

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA

Caracterización y detección de
conformaciones alternativas del citocromo c
in vitro e *in cellula*

Lic. Florencia Tomasina

Director: Dr. Rafael Radi

Co-Directora: Dra. Lucía Piacenza



La tapa fue creada y diseñada por el Dr. Ari Zeida (2022).

Recrea la interacción del anticuerpo 1D3 y R1D3 con citocromo c de conformación alternativa en el contexto celular.

Caracterización y Detección de Conformaciones Alternativas del Citocromo c *in vitro e in cellula*

Tesis de Doctorado

Ciencias Biológicas-PEDECIBA Biología

Sub-área Bioquímica

Lic. Florencia Tomasina

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad de la República

Centro de investigaciones biomédicas

Dirección: Dr. Rafael Radi

Co-Dirección: Dra. Lucía Piacenza

Resumen

El citocromo c (cyt c) es una hemo proteína mitocondrial pequeña. El grupo hemo de la proteína está covalentemente unido y el hierro se encuentra hexacoordinado, ubicada en la sexta posición de coordinación se encuentra la Met80. El espectro de absorción de la proteína incluye la banda de Soret en el entorno de los 410 nm y una banda de absorción en la región a 695 nm característica de la interacción entre el azufre de la Met80 y el hierro del grupo hemo. A pHs superiores a ~ 9,8 la Met80 es sustituida por una Lys, la conformación adoptada a esos pHs es denominada conformación alcalina. Estudios previos demostraron que las modificaciones postraduccionales como la nitración de las tirosinas y la unión al fosfolípido cardiolipina disminuyen el valor de pK_a de la transición alcalina a pHs cercanos a los fisiológicos. De esta forma, surge el concepto de conformación alternativa, que engloba a diferentes proteoformas de cyt c, diferentes a la conformación nativa, a pH fisiológico.

Inicialmente, se ubicó a la proteína exclusivamente en el espacio intermembrana de la mitocondria en donde cumple su principal función, el transporte de electrones en la cadena respiratoria. En la actualidad se le conocen diversas funciones adicionales: formar parte del complejo del apoptosoma en el citosol, actividad chaperona en el núcleo celular, actividad peroxidasa y más recientemente en el espacio extracelular interactuando con receptores. Hasta el momento hay muy pocos reportes de la conformación que tiene el cyt c cumpliendo las diferentes funciones anteriormente mencionadas. En la literatura solamente se describe en dos artículos reportes de conformación, en ambos se utiliza un anticuerpo monoclonal (mAb 1D3), que tiene la particularidad de unir cyt c, pero no en conformación nativa, actualmente el anticuerpo original no está disponible por haberse perdido el hibridoma original.

En la primera etapa de esta tesis se caracterizaron estructural y funcionalmente diferentes conformaciones alternativas del cyt c generadas por la exposición a oxidantes (nitración de tirosina y sulfoxidación de metionina) e interacción con cardiolipina. Se determinaron la capacidad de activar el apoptosoma y la actividad peroxidasa de los mismos. En la segunda parte, se buscó la generación de herramientas para el reconocimiento del cyt c de conformación alternativa, no nativa, desarrollando anticuerpos policlonales y la reconstrucción y caracterización de un anticuerpo monoclonal recombinante (R1D3). En esta sección, se caracterizó y se construye “*de novo*” el mAb 1D3, obteniendo el anticuerpo de manera recombinante. La caracterización bioquímica indicó que el R1D3 posee la misma afinidad y especificidad que el anticuerpo monoclonal original por los cyt c modificados oxidativamente *in vitro*.

En una tercera etapa, con las herramientas desarrolladas, se analizaron la localización subcelular de cyt c en conformación alternativa en diferentes condiciones de estrés oxidativo. Se estudió el impacto en el cyt c frente a la adición de oxidantes a cultivos de diferentes líneas celulares. Se observó que tanto la adición de peroxinitrito como de peróxido de hidrógeno llevaron al cyt c a translocarse al núcleo. Al incorporar cyt c sulfoxidado a células utilizando micropinocitosis se observó localización a nivel nuclear sin activación del apoptosoma.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten plantear que modificaciones oxidativas generan proteoformas de cyt c con conformación alternativa, y postular que podrían cumplir acciones no-canónicas en la señalización celular. Un resultado relevante de esta tesis, es haber logrado reconstruir y caracterizar *in vitro* e *in cellula* una potente herramienta inmunológica para la detección de conformaciones alternativas del cyt c que hasta el momento no podían ser identificadas en sistemas celulares ni purificadas del cyt c de conformación nativa. Estudios futuros serán diseñados para poder dilucidar el rol de estos citocromos a nivel nuclear así como sus posibles funciones a nivel de la respuesta génica y transcriptómica en condiciones de estrés.

Índice

Resumen	2
I. Introducción	5
i) Biosíntesis y propiedades generales del cyt c.....	5
ii) Transición alcalina y cambio conformacional	6
iii) Actividad peroxidasa del cyt c	8
iv) Interacción del cyt c con la cardiolipina.....	9
v) Modificaciones oxidativas postraduccionales: nitración y sulfoxidación del cyt c.....	11
vi) Modificaciones no-oxidativas postraduccionales del cyt c	17
Fosforilación del cyt c.....	17
Acetilación del cyt c	18
vii) Rol del cyt c en la cadena de transporte de electrones mitocondrial	18
viii) El rol del cyt c en la apoptosis.....	20
ix) Mutantes de cyt c en la patología humana	21
x) Funciones alternativas del cyt c: sensor redox y respuestas adaptativas	22
xi) Otras funciones del cyt c	23
xii) Evidencia temprana en la detección inmunoquímica de cyt c en conformación alternativa: mAb 1D3.	23
II. Objetivos	25
III. Resultados	26
1- Objetivo específico 1	26
<i>Caracterizar en términos estructurales y funcionales formas de cyt c modificadas oxidativamente</i>	26
1.1) Generación de cyt c sulfoxidado: sulfoxidación de la Met80.....	26
1.2) Nitración de tirosinas	28
1.3) Determinación de la temperatura media (TM) de los cyt c modificados oxidativamente	30
1.4) Determinación de los puntos isoeléctricos de las especies de cyt c modificadas oxidativamente	30
1.5) Capacidad del cyt c nativo y de los cyt c modificados oxidativamente de inducir lipoperoxidación a la cardiolipina.....	31
1.6) Efecto de la cardiolipina en la nitración de proteínas.....	32
1.7) Actividad peroxidasa de los cyt c modificados oxidativamente.....	34
1.8) Capacidad de los cyt c modificados oxidativamente de activar el apoptosoma	39

2. Objetivo específico 2	41
<i>Generación de herramientas inmunoquímicas para el reconocimiento del cyt c de conformación alternativa.</i>	41
2.1) Unión del anticuerpo mAb 1D3 a cyt c modificados oxidativamente	41
2.2) Síntesis <i>de novo</i> del anticuerpo 1D3: generación de un anticuerpo recombinante ...	45
3) Objetivo específico 3	53
<i>Generación y localización subcelular de cyt c de conformación alternativa en diferentes condiciones de estrés oxidativo.</i>	53
3.1) Localización a nivel celular del cyt c de conformación alternativa luego de la exposición a peroxinitrito.	53
3.2) Localización a nivel celular del cyt c de conformación alternativa luego del tratamiento con H ₂ O ₂	59
3.3) Evaluación del daño al ADN en las células tratadas con peroxinitrito y H ₂ O ₂	62
3.4) Estado apoptótico de las células tratadas con peroxinitrito y/o H ₂ O ₂	62
3.5) Evaluación de la presencia de cyt c en células B16-F1 senescentes	63
3.6) Carga pinocítica e inmunolocalización de cyt c alternativos en células	65
IV. Conclusiones y Perspectivas.....	67
V. ANEXO I.....	71
Generación de un anticuerpo policlonal que reconozca conformaciones alternativas del cyt c	71
VI. ANEXO II.....	77
Resultados en publicaciones en revistas internacionales	77
Revisiones relacionadas de la tesis	78
Otras publicaciones relacionadas de la tesis	78
VII. Materiales y Métodos	80
VII. Referencias	88
VIII. Financiación y agradecimientos	99
Financiación	99
Agradecimientos	99

I. Introducción

i) Biosíntesis y propiedades generales del cyt *c*.

El citocromo *c* (cyt *c*) es una pequeña hemo proteína globular (12,4 kDa) compuesta de 104 residuos de aminoácidos en humanos, pero dependiendo de las especies, varía de unos 94 a 114 residuos. Los cambios en su secuencia a lo largo de la evolución fueron tempranos y se basaron en la optimización de la velocidad de transporte de los electrones del cyt *c* a la citocromo oxidasa terminal (complejo IV) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial¹. La secuencia de aminoácidos en el extremo N- y C- terminal de la proteína se ha conservado en el tiempo, planteándose que estas regiones son fundamentales para la formación y maduración de la estructura proteica. Las estructuras helicoidales en el extremo N-terminal sirven de reconocimiento para la unión con la holo-cyt *c* sintetasa necesaria para la maduración del cyt *c*².

El grupo hemo del cyt *c* se encuentra ubicado en un bolsillo hidrofóbico parcialmente expuesto al solvente³⁴. Dentro de los aminoácidos más conservados del cyt *c* se encuentran la cisteína 14 y 17 que forman los enlaces tioéster con el grupo hemo⁵ (Figura 1). Las últimas reacciones de maduración del cyt *c* se llevan adelante en el espacio intermembrana de la mitocondria. Los pasos necesarios para la formación final del cyt *c* incluyen: *i*) la translocación del péptido apo-cyt *c* al sitio de unión del hemo; *ii*) el transporte del hemo al espacio intermembrana; *iii*) la reducción del hemo y la unión de la chaperona a la apo-cyt *c* y *iv*) formación de los enlaces tioéster entre el hemo y las dos cisteínas (Cys14 y Cys17)⁶. El sello distintivo de la síntesis de citocromos de tipo *c* es la unión covalente de grupos vinil hemo a dos residuos de cisteinilo del apo cyt *c* (en un motivo característico Cys-Xxx-Yyy-Cys-His). A partir de estudios genéticos, genómicos y bioquímicos, está claro que tres sistemas distintos han evolucionado en la naturaleza para ensamblar esta proteína ancestral. En particular, el sistema III ha evolucionado específicamente en mitocondrias de hongos, invertebrados y vertebrados. Lo que diferencia del resto de los sistemas es que el sistema III incluye una enzima llamada cyt *c* hemo liasa (CCHL) que juega un papel fundamental en el espacio intermembrana mitocondrial⁷.

La estructura terciaria del cyt *c* consiste en cinco alfa-hélices interconectadas con cuatro omega-loops y un par de hojas-beta antiparalelas (Figura 1). Los omega-loops son definidos como una categoría discreta dentro de la estructura secundaria de las proteínas, caracterizados por tener un lazo aleatorio de conformación y por tener un cuello de interacción entre las dos terminales⁸. De hecho, a estos omega-loops se les ha encontrado un rol importante en el plegamiento de la proteína y de su función. El omega-loop 40s está constituido por los residuos amionoácidos que van desde el aminoácido 40-57 y los residuos terminales (40 NH y 57 CO) están unidos por enlace de hidrógeno. Estudios realizados por cristalografía de rayos X indican la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo imidazol de la histidina 26 y la cadena carbonilo de la prolina 44, generando un puente entre el omega-loop 20s y el 40s de la cadena polipeptídica⁹. Parte de la estabilización de la conformación terciaria de la proteína se da por la interacción que hay con el omega-loop y es fundamental el efecto protector que cumple al hemo. Al mismo tiempo se le ha encontrado un rol importante en asegurar la correcta transición a la conformación alcalina¹⁰.

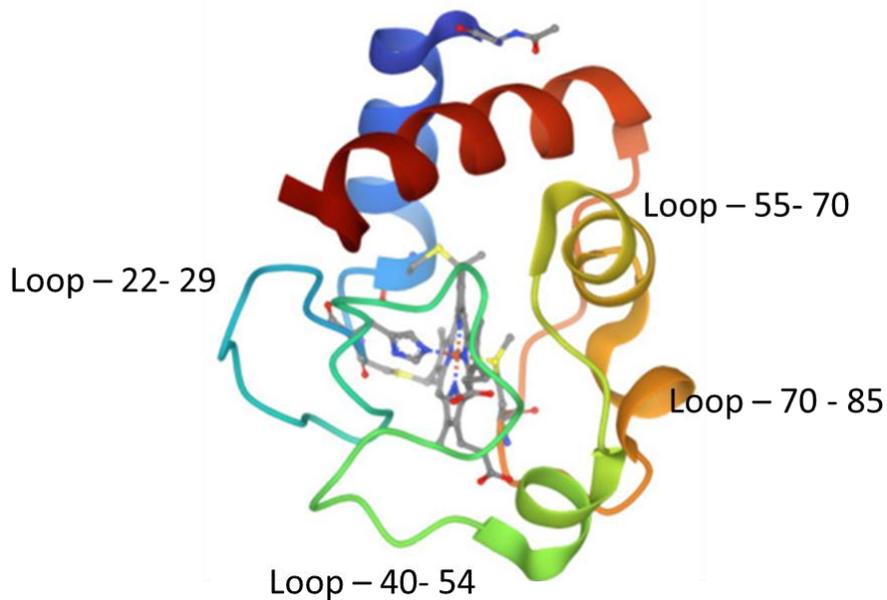


Figura 1. Cyt c de corazón de caballo (PDB: 1HRC). En color se representa los loops que posee la proteína. En el centro y de color gris, se esquematiza el grupo hemo.

En condiciones fisiológicas, la His18 y la Met80 son los ligandos axiales del hierro del hemo. La Met80 juega un papel significativo para la proteína, siendo considerado el residuo responsable del alto potencial redox que presenta el cyt c ¹¹. En la Figura 2, se muestran los enlaces formados entre las cisteínas con el grupo hemo y la quinta y sexta posición de coordinación del hierro.

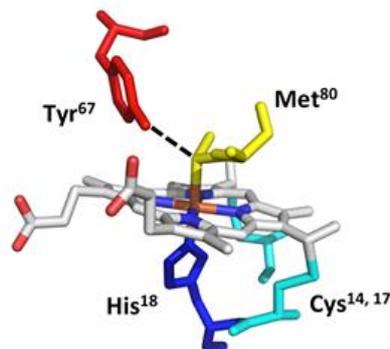


Figura 2. Figura adaptada de la referencia². Sitio activo del cyt c humano de la variante G41S (código PDB 3NWV) en el que se muestra los ligandos axiales de los residuos de la Met80 y la His18, el link de unión con las Cys14 y la Cys17 y el residuo Tyr67 formando un enlace de hidrógeno con la interacción Fe-S de la Met80.

ii) Transición alcalina y cambio conformacional

En la década de 1940 se observó que el cyt c presentaba diferencias en su espectro dependiendo del pH. Se identificaron 5 espectros a los que se los nombró según el pH (yendo de ácido a alcalino) de I a V¹² (Figura 3). Los valores de pKa observados para la transición entre los

espectros fue: I-II = 0.42; II-III = 2.50; III-IV = 9.35 y del IV-V = 12.76. El estado III es el predominante a pH fisiológico conocido como la “*conformación nativa*”¹². La transición de pKa de III -IV (9.35) se produce entre dos especies diferentes de bajo-spin del cyt *c* y es normalmente referida como la “*transición alcalina*”. En la Figura 3, se muestra la transición espectral entre los diferentes estados de la proteína según el pH, observándose que a pHs alcalinos. Estudios posteriores mostraron que los diferentes cambios en la transición se debían a la pérdida del ligando axial del hierro con el azufre de la Met80 (estado III) y por consiguiente la pérdida de la banda a 695 nm en el espectro de absorción, en donde el ligando es remplazado por una lisina (estado IV)^{13,14} (Figura 3B).

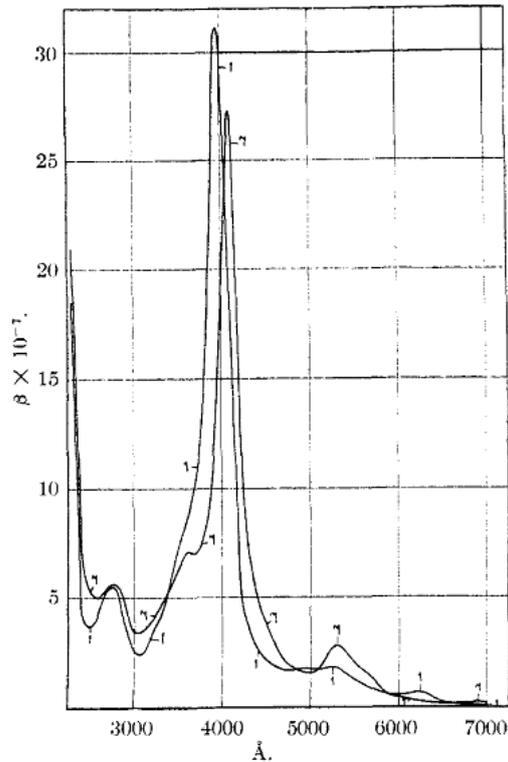


Fig. 5.—Light absorption of ferricytochrome *c* at pH 1 (92% type II + 8% I) and pH 7 (type III).

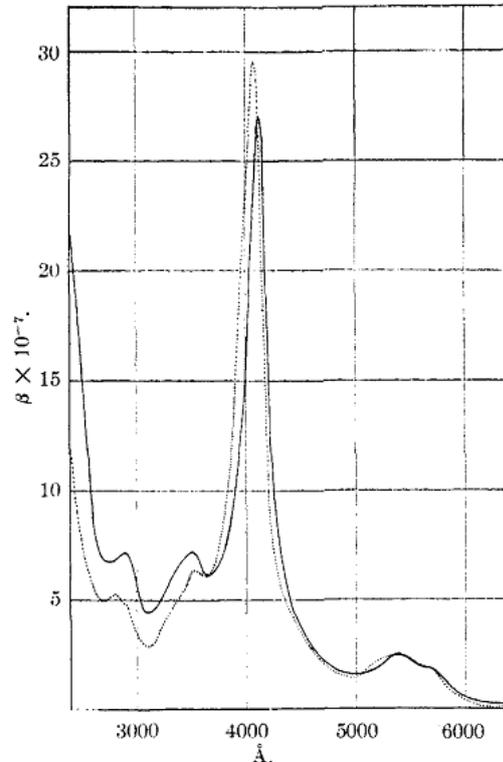


Fig. 6.—Light absorption of ferricytochrome *c* at pH 11.1 (type V) and pH 13.8 (type IV).

Figura 3. Tomada de¹². Espectro de absorción de cyt *c* a diferentes pHs. El espectro de la izquierda corresponde con cyt *c* a pH = 1 (especie II en un 98 % y especie I en un 8 %) y pH = 7 (especie III). El espectro de la derecha corresponde al cyt *c* a pH = 11.1 (especie IV) y pH = 13.8 (especie V).

Posteriormente, se realizaron estudios con diferentes mutaciones del cyt *c* para identificar cuál lisina podría estar sustituyendo a la Met80 en la transición de las especies III-IV. Las lisinas más cercanas y candidatas a ser las sustituyentes son la Lys72, 73 y 79¹⁵⁻¹⁷. Los resultados muestran que para el cyt *c* de caballo, la sexta posición de coordinación está ocupada mayoritariamente por la Lys79 y en una menor fracción por la Lys73¹⁸, en tanto, la Lys72 no participaría de la sexta posición del ligando¹⁹. Estudios de cristalografía para el cyt *c* de levaduras en la transición alcalina muestra un cambio importante en la conformación de la proteína, con un gran cambio de posición a nivel del omega-loop 70-85 (Figura 4). Es interesante observar que existe una dinámica de comunicación entre los omega-loops 40-57 y 71-85. El omega-loop 40-57 tiene una menor estabilidad. La interacción entre el azufre de la Met80 y el hierro en estado III es influenciado por la contribución de una comunicación a través de un enlace de hidrógeno entre

los dos omega-loops²⁰. Las perturbaciones en dicho enlace potencian la disociación de la Met80^{20,21}.

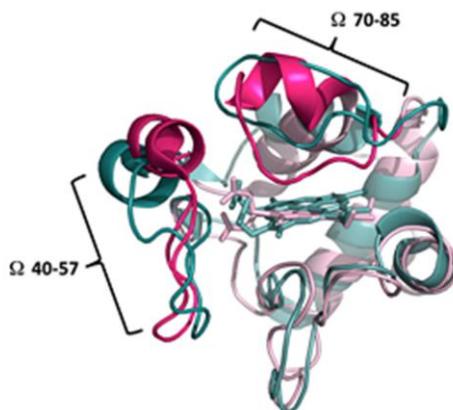


Figura 4. Figura adaptada de ²². Comparación de iso-cyt c (cyt c de levadura) en conformación nativa (código PDB: 2HV4) con iso-cyt c en conformación alcalina (código PDB: 1LMS). Las estructuras de NMR de iso-cyt c de levadura a pH neutro corresponden con la proteína en violeta y a pH alcalino en color gris.

Durante la transición alcalina, el cyt c genera una caída drástica del potencial de reducción en aproximadamente unos 300 mV. Esta caída en el potencial inhibe el transporte de electrones en la cadena respiratoria. Por otro lado, varios reportes indican que la transición alcalina lleva a un aumento de la actividad peroxidasa del cyt c comparado con el estado nativo²³⁻²⁵. La actividad peroxidasa del cyt c juega un rol importante para la salida del cyt c y de otras proteínas desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol celular durante el proceso de muerte por apoptosis, rol que se profundizará más adelante. La importancia de la ruptura de este ligando axial se pone de manifiesto en estudios con el cyt c recombinante Met80Ala, mutante que tiene libre la sexta posición de coordinación del hierro. En este mutante, se observa un aumento en la actividad peroxidasa y su translocación al núcleo en células no apoptóticas²⁶.

Como se describe más adelante, tanto la nitración de tirosinas, la sulfoxidación de las metioninas y la interacción con el lípido cardiolipina induce la pérdida de la banda a 695 nm indicando que hay ruptura de la interacción hierro-azufre.

iii) Actividad peroxidasa del cyt c

El cyt c tiene la capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)²⁷ y con diferentes hidroperóxidos lipídicos lo que lleva a la propagación de la peroxidación lipídica en membranas²⁸. Algunos autores muestran que el cyt c cataliza la peroxidación de liposomas de fosfatidil colina en presencia de H_2O_2 ²⁹. Aún se desconoce el mecanismo por el cual el cyt c adquiere actividad peroxidasa, ya que no cumple con los requisitos de las peroxidases clásicas. El mecanismo de las hemo peroxidases, como la peroxidasa de rábano (HRP) o la mieloperoxidasa (MPO), implica la formación del denominado compuesto I como se describe en la Figura 5 para el HRP. En particular estas peroxidases tienen un entorno en el hemo que le permite un sitio catalítico altamente eficiente para unir y descomponer al H_2O_2 ³⁰. Las constantes

de reacción con el H_2O_2 están en el entorno de los $10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ³¹. Son dependientes de la presencia de una His en la quinta posición del ligando del hierro en el bolsillo proximal del hemo, así como también una His y Arg en la zona distal del hemo. Estos últimos aminoácidos participan en la ruptura del H_2O_2 ³⁰. El compuesto I tiene dos oxidantes equivalentes, uno sobre el oxoferril del centro del hemo y el otro dispuesto sobre el anillo de la porfirina como un π -catión radical. El compuesto I tiene gran habilidad para oxidar a sus sustratos a través del mecanismo de un electrón formando el intermediario (compuesto II) ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). Al cerrar el ciclo de la reacción, el sitio activo retorna a la forma nativa (Figura 5)³².

En su conformación nativa, el cyt *c* no tiene en el bolsillo del hemo a los aminoácidos anteriormente mencionados, siendo por tanto, una pobre peroxidasa para el H_2O_2 ($K_M = 70 \text{ mM}$ ³³), pero no tan mala peroxidasa para los hidropéroxidos lipídicos. Esto se debe a que la interacción del cyt *c* con éstos lípidos cambian su conformación exponiendo más al hemo^{30,34}. Varios autores observan que la ruptura de la conformación nativa, en particular la ruptura del ligando Met80, es un pre-requisito para que el cyt *c* gane actividad peroxidasa³⁵.

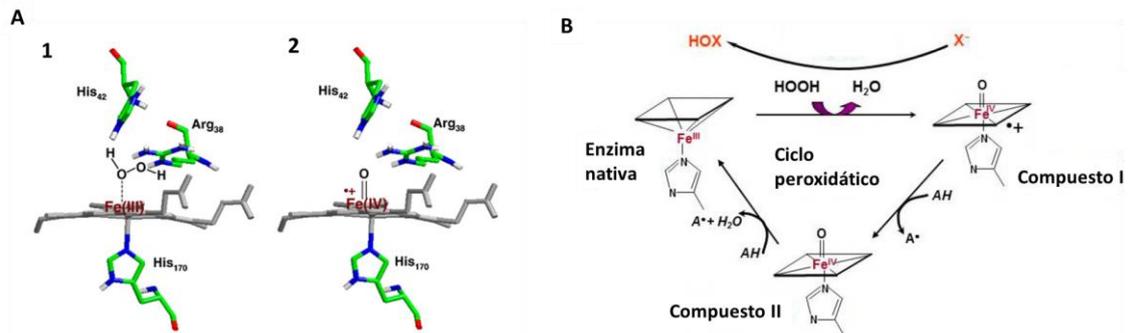


Figura 5. Mecanismo catalítico de la HRP. A1. Peróxido de hidrógeno ubicado en la sexta posición del ligando con el hierro del hemo. **A2.** La formación del compuesto uno, con el oxoferril. **B.** Adaptada de³². Ciclo catalítico, formación de compuesto I y II y posterior finalización del ciclo. A adaptada de³⁰.

Para el caso del cyt *c*, el H_2O_2 causa inmediatamente la oxidación de los aminoácidos cercanos al centro activo. Algunas hipótesis señalan a la Tyr67 ya que se ubica próxima al sitio³⁶ y porque mutantes que sustituyen la Tyr67 por fenilalanina y pierden la actividad peroxidasa³⁶. El cyt *c* también cataliza la peroxidación de la cardiolipina poliinsaturada, propagando la oxidación en la membrana mitocondrial. La propagación implica dos pasos, en el primero la reacción entre el peróxido (de hidrógeno o lipídico) forma la especie intermedia de “tipo-compuesto I” con la formación del radical tirosilo y en el segundo paso, el radical tirosilo abstrae un hidrógeno del lípido insaturado con la posterior adición de oxígeno³⁶. Dicha adición genera un nuevo producto radicalar que se oxigena formando un hidropéroxido.

iv) Interacción del cyt *c* con la cardiolipina.

La cardiolipina es un fosfolípido aniónico dimérico que se encuentra en la mitocondria representando entre un 5-20% de los lípidos de la membrana mitocondrial interna^{37,38}. La reacción de síntesis ocurre en la matriz mitocondrial próxima a la cara interna de la membrana mitocondrial. Es un fosfolípido de ácidos grasos insaturados, en particular el ácido linoleico en

el hígado y el corazón, y el ácido araquidónico en el tejido nervioso³⁹. Que tenga la particularidad de ser insaturado hace a la cardiolipina ser blanco de diferentes oxidantes. Varias proteínas se unen a la cardiolipina desde la matriz mitocondrial las cuales se mantienen por interacciones del tipo electrostáticas e hidrofóbicas, cumpliendo un rol fundamental en la importación y exportación de proteínas⁴⁰. Asimismo, la cardiolipina participa en el ensamblaje de los super complejos respiratorios, necesarios para regular el transporte de electrones y el rendimiento de la mitocondria al mantener unidos los complejos III y IV de la cadena respiratoria ⁴¹.

El cyt *c* mantiene una estrecha unión con la cardiolipina mediante interacciones del tipo hidrofóbica y electrostáticas dada por la carga neta positiva (+8) del cyt *c* a pH fisiológico ²⁸ y la carga negativa de la cardiolipina a pH fisiológico. Se ha identificado en primer lugar dos sitios para dichas interacciones: *i*) el sitio denominado A y, *ii*) el sitio C (Figura 6). El sitio A se superpone con un sitio de unión al ATP y corresponde con el sitio de unión aniónico. El sitio C es el sitio que permite la interacción hidrofóbica generando un anclaje de las cadenas del lípido ⁴². Posteriormente se ha identificado el sitio L, también con carga positiva por lo que sería un sitio de interacción electrostática.

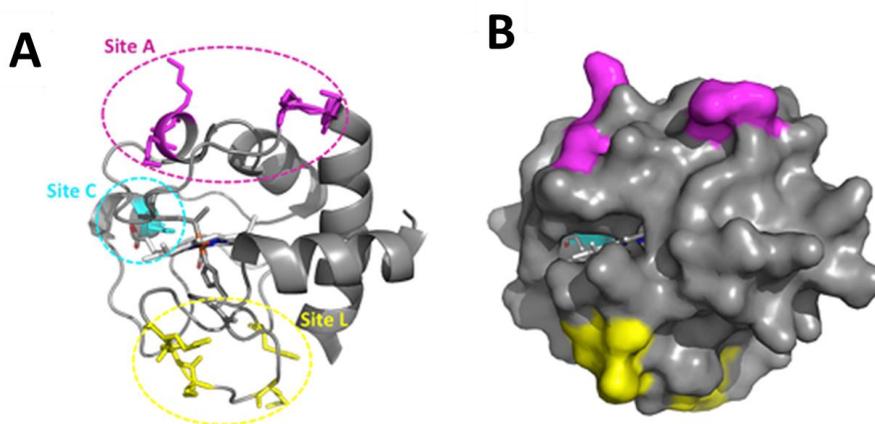


Figura 6. Sitios de interacción del cyt *c* con fosfolípidos. A. Representación del cyt *c* (PDF: 1HRC) señalando los sitios de contacto A, C y L. El Sitio A (color magenta) lo componen los residuos Lys72, Lys73, Lys86 y Lys87. El sitio C (color celeste) consiste de un residuo clave que es la Asn52. El Sitio L (amarillo) incorpora los residuos de Lys 22, Lys 25, Lys 27, His26 e His33. Las interacciones formadas en el los sitios A y L con el fosfolípidos son principalmente del tipo electrostáticas, mientras que el sitio C se dan interacciones del tipo enlace de hidrógeno. B. Mapa de superficie de cyt *c* en donde se ilustra el acceso al solvente y los sitios de interacción con los fosfolípidos. Figura tomada de ².

La interacción del cyt *c* con la cardiolipina induce un cambio conformacional bastante importante en la proteína. Algunos autores plantean la conformación adoptada es una “conformación extendida” del cyt *c* (Figura 7)⁴³. Estudios por medio de espectrometría Raman resonante confirman que existe una ruptura de la interacción de la Met80–Fe del hemo sustituyéndola por una His, quedando la configuración His-Fe-His³⁴.

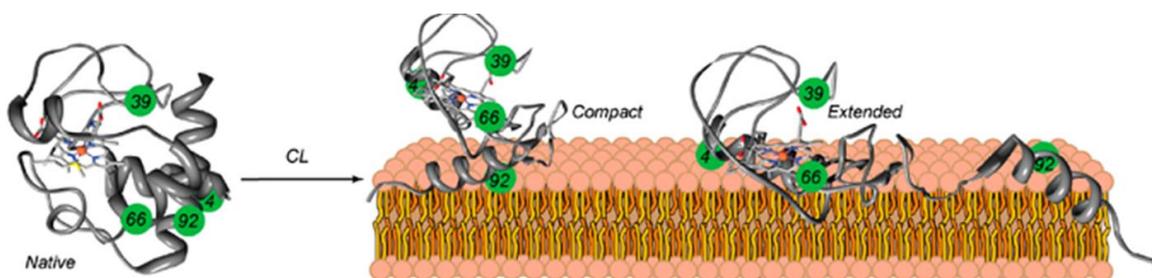


Figura 7. Se describe la pérdida de la conformación nativa por la unión a la cardiolipina generando una *conformación extendida* del cyt c, con la pérdida de la interacción Fe-Met80. Tomada de ⁴³. Los residuos aminoácidos señalados corresponden a puntos utilizados para estudiar el movimiento de la proteína utilizando una sonda fluorescente por el artículo original ⁴³.

Este cambio conformacional del cyt c durante su unión con la cardiolipina, induce un aumento en la actividad peroxidasa del cyt c como se describió previamente. Dada su interacción y la capacidad de oxidarla, el grupo del Dr. Kagan lo describen como un “beso de muerte” ³⁰ dado que la oxidación de la cardiolipina es un paso necesario en el proceso de apoptosis³⁰. La cardiolipina puede oxidarse directamente por el radical hidroxilo⁴⁴ y el cyt c puede propagar dicha oxidación mediante su actividad peroxidasa, así como también usando H₂O₂ como sustrato.

No existe evidencia que otro fosfolípido sin carga induzca un aumento en la actividad peroxidasa del cyt c como lo hace la cardiolipina⁴⁵.

v) **Modificaciones oxidativas postraduccionales: nitración y sulfoxidación del cyt c**

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno se forman, a bajos niveles, de forma continua en condiciones fisiológicas^{46,47} pudiendo participar en reacciones de señalización redox^{48,49}. Las oxidaciones que mayoritariamente ocurren en los sistemas biológicos corresponden a reacciones de dos electrones mientras que las reacciones por un electrón son evitadas ya que puedan generar daño por la generación de nuevos radicales durante el proceso⁵⁰. Existen diferentes fuentes de formación de oxidantes y radicales libres que se forman en diferentes compartimentos celulares y varias de ellas están relacionadas con el mecanismo de acción de diferentes enzimas. Por ejemplo, en la membrana plasmática se encuentran las enzimas lipoxigenasa, prostaglandina sintasa y NADPH oxidasa, mientras que en los peroxisomas están presentes varias oxidasas y flavoproteínas también generadoras de oxidantes y radicales libres. La familia de las óxido nítrico sintetasa (NOSs) forman a partir de la oxidación de la L-arginina el radical óxido nítrico (*NO), radical estable que es utilizado para transmitir señal a través de las membranas lipídicas⁵¹. El *NO es el mayor contribuyente a mantener la homeostasis normal en el sistema cardiovascular, siendo la isoforma endotelial (eNOS), la determinante principal en el proceso de relajación y regulación del tono vascular. Los niveles normales de *NO están en el rango nM. El *NO reacciona con ferro-cyt c a una velocidad de 200 M⁻¹s⁻¹ para formar ferri-cyt c y anión nitroxyl (NO⁻)⁵¹. Algunos autores plantean que el cyt c cumpliría un rol en detoxificar el *NO. Al mismo tiempo, se ha planteado la posibilidad de que el *NO controle el

flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial al ser un potente inhibidor reversible del complejo IV de la cadena (citocromo c oxidasa)⁵².

La familia de las NADPH oxidasas (NOXs) producen radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en diferentes condiciones y compartimentos celulares^{46,53,54}.

La respiración aeróbica mitocondrial lleva a la reducción del O_2 por 4 electrones a nivel del complejo IV con la consiguiente generación de H_2O en la matriz mitocondrial. Este proceso genera el gradiente electroquímico utilizado para la síntesis de ATP cuando el mismo se disipa por la ATP sintasa (complejo V). Sin embargo, el proceso no es 100 % eficiente y parte de los electrones se fugan de la cadena reduciendo al oxígeno por un electrón con la consiguiente generación de $O_2^{\bullet-}$ ^{55,56, 57}. Se estima que aproximadamente el 0.1 % de los electrones que pasan por la cadena respiratoria se desvían hacia la formación del $O_2^{\bullet-}$ ^{55,58}. La producción está mediada, en parte, por la inhibición de los complejos I, III ó IV, que incrementa los electrones en los clusters hierro-azufre de los complejos. Un segundo mecanismo está dado por el transporte reverso de los electrones a través de la cadena respiratoria. El $O_2^{\bullet-}$ es generado por la semi-ubiquinona (mono-reducida) en el sitio de unión a la ubiquinona en el complejo I. En el complejo III, se ha reportado la producción de $O_2^{\bullet-}$ en el centro de oxidación del ubiquinol, en particular frente al agregado del inhibidor antimicina A^{58,59}. Esta reportado que la hiperpolarización de la membrana mitocondrial (mayor a 140 mV) lleva a un mayor flujo de electrones en la cadena respiratoria generando un aumento en la fuga de electrones hacia el O_2 con la consecuente generación de especies reactivas del oxígeno^{60,61}.

El $O_2^{\bullet-}$ 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 O_2 , produciendo $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 ⁶². El H_2O_2 también es generado como producto de la reacción catalizada por las superóxidos dismutasas (SODs) en el proceso de dismutación de dos $O_2^{\bullet-}$ en presencia de H^+ ⁶³.

A diferencia del $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 es una especie neutra, no radicalar, relativamente estable y en cuanto a su reactividad, es un oxidante moderado⁶⁴. La producción de H_2O_2 se da por la dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ (SODs) o por diferentes oxidasas, como la xantina oxidasa (XO), monoamina oxidasa (MAO), o D-aminoácido oxidasa (DAO)⁴⁸. Presenta una permeabilidad a través de membranas relativamente similar a la del H_2O y una mayor vida media en sistemas biológicos, lo cual permite su difusión a través de diferentes compartimentos celulares alejados del sitio de producción⁶⁵.

El H_2O_2 es un oxidante de dos electrones, cuyo blanco principal son los tioles. Dada las propiedades fisicoquímicas del H_2O_2 puede ser utilizado como mensajero transportando señales redox desde su sitio de generación al sitio blanco. La regulación redox a nivel celular mediada por H_2O_2 puede darse a través de la actividad enzimática o a nivel transcripcional⁶⁶. El concepto de señalización redox por H_2O_2 fue propuesto luego del descubrimiento de varias proteínas blanco involucradas en la señalización como son las fosfatasa, quinasas y factores de transcripción, que contienen residuos de cisteínas susceptibles de oxidación y que causan cambios en su actividad biológica. Las peroxirredoxinas, son responsables de su detoxificación, pero también son responsables de la transmisión de señales oxidativas a nivel celular. De esta manera, un aumento en las concentraciones de H_2O_2 puede inducir una cascada de señalización redox a nivel celular⁶⁶. En células de mamífero se ha reportado a los siguientes factores de

transcripción regulados por la oxidación de sus cisteínas mediada por H₂O₂: AP-1 (proteína activadora 1), NRF2 (Factor nuclear 2), CREB (proteína de respuesta de unión), HSF1, HIF-1 (factor de respuesta a la hipoxia), TP53 (proteína tumoral 53), NF-κB (factor nuclear- κB), NOTCH, SP1 (proteína específica 1) y SCREB-1.

Efectivamente, para que se dé un aumento de la concentración de H₂O₂, es necesario superar la capacidad de los sistemas antioxidantes que existen a nivel celular, en los diferentes compartimentos celulares, como son los tioles de bajo peso molecular (glutatión, GSH, tioredoxina Trx) y las enzimas antioxidantes como las glutatión peroxidases (GPx), peroxiredoxinas (Prx) y la catalasa. Un dato importante, es que tomando en cuenta la abundancia y las constantes de reacción del H₂O₂ con estas enzimas antioxidantes, las moléculas señalizadoras nombradas anteriormente no compiten por el H₂O₂. Varios autores adjudican por lo tanto, que estas enzimas antioxidantes no cumplen únicamente el rol de ser aquellas detoxificantes, sino que cumplen un rol censando los niveles de H₂O₂ y, mediante la interacción tiol/disulfuro, transfieren la reacción hasta oxidar las proteínas blanco⁶⁶. Las concentraciones de H₂O₂ asociadas a una respuesta al estrés a nivel intracelular son en el entorno de 0.1 – 10 μM⁴⁸. Cuando el H₂O₂ es generado a concentraciones menores a 0.7 μM actúa como un segundo mensajero⁶⁷ activando vías de señalización que estimula la proliferación celular⁶⁸, la diferenciación⁶⁹ y la migración (Figura 8)⁷⁰.

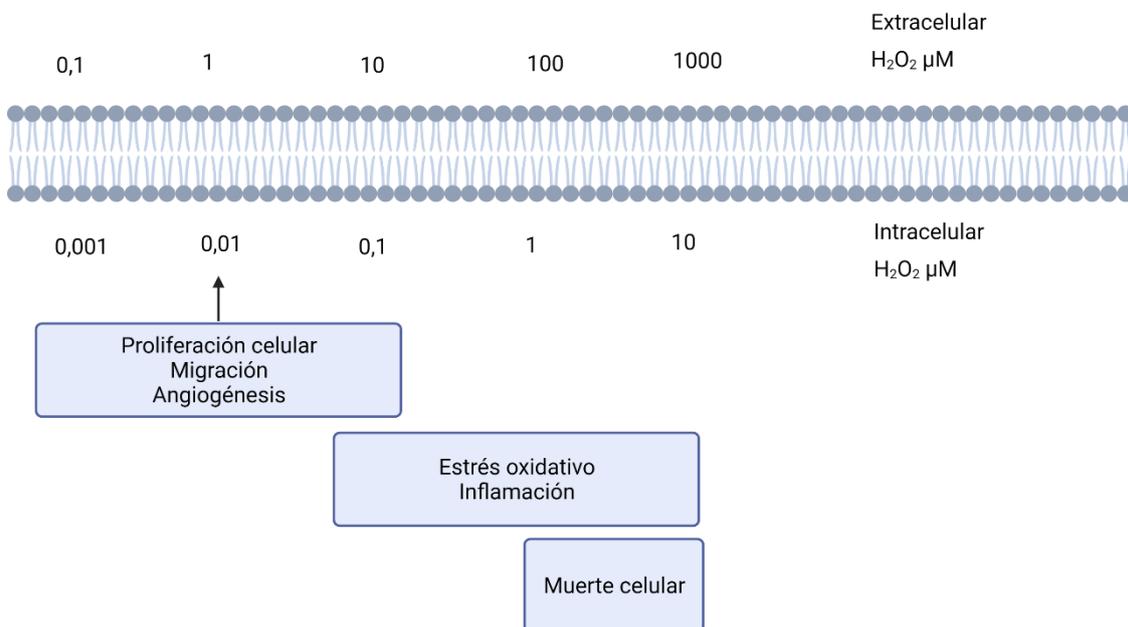


Figura 8. Respuesta celular a diferentes concentraciones H₂O₂. La concentración de H₂O₂ en hepatocitos en condiciones fisiológicas. En condiciones de estrés oxidativo, la concentración a nivel intracelular aumenta a 100 nM. El estrés y la respuesta adaptativa al estrés, al igual que frente a una respuesta inflamatoria, crecimiento y muerte celular son varios procesos donde la concentración de H₂O₂ aumenta a nivel celular. Modificada de la referencia⁴⁸.

Otras especies reactivas del oxígeno, como el radical hidroxilo (*OH) pueden generarse en presencia de O₂⁻, H₂O₂ y metales de transición mediante la reacción de Fenton⁷¹. Diferentes metales de transición como el hierro, cobre y el níquel pueden reaccionar con H₂O₂ para formar *OH⁷¹.

El $O_2^{\cdot-}$ reacciona con los aminoácidos con muy baja constante de reacción⁷². En la mayoría de los casos no puede iniciar la oxidación por un electrón en una cadena polipeptídica, a excepción de la metionina, la cual puede iniciar oxidación de la misma formando metionina sulfóxido⁷³. El $\cdot OH$ por su parte, puede oxidar también por un electrón con un potencial de 2.34 V a pH 7 y la reacción no excede más de 10^7 segundos. Es poco probable considerar que el $\cdot OH$ difunde y selectivamente reacciona con los blancos. En particular, las evidencias con cyt c indican que el $\cdot OH$ reacciona con los residuos más accesibles de la cadena polipeptídica, uno de sus puntos es la oxidación de la Met80⁷⁴.

Algo interesante de remarcar es que un aumento en la concentración de H_2O_2 puede llevar a la generación de una disfunción mitocondrial, induciendo a un aumento en la producción del $O_2^{\cdot-}$ por la cadena respiratoria. Un blanco de ese $O_2^{\cdot-}$ puede ser el cyt c. Por lo tanto, tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el $\cdot OH$ pueden oxidar a las metioninas del cyt c. La de la Met80 rompe la interacción hierro-azufre evidenciado por la desaparición de la banda a 695 nm⁷⁴. Está establecido que existe un blanqueamiento (bleaching, pérdida de color) del cyt c por parte del H_2O_2 producido por daño en el anillo de la porfirina^{29,75}. Algunos trabajos describen que complejos electrostáticos con carga superficiales negativas tienen un efecto protector del cyt c previniendo el daño en la porfirina causado por la reacción con H_2O_2 ⁷⁶. Más allá de ser blanco de oxidación por el H_2O_2 , el cyt c también participa regulando la generación de H_2O_2 mediante la reducción de p66Sch. p66Sch es una enzima redox presente en el espacio intermembrana mitocondrial que genera H_2O_2 utilizando electrones del cyt c reducido⁷⁷. Un dato interesante es que el *knockout* de p66Sch en ratones y células aumenta la sobrevivencia, observando específicamente que los ratones *knockout* tienen incrementada la resistencia a especies reactivas del oxígeno y al daño UV. De hecho, la expresión y activación de p66Sch promueve el incremento del transporte de electrones de la cadena mitocondrial y un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno⁷⁸.

Finalmente, el $O_2^{\cdot-}$ reacciona con el $\cdot NO$ a una velocidad controlada por difusión llevando a la formación de peroxinitrito anión ($ONOO^-$), una base débil que se protona para dar el ácido peroxinitroso ($ONOOH$, pka = 6.8)⁷⁹. Se nombrará en este trabajo peroxinitrito como la suma de ambas especies ($ONOO^- / ONOOH$) y se indicará en particular la especie reaccionante cuando sea necesario. El peroxinitrito es un potente oxidante formado *in vivo*, de muy corta vida media (10 ms)⁸⁰ que puede reaccionar directamente con diferentes biomoléculas oxidando por un electrón (ejemplo reacción con metales de transición) o por dos electrones (ejemplo reacciones con tioles)⁸¹. El peroxinitrito se descompone en un 30 % por homólisis del ácido peroxinitroso ($ONOOH$) a dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$) y $\cdot OH$. Dichas especies pueden participar en reacciones de nitración/oxidación^{80,82,83}. Una de las reacciones más importantes del peroxinitrito en sistemas biológicos es su reacción con dióxido de carbono (CO_2), que se encuentra en equilibrio con el bicarbonato (HCO_3^-)⁸⁴ dando un intermediario inestable que decae a $\cdot NO_2$ y radical carbonato $CO_3^{\cdot-}$ ⁸⁵. Un importante aspecto del peroxinitrito es su capacidad para nitrar tirosinas, si bien no involucra una reacción directa, pero si con los radicales derivados del mismo^{83,86}. La nitración implica una modificación covalente postraduccional mediada por oxidantes derivados de su descomposición⁸². La nitración de tirosinas puede resultar en cambios dramáticos en la estructura proteica y afectar la función tanto en la pérdida de la misma o en ganancia de una nueva actividad⁸⁷. Constituye la sustitución de un hidrógeno por el grupo nitro en la posición 3 del anillos fenólico, siendo 3-nitro-tirosina el producto de la reacción. El mecanismo para la nitración de tirosina implica un paso de oxidación por un electrón que lleva a la formación de radical tirosina^{83,88}. En los sistemas biológicos los oxidantes que pueden realizar dicha oxidación son $\cdot OH$, $\cdot NO_2$, $CO_3^{\cdot-}$, los complejos oxo-metales (como el complejo I de la myeloperoxidasa) y

los peroxilos lipídicos (LOO[•]) y alkoxyl lipídicos (LO[•])^{89,90}. La reacción del radical tirosilo con [•]NO₂ (y [•]NO) es controlada por difusión y deja la formación de 3-nitrotirosina, aunque también otras reacciones pueden derivar en otros productos como la 3,3'-ditirosina, lo que incluye la unión de proteínas en daños degenerativos y en procesos de envejecimiento⁸⁷. La nitro tirosina afecta las propiedades fisicoquímicas del aminoácido, en particular causa una disminución en el pKa del grupo hidroxilo del fenol de 10.2 a 7.2 en solución⁹¹. Este cambio puede afectar el entorno de la proteína al cambiar la proporción de residuos cargados, afectando la polaridad e incrementando la hidrofobicidad de la misma^{92,93}. Se ha detectado *in vivo* proteínas nitradas en tejidos y células^{94,95}.

El cyt *c* humano cuenta con 5 tirosinas en su secuencia aminoacídica, las cuales 4 están altamente conservadas. El cyt *c* de caballo posee esas 4 tirosinas en las mismas posiciones y dada su alta similitud con la estructura del cyt *c* humano se utiliza como modelo. La Tyr74 y Tyr97 se encuentran expuestas al solvente, mientras que la Tyr67 y la Tyr68 se encuentran en cavidades internas de la proteína. La reacción del cyt *c* con peroxinitrito genera una colección de proteoformas con diferentes tirosinas nitradas. En solución las nitraciones preferenciales son la Tyr97 y Tyr74 por estar más expuestas al solvente. En particular a lo que respecta al cyt *c*, existen varios reportes *in vivo* de nitración de tirosinas⁹⁶. En los osteoclastos se ha detectado la nitración de la Tyr97 y de la Tyr67, estas células tienen la particularidad de tener altas concentraciones de H₂O₂ en condiciones basales (0.34 μM)⁹⁷. Por otro lado, el daño ocasionado por la isquemia/reperfusión de los tejidos en diferentes circunstancias, está asociado con una sobreproducción de O₂^{•-} y [•]NO⁹⁸, daño a la mitocondria y eventualmente, muerte celular. En modelos de isquemia/reperfusión en ratones, se evidencia la co-localización de proteínas nitradas y de cyt *c* en el citosol celular luego de la isquemia⁹⁶.

En diferentes trabajos de nuestro grupo, se ha logrado purificar formas mono y dinitradas del cyt *c*⁹³. En particular, se observó que la nitración de la Tyr74 y la Tyr97 inducen la pérdida de la banda a 695 nm, lo cual indica una ruptura de la interacción entre el hierro y el azufre de la Met80. Estudios de espectrometría Raman han reportado la sustitución de la Met80 por una Lys a pH fisiológico como sucede en la conformación alcalina del cyt *c*, generando un complejo hexacoordinado de bajo spin. Se postula que existe un enlace de hidrógeno que interacciona entre la Tyr67 y el azufre de la Met80 que media un red entre la Tyr74 –Glu66 –Tyr67 –Met80 – Fe, frente a la nitración de la Tyr74 esta red se pierde⁹⁹, lo que permite realizar la transición alcalina a pHs más bajos (pKa 7.1)²³. La red de interacción está representada en la Figura 9.

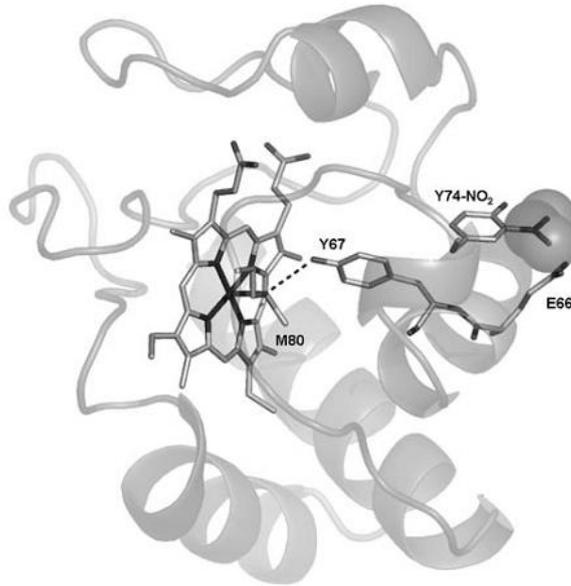


Figura 9. Red de contacto propuesto para transmisión del efecto de la nitración de la Tyr74 al grupo hemo de la proteína. La nitración de esa tirosina induce la pérdida de la interacción de la Met80- Fe del hemo. Tomada de Referencia ⁹⁶.

Este cambio en la configuración del hemo produce una reducción en su potencial de reducción, lo que impide que el cyt c sea capaz de transferir electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial. Cabe señalar que esta pérdida de actividad se da en los cyt c nitrados en las diferentes tirosinas como se muestra en la Tabla 1 de la referencia¹⁰⁰.

Con respecto a la actividad peroxidasa ocurre una ganancia de función con la nitración de la proteína. El cyt c no es una buena peroxidasa, pero la nitración de la proteína induce un aumento significativo en dicha actividad (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las velocidades de respiración dependiente de succinato y la actividad peroxidasa de los cyt c nitrados en las diferentes tirosinas.

	Velocidad de respiración dependiente de succinato		Actividad peroxidasa	
	mM O ₂ /min	% del control	μM/min	% del control
Nativo	0.71 ± 0.032	100	1.67 ± 0.11	100
NO₂Y74	0.039 ± 0.011	55	7.69 ± 0.11	460
NO₂Y97	0.064 ± 0.015	90	4.58 ± 0.08	274
NO₂Y67	0.015 ± 0.011	21	4.77 ± 0.12	285
DiNO₂Y	0.028 ± 0.012	39	11.72 ± 0.15	701
DiNO₂Y (Y74-Y67)	ND	---	6.2 ± 0.2	371
TriNO₂Y	ND	----	12.2 ± 0.2	730
Tratamiento con peroxinitrito	0.026 ± 0.013	36.6	9.35 ± 0.025	560

Recientemente, se ha observado que el cyt c puede cumplir con la función de oxidar al sulfuro de hidrógeno (H₂S) y actuar como modulador de dicha molécula señalizadora¹⁰¹. El cyt c actúa como agente oxidante que facilita la conversión de sulfito a sulfato por medio de la sulfato oxidasa, enzima mitocondrial dependiente de molybdeno^{102,103}. El sulfito es un producto metabólico que se genera del catabolismo de los aminoácidos que contienen sulfuros como son

la metionina y la cisteína. Se ha propuesto que el cyt *c* podría ayudar a reducir la toxicidad del sulfito por interacción con la sulfito oxidasa en la unión a un dominio similar al del complejo III de la cadena respiratoria¹⁰⁴.

Otra modificación que puede sufrir el cyt *c* es la nitrosilación. La nitrosilación corresponde a la adición de un grupo NO a cisteínas libres o metales de transición. En el caso del cyt *c* no posee cisteínas libres, por lo que su único blanco es el grupo hemo¹⁰⁵. Unos pocos estudios han visto nitrosilado el cyt *c* *in vitro* y en monocitos U-937^{51,106-108}. Un dato interesante es que la nitrosilación induce que el hemo quede penta coordinado, rompiendo la interacción Fe-S de la Met80.

vi) Modificaciones no-oxidativas postraduccionales del cyt *c*

Fosforilación del cyt c

Desde el punto de vista celular, el cyt *c* es una proteína ideal para ser regulada ya que cumple funciones claves en la vida de una célula. Una de las maneras de regular la función de las proteínas y en definitiva las vías en la que están involucradas esas proteínas, es la fosforilación. Varios grupos que trabajan en cyt *c* han detectado la presencia de esta modificación postraducciona en sistemas biológicos. Se ha detectado la presencia de cyt *c* fosforilado en varias tirosinas o treoninas y observado que según el tejido los aminoácidos que se encuentran fosforilados son diferentes¹⁰⁵. La primera fosforilación detectada *in vivo* para el cyt *c* fue descrita en el 2006 y corresponde a la Tyr97¹⁰⁹. Fue detectada en corazón bovino¹⁰⁹ y en el cerebro porcino luego de tratamiento con insulina¹¹⁰. La función de la fosforilación de esta tirosina evitaría la migración del cyt *c* al citosol celular, preservando la sobrevivencia de las neuronas frente a un daño por isquemia^{110,111}. Con respecto a las funciones, el cyt *c* cuando se encuentra fosforilado en esa posición cambia la cinética con la que se une al complejo III pasando de una cinética del tipo Micheliana a una sigmoidea. Este cambio en la cinética regula la velocidad de transporte de electrones a través de la cadena respiratoria¹⁰⁹.

La tyr48 fue detectada fosforilada en el hígado de vaca y el efecto de esa fosforilación induce una disminución en un 50 % de la capacidad máxima de transporte de electrones, obteniendo un mayor efecto que lo observado en la Tyr97 donde no baja la capacidad máxima del transporte¹¹². Estudios *in vitro* donde se sustituye a la Tyr48 por glutamato simulando el cambio de aminoácido por uno con carga negativa, muestran una disminución en 45 mV en el potencial redox, probablemente debido a un cambio en la región del hemo que induce un cambio en el estado redox del hierro. Con estos datos se puede observar que la Tyr48 fosforilada cumplirá un rol regulador en el transporte de electrones. Al mismo tiempo se detectó en estos mutantes una disminución en la peroxidación de la cardiolipina, proceso asociado con la apoptosis¹¹³.

La fosforilación en la Thr28 y Ser47 fueron detectadas en el músculo esquelético luego de realizar ejercicio^{114,115}. La Thr28 fue detectada en el riñón, más del 80% del cyt *c* se encontraba fosforilado en esa posición¹¹⁶. La Thr28 fosforilada o el recombinante Thr28Glu (mutación que simula con el glutamato la fosforilación) inhibe en la actividad del complejo III en más de un 50%, disminuyendo la capacidad respiratoria y la producción de especies reactivas del oxígeno. Este dato puede significar una importancia en la regulación del cyt *c* en el control del flujo de los electrones¹¹⁶. AMPkinasa sería la enzima candidata de ser la que medie la fosforilación al cyt *c*¹¹⁶.

La fosforilación de la Ser47 es otra modificación detectada en el músculo esquelético por algunos grupos de investigación. Los estudios *in vitro* mediante mutantes que simulan la fosforilación muestran que existe una disminución en la capacidad de activar a las caspasas¹¹⁷. Al mismo tiempo, ese mismo mutante tiene mayor actividad peroxidasa¹¹⁷.

Existe cyt c fosforilado de manera basal en diferentes tejidos como en la Tyr97 en el corazón, Tyr48 en el hígado y la Thr28 en el riñón. En todos ellos existe una disminución en el transporte de electrones del cyt c, lo que algunos autores lo catalogan como una manera de controlar la respiración celular. Como ya se comentó en condiciones de hiperpolarización de mayor a 140 mV está reportado en varios tejidos un aumento considerable de formación de especies reactivas del oxígeno. Existe una hipótesis planteada que establece que la fosforilación podría ser la modificación que regule la producción de especies reactivas del oxígeno formadas por la cadena respiratoria. Luego de una hiperpolarización de la membrana, el cyt c se fosforila, lo que evita que pueda transportar electrones en la cadena respiratoria bajando la formación de especies reactivas del oxígeno, previniendo la apoptosis celular¹¹⁶. Pero bajo condiciones de estrés y en condiciones de hiperpolarización de la membrana, el cyt c se desfosforila lo que el flujo de electrones aumenta induciendo la producción de las especies reactivas del oxígeno que induce la apoptosis¹¹⁶. Con esta evidencia se plantea la hipótesis de que la fosforilación/desfosforilación regula la muerte celular por apoptosis de manera indirecta.

Acetilación del cyt c

Con respecto a la acetilación, el cyt c tiene 18 residuos de lisinas que podrían ser blanco de acetilación. Hasta el momento solo se ha detectado acetilaciones en modelos celulares en la Lys8 en el hígado de ratón¹¹⁸ y en la Lys53 en tejidos y líneas celulares de cáncer de próstata¹¹⁹. Se utilizaron mutantes miméticos de la acetilación, sustitución de la lisina por glutamina, con pérdida de la carga positiva pero mantiene la polaridad en el aminoácido. Se observa una baja actividad en la transferencia de electrones al complejo citocromo oxidasa terminal de la cadena de transporte para ambos mutantes K8Q y K53Q^{119,120}. Para K53Q se observa una baja capacidad en la activación del apoptosoma, al igual que un aumento en la actividad peroxidasa lo que sumado a una disminución de actividad en la cadena respiratoria indicarían un rol pro-tumoral, ya que estimularía el efecto Warburg (tendencia a fermentación láctica observado en tejidos proliferativos y tumorales) y un rol de evitar la muerte celular siendo scavengers de H₂O₂ evitando la formación del apoptosoma¹¹⁹. En el mismo reporte, observan la especificidad al encontrar únicamente la Lys53 acetilada utilizando espectrometría de masas, lo que da la pauta de la posibilidad de encontrarse alguna acetilasa sitio-específica. El espacio intermembrana mitocondrial se encuentra a un pH más ácido que en la matriz mitocondrial y una menor concentración de Acetil-CoA lo que sugiere una menor probabilidad de acetilación no enzimática a diferencia de lo que ocurre dentro de la matriz mitocondrial^{121,122}.

vii) Rol del cyt c en la cadena de transporte de electrones mitocondrial

El descubrimiento de Eugene Kennedy y Albert Lehninger en 1948 de que las mitocondrias son el sitio en donde se realiza la fosforilación oxidativa marcó el inicio de la fase moderna de los estudios sobre la transducciones biológicas de energía¹²³. Las mitocondrias son organelos de

doble membrana con ADN propio que codifica para 13 subunidades de los complejos que participan en la cadena respiratoria así como también para veintidós ARN de transferencia y dos ARN ribosomales¹²⁴. La cadena respiratoria se encuentra localizada en la membrana interna de la mitocondria y consta de una serie de transportadores electrónicos que actúan secuencialmente, como se muestra en la Figura 10. Además del di-nucleótido de adenina y nicotinamida (NAD⁺/NADH) y de las flavoproteínas, hay otros tres tipos de moléculas transportadoras de electrones que funcionan en la cadena respiratoria: una benzoquinona y dos diferentes proteínas que contienen hierro (citocromos y proteínas ferro-sulfuradas). Los citocromos son proteínas que se caracterizan por tener una intensa absorción de la luz visible debido a la presencia del grupo prostético hemo que contiene hierro. Las mitocondrias tienen tres clases de citocromo (a, b y c).

El complejo III de la cadena respiratoria, también llamado complejo citocromo bc1, acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol al cyt c con el transporte vertical de protones de la matriz al espacio intermembrana.

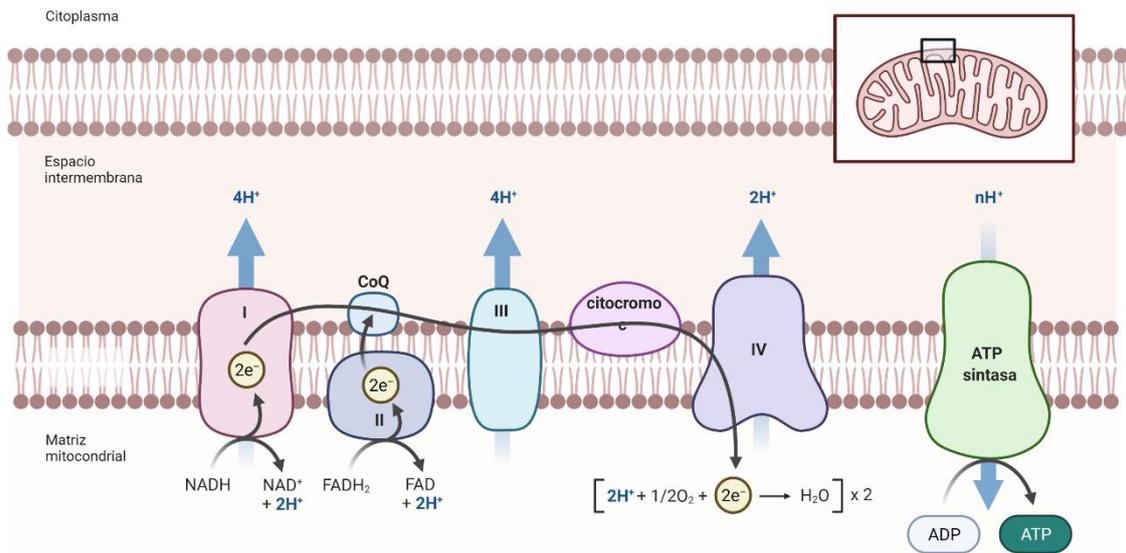


Figura 10. Esquema de la cadena respiratoria localizada en la membrana interna de la mitocondria. Consta de cuatro complejos (I-IV) y la ATPasa. El cyt c es la proteína responsable del transporte de los electrones entre los complejos III y IV. Esquema tomado de¹²³.

En la mitocondria se forma la mayor cantidad de ATP de la célula. En este organelo, la producción resulta de reacciones de óxido-reducción generado por complejos multi-enzimáticos ubicados en la membrana mitocondrial interna. Dichas reacciones son acopladas a un gradiente electroquímico de protones que es utilizado para la síntesis de ATP por la ATP sintasa a partir de ADP y fosfato inorgánico¹²⁵. La cadena respiratoria cuenta con cuatro complejos multi-enzimáticos (complejos del I al IV) y la ATP sintasa en la membrana mitocondrial interna (también llamado complejo V). El NADH producido en el ciclo de Krebs es oxidado en el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y el succinato formado en el mismo ciclo es oxidado por el complejo II (succinato deshidrogenasa). Los electrones obtenidos de los dos complejos son transferidos al pool de ubiquinonas, el cual transporta los electrones dentro de la membrana lipídica al complejo III de la cadena quién termina transfiriendo los electrones al cyt c. El cyt c solo puede reducirse de a un electrón y transporta el mismo al complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) lugar donde ocurre la reducción del oxígeno¹²⁶.

Está aceptado que los componentes de la cadena respiratoria existan en complejos macromoleculares ensamblados denominados supercomplejos¹²⁷. Los mismos permiten el incremento en la eficiencia de la translocación de los electrones y los protones que trae como consecuencia una mejor eficiencia en la utilización del gradiente para la síntesis de ATP¹²⁸. Otra consecuencia importante es la de disminuir la producción de $O_2^{\cdot -}$ generado en la cadena respiratoria¹²⁹. La cardiolipina participa en el ensamblado estructural de estos supercomplejos dando estabilidad a los mismos. Algunos autores plantean la disminución de cardiolipina en estos supercomplejos lleva a una desestabilización de la cadena respiratoria causado por un aumento en la oxidación de la cardiolipina¹²⁹.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de fosforilación oxidativa mitocondria es el sistema que genera mayor energía a nivel celular, pero a su vez, está involucrado en la generación de especies reactivas del oxígeno y en la inducción de la apoptosis.

El *cyt c*, localizado en el espacio intermembrana mitocondrial, está cargado positivamente con un punto isoeléctrico de 9.6. El complejo IV representa el último paso en la cadena de los electrones y cataliza la transferencia de 4 electrones al O_2 , reduciéndolo a H_2O ¹³⁰. Al mismo tiempo, el complejo IV bombea un H^+ al espacio intermembrana por cada electrón transferido. La reacción catalizada tiene una energía libre de Gibbs irreversible con un $\Delta G^{\circ} = -100 \text{ kJ/mol}$ ¹³¹. La cadena de transporte de electrones necesita obligatoriamente al *cyt c*. Ratones *cyt c* knockout mueren a mitad de la gestación¹³² momento que coincide con el cambio de un metabolismo glucolítico a una fosforilación oxidativa debido a un incremento en la necesidad de energía dado por el crecimiento del organismo¹³³.

viii) El rol del *cyt c* en la apoptosis

La muerte por apoptosis es un tipo de muerte celular programada esencial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, maduración del sistema inmune, remodelación de tejidos y eliminación de patógenos entre otros. Su desregulación está implicada en diferentes patologías tales como: cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias e inflamación. El primer reporte de salida del *cyt c* de la mitocondria al citosol celular fue con el descubrimiento de la activación del Factor de Activación de proteasa 1 (Apaf-1)¹³⁴. La salida del *cyt c* de la mitocondria al citosol marca el mayor evento durante la apoptosis¹³⁵. Una vez en el citosol, el *cyt c* forma complejo con el Apaf-1, quien se encuentra unido a la pro-caspasa 9 (caspasa iniciadora del proceso), lo que lleva a un cambio de conformación de Apf-1 y a la formación del súper complejo del apoptosoma. Una vez ensamblado, la procaspasa 9 se activa y ésta activa a continuación a las caspasas ejecutoras (ej: caspasa 3) llevando al desensamblaje de la célula en cuerpos discretos (cuerpos apoptóticos). Varios estudios muestran que la carga positiva que le dan las lisinas de la superficie del *cyt c* permiten su unión e interacción con otras proteínas como son el complejo bc1^{136,137}, la citocromo c oxidasa^{138,139} y el dominio negativo de la WD40 de la Apaf-1¹⁴⁰. Algunos trabajos han demostrado que dicha unión es regulada por medio de la interacción entre el *cyt c* y la Hsp27¹⁴¹. Dicha interacción bloquea la posibilidad del *cyt c* de interactuar con Apaf-1/procaspasa-9, interfiriendo de esta forma con la vía apoptótica¹⁴².

El *cyt c* es capaz de unirse al receptor del inositol-1,4,5-trifosfato en el retículo endoplasmático durante la apoptosis, abriendo canales de calcio de la mitocondria al citosol, resultando en un

mecanismo de retroalimentación positiva que causa más salida del cyt c activando la apoptosis¹⁴³⁻¹⁴⁵. Un rol importante determinado para el cyt c necesario para la apoptosis es su participación en la oxidación selectiva de cardiolipina, la cual genera un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial²⁸. Pero para que esto ocurra es necesario en primer lugar una migración de la cardiolipina de la cara interna a la cara externa de la membrana mitocondrial interna, cuyo paso estaría facilitado por la fosforilación de la scramblasa-3^{146,147} la creatina-kinasa y la dinucleótido fosfokinasa-D mitocondriales¹⁴⁸. Ahora, el cyt c entra en contacto con la cardiolipina y puede formar el complejo de alta afinidad cyt c/cardiolipina. Dicho complejo aumenta considerablemente la actividad peroxidasa del cyt c que en presencia de H₂O₂ induce un aumento en la cantidad de lípidos oxidados generando un aumento de la permeabilidad de membrana como se mencionó previamente. El cyt c puede translocarse también al núcleo celular en respuesta al daño al ADN. En esta localización, induce la condensación de la cromatina independiente de la activación de las caspasas. Posterior a la salida a el citosol, se observa un aumento progresivo de cyt c en el núcleo junto con un aumento en la acetilación de la histona H2A¹⁴⁹.

ix) Mutantes de cyt c en la patología humana

Las trombocitopenias hereditarias son un grupo heterogéneo de enfermedades que están asociadas a más de veinte genes diferentes. En particular, se han detectado mutaciones humanas en genes de cyt c que dan lugar a enfermedades hereditarias autosómicas dominantes, la trombocitopenia 4, acompañada de un aumento en la actividad apoptótica mitocondrial¹⁵⁰. Hasta el momento se han detectado 3 mutaciones en el gen de cyt c G41S, Y48H y A51V (Figura 11)¹⁵⁰⁻¹⁵². La variante G41S tiene aumentada la actividad peroxidasa en comparación con el cyt c nativo^{153,154}. Dicha variante tiene una mayor población de estado pentacoordinado¹⁰⁶. Algunos autores manifiestan que la variante G41S es más propensa a oxidar la Met80 a sulfóxido¹⁵⁵ y dicha modificación oxidativa aumenta la actividad peroxidasa¹⁵⁶.

La mutante Y48H detectada en una familia Italiana¹⁵¹, fue caracterizada *in vitro*, revelando que tiene una mayor actividad peroxidasa que la variante G41S. Dicho aumento en la actividad, se puede explicar en que hay un mayor equilibrio con tendencia hacia la penta coordinación del hemo asociado a una mayor actividad peroxidasa²¹. En particular, los puntos calientes dinámicos se centran alrededor de los bucles 40-57 y 71-85Ω con una jerarquía dinámica de Y48H> G41S> nativo, que actualmente escala con la población de las especies penta coordinadas asociadas con la actividad peroxidasa²¹. La variante A51V contiene valores similares que Y48H en cuanto a la cantidad de población que se encuentra penta-coordinada, a pesar de eso si bien posee una mayor actividad peroxidasa que el cyt c salvaje la misma es menor que la variante Y48H siendo más cercana a la G41S¹⁵⁷.

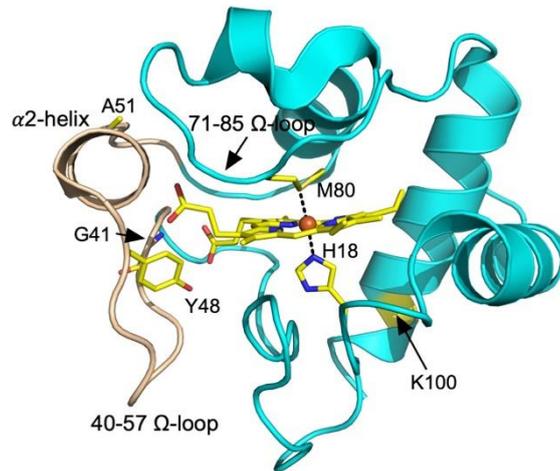


Figura 11. Estructura de rayos x del *cyt c* recombinante humano (3ZCF) señalando las mutaciones naturales identificadas. Se señala los omega loops que se ven perturbados frente a estas mutaciones en color marrón. Tomada de ¹⁵⁷

La Tyr48 se ubica muy próxima al hemo, centro redox, por lo que la sustitución de dicho aminoácido puede interferir con el pasaje de los electrones. Se midió la actividad respiratoria en levaduras que expresan esta variante y se observó una disminución en el consumo de O₂ de un 40 % comparado la expresión del *cyt c* salvaje ¹⁵⁷. Para el caso de la variante A51V, el pK para la transición alcalina seguida por la banda a 695 nm (ruptura de la interacción azufre-hierro) y la consecuente sustitución por una Lys de ligando axial corresponde a 8.3 ± 0.1 ¹⁵⁷, similar a lo obtenido para las otras variantes (una unidad de pH por debajo del *cyt c* salvaje) ¹⁵⁸. Por lo tanto, las variantes que generan enfermedad estabilizan la conformación alcalina indicando que podrían llevar a una mayor salida del *cyt c* al citoplasma celular por tener una mayor actividad peroxidasa, necesaria para la oxidación de la membrana mitocondrial.

x) Funciones alternativas del *cyt c*: sensor redox y respuestas adaptativas

Dado que el *cyt c* puede tomar conformaciones alternativas en respuesta a estímulos oxidativos, es posible que el mismo pueda servir como un sensor redox modulando un espectro de respuestas celulares. En células en estado basal, el *cyt c* está predominantemente hexacoordinado y funciona en el transporte de electrones mitocondrial. En respuesta a niveles moderados de agentes oxidantes o nitrantes, una subpoblación de *cyt c* puede pasar a un estado alternativo, perdiendo la interacción hierro-azufre (Met80-Fe), ganando actividad peroxidasa, y trastocándose de forma temprana al núcleo y al citoplasma. En estas circunstancias, el *cyt c* de conformación alternativa podría funcionar como un sensor redox. Por otra parte, en condiciones de estrés oxidativo predominaría la actividad cardiolipina oxigenasa del *cyt c* ²⁸, conduciendo a la liberación masiva de *cyt c* nativo y otras proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana mitocondrial al citosol, activándose la vía apoptótica.

Nuestro grupo ha reportado que a nivel celular las conformaciones alternativas de *cyt c* se translocan de forma temprana al citosol, no induciendo la apoptosis ²⁶. Resultados preliminares sugieren que estas variantes citosólicas de *cyt c* funcionan como sensores redox en virtud de su

ganancia de función peroxidática y pudiendo disparar respuestas transcripcionales y traduccionales.

xi) Otras funciones del cyt c

En otro trabajo más reciente, se ha descrito un nuevo rol del cyt c tras el tratamiento con pro-apoptóticos como los miméticos de BH3. En algunas células se observa una persistencia a la droga dada por la comunicación entre la mitocondria y el núcleo que se da por la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y por la activación dependiente de cyt c de HRI (inhibidor regulado por hemo), que conduce a la síntesis del factor de transcripción 4 (ATF4)¹⁵⁹. ATF4 estimula un programa de expresión génica a corto plazo que promueve la supervivencia, aumentando la toma de nutrientes y la autofagia, y disminuyen el estrés oxidativo¹⁶⁰.

Se ha identificado al cyt c en el espacio extracelular y su interacción con el ligando α -2 rico en leucina glicoproteína 1 (LRG1)¹⁶¹. Se señaló que el LRG1 se une al cyt c en circulación para amortiguar su efecto proinflamatorio.

xii) Evidencia temprana en la detección inmunoquímica de cyt c en conformación alternativa: mAb 1D3.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son producidos por un único clon de linfocitos B y de ésta manera son todos idénticos reconociendo a un epítipo específico^{162,163}. Constituyen herramientas fundamentales en bioquímica y pueden ser utilizados, entre otros, para detectar cambios conformacionales en un polipéptido de una proteína. A través de los años, se han obtenido una serie de mAbs específicos para formas nativas y no nativas del cyt c¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Entre la década del 80 y 90, se produjeron varios mAb con diferentes patrones de reconocimiento en el cyt c. Se señalaron tres sitios de reconocimiento para varios de estos mAb. Varios sensibles al residuo de aminoácido presente en la posición 44 de la secuencia^{164,165,167}. Otros anticuerpos reconocen la región en el entorno del residuo 60 y el residuo 89¹⁶⁷. En estos casos, los anticuerpos reconocen al cyt c en su conformación nativa, confirmado ya que se requiere las interacciones de regiones no contiguas de la molécula para que el anticuerpo se una. Otro anticuerpo monoclonal generado reconoce la región entre los residuos 93 a 104 únicamente en el cyt c desnaturalizado y por ello es utilizado mayoritariamente en la técnica de western blot¹⁶⁸.

En 1999, el grupo del Dr. Jemmerson obtuvo un anticuerpo monoclonal (denominado: mAb 1D3) que reconoce cyt c de conformación alcalina, pero no en su conformación nativa. Para la generación de este mAb utilizó un inmunógeno en donde fijó la conformación alcalina del cyt c a pH fisiológico utilizando glutaraldehído y ovalbúmina (OVA). El anticuerpo mAb 1D3 fue caracterizado utilizando ELISAs competitivas, en donde el anticuerpo reconoce al cyt c que se une a la placa (y es modificado por la misma a una conformación alternativa), pero no al soluble de conformación nativa que no le compete por la unión a la placa. En el mismo trabajo, identifican un aumento en la señal utilizando el anticuerpo en células apoptóticas, observando que se marcan las células en etapas tempranas del proceso de muerte por apoptosis¹⁶⁶.

En un trabajo publicado en PNAS del año 2010, se identificó la presencia de cyt c no nativo en la periferia nuclear en células HeLa tratadas con concentraciones subletales de peroxinitrito. La

identificación fue mediante el uso del mAb 1D3 como anticuerpo primario mediante ensayos de inmunofluorescencia. Desafortunadamente, el hibridoma que producía la expresión del mAb 1D3 se perdió por un mal manejo de temperatura, y de esta manera, también se perdió la producción de este anticuerpo. Aun contando en el laboratorio con el mAb 1D3 pero conociendo que el mismo no se podría volver a producir, se decidió que la herramienta no se utilice en publicaciones científicas hasta que se logre su recuperación y de esta forma permitir el uso a la comunidad científica.

II. Objetivos

Objetivo General:

Caracterizar las diferentes conformaciones alternativas del cyt *c* expuesto a oxidantes en términos estructurales y funcionales y evaluar su presencia y localización en distintos sistemas celulares.

Objetivos específicos

1. Caracterización estructural y funcional de formas de cyt *c* modificadas oxidativamente.
2. Generación de herramientas inmunoquímicas para el reconocimiento del cyt *c* de conformación alternativa. Desarrollo de anticuerpos policlonales (pAb) y reconstrucción, generación y caracterización del anticuerpo monoclonal recombinante mAb R1D3.
3. Generación y localización subcelular de cyt *c* de conformación alternativa en diferentes condiciones de estrés oxidativo.

III. Resultados

1- Objetivo específico 1

Caracterizar en términos estructurales y funcionales formas de cyt c modificadas oxidativamente

El cyt c de corazón de caballo utilizado durante el trabajo experimental fue adquirido de SIGMA-Aldrich (C7752) con un porcentaje de pureza mayor o igual al 95%.

1.1) Generación de cyt c sulfoxidado: sulfoxidación de la Met80

Una de las modificaciones oxidativas del cyt c obtenida previamente, pero no caracterizada, es la oxidación de la Met80. La reacción para obtener la oxidación de las metioninas se realiza con cloramina T (CT, oxidante) en buffer Tris-HCl pH 8.3. La cinética de la reacción se sigue mediante la caída en la absorbancia a 695 nm. Nuevamente se toma este punto de partida porque se sabe que al oxidarse la Met80 se pierde la interacción hierro-azufre (como se observa en la Figura 12).

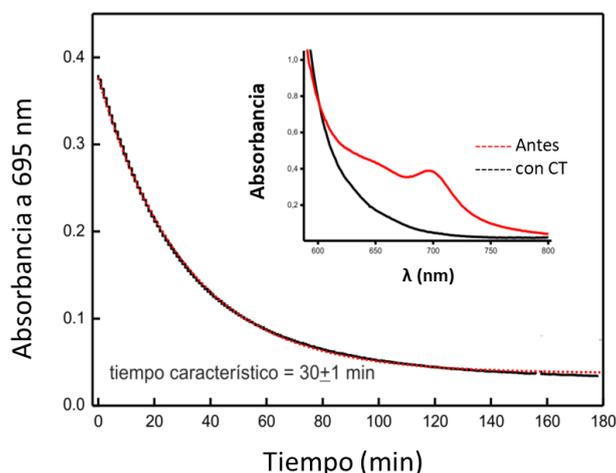


Figura 12. Cinética de la reacción del cyt c con cloramina T (CT), en buffer Tris-HCl pH 8,3, en una relación molar del cyt c con respecto al oxidante de 1:27. Se sigue en el tiempo registrando la pérdida en la banda a 695 nm. **Inserto.** Espectro de absorción antes del agregado de CT (rojo) y posterior al agregado del oxidante (negra).

Luego de terminar la reacción, se quita el excedente de CT mediante gel filtración y se lo deja en buffer fosfato (10 mM, pH 7.4). La mezcla obtenida de las diferentes especies oxidadas se pasa por una cromatografía de intercambio catiónico (sulfopropyl-TSK preparativa) utilizando un HPLC de forma de obtener fracciones puras uniformemente oxidadas. Se utiliza buffer acetato de amonio pH 9, en donde el cyt c se encuentra con carga positiva por lo que se unirá a la columna de intercambio catiónico y mediante el aumento de la fuerza iónica (gradiente lineal de 10-400 mM del acetato de amonio) las diferentes especies con diferentes puntos isoeléctricos (debido a la sulfoxidación de las metioninas) salen antes que el cyt c nativo en la

cromatografía. La columna se equilibra con buffer acetato de amonio (5 mM, pH 9) y luego aumenta de manera lineal la concentración a 400 mM en el minuto 76 con un flujo de 3 mL/min (el gradiente es señalado en la figura con el color verde, Figura 13).

En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido y las diferentes fracciones que fueron recogidas para analizar por espectrometría de masas para su caracterización.

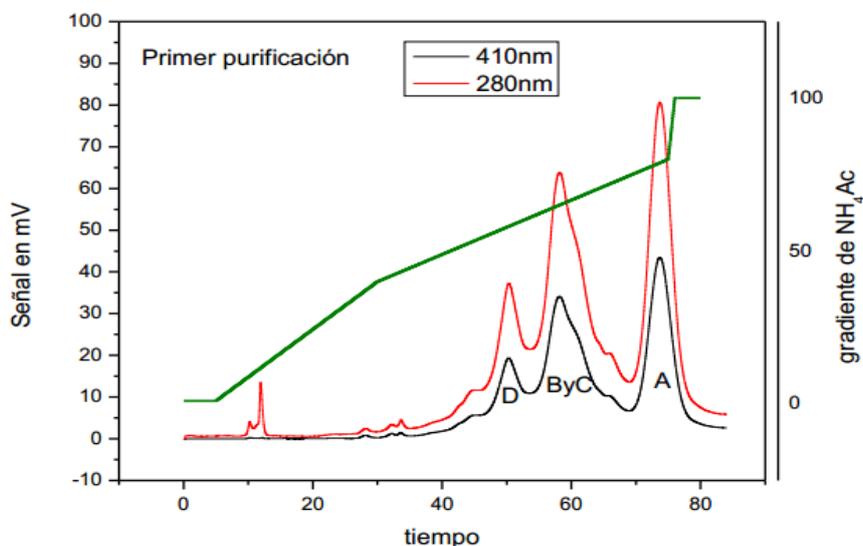


Figura 13. Cromatograma de la muestra de la reacción del cyt c con cloramina T, utilizando una columna de intercambio catiónico y elución con gradiente de acetato de amonio (0.5 M, pH 9). Las letras corresponden a las fracciones recogidas para el análisis posterior por espectrometría de masas.

Las fracciones obtenidas se desaladan y digieren con tripsina (relación 1:50) en buffer bicarbonato de sodio (50 mM, pH 8.1) toda la noche a 37°C en anaerobiosis (desgaseadas con nitrógeno). Se realizó un control con cyt c para verificar la no presencia de metioninas sulfoxidadas. El resultado obtenido de la digestión con tripsina fue analizada utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF). La fracción A, tiene péptidos con metionina oxidada al igual que sin oxidar (mezcla de especies). La fracción A eluye con el cyt c nativo indicando que las modificaciones sufridas no alteran su punto isoeléctrico. Para las fracciones B y C, se verificaron inicialmente que ambas tenían las dos metioninas oxidadas (la Met65 y Met80) en todos los péptidos encontrados para esas posiciones con la presencia de una modificación de más 16 Da para los péptidos que contaban con una metionina, y de más 32 Da para aquellos péptidos que contenía a ambas metioninas. De manera de entender por qué eluyen en tiempos diferentes, se las trató con ferrocianuro de potasio para reducir el hierro del grupo hemo de las muestras. Posteriormente, las fracciones reducidas fueron nuevamente pasadas por la columna de intercambio catiónico obteniendo un único pico. Por lo que la fracción B y C, corresponde a una mezcla de cyt c oxidado en ambas metioninas, pero con el Fe en estado oxidado y reducido. En la fracción D se observó también presencia de ambas metioninas oxidadas dados por la presencia de una modificación de más 16 y otra de más 32 Da en los diferentes péptidos (Figura 14).

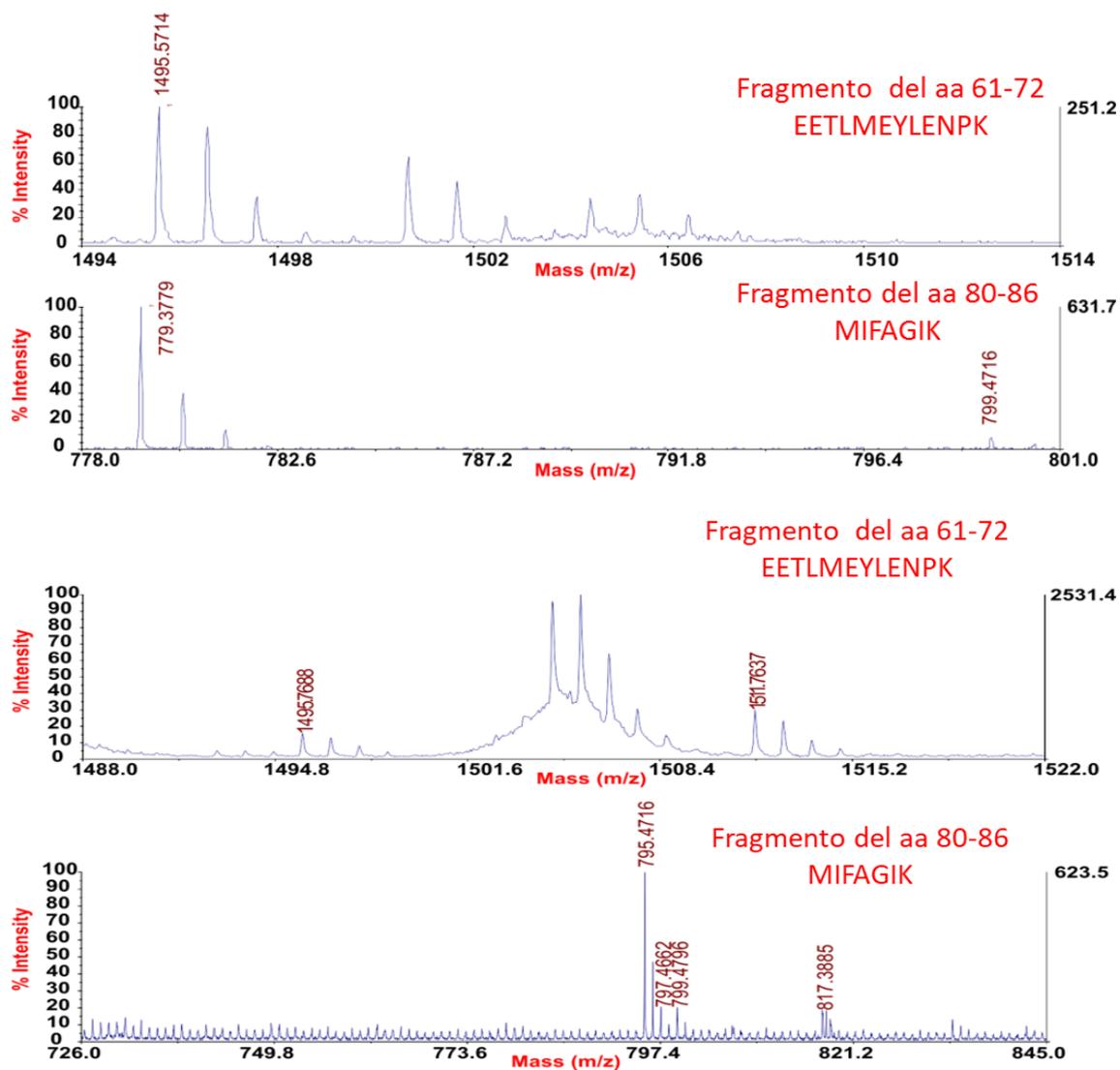


Figura 14. Espectro de masas obtenido del análisis por MALDI-TOF de cyt c nativo y de la fracción B y C digeridas con tripsina. Los dos espectros superiores corresponden a los dos fragmentos que contienen las metioninas del cyt c nativo. Los dos espectros inferiores, se muestran los dos fragmentos que contienen las metioninas, en ambos casos hay un aumento en la masa correspondiente a un oxígeno característico de la sulfoxidación de las metioninas.

Se determinó para cada fracción la presencia de actividad peroxidasa con H_2O_2 utilizando el AmplexRed como sonda. Se observó que la fracción con más actividad peroxidasa es la fracción B y C observándose un aumento de más de 10 veces en comparación con el cyt c nativo. Utilizando Raman Resonante se determinó que la fracción B y C posee una coordinación a nivel del hemo OH^-/His . A la fracción B y C se le denominó SO-M80 cyt c. Los ensayos posteriores se realizaron con esta fracción.

1.2) Nitración de tirosinas

Se realizó la caracterización de las especies de cyt c nitradas en las diferentes tirosinas. Previamente se había demostrado la relevancia de esta modificación oxidativa que produce la ganancia de una nueva función, actividad peroxidática. Se obtuvieron especies nitradas en la

Tyr74 y en la Tyr97. Para obtener las especies puras se siguió el mismo procedimiento utilizado en⁹³ nitrando al cyt c con flujos de peroxinitrito y posterior purificación con columna de intercambio catiónico que permite la separación de los distintos cyt c nitrados.

En la Figura 15 se esquematiza el procedimiento para obtener las formas mononitradas del cyt c.

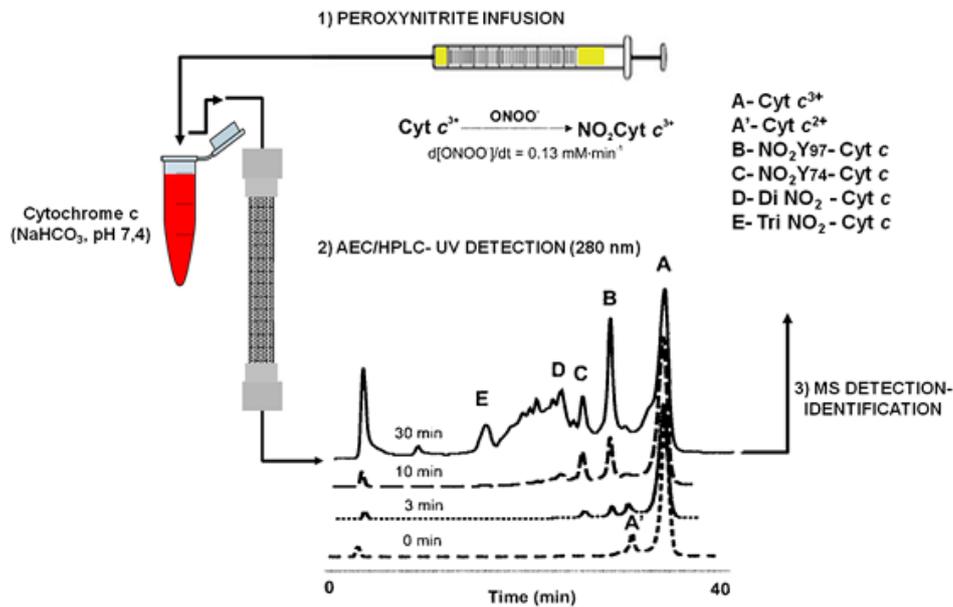


Figura 15. Esquema del procedimiento para obtener formas mononitradas del cyt c. Dicha figura forma parte de la revisión bibliográfica que realizamos². Posteriormente a la nitración por infusión peroxinitrito, la muestra obtenida se separa mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se observa los cromatogramas que se obtienen según los minutos de infusión del peroxinitrito.

Las diferentes fracciones fueron analizadas por espectrometría de masas (Figura 16). La muestra mayoritaria corresponde al cyt c nitrado en la Y74 (NO_2Y74 -cyt c) pero la fracción contiene también cyt c nitrado en la Y48 aunque en menor proporción (Figura 16C). Para la muestra de NO_2Y97 -cyt c más del 90% de la proteína tienen una única nitración en la Tyr97.

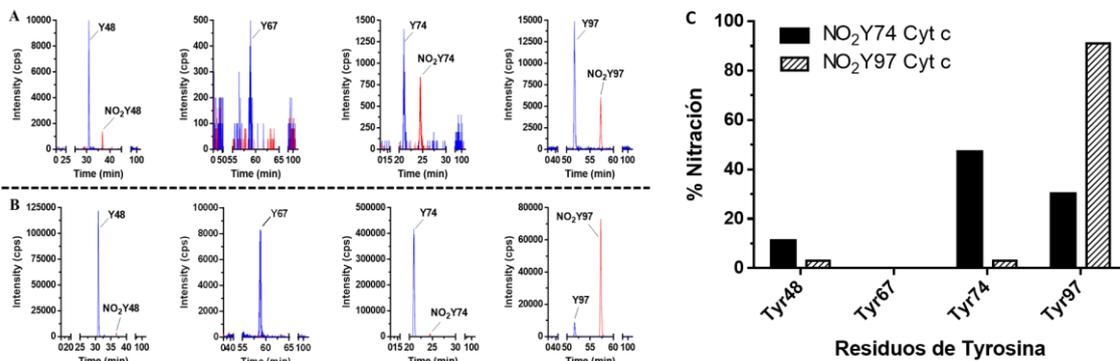


Figura 16. Cromatogramas del análisis de MRM de las especies purificadas de cyt c nitradas. Cuantificación relativa del grado de modificación de las cuatro tirosinas nitradas en las muestras purificadas de NO_2Y74 cyt c (A) y NO_2Y97 cyt c (B). Las muestras fueron tripsinizadas y analizadas por HPLC-MS (AB Sciex QTRAP

4500 mass spectrometer) con un protocolo específico de reacción múltiple monitoreada (MRM) para la detección en simultáneo de cuatro péptidos específicos que contienen a las tirosinas, tanto sin modificar (en azul) o nitradas (en rojo). Para cada muestra, se integró el valor del área de cada pico y los valores de cada área fueron usados para estimar el grado de modificación para cada residuo. **C.** Porcentaje de nitración para cada tirosina de las muestras de NO₂Y74 cyt c y NO₂Y97 cyt c.

1.3) Determinación de la temperatura media (TM) de los cyt c modificados oxidativamente

Para estudiar el plegamiento de las diferentes especies oxidadas obtenidas se determinó la temperatura media (TM) de cada especie siguiendo la fluorescencia del triptófano 59 que al exponerse al solvente acuoso fluoresce con mayor intensidad. Se utilizó 1 mL (30 μM) de las diferentes especies en buffer HEPES (20 mM, pH 7), y se incubaron a cada temperatura por 15 minutos para posteriormente medir la fluorescencia a λ excitación = 290 nm y λ emisión = 340 nm. El cyt c sulfoxidado presenta menor TM partiendo de una conformación más desplegada de la que posee el cyt c nativo (Figura 17). Los cyt c nitrados (NO₂Y74-cyt c y NO₂Y97-cyt c) también disminuyen la TM pero en menor proporción (Figura 17).

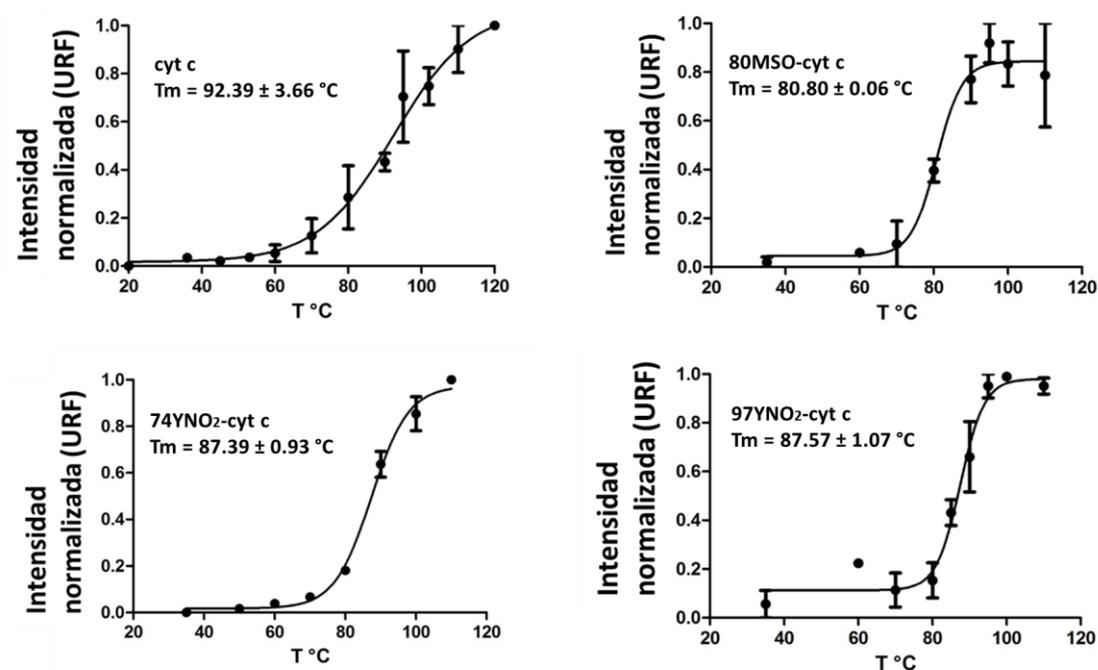


Figura 17. Temperatura media de las especies modificadas oxidativamente. 30 μM de las diferentes especies en buffer HEPES (20 mM pH 7), se incubaron a cada temperatura por 15 minutos para posteriormente medir la fluorescencia a λ excitación = 290 nm y λ emisión = 340 nm. Cada gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo se lo ajusta para la determinación de la TM para cada especie.

1.4) Determinación de los puntos isoeléctricos de las especies de cyt c modificadas oxidativamente

Para determinar los puntos isoeléctricos (pI) de las especies que se forman por la nitración y la sulfoxidación se realizaron geles en dos dimensiones de las especies purificadas (Figura 18). Para el cyt *c* nativo se determinó un pI de 10.1, valor dentro del rango de lo determinado en la literatura para la proteína (pH 9.0–10.65)¹⁶⁹. Para el caso del NO₂-Y74 cyt *c* el pI fue una unidad menor al cyt *c* nativo (pI = 9.23) mientras que para la especie sulfoxidada fue de 2 unidades de pH por debajo del nativo (pI = 8.5). Estos datos coinciden con lo observado en la cromatografía de intercambio catiónico donde estas especies eluyen de forma previa al cyt *c* nativo.

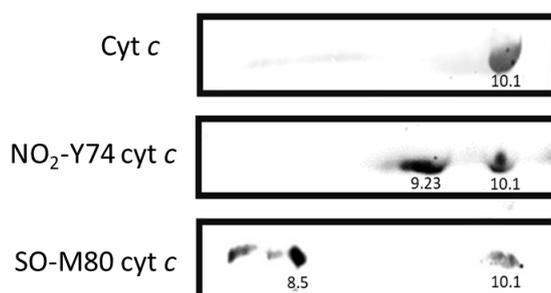


Figura 18. Isoelectroenfoque de cyt *c*, NO₂-Y74 cyt *c* y SO-M80 cyt *c*. Determinación de los puntos isoeléctricos para el cyt *c* mediante isoelectroenfoque del rango pH 6- pH 11.

1.5) Capacidad del cyt *c* nativo y de los cyt *c* modificados oxidativamente de inducir lipoperoxidación a la cardiolipina

V.I) Unión del cyt *c* a la cardiolipina

Para determinar las constantes de afinidad del cyt *c* a los liposomas de cardiolipina se preparó una solución de 200 μM de liposomas de TetraOleil- Cardiolipina (TOCL) con igual cantidad de fosfatidil-colina (PC) en buffer HEPES (25 mM, pH 7.4). Se prepara los liposomas mezclando los lípidos (guardados en cloroformo), se secan utilizando nitrógeno, posteriormente se agrega buffer Hepes (25 mM pH 7.4) y luego se vortexea por 10 min. Se sónica la muestra hasta que la solución quede transparente formando la solución de liposomas.

Se incubó a las diferentes concentraciones de cyt *c* (10-110 μM) con la solución de liposomas durante toda la noche a 4°C. Se centrifuga a 100000 x *g* por 1 hora a 4°C. Se cuantifica la concentración del cyt *c* libre (no unido a cardiolipina) por absorbancia a 410 nm ($\epsilon = 104.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para determinar la concentración de cyt *c* unido a cardiolipina se resta la concentración inicial menos el cyt *c* libre (no unido). Este mismo procedimiento se repite con NO₂-Y74 cyt *c* y SO-M80 cyt *c*. Los cyt *c* modificados oxidativamente se unen a la cardiolipina con una afinidad mayor que el cyt *c* nativo. Para el caso del cyt *c* nitrado en la Y74 aumenta dos veces, mientras que el sulfoxidado aumenta en 4 veces (Figura 19).

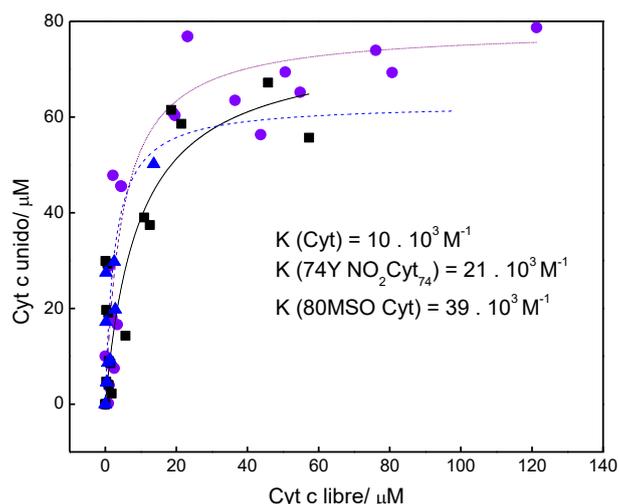


Figura 19. Determinación de la constante de unión del cyt c (cuadrados), NO₂-Y74 cyt c (triángulos) y 80MSO cyt c (círculos) a liposomas de cardiopina y fosfatidil colina. Las diferentes especies de cyt c se incubaron toda la noche con 200 μM de liposomas TOCL/PC. Cada punto corresponde con un experimento independiente. La determinación del cyt c libre corresponde con concentración en el sobrenadante posterior a la ultracentrifugación, mientras que el cyt c unido se determina como la diferencia entre la concentración inicial menos el cyt c libre determinada.

1.6) Efecto de la cardiopina en la nitración de proteínas

En el trabajo de tesis de doctorado de Verónica Demicheli, se reporta un aumento de la nitración de cyt c expuesto a peroxinitrito o una mezcla de H₂O₂ y NO₂⁻ en presencia de cardiopina, indicando que la interacción entre el fosfolípido y la proteína potencia la oxidación de la misma. Este fenómeno fue detectado por western blot utilizando un anticuerpo anti-nitro tirosina y mediante la cuantificación de nitrotirosina por espectrometría de masas.

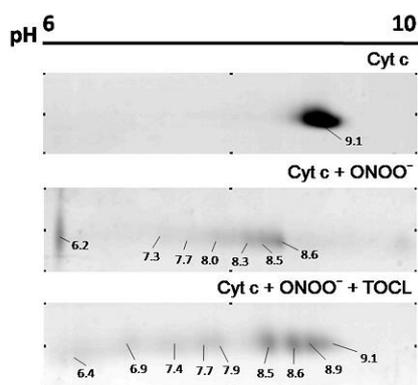


Figura 20. Electroforesis en 2D de diferentes variantes de cyt c formados por la exposición de peroxinitrito en presencia o ausencia de liposomas que contienen cardiopina (200 μM). Se señala el punto isoelectrico de las mismas.

Durante esta tesis, se profundizó en la caracterización. Se realizó un gel 2D para la mezcla de las proteínas obtenidas al nitrar en presencia y ausencia de cardioplipina, observando un aumento de las especies que se forman con diferentes puntos isoeléctricos en presencia de cardioplipina. Indicando que la presencia de cardioplipina promueve no solo un aumento en las especies nitradas, sino también en la formación de varios patrones de tirosinas diferentes (Figura 20).

Al comparar los espectros de masas obtenidos con el MALDI-TOF de las muestras en solución o en presencia de cardioplipina, se observa un aumento en la nitración de la Y67 en presencia de cardioplipina. Por lo que, utilizando un mutante para la Y67 (Y67F), se realizaron nuevamente western blot con el mutante tratado con peroxinitrito en presencia y ausencia de cardioplipina observando que no hay aumento de la nitración en comparación con el cyt c salvaje (Figura 21).

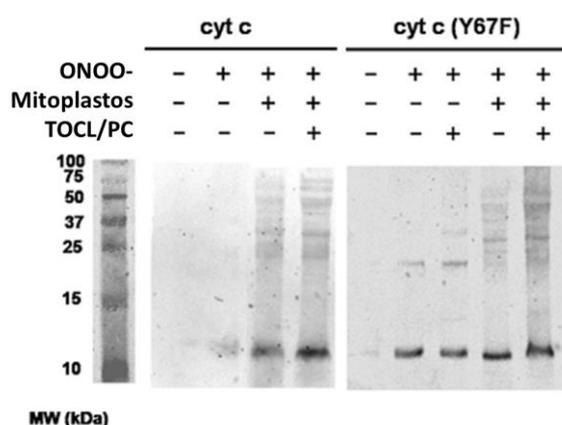


Figura 21. Efecto de la nitración del cyt c en presencia de liposomas con cardioplipina o en presencia de mitoplastos mitocondriales. Western blot anti-nitrotirosina. Cyt c o mutante Y67 fenilalanina (Y67F) tratado con peroxinitrito (1 mM) en presencia de liposomas con cardioplipina (TOCL/PC) o mitoplastos.

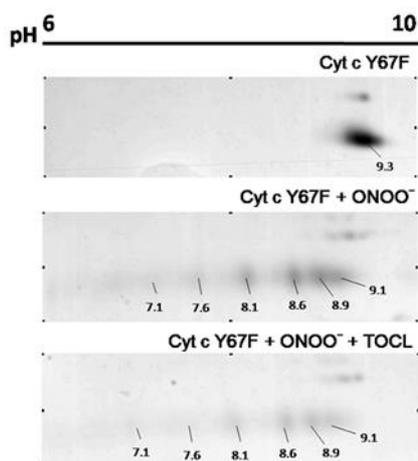


Figura 22. Electroforesis 2D de las diferentes variantes de cyt c formados por la exposición a peroxinitrito en presencia o ausencia de liposomas que contienen cardioplipina (200 μ M). Se señala el punto isoeléctrico de las mismas.

Se confirma la preferencia de la nitración de la Y67. Para confirmar, se realizó una electroforesis 2D a la muestra con el mutante Y67F tratado con peroxinitrito en ausencia o presencia de cardioplipina. No se observó aumento de las especies para el mutante en presencia de cardioplipina indicando que efectivamente el aumento de la nitración se debe a un aumento en la Y67 (Figura 22).

Para determinar el efecto del cyt *c* en condiciones más fisiológicas, se aislaron mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa y por tanto sin cyt *c*) a partir de corazón de rata mediante centrifugaciones diferenciales¹⁷⁰. Se trató al cyt *c* con peroxinitrito (1 mM) en presencia o ausencia de mitoplastos (2 ng de cyt *c* libre por cada mg de proteína de mitoplasto). Las muestras se separaron en SDS-PAGE al 15% y posteriormente se revelaron con anticuerpo anti-nitrotirosina (Figura 22). Se observa un aumento de la nitración en presencia de los mitoplastos para el cyt *c* nativo. No se observa el mismo efecto para el cyt *c* Y67F, demostrando nuevamente que la tirosina que se nitra de forma preferencial en el cyt *c* unido a la cardiolipina es la Y67.

A continuación, se realizó un ensayo de unión de cyt *c* a liposomas conteniendo cardiolipina y posterior agregado de peroxinitrito o H₂O₂/NO₂⁻. Se observa un aumento de la afinidad a la cardiolipina por parte del cyt *c* en las condiciones nitrantes. La constante de afinidad obtenida del cyt *c* tratado con peroxinitrito aumenta 4.3 veces con respecto a la constante de afinidad del cyt *c* sin tratar (Figura 23A). Con respecto al tratamiento con H₂O₂ y NO₂⁻ la constante de afinidad aumentó en 8.6 veces (Figura 23B). Para el caso del cyt *c* mutante Y67F tratado con peroxinitrito no hubo aumento de afinidad con respecto al salvaje reafirmando que la nitración de la Y67 podría ser crucial para la unión del cyt *c* a la cardiolipina (Figura 23C).

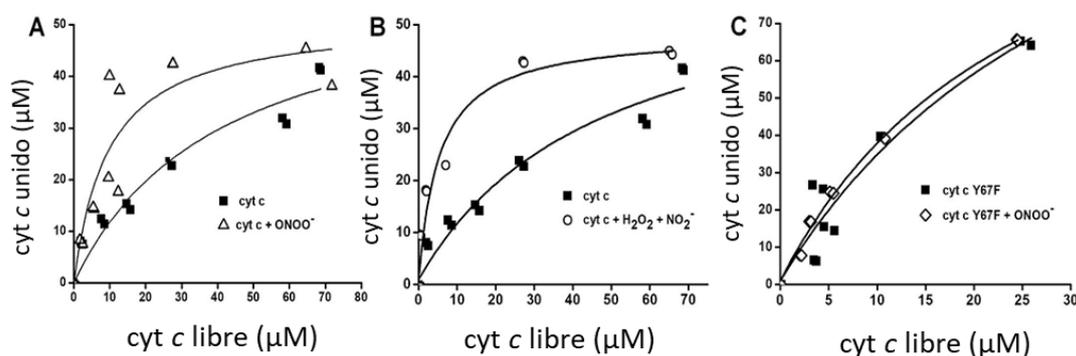


Figura 23. Determinación de la afinidad del cyt *c* a liposomas que contienen cardiolipina. **A.** Se incubó diferentes concentraciones de cyt *c* (10-100 μM) con liposomas de cardiolipina y fosfatidilcolina (TOCL/PC, 200 μM) en buffer HEPES (25 mM, pH 7.4), tratados con peroxinitrito (1 mM). El cyt *c* libre fue cuantificado por espectrofotometría a 410 nm (triángulos blancos). **B.** Misma condición que **A** pero tratados con H₂O₂/NO₂ (1 mM de cada uno) (cuadrados). **C.** Se incubó con diferentes concentraciones de Y67F a liposomas de TOCL/PC en presencia de peroxinitrito (1 mM) o ausencia del mismo en buffer HEPES (25 mM, pH 7.4) (diamantes blancos). Cada punto corresponde con una condición experimental única.

1.7) Actividad peroxidasa de los cyt *c* modificados oxidativamente

1.7.1 Sustrato H₂O₂

Se determinó la actividad peroxidática de las diferentes especies de cyt *c* modificadas en ausencia o presencia de liposomas con H₂O₂ como sustrato. Las medidas de actividad se realizaron en buffer fosfato (20 mM, pH 7.4) y se utilizó como sonda al Amplex Red. El AmplexRed reacciona con el compuesto tipo I generando un producto fluorescente que se puede seguir en el tiempo. El resultado de la actividad peroxidática para los distintos cyt *c* utilizados se muestra en la Figura 24.

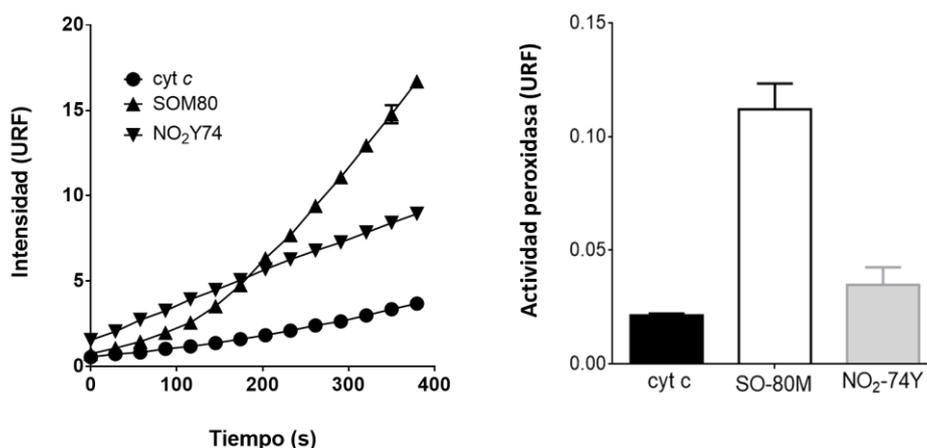


Figura 24. Actividad peroxidática del cyt c, SO-M80 cyt c, NO₂Y74 cyt c. A. Se determinó la velocidad inicial de oxidación de la sonda Amplex Red (50 μ M) a pH 7.4 en presencia de H₂O₂ (25 μ M) y 0.5 μ M de las diferentes especies de cyt c. El producto de oxidación fluorescente, la resorufina, fue monitoreado usando una longitud de onda de emisión de 585 nm y una longitud de onda de excitación de 570 nm. B. Promedio determinado de las velocidades iniciales para las diferentes cyt c.

El cyt c oxidado en la Met80 y Met65 (SO-M80 cyt c) tiene en solución una actividad peroxidática 7 veces mayor que el cyt c nativo (Figura 24). El cyt c nitrado en la Y74, tiene mayor actividad que el cyt c nativo dato consistente con lo reportado anteriormente¹⁷⁰. Es importante notar que tanto el NO₂-Y74 cyt c como el SO-M80 cyt c pierden la interacción entre el hierro del hemo y el azufre de la Met80 (pérdida de la banda a 695 nm)⁹³. La literatura establece que al nitrar el cyt c en la Y74, la sexta posición del ligando es ocupada por una lisina. Para la sulfoxidación de la metionina esa posición es ocupada por un grupo hidroxilo, sea por un residuo de aminoácido o por el agua. Se realizaron ensayos de actividad peroxidasa de cyt c utilizando como sustrato el H₂O₂ en presencia de liposomas TOCL/PC (Figura 25). Se utilizó para la determinación de la actividad una relación de cyt c: liposoma 1:20, dado que a esa relación, la mayor parte del cyt c se encuentra unido al liposoma. Por lo tanto, lo que se está evaluando en este experimento es la capacidad de los diferentes cyt c de reaccionar con H₂O₂ (sustrato oxidante) en la conformación que adopta al unirse al liposoma. Al determinar la actividad peroxidasa en presencia de cardiolipina se observa un aumento de 8 veces en la actividad en comparación con el cyt c en solución. Los datos obtenidos del Raman resonante indican que el cyt c se encuentra en conformación His/His, es decir, rompe la interacción nuevamente Fe-M80 de la conformación nativa.

De esta manera, para que el cyt c gane actividad peroxidasa sería necesario romper la interacción Fe-M80 y que la misma sea sustituida por otros residuos tales como: His, Lys u OH⁻, generando especies diferentes pero todas con mayor actividad peroxidasa, dato que va en línea con lo reportado en la literatura¹⁷¹. La ruptura de la interacción Fe-M80 permite una mayor exposición del hemo lo que se traduce en una mayor actividad peroxidasa.

Adicionalmente, se determinó la actividad peroxidasa para el NO₂Y-74 y SO-M80-cyt c con H₂O₂ en presencia de TOCL/PC no encontrándose diferencias (Figura 25). Sumado a los resultados obtenidos en el Raman resonante, tanto el cyt c nativo como el SO-M80 al igual que el NO₂Y-74 cyt c adoptan una conformación del tipo His/His según reportamos en el artículo Capdevila et

al³⁴. Los diferentes citocromos unidos a la CL no desarrollan una diferencia en la actividad peroxidática que podría estar relacionado con el hecho de que todos terminan adoptando la misma conformación al estar unidos a CL.

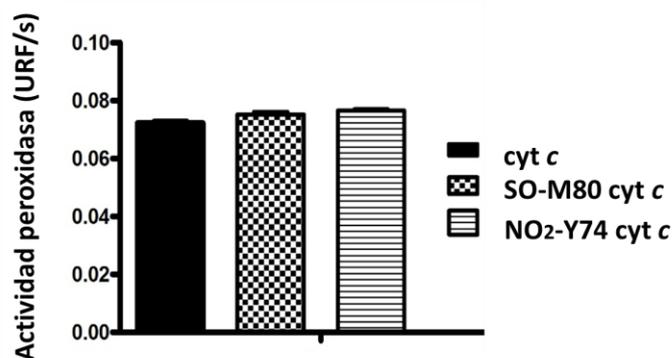


Figura 25. Actividad peroxidática del cyt c, SO-M80, NO₂-Y74 cyt c interaccionando con liposomas de TOCL/DOPC en una relación de 1:20 utilizando H₂O₂. Se determinó la velocidad inicial de oxidación de la sonda Amplex Red (50 μM) a pH 7.4 en presencia H₂O₂ (25 μM) las diferentes especies de cyt c (0.5 μM). El producto de oxidación fluorescente, resorrufina, fue monitoreado usando una longitud de onda de emisión de 585 nm y una longitud de onda de excitación de 570 nm.

1.7.2) *Sustrato hidroperóxidos lipídicos*

Se determinó la actividad peroxidática de los diferentes cyt c utilizando como sustrato hidroperóxidos lipídicos. Para obtener los hidroperóxidos lipídicos se trabajó con liposomas de cardiolipina y fosfatidil colina proveniente de corazón bovino. Más del 80% de la cardiolipina del corazón bovino es tetralinoleilcardiolipina (TLCL), es decir que posee dos insaturaciones ($\Delta^{9,12}$) por lo que en presencia de O₂ se oxida. Se cuantificaron los hidroperóxidos preexistentes en los liposomas utilizando el ensayo de FOX determinando una concentración de hidroperóxidos de 10 μM para una TLCL de 400 μM. La actividad peroxidasa para hidroperóxidos lipídicos se determina en buffer fosfato (20 mM, pH 7.4) utilizando Amplex Red como sonda (50 μM; Figura 26).

La primera conclusión de este ensayo es que tanto el cyt c como los cyt c modificados oxidativamente tienen actividad peroxidasa para los hidroperóxidos lipídicos de los liposomas. El cyt c nativo y el NO₂-Y74 cyt c unidos a cardiolipina tiene una actividad peroxidática mayor para los hidroperóxidos lipídicos que lo observado para el H₂O₂. En cambio, para el caso del SO-M80 cyt c la actividad peroxidasa con respecto a los lipoperóxidos de la CL es más de diez veces menor que la del cyt c nativo (Figura 26).

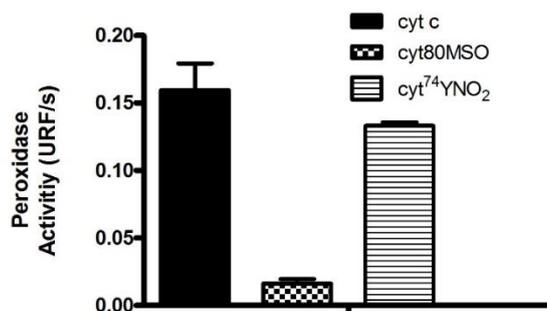


Figura 26. Actividad peroxidasa del cyt c, SO-M80 cyt c y NO₂ Y74 cyt c con sustrato oxidante los propios hidroperóxidos de la CL (CL-OOH). La actividad se determinó con la oxidación de la sonda Amplex Red.

Adicionalmente, se determinó la actividad peroxidasa del cyt c mediante el consumo de O₂. El resultado que se muestra en la Figura 27 es para liposomas de TLCL/DOPC (400 μM), cyt c (20 μM) y H₂O₂ (100 μM) en buffer fosfato (20 mM, pH 7.4). Lo que se observa en el registro es que solo con los lipoperóxidos de la TLCL, al agregar el cyt c se observa un aumento en el consumo de O₂. Por lo que el cyt c puede utilizar a los lipoperóxidos de cardiolipina como sustrato, dato concordante con lo obtenido con el ensayo realizado utilizando Amplex Red.

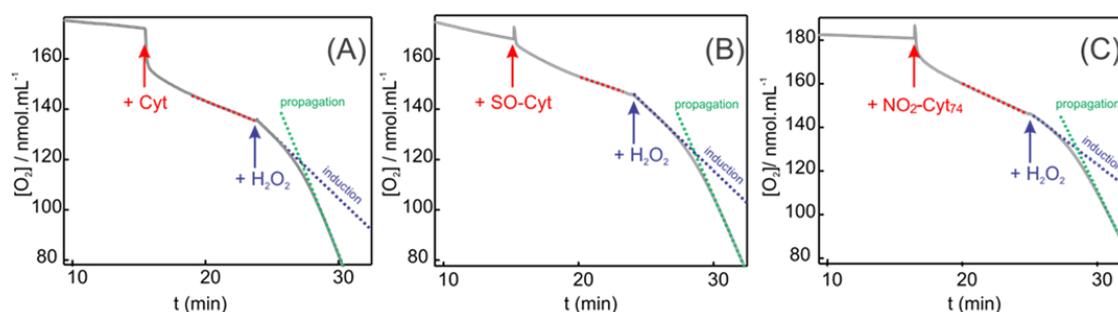


Figura 27. Consumo de O₂ generado por la lipoperoxidación dependiente de H₂O₂ y de cyt c. **(A)** actividad peroxidática del cyt c nativo. **(B)** SO-M80 cyt c y **(C)** NO₂-Y74 cyt c.

Frente al agregado de cyt c y de NO₂-Y74 cyt c baja la concentración de O₂ ya que el cyt c propaga la lipoperoxidación (Figura 27). La secuencia de reacciones estaría dada por: *i*) la reacción del cyt c con un hidroperóxido lipídico o con H₂O₂ formando compuesto I like con la formación de un radical tirosilo; *ii*) el radical tirosilo abstrae un electrón de los lípidos insaturados que reaccionan con el O₂, mecanismo similar al descrito para la ciclooxigenasa II¹⁷² (Figura 28). La pendiente de consumo de O₂ frente al agregado de SO-M80 cyt c prácticamente no cambia, lo que concuerda con la ausencia de actividad peroxidasa con éstos hidroperóxidos medido por AmplexRed (Figura 26).

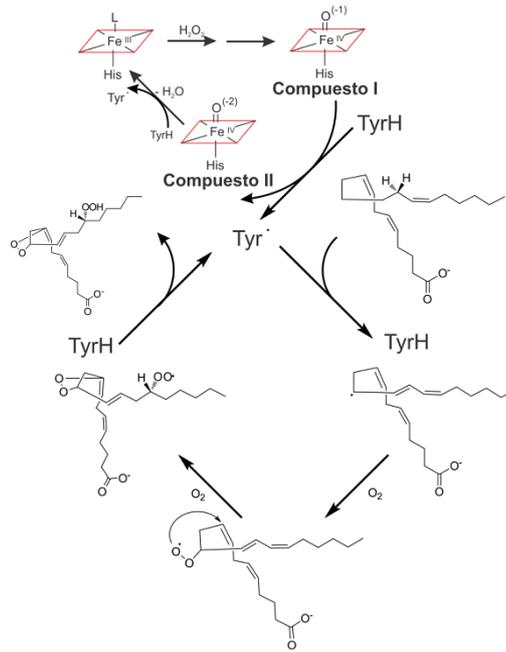


Figura 28. Reacción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Esquema adaptado de ¹⁷². La secuencia implica reacción de la COX-2 con H₂O₂, formación del compuesto I que reacciona por un electrón con un lípido insaturado, formación de un radical lipídico, reacción con O₂ y formación de un radical hidropéroxido lipídico y formación de un hidropéroxido lipídico cíclico.

Para determinar la producción de lipohidroperóxidos por el H₂O₂, se hace la diferencia entre la pendiente luego de inyectado el H₂O₂ y la pendiente previa (Figura 27). Se realizó el control de la pendiente inducida por H₂O₂ independiente de cyt c no registrando cambios. Las diferencias con el H₂O₂ no son significativas, es decir, ningún cyt c unido a CL tiene mayor actividad peroxidasa para el H₂O₂, pero tomando a los lipohidroperóxidos de CL como sustrato oxidante, el cyt c nativo tiene mayor actividad para lipoperoxidar que el resto de los citocromos modificados, dato concordante con el resultado obtenido por Amplex Red (figura 26). Se realizaron diversos controles para verificar que el aumento en el consumo de O₂ se deba al proceso de lipoperoxidación. El liposoma con lípidos sin insaturaciones (no peroxidable) sin cyt c frente al agregado de H₂O₂ no cambia su pendiente. El mismo resultado se obtiene para cyt c más DOPC (liposomas sin cardiolipina) y H₂O₂ indicando que es la cardiolipina insaturada quien se oxida. Se realizó también el mismo experimento con liposomas DOPC:Eterilamina, que es un lípido con carga positiva. Nuevamente las pendientes frente al agregado de H₂O₂ no generaron consumo de oxígeno.

El cyt c en solución (sin liposomas) no cambia su pendiente frente al agregado de H₂O₂. Pero, si el cyt c se encuentra en presencia de un liposoma con cardiolipina sin dobles insaturaciones (no peroxidables) como TMCL o TOCL, si se observa un consumo de O₂, probablemente porque al estar el cyt c unido a CL, se expone más el hemo al H₂O₂ y se oxidan otros aminoácidos que en ausencia de cardiolipina no ocurre. De igual forma estas pendientes son menores a las obtenidas en cualquier caso para el sustrato TLCL. El SO-M80 cyt c tiene mayor tendencia a oxidarse (1.7 veces más) que el cyt c nativo y el NO₂-Y74 cyt c.

1.8) Capacidad de los cyt c modificados oxidativamente de activar el apoptosoma

Para determinar la capacidad de los distintos cyt c de activar a la pro-caspasa 9 *in vitro*, se utilizaron extractos de citosol de células Jurkat (linfocitos T inmortalizados) que contienen las proteínas necesarias para el ensamblaje del apoptosoma, en presencia de un sustrato fluorescente para la caspasa 3 (DEVD-AFC).

Como ya se reportó en ¹⁰⁰ el cyt c nitrado tiene una menor capacidad de activar a la pro-caspasa 9. En este trabajo, determinamos la capacidad del SO-M80 cyt c de activar el apoptosoma. Como se muestra en la Figura 29, la oxidación de la Met80 del cyt c también lleva a una pérdida en la capacidad de activar el apoptosoma en comparación al cyt c nativo. De esta manera, pensamos que los cyt c modificados oxidativamente pueden cumplir otro rol en el proceso de señalización a nivel del citosol celular sin llevar a la activación del apoptosoma y por tanto la muerte por apoptosis.

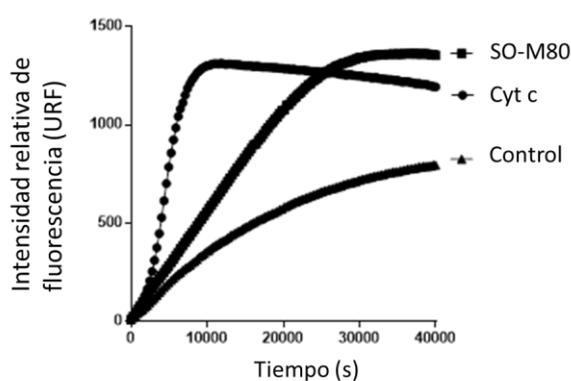


Figura 29. Determinación de la actividad caspasa 3. Cyt c nativo o SO-M80 cyt c purificados (20 μg) fueron agregados a extractos citosólicos de células Jurkat (2 mg/mL) en presencia de dATP y ATP. La actividad caspasa-3 fue medida usando un sustrato fluorescente para caspasa 3 DEVD-AFC a $\lambda_{\text{ex}} = 400$ and $\lambda_{\text{em}} = 505$ nm.

Finalmente, podemos concluir de estos resultados que en presencia de cardiolipina el cyt c se nitra más que el cyt c en solución frente a la exposición a peroxinitrito. El cyt c nitrado tiene una mayor afinidad por la cardiolipina que el nativo, indicando que probablemente en una situación celular con un aumento de oxidantes y presencia de cardiolipina, el cyt c se nitré más, se una a la cardiolipina de forma más fuerte y sea capaz de propagar la oxidación de la misma en la membrana mitocondrial (Figura 30). Por otro lado, estos cyt c modificados oxidativamente son menos eficientes en activar el apoptosoma lo que sugiere, que en el citosol celular, pueden estar cumpliendo otras funciones tales como señalización redox.

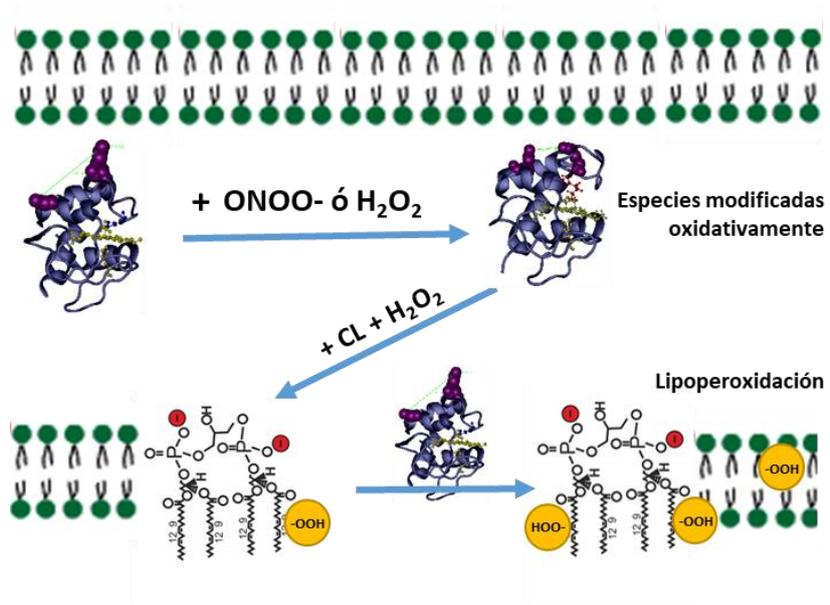


Figura 30. Hipótesis sobre el posible mecanismo de oxidación y propagación de la oxidación de la cardiolipina por el cyt c frente a un aumento de oxidantes.

2. Objetivo específico 2

Generación de herramientas inmunoquímicas para el reconocimiento del cyt c de conformación alternativa.

Desarrollo de anticuerpos policlonales (pAb) y reconstrucción, generación y caracterización del anticuerpo monoclonal recombinante mAb R1D3.

El objetivo específico 2 involucra la generación de herramientas que identifiquen al cyt c de conformación alternativa. El cyt c de conformación alternativa se define como aquellos que han perdido la interacción del Fe del grupo hemo con el azufre de la Met80². En condiciones fisiológicas esta situación se da cuando el cyt c se encuentra nitrado en las Tyr97 y Tyr74^{23,93}, unido a cardiolipina¹⁵⁶ y como determinamos anteriormente cuando la Met80 se encuentra sulfoxidada. Debido a que la generación del nuevo anticuerpo monoclonal recombinante (mAbR1D3) se extendió mucho en el tiempo, decidimos intentar generar un anticuerpo policlonal que reconozca conformaciones alternativas del cyt c. Los resultados de este anticuerpo se encuentran en el Anexo I de manera de simplificar la lectura de la tesis. Afortunadamente se logró finalmente reconstruir el mAb 1D3 perdido por lo que no se siguió profundizando en el anticuerpo policlonal.

2.1) Unión del anticuerpo mAb 1D3 a cyt c modificados oxidativamente

Como se mencionó en la introducción, el mAb 1D3 es un anticuerpo monoclonal generado en el laboratorio del Dr. Jemmerson el cual reconoce cyt c en células necróticas, apoptóticas¹⁶⁶ así como en células no-apoptóticas tratadas con peroxinitrito²⁶. Anteriormente, se determinó mediante ELISAs de competencia la capacidad del mAb 1D3 de unirse a cyt c modificado por la adsorción a la placa de ELISA. En este trabajo, profundizamos en la capacidad del anticuerpo de reconocer diferentes conformaciones alternativas del cyt c, tales como diferentes modificaciones oxidativas, cardiolipina y/o miméticos de cyt c fosforilados o acetilados.

En primer lugar se determina la concentración del anticuerpo a utilizar en los ELISA competitivos. Se determina una dilución 1:8000 (0.18 ng/ μ L) del anticuerpo en los ELISA competitivos ya que permite obtener valores de absorbancia adecuados y con margen para observar la competencia de los antígenos (Figura 31A). El ELISA competitivo confirma que el mAb 1D3 reconoce al cyt c nitrado en la Tyr97 y en la Tyr74 (Figura 31B) y unido a liposomas con una mezcla en igual proporción de fosfatidilcolina (PC) y tetraoleil cardiolipina (Figura 32). En este ensayo en particular, se observa cierta unión del cyt c nativo al mAb 1D3, este efecto observado en este experimento, se puede deber a un aumento de cyt c desnaturalizado presente en la muestra utilizada que es reconocido por el anticuerpo.

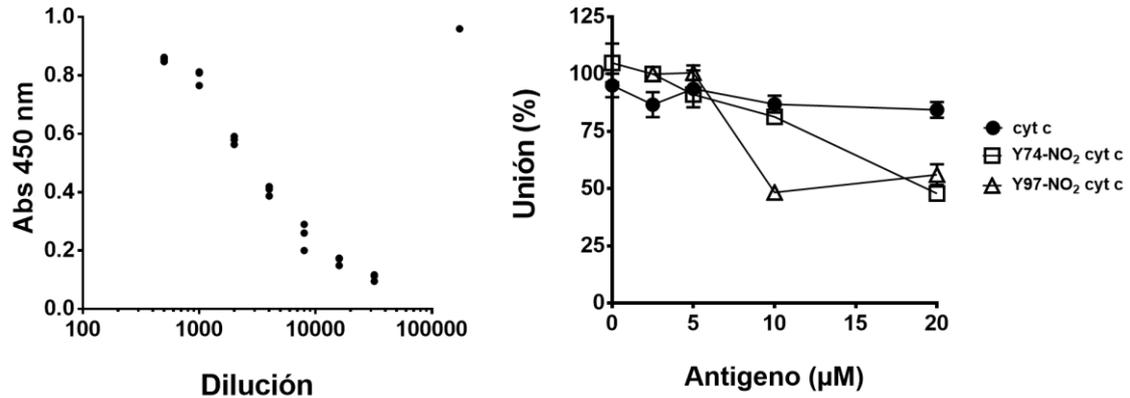


Figura 31. Caracterización inmunoquímica del mAb 1D3. En todos los casos la placa fue sensibilizada con cyt c (0.5 µM) y revelada con OPD registrando la absorbancia a 450 nm. **A.** ELISA indirecta, se incubó diferentes concentraciones del mAb 1D3 (1:500-1:30000) en PBS-Tween de la solución stock de concentración 1.44 mg/mL. **B.** Elisa competitiva con diferentes cyt c puros de conformación alternativa y mAb 1D3 fijo a 0.08 µg. Los resultados se expresan en % con respecto a la unión del anticuerpo a la placa sensibilizada.

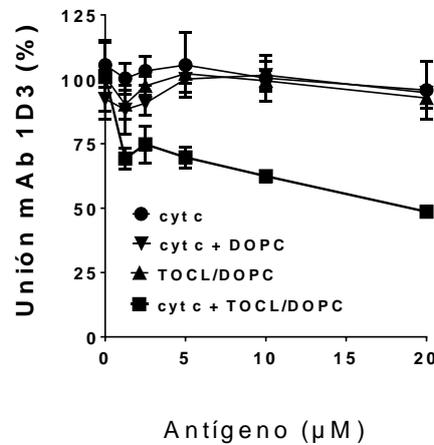


Figura 32. ELISA competitiva de cyt c unido a liposomas de cardiolipina (TOCL/DOPC). La placa es sensibilizada con cyt c (0.5 µM) y se compete mAb 1D3 (0.08 µg) de manera soluble con cyt c con liposomas (200 µM) o sin liposomas de DOPC y DOPC/TOCL o TOCL/DOPC sin cyt c.

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular con el fin de confirmar la unión del mAb 1D3 a las diferentes variantes de cyt c modificados oxidativamente (Figura 33). Los cyt c de conformación alternativa y el nativo (0.07 mg) fueron incubados con el mAb 1D3 (0.8 mg) toda la noche a 4°C en agitación continua. Posteriormente, es cargada la muestra en una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 column (GE healthcare, 60 cm x 16 mm) y eluidos usando buffer fosfato de sodio (50 mM, pH 7.4) conteniendo NaCl (150 mM) a un flujo de 0.8 mL/min. Se registró la absorbancia a 410 nm y 280 nm durante toda la corrida. Para las diferentes muestras la fracción que fue colectada entre los minutos 55 y 80 (señalados con las líneas punteadas) se analizaron por SDS-PAGE 15% (Figura 33).

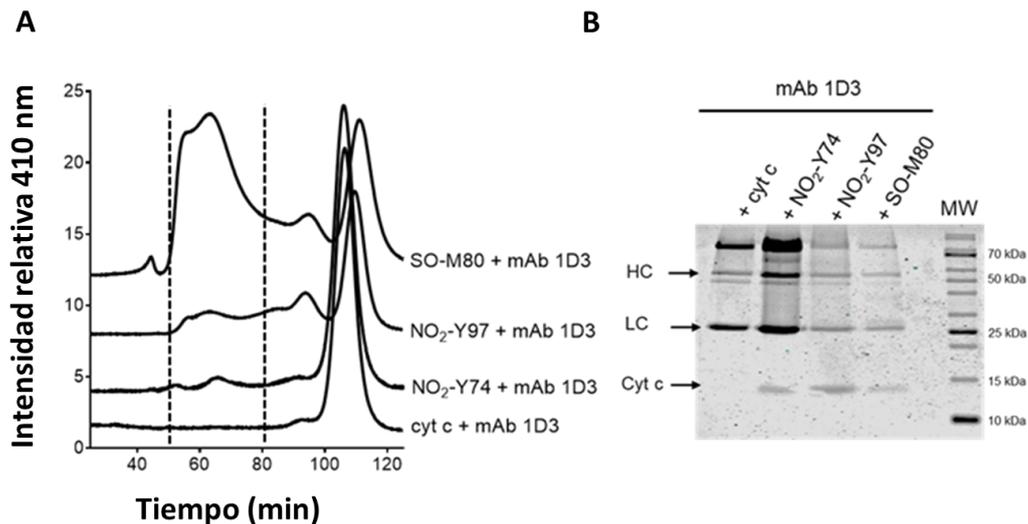


Figura 33. Unión del mAb 1D3 a conformaciones alternativas de cyt c. **A.** Posterior a la incubación con el mAb 1D3 de las diferentes especies de cyt c (nativo, NO₂-Y74 y SO-M80) se realizó una cromatografía de exclusión molecular. Se registró la corrida a 410 nm y tomando la fracción entre los minutos 50 y 80. **B.** La fracción recolectada se corrió en SDS-PAGE 15% y se reveló con azul de Coomassie R250. Se señala las diferentes proteínas identificadas en cada fracción. Se señala el peso correspondiente a la cadena liviana (LC) y pesada (HC) del anticuerpo.

Debido a que la fosforilación y la acetilación son modificaciones post-traduccionales que se observa *in vivo* en diferentes tejidos^{105,112,130} evaluamos, en colaboración con el laboratorio Dr. Hutteman, la capacidad del mAb 1D3 de reconocer a estas especies utilizando para ello diferentes fosfo- y acetil miméticos. Con tal propósito se realizó un ELISA competitiva con fosfo- y acetil-miméticos de cyt c en diferentes posiciones. Ningún fosfo- o acetil- mimético compite por la unión del mAb 1D3 a la placa sensibilizada, es decir no es reconocido por el anticuerpo. En tal sentido, se realizaron espectros de absorción de los diferentes miméticos para conocer si estaba intacta la unión Fe-M80.

Como se observa en la Figura 34B, todos los miméticos utilizados presentan la banda a 695 nm indicando la integridad de la unión Fe-Met80 y confirmando que el mAb 1D3 reconoce a conformaciones alternativas que pierden esta interacción.

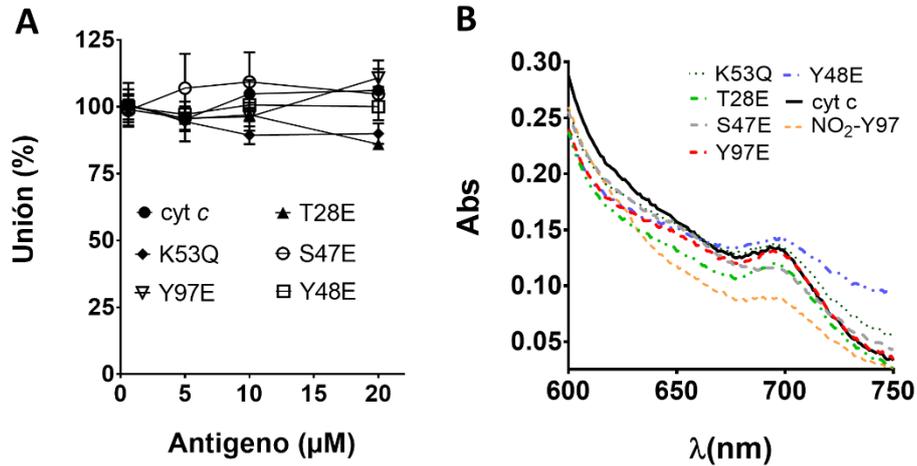


Figura 34. Unión mAb 1D3 a miméticos de cyt c fosforilados. **A.** ELISA competitiva fosfomiméticos. La unión del mAb 1D3 (0.18 ng/μL) en presencia o ausencia de cyt c recombinante nativo y mutantes Y48E, T28E, Y97E, K53Q and S47E (0-20 μM). La placa fue revelada con OPD y se registró la absorbancia a 450 nm. Los resultados están expresados en % de anticuerpo unido a la placa. **B.** Espectros de absorción de los diferentes fosfomiméticos observando el pico a 695 nm indicativo de la presencia de la interacción Fe-M80. Se incluye NO₂Y97 como cyt c que está reportado que pierde la interacción a 695 nm⁹³.

Previamente fue reportado que el mAb 1D3 no reconoce ni cyt c en su conformación nativa ni cyt c desnaturalizado¹⁶⁶, indicando que el epítipo que reconoce el anticuerpo es conformacional y se expone luego de adquirir la conformación alternativa inducida por la ruptura de la interacción Fe-M80. Se profundizó en la caracterización bioquímica del anticuerpo mAb 1D3 identificando nuevas conformaciones alternativas que pueden ser reconocidas por este anticuerpo (nitradas, sulfoxidadas y unidas al fosfolípido de cardiolipina), no reconociendo a los fosfo- y/o acetyl-miméticos que no pierden la interacción hierro-azufre de la Met80.

Estos resultados muestran la importancia de este anticuerpo para el estudio del cyt c en contextos biológicos.

2.2) Síntesis *de novo* del anticuerpo 1D3: generación de un anticuerpo recombinante

El mAb 1D3 es una herramienta esencial en el estudio de *cyt c*, pues es el único anticuerpo monoclonal que reconoce estas conformaciones alternativas ya sean modificadas oxidativamente, unidas a cardiolipina, en conformación alcalina, pero sin reconocer al *cyt c* en conformación nativa.

Dado que el hibridoma que contenía la clona que expresaba dicho anticuerpo se perdió, se envió a la plataforma de Proteómica y Espectrometría de Masas de la Universidad de Vanderbilt (EEUU) una muestra de mAb 1D3 para determinar la secuencia aminoacídica de las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo. Se digirió el anticuerpo con cinco proteasas (tripsina, elastasa, quimiotripsina Asp-N y subtylisisina), posteriormente los productos de digestión fueron cargados en una columna C18 HPLC de nanoflujo y los péptidos fueron resueltos en un gradiente de acuoso a fase orgánica en el curso de los 90 min. Los productos fueron directamente ionizados en Thermo Fisher Orbitrap Velos mass spectrometer. El análisis en el espectrómetro de masas y secuenciamiento *de novo* por técnicas bioinformáticas desarrolladas por Abterra Bioscience Inc. En la Figura 35 se señala los aminoácidos que corresponden con las regiones líderes (celeste), variable (rojo) y constante (verde) de la cadena liviana y pesada del anticuerpo.

A Secuencia cadena pesada

MDFGLRLIFLVLVFKGVLCQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSNMHWVKQTPG
QGLEWIGGLYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSGDSAVYYCARGIRDFE
AMDYWGQGTSTVVSASLTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL
SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPP
CKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVL
PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV
EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*

Secuencia cadena liviana

MKFPSQLLLLLLFGIPGMRSDIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGK
SPQLLIYAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFISLQAEDFVSYCCQQLYSTPLTFGAGTKLE
LKRAAAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDKINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQD
SKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSFNRNEC*

Figura 35. Predicción de las cadenas polipeptídicas del mAb 1D3 (pesada y liviana). Los colores indican la región líder (celeste), variable (rojo) y las regiones constantes (verde). * Indica el grupo carboxy terminal*.

Las secuencias fueron insertas en un plásmido de expresión para células eucariotas (invitrogen pCR 3.1) por el grupo de Vanderbilt. Se corrieron los plásmidos en gel de agarosa observando una banda de 5000 pb confirmando el tamaño de los mismos (Figura 36). Posteriormente, se realizó transformación a bacterias DH5alfa para amplificar los plásmidos.

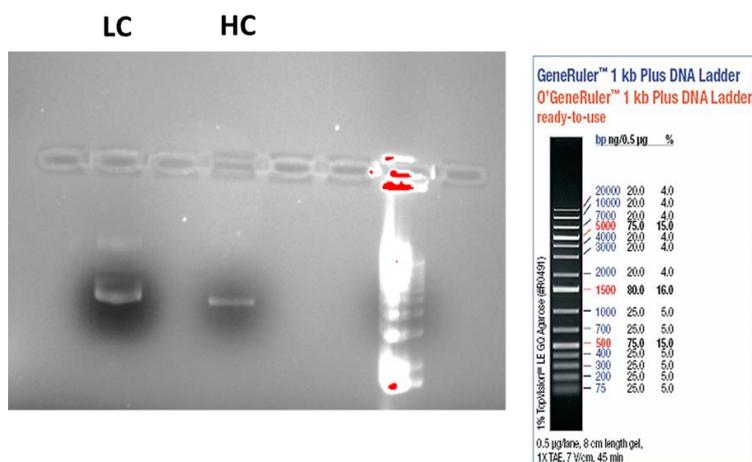


Figura 36. Plásmidos con los insertos de la cadena pesada y la cadena liviana. Agarosa 1% revelado con Bromuro de Etidio. El marcador de peso molecular es 10787-018 Invitrogen 1 kb plus DNA ladder (2 μ L).

2.2.1) Transfección en Células HEK293

Para expresar el anticuerpo recombinante (mAb R1D3) en sistemas de expresión eucariota se realiza una transfección a células HEK293. Se realizó una prueba a baja escala para determinar la cantidad de plásmido y de polyethyleneimine (PEI) a utilizar para la transformación posterior a gran escala. En una placa de 6 pocillos se cultivaron células HEK 293 hasta alcanzar la confluencia. El mismo día se prepararon las soluciones para la transfección probando diferentes relaciones de cantidad de plásmido:PEI (1:1, 1:5, 1:10).

Luego de la transfección realizada como se indica en materiales y métodos, se colecta diariamente (del día 2 al 12) el medio de cultivo, se liofilizan y congelan a -20°C hasta su evaluación. De manera de saber la expresión del anticuerpo recombinante se realizó un ELISA indirecto sensibilizando con cyt c ($2 \mu\text{M}$) con las muestras tomadas en cada día (Figura 37). La producción de anticuerpos en células HEK293 transfectadas (evaluadas en los sobrenadantes) aumentó hasta el día 6 de cultivo y las células mantienen la productividad durante 10 días (Figura 37). El anticuerpo mAb recombinante purificado (mAb R1D3) mostró un tamaño de peso molecular esperado para las cadenas H (50 kD) y L (25 kD). Los resultados permiten verificar que se expresa el mAb R1D3 hasta el día 10 inclusive en nuestro sistema y que una relación 1:5 (plásmido:PEI) es la condición a utilizar para escalar.

Para la expresión a gran escala se partió de 5 botellas de 175 cm^2 en confluencia de células HEK293. Cada dos días se tomó el medio de cultivo de cada botella y se centrifugó para quitar los restos de células. Se sacaron alícuotas para realizar el seguimiento de la expresión del R1D3 en el tiempo. Posteriormente, se realizó un ELISA indirecta la expresión del R1D3 hasta el día 10 inclusive (Figura 38A). Posteriormente se realizó la purificación del R1D3 del medio de cultivo mediante la utilización de una columna para purificación de IgG (HiTrapTM Protein G HP) siguiendo los protocolos según el manual de la misma. Con la fracción purificada se realizó una electroforesis para verificar la correcta expresión del anticuerpo (Figura 38B). Se observa, en condiciones reductoras, las bandas correspondientes a la cadena pesada y liviana (50 kDa, cadena pasada, 25 kDa, cadena liviana) con una alta pureza.

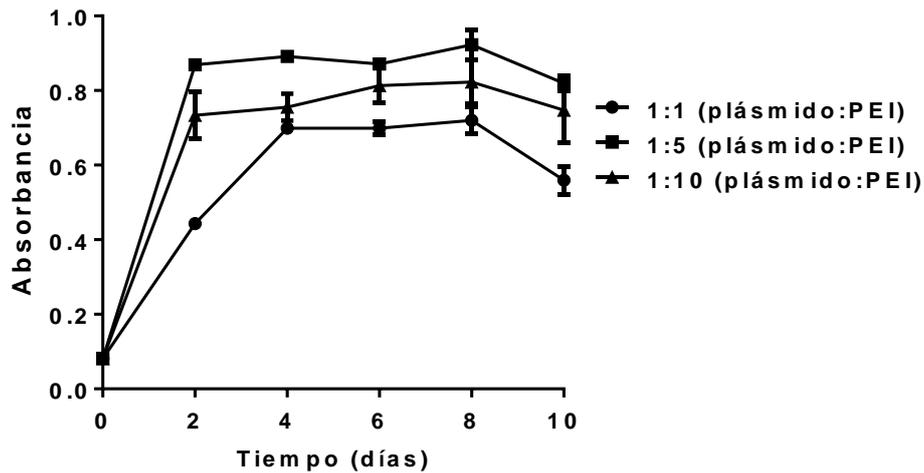


Figura 37. Expresión del mAb R1D3 en el sobrenadante de cultivo de células HEK293 determinada por ELISA indirecta sensibilizada con cyt c ($2 \mu\text{M}$) y revelada con OPD midiendo a 450 nm .

Globalmente, se obtuvo a partir de 200 mL de medio de cultivo (día 10) una producción de aproximadamente $80\text{-}100 \mu\text{g}$ de mAb R1D3 puro.

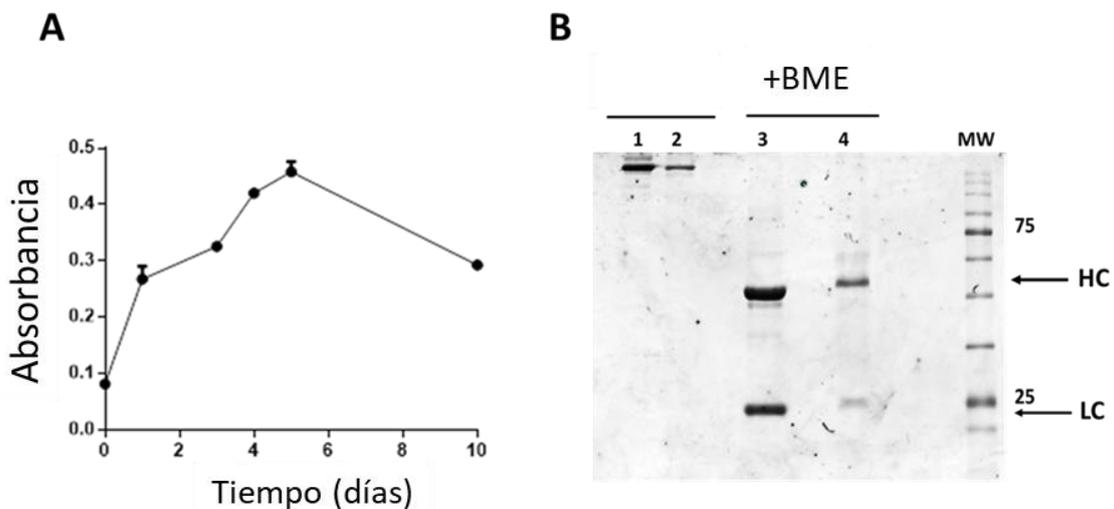


Figura 38. A. ELISA indirecta sensibilizada con cyt c ($1 \mu\text{M}$), posteriormente los sobrenadantes del cultivo a diferentes días son testeados. **B.** SDS-PAGE de la purificación del R1D3 del medio celular de células HEK293. Se sembró la purificación del mAb R1D3 y el mAb 1D3 en ausencia y presencia de reductor (β -mercapto-etanol). El último carril corresponde al peso molecular. LC y HC corresponden con el peso de la cadena pesada y liviana del anticuerpo respectivamente.

2.3) Caracterización bioquímica del mAb R1D3

Una vez purificado, se llevó adelante la caracterización bioquímica del anticuerpo tomando como referencia el anticuerpo mAb 1D3 original en los diferentes ensayos.

En la Figura 39 se muestran los resultados del ensayo de ELISA indirecto que muestra que efectivamente el mAb R1D3 reconoce epítopes expuestos en la placa generados por la unión del

cyt c nativo a la misma. Este ensayo es necesario para determinar la dilución correcta que será utilizada en los ELISA de competencia. Como se observa, el anticuerpo recombinante tiene el mismo comportamiento que el mAb 1D3, lo que confirma su funcionalidad, especificidad y afinidad similar al original.

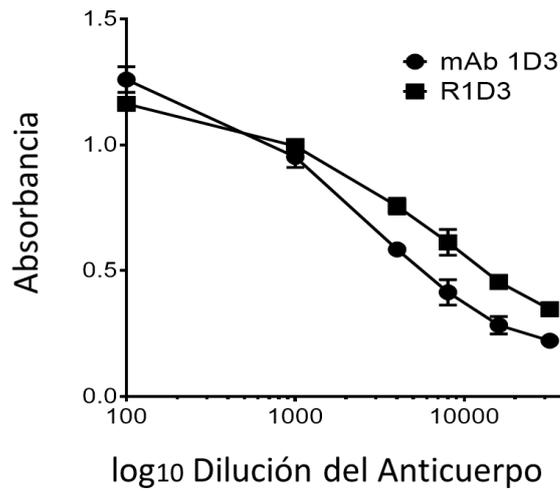


Figura 39. ELISA indirecta. Se usaron varias diluciones del anticuerpo primario 1D3 o R1D3 y se revelaron con anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP. Se reveló con OPD midiendo la absorbancia a 450 nm.

La concentración de anticuerpo que produce un decaimiento en un 50% de la señal inicial a 450 nm fue calculada y corresponde con $\sim 0.18 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para ambos anticuerpos. En las ELISAs competitivas que se muestran a continuación, se utilizó dicha concentración de anticuerpo.

El sitio de unión del mAb 1D3 se encuentra en la región del loop 40-54, región que sufre alteración en la transición alcalina del cyt c, y frente a la nitración de la proteína según se determinó por estudios de biología estructural realizados en el grupo (Figura 40).

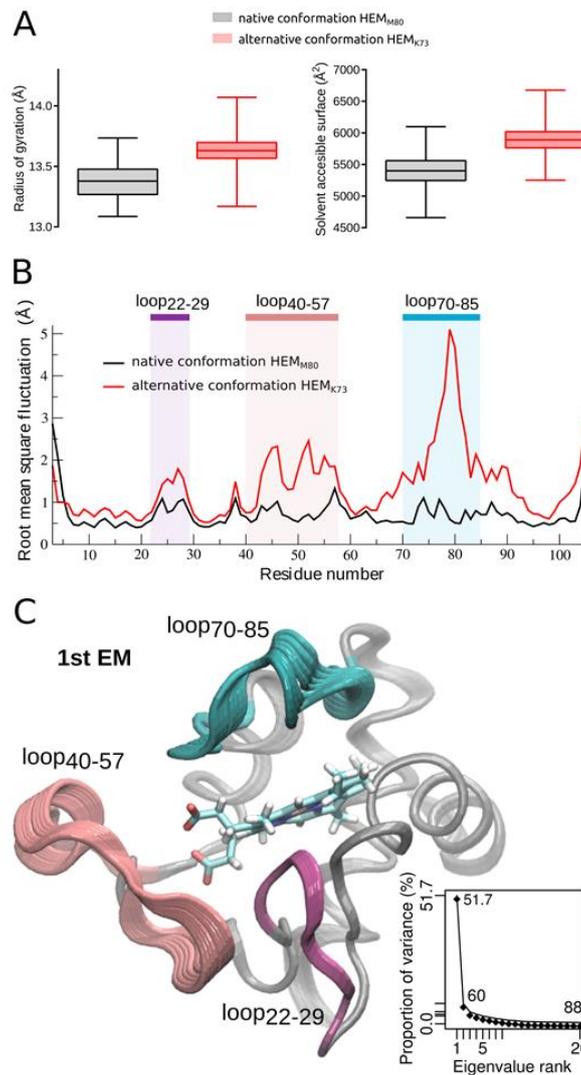


Figura 40. Dinámica comparativa del comportamiento del cyt c nativo y de conformación alternativa. A. Radio de giro de la proteína (Å) (izquierda) y el área de la superficie (SASA, Å²) de acceso al solvente (derecha), fueron calculados por el equipo de dinámica molecular del laboratorio utilizando simulaciones de MD de conformación nativa HEMM80 (negro) y de conformación nativa HEMK73 (rojo). B. Fluctuación de la cadena carbonada destacando las regiones que presentan diferente flexibilidad. C. Análisis de la dinámica. Representación de la estructura en el primer módulo (1er EM).

Adicionalmente está reportado que dentro del loop algún aminoácido sufre una desprotonación al realizar la transición alcalina¹⁵, confirmando que es una región que sufre modificación frente a la transición. Por tal motivo, se realizó una ELISA competitiva utilizando dos péptidos sintéticos para conocer si el mAb R1D3 reconoce efectivamente esta región (Figura 41).

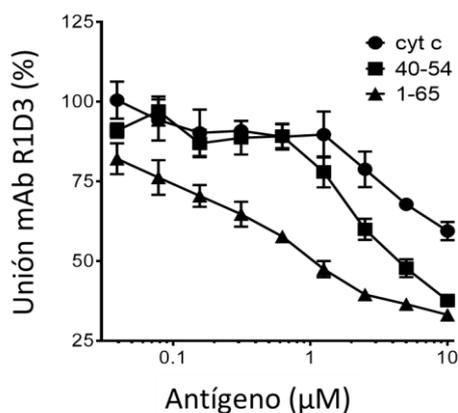


Figura 41. ELISA competitiva. La placa se sensibilizó con cyt c (0.5 μM), se compitió la unión del mAb R1D3 a la placa con diferentes concentraciones de péptidos sintético. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP. Se reveló con OPD midiendo la absorbancia a 450 nm.

Se observa un decaimiento en la señal en presencia de los péptidos sintéticos indicando que efectivamente logra reconocer en la región del loop 40-54, región que fue analizada por dinámica molecular por adoptar flexibilidad en conformación alternativa en comparación con el cyt c nativo (Figura 40), que expone otros residuos al solvente.

Para reconfirmar que el mAb R1D3 reconoce con la misma afinidad el cyt c de conformación alternativa (NO₂-Y74 cyt c, NO₂-Y97 cyt c y SO-M80 cyt c) se realizaron ELISAs competitivas (Figura 42).

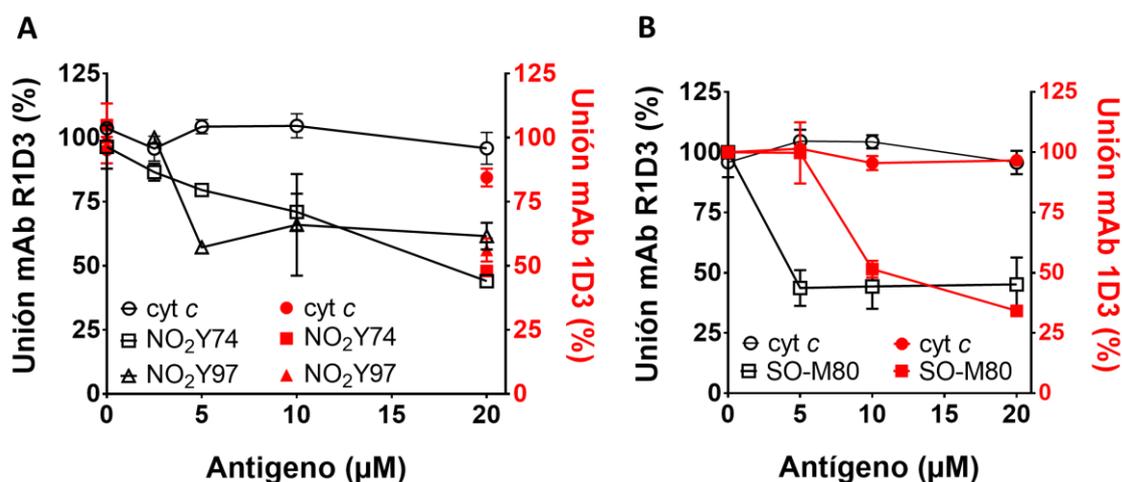


Figura 42. ELISA competitiva. La placa se sensibilizó con cyt c (0.5 μM), se compitió la unión del mAb R1D3 a la placa con diferentes concentraciones de cyt c modificados oxidativamente (NO₂-Y74 cyt c, NO₂-Y97 cyt c y SO-M80 cyt c) con una dilución de 1/5000 de mAb 1D3 o R1D3. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP. Se reveló con OPD midiendo la absorbancia a 450 nm.

Adicionalmente, se realizaron ELISAs competitivas con los diferentes citocromos en presencia de liposomas de fosfatidilcolina y cardiolipina (Figura 43).

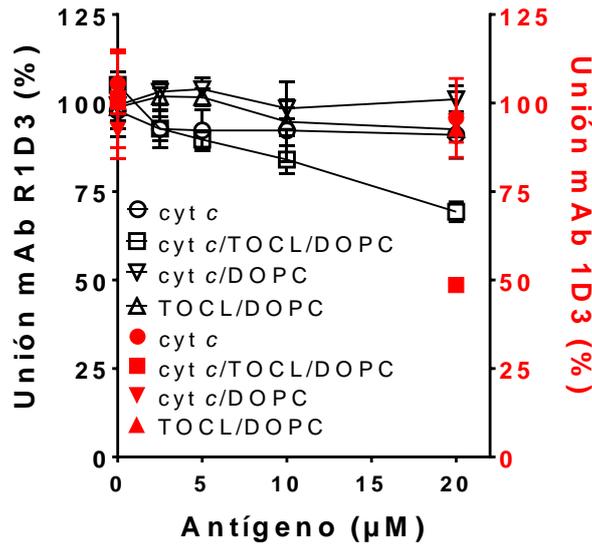


Figura 43. ELISA competitiva. Sensibilizado cyt c (0.5 µM) y se usó una dilución de 1/5000 del mAb 1D3 ó R1D3, compitiendo en solución con diferentes concentraciones de cyt c en presencia (o ausencia) de TOCL/DOPC (200 µM) y TOCL/DOPC sin cyt c. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP y se reveló con OPD (0.4 mg/mL) midiendo la Absorbancia a 450 nm.

Estos resultados nos permiten concluir que los cyt c modificados oxidativamente (NO₂-Y74, NO₂-Y-97 y SO-M80) y el complejo cyt c/cardiolipina, son reconocidos por ambos anticuerpos con igual afinidad (Figuras 42 y 43).

2.4) Detección de conformaciones alternativas del cyt c en modelos celulares usando el mAb 1D3/R1D3

En la literatura existen dos reportes donde se utiliza el mAb 1D3 previamente. Se reportó la detección de cyt c no nativos en células apoptóticas y necróticas¹⁶⁶ y en el segundo artículo, frente a la exposición de peroxinitrito a células HeLa, se observa un marcado a nivel nuclear²⁶. De manera de extender estos estudios y utilizando el nuevo anticuerpo recombinante generado en este trabajo, llevamos adelante diferentes tratamientos usando distintos tipos celulares y evaluamos por inmunohistoquímica la presencia y localización subcelular de conformaciones alternativas del cyt c.

En primer lugar, se utilizó el tratamiento con peroxinitrito a células VERO. Para ello, se trataron a las células con peroxinitrito (300 µM de peroxinitrito) y se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera de CO₂. Luego de la incubación se realiza la inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti- cyt c nativo y/o mAB R1D3 y 1D3.

Como se observa en la Figura 44 (paneles D y F), la exposición al oxidante induce la translocación al núcleo de cyt c en conformación alternativa que se detecta por ambos anticuerpos (1D3 y R1D3). La tinción con el anticuerpo anti-cyt c nativo es claramente diferente, marcando de forma clara las mitocondrias celulares tanto antes como después del tratamiento con el oxidante (paneles A y B). Este resultado indica que el anticuerpo contra conformaciones alternativas del

cyt c no reconoce al nativo siendo una herramienta experimental fundamental para el estudio de estas proteoformas a nivel celular.

Como control, se compitió la unión del mAb R1D3 a las células tratadas con peroxinitrito con NO_2 -Y74 cyt c en solución. Como se observa en el panel H, disminuye significativamente la señal. Finalmente, se utilizó Mitotraker Red de manera de poder visualizar las mitocondrias (panel G), observando que el R1D3/D3 están reconociendo cyt c que migran al núcleo y no mitocondrias cercanas al núcleo.

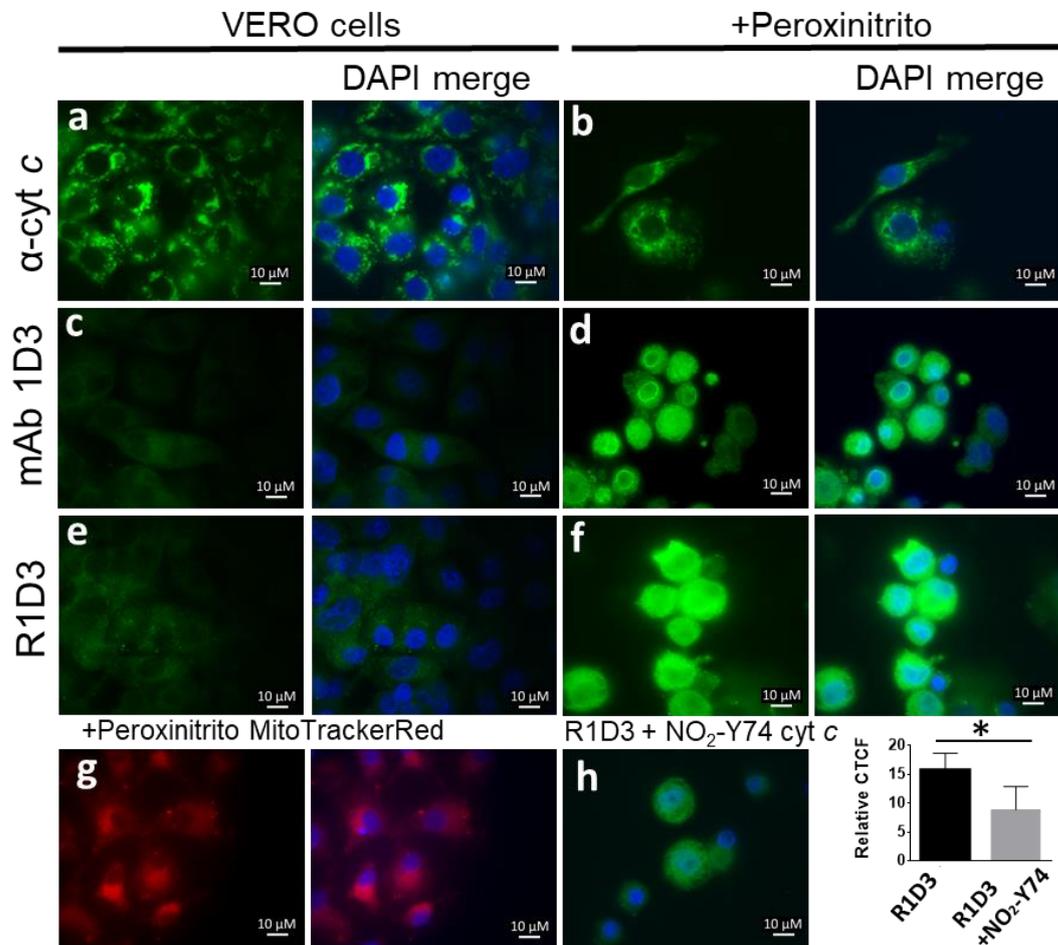


Figura 44. Inmunodetección de cyt c en conformación alternativa utilizando mAb 1D3 y R1D3. Células VERO (control) o tratadas con peroxinitrito 300 μM (+peroxinitrito), fueron fijadas 16 h luego de la adición de peroxinitrito. Se probaron con mAb 1D3, R1D3, y anti-cyt c (Sigma 6H2.B4). El núcleo se tiñó con DAPI y la mitocondria fue evaluada con mitotracker red (panel G). En el panel H se realizó un ensayo de competencia incubando mAb 1D3 en presencia de NO_2 Y74 cyt c (50 μM).

3) Objetivo específico 3

Generación y localización subcelular de cyt c de conformación alternativa en diferentes condiciones de estrés oxidativo.

De manera de evaluar qué sucede a nivel celular con el cyt c en diferentes contextos de estrés oxidativo se emplearon tres modelos diferentes:

1. Tratamiento con adición exógena de oxidantes como el peroxinitrito y H₂O₂
2. Generación endógena de oxidantes: modelo de células senescentes
3. Incorporación de forma exógena de cyt c modificado oxidativamente

3.1) Localización a nivel celular del cyt c de conformación alternativa luego de la exposición a peroxinitrito.

Se examinaron diferentes tipos celulares luego del tratamiento con peroxinitrito realizado de igual manera que para las células Vero (sección 2.3). Estos estudios nos permitirán determinar si la translocación al núcleo del cyt c en conformación alternativa es una respuesta general y no particular de una línea celular.

a) Células de aorta bovina (BAECs)

Los ensayos en BAECs muestran un aumento de cyt c de conformación alternativa en la región nuclear luego de 24h post tratamiento con el oxidante (300 μM) de aproximadamente 4 veces respecto a la condición control (Figura 45).

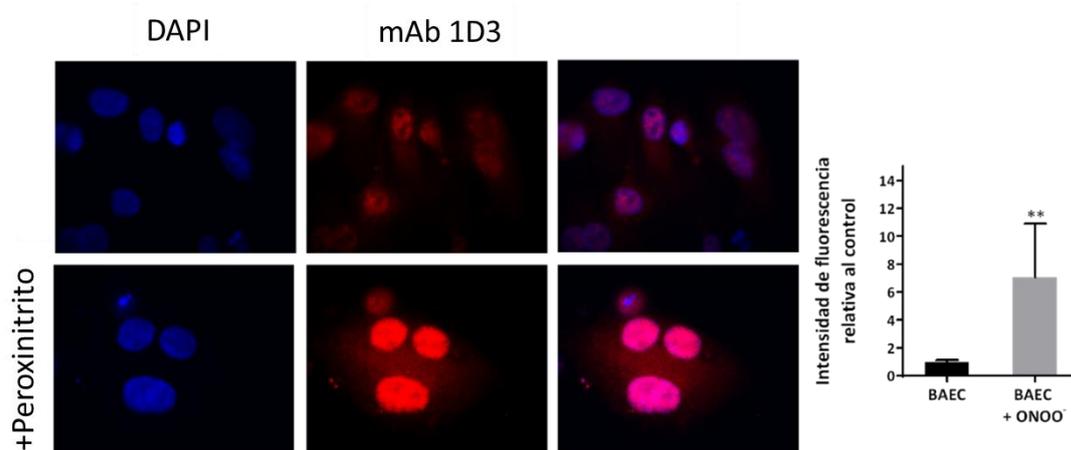


Figura 45. Inmunolocalización de de cyt c en BAECs luego del tratamiento con peroxinitrito utilizando el anticuerpo 1D3 (rojo), y tinción nuclear con DAPI (azul). El gráfico de la derecha es la cuantificación de la intensidad de la fluorecencia de la detección del mAb 1D3. ** significa diferencias significativas $p < 0.05$.

Utilizando éste modelo, se intentó determinar la presencia de cyt c nitrado luego del tratamiento. Para ello se utilizó la técnica de SILAC (de sus siglas en inglés: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture). Esta técnica permite identificar diferencias de expresión de

proteínas e identificar modificaciones postraduccionales que no estén presentes en la muestra control.

Para realizar esta técnica, se partió de células BAECs cultivadas en el medio modificado SILAC (DMEM with $^{13}\text{C}_6$ Arginine and $^{13}\text{C}_6$ Lysine) heavy (H) o en medio modificado SILAC light (L). A las células crecidas con medio SILAC light se las trató con peroxinitrito 200 μM o con SIN-1 y se las dejó toda la noche a 37°C, 5 % CO_2 . Posteriormente, se realizó un fraccionamiento subcelular de citosol y núcleo utilizando un kit para fraccionamiento subcelular específico para núcleos. Posteriormente, se cuantificó la concentración proteica de cada fracción y se realizó el mix igualando las concentraciones de las células cultivadas en medio DMEM Heavy y las cultivadas en medio DMEM Light. Las distintas muestras contienen:

Tubo 1. Control citosol (H) + Adición Reversa citosol (L)

Tubo 2. Control Núcleo (H) + Adición Reversa Núcleo (L)

Tubo 3. Control Citosol (H) + ONOO- citosol (L)

Tubo 4. Control Núcleo (H) + ONOO- Núcleo.

Luego del mix se agregó buffer de la muestra y se enviaron a analizar.

El análisis de SILAC proteómico logró identificar 1343 proteínas totales. El análisis solo tomó en cuenta las proteínas menores a 45 kDa para lograr identificar al cyt *c*. Se identificaron tres proteínas que incorporaron grupo nitro a tirosinas, correspondientes a proteínas de membrana plasmática. La nitración se produjo en dominios expuestos en la cara externa de la membrana (Tabla 2A). No se logró identificar al cyt *c* nitrado, lo que podría indicar que se encuentra en bajas concentraciones, por lo que será importante realizar nuevamente el ensayo, pero inmunoprecipitando cyt *c* de manera de enriquecer la muestra o utilizando otro medio modificado, SILAC médium. Esta última estrategia podría evitar contaminaciones de proteínas provenientes del suero presente en el medio de cultivo que interfieren en la detección del cyt *c*.

Este mismo ensayo nos permitió identificar un cambio de expresión en un total de 250 proteínas entre el tratamiento con peroxinitrito y las células control tratadas con la adición reversa (peroxinitrito descompuesto). Esas proteínas representan un 19% del total de las proteínas. En la Tabla 2B, se resume algunas de las proteínas que varían en su abundancia.

Con respecto a la variación de concentración del cyt *c*, se identifica la presencia de la proteína en la fracción citosólica y nuclear tanto para la condición control como luego del tratamiento con peroxinitrito. La abundancia relativa del cyt *c* tiende a incrementar en la fracción nuclear en las células tratadas con peroxinitrito. Dentro del experimento la única modificación oxidativa detectada del cyt *c* es la oxidación de la Met65.

Tabla 2. A. Resumen de las proteínas que se identificaron que incorporan grupo nitrotirosina (A) y los cambios en la expresión (B) en células BAECs tratadas con peroxinitrito 200 μ M.

A			B	
Proteína	Localización/Función	Posición de la Nitración	Proteína	Expresión
F1MJU4	Actividad ATPasa/Proteína Transmembrana	536 (dominio no transmembrana)	Hsp90	Disminuye
F1MT13	PDZ/Unida a receptores o canales iónicos	359	Aha1	Disminuye
F1MB25	Actividad ATP hidroxilasa/Proteína transmembrana	246-256 (dominio no transmembrana)	NADH deshidrogenasa I	Aumenta
			ATP sintasa	Aumenta
			Tioredoxina	Aumenta
			H2A	Aumenta

Se puede concluir de esta parte, que se detecta un aumento de cyt c a nivel nuclear en células BAECs tratadas con peroxinitrito por espectrometría de masas. Y que en ese contexto de estrés oxidativo, hay un cambio en la expresión proteica. Es interesante notar el aumento en la expresión de la histona H2A y de la tioredoxina luego del tratamiento.

Estos ensayos fueron realizados en el Laboratory of Clinical Biochemistry and Metabolism, Center of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical Care, de la University of Freiburg en Alemania, bajo la supervisión de la colaboradora del CEINBIO Dra. Luciana Hannibal, en el marco de dos pasantías financiadas por el TREAM. Se utilizó el core proteómico de dicha Universidad para el desarrollo de la Técnica de SILAC.

b) Purificación de cyt c de conformación alternativa por columna de afinidad

De manera de evaluar la formación de cyt c en conformación alternativa a nivel celular luego del tratamiento con oxidantes se utilizó una columna de afinidad la cual tenía unido a la matriz el anticuerpo mAb 1D3. Se obtuvieron extractos celulares de células BAECs tratadas con peroxinitrito y sin tratamiento (control). Los extractos celulares control y expuesto a peroxinitrito se pasan por la columna de afinidad y se colectan las proteínas unidas y no unidas a la columna. Con las muestras obtenidas se realizó WB anti-cyt c (Figura 46), que da un indicio que hay un aumento de cyt c de conformación alternativa en las células tratadas con peroxinitrito con respecto al control. Se observan algunas bandas de mayor peso molecular que el cyt c, que puede deberse a dímeros, ya que su peso corresponde con dímeros de cyt c.

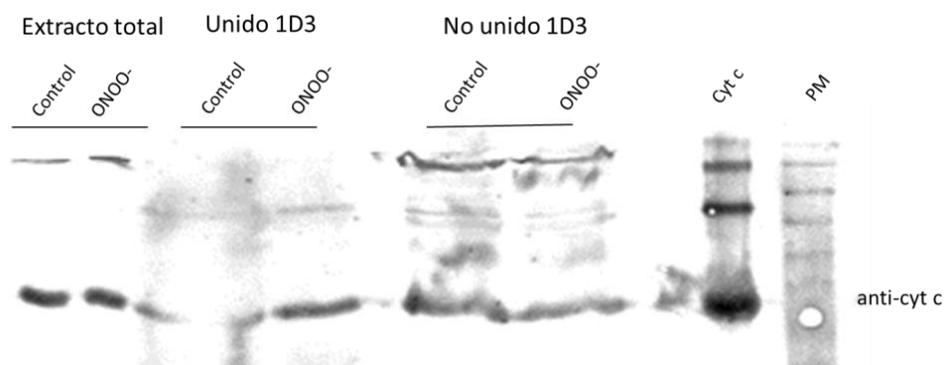


Figura 46. Western Blot anti-cyt c de extractos celulares purificados en columna de afinidad. Los primeros dos carriles corresponde a extracto celular total de BAECs sin tratamiento (control) y tratadas con peroxinitrito (ONOO-). Los carriles 3 y 4, corresponde a las proteínas que se unieron al anticuerpo 1D3. Los carriles 5 y 6, corresponde a las proteínas que no se unieron al mAb 1D3. Carril 7, corresponde al cyt c, y el carril 8, al marcado de peso molecular. Este es una réplica de un n=3 ensayos realizados.

Es de notar que existe una gran cantidad de cyt c que no se une al mAb 1D3, lo cual es esperable ya que la mayoría del cyt c a nivel celular no esté en conformación alternativa.

Con las mismas muestras de BAECs (purificadas por columna de afinidad) se realizaron geles 2D con tinción plata para la identificación de posibles proteínas “partners” (Figura 47A). En la Figura 47B, se indica con flechas los nuevos spots encontrados. A futuro, se analizarán cada uno de los spots, para poder identificar los posibles partners del cyt c cuando este se encuentra en conformación alternativa.

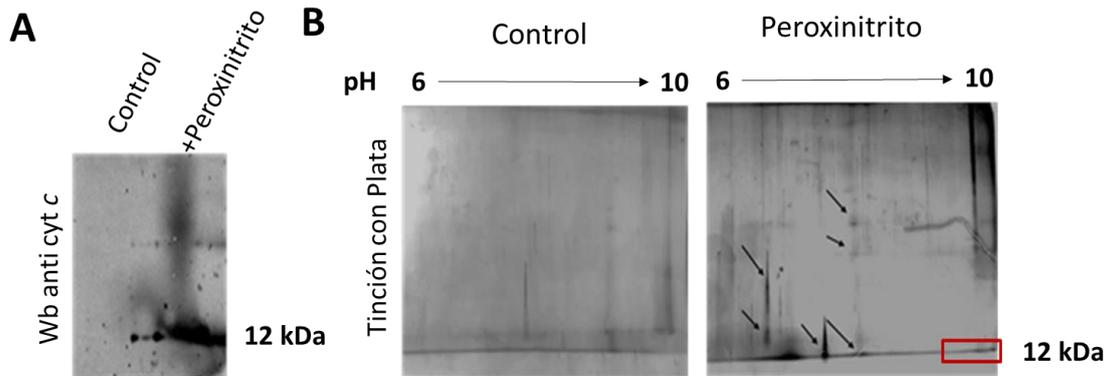


Figura 47. Identificación de proteínas partners al cyt c. Células BAECs fueron tratadas con peroxinitrito (300 μ M), posteriormente el extracto total fue pasado por columna de afinidad con el mAb 1D3 unido. **A.** SDS-PAGE y WB anti-cyt c que corresponde a las proteínas unidas al 1D3. **B.** Electroforesis en 2 dimensiones de las proteínas unidas al mAb 1D3. Control: células no tratadas; +peroxinitrito: células tratadas con peroxinitrito evaluadas 16h posterior al tratamiento.

Asimismo, se observa varios spots a la altura del peso molecular del cyt c, pero de menor punto isoeléctrico que el cyt c, lo que identificaría presencia de cyt c oxidados (indicado por el cuadrado rojo en la Figura 47B), ya que las modificaciones postraduccionales modifican los puntos isoeléctrico de la proteína. De esta forma, logramos visualizar la presencia de posibles proteínas partners que se unen al cyt c de conformación alternativa y la presencia de spots correspondientes a cyt c modificados oxidativamente (con menor pI). Futuros experimentos serán diseñados para poder identificar a estas proteínas así como también las modificaciones oxidativas del cyt c en este modelo celular.

Finalmente, se evaluó la posible producción de oxidantes endógenos luego del tratamiento con peroxinitrito. La producción de oxidantes a nivel celular se evaluó utilizando la sonda diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), 16 h luego de la exposición al oxidante (Fig. 48).

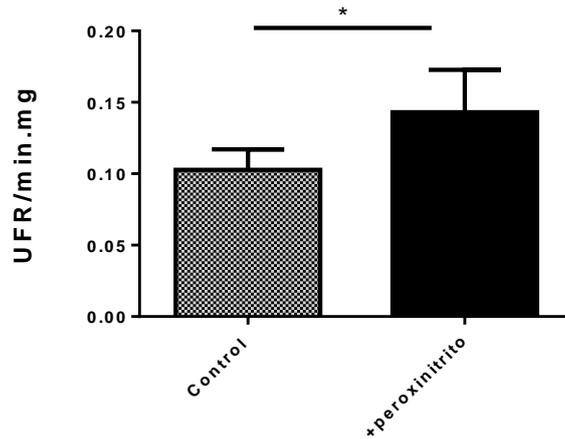


Figura 48. Detección de la producción de especies reactivas del oxígeno con DCF-DA, para las células BAECs (control) y tratadas con peroxinitrito (200 μ M), 16 horas posteriores al tratamiento. *Diferencia significativa, $p < 0.05$.

Tal como se observa en la Figura 48, las células tratadas con peroxinitrito tienen una mayor producción de oxidantes. Esto puede deberse a que, como se observó anteriormente para este tipo celular¹⁷³, el tratamiento con peroxinitrito lleve a una disfunción mitocondrial con una mayor generación de oxidantes. Ese aumento, llevaría a la oxidación del cyt c induciendo la conformación alternativa detectada por el mAb 1D3.

Se repitió el tratamiento con peroxinitrito en varios tipos celulares de diferentes especies. En la Figura 49A, se observa que tanto para células HeLa, B16F1, IMR90 y BAECs, el tratamiento con peroxinitrito induce una migración al núcleo de cyt c de conformación alternativa identificado con el mAb 1D3.

La Figura 49B, corresponde a células B16F1 tratadas o no (control) con peroxinitrito y posterior lisis celular y selección de proteínas que se unan al mAb 1D3 en columna de afinidad. Las fracciones eluidas se prueban por WB anti-cyt c. Se observa una banda correspondiente al peso molecular del cyt c en la muestra de las células tratadas con peroxinitrito. Este resultado indica que luego de la exposición al oxidante, una fracción del cyt c adquiere conformación alternativa que es reconocido por el mAb 1D3. No se pudo identificar si esta conformación corresponde a cyt c nitrado. Futuros experimentos utilizando un mayor número celular serán diseñados para poder identificar por espectrometría de masas la modificación(es) que presenta este cyt c.

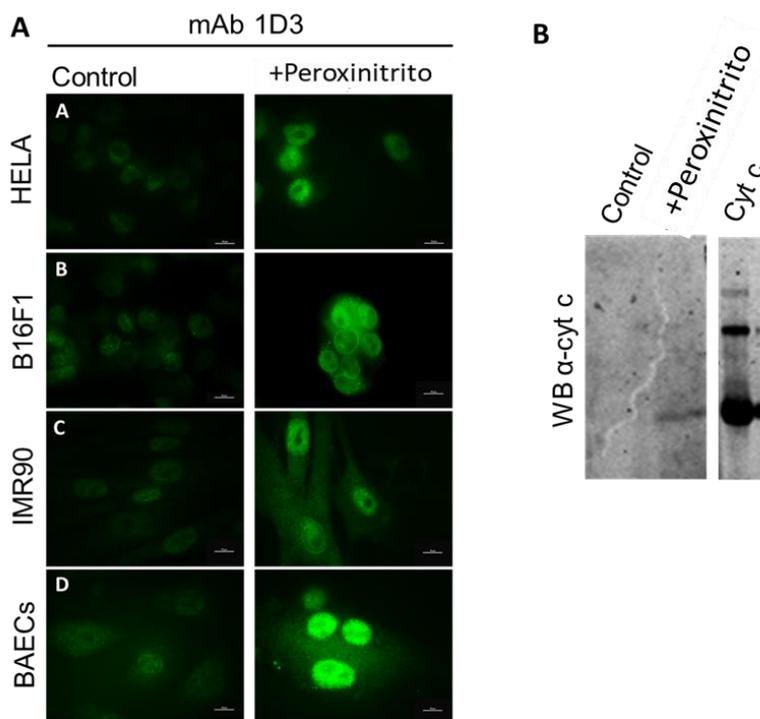


Figura 49. Exposición a peroxinitrito e identificación de cyt c por el mAb 1D3. A. Diferentes tipos celulares (control) o tratados con peroxinitrito (300 μ M) y evaluadas con el mAb 1D3 16 hrs posterior al tratamiento. En verde se señala marca con mAb 1D3. B. Western blot anti-cyt c. Las fracciones eluidas de la columna de afinidad conteniendo el 1D3 de células control o tratadas con peroxinitrito se separaron en SDS-PAGE y posterior WB anti-cyt c.

En simultáneo, células B16F1 control fueron incubadas durante 48 días previo al tratamiento con peroxinitrito en presencia de N-acetilcisteína (NAC). El NAC es utilizado como un precursor para la formación de antioxidantes en el modelo. 24 horas posteriores al tratamiento con peroxinitrito, se evaluó la formación de oxidantes por oxidación de la sonda DCF-DA por citometría de flujo. Se observa un aumento en la oxidación de la sonda en células tratadas con peroxinitrito y una disminución en las células previamente tratadas con NAC (Figura 50). De esta manera, observamos que el aumento detectado en la oxidación de la sonda se debe a una mayor generación de oxidantes y no por efectos artefactuales. Tomando estas dos premisas, se verifica que efectivamente el cyt c migra al núcleo en presencia de estrés oxidativo.

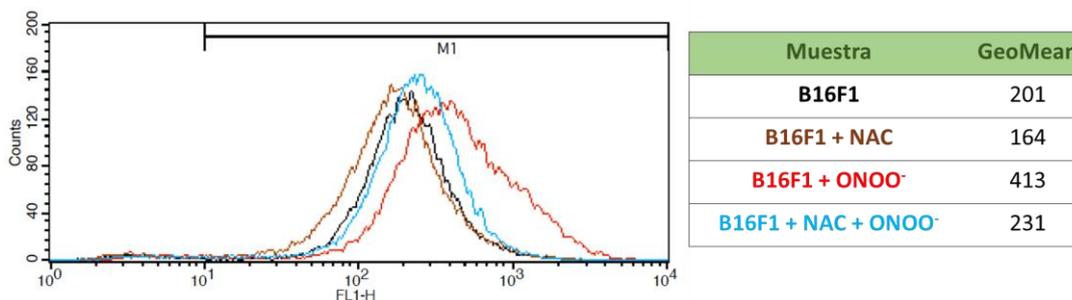


Figura 50. Análisis por citometría de flujo de la oxidación de la sonda DCF-DA. Células B16-F1 fueron tratadas con peroxinitrito y 24 h después se determinó la oxidación de la sonda DCF-DA. Se observa un aumento en la oxidación de la sonda posterior al tratamiento con peroxinitrito (rojo). Células B16-F1 fueron tratadas con NAC durante 48 h previo al tratamiento con el oxidante y se evaluaron 24 h después (celeste y marrón).

Utilizando este mismo tratamiento con NAC observamos, posterior al tratamiento con peroxinitrito, una disminución en el marcado de mAb 1D3. Estos resultados indican que la formación de cyt c de conformación alternativa depende de un aumento en la generación de oxidantes mitocondriales (Figura 51).

Comprobamos la translocación al núcleo del cyt c en conformación alternativa frente al agregado de peroxinitrito, como ya se había reportado para las células HeLa²⁶. Asimismo, se verificó que el tratamiento con peroxinitrito induce un aumento en las especies reactivas del oxígeno a nivel mitocondrial, por lo que se sugiere que la translocación al núcleo a nivel celular se deba a un contexto oxidante que genere cyt c modificado oxidativamente de conformación alternativa. A modo de confirmación, se trató previamente a las células con NAC verificando una disminución en la formación y translocación de cyt c de conformación alternativa.

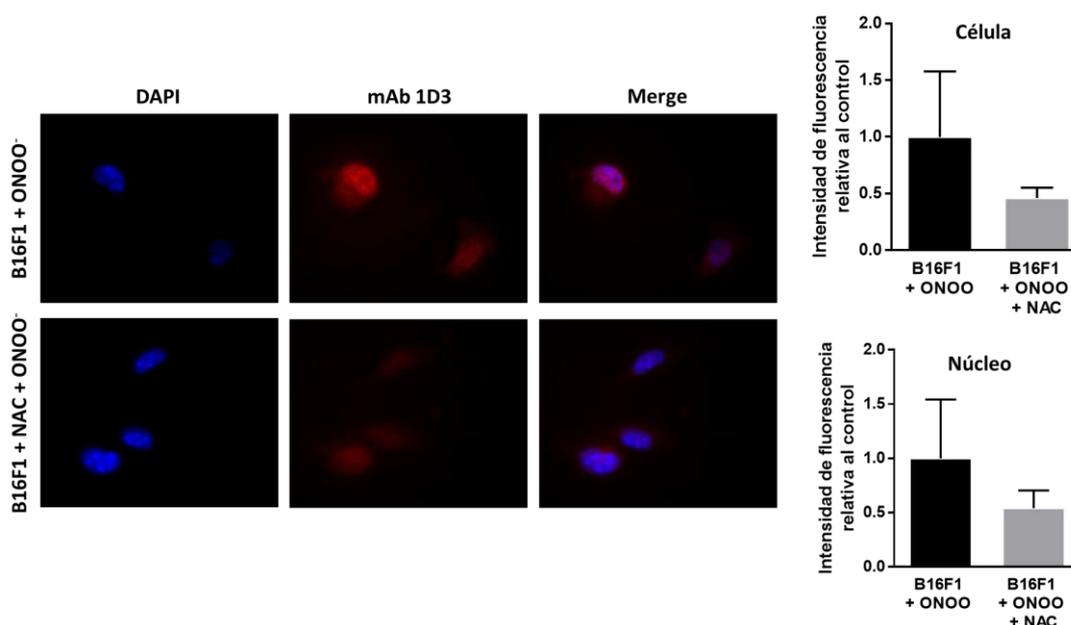


Figura 51. Disminución en la formación de cyt c de conformación alternativa por NAC. Células B16F1 pretratadas (o no) con NAC (500 μ M) y posterior tratamiento con peroxinitrito. Se cuantificó la intensidad relativa de fluorescencia del mAb 1D3 en el núcleo y en la célula total.

3.2) Localización a nivel celular del cyt c de conformación alternativa luego del tratamiento con H_2O_2

Otro oxidante que se forma en condiciones celulares y que en varios contextos cumple funciones de señalizador redox, es el H_2O_2 . Con el fin evaluar si el efecto del peroxinitrito se reproduce con H_2O_2 , se testeó en primera instancia la cinética del consumo de H_2O_2 por los cultivos celulares (Figura 52). Las células B16-F1 se expusieron a H_2O_2 (2-4 mM) en medio DMEM (conteniendo: 4% glucosa sin suero bovino fetal). Como control de consumo de H_2O_2 , se adicionó la misma solución en ausencia de células. A diferentes tiempos de la incubación, se tomaron muestras y se cuantificó el H_2O_2 utilizando Amplex Red y HRP (Figura 52).

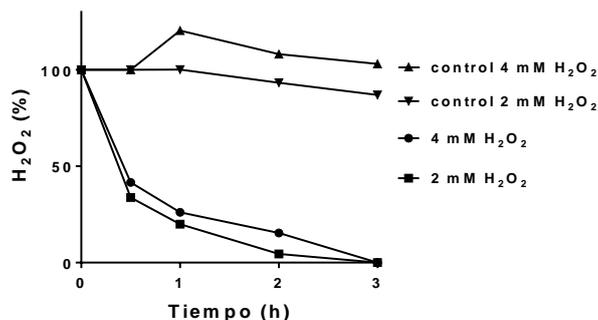


Figura 52. **Determinación del consumo de H₂O₂.** Se cultivaron células B16-F1 en presencia de H₂O₂ (2-4 mM) y se midió a los diferentes tiempos en el sobrenadante de cultivo la concentración de H₂O₂ utilizando AmplexRed. El control corresponde a H₂O₂ en el medio de cultivo en ausencia de células.

Se observa que más del 50 % del H₂O₂ se consume luego de media hora de incubación y más de un 90% a las 2 h (Figura 52). Posteriormente, se realizó mediante inmunofluorescencia con mAb 1D3, la detección del cyt c a nivel nuclear a diferentes tiempos de incubación con H₂O₂ (Figura 53).

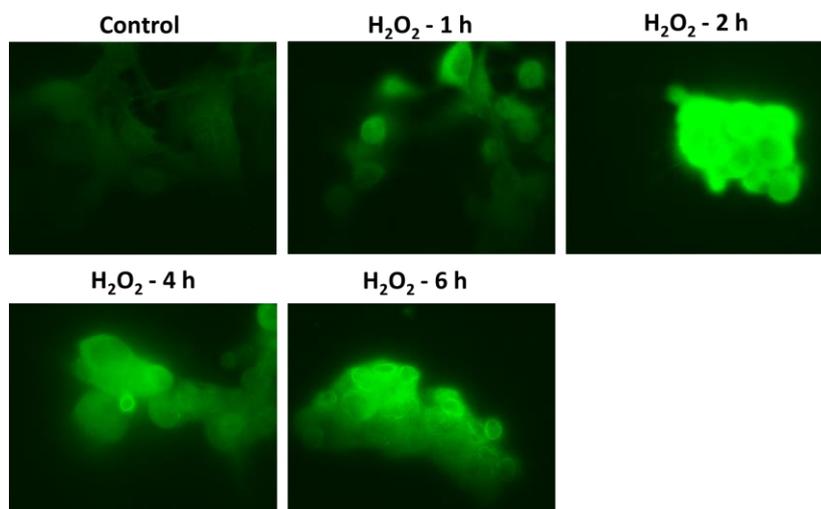


Figura 53. **Detección de cyt c a nivel nuclear a diferentes tiempos de incubación con H₂O₂.** Células B16-F1 se incubaron con H₂O₂ (4 mM) en DMEM sin suero y se probaron con el mAb 1D3 a diferentes tiempos. Inmunofluorescencia marcadas con mAb 1D3 (verde).

Se ve un marcado progresivo de cyt c de conformación alternativa a medida que avanza el tiempo de incubación con el H₂O₂. A las 2 h de tratamiento se observa un marcado intenso, mientras que a las 4 h prácticamente todas las células se encuentran con marca para el mAb 1D3 en la zona perinuclear.

Se eligió un tiempo de tratamiento por dos horas para los siguientes experimentos. Se analizó, en células Vero, la capacidad del R1D3 de detectar cyt c alternativo luego del tratamiento con H₂O₂ (2 h, 4 mM) y se comparó con el mAb 1D3. Se observa que el R1D3 detecta de igual manera que el anticuerpo original al cyt c en este modelo (Figura 54).

Los resultados con H₂O₂ expanden los obtenidos previamente con peroxinitrito y muestran que ambos oxidantes llevan a la formación de cyt c alternativo y su translocación a nivel nuclear. Los mecanismos por los cuales ambos oxidantes desencadenan el efecto pueden ser diferentes. El peroxinitrito (16 h) generando una disfunción mitocondrial con aumento en la generación de oxidantes mientras que para el H₂O₂ el mecanismo podría ser por acción directa del oxidante sobre el cyt c (2 h).

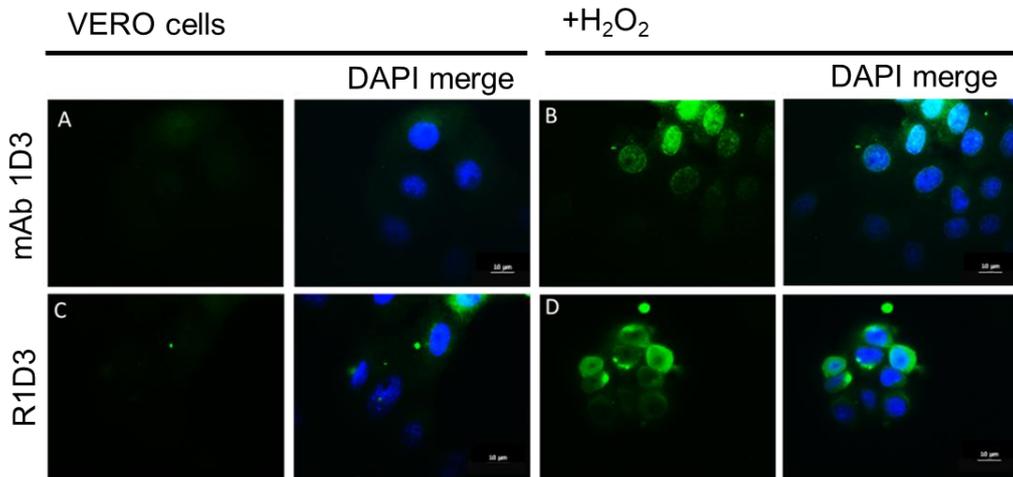


Figura 54. Detección de cyt c de conformación alternativa luego del tratamiento con H₂O₂. Células Vero fueron tratadas con H₂O₂ (4 mM, 2 h) en DMEM sin suero. Las células fueron analizadas por microscopia confocal con el mAb 1D3 o R1D3 (verde) y DAPI para marcar el núcleo (azul).

Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular luego del tratamiento con estos oxidantes. Primero, se realizaron controles de viabilidad celular (integridad de membrana plasmática) con 6-carboxyfluoresceína diacetato (6CF-DA) para las células tratadas con H₂O₂ (4 mM, 4 h) y peroxinitrito (300 µM toda la noche). La 6CF-DA ingresa a las células en donde las esterasas endógenas clivan el di-acetato dando como producto fluorescente la fluoresceína. Se observa que tanto las células B16F1 tratadas con peroxinitrito, así como tratadas con H₂O₂ se encuentran viables y con forma similar a las células control, indicando que la formación de cyt c de conformación alternativa se da en células viables (Figura 55).

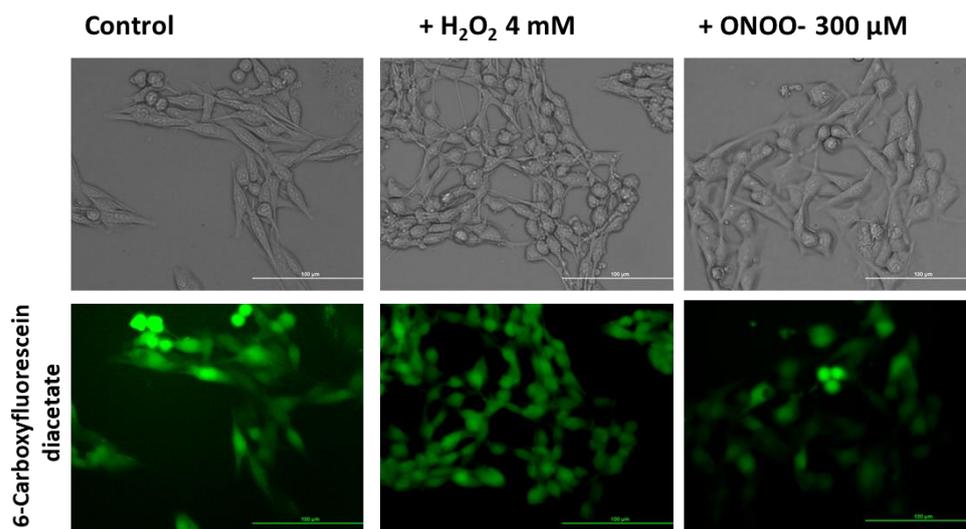


Figura 55. Viabilidad celular de células B16F1 tratadas con H₂O₂ (4 mM, 4 h) y peroxinitrito (300 μM, 16 h). Los paneles superiores corresponden con el campo claro mientras que los paneles inferiores, son las células incubadas 10 minutos con 6-carboxifluoresceina-diacetato.

3.3) Evaluación del daño al ADN en las células tratadas con peroxinitrito y H₂O₂

De forma de conocer cómo se encuentra el ADN frente al tratamiento con peroxinitrito o H₂O₂, se evaluó la presencia de la histona H2 fosforilada (H2Ax- 05-636, Merck Millipore, MA). La fosforilación de la histona H2A es una señal de que el ADN nuclear se encuentra dañado (Figura 56).

De esta manera, se observa que el tratamiento con ambos oxidantes genera daño al ADN que induce la fosforilación de la histona H2A.

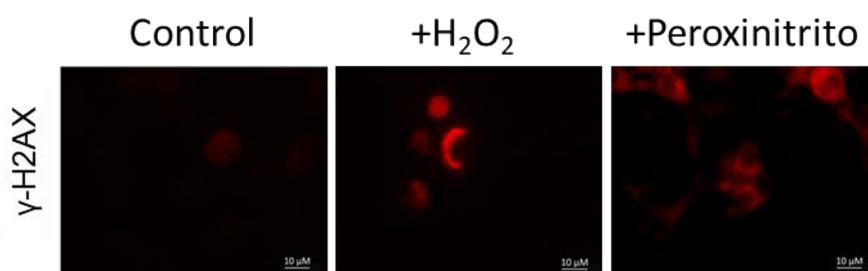


Figura 56. Identificación de daño al ADN marcando con anticuerpo anti-H2Ax fosforilada. B16F1 tratadas con H₂O₂ (4 mM, 2h), o células tratadas con peroxinitrito (300 μM, 16 h). Las células fueron analizadas por microscopia confocal con anti-pH2Ax (rojo).

3.4) Estado apoptótico de las células tratadas con peroxinitrito y/o H₂O₂

Para evaluar si en nuestro modelo celular de tratamiento con oxidantes, las células se encuentran en estado apoptótico, se analizó la exposición de fosfatidil-serina como indicador temprano del inicio del programa de muerte. Se cuantificó la fluorescencia de la Annexina V por citometría de flujo luego del tratamiento con H₂O₂ (4 mM) por 2, 4 ó 6 h o posterior al

tratamiento con peroxinitrito con 300 μ M, 16 h. Observando un aumento de la exposición de fosfatidilserina detectada por un aumento de fluorescencia por la anexina V.

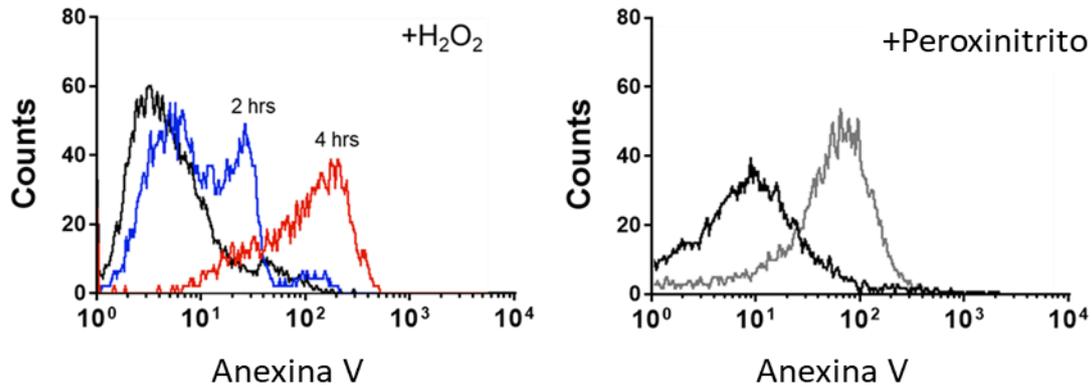


Figura 57. Presencia de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana plasmática evaluada con Annexina-Alexa-488 por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con H_2O_2 ó peroxinitrito y se analizó la exposición luego de 2-4 h para el H_2O_2 y 16 h para el peroxinitrito.

3.5) Evaluación de la presencia de cyt c en células B16-F1 senescentes

Finalmente, utilizamos un modelo preestablecido de senescencia celular inducida por terapia mediante el tratamiento de células de melanoma (B16F1) con temozolomida (TMZ), droga utilizada en el tratamiento del melanoma. Dicho tratamiento induce senescencia celular¹⁷⁴. En el modelo se observa una respuesta persistente al daño al ADN ya pre establecida¹⁷⁴. Después del tratamiento con TMZ, se observó un aumento en el cyt c en los núcleos celulares con respecto a las células control por inmunquímica (Figura 58, paneles A-C) y se cuantificó por citometría de flujo usando mAb 1D3/R1D3 (Figura 58, paneles D-E). Como se observa, el tratamiento con TMZ induce la translocación al núcleo del cyt c en conformación alternativa detectado por ambos anticuerpos.

Se evaluó si en este modelo de senescencia se encontraba aumentada la formación de oxidantes endógenos mediante la oxidación de la DCF-DA por citometría de flujo. Se observa, que las células tratadas presentan un aumento (dos veces) en la oxidación de la sonda (Figura 58F). Estos resultados concuerdan con los observados con peroxinitrito, en donde la generación endógena de oxidantes puede desencadenar la oxidación del cyt c y su translocación al núcleo celular.

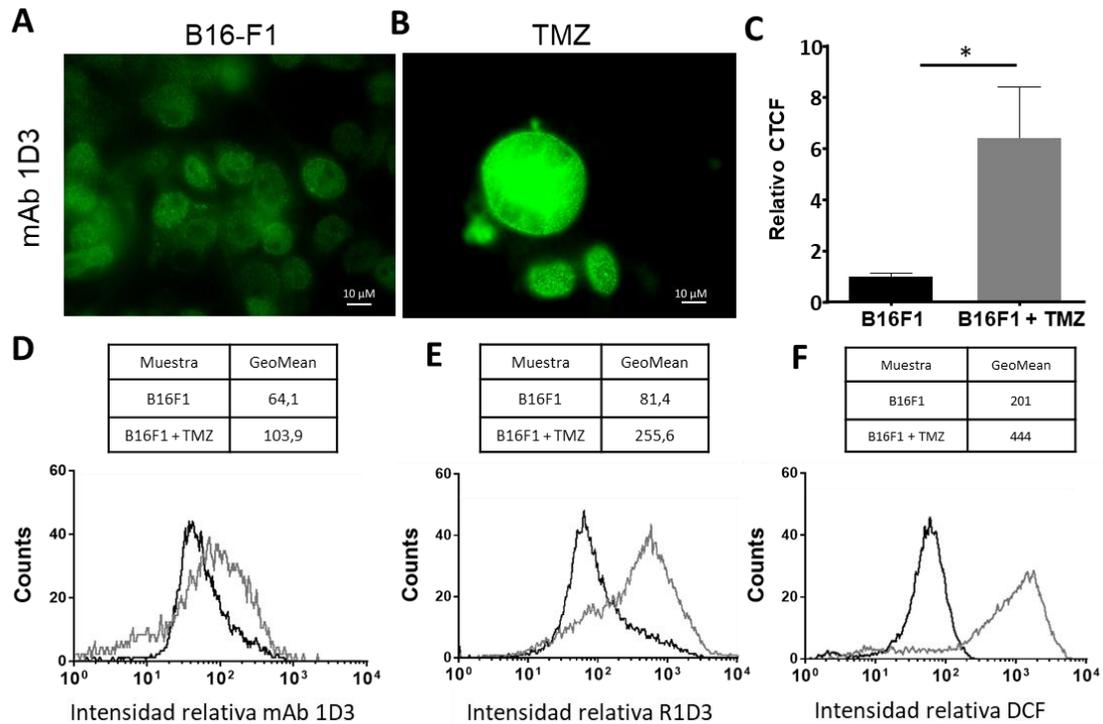


Figura 58. Detección de una conformación alternativa de cyt c en un modelo de célula senescente. A y B. Inmunoquímica con mAb 1D3. Células B16-F1 (control, tratadas con DMSO) (A) o tratadas con TMZ (B) fueron sondeadas con el mAb 1D3 después del anticuerpo conjugado con anti-mouse-FITC (verde) y analizadas por microscopía confocal. La escala de las barras horizontales indica 10 μ m. **C.** La fluorescencia celular total corregida (CTCF) se muestra como cambio de pliegues en los niveles de fluorescencia en comparación con el control. Las diferencias mostradas con un asterisco (*) fueron estadísticamente significativas, con $p < 0,05$. **D.** Análisis de citometría de flujo del mAb 1D3 unido a células de control (histograma negro) o senescentes (histograma gris). **E.** Análisis por citometría de flujo del R1D3 unido a células de control (histograma negro) o senescentes (histograma gris). **F.** Análisis por citometría de flujo de las especies reactivas generadas en las células de control (B16-F1, histograma negro) o senescentes (histograma gris) detectadas por el aumento de DCF.

A modo de verificar si efectivamente esta translocación al núcleo del cyt c se debe a la presencia de oxidantes, cultivamos las células en presencia de NAC (500 μ M). En el mismo momento que se las trató con TMZ se le aplicó N-acetilcisteína. A estas células se las evaluó por inmunolocalización para verificar si efectivamente se evita la translocación al núcleo del cyt c (Figura 59). Si bien el tratamiento con NAC no inhibe por completo la translocación del cyt c a nivel nuclear la disminuye de forma significativa.

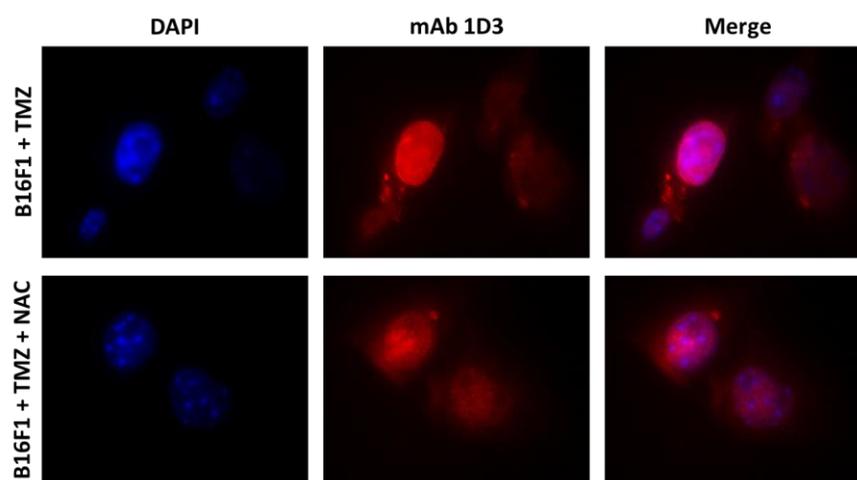


Figura 59. Detección de una conformación alternativa de cyt c en un modelo de célula senescente en presencia de NAC. Inmunoquímica con mAb 1D3. Células B16-F1 previamente tratadas con NAC (500 μ M) tratadas con TMZ fueron sondeadas con el mAb 1D3 después del anticuerpo conjugado con anti-mouse-FITC (verde) y analizadas por microscopía confocal.

3.6) Carga pinocítica e inmunolocalización de cyt c alternativos en células

Finalmente, de manera de comprobar que el cyt c modificado oxidativamente en conformación alternativa migra al núcleo celular, incorporamos a células B16F1, SO-M80 cyt c purificado y cyt c nativo realizando la técnica de pinocitosis (Figura 60). La concentración de cyt c (20 μ M) utilizada para la pinocitosis fue la misma que la utilizada para demostrar la importancia del cyt c en la apoptosis en un trabajo publicado en el 2000¹⁷⁵. En tal sentido, las células que incorporaron cyt c nativo inducen la muerte por apoptosis ya que se observa una disminución en el número de células con respecto a la condición control (sin carga de proteína) (Figura 60 A y B). Por otro lado, no hubo cambio en el número de células cargadas con SO-M80 cyt c mostrando una clara localización nuclear (Figura 60 A y B). Es importante destacar que SO-M80 cyt c no es eficaz para activar a la caspasa-3 en comparación con cyt c nativo (Figura 60 C) como demuestran los ensayos *in vitro* que realizamos utilizando extracto de células Jurkat (que contienen el componente del complejo del apoptosoma, Apaf-procaspasa 9) y demás sustratos (caspasa 3). La activación del apoptosoma y posterior activación de la caspasa 3, se puede seguir por fluorescencia. Esta deficiencia en la activación del apoptosoma también se observó previamente para NO₂-Y74 y NO₂-Y97¹⁰⁰ y M80A cyt c²⁶, mutante que pierde la interacción de la Met80-Fe del hemo¹⁷⁶. En general, este resultado muestra la capacidad de conformaciones alternativas del cyt c para translocarse al núcleo sin activar la vía de muerte apoptótica, indicando que el cyt c de conformación alternativa efectivamente puede estar cumpliendo un rol a nivel del núcleo celular no relacionado con la activación de caspasas.

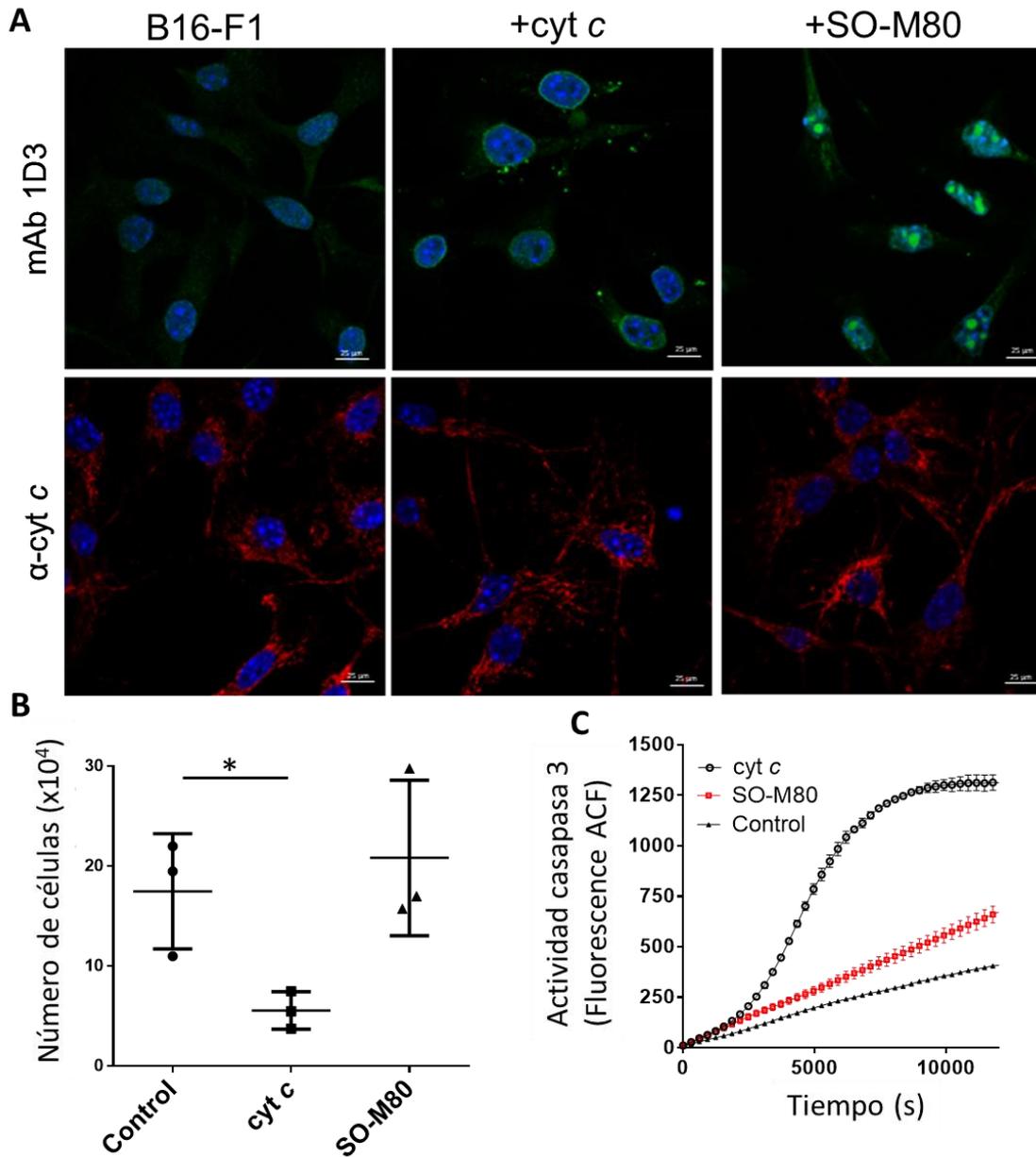


Figura 60. La carga pinocítica de células B16-F1 con SO-M80 cyt c no activa a la caspasa 3. A. Las células se cargaron o no (control) con: cyt c nativo o SO-M80 (20 μ M) mediante pinocitosis con incubación de una noche. Tras la carga, las células se fijaron y se probaron con mAb 1D3 (verde), anti-cyt c (6H2.B4, rojo) y tinción nuclear (DAPI, azul) y se analizaron mediante microscopía confocal. La escala de las barras horizontales indica 25 μ m. **B.** La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de tripán blue. No se observaron diferencias en la población celular entre el control y las células cargadas pinocíticamente con SO-M80 cyt c. *indica una diferencia estadística con $p < 0,05$. **C.** Se añadió cyt c nativo o SO-M80 cyt c (20 μ g) a extractos citosólicos de células Jurkat (2 mg/mL) en presencia de dATP y ATP. La actividad de la caspasa-3 se midió utilizando el sustrato fluorogénico DEVD-AFC a ($\lambda_{ex} = 400$ y $\lambda_{em} = 505$ nm).

IV. Conclusiones y Perspectivas

En el presente trabajo, generamos métodos para la generación y purificación de cyt *c* modificados oxidativamente de forma postraduccional. En particular, desarrollamos un método para la síntesis y purificación de cyt *c* sulfoxidado en sus metioninas y realizamos su caracterización por espectrometría de masas. Caracterizamos su actividad peroxidasa, observando que aumenta en comparación con el cyt *c* nativo y pierde la capacidad de activar al apoptosoma de igual forma que el cyt *c* nitrado.

Hemos avanzado en el concepto de que a nivel celular y bajo la acción de interacciones físico-químicas con fosfolípidos aniónicos y/o modificaciones oxidativas postraduccionales, una fracción de cyt *c*, dispara cambios conformacionales. Estas conformaciones alternativas del cyt *c* difieren significativamente del punto de vista estructural de la conformación nativa, pierden la interacción Met80-Fe del grupo hemo y eventualmente participan en nuevas funciones. En particular, las conformaciones alternativas pueden ganar reactividad con peróxidos y eventualmente transformarse en un sensor o mediador redox intracelular. Observamos que la proteína pierde la capacidad de activar el apoptosoma en dicha conformación, lo que le otorga la ventaja de ser un mensajero a nivel celular sin la activación de la apoptosis (Figura 61).

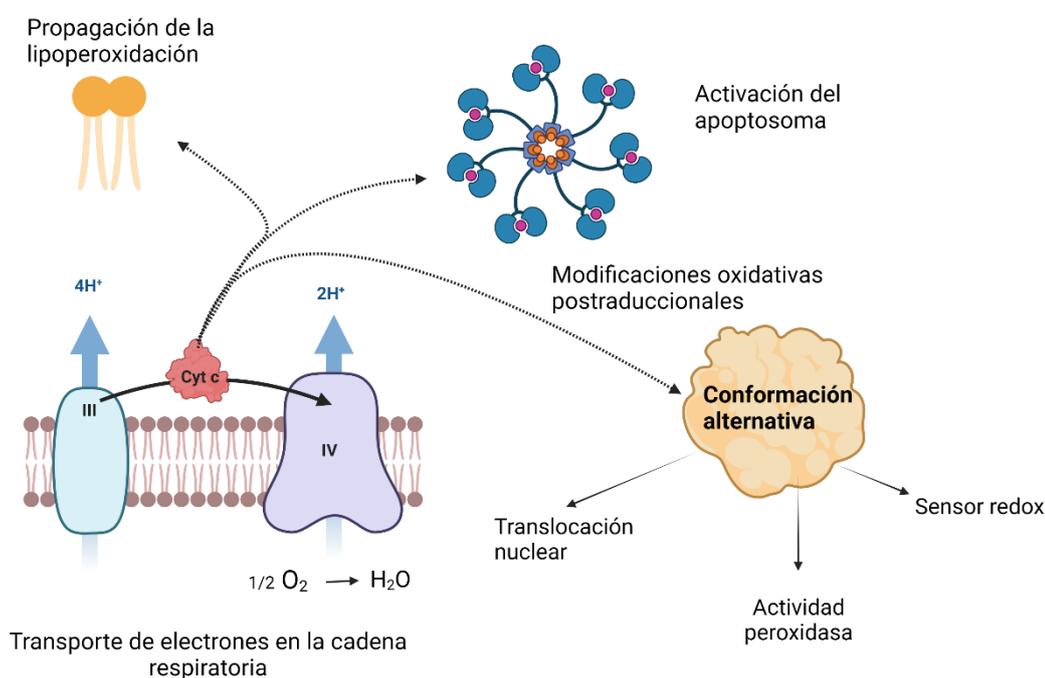


Figura 61. Modificada de ². Se resumen diferentes actividades y funciones que cumple el cyt *c* en conformación nativa (proteína roja) o en conformación alternativa (proteína amarilla).

Observamos que el complejo cyt *c* cardioplipina expuesto a peroxinitrito se nitra más que el cyt *c* en solución, indicando que en un contexto de aumento en la concentración de oxidantes se podrían formar especies nitradas. Estas nuevas especies aumentan su afinidad por la cardioplipina lo que aumentaría la concentración de cyt *c* en la membrana. El cyt *c* unido a cardioplipina tiene actividad peroxidasa para los hidroperóxidos de cardioplipina, indicando que no solo podría oxidar a la cardioplipina utilizando H₂O₂, sino que además, sería capaz de catalizar y propagar la oxidación lipídica a nivel de la membrana mitocondrial (Figura 62).

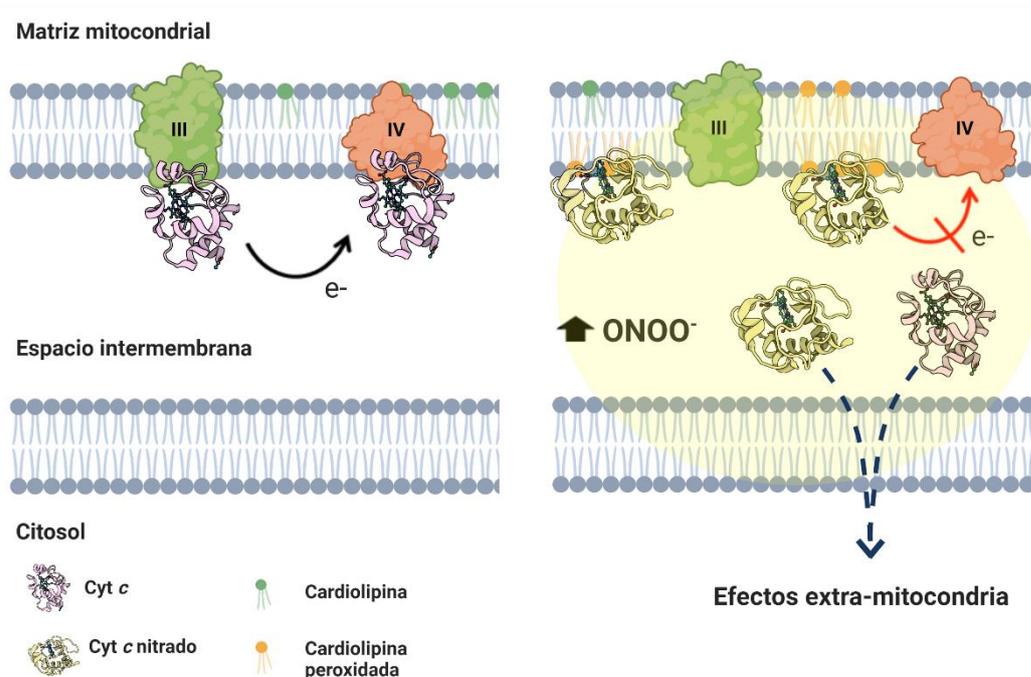


Figura 62. Hipótesis sobre el efecto de un aumento de peroxinitrito a nivel mitocondrial y el efecto sobre el cyt *c* en presencia de cardiolipina. Esta figura adaptada fue utilizada en ¹⁷⁷ (ver Anexo II).

El conjunto de resultados y conclusiones presentados hasta el momento fueron documentados en trabajos derivados de esta tesis en la literatura científica internacional (Anexo II).

En una segunda parte, realizamos la caracterización bioquímica del mAb 1D3, confirmando su unión al cyt *c* con modificación oxidativa postraducciona, ampliando las proteoformas descritas anteriormente para el anticuerpo. Dada la importancia en el reconocimiento de conformaciones alternativas, se reconstruyó el anticuerpo de forma recombinante. Se secuenciaron las cadenas livianas y pesadas para finalmente producir de forma soluble el anticuerpo recombinante R1D3 en células eucariotas. El anticuerpo mAb 1D3/R1D3 reconoce un epítoto conformacional de la proteína que se pierde al desnaturalizarla y debido a ello solo fue utilizado en solución en diferentes ELISAs y en estudios inmunquímicos utilizando procedimientos de fijación cuidadosamente controlados^{166,178}. En este trabajo, mostramos que el anticuerpo también puede ser utilizado en ensayos de inmunoprecipitación como se observó por la unión del mAb 1D3 a conformaciones alternativas del cyt *c* en solución y posterior separación por cromatografía de exclusión molecular, así como también mediante el reconocimiento del cyt *c* en extractos celulares utilizando cromatografía de afinidad. De esta manera, estudios futuros nos permitirán la identificación de conformaciones alternativas del cyt *c* a nivel celular mediante inmunopurificación y posterior análisis por espectroscopia de masas.

Otras modificaciones no-oxidativas postraduccionales como la fosforilación de diferentes residuos de Ser, Thr y Tyr y la acetilación de Lys, han sido detectadas en diferentes tejidos^{105,117,179}. Esta falta de reconocimiento de los fosfo- y acetil-miméticos de cyt *c* (utilizados en este estudio) por el mAb 1D3/R1D3 es importante caracterizar, ya que estas PTMs reversibles representan las modificaciones más frecuentes de cyt *c* en células y tejidos¹⁰⁵. Existen otros

fosfo-miméticos que se utilizan en la literatura alternativos a las mutaciones que utilizamos en esta tesis, en el futuro cercano serán evaluados para corroborar la falta de reconocimiento^{180,181}.

Los resultados obtenidos de la dinámica molecular del cyt c de conformación alternativa, sugieren que los cambios en la posición de la sexta coordinación en la cavidad axial tienen repercusiones en la dinámica de la proteína que pueden rastrearse más allá de esta región, lo que resulta en una exposición significativa de los loops 22-29, 40-57 y 70-80. Tomando todos los datos, pensamos que estas variaciones, junto con la ganancia de flexibilidad en otros loops, pueden representar la base molecular del reconocimiento de mAb 1D3/R1D3 de conformaciones alternativas de cyt c. De manera de confirmar la región de unión del anticuerpo a las conformaciones alternativas, realizaremos en colaboración con el Dr. Buschiazzi (Unidad de Cristalografía de Proteínas, Instituto Pasteur), la cristalización del complejo SO-M80/mAb1D3.

En esta tesis evaluamos el efecto en el cyt c frente a un aumento de oxidantes a nivel celular. Utilizamos tres modelos celulares diferentes en este trabajo: la adición exógena de oxidantes, generación endógena de oxidantes y la incorporación de cyt c previamente modificado oxidativamente.

En el primer modelo, frente al tratamiento con peroxinitrito y peróxido de hidrógeno, observamos daño en el ADN y señal de apoptosis celular. Sin embargo, detectamos la translocación al núcleo del cyt c de conformación alternativa en etapas más tempranas lo que indicaría un posible rol como señalizador redox en este nuevo compartimento mediante su actividad peroxidasa. Esta translocación al núcleo celular luego del tratamiento con oxidantes se observa en las diferentes líneas celulares utilizadas sugiriendo que la respuesta no depende en principio del tipo celular.

Las células B16-F1 de melanoma senescente por tratamiento con quimioterapia, producen de manera endógena oxidantes. En este modelo, observamos también una translocación de cyt c al núcleo celular.

Con el fin de mostrar de forma inequívoca la localización de conformaciones alternativas de cyt c en los núcleos celulares, realizamos pinocitosis de cyt c nativo y/o SO-M80 en células B16-F1, de la misma forma a la realizada previamente¹⁷⁵. En las células cargadas con cyt c nativo, se observa una disminución del número de células debida a la inducción de la muerte por apoptosis por la presencia de cyt c nativo a nivel del citoplasma celular como se reporta previamente¹⁷⁵. Sin embargo, para las células cargadas con SO-M80, se observa una fuerte localización nuclear del cyt c SO-M80 sin disminución del número de células. Esto está indicando que al igual que lo observado para el mutante M80A²⁶ o para las proteoformas nitradas¹⁷⁰ el SO-M80 no es eficiente en activar el apoptosoma lo que le permite ser un perfecto mensajero entre la mitocondria y el núcleo celular.

El papel biológico de las conformaciones alternativas de cyt c presentes en los núcleos celulares es todavía difícil de establecer, pero puede implicar la regulación de la expresión génica y el pre-acondicionamiento de las células para hacer frente a un mayor estrés oxidativo, como se sugirió previamente²⁶. De hecho, en las células tratadas con oxidantes, observamos cambios en la expresión celular (observado por SILAC), estamos trabajando en la realización de un transcriptoma para obtener una mirada general en cuanto a la magnitud del cambio de la expresión génica. Actualmente, estamos en proceso de realizar ensayos de Chip-DNA-sequence de forma de averiguar si el cyt c se une al ADN nuclear y si lo realiza, identificar de manera específica la o las secuencias de ADN blanco. También es interesante considerar que la actividad

peroxidasa de los cyt *c* de conformación alternativa en los núcleos podría catalizar la oxidación de los nucleótidos y promover el daño del ADN, incluidas las roturas de la cadena de ADN¹⁸². La activación de la respuesta al daño del ADN, se evidencia en las células B16-F1 junto con la translocación del cyt *c* a los núcleos, lo que sugiere que estas conformaciones alternativas podrían desempeñar un papel en la señalización retrógrada mitocondrial, comunicando el estado mitocondrial a los núcleos y conduciendo a cambios en la expresión génica.

La reconstrucción del mAb R1D3 permitirá seguir dilucidando en profundidad la existencia y rol biológico de conformaciones alternativas de cyt *c* a nivel celular y tisular, integrando el conocimiento de la dinámica y la plasticidad de las proteínas, con la identificación de estructuras y funciones no canónicas del cyt *c* *in vivo*.

V. ANEXO I

Generación de un anticuerpo policlonal que reconozca conformaciones alternativas del cyt c

El inmunógeno utilizado fue previamente descrito por Jemmerson¹⁶⁶ y consiste en fijar la conformación alcalina del cyt c de forma covalente a la ovoalbúmina (OVA) utilizando glutaraldehído.

Formación y caracterización del inmunógeno a utilizar

El inmunógeno a utilizar para la generación de los anticuerpos policlonales corresponde con el cyt c de conformación alcalina unido a OVA a pH fisiológico.

Utilizando como base el protocolo utilizado por el Dr. Jemmerson, se probaron diferentes condiciones para fijar la conformación alcalina testeando distintas concentraciones de glutaraldehído y tiempos de incubación. La Figura A1 corresponde con el SDS-PAGE de los productos de las diferentes reacciones testeadas.

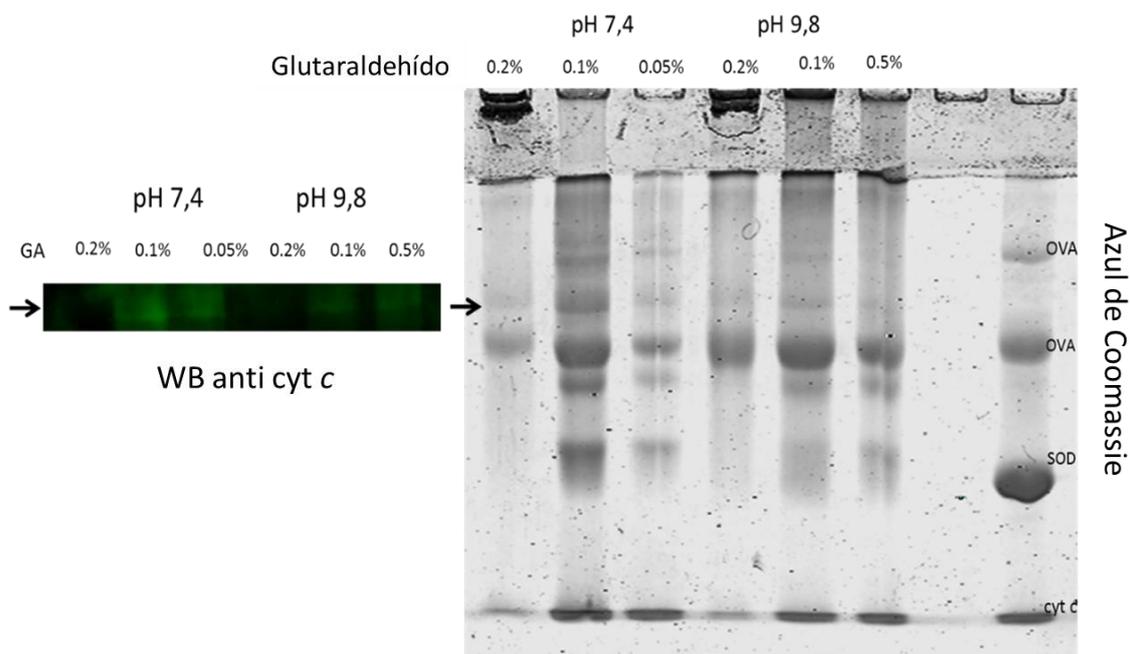


Figura A1. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12%. Diferentes condiciones se probaron para poner a punto la formación del inmunógeno. Se reveló con azul de Coomassie (derecha), en la izquierda se reveló con anticuerpo anti-cyt c.

Las muestras sembradas (12 μ g), corresponden a distintas concentraciones de glutaraldehído (0.2%, 0.1%, 0.05%), obtenidas luego de 10 min de reacción con la OVA. Se observa, que para una concentración de 0.2 % de glutaraldehído, se forman agregados de proteína de peso moleculares mayores, que no ingresan al gel. Se indica con la flecha el aducto de cyt c-OVA. Se verificó que ese era el aducto mediante un western blot anti-cyt c (Figura A1, panel izquierdo). Asimismo, se tomó como procedimiento a seguir para los posteriores experimentos, una

concentración de glutaraldehído al 0.1 % durante 10 minutos, puesto que se observó que con concentraciones mayores de glutaraldehído las muestras precipitaban, así como también con tiempos mayores de incubación. Para conocer la composición del aducto cyt-OVA, se realizó un gel de agarosa nativo (Figura A2) porque de esta forma se pueden separar proteínas de diferente carga a pH 8.3. El cyt *c* se encuentra con carga positiva a dicho pH (tiene un pI cercano a 10). En cambio, la ovalbúmina está cargada negativamente.

El gel de agarosa revela que el cyt *c* tratado con glutaraldehído y ovalbúmina, forma un aducto, que queda cargado negativamente, y que la relación peso/carga del aducto con respecto a la ovalbúmina es mayor, puesto que migra menos.

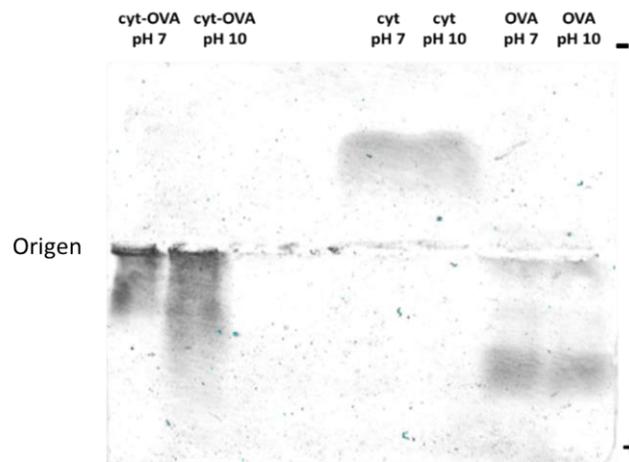


Figura A2. Electroforesis nativa de muestras de cyt *c* y/o OVA. Las muestras fueron tratadas con glutaraldehído en presencia o ausencia de OVA, la reacción se realizó a diferentes pHs (7 ó 10). Se sembraron en un gel de agarosa 0.5 % revelado con azul de Coomassie. Se indica con una flecha donde se sembró las muestras. El cátodo señalado como (-) y el ánodo (+).

El espectro de absorción del cyt *c*-OVA se muestra en la Figura A3. Como se observa, el espectro obtenido del cyt *c* a pH 7.4 muestra la banda a 695 nm la que se pierde a pH mayores de 9 (conformación alcalina).

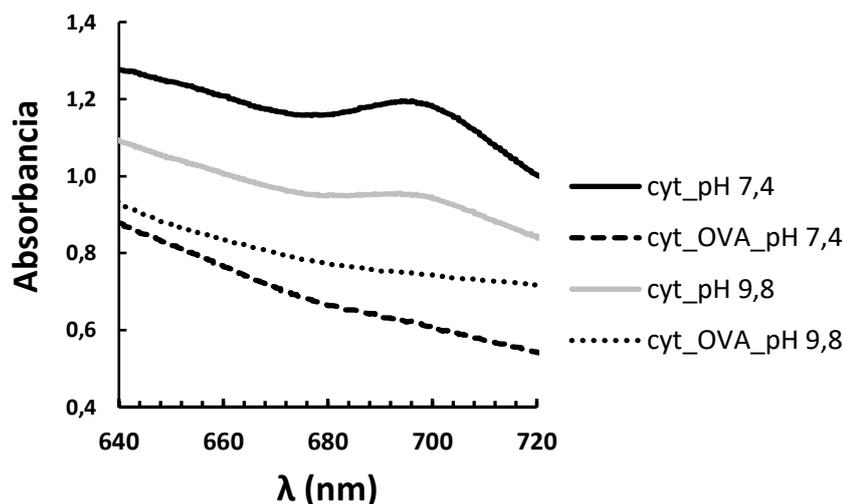


Figura A3. Espectros de absorción para el cyt c a pH 7.4 y pH 10, y cyt-OVA unido a pH 7.4 y cyt c-OVA unido a pH 10, a pH 7.4.

Se realizó un control en donde en vez de fijar al cyt c en conformación alcalina (pH 9.8), se fijó a la OVA a pH 7.4 (cyt c-OVA pH 7.4). Los espectros obtenidos muestran que el cyt c-OVA a pH 10 (conformación alcalina) pierde la banda a 695 nm, pero ese proceso también ocurre con el cyt c unido a OVA a pH 7.4. Estos resultados indican que el proceso de unión con glutaraldehído del cyt c a OVA induce la ruptura del enlace de coordinación del cyt c Fe-M80.

A continuación, se caracterizó la actividad peroxidasa del cyt c-OVA ya que si encuentra en conformación alcalina, se esperaría una exposición mayor del hemo y por tanto una mayor accesibilidad del H₂O₂ con aumento en la actividad peroxidasa. Se determinó la actividad peroxidasa a pH 7.4 del cyt c y de las variantes del inmunógeno obtenidas a diferentes pHs (cyt-OVA pH 7.4, cyt-OVA pH 10). El ensayo se realizó utilizando la sonda fluorescente Amplex Red en presencia de H₂O₂ (25 μM). El aducto cyt-OVA pH 9.8 aumenta la actividad peroxidasa en tres veces en comparación al cyt c nativo. Otro dato interesante, es que el tratamiento *per se* del cyt c a pH 9.8 con glutaraldehído sin OVA (cyt c-glut pH 9.8), induce un cambio en el cyt c que genera un aumento en la actividad peroxidasa. Como controles adicionales, se verificó que ni la OVA ni el glutaraldehído generan un aumento en la actividad peroxidasa.

Esta reportado que el cyt c tiene un sitio de unión a fosfato inorgánico (Pi). Si el Pi se une en dicha región, se inhibe la actividad peroxidasa. De esta manera, se puede conocer si la unión del cyt c a la OVA involucra ese sitio de la proteína. La región reportada de sitio de unión al Pi, incluye a la Lys86 y 87, la Thr89 y la Arg91. Tanto las lisinas como la arginina tienen grupos aminos libres que pueden reaccionar con los aldehídos del glutaraldehído y formar enlace covalente. De esta manera, si se caracteriza la actividad peroxidasa de las distintas variables de los cyt c a diferente concentración de Pi, se puede determinar si efectivamente el glutaraldehído se une en dicha región. Para todos los cyt c tratados con glutaraldehído se observa una dependencia con el aumento en la concentración de Pi (Figura A4). Sin embargo, la actividad peroxidasa del cyt c unido a OVA a pH 10 no se inhibe, lo que podría indicar que la unión del glutaraldehído con el cyt c y la OVA, a este pH, incluiría la unión a través de las Lys y/o la Arg del sitio de unión a Pi.

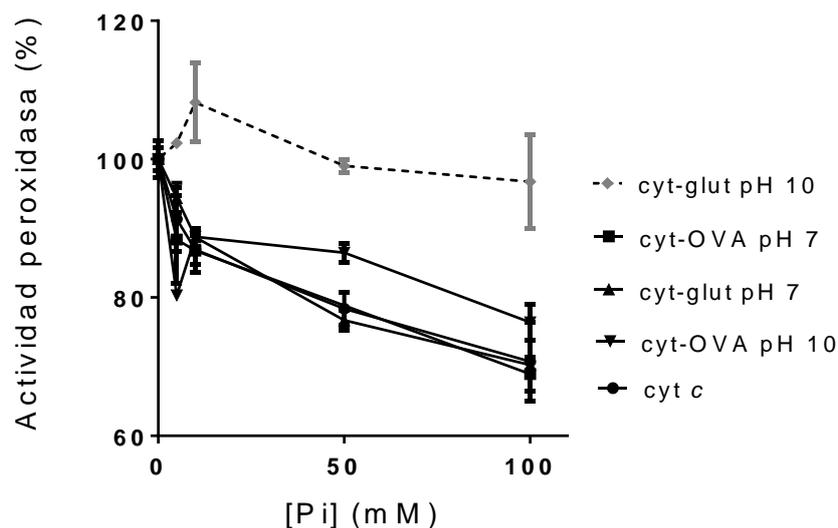


Figura A4. Efecto de la concentración del Pi en cyt *c* unidos a OVA. Se determinó la actividad peroxidasa de cyt *c* a diferente concentración de Pi a pH 7.4. La actividad peroxidasa se determina siguiendo la oxidación del AmplexRed (50 μ M) en presencia de cyt *c* (1 μ M), H₂O₂ (12 μ M) y de Pi (5-100 mM). Se muestran los resultados como % de actividad peroxidasa con respecto a la actividad obtenida a una concentración inicial de 5 mM Pi.

Para verificar que la conformación del cyt-OVA obtenido a pH 10 se encuentra en conformación alcalina y sirva para el desarrollo de anticuerpos policlonales se realizó una ELISA competitiva. Se compite la unión del mAb 1D3 con el agregado de diferentes concentraciones de cyt *c* modificados (NO₂ Y74 cyt *c* y NO₂ Y97 cyt *c*) y nativo (Figura A5).

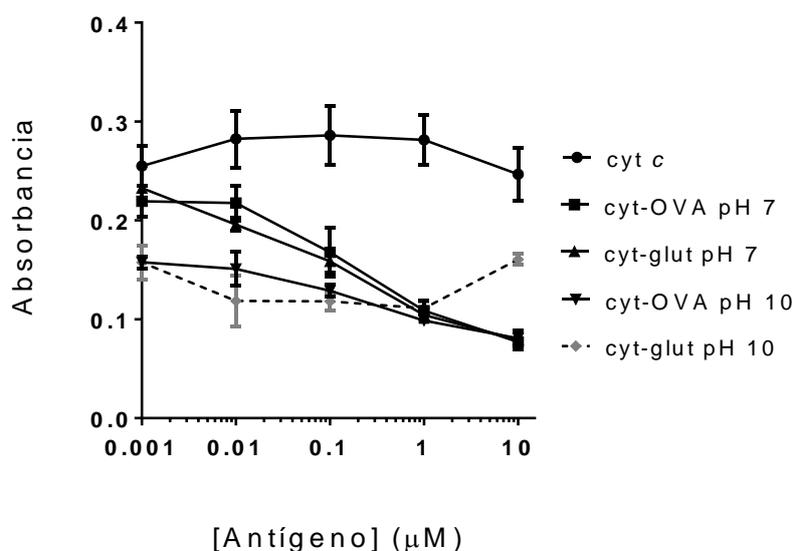


Figura A5. Unión del inmunógeno al mAb 1D3. Elisa competitiva, en todos los casos la placa fue sensibilizada con cyt *c* (0.5 μ M), mAb 1D3 (1:8000 de una solución 1.44 mg/mL) y revelada con OPD registrando la absorbancia a 450 nm. Los competidores corresponden con cyt *c* nativo, tratado con glutaraldehído unido a OVA a pH 7 ó pH 9.8 ó en ausencia de OVA.

El resultado obtenido en el ELISA competitivo, como ya estaba reportado, el 1D3 no se une a cyt *c* nativo, pero si se observa que se une tanto para el aducto formado cyt *c*-OVA pH 9.8, así como también para pH 7. Adicionalmente en congruencia con los anteriores experimentos, se observa que el mero tratamiento con glutaraldehído genera una nueva conformación en el cyt *c* que es reconocida por el anticuerpo (Figura A5).

En conclusión, se obtuvo y caracterizó el inmunógeno a utilizar para la generación de anticuerpos policlonales que reconozcan conformaciones alternativas del cyt *c* (como la conformación alcalina). Se estableció una concentración de glutaraldehído al 0.1%, durante 10 minutos. Se verificó la presencia de aductos tanto dímeros de cyt *c*, así como cyt *c* unido a OVA. El cyt-OVA pH 9.8, pierde la banda a 695 nm, aumenta su actividad peroxidasa en más de 3 veces, y es reconocido por el mAb 1D3. Todas estas características del inmunógeno nos permiten confirmar que se pudo fijar la conformación alcalina a pH fisiológico.

Obtención de un anticuerpo poli-clonal anti conformación alternativa del cyt *c*

Utilizando el inmunógeno anteriormente descrito, se siguió el protocolo como se detalla en materiales y métodos. Durante la inmunización, se fue siguiendo el título de los anticuerpos policlonales en el suero mediante ELISA indirecta. Las placas fueron sensibilizadas con cyt *c* (10 μ M) y se cuantificó el título de anticuerpos en el suero a los diferentes tiempos. Con este dato se decidió realizar hasta una tercera inmunización de manera de poder tener un mayor número de anticuerpos anti cyt *c*. A los 15 días luego de la tercera inmunización, se obtuvo el suero del conejo y se empezaron los primeros pasos para la purificación y obtención de los anticuerpos policlonales anti-cyt *c* de conformación alcalina. Los anticuerpos generados reconocen tanto cyt *c* de conformación nativa como cyt *c* de conformación alternativa, por lo que se debió purificar los últimos de la muestra. Como estrategia para la purificación de estos anticuerpos que reconocen cyt *c* modificado, se utilizó una columna conteniendo un péptido correspondiente a la región del loop que contiene a la prolina 44¹⁶⁶, puesto que dicha región suele exponerse de manera inmunogénica en los cyt *c* de conformación alternativa como se señala en la Figura A6². Se realizaron análisis computacionales de la estructura mostrando que las conformaciones alternativas (aquellas que rompen la interacción Fe-M80) tienen mayor flexibilidad en el loop que contiene a la prolina 44, así como en el loop 22-29, lo que permite que los anticuerpos que reconozcan estas conformaciones se unan en esta región (Figura 40).

Posteriormente, se realizó una segunda selección con una columna unida a cyt *c* nativo. Se colectaron los anticuerpos que eluyen de la columna (no reconocen cyt *c* nativo). En el esquema (Figura A6, panel A) se visualiza la estrategia experimental para obtener los anticuerpos policlonales de anti-cyt *c* de conformación alternativa no nativa.

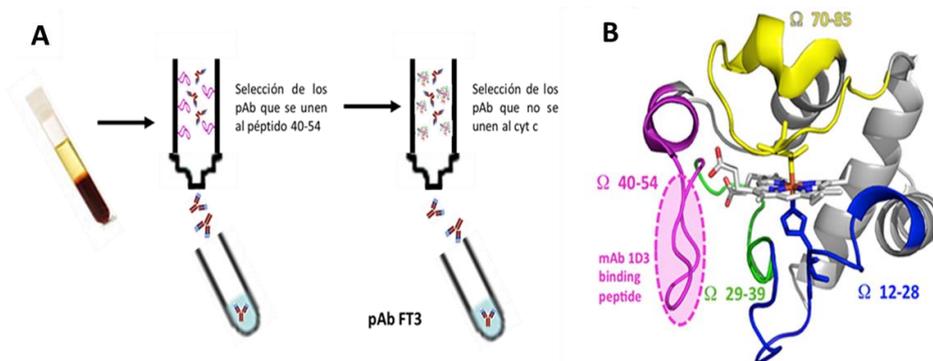


Figura A6. A. Procedimiento para la selección de los anticuerpos policlonales (pAb FT3) que no se unen a *cyt c* de conformación alternativa (péptido inmunogénico), pero no al *cyt c* de conformación nativa. **B.** Imagen tomada de la referencia². Estructura del *cyt c* de caballo (PDB: 1HRC). Con los diferentes colores se señala los loops del *cyt c* y en violeta se indica la zona inmunológica donde reconoce el mAb 1D3 al *cyt c* de conformación alternativa.

Para caracterizar los anticuerpos purificados, se realizaron ELISAS competitivas, contra *cyt c* nativo y modificado oxidativamente (Figura A7). Simultáneamente se realizó control con el anticuerpo mAb 1D3, que previamente se caracterizó.

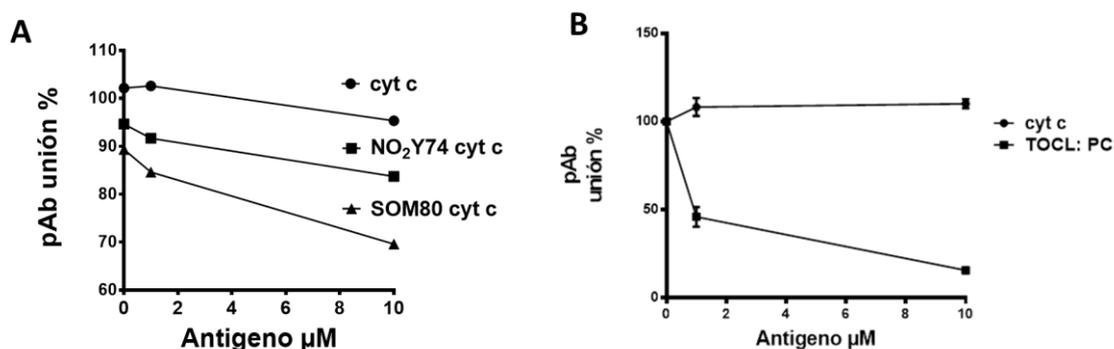


Figura A7. Caracterización inmunquímica de pAb anti *cyt c* de conformación alternativa. En todos los casos la placa fue sensibilizada con *cyt c* (0.5 μM) y revelada con OPD registrando la absorbancia a 450 nm. **A.** Elisa competitiva con diferentes *cyt c* puros de conformación alternativa (*cyt c*, SOM80-*cyt c* y NO₂Y74-*cyt c*) con una concentración de mAb 1D3 0.08 μg . Los resultados se expresan en % con respecto a la unión del anticuerpo a la placa sensibilizada. **B.** ELISA competitiva de *cyt c* unido a liposomas de cardiolipina (TOCL/DOPC). La placa es sensibilizada con *cyt c* (0.5 μM) y se compete mAb 1D3 (~0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de manera soluble con *cyt c* (10 μM) con liposomas (200 μM) o sin liposomas (*cyt c*).

Como se observa en los ELISA competitivos, el anticuerpo policlonal purificado (pAb FT3) no se une a *cyt c* nativo, pero si a *cyt c* nitrado o sulfoxidado (Figura A7, panel A). Se realizó otro ELISA competitiva, pero usando como competidor *cyt c* unido a liposomas de TOCL:PC, en una relación *cyt c*/TOCL:PC, 1 a 20. Se observa que al igual que con el mAb 1D3, el pAb FT3 se une al *cyt c* que está unido a cardiolipina (Figura A7, panel B).

Finalmente, se realizó un dot blot de los diferentes *cyt c* modificados y se probaron con el pAb FT3 (Figura A8). Como se observa, el pAb FT3 reconoce a los *cyt c* modificados, pero con menor intensidad al *cyt c* nativo. Para este anticuerpo, hay reconocimiento de *cyt c* desnaturalizado (dot 5).

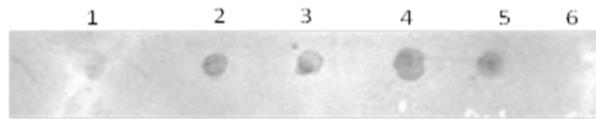


Figura A8. Inmunodetección con pAb FT3 mediante Dot Blot. Se sembraron 1 µg de diferentes proteínas (1. cyt c, 2. NO₂74Y cyt c, 3. NO₂97Y cyt c, 4. cyt c nitrados, 5. cyt c desnaturalizado, 6. alfa-sinucleína). El primario correspondió con una dilución 1/1000 de pAb FT3.

En conclusión de esta sección, se pudo obtener un anticuerpo policlonal de conejo que no reconoce cyt c nativo, y que es capaz de reconocer a otros cyt c de conformación alternativa, tanto a cyt c de conformación alcalina (cyt-OVA pH10), unido a CL, así como también cyt c modificados oxidativamente.

VI. ANEXO II

Resultados en publicaciones en revistas internacionales

El conjunto de resultados obtenidos en el trabajo de la tesis han sido revisados y documentados en los siguientes artículos de revistas internacionales.

De novo sequencing and construction of a unique antibody for the recognition of alternative conformations of cytochrome c in cells.

Florencia Tomasina, Jennyfer Martínez, Ari Zeida, María Laura Chiribao, Verónica Demicheli, Agustín Correa, Celia Quijano, Laura Castro, Robert H. Carnahan, Paige Vinson, Matt Goff, Tracy Cooper, Hayes W. McDonald, Natalie Castellana, Luciana Hannibal, Paul T. Morse, Junmei Wan, Maik Hüttemann, Ronald Jemmerson, Lucía Piacenza and Rafael Radi.

PNAS. 2022; 119 (47) e2213432119

<https://doi.org/10.1073/pnas.2213432119>

Cardiolipin interactions with cytochrome c increase tyrosine nitration yields and site-specificity.

Verónica Demicheli, Florencia Tomasina F, Santiago Sastre, Ari Zeida, Verónica Tórtora, Ana Lima, Carlos Batthyány, Rafael Radi. *Demicheli y Tomasina son co-autoras

Arch Biochem Biophys. 2021; 703:108824.

doi: 10.1016/j.abb.2021.108824.

Active Site Structure and Peroxidase Activity of Oxidatively Modified Cytochrome c Species in Complexes with Cardiolipin.

Daiana A. Capdevila, Santiago Oviedo Rouco, Florencia Tomasina, Verónica Tortora, Verónica Demicheli, Rafael Radi and Daniel H. Murgida

Biochemistry. 2015. 54, 51, 7491–7504.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00922>

Specific methionine oxidation of cytochrome c in complexes with zwitterionic lipids by hydrogen peroxide: potential implications for apoptosis.

Daiana A. Capdevila, Waldemar A. Marmisolle, Florencia Tomasina, Verónica Demicheli, Magdalena Portela, Rafael Radi and Daniel H. Murgida

Chemical Science. 2015 Jan 1; 6(1): 705–713.

doi: 10.1039/c4sc02181a

[Revisiones relacionadas de la tesis](#)

Alternative Conformations of Cytochrome c: Structure, Function, and Detection.

Luciana Hannibal, Florencia Tomasina, Daiana Capdevila, Verónica Demicheli, Verónica Tórtora, Damián Álvarez-Paggi, Ronald Jemmerson, Daniel H. Murgida, Rafael Radi.

Biochemistry. 2016 Jan 26;55(3):407-28.

doi: 10.1021/acs.biochem.5b01385.

Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog.

Alvarez-Paggi D, Hannibal L, Castro MA, Oviedo-Rouco S, Demicheli V, Tórtora V, Tomasina F, Radi R, Murgida DH.

Chem Rev. 2017; 117(21):13382-13460.

doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00257.

[Otras publicaciones relacionadas de la tesis](#)

El aporte en estas publicaciones correspondió con la síntesis y purificación de especies nitradas puras, y el posterior análisis y discusión de los resultados.

Decreased proteasomal cleavage at nitrotyrosine sites in proteins and peptides.

Ott C, Tomasina F, Campolo N, Bartesaghi S, Mastrogiovanni M, Leyva A, Batthyány C, Meinel W, Grune T, Radi R.

*Otto, Tomasina y Campolo son co-autores

Redox Biol. 2021 Oct; 46:102106.

doi: 10.1016/j.redox.2021.102106.

Electron transfer and conformational transitions of cytochrome c are modulated by the same dynamical features.

Oviedo-Rouco S, Perez-Bertoldi JM, Spedalieri C, Castro MA, Tomasina F, Tortora V, Radi R, Murgida DH.

Arch Biochem Biophys. 2020;680:108243.

doi: 10.1016/j.abb.2019.108243.

The alkaline transition of cytochrome c revisited: Effects of electrostatic interactions and tyrosine nitration on the reaction dynamics.

Oviedo-Rouco S, Castro MA, Alvarez-Paggi D, Spedalieri C, Tortora V, Tomasina F, Radi R, Murgida DH.

Arch Biochem Biophys. 2019; 665:96-106.

doi: 10.1016/j.abb.2019.02.016.

VII. Materiales y Métodos

Obtención de conformaciones alternativas del cyt c:

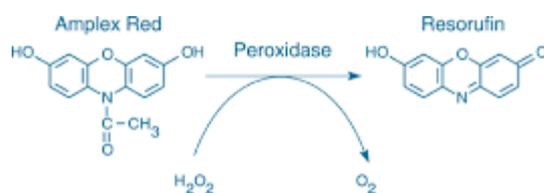
Crosslinkin cyt c ovalbúmina.

Para la obtención de conformaciones alternativas del cyt c se llevó a cabo la unión de ovoalbúmina a cyt c a pH 10, con la intención de fijar la conformación alcalina del cyt c y ser este el inmunógeno para la obtención de un nuevo anticuerpo policlonal. Para la unión del cyt c con la ovalbúmina y fijación de la conformación alcalina se incubaron en buffer bicarbonato (0.5 M, pH 9), 4 mg de cyt c con 4 mg de ovalbúmina (OVA) conteniendo 0.1% de glutaradehído. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 10 min y luego se desala por columna PD-10 para quitar el exceso de glutaradehído y dejar la muestra en buffer fosfato (65 mM, pH 7.4).

De las muestras obtenidas se realizaron geles de SDS-PAGE al 12 % de entrecruzamiento. Se sembraron 10 μ g de proteína por carril en buffer desnaturalizante (SDS, UREA), en buffer de la muestra desnaturalizante. Se realizaron geles de agarosa nativos al 0.5 %, en este caso se usó un buffer de la muestra no desnaturalizante.

Evaluación de la actividad peroxidática del cyt c

La actividad peroxidática se monitoreó empleando el reactivo Amplex UltraRed (Invitrogen). El producto de oxidación fluorescente, resorufina fue monitoreado a $\lambda_{ex} = 585$ nm con $\lambda_{em} = 570$ nm (ver esquema 1). Cyt c (1 μ M) en buffer fosfato (10 mM pH 7.4) más 50 μ M Amplex Red y 25 μ M de H_2O_2 fueron agregados al ensayo. La fluorescencia de la resorufina formada fue registrada usando un lector de placas fluorescente (Varioskan Flash multimode Reader (Thermo)).



Esquema 1. Oxidación de la sonda AmplexRed por parte de una peroxidasa oxidada por peróxido de hidrógeno a su producto Resurfina.

Generación de los Anticuerpos policlonales.

La producción de los policlonales se realizó en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República bajo protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) con número de aprobación 071140-000771-11. Se inmunizó a un conejo en cuatro oportunidades con el inmunógeno cyt-OVA pH 10 en todas las oportunidades acompañadas de adyuvante de Freund completo. Se evaluó el título de anticuerpos anti-cyt c del conejo previo a su desangre, verificando así la generación de anticuerpos. Se evaluó mediante ELISA indirecto. Se sembró en la placa cyt c (10 μ M) y se lo dejó adsorber toda la noche a 4°C. Al otro día se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 (0.05% v/v) y luego se incuban diferentes concentraciones de suero extraído del conejo inmunizado, se deja reaccionar

por 1 hora a 37°C, luego se lavó nuevamente la placa por tres oportunidades con PBS-Tween 0.05%. Se incubó nuevamente con anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a Hrp. Se dejó incubando por una hora a 37°C, luego se lavó el anticuerpo no unido, y se incubó con una solución de H₂O₂ y o-Phenylenediamine (OPD), se corta la reacción con Ácido sulfúrico y se midió absorbancia a 492 nm.

Se desangró posterior a 15 días de la última inmunización, y se obtuvo 42 mL de suero. Se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 50 %, se deja por 6 horas a temperatura ambiente agitando con magneto. Se centrifuga por 10.000 x g por 30 min, a temperatura ambiente. El pellet contiene los Ac. Se guarda el sobrenadante (sobrenadante 1). Se resuspende el precipitado con PBS (50 mL). Para quitar el sulfato de amonio, se realiza una diálisis contra PBS (se realizaron 8 lavados con PBS durante 24 horas, a 4°C). Posteriormente, se concentra utilizando centricones (filtro con cut off de 10.000 Da). Para quitar la albúmina del sobrenadante, se realiza una extracción en batch con DE-52 (aniónico en batch). Para preparar la matriz se quita la lactosa del DE-52 y se prepara la matriz. 500 g DE-52 en 1.5 mL 0.1 N HCl. Después que decanta, si el pH es menor a 2, se repone con nuevo 0.1 N HCl. Si el pH está mayor a 2, se cambia por 0.1 M Tris-HCl pH 8 (2 ó 3 veces). Luego se lava con agua y luego 3 con 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Antes de usar se centrifuga a 1000 x g, 1 min, se saca el buffer y se coloca por cada 2,5 g de resina seca, 500 µL de suero. Se deja por una hora a 4 °C agitando lentamente. Se centrifuga la mezcla a 1000 x g 1 min, 4 °C. Se guarda el sobrenadante que contiene los Ac purificados. Para la purificación de los Ac se activa la matriz CN-Br con la secuencia del cyt c 40'-TGQAPGFYTDANKNK- 54` (péptido sintético) para esto se lava con NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3- 8.5. (5 mL por gramo de resina, 10 mL en mi caso). Antes se prepara el péptido en NaHCO₃ 0.1 M, 0.5 M NaCl pH 8.3- 8.5, V= 5 mL, m= 14 mg. Se deja la resina con el péptido agitando toda la noche a 4°C. Se realiza lavado con Tris 10 mM, pH 7.5, posterior lavados con Gly pH 2.5, lavados con Tris pH 8.8, lavados con etanolamina pH 11.5, y nuevamente Tris pH 7.5. Se realiza una unión en batch del suero con la matriz que contiene el péptido sintético toda la noche a 4°C. Nuevamente se lava la columna con buffer Tris 7.5. Se realiza una elución ácida con Gly pH 2.5, y un elución básica con etanolamina pH 11.5. Ambas eluciones se guardan (corresponden con la fracción FT2). La fracción FT2, es nuevamente pasada por una columna CN-Br activada, unida a cyt c nativo, se realiza igual procedimiento, con la pequeña modificación, que los anticuerpos que se conservan son aquellos que no se unen al cyt c nativo (fracción FT3).

ELISA competitiva.

Para el caso de ELISA competitivo, se adsorbe a la placa de ELISA cyt c (1 mM), y se lo dejó toda la noche a 4°C. Luego de tres lavados con PBS-Tween 0.05% se incubó con los diferentes anticuerpos a ser testeados (mAb 1D3, R1D3 ó FT3) y diversos cyt c modificados solubles (10 µM) de manera simultánea, se los dejó por 1 h a 37°C. Los cyt c modificados solubles compiten por la unión del mAb o pAb al cyt c unido a la placa. Se lavó nuevamente la placa por tres oportunidades con PBS-Tween 0.05%. Luego se incubó con anticuerpo secundario conjugado a Hrp, anticuerpo anti ratón para el caso de los monoclonales o de conejo o para el caso del policlonal, se deja incubando por 1 h a 37°C, luego se lava el anticuerpo no unido, y se incubó con una solución de H₂O₂ y o-Phenylenediamine (OPD), se corta la reacción con ácido sulfúrico y se mide a 492 nm.

Dots blots.

Se utiliza membrana de nitrocelulosa y en él se siembran las diversas proteínas 1 µM, las muestras se secan sobre la membrana, se bloquea con 0.5 % de PBS leche (1 hora a temperatura

ambiente), se lava con PBS-Tween 0,1%, y se incuba el anticuerpo mAb o pAb en PBS dilución 1/5000, se lo deja a 4°C toda la noche, se lava nuevamente, para posterior incubación con anticuerpo secundario conjugado a fluoróforos que emiten en el infrarrojo (IRE 680 Y 800 LICOR). Se revela con detector Oddysey.

Sulfoxidación de la Met80 del cyt c y Nitración de cyt c.

La nitración de cyt c se realizó por reacción con peroxinitrito, con modificaciones menores como se describe⁹³. Se añadió peroxinitrito a cyt c (67 mM) en fosfato de potasio (200 mM, pH 7), NaHCO₃ (25 mM) y DTPA (100 μM) a 25 °C como flujo continuo (0.13 mM min⁻¹) usando un motor- jeringa accionada (SAGE Instruments, Boston, MA), bajo agitación vigorosa. La reacción se detuvo pasando la mezcla a través de una columna de desalinización (HiTrap, 5 mL, Amersham Biosciences) equilibrada con fosfato de potasio (10 mM, pH 7.4). Para la purificación de las especies mononitradas, la mezcla de reacción se pasó a través de una columna preparativa de intercambio catiónico sulfopropil-TSK (21.5 mm x 15.0 cm; Tosoh Biosep) a un caudal de 3 mL/min. La columna se equilibró con buffer de acetato de amonio (5 mM, pH 9.0), se mantuvo durante 5 minutos en este buffer y luego se eluyó usando un gradiente lineal de acetato de amonio como sigue: 5 mM- 150 mM de 5 a 30 minutos; 150-400 mM de 30 a 75 min y 500 mM de 76 a 90 min. El cyt c sulfoxidado (SO-M80) se obtuvo por reacción con cloramina-T, como se describió anteriormente con modificaciones menores¹⁵⁶. Volúmenes iguales de cyt c (1 mM) se mezclaron con cloramina-T (5 mM) y el pH se ajustó a 8.4. Después de 3 h a temperatura ambiente, la reacción se detuvo pasando la mezcla a través de una columna de desalinización (HiTrap, 5 ml, Amersham Biosciences) equilibrada con fosfato de potasio (10 mM, pH 7,4). Para la purificación de cyt c sulfoxidada (SO-M80) se utilizaron los mismos métodos de purificación que para la mezcla nitrada. Después de la purificación del cyt c modificado oxidativamente, las especies se usaron en ELISA competitivo para evaluar la unión del anticuerpo.

Preparación de Liposomas.

Para la formación de liposomas unilamelares, se coloca la cantidad apropiada de lípidos suspendidos en cloroformo en tubo de vidrio, para la posterior evaporación con por N₂. Posteriormente, los liposomas se hidratan en buffer fosfato 20 mM y se sónica durante 30 seg en 5 oportunidades.

Mitoplastos.

Primariamente se aisló mitocondrias a partir de corazón de rata como se describe en¹⁸³ mediante centrifugaciones diferenciales. Posteriormente se obtuvo mitoplastos siguiendo el protocolo utilizado en¹⁷⁰. El pellet de mitocondrias obtenido es resuspendido en Tris-HCl 10 mM pH 7.4 con KCl 10 mM por 10 min a 37°C, posteriormente se centrifuga a 10000 x g por 30 min a 4°C. El pellet es resuspendido en Tris-HCl (2 mM, pH 7.4) con 150 mM KCl de manera de extraer el cyt c unido a la membrana. El procedimiento se repite en dos oportunidades para quitar el exceso total del cyt c.

Detección de hidroperóxidos lipídicos por FOX.

El reactivo de FOX se prepara en metanol 90% con 25 mM H₂SO₄ con 100 μM de xilenol orange con 250 μM de sal de Fe²⁺ (sulfato de amonio ferroso) más 4 mM de BHT. Para cuantificar por FOX, a las muestras se les realiza una extracción orgánica: 100 μL de muestra, más 100 μL de metanol, 200 μL de cloroformo más 40 μL de NaCl 5 M. Se mezcla por dos minutos. La fase de abajo corresponde con la del cloroformo, donde se ubica el lípido. Se evapora y se resuspenden

en metanol 100 μL . A la solución se le agrega 900 μL de reactivo de FOX y se incuba por 30 min. Se mide la absorbancia a 560 nm y se utiliza el $\epsilon = 76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Determinación de lipoperoxidación.

Las medidas de lipoperoxidación fueron determinadas midiendo el consumo de oxígeno en un electrodo del tipo Clark en una cámara refrigerada de 2.2 mL (Oxygraph 2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Liposomas de TLCL/DOPC (200 μM) fueron pre-incubadas a 37°C en buffer fosfato pH 7.4 más DTPA 100 μM en la ausencia o presencia de 20 μM cyt c o NO_2 -Y74 o SO-cyt. Después de 15 min se agrega peróxido de hidrógeno (100 μM) a la suspensión del liposoma con el cyt c. Determinación de lipoperoxidación por producción de malón-dialdehído. Para la reacción del ácido tiobarbitúrico se utilizará una solución de TCA/TBA/HCl (15 % w/v de tricloroacético, 0.375 % w/v de ácido tiobarbitúrico en 0.25 N HCl). Para la reacción, a 500 μL de muestra se le agrega 1 mL de la solución y se los mezcla enérgicamente. Se los calienta a ebullición durante 30 min, esperar que se enfríe y centrifugar durante 10 min a 2,200 x g por 10 min. Medir a 532 nm el sobrenadante obtenido. Se realiza una curva de calibración con MDA en un rango entre 0.5-9.0 μM .

Actividad caspasa de los cyt c modificados oxidativamente

Ensayo de actividad de caspasa 3. La actividad de la caspasa 3 se evaluó luego de la escisión del sustrato fluorogénico DEVD-AFC usando un volumen final de 200 μL de extracto libre de células (2–4 mg/mL) que contenía ATP (2 mM), dATP (2 mM), AcDEVD-AFC (0.2 mM) y diferentes concentraciones de nativo y SO-M80 cyt c. La fluorescencia del producto de escisión (AFC) se controló a $\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$ y $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$ y la fluorescencia se registró utilizando un lector multimodo Flash Varioskan (Thermo). En la condición de control se omitió el extracto celular.

Cultivos celulares y reactivos

Todos los reactivos y soluciones fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario. Las células de melanoma de ratón B16-F1 (ATCC® #CRL-6323™), B16-F10 (ATCC® #CRL-6475™), las células humanas de riñón (HEK-293T (ATCC® #CRL-3216™), células del endotelio bovino (BAECs), las células de Hela y células humanas de riñón se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Gibco) suplementado con 4.5 g/l de glucosa, suero fetal bovino (SFB, Gibco) 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Viabilidad celular y producción de oxidantes.

Después del tratamiento con oxidante (peroxinitrito ó H_2O_2), las células B16-F1 se tripsinizaron, se recogieron en medio de cultivo y se tiñeron con anexina-V-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) para la determinación de la externalización de fosfatidilserina por citometría de flujo (FACS-Calibur, Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad de la membrana plasmática se evaluó incubando las células en placa con diacetato de 6-clorofluoresceína (6-CF-DA, 25 μM , 30 min a 37°C en la oscuridad). Las esterases de células viables permitieron la desesterificación de la sonda produciendo una fluorescencia verde que se analizó mediante microscopía confocal. La producción de oxidante se evaluó en células tratadas con TMZ después de la oxidación de diclorofluoresceína-DA ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Molecular Probes). Brevemente, las células se incubaron en PBS durante 30 min a 37°C con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (30 μM) en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo (Facs-Calibur).

Tratamiento con temozolomida

Se sembraron 2×10^4 células/cm² de B16-F1, en placas adherentes (Thermo Scientific, Nunc) y luego de 24 h se realizaron dos tratamientos con TMZ 200 μ M por 5 h cada uno, separados por un intervalo de 24 h. El vehículo utilizado para preparar la solución stock de TMZ fue dimetilsulfóxido (DMSO) y la condición control consistió en la exposición de las células a este solvente. Los experimentos se realizaron a los 4 días luego del segundo tratamiento con TMZ.

Extracción de proteínas, electroforesis y western blot

Se lisaron las células en solución de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%) con los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, pirofosfato de sodio 25 mM, β -glicerofosfato 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, fluoruro de sodio (NaF) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, inhibidor de proteasas Sigma FAST e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem). Las muestras se sonicaron, se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C y se guardaron a -80 °C. La concentración de proteínas se determinó con la técnica del ácido bicinonínico (Pierce, Thermo Scientific).

Para resolver las proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (LI-COR Bioscience) durante toda la noche a 4 °C. Luego se bloquearon las membranas durante 1 h a temperatura ambiente en buffer Tris salino (TBS: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM) con Tween 0.1% y leche descremada 5%. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4 °C; para revelar se utilizaron los anticuerpos secundarios: IRDye® 800 anti-IgG (H+L) de conejo (#926-32211, 1:20000) y IRDye® 680 anti-IgG (H+L) de ratón (#926-68070, 1:20000) de LI-COR Bioscience. Se realizaron tres lavados con TBS, Tween 0.1%, entre cada paso. Se utilizó el equipo Odyssey (LI-COR Biosciences) para detectar las bandas en las membranas y las imágenes se analizaron con el software Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

Para obtener extracto celular para posterior purificación con la columna de afinidad Br-CN 1D3: se levantan las células con tripsina, posteriormente se inactiva la tripsina con medio con suero, luego se centrifuga las células y se le agrega PBS. Se realizan ciclos de congelado y descongelado y posteriormente se pasada la muestra con jeringa de 1 mL, para finalizar centrifugando la muestra y solo se guarda el sobrenadante. Con este procedimiento se evita desnaturar con detergentes las proteínas.

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cámaras con fondo de vidrio (Lab-tek) o en cubreobjetos y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 min a temperatura ambiente. La permeabilización se realizó en buffer fosfato salino (PBS: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) con Tritón 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente; y luego se bloqueó con PBS, Tritón 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) 3% durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron las incubaciones con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (Anexo Tabla 2) y al día siguiente se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (1:1000): Alexa Fluor® 488 anti-IgG (H+L) de conejo (#A11034) y Alexa Fluor® 594 anti-IgG (H+L) de ratón (#A11005) (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) 1 μ g/ml para teñir los núcleos. Entre cada paso se realizaron tres lavados con PBS. Las proteínas marcadas se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE200 o con un microscopio confocal de fluorescencia Leica, SP5.

En todos los casos se analizaron al menos tres cámaras/cubreobjetos diferentes por condición, contando más de 100 células en 5 campos diferentes por condición.

Para evaluar la co-localización de DRP1 con SDHA se calculó el coeficiente de correlación de Pearson con el plugin Colocalization Studio del software libre Icy. Este coeficiente es independiente de la intensidad de la señal porque sustrae la media de la intensidad del valor de intensidad cada pixel.

Procedimiento para transformar bacterias DH5alfa con los plásmidos que expresan HC y LC:

Se deja creciendo 3 mL de bacterias alfaDH5 en medio LB toda la noche. Tomar solo 12 µL del medio crecido en un eppendorf a 4°C. Agregar 1-5 µL de plásmido (10 % del volumen total). Incubar en hielo por 15 min. Realizar un Heat shock a 42°C por 30 s. Incubar en hielo por 1 min. Agregar 250 µL de medio SOC (Tryptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L). Agitar a 37°C por 1 h. Centrifugar y resuspender en 100 µL. Plaquear en LB agar (ampicilina), dejar toda la noche a 37°C. Al otro día, crecer en medio líquido en LB 4 mL y al día siguiente congelar crio viales con 85% de Glicerol. Para obtener el plásmido se realiza una Midiprep KIT k210004 Purelink Plasmid Midi Prep 25.

Expresión R1D3 en células eucariotas HEK293.

Puesta a punto de relación de PEI y plásmido para la transformación:

Relación 1:1

2 µg de PEI en 150 µL de OPTI-MEM final + 4 µg del plásmido cadena liviana + 2 µg cadena pesada en 150 µL de OPTI-MEM final.

Relación 1:5

10 µg de PEI en 150 µL de OPTI-MEM final (140 µL) + 4 µg del plásmido cadena liviana + 2 µg cadena pesada en 150 µL de OPTI-MEM final.

Relación 1:10

2 µg de PEI en 150 µL de OPTI-MEM final + 4 µg del plásmido cadena liviana + 2 µg cadena pesada en 150 µL de OPTI-MEM final.

Para la expresión a gran escala se partió de 5 botellas de 175 cm² en confluencia de células HEK293, colocando una relación de plásmido:PEI 1:5. Lo que implica 36 µg de LC y 36 µg de HC en OPTIMEM 2.7 mL por botella y 5 veces la concentración de PEI. Posteriormente a la purificación del R1D3 del medio de cultivo mediante la utilización de una columna para purificación de IgG (HiTrap™ Protein G HP).

Detección por espectrometría de masas SO-M80 cyt c y nitrados.

Los diferentes productos obtenidos en el cromatograma posterior a la oxidación con cloramina T, se caracterizaron por espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector de iones positivos. Los espectros de masas se calibraron externamente usando una mezcla de estándares de péptidos (Applied Biosystems). Se registraron los espectros MS/MS para confirmar el sitio de oxidación en los péptidos analizados. Los espectros de masas se analizaron usando DATA explorer y el software GPM4W.

Para el análisis por MRM de las especies purificadas del cyt c nitradas. Para la cuantificación relativa y el análisis de las diferentes especies nitradas. Se cuantificaron los 4 residuos de tirosinas para las muestras NO₂- Y74 y NO₂- Y97. Las muestras purificadas fueron tripsinizadas y analizadas por HPLC-MC (AB Sciex QTRAP 4500 mass spectrometer) utilizando un protocolo específicamente diseñado de multiple reaction monitoring (MRM). El método diseñado en la Unidad de Espectrometría de Masas del CEINBIO, a cargo de Dr. Mauricio Mastrogiovanni, incluye transiciones para la detección simultánea de péptidos específicos de cyt c que incluye las tirosinas Y48, Y67, Y74 o Y97. Los picos correspondientes con especies nitradas o no modificadas fueron integradas y el valor de las áreas usadas para estimar la modificación para cada residuo. Los péptidos específicos seleccionados para el análisis son para NH₂-KTGQAPGFTYTDANK-COOH (Y48) y NH₂-KTGQAPGFTY(NO₂)TDANK-COOH (NO₂ Y48); NH₂-EETLMEYLENPK-COOH (Y67) y NH₂-EETLMEY(NO₂)LENPK-COOH (NO₂-Y67); NH₂-YIPGTK-COOH (Y74) y NH₂-Y(NO₂)IPGTK-COOH (NO₂Y74); NH₂-EDLIAYLK-COOH (Y97) y NH₂-EDLIAY(NO₂)LK-COOH (NO₂Y97). Las transiciones empleadas fueron detectadas por las especies como m/z 534/486 para el péptido Y48 (fragmentación del péptido 3+ del fragmento ion b5), m/z 549/486 para péptidos con NO₂-Y48 (fragmentación +3 nitrada del péptido del fragmento del ión), para el péptido Y67 (fragmentación +3 del péptido del fragmento del ión y4), m/z 678/402 para el péptido (fragmentación de +1 del fragmento ión y4), m/z 483/423 para el péptido Y97 (fragmentos +2 del péptido para y3 del ión fragmentado) y m/z 505/468 para el péptido NO₂-Y97 (fragmentación del +2 del péptido del fragmento ión y3).

Pinocitosis de cyt c y SO-M80.

La carga pinocítica de cyt c nativo y SO-M80 en células B16-F1 se realizó de manera similar al método descrito por KJ Gilmore¹, HE Quinn y MR Wilson¹⁷⁵. Brevemente, se tripsiniza 0.5 x 10⁶ células, se recogieron en medio de cultivo, se centrifugaron (500 x g, 5 min) y se resuspendieron en 83 µl de tampón hiperosmótico (HEPES 10 mM, pH 7.4, PEG1000 al 10 % (p/v), sacarosa 0.5 M) con o sin 20 µM de SO-M80 cyt c nativo o purificado. Después de una incubación de 10 min a 37 °C, las células se sembraron en placas con fondo de vidrio de 35 mm con medio de cultivo completo y se incubaron durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%. Las células se procesaron para microscopía confocal como anteriormente. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de exclusión con trypan blue. Los resultados se expresan como número de población de células viables en cada condición. El control siguió el mismo procedimiento de carga pinocítica que las células cargadas con proteína, pero sin la adición de proteína.

Preparación de extractos libres de células para actividad caspasa.

Se generaron extractos libres de células a partir de células de linfocitos T Jurkat (ATCC TIB-152) como se describió anteriormente²⁶. Las células (5x10⁶/ml) se sedimentaron y lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo. El sedimento celular se suspendió en 5 volúmenes de buffer en frío (Hepes-KOH, pH 7.5 (20 mM), KCl (10 mM), MgCl₂ (1.5 mM), EDTA (1 mM), ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA, 1 mM), y DTT (1 mM) complementado con inhibidores de proteasa (mezcla de inhibidores de proteasa P8340, Sigma). Después de reposar en hielo durante 15 min, las células se rompieron con 10 golpes a 500 rpm con un mortero de teflón. Los núcleos y las células no rotas se eliminan por centrifugación a 1000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó, luego a 100 000 x g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante resultante se eliminó con cuidado y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Ensayo de actividad de caspasa 3.

La actividad de la caspasa 3 se evaluó luego de la escisión del sustrato fluorogénico DEVD-AFC usando un volumen final de 200 μ L de extracto libre de células (2–4 mg/mL) que contenía ATP (2 mM), dATP (2 mM), AcDEVD-AFC (0.2 mM) y diferentes concentraciones de nativo y SO-M80 cyt c. La fluorescencia del producto de escisión (AFC) se controló a λ_{em} = 505 nm y λ_{ex} = 400 nm y la fluorescencia se registró utilizando un lector multimodo Flash Varioskan (Thermo). En la condición de control se omitió el extracto celular.

Cuantificación de mAb 1D3 por citometría

Se utilizó células B16F1 confluentes en placas de 6 wells. Se quita el medio de las células y posteriormente se lava con PBS. Se agrega tripsina a la placa de células. Luego de que las células se levantan, se agrega medio con suero. Las células se pasan a un eppendorf para posteriormente centrifugar las mismas a 1000 x g por 5 minutos. Se quita el sobrenadante y se fijan las células con paraformaldehído (PFA) fresco 2% en medio de cultivo por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifuga nuevamente y se agrega una solución 4% de PFA por 30 min en PBS a 4°C. Lavar con PBS frío por 3 veces (centrifugando entre cada lavado). Se permeabiliza con PBS Tritón 0.5 % durante 30 min a temperatura ambiente. Se bloquea por 1 h a temperatura ambiente con PBS-BSA 1%- Tritón 0.5 %. Se lava con PBS frío por tres veces. Se deja con el anticuerpo primario por una hora a temperatura ambiente en PBS. Para el mAb 1D3 se usó una concentración de 1/50 en PBS Tritón 0.1%. Se lava con PBS frío por tres veces. Se deja con el anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-mouse 488 dilución 1/100 en PBS Tritón 0.1%. Se lava con PBS frío. Se conserva en oscuridad y en frío. Después de la incubación, las células se lavaron e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo (Facs-Calibur).

Estadística.

La diferencia estadística se determinó utilizando una prueba t de dos colas para muestras pareadas.

VII. Referencias

1. Schmidt, T. R. *et al.* Rapid electrostatic evolution at the binding site for cytochrome c on cytochrome c oxidase in anthropoid primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 6379–6384 (2005).
2. Hannibal, L. *et al.* Alternative Conformations of Cytochrome c: Structure, Function, and Detection. *Biochemistry* **55**, (2016).
3. Berghuis, A. M. & Brayer, G. D. Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome c. *J. Mol. Biol.* **223**, 959–976 (1992).
4. Butler, J. *et al.* Preferred sites for electron transfer between cytochrome c and iron and cobalt complexes. *J. Biol. Chem.* **258**, 6400–6404 (1983).
5. Barker, P. D. & Ferguson, S. J. Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure* **7**, R281–R290 (1999).
6. Mavridou, D. A. I., Ferguson, S. J. & Stevens, J. M. Cytochrome c assembly. *IUBMB Life* **65**, 209–216 (2013).
7. Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G. & Merchant, S. Mmicular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* **29**, 383–396 (1998).
8. Leszczynski, J. F. & Rose, G. D. Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure. *Science (80-.).* **234**, 849–855 (1986).
9. Bushnell, G. W., Louie, G. V & Brayer, G. D. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J. Mol. Biol.* **214**, 585–595 (1990).
10. Caroppi, P. *et al.* The 40s Ω -loop plays a critical role in the stability and the alkaline conformational transition of cytochrome c. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 997–1006 (2004).
11. Moore, G. R. & Pettigrew, G. W. Axial ligation of cytochrome f and cytochrome c1, Cytochromes c, Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. (1990).
12. Theorell, H. & Åkesson, Å. Studies on cytochrome c. II. The optical properties of pure cytochrome c and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 1812–1818 (1941).
13. Brautigan, D. L. *et al.* Multiple low spin forms of the cytochrome c ferrihemochrome. EPR spectra of various eukaryotic and prokaryotic cytochromes c. *J. Biol. Chem.* **252**, 574–582 (1977).
14. Gadsby, P. M., Peterson, J., Foote, N., Greenwood, C. & Thomson, A. J. Identification of the ligand-exchange process in the alkaline transition of horse heart cytochrome c. *Biochem. J.* **246**, 43–54 (1987).
15. Hoang, L., Maity, H., Krishna, M. M. G., Lin, Y. & Englander, S. W. Folding units govern the cytochrome c alkaline transition. *J. Mol. Biol.* **331**, 37–43 (2003).
16. Pollock, W. B. R., Rosell, F. I., Twitchett, M. B., Dumont, M. E. & 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* **37**, 6124–6131 (1998).
17. Smith, H. T. & Millett, F. Involvement of lysines-72 and-79 in the alkaline isomerization

- of horse heart ferricytochrome c. *Biochemistry* **19**, 1117–1120 (1980).
18. Maity, H., Rumbley, J. N. & Englander, S. W. Functional role of a protein foldon—An Ω -loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome c. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **63**, 349–355 (2006).
 19. Weinkam, P. *et al.* Characterization of Alkaline Transitions in Ferricytochrome c Using Carbon– Deuterium Infrared Probes. *Biochemistry* **47**, 13470–13480 (2008).
 20. Mara, M. W. *et al.* Metalloprotein entatic control of ligand-metal bonds quantified by ultrafast x-ray spectroscopy. *Science (80-.)*. **356**, 1276–1280 (2017).
 21. Deacon, O. M., Svistunenko, D. A., Moore, G. R., Wilson, M. T. & Worrall, J. A. R. Naturally occurring disease-related mutations in the 40–57 Ω -Loop of human cytochrome c control triggering of the alkaline isomerization. *Biochemistry* **57**, 4276–4288 (2018).
 22. Hannibal, L. *et al.* Correction: Alternative Conformations of Cytochrome c: Structure, Function, and Detection (Biochemistry (2016): 55 (407-428) DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01385). *Biochemistry* **55**, (2016).
 23. Capdevila, D. A. *et al.* Coupling of tyrosine deprotonation and axial ligand exchange in nitrocytochrome c. *Chem. Commun.* **50**, 2592–2594 (2014).
 24. Millo, D. *et al.* pH-Induced changes in adsorbed cytochrome c. voltammetric and surface-enhanced resonance Raman characterization performed simultaneously at chemically modified silver electrodes. *Langmuir* **23**, 9898–9904 (2007).
 25. Battistuzzi, G., Borsari, M., Sola, M. & Francia, F. Redox thermodynamics of the native and alkaline forms of eukaryotic and bacterial class I cytochromes c. *Biochemistry* **36**, 16247–16258 (1997).
 26. Godoy, L. C. *et al.* Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 2653–2658 (2009).
 27. Radi, R., Thomson, L., Rubbo, H. & Prodanov, E. Cytochrome c-catalyzed oxidation of organic molecules by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 112–117 (1991).
 28. Kagan, V. E. *et al.* Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 223–232 (2005).
 29. Radi, R., Turrens, J. F. & Freeman, B. A. Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 118–125 (1991).
 30. Kagan, V. E. *et al.* Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1439–1453 (2009).
 31. Everse, J., Grisham, M. B. & Everse, K. E. *Peroxidases in chemistry and biology*. vol. 1 (CRC press, 1990).
 32. Vlasova, I. I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control. *Molecules* **23**, 2561 (2018).
 33. Diederix, R. E. M., Ubbink, M. & Canters, G. W. Peroxidase activity as a tool for studying the folding of c-type cytochromes. *Biochemistry* **41**, 13067–13077 (2002).
 34. Capdevila, D. A. *et al.* Active Site Structure and Peroxidase Activity of Oxidatively Modified Cytochrome c Species in Complexes with Cardiolipin. *Biochemistry* **54**, (2015).

35. Tomášková, N., Varhač, R., Lysáková, V., Musatov, A. & Sedlák, E. Peroxidase activity of cytochrome c in its compact state depends on dynamics of the heme region. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics* **1866**, 1073–1083 (2018).
36. Kapralov, A. A. *et al.* Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2147–2155 (2011).
37. Krebs, J. J., Hauser, H. & Carafoli, E. Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**, 5308–5316 (1979).
38. Ardail, D. *et al.* Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* **265**, 18797–18802 (1990).
39. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M. & Petrosillo, G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 14205 (2014).
40. Dudek, J. Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways. *Front. cell Dev. Biol.* **5**, 90 (2017).
41. Zhang, M., Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. Gluing the respiratory chain together: cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 43553–43556 (2002).
42. Rytömaa, M. & Kinnunen, P. K. Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **269**, 1770–1774 (1994).
43. Hanske, J. *et al.* Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 125–130 (2012).
44. Yin, H. & Zhu, M. Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free Radic. Res.* **46**, 959–974 (2012).
45. Belikova, N. A. *et al.* Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* **45**, 4998–5009 (2006).
46. Bartesaghi, S. & Radi, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* **14**, 618–625 (2018).
47. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science (80-.)*. **201**, 875–880 (1978).
48. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **11**, 613–619 (2017).
49. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748 (2017).
50. R Buettner, G. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. (Formerly Curr. Med. Chem. Agents)* **11**, 341–346 (2011).
51. Schonhoff, C. M., Gaston, B. & Mannick, J. B. Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 18265–18270 (2003).
52. Brown, G. C. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* **369**, 136–139 (1995).

53. Dang, P. M.-C., Cross, A. R. & Babior, B. M. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3001–3005 (2001).
54. Babior, B. M., Lambeth, J. D. & Nauseef, W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 342–344 (2002).
55. Boveris, A. & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707–716 (1973).
56. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
57. Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R. A. & Parks, D. A. Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1122**, 178–182 (1992).
58. Dröse, S. & Brandt, U. Mitochondrial oxidative phosphorylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 145–169 (2012).
59. Bleier, L. & Dröse, S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1827**, 1320–1331 (2013).
60. Liu, S. Cooperation of a “reactive oxygen cycle” with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain—superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 367–376 (1999).
61. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15–18 (1997).
62. Knowles, P. F., Gibson, J. F., Pick, F. M. & Bray, R. C. Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to a free radical, the superoxide ion. *Biochem. J.* **111**, 53–58 (1969).
63. Fridovich, I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 239–257 (1983).
64. Winterbourn, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* **528**, 3–25 (2013).
65. Möller, M. N. & Denicola, A. Diffusion of nitric oxide and oxygen in lipoproteins and membranes studied by pyrene fluorescence quenching. *Free Radic. Biol. Med.* **128**, 137–143 (2018).
66. Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H. & Antunes, F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology* vol. 2 535–562 (2014).
67. Rhee, S. G. *et al.* Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 183–189 (2005).
68. Geiszt, M. & Leto, T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J. Biol. Chem.* **279**, 51715–51718 (2004).
69. Li, J. *et al.* The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3978–3988 (2006).

70. Ushio-Fukai, M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* **71**, 226–235 (2006).
71. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, (2014).
72. Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L. & Ross, A. B. Reactivity of HO₂/O⁻ 2 radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. data* **14**, 1041–1100 (1985).
73. Stadtman, E. R., Moskovitz, J. & Levine, R. L. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxidants Redox Signal.* **5**, 577–582 (2003).
74. Marked difference in cytochrome c oxidation mediated by HO· and/or O₂⁻ free radicals in vitro - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S030090840800179X?via%3Dihub>.
75. Valderrama, B., Ayala, M. & Vazquez-Duhalt, R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.* **9**, 555–565 (2002).
76. Wang, L. & Waldeck, D. H. Denaturation of cytochrome c and its peroxidase activity when immobilized on SAM films. *J. Phys. Chem. C* **112**, 1351–1356 (2008).
77. Giorgio, M. *et al.* Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* **122**, 221–233 (2005).
78. Lone, A., Harris, R. A., Singh, O., Betts, D. H. & Cumming, R. C. p66Shc activation promotes increased oxidative phosphorylation and renders CNS cells more vulnerable to amyloid beta toxicity. *Sci. Rep.* **8**, 1–17 (2018).
79. Pantopoulos, K. & Schipper, H. M. *Principles of free radical biomedicine.* (Nova Science Publ., 2012).
80. Radi, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem.* **288**, 26464–26472 (2013).
81. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. & Cayota, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 463–488 (2001).
82. Radi, R. [33] Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods Enzymol.* **269**, 354–366 (1996).
83. Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G. & Rubbo, H. Nitric oxide biology and pathobiology. *Nitric Oxide Biol. Pathobiol.* 57–82 (2000).
84. Radi, R., Denicola, A. & Freeman, B. A. [37] Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol.* **301**, 353–367 (1999).
85. Radi, R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 720–721 (1998).
86. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A. & Radi, R. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.* **274**, 842–848 (1999).
87. Souza, J. M., Peluffo, G. & Radi, R. Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 357–366 (2008).
88. Radi, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.* **46**, 550–559 (2013).

89. Bartesaghi, S. *et al.* Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 821–835 (2010).
90. Folkes, L. K., Bartesaghi, S., Trujillo, M., Radi, R. & Wardman, P. Kinetics of oxidation of tyrosine by a model alkoxyl radical. *Free Radic. Res.* **46**, 1150–1156 (2012).
91. Yokoyama, K., Uhlin, U. & Stubbe, J. Site-specific incorporation of 3-nitrotyrosine as a probe of pK a perturbation of redox-active tyrosines in ribonucleotide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 8385–8397 (2010).
92. Nakagawa, H. *et al.* Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome C is associated with caspase-cascade inactivation. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 15–20 (2007).
93. Batthyány, C. *et al.* Time course and site (s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxy nitrite. *Biochemistry* **44**, 8038–8046 (2005).
94. MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S. & Thompson, J. A. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 11853–11858 (1996).
95. Guo, W. *et al.* Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **285**, H1396–H1403 (2003).
96. Alonso, D. *et al.* Coexistence of translocated cytochrome c and nitrated protein in neurons of the rat cerebral cortex after oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience* **111**, 47–56 (2002).
97. Oursler, M. J., Bradley, E. W., Elfering, S. L. & Giulivi, C. Native, not nitrated, cytochrome c and mitochondria-derived hydrogen peroxide drive osteoclast apoptosis. *Am. J. Physiol. Physiol.* **288**, C156–C168 (2005).
98. Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z. G. & Chopp, M. Nitric oxide measured by a porphyrinic Micro Sensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**, 355–358 (1993).
99. Abriata, L. A. *et al.* 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.* **284**, 17–26 (2009).
100. Souza, J. M., Castro, L., Cassina, A. M., Batthyány, C. & Radi, R. Nitrocytochrome c: synthesis, purification, and functional studies. *Methods Enzymol.* **441**, 197–215 (2008).
101. Vitvitsky, V. *et al.* Cytochrome c reduction by H₂S potentiates sulfide signaling. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2300–2307 (2018).
102. Cohen, H. J., Betcher-Lange, S., Kessler, D. L. & Rajagopalan, K. V. Hepatic sulfite oxidase: congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *J. Biol. Chem.* **247**, 7759–7766 (1972).
103. Velayutham, M., Hemann, C. F., Cardounel, A. J. & Zweier, J. L. Sulfite oxidase activity of cytochrome c: role of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. reports* **5**, 96–104 (2016).
104. Smith, H. T., Staudenmayer, N. & Millett, F. Use of specific lysine modifications to locate the reaction site of cytochrome c with cytochrome oxidase. *Biochemistry* **16**, 4971–4974 (1977).
105. Kalpage, H. A. *et al.* Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational

- modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *J. • Rev. • www.fasebj.org* doi:10.1096/fj.201801417R.
106. Karsisiotis, A. I. *et al.* Increased dynamics in the 40–57 Ω -loop of the G41S variant of human cytochrome c promote its pro-apoptotic conformation. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
 107. Ascenzi, P., Coletta, M., Santucci, R., Polizio, F. & Desideri, A. Nitric oxide binding to ferrous native horse heart cytochrome c and to its carboxymethylated derivative: a spectroscopic and thermodynamic study. *J. Inorg. Biochem.* **53**, 273–280 (1994).
 108. Sharpe, M. A. & Cooper, C. E. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J.* **332**, 9–19 (1998).
 109. Lee, I. *et al.* New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo. *Biochemistry* **45**, 9121–9128 (2006).
 110. Sanderson, T. H. *et al.* Cytochrome c is tyrosine 97 phosphorylated by neuroprotective insulin treatment. *PLoS One* **8**, e78627 (2013).
 111. Sanderson, T. H., Kumar, R., Sullivan, J. M. & Krause, G. S. Insulin blocks cytochrome c release in the reperfused brain through PI3-K signaling and by promoting Bax/Bcl-XL binding. *J. Neurochem.* **106**, 1248–1258 (2008).
 112. Yu, H., Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K. & Hüttemann, M. Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1777**, 1066–1071 (2008).
 113. Pecina, P. *et al.* Phosphomimetic substitution of cytochrome c tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation. *Biochemistry* **49**, 6705–6714 (2010).
 114. Zhao, X. *et al.* Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110-000299 (2011).
 115. Hoffman, N. J. *et al.* Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise-regulated kinases and AMPK substrates. *Cell Metab.* **22**, 922–935 (2015).
 116. Kalpage, H. A. *et al.* Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **121**, 105704 (2020).
 117. Guerra-Castellano, A., Díaz-Moreno, I., Velázquez-Campoy, A., Miguel, A. & Díaz-Quintana, A. Structural and functional characterization of phosphomimetic mutants of cytochrome c at threonine 28 and serine 47. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1857**, 387–395 (2016).
 118. Kim, S. C. *et al.* Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol. Cell* **23**, 607–618 (2006).
 119. Bazylanska, V. *et al.* Lysine 53 Acetylation of Cytochrome c in Prostate Cancer: Warburg Metabolism and Evasion of Apoptosis. *Cells* **10**, 802 (2021).
 120. Márquez, I. *et al.* Structural and functional insights into lysine acetylation of cytochrome c using mimetic point mutants. *FEBS Open Bio* (2021).
 121. Wagner, G. R. & Payne, R. M. Widespread and Enzyme-independent Nε-Acetylation and

- Ne-Succinylation of Proteins in the Chemical Conditions of the Mitochondrial Matrix* ♦.
J. Biol. Chem. **288**, 29036–29045 (2013).
122. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orłowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **11**, 50–61 (2010).
 123. Cox, M. M. & Nelson, D. L. *Lehninger principles of biochemistry*. vol. 5 (Wh Freeman New York, 2008).
 124. Chan, D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–1252 (2006).
 125. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
 126. Lehninger, A. L. *The mitochondrion*. (WA Benjamin, 1964).
 127. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. & Enriquez, J. A. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* **32**, 529–539 (2008).
 128. Claypool, S. M. & Koehler, C. M. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 32–41 (2012).
 129. Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G. & Genova, M. L. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 1469–1480 (2013).
 130. Hüttemann, M., Lee, I., Grossman, L. I., Doan, J. W. & Sanderson, T. H. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation* 237–264 (2012).
 131. Hinkle, P. C., Kumar, M. A., Resetar, A. & Harris, D. L. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576–3582 (1991).
 132. Li, K. Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, and Williams RS. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* **101**, 389–399 (2000).
 133. Morriss, G. M. & New, D. A. T. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *Development* **54**, 17–35 (1979).
 134. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147–157 (1996).
 135. Hüttemann, M. *et al.* The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* **11**, 369–381 (2011).
 136. Lange, C. & Hunte, C. Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2800–2805 (2002).
 137. Rieder, R. & Bosshard, H. R. Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc1, and cytochrome c1. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **255**, 4732–4739 (1980).

138. Roberts, V. A. & Pique, M. E. Definition of the Interaction Domain for Cytochrome c with Cytochrome c Oxidase: III. PREDICTION OF THE DOCKED COMPLEX BY A COMPLETE, SYSTEMATIC SEARCH. *J. Biol. Chem.* **274**, 38051–38060 (1999).
139. Döpner, S. *et al.* 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.* **261**, 379–391 (1999).
140. Rao, P. N., Gullipalli, D. & Bhuyan, A. K. Bacterially expressed recombinant WD40 domain of human Apaf-1. *Protein Expr. Purif.* **67**, 53–60 (2009).
141. Chaurasia, G. *et al.* UniHI: an entry gate to the human protein interactome. *Nucleic Acids Res.* **35**, D590–D594 (2007).
142. Bruey, J.-M. *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **2**, 645–652 (2000).
143. Boehning, D. *et al.* Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1051–1061 (2003).
144. Boehning, D., Patterson, R. L. & Snyder, S. H. Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Cell Cycle* **3**, 250–252 (2004).
145. Beręsewicz, M., Kowalczyk, J. E. & Zabłocka, B. Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate and ryanodine receptors in vivo after transient brain ischemia in gerbils. *Neurochem. Int.* **48**, 568–571 (2006).
146. Liu, J., Chen, J., Dai, Q. & Lee, R. M. Phospholipid scramblase 3 is the mitochondrial target of protein kinase C δ -induced apoptosis. *Cancer Res.* **63**, 1153–1156 (2003).
147. Liu, J. *et al.* Phospholipid Scramblase 3 Controls Mitochondrial Structure, Function, and Apoptotic Response. NIH grants K08CA795093 (RML) and K08AR48618 (DG); Huntsman Cancer Foundation. *Mol. cancer Res.* **1**, 892–902 (2003).
148. Schlattner, U. *et al.* Mitochondrial kinases and their molecular interaction with cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1788**, 2032–2047 (2009).
149. Nur-E-Kamal, A. *et al.* Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 24911–24914 (2004).
150. Morison, I. M. *et al.* A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nat. Genet.* **40**, 387–389 (2008).
151. De Rocco, D. *et al.* Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.* **1842**, 269–274 (2014).
152. Johnson, B. *et al.* Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica* **101**, 1170 (2016).
153. Rajagopal, B. S. *et al.* The hydrogen-peroxide-induced radical behaviour in human cytochrome c–phospholipid complexes: implications for the enhanced pro-apoptotic activity of the G41S mutant. *Biochem. J.* **456**, 441–452 (2013).
154. Josephs, T. M., Morison, I. M., Day, C. L., Wilbanks, S. M. & Ledgerwood, E. C. Enhancing the peroxidase activity of cytochrome c by mutation of residue 41: implications for the peroxidase mechanism and cytochrome c release. *Biochem. J.* **458**, 259–265 (2014).

155. Parakra, R. D., Kleffmann, T., Jameson, G. N. L. & Ledgerwood, E. C. The proportion of Met80-sulfoxide dictates peroxidase activity of human cytochrome c. *Dalt. Trans.* **47**, 9128–9135 (2018).
156. Capdevila, D. A. *et al.* Specific methionine oxidation of cytochrome c in complexes with zwitterionic lipids by hydrogen peroxide: Potential implications for apoptosis. *Chem. Sci.* **6**, (2015).
157. Deacon, O. M., White, R. W., Moore, G. R., Wilson, M. T. & Worrall, J. A. R. Comparison of the structural dynamic and mitochondrial electron-transfer properties of the proapoptotic human cytochrome c variants, G41S, Y48H and A51V. *J. Inorg. Biochem.* **203**, 110924 (2020).
158. Deacon, O. M. *et al.* Heightened dynamics of the oxidized Y48H variant of human cytochrome c increases its peroxidatic activity. *Biochemistry* **56**, 6111–6124 (2017).
159. Kalkavan, H. *et al.* Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells. *Cell* **185**, 3356–3374 (2022).
160. Costa-Mattioli, M. & Walter, P. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science (80-.)*. **368**, eaat5314 (2020).
161. Choi, C. H. J. *et al.* LRG1 is an adipokine that promotes insulin sensitivity and suppresses inflammation. *Elife* **11**, e81559 (2022).
162. Sela, M., Schechter, B., Schechter, I. & Borek, F. Antibodies to sequential and conformational determinants. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* vol. 32 537–545 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1967).
163. Sachs, D. H., Schechter, A. N., Eastlake, A. & Anfinsen, C. B. An immunologic approach to the conformational equilibria of polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 3790–3794 (1972).
164. Goshorn, S. C., Retzel, E. & Jemmerson, R. Common structural features among monoclonal antibodies binding the same antigenic region of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **266**, 2134–2142 (1991).
165. Minnerath, J. M., Mueller, C. M., Buron, S. & Jemmerson, R. B lymphocyte recognition of cytochrome c: higher frequency of cells specific for self versus foreign antigen early in the immune response and V gene usage in the response to self antigen. *Eur. J. Immunol.* **25**, 784–791 (1995).
166. Jemmerson, R. *et al.* 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* **38**, 3599–3609 (1999).
167. Carbone, F. R. & Paterson, Y. Monoclonal antibodies to horse cytochrome c expressing four distinct idiotypes distribute among two sites on the native protein. *J. Immunol.* **135**, 2609–2616 (1985).
168. Jemmerson, R., Johnson, J. G., Burrell, E., Taylor, P. S. & Jenkins, M. K. A monoclonal antibody specific for a cytochrome c T cell stimulatory peptide inhibits T cell responses and affects the way the peptide associates with antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* **21**, 143–151 (1991).
169. Hristova, S. H. & Zhivkov, A. M. Isoelectric point of free and adsorbed cytochrome c

- determined by various methods. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, 87–94 (2019).
170. Cassina, A. M. *et al.* Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, 21409–21415 (2000).
 171. Tomášková, N., Varhač, R., Lysáková, V., Musatov, A. & Sedlák, E. Peroxidase activity of cytochrome c in its compact state depends on dynamics of the heme region. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1866**, 1073–1083 (2018).
 172. Rouzer, C. A. & Marnett, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* **50**, S29–S34 (2009).
 173. Fiuza, B. *et al.* Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: Protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. *Free Radic. Res.* **49**, 122–132 (2015).
 174. Martínez, J. *et al.* Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *Biochem. J.* **476**, 2463–2486 (2019).
 175. Gilmore, K. J., Quinn, H. E. & Wilson, M. R. Pinocytic loading of cytochrome c into intact cells specifically induces caspase-dependent permeabilization of mitochondria: evidence for a cytochrome c feedback loop. *Cell Death Differ.* **8**, 631–639 (2001).
 176. Oviedo-Rouco, S. *et al.* The alkaline transition of cytochrome c revisited: Effects of electrostatic interactions and tyrosine nitration on the reaction dynamics. *Arch. Biochem. Biophys.* **665**, (2019).
 177. Demicheli, V. *et al.* Cardiolipin interactions with cytochrome c increase tyrosine nitration yields and site-specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **703**, 108824 (2021).
 178. Jemmerson, R. Effects of conformation, amino acid sequence, and carrier coupling on the immunological recognition of peptide and protein antigens. *Immunol. Recognit. Pept. Med. Biol.* **213**, (1995).
 179. Kalpage, H. A. *et al.* Serine-47 phosphorylation of cytochrome c in the mammalian brain regulates cytochrome c oxidase and caspase-3 activity. *FASEB J.* **33**, 13503–13514 (2019).
 180. Guerra-Castellano, A. *et al.* Mimicking tyrosine phosphorylation in human cytochrome c by the evolved tRNA synthetase technique. *Chem. Eur. J.* **21**, 15004–15012 (2015).
 181. Guerra-Castellano, A. *et al.* Post-translational modifications of cytochrome c in cell life and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8483 (2020).
 182. Adam, W., Kurz, A. & Saha-Möller, C. R. Peroxidase-catalyzed oxidative damage of DNA and 2'-deoxyguanosine by model compounds of lipid hydroperoxides: involvement of peroxy radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 1199–1207 (2000).
 183. Cassina, A. & Radi, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 309–316 (1996).

VIII. Financiación y agradecimientos

Financiación

El Proyecto tuvo financiación: Fondo Clemente Estable de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. El código de Proyecto: FCE_1_2014_1_104233

Título del Proyecto: Conformaciones Alternativas del Citocromo c: Caracterización Bioquímicas, Detección y Función en Sistemas Biológicos.

Responsable: Dr. Rafael Radi

Durante mi posgrado conté con beca de maestría y doctorado financiada por la Comisión Académica de Posgrado (CAP) de la Universidad de la República.

Conté durante el proyecto con cargo docente del Departamento de Bioquímica y de la Unidad de Apoyo a las Actividades Prácticas del Departamento de Educación médica de la Facultad de Medicina.

Agradecimientos

A mis tutores que me permitieron desarrollar el posgrado y aprender en cada paso.

En especial a Lucia que es un pilar constante.

A mis compañeros del CEINBIO, del departamento de Bioquímica y del departamento de Educación Médica. A las Dra. Verónica Demicheli y Dra. Daiana Capdevila con las cuales aprendí los primeros pasos de la proteína. Al Dr. Mauricio Mastrogiovanni, la Dra. Jennyfer Martínez, Dra. María Laura Chiribao y el Lic. Nicolás Campolo con los cuales trabajamos en conjunto en varias oportunidades durante el Proyecto. A la Dra. Luciana Hannibal con la cual realicé tres pasantías en su laboratorio.

A la Dra. María Noel Álvarez por ser tutora constante.

A los amigos del call center que siempre están (Inés, Mercedes, Patricia, Santiago y Nikito).

A los amigos de la Carrera (Flor, Nadia, Lu, Santi, Mauri, Martín y Yan).

A Gabi, Jenny, Kari y Vivi.

A mis padres y mis hermanos.

A Maxi y Emilia que me enseñan a ser tía.

A los trillizos que ya nos cambiaron la vida y a Dani que nos sostiene a los cuatro.