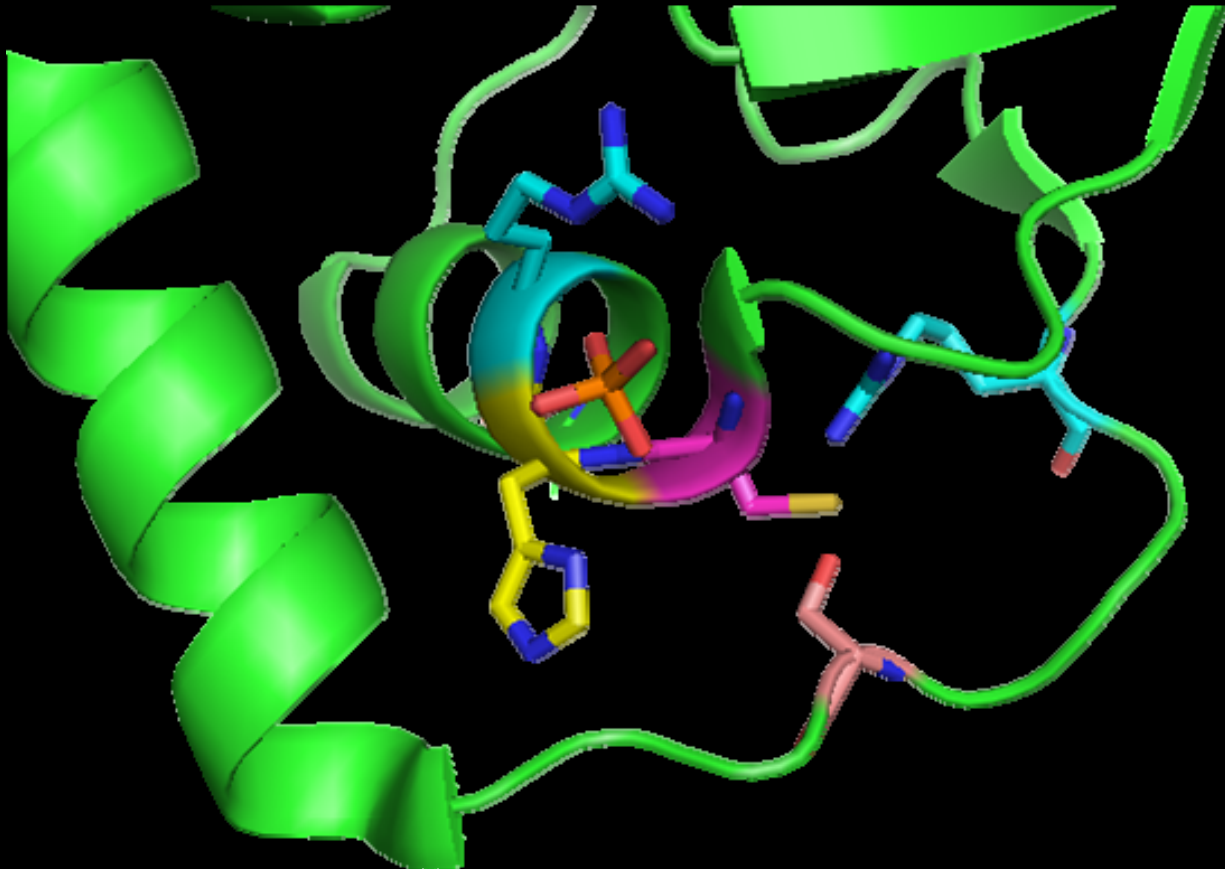


CARACTERIZACIÓN DE LA ACIDEZ Y NUCLEOFILIA DE TIOLES DE BAJO PESO MOLECULAR Y TIOLES PROTEICOS



M^a FLORENCIA SARDI PIANO

TUTOR: GERARDO FERRER-SUETA

TESINA DE GRADO - LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA BIOLÓGICA-ENZIMOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

SETIEMBRE 2011

CARACTERIZACIÓN DE LA ACIDEZ Y NUCLEOFILIA DE TIOLES DE BAJO PESO MOLECULAR Y TIOLES PROTEICOS.

Agradecimientos

Los resultados presentados en esta Tesis son producto del trabajo en conjunto con Gerardo Ferrer-Sueta y Bruno Manta. Sin el aporte particular de cada uno, este trabajo no se hubiese concretado.

Quiero agradecer a todos los integrantes, actuales y pasados, del Laboratorio de Fisiología Biológica-Enzimología de la Facultad de Ciencias por sus invaluable aportes tanto humanamente como académicamente. A Gerardo Ferrer-Sueta en particular por haberme dado la oportunidad de trabajar durante todo este tiempo en el laboratorio de Fisiología Biológica y por haberme enseñado a manejar en el laboratorio aplicando todos los conocimientos adquiridos durante los años de carrera.

Me gustaría agradecer a mis padres, familia, amigos y amigas que siempre estuvieron presentes y por todo el apoyo brindado.

Por último, quiero agradecer a la comisión sectorial de investigación científica (CSIC) de la Universidad de la República quien apoyo económicamente este proyecto.

Índice

Agradecimientos	2
Índice.....	3
Índice de figuras	6
Índice de Tablas.....	8
Abreviaturas y símbolos frecuentes	9
Resumen	11
1. Introducción	12
1.1 Química del grupo tiol	13
1.1.1. Generalidades.....	13
1.1.2. Bioquímica del grupo tiol	14
1.1.3. pK _a , reactividad y disponibilidad de tiolato.....	16
1.1.4. Acidez	17
1.1.5. Nucleofilia y factores determinantes de la reactividad nucleofílica.....	20
1.1.6. Correlación de Brønsted	23
1.2. Tioles de bajo peso molecular	26
1.2.1. Cisteína	26
1.2.2. Glutación.....	28
1.2.3. Homocisteína.....	29
1.3 Tioles Proteicos.....	30
1.3.1 Nucleofilia de aminoácidos y péptidos	30
1.3.2 Sulfirredoxina humana (hSrx), como modelo de estudio.....	34
1.4 Tioles biológicos, sus funciones e importancia	38
2. Objetivos	41
2.1. Objetivos Generales	41

2.2.	Objetivos específicos	41
2.2.1.	Objetivo específico 1.	41
2.2.2.	Objetivo específico 2.	41
3.	Materiales y Métodos.....	42
3.1	Reactivos y materiales	42
3.2.	Producción, purificación y caracterización de hSrx.....	42
3.2.1.	Cultivo e inducción	42
3.2.2.	Preparación del extracto libre de células	43
3.2.3.	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados	43
3.2.4.	Digestión con trombina	44
3.2.5.	Cromatografía de exclusión molecular	44
3.2.5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	45
3.3.	Procedimientos Generales.....	45
3.3.1.	Reducción de tioles proteicos	45
3.3.2.	Cuantificación de tioles de bajo peso molecular y proteicos	45
3.3.3.	Herramientas computacionales	46
3.4.	Reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr)	46
3.5.	Determinación de las constantes de velocidad de reacción	48
3.5.1.	Tioles de bajo peso molecular	48
3.5.2.	Tioles proteicos.....	50
3.6.	Determinación de pK_a y nucleofilia.....	50
3.6.1.	Tioles de bajo peso molecular	50
3.6.2.	Sulfirredoxina humana.....	51
3.7.	Construcción de correlaciones de Brønsted	52
4.	Resultados y Discusión	53

4.1	Expresión y purificación de hSrx	53
4.2.	Determinación del pK_a y la nucleofilia de tioles de bajo peso molecular	56
4.3.	Determinación del pK_a y nucleofilia de hSrx	62
5.	Conclusiones y perspectivas	70
6.	Referencias	71

Índice de figuras

Figura 1.	Diagrama de distribución de tiolato de acuerdo al pH.	16
Figura 2.	Ejemplos de reacciones enzimáticas donde el tiolato funciona como nucleófilo.	20
Figura 3.	Gráfico de Brønsted para la reducción de ONOOH con tioles.	24
Figura 4.	Correlaciones de Brønsted para la reacción de reducción de tioles de bajo peso molecular con cloramina de taurina (A), con ácido peroxinitroso (B) y con H ₂ O ₂ (C)	25
Figura 5.	Estructura química de la cisteína reducida.	26
Figura 6.	Modificaciones oxidativas de tioles proteicos y tioles no proteicos.	27
Figura 7.	Fórmula liniangular del glutatión.	28
Figura 8.	Estructura química de la homocisteína.	29
Figura 9.	Valores de pK _a intrínsecos de los grupos de cadena lateral ionizable en proteínas en solución acuosa.	31
Figura 10.	Mecanismo de reacción para la reducción de la 2-Cys Prx sulfínica por la Srx.	35
Figura 11.	Estructura de la sulfirredoxina humana (hSrx, PDBID 2B6F) en complejo con ATP y Mg ²⁺ .	36
Figura 12.	Residuos aminoácidos de la hSrx en contacto con los fosfatos del ATP.	37
Figura 13.	Espectro de emisión del monobromobimano en buffer (a) y espectro de emisión de la hSrx con mBBr a 37 °C (b).	47
Figura 14.	Gel de electroforesis SDS-PAGE 12% de las primeras etapas de la purificación de hSrx.	53
Figura 15.	Perfil de elución de la sulfirredoxina humana en cromatografía de exclusión molecular (SEC).	54
Figura 16.	Gel de electroforesis SDS-PAGE 15% de las últimas etapas de la purificación de la hSrx.	54
Figura 17.	Espectro de masa de la sulfirredoxina humana.	55
Figura 18a.	Cursos temporales de la reacción de captopril con mBBr en condiciones de pseudo-primer orden	56
Figura 18b.	Determinación de la constante de velocidad de segundo orden aparente.	56
Figura 18c.	Determinación del pK _a y constante de velocidad de segundo orden del captopril	57
Figura 19.	Reacción de cisteína etil éster con mBBr a pH 7.42.	58

Figura 20.	Perfil de pH para tioles de bajo peso molecular en el intervalo de pH de 6-12	58-59
Figura 21.	Gráfico de correlación de Brønsted para distintos tioles de bajo peso molecular	61
Figura 22.	Cursos temporales de la reacción de hSrx con mBBr en condiciones de velocidad inicial	63
Figura 23.	Determinación del pKa de la sulfirredoxina humana (hSrx) por medio de la alquilación con mBBr	64
Figura 24.	Curso temporal de la reacción hSrx con exceso de mBBr a 37 °C y pH 8.39	65
Figura 25.	Determinación de la constante de velocidad de reacción dependiente del pH para la reacción de hSrx con exceso de mBBr y en presencia de ATP	66
Figura 26.	Perfil de pH de captoril (línea punteada) y de la sulfirredoxina humana (línea roja)	67
Figura 27.	Gráfico de Brønsted para tioles de bajo peso molecular y hSrx	68

Índice de Tablas

Tabla 1.	Principales tioles de bajo peso molecular y valores de pK_a .	17
Tabla 2.	Acidez de Brønsted de grupos tioles importantes en catálisis enzimática.	19
Tabla 3.	Algunos tioles proteicos notablemente ácidos	33
Tabla 4.	Valores de pK_a obtenidos experimentalmente y valores de pK_a de la literatura.	60
Tabla 5.	Valores de pK_a aportados por PROPKA para la Cys99 y los residuos vecinos	63

Abreviaturas y símbolos frecuentes

ACES	ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico
ATP	trifosfato de adenosine
DMF	dimetil formamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DTNB	ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTPA	ácido dietilentriaminopentaacético
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GSH	glutación
GSSG	glutación disulfuro
hSrx	sulfirredoxina humana
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
k_2	constante de velocidad de segundo orden
λ_{exc}	longitud de onda de excitación
λ_{em}	longitud de onda de emisión
mBBr	Monobromobimano
MES	ácido 2 -(N-morfolino) etanosulfónico
NaH_2SO_4	amortiguador sulfato monosódico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
Prx	peroxirredoxina
RS^-	anión tiolato
RSH	tiol

RSOH	ácido sulfénico
RSO ₂ H	ácido sulfinico
RSSR	Disulfuro
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEC	cromatografía de exclusión molecular

Resumen

El grupo tiol (RSH) es uno de los grupos más versátiles en bioquímica, participa en la estabilización de estructuras terciarias de proteínas mediante la formación de disulfuros, catálisis enzimática, entre otras.

La gran mayoría de los tioles biológicos son derivados del aminoácido cisteína, y sus reacciones comienzan con el ataque nucleofílico del tiolato sobre la molécula blanco. Siendo la nucleofilia del tiolato una de las propiedades químicas más importantes, fue la considerada a estudiar. Las determinaciones de pK_a de tioles mediante la reactividad diferencial entre tiol y tiolato proporcionan una forma de medir la nucleofilia.

Hemos estudiado las constantes de acidez y las constantes de velocidad de diferentes tioles de bajo peso molecular por medio de la reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr). Con la posterior construcción de una escala nucleofílica, la cual consiste en correlacionar constantes de velocidad de una reacción con la acidez del tiol. Con los valores de constantes de velocidad para las reacciones con mBBr y los pK_a s obtenidos hemos construido una correlación de Brønsted, a partir de la cual se puede comprender la relación entre la acidez y la nucleofilia, y utilizar como marco de referencia para la ubicación de cisteínas proteicas que caen en la ubicación esperada por la correlación y aquellas que tienen su pK_a o nucleofilia alterada por el entorno proteico.

Hemos escogido el sistema de la enzima sulfirredoxina humana (hSrx) en presencia de ATP y Mg^{2+} , determinando los pK_a del tiol proteico por medio de la reacción de alquilación con mBBr. Los resultados muestran que la cisteína99 es muy poco nucleofílica y reacciona muy lento en comparación con los tioles de bajo peso molecular, para esta reacción en particular.

La interpretación de los resultados puede verse facilitada dado que se conocen diferentes estructuras cristalográficas, la reactividad de la cisteína99 de la hSrx estaría alterada por residuos vecinos cargados positivamente.

1. Introducción

Las células utilizan las reacciones redox para promover y modular el crecimiento de los organismos. En el metabolismo de todos los seres vivos, los procesos redox tienen una importancia capital, ya que están involucrados en la cadena de reacciones químicas de la fotosíntesis y de la respiración aeróbica. En ambas reacciones existe una cadena transportadora de electrones formada por una serie de complejos enzimáticos, entre los que destacan los citocromos. El metabolismo implica cientos de reacciones redox, donde procesos biológicos tan diferentes como la inflamación y la fotosíntesis requieren inevitablemente la transferencia de electrones o de hidrógenos ($[H] \equiv H^+ + e^-$) para mantener las proporciones adecuadas de las formas [oxidada] / [reducida] de una especie química.

Los sistemas redox basados en la cisteína son excepcionales, debido a la extraordinaria participación del azufre en diversas reacciones redox de un punto de vista mecanístico, como es el caso de las reacciones de intercambio tiol/disulfuro (ej, en tioredoxina (Trx)), reacciones de transferencia de electrones (ej: en la glutatión reductasa (GR)), reacciones de transferencia de tiol/radicales tiólo (ej: en la ribonucleótido reductasa (RNRasa)), y las diferentes reacciones de transferencia de hidruros (ej: en la NADH peroxidasa (Npx) y en la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)) [1].

Además las reacciones redox sirven para detoxificar eficientemente las especies reactivas o cumplir un rol en la regulación de los caminos metabólicos. La consecuencia inmediata de estas posibilidades es que la disfunción de los procesos redox estará asociada con determinadas patologías. Por ello, las células han desarrollado una serie de mecanismos enzimáticos complejos que generan y consumen las especies reactivas para mantener sus concentraciones intracelulares bajo control [2].

Los derivados de la cisteína, como el glutatión, tienen una función fundamental en la detoxificación de electrófilos (como en la reducción de peróxidos o en la síntesis de ácido mercaptúrico). El hecho de que los tioles puedan oxidarse por 1 o 2 electrones les brinda propiedades detoxificantes de especies reactivas. Es por esto que un gran número de investigadores han enfatizado la importancia del estudio del grupo tiol en el área bioquímica, el cual se encuentra presente tanto en proteínas como en compuestos de bajo peso molecular [3][4][5].

El grupo tiol constituye una función química muy reactiva, esta elevada reactividad se debe a la alta nucleofilia de los iones tiolato (RS^-), los cuales existen en concentraciones significativas a valores de pH neutros y débilmente alcalinos, ecuación (1):



Dado que la reactividad del tiol es mucho mayor cuando se encuentra en su estado aniónico, como tiolato (RS^-) respecto al estado protonado (RSH)[6][7], las reacciones que involucran tioles son por lo general, dependientes del pH. Un tiol en una macromolécula, en general, puede ser caracterizado por su peculiar reactividad dada por el entorno característico en el que se encuentre, ya sea una región hidrofóbica o a partir de las interacciones específicas con otros residuos aminoacídicos entre otros [8][9][10].

1.1 Química del grupo tiol

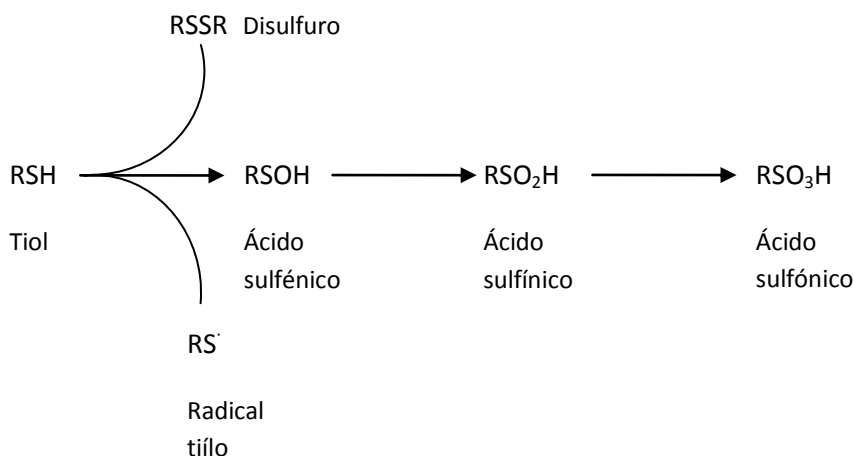
1.1.1. Generalidades

El grupo tiol es uno de los grupos más versátiles en bioquímica [11][12], formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno unido a un compuesto orgánico. Los tioles son análogos azufrados de los alcoholes, con un grupo $-SH$ que reemplaza al grupo alcohol $-OH$. El oxígeno y el azufre están en la misma familia de la tabla periódica (grupo 16, los calcógenos), el oxígeno está en el segundo período y el azufre en el tercer período. A pesar de que el oxígeno es más electronegativo que el azufre, los tioles son más ácidos que los alcoholes. Esta acidez se debe a dos motivos: en primer lugar, los enlaces $S-H$ generalmente son más débiles que los enlaces $O-H$, lo que facilita que los enlaces $S-H$ se rompan con más facilidad. En segundo lugar, el ion tiolato (RS^-) tiene su carga negativa en el azufre, y como el azufre tiene mayor volumen atómico que el oxígeno, su carga negativa está deslocalizada sobre una región del espacio más grande. Proporcionando una mayor estabilidad al tiolato respecto al alcóxido.

Generalmente, el valor de pK_a del grupo $-OH$ de un alcohol es 5-6 unidades de pK_a más básico que el valor de pK_a del grupo $-SH$ del sulfhidrilo.

Al contrario que los alcoholes, los tioles se oxidan fácilmente para dar lugar a un dímero conocido como disulfuro. El metabolismo y la función biológica de los tioles depende en gran medida de la facilidad de estos grupos para oxidarse, lo cual los diferencia de otros grupos de nucleofilia o reactividad comparables presentes

en el organismo. Los tioles son nucleófilos que presentan potenciales de reducción negativos: $E^{\circ'}(\text{cistina}, 2\text{H}^+ / 2 \text{ cisteínas}) = -0.22 \text{ V}$; $E^{\circ'}(\text{GSSG}, 2\text{H}^+ / 2\text{GSH}) = -0.23 \text{ V}$ (EEH)[13]. La cisteína puede ser oxidada por un amplio espectro de agentes oxidantes. Los tioles se oxidan generando productos con diversos estados de oxidación (Esquema 1).



Esquema 1. Productos de oxidación del grupo tiol y derivados

El átomo de azufre tiene una configuración electrónica ($[\text{Ne}]3s^23p^4$) que le permite adoptar estados de oxidación entre +6 y -2. En las proteínas, los tioles de las cisteínas constituyen el estado más reducido (estado de oxidación: -2) pero la capacidad del azufre para asumir múltiples estados de oxidación y formar uniones con el oxígeno, el nitrógeno, los halógenos y el selenio origina un rango de modificaciones post-traduccionales que están estrechamente vinculadas a la señalización redox. Nuevos experimentos muestran que los grupos sulfénico [R-SOH], sulfinico [R-SO₂H] y sulfónico [R-SO₃H] tienen un rol significativo en la remoción del H₂O₂ y en la señalización redox.

1.1.2. Bioquímica del grupo tiol

El grupo tiol (RSH) participa en la estabilización de estructuras terciarias de proteínas mediante la formación de disulfuros, en catálisis enzimática facilita reacciones redox, hidrólisis y alquilaciones; participa en el transporte y almacenamiento de iones metálicos de transición, y en la formación de sitios catalíticos, estructurales y de transporte electrónico metal-azufre. Esta enorme diversidad de reacciones y funciones puede hacer olvidar el

hecho de que la enorme mayoría de los tioles biológicos son derivados de cisteína y que la gran mayoría de las reacciones donde el tiol participa comienzan con el ataque nucleofílico del tiolato sobre la molécula blanco.

La bioquímica del grupo tiol se caracteriza en cierto modo porque la mayoría de las reacciones involucran un ataque nucleofílico del tiolato sobre un electrófilo y la mayoría de los tioles tienen valores de pK_a s cercanos al pH fisiológico o neutro.

Al proponer un mecanismo de reactividad, es importante considerar que el tiolato (RS^-) es la especie reactiva, entonces la fracción de tiolato disponible debe tomarse en cuenta para comparar reactividades.

Las reacciones propuestas se pueden generalizar por las ecuaciones (1) y (2)



El equilibrio 1 corresponde a la ionización rápida del tiol, donde la relación tiolato/tiol está controlada por la concentración de H^+ , de acuerdo a la expresión de la constante de acidez, ecuación (3). A partir de la cual se define el pK_a , ecuación (4).

$$K_a = \frac{[RS^-][H^+]}{[RSH]} \quad (3)$$

$$pK_a = -\log K_a \quad (4)$$

La constante de velocidad cinética que se desprende de la ecuación (2), es un parámetro conocido como la constante de velocidad independiente del pH (k_{RS^-}). El valor numérico de k_{RS^-} se puede obtener a partir de la constante de velocidad observada ($k_{app}^{H^+}$) para un valor determinado de pH dividida entre la fracción de tiolato disponible a ese mismo valor de pH, ecuación (5).

$$k_{RS^-} = k_{app}^{H^+} \left(\frac{K_a + [H^+]}{K_a} \right) \quad (5)$$

El valor de k_{RS^-} se puede extrapolar al determinar experimentalmente $k_{app}^{H^+}$ en un rango de pH cercano al valor de pK_a , y ajustando los valores a la ecuación (5).

La constante k_{RS^-} se desliga de las condiciones experimentales utilizadas para obtener las constantes de velocidad dependientes de pH, y es un buen descriptor de tendencias de reactividad.

Es de gran importancia conocer el estado del tiol, para comprender la funcionalidad de una enzima tiólica y determinar los parámetros cinéticos, pK_a y la constante de velocidad de segundo orden independiente del pH (k_{RS^-}), los cuales se ven influenciados por la naturaleza del entorno [14].

1.1.3. pK_a , reactividad y disponibilidad de tiolato

En la literatura se presta mucha atención al pK_a del tiol como favorecedor de la reactividad, pero hay que resaltar que si bien la nucleofilia del tiolato es unas 10^5 veces mayor que la del tiol, ambas especies coexisten a pH neutro. Un pK_a menor hará más disponible el tiolato a pH neutro, pero el aumento de reactividad esperado por esta mayor disponibilidad es bastante limitado.

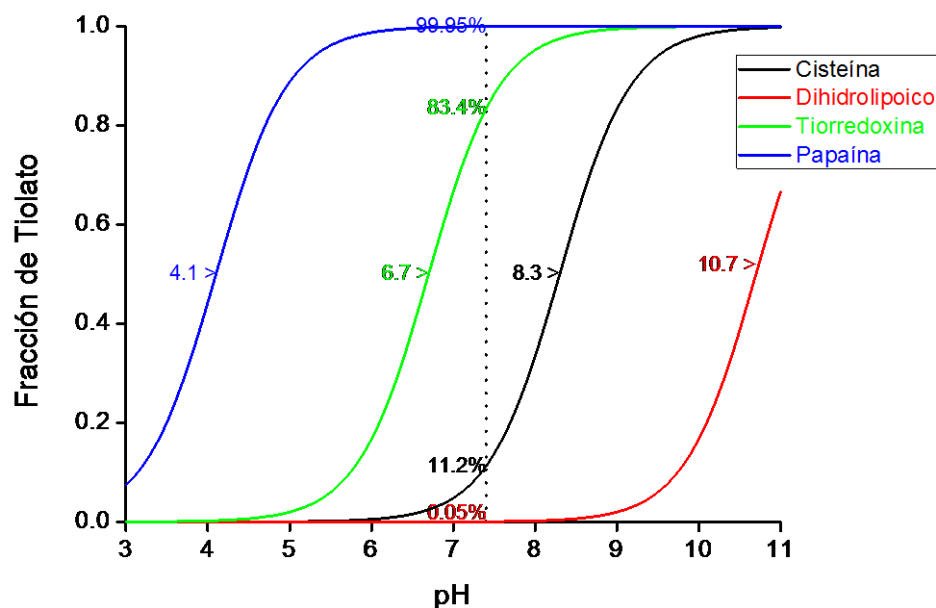


Figura 1. Diagrama de distribución de tiolato de acuerdo al pH. Para 2 proteínas diferentes en comparación con 2 tioles de bajo peso molecular.

Por ejemplo, la cisteína tiene un pK_a de aproximadamente 8.3 a 25 °C y eso significa que un 11% de la cisteína está como tiolato a pH = 7.4 (Figura 1). En cambio para una proteína con una cisteína particularmente ácida, como la peroxirredoxina 5 (Prx V) (pK_a = 5.1 [15]) prácticamente el 100% del tiolato está disponible. Esta diferencia implicaría un aumento de 9 veces en la reactividad, no obstante, la diferencia de reactividad frente a peróxido de hidrógeno es más de 10^5 veces y frente a ONOOH más de 10^3 veces [15]. Por lo que existirían factores adicionales que favorecen la cinética de esta reacción nucleofílica y cuya identidad se puede proponer a partir del conocimiento estructural de la proteína, como será explicado posteriormente.

1.1.4. Acidez

La determinación de la acidez del grupo –SH presente en diferentes compuestos, representada por el valor de pK_a , es posible a pesar de la presencia de otros protones. Se han desarrollado diversas técnicas para determinar el pK_a del –SH, tanto métodos cinéticos, como espectroscópicos, o procedimientos calorimétricos [11].

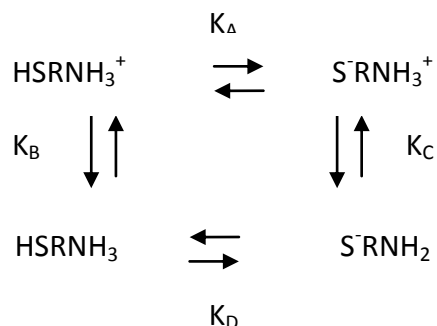
Tabla 1. Principales tioles de bajo peso molecular y valores de pK_a ; obtenidos de NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes.

Tiol	pK_a
Cisteína etil éster	6.6
Cisteína metil éster	6.7
Penicilamina	7.9
Cisteamina	8.2
Cisteína	8.3
Glutatión	8.8
Ditiotreitol	9.2
2-Mercaptoetanol	9.5
Homocisteína	9.5
N-Acetil cisteína	9.5
Ácido 2-mercaptoacético	10.56
Ácido dihidrolipoico	10.7
Ácido 3-mercaptopropanoico	10.8
2-Metilpropanotiol	11.2

En la tabla 1 se resumen los valores de pK_a de los principales tioles de bajo peso molecular. Los grupos electroatrayentes que se encuentren en una posición α o β al grupo –SH, como –OH o un grupo carbonilo, aumentan la acidez del protón tiólico. Como se observa para el caso de los compuestos cisteína etil éster, y la cisteína metil éster, presentan un valor de pK_a menor al de la cisteína provocado en parte a la presencia de un

grupo alcoxycarbonilo, donde la densidad de carga se concentra sobre el carbonilo, favoreciendo la pérdida del protón tiólico y por lo tanto aumentando la acidez del mismo.

La introducción de un grupo α -carboxilo, como sucede en la cisteína, resulta en un incremento de la acidez del grupo amino, porque el efecto inductivo del grupo carboxilo supera el efecto electrostático de la carga negativa. Lo cual provoca la ionización del grupo amino dentro del mismo rango que la del grupo $-\text{SH}$, implicando “ pK_a s mezclados”[16]. La disociación de los protones de los grupos $-\text{SH}$ y $-\text{NH}_3^+$ puede verse representada en los siguientes pasos (esquema 2) [17]:



Esquema 2. Disociación de los protones de los grupos $-\text{SH}$ y NH_3^+ . Donde K_A , K_B , K_C , K_D corresponden a las constantes microscópicas de acidez.

Para cada uno de los protones están involucrados dos pasos de disociación, uno del grupo amonio y uno del grupo sulfhidrilo. En todos los casos donde la acidez es de una magnitud similar, existen cuatro formas diferentes del compuesto y su interrelación está dada por cuatro constantes de disociación [16]. Estas constantes de disociación denominadas constantes microscópicas, representan el equilibrio de protonación de diferentes grupos funcionales y la especiación de las microespecies [18].

Por lo tanto, aquellos compuestos que presentan un grupo sulfhidrilo y un grupo amino, como es el caso de los aminotioles (cisteína), han sido sujeto de discusión, ya que determinar correctamente la contribución relativa de cada uno de estos grupos a la disociación de los dos protones no ha sido simple. La decisión a tomar entre estas alternativas se hace difícil dado la ausencia de un método que permita distinguir entre la forma ionizada y la no ionizada de alguno de los dos grupos ionizables. De esta manera, Benesch and Benesch [16] encontraron que la aparición en el espectro UV del anión tiolato está asociada a un corrimiento del pico de absorbancia de 230-232nm a 236-238nm. Sin embargo, cada compuesto debe ser considerado en particular para su estudio.

La acidez de los tioles de bajo peso molecular en solución acuosa, se encuentra únicamente determinada por

los efectos electrostáticos e inductivos producidos por los grupos funcionales presentes unos pocos enlaces de distancia del átomo de azufre, como ya vimos. Sin embargo, en las proteínas hay otros factores que entran en juego, tales como campos eléctricos difusos provenientes de los aminoácidos vecinos cargados y características de la polaridad de la estructura secundaria, exclusión de disolvente y puentes de hidrógeno específicos [14].

En muchos sistemas enzimáticos cuya actividad catalítica depende de la nucleofilia del tiolato los valores de pK_a son mucho menores que el de la cisteína libre (Tabla 2). Esto asegura que la mayor parte del tiolato estará disponible a pH cercanos al neutro.

Tabla 2. Acidez de Brønsted de grupos tioles importantes en catálisis enzimática.

Se ponen a modo de comparación dos tioles de bajo peso molecular.

Tiol	Reacción catalizada	pK_a
Peroxirredoxina 5 (C47)	Reducción de H_2O_2	5.1 [15]
PTP1B (C215)	Hidrólisis de tirosinafosfato	4.7 [19]
Glutarredoxina 3 (C11)	Intercambio tiol-disulfuro	< 5.5 [20]
Papaína (C25)	Hidrólisis de enlace peptídico	4.1 [21]
Glutación unido a GST	Alquilación de glutación	6.9 [22]
Isomerasa de disulfuros proteicos (C32)	Intercambio tiol disulfuro	6.7 [23]
Creatina quinasa (C282)	Fosforilación de creatina	5.6 [22]
Cisteína		8.3
Homocisteína		8.7 [24]

Todos los métodos experimentales para medir pK_a implican variaciones de pH y la gran mayoría de las proteínas sufren cambios conformacionales cuando es modificado el pH en el que se encuentran. Por lo que, cambios en el pH no solo perturbarían la carga y el estado de protonación del tiol y grupos funcionales vecinos, sino también distancias entre uno y otro. Resulta muy difícil, aunque no imposible, evaluar la contribución de protonación/desprotonación de un grupo funcional particular en un set de datos de pH de una proteína. Sin embargo, este punto complejo es justamente lo que causa la reactividad y especificidad de tioles proteicos respecto a pequeñas moléculas [18].

1.1.5. Nucleofilia y factores determinantes de la reactividad nucleofílica

La basicidad y la nucleofilia son propiedades diferentes, aunque relacionadas. La basicidad, describe un proceso termodinámico determinado por la constante de equilibrio para abstraer un protón, mientras que la nucleofilia es un concepto eminentemente cinético, el mejor nucleófilo es aquel que reacciona más rápido. De este modo la nucleofilia se define por la velocidad de ataque sobre un átomo electrófilo para dar sustituciones o adiciones, por tanto se mide como las constantes de velocidad. La nucleofilia del anión tiolato en disolventes próticos provoca una gran cantidad de reacciones de sustitución del tipo S_N2 (sustitución nucleofílica bimolecular) y de adiciones [11].

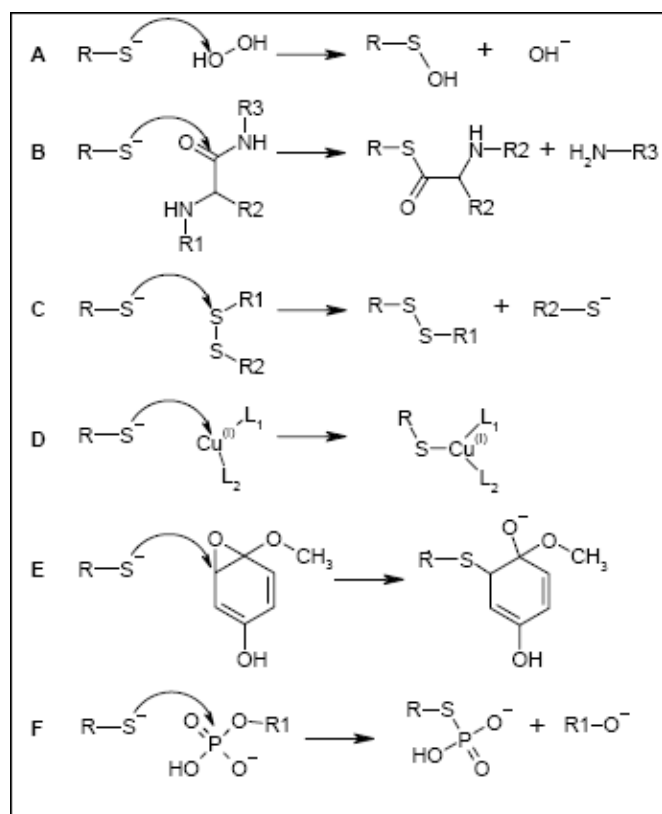


Figura 2. Ejemplos de reacciones enzimáticas donde el tiolato funciona como nucleófilo. A: reducción de peróxido de hidrógeno (peroxiredoxinas). B: hidrólisis de enlace peptídico (proteasas de cisteína). C: intercambio tiol disulfuro (glutarredoxinas, disulfuro isomerasas). D: coordinación de Cu^{2+} (chaperonas de cobre, proteínas azules de cobre, metalotioneína). E: adición a electrófilos (glutathión S-transferasa). F: Hidrólisis de ésteres fosfato (fosfatasas de tirosina proteica)

En la figura 2 se ilustran varias reacciones bioquímicas en la que el tiolato participa y donde se destaca el carácter nucleofílico del ataque en la reacción inicial.

De hecho, la característica extraordinaria de este grupo funcional radica en la nucleofilia del tiolato. En una escala relativa de nucleofilia si se establece al agua como base de la escala el orden es: $RS^- > I^- > CN^- > RO^- >$

$\text{OH}^- > \text{RNH}_2 > \text{ArO}^- > \text{RCOO}^- > \text{ROH} > \text{RSH} > \text{H}_2\text{O}$; y los valores relativos abarcan una relación de reactividad de 5×10^5 a 1 [25][26].

No existe una forma absoluta de medir la nucleofilia de un compuesto ni una sola escala, así que lo que se ha hecho históricamente es comparar reactividades de diferentes compuestos con respecto a una reacción de referencia, por ejemplo, la sustitución nucleofílica del bromuro en bromometano [25]. No obstante, en principio se puede construir una relación de nucleofilia con respecto a cualquier reacción de sustitución o adición nucleofílica, como se verá más adelante.

- Factores que determinan la reactividad nucleofílica

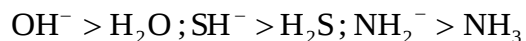
Una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular se representa de acuerdo a la siguiente reacción:



donde N corresponde a un nucleófilo (por ejemplo ion hidróxido, ion tiolato) y SX corresponde a un sustrato (por ejemplo el yodometano) que es atacado por el reactivo. La parte X corresponde a un grupo intercambiable (un ion yoduro) y la parte S corresponde a la parte electrofílica (el carbono del yodometano) ya que la densidad electrónica se encuentra alejada del carbono debido a la inducción ejercida por el átomo de halógeno [27].

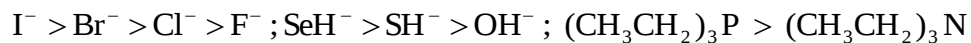
La nucleofilia se verá influenciada por la carga, la basicidad (de Brønsted), la polarizabilidad del átomo donador, la presencia de electrones de no enlace en el átomo vecino, los efectos estéricos, los efectos de estabilización por donación parcial de electrones y la solvatación; como será explicado a continuación.

En primer lugar, la carga del nucleófilo afecta fuertemente a la velocidad de las reacciones. Si consideramos que una especie con carga negativa es más nucleofílica que una especie neutra, se podría considerar que una base es siempre un nucleófilo más fuerte que su ácido conjugado. Un nucleófilo fuerte es mucho más efectivo que uno débil a la hora de atacar un átomo de carbono electrófilo. Por ejemplo:



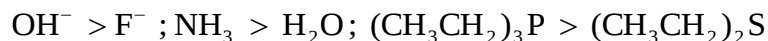
Sin embargo, como ya fue explicado, la basicidad y la nucleofilia son propiedades diferentes. En ambos casos, el nucleófilo (o base) forma un nuevo enlace.

Otro punto a considerar, es que la nucleofilia aumenta de arriba hacia abajo en la tabla periódica, al igual que el aumento de volumen y la polarizabilidad de los átomos, por ejemplo:



A medida que se va hacia abajo en una columna en la tabla periódica, los átomos son más voluminosos, con más electrones a mayor distancia del núcleo. Por lo que los electrones son retenidos con menos fuerza y el átomo es más polarizable, es decir, sus electrones se pueden mover con más facilidad hacia la carga positiva del electrófilo. Para un conjunto de nucleófilos similares la mayor polarizabilidad corresponde a una mayor nucleofilia.

Además, la nucleofilia decrece de izquierda a derecha en la tabla periódica conforme se da un aumento de electronegatividad (capacidad de un átomo para atraer hacia él los electrones) de izquierda a derecha. Es decir, los elementos más electronegativos retienen con más fuerza los electrones no enlazantes, que son menos reactivos a la hora de formar nuevos enlaces, por ejemplo:



El efecto estérico también influye sobre una molécula para que sirva como buen nucleófilo. Los grupos voluminosos en los nucleófilos dificultan la aproximación hacia el electrófilo y disminuyen la velocidad de reacción.

El impedimento estérico tiene poco efecto en la basicidad ya que la basicidad (Brønsted) implica el ataque sobre un protón que generalmente está accesible, sin embargo cuando un ataque nucleofílico a un átomo de carbono está implicado, una base voluminosa no se podrá aproximar al electrófilo tan fácilmente.

Otro factor que influye en la nucleofilia es la solvatación, particularmente en disolventes próticos (aquel que tiene protones ácidos que forman puentes de hidrógeno con los nucleófilos cargados negativamente). En un disolvente prótico, los aniones pequeños se solvatan más fuertemente que los grandes, es decir cuanto más concentrada esté la carga en el átomo reactivo mayor será la interacción con el disolvente. Cuando un anión reacciona como nucleófilo, se requiere energía para retirar alguna de las moléculas del disolvente. Si el ion es pequeño, como el fluoruro, se requiere más energía para poder separar las moléculas del disolvente ya que

está fuertemente solvatado, a diferencia de uno de mayor tamaño (por ejemplo el yoduro). Esta solvatación incrementada requiere más energía para separar molécula del disolvente y, por lo tanto, reduce su nucleofilia. La naturaleza del disolvente es de primordial importancia en una reacción de sustitución nucleofílica.

En agua y en otros disolventes próticos la energía de solvatación afecta la nucleofilia dado que la energía de solvatación disminuye la energía en el estado basal respecto a la del estado de transición, donde la carga es más difusa. Esto resulta en una mayor energía de activación. La solvatación en agua es un factor importante a la hora de disminuir el ataque nucleofílico de los tiolatos en comparación con otros medios, como el DMSO o el DMF (apróticos)[14]. Las constantes de velocidad determinadas para la reacción de intercambio tiol-disulfuro aumentan por un factor de 3×10^3 cuando se utilizan disolventes polares apróticos como DMSO y DMF en lugar de agua [28].

Entonces es importante resaltar que, la nucleofilia aumenta con la carga negativa, la basicidad y la polarizabilidad y disminuye por impedimento estérico y una mayor solvatación. Por lo tanto, que tan nucleófilo sea un tiolato se verá reflejado en la concentración de carga negativa y en su solvatación, que actúa como pantalla disminuyendo la nucleofilia.

1.1.6. Correlación de Brønsted

Existe un número de correlaciones lineales empíricas entre el logaritmo de la constante de velocidad de una reacción con el logaritmo de la constante de equilibrio de la misma especie.

En la práctica dichas correlaciones han demostrado ser una medida empírica útil de la relación que hay entre diferentes series de reacciones, y más importante, a menudo nos permiten predecir tendencias en reactividad para una serie de reacciones.

La correlación de Brønsted es una relación lineal de energía libre entre la nucleofilia (k_{RS^-}) y la basicidad (pK_a), la cual presenta la forma de la ecuación (7):

$$\log k_{RS^-} = \beta_{Nuc} pK_a^{RSH} + C \quad (7)$$

Donde k_{RS^-} es la constante de velocidad para el tiolato, y las constantes C y β_{Nuc} son parámetros empíricos característicos del blanco de reacción y de las condiciones de reacción [29]. β_{Nuc} corresponde a la pendiente del gráfico $\log k_{RS^-}$ vs pK_a^{RSH} [24] para la reacción del tiolato con ácido peroxinitroso (Figura 3).

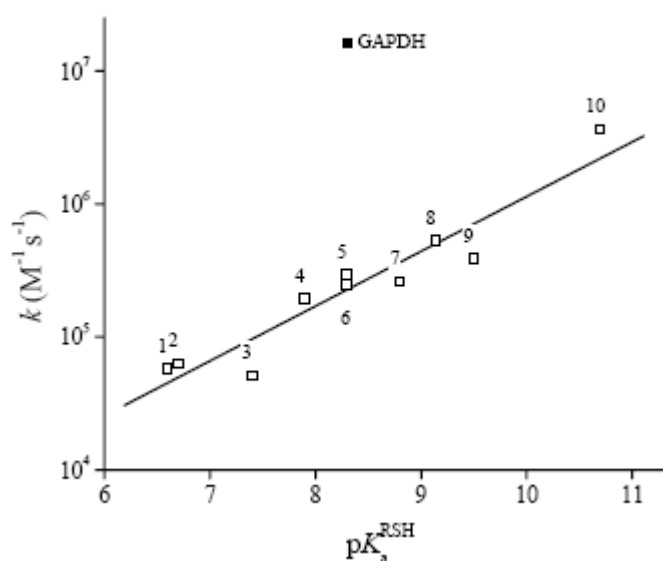


Figura 3. Gráfico de Brønsted para la reducción de ONOOH con tioles. Se aprecia que hay una buena correlación para la mayoría de los tioles ilustrados excepto para el tiol crítico de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Clave: 1 cisteína etil éster; 2 cisteína metil éster; 3 tripanotona; 4 penicilamina; 5 cisteína; 6 albúmina sérica humana (Cys34); 7 glutación; 8 mercaptoetilguanidina; 9 N-acetilcisteína; 10 ácido dihidrolipoico; GAPDH gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Modificado de [15]

La ecuación de Brønsted es una relación general que puede ser aplicada a todas las reacciones entre dadores y aceptores. Por ejemplo, la ecuación puede ser utilizada para una serie de bases que no reaccionen únicamente con un ácido sino también con un halogenuro de alquilo como aceptor de electrones u otro cualquier tipo de electrófilo [30].

En el ejemplo de la figura 3 se puede observar que la correlación entre parámetros fisicoquímicos sirve para evidenciar anomalías con respecto al comportamiento esperado y eso a su vez facilita la detección de casos donde se necesitan factores adicionales que contribuyen a la nucleofilia del tiolato para explicar la velocidad de la reacción y que están ausentes en los tioles de bajo peso molecular. Es importante hacer notar que los valores sobresalientes en la reactividad del tiol no están necesariamente vinculados a la función enzimática. En el caso ilustrado, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no es una enzima especializada en la reacción con peroxiácidos, pero comparte características estructurales y electrostáticas en su sitio activo que le permiten reaccionar con peróxidos mucho más rápido de lo que su nucleofilia indica[14].

Las relaciones de Brønsted son comunes en la literatura para diferentes reacciones que involucran al tiol como nucleófilo. Los valores de β_{Nuc} se encuentran en el intervalo de 0 a 1, y han sido utilizados para predecir e

interpretar las constantes de velocidad de tioles peptídicos con diferentes pK_a s [31][32][33]. Sin embargo, poco se sabe acerca de la aplicabilidad de la relación de Brønsted para residuos de cisteína en polipéptidos plegados o desplegados. En el contexto de una proteína, la nucleofilia está afectada en forma independiente al valor del pK_a .

Por ejemplo, experimentos realizados con la proteína peroxirredoxina 2 (Prx2) de glóbulo rojo para determinar la constante de velocidad en presencia de diferentes oxidantes (cloramina de taurina, ácido peroxinitroso y peróxido de hidrógeno) muestran diferencias significativas en los valores de k_{RS}^- . Siendo los valores reportados de constantes del orden de $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción de Prx2 con cloramina de taurina, de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción de Prx2 con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción con ácido peroxinitroso [34]. Las correlaciones de Brønsted construidas para la reacción de diferentes tioles de bajo peso molecular con cloramina de taurina, con ácido peroxinitroso o con peróxido de hidrógeno (Figura 4), muestran como el valor de k_2 de la enzima Prx2 difiere de una reacción a la otra, mientras que su valor de pK_a siempre es el mismo. (pK_a 5.3)

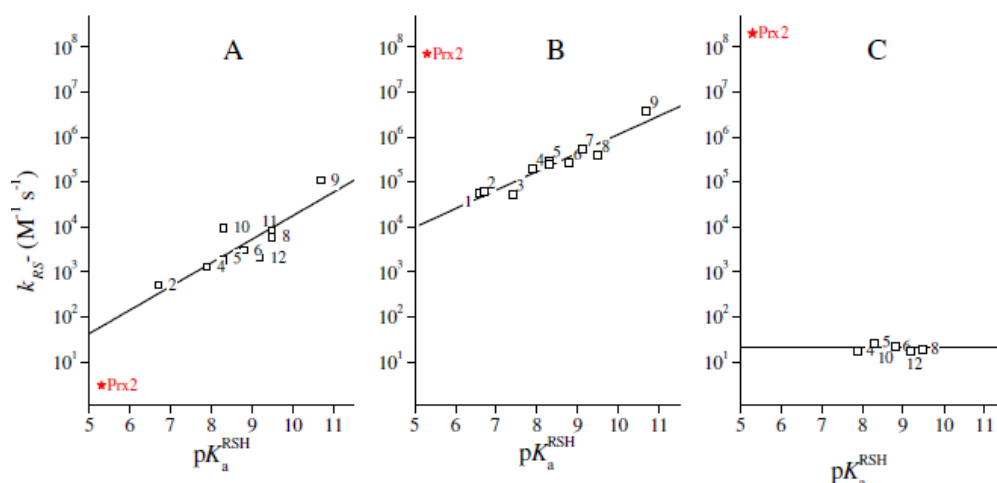


Figura 4. Correlaciones de Brønsted para la reacción de reducción de tioles de bajo peso molecular con cloramina de taurina (A), con ácido peroxinitroso (B) y con H_2O_2 (C). Figura obtenida de referencia [14]. Donde 1) cisteína etil éster; 2) cisteína metil éster; 3) tripanotona; 4) penicilamina; 5) cisteína; 6) glutatión; 7) mercaptoetilguanidinio; 8) *N*-acetilcisteína; 9) ácido dihidrolipoico; 10) cisteamina; 11) 2-mercaptoetanol; 12) ditiotritol. Prx2 corresponde a la proteína humana peroxirredoxina 2 y no está considerada en la regresión lineal.

El pK_a del tiol puede verse influenciado por una variedad de factores, tales como orientación y fuerza de dipolos cercanos, presencia de aminoácidos cargados cercanos, y la accesibilidad del disolvente [35][36][37], pero la reactividad del tiolato no está determinada por el pK_a .

1.2. Tioles de bajo peso molecular

En este apartado se dará especial importancia a la cisteína, al glutatión y a la homocisteína por ser componentes celulares críticos que presentan diversas funciones en el metabolismo y en la homeostasis.

1.2.1. Cisteína

La cisteína es un aminoácido (Figura 5) que comprende un amplio espectro de funciones, entre las cuales se incluye la formación de puentes disulfuro, unión a metales, donación de electrones, hidrólisis y catálisis redox.

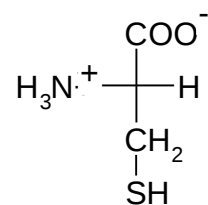


Figura 5. Estructura química de la cisteína reducida.

El grupo tiol de la cisteína es fácilmente desprotonado en condiciones de pH fisiológico, y el tiolato resultante es uno de los grupos funcionales más reactivos encontrados en proteínas, por lo que a menudo se encuentran tioles en forma reactiva en la célula [38]. El valor del pK_a del grupo tiol para la cisteína ha sido determinado en la literatura, siendo éste de 8.3 [39]. Debido a su alta reactividad, el grupo tiol de la cisteína tiene numerosas funciones biológicas.

De los aminoácidos capaces de integrar las proteínas es el de más baja concentración en células (30-200 μM). Los niveles de cisteína libre están muy bien regulados. El rango reducido de concentraciones se limita por la toxicidad que puede producir su exceso y por el mínimo necesario para el correcto funcionamiento del metabolismo.

La notable capacidad del azufre para adoptar múltiples estados de oxidación (Figura 6) genera no sólo los radicales tílo, los oxoácidos sulfénico (RSOH), sulfínico (RSO_2H), y sulfónico (RSO_3H) sino también otras especies oxidadas como, tiosulfatos (disulfuro-S-monóxidos), selenodisulfuros, nitrosotioles, revelando que la función de los tioles en las cisteínas no está circunscripta exclusivamente a la formación y ruptura de puentes disulfuro.

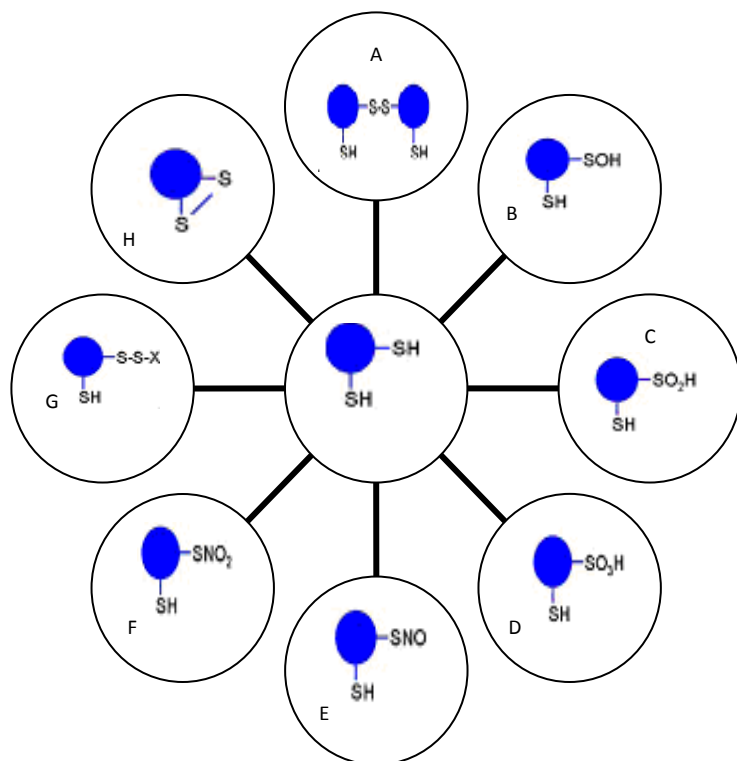
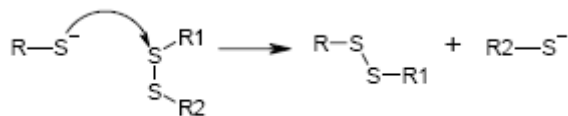


Figura 6. Modificaciones oxidativas de tioles proteicos y muchos tioles no proteico. Algunas mostradas aquí [40]. A: Enlace inter-disulfuro; B: Ácido sulfénico; C: Ácido sulfínico; D: Ácido sulfónico; E: Nitrosilación; F: Nitrosotiol; G: Tionilación; H: Enlace intra-disulfuro.

La flexibilidad de un único residuo cisteína para adoptar diferentes modificaciones post-traduccionales sugiere que varias de estas especies pueden participar en la señalización redox intracelular [41]. Cada uno de los estados de oxidación nombrados anteriormente presentan propiedades químicas y bioquímicas características, tales como comportamiento redox, unión a metales, acidez, nucleofilia y actividad catalítica. Si bien la cisteína y su especie oxidada, la cistina, pueden considerarse como las formas más abundantes de cisteína *in vivo*, las variaciones mostradas en la figura 5 han adquirido gran importancia en las investigaciones bioquímicas.

La reacción de intercambio tiol/disulfuro continúa siendo la reacción redox más común *in vivo* de los residuos cisteína, ecuación (8):



(8)

En donde el tiolato actúa como nucleófilo, desplazando un átomo de azufre que forma parte de un puente disulfuro y formando así un nuevo enlace con otro átomo de azufre.

Estas reacciones son un ejemplo de reacciones redox biológicas que involucran transferencia electrónica [1], de este modo la reacción del RSH con el GSSG para dar el disulfuro mixto GSSR y GSH, involucra la oxidación del azufre del RSH y la reducción de uno de los azufres del GSSG.

Esta reacción es utilizada para formar disulfuros estructurales en péptidos y proteínas, como son reversibles se encuentran involucradas en el mantenimiento del balance celular redox. Las enzimas oxidoreductasas de tiol/disulfuro, por ejemplo el sistema de la tioredoxina, cumplen un rol de reducir disulfuros proteicos a través de un mecanismo de intercambio tiol/disulfuro y en el proceso generan un disulfuro intramolecular en el sitio activo.

Además la reacción de intercambio tiol/disulfuro participa en la regulación de la actividad enzimática (S-tionilación o la S-glutationilación), en vías de señalización celular, y provee una fuente importante de catálisis redox [41]. Por ejemplo las glutarredoxinas tienen un sitio específico de unión a glutatión que le proporciona una alta especificidad por las reacciones de glutationilación/desglutationilación [42]. En su mecanismo de reacción, se forma un disulfuro mixto entre glutatión y la enzima. Evidencia del involucramiento de la glutationilación en la regulación y señalización redox viene en aumento [43]. Proteínas glutationiladas podrían actuar como sensores redox [44].

1.2.2. Glutatión

El glutatión también ha sido motivo de estudio por muchos investigadores, dado su importancia y abundancia en las células, se encuentra presente en altas concentraciones (0.1mM- 10mM) y es por lo tanto el tiol no proteico más abundante.

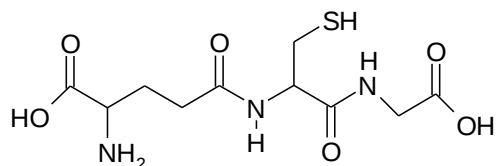


Figura 7. Fórmula liniangular del glutatión

El glutatión es un tiol de bajo peso molecular formado por tres aminoácidos (Figura 7), un residuo glicina, un residuo cisteína y un residuo glutamato (γ -Glu-CysH-Gly)[45]. En las células y tejidos sanos, más del 90% de glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% que existe en la forma disulfuro (GSSG). Un aumento en la concentración de GSSG respecto a GSH se considera como indicativo de estrés oxidativo [46]. Presenta dos características estructurales, el enlace γ -Glu, y el grupo $-SH$. El grupo $-SH$ se encuentra relacionado íntimamente con sus funciones, el GSH actúa como antioxidante, protegiendo ante el estrés oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno (ROS), manteniendo un ambiente reductor dentro de la célula que impide la oxidación de proteínas. Esto ocurre gracias a la oxidación del grupo tiol de la cisteína del glutatión.

1.2.3. Homocisteína

La homocisteína (Figura 8) es un tiol de bajo peso molecular, que al igual que la cisteína es un aminoácido azufrado, es un producto normal del metabolismo de la metionina.

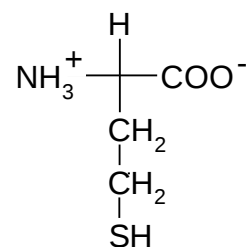


Figura 8. Estructura química de la homocisteína

La homocisteína no se encuentra en grandes cantidades en la célula, pues puede ser reciclada a través de la vía de recuperación de la metionina o de la vía de formación de cisteína. La homocisteína puede ser remetilada para reciclar metionina y puede volver a formar S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy). Parte de la homocisteína se dirige hacia el ciclo de la transulfuración inversa para formar cisteína. Cuando los niveles de homocisteína en la célula son elevados se puede observar la exportación hacia el plasma.

El aumento anormal en las concentraciones plasmáticas de homocisteína, es considerada un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson [47][48][49][50]. A su vez, en mujeres embarazadas se ha relacionado con deficiencias en el desarrollo del tubo neural de los fetos [51]. Los niveles considerados normales de homocisteína total en plasma se encuentran en un intervalo entre 5 y 15 μM . Los casos anormales se clasifican como hiperhomocisteinemia moderada (entre 16 y 100 μM) o

severa (cuando son mayores que 100 μM). Los mecanismos moleculares por los cuales la homocisteína se relaciona con el daño vascular no se conocen todavía.

Este metabolito por su grupo tiol, como cualquiera de los nombrados en la tabla 4, tiende a formar puentes disulfuro, tanto entre sus moléculas como con las de otros compuestos de grupo $-\text{SH}$. De modo que puede considerarse a la homocisteína y los disulfuros que ella forma como pares redox: forma reducida-homocisteína, formas oxidadas-disulfuros (homocistina, homocisteína-cisteína) [52].

1.3 Tioles Proteicos

La concentración de grupos $-\text{SH}$ proteicos (PSH) en la célula es mayor respecto a la del tiol metabólico más importante, GSH (2-10mM)[53]. La reactividad intrínseca de los grupos $-\text{SH}$ proteicos no depende únicamente del valor de pK_a , sino que de otras características estructurales, tales como accesibilidad, distribución de cargas y dipolos en el entorno del residuo cisteína catalítico. Para una proteína dada, la reactividad aparente del $-\text{SH}$ se ve influenciada por las características fisicoquímicas de la proteína misma (hidrofilicidad, carga, polarizabilidad, etc.)[54].

1.3.1 Nucleofilia de aminoácidos y péptidos

Recientemente se ha estudiado la cinética de las reacciones de aminoácidos con iones diarilcarbenio (Ar_2CH^+). Donde se vio que el tiolato de la cisteína es 10^4 veces más reactivo que los grupo amino primarios y es por mucho el grupo funcional más nucleofílico de los presentes en proteínas [55]. En función de esta reacción se vio que en el intervalo de $10.5 < \text{pH} < 12$, los aminoácidos reaccionan mucho más rápido en comparación con sus competidores, el hidróxido y el agua.

En el estudio de Mayr [55] los parámetros de nucleofilia N han sido determinados, para incluir a los aminoácidos en una escala nucleofílica simple basada en las reacciones con iones diarilcarbenio (Ar_2CH^+), la cual provee una directa comparación con los n -nucleófilos (aminas, alcoholes, fosfatos, tioles), p -nucleófilos (alquenos, arenos, organometálicos) y r -nucleófilos (dadores de hidruro) con otros.

Siguiendo en la misma línea del estudio de Mayr, los grupos amino primarios en los aminoácidos y los pequeños péptidos presentan nucleofilias relativamente cercanas en agua, y significativamente más altas que el hidróxido. Si bien el valor de pK_a de la prolina es comparable con el de la alanina y el del ácido aminobutírico,

su reactividad excede a la del resto de los aminoácidos por varios órdenes de magnitud. Sin embargo sólo la cisteína, donde el tiolato es más reactivo, es más nucleofílica [55].

En las proteínas solo un número limitado de grupos químicos con cadena laterales son capaces de actuar en catálisis (Figura 9).

Ionizaciones de las cadenas laterales de algunos aminoácidos

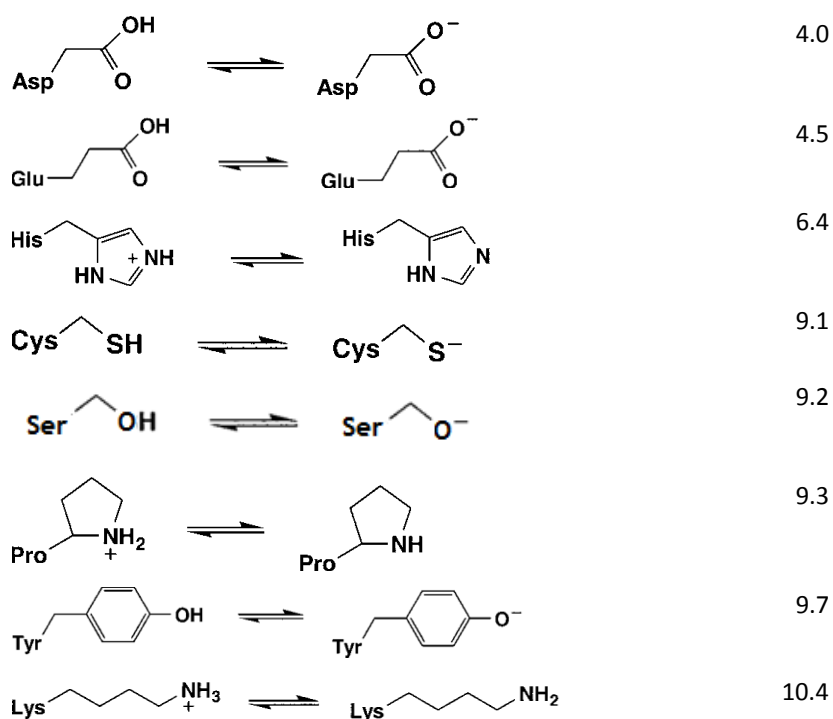


Figura 9. Valores de pK_a intrínsecos de los grupos de cadena lateral ionizable en proteínas en solución acuosa.

La multitud de reacciones catalizadas por enzimas resulta de la capacidad de estos grupos de actuar como nucleófilos, electrófilos, o como catalizadores ácido-base generales [56], y una de las claves de la adaptación de su función química radica en los estados de protonación.

Los grupos catalíticos más comunes en proteínas incluyen el carboxilo C-terminal, el grupo carboxilo del ácido aspártico y glutámico, el grupo imidazol de la histidina, el sulfihidrilo de la cisteína, el grupo amino de la lisina, el hidroxilo de la tirosina, el hidroxilo de la serina y el amino N-terminal (Figura 9).

La ionización está determinada por el valor de pK_a intrínseco del grupo y por el microambiente creado alrededor del mismo por la estructura proteica, la cual perturba el valor de pK_a intrínseco a uno aparente.

Este corrimiento en el valor del pK_a resulta de las interacciones del grupo catalítico con otros grupos total o parcialmente cargados, así como de la polaridad o constante dieléctrica del medio que lo rodea.

Las interacciones electrostáticas entre los grupos ionizables encontradas en la superficie de las macromoléculas son débiles y causan sólo sutiles perturbaciones en el valor de pK_a (<2 unidades). La suma de muchas de estas interacciones débiles contribuye a la estabilidad de proteínas nativas o plegadas. Sin embargo, el pK_a de los grupos catalíticos encontrados en el sitio activo de las enzimas a menudo se ven significativamente cambiados (>2 unidades)[57].

Para que los grupos químicos sean activados como nucleófilos, el protón debe ser disociado del átomo reactivo ya sea, del oxígeno, del nitrógeno o del azufre. Un pK_a menor hará más disponible el tiolato a cualquier pH, aunque hay que recordar que ambas especies coexisten a cualquier pH. Para que los grupos sean activados como electrófilos, el grupo debe estar en su forma protonada para actuar tanto como un dador de puente de hidrógeno o para aportar carga positiva localizada o total. Un pK_a mayor hará menos disponible el tiolato a cualquier pH.

Sin embargo, los grupos químicos mostrados en la figura 9, pueden actuar como nucleófilos, electrófilos, ácidos y bases, dependiendo de la enzima. Aunque no todos los grupos pueden actuar como todo, por ejemplo un tiol nunca va a ser electrofílico. La activación de estos grupos catalíticos es un efecto directo del microambiente creado alrededor del grupo por la estructura proteica.

- Factores proteicos que determinan la reactividad nucleofílica

La reactividad de tioles proteicos es un tema complejo, dado que involucra una amplia diversidad de enzimas que catalizan reacciones muy particulares, como transferencia electrónica, transferencia de grupos e isomerización, entre otras.

De acuerdo a lo explicado en la sección 1.1.5, la nucleofilia depende por un lado, de las propiedades moleculares y estructurales del nucleófilo, tales como su basicidad, polarizabilidad y la presencia de electrones de no enlace en el átomo vecino [27]. En el caso de los tiolatos proteicos estos factores no se aplican ya que en todos los casos el nucleófilo es la cisteína. Por otro lado la nucleofilia depende del entorno en el que se encuentre el nucleófilo, tales como solvatación, impedimento estérico, enlaces de hidrógeno, y la formación de estados de transición cíclicos, los cuales son más propensos a verse afectados por el entorno proteico [14].

El entorno en el cual se encuentran los tiolatos en las proteínas es parcialmente acuoso pero principalmente proteico, y como ya se ha descrito anteriormente, los residuos proteicos son los que proveen las interacciones dipolares, puente de hidrógeno y de carga que rodean al tiolato. Sin embargo los tiolatos en proteínas presentan una gran ventaja catalítica, las interacciones pueden verse alteradas debido a cambios conformacionales de la proteína, provocando una modulación de la reactividad del residuo catalítico [14]. De un punto de vista de la catálisis, el nucleófilo menos estable será el más reactivo y por lo tanto el más rápido en realizar el primer paso de reacción. Como fue evidenciado en modelos de centros Zn-tiolato de bajo peso molecular [58] los puentes de hidrógeno disminuyen la reactividad nucleofílica de los tioles [59]. Esto se debe a que las interacciones puente de hidrógeno estabilizan el tiolato, y como dependen de la estructura proteica, pueden verse modificadas durante el ciclo catalítico, modulando así la nucleofilia. La presencia de un puente de hidrógeno entre los residuos cisteína (C106) y glutamato (E18) de la enzima DJ-1 en el sitio activo de la misma, propone que el ácido carboxílico protonado del residuo E18 contribuye a la disminución del pK_a del residuo C106 reactivo y a la estabilización de una forma oxidada específica de la C106 [60].

Por otro lado, algunos tioles proteicos son notablemente ácidos, como se representa en la tabla 3; pero su reactividad no se ve disminuida como es de esperar en un gráfico de Brønsted (Figura 3). Algunos de los efectos del entorno proteico parecen disminuir el valor de pK_a sin alterar la nucleofilia. A continuación se detallan diferentes estudios realizados donde se observan estas peculiaridades.

Tabla 3. Algunos tioles proteicos notablemente ácidos.

Tiol	pK_a	Fracción ionizada a pH 7.4	Disponibilidad de tiolato en relación a cisteína
Cisteína	8.3	0.1118	1
Glutarredoxina 1[61]	3.2	0.9999	8.94
Papaína [62]	3.4	0.9999	8.94
DsbA [33]	<4	>0.9996	8.94
Proteína disulfuro isomerasa [63]	4.2	0.9900	8.93
Proteína tirosina fosfatasa 1B [19]	4.7	0.9981	8.93
Peroxirredoxina 5 [15]	5.1	0.9950	8.90

Peroxirredoxina 2	5.3	0.9921	8.87
DJ-1 [60]	5.4	0.9901	8.85
Creatina quinasa [22]	5.7	0.9804	8.77
Tiorredoxina [64]	6.7	0.8337	7.46

En primer lugar se ha visto en la proteína papaína que una disminución significativa en el valor del pK_a (4.6 unidades) podría deberse a interacciones carga-carga que actúan a través del espacio en el sitio activo de la papaína sin disminuir su reactividad nucleofílica [62]. Sin embargo, estudios realizados en la proteína tirosina fosfatasa mostraron que la mutación de un residuo histidina vecino a un residuo cisteína catalítico afecta tanto el valor del pK_a como la nucleofilia, aunque no se observa una tendencia en los cambios, indicando que el problema es un tanto más complejo que una simple correlación de Brønsted [19]. Por otro lado, un estudio muy representativo es el visto con la proteína citosólica glutatión S-transferasa (GST), la cual cataliza la conjugación del glutatión con electrófilos, donde el pK_a del glutatión disminuye luego de la unión a la enzima y se sugiere que se debe a una activación por sustrato [22]. El uso de varias mutantes de GST permitió modular el valor del pK_a del glutatión junto con la medición de su reactividad. Los resultados indican que los constantes de Brønsted son muy pequeñas (<0.25 [65], en comparación con los tioles de bajo peso molecular o hasta negativas [66]), indicando que la estructura proteica y la unión pueden modular la acidez del tiol de forma independiente a su nucleofilia.

1.3.2 Sulfirredoxina humana (hSrx), como modelo de estudio

La sulfirredoxina (Srx) es una enzima muy conservada en eucariotas, que reduce selectivamente peroxirredoxinas de dos cisteínas típicas sobreoxidadas (ácido sulfínico) hasta una forma catalíticamente activa (ácido sulfénico, Prx-Cys-SOH) en presencia de ATP y Mg^{2+} , reestableciendo la actividad peroxidasa y la función antioxidante de las Prx, así como también la regulación de vías de señalización [67].

La sulfirredoxina humana presenta una distribución ubicua en los tejidos, a pesar que sus niveles de expresión varían ampliamente [68]. Esta enzima se localiza principalmente en el citosol reparando a las enzimas PrxI y PrxII. Además la Srx puede ser importada hacia la mitocondria en condiciones de estrés oxidativo, donde puede reparar a la PrxIII, a pesar de no presentar una señal de localización mitocondrial [69]. Por lo tanto, la Srx

puede unirse y reparar todas las subclases de 2-Cys Prx, desde PrxI-IV, sin embargo no es capaz de unirse ni de reducir el ácido sulfínico correspondiente a la PrxV de dos cisteínas atípica [70].

Esta enzima contiene un residuo cisteína conservado que media la fosforilación del estado sulfínico de la peroxirredoxina (Prx-Cys-SO₂H), donde el resultante anhídrido sulfínico fosfórico (Prx-Cys-S(=O)OPO₃²⁻) se convierte en tiosulfinato (Prx-Cys-S(=O)S-R) con un tiol en solución actuando como reductor, por ejemplo, glutatión. Posteriormente el tiosulfinato se reduce a Prx-Cys-SOH mediante la oxidación de un equivalente de tiol (Figura 10) [67].

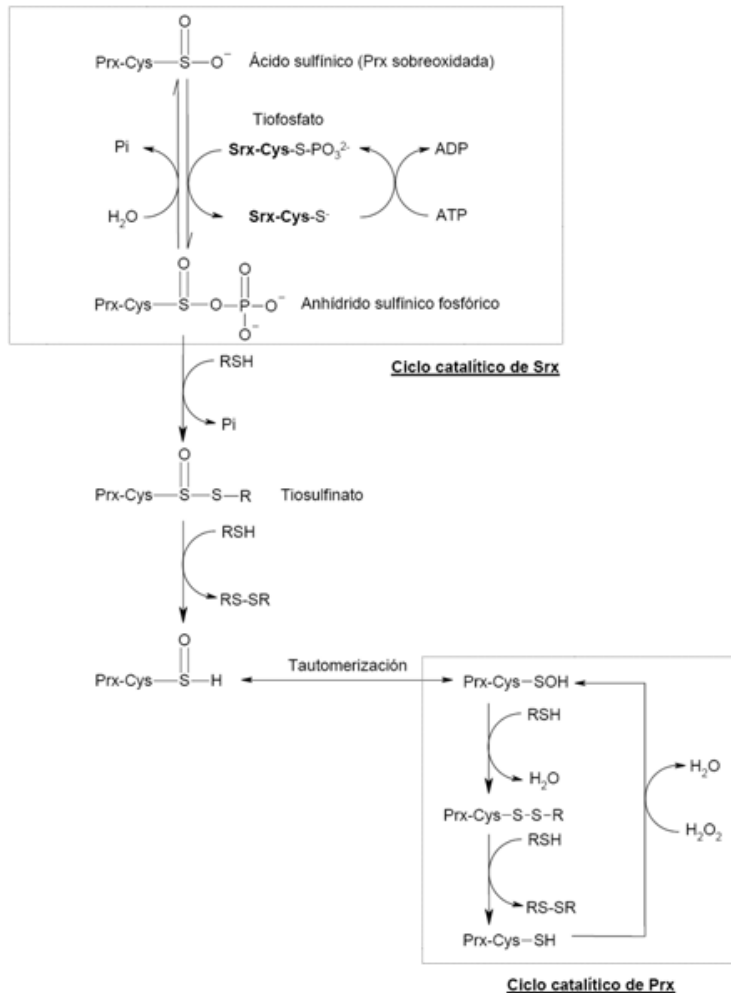


Figura 10. Secuencia de reacción para la reducción de la 2-Cys Prx sulfínica por la Srx [67].

Puesto que bajo condiciones fisiológicas *in vitro* los ácidos sulfínicos son muy difíciles de reducir a tioles, hasta hace poco dicha reacción era considerada como un evento biológicamente irreversible *in vivo*. En cambio el ácido sulfénico de una cisteína es rápidamente reducido por tioles en una reacción que involucra un ataque nucleofílico del tiolato al azufre, con la posterior eliminación de OH⁻. En el ácido sulfínico se encuentra

desprotonado a pH neutro y el O^{2-} no es un buen grupo saliente. Por lo que el ácido sulfínico de la Prx sería en primer lugar fosforilado, para generar un buen grupo saliente, que posteriormente se pueda sustituir por un tiol, obteniéndose fosfato y tiosulfinato [71]. La Srx participaría actuando como una fosfotransferasa dependiente de ATP para activar al grupo sulfínico de la Prx.

Los análisis de los productos de reacción por HPLC indican que el sitio de hidrólisis del ATP se da entre los fosfatos β y γ . Esta observación es la más razonable dada la proximidad del fosfato γ al residuo C99 (Figura 11).

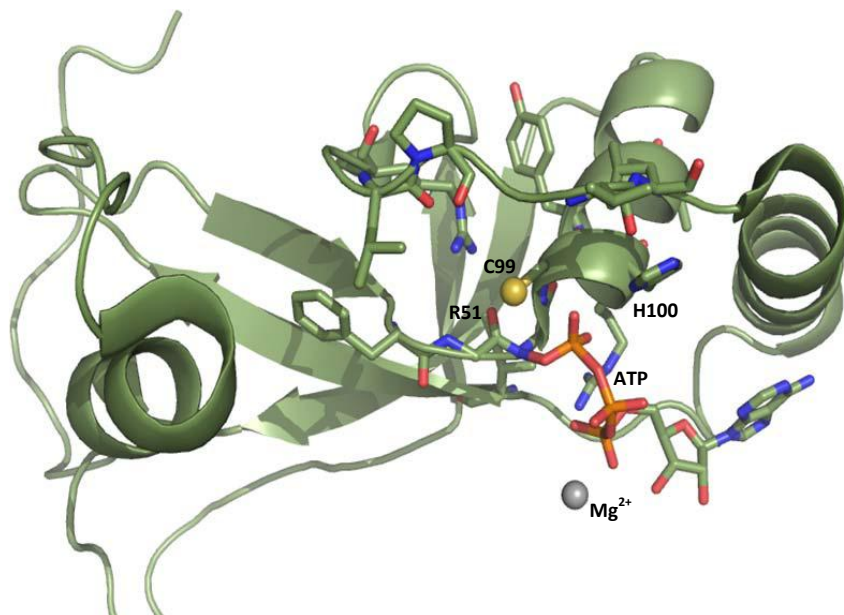


Figura 11. Estructura de la sulfirredoxina humana (hSrx, PDBID 2B6F) en complejo con ATP y Mg^{2+} . Ubicación espacial de la C99(en amarillo), R51, ATP(en rojo) y el ion Mg^{2+} (en gris) para ilustrar la relación de estructura en el sitio activo. Se muestran todos los residuos presentes a una distancia de 5 Å o menor con respecto de la C99.

Al realizarse la alquilación y una mutación del residuo C99 por una serina se vió una inhibición significativa de la hidrólisis del ATP, indicando que una variación estructural en la proximidad del sitio de unión es suficiente para impedir que el grupo $Cys-SO_2^-$ de la Prx se aproxime al fosfato γ del ATP [72]. La presencia de los residuos H100 y R101 en la Srx servirían para estabilizar la carga negativa del átomo de oxígeno que forma el enlace fosfodiéster β - γ , y otras interacciones Srx-Prx generarían una posición adecuada de la molécula de ATP para la catálisis. (Figura 12).

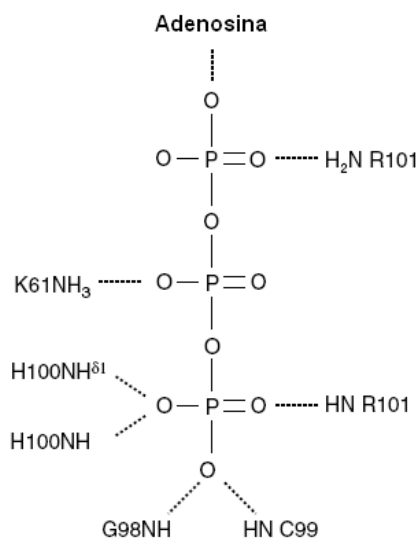


Figura 12. Residuos aminoacídicos de la hSrx en contacto con los fosfatos del ATP.

El ATP se une, independientemente de la PrxI, a un bolsillo de la Srx en donde los fosfatos del ATP interaccionan con Lys61, His100, Gly98, Cys99, y Arg101 de la hSrx (Figura 12).

A pesar de la unión independiente del ATP a la Srx, esta enzima no cataliza la hidrólisis del ATP por sí sola y no presenta residuos catalíticos típicos de la familia de las ATPasas. El modelado de un complejo Prx con ATP unido a la Srx indica que Asp187 de la PrxI está en contacto con la Srx unida a los fosfatos β- y γ- del ATP, y serviría como residuos catalíticos responsables de la hidrólisis del ATP en la formación del anhídrido sulfínico fosfórico (ver figura 10)[67].

Sin embargo, en algunos artículos no se propone el intermediario Srx-Cys-PO₃²⁻ sino la fosforilación directa de Prx-SO₂⁻ [73]. Entonces, para que se lleve a cabo el primer paso de la reacción, es decir, el ataque del grupo Cys-SpO₂⁻ sobre el fosfato γ del ATP, es probable que ocurran rearrreglos estructurales en la Prx;

Las estructuras cristalográficas indican que el grupo tiol del residuo C99 de la sulfirredoxina humana (hSrx) existe predominantemente en forma de anión tiolato como resultado de la interacción con el grupo guanidinio del residuo R51 adyacente [74]. Un análisis preliminar de diferentes estructuras depositadas en el Protein Data Bank mediante el programa PROPKA (<http://propka.ki.ku.dk/>) revela que la acidez del tiol podría depender en gran medida de los ligandos unidos a la enzima. Así, la proteína libre (PDBID:1YZS) tiene un pK_a calculado para la C99 de 7.35, la unión de ATP (PDBID:2B6F) aumentaría dicho pK_a hasta 10.64, mientras que la unión de fosfato inorgánico, un producto de la reacción (PDBID:1XW3), haría que el pK_a disminuyera hasta 4.98. Como se conoce la estructura de esta enzima se podrán interpretar los resultados en términos de factores estructurales

que expliquen reacciones muy rápidas o muy lentas con respecto a los tioles de bajo peso molecular [72][73][75].

1.4 Tioles biológicos, sus funciones e importancia

Las alteraciones causadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre el ADN, los lípidos y las proteínas son frecuentes en los organismos aeróbicos, tanto en procariotas como en eucariotas, siendo responsables de las patologías relacionadas al envejecimiento de los animales y a la senescencia de las plantas. Los compuestos que contienen tioles son muy importante en la protección de los sistemas biológicos contra lesiones oxidativas. En los últimos tiempos ha incrementado notoriamente las investigaciones que evidencian un rol y participación de los tioles en la regulación metabólica, en la transducción de señales y en la regulación de la expresión génica.

Los oxidantes, principalmente como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxidos orgánicos (RO-OH), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\text{HO}^{\bullet}$), solían ser considerados exclusivamente como especies peligrosas causantes de daños y disfunciones. Sin embargo, ahora se conoce que los oxidantes son producidos en los tejidos sanos, observándose un relativo control de su producción. Además, se cuenta con evidencia de que estos oxidantes en sí podrían servir como moléculas señalizadoras (mecanismos para vincular el H_2O_2 con los caminos de transducción de señales donde diferentes estados de oxidación de residuos específicos determinan las funciones de las proteínas y sus uniones a los ligandos)[76][77]. Las proteínas implicadas en la señalización deben cumplir dos requisitos para provocar una respuesta eficiente: los residuos regulatorios deben residir en posiciones específicas y las transformaciones del estado de oxidación deben ser rápidas y reversibles. Mientras las modificaciones post-traduccionales clásicas (por ejemplo, fosforilación, acetilación) provocan un único cambio en el residuo afectado, los diferentes estados de oxidación del átomo de azufre en los residuos cisteína y metionina permiten generar varias formas de una proteína [2]. Por lo tanto, la reacción entre oxidantes y biomoléculas es la base molecular para detectar alteraciones del estado redox celular.

El grupo tiol ($-\text{SH}$) presente en la cadena lateral del aminoácido cisteína es especialmente sensible a las reacciones redox y se ha establecido como un sensor redox. Los tioles pueden reaccionar con una variedad de oxidantes, para formar en varios casos una modificación covalente reversible. Esta modificación oxidativa

reversible, que incluye la formación de puentes disulfuro, es un potencial mecanismo para poder controlar la funcionalidad y actividad de una proteína.

No todos los tioles proteicos son importantes sensores redox, la gran mayoría de los tioles proteicos no reaccionan con oxidantes bajo las condiciones y las concentraciones a las que se encuentran en las células. Sin embargo, algunos tioles proteicos presentan una marcada reactividad frente a determinados oxidantes, y esto aporta una base en la señalización redox mediada por tioles. Los tioles reactivos frecuentemente forman intermediarios catalíticos en la reacción de muchas enzimas [78]. Esto puede significar que los tioles proteicos importantes en términos de la funcionalidad proteica son los mismos que aquellos susceptibles a las modificaciones redox. Esto permite a los oxidantes alterar la actividad de algunas proteínas por cambios en el estado redox de tioles funcionalmente esenciales, y sirve como un mecanismo de transducción de señales simple, el cual acopla el estado redox proteico directamente con la actividad funcional [79].

Tanto la cisteína como el glutatión tienen valores de pK_a s cercanos a 8 pero los valores de tioles proteicos varían dependiendo del entorno molecular, viéndose favorecida la ionización con la cercanía de residuos aminoácidos cargados positivamente. Dado que el pK_a del tiol proteico no aporta información directa sobre su reactividad con oxidantes, no es una regla a seguir ya que en el contexto de una proteína, el pK_a del tiol puede verse influenciado por una variedad de factores, como fue descrito en el apartado 1.3.1.

Algunos oxidantes podrían tener un acceso o una reactividad diferencial hacia los tioles proteicos. Esto daría una idea de modificaciones oxidativas específicas, donde los oxidantes potenciarían los efectos funcionales específicos. Es más, si múltiples oxidantes modifican un residuo cisteína, podría haber diferencias o consecuencias funcionales, dependiendo de las propiedades que fueron modificadas [40]. Siguiendo la misma línea de trabajo, Kim et al generaron un set de proteínas OxyR (activador transcripcional) altamente puras que difieren en modificaciones redox. Donde demuestran que un mismo residuo de cisteína puede ser modificado hasta alcanzar formas estables y transcripcionalmente activas, las cuales difieren tanto en la estructura como en la afinidad hacia el ADN y la respuesta cooperativa. El modelo propuesto por Kim et al, sostiene que las proteínas (por ejemplo, activadores transcripcionales) que reciben señales provenientes de diferentes vías de señalización redox, serían capaces de procesar la información en diferentes respuestas funcionales. [40].

Por lo tanto, la importancia del tiolato como especie reactiva presente en muchas de las enzimas metabólicas, y moléculas pequeñas principalmente aquellas que regulan y controlan el nivel redox de la célula. Se considera

en este trabajo ahondar en el tema de la reactividad del tiolato, correlacionando la misma con la nucleofilia y las constantes de acidez. Se pretende comprender la relación entre la acidez y la nucleofilia de tioles, y por lo tanto construir un marco de referencia dentro del cual se pueda comprender en el futuro la reactividad de tioles proteicos. Esto permitirá plantearnos hipótesis sobre el modo en que la nucleofilia puede encontrarse afectada, en caso de que lo este, o en caso de que no, que factores no estarían influyendo.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Generales

El objetivo general de éste trabajo es estudiar las constantes de acidez de tioles de bajo peso molecular por una metodología de reactividad, para construir correlaciones de Brønsted que permitan establecer la influencia de la nucleofilia a través de la reacción de alquilación con monobromobimano.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Objetivo específico 1.

Determinar el pK_a y nucleofilia de diferentes tioles de bajo peso molecular.

2.2.2. Objetivo específico 2.

Determinar factores estructurales, electrostáticos y de interacciones débiles que afectan la nucleofilia del tiolato de la sulfirredoxina humana, en algunas condiciones de unión a sustratos.

De este modo poder establecer la reactividad sobresaliente de la cisteína en estudio y además detectar los factores que aportan a la especificidad de la reacción enzimática que cataliza.

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos y materiales

Los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Applichem, Acros o Amresco. El glutatión (GSH), la N-acetil-cisteína, el L-cys-etiléster, el b-mercaptoetanol (B-ME) y el monobromobimano (mBBr) corresponden a Sigma-Aldrich. La cisteamina, ditiotreitól (DTT), el ácido mercaptoacético o tioglicólico, el DTNB, el MES, el TRIS, el ACES, y el ATP corresponden a Applichem. La cisteína (Cys) corresponde a Amresco, y por último el DTPA corresponde a Acros.

El vector de expresión de hSrx fue gentilmente cedido por Bruno Manta, en la forma de crioinóculo, a partir del cual se llevo a cabo la expresión de la misma.

Las medidas de cuantificación de tioles fueron realizadas en un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible usando las cubetas apropiadas.

Los espectros, medidas de fluorescencia, y cinéticas de pseudo-primer orden para aquellas reacciones muy rápidas ($t_{1/2}$ aproximadamente 2-3 minutos) fueron llevados a cabo en el Fluorímetro Aminco Bowman Series 2, conectado al accesorio Stopped-Flow (ProK.2000 Rapid Kinetics System; Applied Photophysics, Leatherhead, UK) con un tiempo muerto de 8 ms y paso óptico de 10 o 2 mm.

El conjunto de cinéticas de pseudo-primer orden correspondientes a las reacciones más lentas ($t_{1/2}$ aproximadamente 38 minutos), fueron realizadas en el lector de microplacas absorbancia/fluorescencia UV/vis con capacidad de obtención de espectros Varioskan Flash.

3.2. Producción, purificación y caracterización de hSrx

3.2.1. Cultivo e inducción

El stock de hSrx se obtuvo a partir de la expresión del vector pET15b-hSrx en bacterias E.coli de la cepa XL1Blue. Se encuentra en el laboratorio un crioinóculo de bacterias ya transformadas capaz de producir la hSrx (EC 1.8.98.2) humana, según la ubicación en el vector expresará una proteína con una secuencia N-terminal compuesto por una cola de 6 histidinas y un sitio de corte a trombina [68] a partir de las cuales se generaron

los cultivos. Se generaron crioinóculos de la cepa BL21 (DE3) plus que son para seguir trabajando y de la cepa XL21 Blue que son para la conservación del plásmido.

El plásmido recombinante fue diseñado para que la célula responda a la presencia de IPTG en el medio favoreciendo la producción de la proteína de interés. Se usó el medio Luria-Bertani (LB) (contiene por cada litro de medio 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl), para el crecimiento de las bacterias. La adición de ampicilina en concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ convirtió a los cultivos en selectivos para nuestras bacterias que poseían resistencia por la presencia del plásmido. Se preparó un erlenmeyer de 50 mL que contenía 10 mL de medio LB y 50 μL ampicilina, se inoculó con el crioinóculo y se dejó overnight a 30 $^{\circ}\text{C}$ (aproximadamente 14hs). Luego se procedió al cambio de escala, para lo cual se utilizó un erlenmeyer de 5L que contenía 1L de medio LB, 50 μL de ampicilina y los 10mL de cultivo. Se dejaron crecer durante 3hs a 37 $^{\circ}\text{C}$ hasta una turbidez (medida a 600 nm) de 0.6 y se indujo la expresión de nuestra enzima con IPTG 250 μM , 37 $^{\circ}\text{C}$ y 4hs. Una vez finalizada la inducción comenzó la cosecha, para esto se centrifugaron los cultivos con la intención de recoger las bacterias que decantan en el fondo. La centrifugación fue a 5000g durante 20 min. El sedimento de células recogido del litro de cultivo fue resuspendido en PBS y centrifugado nuevamente a 5000g durante 20min. El pellet obtenido fue de 3.68gr. Se resuspendieron los pellets en un amortiguador de lisis conteniendo 50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 20mM imidazol, e inhibidores de proteasas (1mg/mL lisozima, 5 μM pepstatina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1mM PMCF, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dnasa concentraciones finales).

3.2.2. Preparación del extracto libre de células

Luego de una hora de agregado el buffer de lisis, se procedió a lisar las células mediante ultrasonido, con 3 ciclos de 2min a máxima potencia, en hielo, dejando intervalos de 1 min para que se enfríen las muestras tratadas.

El sonicado se centrifugó a 20000g durante 1 hora a 4 $^{\circ}\text{C}$. La proteína se encontraba en el sobrenadante, por lo que se guardó en la heladera a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se le agregaron inhibidores de proteasas nuevamente. Se tomó una muestra para la electroforesis.

3.2.3. Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados

El primer paso de la purificación consistió en la realización de una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), se utilizó una columna Histrap de 5mL, donde la proteína se ve retenida en la columna dada la afinidad de los residuos histidina por los iones níquel inmovilizados a la matriz. Se pasó todo el volumen del lisado de las bacterias (aprox 20mL), se ajustó el flujo a 1mL/min, y se recogió en una fracción todo aquello que no se une, la fracción no unida (F1). Luego se procedió a la elución de la proteína utilizando un gradiente de imidazol 60-500mM. Para ello se comienza utilizando una mezcla de 10mL del amortiguador de unión¹ (20mM imidazol) y 1mL del amortiguador de elución² (500mM imidazol), correspondiendo a 64.3mM imidazol, se obtuvo la F2; de igual modo se continuó con diferentes mezclas de ambos amortiguadores, 116mM, 212mM y 500mM, obteniéndose las fracciones F3, F4, F5 y F6 respectivamente.

Se tomaron alícuotas de cada fracción para luego ser separadas por una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), a modo de determinar la presencia de la proteína en las diferentes fracciones para decidir cual utilizar en un segundo paso de purificación y monitorear los contaminantes aún remanentes.

3.2.4. Digestión con trombina

Una vez finalizado el primer paso de la purificación, se guardó la proteína en la heladera durante 24hs y luego se procedió a la proteólisis de la cola de polihistidina con trombina. Se utilizó una concentración final de trombina de 3 U/mg de proteína, se partió de un stock 200 U/mL y se le agregó 1mM DTT. La muestra permaneció toda la noche a temperatura ambiente, para luego continuar con el segundo paso de purificación. También en este paso se guardó una alícuota pre-trombinización y post-trombinización para la correspondiente electroforesis.

3.2.5. Cromatografía de exclusión molecular

El segundo paso de purificación consistió en realizar una cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando una columna Superdex 200 preparativa, (GE healthcare), equilibrando la misma con un amortiguador fosfato de sodio 50mM pH 7.4 con 150mM NaCl, 0.1mM DTPA. La fracción F4 excluida en la columna IMAC fue concentrada utilizando los centricones Amicon Ultra 5K de Millipore (debido a que el peso molecular de la hSrx

¹ Amortiguador de unión: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM Imidazol a pH 8.

² Amortiguador de elución: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM imidazol a pH 8.

es 13kDa) hasta obtener un volumen final de 500µl, se filtró el concentrado antes de pasarlo por la columna. La columna sembrada se acopla a un sistema de cromatografía líquida (ÄKTAFPLC™, GE Healthcare) con un flujo de 0.5mL/min detección espectrofotométrica en línea y colección de fracciones automatizada.

Se guardó alícuota de las fracciones más relevantes para ser sembradas en un gel de electroforesis.

3.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las fracciones de la purificación se analizaron por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida discontinuo (SDS-PAGE) con entrecruzamiento del 12 % para el gel de resolución y de 5 % para el gel concentrador, la desnaturalización de la muestra se realiza con calentamiento a 100 °C durante 3 minutos, en amortiguador de carga, detallado como trishidroximetilaminometano (Tris) 62.5 mM pH 6.8, con dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 %, glicerol 10%, β- mercaptoetanol (β-ME) 10% y azul de bromofenol 0.01 %. En todos los casos los experimentos de SDS-PAGE se realizaron de esta manera. El revelado de las proteínas se realiza por tinción con azul de Coomasie.

3.3. Procedimientos Generales

3.3.1. Reducción de tioles proteicos

Para la reducción de los tioles proteicos, la proteína de interés se incubó con 10 mM ditionitroetanol (DTT) en el amortiguador adecuado durante 30 min a temperatura ambiente (TA). El exceso de reductor fue removido mediante utilización de una columna de gel-filtración PD10, previamente equilibrada con un amortiguador 2x: Tris 30mM, ácido acético 15mM y Mes 15mM con DTPA 0.2mM y NaCl 240mM, a diferentes pHs medidos luego de cada reacción y a concentraciones variables de NaOH. A las fracciones recolectadas de la columna, se les determinó el contenido en tioles y se midió su absorbancia a 280nm para determinar su concentración.

3.3.2. Cuantificación de tioles de bajo peso molecular y proteicos

La cuantificación de tioles proteicos se realizó mediante el método de Ellman [80] que se basa en la reacción del ácido ditionitrobenzoico (DTNB) con los grupos tiol proteicos produciendo el anión coloreado 5-tio-3-nitrobenzoato (TNB⁻) el cual es cuantificado por su absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)[81]. Las muestras se incubaron con DTNB (200µM) en exceso en el amortiguador utilizado para el experimento a temperatura

ambiente. En todos los casos se realizó un control sin tior o proteína dado que a pH alcalino el DTNB puede hidrolizarse dando lugar a la liberación de TNB^- .

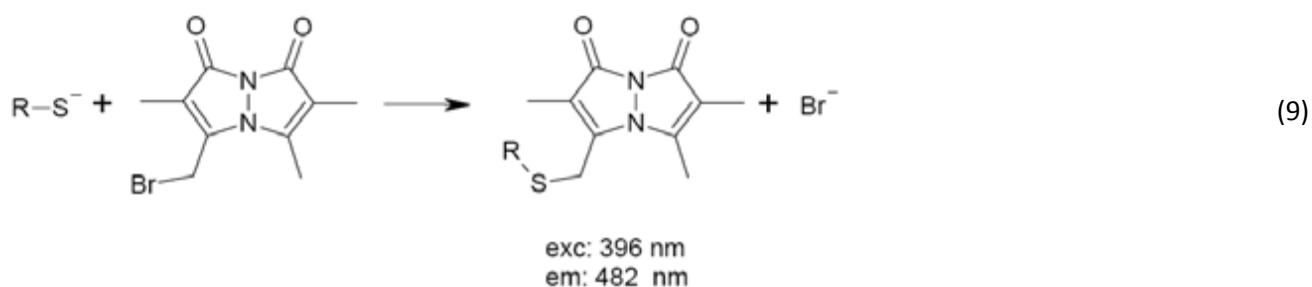
3.3.3. Herramientas computacionales

Todas las graficas y ajustes matemáticos fueron realizados usando el programa Origin 8.0 (Microcal, USA). El análisis de la secuencia primaria de la proteína de interés se realizó utilizando las herramientas disponibles en el sitio del ExPASy (<http://expasy.org>) cuyo SWISS PDB entry es Q9BYN0 (SRXN1_HUMAN), obteniéndose el nombre de Sulfiredoxin-1 correspondiente a la familia de las oxidoreductasa y cuyo numero es EC=1.8.98.2 [82]. La estructura tridimensional de la sulfiredoxina humana, así como cálculos y visualizaciones presentadas en este trabajo se realizaron a partir del archivo PDB correspondiente a la proteína de interés depositado en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>), con el código de acceso 1xw3 [83].

Los valores de pK_a fueron calculados por el servidor PROPKA (PROTEIN PKA PREDICTOR) (<http://propka.ki.ku.dk/>). Este utiliza un método basado en relaciones empíricas que usa coordenadas 3D [84].

3.4. Reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr)

Para determinar el pK_a de tioles de bajo peso molecular y tioles proteicos se emplea la alquilación con monobromobimano (mBBr) donde el alquilante genera un producto detectable. El monobromobimano (mBBr) es una opción que brinda relativa rapidez y muy buena sensibilidad. El reactivo alquilante no es fluorescente (figura 13), mientras que el tior alquilado posee una emisión fluorescente intensa con $\lambda_{\text{exc}} = 396 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 - 482 \text{ nm}$; ecuación (9).



La alquilación con mBBr ofrece otras ventajas por ser una reacción relativamente limpia con un solo producto posible por cada tiol, que usa un reactivo eléctricamente neutro cuya velocidad de reacción no se verá afectada por cargas eléctricas locales en la superficie de la proteína, y que no tiene equilibrios ácido-base que puedan complicar el análisis. Además, el producto de alquilación con monobromobimano no presenta cambios en la intensidad de fluorescencia con el pH de la reacción.

La reacción permite, en teoría, la alquilación sucesiva de tioles de diferente pK_a en la misma proteína. Adicionalmente, el producto fluorescente es sensible a los cambios en la polaridad del medio lo que permitiría evaluar la accesibilidad del disolvente al sitio del tiol en estudio. Finalmente, el mBBr puede funcionar como receptor en una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) cuando el donador es un triptófano, si se conoce la ubicación relativa de diferentes tioles con respecto a los triptófanos de una proteína y a partir de la presencia o ausencia de FRET se podría identificar cuál de los tioles es el que se está alquilando [85] (Figura 13b).

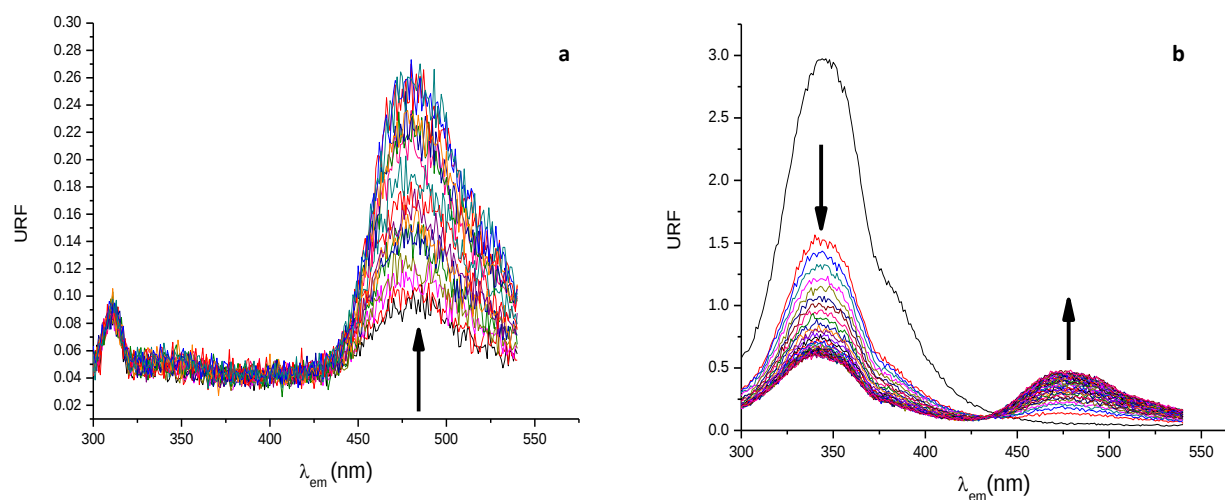


Figura 13. Espectro de emisión del mBBr en buffer (a) y Espectro de emisión de la SrX con mBBr a 37 °C en buffer (b). Se utilizó una $[mBBr]_0 = 52.4 \mu M$, $[hSrX] = 3.96 \mu M$ a pH 8.1 y una $\lambda_{exc} = 280$ nm. El registro se llevó a cabo cada 5 min.

Al realizar el espectro de emisión del monobromobimano en buffer (Figura 13a), se observa que el mBBr presenta un pico de emisión a 482nm. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia es muy baja (I_F máx = 0.24

URF) respecto a la intensidad de fluorescencia emitida por el producto de alquilación (I_F máx = 0.48 URF) (Figura 13b).

El monobromobimano presenta autofotólisis, por lo que sufre descomposición en presencia de luz, sin embargo este fenómeno a la longitud de onda de 280nm es de menor magnitud. Además se debe considerar el efecto de filtro interno, el cual ocurre porque otra molécula, en este caso el monobromobimano, absorbe las longitudes de onda en la que el fluoróforo emite radiación. Se observa un pico de emisión en el espectro de monobromobimano (Figura 13a) en 340nm, región donde emite el triptofano de la hSrx. Por lo que una parte de los fotones emitidos por el fluoróforo pueden ser absorbidos de nuevo. Los efectos del filtro interno cambian el espectro y la intensidad de la luz emitida y, por tanto, deben ser considerados al analizar el espectro de emisión de luz fluorescente.

En la figura 13b se observa una disminución de la fluorescencia del triptofano de la proteína y un aumento de la fluorescencia del producto alquilado a una λ_{em} , 482nm aproximadamente. Se confirma la transferencia de energía de un cromóforo excitado a otro cromóforo.

Por lo tanto, se determinó el pK_a de tioles de bajo peso molecular por medio de la reacción antes descrita y en condiciones estandarizadas de temperatura (37 °C) y fuerza iónica (0.15 M).

3.5. Determinación de las constantes de velocidad de reacción

3.5.1. Tioles de bajo peso molecular

Para llevar a cabo la determinación de las constantes de velocidad se utilizó el método integral en condiciones de pseudo primer orden. El experimento se dispone de modo que $[A_0] \gg [B_0]$ o viceversa. Si hay un gran exceso de A con relación a B, la concentración de [A] no presentará un cambio significativo durante la reacción. Obsérvese que la expresión de velocidad tiene la misma forma y la misma solución integrada que una reacción de primer orden.

Los datos se ajustaron a la ley de velocidad integrada descrita en la ecuación (10):

$$[A] = [A_0] e^{(-kt)} + A_{inf} + bt \quad (10)$$

Donde A es la variable dependiente (la fluorescencia en este caso) del tiempo (t), k la constante cinética de primer orden observada, k_{obs} , y el término b es la pendiente de la desaparición de producto dependiente de OH^- . La determinación de k_{obs} a diferentes concentraciones iniciales de tiol permite la determinación de la constante de segundo orden aparente, k_2 , de la reacción bimolecular entre tiol y monobromobimano, tal que,

$$k_{obs} = k_2 [\text{tiol}]$$

Mediante la manipulación de las concentraciones iniciales, hemos convertido una reacción bimolecular en una reacción de pseudo-primer orden. Sin embargo, a diferencia de una reacción de primer orden, en este caso no obtendremos el mismo valor de k_{obs} en experimentos realizados con distintas concentraciones iniciales de $[A_0]$.

Las reacciones se realizaron en amortiguadores cuya fuerza iónica se mantiene constante ($\mu = 0.15$) en el intervalo de pH de interés, ($6 < \text{pH} < 12$), a 37°C y en condiciones de pseudo-primer orden para los tioles de bajo peso molecular, con el tiol como reactivo en exceso.

En todos los casos, los tioles de bajo peso molecular se prepararon en amortiguador 4x: Tris 120mM, ácido acético 60mM, MES 60mM y NaCl 0.48M con DTPA 0.4mM a diferentes pH medidos luego de cada reacción y a concentraciones variables de NaOH. Para realizar los experimentos a pH mayores a 9 se utilizó un amortiguador 4x: Tris 62.4 mM, Aces 120mM, etanolamina 62.4 mM y NaCl 0.48M con DTPA 0.4mM

Las determinaciones de constantes de velocidad de alquilación se realizaron en general en el lector de microplacas ya que permite utilizar volúmenes pequeños y realizar varias determinaciones en paralelo. Para un análisis espectral más detallado se empleó el fluorímetro Aminco Bowman con el accesorio de Stopped-Flow.

Se llevaron a cabo reacciones a pH básico, cercano a un valor de 11.5, por lo que al tratarse de cinéticas muy rápidas, su estudio se realizó en el stopped flow asociado al fluorímetro, donde se coloca amortiguador fosfato a pH 12.5 en una jeringa y el tiol con el monobromobimano y ácido clorhídrico 500 μM en la otra, de modo de evitar comienzo de la reacción antes de tiempo. La reacción se dispara mediante el mezclado rápido ($< 8\text{ms}$) de iguales volúmenes de cada jeringa en condiciones de exceso molar de tiol y se registra la aparición en la fluorescencia del producto alquilado ($\lambda_{exc} = 396\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 482\text{nm}$) durante un intervalo de 0 a 120 segundos.

3.5.2. Tioles proteicos

Las constantes de velocidad de reacción para los tioles proteicos se determinaron utilizando el método integral. Se desarrolló un abordaje experimental donde se siguió la desaparición de la fluorescencia del triptófano de la proteína a medida que la proteína reacciona con el monobromobimano (Figura 13b). Es decir, por la transferencia de energía resonante desde el triptófano de la hSrx al producto de alquilación:

Excitación del Trp ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) $\rightarrow$ FRET $\rightarrow$ Emisión del Trp ($\lambda_{em} = 340\text{nm}$)

En el experimento se realiza en condiciones de pseudo-primer orden, utilizando un exceso de monobromobimano de al menos 10 veces la concentración de proteína a un valor de pH. La proteína ya reducida con DTT se siembra en una microplaca para fluorescencia junto con amortiguador ácido (MES 60mM, ácido acético 60mM, DTPA 0.4mM, NaCl 540mM), agua y diferentes concentraciones de monobromobimano. (65 μM - 260 μM). En el equipo se inyecta el amortiguador básico (Tris 120mM, NaOH 95mM). Este ensayo se realizó también en presencia de uno de sus sustratos (ATP). En cada caso se compara la nucleofilia esperada con el pK_a determinado a fin de saber si la reactividad frente a la reacción con mBBR está alterada de la misma forma que en las reacciones que la proteína cataliza.

3.6. Determinación de pK_a y nucleofilia

3.6.1. Tioles de bajo peso molecular

El registro de la fluorescencia a $\lambda_{exc} = 396\text{ nm}$ y un $\lambda_{em} = 482\text{ nm}$, permitió la determinación de las constantes de pseudo primer orden, k_{obs} , por medio de un ajuste exponencial (ecuación (10)).

A partir de las constantes de pseudo primer orden (k_{obs}) obtenidas para cada una de las diferentes concentraciones de tiol, siempre manteniendo un exceso de por lo menos 10 veces respecto a la concentración de monobromobimano, se procedió a realizar un gráfico de k_{obs} en función de la concentración de tiol utilizado. Utilizando un ajuste lineal en el programa Origin 8.0, se obtiene la constante aparente de segundo orden de la reacción en estudio a un determinado valor de pH y a 37° C, para cada uno de los tioles en cuestión.

Para determinar el pK_a de estos tioles de bajo peso molecular, se realizaron las corridas cinéticas a diferentes valores de pH. Se realizó un perfil de pH de la constante de reacción y se lleva a cabo un ajuste a un pK_a (ecuación (11)) o un ajuste a dos pK_a (ecuación (12)) en el programa Origin 8.0.

$$k = \frac{a_1[H^+] + a_2K_{a1}}{[H^+] + K_{a1}} \quad (11)$$

Donde a_1 y a_2 corresponden al valor de constante de velocidad de segundo orden independiente de pH para el tior y el tiolato, respectivamente. K_{a1} corresponde a la constante de acidez y k corresponde a la constante de velocidad de segundo orden aparente.

$$k = \frac{a_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]}} + \frac{a_2}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} + \frac{a_3}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1} \quad (12)$$

Donde a_1 , a_2 y a_3 corresponden al valor de constante de velocidad de segundo orden independiente del pH para las especies protonadas (a_1) y para las especies ionizadas (a_2 y a_3). K_{a1} , K_{a2} corresponden a las constantes de acidez y k corresponde a la constante de velocidad de segundo orden aparente.

3.6.2. Sulfirredoxina humana

El método de velocidades iniciales fue utilizado para la determinación del pK_a , el cual se basa en un análisis preciso de la formación de producto en las etapas tempranas de reacción. Durante dicho intervalo, las concentraciones de los reactivos han cambiado de forma despreciable, y la pendiente de un gráfico [producto] en función del tiempo define la velocidad inicial, denominada como v_0 [86]. Una vez que el valor de velocidad inicial ha sido determinado bajo un conjunto de condiciones, el procedimiento puede ser repetido variando las concentraciones de reactivos.

Para el caso de la proteína en estudio, la reacción se puede seguir por la fluorescencia directa del producto o por la transferencia de energía resonante desde el triptófano de la hSrx al producto de alquilación. Por lo que la pendiente de un gráfico intensidad de fluorescencia del producto alquilado en función del tiempo define la velocidad inicial.

Para este caso, a fin de economizar reactivos valiosos el perfil de pH se realiza a una sola concentración de proteína y de mBBR, simultáneamente a todos los pHs deseados. El valor de pK_a se obtuvo realizando un perfil

de pH para una concentración de proteína y una concentración de mBBBr a 37° C. Los resultados obtenidos de los cursos temporales en condiciones de velocidad inicial, se analizan a través de la pendiente de aumento de la fluorescencia a cada pH, cada valor de pendiente es proporcional a un valor de velocidad inicial. El perfil de pH así obtenido se ajusta a una función de pH apropiada para la determinación del valor del pK_a .

Para comparar la nucleofilia de un tiol de bajo peso molecular con un tiol proteico es necesario obtener la constante de velocidad. Por lo tanto se determinó una constante de velocidad de reacción por el método integral descrito anteriormente. El procesamiento de los datos obtenidos luego de la corrida cinética se realizó por medio de un ajuste a una exponencial (ecuación (10)). Se obtienen valores de k_{obs} para cada una de las concentraciones de mBBBr utilizadas, se procede a realizar un gráfico k_{obs} vs [mBBBr]. A partir de un ajuste lineal se obtiene la k_{app} dependiente del pH para la reacción de la sulfirredoxina con mBBBr a 37 °C. Con el valor de k_{app} obtenido a un pH de reacción y el perfil de pH al inicio de reacción, se extrapolan el resto de los valores de k_{app} . De esta forma se obtiene el perfil de pH adecuado para poder comparar con el de los tioles de bajo peso molecular.

3.7. Construcción de correlaciones de Brønsted

Con los valores de constantes de velocidad independientes de pH para las reacciones con monobromobimano y los pK_a s obtenidos se construyó una correlación de Brønsted. Esta correlación de Brønsted servirá como marco de referencia para la ubicación de cisteínas proteicas “normales”, es decir, que caen en la ubicación esperada por la correlación, y aquellas cuyo pK_a o cuya nucleofilia están alterados por el entorno proteico.

4. Resultados y Discusión

4.1 Expresión y purificación de hSrx

La primera parte de esta tesis consistió en la expresión y purificación de la proteína sulfirredoxina humana (hSrx) con el fin de cumplir con el segundo objetivo específico. Se usó como base el protocolo publicado por Chang y colaboradores [68], el cual se modificó con el objetivo de aumentar la cantidad y calidad de la muestra obtenida.

Se siembran en un gel desnaturalizante las alícuotas guardadas correspondientes al lisado de las bacterias, a una muestra de la resuspensión del pellet sonificado, y a las fracciones obtenidas de la IMAC. A modo de determinar la presencia de la proteína en las diferentes fracciones para decidir cuál utilizar en un segundo paso de purificación y monitorear los contaminantes aún remanentes. (Figura 14)

Como se observa en los carriles 7 y 8 (Figura 14), se encuentra presente la proteína (aproximadamente 14 kDa). Sin embargo, esta fracción eluida no presenta únicamente la proteína de interés, sino que dado el número de contaminantes remanentes se requiere un segundo paso de purificación.

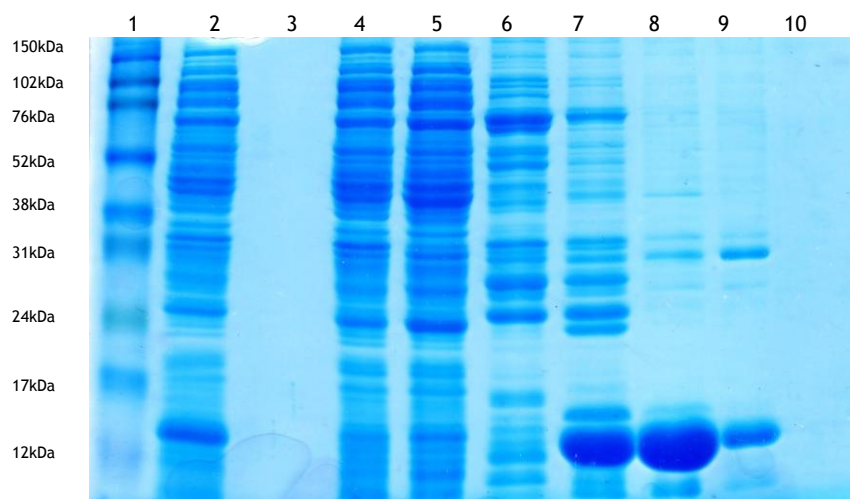


Figura 14. Gel de electroforesis SDS-PAGE 12% de las primeras etapas de la purificación de hSrx. Carriles 1: Marcador de peso molecular; 2: lisado de bacterias inducidas; 3: vacío; 4: Fracción no unida (FNU); 5: lavado 1; 6: fracción 14; 7: fracción 15; 8: fracción 16; 9: fracción 17; 10: vacío.

El perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular (Figura 15) indica que la proteína se encuentra presente en un pico correspondiente al de las fracciones de elución B8-B10, correspondiente a un volumen de retención de 104mL.

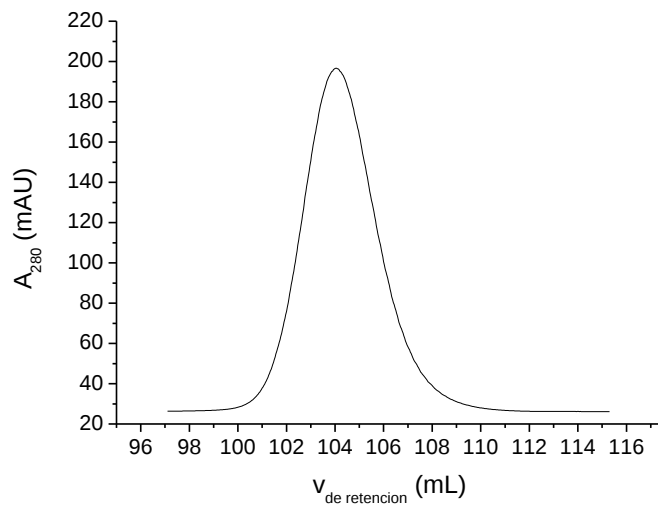


Figura 15. Perfil de elución de la sulfirredoxina humana en cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se sembraron 500 μ l de la Fracción 16 (carril 8 de figura 14) concentrado y filtrado en una columna Superdex 16/60 200 (GE) acoplada a un FPLC AKTA Purifier con flujo de 0.5 mL/min y detección en línea a 280 (-). El pico central (fracciones B8-B10) fue colectado y concentrado.

La electroforesis desnaturalizante correspondiente a las fracciones obtenidas por la cromatografía se muestra en la figura 16, las alícuotas guardadas correspondientes al paso de trombinización también fueron sembradas.

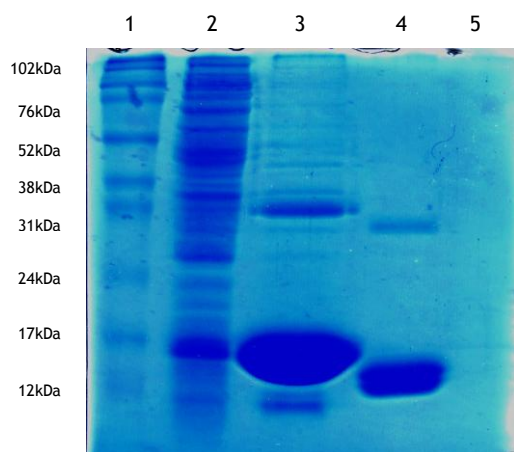


Figura 16. Gel de electroforesis SDS-PAGE 15% para las últimas etapas de la purificación de la hSrx. Carriles 1: MPM; 2: 20 μ L del lisado concentrado; 3: 20 μ L de muestra pre trombinización; 4: fracciones B8-B10 de SEC; 5: vacío

El análisis de la composición de las fracciones en los distintos pasos de la purificación realizada mediante electroforesis (Figura 15 y 16), muestra un enriquecimiento progresivo en una banda de ≈ 14 kDa correspondiente al monómero de hSrx.

Además, se determinó la masa molecular de la muestra luego de realizada la SEC con un espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF-TOF Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el modo lineal positivo. Se utilizó ácido sinapínico como matriz y se calibró de forma externa la medida utilizando una mezcla de péptidos estándares (Applied Biosystems).

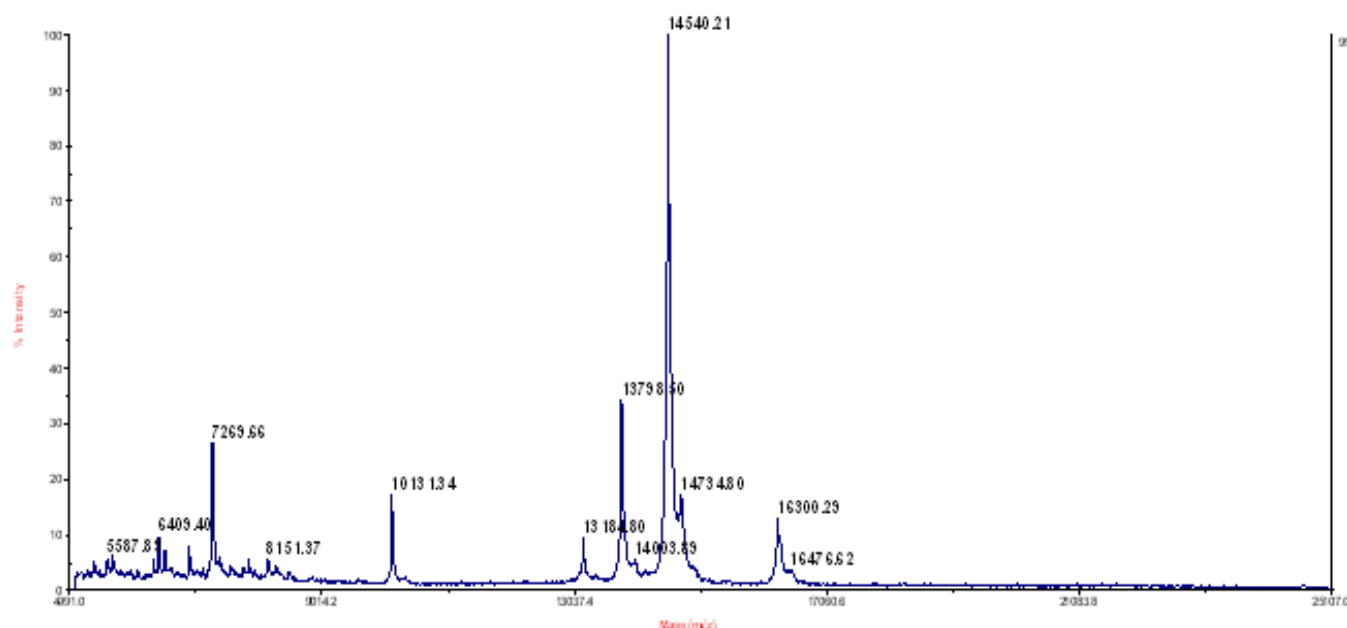


Figura 17. Espectro de masa de la sulfirredoxina humana. Se utilizó MALDI TOF/TOF en el modo lineal positivo. Se registró el espectro de masas de la Srx sin digerir y de la Srx post trombinización. Se indica la masa molecular de las especies monocargadas predominantes.

Como se puede ver en el espectro de masa (Figura 17), se encuentra una masa de la proteína monomérica sin cola de 14540 Da y una fracción de proteína que no ha sido trombinizada, es decir con cola, correspondiente a 16300 Da.

Se cuantificó la concentración de proteína total, considerando que la muestra presenta mayoritariamente la proteína hSrx, la concentración de proteína se determinó por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de

absortividad molar de la proteína nativa ya reportado [82], siendo este de $\epsilon = 12950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se obtuvo una concentración de proteína stock de $87.3 \mu\text{M}$ que luego fue almacenada en el freezer a -20°C para su posterior uso.

4.2. Determinación del pK_a y la nucleofilia de tioles de bajo peso molecular

La segunda parte de esta tesis consistió en la determinación del pK_a y nucleofilia de diferentes tioles de bajo peso molecular, y la construcción de la correlación de Brønsted correspondiente.

Los tioles de bajo peso molecular ensayados y estudiados fueron los siguientes, cisteína (Cys), L- cisteína etil éster (CysEE), cisteamina, glutatión (GSH), 2-mercaptoetanol (2-ME), 2-mercaptoacético, 2,3-dimercaptosuccínico (2,3-DMSA), captopril, N-acetil cisteína (N-acCys).

Como fue descrito en el apartado correspondiente a materiales y métodos, se determinaron las constantes de pseudo primer orden, k_{obs} , por medio de un ajuste exponencial (Figura 18a). Para el conjunto de k_{obs} obtenidos se procedió a realizar un gráfico en función de la concentración de tiol utilizado, (Figura 18b), con el objetivo de obtener la constante aparente de segundo orden de la reacción (k_{app}) como la pendiente de un ajuste lineal. Como se puede observar en el gráfico, la reacción se vuelve más rápida a medida que el pH aumenta.

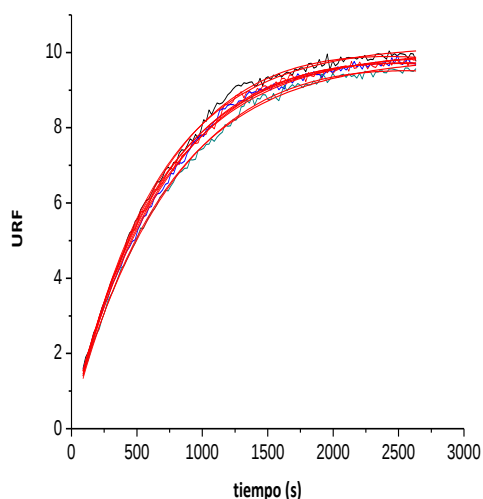


Figura 18a. Cursos temporales de la reacción de captopril con mBBBr en condiciones de pseudo-primer orden. $[\text{mBBBr}]_0 = 2 \mu\text{M}$ y $[\text{Captopril}]_0 = 47 \mu\text{M}$ a pH 7.73.

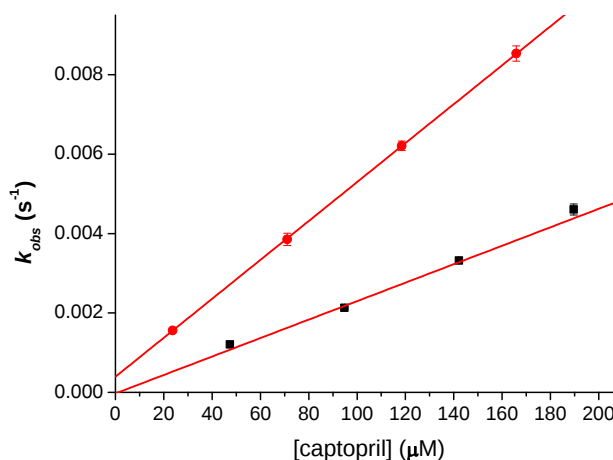


Figura 18b. Determinación de la constante de velocidad de segundo orden aparente. Se muestra la reacción a pH = 7.73 (■) y pH = 8.16 (●).

Por lo tanto, se midieron las k_{app} a distintos pH de reacción y se graficaron (Figura 18c). Los datos obtenidos fueron ajustados a una apropiada función de pH de acuerdo al número de equilibrios de ionización observados. La curva mostró un cambio de pendiente, la cual fue ajustada a un modelo de un pK_a de acuerdo a la ecuación (11). Los mejores valores ajustados fue, un pK_a de 9.7, y k_{RS^-} de $1650 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el caso del captopril.

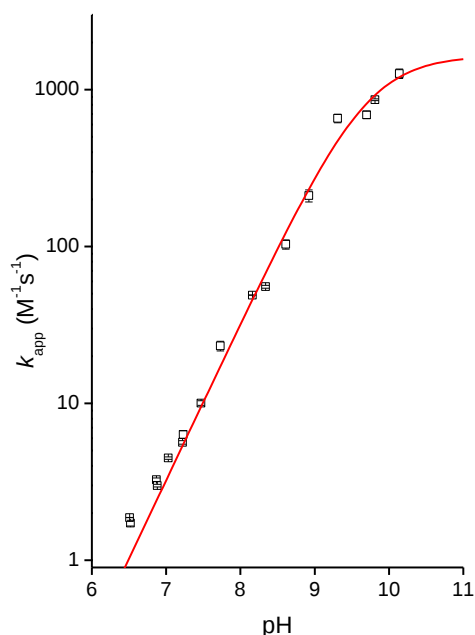
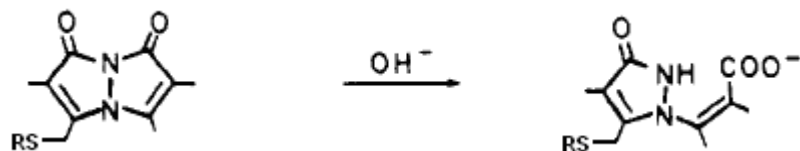


Figura 18c. Determinación del pK_a y constante de velocidad de segundo orden del captopril. El cambio de pendiente en el ajuste corresponde al pK_a experimental, (9.7 ± 0.1) . Los parámetros obtenidos del ajuste fueron, $a_1 = 0$, $a_2 = 1650 \pm 191$, $pK_a = 9.7 \pm 0.1$

Se observó en algunos experimentos un decaimiento en la fluorescencia del producto alquilado, (Figura 19), indicando la presencia de otra reacción que interfería con la reacción de interés. Esta segunda reacción podría deberse a la reacción del OH^- en solución con el anillo del bimanó, la cual ya ha sido descrita [87], para dar lugar a un producto de hidrólisis de anillo abierto, el cual no fluoresce (ec. 13)



(13)

La desaparición del producto es relativamente lenta y su interferencia puede ser evitada aumentando la concentración de reactivos para hacer la reacción más rápida. La reacción de interés fue convenientemente seguida en un equipo de cinética rápida (stopped flow).

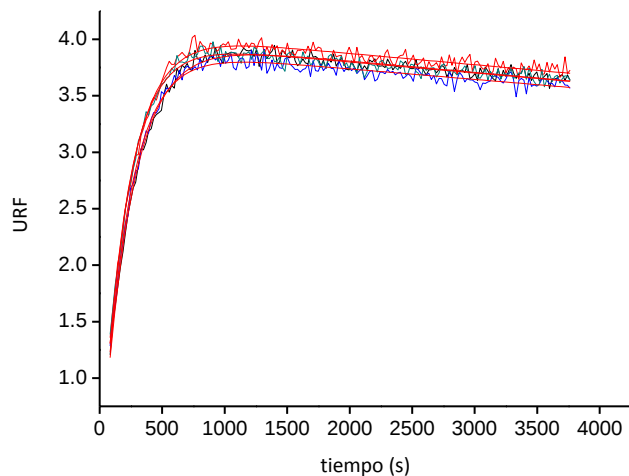
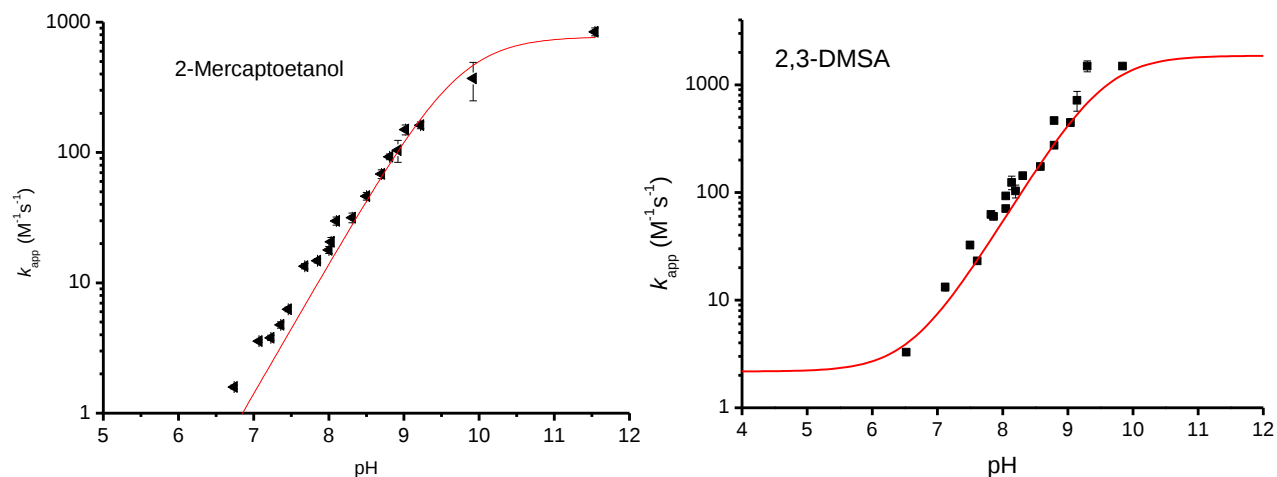


Figura 19. Reacción de cisteína etil éster con mBBR a pH 7.42. Se observa un decaimiento de la fluorescencia luego de comenzada la reacción.

Es así que se procedió a realizar cinéticas rápidas para los tioles en estudio a pHs muy alcalinos.

Se utilizaron los datos obtenidos en el stopped flow en conjunto con los obtenidos anteriormente, construyendo el perfil de pH para cada uno de los tioles. (Figura 20)



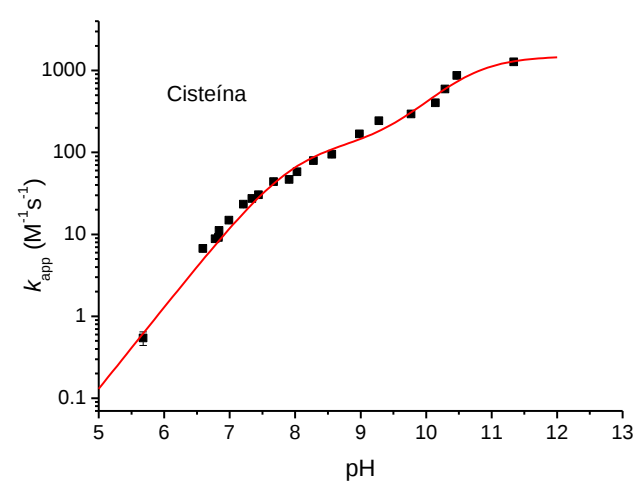
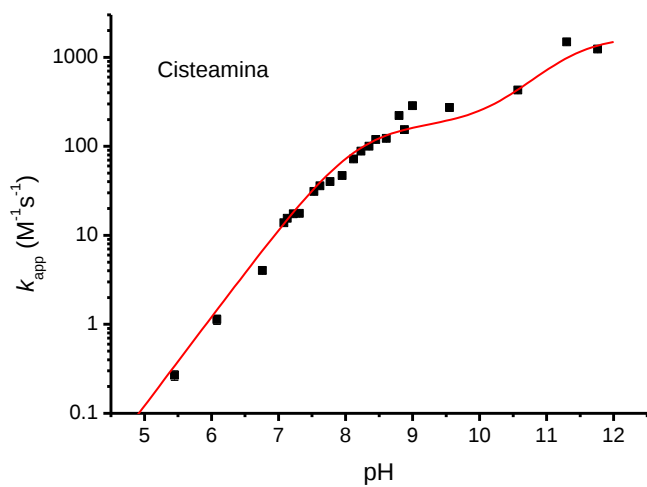
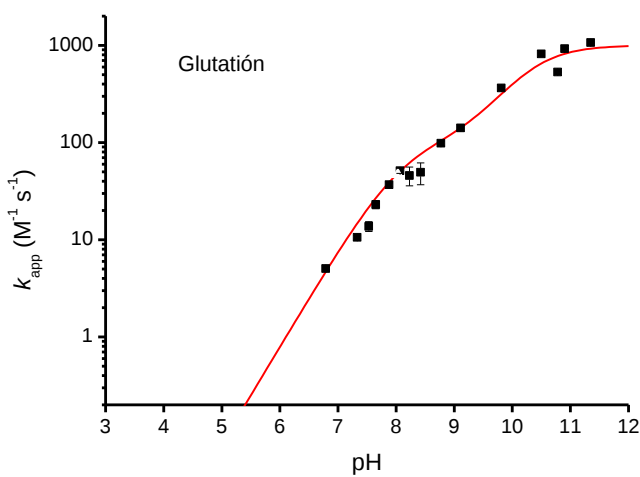
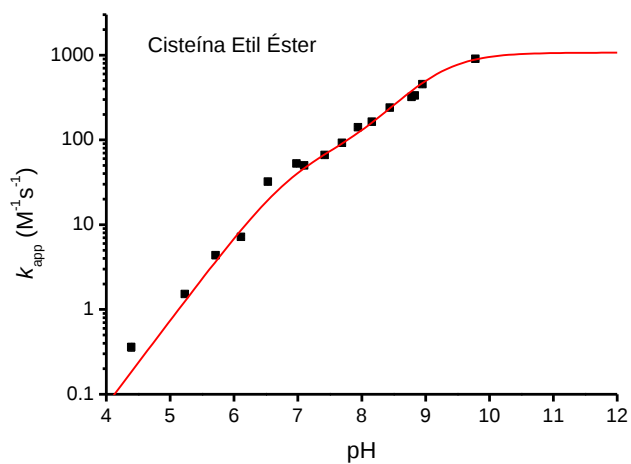
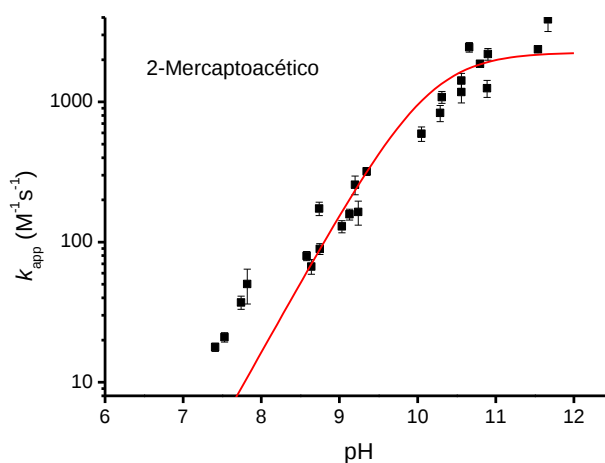
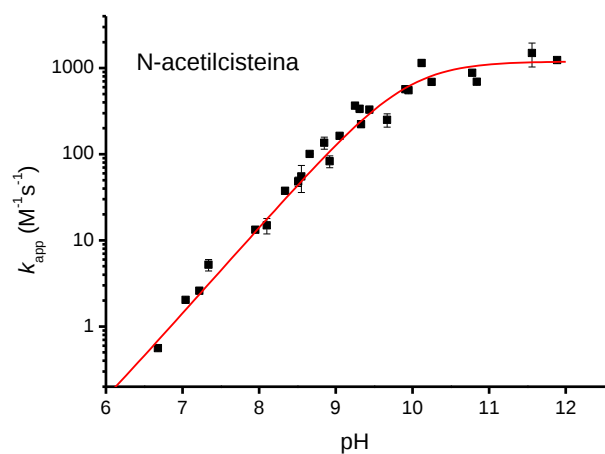


Figura 20. Perfil de pH para 2,3-DMSA, b-mercaptoetanol, N-acetilcisteína, 2-mercaptoacético, cisteína etil éster, glutación, cisteamina y cisteína, en el intervalo de pH de 6-12. Obteniéndose los valores de pK_a y k_2 para cada uno.

Se observa que algunos de los tioles ajustan a una función de dos pK_a , en lugar de a una función correspondiente a un pK_a , lo cual no era lo esperado dado que contamos solo con un grupo tiol. Si analizamos el caso de la cisteína, por ejemplo, la misma se encuentra formada por un grupo amino, un grupo carboxilo y un grupo tiol. El grupo amino esta muy cercano al grupo tiol, podría encontrarse protonado o no, provocando entonces la presencia de otro valor de pK_a . Los valores experimentales obtenidos para la cisteína son $pK_{a1} = 8.10 \pm 0.2$ y $pK_{a2} = 10.5 \pm 0.1$. Sin embargo, la N-acetil cisteína ajusta a una función de un pK_a , indicando que la presencia de un grupo amida no estaría afectando en la protonación del grupo tiol. Esto se explica por que el pK_a del grupo amida es aproximadamente de 14, mientras que el pK_a del grupo tiol de la cisteína es de 9, no interfiriendo.

A continuación, se resumen todos los valores de pK_a experimentales obtenidos para los diferentes tioles ensayados (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de pK_a obtenidos experimentalmente y valores de pK_a obtenidos de NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes.

Tiol de bajo peso molecular	pK_a (lit)	pK_a (exp)	$k(M^{-1} s^{-1})$
Cisteína etil éster (Cys EE)	6.6	6.99	72.9
		9.13	1070.5
Cisteamina	8.2	8.16	176.6
		11.27	1737.7
Cisteína (Cys)	8.3	7.98	124
		10.57	1494
Glutación (GSH)	8.8	7.99	64.95
		10.18	1126
2-Mercaptoetanol (2-ME)	9.5	9.74	775.1
N-Acetil cisteína	9.5	9.92	1192.9
2,3-Dimercaptosuccínico (2,3-DMSA)		9.54	1862.1
Captopril	9.6	9.7	1650.5
2-Mercaptoacético	10.6	10.1	2256.3

Con la finalidad de estudiar la reactividad y nucleofilia de diferentes tioles de bajo peso molecular, se construye una correlación de Brønsted (Figura 21) utilizando los valores de k_{RS^-} y de pK_a obtenidos experimentalmente para cada tiol (Tabla 4).

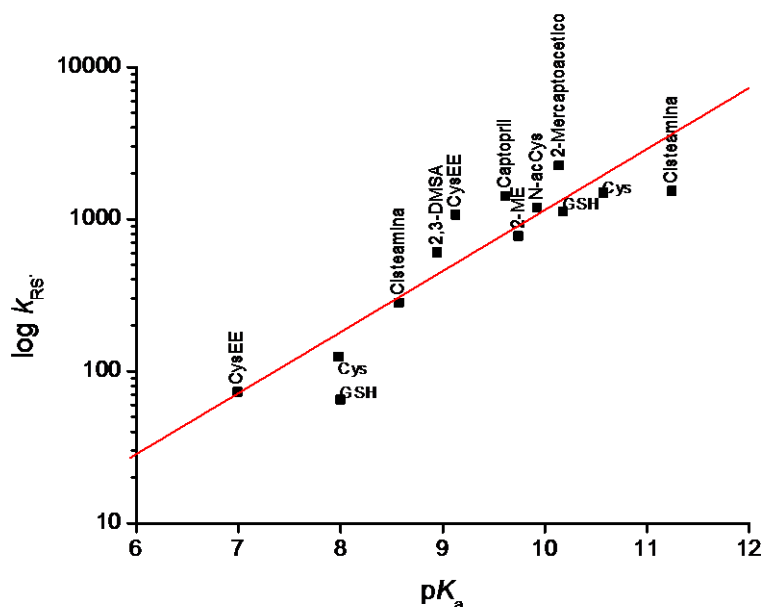


Figura 21. Gráfico de correlación de Brønsted para distintos tioles de bajo peso molecular con la reacción de alquilación con mBBr. Se observa una tendencia entre el pK_a del tiol y su reactividad, dada por la ecuación: $\log k_{RS^-} = 0.40pK_a - 0.96$

Como se puede observar en la figura 21, existe una tendencia lineal entre los diferentes tioles de bajo peso molecular, donde aquellos tioles que presentan un valor de pK_a alto se corresponden con valores de constante de velocidad de segundo orden independientes del pH mayores, indicando que el tiolato es mucho más reactivo. Los tiolatos más básicos (pK_a alto) son mejores nucleófilos, presentan una alta reactividad a la hora de atacar otra molécula, es decir, son más rápidos para desencadenar un ataque.

La correlación de Brønsted realizada utilizando la reacción de alquilación con monobromobimano confirma la relación entre dichas propiedades tal como ya ha sido reportado por diferentes autores pero para otras reacciones.

4.3. Determinación del pK_a y nucleofilia de hSrx

En la tercera parte de esta tesis se abordó la reactividad de la enzima sulfirredoxina humana.

Para ello, una vez que tuvimos la enzima purificada y con una calidad adecuada, nuestro interés particular se centró en determinar de manera precisa el pK_a y nucleofilia del residuo cisteína conservado.

Con el objetivo de incluir la reactividad de esta enzima dentro de la correlación de Brønsted y estudiar sus condicionantes de reactividad.

En un principio, para llevar a cabo el objetivo específico 2 se realizó un estudio con el programa PROPKA. Este programa se ha creado para predecir en cuestión de segundos y de forma automática los valores de pK_a basados en dicha relación empírica. Una interpretación teórica y la predicción de valores de pK_a proteicos son muy útiles para comprender muchos problemas bioquímicos. Grupos ionizables con valores de pK_a inusualmente altos o bajos suelen encontrarse en los sitios activos de proteínas, por lo que la identificación de valores de pK_a puede facilitar la identificación de sitios activos en proteínas, así como su mecanismo funcional [84].

El estudio teórico utilizando PROPKA revela tres comportamientos bien diferentes en la enzima libre, la enzima unida a ATP y la enzima unida a fosfato. Aunque PROPKA es una herramienta a menudo inexacta, es posible esperar que los tres comportamientos sean suficientemente diferentes como para observarse mediante nuestra reacción de alquilación. Desde el punto de vista de la nucleofilia es más difícil pronosticar el resultado, por una parte la nucleofilia aumenta acorde con la basicidad del tiolato y por otra parte en muchos casos de tioles reactivos en enzimas, la estabilización electrostática del ion tiolato afecta mucho su pK_a pero muy poco su nucleofilia [62]. El mejor de los escenarios posibles es aquel donde la unión del sustrato revela la reactividad aumentada del residuo activo. Para poder observar esto realizamos determinaciones de nucleofilia en presencia de fosfato inorgánico y ATP.

Los valores obtenidos se resumen en la tabla 5, tanto para la proteína libre (PDBID:1YZS), la proteína unida a ATP (PDBID:2B6F) como para la proteína en complejo con fosfato inorgánico, un producto de la reacción (PDBID:1XW3). Estos valores revelan que la acidez del tiol podría depender en gran medida de los ligandos unidos a la enzima. Así, la proteína libre tiene un pK_a calculado para la C99 de 7.35, la unión de ATP aumentaría dicho pK_a hasta 10.64, mientras que la presencia de fosfato orgánico, haría que el pK_a disminuyera hasta 4.98.

Tabla 5. Valores de pK_a aportados por PROPKA para la Cys99 y los residuos vecinos;
His100, Arg101, Arg51 predichos a partir de la estructura de la hSrx libre
(PDBID:1YZS), unida a ATP(PDBID:2B6F) y unido a fosfato orgánico(PDB ID : 1xw3)

	Srx libre		Srx unida ATP		Srx unida fosfato	
	pK_a	ubicación	pK_a	Ubicación	pK_a	Ubicación
Cys99	7.35	Superficie	10.64	Superficie	4.98	Superficie
His100	6.52	Superficie	6.80	Superficie	6.22	Superficie
Arg101	11.80	Superficie	11.37	Interno	11.28	Interno
Arg51	12.01	Superficie	11.18	Interno	11.21	Interno

Dejando a un lado el estudio computacional, se realizaron experimentos con hSrx sola, y con ATP a modo de obtener resultados del valor del pK_a y nucleofilia del residuo Cys 99.

Como fue descrito en el apartado de materiales y métodos, se adoptó un abordaje por velocidad inicial. Los puntos correspondientes a los primeros 10 minutos se ajustaron a una línea recta, para obtener el valor de pendiente inicial, el cual es proporcional al valor de velocidad inicial. (Figura 22)

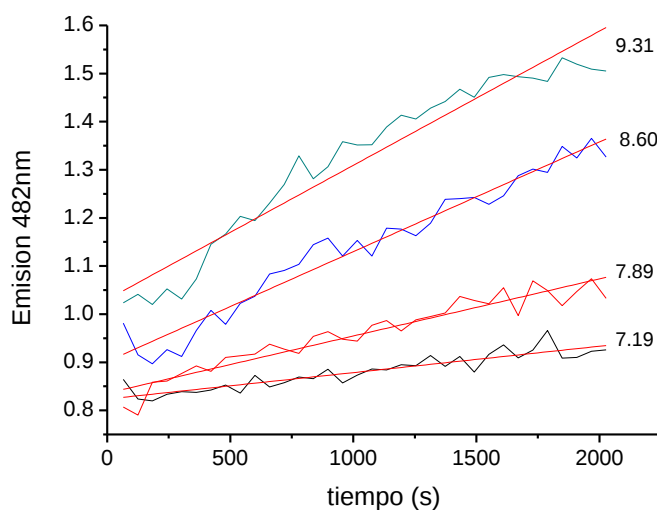


Figura 22. Cursos temporales de la reacción de hSrx con mBBR en condiciones de velocidad inicial.

Los valores de pendiente inicial fueron normalizados dividiendo por la concentración de monobromobimano utilizado.

Estos valores de pendiente normalizada se graficaron en función de los diferentes valores de pH utilizados en el rango de estudio (Figura 23).

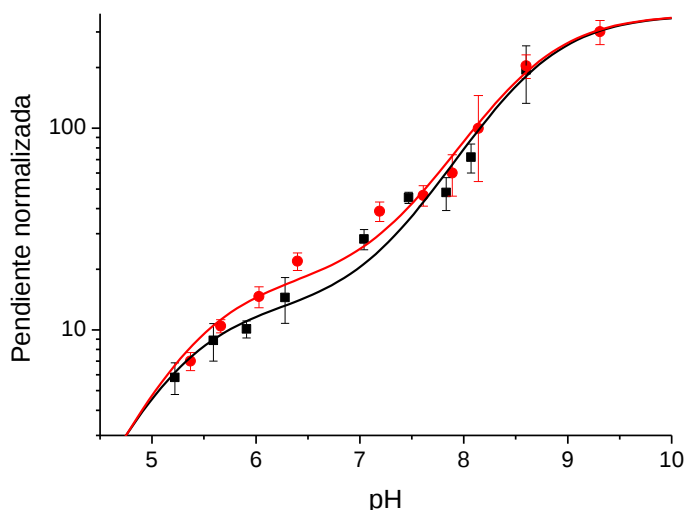


Figura 23. Determinación del pKa de la sulfirredoxina humana (hSrx) por medio de la alquilación con mBBR. El experimento se llevo a cabo a 37° C determinando las pendientes iniciales de la reacción en presencia (■) ausencia de ATP (●). Se utilizó una [hSrx] = 2.4μM, [ATP]₀ = 1.5mM, [mBBR]₀ = 2.8 μM para los valores de pH ácidos y una [mBBR]₀ = 1.4 μM para los valores de pH básicos.

La gráfica de la reacción de alquilación de la sulfirredoxina humana (hSrx) con mBBR (Figura 23, línea roja) muestra dos cambios de pendiente, por lo que fue ajustada a una función dos pKa. Sin embargo, solo hay un residuo cisteína en la proteína. Los mejores valores del ajuste son $pK_{a1} = 6.1 \pm 0.3$ y $pK_{a2} = 8.8 \pm 0.6$. A partir de la estructura cristalográfica se podría adjudicar la diferente reactividad a un residuo histidina (His100) muy cercano a la Cys99, que podría encontrarse limitando su ionización. Se han encontrado diferentes casos en la literatura, por ejemplo para la proteína tirosina fosfatasa de Yersinia [19], donde se observa un residuo histidina muy cercano a un residuo de cisteína en el sitio catalítico de la enzima, que altera el valor de pK_a de la cisteína. El imidazol de la histidina y el tiol de la cisteína podrían estar formando una especie zwitteriónica. Entonces el anión tiolato de la Cys99 podría verse estabilizado, provocando una disminución en el valor del pK_a , respecto al valor de una cisteína libre.

Otro ejemplo es la cisteína 25 de la papaína, la cual se encuentra muy cercana a un residuo histidina en el sitio activo de la enzima, y en donde la curva de perfil de pH de la cisteína 25 muestra dos cambios de pendiente. Al

igual que para la sulfirredoxina solo un residuo cisteína se encuentra en estudio. Se propone entonces que el pK_a del grupo tiol se vería aumentado cuando el residuo histidina se encuentra desprotonado [62]. La disociación del grupo tiol de la cisteína 25 podría involucrar dos tiolatos diferentes, de acuerdo a la presencia del imidazol, y por lo tanto se podrían determinar dos constantes de disociación ácidas. Las dos diferentes especies de disociación del grupo tiol se esperan que exhiban un comportamiento diferente frente al agente utilizado. Para nuestro estudio se observaría una diferencia de reactividad frente a la alquilación con monobromobimano. Por lo tanto, el comportamiento observado de la Cys99 de la hSrx estaría dado por la cercanía del residuo His100.

La reacción de sulfirredoxina con monobromobimano también se realizó en presencia de ATP (Figura 23, línea negra). No se observan diferencias significativas, sino que los valores obtenidos bajo esta condición son muy similares a los obtenidos en ausencia de ATP, corresponden a un valor de $pK_{a1} = 5.4 \pm 0.4$ y un valor de $pK_{a2} = 8.6 \pm 2$ a partir de un ajuste a dos pK_a .

Por otro lado, el estudio de la reactividad y la constante de velocidad de reacción se llevó a cabo mediante el método integral, como ya fue explicado en la sección materiales y métodos.

Como se muestra en la figura 24, se observa la transferencia de energía del triptófano de la hSrx al producto alquilado, donde se excita a una $\lambda_{exc} = 280nm$ y se registra la emisión de fluorescencia a una $\lambda_{em} = 340nm$. El ajuste de los datos a una exponencial permite obtener los valores de k_{obs} para cada una de las concentraciones de mBBBr ensayadas. (65 μM , 130 μM , 196 μM y 260 μM respectivamente).

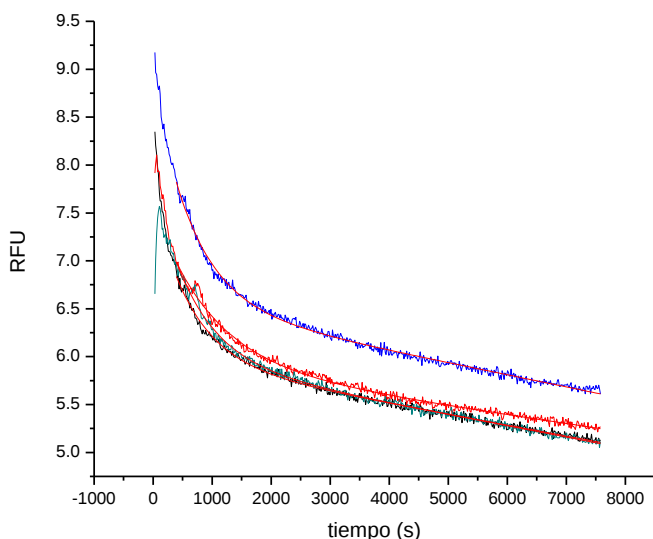


Figura 24. Curso temporal de la reacción hSrx con exceso de mBBBr a 37 °C y pH 8.39. Se registra el decaimiento de la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 280nm$, $\lambda_{em} = 340nm$) del triptófano de la hSrx por FRET al producto de alquilación. Se utiliza una $[hSrx]_0 = 2 \mu M$ y $[mBBBr] = 260 \mu M$.

La determinación de la constante de velocidad dependiente del pH se observa en la figura 25, siendo $k_{app} = (4.2 \pm 0.2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Además, se realizó el experimento en presencia de ATP, el cual no muestra diferencias significativas para el valor de constante de velocidad obtenido, siendo $k_{app} = (4.2 \pm 0.2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura 25, línea roja).

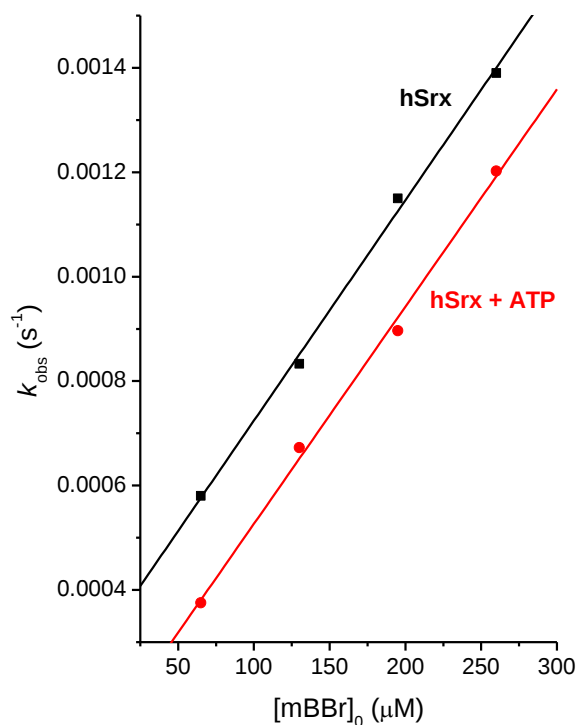


Figura 25. Determinación de la constante de velocidad de reacción dependiente del pH para la reacción de hSrx con exceso de mBBR (línea negra) y en presencia de ATP (línea roja). Se realizó a 37 °C, pH 8.37, con $[\text{hSrx}]_0 = 2\mu\text{M}$, $[\text{mBBR}] = 65\mu\text{M}$, $130\mu\text{M}$, $195\mu\text{M}$, $260\mu\text{M}$ y $[\text{ATP}]_0 = 1.4\text{mM}$.

Se esperaba un cambio en el valor de la constante de velocidad de reacción, dado que el ATP es uno de los sustratos de la reacción de la hSrx para reducir a las 2-Cys peroxirredoxina. Si bien no es del todo conocido el mecanismo de acción, el ácido sulfínico de la Prx sería en primer lugar fosforilado, para generar un buen grupo saliente, y posteriormente podría ser reemplazado por un tiol, obteniéndose fosfato y tiosulfonato. La Srx participaría actuando como una fosfotransferasa dependiente de ATP para activar al grupo sulfínico de la Prx [67].

Siguiendo en la misma línea de pensamiento, la sulfirredoxina estaría en contacto con el ATP por medio de diferentes residuos presentes en su sitio activo (ver figura 12), entre ellos la cisteína 99. Por un lado, el tiol desprotonado de la cisteína 99 atacaría al fosfato gamma del ATP, por lo que la unión del ATP aumentaría la nucleofilia del tiol, pero en ausencia de ATP la cisteína 99 debería ser menos reactiva.

Por otro lado, podría ser que el ATP bloqueara el ataque nucleofílico de la cisteína 99, en este caso la cisteína 99 debería ser más reactiva en ausencia de ATP.

Sin embargo, los resultados obtenidos no apoyan ninguna de las hipótesis sugeridas. A modo de buscar una explicación, se proponen dos opciones. Una opción es que no hay una transferencia de fosfato moderada por la C99. De este modo la cisteína no tendría porque ser nucleofílica.

La otra opción es que sólo si están los dos sustratos se verá aumentada la nucleofilia de la cisteína 99. Es decir, en presencia de peroxirredoxina 2 sobreoxidada y ATP, se vuelva una cisteína mucho más reactiva que simplemente una cisteína libre.

Con el valor de k_{app} obtenido a pH 8.4 y el perfil de pH obtenido con las pendientes normalizadas, se calculó el factor de proporcionalidad y así se extrapoló el resto de los valores de k_{app} correspondientes al rango de pH estudiado. (Figura 26).

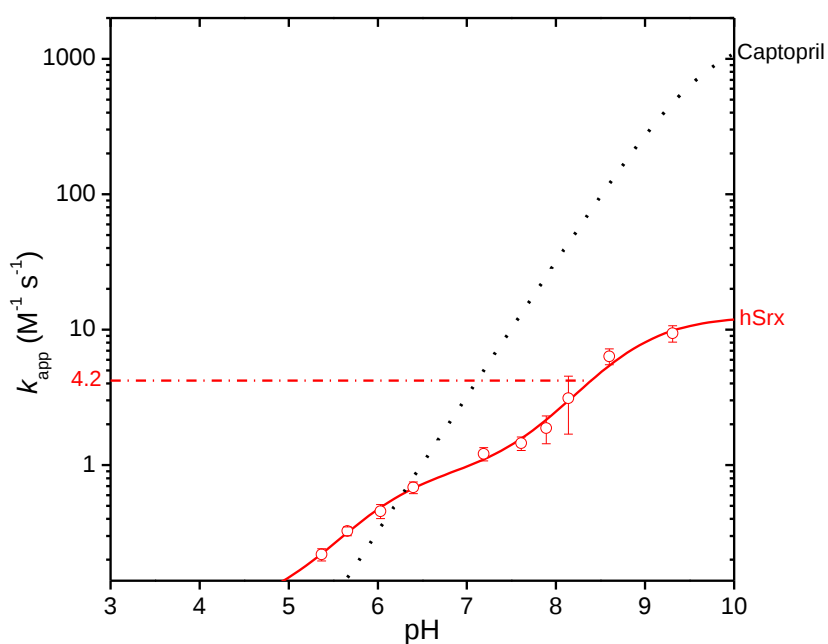


Figura 26. Perfil de pH de captopril (línea punteada) y de la sulfirredoxina humana (línea roja)

El perfil de pH obtenido para el captopril se utilizó como referencia para comparar con el perfil de pH obtenido para la hSrx. La cisteína 99 es marcadamente menos nucleofílica que el captopril. El perfil de pH de hSrx fue

ajustado a una función dos pK_a , donde se obtuvieron el valor de la constante de velocidad de segundo orden independiente de pH. Siendo $pK_{a2} = 8.7$ $k_{RS} = 12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sin embargo cabe remarcar, que a pH menores a 6.3 aproximadamente, la cisteína 99 de la hSrx es más reactiva que el captopril.

Finalmente, los valores de pK_a y k_{RS} obtenidos para la sulfirredoxina humana fueron introducidos en el gráfico de Brønsted obtenido para los tioles de bajo peso molecular con la reacción de alquilación con monobromobimano (Figura 27).

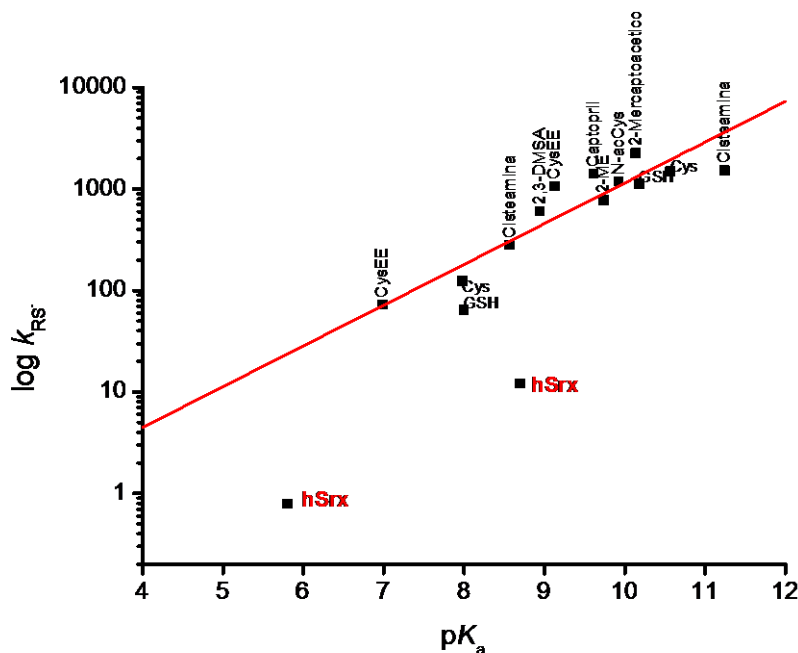


Figura 27. Gráfico de Brønsted obtenido para la reacción de alquilación de tioles de bajo peso molecular con mBBR, se introducen los valores de hSrx.

Como se puede observar en la figura 27, la cisteína de la sulfirredoxina cae por debajo de la tendencia. Esto indica que el tiol de la Cys99 es menos nucleofílico que los tioles de bajo peso molecular para una reacción inespecífica como la utilizada en este trabajo.

Más allá de todo el análisis realizado en función de las estructuras cristalográficas y los valores de pK_a proporcionados por el programa PROPKA, los resultados obtenidos en el contexto de esta tesina de grado indican lo contrario. Es decir, no se encuentran diferencias en la reactividad (nucleofilia) de la sulfirredoxina en

presencia o ausencia de sustratos o productos de la reacción pero la determinación del pK_a del residuo cisteína99 muestra una diferencia.

5. Conclusiones y perspectivas

Los estudios efectuados en el marco de este trabajo, han permitido profundizar en la reactividad del grupo tiol de la sulfirredoxina humana respecto a tioles de bajo peso molecular, aportando nuevos datos al estudio de determinantes de la reactividad nucleofílica.

Se logró satisfactoriamente la determinación del pK_a de diferentes tioles de bajo peso molecular. Por medio de estos resultados se construyó una correlación de Brønsted que podrá ser utilizada por otros investigadores y para futuros experimentos de nucleofilia y pK_a .

Se puso a punto una técnica de determinación de reactividad de tioles por medio de la reacción de los mismos con monobromobimano. Esta reacción permitió obtener valores de pK_a para tioles de bajo peso molecular muy cercanos a los reportados y los correspondientes valores de constante de velocidad de reacción de segundo orden independientes del pH.

La reacción presenta numerosas ventajas en comparación con otras técnicas, la detección de fluorescencia es extremadamente sensible, se pueden medir constantes de reacción con concentraciones de producto del orden de nanomolar.

Se continuará el trabajo profundizando en el residuo cisteína conservado de la sulfirredoxina, se propone realizar un experimento en presencia de ATP y peroxirredoxina 2, en busca de una posible explicación a su comportamiento.

A partir de la escala de nucleofilia obtenida para la reacción de alquilación con monobromobimano, se continuará caracterizando otros tioles proteicos. Se elegirán en principio aquellos residuos de cisteína proteicos que se conocen por ser muy reactivos en la célula y cuyos determinantes de reactividad puedan ser modulados. Diferentes factores estructurales proteicos (interacciones de carga, puentes de hidrógeno, y exclusión del solvente) contribuyen al aumento de la reactividad del tiol en reacciones muy específicas, pero estos factores no implican un aumento indiscriminado en la reactividad general del tiol.

6. Referencias

1. Jacob, C., Giles G., Giles, N.M. (2002). Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300: 1-4.
2. Aran, M., Rimmaudo, L., Wolosiuk, R.A. (2009). Reevaluación de los residuos cisteína en el señalamiento redox.
3. Cecil, R. (1963). En *The Proteins* (H. Neurath, Ed.) 1: 380-476. Academic Press: New York.
4. Boyer, P. (1959). En *The Enzymes* (P. Boyer, H.A. Lardy, K. Myrback., Ed.) 1: 516-520. Academic Press: New York.
5. Williams, A. (1969). En *Introduction to the chemistry of enzyme action*. McGraw-Hill: London.
6. Lindley, H. (1960). A study of the kinetics of the reaction between thiol compounds and choloracetamide. *Biochemical Journal*, 74: 577-584.
7. Ogilvie, J.W., Tildon, J.T., Strauch, B.S. (1964). A Kinetic Study of the Reaction of Thiols with P-Nitrophenyl Acetate. *Biochemistry*, 3: 754-758.
8. Smellie, R. (1970). En *Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes*. Academic Press: New york and London.
9. Blow, D., Steity, T. (1970). X-ray diffraction studies of enzymes. *Annu. Rev. Biochem*, 39: 63-100.
10. Linderstrom-Lang, K., Jacobsen, C.F. (1941). On the properties of 2-Methylthiazoline and their relation to the protein problem. *J Biol Chem*, 137: 443-455.
11. Russo, A., Bump, E.A. (1988).Detection and quantitation of biological sulfhydryls. *Methods Biochem Anal*, 33: 165-241.
12. Holliday, G.L., Mitchell, J.B., Thornton, J.M. (2009). Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. *J Mol Biol*, 390: 560-77.
13. Segel, I.H. (1976). *Biochemical Calculations*. New York: Wiley. 83-5.
14. Ferrer-Sueta, G., Manta B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., Denicola, A. (2011). Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem Res Toxicol*.
15. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoop, B. and Radi, R. (2007). Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch Biochem Biophys*, 467(1): 95-106.

16. Benesch, R., Benesch, R.E. (1955). The acid strength of the -SH group in cysteine and related compounds. *J Am Chem Soc*, 77: 5877-5881.
17. Rykkan, L.R., Schmidt, C.L.A. (1944). *Arch Biochem*, 5: 89.
18. Nagy, P., Winterbourn, C.C. (2010). Redox chemistry of biological thiols, en *Advances in Molecular Toxicology*, (C.C. Winterbourn, Ed.) Elsevier, B.V.
19. Zhang, Z.Y., Dixon, J.E. (1993). Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry*, 32(36): 9340-5.
20. Nordstrand, K., Aslund, F., Meunier, S., Holmgren, A., Otting, G. and Berndt, K. D. (1999) Direct NMR observation of the Cys-14 thiol proton of reduced Escherichia coli glutaredoxin-3 supports the presence of an active site thiol-thiolate hydrogen bond. *FEBS Lett*, 449(2-3): 196-200.
21. Shaked, Z., Szajewski, R.P., Whitesides, G.M. (1980). Rates of thiol-disulfide interchange reactions involving proteins and kinetic measurements of thiol pKa values. *Biochemistry*, 19(18): 4156-66.
22. Atkins, W.M., Wang, R. W., Bird, A. W., Newton, D. J. and Lu, A. Y. (1993). The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. *J Biol Chem*, 268(26): 19188-91.
23. Hawkins, H.C., Freedman, R.B. (1991). The Reactivities and Ionization Properties of the Active-Site Dithiol Groups of Mammalian Protein Disulfide-Isomerase. *Biochemical Journal*, 275: 335-339.
24. Friedman, M., Cavins, J.F., Wall, J.S. (1965). Relative Nucleophilic Reactivities of Amino Groups and Mercaptide Ions in Addition Reactions with α,β -Unsaturated Compounds. *J Am Chem Soc*, 87(16): 3672-3682.
25. Swain, C.G., Scott, C.B. (1953). Quantitative Correlation of Relative Rates. Comparison of Hydroxide Ion with Other Nucleophilic Reagents toward Alkyl Halides, Esters, Epoxides and Acyl Halides. *J Am Chem Soc*, 75(1): 141-147.
26. Edwards, J. O. (1962). Nucleophilic displacement on oxygen in peroxides, En *Peroxide reaction mechanisms* (Edwards, J. O., Ed.) pp 67-106, Interscience Publishers, New York.
27. Edwards, J.O., Pearson, R.G. (1961). The Factors Determining Nucleophilic Reactivity. *J Am Chem Soc*, 84: 16-24.
28. Singh, R., Whitesides, G.M. (1990). Comparisons of Rate Constants for Thiolate-Disulfide Interchange in Water and in Polar Aprotic Solvents Using Dynamic ^1H NMR Line Shape Analysis. *J Am Chem Soc*, 112: 1190-1197.
29. Bulaj, G., Kortemme, T., Goldenberg, D.P. (1998). Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*, 37: 8965-8972.

30. Bordwell, F.G., Hughes, D.L. (1982). Thiol acidities and thiolate ion reactivities toward butyl chloride in dimethyl sulfoxide solution. The question of curvature in Broensted plots. *J Org Chem*, 47: 3224-3232.
31. Darby, N.J., Creighton, T.E. (1993). Dissecting the disulphide-coupled folding pathway of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Forming the first disulphide bonds in analogues of the reduced protein. *J Biol Mol*, 232: 873-896.
32. Rabenstein, D.L., Weaver, K.H. (1996). Kinetics and Equilibria of the Thiol/Disulfide Exchange Reactions of Somatostatin with Glutathione. *J Org Chem*, 61: 7391-7397.
33. Nelson, J.W., Creighton, T.E. (1994). Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry*, 33: 5974-5983.
34. Peskin, A.V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., Winterbourn, C. C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem*, 282(16): 11885-92.
35. Hupe, D.J., Wu, D. (1980). Effect of charged substituents on rates of the thiol-disulfide interchange reaction. *J Org Chem*, 45: 3100-3103
36. Snyder, G. H., Cennerazzo, M. J., Karalis, A. J., and Field, D. (1981). Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry*, 20: 6509-6519.
37. Snyder, G.H. (1984). Free energy relationships for thiol-disulfide interchange reactions between charged molecules in 50% methanol. *J Biol Chem*, 259: 7468-7472.
38. Jocelyn, P.C. (1972). En *Biochemistry of the -SH group*, pp 121-126. Academic Press: New York.
39. Gilbert, H.F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *AdvEnzymol Relat Areas Mol Biol*, 63: 69-172.
40. Oog Kim, S., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W.F. Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., Stamler, J.S. (2002). OxyR: A Molecular Code for Redox-Related Signaling. *Cell*, 109: 383-396.
41. Jacob, C., Giles, G.L., Giles, N.M., Sies, H. (2003). Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State en *Protein Structure and Function, in Chalcogen-containing Proteins*, A.C. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim.
42. Yang, Y., Jao, S., Nanduri, S., Starke, D.W., Mieyal, J.J., Qin, J. (1998). Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry*, 37: 17145-17156.
43. Shelton, M., Mieyal, J. (2008). Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory disease. *Mol Cells*, 25: 332-346.
44. Jensen, K.S., Hansen, R.E., Winther, J.R. (2009). Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation. *Antioxidants and redox signaling*, 11(5): 1047-1058.

45. Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 263(33): 17205-8.
46. Di Simplicio, P., Cacace, M.G., Lusini, L., Giannerini, F., Giustarini, D., Rossi, R. (1998). Role of Protein -SH groups in Redox Homeostasis: The Erythrocyte as a Model System. *Arch Biochem Biophys*, 355(2): 145-152.
47. Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L., Ueland, P.M. (1998). Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 55: 1449-1455.6.
48. Eikelboom, J., Lonn, E., Genest, J. Jr., Hankey, G., Yusuf, S. (1999). Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*, 131: 363-375.7.
49. Isobe, C., Murata, T., Sato, C., Terayama, Y. (2005). Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci*, 77: 1836-1843.8.
50. Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W., Wolf, P.A. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 346: 476-483.
51. Mills, J.L., McPartlin, J.M., Kirke, P.N., Lee, Y.J., Conley, M.R., Weir, D.G., Scott, J.M. (1995). Metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*, 345: 149-151.
52. Menendez Cabezas, A., Fernandez-Britto Rodriguez, J. (1999). Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 18(3): 155-168.
53. Torchinsky, Y.M. (1981). En *Sulfur in Proteins*. Pergamon: Oxford.
54. Wilson, J. M., Wu, D., Motin-DeGrood, R., Hupe, D. J. (1980). A spectrophotometric method for studying the rates of reaction of disulfides with protein thiol groups applied to bovine serum albumin. *J Am Chem Soc*, 102: 359-363.
55. Mayr, H., Brotzel, F. (2007). Nucleophilicities of amino acids and peptides. *Org Biomol Chem*, 5: 3814-3820.
56. Jencks, W.P. (1987). En *Catalysis in chemistry and enzymology*. Dover Publications, Inc.: New York.
57. Harris, T.K., Turner, G.J. (2002). Structural Basis of Perturbed pKa values of Catalytic Groups in Enzyme Active Sites. *Life Sci*, 53: 85-98.
58. Smith, J.N., Hoffman, J. T., Shirin, Z., Carrano, C. J. (2005). *H-bonding interactions and control of thiolate nucleophilicity and specificity in model complexes of zinc metalloproteins*. *Inorg Chem*, 44: 2012-2017.
59. Chen, X., Brauman, J.I. (2008). Hydrogen Bonding Lowers Intrinsic Nucleophilicity of Solvated Nucleophiles. *J Am Chem Soc*, 130: 15038-15046.

60. Witt, A.C., Lakshminarasimhan, M., Remington, B. C., Hasim, S., Pozharski, E., Wilson, M. (2008). A Cysteine pKa Depression by a Protonated Glutamic Acid in Human DJ-1. *Biochemistry*, 47: 7430–7440.
61. Discola, K.F., de Oliveira, M. A., Rosa Cussiol, J. R., Monteiro, G., Bárcena, J. A., Porras, P., Padilla, C. A., Guimarães, B. G., Netto, L. E. S. (2009). Structural Aspects of the Distinct Biochemical Properties of Glutaredoxin 1 and Glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 385: 889-901.
62. Roberts, D.D., Lewis, S. D., Ballou, D. P., Olson, S. T., Shafer, J. (1986). A Reactivity of small thiolate anions and cysteine-25 in papain toward methyl methanethiosulfonate. *Biochemistry*, 25: 5595-5601.
63. Hernandez, G., Anderson, J.S., LeMaster, D.M. (2008). Electrostatic stabilization and general base catalysis in the active site of the human protein disulfide isomerase a domain monitored by hydrogen exchange. *Chem biochem*, 9: 768-778.
64. Kallis, G.B., Holmgren, A. (1980). Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 255: 10261-10265.
65. Nieslanik, B.S., Atkins, W.M. (1998). Contribution of Linear Free Energy Relationships to Isozyme- and pH-Dependent Substrate Selectivity of Glutathione STransferases: A Comparison of Model Studies and Enzymatic Reactions. *J Am Chem Soc*, 120: 6651-6660.
66. Winayanuwattikun, P., Ketterman, A.J. (2005). An electron-sharing network involved in the catalytic mechanism is functionally conserved in different glutathione transferase classes. *J Biol Chem*, 280: 31776-31782.
67. Rhee, S.G., Jeong, W., Chang, T-S., Woo, H.A. (2007). Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int Suppl*, 106: 3-8.
68. Chang, T-S., Jeong, W., Woo, H.A., Lee, S.M., Park, S., Rhee, S.G. (2004). Characterization of Mammalian Sulfiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in the Active Site to Cysteine. *J Biol Chem*, 279: 50994-51001.
69. Noh, Y.H., Baek, J.Y., Jeong, W., Rhee, S.G., Chang, T-S. (2009). Sulfiredoxin Translocation into Mitochondria Plays a Crucial Role in Reducing Hyperoxidized Peroxiredoxin III. *J Biol Chem*, 284: 8470-8477.
70. Lowther, T.W., Haynes, A.C. (2010). Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Eukaryotic, Typical 2-Cys Peroxiredoxins by Sulfiredoxin. In *Cysteine sulfinic acid reduction by Srx*. Wake Forest University School of Medicine: Winston-Salem.
71. Jacob, C., Holme, A.L., Fry, F.H. (2004). The sulfinic acid switch in proteins. *Org Biomol Chem*, 2(14): 1953-6.
72. Jonsson, T.J., Murray, M.S., Johnson, L.C., Poole, L.B., Lowther, W.T. (2005). Structural Basis for the Retroreduction of Inactivated Peroxiredoxins by Human Sulfiredoxin. *Biochemistry*, 44(24): 8634-42.

73. Jonsson, T.J., Tsang, A.W., Lowther, W.T., Furdui, C.M. (2008). Identification of Intact Protein Thiosulfinate Intermediate in the Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Peroxiredoxin by Human Sulfiredoxin. *J Biol Chem*, 283(35): 23846-51.
74. Jeong, W., Park, S.J., Chang, T-S., Lee, D-Y., Rhee S.G. (2006). Molecular Mechanism of the Reduction of Cysteine Sulfinic Acid of Peroxiredoxin to Cysteine by Mammalian Sulfiredoxin. *J Biol Chem*, 281(20): 14400-7.
75. Jonsson, T.J., Johnson, L.C., Lowther, W.T. (2008). Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature*, 451(7174): 98-101.
76. Rhee, S. G., Bae, Y.-S., Lee, S.-R., Kwon, J. (2000). Hydrogen Peroxide: A key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *STKE* http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/53/pe1
77. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2): 150–166
78. Eaton, P., Wright, N., Hearse, D. J., Shattock, M. J. (2002). Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 34: 1549-1560.
79. Eaton, P. (2005). Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Biology & Medicine*, 40: 1889-1899.
80. Ellman, G., Lysko, H. (1979). A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem*, 93(1): 98-102.
81. Riener, C., Kada, G., Gruber, H. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem*, 373: 4-5.
82. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook.*, JMW. Humana Press.
83. Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1): 235-242.
84. Li, H., Robertson, A.D., Jensen, J.H. (2005). Very Fast Empirical Prediction and Rationalization of Protein pKa Values. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61: 704-721.
85. Hu, L., Colman, R.F. (1997). Resonance energy transfer between sites in rat liver glutathione S-transferase, 1-1, selectively modified at cysteine-17 and cysteine-111. *Biochemistry*, 36(7): 1635-45.
86. Espenson, J.H. (1981). En *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, p 218. McGraw-Hill: New York.
87. Kosower, E.M., Kanetyla, H. (1982). Kinetics and Mechanism of the Hydroxide Ion Reaction with 1,5-Diazabicyclo[3.3.0]octadienediones (9,10-Dioxabimanes). *J Org Chem*, 47: 4222-4226.