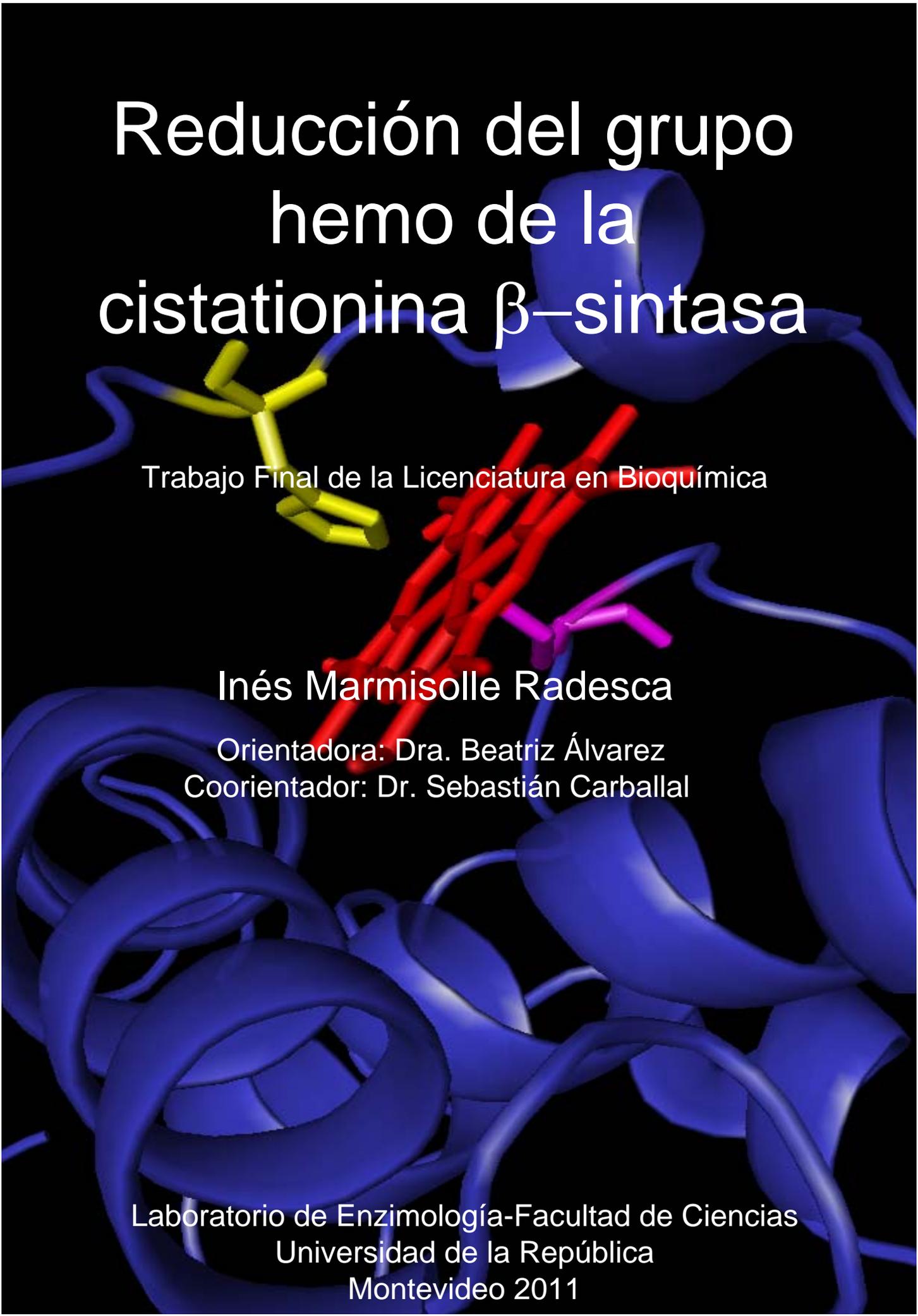


Reducción del grupo hemo de la cistationina β -sintasa

A 3D ribbon diagram of a protein structure, likely the beta-synthase mentioned in the title. The protein backbone is shown in blue. A heme group is highlighted in yellow and red, indicating the site of reduction. The background is black.

Trabajo Final de la Licenciatura en Bioquímica

Inés Marmisolle Radesca

Orientadora: Dra. Beatriz Álvarez
Coorientador: Dr. Sebastián Carballal

Laboratorio de Enzimología-Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo 2011

RESUMEN

La cistationina β -sintasa es una enzima clave en el metabolismo de aminoácidos azufrados, en la vía de transulfuración inversa que lleva de metionina a cisteína. Las alteraciones en esta enzima llevan a un aumento de las concentraciones plasmáticas de uno de sus sustratos, la homocisteína, lo cual está fuertemente relacionado a daños vasculares y neurológicos. La cistationina β -sintasa posee un grupo hemo de función desconocida. El valor del potencial de reducción del grupo hemo, si bien es relativamente bajo (-0,291 V), sugiere que podría reducirse *in vivo*. Al reducirse, el hierro hémico es capaz de unir ligandos como $\cdot\text{NO}$ y CO y de reaccionar rápidamente con el oxígeno formando radical superóxido. Ahondar en esta cuestión resulta relevante para comprender la función del hemo en la enzima.

En la presente tesina se caracterizó la reducción del grupo hemo de la CBS por el ditionito de sodio. La cinética resultó de orden un medio con respecto al mismo, reflejando que la especie reductora es el producto de su homólisis $\text{SO}_2^{\cdot-}$ formado en un equilibrio rápido. Éste reacciona con la CBS con una constante de $(1,13 \pm 0,03) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7,4, 25°C). Por otra parte se estudió la posible reducción biológica del grupo hemo de la CBS mediante distintas aproximaciones experimentales. Se utilizaron como posibles sistemas reductores fracciones subcelulares de hígado de rata y flavoproteínas purificadas. Los resultados indicaron que en nuestras condiciones de reacción no es posible detectar la reducción del hemo de la CBS, monitoreado por los cambios en los espectros UV-visible y por el consumo de oxígeno.

Agradecimientos

A todas las personas que me han acompañado a lo largo de mi carrera, a mi familia y amigos por estar siempre y a los compañeros de laboratorio por brindarme una mano cuando la necesitaba.

A mis tutores Beatriz Álvarez y Sebastián Carballal por orientarme y permitirme dar los primeros pasos por la ciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
1. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS.....	6
1.1 VÍAS METABÓLICAS.....	7
1.2 REGULACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS.....	11
2. HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	14
3. CISTATIONINA β-SINTASA.....	15
3.1 ESTRUCTURA.....	16
3.2 REACCIÓN.....	19
3.3 HEMO.....	22
4. POSIBLES REDUCTORES BIOLÓGICOS.....	25
4.1 XANTINA OXIDASA.....	26
4.2 ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS.....	27
OBJETIVOS.....	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. MATERIALES.....	30
2. CBS.....	30
3. ANAEROBIOSIS.....	30
4. CUANTIFICACIÓN DE DITIONITO DE SODIO CON FERRICIANURO DE POTASIO.....	31
5. OBTENCIÓN DE LA CBS REDUCIDA.....	31

6. ESTUDIO DE LA CINÉTICA RÁPIDA DE REACCIÓN ENTRE EL DITIONITO DE SODIO Y EL GRUPO HEMO DE LA CBS	32
7. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	33
7.1 EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS	33
7.2 PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES	33
7.3 FRACCIÓN MICROSOMAL	33
8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	33
9. ACTIVIDAD REDUCTORA DE LOS EXTRACTOS SUBCELULARES.....	34
9.1 EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS Y FRACCIÓN MICROSOMAL	34
9.2 PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES	35
10. EXPOSICIÓN DE LA CBS A LOS EXTRACTOS CELULARES.....	35
11. MEDIDAS DE CONSUMO DE O₂	36
12. ESPECTROS UV-VISIBLE.....	36
13. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	36
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>37</u>
1. CARACTERIZACIÓN DE LA CBS.....	37
1.1 ESPECTRO UV-VISIBLE	37
1.2 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	38
2. CINÉTICA DE LA REDUCCIÓN DEL HEMO DE LA CBS CON DITIONITO DE SODIO	39
3. EXPOSICIÓN DE LA CBS A SISTEMAS BIOQUÍMICOS	45
3.1 MEDIDAS DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LOS EXTRACTOS SUBCELULARES	45
3.2 EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS	47
3.3 EXTRACTO DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES	51
3.4 FRACCIÓN MICROSOMAL	55
4. EXPOSICIÓN DE LA CBS A REDUCTASAS PURIFICADAS.....	58
4.1 XANTINA OXIDASA.....	58
4.2 DOMINIO REDUCTASA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.....	59
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>61</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>62</u>

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Ciclo de la metionina.....	8
Figura 2: Vía de la transulfuración inversa.....	9
Figura 3: Destinos de la cisteína.....	10
Figura 4: Metabolismo de aminoácidos azufrados.....	12
Figura 5: Estructura cristalográfica de la CBS humana dimérica.....	15
Figura 6: Organización modular de la CBS humana.....	16
Figura 7: Secuencia aminoacídica de un monómero de CBS humana..	17
Figura 8: Modelo propuesto para la CBS de <i>D. melanogaster</i> en presencia y ausencia de AdoMet.....	19
Figura 9: Reacción principal catalizada por la CBS.....	20
Figura 10: Tautómeros de la aldimina interna del PLP en la CBS humana.....	21
Figura 11: Mecanismo propuesto para la reacción de la CBS humana.	21
Figura 12: Hemo de la CBS.....	23
Figura 13: Mecanismo propuesto de regulación alostérica.....	25
Figura 14: Dominios de la NOS.....	28
Figura 15: Dirección del flujo de electrones y potenciales redox en nNOS.....	28
Figura 16: Reducción del DCFIF.....	34
Figura 17: Espectro UV-visible de la CBS oxidada y reducida.....	37
Figura 18: Curva de calibración para cuantificar CBS por el método de Bradford.....	38
Figura 19: Gráfica representativa normalizada del aumento de absorbancia a 449 nm por la reacción de la CBS con el ditionito de sodio.....	39
Figura 20: Dependencia entre la k_{obs} y la concentración de ditionito de sodio.....	41
Figura 21: Simulación en el programa Gepasi.....	44
Figura 22: Curvas de calibración para cuantificar proteínas por el método de Bradford.....	45
Figura 23: Reducción del DCFIF expuesto al extracto libre de células.	47

Figura 24: Exposición de la CBS al extracto libre de células.....	48
Figura 25: CBS reducida en presencia de cianuro.....	49
Figura 26: Exposición de la CBS al extracto libre de células en presencia de cianuro.....	50
Figura 27: Consumo de oxígeno por el extracto libre de células en presencia de CBS.....	51
Figura 28: Actividad reductora del extracto de PSM.....	52
Figura 29: Exposición de la CBS a las PSM y NADH.....	53
Figura 30: Exposición de la CBS a las PSM y succinato.....	53
Figura 31: Consumo de oxígeno por las PSM y NADH en presencia de CBS.....	54
Figura 32: Consumo de oxígeno por las PSM y succinato en presencia de CBS.....	55
Figura 33: Actividad reductora de la FM.....	56
Figura 34: Exposición de la CBS a la FM.....	56
Figura 35: Consumo de oxígeno de la FM en presencia de CBS.....	57
Figura 36: Exposición de la CBS a la XO.....	58
Figura 37: Exposición de la CBS a la NOSr.....	59
Tabla 1: Promedio y desviación estándar de las k_{obs} con las concentraciones de ditionito correspondientes.....	40
Tabla 2: Reacciones de la CBS con el ditionito de sodio y sus productos de descomposición.....	43
Tabla 3: Concentraciones proteicas de los extractos subcelulares.....	46

ABREVIATURAS

AdoHcy o SAH	S-adenosil-L-homocisteína
AdoMet o SAM	S-adenosil-L-metionina
BSA	albúmina sérica bovina
Cat	catalasa
CBS	cistationina β -sintasa
CGL	cistationina γ -liasa
Cth	cistationina
FM	fracción microsomal
Glc	glucosa
GO	glucosa oxidasa
GSH	glutación
Hcy	homocisteína
MSR	metionina sintasa reductasa
NOS	óxido nítrico sintasa
NOSr	dominio reductasa de la óxido nítrico sintasa
Pi	fosfato inorgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
PLP	piridoxal 5'-fosfato
PSM	partículas submitocondriales
THF	tetrahidrofolato
XDH	xantina deshidrogenasa
XO	xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

1. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS

El azufre forma parte de distintas biomoléculas. Es constituyente de las proteínas, de vitaminas como la biotina, de distintas enzimas y de coenzimas como por ejemplo la coenzima A. Participa en procesos de oxidación y reducción de las células a través, entre otros, del glutatión (GSH), interviene en la estructura terciaria de las proteínas y últimamente, se han propuesto distintos roles fisiológicos para el sulfuro de hidrógeno como neuromodulador [1] y vasodilatador [2].

El azufre es componente de dos aminoácidos constituyentes de proteínas llamados aminoácidos azufrados, cisteína y metionina. En mamíferos, están relacionados metabólicamente por la vía unidireccional de la transulfuración inversa (Figuras 1 y 2). Esta vía produce cisteína a partir de intermediarios de la vía de transmetilación que procesa a la metionina.

Ambos aminoácidos son consumidos diariamente como componentes de las proteínas de nuestra dieta. El requerimiento diario de metionina y cisteína es de $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en adultos [3]. Los aminoácidos, luego de la digestión, entran en el plasma y circulan como aminoácidos libres o disulfuros antes de que sean incorporados por los tejidos. El hígado capta la mayor parte de aminoácidos azufrados desde la circulación portal (enterohepática) y los utiliza para la síntesis de proteínas y GSH, o para el catabolismo a taurina y sulfato. La absorción de los productos de digestión de las proteínas es muy eficiente (95%-99%) [4, 5].

La reabsorción en el riñón, a nivel del túbulo proximal, es normalmente muy alta ($\geq 94\%$) y la pérdida de ambos aminoácidos en la orina es indetectable. La información reportada de excreción urinaria de metionina es de 22-41 μmol por día y de cisteína es de 63-285 μmol por

día [3]. La principal forma de excreción del azufre es como sulfato libre (77%-92%), lo siguen en menor proporción ésteres de sulfato (7%-9%), y taurina (2%-6%) [6-8].

1.1 Vías metabólicas

La metionina es considerada un aminoácido esencial dado que los mamíferos no pueden sintetizarla *de novo*, mientras que la cisteína es considerada semiesencial, ya que su síntesis depende de la presencia de metionina en la dieta.

En humanos, el metabolismo de la metionina comienza con el ataque nucleofílico del átomo de azufre de la metionina al carbono 5' de la porción ribosa del ATP por acción de la metionina adenosil-transferasa (Figura 1). Se libera trifosfato que se escinde a Pi y PPi en la enzima, posteriormente, el PPi es escindido por la pirofosfato inorgánico hidrolasa, de modo que en esta reacción se rompen tres enlaces, entre ellos dos de alta energía. El producto de esta reacción, la S-adenosilmetionina (AdoMet o SAM), es el principal dador de grupo metilo del organismo y participa en múltiples reacciones de metilación. Es esencial para la biosíntesis de varios componentes celulares incluyendo creatina, epinefrina, carnitina, fosfolípidos, proteínas, ADN y ARN [9].

Como producto secundario de las metilaciones se forma S-adenosilhomocisteína (AdoHcy o SAH) que se hidroliza con la ayuda de la adenosilhomocisteinasa, dando adenosina y homocisteína (Hcy). La adenosina es removida por la adenosina deaminasa o por la adenosina quinasa. La metionina se regenera por transferencia de un grupo metilo a la homocisteína y la metionina se reconvierte nuevamente en AdoHcy para completar un ciclo de transmetilación y remetilación o ciclo de la metionina.

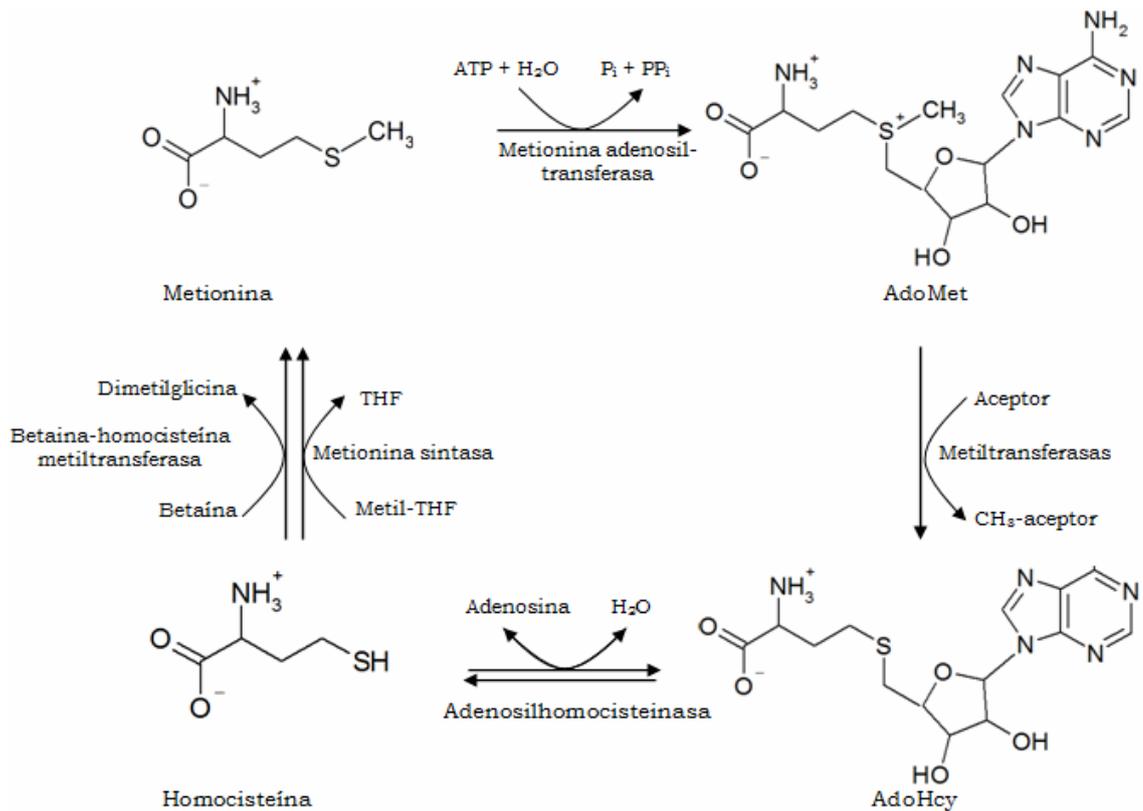


Figura 1: Ciclo de la metionina. La metionina es utilizada para sintetizar el agente metilante AdoMet y puede ser regenerada por metilación del grupo tiol de la homocisteína.

Hay dos metiltransferasas involucradas en el reciclaje de homocisteína a metionina: la metionina sintasa y la betaína-homocisteína metiltransferasa. La primera, distribuida ampliamente en los tejidos de mamíferos, tiene como cofactor esencial metilcobalamina, derivada de la vitamina B12. El metilo deriva del N⁵-metil-tetrahidrofolato [10]. El N⁵-metil-tetrahidrofolato es sintetizado en el ciclo del folato. El último paso de su síntesis, la reducción irreversible del N^{5,10}-metilen-tetrahidrofolato catalizado por la flavoenzima N^{5,10}-metilen-tetrahidrofolato reductasa, está bajo la regulación de AdoMet y AdoHcy. AdoMet inhibe la reducción mientras que la AdoHcy favorece la formación de N⁵-metil-tetrahidrofolato [11, 12]. La otra enzima involucrada en la regeneración de metionina, la betaína-homocisteína metiltransferasa, se encuentra solamente en hígado, riñón y cristalino [13, 14]. Es una metaloenzima dependiente de zinc [15] que requiere betaína como donador de metilos. La betaína se

produce durante la oxidación de la colina o se obtiene de la dieta. Esta enzima cobra importancia cuando hay deficiencias nutricionales (baja metionina, alta colina) o ciertas patologías [16].

La homocisteína integra el primer paso en la vía de la transulfuración inversa, en la cual se transfiere de forma irreversible el átomo de azufre de la homocisteína a la serina para formar cistationina (Figura 2).

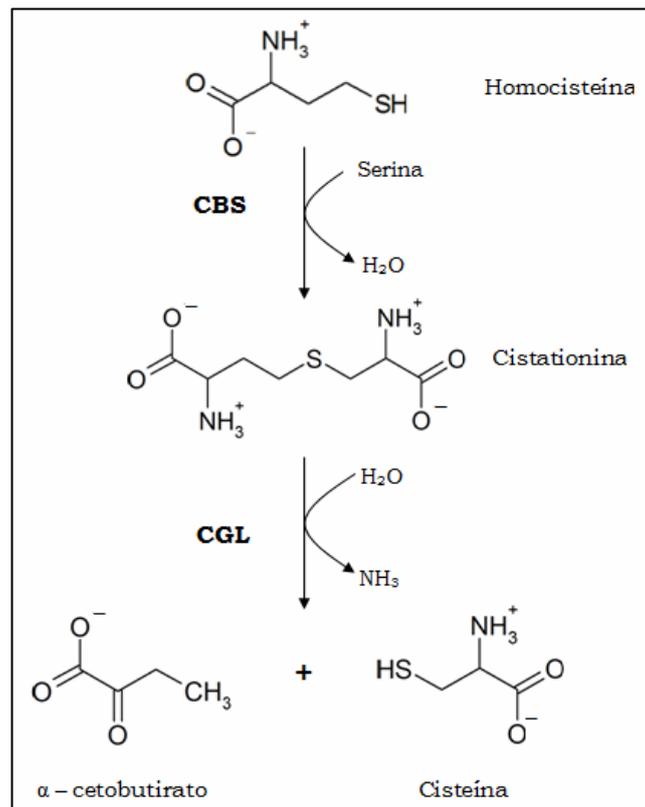


Figura 2: Vía de la transulfuración inversa. En el primer paso catalizado por la cistationina β-sintasa (CBS) se condensan la serina y la homocisteína para dar cistationina. En el segundo paso catalizado por la cistationina γ-liasa (CGL) se cliva la cistationina para liberar α-cetobutirato, cisteína y amonio.

En una reacción de β sustitución, catalizada por la cistationina β-sintasa (CBS), se sustituye el hidroxilo de la serina por el tiol de la homocisteína para dar cistationina (Cth). La CBS también cataliza una segunda reacción utilizando como sustratos homocisteína y cisteína dando lugar a la producción de sulfuro de hidrógeno [17, 18]. Por último, la cistationina γ-liasa (CGL) cataliza la ruptura de la cistationina para dar

cisteína libre, α -cetobutirato y eliminar amoníaco. Ambas enzimas son dependientes de piridoxal 5'-fosfato (PLP).

Si bien se produce homocisteína en todo el organismo, la vía de la transulfuración está restringida a ciertos tipos celulares. Las células que no completan la vía necesitan una fuente de cisteína exógena y deben exportar homocisteína o cistationina. En humanos, la CBS se encuentra en el compartimiento citosólico de varios tipos celulares y últimamente se la ha encontrado en el núcleo [19]. En ratas, se distribuye principalmente en hígado, páncreas, riñón, tejido adiposo, cerebro y mucosa del intestino delgado. La CGL se localiza en hígado, páncreas y riñón [20]. En el cerebro de ratones, la vía de la transulfuración inversa está completa [21], al igual que en macrófagos humanos [22]. Datos recientes indican la presencia de ambas enzimas de esta vía en el endotelio de ratones y de humanos. Las mismas serían excretadas desde los hepatocitos y las células endoteliales a la sangre, completándose la vía de la transulfuración en el medio extracelular [23].

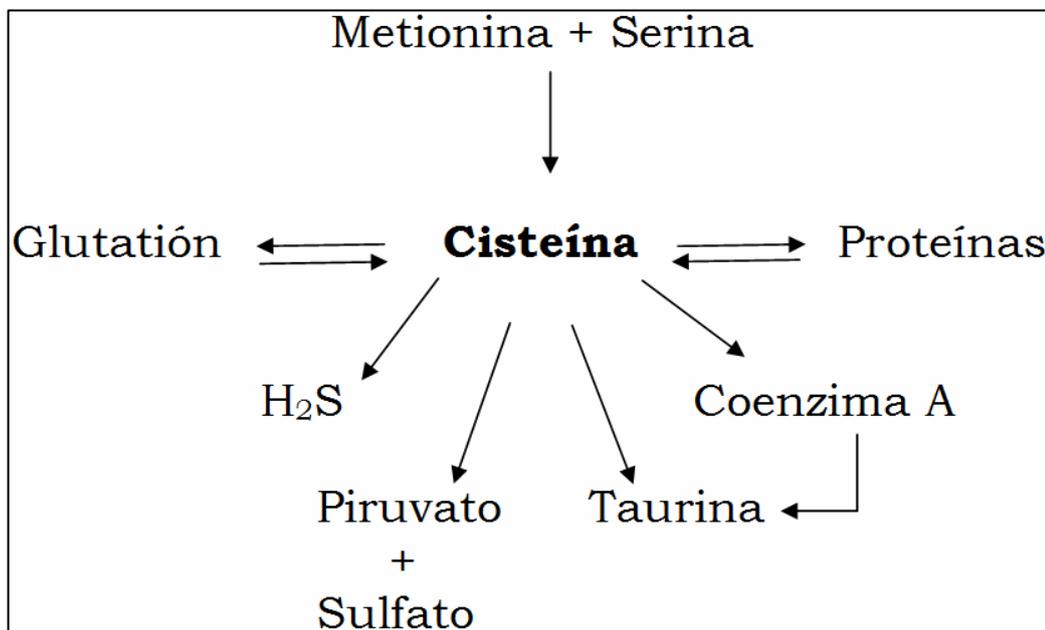


Figura 3: Destinos de la cisteína. La taurina y el sulfato son los productos principales del catabolismo de la cisteína.

La cisteína, uno de los productos de la transulfuración, se utiliza como precursor para la síntesis de proteínas y metabolitos esenciales como GSH, coenzima A, taurina y azufre inorgánico. El GSH sirve como reservorio de cisteína [4]. Las enzimas involucradas en su síntesis son la glutamato cisteína ligasa y la glutatión sintetasa. La primera cataliza el paso limitante en la síntesis de GSH y está fuertemente regulada por retroalimentación (feedback) negativa además de una regulación transcripcional en respuesta al estrés oxidativo [24, 25].

El primer paso en el catabolismo de la cisteína es catalizado por la cisteína dioxigenasa que incorpora una molécula de oxígeno para obtener cisteínasulfinato. A partir de este intermediario la vía se bifurca. Un camino posible es una descarboxilación catalizada por la cisteínasulfinato decarboxilasa. Como producto se obtiene hipotaurina que subsecuentemente se oxida a taurina. El otro camino alternativo es una transaminación que da como producto sulfinilpiruvato que espontáneamente se disocia en piruvato y sulfito [3]. Este último se oxida a sulfato con la sulfito oxidasa.

La cisteína también puede sufrir reacciones de desulfuración en las que se forma sulfuro de hidrógeno como procesos secundarios catalizados por CBS y CGL [17, 18, 26]. El catabolismo oxidativo predomina cuando hay exceso de cisteína [27-29]. El hígado es el principal responsable en la regulación de los destinos de la cisteína [30].

1.2 Regulación de las vías metabólicas

El metabolismo de aminoácidos azufrados está coordinado por múltiples factores que incluyen los componentes de cada tejido, las propiedades cinéticas de los constituyentes enzimáticos, la concentración de los sustratos y las enzimas, la presencia de cofactores enzimáticos y las actividades de las enzimas que compiten por los mismos sustratos.

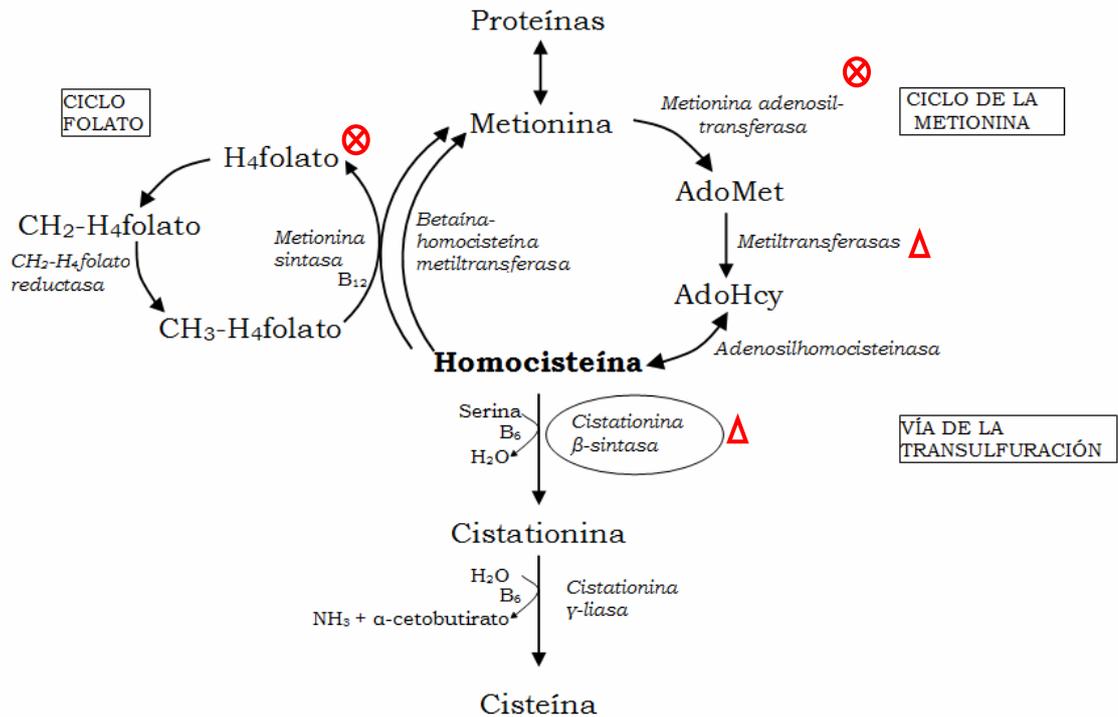


Figura 4: Metabolismo de aminoácidos azufrados. Se observa el metabolismo de la metionina hasta la cisteína. El azufre de la metionina compone el grupo tiol de la homocisteína y deriva por medio de la vía de la transulfuración a la cisteína. Se destaca a la homocisteína como intermediario clave. Su participación en las tres vías le confiere un rol crítico en el destino de los compuestos de azufre. Los símbolos \triangle y \otimes indican los sitios de activación o inhibición de la vía por la AdoMet respectivamente.

La concentración de AdoMet regula las vías en diversos puntos. Inhibe a las metionina adenosil-transferasas de todo el organismo que catalizan el primer paso del catabolismo de la metionina dando como producto al AdoMet [3] (Figura 4). El siguiente paso de la vía es una reacción en la cual se utiliza AdoMet como donador de grupo metilo y es catalizado por diversas metiltransferasas. Todas estas enzimas tienen una alta afinidad por el sustrato en común, AdoMet, así como una inhibición por AdoHcy, el producto de las metilaciones. AdoHcy es hidrolizado a adenosina y homocisteína por la adenosilhomocisteinasa. La AdoMet activa alostéricamente a la CBS y paralelamente es un inhibidor alostérico de la $\text{N}^{5,10}$ -metilen-tetrahidrofolato reductasa por lo cual niveles altos de AdoMet llevan a disminuciones en la remetilación y aumentos en la transulfuración [31, 32].

Aunque la actividad de la CBS presenta cierta sensibilidad a las concentraciones elevadas de homocisteína presente luego de un ingesta de proteínas, lo que es consistente con el rol de la transulfuración de eliminar el exceso de metionina [33], el flujo de homocisteína hacia la vía de transmetilación y hacia la vía de transulfuración parecen ser equivalentes en el hígado [34].

El metabolismo de aminoácidos azufrados es dependiente de las vitaminas B6, B9 y B12. El ácido fólico (vitamina B9) es necesario para la reconversión de homocisteína a metionina. La cobalamina (vitamina B12) es una coenzima que acepta al grupo metilo proveniente del N⁵-metil-tetrahidrofolato formando metilcobalamina a nivel de la metionina sintasa. La reacción culmina con la formación de tetrahidrofolato y metionina. El derivado de la vitamina B6, el PLP, es el cofactor de las dos enzimas de la vía de la transulfuración CBS y CGL y también es necesario en la incorporación de unidades monocarbonadas al tetrahidrofolato [35].

Se ha sugerido que las enzimas de la transulfuración inversa, CBS y CGL, que conducen a la síntesis del GSH, están reguladas por las condiciones redox del medio [36]. Cuando aumentan los requerimientos de cisteína o GSH, se favorecería la transulfuración a expensas de la remetilación si bien los mecanismos moleculares no están claros. Estudios sobre otras enzimas del metabolismo del azufre también revelan que son sensibles a los cambios redox. La metionina sintasa disminuye su actividad bajo condiciones oxidativas, posiblemente por la oxidación de su cofactor cobalamina o la oxidación de sus cisteínas unidas al zinc. La betaína-homocisteína metiltransferasa, es una enzima zinc-dependiente que también disminuye su actividad de forma reversible bajo condiciones oxidativas. En contraste, en células expuestas a oxidantes se han observado aumentos en la vía de la transulfuración, lo que iría en la línea de aumentar la síntesis de GSH como respuesta al estrés oxidativo [37, 38].

2. HIPERHOMOCISTEINEMIA

La homocisteína es un intermediario clave en el metabolismo de aminoácidos azufrados. Sufre dos cambios metabólicos importantes, transmetilación y transulfuración. Hay otros dos destinos auxiliares que son la formación de AdoHcy por la reacción reversa a la hidrólisis y, si los niveles celulares son altos, la exportación al plasma.

Índices elevados de homocisteína en plasma, condición conocida como hiperhomocisteinemia, están relacionados con aumentos en el riesgo de padecer enfermedades vasculares [39]. También el aumento de homocisteína está asociado a múltiples desórdenes neurológicos que incluyen Alzheimer, demencias relacionadas con la edad y defectos en el tubo neural de los fetos [40].

La concentración plasmática de homocisteína considerada normal en humanos es de 5-15 μM . Las causas que inducen a hiperhomocisteinemia pueden ser genéticas y/o nutricionales. Los casos serios de aumento de homocisteína en plasma (mayores a 100 μM) están fuertemente relacionados a defectos en las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína y las causas más frecuentes son mutaciones en la CBS [38].

Las enzimas involucradas en las vías descritas anteriormente han sido estudiadas reiteradas veces pero no se conoce tanto de su regulación en el contexto celular. Tampoco se conoce el mecanismo por el cual se relaciona la hiperhomocisteinemia con los daños vasculares y neurológicos asociados. Se han planteado varias hipótesis para explicar las patologías asociadas con la hiperhomocisteinemia como estrés oxidativo [38] e hipometilación del ADN [41]. Últimamente ha crecido la hipótesis que fallas en las enzimas de la transulfuración inversa llevan a la deficiencias de sulfuro de hidrógeno, el cual cumpliría funciones de citoprotector [23].

3. CISTATIONINA β -SINTASA

La cistationina β -sintasa (CBS, EC 4.2.1.22) es un enzima clave en el metabolismo de aminoácidos azufrados. Cataliza el primer paso en la vía de la transulfuración inversa que lleva a la síntesis de cisteína a partir de metionina. Se encuentra en el citosol de varios tipos celulares y también se la ha encontrado en el núcleo [19].

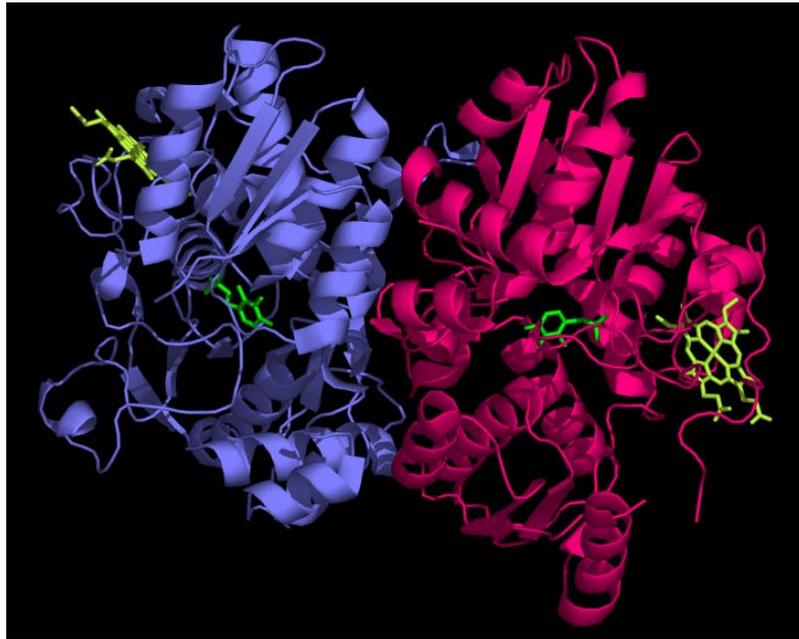


Figura 5: Estructura cristalográfica de la CBS humana dimérica. En verde se indica el PLP y en amarillo el grupo hemo. La información estructural se obtuvo de PubMed (código de acceso 1JBQ) [42] y se visualizó con el programa PyMOL Molecular Graphics Systems v0.99 [43].

Los genes de la CBS humana se han identificado en el cromosoma 21q22.3 [44]. Se conocen hasta el momento 5 mRNA y entre ellos se observa cierta variabilidad sólo en la región 5'UTR [45, 46]. La expresión de los mismos es dependiente del tejido y es regulada por un mecanismo sensible al medio redox que está relacionado con el estado proliferativo de la célula [47]. En humanos la CBS se encuentra en el cerebro, placenta, hígado, páncreas, tráquea, riñón y en el feto en hígado, riñón y corazón [45].

3.1 Estructura

La CBS humana es una hemoproteína que forma tetrámeros de subunidades idénticas de 63 kDa cada una [48]. Cada subunidad une a los dos sustratos, homocisteína y serina, y a tres ligandos adicionales: en la región N-terminal un hemo, seguido del dominio catalítico que une PLP y en el extremo C-terminal un activador alostérico, la AdoMet [49] (Figura 6).

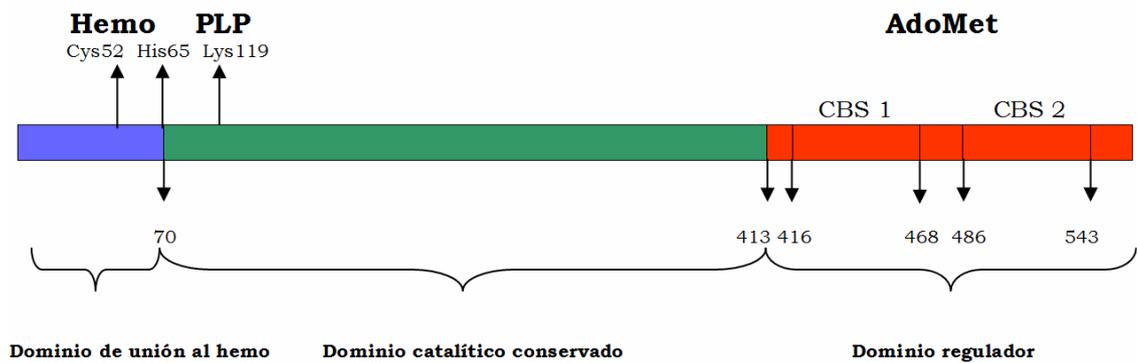


Figura 6: Organización modular de la CBS humana. En azul se muestra el dominio N-terminal, se señalan los residuos de Cys e His que coordinan al hemo. En verde se muestra el dominio catalítico y se resalta el residuo de Lys que se une al PLP. En rojo se muestra el dominio C-terminal indicando los dominios CBS. Adaptado de [49].

Se ha encontrado una forma homodimérica de la enzima que es activa y no responde a la presencia de AdoMet. Inicialmente, se encontró una proteína de 48 kDa, que fue purificada a partir de extractos de hígado humano por acción de proteasas hepáticas [48, 50]. Años después, se obtuvieron proteínas de comportamiento similar y peso molecular semejante con distintos procedimientos, Kery *et al* a partir de proteólisis limitada [51] y Shan *et al* por mutaciones sitio dirigidas de la proteína nativa recombinante [52]. En ambos casos se aisló una proteína dimérica estable de subunidades de 45 kDa. Experimentos utilizando células en cultivo expuestas al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), mostraron que éste era capaz de inducir la activación postraducciona de la CBS mediante proteólisis generándose un producto de 45 kDa [53].

MPSETPQAEVGP^TGC^PHRSGPHSAKGSLEKGSPE^DKEAKEPLWIRPDAPS^RCTWQLGRPASESP^HHHTAP
 AKSPKILPDILKKIGDTPMVRINKIGKFKGLKCELLAKCEFFNAGGSVK^DRISLRMIEDAERDGT^LKPGD
 TII^EPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCII^VMPEKMSSEKVDVLRALGAEIVRTP^TNARFDS^PESHVGVAVRL
 KNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYD^TTADEILQQCDGKLDMLVASVGTGGTITGIARKLKEK^CPGC^RIIGV
 DPEGSILAEPEELNQT^EQ^TTYEVEGIGYDFIPTVLDRTVVDKWFKSNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGSA
 GSTVAVAVKAAQ^ELQ^EGQ^RCVVILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGF^LKEEDL^TEKKPWWWHLRVQ^ELGLS
 APLTVLPTITCGHTIEILREKGF^DQAPVVDEAGVILGMVTLGNMLSSLLAGKVQPSDQVGKVIYKQ^FKQ^I
 RLTDTLGRLSHILEMDHFALVVHEQIQYHSTGKSSQRQMVFGVVT^AIDL^LNFVAAQERDQK

Figura 7: Secuencia aminoacídica de un monómero de CBS humana. Se indica en azul el dominio N-terminal de unión al hemo. En subrayado se encuentran la cisteína e histidina que coordinan al hemo. En verde se encuentra el dominio central responsable de la catálisis, señalándose la lisina 119 que se une al PLP. Se destaca subrayado un motivo CPGC. En rojo se observa el dominio C-terminal que contiene los dominios CBS (subrayados) y responde a la presencia de AdoMet.

En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de unión al hemo, el cual no se encuentra unido covalentemente y por los sustituyentes presentes, se clasifica como hemo tipo b. El ión de hierro central está coordinado ecuatorialmente por los cuatro nitrógenos de la porfirina y axialmente por el tiolato de la Cys 52, como las citocromo P450 y las óxido nítrico sintasas (NOS). Como sexto ligando está coordinado por el nitrógeno N_{ε2} del imidazol de la His 65 [42]. La función del grupo hemo en la CBS aún es desconocida.

La enzima tiene en su estructura un motivo CXXC que puede estar reducido o como disulfuro. En la CBS consiste en la secuencia C₂₇₂PGC₂₇₅ y está presente en la CBS de distintos mamíferos al igual que el grupo hemo [42, 54].

El dominio catalítico de la enzima se encuentra entre el aminoácido 70 y el 413 y es el más conservado, siendo el responsable de la unión al PLP. Hay diversas enzimas que utilizan al PLP como cofactor dada su versatilidad en los mecanismos de acción. El único intermediario en común de todas las enzimas que utilizan aminoácidos como sustratos y PLP como cofactor se produce cuando el aminoácido desplaza al residuo de lisina formándose una aldimina unida al PLP. Análisis de la estructura y secuencia de las enzimas que utilizan al PLP como cofactor las clasifican en 4 o 5 tipos. Las comparaciones del dominio catalítico de la

CBS de humanos, ratas y levaduras corresponden al plegamiento tipo II o familia β . El PLP se une covalentemente a la Lys 119 y establece enlaces de hidrógeno con otros aminoácidos que forman una estrecha cavidad hacia el sitio activo [49, 55].

El extremo C-terminal presenta un dominio autoinhibitorio de la actividad enzimática. La unión de AdoMet revierte la inhibición, activando la enzima. Se postulan tres especies cinéticamente diferenciables: basal (enzima completa, ausencia de AdoMet), activada (enzima completa, presencia de AdoMet) y superactivada (enzima trunca) [56]. Cuando el activador AdoMet está presente en el medio se incrementa la k_{cat} de la enzima entre 2 y 3 veces. La eliminación del dominio C-terminal, aumenta la k_{cat} en 4 veces y ocasiona pérdida de respuesta a la presencia de AdoMet. Ambas comparaciones son con respecto a la actividad basal del homotetrámero [57]. Además la presencia de AdoMet modifica la estabilidad de la CBS. Se estima una vida media para la enzima de 18 y 49 horas en ausencia y presencia de AdoMet respectivamente [32].

Se han encontrado dos dominios CBS en el extremo C-terminal, CBS1 comprende los aminoácidos 416-468 y CBS2 los aminoácidos 486-543. Estos dominios hidrofóbicos de estructura secundaria β - α - β - β - α han sido encontrados en una amplia variedad de especies que van desde las arqueas hasta los humanos. Están presentes en enzimas como proteínas quinasas, canales de cloruro, transportadores ABC e inosina monofosfato deshidrogenasa [58]. Se les adjudica la capacidad de unión a derivados de la adenosina. En el caso de la CBS son los encargados de la unión a AdoMet [59, 60].

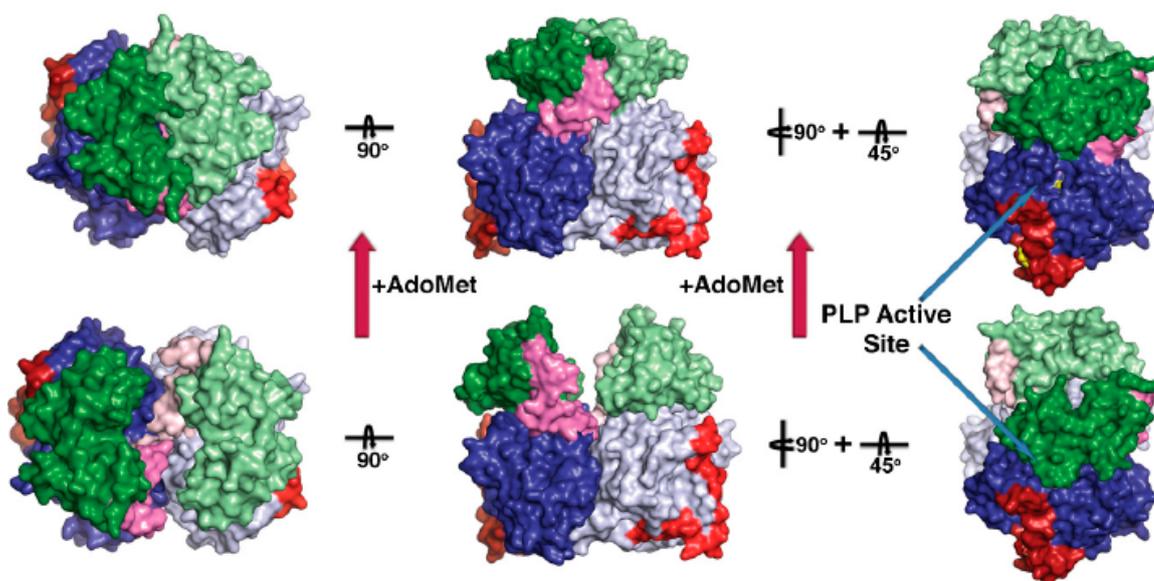


Figura 8: Modelo propuesto para la CBS de *D. melanogaster* en presencia y ausencia de la AdoMet. El cambio conformacional provocado por la unión de la AdoMet aumenta la superficie de dimerización dejando más expuesto al sitio activo. El dominio de unión al hemo se encuentra en rojo, del PLP en azul, los dominios CBS en verde y la hélice α que une a los monómeros en rosado. Adaptado de [59].

A partir de la estructura completa de la CBS de *D. melanogaster* se postula que la unión de la AdoMet a los dominios CBS disminuye la flexibilidad de la enzima provocando una mayor exposición de los sitios activos. Los cambios conformacionales propuestos se observan en la figura 8.

3.2 Reacción

Se ha propuesto para la reacción principal que cataliza la CBS (Figura 9), un mecanismo similar al de otras enzimas que participan en reacciones de β sustitución dependientes de PLP como la triptófano sintasa [55]. El mecanismo de la reacción fue estudiado inicialmente en la CBS de levadura [61-63]. El hemo ubicado en la región N-terminal de la CBS humana enmascara los cambios de absorbancia y fluorescencia a nivel del PLP producidos durante la reacción dificultando los experimentos de cinética preestacionaria. Posteriormente, en el año 2004, Evande *et al.* [64] construyeron una variante de la CBS humana sin los

69 aminoácidos N-terminales, lo que permitió visualizar los intermediarios de la reacción.

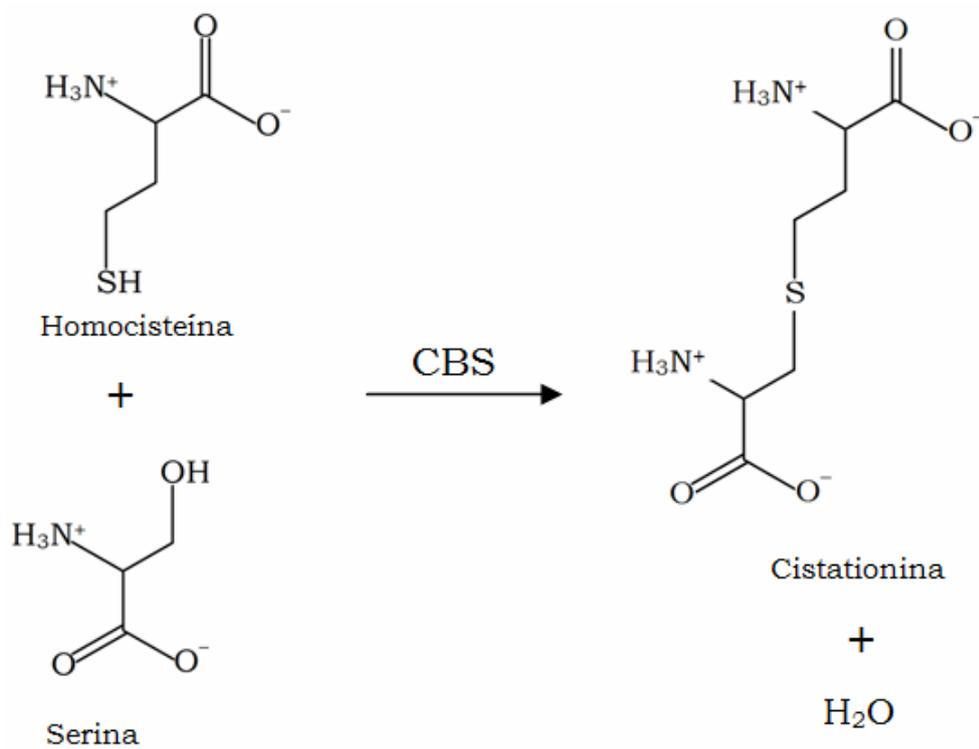


Figura 9: Reacción principal catalizada por la CBS. Condensación de homocisteína con serina para dar los productos cistationina y agua.

El grupo amino N_ε de la Lys119 forma una base de Schiff con el grupo carbonilo del PLP, que es sustituido por una aldimina externa cuando la serina llega al sitio activo. La forma protonada de la aldimina interna (cetoenamina) convierte a la imina en más reactiva hacia el ataque nucleofílico, mientras que la conversión a su forma tautomérica enolimina disminuye su reactividad (Figura 10). La formación del intermediario aminoacrilato elimina una molécula de agua. El carbono β del aminoacrilato es atacado por el tiol de la homocisteína para formar la cistationina. Por último se vuelve a formar la aldimina interna [62, 65] (Figura 11).

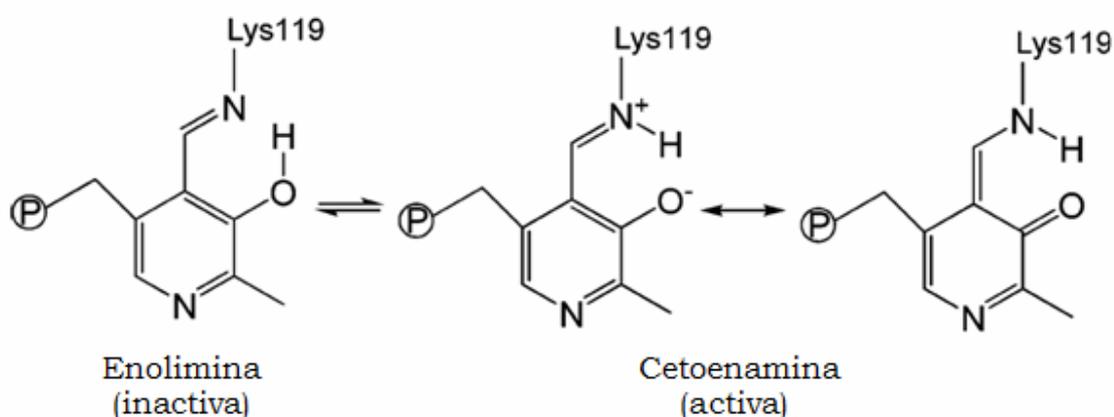


Figura 10: Tautómeros de la aldimina interna del PLP en la CBS humana. Los tautómeros se asocian con diferencias en la actividad enzimática. La forma activa sería la cetoenamina protonada.

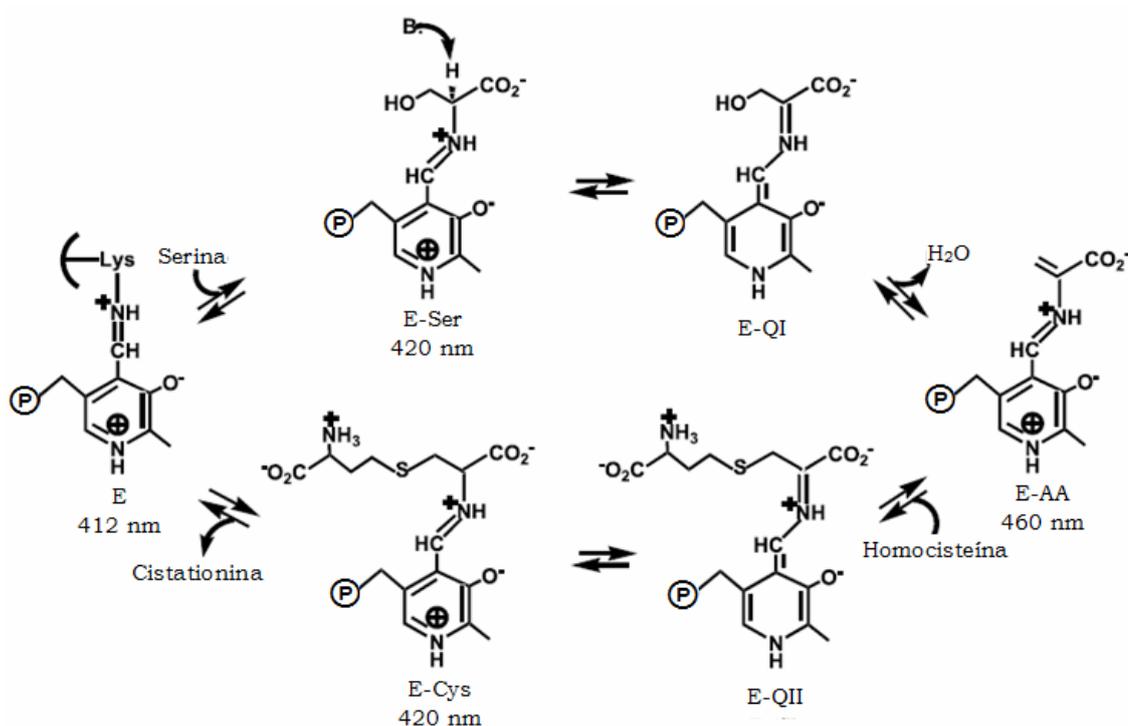


Figura 11: Mecanismo propuesto para la reacción catalizada por la CBS humana. Se muestran intermediarios que han sido identificados. E y E-Ser representan las aldiminas interna y externa respectivamente. E-AA al intermediario aminoacrilato y E-Cys representa la aldimina externa de la cistationina. Se muestran debajo de cada intermediario los máximos de absorción. Adaptado de [64].

Se han planteado otras reacciones alternativas de la CBS cuyos mecanismos planteados son comunes a otras enzimas PLP-dependientes que incluyen β sustitución y β eliminación [66]. Una de las reacciones alternativas condensa cisteína en lugar de serina con homocisteína para formar cistationina y sulfuro de hidrógeno [17, 18, 52]. En los últimos años este gas ha captado la atención de la comunidad biomédica. Se han identificado distintos roles fisiológicos en mamíferos, entre los que se destaca el de neuromodulador en el cerebro [67] y el de vasodilatador [2].

3.3 Hemo

El grupo prostético hemo es vital para muchos procesos celulares y se encuentra presente en varios organismos con distintos orígenes filogenéticos. Es una estructura química que consiste en un sistema anular tetrapirrólico plano, que une mediante enlaces de coordinación un ión de hierro. La estructura en anillo de la porfirina es la razón por la cual todos los derivados porfirínicos absorben luz a una longitud de onda próxima a los 410 nm, la cual contiene su color característico. El estado adicional del hierro central y su entorno afectan esta propiedad. La CBS presenta en estado férrico un máximo de Soret a 428 nm y una banda ancha centrada en los 550 nm. Al pasar al estado ferroso, la banda de Soret pasa a los 449 nm y se observan picos a 540 y 571 nm.

El ión metálico, además de estar ligado a los cuatro nitrógenos en el centro del anillo de la porfirina, puede formar en el eje perpendicular otros dos enlaces, uno a cada lado del hemo. Estos lugares se denominan quinta y sexta posición de coordinación.

Los electrones deslocalizados del orbital Π del anillo tetrapirrólico, las propiedades redox del ión de hierro central y la variedad de interacciones generada por el ambiente proteico, le permite al hemo tener una gran diversidad de funciones. Algunos ejemplos de hemoproteínas son los citocromos que participan en la transferencia de electrones de una proteína a otra. En la hemoglobina el hemo une y transporta el oxígeno y en la catalasa tiene función catalítica. Además, está implicado

en la traducción de señales, control de la expresión génica y como sensor de gases (por ejemplo O_2 , NO , CO) [68].

Tres clases de hemos se clasifican según sus sustituyentes, que pueden ser metilos, vinilos o propionatos. El hemo de la CBS fue identificado como hemo tipo b de acuerdo al espectro obtenido y comparado con hemo a, b y c estándar por el método de piridina hemocromo [69].

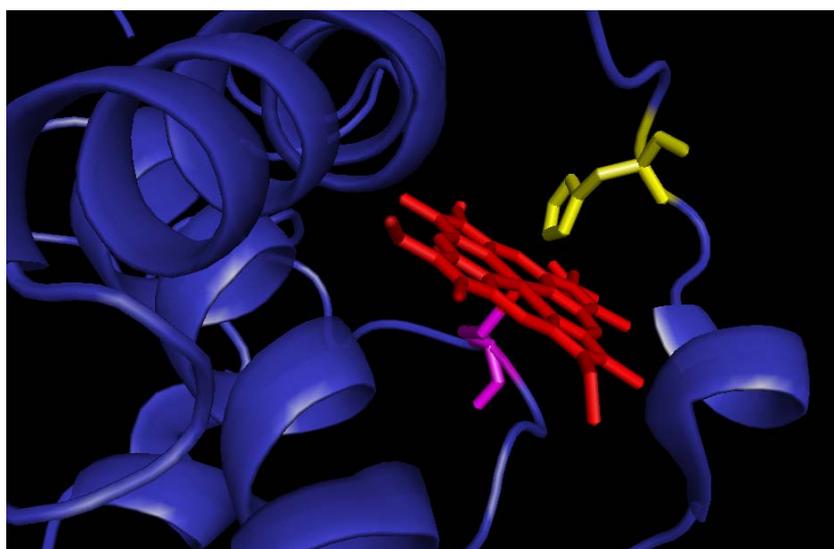


Figura 12: Hemo de la CBS. Se indica en rojo el grupo hemo y sus ligandos Cys52 e His65 en violeta y amarillo respectivamente. La información estructural se obtuvo de PubMed (código de acceso 1JBQ) [42] y se visualizó con el programa PyMOL Molecular Graphics Systems v0.99 [43].

La estructura cristalográfica de la CBS trunca revela como quinto y sexto ligando a la Cys52 y a la His65, respectivamente (Figura 12). Es una coordinación inusual, con pocos ejemplos en la naturaleza [70, 71].

En la CBS purificada el hemo se encuentra oxidado como $Fe(III)$ [72] pero puede ser reducido a $Fe(II)$ con reductores como el ditionito de sodio [73]. En ambos estados el ión de hierro se encuentra hexacoordinado y de bajo espín [74]. A pesar de estar expuesto en la superficie proteica, el hemo se muestra particularmente inerte en estado férrico. El potencial de reducción para este cofactor en la CBS trunca dimérica es relativamente

bajo, de -0,291 V [75]. De acuerdo a este valor, el estado oxidado sería el más estable.

Varios estudios mostraron que el hemo, en estado reducido, es capaz de unirse a distintos ligandos como monóxido de carbono, óxido nítrico, cianuro y diversos isonitrilos. La coordinación del hemo con la Cys52 parece ser fundamental para conservar la actividad enzimática. La unión de monóxido de carbono al hemo reducido desplaza a la Cys52. Forma un complejo hexacoordinado, de bajo espín, ocasionando la inactivación de la misma ($K_d = 1,5 \pm 0,1$ y $68 \pm 14 \mu\text{M}$, $K_i = 5,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$) [76, 77]. La unión de óxido nítrico genera un complejo pentacoordinado indicando pérdida de coordinación en ambos ligandos endógenos y de la actividad enzimática ($K_d = 281 \pm 50 \mu\text{M}$, $K_i = 320 \pm 60 \mu\text{M}$) [78]. La exposición de la CBS reducida al cianuro ($K_d = 3,3 \pm 0,6$ y $54 \pm 22 \text{ mM}$, $K_i = 2,3 \pm 0,7 \text{ mM}$) [77] y distintos isonitrilos [79], al igual que los casos anteriores, presenta una sustitución de su ligando Cys52 y disminuciones en la actividad enzimática.

Una vez reducido, el hemo reacciona rápidamente con oxígeno (O_2) formando radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Esta reacción tiene una constante de $(1,11 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [75]. A una concentración intracelular de O_2 del orden de $30 \mu\text{M}$, predominaría sobre, por ejemplo, la disociación del ligando Cys, que ocurre a $0,0166 \text{ s}^{-1}$ y es limitante para la reacción con el monóxido de carbono [80].

La función del grupo hemo en la CBS aún es desconocida. Se ha identificado claramente que no participa en el proceso catalítico dependiente de PLP [81]. Pero a pesar de estar un poco alejado del mismo, a aproximadamente 20 \AA [42, 63, 82], se han identificado varias mutaciones puntuales en su entorno en pacientes con hiperhomocisteinemia hereditaria, lo que involucra al hemo con la actividad catalítica o con la estabilidad de la enzima [83-86]. Cuando se eliminan los 70 primeros residuos en la región N-terminal, la enzima es incapaz de unir el grupo hemo, no afectándose la unión al PLP. Como

consecuencia se observa una disminución del 60 % en la actividad enzimática [64, 82, 87].

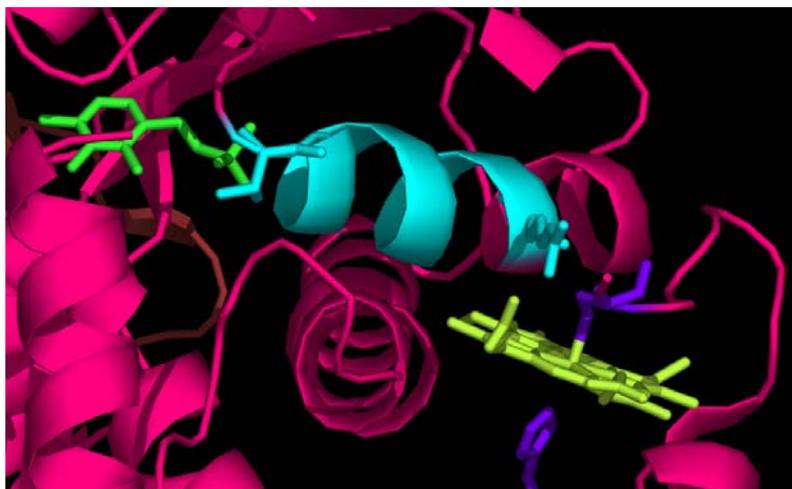


Figura 13: Mecanismo propuesto de regulación alostérica. Se ha propuesto que una hélice alfa transmitiría las señales del entorno del hemo hacia el sitio activo en la CBS humana. La Arg266 en un extremo de la hélice establece un contacto con el tiolato de la Cys53 ligada al hemo. El otro extremo de la hélice se proyecta hacia el sitio activo estableciendo contactos electrostáticos con el fosfato del PLP [80]. La información estructural se obtuvo de PubMed (código de acceso 1JBQ) [42] y se visualizó con el programa PyMOL Molecular Graphics Systems v0.99 [43].

Se ha propuesto una conexión a través de una hélice α , que nace en la Arg266, unida mediante puente de hidrógeno a la Cys52, y se extiende hasta la Thr257, que forma un puente de hidrógeno con el PLP. A través de la hélice α , los cambios en el entorno del hemo, como desplazamiento de la Cys52, repercutirían en el sitio activo induciendo una tautomerización de cetoenamina a enolimina que conduce a una disminución de la reactividad [65, 80, 88] (Figura 13).

4. POSIBLES REDUCTORES BIOLÓGICOS

El grupo hemo de la CBS se muestra particularmente inerte en estado oxidado. Sin embargo en estado reducido tiende a perder la coordinación con la cisteína y es capaz de unirse a diferentes ligandos como por ejemplo al CO y al 'NO disminuyendo la actividad enzimática.

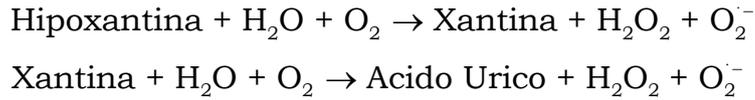
Basándose en esta información se ha propuesto para el hemo el rol de sensor redox, para lo cual es necesaria su reducción al estado ferroso.

El potencial de reducción del grupo hemo de la CBS trunca dimérica es de -0,291 V y aunque es bajo, no lo es tanto como para impedir su reducción *in vivo*. Considerando que el hemo en la CBS se encuentra particularmente expuesto, por lo cual estaría accesible a reductores celulares, los candidatos a reducirlo deben encontrarse en el citosol y poseer un potencial de reducción menor a -0,291 V. Algunos reductores biológicos podrían ser la metionina sintasa reductasa (potenciales de reducción de la forma semiquinona a hidroquinona de -0,291 y -0,227 V para FAD y FMN respectivamente), la óxido nítrico sintasa (-0,280 y -0,274 V), la oxidoreductasa NR1 (-0,365 y -0,305 V) y la xantina oxidasa (-0,255 V). De estas flavoproteínas profundizaremos aquí en la óxido nítrico sintasa (NOS) y la xantina oxidasa (XO).

4.1 Xantina oxidasa

La xantina oxidoreductasa es una enzima presente en la mayoría de las especies incluida la humana. En mamíferos se distribuye ampliamente en los tejidos pero principalmente la encontramos en hígado e intestino. Naturalmente existe en dos formas interconvertibles por la formación y ruptura de enlaces disulfuro. La xantina deshidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.204) utiliza como aceptor final de electrones al NAD^+ y alternativamente puede usar al O_2 . La xantina oxidasa (EC 1.1.3.22) solo utiliza como aceptor final de electrones al O_2 . En un proceso irreversible la XDH es transformada en XO por proteólisis [89].

La XO participa en las fases finales del catabolismo de las purinas en mamíferos, catalizando la oxidación de la hipoxantina y la xantina a ácido úrico, al mismo tiempo que reduce al oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y radical anión superóxido.



En la forma activa de la enzima los monómeros actúan de forma independiente. Cada subunidad contiene un cofactor molibdopterina, dos centros [2Fe-2S] y un cofactor FAD. Los sustratos reductores como la xantina intercambian los electrones a nivel del Mo mientras que los sustratos oxidantes como el NAD⁺ o el O₂ lo hacen a nivel del FAD.

El potencial de reducción del par FAD[•]/FADH₂ en la XDH es de -0,340 V [90] mientras que en la XO es de -0,255 V [91].

4.2 Óxido nítrico sintasas

Las óxido nítrico sintasas (EC: 1.14.13.39) constituyen una familia de enzimas responsables de transformar la L-arginina en óxido nítrico y citrulina mediante una reacción de oxidorreducción. En mamíferos se expresan tres isoformas de NOS que se conocen como: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) [92]. En cualquiera de los casos se trata de un dímero. Cada subunidad presenta en su estructura dos dominios. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio oxigenasa que une tetrahydrobiopterina (BH₄), un grupo hemo y L-arginina. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio reductasa que une FMN, FAD y NADPH. Entre ambos dominios se encuentra un sitio de reconocimiento a la calmodulina [93].

Esta familia de enzimas que generalmente se presenta como dímeros en realidad son tetrámeros si se tiene en cuenta la calmodulina necesaria para ejercer su actividad. Los tres dominios, calmodulina, oxigenasa y reductasa pueden expresarse por separado y han sido muy bien estudiados [94].

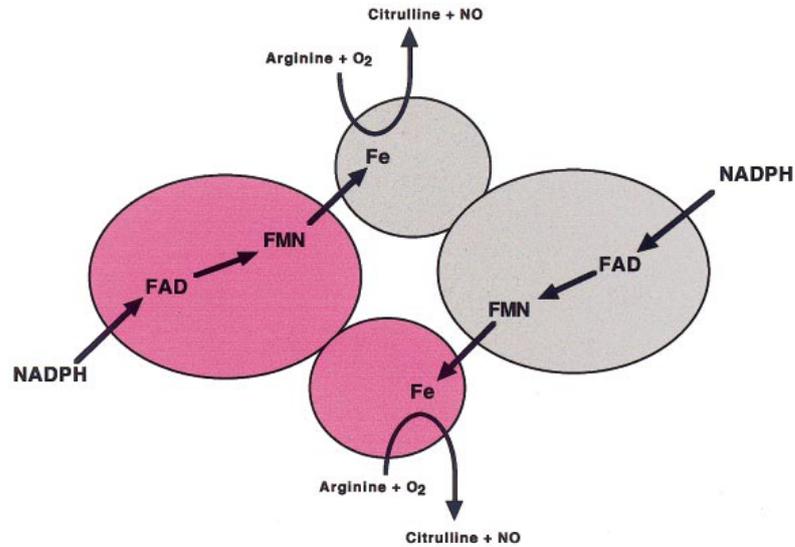


Figura 14: Dominios de la NOS. Los electrones son donados por el NADPH al dominio reductasa de la enzima, proceden vía FAD y FMN hacia el dominio oxigenasa en donde interactúan con el ión de hierro y la tetrahidrobipterina en el sitio activo. La enzima cataliza la reacción del O₂ con la arginina generando citrulina y óxido nítrico como productos. El flujo de electrones por el dominio reductasa requiere la presencia de Ca⁺⁺/CaM. Figura tomada de [95].

Los potenciales redox están posicionados termodinámicamente para que el flujo de electrones ocurra desde el dominio reductasa de un monómero NADPH→FAD→FMN hacia el hemo del dominio oxigenasa ubicado en el otro monómero [96].

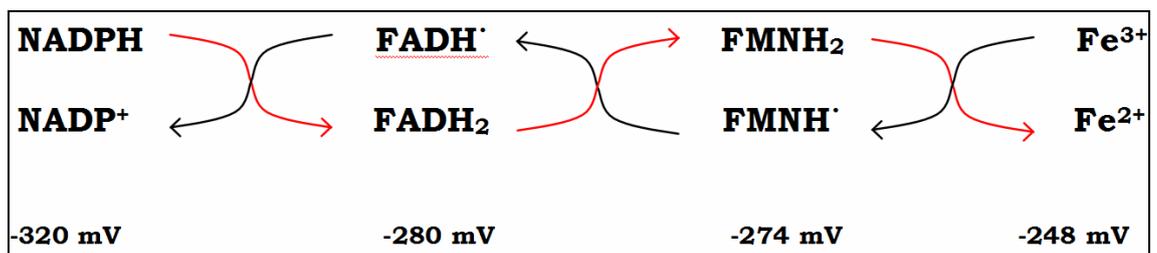


Figura 15: Dirección del flujo de electrones y potenciales redox en nNOS. Se muestran los potenciales de oxidación de cada reacción y las flechas rojas indican la dirección del flujo de electrones. Esquema adaptado de [95]. Información obtenida de [97].

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El grupo hemo de la CBS resulta inerte en estado oxidado, no así en estado ferroso. Una vez reducido interacciona con distintos ligandos como monóxido de carbono, óxido nítrico y cianuro disminuyendo la actividad enzimática. A su vez, puede reaccionar con oxígeno formando radical superóxido, constituyendo una fuente potencial de especies reactivas. El potencial de reducción reportado para el hemo de la CBS trunca dimérica es de $-0,291$ V y aunque es bajo, lo cual denota su estabilidad en estado férrico, no lo es tanto como para impedir su posible reducción *in vivo*.

De acuerdo con estas consideraciones, el conocimiento de la reducción biológica del hemo de la CBS es central para poder determinar el rol de este cofactor en la enzima. En el presente trabajo se propone estudiar la reducción del grupo hemo de la CBS trunca dimérica utilizando un reductor químico y abordar la reducción biológica exponiendo a la CBS purificada a distintos sistemas bioquímicos que incluyen fracciones subcelulares y reductasas citosólicas purificadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar la reducción química por ditionito de sodio del grupo hemo de la CBS.
- 2) Abordar la reducción del grupo hemo de la cistationina β -sintasa trunca dimérica por sistemas bioquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Todos los reactivos usados se adquirieron en Sigma-Aldrich o en AppliChem. La xantina oxidasa fue purificada por Beatriz Alvarez y Laura Celano en el Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias (UdelaR). El dominio reductasa de la óxido nítrico sintasa fue cedido por Dennis J. Stuehr, Cleveland Clinic.

2. CBS

La CBS purificada fue cedida por Ernesto Cuevasanta (Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias). Se purificó a partir de una cepa de BL-21 (DE3) de *Escherichia coli* transformada con el plásmido pGEX4T1/hCBSΔC143 que es capaz de producir la CBS humana trunca dimérica fusionada con el dominio de la glutatión S-transferasa en el extremo N-terminal [98].

3. ANAEROBIOSIS

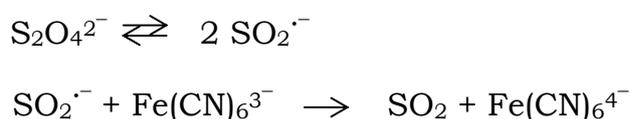
Se trabajó en condiciones anaeróbicas sellando a la celda y a las soluciones con septos de goma y burbujeándolas de forma constante e intensa con argón conectado a una trampa de agua durante el degaseo para evitar la evaporación. Además, se utilizó un sistema de consumo de O₂ compuesto por glucosa (glc, 100 mM), glucosa oxidasa (GO, 8 U/mL) y catalasa (Cat, 260 U/mL) para eliminar las trazas remanentes de oxígeno [99].

Todas las soluciones fueron hechas en el momento del experimento y transferidas con jeringas Hamilton “gastigth”. La solución amortiguadora anaeróbica fue preparada disolviendo las sales de fosfato en agua destilada hervida y burbujeada con argón.

4. CUANTIFICACIÓN DE DITIONITO DE SODIO CON FERRICIANURO DE POTASIO

Esta cuantificación se fundamenta en los cambios de absorbancia que experimenta el ferricianuro cuando sufre una reducción. El máximo de absorbancia observado para el ferricianuro se da a 420 nm ($\epsilon_{420} = 1020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [100].

En la reacción del ditionito con el ferricianuro se asume una estequiometría 2:1 considerando que el reductor es la especie radical anión dióxido de azufre ($\text{SO}_2^{\cdot-}$), producto de la homólisis del ditionito de sodio de acuerdo con la siguiente reacción:



5. OBTENCIÓN DE LA CBS REDUCIDA

La CBS se presenta con su grupo hemo oxidado como Fe(III). Una vez reducido el hemo reacciona rápidamente con el oxígeno volviendo a su estado oxidado inicial. Sólo es posible mantener la enzima reducida bajo las estrictas condiciones de anaerobiosis descritas en el punto 3.

La reducción química del hemo se realizó con soluciones de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) en NaOH 0,1 N degaseada, monitoreando espectrofotométricamente el nivel de reducción de la CBS por el corrimiento de la banda de Soret de 428 a 449 nm. Cuando fue necesario se cuantificaron las soluciones con ferricianuro de potasio. Las soluciones de CBS se prepararon en amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM) previamente burbujeada con argón.

6. ESTUDIO DE LA CINÉTICA RÁPIDA DE REACCIÓN ENTRE EL DITIONITO DE SODIO Y EL GRUPO HEMO DE LA CBS

Los experimentos de cinética rápida se realizaron en un espectrofotómetro (Varian Cary 50) acoplado a un accesorio de flujo detenido (Applied Photophysics, RX2000). En todos los casos se utilizó amortiguador fosfato (0,2 M concentración final, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM final) y se midió el pH de la mezcla al inicio y al final de cada reacción para descartar posibles cambios por el NaOH presente en la solución de ditionito de sodio. La temperatura en la celda de reacción se mantuvo a 25 °C.

Para asegurar la anaerobiosis se lavó e incubó el equipo toda la noche con una solución de ditionito de sodio para eliminar las trazas de oxígeno presentes. Para remover el ditionito se utilizó luego amortiguador fosfato desoxigenado.

La cinética de reacción entre el ditionito de sodio y la enzima se siguió a 449 nm donde la variación en la absorbancia se debe únicamente a los cambios de estado de la enzima de oxidada a reducida. Con el fin de trabajar en condiciones de pseudo primer orden se utilizó una concentración única final de CBS (2 μ M) y concentraciones de ditionito de sodio finales de 0,10 a 4 mM en NaOH 0,1 N.

A partir del ajuste de los cursos temporales a una función exponencial se obtuvieron las constantes observadas (k_{obs}), que luego se graficaron en función de la concentración de ditionito de sodio y de la raíz de la concentración de ditionito de sodio para determinar el orden y el valor de la constante de velocidad de la reacción de reducción.

7. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

7.1 Extracto libre de células

El hígado de rata fue cedido por Adriana Cassina (Facultad de Medicina) quien cuenta con los permisos necesarios para trabajar con animales.

La obtención del extracto libre de células la realizó Sebastián Carballal siguiendo protocolos publicados [101]. El homogeneizado de hígado de rata en amortiguador tris 50 mM, pH 7,4, sacarosa 0,25 M, se centrifugó a 900 g por 20 minutos y el sobrenadante se conservó a 4 °C.

7.2 Partículas submitocondriales

Al sobrenadante de la centrifugación previa se lo centrifugó durante 1 h a 10000 g a 4 °C. El sobrenadante contiene el extracto citosólico y el pellet la fracción mitocondrial. Se resuspendió el pellet en 1 mL de amortiguador tris 50 mM, pH 7,4 con sacarosa 0,25 M y se obtuvo la fracción de partículas submitocondriales (PSM). Se conservó a 4 °C.

7.3 Fracción microsomal

Al sobrenadante de la centrifugación previa se lo centrifugó a 100.000 g durante 1 h y 4 °C. Finalmente, se obtuvo la fracción microsomal (FM) del pellet resuspendido en 1 mL de amortiguador tris 50 mM, pH 7,4 con sacarosa 0,25 M. Se conservó a 4 °C.

8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración proteica se determinó por el método de Bradford [102]. Este método se basa en el cambio de las propiedades espectrofotométricas del azul de Coomassie cuando se une a la proteína. Este compuesto interacciona con aminoácidos hidrofóbicos y básicos (especialmente arginina). En solución de ácido fosfórico presenta un color

entonces un descenso en la absorbancia a 600 nm, ($\epsilon_{600\text{nm}} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 7) [103].

9.2 Partículas submitocondriales

En esta fracción se encuentra la cadena respiratoria. Su función es aceptar los electrones donados por el NADH y otros sustratos para finalmente, luego de varios procesos de oxidorreducción, cederlos al oxígeno. Para comprobar la capacidad de transferir electrones del extracto de PSM se usó al citocromo c como aceptor final. La reducción del citocromo c se monitoreó a través de su espectro UV-visible. Se distinguen tres cambios en el espectro del citocromo c cuando se reduce, aparecen dos picos en el entorno de 521 y 550 nm correspondientes a las bandas β y α respectivamente y el pico principal se corre a los 415 nm [104].

Alternativamente se observó la disminución de la absorbancia a 340 nm de la solución de la fracción de PSM y NADH. El NADH tiene un máximo de absorción a 340 nm que se pierde al ser oxidado.

10. EXPOSICIÓN DE LA CBS A LOS EXTRACTOS

CELULARES

En los intentos de reducir a la CBS por sistemas bioquímicos se ideó un protocolo en el que se incluía:

- Un sistema de consumo de oxígeno compuesto por glc-GO-Cat.
- Nucleótidos de piridina y/o flavinas
- CBS
- El sistema bioquímico reductor a utilizar
- Cianuro de potasio y/o un dador de óxido nítrico
- Exceso de ditionito como control

Se partió del orden de agregado recién mencionado y se efectuaron los cambios que están identificados en cada caso en el apartado de resultados y discusión. También se detallan las concentraciones utilizadas.

11. MEDIDAS DE CONSUMO DE O₂

Se utilizó un oxímetro Cole Parmer (Vernon Hills, IL, USA) conectado a un electrodo Clark (Modelo 5300, Yellow Springs Instrument Co.) La calibración del oxímetro se realizó con agua saturada en aire mediante el burbujeo con pipeta pasteur durante algunos minutos (solubilidad del oxígeno a 25 °C, 258 μM). El registro de los datos se realizó con el software aportado por el equipo DUO.18 (World Precision Instruments) y el análisis de los datos con Origin 6.1. En algunos casos la solución de CBS fue degaseada con argón antes de ingresar a la celda del oxímetro.

12. ESPECTROS UV-VISIBLE

Todos los registros de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 a temperatura ambiente.

13. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos se analizaron y graficaron utilizando el programa Origin 6.1 (Microcal Software).

Las estructuras cristalográficas se analizaron y visualizaron con el programa PyMol 0.99 [43] utilizando las coordenadas atómicas obtenidas del Protein Data Bank con el código de acceso 1JBQ [42].

La cinética de la reacción de la CBS con el ditionito de sodio fue simulada con el programa Gepasi versión 3.0 [105-107].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE LA CBS

1.1. Espectro UV-visible

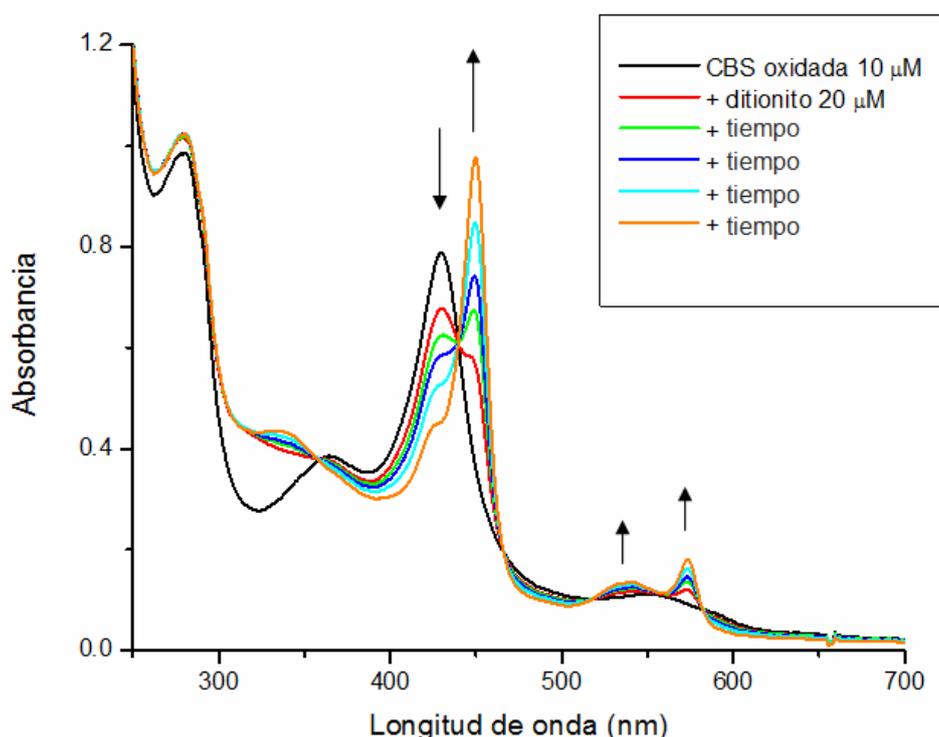


Figura 17: Espectro UV-visible de la CBS oxidada y reducida. En una celda tapada con septo de goma se agregó la solución previamente degaseada de CBS en amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM). Se redujo con el agregado de una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Ambas soluciones fueron transferidas con jeringas Hamilton y burbujeadas intensamente con argón.

El espectro UV-visible característico de la CBS es consecuencia de la presencia del hemo con contribuciones del PLP. La enzima en estado oxidado presenta un máximo a los 428 nm que corresponde a la banda y de Soret del grupo hemo y al aporte de la aldimina interna protonada ($\lambda_{\text{máx}}$ 420 nm). A 550 nm se observa un máximo poco definido correspondiente a la banda $\alpha\beta$ del hemo y a 364 nm absorbe la banda δ del hemo y parcialmente la aldimina desprotonada del PLP ($\lambda_{\text{máx}}$ 330 nm).

Cuando el grupo hemo se reduce, la banda γ y de Soret sufre un corrimiento hacia los 449 nm y se muestran dos picos de absorbancia extra a los 540 y 571 nm que corresponden a las bandas β y α respectivamente. En la zona entre los 300 y 340 nm absorbe el ditionito de sodio utilizado para reducir a la enzima. Se observan en la figura 17 varios puntos isobésticos demostrando la ausencia de estados intermedios de la enzima entre los estados oxidado y reducido. El máximo que se encuentra en los 280 nm es ocasionado por los aminoácidos aromáticos que componen la estructura de la enzima. Según los datos reportados, la relación entre las absorbancias registradas a 280 nm y 429 nm en el espectro de la enzima oxidada debe tener una relación de aproximadamente 1, indicando si se cumple un buen estado de purificación de la enzima [57, 73, 108].

1.2. Medida de la concentración proteica

Se determinó la concentración proteica de la CBS stock por el método de Bradford. La curva de calibración se muestra en la figura 18. La concentración calculada a partir del ajuste lineal teniendo en cuenta el PM de la enzima trunca dimérica (45000 g/mol) es de $65,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$. Los datos de purificación de la enzima indicaron una concentración de $57 \pm 17 \mu\text{M}$ [98].

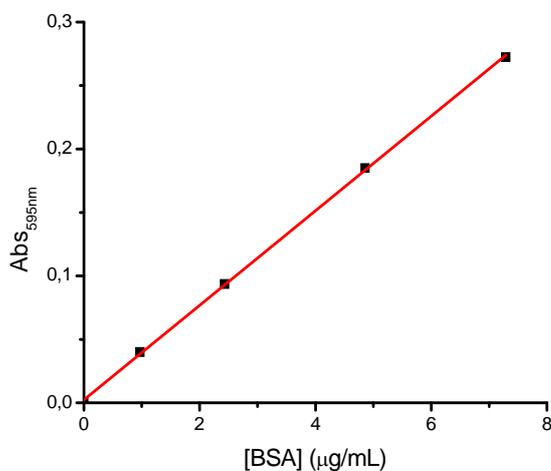


Figura 18: Curva de calibración para cuantificar CBS por el método de Bradford. Se construyó con cantidades conocidas de proteína de una solución de BSA 0,28 mg/mL. Los datos se ajustaron a la mejor recta:

$$\text{Abs}_{595\text{nm}} = 0,0373 (\mu\text{g}^{-1} \text{ mL}) \times [\text{BSA}] (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0,0024$$

$$(R = 0,99965).$$

2. CINÉTICA DE LA REDUCCIÓN DEL HEMO DE LA CBS CON DITIONITO DE SODIO

Se utilizó la técnica de espectrofotometría de flujo detenido para determinar la cinética de la reacción entre la CBS y el ditionito de sodio. Se trabajó en condiciones de pseudo primer orden manteniendo la concentración de la CBS constante ($1,9 \mu\text{M}$) y variando la concentración de ditionito de sodio ($100\text{--}4000 \mu\text{M}$). Cada corrida se realizó por triplicado.

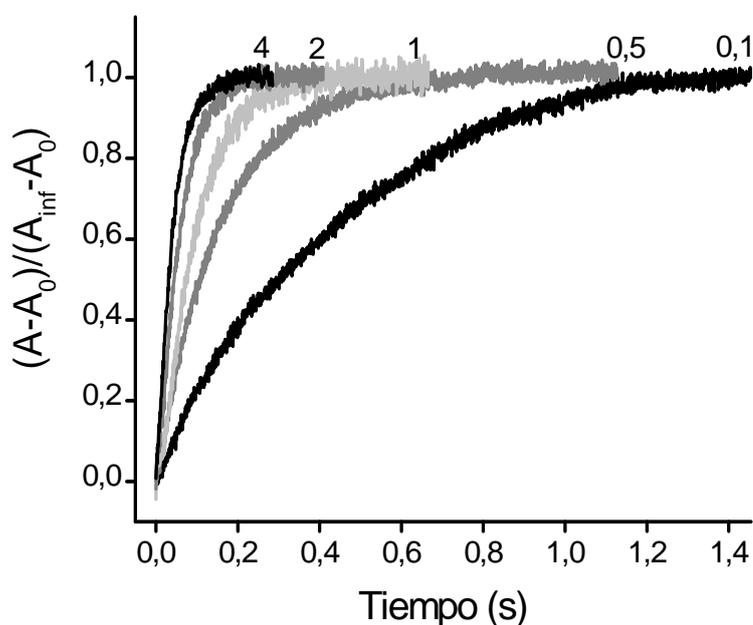


Figura 19: Gráfica representativa normalizada del aumento de absorbancia a 449 nm por la reacción de la CBS con ditionito de sodio. Se mezcló CBS ($1,9 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato ($0,2 \text{ M}$, pH 7,4) con DTPA ($0,2 \text{ mM}$) y $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$. Las concentraciones finales utilizadas de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ son: 0,1, 0,5, 1, 2 y 4 mM. Todas las soluciones fueron degaseadas con argón. Registro obtenido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los datos ajustaron a una función exponencial hasta las siete vidas medias.

Utilizando el programa OriginPro 6.1 se procesaron los datos obtenidos para cada concentración de ditionito. Todos ajustaron una función exponencial, que corresponde a una reacción de orden 1 con

respecto a la CBS, el reactivo en defecto. En algunos casos, particularmente cuando habían transcurrido tiempos relativamente largos desde el llenado de las jeringas, se observaba, pasadas las siete vidas medias, una segunda fase más lenta. Esta segunda fase se podía deber a la presencia de oxígeno. Éste reoxidaba parte de la enzima, la cual se volvía a reducir por el exceso de ditionito de sodio, generando la segunda fase, una recta con pendiente positiva. Dichos datos fueron ajustados a una función exponencial hasta las siete vidas medias y a una función exponencial más recta. No se registraron cambios significativos al comparar las constantes exponenciales surgidas de ambas funciones.

$$\text{Ecuación exponencial: } \text{Abs}_{449\text{nm}} = P_1(1 - e^{-P_2t}) + P$$

$$\text{Ecuación exponencial más recta: } \text{Abs}_{449\text{nm}} = P_1(1 - e^{-P_2t}) + P_3t + P$$

Las constantes exponenciales P_2 (s^{-1}) o k_{obs} fueron determinadas a partir del aumento exponencial de Fe(II)CBS a 449 nm versus tiempo para cada concentración de ditionito de sodio. Se puede observar en la tabla 1 el promedio de la k_{obs} correspondiente a cada concentración de ditionito.

$[\text{S}_2\text{O}_4^{2-}]$ (mM)	k_{obs} (s^{-1}) (promedio \pm desv. estándar)
0,102	$1,797 \pm 0,257$
0,510	$6,548 \pm 0,374$
1,020	$10,645 \pm 0,118$
2,040	$17,045 \pm 1,073$
4,080	$23,779 \pm 0,976$

Tabla 1: Promedio y desviación estándar de las k_{obs} con las concentraciones finales de ditionito correspondientes.

Se graficaron los datos de la tabla 1, k_{obs} vs [ditionito] (Figura 20A). En la gráfica no se encontró una relación lineal entre las variables, mientras que en la gráfica k_{obs} vs [ditionito]^{1/2} (Figura 20B) sí se observó

una dependencia lineal. El ajuste correspondió a una recta con un valor de pendiente de 421 ($M^{-1/2} s^{-1}$).

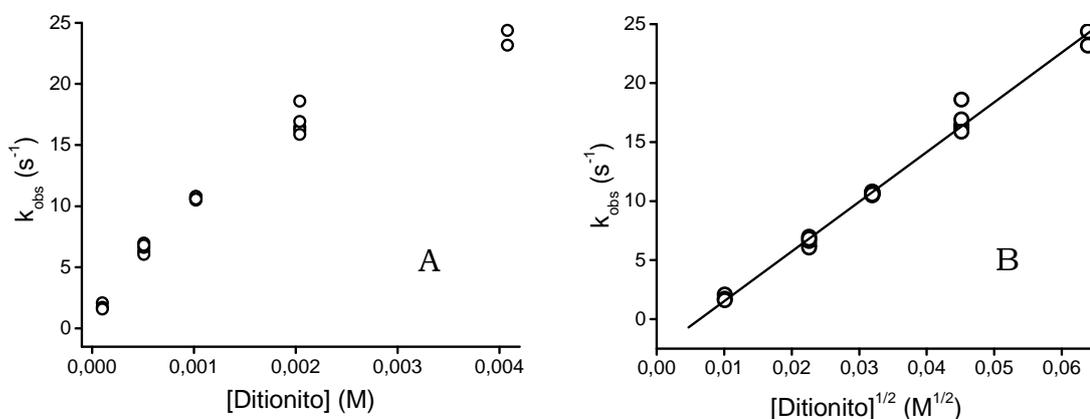
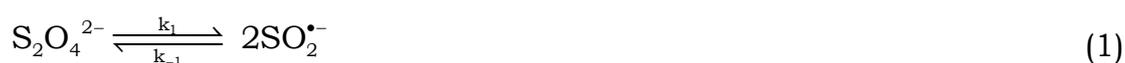


Figura 20: Dependencia entre la k_{obs} y la concentración de ditionito. En A se indica k_{obs} vs. [ditionito] y en B k_{obs} vs. [ditionito]^{1/2}. El ajuste lineal de B corresponde a la siguiente recta: $k_{obs} = 421 (s^{-1} M^{-1/2})[S_2O_4^{2-}]^{1/2} (M^{1/2}) - 2,7 (s^{-1})$, $R = 0,99519$. Las k_{obs} se determinaron a partir del ajuste exponencial para cada concentración de $S_2O_4^{2-}$.

Los resultados obtenidos indican que la especie reductora es el radical anión dióxido de azufre ($SO_2^{\bullet-}$) formado en un equilibrio rápido previo. Las dos reacciones que describen el mecanismo de reducción de la CBS con el ditionito son:



Las velocidades de reacción se pueden describir como:

$$-\frac{d[S_2O_4^{2-}]}{dt} = k_1[S_2O_4^{2-}] - k_{-1}[SO_2^{\bullet-}]^2 \quad (3)$$

$$\frac{d[SO_2^{\bullet-}]}{dt} = 2k_1[S_2O_4^{2-}] - 2k_{-1}[SO_2^{\bullet-}]^2 - k_{CBS/SO_2^{\bullet-}}[SO_2^{\bullet-}][CBS]_{ox} \quad (4)$$

$$\frac{d[CBS]_{red}}{dt} = -\frac{d[CBS]_{ox}}{dt} = k_{CBS/SO_2^{\bullet-}}[SO_2^{\bullet-}][CBS]_{ox} \quad (5)$$

Si se asume la hipótesis de estado estacionario se puede igualar la ecuación (4) a cero y llegar a la expresión:

$$2k_1 [S_2O_4^{2-}] = [SO_2^{\bullet-}] (2k_{-1} [SO_2^{\bullet-}] + k_{CBS/SO_2^{\bullet-}} [CBS]) \quad (6)$$

El equilibrio entre el ditionito de sodio y el producto de su homólisis el radical anión dióxido de azufre es rápido y no es afectado por la reacción del radical con la CBS oxidada. Como consecuencia se puede prescindir del término $k_{CBS/SO_2^{\bullet-}} [CBS]$ en la ecuación 6 obteniéndose la expresión:

$$\left(\frac{k_1}{k_{-1}} [S_2O_4^{2-}] \right)^{1/2} = [SO_2^{\bullet-}] = \sqrt{K} \sqrt{S_2O_4^{2-}} \quad (7)$$

Sustituyendo la concentración de $SO_2^{\bullet-}$ en la ecuación 5 se obtiene la ecuación 8, en donde K es la constante de equilibrio de la reacción 1, que ya ha sido reportada y vale $1,4 \times 10^{-9}$ M [109, 110].

$$\frac{d[CBS]_{red}}{dt} = -\frac{d[CBS]_{ox}}{dt} = k_{CBS/SO_2^{\bullet-}} (K [S_2O_4^{2-}])^{1/2} [CBS]_{ox} \quad (8)$$

Cuando la concentración de $S_2O_4^{2-}$ se encuentra en exceso suficiente para estar en condiciones de pseudo primer orden, es válida la ecuación 9.

$$k_{obs} = k_{CBS/SO_2^{\bullet-}} K^{1/2} [S_2O_4^{2-}]^{1/2} \quad (9)$$

De la información obtenida en la figura 20B y utilizando el valor de K reportado [109, 110] se llegó a un valor de $(k_{CBS/SO_2^{\bullet-}})$ para la reducción de la CBS y el ditionito de:

$$k_{CBS/SO_2^{\bullet-}} = (1,13 \pm 0,03) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Se han encontrado otras hemoproteínas que presentan el mismo comportamiento frente al ditionito: citocromo c ($3,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),

citocromo b-558 solubilizado ($7,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y metamioglobina de caballo ($2,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [112].

Simulación de la reacción entre la CBS y $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$

La variación de la concentración de la CBS en el tiempo en determinados casos ajustaba a una función exponencial más recta. Se supuso que una pequeña concentración de oxígeno era la causante de la segunda fase. Aunque el promedio de las pendientes era pequeño, del orden de 10^{-3} y no afectaba el valor de k_{obs} , se realizaron distintas simulaciones de la reducción de la CBS con el ditionito en el programa Gepasi con el fin de comprobar la hipótesis planteada sobre la desviación experimental del modelo planteado por la presencia de oxígeno. Las ecuaciones ingresadas al programa con sus respectivas constantes se muestran en la tabla 2.

Reacción	Constante de velocidad	Referencia
$\text{CBS}_{\text{ox}} + \text{SO}_2^{\bullet-} \xrightarrow{k_{\text{CBS}/\text{SO}_2^{\bullet-}}} \text{CBS}_{\text{red}} + \text{SO}_2$	$1,13 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Este trabajo
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} \xrightleftharpoons{K} 2 \text{SO}_2^{\bullet-}$	$2,5 \text{ s}^{-1} \text{ (d)}, 1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (r)}$	[109, 110]
$\text{SO}_2^{\bullet-} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{SO}_2 + \text{O}_2^{\bullet-}$	$1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[109]
$2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	$2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[111]
$\text{CBS}_{\text{red}} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{CBS}_{\text{ox}} + \text{O}_2^{\bullet-}$	$1,11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[75]
$\text{CBS}_{\text{red}} + \text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{CBS}_{\text{ox}} + \text{H}_2\text{O}_2$	$2-10 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[75]

Tabla 2: Reacciones de la CBS con el ditionito de sodio y sus productos de descomposición. Se muestran las reacciones que ocurren en la celda en presencia de oxígeno. Se indican las constantes de cada una con la referencia correspondiente.

En las simulaciones realizadas se fijó la concentración de CBS oxidada en 0,5 y 2 μM y se variaron las concentraciones iniciales de ditionito en el rango de las utilizadas en la práctica. Se probaron diversas concentraciones iniciales de oxígeno.

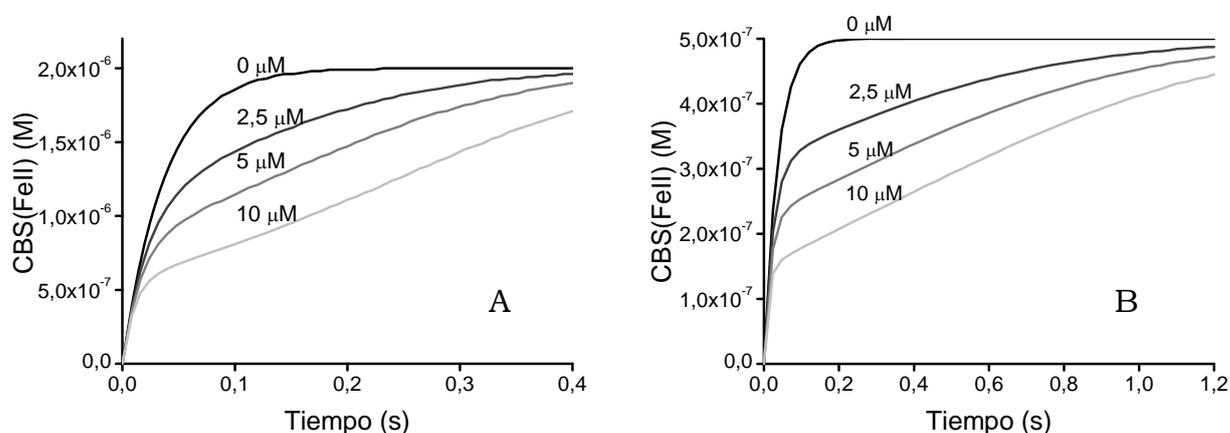


Figura 21: Simulación en el programa Gepasi. Se utilizó el sistema de ecuaciones de la tabla 2 y las concentraciones iniciales: ditionito 100 μM ; O_2 , 0-10 μM ; CBS Fe(III) 0,5 μM (A) y 2 μM (B). Los límites de tiempo utilizados en las simulaciones corresponden con las siete vidas medias para cada concentración de CBS utilizada

Para todas las condiciones de trabajo se visualizó un ajuste a una exponencial cuando no existía presencia de oxígeno (Figura 21A) mientras que con la presencia de 2,5, 5 y 10 μM de oxígeno (Figura 21B), el ajuste correspondía a una exponencial más recta. Se verificó entonces que las desviaciones a la exponencial se debían a la aparición de O_2 . Cuando la concentración de oxígeno superaba los 10 μM el curso temporal de la CBS no ajustaba a esta función.

En las simulaciones también se observó que cuando la relación entre las concentraciones de CBS oxidada y ditionito de sodio se acercaba a 1, la constante de la reacción se acercaba a 2,5 s^{-1} , que es el valor de la constante de homólisis del ditionito (datos no mostrados) [109, 110].

3. EXPOSICIÓN DE LA CBS A SISTEMAS BIOQUÍMICOS

3.1. Medidas de la concentración proteica de los extractos subcelulares

Se midieron las concentraciones proteicas de tres preparados: de la fracción libre de células de hígado de rata, de la fracción submitocondrial y de la fracción microsomal.

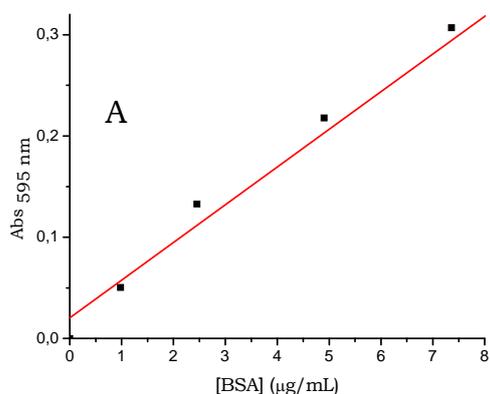
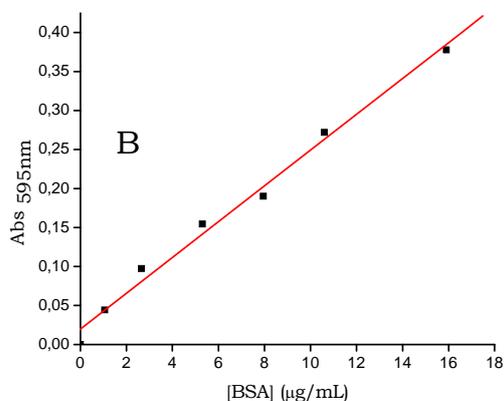


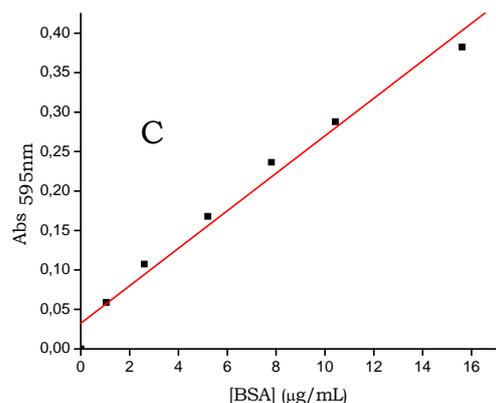
Figura 22: Curvas de calibración para cuantificar proteínas por el Método de Bradford del extracto libre de células (A), partículas submitocondriales (B) y fracción microsomal (C). Las curvas se construyeron con cantidades conocidas de proteínas de una solución de BSA 0,49 mg/mL. La relación obtenida por un ajuste lineal a la mejor recta es:



A) $Abs_{595nm} = 0,0412 (\mu g^{-1} mL) \times BSA (\mu g mL^{-1}) + 0,0122$ (R =0,9866).

B) $Abs_{595nm} = 0,0230 (\mu g^{-1} mL) \times BSA (\mu g mL^{-1}) + 0,0197$ (R =0,9946).

C) $Abs_{595nm} = 0,0324 (\mu g^{-1} mL) \times BSA (\mu g mL^{-1}) + 0,0238$ (R =0,9898).



Se utilizaron cuatro diluciones de cada muestra. Se mezcló cada dilución por triplicado con el reactivo de Bradford. De la comparación con las respectivas curvas de calibración se deducen las concentraciones de cada extracto (Tabla 3).

Fracción	Conc. (mg/mL)
Libre de células	12,6
Submitocondrial	5,0
Microsomal	31,9

Tabla 3: Concentraciones proteicas de los extractos subcelulares. Las concentraciones se determinaron por el método de Bradford.

3.2. Extracto libre de células

Actividad reductora del extracto

Como candidato para reducir a la CBS, era fundamental que el extracto libre de células tuviera poder reductor. Para detectarlo se observó si el extracto libre de células (0.12 mg/mL) era capaz de reducir al DCFIF (50 μ M) en presencia de donadores de electrones como el NADH (100 μ M) y NADPH (100 μ M) (Figura 23).

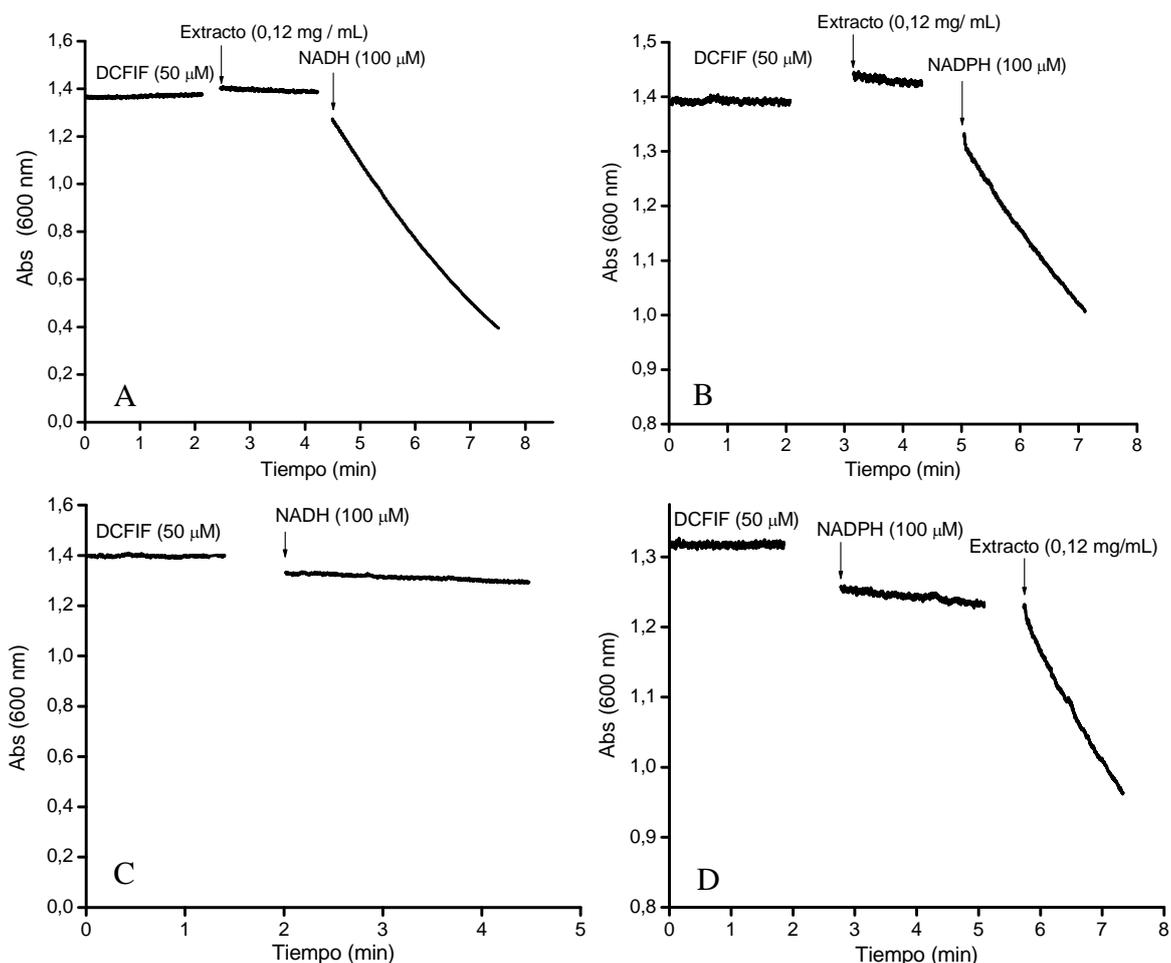


Figura 23: Reducción del DCFIF expuesto al extracto libre de células. En A y B se mezcló en el siguiente orden: DCFIF (50 μ M), extracto libre de células (0,12 mg/mL) y NAD(P)H (100 μ M). C es un control sin agregado de extracto y en D se cambió el orden de agregado. En todos los casos se midió la absorbancia a 600 nm y 25°C.

Cuando se expuso el DCFIF al extracto libre de células junto con un donador de electrones se observó una disminución de la absorbancia a 600 nm confirmando la reducción del DCFIF con el extracto libre de

células. En la figura 23, partes C y D se muestran los controles realizados, en los que en ausencia de extracto, no se observa disminución en la absorbancia.

Exposición de la CBS al extracto libre de células

Para evaluar la reducción de la CBS por el extracto libre de células se montó en la celda del espectrofotómetro un sistema de desoxigenación continuo que constaba de burbujeo con argón y Glc, GO y Cat. Todas las soluciones fueron degaseadas de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. Como donadores de electrones se utilizaron NADPH y NADH. También se adicionó en algunos casos FMN (Figura 24).

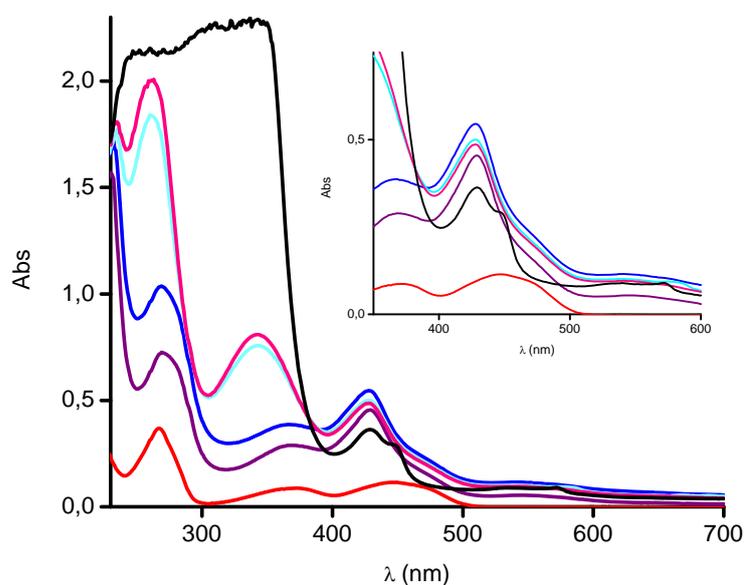


Figura 24: Exposición de la CBS al extracto libre de células. Los espectros registrados corresponden a: (—) FMN (5 mM) + Glc (100 mM) + GO (8 U/mL) + Cat (260 U/mL), (—) + CBS 9,3 μ M, (—) + extracto libre de células 0,13 mg/mL, (—) + NADPH 100 μ M, (—) + NADH 100 μ M. Se tomaron seis registros cada dos minutos, todos similares y (—) + ditionito de sodio en exceso. Inserto, se destacan los picos de la CBS oxidada (428 nm) y reducida (449 y 571 nm).

Los espectros registrados en la figura 24 presentan varios máximos de absorción característicos de las sustancias que los originan. El NADH produce un máximo en los 340 nm producido por la adenina que lo compone. El ditionito de sodio en solución tiene su λ_{max} a 314 nm, como consecuencia se observa un incremento en la absorción desde 250 nm

hasta 370 nm. Después del agregado de la CBS se observan dos picos de absorción, uno a 280 nm que es consecuencia de su estructura proteica y otro correspondiente a la banda de Soret que depende del estado de oxidación del grupo hemo. Cuando éste se encuentra oxidado el máximo se observa a 428 nm y en estado reducido se corre hacia los 449 nm. Sólo se observó el corrimiento del pico a los 449 nm cuando se agregó ditionito de sodio. Como alternativa para obtener un registro de la CBS reducida se realizaron experimentos con el agregado de CN^- (20 mM) que forma un complejo con la CBS reducida que absorbe a 435 nm tal como se indica en la figura 25 [77].

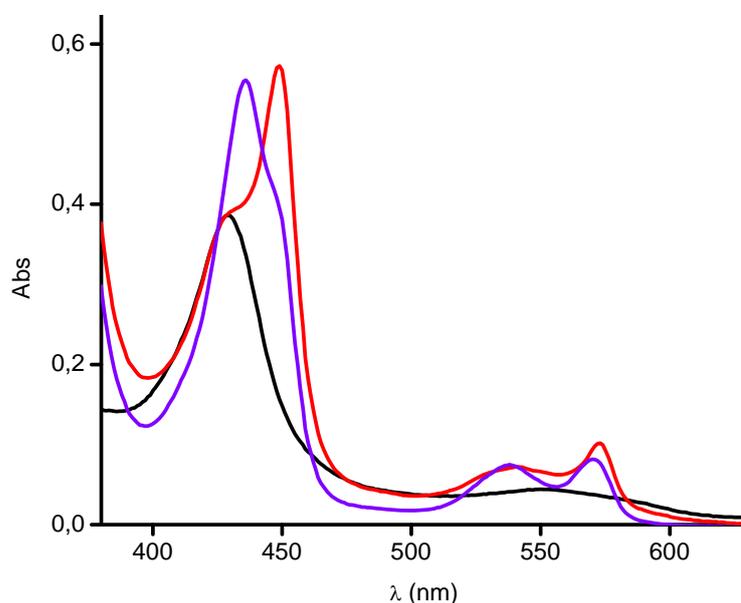


Figura 25: CBS reducida en presencia de cianuro. Se presentan los tres máximos de absorbancia. A los 428 nm el correspondiente a la CBS oxidada que se corre a los 449 nm cuando se reduce y a los 435 nm cuando la CBS reducida se une al CN^- . Los espectros registrados corresponden a: (—) glc (100 mM) + GO (8 U/mL) + Cat (260 U/mL) + CBS (9,3 μM), (—) + $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ (40 μM), (—) KCN (29 mM).

Se buscó reducir a la CBS con el extracto libre de células y observar dicha reducción al agregar CN^- como un pico a 435 nm.

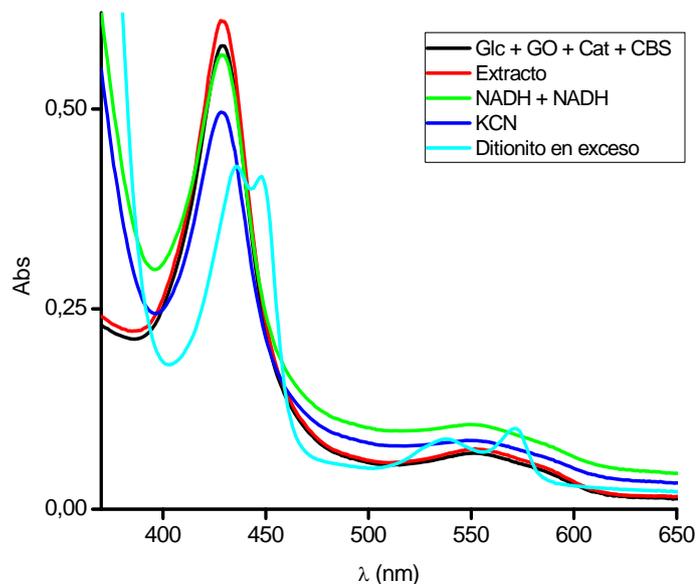


Figura 26: Exposición de la CBS al extracto libre de células en presencia de cianuro.

Se registraron los espectros en amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7.4) con DTPA (0,2 mM). Se agregó Glc (100 mM), GO (8 U/mL), Cat (260 U/mL) y CBS (9,3 μ M), el extracto libre de células (0,137 mg/mL), el NADH (100 μ M) y NADPH (100 μ M), KCN (20 mM) y ditionito en exceso.

No se observó reducción de la CBS por el extracto celular. Solo se observó el pico a 435 nm cuando se agregó como control ditionito de sodio (Figura 26).

Consumo de oxígeno

Dada la rápida reacción del hemo reducido con el oxígeno, como alternativa se realizaron experimentos en los que se siguió el consumo de oxígeno de las fracciones subcelulares en presencia de CBS y NAD(P)H. En algunos casos fue necesario degasear previamente las soluciones de CBS y NAD(P)H para obtener registros mas claros.

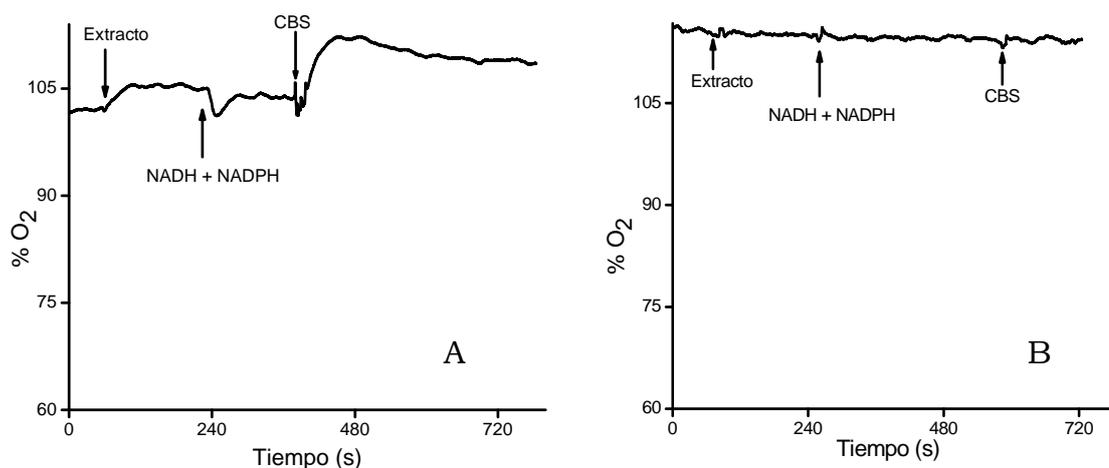


Figura 27: Consumo de O₂ por el extracto libre de células en presencia de CBS. En ambos casos se agregó al amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM) y las diferentes soluciones como se indica: extracto libre de células (0,12 mg/mL), NADPH (100 μ M), NADH (100 μ M) y CBS (9,3 y 18,6 μ M en A y B respectivamente). En B las soluciones de NADPH, NADH y CBS se burbujearon con argón.

Alternativamente se midió el consumo de oxígeno de una solución de CBS (9,3 μ M) expuesta al extracto libre de células (0,12 mg/mL), NADH (250 μ M) y NADPH (250 μ M).

Los resultados obtenidos (Figura 27) no indican consumo de oxígeno en ninguno de los casos al agregar la CBS. Teniendo en cuenta la rápida reacción de la CBS reducida con el oxígeno [75], no se estaría formando la enzima reducida.

3.3. Extracto de partículas submitocondriales

Aunque la CBS es una enzima citosólica se utilizó el extracto de PSM como posible reductor de la misma. En este extracto se encuentra la cadena respiratoria que tiene la capacidad de transportar electrones donados y luego de varios procesos de oxidorreducción cederlos al oxígeno.

Actividad reductora del extracto

Para verificar si el extracto de partículas submitocondriales tenía capacidad reductora se preparó una solución de citocromo c ($10 \mu\text{M}$), NADH ($400 \mu\text{M}$) y PSM ($0,12 \text{ mg/mL}$). Se registraron los espectros a medida que se agregaron los distintos reactivos.

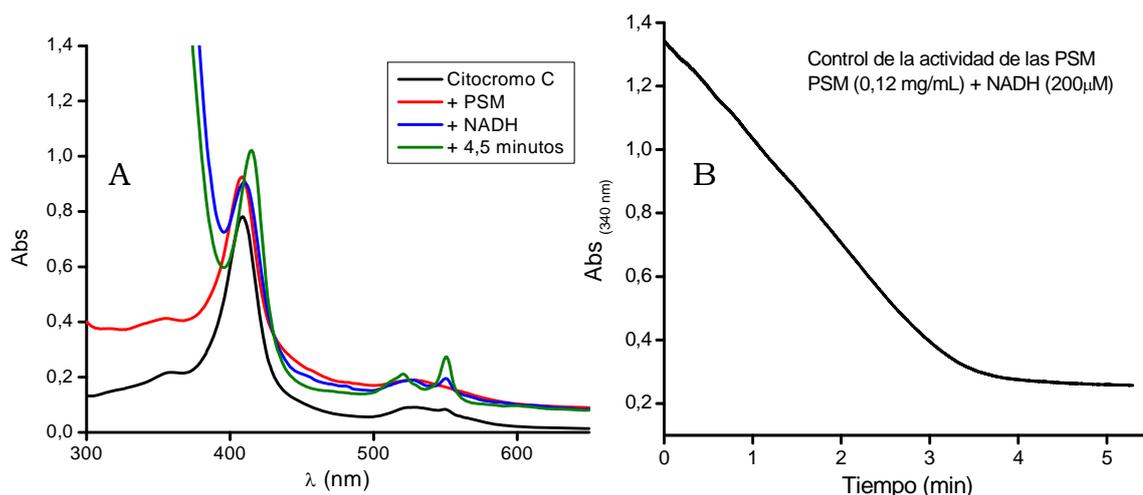


Figura 28: Actividad reductora del extracto de PSM. En A se usó citocromo c ($10 \mu\text{M}$), PSM ($0,12 \text{ mg/mL}$) y NADH ($400 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato (pH 7,4, $0,2 \text{ M}$) con DTPA ($0,2 \text{ mM}$). En B se utilizó igual amortiguador y se tomaron registros a 340 nm de una solución de PSM + NADH.

En la figura 28 (A) se muestra el espectro del citocromo c oxidado y al agregar la fracción de PSM no hay cambios en el espectro. Cuando se agrega el dador de electrones NADH se observa un pico en el espectro en el entorno de los 550 nm que corresponde a la banda α del hemo del citocromo c reducido y un aumento de la absorbancia a 340 nm . Después de unos minutos se ve el espectro del citocromo totalmente reducido, con incremento de la banda α , aparición en los 521 nm de la banda β y un corrimiento hacia los 415 nm de la banda γ . En la figura 28 (B) se observa la disminución de la absorbancia a 340 nm indicando consumo del NADH.

Exposición de la CBS a PSM

Se estudió si el extracto de PSM era capaz de reducir el grupo hemo de la CBS. Se registraron espectros en el UV-visible de soluciones anaeróbicas de la CBS con el extracto de PSM. Se usaron el NADH y el succinato como donadores de electrones. Los resultados se muestran en las figuras 29 y 30 respectivamente.

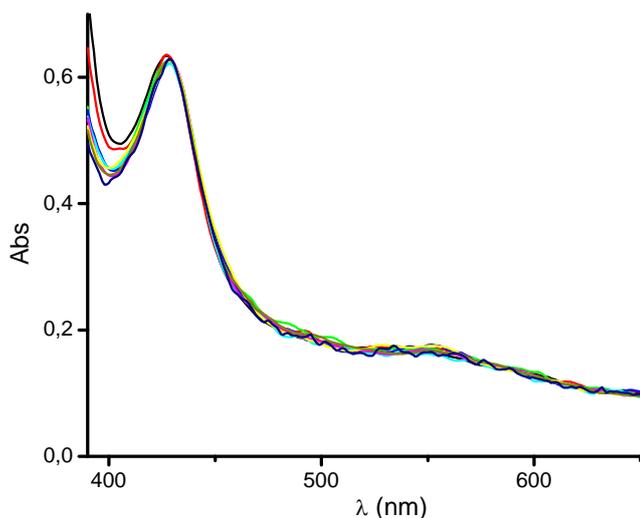
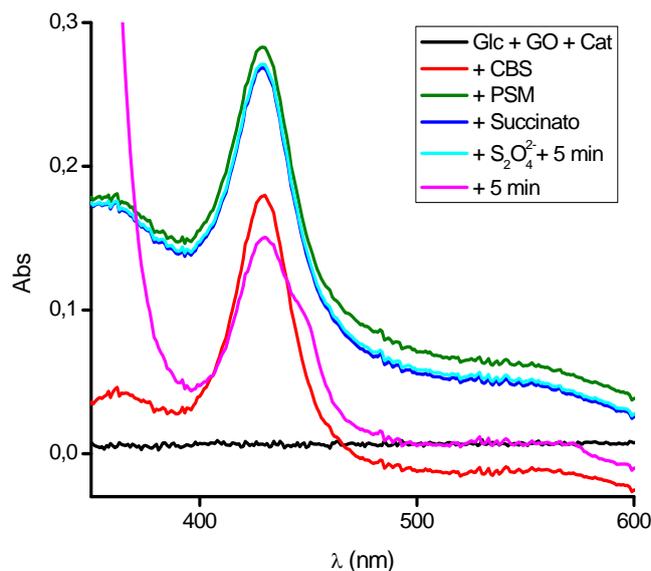


Figura 29: Exposición de la CBS al extracto de PSM y NADH. Se realizaron espectros UV-visible de una solución de PSM (0,12 mg/mL), CBS (9,3 μM) y NADH (1 mM). Los registros se tomaron cada tres minutos. Se muestran algunos de los registros. Inicialmente en la celda se encontraba el sistema de degaseo: Glc (100 mM), GO (8 U/mL), Cat (260 U/mL) en amortiguador fosfato (pH 7,4, 0,2 M) con DTPA (0,2 mM).

No se observó una disminución en el máximo a 428 nm que correspondería a un cambio de estado de la CBS de oxidada a reducida.

Figura 30: Exposición de la CBS al extracto de PSM y succinato.

Se realizaron espectros UV-visible de una solución de PSM (0,12 mg/mL), CBS (10 μM) y succinato (5 mM). La línea de base se hizo con el sistema de consumo de O₂, Glc (100 mM), GO (8 U/mL), Cat (260 U/mL). Como control de la reducción de la CBS se agregó S₂O₄²⁻ en exceso y se registraron espectros en distintos tiempos.



Consumo de oxígeno

En los estudios de oximetría realizados con la fracción de PSM también se trabajó con dos donadores de electrones: el NADH y el succinato. Cuando se trabajó con el NADH como donador de electrones no se detectaron cambios en el consumo de oxígeno (Figura 31).

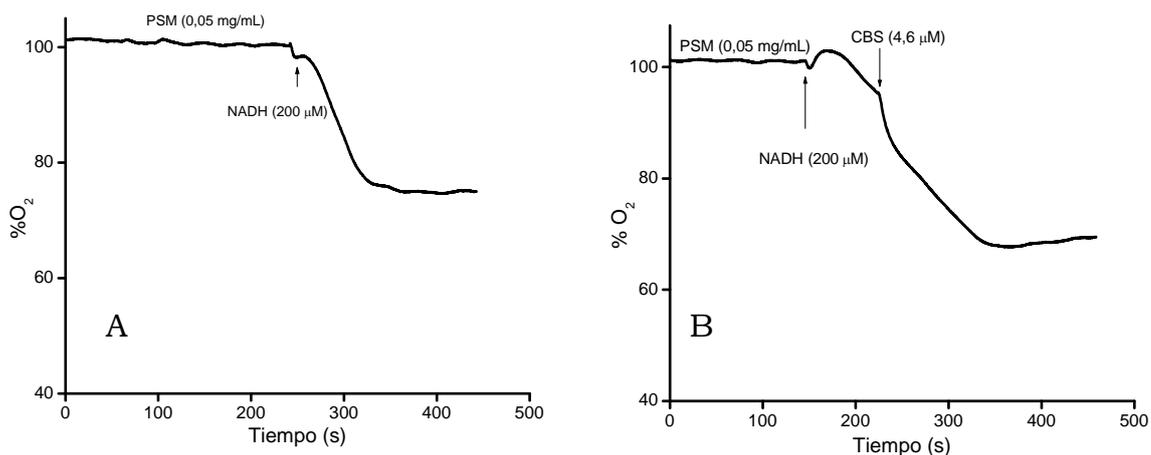


Figura 31: Consumo de O₂ por PSM y NADH en presencia de CBS. En el panel A observa un control del consumo de oxígeno cuando el NADH cede sus electrones a los componentes de la cadena respiratoria presente en la fracción de PSM. En el panel B se registró el consumo de O₂ de una solución de PSM en presencia de CBS y NADH en amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA 0,2 mM.

En lo que respecta al succinato como donador de electrones se observó una disminución en el consumo de oxígeno cuando se encuentra presente la CBS en una solución de PSM (Figura 32B). En la figura 32A se observa un control del consumo de O₂ cuando el succinato dona sus electrones a la cadena respiratoria y la CBS no está presente. Los experimentos se realizaron por duplicado obteniendo ambas veces igual resultado. Los datos obtenidos sugieren una inhibición de la cadena respiratoria, sin embargo, en los espectros de la CBS con las PSM y succinato (Figura 30) no se observó una reducción de la misma.

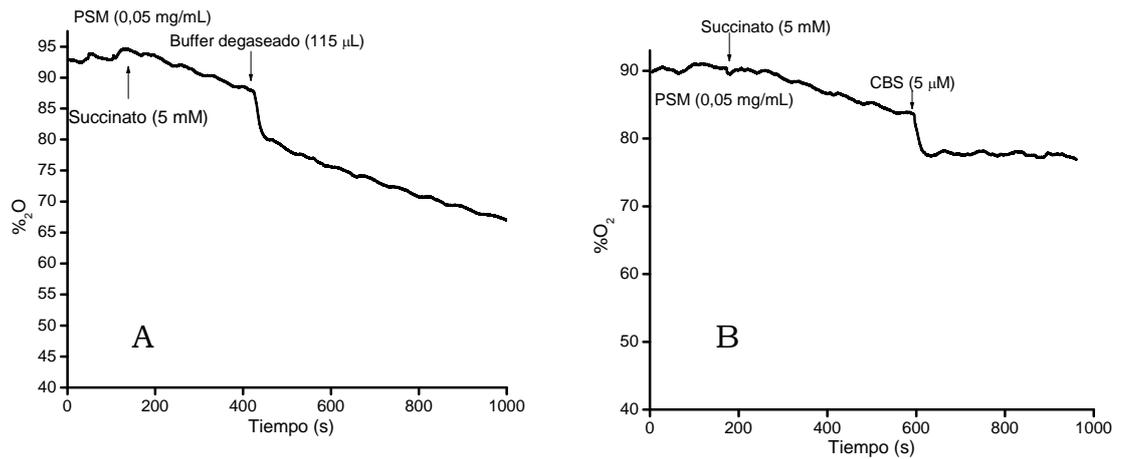


Figura 32: Consumo de O₂ por PSM y succinato en presencia de CBS. En A se observa el control realizado. Se agregó a la celda del oxímetro amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM), succinato, PSM y amortiguador. En B se realizó el mismo procedimiento pero el último paso consistió en el agregado de CBS en vez de amortiguador

3.4. Fracción microsomal

Actividad reductora del extracto

Se observó mediante la reducción del DCFIF si la fracción microsomal tenía poder reductor. Se midió la absorbancia a 600 nm, que es donde el DCFIF oxidado presenta su máximo. La disminución de la absorbancia a 600 nm cuando se agregan los donadores de electrones NADH y NADPH indicó una reducción del DCFIF por la fracción microsomal en ambos casos, confirmando la capacidad de dicho extracto para ceder sus electrones. Otro estudio que se realizó fue medir la absorbancia a 340 nm de una solución de fracción microsomal (0,12 mg/mL) en ausencia y presencia de NADH (200 µM) (datos no ilustrados). Se observó una disminución en la absorbancia en presencia de NADH indicando su consumo.

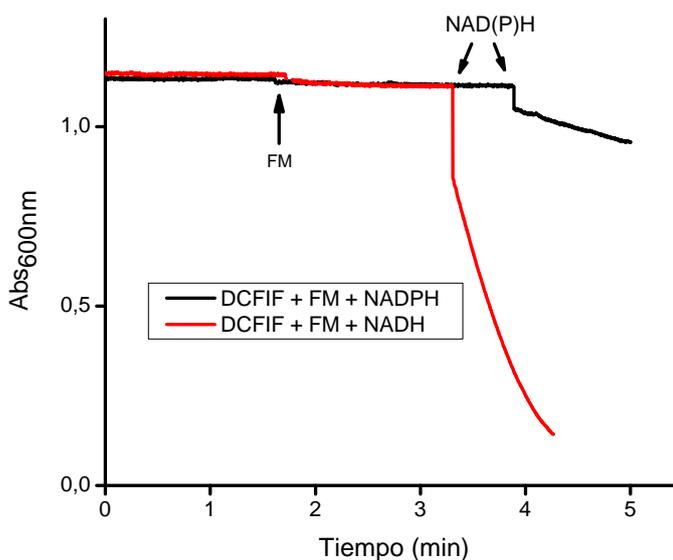


Figura 33: Actividad reductora del extracto de FM. Los espectros se tomaron a 600 nm y 25 °C. En negro se muestra el registro de DCFIF (50 μ M), FM (0,12 mg/mL) y NADPH (100 μ M). En rojo se muestra el registro de DCFIF (50 μ M), FM (0,12 mg/mL) y NADH (100 μ M).

Exposición de la CBS a FM

Se expuso a la solución de CBS desoxigenada a la fracción microsomal junto con donadores de electrones y se realizaron espectros en el UV-visible (figura 34). No se observaron cambios en el espectro de la enzima provocados por la presencia de la fracción microsomal y los donadores de electrones. El máximo de absorción a 429 nm que corresponde al hemo oxidado de la CBS sólo disminuyó ante la presencia del ditionito de sodio, observándose también en este caso un hombro a 449 nm.

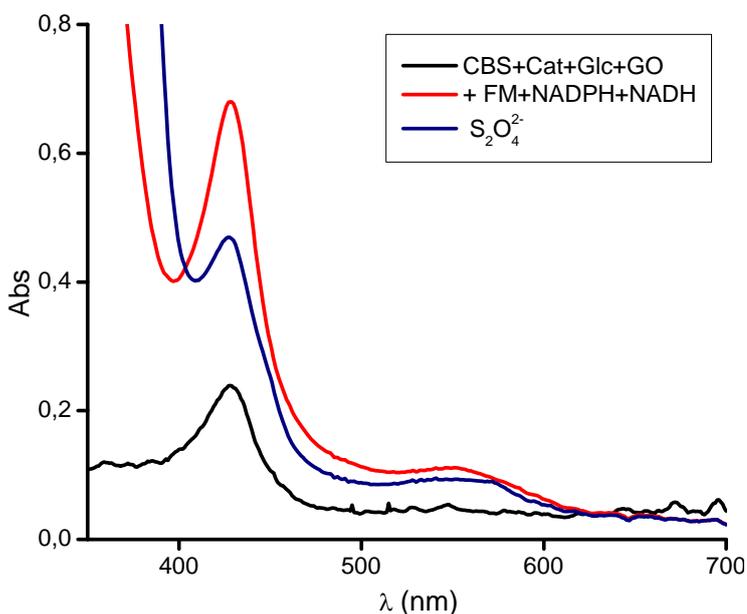


Figura 34: Exposición de la CBS a la FM. Se indica el espectro de Glc (100 mM), GO (8 U/mL), Cat (260 U/mL) y CBS (10 μ M). Se le agregó FM (13 mg/mL), NADPH (100 μ M) y NADH (100 μ M). Se tomaron 6 registros cada 2 min sin obtener variantes entre ellos. Por último, se muestra el espectro después de agregar ditionito de sodio en exceso.

Consumo de oxígeno

Cuando se expuso a la CBS a la fracción microsomal con NADH y NADPH no se registró un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno. Las mediciones se realizaron por triplicado sin registrarse modificaciones en los resultados (Figura 35).

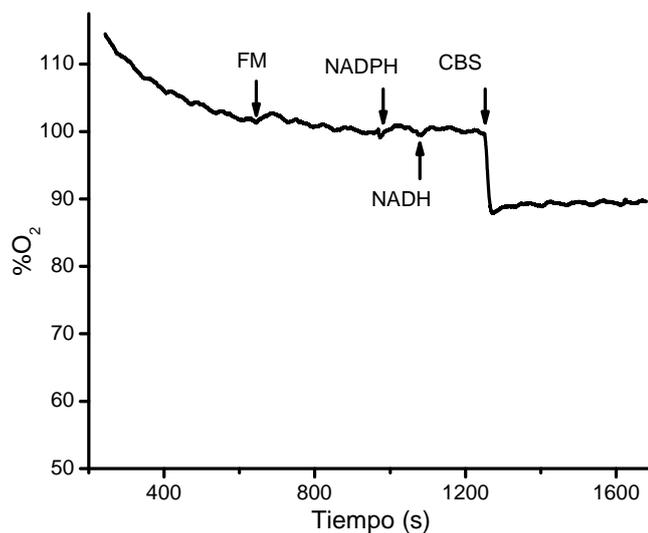


Figura 35: Consumo de O₂ de FM en presencia de CBS. A una solución de FM (0,12 mg/mL) en amortiguador fosfato (0,2 M pH 7,4) con DTPA (0,2 mM) a 25 °C se le agregó NADPH (100 μM), NADH (100 μM) y CBS (9,3 μM) burbujeada con argón.

4. EXPOSICIÓN DE LA CBS A REDUCTASAS

PURIFICADAS

4.1. Xantina oxidasa

Para reducir a la CBS con la XO se utilizaron tres donadores de electrones, el NADH y los dos sustratos naturales de la enzima: xantina e hipoxantina, que cederían sus electrones a la XO y ésta reduciría finalmente a la CBS. En ninguno de los experimentos llevados a cabo con la XO y la CBS se observó reducción de la misma (Figura 36).

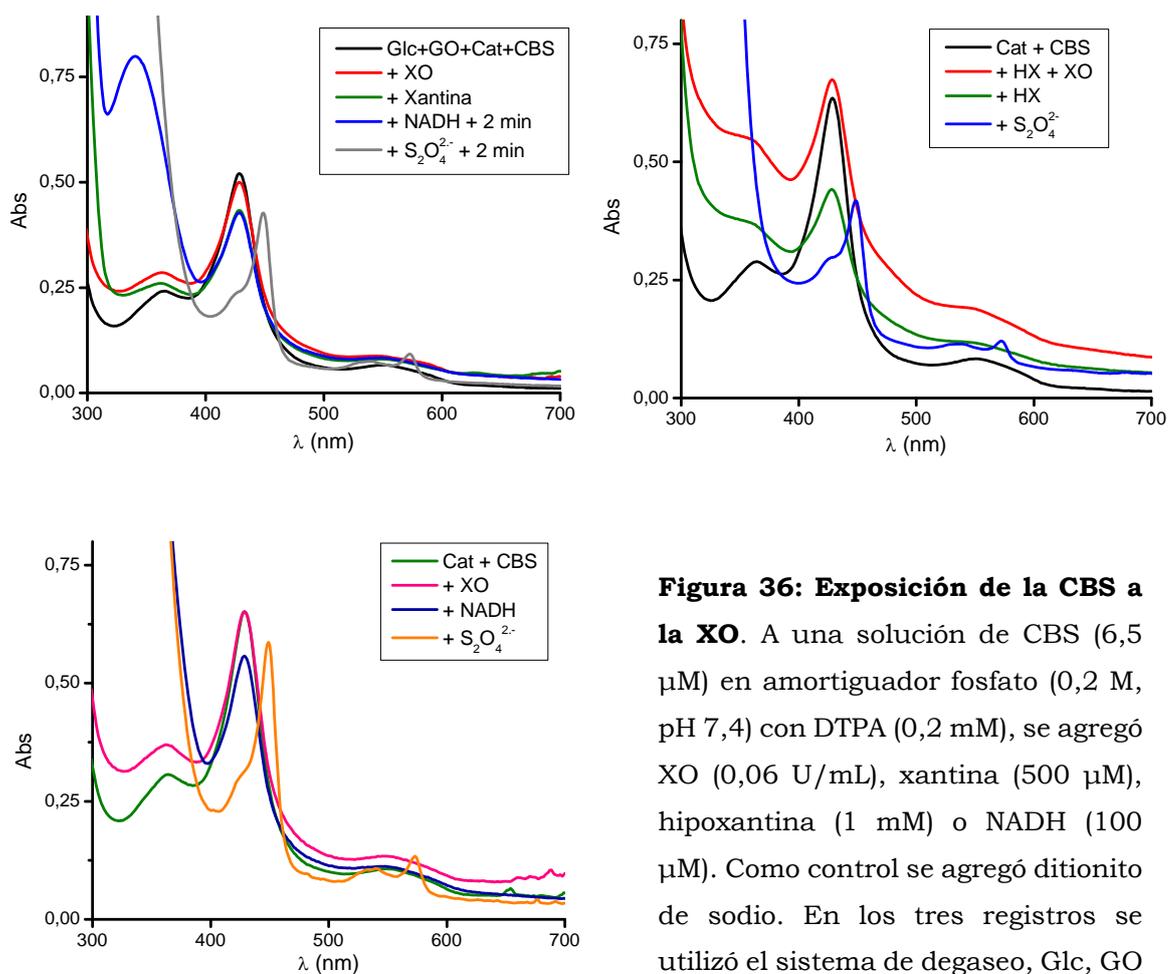


Figura 36: Exposición de la CBS a la XO. A una solución de CBS (6,5 μM) en amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM), se agregó XO (0,06 U/mL), xantina (500 μM), hipoxantina (1 mM) o NADH (100 μM). Como control se agregó ditionito de sodio. En los tres registros se utilizó el sistema de degaseo, Glc, GO y Cat o sólo Cat.

4.2. Dominio reductasa de la oxido nítrico sintasa

Se realizaron distintos espectros con el dominio reductasa de las NOS (NOSr) y la CBS. En todos los casos se utilizó al NADPH como donador de electrones así como el sistema de consumo de oxígeno. Se trató de identificar el estado reducido de la CBS adicionando cianuro o un donador de óxido nítrico (ProliNO). Ambos generan complejos con la CBS reducida favoreciendo en principio su reducción. La figura 37 es representativa de los estudios que se realizaron con la CBS y la NOSr. En las mismas condiciones de trabajo se realizaron registros con la CBS y la NOSr con y sin cianuro sin el agregado del donador de óxido nítrico. En ningún caso se evidenció la reducción de la CBS.

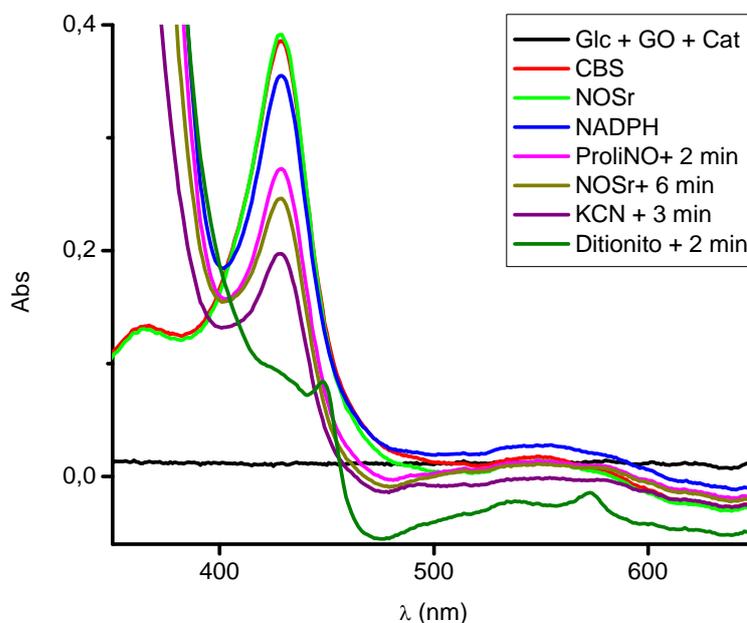


Figura 37: Exposición de la CBS a la NOSr. La línea de base se realizó con Glc-GO-Cat. Se utilizó una solución de CBS (9,3 μM) en amortiguador fosfato (0,2 M, pH 7,4) con DTPA (0,2 mM) a la que se le fueron agregando: NOSr (5 μM), NADPH (400 μM), ProliNO (0,65 mM), NOSr (8 μM), KCN (0,19 mM) y ditionito en exceso. Los registros se realizaron a 25 °C.

Paralelamente al desarrollo de esta tesina, Sebastián Carballal encontró reducción de CBS por la flavorreductasa purificada metionina sintasa reductasa (MSR) y NADPH en presencia de monóxido de carbono

[113]. Si bien nuestro extracto libre de células contendría esta proteína es posible que no se haya visto en nuestras condiciones reducción de la CBS por ser la MSR escasa o estar inactiva. Puede ser también que la presencia de monóxido de carbono para atrapar a la especie reducida resulte crítica.

CONCLUSIONES

En este trabajo se abordó el estudio de la reducción del grupo hemo de la CBS. Por un lado se caracterizó la reducción química anaerobia utilizando ditionito de sodio como reductor. Se observó que la constante cinética de reducción es de orden un medio con respecto al ditionito sugiriendo que la especie reductora es el radical dióxido de azufre que es el producto de homólisis del ditionito. El valor de la constante fue de $(1,13 \pm 0,03) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C). Los datos obtenidos se respaldaron con simulaciones en el programa Gepasi.

Por otra parte se estudió la posible reducción biológica del hemo de la CBS mediante diferentes aproximaciones experimentales. Se utilizó como posible sistema reductor fracciones subcelulares de hígado de rata: extracto libre de células, partículas submitocondriales y fracción microsomal y flavoproteínas purificadas como la xantina oxidasa y el dominio reductasa de la NOS. Los resultados indican que en nuestras condiciones de reacción no fue posible detectar la reducción del hemo de la CBS, monitoreado por los cambios en los espectros UV-visible y por el consumo de oxígeno.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abe, K. and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* **16**, 1066-1071
- 2 Hosoki, R., Matsuki, N. and Kimura, H. (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 527-531
- 3 Stipanuk, M. H. (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* **24**, 539-577
- 4 Garcia, R. A. and Stipanuk, M. H. (1992) The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *J Nutr* **122**, 1693-1701
- 5 Stipanuk, M. H. (2006) *Biochemical, Physiological & Molecular Aspects of Human Nutrition*. Saunders-Elsevier
- 6 Martensson, J. (1982) The effects of short-term fasting on the excretion of sulfur compounds in healthy subjects. *Metabolism* **31**, 487-492
- 7 Nakamura, H., Kajikawa, R. and Ubuka, T. (2002) A study on the estimation of sulfur-containing amino acid metabolism by the determination of urinary sulfate and taurine. *Amino Acids* **23**, 427-431
- 8 Yuasa, S., Akagi, R., Ubuka, T., Masuoka, N. and Yao, K. (1990) Excretion of 3-mercaptolactate-cysteine mixed disulfide, sulfate and taurine in human urine before and after oral administration of sulfur-containing amino acids. *Acta Med Okayama* **44**, 117-122
- 9 Brosnan, J. T. and Brosnan, M. E. (2006) The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* **136**, 1636S-1640S
- 10 Li, Y. N., Gulati, S., Baker, P. J., Brody, L. C., Banerjee, R. and Kruger, W. D. (1996) Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* **5**, 1851-1858
- 11 Jencks, D. A. and Mathews, R. G. (1987) Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. *J Biol Chem* **262**, 2485-2493
- 12 Kutzbach, C. and Stokstad, E. L. (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* **250**, 459-477
- 13 Rao, P. V., Garrow, T. A., John, F., Garland, D., Millian, N. S. and Zigler, J. S., Jr. (1998) Betaine-homocysteine methyltransferase is a developmentally regulated enzyme crystallin in rhesus monkey lens. *J Biol Chem* **273**, 30669-30674

- 14 Sunden, S. L., Renduchintala, M. S., Park, E. I., Miklasz, S. D. and Garrow, T. A. (1997) Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* **345**, 171-174
- 15 Millian, N. S. and Garrow, T. A. (1998) Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. *Arch Biochem Biophys* **356**, 93-98
- 16 Park, E. I. and Garrow, T. A. (1999) Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. *J Biol Chem* **274**, 7816-7824
- 17 Chen, X., Jhee, K. H. and Kruger, W. D. (2004) Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* **279**, 52082-52086
- 18 Singh, S., Padovani, D., Leslie, R. A., Chiku, T. and Banerjee, R. (2009) Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J Biol Chem* **284**, 22457-22466
- 19 Kabil, O., Zhou, Y. and Banerjee, R. (2006) Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry* **45**, 13528-13536
- 20 Mudd, S. H., Finkelstein, J. D., Irreverre, F. and Laster, L. (1965) Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway. *J Biol Chem* **240**, 4382-4392
- 21 Vitvitsky, V., Thomas, M., Ghorpade, A., Gendelman, H. E. and Banerjee, R. (2006) A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* **281**, 35785-35793
- 22 Garg, S., Vitvitsky, V., Gendelman, H. E. and Banerjee, R. (2006) Monocyte differentiation, activation, and mycobacterial killing are linked to transsulfuration-dependent redox metabolism. *J Biol Chem* **281**, 38712-38720
- 23 Bearden, S. E., Beard, R. S., Jr. and Pfau, J. C. Extracellular Transsulfuration Generates Hydrogen Sulfide from Homocysteine and Protects Endothelium From Redox Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
- 24 Richman, P. G. and Meister, A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**, 1422-1426
- 25 Shi, M. M., Kugelman, A., Iwamoto, T., Tian, L. and Forman, H. J. (1994) Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* **269**, 26512-26517
- 26 Stipanuk, M. H. and Ueki, I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis*

- 27 Bella, D. L., Hahn, C. and Stipanuk, M. H. (1999) Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol* **277**, E144-153
- 28 Bella, D. L., Hirschberger, L. L., Hosokawa, Y. and Stipanuk, M. H. (1999) Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo. *Am J Physiol* **276**, E326-335
- 29 Lee, J. I., Londono, M., Hirschberger, L. L. and Stipanuk, M. H. (2004) Regulation of cysteine dioxygenase and gamma-glutamylcysteine synthetase is associated with hepatic cysteine level. *J Nutr Biochem* **15**, 112-122
- 30 Stipanuk, M. H., Londono, M., Lee, J. I., Hu, M. and Yu, A. F. (2002) Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *J Nutr* **132**, 3369-3378
- 31 Finkelstein, J. D. (2007) Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* **45**, 1694-1699
- 32 Prudova, A., Bauman, Z., Braun, A., Vitvitsky, V., Lu, S. C. and Banerjee, R. (2006) S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6489-6494
- 33 Martinov, M. V., Vitvitsky, V. M., Mosharov, E. V., Banerjee, R. and Ataullakhanov, F. I. (2000) A substrate switch: a new mode of regulation in the methionine metabolic pathway. *J Theor Biol* **204**, 521-532
- 34 Finkelstein, J. D. and Martin, J. J. (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* **259**, 9508-9513
- 35 Lehninger, A. L., Lehninger, A. L. P. o. b., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2000) *Lehninger principles of biochemistry*. Worth Publishers, New York
- 36 Lu, S. C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* **13**, 1169-1183
- 37 Vitvitsky, V., Mosharov, E., Tritt, M., Ataullakhanov, F. and Banerjee, R. (2003) Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* **8**, 57-63
- 38 Zou, C. G. and Banerjee, R. (2005) Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* **7**, 547-559
- 39 Refsum, H., Ueland, P. M., Nygard, O. and Vollset, S. E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* **49**, 31-62
- 40 Mattson, M. P. and Shea, T. B. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* **26**, 137-146
- 41 Castro, R., Rivera, I., Struys, E. A., Jansen, E. E., Ravasco, P., Camilo, M. E., Blom, H. J., Jakobs, C. and Tavares de Almeida, I. (2003) Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine

- concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem* **49**, 1292-1296
- 42 Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J. P. and Burkhard, P. (2001) Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *Embo J* **20**, 3910-3916
- 43 DeLano, W. L. (2002) DeLano WL. PyMOL v0.99. I. DeLano Scientific pp. <http://www.pymol.org>, San Carlos, CA, USA
- 44 Munke, M., Kraus, J. P., Ohura, T. and Francke, U. (1988) The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am J Hum Genet* **42**, 550-559
- 45 Bao, L., Vlcek, C., Paces, V. and Kraus, J. P. (1998) Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms. *Arch Biochem Biophys* **350**, 95-103
- 46 Chasse, J. F., Paly, E., Paris, D., Paul, V., Sinet, P. M., Kamoun, P. and London, J. (1995) Genomic organization of the human cystathionine beta-synthase gene: evidence for various cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **211**, 826-832
- 47 Maclean, K. N., Janosik, M., Kraus, E., Kozich, V., Allen, R. H., Raab, B. K. and Kraus, J. P. (2002) Cystathionine beta-synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Physiol* **192**, 81-92
- 48 Skovby, F., Kraus, J. P. and Rosenberg, L. E. (1984) Biosynthesis and proteolytic activation of cystathionine beta-synthase in rat liver. *J Biol Chem* **259**, 588-593
- 49 Miles, E. W. and Kraus, J. P. (2004) Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem* **279**, 29871-29874
- 50 Kraus, J. P. and Rosenberg, L. E. (1983) Cystathionine beta-synthase from human liver: improved purification scheme and additional characterization of the enzyme in crude and pure form. *Arch Biochem Biophys* **222**, 44-52
- 51 Kery, V., Poneleit, L. and Kraus, J. P. (1998) Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch Biochem Biophys* **355**, 222-232
- 52 Shan, X. and Kruger, W. D. (1998) Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nat Genet* **19**, 91-93
- 53 Zou, C. G. and Banerjee, R. (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 16802-16808
- 54 Taoka, S., Lepore, B. W., Kabil, O., Ojha, S., Ringe, D. and Banerjee, R. (2002) Human cystathionine beta-synthase is a heme sensor protein. Evidence that the redox sensor is heme and not the vicinal

- cysteines in the CXXC motif seen in the crystal structure of the truncated enzyme. *Biochemistry* **41**, 10454-10461
- 55 Banerjee, R. and Zou, C. G. (2005) Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch Biochem Biophys* **433**, 144-156
- 56 Banerjee, R., Evande, R., Kabil, O., Ojha, S. and Taoka, S. (2003) Reaction mechanism and regulation of cystathionine beta-synthase. *Biochim Biophys Acta* **1647**, 30-35
- 57 Taoka, S., Widjaja, L. and Banerjee, R. (1999) Assignment of enzymatic functions to specific regions of the PLP-dependent heme protein cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* **38**, 13155-13161
- 58 Bateman, A. (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* **22**, 12-13
- 59 Koutmos, M., Kabil, O., Smith, J. L. and Banerjee, R. Structural basis for substrate activation and regulation by cystathionine beta-synthase (CBS) domains in cystathionine {beta}-synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20958-20963
- 60 Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A., Norman, D. G. and Hardie, D. G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* **113**, 274-284
- 61 Aitken, S. M. and Kirsch, J. F. (2003) Kinetics of the yeast cystathionine beta-synthase forward and reverse reactions: continuous assays and the equilibrium constant for the reaction. *Biochemistry* **42**, 571-578
- 62 Jhee, K. H., McPhie, P. and Miles, E. W. (2000) Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine beta-synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *Biochemistry* **39**, 10548-10556
- 63 Taoka, S. and Banerjee, R. (2002) Stopped-flow kinetic analysis of the reaction catalyzed by the full-length yeast cystathionine beta-synthase. *J Biol Chem* **277**, 22421-22425
- 64 Evande, R., Ojha, S. and Banerjee, R. (2004) Visualization of PLP-bound intermediates in hemeless variants of human cystathionine beta-synthase: evidence that lysine 119 is a general base. *Arch Biochem Biophys* **427**, 188-196
- 65 Weeks, C. L., Singh, S., Madzellan, P., Banerjee, R. and Spiro, T. G. (2009) Heme regulation of human cystathionine beta-synthase activity: insights from fluorescence and Raman spectroscopy. *J Am Chem Soc* **131**, 12809-12816
- 66 Braunstein, A. E. and Goryachenkova, E. V. (1984) The beta-replacement-specific pyridoxal-P-dependent lyases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **56**, 1-89
- 67 Kimura, H. (2002) Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* **26**, 13-19

- 68 Paoli, M., Marles-Wright, J. and Smith, A. (2002) Structure-function relationships in heme-proteins. *DNA Cell Biol* **21**, 271-280
- 69 Berry, E. A. and Trumpower, B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* **161**, 1-15
- 70 Alric, J., Tsukatani, Y., Yoshida, M., Matsuura, K., Shimada, K., Hienerwadel, R., Schoepp-Cothenet, B., Nitschke, W., Nagashima, K. V. and Vermeiglio, A. (2004) Structural and functional characterization of the unusual triheme cytochrome bound to the reaction center of *Rhodovulum sulfidophilum*. *J Biol Chem* **279**, 26090-26097
- 71 Reijerse, E. J., Sommerhalter, M., Hellwig, P., Quentmeier, A., Rother, D., Laurich, C., Bothe, E., Lubitz, W. and Friedrich, C. G. (2007) The unusual redox centers of SoxXA, a novel c-type heme-enzyme essential for chemotrophic sulfur-oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. *Biochemistry* **46**, 7804-7810
- 72 Kery, V., Bukovska, G. and Kraus, J. P. (1994) Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein. *J Biol Chem* **269**, 25283-25288
- 73 Taoka, S., Ohja, S., Shan, X., Kruger, W. D. and Banerjee, R. (1998) Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* **273**, 25179-25184
- 74 Ojha, S., Hwang, J., Kabil, O., Penner-Hahn, J. E. and Banerjee, R. (2000) Characterization of the heme in human cystathionine beta-synthase by X-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies. *Biochemistry* **39**, 10542-10547
- 75 Carballal, S., Madzellan, P., Zinola, C. F., Grana, M., Radi, R., Banerjee, R. and Alvarez, B. (2008) Dioxygen reactivity and heme redox potential of truncated human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* **47**, 3194-3201
- 76 Green, E. L., Taoka, S., Banerjee, R. and Loehr, T. M. (2001) Resonance Raman characterization of the heme cofactor in cystathionine beta-synthase. Identification of the Fe-S(Cys) vibration in the six-coordinate low-spin heme. *Biochemistry* **40**, 459-463
- 77 Taoka, S., West, M. and Banerjee, R. (1999) Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine beta-synthase reveals nonequivalent active sites. *Biochemistry* **38**, 7406
- 78 Taoka, S. and Banerjee, R. (2001) Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *J Inorg Biochem* **87**, 245-251
- 79 Vadon-Le Goff, S., Delaforge, M., Boucher, J. L., Janosik, M., Kraus, J. P. and Mansuy, D. (2001) Coordination chemistry of the

- heme in cystathionine beta-synthase: formation of iron(II)-isonitrile complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 487-492
- 80 Puranik, M., Weeks, C. L., Lahaye, D., Kabil, O., Taoka, S., Nielsen, S. B., Groves, J. T., Banerjee, R. and Spiro, T. G. (2006) Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase. *J Biol Chem* **281**, 13433-13438
- 81 Kery, V., Poneleit, L., Meyer, J. D., Manning, M. C. and Kraus, J. P. (1999) Binding of pyridoxal 5'-phosphate to the heme protein human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* **38**, 2716-2724
- 82 Kabil, O., Toaka, S., LoBrutto, R., Shoemaker, R. and Banerjee, R. (2001) Pyridoxal phosphate binding sites are similar in human heme-dependent and yeast heme-independent cystathionine beta-synthases. Evidence from ³¹P NMR and pulsed EPR spectroscopy that heme and PLP cofactors are not proximal in the human enzyme. *J Biol Chem* **276**, 19350-19355
- 83 Janosik, M., Oliveriusova, J., Janosikova, B., Sokolova, J., Kraus, E., Kraus, J. P. and Kozich, V. (2001) Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria. *Am J Hum Genet* **68**, 1506-1513
- 84 Katsushima, F., Oliveriusova, J., Sakamoto, O., Ohura, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Kraus, E., Stouracova, R. and Kraus, J. P. (2006) Expression study of mutant cystathionine beta-synthase found in Japanese patients with homocystinuria. *Mol Genet Metab* **87**, 323-328
- 85 Kim, C. E., Gallagher, P. M., Guttormsen, A. B., Refsum, H., Ueland, P. M., Ose, L., Folling, I., Whitehead, A. S., Tsai, M. Y. and Kruger, W. D. (1997) Functional modeling of vitamin responsiveness in yeast: a common pyridoxine-responsive cystathionine beta-synthase mutation in homocystinuria. *Hum Mol Genet* **6**, 2213-2221
- 86 Ojha, S., Wu, J., LoBrutto, R. and Banerjee, R. (2002) Effects of heme ligand mutations including a pathogenic variant, H65R, on the properties of human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry* **41**, 4649-4654
- 87 Oliveriusova, J., Kery, V., Maclean, K. N. and Kraus, J. P. (2002) Deletion mutagenesis of human cystathionine beta-synthase. Impact on activity, oligomeric status, and S-adenosylmethionine regulation. *J Biol Chem* **277**, 48386-48394
- 88 Singh, S., Madzellan, P., Stasser, J., Weeks, C. L., Becker, D., Spiro, T. G., Penner-Hahn, J. and Banerjee, R. (2009) Modulation of the heme electronic structure and cystathionine beta-synthase activity by second coordination sphere ligands: The role of heme ligand switching in redox regulation. *J Inorg Biochem* **103**, 689-697
- 89 Hille, R. and Nishino, T. (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J* **9**, 995-1003
- 90 Hunt, J., Massey, V., Dunham, W. R. and Sands, R. H. (1993) Redox potentials of milk xanthine dehydrogenase. *Room*

- temperature measurement of the FAD and 2Fe/2S center potentials. *J Biol Chem* **268**, 18685-18691
- 91 Porras, A. G. and Palmer, G. (1982) The room temperature potentiometry of xanthine oxidase. pH-dependent redox behavior of the flavin, molybdenum, and iron-sulfur centers. *J Biol Chem* **257**, 11617-11626
- 92 Stuehr, D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 217-230
- 93 Li, H. and Poulos, T. L. (2005) Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* **99**, 293-305
- 94 Ilagan, R. P., Tejero, J., Aulak, K. S., Ray, S. S., Hemann, C., Wang, Z. Q., Gangoda, M., Zweier, J. L. and Stuehr, D. J. (2009) Regulation of FMN subdomain interactions and function in neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* **48**, 3864-3876
- 95 Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615
- 96 Stuehr, D. J., Tejero, J. and Haque, M. M. (2009) Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain. *Febs J* **276**, 3959-3974
- 97 Noble, M. A., Munro, A. W., Rivers, S. L., Robledo, L., Daff, S. N., Yellowlees, L. J., Shimizu, T., Sagami, I., Guillemette, J. G. and Chapman, S. K. (1999) Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* **38**, 16413-16418
- 98 Cuevasanta Dans, E. (2008) Cistationina β -sintasa y sulfuro de hidrógeno. In *Laboratorio de Enzimología-Facultad de Ciencias*, pp. 72, Universidad de la República, Montevideo
- 99 Ferrer-Sueta, G., Hannibal, L., Batinic-Haberle, I. and Radi, R. (2006) Reduction of manganese porphyrins by flavoenzymes and submitochondrial particles: a catalytic cycle for the reduction of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **41**, 503-512
- 100 Schellenberg, K. A. and Hellerman, L. (1958) Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* **231**, 547-556
- 101 Castle, J. D. (2004) Purification of organelles from mammalian cells. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 4**, Unit 4 2
- 102 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- 103 Armstrong, J. M. (1964) The Molar Extinction Coefficient of 2,6-Dichlorophenol Indophenol. *Biochim Biophys Acta* **86**, 194-197
- 104 Voet, D., Voet, J. G. and Pratt, C. W. (2006) *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level*. Wiley, New York ; Chichester
- 105 Mendes, P. (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput Appl Biosci* **9**, 563-571

- 106 Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem Sci* **22**, 361-363
- 107 Mendes, P. and Kell, D. (1998) Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics* **14**, 869-883
- 108 Pazicni, S., Lukat-Rodgers, G. S., Oliveriusova, J., Rees, K. A., Parks, R. B., Clark, R. W., Rodgers, K. R., Kraus, J. P. and Burstyn, J. N. (2004) The redox behavior of the heme in cystathionine beta-synthase is sensitive to pH. *Biochemistry* **43**, 14684-14695
- 109 Creutz, C. and Sutin, N. (1974) Kinetics of the reactions of sodium dithionite with dioxygen and hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry* **13**, 2041-2043
- 110 Lambeth, D. O. and Palmer, G. (1973) The kinetics and mechanism of reduction of electron transfer proteins and other compounds of biological interest by dithionite. *J Biol Chem* **248**, 6095-6103
- 111 Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* **264**, 7761-7764
- 112 Aviram, I. and Sharabani, M. (1986) Kinetic studies of the reduction of neutrophil cytochrome b-558 by dithionite. *Biochem J* **237**, 567-572
- 113 Kabil, O., Weeks, C. L., Carballal, S., Gherasim, C., Alvarez, B., Spiro, T. G. and Banerjee, R. (2011) Reversible heme-dependent regulation of human cystathionine beta-synthase by a flavoprotein oxidoreductase. *Biochemistry* **50**, 8261-8263