

Tesina de graduación
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Detección de electrófilos en proteínas

Ana Clara López
Tutor: Dr. Matías Möller

Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Instituto de Química Biológica
Diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Matías por su infinita paciencia, apoyo y dedicación.

También quiero agradecer a todos los compañeros del laboratorio con los que es un placer compartir el día a día.

Y por último me gustaría agradecer a mis amigos y familia por estar siempre.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Estrés oxidativo.....	7
1.2 Oxígeno y especies reactivas (sistemas oxidantes)	8
1.2.1 Oxígeno singulete.....	8
1.2.2 Radical peroxilo	10
1.2.3 Radical hidroxilo y oxidación catalizada por metales	11
1.2.4 Peroxinitrito	12
1.3 Oxidación de proteínas	14
1.3.1 Consecuencias a nivel celular.....	16
1.3.2 Reparación de proteínas oxidadas	17
1.3.3 Degradación de proteínas oxidadas.....	17
1.3.4 Acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento	17
1.3.5 Roles fisiopatológicos de las proteínas oxidadas.....	18
1.3.6 Proteínas oxidadas y enfermedades	19
1.4 Oxidación de tirosina	20
1.4.1 Tirosina y oxígeno singulete	22
1.4.2 Radical tirosilo y superóxido	22
1.4.3 Tirosina y radical hidroxilo	23
1.4.4 Radical peroxilo lipídico	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo general.....	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIALES Y METODOS	27
3.1 Equipamiento y reactivos	27
3.2 Síntesis de sondas	27
3.2.1 Síntesis de glutatión-fluoresceína	27
3.2.2 Síntesis de cisteamina-fluoresceína	28

3.2.3 Síntesis de cisteamina-dansilo	28
3.3 Oxidación de péptidos	29
3.3.1 Oxidación de GY. (Síntesis y purificación de GHOCHDA)	29
3.4 Reacción entre péptido oxidado y sonda	29
3.5 Oxidación de proteínas	30
3.5.1 Oxidación con oxígeno singulete.	30
3.5.2 Oxidación con radical peroxilo.	30
3.5.3 Oxidación con radical hidroxilo (MCO)	30
3.5.4 Oxidación con peroxinitrito.....	30
3.6 Reacción proteína oxidada – sonda (detección de electrófilos).....	31
3.7 Estándar de proteína marcada	31
3.8 Análisis por HPLC.....	31
3.9 Geles de electroforesis	32
3.10 Digestión de RnA.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Síntesis de sondas	34
4.1.1 Síntesis de glutatión-fluoresceína (F-GSH).....	34
4.1.2 Síntesis de cisteamina-fluoresceína (CSA-F)	35
4.1.3 Síntesis de cisteamina-dansilo (CSA-D)	36
4.2 Oxidación de péptidos	37
4.3 Reacción entre el péptido oxidado y la sonda.....	38
4.4 Detección de electrófilos en proteínas.....	41
4.4.1 Optimización del método de detección	41
4.4.2 Oxidación con oxígeno singulete	42
4.4.3 Oxidación con radical peroxilo (ABAP).....	44
4.4.4 Oxidación con radical hidroxilo (MCO)	45
4.4.5 Oxidación con peroxinitrito.....	46
5. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	51

ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre completo</i>
(CSA-F) ₂	Cistamina-2-Fluoresceína
¹ O ₂	Oxígeno singlete
ABAP	Diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
CAT	Catalasa
CSA	Cisteamina
CSA ₂	Cistamina
CSA ₂ -D	Cistamina-dansilo
CSA ₂ -D ₂	Cistamina-didansilo
CSA-D	Cisteamina-Dansilo
CSA-F	Cisteamina-Fluoresceína
DMF	Dimetilformamida
DMS	Dimetilsulfuro
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EN	Enfermedades neurodegenerativas
F-GSH	Glutación-Fluoresceína
G-HOCHDA	Dipéptido glicil-HOCHDA
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
GST	Glutación S-transferasa
GY	Dipéptido glicil-tirosina
HOCHDA	3-(1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina
HOCl	Ácido hipocloroso
HOHICA	Ácido 3a-hidroxi-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol-2-carboxílico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPOCHDA	3-(1-hidroperoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina
MB	Azul de metileno
MCO	Oxidación catalizada por metales
MS	Espectrometría de masa
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NHS-F	N-Hidroxisuccinimida-Fluoresceína

O_2	Oxígeno molecular
$O_2^{\bullet -}$	Anión radical superóxido
O_2^{-2}	Ion peróxido
$ONOOCO_2^-$	Nitrosoperoxicarbonato
Rnasa	Ribonucleasa A
ROO^{\bullet}	Radical peroxilo
ROOH	Peróxido orgánico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa

RESUMEN

Los organismos están constantemente expuestos a especies reactivas del oxígeno producidas como efectores o como productos secundarios del metabolismo. Éstas pueden oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Dada su abundancia y reactividad las proteínas son uno de los principales blancos del daño oxidativo. La oxidación de proteínas con oxígeno singulete lleva a la formación de productos electrofílicos, particularmente en residuos de tirosina, histidina y triptofano, que pueden seguir reaccionando y podrían constituir un mecanismo importante de daño proteico.

En este trabajo se buscó profundizar en el estudio de la formación de derivados electrofílicos en proteínas por oxidación. Para ello se utilizaron oxidantes que podemos encontrar en sistemas biológicos, incluyendo oxígeno singulete, radicales peroxilo, radical hidroxilo, y peroxinitrito, y sondas fluorescentes nucleofílicas que permitieron detectar dichos derivados.

Los resultados mostraron que no solo el oxígeno singulete si no que todos los sistemas oxidantes estudiados fueron capaces de generar electrófilos en proteínas, lo cual constituye un nuevo mecanismo de daño molecular, potencialmente implicado en el desarrollo de agregados proteicos en varias patologías.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidativo

Los organismos están constantemente expuestos a uno o más sistemas que generan especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Algunas de las fuentes más comunes de generación de ROS en los sistemas biológicos incluyen factores ambientales como radiación y contaminación en la atmósfera así como variados procesos metabólicos normales. Para evadir el daño celular de estos procesos la mayoría de los sistemas biológicos desarrollaron una batería de antioxidantes que pueden convertir ROS en derivados no reactivos.

Estos incluyen algunas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST), peroxirredoxinas (Prx), metionina sulfóxido reductasa (MRS), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa; varias proteínas de unión a metales como la ceruloplasmina, ferritina, transferrina; varios metabolitos y cofactores (NADP⁺/NADPH, NAD⁺/NADH, ácido lipoico, ácido úrico, bilirrubina, etc); y un número de componentes dietarios (vitamina A, C y E, quercetina) y iones metálicos (Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺).

El “estrés oxidativo” se definió como un desbalance entre prooxidantes y antioxidantes a favor del primero, que lleva a un daño potencial [1]. La mayoría de las oxidaciones proteicas ocurren bajo condiciones que reflejan el balance entre actividades prooxidantes y antioxidantes que son dictadas prevalentemente por factores ambientales, genéticos y nutricionales.

La acumulación intracelular de formas oxidadas de proteínas es una función compleja de las actividades prooxidantes, antioxidantes y la concentración y actividad de proteasas que degradan las formas oxidadas de las proteínas [2].

Las enfermedades asociadas al daño oxidativo pueden deberse a la disminución de antioxidantes y/o al aumento en la producción de especies reactivas. Sin embargo, en la mayoría de las enfermedades humanas, el estrés oxidativo es una consecuencia y no una causa del proceso primario de enfermedad. Daños producidos en los tejidos por infección, trauma, toxinas, temperaturas anormalmente bajas o altas, y otras causas llevan a la formación de “mediadores de lesión” como prostaglandinas, leucotrienos, interleuquinas y citoquinas que a su vez llevan a la formación de especies oxidantes [3].

1.2 Oxígeno y especies reactivas (sistemas oxidantes)

Un radical es un átomo, molécula o ion que posee uno o más electrones desapareados (IUPAC).[3] El oxígeno molecular (O_2) es un radical, con dos electrones desapareados localizados en un orbital π antienlazante (π^*) (figura 1). Los dos electrones desapareados tienen el mismo número cuántico de spin (spin paralelo), por lo que para reaccionar con otra molécula la misma debe poseer dos electrones con spin paralelo para encajar en los espacios vacíos de los orbitales π^* . La mayoría de las biomoléculas son no-radicales y están unidas de forma covalente, los dos electrones que forman el enlace están ocupando el mismo orbital molecular y tienen spines opuestos. Por lo tanto la reacción del O_2 con biomoléculas está restringida por spin [3, 4].

Esta restricción de spin del oxígeno puede ser superada por enzimas oxidasas y oxigenasas que contienen metales de transición en su sitio activo con capacidad de aceptar o donar un electrón [4].

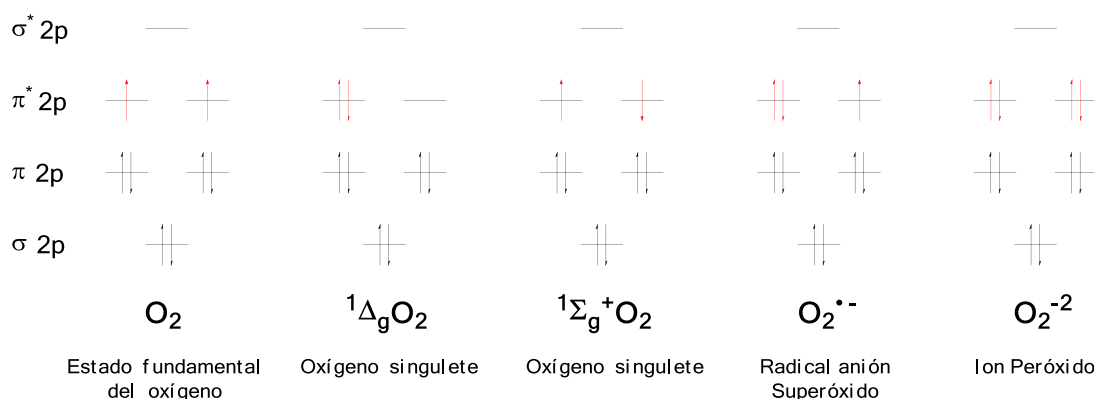


Figura 1. Diagramas de orbital molecular para el estado fundamental del oxígeno molecular (O_2), oxígeno singlete (1O_2), anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e ion peróxido (O_2^{2-}) (Adaptación de [3, 5])

1.2.1 Oxígeno singlete

El oxígeno singlete (1O_2) es la forma más reactiva del oxígeno, generada por un aporte de energía. El estado ${}^1\Delta_g O_2$ tiene una energía de 93.6 kJ sobre el estado fundamental. El estado ${}^1\Sigma_g^+ O_2$ es aún más reactivo, 157 kJ sobre el estado fundamental (figura 1), sin embargo este decae rápidamente al estado ${}^1\Delta_g$ por lo que usualmente solo este último es considerado en sistemas biológicos. El ${}^1\Delta_g O_2$ no es un radical ya que no tiene un electrón desapareado. En ambas formas del 1O_2 la restricción de espín es removida y la capacidad oxidante del oxígeno es ampliamente incrementada [3].

En los sistemas biológicos el $^1\text{O}_2$ se genera tanto por procesos endógenos (reacciones enzimáticas y químicas) como por estímulos exógenos (luz UV o visible en presencia de sensibilizadores).

Dentro de las reacciones enzimáticas capaces de generar $^1\text{O}_2$ se encuentran las mediadas por peroxidasas (como mieloperoxidasa, lactoperoxidasa, peroxidasa de rábano y cloroperoxidasa) y lipooxigenasas. También se forman en reacciones que involucran ozono con moléculas biológicas, durante reacciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con ácido hipocloroso (HOCl), y en reacciones de dimerización de radicales peroxilo [6-8].

Por otro lado los pigmentos que absorben luz pasan a un estado electrónico excitado y en presencia de O_2 pueden transferirle la energía a esta molécula generando el estado singulete y retornando a su estado basal, en un proceso llamado fotosensibilización. En la célula existe un amplio rango de cromóforos que pueden actuar como fotosensibilizadores, por lo que este mecanismo se considera la fuente más probable de $^1\text{O}_2$ en sistemas biológicos [3, 4, 7].

El $^1\text{O}_2$ puede reaccionar con otras moléculas esencialmente de dos maneras: puede reaccionar químicamente con ella, o bien puede transferir su energía de excitación, retornando al estado basal mientras la otra molécula entra en un estado excitado, en un fenómeno conocido como quenching. Las reacciones químicas mejor estudiadas del $^1\text{O}_2$ son las que involucran compuestos con doble enlace $\text{C}=\text{C}$, presentes en muchas moléculas biológicas como carotenoides, clorofila y ácidos grasos. Compuestos que contienen doble enlaces conjugados a menudo reaccionan para formar endoperóxidos [3].

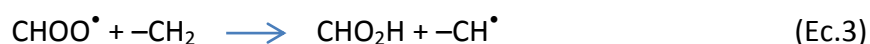
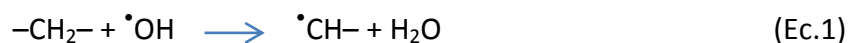
El oxígeno singulete en solución se desactiva por transferencia de energía de excitación al solvente, por tanto su tiempo de vida depende del solvente en que se encuentre. Así su tiempo de vida en agua es aproximadamente $3.8 \mu\text{s}$, mientras que en óxido de deuterio (D_2O) es $62 \mu\text{s}$ [3].

Esta especie reactiva reacciona con un amplio espectro de moléculas biológicas incluidas ADN, colesterol, lípidos, aminoácidos y proteínas. Y podría tener un rol importante en el desarrollo de diversas patologías humanas como cataratas, quemaduras solares y algunos cáncer de piel. Las proteínas son el mayor blanco del $^1\text{O}_2$, el daño ocurre preferentemente sobre cadenas laterales de Trp, His, Tyr, Met y Cys. La reacción con algunas de estas especies da lugar a más especies reactivas [6-9].

1.2.2 Radical peroxilo

En general los radicales peroxilo (ROO^\bullet) y alcoxilo (RO^\bullet) son buenos agentes oxidantes, teniendo potenciales de reducción que van desde +0.77 V hasta +1.44 V, dependiendo del grupo R [10], aunque a menudo experimentan rápidos rearrreglos moleculares a otras especies radicalares. ROO^\bullet y RO^\bullet se forman típicamente en reacciones de carbono radicalar con oxígeno, como la peroxidación lipídica [3].

La iniciación de la peroxidación lipídica se da por el ataque de cualquier especie lo suficientemente reactiva para abstraer un hidrógeno a un grupo metilo (Ec. 1). Bajo condiciones aerobias el radical $-\dot{\text{C}}\text{H}-$ producido en (Ec. 1) reacciona con O_2 para dar un radical peroxilo (Ec. 2). El radical peroxilo producido en (Ec. 2) es capaz de abstraer un hidrógeno de otra molécula de lípido propagando así el proceso (Ec. 3) y promoviendo una reacción en cadena [11].



A bajas concentraciones de oxígeno se puede favorecer las reacciones de terminación de los radicales centrados en el carbono (Ec. 4), limitando el proceso de propagación [10].



ROO^\bullet y RO^\bullet también pueden formarse por descomposición de peróxidos orgánicos (ROOH). La mayoría de los peróxidos son estables a temperatura ambiente, pero pueden ser descompuestos por calentamiento, exposición a luz UV o por la adición de iones de metales de transición.

En el laboratorio se pueden utilizar azoiniciadores para generar radicales ROO^\bullet (y radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$). Estas moléculas que pueden ser hidrosolubles (ej. ABAP) o hidrofóbico (ej. AMVN) se descomponen a una velocidad controlada por la temperatura para generar radicales centrados en carbono (Ec. 5) que reaccionan rápidamente con el O_2 para dar radicales peroxilo (Ec. 6) [3].



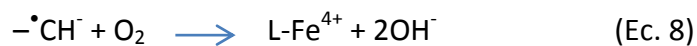
El radical peroxilo más simple es el radical dioxilo (HO_2^\bullet), el ácido conjugado del superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Entre los más complejos se incluyen derivados del colesterol, ácidos grasos, etc. La química de este tipo de moléculas es variable debido a la identidad del grupo R, el entorno, y la concentración de oxígeno y otros reactivos. Participa en una gran diversidad de reacciones como el clivaje del ADN y modificación de cadena polipeptídica de proteínas [10].

La generación de radicales peroxilo, alcoxilo, aldehídos y otros productos de peroxidación lipídica en membranas y lipoproteínas, pueden causar daño a las proteínas presentes. Se ha visto la formación de agregados proteicos de gran peso molecular en membranas de hígado y eritrocitos causados por peroxidación. La peroxidación lipídica también puede provocar daño a receptores de superficie que responden a hormonas y citoquinas, así como canales de potasio [3].

1.2.3 Radical hidroxilo y oxidación catalizada por metales

La oxidación catalizada por metales (MCO) es considerada una fuente importante de daño oxidativo. El H_2O_2 y los alquilperóxidos son los productos finales más comunes de la mayoría de los sistemas generadores de ROS. Estos peróxidos por si mismos son compuestos relativamente poco reactivos. Sin embargo en presencia de metales de transición, Fe(II) o Cu (I), estos son convertidos en el radical hidroxilo (HO^\bullet) altamente reactivo, o radical alcoxilo (RO^\bullet) que es capaz de reaccionar con casi cualquier sustancia orgánica [2].

A este proceso de oxidación se lo conoce como reacción de Fenton. Para la cual se ha propuesto un mecanismo de esfera interna, con la formación de un intermediario inestable que puede ser considerado como un complejo de peróxido ferroso (Ec. 7). En esta reacción el hierro es considerado como acomplejado con un ligando (L) que puede ser EDTA, fosfato, o cualquier quelante biológico [12].



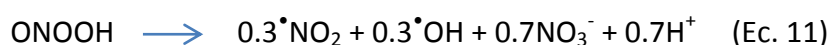
Dicho intermediario puede descomponerse de varias maneras; para dar el radical hidroxilo (Ec. 7), o la especie Fe(IV) (Ec. 8) o por oxidación directa del sustrato (R) (Ec. 9). Las velocidades de estas reacciones están influenciadas por la accesibilidad del peróxido de hidrógeno al hierro, que a su vez hace referencia al número de sitios de

unión ocupados por el quelante. Algunas sustancias puedan ser directamente oxidadas por el intermediario (Ec. 7) [12].

Virtualmente todos los residuos aminoácidos de las proteínas son potenciales blancos de la oxidación por $\cdot\text{OH}$ generado por altas concentraciones de H_2O_2 y Fe(II) . Sin embargo, a las bajas concentraciones de iones hierro o cobre y H_2O_2 presentes bajo la mayoría de condiciones fisiológicas, el daño proteico está probablemente limitado a la modificación de residuos aminoácidos en los sitios de unión a metales en las proteínas. Esto da lugar a la hipótesis de que la oxidación de proteínas en condiciones fisiológicas es un proceso sitio específico, en el que la unión de hierro o cobre al sitio de unión a metales en la proteína es seguido por reacciones con peróxidos para generar especies reactivas ($\text{HO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, radical perferril) que reaccionan preferentemente con aminoácidos del sitio activo. Así, el sitio de unión a metales conforma una especie de “jaula reactiva”. En el caso de muchas enzimas, especialmente las que requieren un ion metálico para su actividad, esto las puede llevar a una pérdida en la función catalítica [2].

1.2.4 Peroxinitrito

El peroxinitrito (oxoperoxonitrato (1-)), se forma principalmente por combinación de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ (Ec. 10) en un proceso controlado por difusión ($k = 4\text{-}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [3, 13]. El anión peroxinitrito (ONOO^-) se encuentra en equilibrio con el ácido peroxinitroso (ONOOH). El pK_a de este equilibrio es 6.8, por lo que en condiciones fisiológicas $\text{pH} = 7.4$, el peroxinitrito existe mayoritariamente en su forma aniónica (80%) [14].

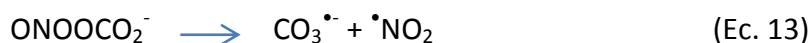
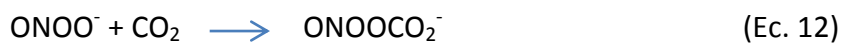


El peroxinitrito es un oxidante fuerte y puede reaccionar directamente con grupos ricos en electrones. Sin embargo la constante de velocidad es relativamente lenta para estas reacciones de segundo orden, variando de 10^3 a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La reactividad limitada del peroxinitrito con la mayoría de las moléculas lo convierte en un oxidante inusualmente selectivo, lo que aumenta su influencia sobre procesos biológicos [15].

El peroxinitrito puede reaccionar con blancos moleculares promoviendo reacciones de oxidación de uno o dos electrones en reacciones directas (ej. Interacciones con centros metálicos, oxidación de tioles). O puede homolizarse (Ec. 11)

a $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ que a su vez reaccionan con blancos moleculares. Sin embargo la reacción de formación de estos radicales tiene una constante de primer orden de 0.9 s^{-1} a pH 7.4 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por lo que más del 99% del peroxinitrito reacciona antes de homolizarse. Por ende la contribución de $\cdot\text{OH}$ por esta vía a la toxicidad del peroxinitrito es mínima.

Una de las reacciones biológicamente más relevantes del peroxinitrito es con el dióxido de carbono ($k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Ec. 11), que en sistemas biológicos está presente en concentraciones relativamente altas (1.3-1.5 mM). Durante esta reacción se forma un intermediario de vida media corta, nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), que se homoliza a radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) (Ec.13)[16] [17]. El $\text{CO}_3^{\cdot-}$ es un oxidante de un electrón relativamente fuerte y $\cdot\text{NO}_2$ es un oxidante más moderado y también un agente nitrante. Ambos promueven eventos de oxidación secundarios [14, 18, 19].



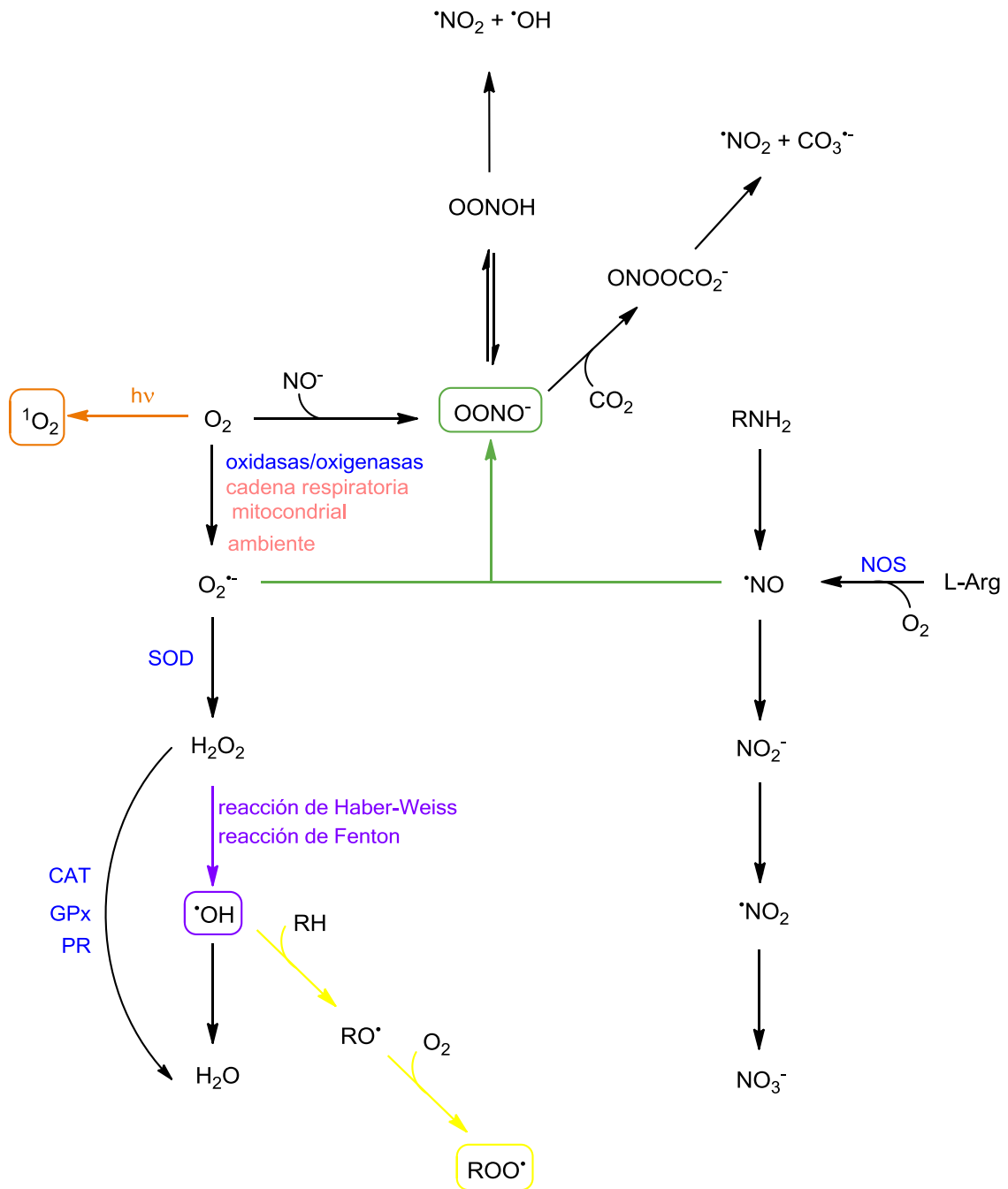


Figura 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en sistemas biológicos. Se indican algunas de las enzimas más importantes en su metabolismo, incluyendo la óxido nítrico sintasa (NOS), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).

1.3 Oxidación de proteínas

En los sistemas biológicos, las proteínas son el principal blanco de oxidación por especies reactivas, esto se debe a su abundancia (componente más abundante

después del agua) y a sus altas constante de velocidad para estas reacciones [20]. La oxidación de proteínas por especies reactivas del oxígeno puede resultar en daño a la cadena principal, provocando su fragmentación o a las cadenas laterales de los aminoácidos, generando variados productos de oxidación [21]. Los aminoácidos libres también son blanco de oxidación, pero como usualmente se encuentran en menores concentraciones (micromolar) que las cadenas laterales de las proteínas (milimolar), el daño a AA libres es cuantitativamente menor [20].

Los oxidantes no radicales generan poco daño a las cadena principal de proteínas, debido a que las reacciones entre ellos son lentas[20], en cambio el ataque de OH^\bullet [22] o de otros radicales a la cadena principal de un péptido o proteína da como resultado la abstracción del átomo de hidrógeno del carbono alfa, lo que lleva a la formación de un radical estabilizado centrado en el carbono. Este radical puede reaccionar con otros radicales centrados en el carbono o con O_2 . Esto último da como resultado la formación de un radical peroxilo. Los radicales peroxilo pueden sufrir una reacción de eliminación, por la cual se libera HO_2^\bullet , o generar hidroperóxidos a través de la abstracción de hidrógeno de otra molécula. Ambas rutas conducen finalmente a la fragmentación de la cadena principal de la proteína [21].

Por otro lado dado que hay 20 aminoácidos diferentes, la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos es un mecanismo más complejo que la oxidación de la cadena principal de proteínas y conduce a la formación de varios productos de oxidación. Estas reacciones se pueden dividir en cuatro grupos principales; las reacciones con AA alifáticos, aromáticos, Cys y Met.

La formación de radicales centrados en el carbono a partir de la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos alifáticos pueden tener varios destinos. Por ejemplo, pueden sufrir dimerización debido a la reacción con otros radicales centrados en carbono o pueden ser reparados por tioles, generando radicales tiílo. Sin embargo, la reacción predominante en condiciones aeróbicas es la formación de radicales peroxilo. Como resultado, pueden generarse radicales alcoxilo, hidroperóxidos, alcoholes y carbonilos.

Un buen ejemplo de oxidación de residuos de aminoácidos aromáticos es la tirosina. El daño oxidativo de la tirosina a menudo conduce a la generación de radicales tirosilo. Estos radicales pueden dimerizarse, generando ditirosina, un proceso implicado en el entrecruzamiento y la agregación de proteínas. Otros productos importantes de la oxidación de la tirosina son 3-clorotirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina y 3-nitrotirosina (3-NT). Estos últimos se generan debido a la reacción con ONOO^- y serán tratados más adelante.

Las cadenas laterales de aminoácidos que contienen azufre son los blancos más sensibles para la oxidación. La oxidación de la cisteína conduce a la formación de

radicales tiílo. Hay varios destinos para estos radicales tiílo. Las reacciones de dimerización dan lugar a disulfuros que generan cistina. Además, pueden formarse dímeros mixtos debido a la reacción de radicales tiílo con otras especies. La reacción de los radicales tiílo con O₂ conduce a la formación de radicales peroxilo y da lugar a oxiácidos (ácido sulfénico, ácido sulfínico y ácido sulfónico).

Uno de los principales productos de la oxidación de metionina son los sulfóxidos de metionina (MeSOs). Los MeSO pueden formar sulfonas después de una oxidación adicional o pueden reducirse mediante metionina sulfóxido reductasas (MSR) [21].

1.3.1 Consecuencias a nivel celular

Las modificaciones oxidativas de las proteínas resultan en proteínas mal plegadas y con un deterioro en sus funciones, lo que podría afectar negativamente el metabolismo celular. Sin embargo, la inactivación de proteínas debido a la oxidación también puede tener funciones reguladoras. De forma similar a otras modificaciones proteicas postraduccionales, la oxidación también parece estar implicada en la regulación de una gran cantidad de procesos metabólicos.

Un evento de oxidación inicial puede conducir no solo a múltiples modificaciones dentro de una proteína, sino también a la oxidación de proteínas adicionales y otras macromoléculas, dando lugar a reacciones en cadena difíciles de controlar.

La acumulación de proteínas oxidadas produce reacciones de entrecruzamiento y una mayor formación de agregados de proteínas no degradables. Los agregados proteicos son inicialmente el resultado de interacciones hidrofóbicas debido al aumento de la hidrofobicidad superficial de las proteínas oxidadas, como resultado de su despliegue parcial. Además, las proteínas oxidadas en estos agregados se entrecruzan químicamente por reacciones covalentes; por ejemplo, formación de ditirosina, interacción de dos radicales centrados en carbono, formación de disulfuro y la reacción de carbonilos proteicos con residuos de lisina y arginina.

Estos agregados proteicos son insolubles y no degradables por lo que se acumulan dentro de la célula, lo que parece tener diversas consecuencias para el metabolismo y la viabilidad celular. Está demostrado que la acumulación de agregados de proteínas conduce a la inhibición del sistema proteasoma y, por lo tanto, a una mayor agregación [21].

1.3.2 Reparación de proteínas oxidadas

La mayoría de las modificaciones oxidativas de proteínas no son reparables, lo que hace que un sistema de degradación rápido y eficaz sea esencial para proteger las células de la acumulación de proteínas oxidadas y las consecuencias relacionadas.

Sin embargo, existen algunas enzimas que pueden reparar modificaciones de residuos de aminoácidos que contienen azufre (disulfuros y MeSO). Los disulfuros pueden repararse con tioredoxina (Trx) o con la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Un grupo de enzimas, denominadas metionina sulfóxido reductasas (MSRs), son capaces de reducir los dos estereoisómeros de MeSO.

1.3.3 Degradación de proteínas oxidadas

Los sistemas de degradación tienen una gran participación en la eliminación de productos de oxidación de proteínas. El sistema más importante responsable de la degradación de las proteínas oxidadas es el sistema proteasomal y, en particular, el proteasoma 20S.

Además del sistema de degradación proteasomal, existe una maquinaria de degradación adicional que podría estar involucrada en la proteólisis de proteínas oxidadas: el sistema lisosomal. Sin embargo, la degradación lisosomal de las proteínas es un proceso menos selectivo que la degradación proteasomal. La captación lisosomal se logra a través de tres procesos diferentes: fagocitosis, endocitosis y autofagia. En particular, la autofagia es importante para la degradación de proteínas endógenas [21].

1.3.4 Acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento

Como se ha visto, los seres humanos estamos expuestos constantemente a ROS, lo que implica que las proteínas oxidadas se generan a lo largo de toda la vida. Se ha visto que el envejecimiento se acompaña de la acumulación de ADN dañado, proteínas mal plegadas y proteínas oxidadas. La acumulación de proteínas oxidadas está limitada en las células en proliferación debido al hecho de que las divisiones celulares permanentes conducen a una dilución de las moléculas dañadas. Por el contrario, las células postmitóticas tienen el potencial de acumular proteínas dañadas oxidativamente. Todavía no está claro si la acumulación de proteínas oxidadas relacionada con la edad es un producto de una mayor oxidación de proteínas,

disminución de la degradación de proteínas oxidadas o una combinación de ambos mecanismos.

Se ha propuesto que existe un deterioro en las funciones del sistema proteasomal que se relacionan con la edad. Se ha demostrado un aumento de las modificaciones oxidativas en subunidades del proteasoma, junto con una disminución de la expresión de dichas subunidades que están relacionados con la edad. Lo que resulta en una disminución del recambio proteico y una mayor acumulación de proteínas oxidadas.

A su vez "The Mitochondrial-Lysosomal Axis Theory of Aging," definida por Brunk y Terman, parece ser una explicación adicional para la acumulación relacionada con la edad de proteínas oxidadas. Con el envejecimiento, existe una regulación disfuncional del pH lisosomal, disminución de la estabilidad lisosomal, como consecuencia de la alta sensibilidad de la membrana lisosomal hacia el daño oxidativo, y un deterioro en el direccionamiento de proteínas oxidadas hacia los lisosomas. Todo ello puede conducir a una disminución de la degradación lisosomal de las proteínas oxidadas [21].

1.3.5 Roles fisiopatológicos de las proteínas oxidadas

Debido a la acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento, existe una extensa formación de agregados de proteínas a lo largo de toda la vida. Como se mencionó anteriormente, estos agregados experimentan modificaciones secundarias, por ejemplo, debido a productos de peroxidación de lípidos, dando como resultado la formación de material oxidado altamente entrecruzado. Un ejemplo importante es la lipofuscina, también llamada "pigmento de la edad" o "ceroide". Consiste en aproximadamente 30% -70% de proteínas entrecruzadas, 20% -50% de lípidos, y aunque en menor proporción, también se identificaron carbohidratos como componentes de la lipofuscina [21].

Se cree que la acumulación de lipofuscina es uno de los factores más importantes que limitan la vida útil de una célula. La lipofuscina no es degradable por el sistema proteasomal o lisosomal. Por lo tanto, con la edad, la lipofuscina se acumula en las células postmitóticas y de división lenta. Sin embargo, no solo la cantidad de lipofuscina aumenta durante el envejecimiento, sino que la tasa de acumulación de lipofuscina se correlaciona positivamente con la tasa de envejecimiento. Por lo tanto, la lipofuscina se usa ampliamente como biomarcador del envejecimiento. El contenido de lipofuscina es fácil de detectar debido a su autofluorescencia [21].

Si bien la lipofuscina se acumula especialmente en la luz lisosomal, también se encuentran bajas cantidades de lipofuscina en el citosol. La lipofuscina es capaz de inhibir el proteosoma. Por lo tanto, en presencia de altas cantidades de lipofuscina, la degradación de las proteínas oxidadas disminuye, dando como resultado una mayor acumulación intracelular de proteínas oxidadas y su agregación. Además favorece la apoptosis al inhibir la degradación de proteínas proapoptóticas lo que conduce a la iniciación de la cascada apoptótica.

Brunk y Terman han propuesto que la acumulación lisosomal de lipofuscina produce un deterioro en la autofagia y la degradación lisosomal, lo que podría causar una disminución de la degradación lisosomal de los agregados de proteínas y organelos, como las mitocondrias dañadas, lo que finalmente da como resultado un aumento de la generación de ROS, oxidación de proteínas, mayor agregación y más formación de lipofuscina.

Es importante observar que la acumulación de agregados de proteínas con la edad no solo es causada por el estrés oxidativo. Muchos otros procesos conducen a la agregación de proteínas, como un deterioro del proteasoma 26S y del sistema lisosomal.

Otra causa importante, a menudo involucrada en las enfermedades neurodegenerativas (EN) relacionadas con la edad, podría atribuirse a mutaciones, que pueden conducir a un plegamiento anormal de las proteínas y, por lo tanto, a la agregación [21].

1.3.6 Proteínas oxidadas y enfermedades

El sistema nervioso parece ser muy susceptible al daño oxidativo debido al alto consumo de oxígeno (20% - 25% del consumo de oxígeno de todo el cuerpo). Además, el cerebro tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, que son muy susceptibles a la oxidación, y de hierro, que es responsable de la generación de ROS altamente reactivos a través de la reacción de Fenton. Además, las neuronas son células postmitóticas y, por lo tanto, son propensas a la acumulación de moléculas dañadas. Por lo tanto, varios marcadores de estrés oxidativo, incluida la acumulación de macromoléculas oxidadas dañadas, a menudo son elevados en enfermedades neurológicas. Estos hechos sugieren una posible implicación del estrés oxidativo y el daño oxidativo, incluida la oxidación de proteínas, en la patogénesis de las enfermedades neurológicas [21].

1.4 Oxidación de tirosina

La tirosina es un aminoácido natural no esencial que en promedio constituye entre el 3 y 4 % de los residuos de una proteína. Consta de una cadena lateral fenólica relativamente larga con propiedades anfipáticas, capaz tanto de interactuar con agua y participar en la formación de enlaces de hidrógeno, como de experimentar interacciones catión- π y no polares.

Las propiedades fisicoquímicas versátiles de la tirosina le permiten localizarse en distintas regiones de la proteína y le otorgan un rol central en la conformación y reconocimiento molecular de muchas proteínas. La función fenol de la tirosina puede recibir grupos fosfatos en proteínas blanco, a través de quinasas de tirosinas y puede participar en procesos de transferencia de electrones con la formación del intermediario radical tirosilo (Tyr \cdot) ($E = +0.94$ V) [23].

Los radicales tirosilo son importantes en el sitio activo de distintas enzimas, (incluida la ribonucleótido reductasa), y usualmente están involucrados en oxidaciones promovidas por mezclas de peróxido de hidrógeno y hemoproteínas. Estos también pueden resultar del ataque de radicales libres (OH \cdot , ROO \cdot , RO \cdot) a proteínas. Los residuos de tirosina pueden ser nitrados como resultado del ataque por RNS, pueden sufrir cloración al ser atacados por HOCl, y pueden ser hidroxilados mediante el ataque del radical \cdot OH formando dihidroxifenilalanina (Figura 3). Se ha planteado que la nitración, cloración o entrecruzamiento de residuos de tirosina podrían inhibir la transducción de señales al impedir la fosforilación de la tirosina [3].

La oxidación de la tirosina por los radicales libres y otras especies reactivas se produce en condiciones fisiológicas y suele aumentarse en muchas patologías como consecuencia del aumento de la producción de especies reactivas.

Las modificaciones oxidativas de tirosina reportadas generalmente implican sustituciones en la posición *orto* del fenol de la tirosina (en relación con el OH), como ocurre con la o-nitrotirosina, o,o'-dityrosina y o-clorotirosina (Figura 3). Estos productos estables son termodinámicamente favorecidos por la re-aromatización del anillo fenólico subsiguiente a la sustitución.

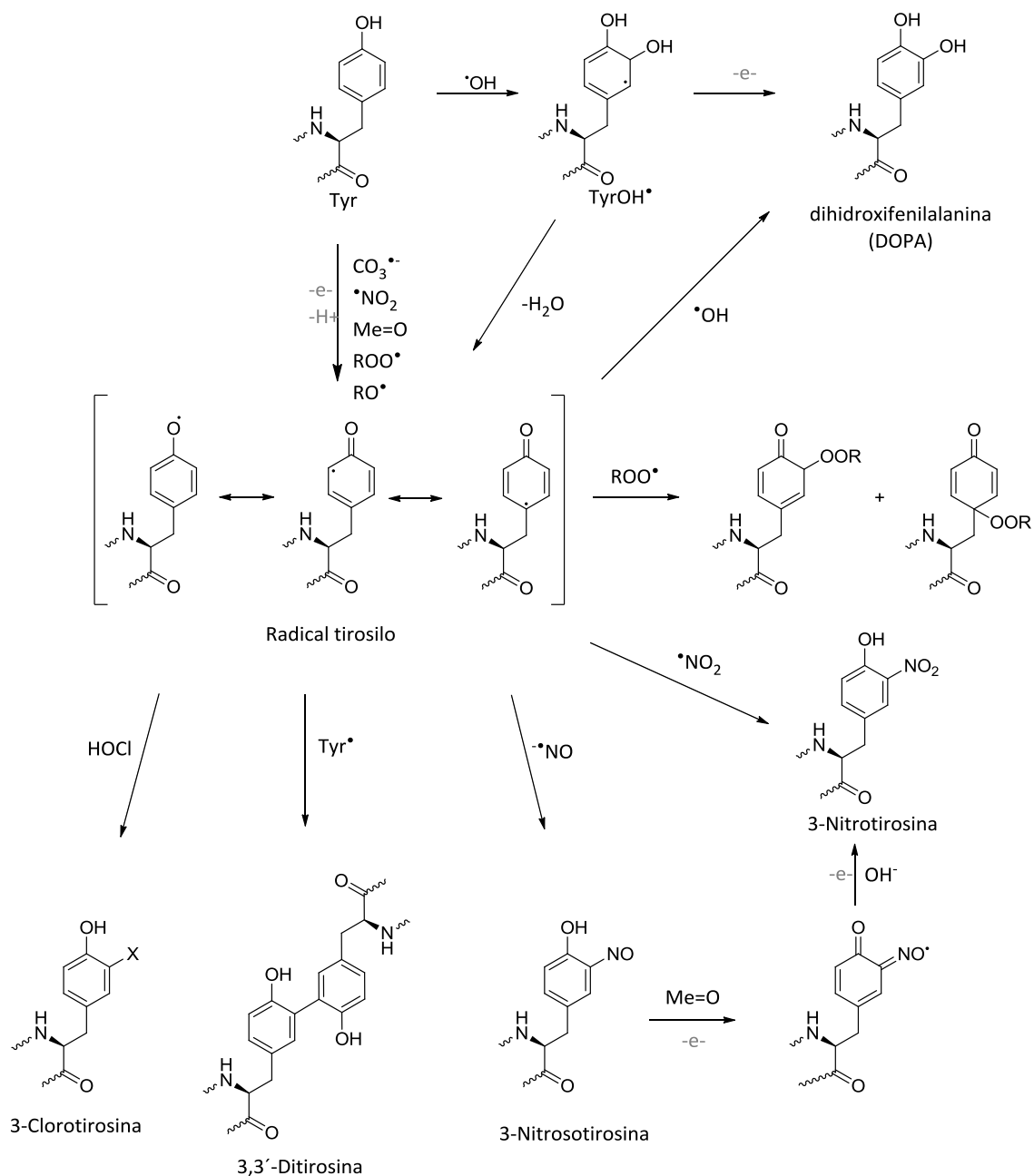


Figura 3. Algunos productos finales de la oxidación de tirosina. Adaptado de [3, 23].

Las proteínas nitradas se han detectado en una serie de entornos fisiológicos y patológicos. La nitración de tirosina *in vivo* se traduce en alteraciones funcionales. La importancia de la nitración proteica en el recambio proteico, la localización de proteínas, procesos de transducción de señales y la regulación de las respuestas inmunes están bajo investigación [24].

Por otro lado la posición *para* se considera generalmente mucho menos reactiva debido al impedimento estérico hacia la sustitución junto con la pérdida de la estabilización de rearomatización. Sin embargo, existen algunas reacciones que modifican la tirosina en la posición *para*, incluyendo la reacción entre el radical tirosilo

y peroxilo lipídico [25]; la reacción entre el radical tirosilo y el superóxido [26, 27]; la hidroxilación por radical hidroxilo [27]; y la reacción no radicalar entre la tirosina y el oxígeno singulete [8]. Estas tirosinas *para*-sustituidas contienen carbonilos α,β -insaturados, que los convierten en buenos electrófilos, y podrían conferirles interesantes propiedades biológicas pudiendo formar aductos con tioles y otros nucleófilos [28].

1.4.1 Tirosina y oxígeno singulete

En la reacción de oxidación de Tyr mediada por $^1\text{O}_2$ se ha propuesto la formación inicial de un endoperóxido que sufre rápida apertura de anillo para dar un hidroperóxido situado en la posición C1 del anillo (posición *para* respecto al grupo fenólico, (Figura 3). En presencia de grupo amino alfa libre (Tyr libre), ocurre un rápido cerramiento del anillo para dar un hidroperóxido indólico que decae en el alcohol correspondiente, ácido 3a-hidroxi-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol-2-carboxílico (HOHICA) (Figura 3). Por otro lado, los derivados de tirosina N-protegidos, y oxidados mediante $^1\text{O}_2$ dan lugar a hidroperóxidos de larga duración, con la función peróxido presente en la posición del anillo C1. A bajas temperaturas, estos hidroperóxidos se descomponen en los correspondientes alcoholes. A temperaturas fisiológicas y particularmente en presencia de luz UV o iones metálicos, estos hidroperóxidos pueden dar lugar a radicales reactivos adicionales. Tanto los hidroperóxidos parentales, como los radicales derivados de los mismos, pueden mediar otro daño oxidativo. Estas especies pueden inhibir enzimas celulares claves. La formación y las reacciones posteriores de los peróxidos de proteína mediados por $^1\text{O}_2$ pueden por tanto desempeñar un papel clave en el daño inducido por la luz UV y otras fuentes de $^1\text{O}_2$ [8].

1.4.2 Radical tirosilo y superóxido

La reacción del superóxido con el radical tirosilo puede resultar en la adición de $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar hidroperóxido de tirosina o en la regeneración de la tirosina (Figura 4) [29].

La adición de superóxido da lugar a derivados *para*-hidroperóxido que pueden ciclarse en la mayor parte a un derivado indólico cis-fusionado, ácido 3a-hidroxi-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol-2-carboxílico (HOHICA), cuando la tirosina es N-terminal; o permanecer como una *p*-OOH ciclohexadienona acíclica (3-(1-hidroperoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina, HPOCHDA) cuando la tirosina está en otra

parte del péptido. El hidroperóxido puede hidrolizarse espontáneamente o reducirse para producir el *p*-alcohol correspondiente.

Los péptidos de tirosina N-terminales dan 10 veces más adición de superóxido que los péptidos con una tirosina interna. Esta propensión a las tirosinas N-terminales para dar más productos de oxidación se ha observado antes y se ha atribuido a la preferencia selectiva por adición en lugar de reducción de superóxido al radical tirosilo N-terminal [27].

1.4.3 Tirosina y radical hidroxilo

La hidroxilación de la tirosina por radical hidroxilo de diferentes fuentes da derivados *o*-OH (DOPA) como los principales productos. Sin embargo se ha demostrado que alrededor del 10% de los productos de esta reacción son *p*-OH (3-(1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina, HOCHDA).[27]

Por otro lado se ha demostrado que el radical triptófano formado en la reacción con radicales OH[•] derivados de peroxinitrito reacciona con O₂ para formar hidroperóxido. Un mecanismo similar se puede proponer para los residuos de tirosina [30].

1.4.4 Radical peroxilo lipídico

Estudios recientes han demostrado que los radicales de peroxilo lipídico experimentan reacción exclusivamente en la posición *para* del radical tirosilo [25, 27].

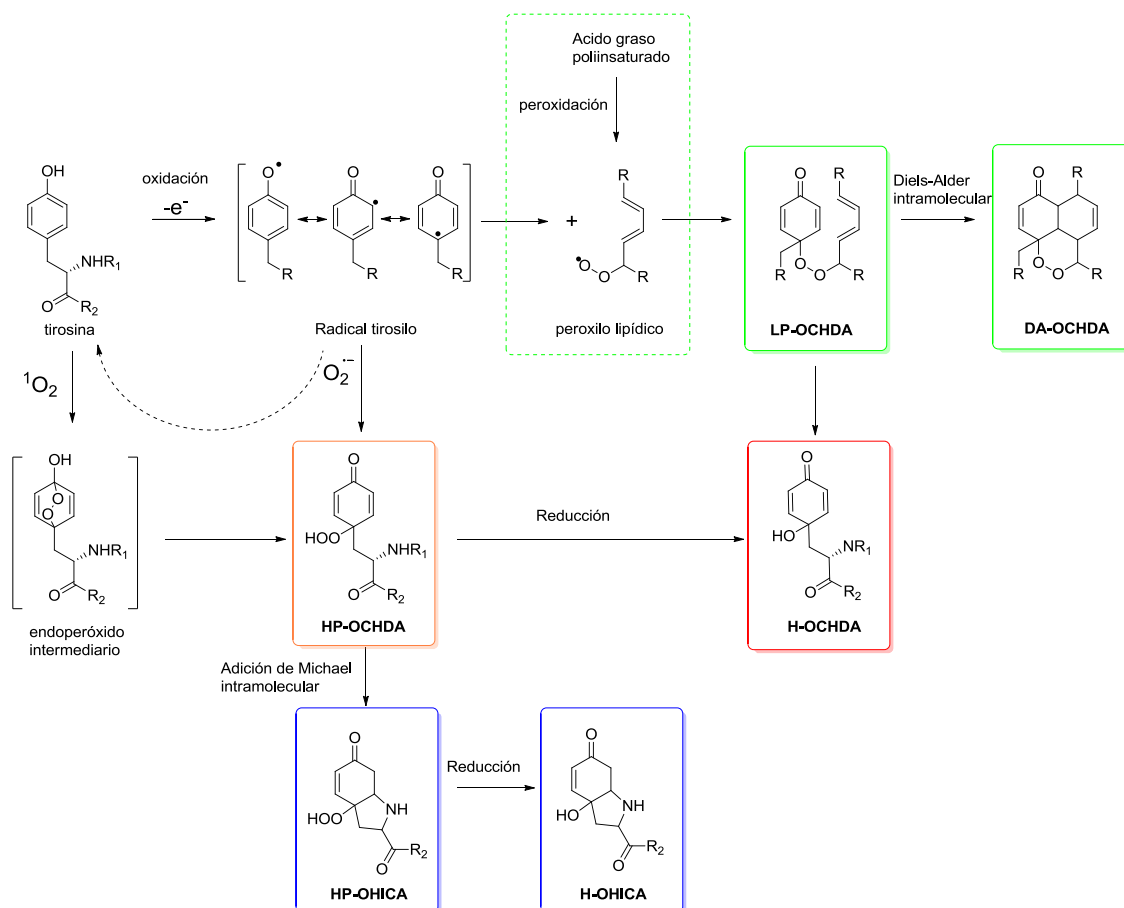


Figura 4. Reacciones de tirosina con especies radicales y oxígeno singulete.

A partir de un modelo cinético construido por Lancaster [31], en el que se tienen en cuenta las reacciones más importantes de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con otros radicales y antioxidantes enzimáticos y de bajo peso molecular en condiciones biológicas, se determinó que las principales reacciones del radical tirosilo son el intercambio radicalar con el glutatión que forma GS^\bullet y regenera la Tyr y la reacción de estos con el superóxido, siendo este último significativamente más importante que la reacción con dióxido de nitrógeno. Lo que sugiere que los derivados *p*-OOH y *p*-OH de la tirosina deberían ser significativamente más abundantes que la *o*-nitrotirosina en condiciones fisiológicas [27, 31].

Como se ha observado para otros electrófilos como el 4-hidroxiacetaldehído, es posible que a bajas concentraciones estas tirosinas *para*-sustituidos electrofílicas desencadenen una respuesta adaptativa, como respuesta al shock térmico o respuesta antioxidante para prevenir futuros daños. Por otro lado, altas concentraciones de estas tirosinas modificadas, podrían contribuir a la agregación proteica, como se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas, promover daño celular, y en última instancia llevar a la muerte celular. Estas potenciales funciones biológicas merecen una investigación adicional de estos electrófilos derivados de la tirosina [27].

En este trabajo nos propusimos desarrollar un método que nos permita detectar electrófilos en péptidos y proteínas. Considerando que los derivados α,β -insaturados de la tirosina reaccionan con el GSH formando un aducto de Michael reversible (Figura 5), que puede ser estabilizado por reducción [32], en este trabajo nos planteamos utilizar glutatión conjugado a una molécula fluorescente como sonda para poder detectar y cuantificar posibles electrófilos en proteínas.

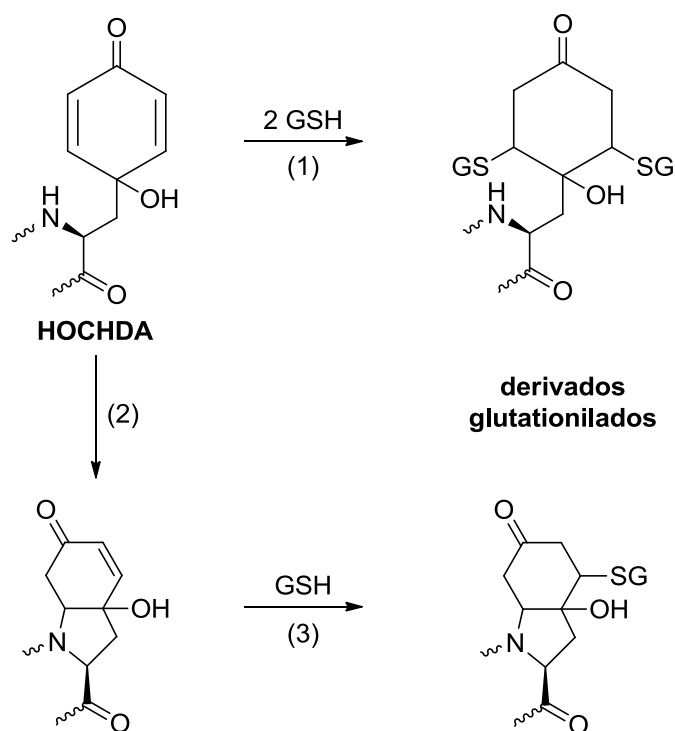


Figura 5. HOCHDA puede formar productos de adición con glutatión (GSH) u otros tioles. El HOCHDA derivado de la Tyr contiene dos centros electrofílicos, que pueden reaccionar con dos moléculas de GSH a través de la adición de Michael para dar un derivado de Tyr diglutatiónilado (reacción 1). Alternativamente, la adición conjugada del nitrógeno amida de Tyr al anillo fenólico (reacción 2) puede conducir a un derivado bicíclico, dejando solo un sitio para la adición de GSH (reacción 3). Adaptado de [28].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Detectar electrófilos en proteínas.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar derivados de glutatión y cisteamina conjugados a un grupo fluorescente, fluoresceína o dansilo.
- Validar método de detección de electrófilos en péptidos y en proteínas.
- Evaluar formación de derivados electrófilos en proteínas mediante sistemas de oxidación radicalar.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Equipamiento y reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados fueron obtenidos de Sigma, Applichem y GE healthcare. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Uv-Vis Varian Cary 50. Para el análisis por HPLC se utilizó un HPLC Agilent Infinity 1260 cuaternario con detector de absorbancia de arreglo de diodos (1260 DAD VL) y fluorescencia (1260 FDL), con inyección manual. Las fases móviles utilizadas fueron A: 0.1% ácido trifluoracético (TFA) en agua y B: 0.1% TFA en acetonitrilo (salvo que se especifique). Las columnas utilizadas fueron: Agilent Eclipse Plus C18, 100 x 4.6 mm (Eclipse analítica) y Hi Trap Desalting 100 x 5 mL (Gel filtración, GE Healthcare).

3.2 Síntesis de sondas

Se preparó un derivado de glutatión conjugado a una molécula de fluoresceína mediante enlace amida. También se prepararon dos derivados de cisteamina conjugados a grupos fluorescentes, fluoresceína y dansilo mediante enlace amida y sulfonamida respectivamente.

3.2.1 Síntesis de glutatión-fluoresceína

Se hicieron reaccionar 5 mL de glutatión disulfuro (GSSG) 6 mM con N-hidroxisuccinimida-Fluoresceína (NHS-F) 3 mM preparada en dimetilformamida (DMF), en amortiguador borato 50 mM pH 8.5 durante 2 h a temperatura ambiente, protegido de la luz y bajo agitación. Luego se redujo con 50 mM DTT durante 1 h en oscuridad y se purificó por extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Bakerbond C18, 500 mg, 3 mL.

Para la purificación se activó la columna con 2 mL de acetonitrilo 0.1% ácido fórmico y 2 mL de H₂O 0.1% ácido fórmico. La muestra fue acidificada con 1% TFA antes de sembrar y los lavados se realizaron con concentraciones crecientes de acetonitrilo, utilizando 2 mL de soluciones de 5, 10, 20, 30, 50 y 100% de acetonitrilo en H₂O, 0.1% ácido fórmico. Todas las soluciones fueron aplicadas a la columna de 1 mL por vez.

Los productos se analizaron por HPLC, con detección UV-Vis y fluorescencia. Se utilizó una columna Eclipse analítica. El método utilizado fue (0-5)´ 0% B, (15-17)´ 100% B, (18-23)´ 0% B. La detección de absorbancia se realizó a 228, 280, 350 y 440 nm y la

detección de fluorescencia se realizó a $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$. Se inyectaron 5 μL de muestra.

La cuantificación del producto purificado por SPE se realizó a pH básico por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 495 nm, donde la fluoresceína presenta un $\varepsilon = 70000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Instrucciones del fabricante).

3.2.2 Síntesis de cisteamina-fluoresceína

Se hizo reaccionar 2 mL de dihidrocloruro de cistamina 10 mM en amortiguador borato 100 mM pH 8.5 con 0.2 mL NHS-F 25 mM en DMF durante 2h, a temperatura ambiente, protegido de la luz. Luego se redujo con DTT 50 mM durante 1 h. La purificación se realizó por SPE C18, como se describió previamente para F-GSH.

Los productos se analizaron por HPLC, con detección UV-Vis y fluorescencia. Se utilizó una columna Eclipse analítica. El método utilizado fue (0-3)' 1% B (20-22)' 100% B (23-30)' 1% B. La detección de absorbancia se realizó a 228, 280, 350 y 440 nm y la detección de fluorescencia se realizó a $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$. Se inyectaron 5 μL de muestra. Se analizaron diluciones de NHS-F, de la reacción sin reducir y de la purificación, todas realizadas en agua. La cuantificación del producto purificado por SPE se realizó a pH básico por espectrofotometría midiendo absorbancia a 495 nm, como descrito para F-GSH.

3.2.3 Síntesis de cisteamina-dansilo

Se hizo reaccionar 2 mL de dihidrocloruro de cistamina 10 mM en amortiguador borato 100 mM pH 8.5 con 0.2 mL de cloruro de dansilo 25 mM en DMF durante 2 h, temperatura ambiente, protegido de la luz. Luego se redujo con DTT 50 mM durante 1 h y se purificó por SPE C18, como se describió previamente.

El análisis de los productos se realizó por HPLC en condiciones similares a las de la reacción anterior pero variando la las longitudes de onda para detectar fluorescencia, en este caso se excitó a 350 nm y se detectó la emisión a 500 nm.

3.3 Oxidación de péptidos

3.3.1 Oxidación de GY. (Síntesis y purificación de GHOCHDA)

El G-HOCHDA se obtuvo por oxidación de glicil-tirosina (GY) con oxígeno singulete y posterior reducción con dimetilsulfuro (DMS).

El oxígeno singulete fue producido mediante fotosensibilización con azul de metileno (MB) a 0 °C (baño de hielo), borboteo de oxígeno y expuesto a dos lámpara fluorescentes de 32 W de potencia con un flujo luminoso de 1950 lm. La reacción se realizó en D₂O para aumentar el tiempo de vida media del oxígeno singulete.

Bajo estas condiciones se hicieron reaccionar 2 mL GY 40 mM en D₂O y 30 μM de MB durante 1 h. Esta reacción genera el derivado HPOCHDA de la tirosina. El G-HOCHDA se obtuvo tras la reducción del hidroperóxido con 0.1 M de DMS durante 1 h en agitación.

La purificación se realizó por SPE C18, en este caso la columna fue activada con 2 mL de acetonitrilo y 3 mL de H₂O 0.1% TFA, se sembró aproximadamente 1 mL de la reacción acidificada con 1% TFA y la elución se realizó con H₂O 0.1% TFA.

El producto purificado se cuantificó por espectrofotometría midiendo absorbancia a 227 nm donde el compuesto de referencia adoptado, N-acetil HOCHDA glicilmetilester tiene un $\epsilon = 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (M. Moller, N. Porter, comunicación personal).

Los productos de la reacción se analizaron por HPLC con detección UV-Vis. Se utilizó una columna Eclipse analítica, el gradiente utilizado fue: (0-5)' 0% B, (15-17)' 100% B, (18-23)' 0% B, con un flujo de 1 mL/min. Se inyectaron 5 μL de GY, reacción a las 2 h, reacción + DMS, y purificación.

3.4 Reacción entre péptido oxidado y sonda

Se hicieron reaccionar 200 μM de GH con 0.2, 0.6, 2.0 y 4.0 mM de F-GSH en amortiguador fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa pH 7.4 durante 2 h, temperatura ambiente, en agitación y protegido de la luz.

El análisis de la reacción se realizó por HPLC con detección UV-Vis y fluorescencia. Se utilizó una columna Eclipse analítica, el gradiente utilizado fue: (0-5)' 0% B, (15-17)' 100% B, (18-23)' 0% B, con un flujo de 1 mL/min, se inyectó 5 μL de cada reacción, como controles se inyectaron también GHOCHDA y F-GSH.

La estructura del aducto fue caracterizada por espectrometría de masa (MS) en la facultad de Medicina con ayuda del Msc. Mauricio Mastrogiovanni utilizando un Espectrómetro de Masa de tipo ESI, triple cuadrupolo Applied Biosystems.

3.5 Oxidación de proteínas

Se oxidó la proteína ribonucleasa A (Rnasa) por distintos métodos.

3.5.1 Oxidación con oxígeno singulete.

Se hicieron reaccionar 100 μM de Rnasa con 30 μM de MB en agua y en agua deuterada durante 1 h, a 0 °C con flujo superficial de oxígeno, expuesto a dos lámparas fluorescentes de 32 W.

3.5.2 Oxidación con radical peroxilo.

El radical peroxilo (RO_2^\bullet) fue generado por descomposición térmica de diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP), un azoiniciador hidrosoluble que reacciona rápidamente con el oxígeno originando radicales peroxilo.

Se hizo reaccionar 100 μM Rnasa con 10 y 100 mM ABAP en amortiguador fosfato dtpa pH 7.4 durante 1 h a 37 °C, agitando cada 10 min para equilibrar con aire y reoxigenar la solución. Se filtró 3 veces a 14000 g y 4 °C por 15 min en filtro de centrifuga de 500 μL y 5 KDa de corte de GE healthcare para remover el exceso de ABAP antes de proseguir al marcado.

3.5.3 Oxidación con radical hidroxilo (MCO)

La oxidación de proteína con H_2O_2 en presencia de Fe(II):EDTA (1:2) se realizó en amortiguador fosfato de sodio 5 mM pH 7.4 según lo reportado por Möller *et. al* [27]. Se oxidó 100 μM RNasa A con 0.2 mM H_2O_2 y 0.2 mM Fe(II):EDTA(1:2) o 4 mM H_2O_2 y 4 mM Fe(II):EDTA (1:2). Se filtró 2 veces a 14000 g por 15 min en filtros para centrifuga, de 500 μL y 5 KDa de corte para eliminar el exceso de hierro y H_2O_2 .

3.5.4 Oxidación con peroxinitrito

Se hicieron reaccionar 100 μM RNasa con 1 mM de peroxinitrito en amortiguador fosfato 50 mM pH 7.4 y en amortiguador fosfato 50 mM pH 7.4, 50 mM carbonato.

Previamente el stock de peroxinitrito fue tratado con dióxido de manganeso para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno y su concentración se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [33]. Las diluciones se realizaron en NaOH preparada al momento de su uso.

En este caso el producto final del ONOO^- es nitrato, por lo que no fue necesario remover el exceso.

3.6 Reacción proteína oxidada – sonda (detección de electrófilos)

En todos los casos se hicieron reaccionar 50 μM de Rnasa oxidada con 2 mM de F-GSH en amortiguador fosfato 100 mM, 0.1 mM dtpa pH 7.4, durante 2 h, en agitación a temperatura ambiente, protegido de la luz. Previo a la separación por gel filtración se redujo con DTT 18.2 mM por 30 min, protegido de la luz, para remover posibles disulfuros mixtos entre la proteína y la sonda fluorescente.

3.7 Estándar de proteína marcada

Para poder cuantificar los productos, se marcó covalentemente la proteína RNasa con nhs-fluoresceína. Para esto se preparó NHS-F 30 mM en DMF, del cual se hicieron reaccionar 30 μL con 150 μL de RNasa 400 μM en 150 μL amortiguador borato pH 8.5 durante 1 h, RT, oscuridad. La purificación se realizó por gel filtración en PD-10 (desalting column) contra fase móvil (amortiguador fosfato de sodio 50 mM, 150 mM NaCl pH 7.4). El producto de la purificación se cuantificó por absorbancia a 495 nm donde la fluoresceína tiene un $\epsilon = 70000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y se preparó un estándar 10 μM fluoresceína en fase móvil.

3.8 Análisis por HPLC

La formación de productos electrófilos generados mediante las distintas oxidaciones se estudió por gel filtración en HPLC con detección UV-Vis y fluorescencia. La detección de absorbancia se realizó a 210, 254, 280, 450 y 495 nm y la detección de fluorescencia se realizó a $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

Luego de distintos ensayos se determinó que la mejor separación entre los picos se obtenía con la muestra reducida y utilizando dos columnas HiTrap de 5mL (GE Healthcare) colocadas en serie a un flujo de 2.5 mL/min con amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, 150 mM NaCl como fase móvil.

3.9 Geles de electroforesis

Se realizó una corrida electroforética en condiciones desnaturizantes en gel de poliacrilamida 15%, se utilizó un marcador de peso molecular (MPM), sigma marked wide Range 6500-200000 Da (Sigma-Aldrich) del cual se sembró 10 µL. Los geles fueron revelados por fluorescencia (utilizando G-box), y por teñido de las proteínas con azul de coomassie coloidal (R-250). También se realizó un gel con el fin de realizar una digestión en gel de la RNasa A, que se tiño con coomassie común (G-250).

3.10 Digestión de RnA

Para poder analizar los aductos formados entre los derivados electrofílicos en la Rnasa y la sonda por MS se realizó una digestión de la proteína con tripsina, Si bien los productos de la digestión se pudieron observar por HPLC, no fue posible identificar estos productos por MS. Por lo que se optó por realizar una digestión en gel de la proteína para optimizar los resultados.

La digestión de las bandas se realizó siguiendo el protocolo para digestión en gel de Shevchenko.[34] Se escindieron las bandas de la proteína del gel y se cortaron en cubos de aproximadamente 1mm de lado. Evitando obtener trozos más pequeños que pudiesen obstruir los tips de las pipetas. Los trozos de gel se transfirieron a un eppendorf y se incubaron con 500 µL de acetonitrilo por 10 min.

Se redujo con un volumen suficiente de DTT 100 mM para cubrir los trozos de gel (~50 µL) y se incubó a 56 °C por 30 min. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente (~22 °C), se adicionó 500 µL de acetonitrilo, se incubó por 10 min y se removió el líquido. Luego se alquiló la muestra con un volumen de iodoacetamida 55 mM suficiente para cubrir los trozos de gel (~50 µL) y se incubó 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se deshidrataron los trozos de gel con acetonitrilo y se removió el líquido.

Para desteñir los trozos de gel se adicionó ~100 µL de bicarbonato 100 mM:acetonitrilo (1:1) y se incubó por 30 min, con agitación ocasional. Se adicionó 500 µL de acetonitrilo y se incubó a temperatura ambiente agitando ocasionalmente hasta obtener trozos de geles blancos y deshidratados, luego se removió el acetonitrilo.

Para la digestión se adicionó un volumen de tripsina 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suficiente para cubrir los geles secos ($\sim 50 \mu\text{L}$) y se mantuvo en hielo. Luego de 30 min se chequeó que la solución fuera absorbida y se agregó más solución de tripsina hasta cubrir completamente los trozos de gel. Se dejó en hielo por 90 min más para asegurar la saturación con tripsina y se agregó bicarbonato de amonio para cubrir los trozos de gel y mantenerlos hidratados durante la digestión. La digestión se realizó a 37 °C overnight.

Para extraer los productos de digestión se adicionó 100 μL de solución de extracción, 5% ácido fórmico:acetonitrilo (1:2) y se incubó por 15 min a 27 °C con agitación. El sobrenadante se extrajo con pipeta utilizando un tip fino de electroforesis evitando cargar trozos de gel. Las soluciones de DTT y iodoacetamida fueron preparadas en bicarbonato de amonio 100 mM y la de tripsina en bicarbonato de amonio 10 mM, 10% acetonitrilo.

Todo el procedimiento se realizó teniendo las precauciones necesarias para evitar la contaminación de la muestra con queratina.

4. RESULTADOS

Para la detección de derivados electrófilos en proteínas se sintetizaron tres sondas que consisten en tioles nucleófilos conjugados a grupos fluorescentes. Una de ellas, el F-GSH fue probada con un derivado electofílico del dipéptido GY y luego se verificó su unión a una proteína oxidada por distintos sistemas.

4.1 Síntesis de sondas

4.1.1 Síntesis de glutatión-fluoresceína (F-GSH)

Para la síntesis de F-GSH (figura 6) se hizo reaccionar un exceso de glutatión disulfuro (GSSG) con NHS-F en medio básico. En esta reacción se forma un enlace amida mediante el ataque del grupo amino libre del GSSG al carbono carbonílico de la NHS-fluoresceína. Posteriormente se redujo el disulfuro con DTT para obtener la sonda con el tiol libre.

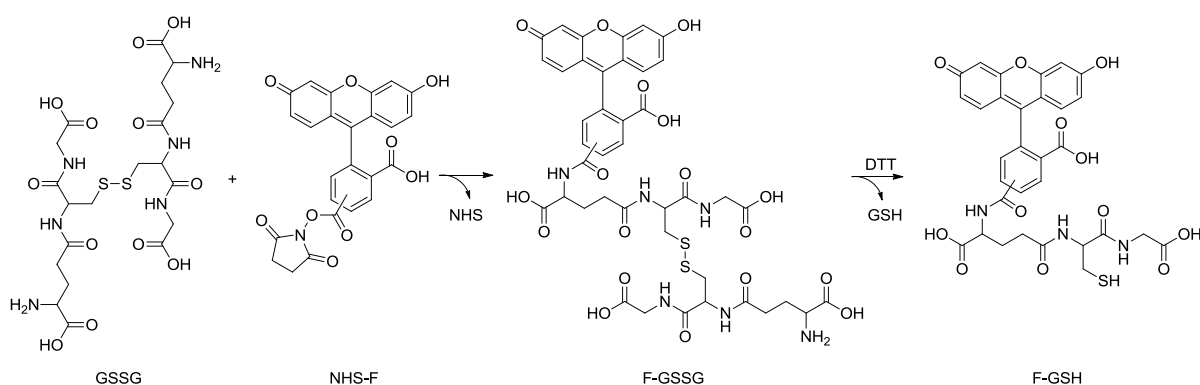


Figura 6. Síntesis de glutatión-fluoresceína.

Esta reacción ya fue caracterizada en el trabajo de Silvina Acosta [35] por lo que no se realizó el análisis de todos los productos de reacción, y solo se analizó por HPLC el producto de purificación en estado oxidado y reducido (figura 7). La detección se realizó a 450 nm, donde la fluoresceína en medio ácido tiene un máximo de absorbancia.

Cuando se inyecta la sonda en estado oxidado se observa un pico mayor a los 10.3 min correspondiente al disulfuro de la sonda (menos polar) y uno menor que corresponde a la sonda libre (con tiol libre, más polar). Al reducir con DTT se observa como estos picos se invierten.

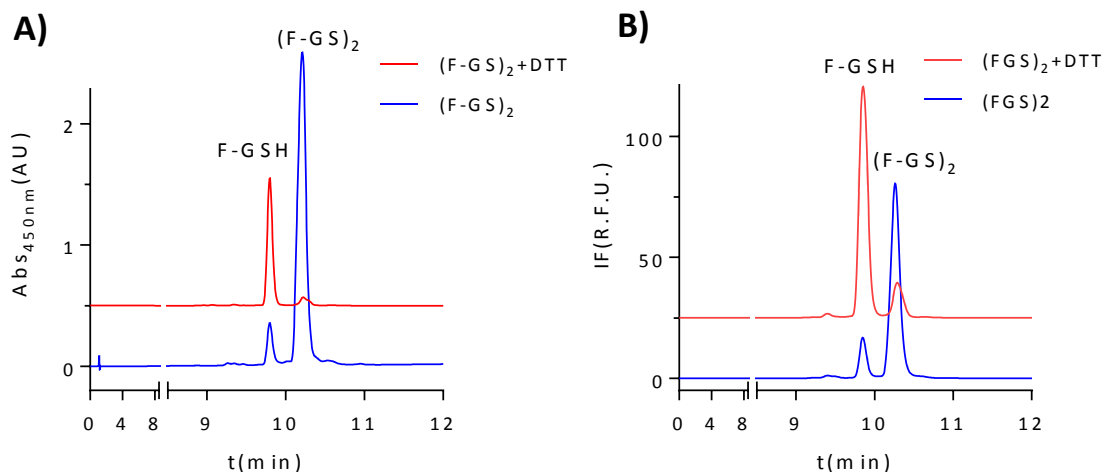


Figura 7. Análisis del producto purificado de la síntesis de F-GSH. Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 450 \text{ nm}$ (A) e intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ (B) del producto purificado de la síntesis en estado reducido y oxidado.

3.1.2 Síntesis de cisteamina-fluoresceína (CSA-F)

Para la síntesis de CSA-F (Figura 8) se hizo reaccionar un exceso de cistamina (CSA₂) con NHS-F en medio básico, en este caso se forma un enlace amida mediante el ataque del grupo amino de la CSA₂ al carbono carbonílico de la nhs-fluoresceína. Posteriormente se redujo el disulfuro con DTT para obtener CSA-F y CSA.

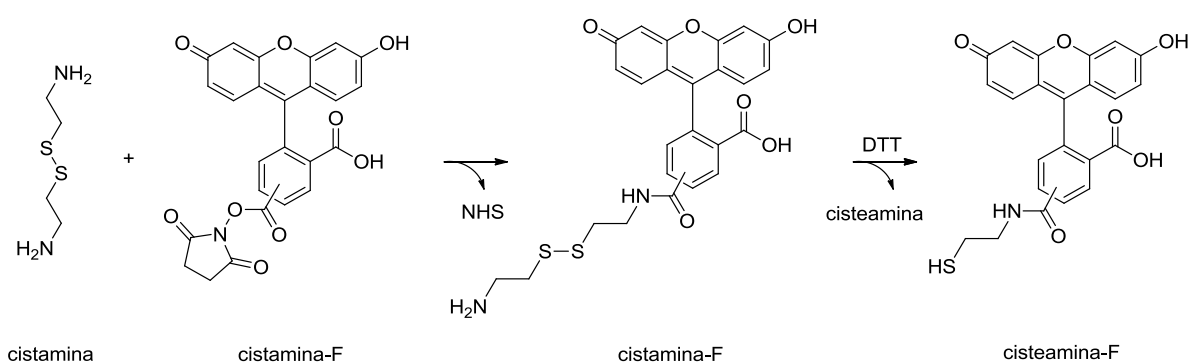


Figura 8. Síntesis de cisteamina-fluoresceína.

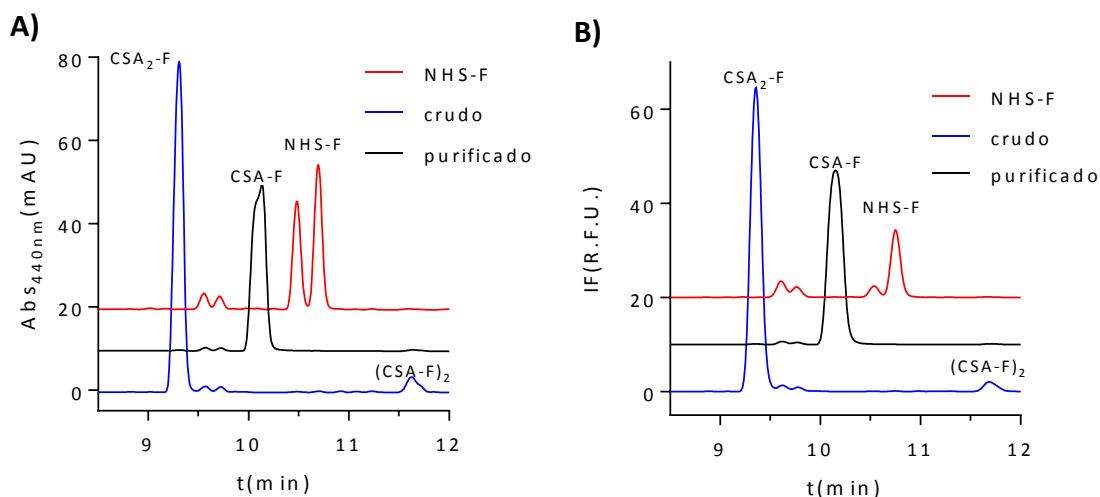


Figura 9. Análisis de la purificación de cisteamina-Fluoresceína por HPLC. Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 440\text{nm}$ (A) e intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ (B) de NHS-F y de los productos de cada paso de reacción de síntesis de la sonda.

En el cromatograma a 440 nm de NHS-F (figura 9) se visualizan 2 picos a los 10.7 min que corresponden a los dos isómeros del NHS-F (éster de succinimidilo, 5-(y 6-)carboxifluoresceína) y dos picos a los 9.6 min que corresponden a los productos de hidrólisis. En el análisis de la muestra de reacción previo a reducir se observa la formación de un producto mayoritario, CSA₂-F que eluye a los 9.3 min y un producto minoritario que queda más retenido y eluye a los 11.7 min que corresponde a la reacción de la cistamina con dos moléculas de NHS-F, cistamina-F₂, (CSA-F)₂. Luego de reducir con DTT y purificar se obtuvo un pico a los 10.3 min correspondiente a cisteamina-F. La extracción en fase sólida retiene CSA-F, mientras que CSA libre y DTT eluyen.

4.1.3 Síntesis de cisteamina-dansilo (CSA-D)

Se hizo reaccionar un exceso de CSA₂ con cloruro de dansilo en medio básico. En esta reacción el grupo amino primario de la cisteamina ataca al cloruro de sulfonilo desplazando al ion cloruro para formar una sulfonamida (Cistamina-dansilo), esta es luego reducida con DTT para dar la sonda con el tiol libre (figura 10).

El cromatograma a 228 nm (figura 11) de la reacción previa reducción, muestra un pico a los 11.5 min correspondiente a cistamina-didansilo (CSA₂-D₂) el producto formado cuando los dos grupos amino de la cistamina son dansilados y otro a los 8.3min correspondiente a la cistamina-monodansilo (CSA₂-D). Luego de reducir y

purificar se observó un pico a 9 min que corresponde a la sonda libre (cisteamina-dansilo, CSA-D).

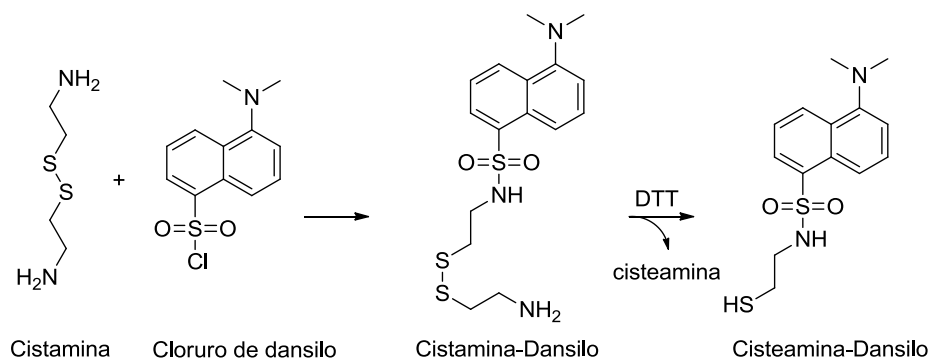


Figura 10. Síntesis de sonda cisteamina-dansilo.

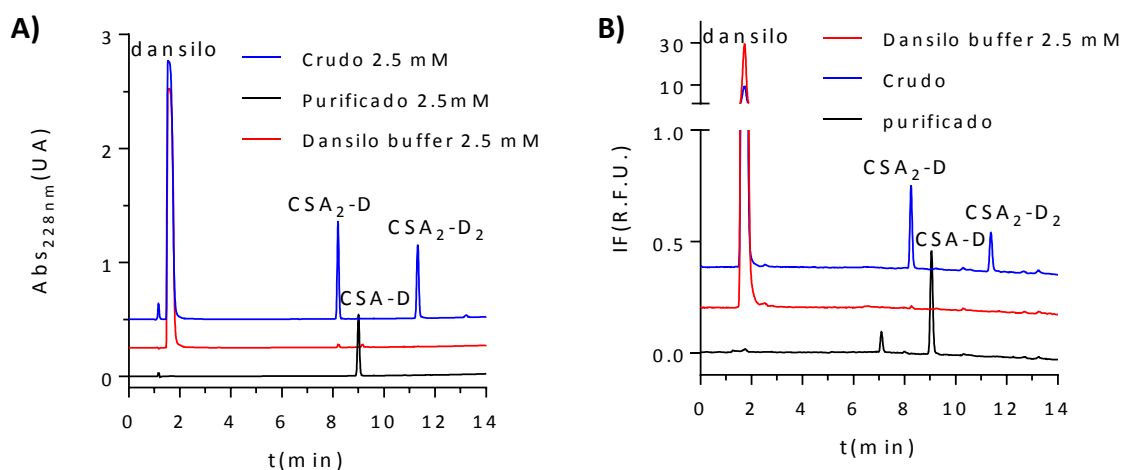


Figura 11. Análisis de la purificación de cisteamina-Dansilo por HPLC. Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 228\text{nm}$ (A) e intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 500\text{ nm}$ (B) de cloruro de dansilo y de los productos de cada paso de reacción de síntesis de la sonda.

4.2 Oxidación de péptidos

Para estudiar la reactividad de la sonda se utilizó un derivado del dipéptido GY oxidado con $^1\text{O}_2$. La reacción de la Tyr con $^1\text{O}_2$ genera el derivado electrofílico (HOCHDA) bien caracterizado, el mismo puede ciclar por la reacción entre el carbono electrófilo y el amino libre de la Tyr. Para evitar la reacción de ciclación se utilizó GY en lugar de Tyr libre.

La exposición de GY a oxígeno singulete genera como producto mayoritario un derivado 3-hidroperóxido de la tirosina (G-HPOCHDA), en esta reacción también se forman algunos derivados 3-OH, pero no se forman derivados *o*-OH o dímeros bajo

estas condiciones.[27] El derivado G-HOCHDA es obtenido por reducción de G-HPOCHDA con dimetilsulfuro (DMS) (Figura 12).

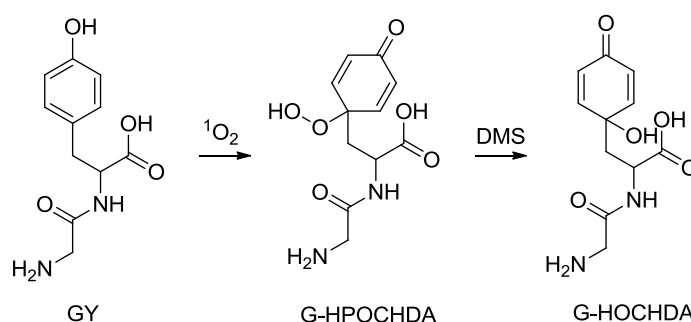


Figura 2. Síntesis de GHOCHDA.

Luego de transcurridas dos horas de la reacción se analizaron los productos por HPLC (figura 13). El cromatograma a 228nm mostró dos picos; uno a los 7.5 min que corresponde al GY, y otro alrededor de 1.7 min, que luego de agregar DMS desaparece para dar un pico a los 1.2 min, lo que sugiere que el pico a los 1.7 corresponde a G-HPOCHDA, y el de 1.2min a G-HOCHDA. En la fracción purificada por extracción en fase sólida solo se observó el pico a 1.2 min correspondiente a G-HOCHDA, esto coincide con lo reportado previamente [27].

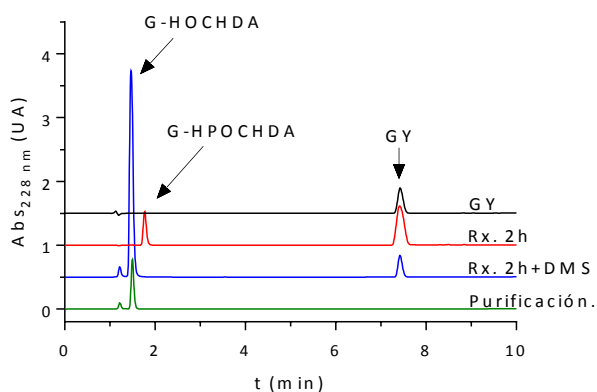


Figura 33. Análisis de síntesis y purificación de GHOCHDA.

4.3 Reacción entre el péptido oxidado y la sonda

Una vez obtenido el GHOCHDA se lo hizo reaccionar con la sonda durante 2 horas y la reacción se estudió mediante HPLC. En esta reacción se forma un aducto de Michael (aducto 1), mediante el ataque del tiol nucleofílico a un carbono en posición meta (enlace α,β -insaturado) del anillo de G-HOCHDA (figura 14).

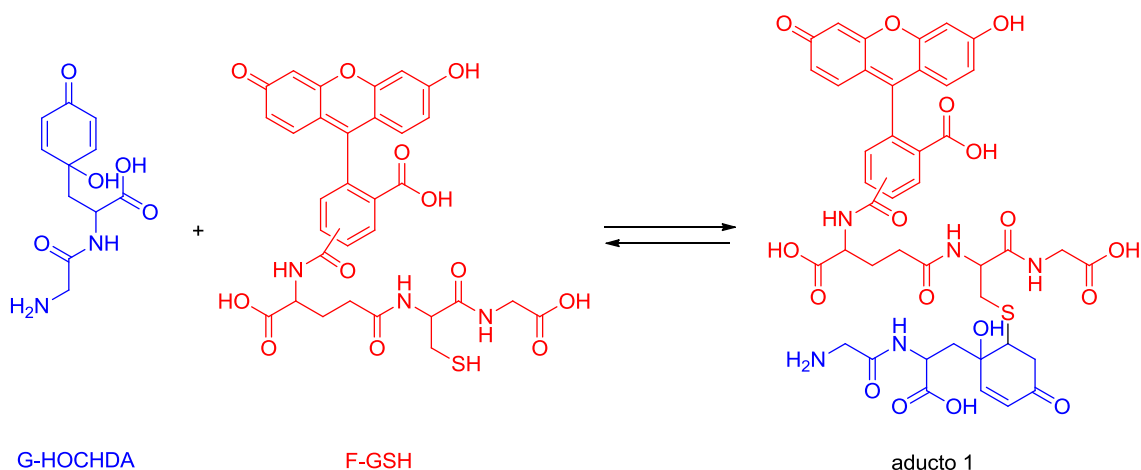


Figura 14. Reacción de formación de aducto 1.

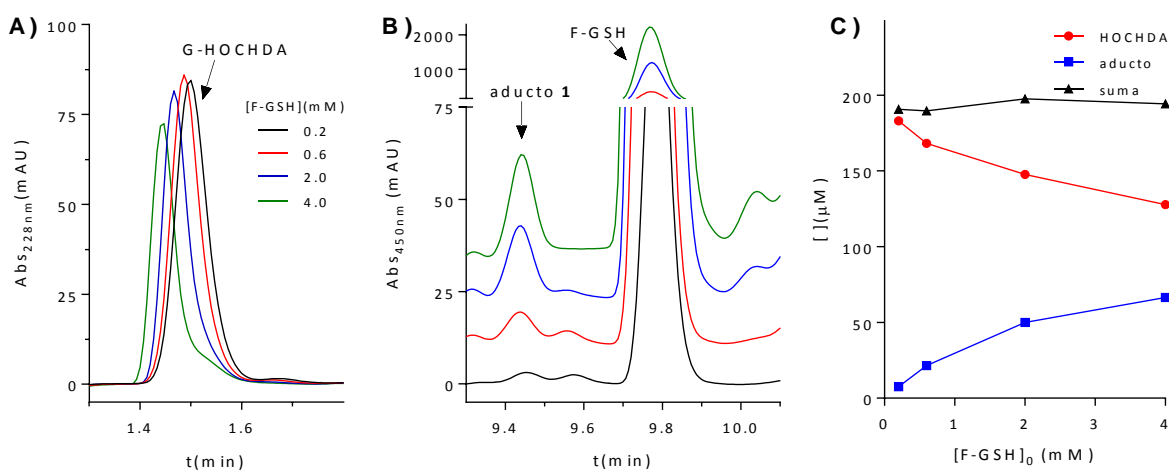


Figura 15. Análisis de la reacción entre GHOCHDA (200 μM) y F-GSH. Cromatogramas a 228 y 450 nm de los productos de reacción a distintas concentraciones de F-GSH (A). Concentración de HOCHDA y aducto 1 luego de transcurridas 2 h de reacción para las distintas concentraciones de F-GSH (B).

En el cromatograma a 228 nm se observa como el pico correspondiente a G-HOCHDA (1.5 min) disminuye a medida que aumenta la concentración inicial de F-GSH. Mientras que a 450 nm este aumento en la concentración de F-GSH es acompañado por aumento en la concentración de aducto (9.4 min). Esta dependencia de la formación de aducto con la concentración de sonda se evidencia en la gráfica de la derecha (figura 15). Esta reacción se realizó también durante 24 horas pero no mejoró el rendimiento indicando que la reacción es reversible y a las 2 horas ya se observan las concentraciones de producto en equilibrio.

La formación de aducto **1** fue confirmada por espectrometría de masas (figura 16). En MS1 se obtuvieron picos de m/z 920, 921 y 922 que corresponden al ion monocargado del aducto y la distribución isotópica esperada. Tras la fragmentación del ión de m/z 920.08 se obtuvieron fragmentos de m/z = 666, 632, 488 y 377. Los que corresponden a la reversión de la adición de Michael con el peso de la sonda (F-GSH) m/z = 666, a la ruptura del enlace azufre del glutatión m/z = 632, a la ruptura del enlace peptídico entre el carbono carbonílico de la cadena lateral del glutamato y en nitrógeno del grupo amino de la cisteína que forman parte del GSH m/z = 488, y a la hidrólisis en estado activado, donde se forma carboxifluoresceína m/z = 377.

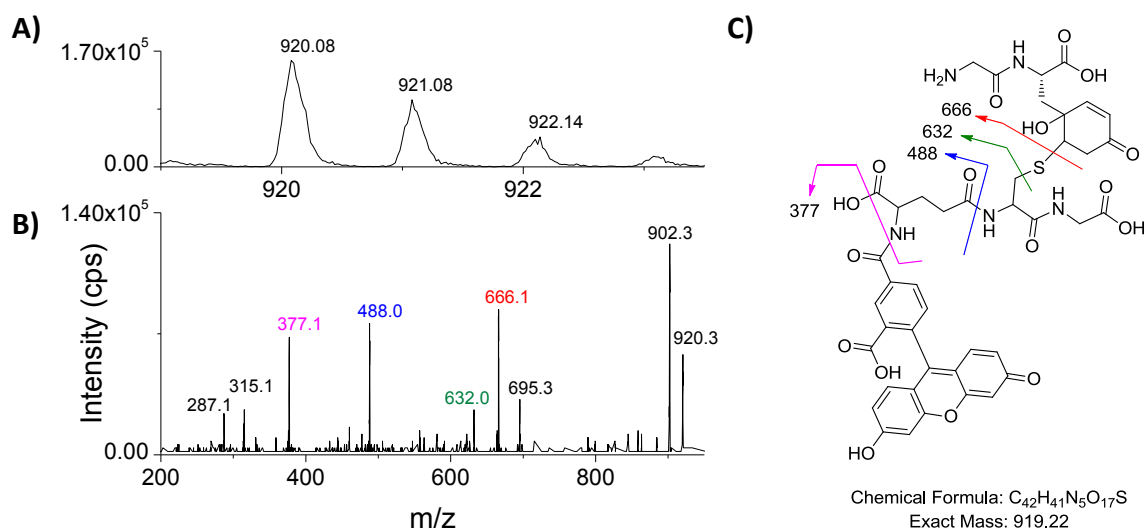


Figura 16. Caracterización del aducto 1 por espectrometría de masa. A) Espectro de masa del aducto, **B)** Patrón de fragmentación del aducto (CID), **C)** Estructura del aducto y sitios de fragmentación.

Si bien la sonda fluorescente no es completamente eficiente debido a que la reacción reversa parece ser muy favorable, es suficiente para detectar derivados electrofílicos con alta sensibilidad en péptidos pequeños. Por lo tanto, a continuación se procedió a validar este método con proteínas que son el objetivo principal de este trabajo.

4.4 Detección de electrófilos en proteínas

Para la validación con proteína se utilizó ribonucleasa A (Rnasa), una proteína pequeña (13.7 KDa) que contiene 6 residuos Tyr y 4 His, ambos capaces de generar productos electrófilos al ser oxidados con oxígeno singulete. Se detectó la formación de aductos de F-GSH con proteína oxidada por gel filtración en HPLC con detección UV-Vis y fluorescencia y por electroforesis en gel.

4.4.1 Optimización del método de detección

Para poder detectar los derivados marcados con la sonda se analizaron los productos de las reacciones por HPLC utilizando una columna de exclusión molecular que nos permitiera separar la proteína de la sonda libre, midiendo emisión de fluorescencia a 520 nm y Abs a 495 nm, longitud de onda a la que la fluoresceína presenta mayor absorbancia a pH 7.4.

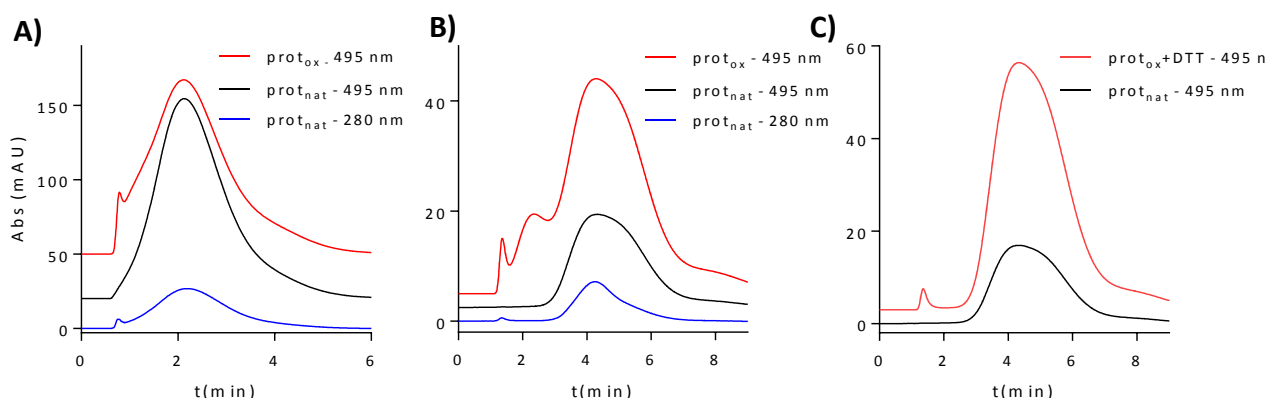


Figura 17. Optimización de método separativo. Se utilizan columnas de Gel Filtración HiTrap de 5 mL, y se inyecta proteína nativa con sonda seguida a 280 nm (azul) y 495 nm (negro) y proteína oxidada con sonda seguida a 495 nm (rojo). **A.** Separación utilizando una columna de HiTrap (5 mL). **B.** Separación utilizando dos columnas HiTrap en serie. **C.** Separación utilizando dos columnas HiTrap en serie, luego de prerreducir la muestra con DTT.

En el primer ensayo que se realizó con una columna HiTrap de gel filtración de 5 mL, se observó que la proteína y la sonda eluyen parcialmente solapadas (figura 17a). Alrededor del minuto 1 eluye la proteína mientras que la sonda queda más retenida alcanzando el máximo del pico cerca de los 2.5 minutos.

Para aumentar el tiempo de retención y así lograr separar la proteína y la sonda en picos independientes se utilizaron dos columnas colocadas en serie (figura 17b). Se mejoró la resolución pero se observó un pico intermedio entre la proteína y la

sonda que corresponde al disulfuro de la sonda, que debido a su gran tamaño es parcialmente excluido de los poros de la fase estacionaria.

Luego de varios ensayos se determinó que la mejor separación entre los picos se obtenía con la muestra reducida y utilizando dos columnas colocadas en serie. Para evitar la co-elución del disulfuro de la sonda con la proteína se redujo la muestra con DTT antes de inyectar (figura 17c). Al reducir con DTT antes de inyectar además reducimos los posibles disulfuros mixtos entre cisteínas de la proteína y el GSH, evitando así obtener señal que no corresponda a un carbono electrófilo.

4.4.2 Oxidación con oxígeno singulete

Para formar derivados electrofílicos de Rnasa se oxidó con $^1\text{O}_2$ en agua y en agua deuterada, lo que aumenta el tiempo de vida media del $^1\text{O}_2$, para posteriormente evaluar con F-GSH.

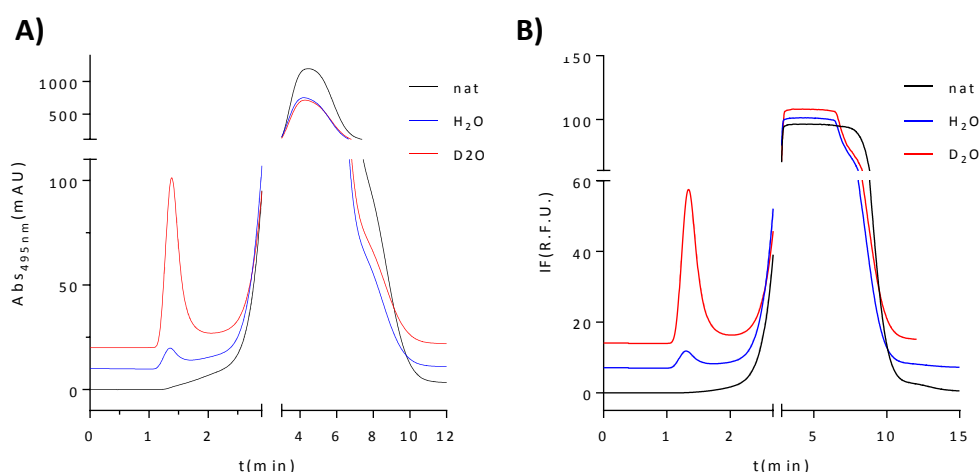


Figura 18. Análisis de producto de reacción entre RNasa A oxidada con oxígeno singulete y F-GSH por HPLC. A) Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 495\text{nm}$. **B)** Intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ de los productos de reacción.

En el cromatograma se observaron dos picos, uno a $t = 1.5\text{ min}$ que corresponde a la proteína marcada covalentemente con F-GSH y otro alrededor de los 5 min que corresponde a la sonda libre (F-GSH). Se observó también que la proteína oxidada con oxígeno singulete generado en agua deuterada formó mayor cantidad de electrofílicos capaces de reaccionar con F-GSH, que la oxidada con oxígeno singulete generado en agua (Figura 18). Este aumento se debe a que el $^1\text{O}_2$ cuando se encuentra en D_2O se desactiva más lentamente que en H_2O por lo que su concentración efectiva aumenta generando mayor cantidad de electrofílicos.

También se analizó la RNasa A oxidada por oxígeno singlete generado en D₂O y marcada con F-GSH por electroforesis en gel mediante tinción con coomassie y revelado de fluorescencia (Figura 19). Para poder detectar la adición del F-GSH a la proteína oxidada, se utilizó NaBH₄ para reducir el grupo carbonilo de la tirosina modificada a OH y estabilizar los productos unidos a F-GSH.

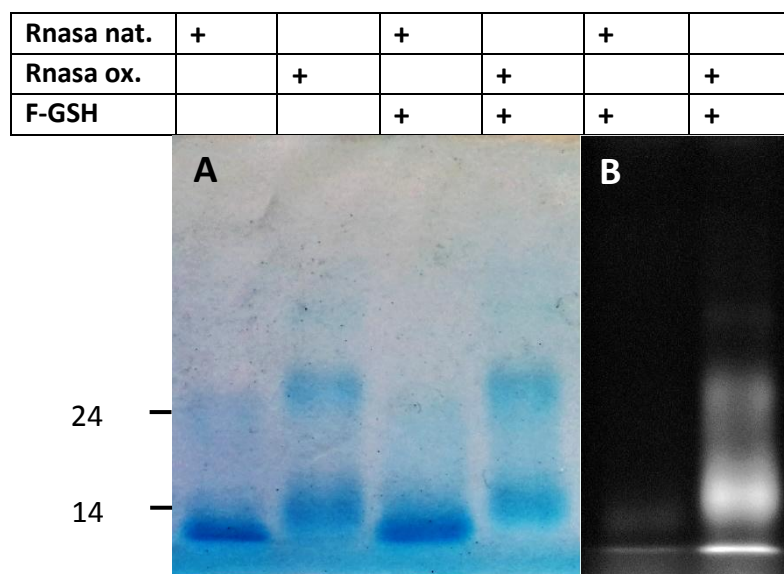


Figura 19. SDS-PAGE (poliacrilamida 15%) teñido con coomassie coloidal (A) y revelado por fluorescencia (B). La RNasa fue oxidada con oxígeno singlete, y las muestras que contienen F-GSH fueron tratadas con NaBH₄.

Los patrones de corrida electroforética fueron similares para las muestras tratadas con F-GSH (carril 3 y 4) y para las muestras sin tratar (carril 1 y 2). Se observó que la proteína oxidada disminuye su movilidad electroforética con respecto a la nativa. En los carriles de RNasa oxidada se observó una banda de un poco más de 24 KDa que podría deberse a la formación de un dímero.

Al revelar el gel por fluorescencia se verificó que la proteína oxidada se unió covalentemente a F-GSH, mientras que la nativa no presenta señal.

Para evaluar si sistemas de oxidación radicalar también eran capaces de generar electrófilos se utilizaron diversos sistemas oxidantes con relevancia en sistemas biológicos. En primer lugar se utilizó ABAP, un azoiniciador que genera radicales peroxilo. En segundo lugar se oxidó la proteína con radical hidroxilo generado

por la reacción de peróxido de hidrógeno catalizada por metales. Y en última instancia se trabajó con peroxinitrito.

4.4.3 Oxidación con radical peroxilo (ABAP)

La velocidad de descomposición de ABAP es determinada principalmente por la temperatura, y en menor medida por el solvente y el pH. A 37 °C en agua, la vida media de ABAP es alrededor de 175 h, y la velocidad de generación de radicales es virtualmente constante por las primeras horas [36]. La velocidad de generación de radicales libres, R_i , para ABAP a 37 °C está dada en la ecuación (4*),

$$R_i = 1.36 \times 10^{-6} [\text{ABAP}] \quad \text{M/s} \quad (4^*)$$

donde la concentración de ABAP está dada en M. La velocidad de generación de radicales es directamente proporcional a la concentración de ABAP. La cantidad total de radicales formados a 37 °C es calculada por la ecuación (5*),

$$\text{Cantidad total de radicales formados} = 1.36 \times 10^{-6} [\text{ABAP}] \times t \quad (5^*)$$

donde t está en segundos y la concentración de ABAP en M.[36]

En este trabajo utilizamos 10 y 100 mM de ABAP por 1 hora, lo que equivale a una cantidad de radicales peroxilo formados de 49 μM y 490 μM respectivamente.

En el análisis por HPLC de la proteína oxidada con radical peroxilo (Figura 20) se observó la formación de electrófilos, y dicha formación tiene una respuesta dosis dependiente.

Parte de los productos electrófilos detectados en esta reacción pueden corresponder a derivados de la tirosina formados en dos etapas, un primer paso donde el radical peroxilo extrae un electrón de la cadena lateral de la tirosina formando radical tirosilo (y peroxilo no radical), y un segundo paso donde el radical Tyr^\bullet reacciona con el ROO^\bullet en el cual se pueden formar los productos de adición en la posición 3 del anillo de la cadena lateral similar a LPOCHDA. Este último posee un carbonilo α,β -insaturado que lo convierten en electrófilo (Figura 3).

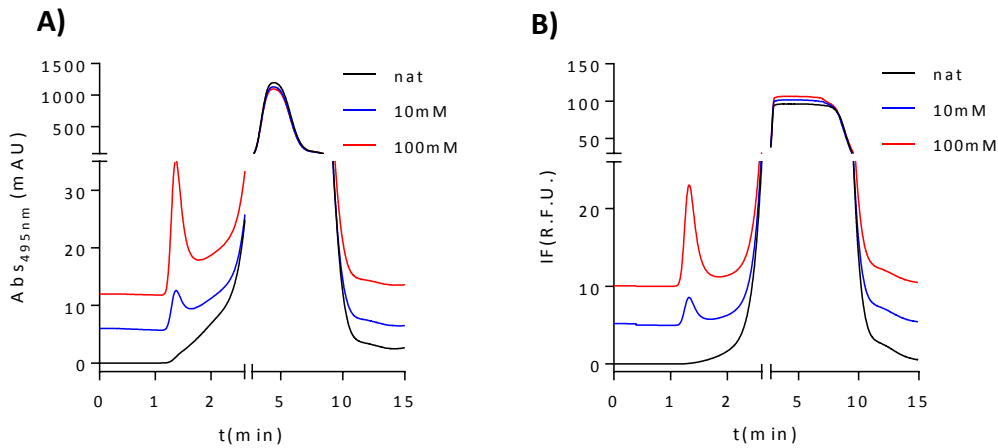


Figura 20. Análisis de producto de reacción entre RNasa A oxidada con radical peroxilo y F-GSH por HPLC. Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 495\text{nm}$ (A) e intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ (B) de los productos de reacción.

4.4.4 Oxidación con radical hidroxilo (MCO)

A diferencia de los otros resultados en este caso (Figura 21) se observa un “hombro” de fluorescencia (y absorbancia a 495) entre el pico de la proteína y el de la sonda libre, en esta región es donde se observa el disulfuro de la sonda, $(\text{F-GS})_2$, la presencia de F-GSSG-F puede deberse a que la muestra no fue totalmente reducida por el tratamiento con DTT, pudiendo deberse a la presencia de Fe:EDTA que no haya sido removido con las filtraciones, y que esté oxidando DTT impidiendo que este reduzca al disulfuro de la sonda.

Aunque las concentraciones de DTT son mayores que las de Fe, este podría reciclarse por la presencia de EDTA y seguir reaccionando.

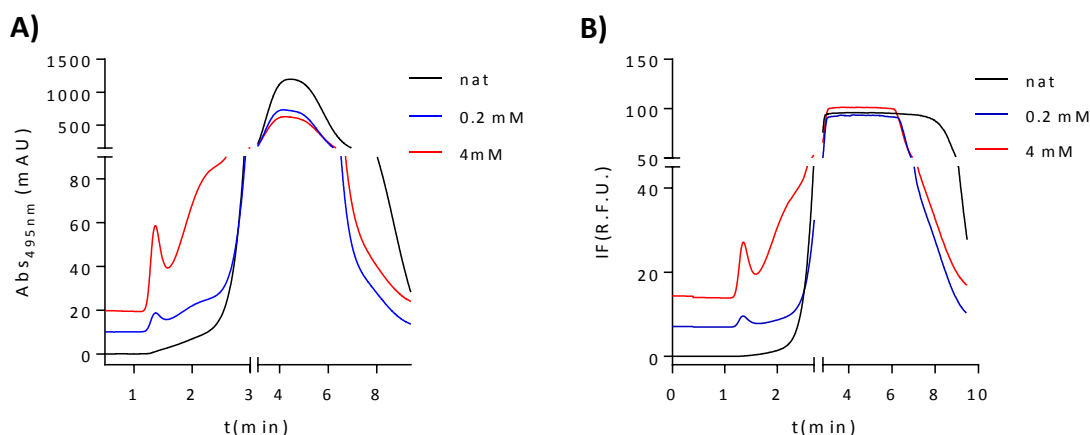


Figura 21. Análisis de producto de reacción entre RNasa A oxidada con radical hidroxilo y F-GSH por HPLC. Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 495\text{nm}$ (A) e intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ (B) de los productos de reacción.

Se utilizaron dos concentraciones distintas de Fe:EDTA y H_2O_2 , en ambos casos se observó formación de aductos. A concentraciones mayores de Fe:EDTA y H_2O_2 la formación aductos aumenta, indicando que este tipo de oxidación también lleva a la formación de electrófilos proteicos.

4.4.5 Oxidación con peroxinitrito

Se probaron dos condiciones, en una se oxidó con peroxinitrito solo y en la otra en presencia de CO_2 , el cual es relevante por encontrarse en altas concentraciones en sistemas biológicos.

Los cromatogramas mostraron formación de productos electrófilos al oxidar con peroxinitrito que aumenta cuando se le agrega carbonato al amortiguador (figura 22), esta variación en la formación de electrófilos se evidencia mejor en la figura 23.

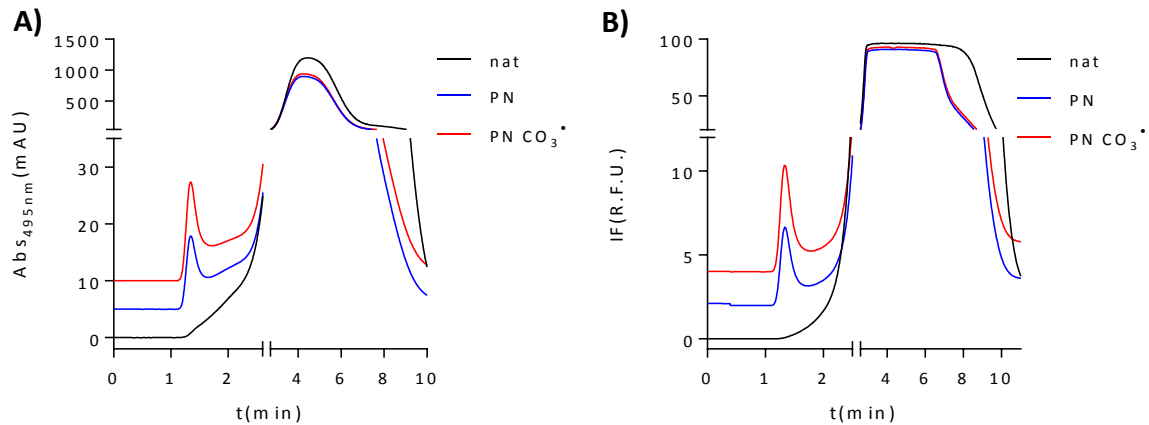


Figura 22. Análisis de producto de reacción entre RNasa A oxidada con peroxinitrito y F-GSH por HPLC. Cromatograma midiendo absorbancia a $\lambda = 495\text{nm}$ (A) e intensidad de fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ (B) de los productos de reacción.

Cuando se le agrega CO_2 al amortiguador este reacciona con el peroxinitrito para formar nitrosoperoxicarbonato, a su vez este rápidamente que se homoliza produciendo radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$).

El $\text{CO}_3^{\bullet-}$ es más selectivo como agente oxidante de la tirosina que el radical $\bullet\text{OH}$ (producido por homólisis de ONOOH) por lo que se esperaría que el rendimiento de los radical tirosilo sea mayor en presencia de CO_2 . Lo que podría explicar el aumento en la formación de derivados electrófilos de la tirosina.

4.4.6. Formación de electrófilos por los diferentes sistemas

Los productos electrófilos generados por los distintos sistemas se cuantificaron mediante un estándar de proteína marcada covalentemente con nhs-fluoresceína. De esta forma podemos comparar los productos marcados de las distintas reacciones (figura 23).

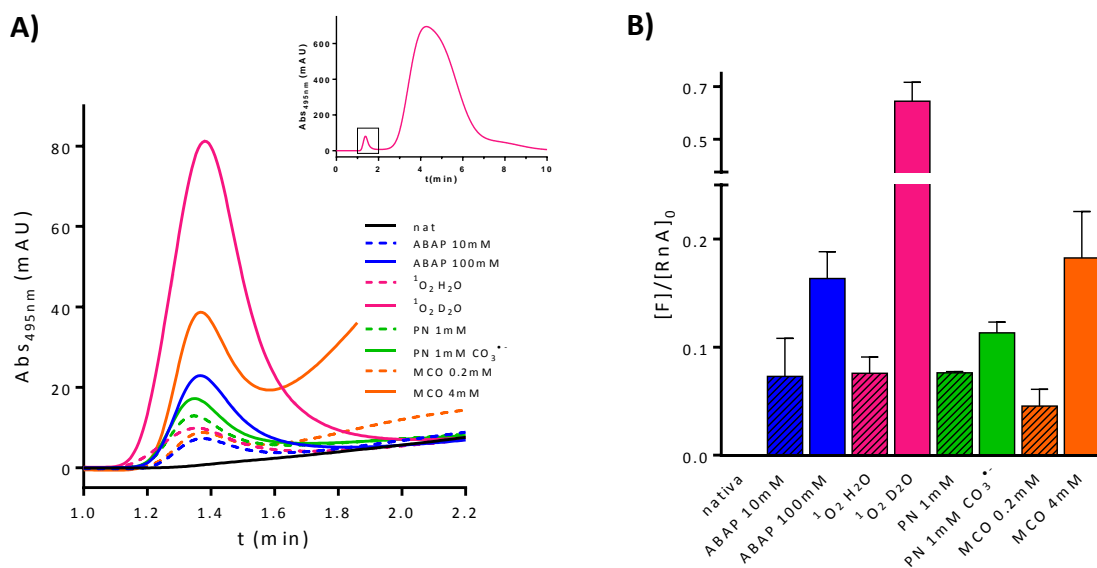


Figura 23. Cuantificación de la formación de aductos entre RNasa A oxidada y F-GSH utilizando cromatografía de exclusión molecular con detección a 495nm. Cromatograma a 450nm donde se evidencia el pico correspondiente a la RNasa A oxidada por las distintas especies reactivas marcada con F-GSH (A). Cuantificación de productos electrófilos en RNasa oxidada (B). Referencias: proteína oxidada por: radical peroxilo (azul), oxígeno singlete (rosado), peroxinitrito (verde) y radical hidroxilo (anaranjado).

Los resultados obtenidos tras las distintas oxidaciones de la Rnasa muestran que todos los sistemas oxidantes evaluados formaron productos electrófilos capaces de formar aductos con la sonda F-GSH.

Se intentó determinar el sitio de unión de la sonda con proteínas mediante estudios de espectrometría de masa, pero no se pudo reconocer ninguno de los péptidos modificados.

5. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Mediante la unión covalente con F-GSH se logró detectar la formación de un centro con carácter electrofílico en el dipéptido oxidado GHOCHDA. El aducto formado fue confirmado mediante HPLC y espectrometría de masa. La formación de electrófilos también se pudo observar en la proteína ribonucleasa A oxidada, siguiendo la formación de aductos con la sonda fluorescente mediante HPLC y electroforesis. El pretratamiento de los aductos con DTT permite descartar la formación de disulfuros mixtos con la proteína que generen falsos positivos. A su vez, la ausencia de reacción con la proteína nativa indica que la oxidación es necesaria para la formación de grupos electrófilos en la proteína. Resultó interesante encontrar que todos los sistemas oxidantes ensayados resultaron en la formación de electrófilos en la proteína.

Hace tiempo que se conoce la generación de productos electrófilos por oxidación de lípidos, y este ha sido un campo importante de investigación que incluye desde 4-hidroxinonenal (HNE) [37] a los más recientemente explorados nitrolípidos. [38, 39] Se ha constatado que estos derivados lipídicos tienen varios efectos sobre células, incluyendo la activación de la respuesta antioxidante [39].

En contraste, la formación de electrófilos en proteínas no está tan estudiada. El electrófilo más común en proteínas es probablemente el ácido sulfénico, que se forma de la reacción del tiol del residuo de cisteína con peróxidos [40]. Este sulfénico reacciona muy rápidamente con otro tiol para formar un enlace disulfuro, y este mecanismo es utilizado para la detoxificación de peróxido de hidrógeno por las peroxirredoxinas [41]. Si bien en algunas condiciones se ha reportado la formación de una sulfenamida, esta reacción parece ser excepcional, indicando una selectividad clara hacia otros tioles [42].

Otros electrófilos han sido reportados en algunas proteínas como el grupo piruvoilo de la enzima S-adenosil-L-metionina descarboxilasa (AMD1) y un grupo glioxilo en la Secernina 3 [43]. En la AMD1, el grupo piruvoilo se forma por autólisis de la proteína precursora inactiva, y es esencial para su actividad) [43].

La oxidación por radicales libres y especies reactivas también puede llevar a la formación de electrófilos en proteínas, en particular el radical hidroxilo y el oxígeno singulete.

Los radicales hidroxilo son muy oxidantes y se ha reportado la formación de aldehídos reactivos a partir de lisina, arginina, prolina y de la cadena peptídica. Si bien estos aldehídos son electrófilos, se comportan como electrófilos duros, que preferencialmente reaccionan con nucleófilos fuertes, como las aminas[2]. Estas modificaciones serían importantes para la agregación proteica, pero no se espera que

sean reactivas frente a nucleófilos blandos como los tioles usados en este trabajo. Un candidato posible a generar electrófilos pasibles de reaccionar con tioles es la histidina. Hay varios trabajos que señalan la formación de 2-oxo-histidina como producto de la oxidación por H_2O_2 catalizada por metales [44-46]. También podría ser HOCHDA generado en baja proporción a partir de la oxidación de tirosina [27].

La generación de electrófilos blandos a partir de residuos proteicos ha sido bien descrita para las oxidaciones por 1O_2 , en particular a partir de Tyr, His y Trp [9], así que lo que se observa para ribonucleasa bien puede corresponder a productos de oxidación de Tyr o His (no tiene Trp), aunque no pudimos confirmarlo por espectrometría de masa. La formación de electrófilos por los otros oxidantes no es tan clara.

Al peroxinitrito por ejemplo se lo conoce principalmente como un agente nitrante, formando nitro-tirosina como uno de sus productos característicos [23]. Otros productos menores han sido descritos [18] y buen candidato para ser electrófilo es la 2-oxo-histidina [47]. También cabe la posibilidad de que el radical hidroxilo que se forma a partir de la homólisis del ácido peroxinitroso forme cierta cantidad de HOCHDA [27].

Los radicales peroxilo se han reportado que provocan especialmente oxidación de residuos de metionina y formación de radicales en tirosina y triptófanos, con formación subsecuente de productos de terminación como ditirosina [48-50]. En este caso existe la posibilidad de que se formen productos tipo LPOCHDA derivados de la tirosina [25] que tengan reactividad similar a la de HOCHDA.

Nos parece que estos hallazgos abren oportunidades interesantes para seguir trabajando, en especial porque hay muy poco trabajo hecho en este campo, que podría ser de alta relevancia en la generación de agregados proteicos, especialmente como los observados en enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento.

A corto y mediano plazo nos interesaría identificar cuáles son los residuos modificados y los productos electrófilos generados por estas oxidaciones. Además, dado que la reacción de los derivados tipo HOCHDA con tioles es lenta, reversible y no parece estar muy favorecida, nos gustaría encontrar otro nucleófilo que reaccionara más rápidamente y cuyo equilibrio se encontrara desplazado hacia los productos. Esto permitiría realizar un estudio más cuantitativo de los electrófilos formados en proteínas. A su vez, nos parece que los derivados de la histidina son candidatos interesantes para formar buenos electrófilos que ameritan una investigación más exhaustiva. Sería interesante entonces caracterizar los productos de oxidación de la histidina y su reactividad frente a nucleófilos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sies, H., *Biochemistry of oxidative stress*. Angewandte Chemie International Edition, 1986. **25**(12): p. 1058-1071.
2. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Protein oxidation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **899**(1): p. 191-208.
3. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 2015: Oxford University Press, USA.
4. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, [1] *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview*. Methods in enzymology, 1990. **186**: p. 1-85.
5. Krumova, K. and G. Cosa, *Overview of Reactive Oxygen Species*. 2016.
6. Gracanin, M., et al., *Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products*. Free radical biology and medicine, 2009. **47**(1): p. 92-102.
7. Davies, M.J., *Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(1): p. 17-25.
8. Wright, A., et al., *Singlet Oxygen-mediated Protein Oxidation: Evidence for the Formation of Reactive Side Chain Peroxides on Tyrosine Residues*. Photochemistry and photobiology, 2002. **76**(1): p. 35-46.
9. Davies, M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochemical and biophysical research communications, 2003. **305**(3): p. 761-770.
10. Valko, M., et al., *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Molecular and cellular biochemistry, 2004. **266**(1-2): p. 37-56.
11. Möller, M.N., J.R. Lancaster, and A. Denicola, *The interaction of reactive oxygen and nitrogen species with membranes*. Current Topics in Membranes, 2008. **61**: p. 23-42.
12. Winterbourn, C.C., *Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction*. Toxicology letters, 1995. **82**: p. 969-974.
13. Ferrer-Sueta, G. and R. Radi, *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals*. ACS chemical biology, 2009. **4**(3): p. 161-177.
14. Kalyanaraman, B., *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms*. Redox biology, 2013. **1**(1): p. 244-257.
15. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiological reviews, 2007. **87**(1): p. 315-424.
16. Denicola, A., et al., *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **333**(1): p. 49-58.
17. Bonini, M.G., et al., *Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(16): p. 10802-10806.
18. Alvarez, B. and R. Radi, *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino acids, 2003. **25**(3): p. 295-311.
19. Radi, R., et al., *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. **30**(5): p. 463-488.
20. Davies, M.J., *Protein oxidation and peroxidation*. Biochemical Journal, 2016. **473**(7): p. 805-825.
21. Reeg, S. and T. Grune, *Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression?* Antioxidants & redox signaling, 2015. **23**(3): p. 239-255.
22. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(33): p. 20313-20316.

23. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. Accounts of chemical research, 2012. **46**(2): p. 550-559.
24. Ischiropoulos, H., *Protein tyrosine nitration—an update*. Archives of biochemistry and biophysics, 2009. **484**(2): p. 117-121.
25. Shchepin, R., et al., *Tyrosine– Lipid Peroxide Adducts from Radical Termination: Para Coupling and Intramolecular Diels– Alder Cyclization*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(49): p. 17490-17500.
26. Jin, F., J. Leitich, and C. von Sonntag, *The superoxide radical reacts with tyrosine-derived phenoxyl radicals by addition rather than by electron transfer*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1993(9): p. 1583-1588.
27. Möller, M.a.N., et al., *Superoxide reaction with tyrosyl radicals generates para-hydroperoxy and para-hydroxy derivatives of tyrosine*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(40): p. 16773-16780.
28. Das, A.B., et al., *Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition*. Free Radical Biology and Medicine, 2014. **70**: p. 86-95.
29. Das, A.B., et al., *Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical*. Free Radical Biology and Medicine, 2010. **48**(11): p. 1540-1547.
30. Michalski, R., et al., *Real-time measurements of amino acid and protein hydroperoxides using coumarin boronic acid*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(32): p. 22536-22553.
31. Lancaster, J.R., *Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions*. Chemical research in toxicology, 2006. **19**(9): p. 1160-1174.
32. Nagy, P., et al., *Conjugation of glutathione to oxidized tyrosine residues in peptides and proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(31): p. 26068-26076.
33. Hughes, M. and H. Nicklin, *The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*. Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical, 1968: p. 450-452.
34. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nature protocols, 2006. **1**(6): p. 2856-2860.
35. Acosta, S., *Desarrollo de método para detección de productos electrofílicos de la oxidación de tirosina*. 2005, Universidad de la Republica.
36. Niki, E., [3] *Free radical initiators as source of water-or lipid-soluble peroxy radicals*. Methods in enzymology, 1990. **186**: p. 100-108.
37. Uchida, K. and E. Stadtman, *Selective cleavage of thioether linkage in proteins modified with 4-hydroxynonenal*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(12): p. 5611-5615.
38. Turell, L., et al., *The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(4): p. 1145-1159.
39. Schopfer, F.J., P.R. Baker, and B.A. Freeman, *NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?* Trends in biochemical sciences, 2003. **28**(12): p. 646-654.
40. Turell, L., et al., *Sulfenic acid—a key intermediate in albumin thiol oxidation*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(28): p. 3384-3392.
41. Manta, B., et al., *The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2*. Archives of biochemistry and biophysics, 2009. **484**(2): p. 146-154.
42. Turell, L., et al., *Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment*. Brazilian journal of medical and biological research, 2009. **42**(4): p. 305-311.

43. Matthews, M.L., et al., *Chemoproteomic profiling and discovery of protein electrophiles in human cells*. *Nature chemistry*, 2017. **9**(3): p. 234-243.
44. Gunther, M.R., J.A. Peters, and M.K. Sivaneri, *Histidiny radical formation in the self-peroxidation reaction of bovine copper-zinc superoxide dismutase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(11): p. 9160-9166.
45. Uchida, K. and S. Kawakishi, *Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu, Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(4): p. 2405-2410.
46. Traoré, D.A., et al., *Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein*. *Nature chemical biology*, 2009. **5**(1): p. 53-59.
47. Uchida, K., *Histidine and lysine as targets of oxidative modification*. *Amino acids*, 2003. **25**(3): p. 249-257.
48. Bartesaghi, S., et al., *Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2017. **622**: p. 9-25.
49. Leinisch, F., et al., *Peroxyl radical-and photo-oxidation of glucose 6-phosphate dehydrogenase generates cross-links and functional changes via oxidation of tyrosine and tryptophan residues*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017. **112**: p. 240-252.
50. Carroll, L., et al., *Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017. **113**: p. 132-142.