

Tesis de Doctorado en Química
Facultad de Química-PEDECIBA Química

**NITRACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.
ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES EN ESPECIES
NITRADAS DE CITOCROMO C Y SUPERÓXIDO DISMUTASA DE
MANGANESO.**

Verónica Demicheli Dege

Orientador: Dr. Rafael Radi

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Centro de Investigaciones Biomédicas

Universidad de la República

Montevideo, 2012



A mis padres Ana y Walter, a mis hermanas Mariana y
Victoria, a mi abuela Olga y a mi esposo Gustavo.

Por todo

Indice

RESUMEN.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 MITOCONDRIA: FUNCIÓN Y ROL COMO GENERADOR DE RADICAL SUPERÓXIDO	9
1.1.1 SUPERÓXIDO	9
1.2 ÓXIDO NÍTRICO.....	11
1.3 MITOCONDRIA COMO FUENTE DE PEROXINITRITO Y ESPECIES NITRANTES.....	12
1.3.1 PEROXINITRITO.....	12
1.4 NITRACIÓN DE TIROSINA COMO MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL	13
1.4.1 NITRACIÓN PROTEICA Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	15
1.4.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE NITRACIÓN PROTEICA.....	16
1.5 ENFOQUE EN DOS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES: CITOCROMO C Y MNSOD	16
1.6 CITOCROMO C	18
1.6.1 ACTIVIDAD PEROXIDASA DE CITOCROMO C Y CONFORMACIONES ALTERNATIVAS	19
1.6.2 TRANSICIÓN ALCALINA DE CITOCROMO C	20
1.6.3 NITRACIÓN DE CITOCROMO C POR PEROXINITRITO	21
1.6.4 OTRAS MODIFICACIONES RELEVANTES DE CITOCROMO C.....	21
1.6.5 CARDIOLIPINA.....	22
1.6.6 INTERACCIÓN CITOCROMO C CON CARDIOLIPINA Y OTROS LÍPIDOS.....	24
1.6.7 PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS: ROL DEL CITOCROMO C	24
1.6.8 ASPECTOS INMUNOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS DEL CITOCROMO C	26
1.7 SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	27
1.8 SUPERÓXIDO DISMUTASA DE COBRE Y CINC (CuZNSOD)	28
1.9 SUPERÓXIDO DISMUTASA DE MANGANESO (MNSOD)	30
1.9.1 NITRACIÓN DE MNSOD	33
1.9.2 CONTROVERSA FRENTE A LA CONSTANTE DE REACCIÓN DE MNSOD Y PEROXINITRITO.....	34
1.9.3 POLIMORFISMOS DE MNSOD ASOCIADOS A CÁNCER Y REACTIVIDAD AUMENTADA DE TIOLES	34
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36

2.1	MATERIALES	36
2.2	MÉTODOS	36
2.2.1	SÍNTESIS DE PEROXINITRITO	36
2.2.2	PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C NATIVO	36
2.2.3	EXPRESIÓN DE CITOCROMO C RECOMBINANTE NATIVO Y MUTADO EN TIROSINAS	37
2.2.4	SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C MONONITRADO EN TIROSINA 97 Y 74 ..	37
2.2.5	SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C CARBOXIMETILADO	38
2.2.6	PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMELARES	38
2.2.7	EXPRESIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA DE MANGANESO	38
2.2.8	MNSOD MUTADA SITIO ESPECÍFICAMENTE.....	39
2.2.9	EXPRESIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA DE COBRE Y CINC	39
2.2.10	MEDIDA DE CONCENTRACIÓN PROTEICA	40
2.2.11	GENERACIÓN DE FLUJOS (J) DE SUPERÓXIDO:	40
2.2.12	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FLUJOS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	40
2.2.13	EXPOSICIÓN DE CITOCROMO C A PEROXINITRITO EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS UNILAMELARES CONTENIENDO CARDIOLIPINA.....	41
2.2.14	EXPOSICIÓN DE MNSOD Y CUZNSOD A FLUJOS DE ÓXIDO NÍTRICO	41
2.2.15	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	42
2.2.15.1	Actividad peroxidasa de citocromo c.....	42
2.2.15.2	Detección de actividad SOD por método de reducción de citocromo c	42
2.2.15.3	Geles de actividad SOD.....	42
2.2.15.4	Cinética de reacción de MnSOD con peroxinitrito	43
2.2.15.5	Determinación de la variación en la formación de oxígeno por peroxinitrito en presencia de MnSOD.....	43
2.2.16	MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS.....	43
2.2.16.1	Detección de 3-nitrotirosina proteica en citocromo c y MnSOD.....	43
2.2.16.2	Detección de radicales libres proteicos en SOD	44
2.2.16.3	Detección de formas modificadas de citocromo c	44
2.2.17	CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DE MODIFICACIONES NITRO- OXIDATIVAS DE PROTEÍNAS.....	45
2.2.17.1	Análisis de modificaciones en citocromo c por espectrometría de masa (MALDI-TOF).....	45
2.2.17.2	Cuantificación de la formación de 3-nitrotirosina en citocromo c.....	46
2.2.17.3	Detección de alquilación y confirmación de mutaciones en MnSOD por espectrometría de masa (Electro Spray).....	47
2.2.18	RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR).....	47

2.2.18.1	Detección de radicales libres por EPR directo de citocromo c expuesto a peroxinitrito	47
2.2.18.2	Detección de radicales libres por EPR utilizando atrapadores de spin en citocromo c expuesto a peroxinitrito.....	47
2.2.18.3	Detección de radicales libres de citocromo c expuesto a peróxido de hidrógeno por EPR de baja temperatura.....	48
2.2.19	FLUORESCENCIA DE TRIPTÓFANO Y TIROSINA DE CITOCROMO C	48
2.2.20	ANÁLISIS ESTRUCTURAL	49
2.2.20.1	Geles nativos para identificación de estructura cuaternaria en MnSOD mutada	49
2.2.21	NMR PARAMAGNÉTICO Y DIAMAGNÉTICO DE CITOCROMO C EXPUESTO A CARDIOLIPINA.....	49
2.2.21.1	NMR Paramagnético	49
2.2.21.2	NMR Diamagnético.....	49
2.2.22	MÉTODOS <i>IN SILICO</i>	50
2.2.22.1	Simulaciones de Dinámica molecular y cálculos de energía libre	50
2.2.22.2	Simulaciones en GEPASI	50
2.2.22.3	Representación grafica de proteínas	50
3	<u>OBJETIVOS.....</u>	51
4	<u>RESULTADOS.....</u>	53
4.1	NITRACIÓN DE CITOCROMO C EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA.....	53
4.1.1	DETECCIÓN DEL AUMENTO DE NITRACIÓN DE CITOCROMO C EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA POR PEROXINITRITO.....	53
4.1.2	AUMENTO DE LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES PROTEICOS EN CITOCROMO C EXPUESTO A PEROXINITRITO EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA	55
4.1.3	IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES NITRADAS	58
4.1.4	IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DE LAS TIROSINAS NITRADAS DE CITOCROMO C POR PEROXINITRITO ESTUDIANDO EL EFECTO DE LA PRESENCIA DE CARDIOLIPINA.....	59
4.1.5	CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE 3-NITROTIROSINA POR ESPECTROMETRÍA DE MASA	62
4.1.6	EVALUACIÓN DE MODIFICACIONES EN EL TRP 59 POR FLUORESCENCIA.....	64
4.2	FORMACIÓN DE ESPECIES NITRANTES POR FLUJOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y SUPERÓXIDO EN PRESENCIA DE SOD Y EFECTO DE LAS MISMAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	66

4.2.1	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y NITRACIÓN DE CUZNSOD Y MNSOD EXPUESTAS A FLUJOS SIMULTÁNEOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y SUPERÓXIDO	66
4.2.2	DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE REACCIÓN DE MNSOD CON PEROXINITRITO 77	
4.2.3	ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE OXÍGENO POR PEROXINITRITO EN PRESENCIA DE MNSOD.....	79
4.3	CARACTERIZACIÓN POR NMR DE LA INTERACCIÓN DE CITOCROMO C Y CARDIOLIPINA 82	
4.3.1	ESTUDIOS DE NMR PARAMAGNÉTICO DE CITOCROMO EXPUESTO A CARDIOLIPINA..	82
4.3.2	NMR DIAMAGNÉTICO	86
4.4	ESTUDIO DE LA TOPOGRAFÍA DE LAS TIROSINAS DE CITOCROMO C DURANTE SU INTERACCIÓN CON CARDIOLIPINA	91
4.4.1	ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA DE LA INFLUENCIA DE CADA RESIDUO DE TIROSINA EN LA INTERACCIÓN CON CARDIOLIPINA.....	92
4.4.2	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA DE LOS DIFERENTES MUTANTES EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA.....	94
4.4.3	CAMBIOS DEPENDIENTES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA FLUORESCENCIA DE TIROSINAS Y TRIPTÓFANO, LA FORMACIÓN DE RADICALES PROTEICOS Y LA FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS EN CITOCROMO C EXPUESTO A CARDIOLIPINA.....	95
4.5	SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CITOCROMO C CARBOXIMETILADO Y SU INTERACCIÓN CON CARDIOLIPINA.....	98
4.6	SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C MONONITRADO PARA LA GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN FORMAS ALTERNATIVAS DE CITOCROMO C.....	103
4.7	ESTUDIOS COMPUTACIONALES DE LA INACTIVACIÓN DE MNSOD MEDIADA POR LA NITRACIÓN DE TIROSINA 34	107
4.8	MODIFICACIONES POR MUTACIONES PUNTUALES EN LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE MNSOD Y SENSIBILIDAD DE TIOLES.....	110
4.8.1	ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE TIOLES DE MNSOD NATIVA Y MUTADA A NIVEL DE ILE58TRE Y LEU60PHE.....	111
4.8.2	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS VARIANTES I58T Y L60F DE MNSOD	112
5	<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</u>	115
6	<u>PERSPECTIVAS.....</u>	122

7	<u>PUBLICACIONES.....</u>	<u>124</u>
8	<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>125</u>
9	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>127</u>

Resumen

La mitocondria es un el sitio principal de generación de superóxido y otras especies reactivas y es uno de los principales sitios de formación de 3-nitrotirosina proteica tanto en condiciones basales como patológicas. En este trabajo se estudiaron dos proteínas mitocondriales, el citocromo c y la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y de cobre y cinc (CuZnSOD), estudiando tanto la nitración de estas proteínas como cambios estructurales en condiciones similares a las encontradas *in vivo*. En el caso del citocromo c se estudió la nitración de tirosinas proteicas evaluando la presencia de un lípido mitocondrial, la cardiolipina. En los experimentos realizados se observó por diversas técnicas que en presencia de este lípido la nitración de citocromo c expuesto a peroxinitrito se encuentra aumentada, siendo este aumento mediado por un cambio conformacional mediado por la cardiolipina. A nivel estructural, se observaron los cambios sufridos por citocromo c en presencia de cardiolipina por técnicas de NMR para y diamagnético. Estos experimentos, si bien no fueron concluyentes mostraron que la proteína sufre un cambio conformacional global. Estudios de la reactividad de cada tirosina de citocromo c utilizando mutantes mostró que, en presencia de cardiolipina, tirosinas que no son preferencialmente nitradas o modificadas en ausencia de este lípido están involucradas en procesos oxidativos tales como la actividad peroxidasa de citocromo c mediada por cardiolipina. Esta actividad peroxidasa se estudió también utilizando un derivado carboximetilado en metionina de citocromo c que, a diferencia del citocromo c sin modificar permite la detección de un Compuesto I de peroxidasa. El agregado de cardiolipina a citocromo c carboximetilado expuesto a peróxido de hidrógeno aumenta la formación de compuesto I de citocromo c, y por lo tanto su actividad peroxidasa. Para profundizar el estudio de los cambios estructurales sufridos por citocromo c frente a diferentes oxidantes se sintetizó y purificó citocromo c mononitrado a nivel de Tyr 97 y 74, para generar anticuerpos monoclonales contra formas conformacionalmente modificadas de esta proteína que permitan la detección de las mismas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*

En el caso de las superóxido dismutasas (SOD) se estudiaron las modificaciones sufridas en presencia de flujos de óxido nítrico y superóxido evaluando la capacidad de esta enzima de competir con el óxido nítrico por su sustrato, observándose que en presencia de estos flujos se forma peroxinitrito en concentraciones capaces de inactivar a la enzima y en el caso de MnSOD capaz de nitrarla. Por otra parte se re-estudió la reacción de MnSOD con peroxinitrito determinando un nuevo valor para la constante de reacción de $1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ por tetrámero. A nivel estructural se estudió el efecto de la nitración en la accesibilidad del sustrato al sitio activo utilizando métodos *in silico* donde se determinó que la nitración de Tyr 34, responsable de la inactivación de MnSOD por peroxinitrito genera un aumento en la barrera de energía libre para el acceso del superóxido al sitio activo, lo cual impide el acceso al sustrato, tanto por repulsión estérica como electrostática. También a nivel estructural, se determinó el efecto de mutaciones puntuales de MnSOD en la estructura cuaternaria de la enzima, evaluando, a su vez, el efecto de estas mutaciones en la sensibilidad de sus tioles.

1 Introducción

1.1 Mitocondria: Función y rol como generador de radical superóxido

Las mitocondrias son organelos intracelulares que, debido a su habilidad para acoplar la energía liberada del transporte de electrones a la síntesis de ATP, constituyen el principal sitio de control bioenergético en células eucariotas [1].

La fosforilación oxidativa, proceso en el cual electrones son transportados a través de una serie de moléculas carrier (Compuestos I a IV), es el responsable de la generación de la mayor parte de la energía de las células animales. Estos electrones son generados a partir de NADH y FADH₂ (nicotinamida adenina di-nucleótido reducido y flavina adenina di-nucleótido), producidos por la oxidación de nutrientes, y son transferidos, en última instancia al oxígeno molecular [1, 2].

El pasaje de electrones a través de los cuatro complejos que forman la cadena respiratoria genera un gradiente de protones que es utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato [1].

Los complejos de la cadena respiratoria previamente mencionados son: complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato: ubiquinona reductasa o succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo bc₁), citocromo c y complejo IV (citocromo oxidasa).

La mitocondria es además una de las fuentes más importantes de especies reactivas del oxígeno, principalmente por la generación de superóxido a nivel del complejo I y III de la cadena respiratoria [3-6].

1.1.1 Superóxido

El superóxido (O₂^{•-}) es un radical libre, que debido a sus potenciales de reducción y oxidación ($E^{\circ}O_2/O_2^{\cdot-} = -0.33 \text{ V}$ y $E^{\circ}O_2^{\cdot-}/H_2O_2 = 0.94 \text{ V}$) [8] puede actuar tanto como reductor u oxidante. El superóxido se genera por la reducción por un electrón del oxígeno molecular. Existen diferentes fuentes de superóxido tanto en condiciones fisiológicas a nivel tanto intra como extracelular generándose, en condiciones normales, un flujo de este radical de hasta aproximadamente 40 μM/min [9-13].

La principal fuente extracelular de superóxido, que además tiene un rol en la defensa contra microorganismos, es la NADPH oxidasa, enzima asociada a membranas de

granulocitos polimorfo nucleares y macrófagos, que se activa durante el estallido respiratorio que se produce al iniciarse la fagocitosis. El término estallido respiratorio se refiere a un marcado aumento del consumo de oxígeno por estas especies celulares, no asociado a la respiración mitocondrial [14].

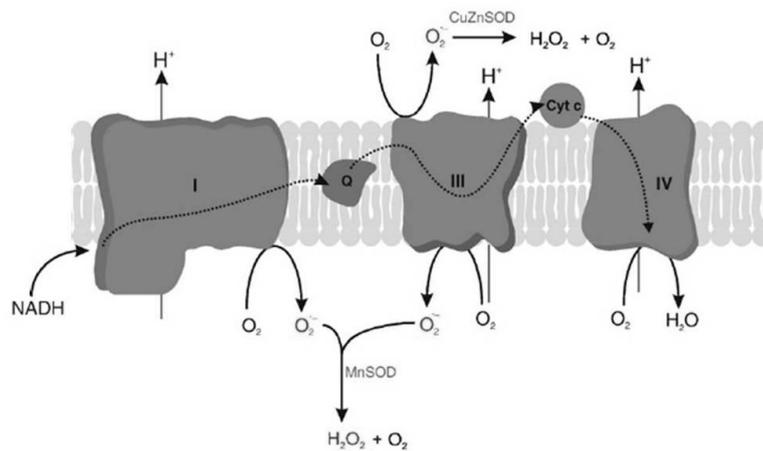


Fig. 1.1. Formación de superóxido a nivel mitocondrial y su detoxificación. Adaptado de Kowaltowski *et al* [7]

El superóxido juega, en este caso, un rol de mediador en la respuesta inmune mediada por células, a pesar del daño potencial que pueda producir en células y tejidos propios. Intracelularmente, el superóxido se produce en su mayor parte por la autooxidación o reducción parcial de componentes de los sistemas de transporte electrónico, principalmente a nivel mitocondrial, por el complejo NADH deshidrogenasa y el segmento ubiquinona-citocromo c. Esta reducción parcial constituye, de acuerdo a diferentes autores, en hasta un 1% del oxígeno total consumido en la mitocondria [10, 15].

El superóxido también puede ser generado enzimáticamente o por medio de compuestos autooxidables como flavinas, catecoles o nitrofuranos. Ejemplos de otras formas de generación enzimática son las enzimas xantina oxidasa y la aldehído deshidrogenasa, que contienen molibdeno, centros ferro sulfurados y flavinas, capaces de transferir electrones al oxígeno, produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno [16].

El radical superóxido presenta una vida media corta, (menor a 1 ms), debido, fundamentalmente, a la reacción de dismutación de ésta molécula a peróxido de hidrógeno catalizada por las diferentes isoformas de la superóxido dismutasa, con una

constante de velocidad de $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en contraste con la dismutación espontánea a pH fisiológico, que tiene una constante de velocidad de $\sim 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [17]. En mitocondrias se encuentra la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) a nivel de la matriz mitocondrial y la superóxido dismutasa de cobre y cinc (CuZnSOD) en el espacio intermembrana con concentraciones de 1-30 μM y 4-40 μM , respectivamente [18, 19].

Pese a su baja reactividad, este radical puede reaccionar con metales de transición (Fe, Cu), centros ferro sulfurados proteicos como los de la aconitasa [20] o con óxido nítrico con constantes en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente [21-24]. Incrementos en la producción de superóxido en condiciones patológicas tales como diabetes, enfermedades neurodegenerativas o inflamación direccionan la reactividad del superóxido hacia su reacción con óxido nítrico [25]

1.2 Óxido nítrico

El descubrimiento en 1987 del óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) como radical libre que actúa en la señalización celular, revolucionó el estudio de la bioquímica de radicales libres [26]. Esta molécula es sintetizada enzimáticamente por la óxido nítrico sintasa (NOS), a partir del aminoácido L-arginina produciendo óxido nítrico y L-citrulina. El óxido nítrico es generado en una amplia variedad de células, incluyendo macrófagos, células endoteliales, epiteliales y neuronas.

Esta molécula posee varias funciones dentro del organismo en su rol de molécula reguladora, como la inhibición de la agregación plaquetaria, vasodilatación y neurotransmisión [14].

El óxido nítrico es un radical libre bastante estable, con poca capacidad redox ($E^{\circ} \text{NO}_2^- / \text{NO} = +0,375 \text{ V}$ y $E^{\circ} \text{NO} / \text{NO}^- = +1,17 \text{ V}$) [27], que no reacciona con la mayoría de las biomoléculas. A pesar de esto, su vida media *in vivo* es relativamente corta (menor a 10 s), siendo las reacciones directas más rápidas la que se dan con metales de transición, como por ejemplo la reacción en mitocondria con el centro bi-nucleado de la citocromo c oxidasa ($\text{Cu}^+ \text{-Fe}^{2+}$), que modula el consumo de oxígeno y la formación de ATP y superóxido [28-30]. El óxido nítrico también es capaz de reaccionar con otras especies radicalares como por ejemplo radicales proteicos, lipídicos o específicamente con el superóxido a velocidades cercanas al límite de difusión [23]. Debido a esta última reacción, su sobreproducción posee efectos adversos debidos principalmente a la

formación otros óxidos de nitrógeno más reactivos derivados, como por ejemplo peroxinitrito.

1.3 Mitochondria como fuente de peroxinitrito y especies nitrantes

Debido a la presencia de óxido nítrico en la mitocondria, ya sea por formación *in situ* por la óxido nítrico sintasa mitocondrial [31] o difusión desde otros compartimientos [32], la formación de peroxinitrito en mitocondrias es un proceso cuya importancia se relaciona con disfunciones celulares y apoptosis. El peroxinitrito es responsable de modificaciones nitro-oxidativas de una gran cantidad de moléculas mitocondriales, tales como componentes de la cadena respiratoria, ATP sintasas, componentes intermembrana y de la matriz [33].

1.3.1 Peroxinitrito

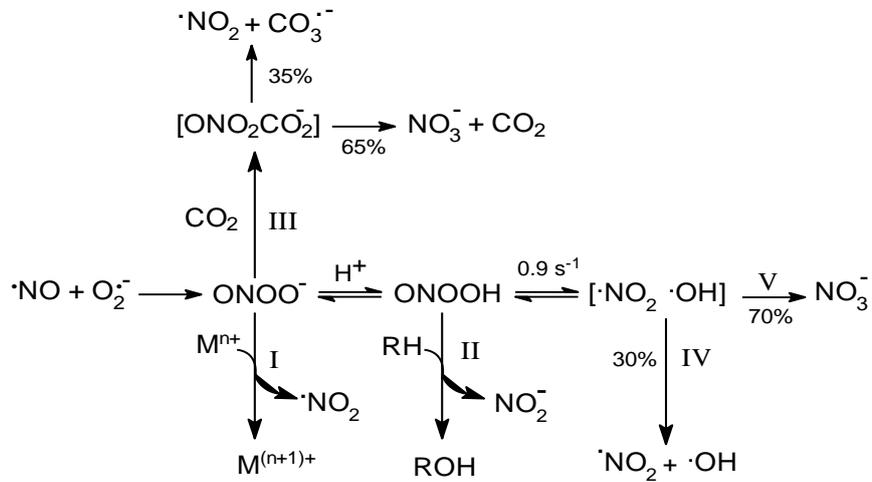
Como se ha mencionado anteriormente, la rápida reacción entre el óxido nítrico y el superóxido lleva a la formación de una nueva especie, no radicalar pero de gran poder oxidante. Esta reacción se da con una constante de velocidad de $0,6- 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [23, 34], cercana al límite de velocidad controlada por difusión.

El peroxinitrito (ONOO^-) es un ácido débil ($\text{pK}_a = 6.8$), relativamente estable a pH alcalino, pero a pH ácido o neutro se descompone por la homólisis de su ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH) a dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), con una constante de 0.9 s^{-1} a 37°C [35] y 0.3 s^{-1} a 25°C (pH 7.4) [36]. El rendimiento de esta reacción es de aproximadamente 30% [37].

Una de las reacciones más importantes del peroxinitrito es la que ocurre con el dióxido de carbono. Esta reacción ocurre a una velocidad alta ($5.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4; 37°C) [38], para dar un intermediario (nitroso-peroxocarbonato), quien luego se homoliza para dar los radicales dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), agente nitrante quien también es moderadamente oxidante y radical carbonato ($\text{CO}_3\cdot^-$), un fuerte oxidante por un electrón. El rendimiento de esta reacción es de aproximadamente un 35 % [37]. Las reacciones del peroxinitrito se resumen en el esquema 1.1.

El peroxinitrito es una especie que posee una vida media relativamente larga. Esto permite que pueda difundir a través de una célula hasta encontrar un blanco [39], lo que aumenta su toxicidad. Los blancos del peroxinitrito pueden ser proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. A su vez, el efecto nitrante y oxidante del peroxinitrito tiene como

consecuencia la inactivación de algunas enzimas, como por ejemplo la MnSOD [40, 41].



Esquema 1.1. Reacciones del peroxinitrito con diferentes blancos: (I): Oxidación por un electrón de centros conteniendo metales de transición (Fe, Mn, Cu). (II): Oxidaciones por dos electrones con un blanco (RH). (III): Formación de nitroso-peroxocarbonato en la reacción con dióxido de carbono. (IV): Homólisis del ácido conjugado del peroxinitrito (ácido peroxinitroso) a radicales. (V) Recombinación del peroxinitrito a nitrato. Tomado de Radi *et al* [37]

1.4 Nitración de tirosina como modificación post-traduccional

La nitración mediada por peroxinitrito y otras especies derivadas del óxido nítrico, es un proceso que puede afectar diversos blancos, entre los cuales los principales son proteínas y lípidos [41].

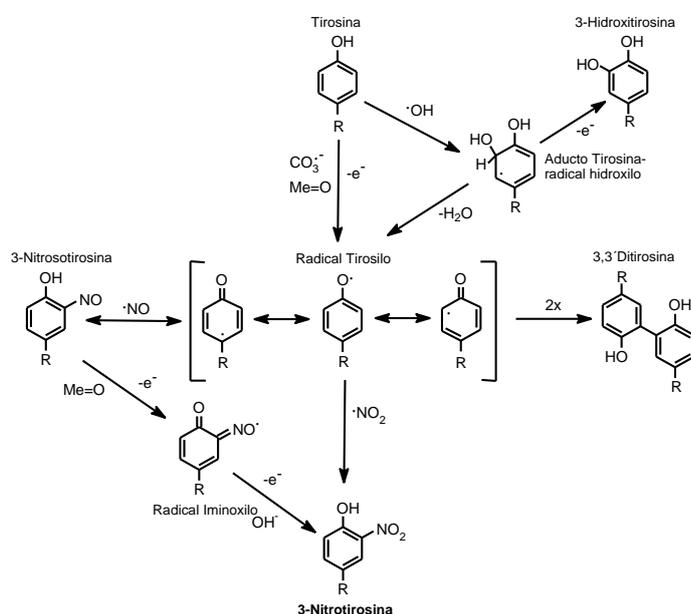
En particular, la nitración de residuos de tirosina se considera como uno de los principales marcadores biológicos de la acción del peroxinitrito y otros oxidantes derivados del óxido nítrico *in vivo* [42]. La nitración de tirosinas proteicas ocurre por diversos mecanismos (Esquema 1.2.) [25].

Tanto en la oxidación como en la nitración de tirosina participan especies radicalares derivadas del peroxinitrito [37, 41, 43] La tirosina puede reaccionar con radical carbonato, así como con complejos oxo-metales para dar el radical tirosilo el cual puede reaccionar rápidamente con $\cdot\text{NO}_2$ ($k = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para dar 3-nitrotirosina o recombinarse con otro radical tirosilo ($k = 2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C, pH 7,4) para dar 3,3'-ditirosina [25]. También a partir de radical hidroxilo puede formarse radical tirosilo,

si bien la principal reacción de este radical con la tirosina es la adición para formar dihidroxi tirosina [25].

Es de destacar que, en medios acuosos, la nitración por $\cdot\text{NO}_2$ en ausencia de otras especies oxidantes tales como metales no es un proceso muy eficiente si bien es posible ya que requiere primero la formación del radical tirosilo siendo el $\cdot\text{NO}_2$ un oxidante poco adecuado para llevar a cabo esta reacción debido a la baja velocidad de reacción de este radical con la tirosina ($k = 3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C , pH 7,4).

Otro mecanismo de nitración biológicamente relevante es a través de la ruta de las hemoperoxidasas en donde los complejos oxo-hierro oxidan la tirosina a radical tirosilo y el nitrito a $\cdot\text{NO}_2$ el cual se recombina con el radical tirosilo para dar 3-nitrotirosina.



Esquema 1.2. Mecanismos radicalares de la nitración de tirosinas proteicas. Tomado de Radi *et al* [25]

Si bien la mayor parte de los estudios sobre nitración de biomoléculas han sido principalmente realizados para proteínas solubles, los procesos de nitración tienen lugar también a nivel de membranas, tanto en lípidos [44] como en proteínas. A nivel de lípidos, es interesante destacar que el $\cdot\text{NO}$ y el $\cdot\text{NO}_2$ por su carácter hidrofóbico pueden concentrarse en las membranas [45, 46] lo que facilitaría reacciones de nitración, sobre todo con radicales lipídicos, formados por ejemplo, en el proceso de lipoperoxidación [47]. En este medio, esta reacción, que en medios acuosos no sería relevante, sería de gran importancia en membranas y otros sitios, particularmente dentro del marco de estudio de interacciones de proteínas con lípidos oxidables.

1.4.1 Nitración proteica y su influencia en la actividad enzimática de proteínas mitocondriales

La nitración de tirosinas proteicas tiene importantes consecuencias a nivel biológico, ya que puede alterar de forma irreversible la estructura o función de la proteína. Dichas alteraciones pueden ser la pérdida de función, tal como ocurre con la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) [40] o una ganancia de función como es el caso del citocromo c, una esta proteína adquiere actividad peroxidasa [48]. En otros casos, tal como sucede con la enzima aconitasa, la nitración de tirosinas no ocasiona, *per se*, un cambio en su actividad. (Fig. 1.2.)

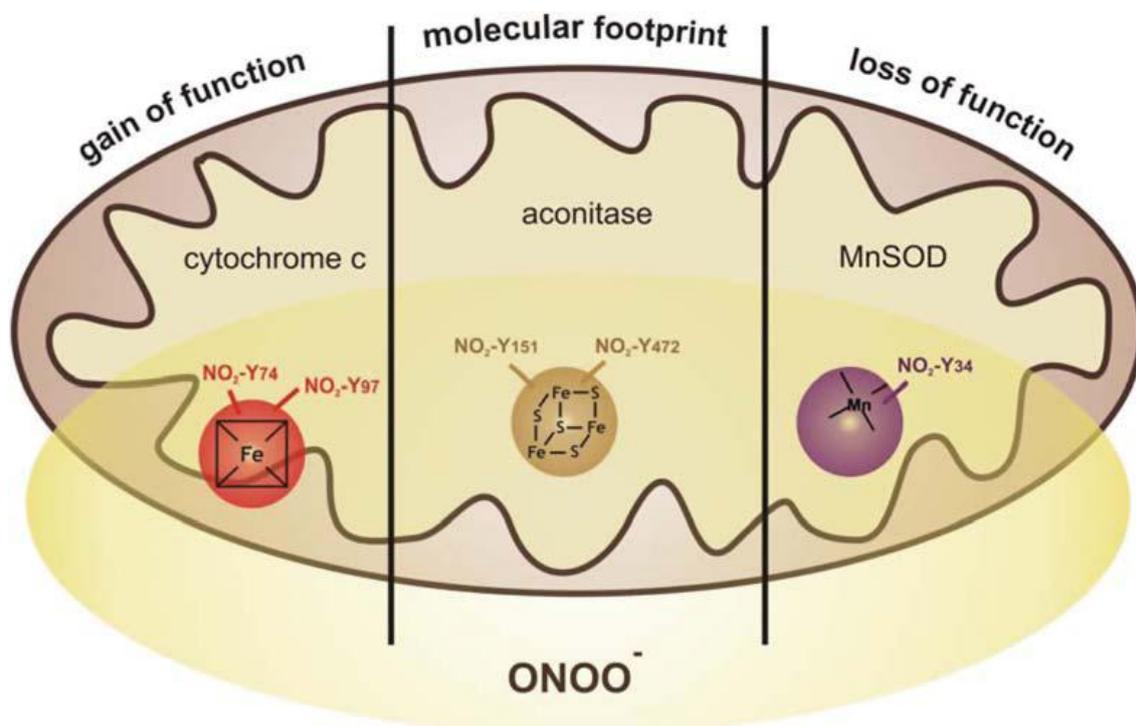


Fig. 1.2. Consecuencias biológicas de la nitración de tirosinas dependiente de peroxinitrito. Izquierda: Nitración específica de tirosinas externas de citocromo c (particularmente Tyr 74) dispara la actividad peroxidasa de la proteína tras un cambio conformacional impidiendo a su vez su funcionamiento como carrier de electrones en la cadena respiratoria. Centro: La nitración de la aconitasa por los radicales derivados de peroxinitrito no modifica su actividad. La nitración de aconitasa en mitocondria se utiliza como marcador de la formación de peroxinitrito en este organelo. Derecha: La rápida reacción de peroxinitrito con el centro metálico de MnSOD lleva a la nitración específica de MnSOD a nivel de la tirosina 34, lo cual genera una pérdida de actividad de la enzima. Tomado de Castro *et al* [49].

La nitración de tirosinas a nivel proteico genera cambios asociados tanto al agregado de un grupo voluminoso (45 Da) como cambios en las propiedades ácido-base de este residuo. Particularmente, la nitración de tirosinas genera un cambio en el pKa de este

residuo de 10 a 7,5, lo que causa que este residuo adquiera carga negativa parcial a pH fisiológico [25, 50].

In vivo se ha observado un aumento de la nitración proteica asociado a diferentes patologías tales como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias, metabólicas o envejecimiento [51-61]. Se debe notar que, sin embargo, en condiciones basales también se han detectado proteínas nitradas, siendo la mitocondria el organelo subcelular donde esta modificación se encuentra más exacerbada [62].

1.4.2 Métodos de detección de nitración proteica

Debido a la inmunorreactividad de las proteínas nitradas existe una gran variedad de anticuerpos que reconocen esta modificación post-traducciona. Los métodos de detección inmunoquímica incluyen westernblot e inmunoprecipitación [55, 63-66]. Esta herramienta ha permitido la generación de una nueva rama de estudio llamada “nitroproteómica” la cual, junto con estudios proteómicos, basándose en herramientas de espectrometría de masa, permiten la identificación de proteínas nitradas en tejidos tanto en condiciones patológicas como en condiciones basales, identificando además sitios de nitración generados *in vivo* [62, 67-70]. Por otra parte, también se han generado herramientas que permiten la identificación de proteínas nitradas utilizando métodos analíticos tales como la cromatografía líquida asociados a espectrometría de masa, donde, a partir de mezclas complejas que incluyen tejidos u homogenados enriquecidos en ciertos organelos, se realizan la identificación de cada proteína y la modificación asociada a la misma, permitiendo además la cuantificación de la modificación estudiada, particularmente la nitración [71].

1.5 Enfoque en dos proteínas mitocondriales: Citocromo c y MnSOD

Tanto la MnSOD como el citocromo c son dos metaloproteínas mitocondriales cuya actividad se afecta, tal como se mencionó anteriormente, tras la nitración de tirosinas proteicas. Ambas proteínas han sido detectadas nitradas *in vivo* en diferentes tejidos en condiciones patológicas tales como isquemia reperusión, hiperglicemia o tabaquismo, utilizando técnicas detalladas previamente. En la Tabla 1.1. se indican, esquemáticamente las condiciones de detección de estas proteínas nitradas así como las tirosinas nitradas identificadas en dichas proteínas.

Proteína	Condiciones de detección	Metodología de detección	Tirosina identificada	Modificación de la actividad
Citocromo c	Cortex cerebral de ratas sometido a isquemia y reperfusión [72] Rechazo de trasplante de riñón asociado con nefropatía en ratas [76] Isquemia y reperfusión en riñones de ratas [77]	Inmunohistoquímica, Western Blot Inmunodetección, Western blot Inmunoprecipitación, Western Blot	Tyr 74 y 97 [73]	Aumento de la actividad peroxidática, inhibición de la cadena de transporte electrónica [74] e incapacidad de activar el apoptosoma [75]
MnSOD	Islotes de páncreas de ratas hiperglicémicas [78] Fluido cerebroespinal de pacientes con Esclerosis lateral amiotrófica, Enfermedad de Parkinson y Alzheimer [79] Aorta de rata envejecida [80] Hígado de rata tratado con LPS [60] Tejido ocular de rata tratado con LPS [81] Rechazo de trasplante de riñón crónico de en humanos [65] Rechazo de trasplante de riñón crónico de en ratas [76] Isquemia y reperfusión de riñón de rata [77] Riñón de rata infundido con angiotensina II [82] Corazón de ratón Apo E-/- [83] Corazón de ratón expuesto a humo de tabaco [83] Células beta e islotes de ratas hiperglicémicas [78] Hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno [84]	Inmunodetección, Espectrometría de masa Inmunodetección, Western Blot Inmunodetección, Western Blot, Detección por HPLC Proteómica Inmunodetección Inmunodetección, Western blot Inmunodetección, Western blot Inmunoprecipitación, Western Blot Inmunohistoquímica, Westernblot, detección por HPLC Inmunodetección Western Blot Inmunodetección, Western Blot Inmunodetección, Espectrometría de masa Inmunodetección	Tyr 34 [50]	Inactivación de la actividad catalítica [50, 65]

Tabla 1.1. Detección de tirosinas nitradas de MnSOD y citocromo c en diferentes condiciones patológicas. Adaptada de Castro *et al* [49].

1.6 Citocromo c

El citocromo c es una hemoproteína globular de 12384 Da localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria que funciona como carrier de electrones entre el complejo III y el IV. Su concentración en el espacio intermembrana es alrededor de 1 mM [85]. Su función es el transporte de electrones desde el complejo III al complejo IV, donde se realiza la reducción del oxígeno por la citocromo oxidasa [1]. El citocromo c puede cambiar entre las formas redox férrico y ferroso, con un potencial (E_0) característicamente alto de +260 mV [86].

Esta proteína posee un alto punto isoeléctrico (\sim pH 10), debido a la presencia de nueve residuos de lisina altamente conservados. Al ser una proteína básica, con nueve cargas positivas no compensadas, su unión con la membrana mitocondrial es principalmente electrostática, uniéndose a fosfolípidos aniónicos, principalmente cardiolipina [87].

En eucariotas, el citocromo c es una proteína con una secuencia altamente conservada. En particular, la presencia de 4 de las tirosinas de la secuencia a nivel de los residuos en posición 48, 67, 74 y 97 se encuentran conservados en un alto porcentaje [88]. Los aminoácidos involucrados en la unión con el grupo hemo del citocromo c son también conservados. Estos aminoácidos son la Cys 14¹ y 17; His18 y Met 80. La His 18 y la Met 80 coordinan la quinta y sexta posición de coordinación del hierro de la porfirina [87].

El citocromo c de caballo presenta estos residuos en estas posiciones conservadas, por lo que se utilizó la proteína de esta especie para realizar estudios estructurales y funcionales. El citocromo c humano presenta 5 tirosinas (una tirosina extra, no conservada en posición 46). Ya que dicha tirosina no ha sido reportada nitrada *in vivo*, salvo en estudios con mutantes que no presentan ninguna otra tirosina [89], y no presenta un alto índice de conservación se referirá al citocromo c de caballo como citocromo c, asumiéndose que los estudios; tanto los reportados en literatura o en los resultados presentados en esta tesis; fueron realizados con la proteína de esta especie.

¹ Se utilizó el código de tres letras para denominar los aminoácidos de una secuencia particular de una proteína mientras que para secuencias peptídicas se utilizó el código de una letra. Para referirse a un aminoácido en general se utilizó el nombre completo. Ver Anexo I.

Las modificaciones nitro-oxidativas que pueden sufrir las tirosinas en citocromo c en presencia de agentes oxidantes o nitrantes tales como peroxinitrito han sido estudiadas en profundidad [73, 74] y serán el foco de estudio de este trabajo. Las tirosinas del citocromo c así como su distancia del hierro del grupo hemo se observan en la Fig. 1.3.

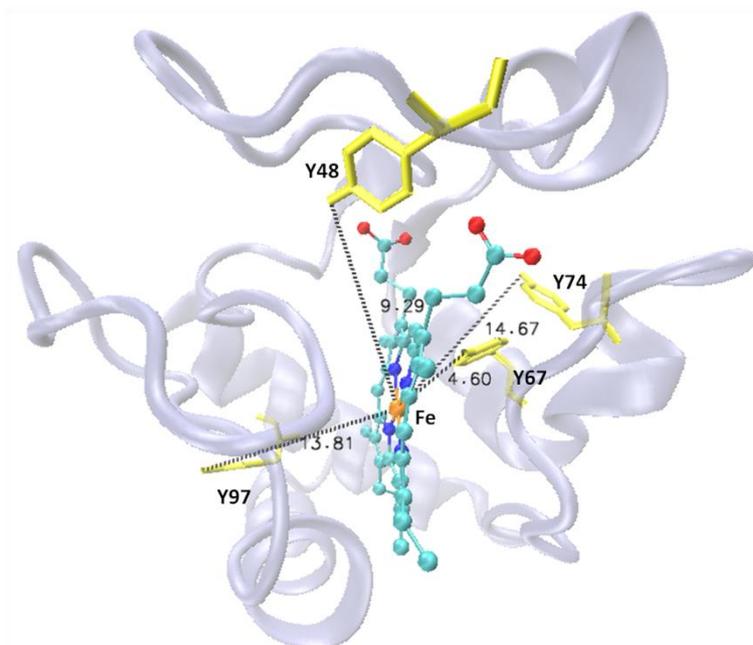


Fig. 1.3. Estructura tridimensional del citocromo c de caballo donde se indica la localización y distancias del grupo –OH del fenol de las tirosinas en la proteína (en Da) con respecto al hierro del hemo. Código PDB:1HRC

1.6.1 Actividad peroxidasa de citocromo c y conformaciones alternativas

Cambios en la coordinación del hierro por modificaciones estructurales en el citocromo c, ya sean modificaciones conformacionales u oxidaciones de los aminoácidos que realizan la coordinación o aminoácidos adyacentes, pueden producir alteraciones en la función del citocromo c generando un cambio en su potencial redox en 250-300 mV y un aumento de la actividad peroxidasa de esta proteína. En condiciones normales, es decir cuando el hierro se encuentra en un estado hexacoordinado, el citocromo c es una peroxidasa con baja eficiencia catalítica pero cuando ocurre la disrupción del enlace entre la metionina en posición 80 y el hierro del hemo este cambio es el principal responsable de dicho aumento de actividad

peroxidasa. Esta propiedad, descrita hace más de 2 décadas por Radi *et al* [90], tendría vital importancia en procesos de iniciación apoptótica, como ha sido descrito por Kagan *et al* [91], principalmente por su interacción con cardiolipina [92] y en particular por su capacidad de disparar procesos de lipoperoxidación en la membrana mitocondrial interna [93, 94].

La actividad peroxidasa de citocromo c, sufre incrementos cuando el citocromo c atraviesa cambios conformacionales, que permiten el desplazamiento de del sexto ligando del hemo de citocromo c por peróxidos de diferentes naturalezas, en particular en presencia de peróxidos de naturaleza lipídica [95]. Este estado se denomina estado de bajo espín "alternativo".

El mecanismo de oxidación que procede a la actividad peroxidasa de citocromo c ha sido propuesto, implicando al grupo hemo y aminoácidos adyacentes al mismo, incluyendo tirosinas [96-100]. En particular, la nitración de este aminoácido genera un aumento la actividad peroxidasa. Esta modificación será discutida en profundidad en secciones posteriores.

Dentro del mecanismo propuesto de la actividad peroxidasa de citocromo c se ha propuesto la formación de un compuesto I de hemoperoxidasa ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) sin embargo este compuesto no se ha podido detectar en forma directa salvo en presencia de modificaciones químicas que estabilizan dicho compuesto tal como la carboximetilación de la Met 80 [101].

La ausencia de la detección de este compuesto de oxo-hierro se debe, probablemente, a la inestabilidad del complejo oxo-hierro formado, lo que lleva, en ausencia de co-sustrato reductor a la oxidación y apertura del grupo hemo (efecto denominado bleaching o blanqueamiento).

1.6.2 Transición alcalina de citocromo c

En la década de 1940, Thorell y Akesson demostraron que el citocromo c oxidado (ferricitocromo c) tiene cinco estados conformacionales diferentes dependientes del pH (rango 1-12) [102, 103] observados espectrofotométricamente. Estos cambios son consecuencia de modificaciones a nivel de la coordinación axial hemo y/o en la conformación de la proteína [85, 104]. El estado conformacional III es la especie dominante a pH fisiológico, y su estructura se ha estudiado extensamente [105-107]. La transformación de la especie del estado III (especie "neutra") al estado IV ("alcalina") al aumentar el pH se denomina transición alcalina (que se produce con un

pKa de 9,3 aproximadamente, dependiendo de la fuente de citocromo c [106]. Este cambio conformacional está presente en básicamente todos los citocromo c procariotas y eucariotas e implica el desplazamiento de Met 80 de su unión al hemo y su sustitución por otro ligando, Lys 72 o Lys 79 [105, 108] manteniendo el hierro en un estado de espín bajo; esta transición está controlada del punto de vista estructural por movimientos en un sector flexible de la proteína, uno de los omega-loop presentes en la proteína, ubicado entre los amino ácidos 70 al 85 [109].

1.6.3 Nitración de citocromo c por peroxinitrito

El citocromo c nitrado ha sido detectado en varias situaciones patológicas (ver tabla II) y la nitración de esta proteína ha sido estudiada extensivamente [74, 110, 111]. En particular, en el trabajo de Batthyany *et al* [73] se determinan los principales sitios de nitración de citocromo c por peroxinitrito, los cuales son principalmente a nivel de las Tyr 74 y 97. La nitración de tirosinas en citocromo c genera un cambio funcional en la proteína, con un aumento de su actividad peroxidasa [74] y dicho cambio funcional tiene un origen conformacional, dado que la nitración agregar un grupo voluminoso como es el grupo nitro (-NO₂, de 45 Da) genera, entre otros, cambios en el pK_a del grupo fenólico (acidificación del mismo en más de una unidad de pH). Recientemente, estudios por NMR paramagnético realizados con citocromo c mononitrado en Tyr 97 o 74 mostraron que la nitración, particularmente a nivel de la Tyr 74, favorecen el cambio conformacional de citocromo c de estado III a IV (“transición alcalina”) a pH fisiológico (pH 7,4) [112].

La nitración de citocromo c a nivel de una tirosina, tal como Tyr 97 o 74 genera cambios en la proteína que van, a nivel biológico, desde la inducción de actividad peroxidasa (reducción de peróxidos tales como peróxido de hidrógeno en concomitancia la oxidación sucesiva de un segundo sustrato *vía* un ciclo dependiente del grupo hemo); pérdida de la capacidad de transporte electrónico en la cadena respiratoria [73, 74] y pérdida de la capacidad de inducir el apoptosoma [113].

1.6.4 Otras modificaciones relevantes de citocromo c

Otras modificaciones postraduccionales que muestran relevancia biológica y que derivan de procesos oxidativos que ocurren *in vivo* incluyen la oxidación de la Met 80 por ácido hipocloroso, generado por la activación de neutrófilos. Dicha oxidación consta de la adición de 1 o 2 átomos de oxígeno al la Met80 y esta modificación, que induciría la aparición de conformaciones alternativas de citocromo c, aumentan la actividad peroxidasa de dicha proteína [114].

Por otra parte se ha reportado que citocromo c es capaz de reaccionar con oxígeno singulete ($O_2(^1\Delta_g)$) generando cambios en la coordinación del hierro hacia un estado de alto espín [115].

A nivel biológico es también sumamente importante la fosforilación del citocromo c residuos de tirosina (particularmente las Tyr 97 y 48), que podría estar asociado a cambios conformacionales del mismo por modificaciones de la interacción de la Met 80 con el hierro del grupo hemo. Dicha modificación ejerce efectos en el control de la respiración celular [116, 117] y en el inicio de la apoptosis mediada tras la interacción con cardiolipina [118].

1.6.5 Cardiolipina

La cardiolipina (1,3-bifosfatidil-*sn*-glicerol) es un fosfolípido único, con una estructura dimérica en la cual dos grupos de ácido fosfatídico se encuentran unidas por un glicerol central [119]. Este fosfolípido, que se encuentra exclusivamente en membranas de mitocondrias y procariontas, fue descubierto en 1942 por M. Pangborn. El nombre “cardiolipina” deriva del tejido donde fue extraído por primera vez, tejido cardíaco bovino [120].

La estructura de este fosfolípido se observa en la Fig. 1.4.

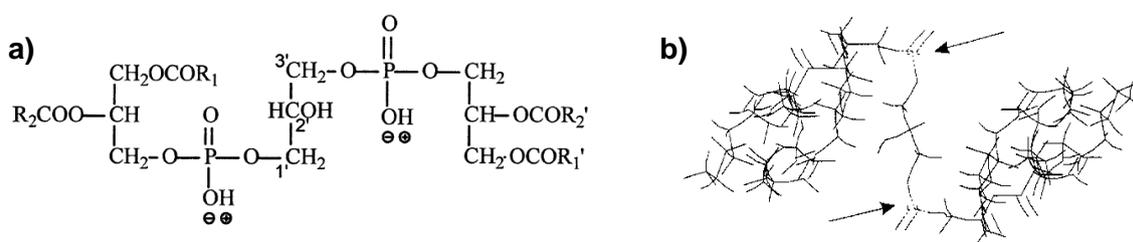


Fig. 1.4. Estructura de cardiolipina (a) Estructura lineal del lípido, los grupos representados con “R” representan ácidos grasos. Tomado de Hsu *et al* [121]. (b) Conformación en la bicapa de tetralinoleil-cardiolipina, obtenido por modelado molecular. Las flechas indican los grupos fosfato. Tomado de Schlame *et al* [122].

Cada grupo fosfato de la cardiolipina contiene un protón ácido, con diferentes niveles de acidez ($pK_1= 2.8$ y $pK_2>7.5$). Las diferencias en los pKas se deben a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular del segundo fosfato con el hidroxilo 2' del glicerol central [123].

Una característica a tener en cuenta es que, a pesar de la aparente simetría de la estructura de este fosfolípido, esta posee dos componentes distintos, aún en presencia de de cuatro residuos acídicos iguales, debido a la presencia de dos centros quirales en cada glicerol exterior, dando lugar a diasterómeros tales como R/R, S/R, S/S Y R/R. La cardiolipina natural se encuentra en la forma R/R [119].

Localización: La cardiolipina se encuentra localizada principalmente en la membrana interna de la mitocondria [124], y en los lugares de contacto intermembrana, en los que jugaría un rol importante en su formación debido a su capacidad de formar estructuras monocapa [122].

Función: Si bien su función específica no está completamente entendida, la propiedad de la cardiolipina de unirse a proteínas es la más interesante. Esta interacción involucra tanto unión no-covalente como activación funcional y es notable que, a pesar de que la esta unión es relativamente no-selectiva, muchas proteínas prefieren unirse a cardiolipina frente a otros fosfolípidos. La razón de esta preferencia podría estar dada tanto por la estructura de la propia cardiolipina como en alguna característica que compartirían ciertos dominios hidrofóbicos de proteínas [122].

En la membrana interna mitocondrial este fosfolípido interacciona con un gran número de proteínas, como se muestra en la Tabla 1.2.

Compartimiento mitocondrial	Proteína
Membrana interna	Carrier ADP-ATP
	Carrier de fosfato
	Carrier de piruvato
	Carrier de carnitina
	Complejo I
	Complejo III
	Citocromo oxidasa (Complejo IV)
	ATP sintasa
	Citocromo P450 SCC
	Cardiolipina sintasa
	Espacio intermembrana
Creatina quinasa	

Tabla 1.2. Proteínas unidas a cardiolipina en mitocondria. Tomado de Schlame *et al* [122]

1.6.6 Interacción citocromo c con cardiolipina y otros lípidos

Es importante mencionar la interacción con citocromo c con la cardiolipina ya que esta interacción lípido-proteína puede producir cambios en la estructura secundaria y terciaria del citocromo c [125], inducidos por interacciones electrostáticas con las Lys 72 y 73 y o la Asn 52 que se uniría a fosfolípidos protonados mediante puentes de hidrógeno.

La unión del citocromo c los diferentes fosfolípidos se da por dos sitios de unión, el sitio A (donde participan las Lys 72 y 73), que facilita las interacciones electrostáticas y el sitio C (Asn 52), opuesto en la proteína al sitio A, que se uniría con alta afinidad a fosfolípidos ácidos protonados mediante puentes de hidrógeno o generando interacciones hidrofóbicas [126-128].

El sitio de unión A del citocromo c no genera, tras la unión con un fosfolípido, cambios críticos a nivel de su estructura secundaria y la unión puede ser revertida por ATP. El sitio C sin embargo, si genera cambios que incluyen modificaciones en la absorción de las bandas de Soret, sugiriendo que el cambio conformacional involucra al hemo y, si bien el ATP puede reaccionar con dicho sitio, no puede revertir la conformación, tal como sucede en el sitio A [129].

Se han reportado además otros sitios de unión de lípidos al citocromo c, tal como el sitio L, que sería una segunda zona donde se concentran aminoácidos cargados positivamente, específicamente Lys 22, Lys 25, His 26, Lys 27 e His 33) [130].

En la mitocondria, el citocromo c se encuentra formando dos conjuntos. Uno es el que se separa fácilmente de la membrana por cambios en la fuerza iónica, siendo el que participa en el transporte de electrones de la cadena respiratoria, y el otro (15 %) es el que se encuentra fuertemente asociado a la cardiolipina. Este último grupo no participa en la cadena respiratoria y es el responsable de la actividad peroxidasa del citocromo c [131].

1.6.7 Papel de la mitocondria en la apoptosis: rol del citocromo c

La participación de la mitocondria en la apoptosis se encuentra muy bien documentada, y el citocromo c juega un rol primordial en el proceso, así como también la cardiolipina.

Se pueden definir dos puntos cruciales en el desencadenamiento de este evento: El primero es la liberación de proteínas del espacio intermembrana de mitocondrial (tales

como el citocromo c) y el segundo es la alteración de múltiples parámetros mitocondriales que llevan a la disfunción [132].

Las etapas relacionadas con la liberación de citocromo c en el proceso de apoptosis, mediado por citocromo c han sido descritas en un curso temporal: 1) migración de la cardiolipina de la parte interna a la externa de la membrana interna mitocondrial, facilitada por la fosforilación de la enzima escramblasa [133-135]. 2) Formación de un complejo de alta afinidad entre citocromo c y cardiolipina, con actividad peroxidasa [136]. 3) Peroxidación selectiva de cardiolipina por la actividad peroxidasa de citocromo c [137, 138]. 4) Disociación del citocromo c de la cardiolipina oxidada y 5) participación de dicha cardiolipina en la permeabilización de la membrana mitocondrial [91].

Una vez que el citocromo c es liberado, forma un complejo oligomérico con el Factor 1 activador de proteasa de la apoptosis (Apaf-1) y la caspasa 9, formando lo que se conoce como “apoptosoma”, que activaría las procaspasas 3 y 7, desencadenando los procesos de apoptosis [132, 139, 140]. Recientes estudios muestran que la cardiolipina es el único fosfolípido que sufriría una oxidación temprana durante la apoptosis, siendo esta oxidación catalizada por una actividad cardiolipina oxidasa específica de citocromo c. Este estudio muestra que la oxidación de la cardiolipina mediada por citocromo c es esencial para la liberación de factores proapoptóticos desde la mitocondria hacia el citosol [91].

Recientemente, se ha determinado un nuevo factor en la liberación de citocromo c fuera de la mitocondria dado que la propia conformación del citocromo c podría determinar el destino del mismo. En estos estudios se utilizaron formas mutantes de citocromo c donde, al mutar la Met 80 por Ala se induce la activación de la actividad peroxidasa de citocromo c y se observó que dicho citocromo, si bien se trasloca preferencialmente al citoplasma, no permanecía en ese espacio subcelular sino que se traslocaba nuevamente al núcleo evitándose el inicio de la apoptosis [141]. Por otra parte, y dentro de la misma línea, se realizaron estudios mutando uno de los aminoácidos de sitio A de unión a lípidos (Lys72Ala) en animales (“knock-in”). En ese trabajo se observó que, si bien el citocromo c era capaz de participar en la transferencia de electrones, no es capaz de activar Apaf-1 y por lo tanto incapaz de iniciar la muerte celular programada [142].

De esto se deduce que los cambios que pueda el citocromo c pueden conducir a diferentes resultados, desde la iniciación de la apoptosis por su interacción con cardiolipina como a la inhibición de la misma.

1.6.8 Aspectos inmunoquímicos e inmunológicos del citocromo c

El citocromo c posee propiedades antigénicas y debido al hecho que los anticuerpos monoclonales son sensibles a la conformación del antígeno, la producción de diferentes anticuerpos monoclonales anti-citocromo c puede ser aprovechada para evaluar diferentes cambios conformacionales de la proteína, utilizando dicha herramienta para seguir tanto su aparición *in situ* en sistemas biológicos como para detectar cambios conformacionales en dicha proteína tras la interacción con diversos compuestos tales como lípidos u oxidantes.

Actualmente existe anticuerpos dirigidos contra citocromo c de diferentes especies, los que han sido de gran utilidad para estudiar el papel del citocromo c en la apoptosis celular y otros procesos que involucran la salida del citocromo c de la mitocondria al citosol u otros compartimentos [141, 143, 144]

Los anticuerpos monoclonales producidos contra citocromo c de diferentes especies de mamífero se unen a dos regiones antigénicas mayores, localizadas en diferentes superficies de la molécula [143, 145]. La región que comprende los residuos 44 y/o 47 se sitúa en una curva por debajo de la hendidura donde se ubica el grupo hemo. La otra región que comprende los residuos 60 y/o 62 se sitúa en una superficie relativamente plana y se extiende hasta los residuos 100 a 104.

Particularmente, Jemmerson *et al* han producido un grupo diverso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra citocromo c de diferentes especies que difieren en aspectos estructurales en regiones específicas, para definir la respuesta generadora de anticuerpos a epítopes levemente diferentes. Utilizando esta aproximación inmunoquímica, particularmente utilizando la clona 1D3, que no une citocromo c nativo sino solamente una conformación alterada, se ha detectado la aparición de conformaciones alternativas de citocromo c en modelos celulares [141, 145].

La aparición de estas formas no nativas de citocromo c ocurre tanto en condiciones de desencadenamiento de la apoptosis [145] como bajo otros estímulos no apoptóticos [141] y datos recientes apoyan la idea que el citocromo c nitrado en Tyr-97 podría contribuir a respuestas autoinmunes [146], en particular en aquellas condiciones de lesión celular donde hay liberación de citocromo c al espacio extracelular [147] donde incluso una pequeña fracción de citocromo c liberado podría desencadenar la

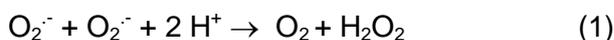
generación de auto-anticuerpos contra formas modificadas y conformaciones alternativas de citocromo c.

1.7 Superóxido dismutasa

En 1939, Mann y Keilin identificaron en eritrocitos bovinos una proteína verde-azulada, de 34000 Da, con contenido de cobre, que se denominó “hemocupreína” [148]. Proteínas con similar tamaño y contenido de cobre fueron halladas en diversos tejidos y fueron llamadas “eritrocupreína” (aislada de eritrocitos humanos), “cerebrocupreína” (aislada de cerebro humano) y “hepatocupreína” (aislada a partir de tejido hepático bovino y equino). Todas las proteínas mencionadas anteriormente, a pesar de haber sido estudiadas estructuralmente, no presentaban ninguna función asociada, hasta que trabajos en el laboratorio de Joe Mc Cord e Irwin Fridovich en 1969 llevaron a la propuesta de una actividad enzimática insospechada: la catálisis de la dismutación o desproporción de superóxido [149]. Este descubrimiento tuvo una importancia fundamental, ya que fue una prueba contundente de la formación *in vivo* de especies radicalares, específicamente del superóxido.

Esta enzima fue denominada entonces superóxido dismutasa, y su nombre completo sería superóxido: superóxido oxidoreductasa (I.U.B.: 1.15.1.1.) [150]

La reacción catalizada por esta enzima es:



Básicamente, la superóxido dismutasa cataliza la dismutación de 2 moléculas de superóxido a una molécula de oxígeno y una de peróxido de hidrógeno, vía la oxidación y reducción (por mecanismo de ping-pong) del metal del sitio activo.

La constante de reacción entre la SOD y el superóxido es generalmente $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [151], y su concentración de $10 \times 10^{-6} \text{ M}$, lo cual le da una velocidad de reacción en condiciones fisiológicas varios órdenes de magnitud mayores a la dismutación espontánea del superóxido, que como se mencionó anteriormente, posee una constante de reacción, a pH fisiológico, de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una concentración de 10^{-10} M [151, 152].

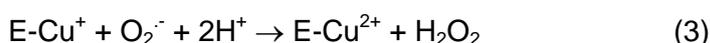
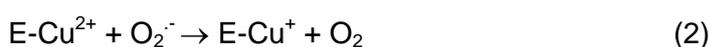
A pesar que la primera de las superóxido dismutasas identificada tenía contenido de cobre, se han reportado varios tipos diferentes, basados en los requerimientos de diferentes especies metálicas en el sitio activo, pero que catalizan la misma reacción. Esquemáticamente se agrupan en al menos 3 familias: Las superóxido dismutasa que

contienen manganeso o hierro, que presentan homología estructural, la superóxido dismutasa con centro bi-nucleado de cobre y cinc y la superóxido dismutasa de níquel [14].

A continuación se detallarán características de dos de estas enzimas, la superóxido dismutasa de cobre y zinc y la superóxido dismutasa de manganeso. En el caso de la última, se realizará un análisis de las consecuencias y los mecanismos asociados a la nitración de tirosina y las consecuencias de la misma.

1.8 Superóxido dismutasa de cobre y cinc (CuZnSOD)

Esta enzima fue la primera de las superóxido dismutasas en ser identificada, aunque su contenido de Zn fue determinado posteriormente. Tiene un color verde-azulado debido a la presencia de un átomo de cobre en su sitio activo, esencial para la catálisis. La CuZnSOD se encuentra en virtualmente todos los organismos eucarióticos, aunque también se ha revelado su presencia en procariontas. En humanos, esta proteína es codificada por el gen *sod1*, que se encuentra en el cromosoma 21 del genoma [153, 154]. La CuZnSOD presenta como una característica particular su notoria estabilidad, resistiendo tratamientos altamente agresivos, como tratamientos con acetona o exposición a temperatura ambiente durante horas sin mayor pérdida de actividad [149]. Su mecanismo de acción se puede simplificar como:



Durante esta reacción, el cobre del sitio activo pasa de un estado oxidado a uno reducido, para luego, recobrar su estado oxidado original Cu^{+2} , pudiendo de esta manera comenzar otro ciclo catalítico [149].

Sitio activo: El sitio activo, que contiene un ion de cobre y uno de cinc por monómero, se compone de dos grandes bucles que conectan las cadenas β [155].

El cobre del sitio activo, que es reducido y oxidado alternativamente durante la reacción enzimática, se encuentra ligado por los nitrógenos imidazólicos de cuatro residuos de histidina (His 46, 48, 63 y 120) con una geometría de “cuadrado plano distorsionado” [156]. El arreglo y orientación de estos ligandos de histidina hacen que la orientación axial del ion de cobre sea más abierta hacia el lado del solvente que hacia el lado proteico, permitiendo la unión de una molécula del solvente al metal [155]. Diversos estudios (incluyendo NMR), han revelado, de hecho, la existencia de al menos una molécula de agua coordinada débilmente al cobre, 2.5Å en posición axial con respecto al cuadrado plano distorsionado [156-158]. El ion de cinc, también presente en el sitio activo se encuentra ligado por tres histidinas (His 63, 71 y 80) y por un oxígeno proveniente de un residuo de aspartato (Asp 83). La geometría de los ligandos del cinc es tetraédrica, con una fuerte distorsión hacia el residuo de Asp 83, que se encuentra en el ápice. De la descripción realizada de los ligandos de ambos metales en el sitio activo, se desprende el rol crucial del residuo de histidina 63, que une ambos cofactores. En este residuo, el anillo imidazólico se encuentra en forma planar con respecto a ambos metales. Datos espectrofotométricos sugieren que esta unión permanece estable en un rango de pH de 5 a 9.5, nivel en el cual la actividad de la CuZnSOD no se altera [155].

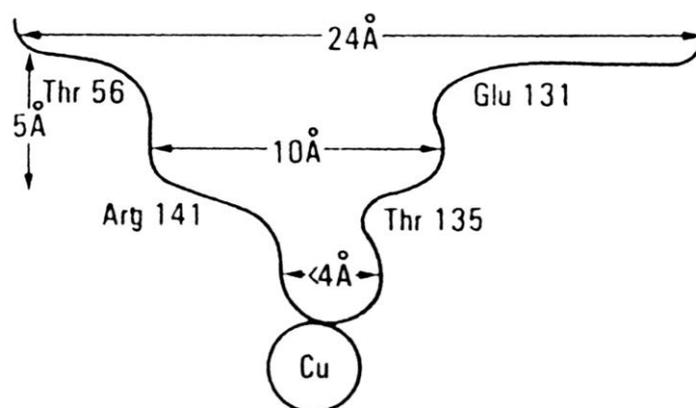


Fig 1.5. Estructura esquemática de las formas y dimensiones del sitio activo de la CuZnSOD humana [155].

La CuZnSOD no posee tirosinas en su secuencia (PDB: 1SPD), sin embargo es susceptible a la inactivación por peroxinitrito, reaccionando con el mismo con una constante de reacción de $(9,4 \pm 1,0) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ por monómero [159].

1.9 Superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD)

En eucariotas, la MnSOD se localiza a nivel de la matriz mitocondrial lugar que, como se mencionó previamente, es uno de los principales sitios de producción de superóxido a nivel celular.

La MnSOD es una enzima esencial, tal como fue reportado por Li y colaboradores [160] donde ratones knock-out para esta enzima (sod2 -/-) morían dentro de los 10 días de nacimiento, cuando la vida promedio de estos animales es de 24 meses.

Los ratones knock out mostraron además retardos en el crecimiento y con hipotermia e hipotonía. Otros reportes utilizando estos animales que carecen de MnSOD mostraron que tiene baja tolerancia al oxígeno [161, 162] y a nivel celular un crecimiento anormal y errores en la transducción de señales [163]. Otros estudios, realizados con ratones heterocigotos para la MnSOD (sod2+/-) o ratones con el gen para esta enzima atenuado, mostraron aumentos en infartos cerebrales, muerte neuronal acelerada y un incremento de las disfunciones vasculares relacionadas con el envejecimiento [162-164].

Estructura: La masa molecular de la MnSOD humana es de aproximadamente 88 kDa y se compone de cuatro subunidades idénticas, cada una conteniendo un átomo de manganeso. [165]. Todas la MnSOD descritas hasta el momento existen como dímeros o tetrámeros, dependiendo de la interacción entre dímeros, que puede no existir tal como ocurre en la MnSOD de *escherichia coli* o *saccharomyces cerevisiae* [166].

A nivel de estructura secundaria, la MnSOD humana se compone de una mezcla de α hélice y hojas β , similar a la estructura cristalográfica reportada para *T. thermophilus* [167].

La MnSOD humana, al igual que su par conteniendo cobre y zinc, posee un anillo de carga electrostática positiva rodeando al sitio activo que facilitaría el acceso del sustrato. A partir de los cristales obtenidos para la MnSOD [168, 169] se ha determinado la conformación del sitio activo, que consiste en un átomo de Mn por en un ambiente trigonal-bipiramidal distorsionado, coordinado por 3 residuos de histidina, un aspartato y una molécula de H₂O o OH⁻ por molécula (Fig. 1.6).

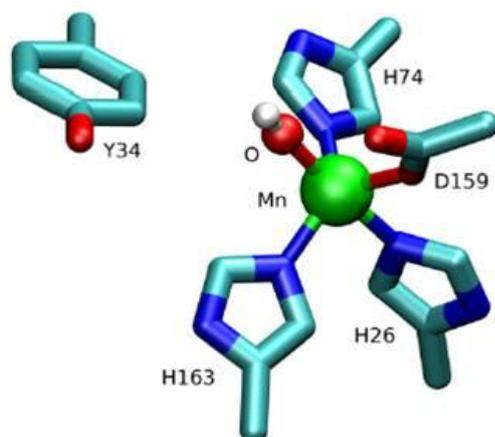
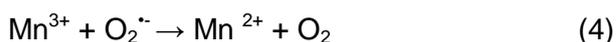


Fig. 1.6. Estructura del sitio activo de MnSOD, donde se observa el centro de Mn, tres His (74, 26 y 163), un Asp, y la molécula de solvente ($\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}$) y en la segunda esfera de coordinación se observa la Tyr 34. Tomado de Moreno *et al* [170]

El entorno al sitio catalítico se caracteriza por una red de puentes de hidrógeno que consiste en moléculas de solvente (agua) y varios residuos claves. Dichos residuos, en la MnSOD humana son: Gln143, Tyr34, His30 y Tyr166 y también son necesarios para la actividad de la enzima [168, 171].

Mecanismo: El mecanismo propuesto para la MnSOD es “ping-pong”, en el cual el metal oscila entre los estados III y II, tal como se muestra en las siguientes ecuaciones [172, 173]:



Al igual que con CuZnSOD, la alta constante de reacción de MnSOD con su sustrato, superóxido (1.5 y $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para cada semi-reacción) [174], se explica por la presencia de un canal de entrada que “guiaría” al superóxido al sitio activo. Cambios en los residuos que componen dicho canal podrían afectar la constante de reacción para cada semi-reacción, disminuyéndolas.

Dentro de los residuos que se localizan cercanos al sitio activo, la tirosina 34 ha generado un interés particular. Estructuralmente, la tirosina 34, dado que se encuentra localizada en el túnel de acceso del sustrato, juega un rol central en el proceso de migración [174], sugiriendo que además, la Tyr 34 juega un rol importante en el segundo paso de catálisis [175, 176], donde el primer paso, la oxidación de superóxido

a oxígeno molecular, ocurre por un mecanismo de asociación y el segundo paso (reducción de superóxido a peróxido de hidrógeno), ocurre por un mecanismo de transferencia de electrones en una segunda esfera, sin que el superóxido coordine directamente con el metal del sitio activo. Resultados obtenidos con mutantes puntuales en la Tyr 34 de MnSOD humana muestran que el reemplazo de este residuo por otros tales como Phe, Ala, Arg o His genera un “hueco” en la zona del sitio activo, que es reemplazado por una molécula de agua que reinstaura la cadena de puente de hidrógeno del sitio activo de manera que la estructura y el ensamblaje del sitio activo no es modificado pero que genera una disminución significativa en la constante de velocidad de la reducción de superóxido [174, 177].

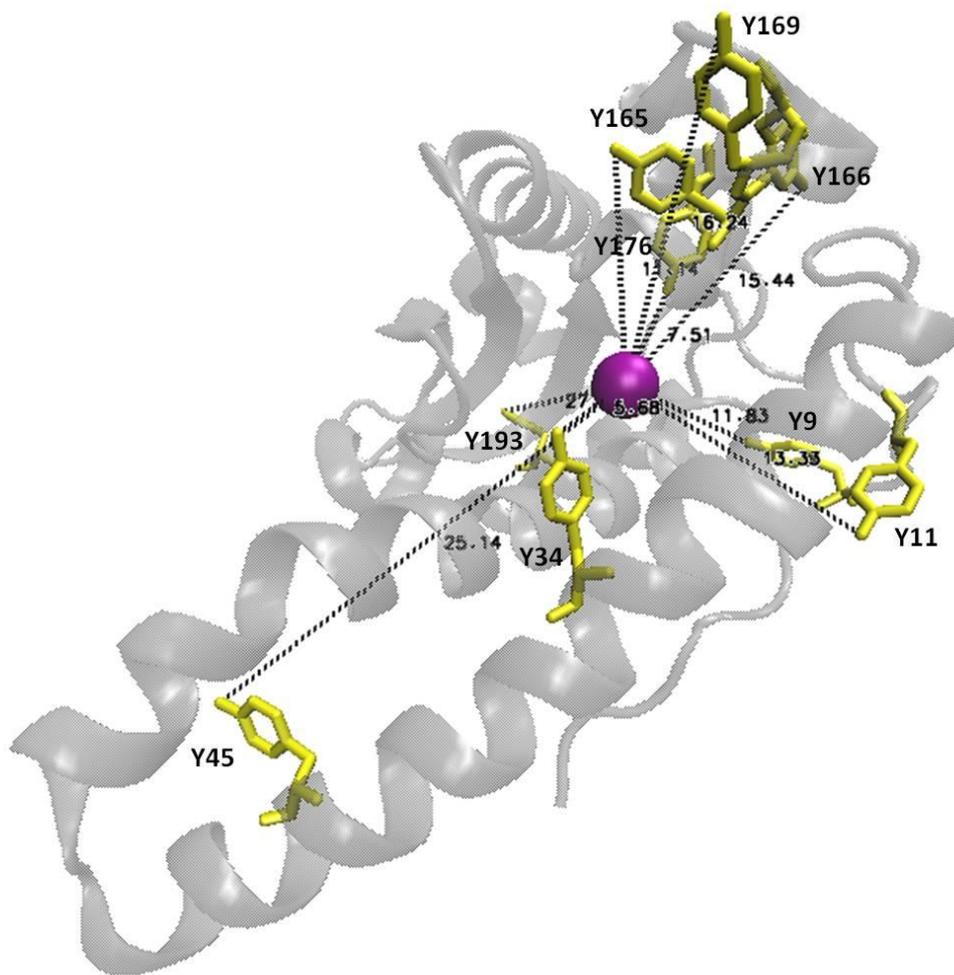


Fig. 1.7. Estructura tridimensional MnSOD humana donde se indica la localización y distancias (en Å) del grupo –OH del fenol de las tirosinas en la proteína (en Da) con respecto al átomo de manganeso del sitio activo. Código PDB:1LUV

1.9.1 Nitración de MnSOD

La nitración de MnSOD es uno de los principales ejemplos de nitración de tirosinas con consecuencias funcionales, tal como se ha detallado en la Tabla 1.1. y, tal como se ha mencionado anteriormente, se relaciona con una amplia variedad de condiciones patológicas en humanos, tales como rechazo de órganos (primer condición donde se reportó la nitración de esta enzima *in vivo* [65]); isquemia/reperfusión; aterosclerosis y tumorigénesis [77, 178].

Tal como se ha descrito previamente, la Tyr 34 en MnSOD humana es un residuo del sitio activo de la enzima, cercano (5.5 Å) del átomo de Mn, pero no unido directamente a él. La Tyr 34 es altamente conservada en MnSOD tanto eucariota como procariota así como en FeSOD de bacterias y otros microorganismos [168].

A pesar de que la MnSOD humana posee 10 residuos de tirosina en su secuencia (cuya posición y distancia al sitio activo se muestran en la Fig. 1.7) es nitración de la Tyr 34 la que ha sido determinada como la modificación causante de la inactivación de la enzima, tanto *in vivo* como *in vitro* [40, 50]. El mecanismo de inactivación de esta enzima por nitración, particularmente por peroxinitrito, fue determinado por Quijano *et al* [18], quien determinó además que existe una reacción directa del peroxinitrito con el metal del sitio activo ($k = 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Dado que la función detoxificadora de la MnSOD es esencial para la funcionalidad celular y la homeostasis mitocondrial, la nitración de MnSOD en Tyr 34 y su consecuente inactivación tiene consecuencias a nivel celular, tanto a nivel bioenergético como a nivel del control de la muerte celular, en la cual la mitocondria juega un rol preponderante.

La función de la tirosina 34, y su rol tras la nitración ha sido previamente estudiada habiéndose generado un cristal de MnSOD nitrada a nivel de la Tyr34 [171] donde se observa que la nitración de este residuo no genera un cambio conformacional significativo, infiriendo que el cambio que genera dicha modificación genera otro tipo de cambio en la proteína. De hecho, tal como se mencionó previamente, la nitración genera cambios a nivel del pKa del grupo fenólico de la tirosina de 10 a 7,5 [25, 50]. Este cambio podría interrumpir la red de puentes de hidrógeno en la que participa la Tyr34, afectando de esa manera el ciclo catalítico. Otra de las teorías que explican la pérdida de actividad de la enzima tras la nitración de este aminoácido es la que propone que es el impedimento estérico del grupo nitro el que impide la llegada del

superóxido al átomo de Mn, inhibiendo así la actividad de la enzima [171], lo cual se estudiará en el marco de esta tesis.

1.9.2 Controversia frente a la constante de reacción de MnSOD y peroxinitrito

Tal como se mencionó previamente, en el año 2001, Quijano y colaboradores determinaron la constante de reacción de MnSOD con peroxinitrito. En dicho trabajo se determinó también que el peroxinitrito reacciona directamente con el átomo de Mn del sitio activo, siendo la constante de segundo orden para la MnSOD humana de $1,0 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por tetrámero, y $1,4 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la MnSOD de *E. coli*, por dímero, a pH 7,47, 37°C [18] y dicha constante de reacción depende en su mayor parte en la reacción del peroxinitrito con el metal. Los valores por monómero para cada enzima son $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $7,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para MnSOD humana y de *E. coli*, respectivamente.

En un artículo reciente, Groves y colaboradores reportaron una constante de reacción de MnSOD de *E. coli* con peroxinitrito que difiere de los resultados previamente reportados por Quijano, con un valor de $9,3 \pm 0,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [179]. Este valor es llamativamente bajo dado el contenido de aminoácidos de la enzima y la presencia del átomo de Mn, que es responsable de casi un 70% del valor de la constante de MnSOD con peroxinitrito [18, 180]. Es por esta razón que surge la necesidad de re-estudiar esta reacción de manera de definir un valor confiable para esta constante.

1.9.3 Polimorfismos de MnSOD asociados a cáncer y reactividad aumentada de tioles

Además de modificaciones post-traduccionales asociadas con la inactividad de la enzima, en MnSOD se han descrito polimorfismos, particularmente mutaciones puntuales de diferentes aminoácidos, que se han asociado con diferentes patologías en las que se destacan diferentes tipos de cáncer y diabetes [181-184]. Por otra parte, en líneas celulares derivadas de células cancerígenas o que sufren algún otro tipo de transformación (inmortalización de la línea) se observan niveles disminuidos de MnSOD, además de una alta sensibilidad a compuestos reactivos a tioles, que causan una completa inhibición de su actividad enzimática [185].

Una de las diferencias significativas de la MnSOD de mamíferos (incluyendo a la humana) es la presencia de 2 residuos de cisteína (Cys 140 y 196) que no se

encuentra presente en sus homólogas de procariontes, hongos o plantas. De esas 2 cisteínas, solo la Cys 196 es reactiva frente a agentes alquilantes u otros reactivos para sulfhidrilos y su bloqueo no afecta la actividad enzimática de la MnSOD [186]. La reactividad de la Cys 140, que se encuentra poco expuesta al solvente no ha sido estudiada. Dentro del marco de la tesis se estudiará la sensibilidad de tioles en MnSOD que presentan polimorfismos asociados con cáncer o células tumorales.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Los siguientes reactivos fueron comprados en Sigma: fosfato de potasio monobásico y dibásico, nitrito de sodio, bicarbonato de sodio, citocromo c.

El peróxido de hidrogeno es de Mallinkrodt y su concentración fue determinada a partir de su absorbancia a 240 nm ($\epsilon=43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Los lípidos (tetraoleil cardiolipina, dioleil fosfatidil colina, dilauril fosfatidil colina, oleil,estearoil fosfatidil colina) son de Avanti Lipids.

El dador de óxido nítrico espermina/NONOato y el 5,5' dimetil-1-pirrolin-N-óxido (DMPO) son de Alexis. Metil nitroso propano es de Aldrich.

Los solventes orgánicos utilizados son de Baker. El intercambiador aniónico DEAE-sepharosa CL-6B es de Pharmacia.

2.2 Métodos

2.2.1 Síntesis de peroxinitrito

El peroxinitrito fue preparado a partir de peróxido de hidrógeno en medio ácido y nitrito, tal como se describe en [187]. La contaminación de peróxido de hidrógeno del peroxinitrito sintetizado fue eliminada por el agregado de dióxido de manganeso. La concentración de peroxinitrito fue determinada por medida de absorbancia a 302 nm ($\epsilon_{302}= 1.67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [188]. La concentración de peróxido de hidrógeno fue medida por absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [189]). La concentración de nitrito fue medido por la técnica de Griess [190] luego que se descompuso el peroxinitrito en una solución de fosfato monobásico a pH ácido (5,5). Se utilizó peroxinitrito conteniendo menos de 30% de nitrito.

2.2.2 Purificación de citocromo c nativo

El citocromo c oxidado (citocromo c⁺³) de caballo utilizado en los ensayos fue obtenido en Sigma (purificado sin la utilización de ácido tricloroacético) y re-purificado para su utilización por intercambio catiónico (columna preparativa TSK-Gel SP-5PW, 21,5 mm x 15 cm, Tosoh Bioscience) [73], utilizando un equipo de HPLC (Agilent 1200 series), detectando el pico de citocromo c oxidado nativo por absorbancia a 280 nm.

2.2.3 Expresión de citocromo c recombinante nativo y mutado en tirosinas

Citocromo c recombinante “pseudo-wild type” y citocromo c mutado en tirosinas: El citocromo pseudo-wild type y los citocromo c equinos mutados en tirosinas fueron expresados y purificados por la Mag. Verónica Tortora, del Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina. Brevemente, para la expresión del citocromo c pseudo-wild type se utilizó el plásmido pJRhrsN2 (provisto por el Dr. Jon Rumbley, del Departamento de Química de la Universidad de Minnesota) que codifica para el citocromo c recombinante con 2 sustituciones H26N y H33N, sustituciones que permiten el correcto plegamiento en un sistema de expresión bacteriano. Sobre ese plásmido se realizaron luego las diferentes mutaciones de tirosinas por fenilalaninas: Y97F, Y74F, Y67F y Y48F utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange II. Los plásmidos resultantes fueron transformados en una cepa de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Las proteínas fueron expresadas y purificadas según Rumbley *et al* [191] Las proteínas fueron purificadas utilizando una columna de flujo rápido con CM-Sepharosa (Amersham Biosciences). El criterio para determinar que las muestras son puras es una relación de absorbancia mayor a 4 entre 410/280 nm. Se verificó dicha pureza por SDS-PAGE, tiñéndose con Azul de Coomassie. Para los ensayos de NMR se utilizó el plásmido que codifica para el citocromo c equino pseudo wild-type” crecido en medio mínimo M9, con fuente de nitrógeno (cloruro de amonio; NH₄Cl) marcado con ¹⁵N, obteniéndose un citocromo c marcado con este isotopo.

2.2.4 Síntesis y purificación de citocromo c mononitrado en tirosina 97 y 74

El citocromo c mono-nitrado utilizado en la generación de anticuerpos específicos contra formas alternativas de citocromo c fueron purificados a partir de una mezcla de citocromo c, el cual fue nitrado por infusión de peroxinitrito de acuerdo a lo reportado por Batthyany *et al* [73]. Brevemente, citocromo c⁺³ (1 mM) fue infundido con peroxinitrito 67 mM durante media hora con un flujo de 1 µL/min durante 20 minutos en presencia de bicarbonato de sodio en buffer fosfato de potasio 200 mM, conteniendo 0.1 mM DTPA. Los citocromos mono-nitrados se purifican por intercambio catiónico (columna preparativa TSK-Gel SP-5PW, 21,5 mm x 15 cm, Tosoh Bioscience) [73], utilizando un equipo de HPLC (Agilent 1200 series). Los picos correspondientes a citocromo c mono-nitrado en tirosina 97 o 74 fueron colectados y re-purificados utilizando la misma columna. Los picos colectados fueron testeados por espectrometría de masa de manera de asegurar la nitración específica de la tirosina requerida.

2.2.5 Síntesis y purificación de citocromo c carboximetilado

Citocromo c carboximetilado se preparó a partir de citocromo c de caballo oxidado, purificado como se describió previamente. La carboximetilación a nivel de las metionina 65 y 80 se realizó incubando 8 mg de citocromo c en ácido bromoacético (0,18M) pH 7 y cianuro de potasio (0,1 M) pH 7 en amortiguador Tris-HCl pH 7,0. La reacción se llevó a cabo a 28°C durante 26 horas, cuando se considera que la reacción se ha completado [110]. Se purificó a partir de la mezcla obtenida el pico mayoritario por intercambio catiónico (columna preparativa TSK-Gel SP-5PW, 21,5 mm x 15 cm, Tosoh Bioscience), utilizando un equipo de HPLC (Agilent 1200 series) y se verificó la doble carboximetilación por espectrometría de masa (MALDI-TOF). La concentración de citocromo c carboximetilado se determinó espectrofotométricamente utilizando los coeficientes de absorción molar $\epsilon_{416} = 106 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [192]

2.2.6 Preparación de liposomas unilamelares

Los liposomas unilamelares se prepararon a partir de tetraoleil cardiolipina (TOCL) y fosfatidil colina (di-lauril o di-estearoil) en relación 1:1, por sonicación (según lo reportado en www.avantilipids.com). Cada fosfolípido, a partir de un stock en cloroformo (guardado a -20°C), fue mezclado y secado bajo atmósfera de argón. Luego, los lípidos fueron mezclados en buffer fosfato 20 mM, 100 μM DTPA (pH 7.4 por agitación y sometidos a sonicación con un sonicador de punta (Vibracel, Sonic Materials, Danbury CT, USA) 5 veces durante 30 segundos, dejando 1 minuto de separación entre cada ciclo. Los liposomas son usados inmediatamente luego de cada ciclo.

2.2.7 Expresión de superóxido dismutasa de manganeso

La superóxido dismutasa de manganeso fue expresada utilizando una cepa de *escherichia coli* que no contiene SOD, (QC2375 2375/ K12 sodB D2, (sodA-lacZ) 49) (cedida por Julia Pianzola, Departamento de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República). Debido a la alta sensibilidad de esta cepa al oxígeno, previo a la transformación con el plásmido conteniendo el gen de la MnSOD humana, la cepa se creció con baja tensión de oxígeno utilizando una cámara hipóxica. Las bacterias fueron luego transformadas con el plásmido de la MnSOD (pGB1, conteniendo el gen de la MnSOD humana, hrMn-SOD) (cedido por Dr. Daniel Hernández-Saavedra (Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, University of Colorado at Denver, y Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Mexico DF, México) y se creció en medio LB conteniendo ampicilina, a 37°C, donde se crece overnight. La expresión de MnSOD se induce por el agregado

de paraquat (30 μ M), y se expresa durante 12 horas. Las bacterias son sonicadas y la enzima se purifica por fraccionamiento salino entre 65 y 80% de saturación. El precipitado con 80% de saturación se somete a diálisis en un amortiguador de acetato de potasio 20 mM (pH 6,6) seguido de un intercambio iónico en el mismo amortiguador. La pureza de la enzima se verifica por SDS-PAGE.

2.2.8 MnSOD mutada sitio específicamente

Las diferentes MnSOD mutadas a nivel de I58T, L60F y los dobles mutantes I58T/C140S y L60F/C140S fueron aportadas por el Dr. Daniel Hernández-Saavedra (Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, University of Colorado at Denver, y Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Mexico DF, México). Cada batch de proteína fue analizado por espectrometría de masa en un espectrómetro de masa híbrido de triple cuadrupolo/ trampa lineal (QTRAP 200 Applied Biosystems/MDS SCIEX) previo su utilización en los diferentes experimentos, para confirmar la presencia de la mutación especificada.

2.2.9 Expresión de superóxido dismutasa de cobre y cinc

La CuZnSOD recombinante se obtuvo expresando un plásmido pET-3D (donado por el Dr. J. Beckman) con el gen de CuZnSOD humana y resistencia al cloranfenicol y la ampicilina. El plásmido fue expresado en una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLys S, crecida a 37°C medio LB. La expresión de la CuZnSOD recombinante fue inducida por el agregado de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (1 mM). La inducción fue realizada durante 4 horas, a temperatura ambiente (24°C). La expresión fue confirmada por SDS-PAGE. Luego de la inducción, se centrifugó el medio y se sonicó a máxima potencia para romper la membrana de las células y así liberar la proteína expresada. Se agregó ADNasa (1 μ g/mL final) para fragmentar el ADN liberado por las bacterias luego de la sonicación y se centrifugaron las muestras a 18000 G durante 15 minutos, conservando el sobrenadante. A este sobrenadante se le agregó nuevamente ZnCl₂ y CuCl₂ (en ese orden) en una concentración de 0.1 mM de cada uno, para asegurar la metalización de la proteína. El sobrenadante obtenido en el paso anterior fue sometido a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio entre 55 y 95% de saturación. El precipitado obtenido a 95% de saturación fue desalado por diálisis durante 12 horas contra amortiguador Tris HCl 2mM, pH 7.4 y las muestras dializadas fueron luego sometidas a una cromatografía de intercambio iónico (aniónico), en Sepharosa CL6B equilibrada con amortiguador Tris HCl 2mM, pH 7.4. La CuZnSOD se eluyó de la columna aplicando un gradiente de cloruro de sodio (NaCl) de 0 a 200 mM. La concentración proteica de cada fracción colectada fue determinada por

absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu, UV-1603 UV / Visible y la pureza de la muestra fue evaluada por electroforesis (SDS-PAGE). Posteriormente se realizó una gel filtración en una columna con Sephadex G-75 equilibrada en amortiguador Tris-HCl 2 mM, pH 7.4. La concentración de la enzima purificada se midió directamente por espectrofotometría a 280 nm con un $\epsilon_{280} = 1.08 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [193] y a 680 nm con un $\epsilon_{680} = 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [194].

2.2.10 Medida de concentración proteica

La concentración de proteína fue determinada utilizando el ensayo de ácido bis-cinconínico (BCA) aumentado (Pierce) a 60°C, utilizando albúmina bovina (BSA) como estándar.

2.2.11 Generación de flujos (J) de superóxido:

Los flujos de superóxido (JO_2^-) se generaron con el sistema hipoxantina /xantina oxidasa (XO). La medida de actividad XO (Calbiochem) se determinó midiendo la aparición de ácido úrico a 295 nm ($\epsilon_{295} = 11 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [195, 196]. El flujo de superóxido generado por este sistema se denomina “flujo univalente”, ya que se da por el pasaje de un solo electrón, y corresponde sólo a un porcentaje del flujo total de electrones, calculado como:

$$J \text{ Univalente} = (\text{JO}_2^- / 4 J \text{ Ác. Úrico}) \times 100$$

La cuantificación de flujos de superóxido se realizó midiendo la reducción de citocromo c^{3+} a 550 nm ($\epsilon_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [195, 196].

2.2.12 Generación y caracterización de flujos de óxido nítrico

Para generar los flujos de óxido nítrico ($J \cdot \text{NO}$) se utilizó el dador espermina/NONOato (Alexis Biochemicals), un diazeniodiolato, con una vida media de 39 min a pH 7.4, 37°C que produce un flujo constante de óxido nítrico durante los primeros 10-15 minutos [197].

El flujo de óxido nítrico fue cuantificado midiendo directamente la disminución de la absorbancia del dador a 252 nm ($\epsilon_{252} = 8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), considerando una estequiometría de dos moléculas de óxido nítrico producidas por molécula de dador. Por otra parte se realizó una cuantificación indirecta del óxido nítrico cuyo método se basa en su rápida reacción con la oxihemoglobina (Hb^{2+}O_2) para dar metahemoglobina (Hb^{3+}) y nitrato (NO_3^-) [198] de acuerdo a la siguiente reacción:



La concentración de oxihemoglobina se calculó midiendo la absorbancia a 577 y 630 nm, calculándose entonces la concentración final como $[Hb^{2+}O_2] = 66 \times A_{577} - 80 \times A_{630}$ [199].

2.2.13 Exposición de citocromo c a peroxinitrito en presencia de liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina

Citocromo c oxidado (citocromo c^{+3}) fue incubado en presencia o ausencia de liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina, en diferentes relaciones proteína/lípido, a temperatura ambiente (24°C) en amortiguador fosfato 20 mM, pH 7,4, 0,1 mM DTPA. El peroxinitrito fue agregado en bolo o por infusión.

La concentración de amortiguador fosfato a utilizar se determinó observando la inhibición obtenida por fosfato en la actividad peroxidasa de citocromo c expuesto en presencia de cardiolipina frente a diferentes concentraciones de amortiguador fosfato (10-200 mM). La concentración elegida (20 mM) no genera inhibición de la actividad peroxidasa de citocromo c en presencia de cardiolipina medido por el ensayo de Amplex Red.

2.2.14 Exposición de MnSOD y CuZnSOD a flujos de óxido nítrico

Se incubó cada enzima en presencia de flujos de óxido nítrico y superóxido (indicados en cada caso) a diferentes tiempos. La incubación se realizó siempre a 37°C, en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7,4 en con 0,1 mM DTPA.

Las reacciones de generación de ambos flujos se detuvieron por gel filtración, en columnas de cromatografía Micro BioSpin 6 (BioRad) o por dilución inmediata seguida de congelamiento.

Los tiempos de incubación fueron definidos de manera que la concentración de oxígeno fuera suficiente para mantener constante el flujo de superóxido generado por la reacción de xantina/ xantina oxidasa. En caso que el tiempo de incubación consumiera el oxígeno necesario para mantener constante los flujos de superóxido, se burbujea oxígeno a la mezcla de reacción cada 5-10 minutos, y se agregaron alícuotas frescas de xantina oxidasa. Los controles de consumo de oxígeno se realizaron utilizando un oxímetro (YSI 5300), controlando la concentración de oxígeno en solución en presencia de xantina oxidasa y su sustrato, en presencia y ausencia de espermina NONOato, de manera de determinar si los productos de esta reacción afectaban la generación de los flujos de superóxido.

2.2.15 Determinación de Actividades enzimáticas

2.2.15.1 Actividad peroxidasa de citocromo c

La actividad peroxidasa de citocromo c se determina utilizando la sonda Amplex Red, midiendo la fluorescencia de la resorufina, producto de oxidación del amplex red (λ_{ex} — 570 nm, λ_{em} — 585 nm). En cada caso el citocromo fue incubado en diferentes condiciones, y para realizar la medida 0.5 μ M de la proteína es incubada en fosfato 20 mM en presencia de 25 μ M de peróxido de hidrógeno y Amplex Red. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se mide en lector de placas de fluorescencia Fluostar Galaxy (BMG) a las longitudes de onda mencionadas anteriormente.

2.2.15.2 Detección de actividad SOD por método de reducción de citocromo c

La actividad superóxido dismutasa fue medida utilizando el método de la inhibición de la reducción de citocromo c dependiente de superóxido, utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa como fuente de superóxido [149, 200]. La cantidad de enzima necesaria para disminuir la velocidad de reducción de citocromo c en un 50% fue definida como 1/3 de unidad en 1 mL de ensayo (para compararlo con el ensayo realizado en 3 mL reportado usualmente). La actividad fue determinada graficando el inverso de la velocidad con respecto al volumen (en μ L) de superóxido dismutasa agregado a la cubeta en cada ensayo, ajustando a una recta con el método de mínimos cuadrados, y calculando la actividad según la siguiente ecuación:

$$U/mL = (1000/3) \times (\text{pendiente}/y_0) \times \text{Factor Dilución [159]}$$

2.2.15.3 Geles de actividad SOD

La actividad SOD se determinó además realizando geles de actividad, utilizando geles nativos de acrilamida (15%), sin SDS, teñidos con 4-nitro blue tetrazolium (NBT) en presencia de riboflavina y TEMED. Cuando se expone esta mezcla a la luz, el NBT es reducido por el superóxido formado en la reacción de autooxidación de la riboflavina catalizada por el TEMED, produciendo un precipitado violeta (diformazán). En las zonas donde existe SOD activa, el superóxido es dismutado rápidamente antes de poder reaccionar con el NBT y se observan bandas incoloras [200]. En el análisis de la actividad de las formas mutadas de MnSOD, se utilizaron geles conteniendo ácido ϵ -aminocaproico (ver más adelante).

2.2.15.4 Cinética de reacción de MnSOD con peroxinitrito

La velocidad de reacción de MnSOD con peroxinitrito se determinó utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido (Applied Photophysics). La constante de decaimiento aparente del peroxinitrito fue determinada a 302 nm en presencia de concentraciones crecientes de enzima, siguiendo la descomposición del peroxinitrito durante 10 segundos. La constante aparente fue determinada por ajuste a un decaimiento exponencial de primer orden utilizando el programa Pro Data SX de Applied Photophysics. El pH se mide en luego del mezclado de la muestra con peroxinitrito, de manera de verificar que el mismo se mantiene estable.

2.2.15.5 Determinación de la variación en la formación de oxígeno por peroxinitrito en presencia de MnSOD

Las variaciones en la concentración de peroxinitrito se determinaron utilizando un sensor de oxígeno de alta sensibilidad (Oroboros oxygraph 2K, Oroboros Company), midiendo las variaciones de la concentración de oxígeno tras el agregado de peroxinitrito (200 μ M) a concentraciones crecientes de MnSOD (0-10 μ M). Como control se utilizó albúmina bovina (Sigma).

2.2.16 Métodos inmunoquímicos

2.2.16.1 Detección de 3-nitrotirosina proteica en citocromo c y MnSOD

Para la detección inmunoquímica de 3-nitrotirosina las proteínas tratadas fueron corridas en un gel de 13 o 15% de acrilamida (para superóxido dismutasa y citocromo c, respectivamente) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con 5% de albúmina bobina (BSA) en amortiguador Tris salino (TBS) con 0,6% Tween por una hora y expuesta, luego de lavado con TBS/Tween 0,6%, incubados con anticuerpo policlonal anti-3-nitrotirosina, desarrollado en conejo (1/2000) durante una hora a temperatura ambiente. Para realizar la detección las membranas incubadas con el anticuerpo primario se lavaron en TBS, 0,3% Tween e incubados con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo (Calbiochem) (dilución 1/10000). El anticuerpo secundario utilizado varió según la proteína utilizada. En los ensayos de detección de 3-nitrotirosina en MnSOD se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. En el caso de los ensayos realizados con citocromo c se utiliza el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, debido a la potencial actividad peroxidasa que puede presentar el citocromo c en diferentes condiciones. En el caso del anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano, se realizó

el revelado utilizando un kit de detección de quimioluminiscencia basado en luminol (BioRad).

2.2.16.2 Detección de radicales libres proteicos en SOD

Para realizar esta detección se incubó las proteínas (SOD) a agentes oxidantes en presencia de 100 mM de 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO). Las muestras fueron luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa desde geles de poliacrilamida, donde se corrieron previamente las muestras. Las membranas se bloquearon con 2.5% BSA y 2.5% leche en TBS con 0.3% Tween durante 1 hora. Luego se expuso la membrana al anticuerpo policlonal anti-DMPO desarrollado en conejo (suero de conejo anti-DMPO, dilución 1/5000, regalo del Dr. R.Mason, National Institute of Health, Carolina del Norte, USA) durante 1 hora [201]. Luego se procede al lavado en TBS 0.1% BSA 0.1%leche 0.3% Tween se expuso la membrana al anticuerpo secundario IgG anti- proteínas de conejo conjugado con peroxidasa de rábano y las proteínas inmunoreactivas se visualizaron por quimioluminiscencia como se describió en el punto anterior [202].

2.2.16.3 Detección de formas modificadas de citocromo c

Para determinar la especificidad de anticuerpos monoclonales que reconocen formas modificadas de citocromo c se realizaron ensayos inmunoquímicos de absorción en placa (ELISA) realizando una competencia entre citocromo c de caballo comercial (Sigma) purificado (0,2 μ M), con el que sensibilizaron las placas (Nunc-Immuno Maxisorp plates, Gibbco Scientific, Coon Rapids, MN) y se testearon 3 tipos diferentes de citocromo: citocromo c nativo, citocromo c mononitrado en tirosina 74 y citocromo c mononitrado en tirosina 97. La competencia se realizó frente al anticuerpo monoclonal 1D3 (dilución 1/20000 en PBS/triton-X100 (0.1%), brindado por el Dr. Ron Jemmerson de la Universidad de Minnesota, USA, y el anticuerpo secundario utilizado fue IgG anti-proteínas de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Calbiochem DC02L) en PBS/Triton X100 0,1%. El ELISA se reveló con OPD/H₂O₂ por 10 min deteniéndose la reacción con H₂SO₄ 1M. La placa se mide a 492 nm. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Leonor Thomson del Laboratorio de Enzimología de Facultad de Ciencias.

2.2.17 Caracterización por espectrometría de masa de modificaciones nitro-oxidativas de proteínas

2.2.17.1 Análisis de modificaciones en citocromo c por espectrometría de masa (MALDI-TOF)

Los análisis de las modificaciones de citocromo c modificado (tanto nitrado como carboximetilado) se realizó por el análisis de los péptidos de dicha proteína tras la digestión proteolítica con tripsina. Dicha digestión proteolítica se llevó a cabo incubando las proteínas con tripsina (grado de secuenciación, de Promega) en amortiguador bicarbonato de amonio pH 8,3 a 37°C durante toda la noche, con una relación 1:100. Dicha tripsinización se realizó tanto con muestras en solución como en muestras que fueron corridas en geles de poliacrilamida, teñidas con azul de Coomassie. Para este último tipo de muestra, cada banda de proteína obtenida en el gel se corta a mano y se realiza la digestión en el gel. Para la extracción de los péptidos se utiliza acetonitrilo 60% en 1% ácido trifluoroacético (TFA) y se concentra las muestras por secado al vacío.

Previo al análisis por espectrometría de masa, las muestras son desaladas usando micro columnas de fase reversa C18 (Omix®Tips, Varian) y se eluyen las muestras directamente con una solución de matriz de CHCA en acetonitrilo 60% y TFA 0,1%. El análisis por MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* o desorción/ionización láser asistida por matriz – time of flight/tiempo de vuelo) de la mezcla de péptidos se obtuvo en un instrumento MALDI TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) en modo de reflector positivo. Los espectros de masa fueron calibrados previamente utilizando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). Los espectros fueron procesados utilizando el programa Data Explorer(R) Software versión 4.9 de Applied Biosystems, utilizando un umbral de detección de picos de 25.

Las proteínas fueron identificada luego utilizando la base de datos MASCOT (Matrix Science <http://www.matrixscience.com>) a partir de los valores obtenidos de masa/carga de los péptidos. Se agregaron parámetros tales como posible oxidación de metionina y nitración de tirosinas. El error considerado fue de 0,18 Da.

El criterio para la identificación de una proteína fue la obtención de un score significativo ($p < 0,05$).

En el caso de la carboximetilación en metionina de citocromo c, debido a que dicha modificación no se encuentra en la base de datos, se realizó la búsqueda de los péptidos modificados y nativos de forma manual.

Los péptidos teóricos que se obtendrían luego de la tripsinización se generaron con el programa GPMAW versión 4.02 (Lighthouse Data).

2.2.17.2 Cuantificación de la formación de 3-nitrotirosina en citocromo c

Para realizar la cuantificación de la formación de 3-nitrotirosina en citocromo c expuesto a peroxinitrito previamente se realizó la hidrólisis total de citocromo c para cuantificación por espectrometría de masa: 1,5 nmoles de citocromo c son expuestos a peroxinitrito en presencia o ausencia de cardiolipina. Dichas muestras fueron sometidas a gel filtración (Micro Biospin 6, Biorad) y se agregaron los siguientes estándares internos pesados: tirosina marcada con ^{13}C en toda la molécula y 3-nitrotirosina marcada con ^{13}C en el anillo fenólico. Luego se precipita la proteína (2 veces) con acetonitrilo (relación ACN/muestra 1/1) para evitar la presencia de nitrito remanente en las muestras que, al exponerse a un medio ácido generaran nitración artefactual. Las muestras se resuspenden en ácido clorhídrico 6 N y se incuban 12 horas a 116°C para realizar la hidrólisis completa. Las muestras se evaporan bajo atmósfera de nitrógeno y se resuspenden en 400 μL de ácido fórmico 0,1%. Para realizar la cuantificación se realiza una curva de calibración con tirosina y 3-nitrotirosina.

Los aminoácidos obtenidos se separan en una columna de fase reversa C18 (Agilent, 150mm x 4.2 mm) conectada en tándem con un espectrómetro de masa híbrido de triple cuadrupolo/ trampa lineal (QTRAP 200 Applied Biosystems/MDS SCIEX). Para la detección de 3-nitrotirosina y tirosina, así como la corrección del total (por la ocasional pérdida de muestra durante el proceso de hidrólisis) se siguen las siguientes transiciones de m/z: 227-181 (cuantificación de 3-nitrotirosina), 233-187 (estándar interno de 3-nitrotirosina) 192-174 y 237-190 (control de nitración artefactual de tirosina marcada en ^{13}C y ^{15}N) y 182-165 (cuantificación de tirosina total en la muestra). Los datos se correlacionan con una curva de calibración de tirosina y 3-nitrotirosina control que contiene los mismos estándares internos que las muestras hidrolizadas.

2.2.17.3 Detección de alquilación y confirmación de mutaciones en MnSOD por espectrometría de masa (Electro Spray)

Se estudió por espectrometría de masa la alquilación de tioles en MnSOD mutada en diferentes sitios utilizando un espectrómetro de masa híbrido de triple cuadrupolo/trampa lineal (QTRAP 200 Applied Biosystems/MDS SCIEX).

Las muestras fueron inyectadas en agua/metanol/ácido acético (50/49/1) con un flujo de 10 μ l/min. Las medidas se realizaron en modo de ionización positivo. Los escaneos fueron realizados con el primer cuadrupolo y la masa de las proteínas estudiadas fue calculada por reconstrucción. La detección por espectrometría de masa de las muestras alquiladas con N-etilmaleimida (NEM) fue realizada incubando MnSOD nativa y mutada en una concentración de 10 μ M en presencia de 4mM β -mercaptoetanol (2 h a 4°C, para realizar la reducción total de los tioles proteicos) previo a la incubación con el agente alquilante. El agente alquilante fue eliminado por gel filtración usando una columna Micro Biospin 6 (Bio-Rad) equilibrada en amortiguador fosfato 100 mM, 0,1 mM DTPA, pH 7,4. Las enzimas fueron entonces incubadas en presencia o ausencia de NEM durante 30 minutos, deteniendo la reacción por gel filtración, con las columnas equilibradas esta vez en agua.

2.2.18 Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

2.2.18.1 Detección de radicales libres por EPR directo de citocromo c expuesto a peroxinitrito

Las medidas de EPR directo se realizaron en un Espectrómetro Bruker EMX. Para realizar dichas medidas se expuso citocromo 0.5 mM expuesto a peroxinitrito (3 mM) comparando la influencia del agregado de liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina (2 mM) en la intensidad de la señal.

2.2.18.2 Detección de radicales libres por EPR utilizando atrapadores de spin en citocromo c expuesto a peroxinitrito

La detección y caracterización de radicales proteicos (tiroxilo) en citocromo c expuesto a cardiolipina y oxidantes se realizó utilizando metil nitroso propano (MNP) como atrapador. Se expuso citocromo c (0,2 mM) en presencia o ausencia de cardiolipina a peroxinitrito (2 mM), en presencia de MNP (22 mM). Los dímeros de MNP que pueden formarse durante la reacción y pueden interferir con la medida se eliminaron por gel filtración utilizando columnas de cromatografía Micro BioSpin 6 (BioRad). Luego de

medir las señales inmobilizadas se realiza la proteólisis utilizando Pronasa (mezcla de enzimas proteolíticas con clivado inespecífico), de manera que la señal se desinmoviliza, pudiendo caracterizarse así el tipo de radical observado de acuerdo al acoplamiento hiperfino determinado.

2.2.18.3 Detección de radicales libres de citocromo c expuesto a peróxido de hidrógeno por EPR de baja temperatura

Los espectros de EPR fueron obtenidos luego de la adición de peróxido de hidrógeno (60 μM) a citocromo c (20 μM) en presencia de liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina (400 μM). Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y los espectros de EPR fueron medidos a 77 K. Se ajustó la concentración de la muestra con la señal obtenida utilizando como estándar 100 μM Cu (EDTA) a 77K. La integración doble de la señal resultante se utilizó para establecer la constante de proporcionalidad entre la concentración de spin en el espectro de EPR con la concentración de la señal, utilizando esta correlación para calcular la concentración de radicales con spin $\frac{1}{2}$ en citocromo c nativo o sus formas mutantes. Estos experimentos fueron realizados por el grupo de V. Kagan, de la Universidad de Pittsburgh, PA, USA.

2.2.19 Fluorescencia de triptófano y tirosina de citocromo c

La fluorescencia de triptófano y tirosina fueron medidos utilizando un fluorímetro Aminco-Bowman Series 2, utilizando longitudes de onda de excitación de 275 y 289 para excitar tirosina y triptófano, respectivamente. Para realizar la medida se incubó citocromo c (5 μM) en presencia o ausencia de cardiolipina, y se expone a peroxinitrito 50 μM . Luego se incubó la muestra en cloruro de guanidinio (5 M) de manera de desplegar la proteína y poder determinar la fluorescencia del triptófano, que es inhibida cuando la proteína se encuentra en su conformación nativa. Para poder analizar de manera separada la fluorescencia de tirosinas y triptófanos se utilizó un mutante de citocromo c mutado en sus cuatro tirosinas por fenilalaninas, de manera de poder sustraer, matemáticamente, el aporte por separado de cada tipo de aminoácido.

Para la detección por separado del aporte a la fluorescencia intrínseca se utilizaron mutantes en cada una de las tirosinas, además del cuádruple mutante. Estos estudios se realizaron en colaboración durante una pasantía en el laboratorio del Dr. Valerian Kagan, Universidad de Pittsburgh, PA, USA.

2.2.20 Análisis estructural

2.2.20.1 Geles nativos para identificación de estructura cuaternaria en MnSOD mutada

Las muestras de MnSOD nativa y mutada en I58T, L60F, C140S, I58T/C140S, L60F/C140S y MnSOD de *E. coli* fueron incubadas en buffer de la muestra conteniendo 0,5% SDS durante 20 minutos previo a la electroforesis. Las muestras fueron sembradas sin ser calentadas previamente en geles de poliacrilamida 10% conteniendo 300 mM de ácido ϵ -aminohexanoico [203]. La electroforesis se realizó en amortiguador Tris-Glicina. Los geles fueron teñidos con tinción de plata, así como revelados con la técnica de NBT-riboflavina para determinar actividad SOD en las diferentes muestras.

2.2.21 NMR paramagnético y diamagnético de citocromo c expuesto a cardiolipina

2.2.21.1 NMR Paramagnético

Citocromo c liofilizado se disolvió en amortiguador fosfato 20 mM preparado con agua deuterada a pH 7. Los espectros de NMR fueron adquiridos utilizando un espectrómetro Bruker Avance II de 600.13 MHz (Frecuencia del ^1H) con pre-saturación de la señal del agua durante el relajamiento. Se utilizó una ventana espectral de 70 ppm, y el ciclo total fue de 300 ms.

2.2.21.2 NMR Diamagnético

Los espectros ^1H - ^{15}N HSQC- NMR de citocromo c marcado uniformemente con ^{15}N se obtuvieron también con un espectrómetro Bruker Avance II de 600.13 MHz. La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el software Topspin Version 3.0 y los espectros se procesaron y analizaron utilizando el programa Sparky.

El espectro control de citocromo c en ausencia de liposomas conteniendo cardiolipina se realizaron con citocromo c wild type recombinante (pseudo wild type) (μM) en amortiguador fosfato 20 mM pH 6,0. Tras el primer espectro se agregó secuencialmente liposomas conteniendo cardiolipina (50% tetraoleil cardiolipina, 50% 1-estearoil, 2-oleil fosfatidil colina) en relaciones lípido/ proteína de 0,5/1; 1/1 y 2/1. Todos los estudios de NMR fueron realizados en laboratorio del Dr. Alejandro Vila, Unidad de Biofísica de proteínas de la Universidad de Rosario, con la ayuda del Dr. Luciano Abriata.

2.2.22 Métodos *in silico*

2.2.22.1 Simulaciones de Dinámica molecular y cálculos de energía libre

Los cálculos de dinámica molecular (Multiple Steered Molecular Dynamics, MSMD) y cálculo de energía libre fueron realizados por Diego Moreno y Leonardo Boechi, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Ver referencia: [170]. Para realizar las simulaciones se utilizaron las estructuras cristalizadas de MnSOD nativa (código PDB 1ABM, y los cambios como la nitración a nivel de la Tyr 34 fueron realizados *in silico*). Se utilizó el programa AMBER 10 para realizar los cálculos (Universidad de California, San Francisco)

2.2.22.2 Simulaciones en GEPASI

Las simulaciones de niveles de metabolitos fueron realizadas utilizando reacciones reportadas en literatura, por medio del programa GEPASI (versión 3.3) [204].

2.2.22.3 Representación gráfica de proteínas

La representación gráfica de proteínas se realizó con el programa VMD de la Universidad de Illinois, USA. Los archivos de estructuras cristalográficas de proteínas se obtuvieron del Protein Data Bank (www.pdb.org)

3 Objetivos

Objetivo 1- Estudio del proceso de nitración de tirosinas mediada por peroxinitrito de dos proteínas mitocondriales: citocromo c y MnSOD

Objetivo específico 1.1: Nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina

- Determinación del mecanismo, magnitud y localización de esta modificación en diferentes condiciones de nitración estudiando el efecto de la cardiolipina en la nitración proteica realizando estudios por inmunquímica, espectrometría de masa, EPR y otras técnicas analíticas.

Objetivo específico 1.2: Formación de especies nitrantes por flujos en presencia de SOD y efecto de las mismas en la actividad enzimática.

- Estudio de la nitración y formación de radicales proteicos en MnSOD y CuZnSOD y su efecto en la actividad enzimática de dichas proteínas detoxificadoras.
- Caracterización cinética de la reacción de MnSOD por peroxinitrito.

Objetivo 2- Caracterización estructural de formas modificadas de citocromo c y MnSOD: interacción de citocromo c y cardiolipina y caracterización de modificaciones estructurales de MnSOD (mutaciones puntuales y nitración)

Objetivo específico 2.1: Estudios estructurales de citocromo c nitrado o asociado a cardiolipina

- Estudio por NMR paramagnético y diamagnético de la interacción de citocromo c con cardiolipina
- Síntesis y purificación de citocromo c carboximetilado y análisis de la formación del Compuesto I de peroxidasa en esta variante por peróxido de hidrógeno en presencia o ausencia de cardiolipina.

- Purificación y caracterización de citocromo c mononitrados, para la generación de anticuerpos monoclonales contra formas modificadas de citocromo c a partir de citocromo c mononitrado en Tyr 74 o 97. Caracterización de anticuerpos anti-citocromo c modificado.
- Estudios de mutantes de citocromo c en diferentes tirosinas analizando la topografía de estos residuos en presencia de cardiolipina y su influencia en la actividad peroxidasa de la proteína.

Objetivo específico 2.2: Estudios estructurales de MnSOD. Efecto de mutaciones puntuales en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína y de la nitración sitio-específica.

- Estudio del efecto de la nitración en Tyr 34 de MnSOD a nivel estructural por estudios *in silico*
- Estudio en la estabilidad de la estructura cuaternaria de MnSOD en presencia de mutaciones puntuales de la enzima en relación con la exposición de tioles de esta enzima.

4 Resultados

Objetivo 1. Estudio del proceso de nitración de tirosinas mediada por peroxinitrito de dos proteínas mitocondriales: citocromo c y MnSOD

Tanto la nitración de tirosinas de citocromo c como de MnSOD han sido procesos ampliamente estudiados por su repercusión en patologías y en alteraciones de la homeostasis redox celular y el proceso de apoptosis, razón por la cual el estudio a nivel bioquímico de la misma se convierte en un objetivo de gran interés.

4.1 Nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina

En los resultados presentados a continuación se estudiará la nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina. La interacción de este lípido con cardiolipina es de amplio interés a nivel biológico ya que se ha planteado un rol preponderante en el inicio de la apoptosis mediada por citocromo c [91]. La nitración de citocromo c en presencia de este lípido no ha sido estudiada previamente, y la misma puede relacionarse con los cambios conformacionales que la misma sufre en presencia de cardiolipina, así como podría afectar su actividad en la cadena respiratoria. A su vez, se trató de elucidar por diferentes técnicas los cambios conformacionales sufridos por el citocromo c en presencia de este lípido en ausencia de agentes oxidantes. En los modelos a estudiar la cardiolipina se agrega en forma de liposomas unilamelares, de manera de simular las condiciones fisiológicas en las cuales el citocromo se encuentra expuesto a dicho lípido. Estos liposomas, además, incluyen un 50% de fosfatidil colina que permite una distribución más homogénea de la cardiolipina.

4.1.1 Detección del aumento de nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina por peroxinitrito

Tal como se muestra en la Fig. 4.1 cuando el citocromo c se expone a citocromo c, aquel en presencia de cardiolipina muestra un incremento en la nitración, detectado por técnicas inmunoquímicas (WesternBlot). En este experimento, se

expuso citocromo c (50µM) a bolos de peroxinitrito (1 mM) incubado previamente en presencia o ausencia de liposomas unilamelares conteniendo tetraoleil cardiopina, en una relación 10:1 cardiopina: citocromo c. Se observó que, en presencia de cardiopina, la nitración tanto del monómero de citocromo c como los dímeros, trímeros y otros oligómeros se encuentra aumentada. Para evitar la presencia de peróxido de hidrógeno en el peroxinitrito agregado las alícuotas de peroxinitrito que se usaron fueron expuestas durante 2 horas a dióxido de manganeso, con agitación. La ausencia de peróxido de hidrógeno indica que la formación de dímeros se da por reacciones dependientes de peroxinitrito y que las mismas también implican la presencia de cardiopina. También se evaluó el efecto del DMPO, un atrapador de radicales libres, en la formación de 3-nitrotirosina. En este caso, la presencia de una concentración relativamente alta de DMPO (22 mM) inhibió por completo la nitración de citocromo c expuesto a peroxinitrito, tanto en presencia como ausencia de liposomas conteniendo cardiopina, lo que indicaría que el proceso de nitración observado presenta un componente que depende de la formación de radicales que son atrapados por DMPO.

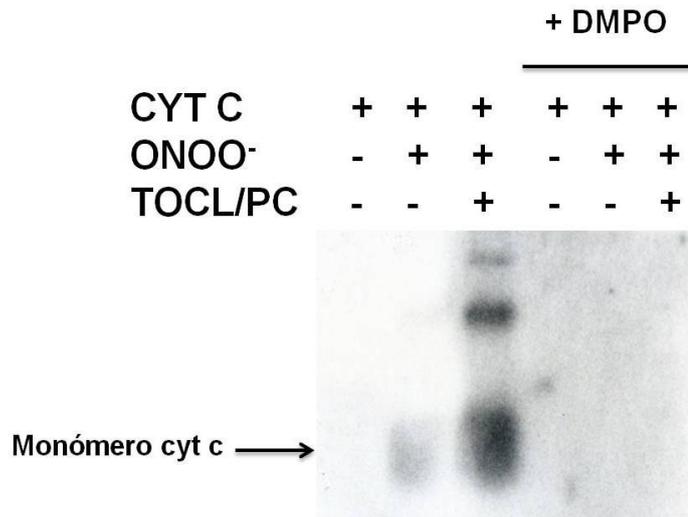


Fig. 4.1. Formación de 3-nitrotirosina en citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia de liposomas conteniendo cardiopina. Aumento en la formación de 3-nitrotirosina en citocromo c (50 µM) control sin tratamiento (carril 1) expuesto a peroxinitrito (1mM) (carril 2 y 3) incubado en ausencia (carril 2) o presencia de liposomas conteniendo cardiopina (0,5 mM) (carril 3). En los carriles de la derecha (carril 4-6) se observa que la formación de 3-nitrotirosina se encuentra inhibida cuando las muestras son co-incubadas con DMPO (22 mM) en condiciones idénticas a las presentadas en los carriles 1 a 3.

4.1.2 Aumento de la formación de radicales libres proteicos en citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia de cardiolipina

Como se ha mencionado anteriormente, la nitración de tirosinas proteicas tiene un intermediario radicalar, el radical tirosilo. Por lo tanto se estudió la formación de radicales libres en esta molécula mediante el estudio por espectrometría de resonancia paramagnética (EPR). Esta técnica permite la detección de electrones desapareados en una gran variedad de moléculas, incluyendo en proteínas. Esta detección se puede determinar de diferentes maneras. La detección por EPR directo permite observar la formación de radicales libres en proteínas, permitiendo determinar la estabilidad y de manera cualitativa, estimar si la formación de los mismos es significativa.

En la Fig. 4.2 se observa un espectro paramagnético de citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia o ausencia de cardiolipina. En presencia de cardiolipina se observa un aumento significativo de la formación de radicales libres proteicos. Esto es concordante con lo observado previamente en la Fig. 4.1, ya que la formación de 3-nitrotirosina está asociada con un paso intermedio donde un radical proteico se localiza a nivel del carbono del anillo aromático de la tirosina.

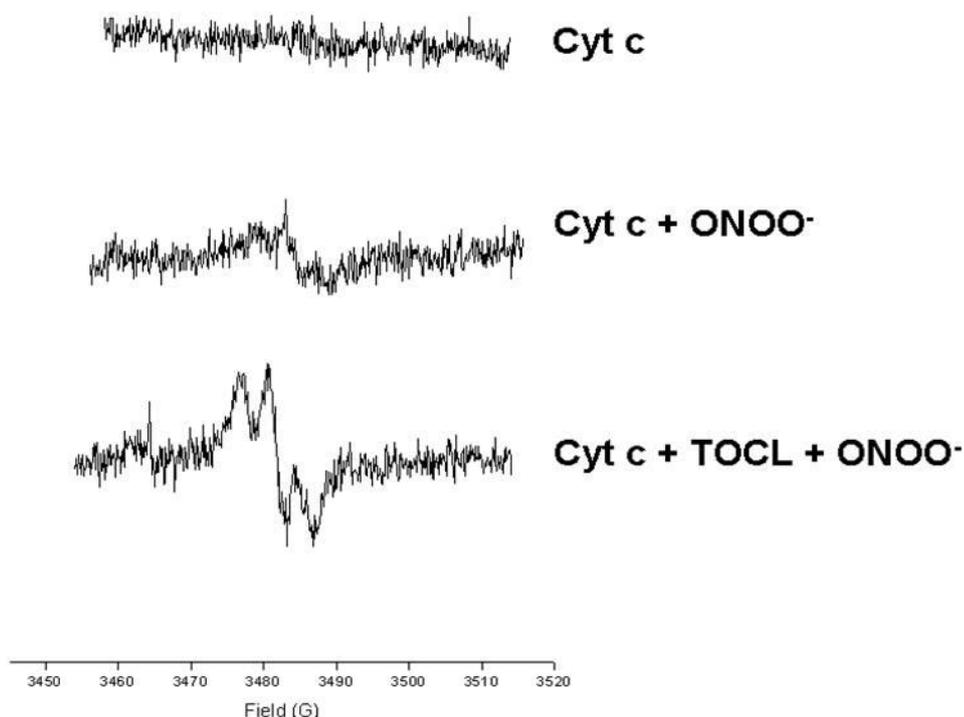
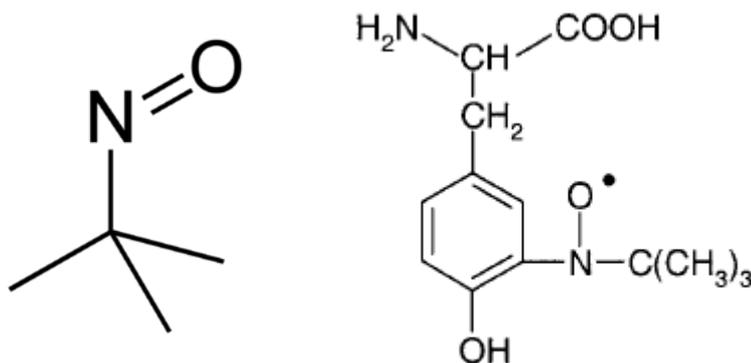


Fig. 4.2. Formación de radicales libres proteicos en citocromo c. Medida por EPR directo de la formación de radicales proteicos en citocromo c (0,5 mM) expuesto a peroxinitrito (3 mM) en presencia o ausencia de liposomas conteniendo cardiolipina (2 mM) comparando la influencia de la última en la intensidad de la señal de EPR. Los parámetros del instrumento

fueron: Amplitud de modulación, 2 G; constante de tiempo, 163,8 s, velocidad de barrido, 5,6 G/2, ganancia, 2×10^5 ; potencia microondas, 20 mW.

La detección de un aumento en la formación de radicales sugiere una mayor reactividad del citocromo c en presencia de cardiolipina al peroxinitrito, lo que sería coherente con un aumento de radical tirosilo, tal como ha sido reportado en citocromo c expuesto a peróxido de hidrógeno [205]. Para determinar la naturaleza de dicho radical se debe utilizar otra técnica de EPR, que incluye la utilización de atrapadores de spin. Los atrapadores de spin son moléculas capaces de reaccionar con radicales centrados en otra molécula, tal como una proteína, generando un radical libre estable, centrado en el propio atrapador de spin, que queda unido a la macromolécula.

Existen diferentes tipos de atrapadores de spin, basados en la naturaleza de los diferentes tipos de radicales a los que se pueden adicionar. El metil nitroso propano (MNP) (Esquema 4.1) es un atrapador de spin que permite la detección de radicales centrados en carbono, como lo es el radical tirosilo [96].



Esquema 4.1. Estructura del metil nitroso propano (MNP) (izq.) y estructura de un aducto de MNP radical con tirosina (der.) (Tomado de Gunther *et al* [206])

A su vez, los radicales estabilizados del atrapador permiten elucidar la naturaleza del residuo (en el caso de una proteína) en el que están asociados [206].

Como se observa en la Fig. 4.3, se expuso citocromo c en presencia o ausencia de liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina, exponiendo la proteína a peroxinitrito. Se observa que, en el caso de la muestra incubada previamente con cardiolipina la señal inmovilizada obtenida es mayor, lo que indica una mayor detección de radicales libres proteicos. Luego se realizó proteólisis de las muestras y se analizó la señal des-inmovilizada. La señal obtenida tras la proteólisis con Pronasa

presenta un acoplamiento hiperfino de 15,5 G, que coincide con la reportada de radical tirosilo tanto a nivel proteico como a nivel del aminoácido aislado [207], lo cual es coherente con el aumento de 3-nitrotirosina obtenido por estudios inmunquímicos.

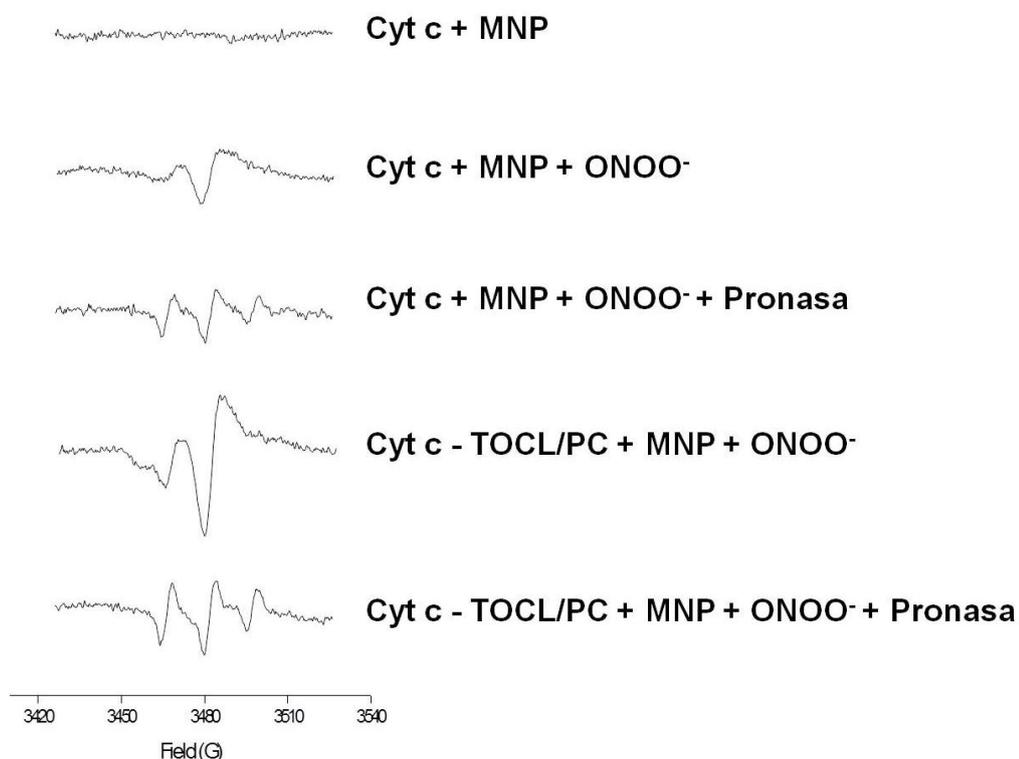


Fig. 4.3. Detección por EPR de la formación de radical tirosilo utilizando como atrapador de radicales MNP. Se expuso citocromo c (0,2 mM) a peroxinitrito (2 mM) en presencia de MNP (22 mM). Se obtuvieron cambios en la intensidad de la señal inmovilizada cuando la muestra fue incubada con liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina (1 mM). Los parámetros del instrumento fueron: Amplitud de modulación, 5 G; constante de tiempo, 328ms, velocidad de barrido, 1,2 G/s, ganancia, 5×10^5 ; potencia microondas, 20 mW. Para obtener los espectros finales se acumularon 5 scans.

Este resultado demuestra que el mecanismo de nitración de citocromo c en estas condiciones implica la formación de un radical tirosilo intermediario, que está aumentada cuando el citocromo c se expone al oxidante en presencia de cardiolipina, sugiriendo un cambio conformacional o un aumento de reactividad de la proteína probablemente mediado por el hierro del grupo hemo.

4.1.3 Identificación de las especies nitradas

La detección del aumento de nitración en presencia de cardiolipina sugiere dos posibilidades: la nitración en un residuo único de más moléculas de citocromo c o la sucesiva nitración de citocromo c para dar formas di, tri o tetra-nitradas. Para determinar que especie o especies son las causantes del aumento de nitración se analizaron muestras de citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia o ausencia de liposomas unilamelares conteniendo cardiolipina mediante cromatografía HPLC midiendo espectrofotométricamente a 280 nm de acuerdo a lo reportado por Batthyany *et al* [73]. Los picos obtenidos se asignaron a diferentes formas tanto mononitradas específicamente como di o tri nitradas. En la Fig. 4.4 se observan los cromatogramas obtenidos, con la asignación de picos correspondiente a análisis por espectrometría de masa o a partir de literatura [73].

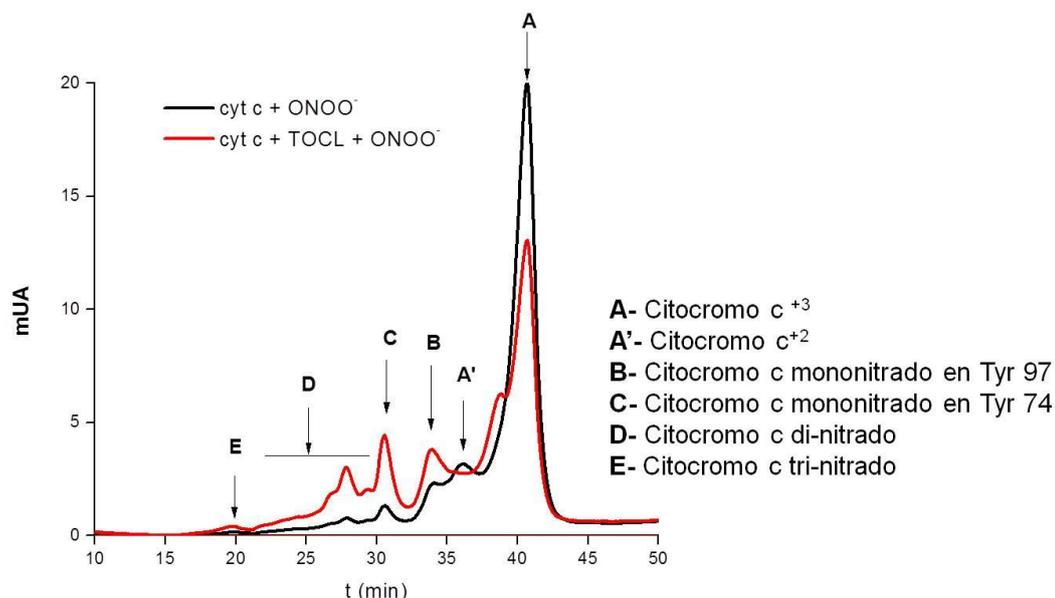


Fig. 4.4. Análisis por HPLC de intercambio catiónica de citocromo c (20 μM) expuesto a peroxinitrito (1 mM) en ausencia (línea negra) o presencia de liposomas conteniendo cardiolipina (100 μM) (línea roja).

Tal como se observa en la Fig. 4.4, y en concordancia con experimentos anteriores, las formas nitradas de citocromo c se ven aumentadas cuando la proteína se expone a peroxinitrito en presencia de cardiolipina.

En cuanto a las características de las muestras nitradas obtenidos se puede observar que se observa un aumento de las formas tri- y di-nitradas, lo cual indicaría una mayor

exposición de tirosinas que no son preferencialmente nitradas, tales como la Tyr 48 y 67. En cuanto a aquellas tirosinas que si son preferencialmente nitradas se observan diferencias. Los picos correspondientes a citocromo c mononitrado tanto de Tyr 74 como en Tyr 97 muestran diferencias en sus alturas relativas, particularmente, un decremento del pico del citocromo c mononitrado en Tyr 97 con respecto al mononitrado en Tyr 74. Se debe notar la existencia de un pico en la condición de citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia de cardiolipina, entre los picos de citocromo c nativo oxidado y reducido. Este pico no ha sido identificado, pero estudios preliminares con muestras de citocromo c mononitrado muestran que el mismo sería un producto derivado de la nitración de citocromo c a nivel de Tyr 97. Dicha modificación no ha sido estudiada en profundidad, por lo que no se ha determinado todavía si conserva la modificación a nivel de la tirosina o el mismo es un derivado oxidado. Dada la posición en que esta especie eluye, así como estudios preliminares por espectrometría de masa es probable que dicha modificación no sea 3-nitrotirosina.

4.1.4 Identificación por espectrometría de masa de las tirosinas nitradas de citocromo c por peroxinitrito estudiando el efecto de la presencia de cardiolipina.

Tras la observación del aumento de nitración de citocromo c por peroxinitrito en presencia de cardiolipina, y la observación de los diferentes tipos de especies detectadas por HPLC, se procedió a la caracterización de dicha nitración. Para ello se realizó un análisis de MALDI-TOF de las muestras de citocromo c (50 μ M) expuestas a peroxinitrito (0,5 mM) en presencia o ausencia de cardiolipina (0,5 mM), estudiando los péptidos obtenidos por digestión con tripsina. La digestión se realizó en las bandas correspondientes al monómero de citocromo c y se analizaron los datos obtenidos utilizando la base de datos MASCOT. En la Tabla 4.1 se observan los resultados obtenidos, donde se muestran los péptidos obtenidos que contienen tirosina, tanto en su forma nitrada como nativa. Estos datos se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos por HPLC mostrando que la nitración de las Tyr 48 y 67, que no son nitradas en un alto porcentaje en ausencia de cardiolipina, es detectada en el caso de la muestra expuesta a peroxinitrito en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina. En particular, la nitración de Tyr67 tiene importancia a nivel estructural ya que dicho aminoácido forma parte de una red de puentes de hidrógeno que incluye al ligando axial Met80 y los aminoácidos conservados Asn52 y Thr78, teniendo un rol importante en el rol de transferencia de electrones de citocromo c controlando el potencial redox de la proteína y modulando la flexibilidad de segmento 65-75 [208].

Estos datos sugieren un cambio conformacional de citocromo c cuando se expone a liposomas conteniendo cardiolipina que harían más accesibles al peroxinitrito residuos que en ausencia del lípido no son modificados en cantidad detectable. Si bien la nitración no es confirmada por MS/MS, la diferencia de 45 Da, característica de el aumento en $-\text{NO}_2$ y la presencia de un solo aminoácido nitrable por péptido (salvo en el caso del péptido conteniendo triptófano) sugieren fuertemente que la nitración sucede en los puntos marcados en la tabla.

La razón por la que no se pudo realizar MS/MS en estos péptidos es la baja señal obtenida, que dificulta la elección de un pico en particular y tener una señal significativa. Como se observa en la Fig. 4.4., el perfil de nitración de citocromo c no llega al 100%, siendo el citocromo c sin modificar el producto mayoritario. Esto implica que en los estudios realizados, donde se toma la mezcla de proteínas nitradas a partir de la banda en un gel la proporción de proteínas nitradas es baja con respecto a las proteínas sin modificar, lo que dificulta por tanto la secuenciación de los mismos por técnicas de espectrometría de masa.

Es de notar que el péptido que contiene a la tirosina 74 no fue detectado. La razón de ello es que el péptido tríptico que contiene dicha tirosina es pequeño y con varios sitios de corte cercanos, lo que hace difícil su detección. Sin embargo el pico obtenido por HPLC ha sido ampliamente caracterizado, de manera que la nitración en este aminoácido tanto en presencia como ausencia de cardiolipina se agrega al los aminoácidos detectados, particularmente dada el alto rendimiento de esta especie nitrada en las diferentes condiciones testeadas.

Péptidos conteniendo Tirosina						
Muestra	m/z Péptido nitrado medido (Secuencia asignada)	m/z Péptido control (Secuencia asignada)	Número secuencia	Posible sitio de nitración	Nitración	Δ m/z Calculado
Citocromo c control	ND	1470.6272 (K.TGQAPGFTYTDANK.N)	40-53	48	NO	----
	ND	2080.9280 (K.GITWKEETLMEYLENPK.K)	56 - 72	67	NO	----
	ND	1623,7333 (K.EETLMEYLENPKK.Y)	61 - 73	67	NO	----
	ND	964.4931 (R.EDLIAYLK.K)	92 - 99	97	NO	----
	ND	ND	-----	74	ND	----
Citocromo c + ONOO ⁻	1395.6492 K.TEREDLIAYLK.K	1350.6676 K.TEREDLIAYLK.K	89-99	97	SI	44,982
	1009.4705 K.TEREDLIAYLKK.A	964.4847 K.TEREDLIAYLKK.A	92-99	97	SI	44,986
	1540.6122 K.EETLMEYLENPK.K	1495.6342 K.EETLMEYLENPK.K	61-72	67	SI	44,978
	ND	1470.6279 K.TGQAPGFTYTDANK.N	40-53	48	NO	----
	ND	ND	-----	74	ND	----
Citocromo c + TOCL + ONOO ⁻	1515.5367 K.TGQAPGFTYTDANK.N	1470.5597 K.TGQAPGFTYTDANK.N	40-53	48	SI	44,977
	2125.8159 K.GITWKEETLMEYLENPK.K	2080.8394 K.GITWKEETLMEYLENPK.K	57-73	67	SI	44,976
	2253.9075 K.GITWKEETLMEYLENPKK.Y	2208.9238 K.GITWKEETLMEYLENPKK.Y	57-74	67	SI	44,9837
	1395.5967 K.TEREDLIAYLK.K	1350.6233 K.TEREDLIAYLK.K	90 - 100	97	SI	44,9734
	1523.6766 K.TEREDLIAYLKK.A	1478.6962 K.TEREDLIAYLKK.A	90 - 101	97	SI	44,9804
	ND	ND	----	74	ND	----

Tabla. 4.1. Péptidos obtenidos tras la digestión trípica de citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia o ausencia de liposomas conteniendo cardiolipina, detectados por espectrometría de masa (MALDI-TOF).

4.1.5 Cuantificación de la formación de 3-nitrotirosina por espectrometría de masa

Dado que se detectó cualitativamente que en citocromo c la formación de 3-nitrotirosina por peroxinitrito en presencia de cardiolipina es mayor, se decidió realizar un estudio analítico cuantitativo. Dicho análisis consiste en la hidrólisis total de las muestras expuestas a peroxinitrito en presencia o ausencia de cardiolipina y posterior cuantificación por espectrometría de masa, utilizando estándares pesados de tirosina y 3-nitrotirosina para realizar los controles internos. Además de la hidrólisis, para realizar la cuantificación se realizó una curva de calibración, también con estándares internos, que controlan posibles pérdidas de muestra que pueden ocurrir durante la manipulación.

Los resultados obtenidos se aprecian en la Tabla 4.2.

Muestra	3-NO ₂ Tirosina (p moles)	Tirosina (p moles)
Cyt c	ND	504
Cyt c + ONOO-	10.3	381
Cyt c + CL	ND	395
Cyt c + CL + ONOO-	82.5	329

Tabla. 4.2. Cuantificación de 3-nitrotirosina en muestras de citocromo c (150 pmoles totales de proteína, 600 pmoles totales de tirosina) expuesto a peroxinitrito (1mM) en presencia o ausencia de liposomas conteniendo cardiolipina (relación lípido/proteína: 5/1).

Es de notar que existe pérdida de muestra en los pasos previos al agregado de los estándares interno, debido a que existe un paso de gel filtración preliminar, que elimina el exceso de cardiolipina en las muestras y que en dicho paso no se puede agregar estándares de bajo peso molecular, dado que quedarían retenidos.

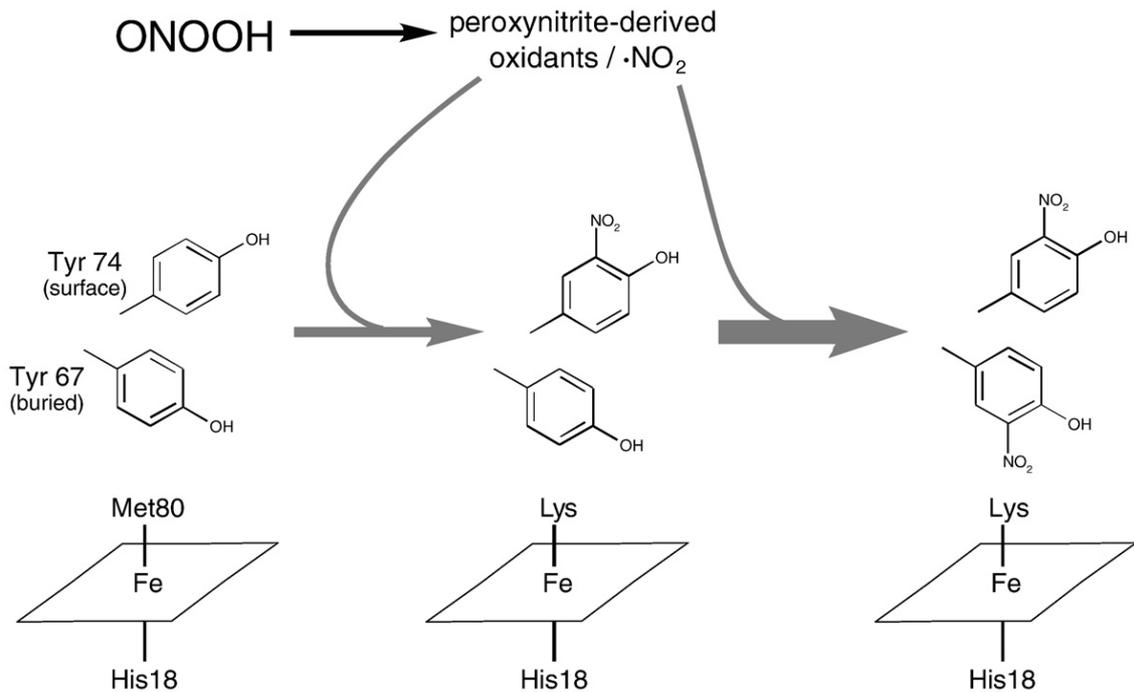
Los resultados muestran un aumento claro de la formación de 3-nitrotirosina en la muestra. Tomando como cantidad de tirosina total la suma de tirosina y 3-nitrotirosina, los resultados obtenidos muestran un aumento de nitración cercano a 7 veces en la condición de nitración en presencia de cardiolipina (Tabla 4.3.). Estos datos son acordes con los resultados obtenidos previamente, tanto por técnicas inmunoquímicas como HPLC y espectrofotometría.

Muestra	% de 3-NO ₂ Tirosina
Cyt c + ONOO-	2.6
Cyt c + CL + ONOO-	20.04

Tabla. 4.3. Porcentajes de formación de 3-nitrotirosina por peroxinitrito en citocromo c incubado en presencia o ausencia de liposomas conteniendo cardiolipina.

En cuanto a los rendimientos de nitración expresados por molécula de peroxinitrito agregada, los mismos son de 1 molécula de 3-nitrotirosina formada cada 8000 moléculas de peroxinitrito en el caso de citocromo c expuesto a peroxinitrito, valor que aumenta a 1 en 1000 en el caso de citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina.

Los resultados obtenidos hasta ahora de citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia de cardiolipina muestran que la proteína es claramente más susceptible a la nitración que la proteína en ausencia del lípido. Dicho cambio puede tener dos factores, un cambio conformacional, generado por el lípido, el cual podría exponer tirosinas al oxidante que de otra manera estarían protegidas o una ganancia de reactividad del citocromo (actividad peroxidasa), que podría, tras la reacción con peroxinitrito, generar especies oxidantes derivadas y posteriores nitraciones, tal como ha sido sugerido en la literatura (Esquema 4.2.) [75], si bien no se pudo detectar una reacción directa entre peroxinitrito y citocromo c oxidado expuesto a liposomas conteniendo cardiolipina.



Esquema 4.2. Cambios en la coordinación del grupo hemo de citocromo c por nitración de tirosinas. Los radicales derivados de peroxinitrito son capaces de nitrar las tirosinas 74 o 97 de citocromo c. Tras la nitración de tirosinas, particularmente Tyr 74, se induce un desplazamiento de la Met80 de la sexta posición de coordinación del hierro del grupo hemo que permitiría la modificación (nitración) de otros residuos cercanos al hemo, por ejemplo la Tyr67. Tomado de Souza et al [75]

4.1.6 Evaluación de modificaciones en el Trp 59 por fluorescencia

Dado que el triptófano ha sido reportado como uno de los residuos capaces de ser nitrados por peroxinitrito [209] y el citocromo c posee un residuo de triptófano en su secuencia, se analizó la fluorescencia del mismo tras la exposición a peroxinitrito en presencia o ausencia de liposomas conteniendo cardiolipina. Este dato es particularmente interesante en este trabajo ya que en el caso de la detección de la nitración de la Tyr 67 en citocromo c expuesto a peroxinitrito en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina, realizada por espectrometría de masa, los péptidos detectados contienen al Trp59 en su secuencia, por lo que es de suma importancia descartar que dicho aumento en +45Da, asociado a la nitración de tirosinas no se deba a la nitración de este residuo de triptófano. Como se mencionó anteriormente, la secuenciación de los péptidos obtenidos por tripsinización de las muestras en gel no dieron resultados significativos, por lo que se decidió realizar otro estudio para descartar o confirmar la nitración de Trp59 en citocromo c.

Tal como se observa en la Fig. 4.5., la exposición de citocromo c a peroxinitrito en presencia o ausencia de cardiolipina no modifica el espectro de emisión de fluorescencia de triptófano ($\lambda_{ex}=289$ nm), que disminuye significativamente cuando este residuo se encuentra nitrado. Para realizar esta medida se utilizó citocromo c “pseudo-wild type” y citocromo c mutado en todas las tirosinas por fenilalanina. Esto permitió sustraer matemáticamente el aporte de las tirosinas a la fluorescencia a esta longitud de onda de acuerdo a lo reportado por Kapralov y colaboradores [88].

Esto permite inferir que los residuos modificados por peroxinitrito son efectivamente las tirosinas y que incluso en presencia de cardiolipina, donde se genera un cambio conformacional que expondría ciertos aminoácidos que no serían reactivos en ausencia de este lípido, el residuo de triptófano no se modifica.

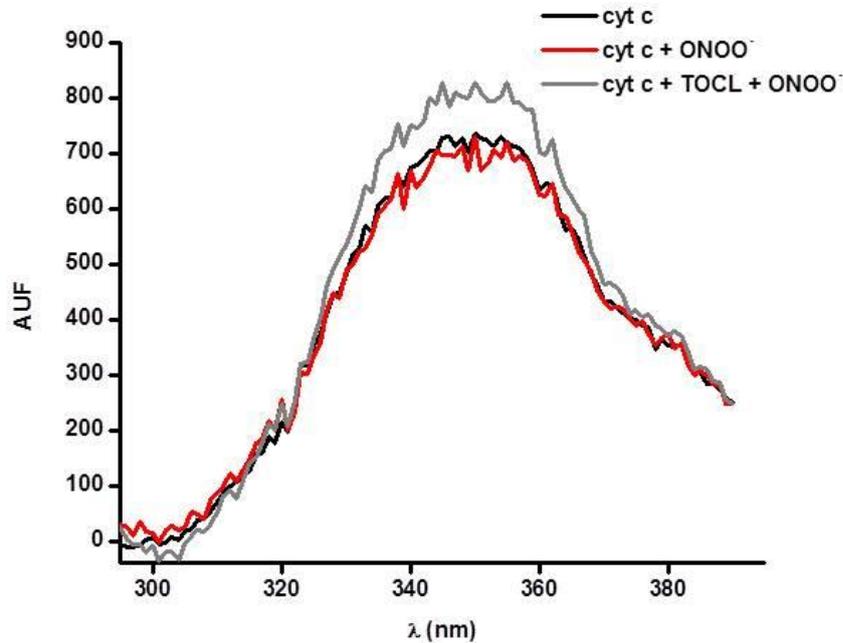


Fig. 4.5. Espectro de emisión de triptófano 59 de citocromo c. Espectro de emisión de triptófano ($\lambda_{ex}=289$ nm) de citocromo c (línea negra) expuesto a peroxinitrito en presencia (línea gris) o ausencia (línea roja) de liposomas conteniendo cardiolipina, incubado en cloruro de guanidinio (5M). La fluorescencia de tirosinas fue sustraída matemáticamente.

4.2 Formación de especies nitrantes por flujos de óxido nítrico y superóxido en presencia de SOD y efecto de las mismas en la actividad enzimática.

Las superóxido dismutasas, al ser enzimas detoxificadoras del radical superóxido son vitales para mantener a concentración baja este radical, el cual, tras la rápida reacción con óxido nítrico puede formar peroxinitrito el cual, como se mencionó previamente, es una molécula altamente oxidante y nitrante.

Estudios previos han demostrado que tanto la CuZnSOD [159] como la MnSOD [40] son inactivadas por peroxinitrito. Es por lo tanto de interés determinar si, en presencia de SOD, flujos de superóxido y óxido nítrico son capaces de reaccionar para formar peroxinitrito, con la consiguiente inactivación de las SOD, lo que generaría una retroalimentación positiva para la formación de peroxinitrito ya que al inactivarse las SOD, más superóxido estaría disponible para reaccionar con óxido nítrico, formando más peroxinitrito capaz de inactivar aún más SOD. Sin embargo, esta situación genera un “dilema cinético” ya que las SOD, tal como se mencionó previamente, reaccionan con superóxido con una constante cercana al límite de difusión por lo que asumir que el peroxinitrito en estas condiciones pueda de hecho formarse es una de las variables a definir en este estudio, utilizando tanto técnicas de análisis *in vitro* como *in silico*. En esta parte se estudiará entonces la actividad de las SOD (CuZnSOD y MnSOD) en presencia de flujos simultáneos de óxido nítrico y superóxido en diferentes condiciones, así como la nitración de MnSOD la cual, como se ha reportado previamente [50], es la causa de su inactivación, particularmente a nivel de la tirosina 34 de esta proteína.

4.2.1 Estudio de la actividad y nitración de CuZnSOD y MnSOD expuestas a flujos simultáneos de óxido nítrico y superóxido

Tal como se observa en la Fig. 4.6. la exposición de CuZnSOD (5 μ M) y MnSOD (5 μ M) a flujos simultáneos equimolares (10 μ M/min) de superóxido y óxido nítrico llevó a la inactivación dosis-dependiente de ambas enzimas, obteniéndose un máximo de 60% de inactivación a los 30 minutos de incubación (Fig. 4.6.A). La inactivación fue verificada también por geles de actividad en el caso de CuZnSOD, observándose también un comportamiento dosis dependiente (Fig. 4.6.B).

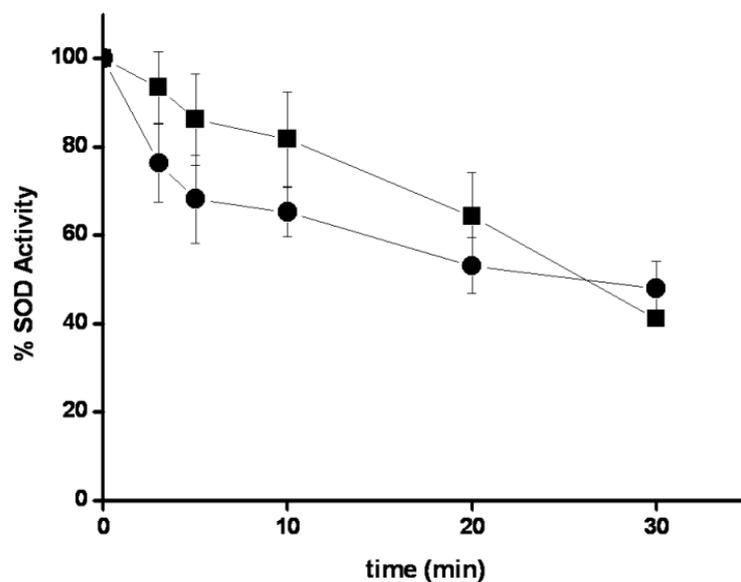
Dado que ambas enzimas son inactivadas por peroxinitrito, esta inactivación indicaría que la formación de peroxinitrito ocurre en presencia de estas enzimas detoxificadoras. Debido a que la inactivación de MnSOD por peroxinitrito ocurre específicamente por la nitración de la tirosina 34, se realizó un análisis inmunoquímico

de la formación de MnSOD bajo las mismas condiciones (Fig. 4.6.C). Tal como se observa en la Fig., la nitración de MnSOD también demuestra un comportamiento dependiente del tiempo de exposición a flujos, mostrando una relación entre los perfiles de actividad determinados previamente, lo que indicaría que la nitración de MnSOD está relacionada con la pérdida de actividad observada.

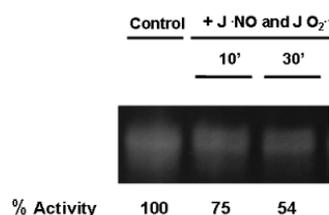
Como control, se evaluó el efecto de los flujos por separado, para eliminar como causa de inactivación cada uno de los radicales por separado, así como productos derivados de los mismos, ya sea por subproductos generados por la degradación de los radicales (como es el peróxido de hidrógeno) o el ácido úrico, sub producto de la reacción de generación de superóxido por el sistema xantina/ xantina oxidasa.

Tal como se observa en la Tabla 4.4 se muestran las actividades de CuZnSOD y MnSOD (5 μ M) expuestas a flujos de óxido nítrico y superóxido (10 μ M/min, 10 min), estudiando además el efecto del agregado de uricasa (2 U/mL), catalasa (100 U/mL) y peróxido de hidrógeno (50 μ M).

A



B



C

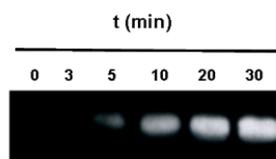


Fig. 4.6. Inactivación dependiente del tiempo de MnSOD y CuZnSOD expuestas a flujos de superóxido y óxido nítrico. (A) Curso temporal de la actividad de CuZnSOD y MnSOD (5 μ M) expuesta a flujos equimolares de óxido nítrico y superóxido (10 μ M/min) (37°C, pH 7,4). (B) Gel nativo de actividad de CuZnSOD expuesta a flujos de óxido nítrico y superóxido expuesta a los mismos durante 0, 10 y 30 minutos. La actividad SOD se detecta como bandas sin color. (C) Inmunodetección de la formación de 3-nitrotirosina en MnSOD (5 μ M), expuesto a flujos equimolares de óxido nítrico y superóxido (10 μ M/min) durante 0, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos.

Condición	CuZnSOD	MnSOD
	% Actividad	% Actividad
Control (SOD)	100 ± 7	100 ± 5
SOD + J [•] NO y JO ₂ ^{•-}	66 ± 13	68 ± 14
SOD + J [•] NO	99 ± 11	94 ± 2
SOD + J O ₂ ^{•-}	92 ± 8	99 ± 6
SOD + J [•] NO y JO ₂ ^{•-} + uricasa	78 ± 3	52 ± 4
SOD + J [•] NO y JO ₂ ^{•-} + catalasa	77 ± 12	58 ± 5
SOD + J [•] NO y JO ₂ ^{•-} + H ₂ O ₂	72 ± 15	63 ± 9

Tabla. 4.4. Actividad de MnSOD y CuZnSOD expuestas a flujos de óxido nítrico y superóxido (J[•]NO y JO₂^{•-}, respectivamente), en presencia de uricasa, catalasa y peróxido de hidrógeno.

Por otra parte, para determinar el mecanismo por el que sucede este proceso, se realizaron estudios de detección de radicales proteicos.

En este caso se utilizaron técnicas inmunoquímicas que permiten detectar atrapadores de spin (DMPO) tras su decaimiento a nitrona utilizando un anticuerpo anti-DMPO que detecta dicho compuesto unido a proteínas. Esta técnica permite detectar de manera muy sensible la formación de radicales proteicos, sin la necesidad de utilizar técnicas como el EPR, que requieren una cantidad de proteína alta para poder detectar una señal adecuada.

La detección de radicales proteicos es sumamente importante tanto para el caso de MnSOD, donde la formación de un radical en un residuo de tirosina es parte del mecanismo propuesto, como para CuZnSOD, ya que al carecer de tirosinas en su secuencia la determinación de la formación de radicales aportaría datos sobre el mecanismo de inactivación. En el caso de CuZnSOD, reportes previos mostraron que cuando se expone la proteína a peroxinitrito se detecta un radical histidinilo, sugiriendo que dicho radical estaría interviniendo en la inactivación de la proteína [159].

Tal como se observa en la Fig. 4.7., tras la exposición a flujos simultáneos de óxido nítrico y superóxido, se detecta la generación de un radical proteico tanto en el caso de CuZnSOD como en MnSOD. En el caso de CuZnSOD (Fig. 4.7.A se detecta que la señal del radical es dependiente del tiempo de exposición a los flujos, de manera similar a la inactivación de la proteína. La detección de un radical proteico en estas

condiciones apoya la hipótesis de la formación de un radical histidinilo involucrado en la inactivación de la proteína.

Dicho radical puede evolucionar a otros compuestos tales como nitrohistidina, y otros derivados oxidados.

En el caso de la MnSOD se expuso la muestra a flujos simultáneos de superóxido y óxido nítrico y a peroxinitrito, en presencia o ausencia de DMPO. Tal como se observa en la Fig. 4.7.B. la presencia de DMPO disminuye la nitración en MnSOD, y se detecta la presencia de radicales, confirmando que el mecanismo de nitración en MnSOD depende de un paso intermedio de formación de radicales proteicos. Esto es de importancia dado que apoya la hipótesis de que un oxidante fuerte (peroxinitrito) se está formando durante la incubación de la proteína, a pesar de la presencia de superóxido dismutasa catalizando la desaparición superóxido.

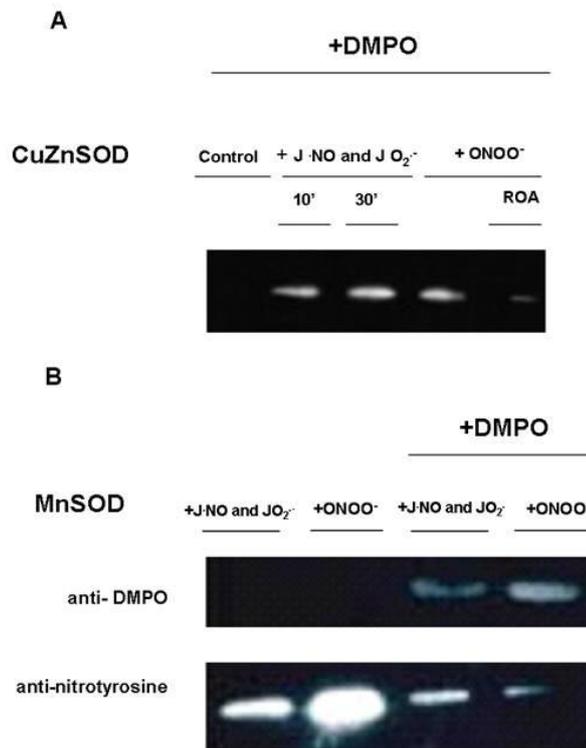


Fig. 4.7. Formación de radicales libres en CuZnSOD y MnSOD expuesta a flujos de óxido nítrico y superóxido. A. CuZnSOD (5 μ M) se expuso a flujos equimolares de superóxido y óxido nítrico (10 μ M/min) durante 10 y 30 minutos y a peroxinitrito (100 μ M) ROA: Adición de peroxinitrito descompuesto. B. MnSOD (5 μ M) se expuso a flujos equimolares de superóxido y óxido nítrico (10 μ M/min) y a peroxinitrito (100 μ M) en presencia o ausencia de DMPO (22mM) evaluando la formación de radicales proteicos (panel superior) o nitración de tirosinas (panel inferior).

Para poder justificar cinéticamente cómo se forma peroxinitrito a partir de superóxido y óxido nítrico en presencia de superóxido dismutasa se realizaron simulaciones computacionales, donde se emularon las condiciones experimentales (SOD 5 μM ; flujos equimolares de superóxido y óxido nítrico 10 $\mu\text{M}/\text{min}$), junto con las reacciones que se muestran en la Tabla 4.5.

Reacción	k	Referencia
1) $\text{O}_2^{\bullet-} + \bullet\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$	$5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[22]
2) $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{SOD} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{SOD}_{\text{red}}$	$2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[210]
3) $\text{SOD}_{\text{red}} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{SOD} + \text{H}_2\text{O}_2$	$2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[210]
4) $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	$2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[211]
5) $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	0.63 s^{-1}	[212]
6) $\text{ONOO}^- \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{OH}$	0.27 s^{-1}	[212]
7a) $\text{CuZnSOD} + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{CuZnSOD}_{\text{inactiva}}$	$9.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[159]
7b) $\text{MnSOD} + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{MnSOD}_{\text{inactiva}}$	$1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[18]
8) $\bullet\text{OH} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \bullet\text{NO}_2$	$1.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[213]
9) $\bullet\text{OH} + \bullet\text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+$	$2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[213]
10) $\bullet\text{OH} + \bullet\text{NO}_2 \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}^+$	$4.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[214]
11) $\bullet\text{OH} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^-$	$7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[213]
13) $2 \bullet\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \bullet\text{NO}_2$	$2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$	[215]
14) $\bullet\text{NO} + \bullet\text{NO}_2 \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_3$	$1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (f) ^a	[213]
15) $2 \bullet\text{NO}_2 \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_4$	$8.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (r) $4.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (f) $6.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (r)	[213]
16) $\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$	$8.2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ ^b	[215]
17) $\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$	$1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	[216]
18) $\text{NO}_2\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} \rightleftharpoons \text{O}_2\text{NOO}^-$	$4.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (f) 1.1 s^{-1} (r)	[217]
19) $\text{O}_2\text{NOO}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{O}_2$	1.3 s^{-1}	[217]
20) $\text{N}_2\text{O}_3 + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + 2 \bullet\text{NO}_2$	$3.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[218]
21) $\text{ONOO}^- + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{ONOO}\bullet + \text{OH}^-$	$4.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[214]

Tabla. 4.5. Reacciones que tienen lugar cuando se genera óxido nítrico y superóxido simultáneamente en presencia de superóxido dismutasa. (f) y (r) representan las constantes cinéticas en avance y en reversa, respectivamente.

En la Fig. 4.8 se muestran los perfiles de concentración en función del tiempo de las especies de interés (superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito) en presencia o ausencia

de superóxido dismutasa. Los resultados obtenidos muestran un cambio dramático en los estados estacionarios de superóxido, que cambia de concentraciones en el rango de nM a pM, y de óxido nítrico, que cambia su concentración transitoria del orden de nM a μM en presencia de SOD. Sin embargo, y sorprendentemente, en presencia de SOD la formación de peroxinitrito decrece solamente $\sim 37\%$, demostrando por lo tanto que peroxinitrito se puede formar a partir de superóxido y óxido nítrico a pesar de la dismutación catalítica de superóxido y es capaz entonces de reaccionar con diferentes blancos, incluyendo a la propia SOD.

En el organismo no sólo existen enzimas detoxificantes sino también otros agentes de bajo peso molecular que actúan como antioxidantes contra especies reactivas. Si bien en nuestro sistema se pudo determinar que se forma peroxinitrito y que dicha molécula es capaz de inactivar (vía nitración u oxidación) a las dos SOD testeadas, estos estudios fueron realizados en ausencia de otros agentes antioxidantes. Por ello se realizaron estudios incubando ambas enzimas a flujos de óxido nítrico y superóxido, en presencia de antioxidantes, particularmente ácido úrico, molécula que ha sido ampliamente reportada como atrapador de moléculas derivadas del peroxinitrito tales como dióxido de nitrógeno y radical hidroxilo [195, 219, 220] y glutatión, el cual reacciona tanto con peroxinitrito ($k=1.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [221] como con dióxido de nitrógeno ($k=2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [222].

Los resultados obtenidos, tal como se observa en la Fig. 4.9 muestran que, en presencia de ácido úrico, la inactivación no se afecta, si bien si disminuyó la nitración de tirosinas en MnSOD. Los mismos resultados se observaron en el caso de la adición de peroxinitrito en bolo, realizado como control. Un resultado llamativo es el que se observa en el estudio de la nitración de MnSOD en presencia de glutatión (Fig. 4.9.D) por flujos de óxido nítrico y superóxido, donde se observó que la nitración, si bien disminuye en presencia del agente antioxidante, no se inhibe completamente, como es el caso cuando se expone la enzima a peroxinitrito en bolo o flujo en presencia de glutatión. Este resultado podría indicar que la nitración mediada por flujos de óxido nítrico y superóxido no depende exclusivamente de la formación de peroxinitrito sino que la presencia de óxido nítrico y otros oxidantes, podría ser capaz que nitrar la enzima, probablemente luego de la generación de radical tirosilo por un oxidante fuerte generado en el sistema.

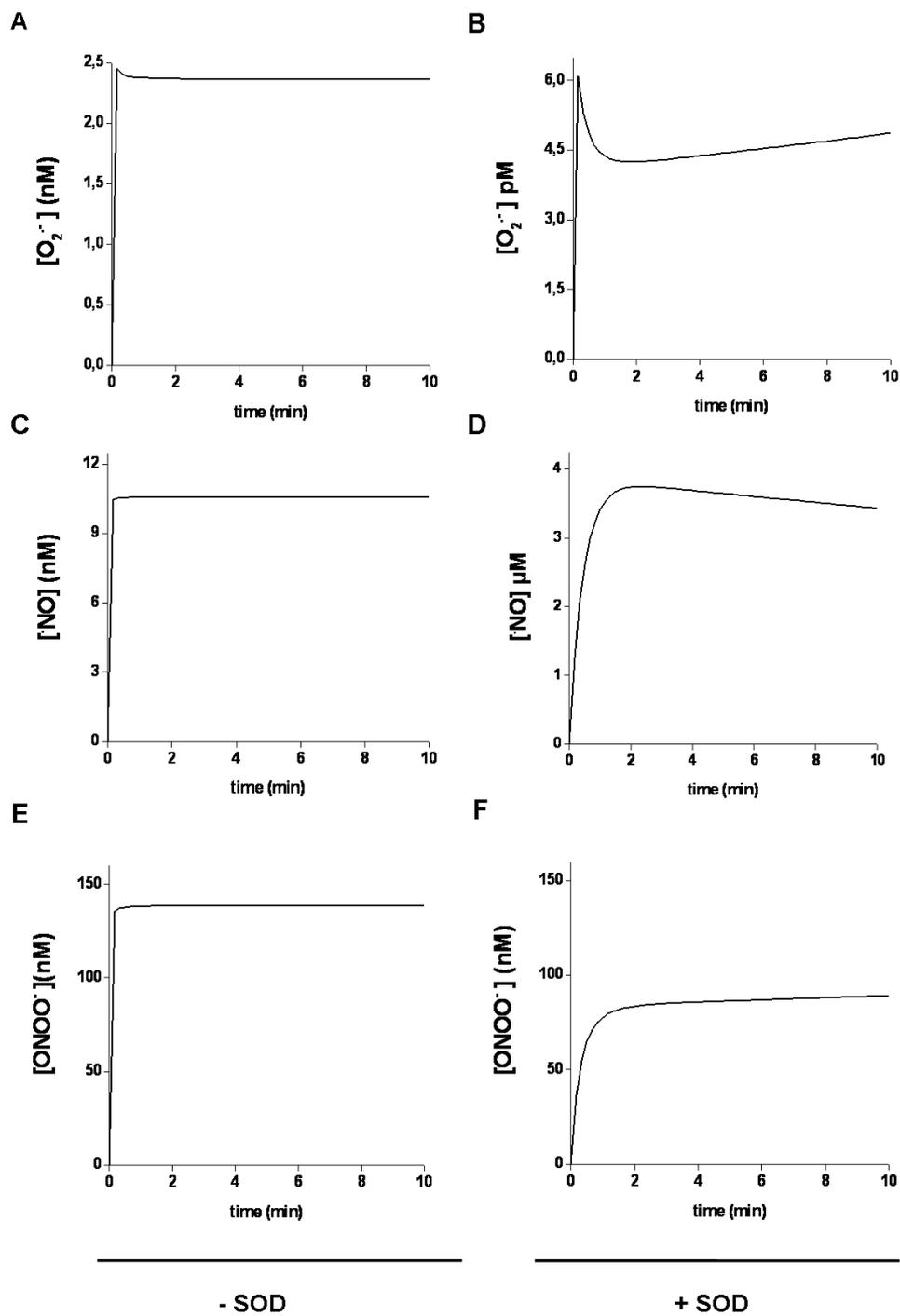


Fig. 4.8. Simulaciones computacionales de la concentración de superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito en las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos en presencia o ausencia de SOD. Las condiciones simuladas son flujos equimolares de superóxido y óxido nítrico en presencia de CuZnSOD 5 μ M, utilizando las reacciones presentadas en la Tabla 4.5.

A nivel celular la generación de los flujos de oxidantes no es necesariamente equimolar, por lo que se estudió la actividad y nitración de CuZnSOD y MnSOD en presencia de flujos de óxido nítrico y superóxido en diferentes relaciones. Tal como se observa en la Fig. 4.10 cuando la SODs fueron expuestas a un flujo constante de superóxido (10 o 30 $\mu\text{M}/\text{min}$), variando el flujo de óxido nítrico la inactivación enzimática se mantiene (Fig. 4.10 A y B), llegando a un máximo de inactivación cercano al 40- 50% a una relación de flujos de 3/1 óxido nítrico/ superóxido donde la concentración de peroxinitrito calculada por métodos computacionales llega a una meseta (Fig. 4.10.A inset). Esto indica que la inactivación de las enzimas se relaciona directamente con la formación de peroxinitrito en el sistema y no con la formación de

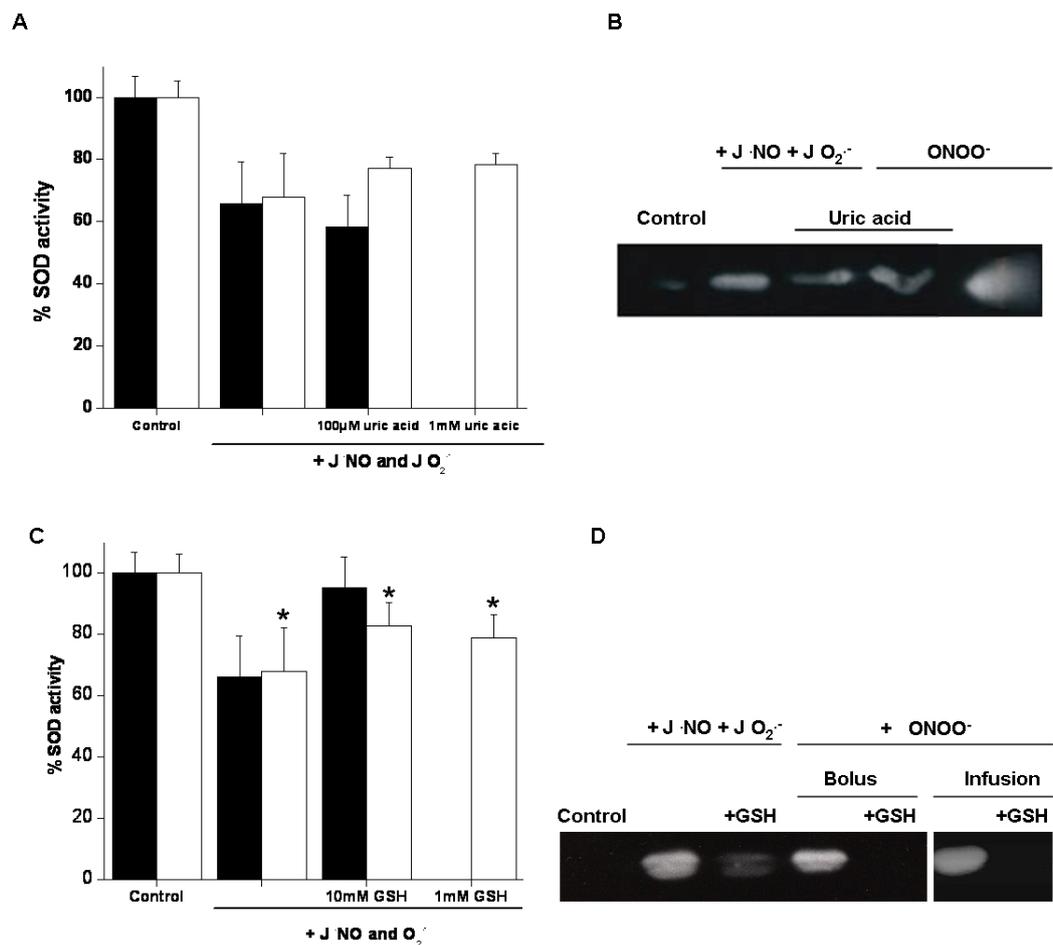


Fig. 4.9. Efecto del ácido úrico y el glutatión en la actividad y nitración de SOD. (A y C) Actividad de CuZnSOD (barras negras) y MnSOD (barras blancas) ($5\mu\text{M}$) luego de la exposición a flujos de óxido nítrico y superóxido ($10\mu\text{M}/\text{min}$, 10 min) en ausencia o presencia de ácido úrico ($100\mu\text{M}$ y 1mM) o glutatión (1 y 10mM). (B y D) Detección inmunoquímica de 3-nitrotirosina en muestras de MnSOD expuestas a flujos de óxido nítrico y superóxido en presencia o ausencia de ácido úrico (1mM) o glutatión (10mM) en las mismas condiciones que en A y C. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa utilizando el test LSD ($p < 0.05$).

radicales, los cuales, al variar la relación de los flujos estudiados presentan una variación tipo campana, disminuyendo la generación de dióxido de nitrógeno y radical hidroxilo a medida que aumenta la generación de uno de los flujos.

Sin embargo, la nitración de MnSOD no tuvo el mismo comportamiento, ya que la misma aumentó linealmente al aumentar la relación de óxido nítrico/superóxido (Fig. 4.10. B inset). Esto es coherente con los resultados observados en la Fig. 4.9, donde el agregado de glutatión a la muestra durante la exposición a flujos de óxido nítrico y superóxido no inhibe la nitración. Esto indica que parte de la nitración, aunque no la inactivación dependiente de esta modificación es mediada por óxido nítrico u otro derivado.

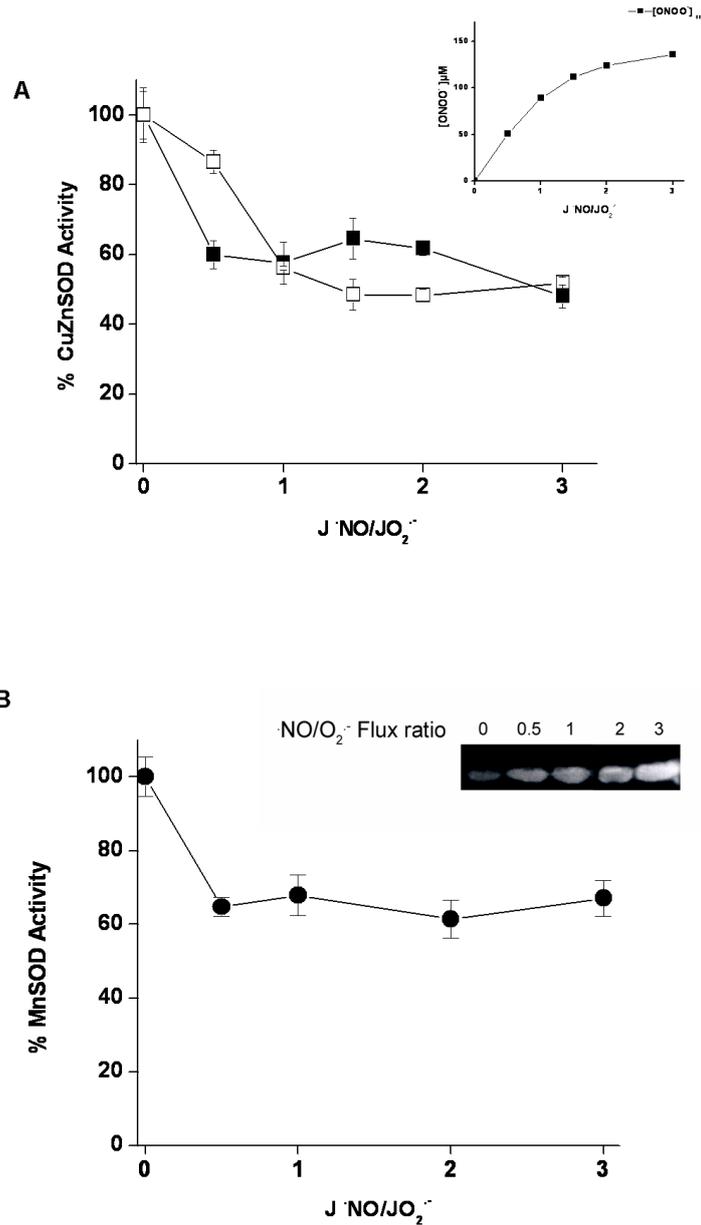


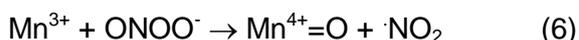
Fig. 4.10. Efecto de la variación de la relación de los flujos de óxido nítrico / superóxido en la actividad de CuZnSOD y MnSOD. (A) Se expuso CuZnSOD (5μM) a un flujo constante de superóxido, 10 μM/min por 10 min (■) o 30 μM/min por 3 min (□), variando la generación de óxido nítrico de 5 a 30 o 15 a 90 μM/min. Inset: Simulaciones computacionales de los niveles de estado estacionario de peroxinitrito alcanzados a diferentes relaciones de flujos de óxido nítrico/superóxido utilizando las reacciones presentadas en la Tabla 4.3. (B) Se expuso MnSOD a un flujo constante de superóxido (10μM/min) durante 10 minutos, variando el flujo de óxido nítrico de 5 a 30 μM (min. Inset: Inmunodetección de la formación de 3-nitrotirosina en las muestras.

4.2.2 Determinación de la constante de reacción de MnSOD con peroxinitrito

Debido a la controversia entre las constantes de reacción de MnSOD con peroxinitrito y dado que los resultados difieren entre sí por varios órdenes de magnitud se estudió nuevamente la reacción de MnSOD (utilizando la enzima humana) con peroxinitrito.

Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 4.11. En este caso se observaron diferencias con las dos constantes reportadas, obteniéndose un valor $4,8 \pm 0,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por monómero ($1,92 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por tetrámero). Este valor de reacción se encuentra en el orden de la constante reportada para CuZnSOD con peroxinitrito ($9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por monómero, $1,86 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por dímero) [159]. La similitud de la constante entre ambas metaloenzimas, que poseen características estructurales similares, es esperable.

Es de notar que los valores obtenidos en este caso se determinaron por un ajuste no lineal, a un decaimiento exponencial de primer orden. Esto es llamativo ya que las constantes reportadas previamente se realizaron por un ajuste a velocidades iniciales, ya que los resultados obtenidos no ajustaban al comportamiento reportado en este caso. La obtención de este tipo de comportamiento es compatible con una reacción catalítica de la MnSOD con peroxinitrito. Si se considera que sólo un pequeño porcentaje de peroxinitrito puede reaccionar cada vez con MnSOD y considerando las concentraciones utilizadas (MnSOD 0-20 μM y peroxinitrito 128 μM), se puede explicar este mecanismo "catalítico" como múltiples sitios de Mn en MnSOD reaccionando cada vez con peroxinitrito de manera que no llega a agotar la cantidad de MnSOD disponible, aún si con cada reacción la MnSOD se inactiva por oxidación del Mn y posterior reacción de nitración de Tyr 34 en el sitio activo. Por otra parte podría existir otro mecanismo catalítico donde el Mn oxidado por la reacción con peroxinitrito podría oxidar una nueva molécula de peroxinitrito a radical nitrosodioxi. Estos mecanismos se indican en las siguientes ecuaciones:



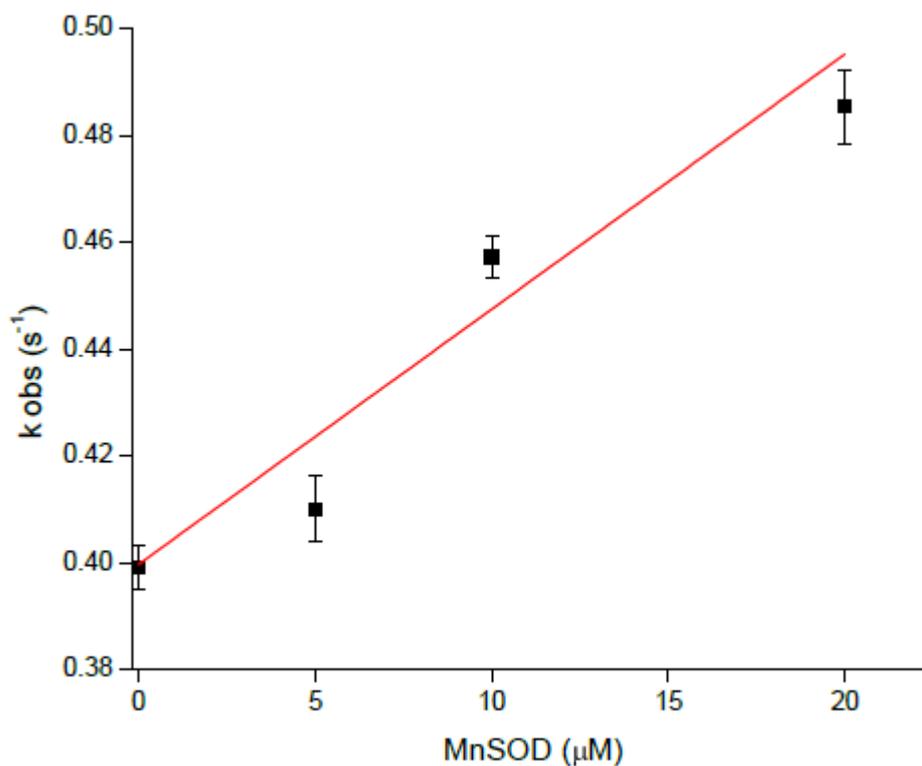


Fig. 4.11. Determinación de la constante de reacción de segundo orden de MnSOD (0-20 μM) con peroxinitrito (128 μM), pH 7,44, 25°C; midiendo a 302 nm. Las constantes de velocidad se obtuvieron por regresión no lineal a una función exponencial simple

Los datos de k_{obs} obtenidos para cada concentración de MnSOD se muestran en la Tabla 4.6.

[MnSOD] μM	k (s ⁻¹)	$\pm\text{SD}$
0	0.399	0.004
5	0.411	0.006
10	0.457	0.004
20	0.485	0.007

Tabla. 4.6. Valores de constantes observadas del decaimiento de peroxinitrito (medido a 302 nm) en presencia de MnSOD a diferentes concentraciones.

El valor de la constante de reacción de segundo orden se obtuvo por un ajuste lineal de las k_{obs} vs la concentración de MnSOD utilizada.

En todos los casos se observó nitración de MnSOD cuando la misma fue expuesta a peroxinitrito, y un decremento en la actividad enzimática (actividad remanente ~30%), probablemente por nitración de Tyr 34.

4.2.3 Estudio de la formación de oxígeno por peroxinitrito en presencia de MnSOD

Para continuar el estudio de la reacción entre MnSOD y peroxinitrito se realizaron estudios de oximetría estudiando la evolución del oxígeno a partir de peroxinitrito, evaluando el efecto de la presencia de MnSOD, de acuerdo al mecanismo catalítico propuesto previamente (Ecuaciones 6-9).

En la Fig. 4.12 se muestran resultados preliminares de los perfiles de producción de oxígeno tras el agregado de peroxinitrito. Tal como se ve en la Fig 4.12., la presencia de MnSOD no modifica la concentración de oxígeno final, pero si la velocidad de formación del mismo, siendo dependiente de la concentración de enzima.

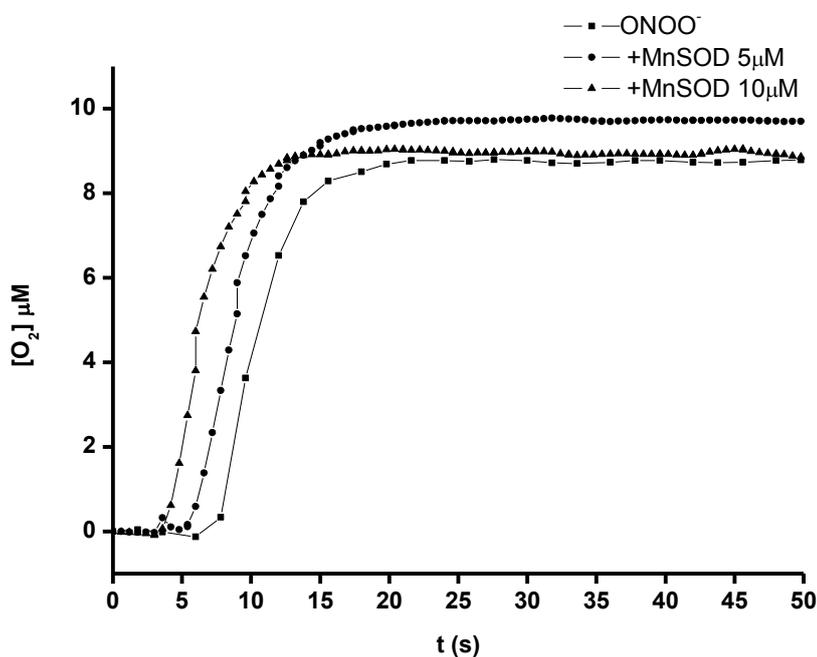


Fig. 4.12. Perfiles de producción de oxígeno por peroxinitrito en presencia o ausencia de MnSOD. Se expuso peroxinitrito (200 μM) a diferentes concentraciones de MnSOD (5 y 10 μM) observando las variaciones en la producción de oxígeno.

La constante de segundo orden global, obtenida a partir de las pendientes de producción de oxígeno es $(5.6 \pm 2.9) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C , pH 7,4 (Fig. 4.13). Esta constante es mayor a la obtenida por métodos de cinética rápida de flujo detenido, sin embargo, dado que los mecanismos de producción de oxígeno en estas condiciones no han sido completamente elucidados, puede haber más de un factor que influya en la producción de esta molécula por parte de peroxinitrito en presencia de MnSOD.

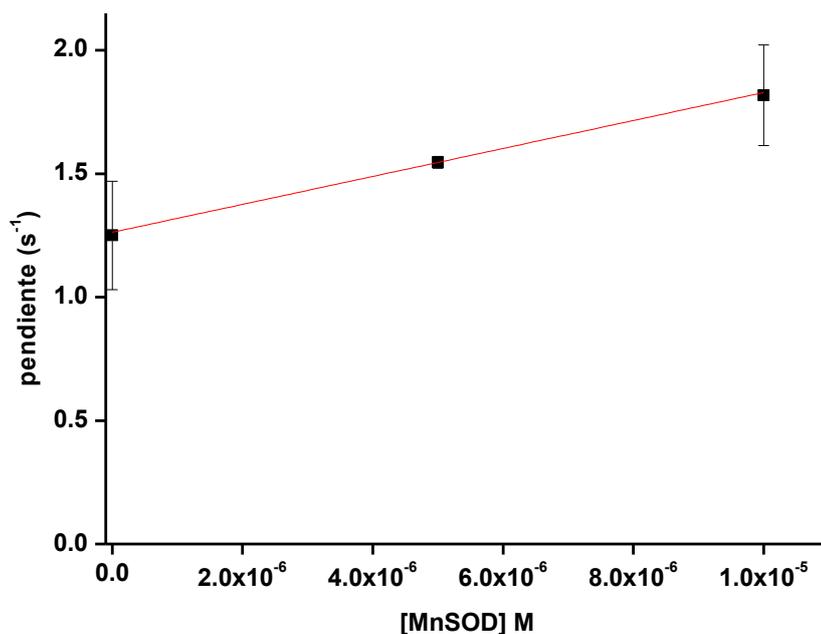


Fig. 4.13. Cálculo de la constante de segundo orden global de la reacción de peroxinitrito con MnSOD a partir de las pendientes en la producción de oxígeno y su variación por la presencia de MnSOD.

Otro dato obtenido en estos experimentos fue el pico de flujo máximo de producción de oxígeno, obtenido directamente a través de los cálculos de la derivada del consumo de oxígeno. Estos muestran una importante diferencia con respecto a la presencia o ausencia de MnSOD observándose también una diferencia en los tiempos que tarda el sistema en alcanzar ese máximo de producción de oxígeno, coherente con lo mencionado previamente en el cálculo de las pendientes (Tabla 4.7).

Condición	Flujo máximo de O ₂ (nM/s)	Tiempo máx. (s)
ONOO- sin MnSOD	-165	47
+ MnSOD 5 µM	-669	14
+ MnSOD 10 µM	-664	10
+ BSA 10 µM	-133	45

Tabla. 4.7. Flujo máximo de producción de oxígeno por peroxinitrito en presencia o ausencia de MnSOD y tiempo de generación de dicho flujo máximo.

Es de notar que la presencia de otra proteína tal como la albúmina bovina, que no posee metales ni sitios de reacción directa con peroxinitrito no modifican ni la pendiente ni el flujo máximo de producción de oxígeno, mostrando que es la reacción con el metal de la MnSOD la responsable de la aceleración de dicha reacción.

Objetivo 2- Caracterización estructural de la interacción de citocromo c y cardiolipina y caracterización de modificaciones estructurales de MnSOD

4.3 Caracterización por NMR de la interacción de citocromo c y cardiolipina

Para determinar la naturaleza de los cambios estructurales sufridos por citocromo c en presencia de cardiolipina se realizaron estudios de NMR para determinar los cambios ocasionados por el agregado de liposomas conteniendo cardiolipina tanto a nivel de los elementos cercanos al grupo hemo, utilizando el Fe^{3+} como sonda paramagnética (NMR paramagnético) como a nivel de la proteína completa (NMR diamagnético).

4.3.1 Estudios de NMR paramagnético de citocromo expuesto a cardiolipina

Los estudios por NMR paramagnético permiten observar los cambios sufridos por los grupos cercanos al hierro del grupo hemo tales como metilos del propio grupo hemo o zonas de los residuos que coordinan al hierro, midiendo los cambios en los protones (^1H) cercanos.

En los estudios realizados se expuso citocromo c a liposomas conteniendo cardiolipina, aumentando la relación lípido proteína. Como se observa en la Fig. 4.14, frente al aumento de la relación de cardiolipina se observa un ensanchamiento de los picos y una disminución de la intensidad de las señales, principalmente a nivel de los metilos 8 y 3 del grupo hemo y del metilo ϵ de la Met80.

La asignación de cada pico en el espectro paramagnético fue tomada de la literatura [223, 224].

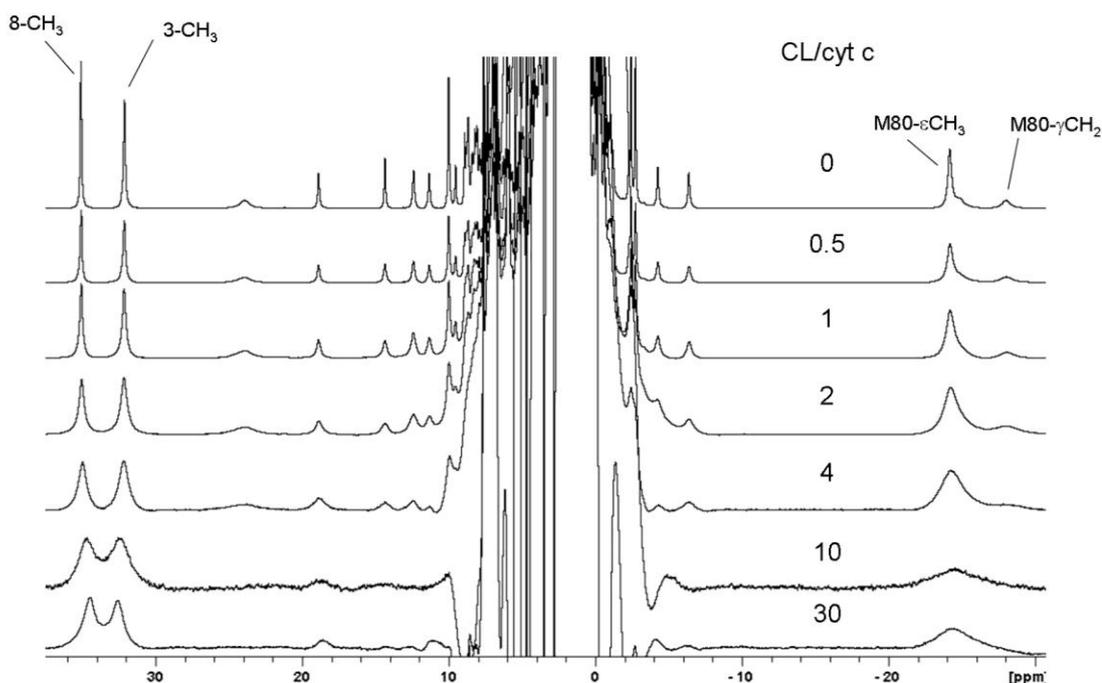
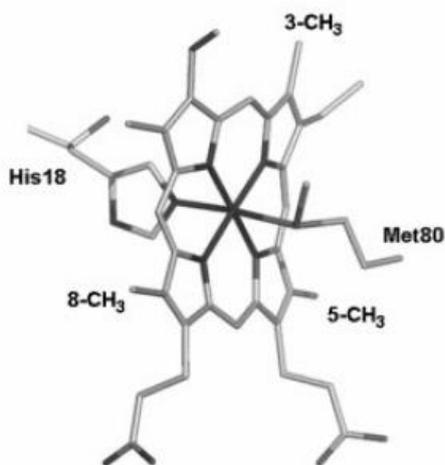


Fig. 4.14. Efecto del agregado de cardiolipina en el espectro paramagnético (^1H) de citocromo c. Espectro paramagnético de la titulación de citocromo c (0,5 mM) expuesto a concentraciones crecientes de liposomas conteniendo cardiolipina. (Amortiguador fosfato 20 mM, pH 7,4, 37 °C)

En el Esquema 4.3 se observa un esquema del grupo hemo del citocromo c con las estructuras referidas en la Fig. 4.14.



Esquema 4.3. Representación del grupo hemo de citocromo c. Tomado de Abriata *et al* [112].

Se ha demostrado que con cambios puntuales en citocromo c, específicamente con la nitración a nivel de la Tyr74, se observa un cambio similar a la transición alcalina a pH

fisiológico, que se refleja en el espectro paramagnético como la desaparición del pico correspondiente a la Met80 [112]. Se ha propuesto que la interacción de citocromo c con cardiolipina favorecería esta transición ya que aumenta la actividad peroxidasa de la proteína. En este caso si bien se observa un decrecimiento del pico y un ensanchamiento el mismo se observa a relaciones de lípido/proteína de 20 o mayores, donde el resto de los picos correspondientes a otros elementos sufren un decremento mayor.

Para determinar si una de las señales decrece más con respecto a las demás, hecho que implicaría un cambio conformacional puntual en la proteína, se analizaron las integrales de los picos correspondientes a los metilos 5 y 8 del grupo hemo, así como el metilo ϵ de la Met80, que se observa en la Fig. 4.15. No se observan diferencias en la disminución del área de los picos. Tal como ha sido descrito previamente por Soussi y colaboradores, el ensanchamiento de las bandas se puede explicar por las señales superpuestas de citocromo c libre y unido a agregados de liposomas de diferentes tamaños, bajo condiciones de intercambio lento entre la especie unida y la libre ($K_{D=}$ 35 μ M) [225] y en general generado por una unión no específica a la proteína [223] y principalmente de carácter electrostático. Cambios reportados previamente [223], particularmente en las regiones cercanas a 10 ppm y -6 ppm no pudieron detectarse.

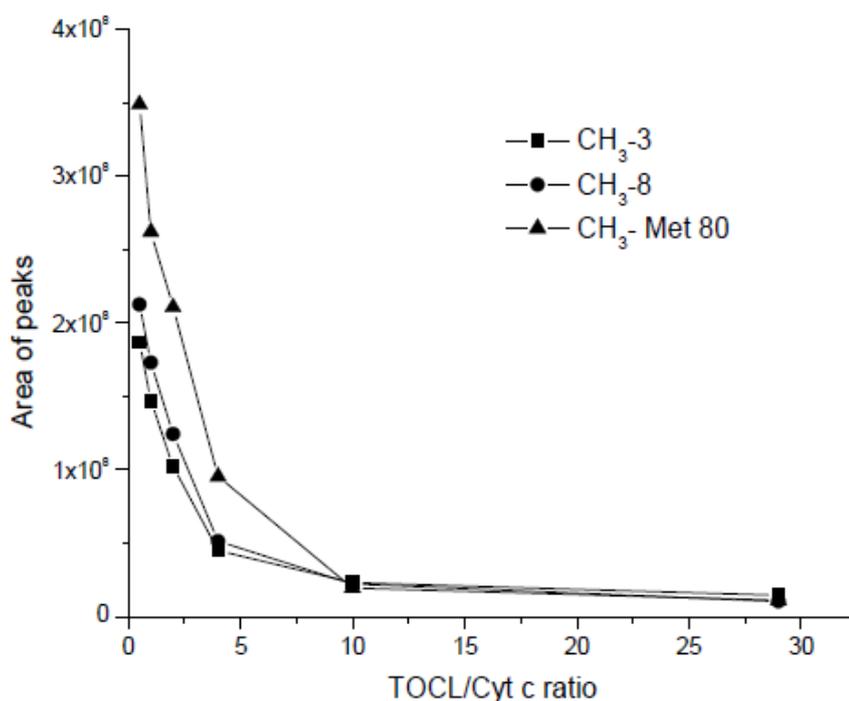


Fig. 4.15. Integral de los picos correspondientes a los metilos 3 y 8 del grupo hemo y el metilo ϵ de la Met80.

Dado que el citocromo c sufre cambios a diferentes pH, y en particular el cambio de la conformación III a la IV se da con un pKa de 9,3, se realizaron espectros a ese pH.

Como se observa en la Fig. 4.16, a pH 9,4 no se observa una desaparición más acelerada de la señal correspondiente a los metilos de la Met80, similar a lo observado a pH 7,4, obteniéndose además una menor disminución y ensanchamiento de las señales. Esto es concordante con lo reportado previamente por Soussi y colaboradores, donde se propone que la interacción entre citocromo c y cardiolipina es fundamentalmente de carácter electrostático, por lo cual la interacción entre el citocromo c a este pH con cardiolipina, un lípido aniónico, estaría disminuida [223]. Las señales iniciales, sin cardiolipina, son menores a las observadas a pH fisiológico.

Estos resultados están en concordancia con estudios recientes donde, por estudios de fluorescencia con derivados dansilados muestran que la interacción de citocromo c con liposomas conteniendo cardiolipina generan estados de desnaturalización variables, desde un estado “compacto” a un estado altamente extendido, donde la estructura se asemeja a aquella obtenida tras la exposición a agentes desnaturalizantes pero generados principalmente por interacciones electrostáticas entre la proteína y el lípido [226].

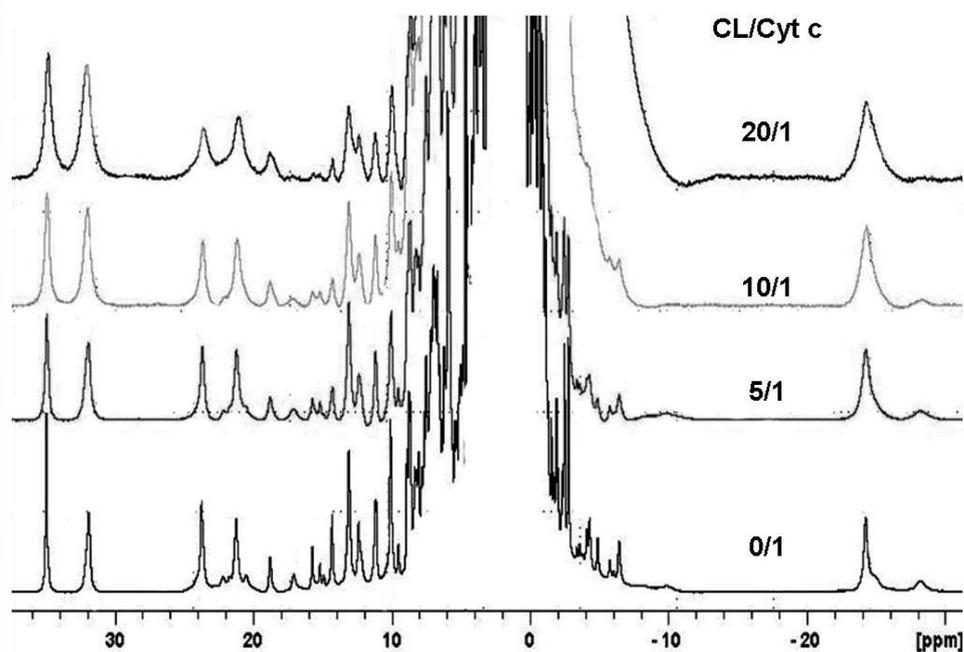


Fig. 4.16. Espectro paramagnético de citocromo c (0,5 mM) expuesto a concentraciones crecientes de liposomas conteniendo cardiolipina, amortiguador fosfato 20 mM, pH 9,4. (En relación 20/1 CL/cyt c el espectro se visualiza 2X)

Dada la alta concentración de lípidos a la que se sometió la muestra de citocromo c, se realizó un control para verificar que la variación en la señal obtenida no se debe a un problema de viscosidad o interacción con lípidos en general y no particularmente con la cardiolipina. Para ello se expuso citocromo c a concentraciones crecientes de liposomas conformados exclusivamente por fosfatidilcolina (SOPC), estudiando su espectro paramagnético (^1H). Dicho control se observa en la Fig. 4.17, donde se observa que la presencia de liposomas que no contienen cardiolipina no afecta ni la intensidad ni la forma de los picos obtenidos.

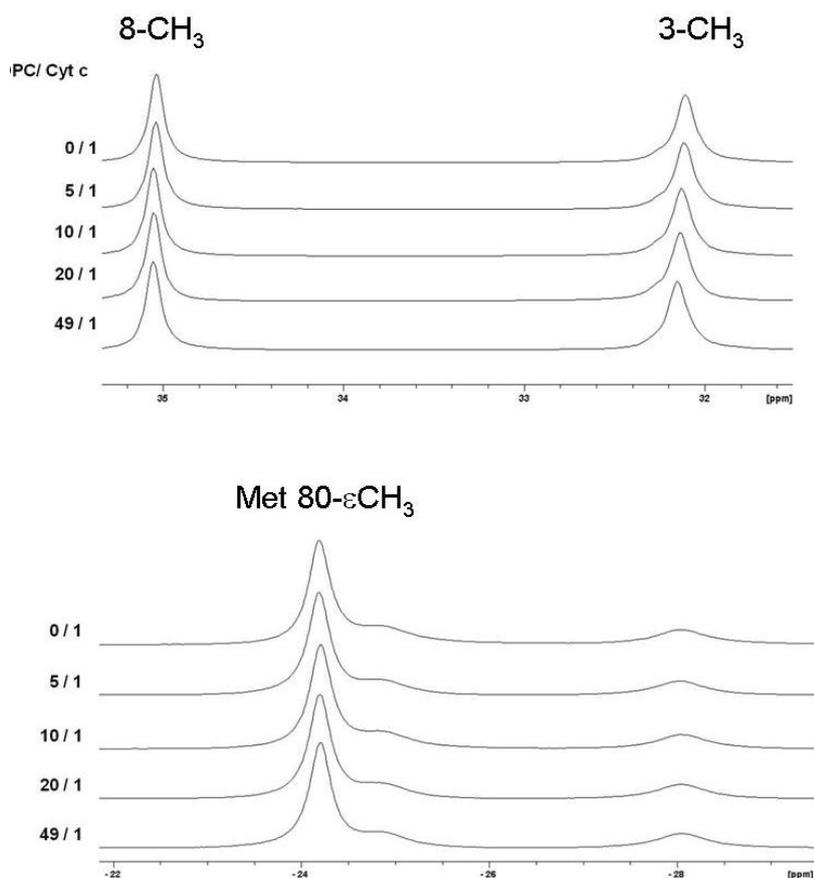


Fig. 4.17. Espectro paramagnético de citocromo c (0,5 mM) expuesto a concentraciones crecientes de liposomas conteniendo SOPC exclusivamente. (pH 7,4, 37°C).

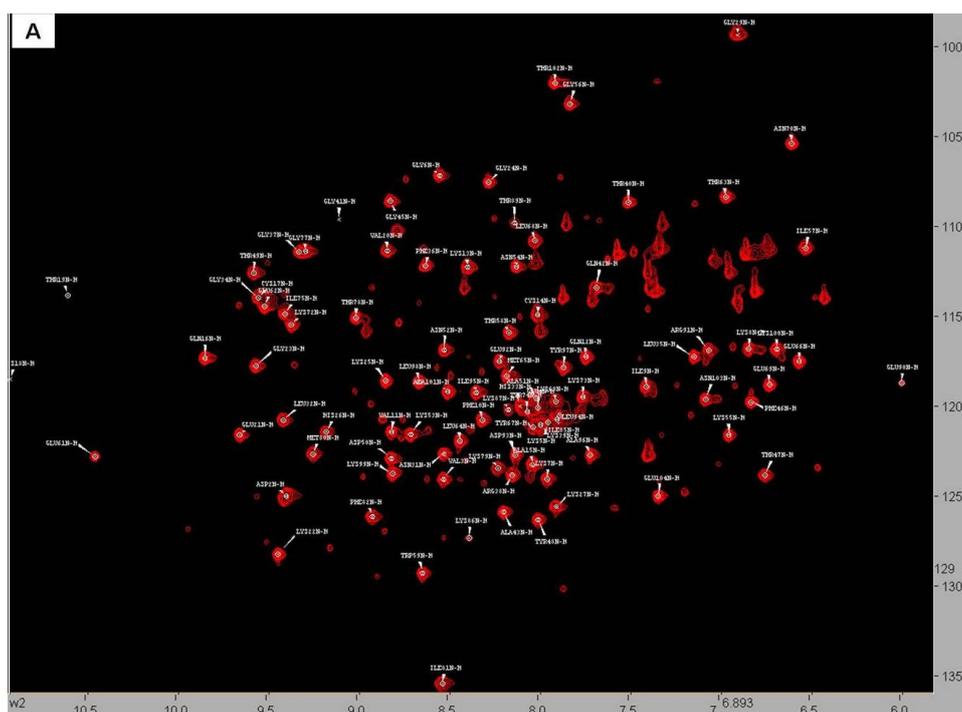
4.3.2 NMR diamagnético

Además de los estudios paramagnéticos, se realizaron estudios diamagnéticos, analizando la proteína total. Los estudios en dos dimensiones (^1H - ^{15}N) permiten determinar variaciones en la estructura de la proteína, obteniéndose señales para cada residuo de la proteína y cambios en los espectros permiten determinar cambios conformacionales en una proteína.

Para realizar esos estudios, particularmente los de HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation) se utilizó citocromo c marcado en ^{15}N , lo cual permite correlacionar los protones (^1H) unidos a los átomos de nitrógeno marcado, permitiendo detectar los grupos NH de la cadena principal de la proteína. Dado que estas señales son sensibles al ambiente local de cada par $^1\text{H}^{15}\text{N}$, estas medidas pueden utilizarse para detectar cambios ocasionados por la unión a cardiolipina. Los experimentos de HSQC se realizaron con citocromo c pseudo wild-type en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de liposomas conteniendo cardiolipina. En el experimento realizado en ausencia de cardiolipina se realizó la asignación de residuos para cada pico utilizando como referencia los datos obtenidos por Liu *et al* para esta proteína [227]. Además de los estudios de HSQC, se realizaron medidas de ^1H - ^{15}N HET-SOFAST.

Tal como se observa en la Fig. 4.18.A, en el caso de la proteína sin cardiolipina se obtuvo un espectro con picos definidos para cada residuo. A medida que se agregó cardiolipina se observa un ensanchamiento y disminución de la señal de los picos (Fig. 4.18 B y C) que resultan en la pérdida de definición de cada residuo. Este cambio se observó incluso en relaciones sub-equimolares de cardiolipina/citocromo c.

Estos resultados están en concordancia con lo reportado en paralelo con nuestros experimentos por Kagan y colaboradores [88].



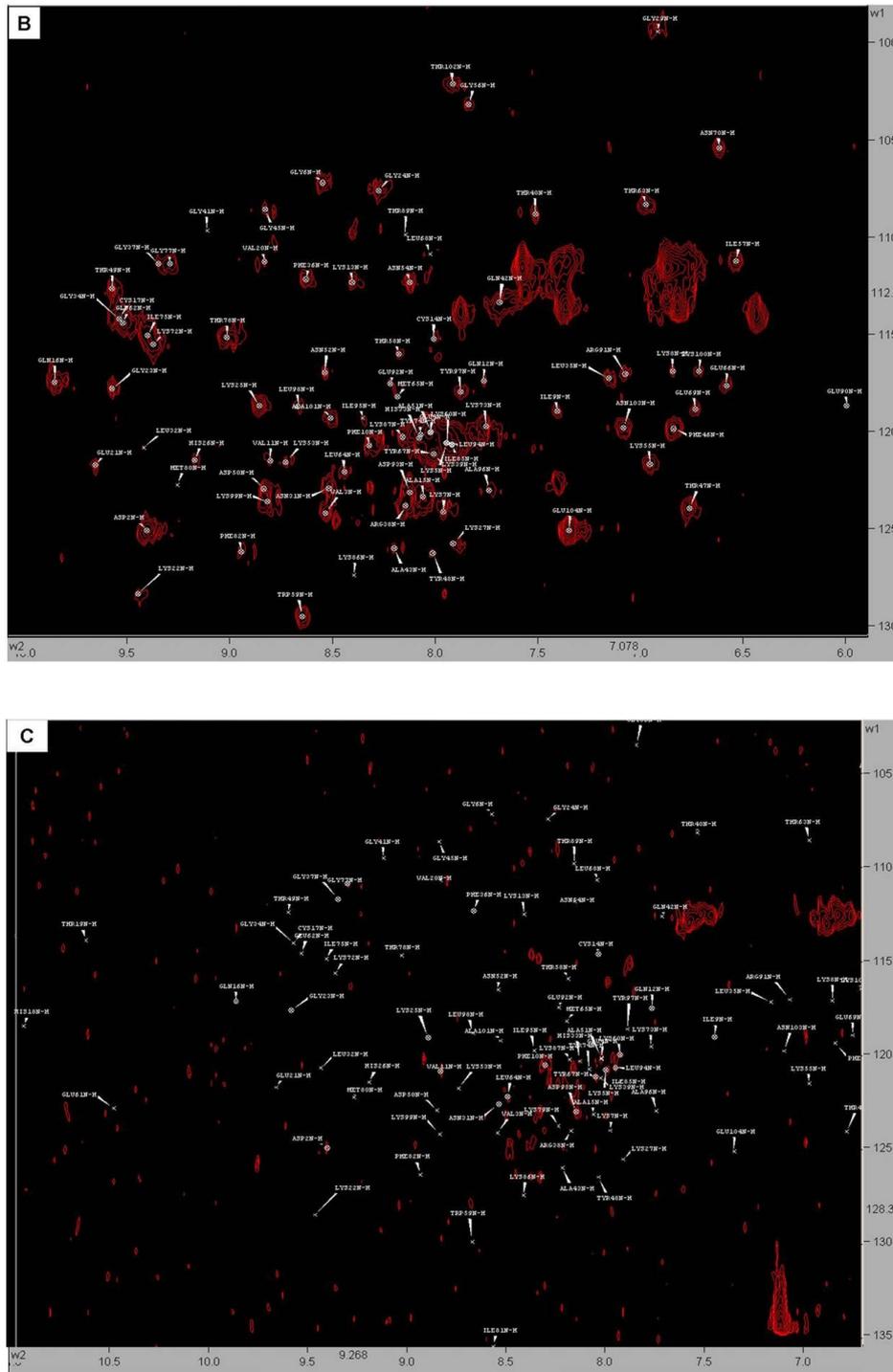


Fig. 4.18. Espectros HSQC $^{15}\text{N}^1\text{H}$ de citocromo c expuesto a dosis crecientes de cardiolipina. (A) Espectro HSCQ de citocromo c marcado con ^{15}N (0,5 mM). (B) Idem A más 250 μM liposomas conteniendo 50% TOCL (C) Idem A más 1mM liposomas conteniendo 50% TOCL. w2 corresponde a la señal de ^1H y w1 a la del ^{15}N .

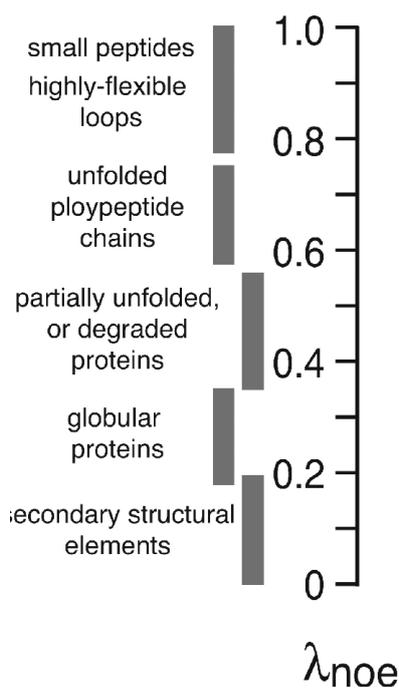
De los espectros de HSQC no se logró determinar un cambio en la estructura de la proteína ya que tras el agregado de cardiolipina la disminución de las señales no

permite determinar un cambio, y los picos que si se lograron ver a pesar de la atenuación y ensanchamiento de la señal no presentan movimientos significativos con respecto a la asignación del citocromo c sin tratar con cardiolipina.

También se realizaron experimentos de SOFAST, método que realiza una correlación entre los espectros en dos dimensiones (^1H - ^{15}N) que provee información sitio-específica acerca de la heterogeneidad estructural a lo largo de la cadena polipeptídica [228]. Estos estudios se realizaron para observar el efecto del agregado de cardiolipina a citocromo c, y también como forma de confirmar el plegamiento de la forma nativa del citocromo c pseudo-wild type.

En este tipo de estudios se mide la difusión del spin del ^1H (llamado efecto NOE o λ_{NOE}) y los valores de λ_{NOE} , van de 0 a 1, siendo los valores más bajos correspondientes a estructuras ordenadas y estructuras secundarias definidas y los valores más altos estructuras más flexibles o desordenadas.

La clasificación se muestra en el esquema 4.4. tomado de Schanda *et al* [228].



Esquema 4.4. Clasificación de muestras polipeptídicas según su valor de λ_{NOE} , en categorías correspondientes a diferentes grados de compactación estructural.

Los valores de λ_{NOE} obtenidos para el citocromo c pseudo wild type se muestran en la Fig. 4.19. Ahí se puede observar que de acuerdo a los resultados obtenidos, y comparando con la estructura de citocromo c wild type comercial purificado no se observan diferencias en la estructura secundaria de la proteína.

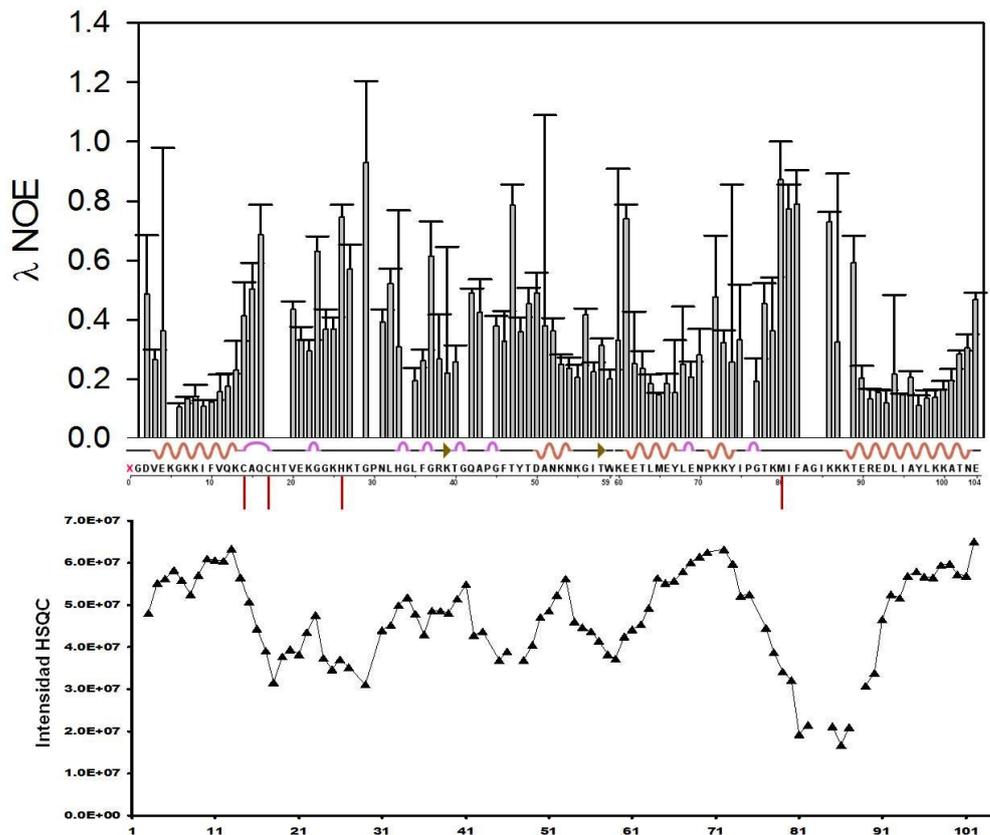


Fig. 4.19. Valores de λ_{NOE} (panel superior) e intensidad de la señal de HSQC (panel inferior) de citocromo c pseudo wild type, correlacionado con la estructura reportada de citocromo c comercial (panel medio). Estas medidas se realizaron por irradiación preferencial de los residuos alifáticos de la proteína

Luego de confirmar que no existen diferencias significativas entre la estructura secundaria del citocromo c pseudo wild type con el citocromo c nativo, se procedió a realizar el estudio tras el agregado de liposomas conteniendo cardiolipina. El resultado se observa en la Fig. 4.20. Los resultados obtenidos de λ_{NOE} son muy dispersos y con un error muy alto, por lo que no los datos no son concluyentes, si bien se observa una pequeña diferencia a nivel de la secuencia 8 a 14 y 63 a 69.

Se puede concluir que el método de NMR en solución tal como se planteó no generó resultados concluyentes. Dicha falta de resultados pueden deberse a una limitación propia del método, por lo cual se debería probar otro método, particularmente NMR en estado sólido, que permite el estudio de interacciones de proteínas con membranas, tal como ha sido reportado para el caso de otras proteínas, pudiéndose determinar cambios puntuales en la estructura proteica [229].

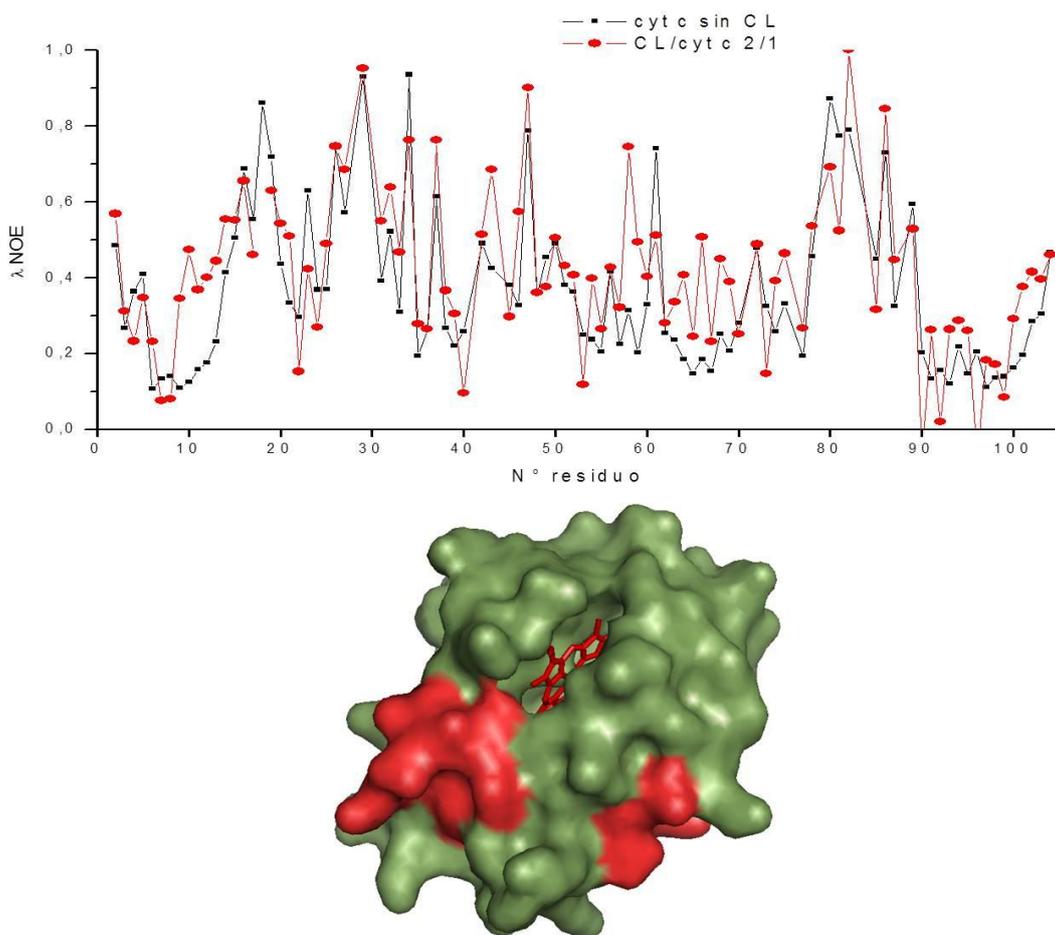


Fig. 4.20. Panel superior: Valores de λ_{NOE} de citocromo c pseudo wild type (0,5 mM), en presencia o ausencia de liposomas conteniendo cardioplipina (relación cardioplipina/citocromo c 2/1). Panel inferior: Representación de citocromo c (código PDB 1HRC) con las zonas que muestran cierta variación en presencia de cardioplipina marcadas en rojo.

4.4 Estudio de la topografía de las tirosinas de citocromo c durante su interacción con cardioplipina

Como se mencionó previamente, el citocromo c posee 4 tirosinas altamente conservadas. Mediante el uso de mutantes en cada una de las tirosinas (Tyr48Phe; Tyr67Phe; Tyr74Phe; Tyr97Phe y un mutante que tiene sustituido por fenilalanina todas sus tirosinas) se realizó el estudio de la influencia de cada uno de estos residuos en la estructura de la proteína durante su interacción con cardioplipina y el efecto de los mismos en la actividad peroxidasa de citocromo c tras su interacción con cardioplipina.

Tal como se vio en la Fig. 1.3 de las cuatro tirosinas presentes en citocromo c cristalizado en ausencia de cardiolipina, la tirosina 67 es la más cercana. La hipótesis de este trabajo fue que, durante la interacción con cardiolipina, la Tyr 67, dada su proximidad, jugaría un rol importante durante el desarrollo de la actividad peroxidasa de citocromo c.

4.4.1 Estudios de fluorescencia de la influencia de cada residuo de tirosina en la interacción con cardiolipina

Para validar experimentalmente la proximidad de la Tyr 67 en el estado de citocromo c unido a cardiolipina se realizaron medidas de fluorescencia intrínseca.

En citocromo c nativo, que no solo posee tirosinas capaces de fluorecer sino también un triptófano, la fluorescencia se ve casi completamente atenuada por un mecanismo de transferencia de energía entre estos residuos y el grupo hemo. Por ello la fluorescencia de citocromo c sólo se había podido medir en casos de citocromo c deficiente en hierro o en presencia de cloruro de guanidinio, un agente desnaturizante [230].

En presencia de liposomas conteniendo cardiolipina, se puede detectar una señal de fluorescencia débil pero detectable en citocromo c, indicando el cambio conformacional que sufre la proteína. Para poder resolver la contribución de cada tirosina y el triptófano en la fluorescencia total de citocromo c en presencia de cardiolipina se estudió la fluorescencia de los complejos citocromo c/cardiolipina utilizando mutantes para las diferentes tirosinas.

En soluciones acuosas, el máximo de excitación para tirosina se encuentra en 275 nm mientras que para triptofano es de 289 nm. Los máximos de emisión de tirosina y triptófano son 303 y 350 nm, respectivamente. La cercanía de los máximos para cada residuo conduce a que en los complejos de citocromo c /cardiolipina los espectros de emisión del citocromo c nativo contengan características tanto de tirosina como de triptófano.

La utilización del mutante que carece de todas las tirosinas brindó una herramienta importante dado que, tal como se esperaba, al realizar los espectros de emisión de fluorescencia excitando a 275 (máximo para tirosina) como a 289 nm (máximo para triptófano), se obtienen registros que varían en su intensidad pero que muestran un mismo máximo correspondiente a la emisión del triptófano. Utilizando estos datos se realizó la substracción de la fluorescencia del triptófano en las medidas realizadas a continuación, con lo que se obtiene la fluorescencia de las tirosinas, sin interferencia

del triptófano. Utilizando los mutantes, se pueden detectar por separado la fluorescencia de cada tirosina, realizando sustracciones sucesivas con respecto al citocromo c nativo.

Los resultados se observan en la Fig. 4.21 donde se muestra claramente que la fluorescencia de las diferentes tirosinas no es igual tras la interacción con cardiolipina, siendo la Tyr97 la de mayor fluorescencia, seguida por la Tyr48 y luego, con fluorescencias significativamente menores, las tirosinas 67 y 74.

El hecho que las Tyr 67 y 74 sufran el atenuamiento mayor sugiere que dicha tirosinas permanecen en la proximidad del grupo hemo del citocromo c durante la interacción con cardiolipina, lo que sugiere que podrían estar involucradas en los procesos de oxidación. Estos resultados están en línea con los resultados obtenidos estudiando nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina, donde se observa un rendimiento mayor de nitración en presencia del lípido con respecto a la nitración en ausencia del mismo, y tal como se detectó por espectrometría de masa, los resultados sugieren que, particularmente, la Tyr67 tendría un mayor índice de nitración.

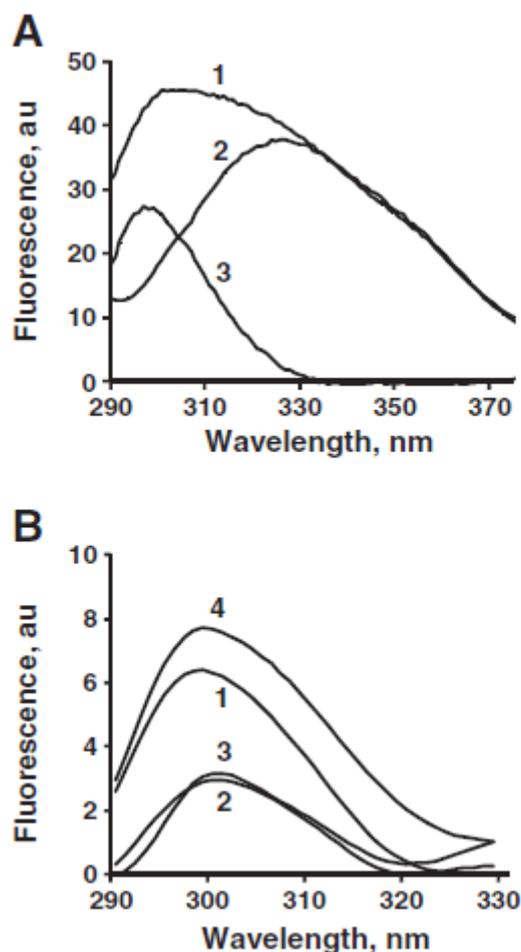


Fig. 4.21. Espectro de fluorescencia de citocromo c nativo y mutado en tirosinas. (A) Espectro de fluorescencia de citocromo c nativo (1) citocromo c mutado en todas las tirosinas (2) y el espectro de fluorescencia de las tirosinas de citocromo c nativo tras la sustracción de la fluorescencia de triptófano (3) utilizando amortiguador HEPES 20 mM, pH 7,4. La fluorescencia fue medida en complejos citocromo c/cardiolipina, con una relación lípido/proteína de 20/1 siendo la concentración de proteína en todos los casos de 10 μ M. (B) Espectro de emisión de fluorescencia de cada tirosina de citocromo c calculadas por sustracción. 1- Tyr 48; 2- Tyr67; 3- Tyr74; 4- Tyr97.

4.4.2 Evaluación de la actividad peroxidasa de los diferentes mutantes en presencia de cardiolipina

Para determinar la influencia de las diferentes tirosinas en la actividad peroxidasa de citocromo c en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina se utilizó la sonda Amplex Red, y se midió la actividad peroxidasa de cada mutante en presencia de cardiolipina. Tal como se observa en la Fig. 4.22, la mutación en Tyr 67 por Phe causa una disminución significativa en la actividad peroxidasa de citocromo c. También se

observa una disminución significativa pero menor en la actividad peroxidasa de citocromo c mutado en Tyr 48 y Tyr 74.

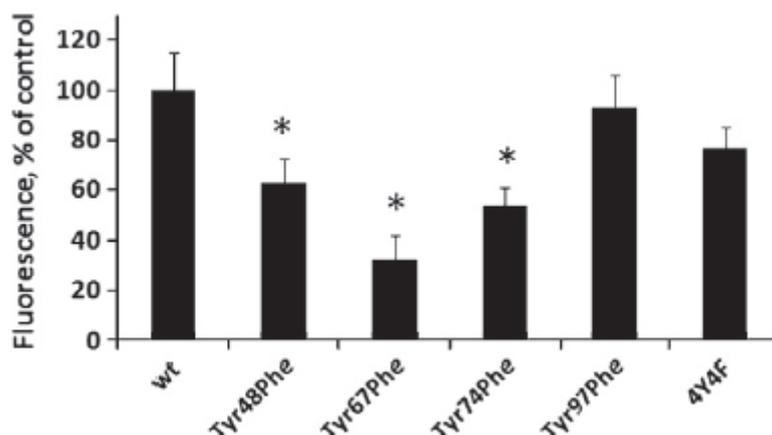


Fig. 4.22. Actividad peroxidasa de citocromo c en presencia de cardiolipina. Citocromo c (1 μ M) nativo y mutantes en las 4 diferentes tirosinas fue expuesto a peróxido de hidrógeno (25 μ M) en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina (20 μ M). La actividad peroxidasa se midió evaluando la fluorescencia de Amplex red. Los experimentos se realizaron en amortiguador PBS, pH 7,4, 100 μ M DTPA * p <0.01 vs. citocromo c nativo.

4.4.3 Cambios dependientes de peróxido de hidrógeno en la fluorescencia de tirosinas y triptófano, la formación de radicales proteicos y la formación de oligómeros en citocromo c expuesto a cardiolipina

Tal como se muestra en la Fig. 4.23 la exposición de citocromo c a peróxido de hidrógeno genera una disminución de la fluorescencia tanto de tirosinas como de triptófanos. La modificación de una tirosina modifica esa disminución en el caso de la mutación en Tyr67 por Phe donde tanto las tirosinas restantes como el triptófano de la proteína son protegidas (el decremento en la fluorescencia es menor) indicando que esta tirosina jugaría un rol en la oxidación mediada por peróxido de hidrógeno durante la actividad peroxidasa de citocromo c generando complejos con cardiolipina que están en concordancia con los resultados obtenidos analizando la actividad peroxidasa de este mutante, indicando una probable acción catalítica de este residuo.

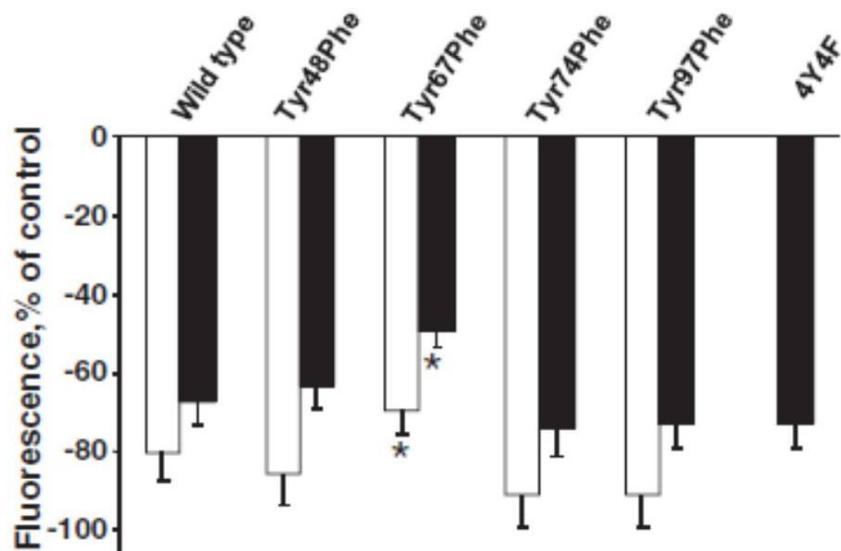


Fig. 4.23. Disminución de la fluorescencia de tirosina (λ_{em} 303 nm) y triptófano (λ_{em} 325 nm) dependiente de peróxido de hidrógeno en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina (λ_{ex} 275 nm). Barras blancas % de fluorescencia de tirosina, barras negras % fluorescencia de triptófano. * $p < 0.01$ vs. citocromo c nativo.

También se evaluó el efecto del cambio en tirosinas puntuales, utilizando los mutantes en tirosina mencionados previamente, en la formación de radicales proteicos, medidos por EPR de baja temperatura.

La formación de radicales libres en presencia de peróxido se cuantificó, evaluando el aporte de las diferentes tirosinas utilizando un acercamiento similar al utilizado en los casos de fluorescencia. Utilizando el mutante que carece de las cuatro tirosinas se lo expuso a peróxido de hidrógeno, y se utilizó la señal obtenida para sustraerla de las demás y así observar el aporte de las tirosinas solamente.

En la Fig. 4.24 se observa la señal característica de radical tirosilo obtenida en estas condiciones (ancho de pico de ~ 16 G y un factor g de ~ 2.005), así como las intensidades obtenidas para las diferentes muestras evaluadas. De este experimento se extrae que en el caso de las mutantes en Tyr 48, 67 y 74 hay una disminución significativa de la señal de radical tirosilo, siendo la disminución de esta señal mayor en el mutante de Tyr67Phe, indicando que la formación de este radical es mayoritaria durante la reacción con peróxido de hidrógeno en presencia de cardiolipina. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos por EPR de citocromo c nativo expuesto a peroxinitrito, donde se observa que la formación de radicales libres en presencia de cardiolipina es mayor que en ausencia de este lípido, probablemente adjudicable a un aumento en la formación de radical tirosilo a nivel de la tirosina 67.

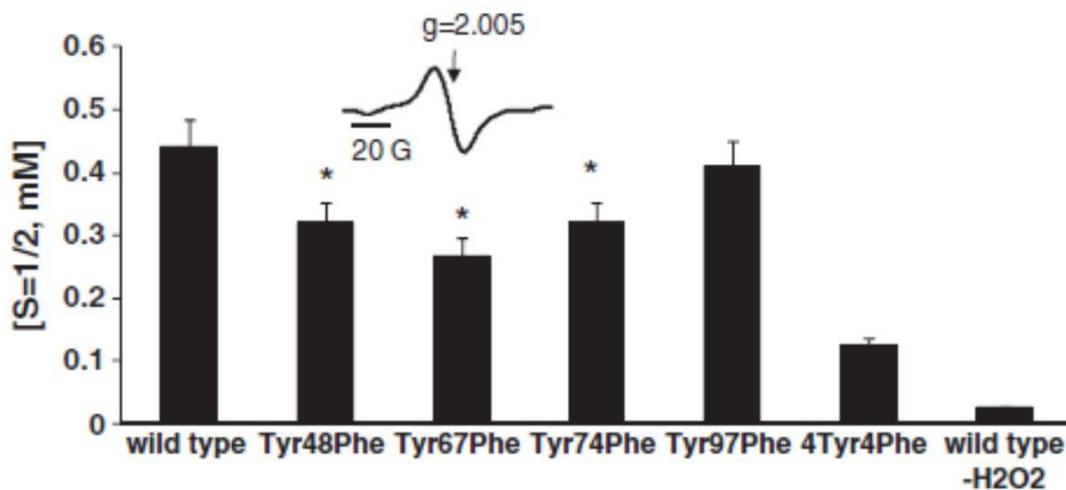


Fig. 4.24. Producción de radicales proteicos en citocromo c como resultado de la incubación con liposomas conteniendo cardiolipina y peróxido de hidrógeno. Inset: Espectro típico de radical tirosilo obtenido por métodos de EPR a 77 K.

Dado que tras la formación de radicales proteicos tales como radical tirosilo se pueden ocasionar entrecruzamientos entre proteínas para formar oligómeros se realizó un análisis en geles de poliacrilamida para detectarlos. Las muestras fueron incubadas con liposomas conteniendo cardiolipina, estudiando la influencia del peróxido de hidrogeno en la formación de oligómeros de alto peso molecular, y si la ausencia de cada tirosina (utilizando los mutantes antes mencionados) generan diferencias en la formación de dichos oligómeros.

En la Fig. 4.25 se observa que los mutantes en Tyr 97 y 67 exhiben una disminución significativa en la cantidad de oligómeros, si bien el mutante en Tyr 97 expuesto a peróxido exhibe una cantidad significativamente mayor de dímeros y trímeros. Por lo tanto la disminución mayor en la formación de oligómeros recae en el mutante en Tyr 67, implicando que la formación de ese radical es el responsable de la formación de oligómeros, tanto por unión entre dos radicales tirosilo en esa posición como de iniciador cadenas de propagación de radicales dentro de la propia proteína.

Como control se estudió la formación de oligómeros en el mutante de citocromo c que carece de tirosinas y, tal como era esperable, el agregado de peróxido de hidrógeno en presencia de cardiolipina no genera un aumento en la formación de oligómeros, ya que los mismos están generados principalmente por unión entre dos radicales tirosilo.

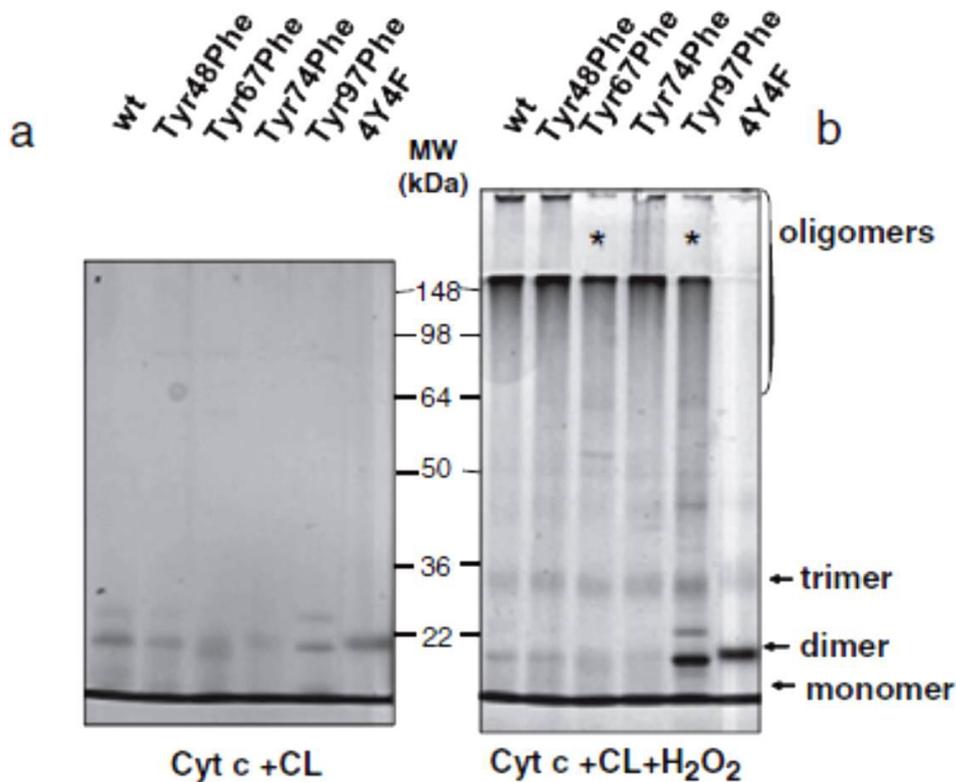
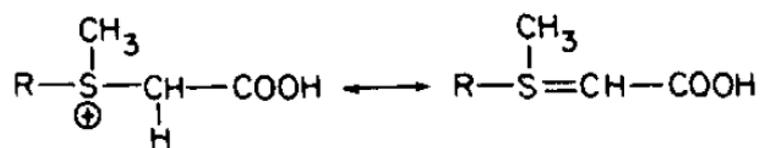


Fig. 4.25. Gel de poliacrilamida (10%) de complejos de citocromo c nativo y mutantes en tirosina (8 μM) con liposomas conteniendo cardiolipina (relación lípido/ proteína 20/1) en ausencia (panel A) o presencia de peróxido de hidrógeno (35 μM) (panel B) durante una hora. Los gels fueron teñidos por la técnica de plata. Las incubaciones se realizaron en amortiguador HEPES (20 mM), pH 7.4 con 100 μM DTPA

4.5 Síntesis, purificación y caracterización de citocromo c carboximetilado y su interacción con cardiolipina.

La carboximetilación es una modificación muy utilizada para establecer la función de diversos aminoácidos en una proteína, ya que reaccionan con el grupo tiol de la cisteína, el grupo tioeter de la metionina (Esquema 4.5), el imidazol de la de la histidina o el ϵ -amino de la lisina [231].



Esquema 4.5. Estructura de la metionina carboximetilada, mostrando el equilibrio con el ion sulfonio. Tomado de Chin *et al* [231].

La actividad peroxidasa de citocromo c se ha reportado ampliamente con una gran cantidad de dadores electrónicos tales como luminol, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sulfónico) (ABTS) o Amplex red [91, 232, 233], sin embargo, la aparición del compuesto I (oxo ferrilo a nivel del hierro del grupo hemo) a nivel espectrofotométrico no ha sido detectada. Un artículo de Prasad un colaboradores reportó que el citocromo c carboximetilado a nivel de Met 65 y Met 80 reportó la aparición de un compuesto I en esta proteína tras su interacción con peróxido de hidrógeno, así como una actividad peroxidasa aumentada [101]. Dicho aumento de actividad es comprensible ya que la carboximetilación de la Met 80 rompe el enlace Fe-S con el consiguiente cambio en el ligando axial del hierro hémico [234, 235].

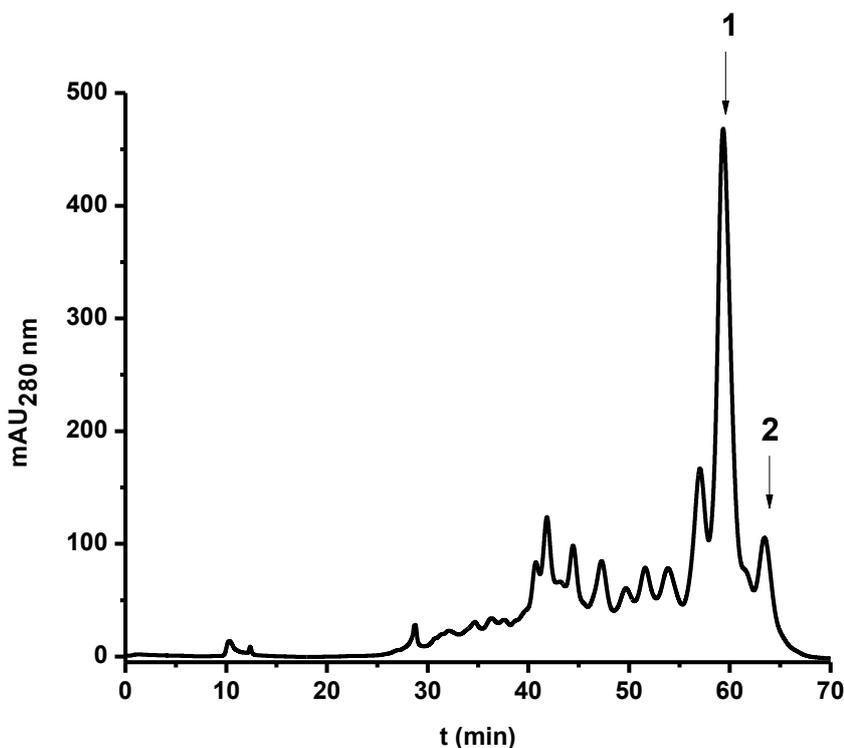


Fig. 4.26. Cromatograma de purificación de citocromo carboximetilado por HPLC de intercambio catiónico. Los picos marcados como 1 y 2 son las especies mayoritarias que se separaron y analizaron posteriormente.

El citocromo c se sometió a los procesos de carboximetilación descritos en literatura [110], y luego de los mismos se analizó la pureza de la muestra sintetizada. Como se observa en la Fig. 4.26 tras el proceso de carboximetilación se obtiene una muestra heterogénea, con una población mayoritaria.

De los dos picos señalados en el cromatograma se colectaron muestras que se analizaron por espectrometría de masa tras su re-purificación. El análisis de la carboximetilación por espectrometría de masa se realizó analizando los espectros de la digestión trípica de los picos mayoritarios, buscando un aumento en m/z de +58 Da y la modificación de carboximetilación de metionina que puede ser observada como un decremento en -48 Da, generada durante la medida donde la carboximetil metionina se degrada primero a homoserina y luego tras una deshidratación sufre una pérdida total del grupo CH_3S - [236]. Las modificaciones fueron obtenidas de la base de datos *Delta Mass* de la Association of Biomolecular Resource Facilities (ABRF) (<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>).

Los resultados del análisis realizado buscando esta modificación muestran que el pico mayoritario 1 muestra la modificación en Met 80 correspondiente a una pérdida de 48 Da (Fig. 4.27), además de la misma modificación de la metionina 65 (no se muestra).

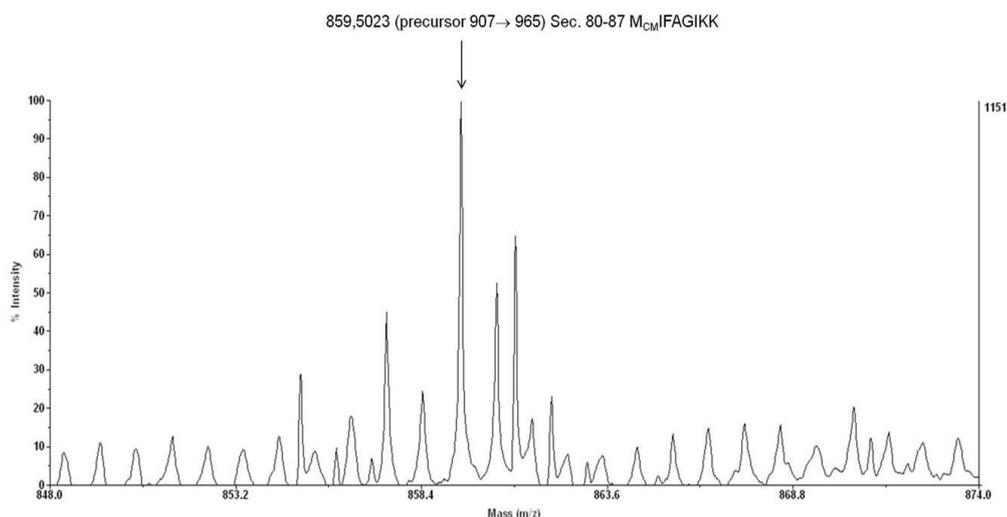


Fig. 4.27. Espectros de m/z de péptidos de citocromo c carboximetilado en Met80, pico 1. La flecha indica el pico identificado con una relación m/z de 859, que corresponde al derivado carboximetilado tras su descomposición.

Luego de la caracterización por espectrometría de masa, se procedió a caracterizar la proteína espectrofotométricamente, realizando espectros de la muestra purificada comparándola con citocromo c nativo.

Dichos espectros se muestran en la Fig. 4.28 siendo los cambios observados en el espectro de citocromo c carboximetilado concordantes con los reportados en literatura.

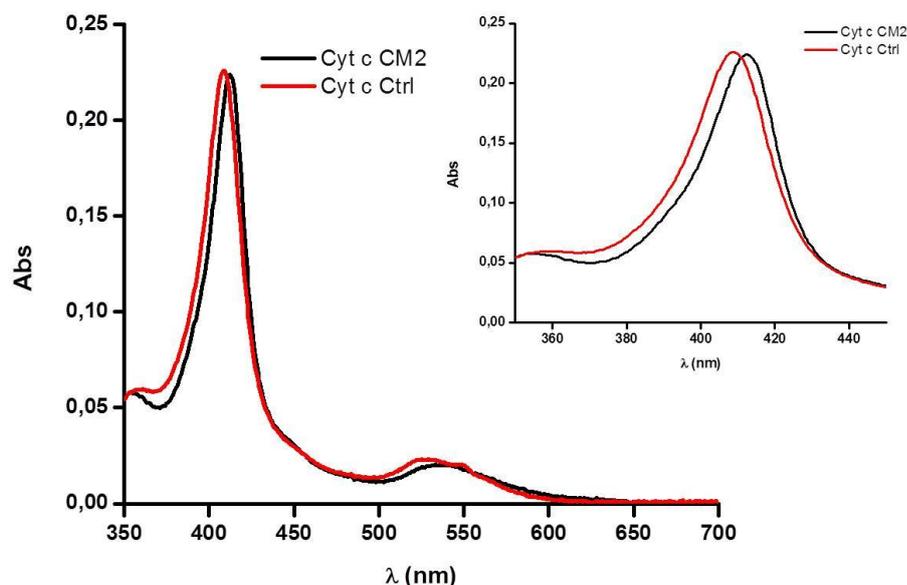


Fig. 4.28. Espectros comparados de citocromo c nativo (Cyt c control en rojo) y citocromo c carboximetilado purificado (Cyt c CM2 en negro), 2 μ M. Inset: espectro de 350 a 450 nm, donde se observa el corrimiento en el pico de absorción de la banda de Soret de 412 a 408 nm.

Luego de la caracterización de la carboximetilación de esta proteína se procedió a confirmar espectrofotométricamente la formación de Compuesto I, tras la exposición de esta proteína a una concentración equimolar de peróxido de hidrógeno, que se observa en la Fig. 4.29 como la disminución de la absorción en la banda de Soret. Como característicamente se observa en la formación de Compuesto I de peroxidasas “clásicas” [237] se detecta un punto isobéptico en este caso a 407 nm. Citocromo c nativo sin modificar no muestra diferencias en su espectro a esta concentración de peróxido de hidrógeno y los tiempos de exposición medidos.

Tras la confirmación de la formación de compuesto I en presencia de peróxido de hidrógeno en citocromo c carboximetilado se procedió al estudio de la formación de este compuesto en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina.

En la Fig. 4.30 se observa la variación de la absorbancia de esta proteína en ausencia o presencia de liposomas conteniendo cardiolipina.

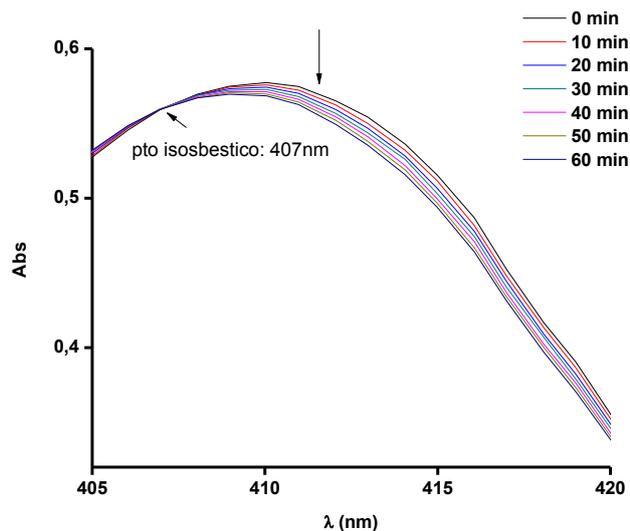


Fig. 4.29. Formación de compuesto I en citocromo c carboximetilado ($5 \mu\text{M}$) expuesto a peróxido de hidrógeno ($5 \mu\text{M}$) durante 1 hora. Se indica en el gráfico el punto isobéptico y a 411 nm la longitud de onda de mayor diferencia entre $t=0$ y 60 min .

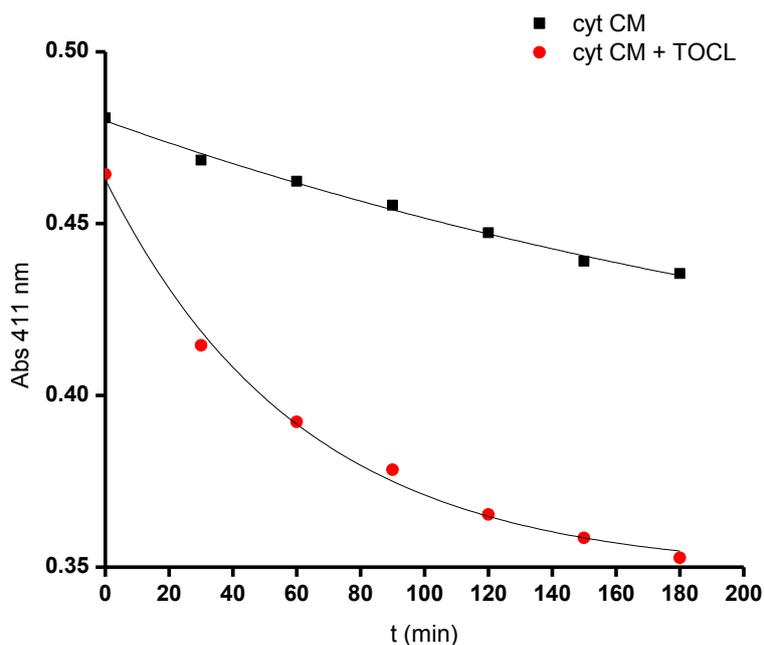


Fig. 4.30. Cambios en la absorbancia a 411 nm de citocromo c carboximetilado ($5 \mu\text{M}$) expuesto a peróxido de hidrógeno ($200 \mu\text{M}$) en presencia (círculos rojos) o ausencia (cuadros negros) de liposomas conteniendo cardiolipina.

En presencia de cardiolipina se observa un aumento de la formación de Compuesto I, medido como la disminución de la señal a 411 nm , con constantes aparentes de

reacción de citocromo c carboximetilado con peróxido de hidrógeno (k_{app}) de $0,42 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en ausencia de cardiolipina y $1,59 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en presencia de cardiolipina, pH 7,4, 25°C .

La actividad peroxidasa de este citocromo c modificado se realizó, además, utilizando una sonda que reacciona con el compuesto I, Amplex Red.

Los resultados se muestran en la Fig. 4.31, donde en presencia de cardiolipina citocromo c carboximetilado muestra un aumento de dicha actividad, superando también la actividad peroxidasa de citocromo c control en presencia de cardiolipina.

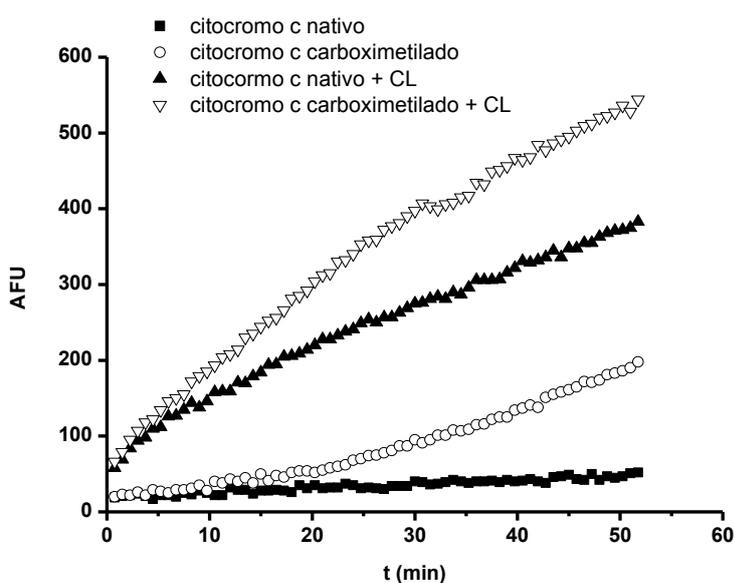


Fig. 4.31. Actividad peroxidasa de citocromo c. Actividad peroxidasa medida por fluorescencia de Amplex Red de citocromo c nativo y citocromo c carboximetilado en presencia o ausencia de cardiolipina.

4.6 Síntesis y purificación de citocromo c mononitrado para la generación y validación de anticuerpos monoclonales que reconocen formas alternativas de citocromo c

Para la generación de anticuerpos monoclonales que reconozcan formas modificadas de citocromo c se realizó la purificación a gran escala de citocromo c mononitrados en tirosina 74 y tirosina 97 de acuerdo a lo reportado en bibliografía [73].

Los citocromos c mononitrados fueron purificados exhaustivamente y testeados por espectrometría de masa para confirmar la nitración en el sitio de interés y descartar otras posibles modificaciones.

En la Fig. 4.32 se observan los espectros de masa de los péptidos nitrados de citocromo c mononitrados en Tyr 97 o 74, obtenidos por tripsinización de la muestra.

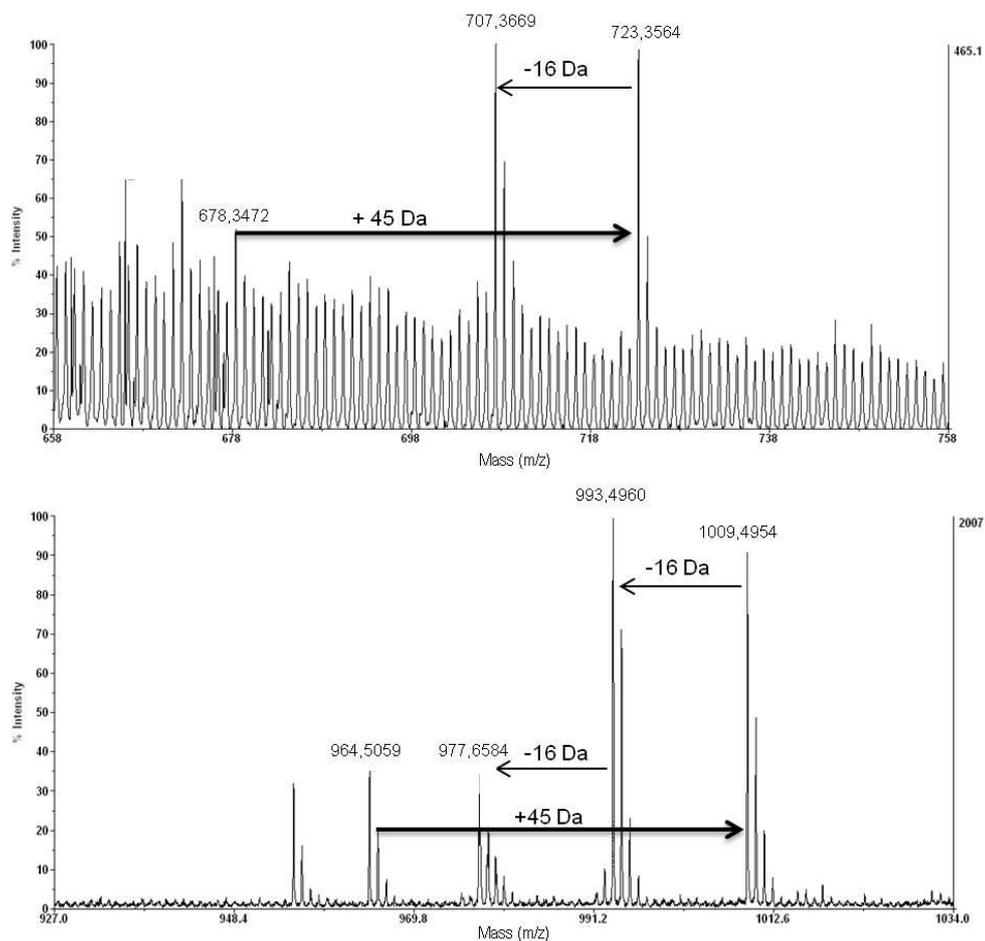
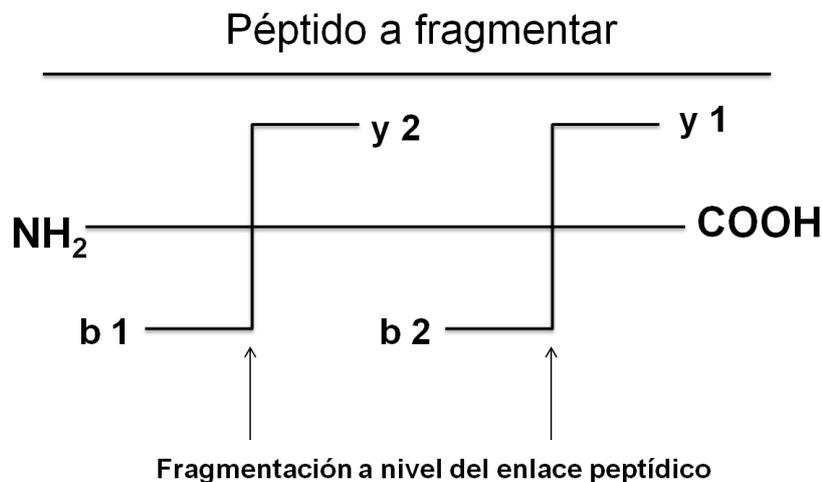


Fig. 4.32. Espectros de masa MADLI-TOF de péptidos de citocromo c mononitrado en Tyr 74 (panel superior) y Tyr 97 (panel inferior) purificados por HPLC (intercambio catiónico).

La nitración se confirma por la obtención de el patrón de ion nativo + 45 Da y de un ion nativo + 29, correspondiendo este último a la pérdida de un oxígeno del grupo nitro. Esta modificación ha sido descrita como patrón característico de las muestras nitradas (+45 kDa) y su derivado hidroxilaminado (+29 Da) [238]. Un tercer ion, correspondiente al ion nitrado con la pérdida de 36 Da (pérdida de 2 oxígenos), corresponde al derivado amino que también se observa en el caso de la muestra de mononitrado en Tyr 97.

Los péptidos fueron además sometidos a secuenciación (MS/MS) para confirmar la posición de nitración.



Esquema 4.6. Patrón de fragmentación para secuenciar péptidos por MS/MS (MALDI TOF)

En la Tabla 4.6 se muestran los péptidos observados (en negrita) obtenidos fragmentación según lo descrito en el Esquema 4.3. A partir de estos datos se puede confirmar la nitración en las posiciones 74 y 97 para las dos muestras analizadas.

Péptido 75-80

#	b	Sec	y	#
1	209.0557	Y		6
2	322.1397	I	515.3188	5
3	419.1925	P	402.2347	4
4	476.2140	G	305.1819	3
5	577.2617	T	248.1605	2
6		K	147.1128	1

Péptido 93-100

b	Sec	y	#
130.0499	E		8
245.0768	D	880.4775	7
358.1609	L	765.4505	6
471.2449	I	652.3665	5
542.2821	A	539.2824	4
750.3305	Y	468.2453	3
863.4145	L	260.1969	2
	K	147.1128	1

Tabla. 4.8. Péptidos fragmentados y secuenciados por MS/MS de las muestras de citocromo c mononitrado en Tyr 74 (panel de la izquierda, péptido 75-80) y de citocromo c mononitrado en Tyr 97 (panel de la derecha, péptido 93-100). Los iones hallados se marcan en negrita.

Una vez determinada la pureza de la muestra y detección de una única nitración las muestras se enviaron para la generación de anticuerpos monoclonales que detecten

formas alternativas de citocromo c al Departamento de microbiología, Centro de Inmunología del la Universidad de Minnessota (a cargo del Dr. Ron Jemmerson).

Dichos anticuerpos están aún en periodo de purificación y caracterización, aunque otra clona, 1D3 [145], se caracterizó para determinar su especificidad con citocromo c mononitrado puro en Tyr97 o 74.

Los resultados se observan en la Fig. 4.33, donde se realizó un ELISA de competencia utilizando citocromo c nativo, mononitrado en Tyr 97 o 74.

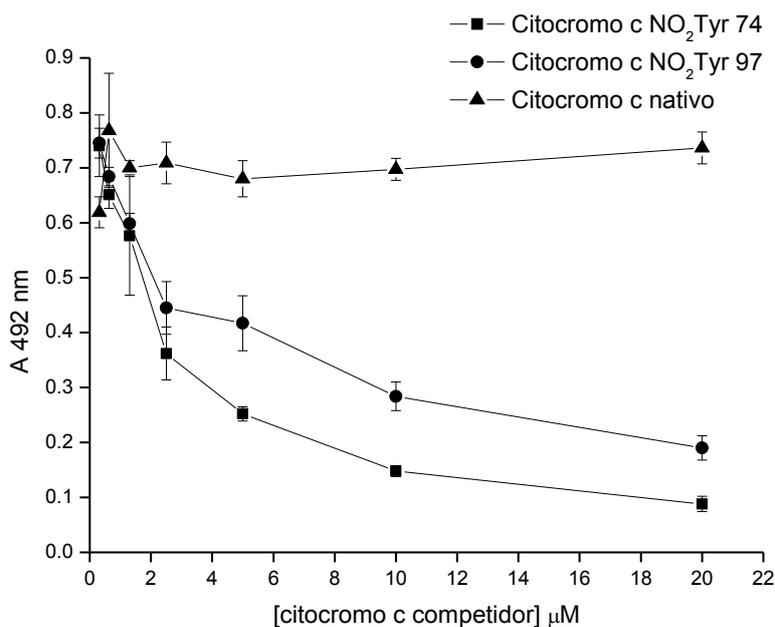


Fig. 4.33. ELISA de competencia de citocromo c nativo frente a diferentes tipos de competidores, frente al anticuerpo 1D3, que reconoce formas modificadas de citocromo c preferencialmente.

Como se observa en la Fig. 4.33, la competencia de los citocromos mononitrados fue más efectiva por el anticuerpo que la forma nativa de la proteína y particularmente el citocromo mononitrado en Tyr 74 fue el más eficiente. Esto indica que, primero, el anticuerpo 1D3 tiene preferencia por formas modificadas frente a citocromo c nativo, como ha sido reportado previamente [141]. Segundo, que el citocromo c mononitrado en Tyr 74 presenta un cambio conformacional mayor o por lo menos mejor reconocible para el anticuerpo que el mononitrado en Tyr 97. Esto está de acuerdo también con trabajos previos que muestran que de ambos citocromos mononitrados, el nitrado en Tyr 74 sufría una transición alcalina más temprana que el mononitrado en Tyr 97.

4.7 Estudios computacionales de la inactivación de MnSOD mediada por la nitración de tirosina 34

Para poder elucidar los mecanismos moleculares que llevan a la inactivación de la MnSOD por la nitración sitio-específica a nivel de la Tyr 34 de la MnSOD se realizaron estudios simulaciones de dinámica molecular (Multiple Steered Molecular Dynamics, MSMD) en colaboración con el Dr. Leonardo Boechi de la Universidad de Buenos Aires [170]. En estos estudios se calcularon los perfiles de energía libre considerando modelos de MnSOD nativa o nitrada a nivel de Tyr 34, analizando la energía libre necesaria para el acceso de superóxido al átomo de Mn del sitio activo.

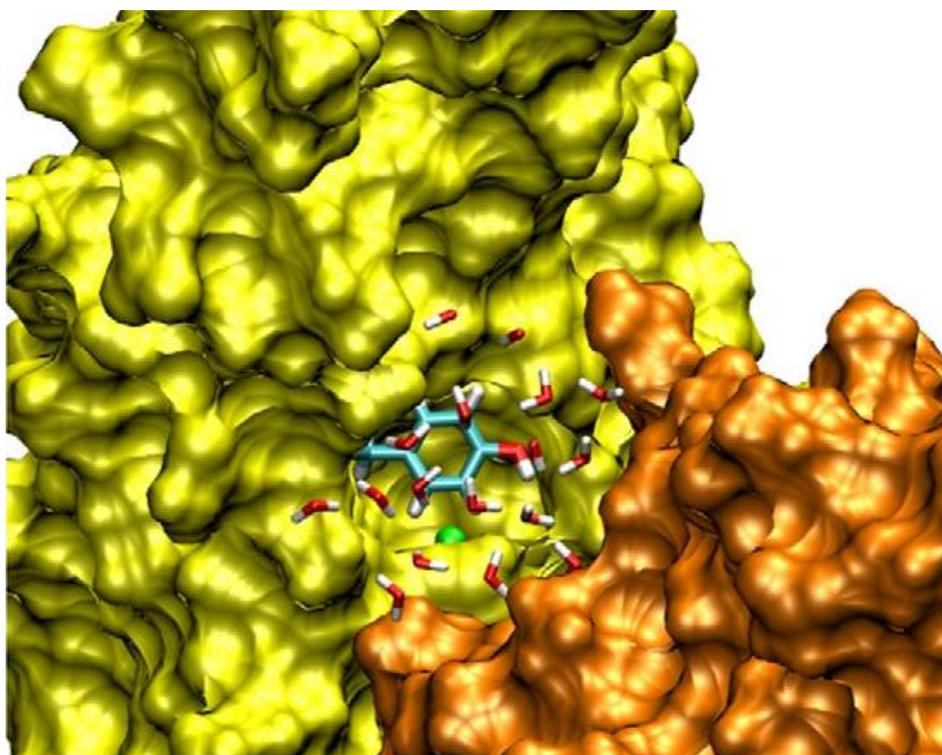


Fig. 4.34. Modelado de la superficie de MnSOD (cada color indica un monómero diferente), donde se puede observar al átomo de manganeso (verde) y la tirosina 34 localizada en la cavidad de llegada al sitio activo (tomada de Moreno *et al* [170]).

La cercanía al sitio activo de la Tyr 34 se representa en la Fig. 4.34.

En el caso de MnSOD nativa se observa que hasta los 7-8 Å no existen barreras energéticas para el acceso del superóxido al sitio activo (Fig. 4.35.) observándose una pequeña depresión previa al aumento de la energía libre, donde se da la interacción del superóxido con residuos de la segunda esfera cercanos al Mn (His 30 y 163) (sitio 1). A partir de esa distancia, se observa un aumento en la energía libre necesaria para

el acceso al sitio activo siendo el total para la entrada del superóxido al sitio activo alrededor de 6 kcal/mol.

Los mismos estudios se realizaron para la MnSOD nitrada en Tyr34, que también se observan en la Fig. 4.35. En este caso se observó que incluso previo al acercamiento del superóxido al sitio activo se observa un aumento de 2 kcal/mol cercano al sitio 1. Esta barrera probablemente se relacione con la repulsión electrostática del grupo nitro hacia el superóxido en el canal de entrada. Luego de superada esa barrera, la interacción del superóxido con las His30 y 163 estabilizan al sustrato pero luego, en la cercanía del átomo de Mn (4 a 7 Å) los perfiles de energía libre muestran una barrera de alrededor de 15 kcal/mol (8 kcal/mol más que en el caso de la MnSOD nativa). Este efecto sugiere que el grupo nitro presenta una barrera tanto estérica como electrostática, que bloquea al Mn del sitio activo forzando al superóxido a desplazar el grupo nitro para unirse al Mn. Esta barrera energética se ve además aumentada incluso más aún cuando la nitro-Tyr34 se encuentra desprotonada, indicando la importancia del cambio de pKa de la nitro-Tyr34 con respecto a la Tyr34 sin modificar (Fig. 4.35).

La posición inicial del grupo nitro y la final, luego del acercamiento del superóxido al Mn se observan en la Fig. 4.36. En la posición final de la nitro-Tyr34, se observa que el grupo OH⁻ del fenol de la nitro-Tyr34 apunta hacia fuera del sitio activo, opuesto a lo observado en el caso de la enzima nativa, impidiendo, entonces, la participación de este grupo en la reacción.

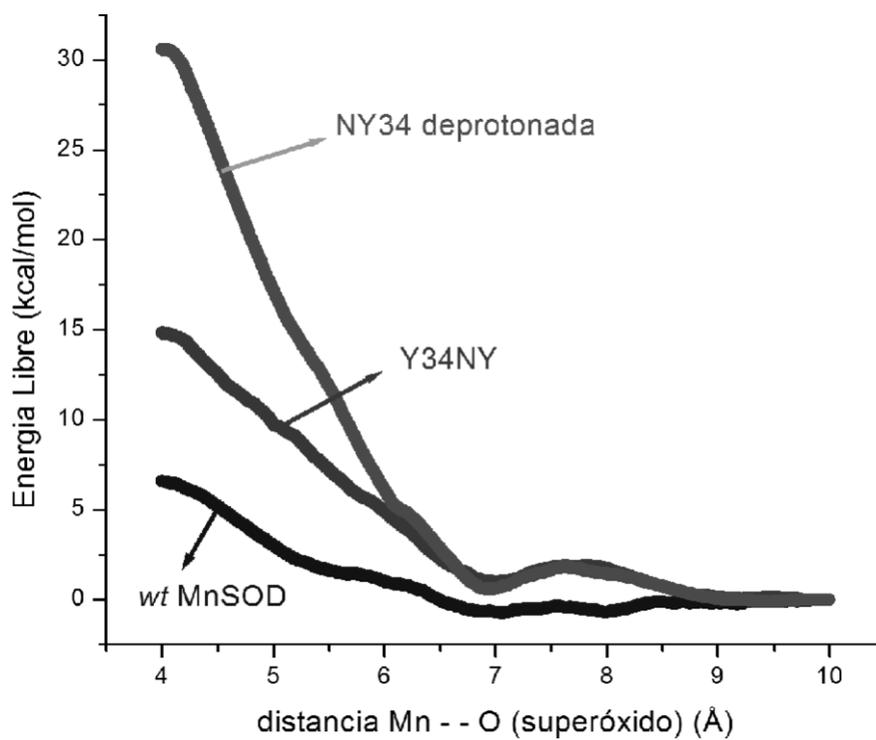


Fig. 4.35. Perfiles de energía libre de la migración de superóxido en función de la distancia Mn-O del superóxido. Los perfiles de energía libre se realizaron considerando MnSOD nativa y nitrada, considerando diferentes estados ácido-base de la 3-nitrotirosina 34 de MnSOD nitrada.

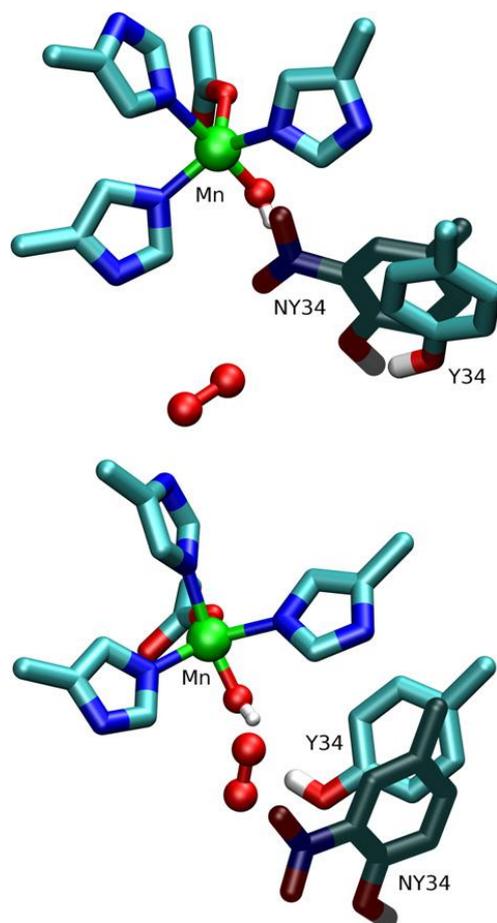


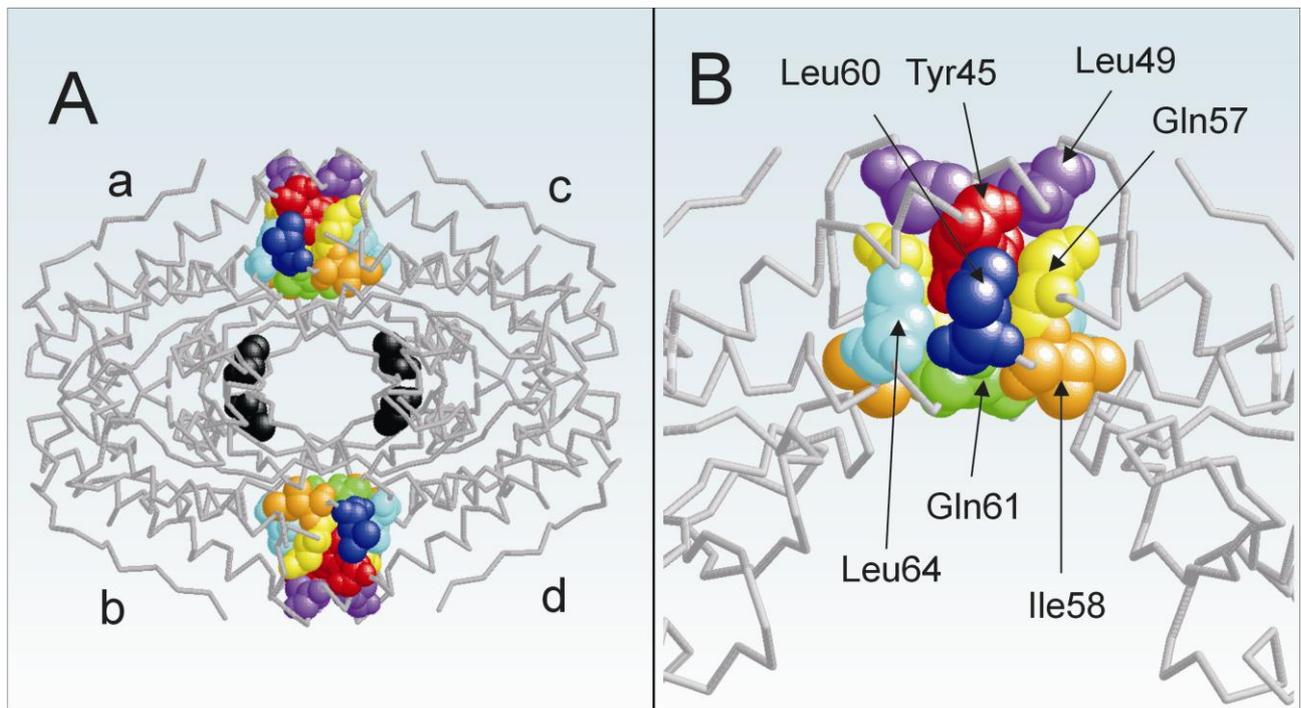
Fig. 4.36. Instantánea de la simulación de MSMD mostrando los sitios de MnSOD nativa y nitrada en Tyr34 donde el grupo nitro de la Tyr34 bloquea el sitio activo (panel superior). En el panel inferior se muestra la última posición tomada por el ligando durante las simulaciones de los perfiles de energía libre.

4.8 Modificaciones por mutaciones puntuales en la estructura cuaternaria de MnSOD y sensibilidad de tioles.

Tras el estudio de modificaciones post-traduccionales en MnSOD se estudió también el efecto de diferentes modificaciones puntuales en la secuencia aminoacídica de la SOD que se han encontrado *in vivo*, observando los efectos que dichas mutaciones pueden tener en la estabilidad y sensibilidad de dichas enzimas.

Dos variantes derivadas de líneas celulares inmortalizadas son MnSOD mutadas específicamente a nivel de la Ile58 (caracterizada por Borghstal *et al* [168]) y Leu60 (encontrada en células de la línea celular inmortalizada Jurkat) muestran propiedades similares en cuanto a su estabilidad y actividad tal como se ha descrito previamente,

por lo que se decidió estudiar en profundidad la sensibilidad de los tioles de esta proteína en diferentes condiciones y como estas mutaciones puntuales pueden afectar su estructura cuaternaria dado que ambas mutaciones afectan la interacción dímero-dímero de la enzima (Esquema 4.7).



Esquema 4.7. Localización de los residuos en la interfase dímero-dímero que incluye los residuos Ile58 y Leu60.

4.8.1 Estudio de la reactividad de tioles de MnSOD nativa y mutada a nivel de Ile58Tre y Leu60Phe.

Como se mencionó anteriormente, en condiciones no desnaturizantes, sólo una de las cisteínas (la Cys 196) es titulable frente a agentes que reaccionan con tioles, por lo que se estudió la reactividad de tioles de las proteínas mutadas, utilizando NEM como agente alquilante de tioles.

Tal como se observa en la Tabla 4.9., las proteínas mutadas, previamente reducidas con β -mercaptoetanol e incubadas con NEM, son alquiladas en 2 posiciones, lo que indica que las dos cisteínas de las proteínas son accesibles para el reactivo.

Proteína (monómero)	MW (Da)
SOD2 wt	22487
SOD2 wt + NEM	22611 (+ 125, 1 NEM)
SOD2 I58T	22471
SOD2 I58T + NEM	22724 (+ 250, 2 NEM)
SOD2 L60F	22517
SOD2 L60F + NEM	22646 (+125, 1 NEM)
	22763 (+250, 2 NEM)
SOD2 I58T/C140S	22454
SOD2 I58T/C140S + NEM	22580 (+ 125, 1 NEM)

Tabla. 4.9. MnSOD nativa o mutada en Ile58Tre o Leu60Phe (5µM) incubada con NEM (5 mM) por 30 min a 37°C, estudiando las modificaciones sufridas por espectrometría de masa (ESI). Se muestra la masa molecular de la especie o especies principales obtenidas.

4.8.2 Determinación de la estabilidad de la estructura cuaternaria de las variantes I58T y L60F de MnSOD

Como se ha mencionado previamente, la MnSOD humana tiene una conformación de homotetrámero, con un átomo de Mn por monómero. Cada monómero tiene una masa aproximada de 22.5 kDa. Dado que las mutaciones afectan la estabilidad de la interacción dímero-dímero se estudiaron los cambios sufridos por las proteínas por diferentes métodos en su estructura cuaternaria, principalmente la estabilidad del tetrámero de la proteína.

Tal como se observa en la Fig. 4.37, estudios por gel filtración muestran que la masa molecular de las proteínas estudiadas es diferente de la masa de la MnSOD nativa. La masa molecular aparente de la variante Ile58Tre es de 70 kDa mientras que la de la variante de Leu60Phe es de 74 kDa. Estos resultados muestran las variantes mutantes muestran un porcentaje de la proteína en su forma tetramérica y un porcentaje en su forma dimérica (o monomérica). El análisis de los picos utilizando una columna

diferente muestran que al contrario con la especie nativa, que eluye como un pico simétrico y fino, las variantes mutantes en Tre o Leu eluyen como picos ensanchados, y asimétricos, mostrando que existe una heterogeneidad en cuanto al tamaño de dichas muestras. Esto sugiere que si bien la estructura tetramérica es estable en la enzima nativa, las variantes mutantes no lo son, observado por el aumento del tiempo de retención en la columna, indicando que la asociación-disociación del complejo tiende hacia la disociación en estas muestras.

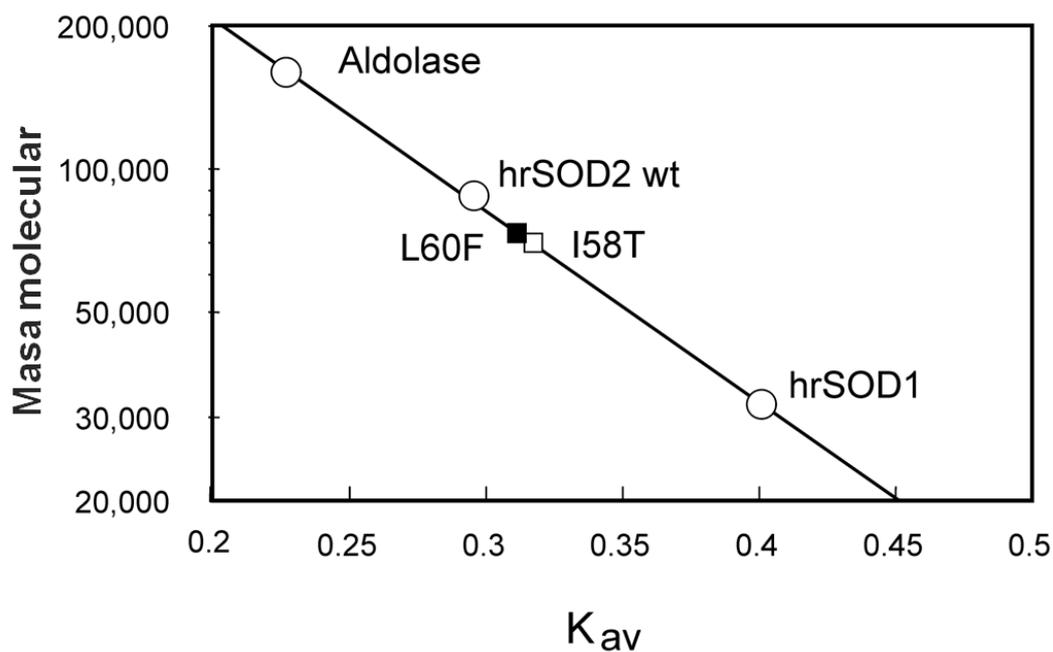


Fig. 4.37. Masa molecular aparente de las variantes de MnSOD Ile58Tre (I58T) y Leu60Phe (L60F) obtenido por cromatografía de gel filtración. Se utilizó Aldolasa (160 kDa), MnSOD humana nativa recombinante (hrSOD2 wt) (88 kDa) y CuZnSOD (hr SOD1) (32 kDa) como estándares de masa molecular. Las fracciones fueron analizadas espectrofotométricamente a 280 nm y midiendo actividad SOD.

Para confirmar los resultados se realizaron estudios con geles nativos. Dado que se ha reportado [186] que la MnSOD es muy resistente a la desnaturalización con SDS se realizaron dichos geles nativos con algunas modificaciones que aumentan la separación las muestras, tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

En la Fig. 4.38 se observan dichos geles nativos y de actividad. Allí se detecta que aquellas variantes que presentan la mutación a nivel de la Ile58 o Leu60 muestran una inestabilidad mayor en la forma de tetrámero, estando en su mayoría como dímero, siendo la forma nativa, como tetrámero, indetectable. La mutación en estos dos

aminoácidos mencionados anteriormente genera la pérdida de la forma de tetrámero, más allá de la presencia o ausencia de la Cys140.

En el gel de actividad de la Fig. 4.38 se observa que las muestras son activas a pesar del tratamiento suave con SDS, en su forma de dímero y tetramérica, siendo la forma tetramérica más activa.

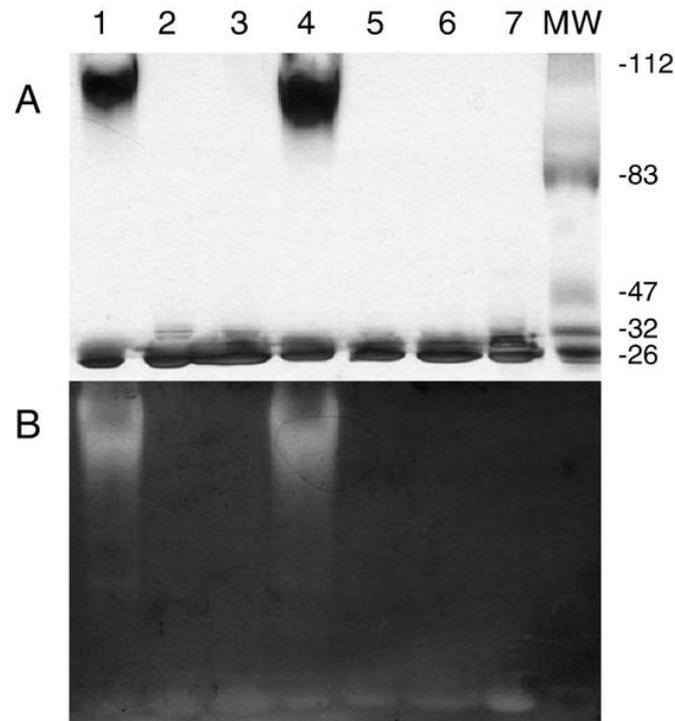


Fig. 4.38. Gel semi-nativo y gel actividad de muestras de MnSOD humana. En los geles se sembraron 5 μ g de MnSOD nativa (carril 1), y las variantes de MnSOD I58T, L60F, C140S, I58T/C140S y L60F/C140S (carriles 2-6). Las muestras se prepararon en 0,5% SDS y se sembraron en un gel conteniendo 300 mM de ácido ϵ -aminohexanoico. Como control se sembró MnSOD de *e. coli* (carril 7). Panel A: Tinción por plata. Panel B: Tinción por actividad SOD, las proteínas activas se detectan como las bandas sin color.

A partir de estos resultados se puede inferir que la sustitución de los aminoácidos que son responsables de la interacción dímero-dímero generan mutantes con una menor estabilidad a nivel de su estructura cuaternaria y una mayor sensibilidad a nivel de los tioles e inestabilidad térmica [239]. Este tipo de mutación, por lo tanto, pueden dar lugar a un estado de estrés oxidativo crónico, razón por la cual, en el caso de algunas de estas mutaciones pueden asociarse a diferentes tipos de cáncer.

5 Discusión y conclusiones

Formación de peroxinitrito e inactivación de SOD

La mitocondria constituye el mayor sitio de control bioenergético en las células eucariotas pero también constituye el mayor sitio de generación de superóxido y otras especies reactivas, siendo un lugar preferencial de formación de especies oxidantes tales como el peroxinitrito, que se forma tras la rápida reacción del superóxido formado *in situ* y el óxido nítrico. Existe una creciente evidencia que afirma que el peroxinitrito es, particularmente en mitocondria, el principal agente nitrante [33] y en dicho organelo, aún en condiciones basales, se han encontrado proteínas nitradas que llegan al 10% del total de las proteínas nitradas, aumentando este número en condiciones patológicas [67]. Esto es coherente con la condición de generadora de especies oxidantes de la mitocondria.

Este organelo, sin embargo, posee defensas contra las especies oxidantes generadas, principalmente el superóxido, tales como las superóxido dismutasas. Estas enzimas, localizadas en la matriz (MnSOD) y espacio intermembrana (CuZnSOD) de de la mitocondria actúan como primera línea de defensa contra el superóxido, disminuyendo su disponibilidad para la formación de peroxinitrito. Sin embargo, estas enzimas son sensibles a la inactivación con este oxidante, tal como ha sido reportado previamente [50, 159], y, en el caso de la MnSOD, la misma ha sido encontrada nitrada en condiciones patológicas, lo cual indica una inactivación *in vivo* por parte del peroxinitrito [65, 77, 79, 82, 84]. Esto plantea un dilema cinético, ya que la presencia de superóxido dismutasas en mitocondria disminuye la concentración disponible de superóxido, por lo que la formación de peroxinitrito disminuiría también. Sin embargo, tal como se ha presentado en esta tesis, en presencia de flujos simultáneos de superóxido y óxido nítrico generados en concentraciones similares o menores a los hallados *in vivo*, son capaces de inactivar tanto a la MnSOD como a la CuZnSOD, indicando que la rápida reacción del óxido nítrico con el superóxido ($0,5-1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) puede ocurrir a pesar de la presencia de estas enzimas detoxificadoras. Dicha formación fue simulada en presencia y ausencia de superóxido dismutasa, y se observó que en presencia de dichas enzimas se generan concentraciones de peroxinitrito capaces de inactivar las enzimas en estudio. Esta inactivación es dependiente del tiempo de incubación de dichas enzimas con los flujos, indicando que depende de la dosis acumulada de peroxinitrito. Estos estudios además sugieren que es la reacción directa con peroxinitrito la causante de la inactivación ya que diversos atrapadores de los radicales derivados de este oxidante fueron co-incubados con las

enzimas estudiadas y no se observó un cambio significativo en la inactivación. En el caso de MnSOD, donde la nitración sitio-específica de la Tyr34, cercana al sitio activo, es la causante de la inactivación por peroxinitrito, se estudió si en presencia de flujos simultáneos de óxido nítrico y superóxido se observa nitración de esta enzima. En todos los casos donde se detectó inactivación de la enzima se observó también nitración, coherente con la hipótesis de inhibición por nitración de la Tyr34. La presencia de atrapadores de radicales derivados de la homólisis de peroxinitrito, principalmente dióxido de nitrógeno, si bien disminuye la nitración general, no altera los índices de inhibición, sugiriendo que la nitración inhibida por estos compuestos corresponde a tirosinas no críticas de la proteína. Es de notar que en presencia de altas dosis de glutatión, molécula que reacciona tanto con peroxinitrito como con dióxido de nitrógeno, la inhibición no se pierde en presencia de flujos simultáneos de óxido nítrico y superóxido, efecto que si se observa en presencia de peroxinitrito auténtico. Esto sugiere que, además de la nitración e inhibición mediada por peroxinitrito tras una reacción directa con los centros metálicos, existiría otro mecanismo de inactivación mediado probablemente por óxido nítrico *via* la formación de compuestos intermediarios tales como radical iminoxilo [240] que generarían, tras su oxidación, 3-nitrotirosina.

Estos estudios, por lo tanto, presentan evidencias cinéticas y mecanísticas que explican la observación de proteínas nitradas *in vivo*, incluyendo las propias SOD, apoyando la hipótesis de la formación de peroxinitrito en diferentes compartimentos celulares, incluyendo la mitocondria.

Estudios cinéticos de la reacción de MnSOD con peroxinitrito

La controversia entre las constantes reportadas, que difieren entre sí casi tres órdenes de magnitud generó la necesidad de establecer un valor de la constante entre MnSOD y peroxinitrito. El valor obtenido, de $1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para MnSOD por tetrámero, si bien es menor al obtenido por Quijano y colaboradores previamente es similar al obtenido para CuZnSOD previamente ($1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ por dímero) [159]. Dada las similitudes estructurales de las enzimas, con un túnel de acceso y metales en su sitio activo, la similitud de dichas constantes es esperable. A su vez la diferencia en susceptibilidad de ambas enzimas a peroxinitrito, podría ser debido a la presencia, en MnSOD, de una tirosina cercana al sitio activo que, tras su nitración, sería la responsable de su inactivación mientras que la CuZnSOD no posee residuos fácilmente nitrables, particularmente tirosinas.

El valor de constante reportada en esta tesis fue calculada a partir de constantes aparentes cuyos valores fueron obtenidas por ajuste a una exponencial de primer orden. Este comportamiento exponencial implicaría que la reacción de descomposición de peroxinitrito por MnSOD en las condiciones estudiadas sería aparentemente catalítica. Por otra parte los estudios de oximetría que aún se encuentran en fase preliminar apoyan la hipótesis de una constante más alta que la reportada por Groves y colaboradores [179], más cercana al valor obtenido por Quijano y colaboradores [18], con valores de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción global y apoyarían la observación de una reacción catalítica.

Citocromo c y cardiolipina: Estudios estructurales y nitración

Como se ha mencionado previamente, la mitocondria es un sitio de formación de especies altamente oxidantes tales como el peroxinitrito, y la presencia de enzimas detoxificadoras, particularmente las superóxido dismutasas, no son capaces de inhibir su formación a partir de los radicales que lo generan: el superóxido y el óxido nítrico. El citocromo c, como se ha mencionado extensivamente a lo largo de esta tesis, es una proteína mitocondrial susceptible a la nitración mediada por peroxinitrito, y dicha modificación post-traducciona genera un aumento de su actividad peroxidática, transformando al citocromo c en una especie oxidante. Esta actividad peroxidasa no sólo es activada tras la nitración sino que también es observada cuando esta proteína interacciona con un lípido mitocondrial, la cardiolipina.

Sin embargo, ambos cambios, si bien aumentan la actividad peroxidática en niveles similares, tienen finales diferentes a nivel celular. La actividad peroxidasa mediada por cardiolipina de citocromo c genera la activación de la cascada apoptótica luego de la traslocación esta proteína al citosol [91] mientras que la nitración de la proteína no inicia la cascada apoptótica sino que genera una traslocación hacia el núcleo del citocromo c [141].

Estos eventos hacen que estudiar la nitración de citocromo c tras la interacción con cardiolipina un evento interesante, ya que la interacción con el lípido, al generar un cambio conformacional podría o facilitar o inhibir dicha nitración y con ello definir la participación del citocromo c como activador de la apoptosis.

Los experimentos de análisis de estructura de citocromo c con cardiolipina realizados por técnicas de NMR indican que si bien existe un cambio contundente en la

conformación de esta proteína, la misma no es puntualmente ligada a una zona particular de la enzima sino un cambio generalizado en toda la proteína, concordante con un desplegamiento de la proteína, apuntando a interacciones electrostáticas entre citocromo c y cardiolipina que generen dicho cambio. Los estudios de NMR paramagnético, realizados a pH fisiológico muestran que, particularmente, la señal correspondiente a la Met 80, que coordina axialmente el hierro del grupo hemo, no se ve particularmente afectada, si bien sufre una disminución de la señal similar al resto de las señales detectadas en las cercanías del grupo hemo. Esto es sorprendente, ya que la modificación de la coordinación de esta metionina fue reportada previamente por esta técnica utilizando citocromo c mononitrado, a pH fisiológico, observándose un “transición alcalina” temprana [112]. Por lo tanto, y de acuerdo a nuestros datos, la modificación generada por la interacción con cardiolipina en citocromo c no es la misma que la generada por la nitración, lo cual es concordante con la diferencia en cuanto a la respuesta biológica de estos dos cambios en la proteína. Por otra parte, sin embargo, la interacción con cardiolipina al modificar la interacción con Met 80 utilizando un derivado carboximetilado en las metioninas de esta proteína se detecta un aumento en la formación de Compuesto I, característico de las hemoperoxidasas [237], en presencia de cardiolipina y peróxido de hidrógeno. El aumento de la formación de este compuesto I, que se caracteriza por la formación de un oxoferrilo (Fe IV) a nivel del hierro del grupo hemo, tras la incubación de citocromo c carboximetilado con cardiolipina y expuesto a peróxido, indica que si bien la interacción con Met 80 no se logró esclarecer, podría estar relacionada con la modificación de dicho residuo en citocromo c sin modificar. Más aún, reportes recientes muestran que la carboximetilación de citocromo c reducido (Fe III) aumentan la reactividad del mismo con peroxinitrito en presencia cardiolipina [241], en concordancia con los resultados reportados en esta tesis con respecto a peróxido de hidrógeno lo que indicaría un aumento general de la reactividad de citocromo c en presencia de cardiolipina.

Dadas las amplias diferencias reportadas y estudiadas entre la interacción con cardiolipina y la nitración de citocromo c, se procedió a estudiar el efecto de agentes nitrantes en citocromo c en presencia de cardiolipina. Tal como ha sido presentado en la sección de resultados, la nitración de citocromo c en presencia de liposomas conteniendo cardiolipina es mayor que en ausencia de este lípido. Esto se demostró utilizando técnicas cualitativas y técnicas cuantitativas y analíticas.

Técnicas inmunoquímicas mostraron un aumento global de la nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina, en concordancia con un aumento de los radicales libres

generados en esas condiciones. Dichos radicales, además, fueron identificados como radical tirosilo. Por otra parte, el estudio por espectrometría de masa MALDI-TOF sugiere que la formación de 3-nitrotirosina se localiza en diferentes péptidos cubriendo las 4 tirosinas de citocromo c, indicando que la nitración en esta proteína en estas condiciones se asocia con una exposición y aumento de reactividad que no ocurren en el caso de la exposición de citocromo c a peroxinitrito en ausencia del lípido.

Por otra parte se utilizaron técnicas analíticas, que permiten la cuantificación y caracterización de cada especie formada. En particular, la caracterización realizada por HPLC de intercambio catiónico muestra una diferencia importante no sólo en la magnitud de la nitración (que es mayor) sino también un aumento de la especies di- o tri- nitradas, explicando la presencia de identificación de las tirosinas 67 y 48 nitradas. Se ha de aclarar que si bien el péptido de la tirosina 67 se haya nitrado en el caso de la exposición de citocromo c a peroxinitrito en ausencia de cardiolipina, el rendimiento del mismo es muy bajo, como se extrae de las técnicas cromatográficas que han caracterizado exhaustivamente las especies formadas y analizadas en estas condiciones [73].

Concordantemente con los resultados mencionados anteriormente, un análisis cuantitativo de la cantidad de 3-nitrotirosina formada en las condiciones de estudio reveló que el aumento en la nitración es de casi 7 veces, indicando la magnitud del cambio sufrido por la proteína.

Estos datos son además apoyan los resultados donde se evalúa la influencia de cada tirosina en la actividad peroxidasa de citocromo c en presencia de cardiolipina. En estos datos se extrae que la tirosina 67 jugaría un rol preponderante en la actividad peroxidasa de esta proteína jugando un rol importante por la formación preferencial de radical tirosilo en este residuo. La formación preferencial de un radical en este residuo, además de los formados en las demás tirosinas implica que, en presencia de un agente nitrante esta tirosina sería además preferencialmente nitrada con respecto a su condición sin cardiolipina.

Por otra parte se caracterizó, tras la obtención de citocromo c mononitrada en Tyr 97 o 74 de alta pureza, el anticuerpo 1D3, el cual permite detectar conformaciones alteradas de citocromo c. En estos casos se observó claramente que los citocromos c mononitrados interaccionan con este anticuerpo indicando un cambio conformacional en los mismos que no presenta el citocromo c nativo. Los citocromo c mononitrados

de alta pureza se utilizarán además para la generación de nuevos anticuerpos específicos contra conformaciones alteradas de esta proteína.

Estudio estructural de la inactivación de MnSOD por nitración de tirosina 34 *in silico*

Se ha mencionado extensivamente a lo largo de este trabajo que la nitración sitio específica de la Tyr 34 de MnSOD es la responsable de la inactivación de la enzima por peroxinitrito, hecho que ha sido reportado ampliamente [18, 50]. En el trabajo aquí presentado se estudiaron, mediante metodologías computacionales, los procesos que, a nivel molecular generan la inactivación de la MnSOD tras el agregado de un grupo nitro a la tirosina 34. Dichos resultados mostraron que la introducción de un grupo voluminoso tal como el grupo nitro (45 Da) produce tanto una repulsión estérica como electrostática, esto último debido a la polarización negativa de dicho sustituyente, creando una barrera que resulta en el bloque del canal del sitio activo y consiguiente inactivación de la enzima. Estos resultados además confirman no solo el rol de la nitración de la Tyr34 en la inactivación sino también la importancia del grupo fenol de la Tyr nativa en la función de la MnSOD.

Efecto de mutaciones puntuales en la estabilidad de la estructura cuaternaria de MnSOD

Como parte de estudio estructural realizado para MnSOD se estudió el efecto de mutaciones puntuales, encontrados en líneas celulares de líneas inmortalizadas, en la estabilidad de la estructura cuaternaria de MnSOD, para determinar si dichas mutaciones, o polimorfismos, podrían estar involucrados en una inestabilidad de la enzima que pueden alterar el metabolismo redox de la enzima. Tal como fue presentado en los resultados, las mutaciones puntuales a nivel de la Leu60Phe y Ile58Tre generan desestabilización del tetrámero de MnSOD, y dicha desestabilización está asociada con una mayor sensibilidad a agentes alquilantes, por exposición aumentada de una Cys localizada en la posición 160 que en conformaciones nativas no está expuesta. La expresión de estas proteínas alteradas en cepas de *E. coli* generan también una disminución del crecimiento a 40°C, lo que implica una inestabilidad termal aumentada causada por estas proteínas, en comparación con las cepas que contienen MnSOD nativa (no se muestra, reportado en [239]).

La inestabilidad de estas proteínas mutadas disminuiría su capacidad antioxidante, generando en las células que presentan este tipo de enzima un estado oxidativo

crónico que podría contribuir a la inestabilidad genética observada en ciertos tipos de cáncer.

En suma, en este trabajo enfocado en el estudio de dos proteínas mitocondriales se determinaron los mecanismos de nitración de 3-nitrotirosina en citocromo c y MnSOD así como los cambios estructurales que favorecen dicha nitración o que ocurren tras esta modificación. Estos resultados proveen de elementos bioquímicos relevantes para el entendimiento de la alteración de la homeostasis mitocondrial secundaria a la formación de peroxinitrito y otras especies nitrantes

6 Perspectivas

Interacción citocromo c y cardiolipina

Sería de gran interés, como perspectiva para nuevos estudios, el análisis de los citocromo c nitrados en presencia de cardiolipina utilizando anticuerpos que reconocen formas alternativas de citocromo c, ya que permitiría determinar, con una nueva herramienta las variaciones que existen, o no, entre las especies nitradas obtenidas en presencia o ausencia de cardiolipina.

A nivel estructural, para determinar los cambios conformacionales de citocromo c durante su interacción con cardiolipina se pretenden realizar estudios de NMR en estado sólido, dentro del marco del CEBEM, en la Universidad Federal de Rio de Janeiro. En este tipo de estudios se pueden determinar estructuras utilizando proteínas doblemente marcadas (a nivel de ^{15}N y ^{13}C), interaccionando con bicapas lipídicas [229], sin las limitaciones del método en solución. Por otra parte, y en colaboración con el Laboratorio de Cristalografía del Institut Pasteur de Montevideo, se pretenden obtener cristales de citocromo c interaccionando con cardiolipina, además de la obtención de otros cristales de modificaciones de citocromo c tales como citocromo c durante la transición alcalina, y citocromo c mononitrado. Este último se utilizará para caracterizar en profundidad anticuerpos que reconocen formas alteradas conformacionalmente de citocromo c (incluyendo aquel derivado de la clona 1D3), lo que resultará una herramienta de mucha utilidad para la detección *in vivo* de formas modificadas de citocromo c.

MnSOD y su interacción con peroxinitrito

Para poder definir el mecanismo de reacción de MnSOD con peroxinitrito se encuentran en curso experimentos de oximetría y detección de óxido nítrico de manera de poder determinar los mecanismos moleculares que se llevan a cabo tras su reacción, más específicamente, las modificaciones en el estado redox del centro metálico de Mn. En conjunto con estos experimentos, se están llevando a cabo en colaboración con la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, cálculos computacionales para establecer, desde un punto de vista teórico, este mecanismo.

Además, dentro del marco de un proyecto Fondo Clemente Estable modalidad III, se continuará el estudio de MnSOD nitrada en tirosina 34 tanto de manera post-traducciona como co-traducciona. Estos estudios incluyen caracterización estructural

de la MnSOD nitrada co-traduccionalmente y generación de herramientas de cuantificación específica de esta modificación *in vivo* (cultivos celulares).

7 Publicaciones

A partir de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos originales:

Demicheli, V., Quijano, C., Alvarez, B., and Radi, R., Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(9): p. 1359-1368.

Hernandez-Saavedra, D., Quijano, C., Demicheli, V., Souza, J.M., Radi, R., and McCord, J.M., Thiol-sensitive mutant forms of human SOD2, L60F, and I58T: the role of Cys140. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(9): p. 1202-10.

Kapralov, A.A., Yanamala, N., Tyurina, Y.Y., Castro, L., Samhan-Arias, A., Vladimirov, Y.A., Maeda, A., Weitz, A.A., Peterson, J., Mylnikov, D., Demicheli, V., Tortora, V., Klein-Seetharaman, J., Radi, R., and Kagan, V.E., Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(9): p. 2147-55.

Moreno, D.M., Marti, M.A., De Biase, P.M., Estrin, D.A., Demicheli, V., Radi, R., and Boechi, L., Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **507**(2): p. 304-9.

Además se publicó la siguiente revisión:

Castro, L., Demicheli, V., Tortora, V., and Radi, R., *Mitochondrial protein tyrosine nitration*. *Free Radic Res*, 2011. **45**(1): p. 37-52.

Los resultados de nitración de citocromo c en presencia de cardiolipina y de interacción de citocromo c carboximetilado con cardiolipina en presencia de peróxido de hidrógeno se encuentran en fase de escritura, para ser enviados a revistas arbitradas.

8 Agradecimientos

A PEDECIBA-Química y a la ANII, por el apoyo económico en la forma de becas, fundamental para realizar esta tesis.

A Rafael Radi mi orientador, quien me dio un lugar para realizar este trabajo, siempre dando libertad para probar ideas nuevas, y apoyando para poder lograr los objetivos.

A Noel Alvarez, una segunda madre en el laboratorio, que me apoyó durante todos estos años para poder dar cada vez más.

A Lucía Piacenza, Gonzalo Peluffo y Natalia Romero, amigos que siempre están ahí (aunque estén lejos) para aconsejar, ayudar con un experimento trancado y siempre dando para adelante (a su propia manera...)

A Verito Tórtora, amiga y compañera de escritorio. Por la ayuda a nivel experimental pero sobre todo a nivel humano, por las coquitas en el quiosco y los te de la tarde, por las charlas y el apoyo siempre.

A Celia Quijano por el apoyo durante todos estos años, y el trabajo en conjunto.

A Beatriz Alvarez por abrirme la puerta a la investigación hace ya 12 años y darme las primeras herramientas para poder realizar esto, siempre dispuesta a dar una mano cuando se la necesite.

A Sebastián Carballal, amigo y compañero con el que hemos compartido tantas experiencias desde el año 2000.

A Madia Trujillo, por tantas conversaciones, discusiones científicas, y apoyo a lo largo de los años.

A Gerardo Ferrer, que siempre estuvo para solucionar dudas, conversar y al resto de los compañeros del Laboratorio de Enzimología.

A los representantes de la CUEVA, por el apoyo logístico en horas de necesidad, mate, galletitas y charla.

A los restantes compañeros del laboratorio, compañeros de un grupo humano que crece y que se apoya mutuamente.

A los integrantes de UByPA del Instituto Pasteur, Carlos, Madelón, Rosario, Analía y Maggie. Por hacerme sentir que formaba parte, y enseñarme muchísimo durante la “pasantía” de tantos meses.

A Vicky Gonzalez, siempre ayudando y haciendo las cosas fáciles, solucionando todo!

A mis amigas Lorena y Julia, por el apoyo incondicional y la confianza.

A mis amigos Gonzalo, Fede, Nicolás, Juan Pablo, Fernando, Rafa.

A mis padres y mis hermanas, que siempre siempre están!

A mi esposo Gustavo, por bancarme durante todo este largo proceso.

9 Referencias

1. Nelson, D. and Cox, M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. 2000: Worth Publishers.
2. Saraste, M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle*. *Science*, 1999. **283**(5407): p. 1488-93.
3. Barja, G., *Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity*. *J Bioenerg Biomembr*, 1999. **31**(4): p. 347-66.
4. Barja, G. and Herrero, A., *Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon*. *J Bioenerg Biomembr*, 1998. **30**(3): p. 235-43.
5. Turrens, J.F. and Boveris, A., *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria*. *Biochem J*, 1980. **191**(2): p. 421-7.
6. Turrens, J.F., Freeman, B.A., Levitt, J.G., and Crapo, J.D., *The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles*. *Arch Biochem Biophys*, 1982. **217**(2): p. 401-10.
7. Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E., *Mitochondria and reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(4): p. 333-43.
8. Ilan, Y.A., Czapski, G., and Meisel, D., *The one-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen/superoxide system*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **430**(2): p. 209-24.
9. Babior, B.M., *Phagocytes and oxidative stress*. *Am J Med*, 2000. **109**(1): p. 33-44.
10. Boveris, A. and Cadenas, E., *Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration*. *FEBS Lett*, 1975. **54**(3): p. 311-4.
11. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B., *The cellular production of hydrogen peroxide*. *Biochem J*, 1972. **128**(3): p. 617-30.
12. Misra, H.P. and Fridovich, I., *The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin*. *J Biol Chem*, 1972. **247**(21): p. 6960-2.
13. Quijano, C., Castro, L., Peluffo, G., Valez, V., and Radi, R., *Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(6): p. H3404-14.
14. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. 1999, Oxford, New York: Clarendon Press; Oxford University Press. xvi, 543.
15. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I., and Stoppani, A.O., *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria*. *Arch Biochem Biophys*, 1977. **180**(2): p. 248-57.
16. Knowles, P.F., Gibson, J.F., Pick, F.M., and Bray, R.C., *Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to a free radical, the superoxide ion*. *Biochem J*, 1969. **111**(1): p. 53-8.
17. Fridovich, I., *Superoxide radical: an endogenous toxicant*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1983. **23**: p. 239-57.
18. Quijano, C., Hernandez-Saavedra, D., Castro, L., McCord, J.M., Freeman, B.A., and Radi, R., *Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 11631-8.

19. Chang, L.Y., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Crapo, J.D., *Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes*. J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2169-79.
20. Gardner, P.R. and Fridovich, I., *Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19328-33.
21. Hausladen, A. and Fridovich, I., *Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29405-8.
22. Goldstein, S., Lind, J., and Merenyi, G., *Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates*. Chem Rev, 2005. **105**(6): p. 2457-70.
23. Huie, R.E. and Padmaja, S., *The reaction of NO with superoxide*. Free Radic Res Commun, 1993. **18**(4): p. 195-9.
24. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P.G., and Koppenol, W.H., *Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(11): p. 1285-92.
25. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4003-8.
26. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
27. Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W., and Richardson, D.J., *Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1232**(3): p. 97-173.
28. Brown, G.C. and Cooper, C.E., *Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase*. FEBS Lett, 1994. **356**(2-3): p. 295-8.
29. Cassina, A. and Radi, R., *Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport*. Arch Biochem Biophys, 1996. **328**(2): p. 309-16.
30. Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S., and Schapira, A.H., *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases*. FEBS Lett, 1994. **345**(1): p. 50-4.
31. Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S.D., and Richter, C., *Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31185-8.
32. Quijano, C., Romero, N., and Radi, R., *Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: Modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(6): p. 728-41.
33. Quijano, C., Cassina, A., Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R., *Peroxynitrite: A mediator of nitric-oxide-dependent mitochondrial dysfunction in pathology*, in *Nitric oxide, Cell Signaling, and Gene Expression*, S. Lamas and E. Cadenas, Editors. 2005.
34. Botti, H., Moller, M.N., Steinmann, D., Nauser, T., Koppenol, W.H., Denicola, A., and Radi, R., *Distance-dependent diffusion-controlled reaction of *NO and O2*- at chemical equilibrium with ONOO*. J Phys Chem B, 2010. **114**(49): p. 16584-93.
35. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A., *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4244-50.

36. Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S., *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(6): p. 834-42.
37. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., and Cayota, A., *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(5): p. 463-88.
38. Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M., and Radi, R., *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*. Arch Biochem Biophys, 1996. **333**(1): p. 49-58.
39. Romero, N., Denicola, A., Souza, J.M., and Radi, R., *Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(1): p. 23-30.
40. MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., and Thompson, J.A., *Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues*. Biochemistry, 1998. **37**(6): p. 1613-22.
41. Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Rubbo, H., *The biological Chemistry of peroxynitrite*, in *Nitric Oxide: Biology and pathobiology*, L.J. Ignarro, Editor. 2000, Academic Press. p. 57-82.
42. Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P.G., Chen, J., Accavitti, M.A., Tarpey, M.M., and White, C.R., *Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1994. **375**(2): p. 81-8.
43. Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D., and Beckman, J.S., *Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 431-7.
44. Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B.A., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
45. Liu, X., Miller, M.J., Joshi, M.S., Thomas, D.D., and Lancaster, J.R., Jr., *Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2175-9.
46. Moller, M., Botti, H., Bathyany, C., Rubbo, H., Radi, R., and Denicola, A., *Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8850-4.
47. Bartesaghi, S., Wenzel, J., Trujillo, M., Lopez, M., Joseph, J., Kalyanaraman, B., and Radi, R., *Lipid peroxyl radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes*. Chem Res Toxicol. **23**(4): p. 821-35.
48. Radi, R., Bush, K.M., and Freeman, B.A., *The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation*. Arch Biochem Biophys, 1993. **300**(1): p. 409-15.
49. Castro, L., Demicheli, V., Tortora, V., and Radi, R., *Mitochondrial protein tyrosine nitration*. Free Radic Res, 2011. **45**(1): p. 37-52.
50. Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., and Murayama, K., *Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14085-9.
51. Ansari, M.A. and Scheff, S.W., *Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex*. J Neuropathol Exp Neurol. **69**(2): p. 155-67.
52. Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J.B., Lynn, B., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A., *Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain*. J Neurochem, 2003. **85**(6): p. 1394-401.
53. Reynolds, M.R., Berry, R.W., and Binder, L.I., *Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs"*. Biochemistry, 2007. **46**(25): p. 7325-36.
54. Peluffo, G. and Radi, R., *Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(2): p. 291-302.

55. Kooy, N.W., Lewis, S.J., Royall, J.A., Ye, Y.Z., Kelly, D.R., and Beckman, J.S., *Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite*. Crit Care Med, 1997. **25**(5): p. 812-9.
56. Eleuteri, E., Di Stefano, A., Ricciardolo, F.L., Magno, F., Gnemmi, I., Colombo, M., Anzalone, R., Cappello, F., La Rocca, G., Genta, F.T., Zummo, G., and Giannuzzi, P., *Increased nitrotyrosine plasma levels in relation to systemic markers of inflammation and myeloperoxidase in chronic heart failure*. Int J Cardiol, 2009. **135**(3): p. 386-90.
57. Kaur, H. and Halliwell, B., *Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients*. FEBS Lett, 1994. **350**(1): p. 9-12.
58. Shigenaga, M.K., Lee, H.H., Blount, B.C., Christen, S., Shigeno, E.T., Yip, H., and Ames, B.N., *Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3211-6.
59. Ceriello, A., Mercuri, F., Quagliari, L., Assaloni, R., Motz, E., Tonutti, L., and Taboga, C., *Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress*. Diabetologia, 2001. **44**(7): p. 834-8.
60. Turko, I.V., Li, L., Aulak, K.S., Stuehr, D.J., Chang, J.Y., and Murad, F., *Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33972-7.
61. Turko, I.V. and Murad, F., *Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35844-9.
62. Bigelow, D.J. and Qian, W.J., *Quantitative proteome mapping of nitrotyrosines*. Methods Enzymol, 2008. **440**: p. 191-205.
63. Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A.C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R., and Cayota, A.M., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.
64. Estevez, A.G., Crow, J.P., Sampson, J.B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G.J., Tarpey, M.M., Barbeito, L., and Beckman, J.S., *Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2498-500.
65. MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., and Thompson, J.A., *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11853-8.
66. Vieira, H.L., Belzacq, A.S., Haouzi, D., Bernassola, F., Cohen, I., Jacotot, E., Ferri, K.F., El Hamel, C., Bartle, L.M., Melino, G., Brenner, C., Goldmacher, V., and Kroemer, G., *The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal*. Oncogene, 2001. **20**(32): p. 4305-16.
67. Sacksteder, C.A., Qian, W.J., Knyushko, T.V., Wang, H., Chin, M.H., Lacan, G., Melega, W.P., Camp, D.G., 2nd, Smith, R.D., Smith, D.J., Squier, T.C., and Bigelow, D.J., *Endogenously nitrated proteins in mouse brain: links to neurodegenerative disease*. Biochemistry, 2006. **45**(26): p. 8009-22.
68. Aulak, K.S., Miyagi, M., Yan, L., West, K.A., Massillon, D., Crabb, J.W., and Stuehr, D.J., *Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12056-61.
69. Nardo, G., Pozzi, S., Mantovani, S., Garbelli, S., Marinou, K., Basso, M., Mora, G., Bendotti, C., and Bonetto, V., *Nitroproteomics of peripheral blood mononuclear cells from patients and a rat model of ALS*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(7): p. 1559-67.
70. Zhang, Q., Qian, W.J., Knyushko, T.V., Clauss, T.R., Purvine, S.O., Moore, R.J., Sacksteder, C.A., Chin, M.H., Smith, D.J., Camp, D.G., 2nd, Bigelow, D.J., and Smith, R.D., *A method for selective enrichment and analysis of*

- nitrotyrosine-containing peptides in complex proteome samples*. J Proteome Res, 2007. **6**(6): p. 2257-68.
71. Amoresano, A., Chiappetta, G., Pucci, P., D'Ischia, M., and Marino, G., *Bidimensional tandem mass spectrometry for selective identification of nitration sites in proteins*. Anal Chem, 2007. **79**(5): p. 2109-17.
 72. Alonso, D., Encinas, J.M., Uttenthal, L.O., Bosca, L., Serrano, J., Fernandez, A.P., Castro-Blanco, S., Santacana, M., Bentura, M.L., Richart, A., Fernandez-Vizarra, P., and Rodrigo, J., *Coexistence of translocated cytochrome c and nitrated protein in neurons of the rat cerebral cortex after oxygen and glucose deprivation*. Neuroscience, 2002. **111**(1): p. 47-56.
 73. Batthyany, C., Souza, J.M., Duran, R., Cassina, A., Cervenansky, C., and Radi, R., *Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite*. Biochemistry, 2005. **44**(22): p. 8038-46.
 74. Cassina, A.M., Hodara, R., Souza, J.M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B.A., and Radi, R., *Cytochrome c nitration by peroxynitrite*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21409-15.
 75. Souza, J.M., Peluffo, G., and Radi, R., *Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker?* Free Radic Biol Med, 2008. **45**(4): p. 357-66.
 76. MacMillan-Crow, L.A., Cruthirds, D.L., Akhi, K.M., Sanders, P.W., and Thompson, J.A., *Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(12): p. 1603-8.
 77. Cruthirds, D.L., Novak, L., Akhi, K.M., Sanders, P.W., Thompson, J.A., and MacMillan-Crow, L.A., *Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion*. Arch Biochem Biophys, 2003. **412**(1): p. 27-33.
 78. Koeck, T., Corbett, J.A., Crabb, J.W., Stuehr, D.J., and Aulak, K.S., *Glucose-modulated tyrosine nitration in beta cells: targets and consequences*. Arch Biochem Biophys, 2009. **484**(2): p. 221-31.
 79. Aoyama, K., Matsubara, K., Fujikawa, Y., Nagahiro, Y., Shimizu, K., Umegae, N., Hayase, N., Shiono, H., and Kobayashi, S., *Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann Neurol, 2000. **47**(4): p. 524-7.
 80. van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., and Luscher, T.F., *Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1731-44.
 81. Pittman, K.M., MacMillan-Crow, L.A., Peters, B.P., and Allen, J.B., *Nitration of manganese superoxide dismutase during ocular inflammation*. Exp Eye Res, 2002. **74**(4): p. 463-71.
 82. Guo, W., Adachi, T., Matsui, R., Xu, S., Jiang, B., Zou, M.H., Kirber, M., Lieberthal, W., and Cohen, R.A., *Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(4): p. H1396-403.
 83. Knight-Lozano, C.A., Young, C.G., Burow, D.L., Hu, Z.Y., Uyeminami, D., Pinkerton, K.E., Ischiropoulos, H., and Ballinger, S.W., *Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues*. Circulation, 2002. **105**(7): p. 849-54.
 84. Agarwal, R., Hennings, L., Rafferty, T.M., Letzig, L.G., McCullough, S., James, L.P., MacMillan-Crow, L.A., and Hinson, J.A., *Acetaminophen-induced hepatotoxicity and protein nitration in neuronal nitric-oxide synthase knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **340**(1): p. 134-42.
 85. Scott, R. and Mauk, A.G., *Cytochrome c: a multidisciplinary approach*. 1996, Sausalito, California: University Science Books. 738.
 86. Liu, G., Shao, W., Zhu, S., and Tang, W., *Effects of axial ligand replacement on the redox potential of cytochrome c*. J Inorg Biochem, 1995. **60**(2): p. 123-31.

87. Millett, F. and Scott, R., *Cytochrome c, A Multidisciplinary Approach*, ed. A.G. Mauk and R.A. Scott. 1996, Sausalito, CA: University Science Books.
88. Kapralov, A.A., Yanamala, N., Tyurina, Y.Y., Castro, L., Samhan-Arias, A., Vladimirov, Y.A., Maeda, A., Weitz, A.A., Peterson, J., Mylnikov, D., Demicheli, V., Tortora, V., Klein-Seetharaman, J., Radi, R., and Kagan, V.E., *Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(9): p. 2147-55.
89. Diaz-Moreno, I., Garcia-Heredia, J.M., Diaz-Quintana, A., Teixeira, M., and De la Rosa, M.A., *Nitration of tyrosines 46 and 48 induces the specific degradation of cytochrome c upon change of the heme iron state to high-spin*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(12): p. 1616-23.
90. Radi, R., Thomson, L., Rubbo, H., and Prodanov, E., *Cytochrome c-catalyzed oxidation of organic molecules by hydrogen peroxide*. *Arch Biochem Biophys*, 1991. **288**(1): p. 112-7.
91. Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., Vlasova, I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A., Kurnikov, I.V., and Borisenko, G.G., *Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(4): p. 223-32.
92. Kapralov, A.A., Kurnikov, I.V., Vlasova, I., Belikova, N.A., Tyurin, V.A., Basova, L.V., Zhao, Q., Tyurina, Y.Y., Jiang, J., Bayir, H., Vladimirov, Y.A., and Kagan, V.E., *The hierarchy of structural transitions induced in cytochrome c by anionic phospholipids determines its peroxidase activation and selective peroxidation during apoptosis in cells*. *Biochemistry*, 2007. **46**(49): p. 14232-44.
93. Radi, R., Turrens, J.F., and Freeman, B.A., *Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide*. *Arch Biochem Biophys*, 1991. **288**(1): p. 118-25.
94. Radi, R., Sims, S., Cassina, A., and Turrens, J.F., *Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **15**(6): p. 653-9.
95. Belikova, N.A., Tyurina, Y.Y., Borisenko, G., Tyurin, V., Samhan Arias, A.K., Yanamala, N., Furtmuller, P.G., Klein-Seetharaman, J., Obinger, C., and Kagan, V.E., *Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(32): p. 11288-9.
96. Barr, D.P., Gunther, M.R., Deterding, L.J., Tomer, K.B., and Mason, R.P., *ESR spin-trapping of a protein-derived tyrosyl radical from the reaction of cytochrome c with hydrogen peroxide*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(26): p. 15498-503.
97. Belikova, N.A., Jiang, J., Stoyanovsky, D.A., Glumac, A., Bayir, H., Greenberger, J.S., and Kagan, V.E., *Mitochondria-targeted (2-hydroxyamino-vinyl)-triphenyl-phosphonium releases NO(.) and protects mouse embryonic cells against irradiation-induced apoptosis*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(12): p. 1945-50.
98. Radi, R.A., Rubbo, H., and Prodanov, E., *Comparison of the effects of superoxide dismutase and cytochrome c on luminol chemiluminescence produced by xanthine oxidase-catalyzed reactions*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. **994**(1): p. 89-93.
99. Barr, D.P. and Mason, R.P., *Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. An ESR spin trapping investigation*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(21): p. 12709-16.
100. Lawrence, A., Jones, C.M., Wardman, P., and Burkitt, M.J., *Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of*

- glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis.* J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29410-9.
101. Prasad, S., Maiti, N.C., Mazumdar, S., and Mitra, S., *Reaction of hydrogen peroxide and peroxidase activity in carboxymethylated cytochrome c: spectroscopic and kinetic studies.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1596**(1): p. 63-75.
 102. Theorell, H. and Akesson, A., *Absorption Spectrum of Further Purified Cytochrome C.* Science, 1939. **90**(2325): p. 67.
 103. Theorell, H. and Akesson, A., *Studies on cytochrome c II. The Optical properties of pure cytochrome c and some of its derivatives.* J Am Chem Soc, 1941. **63**(7): p. 8.
 104. Dopner, S., Hildebrandt, P., Rosell, F.I., Mauk, A.G., von Walter, M., Buse, G., and Soulimane, T., *The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase.* Eur J Biochem, 1999. **261**(2): p. 379-91.
 105. Assfalg, M., Bertini, I., Dolfi, A., Turano, P., Mauk, A.G., Rosell, F.I., and Gray, H.B., *Structural model for an alkaline form of ferricytochrome C.* J Am Chem Soc, 2003. **125**(10): p. 2913-22.
 106. Banci, L., Bertini, I., Gray, H.B., Luchinat, C., Reddig, T., Rosato, A., and Turano, P., *Solution structure of oxidized horse heart cytochrome c.* Biochemistry, 1997. **36**(32): p. 9867-77.
 107. Bushnell, G.W., Louie, G.V., and Brayer, G.D., *High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c.* J Mol Biol, 1990. **214**(2): p. 585-95.
 108. Pollock, W.B., Rosell, F.I., Twitchett, M.B., Dumont, M.E., and Mauk, A.G., *Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome c. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome c and the alkaline conformational transition.* Biochemistry, 1998. **37**(17): p. 6124-31.
 109. Maity, H., Rumbley, J.N., and Englander, S.W., *Functional role of a protein foldon--an Omega-loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome c.* Proteins, 2006. **63**(2): p. 349-55.
 110. Schejter, A. and Aviram, I., *The effects of alkylation of methionyl residues on the properties of horse cytochrome c.* J Biol Chem, 1970. **245**(7): p. 1552-7.
 111. Sokolovsky, M., Aviram, I., and Schejter, A., *Nitrocytochrome c. I. Structure and enzymic properties.* Biochemistry, 1970. **9**(26): p. 5113-8.
 112. Abriata, L.A., Cassina, A., Tortora, V., Marin, M., Souza, J.M., Castro, L., Vila, A.J., and Radi, R., *Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome c triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies.* J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 17-26.
 113. Souza, J.M., Castro, L., Cassina, A.M., Batthyany, C., and Radi, R., *Nitrocytochrome c: synthesis, purification, and functional studies.* Methods Enzymol, 2008. **441**: p. 197-215.
 114. Chen, Y.R., Deterding, L.J., Sturgeon, B.E., Tomer, K.B., and Mason, R.P., *Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity.* J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29781-91.
 115. Estevam, M.L., Nascimento, O.R., Baptista, M.S., Di Mascio, P., Prado, F.M., Faljoni-Alario, A., Zucchi Mdo, R., and Nantes, I.L., *Changes in the spin state and reactivity of cytochrome C induced by photochemically generated singlet oxygen and free radicals.* J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39214-22.
 116. Lee, I., Salomon, A.R., Yu, K., Doan, J.W., Grossman, L.I., and Huttemann, M., *New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo.* Biochemistry, 2006. **45**(30): p. 9121-8.

117. Yu, H., Lee, I., Salomon, A.R., Yu, K., and Huttemann, M., *Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1777**(7-8): p. 1066-71.
118. Pecina, P., Borisenko, G.G., Belikova, N.A., Tyurina, Y.Y., Pecinova, A., Lee, I., Samhan-Arias, A.K., Przyklenk, K., Kagan, V.E., and Huttemann, M., *Phosphomimetic substitution of cytochrome C tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation*. *Biochemistry*, 2010. **49**(31): p. 6705-14.
119. Lecocq, J. and Ballou, C.E., *On the Structure of Cardiolipin*. *Biochemistry*, 1964. **3**: p. 976-80.
120. Pangborn, M., *Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart*. *J Biol Chem*, 1942. **143**: p. 247-256.
121. Hsu, F.F., Turk, J., Rhoades, E.R., Russell, D.G., Shi, Y., and Groisman, E.A., *Structural characterization of cardiolipin by tandem quadrupole and multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(4): p. 491-504.
122. Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M.L., *The biosynthesis and functional role of cardiolipin*. *Prog Lipid Res*, 2000. **39**(3): p. 257-88.
123. Kates, M., Syz, J.Y., Gosser, D., and Haines, T.H., *pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue*. *Lipids*, 1993. **28**(10): p. 877-82.
124. Daum, G., *Lipids of mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **822**(1): p. 1-42.
125. Heimburg, T. and Marsh, D., *Investigation of secondary and tertiary structural changes of cytochrome c in complexes with anionic lipids using amide hydrogen exchange measurements: an FTIR study*. *Biophys J*, 1993. **65**(6): p. 2408-17.
126. Rytomaa, M. and Kinnunen, P.K., *Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(3): p. 1770-4.
127. Rytomaa, M. and Kinnunen, P.K., *Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(7): p. 3197-202.
128. Rytomaa, M., Mustonen, P., and Kinnunen, P.K., *Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(31): p. 22243-8.
129. Tuominen, E.K., Zhu, K., Wallace, C.J., Clark-Lewis, I., Craig, D.B., Rytomaa, M., and Kinnunen, P.K., *ATP induces a conformational change in lipid-bound cytochrome c*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 19356-62.
130. Kawai, C., Prado, F.M., Nunes, G.L., Di Mascio, P., Carmona-Ribeiro, A.M., and Nantes, I.L., *pH-Dependent interaction of cytochrome c with mitochondrial mimetic membranes: the role of an array of positively charged amino acids*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(41): p. 34709-17.
131. Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Potapovich, A.I., Kini, V., Amoscato, A.A., and Fujii, Y., *Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(12): p. 1963-85.
132. Richter, C., *Oxidative stress, mitochondria, and apoptosis*. *Restor Neurol Neurosci*, 1998. **12**(2-3): p. 59-62.
133. He, Y., Liu, J., Grossman, D., Durrant, D., Sweatman, T., Lothstein, L., Epand, R.F., Epand, R.M., and Lee, R.M., *Phosphorylation of mitochondrial phospholipid scramblase 3 by protein kinase C-delta induces its activation and facilitates mitochondrial targeting of tBid*. *J Cell Biochem*, 2007. **101**(5): p. 1210-21.
134. Liu, J., Chen, J., Dai, Q., and Lee, R.M., *Phospholipid scramblase 3 is the mitochondrial target of protein kinase C delta-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 2003. **63**(6): p. 1153-6.

135. Liu, J., Dai, Q., Chen, J., Durrant, D., Freeman, A., Liu, T., Grossman, D., and Lee, R.M., *Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 892-902.
136. Belikova, N.A., Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Potapovich, M.V., Basova, L.V., Peterson, J., Kurnikov, I.V., and Kagan, V.E., *Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes*. Biochemistry, 2006. **45**(15): p. 4998-5009.
137. Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Kochanek, P.M., Hamilton, R., DeKosky, S.T., Greenberger, J.S., Bayir, H., and Kagan, V.E., *Oxidative lipidomics of programmed cell death*. Methods Enzymol, 2008. **442**: p. 375-93.
138. Tyurina, Y.Y., Kini, V., Tyurin, V.A., Vlasova, I., Jiang, J., Kapralov, A.A., Belikova, N.A., Yalowich, J.C., Kurnikov, I.V., and Kagan, V.E., *Mechanisms of cardiolipin oxidation by cytochrome c: relevance to pro- and antiapoptotic functions of etoposide*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(2): p. 706-17.
139. Reed, J.C., *Cytochrome c: can't live with it--can't live without it*. Cell, 1997. **91**(5): p. 559-62.
140. Zalk, R., Israelson, A., Garty, E.S., Azoulay-Zohar, H., and Shoshan-Barmatz, V., *Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria*. Biochem J, 2005. **386**(Pt 1): p. 73-83.
141. Godoy, L.C., Munoz-Pinedo, C., Castro, L., Cardaci, S., Schonhoff, C.M., King, M., Tortora, V., Marin, M., Miao, Q., Jiang, J.F., Kapralov, A., Jemmerson, R., Silkstone, G.G., Patel, J.N., Evans, J.E., Wilson, M.T., Green, D.R., Kagan, V.E., Radi, R., and Mannick, J.B., *Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2653-8.
142. Hao, Z., Duncan, G.S., Chang, C.C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W.C., Ohashi, P., Wang, X., and Mak, T.W., *Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis*. Cell, 2005. **121**(4): p. 579-91.
143. Goshorn, S.C., Retzel, E., and Jemmerson, R., *Common structural features among monoclonal antibodies binding the same antigenic region of cytochrome c*. J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2134-42.
144. Jiang, X. and Wang, X., *Cytochrome C-mediated apoptosis*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 87-106.
145. Jemmerson, R., Liu, J., Hausauer, D., Lam, K.P., Mondino, A., and Nelson, R.D., *A conformational change in cytochrome c of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles*. Biochemistry, 1999. **38**(12): p. 3599-609.
146. Birnboim, H.C., Lemay, A.M., Lam, D.K., Goldstein, R., and Webb, J.R., *Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 528-32.
147. Jemmerson, R., LaPlante, B., and Treeful, A., *Release of intact, monomeric cytochrome c from apoptotic and necrotic cells*. Cell Death Differ, 2002. **9**(5): p. 538-48.
148. Mann, T. and Keilin, D., *Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals*. Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci., 1939. **126**: p. 303-315.
149. McCord, J.M. and Fridovich, I., *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
150. Worthington Enzyme Manual Enzymes and Related Biochemicals; Available from: <http://www.worthington-biochem.com/SODBE/default.html>.

151. Fridovich, I., *Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas.* J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7761-4.
152. Geller, B.L. and Winge, D.R., *Rat Liver Cu,Zn-Superoxide Dismutase (subcellular location in lysosomes).* J Biol Chem, 1982. **257**(15): p. 8945-8952.
153. Levanon, D., Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Wigderson, M., Sherman, L., Bernstein, Y., Laver-Rudich, Z., Danciger, E., Stein, O., and Groner, Y., *Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase.* EMBO J, 1985. **4**(1): p. 77-84.
154. Sherman, L., Dafni, N., Lieman-Hurwitz, J., and Groner, Y., *Nucleotide sequence and expression of human chromosome 21-encoded superoxide dismutase mRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(18): p. 5465-9.
155. Roberts, V.A., Fisher, C.L., Redford, S.M., Mcrec, D.E., Parge, H.E., Getzoff, E.D., and Tainer, J.A., *Mechanism and atomic structure of superoxide dismutase.* Free Radic Res Comms, 1991. **12-13**: p. 269-278.
156. Hart, P.J., Balbirnie, M.M., Ogihara, N.L., Nersissian, A.M., Weiss, M.S., Valentine, J.S., and Eisenberg, D., *A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase.* Biochemistry, 1999. **38**(7): p. 2167-78.
157. Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S., and Richardson, D.C., *Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase.* Nature, 1983. **306**: p. 284-287.
158. Gaber, B., Brown, R., Koenig, S., and Fee, J., *Nuclear magnetic relaxation dispersion in protein solutions. V. Bovine erythrocyte superoxide dismutase.* Biochim Biophys Acta, 1972. **271**(1): p. 1-5.
159. Alvarez, B., Demicheli, V., Duran, R., Trujillo, M., Cervenansky, C., Freeman, B.A., and Radi, R., *Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical.* Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 813-22.
160. Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., and et al., *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.* Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 376-81.
161. Asikainen, T.M., Huang, T.T., Taskinen, E., Levonen, A.L., Carlson, E., Lapatto, R., Epstein, C.J., and Raivio, K.O., *Increased sensitivity of homozygous Sod2 mutant mice to oxygen toxicity.* Free Radic Biol Med, 2002. **32**(2): p. 175-86.
162. Tsan, M.F., *Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review).* Int J Mol Med, 2001. **7**(1): p. 13-9.
163. Zhang, Y., Zhang, H.M., Shi, Y., Lustgarten, M., Li, Y., Qi, W., Zhang, B.X., and Van Remmen, H., *Loss of manganese superoxide dismutase leads to abnormal growth and signal transduction in mouse embryonic fibroblasts.* Free Radic Biol Med, 2010. **49**(8): p. 1255-62.
164. Wenzel, P., Schuhmacher, S., Kienhofer, J., Muller, J., Hortmann, M., Oelze, M., Schulz, E., Treiber, N., Kawamoto, T., Scharffetter-Kochanek, K., Munzel, T., Burkle, A., Bachschmid, M.M., and Daiber, A., *Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction.* Cardiovasc Res, 2008. **80**(2): p. 280-9.
165. McCord, J., Boyle, J.A., Day Jr., E.D., Rizzolo, L.J., and Salin, M.L., *A manganese containing superoxide dismutase from human liver*, in *Superoxide and Superoxide Dismutase*, A.M. Michelson, J.M. McCord, and I. Fridovich, Editors. 1977, Academic Press: London. p. 129-138.
166. Bjerrum, M.J., *Structural and spectroscopic comparison of manganese-containing superoxide dismutases.* Biochim Biophys Acta, 1987. **915**(2): p. 225-37.

167. Stallings, W.C., Patridge, K.A., Strong, R.K., and Ludwig, M.L., *The structure of manganese superoxide dismutase from Thermus thermophilus HB8 at 2.4-Å resolution*. J Biol Chem, 1985. **260**(30): p. 16424-32.
168. Borgstahl, G.E., Parge, H.E., Hickey, M.J., Beyer, W.F., Jr., Hallewell, R.A., and Tainer, J.A., *The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles*. Cell, 1992. **71**(1): p. 107-18.
169. Ludwig, M.L., Metzger, A.L., Patridge, K.A., and Stallings, W.C., *Manganese superoxide dismutase from Thermus thermophilus. A structural model refined at 1.8 Å resolution*. J Mol Biol, 1991. **219**(2): p. 335-58.
170. Moreno, D.M., Marti, M.A., De Biase, P.M., Estrin, D.A., Demicheli, V., Radi, R., and Boechi, L., *Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration*. Arch Biochem Biophys, 2011. **507**(2): p. 304-9.
171. Quint, P., Reutzel, R., Mikulski, R., McKenna, R., and Silverman, D.N., *Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(3): p. 453-8.
172. Bull, C., Niederhoffer, E., Yoshida, T., and Fee, J.A., *Kinetic studies of superoxide dismutases: Properties of the manganese-containing protein from Thermus thermophilus*. J Am Chem Soc, 1991. **113**: p. 4069-4076.
173. Hsu, J.L., Hsieh, Y., Tu, C., O'Connor, D., Nick, H.S., and Silverman, D.N., *Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17687-91.
174. Perry, J.J., Hearn, A.S., Cabelli, D.E., Nick, H.S., Tainer, J.A., and Silverman, D.N., *Contribution of human manganese superoxide dismutase tyrosine 34 to structure and catalysis*. Biochemistry, 2009. **48**(15): p. 3417-24.
175. Rulisek, L., Jensen, K.P., Lundgren, K., and Ryde, U., *The reaction mechanism of iron and manganese superoxide dismutases studied by theoretical calculations*. J Comput Chem, 2006. **27**(12): p. 1398-414.
176. Srnec, M., Aquilante, F., Ryde, U., and Rulisek, L., *Reaction mechanism of manganese superoxide dismutase studied by combined quantum and molecular mechanical calculations and multiconfigurational methods*. J Phys Chem B, 2009. **113**(17): p. 6074-86.
177. Guan, Y., Hickey, M.J., Borgstahl, G.E., Hallewell, R.A., Lepock, J.R., O'Connor, D., Hsieh, Y., Nick, H.S., Silverman, D.N., and Tainer, J.A., *Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34*. Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 4722-30.
178. Macmillan-Crow, L.A. and Cruthirds, D.L., *Invited review: manganese superoxide dismutase in disease*. Free Radic Res, 2001. **34**(4): p. 325-36.
179. Surmeli, N.B., Litterman, N.K., Miller, A.F., and Groves, J.T., *Peroxynitrite Mediates Active Site Tyrosine Nitration in Manganese Superoxide Dismutase. Evidence of a Role for the Carbonate Radical Anion*. J Am Chem Soc, 2010.
180. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B.A., and Radi, R., *Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 842-8.
181. Kang, D., Lee, K.M., Park, S.K., Berndt, S.I., Peters, U., Reding, D., Chatterjee, N., Welch, R., Chanock, S., Huang, W.Y., and Hayes, R.B., *Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(8): p. 1581-6.
182. Bica, C.G., de Moura da Silva, L.L., Toscani, N.V., da Cruz, I.B., Sa, G., Graudenz, M.S., and Zettler, C.G., *MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer*. Pathol Oncol Res, 2009. **15**(1): p. 19-24.

183. Nakanishi, S., Yamane, K., Ohishi, W., Nakashima, R., Yoneda, M., Nojima, H., Watanabe, H., and Kohno, N., *Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. **81**(3): p. 381-5.
184. Arsova-Sarafinovska, Z., Matevska, N., Petrovski, D., Banev, S., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Sayal, A., Aydin, A., Suturkova, L., and Dimovski, A.J., *Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphism is associated with risk of early-onset prostate cancer*. *Cell Biochem Funct*, 2008. **26**(7): p. 771-7.
185. Oberley, L.W., Ridnour, L.A., Sierra-Rivera, E., Oberley, T.D., and Guernsey, D.L., *Superoxide dismutase activities of differentiating clones from an immortal cell line*. *J Cell Physiol*, 1989. **138**(1): p. 50-60.
186. Matsuda, Y., Higashiyama, S., Kijima, Y., Suzuki, K., Kawano, K., Akiyama, M., Kawata, S., Tarui, S., Deutsch, H.F., and Taniguchi, N., *Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity*. *Eur J Biochem*, 1990. **194**(3): p. 713-20.
187. Saha, A., Goldstein, S., Cabelli, D., and Czapski, G., *Determination of optimal conditions for synthesis of peroxyntirite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(4): p. 653-9.
188. Hughes, M.N. and Nicklin, H.G., *Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*, in *The chemistry of pernitrites*, J.o.C.S. (A), Editor. 1968. p. 450-452.
189. Claiborne, A., *Catalase activity*, in *Handbook of methods for oxygen radical research*, R.A. Greenwald, Editor. 1985, CRC Press: Boca Raton. p. 283-284.
190. Griess, J.P., *On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1864. **154**: p. 667-731.
191. Rumbley, J.N., Hoang, L., and Englander, S.W., *Recombinant equine cytochrome c in Escherichia coli: High level expression, characterization, and folding and assembly mutants*. *Biochemistry*, 2002. **41**(47): p. 13894-13901.
192. Stellwagen, E., *Carboxymethylation of horse heart ferricytochrome c and cyanferricytochrome c*. *Biochemistry*, 1968. **7**(7): p. 2496-501.
193. Goto, J.J., Gralla, E.B., Valentine, J.S., and Cabelli, D.E., *Reactions of hydrogen peroxide with familial amyotrophic lateral sclerosis mutant human copper-zinc superoxide dismutases studied by pulse radiolysis*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30104-9.
194. Bray, R.C., Cockle, S.A., Fielden, E.M., Roberts, P.B., Rotilio, G., and Calabrese, L., *Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide*. *Biochem J*, 1974. **139**(1): p. 43-8.
195. Trujillo, M., Alvarez, M.N., Peluffo, G., Freeman, B.A., and Radi, R., *Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(14): p. 7828-34.
196. Castro, L., Alvarez, M.N., and Radi, R., *Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **333**(1): p. 179-88.
197. Ramamurthi, A. and Lewis, R.S., *Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors*. *Chem Res Toxicol*, 1997. **10**(4): p. 408-13.
198. Herold, S., Exner, M., and Nauser, T., *Kinetic and mechanistic studies of the NO-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin*. *Biochemistry*, 2001. **40**(11): p. 3385-95.
199. Winterbourn, C.C., *Oxidative reactions of hemoglobin*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 265-72.
200. Flohe, L. and Otting, F., *Superoxide dismutase assays*. *Methods Enzymol*, 1984. **105**: p. 93-104.
201. Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C.D., Mason, R.P., and Denicola, A., *Reaction of human hemoglobin with peroxyntirite*.

- Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals.* J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44049-57.
202. Ramirez, D.C., Chen, Y.R., and Mason, R.P., *Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical.* Free Radic Biol Med, 2003. **34**(7): p. 830-9.
 203. Wittig, I., Braun, H.P., and Schagger, H., *Blue native PAGE.* Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 418-28.
 204. Mendes, P., *GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems.* Comput Appl Biosci, 1993. **9**(5): p. 563-71.
 205. Chen, Y.R., Chen, C.L., Chen, W., Zweier, J.L., Augusto, O., Radi, R., and Mason, R.P., *Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 18054-62.
 206. Gunther, M.R., Tschirret-Guth, R.A., Witkowska, H.E., Fann, Y.C., Barr, D.P., Ortiz De Montellano, P.R., and Mason, R.P., *Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide.* Biochem J, 1998. **330 (Pt 3)**: p. 1293-9.
 207. Qian, S.Y., Chen, Y.R., Deterding, L.J., Fann, Y.C., Chignell, C.F., Tomer, K.B., and Mason, R.P., *Identification of protein-derived tyrosyl radical in the reaction of cytochrome c and hydrogen peroxide: characterization by ESR spin-trapping, HPLC and MS.* Biochem J, 2002. **363**(Pt 2): p. 281-8.
 208. Berghuis, A.M., Guillemette, J.G., Smith, M., and Brayer, G.D., *Mutation of tyrosine-67 to phenylalanine in cytochrome c significantly alters the local heme environment.* J Mol Biol, 1994. **235**(4): p. 1326-41.
 209. Yamakura, F., Matsumoto, T., Fujimura, T., Taka, H., Murayama, K., Imai, T., and Uchida, K., *Modification of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxyxynitrite in the presence of bicarbonate.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1548**(1): p. 38-46.
 210. Klug, D., Rabani, J., and Fridovich, I., *A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis.* J Biol Chem, 1972. **247**(15): p. 4839-42.
 211. Bielski, B.H. and Arudi, R.L., *Preparation and stabilization of aqueous/ethanolic superoxide solutions.* Anal Biochem, 1983. **133**(1): p. 170-8.
 212. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R., *Slowing of peroxyxynitrite decomposition in the presence of mannitol and ethanol.* Free Radic Biol Med, 1998. **24**(7-8): p. 1331-7.
 213. Ross, A.B., Mallard, W.G., Helman, W.P., Buxton, G.V., Huie, R.T., and Neta, P., NDRL-NIS T Solution Kinetics Database, ver. 3 Notre Dame Radiation Laboratory, Notre Dame, IN and NIST Standard Reference Data, Gaithersburg, MD, 1998.
 214. Merenyi, G., Lind, J., Goldstein, S., and Czapski, G., *Mechanism and thermochemistry of peroxyxynitrite decomposition in water.* J Phys Chem A, 1999. **103**(29): p. 5685-5691.
 215. Goldstein, S. and Czapski, G., *Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solutions in the absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates.* J Am Chem Soc, 1995. **117**: p. 12078-12084.
 216. Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J., and Merenyi, G., *Tyrosine nitration by simultaneous generation of ·NO and O₂⁻ under physiological conditions. How the radicals do the job.* J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3031-6.
 217. Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J., and Merenyi, G., *Mechanism of Decomposition of Peroxyxynitric Ion (O₂NOO⁻): Evidence for the Formation of O₂⁻ and ·NO₂ Radicals.* Inorg Chem, 1998. **37**(16): p. 3943-3947.

218. Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J., and Merenyi, G., *Effect of *NO on the decomposition of peroxyxynitrite: reaction of N2O3 with ONOO*. Chem Res Toxicol, 1999. **12**(2): p. 132-6.
219. Reiter, C.D., Teng, R.J., and Beckman, J.S., *Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxyxynitrite*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32460-6.
220. Sawa, T., Akaike, T., and Maeda, H., *Tyrosine nitration by peroxyxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32467-74.
221. Koppenol, W.H. and Kissner, R., *Can O=NOOH undergo homolysis?* Chem Res Toxicol, 1998. **11**(2): p. 87-90.
222. Ford, E., Hughes, M.N., and Wardman, P., *Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(12): p. 1314-23.
223. Soussi, B., Bylund-Fellenius, A.C., Schersten, T., and Angstrom, J., *¹H-n.m.r. evaluation of the ferricytochrome c-cardiolipin interaction. Effect of superoxide radicals*. Biochem J, 1990. **265**(1): p. 227-32.
224. Santos, H. and Turner, D.L., *Proton NMR studies of horse ferricytochrome c. Completion of the assignment of the well resolved hyperfine shifted resonances*. FEBS Lett, 1987. **226**(1): p. 179-85.
225. Rietveld, A., Sijens, P., Verkleij, A.J., and Kruijff, B., *Interaction of cytochrome c and its precursor apocytochrome c with various phospholipids*. EMBO J, 1983. **2**(6): p. 907-13.
226. Hanske, J., Toffey, J.R., Morenz, A.M., Bonilla, A.J., Schiavoni, K.H., and Pletneva, E.V., *Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(1): p. 125-30.
227. Liu, W., Rumbley, J., Englander, S.W., and Wand, A.J., *Backbone and side-chain heteronuclear resonance assignments and hyperfine NMR shifts in horse cytochrome c*. Protein Sci, 2003. **12**(9): p. 2104-8.
228. Schanda, P., Forge, V., and Brutscher, B., *HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains*. Magn Reson Chem, 2006. **44 Spec No**: p. S177-84.
229. Schneider, R., Etzkorn, M., Giller, K., Daebel, V., Einfeld, J., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Becker, S., and Lange, A., *The native conformation of the human VDAC1 N terminus*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(10): p. 1882-5.
230. Strottmann, J.M., Stellwagen, A., Bryant, C., and Stellwagen, E., *Spectral studies of horse heart porphyrin cytochrome c*. J Biol Chem, 1984. **259**(11): p. 6931-6.
231. Chin, C.C. and Wold, F., *Some chemical properties of carboxymethyl derivatives of amino acids*. Arch Biochem Biophys, 1975. **167**(2): p. 448-51.
232. Harel, S. and Kanner, J., *The generation of ferryl or hydroxyl radicals during interaction of haemproteins with hydrogen peroxide*. Free Radic Res Commun, 1988. **5**(1): p. 21-33.
233. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A., *Peroxyxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(2): p. 481-7.
234. Santucci, R., Brunori, M., and Ascoli, F., *Unfolding and flexibility in hemoproteins shown in the case of carboxymethylated cytochrome c*. Biochim Biophys Acta, 1987. **914**(2): p. 185-9.
235. Santucci, R., Giartosio, A., and Ascoli, F., *Structural transitions of carboxymethylated cytochrome c: calorimetric and circular dichroic studies*. Arch Biochem Biophys, 1989. **275**(2): p. 496-504.
236. Jones, M.D., Merewether, L.A., Clogston, C.L., and Lu, H.S., *Peptide map analysis of recombinant human granulocyte colony stimulating factor:*

- elimination of methionine modification and nonspecific cleavages.* Anal Biochem, 1994. **216**(1): p. 135-46.
237. Schonbaum, G.R. and Lo, S., *Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product analysis.* J Biol Chem, 1972. **247**(10): p. 3353-60.
238. Sarver, A., Scheffler, N.K., Shetlar, M.D., and Gibson, B.W., *Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.* J Am Soc Mass Spectrom, 2001. **12**(4): p. 439-48.
239. Hernandez-Saavedra, D., Quijano, C., Demicheli, V., Souza, J.M., Radi, R., and McCord, J.M., *Thiol-sensitive mutant forms of human SOD2, L60F, and I58T: the role of Cys140.* Free Radic Biol Med, 2010. **48**(9): p. 1202-10.
240. Gunther, M.R., Hsi, L.C., Curtis, J.F., Gierse, J.K., Marnett, L.J., Eling, T.E., and Mason, R.P., *Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation.* J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17086-90.
241. Ascenzi, P., Ciaccio, C., Sinibaldi, F., Santucci, R., and Coletta, M., *Peroxynitrite detoxification by horse heart carboxymethylated cytochrome c is allosterically modulated by cardiolipin.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(3): p. 463-7.

ANEXO I: Código de aminoácidos de 1 y 3 letras utilizados.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V