



***Reacciones y efectos de
radicales libres y oxidantes biológicos
a nivel molecular***

Formación controlada por distancia de peroxinitrito y
modulación alostérica redox en la albúmina humana

Tesis de Doctorado en Biología

PEDECIBA-ANII

Horacio Botti Alsina

Orientador: Dr. Rafael Radi

Coorientador: Dr. Homero Rubbo

Reacciones y efectos de radicales libres y oxidantes biológicos a nivel molecular.

Formación controlada por distancia de peroxinitrito y
modulación alostérica redox en la albúmina humana.

por

Horacio Botti Alsina

Dr. en Medicina, Facultad de Medicina, 2001

Mag. en Ciencias, Facultad de Ciencias-PEDECIBA, 2003

Orientador: Rafael Radi Ísola

Coorientador: Homero Rubbo Amonini

Tesis requerida como parte del
Doctorado en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias, Universidad de la República;
Programa para el Desarrollo de las ciencias Básicas (PEDECIBA);
Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII);

Instituto Pasteur de Montevideo

Tribunal, Orientadores y Comisión de Seguimiento

Dr. Luis Acerenza

Prof. de Biología de Sistemas, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Presidente del Tribunal

Dr. Gustavo Salinas

Prof. Agregado de la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene, Facultad de Química, UdelaR.

Miembro del Tribunal

Dr. Balaraman Kalyanaraman

Prof. Director del Departamento de Biofísica del Colegio Médico de Wisconsin, USA.

Miembro del Tribunal

Dr. Rafael Radi

Prof. Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Orientador

Dr. Homero Rubbo

Prof. Agregado del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Coorientador

Dra. Ana Denicola

Prof. Directora del Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias.

Integrante de la Comisión de Seguimiento

Dr. Otto Pitsch

Prof. Agregado del Departamento de Inmunología Básica de la Facultad de Medicina, UdelaR

Integrante de la Comisión de Seguimiento

Agradecimientos

Agradecimientos a Instituciones y Programas

PEDECIBA

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y CEINBIO

Universidad de la República

Institut Pasteur de Montevideo

Fundación Manuel Pérez

ANII

Agradecimientos personales

A los Drs. Rafael Radi and Homero Rubbo del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Al Dr. Alejandro Buschiazzi, responsable de la Unidad de Cristalografía de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo.

A todos mis colegas y amigos del LOBBM, del Institut Pasteur de los Laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica de la Facultad de Ciencias, del Depto. de Fisiopatología de la Facultad de Medicina y del extranjero, especialmente a Matías Möller, Lucía Bonilla, Carlos Batthyány, Bruno Manta, Felipe Trajtenberg, Beatriz Álvarez, Lucía Turell, Carlos Cerveñansky, Alejandro Ricchiardi y Javier González.

A los Dres. Wilhem Koppenol, Robert Sweet, Gleb Oshanin, Claudio Fernández y Alejandro Vila.

Dedicación

Dedicado a mi familia pero especialmente a mis amados hijos, Francisco y Rodrigo



Francisco¹



Rodrigo²

¹ Nacido en 2002, es en este momento un gran pescador, escritor, experto en dispositivos electrónicos, jugador de football, estudiante, matemático, y muchas cosas más.

² Nacido en 2005, es hoy un gran atleta, apasionado del cine, un esforzado jugador de basketball y football, también un gran matemático y muchas cosas más.

Índice de Contenidos

1. Introducción	pág. 7
2. Objetivos	pág. 37
3. Control difusional en la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ para dar ONOO^-	pág. 39
4. Modulación redox alostérica del transporte de ligandos del Sitio de Sudlow I	pág. 76
5. Conclusiones, perspectivas y comentarios finales	pág. 191
6. Anexo 1- Procedimientos cristalográficos	pag. 194
7. Referencias bibliográficas	pág. 211

1. Introducción

1.1. Especies reactivas del Oxígeno y Nitrógeno

1.1.1 Generalidades. Muchas de las reacciones enzimáticas de oxidación-reducción intermoleculares biológicas son proclives a la formación colateral de especies intermedias parcialmente reducidas,³ particularmente de radicales⁽³⁾, incluyendo reacciones que tienen lugar en la cadena de transporte de electrones y protones mitocondrial,⁴⁻⁵ pero no solo (ej. Xantina Oxidasa y flavoproteínas).⁶⁻¹⁰ El O₂ es un diradical poco reactivo con especies diamagnéticas. Su producto de reducción parcial por un electrón, el anión superóxido (O₂^{•-}, Fig. 1.1.1.1), es uno de los principales precursores de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Podemos considerar entonces que la producción de oxidantes altamente reactivos depende del poder reductor que deben manejar los organismos vivos para acceder a la síntesis de sus propios componentes y realizar otros tipos de trabajo biológico. Además, la interacción de radiaciones electromagnéticas con los electrones de las biomoléculas puede producir ionizaciones con emisión de fotoelectrones y formación de radicales o simplemente especies electrónicamente excitadas. Algunas de estas moléculas excitadas u otras generadas por transferencia de energía a partir de ellas suelen poseer una alta reactividad, particularmente el oxígeno singlete (¹O₂).¹¹⁻¹² Una tercera fuente de oxidantes de importancia biológica resulta del ingreso y/o metabolismo de algunos xenobióticos (por ej. etanol) y sustancias no biológicas polucionantes ingeridos,¹³ inhalados,¹⁴ o ingresados al organismo de cualquier forma. Por último, hay enzimas especializadas en la producción de especies reactivas del oxígeno¹⁵ y nitrógeno.¹⁶⁻¹⁷

³ Radical (antes radical libre), es un átomo, molécula o ión que posee uno o más electrones desapareados. IUPAC

El estrés oxidativo, ha sido definido como “un desbalance entre antioxidantes y oxidantes a favor de los primeros, causante de la disrupción de la señalización y el control redox y/o daño molecular”. Como ya mencionamos, los organismos aeróbicos están adaptados⁴ a una vida con producción, exposición y daño molecular continuos debidos a especies reactivas derivadas de su metabolismo y el entorno. Podemos considerar que los organismos adaptados: 1) poseen un estricto control de: A) los pooles activos y de almacenamiento de metales de transición (fundamentalmente Fe(II/III) y Cu(II);¹⁸⁻¹⁹ y B) la producción propia indeseada de $O_2^{\bullet-}$ y $\cdot NO$;²⁰ 2) obtienen beneficios de una producción controlada (tipo, cantidad, tiempo y lugar) de $O_2^{\bullet-}$ y $\cdot NO$;²¹⁻²³ 3) son capaces de defenderse de la agresión interna o externa por especies reactivas derivadas del $\cdot NO$ y $O_2^{\bullet-}$ mediante sistemas de compartimentalización y sistemas antioxidantes, manteniendo estados estacionarios adecuados de especies reactivas,²⁴⁻²⁵ 4) detectan el daño o los agentes responsables del daño gatillando respuestas génicas y postranscripcionales adecuadas,²⁶ 5) reparan, eliminan y reponen materiales dañados con suficiente eficiencia para evitar la disfunción y la acumulación de desechos,²⁷⁻²⁸ 6) detectan el daño letal o potencialmente letal y son capaces de responder adecuadamente,²⁹ incluso con muerte apoptótica.³⁰ Parece también sensato decir que estrés oxidativo es cualquier situación desadaptativa, en contraposición con los puntos 1-6 arriba señalados.

1.1.2. Oxidantes Biológicos Radicalares. Podemos clasificar a los oxidantes por grupo químico en dos categorías principales, oxidantes radicalares y no radicalares. Los primeros ejecutan oxidaciones por $1e^-$ (aunque participan de oxidaciones secuenciales). Según el átomo que posea la mayor densidad de spin, los radicales pueden clasificarse en centrados en el

⁴ El término adaptación lo usamos en un sentido amplio, no como se usa en forma restrictiva para denotar precondicionamiento, en todo caso el precondicionamiento es uno de los mecanismos de adaptación más común.

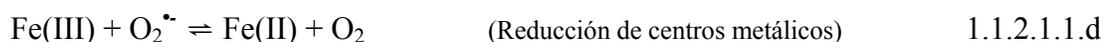
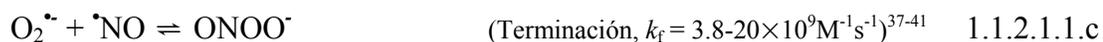
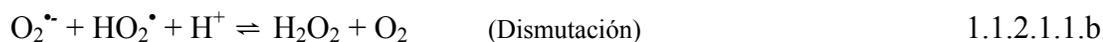
oxígeno, nitrógeno, carbono, azufre, etc., y en radicales deslocalizados. Las categorías más importantes de radicales oxidantes son las de los radicales centrados en el oxígeno y en el nitrógeno. Los oxidantes no radicalares que consideraremos son aquellos más reactivos o electrófilos. A continuación desarrollamos esta temática tomando algunos ejemplos de relevancia temática general y específica de esta Tesis.

1.1.2.1. Radicales centrados en el oxígeno. Los radicales participan típicamente en reacciones de oxidorreducción por $1e^-$, las que pueden ser únicas o consistir en una secuencia de pasos, dando lugar a oxidaciones por 2 o más electrones.³¹ Los radicales deslocalizados resonantes son típicamente más estables y pueden formar parte de sistemas antioxidantes,³² dependiendo principalmente de la facilidad con que reaccionan con reductores disponibles,³³ con O_2 (autooxidación radicalar) o sufren dismutación o terminación (dimerización).³⁴ A continuación trataremos brevemente sobre dos ejemplos de miembros de las mencionadas categorías principales.

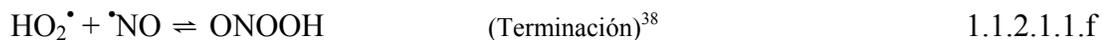
1.1.2.1.1. Radical anión superóxido. El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, distancia de enlace 1.33 Å) es un radical reductor a pH neutro ($O_2/O_2^{\bullet-}$, $E^{\circ'} = -330$ mV),³⁵ sin embargo a $pH \leq pK_a = 4.8$ se forma el radical hidroperoxilo o perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) cuyo potencial de reducción, comparable al de otros radicales peroxilo, es francamente oxidante ($HO_2^{\bullet} + H^+/H_2O_2$, $E^{\circ} = 1060$ mV).³⁵⁻³⁶



Estos valores de pH pueden ser alcanzados en ciertos compartimientos, por lo que en ciertas condiciones debería considerársele un probable agente de oxidaciones por $1e^-$.³⁶ Las reacciones características del $O_2^{\bullet-}$ son aquellas con especies paramagnéticas, otros radicales libres y ciertos estados redox de metales:



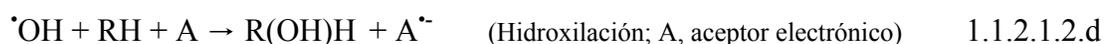
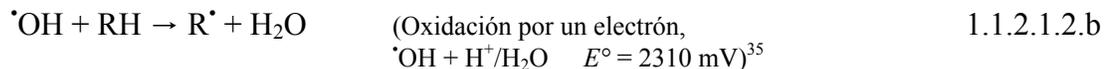
Las reacciones características de los radicales HO_2^{\bullet} son la dismutación (ver arriba), las oxidaciones por $1e^-$ y las reacciones de terminación:



Formación de $O_2^{\bullet-}$. In vitro el radical $O_2^{\bullet-}$ se forma por reducción por $1e^-$ del O_2 ,⁴² por reducción por $1e^-$ del oxígeno singlete $^1O_2^*$, por oxidación por $1e^-$ del H_2O_2 o por homólisis del $ONOO^{\bullet-}$. In vivo, la ruta principal de formación es la reducción monoelectrónica del dioxígeno, la que puede ocurrir como resultado indeseado de procesos de transferencia electrónica o como resultado de la formación controlada con fines inmunes, de señalización celular o biosintéticos.^{4,43}

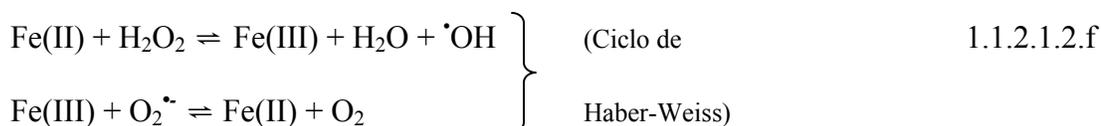
Relevancia Biomédica. El $O_2^{\cdot-}$ tiene un rol clave en la defensa inmune innata, trastornos asociados con un déficit en su producción por las NADPH oxidasas de células inflamatorias (neutrófilos principalmente) da lugar a la Enfermedad Granulomatosa Crónica, caracterizada por una susceptibilidad aumentada a las enfermedades infecciosas bacterianas.⁴⁴ Participa de la señalización en el eje hormonal Renina-Angiotensina-Aldosterona de control de la presión arterial, el tono y la remodelación cardiovascular.^{21,45} La producción de $O_2^{\cdot-}$ puede modular los flujos de formación de $ONOO^-$ y de inactivación de $\cdot NO$, pudiendo ser responsable de la manifestación vascular denominada disfunción endotelial.⁴⁶

1.1.2.1.2. Radical Hidroxilo. El radical hidroxilo ($\cdot OH$) es extremadamente reactivo. Reacciona con constantes de velocidad de reacción controladas por difusión con la mayoría de las biomoléculas ($k \geq 1 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$), por lo que su vida media en sistemas biológicos ($< 1 \times 10^{-9}$ s) le permite difundir tan solo 3 o 4 diámetros moleculares a partir del punto de formación.⁴⁷ Como consecuencia de su alta reactividad e inespecificidad, una vez que el $\cdot OH$ se ha formado en el lugar correcto, la oxidación de la molécula blanco es prácticamente inevitable, a menos que otra molécula interfiera en su camino. Esto se puede lograr en forma significativa cuando el antioxidante pasa a tener fracciones molares relativamente altas (> 0.005 %, concentraciones > 100 mM)⁴⁸ o cuando éste se une a la molécula blanco. Esta propiedad del $\cdot OH$ lo hace útil para estudios de marcado de superficies expuestas al solvente en macromoléculas.⁴⁹ Es por ello que las estrategias de combate eficientes contra las oxidaciones por $\cdot OH$ a bajas concentraciones del antioxidante incluyen principalmente la prevención de su formación, la reparación del daño y la prevención del daño secundario. Las reacciones en que participa son las siguientes:



La adici3n es la reacci3n primaria del radical hidroxilo, la oxidaci3n por 1 e⁻ y la hidroxilaci3n de sustratos suceden como paso secundario a esta. La hidroxilaci3n y la oxidaci3n de sustratos no oxidables por otros radicales son huellas relativamente selectivas de la formaci3n y reacci3n de $\cdot\text{OH}$.⁵⁰⁻⁵¹

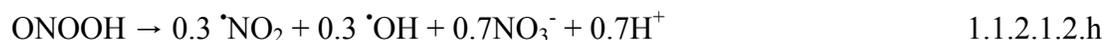
Rutas de formaci3n de $\cdot\text{OH}$ dependientes de metales. Los mecanismos de formaci3n de radical hidroxilo se pueden clasificar en rutas dependientes e independientes de metales. Las rutas dependientes de metales se ejemplifican con la reacci3n de Fenton que puede ocurrir en forma catal3tica dando lugar al llamado ciclo de Haber-Weiss:





En estas reacciones se puede apreciar el rol reductor del $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el rol de los metales de transición como catalizadores de la reacción de Haber-Weiss. En ausencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (o en muy baja concentración de este por acción de la SOD) y Fe(III), otros reductores y metales pueden tomar sus lugares.⁵²⁻⁵³

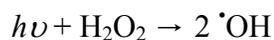
Rutas de formación de $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ independientes de metales. Las rutas que conducen a la formación de $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ sin la participación de metales de transición como catalizadores son de tres tipos: químicas⁵⁴, radiolíticas⁵⁵ y fotolíticas^{40-41,56-57}. Pese a muchos años de investigación, la posible formación de $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ por homólisis del ácido peroxinitroso permanece controversial.⁵⁸ La formación de $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ en sistemas biológicos podría ocurrir por la homólisis del ácido peroxinitroso:^{54,59-62}



La ruta radiolítica implica la deposición de energía y la formación de moléculas de agua excitadas, que sufren radiólisis:⁵⁵



La ruta fotolítica mejor descrita es la fotólisis directa del H₂O₂:^{40-41,57}



1.1.2.1.2.k

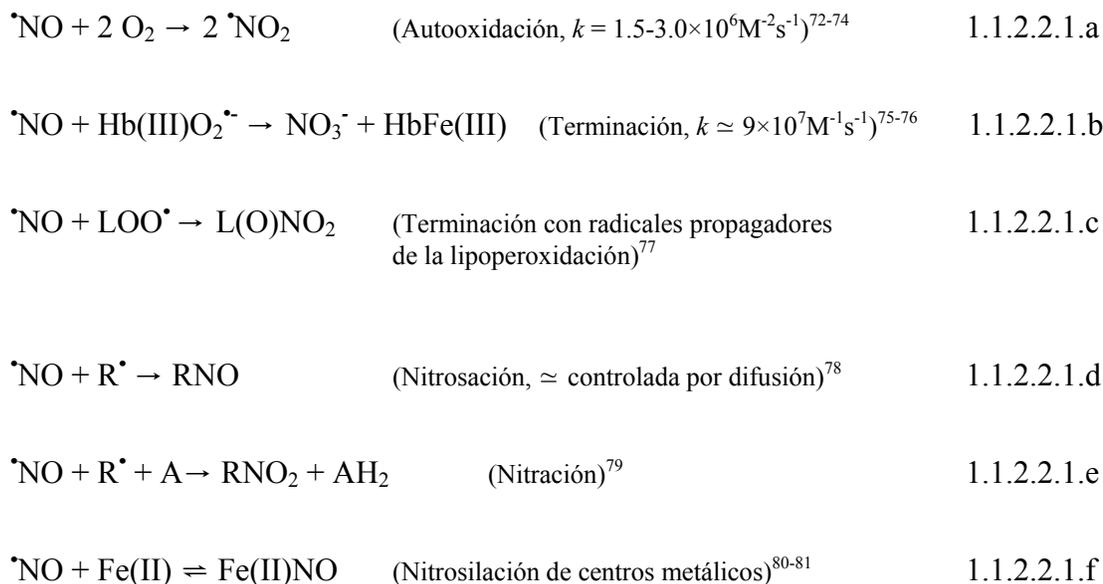
Además de su relevancia en experimentación en radicales libres, esta reacción es de importancia en la fotoquímica troposférica.⁶³

Relevancia Biomédica. Es difícil establecer la relevancia biomédica del $\cdot\text{OH}$; es esperable que tenga un rol preponderante en condiciones de producción aumentada de ONOO^{-54,62} y de disponibilidad alterada de metales de transición.^{18,64-65} La formación de este radical tan dañino puede generar daño estocástico (al azar, imposible de predecir exactamente en tiempo y espacio) irreparable. El tipo de daño estocástico es previsiblemente más probable en el caso de la generación de $\cdot\text{OH}$ dependiente de ONOO⁻. Estudios teóricos y experimentales en este sentido serían necesarios. Este daño es poco importante en sistemas sin puntos únicos de fallo.⁶⁶ En este sentido, el ADN nuclear aparece como un punto de mayor susceptibilidad, especialmente si coexisten alteraciones en los mecanismos de reparación del daño.⁶⁷⁻⁶⁸

1.1.2.2. Radicales centrados en el nitrógeno.

1.1.2.2.1. El óxido nítrico. El $\cdot\text{NO}$ es el precursor del peroxinitrito y de la mayoría de los radicales centrados en el nitrógeno. El $\cdot\text{NO}$ es un gas en condiciones estándar con una distancia de enlace de 115.1 pm, cuya solubilidad en agua es $\approx 1.95 \text{ mM atm}^{-1}$.⁶⁹⁻⁷⁰ Su vida media en sistemas biológicos se ha estimado en 1-10s, lo que contrasta diametralmente con la corta vida media del radical $\cdot\text{OH}$. Siendo un radical reductor ($\cdot\text{NO}/\text{}^3\text{NO}^{\cdot-}$, $E^{\circ} = -890 \text{ mV}$),⁷¹ el óxido nítrico

es muy poco reactivo con la mayoría de las biomoléculas, sin embargo reacciona en forma rápida con otras especies paramagnéticas:



Formación de $\cdot\text{NO}$. El $\cdot\text{NO}$ se forma a nivel biológico, principal o exclusivamente por la oxidación aeróbica de la *L*-arginina catalizada por las óxido nítrico sintasas (NOS, Fig.1.1.2.1.1).⁸² Recientemente se ha propuesto que el nitrito (NO_2^-) puede ser un precursor biológico y farmacológico del $\cdot\text{NO}$.⁸³⁻⁸⁵ El $\cdot\text{NO}$ es un contaminante ambiental, e ingresa a nuestro organismo por vía respiratoria.⁸⁶

Relevancia Biomédica. Su estabilidad y pequeño tamaño, así como su bajo reparto y alta permeabilidad a través de membranas biológicas permite su rol como modulador local en la señalización intercelular.⁸⁷⁻⁸⁸ El $\cdot\text{NO}$ es el principal agente vasorrelajante derivado del endotelio vascular (EDRF, endothelium-derived relaxing factor),⁸⁹ es un neurotransmisor ubicuo,⁹⁰⁻⁹¹ regula el metabolismo mitocondrial⁹²⁻⁹⁴ y tiene un importante rol antioxidante en la prevención

de la formación de hidroperóxidos lipídicos y proteicos y productos que de ellos derivan.⁸⁸ La producción aumentada desadaptada de $\cdot\text{NO}$ por la iNOS (inducible/inflamatoria) es el sello radicalar del shock séptico, que causa hipoxia por falla en la utilización de O_2 e hipotensión arterial.⁹⁵⁻⁹⁷ Una biodisponibilidad disminuida y bioactividad alterada se asocia con la disfunción endotelial, una condición en la que predominan efectos antagónicos de factores de vasoconstricción e inflamación derivados del endotelio, entre ellos el $\text{O}_2\cdot^-$.⁹⁸ Entre los fármacos utilizados en medicina clínica vinculados directamente a las funciones del óxido nítrico resaltamos: óxido nítrico inhalado en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar persistente del recién nacido,⁹⁹ nitrovasodilatadores en la isquemia cardíaca¹⁰⁰ y en varias condiciones cardiovasculares agudas,¹⁰¹ y el uso de antihipertensivos que reducen la producción de $\text{O}_2\cdot^-$ y otros antagonistas del $\cdot\text{NO}$.⁹⁸

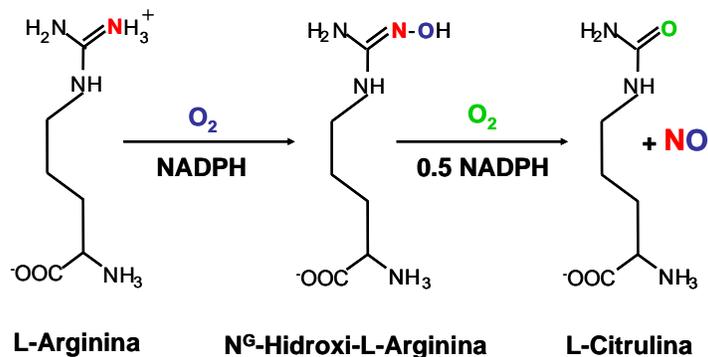
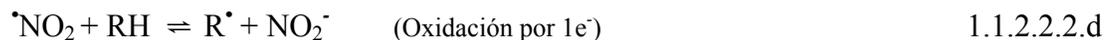
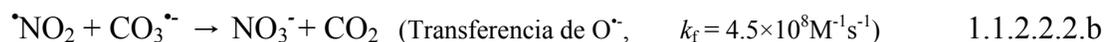
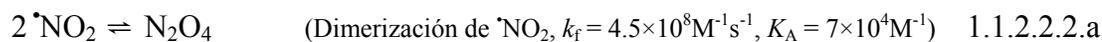


Figura 1.1.2.1.1. Biosíntesis de óxido nítrico. Las óxido nítrico sintasas de eucariotas y procariotas son oxidoreductasas (oxigenasas) relativamente complejas con varios cofactores y un grupo prostético hemo tiolato. En humanos se clasifican en endotelial, neuronal e inflamatoria. La producción de óxido nítrico está fuertemente controlada por diversos mecanismos: señales de Ca^{2+} , inducción enzimática, etc.

1.1.2.2.2. El dióxido de nitrógeno. El dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) es un gas oxidante ($\cdot\text{NO}_2/\text{NO}_2^-$, $E^\circ = 1040 \text{ mV}$), cuyo momento dipolar lo hace más soluble en agua ($10\text{-}14 \text{ mM atm}^{-1}$) que el $\cdot\text{NO}$.⁸⁸ Aunque la densidad de spin electrónico predomina sobre el átomo de N, es un

radical relativamente deslocalizado. Dada su alta reactividad con biomoléculas, tiene una corta vida media ($\leq 1 \mu\text{s}$). Algunas de las reacciones más representativas de su repertorio son las siguientes:¹⁰²⁻¹⁰³



Formación de $\cdot\text{NO}_2$. El $\cdot\text{NO}_2$ se forma a partir del $\cdot\text{NO}$ por distintos mecanismos: autooxidación del $\cdot\text{NO}$; homólisis de ONOOH y ONOOCO₂ (nitrosoperoxo carboxilato), oxidación por $1e^-$ de NO_2^- . La oxidación de NO_2^- por hemoperoxidasas, principalmente la mieloperoxidasa neutrofílica, constituye la principal ruta de formación de $\cdot\text{NO}_2$ y nitración alternativa a la formación de ONOO $^-$.^{88,104}

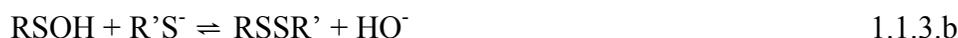
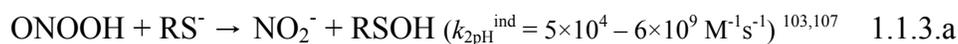
1.1.3. Oxidantes electrofílicos. En esta categoría incluimos a oxidantes no radicalares, que típicamente participan de oxidaciones por $2e^-$, incluyendo principalmente:

- a. peróxidos (H_2O_2 , ROOH) y peroxiácidos (ONOOH)

- b. ácidos de halogenuros: HOCl, HOBr y HOI (ácido hipocloroso, hipobromoso, e hipoiodoso).

Otros electrófilos importantes que participan de reacciones de alquilación son los aldehídos, ciertos nitrolípidos y prostanoïdes.¹⁰⁵ Estos oxidantes reaccionan preferencialmente con nucleófilos, como el grupo tiolato, amino, indol, histidinilo, fenolato, etc.¹⁰⁶

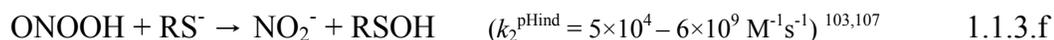
Todos los productos de reacción de estos oxidantes electrófilos con nucleófilos son por principio a su vez electrófilos menos potentes pero, eventualmente capaces de participar en reacciones redox con nucleófilos fuertes,¹⁰⁶ así:



En las ecuaciones de arriba mostramos la reducción por $2e^-$ de ONOOH por un tiolato (nucleófilo fuerte) con formación de nitrito y de ácido sulfénico, y la reacción posterior de éste con otro tiolato para dar un disulfuro y anión hidroxilo. Otro ejemplo sería:



De manera similar, alguno de los productos de la reacción de un electrófilo fuerte con un nucleófilo fuerte, podrá actuar como nucleófilo frente al electrófilo fuerte.¹⁰⁶



Ya que el H^+ es un electrófilo, como todos los ácidos de Lewis,¹⁰⁸



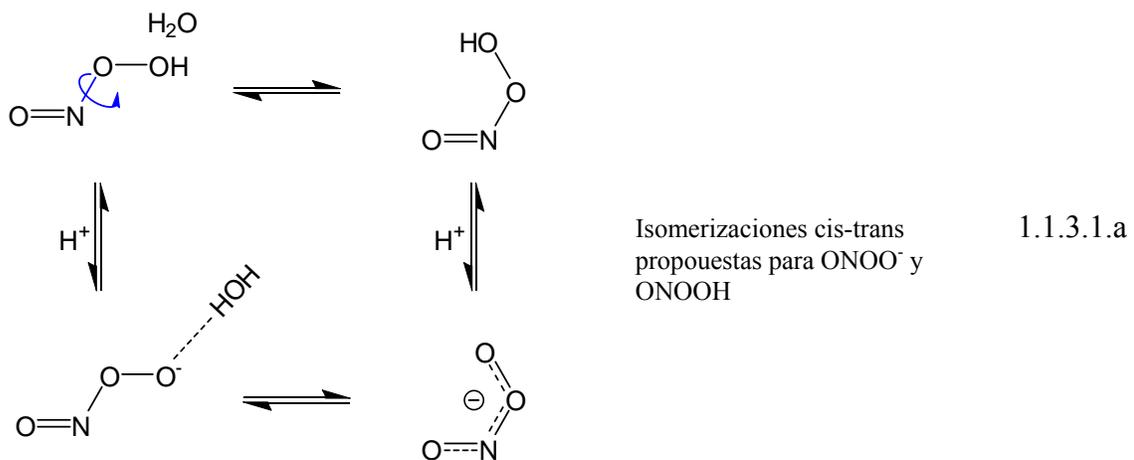
Existen relaciones lineales de energía libre entre las constantes cinéticas de las reacciones analizadas y los $\text{p}K_a$ de los grupos implicados.^{103,105-106} Si comparamos una serie cualquiera de nucleófilos del mismo tipo, por ejemplo, tiolatos, los nucleófilos con ácidos conjugados de $\text{p}K_a$ más alto son aquellos que deben ser más nucleofílicos, ya que la afinidad de los protones por ellos es mayor.

1.1.3.1. El ácido peroxinitroso. El ONOOH es un electrófilo potente y fuertemente oxidante.

Los potenciales de reducción estándar por uno y dos electrones reportados son $E^\circ(\text{ONOOH} + \text{H}^+ + e^- / \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}) = +1600 \text{ mV}^{109}$ y $E^\circ(\text{ONOOH} + \text{H}^+ + 2e^- / \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}) = +1700 \text{ mV}^{110}$

El $\text{p}K_a$ aparente del ONOOH en medios acuosos varía con la fuerza iónica, la temperatura y los solutos presentes entre 6.5 y 6.8.^{107,111-112} No se encuentra en la literatura información precisa

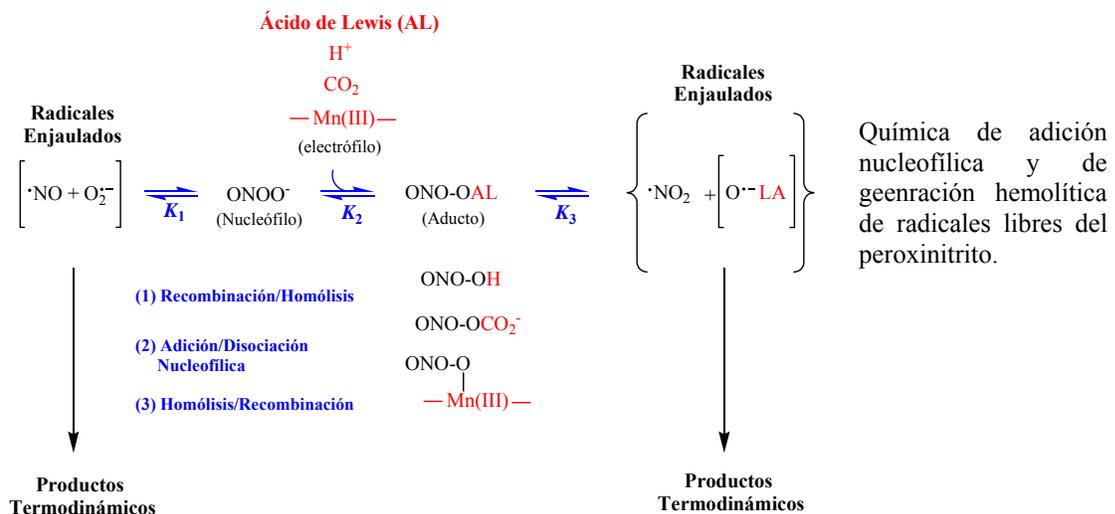
experimental sobre la estructura del ONOOH, pero también estaría sujeto a la misma isomería rotacional propuesta para su base conjugada: el anión ONOO⁻ es una molécula tetra atómica lineal (O[1]=N-O-O⁻), y gracias a que el enlace entre el N y el O peroxílico próximo (O[3]) tiene carácter doble parcial (ver esquema abajo), existe una barrera para la rotación en torno a este enlace, por lo que el ONOO⁻ (y eventualmente el ONOOH) puede hallarse en conformaciones *cis* y *trans*.¹¹³⁻¹¹⁹ Evidencias indirectas sugirieron que el isómero *trans*-ONOOH tendría un pK_a mayor que el *cis*-ONOOH (>8.0 vs 6.8)^{54,115}. De acuerdo con lo que venimos planteando, de ser así, el electrófilo más potente sería el *cis*-ONOOH. Sin embargo, pesando evidencias y suponiendo que el equilibrio de rotamerización es más rápido que el de protonación, Pryor y Squadrito recomendaron considerar 6.8 como el pK_a promedio de ambas especies.⁶⁰



El ONOOH presenta dos comportamientos cinéticos principales y existen varios modelos de reactividad propuestos. El peroxinitrito se descompone a pH ácido ($\approx 5.5-6.0$) con una constante de velocidad de reacción de primer orden $k_d = 1.25 \text{ s}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y $k_d = 4.50 \text{ s}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.^{40,60,112} Los parámetros activacionales de Arrhenius reportados para esta reacción son: $A = 1.8 - 10 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$ y $E_a = 87 - 92 \text{ kJmol}^{-1}$ ¹²⁰, cercana a la E_a reportada para la isomerización *cis* \rightleftharpoons

trans del ONOO⁻.^{116,119} La constante observada de desaparición de ONOO⁻ puede ser estimada con precisión para valores de pH > 5.5 de acuerdo con el pK_a arriba mencionado. A pH alcalino (pH>12) el peroxinitrito es relativamente estable. Los rendimientos de los productos cinéticos y termodinámicos formados durante el decaimiento de peroxinitrito, principalmente NO₃⁻, [•]NO₂, [•]OH, [•]NO, O₂^{•-}, O₂NOOH, O₂, CO₃^{•-} y [•]NO₂⁻, varían con la concentración de CO₂, el pH y en menor medida con la concentración de peroxinitrito.¹²¹⁻¹²³ A pH> 12 se ha podido estudiar la cinética de la homólisis de ONOO⁻ para dar [•]NO y O₂^{•-}.¹²⁴

Algunos reductores no aceleran la descomposición de peroxinitrito y se oxidan con velocidades menores a la de desaparición de este oxidante en ausencia de blancos ($k < k_d$).^{31,125} Este tipo de reacciones son oxidoreducciones monoelectrónicas y han sido denominadas indirectas.¹²⁶ Otras moléculas, nucleófilos y electrófilos fuertes reaccionan directamente con ONOOH y con ONOO⁻ (con constantes de velocidad de segundo orden apreciables, de hecho las constantes de reacción a pH 7.4 con algunos tiolatos como nucleófilo y con algunas porfirinas de Mn(III) como ácido de Lewis (electrófilo), respectivamente, son incluso mayores a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$,¹²⁷⁻¹²⁸ por lo que aceleran la desaparición de peroxinitrito^{125,129} (ver esquema abajo).



La reacción de ONOO^- con ácidos de Lewis puede resultar en oxidación de sustratos por uno y dos electrones de acuerdo con la reactividad y estabilidad de los aductos formados. Además de estos patrones de reacción predominantes, en los que ocurren reacciones de oxido reducción, ciertas biomoléculas catalizan la isomerización del peroxinitrito a NO_3^- ^{31,130-132}.

Para algunos investigadores los detalles de la estructura y la dinámica de isomerizaciones del sistema $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ antes señalados son de suma importancia para entender su reactividad en sistemas biológicos. W. Koppenol propuso que las determinaciones cinéticas y termodinámicas disponibles en el momento (1992) apoyaban la formación de una especie con reactividad similar a la del $\cdot\text{OH}$ a partir del *trans*- ONOOH denominada *trans*- ONOOH^* y no la homólisis del ONOOH para dar radical $\cdot\text{OH}$ *per se* ^{58,109,112,115}. Por otro lado, J. Beckman propuso que el sitio activo de la Cu,Zn-SOD cataliza selectivamente la heterólisis del *trans*- ONOO^- y que la velocidad de reacción de ONOO^- con la Cu,Zn-SOD podría estar limitada por el paso de isomerización *cis* \rightarrow *trans* ¹¹⁴. Estas dos propuestas tienen en común el hecho de considerar la rotamerización como un paso potencialmente limitante en la cinética de las reacciones del peroxinitrito. En contraposición, Pryor propuso un modelo basado en la homólisis de ONOOH con formación de radicales en una caja de solvente, un modelo análogo al ya bien establecido para la termólisis de azocompuestos que no considera como limitante cinético los posibles cambios conformacionales del peroxinitrito ⁶⁰. Este último modelo (en acuerdo con el esquema de arriba), aunque ha sufrido algunos reveses ¹³³⁻¹³⁴, goza actualmente de mayor aceptación por nuestro ^{129,135} y otros grupos de investigación ^{120,136-137}. Sin embargo, como dijimos los mecanismos son cinéticamente indistinguibles. Son necesarias más evidencias directas para las siguientes afirmaciones: 1) que la isomerización *cis* \rightarrow *trans* es necesaria para la descomposición de ONOO^- a pH cercano a la neutralidad en ausencia y presencia de Cu,Zn-

SOD; 2) de que se forme radical $\cdot\text{OH}$ y/o $\cdot\text{NO}_2$ por homólisis de ONOOH ; 3) de la existencia de una forma vibracionalmente excitada del ONOOH (trans-ONOOH*) que ejecute reacciones en forma similar a como lo hace el $\cdot\text{OH}$. Con respecto a este último punto, quisiéramos recordar que el trans-ONOOH* surge por un argumento de necesidad termodinámica, y que si dicho argumento termodinámico pudiera rebatirse, es posible que ya no exista ni un mérito en sostener dicha propuesta.

Relevancia Biomédica. El peroxinitrito participaría en distintas etapas de una amplia variedad de procesos en fisiología y patología humanas ¹³⁸. Entre los procesos biológicos de relevancia en salud humana en los que se cree que la participación del peroxinitrito es decisiva destacamos: necrosis y apoptosis ¹³⁸⁻¹⁴⁰, inflamación ¹⁴¹, respuesta inmune celular en la infección ^{25,142}, disfunción mitocondrial ¹⁴³, disfunción vascular ¹⁴⁴⁻¹⁴⁵, aterogénesis ¹⁴⁶⁻¹⁴⁷, lesión tisular por isquemia y reperfusión ¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ y neurodegeneración ¹⁵⁰⁻¹⁵². Fue tempranamente propuesto que las acciones biológicas del peroxinitrio dependen de su capacidad para causar cambios oxidativos en biomoléculas ⁵⁴. La nitración de tirosilos en proteínas ¹⁵³⁻¹⁵⁵, la oxidación y fragmentación del ADN ¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ y la oxidación y nitración de lípidos ^{59,77,158} y de una amplia variedad de biomoléculas, incluyendo tioles ¹⁵⁹, son ejemplos de procesos oxidativos donde radicales libres participan como reactivos y/o productos. El ejemplo típico de las oxidaciones concertadas por $2e^-$ a cargo del ONOOH (y también a cargo de peróxidos) es la oxidación de grupos tiol proteicos a grupos sulfénico, y la oxidación secuencial de éstos a grupos sulfinato y sulfonato ^{107,160-162}.

Una vez dicho lo anterior, cabe preguntarse cómo es que las modificaciones oxidativas se traducen o podrían traducirse en efectos biológicos. Los mecanismos de acción biológica del peroxinitrito son variados, destacamos las siguientes categorías y ejemplos: 1) inactivación de

enzimas antioxidantes por modificación irreversible de grupos en sitios activos: La inactivación por nitración del tirosilo 34 de la Mn-SOD mitocondrial ¹⁶³⁻¹⁶⁴. La simple inactivación enzimática difícilmente resulte en efectos biológicos marcados dado que el grado de inhibición requerido suele ser alto y se pueden requerir más de un golpe para knockearlas. Así, las enzimas con concentraciones típicas que se inactivan por peroxinitrito por rutas indirectas o que lo hacen con una constante de velocidad de reacción comparable con la constante de reacción esperada de acuerdo a su composición aminoacídica ¹⁶⁵ están protegidas de sufrir tales grados de inhibición. Por el contrario, aquellas enzimas poco concentradas que reaccionan con altas constantes de velocidad podrían verse notoria y predeciblemente inhibidas en condiciones de producción aumentada de peroxinitrito. El caso de la inactivación de SODs es paradigmático dado que estas enzimas normalmente regulan el estado estacionario de $O_2^{\bullet-}$ descomponiéndolo mediante reacciones controladas por difusión. Dado que frecuentemente el $O_2^{\bullet-}$ es el reactivo limitante en la formación de peroxinitrito, la inactivación de la Mn-SOD mitocondrial aumenta los niveles de estado estacionario de $O_2^{\bullet-}$ y con ello se constituye un mecanismo de retroalimentación positiva, facilitando la formación de más peroxinitrito. 2) El peroxinitrito puede inhibir y desacoplar el transporte electrónico: A nivel mitocondrial, puede causar una producción aumentada de $O_2^{\bullet-}$ estimulada por succinato ¹⁶⁶. También puede ser responsable del desacoplamiento parcial de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por reacción directa con su centro de Zn-S4 ¹⁶⁷⁻¹⁶⁸. Estos eventos resultarían en la formación aumentada de $O_2^{\bullet-}$ y de peroxinitrito a expensas de la formación disminuída y/o el consumo de óxido nítrico. 3) El daño a cargo de radicales libres, principalmente $\cdot OH$, a moléculas esenciales en bajo número de copias por mecanismos estocásticos: El caso del daño al DNA por radicales derivados del peroxinitrito en forma directa o indirecta (ej. a través de los mecanismos 1 y 2). Esto incluye la inducción de: A) lesiones

letales como cortes de doble hebra no reparados ¹⁶⁹; B) lesiones subletales (cortes de hebras simples) reconocidas por la PARP-1, que lleva a la activación normal o exagerada de este enzima ^{157,170}; y C) lesiones toleradas con potencial para causar inestabilidad genómica y procesos oncogénicos ¹⁷¹⁻¹⁷². 4) Regulación redox de la expresión génica y la estabilidad proteica a través de enzimas señalizadores: El caso de la inducción de la fosforilación y activación de p38 MAPK por peroxinitrito dependiente de la formación de disulfuros proteicos como ejemplo ¹⁷³⁻¹⁷⁵ entre otros.

1.2. Mecanismo de formación de ONOO⁻ a partir de [•]NO y O₂^{•-}.

En la actualidad se acepta que la vía principal para la formación de anión peroxinitrito [oxoperoxonitrato (1-), ONOO⁻] en sistemas biológicos es la reacción de terminación radicalar de spin permitido entre los radicales anión superóxido (O₂^{•-}) y óxido nítrico (monóxido de nitrógeno, [•]NO),^{60,135,176} como se indica a continuación (Fig. 1.2.1):



De acuerdo con Pegel y cols.¹⁷⁶ la reacción daría lugar inicialmente a una forma no cíclica compatible con el *cis*-peroxinitrito de otros autores (Figs. 1.4.1 y 1.4.2).¹⁷⁷ Las formas *cis* y *trans* del ONOO⁻ pueden alcanzar un rápido equilibrio en medios acuosos, y en agua pesada, donde se ha visto predominar a la forma *cis*.¹¹⁹

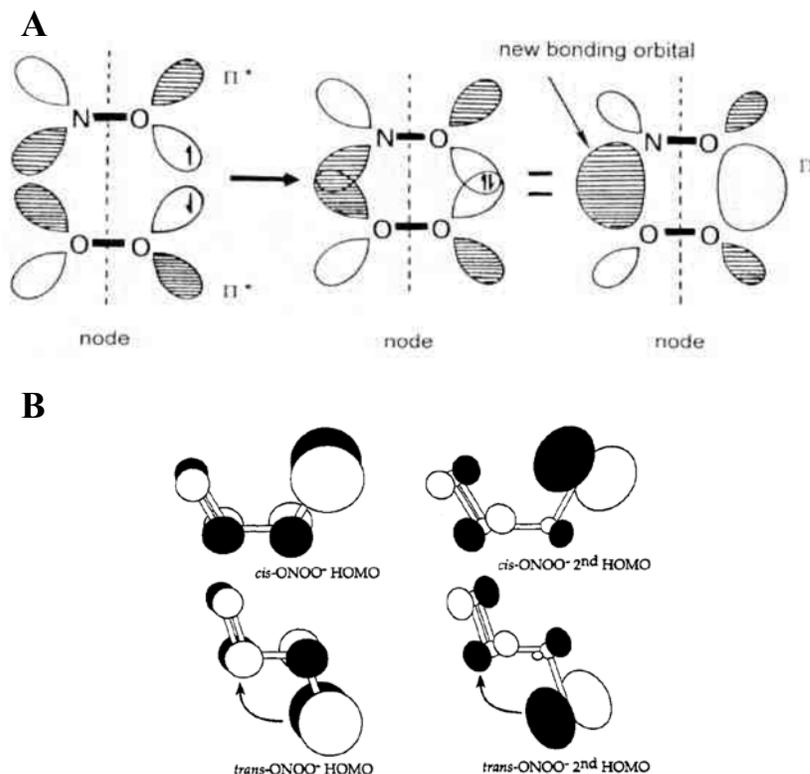


Figura 1.2.1. Teoría de orbitales moleculares aplicada a la formación y estructura de ONOO⁻. Panel A. Esquema de cambios propuestos en los orbitales moleculares durante la reacción de [•]NO con O₂^{•-} para dar ONOO⁻, según Pegel et al. (referencia en el texto). **Panel B.** Modelos de orbitales moleculares ocupados de mayor energía del *cis* y *trans* ONOO⁻, según Beckmann et al.

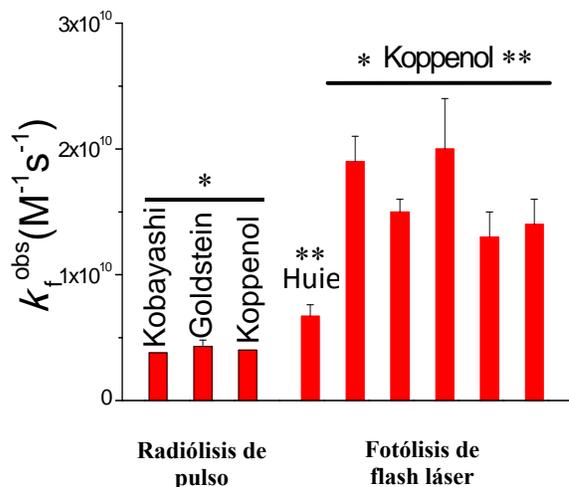


Figura 1.2.2. Análisis de las diferencias en las constantes reportadas de velocidad de reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$. El análisis de la varianza (ANOVA) de una vía de los valores reportados de las constantes cinéticas y sus desviaciones estándar, seguido del test de significancia de Tukey, permitió definir las diferencias significativas señaladas en el gráfico con una probabilidad de cometer un error de tipo $\alpha p \leq 0.05$. Como se muestra, los valores de las constantes obtenidas por radiólisis de pulso se diferencian de los valores provenientes de experimentos de fotólisis de flash láser reportados por Koppenol y colaboradores, los que también se diferencian del valor de constante reportado por Huie y Padmaja, quienes llamativamente también utilizaron fotólisis de flash. En el caso de los reportes de estudios de radiólisis de pulso de Kobayashi y de Koppenol, en los que nos se reportan errores en las determinaciones, se asumieron los mismos errores que para el reporte de Goldstein y cols.

El ONOO^- es un agente oxidante de corta vida media en medios biológicos (ms). Como hemos mencionado, es en general difícil o imposible demostrar directamente *in vivo* la presencia de especies tan reactivas con alta especificidad a la sensibilidad necesaria. Una complejidad agregada es que *in vivo* el enzima SOD cataliza la reacción de dismutación del $\text{O}_2\cdot^-$ con una constante cercana al límite difusional ($k \simeq 2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), compitiendo con el $\cdot\text{NO}$, lo que podría impedir la formación de ONOO^- . El primer reporte cinético apoyó la existencia de una rápida reacción entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, con una constante de velocidad de reacción del orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹⁷⁸ En la actualidad la mayoría de los autores coinciden

en que la reacción esta prácticamente limitada por difusión.¹³⁵ Es por eso que además del hecho ampliamente aceptado de la formación biológica de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, el segundo principal argumento a favor de la formación de peroxinitrito *in vivo* es de naturaleza puramente cinética.

Al momento de iniciar estos estudios existía un fuerte desacuerdo sobre el valor de esta constante de velocidad de reacción. Los valores reportados se pueden entender como tres poblaciones con medias de 4.0 , 6.7 y $16.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cubriendo un rango de 3.8 a $20.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.³⁷⁻⁴¹ En la Fig. 1.2.2

mostramos los resultados del análisis estadístico los datos reportados.⁵ Nauser y Koppenol⁴¹ han argumentando en contra de los valores bajos obtenidos en estudios por radiólisis de pulso^{37-39,41} diciendo que ellos subestiman la constante verdadera porque la formación de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ mediante protocolos de radiólisis de pulso no es lo suficientemente rápida (varios pasos químicos) como para permitir la determinación exacta de la constante de velocidad. Esto deja sin explicar sin embargo, la diferencia existente entre los datos obtenidos por fotólisis de destello (“flash”) láser. Los valores reportados por Huie y Padmaja ($k_f = 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)³⁹ no pudieron ser reproducidos por Nauser y Koppenol.⁴¹ Además, los datos de destello fotólisis obtenidos en el laboratorio de Koppenol⁴⁰⁻⁴¹ muestran diferencias internas (valores entre $1.3 \pm 0.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.0 \pm 0.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), que a nuestro juicio estaban incompletamente explicadas, pudiendo deberse a diferencias en los protocolos usados. Nauser y Koppenol decidieron recomendar un valor de $1.6 \pm 0.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ que es el resultado de una media ponderada por los errores de las determinaciones realizadas por fotólisis destello láser.⁴¹

Aunque la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ podría ser una de las reacciones químicas más rápidas halladas en la naturaleza, siendo de fundamental importancia en biología y patología celular y tisular, sorprendentemente, todos los análisis cinéticos anteriores se realizaron de acuerdo con la cinética química clásica y no se ha intentado entender a esta reacción de acuerdo con la teoría de las reacciones controladas o influidas por la difusión.¹⁷⁹ Brevemente, las reacciones pueden ser clasificadas desde el punto de vista cinético de acuerdo con la naturaleza fisicoquímica del proceso que determina (controla) la velocidad. Así tenemos reacciones controladas por: 1) activación (la formación de un estado de transición de alta energía vibracional el que se encuentra en equilibrio con reactivos y eventualmente con productos, cinética clásica, la mayoría de las reacciones que conocemos), 2) difusión (el transporte de masa a favor de un gradiente de energía potencial electroquímica es la etapa limitante de la velocidad del proceso), 3) conversión de spin (cambio en la multiplicidad del spin electrónico) 4) restricciones espaciales (por ej.

⁵ Es de destacar que existe una gran dispersión en los valores de constantes por fotólisis de flash hallados por Koppenol y colaboradores y esto determina que la asunción de iguales varianzas pueda ser criticable (test de Lavene $p = 0.061$), por lo que estos resultados son probablemente simplemente sugestivos de la existencia de diferencias significativas. Otros análisis, quizás de tipo no paramétrico, podrían ser utilizados.

reacciones controladas por la dinámica de compuertas moleculares), 5) restricciones posicionales y difusión rotacional,¹⁸⁰ etc. El control de la velocidad de reacciones por la difusión es un caso particular del control por el transporte de los reactivos, otras formas de transporte y campos de fuerza pueden intervenir en el control también. El control puede ser compartido, así cuando se dice que ciertas reacciones están parcialmente controladas por difusión¹⁸¹⁻¹⁸³ se está típicamente queriendo decir que difusión y activación establecen conjuntamente (comparten) el control de la velocidad con que la reacción avanza, pero el control puede establecerse compartidamente entre cualquier par (o conjunto), puesto que son factores independientes. La constante química es en estos casos generalmente llamada constante intrínseca.¹⁸⁴⁻¹⁸⁵ Las reacciones bimoleculares influidas por la difusión⁶ (en las que la difusión participa en mayor o menor medida del control) se caracterizan por constantes de velocidad de reacción $k_f \gtrsim 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o más frecuentemente, suelen ser identificadas en comparación con el valor de la constante de Smoluchowski (k_{Smol}): $1 \geq k_f/k_{\text{Smol}} \geq 0.1$.¹⁷⁹ Nótese que no suele considerarse y quizás resulte contraintuitivo pensar que k_f pueda ser mayor que k_{Smol} , pero como veremos, esto es una falacia producto de que frecuentemente se toma el valor de la constante de estado estacionario k_{Smol} como el límite superior para una constante controlada por difusión. Es también característico de reacciones influidas por la difusión que se puedan registrar cursos temporales no exponenciales a tiempos muy cortos luego de iniciada la reacción aún cuando la reacción ocurre en condiciones de inundamiento (gran exceso) con uno de los reactivos ($[A] \gg [B]$).¹⁷⁹

Contrariamente a lo que se encuentra en condiciones fisiológicas, el ONOO⁻ se mantiene estable en ausencia de H⁺, CO₂ y otros ácidos de Lewis.¹⁸⁶ Gracias a este hecho, la constante de velocidad de la reacción inversa (reacción 1.2.1.b) ha sido ya estudiada en forma precisa.¹²⁴ Se han realizado estudios en medios acuosos fuertemente alcalinos en presencia de concentraciones suficientemente altas de atrapadores de [•]NO y O₂^{•-} que han permitido el seguimiento continuo del avance irreversible de la reacción termo-homolítica.^{124,187-189}

⁶ Aquí la consideramos una categoría amplia que incluye a las reacciones parcial y totalmente controladas por difusión.



De esta manera, Sturzbecher y cols. establecieron la dependencia en la temperatura (15 - 55 °C) y presión (5-175 MPa) de la constante de velocidad de reacción 1.2.1.b, la reversa de la formación de ONOO⁻ (k_r).¹²⁴ Se puede suponer un estado de equilibrio entre ONOO⁻, NO y O₂⁻ en soluciones fuertemente alcalinas (pH > 12, ecuaciones 2 y 3):



$$K_A^{\text{eq}} = \frac{[\text{ONOO}^-]_{\text{eq}}}{[\text{NO}]_{\text{eq}} \times [\text{O}_2^-]_{\text{eq}}} \quad (1.2.1.d)$$

De hecho, el valor de la constante de equilibrio para la formación de ONOO⁻ derivada a partir de datos obtenidos en condiciones irreversibles (K_A^{irr}) se ha deducido a partir de los valores reportados de k_f^{irr} y k_r^{irr} ,^{124,187-189} pero naturalmente, dichas constantes sufren de la incertidumbre en los valores de k_f^{irr} :

$$1.9 \times 10^{11} \text{M}^{-1} \leq K_A^{\text{irr}} = \frac{k_f^{\text{irr}}}{k_r^{\text{irr}}} \leq 1.0 \times 10^{12} \text{M}^{-1} \quad (1.2.1.e)$$

Dejando de lado las primeras estimaciones ($-59 \pm 13 \text{ kJ mol}^{-1}$)¹⁰⁹ basadas en una aproximación distinta,¹⁰⁹ los valores de energía libre de Gibbs estándar reportados varió en forma correspondiente: $-68 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$,¹²⁴ $-68.5 \pm 1.4 \text{ kJ mol}^{-1}$,¹⁸⁹ $-69.5 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$.¹⁸⁷

1.3. Biología redox, estructura y propiedades alostéricas de la Albúmina Sérica Humana

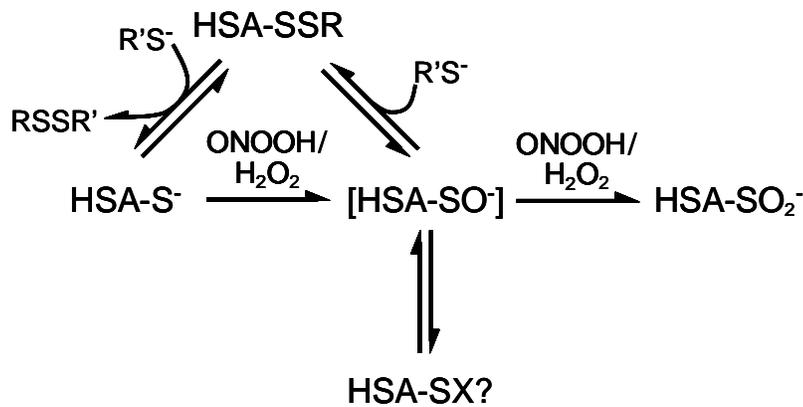
La albúmina sérica es una proteína de cadena única que se secreta con un ritmo elevado de producción desde el hígado al sistema circulatorio de los vertebrados.¹⁹⁰ La albúmina del suero humano (HSA, del inglés Human Serum Albumin) tiene 585 residuos y está organizada en tres dominios homólogos (I-III) conectados por dos largas hélices α . Cada dominio está compuesto de dos subdominios A y B, integrados por 6 y 4 α -hélices, respectivamente. La proteína madura nativa, que deja el hígado no está glicosilada, cuenta con 17 puentes disulfuro que explican su alta estabilidad térmica, y tiene un grupo tiol libre en la posición 34 (Cys34),¹⁹⁰ que explica el carácter irreversible de su desnaturalización térmica¹⁹¹ y en una gran su extensión, sus propiedades antioxidantes.^{160,192-194}

Aunque es la principal proteína del plasma, su distribución es más amplia. El 70 % de la HSA se localiza en el compartimiento extracelular extraplasmático.¹⁹⁰ Su único tiol libre da cuenta de la gran mayoría de los sulfidrilos del plasma

Estudios de bioquímica y proteómica analíticas han mostrado que varias isoformas de HSA están presentes en la sangre periférica en condiciones fisiológicas. Aproximadamente el 75% de las HSA circula como la forma nativa, el 24% como productos de oxidación reversible de tiol (disulfuros mixtos)¹⁹⁵ y una pequeña fracción (1%) como isoformas oxidadas no reducibles con tioles (con el tiol libre Cys34 oxidado a grupos sulfinato o sulfonato).^{194,196} Sin embargo, una gran acumulación de isoformas oxidadas de la HSA se produce in vivo en condiciones asociadas con el estrés oxidativo plasmático grave. No sabemos en realidad si existen mecanismos de reciclado de HSA a partir de estas formas oxidadas por 4 o 6 e⁻. Sin

embargo, dado que los mecanismos de reparación necesarios son extremadamente poco frecuentes, específicos e intracelulares, a falta de evidencias, es muy razonable pensar que estas modificaciones oxidativas son irreversibles. Las mismas modificaciones se pueden encontrar en los preparados de HSA para el uso clínico.¹⁹⁷⁻¹⁹⁸ La oxidación secuencial del grupo tiol de las isoformas antes mencionadas ha sido y continúa siendo estudiada por nosotros, en particular con respecto a su cinética y la intermediación de la isoforma +2 (ácido sulfénico) del residuo Cys34 (ver Esquema HI).¹⁹⁹⁻²⁰¹

Esquema 1.3.1. Rutas de oxidación de la HSA.



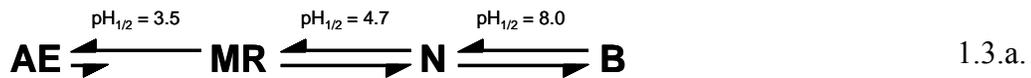
No existen variantes naturales sin la Cys34. Sin embargo, una variante mutacional de la HSA no posee tiol libre: la Cys34 forma un puente disulfuro con una cisteína adicional que sustituye a la Tyr140; se ha sugerido que esta modificación podría estar asociada con grandes cambios conformacionales de la molécula.²⁰²

Las albúminas del suero son proteínas extracelulares con función de transportador multi-específico.^{190,203} Una amplia variedad de ligandos endógenos, xenobióticos y fármacos son transportados en el plasma unidos a HSA, con constantes de afinidad bajas a moderadas 1×10^4

$M^{-1} \leq K_A \leq 1 \times 10^7 M^{-1}$), los que encuentran en la HSA más de una docena de sitios de unión distribuidos en sus tres dominios.^{190,204-207} A su vez, la unión de ligandos afecta el comportamiento biofísico y bioquímico de la proteína. De este modo, la HSA circula en promedio como un complejo con 1-2 ácidos grasos de cadena larga (concentración plasmática ~ 1 mM, siete sitios de unión de distinta afinidad), $1 Ca^{2+}$ (concentración plasmática 2.4 mM), y ~ 7 iones Cl^- (concentración plasmática 100 mM).^{190,208-209} Los sitios de unión de Sudlow I y II son dos cavidades de unión presentes en la apoHSA,²¹⁰ cuyas paredes comprenden residuos de subdominios IB (incluyendo Tyr150), IIA (incluyendo Trp214) y II B en el caso del sitio de Sudlow I, y residuos de subdominios IIIA y IIIB para el sitio II. Estos sitios pueden acomodar una variedad de compuestos aromáticos de mediano tamaño y en menor medida, compuestos alifáticos poliinsaturados aniónicos. El sitio de Sudlow I ocupa un lugar clave interdominio en la proteína (entre los dominios I y II), de mayor tamaño que el sitio de Sudlow II, puede acomodar a más de un ligando, presenta más de un subsitio de unión, se solapa parcialmente con un sitio de moderada afinidad para ácidos grasos libres de cadena larga y está sujeto a interacciones alostéricas.^{207,211-212} Además del rol clave de la Tyr150, los estudios por mutagénesis dirigida identifican al Trp214, Arg218, Lys199 y a la His242 como los residuos que pueden modular la afinidad de unión de la warfarina ($K_A = 3.4 \times 10^5 M^{-1}$), el ligando prototípico del sitio de Sudlow I. Algunas de las 77 mutaciones (puntuales y de terminación) descriptas han sido comprobadas como causa de condiciones alteradas conocidas como disalbuminemias: bisalbuminemias (o aloalbuminemias, dos proteínas distintas en la circulación) y muy raramente analbuminemias (concentraciones muy bajas de esta proteína en la circulación).^{190,213} Las variantes mutacionales de mayor importancia en la clínica son las que se asocian con hipertiroxinemia (aumento de la concentración plasmática de triiodotironina- T3 - por pérdida de afinidad con la HSA).^{190,213-217}

Al contrario, una variante mutacional hallada en la población que se caracteriza por la sustitución His242Arg posee mayor afinidad por T3 y menor afinidad por warfarina (normalmente T3 no se une al sitio de la warfarina). La unión de aniones a la HSA (en particular, Cl⁻) aumenta la carga efectiva negativa de la partícula, lo que ayuda a disminuir pérdidas de HSA por filtración en los glomérulos renales.¹⁹⁰ La HSA también puede actuar como transportador secundario no fisiológico de grupos hemo y hierro, ayudando al organismo a manejar la sobrecarga plasmática asociada a ciertas patologías o a la administración intravenosa.²¹⁸⁻²²²

Existen evidencias de distinto peso de que por cambios en el estado redox y por la unión de H⁺, Ca²⁺, FFA, Cl⁻, hemo y fármacos (incluyendo aquellos que se unen al sitio de Sudlow I) ocurren modificaciones alostéricas sobre diversas propiedades/actividades de la molécula.²²³⁻²³¹ La HSA sufre isomerizaciones reversibles dependientes del pH (ec. 1.3.a):¹⁹⁰



Donde AE es la forma ácida expandida (que pierde afinidad por ácidos grasos de cadena larga y se renaturaliza lentamente luego de un salto a pH = 5-7); MR es la forma de migración electroforética rápida; N es la forma neutra, es decir aquella que predomina a pH cercano a la neutralidad; y B es la forma básica. Aunque el equilibrio N ⇌ B tiene un pH medio de transición (pH_{1/2}) cercano a 8 en ausencia de ligandos, en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca²⁺ e iones Cl⁻ el valor de este parámetro baja aproximadamente 0.5 unidades de pH.² Con este valor de pH_{1/2} ≈ 7.5 la transición básica es de mayor relevancia in vivo. La unión de Ca²⁺ aumenta con

el pH²³² y facilita aparentemente la adopción del estado básico.² Dado que se halló que la forma básica poseería mayor afinidad por warfarina, se concluyó que la unión de ligandos al sitio de Sudlow I depende de la transición $N \rightleftharpoons B$, y como el calcio facilita esta transición, este catión aumentaría la afinidad de la HSA por ligandos del sitio de Sudlow I.² Estudios posteriores del mismo grupo indicaron que la unión de Ca^{2+} y Mg^{2+} no afectan la unión de warfarina a pH 7.4,²³³ aunque a ese pH la transición básica de la HSA esta casi a medio camino. Se han descrito fenómenos alostéricos vinculados al sitio de Sudlow I que no estarían vinculados con la transición básica, es decir, serían propios de la forma neutra de la proteína.²³⁴ Por otro lado, la vinculación de la transición $N \rightleftharpoons B$ y la unión de tolmetina (un antiinflamatorio no esteroideo que se une al sitio de Sudlow I) fueron investigadas. Los resultados solo sugirieron que la asociación de tolmetina y HSA podría estar vinculada con el equilibrio $N \rightleftharpoons B$.¹ Peters propuso que la transición $N \rightleftharpoons B$ consiste en la desprotonación de cinco histidinas en el dominio I, con ruptura de puentes salinos entre el dominio I y el dominio III, causando una mayor flexibilidad de la molécula y una mayor unión a ligandos en subdominio II.¹⁹⁰ Más recientemente, se propone que la interconversión $N \rightleftharpoons B$ dependería de la unión de H^+ a residuos de histidina del dominio I, pero no a las histidinas 242 y 39 que pertenecen al sitio de Sudlow I y al sitio del tiol, respectivamente.²³⁵ Otras sondas del sitio de Sudlow I han sido empleadas para entender el comportamiento de la HSA en su relación con el entorno y la red de interacciones moleculares en las que participa este sitio interdominio. Entre ellos destacamos a Prodan, un aromático derivado del naftaleno sintetizado por el Prof. G. Weber cuya fluorescencia es sensible a la polaridad y polarizabilidad del entorno inmediato.²³⁶ A diferencia de la warfarina que posee un comportamiento complejo en solución y una amplia variedad de posibles mecanismos de

interacción, y que se une a la HSA como anión fenolato,²³⁷⁻²⁴⁰ Prodan es un ligando hidrofóbico específico del sitio de Sudlow I sin grupos ionizables, cuyas propiedades de fluorescencia no cambian con el pH en el rango en estudio (Esquema HIII).^{236,241} Prodan se ha utilizado para estudiar la polaridad del “interior” proteico,^{236,242} la dinámica ultra rápida de la hidratación de las “superficies” proteicas,²⁴³ distancias intramoleculares a través de transferencia de energía resonante (RET),²⁴⁴ como una sonda reportera de estados funcionales de proteínas,²⁴⁵ y menos frecuentemente para estudiar fenómenos alostéricos.²⁴⁶

A pesar de ser una proteína monomérica (pero multidominio), una gran cantidad de evidencias biofísicas revisadas por Ascenzi et al.,²⁰⁵ demuestran que la HSA tiene una compleja red termodinámica de alosterismo de unión. Los cambios conformacionales en los sitios de Sudlow I y II observados en los modelos cristalográficos son sutiles y locales, ya sea en la ausencia o presencia de ácidos grasos de cadena larga.^{204,230,247} Las interacciones alostéricas entre el sitio del tiol y sitios de unión a ligandos han sido menos estudiadas.^{223,248} Es posible que en gran medida esto se deba a la falta de rigor en la preparación de muestras puras de HSA-SH y HSA oxidada para realizar las comparaciones, y a los diversos métodos y productos de oxidación estudiados. El antecedente más notable propone que el anclaje de los dos bucles que contienen la Tyr84 y la Cys34 pueden desencadenar la transmisión de información sobre el estado redox de Cys34 en todo el dominio I, así como hacia la interfaz de dominio IB-IIA,²⁴⁹ pero no existe un mecanismo detallado para esta transmisión.

2. Objetivos

Los oxidantes y en particular el peroxinitrito, deben primero formarse, evitar ser interceptados por antioxidantes, reaccionar con el blanco para finalmente ejercer o no un efecto biológico relevante. Esta tesis pretende contribuir desde una perspectiva reduccionista al conocimiento detallado de cómo ocurren los dos procesos en los extremos de la mencionada cascada. De esta forma intentamos dar respuesta a dos preguntas principales: ¿cómo se forma el peroxinitrito a partir de óxido nítrico y superóxido? y ¿cómo las modificaciones oxidativas de macromoléculas pueden en ciertos casos ser transducidas a nivel molecular causando efectos biológicos?

2.1. Objetivo General

Contribuir a una mejor comprensión a nivel molecular de los mecanismos de formación y acción biológicas del peroxinitrito.

2.1.1. Objetivo específico 1

Estudiar la dependencia difusional de la formación de ONOO^- a partir de $^{\bullet}\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ en condiciones de equilibrio químico

2.1.2. Objetivo específico 2

Estudiar la comunicación alostérica entre los sitios de la Cys34 y de unión de Sudlow I: de relevancia en formas oxidadas de la HSA.

3. Control difusional en la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ para dar ONOO^-

Como parte de nuestro trabajo de tesis nos interesamos en estudiar la reacción reversible de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ para formar ONOO^- (ec. 1.2.1.a) mediante la medición amperométrica de concentraciones de equilibrio de $\cdot\text{NO}$ presentes en soluciones alcalinas ($\text{pH} \geq 12$) de ONOO^- de concentración conocida. Este enfoque evita los problemas inherentes a la medición de constantes de velocidad de reacción muy elevadas y permite un estudio sencillo y preciso de este sistema de reacción-difusión. Hipotetizamos que el desacuerdo entre los valores de las constantes de velocidad de reacción reportadas no es (totalmente) debido al error experimental, ni tampoco a la insuficiencia de los métodos experimentales empleados. De otro modo, las diferencias podrían explicarse por algún factor no controlado en relación con la naturaleza difusional del proceso, el que no se ha considerado debido a la elección incorrecta de la teoría cinética química clásica para tratar una reacción influida o controlada por la difusión.

3.1. Materiales y Métodos

Materiales Polietilenglicol (PEG) 3350 y 8000 de alta pureza de obtuvieron de Fluka. Hidróxido de sodio, glicerol, superóxido de potasio y otras sustancias químicas fueron comprados con el más alto grado disponible de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones acuosas fueron preparadas utilizando agua nanopura (resistividad $> 17 \text{ M}\Omega$).

El peroxinitrito fue sintetizado por la reacción del peróxido de hidrógeno y nitrito acidificado en medios acuosos mediante mezclado rápido de soluciones y envejecimiento controlado de la mezcla, reacción que es luego detenida por una solución de fría de NaOH concentrado.²⁵⁰ El peroxinitrito (0.2 M) en solución acuosa fue almacenado en NaOH 0.6 N a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante menos de un año (estas preparaciones contienen típicamente menos de 25% de NO_2^- por mol de ONOO^-

como contaminante). A partir de estos stocks de 50 mL se pueden obtener en un solo paso de descongelación soluciones altamente concentradas de ONOO^- (0,9 M). Las determinaciones de la concentración de ONOO^- se realizaron por espectrofotometría de absorción UV-Vis, registrando espectros de absorción en el rango de 220 - 400 nm, típicamente en diluciones 1/1000 de soluciones madre de ONOO^- realizadas en NaOH acuoso 10 - 20 mM, usando el coeficiente de extinción molecular reportado por Bohle et al. ($\epsilon_{302 \text{ nm}} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)²⁵¹.

Soluciones de alta viscosidad (50 y 25% de glicerol) se prepararon mezclando partes iguales de NaOH (50 - 100 mM) y glicerol (100% y 50% en agua). La viscosidad relativa se comprobó en viscosímetro de Ostwald. Soluciones alcalinas concentradas de PEG 4000 (25%) y 8000 (15%) fueron preparadas de una manera similar.

Las mediciones de las concentraciones de $\cdot\text{NO}$ se realizaron mediante un método electroquímico ampliamente usado en nuestro laboratorio^{77,87,252}. Se utilizó un analizador Apolo II dotado de un electrodo ISO-NO (World Precision Instruments Inc). Este es un electrodo recubierto por una membrana permeable a gases pequeños (en nuestro caso: O_2 , $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$ y CO_2), y es impermeable a iones presentes en la solución (ONOO^- , O_2^- , NO_2^- , y NO_3^-). Además el electrodo está bañado internamente por una solución electrolítica que permite la detección selectiva de $\cdot\text{NO}$ vs CO_2 (único gas que podría interferir con la detección amperométrica selectiva de $\cdot\text{NO}$). Se realizaron calibraciones a distintas T, concentraciones de NaOH, y viscosidades. Las calibraciones a distintas temperaturas se realizaron mediante la reducción de nitrito de sodio en una solución de yoduro de potasio y ácido sulfúrico como antes⁸⁷. En otros casos, mediante la adición de cantidades conocidas de una solución stock anaeróbica de $\cdot\text{NO}$ acuoso preparado usando una garrafa de $\cdot\text{NO}$ líquido⁸⁷. El límite de cuantificación de la técnica con el mencionado equipamiento en óptimas condiciones y

de acuerdo a la información aportada por los constructores del mismo es $[\text{NO}] \geq 10 \times 10^{-9} \text{ M}$, aunque esto seguramente varíe mucho de un experimento a otro. No realizamos determinaciones de límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de acuerdo con el desvío estándar de los registros de corridas en blanco como se usa frecuentemente^{253, 254 255}.

$$LD = \bar{I}_B + 3.3\sigma(I_B) \quad (3.1.a)$$

$$LC = \bar{I}_B + 10\sigma(I_B) \quad (3.1.b)$$

La revisión más reciente de las definiciones de límite de detección (concentración neta mínima detectable) y límite de cuantificación que se realizaron en 1997 (ISO, 1997), tampoco fueron consideradas. Sin embargo, 1) la inyección cuidadosa de volúmenes pequeños (menores a 1/50 del volumen de la cámara-750 μL) de soluciones blanco (soda o agua) no produce señales apreciables; 2) el ruido de alta frecuencia ($> 1 \text{ Hz}$) es muy bajo, de modo que nuestras mediciones están seguramente muy por encima de los valores previstos por de la definición arriba dada para el LC considerando esa fuente de error, 3) se intentó siempre realizar modificaciones al sistema de detección para disminuir el ruido de baja frecuencia ($< 0.1 \text{ Hz}$) proveniente generalmente de fluctuaciones hidrodinámicas del sistema de termostatización (flujo variable de agua termostatizada a en el espacio que rodea la cámara del sensor), usando amortiguadores (botella interpuesta con cámara aérea) y espejos de ondas con disminución del flujo (1 quiebre brusco en la dirección de la manguera que alimenta a la cámara), y 4) el ruido de baja frecuencia se tuvo en cuenta en forma manual (no se realizaron suavizaciones ni filtrados de los datos registrados) para realizar las determinaciones. En cualquier caso, siempre se realizaron mediciones con $I/\sigma(I) \geq 3$ y se verificó la exactitud relativa de una señal equivalente usada en la

calibración de acuerdo con un modelo de regresión lineal ajustado usando minimización de cuadrados de residuales como función objetivo (se empleó el programa de análisis y presentación gráfica Origin).

Nuestros colaboradores en Suiza (del Institute of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry and Applied Biology, ETH Zürich), los Dres. Thomas Nauser, Willem Koppenol y el Lic. Daniel Steinmann realizaron experimentos de fotólisis de destello usando luz láser con un instrumento de Applied Photophysics LKS 50. La fotólisis se sirvió de los armónicos terceros (6 ns, 355 nm, 100 a 200 mJ/pulso) de un láser de Nd: YAG (Quantel Brillante B). Entre la lámpara de Xe y la muestra se interpuso un filtro de corte a 335 nm para evitar la fotólisis de ONOO^- por la luz analizante. Las señales de absorbancia a 335 nm fueron grabadas con un osciloscopio digital LeCroy WaveRunner 64Xi. Para una estabilización de la temperatura se utilizó un termostato de agua. Las soluciones fueron degaseadas y purgadas con Ar en repetidas ocasiones y las mediciones se realizaron en una celda de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de paso equipada con una válvula de Young. La concentración de ONOO^- en las muestras estudiadas fue aproximadamente 200 μM . El ONOO^- usado en los experimentos de fotólisis de destello fue sintetizado de acuerdo con ²⁵⁶, y contenía menos de 10% de nitrito (esto es de importancia para minimizar la fotólisis de NO_2^-). En estos experimentos se mantuvo el $\text{pH} = 12$. Para la determinación de k_t^{irr} se siguió la formación de ONOO^- usando un coeficiente de extinción molecular a 335 nm de $\simeq 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2. Resultados

3.2.1. Medición directa de $\cdot\text{NO}$ proveniente de ONOO^- en soluciones alcalinas estables de ONOO^- . Si se inyectan cuidadosamente cantidades pequeñas de una solución madre suficientemente concentrada de ONOO^- en la cámara del sensor de $\cdot\text{NO}$, la que ha sido llenada con 10 - 50 mM de $[\text{NaOH}]$ se pueden observar señales de $\cdot\text{NO}$ estables. Sin embargo, algunas soluciones madre de ONOO^- contienen concentraciones de $\cdot\text{NO}$ relativamente altas e inestables, como se muestra en la Figura 1. En estos casos, si el frasco que contiene ONOO^- concentrado se deja abierto a temperatura ambiente, después de algún tiempo (1-2 horas), la medida de $[\cdot\text{NO}]$ alcanza una concentración más baja estable. En el experimento de la figura 1, la primera medida de $[\cdot\text{NO}]$ realizada inmediatamente después de descongelar un vial de ONOO^- a 37 °C fue de 3.35 μM para una concentración final en la cámara del sensor de 1.0 mM ONOO^- . Después de repetidas determinaciones se alcanzó una concentración final estable de $\cdot\text{NO}$ concentración de 56 ± 4 nM (1 mM ONOO^- , T = 34 ° C, Fig. 1). También se pueden medir concentraciones de $\cdot\text{NO}$ mayores que la de equilibrio cuando se inyecta $\cdot\text{NO}$ auténtico a una solución de ONOO^- . En cualquiera de los dos casos se puede observar en el tiempo, como en la Fig. 1, la desaparición de $\cdot\text{NO}$ en la cámara del sensor. La velocidad de desaparición de $\cdot\text{NO}$ depende en forma no lineal de la concentración de $\cdot\text{NO}$, como lo muestra el análisis de la Fig. 1 (Fig. 1, Panel B). La dependencia de las pendientes de desaparición de $\cdot\text{NO}$ en función de la $[\cdot\text{NO}]$ ajusta a una función exponencial doble decreciente, siendo aparente la separación cinética de al menos dos procesos. De acuerdo con la literatura que apoya la formación de $\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$ por homólisis de ONOOH , las velocidades de formación de cada uno de estos radicales en las condiciones del experimento (T = 34 °C, NaOH 14 mM \simeq pH 12.14, $[\text{ONOO}^-] = 1$ mM) es de 4.5×10^{-9} Ms⁻¹. Por tanto, los resultados sugieren que el proceso que consume $\cdot\text{NO}$ a bajas $[\cdot\text{NO}]$ es la reacción

de $\cdot\text{NO}$ con $\cdot\text{NO}_2$, que el proceso que ocurre principalmente a mayores $[\cdot\text{NO}]$ es la reacción de $\cdot\text{NO}$ con $\cdot\text{OH}$ además de la reacción de $\cdot\text{NO}$ con $\cdot\text{NO}_2$, y que a medida que la $[\cdot\text{NO}]$ disminuye estos radicales ($\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$) derivados de la homólisis del ONOOH presente en trazas se redirigen a otros blancos (principalmente el $\cdot\text{OH}$ reaccionando con ONOO \cdot y NO $_2^-$, Fig. 1B). La purga repetida del $\cdot\text{NO}$ con N $_2$ de las soluciones madre ONOO \cdot previo a la inyección en la cámara de detección de $\cdot\text{NO}$ no alteró la $[\cdot\text{NO}]_{\text{eq}}$ final estable medida pero si elimina la posibilidad de medir $[\cdot\text{NO}] > [\cdot\text{NO}]_{\text{eq}}$, apoyando la hipótesis de que el valor estable de $\cdot\text{NO}$ medido no es un simple contaminante residual de las soluciones de ONOO \cdot , sino que es rápida y continuamente formado a partir de ONOO \cdot , en completo acuerdo con los conocimientos previos. El hecho de que se pueda determinar una concentración estable de $\cdot\text{NO}$ sugiere fuertemente que una condición de equilibrio se alcanzó en la cámara del sensor de $\cdot\text{NO}$ después de la dilución de la solución stock de ONOO \cdot . Frente a estas observaciones inmediatamente pensamos que esta condición de equilibrio también debería incluir al O $_2^{\cdot-}$ que se forma por homólisis de ONOO \cdot en iguales cantidades y a la misma velocidad que el $\cdot\text{NO}$ (reacción reversa de la formación de ONOO \cdot , ecuación 1B). En los recuadros pequeños de la Figura 1 se puede observar el efecto de la adición de 5 - 20 mg de KO $_2$ sólido (concentración final 90 - 375 mM) a soluciones de ONOO \cdot 7.5 mM (37 °C). Dichos agregados resultan en disminuciones transitorias en $[\cdot\text{NO}]$, que son seguidas por la recuperación espontánea de la concentración de $\cdot\text{NO}$ a valores iguales a los que eran anteriormente estables (Fig. 1, Recuadros A y B). La observación cuidadosa mostró que el burbujeo en la solución, que comienza inmediatamente luego de la adición de KO $_2$ por dismutación de O $_2^{\cdot-}$ no catalizada (Esquema I), cesa sincrónicamente con la recuperación espontánea (sin nuevos agregados de $\cdot\text{NO}$ o cualquier otra sustancia) de la señal de $\cdot\text{NO}$. Esto muestra que las disminuciones en las concentraciones de $\cdot\text{NO}$ observadas en los registros de los

recuadros de la Figura 1 se deben al mantenimiento de concentraciones de $O_2^{\bullet-}$ mayores a las de equilibrio alcanzadas transitoriamente por la adición KO_2 . Estas disminuciones en la concentración de $\bullet NO$ se acompañan con seguridad a la formación de $ONOO^-$, debiéndose cumplir que $\Delta [ONOO^-] \equiv -\Delta [\bullet NO]$. Teniendo en cuenta que: a) la concentración instantánea $\bullet NO$ depende de la concentración instantánea de $O_2^{\bullet-}$, b) tanto $\bullet NO$ y $O_2^{\bullet-}$ son formados continuamente por la homólisis de $ONOO^-$, c) la homólisis $ONOO^-$ y la recombinación de $\bullet NO$ y $O_2^{\bullet-}$ son los flujos químicos microscópicos principales en el sistema (ver más abajo y Fig.1, Paneles C y D), d) bajo las condiciones probadas $ONOO^-$ es estable, y e) las concentraciones de $\bullet NO$ o $O_2^{\bullet-}$ superiores a las concentraciones estables de $\bullet NO$ son inestables y estos radicales desaparecen por otros canales menores de reacción (principalmente dismutación de $O_2^{\bullet-}$, y reacción de $\bullet NO$ con otros radicales libres derivados del $ONOOH$), entonces si una concentración estable de $\bullet NO$ se establece, esto debe ocurrir porque la concentración de $O_2^{\bullet-}$ también debe ser estable e igual a la de $\bullet NO$. Por lo tanto, una constante de equilibrio puede calcularse en acuerdo con la (ec. 3.2.1.a):

$$K_A^{eq} \equiv \frac{[ONOO^-]_{eq}}{[\bullet NO]_{eq}[O_2^{\bullet-}]_{eq}} = \frac{[ONOO^-]_0}{([\bullet NO]_{eq})^2} \quad (3.2.1.a)$$

Dado que en nuestras condiciones de $[\bullet NO]_{eq} \ll [ONOO^-]_0$, en la ecuación 3.2.1.a hacemos la simplificación de que la concentración de peroxinitrito es fija e igual a la calculada considerando la dilución realizada a partir de la solución madre (como se suele suponer cuando se mide peroxinitrito por el método espectrofotométrico habitual). En el experimento que se muestra en la figura. 1, mediante la ecuación 3.2.1.a, se puede calcular la constante de equilibrio K_A^{eq} para la

formación de ONOO^- a 34 °C: $K_A^{\text{eq}} \simeq 3.2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, la que está de acuerdo con el rango de valores calculado a partir de constantes cinéticas previamente reportadas ($1.9 - 10 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$). En cambio, asumir que $[\text{O}_2^{\bullet-}] = [\text{NO}]$ para todo t cuando la $[\text{NO}]$ es inestable nos llevaría a calcular erróneamente valores de K_A^{eq} muy alejadas de los valores reportados (por ejemplo, “ K_A ” = $9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ para las $[\text{NO}]$ más altas que se muestran en la Fig. 3.2.1).

Aunque el ONOO^- es bastante estable a $\text{pH} > 11$, de todas formas experimenta una descomposición lenta descrita previamente, aunque sin acuerdo sobre su mecanismo. Para resolver si pudiera haber un efecto cuantitativamente importante de la desaparición de peroxinitrito en los valores de las constantes de equilibrio determinadas por el método arriba descrito (Ecuación 7), resolvimos cuantificar la desaparición de ONOO^- a $\text{pH} \simeq 12$ (20 mM NaOH) a diferentes concentraciones de ONOO^- (0.42 a 5.04 mM, Fig. 1 Panel C) y temperaturas (15 – 45 °C, Fig. 3.2.1, Panel D) midiendo velocidades iniciales por espectrofotometría de absorción UV-Vis ($\lambda = 302 \text{ nm}$). Las dependencias de la constante de desaparición de ONOO^- en la $[\text{ONOO}^-]_0$ y de su logaritmo natural en el inverso de la temperatura mostraron un comportamiento lineal esperado. Como detallamos en el Recuadro 1, a partir de estos datos se puede concluir que los efectos de la inestabilidad del ONOO^- sobre las determinaciones realizadas son despreciables en los rangos de T y $[\text{ONOO}^-]$ estudiados ($1.001 < K_D^{\Psi} / K_D^{\text{eq}} < 1.003$).

Figura 3.2.1.1. Concentraciones de óxido nítrico en soluciones alcalinas de peroxinitrito. Panel A. Se toman alícuotas de peroxinitrito (20 μL x 150 mM) con una jeringa Hamilton “gas tight” y se inyectan en una cámara de vidrio termostatzada de $V_{\text{total}} = 3$ ml que está llena con NaOH 10 mM acuoso donde se aloja el electrodo revestido que detecta al $\cdot\text{NO}$. Inmediatamente luego de la adición se puede observar la lenta aparición de una señal positiva adscribible únicamente a la presencia o formación de $\cdot\text{NO}$ a partir de ONOO^- (flechas que apuntan hacia arriba). La concentración de ONOO^- final en la cámara de detección es de 1 mM. La solución alcalina de peroxinitrito utilizada en el experimento que se muestra había permanecido almacenada en un frasco cerrado a -20 $^{\circ}\text{C}$ durante un mes, fue descongelada rápidamente a 37 $^{\circ}\text{C}$ justo antes de la medición y fue mantenida en contacto con la atmósfera del laboratorio a T ambiente por espacio de casi dos horas mientras se realizó un muestreo repetido de la solución. Después de cada adición, la evolución en el tiempo de la concentración de $\cdot\text{NO}$ fue seguida por unos minutos. Condiciones experimentales $[\text{NaOH}]_{\text{Tot}} = 14$ mM, $T = 34$ $^{\circ}\text{C}$.

Insertos a y b: Efecto de la adición de KO_2 . Se realizaron adiciones en bolo de ONOO^- en los momentos indicados (7.5 mM de concentración final). La adición de un exceso de KO_2 sólido produce una disminución transitoria parcial de la señal $\cdot\text{NO}$ (**recuadro a**), mientras que una cantidad aún mayor (**recuadro b**) suprimió transitoriamente la señal. Como puede observarse, la señal de $\cdot\text{NO}$ se recupera espontáneamente (**recuadro a**).

Panel B. Dependencia de la velocidad de desaparición de $\cdot\text{NO}$ en $[\cdot\text{NO}]_t$. Se grafica la velocidad de consumo de $\cdot\text{NO}$ tomadas del panel A como allí se señala, en función de la concentración de $\cdot\text{NO}$. Las líneas horizontales se usan para indicar la velocidad de formación de radicales $\cdot\text{NO}_2$, ó $\cdot\text{NO}_2 + \cdot\text{OH}$ por homólisis de ONOOH de acuerdo con datos de la literatura. Estas velocidades son constantes debido a que la concentración de ONOO^- , el pH y la temperatura son constantes en el lapso de tiempo estudiado.

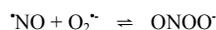
Panel C. Evaluación de la constante de velocidad de desaparición de ONOO^- a $\text{pH} \approx 12$ y 37 $^{\circ}\text{C}$ en función de la $[\text{ONOO}^-]_0$. Determinamos las velocidades iniciales de desaparición de ONOO^- en NaOH 20 mM siguiendo su absorbancia a 302 nm usando un epsilon reportado en celdas de cuarzo de fluorimetría, usando un paso óptico de 2.3 mm (para poder alcanzar concentraciones de ONOO^- comparables a aquellas usadas en las determinaciones electroquímicas de $[\text{NO}]_{\text{eq}}$). Estas velocidades iniciales muestran una dependencia lineal en la $[\text{ONOO}^-]_0$, de la que se puede extraer la constante de primer orden de desaparición de ONOO^- (k_d) en NaOH ≈ 20 mM a 37 $^{\circ}\text{C}$, cuyo valor estimado es $k_d = 9.8 \pm 0.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. En la figura se detalla el valor hallado para $K_D^{\text{v}} / K_D^{\text{eq}} = (k_r + k_d) / k_r$.⁷

Panel D. Evaluación de la constante de velocidad de desaparición de ONOO^- a $\text{pH} \approx 12$ en función de la temperatura. Determinamos las velocidades iniciales de desaparición de ONOO^- (1 mM) en NaOH 20 mM siguiendo como antes su absorbancia a 302 nm, variando la temperatura entre 15 y 45 $^{\circ}\text{C}$. Como previamente, se tuvo cuidado de termostatar la celda conteniendo NaOH 20 mM antes de realizar los agregados de ONOO^- concentrado. Se presenta el gráfico de Arrhenius ($\ln k_d$ vs $1/T$), de donde se extraen los parámetros que permiten calcular el factor pre-exponencial (A) y la energía de activación (E_a), cuyos valores estimados se detallan en la figura. **Inserto: Gráfico de $K_D^{\text{v}} / K_D^{\text{eq}}$ vs $1/T$.** Como se puede apreciar en el eje de las y, este gráfico muestra el efecto de la descomposición de ONOO^- sobre las determinaciones realizadas es despreciable, y es disminuye con el aumento de la T.

⁷ De acuerdo con lo que ya señalamos, en el equilibrio la reacción en estudio se caracteriza por la constante de equilibrio de disociación (K_D^{eq} , ecuación 7B):

$$K_D^{\text{eq}} = [\cdot\text{NO}] \times [\text{O}_2^{\cdot-}] / [\text{ONOO}^-] = [\cdot\text{NO}]^2 / [\text{ONOO}^-] = k_r^{\text{eq}} / k_f^{\text{eq}}$$

Considere ahora que el ONOO^- se descompone irreversiblemente a $\text{pH} \approx 12$ a varios productos (NO_2^- , NO_3^- , HO^{\cdot} , H_2O_2 , etc) a través de diferentes vías 1-2 cuya naturaleza no es importante en este momento. La cuestión importante es determinar la constante de velocidad de desintegración ONOO^- (k_d) y cuánto puede este proceso afectar al equilibrio arriba señalado (reacción 2). Obsérvese que modelamos la descomposición de ONOO^- como un proceso de primer orden en la $[\text{ONOO}^-]$, como se prueba experimentalmente (Fig. 1 Panel C). La descomposición irreversible del ONOO^- provocará un alejamiento del equilibrio, que puede ser evaluada mediante la comparación de K_D^{eq} (Ecuación 7B) con una constante de pseudo equilibrio (K_D^{v} , Ecuación 7C), de acuerdo con el siguiente esquema y la ecuación 7D:



$$K_D^{\text{v}} = (k_r^{\text{eq}} + k_d) / k_f^{\text{eq}}$$

$$K_D^{\text{v}} / K_D^{\text{eq}} = (k_r^{\text{eq}} + k_d) / k_r^{\text{eq}}$$

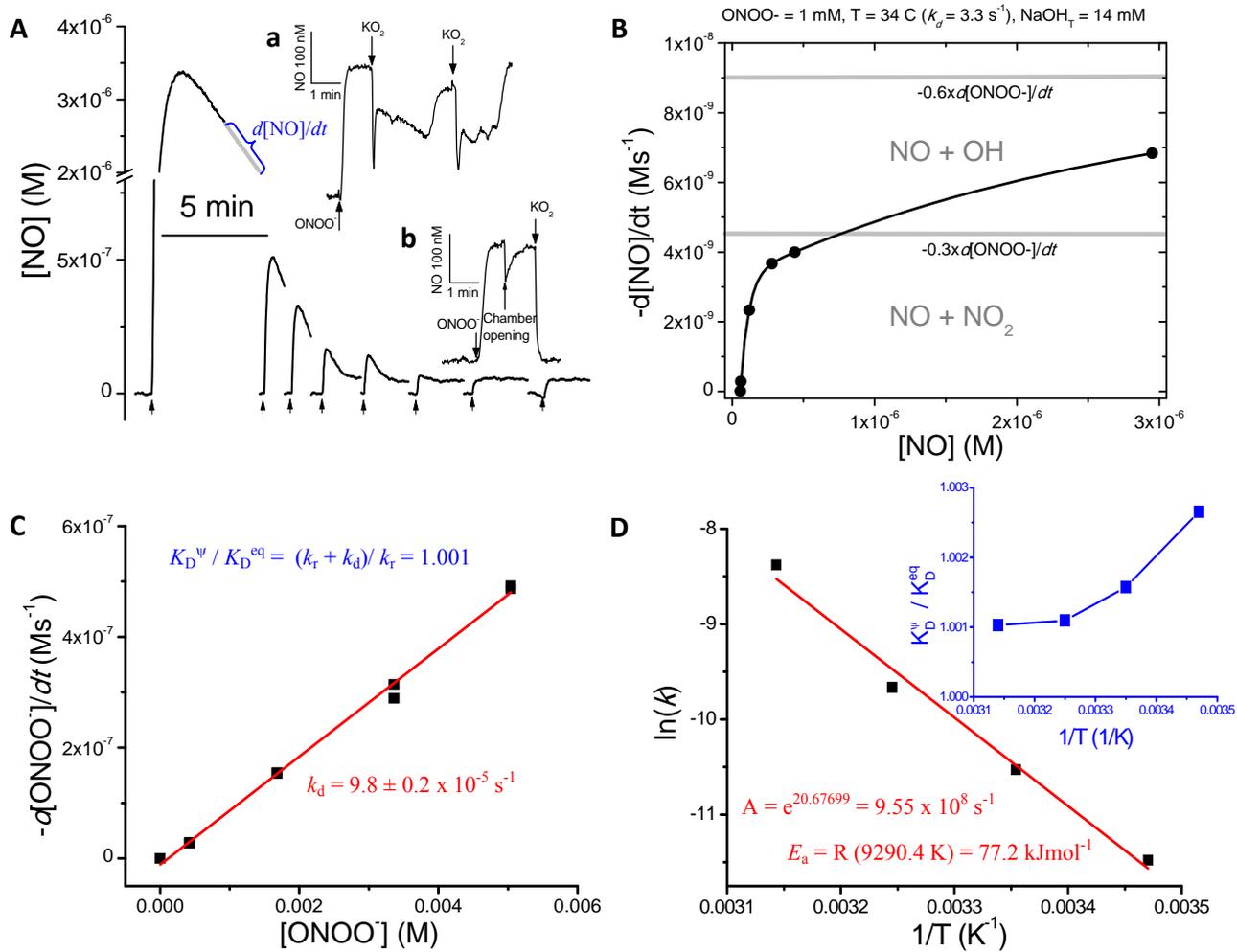


Fig. 3.2.1.1.

3.2.2. Dependencia de K_A^{eq} en la viscosidad y la temperatura. Los conocimientos actuales acerca de la reacción 1.2.1.b, caracterizada por k_r^{irr} ,^{61,124,187-188} muestran claramente que es un proceso controlado por activación. Por lo tanto, si la reacción de $\bullet\text{NO}$ con $\text{O}_2^{\bullet-}$ para dar ONOO^- (caracterizada por k_f , ec. 1.2.1.a) está influida por la difusión y si el proceso fisico-químico es elemental, entonces, de acuerdo con las ecuaciones de Stokes-Einstein y de Smoluchowski (ec. 3.2.2.a-c, respectivamente,¹⁷⁹), el aumento de la viscosidad (η) debería disminuir k_f , dejando sin cambios k_r , produciendo así una disminución de la constante de equilibrio de acuerdo con la ecuación 3.2.2.d, y un aumento de la concentración de $\bullet\text{NO}$ medido de acuerdo con la ecuación 3.2.1.a.

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{hyd}} \quad (3.2.2.a)$$

$$k_{Smol} = \frac{N_A 4\pi R^* D_{ij}}{1000} \quad (3.2.2.b)$$

$$K_A^{Smol} = \frac{k_{Smol}}{k_b^1} = \frac{N_A 4\pi R^* D_{ij}}{1000 k_b^1} \quad (3.2.2.c)$$

En las ecuaciones 3.2.2.a-c R_{hyd} es el radio hidrodinámico, N_A el número de Avogadro, k_B es la constante de Boltzmann, R^* es la distancia efectiva de reacción, $D_{ij} = D_{\text{NO}} + D_{\text{O}_2^{\bullet-}}$ es la suma de los coeficientes de difusión soluto-disolvente del par de reactivos (coeficiente de difusión que permite modelar la movilidad relativa de los solutos en un mismo disolvente) y K_A^{Smol} es una constante de equilibrio hipotética que sería de esperar si la reacción en el sentido de la formación

de ONOO⁻ en el equilibrio se comportase como lo predice la teoría cinética clásica de estado estacionario de Smoluchowski para reacciones irreversibles controladas por difusión. Es importante reconocer que la ec. 3.2.4 es una mera especulación, una forma de expresar la hipótesis cinética, la que tiene valor puesto que parece desprenderse lógicamente de la teoría cinética que se ha usado hasta el momento para tratar de entender esta reacción. La razón por la que la ecuación 3.2.4 no se encuentra en otros trabajos que fijan su atención en sistemas similares es porque en general el modelo más sencillo propuesto para explicar el mecanismo cinético de reacciones controladas por difusión en el equilibrio implica al menos dos pasos difusionales y dos pasos activacionales (ec. 3.2.2.d):²⁵⁷

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_D \times k_f^{\text{act}}}{k_{-D} \times k_r^{\text{act}}} \quad (3.2.2.d)$$

Ecuación que no toma en cuenta la posibilidad de efectos de múltiples cuerpos (“many body effects”). Para probar si el valor observado de la constante de equilibrio aparente K_A^{eq} depende de η determinamos la [^{*}NO] en equilibrio aparente con peroxinitrito (7.5 mM, 25 ° C) en 28 mM de NaOH (control) y 28 mM de NaOH con 50% de glicerol (w / v), donde $(\eta \text{ glicerol } 50 \%) / (\eta \text{ H}_2\text{O}) \approx 4$. Dos procesos tienen lugar en presencia de altas concentraciones de glicerol: uno rápido que se completa en aproximadamente 1 min (Fig. 3.2.2, Panel A) y otro lento que causó una acumulación progresiva de ^{*}NO (un proceso que se completa en 1 h (Fig. 3.2.2.1, Panel A Inserto en colores). Este último proceso estuvo acompañado de la descomposición de peroxinitrito (seguida a 302 nm, no mostrado). Un comportamiento similar se observó cuando polietilenglicol (PEG) 3350, PEG 8000 o azul de nitro-tetrazolio (NBT²⁺) se utiliza en lugar de

glicerol (no mostrado), lo que sugiere que todos estos agentes promueven la formación de $\cdot\text{NO}$ a partir de ONOO^- (véase la discusión). Por lo tanto, si los cursos temporales de las $[\cdot\text{NO}]$ son corregidas para cancelar la mencionada reacción indeseada lenta, se puede observar que el efecto de cambios sustanciales en η (hasta 4 veces) provocan cambios despreciables en la $[\cdot\text{NO}]$ en equilibrio con ONOO^- y por lo tanto cambios en η no afectarían K_A^{eq} (como se muestra en la Fig. 3.2.2.1, Panel A). Téngase en cuenta que si sólo k_f estuviera influenciada por la difusión el cambio esperado en la concentración de equilibrio de $\cdot\text{NO}$ sería de aproximadamente 2 veces (para un incremento de η de 4 veces). Este resultado apoya cualquiera de los tres alegatos siguientes: a) ni k_r^{eq} ni k_f^{eq} son influenciadas por la difusión, b) los dos procesos son el controlados por difusión, o c) el proceso es complejo, involucrando tanto pasos controlados por difusión como por activación y tanto en dirección de retroceso como en la dirección de avance de la reacción de formación de ONOO^- . Dado que como ya se mencionó, es bien conocido que la constante de velocidad de homólisis de ONOO^- es térmicamente activada, la posibilidad b) puede ser pasada por alto.

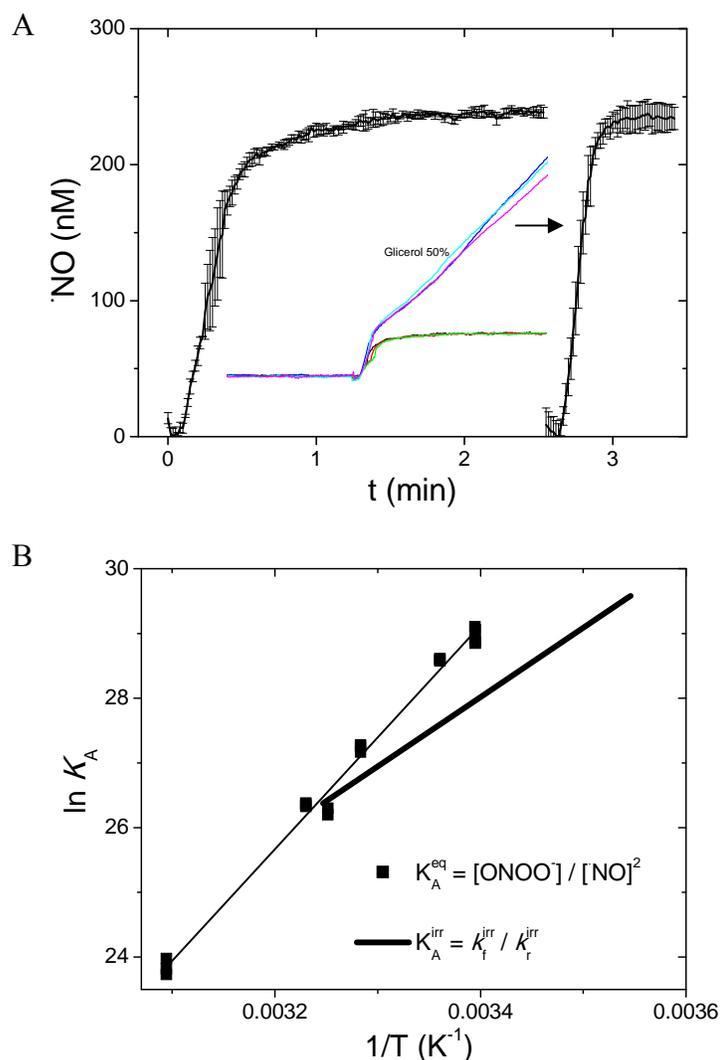


Figura 3.2.2.1. Dependencia en la viscosidad y la temperatura de la constante de equilibrio de la reacción de $^{\bullet}NO$ con $O_2^{\bullet-}$ para dar $ONOO^-$. Panel A. Medimos la concentración de $^{\bullet}NO$ en equilibrio con 7.5 mM $ONOO^-$ en solución alcalina en ausencia (trazo de la izquierda) y presencia (trazo de la derecha) de 50% de glicerol (solución de alta viscosidad relativa, $\eta_2/\eta_1 = 4$). Se muestran valores promedio \pm SD, $n = 3$, siendo estos resultados representativos de dos experimentos separados con cada uno de los poli alcoholes utilizados. **Inserto:** se muestran los cursos temporales crudos (sin restar la acumulación de $^{\bullet}NO$ debida al proceso lento). **Panel B. Gráficos de van't Hoff - $\ln(K_A)$ vs inverso de la T- para constantes determinadas en condiciones reversibles e irreversibles.** Los valores de K_A en el equilibrio (K_A^{eq} , cuadrados llenos) se calcularon utilizando la ecuación 7A. Mientras que la concentración de $[ONOO^-]_0$ se mantuvo constante en $5,1 \pm 0,1$ mM y la $[^{\bullet}NO]_{eq}$ resultante varió entre ~ 40 nM a 22 °C y ~ 470 nM a 55 °C. La línea gruesa representa los valores de K_A^{irr} calculados a partir de las constantes de velocidad de reacción determinadas bajo condiciones irreversibles (k_f^{irr} determinada por fotólisis de flash -detalles a continuación- y k_r^{irr} determinada por espectrofotometría flujo detenido por Sturzbecher et al., 2007).

Puesto que los valores reportados de k_f^{eq} están cerca del límite difusional definido por k_f^{Smol} (ec. 3.2.2.c) el estado de equilibrio considerado en la posibilidad a) puede ser también descartado. Por lo tanto llegamos a la conclusión de que, en las condiciones ensayadas, el equilibrio en estudio debe comportarse tal como se propone en la opción c), en apoyo a la idea de que el proceso físico-químico que se estudia en el equilibrio podría ser mejor descrito por un mecanismo cinético más complejo de lo que pensábamos inicialmente. A continuación, estudiamos la dependencia de K_A^{eq} en la temperatura (15 a 50 ° C, a presión constante de 1 atm) y luego estudiamos la dependencia en la temperatura de la constante de velocidad de interés (sección siguiente). Los resultados del análisis de Van't Hoff, gráfico de $\ln(K_A^{\text{eq}})$ vs T^{-1} (Ec. 9) 28, se muestran en la Fig. 2, Panel B). La concentración de ONOO⁻ se mantuvo fija en estos estudios (5.1 ± 0.1 mM). El trazo lleno representa la línea recta que mejor ajusta a los datos (ec. 3.2.2.e).

$$\ln K_A = \frac{d \ln K_A}{dT^{-1}} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta_r S}{R} = \ln K_A^{\text{eq}} = \frac{17274(\pm 427)}{T} - 29.6(\pm 1.4) \quad (3.2.2.e)$$

$$\frac{d \ln K_A}{dT^{-1}} = -\frac{\Delta_r H^\circ}{R} = 17274(\pm 427) \quad (3.2.2.f)$$

$$\Delta_r H^\circ = -R(1.73 \times 10^4 \pm 427 K) = -143.7 \pm 3.6 \text{ kJ mol}^{-1} \quad (3.2.2.g)$$

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \Delta_r S^\circ = -70.4 \text{ kJ mol}^{-1} \quad (3.2.2.h)$$

La ΔG° obtenida (ec. 3.2.5.h) está en acuerdo parcial con valores previos de -64.4 a $-68.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ los que han sido deducidos a partir de los valores de k_r^{irr} and k_f^{irr} (referenciados en la Introducción).

3.2.3. Dependencia de k_f^{eq} , k_f^{irr} , k_f^{Smol} y D_{NO} en la temperatura. Si asumimos que la constante de velocidad de reacción en sentido reverso está controlada la activación y que tiene el mismo valor si se determina en equilibrio o en condiciones irreversibles ($k_r^{irr} = k_r^{eq}$), conociendo k_r^{irr} en función de la temperatura¹²⁴ y usando los valores hallados de K_A^{eq} en función de T (Fig. 3.2.2.1), se puede calcular $k_f^{eq} = f(T)$. Así, para T = 25 °C, $K_A^{eq} = 2.03 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ y $k_r^{eq} = 0.02 \text{ s}^{-1}$, y por tanto se deduce un valor de $k_f^{eq} = 3.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (ec. 3.2.3.a):

$$k_f^{eq} = K_A^{eq} k_r^{irr} \quad (3.2.3.a)$$

El valor calculado está por encima del límite de difusión (ver texto más adelante y ec. 3.2.3.f), sin embargo, está en buen acuerdo con los valores más altos reportados por Kissner et al. y Nauser et al.⁴⁰⁻⁴¹ Asumiendo la validez de esta relación (ec. 3.2.3.a) para cualquier temperatura dentro del rango estudiado usando la ec. 3.2.3.b que establece la dependencia de k_r^{irr} en T, se deduce k_f^{eq} como una función de T (ec. 3.2.3.b-d, Fig. 3.2.3.1).

$$\ln k_r^{eq} = \ln k_r^{irr} = 37.02 - \frac{12267(\pm 241)K}{T} \quad (3.2.3.b)$$

$$\ln K_A^{eq} = -29.6(\pm 1.4) + \frac{17274(\pm 427)}{T} = \ln \left(\frac{k_f^{eq}}{k_r^{eq}} \right) = \ln k_f^{eq} - \ln k_r^{eq} \quad (3.2.3.c)$$

$$\begin{aligned} \ln k_f^{eq} &= \ln K_A^{eq} + \ln k_r^{eq} = \\ &= -29.6 + \frac{17274(\pm 427)K}{T} + 37.02 - \frac{12267(\pm 241)K}{T} = \\ &= 7.42 + \frac{5007(\pm 668)K}{T} \end{aligned} \quad (3.2.3.d)$$

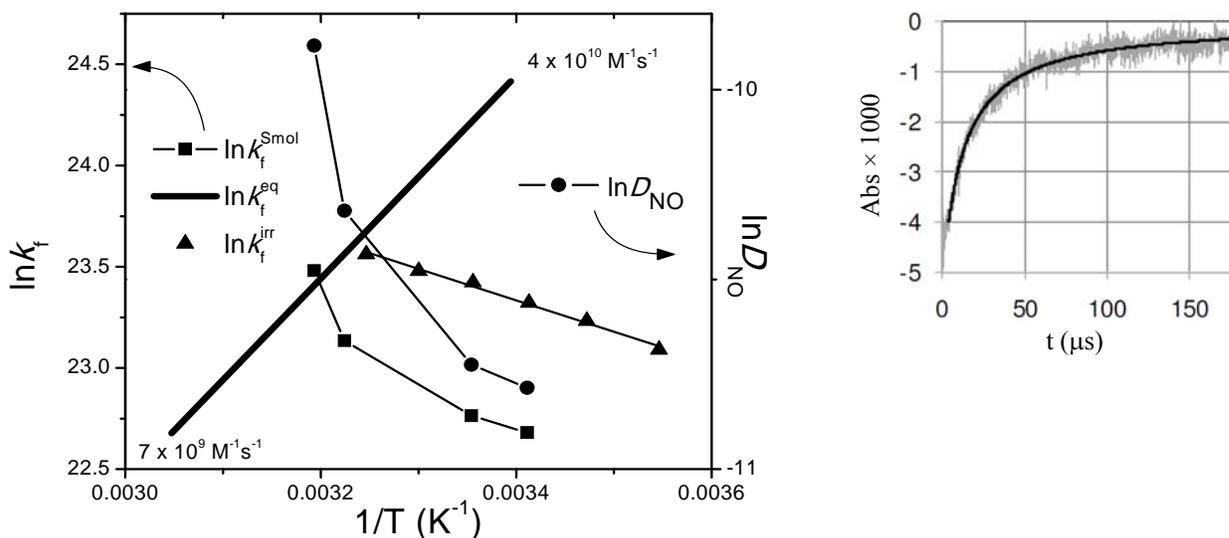


Figura 3.2.3.1. Gráficos de Arrhenius $-\ln(k)$ vs $1/T$ - para las constantes de velocidad de la reacción de NO con $\text{O}_2^{\cdot-}$ calculadas y experimentales y para el coeficiente de difusión del NO . Los valores de la constante de velocidad de la reacción NO con $\text{O}_2^{\cdot-}$ para dar $\text{ONOO}^{\cdot-}$ en condiciones irreversibles (k_f^{irr}) fueron determinados directamente por fotólisis flash en función de la temperatura (triángulos). Los valores de k_f^{eq} fueron deducidos a partir de los valores de K_A^{eq} hallados (Fig. 2, Panel B) y k_f^{irr} como se explica en el texto (línea gruesa; como referencia directa, se detallan los valores extremos de esta línea). Los valores calculados de k_f^{smol} se muestran como cuadrados. Los valores reportados (citas en el texto principal) del coeficiente de difusión del NO se muestran como círculos (eje y de la derecha). Inserto (derecha): Curso temporal representativo de la reacción de NO y $\text{O}_2^{\cdot-}$ generados fotolíticamente a partir de $\text{ONOO}^{\cdot-}$ seguida espectrofotométricamente como la reaparición de $\text{ONOO}^{\cdot-}$.

En consecuencia, el valor esperado de la constante de velocidad de reacción a 37°C y $[\text{ONOO}^{\cdot-}] = 5.1 \text{ mM}$ es $k_f^{eq} = 1.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, inesperadamente menor que a 25°C si se considera la aplicable la teoría de Stokes-Einstein-Smoluchowski (Ecs. 3.2.2.c y 3.2.3.e). En la Fig. 3.2.3.1 se muestran los valores de $\ln(k_f^{eq})$ graficados contra en inverso de la temperatura (gráfico de Arrhenius). Los datos ajustan al comportamiento lineal predicho por la ecuación de Arrhenius,

obteniéndose valores negativos y al parecer constantes de energía de activación $E_a = -40.0 \pm 5.5$ kJ mol⁻¹ y un factor pre-exponencial llamativamente bajo $A = 1.70 \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹.

La constante de velocidad de la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ en condiciones irreversibles (k_f^{irr}) fue estudiada por fotólisis de destello de soluciones alcalinas de ONOO^- en función de la temperatura por nuestros colaboradores Daniel Steinmann, Thomas Nauser y Willem Koppenol del Departamento de Química y Biociencias Aplicadas de la Escuela Politécnica Federal de Zürich (Figura 3.2.3.1, triángulos, eje y a la izquierda). Los valores observados de k_f^{irr} están en excelente acuerdo con las determinaciones anteriores por fotólisis de destello a $T = 25$ °C.⁴⁰⁻⁴¹ El valor de k_f^{irr} varía en forma esperada de 1.07×10^{10} M⁻¹s⁻¹ a 1.71×10^{10} M⁻¹s⁻¹ al pasar de 282,15 K a 308,15 K. Un muy buen ajuste a la ecuación de Arrhenius se puede observar en el rango de temperatura estudiado, con $E_a = 12.9 \pm 0.6$ kJmol⁻¹ positiva y constante, con un valor pre-exponencial $A = 2.70 \times 10^{12}$ M⁻¹s⁻¹.

Además, se estudió la dependencia de la constante de velocidad controlada por difusión (k_f^{Smol}), que caracterizaría el avance irreversible bajo estado estacionario de la reacción de formación de ONOO^- , en el coeficiente de difusión de $\cdot\text{NO}$ en solución acuosa ($D_{\cdot\text{NO}}$). Para ello calculamos k_f^{Smol} usando los valores reportados de $D_{\cdot\text{NO}}$ a distintas T: 2.07×10^{-5} cm²s⁻¹ a 20 °C; 2.21×10^{-5} cm²s⁻¹ a 25 °C²⁵⁸; 3.3×10^{-5} cm²s⁻¹ a 37 °C²⁵⁹; y 5.10×10^{-5} cm²s⁻¹ a 40 °C²⁶⁰. La dependencia de $D_{\cdot\text{NO}}$ en la temperatura (Fig. 3.2.3, círculos, eje y de la derecha) se encuentra en muy buen acuerdo con la predicha por la relación de Stokes-Einstein (Ec. 3.2.3.e):

$$D_{\text{NO}} = \frac{k_B T}{\xi_{\text{NO}}} = \frac{k_B T}{6\pi(\eta^{\alpha_{\text{NO}}})R_{\text{hyd}}} \quad (3.2.3.e)$$

Teniendo en cuenta la ecuación 14 y los valores observados de $D_{\bullet\text{NO}}$, se puede concluir que $1.05 \leq \alpha_{\bullet\text{NO}} \leq 1.12$ (teniendo en cuenta el efecto de la temperatura sobre la $\eta_{\text{H}_2\text{O}}$), lo que muestra que la difusión de $\bullet\text{NO}$ en medios acuosos es *cuasi* stokesiana ($\alpha = 1$ para una difusión estrictamente stokesiana). Esto está de acuerdo con un reporte anterior²⁶¹ y se aparta como es de esperar del valor $\alpha_{\bullet\text{NO}} \cong 0.5$ hallado por nosotros previamente en entornos lipídicos⁸⁷ y por otros autores para la difusión de dioxígeno en n-alcanos.²⁶² La figura 3.2.3.1 también muestra la dependencia en la temperatura de la constante de velocidad de reacción limitada por difusión de la reacción del $\bullet\text{NO}$ con $\text{O}_2^{\bullet-}$ para dar $\text{ONOO}^{\bullet-}$ asumiendo que ella obedece la relación de estado estacionario de Stokes-Einstein-Smoluchowski (Ecs. 3.2.2.c y 3.2.3.e), usando un valor de $\alpha_{\bullet\text{NO}} = 1.08$ (Fig. 3.2.3.1, Panel B, eje y a la izquierda). No se conoce la dependencia en la temperatura del coeficiente de difusión del $\text{O}_2^{\bullet-}$. Sin embargo, si asumimos que $\alpha_{\text{O}_2^{\bullet-}} = 1$ (una suposición probablemente segura), el efecto de los cambios en T sobre la constante de velocidad de reacción limitada por difusión para la reacción en estudio pueden ser calculados usando la ec. 3.2.3.f:

$$k_f^{\text{Smol}} = 4\pi \frac{N_A}{1000} (R^*) \left[\left(\frac{k_B T}{6\pi} \right) \left(\frac{1}{R_{\text{NO}}^{\text{hyd}} \eta^{\alpha_{\text{NO}}}} + \frac{1}{R_{\text{O}_2^{\bullet-}}^{\text{hyd}} \eta^{\alpha_{\text{O}_2^{\bullet-}}}} \right) \right] \quad (3.2.3.f)$$

Suponemos que el par reactivo es una par de contacto de van der Waals como se espera de una reacción covalente, dando $R^* = R_{\text{NO}}^{\text{vdW}} + R_{\text{O}_2^{\bullet-}}^{\text{vdW}} \approx 3.2 \times 10^{-8}$ cm. Tomando $R_{\text{NO}}^{\text{hyd}} = R_{\text{NO}}^{\text{vdW}}$ (lo que ya comprobamos al encontrar que la difusión de $\bullet\text{NO}$ es básicamente stokesiana) y $R_{\text{O}_2^{\bullet-}}^{\text{hyd}} = 2.05 \times 10^{-8}$ cm,²⁶³ se obtiene k_f^{Smol} a 25 ° C:

$$\begin{aligned}
k_f^{\text{Smol}(298.15\text{K})} &= \left(\frac{4\pi\pi_A}{1000} \right) (2.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1} + 1.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}) (1.6 \times 10^{-8} \text{ cm} + 2.05 \times 10^{-8} \text{ cm}) \\
&= 9.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \qquad (3.2.3.g)
\end{aligned}$$

Al contrario del comportamiento lineal de $\ln(k_f^{\text{eq}})$ y $\ln(k_f^{\text{irr}})$ en función de $1/T$, valores positivos no constantes de E_a son necesarios para explicar la dependencia de $\ln(k_f^{\text{Smol}})$ en $1/T$ en el rango de T que se estudió.

A partir de los resultados mostrados en la Fig. 3.2.3.1 se puede concluir que: a) la constante de velocidad de reacción hacia adelante tal como lo describe $k_f^{\text{eq}} = k_f^{\text{irr}} \times K_A^{\text{eq}}$ no se comporta como se esperaría para el caso de la k_f^{Smol} (que suele ser asumido como válido para las reacciones irreversibles), b) sin embargo, tampoco k_f^{irr} determinado por fotólisis de destello sigue el comportamiento esperado para k_f^{Smol} , c) como es de esperar, la dependencia de la temperatura de k_f^{Smol} sigue la misma dependencia en la temperatura que D_{NO} .

3.2.4 La dependencia de K_A^{eq} y k_f^{eq} en la concentración de ONOO^- . Se determinaron las concentraciones de NO en equilibrio con ONOO^- como función de la concentración de ONOO^- a 37°C en NaOH 50 mM (Fig. 3.2.4.A). Nuestro objetivo inicial era evaluar mejor K_A^{eq} , esperando confirmar una esperada relación lineal entre el cuadrado de la concentración de NO y la concentración de ONOO^- . Esta relación lineal esperada implicaría una valor constante de K_D (Ec. 3.2.4a):

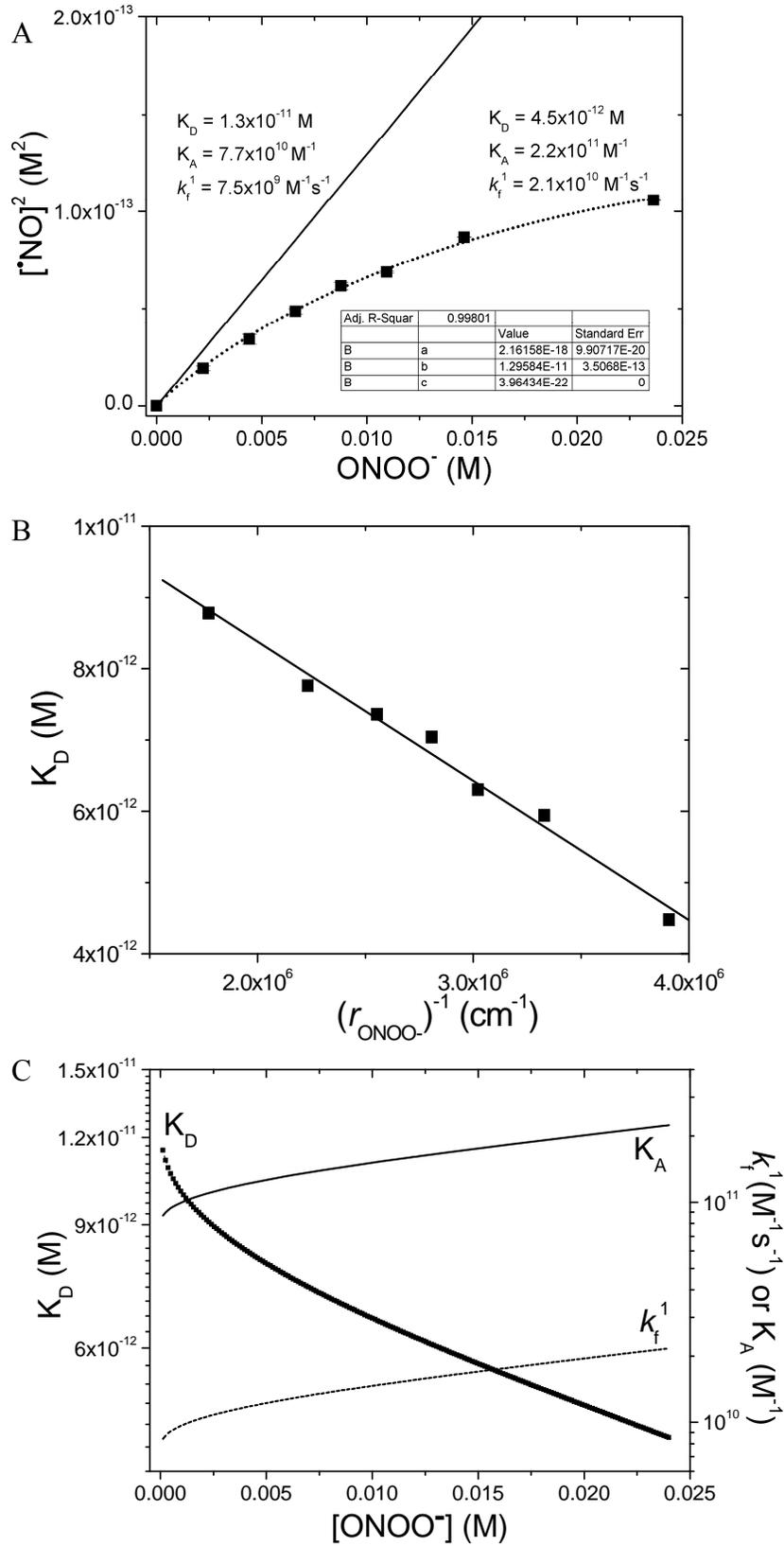
$$K_D = K_A^{-1} = \frac{([\text{NO}]_e)^2}{[\text{ONOO}]_0} = \frac{d([\text{NO}]_e)^2}{d[\text{ONOO}]_0} = \text{const} \qquad (3.2.4.a)$$

Si $K_D = \text{constante}$, la aplicabilidad de la ley de acción de masas para el caso en estudio se puede garantizar. Sin embargo, la Fig. 3.2.4.1.A muestra claramente que la K_D observada depende de la concentración ONOO^- . Hasta donde sabemos, este tipo de comportamiento no se ha observado anteriormente, pero las desviaciones de la ley de acción de masas han sido predichas teóricamente hace ya largo tiempo para en las reacciones reversibles dependientes de la difusión en condiciones de equilibrio químico.²⁶⁴⁻²⁶⁵ Como control se estudió la dependencia de la señal de $\cdot\text{NO}$ en la fuerza iónica agregando cantidades conocidas de $\cdot\text{NO}$ auténtico ($\cdot\text{NO}$ disuelto en agua) en NaOH 25-100 mM con o sin 0.1 M NaCl , pudiéndose observar sólo un pequeño aumento en la señal (no se muestra), compatible con un reparto disminuído del $\cdot\text{NO}$ en soluciones con alta fuerza iónica, manteniendo constante la fuerza iónica de la solución electrolítica presente en el electrodo. De modo que el incremento en la fuerza iónica en la cámara del sensor no era responsable de la reducción observada en la concentración medida de $\cdot\text{NO}$ con relación a la esperada al aumentar la concentración de ONOO^- . Además, se puede descartar que el aumento de la concentración de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueda provocar el efecto observado, ya que la dismutación aumentada de $\text{O}_2^{\cdot-}$ solo podría aumentar la concentración de $\cdot\text{NO}$. Por último, también se consideró la posibilidad de una reacción entre el $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- y/o con las especies reactivas derivadas del ONOO^- . Trabajos anteriores han estimado que la constante de velocidad para la reacción directa de $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- es menor que $1.3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (menor que el límite de detección de la técnica usada).²⁶⁶⁻²⁶⁷ La concentración máxima de $\cdot\text{NO}$ medida después de la adición de un bolo de $\cdot\text{NO}$ acuoso disminuye en la presencia de ONOO^- en una proporción constante para una determinada concentración de ONOO^- ; además la adición de ONOO^- acelera la velocidad de desaparición de $\cdot\text{NO}$ en condiciones alcalinas (NaOH 50 mM) y la velocidad de

esta reacción fue linealmente dependiente de la concentración de ONOO^- con una constante aparente de velocidad (de pseudo primer orden) de $\sim 4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (no se muestra). Este valor es comparable con una constante de velocidad estimada para la homólisis de ONOOH en 50 mM de NaOH ($4.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$). Por lo tanto, estos resultados están de acuerdo con el consumo de $\cdot\text{NO}$ por su reacción con radicales $\text{HO}\cdot$ y $\cdot\text{NO}_2$ derivados de la homólisis ONOOH (ver también Figura 3.2.1.B). Esta constante de velocidad es casi cuatro órdenes de magnitud menor que la constante de velocidad de reacción de ONOO^- para dar $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, y por lo tanto, tiene una influencia insignificante en el estado estacionario en estudio. Es importante destacar que, si nuestras suposiciones son correctas y las determinaciones reflejan fielmente las concentraciones de $\cdot\text{NO}$ libre en equilibrio con ONOO^- y $\text{O}_2\cdot^-$, el incremento de los valores de K_A a concentraciones altas de ONOO^- permiten deducir la falta de un coeficiente constante de velocidad de reacción entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$. Como se muestra en la Figura 3.2.4.1.C se puede suponer una dependencia espacial de k_f^{eq} y las constantes de equilibrio dependiente de la $[\text{ONOO}^-]$, que nosotros relacionamos con la variación en distancia media que separa moléculas de ONOO^- que ocurre cuando se varía la concentración de ONOO^- , tal como se propone en la Figura 3.2.4.1.B y en ecuaciones 3.3.2.e-g (véase Discusión). El valor más alto de k_f^{eq} que obtuvimos a la mayor $[\text{ONOO}^-]$ probada ($\approx 25 \text{ mM}$) y $37 \text{ }^\circ\text{C}$ es de $2.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, el cual está de acuerdo con los valores más altos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ reportados por Kissner et al. y Nauser et al.⁴⁰⁻⁴¹ Deducimos un valor mínimo de $k_f^{\text{eq}} = 7.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ usando el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 28A (Figura 4A), el que está en buen acuerdo con el valor reportado por Huie et al. ($6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).³⁹

Figura 3.2.4.1 Dependencia de K_A^{eq} y k_f^{eq} en la concentración de ONOO $^-$. Se determinaron las concentraciones de $^{\bullet}\text{NO}$ presentes en equilibrio con soluciones alcalinas de ONOO $^-$ de diferente concentración ([ONOO $^-$] $_{eq}$ es la variable controlada, T = 37 ° C, pH > 12,5). **Panel A.** Se grafica el cuadrado de las [$^{\bullet}\text{NO}$] $_{eq}$ en función de las correspondientes [ONOO $^-$] $_{eq}$ (cuadrados llenos, promedios \pm SE). La curva de puntos y los valores detallados a la derecha resultan de un ajuste por mínimos cuadrados de los parámetros de la ecuación 28B a los datos experimentales (el parámetro "a" y "b" se ajustaron mientras que el parámetro "c" se mantuvo constante (c = 3000 / 4 π N $_A$). El trazo continuo representa a la recta ($[^{\bullet}\text{NO}]_{eq}$) 2 = b \times [ONOO $^-$] $_{eq}$, que es asintótica a la curva de puntos para [ONOO $^-$] $_{eq}$ \rightarrow 0. Los valores detallados a la izquierda están de acuerdo con este comportamiento lineal esperado pero no observado. **Panel B.** Representación de los valores experimentales de la K_D^{eq} en función del inverso de r_{ONOO^-} , siendo r_{ONOO^-} la distancia media macroscópica entre moléculas de ONOO $^-$. El mejor ajuste de una ecuación lineal a los datos permite obtener los siguientes parámetros $y_0 = 1.23 \times 10^{-11}$ M, aproximadamente igual al valor de "b" arriba mencionado) y una pendiente a = -1.95 $\times 10^{-18}$ M cm^{-1} , similar a los valores obtenidos directamente por ajuste de la ecuación 28B a los datos experimentales, según se muestra en el panel A. **Panel C.** Se grafican los valores de K_D^{eq} , K_A^{eq} y K_f^{eq} calculados de acuerdo con la ecuación C-28A en función de la [ONOO $^-$] $_{eq}$.

Figura 3.2.4



3.3 Discusión

3.3.1. La química radicalar simple que ocurre en el sistema en estudio. Ya existe un vasto conocimiento acumulado sobre la química del peroxinitrito.²⁶⁸ La reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ sólo da ONOO^- , y la homólisis de ONOO^- solo da $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$,¹²⁰ constituyendo una reacción de canal único (“single channel reaction”). Esto está en contraste con la homólisis de ONOOH en $\text{HO}\cdot$ y $\cdot\text{NO}_2$, reacción en la que la isomerización en ácido nítrico y nitrato se produce con rapidez dentro de la jaula de solvente.¹²⁰ La relativa alta estabilidad del ONOO^- a $\text{pH} \geq 12$ (Fig. 3.2.1.B-C),^{112,120,269-270} y la estabilidad de la concentración de $\cdot\text{NO}$ en equilibrio con ONOO^- observada en este estudio (Fig. 3.2.1.1), indican que lo que estamos estudiando es un equilibrio entre ONOO^- y los radicales precursores/derivados $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$. Si una concentración de $\cdot\text{NO}$ o de $\text{O}_2\cdot^-$ mayor a la correspondiente al equilibrio se alcanza transitoriamente por adición de $\cdot\text{NO}$ o $\text{O}_2\cdot^-$, dado el tiempo suficiente, el sistema vuelve a la concentración de equilibrio de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ (Fig. 3.2.1.A). A nuestro entender, estos hechos surgen de dos características cinéticas clave del sistema en estudio: i) en las condiciones estudiadas, la reacción muy rápida entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ aventaja en gran medida a tres procesos que fallan en desviar el equilibrio: la autooxidación del $\cdot\text{NO}$ ($v = k \times [\cdot\text{NO}]^2 \times [\text{O}_2]$; $k \approx 2.1 \times 10^7 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$)^{38,120}, la dismutación no catalizada del $\text{O}_2\cdot^-$ ($v = k \times [\text{O}_2\cdot^-]^2$; $k \approx [\text{H}^+] 5 \times 10^{12} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$)²⁷¹ y la difusión de $\cdot\text{NO}$ fuera de la solución (lo que hemos minimizado mediante el diseño de cámaras con una pequeña superficie de intercambio aire-líquido, 1-2 mm², para un volumen de 3000-750 mm³), ii) además, en las condiciones de pH utilizado, la homólisis de ONOOH para dar radicales $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{HO}\cdot$ ($v = k \times [\text{ONOOH}]$; $k_{298.15 \text{ K}} = 1.25 \text{ s}^{-1} \times [10^{\text{pKa}} / (10^{\text{pH}} + 10^{\text{pKa}})] \leq 6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a $\text{pH} \geq 12$)¹¹² es de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud más lenta que la homólisis de ONOO^- en $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ ($v = k \times [\text{ONOO}^-]$; $k_{298.15 \text{ K}} = 0,02 \text{ s}^{-1}$).^{124,187} Mientras que se mantengan condiciones fuertemente alcalinas, en el

corto plazo dentro del cual se llevan a cabo nuestros experimentos, ninguno de estos procesos es de importancia en relación con el equilibrio en estudio, como lo mostramos en la Fig. 3.2.1.1, Paneles C y D. La Fig. 3.2.1.1.B sugiere que el principal mecanismo de consumo de $\cdot\text{NO}$ en el sistema se debe a la reacción con radicales derivados del ONOOH; el hecho de que $-(d[\cdot\text{NO}]/dt)/d[\cdot\text{NO}]$ (Fig. 3.2.1.1.B) sea menor a mayores $[\cdot\text{NO}]$ permite descartar que la autooxidación del $\cdot\text{NO}$ esté jugando algún rol importante (lo que es de esperar dado que las concentraciones de $\cdot\text{NO}$ son bajas). Sin embargo, estos procesos contribuyen con seguridad a la lenta descomposición del ONOO \cdot durante el almacenamiento prolongado. Una situación diferente se plantea si se añade en cantidades suficientes una sustancia que reacciona con ONOO \cdot , $\cdot\text{NO}$ o $\text{O}_2\cdot^-$. La adición de glicerol y PEGs determinaron una lenta desaparición de ONOO \cdot con acumulación $\cdot\text{NO}$ (Fig. 3.2.2, Panel A, Inserto), proceso que pudo ser resuelto (aislado) cinéticamente del equilibrio rápido en estudio (Fig. 3.2.2.1.A). Estos fenómenos están de acuerdo con reportes anteriores que muestran que varios compuestos con grupos hidroxilo reaccionan con ONOO \cdot en medios fuertemente alcalinos, con la formación de moléculas dadoras de $\cdot\text{NO}$.²⁷²⁻²⁷³ Por un mecanismo distinto, el NBT²⁺ también causa acumulación de $\cdot\text{NO}$: produce la oxidación por un electrón de dos $\text{O}_2\cdot^-$ con la formación del producto de reducción de dos electrones azul de formazán y dos moles de O_2 .²⁷¹ Vale la pena mencionar que no hay evidencia clara de que el $\cdot\text{NO}$ o el $\text{O}_2\cdot^-$ reaccionen con ONOO \cdot , H_2O_2 o NO_2^- en condiciones alcalinas.

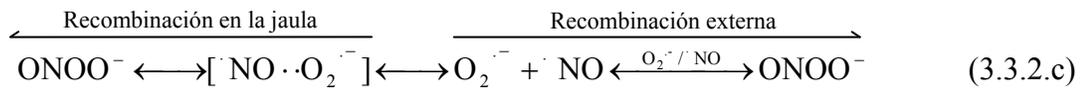
3.3.2. La dependencia de K_{eq} en $[\text{ONOO}^-]_{eq}$ se produce por la dependencia de k_f^{eq} en la distancia. Si la ley de acción de masas se cumpliera, la ec. 3.2.4.a debiera verificarse experimentalmente en el caso particular. En su lugar, nos encontramos con una dependencia no lineal de $([\cdot\text{NO}]_{eq})^2$ en $[\text{ONOO}^-]_{eq}$ (Figura 3.2.4.1.A). El denominado efecto Franck-Rabinowitch

describe el proceso globalmente irreversible de generación de radicales por homólisis y los procesos de recombinación en una forma simple (ec. 3.3.2.a-b):



$$F_C = k_C / (k_C + k_E) \quad (3.3.2.b)$$

Donde F_C es la fracción de radicales que sufre recombinación gemelar dentro de la jaula de solvente. F_C depende de la relación entre la constante de velocidad de recombinación en la jaula (k_C) y la suma de todas las constantes de velocidad de las vías de la competencia, incluyendo el escape de los radicales (k_E). Aplicado esto al sistema que se examina, el modelo puede ser representado de acuerdo con la ec. 3.3.2.c:



La constante de velocidad de disociación efectiva k_r^{ef} puede expresarse como sigue:

$$k_r^{\text{ef}} = k_H(1 - F_C) = k_H - \frac{k_H k_C}{k_C + k_E} \quad (3.3.2.d)$$

De acuerdo con la teoría y con datos experimentales k_r^{ef} (y por tanto, k_H , k_C y k_E) es independiente de la concentración de ONOO^- .¹²⁴ Por tanto, resulta razonable adjudicar cambios en la constante de equilibrio a cambios en k_f . Sin embargo, otros procesos potenciales deben ser

considerados. Particularmente la dimerización de los reactivos dado que podrían ser la causa de desviaciones aparentes de la ley de acción de masas (sobre todo la dimerización de ONOO^-). Las velocidades de descomposición de ONOO^- a pH alcalino en presencia¹²⁴ o ausencia de concentraciones adecuadas de atrapadores de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ depende linealmente de $[\text{ONOO}^-]_0$ (Fig. 3.2.1.1.C) por lo tanto, cualquier grado de dimerización significativa de este anión puede ser desechada. A este respecto, debe aclararse que en una reciente comunicación titulada "Dimeric form of peroxyxynitrite", Simon y Tulub simulan la formación en fase gaseosa de un heterodímero triplete débilmente ligado de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$, pero no la producción de un dímero de moléculas de ONOO^- .²⁷⁴ La dimerización de óxido nítrico puede ocurrir en la fase gaseosa si se estudian concentraciones relativamente altas de $\cdot\text{NO}$,²⁷⁵⁻²⁷⁷ pero las curvas de calibración muestran una dependencia de la señal estrictamente lineal en relación con el $\cdot\text{NO}$ añadido. Por último, a nuestro mejor saber, no hay publicaciones o propuestas que den crédito a la posible dimerización de $\text{O}_2^{\cdot-}$, y además de ocurrir esta debería causar una curvatura positiva de $([\cdot\text{NO}]_{\text{eq}})^2$ vs $[\text{ONOO}^-]_{\text{eq}}$, lo que se diferencia de lo que observamos (Figura 3.2.4.1.A). El alejamiento de condiciones ideales también puede ser considerado como una causa, al menos en parte, del desvío observado de la ley de acción de masas. Esta desviación se aplicaría a la especie más concentrada, ONOO^- . Sin embargo, al tomar como referencia el comportamiento de KNO_3 ,²⁷⁸ se puede estimar que en la concentración más alta utilizada de $[\text{ONOO}^-] = 25 \text{ mM}$ (Fig. 3.2.4.), el coeficiente de actividad podría tener un cambio menor a un 12 % con respecto al límite impuesto por la ley de Henry $\gamma_2 = 1$ cuando la fracción molar del soluto tiende a 0. Además, no se han observado efectos de cambios en la fuerza iónica sobre la constante de velocidad de la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$,³⁸ ni sobre la constante de homólisis de ONOO^- .¹²⁴

Después de haber descartado los factores de confusión antes mencionados llegamos a la conclusión de que la dependencia de la concentración de K_D^{eq} (Figura 3.2.4.A) debe ser la consecuencia de los cambios en k_f^{eq} (Figura 3.2.4.1.B-C). A continuación proponemos una expresión fenomenológica para dar cuenta de la dependencia en la concentración-distancia de K_D^{eq} (ec. 3.3.2.e) y por tanto de $[\cdot\text{NO}]^2$ (ec. 3.3.2.f, Fig. 3.2.4.1.A línea punteada) y k_f^{eq} (ec. 3.3.2.g). La derivación de estas ecuaciones se basa en la ec. 3.2.3.a y en la dependencia propuesta de K_D^{eq} en $1/r_{\text{ONOO}^-}$ (Fig. 3.2.4.1.B).

$$k_f^{eq} = K_A^{eq} k_r^{irr} \quad (3.2.3.a)$$

$$K_D^{eq} = K_D^{[\text{ONOO}^-] \rightarrow 0} + \left(\frac{a}{r_{\text{ONOO}^-}} \right) =$$

$$K_D^{[\text{ONOO}^-] \rightarrow 0} + \left(\frac{a}{(3000/4\pi N_A [\text{ONOO}^-])^{1/3}} \right) = b + \left(\frac{a}{(c/[\text{ONOO}^-])^{1/3}} \right) \quad (3.3.2.e)$$

$$[\text{NO}]^2 = K_D^{eq} \times [\text{ONOO}^-] \quad (3.3.2.f)$$

$$(k_f^{eq})^{-1} = (k_f^{[\text{ONOO}^-] \rightarrow 0})^{-1} + \left(\frac{a}{k_r^{irr} (c/[\text{ONOO}^-])^{1/3}} \right) = \frac{b}{k_r^{irr}} + \left(\frac{a}{k_r^{irr} (c/[\text{ONOO}^-])^{1/3}} \right) \quad (3.3.2.g)$$

En estas expresiones a es equivalente al coeficiente angular de la regresión lineal de K_D^{eq} vs. $1/r_{\text{ONOO}^-}$ (Figura 3.2.4.1.B). Este parámetro es más confiablemente estimado ajustando directamente los datos experimentales de la figura 3.2.4.1.A a las ecuaciones 3.3.2.e-f (línea punteada), lo que da $a = -2.16 \pm 0.1 \times 10^{-18}$ Mcm. Dado que $a < 0$, $k_f^{eq} \geq k_f^{[\text{ONOO}^-] \rightarrow 0}$. La

dependencia observada de K_D^{eq} en la concentración de $ONOO^-$ (Fig. 3.2.4.1) nos ha permitido deducir una serie de valores de k_f^{eq} (válidos en el rango estudiado de $[ONOO^-]_{eq}$), con mínimo y máximo observados de $7.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $21.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Fig. 3.2.4.1.C). Estos resultados pueden explicar las disparidades observadas previamente entre constantes de velocidad obtenidas por fotólisis de destello que tienen como mínimo y máximo reportados $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $20 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.³⁹⁻⁴¹ Es importante destacar que la ec. 3.3.2.g asume que la reacción es completa y únicamente limitada difusión, sin necesidad de implicar ninguna dependencia activacional (es decir en una constante intrínseca). En consecuencia, las ecuaciones 3.3.2.e-g predicen que $K_D^{eq} \rightarrow 0$ y $k_f^{eq} \rightarrow +\infty$ cuando $[ONOO^-] \geq 0,085 \text{ M}$ y $r_{ONOO^-} \leq 1.6 \times 10^{-7} \text{ cm} \approx 4R^*$, esto último es decir 5.5 veces la distancia entre los átomos de N y O el heterodímero triplete $[O=^3N^{\cdot\cdot\cdot}O=O^{\cdot}]_{\text{fase gaseosa}}$ propuesto por Simon y cols.²⁷⁴ Proponemos que el aumento observado en K_A^{eq} con la concentración de $ONOO^-$ y con la concomitante disminución en las distancias, se debe a la acción conjunta de la correlación espacio-temporal (que crea un orden dinámico de reactivos) y de “efectos de muchos cuerpos” sobre las recombinaciones no gemelares de radicales (es decir, reacciones que involucran al menos a un radical que proviene libre de la solución), efectos que crecen con la densidad de partículas.

3.3.3. La dependencia de k_f^{eq} en $[ONOO^-]_{eq}$ revela la razón de las discrepancias entre las constantes de velocidad de reacción obtenidas por fotólisis de destello láser. Nuestro objetivo final es entender mejor el mecanismo cinético de la formación de $ONOO^-$ a partir de $^{\cdot}NO$ y $O_2^{\cdot-}$ en solución acuosa y si es posible extraer conclusiones generales sobre las reacciones reversibles controladas por difusión. Resultados anteriores³⁹⁻⁴¹ por fotólisis de destello láser y los experimentos que aquí reportamos de equilibrio (Fig. 3.2.4.1) han demostrado una notable

coincidencia con respecto al rango observado de las constantes de velocidad de formación de ONOO^- ($6.7 \leq k_f^{\text{irr}} \leq 20 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ³⁹⁻⁴¹ frente a $7.5 \leq k_f^{\text{eq}} \leq 2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 3.3.4.1.A). Por lo tanto, es muy probable que las variaciones observadas en k_f^{irr} y k_f^{eq} realmente tengan la misma causa: la dependencia de k_f en la distancia entre los reactivos. A nuestro entender, el curso temporal de una reacción controlada por difusión puede ser analizada considerándola dividida en al menos 4 estadios. Su curso más temprano y cuando se aproxima al equilibrio son dos etapas que han recibido mucha atención, tanto desde el punto de vista teórico como experimental,^{179,279} ya que el descubrimiento en ellas de dinámicas no exponenciales se considera diagnóstico del control difusional. La ecuación de Smoluchowski para la constante de velocidad dependiente del tiempo (ec. 3.3.3.a)²⁸⁰

$$k_f^{\text{Smol}}(t) = k_f^{\text{Smol}} \left[1 + \frac{R^*}{\left(\pi (D_{\text{NO}} + D_{\text{O}_2^-}) t \right)^{1/2}} \right] \quad (3.3.3.a)$$

utiliza las simplificaciones del blanco molecular estático y de pseudo-primer orden, dejando de lado la posibilidad de una reacción posterior de los productos en el sentido inverso, para considerar los cambios en la concentración del reactivo en exceso al inicio de reacción de controlada por difusión en condiciones irreversibles. Estas simplificaciones siguen siendo aparentemente útiles fuera del régimen de pseudo-primer orden.²⁸¹⁻²⁸³ Consideremos ahora, la otra etapa señalada, la aproximación al equilibrio de una reacción controlada por difusión en la que el flujo en un sentido y el otro es prácticamente el mismo. De acuerdo con la teoría de Zeldovich-Ovchinnikov-Oshanin-Burlatzky (ZOOB)^{264-265,284-289} la dinámica de las reacciones en equilibrio, está dominada por cambios fluctuacionales, y, en consecuencia, el regreso después de

una pequeña perturbación o el progreso hacia la concentración de equilibrio del reactivo B (B_{∞}) debería estar de acuerdo con la ec. 3.2.16:

$$B(t) = B(\infty) - \frac{\alpha}{(D^{3/2} t^{3/2})} \quad (3.3.3.b)$$

Las etapas finales e intermedias de la reacción controlada por difusión entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ han sido estudiadas en este y en trabajos anteriores.³⁹⁻⁴¹ Los resultados obtenidos en la etapa de equilibrio en este trabajo están de acuerdo con la predicción de constantes de velocidad dependientes de la distancia de la teoría de ZOOB.²⁸⁸⁻²⁸⁹ La mayoría de las predicciones de la teoría de ZOOB y de otras teorías analíticas han sido probadas contra simulaciones numéricas y reacciones de estados excitados.²⁹⁰⁻²⁹¹ En este trabajo, demostramos que la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ en sus estados fundamentales está en las condiciones estudiadas estrictamente controlada por difusión y que el cambio de concentración de ONOO^- deja al descubierto las desviaciones de la ley de acción de masas (Figura 3.2.4.1), lo que confirma por primera vez experimentalmente una de las predicciones clave de la teoría de ZOOB, a saber, que una amplia gama de constantes macroscópicas de velocidad de avance deben ser observadas en una reacción reversible controlada por difusión en el equilibrio si la distancia promedio entre los reactivos es modificada. De esta manera, la difícil tarea de separar parámetros dependientes de tiempo y espacio es completamente eludida. Otras predicciones de la teoría de ZOOB que confirmamos incluye la dependencia de orden cero de K_A en la viscosidad (Figura 3.2.2.1.A). Hemos observado que la etapa intermedia de la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ estudiada por fotólisis destello láser de soluciones alcalinas de ONOO^- puede ser adecuadamente descrita en términos de

aproximaciones campo medio, es decir de cinéticas exponenciales (Fig. 3.2.3.1, Inserto). La etapa intermedia de las reacciones controladas por difusión con frecuencia se supone que se produce después del establecimiento de gradientes de concentración estacionarios y obedecen a la ecuación de estado estacionario de Smoluchowski (ec. 3.2.15). Dado que algunas constantes de velocidad ya informadas,⁴⁰⁻⁴¹ así como las aportadas por nuestros estudios en condiciones irreversibles superan este límite clásico, la ecuación de Smoluchowski claramente falla al no tener en cuenta los efectos confirmados en este trabajo, básicamente la dependencia de la distancia promedio entre reactivos generados por homólisis en un mismo sitio y las interacciones de estos con reactivos que provienen de otros sitios de generación. Estos hechos son más importantes en condiciones de equilibrio y menos en condiciones alejadas del equilibrio, siendo para estas últimas condiciones para las que la teoría de Smoluchowski ha sido propuesta. Por otra parte, la dependencia de la constante de velocidad observada en la temperatura no sigue la tendencia mostrada por la ecuación de Smoluchowski de estado estacionario (Fig. 3.2.3). En conjunto, los estudios de fotólisis de destello láser de la etapa intermedia y los resultados de la etapa final de equilibrio sugieren que aunque no se puedan identificar dinámicas no exponenciales, se podría demostrar que los cursos temporales reflejan el control por la difusión si existen diferencias sistemáticas significativas entre las constantes de velocidad observadas cuando se varía de alguna forma la concentración de los reactivos.

3.3.4. Comentarios sobre la energía de activación negativa observada en la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot$ en condiciones de equilibrio químico. Un comportamiento distinto al previsto por la ecuación de Arrhenius con un valor negativo de energía de activación ($E_a = -40 \pm 6 \text{ kJ mol}^{-1}$) resultó de los experimentos realizados bajo condiciones de equilibrio y concentración constante

de ONOO⁻ (Fig. 3.2.3.1, línea gruesa). Este resultado puede indicar que la reacción es inactivada térmicamente. Energías de activación negativa han encontrado varias explicaciones en la literatura, si los valores son pequeños, se los ha tomado como evidencia de termoneutralidad (la activación térmica es innecesaria). Si la reacción puede ser cinéticamente descompuesta en más de un paso,



la explicación más común para una energía de activación significativamente negativa requiere que: i) un rápido equilibrio sea seguido por un paso de energía de activación baja (a este último suele denominársele paso sin barreras), y si eso se cumple, ii) más rápida será la descomposición de los intermedios en los reactivos a mayor temperatura si y solo si k_{AB} se caracteriza por una E_a tal que es la más alta de las tres.²⁹²⁻²⁹³ En particular, esto se ha propuesto para explicar la energía de activación negativa de una variedad amplia de reacciones de radicales que se producen en la fase gaseosa,^{292,294-297} incluyendo la oxidación de [•]NO por dioxígeno (O₂).^{293,298} También se han observado energías de activación negativas en algunas de las reacciones de condensación que tienen lugar en fases condensadas orgánicas.²⁹⁹⁻³⁰⁰ Ejemplos bien documentados de energías de activación negativas en reacciones bimoleculares en medio acuoso son escasos, y en su mayoría implican estados supercríticos del solvente.³⁰¹ La existencia de un intermediario en la reacción entre [•]NO y O₂[•] para producir ONOO⁻ debe ser investigada, tanto por simulaciones de dinámica molecular como en forma experimental. En nuestra opinión, la existencia de un intermedio covalente puede ser desechada. La formación de un par de contacto en una jaula de solvente puede ser considerado como un paso necesario para que tenga lugar la reacción, y como punto de

partida, el trabajo de Simon y Tulub identifica en fase gaseosa un mínimo relativo de energía potencial asociado a la constitución de un complejo $[O=^3N^{\bullet} \cdots ^3O=O^{\bullet}]$.²⁷⁴ La teoría de ZOOB no hace ninguna declaración explícita sobre los parámetros de activación macroscópicos aparentes que deben presentar las constantes de avance de reacciones bimoleculares controladas por difusión en el equilibrio. La relajación incompleta debida a la continua generación de reactivos altamente correlacionados ha sido sugerida arriba como una causa de orden en el sistema en equilibrio químico, de acuerdo con la teoría de ZOOB.^{264-265,284-289} Un aumento de la temperatura podría causar un aumento en los efectos anticorrelacionantes de la difusión, aumentando la constante de relajación dependiente de la fluctuación (lo que se podría entender como ruido o error), aumentando por lo tanto la distancia promedio entre los reactivos. De hecho, el rango de valores de constantes de velocidad de avance que se observaron en función de la temperatura ($7.0-40.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ver Fig. 3.2.3.1) incluye toda la gama de valores obtenidos al cambiar la concentración de $ONOO^-$ ($7.5-21.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Fig. 3.2.4.1).

3.3.5. Comentarios Finales. El presente estudio podría contribuir a la mejor comprensión de la cinética y la termodinámica de la reacción controlada por difusión de $\bullet NO$ y $O_2^{\bullet -}$ para formar $ONOO^-$. Vale la pena mencionar dos limitaciones experimentales de este estudio, que sería deseable abatir en futuros estudios: una es depender de una sola técnica para medir la concentración de $\bullet NO$ en equilibrio con $ONOO^-$, y la otra es la falta de una evaluación directa de la concentración de $O_2^{\bullet -}$. Es difícil imaginar alguna forma alternativa de medir $\bullet NO$ o alguna forma de medir $O_2^{\bullet -}$ con la suficiente sensibilidad y precisión en presencia de un gran exceso (necesario) de $ONOO^-$ en condiciones altamente alcalinas (necesarias para estabilizar al $ONOO^-$). En otros aspectos, información adicional acerca de este sistema de reacción-difusión sin duda

se podría obtener de experimentos en condiciones irreversibles usando técnicas ultrarrápidas como la espectroscopia UV e IR de pulso de bombeo-sonda con resolución temporal de femto-picosegundo.³⁰²⁻³⁰³ Otros experimentos probablemente informativos puede resultar si se aplican métodos de polarización dinámica de spin nuclear químicamente inducida (CIDNP) y foto-CIDNP³⁰⁴⁻³⁰⁵ al estudio del problema del balance entre recombinaciones en la caja de solvente entre pares de radicales gemelos y recombinaciones de radicales libres en la solución en muestras alcalinas de ONOO⁻.

El tipo de reacción en estudio ($A + B \rightleftharpoons C$, con $[A] = [B]$ y k_f controlada por difusión) ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista teórico. En general, el descubrimiento de una dependencia en la distancia de la constante de velocidad entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ para formar ONOO⁻ en el equilibrio químico es a nuestro saber un resultado sin precedentes en el campo experimental de las reacciones reversibles controladas por difusión, confirmando predicciones teóricas del comportamiento de este tipo de reacciones entre reactivos en estado basal.²⁸⁸⁻²⁸⁹ Esta confirmación sobre el estado "final" macroscópico de un sistema dominado por una reacción reversible controlada por difusión puede impactar en las teorías de la cinética rápida de reacciones reversibles influenciadas por la difusión entre reactivos excitados.³⁰⁶ Nuestros resultados indican que la información sobre parámetros termodinámicos para la reacción en estudio,^{109-110,124,187-189,307} que asumen la validez de la ley de acción de masas, debe ser revisada y la dependencia en la distancia y la concentración deben ser reconocidas. En cuanto a los datos cinéticos, nuestros resultados (Figura 3.2.4.1.C, ec. 3.3.2.e-g) apoyan una constante dependiente de la distancia y controlada por la difusión para la formación de ONOO⁻ a partir de $\text{O}_2\cdot^-$ y $\cdot\text{NO}$, de modo que en solución acuosa diluida en condiciones de equilibrio a 310 K, $k_f \geq 7.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

1.

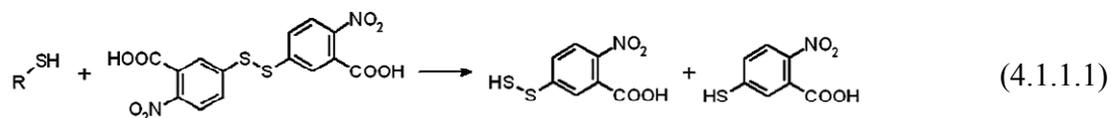
4. Modulación redox alostérica del transporte de ligandos del Sitio de Sudlow I .

El objetivo de este estudio es obtener una mejor comprensión de los mecanismos de alostéricos de la HSA, en particular del acoplamiento que se ha propuesto que existe entre el sitio de tiol libre y el sitio de unión de Sudlow I. Para eso **(4.2.1)** sintetizamos y purificamos isoformas redox de la HSA y estudiamos: **(4.2.2)** la modulación alostérica por unión de H⁺ y Ca²⁺ de la reactividad de disulfuros sintéticos con la Cys34 y de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I; **(4.2.3)** la modulación alostérica de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I dependiente del estado redox de la Cys34; **(4.2.4)** la modulación de la cristalizabilidad de la HSA por Ca²⁺ y el estado redox de la Cys34; **(4.2.5)** estudiamos la cristalizabilidad de la HSA en presencia de Ca²⁺ y los efectos del estado redox de la Cys34; **(4.2.6)** co-cristalizamos, resolvimos la estructura y refinamos el modelo de la HSA con seis iones cloruro; **(4.2.7)** realizamos estudios de comparación conformacional que toman en cuenta la incertidumbre posicional de los modelos cristalográficos; **(4.2.8)** desarrollamos y comenzamos a validar un nuevo método de comparación de factores B de modelos cristalográficos; y **(4.2.9)** utilizamos la información contenida en los factores B para evidenciar rutas de comunicación alostérica y proponer un mecanismo alostérico más detallado.

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Preparaciones de HSA. Preparaciones para uso clínico de HSA al 25% (peso/volumen) elaboradas por ZBL Bioplasma AG (Switzerland) obtenidas a partir de la fracción V del suero humano fueron empleadas como materia prima. Estas preparaciones se utilizan en la clínica para la expansión y el mantenimiento del volumen circulatorio,

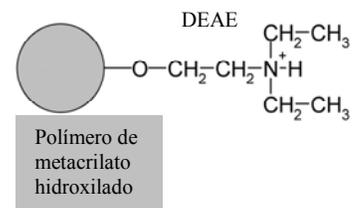
componiéndose de una mezcla compleja de isoformas de la HSA. Esta mezcla contiene menos de 0.20 moles de tiol por mol de HSA evaluados por el método de DTNB²⁻ (ec. 4.1.1.1).



Comparada con similares presentaciones de otros laboratorios (Octapharma AG, Switzwerland), la HSA usada tenía menor proporción de isoformas redox oxidadas irreversiblemente. También se usó como indicador de calidad aquellas preparaciones que mostraron un punto isoeléctrico para la forma nativa reducida no menor a 4.7 (el pI reportado para la HSA es de 4.85-4.90.^{190,308} Además, las preparaciones para uso clínico de HSA contienen 0.02 M de caprilato de sodio y 0.02 M de N-acetil-triptofanato de sodio como estabilizadores. Por lo tanto, para la preparación de HSA reducida pura sometimos el material inicial al siguiente procedimiento. La preparación de partida fue deslipidada utilizando el procedimiento reportado por Chen,³⁰⁹ el cual asegura la remoción de ligandos hidrofóbicos, los que no puedan ser removidos por diálisis o ultrafiltración. Luego la muestra se dializó contra agua (500 volúmenes de agua por unidad de volumen HSA, con agitación constante) durante una hora (a temperatura ambiente) y nuevamente por 16 hs (a 6 ° C). Después de la diálisis, la proteína fue objeto de reducción mediante incubación a 6 ° C durante la noche con β-mercaptoetanol 10 mM, en tampón fosfato 50 mM pH 7,0. Esto produce una mezcla de isoformas enriquecida en HSA-SH. Las preparaciones que usamos contenían en esta etapa 0.7 moles de tiol/mol de HSA. Sin embargo, recientemente pudimos analizar la reducibilidad (la fracción de HSA con modificaciones reversibles de la Cys34) y el pI de HSA en solución de otra fuente comercial, estableciendo que estas preparaciones hubieran sido más adecuadas (pI = 4.9 y 0.95 tioles/mol de HSA luego de la reducción con β-ME). Inmediatamente

después de la reducción, las muestras fueron desalinizadas y purificadas por exclusión molecular usando una columna comercial Hi-Trap (General Electric) y acetato de amonio/ácido acético 10 mM pH 5,35 como fase móvil (fase móvil A). A este pH las muestras fueron congeladas (-80 °) y conservadas durante menos de dos meses. La HSA reducida (HSA-SH) fue purificada a partir de estas muestras por cromatoenfoco con gradiente externo de pH usando una columna preparativa (50 mL de cama) en la que empaquetamos una matriz de intercambio aniónico suave DEAE (dietil-amino etilo) de alta resolución (TSKgel DEAE-5PW, partículas de 20 µm de diámetro, TOSOH Bioscience LLC). Se inyectaron 200 mg de HSA. La HSA-SH (mercaptoalbúmina) eluye en un gradiente lineal de pH (0 - 15% de B, B = acetato de amonio/ácido acético 10 mM pH 3,95) a pH = 4,7 debido exclusivamente al cambio de su carga (los grupos DEAE tienen un pKa = 11.5 según información del productor). La HSA-SH se almacenó congelada (-80 °C) para ser utilizada en un plazo de 2 meses. Este procedimiento de cromatografía separa eficazmente HSA-SH de las isoformas de la HSA que carecen del residuo Asp amino terminal (pI aparente = 4,85) y de la isoforma oxidada por 4 e⁻, HSA-SO₂⁻ (pI aparente = 4.63), pero no resuelve HSA-SH nativa de isoformas oxidadas por dos electrones (HSA-SSR, disulfuro mixto; y HSA-SOH, grupo tiolato oxidado a grupo sulfenato). Para cuantificar de manera inequívoca la fracción de HSA presente como HSA-SH en estas muestras de alta pureza se analizaron alícuotas pequeñas de una muestra sin modificar y otra alícuota previamente incubada durante 1 min con un pequeño exceso de HgCl₂ (1.2 moles de HgCl₂ por mol de HSA, con HSA 0.5-1 mM, luego del agregado de buffer TRIS pH 8.0 10 mM). En estos análisis se empleó el mismo gradiente externo de pH pero se inyectaron cantidades relativamente pequeñas de proteína (50-100 ug) en una columna analítica pre-empacada con

Esquema 4.1.1.1

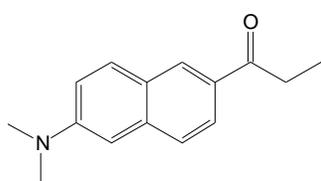


los mismos grupos funcionales (TOSOH Bioscience). Un mol de Hg^{2+} por mol de HSA-SH se une fuerte y específicamente al grupo tiolato, por lo tanto, la HSA-SH, pero no otras isoformas, sufre un cambio significativo en el pI (pI aparente = 5,0), lo que permite diferenciarla de la isoforma HSA-SOH y HSA-SSR (pI aparente \simeq 4,7) y HSA Δ Asp1 (pI = 4.85). Basado en este análisis, las muestras de HSA-SH eran típicamente 98% puras. Estas preparaciones son desde ahora denominadas HSA-SH pura. La isoforma HSA-SO₂⁻ fue parada por la incubación de HSA-SH pura 2 mM con 5 mM H₂O₂ durante dos horas a pH 7,4 y temperatura ambiente, y luego fue desalinizada y purificada por cromatografía con gradiente externo preparativo. Sobre la base de los cromatogramas la pureza de estas muestras es mejor que el 98%, y que no contienen restos de tioles titulables con DTNB²⁻. Todas las isoformas redox de la HSA purificadas se cuantificaron usando el coeficiente de extinción molecular reportado para HSA ($\epsilon_{279 \text{ nm}} = 23700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

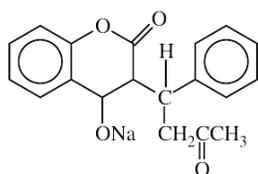
4.1.2. Estudios de cinética por espectrofotometría de flujo detenido. Las mediciones de flujo detenido se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro SF.17MV de Applied Photophysics (Leatherhead, England), con un tiempo de mezclado de 1ms y un camino óptico de 1 cm. Volúmenes iguales de soluciones de HSA-SH, típicamente 20 μM (10 μM luego del mezclado) ; y del disulfuro, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato (2-)) (DTNB^{2-}) ó 4,4'-Ditiodipiridina (DTDPy) en tampón Tris ó Hepes 50 mM pH 6-9 de fuerza iónica constante ($I = 0.15$) con o sin CaCl_2 . En la mayoría de las corridas se empleó una concentración final -luego del mezclado- de 2.4 mM, en un set de experimentos se varió la concentración de Ca^{2+} entre 0.5 y 10 mM. Las soluciones que se mezclaron para iniciar la reacción fueron preparadas inmediatamente antes del mezclado por diluciones adecuadas de soluciones madre realizadas directamente en la jeringa. Se permitió un tiempo mínimo de 2 min para que se alcanzase el equilibrio en la jeringa (nos preocupaba principalmente la unión de Ca^{2+} a la proteína). Con este tiempo de equilibrio a 37 °C se obtuvieron resultados reproducibles. La aparición de los productos coloreados de la reducción de los disulfuros 5-tionitro benzoato (2-) (TNB^{2-}) y 4-tiopiridina (TPy) fue seguida por espectrofotometría a 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y a 324 nm ($\epsilon = 21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente.³¹⁰

4.1.3. Experimentos de fluorescencia. Los experimentos de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Cary Eclipse, equipado con un bloque de ajuste de la celda termostaticado por efecto-Peltier con intercambiador de calor de agua. Empleamos Prodan (6-propionilo-2-dimetilamino naftaleno) como sonda fluorescente específica para el sitio de unión de Sudlow I.^{236,241} En este trabajo, algunas propiedades relevantes de Prodan han sido debidamente

Esquema 4.1.3.1



Prodan



Warfarina Sódica

contempladas: 1) una vez unido a la HSA, puede aceptar energía a partir del residuo Trp214 excitado a través de la transferencia de energía de resonancia (RET, Resonance Energy Transfer); 2), sin embargo, la excitación directa de las formas unida y libre del Prodan también tiene lugar con un rendimiento que depende de la longitud de onda de excitación; 3) según lo descrito por Weber, Prodan unido a la albúmina es objeto de un entorno de baja polaridad y emite desde un estado excitado localmente excitado (LE, “locally excited”) con un λ de emisión máximo ($^{em}\lambda_{max}$) característico cerca de 445 nm;²³⁶ 4) la forma monomérica libre en solución acuosa de Prodan emite desde un estado de transferencia de carga interna (ICT, internal charge transfer) con $^{em}\lambda_{max}$ a mayores longitudes de onda, cerca de 525 nm); 5) su solubilidad en agua es cerca de 5 μ M;²³⁶ 6) el Prodan dimeriza en condiciones de sobresaturación, causando cambios en $^{em}\lambda_{max}$ y en el rendimiento de fluorescencia;³¹¹ 7) la solubilidad del Prodan dependerá de la fuerza iónica y la temperatura de trabajo; 8) y por último el rendimiento de fluorescencia del Prodan se puede potenciar o apagar por varios compuestos³¹²⁻³¹³. La transferencia de energía de resonancia de Trp214 a Prodan ha sido utilizado previamente para monitorear los cambios conformacionales en HSA,^{244,314} para medir distancias Trp 214-sitio de unión³¹⁵ y para estudiar la dinámica de hidratación de la HSA.²⁴³ Para el propósito de estudiar el alosterismo, también hay que considerar que los cambios no conformacionales, siendo alostéricos o no, pueden manifestarse, interferir y/o ser causa de confusión. Además, teniendo en cuenta su baja solubilidad en agua y su constante de afinidad moderada, es particularmente importante definir si la ocupación del sitio de unión de Sudlow I

por Prodan cambia o se mantiene constante al variar las condiciones experimentales, ya que cambios en la ocupación pueden simular cambios en la distancia aparente entre donantes y aceptadores de energía. Afortunadamente esto puede ser fácilmente controlado mediante la realización de experimentos de doble excitación, dos espectros de emisión de la misma muestra se registraron según la longitud de onda de excitación apropiada para el donante en un caso y con una longitud de onda selectiva para el aceptor en el otro (en nuestro caso, las longitudes de onda fueron 295 nm y 360 nm, respectivamente). Además, se puede realizar experimentos separados para tratar de distinguir los cambios en la eficiencia de RET y cambios en la constante de afinidad. También hay que destacar que un cambio en la constante de afinidad puede ser causado por un cambio en la conformación o no, y que un cambio conformacional se puede expresar en forma de cambios en las constantes de afinidad y/o distancias entre aceptor y donante, o pueden pasar desapercibidos. En cualquier caso, los diversos efectos posibles sobre la fluorescencia del Prodan en estado localmente excitado (FLE) puede ser modelada como una combinación lineal de los factores independientes. Las ecuaciones de mayor utilidad práctica en el estudio por RET de propiedades e interacciones moleculares son las que detallamos a continuación:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (4.1.3.1)$$

La ecuación 4.1.3.1 establece la dependencia de la constante de velocidad de transferencia de energía resonante en el inverso del tiempo de vida del fluoróforo dador excitado en ausencia del aceptor y en la sexta potencia del cociente entre la distancia de Förster (R_0) y la distancia efectiva (r) que separa a dador y aceptor. Si $r = R_0$, la constante de transferencia es igual a la constante de

desactivación del fluoróforo dador excitado en ausencia del aceptor, y por tanto la intensidad de fluorescencia del dador cae a la mitad.

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda) \quad (4.1.3.2)$$

La ecuación 4.1.3.2 expresa una de las afirmaciones principales de la teoría de la transferencia de energía resonante desarrollada por Förster, estableciendo que R_0 se puede calcular a partir de constantes físicas y propiedades ópticas, espectroscópicas y geométricas del sistema de fluoróforos entorno-dador-aceptor, de modo que se cumple la siguiente relación:

$$R_0(\text{Å}) = 9.78 \times 10^3 (\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad (4.1.3.3)$$

Donde κ^2 es el factor orientación, que relaciona geoméricamente la orientación de los vectores momentos dipolares del fluoróforo excitado y del aceptor en estado basal; n es el índice de refracción del entorno (en solución acuosa diluida se toma el del agua); Q_D es la eficiencia cuántica del dador (se puede establecer por comparación con estándares) y $J(\lambda)$ es la integral de solapamiento espectral (se calcula determinando previamente el espectro de emisión del dador normalizado con la emisión máxima igual a 1 y el espectro de absorción del aceptor en concentración 1 M y con un paso óptico de 1 cm.³¹⁶ Desde el punto de vista práctico, en general hay otras dos ecuaciones muy importantes,

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (4.1.3.4)$$

Dado que F_D y F_{DA} (la fluorescencia del dador en ausencia y presencia del aceptor) y R_0 se determinan experimentalmente, la ecuación H6 deja solo una incógnita, r . En general, esta ecuación puede ser engañosa, siendo preferible la ecuación H7. La eficiencia de la transferencia E depende también de la fracción de aceptor efectivamente disponible para la misma, es decir del grado de ocupación o marcado del sitio del aceptor.³¹⁶

$$E = 1 - \frac{F_{DA} - F_D(1 - f_A)}{F_D f_A} = \left(1 - \frac{F_{DA}}{F_D}\right) \frac{1}{f_A} = \left(\frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}\right) \frac{1}{f_A} \quad (4.1.3.5)$$

En nuestro caso la variable f_A es la fracción de los sitios de Sudlow I disponibles ocupados con Prodan, lo que se puede calcular conociendo la constante de equilibrio correspondiente en las condiciones específicas que quieran ser evaluadas y las concentraciones totales de HSA y Prodan.

4.1.4. Cristalización de HSA. Se empleó el método de difusión de vapor con gota colgante en los ensayos manuales y con gota sentada en los ensayos robóticos. La cristalización inicial de HSA-SH se logró esencialmente según lo reportado por Sugio et al. utilizando preparados parcialmente purificados de HSA-SH (HSA comercial delipidada, dializada y reducida). Los cristales cultivados inicialmente fueron seleccionados para los experimentos de micro-siembra con bigotes de gato. Se probaron varias condiciones para la optimización. Las muestras cristalinas de HSA-SH que mejor difractaron se cultivaron mezclando 2 μL de HSA-SH 50 - 120 mg mL^{-1} en tampón fosfato Na^+/H^+ 50 mM pH 7,5 y 50 a 100 mM de NaCl con 2 μl de la solución de cristalización: 25% PEG 3350, tampón fosfato Na^+/H^+ 50 mM pH 7,5 y 50 a 100 mM NaCl. Las gotas colgantes se dejaron equilibrar durante la noche y después de eso, se realizaron las microsiembras. La cristalización de $\text{HSA-SH-(Ca}^{2+})_n$ se intentó mediante la preparación de una placa de 96 pozos profundos con condiciones de cristalización similares a los utilizados para la HSA-SH, pero cambiando el tampón fosfato a tampones Tris y Hepes e introduciendo variaciones en el pH (7-9) y concentraciones de Ca^{2+} (1-10 mM). Se realizaron micro gotas de 300 nL volumen inicial total usando un estación robótica Honeybee963® (Digilab). Se realizaron ensayos de cristalización de la isoforma HSA-SO_2^- manuales y robóticos (HSA-SO_2^- 120 mg mL^{-1}) en condiciones similares a aquellas en que cristaliza la isoforma reducida y también usando soluciones comerciales de barrido de condiciones de cristalización³¹⁷⁻
³¹⁸ NeXtal DWBlock AmSO4 Suite, NeXtal DWBlock JCSG Core Suite II, NeXtal DWBlock JCSG Core Suite III de © Qiagen.

4.1.5. Crioprotección y enfriamiento rápido de cristales de HSA-SH. Frente a la falla de los procedimientos estándar, la criopreservación efectiva de los cristales de HSA fue realizada mediante un método de equilibrio de la presión de vapor de agua revisado por Garman y Owen.³¹⁹ Este método evita el choque osmótico a los cristales, brindando la posibilidad de una lenta deshidratación de los cristales de modo que la presión osmótica final es igual a la de la solución de crioprotección. Brevemente, se seleccionaron gotas colgantes con cristales de tamaño adecuado, el cubreobjetos con la gota se transfirió del pocillo original a un nuevo pocillo conteniendo 1 ml del licor madre con la solución de criopreservación a ensayar. Se permitió que el sistema alcanzara el equilibrio durante uno o dos días. Durante este período, se pudo observar la disminución del volumen de la gota. Los cristales pueden luego ser directamente remojados en la solución de criopreservación subyacente para ser congelados o, alternativamente, la gota puede ser transferida sucesivamente a nuevos reservorios con soluciones de criopreservación más concentradas (5-10 ciclos). Siguiendo esta técnica, se probaron soluciones conteniendo de 4 a 30% de glicerol como crioprotector. La solución de criopreservación que finalmente resulto en mejor difracción consistió en el 27.5% PEG 3350, 50 mM Na⁺/H⁺ tampón fosfato pH 7.5, 50-100 mM NaCl y 4-5% glicerol. Los cristales así crioprotegidos fueron sobreenfriados rápidamente, usando N₂ líquido o gaseoso a 100 o 108 K.

4.1.6. Estudios de difracción de rayos X. Todas las etapas del proceso (la colecta y procesamiento de datos de difracción de rayos X; la solución de la estructura; la construcción, validación y el refinamiento del modelo) se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar. Los experimentos de difracción de cristales individuales se realizaron en dos laboratorios: la Unidad de Cristalografía de Proteínas de (Institut Pasteur de Montevideo) usando un generador de rayos X con ánodo rotatorio de cobre (Micromax007-HF®, Rigaku), utilizando una pieza óptica de espejos multicapa (Varimax-HF®, Rigaku) y un detector de placa de imagen (Mar345dtb®, Mar Research); y en la línea de luz X26C del sincrotron NSLS (Brookhaven National Laboratory, USA), durante el curso Rapidata 2009 (Robert Sweet & colaboradores; http://www.px.nsls.bnl.gov/courses/rr_course/).

Se usaron principalmente los programas del paquete CCP4,³²⁰ brevemente: iMosflm³²¹ y Scala³²² fueron empleados para el procesamiento de datos; Amore³²³ se utilizó para la búsqueda de las fases iniciales por RM, se introdujo ruido blanco en el modelo de partida mediante el programa de pdbset y se empleó REFMAC³²⁴ para la solución de la estructura y el refinamiento del modelo. El programa Coot se utilizó para completar el modelo, su ajuste a la densidad electrónica y su validación.³²⁵ La definición de grupos de traslación, libración y tornillo (TLS, translation, libration and screw) se realizó de acuerdo a varias estrategias, dos de ellas implicaron el análisis estructural de los modelos cristalográficos disponibles HSA mediante el programa de ESCET (ver adelante sección de resultados) y de acuerdo con el servidor TLS Motion Determination (TLSMD).³²⁶⁻³²⁷

4.1.7. Superposición estructural y clasificación de modelos de HSA tomados del banco de datos Protein Data Bank. Al momento de iniciar nuestros estudios cristalográficos (julio de 2007) existían 50 modelos de HSA depositados en el Protein Data Bank (PDB). Se puede realizar una comparación rápida y precisa de dichos modelos en distintos estados funcionales (formas apo y con ligandos de diversa índole) si se analiza los RMSD (del inglés root mean square deviation), que es la raíz cuadrada del cociente resultante de dividir la sumatoria de los cuadrados de las diferencias de posición δ_i^2 respecto de un modelo de referencia comparando átomos equivalentes del esqueleto principal de cada modelo entre N , el número de átomos considerado (ec. 4.1.7.1).

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} \delta_i^2} \quad (4.1.7.1)$$

Para ello se utilizó la herramienta en red del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmserver>) de superposición espacial de modelos que usa un algoritmo que reconoce coincidencias de estructuras secundarias (SSM, Secondary Structure Matching) para guiar la identificación de residuos equivalentes. Como modelos de referencia usamos un modelo consenso (el que se construye por promediado de todas las posiciones atómicas a comparar a partir de todos los modelos) y de un modelo específico 1AO6, el que se ha elegido por ser el aceptado como descripción más adecuada de cristales de la forma apo de la HSA a temperatura ambiente.

4.1.8. Análisis de coordenadas atómicas. Los análisis de coordenadas atómicas posteriores a la clasificación de los modelos se realizaron utilizando los programas PyMOL v0.99 (PyMOL^(TM) Incentive Product - Copyright (C) 2006 DeLano Scientific LLC) y ESCET Version 0.7 (Thomas R. Schneider).³²⁸⁻³³⁰ ESCET es una herramienta de comparación y evaluación de estructuras con consideración de errores que utiliza el modelo predictivo de Cruickshank sobre la incertidumbre en las coordenadas de los modelos cristalográficos (Ec. 4.1.8.1-2), y en particular la aproximación lineal a la dependencia de la incertidumbre de las coordenadas atómicas en los factores B atómicos (ec. 4.1.8.3), válida para modelos que resultan del refinamiento con contenciones:³³¹⁻³³²

$$\sigma_{(r,j)}^{DPI} = 3^{1/2} (N_i / n_{\text{obs}})^{1/2} \left[\frac{a_2 (B_j)^2 + a_1 B_j + a_0}{a_2 (B_{\text{avg}})^2 + a_1 B_{\text{avg}} + a_0} \right] C^{-1/3} R_{\text{free}} d_{\text{min}} \quad (4.1.8.1)$$

$$\sigma_{r,B_{\text{avg}}}^{DPI} = 3^{1/2} \sigma_x^{DPI} = \mathbf{3}^{1/2} (N_i / n_{\text{obs}})^{1/2} C^{-1/3} R_{\text{free}} d_{\text{min}} \quad (4.1.8.2)$$

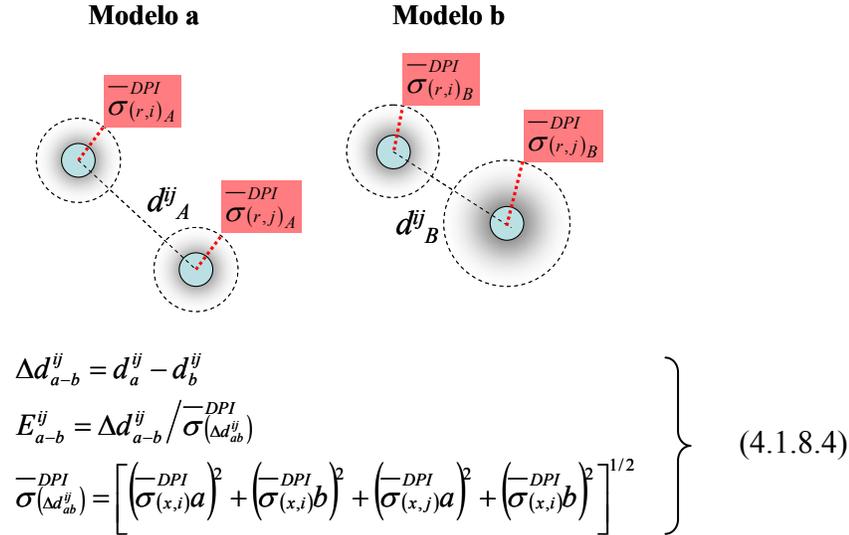
$$\bar{\sigma}_{(r,j)}^{DPI} \cong 3^{1/2} (N_i / n_{\text{obs}})^{1/2} \left(\frac{B_j}{B_{\text{avg}}} \right) C^{-1/3} R_{\text{free}} d_{\text{min}} \quad (4.1.8.3)$$

Donde $\sigma_{(r,j)}^{DPI}$ es el error o incertidumbre estándar posicional de cualquier átomo j del modelo. Los términos a_2 , a_1 y a_0 son típicamente desconocidos pero se han obtenido por modelado y ajuste del error posicional estándar en función de los valores de B luego de la inversión de la matriz completa de residuales finales del refinamiento. Así, $\sigma_{(r,B_{\text{avg}})}^{DPI}$ es el error estándar posicional de cualquier átomo del modelo que posea un factor B atómico (B_j) igual al factor B promedio (B_{avg}), caso en el cual el término entre paréntesis recto en la ecuación 4.1.8.1 adopta exactamente el valor de 1. $\bar{\sigma}_{(r,j)}^{DPI}$ es el error estándar posicional de cualquier átomo

asumiendo que $a_1 B_j \gg (a_2 (B_j)^2 + a_0)$, lo que se cumple aproximadamente en el caso de modelos refinados con uso de contenciones (restrains) de distancia y ángulos) previos (librerías de contenciones derivadas de estructuras resueltas con alta precisión).³³¹⁻³³² Es importante aclarar que en todas estas ecuaciones y planteos hacemos referencia exclusiva a modelos refinados con factores B isotrópicos (ver más abajo). Otros factores que aparecen en estas ecuaciones tienen los siguientes significados: N_i es el número de átomos contenidos en el modelo; n_{obs} , el número de observaciones, es el número de reflexiones únicas utilizadas en el refinamiento; C es la completitud de los datos procesados (N° de reflexiones únicas registradas/ N° de reflexiones únicas esperadas); d_{min} (en unidades de distancia) es el inverso de la máxima resolución de los datos empleados en el refinamiento; y R_{free} es el residual acumulado normalizado cristalográfico de validación cruzada de uso corriente.

ESCET usa un algoritmo genético para identificar las regiones invariantes en conformación (cuerpos rígidos) mediante la comparación de dos modelos de proteína.³²⁹ El programa produce scripts PyMOL para visualizar las superposiciones atómicas con cualquiera (pero sólo uno a la vez) de los cuerpos rígidos como referencia, usando una codificación de cuatro colores (azul, verde y celeste para los cuerpos rígidos, de mayor a menor tamaño; y rojo para zonas flexibles). Los residuos i y j del modelo A y los equivalentes i y j del modelo B resultarán contenidos en un mismo cuerpo rígido si no presentan diferencias significativas en las distancias entre sus carbonos alfa. El programa calcula una matriz de diferencias de distancias estandarizadas (E_{a-b}^{ij}) considerando la variable aleatoria Δd_{a-b}^{ij} (diferencia de distancias) y su error estándar $\sigma_{(\Delta d_{ab}^{ij})}^{-DPI}$ estimado de acuerdo con Cruickshank, tomando en cuenta la propagación de errores que ocurre al calcular la diferencia entre las distancias (Esquema 4.1.8.1, ec. 4.1.8.4).

Esquema 4.1.8.1



El programa requiere un archivo de ingreso de tareas y definiciones por el usuario: nombre de los archivos PDB que se van a utilizar, moléculas que se van a comparar, nivel de confianza al que se quiere hacer la comparación, etc. El nivel de confianza se define especificando un parámetro denominado “lolim” que es el límite de diferencia de distancias normalizada E_{a-b}^{ij} que se aceptará como diferencia significativa (ver esquema 4.1.8.1). Es decir el límite inferior de veces que debe ser mayor la diferencia de distancia a la incertidumbre estimada de la diferencia de distancias. El nivel de confianza se puede entonces variar: aumentar el parámetro “lolim” para minimizar el riesgo de un error de tipo I (en este caso, afirmar que hay una diferencia conformacional cuando las diferencias son estadísticamente insignificantes) o disminuir este parámetro para aumentar la sensibilidad del análisis (ver http://schneider.group.ifom-ieo-campus.es/escet/escet_user.pdf). Como criterio general adoptamos $p = 0.95$ como nivel de confianza de validación de la hipótesis alternativa (existencia de cambio conformacional).

4.1.9. Análisis cuantitativo de factores B . Los valores de los factores B atómicos ocupan las columnas 61 a 66 en las líneas con la indicación ATOM de los archivos PDB (el formato de archivo de datos del Protein Data Bank). Se acepta que los factores B son portadores de información sobre desorden en la estructura cristalina de la proteína, ya sea desorden estático (conformaciones alternativas de la proteína presentes en el cristal - sean estas producto de una estabilización cinética por barreras energéticas relativamente grandes, producto de contactos cristalinos diferenciales en distintas cadenas, o producto de la ocupación parcial de sitios de unión a ligandos- y desorden de la red cristalina) o desorden dinámico (movimientos del átomo aislado o de un colectivo de átomos).³³³ Existen diversas formas de modelar el desorden, pero la forma más común, justificada por la relativa pobre resolución de los datos obtenidos a partir de cristales macromoleculares, es la de considerar que la densidad electrónica del átomo j (ρ_j) se desvanece en el espacio de acuerdo con una distribución tridimensional de probabilidad esféricamente simétrica Gaussiana en torno a la posición esperada del átomo $\langle r_j \rangle$ (donde ρ_j es máxima), con varianza

$$\sigma^2 = \langle |\Delta r_j|^2 \rangle / 3 \quad (4.1.9.1)$$

donde

$$\langle |\Delta r_j|^2 \rangle = \frac{3\pi}{8} \langle |\Delta r_j| \rangle^2 \quad (4.1.9.2)$$

es el desplazamiento cuadrático medio esperado. Esta modelización simple exige la determinación de solo dos parámetros $\langle r_j \rangle$ y $\langle |\Delta r_j|^2 \rangle$, de los cuales $\langle r_j \rangle$ está especificado en las coordenadas xyz del átomo j en el modelo. Los factores B atómicos isotrópicos que hemos refinado en nuestro modelo, se calculan entonces como sigue:

$$B_j = 8\pi^2 \langle |\Delta r_j|^2 \rangle = 3\pi^3 \langle |\Delta r_j| \rangle^2 = 24\pi^2 \sigma^2 \quad (4.1.9.3)$$

La ecuación que sigue establece que los factores de estructura tienen una dependencia exponencial decreciente en el producto escalar de B_j y $(\text{sen}\theta/\lambda)^2$, por lo que cuanto más alto sea el valor del factor B de un átomo, mayor será la tasa de disminución con la resolución de la contribución de ese átomo a las intensidades de la difracción de rayos X; dicho de otra forma, el factor de dispersión (scattering) atómico \mathbf{f}_j dependerá de B_j y de la resolución.

$$\mathbf{F}_C = G \cdot \sum_j n_j \mathbf{f}_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (4.1.9.4)$$

$$\mathbf{f}_j = \mathbf{f}_j^0 \exp(-B_j [(\text{sen}\theta)/\lambda]^2) \quad (4.1.9.5)$$

El problema principal de la comparación de factores B es su comparación entre distintos modelos. Se sabe que la comparación está sujeta a problemas relacionados con la distinta resolución de los modelos así como del éxito del refinamiento y el método usado para ello, incluyendo el método de refinamiento de factores B (se discute más adelante). Frecuentemente se

limita el análisis al de los factores B de átomos de C alfa, aunque esto es necesario. Existen al menos tres formas de comparación de B_j por cocientes que se basan en las ec. 4.1.9.6-10. La comparación de B_j de dos modelos A y B hipotéticos en forma directa es la forma más simple (ec. 4.1.9.6), pero por lo que arriba mencionamos, es en muchos casos inadecuada, por lo que frecuentemente se decide normalizar el valor de B_j usando el B promedio (B_j/B_{avg} , ec. 4.1.9.7).

$$C_j = \frac{B_j^B}{B_j^A} \quad (4.1.9.6)$$

$$C_j = \frac{B_j^B B_{avg}^A}{B_j^A B_{avg}^B} \quad (4.1.9.7)$$

Donde C_j es una nueva variable, el cociente calculado para comparar factores B atómicos. También se ha propuesto normalizar la diferencia entre B_j y el B promedio usando el desvío estándar de los factores B ($\sigma(B_j)$) dando lugar a ΔB_j^S (ΔB_j estandarizados), lo cual podría ser utilizado para comparar entre modelos (ec. 4.1.9.8-10).

$$\Delta B_j^S = \frac{B_j - B_{avg}}{\sigma(B_j)} \quad (4.1.9.8)$$

$$\sigma(B_j) = \frac{\sum (B_j - B_{avg})^2}{N_j} \quad (4.1.9.9)$$

$$C_j^\Delta = \frac{\Delta B_j^{SB}}{\Delta B_j^{SA}} = \frac{\sigma(B_j^A)(B_j^B - B_{avg}^B)}{\sigma(B_j^B)(B_j^A - B_{avg}^A)} \quad (4.1.9.10)$$

Cabe señalar que, como se detalla más adelante, nosotros debimos recurrir a otro modo de análisis, cuya validez y significado se exponen más adelante.

4.2. Resultados

- 4.2.1. Síntesis y purificación de isoformas redox de la HSA**
- 4.2.2. Modulación alostérica de la reactividad de disulfuros sintéticos con la Cys34**
- 4.2.3. Modulación alostérica de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I por unión de H⁺ y Ca²⁺.**
- 4.2.4. Modulación alostérica de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I el pH y el estado redox de la Cys34.**
- 4.2.5. Modulación de la cristalizabilidad de la HSA por Ca²⁺ y el estado redox de la Cys34.**
- 4.2.6. Co-cristalización, solución de la estructura y refinamiento de un modelo cristalográfico de la HSA con seis iones cloruro**
- 4.2.7. Estudios de comparación conformacional usando ESCET de los modelos de HSA criogénico y a temperatura ambiente de la forma apo y en complejo con ligandos del sitio de Sudlow I.**
- 4.2.8. Desarrollo y validación inicial de un nuevo método de comparación de factores B de modelos cristalográficos**
- 4.2.9. Estudio de la información contenida en los factores B para evidenciar rutas de comunicación alostérica**

4.2.1. Síntesis y purificación de HSA-SH y HSA-SO₂⁻. Se preparó (sintetizó y purificó) HSA-SH y HSA-SO₂⁻ como se describe en la sección de Métodos. En la Fig. 4.2.1.1. se muestran cromatogramas representativos analíticos. La isoforma HSA-SO₂⁻ es el producto principal de la oxidación por cuatro electrones de la HSA-SH cuando la oxidación ocurre a cargo de oxidantes electrofilicos como H₂O₂ y ONOO⁻. La oxidación por 4 electrones a cargo de ONOO⁻ y H₂O₂ ocurre a través de un mecanismo secuencial que ya estudiamos en colaboración con la Dra. Beatriz Alvarez y la Lic. Lucía Turell.^{199-201,334} Véase el Esquema 4.1.1.1.

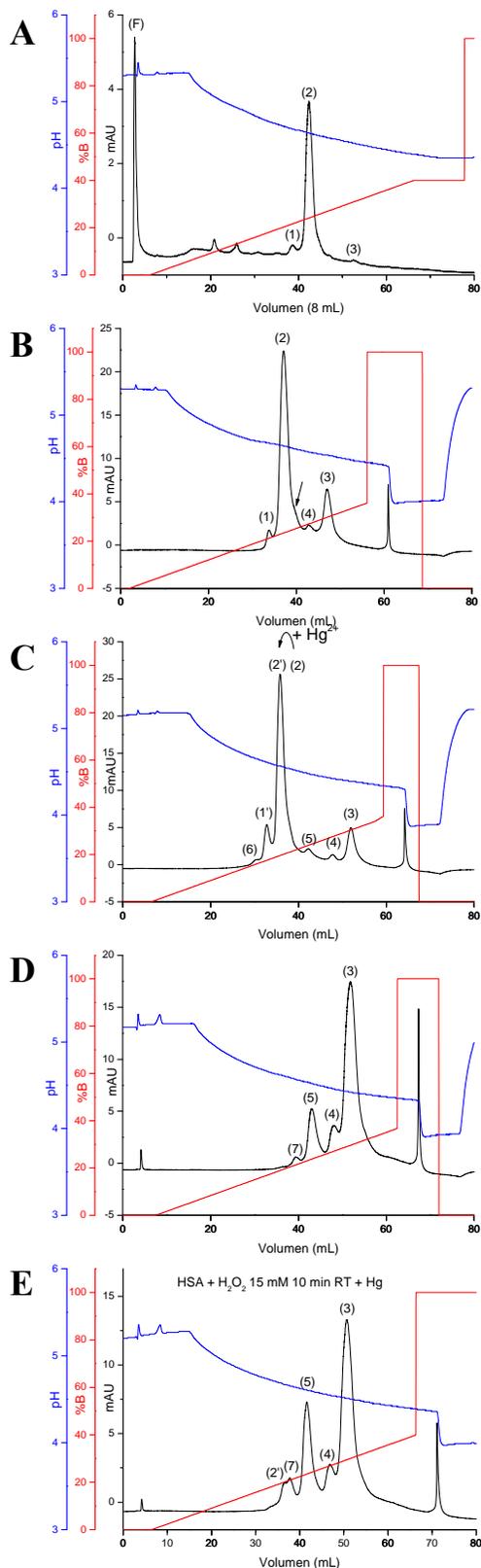
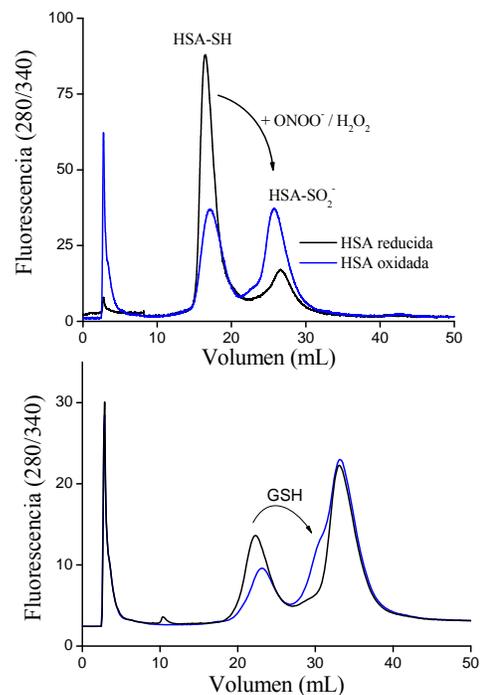


Figura 4.2.1.1. Síntesis y purificación de HSA-SH y HSA-SO₂⁻. **Panel A.** Cromatofocado con gradiente externo de plasma humano, destaca la aparición de un frente de elución importante y tres isoformas de HSA separables en base a su pI: (1) HSA – Asp1, pI = 4.69, albúmina que ha perdido el aspartato amino terminal; (2) complejo HSA-SH, HSASSR, HSA-SOH, pI = 4.64; (3) HSA-SO₂⁻, producto de oxidación irreversible de la HSA-SH, pI = 4.51. La identidad se adjudicó por comparación con el comportamiento cromatográfico de estándares (ver siguientes cromatogramas). **Panel B.** Análisis de una preparación de uso clínico de HSA que se deslipidó y redujo con β-ME: (1) HSA-Asp (pI = 6.68); (2) HSA-SH, principalmente (pI = 4.65); (3) HSA-SO₂⁻, pI = 4.54; (4) isoforma no identificada por masa aún, probablemente HSA-SO₂⁻-Asp, pI = 4.58; la flecha indica un hombro pI = 4.60. **Panel C.** HSA deslipidada y reducida incubada con un ligero exceso de HgCl₂, (5) principalmente HSA-SOH; (6) isoforma aún no identificada. **Panel D.** HSA reducida y deslipidada tratada con H₂O₂ 30 mM por 10 min a T ambiente. (7) isoforma aún no identificada por masa, probablemente HSA-SOH-Asp. **Panel E.** HSA reducida y deslipidada tratada con H₂O₂ 15 mM por 10 min a T ambiente e incubada posteriormente con un ligero exceso de HgCl₂.



4.2.2. Modulación alostérica de la reactividad de disulfuros sintéticos con la Cys34 y de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I por la unión de H^+ y Ca^{2+} . La reacción del tiol de la HSA con disulfuros de bajo peso molecular es una reacción que avanza hacia el equilibrio, que en exceso (más 100 veces) de disulfuros oxidantes puede verse prácticamente avanzar hasta la completitud. Estudiamos los efectos de la unión de Ca^{2+} en la reactividad dependiente del pH de la Cys34 hacia disulfuros sintéticos (DTNB²⁻ y DTDPy), en la unión de Prodan al sitio de unión de Sudlow I y en la cristalizabilidad de la HSA-SH (ver sección correspondiente más adelante). En ausencia de Ca^{2+} y I (fuerza iónica) constante = 0.15, la constante de segundo orden dependiente del pH (k_2 obs) para la reacción del tiol de la Cys34 con DTNB²⁻ mostró una dependencia sigmoidea en el pH (Fig. 4.2.2.1, Panel A, círculos rojos). La curva de mejor ajuste a estos datos a la ecuación de Boltzmann mostró un $pH_{1/2}$, de 7.95 ± 0.05 y una k_2 independiente de pH (k_2) de $5.7 \pm 0.2 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$. La adición de concentraciones fisiológicas (2.4 mM) de Ca^{2+} manteniendo I = 0.15, produce cambios significativos en el perfil de pH de k_2 obs, bajando $pH_{1/2}$ a 7.6 ± 0.1 y la k_2 en presencia de Ca^{2+} ($k_2^{Ca^{2+}}$) a $3.4 \pm 0.2 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$. Sin embargo, a pH = 7.4, el efecto neto de la unión de Ca^{2+} es el aumento de k_2 obs^{Ca²⁺}. Un comportamiento similar se observó para el caso del disulfuro neutro DTDPy (valores que aparecen en Tabla HII). Graficando en cociente de las constantes dependientes de pH y el cociente de las derivadas primeras dk_2/dpH (Fig. 4.2.2.1, Panel A, trazo azul y verde respectivamente, ordenadas de la derecha) se puede observar que a pH = 7.55 la constante en presencia de Ca^{2+} es máxima en relación a la constante en ausencia (el cociente $k_2^{-Ca^{2+}}/k_2^{+Ca^{2+}}$ tiene allí un mínimo relativo). Por otro lado, el cociente $[(dk_2^{+Ca^{2+}}/dpH)/(dk_2^{-Ca^{2+}}/dpH)] = dk_2^{+Ca^{2+}}/dk_2^{-Ca^{2+}}$ tiene un máximo = 2.14 a pH 7.39 (Fig. 4.2.2.1, Paneles A y B).

La magnitud del efecto de la unión de Ca^{2+} en el $\text{pH}_{1/2}$ y en k_2 , para ambos disulfuros muestra una estricta conservación de las relaciones lineales de energía libre, es decir cocientes $\log k_2/\text{pH}_{1/2}$ constantes en ausencia y presencia de Ca^{2+} (Tabla 4.2.2.1).

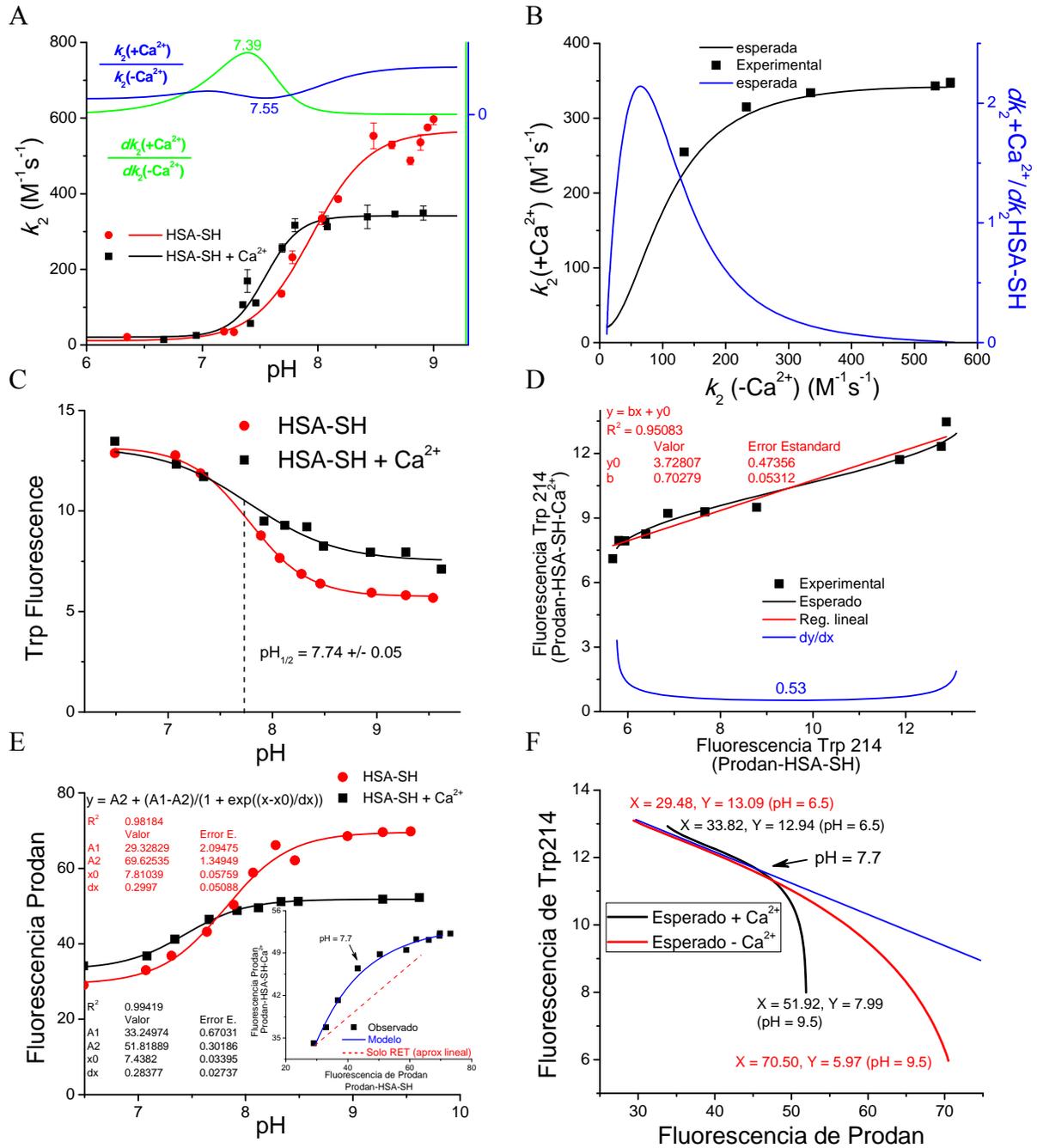
Tabla 4.2.2.1. Parámetros de reactividad y relaciones lineales de energía libre (LFER) para la reducción de disulfuros por el tiol de la HSA

	$\text{pH}_{1/2}$	k_2 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\log k_2/\text{pH}_{1/2}$	$\text{pH}_{1/2}^{\text{Ca}^{2+}}$	$k_2^{\text{Ca}^{2+}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\log k_2^{\text{Ca}^{2+}} / \text{pH}_{1/2}^{\text{Ca}^{2+}}$
DTNB²⁻	7.95 ± 0.05	$5.7 \pm 0.2 \times 10^2$	0.3466	7.60 ± 0.10	$3.4 \pm 0.2 \times 10^2$	0.3331
DTDPy	7.50 ± 0.20	$2.0 \pm 0.4 \times 10^4$	0.5735	7.20 ± 0.30	$1.5 \pm 0.1 \times 10^4$	0.5800

Figura 4.2.2.1. Efecto del pH y la presencia de Ca^{2+} sobre la reactividad de la Cys34 con disulfuros sintéticos y sobre la transferencia de energía resonante del Trp214 al Prodan unido. Panel A. El panel A muestra los resultados para la dependencia en el pH y la presencia de Ca^{2+} de la reacción de DTNB²⁻ con el tiol libre de la HSA-SH. Mediante espectrofotometría de flujo detenido se estudió la reacción de la HSA-SH (10 μM , concentración final) en ausencia o presencia de CaCl_2 (2.4 mM) con los disulfuros sintéticos DTNB²⁻ y DTDPy (ellos siempre en exceso). La formación del producto reducido coloreado fue seguida a las longitudes de onda en las que los cromóforos absorben máximamente (412 nm para TNB²⁻ y 320 nm para la TP). La fuerza iónica se mantuvo constante ($I = 0.15$) con las concentraciones adecuadas de NaCl. Se analizaron de cinco a siete repeticiones por condición. Se empleó el método integral, ajustando al curso temporal un modelo exponencial simple. Se ensayaron al menos 4 condiciones de concentración de disulfuro para hallar la constante dependiente de pH y de la presencia de Ca^{2+} . **Panel B.** Gráfico de correlación de las constantes dependientes de pH en ausencia y presencia de Ca^{2+} (abscisa y ordenadas, respectivamente). **Paneles C-F:**

Se prepararon 10 mL de HSA (1 μM) y Prodan (10 μM) en buffer Tris 50 mM pH 6.5 o en Tris 50 mM pH 9.7, con o sin CaCl_2 (2.4 mM). La $I = 0.15$ se mantuvo constante con concentraciones ajustadas de NaCl. Mezclas de 1 mL de volumen de estas soluciones fueron preparadas en microtubos de plástico, las que se dejaron a T ambiente para que alcanzaran el equilibrio. Se tomaron espectros de emisión de fluorescencia de estado estacionario usando $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm. La emisión del Trp214 (**Panel C**) se evaluó a 350 nm y la de prodan unido (**Panel E**) a 437 nm (donde la fluorescencia de la proteína y del Prodan interfieren menos). El **Panel E** incluye como inserto un gráfico de correlación de la fluorescencia de Prodan unido en presencia (ordenadas) y ausencia (abscisas) de Ca^{2+} 2.4 mM. El **Panel D** es un gráfico de correlación de los presentados en el panel C. El **Panel F** muestra un gráfico de correlación de la fluorescencia intrínseca de la HSA debida al Trp214 versus la fluorescencia de Prodan unido a la HSA en el sitio de Sudlow I. Los pH en cada condición fueron medidos luego de completado el experimento, con control riguroso de la T. Se muestran resultados de un experimento representativo de al menos tres.

Figura 4.2.2.1.



4.2.3. Modulación alostérica de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I por unión de H⁺ y Ca²⁺. La Fig. 4.2.2.1 Paneles C y D muestran los cambios observados en la emisión de fluorescencia del Trp214 de la HSA-SH (HSA-SH = 1 μM, λ_{exc} = 295 nm, λ_{em} = 350 nm) en función del pH en la presencia de Prodan (10 μM) con y sin Ca²⁺ (2.4 mM), manteniendo la fuerza iónica constante = 0.15. En presencia de Prodan (pero no en su ausencia), la intensidad de la emisión de fluorescencia del triptófano 214 disminuye a medida que aumenta el pH (Fig. 4.2.2.1, Panel C), lo cual es consistente con RET (transferencia resonante de energía) aumentada al Prodan unido (pero no libre en solución). La unión de Ca²⁺ a HSA-SH, produce una disminución promedio en la eficiencia de RET de 30 ± 5% (Fig. 4.2.2.1, Paneles C y D). Es conveniente recalcar que la forma inequívoca de evaluar la eficiencia del RET es usando las ecuaciones 4.1.3.4 y 4.1.3.5, que hacen uso exclusivo de las intensidades de fluorescencia del dador. Como veremos nuestros resultados apoyan esta conducta. La disminución en la eficiencia de la transferencia se calculó usando una aproximación lineal (Panel D). Valores similares se pueden obtener calculando cocientes de diferencias de intensidad de fluorescencia comparando pH 6.5 y pH 9.5 con y sin Ca²⁺:

$$C\Delta F = \Delta F_{6.5-9.5}^{W,+Ca^{2+}} / \Delta F_{6.5-9.5}^{W,-Ca^{2+}} = 4.95/7.12 = 0.695 \quad (4.2.3.1)$$

Esto ocurre sin cambios en el pH al cual ocurre el 50 % de la disminución (pH_{1/2} = 7.8 en ambos casos), por lo que las curvas del Panel C muestran tan solo una diferencia en la amplitud del cambio de fluorescencia.

El análisis de la emisión de Prodan unido muestra un comportamiento diferente (Fig. 4.2.2.1, paneles E y F). La intensidad de emisión de Prodan en presencia de 2.4 mM de Ca^{2+} a pH 9 es de 40 % en comparación con su emisión en ausencia del Ca^{2+} , y el $\text{pH}_{1/2}$ se desplaza a un valor menor ($\Delta\text{pH} = -0,37$). De modo que existe un cambio de amplitud y $\text{pH}_{1/2}$. El cambio en la intensidad de fluorescencia de Prodan de -60% duplica el -30% previsto en la base de la disminución de RET (evaluado a nivel de la emisión del Trp214), la cual se caracteriza como ya vimos por un único $\text{pH}_{1/2}$ (Fig. 4.2.2.1, Panel C). El $\text{pH}_{1/2}$ de la transición de la emisión de Prodan unido en ausencia de Ca^{2+} ($\text{pH}_{1/2} = 7.8$) coincide exactamente con el $\text{pH}_{1/2}$ de la transición de la emisión del Trp214. Un cambio importante dependiente del pH en las intensidades de emisión se pueden observar a pH mayores a 7.7 (Fig. 4.2.2.1, Panel F).

Para comprender mejor estos resultados, sospechando que el Ca^{2+} induce cambios en la constante de afinidad HSA-SH – Prodan (K_A) y cambios en el rendimiento de fluorescencia de Prodan unido, cambiamos las condiciones experimentales: se fijó $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm (máximo de excitación de Prodan unido y libre) y se realizaron experimentos de titulación con HSA-SH en ausencia y presencia de Ca^{2+} (Fig. 4.2.3.1, Paneles A y B). Se puede observar claramente que a $\text{pH} \leq 7.5$, la unión de Ca^{2+} no afecta significativamente el rendimiento cuántico relativo del Prodan unido, ni la afinidad ($K_A = 10.6 \pm 2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) entre HSA y Prodan (Fig. 4.2.3.1, Paneles A y B). Por el contrario, a $\text{pH} = 9.0$, la unión de Ca^{2+} causa una disminución K_A : $K_A^{(-\text{Ca}^{2+})} = 15.4 \pm 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $K_A^{(+\text{Ca}^{2+})} = 10,5 \pm 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; que es un cambio -30% en el K_A (Fig. 4.2.3.1, Panel D). El conjunto de los resultados indican que la reducción del 30% en la eficiencia de RET observada en la Fig. 4.2.2.1, Panel C y D podría explicarse por la diferencia hallada de K_A . La Fig. 4.2.3.1, Panel D muestra la unión normalizada de Prodan, que es la fracción de Prodan unido a HSA, y en el recuadro se muestran los datos originales (en unidades

de fluorescencia relativa), donde el efecto del pH y del Ca^{2+} sobre el rendimiento cuántico relativo puede ser mejor apreciado. El rendimiento de fluorescencia de Prodan es notablemente superior si está ligado a la forma básica de la HSA (casi 3 veces), pero este efecto es abolido por la unión de Ca^{2+} (compárese con unidades relativas de fluorescencia en las ordenadas en la Fig. 4.2.3.1, Panel D recuadro vs Panel B). En ausencia de Ca^{2+} , el aumento de tres veces en el rendimiento de la fluorescencia de Prodan a pH = 9.0 *versus* pH = 7.5 se explica sólo en parte por la mayor K_A al primer pH (un aumento de 1.45 veces en la fluorescencia es el cambio esperado por esta causa). Obsérvese que, puesto que en los experimentos de la Fig. 4.2.3.1 excitamos directamente Prodan ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$), no esperamos observar fenómenos de RET. Esto implica que la parte complementaria (aproximadamente la mitad) del aumento de la fluorescencia de Prodan unido a HSA a pH alcalino es debida a un rendimiento cuántico 1.5 veces superior de la sonda en esta condición. Se puede concluir que para explicar los cambios observados en la eficiencia de RET en función del pH debidos a la presencia de Ca^{2+} no es necesario invocar otro cambio más que de afinidad por Prodan.

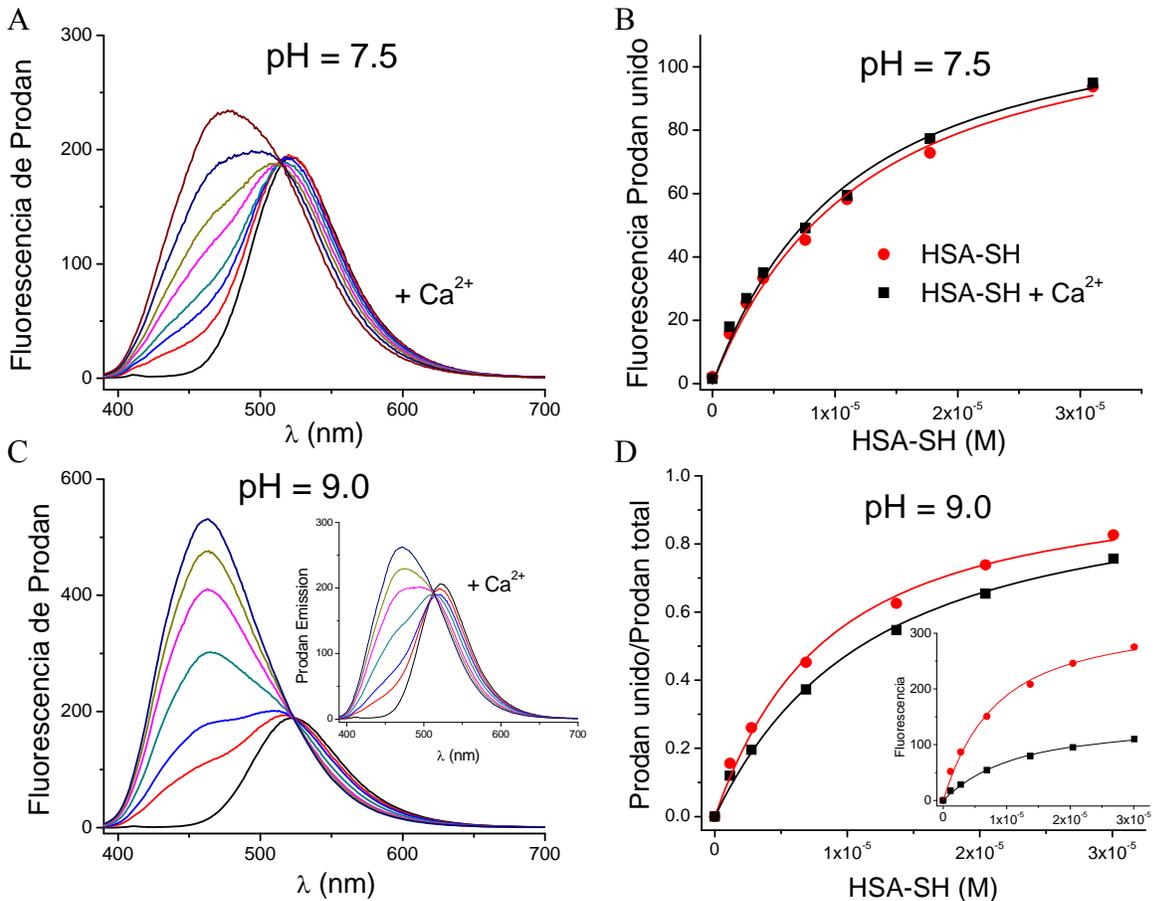


Figura 4.2.3.1. Efecto de la unión de Ca^{2+} en el rendimiento cuántico relativo de Prodan unido y en la constante de unión de Prodan a la HSA-SH a pH 7.5 y 9.0. Pequeños volúmenes de HSA-SH 1.1 mM fueron agregadas a una solución de Prodan (3 μM) tamponada (pH = 7.5, HEPES y pH 9.0, Tris; 100 mM) y de fuerza iónica = 0,15. Después de 3 minutos de equilibrio a 37 $^{\circ}\text{C}$, los espectros de emisión de Prodan se registraron ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm) en forma repetida hasta que no se observaron cambios dependientes del tiempo en los espectros (por lo general los 3 minutos fueron suficientes). Dos espectros se tomaron en cada estado y se promediaron. Las correcciones para los pequeños cambios en el volumen total (máximo 2.8 %) debidos a la adición de HSA se introdujeron en la concentración calculada de HSA y en los datos de intensidad de fluorescencia. Se muestra un experimento realizado por duplicado (en el otro experimento se utilizó Prodan 1.5 μM , con los mismos resultados). Los **Paneles A y B** muestran los datos obtenidos a pH 7.5 y en los **Paneles C y D** muestran los datos obtenidos a pH 9.0. En el **Panel A** se omitieron los espectros de emisión de Prodan en ausencia de Ca^{2+} por ser prácticamente indistinguibles de los que se presentan.

4.2.4. Modulación alostérica de la unión de Prodan al sitio de Sudlow I por el pH y estado redox de la Cys34. Se realizaron estudios de fluorescencia similares a los de la Fig. 4.2.2.1 (Paneles C-F) en colaboración con el Dr. Gerardo Ferrer-Sueta y la Lic. Lucía Bonilla con el objetivo de comparar los efectos de la unión de Ca^{2+} (2.4 mM) sobre la fluorescencia del Prodan unido a la HSA-SH y a la HSA-SO₂⁻. Estos estudios mostraron efectos muy similares de la presencia de Ca^{2+} sobre el RET entre Trp214 y Prodan en ambas isoformas redox (una disminución del 30% de la eficiencia RET, no mostrado). Los efectos del estado de oxidación de la Cys34 fueron poco evidentes en esos ensayos, en los que observamos un $\Delta\text{pH}_{1/2} \cong -0.2$. Con la hipótesis de que la oxidación de la Cys34 disminuía el punto medio de la transición neutro-básica de la HSA y en condiciones optimizadas para una comparación detallada (realizamos mejoras en los métodos de purificación y síntesis de isoformas, y optimizamos las concentraciones de proteína y fluoróforo -HSA 5 μM , 10 μM Prodan-) se realizaron los estudios que se muestran en la Figs. 4.2.4.1 y 4.2.4.2. Se puede observar que el aumento de la intensidad de fluorescencia de Prodan unido a la isoforma HSA-SO₂⁻ ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, RET Trp214 \rightarrow Prodan) en función de pH se puede modelar más exactamente como una transición en dos etapas (Fig. 4.2.4.1, Paneles A y B): las regresiones usando una ecuación de tipo dosis-respuesta logística simple (DRS, ec. 4.2.4.1) no ajustaba correctamente a las observaciones para el caso de la HSA-SO₂⁻, aunque efectivamente estimaban un $\Delta\text{pH}_{1/2} = -0.23 \pm 0.1$ (8.00 ± 0.08 y 8.23 ± 0.06 , HSA-SO₂⁻ y HSA-SH); usando una ecuación de tipo dosis-respuesta logística doble (DRD, ec. 4.2.4.2) se obtienen mejores ajustes para el caso de la isoforma oxidada ($R^2_{(\text{DRD}, \text{HSA-SO}_2^-)} = 0.98899$ vs $R^2_{(\text{DRS}, \text{HSA-SO}_2^-)} = 0.98815$, Fig. H4, Panel A, líneas negra y verde superiores); para el caso de la HSA-SH sin embargo, los ajustes usando una ecuación DRS eran mejores que con una ecuación DRD, los que estimaban parámetros con poco sentido físico y grandes errores ($R^2_{(\text{DRS},$

$R^2_{\text{HSA-SH}} = 0.98846$ (Fig. 4.2.4.1, Panel A, línea azul) vs $R^2_{\text{(DRS, HSA-SOH)}} = 0.98815$ (Fig. 4.2.4.1, Panel A, línea verde).

$$y = y_0 + \frac{(y_\infty - y_0)}{1 + 10^{(a1-x)p}} \quad (4.2.4.1)$$

$$y = y_0 + (y_\infty - y_0) \left[\frac{p}{1 + 10^{(a1-x)/h1}} + \frac{1-p}{1 + 10^{(a2-x)/h2}} \right] \quad (4.2.4.2)$$

Donde: y_0 y y_∞ tienen el significado habitual, siendo $y_\infty - y_0$ la diferencia de amplitud del cambio total en y ; p representa la proporción de la diferencia de amplitud debida a la fase 1 en relación al cambio total de y ; $a1$ y $a2$ representan los $\text{pH}_{1/2}$ de las fases 1 y 2, y $h1$ y $h2$ representan las pendientes en los puntos de inflexión de las fases 1 y 2. En el caso en estudio, $y = I_{437\text{nm}} = f(x = -\log [\text{H}^+] = \text{pH})$.

Desde el punto de vista biofísico, a los efectos de entender mejor el mecanismo de modulación alostérica de la HSA, no resulta lo mismo decir que los cambios en la fluorescencia están indicando una estabilización de la forma básica de la HSA (si damos crédito al modelo sigmoideo simple, DRS), que decir que los cambios puedan deberse exclusivamente a cambios en la constante de afinidad entre Prodan y el sitio de Sudlow I. También, desde la óptica biofísica resulta razonable cuestionarse el uso de un modelo con 7 parámetros ajustables (DRD) cuando un modelo más sencillo (DRS) brinda buenos ajustes. El sobre fiteo del modelo DRD es evidente cuando se lo usa en forma libre, sin restricciones (obsérvese el recorrido de la línea roja en el Panel A de la Fig. 4.2.4.1 donde se indica con la flecha roja). Asumiendo que la oxidación de la Cys34 no causa la aparición de una propiedad nueva de la HSA, sino que modula un repertorio preexistente, es que nos apoyamos en los resultados del modelado del comportamiento de la

isoforma oxidada, imponiendo restricciones al modelo DRD de modo progresivo y sistemático (Fig. 4.2.4.1, Panel C), hallando que el mejor resultado para el ajuste a los datos experimentales de la isoforma reducida tiene un $R^2_{(DRDC, HSA-SH)} = 0.99096$ (Fig. 4.2.4.1, Panel A, línea negra y Panel C, cuadrado negro con etiqueta DRDC4) se obtiene fijando los $pH_{1/2}$ de cada transición y el parámetro $h1$ para la primera transición, de acuerdo con los valores ajustados para el caso de la $HSA-SO_2^-$. Esto reduce el número de parámetros ajustados en el modelo DRD constreñido (DRDC) a solo 4 ($p, y_0, y_\infty, h2$), el mismo número del modelo DRS.

Los resultados de los ajustes indican que la $HSA-SO_2^-$ tiene una constante de afinidad por Prodan aproximadamente 3 veces superior en relación con aquella de la isoforma reducida. Esto se deduce de comparar los valores de los parámetros p ajustados en cada caso: $p_{HSA-SO_2^-} = 0.248$ y $p_{HSA-SH} = 0.081$. El gráfico de correlación que se muestra en el Panel B de la Fig. 2.4.4.1 indica que la oxidación del tiol tiene efectos a pH por debajo del $pH_{1/2}$ de la transición $N \rightleftharpoons B$. En el Panel B de la Fig. 2.4.4.1 puede observarse que a valores de pH por encima de 7.5, existe una correlación lineal muy buena entre ambas variables con un coeficiente de correlación de 1.27 (aproximación lineal, trazo punteado). Si no se trata de una modulación sobre el equilibrio $N \rightleftharpoons B$ de la HSA, el efecto alostérico de la oxidación del tiol podría explicarse por la modulación más selectiva de interacciones de Prodan con componentes del sitio de Sudlow I, ya sea en forma directa o indirecta. Dado que el fluoróforo utilizado es una molécula neutra sin grupos ionizables, descartamos cualquier efecto del pH (en este rango) sobre este ligando de bajo peso molecular. En cuanto a efectos sobre grupos proteicos que directamente interaccionan con ligandos en el sitio de Sudlow I, y si se consideran residuos con pK_a cercanos a 7, surge inmediatamente como candidato la His242.³³⁵ Al respecto, es interesante notar que la mutación

natural His242Arg lleva a una pérdida de afinidad por warfarina^{213,336-337} y que la presencia de iones cloruro inhibe la unión de la tolmetina y de la warfarina al sitio de Sudlow I.¹⁻² En la sección de discusión realizamos un análisis más detallado al respecto, que considera nuestros resultados cristalográficos.

Sin ir más lejos, debemos decir que un cambio de amplitud en la fase 1 del cambio de fluorescencia del Prodan con el pH (Fig. 4.2.4.1, Panel A) también podría explicarse por un aumento del rendimiento cuántico del fluoróforo unido (sin cambios de K_A). Además, si bien se realizaron controles, los resultados de la Fig. 4.2.4.1 dependen de la excitación de Prodan *via* Trp214 (RET). Por tanto, para confirmar estos resultados decidimos realizar un experimento ortogonal, donde se cambian drásticamente las condiciones del ensayo para medir el parámetro de interés: K_A de ambas isoformas redox y Prodan (Fig. 4.2.4.2 y Tabla 4.2.4.1). Se puede observar que la diferencia de afinidad del complejo Prodan-HSA-SO₂⁻ es modesta: su K_A es 2.6 veces mayor que la del complejo Prodan-HSA-SH, estando en excelente acuerdo con el valor esperado de acuerdo con los resultados de la Fig. 4.2.4.1. Nótese que los cambios de intensidad de fluorescencia de Prodan son solo comparables a una misma temperatura, la fluorescencia de Prodan, como la de la mayoría de los fluoróforos,³¹⁶ disminuye con el aumento de la temperatura.

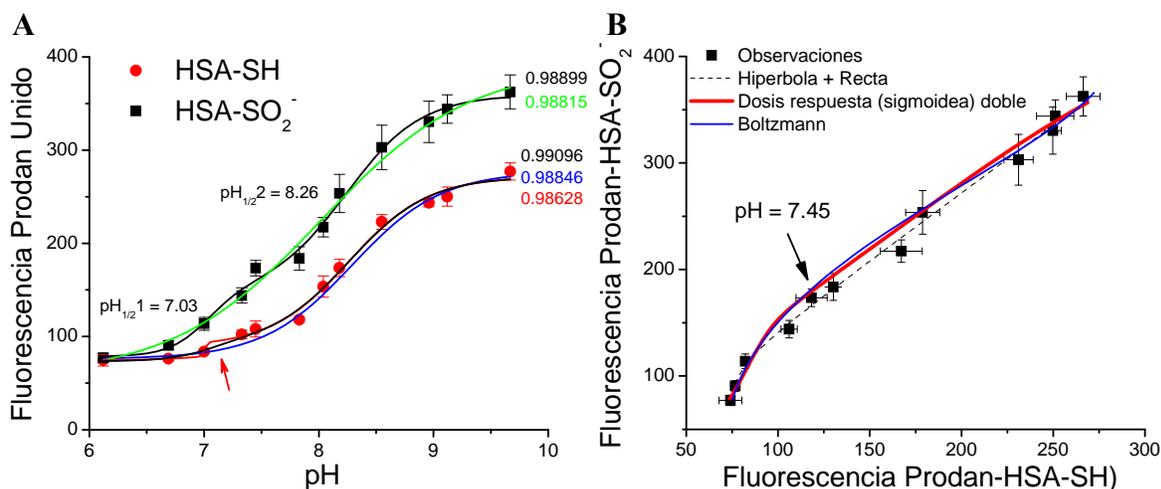


Figura 4.2.4.1. Efectos dependientes del pH y de la oxidación de la Cys34 sobre la fluorescencia de mezclas Prodan-HSA. Mezclas de soluciones tamponadas y de fuerza iónica constante de HSA (5 μ M) y Prodan (10 μ M) fueron preparadas en microtubos de plástico y luego dejadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se registraron espectros de emisión de fluorescencia de estado estacionario usando $\lambda_{exc} = 295$ nm (excitación de Prodan por RET), a temperatura ambiente. La emisión de las moléculas de Prodan unido fue evaluada a 437 nm. El pH de cada muestra se midió inmediatamente luego de finalizado el experimento. Los datos que se muestran son promedios de 3 determinaciones de un experimento representativo de dos. **Panel A.** Cambios en la fluorescencia de Prodan en función del pH para dos isoformas redox de la HSA: HSA-SH (círculos rojos) y HSA-SO₂⁻ (cuadrados negros). Las líneas representan regresiones no lineales de las variables dependientes sobre el pH, se usaron funciones sigmoideas en ambos casos: negro y rojo, dosis-respuesta logística doble; azul y verde dosis-respuesta logística simple (ver detalles en el texto). **Panel B.** Gráfico de correlación para las variables dependientes en estudio. Observaciones: Cuadrados negros con barras de error estándar en x e y; trazos llenos: rojo, modelo doble dosis-respuesta (corresponde con líneas negra y roja del panel A); azul, sigmoidea simple; el trazo punteado es una línea de regresión de fluorescencia de Prodan-HSA-SO₂⁻ en función de la fluorescencia de Prodan-HSA-SH usando la ecuación de una hipérbola más una recta. **Panel C.** Coeficientes de determinación (R²) resultantes de ajustes de distintos modelos para describir la regresión de la intensidad de la fluorescencia sobre el pH de la muestra.

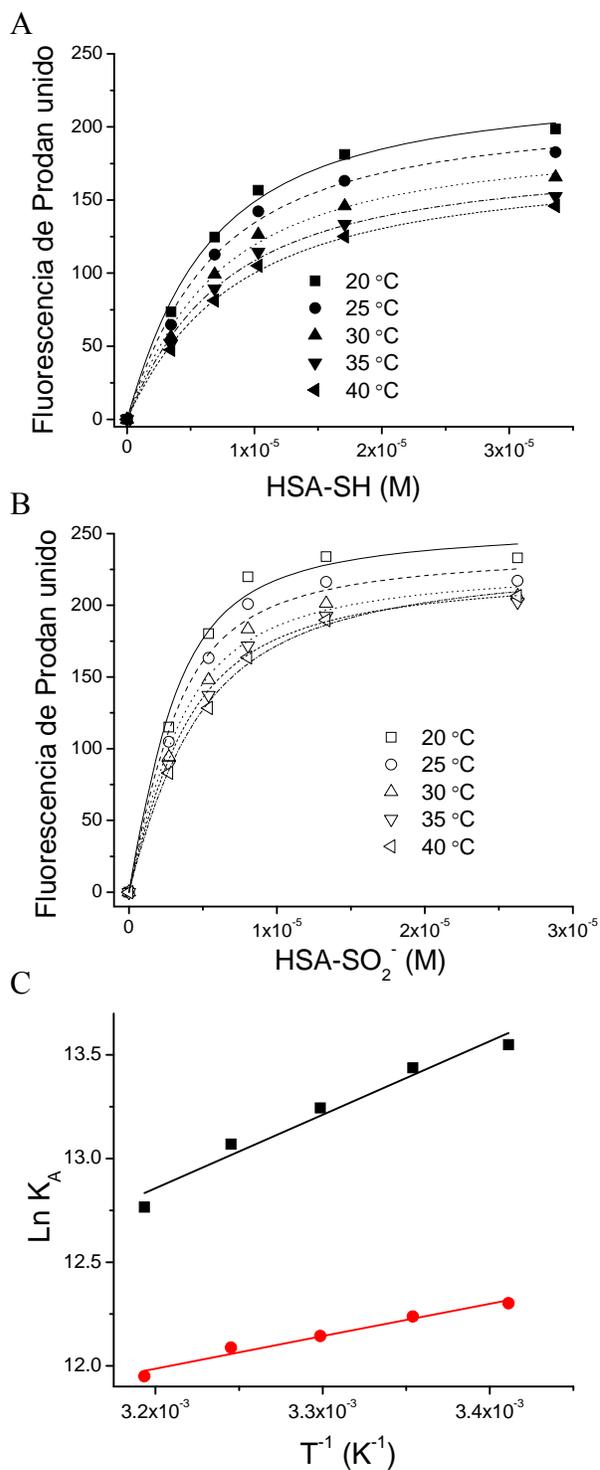


Figura 4.2.4.2. Determinación de constantes de unión de Prodan a isoformas redox de la HSA. Volúmenes pequeños de HSA-SH (1.0 mM) y HSA-SO₂⁻ (0.9 mM) se adicionaron a una solución salina tamponada (Hepes pH 7.5, ionic strength $\mu = 0.15$) de Prodan (3 μ M). Luego de 3 minutos de espera para permitir el equilibrio en la muestra, se registraron espectros de emisión de fluorescencia del Prodan excitándolo en forma directa ($\lambda_{exc} = 360$ nm). El procedimiento se repitió a cada temperatura y se regresó a 20°C para repetir las medidas ahora a otra concentración de HSA. La iluminación de la muestra ocurre solamente durante la medida. En controles independientes observamos que los cambios en la HSA debidos a estos tratamientos térmicos son reversibles. Los **Paneles A y B** muestran el aumento en la fluorescencia de Prodan ($\lambda_{em} = 427$ nm) en complejo con HSA-SH (Panel A) y HSA-SO₂⁻ (Panel B). **Panel C.** Mostramos los respectivos gráficos de van't Hoff (HSA-SO₂⁻-Prodan, cuadrados negros y HSA-SH-Prodan, círculos rojos). Correcciones por los pequeños cambios de volumen se realizaron como antes.

Tabla 4.2.4.1. Equilibrio de unión de Prodan y las isoformas redox de la HSA

	$K_A \times 10^{-5}$ (37 °C, M ⁻¹)	ΔH (kJmol ⁻¹)	ΔS (kJmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (37 °C, kJmol ⁻¹)
HSA-SH	1.6±0.1	-3.0±1.2	58.1±4.1	-31.0± 2.4
HSA-SO ₂ ⁻	4.2±0.4	-9.5±3.2	12.5±5.5	-33.4± 3.2
cociente [diferencia]	2.6	[-16.5]	[-45.6]	[-2.4]

4.2.5. Modulación de la cristalizabilidad de la HSA por unión de Ca^{2+} y oxidación del tiol.

En todos los modelos cristalográficos hasta el momento reportados la cisteína 34 es modelada en su estado reducido. La cristalización de HSA-SH se realizó como se indica en la sección de M&M. Los cristales iniciales fueron evidentes al microscopio después de tres semanas aproximadamente. Mediante microsembrado (ver M&M) se obtuvieron cristales en forma controlada (número) y en menos tiempo (3-5 días), los que se utilizaron después de 1-3 semanas de crecimiento a 20 °C (contando desde el día de preparación de la gota). La inclusión de NaCl previno la precipitación de la proteína y favoreció la separación de fases, con evidente formación de microgotas de fase proteica líquida. El control de la concentración de NaCl (50-100 mM) fue importante para obtener cristales de buen aspecto, tamaño (0.2 - 0.4 mm), cantidad (5-10) y buena calidad de difracción ($\lambda_{\text{min}} = 1.9 \text{ \AA}$). Es importante señalar que los trabajos previos no reportan este efecto de la inclusión de NaCl ni especifican la concentración de esta sal en la preparación de HSA, en la solución de cristalización ni tampoco en la gota.

No existen reportes de modelos cristalográficos de HSA en complejo con cationes divalentes, incluido Ca^{2+} . Intentamos la co-cristalización de complejos HSA- Ca^{2+} como se indica en la sección de M&M. Cristales de HSA en presencia de Ca^{2+} fueron evidentes después de más de 6 semanas de preparada la gota. Muchos de ellos fueron probados a temperatura ambiente (micromounts MiTeGen y otras herramientas), mostrando patologías (manchas divididas, evidencias múltiples redes cristalinas, baja resolución – $d_{\text{min}} > 4 \text{ \AA}$ –). En experimentos manuales de microsiembra fue evidente de que el Ca^{2+} inhibe el crecimiento de cristales de HSA-SH, sin embargo, dos conjuntos completos de datos fueron recogidos, utilizando cristales que crecieron en presencia de 2.4 mM de Ca^{2+} y de cristales de HSA-SH crecidos en ausencia de

Ca^{2+} y luego remojados durante 10 horas en 10 mM de CaCl_2 . En ambos casos la estructura resuelta fue la de la especie HSA-SH sin evidencias en mapas $2F^{\text{obs}} - F^{\text{calc}}$ de densidades de electrónicas indicativas de la unión de Ca^{2+} .

La oxidación de la Cys34 modula la cristalizabilidad de la HSA. La cristalización de HSA-SOH y HSA-SO_2^- se intentó en condiciones similares a las de la isoforma reducida. Se intentó facilitar la cristalización de HSA-SOH y HSA-SO_2^- usando la siembra de microcristales de HSA-SH, pero esto solo determinó la formación de una gran cantidad de cristales muy pequeños (0.01-0.02 mm), que no pudieron probarse en el difractor, y que no crecieron en ensayos de siembra y microsiembra en gotas conteniendo proteína fresca (HSA-SOH y HSA-SO_2^-). En dos ocasiones, utilizando condiciones de cristalización semejantes a las de HSA-SH, creció un cristal por gota después de una incubación prolongada (más de un mes) sin microsiembras, pero los datos de difracción indicaron claramente que los cristales obtenidos fueron de la escasa HSA-SH contaminante, a pesar de la rigurosa purificación empleada de las mencionadas isoformas redox. Se realizaron estudios robóticos de barrido de condiciones de cristalización de HSA-SOH y HSA-SO_2^- (M&M), en los que se obtuvo separación de fases y precipitados en aproximadamente 40 % de las condiciones, pero no se obtuvieron cristales.

4.2.6. Co-cristalización, solución de la estructura y refinamiento de un modelo cristalográfico de la HSA con seis iones cloruro (tres por cadena)

4.2.6.1. Criocristalografía de HSA-SH. La gran mayoría de los estudios de por rayos X sobre proteínas hoy se realizan en estaciones de difracción en sincrotrones usando muestras superenfriadas. La popularidad de este dueto es debida a la rapidez y precisión con que estos estudios se realizan. Sin embargo, no hay estudios cristalográficos que nos brinden información de alta resolución sobre los efectos de la temperatura sobre la estructura de apoHSA. Nos estamos refiriendo a las propiedades estructurales (conformación y dinámica) de la molécula en el estado cristalino sin más ligandos que agua y los iones Na^+ y Cl^- . Esto se debe a que al momento que estos estudios se iniciaron no había sido imposible encontrar un método de crioprotección adecuado para los cristales de apoHSA (si existía un trabajo donde se reportaba

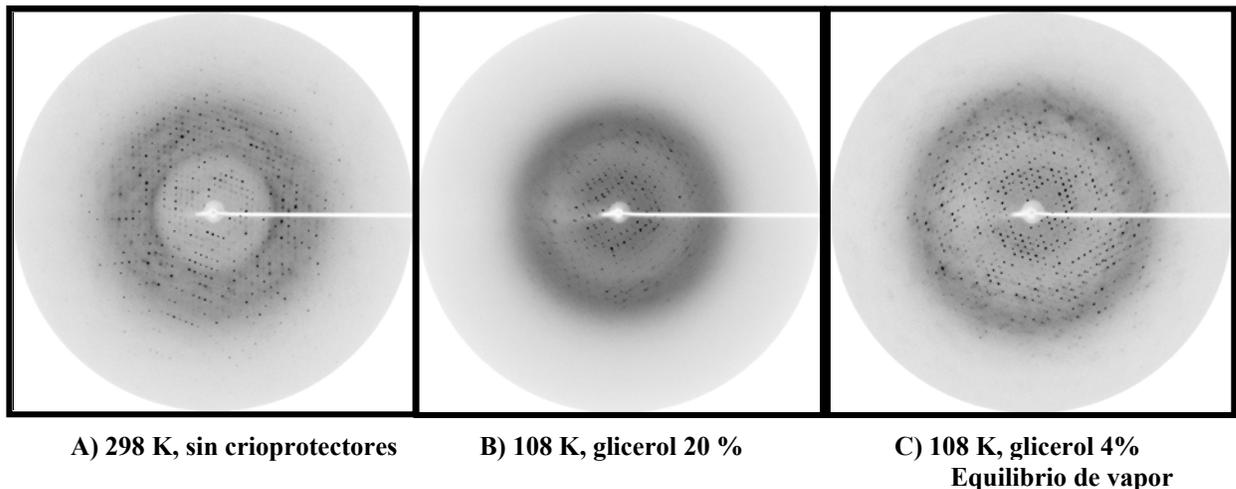


Figura 4.2.6.1.1. Efecto del choque osmótico sobre el patrón de difracción de cristales superenfriados de HSA-SH. Imágenes de difracción obtenidas a partir de cristales de similar tamaño de HSA-SH montados en el difractómetro del Institut Pasteur de Montevideo ($\lambda = \text{CuK}\alpha = 1,54178$). En todos los casos el tiempo de exposición a rayos X fue de 5 minutos, la distancia 25 cm y 1° de barrido por imagen.

un modelo de HSA-(Miristato)₅ a temperatura criogénica,²²² pero los autores no revelaron nunca el secreto de la crioprotección, tómesese esto literalmente). Por tanto, se llevó a cabo un estudio sobre el superenfriamiento de cristales de apo HSA (Fig. 4.2.6.1.1). El patrón de difracción a temperatura ambiente fue muy bueno difractando a una $d_{\min} = 1.9 \text{ \AA}$ (Fig. 4.2.6.1.1, Panel A), sin embargo, en nuestras condiciones pudimos conseguir que tan sólo 10-15 imágenes fueran de buena calidad, sin pérdida significativa de difracción a alta resolución debido a los daños por radiación. Los protocolos de criopreservación habituales (ej. remojado rápido en soluciones madre con glicerol 10-25 %) no lograron mantener la buena calidad de los patrones de difracción obtenida a temperatura ambiente (Fig. 4.2.6.1.1, Panel B). Se ensayaron 9 crioprotectores, uno por familia química disponible, a dos concentraciones (10 y 20 %), y ninguno fue efectivo, logrando difracciones con $d_{\min} = 3.6 \text{ \AA}$ en el mejor de los casos (Fig. 4.2.6.1.1, Panel B). Decidimos rápidamente abandonar la estrategia de tamizaje de crioprotectores, y buscamos resolver el problema con un enfoque racional basado en la comprensión del proceso fisicoquímico de crioprotección. De acuerdo con la literatura,³³⁸ entendimos que la razón más probable para el fracaso de los métodos reportados y los que nosotros habíamos implementado era que la débil red cristalina de los cristales de HSA no soportaba el choque osmótico. Acorde con ello, el procedimiento que resultó ser adecuado, combina la deshidratación gradual (1-2 días) por difusión de vapor de agua de los cristales hasta el equilibrio de presiones osmóticas entre la gota y la solución de crioprotección,³¹⁹ usando bajas concentraciones de glicerol (4-5 %). Los cristales así tratados difractaron sistemáticamente a $2.2 - 2.3 \text{ \AA}$ (Fig. 4.2.6.1.1, Panel C), lo que es una gran mejora, aunque aún subóptimo. El modelo resultante de un experimento de difracción de temperatura criogénica está representado en la Fig. 4.2.6.4.4 y en la Tabla 4.2.6.4.2 se resume información sobre la colección, el procesamiento, solución de estructura y

refinamiento correspondientes. La resolución máxima empleada en el refinamiento ($d_{\min} = 2.3 \text{ \AA}$) fue independiente de la radiación empleada ($\lambda = \text{CuK}\alpha = 1.54178 \text{ \AA}$ vs radiación de sincrotrón $\lambda = 1.0809 \text{ \AA}$), lo que demuestra que es el desorden en el cristal lo que limita la resolución. El grupo de espacio no se afectó por el sobreenfriamiento (P1) y la celda cambió de volumen muy escasamente (contracción), como es de esperar. El modelo de HSA a T criogénica que describimos no presenta grandes cambios con respecto a los obtenidos en T ambiente (1AO6, 1BM0), incluso si se consideran otras formas cristalinas (1E78, 1UOR), si se comparan las coordenadas atómicas de los átomos proteicos. Más allá de esta similitud esencial, existen algunas cualidades o aspectos importantes que distinguen al modelo que proponemos: 4.2.6.2) su precisión, 4.2.6.3) las características del modelado de movimiento/desorden isotrópico y anisotrópico, 4.2.6.4) la optimización de contenciones de simetría No Cristalográfica (SNC), y 4.2.6.5) la definición de sitios de unión para aniones cloruro.

4.2.6.2. Precisión del modelo. Nuestro modelo de la HSA-SH es más preciso que los modelos anteriores de este estado (1AO6, 1BM0, 1E78, 1UOR), como se esperaba para un modelo derivado de un experimento de difracción a temperaturas criogénicas ($\sigma^{\text{DPI}}(r, B_{\text{avg}}, 100\text{K}) = 0.498 \text{ \AA}$ vs. $\sigma^{\text{DPI}}(r, B_{\text{avg}}, 293\text{K}) = 0.603\text{-}0.636 \text{ \AA}$; Fig. 4.2.6.2.1, Panel A). La incertidumbre posicional estándar se estimó de acuerdo con la ec. 4.2.6.2.1.³³¹

$$\sigma_r^{\text{DPI}}(B_{\text{avg}}) = 3^{1/2} (N_i / n_{\text{obs}})^{1/2} C^{-1/3} R_{\text{free}} d_{\text{min}} \quad (4.2.6.2.1)$$

Nótese que, para el caso de considerar la incertidumbre en 1D ($\sigma_x^{\text{DPI}}(B_{\text{avg}})$) solo debe dividirse $\sigma_r^{\text{DPI}}(B_{\text{avg}})$ entre $3^{1/2}$.³³¹ En la Fig. 4.2.6.2.1, Panel B se puede observar que el ajuste al modelo lineal indica fuertemente que es mayor la incertidumbre posicional de modelos de HSA a temperatura criogénica si se la compara con la de modelos a temperatura ambiente refinados a la misma resolución, para toda d_{min} . Esto está de acuerdo con reportes que señalan las dificultades en la crioprotección de cristales de HSA.³³⁹ Las referencias a los códigos de depósito en la PDB de los modelos criogénicos y los correspondientes métodos de crioprotección pueden encontrarse en la Tabla 4.2.6.2.1. Sin embargo, cabe notar que nuestro modelo es uno de los que más se aleja de esta tendencia general (Fig. 4.2.6.2.1, Panel B), lo que podría explicarse por la optimización que realizamos de las condiciones de crioprotección, minimizando el choque osmótico. Al igual que a temperatura ambiente,²¹⁰ el dominio III de la HSA fue difícil de modelar: observamos altos factores B_i y densidad electrónica pobre en varias localizaciones, particularmente la región comprendida entre el residuo 561 y el extremo carboxilo, por lo que en estas localizaciones la incertidumbre del modelo $\sigma^{\text{DPI}}(r, i, 100 \text{ K}) \geq 0.7 \text{ \AA}$. Esto se puede estimar de acuerdo con la

ecuación 4.1.8.3, que como ya señalamos es una aproximación de primer orden a la dependencia de $\sigma^{\text{DPI}}(r,i)$ en B_i y B_{avg} .

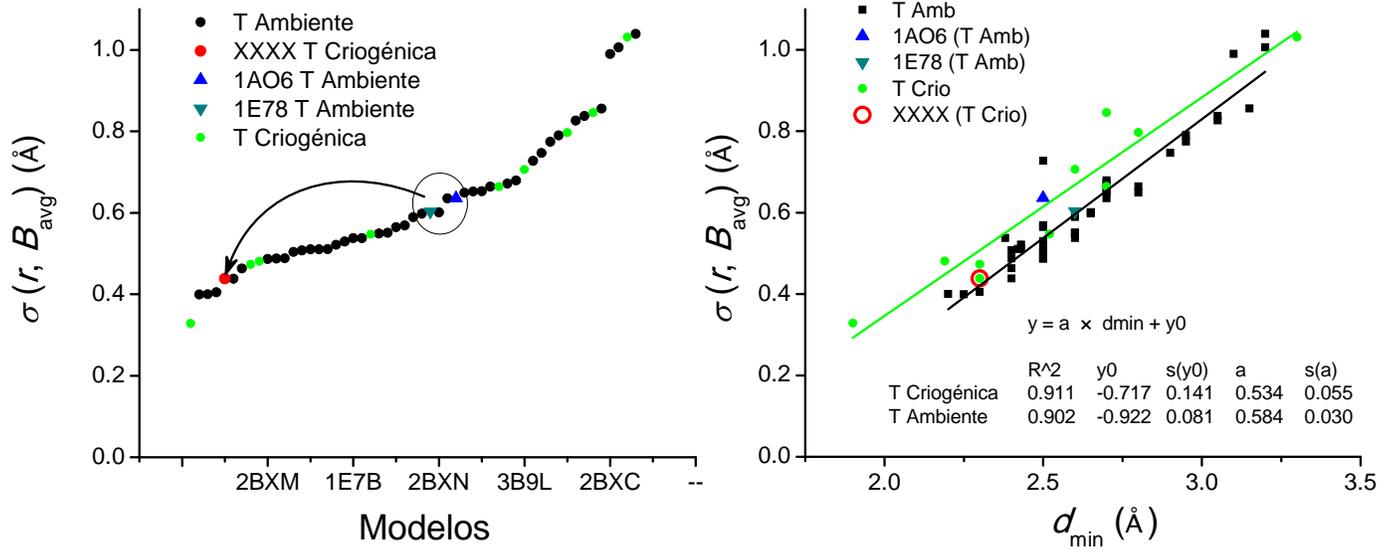


Figura 4.2.6.2.1. Incertidumbre posicional (3D) en modelos de HSA. Panel A. Error posicional estándar de acuerdo con el Índice de Precisión Posicional del Componente de la Difracción (DPI) para el modelo reportado en este trabajo (rojo) y otros reportados previamente. Los modelos que resultaron de experimentos de difracción a temperatura ambiente y criogénica aparecen en negro y en fucsia, respectivamente. Otros modelos de apoHSA (temperatura ambiente) son destacados. **Panel B.** Dependencia de la precisión posicional en la resolución de los modelos (se usa el mismo código de colores). Se muestran las líneas que mejor ajustan a las incertidumbres posicionales de los modelos a temperatura ambiente (línea negra) y a temperatura criogénica (línea fucsia).

Tabla 4.2.6.2.1. Modelos criocristalográficos de HSA y complejos derivados

<i>Código PDB</i> <i>Fecha</i> <i>(λ_{\min}, Å) [R_w]</i> <i>R_{FREE}</i>	<i>Estado</i>	<i>Celda*; Simetría y # cadenas</i>	<i>Crioprotección</i>
XXXX (2.3) [0.199] 0.248	6 Cl ⁻ por unidad asimétrica, 3 Cl ⁻ por cadena	58.880 59.230 95.610 75.17 87.83 74.20; P1 2	Equilibrio osmótico lento por difusión de vapor con solución de crioprotección y remojo rápido en ella: PEG 3350 27.5% w/v, NaCl 50 mM, (Na/H)PO ₄ 50 mM pH 7.4, glicerol 5 % .
1N5U 2002 (1.9) [0.235] 0.28	Complejo con 5 miristatos y un grupo hemo por cadena	183.116 37.909 94.832; 90.00 105.04 90.00 C 1 2 1 4	¿?
1TF0 2004 (2.7) [0.251] 0.295	Complejo con 3 decanoatos, un citrato y el módulo de unión a albúmina de la proteína PAB** por cadena	96.295 134.799 122.463 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21 8	Aceite mineral
2VDB 2008 (2.52) [0.236] 0.28	Complejo con 6 decanoatos y S-naproxenato*** y el módulo de unión a albúmina de la proteína PAB por cadena	190.507 49.462 79.933 90.00 93.00 90.00 C 1 2 1 4	Naproxeno 10 mM y glicerol 20%
3B9M 2008 (2.7) [0.242] 0.316	Complejo con 6 miristatos, 2 salicilatos y AZT por cadena	181.536 38.458 95.368 90.00 104.92 90.00 C 1 2 1 4	¿?
3CX9 2008 (2.8) [0.223] 0.295	Complejo con 5 miristatos y lisofosfatidiletanolamina	183.888 39.015 95.633 90.00 104.69 90.00 C 1 2 1 4	¿?
3B9L 2008 (2.6) [0.223] 0.292	Complejo con 7 miristatos, 2 AZT por cadena	183.900 38.696 95.867 90.00 104.35 90.00 C 1 2 1 4	¿?
3A73 2009 (2.19) [0.233] 0.291	Complejo con 6 miristatos y prostaglandina J2 por cadena	38.060 92.047 94.664 74.80 89.53 80.21 P 1 2	¿?
3JQZ 2010, en prensa (3.3) [0.233] 0.268	Complejo con 1 molécula de lidocaína 1 por dímero	168.476 168.476 97.020 90.00 90.00 90.00 I 41 16	Adición lenta de licor madre con 20 % glicerol, hasta que la concentración de glicerol fue de 20 aprox. %
3JRY 2010, en prensa (2.30) [0.212] 0.268	Complejo con 1 ión sulfato por UA (dímero)	55.600 55.787 121.344 80.48 90.75 63.48 P 1 2	Adición lenta de licor madre con 20 % glicerol, hasta que la concentración de glicerol fue de 20 aprox. %

* (a,b,c; $\alpha\beta\gamma$)

** Peptostreptococcal Albumin-Binding

*** (2S)-2-(6-metoxinaftalen-2-ilo)propanoato

4.2.6.3. Modelado de movimiento/desorden isotrópico y anisotrópico. En el Panel A de la Figura 4.2.6.3.1 comparamos la distribución de factores B de los carbonos alfa del esqueleto proteico para distintos modelos: el modelo de referencia 1AO6²¹⁰ (temperatura ambiente) y modelos derivados del refinamiento de nuestro modelo (temperatura criogénica) siguiendo distintas estrategias. Nuestro modelo a temperatura criogénica de la HSA-SH presenta $B_i^{C\alpha}$ y B_{avg} mayores que los modelos de la misma forma cristalina a temperatura ambiente. Esto fue algo inesperado, en desacuerdo aparente con la teoría física ampliamente aceptada que prevé un aumento del B_{avg} en función de la temperatura, sea este simple o bifásico.³⁴⁰⁻³⁴³ Esto depende solo parcialmente del uso de grupos de TLS en el refinamiento, dado que modelos que no incorporan esta parametrización también poseen B_{avg} mayores que el B_{avg} del modelo de referencia (Fig. 4.2.6.3.1, Tablas 4.2.6.3.1 y 4.2.6.3.2). Aunque más adelante ahondaremos en ello, aquí parece conveniente señalar el razonamiento de que los cambios en los B_i y B_{avg} , usando o no grupos TLS en el refinamiento, no pueden hacer otra cosa más que asociarse con cambios en las coordenadas atómicas del modelo, por ende en la precisión de las mismas y de los propios factores B_i , y como consecuencia de ello, con cambios en los residuales del refinamiento R_{Free} y R_W (R_{Crist}).

En el panel B de la figura 4.2.6.3.1 mostramos la comparación de los cocientes B_i sobre B_{avg} para los modelos arriba mencionados. Esta forma de análisis de factores B isotrópicos es la más usada (véase sección de Métodos), y se fundamenta frecuentemente porque se cree que existe correlación negativa entre estimadores de la calidad del modelo, particularmente la resolución, y los factores B , particularmente el B_{avg} (aunque llamativamente no encontramos evidencias sólidas al respecto en la literatura). En esta representación puede apreciarse que hay sectores del esqueleto proteico que parecen tener B_i/B_{avg} menores a temperatura ambiente que a

temperatura criogénica, lo cual sigue siendo inconsistente con la literatura previa.³⁴⁰⁻³⁴³

Recordando que los factores B contienen información sobre desorden dinámico y también estático, esto debería interpretarse como que ciertas regiones de la proteína están más desordenadas en el estado criogénico. El punto más llamativo de esto quizás, es que justamente las zonas más desordenadas según el panel B a temperatura criogénica coinciden con residuos con mínimos relativos de factores B , los que además (y como es lógico) pertenecen topológicamente al core de la proteína (véase más adelante).

Dadas las contradicciones aparentes arriba mencionadas, decidimos calcular la incertidumbre posicional para estos átomos de acuerdo con las ecuaciones 4.1.8.2 y 4.1.8.3 debidas a Cruickshank³³¹. En el Panel C de la Figura 4.2.6.3.1, se puede observar que los mínimos de las incertidumbres posicionales coinciden en magnitud y número de residuo entre los modelos a temperatura ambiente y nuestro modelo (con un grupo TLS por dominio). Esto si es un resultado esperado, los sectores que mejor se pueden conocer de la estructura son aquellos menos móviles y más ordenados, típicamente el core de la proteína. Esos átomos son al menos tan poco móviles a temperatura criogénica como a temperatura ambiente. Especulamos que en estas regiones es de esperar que la mayor parte del desorden se deba a desorden estático (desorden en la red cristalina o desorden conformacional). Sin embargo, como discutimos, es escasa la literatura al respecto en el caso de cristales macromoleculares. Cabe resaltar que según Schneider, las ecuaciones 4.1.8.2 y 4.1.8.3 permiten calcular estimadores de la incertidumbre posicional directamente comparables entre distintos modelos pero cuyos valores no estarían en una escala absoluta.³³⁰ La pregunta de rigor que nos realizamos, es: ¿cómo pueden ser directamente comparables entre distintos modelos y no estar en una escala absoluta?

El uso de contenciones fuertes de simetría cristalográfica y de parámetros de TLS afectan los valores de B_i en forma singular y opuesta (Fig. 4.2.6.3.1, Paneles D-F). Si estudiamos la correlación lineal entre los B_i del modelo 1AO6 (referencia) y A) los B_i del modelo de T criogénica refinado con contenciones geométricas, contenciones de SNC fuertes y sin grupos TLS, y B) los B_i del modelo de T criogénica refinado con contenciones geométricas, contenciones de SNC fuertes y con un grupo TLS por dominio, observaremos que el coeficiente cuadrado de correlación lineal es mayor para el caso B que el caso A ($r^2_A = 0.795$; $R^2_B = 0.850$; no lo mostramos). En la Fig. 4.2.6.3.1, Paneles D al F, se puede comparar los valores de las diferencias y de diferencias cuadradas entre B_i de carbonos alfa de cadenas A y B de un mismo modelo a la vez: Panel D para 1AO6, Panel E para nuestro modelo sin TLS y Panel F para el modelo que incorpora parámetros de TLS para 6 grupos en total (uno por dominio). En el Panel D se puede observar que los cuadrados de las diferencias varían muy poco con el valor de B_i . Sugio y cols. no usaron contenciones de SNC, pese a que si observaron la existencia de SNC en la unidad asimétrica.²¹⁰ Muy distinto, cuando se aplican contenciones fuertes de simetría no cristalográfica y no se modelan grupos de TLS, puede apreciarse una fuerte reducción de la variabilidad de los B_i entre cadenas, la cual es mayor cuanto mayor los B_i (Fig. 4.2.6.3.1, Panel E). En el Panel E se puede observar una caída exponencial de la dispersión de B_i en función de B_i . En cambio, las diferencias cuadradas recuperan variabilidad aunque no “aleatoriedad” cuando se incorporan parámetros de TLS en el refinamiento (Fig. 4.2.6.3.1, Panel F). El modelado con grupos TLS como es de esperar segrega poblaciones de átomos en relación a sus factores B en tres grupos (como se intenta jerarquizar con óvalos en el Panel F de las Fig. H8). Recordando que en entre nuestros modelos, los factores B de los modelos refinados sin grupos TLS son menores que los de modelos refinados con TLS (Fig. 4.2.6.3.1, Panel A), en conjunto, sugieren

que los B_i serán subestimados si usamos contenciones fuertes de SNC, y que estarán mejor determinados cuando se incorporen parámetros de TLS, todo lo que por supuesto, se confirma cuando se comparan los residuales cristalográficos R_{FREE} y R_{W} (Tablas 4.2.6.3.2 y 4.2.6.4.1). Es interesante notar que puede existir cierta potenciación en el refinamiento cuando se usan contenciones adecuadas de SNC y grupos TLS.

Desde el punto de vista de quien está usando un programa para refinar un modelo, quizás, lo más importante en la parametrización de grupos TLS sea la definición de que partes de la molécula son consideradas como grupos cooperativos en gran medida independientes, capaces de tener una movilidad de tipo cuerpo rígido. Esto depende fuertemente del conocimiento previo sobre la molécula. Nosotros seguimos 5 estrategias distintas para definir las identidades de los grupos (Tabla 4.2.6.3.2): 1) usamos el programa ESCET para analizar las conformaciones de HSA presentes en 8 modelos (1AO6, 2BXA, 2I30, 1O9X, 1E7H, 2BXM, 1BJ5, 1E7C) representativos de distintos estados funcionales de la HSA-SH, apuntando a identificar regiones invariantes como grupos cooperativos (Figs. 4.2.6.3.2 y 4.2.6.3.3, Tabla 4.2.6.3.2); 2) usando las opciones de análisis isotrópico o anisotrópico que tiene el servidor TLSMD y como input el archivo PDB del modelo $\text{XXXX}^{\text{TLS}213}$ (con B_i isotrópicos equivalentes totales) resultaron las definiciones de grupos TLS 2A y 2B presentes en la Tabla HVI; 3) usamos la opción de 1 grupo por cadena (definición 3, dispuesta por defecto en Refmac); 4) definimos grupos de acuerdo con los dominios de HSA, 1 grupo por dominio (definición 4A, 6 grupos en total), y 2 grupos por cadena asociando dos dominios por vez: el I con el II formando un grupo TLS y el dominio III otro grupo (definición 4B); $\text{II} \cup \text{III} + \text{I}$ (definición 4C); y $(\text{I} \cup \text{III}) + \text{II}$ (definición 4D); y por último, 5) asociamos ambas cadenas como un único grupo de TLS.

Figura 4.2.6.3.1.

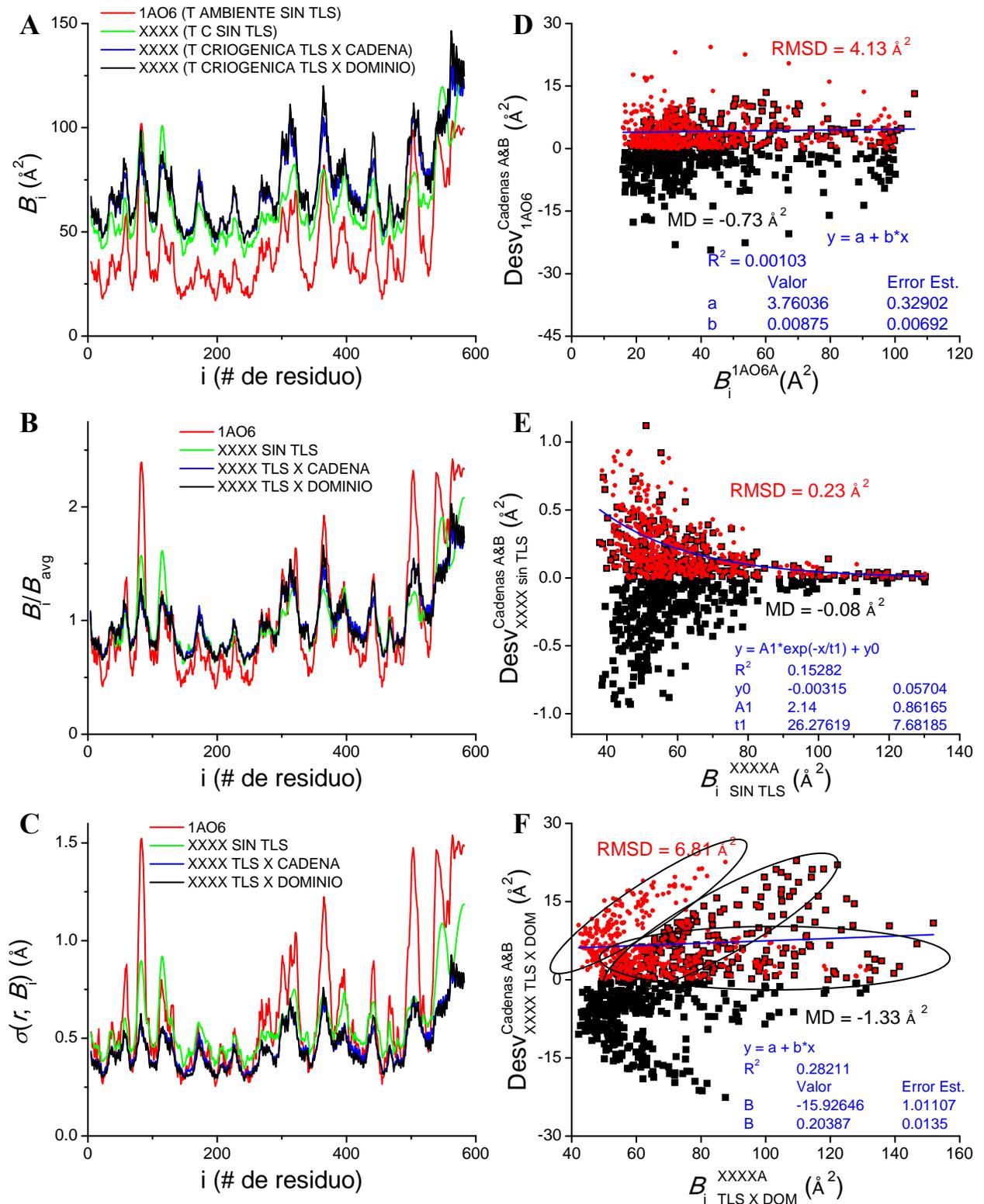


Figura 4.2.6.3.1. Análisis de factores B. Panel A. Se muestran los valores refinados de B_i para carbonos alfa **a)** del modelo reportado 1AO6 que resulta de experimentos a temperatura ambiente (**línea roja**) y de modelos refinados en este trabajo, usando distintas estrategias de refinamiento: **b)** con contenciones geométricas y de factores B (**línea verde**); refinamiento con contenciones geométricas y de factores B pero que además incluye la determinación de parámetros de TLS para **c)** dos grupos TLS (**línea azul, uno por cadena proteica**) y **d)** seis grupos TLS (**línea negra, uno por dominio**). **Panel B.** Se grafica el cociente de B_i sobre B_{avg} para los átomos de carbono alfa de los modelos arriba mencionados, usando los mismos códigos de colores. **Panel C.** Se grafica la incertidumbre posicional para los átomos de carbono alfa de los modelos arriba mencionados, usando para su cálculo la ecuación H4. Los códigos de colores son iguales a los usados en los paneles A y B de esta figura. **Paneles D, E y F.** Comparación de B_i refinados para cada cadena A y B de distintos modelos: Panel D, 1AO6; Panel E, modelo isotrópico sin TLS; y Panel F, modelo con parámetros de TLS refinados. En cada panel se muestran las desviaciones ($B_i^A - B_i^B$, **cuadrados negros**) y la raíz cuadrada de las desviaciones al cuadrado, abreviado del inglés RSD ($((B_i^A - B_i^B)^2)^{1/2}$, **círculos rojos**). Las líneas azules son ajustes a modelos lineales y exponenciales, que sirven solo como guía visual.

Tabla 4.2.6.3.1. Factores B promedio y residuales de refinamiento de distintos modelos de

HSA

<i>Código PDB y Fecha</i>	<i>Celda*; Simetría y # cadenas en la celda</i>	<i>T** (K)</i>	<i>B_{avg} (Å²)</i>	<i>d_{min}[†] (Å)</i>	<i>R_w (R_{free})</i>	<i>Refinamiento [$\sigma^{DPI}(r, B_{avg})$]</i>
1UOR 1992	58.860 88.280 60.680 90.00 101.85 90.00 P 1 21 1 2	295	23.0	2.8	0.231	X-PLOR, B isotrópicos atómicos [?]
1BM0 1998	59.360 96.890 59.240 91.04 103.40 74.94 P 1 2	293	40.7	2.5	0.207 (0.292)	X-PLOR, B isotrópicos atómicos [0.727 Å]
1AO6 1998	59.680 96.980 59.720 91.07 103.50 75.08 P 1 2	293	48.5	2.5	0.218 (0.282)	X-PLOR, B isotrópicos atómicos [0.636 Å]
1E78 2000	54.840 55.620 120.270 81.22 91.08 64.28 P 1 2	298	73.2	2.6	0.247 (0.277)	X-PLOR 3.851, B isotrópicos atómicos [0.603 Å]
<i>XXXX^{TLS}_{213***}</i>	58.880 59.230 95.610 75.17 87.83 74.20 P 1 2	100	71.8	2.3	0.205 (0.253)	REFMAC, 3 TLS, contenciones fuertes de SNC entre cadenas A y B [0.438 Å]
<i>XXXX^{TLS}₂₆₉</i>	58.880 59.230 95.610 75.17 87.83 74.20 P 1 2	100	72.60	2.3	0.199 (0.248)	REFMAC, 3 TLS (1 por dominio), contenciones medias sobre dominio I, Fuertes sobre la Cadena Principal y Laxas sobre las Cadenas Laterales de dominio II, Fuerte dominio III [0.429 Å]

* (a,b,c;αβγ)

** Temperatura del experimento de difracción.

† La máxima resolución usada en el refinamiento

*** 213 es el número de corrida de REFMAC, y corresponde a un modelo subóptimo, el mejor modelo es el 269.

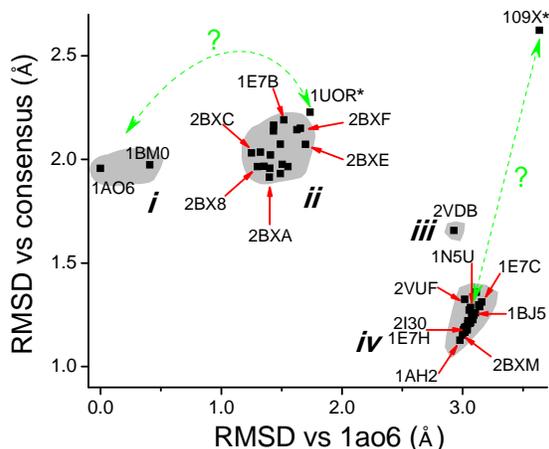


Figura 4.2.6.3.2. Clasificación de modelos de HSA según desviaciones en las coordenadas atómicas. Se incluyeron más de 50 modelos, y se usaron como referencias el modelo 1AO6 y un modelo consenso (ver materiales y métodos).

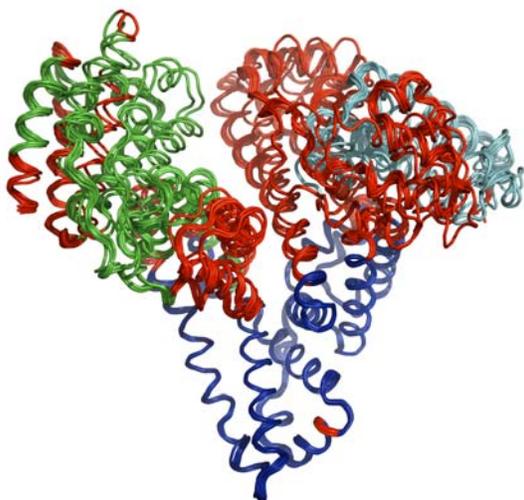


Figura 4.2.6.3.3. Superposición espacial de la cadena A de modelos de HSA de acuerdo con ESCET. Mediante este análisis se pueden distinguir tres cuerpos rígidos principales de la molécula (de mayor a menor: azul, verde y celeste) así como tres grandes regiones flexibles (rojo).

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.2.6.3.4 y en la Tabla 4.2.6.3.2 y se discuten más adelante. Se puede observar que usando la minimización de R_{Free} con $R_{\text{Free}} - R_{\text{w}}$ cercano a 5 % como criterios de bondad del ajuste, la definición que arrojó mejores resultados fue la 4A, es decir un grupo TLS por dominio. Esta definición (4A) es idéntica a la que genera el servidor TLSMD cuando se usa la opción de análisis anisotrópico sobre el PDB que contiene B_{eq} (con información de grupos TLS). Así, solo cuando el PDB contiene información de anisotropía, el servidor TLMSD define los mismos grupos TLS que nosotros.

El hecho de que una solución se distinga del resto por los criterios arriba señalados, es un buen indicador de la correcta determinación del modelo. Cada grupo de TLS agrega al modelo 20 parámetros, por lo que la contribución que el refinamiento con

parámetros de TLS puede hacer al potencial “sobre-refinamiento” es escasa. La validación cruzada del refinamiento cristalográfico a través del cálculo de la diferencia de residuales de los

set de reflexiones de trabajo (R_W) y de validación no usado en el refinamiento (R_{FREE}) es la forma habitual de valorar si existe sobre refinamiento. Menos frecuentemente se lo utiliza para evidenciar sub refinamiento (frecuentemente debido a sobre contención). Los cambios en el ΔR se pueden ver en el Panel B de la Fig. 4.2.6.3.4. Se puede observar que el modelado con una definición adecuada de grupos TLS (número y composición) favorece un refinamiento óptimo (disminución de R_{Free} y R_W con aumento de $R_{Free} - R_W$ hasta un máximo estable no mayor a 5 %).

Se ha reportado que el uso de refinamiento con grupos de TLS tiende a aumentar los B_i , pero el grado de cambio depende completamente del caso en estudio.³⁴⁴ En el Panel C de la Fig. 4.2.6.3.4 se muestran los cambios en B_{avg} y en el error estándar de B_i estimado a través del uso de funciones de máxima verosimilitud en REFMAC (σB_i). Aunque σB_i es mínimo en ausencia de grupos de TLS, y máximo usando un grupo de TLS para la unidad asimétrica entera, el σB_i se estabiliza (Fig. 4.2.6.3.4, Panel C) a medida que baja el R_{Free} (Fig. 4.2.6.3.4, Panel A). Siendo σB_i un estimador de precisión, es independiente del error sistemático (la desviación con respecto al verdadero valor de la variable) debido al refinamiento subóptimo de los B_i en ausencia de definiciones adecuadas de grupos de TLS y en presencia de contenciones fuertes de SNC. Nótese que la optimización de las definiciones de grupos de TLS resultó en un aumento del B_{avg} del modelo (Fig. 4.2.6.3.4 y Tabla 4.2.6.3.2). Esto está de acuerdo con las desviaciones y los RMSD de B_i entre cadenas que mostramos en los Paneles D-F de la Fig. 4.2.6.3.1. Es importante hacer notar que los factores B_{avg} y B_i que mostramos en las Figs. 4.2.6.3.1 y 4.2.6.3.4 refinados con grupos TLS son factores B equivalentes (B_{eq}), es decir son B que conjugan los componentes de TLS (anisotrópico) y residual (verdaderamente isotrópico). También es importante mencionar que las contenciones de factores B y de SNC no se aplican al componente de TLS de los B_{eq} , solo

se aplican al componente residual. Esto último se analiza con más detalle en el apartado siguiente.

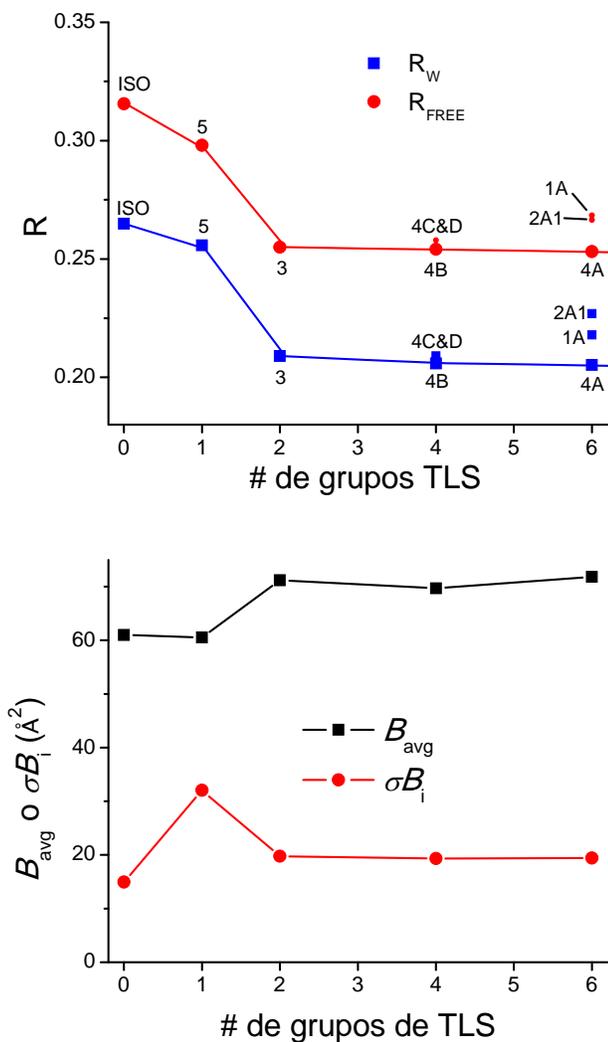


Figura 4.2.6.3.4. Uso de grupos TLS en el refinamiento. Panel A. Residuales cristalográficos de los modelos refinados usando distintas definiciones de grupos de TLS (cada definición se indica junto al punto que la representa, las denominaciones son las mismas que se usan en la Tabla HIII). **Panel B.** Diferencia de residuales cristalográficos. **Panel C.** Se representan los B_{avg} e incertidumbres estándares de B_i para los mejores modelos en cada categoría de números de grupos de TLS (son los que se representan en azul en el panel B). No se toma en cuenta la contribución de las aguas al componente anisotrópico del B_{avg} .

Tabla 4.2.6.3.2. Comparación de resultados de refinamientos usando distintas definiciones de grupos de TLS ^W

Referencias	B_{avg} (error B_i) (\AA^2)	R_w (R_{FREE})	ΔR ($R_{FREE} - R_w$)	Definiciones de grupos TLS
XXXX ^{ISO} ₁₈₂	61.02 (14.93)	0.26500 (0.31558)	0.05058	Sin parámetros de TLS
XXXX ^{TLS} ₂₄₆	74.17 (12.84)	0.21794 (0.26847)	0.05053	1A 3 cuerpos rígidos por cadena*, comenzando con $B_i = B_i$ refinados usando la misma definición
XXXX ^{TLS} ₂₄₅	74.97 (13.72)	0.23537 (0.27902)	0.04365	1B 3 cuerpos rígidos por cadena*, comenzando con $B_i = 20$ \AA^2
XXXX ^{TLS} ₂₃₃	71.58 (20.2)	0.20795 (0.25841)	0.05046	2A1 2 grupos por cadena (NH ₂ -276, 277-CO ₂)
XXXX ^{TLS} ₂₃₂	70.85 (24.87)	0.22688 (0.26654)	0.03966	2A2 3 grupos por cadena (NH ₂ -143,144-536, 537-CO ₂)
XXXX ^{TLS} ₂₀₆	71.18 (19.77)	0.20902 (0.25500)	0.04598	3 2 grupos (Cadena A, Cadena B)
XXXX ^{TLS} ₂₁₃	71.82 (19.44)	0.20530 (0.25314)	0.04784	4A 3 cuerpos rígidos por cadena (DI, DII, DIII)
XXXX ^{TLS} ₂₂₈	69.70 (19.35)	0.20588 (0.25408)	0.0482	4B 2 grupos por cadena (DI \cup DII, DIII)
XXXX ^{TLS} ₂₄₇	72.55 (20.40)	0.20689 (0.25554)	0.04865	4C 2 grupos por cadena (DI, DII \cup DIII)
XXXX ^{TLS} ₂₄₉	72.06 (20.41)	0.20902 (0.25792)	0.0489	4D 2 grupos por cadena (DI \cup DIII, DII)
XXXX ^{TLS} ₂₂₁	60.52 (32.05)	0.25578 (0.29805)	0.04227	5 1 grupo (Cadena A \cup B)

^W Los factores B promedio que aquí se muestran, no toman en cuenta el componente anisotrópico de los B de las moléculas de agua, que suma aproximadamente 32 \AA^2 más.

* grupo 1 = (5-64 \cup 140-147), grupo 2 = (203-243 \cup 255-282 \cup 288-318 \cup 321-390 \cup 438-446), grupo 3 = (447-449 \cup 436-437 \cup 404-433 \cup 489-537 \cup 558-582).

4.2.6.4. Optimización de contenciones de Simetría No Cristalográfica (SNC). Evaluamos distintas opciones de contenciones de SNC (ver Tabla 4.2.6.4.1 y Fig. 4.2.6.4.1). Se mantuvieron restricciones fuertes de simetría no cristalográfica hasta etapas avanzadas del refinamiento. A nuestro entender, el sesgo que introdujimos con ello es hacia una estructura promedio entre las estructuras de la cadena A y B, quizás hacia una estructura más próxima a la cadena que mejor definida esté en términos de calidad de la difracción y de fases iniciales.

La decisión sobre cual es el mejor tratamiento para las contenciones de SNC fue difícil de tomar. Si comparamos el uso de contenciones fuertes sobre cadena principal y cadenas laterales de ambas moléculas de HSA de la unidad asimétrica (modo de refinamiento **F** en la Fig. 4.2.6.4.1, Panel A) con el uso de contenciones **Fuertes** sobre la **Cadena Principal (FCP)** pero **Moderadas** o **Leves** sobre las **Cadenas Laterales (FCPMCL y FCPLCL)**; Fig. 4.2.6.4.1, Panel A) observamos que el R_{FREE} disminuye sustancialmente a pesar de un muy leve cambio del R_w (señalado con un óvalo azul). Si se usan contenciones **Medias** para cadenas principal y laterales (modo de refinamiento **M**, se observa una disminución importante de R_w y una disminución sostenida del R_{FREE} (Fig. 4.2.6.4.1, Panel A), con aumento de ΔR (Fig. 4.2.6.4.1, Panel B). También se puede apreciar que las variaciones en los pesos (categorizados por REFMAC en fuertes, medios y leves) de estas contenciones de SNC no afectan en gran medida ($\cong 2 \text{ \AA}^2$) el valor promedio de los B_{eq} del modelo (Fig. 4.2.6.4.1, Panel C), por lo que detalles de este tipo pasan frecuentemente inadvertidos. Es interesante notar que los B_{eq} disminuyen cuando el R_{FREE} y el ΔR aumentan (Fig. 4.2.6.4.1, Paneles A y B; y Fig. 4.2.6.4.2).

Los resultados presentados en los gráficos de la Fig. 4.2.6.4.1 indican que no se ha logrado llegar a un óptimo con las contenciones entre cadenas usadas. Claramente, los peores

resultados se obtienen usando contenciones **L** (leves), se puede observar que el R_{FREE} y el ΔR alcanzan los valores más altos (Fig. 4.2.6.4.1, Paneles A y B). Usando contenciones **FCPLCL** se obtiene un mínimo de ΔR (Fig. 4.2.6.4.1, Panel B, círculo azul), debido a un ligero aumento de R_{W} y una disminución de R_{FREE} (Fig. 4.2.6.4.1, Panel A, óvalo azul). Usando contenciones **M** entre las cadenas, el R_{FREE} y el R_{W} disminuyen aún más (Fig. 4.2.6.4.1, Panel A, óvalo rojo). Sin embargo, esto ocurre a expensas de un aumento de ΔR a un valor mayor a lo esperado (Fig. 4.2.6.4.1, Panel B, círculo rojo). Por tanto decidimos avanzar hacia un modelo más detallado aún, usando contenciones de SNC entre dominios. Las combinaciones realizadas buscan encontrar el grado y la distribución óptima de las mismas en cada dominio y se enfocan en grados de contención intermedios entre las contenciones FCPLCL y M aplicadas a las cadenas completas (Tabla HVII, Contenciones entre dominios I, II y III). En la Fig. H14 se muestra que se obtiene un mínimo global de $R_{\text{FREE}} = 24.778 \%$ con un $\Delta R = 4.892 \%$ usando las siguientes contenciones:

- medias sobre el dominio I,
- fuertes sobre la cadena principal y laxas sobre las cadenas laterales del dominio II, y
- fuertes sobre el dominio III

Esto por supuesto tiene consecuencias sobre las diferencias en las coordenadas de los dominios. Mientras que los RMSD de superposición atómica de ambas cadenas A y B de la unidad asimétrica y de superposición de los dominios IA y IB; IIA y IIB; y IIIA y IIIB son de 0.290, 0.346, 0.120 y 0.094 Å, los RMSD de los Beq entre las cadenas A y B y entre los dominios IA y IB; IIA y IIB; y IIIA y IIIB son de 7.04, 10.44, 6.79 y 3.87 Å². Los dominios modelados con

contenciones más fuertes (dominio III) se parecen más entre si en términos de parámetros atómicos (coordenadas y factores Beq).

Tabla 4.2.6.4.1. Optimización de contenciones de SNC en el refinamiento

\mathbb{W}	Referencias	B_{eq} (σB_{eq}) [Å^2]	B_R^* (Å^2)	R_W (R_{FREE})	Contenciones
Contenciones entre Cadenas A y B	XXXX TLS 1 x dominio 213	71.82 (19.44)	41.28	0.20530 (0.25314)	Fuertes (apretadas o de alto peso)
	XXXX TLS 1 x dominio 236	72.38 (19.51)	41.85	0.20516 (0.25279)	Fuertes sobre la Cadena Principal y Medias sobre Cadenas Laterales
	XXXX TLS 1 x dominio 237	73.60 (19.93)	43.07	0.20544 (0.25215)	Fuertes sobre la Cadena Principal y Laxas (de bajo peso) sobre las Cadenas Laterales
	XXXX TLS 1 x dominio 235	74.07 (20.29)	43.53	0.19460 (0.25146)	Medias
	XXXX TLS 1 x dominio 239	73.72 (20.10)	43.18	0.19436 (0.25358)	Laxas
Contenciones entre Dominios I, II y III	XXXX TLS 1 x dominio 260	72.96 (19.41)	42.43	0.19697 (0.25293)	A Medias sobre dominios I y II, Fuerte dominio III
	XXXX TLS 1 x dominio 269	72.60 (19.22)	41.40	0.19886 (0.24778)	B Medias sobre dominio I, Fuertes sobre la Cadena Principal y Laxas sobre las Cadenas Laterales de dominio II, Fuerte dominio III
	XXXX TLS 1 x dominio 281	71.97 (19.68)	40.77	0.20188 (0.25265)	B' Fuertes sobre la Cadena Principal y Laxas sobre las Cadenas Laterales del dominio I, Medias sobre el dominio II, Fuerte dominio III
	XXXX TLS 1 x dominio 263	72.18 (19.14)	40.99	0.20262 (0.24942)	C Fuertes sobre la Cadena Principal y Laxas sobre las Cadenas Laterales de dominios I y II, Fuerte dominio III
	XXXX TLS 1 x dominio 267	71.95 (19.26)	40.76	0.20264 (0.24947)	D Fuertes sobre la Cadena Principal y Laxas sobre las Cadenas Laterales de dominios I y II, Fuerte sobre la Cadena Principal y Medias sobre Cadenas Laterales de dominio III
	XXXX TLS 1 x dominio 255	72.41 (19.69)	41.87	0.19703 (0.25288)	E Medias sobre dominios I y II, Fuerte sobre Cadena Principal y Laxa sobre Cadenas Laterales de dominio III

* B residual (sin componente de TLS)

\mathbb{W} Los factores B promedio que aquí se muestran, no toman en cuenta el componente anisotrópico de los B de las moléculas de agua, que suma aproximadamente 32 Å^2 más.

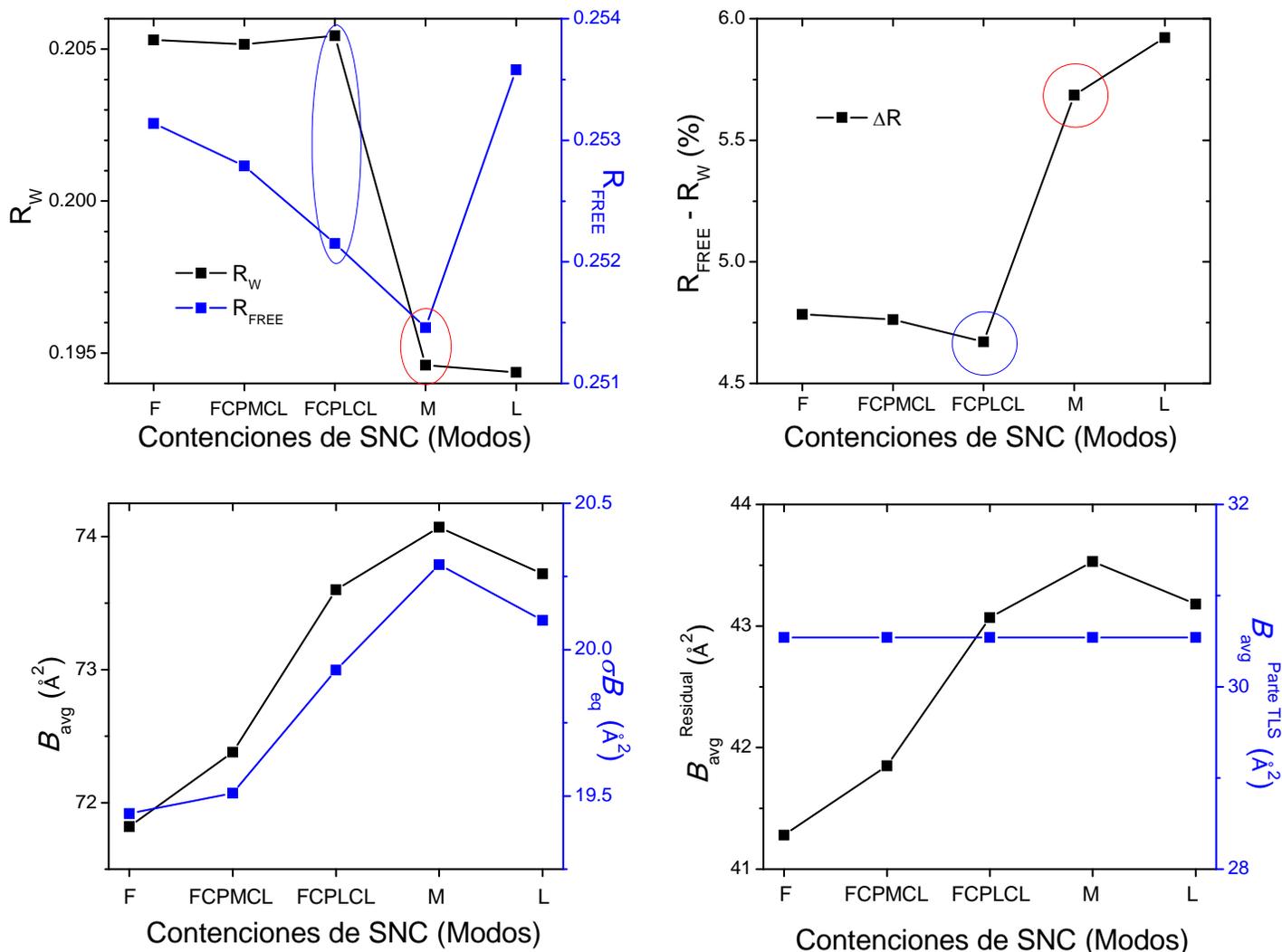


Figura 4.2.6.4.1. Resultados de la evaluación de distintas formas de contención entre cadenas A y B. Las etiquetas en las abscisas de ambos gráficos tienen los siguientes significados: F, contenciones Fuertes; FCPMCL, contenciones Fuertes entre Cadenas Principales y Medias entre Cadenas Laterales; FCPLCL, contenciones Fuertes entre Cadenas Principales y Laxas entre Cadenas Laterales; M, contenciones Medias; L, contenciones Laxas. **Panel A.** Cambios en R_{FREE} y R_W con distintos modelos de contenciones de simetría no cristalográfica en el refinamiento. Nótese que es un gráfico de doble eje de ordenadas, los valores de R_W se leen en el eje de la izquierda y los de R_{FREE} en el azul (derecha). **Panel B.** Cambios en ΔR . **Panel C.** B_{avg} y σB_{eq} refinados con distintas contenciones de SNC. **Panel D.** Componentes residual (isotrópico) y de TLS de B_{avg} (B_{eq} promedio), sin tener en cuenta la contribución de las aguas al componente de TLS (TLSO).

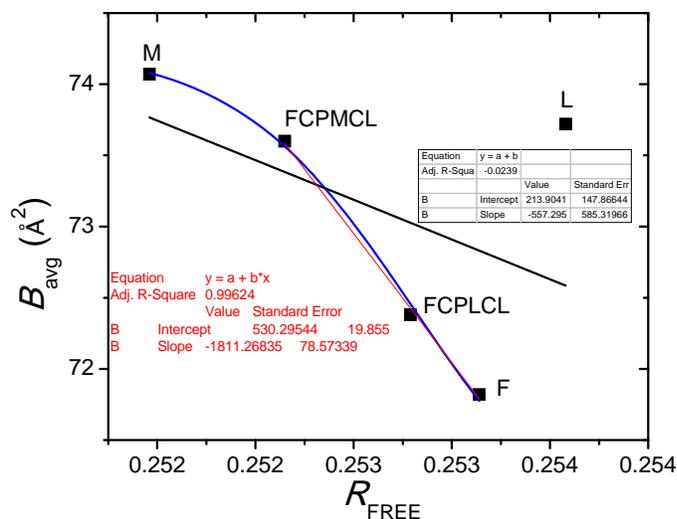


Figura 4.2.6.4.2. Correlación entre B_{avg} y R_{FREE} observado durante la optimización de contenciones de SNC. Se grafica el B atómico promedio de los modelos resultantes de considerar distintas contenciones de SNC en función del R_{FREE} de cada modelo. Las líneas representan curvas de mejor ajuste a funciones lineales (negra, todos los datos; roja, solo tres puntos) y de Boltzmann (azul).

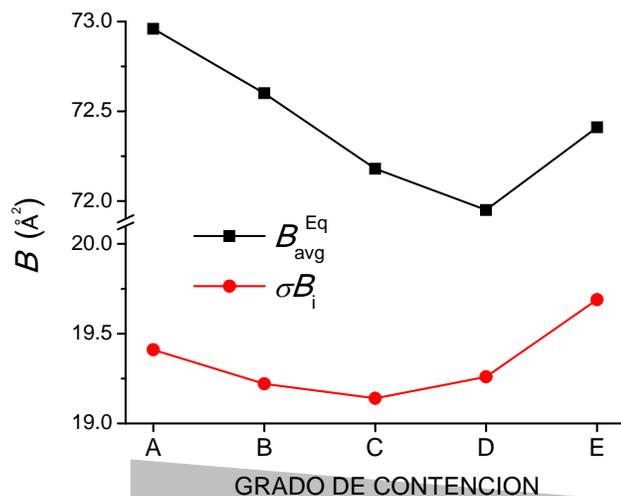
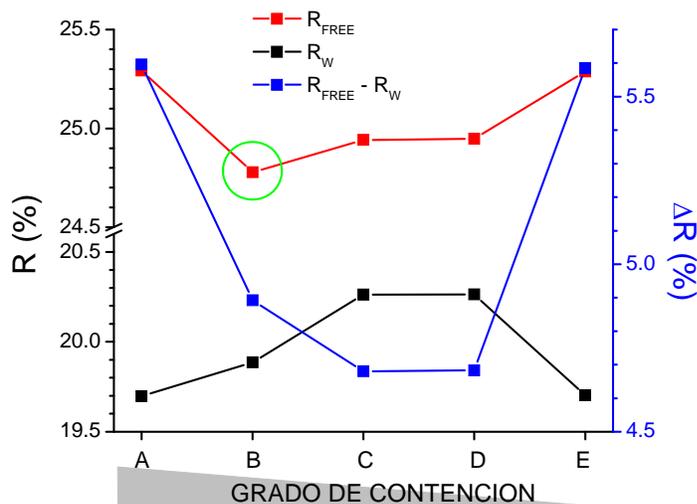


Figura 4.2.6.4.3. Resultados de la evaluación de distintas formas de contención entre dominios. Las etiquetas en las abscisas de ambos gráficos tienen los significados detallados en la Tabla H92. **Panel A.** R_{FREE} , R_{W} y ΔR con distintos modelos de contenciones de simetría no cristalográfica en el refinamiento. Nótese que es un gráfico de doble eje de ordenadas, los valores de R_{FREE} y R_{W} se leen en el eje y de la izquierda (que tiene un corte) y los ΔR en el azul se leen en el eje de la derecha). **Panel B.** B_{avg} y σB_i refinados con distintas contenciones de SNC.

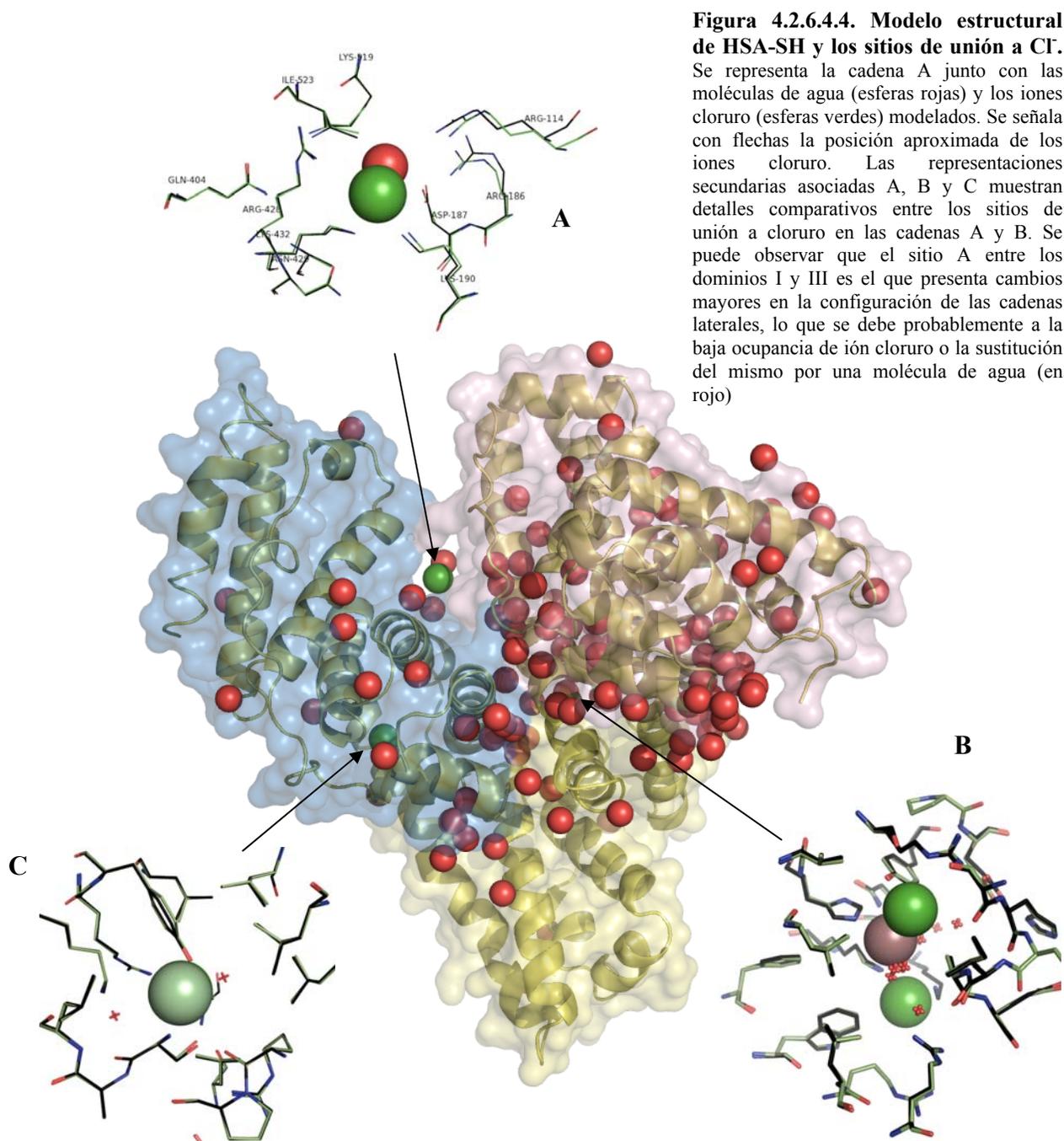


Tabla 4.2.6.4.2. Tabla cristalográfica para nuestro modelo criogénico de (HSA-SH)₂(Cl)₆

Condiciones Experimentales	
Temperatura (K)	100
Longitud de Onda (Å)	1.0809
Indexado y procesamiento de datos	
Programas	iMosflm y Scala
Grupo de espacio	P 1
a b c (Å)	58.9 59.2 95.6
α β δ (grados)	75.2 87.8 74.2
Resolución de los Datos	30 - 2.3 (2.4 - 2.3)
Reflexiones Medidas	54717
Multiplicidad	2.6 (2.6)
Complejidad (%)	93.1 (95)
Moléculas por Unidad Asimétrica	2
Estimación del B_{avg} según Gráfico de Wilson (Å ²)	49.3
Solución de la Estructura⁸	
Programa	AMoRe
Modelo de Búsqueda	1AO6
Refinamiento	
Programa	Refmac 5.5.0109
Procedimiento	Refinamiento con Contenciones (incluyendo contenciones de SNC) de Máxima Verosimilitud (MV) con parametrización TLS
Resolución (Å)	25.5 – 2.3
Definición de Grupos TLS	res 2-199; 200-389; 390-582 (+ aguas unidas)
R _{cris} [N° reflexiones]	0.199[48633]
R _{Free} [N° reflexiones]	0.248[1009]
FOM	0.825
RMSD longitud de enlaces (Å)	0.019
RMSD ángulos (grados)	1.684
B_{avg} (B equivalente, Å ²)	72.6
B_{avg} residual (Å ²)	41.4
ESU factores B basado en MV (Å ²)	19.224
ESU coordenadas basado en MV (Å)	0.209
Átomos proteicos (sin H)	9234
Moléculas de Agua	228
Aniones Cloruro	6
Construcción del Modelo	
Programas	Coot v 0.6-pre-1
Modelo Inicial	1AO6 (residuos 5-582) + Ruido blanco (0.4 Å) + B = 49.3 Å ² (de Plot de Wilson)
Validación	
Programas	Coot v 0.6-pre-1
Outliers en el Grafico de Ramachandran (%)	1.23
Residuos en Regiones Permitidas del Grafico de Ramachandran (%)	3.42

⁸ El RM con modelos derivados de HSA en complejo con lípidos (222) Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J. X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. C. *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, 291, 813., pese a ser el de mayor resolución disponible, ofreció dificultades (múltiples soluciones de baja correlación). El modelo de búsqueda que resultó efectivo derivó del modelo 1AO6. (210) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng* **1999**, 12, 439. Resultaron dos soluciones bien diferenciadas del resto, con $CC_F = 0.372$ y 0.344 (rotación), $CC_T = 0.369$ y 0.624 (traslación) y $CC_A = 0.624$ y 0.624 (ajuste).

4.2.6.5. Definición y análisis de sitios de unión para aniones cloruro. La optimización del refinamiento con contenciones geométricas, de factores B y de SNC, y la parametrización de grupos TLS permitieron el posterior modelado de 6 iones cloruro que cocrystalizaron unidos a las dos moléculas de HSA presentes en la unidad asimétrica. Estos iones Cl^- se distribuyen en forma asimétrica como se detalla más adelante. Los iones cloruro fueron agregados a la solución madre en forma de NaCl porque es conocido que estabilizan a la forma nativa de la HSA.¹⁹⁰ Acorde con ello, observamos que su presencia en el licor madre (50 - 100 mM NaCl) previene la precipitación de la proteína en la gota colgante (aprox. 60 mg/mL, concentración inmediatamente luego del mezclado) y favorece la separación de fases líquidas, a la vez que proporciona muestras monocristalinas de mayor tamaño y mejor calidad de difracción.

La posible presencia de aniones cloruro en el cristal de HSA-SH fue advertida durante la validación del modelo con Coot^{325,345} y varias observaciones soportan la asignación atómica realizada de las densidades electrónicas correspondientes. Si se hipotetiza que son moléculas de agua, luego del refinamiento estas aguas hipotéticas se diferencian del resto por B_{eq} bajos. Los B_{eq} de estas moléculas de agua son significativamente menores que los átomos circundantes que las unirían a la proteína. Las densidades electrónicas a 1 sigma de contorno son de gran volumen (mayor que para aguas verdaderas). Además, se observan diferencias de densidades electrónicas positivas en mapas $F_{\text{O}} - F_{\text{C}}$ usando contornos de densidad electrónica entre 2.5 y 3 sigmas pese a haber ocupado dichas posiciones con átomos de O. Todo esto se puede explicar por la diferencia en número de electrones del átomo de cloro (17 e^-) respecto del átomo de O (8 e^-).

Los sitios de unión que así se definieron presentan varios residuos con carga positiva agrupados, grupos proteicos polares y moléculas de agua bien dispuestos para interactuar en forma electrostática con los iones Cl^- . Todos los aniones de cloruro fueron refinados con una

ocupación de 1, dando lugar a factores B_i promedio $B_{\text{avg}}^{\text{Cl}^-} = 83.7 \text{ \AA}^2$, lo que está 18.22 \AA^2 por encima del B_{avg} los de los átomos vecinos (65.5 \AA^2) y 7.6 \AA^2 del B_{avg} para todos los átomos del modelo (76.1 \AA^2). Esta diferencia es comparable a valor estimado el desvío estandar (incertidumbre) en los factores B: $\sigma B_i = 17.3 \text{ \AA}^2$. Los seis Cl^- están unidos en forma asimétrica como ya mencionamos y pequeños cambios conformacionales locales y concertados (varios residuos) forman parte de la asimetría, como se detalla a continuación. Exceptuando un sitio, los aniones Cl^- se unen a sitios bien conocidos de unión a fármacos.^{190,247,339}

En el modelo a temperatura ambiente 1E78 (60 HOH, $\lambda_{\text{min}} = 2.6 \text{ \AA}$, $R_W = 0.247$, $R_{\text{FREE}} = 0.277$,)³⁴⁶ y en el modelo a temperatura criogénica 3JRY (458 HOH, $\lambda_{\text{min}} = 2.3 \text{ \AA}$, $R_W = 0.212$, $R_{\text{FREE}} = 0.268$)³⁴⁷ se puede encontrar moléculas de agua en la posición que los iones cloruro modelados por nosotros ocupan en los sitios de Sudlow I y II (no se muestra). No hemos encontrado evidencias de moléculas de agua en el sitio de unión a Cl^- entre los dominios I y III en ningún modelo reportado. El modelo reportado por Sugio y cols. (1AO6)²¹⁰ presenta muy pocas moléculas de agua y ninguna ocupa sitios de unión a Cl^- . Los reportes previos no hacen mención específica a la inclusión de Cl^- en la condición de cristalización, pero tampoco se menciona como se prepararon la proteína ni los amortiguadores de pH de fosfato.²¹⁰

Tabla 4.2.6.5.1. Información sobre aniones Cl⁻ y su unión a la proteína en el modelo depositado (código PDB 4EMX)⁹

Sitio	B_{eq} (Å ²)	Átomo más cercano (distancia, Å) [ΔB_{eq} , Å ²]
Interdominio, cadena A	98.7	NZ Lys190 y Lys 432 (3.16 y 3.10) [2.82 y 10.06]
Sitio <i>m</i> Sudlow I, cadena A	67.6	N2 His242 (2.84) [25.63]
Sitio <i>p</i> Sudlow I, cadena B	78.41	OH Tyr150 y NE Arg257 (2.78 y 3.47) [27.67 y 9.29]
Sitio <i>v</i> Sudlow I, cadena B	84.2	Lys199 (3.1) [38.54]
Sudlow II, cadena A	92.77	OH Tyr411 y OG Ser489 (3.07 y 3.47) [23.91 y 23.08]
Sudlow II, cadena B	80.48	OH Tyr411 y OG Ser489 (2.83 y 3.05) [10.43 y 10.77]

⁹ Sitio *m*, medio; sitio *p*, piso; sitio *v*, vestíbulo.

4.2.6.5.1. Sitio de unión a cloruro entre los dominios I y III. Un ión cloruro es modelado en la interfaz entre los dominios I y III de la cadena A. En cambio, no hay evidencias de Cl⁻ unido a la cadena B en similar localización. El sitio de unión incluye tres residuos cargados positivamente aportados por el dominio I: Lys 190 (NZ, 3.1 Å); Arg114 (NH1 y NH2, 7.0 y 6.9 Å) y Arg186 (NH1, 6.2 Å). El Asp187 (OD1, 5.3 Å) pertenece funcionalmente al sitio, donde interacciona fuertemente con la Arg186. El dominio III también contribuye tres residuos con cargas positivas:

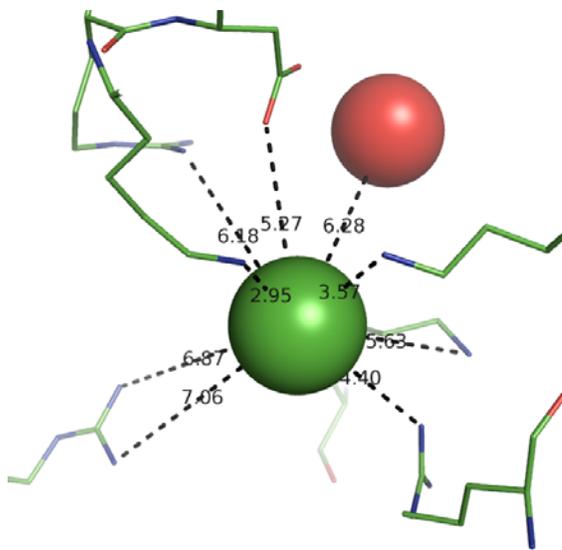


Figura 4.2.6.5.1.1. Sitio de unión a cloruro entre los dominios I y III. Un ión cloruro es modelado en la interfaz entre los dominios I y III de la cadena A.

Lys 432 (NZ, 3.6 Å); Arg428 (NH1, 4.4 Å) y Lys 519 (NZ, 5.6 Å). Al menos dos grupos polares están presentes, la Asn429 (OD1, 5.2 Å) y una molécula de agua que es modelada en cierta cercanía (HOH 88, 6.3 Å). El uso de herramientas bioinformáticas de cálculo de energía de unión disponibles en la web,³⁴⁸ mostraron que una parte significativa de la escasa energía de unión entre estos dominios se debe a este sitio de unión a cloruro (no se muestra). En la Fig. 4.2.6.4.4 mostramos una vista panorámica de la molécula de HSA (cadena A, en cartoon y superficie molecular parcialmente transparente), con el ión cloruro interdominio en color verde (flecha) y moléculas de H₂O en forma de esferas rojas. En el Panel A de la Fig. 4.2.6.4.4 y en la Fig. 4.2.6.5.1.1 se muestra con más detalle el sitio, destacándose la escasa asimetría presente entre la

cadena A que tiene Cl⁻ unido en este sitio entre dominios, y por otro lado, la cadena B que no lo presenta. Se puede observar que dicha asimetría afecta principalmente al dominio I, lo que es esperable ya que se usaron contenciones fuertes (**F**) de SNC entre los dominios III de las cadenas A y B, y contenciones medias entre los dominios I. Este Cl⁻ sería el más lábil de los 6 unidos a la HSA-SH, ya que presenta mayores B_{eq} ($\sim 100 \text{ \AA}^2$), exposición al solvente desordenado y distancias de coordinación. Es importante aclarar que no modelamos la ocupación parcial de este u otros sitios de unión a cloruro, preferimos dejar que los factores B_{eq} y las coordenadas se refinaran asumiendo ocupación de 1 porque pensamos que a esta resolución y con la interferencia de las contenciones de SNC sería muy difícil distinguir entre ambas opciones.

4.2.6.5.2. Unión de Cl⁻ en el sitio de Sudlow I de la cadena A. Ambas cadenas presentan iones Cl⁻ ocupando en forma distinta el sitio de Sudlow I (Fig. 4.2.6.5.2.1). El ión Cl⁻ que ocupa el sitio de unión a fármacos de Sudlow I en la cadena A está fuertemente unido a la His242 (NE2, $\sim 2.9 \text{ \AA}$), en una posición que dimos a llamar media (**m**) (Fig. 4.2.6.5.2.2, Panel A). De los 6 iones Cl⁻ modelados este es el que tiene menor B_{eq} (64.3 \AA^2), en relación con el bajo B_{eq} de la His242 (NE2, 43.3 \AA^2), y es el único que no tiene superficie expuesta al solvente, ya que moléculas de agua estructurales lo protegen del solvente desordenado. Otros residuos con carga positiva que participan de la unión son Lis199 (NZ, 4.8 \AA) y Lis195 (NZ, 5.9 \AA), pertenecientes al dominio I. Más distantes se encuentran residuos positivos del dominio II Arg257 (NH2, 6.5 \AA) y Arg222 (NH1, 6.8 \AA). La Tyr150 se halla relativamente distante (OH, 4.1 \AA) unida a una molécula de agua (HOH 36, 3.02 \AA). Además del ión Cl⁻, el sitio está ocupado por 10 moléculas de agua. El anión Cl⁻, dos HOH directamente unidas al ión cloruro formando un ángulo de 104° , y otras dos

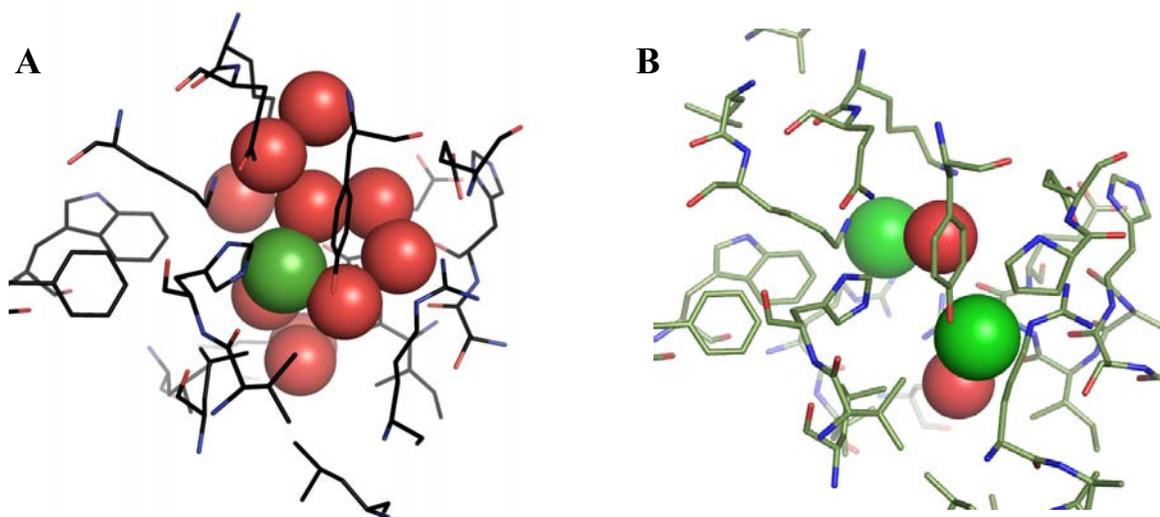


Figura 4.2.6.5.2.1. El sitio de unión de Sudlow I contiene 1 o 2 iones cloruro. Mientras sitio de unión a fármacos de Sudlow II parece albergar a un solo anión cloruro (Fig. H2, panel c y Fig. H5), el sitio de Sudlow I (de mayor complejidad y tamaño) puede alojar un Cl⁻ (Cadena A, **Panel A**) o dos Cl⁻ (cadena B, **Panel B**).

moléculas de agua, forman en conjunto un pentágono bastante regular, sugiriendo quizás una clave de por qué este sitio es capaz de unir moléculas orgánicas aromáticas polares, entre ellas Prodan.

4.2.6.5.3. Sitio de unión de Sudlow I, cadena B. Dos iones Cl⁻ se modelaron en el sitio de unión de Sudlow I de la cadena B (Fig. 4.2.6.5.2.1, Panel B). Uno ocupa una posición expuesta en el vestíbulo (v) del Sitio de Sudlow I (Fig. 4.2.6.5.2.2, Panel B). A esta configuración la llamamos v^1 , usando el superíndice para afirmar que el sitio está ocupado, 1 ; o libre, 0), en forma electrostática unido a la Lis199 (NZ, 3.1 Å), Lis195 (NZ, 4.2 Å), Arg222 (NH2 y NH1, 5.2 y 5.3 Å). Más distante se halla la Arg218 (NH1, 6.5 Å). Como se muestra en el Panel B de la Fig. 4.2.6.5.2.2, el otro ión Cl⁻ está en una configuración que llamamos p^1 , fuertemente unido a la Tyr150 (OH, 2.8 Å) en el interior del sitio de Sudlow I, donde también interacciona fundamentalmente con la Arg257 (NE, 3.6 Å) y menos con la His242 (NE2, 4.8 Å).

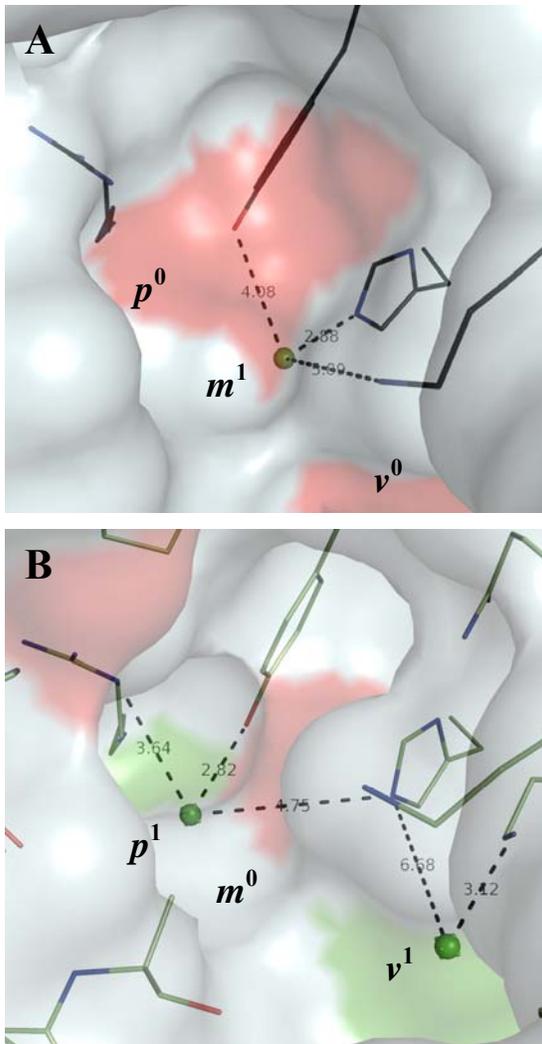


Figura 4.2.6.5.2.2. Entrada al sitio de Sudlow I y sitios de unión de Cl⁻. Sitio de unión de Sudlow I de la cadena A (**Panel A**) y de la cadena B (**Panel B**). Se muestran las superficies moleculares transparentadas de las cadenas A y B en gris, de los iones Cl⁻ en verde y de las moléculas de agua en rojo. Los iones Cl⁻ se muestran como esferas pequeñas y residuos seleccionados como líneas gruesas. Los sitios de unión se denominan **p** (por integrar el piso), **m** (por medio) y **v** (por vestibular).

Estas dos formas de unión de iones Cl⁻ ($v^0 m^1 p^0$, con 5 moléculas de agua ordenadas, cadena A; y $v^1 m^0 p^1$, cadena B) parecen ser isoenergéticas, ya que prácticamente no se observan cambios conformacionales en la proteína, y claro está, ambas formas de unión coexisten en el mismo cristal. El cambio conformacional más notorio entre las cadenas A y B, asociado a la forma de unión de iones Cl⁻ es el leve desplazamiento de la Lys 195 hacia fuera del sitio cuando un único Cl⁻ (unido fuertemente a la His242) y 10 moléculas de agua (4 de ellas unidas al Cl⁻) ocupan el sitio, alejándose del Glu292 (7.13 vs 6.18 Å); y acercándose al oxígeno peptídico del residuo de Ala 291 (4.76 vs 5.34 Å). Adaptaciones estructurales que

involucran a este residuo (Lys 195) se pueden encontrar en varios modelos que muestran la unión de fármacos del sitio de unión de Sudlow I.

En algunos casos se puede observar que el NZ de

la Lys 195 pasa a interactuar en forma electrostática con el ligando (2BXH). Algo similar ocurre cuando dos iones Cl⁻ se unen al sitio de Sudlow I. La Lys 195 interactúa (4.2 Å) con el Cl⁻ que se ubica en la entrada al sitio.

Las posiciones *v* (vestibular), *m* (media) y *p* (piso) no se podrían ocupar todas a la vez, es decir el estado ($s^1 m^1 p^1$) es energéticamente prohibido. Es probable que los estados “isoenergéticos” demostrados ($s^1 m^0 p^1$) y ($s^0 m^1 p^0$), sean de menor energía que los estados mono ocupados ($s^1 m^0 p^0$) y ($s^0 m^0 p^1$) a las concentraciones de proteína y NaCl empleadas. Los estados di ocupados ($s^1 m^1 p^0$) y ($s^0 m^1 p^1$) serían también muy poco probables. Estos resultados son pistas importantes de cómo ocurre el transporte de Cl^- hacia dentro y fuera del sitio de Sudlow I y sobre las formas de unión de aniones y otras moléculas. Los resultados también indican que el tiempo de estadía de moléculas de agua en el sitio y el orden de las mismas es mayor en el estado ($s^0 m^1 p^0$).

4.2.6.5.4. Ión cloruro unido a Tyr411 y Ser 489 en el sitio de unión de Sudlow II. En el sitio

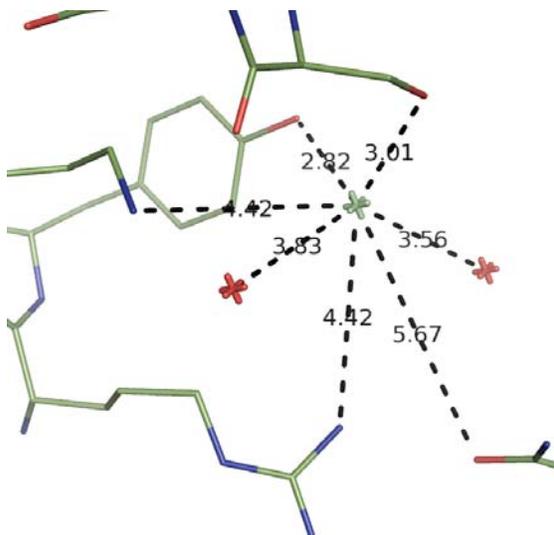


Figura 4.2.6.5.4.1. Forma de unión de Cl^- en el sitio de Sudlow II.

de Sudlow II de las cadenas A y B modelamos un anión cloruro unido fuertemente a la Tyr411 (OH, = 2.8 Å, cadena B) y la Ser 489 (OG, 3.0 Å, cadena B). Los residuos positivos de la Arg410 (NH1, 4.4 Å, cadena B) y Lys 414 (NZ, y 4.4 Å, cadena B) participan de la unión. Modelamos dos moléculas de agua (HOH 215, 3.56 Å; y HOH 17, 3.83 Å) asociadas a la cadena B, pero no a la cadena A cerca

del ión cloruro.

4.2.7. Estudios de comparación conformacional usando ESCET de los modelos de HSA criogénico y a temperatura ambiente de la forma apo y en complejo con ligandos del sitio de Sudlow I.

4.2.7.1. Comparación de la conformación del esqueleto principal. La comparación estructural de dos modelos cristalográficos que representan diferentes estados funcionales y/o físicos de la misma proteína puede parecer fácil si grandes diferencias conformacionales son detectadas por

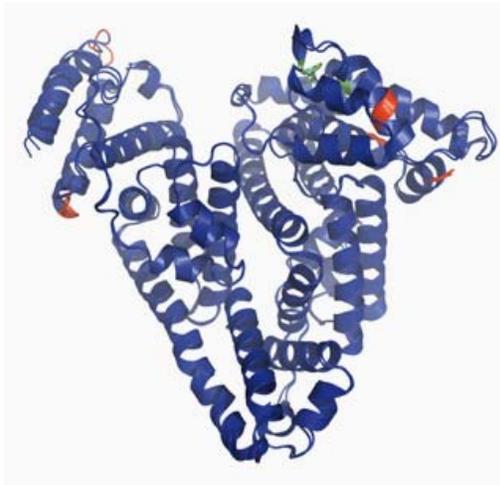


Figura 4.2.7.1.1. Superposición estructural de los modelos de HSA-SH a temperatura criogénica y ambiente según ESCET. El programa ESCET calcula distancias entre pares de átomos A y B y A' y B' equivalentes en los modelos, estima de acuerdo con Cruickshank la incertidumbre posicional de las respectivas coordenadas, para establecer si las diferencias en las distancias A-B y A'-B' son estadísticamente significativas. Las **regiones de la proteína coloreadas de azul** fueron catalogadas como zonas sin cambios conformacionales significativos. Las **zonas rojas**, son zonas evaluadas como flexibles, y la zona en verde, fue detectada como un cuerpo rígido secundario. Para estas comparaciones se aceptaron cambios como significativos usando un nivel de confianza de 95 % ($\alpha = 0.05$).

inspección visual simple. Dado que los modelos cristalográficos contienen errores en las coordenadas atómicas, la precisión de las mismas debe ser inmediatamente considerada si cambios estructurales sutiles están en juego o si el objetivo es evaluar pequeños cambios internos de un cuerpo rígido que ocurren en combinación con cambios a gran escala en la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína.³⁴⁹⁻

³⁵² Estos problemas son típicos de la investigación de fenómenos alostéricos, como los que nosotros estudiamos. El estudio de la incertidumbre sobre la posición atómica cobra también importancia obvia cuando se decide emprender estudios de diseño de fármacos basados en la estructura.³⁵³⁻³⁵⁶ Recurrimos al programa ESCET³²⁸⁻³³⁰ (ver sección de métodos al

respecto) como una aplicación de la teoría de predicción de la incertidumbre posicional de Cruickshank.³³¹

La comparación de coordenadas atómicas con ESCET muestra que los modelos 1AO6 y 1BM0 no difieren significativamente de nuestro modelo si se establece un intervalo de confianza para la diferencia de las medias de 2.25 desviaciones estándar o superior (Fig. 4.2.7.1.1). Sin embargo, si se disminuye la exigencia y la sensibilidad es mayor se puede observar que la excitación térmica (nótese que estamos atribuyendo las diferencias entre modelos criogénico y a T ambiente, a la temperatura solo) parece determinar pequeños cambios (zonas flexibles, en rojo, cuerpos rígidos, en verde y celeste) en el dominio I subdominio A con alta preferencia con respecto al DII y III y que los cambios en DII son más pequeños pero también limitados a subdominio IIA (Fig. 4.2.7.1.2, Paneles A, B y C). De acuerdo con esta comparación de nuestro modelo criogénico (XXXX) y los de temperatura ambiente (1AO6 y 1BM0), los tres dominios homólogos de la HSA presentan diferencias en el patrón y número de puentes disulfuro que favorecen la movilidad del dominio I (5 puentes disulfuro vs. 6 de los dominios II y III). La forma de la curva de ajuste indica que estos fenómenos son de carácter cooperativo. Estos resultados se pueden entender teniendo en cuenta la estructura del subdominio de IA en comparación con el subdominio IIA (Fig. 4.2.7.1.2, Paneles B y C, respectivamente). Esta parte del dominio IA es menos ordenado, más flexible, en comparación con las regiones similares en los dominios II y III lo que resulta en cambios térmicos inducidos en la conformación de mayor magnitud que los cambios en los dominios II y III. El hecho de que se produzcan cambios similares pero de menor magnitud se producen en el dominio II podría ser también consecuencia de la estabilización del dominio II por la interacción de superficies con los dominios I y III, que están en parte involucrados en el montaje del sitio de unión de Sudlow I.

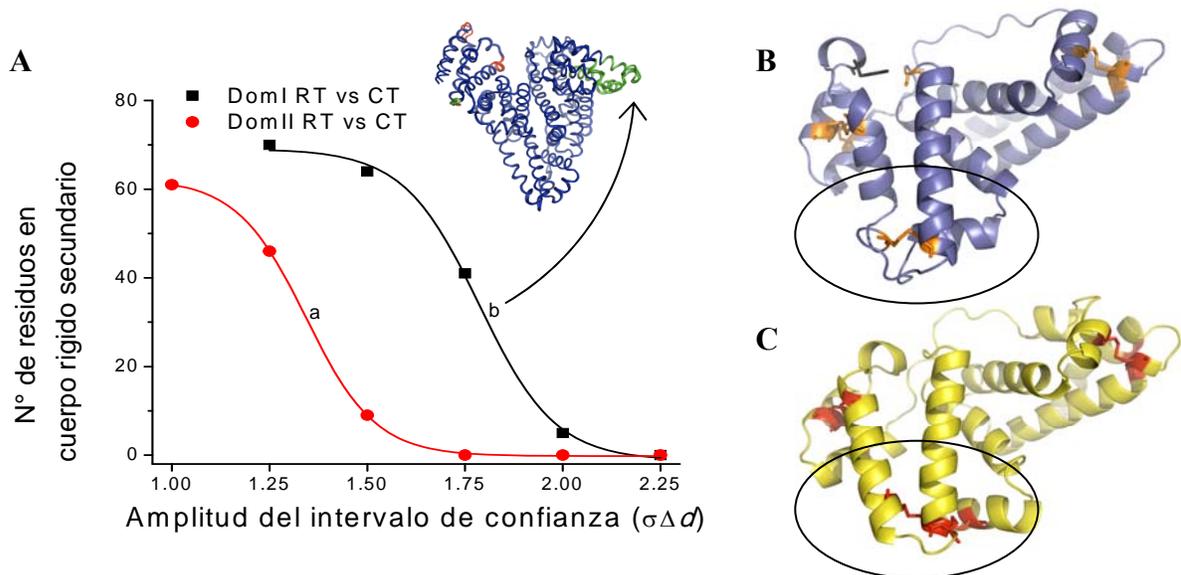


Figura 4.2.7.1.2. Pequeños cambios conformacionales en los dominios IA y IIA asociadas a la excitación térmica en cristales apoHSA. Comparación de los modelos de temperatura criogénica (XXXX) y ambiente (1AO6) usando ESCET. **Panel A y su Inserto.** La sensibilidad del análisis con ESCET fue variada ajustando el parámetro “lolim” entre 2.25 y 1 sigma. Si se realizan evaluaciones con $\alpha \leq 0.05$, muy pocos residuos son considerados como parte de un cuerpo rígido secundario, con un intervalo de confianza de $1.8 \sigma\Delta d$ aproximadamente 25 residuos del subdominio IA están en esta condición (Inserto, sector de color verde), pero ningún residuo de los dominios II escapa al cuerpo rígido principal (Inserto, sector azul mayoritario). Las líneas representan las curvas de mejor ajuste a una ecuación de Boltzmann. **Paneles B y C.** Los dominios I (Panel B) y II (Panel C) de acuerdo con el modelo 1AO6 fueron superpuestos utilizando el programa PyMOL y se presentan por separado. Se puede apreciar la similitud estructural de los dominios I y II, pero también se puede notar que la mayor diferencia estructural reside justamente en el sector térmicamente más lábil del dominio IA (señalado con óvalos). Este sector presenta un patrón de puentes disulfuro distinto. El Dominio IA carece de un puente disulfuro en esta región, el que está presente en los otros dos dominios (II y III).

Los modelos disponibles al momento de esta tesis de complejos de la HSA-SH con ligandos ocupando el sitio de Sudlow I son de baja resolución (2BXXB, 2BXC y 2BXD, 3.2, 3.1 y 3.05 Å). Dejando esto de lado por un momento, la comparación estructural de los modelos a temperatura ambiente de la apoproteína y estos complejos brinda resultados globales similares en magnitud pero sustancialmente distintos en calidad: Se detectan cambios muy sutiles en la conformación de los dominios I y II, fundamentalmente localizados en zonas desordenadas del domino I y en el sitio de unión de Sudlow I, particularmente a nivel de la Tyr150 y la Ala151, mientras que se verifica la separación del dominio III como cuerpo rígido del resto de la molécula (Fig. 4.2.7.1.3).

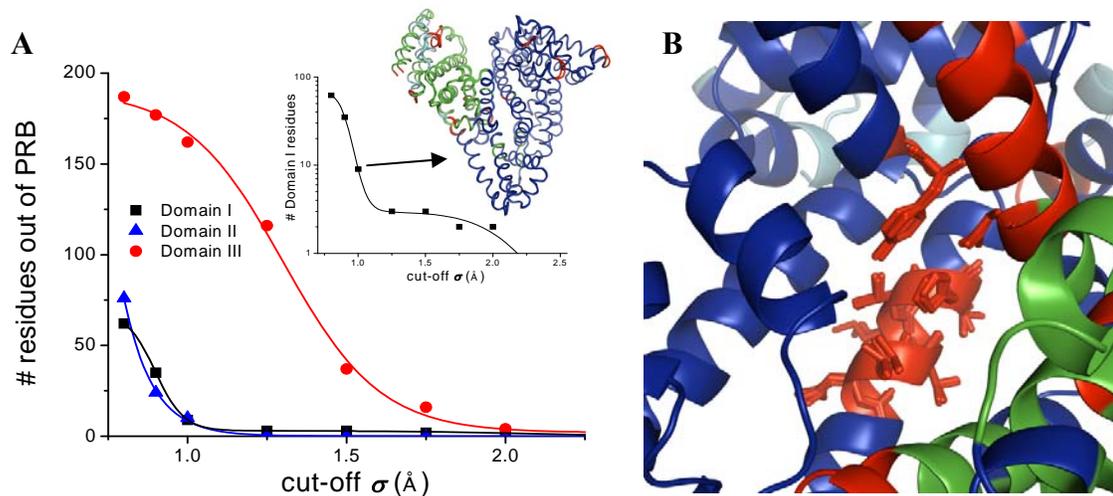


Figura 4.2.7.1.3. Comparación de la conformación del esqueleto principal (carbonos alfa) de modelos de apoHSA y HSA en el complejo con ligandos del sitio de Sudlow I a temperatura ambiente. La comparación de los modelos de RT de apo-HSA (1AO6 y 1BM0) y los complejos de la HSA (2BXXB, 2BXC y 2BXD) se llevó a cabo como en la Fig. 4.2.7.1.2. **Panel A.** El número de residuos en cada dominio que parecen cambiar de conformación después de la unión del ligando de acuerdo a ESCET se representa en función de la amplitud del hemi intervalo de confianza expresada en sigmas de la diferencia de distancias. La mayoría del DIII sufre una rotación y separación en relación al resto de la molécula. Sin embargo, los cambios en los DI y DII son muy sutiles y afectan a un número limitado de residuos, incluyendo principalmente los directamente involucrados en la unión del ligando. **Panel B.** La figura muestra que hay pequeños cambios asociados con la unión del ligando en este sitio de unión (residuos de color rojo, corte = 0.8 σ).

4.2.8. Nuevo método de comparación de factores B

Para poder comprender el fenómeno alostérico en estudio, comparando nuestro modelo con otros de interés, recurrimos también a la comparación de factores B . Considerando que se acepta que la comparación directa de factores B entre distintos modelos es al menos engañosa, luego de observar que los factores B de nuestro modelo a temperatura criogénica fueron inesperadamente mayores que los factores B de modelos de la HSA-SH de cristales a temperatura ambiente (Fig. 4.2.6.3.1, Panel A), y dado el fracaso de otros métodos de comparación de factores B (Fig. 4.2.6.3.1, Panel B), emprendimos la tarea incierta de desarrollar un nuevo método de comparación de factores B . El nuevo método propuesto se basa en los trabajos previos de Cruickshank³³¹ y Read.³⁵⁷ El método se inspira en tres observaciones principales interrelacionadas:

1) Hemos podido observar (Fig. 4.2.6.3.1, Paneles A-C) que la comparación de las incertidumbres posicionales $\sigma(r, i)$ ³³¹ permite reconciliar los resultados cristalográficos con la física de los cristales de proteínas.^{333,340,350,358-359} Schneider reconoció el potencial de $\sigma_{(r,i)}^{DPI}$ como estimador no sesgado de la incertidumbre posicional de átomos,³³⁰ la cual sería función de los factores B atómicos (ec. 4.1.8.1 y 4.1.8.3). Nosotros entendimos que en las ecuaciones de Cruickshank está la clave (la información necesaria) para poder poner en una escala común los factores B de dos (o más) modelos distintos, algo que ni Cruickshank ni Schneider parecen haber advertido.

2) Como veremos en mayor detalle y generalidad en breve, los resultados presentados en las Figs. 4.2.6.3.4 a 4.2.6.4.3 nos llevaron a pensar que una fuente frecuente de error en los modelos cristalográficos incompleta o erróneamente refinados es la subestimación de los factores B , lo que se acompaña naturalmente de valores altos de R_{FREE} . Téngase en cuenta que el R_{FREE}

traduce inexactitudes (sesgo) en las fases del modelo.³⁶⁰⁻³⁶¹ Dicho de otra forma, estamos proponiendo que en etapas relativamente avanzadas del refinamiento de un modelo cristalográfico cualquiera se debe esperar un aumento de los B atómicos y del B_{avg} del modelo. Como corolario, un modelo A refinado de forma que acuerde mejor con los datos podrá tener B_{avg} más altos que otro modelo A' con mayor R_{FREE} (o R_{W}) sin que ello implique menor precisión de A, si no que por el contrario, se estará frente a un modelo A más exacto, con coordenadas y factores B mejor determinados que A'.

3) El reconocimiento cabal del concepto ampliamente aceptado de que los valores de los factores B_j pueden verse aumentados por errores del modelo en las posiciones atómicas³⁶², ejemplifica la forma intrincada con que se relacionan los errores en las coordenadas (producto por ejemplo de un refinamiento o modelo incompleto) y el desorden real del cristal, una relación que como veremos ha sido mejor descrita por Read.³⁵⁷ Dicho de otra forma, a todo efecto práctico, la incertidumbre posicional que deriva de la ecuación 4.1.8.1 no desglosa (como no lo hacen los propios factores B) los distintos componentes de la falta de información posicional que se está estimando, *ergo*, el punto 1 se confirma: si es cierto que los $\sigma_{(r,i)}^{\text{DPI}}$ son comparables entre modelos como lo afirman varios autores,^{324,331,363-364} es cierto que la información necesaria para poner en una escala común los factores B de dos modelos ha de estar contenida en la ecuación 4.1.8.1.

A continuación abordaremos en más detalle las tres observaciones interdependientes que mencionados arriba, aunque no en el mismo orden en que se presentaron.

4.2.8.1. Correlación negativa de B_{avg} con R_{FREE} y subestimación de B_i por refinamiento incompleto o inestable.

El objetivo del refinamiento es minimizar los errores del modelo, disminuir su incertidumbre, sabiendo que cierto nivel de error será al final irremovible.³⁶⁵ Cuando detener el refinamiento es una de las preguntas que el cristalógrafo debe resolver caso a caso. Consideramos la aproximación lineal (ec. 4.1.8.3) propuesta por Peters-Libeu y cols.³⁶⁴ y por Schneider³³⁰ a la teoría de predicción de errores estándar posicionales desarrollada por Cruickshank desde los años 50.³³¹

$$\overline{\sigma_{r,i}^{DPI}} \cong 3^{1/2} (N_i / n_{obs})^{1/2} \left(\frac{B_i}{B_{avg}} \right) C^{-1/3} R_{free} d_{min} \quad (4.1.8.3)$$

Esta ecuación establece que existe una relación directa entre la incertidumbre posicional del átomo i y el valor de B_i . A los efectos de la teoría propuesta por Cruickshank (en particular, de la expresión 4.1.8.3), el cociente N_i / n_{obs} (N° de parámetros¹⁰/N° de observaciones¹¹) puede disminuir y con ello la incertidumbre, solo si se usan más datos (ejemplo: se realiza una nueva colecta de datos, de forma de que ciertas reflexiones no registradas en la colecta previa ahora están contempladas) o si se disminuye el número de parámetros (por ejemplo: se abandona el refinamiento de B atómico y se pasa al refinamiento de B por residuo).¹² En forma similar, la

¹⁰ N° de parámetros = [(3 coordenadas + Factor B) × 9377 átomos = 37508]

¹¹ N° de observaciones = 48633

¹² Sin embargo, cabe aclarar que otras ecuaciones similares a H11 que usan R_w y no R_{FREE} también pueden verse afectadas por el uso de contenciones. (331) Cruickshank, D. W. *Acta crystallographica* **1999**, 55, 583. Desde el punto de vista estadístico, la inclusión de nuevas contenciones o constricciones debe verse como una disminución efectiva del número de parámetros. Sin embargo, desde el punto de vista del refinamiento, los programas toman las contenciones como observaciones.

(366) Tickle, I. J.; Laskowski, R. A.; Moss, D. S. *Acta crystallographica* **1998**, 54, 547

(367) Tickle, I.

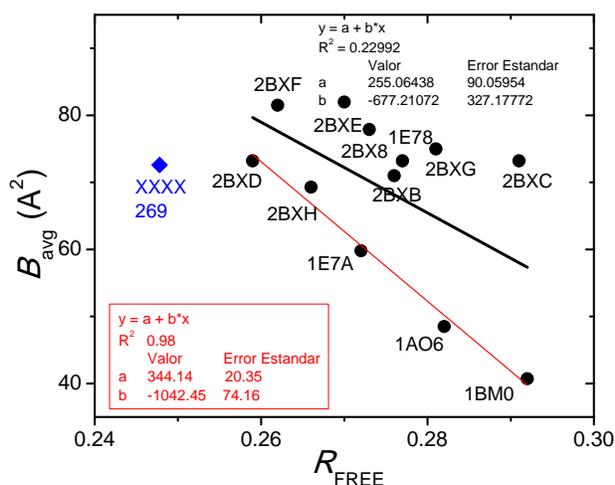


Figura 4.2.8.1.1. Gráfico de B_{avg} vs R_{FREE} para modelos de HSA tomados de la PDB. Se usan datos tomados de la PDB provenientes del refinamiento originalmente reportado por los autores de los modelos. Se usaron los modelos de HSA que no presentan grandes cambios conformacionales con respecto a nuestro modelo (cristales con grupos de espacio P1 y P21, obtenidos a partir de datos colectados a T ambiente, refinados sin grupos TLS). Se excluyeron modelos a temperatura criogénica y modelos de HSA saturada con ácidos grasos. Se incluye para referencia, los datos correspondientes a nuestro modelo. La línea roja se ajusta a los modelos con mínimos B_{avg} para todo R_{FREE} . La línea negra gruesa ajusta a todos los puntos (excluyendo nuestro modelo a temperatura criogénica).

completitud C y d_{min} , típicamente no dependen del refinamiento. De acuerdo con la ecuación 4.1.8.3, no hay dudas de que durante el refinamiento la incertidumbre del modelo disminuye debido cambios en el R_{FREE} . Sin embargo queremos hacer notar que además de cambios en el R_{FREE} , el refinamiento se acompaña de cambios sistemáticos (una disminución) en el inverso de B_{avg} ($1/B_{avg}$, ver Fig. 4.2.6.4.2). Esto es importante porque sugiere una razón (entre otras) por la que los factores B de nuestro modelo son mayores que los B del modelo de referencia del cristal a temperatura ambiente. De acuerdo con esto, nuestro

modelo no solo tendría menor R_{FREE} , menor incertidumbre posicional, sino también mayor B_{avg} por el solo efecto de un mejor acuerdo del modelo con las observaciones.

La Fig. 4.2.8.1.1 intenta corroborar como un fenómeno general entre modelos de HSA, la hipótesis de que cambios en R_{FREE} y B_{avg} se correlacionan en forma negativa. En la Figura 4.2.8.1.1 se puede observar que al igual que lo que observamos durante el refinamiento de nuestro modelo, existe una correlación negativa entre B_{avg} y R_{FREE} en este set de datos de

J.; Laskowski, R. A.; Moss, D. S. *Acta crystallographica* **2000**, 56, 442. En cualquier caso, vale aclarar que el uso que hemos hecho de grupos TLS tiene un efecto despreciable sobre este cociente.

modelos de HSA. Si bien existe cierta correlación negativa, esta es más fuerte para un subset de modelos que se caracterizan por poseer los valores mínimos de B_{avg} para todo R_{FREE} cuando son comparados con el conjunto de modelos. Nótese que la pendiente en de la línea roja en la Fig. 4.2.8.1.1 ($-1042 \pm 74 \text{ \AA}^2$) tiene un valor en el orden al hallado en para el caso del uso de contenciones de SNC en el refinamiento de nuestro modelo ($-1811 \pm 74 \text{ \AA}^2$).

En la Fig. 4.2.8.1.2 mostramos los resultados obtenidos al intentar la generalización para modelos cristalográficos de otras proteínas. El análisis de los grupos de modelos de cristales de proteínas tomados de los reportes originales archivados en la PDB (en negro) mostró un comportamiento variable de B_{avg} como función de R_{FREE} (Fig. 4.2.8.1.2). Es probable que distintas opciones de refinamiento, como por ejemplo el modelo de solvente empleado, expliquen parte de la variabilidad. Por tanto, decidimos recurrir a modelos depositados en la base de datos PDB_Redo (en rojo). PDB_Redo almacena modelos refinados independientemente en forma semi automática a partir de datos experimentales (mtz) reportados por los autores de los modelos presentes en el clásico PDB usando criterios relativamente uniformes. En general se puede ver que los modelos depositados en PDB_Redo poseen menores B_{avg} y menores R_{FREE} que los modelos originales. Sin embargo, el análisis de modelos de PDB-Redo muestra invariablemente una correlación negativa (aunque con distinta fuerza de correlación y pendiente) entre B_{avg} y R_{FREE} .

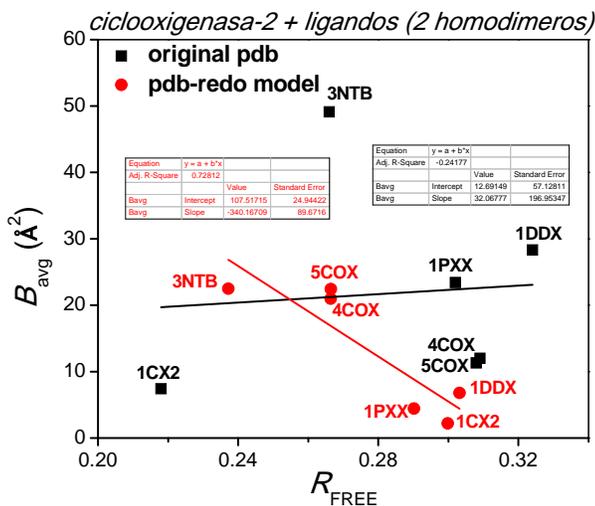
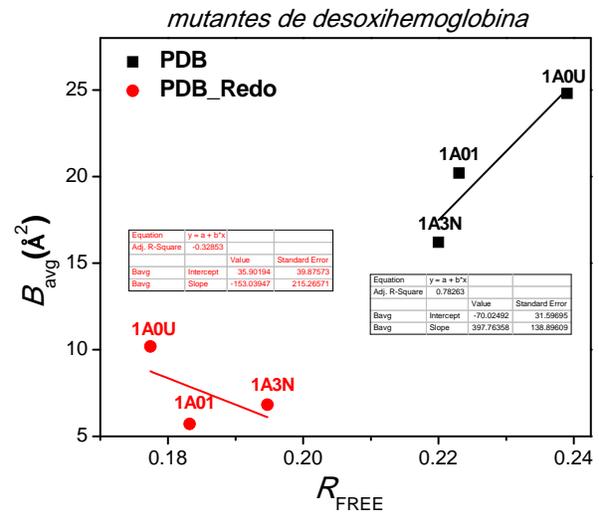
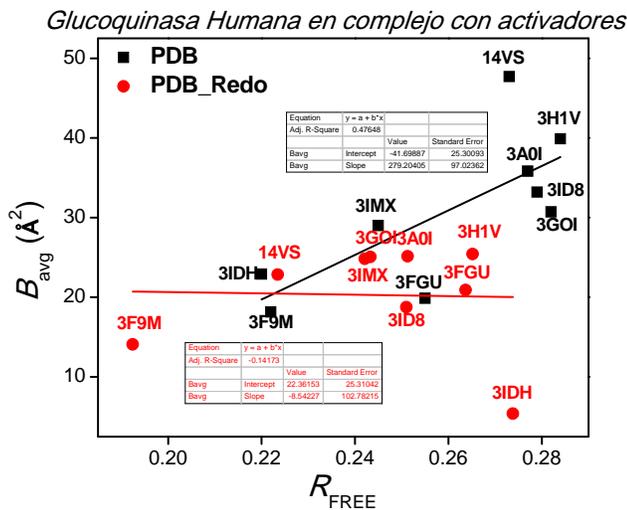
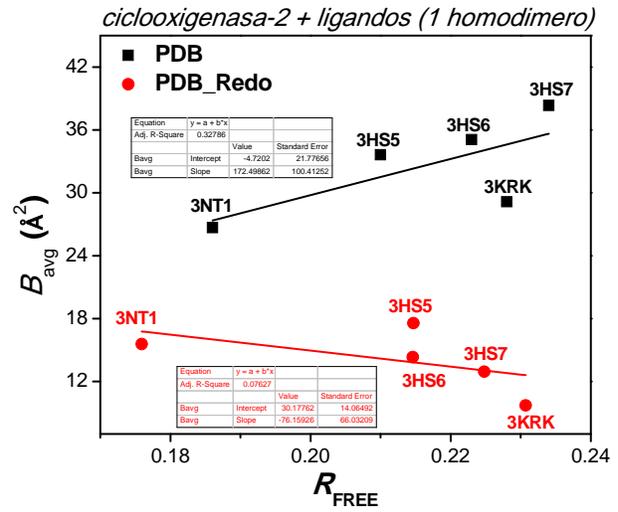
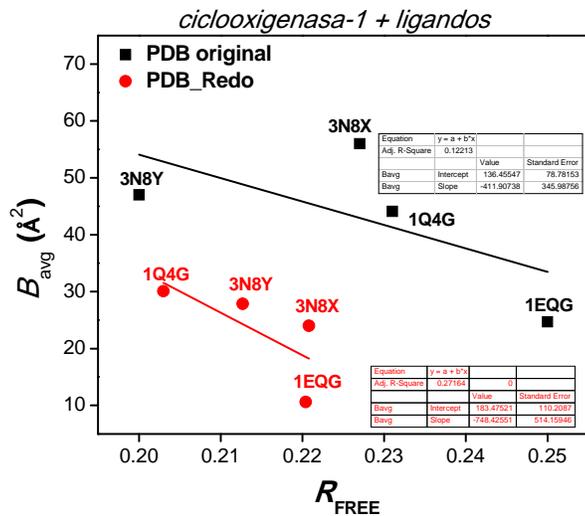


Figura 4.2.8.1.2. Gráficos de B_{avg} vs R_{FREE} para distintas proteínas. Se seleccionaron algunas proteínas para las que existen modelos cristalográficos en PDB y en PDB_Redo que representan distintos estados físicos y funcionales de las mismas.

Una vez más confiados en la generalidad de la correlación negativa entre B_{avg} y R_{FREE} en modelos refinados para distintos estados o cristales de la misma proteína, volvemos al problema de cambios en B_{avg} y R_{FREE} durante el refinamiento de un mismo modelo. Para obtener una idea más detallada del avance del refinamiento, analizamos archivos PDB intermedios, archivos que normalmente no se generan (ni consideran por tanto) luego de realizar 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 25, 50 y 100 ciclos de refinamiento con contenciones pero sin grupos de TLS (Fig. 4.2.8.1.3). Sospechando que pudieran existir problemas de punto de partida, quisimos considerar distintas situaciones iniciales. Para ello, a partir de nuestro modelo óptimo (269) y usando el programa PDBSET,³²⁰ generamos archivos PDB iniciales con: A) $B_0 = B_{\text{avg}0} = 100 \text{ \AA}^2$ y coordenadas óptimas (las del modelo 269); B) $B_0 = B_{\text{avg}0} = 100 \text{ \AA}^2$ y con coordenadas alteradas (cambios al azar en x , y y z de 0.4 \AA); C) $B_0 = B_{\text{avg}0} = 0 \text{ \AA}^2$ y coordenadas óptimas; y D) $B_0 = B_{\text{avg}0} = 0 \text{ \AA}^2$ y con coordenadas alteradas (cambios al azar en x , y y z de 0.4 \AA). De la Fig. 4.2.8.1.3 surgen varias reafirmaciones, nuevos detalles y nuevas hipótesis.

Para facilitar el análisis y la interpretación de estos resultados de la Fig. 4.2.8.1.3 puede ser conveniente dividir el recorrido del refinamiento en cuatro etapas: a) de convergencia, b) de correlación negativa, c) de retorno y d) de pérdida de correlación.

a) *Fase de convergencia:* Nótese que el efecto del ruido blanco es muy dispar si se parte de $B_0 = 0 \text{ \AA}^2$ o $B_0 = 100 \text{ \AA}^2$, en el primer caso la introducción de ruido blanco determina valores de R_{FREE} iniciales muy altos, mientras que en el segundo caso, los R_{FREE} con y sin ruido blanco son prácticamente idénticos. Esto es de esperar dado que los B aumentados previenen la discrepancia seria de fases. Para ver esto con más claridad, recordemos que los factores B atómicos se relacionan directamente con la varianza (σ^2) posicional, y que por tanto son una

medida estadística de dispersión (en el caso de “ B isotrópicos”, de una distribución de probabilidad Gaussiana). Si aumentamos la varianza, estamos permitiendo que las diferencias entre F_{MODELO} y F_{OBS} sean estadísticamente menos significativas, dicho de otra forma, estamos advirtiendo que tenemos menos confianza en nuestro modelo. Sin embargo, el programa es capaz de detectar que no se está frente a un mínimo de gradiente de la función logaritmo de la máxima verosimilitud de la matriz rala de parámetros. Es también muy interesante notar que todos los recorridos, sin importar su origen logran converger a un punto de R_{FREE} y B_{avg} común: $X = R_{\text{FREE}} \cong 0.32$, $Y = B_{\text{avg}} \cong 46.3 \text{ \AA}^2$ (señalado en la Fig. 4.2.8.1.3 con una flecha negra de trazo lleno).

b) *Fase de correlación negativa de B_{avg} y R_{FREE} .* Aquí el refinamiento realiza el recorrido esperado por nosotros, una disminución del R_{FREE} con aumento de B_{avg} . Cabe notar que los recorridos alcanzan valores más bajos de R_{FREE} en esta fase son aquellos que parten de valores iniciales de R_{FREE} también más bajos. La pendiente de la línea verde punteada es $\cong -680 \text{ \AA}^2$.

c) *Fase de retorno.* El refinamiento fue inestable durante su recorrido para todos los casos, de modo que los valores de R_{FREE} dejaron de disminuir y comenzaron a aumentar, dando un giro inesperado (flecha curva azul).

d) *Fase de pérdida de correlación.* Ella se caracteriza por un aumento de R_{FREE} sin cambios en B_{avg} .

La disminución del R_{FREE} no se pudo mantener para alcanzar los valores óptimos alcanzados previamente por nosotros. En todo momento de los distintos recorridos, el RMSD de posiciones atómicas con relación al modelo optimizado (269) aumentó, de modo que en términos de coordenadas los modelos refinados se alejaron del óptimo, así como del inicial (ciclo 0). El cambio en los RMSD no fue monótono, se caracterizó también por varias fases (no lo mostramos). También es importante recalcar, que los cambios observados en la fase de

correlación negativa se corresponden con los valores óptimos hallados (cuadrados verde y fucsia de la Fig. 4.2.8.1.3), es decir, pensamos que de haber escapado a la inestabilidad mencionada se podría haber alcanzado valores de R_{FREE} y B_{avg} similares a los del modelo 182, optimizado en refinamiento con contenciones y sin grupos TLS.

Mención a parte, merece la observación de que las fases de retorno y de pérdida de correlación (asociadas a la inestabilidad del refinamiento) ocurren muy próximas al valor estimado para el $B_{\text{avg}} = B$ de Wilson³⁶⁸ (B de Wilson = 49.3 \AA^2 , según se determinó usando el programa TRUNCATE³²⁰). En este sentido vale recordar que normalmente el refinamiento de estructuras cristalográficas no se realiza como lo sugiere la Fig. H9. El refinamiento de modelos es una combinación de pasos informáticos automáticos con instrucciones humanas que transcurre en el espacio recíproco (el espacio de los F_{OBS} y F_{MODELO}) y por otro lado, de intervenciones

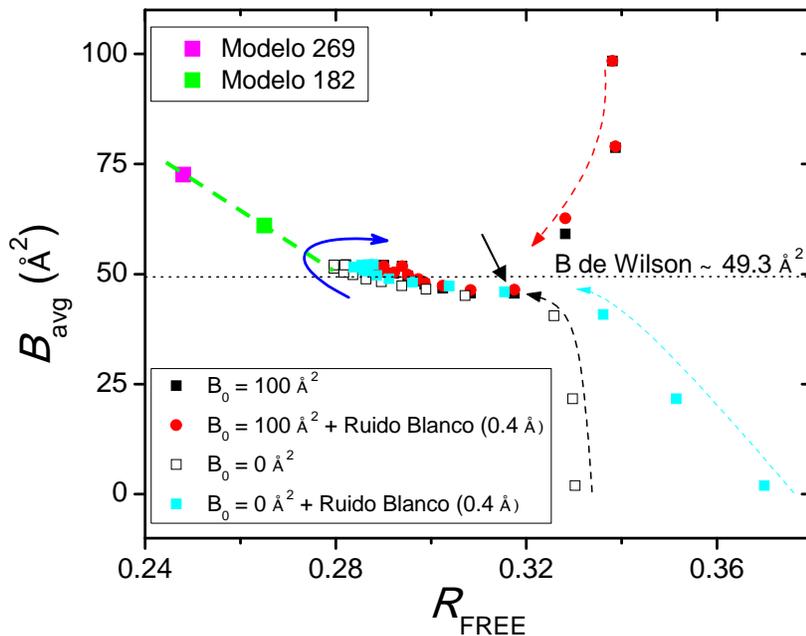


Figura 4.2.8.1.3. Cambios en B_{avg} y R_{FREE} durante el refinamiento con contenciones. Se grafican los B_{avg} y R_{FREE} de distintos modelos que resultan de un número variable de ciclos de refinamiento a partir de las 4 condiciones iniciales señaladas en la figura y detalladas en el texto. Las flechas cabos punteados se utilizan como guía para el ojo, ellas parten del ciclo 0 de refinamiento. La flecha curva azul es una guía para el recorrido que realiza B_{avg} como función de R_{FREE} cuando se alcanzan etapas avanzadas de este experimento de refinamiento. Los cuadrados más grandes a la izquierda representan los resultados óptimos previamente obtenidos para el refinamiento con contenciones sin (verde) y con grupos TLS (fucsia).

humanas destinadas a mejorar el modelo en espacio real (el espacio que mejor comprendemos), realizando tareas que el programa de refinamiento en espacio recíproco no puede hacer, así como ciclos de validación estructural. Sin desmedro de lo cual, es también conveniente advertir que inestabilidades como la registrada en la Fig. 4.2.8.1.3 son relativamente frecuentes, y sintomáticas de errores en el modelo, que posiblemente lleven a mínimos relativos, los que son soluciones falsas. Es tentador especular que esta correlación negativa entre B_{avg} y R_{free} sea más fuerte cuanto más anisotrópico sea el desorden en el cristal, es decir cuanto más desajustada sea la asunción modelo de factores B isotrópicos. Nos preguntamos: ¿por qué la inestabilidad, y la solución falsa ocurren cuando $B_{\text{avg}} \cong B$ de Wilson?; ¿es el B de Wilson un atractor que bajo ciertas condiciones conduce a mínimos relativos?; ¿escapar del B de Wilson con valores de R_{FREE} cada vez más bajos es una indicación de que el refinamiento está en el buen camino? Es tentador especular que esta correlación negativa entre B_{avg} y R_{free} sea más fuerte cuanto más anisotrópico sea el desorden en el cristal, es decir cuanto más desajustado sea constreñir el refinamiento con el modelo isotrópico de desorden.

4.2.8.2. Incertidumbre posicional y la intrincada relación entre movilidad térmica, desorden estático y errores del modelo

En cristalografía de pequeñas moléculas, el 90 % de los modelos basados en difracción de rayos X tienen R_w menores a 0.15 y un 10 %, menores a 0.05. Uno de los desafíos de la cristalografía es el desarrollo de métodos que permitan disminuir el desacuerdo existente entre el modelo y las observaciones, considerando que ninguno de ellos está exento de error.³⁶⁹ Se recomienda que la determinación de la incertidumbre de una medición se realice a través de la ecuación del modelo, es decir una representación matemática que conjuga información sobre proceso de medición y de las cantidades ingresadas para la estimación de la variable considerada y su incertidumbre.³⁷⁰ Eso es similar a lo que se realiza cuando se estima la incertidumbre sobre los valores de cualquier parámetro del modelo por inversión de la matriz completa de residuales al final del refinamiento.³³¹ La incertidumbre poseerá componentes de error por efectos al azar y componentes por efectos de factores sistemáticos. Es conveniente recalcar que estas determinaciones de la incertidumbre de los parámetros basadas en la matriz completa como aquellas basadas en matrices parciales, no alertan sobre la influencia (magnitud) de errores sistemáticos, los que deben ser detectados y corregidos. Esto puede realizarse antes o después de culminar el refinamiento. Nos preguntamos si estamos haciendo todo lo posible para corregir los errores sistemáticos, y en qué medida esto pueda redundar en un mejor acuerdo de los modelos y las observaciones.

Uno de los objetivos del uso de ecuaciones del modelo, es permitir el correcto escalado de las observaciones o más general aún, de los datos ingresados (observaciones y contenciones

en nuestro caso).³⁷⁰ La mayoría de los datos ingresados en cristalografía no tienen que ser correctos en una escala absoluta, sino que tienen que ser consistentes en una escala relativa.^{369,371} Es al menos intuitivo esperar entonces que los factores B de los modelos cristalográficos tampoco tengan un sentido físico estricto, queriendo decir con esto, que no estén en una escala absoluta. Una noción de la importancia de esto se puede apreciar si nos propusiéramos simular el cristal, proponer un modelo para la proteína en solución usando datos cristalográficos, o estudiar la correspondencia cuantitativa de los parámetros de orden de la cadena principal derivados de estudios de NMR, los factores B cristalográficos y los RMSF (del inglés root mean-square fluctuation) derivados de la simulación,³⁷²⁻³⁷⁷ o la correspondencia cuantitativa de modelos determinados por difracción de rayos X, de electrones y de neutrones simplemente, o si quisiéramos comparar los factores B de distintos modelos de difracción de rayos X para proteínas en distintos estados funcionales, físicos o químicos (nuestro caso, y el escenario más frecuente también).

Estas dificultades sin embargo, no son las que han desalentado más el uso de los factores B en Biología Estructural. La razón principal, que además retroalimenta a la anterior, quizás sea la incapacidad de descomponer los factores B en sus contribuyentes de desorden dinámico, desorden estático y error en las coordenadas del modelo. En este trabajo de tesis proponemos usar las ecuaciones de Cruickshank predictivas de la incertidumbre posicional en un método de corrección de las escalas de los factores B . Esto no soluciona el problema de la escala absoluta, pero posiblemente posibilitará el estudio comparativo entre modelos cristalográficos. La propuesta se basa en trabajos previos de Wilson,³⁷⁸ Luzzatti³⁷⁹ y Read,³⁵⁷ principalmente; y se puede expresar sintéticamente de la siguiente forma:

$$\sigma_{(r,B_{avg})} \propto f(de, dd, \varepsilon_r, \varepsilon_B, \varepsilon_M, \varepsilon_C, \varepsilon_I) \quad (4.2.8.2.1)$$

$$B_{avg} \propto g(de, dd, \varepsilon_r, \varepsilon_B, \varepsilon_M, \varepsilon_C, \varepsilon_I) \quad (4.2.8.2.2)$$

Donde $\sigma_{(r,B_{avg})}$ es la incertidumbre estándar estimada de la posición de los átomos del modelo de acuerdo con Cruickshank, de y dd son el desorden estático y dinámico en el cristal, y ε_r y ε_B los errores en las coordenadas y los factores B del modelo refinado, ε_M es el error debido a falencias del modelo cristalográfico (el modelo atómico –básicamente asunciones relacionadas a la esfericidad atómica e isotropismo del desorden-; el del solvente y el de regiones de la proteína no modeladas atómicamente), ε_C es el error asociado a la determinación de los parámetros de la celda y ε_I es el error en las observaciones –intensidades-. Nótese que la inclusión de ε_I y ε_C se realiza distinto de acuerdo con la función blanco de minimización. En el contexto del refinamiento por minimización del cuadrado de las diferencias entre $|\mathbf{F}_{obs}|$ y $|\mathbf{F}_{calc}|$, se asume que las fases son esencialmente correctas y se calculan mapas con amplitudes observadas -obtenidas a partir de intensidades- y fases calculadas (generándose un sesgo hacia el modelo). En el marco del refinamiento con funciones de máxima verosimilitud en cambio, las diferencias entre las $|\mathbf{F}_{obs}|$ y $|\mathbf{F}_{calc}|$ nos pueden ayudar a realizar inferencias acerca de la probabilidad de errores en nuestro modelo,³⁵⁷ buscando obtener la mejor predicción de la distribución de las amplitudes observadas a partir de las amplitudes calculadas (el valor esperado de las $|\mathbf{F}_{obs}|$, $\langle |\mathbf{F}_{obs}| \rangle$, se modifica de acuerdo con las \mathbf{F}_{calc}). En otras palabras buscamos el modelo que maximice $p(|\mathbf{F}_{obs}|; \mathbf{F}_{calc})$, y en ese camino es importante estimar correctamente las desviaciones de las distribuciones

Gaussianas tanto en espacio real como recíproco. Así, los B atómicos pueden afectar los $|\mathbf{F}_{\text{calc}}|$.³⁸⁰ Factores B exageradamente altos implican una desviación estándar en correspondencia y suponen una probabilidad alta en las colas de la distribución, es decir, una densidad electrónica homogénea en el espacio (que no condice con un modelo atómico). Ese factor B atómico aumentado reducirá la amplitud del factor de estructura global si ese átomo contribuía en la dirección del factor de estructura general. La amplitud $|\mathbf{F}_{\text{calc}}|$ también puede ser disminuida por la reducción del B de un átomo que contribuye en la dirección opuesta al factor de estructura general.³⁸⁰

Siguiendo a Read,³⁵⁷ podemos imaginar el problema de los errores en las coordenadas como el problema de las diferencias entre dos cristales de la misma proteína en el mismo estado, uno con densidad electrónica \mathcal{F} y transformada de Fourier \mathbf{F} ; y el otro con densidad electrónica \mathcal{G} y transformada \mathbf{G} :

$$\mathbf{G} = \sum_j \mathbf{g}_j \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j) \quad (4.2.8.2.3)$$

$$\mathbf{F} = \sum_j \mathbf{f}_j \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot (\mathbf{r}_j + \Delta \mathbf{r}_j)] \quad (4.2.8.2.4)$$

Donde \mathbf{s} es el vector de dispersión, \mathbf{r} es el vector posición y se define un vector de desplazamiento posicional $\Delta \mathbf{r}_j$, que por el momento consideraremos como único responsable de las diferencias entre los modelos, debiendo asumir que los factores de dispersión atómicos (factores de forma atómicos) $\mathbf{g}_j \equiv \mathbf{f}_j$. Recordamos que \mathbf{g}_j depende de \mathbf{g}_j^0 -que depende de la

naturaleza de j , carbono, nitrógeno,... y del modelo usado para describir la forma de la densidad de carga electrónica en torno al núcleo de j (suele asumirse simetría esférica)- y del factor B atómico. Entonces, al decir $\mathbf{g}_j \equiv \mathbf{f}_j$, estamos asumiendo entre otras cosas que $B_j^{\mathcal{E}} \equiv B_j^{\mathcal{F}}$. Estas consideraciones fueron asumidas por Luzzati, quien también asumió que la variable al azar $\Delta\mathbf{r}_j$ se podrían derivar independientemente de otras variables a partir de una única distribución de probabilidad, $p(\Delta\mathbf{r})$, una distribución tridimensional simétrica Gaussiana.^{357,379}

Si definimos el centroide de la distribución de \mathbf{F} dado \mathbf{G} en función del multiplicador complejo \mathbf{D} ,

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \mathbf{D}\mathbf{G} \quad (4.2.8.2.5)$$

Entonces

$$\mathbf{D}(\mathbf{s}) = \langle \mathbf{F} / \mathbf{G} \rangle = \left\langle \left[\sum \mathbf{f}_j \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \Delta\mathbf{r}_j) \times \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j) \right] / \mathbf{G} \right\rangle \quad (4.2.8.2.6)$$

Aquí se explicita que \mathbf{D} es una función compleja del vector \mathbf{s} (\mathbf{s} y \mathbf{D} , como \mathbf{F} y \mathbf{G} , pueden ser entendidos como números complejos con parte real e imaginaria o como una función de onda con amplitud y fase) ya que bajo ciertas circunstancias \mathbf{D} puede ser real o complejo. En general \mathbf{D} incluye efectos de diversos factores: diferencia en la posición de j o en \mathbf{g}_j^0 , falta de átomos en el modelo, diferencias en la escala global del modelo o diferencias en B_j . Pero considerando las asunciones de Luzzati, solo dependerá del primer factor mencionado, $\Delta\mathbf{r}$.

Ocurre que la varianza de \mathbf{DG} es un estimador de \mathbf{F} y se puede definir como sigue:³⁵⁷

$$\langle |\mathbf{F} - \mathbf{DG}|^2 \rangle = \langle (\mathbf{F} - \mathbf{DG})[\mathbf{F}^* - (\mathbf{DG})^*] \rangle \quad (4.2.8.2.7)$$

Donde * indica que se trata del conjugado del número complejo. En las condiciones de Luzzati,³⁷⁹ $p(\Delta\mathbf{r})$ es independiente de otros parámetros y la ecuación H43 se puede reorganizar para dar:

$$\mathbf{D}(\mathbf{s}) = \langle \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \Delta\mathbf{r}_j) \rangle = \int_{\substack{\text{todo} \\ \text{el espacio}}} p(\Delta\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \Delta\mathbf{r}_j) d\mathbf{r} \quad (4.2.8.2.8)$$

Es decir, \mathbf{D} es la transformada de Fourier de la distribución de probabilidad de $\Delta\mathbf{r}$. Si como Luzzati, se asume una distribución normal tridimensional, la transformada de Fourier de tal distribución es una función real de la resolución:^{357,379}

$$\mathbf{D}(\mathbf{s}) = \exp[-(2\pi^2 / 3) \langle |\Delta\mathbf{r}|^2 \rangle |\mathbf{s}|^2] \quad (4.2.8.2.9.A)$$

$$\mathbf{D}(\mathbf{s}) = \exp[-(8\pi^2 / 3) \langle |\Delta\mathbf{r}|^2 \rangle (\text{sen}\theta / \lambda)^2] \quad (4.2.8.2.9.B)$$

Esta ecuación tiene la misma forma que la ecuación ya presentada que se utiliza para derivar los factores de dispersión atómica del átomo j en el cristal en función de \mathbf{f}_j^0 , la resolución y los factores B_j :

$$\mathbf{f}_j = \mathbf{f}_j^0 \exp(-B_j [(\text{sen}\theta) / \lambda]^2) \quad (4.2.8.2.10)$$

Donde B_j en general es:

$$B_j = \frac{8\pi^2}{3} \text{Tr}(U_j), \quad U_j = \begin{pmatrix} u_1^2 & u_1u_2 & u_1u_3 \\ u_1u_2 & u_2^2 & u_2u_3 \\ u_1u_3 & u_2u_3 & u_3^2 \end{pmatrix} \quad (4.2.8.2.11)$$

y en el caso isotrópico:

$$B_j = 8\pi^2 \langle |\Delta r_j|^2 \rangle = 3\pi^3 \langle |\Delta r_j| \rangle^2 = 24\pi^2 \sigma^2 \quad (4.2.8.2.12)$$

Como lo muestra Read,³⁵⁷ no lo vamos a repetir aquí, no es necesario que exista una única distribución de probabilidad para el error posicional: pueden considerarse distribuciones atómicas individuales; tampoco es necesario asumir que los errores están solo en las coordenadas: se pueden incorporar errores en los factores B (errores en los factores de dispersión atómicos). En resumen, basta asumir que \mathbf{r} es una variable al azar con una distribución de probabilidad Gaussiana, para que $\Delta \mathbf{r}$ también lo sea, y si asumimos un modelo isotrópico atómico de errores en las coordenadas de nuestro modelo y modelamos el desorden dinámico y estático en el cristal con la aproximación isotrópica (Gaussiana), la forma matemática y los efectos sobre los factores de estructura de errores en las posiciones y el desorden en el cristal se confundirán “inseparablemente”. Es decir, volvemos al consabido concepto de que los factores B atómicos reflejan todos estos factores, son una medida total sobre la incertidumbre posicional atómica.

4.2.8.3. Métodos de escalado de factores B de distintos modelos: intentando reconciliar la teoría cristalográfica con la teoría física de los cristales de macromoléculas.

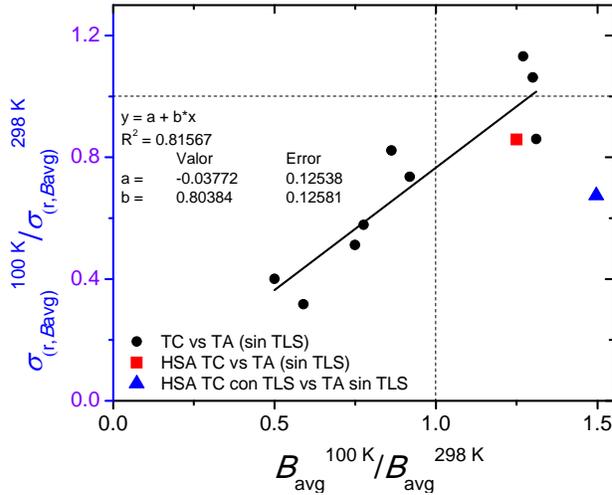


Figura 4.2.8.3.1. Comparación de modelos de cristales a temperatura ambiente y criogénica. Cada punto que se grafica representa un par de modelos, que difieren sustancialmente solo en la temperatura a la que la colecta de datos cristalográficos fue realizada. No siempre los autores del modelo o trabajos donde ellos se reportan son los mismos. La Tabla G (al final de esta sección) contiene la información detallada sobre los modelos usados y los cálculos realizados.

Para conocer más sobre el efecto sobre la incertidumbre posicional y el R_{FREE} que tiene la temperatura a la que se realiza el experimento de difracción por cristales de proteínas (temperatura ambiente, TA; *versus* criogénica, TC) usamos la ecuación H10³³¹ y analizamos modelos cristalográficos de diversas proteínas con la condición de que existieran modelos para ambas condiciones del mismo estado funcional y cristalino previo, es decir que los

cristales estos no difirieran sustancialmente con respecto a su celda unidad, contenido de proteína, y simetría. Decidimos además tomar todos los modelos cuya contraparte a TA se caracterice por $2.0 \leq \lambda_{min} \leq 2.5 \text{ \AA}$. También es importante mencionar que todos los modelos fueron refinados usando contenciones geométricas pero si refinamiento de grupos TLS.

La ecuación 4.2.8.3.1:

$$\sigma_{r,B_{avg}}^{DPI} = 3^{1/2} \sigma_x^{DPI} = 3^{1/2} (N_i / n_{obs})^{1/2} C^{-1/3} R_{free} d_{min} \quad (4.2.8.3.1)$$

fue propuesta por Cruickshank como una forma de estimar la incertidumbre posicional media de un modelo,³³¹ nos dice que la incertidumbre posicional para cualquier átomo con $B = B_{avg}$ se puede predecir con solo cinco términos (todos ellos ya mencionados antes) y deriva de la ecuación 4.1.8.3, como se verá fácilmente sustituyendo B_i con B_{avg} :

$$\overline{\sigma_{r,i}^{DPI}} \cong 3^{1/2} (N_i / n_{obs})^{1/2} \left(\frac{B_i}{B_{avg}} \right) C^{-1/3} R_{free} d_{min} \quad (4.1.8.3)$$

La ecuación 4.1.8.3 tiene como ventaja para el tratamiento que vamos a hacer ahora, el hecho de que la incertidumbre media se calcula independientemente del valor de B_{avg} del modelo. De existir una correlación, esta se deberá a razones físico-matemáticas de relevancia. Como se muestra en la Fig. 4.2.8.3.1, los efectos de la temperatura a la que se encuentra el cristal durante el experimento de difracción (TC = 100 - 110 K, cristal vitrificado; versus TA = 295 - 298 K, cristal fluido) son diferentes según el caso. En la Fig. 4.2.8.3.1 graficamos el cociente de incertidumbres posicionales como función del cociente de B_{avg} (ec. 4.2.8.3.2)

$$\left(\frac{\sigma_{(r, B_{avg})}^{100K}}{\sigma_{(r, B_{avg})}^{298K}} \right) = f \left(\frac{B_{avg}^{100K}}{B_{avg}^{298K}} \right) \quad (4.2.8.3.2)$$

Si la modificación de la temperatura a la que se realiza el experimento no afectara la incertidumbre media o el B_{avg} de los modelos resultantes, cabría esperar que ellos se agruparan en torno a las coordenadas (1, 1) del gráfico de la Fig. 4.2.8.3.1. Se puede observar en la Fig. 4.2.8.3.1 que en general el uso de temperaturas criogénicas disminuyen la incertidumbre de los

modelos, es decir: $(\sigma^{100\text{K}}/\sigma^{298\text{K}}) < 1$. Solo 2 modelos de cristales a T criogénica de 10 pares en total, tienen incertidumbres ligeramente mayores que sus pares a T ambiente. A diferencia, es casi tan frecuente que el B_{avg} aumente o que este disminuya cuando se difracta a T criogénica comparado con T ambiente. La pendiente de la línea en la Fig. 4.2.8.3.1 vale 0.8 y el valor de $y_{x=0} = 0$ (ambos sin dimensiones físicas).

Como se puede observar en la Fig. 4.2.8.3.1, en el caso de HSA, la disminución en la incertidumbre posicional asociada con la difracción a temperatura criogénica se acompaña de un aumento del B_{avg} . El aumento de B_{avg} en modelos criogénicos es un hecho que entra en aparente contradicción con la literatura biofísica sobre los efectos de la temperatura sobre los factores B , como ya hemos señalado. El efecto esperado es que los B_{avg} de modelos que representan cristales vitrificados sean significativamente menores que los B_{avg} de cristales fluidos (cristales a temperatura ambiente). Pero esta contradicción es solo aparente ya que los B no solo traducen desorden estático y dinámico, sino también errores en el modelo. Ahora bien, estamos reportando una observación completamente nueva que está íntimamente ligada al balance desorden-error de los factores B : Mientras que el desorden tiende a aumentar los B , y en general se asume que los errores en las coordenadas aumentan los B también, los errores debidos al refinamiento incompleto y al estancamiento en falsos mínimos (eventualmente vinculados al B de Wilson, Fig. H9) tienden a disminuir los factores B (como vimos los B_{avg} correlacionan negativamente con el residual del refinamiento R_{FREE}) en el refinamiento con factores B isotrópicos. A esto se suma el problema de que los factores B tienen una escala correcta interna al modelo, pero no una escala absoluta.

Nosotros razonamos que: 1) si los factores B atómicos y la incertidumbre posicional de Cruickshank ($\sigma_{r,Bavg}^{DPI}$) absorben efectos de los mismos factores, 2) si ambos traducen la incertidumbre total, 3) si $\sigma_{r,Bavg}^{DPI}$ tiene una escala comparable entre modelos; 4) si $\sigma_{r,Bavg}^{DPI}$ es como propone Cruickshank la incertidumbre posicional de un átomo en el modelo con un B_j igual al B_{avg} del modelo; entonces ha de ser posible corregir la escala de los B_j de acuerdo con $\sigma_{r,Bavg}^{DPI}$.

El procedimiento es muy sencillo, se debe calcular el valor del factor B_{avg} esperado (${}^E B_{avg}$) de acuerdo con $\sigma_{r,Bavg}^{DPI}$ y con la ecuación 4.2.8.3.3 que establece la relación de B_j isotrópicos con la varianza de la distribución Gaussiana tridimensional de la distribución de probabilidad de la posición atómica:

$$B_j = 8\pi^2 \langle |\Delta r_j|^2 \rangle = 3\pi^3 \langle |\Delta r_j| \rangle^2 = 24\pi^2 \sigma^2 \quad (4.2.8.3.3)$$

Entonces, los factores B promedio estimados ${}^E B_{avg}$ según la ecuación de Cruickshank se pueden obtener:

$${}^E B_{avg} = 24\pi^2 \left(\sigma_{r,Bavg}^{DPI} \right)^2 = 237 \left(\sigma_{r,Bavg}^{DPI} \right)^2 \quad (4.2.8.3.4)$$

El siguiente paso es calcular los B_j estimados de acuerdo con $\sigma_{r,Bavg}^{DPI}$ (${}^E B_j$):

$${}^E B_j = B_j \left(\frac{{}^E B_{avg}}{B_{avg}} \right) \quad (4.2.8.3.5)$$

Estos cálculos se pueden realizar equivalentemente a nivel de sigmas y no de factores B , pero como nos están accesibles los factores B_j , esto implica más operaciones, se debe primero calcular

$$\sigma_j = \sqrt[2]{\frac{B_j}{24\pi^2}} \quad (4.2.8.3.6)$$

luego

$${}^E \sigma_j = \sigma_j \sigma_{r,Bavg}^{DPI} / \sqrt[2]{\frac{B_{avg}}{24\pi^2}} \quad (4.2.8.3.7)$$

y finalmente

$${}^E B_j = 24\pi^2 ({}^E \sigma_j)^2 \quad (4.2.8.3.8)$$

Es importante notar que estas correcciones de escala que estamos proponiendo no permiten corregir errores en el refinamiento de factores B , solo logramos que los átomos j que tenían $B_j = B_{avg}$ tengan ahora $B_j = {}^E B_{avg}$. Las inexactitudes internas de cualquier tipo en los valores de los factores B refinados pertenecientes a cada modelo van a persistir: Cuanto mejor sean los modelos, las comparaciones de coordenadas (conformación) y factores B (como función de la incertidumbre posicional de toda causa) serán más exactas. Otro aspecto a destacar es que no ha sido necesario asumir la aproximación lineal a la teoría de Cruickshank, y el cociente

$$\frac{{}^E B_j}{{}^E B_{avg}} = \frac{B_j}{B_{avg}} \quad (4.2.8.3.8)$$

Tabla 4.2.8.3.1. Resumen de Información sobre los modelos de cristales a temperatura ambiente y criogénica*

B _{avg}	DPI r	T (K)	Modelo	Ni=# átomos	dmin	#obs (refl w set)	R	Rfree	C	DPI x	Bavg	T (K)	R RMS Bond Lengths	CRYST1
13	0.7217877 ₁	291	1BT1	5508	2.7	16994	0.168	0.256	0.842	0.4167243 ₃	13	291		45.820 164.750 52.160 90.00 97.50 90.00 P 1 21 1 4
16.9	0.7668968	120	1BT2	5514	2.7	17217	0.184	0.278	0.883	0.4427680 ₈	16.9	120		45.250 162.600 51.490 90.00 95.30 90.00 P 1 21 1 4
35.4 ₈	0.2885390 ₃	293	1CWR	1597	2.1	14727	0.172	0.224	0.804	0.1665880 ₉	calc	293	0.03	51.733 71.110 75.247 90.00 90.00 90.00 P 21 21 21 4
26.5 ₈	0.1478367 ₄	100	1Q80	1872	1.91	19822	0.135	0.143	0.951	0.0853535 ₈	calc	100	0.03	51.169 71.097 73.515 90.00 90.00 90.00 P 21 21 21 4
35	0.3869810 ₅	298	1E2A	2421	2.3	15009	0.19	0.24	0.977	0.2234236 ₁		298	0.005	90.900 90.900 82.400 90.00 90.00 90.00 P 41 21 2 24
45.9	0.3329306	100	2E2A	2511	2.1	18682	0.198	0.249	0.992	0.1922175 ₇	45.9	100	0.176	87.960 87.960 79.840 90.00 90.00 90.00 P 41 21 2 24
37.7	0.3904201 ₃	277	1EP1	4570	2.2	29987	0.202	0.256	0.928	0.2254091 ₇		277	0.011	202.670 202.670 81.110 90.00 90.00 120.00 H 3 2 18
32.5	0.3211025 ₇	120	1EP3	4856	2.1	35305	0.195	0.237	0.987	0.1853886 ₆	32.5	120	0.009	199.890 199.890 80.270 90.00 90.00 120.00 H 3 2 18
26	0.5111992 ₄	293	1I81	1899	2.4	9119	0.156	0.262	0.919	0.2951410 ₂	26	293	0.017	111.600 45.300 110.400 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21 8
13	0.2052531 ₉	100	1I8K	2083	1.8	24309	0.172	0.224	0.988	0.1185029 ₉	13	100	0.0014	110.500 44.800 108.600 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21 8
44.6	0.4467280 ₁	291	1RN7	945	2.5	4835	0.191	0.229	0.945	0.2579185 ₃	44.6	291	0.006	34.900 84.370 47.650 90.00 90.00 90.00 P 21 21 2 4
34.6	0.2584459 ₉	100	1ROA	994	1.8	11576	0.25	0.278	0.949	0.1492138 ₆	34.6	100		34.050 81.720 46.740 90.00 90.00 90.00 P 21 21 2 4
50.3	0.3932507 ₆	293	2GES	2708	2.4	16374	0.188	0.232	0.992	0.2270434 ₃	50.3	293	0.006	78.304 78.304 115.449 90.00 90.00 120.00 P 31 2 1 6
64.3 ₇	0.4449764 ₄	100	2GET	2723	2.35	16654	0.227	0.27	0.996	0.2569072 ₇	CAL C	100	0.007	76.973 76.973 113.647 90.00 90.00 120.00 P 31 2 1 6
28.7	0.4010632 ₄	293	2I8N	2791	2.35	14726	0.1888	0.2242	0.972	0.2315539 ₇	28.7	293	0.007	47.967 57.522 126.740 90.00 90.00 90.00 P 21 21 21 8
16.9	0.1272911 ₆	100	2I8M	3345	1.44	58095	0.1994	0.2082	0.938	0.0734915 ₉	16.9	100	0.007	47.749 56.868 124.470 90.00 90.00 90.00 P 21 21 21 8
36	0.5990528 ₉	293	1V7Y	3870	2.5	15954	0.218	0.271	0.898	0.3458633 ₅	36	293	0.007	158.420 45.100 72.060 90.00 96.90 90.00 C 1 2 1 8
33.1	0.4410170 ₂	100	1WQ5	4266	2.3	21699	0.185	0.248	0.98	0.2546213	33.1	100	0.008	156.774 44.626 71.716 90.00 96.46 90.00 C 1 2 1 8

* Los colores se usan para agrupar los modelos de a pares, los pares que se comparan internamente.

4.2.9. Estudio de la información contenida en los factores B para evidenciar rutas de comunicación alostérica en la HSA

Usamos el método propuesto de comparación de factores *B* escalados con el fin de hallar evidencias que sugieran características probables del mecanismo alostérico que acopla el sitio del tiol a la unión de ligandos en el sitio de unión a fármacos de Sudlow I. Más precisamente, pretendemos entender los procesos de comunicación intramolecular disparados por la unión de ligandos al sitio de Sudlow I, los que ocurren en ausencia de cambios conformacionales significativos según los resultados de la comparación de modelos cristalográficos de las formas apo y de complejos con ligando unido. Nos focalizamos en analizar cambios en el dominio I de la HSA (residuos 1-199), ya que contiene a la Cys34 y como señaláramos, participa del sitio de Sudlow I aportando la Tyr 150 como residuo clave en la interacción con los ligandos (ver Tabla 4.2.9.1).

Tabla 4.2.9.1. Unión de fármacos al sitio de Sudlow I

Código PDB	Identificador PDB (fórmula) [nombre vulgar] -grupo farmacológico-	Residuos (átomos) participantes en puentes de H, [distancia, Å]	N° de interacciones hidrofóbicas
2BXB	OPB (C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃) [Oxifenilbutazona, Hidroxifenilbutazona] -AINE*-	Y150(OH), [2.24] R257(NE), [2.93] R257(NH2), [3.11]	20
2BXC	P1Z (C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂) [Fenilbutazona] -AINE (profármaco)**-	Y150(OH), [2.30] R257(NH1), [2.98]	19
2BXD	RWF (C ₁₉ H ₁₆ O ₄) [Warfarina, -Anticoagulante antagonista de la vitamina K-	Y150(OH), [2.95] H242(NE2), [3.03] R222(NH1) [3.11] A291(O), [3.23]	24

* Antiinflamatorio no esteroideo

** Compuesto activo: Oxifenilbutazona

La aplicación más fundamental de conceptos sobre teorías de la información³⁸¹ nos llevó a suponer que ha de existir un canal de bajo ruido que permita transmitir la información alostérica desde el sitio de Sudlow I al sitio del tiol, de modo que señales de baja energía, en el orden de un par de puentes de H, sean transmitidas a 25 Å de distancia (Fig. 4.2.9.1).

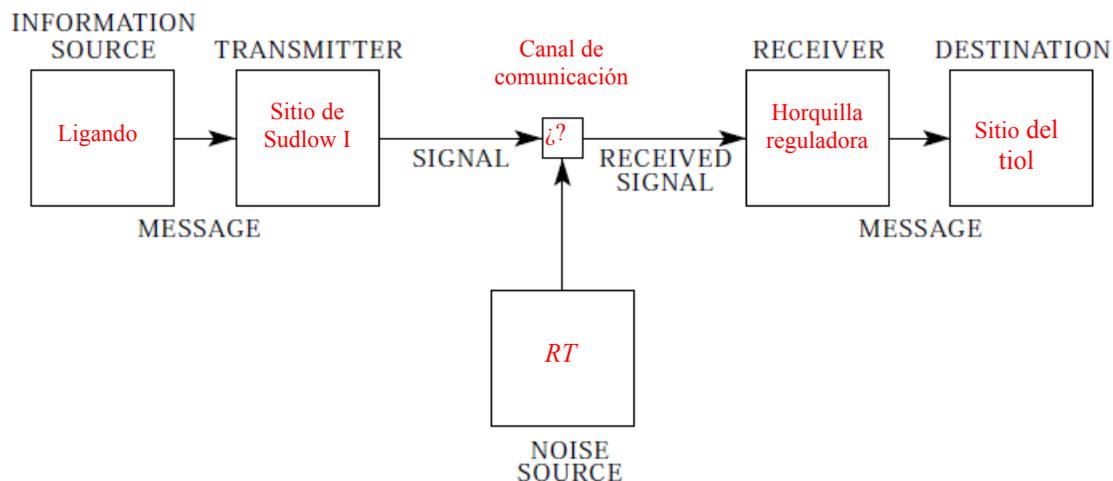


Figura 4.2.9.1. Representación esquemática de un sistema de comunicación general según Shannon (1948) adaptado al caso en estudio.

Del esquema presentado arriba (Fig. 4.2.9.1) nos gustaría destacar los efectos del ruido en relación a la transmisión de la señal a través de la proteína. De acuerdo con ello, residuos con alta movilidad térmica son malos candidatos para formar parte de un canal de comunicación eficiente (poco ruidoso). Por lo tanto, caracterizamos la respuesta térmica de la HSA basándonos en los modelos de los cristales de HSA-SH a temperatura ambiente y temperatura criogénica y en el método propuesto de análisis de factores B (Fig. 4.2.9.2, Paneles A y B). De la comparación por cocientes de factores B atómicos corregidos surge una lista de residuos con B_j aumentados (más sensibles a la agitación térmica) y otra lista de residuos cuyos carbonos alfa poseen básicamente los mismos valores de B_j , independientemente de la temperatura (Fig. 4.2.9.2, Panel

B). La selección de integrantes de cada grupo se hizo manualmente, identificando máximos y mínimos (de hecho, se seleccionaron máximos y mínimos intercalados en la secuencia). Por tanto, residuos potencialmente implicados en la comunicación según nuestra hipótesis podrían ser: 23, 32, 42, 49, 69, 74, 92, 98, 102, 107, 125, 139, 144, 150, 154-156, 162, 175, 182, 191, 194 y 198, o residuos muy próximos.

En los Paneles C y D de la Fig. 4.2.9.2 se pueden apreciar los resultados de la comparación por cocientes de los factores *B* del modelo la proteína formando complejo 1 a 1 con su ligando unido al sitio de Sudlow I (se usan los *B* de cada cadena A y B de los 3 modelos 2BXB, 2BXC y 2BXD, se muestran los promedios $\pm 1 \sigma$) y de los factores *B* del modelo de la forma apo de la HSA-SH (promedios ± 1 error estándar usando las cadenas A y B los modelos 1AO6 y 1BM0). Nuevamente seleccionamos manualmente máximos y mínimos. Los máximos corresponden con residuos cuyos carbonos alfa se desordenan más por la unión del ligando que los de residuos cercanos en la secuencia, destacando que el mencionado desorden puede corresponder con cambios dinámicos o estáticos. Los residuos en cocientes máximos de factores *B* en respuesta a la unión son: 7, 10, 14, 23, 26, 29, 36, 43, 46, 50, 67, 69, 74, 102, 107, 120, 123, 139, 144, 150, 156, 162, 172, 175, 182, 189 y 198. Como podrá apreciarse hay una importante superposición de residuos en ambos grupos: 23, 69, 74, 102, 107, 139, 144, 150, 156, 162, 175, 182 y 198 (13 de 21 y 27 selecciones, respectivamente).

De una forma menos intuitiva, los mismos datos fueron analizados en forma en realidad similar, calculando el cociente de cocientes “CC” para la detección de residuos potencialmente alostéricos (ec. 4.2.9.1), y luego usamos el programa Origin Lab para detectar automáticamente máximos y mínimos. Los máximos así hallados (23, 32, 43, 49, 69, 74, 98, 102, 107, 139, 144,

150, 156, 162, 175, 182, 194 y 198) corresponderían a residuos que se desordenan máximamente y los mínimos (79-88), con aquellos que se ordenan máximamente.

$$CC = \frac{({}^E B_i Lig_{TA}) \times ({}^R B_i apo_{TC})}{({}^E B_i apo_{TA})^2} \quad (4.2.9.1)$$

La ventaja del uso de esta ecuación es que hay menos pérdida de información en interpretaciones intermedias y por tanto las características verdaderamente distintivas (máximos y mínimos) de cada cociente se magnifican. La mayoría de los residuos identificados como máximamente desordenados según cualquier método pertenecen al *core* hidrofóbico de la proteína, mientras que los residuos que se ordenan máximamente pertenecen a la horquilla alfa que contiene a la Tyr84, el residuo más importante en el control de la reactividad de la Cys34.²⁴⁹ Es interesante señalar que adyacentes a los residuos máximamente desordenados por unión del ligando se encuentran la Cys75 y la Cys101, que forman puentes disulfuro con las Cys91 y Cys90, que pertenecen a la base de la horquilla reguladora (Fig. 4.2.9.3). Vale mencionar que el análisis de la red cristalina permite concluir que el ordenamiento de la horquilla reguladora no se debe a contactos cristalinos debidos a diferencias de empaquetamiento. Además, este ordenamiento se acompaña de desorden de la cadena lateral de la Tyr84, tal que impide su modelado, como ya se ha reportado.²⁴⁹

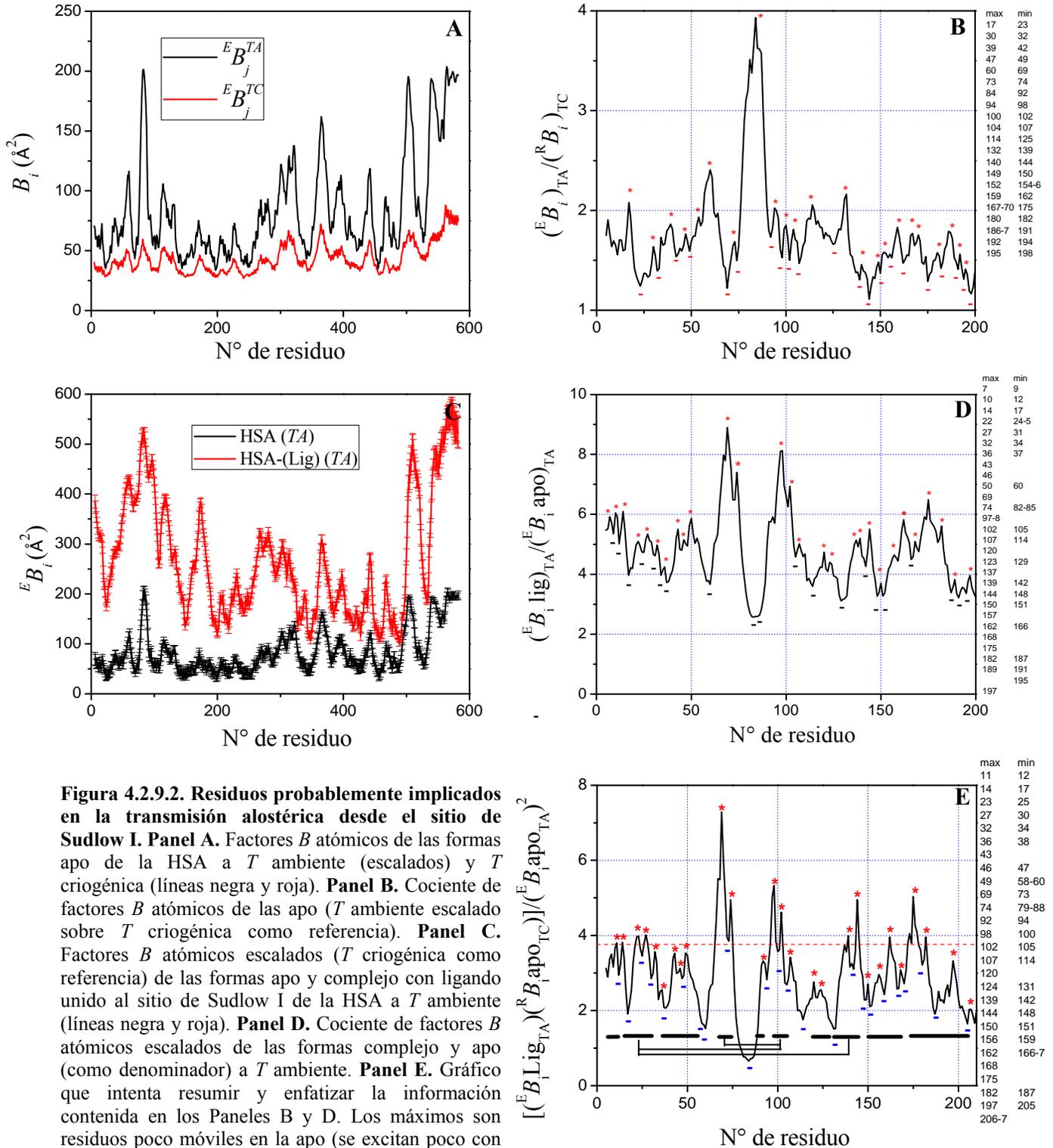


Figura 4.2.9.2. Residuos probablemente implicados en la transmisión alostérica desde el sitio de Sudlow I. **Panel A.** Factores B atómicos de las formas apo de la HSA a T ambiente (escalados) y T criogénica (líneas negra y roja). **Panel B.** Cociente de factores B atómicos de las apo (T ambiente escalado sobre T criogénica como referencia). **Panel C.** Factores B atómicos escalados (T criogénica como referencia) de las formas apo y complejo con ligando unido al sitio de Sudlow I de la HSA a T ambiente (líneas negra y roja). **Panel D.** Cociente de factores B atómicos escalados de las formas complejo y apo (como denominador) a T ambiente. **Panel E.** Gráfico que intenta resumir y enfatizar la información contenida en los Paneles B y D. Los máximos son residuos poco móviles en la apo (se excitan poco con el aumento de T) que se desordenan (dinámica o estáticamente, no sabemos) cuando se unen ligandos al sitio de Sudlow I. Los mínimos son residuos muy móviles en la apo (sensibles a la T) que se ordenan (estática o dinámicamente) por unión de los ligandos del sitio de Sudlow I. Residuos próximos a $y = 1$ (banda amarilla), estos serían residuos “constantes”.

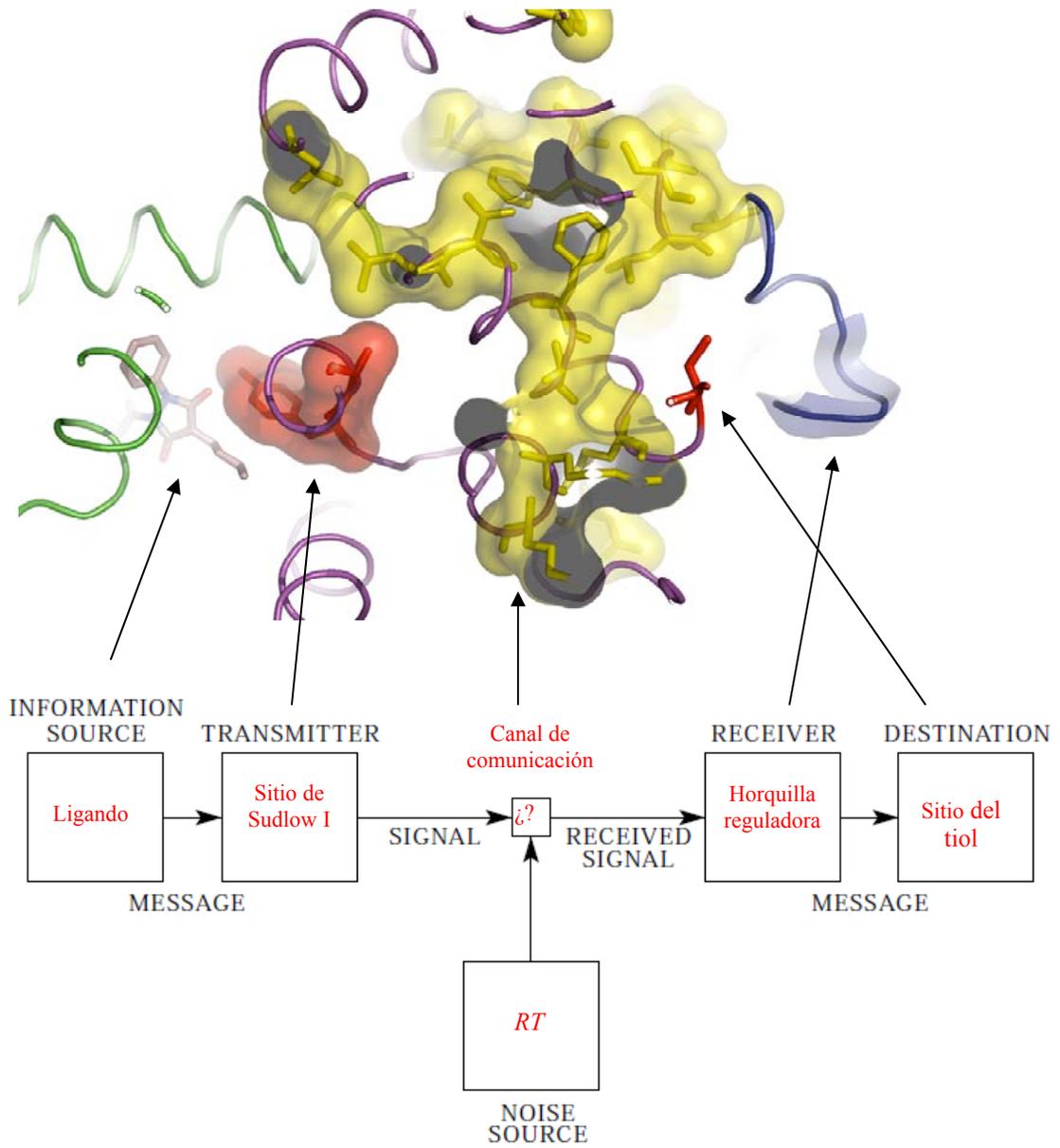


Figura 4.2.9.3. Representación esquemática de un sistema de comunicación general según Shannon (1948) adaptado al caso en estudio.

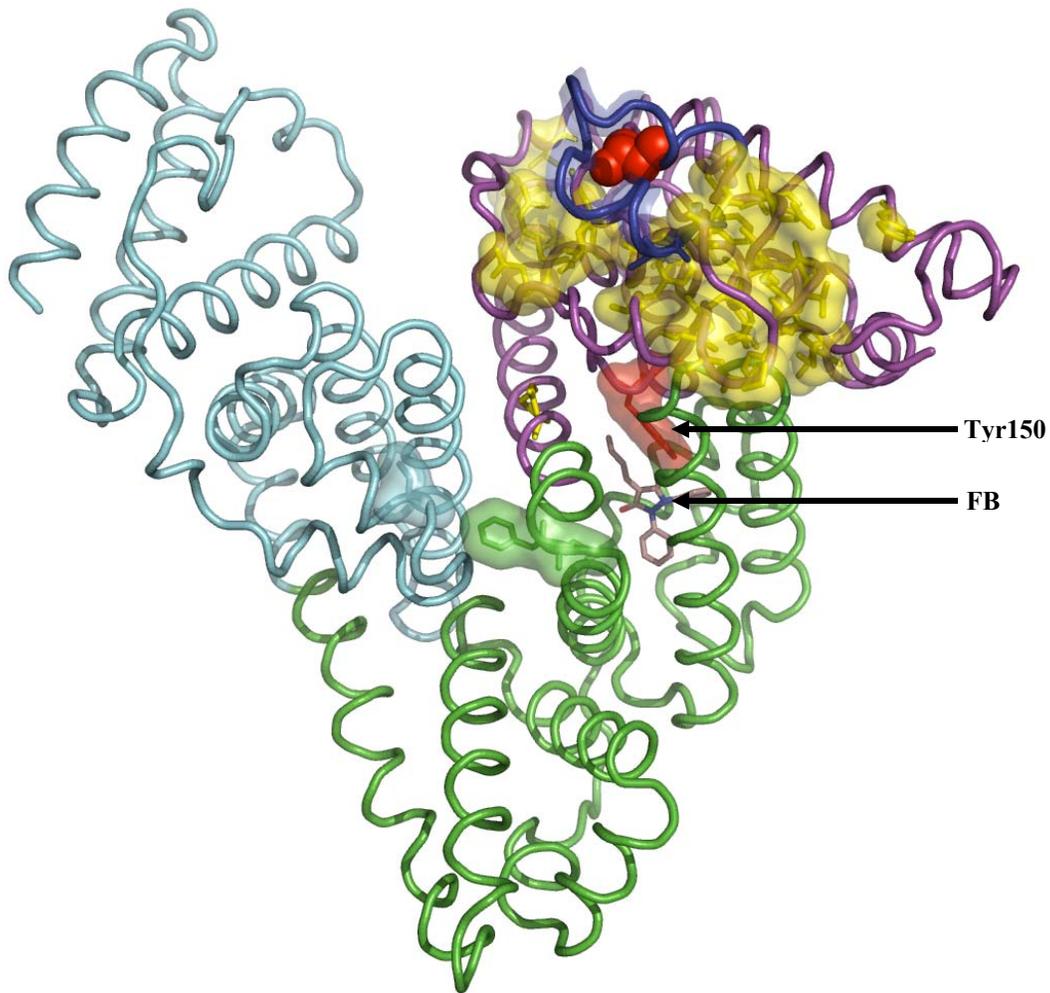


Figura 4.2.9.4. Probable canal de comunicación alostérica entre la Tyr 150 y la Tyr 84. Sistema de comunicación hidrofóbico propuesto en el contexto de la proteína entera. Dominio I en púrpura, II en verde y III en celeste. Se destacan el residuo de Tyr150 unida a fenilbutazona (FB) y los residuos hidrofóbicos máximamente desordenados que conectan el sitio de Sudlow I con la Cys34 en forma más directa (en amarillo). En azul, en la parte superior, se representa como cartoon la horquilla reguladora de la Cys34. También destacamos una conexión hidrofóbica entre dominios II y III que podrían comunicar la unión del ligando entre los sitios de Sudlow I y II, interacción que está demostrada para varios ligandos específicos, como por ejemplo tolmetina y warfarina.¹⁻²

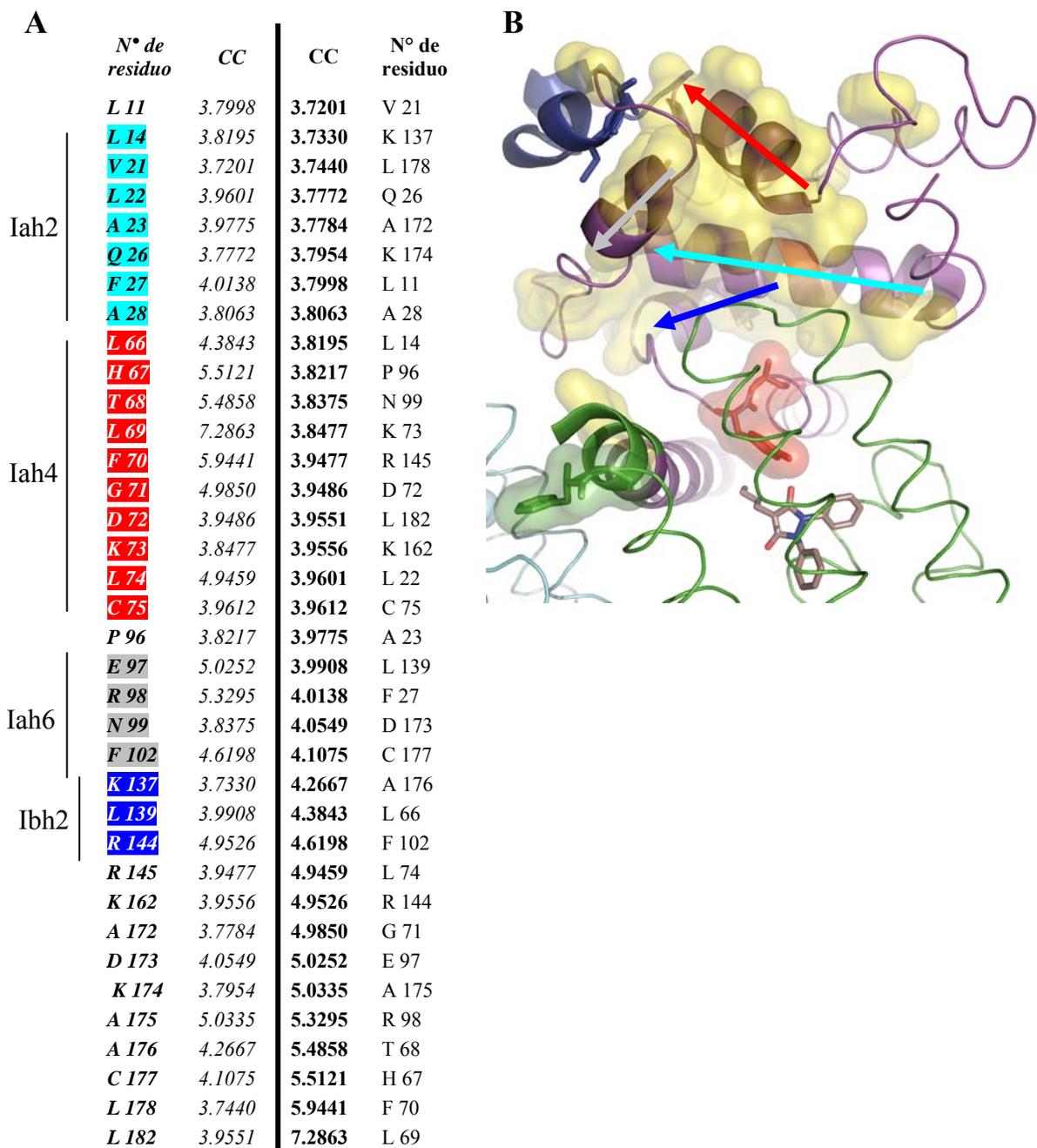


Figura 4.2.9.4 Cuatro alfa hélices del dominio IA que concentran la mayor parte de los cambios en los factores B específicos de la unión del ligando. El 70 por ciento de los residuos con CC mayores a 3.7 (Panel A) se ubican en las cuatro hélices alfa mostradas y señaladas en el Panel B.

4.3. Discusión

Los principales resultados de esta investigación sobre las propiedades alostéricas de la HSA podrían clasificarse en cuatro categorías: 4.3.1) Resultados Metodológicos; 4.3.2) Resultados de Estudios Biofísicoquímicos en Solución; 4.3.3) Resultados de Estudios Biofísicos por Cristalografía de Rayos X; 4.3.4) Resultados dependientes de la integración de toda la información. A continuación presentamos y discutimos los mencionados resultados.

4.3.1.1. Bioquímica Analítica y Cromatografía Preparativa. Se desarrollaron métodos de análisis y de purificación de isoformas redox de la HSA que en conjunto permiten obtener preparaciones de alta pureza, necesarias para la realización de estudios exactos y detallados de la modulación redox del comportamiento alostérico de la HSA (Fig. 4.2.1.1 y sección de Materiales y Métodos). Entre los métodos actuales de estudio del estado redox del plasma más exitoso se encuentra el desarrollado por Era y cols en la década de 1980.¹⁹⁶ Este método que se usa cada vez con mayor frecuencia,¹⁹⁴ se basa en un método cromatográfico mixto de intercambio iónico e interacción hidrofóbica.¹⁹⁶ Este método tiene como ventaja el hecho de poder separar parcialmente HSA-SSR de “HSA-SH” y HSA-SO₂⁻. Nuestros estudios permitieron identificar como desventaja de este método, el hecho de que no permite la separación y por tanto el análisis de HSA-SH y HSA-SOH, de modo que estas dos isoformas coeluyen en un solo pico. Además de las isoformas mencionadas de HSA, se ha propuesto que la HSA puede perder su Asp amino terminal (pérdida o modificación, descarboxilación?) por la liberación de metales de transición asociada con la isquemia tisular, particularmente liberación de Cu²⁺. Por tanto esta isoforma (HSAΔAsp) es vista como un marcador biológico de estrés oxidativo dependiente de la

ocurrencia de de isquemia tisular, con previstas aplicaciones en enfermedades cardiovasculares.³⁸²⁻³⁸⁷ e imprevistas complicaciones.³⁸⁸ El método actualmente disponible para la determinación de esta isoforma es colorimétrico y se basa en la capacidad de unión de Co^{2+} en el extremo amino terminal de la HSA nativa,³⁸⁹ un método que ha recibido críticas.³⁹⁰ Nuestro método en su estado actual usa detección UV y permite la determinación de HSA Δ Asp, HSA-(SOH/SSR), HSA-SH (como HSA-SHg⁺) y HSA-SO₂⁻, por lo que podría sustituir a los otros dos métodos. Además, según nuestros resultados preliminares puede ser acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (ESI-MS), la ventaja del método cromatográfico que proponemos en este sentido es que prevendría la supresión iónica por la HSA-SH de especies poco representadas.

4.3.1.2. Cristalografía de Rayos X. Se desarrolló un método aún incompletamente validado de comparación de factores B cristalográficos, que posibilitó el escalado absoluto de los mismos, permitiendo la realización de comparaciones cuantitativas directas entre distintos modelos. Los métodos actuales de comparación de factores B son tres principalmente. Dejando de lado la comparación directa de factores B de átomos j equivalentes entre distintos modelos por motivos ya explicados, podemos considerar dos métodos: uno consiste en comparar cocientes (B_j/B_{avg}) y el otro, en comparar diferencias estandarizadas $[(B_j - B_{\text{avg}})/\sigma(B_j)]$. Ambos métodos tienen como desventaja el hecho de que se pierde la dimensión física de los factores B (normalmente \AA^2). El segundo método tiene como problema conceptual el hecho de que pese a que se refinaron factores B atómicos, asume que los factores B ocurren de acuerdo con una distribución de probabilidad única, lo cual no es correcto. El valor esperado para el factor B de un átomo j y un átomo i no tienen por qué poseer la misma varianza. Tronrud propone por ejemplo que los

factores B más altos tienden a tener mayor error puesto que su refinamiento es más difícil.³⁹¹ El método propuesto podría suplantar los métodos previos de análisis, pero aún requiere validación.

4.3.1.3. Crioprotección de cristales de HSA. Se adaptó un método de equilibrio de vapor para la crioprotección efectiva de cristales de HSA, lo que permitió estudios cristalográficos a temperatura criogénica. Demostramos que el método propuesto permite obtener un modelo más preciso. Este método podría usarse ampliamente para mejorar la precisión de cristales de HSA previamente estudiados a temperatura ambiente.³³⁹

4.3.2.1 Nuevo modelo para las isomerizaciones dependientes del pH y la unión de Ca^{2+} . El modelo actual establece que la unión de Ca^{2+} facilita la adopción de la conformación básica de la HSA, en acuerdo con reportes de los años 1980.²²⁴ Los estudios realizados de excitación directa de Prodan ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{Prodan unido}} = 437 \text{ nm}$) nos permitieron obtener los siguientes resultados: **a)** Prodan unido a la forma básica de la HSA (pH 9.0) fluoresce con una intensidad casi 3 veces mayor que si está unido a la forma neutra (más precisamente HSA a pH = 7.5); **b)** la transición básica (N (pH = 7.5) \rightarrow B (pH = 9.0)) causa un incremento de la constante de equilibrio observada de unión al sitio de Sudlow I de 1.4-1.5 veces; **c)** la transición básica causa un incremento de casi 1.5 veces en el rendimiento cuántico de Prodan unido, sin cambios en λ_{max} (los que serían indicativos de cambios en la polaridad y polarizabilidad del entorno). Esto por definición quiere decir que la transición básica modula el cociente entre la constante cinética de la ruta luminiscente (k_{hv}) y la constante de vida del fluoróforo de una o ambas de las siguientes dos formas: aumento absoluto de k_{hv} y disminución absoluta de k_{dnr} (constante de decaimiento no

radiativo; Fig. H3); **d**) la unión de Ca^{2+} inhibe completamente **α**) el aumento de la constante de afinidad de unión de Prodan y HSA asociado con la transición básica, y **β**) el aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia de la sonda unida a la forma básica (Fig. H3). Dados los resultados anteriores (**a-d**) se puede concluir que cambios de afinidad y de rendimiento cuántico aparente son fenómenos indisociables en forma alostérica modulados por la unión de H^+ y Ca^{2+} .

Por otro lado, los estudios sobre los cambios en la transferencia no radiativa de energía por resonancia (RET) entre el Trp214 (dador, ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) y Prodan unido al sitio de Sudlow I ($\lambda_{\text{em}} = 437 \text{ nm}$) asociados con la transición $\text{N} \rightarrow \text{B}$ ($6.5 \leq \text{pH} \leq 9.5$), nos permitieron obtener los siguientes resultados: **e**) La presencia de Ca^{2+} inhibe parcialmente (-30%) la transferencia de energía aumentada a pH alcalino en la misma proporción que inhibe el aumento de la constante de afinidad; **f**) la inhibición causada por el Ca^{2+} del aumento de la fluorescencia de Prodan unido que se adquiere en la forma básica es mayor (el doble, -60%) que la disminución del RET. Por tanto (**e y f**) el aumento del RET con el aumento del pH se podría explicarse por un aumento de la fracción de ocupación del sitio de Sudlow I, sin necesidad de hipotetizar cambios conformacionales (ej. cambios en la distancia Trp214 – Prodan).

Además, la unión de Ca^{2+} **g**) provoca una disminución de la constante de segundo orden independiente de pH para la reacción de disulfuros con la Cys34 y una disminución del $\text{pH}_{1/2}$ aparente de la transición básica; **h**) inhibe la cristalización de la forma N de la HSA; **i**) favorece la pérdida de protones, lo que es evidenciado por una pendiente mayor $dk_2/d\text{pH}$. De los puntos (**g-i**) anteriores se puede concluir que al menos dos atributos de la forma B y uno de la forma N son modificados en forma alostérica por el Ca^{2+} , por lo que se debe concluir que la unión de Ca^{2+} no facilita la adquisición de la forma básica de la HSA, ni tampoco estabiliza la forma N, sino que favorece la adopción de otra forma o estado, que llamamos forma C la que se puebla más

fácilmente a pH básico, condición en la que se sabe que la afinidad por el Ca^{2+} aumenta (Figura 4.3.2.1.1). Esto está de acuerdo con trabajos previos de alcance general, que proponen que la unión de ligandos en sitios alostéricos inducen un cambio en la toda la distribución de conformación “ $P(x)$ ” de la proteína regulada.³⁹² Sigue siendo muy importante identificar los sitios de unión de Ca^{2+} , algo que quizás pueda estudiarse computacionalmente.²⁰⁹

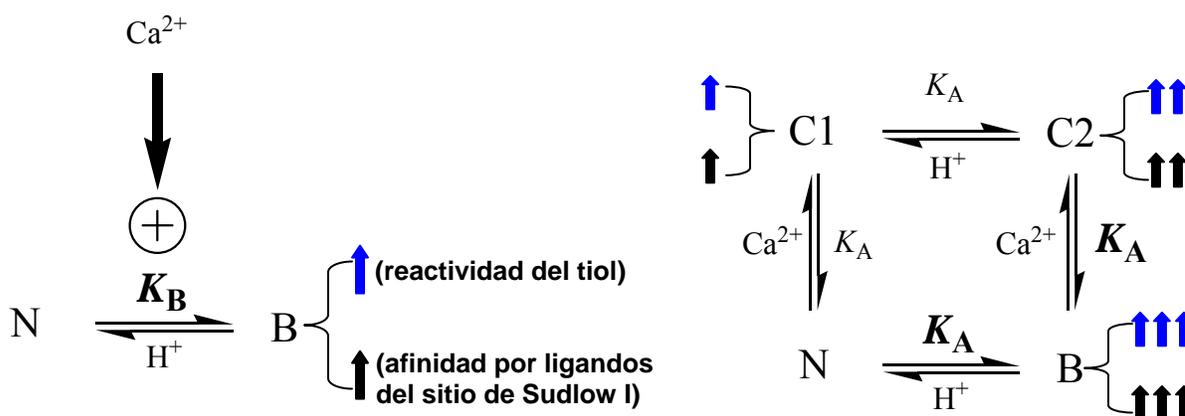


Figura 4.3.2.1. Modelos previo y propuesto para la modulación por pH y Ca^{2+} de la reactividad del tiol y la unión de ligandos al sitio I de Sudlow. El modelo previo (Janssen y cols.,1981) concibe a la HSA como una proteína alostérica, cuyo alosterismo permite la modulación del balance entre los estados neutro y básico. El modelo propuesto por nosotros afirma que la modulación alostérica por Ca^{2+} depende de los equilibrios de unión de Ca^{2+} y H^+ y distingue el complejo HSA- Ca^{2+} a pH alcalino de la forma básica de la HSA.

4.3.2.2. Descripción y cuantificación del efecto alostérico producido por la modificación oxidativa por 4 e⁻ de la Cys34 sobre la unión de Prodan al sitio de Sudlow I. Los estudios de fluorescencia por RET Trp → Prodan y por excitación directa de Prodan coinciden en señalar que: **j)** la oxidación del grupo tío lato de la Cys34 a sulfonato (oxidación secuencial por 4 electrones) aumenta a pH 7.5 aproximadamente 2.6 veces la afinidad del sitio de Sudlow I de la HSA por Prodan; **k)** los cambios en la unión de Prodan a la HSA con el pH tanto en el caso de la forma oxidada como de la reducida pueden ser descriptos como dependientes de la ionización de

dos grupos, uno de $pK_a \simeq 7.0$ y otro de $pK_a \simeq 8.3$ (este último asociado a la transición básica); **l)** la mencionada oxidación no afectaría la transición básica ni los efectos de la unión del Ca^{2+} sobre el RET Trp214 \rightarrow Prodan unido (no lo mostramos); **m)** el aumento de la afinidad de la HSA por Prodan por oxidación del tiol resulta de la exageración de un proceso preexistente dependiente del pH si, pero con $pH_{1/2}$ cercano a 7, independiente de la transición básica. En conjunto, los resultados muestran que el sitio de la Cys34 está conectado en forma alostérica con el sitio de Sudlow I en cualquier estado redox del tiol y que los cambios alostéricos son sutiles, pudiendo implicar cambios conformacionales o dinámicos directos o indirectos en al menos un residuo del sitio de Sudlow I con $pK_a = 7$ (Fig. 4.3.2.2.1). De acuerdo con la literatura, y nuestros resultados de cristalografía, es altamente probable que se trate de la histidina 242, y que el mecanismo implique el desplazamiento de iones cloruro del sitio de Sudlow I. Los isómeros N, B y C podrían hallarse con el tiol oxidado en estados N', B' y C', o eventualmente se podrán encontrar evidencias que muestren que cada uno de ellos presenta propiedades suficientemente distintas como para adjudicarle una identidad realmente propia.

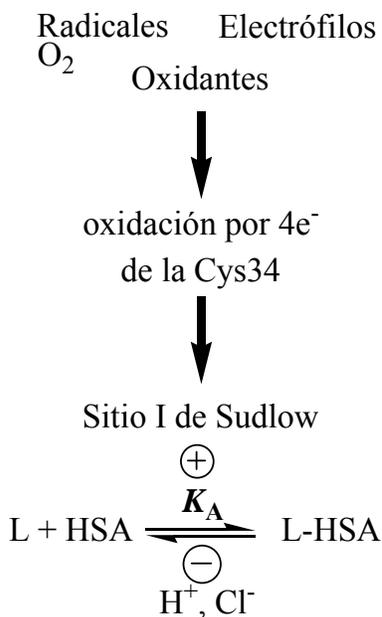


Figura 4.3.2.2.1. Modelo propuesto para las interacciones alostéricas disparadas por la oxidación del tiol libre de la HSA. Electrófilos paramagnéticos (radicales) y diamagnéticos (electrófilos como ONOOH y H_2O_2) pueden determinar la oxidación por $4e^-$ del tiolato en la HSA (los primeros requieren de dióxígeno, O_2). Debe existir un canal de comunicación alostérica entre el sitio del tiol y el sitio de Sudlow I, pero otros blancos alostéricos y cierta disipación del estímulo son probables. El Sitio de Sudlow I responde estereotípicamente al estímulo alostérico, la afinidad por Prodan aumenta escasamente (2.6 veces), lo que pone de manifiesto la participación en el mecanismo de unión de un residuo de pKa cercano a 7, que cuando se desprotona favorece la unión del ligando, y en cuyo estado protonado participa en la unión de Cl^- .

4.3.3.1 Nuevo modelo de cristales de HSA a temperatura criogénica que incluye iones cloruro. Se refinó un modelo con R_W y R_{FREE} (0.199 y 0.248) adecuados para una modelo con $\lambda_{min} = 2.3 \text{ \AA}$, con una estereoquímica adecuada y con indicadores de validación que señalan su buena calidad. A través de estudios sistemáticos de condiciones de contención de simetría no cristalográfica y de definición de grupos TLS se obtuvieron evidencias de la optimización del refinamiento. El modelo es más preciso que otros modelos de HSA comparables obtenidos a temperatura ambiente (todos menos 3) y más preciso que todos los modelos criogénicos excepto 1. El modelo incluye 6 iones Cl^- unidos en forma asimétrica a las cadenas A y B que integran la unidad asimétrica: Un Cl^- se une a un sitio entre los dominios I y III en la cadena A, pero no el la B, representaría un estado ligeramente distinto de la HSA que explica resultados previos que señalan la existencia de puentes iónicos entre estos dos dominios; el sitio de Sudlow I puede alojar uno o dos iones Cl^- , con modos de unión bien distintos, lo que involucra también

ordenamientos dispares de moléculas de agua; y el sitio de Sudlow II solo aloja un ión Cl^- .

Estos resultados ponen en evidencia la importancia de la unión de Cl^- para la unión de ligandos a los sitios de Sudlow I y II, confirmando reportes previos que señalan el mecanismo competitivo de inhibición de la unión de fármacos por iones Cl^- , un efecto que sería independiente de la naturaleza de las interacciones del ligando particular con el sitio de Sudlow I.^{1-2,233,393} Nuestros resultados están en buen acuerdo con estudios computacionales recientes de predicción de sitios de unión de Cl^- en la HSA.²⁰⁹

4.3.3.2. Diferencias conformacionales entre los modelos de cristales de HSA a temperatura criogénica, a temperatura ambiente y con ligandos del sitio de Sudlow I. Exceptuando un puñado de residuos, no pudimos evidenciar cambios conformacionales significativos con $0.05 \leq \alpha$. Identificamos un sector del dominio IA que sufre cambios conformacionales aparentemente cooperativos pequeños de acuerdo con la temperatura (comparación de los modelos a temperatura ambiente y criogénica). Ese sitio del dominio IA se diferencia de sus homólogos de los dominios II y III por poseer un patrón de disulfuros distinto, con un disulfuro menos. El dominio III se comporta como un cuerpo rígido independiente en la comparación de los modelos a T ambiente de las formas apo y con ligandos ocupando el sitio de Sudlow I. Es decir, el dominio III se independiza más en presencia de ligandos en el sitio de Sudlow I. Realizando comparaciones de alta sensibilidad ($0.5 \leq \alpha$) con ESCET identificamos pocos residuos del sitio de Sudlow I y del dominio IA que sufren pequeños cambios conformacionales.¹³ Entre los residuos que por su ubicación podrían estar implicados en la comunicación alostérica destacamos principalmente a la Tyr150 y Ala151. Cabe mencionar, que el Trp214 sufre cambios

¹³ La baja significación estadística “frecuentista” es de alguna forma pesada por la probabilidad a priori de que se detecten cambios coordinados en sectores específicos donde se esperan cambios. Esta forma de análisis requiere validación.

desplazamientos importantes a nivel de su cadena lateral (cambios que no se analizan con ESCET) que acompañan la unión del ligando, cuando éste presenta grupos voluminosos, en general hidrofóbicos (grupos fenilo por ejemplo).

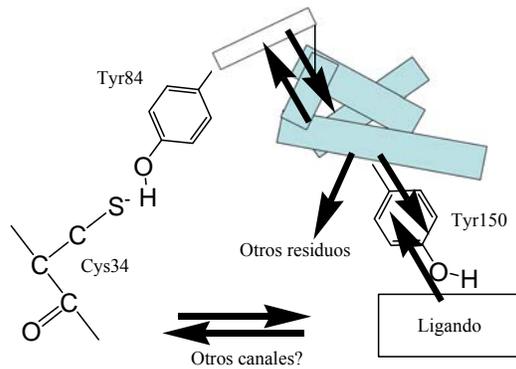
4.3.3.3. Diferencias en el desorden y la incertidumbre posicional atómica entre los modelos de cristales de HSA a temperatura criogénica y con ligandos del sitio de Sudlow I. Usando el método que estamos proponiendo de escalado de factores B, pudimos identificar un grupo de residuos que tienen una escasa respuesta térmica (movimientos de alta frecuencia) pero una alta respuesta frente a la unión de los ligandos. Estos residuos integrarían un canal de comunicación alostérica de bajo ruido, como lo exigiría la teoría de la información de sistemas de comunicación en el caso específico, donde los cambios son de escasa intensidad (recuérdese que la oxidación del tiol aumenta solo 2.6-3 veces la K_A). Este desorden podría ser “estático” (movimientos de baja frecuencia), evidenciando la existencia de estados microconformacionales en el cristal. A favor de esta idea está el hecho de que los residuos se agrupan en regiones del core del dominio IA, integrando cuatro cadenas alfa que podrían realizar desplazamiento helicoidales relativos de escasa amplitud o movimientos de tipo tijera. Eventualmente, se podrían probar métodos de refinamiento cristalográfico recientemente desarrollados para modelar un ensamble de confórmers que permita entender mejor el comportamiento de dicho manojo de hélices alfa.³⁹⁴⁻³⁹⁵ Sin embargo, para ello sería recomendable obtener nuevos datos de HSA en complejo con Prodan u otro ligando del sitio de Sudlow a mejor resolución que los existentes (2BXB, 2BXC, 2BXD), usando el método de crioprotección que reportamos en esta tesis.

4.3.4.1. Integración de la información de estudios en solución y cristalográficos. Vistos en conjunto, nuestros resultados de análisis cristalográfico usando ESCET muestran que los cambios alostéricos relacionados con la unión de los ligandos estudiados en la HSA son de escasa magnitud. No pudimos evidenciar cambios conformacionales significativos en su definición más clásica (cambios en la cadena principal) que expliquen los modestos efectos alostéricos observados en solución dependientes de la oxidación del tiol. Estaríamos por tanto ante un caso de alostería a distancia sin cambio conformacional (significativo), una entidad propuesta por Perutz, de la cual se conocen pocos ejemplos bien caracterizados. En nuestra opinión, es posible que el análisis de factores B escalados que nosotros presentamos sea una herramienta válida y útil para entender estos fenómenos que pueden fácilmente pasar desapercibidos.

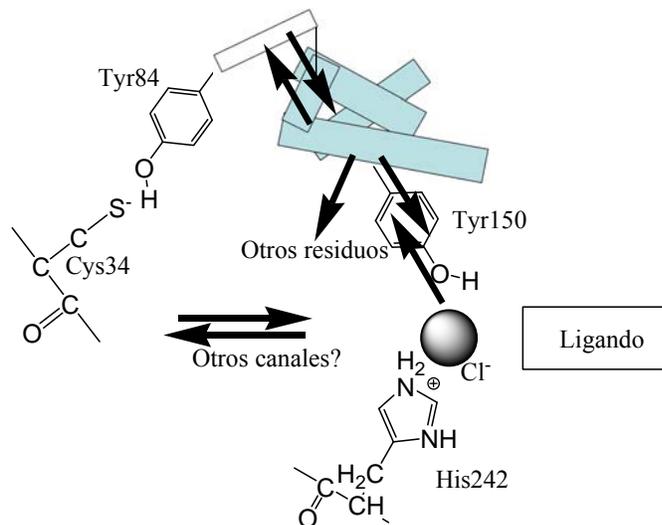
¿Cómo se explica un cambio de 2.6 – 3 veces en la constante de afinidad por Prodan cuando la Cys34 se oxida por $4e^-$ a 25 Å de distancia? Reportes previos señalan la importancia de las interacciones entre la Tyr84 en el control de la reactividad de la Cys34.²⁴⁹ Como se puede observar en nuestro modelo criogénico y en modelos previos de la forma N de la HSA a temperatura ambiente, estos residuos forman un puente de H. Este puente de H debe romperse antes de que ocurra la oxidación, y la oxidación por $4e^-$ no hace más que impedir la interacción de la Cys34 oxidada con la Tyr84. Como mostramos, la horquilla α que contiene en su extremo a la Tyr84, está directamente acoplada por su base y a través de puentes disulfuro con el ramillete de hélices alfa del core del dominio IA. Esto implicaría al canal de comunicación que transmitiría información en el sentido inverso, es decir desde el sitio de Sudlow al sitio del tiol. No queremos decir con esto de que ocurra exactamente lo mismo pero en reversa, solo que la explicación más sencilla y probable a nuestro juicio es que estos cambios deben (para usar

distintos términos) cooperar, ser sinérgicos, solaparse, estar acoplados, al menos parcialmente, de acuerdo con trabajos previos.³⁹⁶⁻³⁹⁷ El modelo hipotético que proponemos se muestra en el esquema 4.3.4.1.1. Una posibilidad que vamos a probar experimentalmente (modelo alternativo representado en el esquema 4.3.4.1.2) es si el efecto alostérico gatillado por la oxidación de la Cys34 depende de la presencia de Cl⁻. Si en ausencia (o concentraciones bajas de Cl⁻ no hay efecto, entonces podríamos proponer que la unión de Cl⁻ en el sitio de Sudlow I podría desfavorecerse en el caso de la isoforma oxidada. Los iones Cl⁻ competirían menos eficientemente con Prodan por el sitio de Sudlow I en la isoforma oxidada.

Esquema 4.3.4.1.1



Esquema 4.3.4.1.2



5. Conclusiones, perspectivas y comentarios finales

Aquí vamos a presentar brevemente algunas conclusiones generales que extraemos de nuestro trabajo y más como espinas irritantes que como conclusiones, algunos pensamientos sobre la experiencia de investigación que ha implicado esta tesis.

No hay trabajos de cinética (resueltos en el dominio del tiempo o la frecuencia) que planteen directamente que en una reacción controlada por difusión la constante bimolecular depende de la distancia media entre reactivos. Por tanto el estudio de la reacción de $O_2^{\cdot-}$ y $^{\cdot}NO$ para dar $ONOO^-$ que hemos realizado y publicado³⁹⁸, nos pone en frente a una posibilidad radical: las reacciones controladas por difusión no son bien comprendidas aún. Tenemos una oportunidad, la de realizar un estudio que nos permita avanzar más para entender mejor la termodinámica de reacciones controladas por difusión, un trabajo que podríamos encarar en colaboración con un investigador formado en el terreno de teoría, simulación y matemática de reacciones controladas por difusión.

No es novedad quizás que el sitio del tiol esté conectado alostéricamente con el sitio de Sudlow, lo novedoso es el planteo de una posible explicación molecular más detallada que las anteriores. Nuestro trabajo hace una propuesta metodológica a cerca de cómo hacer uso de factores B para entender alosterismo sin cambio conformacional (pero por qué no, detalles del alosterismo en gral). Validar el método de escalado con trabajo estadístico y teórico en cristalografía con colaboradores, particularmente Murshudov y Alejandro Buschiazzo sería a mi juicio el camino más natural.

El campo de la investigación de la química biológica del $ONOO^-$ ha sido fuertemente controversial. Tan solo una de ellas ha sido el valor de la constante de reacción de $O_2^{\cdot-}$ y $^{\cdot}NO$. Si bien las controversias provienen de genuinos intereses y creencias, y tuvieron en su momento un efecto vitalizador, las nuevas generaciones de investigadores en el campo tienen la oportunidad

de intentar entender las razones fundamentales de las diferencias, y solucionar los dilemas. El espíritu crítico y rebelde de los investigadores más jóvenes puede aportar la chispa. Pienso que de otra forma, el legado científico de la primera generación de investigadores se debilitará en las incertidumbres. Permítasenos decir que nuestra investigación es un ejemplo de lo que arriba decimos: de lo genuino de las creencias, y del valor potencial de la reinvestigación. Dejo para el lector, sobre todo de los más jóvenes, el ejercicio de pensar cómo debe hacerse la reinvestigación, con que metas, con que filosofía, con qué argumentos. La colaboración entre distintos laboratorios y investigadores principales tiene en esta tarea varias ventajas. Una ventaja obvia es la de capturar la diversidad de ideas y métodos, otra ventaja es la de poder coordinar esfuerzos para una investigación que dudosamente pueda tener financiación propia y la tercera, la de realizar publicaciones conjuntas que quizás faciliten el impacto necesario en un mundo de comunicaciones científicas con mucho “ruido”.

En el campo de la medicina muchas veces la controversia se centra en los efectos finales del uso de tal o cual fármaco en la “realidad”: un agente potencialmente beneficioso es un fármaco hecho y derecho solo cuando pasa la prueba en el uso cotidiano que los médicos y la sociedad hacen de él. ¿Qué sentido tuvo investigar hasta el más mínimo detalle de la farmacodinámica y farmacocinética de una droga, si esta finalmente no se puede usar? El concepto de estrés oxidativo, como si fuera un potencial fármaco, tiene que alcanzar ese grado de madurez, quizás el que alcanzan ciertas ideas que a veces llamamos secretos de la vida. En este sentido quisiera destacar que quizás la estrategia farmacológica antioxidante más potente sea la prevención de la formación de O_2^{\bullet} .

Finalmente, quiero realizar una simple enumeración, a cerca de algunos de los desafíos de los investigadores que como yo se sienten igualmente a gusto en muchas disciplinas, pero tienen una tendencia hacia lo teórico: cada uno debe encontrar la forma de lidiar con las limitaciones de dinero, tiempo, concentración y educación. Cada paso puede ser una gran victoria, pero quizás

solo para nosotros, y no hay que temerle demasiado a eso pero tampoco encerrarse demasiado en uno mismo.

6. Anexo. Procedimientos cristalográficos

6.1. Colecta de Datos. El juego de datos que se utilizó en el modelo que reportamos en este trabajo se obtuvo en la estación de difracción X26C del Brookhaven National Laboratory, Biology Dept., Cold Spring Harbor Laboratory. El rayo utilizado proviene de un magneto de doblado de electrones instalado en el anillo de almacenaje de electrones del Brookhaven National Laboratory. La línea se caracteriza por un rango de energías de 5 – 20 keV, un monocromatizador de cristal de Si(111), una resolución de 8×10^{-4} y una fluencia de 4.1×10^{10} fotones s^{-1} (a 1.1 Å, 2.8 GeV y 200 mA), y spots de 0.1 – 0.5 mm de diámetro. La estación de difracción X26C cuenta con un difractómetro equipado con un goniómetro mini-KB, un detector de área de rayos X CCD (Charge-Coupled Device) ADSC Quantum-210, y un sistema de criopreservación de cristales Oxford CryoSystems 700. La estrategia de colecta de datos fue definida de acuerdo con el análisis de dos imágenes a 0 y 90 °, con barridos de 1 ° imágenes con el programa hkl-2000.³⁹⁹ Se buscaron y registraron reflexiones, se autoindexó en forma automática y se definió la estrategia de la colecta (ángulo de barrido por imagen, ángulo de barrido total, tiempo de exposición y distancia al detector) con datos de esas imágenes iniciales. Los datos se procesaron a medida de que las imágenes se fueron colectando para conocer en tiempo real la completitud del juego de datos en función de la resolución.

6.2. Procesamiento de Datos. Los datos colectados (243 imágenes de difracción) fueron luego reprocesados en Montevideo (indexado, refinado de los parámetros de la celda e integración de las reflexiones) usando iMOSFLM y SCALA.^{322,371,400-402} iMOSFLM toma del encabezado del archivo de imagen la mayoría de los datos necesarios para iniciar el procesamiento de los datos (marca y modelo de detector, ángulo inicial y final de cada imagen, la longitud de onda (1.0809

Å), el tamaño de los pixeles, así como otros parámetros con valores aproximados que son refinados como la distancia al detector (25 cm) y la posición en el plano de detección del punto de incidencia del rayo principal. Se usaron 10 imágenes para autoindexar y 30 imágenes para refinar la celda, de modo de cubrir esparcida y regularmente el ángulo total de barrido. Dado que los cristales de HSA difractan en forma imperfecta, aunque el programa sugirió modificar la ganancia del detector, esta fue fijada de acuerdo con información previa en 0.25. Luego de la integración se verificó la calidad del juego de datos de acuerdo con las alertas generadas por iMOSFLM, así como analizando el archivo .lp en busca de imágenes con un número alto (más de 10) de “bad spots” (aquellas reflexiones observadas que no superan ciertos test de calidad automáticos luego de la integración, mostrando demasiada variación en el nivel de base, un ajuste de perfil pobre, una intensidad muy negativa -más de 5 SDs- o un gradiente muy alto para el plano de fondo) y de spots sobrecargados (detector con pixeles saturados). iMOSFLM genera un archivo de salida .mtz el cual contiene los datos integrados (intensidades y desviaciones para cada reflexión), el cual es el archivo de entrada para SCALA. Dicho mtz contiene I_h y sigma de I_h por imagen como información principal.

El programa SCALA versión 3.3.9 se usó para la reducción de los datos (su corrección, escalado y combinado).³⁷¹ Este emplea un modelo multiparamétrico continuo de escalado tomando como observaciones las intensidades de reflexiones únicas equivalentes integradas por iMOSFLM (reflexiones relacionadas por la simetría del cristal y del espacio recíproco -esto último es esencial para escalar en P1- o registradas e integradas más de una vez –mediciones repetidas de la misma reflexión-). Luego que los factores de escala por imagen y resolución se establecen, se aplican a los datos. Es importante hacer notar que el escalado de los datos fue relativo (como suele serlo), resultando en la mayor consistencia interna posible de los datos pero

no en datos en una escala absoluta.³⁷¹ El programa SCALA minimiza la función Psi que es una sumatoria de cuadrados de residuales:

$$\Psi = \sum_{\mathbf{h}} \sum_l w_{hl} (I_{hl} - g_{hl} \langle I_h \rangle)^2 + \text{términos dependientes de contenciones de parámetros} \quad (6.2.1)$$

Donde la primer sumatoria es para todas las reflexiones únicas hkl (simplificamos como h), la segunda es para la reflexión hkl número l relacionada con otras por simetría o por medición repetida, siendo I_{hl} la medida numero l de una reflexión hkl particular, $\langle I_h \rangle$ el promedio de las intensidades asociada a la reflexión hkl particular, w_{hl} es un peso asignado a la observación I_{hl} y g_{hl} es la función factor de escala inversa, que se define como sigue:³⁷¹

$$g_{hl} = (\text{Escala}, C_{hl}) \times (\text{factor } B, T_{hl}) \times (\text{Absorción}, S_{hl}) \times (\text{Corrección de colas}, L_{hl}) \quad (6.2.2)$$

Donde la escala C_{hl} es una escala en función de la rotación, el factor B relativo T_{hl} (no es un factor B atómico) aquí mencionado es un factor de corrección para el decaimiento de la difracción en función del tiempo (ergo, la rotación) y la resolución debido al daño en el cristal por radiaciones; el factor de corrección por absorción compensa las diferencias entre reflexiones equivalentes debidas absorción diferencial del luz por el cristal (sea del haz primario o del secundario -incidente o difractado-); la corrección de colas, L_{hl} , busca corregir el efecto de la difracción difusa sobre las intensidades de las reflexiones.

El programa SCALA funciona en combinación con otros del conjunto CCP4 (módulo de reducción de datos de CCP4), de modo que se siguió una secuencia o “tubería” de programas estándar en la que los archivos de salida de un programa (SORTMTZ, SCALA, cTRUNCATE,

MTZDUMP, UNIQUE, CAD, FREEFLAG y MTZUTILS) son los de entrada del siguiente, de forma que se produjo un archivo mtz final compatible con otros programas del grupo CCP4 con cuyo contenido principal es la información sobre amplitudes de los factores de estructura (F_{New}) y las desviaciones estándar de las mismas (SIGF_{New}) para cada reflexión única observada. De acuerdo con el análisis e los datos procesados se definió el rango de resolución efectivo del juego de datos.

6.3. Solución de la Estructura por Reemplazo Molecular (RM). Para resolver el problema de las fases se recurrió al RM, usando el programa AMoRe.⁴⁰³ Como otros métodos de faseo, el RM se basa en el cálculo de la función de Patterson:⁴⁰⁴

$$P(u, v, w) = \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu + kv + lw)} \quad (6.3.1)$$

La función de Patterson es la transformada de Fourier de las intensidades ($I = |F_{hkl}|^2$). A diferencia, la función de densidad electrónica es la transformada de Fourier de los factores de estructura (F_{hkl}):

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (6.3.2)$$

La ventaja de la ecuación de Patterson es que no requiere de la información sobre fases contenida en los factores de estructura, y por tanto se puede calcular tanto a partir de datos no faseados como también de modelos ubicados en el espacio real en forma arbitraria. El RM se basa en la comparación de las amplitudes de los factores de estructura observados y los calculados a partir del modelo de búsqueda, las que deben correlacionar.⁴⁰⁵ Para ello es necesario estimar el número

de moléculas por unidad asimétrica (por ende el número de soluciones que debemos hallar) y probar distintas posiciones del modelo de búsqueda en el cristal, cuyos parámetros de celda y simetría son ya conocidos o asumidos, hasta hallar la/s que mejor concuerde/n con las observaciones. Los archivos de ingreso para AMoRe para realizar las búsquedas fueron el archivo mtz derivado de SCALA (y programas asociados del paquete CCP4) y el archivo PDB del modelo de búsqueda. Se probaron varios modelos de búsqueda, se utilizaron solo cadenas A sin moléculas de agua asociadas. Hallar la solución implica determinar valores para 6 variables por cadena: los ángulos de rotación (R) en torno a los ejes Z , Y , y X (ψ , θ , y φ) y las coordenadas x_t y_t z_t del centro de masa del modelo trasladado (T) en el cristal en estudio, de modo que los vectores de posición atómica iniciales del modelo de búsqueda (r^0) se modifican (r'):

$$r' = Rr^0 + T \quad (6.3.3)$$

AMoRe calcula la siguiente función de correlación lineal, que puede tomar valores entre 1 y -1 y que utilizamos para evaluar los resultados:

$$CC_F = \left(\sum_H \overline{|F_H^{obs}|} \times \overline{|F_H^{calc}|} \right) / \left[\left(\sum_H \overline{|F_H^{obs}|}^2 \right) \times \left(\sum_H \overline{|F_H^{calc}|}^2 \right) \right]^{1/2} \quad (6.3.4)$$

Donde $\overline{|F_H|}$ representa una variable centrada:

$$\overline{|F_H|} = |F_H| - \langle |F_H| \rangle \quad (6.3.5)$$

Siendo $\langle |F_H| \rangle$ un promedio de reflexiones.

Se limitó la resolución entre 0.01225 y 0.06250 \AA^{-1} ($9.034 - 4.000 \text{ \AA}$). AMoRe contiene programas que usan funciones de barrido rápido (programas ROTING, TRAINING y FITING),³²³ los que se usaron en ese orden. Estos programas calculan las funciones rápidas de rotación,⁴⁰⁶ traslación y ajuste de dos funciones de Patterson.⁴⁰⁷ Finalmente se creó un archivo de coordenadas PDB en CCP4 con las moléculas situadas en las posiciones que las soluciones de reemplazo indican.

6.4. Refinamiento del Modelo. El modelo inicial proveniente de RM claramente contiene sesgo hacia el modelo usado en la búsqueda; de hecho las coordenadas atómicas del modelo de búsqueda son solamente rotadas y trasladadas como un cuerpo rígido. Para disminuir este sesgo inicial se introdujo ruido blanco (desplazamientos al azar en x, y o z de 0.4 \AA) a las coordenadas atómicas del modelo inicial usando el programa PDBSET del paquete CCP4.³²⁰ También con PDBSET se sustituyeron los factores B del modelo inicial con un único valor igual al factor B de Wilson calculado por TRUNCATE.³²⁰ Además, usando el programa UNIQUE³²⁰ se definió al azar el set de reflexiones únicas empleadas para la validación cruzada del refinamiento a través del cálculo del R_{Free} (1009 reflexiones, aproximadamente 2% del total, ver ecuaciones H12A-C) y del R_{W} , lo que permite evaluar la exactitud de las fases refinadas y el posible incurrimiento en sobre-refinamiento.^{360-361,366-367} Cabe recalcar que el refinamiento exitoso es aquel que minimiza el R_{Free} alcanzando un cociente óptimo entre R_{Free} y R_{W} .

El refinamiento cristalográfico es la optimización de una función de un conjunto de observaciones (función blanco), modificando los parámetros del modelo.⁴⁰⁸ Para refinar el modelo se usó el programa REFMAC incluido en el paquete CCP4.^{320,409-410} El programa

REFMAC se caracteriza por basarse en aplicaciones del teorema de Bayes,⁴¹¹ como lo muestra la ecuación 6.4.1:

$$P(x;|F^{obs}|) = p(x)P(|F^{obs}|;x) / P(|F^{obs}|) = p(x)L(x;|F^{obs}|) \quad (6.4.1)$$

Donde $P(x;|F^{obs}|)$ es la distribución de probabilidad a posteriori de los parámetros x del modelo condicional a los datos observados $|F^{obs}|$, $p(x)$ es la distribución de probabilidad a priori de los parámetros x del modelo (aquí es donde la información en forma de constricciones y contenciones es utilizada), y $L(x;|F^{obs}|)$ es la función de verosimilitud, que de acuerdo con la ecuación H8A puede escribirse como:

$$L(x;|F^{obs}|) = P(|F^{obs}|;x) / P(|F^{obs}|) \quad (6.4.2)$$

De estas ecuaciones se desprende que para aumentar $P(x;|F^{obs}|)$, siendo $p(x)$ constante y conocido, se debe maximizar L y para ello maximizar $P(|F^{obs}|;x)$. Tomando \ln a ambos lados de la ec. 6.4.2 obtenemos la ecuación 6.4.3 y de acuerdo con lo arriba mencionado, la ecuación 6.4.4:

$$\ln[L(x;|F^{obs}|)] = \ln[P(|F^{obs}|;x) / P(|F^{obs}|)] = \ln[P(|F^{obs}|;x)] - \ln[P(|F^{obs}|)] \quad (6.4.3)$$

$$\ln[L(x;|F^{obs}|)] \propto \ln[P(|F^{obs}|;x)] \quad (6.4.4)$$

REFMAC usa la siguiente aproximación:

$$P(\langle F_{hkl}^{obs} \rangle^{hkl}; (F_{hkl}^{calc})^{hkl}) = \prod_{hkl} P(\langle F_{hkl}^{obs} \rangle; F_{hkl}^{calc}) \quad (6.4.5)$$

Implicita en la ecuación 6.4.5 está la asunción simplificadora de que las observaciones (y sus errores) son independientes. El problema de hallar valores de x de modo de maximizar $\ln[L(x; \langle F^{obs} \rangle)]$ y $\ln[P(\langle F^{obs} \rangle; x)]$ es equivalente al problema de minimizar el opuesto (ec. 6.4.6):

$$-\ln[L(x; \langle F^{obs} \rangle)] = \ln[P(\langle F^{obs} \rangle) - \ln[P(\langle F^{obs} \rangle; x)]] \quad (6.4.6)$$

De acuerdo con ello, REFMAC y otros programas minimizan una función de cuadrados de residuales con la siguiente forma general:

$$f(\text{modelo}) = \sum_h^{hkl} \left[\langle F_h^{obs} \rangle - \langle F_h^{\text{modelo}} \rangle \right]^2 / \left[\sigma_{F_h^{obs}}^2 + \sigma_{F_h^{\text{modelo}}}^2 \right] \quad (6.4.7)$$

De relevancia, $\langle F_h^{\text{modelo}} \rangle$ no es simplemente el valor calculado para la amplitud de una reflexión particular h según el modelo de referencia, sino que es el valor esperado para la amplitud de dicha reflexión de acuerdo con todos los modelos plausibles similares al modelo de referencia. Se ha demostrado que se obtienen mejores resultados en el refinamiento de modelos cristalográficos usando funciones blanco de máxima verosimilitud.⁴⁰⁹ Dicha ventaja se explica en parte por la capacidad de estas funciones de reconocer mínimos absolutos. De acuerdo con ello, se ha demostrado que existe una potenciación entre el uso de estas funciones blanco y el uso de

algoritmos de modificación de parámetros por recocido simulado (simulated annealing),⁴¹²⁻⁴¹³ un método de minimización especialmente proclive a hallar mínimos relativos. Para minimizar esta función, REFMAC utiliza un método de optimización de primer orden conocido como el método de gradiente de descenso, usando un muestreo ralo de la matriz normal completa de parámetros.⁴⁰⁸

La estrategia seguida en el refinamiento fue la de introducir grados de libertad (parámetros al modelo) en forma progresiva; y además, de ensayo y error, es decir que se realizaron pruebas más o menos sistemáticas de módulos de refinamiento y diversas parametrizaciones cuyos resultados se evaluaron de acuerdo con R_W y R_{Free} . La secuencia de modos de refinamiento fue la siguiente: 1) refinamiento de cuerpo rígido, 2) refinamiento con contenciones⁴¹⁴⁻⁴¹⁵ y con de factores B atómicos de constricción isotrópica, 3) refinamiento con contenciones; constricciones de factores B atómicos isotrópicos; y con grupos de TLS (“Translation, Libration and Screw”).^{410,416}

El uso de contenciones es esencial a bajas y moderadas resoluciones, y puede ser necesario a alta resolución cuando existen sectores del modelo para los que se ha obtenido una pobre información.⁴¹⁵ Usamos contenciones de: longitud de enlace, ángulos de enlace, planos, quiralidad, ángulos de torsión, interacciones no enlazantes, simetría no cristalográfica y de factores B . Los primeros 5 tipos corresponden a contenciones de estereoquímica o geometría. Los últimos tres de son establecidos con carácter general para todo tipo de residuos. Los pesos asignados a las contenciones de geometría fueron automáticamente definidos por REFMAC, aunque probamos modificarlos en algunas corridas. REFMAC define los pesos, y por ende las penalidades, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Penalidad} = \sum w(v_o - v_i)^2 = \sum \left(\frac{1}{\sigma_{(vi)}^2} \right) (v_o - v_i)^2 \quad (6.4.7)$$

Donde w es el peso específico de una determinada contención, v_o es un valor observado y v_i un valor ideal (tomado de la librería). REFMAC busca minimizar la sumatoria de penalidades, como un término más del residual de refinamiento. Es importante hacer notar que las contenciones son en definitiva tratadas como observaciones adicionales (la información previa en forma de longitudes de enlace, etc., pero también podría usarse como constricciones, lo que lleva a disminuir el número de parámetros del modelo). Las contenciones de factores B consisten en penalidades establecidas para diferencias de valores de $B_i - B_j$ mayores a un valor predeterminado, donde i y j son dos átomos cercanos en espacio, o átomos relacionados por simetría no cristalográfica. Los pesos aplicados por REFMAC para los términos residuales de contención de factores B (R_B) se basan en el tipo de relación espacial entre los átomos i y j : enlace covalente de la cadena principal, enlace covalente cadena lateral, formando un ángulo en la cadena principal, formando un ángulo en la cadena lateral. Tómese en cuenta que sobre un átomo i a pueden aplicarse todos los tipos de contenciones de factores B (ec. 6.4.8).⁴¹⁷

$$R_B = W_{B,\text{enlaces}} \sum_{(i,j)\text{-enlaces}} (B_i - B_j)^2 / \sigma_{\text{enlaces}}^2 + W_{B,\text{ángulos}} \sum_{(i,j,k)\text{-ángulos}} (B_i - B_k)^2 / \sigma_{\text{ángulos}}^2 + \dots \quad (6.4.8)$$

REFMAC incluye la posibilidad de conducir un refinamiento con grupos de átomos con parámetros de TLS.^{344,410} El resultado de este modo de refinamiento es usualmente mejor que cuando se modelan B isotrópicos puros. Tronrud sostiene que la mayor restricción que se le impone a los modelos cristalográficos durante su refinamiento (y representación) es la de asumir

que la movilidad y el desorden son isotrópicos⁴⁰⁸ (ec. 6.4.9) cuando la movilidad y/o el desorden atómico en el cristal tienen muchos componentes que pueden eventualmente ser modelados por separado y pueden ser anisotrópicos (6.4.10):³⁴⁴

$$B_j = 8\pi^2 \langle U_j^2 \rangle, \quad U \text{ atómico isotrópico} \quad (6.4.9)$$

$$U_{\text{Total}} = U_{\text{Cristal}} + U_{\text{TLS}} + U_{\text{Interno}} + U_{\text{Átomos}} \quad (6.4.10)$$

En la ec. 6.4.9 $\langle U_j^2 \rangle$ es el promedio temporal y espacial del desplazamiento cuadrado isotrópico del átomo j del cristal modelado. En la ec. 6.4.10 se supone que parte del desplazamiento no es isotrópico y que parte puede modelarse usando la parametrización de grupos TLS. Considerando el U atómico, este puede ser modelado isotrópicamente, como en la ec. 6.4.9, o anisotrópicamente como un tensor 3x3 promedio temporal y espacial de modo que el factor B atómico correspondiente se define como:

$$B_j = \frac{8\pi^2}{3} \text{Tr}(U_j), \quad U_j = \begin{pmatrix} u_1^2 & u_1u_2 & u_1u_3 \\ u_1u_2 & u_2^2 & u_2u_3 \\ u_1u_3 & u_2u_3 & u_3^2 \end{pmatrix} \quad (6.4.11)$$

En esta ecuación Tr se usa para abreviar *Traza*, que es el equivalente a la suma de los valores propios de la matriz de parámetros de desplazamientos. Cada elemento de la matriz 3x3 (ec. H22) es lo que se denomina un parámetro de desplazamiento anisotrópico atómico (“atomic anisotropic displacement parameter”, ADP). Siendo U_j una matriz simétrica, se deben refinar 6 parámetros por átomo. El refinamiento con grupos TLS es una solución parcial pero poco

costosa en términos del cociente parámetros/observaciones (esto es cierto siempre que el número de grupos TLS sea mucho menor que el número de átomos, y deberá ser tanto menor cuanto menor la cantidad de información disponible sobre el cristal) al problema del refinamiento con resoluciones moderadas o bajas ($\lambda_{\min} \geq 2 \text{ \AA}$), ya que por cada grupo TLS es necesario y suficiente refinar 20 parámetros: 6 parámetros únicos de T (tensor de traslación, tensor 3×3 simétrico, tienen unidades de \AA^2); 6 parámetros únicos de L (tensor de libración, tensor 3×3 simétrico, tienen unidades de radianes^2 o grados^2), 8 parámetros únicos de S (tensor de desplazamiento helicoidal o “screw”, tensor 3×3 asimétrico, e indica en qué medida los desplazamientos trasnacionales y rotacionales están correlacionados, tienen unidades de \AA).^{344,418-419}

REFMAC requiere un archivo de instrucciones que indique las definiciones de grupos TLS que se van a usar en el refinamiento, es decir, cuantos grupos TLS y cómo están ellos constituídos (por qué átomos). Nosotros seguimos varias estrategias para definir estos grupos, las que se presentan en la sección de Resultados. REFMAC refina la escala global del modelo y los parámetros de TLS primero e independientemente del refinamiento con contenciones de las coordenadas atómicas y los factores B isotrópicos atómicos residuales^{344,410} (una definición operativa por cierto). Para analizar los resultados de los refinamientos con grupos TLS se usó el programa TLSANL,^{320,420} el que permite obtener parámetros de desplazamiento atómicos (B_j) a partir de los parámetros refinados de cada grupo de TLS para los átomos que integran estos grupos. Nótese que, de acuerdo con lo expuesto arriba, todos los átomos de cada grupo de TLS compartirán solo la parte traslacional de los desplazamientos. A su vez el programa permite calcular un $B_{j,\text{eq}}$, que integra los componentes isotrópicos residuales y anisotrópicos debidos a TLS.

6.5. Evaluación y validación cruzada del refinamiento. Los programas de refinamiento, incluido REFMAC, escriben un archivo a medida que avanza el refinamiento, donde se detallan las instrucciones con las que el programa está cumpliendo o los problemas que encuentra para cumplir con las mismas, los análisis automáticos que el programa realiza sobre los archivos de ingreso de datos (PDB y mtz), los resultados del refinamiento y el análisis de dichos resultados. Son varios los indicadores de calidad del modelo, los que naturalmente, deben ir mejorando a medida que el refinamiento avanza. Entre los indicadores que reporta REFMAC destacamos los que se detallan en la Tabla 6.5.1.

El uso del R_{FREE} como elemento de validación cruzada fue introducido por Brünger en 1992,³⁶⁰ de acuerdo con la ec. 6.5.1.

$$R_{FREE} = \frac{\sum |F_{obs\ FREE}| - k|F_{calc}|}{\sum |F_{obs\ FREE}|} \quad (6.5.1)$$

Donde $|F_{obs\ FREE}|$ son las amplitudes de los factores de estructura observados (F_{obs}) pertenecientes al grupo de reflexiones no usadas en el refinamiento y $|F_{calc}|$ son las amplitudes de los factores de estructura calculados (F_{calc}) a partir del modelo atómico para las mismas reflexiones (ec. 6.5.2).

$$F_{calc} = G \cdot \sum_j n_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \cdot e^{-B_j[(\sin \theta) / \lambda]^2} \quad (6.5.2)$$

La ecuación 6.5.2 es una simplificación frecuentemente usada con fines didácticos de la ecuación 6.5.3:

$$R_{FREE} = \frac{\sum |Fobs_{FREE}| - |F_{MODEL}|}{\sum |Fobs_{FREE}|} \quad (6.5.3)$$

Donde F_{MODEL} se obtiene considerando parámetros atómicos y no atómicos del modelo (ec 6.5.4):

$$F_{MODELO} = k_{GLOBAL} e^{-sU_{CRIST}} s^1 \left(F_{CALC} + k_{SOL} e^{\frac{B_{SOL} s^2}{4}} F_{Másc} \right) \quad (6.5.4)$$

Tabla HI. Indicadores de calidad del modelo usados para evaluar el refinamiento

Indicador	Fórmula	Uso y significado
Rfact (R factor, R_W o R_{CRIST})	$R_W = \frac{\sum F_{obs_w} - F_{MODEL} }{\sum F_{obs_w} }$	Factor que describe la exactitud del modelo del cristal que se ha refinado por comparación de las amplitudes del modelo con las amplitudes observadas usadas en el refinamiento.
Rfree (R_{FREE})	$R_{FREE} = \frac{\sum F_{obs_{FREE}} - F_{MODEL} }{\sum F_{obs_{FREE}} }$	Factor que describe la exactitud del modelo del cristal que se ha refinado por comparación de las amplitudes del modelo con las amplitudes observadas no usadas en el refinamiento a los efectos de validar el refinamiento (validación cruzada). El correcto uso de este residual acumulado normalizado depende de la correcta elección del grupo de reflexiones usadas para su cálculo, no usadas en el refinamiento. Idealmente, se debería refinar contra distintos sets de reflexiones tomadas a partir del total de reflexiones únicas medidas, dejando cada vez un número pequeño (no más de 10 %) pero estadísticamente suficiente de reflexiones para el cálculo de R_{FREE} . De esto surgen un conjunto de modelos. En la práctica, se considera suficiente refinar un solo modelo tratando de minimizar el número de reflexiones usadas para calcular el R_{FREE} de modo de no perder mucha información (1000 es un número adecuado).
FOM (Figure Of Merit, m)	$m = \left \int P(\varphi) e^{i\varphi} d\varphi \right $	Factor por el cual la amplitud del factor de estructura observado $ F_{obs} $ es escalado, para que en conjunto con la mejor fase (fase del centroide en el plano complejo de la distribución de probabilidad de F_C), se pueda obtener el mapa de densidad electrónica con el nivel más bajo de ruido. $m < 1$, cuanto mayor es m mejor es el acuerdo de fases entre el modelo y el cristal, valores mayores a 0.7 son deseables.
rmsBOND (root mean squared bond length differences)	$rmsBOND = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} (l_{ideal} - l_{modelo})^2}$	Expresa la desviación cuadrática media de las longitudes de enlace presentes en el modelo con respecto a los valores de la literatura (diccionarios de estereoquímica). Valores mayores a 0.02 Å sugieren que los pesos utilizados en la matriz de refinamiento para las contenciones geométricas deben ser disminuídos (menor peso, contención más fuerte).
rmsANGL (root mean squared angle differences)	$rmsANGL = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} (a_{ideal} - a_{modelo})^2}$	Valores mayores a 2 ° sugieren que los pesos utilizados en la matriz de refinamiento para las contenciones geométricas deben ser disminuídos.

6.6. Construcción y validación del modelo atómico en espacio real. Las modificaciones al modelo en espacio real y la validación del modelo fueron realizadas usando el programa Coot v 0.6-pre-1.^{325,345} Seguimos procedimientos estándar de construcción del modelo en espacio real. Partimos de un modelo muy completo de la proteína (residuos 5-578 de cada cadena) derivado

del modelo 1AO6. El programa Coot genera mapas de densidad electrónica tridimensionales a partir de archivos mtz refinados por REFMAC, a la vez que despliega el modelo en 3D. El modelo atómico de la proteína se mejoró por agregado de residuos faltantes en los extremos amino y carboxilo terminales de las cadenas polipeptídicas, de cadenas laterales en múltiples posiciones y por el ajuste del modelo atómico a los mapas de densidad electrónica $2F^{\text{obs}} - F^{\text{calc}}$ y $F^{\text{obs}} - F^{\text{calc}}$. El ajuste del modelo a la densidad electrónica (refinamiento en espacio real) se realizó usando contenciones de torsión, planaridad de enlaces peptídicos y de Ramachandran. Der ser apropiado, donde la densidad electrónica era pobre, empleamos también contenciones locales de estructura secundaria. El proceso consistió en varios ciclos en los que se intercaló refinamiento con REFMAC y construcción y validación con Coot. La densidad electrónica absoluta se expresa en $e^{-\text{Å}^{-3}}$, electrones por Årmstrong cúbico, sin embargo la escala absoluta de densidad electrónica no suele conocerse con exactitud, por lo que se prefiere expresarla en una escala de valores relativos de acuerdo con estimadores estadísticos internamente consistentes. Así, diremos que la evaluación de los mapas de densidad electrónica $2F^{\text{obs}} - F^{\text{calc}}$ se realizó principalmente a un nivel de contorno de superficie de densidad electrónica de 1σ y en el caso de los mapas $F^{\text{obs}} - F^{\text{calc}}$, se utilizó principalmente un nivel de contorno de 2.5σ . Cuando el refinamiento del modelo proteico estuvo avanzado (cuando los cambios en la proteína eran ya muy pequeños), se agregaron moléculas de agua en forma manual de acuerdo con criterios ampliamente aceptados, básicamente, que las moléculas de agua mantengan enlaces de H o polares con la proteína o con moléculas de agua o ligandos firmemente unidos a la proteína. Se eliminaron pocas moléculas de agua que no pasaron los test de validación de Coot.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Matsuyama, K.; Sen, A. C.; Perrin, J. H. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **1987**, *39*, 190.
- (2) Wilting, J.; van der Giesen, W. F.; Janssen, L. H.; Weideman, M. M.; Otagiri, M.; Perrin, J. H. *The Journal of biological chemistry* **1980**, *255*, 3032.
- (3) Michaelis, L. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1939**, *7*, 33.
- (4) Turrens, J. F. *J Physiol* **2003**, *552*, 335.
- (5) Murphy, M. P. *Biochem J* **2009**, *417*, 1.
- (6) Massey, V.; Strickland, S.; Mayhew, S. G.; Howell, L. G.; Engel, P. C.; Matthews, R. G.; Schuman, M.; Sullivan, P. A. *Biochem Biophys Res Commun* **1969**, *36*, 891.
- (7) Fridovich, I. *J Biol Chem* **1970**, *245*, 4053.
- (8) Rubbo, H.; Radi, R.; Prodanov, E. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1074*, 386.
- (9) Radi, R.; Tan, S.; Prodanov, E.; Evans, R. A.; Parks, D. A. *Biochim Biophys Acta* **1992**, *1122*, 178.
- (10) Nishino, T.; Okamoto, K.; Eger, B. T.; Pai, E. F. *FEBS J* **2008**, *275*, 3278.
- (11) Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L. *Photochem Photobiol Sci* **2006**, *5*, 215.
- (12) Triantaphylides, C.; Krischke, M.; Hoerberichts, F. A.; Ksas, B.; Gresser, G.; Havaux, M.; Van Breusegem, F.; Mueller, M. J. *Plant Physiol* **2008**, *148*, 960.
- (13) Nakamura, Y.; Miyoshi, N. *Biosci Biotechnol Biochem* **2010**, *74*, 242.
- (14) Squadrito, G. L.; Cueto, R.; Dellinger, B.; Pryor, W. A. *Free Radic Biol Med* **2001**, *31*, 1132.
- (15) Manea, A. *Cell Tissue Res* **2010**.
- (16) Armitage, M. E.; Wingler, K.; Schmidt, H. H.; La, M. *J Mol Med* **2009**, *87*, 1071.
- (17) Crane, B. R.; Sudhamsu, J.; Patel, B. A. *Annu Rev Biochem* **2010**, *79*, 445.
- (18) Kell, D. B. *BMC Med. Genomics* **2009**, *2*.
- (19) Horowitz, M. P.; Greenamyre, J. T. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20*, S551.
- (20) Cassina, P.; Cassina, A.; Pehar, M.; Castellanos, R.; Gandelman, M.; de Leon, A.; Robinson, K. M.; Mason, R. P.; Beckman, J. S.; Barbeito, L.; Radi, R. *J Neurosci* **2008**, *28*, 4115.
- (21) Queisser, N.; Fazeli, G.; Schupp, N. *Biol Chem* **2010**.
- (22) Brechard, S.; Tschirhart, E. J. *J Leukoc Biol* **2008**, *84*, 1223.
- (23) Lacy, P. *Allergy Asthma Clin Immunol* **2006**, *2*, 98.
- (24) Auchere, F.; Rusnak, F. *J Biol Inorg Chem* **2002**, *7*, 664.
- (25) Piacenza, L.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Radi, R. *Curr Opin Microbiol* **2009**, *12*, 415.
- (26) Nerland, D. E. *Drug Metab Rev* **2007**, *39*, 235.
- (27) Liu, P.; Demple, B. *Environ Mol Mutagen* **2010**, *51*, 417.
- (28) Grimm, S.; Hohn, A.; Grune, T. *Amino Acids* **2010**.
- (29) Sedelnikova, O. A.; Redon, C. E.; Dickey, J. S.; Nakamura, A. J.; Georgakilas, A. G.; Bonner, W. M. *Mutat Res* **2010**, *704*, 152.

- (30) Foller, M.; Bobbala, D.; Koka, S.; Huber, S. M.; Gulbins, E.; Lang, F. *Cell Physiol Biochem* **2009**, *24*, 133.
- (31) Botti, H.; Trujillo, M.; Batthyany, C.; Rubbo, H.; Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. *Chem Res Toxicol* **2004**, *17*, 1377.
- (32) Frank, H. A.; Brudvig, G. W. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8607.
- (33) Scarpa, M.; Rigo, A.; Maiorino, M.; Ursini, F.; Gregolin, C. *Biochim Biophys Acta* **1984**, *801*, 215.
- (34) Nilsson, J. L.; Daves, G. D., Jr.; Folkers, K. *Acta Chem Scand* **1968**, *22*, 206.
- (35) Buettner, G. R. *Arch Biochem Biophys* **1993**, *300*, 535.
- (36) De Grey, A. D. *DNA Cell Biol* **2002**, *21*, 251.
- (37) Kobayashi, K.; Miki, M.; Tagawa, S. *J Chem Soc Dalton Trans* **1995**, *17*, 2885.
- (38) Goldstein, S.; Czapski, G. *Free Radic Biol Med* **1995**, *19*, 505.
- (39) Huie, R. E.; Padmaja, S. *Free Radic Res Commun* **1993**, *18*, 195.
- (40) Kissner, R.; Nauser, T.; Bugnon, P.; Lye, P. G.; Koppenol, W. H. *Chem Res Toxicol* **1997**, *10*, 1285.
- (41) Nauser, T.; Koppenol, W. H. *J Phys Chem A* **2002**, *106*, 4084.
- (42) Ballou, D.; Palmer, G.; Massey, V. *Biochem Biophys Res Commun* **1969**, *36*, 898.
- (43) Lambeth, J. D.; Kawahara, T.; Diebold, B. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43*, 319.
- (44) Rada, B.; Hably, C.; Meczner, A.; Timar, C.; Lakatos, G.; Enyedi, P.; Ligeti, E. *Semin Immunopathol* **2008**, *30*, 237.
- (45) Dupont, A. G.; Brouwers, S. *J Hypertens* **2010**, *28*, 1599.
- (46) Versari, D.; Daghini, E.; Viridis, A.; Ghiadoni, L.; Taddei, S. *Br J Pharmacol* **2009**, *157*, 527.
- (47) Hutchinson, F. *Radiation research* **1957**, *7*, 473.
- (48) Jia, Z.; Zhu, H.; Li, Y.; Misra, H. P. *Exp Biol Med (Maywood)* **2010**, *235*, 614.
- (49) Kiselar, J. G.; Chance, M. R. *J Mass Spectrom* **2010**.
- (50) Wasil, M.; Halliwell, B.; Grootveld, M.; Moorhouse, C. P.; Hutchison, D. C.; Baum, H. *Biochem J* **1987**, *243*, 867.
- (51) Narayan, M.; Berliner, L. J.; Merola, A. J.; Diaz, P. T.; Clanton, T. L. *Free Radic Res* **1997**, *27*, 63.
- (52) Buettner, G. R.; Jurkiewicz, B. A. *Radiat Res* **1996**, *145*, 532.
- (53) Batthyany, C.; Santos, C. X.; Botti, H.; Cervenansky, C.; Radi, R.; Augusto, O.; Rubbo, H. *Arch Biochem Biophys* **2000**, *384*, 335.
- (54) Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, *87*, 1620.
- (55) Arena, V. *Ionizing radiation and life: an introduction to radiation biology and biological radiotracer methods*; Mosby, 1971.
- (56) Klopffer, W.; Kohl, E. G. *Ecotoxicol Environ Saf* **1991**, *22*, 67.
- (57) Yu, X. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2004**, *33*, 747.
- (58) Kissner, R.; Nauser, T.; Kurz, C.; Koppenol, W. H. *IUBMB Life* **2003**, *55*, 567.
- (59) Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. *Arch Biochem Biophys* **1991**, *288*, 481.
- (60) Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. *Am J Physiol* **1995**, *268*, L699.
- (61) Lymar, S. V.; Khairutdinov, R. F.; Hurst, J. K. *Inorg Chem* **2003**, *42*, 5259.
- (62) Stadler, K.; Bonini, M. G.; Dallas, S.; Jiang, J.; Radi, R.; Mason, R. P.; Kadiiska, M. B. *Free Radic Biol Med* **2008**, *45*, 866.

- (63) Wennberg, P.; Hanisco, T.; Jaegle, L.; Jacob, D.; Hintsa, E.; Lanzendorf, E.; Anderson, J.; Gao, R.; Keim, E. *NASA* **1998**.
- (64) Jomova, K.; Vondrakova, D.; Lawson, M.; Valko, M. *Mol Cell Biochem* **2010**, *345*, 91.
- (65) Keyer, K.; Gort, A. S.; Imlay, J. A. *J Bacteriol* **1995**, *177*, 6782.
- (66) Hunter, P. *EMBO Rep* **2009**, *10*, 949.
- (67) Chien, Y. H.; Bau, D. T.; Jan, K. Y. *Free Radic Biol Med* **2004**, *36*, 1011.
- (68) Yakovlev, V. A.; Bayden, A. S.; Graves, P. R.; Kellogg, G. E.; Mikkelsen, R. B. *Biochemistry* **2010**, *49*, 5331.
- (69) Shaw, A.; Vosper, A. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1* **1977**, *73*, 1239.
- (70) Zacharia, I. G.; Deen, W. M. *Ann Biomed Eng* **2005**, *33*, 214.
- (71) Bartberger, M. D.; Liu, W.; Ford, E.; Miranda, K. M.; Switzer, C.; Fukuto, J. M.; Farmer, P. J.; Wink, D. A.; Houk, K. N. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 10958.
- (72) Awad, H.; Stanbury, D. *International Journal of Chemical Kinetics* **1993**, *25*, 375.
- (73) Ford, P.; Wink, D.; Stanbury, D. *FEBS letters* **1993**, *326*, 1.
- (74) Goldstein, S.; Czapski, G. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 12078.
- (75) Herold, S. *Arch Biochem Biophys* **1999**, *372*, 393.
- (76) Herold, S.; Exner, M.; Nauser, T. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3385.
- (77) Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, 26066.
- (78) Madej, E.; Folkes, L. K.; Wardman, P.; Czapski, G.; Goldstein, S. *Free Radic Biol Med* **2008**, *44*, 2013.
- (79) Gunther, M. R.; Sturgeon, B. E.; Mason, R. P. *Toxicology* **2002**, *177*, 1.
- (80) Radi, R. *Chem. Res. Toxicol* **1996**, *9*, 828.
- (81) Lukat-Rodgers, G. S.; Correia, C.; Botuyan, M. V.; Mer, G.; Rodgers, K. R. *Inorg Chem* **2010**, *49*, 6349.
- (82) Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. *Biochem J* **2001**, *357*, 593.
- (83) Alzawahra, W. F.; Talukder, M. A.; Liu, X.; Samouilov, A.; Zweier, J. L. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2008**, *295*, H499.
- (84) Jensen, F. B. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1787*, 841.
- (85) Keszler, A.; Piknova, B.; Schechter, A. N.; Hogg, N. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 9615.
- (86) Van Amsterdam, J. G.; Verlaan, B. P.; Van Loveren, H.; Elzakker, B. G.; Vos, S. G.; Opperhuizen, A.; Steerenberg, P. A. *Arch Environ Health* **1999**, *54*, 331.
- (87) Moller, M.; Botti, H.; Batthyany, C.; Rubbo, H.; Radi, R.; Denicola, A. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 8850.
- (88) Trostchansky, A.; Möller, M. N.; Bartesaghi, S.; Botti, H.; Denicola, A.; Radi, R.; Rubbo, H. In *Nitric Oxide (Second Edition)*; Louise, J. I., Ed.; Academic Press: San Diego, 2010, p 27.
- (89) Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 9265.
- (90) Stevens, C. F. *Nature* **1988**, *336*, 308.
- (91) Edelman, G. M.; Gally, J. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 11651.

- (92) Brunori, M.; Giuffre, A.; Sarti, P.; Stubauer, G.; Wilson, M. T. *Cell Mol Life Sci* **1999**, *56*, 549.
- (93) Brown, G. C.; Borutaite, V. *Biochem Soc Symp* **1999**, *66*, 17.
- (94) Taylor, C. T.; Moncada, S. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30*, 643.
- (95) Brady, A. J.; Poole-Wilson, P. A. *Br Heart J* **1993**, *70*, 103.
- (96) Nin, N.; Cassina, A.; Boggia, J.; Alfonso, E.; Botti, H.; Peluffo, G.; Trostchansky, A.; Batthyany, C.; Radi, R.; Rubbo, H.; Hurtado, F. J. *Intensive Care Med* **2004**, *30*, 2271.
- (97) Fortin, C. F.; McDonald, P. P.; Fulop, T.; Lesur, O. *Shock* **2010**, *33*, 344.
- (98) Mizuno, Y.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. *Am J Hypertens* **2008**, *21*, 1076.
- (99) Steinhorn, R. H. *Pediatr Crit Care Med* **2010**, *11*, S79.
- (100) Nossaman, V. E.; Nossaman, B. D.; Kadowitz, P. J. *Cardiol Rev* **2010**, *18*, 190.
- (101) Johnson, J. M. *Adv Emerg Nurs J* **2009**, *31*, 36.
- (102) Augusto, O.; Bonini, M.; Amanso, A.; Linares, E.; Santos, C.; De Menezes, S. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, *32*, 841.
- (103) Trujillo, M.; Alvarez, B.; Souza, J. M.; Romero, N.; Castro, L.; Thomson, L.; Radi, R. In *Nitric Oxide (Second Edition)*; Louise, J. I., Ed.; Academic Press: San Diego, 2010, p 61.
- (104) Radi, R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 4003.
- (105) Ferrer-Sueta, G.; Manta, B.; Botti, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Denicola, A. *Submitted to Chem Res Toxicol* **2010**.
- (106) Jencks, W. *Catalysis in chemistry and enzymology*; Dover Publications, 1987.
- (107) Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 4244.
- (108) Pearson, R. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 3533.
- (109) Koppenol, W. H.; Kissner, R. *Chem Res Toxicol* **1998**, *11*, 87.
- (110) Merényi, G.; Lind, J.; Czapski, G.; Goldstein, S. *Inorg Chem* **2003**, *42*, 3796.
- (111) Loegager, T.; Sehested, K. *J Phys Chem* **1993**, *97*, 6664.
- (112) Koppenol, W. H.; Moreno, J. J.; Pryor, W. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. *Chem Res Toxicol* **1992**, *5*, 834.
- (113) Liang, B.; Andrews, L. *J. Am. Chem. Soc* **2001**, *123*, 9848.
- (114) Beckman, J. S.; Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; van der Woerd, M.; Smith, C.; Chen, J.; Harrison, J.; Martin, J. C.; Tsai, M. *Arch Biochem Biophys* **1992**, *298*, 438.
- (115) Crow, J. P.; Spruell, C.; Chen, J.; Gunn, C.; Ischiropoulos, H.; Tsai, M.; Smith, C. D.; Radi, R.; Koppenol, W. H.; Beckman, J. S. *Free Radic Biol Med* **1994**, *16*, 331.
- (116) Tsai, J. M.; Harrison, J. J. G.; Martin, J. C.; Hamilton, T. P.; van der Woerd, M.; Jablonsky, M. J.; Beckman, J. S. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 4115.
- (117) Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. *Am J Physiol* **1996**, *271*, C1424.
- (118) Worle, M.; Latal, P.; Kissner, R.; Nesper, R.; Koppenol, W. H. *Chem Res Toxicol* **1999**, *12*, 305.
- (119) Thogersen, J.; Gadegaard, A.; Nielsen, J.; Jensen, S. K.; Petersen, C.; Keiding, S. R. *J Phys Chem A* **2009**, *113*, 10488.
- (120) Goldstein, S.; Lind, J.; Merenyi, G. *Chem Rev* **2005**, *105*, 2457.
- (121) Kissner, R.; Koppenol, W. H. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 234.
- (122) Kirsch, M.; Korth, H. G.; Wensing, A.; Sustmann, R.; de Groot, H. *Arch Biochem Biophys* **2003**, *418*, 133.

- (123) Gupta, D.; Harish, B.; R., K.; Koppenol, W. H. *Dalton Trans* **2009**, 10.1039/b905535e, 5730
- (124) Sturzbecher, M.; Kissner, R.; Nauser, T.; Koppenol, W. H. *Inorg Chem* **2007**, 46, 10655.
- (125) Radi, R. *Methods Enzymol* **1996**, 269, 354.
- (126) Goldstein, S.; Squadrito, G. L.; Pryor, W. A.; Czapski, G. *Free Radic Biol Med* **1996**, 21, 965.
- (127) Ferrer-Sueta, G.; Vitturi, D.; Batinic-Haberle, I.; Fridovich, I.; Goldstein, S.; Czapski, G.; Radi, R. *J Biol Chem* **2003**, 278, 27432.
- (128) Trujillo, M.; Ferrer-Sueta, G.; Thomson, L.; Flohe, L.; Radi, R. *Subcell Biochem* **2007**, 44, 83.
- (129) Radi, R. *Chem Res Toxicol* **1998**, 11, 720.
- (130) Perrin, D.; Koppenol, W. H. *Arch Biochem Biophys* **2000**, 377, 266.
- (131) Herold, S.; Shivashankar, K. *Biochemistry* **2003**, 42, 14036.
- (132) Romero, N.; Radi, R.; Linares, E.; Augusto, O.; Detweiler, C. D.; Mason, R. P.; Denicola, A. *J Biol Chem* **2003**, 278, 44049.
- (133) Pryor, W.; Jin, X.; Squadrito, G. *J. Am. Chem. Soc* **1996**, 118, 3125.
- (134) Pryor, W.; Smith, K. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, 5403.
- (135) Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. *ACS Chem Biol* **2009**, 4, 161.
- (136) Coddington, J. W.; Wherland, S.; Hurst, J. K. *Inorg Chem* **2001**, 40, 528.
- (137) Lymar, S. V.; Hurst, J. K. *Chem Res Toxicol* **1998**, 11, 714.
- (138) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. *Physiol Rev* **2007**, 87, 315.
- (139) Chuang, Y. C.; Chen, S. D.; Liou, C. W.; Lin, T. K.; Chang, W. N.; Chan, S. H.; Chang, A. Y. *Epilepsia* **2009**, 50, 731.
- (140) Vicente, S.; Perez-Rodriguez, R.; Olivan, A. M.; Martinez Palacian, A.; Gonzalez, M. P.; Oset-Gasque, M. J. *J Neurosci Res* **2006**, 84, 78.
- (141) Szabo, C. *Nitric Oxide* **2006**, 14, 169.
- (142) Trujillo, M.; Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. *Antioxid Redox Signal* **2008**, 10, 1607.
- (143) Poderoso, J. J. *Archives of biochemistry and biophysics* **2009**, 484, 214.
- (144) Esposito, E.; Cuzzocrea, S. *Front Biosci* **2009**, 14, 263.
- (145) Szabo, C. *Br J Pharmacol* **2009**, 156, 713.
- (146) Muller, G.; Morawietz, H. *Antioxid Redox Signal* **2009**, 11, 1711.
- (147) Lee, J. R.; Kim, J. K.; Lee, S. J.; Kim, K. P. *Arch Pharm Res* **2009**, 32, 1109.
- (148) Jaeschke, H. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2003**, 284, G15.
- (149) Rabkin, S. W.; Klassen, S. S. *Eur J Pharmacol* **2008**, 586, 1.
- (150) Gonsette, R. E. *J Neurol Sci* **2008**, 274, 48.
- (151) Moncada, S.; Bolanos, J. P. *J Neurochem* **2006**, 97, 1676.
- (152) Cassina, P.; Peluffo, H.; Pehar, M.; Martinez-Palma, L.; Ressler, A.; Beckman, J. S.; Estevez, A. G.; Barbeito, L. *J Neurosci Res* **2002**, 67, 21.
- (153) Ischiropoulos, H.; al-Mehdi, A. B. *FEBS letters* **1995**, 364, 279.
- (154) Batthyany, C.; Souza, J. M.; Duran, R.; Cassina, A.; Cervenansky, C.; Radi, R. *Biochemistry* **2005**, 44, 8038.
- (155) Peluffo, G.; Radi, R. *Cardiovasc Res* **2007**, 75, 291.
- (156) Szabo, C.; Ferrer-Sueta, G.; Zingarelli, B.; Southan, G. J.; Salzman, A. L.; Radi, R. *The Journal of biological chemistry* **1997**, 272, 9030.
- (157) Pacher, P.; Szabo, C. *Am J Pathol* **2008**, 173, 2.

- (158) Rubbo, H.; Trostchansky, A.; O'Donnell, V. B. *Archives of biochemistry and biophysics* **2009**, *484*, 167.
- (159) Quijano, C.; Alvarez, B.; Gatti, R. M.; Augusto, O.; Radi, R. *The Biochemical journal* **1997**, *322 (Pt 1)*, 167.
- (160) Radi, R.; Bush, K. M.; Cosgrove, T. P.; Freeman, B. A. *Archives of biochemistry and biophysics* **1991**, *286*, 117.
- (161) Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K. *Free radical biology & medicine* **2005**, *38*, 1543.
- (162) Hugo, M.; Turell, L.; Manta, B.; Botti, H.; Monteiro, G.; Netto, L. E.; Alvarez, B.; Radi, R.; Trujillo, M. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9416.
- (163) Yamakura, F.; Taka, H.; Fujimura, T.; Murayama, K. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 14085.
- (164) Quijano, C.; Hernandez-Saavedra, D.; Castro, L.; McCord, J. M.; Freeman, B. A.; Radi, R. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 11631.
- (165) Alvarez, B.; Ferrer-Sueta, G.; Freeman, B. A.; Radi, R. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 842.
- (166) Radi, R.; Rodriguez, M.; Castro, L.; Telleri, R. *Archives of biochemistry and biophysics* **1994**, *308*, 89.
- (167) Zou, M. H.; Shi, C.; Cohen, R. A. *J Clin Invest* **2002**, *109*, 817.
- (168) Pall, M. L. *Med Hypotheses* **2007**, *69*, 821.
- (169) Li, C. Q.; Trudel, L. J.; Wogan, G. N. *Chem Res Toxicol* **2002**, *15*, 527.
- (170) Guidarelli, A.; Cerioni, L.; Fiorani, M.; Cantoni, O. *J Immunol* **2009**, *183*, 4449.
- (171) Fraszczak, J.; Trad, M.; Janikashvili, N.; Cathelin, D.; Lakomy, D.; Granci, V.; Morizot, A.; Audia, S.; Micheau, O.; Lagrost, L.; Katsanis, E.; Solary, E.; Larmonier, N.; Bonnotte, B. *J Immunol* **2010**, *184*, 1876.
- (172) Habib, S.; Moinuddin; Ali, A.; Ali, R. *Cellular immunology* **2009**, *254*, 117.
- (173) Oh-Hashi, K.; Maruyama, W.; Isobe, K. *Free radical biology & medicine* **2001**, *30*, 213.
- (174) Kang, Y. J.; Seit-Nebi, A.; Davis, R. J.; Han, J. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281*, 26225.
- (175) McClung, J. M.; Judge, A. R.; Powers, S. K.; Yan, Z. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**, *298*, C542.
- (176) Pegel, K. H.; Laing, M. *South African journal of science* **2001**, *97*, 476.
- (177) Hamilton, T. P.; Tsai, H. H.; Beckman, J. S. *Methods Enzymol* **1996**, *269*, 329.
- (178) Saran, M.; Michel, C.; Bors, W. *Free Radic Res Commun* **1990**, *10*, 221.
- (179) Kotomin, E.; Kuzovkov, V. V. *Modern Aspects of Diffusion-Controlled Reactions. Cooperative Phenomena in Bimolecular Processes.*; Elsevier Science B. V.: Amsterdam, 1996; Vol. 34.
- (180) Shoup, D.; Lipari, G.; Szabo, A. *Biophys J* **1981**, *36*, 697.
- (181) Andre, J. C.; Bouchy, M.; Donner, M. *Cell Biophys* **1981**, *3*, 211.
- (182) Hasinoff, B. B. *Arch Biochem Biophys* **1984**, *233*, 676.
- (183) Mattei, P.; Kast, P.; Hilvert, D. *Eur J Biochem* **1999**, *261*, 25.
- (184) Ibuki, K.; Ueno, M. *J Chem Phys* **2006**, *124*, 134506.
- (185) Traytak, S. D.; Price, W. S. *J Chem Phys* **2007**, *127*, 184508.
- (186) Ferrer-Sueta, G.; Ruiz-Ramirez, L.; Radi, R. *Chem Res Toxicol* **1997**, *10*, 1338.
- (187) Merényi, G.; Lind, J. *Chem Res Toxicol* **1998**, *11*, 243.

- (188) Goldstein, S.; Czapski, G.; Lind, J.; Merenyi, G. *Chem Res Toxicol* **2001**, *14*, 657.
- (189) Lymar, S. V.; Poskrebyshev, G. A. *J Phys Chem A* **2003**, *107*, 7991.
- (190) Peters, T. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*; 1 ed.; Academic Press: San Diego, California, 1995; Vol. I.
- (191) Anraku, M.; Tsurusaki, Y.; Watanabe, H.; Maruyama, T.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics* **2004**, *1702*, 9.
- (192) Gutteridge, J. M. *Biochimica et biophysica acta* **1986**, *869*, 119.
- (193) Pirisino, R.; Di Simplicio, P.; Ignesti, G.; Bianchi, G.; Barbera, P. *Pharmacol Res Commun* **1988**, *20*, 545.
- (194) Oettl, K.; Marsche, G. *Methods in enzymology* **2010**, *474*, 181.
- (195) Matsuyama, Y.; Hayashi, T.; Terawaki, H.; Negawa, T.; Terada, T.; Okano, Y.; Era, S. *J Physiol Sci* **2009**, *59*, 207.
- (196) Era, S.; Hamaguchi, T.; Sogami, M.; Kuwata, K.; Suzuki, E.; Miura, K.; Kawai, K.; Kitazawa, Y.; Okabe, H.; Noma, A.; et al. *International journal of peptide and protein research* **1988**, *31*, 435.
- (197) Otagiri, M.; Chuang, V. T. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2009**, *32*, 527.
- (198) Matsuyama, Y.; Terawaki, H.; Terada, T.; Era, S. *Clinical and experimental nephrology* **2009**, *13*, 308.
- (199) Turell, L.; Botti, H.; Carballal, S.; Ferrer-Sueta, G.; Souza, J. M.; Duran, R.; Freeman, B. A.; Radi, R.; Alvarez, B. *Biochemistry* **2008**, *47*, 358.
- (200) Turell, L.; Botti, H.; Carballal, S.; Radi, R.; Alvarez, B. *Journal of chromatography* **2009**.
- (201) Turell, L.; Carballal, S.; Botti, H.; Radi, R.; Alvarez, B. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al* **2009**, *42*, 305.
- (202) Minchiotti, L.; Galliano, M.; Kragh-Hansen, U.; Watkins, S.; Madison, J.; Putnam, F. W. *European journal of biochemistry / FEBS* **1995**, *228*, 155.
- (203) Varshney, A.; Sen, P.; Ahmad, E.; Rehan, M.; Subbarao, N.; Khan, R. H. *Chirality* **2010**, *22*, 77.
- (204) Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P. *IUBMB Life* **2005**, *57*, 787.
- (205) Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Notari, S.; Fanali, G.; Fesce, R.; Fasano, M. *Mini Rev Med Chem* **2006**, *6*, 483.
- (206) Guo, S.; Shi, X.; Yang, F.; Chen, L.; Meehan, E. J.; Bian, C.; Huang, M. *The Biochemical journal* **2009**, *423*, 23.
- (207) Zhu, L.; Yang, F.; Chen, L.; Meehan, E. J.; Huang, M. *J Struct Biol* **2008**, *162*, 40.
- (208) Bull, T. E.; Halle, B.; Lindman, B. *FEBS letters* **1978**, *86*, 25.
- (209) Song, Y.; Gunner, M. R. *Journal of molecular biology* **2009**, *387*, 840.
- (210) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng* **1999**, *12*, 439.
- (211) Chuang, V. T.; Otagiri, M. *Pharmaceutical research* **2002**, *19*, 1458.
- (212) Noctor, T. A.; Wainer, I. W.; Hage, D. S. *Journal of chromatography* **1992**, *577*, 305.
- (213) Minchiotti, L.; Galliano, M.; Kragh-Hansen, U.; Peters, T., Jr. *Hum Mutat* **2008**, *29*, 1007.

- (214) Yabu, Y.; Miyai, K.; Kobayashi, A.; Miki, K.; Doi, K.; Takamatsu, J.; Mozai, T.; Matsuzuka, F.; Kuma, K. *Journal of endocrinological investigation* **1987**, *10*, 163.
- (215) Petitpas, I.; Petersen, C. E.; Ha, C. E.; Bhattacharya, A. A.; Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Bhagavan, N. V.; Curry, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 6440.
- (216) Kragh-Hansen, U.; Brennan, S. O.; Galliano, M.; Sugita, O. *Molecular pharmacology* **1990**, *37*, 238.
- (217) Kragh-Hansen, U.; Nielsen, H.; Pedersen, A. O. *Int J Clin Pharmacol Res* **1995**, *15*, 33.
- (218) Desuzinges-Mandon, E.; Arnaud, O.; Martinez, L.; Huche, F.; Di Pietro, A.; Falson, P. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 33123.
- (219) Silva, A. M.; Hider, R. C. *Biochimica et biophysica acta* **2009**.
- (220) Siegert, S. W.; Holt, R. J. *Adv Ther* **2008**, *25*, 842.
- (221) Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Curry, S. *BMC structural biology* **2003**, *3*, 6.
- (222) Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J. X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. C. *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, *291*, 813.
- (223) Vorum, H.; Fisker, K.; Otagiri, M.; Pedersen, A. O.; Kragh-Hansen, U. *Clinical chemistry* **1995**, *41*, 1654.
- (224) Janssen, L. H.; Van Wilgenburg, M. T.; Wilting, J. *Biochimica et biophysica acta* **1981**, *669*, 244.
- (225) Oetl, K.; Stadlbauer, V.; Petter, F.; Greilberger, J.; Putz-Bankuti, C.; Hallstrom, S.; Lackner, C.; Stauber, R. E. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1782*, 469.
- (226) Oetl, K.; Stauber, R. E. *Br J Pharmacol* **2007**, *151*, 580.
- (227) Soltys, B. J.; Hsia, C. *J Biol Chem* **1978**, *253*, 3023.
- (228) Droge, J. H.; Janssen, L. H.; Wilting, J. *Pharm Weekbl Sci* **1983**, *5*, 228.
- (229) Ascenzi, P.; Bolli, A.; Gullotta, F.; Fanali, G.; Fasano, M. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 776.
- (230) Ascenzi, P.; Fasano, M. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 1118.
- (231) Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Notari, S.; Menegatti, E.; Fasano, M. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *334*, 481.
- (232) Kragh-Hansen, U.; Vorum, H. *Clinical chemistry* **1993**, *39*, 202.
- (233) van der Giesen, W. F.; Wilting, J. *Biochemical pharmacology* **1983**, *32*, 281.
- (234) Droge, J. H.; Janssen, L. H.; Wilting, J. *Biochimica et biophysica acta* **1985**, *827*, 396.
- (235) Yang, J.; Ha, C. E.; Bhagavan, N. V. *Biochimica et biophysica acta* **2005**, *1724*, 37.
- (236) Weber, G.; Farris, F. J. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3075.
- (237) Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Twine, S.; East, M.; Curry, S. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 22804.
- (238) Nicholls, I. A.; Karlsson, B. C.; Rosengren, A. M.; Henschel, H. *J Mol Recognit* **2010**, *23*, 604.
- (239) Karlsson, B. C.; Rosengren, A. M.; Andersson, P. O.; Nicholls, I. A. *The journal of physical chemistry* **2009**, *113*, 7945.
- (240) Karlsson, B. C.; Rosengren, A. M.; Andersson, P. O.; Nicholls, I. A. *The journal of physical chemistry* **2007**, *111*, 10520.

- (241) Moreno, F.; Cortijo, M.; Gonzalez-Jimenez, J. *Photochemistry and photobiology* **1999**, *69*, 8.
- (242) Macgregor, R. B.; Weber, G. *Nature* **1986**, *319*, 70.
- (243) Kamal, J. K.; Zhao, L.; Zewail, A. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 13411.
- (244) Krishnakumar, S. S.; Panda, D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7443.
- (245) Marriott, G.; Zechel, K.; Jovin, T. M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 6214.
- (246) Erker, W.; Beister, U.; Decker, H. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 12391.
- (247) Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. *Journal of molecular biology* **2005**, *353*, 38.
- (248) Gryzunov, Y. A.; Arroyo, A.; Vigne, J. L.; Zhao, Q.; Tyurin, V. A.; Hubel, C. A.; Gandley, R. E.; Vladimirov, Y. A.; Taylor, R. N.; Kagan, V. E. *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, *413*, 53.
- (249) Stewart, A. J.; Blindauer, C. A.; Berezenko, S.; Sleep, D.; Tooth, D.; Sadler, P. J. *The FEBS journal* **2005**, *272*, 353.
- (250) Alvarez, B.; Denicola, A.; Radi, R. *Chem Res Toxicol* **1995**, *8*, 859.
- (251) Bohle, D. S.; Hansert, B.; Paulson, S. C.; Smith, B. D. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 7423.
- (252) Cassina, A.; Radi, R. *Archives of biochemistry and biophysics* **1996**, *328*, 309.
- (253) Long, G. L.; Winefordner, J. *Analytical Chemistry* **1983**, *55*, 712A.
- (254) Knoll, J. E. *Journal of chromatographic science* **1985**, *23*, 422.
- (255) Anonymous *The Analyst* **1987**, *112*, 199.
- (256) Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B. *Methods in enzymology* **1996**, *269*, 302.
- (257) Andre, J. C.; Baros, F.; Winnik, M. A. *J Phys Chem* **1990**, *94*, 2942.
- (258) Zacharia, I. G.; Deen, W. M. *Annals of biomedical engineering* **2005**, *33*, 214.
- (259) Malinski, T.; Radomski, M.; Taha, Z.; Moncada, S. *Biochemical and biophysical research communications* **1993**, *194*, 960.
- (260) Wise, D.; Houghton, G. *Chemical Engineering Science* **1968**, *23*, 1211.
- (261) Lancaster, J. R., Jr. *Nitric Oxide* **1997**, *1*, 18.
- (262) Kowert, B. A.; Dang, N. C. *J Phys Chem A* **1999**, *103*, 779.
- (263) Potter, M. J.; Luty, B. A.; Zhou, H. X.; McCammon, J. A. *J Phys Chem* **1996**, *100*, 5149.
- (264) Oshanin, G. S.; Ovchinnikov, A. A.; Burlatsky, S. F. *J Phys A* **1989**, *22*, L977.
- (265) Oshanin, G.; Burlatsky, S. *J Phys A* **1989**, *22*, L973.
- (266) Goldstein, S.; Czapski, G.; Lind, J.; Merenyi, G. *Chem Res Toxicol* **1999**, *12*, 132.
- (267) Viggiano, A. A.; Midey, A. J.; Ehlerding, A. *Int J Mass Spectrometry* **2006**, *255*, 65.
- (268) Koppenol, W. H. *Redox Rep* **2001**, *6*, 339.
- (269) Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *J Chem Soc A* **1968**, 450–452.
- (270) Blough, N. V.; Zafiriou, O. C. *Inorg Chem* **1985**, *24*, 3502.
- (271) Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L. *J Phys Chem Ref Data* **1985**, *14*, 1041.
- (272) Moro, M.; Darley-USmar, V.; Lizasoain, I.; Su, Y.; Knowles, R.; Radomski, M.; Moncada, S. *British journal of pharmacology* **1995**, *116*, 1999.

- (273) Schmidt, K.; Pfeiffer, S.; Mayer, B. *Free Radic Biol Med* **1998**, *24*, 859.
- (274) Simon, K.; Tulub, A. *Optics and Spectroscopy* **2009**, *107*, 46.
- (275) Scott, R. *Molecular Physics* **1966**, *11*, 399.
- (276) Jursic, B.; Zdravkovski, Z. *International Journal of Quantum Chemistry* **1995**, *54*, 161.
- (277) East, A. *The Journal of chemical physics* **1998**, *109*, 2185.
- (278) Scatchard, G.; Prentiss, S. S.; Jones, P. T. *J Am Chem Soc* **1932**, *54*, 2690.
- (279) Huppert, D.; Goldberg, S. Y.; Masad, A.; Agmon, N. *Phys Rev Lett* **1992**, *68*, 3932.
- (280) Smoluchowski, M. V. *Z Phys Chem* **1917**, *92*, 129.
- (281) Kim, H.; Shin, K. J. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* **2000**, *61*, 3426.
- (282) Arita, T.; Kajimoto, O.; Terazima, M.; Kimura, Y. *J Chem Phys* **2004**, *120*, 7071.
- (283) Popov, A. *Polish Journal of Chemistry* **2003**, *77*, 1659.
- (284) Zel'Dovich, Y.; Ovchinnikov, A. *Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters* **1977**, *26*, 440.
- (285) Burlatsky, S.; Oshanin, G.; Ovchinnikov, A. *Chemical Physics* **1991**, *152*, 13.
- (286) Burlatsky, S.; Oshanin, G. *Journal of Statistical Physics* **1991**, *65*, 1095.
- (287) Gopich, I.; Ovchinnikov, A.; Szabo, A. *Physical review letters* **2001**, *86*, 922.
- (288) Voituriez, R.; Moreau, M.; Oshanin, G. *Europhys Lett* **2005**, *69*, 177.
- (289) Voituriez, R.; Moreau, M.; Oshanin, G. *J Chem Phys* **2005**, *122*, 84103.
- (290) Solntsev, K. M.; Huppert, D.; Agmon, N. *Phys Rev Lett* **2001**, *86*, 3427.
- (291) Agmon, N. *J Phys Chem A* **2005**, *109*, 13.
- (292) Mozurkewich, M.; Lamb, J. J.; Benson, S. W. *J Phys Chem* **1984**, *88*, 6435.
- (293) Olson, L. P.; Kuwata, K. T.; Bartberger, M. D.; Houk, K. N. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 9469.
- (294) Lii, R.; Gorse, R. A.; Sauer, M. C.; Gordon, S. *J Phys Chem* **1979**, *83*, 1803.
- (295) Menon, A.; Sathyamurthy, N. *J Phys Chem* **1981**, *85*, 1021.
- (296) Chen, Y.; Rauk, A.; Tschuikow-Roux, E. *J Phys Chem* **1991**, *95*, 9900.
- (297) Alvarez-Idaboy, J. R.; Mora-Diez, N.; Vivier-Bunge, A. *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 3715.
- (298) Gadzhiev, O. B.; Ignatov, S. K.; Razuvaev, A. G.; Masunov, A. E. *J Phys Chem A* **2009**, *113*, 9092.
- (299) Shimomura, T.; Tölle, K. J.; Smid, J.; Szwarc, M. *J Am Chem Soc* **1967**, *89*, 796.
- (300) Olson, J. B.; Koch, T. H. *J Am Chem Soc* **1986**, *108*, 756.
- (301) Ghandi, K.; Addison-Jones, B.; Brodovitch, J.; McKenzie, I.; Percival, P. W.; Schüth, J. *Phys Chem Chem Phys* **2002**, *4*, 586.
- (302) Oelkers, A. B.; Scatena, L. F.; Tyler, D. R. *J Phys Chem A* **2007**, *111*, 5353.
- (303) Banno, M.; Ohta, K.; Yamaguchi, S.; Hirai, S.; Tominaga, K. *Acc Chem Res* **2009**, *42*, 1259.
- (304) Closs, G.; Miller, R. J.; Redwine, O. D. *Acc Chem Res* **1985**, *18*, 196.
- (305) Goetz, M.; Frisch, I. *J Phys Chem A* **2002**, *106*, 8079.
- (306) Popov, A. V.; Agmon, N.; Gopich, I. V.; Szabo, A. *J Chem Phys* **2004**, *120*, 6111.
- (307) Nauser, T.; Merkofer, M.; Kissner, R.; Koppenol, W. H. *Chem Res Toxicol* **2001**, *14*, 348.

- (308) Giuliani, A.; Hassan, H. J.; Casalbore, P.; Marini, L.; Orlando, M.; Tentori, L. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **1981**, *113*, 43.
- (309) Chen, R. F. *The Journal of biological chemistry* **1967**, *242*, 173.
- (310) Riener, C. K.; Kada, G.; Gruber, H. J. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2002**, *373*, 266.
- (311) Sun, S.; Heitz, M. P.; Perez, S. A.; Colon, L. A.; Bruckenstein, S.; Bright, F. V. *Applied spectroscopy* **1997**, *51*, 1316.
- (312) Gadad, P.; Lei, H.; Nanny, M. A. *Water Res* **2007**, *41*, 4488.
- (313) Gadad, P.; Nanny, M. A. *Water Res* **2008**, *42*, 4818.
- (314) Basak, S.; Debnath, D.; Haque, E.; Ray, S.; Chakrabarti, A. *Indian journal of biochemistry & biophysics* **2001**, *38*, 84.
- (315) Gonzalez-Jimenez, J.; Cortijo, M. *Protein J* **2004**, *23*, 351.
- (316) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer: Singapore, 2006; Vol. I.
- (317) Page, R.; Grzechnik, S. K.; Canaves, J. M.; Spraggon, G.; Kreusch, A.; Kuhn, P.; Stevens, R. C.; Lesley, S. A. *Acta crystallographica* **2003**, *59*, 1028.
- (318) Newman, J.; Egan, D.; Walter, T. S.; Meged, R.; Berry, I.; Ben Jelloul, M.; Sussman, J. L.; Stuart, D. I.; Perrakis, A. *Acta crystallographica* **2005**, *61*, 1426.
- (319) Garman, E.; Owen, R. L. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **2007**, *364*, 1.
- (320) COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. *Acta crystallographica* **1994**, *50*, 760.
- (321) Leslie, A. G. W. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **1992**, *26*, 27.
- (322) Kabsch, W. *J Appl Cryst* **1988**, *21*, 916.
- (323) Navaza, J. *Acta crystallographica* **2001**, *57*, 1367.
- (324) Murshudov, G. N.; Dodson, E. J. In *CCP4 Newsletter* Cheshire, UK: Daresbury Laboratory, 1997.
- (325) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta crystallographica* **2004**, *60*, 2126.
- (326) Painter, J.; Merritt, E. A. *Acta crystallographica* **2006**, *62*, 439.
- (327) Painter, J.; Merritt, E. A. *J Appl Cryst* **2006**, *39*, 109.
- (328) Schneider, T. R. *Acta crystallographica* **2004**, *60*, 2269.
- (329) Schneider, T. R. *Acta crystallographica* **2002**, *58*, 195.
- (330) Schneider, T. R. *Acta crystallographica* **2000**, *56*, 714.
- (331) Cruickshank, D. W. *Acta crystallographica* **1999**, *55*, 583.
- (332) Cruickshank, D. W. *Acta crystallographica* **1999**, *55*, 1108.
- (333) Petsko, G.; Ringe, D. *Annual review of biophysics and bioengineering* **1984**, *13*, 331.
- (334) Alvarez, B.; Carballal, S.; Turell, L.; Radi, R. *Methods in enzymology* **2010**, *473*, 117.
- (335) Perry, J. L.; Goldsmith, M. R.; Williams, T. R.; Radack, K. P.; Christensen, T.; Gorham, J.; Pasquinelli, M. A.; Toone, E. J.; Beratan, D. N.; Simon, J. D. *Photochemistry and photobiology* **2006**, *82*, 1365.
- (336) Watanabe, H.; Kragh-Hansen, U.; Tanase, S.; Nakajou, K.; Mitarai, M.; Iwao, Y.; Maruyama, T.; Otagiri, M. *The Biochemical journal* **2001**, *357*, 269.

- (337) Petersen, C. E.; Ha, C. E.; Harohalli, K.; Feix, J. B.; Bhagavan, N. V. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, 20985.
- (338) Lopez-Jaramillo, F. J.; Moraleda, A. B.; Gonzalez-Ramirez, L. A.; Carazo, A.; Garcia-Ruiz, J. M. *Acta crystallographica* **2002**, *58*, 209.
- (339) Curry, S. *Drug Metab Pharmacokinet* **2009**, *24*, 342.
- (340) Frauenfelder, H.; Petsko, G.; Tsernoglou, D. *Nature* **1979**, *280*, 558.
- (341) Chong, S. H.; Joti, Y.; Kidera, A.; Go, N.; Ostermann, A.; Gassmann, A.; Parak, F. *Eur Biophys J* **2001**, *30*, 319.
- (342) Parak, F.; Hartmann, H.; Aumann, K. D.; Reuscher, H.; Rennekamp, G.; Bartunik, H.; Steigemann, W. *Eur Biophys J* **1987**, *15*, 237.
- (343) Parak, F. G.; Achterhold, K.; Croci, S.; Schmidt, M. *J Biol Phys* **2007**, *33*, 371.
- (344) Winn, M. D.; Isupov, M. N.; Murshudov, G. N. *Acta crystallographica* **2001**, *57*, 122.
- (345) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. *Acta crystallographica* **2010**, *66*, 486.
- (346) Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 38731.
- (347) Hein, K. L.; Kragh-Hansen, U.; Morth, J. P.; Jeppesen, M. D.; Otzen, D.; Moller, J. V.; Nissen, P. *J Struct Biol* **2010**, *171*, 353.
- (348) EMBL-EBI; http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver: 2010.
- (349) Satoh, A.; Konishi, S.; Tamura, H.; Stickland, H. G.; Whitney, H. M.; Smith, A. G.; Matsumura, H.; Inoue, T. *Biochemistry* **2010**, *49*, 6400.
- (350) Hartmann, H.; Parak, F.; Steigemann, W.; Petsko, G. A.; Ponzi, D. R.; Frauenfelder, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1982**, *79*, 4967.
- (351) Wilson, M. A.; Brunger, A. T. *Acta crystallographica* **2003**, *59*, 1782.
- (352) Mosca, R.; Schneider, T. R. *Nucleic acids research* **2008**, *36*, W42.
- (353) Chim, N.; McMath, L. M.; Beeby, M.; Goulding, C. W. *Infect Disord Drug Targets* **2009**, *9*, 475.
- (354) Lee, J. E.; Settembre, E. C.; Cornell, K. A.; Riscoe, M. K.; Sufrin, J. R.; Ealick, S. E.; Howell, P. L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5159.
- (355) Howard, E. I.; Sanishvili, R.; Cachau, R. E.; Mitschler, A.; Chevrier, B.; Barth, P.; Lamour, V.; Van Zandt, M.; Sibley, E.; Bon, C.; Moras, D.; Schneider, T. R.; Joachimiak, A.; Podjarny, A. *Proteins* **2004**, *55*, 792.
- (356) El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Schneider, T. R.; Hazemann, I.; Ruiz, F.; Oka, M.; Joachimiak, A.; Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Mitschler, A.; Podjarny, A. *Proteins* **2004**, *55*, 805.
- (357) Read, R. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* **1990**, *46*, 900.
- (358) Ringe, D.; Petsko, G. A. *Methods in enzymology* **1986**, *131*, 389.
- (359) Tilton, R. F., Jr.; Dewan, J. C.; Petsko, G. A. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2469.
- (360) Brünger, A. T. *Nature* **1992**, *355*, 472.
- (361) Brünger, A. T. *Acta crystallographica* **1993**, *49*, 24.
- (362) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. *Acta crystallographica* **1997**, *53*, 240.
- (363) Schneider, T. R.; Karcher, J.; Pohl, E.; Lubini, P.; Sheldrick, G. M. *Acta crystallographica* **2000**, *56*, 705.

- (364) Peters-Libeu, C.; Adman, E. T. *Acta crystallographica* **1997**, *53*, 56.
- (365) Lunin, V.; Afonine, P.; Urzhumtsev, A. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* **2002**, *58*, 270.
- (366) Tickle, I. J.; Laskowski, R. A.; Moss, D. S. *Acta crystallographica* **1998**, *54*, 547.
- (367) Tickle, I. J.; Laskowski, R. A.; Moss, D. S. *Acta crystallographica* **2000**, *56*, 442.
- (368) Wilson, A. *Acta crystallographica* **1949**, *2*, 318.
- (369) Tronrud, D. E.; Matthews, B. W. *Protein Sci* **2009**, *18*, 2.
- (370) Sommer, K.; Kühn, O.; León, F.; Siebert, B. *Robotics and Autonomous Systems* **2009**, *57*, 339.
- (371) Evans, P. *Acta crystallographica* **2006**, *62*, 72.
- (372) Clore, G. M.; Schwieters, C. D. *Journal of molecular biology* **2006**, *355*, 879.
- (373) Liu, L.; Koharudin, L. M.; Gronenborn, A. M.; Bahar, I. *Proteins* **2009**, *77*, 927.
- (374) Kuzmanic, A.; Zagrovic, B. *Biophys J* **2010**, *98*, 861.
- (375) Cerutti, D. S.; Freddolino, P. L.; Duke, R. E., Jr.; Case, D. A. *The journal of physical chemistry* **2010**, *114*, 12811.
- (376) Cerutti, D. S.; Le Trong, I.; Stenkamp, R. E.; Lybrand, T. P. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12065.
- (377) Bertini, I.; Kursula, P.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Vahokoski, J.; Wilmanns, M.; Yuan, J. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 5134.
- (378) Wilson, A. *Nature* **1942**, *150*, 152.
- (379) Luzzati, V. *Acta crystallographica* **1952**, *5*, 802.
- (380) Read, R. In *The Macromolecular Crystallography course was presented in the 1999-2000 academic year to staff and students of CIMR, University of Cambridge and the MRC-LMB.*; Department of Haematology: Structural Medicine, University of Cambridge, Cambridge Institute for Medical Research <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/course.html>, 2000.
- (381) Shannon, C. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* **2001**, *5*, 3.
- (382) Ustun, Y.; Engin-Ustun, Y.; Ozturk, O.; Alanbay, I.; Yaman, H. *J Matern Fetal Neonatal Med* **2010**.
- (383) Kazanis, K.; Dalamaga, M.; Nounopoulos, C.; Manolis, A. S.; Sakellaris, N.; Jullien, G.; Dionyssiou-Asteriou, A. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2009**, *408*, 65.
- (384) Duarte, M. M.; Rocha, J. B.; Moresco, R. N.; Duarte, T.; Da Cruz, I. B.; Loro, V. L.; Schetinger, M. R. *Clinical biochemistry* **2009**, *42*, 666.
- (385) Piwowar, A.; Knapik-Kordecka, M.; Warwas, M. *Dis Markers* **2008**, *24*, 311.
- (386) Gunduz, A.; Turedi, S.; Mentese, A.; Altunayoglu, V.; Turan, I.; Karahan, S. C.; Topbas, M.; Aydin, M.; Eraydin, I.; Akcan, B. *The American journal of emergency medicine* **2008**, *26*, 874.
- (387) Sinha, M. K.; Gaze, D. C.; Tippins, J. R.; Collinson, P. O.; Kaski, J. C. *Circulation* **2003**, *107*, 2403.
- (388) Guven, S.; Alver, A.; Mentese, A.; Ilhan, F. C.; Calapoglu, M.; Unsal, M. A. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2009**, *88*, 479.
- (389) Bar-Or, D.; Rael, L. T.; Bar-Or, R.; Slone, D. S.; Mains, C. W.; Rao, N. K.; Curtis, C. G. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2008**, *387*, 120.
- (390) Mothes, E.; Faller, P. *Biochemistry* **2007**, *46*, 2267.
- (391) Tronrud, D. E. *Acta Crystallogr A* **1992**, *48* (Pt 6), 912.

- (392) Ming, D.; Wall, M. E. *Proteins* **2005**, *59*, 697.
- (393) Wilting, J.; van der Giesen, W. F.; Janssen, L. H. *Biochemical pharmacology* **1981**, *30*, 1025.
- (394) Levin, E. J.; Kondrashov, D. A.; Wesenberg, G. E.; Phillips, G. N., Jr. *Structure* **2007**, *15*, 1040.
- (395) Knight, J. L.; Zhou, Z.; Gallicchio, E.; Himmel, D. M.; Friesner, R. A.; Arnold, E.; Levy, R. M. *Acta crystallographica* **2008**, *64*, 383.
- (396) Fenton, A. W. *Trends Biochem Sci* **2008**, *33*, 420.
- (397) Laskowski, R. A.; Gerick, F.; Thornton, J. M. *FEBS letters* **2009**, *583*, 1692.
- (398) Botti, H.; Möller, M. N.; Steinmann, D.; Nauser, T.; Koppenol, W. H.; Denicola, A.; Radi, R. *The journal of physical chemistry* **2010**, *in press (published on line)*.
- (399) Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods in enzymology* **1997**, *276*, 307.
- (400) Powell, H. R. *Acta crystallographica* **1999**, *55*, 1690.
- (401) Leslie, A. G. *Acta crystallographica* **2006**, *62*, 48.
- (402) Kabsch, W. *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 795.
- (403) Navaza, J. *Acta Crystallogr A Foundations of Crystallography* **1994**, *50*, 157.
- (404) Patterson, A. L.; Z Krist: 1935; Vol. 90, p 517.
- (405) Rossmann, M. G. *Acta crystallographica* **2001**, *57*, 1360.
- (406) Crowther, R. *New York: Gordon and Breach* **1972**, 173.
- (407) Rossmann, M. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* **1990**, *46*, 73.
- (408) Tronrud, D. E. *Acta crystallographica* **2004**, *60*, 2156.
- (409) Murshudov, G. N.; A., V. A.; Dodson, E. J. *Acta crystallographica* **1997**, *53*, 240.
- (410) Winn, M. D.; Murshudov, G. N.; Papiz, M. Z. *Methods in enzymology* **2003**, *374*, 300.
- (411) Bayes, T. *Phil Trans R Soc London* **1763**, *53*, 370.
- (412) Adams, P. D.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Brunger, A. T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 5018.
- (413) Adams, P. D.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Brunger, A. T. *Acta crystallographica* **1999**, *55*, 181.
- (414) Vagin, A. A.; Steiner, R. A.; Lebedev, A. A.; Potterton, L.; McNicholas, S.; Long, F.; Murshudov, G. N. *Acta crystallographica* **2004**, *60*, 2184.
- (415) Evans, P. R. *Acta crystallographica* **2007**, *63*, 58.
- (416) Kidera, A.; Go, N. *Journal of molecular biology* **1992**, *225*, 457.
- (417) Brünger, A. T.
<http://biopent.uv.es/~roberto/Manuales/XPLOR/node304.html#SECTION001440000000000000>
 000, 1992.
- (418) Schomaker, V.; Trueblood, K. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1968**, *24*, 63.
- (419) Merritt, E. A.; Painter, J.
<http://pymmlib.sourceforge.net/doc/tlsview/tlsview.html>.
- (420) Howlin, B.; Butler, S. A.; Moss, D. S.; Harris, G. W.; Driessen, H. P. C. *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 622.

