



Informe científico final correspondiente a beca BENTR14.

Caracterización de las propiedades de los residuos de cisteína del dominio amino-terminal RESP18-HD de ICA512

Autora: Antonella S. Ríos

Director: Mario R. Ermácora

Índice

1. Introducción	2
1.1. ICA512	2
1.1.1. Proteína de la familia de las PTPs	2
1.1.2. Dominios y rol de ICA512 en la secreción de insulina	2
1.1.3. ICA512 RESP18-HD	5
1.2. Química de tioles	6
1.2.1. Tiorredoxina, una oxidoreductasa	8
2. Hipótesis y objetivos	11
3. Materiales y métodos	14
3.1. Expresión y purificación de RESP18-HD	14
3.2. Dicroísmo circular	15
3.3. Determinación de grupos tiol libres	16
3.4. Cinética de reacción entre grupos tiol libres y DTNB o DTDP	16
3.5. Anisotropía	18
4. Resultados	20
4.1. Análisis conformacional	20
4.2. Reactividad de tioles	21
4.2.1. Corrección de la reacción de Ellman por pH 4.5	27
4.3. Oligomerización	28
4.4. Interacción con insulina	29
4.4.1. Anisotropía	29

4.4.2. ICA512 RESP18-HD e insulina, co-incubados	30
5. Discusión	33
5.1. Análisis espectroscópico	33
5.2. Reactividad de tioles	34
5.2.1. DTNB	34
5.2.2. DTDP	37
5.2.3. Interacción con insulina	38
6. Conclusiones	41
6.1. Perspectivas futuras	41
7. Anexo	44
7.1. Ecuación exponencial de ajuste del DTNB	44
7.2. Otros ajustes a las cinéticas de ICA512 RESP18-HD	45
7.3. Comportamiento del DTNB a pH 4.5	46
7.4. Runge-Kutta, modelo de ajuste para el DTDP	46

Índice de figuras

1.	Dominios y regiones de ICA512	3
2.	Rol de ICA512 en la movilización de los gránulos de secreción y la exocitosis de insulina	4
3.	Alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a RESP18 α , RESP18 β y el dominio N-terminal de ICA512	5
4.	L-Cisteína	7
5.	Intercambio tiol-disulfuro	8
6.	Espectro UV-VIS de RESP18-HD ICA512 a pH 4.5.	20
7.	Espectros de DC en el UV lejano	21
8.	Cinéticas de reacción con DTNB	24
9.	Cinéticas de reacción con DTDP	25
10.	Gráfico de barras de las constantes de velocidad de reacción de segundo orden con DTNB o DTDP	26
11.	Espectros de absorbancia con DTNB a pH 7.4 y pH 4.5	28
12.	Formación de oligómeros	29
13.	Anisotropía de fluorescencia de triptofano de ICA512 RESP18-HD con insulina .	30
14.	SDS-PAGE; ICA512 RESP18-HD co-incubado con insulina	31
15.	Cinéticas de reacción de ICA512 RESP18-HD con DTNB en otras condiciones .	45
16.	Esquema de reacción de un grupo tiol con DTNB a pH 4.5	46

Lista de abreviaciones

Algunos nombres IUPAC en castellano y otros en inglés.

DC dicroismo circular

DCV dense core vesicles

DTDP 4,4'-ditioldipiridina

DTNB 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

DTPA diethylene triamine pentaacetic acid

DTT dithiothreitol

EDTA ethylenediaminetetraacetic acid

HSA human serum albumin

ICA512 Islet cell autoantigen

PTK protein tyrosine kinase

PTP protein tyrosine phosphatases

RESP 18 regulated endocrine-specific protein)

TCEP tris(2-carboxietil)fosfina

TNB ácido 5'-tio-2-nitro-benzoico

TP 4-tio-piridina

Introducción

1. Introducción

1.1. ICA512

1.1.1. Proteína de la familia de las PTPs

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) son un grupo de proteínas involucradas en la regulación de la transducción de señales, donde junto a las proteínas tirosina quinasas (PTKs) son capaces de defosforilar y fosforilar, respectivamente, residuos de tirosina. De este modo, cumplen un rol clave en diversos procesos fisiológicos como pueden ser la diferenciación, crecimiento celular y metabolismo. Es por ello que se las reconoce como reguladores de la transducción de señales, ya sea en condiciones fisiológicas o en patologías como cancer o diabetes [1] [2].

ICA512, también conocida como IA2, es una proteína de membrana de los gránulos de secreción que se encuentran presentes en células endócrinas secretoras, células del sistema nervioso autónomo, neuronas neuroendócrinas en el cerebro y células α , β y δ pancreáticas. Específicamente, se sabe que ICA512 es el principal autoantígeno en diabetes mellitus tipo 1, donde las células β del páncreas productoras y secretoras de insulina son destruidas [3]. Por su secuencia aminoacídica y estructura pertenece al grupo de las PTPs. Sin embargo, no posee actividad fosfatasa debido a mutaciones en el sitio catalítico [4].

1.1.2. Dominios y rol de ICA512 en la secreción de insulina

ICA512 es una proteína de 979 aminoácidos (106 kDa) y esta formada por un dominio amino-terminal extracelular (residuos 1-576 comprendiendo el péptido señal), un segmento transmembrana (residuos 577-601) y un dominio intracelular carboxilo-terminal (residuos 602-979) [5] (Figura 1). El procesamiento por convertasas da lugar a la forma madura de ICA512 la cual incluye el dominio extracelular (residuos 449–575), transmembrana (residuos 576–600),

y el dominio citoplasmático (residuos 601–979).

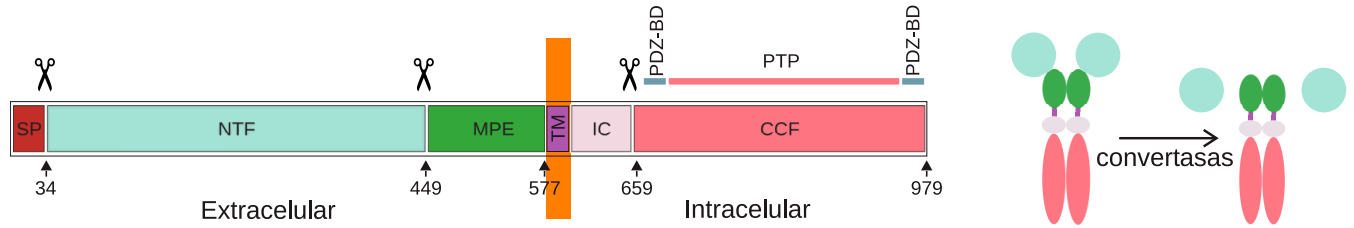


Figura 1: **Dominios y regiones de ICA512.** De izquierda a derecha, el péptido señal (SP), el dominio N-terminal (NTF), el dominio extracelular maduro (MPE), el segmento transmembrana (TM), el dominio intracelular maduro (IC), el fragmento citosólico escindido (CCF), el ‘falso’ dominio catalítico (PTP), y los dominios PDZ. Los sitios conocidos de procesamiento por proteasas se indican con tijeras. La barra vertical representa la membrana del gránulo de secreción o la membrana plasmática. La disposición probable de ICA512 madura en la membrana es la de un dímero (derecha). No se conoce el destino de ICA512 NTF (círculos celestes) luego de su escisión por convertasas.

En condiciones normales (Figura 2), ICA512 interactúa con la forma fosforilada de la proteína β 2-sintrofina (β 2S) y ésta a su vez con la proteína utrofina (UT) anclándose a los filamentos de actina. El incremento de glucosa intracelular aumenta los niveles de ATP dentro de la célula lo que deriva en una despolarización de la membrana, la cual es compensada por el ingreso de Ca^{+2} . El aumento de Ca^{+2} intracelular estimula la desfosforilación de β 2-sintrofina, provocando la disociación del complejo β 2S-UT-actina de ICA512, lo que permite la movilización del gránulo de secreción y posteriormente la exocitosis. Luego de la disociación, el dominio citoplasmático de ICA512 es clivado por una proteasa dependiente de Ca^{+2} , la calpaina, dando lugar al fragmento IA2CCF retroalimentando el mecanismo de exocitosis por desplazamiento de la interacción con el complejo β 2S-UT-actina. A su vez, este fragmento soluble migra al núcleo donde regula la transcripción de genes involucrados en la granulogénesis, incluida la insulina e ICA512 y provocando estímulos pro-mitóticos que resultan en la proliferación de nuevas células β [6] [7].

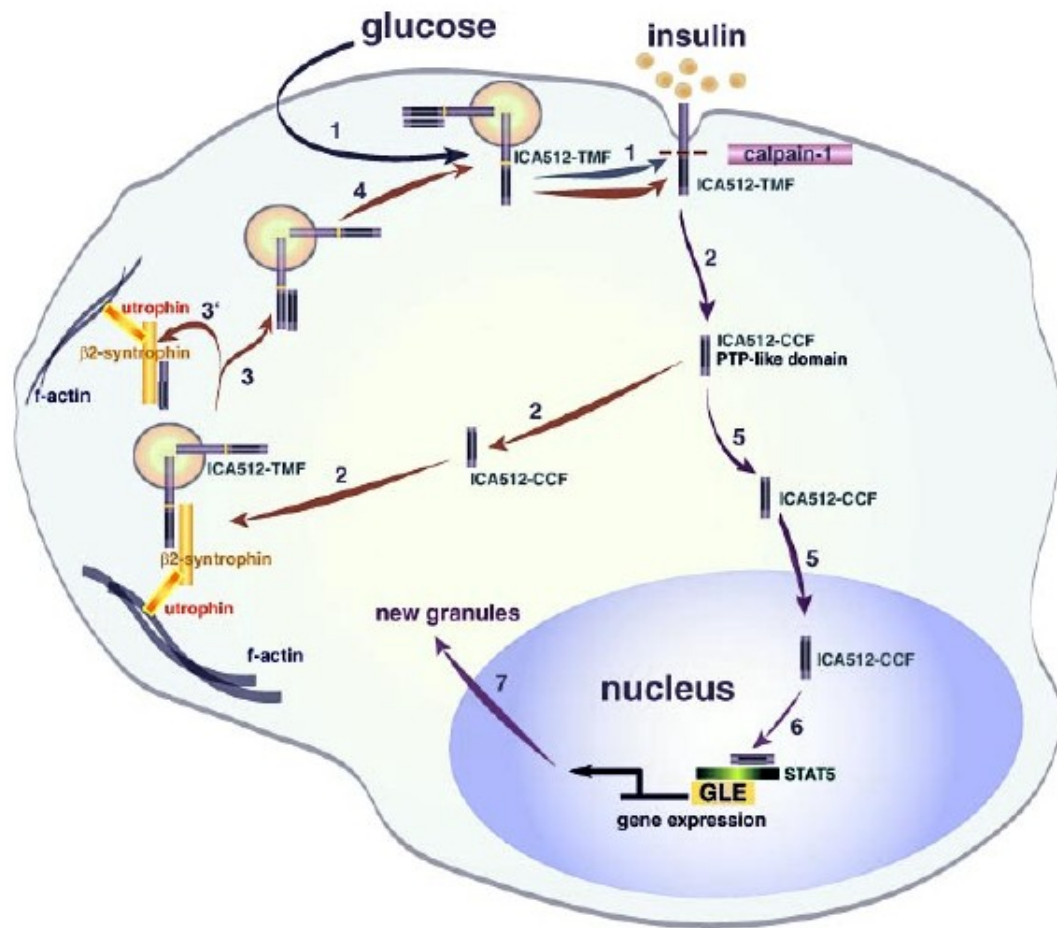


Figura 2: **Rol de ICA512 en la movilización de los gránulos de secreción y la exocitosis de insulina.**¹ Esquema ilustrativo que representa cómo se induce la liberación de insulina en una célula β pancreática por estimulación con glucosa como ejemplo. ICA512-TMF en la membrana plasmática es clivado por la proteína calpaína (1). El fragmento citosólico soluble resultante, ICA512-CCF (2) desplaza el complejo ICA512-TMF con β 2-sintrofina uniéndose a ambos componentes del complejo (3, 3'). La disociación del gránulo secretorio del filamento de actina permite que éste pueda moverse aproximarse a la membrana celular para la exocitosis (4). La eliminación de los gránulos secretorios por exocitosis aumenta la probabilidad de síntesis de ICA512 puesto que nuevos fragmentos ICA512-CCF son producidos y son capaces de migrar al núcleo (5). Ésto aumenta la transcripción de genes involucrados en la granulogénesis a través de la actividad de STAT (6) y por lo tanto la generación de nuevos gránulos de secreción (7).

¹ Esta imagen se obtuvo del trabajo M. Solimena (2008) *Regulation of Insulin Granule Turnover in Pancreatic β -Cells by Cleaved ICA512*. *J. Biol. Chem.* 283 (48), 33719–33729.

1.1.3. ICA512 RESP18-HD

La proteína reguladora endócrino-específica, RESP 18 (del inglés regulated endocrine-specific protein) [8] se encuentra en células endócrinas y neuronales encargadas de la secreción de hormonas peptídicas. Se halla presente en el lumen de vesículas, denominadas vesículas de corazón denso (DCV), de varios tipos celulares, entre ellos las células α , β y δ pancreáticas y su expresión es regulada por el incremento en los niveles de glucosa [9] [10].

Los primeros 200 aminoácidos de segmento N-terminal de ICA512 (ICA512-NTF) poseen homología con RESP18 [9]. Sin embargo, ICA512-NTF contiene un motivo rico en cisteínas, que no está presente en RESP18 (residuos 40-62) (Figura 3). Al fragmento de ICA512-NTF que posee homología con RESP18 y contiene el motivo rico en cisteínas se lo denomina **ICA512 RESP18-HD** (del inglés RESP18-Homology Domain) y comprende los residuos 35-131.

RESP18alpha	-----MQHPLWPGS---SEGLQL	15
RESP18beta	MAVDVEFGVAGWWEAAAPLSPSAVAATFTDTPWGSERAEPGRIQHPLWPGS---SEGLQL	57
IA-2	-----MRRPRRPGGLGGSGGLRL	18
RESP18alpha	LVCFLLLNSCPGGCSDTSAHD-----GQDQVGVGQLWPLQGFATP	55
RESP18beta	LVCFLLLNSCPGGCSDTSAHD-----GQDQVGVGQLWPLQGFATP	97
IA-2	LLCLLLSSRPGGCSAVSAHGCLFDRRLCSHLEVCIQDGLFGQCQVGVGQARPLLQVTSP	78
RESP18alpha	VFQHLQVVLQQII PQGLFWKDDITQDAMIQKMEHASRLHPQEPCLKDGKALFPTKTTEQE	115
RESP18beta	VFQHLQVVLQQII PQGLFWKDDITQDAMIQKMEHASRLHPQEPCLKDGKALFPTKTTE--	155
IA-2	VLQRLQGVLRQLMSQGLSWHDDLTQYVISQEMERIPRLRPPEPRPRDRSGLAPKRPGPAG	138
RESP18alpha	EKLQLLFPS-----ETHSPLAKVNRDQCFTSEVVSKALKQEVANPV-----	156
RESP18beta	-----SPLAKVNRDQCFTSEVVSKALKQEVANPV-----	184
IA-2	ELLLQDIP TGSAPAAQHRLPQPPVKGKGGAGASSLS-PLQAELLPLLEHLLLPPQPPHP	197
RESP18alpha	-----K-----GFSGPLPTVGRNPVAD-----	173
RESP18beta	-----KITYRCSYGGLDMMQAPGPSKEEIIYKIMRLLWA	218
IA-2	SLSYEPALLQP YLFHQFGSRDGSRVSE-----GSPG-MVSVGPLPKAEAPALFSRTASKG	251
RESP18alpha	---	
RESP18beta	TSY 221	
IA-2	I-- 252	

Figura 3: Alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a RESP18 α , RESP18 β y el dominio N-terminal de ICA512. Las secuencias en verde marcan los aminoácidos similares o idénticos. La secuencia recuadrada muestra el fragmento rico en cisteínas de ICA512 que no se encuentra presente en RESP18.

A pesar de que ICA512 es una proteína de interés biológico, poco se conoce sobre la función de ICA512 RESP18-HD. Se sabe que en proteínas presentes en células neuroendócrinas, entre las que se encuentran la cromogranina B y la secretogranina II, la formación de un bucle producto de un puente disulfuro intracatenario es necesaria para el direccionamiento a gránulos de secreción [11] [12]. Estudios recientes demostraron que el RESP18-HD contiene información suficiente para su direccionamiento a gránulos secretorios [13]. En células INS-1 transfectadas con una construcción que contiene la secuencia de RESP18-HD, consecutiva al péptido señal y fusionada a GFP (del inglés green fluorescent protein), tanto ICA512-RESP18-HD-GFP como la insulina se hallan presentes en estructuras tipo gránulos de secreción. La estimulación con KCl y glucosa permite la liberación de los gránulos secretorios y la recuperación de ICA512-RESP18-HD-GFP en el medio extracelular. Sin embargo, cuando se transfecta con ICA512-NTF-GFP queda localizado en el retículo endoplasmático y no se encuentra en gránulos de secreción a pesar de contener a ICA512 RESP18-HD. A su vez, la ausencia de ICA512 RESP18-HD impide el direccionamiento al gránulo y promueve el anclaje en la membrana plasmática [13].

1.2. Química de tioles

El grupo tiol es de gran relevancia en el análisis bioquímico de proteínas. Está formado por un átomo de azufre y uno de hidrógeno. El grupo tiol es el análogo azufrado de los alcoholes. Los tioles cuando se oxidan forman disulfuros, compuestos que poseen un enlace S-S. A pesar de que el oxígeno es más electronegativo que el azufre, los tioles son más ácidos que los alcoholes debido a que los enlaces S-H generalmente son más débiles que los enlaces O-H, por lo que el grupo tiol se desprotona con mayor facilidad. Por otro lado, el ion tiolato ($-S^-$) tiene su carga negativa en el azufre y, como el azufre tiene mayor volumen atómico que el oxígeno, su carga se encuentra deslocalizada sobre una región del espacio más grande, lo que proporciona mayor

estabilidad al tiolato respecto al alcóxido.

La cisteína es un aminoácido que posee en su grupo R un grupo tiol (Figura 4). Los mismos pueden oxidarse y, así, generar productos que poseen distintos estados de oxidación. A su vez, dos residuos de cisteína pueden oxidarse y formar un disulfuro (cistina), dando lugar a un enlace covalente denominado puente disulfuro. El pK_a del grupo tiol de la cisteína se encuentra entre 8 - 9 a 25 °C. Sin embargo, se sabe que hay proteínas que poseen cisteínas particularmente ácidas debido a su entorno NTfresacorr2aminoacídico.

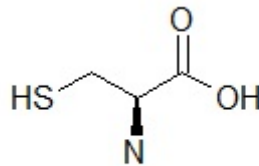
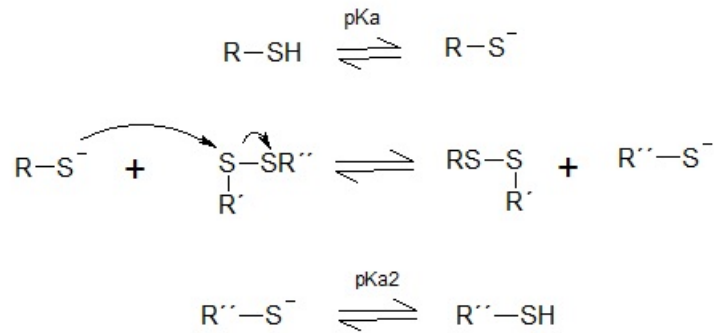


Figura 4: **Molécula de L-cisteína.**

Biológicamente, el rol que cumple el intercambio tiol-disulfuro es de suma importancia, ya sea en procesos redox que requieran la participación de tioles, en la estabilización de estructuras terciarias en proteínas por formación o escisión de cisteínas estructurales, en catálisis enzimática y en el transporte y almacenamiento de iones metálicos [14]. La reacción de intercambio de tioles en solución acuosa se da por un mecanismo establecido en tres pasos.

Figura 5: **Reacción de intercambio tiol-disulfuro**

En primer lugar, ocurre la ionización del grupo tiol (-SH) a tiolato (-S⁻) [15] [16]. La reacción ocurre con el ataque nucleofílico del tiolato a un átomo de azufre que participa en la formación de un disulfuro. Por último, ocurre la protonación del tiolato producto de la reacción.

1.2.1. Tiorredoxina, una oxidoreductasa

En proteínas, la presencia de residuos de cisteína es un factor importante para la estabilización de la estructura terciaria por uniones disulfuro. Para la formación del mismo, se necesita un anión tiolato y, por lo tanto, es necesario que el pH sea neutro o alcalino si se tiene en cuenta el pK_a del grupo tiol. En eucariotas, los puentes disulfuro nativos de las proteínas se forman en el retículo endoplásmico donde se encuentran proteínas que catalizan la formación y ruptura de los mismos, como las disulfuro isomerasas [17]. Sin embargo, el requerimiento de tioles reducidos para el intercambio tiol-disulfuro involucra una serie de proteínas que facilitan la reducción de los grupos tiol. Entre ellas se encuentra una oxidoreductasa: la tiorredoxina (TRX). Las proteínas que forman parte de la familia TRX poseen un motivo tipo tiorredoxina que se compone de la secuencia CxxC, el cual es de suma importancia para la función redox [18]. Las dos cisteínas presentes en la tiorredoxina (Cys-32 y Cys-35) forman un puente disulfuro.

La reactividad de la proteína se debe en parte a los valores de pK_a de las cisteínas del motivo CxxC los cuales se encuentran entre 7 y 9 respectivamente. Esto se debe a que una disminución en los valores de pK_a generalmente disminuye el carácter nucleofílico del grupo tiol, haciéndolo menos reactivo [19]. Sin embargo, una de las dos cisteínas que posee es particularmente reactiva [20] y contribuye a la reactividad de la tiorredoxina como reductora de otras proteínas en intercambios tiol-disulfuro.

Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis y objetivos

La información que se tiene hasta el momento sugiere la importancia de ICA512 RESP18-HD en el mecanismo de secreción de insulina. Se sabe que ICA512 forma parte de las vesículas de secreción de insulina, encontrándose ICA512 RESP18-HD en el lumen de las vesículas secretorias. La característica principal de este fragmento, es que posee el motivo rico en cisteínas capaces de formar uniones del tipo disulfuro intra e intercatenarios. Una de las hipótesis de este trabajo es que, estos residuos de cisteína, poseen una reactividad atípica que podría ser fundamental en el direccionamiento de ICA512 a gránulos de secreción.

A su vez, la insulina es activa biológicamente en forma monomérica y esta formada por dos cadenas de 21 y 30 aminoácidos, la cadena A y la cadena B respectivamente. Ambas se unen covalentemente por dos uniones disulfuro entre residuos de cisteína de cada cadena y a su vez, la cadena A presenta un puente disulfuro intracatenario. Teniendo en cuenta la presencia física de ICA512 RESP18-HD e insulina en la vesícula, otra hipótesis del presente trabajo es que ICA512 RESP18-HD podría estar interactuando con la insulina mediante la formación de puentes disulfuro.

El objetivo del presente trabajo, es caracterizar los residuos de cisteína mediante análisis bioquímicos y biofísicos con el fin de aportar al conocimiento existente. Así mismo se procurará elucidar si estos residuos se encuentran involucrados en la formación de un posible complejo con insulina. Los objetivos específicos comprenden:

1. Obtención del fragmento ICA512 RESP18-HD y caracterización de algunas propiedades biofísicas y bioquímicas.
2. Caracterización de las propiedades de los tioles de ICA512 RESP18-HD.

3. Determinar si existe interacción entre ICA512 RESP18-HD e insulina y si es mediada por los grupos tiol.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

Todos los reactivos fueron de calidad analítica pura. La insulina humana fue cedida por el laboratorio de Inmunoendocrinología (LIE) del Dr. Edgardo Poskus.

El ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DTNB), 4,4'-ditiopiridina (DTDP) y la lisozima (de clara de huevo) fueron de Sigma-Aldrich.

La tiorredoxina fue cedida gentilmente por Dr. Javier Santos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico fue realizado como se describe en [21].

Los siguientes buffers fueron utilizados: Buffer A: acetato / ácido acético 25 mM pH 4.5; Buffer B: buffer A + 5 mM β -mercaptoetanol, 0.5 mM ácido diotiodipropiónico, 0,5 mM cistamina y 0.5 mM cistina.

El coeficiente de absorción molar de RESP18-HD ICA512 a 280 nM, $7,450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, fue calculado con la composición de aminoácidos utilizando los valores de referencia dados en [22].

Los coeficientes de extinción molar de las proteínas utilizadas fueron: lisozima: $37,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; tiorredoxina: $14,105 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; HSA: $39,310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.1. Expresión y purificación de RESP18-HD

ICA512 RESP18-HD se expresó en el vector pET9, en *E. coli* (BL21 DE3 RIL) y se purificó de cuerpos de inclusión. Un informe completo de la preparación del gen recombinante, su transfección y expresión se detalla en [23]. En este trabajo, solo se reportará el proceso de purificación. El medio de cultivo LB contiene kanamicina ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) y cloramfenicol ($35 \mu\text{g}/\text{ml}$) y para la inducción se utilizó lactosa 1%. Se hicieron crecer las bacterias hasta DO_{600}

de 1 durante 4 h, luego se cultivaron y resuspendieron en bufer de lisis (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTPA, 5 mM DTT, 5 mM β -mercaptoetanol, 50 mM Tris - HCl, pH 7.8 conteniendo lisozima) utilizando un sonicador de punta (6 pulsos, 200 joules). Luego de centrifugar a 12,000 rpm durante 15 minutos, los cuerpos de inclusión fueron lavados. Para ello, el precipitado se suspendió en 10 mM de buffer de lisis suplementado con ácido deoxicólico 0.2% y se disgregó usando un sonicador de punta (6 pulsos, 200 joules, 5 watts, en baño de hielo). Como ICA512-RESP18 HD se expresa mayormente formando cuerpos de inclusión, esta fracción insoluble se recolectó por centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4 °C. Para purificar los cuerpos de inclusión de las impurezas asociadas, la fracción insoluble se resuspendió tres veces por sonicación en buffer de lisis conteniendo 0.2% de ácido deoxicólico y se recuperó por centrifugación como se mencionó anteriormente. Luego, los detergentes y el buffer de lisis fueron removidos mediante un lavado de los cuerpos de inclusión en agua. Los mismos fueron solubilizados luego de 1 h de incubación a 37 °C con 6 M urea, 25 mM acetato de sodio, 10 mM glicina, 5 mM tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), pH 4.5.

La fracción solubilizada por la urea se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna Hiprep SP (GE Healthcare) equilibrada a 20°C con 6 M urea, 25 mM acetato de sodio, 10 mM glicina, pH 4.5, y se desarrolló con un gradiente de sales (0 -1 M NaCl en el buffer correspondiente utilizado para equilibrar la columna). Para eliminar la urea, ICA512 RESP18-HD se preparó por cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna HiTrap desalado G-25 (GE Healthcare) equilibrada en 20 mM acetato de sodio, pH 4.5.

3.2. Dicroísmo circular

Se utilizó para la recolección de datos de dicroísmo circular (DC) el espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco Corporation, Tokio, Japón). Los espectros de DC en el UV lejano se ob-

tuvieron en el rango de 185 nm a 340 nm. Se utilizó una celda de 0.1 cm y la concentración de proteína fue de 10 μM . Las mediciones se realizaron a 20°C. La velocidad de muestreo fue 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 1 s, toma de datos cada 0.2 nm y 1 nm de ancho de banda. Se realizaron los espectros por triplicado para cada muestra, se restó el blanco y se realizó el suavizado de los espectros utilizando el polinomio de cuarto grado de Savitzky–Golay.

3.3. Determinación de grupos tiol libres

El contenido de grupos tiol libres se determinó por la reacción de Ellman [24]. Se preparó un stock de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DTNB) 20 mM en 0.1 M fosfato de sodio, pH 7.4. Para estimar el contenido de grupos tiol libres en la proteína, se incubó el DTNB (200 μM) e ICA512 RESP18-HD 30 μM (en 0.05 M fosfato de sodio, pH 7.4) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 412 nm y se estimó la concentración de grupos tiol libres utilizando el coeficiente de extinción molar de 14.150 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [25].

3.4. Cinética de reacción entre grupos tiol libres y DTNB o DTDP

El análisis cinético de la reacción entre los grupos tiol y DTNB o DTDP se llevó a cabo midiendo el incremento de la absorción UV en el tiempo debido a la formación de productos en estado reducido. Para los productos de los reactivos utilizados, los coeficientes de extinción a pH 4.5 fueron $\epsilon_{412 \text{ nm}}=7,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{324 \text{ nm}}=21,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico (TNB) y 4-tio-piridina (TP), respectivamente. Los coeficientes de extinción molar para los disulfuros mixtos y DTDP fueron 1,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y 500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente [25].

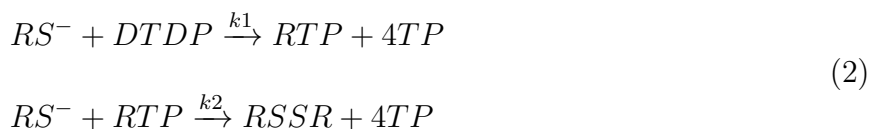
En el caso del DTNB, la constante de velocidad de reacción a pH 4.5 es lo suficientemente lenta para permitir condiciones de pseudo primer orden (en exceso de DTNB) y por lo tanto se

intergraron las ecuaciones cinéticas y se realizaron ajustes por el método de cuadrados mínimos convencional para estimar los valores de las constantes de velocidad de reacción. La reacción en exceso de DTNB con grupos tiol libres se asumió irreversible como se indica a continuación (Ecuación (1)):



Las constantes de segundo orden fueron calculadas como $k = k_{obs} / [DTNB]$ donde k_{obs} representa la constante cinética aparente de pseudo primer orden de la reacción.

En el caso del DTDP, la reacción es mucho más rápida y para monitorearla adecuadamente la concentración de reactivo debió mantenerse baja. Por otra parte, se tuvo en cuenta un mecanismo de reacción en dos pasos (Ecuación (2)).



Esto forzó la utilización las ecuaciones cinéticas para la reacción de segundo orden en su forma diferencial. Para estimar las constantes de velocidad usando ecuaciones diferenciales se escribieron guiones (*scripts*) en el programa **R** para simular la reacción. A partir de suposiciones iniciales, las constantes de velocidad se fueron modificando progresivamente, por prueba y error hasta lograr un buen ajuste de la curva integrada a los datos experimentales. El método de Runge Kutta implementado en **R** fue utilizado para corroborar los ajustes realizados por el método de ecuaciones diferenciales y las constantes de velocidad de reacción de segundo orden derivadas del mismo.

Para calcular las constantes de velocidad de la reacción con DTDP, la curva de absorbancia fue simulada usando los coeficientes de extinción molar de todas las especies que exhiben absorción de luz a 324 nm ($\epsilon_{4-TP} = 21,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{R-TP} = 1,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{DTDP} = 500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a pH 4.5 [25]. La concentración en función del tiempo de estas especies y las constantes cinéticas se estimaron usando ecuaciones diferenciales derivadas del mecanismo de reacción. La absorbancia se calculó como (Ecuación (3)):

$$Abs_{(t_0)} = [4TP]_{(t_0)}x\epsilon_{4-TP} + [RSSP]_{(t_0)}x\epsilon_{R-TP} + [DTDP]_{(t_0)}x\epsilon_{DTDP} \quad (3)$$

Se utilizó el programa **R** para todas las etapas de cálculo numérico y ajuste.

3.5. Anisotropía

La medición de anisotropía de fluorescencia de triptofanos se llevó a cabo utilizando el espectrofluorómetro a SLM-Aminco Bowman Series 2 (SLM, Urbana, IL, USA). La excitación fue a 297 nm y la emisión se midió a 340 nm. La concentración de ICA512 RESP18-HD fue 47 μM en presencia de 0 – 250 μM de insulina. Se realizaron 25 mediciones en cada condición de concentración de insulina. La anisotropía de fluorescencia fue calculada como $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$, donde el subíndice indica emisión polarizada paralela (\parallel) y perpendicular (\perp).

Resultados

4. Resultados

4.1. Análisis conformacional

ICA512 RESP18-HD posee en su secuencia aminoacídica dos residuos de fenilalanina, una tirosina y un triptofano, por lo tanto fue posible obtener el espectro UV-VIS para determinar tanto la concentración proteica cuando fuera necesario, como así también obtener un espectro característico de la proteína. A continuación se muestra el espectro típico de ICA512 RESP18-HD en medio ácido (buffer acetato de sodio 25mM pH 4.5) corregido por la dispersión de luz (Figura 6).

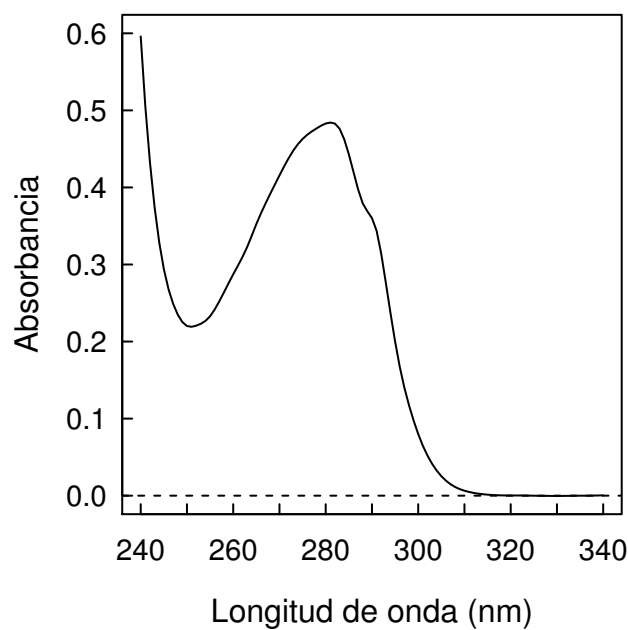


Figura 6: Espectro UV-VIS de RESP18-HD ICA512 a pH 4.5.

Se evidencian los picos típicos para cada residuo (fenilalanina, tirosina y triptofano) en el espectro UV visible, a 270 nm 281 nm y 290 nm. Teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de ICA512 RESP18-HD, el espectro (Figura 6) permite calcular la concentración de la proteína luego del proceso de purificación, donde se obtienen concentraciones de ICA512

RESP18-HD alrededor de $45 \mu\text{M}$.

A su vez, para estudiar el grado de estructura de ICA512 RESP18-HD, se realizaron espectros de DC en el UV lejano entre 185 y 240 nm. Se muestran los resultados de la proteína en estado reducido (Figura 7a) como oxidado (Figura 7b).

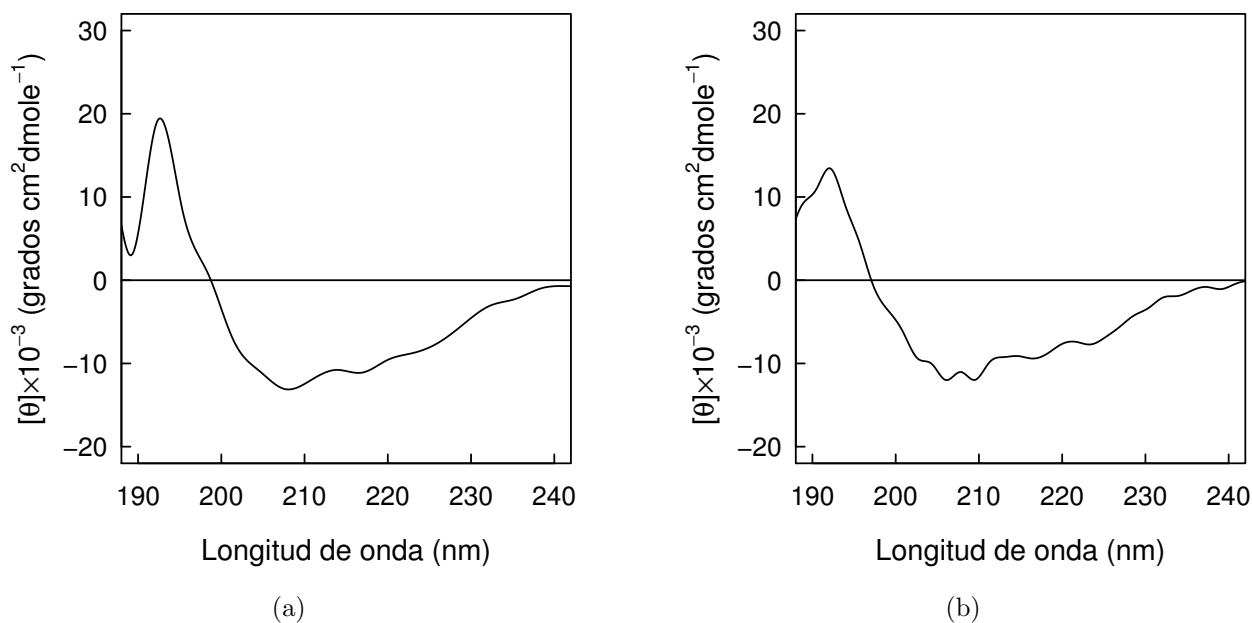


Figura 7: **Espectros de DC en el UV lejano.** (a)RESP18-HD ICA512 reducida según el protocolo de purificación. (b) RESP18-HD ICA512 sometida a oxidación durante 48 horas a temperatura ambiente. Una dilución del stock de RESP18-HD ICA512 en agua fue utilizada para las mediciones de DC (RESP18-HD ICA512 $10.42 \mu\text{M}$).

Cuando ICA512 RESP18-HD se haya en estado reducido, posee estructura secundaria del tipo α -hélice (Figura 7a). Sin embargo, no se descarta que posea estructura del tipo lámina- β debido a la presencia de un pico negativo a aproximadamente 202 nm. La oxidación de los residuos de cisteína del fragmento, hacen que se modifique la estructura secundaria (Figura 7b)

4.2. Reactividad de tioles

Los grupos tiol libres de ICA512 RESP18-HD en condiciones reductoras estimados por la reacción de Ellman fueron 3.06 de un total de 4 residuos de cisteína que se sabe que el fragmento

posee en su secuencia aminoacídica. Es posible que el tiol restante no se haya podido titular debido a su participación en la formación de uniones tipo disulfuro que da lugar a agregados insolubles como se discutirá en la sección **5.2**.

Para poder analizar la reactividad de los grupos tiol, fue necesaria la creación de guiones para realizar los cálculos con el programa **R**. En todos los casos, se consideraron para los cálculos el número total de tioles de cada proteína, teniendo en cuenta que el tratamiento reductor previo a la reacción con cada uno de los reactivos es lo suficientemente fuerte como para reducir la totalidad de los tioles. Si bien no se pudieron titular los 4 grupos tiol de ICA512 RESP18-HD, en las condiciones en las que se llevan a cabo las cinéticas de reacción, suponemos que todos los grupos tiol se encuentran reducidos. Por otro lado, las cinéticas se realizaron inmediatamente después de la obtención de cada proteína pura y reducida.

De este modo, en base a los datos obtenidos para la cinética de reacción con DTNB y teniendo en cuenta el mecanismo de acción para el reactivo (Ecuación (1)) se obtuvieron los ajustes de las curvas de la cinética de reacción (Figura 8). En el caso de la reacción con DTDP, debido a las particularidades de la misma (Ecuación (2)), no pudo suponerse una condición de pseudo primer orden. Así mismo, la complejidad de la reacción impidió el trabajo con ajustes a ecuaciones de reacción integradas. De este modo, se decidió utilizar ecuaciones diferenciales (no integradas de forma directa). Suponiendo un valor inicial (arbitrario) de las constantes de segundo orden, se obtienen las concentraciones de cada reactivo involucrado en la reacción utilizando el método de Runge-Kutta de cálculo numérico (Ecuaciones suplementarias (6)(7)(8) y (9)). Luego se calculó la absorbancia en el tiempo utilizando las concentraciones de cada reactivo estimadas por el método de Runge-Kutta y utilizando los coeficientes de extinción molar correspondientes a las especies involucradas (Ecuación (3)). Esta curva de absorbancia

en función del tiempo, obtenida por métodos de cálculo numérico, es la que luego se ajusta a los datos experimentales mediante el cambio en los parámetros de ajuste que son exclusivamente los valores de las constantes de velocidad de segundo orden (Figura 9).

La reactividad de los grupos tiol de ICA512 RESP18-HD, se comparó: con cisteína libre, HSA tratada para reducir su único grupo tiol libre, HSA tratada con TCEP y en urea para reducir todos sus tioles (como se muestra en la metodología), lisozima y tiorredoxina. Los reductores se eliminan previo a cada ensayo.

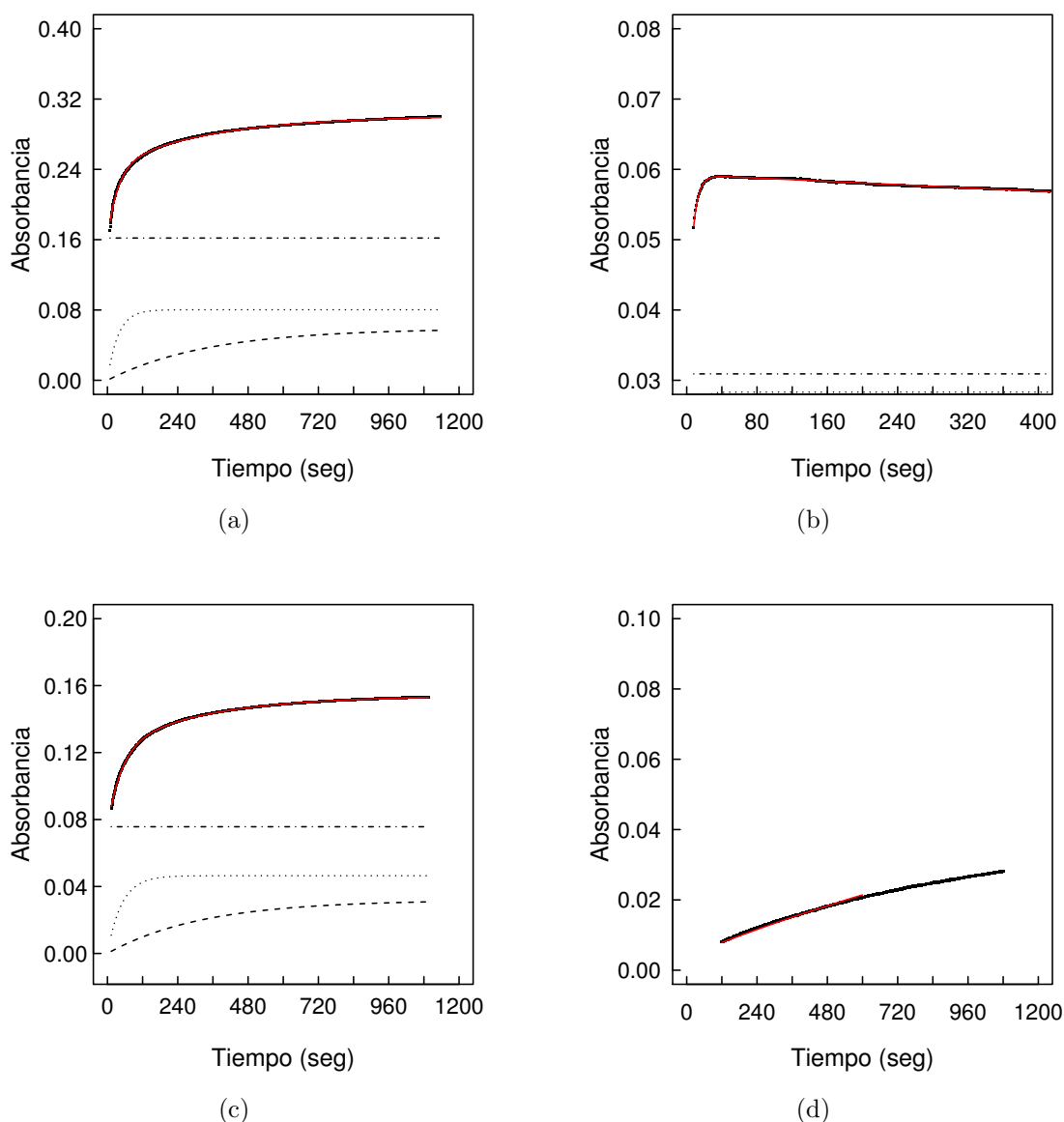


Figura 8: **Cinéticas de reacción con DTNB $200\mu\text{M}$** . En línea roja se muestra el ajuste realizado, la línea sólida negra muestra los datos de absorbancia medidos en la cinética de reacción. La línea de puntos, la línea de guiones y la línea de puntos y rayas muestran la descomposición del ajuste final en una primera, segunda exponencial y una recta respectivamente. (a) ICA512 RESP18-HD $5,7\mu\text{M}$, modelo de ajuste a dos exponenciales. (b) Tiorredoxina $5\mu\text{M}$. (c) Lisozima $2,42\mu\text{M}$. (d) Cisteína $10\mu\text{M}$.

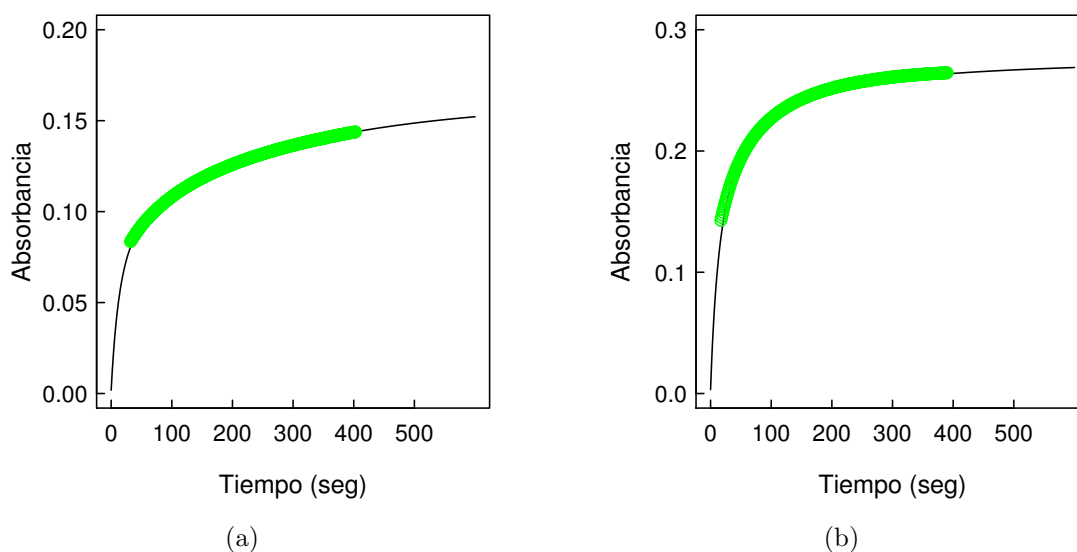


Figura 9: **Cinéticas de reacción con DTDP $10\mu\text{M}$** . La absorbancia simulada se muestra en línea sólida negra. Los datos obtenidos de la cinética de reacción se muestran en línea verde. (c) RESP18-HD $3,6\mu\text{M}$. (d) Tiorredoxina $6,6\mu\text{M}$

Ya sea en las reacciones con DTNB o DTDP, las constantes calculadas se interpretan como un cambio de la absorbancia en el tiempo, producto de la reacción de los tioles proteicos con los correspondientes reactivos agregados. Las constantes de segundo orden se muestran en la tabla 1 y se comparan en la figura 10a y 10b

Tabla 1: Constantes de segundo orden para las reacciones tiol-disulfuro correspondientes a DTNB o DTDP.

Tiolato	Disulfuro	k ($M^{-1}s^{-1}$)
Cisteína	DTNB	1.64 ± 0.5
	DTDP	553.3 ± 40.4
ICA512 RESP18-HD	DTNB	130 ± 39.9
	DTDP	$5,050 \pm 353.5$
Tiorredoxina	DTBN	907 ± 81
	DTDP	$6,633.3 \pm 737.1$
Lisozima	DTNB	116 ± 12
	DTDP	1,530
HSA*	DTNB	150.3
	DTDP	—
HSA	DTNB	227
	DTDP	3,400

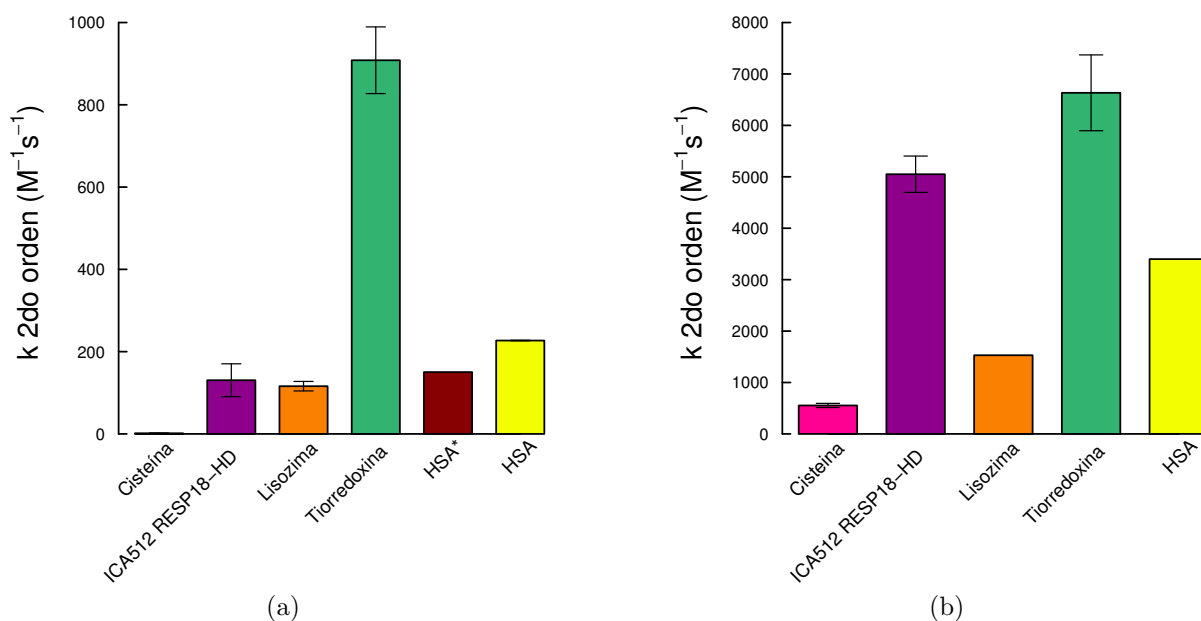


Figura 10: Gráfico de barras de las constantes de velocidad de reacción. (a) DTNB (200μ M); las concentraciones de las proteínas o los reactivos utilizados estuvieron en el siguiente rango: cisteína $10\ \mu$ M, ICA512 RESP18-HD $6,0 - 7,0\ \mu$ M, lisozima $3,3\ \mu$ M, tiorredoxina $5\ \mu$ M, HSA $3\ \mu$ M. (b) DTDP ($10\ \mu$ M); cisteína $10 - 30\ \mu$ M, RESP18-HD ICA512 $3,6\ \mu$ M, lisozima $13\ \mu$ M, tiorredoxina $6,0\ \mu$ M, HSA $1,5\ \mu$ M. Se muestran los datos obtenidos mediante el método de Runge-Kutta.

*HSA con tratamiento reductor débil (DTT 1mM) para reducir únicamente el grupo tiol libre que posee.

En la reacción con DTNB, las constantes de segundo orden de ICA512 RESP18-HD y lisozima fueron alrededor de cien veces más rápidas que la constante de velocidad de segundo orden de cisteína libre (Figura 10a). A su vez, los grupos tiol libres de la tiorredoxina poseen una constante de velocidad de segundo orden mucho más rápida, en el orden de mil veces mayor, que para cisteína libre. En condiciones de reducción débil, la HSA solo presenta como tiol a la única cisteína libre que posee. La constante de velocidad de reacción en este caso se encuentra en el mismo orden que para la HSA en condiciones altamente reductoras (con TCEP y en urea) donde los 35 residuos de cisteína de la proteína se hallan reducidos. A su vez, las constantes de segundo orden calculadas, también se encuentran en el mismo orden que para ICA512 RESP-18 HD y lisozima.

En el caso de las cinéticas de reacción con DTDP, se utilizaron concentraciones menores de los reactivos debido a la elevada reactividad del DTDP aún en condiciones de bajo pH. El análisis de la reacción mostró que al igual que con DTNB, la cisteína libre posee baja reactividad. Sorpresivamente, la constante de velocidad de reacción de segundo orden para ICA512 RESP18-HD es mucho mayor que para lisozima, aproximadamente tres veces mayor y comparable con la tiorredoxina. La HSA con el tratamiento de reducción débil, no pudo ajustarse al modelo propuesto y por lo tanto no se muestra su constante de velocidad, sin embargo, la curva obtenida parece ser mucho más lenta que para cisteína libre. A su vez, cuando se reducen todos los tioles de la HSA, la constante de velocidad obtenida es muy alta, aunque menor que para ICA512 RESP18-HD y tiorredoxina.

4.2.1. Corrección de la reacción de Ellman por pH 4.5

La reacción de Ellman se describe para condiciones de pH levemente alcalino [24], sin embargo, debido a la inestabilidad de ICA512 RESP18-HD en ese ambiente y debido a que

el interior de las vesículas el pH es 4.5, los ensayos fueron realizados en esta condición. Para obtener información sobre el comportamiento del reactivo en este caso, se decidió verificar los espectros de absorbancia (UV) con DTNB a pH 7.4 y pH 4.5 (Figura 11).

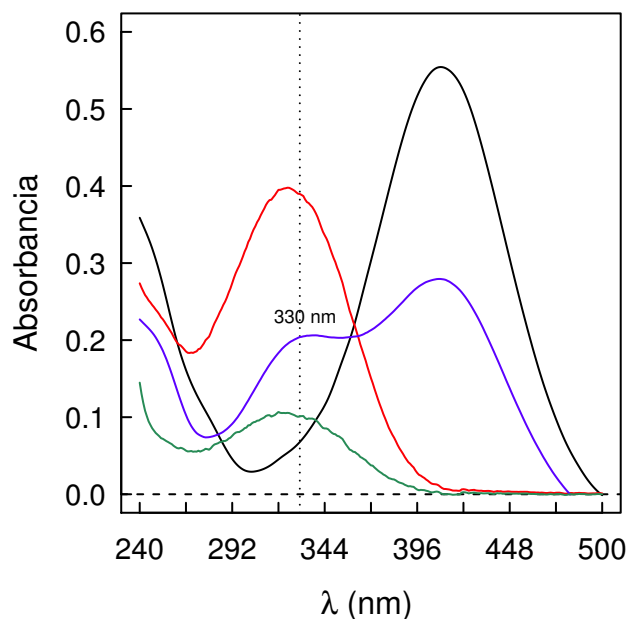


Figura 11: **Espectros de absorbancia con DTNB 200 μM .** — DTT 1 mM con DTNB en buffer PBS pH 7.4. — DTNB en buffer PBS pH 7.4. — DTT 1 mM con DTNB en buffer acetato acético 25 mM pH 4.5. — DTNB en buffer acetato acético 25 mM pH 4.5. Las muestras fueron incubadas durante 1 h. Las muestras de DTT con DTNB fueron corregidas por los espectros de DTT con cistamina 100 μM en los correspondientes buffers para corregir por los puentes disulfuros formados.

A pH 4.5, se observa un corrimiento del pico hacia 330 nm que no corresponde con el pico a 412 nm que se espera para el producto coloreado (TNB) a pH 7.4.

4.3. Oligomerización

ICA512 RESP18-HD tiende a formar oligómeros en tiempos relativamente breves. El análisis por SDS-PAGE muestra un bandeo correspondiente a los oligómeros mencionados, sin embargo el tratamiento con DTT impide la oligomerización entre moléculas de ICA512 RESP18-HD (Figura 12).

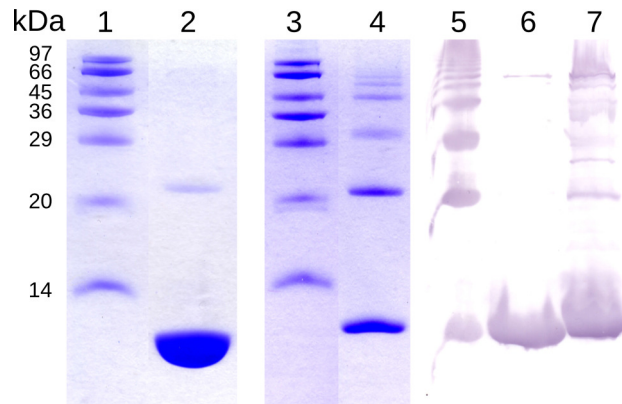


Figura 12: **Formación de oligómeros** SDS-PAGE: (líneas 1 y 3) marcador de peso molecular; (línea 2) ICA512 RESP18-HD reducida con 2-mercaptoetanol 2%; (línea 4) ICA512 RESP18-HD luego de oxidación. Western blot: (línea 5) ICA512 RESP18-HD luego de oxidación; (línea 6) ICA512 RESP18-HD reducida con 2-mercaptoetanol 2%; cuarpos de inclusión de la expresión de ICA512 RESP18-HD en *E. coli* sin reducción. *Esta figura se presenta en en manuscrito "Biochemical, biophysical, and functional properties of ICA512/IA-2 RESP18 homology domain"*

Esto indica que los oligómeros producto del proceso de oxidación de ICA512 RESP18-HD se estabilizan por puentes disulfuro.

4.4. Interacción con insulina

4.4.1. Anisotropía

Para poder determinar si ICA512 RESP18-HD forma un complejo con insulina, se realizó un ensayo de anisotropía de fluorescencia de triptofano. El mismo se llevó a cabo en concentraciones crecientes de insulina (Figura 13).

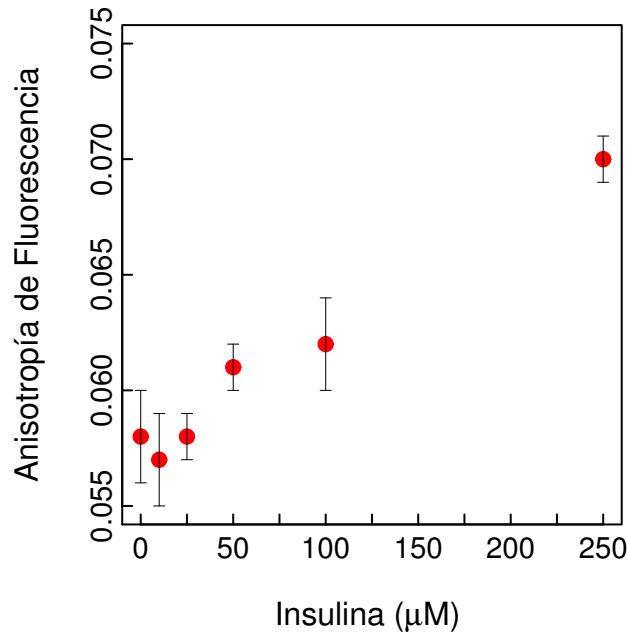


Figura 13: **Anisotropía de fluorescencia de triptofano para ICA512 RESP18-HD en presencia de insulina.** Longitud de onda de excitación, 297 nm

El incremento en la anisotropía de fluorescencia muestra la formación de un complejo entre ICA512 RESP18-HD e insulina en solución y en las condiciones en las que se realizó el ensayo (25 °C, pH 4.5). A partir de los 50 μM de insulina, donde se equipara o supera la concentración de ICA512 RESP18-HD se evidencia un aumento en la anisotropía medida.

4.4.2. ICA512 RESP18-HD e insulina, co-incubados

El resultado de la anisotropía mostró la interacción entre ICA512 RESP18-HD e insulina, sin embargo, para los fines de este trabajo, se propuso analizar en principio si la misma depende de los residuos de cisteína por formación de puentes disulfuro. La co-incubación de ICA512 RESP18-HD con insulina durante 24 horas en ausencia de agentes reductores, mostró la formación de dos bandas en el SDS-PAGE de peso molecular mayor a las dos proteínas por separado (Figura 14).

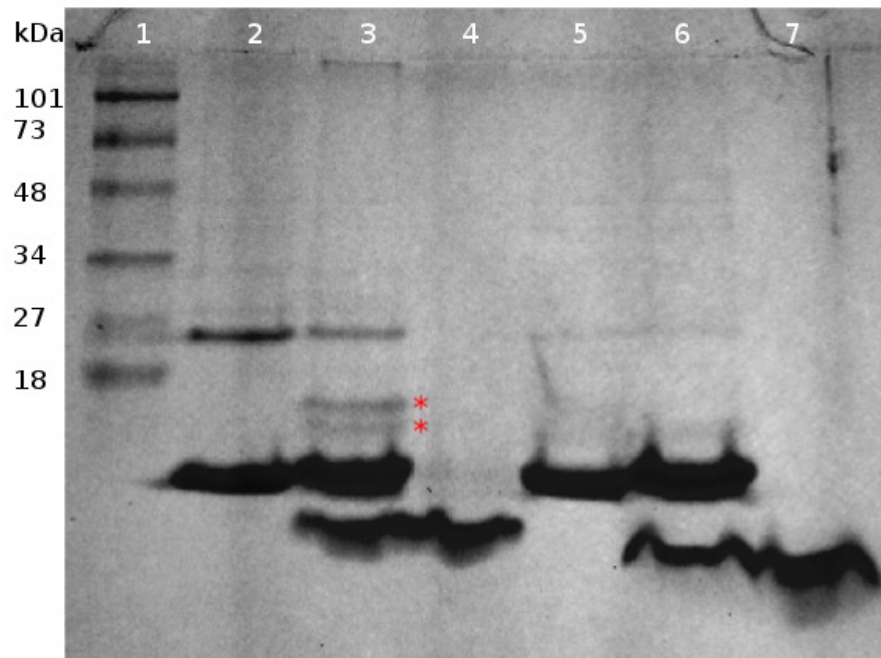


Figura 14: **SDS-PAGE**. Acrilamida/bis-acrilamida 17% incubado over night a 4°C en buffer acetato acético 25 mM pH 4.5. ICA512 RESP18-HD (línea 2); ICA512 RESP18-HD + insulina (línea 3); insulina (línea 4). Líneas 5 a 7 mismas muestras incubadas con 5 mM DTT. SDS-PAGE buffer de siembra sin agentes reductores. El asterisco indica la aparición de una nueva banda doble.

La aparición de una banda doble (Figura 14, calle 3) que no se evidencia con la incubación con un agente reductor como el DTT, podría indicar la presencia de un complejo entre ICA512 RESP18-HD e insulina que involucra la formación de enlaces del tipo disulfuro entre ambas proteínas.

Discusión

5. Discusión

5.1. Análisis espectroscópico

RESP18-HD es un fragmento de 96 aminoácidos que posee en su secuencia residuos aromáticos, por lo tanto, se pudo obtener el espectro de absorbancia a pH 4.5. ICA512 RESP18-HD posee un espectro característico (Figura 6) donde se evidencian los picos de absorción particulares para los residuos de fenilalanina (270 nm), tirosina (281 nm) y triptofano (290 nm). El espectro de absorbancia para estos aminoácidos es variable dependiendo del entorno en el que se encuentren, respetando un rango que varía entre 245–270 nm, 265–285 y 265–295 nm para la fenilalanina, tirosina y triptofano respectivamente [26].

En los ensayos de dicroísmo circular en el espectro de UV lejano, en las condiciones de trabajo, ICA512 RESP18-HD muestra significativa estructura secundaria (Figura 7a). En una proteína correctamente plegada, el enlace peptídico casi no posee variación en su conformación y por lo tanto es capaz de emitir señal en el espectro de dicroísmo circular entre los 180 y 240 nm. Esto es debido a las transiciones de tipo $n \rightarrow \pi^*$ alrededor de los 220 nm o las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ que son más intensas y se encuentran en los 190 nm. [27]. Proteínas que presentan estructura secundaria del tipo α -hélice, poseen en el espectro de DC-lejano dos bandas negativas, una con un mínimo a 222 nm que se asigna a la transición $n \rightarrow \pi^*$ y otra a 208 nm asignada a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y una banda positiva a 190 nm también asignada a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. Así mismo, una estructura del tipo lámina- β , se corresponde con una banda negativa a 215 nm asignada a la transición $n \rightarrow \pi^*$, una banda positiva a 198 nm y otra negativa a 175 nm correspondientes a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ [28]. En condiciones no oxidantes, ICA512 RESP18-HD muestra un patrón en el espectro de DC en el UV lejano que se correspondería con el espectro característico de proteínas que presentan estructura secundaria

del tipo α -hélice (Figura 7a) aunque parece ser también que presenta algo de estructura del tipo lámina- β . ICA12 RESP18-HD presenta una elevada susceptibilidad al estrés oxidativo por radicales de oxígeno impidiéndose la correcta formación de los puentes disulfuro intracelulares e intercelulares. Por lo tanto, el proceso de oxidación en condiciones no controladas, hace que ICA512 RESP18-HD cambie su estructura (Figura 7b).

5.2. Reactividad de tioles

ICA512 RESP18-HD, posee cuatro residuos de cisteína en su secuencia, sin embargo, la estimación de tioles por el método de Ellman solo permitió detectar la presencia de tres de las cuatro cisteínas que se encuentran en este fragmento. Muchas proteínas dan una reacción incompleta con DTNB debido a la inaccesibilidad del reactivo por impedimento estérico o bien por encontrarse el tiol en un entorno con carga positiva, provocando así un impedimento del tipo electrostático [25] [29]. Si bien este puede ser uno de los motivos por el cual no fue posible titular el tiol restante, otra de las razones pudo haber sido la elevada reactividad del mismo para oxidarse, siendo inerte para reaccionar con el reactivo de Ellman.

5.2.1. DTNB

La aparición de TNB en el tiempo, en las reacciones llevadas a cabo con las proteínas en las condiciones ensayadas, se comportó como se espera para una reacción de pseudo primer orden (Figura 8) [30]. En el ajuste de los datos para la reacción con ICA512 RESP18-HD, tiorredoxina y lisozima, la constante de velocidad de segundo orden fue calculada, en principio, utilizando sólo una ecuación exponencial (Ecuación suplementaria (4)). Sin embargo, el ajuste de la curva en todos los casos no fue bueno (Figura 15a). Sólo se lograron ajustar los datos cuando se utilizaron dos exponenciales (Ecuación suplementaria (5)) y por lo tanto se obtuvieron dos

constantes de velocidad de reacción. Esto podría indicar la presencia de al menos dos especies de tioles con reactividades diferentes en estas proteínas, siendo unos más reactivos que otros. Sin embargo, en todos los casos una de las constantes de velocidad de reacción de segundo orden es mucho mayor que la otra (en el orden de, aproximadamente, diez veces mayor). De este modo, sólo se notificó en este trabajo la mayor de las constantes, puesto que es la que resulta relevante. En el caso de la cisteína libre, bastó con utilizar una sola exponencial, lo cual coincide con lo esperado teniendo en cuenta que hay solo una especie de tiol reactivo.

Las curvas de reacción obtenidas para ICA512 RESP18-HD y lisozima son muy similares (Figura 8a y 8c). Si se compara con la cinética obtenida para tiorredoxina en las mismas condiciones (Figura 8b), se observa que en este caso, la curva llega a saturación mucho más rápido. La tiorredoxina, es una proteína conocida por poseer un par de cisteínas que son altamente reactivas [20] y son capaces de formar uniones disulfuro [31] [32], por lo tanto, es de esperar que la velocidad de reacción de los tioles sea elevada. Si se tiene en cuenta la cinética de reacción en el caso de cisteína libre (Figura 8d), la curva es mucho más lenta que para el caso de las proteínas. El efecto que se observa en las cinéticas de reacción cuando ICA512 RESP18-HD se encuentra con sus grupos en forma de tiol (en estado oxidado), es muy diferente cuando se hallan como tiolato (en estado reducido). La curva obtenida con ICA512 RESP18-HD oxidada no presenta una variación en la velocidad de reacción sino que la misma parece ser constante y más lenta (Figura suplementaria 15b). Como se muestra en este trabajo (Figura 12), los agregados insolubles se estabilizan por uniones disulfuro, por lo tanto, en condiciones de oxidación, estos oligómeros se hallan formados. Al realizarse la cinética de reacción en condiciones de oxidación, sólo podrán reaccionar con el DTNB las cisteínas que no están involucradas en la formación de disulfuros intercatenarios. Si estas cisteínas restantes son las que poseen las constantes de velocidad más bajas, puede explicarse la diferencia en la velocidad de reacción

cuando ICA512 RESP18-HD sufrió oxidación previa a reacción.

Como se ha mencionado, uno de los reactivos más utilizados para la cuantificación de tioles es el DTNB. Reacciona con el anión tiolato generando un producto coloreado (TNB) a 412 nm, debido al intercambio tiol-disulfuro que se produce en la reacción. A $\text{pH} > 7,3$ la velocidad de la reacción, así como la absorbancia a 412 nm son independientes del pH [33][25]. Al observar las curvas cinéticas, se vio que se producía un salto en la absorbancia al agregar el DTNB y que no correspondía a la contribución en la absorbancia del reactivo. Como las condiciones en las que se utilizó no fueron las habituales, fue necesario estudiar qué ocurría con el reactivo de Ellman a pH 4.5 (Figura 11). Tanto a pH 7.4 como a pH 4.5 el DTNB posee un único pico máximo de absorbancia a 322 nm. En ambas condiciones, el reactivo posee el espectro típico que se espera a pH levemente alcalino [34] [35]. Con el agregado de 1 mM de DTT a pH 7.4 se produce un corrimiento en el máximo de absorbancia a 412 nm debido a la formación de TNB (Figura 11). Como hay un exceso de DTT en la reacción, el DTNB se consume completamente por lo que no se observa una banda a 322 nm. Cuando el medio de reacción es ácido (pH 4.5), con el agregado de DTT se evidencian dos picos en el espectro UV. El de mayor absorbancia (a 412 nm) corresponde a la formación del TNB. Sin embargo, aparece un pico a 330 nm que no corresponde a DTNB sin reaccionar puesto que la reacción también se hace en exceso de DTT y a su vez no coincide con la longitud de onda de máxima absorbancia medida para el DTNB a pH 4.5.

El grupo sulfidrilo del TNB posee un pK_a de 4.5 a 25 °C [36]. La presencia de este tiol ácido, resuelve el por qué de este pico con absorbancia máxima a una longitud de onda diferente a pH 4.5. En esta condición, donde el pH es igual al pK_a , el grupo sulfidrilo se puede encontrar tanto como tiol o tiolato en concentraciones equimolares (Figura suplementaria 16). Cuando el pH es

7.4, la forma predominante es el sulfirilo con carga neta negativa. Por lo tanto, a pH 4.5, hay una especie que no se encuentra a pH 7.4, siendo este el motivo de la presencia de un pico a 330 nm. Este hallazgo fue de suma importancia para corregir las cinéticas de reacción utilizando una absorbancia de base que corresponde al tiol (-SH) que se encuentra en la reacción en las condiciones de ensayo.

5.2.2. DTDP

Las condiciones de pH a las cuales debieron realizarse las cinéticas de reacción, hicieron difícil el análisis utilizando como reactivo el DTNB. Por ello, se eligió trabajar paralelamente con otro reactivo, la 4,4'-ditiopiridina (DTDP), el cuál puede utilizarse a pH bajos para el intercambio tiol-disulfuro. La elección de este reactivo, se debió también a que es más sensible a reaccionar con tioles poco accesibles y en baja concentración por su pequeño tamaño, su naturaleza anfipática y que no posee carga. De este modo, las concentraciones utilizadas tanto del DTDP como de las proteínas debieron ser considerablemente más bajas que para las reacciones con DTNB, puesto que de lo contrario la velocidad de reacción sería muy elevada, impidiendo medir las constantes de velocidad.

La constante de velocidad de reacción medida para cisteína libre sigue siendo, al igual que con DTNB, muy baja en comparación con las constantes determinadas para los tioles de naturaleza proteica. La constante de velocidad de reacción de segundo orden calculada para ICA512 RESP18-HD fue $5,050 \pm 353.3$. A diferencia de la constante determinada con DTNB, en el caso de ICA512 RESP18-HD, la misma fue mucho mayor, cercana a la constante de velocidad de segundo orden determinada para la tioredoxina que fue $k = 6,633.3 \pm 737.1$. La diferencia en la reactividad de ICA512 RESP18-HD con ambos reactivos pudo deberse por un lado a la naturaleza del DTDP en contraste con la del DTNB. El DTDP es más pequeño, y por

lo tanto, si hubiese algún tiol que no fuese accesible para el DTNB, sí podría reaccionar con el DTDP, obteniéndose una constante de velocidad mayor. En el caso de la HSA, la constante de velocidad de reacción fue también muy elevada, encontrándose entre la constante de velocidad medida para lisozima y para ICA512 RESP18-HD. Se debe tener en cuenta, que si bien al calcular las constantes se considera la concentración de tioles de la muestra, la HSA (con el tratamiento que reduce la totalidad de sus cisteínas) en esta condición posee tantos grupos tiol libres que es posible que parte de la reactividad se vea afectada por este factor.

En base a los resultados obtenidos para las reacciones con DTNB y DTDP, podemos afirmar que ICA512 RESP18-HD posee una elevada reactividad de tioles, comparable con tiorredoxina y lisozima reducidas.

El proceso de oligomerización de ICA512 RESP18-HD ocurre en condiciones donde la formación de disulfuros se ve desfavorecida, como ser el pH ácido. Por lo tanto, la alta reactividad de los tioles es la que probablemente contribuye a este proceso y permite que los agregados se formen y se estabilicen por puentes disulfuro.

5.2.3. Interacción con insulina

ICA512 RESP18-HD posee un residuo de triptofano en su secuencia aminoacídica, a diferencia de la insulina que no posee ninguno. De este modo, la longitud de onda utilizada en el ensayo para la excitación (297 nm), permitió evaluar qué ocurría con la anisotropía de fluorescencia del triptofano de ICA512 RESP18-HD a medida que se incrementa la concentración de insulina en solución. Los resultados obtenidos (Figura 13) muestran un aumento en la anisotropía de fluorescencia cuando la concentración de insulina es igual o mayor a la concentración

de ICA512 RESP18-HD. Controles realizados en las mismas condiciones, pero en ausencia de ICA512 RESP18-HD no mostraron variación en la anisotropía a medida que la concentración de insulina crece. De este modo, el incremento en la anisotropía medida muestra ser consistente con la formación de un complejo con insulina.

Cuando se co-incuban ICA512 RESP18-HD e insulina, se evidencian dos bandas extras en el gel de poliacrilamida (Figura 14) que no corresponden a ICA512 RESP18-HD o insulina. Estas bandas poseen un peso molecular menor a 17,62 kDa, teniendo en cuenta que si se tratase de un complejo entre ICA512 RESP18-HD (11 kDa) e insulina (5,8 kDa), su peso molecular debiera ser de alrededor de 17 kDa. A su vez, en la co-incubación en presencia de un agente reductor como el DTT, estas dos bandas no se observan. Esto indicaría que en caso de estar en presencia del complejo, éste se forma a través de uniones puente disulfuro. Por otro lado, no se observa una banda como era de esperarse, sino dos. Una posible explicación a este fenómeno es que el complejo no se forma con ambas cadenas en simultáneo, sino que la banda de menor peso molecular correspondería al complejo con la cadena A y la banda de mayor peso molecular al complejo con la cadena B, sabiendo que la cadena A es ligeramente más liviana. Paralelamente, la presencia de una banda de aproximadamente 26,8 kDa (Figura 14, calles 2 y 3), refiere a un oligómero de ICA512 RESP18-HD, que desaparece al tratar con DTT, corroborando la estabilización de estos agregados por puentes disulfuro. Estos resultados se suman a otros ensayos realizados en [23] que avalan la hipótesis de la formación del complejo.

Los resultados obtenidos indican la formación de un complejo entre ICA512 RESP18-HD e insulina por puentes disulfuro. Para asegurar sin ninguna duda que esto es lo que ocurre, debieran realizarse ensayos de HPLC y espectrometría de masa para finalizar la caracterización del complejo.

Conclusiones

6. Conclusiones

ICA512 RESP18-HD posee un motivo rico en cisteínas, el cual parece ser importante en proteínas secretorias. Esto nos impulsó a determinar si es posible que cumplieran un rol en el mecanismo de secreción y por lo tanto, una forma de revelar su importancia fue determinar si poseen alguna característica distintiva. De este modo, en este trabajo determinamos que los grupos tiol libres de ICA512 RESP18-HD poseen una elevada reactividad. La tendencia a la formación de oligómeros que se estabilizan por puentes disulfuro, aún en condiciones de pH ácido, donde la oxidación de los tioles no se favorece, así como tampoco se favorece la formación de puentes disulfuro, puede explicarse por esta reactividad de los grupos tiol.

La creación de modelos matemáticos que permitieran lograr ajustes considerables de los datos experimentales, si bien fue un reto, nos permitió determinar las constantes de velocidad de segundo orden para cada especie de tiol, sin la necesidad de recurrir a modelos sumamente complejos. A su vez, fue necesario el estudio de la reacción de Ellman en las condiciones de este trabajo, puesto que la misma solo está descripta para pH levemente alcalino. Esto mostró que el reactivo (DTNB) presenta un tiol ácido el cual posee un pK_a de 4.5, por lo tanto a pH 4.5 hay una especie que no se encuentra a pH 7.4 haciendo que sea importante la corrección de los espectros de cinética en las condiciones de trabajo.

Los ensayos propuestos en este trabajo muestran la formación de un complejo entre ICA512 RESP18-HD e insulina, que se suman a los datos obtenidos en [23].

6.1. Perspectivas futuras

Si bien confirmamos la alta reactividad de los residuos de cisteína de ICA512 RESP18-HD, vimos que hay al menos dos especies de tioles que poseen reactividad diferencial. La

construcción de mutantes específicas para los residuos de cisteína permitiría evaluar cada residuo independientemente. De este modo podría asignarse cuáles son las cisteínas que poseen mayor reactividad y correlacionarlo con algún motivo conocido. A su vez, podría evaluarse cuál de ellas es capaz de formar un complejo con insulina por puentes disulfuro.

Anexo

7. Anexo

7.1. Ecuación exponencial de ajuste del DTNB

Resolución de ecuación de velocidad de reacción (Ecuación (1)) donde las concentraciones de los reactivos y productos se representan como A : RS^- , B : DTNB y D : TNB. Los subíndices t y 0 indican la concentración en el tiempo e inicial, respectivamente.

$$-\frac{dA}{dt} = [A] \times [B] \times k_2 \quad (4)$$

$$-\frac{dA}{dt} = [A] \times k_{obs} \quad \text{donde : } k_{obs} = [B] \times k_2$$

$$-\frac{dA}{[A]} = k_{obs} \times dt$$

$$\int_{A_0}^{A_t} \frac{dA}{[A]} = -k_{obs} \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln \left(\frac{A}{A_0} \right) = -k_{obs} \times t$$

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-k_{obs} \times t}$$

$$A_t = A_0 \times e^{-k_{obs} \times t}$$

$$D_t = A_0 \times (1 - e^{-k_{obs} \times t}) \quad \text{donde } A_t = A_0 - D_t$$

Para las cinéticas de los tioles proteicos, se utilizaron dos exponenciales para el ajuste,

conservando la lógica de resolución planteada anteriormente (4), como se muestra en la siguiente ecuación (5):

$$D_t = A_{a0} \times (1 - e^{-k_{1obs} \times t}) + A_{b0} \times (1 - e^{-k_{2obs} \times t}) + Z \quad (5)$$

Donde A_{a0} y A_{b0} representan las concentraciones de las especies de tioles y Z representa una constante.

7.2. Otros ajustes a las cinéticas de ICA512 RESP18-HD

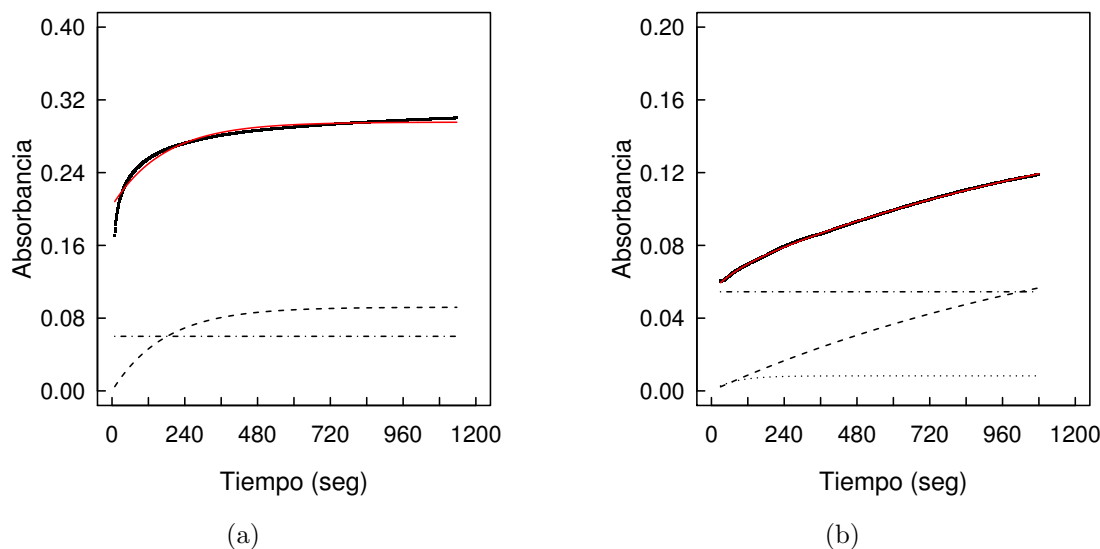


Figura 15: **Cinéticas de reacción con DTNB 200 μ M.** En línea roja se muestra el ajuste realizado, la línea sólida negra muestra los datos de absorbancia medidos en la cinética de reacción. La línea de puntos, la línea de guiones y la línea de puntos y rayas muestran la descomposición del ajuste final en una primera, segunda exponencial y una recta respectivamente. (a) ICA512 RESP18-HD 5,7 μ M, modelo de ajuste a una exponencial. (b) ICA512 RESP18-HD 6,8 μ M con 48 hs de oxidación. La constante de velocidad de reacción de segundo orden obtenida fue $k = 67 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

7.3. Comportamiento del DTNB a pH 4.5

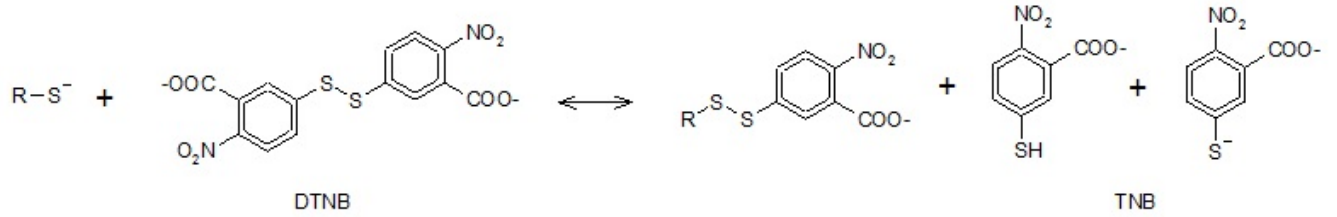


Figura 16: **Esquema de reacción de un grupo tiol con DTNB a pH 4.5.** Se evidencian dos especies de TNB a pH 4.5, una posee el tiol con carga negativa, mientras la otra especie se encuentra protonada.

7.4. Runge-Kutta, modelo de ajuste para el DTDP

Modelo de Runge-Kutta de ecuaciones diferenciales utilizado en los ajustes de la cinética de reacción con DTDP. Se utilizaron como modelo las ecuaciones químicas propuestas para el DTDP (Ecuación (2)), donde a representa RS^- , b representa DTDP, c representa RTP y d representa 4TP:

$$\frac{da}{dt} = -k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times [c] \times [a] \quad (6)$$

$$m_{1a} = \Delta t \times (-k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times [c] \times [a])$$

$$m_{2a} = \Delta t \times \left[-k_1 \times [b] \times \left([a] + \frac{m_1}{2} \right) - k_2 \times [c] \times \left([a] + \frac{m_1}{2} \right) \right]$$

$$m_{3a} = \Delta t \times \left[-k_1 \times [b] \times \left([a] + \frac{m_2}{2} \right) - k_2 \times [c] \times \left([a] + \frac{m_2}{2} \right) \right]$$

$$m_{4a} = \Delta t \times [-k_1 \times [b] \times ([a] + m_3) - k_2 \times [c] \times ([a] + m_3)]$$

$$da \simeq \Delta a = \frac{1}{6}(m_{1a} + 2 \times m_{2a} + 2 \times m_{3a} + m_{4a}) \Rightarrow a_1 = a_0 \times \Delta a$$

$$\frac{db}{dt} = -k_1 \times [b] \times [a] \quad (7)$$

$$m_{1b} = \Delta t \times (-k_1) \times [b] \times [a]$$

$$m_{2b} = \Delta t \times (-k_1) \times \left([b] + \frac{m_1}{2} \right) \times [a]$$

$$m_{3b} = \Delta t \times (-k_1) \times \left([b] + \frac{m_2}{2} \right) \times [a]$$

$$m_{4b} = \Delta t \times (-k_1) \times ([b] + m_3) \times [a]$$

$$db \simeq \Delta b = \frac{1}{6}(m_{1b} + 2 \times m_{2b} + 2 \times m_{3b} + m_{4b})$$

$$\frac{dc}{dt} = k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times [c] \times [a] \quad (8)$$

$$m_{1c} = \Delta t \times (k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times [c] \times [a])$$

$$m_{2c} = \Delta t \times \left[k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times \left([c] + \frac{m_1}{2} \right) \times [a] \right]$$

$$m_{2c} = \Delta t \times \left[k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times \left([c] + \frac{m_2}{2} \right) \times [a] \right]$$

$$m_{4c} = \Delta t \times [-k_1 \times [b] \times [a] - k_2 \times [a] \times ([c] + m_3)]$$

$$dc \simeq \Delta c = \frac{1}{6}(m_{1c} + 2 \times m_{2c} + 2 \times m_{3c} + m_{4c}) \Rightarrow c_1 = c_0 \times \Delta c$$

$$\frac{dd}{dt} = k_1 \times [b] \times [a] + k_2 \times [c] \times [a] \Rightarrow \frac{dd}{dt} = -\frac{da}{dt} \quad (9)$$

Referencias

- [1] Neel B.G (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases, *Curr Opin Cell Biol.* 13(2):182-95.
- [2] Moller N.P. (2004). A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage, *FASEB J.*18(1):8-30.
- [3] Daniel U.Rabin (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules, *The EMBO Journal.* 15 (9) 2102-2114.
- [4] Niels Peter H. Moller (2003). A novel strategy for the development of selective active-site inhibitors of the protein tyrosine phosphatase-like proteins islet-cell antigen 512 (IA-2) and phogrin (IA-2 β), *Biochem. J.* 373, 393–401.
- [5] Abner Louis Notkins (1996). IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 6367-6370.
- [6] M. Solimena (2001). Dephosphorylation of β 2-syntrophin and Ca^{+2} / μ calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion, *The EMBO Journal.* 20, 4013-4023.
- [7] M. Solimena (2008). Regulation of Insulin Granule Turnover in Pancreatic β -Cells by Cleaved ICA512. *J. Biol. Chem.* 283 (48), 33719 –33729.
- [8] Yuanxiu Chen (2010). Aspartyl aminopeptidase, encoded by an evolutionarily conserved syntenic gene, is colocalized with its cluster in secretory granules of pancreatic islet cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (10), 2050-2055.
- [9] Abner L Notkins (2007). RESP18, a homolog of the luminal domain IA-2, is found in dense core vesicles in pancreatic islet cells and is induced by high glucose, *J Endocrinol.* 195, 313–321.
- [10] B A Eipper (1997). The expression of regulated endocrine-specific protein of 18 kDa in peptidergic cells of rat peripheral endocrine tissues and in blood, *J. Endocrinol.* 155, 329–341.

-
- [11] Hans-Hermann Gerdes, (1999). The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J.* 18, 1059–1070.
- [12] Wieland B. Huttner (1989). The Primary Structure of Human Secretogranin IT, a Widespread Tyrosine-sulfated Secretory Granule Protein That Exhibits Low pH- and Calcium-induced Aggregation. *J. Biol. Chem.* 264, 12009-12015.
- [13] M. Solimena, M. R. Ermácora. (2015) Stability of proICA512/IA-2 and Its targeting to insulin secretory granules require β 4-Sheet-mediated dimerization of Its ectodomain in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 35(6), 914-927.
- [14] Ze'ev Shaked (1980). Rates of Thiol-Disulfide Interchange Reactions Involving Proteins and Kinetic Measurements of Thiol pKa Values. *Biochemistry.* 19: 4156-4166.
- [15] George M. Whitesides (1983). Activation Parameters for Thiolate-Disulfide Interchange Reactions in Aqueous Solution. *J. Org. Chem.* 48: 112-115.
- [16] Janette Houk (1987). Structure-Reactivity Relations for Thiol-Disulfide Interchange. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 6825-6836.
- [17] Gruber CW (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci.* 31:455–464.
- [18] Ellgaard, L. (2005) The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 6:28–32.
- [19] Kristine Steen Jensen (2009) Kinetic and Thermodynamic Aspects of Cellular Thiol–Disulfide Redox Regulation. *Antioxidants and Redox Signaling.* 11(5): 1047-1058.
- [20] Gun-Britt Kallis (1980). Differential Reactivity of the Functional Sulfhydryl Groups of Cysteine-32 and Cysteine-35 Present in the Reduced Form of Thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255(21): 10261-10265.
- [21] Schägger H, von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.

- [22] Nozaki Y (1990). Determination of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine by second derivative spectrophotometry. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 324-333.
- [23] Laura Sosa. Estudio estructural e inmunorreactividad del dominio extracelular de la proteína asociada a insulinoma IA-2. Tesis doctoral en desarrollo.
- [24] G.L Ellman (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77.
- [25] C. K. Riener (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine, *Anal. Bioanal. Chem*, 373: 266-276.
- [26] Laura H. Lucas, (2006) Probing protein structure and dynamics by second-derivative ultraviolet absorption analysis of cation- π interactions. *Protein Sci.* 15(10): 2228–2243.
- [27] Sharon M. Kelly (2000) . The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Prot. Pept. Sci* 1: 349-384.
- [28] Woody, R. W. (1996) in *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (Fasman, G. D., Ed.), pp. 25– 67, Plenum, New York.
- [29] Rayudu Gopalakrishna, (1997). Cancer-Preventive Selenocompounds Induce a Specific Redox Modification of Cysteine-Rich Regions in Ca^{2+} -Dependent Isoenzymes of Protein Kinase C. *Arch. Biochem. Biophys.* 348(1): 25–36.
- [30] María J. Torres (2012). Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 521(1-2): 102-110.
- [31] Nils-Erik Engström (1973). Isolation and Characterization of Calf Liver Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 249(1): 206-210.
- [32] Arne Holmgren (1975). Three Dimensional Structure of Escherichia coli Thioredoxin-S₂ to 2.8 Å Resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72(6) 2305-2309.
- [33] P.W. Riddles (1983). Reassessment of Ellman reagent. *Methods Enzymol.* 91: 49–60.
- [34] Trevor A. Walmeley (1987). Effect of Daylight on the Reaction of Thiols with Ellman's Reagent, 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic acid). *Clin. Chem.* 33(10): 1928-1931.

- [35] Lisa M. Landino (2008). Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically-relevant oxidants peroxy nitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Nitric Oxide*. 18(1): 11–18.
- [36] Peter W. Riddles. (1979). Ellman's Reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid)- a Reexamination. *Anal. Biochem.* 94: 75-81.