

## 1. RESUMEN

---

El ácido sulfénico (RSOH), formado en proteínas tras la oxidación del tiol de una cisteína, ha sido implicado en procesos de estrés oxidativo, señalización celular y catálisis redox. Sin embargo, existe poca información en cuanto a su reactividad. Su formación ha sido detectada en el único tiol libre de la albúmina sérica humana (HSA), la cisteína 34, cuando ésta es oxidada con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. En este trabajo se caracterizó a esta especie (HSA-SOH) desde el punto de vista de su reactividad y estabilidad utilizando técnicas complementarias.

A través de su reacción con el tionitrobenzoato (TNB) fue posible cuantificar el HSA-SOH y así determinar su reactividad frente a moléculas de interés analítico y biológico. El HSA-SOH se forma a partir de la reacción con peróxido de hidrógeno con una constante de  $2.3 \pm 0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (37 °C, pH 7.4). Una vez formado puede seguir tres vías de reacción. En primer lugar puede reaccionar con otra molécula de peróxido de hidrógeno formando ácido sulfínico (HSA-SO<sub>2</sub>H) con una constante de  $0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (37 °C, pH 7.4). La formación de HSA-SO<sub>2</sub>H se confirmó por espectrometría de masa de la proteína entera y tripsinizada. En segundo lugar, puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular dando lugar a la formación de disulfuros mixtos. Mediante experimentos de competencia con TNB fue posible determinar las constantes para la reacción entre HSA-SOH y diferentes tioles. Estos experimentos aportaron información mecanística y permitieron concluir que la reacción implica un ataque nucleofílico del tiolato. Aquellos tioles con carga neta positiva a pH 7.4 reaccionaron más rápido que los de carga neta negativa, probablemente debido al entorno electronegativo de la Cys34. En tercer lugar, el HSA-SOH decae espontáneamente en solución ( $1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , 37 °C, pH 7.4), dando lugar a la formación de una nueva especie a la que denominamos HSA-SX.

La técnica del TNB fue también utilizada para caracterizar una peroxirredoxina, la alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE), permitiendo demostrar por primera vez que esta enzima puede reducir peróxido de hidrógeno en forma catalítica y resaltando la necesidad de realizar análisis cinéticos para cada proteína en particular.

Mediante una estrategia cromatográfica fue posible purificar, por diferencias en el punto isoeléctrico, las distintas isoformas de la HSA en relación al estado de oxidación del tiol, las cuales fueron caracterizadas por espectrometría de masa. El análisis de HSA-SX, tanto en la proteína entera como en la proteína tripsinizada sugiere que se trata de una sulfenamida (HSA-SNHR) dado que su masa ( $66436 \pm 4$  Da) es similar a la de la HSA reducida (HSA-SH,  $66435 \pm 3$  Da), es reducible con tioles y no reacciona con alquilantes. Sin embargo, no fue posible determinar la amina o amida con la que reacciona el HSA-SOH.

Por último, se trabajó en la producción de HSA recombinante en la levadura *Pichia pastoris* con el objetivo de generar mutantes en residuos clave del entorno del tiol. Se clonó el ADN copia de la HSA salvaje y se generaron las construcciones con las mutaciones buscadas. Por otro lado se transformaron levaduras y se expresó la proteína salvaje como proteína de secreción.

Esperamos que los resultados obtenidos en esta tesis aporten a la comprensión de las interacciones entre los tioles y los oxidantes, lo cual es relevante dada la creciente evidencia de su participación en procesos de estrés oxidativo, catálisis y señalización, relevantes en diferentes patologías.