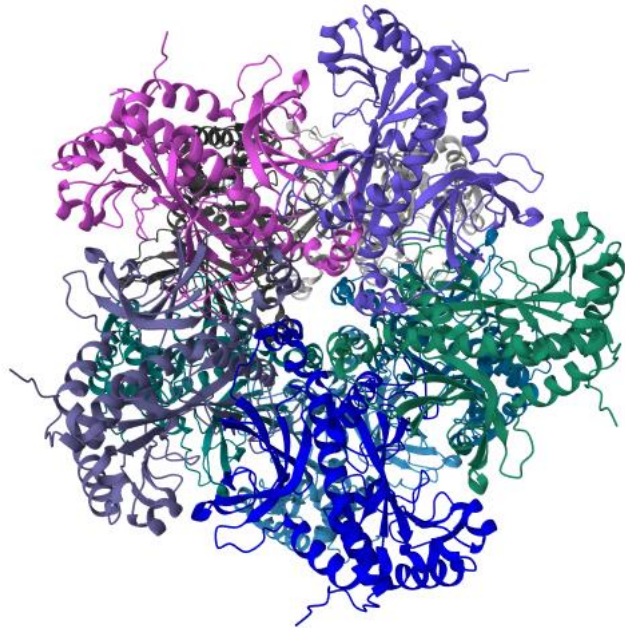




UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INACTIVACIÓN OXIDATIVA DE LA GLUTAMINA SINTETASA HUMANA



Marcela Haberkorn Odicini

Orientador: Dr. Nicolás Campolo

Centro de Investigaciones Biomédicas y Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina

Montevideo, Uruguay, 2023

Contenido

1.	Resumen.....	5
2.	Introducción	6
2.1	Metabolismo del Nitrógeno en Mamíferos.....	7
2.1.1	Catabolismo de aminoácidos	7
	9
2.1.2	Biosíntesis de aminoácidos	9
2.2	Los múltiples roles de la glutamina.....	10
2.2.1	La glutamina en el transporte del amonio	10
2.2.2.	La glutamina como fuente de energía	11
2.2.3	La glutamina en la síntesis de otros compuestos nitrogenados	11
2.2.4	La glutamina en señalización.....	12
2.2.5	La glutamina en el riñón: homeostasis del pH	13
2.2.6	La glutamina en la detoxificación del amonio.....	13
2.2.7	La glutamina en el SNC: el ciclo glutamato-glutamina.....	14
2.3	La Glutamina Sintetasa.....	16
2.3.1	La familia de las Glutamina Sintetasas	17
2.3.2	Estructura de las GS.....	18
2.3.3	Mecanismo catalítico de las GS.....	20
2.3.4	Regulación de las Glutamina Sintetasas.....	22
2.4	Patologías vinculadas a mutaciones y alteraciones funcionales de la HsGS.....	23
2.5	Especies reactivas del oxígeno de formación endógena.....	26
2.5.1	Radical superóxido	26
2.5.2	Peróxido de hidrógeno	27
2.5.3	Óxido nítrico y especies derivadas	29
2.5.4	Reactividad del peroxinitrito	31
2.6	Oxidación de proteínas	34
2.6.1	Mecanismos de oxidación de proteínas.....	34
2.6.2	Nitración de tirosinas proteicas	36
2.6.3	Consecuencias de la modificación oxidativa de proteínas.....	38
2.6.4	Reparación y degradación de proteínas oxidadas	40
2.7	Inactivación oxidativa de la glutamina sintetasa	41
2.7.1	Evidencia <i>in vivo</i>	41

2.7.2 Evidencia <i>in vitro</i>	42
3 Hipótesis de trabajo	43
4 Objetivos	44
4.1 Objetivo general	44
4.2 Objetivos específicos	44
5 Materiales y métodos	44
5.1 Reactivos	44
5.2 Expresión de HsGS	45
5.3 Purificación de HsGS	45
5.4 Exposición de HsGS a ONOO ⁻	46
5.5 Medidas de actividad HsGS	47
5.6 Análisis por SDS-PAGE y Western-Blot	48
5.7 Cuantificación de tioles proteicos por espectrofotometría	49
5.8 Determinación semi-cuantitativa del nivel de modificación oxidativa en cada aminoácido de HsGS mediante análisis por HPLC-MS/MS-MRM	50
5.9 Caracterización por Dicroísmo Circular	52
5.10 Estudios de estabilidad térmica de las diferentes HsGS	53
5.11 Tratamiento de datos y análisis estadístico	54
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1 Producción y purificación de HsGS WT, Y171F e Y283F	54
6.2 Estudios de dicroísmo circular de HsGS WT, Y171F e Y283F	56
6.3 Estudios de estabilidad térmica de HsGS WT, Y171F e Y283F	61
6.4 Puesta a punto del método de cuantificación del producto del ensayo de actividad γ -glutamil-transferasa	64
6.5 Estudios comparativos de inactivación oxidativa por ONOO ⁻ y caracterización bioquímica y proteómica subsiguiente de HsGS WT e Y171F	66
6.5.1 Ensayo comparativo de inactivación oxidativa por ONOO ⁻ para HsGS Y171F y WT	66
6.5.2 SDS-PAGE y Western-Blot	68
6.5.3 Medición del nivel de oxidación de tioles	73
6.5.4 Análisis por HPLC-MS/MS-MRM	75
6.6 Estudios comparativos de inactivación oxidativa por ONOO ⁻ y caracterización bioquímica y proteómica subsiguiente de HsGS WT e Y171F	78
6.6.1 Ensayo comparativo de inactivación oxidativa por ONOO ⁻ para HsGS Y283F y WT	78
6.6.2 SDS-PAGE y Western Blot	80

6.6.3 Medición del nivel de oxidación de tioles	82
6.6.4 Análisis por HPLC-MS/MS-MRM	83
7 Conclusiones y Perspectivas.....	86
8 Agradecimientos	89
9 Bibliografía	90

1. [Resumen](#)

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima altamente conservada y ubicua. Esta cataliza la síntesis ATP-dependiente de glutamina a partir de glutamato y amonio. En vertebrados, la expresión de la GS se concentra en hígado, con un rol primordialmente metabólico, y en cerebro, donde participa en el ciclo glutamato-glutamina. Este último hace posible la eficiente detoxificación astrocitaria del glutamato excedente en las neurosinapsis, evitando fenómenos de excitotoxicidad, al tiempo que da lugar a un acoplamiento funcional entre astrocitos y neuronas, proveyendo a estas últimas con los precursores necesarios para la biosíntesis de sus neurotransmisores. En la literatura científica existen numerosos reportes de disminución en los niveles y/o en la actividad de la GS en cerebros post-mortem de pacientes humanos con patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, así como en los cerebros de modelos animales de dicha patología. En varios de estos estudios se correlacionó este fenómeno con la oxidación de la cadena polipeptídica enzimática, sugiriendo un mecanismo de inactivación oxidativa. A su vez, numerosos trabajos *in vitro* lograron replicar esta inactivación. Estudios previos en el Centro de Investigaciones Biomédicas lograron determinar que la inactivación oxidativa de la GS humana (HsGS) resulta de la acumulación de una multiplicidad de modificaciones oxidativas sobre diferentes aminoácidos, incluyendo la nitración de varias tirosinas.

Esta Tesina de Grado fue planteada como una continuación de esta línea de investigación. En ella me propuse como objetivo principal evaluar el rol de la nitración de las tirosinas 171 y 283 de la HsGS, identificadas previamente como dianas preferenciales de modificación, en la inactivación oxidativa de la enzima por peroxinitrito (ONOO^-), un poderoso agente nitro-oxidante endógeno, producto de la reacción entre el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y el radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$). Este trabajo se llevó a cabo *in vitro*, utilizando formas recombinantes de HsGS wild-type (WT) y dos mutantes de la misma, en cada una de las cuales se sustituyó una de las dos tirosinas de interés por una fenilalanina, bloqueando la nitración en forma sitio-específica.

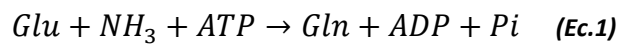
Estudios de dicroísmo circular me permitieron constatar que las mutantes Y171F e Y283F son estructuralmente idénticas a la enzima WT. Por su parte, ensayos de actividad comparativos demostraron que HsGS Y171F presenta una sensibilidad exacerbada frente a inactivación por ONOO^- , mientras que la posterior caracterización de la mutante tratada evidenció una alteración en el patrón de modificación oxidativa de su cadena polipeptídica. Se propone, entonces, que la nitración de la Tyr 171 podría ejercer un rol protector de la actividad enzimática, consumiendo parte de los radicales derivados del ONOO^- , sin causar mayores perjuicios a la función de la HsGS. Por su parte, la mutante Y283F demostró ser igual de sensible que la enzima WT frente a inactivación oxidativa por ONOO^- , aunque también se constataron cambios en su patrón de oxidación, con un incremento drástico de los niveles de nitración de la Tyr 288, muy cercana a la 283 en la estructura tridimensional de la enzima, sugiriendo la existencia de un mecanismo compensatorio.

Los resultados obtenidos en el marco de esta Tesina buscan contribuir a una mayor comprensión de los mecanismos bioquímicos que conducen a la inactivación oxidativa de la HsGS tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto cobra especial relevancia al considerarse que esta pérdida de actividad inducida por

insultos nitro-oxidantes podría constituir un mecanismo fisiopatogénico relevante en el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos de enorme prevalencia poblacional.

2. [Introducción](#)

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima ancestral y ampliamente distribuida, presente en organismos pertenecientes a los tres dominios de los seres vivos: Eukarya, Archaea y Bacteria. Esta cataliza la síntesis del aminoácido glutamina (Gln) a partir de glutamato (Glu) y amonio (NH_3), que implica el acoplamiento energético entre la hidrólisis exergónica del enlace de alta energía entre los fosfatos β y γ del adenosín-trifosfato (ATP), y la formación endergónica de un nuevo enlace amida, entre el NH_3 y el carbonilo terminal de la cadena lateral del Glu, dando lugar a Gln, adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) como productos.



Esta reacción desempeña un papel central en la fijación de nitrógeno proveniente de fuentes inorgánicas en múltiples clases de microorganismos, confiriéndole un rol protagónico en el ciclado de este elemento a través de la biósfera. Asimismo, constituye un paso central en el metabolismo de nitrógeno en animales superiores, incluyendo al ser humano. Los vertebrados poseemos un único gen codificante para GS (denominado GLUL), que es expresado en forma tejido-específica, de forma que la enzima se concentra sobre todo en hígado y cerebro, cumpliendo en cada tejido una función particular. En el hígado, la GS tiene un rol primordialmente metabólico, permitiendo la detoxificación del NH_3 libre, así como la modulación de su concentración en la circulación sanguínea, a través de su incorporación al Glu. Por otra parte, a nivel del sistema nervioso central (SNC), la expresión de GS se concentra fundamentalmente en el citoplasma de los astrocitos, donde esta enzima cumple una función central en la detoxificación o *clearance* de Glu y de ácido γ -aminobutírico (GABA) de las neurosinapsis, a través del ciclo Glu/GABA-Gln. Así, esta enzima tiene un papel crucial en evitar la acumulación en demasía de estos neurotransmisores en las hendiduras sinápticas, donde pueden resultar neurotóxicos. Este fenómeno es conocido como excitotoxicidad y puede conducir a la pérdida de conexiones sinápticas y a la muerte y degeneración de las neuronas. A la luz de lo anterior, la GS se constituye en un actor central en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Consistentemente con lo antedicho, alteraciones en la concentración o en la actividad de esta enzima en el cerebro humano han sido asociadas con diversas patologías, entre ellas el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer. A su vez, la pérdida de actividad HsGS en el marco de estas patologías se ha correlacionado con la modificación oxidativa de la cadena polipeptídica de la enzima, en particular, con la formación de 3-nitro-tirosina (3- NO_2 -Tyr) en distintos sitios a lo largo de la misma.

En esta sección ahondaré en los diferentes roles ejercidos por la GS en los mamíferos, incluyendo el papel protagónico que esta desempeña en el metabolismo del nitrógeno, pero también su función en el ciclo del Glu-Gln cerebral, describiendo su importancia para el mantenimiento del equilibrio y la integridad del tejido neural. Profundizaré, asimismo, en los mecanismos de formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células, deteniéndome particularmente en las vías que conducen a la formación del ONOO^- y en su reactividad particular, así como en su rol en la modificación oxidativa de proteínas. Finalmente profundizaré en los mecanismos de inactivación nitro-oxidativa

de HsGS mediada por ONOO⁻, así como su asociación a diversas patologías neurodegenerativas, incluyendo a la enfermedad de Alzheimer.

2.1 Metabolismo del Nitrógeno en Mamíferos

Los mamíferos obtienen la mayor parte del nitrógeno que requieren para la biosíntesis de sus propias moléculas nitrogenadas a partir de las proteínas consumidas con la dieta. Estas proteínas son desnaturalizadas y degradadas progresivamente a medida que van atravesando el tracto digestivo, hasta obtenerse un conjunto de aminoácidos libres y di- y tri-péptidos a nivel del lumen del intestino delgado. Estos son absorbidos por los enterocitos, a través de transportadores especializados en su membrana apical. Una vez allí, los di- y tri-péptidos son hidrolizados para liberar sus aminoácidos constituyentes, de forma que todos los aminoácidos libres podrán, entonces, ser empleados para biosíntesis de proteínas u otros compuestos nitrogenados en estas mismas células o podrán ser exportados hacia la circulación portal para su distribución sistémica. Desde el torrente sanguíneo, los aminoácidos pueden ser captados por los diferentes tejidos del cuerpo que los requieran como precursores biosintéticos o como fuente de energía a través de su catabolismo. El sitio principal de este conjunto de vías metabólicas convergentes es, por excelencia, el hígado [1, 2].

2.1.1 Catabolismo de aminoácidos

El catabolismo de los aminoácidos permite la obtención de energía a partir de la degradación oxidativa de los esqueletos carbonados de estas moléculas. Esta ruta catabólica solamente toma lugar bajo contextos metabólicos particulares, como cuando el contenido de proteína en la dieta es muy elevado o, por el contrario, bajo condiciones de inanición [3]. Si bien el catabolismo de cada uno de los 20 aminoácidos canónicos implica una serie de reacciones químicas particulares, el mecanismo general es siempre el mismo, y consta de una serie de tres pasos: la transaminación, el catabolismo oxidativo del esqueleto carbonado y el ciclo de la urea.

Así, el primer paso del catabolismo de cualquier aminoácido consiste en la transferencia de su grupo funcional α -amino (α -NH₂) a una molécula de α -cetoglutarato (α -CG) en una reacción conocida como transaminación, que arroja como productos al Glu y al α -cetoácido derivado del aminoácido de partida. Dicha reacción implica, asimismo, la transferencia de electrones desde el aminoácido al α -CG, de manera que el primero se oxida, al tiempo que el segundo se reduce. Se incluye un diagrama de una reacción de transaminación genérica en la Figura 1. Las transaminaciones de los diferentes aminoácidos son catalizadas por enzimas específicas para cada uno de ellos, pertenecientes a la familia de las aminoácido-transaminasas. Todas ellas emplean al α -CG como segundo sustrato, y requieren de piridoxal fosfato (PLP), un derivado fosforilado de la vitamina B6, como cofactor para su catálisis. A través de las transaminaciones, pues, todos los grupos -NH₂ liberados se concentran sobre el Glu, que actúa como un almacén y un administrador del nitrógeno metabólico [1].

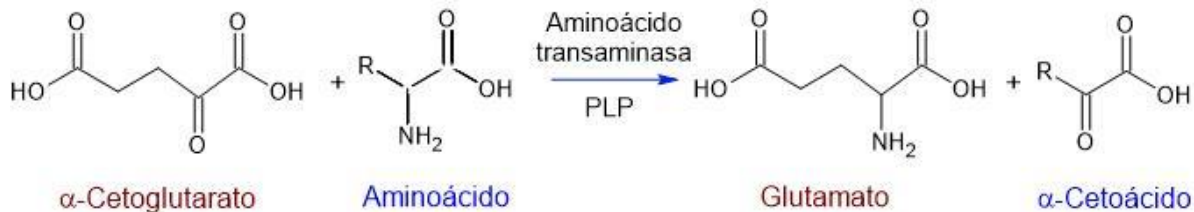


Figura 1. Reacción general de transaminación. Esquema construido en ACD/Chemsketch. Basado en información provista en [1].

Los α -cetoácidos generados por transaminación tendrán como principal destino a su catabolismo oxidativo por diferentes vías, de forma que todas ellas finalmente convergen en la generación de precursores glucogénicos y/o acetil-coenzimaA (acetil-coA), que puede luego ingresar al ciclo de Krebs [1].

Por su parte, el NH_3 , concentrado sobre el Glu, podrá tener dos destinos: o bien podrá ser empleado en biosíntesis o, en su defecto, cuando las demandas biosintéticas estén colmadas, este podrá ser liberado en la matriz mitocondrial de los hepatocitos, por desaminación oxidativa del Glu, para su ingreso al ciclo de la urea. Esta reacción, descrita en la Figura 2, es catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), que es la única enzima metabólica conocida, en mamíferos, que puede emplear tanto nicotinamida-adenosina-dinucleótido (NAD^+) como nicotinamida-adenosina-dinucleótido-fosfato (NADP^+) como aceptores de electrones.

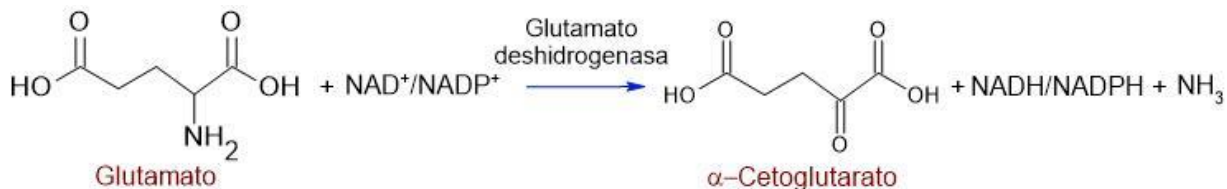


Figura 2. Reacción de desaminación oxidativa del glutamato a α -cetoglutarato, catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Esquema construido en ACD/ChemSketch, usando información obtenida de [1].

El NH_3 liberado en dicha hidrólisis, entonces, puede ser utilizado para la síntesis de urea a través del ciclo del mismo nombre. La urea configura la principal forma de eliminación del nitrógeno en exceso en el cuerpo de los mamíferos, en virtud de lo cual estos son clasificados como organismos ureotélicos. Además, una porción minoritaria del nitrógeno, sobre todo aquel proveniente del catabolismo de purinas y pirimidinas, es eliminada en la forma de ácido úrico. También, según se discutirá más adelante, puede existir un porcentaje marginal de nitrógeno que sea eliminado en la orina como NH_4^+ directamente, de forma que este mecanismo tiene un rol vital en la mantención del pH plasmático a un valor constante de 7,4, aproximadamente [1]. A continuación, nos centraremos en la descripción del mecanismo de biosíntesis de urea.

El ciclo de la urea comienza con la condensación endergónica del NH_3 con una molécula de bicarbonato (HCO_3^-) y una molécula de ATP, para dar lugar al carbamoil-fosfato, en la matriz mitocondrial de los hepatocitos. Esta reacción es catalizada por la enzima carbamoil-fosfato sintetasa, y alimentada por la hidrólisis de dos enlaces fosfato de alto contenido energético provenientes de dos moléculas de ATP. En la segunda reacción del ciclo, la ornitina transcarbamoilasa cataliza la transferencia del grupo carbamoilo al β -aminoácido ornitina,

rindiendo citrulina. A continuación, la citrulina es exportada al citosol del hepatocito, donde es captada por la argininosuccinato sintetasa, que cataliza la condensación de su grupo carbonilo con el grupo $-NH_2$ del aspartato (Asp), formándose argininosuccinato. Esta reacción requiere de la hidrólisis de un nuevo enlace fosfato del ATP para resultar termodinámicamente favorable. El argininosuccinato es clivado, entonces, para dar arginina (Arg) y fumarato, en una reacción catalizada por la argininosuccinato liasa, de forma que la Arg generada es, finalmente, captada por la enzima arginasa, que la hidroliza para regenerar la ornitina de partida, liberando en el proceso una molécula de urea, que es el producto neto del ciclo. La Figura 3 contiene un diagrama representando los diferentes pasos anteriormente descritos en forma esquemática.

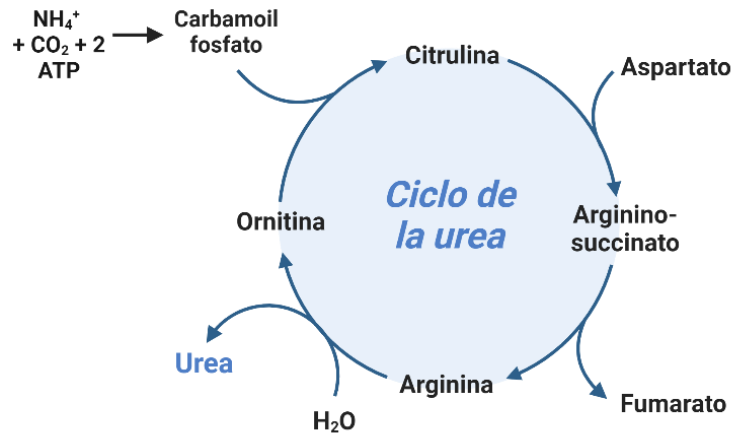


Figura 3. Representación gráfica del ciclo de la urea. Construida en Biorender en base a información obtenida de [1]

El ciclo de la urea es una vía catabólica central con un muy elevado nivel de conservación evolutivo, a pesar de su alto costo energético. Esto responde a su enorme importancia para el mantenimiento de la homeostasis corporal, ya que evita la acumulación de NH_3 en los tejidos, que puede resultar altamente nociva [1].

2.1.2 Biosíntesis de aminoácidos

Todos los aminoácidos proceden, en forma más o menos directa, de intermediarios de la glucólisis, del ciclo de Krebs o de la vía de las pentosas fosfato. El nitrógeno ingresa en estas rutas metabólicas a través de sus reservorios y donantes principales, el Glu y la Gln, mediante reacciones de transaminación. La biosíntesis de diferentes aminoácidos reviste distintos niveles de complejidad, y mientras que la mayoría de las plantas y las bacterias son capaces de sintetizar por sí mismas a los 20 aminoácidos canónicos, los mamíferos solo disponemos de las enzimas requeridas para sintetizar cerca de la mitad. Esto se debe a que en el curso de la evolución hemos hallado una ventaja adaptativa en prescindir de las vías más complejas de biosíntesis de aminoácidos, en favor del consumo dietario de sus productos. Los aminoácidos que debemos obtener de la dieta se conocen como aminoácidos esenciales, al tiempo que llamamos condicionalmente esenciales a aquellos que el organismo es capaz de sintetizar empleando como precursor a un aminoácido esencial. Tal es el caso, por ejemplo, de la tirosina (Tyr).

El Glu, la Gln y la alanina (Ala) son los aminoácidos más abundantes en los mamíferos. Mientras que el Glu es el que se halla a mayores concentraciones en el interior de las células, la Gln es la que presenta mayor concentración plasmática. Esto responde al rol esencial que cumplen ambos aminoácidos en el metabolismo de nitrógeno. Se trata, en ambos casos, de aminoácidos no-esenciales, que provienen de un precursor común: el α -CG. Este también es precursor en la síntesis de la Arg y la prolina (Pro). En animales, la principal fuente de Glu son las reacciones de transaminación, mientras que la Gln es sintetizada en forma ATP-dependiente a partir del Glu y NH_3 , mediante la reacción catalizada por la GS (Ec.1) [1].

2.2 Los múltiples roles de la glutamina

Las funciones de la Gln son múltiples y variadas. Estas abarcan su rol como transportador de NH_3 a través del torrente sanguíneo desde los tejidos extra-hepáticos hasta el hígado, su rol como precursor anabólico para el crecimiento muscular, su papel en el mantenimiento del equilibrio ácido-base en los riñones, su uso como sustrato para la gluconeogénesis en hígado y riñones, su utilización como una de las principales fuentes de energía en células de la inmunidad y otras células proliferantes, y su rol como dador de nitrógeno para la biosíntesis de diversas moléculas pequeñas y macromoléculas, incluyendo a purinas y pirimidinas (y, por ende, nucleótidos y ácidos nucleicos) y al glutatión (GSH) [4].

2.2.1 La glutamina en el transporte del amonio

El metabolismo energético de los tejidos extra-hepáticos genera NH_3 en exceso como sub-producto. Este debe ser transportado hasta el hígado para ser empleado en el anabolismo o incorporado a una molécula de urea para su eliminación. No obstante, el NH_3 libre, incluso en concentraciones moderadas, puede resultar extremadamente tóxico, imposibilitando su transporte como tal, simplemente disuelto en el plasma. La principal estrategia fisiológica para obviar este obstáculo consiste en su condensación ATP-dependiente con el Glu (disponible en altas concentraciones en el medio intracelular), dando lugar a Gln, a través de la reacción catalizada por la GS. La Gln así generada puede, entonces, ser exportada al torrente sanguíneo, a través del cual arriba al hígado, pudiendo ser incorporada por los hepatocitos mediante transportadores específicos o por difusión simple. De esta manera la Gln permite el transporte en forma inocua del NH_3 a través del torrente sanguíneo desde su sitio de formación hasta el sitio preferencial para su detoxificación o utilización en biosíntesis. Esta es la explicación que yace detrás de que la Gln sea el aminoácido con mayor concentración plasmática. En los hepatocitos, la Gln que no sea necesaria como tal será importada a la mitocondria, donde puede ser captada por otra enzima: la glutaminasa o GLS, que cataliza su hidrólisis simple, obteniéndose como productos Glu y NH_3 , de forma que este último podrá ser destinado al ciclo de la urea. La reacción química catalizada por la GLS se representa en la Figura 4. De esta forma, el NH_3 en exceso generado en los tejidos extra-hepáticos podrá ser eliminado, finalmente, como urea en la orina.

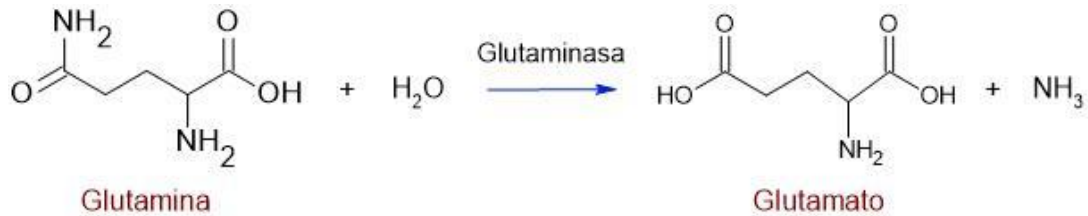


Figura 4. Reacción de hidrólisis de la glutamina a glutamato, liberando amonio, catalizada por la enzima glutaminasa. Construida en ACD/Chemsketch en base a información obtenida de [1].

2.2.2. La glutamina como fuente de energía

Según fue reseñado anteriormente, a través de la reacción catalizada por la GLS, la Gln puede rendir Glu y NH₃. A su vez, el Glu así obtenido podrá sufrir desaminación oxidativa, catalizada por GDH, para rendir α-CG, que no es sino un intermediario del ciclo de Krebs. Así las cosas, el α-CG podrá alimentar esta vía catabólica, a través de la cual cada uno de los carbonos que ingresan son oxidados completamente a CO₂, obteniéndose GTP y poder reductor, en la forma de NADH y FADH₂ como productos. Los electrones recolectados en esta forma podrán ser transferidos a la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. De esta forma, la reacción catalizada por la GDH, bajo determinados contextos, puede ser visualizada como una reacción anaplerótica del ciclo de Krebs, y la Gln como una fuente de energía.

Las células en rápida proliferación, como los linfocitos, las células de la mucosa intestinal (enterocitos) y las células tumorales presentan un elevado consumo de Gln, puesto que la emplean como una de sus principales fuentes de energía [5, 6].

2.2.3 La glutamina en la síntesis de otros compuestos nitrogenados

Otro de los principales roles de la Gln es como dador de nitrógeno en la biosíntesis de otras moléculas biológicas. Hay más de una docena de reacciones biosintéticas conocidas en las que la Gln es la principal fuente de grupos -NH₂. Las enzimas que catalizan estas reacciones son llamadas Gln-amidotransferasas, y todas cuentan con una estructura básica en común, consistente en dos dominios estructurales esenciales: uno que fija la Gln y otro que une al segundo sustrato, que será el que acepte el grupo NH₂. Ambos dominios están conectados entre sí mediante un “canal de amonio”. La catálisis procede, pues, de acuerdo a un esquema común que comienza con el ingreso de la Gln al sitio activo en el primer dominio, donde un residuo de Cys altamente conservado actúa como nucleófilo, atacando al carbono electrofílico de la amida terminal y promoviendo la remoción del NH₂, que adquiere un H⁺ y es liberado como el grupo saliente NH₃. A su vez, simultáneamente, se da la formación de un intermediario glutamil-enzima. El NH₃ generado, que permanece en el seno de la enzima, difunde, entonces, a través del canal de amonio proteico hasta el segundo sitio activo, donde reacciona con el sustrato aceptor para formar el producto final aminado. Al finalizar este paso, el intermediario glutamil-enzima sufre hidrólisis, liberándose Glu y re-generándose la enzima libre. La GLS, que cataliza la hidrólisis simple del grupo amida terminal de la Gln para dar Glu tiene una estructura similar a la de las Gln-amido transferasas, pero usa H₂O como segundo sustrato, de forma que los productos obtenidos son simplemente Glu y NH₃ [1].

A su vez, el Glu (que puede derivar de la hidrólisis por GLS de la Gln) también participa como dador de grupos α -NH₂ en la biosíntesis de aminoácidos, vía transaminaciones. Asimismo, toda su estructura puede ser empleada como precursora en la biosíntesis de Pro y Asp [1].

De igual forma, cabe notar que tanto la Gln como el Asp actúan como dadores de nitrógeno en la biosíntesis *de novo* de las bases nitrogenadas purínicas y pirimidínicas que son, a su vez, componentes esenciales en la estructura de los nucleótidos. Los nitrógenos γ (amida) de dos moléculas de Gln son adicionados al anillo de purina creciente, y un tercer nitrógeno amida es empleado en la conversión de monofosfato de xantina (XMP) en monofosfato de guanosina (GMP). Otros nitrógenos empleados en la síntesis de purinas son aportados por la glicina (Gly) y el Asp, pero muchos de ellos también provienen, en último término, de la Gln (de su grupo α -NH₂, a través del Glu, que por transaminación da lugar a estos aminoácidos). Por su parte, los anillos de pirimidina contienen un nitrógeno proveniente del grupo amida de la Gln y otro proveniente del Asp. Además, un nitrógeno amida adicional es agregado al trifosfato de uridina (UTP) para formar trifosfato de citidina (CTP). La importancia del nitrógeno amida de la Gln en la biosíntesis de las bases nitrogenadas hace de este aminoácido un nutriente esencial durante la proliferación celular [6].

Otra ruta biosintética en la que la Gln participa como dador de grupos -NH₂ es la que lleva a la formación de las hexosaminas, que son importantes precursores en la biosíntesis de diversas macromoléculas con funciones estructurales. El paso limitante de esta vía anabólica es la transferencia del grupo amida de la Gln a la fructosa-6-fosfato para dar glucosamina-6-fosfato, en una reacción catalizada por la glucosamina-6-fosfato sintasa [6, 7].

Asimismo, la Gln participa como dador de Glu en la síntesis del GSH, un tiol de bajo peso molecular con un importante rol en los sistemas antioxidantes celulares.

2.2.4 La glutamina en señalización

Dada su extensa participación en el anabolismo de compuestos nitrogenados, tiene sentido que la Gln también sea utilizada por la célula como una molécula señalizadora, de manera que su presencia por encima de ciertas concentraciones desencadena cascadas de señalización intracelulares que culminan con la activación de la biosíntesis de ciertas macromoléculas, y la inhibición de las vías catabólicas antagónicas (evitándose así la formación de ciclos fútiles, cuyo único producto es el gasto energético). Un ejemplo paradigmático de esto es el de la activación Gln-dependiente de la vía de señalización de la quinasa mTOR, a través del complejo 1 (mTORC1), que requiere del transporte bidireccional de Gln a través de la membrana plasmática. La quinasa mTOR es un interruptor celular que actúa como regulador maestro del metabolismo y la proliferación, tal que, al activarse, fosforila a múltiples blancos efectores, promoviendo la biosíntesis de proteínas, en primer término, pero también la producción de lípidos, glúcidos, y otras macromoléculas, así como la proliferación. Mientras tanto, la inactivación de mTOR lleva a la desfosforilación de sus blancos y a la inhibición global de la biosíntesis proteica.

Otros estudios han identificado a la Gln como un actor central en las vías de señalización de tipo ERK, sobre todo en enterocitos. Adicionalmente, existen trabajos que reportan el rol de la Gln como modulador de la expresión génica en cultivos celulares, de manera que su adición al medio de cultivo promovería la expresión de los factores de proliferación c-jun y c-myc, así como la supervivencia

celular a través de efectos negativos sobre factores inhibidores del crecimiento y pro-apoptóticos, como Fas y ATF5, entre otros [6, 8].

Además, existe evidencia que sugiere que la Gln también participa en la modulación de la respuesta inmune, de forma que fluctuaciones en su concentración modularían el nivel de activación de diferentes vías de señalización en estas células. Por ejemplo, algunos reportes muestran una correlación inversa entre la abundancia de este aminoácido y el nivel de expresión génica regulada por NF- κ B [6].

2.2.5 La glutamina en el riñón: homeostasis del pH

En los riñones, la hidrólisis de la Gln a Glu catalizada por la GLS es la vía principal de liberación de NH_3 . Luego de su liberación, este es exportado a la luz del túbulo colector renal, donde se condensa con H^+ libres, provenientes de la disociación del ácido carbónico (H_2CO_3), generando NH_4^+ , que se elimina con la orina, y HCO_3^- que re-ingresa a la circulación sanguínea donde actúa como base conjugada del sistema amortiguador del pH plasmático $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Así, la hidrólisis de Gln a Glu contribuye a la eliminación de H^+ en la orina y a la consiguiente alcalinización del plasma, constituyéndose en un proceso esencial para la homeostasis del pH corporal. Existe, a su vez, un nivel jerárquicamente superior de regulación de este mismo sistema, en tanto el nivel de expresión de la GLS se incrementa al detectarse una disminución del pH plasmático [1, 3].

2.2.6 La glutamina en la detoxificación del amonio

El catabolismo de aminoácidos genera NH_4^+ como sub-producto, debiendo este ser prontamente metabolizado o excretado, dada su elevada toxicidad. La principal forma de eliminación definitiva del NH_4^+ del cuerpo de los mamíferos es a través de su incorporación en una molécula de urea, que luego es excretada en la orina, como fue visto anteriormente. Sin embargo, no todo el NH_4^+ generado por el metabolismo ingresa en forma inmediata al ciclo de la urea, sino que existen estadios intermedios de detoxificación del mismo, como su incorporación a la Gln. El hígado constituye el sitio preferencial para dichos procesos [1].

En el intestino, por ejemplo, se generan grandes cantidades de NH_4^+ como consecuencia del elevado nivel de catabolismo de Gln que ocurre en los enterocitos (células proliferantes), que se nutren tanto de la Gln dietaria como de aquella circulante en el plasma. El NH_4^+ liberado en la reacción catalizada por la GLS, es exportado entonces a la circulación portal y transportado a través de la misma hacia el hígado, donde se lo detoxifica en conjunto con el NH_4^+ producido en el catabolismo hepático de aminoácidos. Esta detoxificación podrá ocurrir por dos mecanismos diferentes que prevalecen en diferentes regiones hepáticas, en función de los mayores o menores niveles de expresión de las enzimas que participan en los mismos. A nivel de los hepatocitos periportales, por ejemplo, los altos niveles de expresión de GLS y de enzimas del ciclo de la urea promueven el ingreso de la mayor parte del NH_4^+ a esta vía catabólica. Por el contrario, en los hepatocitos perivenosos, los niveles de expresión de estas enzimas se ven muy disminuidos y, en cambio, se observan altos niveles de expresión de GS. Así, en su interior, los iones NH_4^+ remanentes son utilizados para la biosíntesis de Gln. La acción conjunta de estos dos sistemas complementarios de detoxificación permite mantener los niveles plasmáticos de NH_4^+ por debajo de su umbral de toxicidad [9-11].

Cabe destacar que, si bien la síntesis hepática de urea constituye el principal mecanismo de eliminación, tanto del NH_4^+ libre en plasma, como de aquel transportado en la forma de Gln desde los tejidos extra-hepáticos diferentes del intestino hacia el hígado, la síntesis de Gln a nivel de los hepatocitos perivenosos reviste una gran importancia para el balance global.

2.2.7 La glutamina en el SNC: el ciclo glutamato-glutamina

El Glu, además de ser un aminoácido constituyente de las proteínas, es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de los mamíferos. Cuando una neurona glutamatérgica cursa un potencial de acción que llega a su terminal axónico, este desencadena la exocitosis de grandes cantidades de Glu contenido en vesículas especializadas hacia la hendidura sináptica. El Glu liberado se une, entonces, a receptores de alta afinidad y especificidad por el mismo, localizados en la membrana post-sináptica, que pueden pertenecer a dos categorías: por una parte, están los receptores metabotrópicos, que son receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs, por sus siglas en inglés), cuya activación desencadena cascadas señalizadoras intracelulares, que culminan con la activación de la expresión de ciertos paquetes génicos y/o la activación, más inmediata, de enzimas citosólicas efectoras. Ejemplos de esta clase de receptores, son aquellos denominados mGluR1-8. Por otra parte, están los receptores ionotrópicos, de tipo canal iónico de apertura por unión de ligando, de forma que la unión del Glu a los mismos da lugar a un cambio de conformación que determina su apertura, aumentando la corriente de un determinado ion o grupo de iones a través de la membrana plasmática. Estos incluyen a los receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), siendo estos últimos los más abundantes en el SNC. Estos receptores se expresan fundamentalmente en las espinas dendríticas, pero también pueden hallarse en regiones peri- y extra-sinápticas. La unión del Glu a los mismos provoca cambios en la conductividad de la membrana para Na^+ y/o Ca^{2+} , promoviendo incrementos en su concentración intracelular que pueden, indirectamente, activar cascadas señalizadoras pero que, además, en forma directa, dan lugar a una despolarización de la membrana celular. De esta forma, aumenta la probabilidad de que se alcance el umbral de disparo en la post-sinapsis, desencadenándose un nuevo potencial de acción. Esto hace del Glu un neurotransmisor eminentemente excitatorio [12]. Cabe destacar, igualmente, que ningún neurotransmisor puede ser en sí mismo excitatorio o inhibitorio, ya el rol que este desempeñe en una sinapsis particular dependerá puramente de los receptores específicos para el mismo que se hallen en la membrana de la neurona sobre la cual ocurre la descarga [13].

El Glu excedente en la hendidura sináptica, que no logra unirse rápidamente a un receptor post-sináptico, difunde a través del espacio extracelular y es captado por transportadores específicos, llamados transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs), localizados en la membrana plasmática de varias células, incluyendo a la propia neurona pre-sináptica y, sobre todo, a los astrocitos circundantes. De esta forma se evita la acumulación del Glu en el espacio extracelular, por tiempos prolongados y a niveles tóxicos para las neuronas, en un proceso conocido como excitotoxicidad, que puede reflejarse en la ocurrencia de convulsiones y muerte neuronal [12, 14]. En la excitotoxicidad más clásica, un insulto isquémico resulta en una depleción local de ATP y una disfunción de la captación del Glu por los astrocitos. La elevación resultante en los niveles de Glu extracelulares provoca, a su vez una sobre-estimulación de los receptores ionotrópicos post-sinápticos y un ingreso masivo de Na^+ y Ca^{2+} a la post-sinapsis vía receptores NMDA [15]. Mientras

que el ingreso de Na^+ conduce al *swelling* de las neuronas, que es frecuentemente reversible, la entrada de Ca^{2+} contribuye a una lesión excitotóxica irreversible a través de la activación de hidrolasas Ca^{2+} -dependientes (como las calpainas), de la proteína quinasa asociada a muerte 1 (DAPK1, por sus siglas en inglés) y de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), todas ellas asociadas a la cola citosólica de los receptores NMDA. A su vez, el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos producto de su ingreso desde el medio extracelular dispara la liberación de mayores cantidades del mismo desde el retículo endoplásmico liso, dando lugar a un ciclo de retroalimentación positiva. Estos mecanismos, operando conjuntamente, promueven la muerte apoptótica de la neurona [16]. No obstante, la excitotoxicidad no ocurre únicamente como resultado de insultos isquémicos, sino que puede ocurrir como consecuencia de la reducción de la actividad de la GS, según veremos más adelante.

El GABA es otro neurotransmisor secretado por neuronas del SNC; en este caso, con un rol predominantemente inhibitorio. Los astrocitos también participan del *clearance* del mismo, importándolo a su citosol. A través de sucesivas reacciones químicas en el interior del astrocito, el GABA es transformado en succinato que ingresa al ciclo de Krebs obteniéndose energía y α -CG como productos finales, de forma que este último puede adquirir un grupo $-\text{NH}_2$ en una reacción de transaminación, generando Glu [17].

En el citosol de los astrocitos, el Glu generado por cualquiera de estas vías puede ser transformado en Gln a través de su condensación ATP-dependiente con NH_3 , que es catalizada por la GS. Además de permitir la detoxificación de estos neurotransmisores, esta reacción cumple varias funciones cruciales para el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Por una parte, resulta esencial para el metabolismo del NH_3 , de forma que una depleción de GS en astrocitos promueve un incremento en los niveles cerebrales de esta especie, que es altamente neurotóxica y en concentraciones elevadas puede inducir convulsiones y otras formas de encefalopatía [18]. Por otra parte, una porción importante de la Gln sintetizada mediante la reacción de la GS es secretada por los astrocitos al medio extracelular, desde donde esta es captada por las neuronas glutamatérgicas y GABA-érgicas, que la utilizan como precursor en la biosíntesis de sus respectivos neurotransmisores. Dentro de las neuronas, la Gln es transformada en Glu a través de la reacción de hidrólisis simple catalizada por la GLS, liberándose a su vez una molécula de NH_3 que es exportada nuevamente al medio extracelular, desde donde esta es re-captada por los astrocitos para su uso como sustrato de una nueva ronda de catálisis GS. Este mecanismo de ciclado de los neurotransmisores, el NH_3 y la Gln, que implica un acoplamiento funcional sinérgico entre neuronas y astrocitos, se conoce como ciclo Glu/GABA -Gln, y las neuronas dependen del mismo para la biosíntesis de neurotransmisores en tanto estas poseen una capacidad muy restringida de producción de Glu directamente a partir de glucosa [17]. El ciclo Glu-Gln es representado en forma esquemática en la Figura 5.

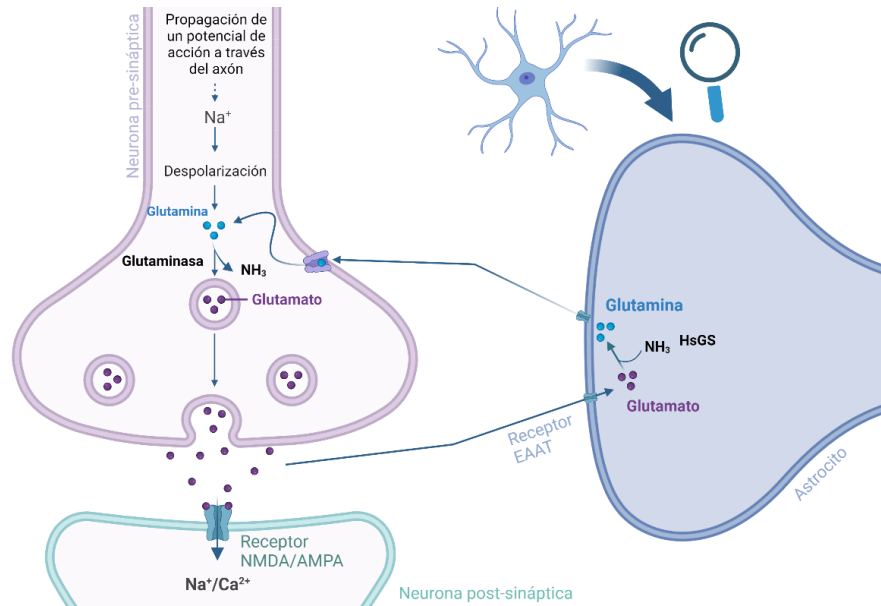


Figura 5. Representación esquemática del ciclo glutamato-glutamina en el sistema nervioso central. Diagrama construido en Biorender.

La Gln provista por los astrocitos, entonces, constituye la principal fuente de Glu en las neuronas glutamatérgicas y GABA-érgicas. A su vez, como este Glu también puede ser utilizado como fuente de energía por las neuronas, el ciclo no resulta estrictamente estequiométrico, entendiéndose por ello que se requieren mayores aportes de Gln por parte de los astrocitos por cada molécula de Glu que se libera a nivel de la neurosinapsis por unidad de tiempo. Así, la pérdida de Glu por su catabolismo oxidativo neuronal debe ser compensada por biosíntesis *de novo* de Gln en los astrocitos, dependiendo esta de la anaplerosis de distintos intermediarios del ciclo de Krebs. Considerando lo antedicho, resulta evidente que la homeostasis neuronal depende de y es controlada por el metabolismo astrocitario, y por la actividad GS de estas células. Resulta lógico, pues, que la deficiencia en actividad GS en astrocitos de cerebros humanos y de otros mamíferos esté asociada a diversas patologías neurológicas y neurodegenerativas.

2.3 La Glutamina Sintetasa

Según fue expresado anteriormente, la GS es una enzima de un elevadísimo grado de conservación evolutiva. Los genes codificantes para la misma están entre los genes funcionales más filogenéticamente antiguos que se conocen, de forma que su origen data de hace unos 1000 millones de años, precediendo a la divergencia entre procariontes y eucariotes [12, 19]. En virtud de ello y de sus características, se ha postulado, incluso, que su secuencia podría usarse como reloj molecular [20]. La conservación de esta enzima a lo largo de la escala evolutiva probablemente responda a su vital importancia para el metabolismo de nitrógeno.

La biosíntesis de Gln a partir de Glu y NH_4^+ fue observada por primera vez en preparados de tejidos animales por Hans A. Krebs en 1935, quien propuso, a su vez, que esta requería de aporte energético [21]. En el curso de los siguientes años, nuevos estudios utilizando distintas muestras biológicas aportaron más conocimiento sobre las particularidades de dicha reacción química [22-25], mientras

que la purificación de la GS a partir de muestras de cerebros de ovinos constituyó un salto cualitativo en el estudio de las propiedades de la enzima [26].

2.3.1 La familia de las Glutamina Sintetasas

Los integrantes de la familia de las GS pueden sub-clasificarse en tres tipos enzimáticos diferentes codificados por tres genes distintos designados GSI, GSII y GSIII, de manera que las proteínas codificadas por unos y otros difieren en sus secuencias, número de subunidades en su forma nativa, pesos moleculares y características funcionales. Las distintas clases de GS son fácilmente distinguibles en función del largo de su cadena polipeptídica, de forma que las GSI tienen un largo promedio de 360 aminoácidos, las GSII de 450 y las GSIII de 730 [27].

GSI se identificó en primer lugar y se encuentra principalmente en organismos procariotas, aunque luego se evidenció su presencia en eucariotas particulares. A su vez, al comienzo se creyó que los genes GSII eran exclusivos de eucariotas, mas, posteriormente, se los halló en bacterias de vida libre en los suelos, pertenecientes a los géneros *Rhizobiaceae*, *Frankiaceae*, y *Streptomycetaceae*, desafiando esta noción. Por su parte, GSIII, la más divergente de las tres clases de GS, con un porcentaje de identidad de secuencia global cercano al 10% respecto a GSI y GSII, fue la identificada más recientemente en el tiempo y es la menos caracterizada de las tres, a pesar de que su expresión también es ubicua. Esta clase de GS se expresa fundamentalmente en bacterias y arqueas, mas también se ha detectado su presencia en ciertos eucariotas [27]. A la luz de estos hallazgos, se ha propuesto que las tres súper-familias génicas codificantes para GS podrían haber surgido antes de la divergencia evolutiva entre procariotas y eucariotas [28-31].

Por su parte, en la mayor parte de los vertebrados existe un único gen codificante para GS, dando lugar a la expresión de una sola isoforma proteica de manera tejido-específica. Además, la localización sub-celular de la GS puede variar según el tejido. Según se mencionó anteriormente, los sitios principales de expresión de GS en vertebrados son el hígado y el SNC. Mientras que en hígado la GS cumple funciones primordialmente vinculadas al metabolismo del nitrógeno y las biomoléculas que lo contienen, en el SNC esta enzima cumple un papel crucial en el ciclo Glu-Gln, que permite la eficiente detoxificación del neurotransmisor remanente en las sinapsis de neuronas glutamatérgicas y GABA-érgicas. En organismos ureotélicos, como los mamíferos, la GS es expresada en citoplasma, tanto en astrocitos como en hepatocitos. Por el contrario, en varios tipos de peces, que cuentan con otros sistemas de eliminación del nitrógeno (por ejemplo, en peces ureosmóticos), la expresión de GS hepática es mitocondrial, mientras que en los astrocitos esta es citosólica. El mecanismo que hace posible esta localización sub-celular diferencial en hígado y SNC es el *splicing* o corte y empalme alternativo tejido-específico, tal que en el hígado de los peces el mensajero codificante para la GS conserva un exón adicional que contiene un codón de inicio *upstream*. en fase con el marco de lectura normal, ausente en el ARNm de la GS astrocitaria. Esto hace posible la aparición de una secuencia de localización mitocondrial en el extremo N-terminal de la GS hepática, que promueve su importación a la matriz. En cambio, la GS astrocitaria, al carecer de esta secuencia, permanece en el citosol [30].

En mamíferos, el gen de la GS tiene un largo aproximado de 10 kb, y cuenta con siete exones separados entre sí por seis intrones, de manera que la transcripción da lugar a un ARNm maduro de 2,8 o 1,4 kb con extremos 3' variables. A su vez, en el cerebro de varios mamíferos, incluyendo ratones, perros y humanos, puede ocurrir una forma de *splicing* alternativo que lleva a la adquisición

de un fragmento 5'UTR extra en el mensajero de la GS. Se propone que este splicing podría constituir una estrategia de regulación a la baja de la traducción del mensajero, en tanto se demostró que la adición de este fragmento a un ARNm que carece del mismo tiene un efecto negativo sobre su nivel de traducción en las células transfectadas [32].

En el genoma humano existe un único gen funcional codificante para GS (GLUL) localizado en la región cromosómica 1q25. Además, el genoma humano cuenta con un pseudogen procesado (GLULP) en la región cromosómica 9p13 y tres homólogos no caracterizados (GLULL1, GLULL2 y GLULL3), que se encuentran en las regiones 5q33, 11p15 y 11q24, respectivamente [32, 33].

2.3.2 Estructura de las GS

Hoy en día las estructuras tridimensionales de GSI, GSII y GSIII son conocidas. Todas las GS nativas son homo-oligómeros formados por dos estructuras de tipo anillo cerrado, con los sitios activos contenidos en las fronteras entre un protómero y sus vecinos [27]. Así, los sitios activos solo pueden formarse cuando las subunidades se asocian entre sí y se disponen en círculo formando la estructura cerrada, en tanto se requiere de un posicionamiento opuesto de sus regiones N- y C-terminal, que solo se logra en esta disposición [34]. Cada anillo homo-oligomérico, a su vez, se asocia con otro a través de una inter-fase para formar la proteína nativa, que posee una simetría de tipo diédrica [27].

El sitio activo de las GS presenta una estructura de tipo “doble embudo”, de forma que el ATP y el Glu se asocian en extremos opuestos. Este contiene tres sitios disponibles para la unión de cationes metálicos divalentes, que normalmente se encuentran ocupados por manganeso (Mn^{2+}) o magnesio (Mg^{2+}). Según se verá más adelante, estos metales ejercen funciones tanto estructurales como catalíticas [35].

Si bien, según fue mencionado anteriormente, a nivel de secuencia existen diferencias significativas entre las cadenas polipeptídicas de las tres clases de GS, a nivel de estructura secundaria y terciaria estas presentan una extensa similitud topológica y arquitectónica que no se limita al sitio activo [27]. Las GSI y GSIII nativas son dodecaméricas, con dos anillos formados por 6 subunidades idénticas entre sí y 12 sitios activos localizados en los límites entre monómeros adyacentes. Los dos anillos hexaméricos se asocian uno con otro a través de una interfaz entre sus caras planares, de forma que la estructura dodecamérica completa es estabilizada por un conjunto de interacciones no covalentes, principalmente hidrofóbicas y de tipo enlace de hidrógeno [27, 32, 35]. Por su parte, las GSII son decámeros formados por dos anillos homopentaméricos, con 10 sitios activos por molécula de enzima nativa, de modo que su estructura tridimensional global y la disposición espacial de sus subunidades son muy similares a las de GSI o GSIII [30, 33].

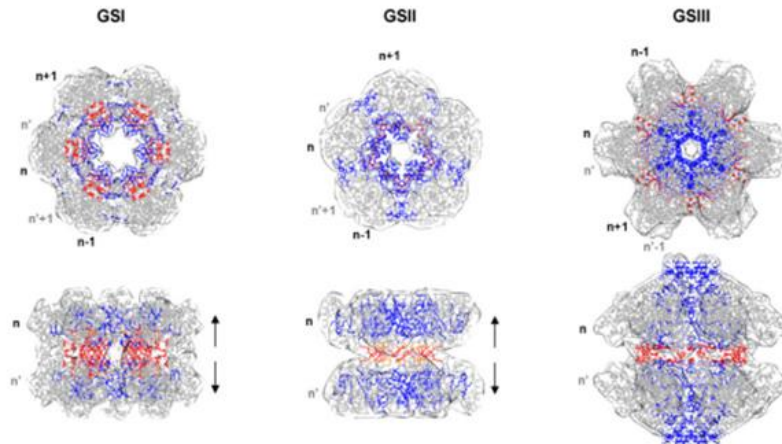


Figura 6. Comparación de las estructuras cuaternarias de las GSI, GSII y GSIII, mostrando los contactos establecidos entre subunidades vecinas dentro de cada uno de los dos anillos de la GS nativa (rojo), y las interacciones a nivel de la interfase entre los anillos (azul), que estabilizan la estructura global. En cada caso, las subunidades designadas n y n' pertenecen a anillos diferentes, y las subunidades $n+/-1$ son vecinas dentro de un mismo anillo [27].

Las primeras estructuras dilucidadas para GSII de mamíferos, correspondientes a la GS canina y humana, fueron publicadas en 2008 por Krajewski *et al*, y corresponden a las enzimas en ausencia y en presencia de distintos ligandos [34].

Se determinó, entonces, que la estructura de cada cadena de GS, desde el N- hacia el C-terminal, consiste en un meandro, que abarca los residuos 3-24, seguido por dos dominios compactos: el N-terminal, compuesto por los residuos 25-112, que generalmente se conoce como dominio “ β -grasp”, y el C-terminal, compuesto por los residuos 113-373, que es el dominio catalítico. En la enzima nativa, el meandro N-terminal de cada subunidad se proyecta hacia el interior del pentámero del que esta forma parte y allí establece contactos con las subunidades vecinas. Asimismo, un gran número de interacciones se forman entre el dominio N-terminal de cada subunidad y las regiones en hoja β del dominio C-terminal de sus vecinas, contribuyendo a la estabilización del pentámero y formando los bolsillos con forma de embudo que conforman los sitios activos (10 en total). Por su parte, las interacciones entre los dos pentámeros para dar lugar al decámero nativo son mucho más limitadas e implican a los bucles formados por los aminoácidos 150-156 de cada subunidad. Estos aminoácidos se orientan hacia el exterior del pentámero, sobresaliendo a través de una misma cara del anillo, de forma que los 5 loops que protruyen de cada pentámero se contactan entre sí, estableciendo interacciones de Van der Waals, así como 10 puentes de hidrógeno a través de los átomos de la cadena principal del residuo de Phe 154 de cada monómero [34]. Las interacciones a nivel del sitio activo de la HsGS fueron estudiadas por Krajewski *et al* utilizando una estructura cristalográfica obtenida en presencia de $MnCl_2$, ADP y el inhibidor competitivo de la enzima L-metionina-sulfoximina (MSO), que se uniría en el mismo sitio que el Glu. En dicha estructura, la adenina del ADP se sitúa en un bolsillo fuertemente hidrofóbico del sitio activo, donde es complejada tetraédricamente por los residuos proteicos Trp 130, Arg 262, Tyr 336 y Pro 208. Las cadenas laterales del Trp y la Arg participan en una interacción de *stacking* planar aromática-Arg, mientras que la Pro adopta una conformación en *cis*. Los cuatro residuos aminoácidos mencionados presentan un muy alto grado de conservación en las secuencias de GS

eucariotas. Los únicos enlaces de hidrógeno que forma la adenina con el sitio activo enzimático están dados por la interacción de sus nitrógenos N1 y N6 con la serina (Ser) 257 de la enzima. El grupo ribosilo del ADP, por su parte, adopta una conformación C2'endo y no establece enlaces de hidrógeno con ligandos proteicos, mientras que los fosfatos α y β sí interaccionan con cadenas laterales aminoacídicas a nivel del sitio activo, así como con dos de los tres cationes Mn^{2+} unidos a la proteína.

La estructura obtenida por los mismos investigadores para la apo-proteína GS canina (CfGS) reveló que esta une a un catión Mg^{2+} y ningún Mn^{2+} a nivel de su sitio activo. Este catión Mg^{2+} ocupa la posición n1, que es aquella donde la unión depende en mayor grado de la estructura proteica, por lo que esta ocurre incluso en ausencia de ligandos. En cambio, en la estructura de HsGS obtenida en presencia de ligandos se observaron tres Mn^{2+} ocupando las posiciones n1, n2 y n3, lo que sugiere que la unión a n2 y n3 depende del ingreso de ATP y Glu al sitio activo. La comparación de las estructuras obtenidas en ausencia y en presencia de ligandos permitió deducir que al unirse el nucleótido se da un cierre del sitio activo, seguido de cambios conformacionales moderados frente a la unión del Glu. No se identificaron, no obstante, cambios alostéricos (esto es, alteraciones conformacionales en regiones de la proteína por fuera del sitio activo) [34]. El cuarto catión Mg^{2+} presente en la estructura se encontraría cercano al sitio de unión del NH_4^+ , identificado previamente mediante una estructura cristalográfica obtenida en presencia de talio [35, 36].

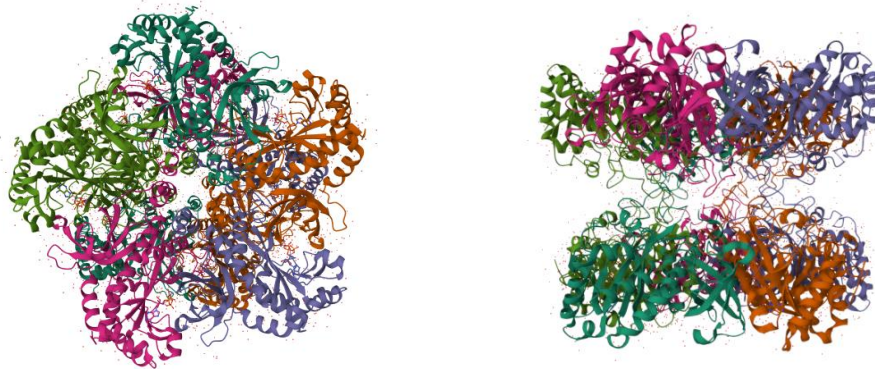


Figura 7. Estructura cristalográfica de HsGS obtenida por difracción de rayos X, en presencia de sus ligandos ADP y Pi, a pH=7.50. Correspondiente a estructura 2OJW en PDB, de Karlberg et al. DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb2OJW/pdb>.

2.3.3 Mecanismo catalítico de las GS

Para la catálisis de la síntesis ATP-dependiente de Gln a partir de Glu y NH_4^+ , llevada a cabo por las GS, se ha propuesto un mecanismo de reacción con dos pasos. El primer paso implica la formación de un intermediario γ -glutamil fosfato. Los tres cationes Mg^{2+} o Mn^{2+} actuarían coordinando a los átomos de oxígeno del fosfato y del ATP, y asistirían en la transferencia de este grupo funcional al Glu. En un segundo paso de la reacción, el NH_4^+ actuaría como nucleófilo atacando al intermediario γ -glutamil fosfato, lo que da lugar a la formación del nuevo enlace amida de la Gln. El fosfato sería liberado como grupo saliente de la sustitución [35].

Meister et al fueron los primeros en inferir este mecanismo de dos pasos. La formación del carboxilato de pirrolidina (producto del ciclado del intermediario γ -glutamil fosfato) luego de calentar una mezcla de ATP, Mg^{2+} , Glu y GS fue un hallazgo que sugirió la formación de un intermediario activado en el curso de la reacción, a pesar de que hasta el momento este no había podido ser aislado como tal. A la luz de estos hallazgos, Meister sospechó que tanto el intercambio como el aislamiento de los intermediarios en sí mismos eran impedidos por la unión estrecha de los complejos de sustratos al sitio activo de la enzima, adscribiendo una reversibilidad global al mecanismo de reacción. Igualmente se propuso un mecanismo reactivo concertado para el segundo paso del proceso, dado que los productos finales ADP y Pi no se disocian de la enzima hasta que se da la unión del NH_4^+ y la liberación de la Gln. Posteriormente, estudios de intercambio posicional de isótopos (PIX) revelaron que el intermediario activado se forma incluso en ausencia de NH_4^+ [35].

A partir de la obtención de cinco estructuras cristalográficas correspondientes a la GSI de *Salmonella typhimurium* en presencia de dos de sus sustratos: Glu y AMPPNP (análogo estructural del ATP), así como de MSO y de dos de sus productos; Gln y ADP, para los que evaluaron la formación de interacciones entre la proteína y sus sustratos y la ocurrencia de cambios conformacionales mediante mapas de Fourier, Liaw et al propusieron un mecanismo catalítico completo para las enzimas de la familia de las GS [37]. El mecanismo descrito por estos autores está representado en la Figura 8. Se trata, pues, de un mecanismo de cinco pasos. El primero implicaría la unión del ATP a la región superior del sitio activo de tipo “doble embudo” de la enzima, en una posición adyacente al sitio n2 de unión de Mn^{2+} . El ingreso del ATP desplazaría a la Arg 359 hacia el sitio de unión del Glu. En el segundo paso del ciclo, el Glu se uniría al sitio activo a través de su región inferior, cerca del Mn^{2+} n1 y de un bucle flexible de la proteína (residuos 324-328). A continuación, en el tercer paso, de acuerdo con lo propuesto por Meister et al, el Glu atacaría al fosfato γ del ATP, dando lugar al intermediario activado γ -glutamil fosfato, y a ADP. En el cuarto paso del proceso reactivo, la presencia de ADP (pero no de ATP), provocaría el desplazamiento de Arg339 hacia el sitio de unión del Pi, posiblemente resultando en una estabilización del intermediario activado y moviendo al Asp 50 de la subunidad adyacente hacia el sitio putativo de unión del NH_4^+ , facilitando su subsiguiente asociación. La desprotonación de NH_4^+ , promovida por residuos enzimáticos, resulta en la formación de la especie activa, NH_3 , que ataca nucleofílicamente al centro electrofílico constituido sobre el γ -glutamil fosfato, dando lugar a un intermediario tetraédrico. Este intermediario catiónico estabiliza al bucle de unión del Glu, debido a la interacción de sus cargas positivas con la carga negativa de la cadena lateral del Glu 327 proteico contenido en el mismo. Esto provoca el cierre del sitio activo, bloqueándose el ingreso de más moléculas de Glu a través del extremo inferior del embudo. Finalmente, el Pi escapa del sitio activo a través de su extremo superior, y se pierde un protón del intermediario tetraédrico, dando lugar a la Gln. La ausencia de atracción electrostática entre la Gln (neutra) y Glu 327 facilita el desplazamiento del bucle flexible de unión de Glu, posibilitando la salida de la Gln a través de la región inferior del sitio activo, y a su vez permitiendo la unión de una nueva molécula de Glu y el inicio de un nuevo ciclo catalítico [35, 37].

Las GSI y GSII comparten varios de sus efectores, pero no la totalidad de los mismos. Todos los residuos aminoacídicos del sitio activo de GSI que ejercen roles relevantes en la catálisis también están presentes en GSII. De ello se dedujo que el mecanismo catalítico probablemente sea semejante para ambas clases de GS [35].

Más recientemente, el modelado computacional (*in silico*) de la HsGS (perteneciente a la subcategoría de las GSII) mediante un método mixto de mecánica cuántica con mecánica molecular (QM/MM) a partir de las estructuras cristalográficas disponibles para la enzima, permitió confirmar que el mecanismo catalítico de las GSII es muy parecido, en sus diferentes etapas, a aquel previamente dilucidado para las GSI, tal que se mantienen los dos pasos básicos mencionados, de forma que ambos pueden ser descritos como sustituciones nucleofílicas bimoleculares por mecanismo concertado (S_N2).

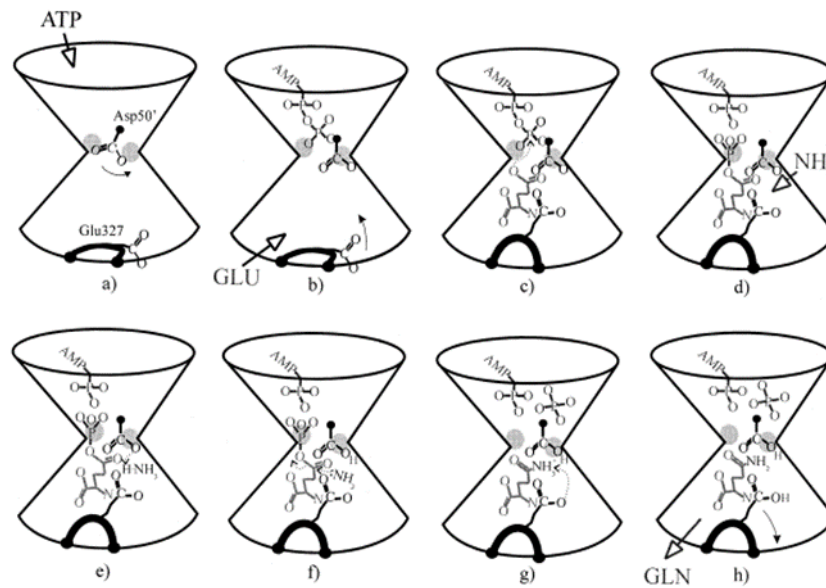


Figura 8. Diagrama ilustrativo del mecanismo catalítico descrito para las GS en forma general, observándose el sitio activo en forma de doble embudo y la ubicación de los diferentes residuos enzimáticos mencionados, así como de los sustratos, estados de transición y productos de la reacción catalizada por la enzima. Los iones Mn^{2+} se observan como esferas grises. Las figuras A-H muestran los 8 pasos del proceso reactivo en forma secuencial. Imagen obtenida de [35]

2.3.4 Regulación de las Glutamina Sintetasas

En procariontes el rol de la GS es el de fijar nitrógeno del medio, de forma que tiene sentido que su actividad sea regulada por la disponibilidad de este nutriente en el entorno de la bacteria. En situaciones de depleción de nitrógeno en el medio, la disponibilidad de Gln es pobre, y se produce una escasez de los productos nitrogenados derivados de la misma, lo que desencadena un incremento en los niveles de actividad de GSI, aumentando así la eficiencia de fijación de nitrógeno, y permitiendo, a su vez, la reposición por biosíntesis de los componentes faltantes [35]. Esto es posible gracias a la regulación de la actividad de la GS por una combinación de mecanismos alostéricos y de modificación covalente [38]. La regulación alostérica de GSI es fundamentalmente del tipo de retro-inhibición por producto, de forma que varios productos finales del metabolismo de Gln, que se acumulan cuando esta se produce en demasía, actúan inhibiendo la actividad de la enzima a cargo de su síntesis. Estos productos incluyen a varios aminoácidos, tales como la histidina (His), el Trp, la Gly y la Ala, así como al adenosín monofosfato (AMP), al carbamoil-fosfato del ciclo de la urea, a la glucosamina-6-fosfato y al NAD^+ . Cada uno de estos ligandos actúa individualmente

como un inhibidor alostérico parcial, pero su acción conjunta sobre una misma molécula de enzima tiene un efecto sinérgico, resultando en una inhibición casi completa de su actividad [1, 39, 40]. La regulación alostérica actúa en forma superpuesta con la regulación por modificación covalente, en particular, por adenililación. Esta consiste en la adición reversible de un grupo funcional AMP a nivel del -OH terminal de la cadena lateral de una Tyr altamente conservada en la región C-terminal de cada monómero enzimático de la GS. La adenililación de la GS aumenta en forma pronunciada su susceptibilidad frente a la inhibición alostérica tal que, en ausencia total de esta modificación post-traducciona la enzima no responde ante la presencia de sus inhibidores [1, 38-41].

Por el contrario, en eucariotas, donde predomina la expresión de GSII, la regulación es diferente. En primer lugar, no existe regulación por adenililación, en tanto GSII carece de la porción C-terminal que incluye al residuo de Tyr que incorpora al AMP. Asimismo, tampoco ocurre retro-inhibición alostérica [42]. Por el contrario, en vertebrados, la regulación de la actividad GS ocurre sobre todo a nivel transcripcional, regulándose la expresión de la enzima en forma diferencial en distintos linajes celulares. Por ejemplo, observaciones tempranas en cultivos celulares demostraron que los niveles elevados de Gln promueven la degradación de la GSII eucariota por el proteasoma en ciertas células [39, 40]. Esto ocurre a través de un mecanismo dependiente de la acetilación de dos residuos de Lys particulares, presentes en cada monómero enzimático: Lys 11 y Lys 14, ambos localizados en la región N-terminal de la enzima, ausente en GSI. Esta acetilación es catalizada por las acetiltransferasas p300 y CBP, de manera que las Lys acetiladas son subsiguientemente reconocidas por la proteína cereblon del complejo ubiquitin-ligasa Cullin-RING 4 desencadenando la poli-ubiquitinación de la enzima. Las subunidades poli-ubiquitinadas son removidas de la estructura del decámero nativo, permitiendo su degradación proteasomal [43] [44].

Adicionalmente, a nivel transcripcional, se cree que la expresión de GSII en células de vertebrados también podría ser regulada por señalización por glucocorticoides [45-47]. Se cree que estas hormonas podrían ejercer un rol clave en la modulación temporal y tejido-específica de la expresión de GSII [48-50]. A su vez, eventos subsiguientes de procesamiento post-transcripcional afinarían los niveles de expresión de la enzima en cada tejido [47].

2.4 Patologías vinculadas a mutaciones y alteraciones funcionales de la HsGS.

Dado el sinnúmero de funciones cumplidas por la Gln, el producto de la reacción catalizada por la HsGS, resulta lógico que la deficiencia en la actividad de esta enzima pueda acarrear graves consecuencias para el individuo portador y resulte incompatible con una vida normal. La expresión disminuida de la HsGS o su deficiencia secundaria han sido descritas previamente, pero son infrecuentes. En estudios post-mortem de neonatos homocigotas para alelos mutados de GS, asociados a una actividad disminuida de esta enzima, se observó una depleción casi total de Gln en suero, orina y líquido cefalorraquídeo, llevando a malformación cerebral severa, fallo multi-orgánico y muerte en el transcurso de las primeras semanas de vida [51-54].

Estudios con modelos animales con una delección parcial (tejido-específica) o total de GLUL, demostraron la esencialidad de la GS para las funciones normales del organismo, así como la salud y sobrevivencia embrionaria y neonatal [55, 56]. Ratones con doble delección del gen codificante para GS mueren antes del nacimiento; se ha planteado que esto ocurriría en el estadio del desarrollo intrauterino en el que se activa el catabolismo de aminoácidos [55]. A su vez, se ha demostrado que

la deficiencia de GS en astrocitos murinos resulta en sobrevida en la etapa fetal, pero muerte neonatal, que ocurriría en la etapa de la vida del ratón donde normalmente se activan los ciclos Glu-Gln y piruvato-Ala (ciclo de Cori) [56].

Por otra parte, existe una enorme cantidad de reportes que vinculan alteraciones en la actividad o nivel de expresión de la GS con el desarrollo de diferentes patologías neurológicas, sobre todo en el SNC. Así, la deficiencia de actividad HsGS en el cerebro de mamíferos podría no solo ser un fenómeno asociado, sino también ser una fuerza motora detrás del desarrollo y la progresión de numerosas patologías neurodegenerativas. Esto es, podría existir una relación causal entre la pérdida de actividad GS astrocitaria y el desarrollo de esta clase de afecciones a nivel del SNC [57].

Por ejemplo, la deficiencia en HsGS es propia de astrocitos en la formación hipocampal y la amígdala en epilepsia humana y de tejidos tumorales de pacientes con gliomas malignos y epilepsia concomitante. Si bien es posible que la pérdida de actividad HsGS sea un fenómeno derivado y no causal en el desarrollo de epilepsia, evidencia recabada en numerosos estudios apoya la noción de que la deficiencia de HsGS se encuentra en las bases o, al menos, constituye un mecanismo contribuyente al desarrollo de algunos tipos de epilepsia en humanos [12]. Asimismo, un gran volumen de evidencia recabado de estudios en pacientes humanos y modelos animales de Alzheimer abona la hipótesis de que la pérdida de actividad GS podría tener un rol en la patogénesis de esta enfermedad, y varios de esos reportes asocian dicha disminución a un proceso de inactivación mediado por especies reactivas del oxígeno generadas en el marco de la patología.

La primera evidencia de una disminución en la actividad HsGS en el cerebro post-mortem de pacientes fallecidos con enfermedad de Alzheimer fue hallada por Smith et al, en 1991. Ellos descubrieron que la actividad de HsGS cerebral en estos individuos era significativamente menor que aquella hallada en individuos control, de edades equivalentes. A su vez, estos investigadores también observaron que existía una reducción relevante de la actividad HsGS en individuos control añosos, al compararlos con controles jóvenes. Esto les permitió concluir que la disminución de la actividad HsGS también ocurre en el marco de un envejecimiento normal. A su vez, en el mismo estudio se midieron los niveles de carbonilos proteicos en diferentes regiones del cerebro, tomándose estos como una medida del nivel de oxidación de las proteínas en la región. Esta medición les permitió establecer una correlación positiva entre la acumulación de proteínas oxidadas (sobre todo en la región frontal del cerebro) y la edad de los pacientes. También se correlacionó la distribución de proteínas oxidadas con la inactivación de la HsGS. Basándose en estos hallazgos, los autores propusieron que la pérdida de actividad HsGS observada en la porción frontal de los cerebros de individuos con Alzheimer y/o envejecidos podría deberse a la vulnerabilidad de la actividad enzimática HsGS frente a la oxidación de algunos de sus residuos aminoacídicos; es decir, plantean la hipótesis de la inactivación oxidativa de esta enzima en un contexto rico en ROS [58].

En 1994, Hensley y colaboradores demostraron que, tanto en cultivos celulares como en medios libres de células, el tratamiento con dos formas de amiloide β ($A\beta$) sintético logra desencadenar la inactivación de la GS, así como de otras enzimas sensibles a la oxidación [59].

En 1995 los mismos investigadores hallaron una disminución promedio del 27% de la actividad HsGS en cerebros post-mortem de pacientes humanos fallecidos con Alzheimer, en comparación con cerebros control. A su vez, observaron que las regiones donde esta disminución se hacía más pronunciada coincidían con aquellas donde se constataba mayor acumulación de marcadores

histopatológicos asociados a la enfermedad, como una mayor densidad de depósitos de placas seniles y formaciones neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*), que a su vez fue correlacionada con una mayor prevalencia de células gliales inmunoreactivas. Esto les permitió concluir que las regiones densas en placas seniles del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer constituyen ambientes de elevado estrés oxidativo, y que posiblemente sea este mismo estrés el que lleve a la inactivación de la HsGS astrocitaria, desencadenando fenómenos de excito-toxicidad y muerte neuronal [59].

A su vez, Le Prince et al, también en 1995, observaron que en cerebros post-mortem de pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer, la disminución en la actividad HsGS se daba en forma progresiva a medida que se iban acumulando las placas seniles y depósitos del péptido A β 4, sin verse afectados los niveles de ARNm codificantes para la enzima, indicando un mecanismo post-transcripcional de inactivación [60].

Posteriormente, estudios comparativos de inmunocitoquímica en cerebros de pacientes humanos de Alzheimer e individuos control de la misma edad, verificaron la disminución de los niveles de HsGS astrocitaria detectable por anticuerpos, particularmente en las proximidades de las placas seniles en los individuos enfermos [61]. Esta distribución particular de la depleción de HsGS detectable por antisuero es consistente con la hipótesis planteada anteriormente por Le Prince, tal que la menor inmunomarcación anti-GS podría deberse a la acumulación de múltiples modificaciones oxidativas sobre la enzima, que la hacen irreconocible a los anticuerpos, inducidas por cadenas de daño oxidativo iniciadas por determinados péptidos de A β . Cabe destacar, pues, que existen múltiples reportes del rol de estos péptidos como iniciadores de cascadas de lipoperoxidación, que llevan a la producción de ROS capaces de mediar la inactivación nitrooxidativa de enzimas susceptibles, como lo es la GS [62-64]. A su vez, factores adicionales deberían estar involucrados, en tanto la intensidad de inmunomarcación contra HsGS se ve reducida en los cerebros de pacientes con Alzheimer a lo largo de toda la materia gris cortical, y no solo en las regiones ricas en placas de amiloide- β . Se ha sugerido que un factor que podría estar contribuyendo a ese decrecimiento generalizado sería la pérdida de señalización por noradrenalina proveniente del *locus coeruleus* a nivel de la corteza cerebral de los pacientes con Alzheimer [61].

Muchos de los fenómenos mencionados, observados en los cerebros de pacientes humanos de la enfermedad de Alzheimer, también fueron constatados en forma paralela en los cerebros de animales de laboratorio transgénicos utilizados como modelos de esta enfermedad, reforzando la noción de que la actividad GS se ve afectada en esta patología [65-68]

Si bien estas observaciones no necesariamente indican que la disminución de la actividad GS es un agente causante de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, existe evidencia experimental que indica que la inhibición farmacológica de esta enzima, por ejemplo con MSO, es capaz de inhibir el ciclo Glu-Gln y, a través de dicha inhibición, puede causar alteraciones de los estados de ánimo y el comportamiento, cambios en los patrones de sueño, amnesia, confusión y disminución del grado de conciencia, siendo todos estos síntomas típicamente asociados a la enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos sugieren un rol clave de la pérdida de actividad GS en el desarrollo de esta patología y las manifestaciones sintomatológicas de la misma [61]. Se ha postulado que al menos una parte significativa del empobrecimiento en actividad GS observado en astrocitos cerebrales de pacientes con Alzheimer, sobre todo en el entorno de las zonas ricas en placas seniles, podría deberse a la inactivación oxidativa de la enzima. En la siguiente sección se explorarán los mecanismos

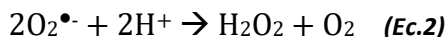
bioquímicos que conducen a la misma, y como estos podrían ser relevantes en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, así como en otros desórdenes neurodegenerativos.

2.5 Especies reactivas del oxígeno de formación endógena

Llamamos colectivamente “especies reactivas del oxígeno” o ROS, por sus siglas en inglés, al conjunto de moléculas derivadas del O₂, formadas como subproducto natural del metabolismo aerobio, y que comparten la característica de ser más reactivas que este, sobre todo actuando como oxidantes en procesos redox. Las ROS pueden ser radicalares o no radicalares (oxidantes de uno o de dos electrones, respectivamente), pueden originarse en el citosol o en diferentes compartimentos sub-celulares (mitocondria, lisosomas, retículo endoplásmico, etc.) y muchas cumplen funciones de señalización. Para ello, su concentración, en condiciones de salud, es estrechamente regulada, tanto a nivel de su producción como mediante un repertorio de mecanismos de detoxificación destinados a evitar que estas se acumulen. No obstante, bajo determinadas condiciones patológicas, puede desencadenarse una producción excesiva o una detoxificación deficiente de estas especies, resultando en daño oxidativo a diversas biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [69, 70].

2.5.1 Radical superóxido

La producción de ROS a nivel celular comienza siempre con la formación de O₂^{•-}, que es el producto de la reducción mono-electrónica del O₂. En la mitocondria de las células eucariotas, su formación ocurre producto de un acoplamiento incompleto a nivel de la cadena de transporte de electrones, que transcurre en la membrana mitocondrial interna. Este lleva a la fuga hacia el O₂ de un porcentaje que oscila entre el 1 y el 3% de los electrones que ingresan en la cadena, sobre todo a nivel de los complejos I y III (NADH-Q-oxidoreductasa y Q-citocromo C-oxidoreductasa). Mientras tanto en el citosol el O₂^{•-} se forma fundamentalmente como producto de la actividad enzimática de las enzimas NADPH oxidasas (NOXs) y de la xantina oxidasa (XO) [71]. El O₂^{•-} es una especie radicalar, pero de reactividad moderada si se lo compara con otros radicales libres biológicos, y actúa tanto como oxidante, como en forma de reductor. En condiciones fisiológicas, este posee una carga neta negativa (pKa=4,8), por lo que se trata de una especie fuertemente polar y como tal incapaz de difundir libremente a través del *core* hidrofóbico de las membranas biológicas. El O₂^{•-} puede, sin embargo, ser transportado a través de las mismas mediante canales aniónicos. El principal destino celular del O₂^{•-} es su dismutación a O₂ y H₂O₂, que puede ser espontánea o catalizada por enzimas pertenecientes a la familia de las superóxido dismutasas (SODs), según:



Así, la dismutación espontánea del O₂^{•-} en medios acuosos posee una constante de velocidad de $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que la catálisis por las SODs acelera significativamente el proceso reactivo, incrementando k en unos cuatro órdenes de magnitud ($k=1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [72]. Además de la dismutación, el O₂^{•-} puede tener otros destinos. Por ejemplo, este es capaz de reaccionar *in vivo* con el radical óxido nítrico ([•]NO), de estar este disponible, dando lugar al ONOO⁻, que es un agente tanto oxidante como nitrante [73, 74].

Adicionalmente, el $O_2^{\bullet-}$ también puede reaccionar directamente con diferentes blancos celulares, como lo son los centros ferrosulfurados (Fe-S) de proteínas con actividad deshidratasa resultando en su inactivación, lo que ocurre, por ejemplo, con la aconitasa del ciclo de Krebs.

Si bien el $O_2^{\bullet-}$ puede ocasionar daños significativos a componentes endógenos mediante su reactividad directa, su principal potencial citotóxico radica en su capacidad de derivar en oxidantes más potentes, como el H_2O_2 y el $ONOO^-$, mediante los mecanismos ya mencionados.

2.5.2 Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 es un oxidante débil. Se trata de una molécula no radicalar y neutra que, como tal, es capaz de difundir con relativa facilidad a través de las membranas biológicas a favor de su gradiente de concentración, lo que la dota de una gran relevancia fisiológica [75, 76]. Este puede formarse producto de la dismutación de $O_2^{\bullet-}$, según fue visto anteriormente, pero también es el producto directo de las reacciones catalizadas por varias enzimas, incluyendo a la NOX-4, las monoamina oxidasas, las hexosa oxidasas, oxidasas de aminoácidos, otras oxidoreductasas e isomerasas de disulfuros proteicos (PDIs, por sus siglas en inglés), entre otras [77].

En la célula, el H_2O_2 actúa oxidando un repertorio limitado de blancos biológicos con los que, en general, presenta reacciones lentas. Quizás el proceso oxidativo mediado por H_2O_2 que cuenta con mayor relevancia *in vivo* sea la oxidación de tioles (-SH), tanto proteicos como pertenecientes a compuestos de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en inglés), que da lugar a grupos funcionales de tipo ácido sulfénico (-SOH). Los -SOH son altamente reactivos, y de encontrarse próximos a grupos -SH pueden reaccionar con los mismos para formar puentes disulfuro (-S-S-), de carácter intra- o inter-molecular [78].

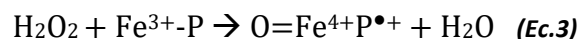
Alternativamente, en contextos de estrés oxidativo los grupos -SOH pueden sufrir subsiguientes eventos de oxidación por nuevas moléculas de H_2O_2 o de otros oxidantes, dando lugar a formas sobre-oxidadas del sulfhídrico inicial, como ácidos sulfínicos (SO_2H) y sulfónicos (SO_3H). Si bien la formación de estas especies en el marco de proteínas suele ser considerada una marca de daño oxidativo, en bajas cantidades la oxidación de la cadena lateral de residuos de Cys por H_2O_2 en proteínas blanco particulares puede constituir un mecanismo de señalización, participando en cascadas de transducción de señales y en vías enzimáticas diversas [78]. Existe evidencia de que el H_2O_2 puede activar a varios componentes de cascadas señalizadoras intracelulares, implicadas en la regulación de la supervivencia, proliferación, diferenciación y muerte de la célula [75].

Las reacciones del H_2O_2 con las cadenas laterales azufradas de Cys y Met, así como con selenocisteínas (Sec), suelen tener asociadas constantes cinéticas muy pequeñas, con la excepción de las reacciones con determinadas enzimas especializadas (como las peroxirredoxinas y GPx) que poseen centros catalíticos que facilitan una ruptura rápida del enlace O-O del peróxido. Tales ambientes pueden elevar la constante de reacción más de un millón de veces [71]. En estas enzimas, la oxidación de Cys proteicas a su forma sulfénica forma parte del mecanismo catalítico.

Alternativamente, el H_2O_2 puede reaccionar con metales de transición tales como el hierro, el cobre y el manganeso, en diferentes estados de oxidación. Por una parte, el H_2O_2 es capaz de reaccionar con metales de transición en estado reducido, como los cationes ferrosos o cuprosos (Fe^{2+} o Cu^+) libres en el citoplasma, en un proceso conocido como química o reacción de Fenton, que lleva a la formación de anión y radical hidroxilo (OH^- y OH^\bullet , respectivamente) como productos, siendo este

último un oxidante extremadamente reactivo e inespecífico. El OH• es la molécula endógena con mayor capacidad de oxidación (mayor potencial de reducción) y es capaz de reaccionar con un sinnúmero de biomoléculas con constantes de velocidad en el orden de 10^9 - 10^{10} M⁻¹s⁻¹ (esto es, dando reacciones controladas por difusión), pudiendo oxidar ácidos nucleicos, lípidos y proteínas varias, tanto a nivel del esqueleto de la cadena polipeptídica como a nivel de las cadenas laterales de varios aminoácidos. Los organismos vivos tienden a limitar la concentración de Fe²⁺ y Cu⁺ libres en el citoplasma, mediante el almacenamiento de estos metales de transición en asociación con proteínas especializadas, lo que disminuye la ocurrencia de la reacción de Fenton. Por ejemplo, en el caso del hierro, este se almacena asociado a la ferritina, formando cristales de óxidos e hidróxidos de hierro férrico. Sin embargo, si el cargado del hierro resulta defectuoso o frente a una acidificación del medio, puede ocurrir la liberación de cationes Fe³⁺, que son capaces de reaccionar con sustratos reductores, como el ascorbato o el radical O₂•⁻, reduciéndose a su forma ferrosa, la cual puede reaccionar por química de Fenton con el H₂O₂ presente en sus inmediaciones, dando lugar a la formación de OH• [79].

Por otra parte, el H₂O₂ también puede reaccionar con metales de transición en estado oxidado. Por ejemplo, este puede oxidar por dos electrones al catión férrico (Fe³⁺) que forma parte de los grupos prostéticos hemo de las hemoproteínas (como lo son la hemoglobina, la mioglobina, etc.) dando lugar a un intermediario oxo-ferrilo (Fe⁴⁺=O) y a un catión radical centrado en el anillo de porfirina, ambos altamente reactivos, según:

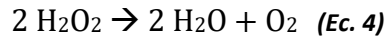


Esta reacción da lugar a dos especies oxidantes secundarias, de mayor reactividad que el H₂O₂ de partida. Cuando esta clase de reacción ocurre sobre los grupos hemo de enzimas con actividad peroxidasa, el intermediario portador del grupo oxo-ferrilo recibe el nombre de compuesto I, y puede volver a reaccionar con una nueva molécula de H₂O₂, que lo reduce por un electrón, generando un grupo O=Fe⁴⁺, de forma que la molécula que lo lleva pasa a ser conocida como compuesto II. Tanto los compuestos I como los compuestos II son especies altamente reactivas, pudiendo oxidar por un electrón a un amplio repertorio de sustratos que no son blancos directos del H₂O₂, incluyendo aminoácidos y ácidos grasos poli-insaturados (PUFAS, por sus siglas en inglés) [80, 81].

Además, cuando estos oxidantes se forman sobre ciertas enzimas, como la mieloperoxidasa (MPO), expresada por células de la inmunidad innata activadas, pueden inducir la formación de otros oxidantes de dos electrones secundarios al H₂O₂, como el ácido hipocloroso (HOCl), formado a partir de la oxidación del anión cloruro (Cl⁻), siendo su reactividad considerablemente mayor que la del H₂O₂ [81, 82]. El HOCl, que existe en equilibrio con Cl₂ a pH ácido, es un componente central de la respuesta inmune contra patógenos, siendo generado en grandes cantidades dentro de los fagolisosomas de los neutrófilos. La liberación de la MPO al espacio extracelular y su subsiguiente reacción con el H₂O₂ allí presente, sin embargo, puede resultar en daño tisular, cuya gravedad guarda proporción con el nivel de actividad enzimática registrado. Este es un componente clave de la patogenia de enfermedades inflamatorias, tanto agudas como crónicas. La utilización por parte de los neutrófilos del HOCl en lugar del propio H₂O₂ como especie oxidante de preferencia en el combate a patógenos, se cimienta en la mayor reactividad del HOCl. Asimismo, la baja reactividad de H₂O₂ es probablemente una de las razones evolutivas de mayor peso para el uso de esta especie

como una molécula mensajera, en tanto esta confiere especificidad y selectividad a las cascadas de señalización en las que el H₂O₂ participa [71].

A su vez, a nivel intracelular la toxicidad del H₂O₂ se ve limitada por varios sistemas antioxidantes que se ocupan de su descomposición. Entre estos cabe destacar a las catalasas, y a las enzimas con actividad peroxidasa, como lo son las Prx y GPxs. La reacción catalizada por las catalasas es la siguiente:



Tal como puede observarse, estas enzimas utilizan al H₂O₂ simultáneamente como dador y como aceptor de electrones, reduciendo una de las moléculas del mismo a H₂O y oxidando la otra a O₂. Mientras tanto, las GPx son capaces de reducir H₂O₂ directamente a H₂O, a través de su propia oxidación, en general a nivel de la cadena lateral de una Cys presente en su sitio activo. La enzima luego deberá ser reducida nuevamente, quedando así lista para una nueva ronda catalítica. Esta reducción puede ocurrir mediante diferentes mecanismos y siempre requiere de cofactores reductores adicionales, que serán los donantes de electrones. Algunos ejemplos paradigmáticos son el GSH y el ascorbato [83]. Las catalasas y peroxidasas, actuando conjuntamente, constituyen un eficiente sistema detoxificador de H₂O₂, permitiendo que su concentración se mantenga dentro de límites estrechos en condiciones de salud [84].

2.5.3 Óxido nítrico y especies derivadas

El •NO, por su parte, se forma producto de la actividad de un conjunto de enzimas conocidas como Óxido Nítrico Sintetasas o NOS, por sus siglas en inglés. Estas enzimas utilizan como sustratos al aminoácido L-Arg, al dador de electrones NADPH y al O₂, catalizando una reacción que arroja como productos al •NO, NADP⁺, H₂O y L-citrulina, según puede observarse en la Figura 9. En esta reacción, uno de los dos grupos guanidinio equivalentes de la Arg es oxidado por 5 electrones para rendir •NO, obteniéndose L-citrulina como sub-producto [83].

Existen múltiples isoformas de NOS, de manera que cada una de ellas es expresada en un repertorio particular de células, con diferentes patrones regulatorios. Por ejemplo, las células del endotelio vascular expresan a la isoforma endotelial de la NOS, eNOS, mientras que las neuronas y otras células del sistema nervioso expresan nNOS, de forma tal que ambas isoformas son de expresión tejido-específica y constitutiva o de *house-keeping*. Tanto eNOS como nNOS tienen actividad enzimática Ca²⁺-dependiente y ambas catalizan la formación de concentraciones pico a nanomolares de •NO, siendo estos niveles basales, consistentes con una función regulatoria. Mientras tanto, los macrófagos y otras células de la inmunidad innata expresan una forma inducible de esta enzima, la iNOS, frente a estímulos pro-inflamatorios que desencadenan su activación, como lo son el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), interferón γ (IFN-γ) e interleuquina 1-β (IL-1β). Esta isoforma, pues, iNOS es expresada en el marco del estallido respiratorio que ocurre en los macrófagos activados, y cataliza la formación de niveles micromolares de •NO, contribuyendo así a la generación de ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS) destinadas a la degradación del material fagocitado por la célula en un contexto inflamatorio o de daño tisular. La actividad iNOS, al contrario que lo que ocurre para las isoformas constitutivas de esta misma enzima, sería Ca²⁺/calmodulina-independiente [85].

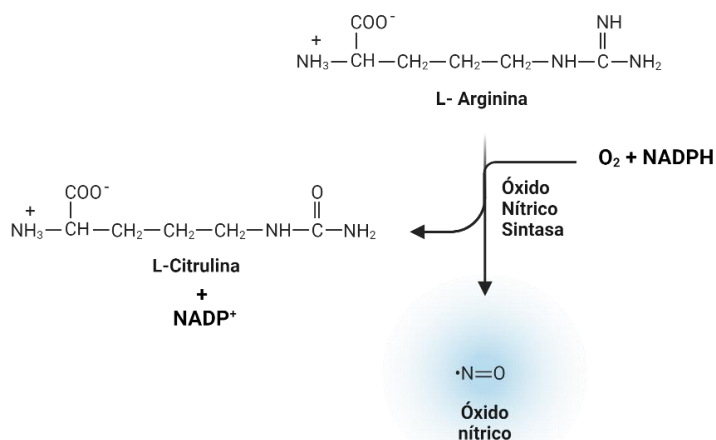
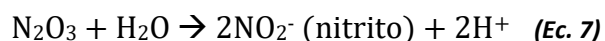
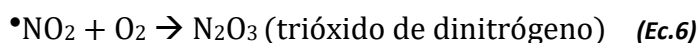
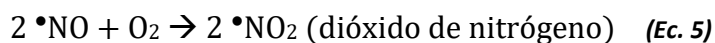


Figura 9. Síntesis de radical óxido nítrico a partir de L-Arginina, oxígeno molecular y NADPH, por enzimas de la familia de las óxido nítrico sintasas. Diagrama construido en Biorender.

Desde el punto de vista molecular, el $\cdot\text{NO}$ es una especie moderadamente oxidante y nitrante. Es radicalar, pero tiene una vida media relativamente larga, y su hidrofobicidad le permite difundir libremente a través de las membranas biológicas, pudiendo migrar dentro de la célula y de una célula a sus vecinas. Esto permite que el $\cdot\text{NO}$ actúe como señalizador autócrino y parácrino, a través de su unión al grupo hemo de receptores de tipo guanilato ciclasa, que se hallan libres en el citosol de las células blanco, induciendo la síntesis del segundo mensajero GMPc. Por ejemplo, el $\cdot\text{NO}$ ha sido identificado como el factor de relajación del endotelio vascular, de forma que este es sintetizado en las células endoteliales y actúa sobre el músculo liso vascular adyacente promoviendo su relajación. Asimismo, el $\cdot\text{NO}$ también media la relajación del músculo liso vascular en forma endotelio-independiente en arterias cerebrales (entre otras), así como en el cuerpo cavernoso del pene [86]. En el cerebro el $\cdot\text{NO}$ actúa como un mensajero neural, mediando la acción del neurotransmisor Glu al unirse a los receptores NMDA [87]. Evidencia recabada recientemente sugiere que un exceso de $\cdot\text{NO}$ sería responsable por una porción importante del daño neural que ocurre luego de los infartos cerebrales [86]. Además, se ha sugerido que el $\cdot\text{NO}$ podría actuar promoviendo reacciones inflamatorias, tanto agudas como crónicas [88]. En concordancia con esta idea, se ha demostrado que la administración de inhibidores de NOS a ratas con artritis reumatoidea atenúa la inflamación en pulmones y piel luego de daño mediado por inmunocomplejos y en intestinos luego de colitis o ileitis experimentales [86].

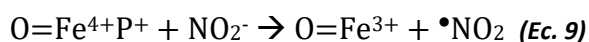
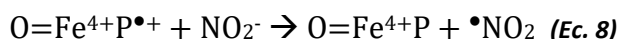
Para evitar que la señalización por $\cdot\text{NO}$ se torne exacerbada y que este se acumule en concentraciones demasiado elevadas pudiendo causar daño por oxidación o nitración a componentes endógenos celulares, la concentración del mismo debe ser estrechamente regulada. Cabe notar que, si bien el $\cdot\text{NO}$ es capaz de reaccionar directamente con diferentes blancos celulares, incluyendo a los metales de transición asociados a metaloproteínas o a radicales lipídicos o proteicos, su principal rol como citotóxico yace en su capacidad de dar lugar a especies más fuertemente oxidantes a través de su propia oxidación.

En presencia de O_2 , el $\cdot\text{NO}$ es una especie relativamente inestable y tiende a reaccionar decayendo hacia diferentes óxidos de nitrógeno. Por ejemplo:



Tanto el $\bullet\text{NO}_2$ como el N_2O_3 son potentes agentes nitrosantes, con la capacidad de N-nitrosar una variedad de aminas primarias y secundarias, así como S-nitrosar a un amplio repertorio de diferentes péptidos y proteínas con residuos de Cys, de forma tal que esta modificación puede llegar a tener un rol señalizador [86].

A su vez, el NO_2^- generado como producto del decaimiento del $\bullet\text{NO}$ podría eventualmente convertirse también en $\bullet\text{NO}_2$ a través de su oxidación por un electrón, mediada por los estados oxidados de determinadas hemo-peroxidasas (complejos I y II ya mencionados).



A diferencia del $\bullet\text{NO}$, el $\bullet\text{NO}_2$ es un oxidante altamente reactivo, que se caracteriza por su capacidad de reaccionar con múltiples blancos, dando reacciones radical-radical, de adición a dobles enlaces, de transferencia electrónica y de sustracción de protones de enlaces carbono-hidrógeno de compuestos insaturados, fenoles y $-\text{SH}$. Resultan de particular relevancia las reacciones con otros radicales, tanto lipídicos como proteicos, que da lugar a lípidos y proteínas nitradas, respectivamente [89]. Otro de los destinos posibles del $\bullet\text{NO}$ es su ya mencionada reacción con $\text{O}_2^{\bullet-}$ que da lugar al oxidante fuerte ONOO^- .

2.5.4 Reactividad del peroxinitrito

Según fue mencionado anteriormente, el ONOO^- es el producto de la reacción controlada por difusión entre los radicales $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$. Se han reportado numerosos valores para la constante de velocidad del proceso, que oscilan consistentemente entre los $4\text{-}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta constante tan elevada explica que efectivamente ocurra formación de ONOO^- *in vivo*, incluso considerando que los reactivos que le dan origen son ambos radicalares, de vida media corta y se encuentran en concentraciones muy bajas en la célula en condiciones normales [74, 90]. Así, el ONOO^- se forma continuamente incluso bajo condiciones metabólicas basales, aunque sus acciones biológicas se vuelven particularmente notorias frente a incrementos en la generación de $\bullet\text{NO}$ y/o $\text{O}_2^{\bullet-}$ a nivel celular o tisular.

Siendo el $\text{O}_2^{\bullet-}$ uno de los principales factores que limitan la vida media del $\bullet\text{NO}$ derivado de la vasculatura y de las células inflamatorias, la formación de ONOO^- a partir del mismo resulta ineludible. No obstante, las reacciones entre $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ no necesariamente resultan en daño oxidativo tisular e incluso en algunos casos pueden ser cito-protectoras. Niveles bajos de ONOO^- , por ejemplo, pueden ser detoxificados por sistemas celulares enzimáticos y no-enzimáticos, pudiendo incluso actuar modulando varios procesos de transducción de señales [74].

Dado que el ONOO^- presenta un pKa de 6,8, su forma aniónica se halla en equilibrio con el ácido peroxinitroso (ONOOH) en condiciones celulares. En general, al utilizarse el término “peroxinitrito”, este refiere a la suma de ambas especies, independientemente de su estado de protonación [90]. Así, tanto el ONOO^- como el ONOOH son oxidantes fuertes de uno y dos electrones, pudiendo

reaccionar con un amplio repertorio de blancos biológicos. Estos blancos incluyen metales de transición contenidos en metaloproteínas y algunos aminoácidos [90-92]. Por otra parte, el ONOO⁻ puede reaccionar con otros blancos celulares, rindiendo nuevas especies oxidantes, incluyendo •OH, •NO₂ y CO₃•⁻, todos ellos extremadamente reactivos y, como tales, poseedores de un elevado potencial citotóxico [93-99]. De la consideración de la co-existencia de la forma protonada y desprotonada de la especie, así como de los múltiples blancos y vías de decaimiento de cada una de ellas *in vivo* se desprende que la reactividad del ONOO⁻ es compleja e intrincada.

Uno de los blancos preferenciales del ONOO⁻ es el dióxido de carbono (CO₂). Este suele ser abundante en la mayoría de los medios biológicos, y reacciona con el ONOO⁻ con una constante de velocidad relativamente elevada ($5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a 37°C y pH=7,4). El resultado de esta reacción es la formación del aducto radical nitrosoperoxicarboxilato (ONOOCO₂•), una especie inestable que rápidamente decae a CO₂ y NO₃⁻ con un rendimiento del 65% y a los radicales CO₃•⁻ y •NO₂ con un rendimiento del 35%. De esta forma, la reacción del ONOO⁻ con CO₂ da lugar a dos nuevos oxidantes radicalares fuertes, de vida media corta y con una reactividad significativamente diferente a la del propio ONOO⁻. Estos radicales tienen como principales blancos de reacción a los tiolatos (-S⁻) y residuos aromáticos proteicos, y pueden participar en la modificación de las bases del ADN, con potenciales efectos mutagénicos [90].

El ONOO⁻ también es capaz de reaccionar con diferentes hemoproteínas dando lugar a productos diversos y difícilmente predecibles. Algunas hemoperoxidasas están dentro de los blancos preferenciales del ONOO⁻ presentando constantes de reacción relativamente elevadas, con valores mayores a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pero incluso tratándose de proteínas funcionalmente relacionadas los productos de la reacción con ONOO⁻ son variables [90]. Por ejemplo, en el caso de la peroxidasa de rábano (HRP) y del endoperoxido de prostaglandina H sintasa-1, la reacción con el ONOO⁻ es una oxidación por dos electrones, que da como productos al compuesto I y NO₂⁻ [88]. Por el contrario, en el caso de la MPO y de la cloroperoxidasa la reacción es de oxidación por un único electrón y da lugar al compuesto II y al radical •NO₂ [100]. Algunas hemoproteínas catalizan la isomerización del ONOO⁻ a NO₃⁻, con constantes cinéticas en el orden de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, como es el caso de la oxi- y la met-hemoglobina y de la met-mioglobina [101, 102], mientras que otras hemoproteínas no reaccionan con ONOO⁻ a niveles detectables, como es el caso de la catalasa [103] y del citocromo C oxidado (férrico) [104]. La reacción del ONOO⁻ con diversos metales de transición que actúan como grupos prostéticos proteicos también conduce a la formación de oxidantes por un electrón de carácter fuerte, incluyendo a los intermediarios oxoferrilo ya mencionados (O=Fe⁴⁺P^{*+} y su producto de reducción por un electrón, O=Fe⁴⁺P), y a •NO₂ [103, 105-107].

Finalmente, el ONOOH también puede generar radicales mediante su propio decaimiento por homólisis, esta ocurre a nivel del enlace O-O y es catalizada por su H⁺. Dicho decaimiento lleva a la formación de NO₃⁻, en un 70% aproximadamente, y de los radicales •OH y •NO₂ con un rendimiento menor o igual al 30%, siendo este significativo. No obstante, es de notar que esta reacción transcurre lentamente en condiciones celulares ($k=0,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C y pH=7,4), sobre todo si se la compara con las otras reacciones posibles para el par ONOO⁻/ONOOH. Considerando lo antedicho, se estima probable que en la célula el ONOO⁻ reaccione preferencialmente con otros blancos antes que decaer por esta vía, que no resulta cinéticamente competitiva y, por ende, cuenta con una relevancia limitada. No obstante, el decaimiento por homólisis sí podría ser más significativo en biocompartimentos específicos, sobre todo en regiones hidrofóbicas, como las membranas

biológicas, donde la disponibilidad de *scavengers* o Prx y otras enzimas detoxificadoras del ONOO^- es limitada, desencadenando allí cadenas de propagación radicalar (lipoperoxidación) [90, 108]. El mecanismo propuesto para la reacción de homólisis del ONOOH puede verse en la Figura 10.

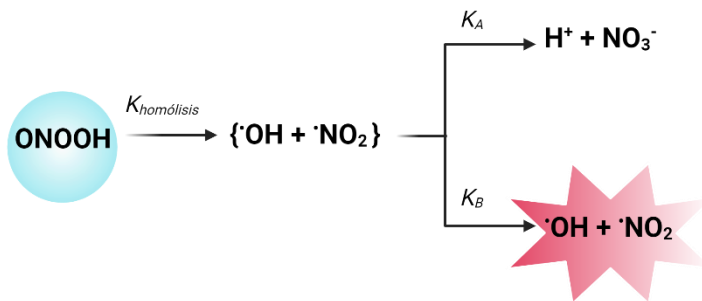


Figura 10. Mecanismo de decaimiento por homólisis del ácido peroxinitroso. Diagrama construido en Biorender, adaptado a partir de uno similar encontrado en [108].

Los $-\text{SH}$ son otro de los blancos principales del par $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ *in vivo*. Esto responde a dos factores: la alta velocidad de reacción entre ONOOH y $-\text{S}^-$ y la elevada concentración de $-\text{SH}$ y $-\text{S}^-$ disponibles en el citoplasma (libres y asociados a proteínas) [90]. La reacción entre ambos implica un ataque nucleofílico del $-\text{S}^-$ sobre el ONOOH , que lleva a la reducción de este último por dos electrones para dar NO_2^- y a la oxidación del $-\text{S}^-$ que da lugar a $-\text{SOH}$. En el caso del $-\text{S}^-$ de la Cys, la reacción del mismo con ONOOH es tres órdenes de magnitud más rápida que la reacción con H_2O_2 , generando el mismo derivado $-\text{SOH}$ como producto. Esto se cumple para la mayoría de los $-\text{SH}$ celulares, salvo para aquellos presentes en enzimas especializadas en la detoxificación de H_2O_2 (las Prx, por ejemplo). A diferencia de los procesos descritos anteriormente, la reducción del ONOO^- por $-\text{SH}$ no genera especies radicalares, por lo cual constituye la mejor estrategia celular para detoxificar $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ [109]. Sin perjuicio de ello, la oxidación de $-\text{SH}$ proteicos mediada por peroxinitrito puede ser dañina para la función de algunas proteínas. En la Figura 11 puede observarse un esquema que ilustra los múltiples destinos celulares del ONOO^- y de su forma protonada, el ONOOH .

Según se ha mencionado anteriormente, el rol del ONOO^- en la patología está asociado, sobre todo, a su capacidad de generar ROS y RNS secundarias más reactivas que él mismo, y que son capaces de interactuar con diferentes biomoléculas, oxidándolas y nitrándolas y alterando de esta forma su estructura y su función. Uno de los posibles productos generados por interacción de los radicales derivados del ONOO^- con biomoléculas es la 3-nitro-tirosina (3- NO_2 -Tyr), tanto sobre el aminoácido Tyr libre como sobre Tyr proteicas. La nitración de Tyr que forman parte de proteínas es fundamentalmente una modificación post-traducciona, y es capaz de promover una variedad de consecuencias significativas sobre la estructura y función de la proteína afectada, según se verá en mayor profundidad más adelante [103, 104].

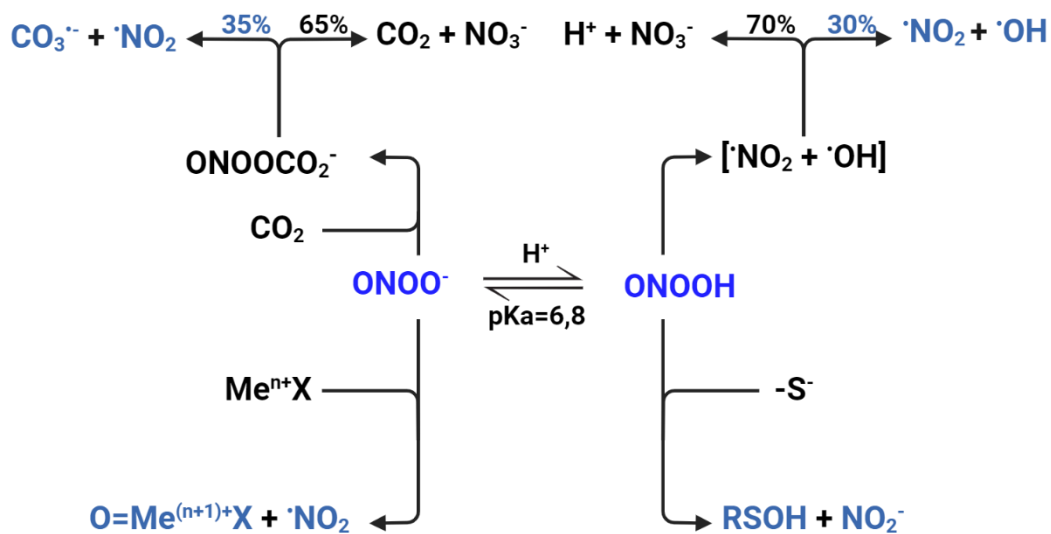


Figura 11. Diagrama ilustrando los posibles destinos celulares principales del par $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$. En celeste se marcan las especies secundarias que pueden dar lugar a nitración de proteínas. Diagrama construido en Biorender a partir de la información contenida en la sección 2.4.4 (reactividad del peroxinitrito).

2.6 Oxidación de proteínas

En los sistemas biológicos, las ROS de formación endógena o exógena son capaces de reaccionar con diferentes biomoléculas, oxidándolas y, en muchos casos, dañándolas. Los blancos moleculares del daño oxidativo son múltiples y variados e incluyen a los ácidos nucleicos (ADN y ARN), a los lípidos, los polisacáridos, los componentes de bajo peso molecular y las proteínas. Estas últimas constituyen las dianas principales, tanto por su elevada concentración como por la presencia en su estructura de grupos funcionales que reaccionan a altas velocidades con muchos de los oxidantes de mayor relevancia biológica. Las modificaciones oxidativas de las proteínas ocurren mayoritariamente a nivel de la cadena lateral de sus aminoácidos, pero en menor grado también a nivel del esqueleto polipeptídico (cadena principal). Estas modificaciones pueden ser causadas por oxidantes de uno o de dos electrones, siendo los primeros más reactivos y, por ende, menos selectivos. Esto último los hace capaces de dar origen a un repertorio más variado de modificaciones post-traduccionales, tanto a nivel del grupo funcional generado, como del residuo aminoacídico sobre el cual la modificación se introduce.

2.6.1 Mecanismos de oxidación de proteínas

Las reacciones entre las proteínas y los radicales (oxidantes de un único electrón) suelen ser de tres tipos: sustracción de un átomo de hidrógeno (H) de un enlace C-H, S-H, O-H o N-H, sustracción de electrones de anillos aromáticos, especies sulfuradas u otras regiones ricas en electrones, o adición del radical a una región rica en electrones. Las sustracciones de átomos de H son las más frecuentes y dan lugar a radicales proteicos, que se centran en el átomo que perdió el enlace con el mismo (pudiendo tratarse de un C, S, O u N, respectivamente). Los radicales centrados en átomos de C (R^\bullet) se forman tanto a nivel de la cadena principal como de las cadenas laterales de los aminoácidos alifáticos (valina, leucina, isoleucina, etc.), sobre todo como consecuencia de la reacción con

oxidantes radicalares fuertes e inespecíficos, como lo son el OH^\bullet o los radicales alcoxilo (RO^\bullet). Los R^\bullet proteicos pueden decaer por distintas vías: mediante dimerización, formando enlaces internos de tipo -R-R-, siendo esta una reacción lenta, o mediante una reacción rápida con el O_2 presente en el medio, generando radicales peroxilo (ROO^\bullet). La relevancia bioquímica de esta última vía dependerá de la biodisponibilidad de los dos sustratos que participan en ella. Los ROO^\bullet generados a través de esta ruta podrán tener, a su vez, dos destinos principales: o bien podrán sustraer un H de otro enlace X-H presente en la proteína, llevando a la formación de un hidroperóxido (ROOH) y de un nuevo radical en otra zona del polipéptido (siendo esto más común para ROO^\bullet en la cadena lateral de aminoácidos alifáticos), o podrán dimerizar, para formar tetraóxidos (ROOOOR), que luego se descomponen generando dos radicales RO^\bullet y O_2 (siendo esta una vía minoritaria de decaimiento). Los RO^\bullet que surgen de esta última reacción pueden luego sufrir reacciones de fragmentación por escisión β para producir un grupo carbonilo y otro radical. Estos procesos son, al menos en parte, los que se hallan detrás de la ocurrencia de pequeñas cadenas de propagación radicalar dentro de la estructura de las proteínas, así como de la formación de carbonilos proteicos, que son marcadores de daño oxidativo. Alternativamente, los radicales RO^\bullet podrán abstraer átomos de H de otros enlaces y convertirse, finalmente, en alcoholes (ROH), poniéndole fin al proceso de propagación oxidativa [71, 110-112]. En cambio, cuando los radicales proteicos se centran en S, O u N, su cinética de reacción con O_2 es más pobre y el entrecruzamiento es el destino más favorecido, dando lugar a la formación de disulfuros (RS-SR), dímeros de Trp (Trp-Trp) y dímeros de Tyr (Tyr-Tyr). También, ocasionalmente pueden formarse dímeros mixtos (ej.: Tyr-Trp) [71, 110].

Diferentes ROS tienen distinta capacidad para oxidar proteínas. Los radicales más reactivos, como el $\bullet\text{OH}$, son también los menos selectivos, mientras que los más estables presentan mayor selectividad [113, 114]. Como la amplia mayoría de los radicales de relevancia biológica son electrófilos, reaccionan preferencialmente con sitios ricos en electrones, como los anillos aromáticos y los -SH proteicos, de forma que el daño oxidativo en las proteínas suele concentrarse sobre el sub-conjunto de aminoácidos que presentan estos grupos funcionales en sus cadenas laterales: los aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe), los aminoácidos azufrados (Cys, Met y cistina), y la His. El producto final de la reacción resultante dependerá de la ROS participante, del residuo con el que esta reaccione y del estado de ionización en que dicho residuo se encuentre (que a su vez depende del entorno proteico y las condiciones celulares), entre otros muchos factores.

La menor velocidad y mayor selectividad de las reacciones de oxidación por dos electrones se desprenden de las altas energías de activación que estas tienen asociadas. Algunos ejemplos de ROS no radicalares que oxidan proteínas son el H_2O_2 , el HOCl , y el ONOO^- . El H_2O_2 , al igual que otros peróxidos orgánicos, presenta una baja reactividad, y reacciona principalmente con residuos de Cys y Met. El HOCl también reacciona principalmente con aminoácidos azufrados. Además este puede interactuar, si bien más lentamente, con nucleófilos nitrogenados (como los de la cadena lateral de His y Lys, y el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ del esqueleto polipeptídico) y con Trp y Tyr [71, 77]. Finalmente, el ONOO^- reacciona con las cadenas laterales de residuos de Cys, Met y Trp, dando lugar a diferentes productos oxigenados [71, 108, 115, 116].

Así las cosas, diferentes ROS pueden causar distintos niveles de daño a las proteínas, sobre todo dependiendo del nivel de acceso que las mismas adquieran a sus blancos potenciales. Por ejemplo, muchos de los residuos que pueden ser oxidados tienen cadenas laterales hidrofóbicas y, por ende, suelen proyectarse hacia el interior de la estructura proteica, alejados del medio acuoso circundante

con el cual su interacción se ve termodinámicamente desfavorecida. Esto ocurre, por ejemplo, con la Tyr. Este fenómeno hace que los oxidantes neutros, menos polares y, por ende, con mayor facilidad para acceder a estas regiones internas de la estructura proteica, sean a menudo más dañinos que los cargados. Adicionalmente, las especies neutras suelen ser más electrófilas y proveen mejores grupos salientes para las reacciones de sustitución, como puede comprobarse para los pares ácido base $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ y HOCl/OCl^- .

Por otra parte, la desprotonación de las cadenas laterales de los aminoácidos aumenta su nucleofilicidad y favorece su oxidación por estas especies electrófilas. Esto es cierto, por ejemplo, para las cadenas laterales de Cys y Tyr [71, 108].

Las proteínas, según se ha mencionado anteriormente, son blancos preferenciales en las células para el daño oxidativo mediado por ROS de generación endógena o exógena. Si bien la célula cuenta con un intrincado sistema de antioxidantes, tanto enzimáticos como de bajo peso molecular, dotado incluso de mecanismos redundantes este no es 100% eficiente, y la oxidación de proteínas y otras macromoléculas toma lugar constantemente. La acumulación de proteínas con modificaciones oxidativas, ya sea debido a una generación exacerbada o a una remoción defectuosa de las mismas, ha sido asociada tanto con el envejecimiento como con múltiples procesos patológicos, incluyendo a la aterosclerosis, diabetes de tipo 2, afecciones neurodegenerativas (Parkinson, epilepsia medial temporal, Alzheimer, etc.), degeneración de la mácula y cataratas [71, 117].

2.6.2 Nitración de tirosinas proteicas

La formación de 3- NO_2 -Tyr en las proteínas ocurre como una modificación post-traduccional *in vivo* y acarrea importantes consecuencias patofisiológicas. Esta modificación ocurre al sustituirse un átomo de H de uno de los dos C equivalentes en la posición *ortho* o 3- respecto al $-\text{OH}$ del anillo fenólico de la Tyr, por un grupo $-\text{NO}_2$ [118]. En sistemas biológicos, la nitración de Tyr es un proceso radicalar de dos pasos, el primero de los cuales consiste en la oxidación por un electrón de la cadena lateral de la Tyr, que puede ser llevada a cabo por un repertorio relativamente amplio de oxidantes radicalares, incluyendo a $\bullet\text{NO}_2$ [119], $\text{CO}_3\bullet$ [120], $\text{OH}\bullet$ [121] y $\text{ROO}\bullet$ [122], así como al compuesto I de las hemoperoxidasas ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}\text{P}^{\bullet+}$) [123], y que genera como producto al radical tirosilo ($\text{Tyr}\bullet$). El segundo paso del proceso consiste en la reacción de terminación radical-radical entre $\text{Tyr}\bullet$ y $\bullet\text{NO}_2$, que da lugar al producto no radicalar 3- NO_2 -Tyr.

El ONOO^- ha sido identificado como el principal agente nitrante de Tyr proteicas *in vivo*, en tanto a través de su reacción con diferentes blancos biológicos este es capaz de rendir $\bullet\text{NO}_2$ en conjunto con diferentes ROS capaces de llevar a cabo la oxidación mono-electrónica de Tyr a $\text{Tyr}\bullet$ [118].

Inicialmente, se propuso al decaimiento por homólisis del ONOO^- , que da lugar a $\text{OH}\bullet$ y $\bullet\text{NO}_2$, como vía principal para la nitración mediada por esta especie. El mecanismo propuesto, pues, consistía en un primer paso de oxidación mono-electrónica de la Tyr, llevado a cabo indistintamente por $\text{OH}\bullet$ o por $\bullet\text{NO}_2$, de forma que el $\text{Tyr}\bullet$ generado reaccionaría luego con $\bullet\text{NO}_2$ dando lugar a 3- NO_2 -Tyr como producto final. Sin embargo, al descubrirse la reactividad del ONOO^- con CO_2 y con centros metálicos de transición contenidos en metaloproteínas, y constatarse que las reacciones con estos blancos dan lugar a productos radicalares que también son capaces de nitrar Tyr, la ruptura homolítica fue perdiendo preponderancia como mecanismo de nitración por ONOO^- en favor de estas nuevas vías, de mayor competitividad cinética.

Así, la reacción de ONOO^- con CO_2 genera $\text{CO}_3^{\bullet-}$, que es un muy eficiente oxidante del anillo fenólico de la Tyr, y $\bullet\text{NO}_2$, que puede reaccionar con el Tyr^\bullet formado, rindiendo 3- NO_2 -Tyr. Algo análogo sucede cuando el ONOO^- reacciona con los metales de transición de metaloproteínas, generando un complejo I que actúa como oxidante en el primer paso, y un $\bullet\text{NO}_2$ capaz de llevar a cabo la segunda etapa. Cabe destacar que la eficiencia del ONOO^- como agente nitrante resulta más elevada en presencia que en ausencia de CO_2 , puesto que el $\text{CO}_3^{\bullet-}$ oxida a los anillos fenólicos de las Tyr con mayor facilidad que el complejo I de las peroxidasas, por ejemplo.

Cabe destacar, asimismo, que los mecanismos radicalares que conducen a la formación de 3- NO_2 -Tyr, también pueden dar lugar a productos secundarios de oxidación, siendo los de mayor relevancia de 3,3'-ditirosina (DiTyr), producto de la reacción de terminación radical-radical entre dos Tyr^\bullet , y la 3-hidroxitirosina (DOPA), que se origina producto de la adición del radical OH^\bullet sobre el anillo fenólico de la Tyr (y reacciones de decaimiento subsiguientes).

También es importante notar que el ONOO^- no es el único agente capaz de nitrar Tyr *in vivo*, sino que existen mecanismos alternativos que conducen al mismo destino. Por ejemplo, las hemoperoxidasas, en presencia de H_2O_2 y NO_2^- también pueden nitrar Tyr libres o proteicas. Esto se debe a que la oxidación por uno o dos electrones de estas proteínas a nivel de su grupo hemo, por el H_2O_2 da lugar a los complejos I y II, que son capaces tanto de oxidar por un electrón a las Tyr a Tyr^\bullet , como de oxidar (también por un solo electrón) al NO_2^- a $\bullet\text{NO}_2$, pudiendo este adicionarse a los Tyr^\bullet , generando 3- NO_2 -Tyr. Dado que las enzimas MPO y eritroperoxidasa (EPO), liberadas por células de la inmunidad innata al medio extracelular durante procesos inflamatorios, han sido caracterizadas como las principales hemoperoxidasas implicadas en la nitración de Tyr mediada por H_2O_2 y hemoproteínas, este mecanismo tiene mayor prevalencia en dicho contexto.

La incorporación de un grupo $-\text{NO}_2$ en la posición *ortho* del fenol de una Tyr puede acarrear importantes consecuencias fisicoquímicas para dicho aminoácido. En primer lugar, cabe destacar una importante reducción en el pKa del $-\text{OH}$ terminal, de forma que en la Tyr sin modificar este tiene un valor entre 10-10,3, mientras que para la 3- NO_2 -Tyr este disminuye casi tres unidades, hasta $\text{pKa}=7,3-7,5$. Esto implica un importante cambio en el estado de protonación de los residuos de Tyr proteicos, de forma que en ausencia de modificaciones estos se encuentran en su totalidad en forma neutra, pero al verse nitrados, aproximadamente la mitad de los mismos pasan a estar ionizados (como fenolato, $-\text{O}^-$) a pH celular [124, 125].

A su vez, la 3- NO_2 -Tyr protonada resulta menos polar y, por ende, más hidrofóbica que la Tyr no modificada. Así, dependiendo de su estado de ionización, la nitración podrá incrementar la hidrofobicidad del residuo de Tyr, promoviendo su desplazamiento hacia regiones de menor exposición al solvente dentro de la estructura proteica o, por el contrario, podrá desencadenar la desprotonación del $-\text{OH}$ fenólico, incrementando la hidrofiliidad del residuo y favoreciendo su exposición en zonas más externas, donde se permite su interacción con las moléculas de H_2O del medio. De esta forma, la nitración de residuos de Tyr puede favorecer cambios conformacionales locales en diferentes regiones de la estructura proteica [126]. En el mismo sentido, el grupo $-\text{NO}_2$ es relativamente voluminoso, de manera que su adición puede añadir impedimentos estéricos a la adopción de diferentes conformaciones por parte de la proteína [127, 128].

Adicionalmente, el potencial de reducción estándar del par Tyr/Tyr $^\bullet$ también se ve afectado por la nitración, tornándose unos 200-300 mV más positivo, lo que indica un incremento en la tendencia a reducirse o una disminución en la tendencia a oxidarse de la especie, por lo que se desfavorece la

formación de la especie radicalar y la participación de la proteína en reacciones de transferencia de electrones [129].

Considerando todos estos fenómenos, resulta evidente que la nitración de Tyr proteicas puede afectar en forma significativa la estructura de las proteínas, tanto localmente, cerca del sitio de incorporación de la modificación, como globalmente, afectando la estructura tridimensional total. Considerando el estrecho acoplamiento existente entre estructura y función proteicas, de ello se desprende que la formación de 3-NO₂-Tyr puede acarrear importantes consecuencias funcionales.

2.6.3 Consecuencias de la modificación oxidativa de proteínas

La modificación oxidativa de proteínas puede provocar alteraciones significativas en su estructura y, a través de estos cambios, generar un efecto sobre su función. En la literatura existen un sinnúmero de reportes de pérdidas de actividad enzimática, aparición de actividades no-canónicas, oligomerización y agregación de proteínas causada por oxidación. Esta última es considerada una de las marcas más importantes de modificación oxidativa sobre proteínas en un tejido u órgano. A continuación, se evalúan las diferentes consecuencias posibles de la oxidación de proteínas.

Por una parte, la modificación oxidativa de ciertas proteínas puede afectar los niveles de expresión de determinados repertorios de genes. Por ejemplo, la oxidación de las histonas nucleosómicas (H2A, H2B, H3 y H4) promueve la formación de entrecruzamientos con el ADN y altera el proceso de ensamblaje y desensamblaje de los nucleosomas, que es crucial para la transcripción y la replicación del ADN. Asimismo, se cree que podría existir una propagación de cadenas radicalares entre las proteínas de asociación al ADN oxidadas por un electrón y el propio ADN que se halla enrollado en torno a la mismas, provocando daño mutacional y rupturas de doble hebra en el material genético, ambos fenómenos comunes durante el envejecimiento.

Por otra parte, existen numerosos reportes que vinculan la oxidación de residuos aminoacídicos específicos de proteínas enzimáticas particulares con la pérdida de su actividad catalítica. Si bien para la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos bioquímicos exactos que conectan a la oxidación de la proteína con su inactivación, para ciertos casos puntuales se ha logrado verificar la inactivación *in vitro* al exponer a la enzima a oxidantes particulares, recabándose además evidencia de su ocurrencia en sistemas biológicos.

Un ejemplo paradigmático de esto lo conforma la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que cataliza una de las reacciones de la vía glucolítica. Su actividad enzimática se ve resentida en forma significativa por la oxidación mediada por ONOO⁻ del -SH terminal de un residuo de Cys catalítico, presente en su sitio activo (Cys 152 en la enzima humana) a su forma sulfénica. Esto ha sido demostrado *in vitro* [130] y observado *in vivo* [131-133]. A su vez, también se ha demostrado que la oxidación de la Met 46 de esta enzima promueve un re-arreglo estructural extenso que conduce a la agregación de la proteína. Otro ejemplo lo conforma la nitración de la Tyr 34 de la SOD dependiente de Mn²⁺ (MnSOD) humana por ONOO⁻, que fue constatada tanto *in vitro* como *in vivo* [134, 135]. Se postula que la nitración de este residuo, próximo al sitio activo de la enzima, promueve su desprotonación, dando lugar a una carga negativa que experimenta una repulsión electrostática con el sustrato enzimático; el O₂^{•-}. Asimismo, la propia voluminosidad del -NO₂ supone un impedimento estérico para el ingreso de este al sitio activo, llevando a la pérdida de la actividad enzimática [136, 137]. Este fenómeno ha sido observado, asimismo, en individuos con

cuadros clínicos diversos, como rechazo crónico de alotransplantes renales [138] e isquemia-reperfusion hepática[139]. En forma análoga, la SOD dependiente de Cobre y Zinc (CuZnSOD) expresada por los glóbulos rojos humanos también sería sensible a inactivación oxidativa, en este caso por H_2O_2 (el producto de la reacción que ella misma cataliza) y/o $O_2^{\bullet-}$, según fue demostrando *in vitro* e *in vivo* (en eritrocitos intactos) por Salo et al. Además, al exponer a los glóbulos rojos a H_2O_2 o una combinación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 generados por la actividad de la XO en presencia de xantina, no solo se observó una inactivación significativa de la CuZnSOD endógena en forma concentración-dependiente, sino que también se evidenció un incremento importante en la proteólisis intracelular de la enzima, indicando que la oxidación promueve su degradación, además de la pérdida de su actividad enzimática [140]. Estudios subsiguientes demostraron, a su vez, que la modificación oxidativa del Trp 32 de esta enzima, desencadenada por su propia actividad peroxidasa HCO_3^- -dependiente, promueve su agregación no-amiloide [141].

Si bien no es un fenómeno especialmente frecuente, existen casos en los que la modificación oxidativa de una enzima lleva a un incremento en su actividad canónica o la aparición de una función no canónica. Este constituye un mecanismo mediante el cual una determinada modificación, incluso siendo poco prevalente, puede tener un efecto biológico relevante. Por ejemplo, el citocromo C, una pequeña proteína cuya función principal es como transportador de electrones en la cadena de transporte mitocondrial, es pasible de oxidación, pudiendo sufrir nitración a nivel de su Tyr 74 [142, 143] u oxidación a nivel de su Met 80 [144], lo que promueve el desplazamiento de este residuo aminoacídico de la sexta posición de coordinación del grupo hemo de la enzima, de manera tal que estas modificaciones promueven un incremento en la actividad peroxidasa no-canónica de la enzima.

Por otra parte, la proteína quinasa C (PKC), cuya actividad enzimática es Ca^{2+} y fosfolípido-dependiente, puede adquirir actividad independiente de estos ligandos gracias a la modificación oxidativa selectiva de su dominio regulatorio, mediada por H_2O_2 , que puede ocurrir bajo ciertas condiciones fisiológicas. En cambio, una modificación oxidativa más extensiva de su cadena polipeptídica lleva a su pérdida de actividad [145].

La modificación oxidativa de proteínas, gracias a su capacidad de inducir cambios conformacionales importantes a lo largo de toda la estructura proteica, también es capaz de promover la exposición al medio circundante de residuos aminoacídicos hidrofóbicos. Esto resulta termodinámicamente desfavorable, en tanto promueve la disposición de las moléculas de agua del medio en derredor de estas zonas apolares, adoptando una conformación altamente estructurada, en un esfuerzo por mantener a la proteína en solución. Esto se traduce en un ordenamiento neto del sistema termodinámico y, por ende, en un descenso en su entropía, tornando al proceso no-espontáneo. Así, las regiones hidrofóbicas de las proteínas expuestas al medio producto de su oxidación, tenderán a adoptar conformaciones que minimicen su interacción con las moléculas de agua del entorno, por lo que, de encontrarse en concentraciones suficientes, tenderán a establecer interacciones hidrofóbicas entre sí, determinando la formación de oligómeros y luego de agregados insolubles. Asimismo, en un contexto de daño oxidativo, la formación de entrecruzamientos covalentes intra- e inter-moleculares también puede favorecer esta agregación [108, 146, 147]. Por ejemplo, se ha demostrado que la formación de dímeros Trp-Trp contribuye al desencadenamiento de la agregación no-amiloide de la CuZnSOD humana, siendo este un proceso de relevancia para el mecanismo patogénico de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) [108]. De igual manera, se ha

logrado establecer que la formación de Tyr-Tyr proteicos bajo condiciones de estrés nitro-oxidativo puede promover y estabilizar procesos de agregación de proteínas. Este fenómeno ha sido constatado para la α -sinucleína [148, 149] y para la proteína τ [150], cuya agregación es un marcador histopatológico de las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, respectivamente.

La agregación inducida por oxidación es un área de estudio central para la biomedicina, gracias a su vínculo estrecho con el envejecimiento y con diversas patologías [146]. Si bien al día de hoy existe un vasto acúmulo de evidencia en la literatura científica que vincula a la oxidación de proteínas con la formación de agregados, los mecanismos bioquímicos subyacentes muchas veces permanecen una incógnita. Algunos ejemplos de proteínas que agregan en forma inducida por daño oxidativo con mecanismos moleculares conocidos son los ya mencionados casos de la CuZnSOD y la GAPDH humanas.

2.6.4 Reparación y degradación de proteínas oxidadas

Algunas modificaciones oxidativas sobre ciertos residuos aminoacídicos pueden ser revertidas por sistemas antioxidantes presentes en las células. Por ejemplo, muchas de las modificaciones oxidativas que ocurren sobre Cys y Met son reversibles, incluso pudiendo formar parte del mecanismo catalítico normal de ciertas enzimas. Un ejemplo de ello es la oxidación del $-SH$ terminal de la cadena lateral de Cys particulares en ciertas enzimas, para formar $-SOH$ o $-S-S-$ con otro $-SH$ cercano, sea dentro de la misma subunidad proteica o en otra (disulfuros intra- o inter-moleculares, respectivamente). Ambas modificaciones pueden ser revertidas mediante reducción por dos de los sistemas antioxidantes más importantes de la célula: el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa o el sistema glutarredoxina/GSH/GSH reductasa, de forma que en ambos casos el dador final de los electrones es el NADPH proveniente, principalmente, de la vía de las pentosas fosfato. Por su parte, las sobre-oxidaciones de los $-SH$ de Cys a $-SO_2H$, así como su S-nitrosilación pueden ser reparadas por enzimas de la familia de las sulfurredoxinas. No obstante, la formación de ácido sulfónico ($-SO_3H$) en estos aminoácidos se considera al día de hoy una modificación oxidativa irreversible.

En el caso de la Met, su oxidación a su forma de sulfóxido ($-SOR_2$) puede ser revertida a través de la actividad de las metionina sulfóxido reductasas A y B, cuyo reciclaje es dependiente del sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. [146, 151].

La vasta mayoría de las modificaciones oxidativas de proteínas, no obstante, son irreparables y muchas de ellas desencadenan cambios severos en la función de las mismas. Por tanto, la mayoría de las proteínas modificadas oxidativamente deben ser prontamente degradadas por la célula, evitando su acumulación, que podría resultar en una patología, así como permitiendo el reciclaje de sus aminoácidos constituyentes. En la mayoría de las proteínas, niveles moderados de oxidación promueven el reconocimiento y subsiguiente degradación por los distintos sistemas proteolíticos intracelulares, al tiempo que el daño oxidativo extenso suele provocar una tendencia creciente a la formación de entrecruzamientos, dando lugar a oligómeros y agregados, cuya degradación es más dificultosa [114, 152-154].

Existen tres sistemas celulares principales que permiten la eliminación de proteínas modificadas; estos son: el proteasoma, los lisosomas y la proteasa Lon en la matriz mitocondrial. La degradación selectiva de proteínas en el citosol, pues, es llevada a cabo fundamentalmente por el sistema del proteasoma. Este es un complejo multi-proteico formado por tres subunidades: dos subunidades

regulatorias idénticas 19S, y una subunidad catalítica 20S. La selectividad de este sistema, en presencia de las partículas reguladoras 19S, depende de la marcación de las proteínas a ser degradadas a través de su poli-ubiquitinación a nivel de uno o más residuos de Lys o del extremo N-terminal de la proteína a degradar, por enzimas especializadas (ubiquitin-ligasas) frecuentemente reclutadas por oxidación. El proteasoma 20S, en ausencia de las partículas reguladoras adquiere la capacidad de reconocer y degradar selectivamente a proteínas oxidadas de manera ubiquitina-independiente. Estos mecanismos, actuando en conjunto, evitan la acumulación de productos de oxidación no funcionales o aberrantes en forma temprana, previniendo que estos agreguen, tornándose resistentes a la degradación [1, 155].

2.7 Inactivación oxidativa de la glutamina sintetasa

Tal como fue discutido previamente, existen numerosos reportes en la literatura científica de disminución en los niveles de expresión y/o actividad HsGS en los cerebros post-mortem de pacientes humanos fallecidos con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo a la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson y la Epilepsia Medial Temporal, entre otras tantas. En varios de estos estudios, dicha inactivación fue hallada en conjunto con la modificación oxidativa de la enzima (frecuentemente en la forma de la nitración de sus residuos de Tyr), lo que sugiere una posible relación causa-efecto entre ambos fenómenos. Evidencia adicional abona esta visión, todo lo cual ha contribuido a asentar la noción de la HsGS como una enzima pasible de inactivación oxidativa bajo contextos patológicos inflamatorios y de estrés oxidativo.

2.7.1 Evidencia *in vivo*

Brevemente, en un estudio comparativo de ratones de un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés) con ratones control, se logró la detección de mayores cantidades de GS en fracciones insolubles de la médula espinal de los ratones enfermos, así como de 3-NO₂-Tyr sobre un porcentaje significativo de la GS presente en estos agregados, indicando una posible vinculación entre la nitración de la proteína y la predisposición de la misma a agregarse [156]. Asimismo, otros estudios constataron la presencia de GS nitrada en las cortezas cerebrales de ratas expuestas a condiciones de hipoxia-reoxigenación, siendo este tratamiento inductor de la producción de ROS [157]. Además, valiéndose de herramientas de la proteómica redox, Shen et al demostraron la acumulación de carbonilos (indicativos del daño oxidativo) sobre la GS en el hipocampo de ratones transgénicos usados como modelo de Alzheimer [158], al tiempo que Boyd-Kimball y colaboradores demostraron la formación de carbonilos en la GS cerebral de ratas sometidas a inyecciones intra-cerebrales de péptidos β-amiloides [159].

Adicionalmente, mediante herramientas de corte proteómico otros investigadores han reportado niveles elevados de carbonilos (indicativos del nivel de daño oxidativo) en la GS de cerebros de pacientes humanos de Alzheimer (en forma análoga a lo reportado para cerebros de otros animales), así como en pacientes fallecidos con deterioro cognitivo leve [36, 160].

Además, trabajos realizados utilizando cultivos primarios de astrocitos de rata demostraron que tanto la adición de las citoquinas pro-inflamatorias TNF-α e INF-γ al medio de cultivo, como el tratamiento con NH₄⁺ promueven la nitración de la GS en estas células [161, 162].

2.7.2 Evidencia *in vitro*

Por su parte, numerosos estudios *in vitro*, utilizando formas purificadas de GS de diferentes organismos, tanto procariotas como eucariotas (obtenidas directamente a partir de muestras biológicas o producidas recombinantemente) han confirmado la sensibilidad de esta enzima frente a la inactivación oxidativa. Cimino et al. realizaron estudios *in vitro* con la GS de *E. coli* y determinaron que su acetilación o nitración no-enzimática (por exposición al reactivo nitrante tetranitrometano, TNM) tiene efectos similares a los de su adenilación, que, según fue discutido anteriormente, aumenta la sensibilidad de la enzima bacteriana frente a la inhibición alostérica [163]. Un efecto análogo fue observado por Berlett et al. al exponer a la misma enzima a ONOO⁻, adjudicándose el efecto inhibitorio a la nitración de las Tyr proteicas [164].

Posteriormente, experimentos con GS proveniente de eucariotas confirmaron que esta también experimenta inactivación oxidativa. Por una parte, Melo y colaboradores lograron demostrar que la exposición de la isoforma GS1a vegetal (de la planta *Medicago truncatula*) a ONOO⁻ causa tanto la nitración de varios residuos de Tyr en su estructura, como la pérdida de su actividad enzimática [165]. Asimismo, estudios realizados con preparados comerciales de GS ovina expuesta a ONOO⁻ demostraron que este, en concentraciones moderadas, provoca la nitración selectiva de ciertos residuos de Tyr de la enzima, así como su inactivación. Los autores de este estudio demostraron, igualmente, que el nivel de nitración de las Tyr de la GS ovina correlaciona en forma significativa con el nivel de inactivación enzimática, y que la “de-nitración” artificial de la GS luego del tratamiento oxidante descrito permite una restauración completa de la actividad enzimática, sugiriendo un rol preponderante de esta modificación en la inactivación observada [166].

Adicionalmente, estudios conducidos empleando la GS ovina identificaron como blanco de nitración preferencial al residuo de Tyr 336 de la enzima, siendo que este tiene un rol clave en la unión de ATP y ADP al sitio activo, por lo que se sugirió que su modificación podría ser un importante mediador en la inactivación [167]. Estudios *in silico*, consistentes en simulaciones de dinámica molecular, abonaron dicha hipótesis [168]. En el caso de la GS1a vegetal, no obstante, se propuso un mecanismo diferente, donde la principal mediadora de la inactivación oxidativa sería la nitración de la Tyr 167 (que se corresponde con la Tyr 171 humana), según se pudo concluir a partir de estudios de mutagénesis sitio-específica y exposición de las mutantes a agentes nitrantes. Asimismo, la subsiguiente exposición de otra isoforma de GS vegetal (proveniente, igualmente, de *M. truncatula*); la GS2a, a ONOO⁻ también resultó en su inactivación oxidativa, pero sin constatar en este caso un rol importante para la nitración de la Tyr 167 y, en cambio, observándose la oxidación de múltiples residuos de Cys de la proteína [165].

Sin embargo, los estudios mencionados no abordaron la dilucidación del mecanismo bioquímico de inactivación oxidativa de la HsGS con una perspectiva global y minuciosa, centrándose en cambio en algunas modificaciones particulares, pero sin evaluar todas las avenidas que podrían conducir a la pérdida de actividad enzimática. Por ejemplo, en la mayoría de estos trabajos no se estudió la incidencia que podrían tener la formación de dímeros de Tyr y de cistinas, así como de formas sulfénicas y sobre-oxidadas de Cys, o la oxidación de Met o Trp. Igualmente, en la amplia mayoría de estos estudios tampoco se identificaron los residuos aminoacídicos específicos siendo modificados, ni el grado de modificación de cada uno (la prevalencia de las diferentes modificaciones en distintos residuos), al exponerse a la GS a diferentes oxidantes. Esto resulta crucial para establecer posibles modificaciones clave, esenciales para la inactivación oxidativa de la

enzima, así como para dilucidar los mecanismos principales por los cuales esta toma lugar. A su vez, la falta de conocimiento sobre estos aspectos del proceso de inactivación imposibilita establecer el nivel real de contribución de la nitración de las Tyr de la GS en su inactivación por ROS y, por el contrario, cuanto de la inactivación responde, en cambio, a otras modificaciones oxidativas. Esto cobra particular relevancia cuando se toman en consideración ciertos reportes de inactivación de esta enzima por exposición a agentes oxidantes que no son nitrantes [169-172].

Con el objetivo de responder a estas y otras preguntas, el Dr. Nicolás Campolo, en conjunto con otros colaboradores dentro del CEINBIO, se propuso realizar una caracterización bioquímica detallada de los mecanismos que conducen a la inactivación oxidativa de la HsGS recombinante *in vitro*, al ser esta expuesta a ONOO⁻. Una de las conclusiones principales de este meticuloso trabajo fue la noción de la inactivación oxidativa de esta enzima como un mecanismo complejo y multi-causal, que no dependería de la nitración de un único residuo de Tyr, como había sido propuesto anteriormente, sino de la nitración de múltiples Tyr, en conjunto con la oxidación de Tyr, Cys, Met y Trp a lo largo de la cadena polipeptídica, de manera que sería la acumulación de diferentes modificaciones y no una única modificación particular la que produciría la pérdida de actividad de la enzima y la predispondría a su agregación en el tubo de ensayo. Sin embargo, el rol que juega cada una de las modificaciones oxidativas cuya ocurrencia fue constatada al exponerse a la HsGS a ONOO⁻ *in vitro* aún permanece desconocida. Sobre todo, sería de interés establecer cuál es la contribución de la nitración de distintos residuos específicos de la enzima a la hora de provocar la pérdida de la actividad catalítica.

Igualmente, resta aún dilucidar si los mecanismos observados *in vitro* para la inactivación oxidativa de esta enzima se corresponden con aquellos que operan *in vivo*, en las condiciones pro-inflamatorias y ricas en oxidantes del cerebro de pacientes con afecciones neurodegenerativas, como el Alzheimer. Tampoco se ha logrado aún esclarecer el rol de la inactivación de la GS en la muerte neuronal y pérdida de sinapsis que caracteriza a la fisiopatogenia de esta patología, aunque, presumiblemente, la excitotoxicidad producto de la detoxificación ineficiente del Glu de las neurosinapsis por los astrocitos de actividad GS deficiente, podría ser uno de los mecanismos de mayor relevancia.

3 [Hipótesis de trabajo](#)

Estudios anteriores realizados en el CEINBIO demostraron que la HsGS producida recombinantemente en *E.coli* puede ser inactivada *in vitro* mediante la exposición a diferentes concentraciones del poderoso agente nitro-oxidante endógeno ONOO⁻. Además, se demostró que dicha inactivación depende de la incorporación de múltiples modificaciones oxidativas a lo largo de su cadena polipeptídica, incluyendo la nitración de Tyr, pero también la oxidación de Tyr, Trp, Met y Cys. Se ha planteado, entonces, que el mecanismo de inactivación oxidativa de esta enzima *in vitro* sería complejo y multi-causal, de forma que múltiples modificaciones contribuirían a la pérdida de actividad enzimática. Los residuos de Tyr 171 y 283 de la enzima se identificaron como blancos preferenciales de nitración por ONOO⁻, por lo que se plantea que su modificación podría tener un rol importante en la inactivación oxidativa de la HsGS, mediada por dicha especie.

Se postula, entonces, que en el caso de que la nitración de estas Tyr tenga un papel importante en el mecanismo bioquímico de inactivación oxidativa de la HsGS por ONOO⁻, cabría esperar que formas mutantes de esta enzima, con sustituciones puntuales Tyr→Phe en las posiciones 171 o 283 presenten una menor sensibilidad frente a la inactivación, al removerse la capacidad de la enzima de experimentar nitración u oxidación a nivel de dichos aminoácidos.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

En esta Tesina de Grado me propuse como principal objetivo determinar el rol de la nitración de las Tyr 171 y 283, identificadas previamente como blancos preferenciales de modificación, en la inactivación oxidativa *in vitro* de la HsGS recombinante, por ONOO⁻.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Lograr la expresión y subsiguiente purificación de la HsGS silvestre (WT) y dos formas mutantes de la misma, Y171F e Y283F, a partir de bacterias *E.Coli* BL21 Star.
- 2) Realizar un estudio preliminar comparando la estructura y estabilidad térmica de las HsGS mutantes Y171F e Y283F con la HsGS WT.
- 3) Realizar un estudio comparativo de la sensibilidad frente a inactivación oxidativa por ONOO⁻ de las HsGS Y171F e Y283F respecto a la enzima WT, acompañado de una caracterización bioquímica y proteómica del grado de modificación oxidativa de cada forma de la enzima luego de su exposición a dicho agente nitro-oxidante.

5 Materiales y métodos

5.1 Reactivos

Todos los reactivos y soluciones fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (Merck), excepto en aquellos casos donde se indique lo contrario expresamente. El plásmido pNIC28-Bsa4 conteniendo la secuencia correspondiente a los aminoácidos 5-365 de la HsGS y un péptido N-terminal de 22 aminoácidos, con un *tag* de 6 His y un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV (ID de la construcción GLULA-c004), fue provisto por el Structural Genomics Consortium (SGC) [34]. Las mutantes Tyr→Phe de la HsGS fueron generadas por mutagénesis sitio específica a partir del mismo plásmido GLULA-c004 por la empresa de biotecnología GenScript. El ONOO⁻ fue sintetizado a partir de nitrito de sodio (NaNO₂) y H₂O₂ (Mallinckrodt Chemicals) en medio ácido, alcalinizado inmediatamente con hidróxido de sodio (NaOH) concentrado [173, 174]. Las soluciones *stock* de ONOO⁻ concentrado fueron almacenadas en NaOH concentrado, en alícuotas de 1 mL, a - 80°C, determinándose su concentración luego de descongeladas y antes de su uso mediante medidas espectrofotométricas a 302 nm, para las cuales se consideró un valor de $\epsilon_{\lambda=302nm} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, obtenido de la bibliografía [175].

5.2 Expresión de HsGS

Para la expresión de la HsGS WT, Y171F e Y283F se transformaron bacterias *E.coli* BL21 (DE3) Star, utilizando los plásmidos pNIC28-Bsa4 conteniendo la secuencia codificante para las diferentes formas de la enzima, mediante la técnica de shock térmico [176].

La selección de las bacterias transformantes capaces de expresar HsGS, se realizó en esterilidad mediante el sub-cultivo de la mezcla de transformación en placas de Petri con medio selectivo: medio Luria-Bertani (LB)-agar suplementado con 50 µg/mL de kanamicina (AppliChem), siendo esta una concentración de antibiótico para la cual el plásmido utilizado confiere resistencia. Solo las bacterias que hayan adquirido el plásmido y expresen su gen de resistencia, pues, podrán sobrevivir y formar colonias en dichas condiciones. Una vez constatada la formación de colonias típicas, se procedió a la realización de pre-cultivos en 25 mL de medio LB líquido con 100 µg/mL de kanamicina. Para ello se inocularon 25 mL del medio escogido con colonias de bacterias transformadas, tocándolas con un tip estéril. Los pre-cultivos se incubaron overnight a 37 °C bajo agitación (220 RPM) en una incubadora MaxQ 6000 (Thermo Scientific). Al culminar la incubación, los pre-cultivos fueron vertidos en 1 L de medio de cultivo Terrific Broth (TB) previamente autoclavado, conteniendo 100 µg/mL de kanamicina para mantener la selectividad. Se procedió, entonces, a la incubación de los cultivos a 37 °C bajo agitación (220 RPM, nuevamente) hasta alcanzar una densidad óptica de 2 unidades (aproximadamente 4 horas). La expresión de la HsGS WT, Y171F o Y283F por las bacterias transformadas se indujo entonces mediante la adición del agente inductor isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG, bioWORLD) a una concentración final de 0,5 mM, luego de lo cual se procedió a una nueva incubación *overnight*, en esta oportunidad, a 18°C.

Al culminar esta incubación, las células fueron precipitadas por centrifugación a baja velocidad (4500 g, durante 20 minutos) a 4°C, descartándose el sobrenadante. Los pellets obtenidos fueron re-suspendidos en buffer fosfato de sodio (NaPi) 50 mM, pH=7,5, con cloruro de sodio (NaCl) 0,5M, tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (TCEP, un agente reductor) 0,5 mM y glicerol 10% (v/v) (buffer A). A continuación, se suplementó el medio con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), un inhibidor de proteasas, destinado a proteger a la HsGS frente a la degradación por estas enzimas una vez realizada la ruptura de las células, en los pasos subsiguientes. Así, los pellets celulares re-suspendidos fueron sometidos a sonicación (utilizando un equipo Branson Sonifier 450), con el objetivo de lisar las células, liberando sus componentes. Se sonicó con la suspensión en hielo durante 6 ciclos de 30 segundos cada uno, separados por intervalos de 30 segundos donde el homogenato se dejó sumergido en hielo para evitar recalentamiento y desnaturalización proteica. Una vez alcanzada una solución homogénea, se clarificó mediante centrifugación (40 min, 15000 g, 4°C), recolectándose los sobrenadantes y descartándose los precipitados.

5.3 Purificación de HsGS

Los sobrenadantes de los lisados celulares fueron sometidos a filtración, para eliminar las partículas de gran tamaño, empleando filtros de acetato de celulosa con poros de 0,2 µm de diámetro. Luego, se purificó la HsGS WT, Y171F o Y283F, según correspondiera, utilizando una columna cromatográfica de afinidad por metales (IMAC), de tipo HisTrap™ HP (GE Healthcare), con un volumen de 5 mL, cargada con sulfato de níquel (NiSO₄). La columna fue equilibrada con el mismo buffer A (NaPi 50mM), al que se enriquece con 10 mM imidazol. Luego de cargada la muestra, se lavó la columna utilizando un gradiente de imidazol, para lo cual se hizo pasar, en forma secuencial

50 mL de buffer A con 10 mM imidazol, luego 50 mL con 25 mM imidazol, 40 mL con 50 mM y 25 mL de buffer A con imidazol 100 mM. En cada paso del proceso se colectaron alícuotas (lisado celular, fracción no unida y lavados sucesivos con imidazol) para realizar el seguimiento del proceso de purificación mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Finalmente, se procedió a la elución de la HsGS mediante el pasaje de una solución con 500 mM imidazol, capaz de desplazar a la enzima de su interacción con el Ni^{2+} de la fase estacionaria. Desde que se comenzó a hacer pasar el buffer de elución se tomaron continuamente alícuotas de 1 mL del eluido, completando un total de 20 alícuotas. Para cuantificar proteínas totales en cada alícuota, se empleó la técnica de medición de absorbancia a 280 nm, asumiéndose un ϵ genérico de $1 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aquellas alícuotas con una absorbancia mayor o igual a 0,45 a dicha longitud de onda fueron desaladas (para remover el imidazol, que puede resultar dañino para la proteína en el mediano plazo), pasando la proteína al buffer B (buffer Tris 30 mM, pH=7,5, NaCl 0,3 M, TCEP 2 mM y glicerol 10%). Para ello se empleó una columna HiTrap™ desalting (GE Healthcare) conectada a un equipo ÄKTA start (Cytiva).

Las muestras de HsGS en buffer B así obtenidas fueron concentradas utilizando filtros de centrifugación en *ependorf* modelo Amicon Ultra (Merck Millipore) con un umbral de corte de 100 kDa y por último almacenadas a -80°C en alícuotas de 200 μL , con una concentración final de proteína en el entorno de 10 mg/mL. Estas alícuotas se descongelaron para ser usadas en los diferentes experimentos planteados en el transcurso de la tesis.

5.4 Exposición de HsGS a ONOO⁻

Previo a la exposición de las diferentes formas de la HsGS a ONOO⁻, se procedió a descongelar las alícuotas de la enzima a ser utilizadas, que según se indicó anteriormente fueron almacenadas en buffer B a -80°C . Una vez descongeladas, se les añadió 1,4-ditiotreitol (DTT) a una concentración final de 10 mM. Se dejó incubar durante 30 minutos en hielo, con el objetivo de asegurar que la enzima esté completamente reducida antes de ser expuesta a oxidantes.

A continuación, se procedió a realizar un cambio de buffer, eliminándose el DTT y las sales de Tris. Para ello se empleó una columna HiTrap™ desalting, y una fase móvil consistente en buffer fosfato de potasio (KPi) 100 mM, pH=7,3 conteniendo cloruro de potasio (KCl) 0,1 M y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 0,1 mM. Una vez completado el cambio de buffer, la nueva concentración de HsGS fue determinada, en cada caso, empleando el método de cuantificación del ácido bicinconínico (BCA, Sigma) [177]. Para ello se prepararon diluciones al quinto y al décimo, por triplicado real, de cada forma de HsGS (WT, Y171F e Y283F). Luego se tomaron alícuotas de 25 μL de cada dilución, que se mezclaron con 200 μL de solución BCA (1:50 solución B: solución A) en diferentes pocillos de una placa de 96 *wells* para lector de placas (Varioskan Flash, Thermo Scientific). En paralelo, en cada ensayo de cuantificación, se midió una curva de calibración para el método preparada por duplicado, utilizando 25 μL de soluciones estándar de seroalbúmina bovina (BSA) en un rango de concentraciones de 0,2-2,0 mg/mL, con 200 μL de la misma solución BCA empleada para las muestras. A continuación, se incubó la placa sembrada con las muestras y la curva de calibración durante 21 minutos a 40°C , y finalmente, se midió la absorbancia a 562 nm en el lector de placas.

La exposición de las diferentes formas de HsGS a ONOO⁻ fue realizada en un volumen total de 200 μL con una concentración de 0,2 mg/mL de HsGS decamérica (4,62 μM de la proteína monomérica)

en buffer KPi 100 mM, pH = 7,3 conteniendo 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA. En cada caso, se añadieron 5 μ L de una solución estándar de ONOO⁻, cuya concentración era la necesaria para lograr la concentración final planteada. La adición se realizó a temperatura ambiente y utilizando un vórtex, para lograr una reacción homogénea a lo largo de la solución.

Luego de la adición del ONOO⁻, se determinó el pH de las muestras para verificar que los cambios fueran mínimos (< 0,1 unidades de pH). Como un control adicional en estos experimentos, con la finalidad de validar que los efectos observados fueran debidos al ONOO⁻ en sí mismo y no debido a sus productos de descomposición (principalmente NO₃⁻) o cantidades remanentes de los precursores de su síntesis (NO₂⁻/H₂O₂), en ciertos casos se realizó la adición reversa del ONOO⁻ (AR).

Este control se llevó adelante permitiendo que el ONOO⁻ se descompusiera en buffer KPi previo al agregado de la HsGS a las muestras de reacción (es decir, se prepararon los tubos agregando el buffer, luego el ONOO⁻ y 5 minutos más tarde, en los que el ONOO⁻ permaneció en incubación a temperatura ambiente, se añadió la enzima).

5.5 Medidas de actividad HsGS

La actividad HsGS fue determinada mediante el ensayo de actividad γ -glutamyltransferasa, basado en la reacción de formación de γ -glutamylhidroxamato (GlnNHOH) a partir de Gln e hidroxilamina (NH₂OH) catalizada por la HsGS en presencia de Mn²⁺, arsenato de sodio (Na₂HAsO₄) y ADP, como se describió previamente [167, 178]. La reacción postulada es la siguiente:



El ensayo fue llevado a cabo como se indica a continuación: se incubó HsGS (a una concentración de 10 nM de decámero) durante 15 minutos a 37°C con Gln 60 mM, NH₂OH 30 mM, Na₂HAsO₄ 20 mM, ADP 0,4 mM y MnCl₂ 1,5 mM en buffer imidazol 60 mM, pH =6,8, llegando a un volumen final de 250 μ L. Para simplificar la mecánica de los ensayos, se preparó el mix de sustratos previamente, con una concentración 10/9 X de cada uno, de manera que al agregar 225 μ L de dicha mezcla a cada tubo, completando el volumen con 25 μ L de HsGS WT, Y171F o Y283F, en buffer C, tratada o no con ONOO⁻, se alcancen las concentraciones mencionadas para cada reactivo. Se llevó a cabo la reacción por un tiempo de 15 minutos (previamente optimizado), y luego se procedió a la terminación de la misma mediante el agregado de un volumen equivalente de solución de terminación/revelado (o solución *stop*) consistente en 0,37 M de cloruro férrico (FeCl₃) y 0,2 M ácido tricloroacético (TCA) en HCl 0,67 M.

La cantidad de GlnNHOH formado a tiempo final fue determinada mediante medidas espectrofotométricas a 500 nm, puesto que el complejo [Fe³⁺-GlnNHOH] presenta una absorbancia significativa a dicha longitud de onda, que está ausente de la solución *stop* sin producto, según queda demostrado en los resultados de esta misma Tesina.

Luego, se determinó el $\epsilon_{\lambda=500\text{nm}}$ para [Fe³⁺-GlnNHOH] mediante la construcción de una curva de calibración utilizando soluciones estándar de GlnNHOH y la misma solución *stop* que la empleada en el ensayo. Las mediciones se realizaron, en ambos casos, en un lector de placas de 96 pocillos (Varioskan Flash, Thermo Scientific).

Las condiciones óptimas para la realización de este ensayo de actividad (tiempo de incubación, concentración de la enzima en el tubo de reacción, etc.) fueron optimizadas en trabajos previos, en

el marco del proyecto de doctorado del Dr. Nicolás Campolo, tutor de esta Tesina. El objetivo de dicha puesta a punto fue el de garantizar que las concentraciones obtenidas a tiempo final se encontraran dentro del intervalo considerado lineal para la proporcionalidad entre la absorbancia a 500 nm y la concentración de dicha especie, según la Ley de Lambert-Beer, y asegurar, asimismo, que a los tiempos elegidos nos encontráramos dentro del rango de velocidad inicial de la reacción, de forma que esta no se viera enlentecida por un consumo significativo de los reactivos.

5.6 Análisis por SDS-PAGE y Western-Blot

Para determinar el patrón de migración de las muestras de HsGS WT, Y171F e Y283F expuestas a diferentes concentraciones de ONOO⁻ e identificar posibles alteraciones en el mismo, debidas a fenómenos de entrecruzamiento, formación de oligómeros y agregación mediada por oxidación, así como determinar si dichos cambios ocurren en forma diferente en las formas mutantes de la HsGS que en la enzima WT, se procedió a someter alícuotas de las diferentes HsGS tratadas a SDS-PAGE. Esta se realizó utilizando geles de poliacrilamida con SDS, con un 10% de entrecruzamiento, en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol. Al finalizar la corrida, se reveló el resultado mediante la tinción de las proteínas con colorante azul de Coomassie.

Para los análisis por WB, se optó por la utilización de dos soluciones particulares de anticuerpos: por una parte, se emplearon anticuerpos monoclonales murinos contra 3-NO₂-Tyr (Invitrogen, número de clona HM11, dilución 1/1000), con el objetivo de determinar la prevalencia de esta modificación en las diferentes formas de HsGS, al enfrentarse estas a diferentes concentraciones de ONOO⁻. Por otra, se empleó una solución policlonal de anticuerpos de conejo anti-HsGS (Abcam, 1/2000), destinados a marcar a la proteína nativa.

Para realizar el WB, se procedió de idéntica forma a lo ya descrito para el análisis por SDS-PAGE, con la salvedad de que, al finalizar la corrida electroforética, en lugar de incubar el gel con Azul de Coomassie, se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Odyssey, Li-Cor Biosciences), recurriendo con este propósito a un equipo de electrotransferencia semi-seca Hoefer TE 70 (Amersham Biosciences).

Al finalizar la transferencia de las proteínas, se extrajo la membrana con pinzas y se la bloqueó utilizando una solución de leche en polvo al 5% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a realizar 4 lavados con PBS-Tween 0,1%, al cabo de los cuales se procedió a la incubación con el primer anticuerpo primario, el anti-3-NO₂-Tyr, que se llevó a cabo por un tiempo mínimo de 1 hora. Al finalizar la misma, se volvió a lavar 4 veces la membrana, y se incubó con el segundo anticuerpo primario; el anti-HsGS. Tras esto, la membrana fue lavada nuevamente y se procedió a su incubación con una solución consistente en anticuerpos secundarios *anti-mouse* y *anti-rabbit* conjugados con sondas fluorescentes, de emisión IR680 e IR800, respectivamente (Li-Cor Biosciences). Esta última incubación también se llevó a cabo por un tiempo mínimo de 1 hora, en oscuridad. Al finalizar la misma, se procedió a lavar por última vez la membrana, y se reveló el resultado en un scanner de fluorescencia Odyssey Li-Cor.

5.7 Cuantificación de tioles proteicos por espectrofotometría

La concentración de grupos –SH remanentes en las muestras de HsGS WT, Y171F e Y283F sometidas a tratamiento con diferentes concentraciones de ONOO⁻ fue determinada mediante medidas espectrofotométricas, valiéndonos para ello de la reacción 1:1 de estos grupos funcionales con el reactivo 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB o reactivo de Ellman), que no toma lugar con los –S-S- o las formas oxidadas y sobreoxidadas de Cys. Dicha reacción consiste en una sustitución nucleofílica, donde el –S⁻ proteico ataca a un centro electrofílico dentro del DTNB, dando lugar a la formación de un disulfuro mixto y liberándose 5-tio-ácido-2-nitrobenzoico (TNB) como grupo saliente. Mientras que el DTNB es incoloro, el TNB generado como producto presenta una intensa coloración amarilla, con un pico de absorbancia a 412 nm, de forma que su concentración puede determinarse a través de la medición espectrofotométrica de la absorción de la muestra a dicha longitud de onda, considerándose un valor de ϵ que está extensamente reportado para la mayoría de los solventes empleados. La reacción entre el DTNB y los grupos –SH se representa en la Figura 12.

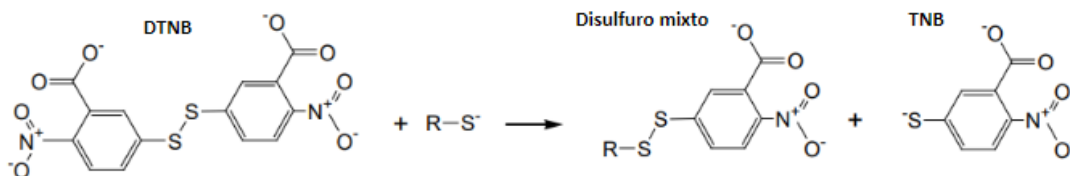


Figura 12. Diagrama representando la reacción entre el 5,5'-ditio-bis-[ácido-2-nitro-benzoico] (DTNB o Reactivo de Ellman) con tioles, en solución acuosa. Se trata de una sustitución nucleofílica que da lugar a un disulfuro mixto y a 5-tio-ácido-2-nitro-benzoico (TNB) como productos. Obtenido de descripción del reactivo de Ellman del catálogo de Thermo Scientific (número de catálogo: 22582).

Procedimentalmente, alícuotas de las diferentes formas de HsGS previamente expuestas a tratamiento con ONOO⁻ fueron tratadas con 5 volúmenes equivalentes de acetona fría, dejándose incubar durante un tiempo mínimo de 20 minutos a -20°C (en el *freezer* del laboratorio). A continuación, se procedió a precipitar a la proteína mediante centrifugación de estas muestras a 17500 g y 4°C, durante 30 minutos. Los *pellets* obtenidos fueron re-disueltos en una solución de cloruro de guanidinio 6 M, preparado en buffer Tris 50 mM a pH=8. El cloruro de guanidinio concentrado es un agente caotrópico y desnaturalizante, capaz de desplegar completamente a la HsGS, exponiendo a sus grupos –SH al medio circundante para facilitar su subsiguiente reacción con el DTNB. El siguiente paso consistió en el agregado de DTNB a una concentración final de 1 mM, partiendo de un stock 20 mM (dilución 1/20), preparado en etanol ese mismo día y almacenado en oscuridad.

Se dejó incubar a las muestras de HsGS con DTNB durante 30 minutos, en completa oscuridad y a temperatura ambiente y, al finalizar este tiempo, se midió la absorbancia de cada muestra a 412 nm. Para el cálculo de la concentración de –SH en cada muestra de HsGS, entonces, se consideró un coeficiente de extinción para el TNB en cloruro de guanidinio 6M, de $\epsilon_{\lambda=412\text{nm}} = 13880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que se encuentra extensamente reportado en la bibliografía y que fue constatado en estudios previos dentro del CEINBIO [179, 180]. Si bien este método permite la cuantificación absoluta de la

concentración de grupos –SH en cada muestra, los resultados obtenidos fueron, finalmente, expresados en forma relativa, de manera que para cada muestra de HsGS tratada con ONOO⁻ se graficó el promedio del porcentaje de grupos –SH remanentes luego del tratamiento, relativizando cada medida respecto a la [-SH] determinada para el control correspondiente a la misma HsGS con 0 μM ONOO⁻ (que se tomó como 100%). Esto hizo posible una mejor comparación de la sensibilidad de los –SH de cada forma de HsGS frente a la oxidación por ONOO⁻, independizando los valores finales obtenidos respecto a las posibles variaciones en las mediciones de la [-SH] de partida, producto de las dificultades asociadas a la técnica descrita (sobre todo, a nivel del proceso de precipitación y re-disolución de las muestras, que es una importante fuente de variabilidad).

5.8 Determinación semi-cuantitativa del nivel de modificación oxidativa en cada aminoácido de HsGS mediante análisis por HPLC-MS/MS-MRM

Con el propósito de caracterizar los patrones de modificación oxidativa de las diferentes formas de HsGS luego de su tratamiento con ONOO⁻, determinando la prevalencia de la oxidación o nitración de los distintos aminoácidos susceptibles a lo largo de la cadena polipeptídica, se recurrió a una estrategia de proteómica dirigida, haciendo uso de la técnica de Monitoreo de Múltiples Reacciones (*Multiple Reaction Monitoring* o MRM, por sus siglas en inglés), para espectrometría de masa en tándem. Para ello se empleó un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo QTrap 4500 (Sciex) acoplado a un sistema de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) Infinity 1260 (Agilent).

El método MRM utilizado fue desarrollado previamente a la realización de este trabajo por grupos de investigación conformados dentro del CEINBIO. Se trata de un método específicamente diseñado para permitir la detección de péptidos, nativos y modificados oxidativamente, derivados de la digestión con tripsina de muestras de HsGS recombinante, sometidas o no a tratamientos previos con ONOO⁻. Para su desarrollo, entonces, el primer paso fue la identificación de las modificaciones oxidativas que se incorporan en los diferentes péptidos derivados de HsGS tras el tratamiento de la misma con ONOO⁻. Para ello, se tomaron muestras de HsGS pre-tratadas con ONOO⁻ y se las tripsinizó. Los péptidos (trípticos) obtenidos fueron sometidos a un escaneo completo (de m/z) y espectrometría de masa en tándem (MS/MS) data-dependiente en un analizador de masa Orbitrap de alta resolución. Una vez identificados los diferentes péptidos de interés (es decir, una vez asignadas las señales a diferentes valores de m/z a los distintos péptidos, nativos y modificados, que se espera obtener de la digestión por tripsina de la HsGS tratada) utilizando el *software* MaxQuant, se procedió a analizar los espectros de fragmentación correspondientes a cada uno de ellos.

En MS/MS, cada péptido ionizado de partida (ion precursor o “padre”) es fragmentado en forma estocástica a nivel de sus diferentes enlaces peptídicos para dar lugar a cantidades teóricamente equivalentes de un repertorio finito de fragmentos “b” e “y” ionizados (iones producto o “hijos”), cada uno de los cuales posee una relación m/z característica. El espectro de fragmentación permite ver la intensidad de la señal obtenida en el detector del espectrómetro de masa para diferentes valores de m/z para la fragmentación de cada péptido. Así, el análisis de estos espectros hizo posible la identificación, para cada ion precursor, de tres iones producto que generan señales de muy elevada intensidad, favoreciéndose aquellos que contienen sitios de posible modificación oxidativa. Esto permitió que en las corridas de HPLC-MS/MS-MRM realizadas en el marco de este trabajo se hiciera el seguimiento simultáneo de tres transiciones ion precursor → ion producto para cada tríptico de HsGS en su forma nativa y en su forma modificada.

Así, en cada corrida cromatográfica se inyectó la muestra, correspondiente a los trípticos de HsGS, en el sistema de HPLC, lográndose una separación temporal en el ingreso de los diferentes péptidos al espectrómetro de masa. A su vez, se programó a dicho equipo para seleccionar a los diferentes iones precursores (en función de su m/z) en el primer cuadrupolo (Q1), someterlos a fragmentación en el segundo cuadrupolo (Q2) y seleccionar a los tres iones producto previamente escogidos (nuevamente a partir de sus m/z particulares) a nivel del tercer cuadrupolo (Q3). Estos iones “hijo” seleccionados para cada péptido son los únicos que el equipo permitirá que lleguen al detector, pudiendo incidir sobre el mismo y dar lugar a una señal, en el momento en que en el Q3 se está seleccionando su relación m/z particular. Esta estrategia me permitió obtener un registro en el tiempo de la intensidad de señal correspondiente a tres transiciones para cada péptido de HsGS, obteniéndose picos para las mismas en los tiempos correspondientes a los tiempos de elución del tríptico de partida de la columna cromatográfica. El área bajo la curva del gráfico de intensidad de señal en función del tiempo para cada transición detectada guarda proporcionalidad con la concentración del péptido de partida en la muestra. Así, si bien el método MRM no permite una cuantificación absoluta de los diferentes péptidos en la muestra (dado que serían necesarios estándares livianos y pesados de cada péptido), al seguirse transiciones correspondientes a los mismos péptidos en su forma nativa y modificada, de la integración de las señales correspondientes a unos y otros, puede hacerse una estimación del porcentaje relativo de modificación experimentado por cada residuo aminoacídico. Esto permitió realizar una caracterización comparativa de los patrones diferenciales de modificación entre la enzima WT, y las mutantes Y171F e Y283F, posibilitando el análisis del impacto de la remoción de las Tyr 171 y 283 sobre la tendencia de los otros residuos de la enzima a ser oxidados o nitrados por ONOO^- .

La preparación de las muestras de proteína para la realización de los experimentos de HPLC-MS/MS, pues, se realizó de la siguiente forma. Luego del tratamiento con ONOO^- , 20 μg de las muestras de HsGS fueron secados en vacío en un equipo Speedvac (Thermo Scientific), durante 2 horas. Al finalizar este paso, se las re-disolvió en 20 μL de urea 8M, preparada en Tris-HCl 50mM, pH = 8,0. A continuación, estas muestras fueron reducidas utilizando DTT y posteriormente alquiladas mediante la adición de iodoacetamida (IAA). Tras esto, se procedió a su tripsinización en solución de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), para lo cual se empleó tripsina Promega, añadiéndose una parte de la misma cada 50 partes de HsGS, y se dejó incubar overnight a 37°C. Al día siguiente, se sometió a los péptidos así obtenidos a extracción en fase sólida, utilizando discos de fase reversa C18, empaquetados en StageTips (*tips* de pipeta p200, a los que se les inserta el disco en su interior, actuando estos como el soporte durante la extracción) [181-183]. Para ello se emplearon sucesivos pasos de centrifugación, a través de los cuales los discos retienen a los péptidos y se lavan las distintas sales y solutos presentes en la muestra. Finalmente, los péptidos retenidos por los filtros fueron eluidos en una solución de acetonitrilo 80% en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, mediante el uso de presión aplicada con una jeringa de 10 mL. Los péptidos eluidos fueron sometidos a una nueva ronda de desecado en vacío en el equipo Speedvac, al cabo de la cual estos fueron re-suspendidos en 10 μL de H_2O nanopura (np) para su análisis.

Tal como fue mencionado anteriormente, el equipo empleado para la separación de los péptidos antes de su inyección en el espectrómetro de masa fue un HPLC Infinity 1260 (Agilent), pareado con una columna GRACE Vydac 218TP C18, de 5 μL de capacidad (2.1 x 150 mm). Durante la corrida se mantuvo una temperatura de 25°C en la columna, y un flujo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. La fase móvil A consistió en 0,1% ácido fórmico en H_2O np, mientras que la fase móvil B estaba formada por ácido fórmico

0,1% en acetonitrilo. Se empleó un gradiente de una y otra fase, tal que entre 0 y 5 minutos se mantuvo un 2% de B, entre los 5 y los 95 minutos de corrida se aumentó el % de B progresivamente de 2 a 45%, mientras que entre los 90 y los 100 minutos, se mantuvo una contribución de B constante, de un 45%. Al culminar 100 minutos de corrida, se procedió a re-equilibrar la columna durante 30 minutos con fase móvil con 2% de B. El volumen de inyección utilizado para las muestras fue de 5 μ L, en cada caso.

La detección individual de cada péptido, nativo o modificado, fue realizada utilizando el método MRM ya descrito. Así, una vez identificada la señal correspondiente a cada una de las tres transiciones seguidas para cada tríptico, se procedió a la integración del gráfico de intensidad de señal en función del tiempo para cada una de ellas utilizando el *software* Analyst (Sciex). A continuación, para cada péptido se seleccionaron aquellas transiciones para las cuales se detectó una mayor intensidad de señal, tanto para su forma nativa como para su(s) forma(s) modificada(s), utilizándose las áreas bajo estos picos para estimar el porcentaje de modificación oxidativa a nivel de cada residuo. Este cálculo consistió, simplemente, en la determinación de la contribución relativa de cada una de las formas modificadas de un péptido, al total de la señal identificada como correspondiente al mismo. Para ello se determinó el área bajo el pico de señal correspondiente al péptido con la modificación de interés y se la dividió entre la suma de las áreas bajo las señales del péptido en todas sus formas posibles (nativo, con la modificación de interés y con otras modificaciones o conjuntos de modificaciones simultáneas).

5.9 Caracterización por Dicroísmo Circular

Con el objetivo de determinar que no ocurrieron cambios en la estructura tridimensional global de la HsGS producto de la incorporación de mutaciones Tyr \rightarrow Phe en sus residuos 171 y 283, se procedió a la realización de espectros de CD en las regiones del UV cercano y lejano del espectro electromagnético para soluciones equimolares de HsGS WT, Y171F e Y283F. La coincidencia de los trazados de los espectros obtenidos nos confirmarían, pues, una coincidencia exacta en la estructura secundaria (plegamientos regulares locales) y terciaria (estructura tridimensional global) de la proteína, indicando que las mutaciones introducidas no afectaron la capacidad de la enzima de adquirir su estructura nativa normal y funcional.

Para la realización de los espectros de CD en la región UV cercana se prepararon alícuotas de 200 μ L, de una concentración de 0,8 mg/mL de cada una de las tres formas de la HsGS en buffer fosfato de potasio (KPi) 20 mM, pH=7,3 con cloruro de potasio (KCl) 20 mM y DTPA 0,1 mM. Se utiliza un buffer más diluido que el buffer A empleado en el resto del protocolo ya que concentraciones elevadas de cloruros (Cl⁻) pueden interferir con la construcción de los espectros. Mientras tanto, para los espectros CD en la región UV lejana, se realizaron diluciones 1/5 en H₂O np de las soluciones empleadas para el UV cercano. Para ello se agregaron 240 μ L de H₂O np, a una alícuota de 60 μ L de la muestra problema de HsGS en buffer KPi 20 mM.

Para preparar las diluciones a las concentraciones deseadas, se emplearon los resultados de la cuantificación de las fracciones proteicas de partida por el método de BCA. A su vez, se corroboró que la concentración final de proteína alcanzada en cada caso fuera cercana a la estipulada a través del seguimiento de la absorbancia a 280 nm de cada muestra durante la construcción del espectro de CD, considerando un coeficiente de extinción molar para la HsGS a dicha λ de 1 ml/(mg.cm), que fue estimado a partir de reportes previos.

El equipo empleado para la construcción de los espectros de CD es un modelo Chirascan V100 desarrollado por Applied Photophysics, y localizado en el *Institut Pasteur* de Montevideo.

Los datos crudos obtenidos fueron analizados utilizando el software ProData Viewer de Applied Biophysics, utilizándose como línea de base en cada región del espectro al espectro correspondiente al buffer KPi 20 mM en ausencia de proteína. Los datos se representaron como un gráfico de elipticidad molar (grados x cm²/dmol) en función de λ (nm).

5.10 Estudios de estabilidad térmica de las diferentes HsGS

Se estudió la estabilidad de la HsGS WT, Y171F e Y283F, en ausencia y en presencia de sus ligandos Mg²⁺ y ATP, mediante la realización de curvas de desnaturalización térmica. El objetivo perseguido era el de evaluar si las sustituciones puntuales Tyr→Phe introducidas en cada forma mutante de la enzima provocan cambios significativos sobre la estabilidad térmica de la enzima, así como si estas alteran la capacidad de la enzima de unirse a y ser estabilizada por los ligandos seleccionados (Mg²⁺ y ATP). Para ello se empleó un método fluorimétrico, basado en el seguimiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína, debida a la presencia en su estructura de numerosos residuos aminoacídicos aromáticos, incluyendo Trp y Tyr. En este caso, se siguió la fluorescencia correspondiente a los Trp, excitando a una $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, y detectando la emisión fluorescente a una $\lambda_{\text{em}} = 335$ nm en un espectrofluorímetro Jasco. Este equipo permite el seguimiento simultáneo de cuatro longitudes de onda de emisión para una misma longitud de onda de excitación, por lo que también se realizó, paralelamente, el seguimiento de la emisión fluorescente a 315, 355 y 375 nm.

A nivel de procedimiento, se prepararon soluciones de 500 μ L de HsGS WT, Y171F o Y283F 0,2 mg/mL en buffer A, en ausencia o presencia de su ligando Mg-ATP. Para la condición de presencia de esta especie, se utilizó una concentración final de 20 mM MgCl₂ y 10 mM ATP. Luego de una breve incubación, estas soluciones fueron vertidas en una cuba de cuarzo de 500 μ L de capacidad, apta para fluorímetro, y se procedió a la medición de su fluorescencia en el tiempo, a medida que se incrementaba en forma automática la temperatura de la celda, en un rango de 15 a 65°C, con una velocidad de aumento de 1,5 °C/min. Cada condición fue medida por triplicado.

Los datos obtenidos para la intensidad de fluorescencia absoluta fueron convertidos a intensidad de fluorescencia relativa, normalizando por el valor de partida de cada curva. Una vez construida la gráfica de intensidad de fluorescencia en función de la temperatura para cada réplica del experimento, se procedió a realizar un ajuste no-lineal para la curva representada, correspondiente a una curva de desnaturalización térmica considerando líneas de base no lineales con el software Graphpad Prism 8.0.2. Esto permitió obtener una estimación del valor de la temperatura de *melting* aparente (T_m) para cada réplica del experimento, a partir de la determinación del valor en el eje Ox al que se da el punto de inflexión (inversión de la curvatura) de la curva de mejor ajuste a los datos experimentales. Se entiende por T_m al valor de temperatura para el cual el 50% de las moléculas de proteína en solución se encuentran desnaturalizadas, al tiempo que el 50% restante permanecen en su forma nativa. Finalmente, los valores de T_m obtenidos para cada réplica del mismo ensayo de *melting* fueron promediados y se calculó el desvío estándar en cada caso.

5.11 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Los resultados se presentan en todos los casos como valores promedio \pm desvío estándar (SD). Se realizaron los gráficos y el análisis estadístico con el software GraphPad Prism 8.0.2. Las comparaciones estadísticas de los resultados obtenidos para un mismo experimento, por dos grupos diferentes de muestras, se realizaron mediante test T de Student múltiple, no pareado, aceptándose $p < 0,05$ como significancia estadística.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Producción y purificación de HsGS WT, Y171F e Y283F

De acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos, el primer paso en el desarrollo de esta Tesina fue la transformación de bacterias *E.coli* BL21 Star con los plásmidos conteniendo la secuencia codificante para la HsGS WT y sus formas mutantes Y171F e Y283F. En particular, los plásmidos empleados codifican para los aminoácidos 5-365 de cada forma de la HsGS, acoplados a una cola N-terminal de 6 residuos de His (*His-tag*), de forma tal que la secuencia completa puede verse en la Figura 13. El *His-tag* fue incluido para facilitar la purificación de la enzima mediante cromatografía IMAC utilizando una columna cromatográfica cuya fase estacionaria corresponde a NiSO_4 . Esto permite la retención en forma específica de la proteína marcada gracias a la capacidad de los grupos funcionales imidazol, de la cadena lateral de los residuos de His del *tag*, de formar complejos muy estables con el Ni^{2+} . También se incluye un sitio de corte para la TEV-proteasa, que permite escindir dicho *tag*, de ser ello necesario (esto no se llevó a cabo en el marco de los experimentos descritos en el curso de la Tesina) [184].

Secuencia de la forma recombinante de HsGS WT (ID: GLULA-c004, SGC)

MHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMASSHLNKGIK
QVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLD
SEPKCVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPA
AMFRDPFRKDPNKLVLCEVFKYNNRRPAETNLRHTC
KRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGW
PSNGFFPQGPYYCGVGADRAWGRDIVEAHYRA
CLYAFVKIAFTNAEVMPAQWEFQIGPCEGISMGDH
LWVARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNAG
CHTNSFSTKAMREENGLKYIEAIEKLSKRHQYHIR
AYDPKGGLDNARRLTGFHETSNINDFSAGVANRS
ASIRIPRTTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPFSVTEALI
RTCLLNETG

Figura 13. Secuencia aminoacídica de la proteína HsGS WT recombinante utilizada. El tag N-terminal está representado en negrita.

La transformación de las bacterias fue llevada a cabo mediante el método de shock térmico, y se seleccionaron las clonas transformantes por su resistencia a kanamicina (a una concentración de $100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). La inducción de la expresión del transgen introducido se realizó mediante la adición de IPTG, un análogo estructural de la alolactosa, activador de la transcripción de los genes regulados

por el operón bacteriano del mismo nombre (operón Lac). Esto responde a que la estructura del plásmido es tal que la secuencia codificante del transgen queda inserta inmediatamente *downstream* (río abajo) respecto a las secuencias reguladoras de dicho operón, de forma que su expresión será regida por las mismas. Una vez añadido el IPTG, se incubó por 4 horas a 18°C, permitiendo la expresión de la enzima.

A partir de los lisados bacterianos obtenidos de esos cultivos se procedió a la purificación de la HsGS, mediante el procedimiento igualmente descrito en Materiales y Métodos. Para ello, entonces, se comenzó cargando la columna cromatográfica con el lisado bacteriano y se realizaron sucesivos lavados con buffer A con concentraciones crecientes de imidazol (10, 25, 50 y 100 mM). Se tomaron alícuotas de 1 mL (aproximadamente) de la fracción no unida (FNU) o flow-through de la columna, así como de cada uno de los lavados realizados. Resulta esperable que a medida que se incrementa la concentración de imidazol, este logre competir con progresiva eficiencia con las proteínas de unión débil a la fase estacionaria, desplazándolas y forzando su elución, de manera que solo la proteína recombinante, dotada del *tag* de His pueda permanecer unida, producto de su muy alta afinidad por el Ni²⁺ inmovilizado en la matriz de la columna. Al finalizar los lavados, se procede a la elución de la HsGS recombinante con un mayor grado de pureza, mediante el pasaje de buffer A con imidazol 500 mM.

Las fracciones extraídas en los diferentes pasos del proceso de purificación se corrieron en los distintos carriles de un gel electroforético desnaturalizante y reductor, con el objetivo de analizar la eficiencia del proceso de purificación, determinando si hubo un enriquecimiento importante en HsGS a lo largo de los diferentes pasos. Los resultados para la purificación de HsGS WT pueden observarse en la figura 14. Dicho análisis reveló una purificación progresiva de la proteína de interés.

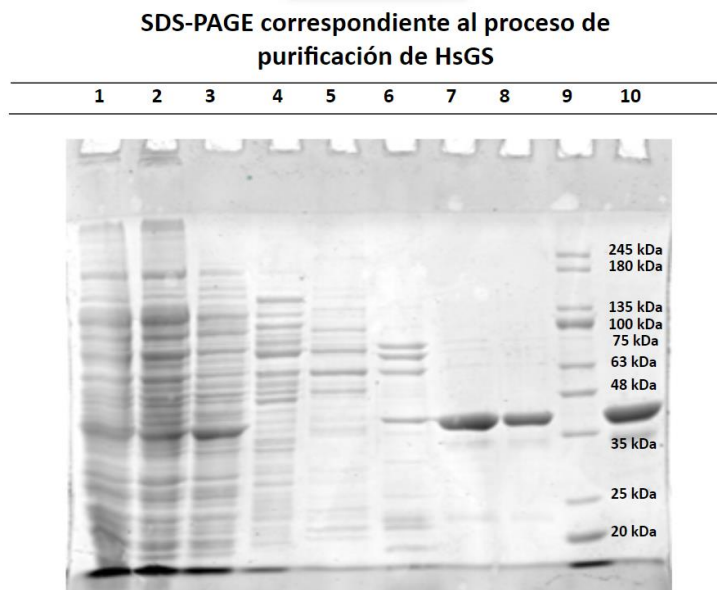


Figura 14. Análisis por SDS-PAGE reductora (con β -mercaptoetanol) del proceso de purificación de la HsGS WT. 1: lisado bacteriano; 2: fracción no unida (FNU o flow-through), 3: lavado con 10 mM imidazol; 4: lavado con 25 mM imidazol; 5: lavado con 50 mM imidazol; 6- lavado con 100 mM imidazol; 7 y 8- fracción eluida con 500 mM imidazol (10 y 5 μ g); 9: marcador de peso molecular (MPM), 10: estándar de HsGS WT obtenida de un proceso de purificación previo.

Si se observan los carriles 7 y 8 del gel incluido en la Figura 14, correspondientes a 10 y 5 μg , respectivamente, de proteína obtenida del eluido cromatográfico, puede constatarse la presencia de una banda de proteína extremadamente intensa, y con un muy elevado nivel de pureza, a un desplazamiento electroforético coincidente con el esperable para la HsGS, cuyo peso molecular es de 43 kDa, aproximadamente. Esto nos habla de un proceso de purificación exitoso. A su vez, si se compara el desplazamiento electroforético de estas bandas con el presentado por la banda única del carril 10, correspondiente a un estándar de HsGS (obtenida de una purificación previa, de calidad comprobada), se observa que la migración es idéntica en todos los casos. Esto nos permite corroborar no solo que se logró una producción exitosa de la enzima recombinante en el sistema bacteriano, sino también que se logró una purificación igualmente exitosa de la misma a partir del lisado de partida. Al observar el carril 6, correspondiente al lavado con imidazol 100 mM se observa una banda relativamente tenue a la misma altura que la banda identificada como HsGS en los carriles 7, 8 y 10. Esto nos estaría indicando que, posiblemente, una pequeña porción de la HsGS recombinante se despegó de la columna durante este último lavado, aunque, en proporción con la intensidad de las bandas observadas en los carriles 7, 8 o 10 esta no resulte una pérdida significativa de enzima.

Al culminar este paso de purificación, se procedió al cambio de buffer de la enzima eluida, que fue traspasada a buffer B. De esta forma, se removió el exceso de imidazol que puede conducir, eventualmente, a la desnaturalización proteica. A continuación, la enzima fue concentrada.

Luego, se procedió a la realización de ensayos de actividad para constatar que la enzima purificada fuese funcional; esto es, que contase con actividad enzimática, tanto en el caso de la HsGS WT como para las mutantes Y171F e Y283F. En todos los casos, el resultado fue positivo. Una vez culminados todos estos controles, se procedió al almacenamiento de la HsGS pura a -80°C en alícuotas de 200 μL , a una concentración de 10 mg/mL en buffer B.

6.2 Estudios de dicroísmo circular de HsGS WT, Y171F e Y283F

El dicroísmo circular es una técnica analítica que permite la dilucidación de aspectos estructurales de macromoléculas intrínsecamente quirales o dispuestas en un entorno quiral (como los ácidos nucleicos y las proteínas), en solución acuosa, basándose en la capacidad de las mismas de absorber en forma diferencial a la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha, dando lugar a una radiación resultante que presenta polarización elíptica. En particular, en el caso del CD de proteínas, los espectros obtenidos para la región UV lejana (180-240 nm) consisten en señales provenientes de la absorción de los enlaces peptídicos, y su análisis puede proveer información sobre la estructura secundaria de la macromolécula. Es posible incluso determinar la contribución relativa de diferentes formas de plegamiento regular ubicuas, como las hélices α o las hojas β , a la estructura secundaria global, mediante un análisis en profundidad del espectro de CD en el UV lejano de una proteína. Por su parte, el espectro de CD de una proteína en la región cercana del espectro UV (250-360 nm) se forma a partir de señales generadas por la absorción de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y, por ende, provee información sobre el entorno en que estos se encuentran, que responde, a su vez, a la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína. Otros cromóforos no-proteicos, como las flavinas y los grupos hemo, también generan señales de

dicroísmo circular, cuya localización a lo largo del espectro UV e intensidad depende del ambiente preciso en que se halle el cromóforo de interés [185].

En este caso, me propuse utilizar el CD en la regiones cercana y lejana del espectro UV como una herramienta para la caracterización de las formas mutantes Y171F e Y283F de la HsGS producidas recombinantemente, con el objetivo de determinar si estas presentaban alteraciones a nivel de su estructura secundaria y/o terciaria respecto a la enzima WT. Se realizó, por consiguiente, un análisis comparativo de los espectros construidos, superponiéndolos sobre un mismo par de ejes, según puede verse en las Figuras 15 y 16.

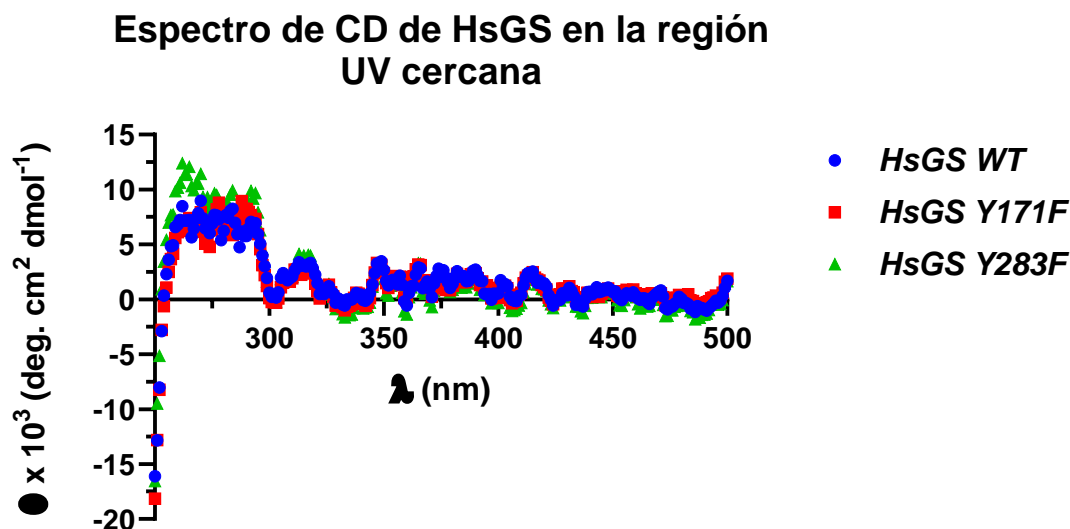


Figura 15. Espectros de dicroísmo circular en la región UV cercana y visible (250-500 nm) del espectro electromagnético para HsGS WT, Y171F e Y283F. Gráfico construido en Graphpad Prism 8.0.2.

Considerando, según fue dicho anteriormente, que la forma del gráfico de CD en esta región del espectro UV (Figura 15) provee información respecto a la estructura tridimensional global de la proteína siendo analizada, y observando una coincidencia casi exacta entre los puntos obtenidos a las diferentes longitudes de onda para las tres formas de la HsGS, concluimos que no se observan alteraciones significativas en las estructuras terciaria y cuaternaria de la enzima producto de las mutaciones sitio-específicas realizadas.

Al analizar los espectros de CD en la región UV lejana (Figura 16) de cada una de las formas de HsGS, nuevamente se constata una coincidencia casi exacta en las siluetas espectrales obtenidas para cada una de las tres formas de la enzima, indicando que no existen diferencias significativas en los plegamientos locales regulares que adopta la proteína, producto de la sustitución de los residuos 171 o 283 de Tyr por Phe, incluso dada la diferencia en la polaridad de las cadenas laterales de uno y otro aminoácido. Cabe notar que se observan ciertas diferencias sutiles en los valores absolutos de θ a lo largo del espectro para las diferentes enzimas, aunque la forma de los espectros sea coincidente. Entiendo que estas variaciones podrían deberse al margen de error existente en la cuantificación de las diferentes HsGS, que se realizó utilizando el método del BCA, basándonos luego en los resultados obtenidos a partir del mismo para la preparación de las soluciones equimolares que se utilizaron en la medición del espectro de CD. Así, un error en la cuantificación podría haber

dado lugar a la preparación de una solución más concentrada de la forma Y171F de la enzima que de sus formas WT o Y283F, lo cual explicaría la mayor intensidad de la señal de CD para la misma a las diferentes longitudes de onda graficadas. No obstante, estas pequeñas diferencias nos permiten igualmente constatar la coincidencia en la forma del espectro, que es reveladora de la conservación del plegamiento secundario de la HsGS WT al introducir las mutaciones estudiadas.

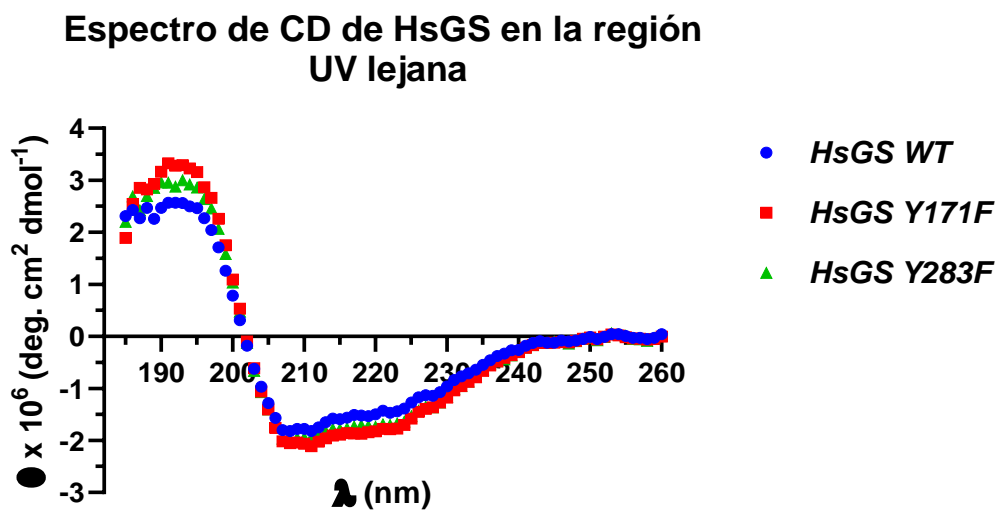


Figura 16. Espectros de dicroísmo circular en la región UV lejana (180-260 nm) del espectro electromagnético para HsGS WT, Y171F e Y283F. Gráfico construido en Graphpad Prism 8.0.2.

A partir de la forma del trazado de los espectros de CD de las proteínas en la región del UV lejano, es posible estimar el porcentaje de contribución de las diferentes formas de plegamiento secundario regular, como hélices α , hojas β paralelas y anti-paralelas, giros β , etc., a su estructura secundaria global. Conociéndose los valores de θ en función de la λ de péptidos artificiales cuya estructura secundaria consiste puramente en diferentes formas regulares de plegamiento que son ubicuas, resulta posible, mediante un análisis matemático relativamente sencillo, determinar el porcentaje de contribución necesario de cada uno de estos espectros elementales para dar lugar al espectro experimental de la proteína de interés mediante una sumatoria ponderada de componentes basales. Esto permite, pues, obtener una estimación del porcentaje de la estructura secundaria de la proteína de interés que corresponde a cada una de las formas más frecuentes de plegamiento secundario. Considerando esto, se plantea una caracterización de las estructuras secundarias de HsGS WT Y171F e Y283F mediante el análisis en profundidad de sus espectros de CD en el UV lejano.

Para ello se recurrió al *software* BestSel, que fue desarrollado por la Universidad *Elte Eotvos Loránd*, de Budapest, Hungría y que se encuentra disponible en forma libre *online*. Este *software* analiza los datos experimentales de CD provistos por el usuario, y procede a hacer una búsqueda del mejor ajuste posible a partir de la combinación lineal de espectros de base pre-fijados, correspondientes a ocho elementos de estructura secundaria ubicuos, definidos por el programa. Estos elementos estructurales son: α -hélices, α -hélices distorsionadas, hojas β paralelas, hojas β anti-paralelas torsionadas hacia la derecha, relajadas y torsionadas hacia la izquierda (Anti1, Anti2, y Anti3, respectivamente), giros β y una última categoría denominada “otras”, que engloba a las regiones

desestructuradas de las proteínas. Una vez hallado el espectro combinatorio de mejor ajuste a los datos experimentales, el programa entrega el porcentaje de contribución de cada uno de los componentes de base que empleó para su construcción, de forma que estos datos pueden ser entendidos como predictores del porcentaje de contribución de cada elemento estructural individual siendo analizado a la estructura secundaria global de la proteína de interés. Asimismo, a modo de indicador de la calidad del ajuste, el software provee el valor de la raíz del cuadrado de las desviaciones medias de las posiciones atómicas (RMSD, por sus siglas en inglés) que surge de la comparación del espectro experimental ingresado por el usuario, con el espectro de mejor ajuste hallado por el *software*.

Así, el análisis individual de cada uno de los espectros de CD en la región UV lejana para HsGS WT, Y171F e Y283F arrojó como resultado una composición muy similar de la estructura secundaria de las tres formas de la enzima. Esto concuerda con lo esperado dada la superposición casi exacta de los espectros de CD correspondientes a las tres formas de HsGS en esta región del espectro electromagnético. El RMSD obtenido fue de 0,035 para HsGS WT, y 0,034 tanto para HsGS Y171F como para HsGS Y283F. Los resultados completos del análisis discutido están representados en la Figura 17.

Entonces, de acuerdo al mejor ajuste obtenido por el *software* BestSel para el espectro de cada variante de la enzima, un importante porcentaje de la estructura secundaria global de cada una de las tres formas de HsGS analizadas correspondería a hojas β anti-paralelas, de manera que el espectro de mejor ajuste se obtuvo, en cada caso, con contribución de un 40,9%, 40,8% y 43,8% del espectro de base correspondiente a dicha forma de plegamiento para HsGS WT, Y171F e Y283F, respectivamente. A su vez, dentro de esta categoría, para las tres formas de la HsGS se constató una contribución casi equitativa de hojas β anti-paralelas relajadas y torsionadas hacia la derecha (en torno al 20% de cada una en cada caso), mientras que la contribución de las hojas β anti-paralelas torsionadas hacia la izquierda sería marginal (en torno al 2%, en los tres casos). Asimismo, para las tres formas de HsGS se detectó una contribución relevante de los giros β a la estructura global (19,2%, 22,7% y 12,1% para HsGS WT, Y171F e Y283F, respectivamente). Finalmente, de acuerdo con los resultados entregados por *BestSel*, una porción importante de la enzima poseería un plegamiento no-regular o no reconocido, siendo su contribución similar, aunque con ligeras variaciones, para las tres formas de HsGS (39,9, 36,6 y 44,1% en HsGS WT, Y171F e Y283F, respectivamente), al tiempo que no existiría una contribución significativa del plegamiento en hélice α a la estructura secundaria global de la enzima. No obstante, un somero análisis de las estructuras cristalográficas existentes para HsGS WT revelan una contradicción en este punto, siendo que esta proteína presenta regiones relativamente extensas con estructura de hélice α , y, por el contrario, esta no es rica en dominios desestructurados o con plegamientos atípicos. Así, resulta lógico suponer que una proporción significativa de la estructura secundaria de la HsGS que el *software* asigna a formas irregulares de plegamiento, en realidad corresponda a hélices α que no están siendo debidamente reconocidas, debido a limitantes existentes en el modelo matemático empleado.

A su vez, las variaciones observadas en los porcentajes de contribución de las diferentes formas de plegamiento regular a la estructura secundaria de cada forma de HsGS no parecerían responder tanto a diferencias estructurales significativas entre HsGS WT, Y171F e Y283F, en tanto los espectros de CD en el UV cercano se superponen en forma casi perfecta para las tres proteínas, sino que más

bien podrían ser el resultado de las limitaciones o rigideces del propio modelo matemático utilizado para el ajuste de estos espectros.

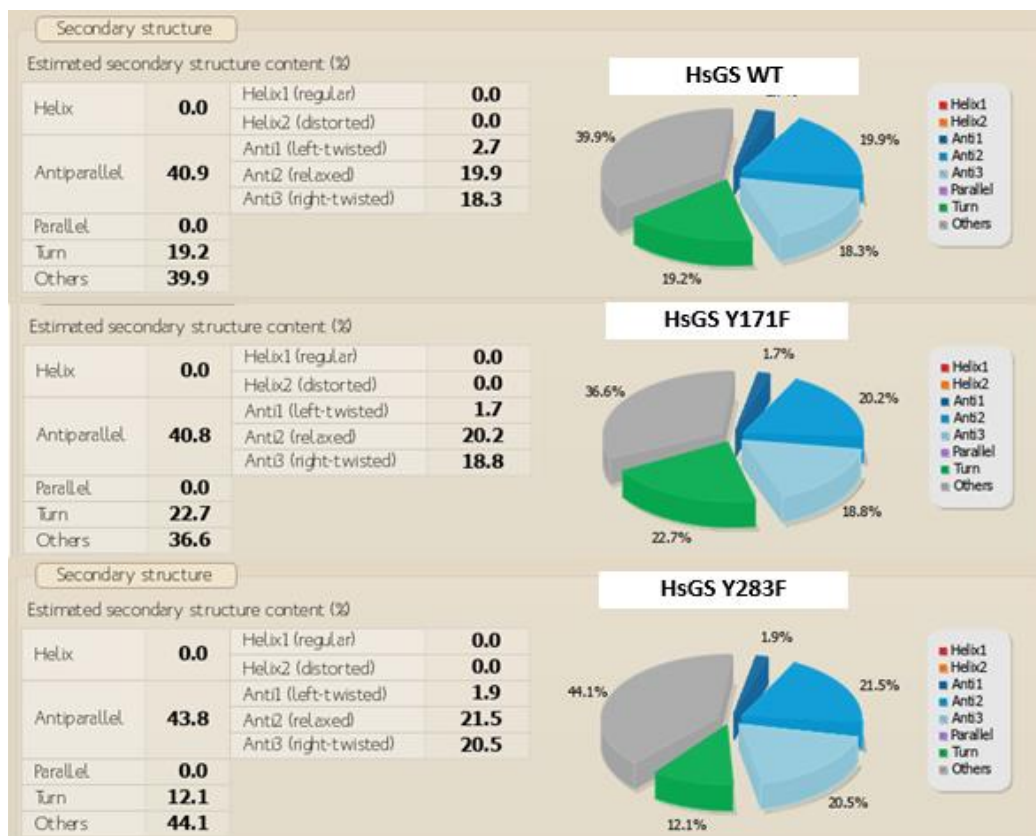


Figura 17. Resultados del ajuste de los espectros de dicroísmo circular en la región UV lejano del espectro electromagnético de HsGS wild-type, Y171F e Y283F a un espectro formado por la sumatoria ponderada de los gráficos correspondientes a péptidos artificiales con el total de su estructura secundaria formada por determinado elemento de plegamiento regular ubicuo. El ajuste se realizó con el software BestSel, desarrollado por la universidad Elte Oltvos Loránd (Budapest, Hungría).

Considerando, pues, el elevado nivel de superposición de los espectros de CD obtenidos tanto en la región UV cercano como lejano para HsGS WT, Y171F e Y283F, así como los resultados obtenidos para el análisis de estructura secundaria de cada forma de la enzima, resulta posible concluir que las mutaciones sitio-específicas introducidas no produjeron un efecto significativo sobre el plegamiento de la HsGS, de forma que las dos mutantes de interés poseerían una estructura secundaria, terciaria y cuaternaria experimentalmente indiferenciables de las de la enzima WT. Esta coincidencia estructural resulta crucial para el análisis de los resultados obtenidos en pasos subsiguientes del trabajo, en tanto permite aceptar que eventuales diferencias observables en la actividad o la sensibilidad frente al ONOO⁻ de las distintas formas de HsGS, son consecuencias directas de la inhibición de la nitración en el sitio mutado, y no resultan de alteraciones estructurales generadas como consecuencia de la mutación en sí.

6.3 Estudios de estabilidad térmica de HsGS WT, Y171F e Y283F

Una vez que se logró demostrar que las mutaciones introducidas no comprometen a la estructura de la HsGS, se procedió al análisis de posibles alteraciones a nivel de su estabilidad.

Con este objetivo en mente se construyeron curvas de desnaturalización térmica o *melting*, sometiendo a soluciones de 0,2 mg/ml de las diferentes formas de la HsGS (WT, Y171F e Y283F) a una rampa de temperatura, comenzando en 15°C e incrementando la temperatura a un ritmo de 1,5°C/min hasta alcanzar los 65°C. El objetivo de este experimento es provocar el desplegamiento progresivo de las moléculas de HsGS en solución al suministrar cantidades crecientes de energía térmica al sistema, provocando de esta forma la ruptura de las interacciones débiles, no-covalentes que estabilizan a la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de la proteína. La progresión de la desnaturalización térmica puede seguirse a través de la medición de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de los residuos de Trp de la proteína luego de cada escalón de temperatura.

Las curvas de desnaturalización fueron construidas a través del seguimiento de la fluorescencia de los Trp proteicos, por lo que se irradiaron las muestras con luz a $\lambda=295$ nm (pico en el espectro de excitación de este aminoácido), y se siguió la intensidad de fluorescencia (IF) emitida a 335 nm (pico en el espectro de emisión). Dicha IF tiende a decaer a medida que la proteína se va desplegando, producto de una mayor exposición de los Trp, normalmente ocultos, al medio acuoso circundante, que actúa como *quencher* o “apagador” de su fluorescencia. La IF registrada varía en función de la temperatura describiendo una curva sigmoidea, de manera que el punto de inflexión de la misma (punto del gráfico en el que se invierte la curvatura, y en el cual la pendiente es infinita) corresponde a la temperatura para la cual el 50% de las moléculas de proteína en solución se han desnaturalizado, al tiempo que el 50% restante permanece en su forma nativa. Este parámetro se conoce como temperatura de *melting* (T_m), y su valor es utilizado como un indicador de la estabilidad térmica de la proteína. Esto responde a que proteínas más estables tienen estructuras tridimensionales nativas que son estabilizadas por mayores cantidades de interacciones débiles o no-covalentes, de forma que se requieren mayores cantidades de energía en la forma de calor y, por consiguiente, temperaturas más elevadas, para provocar su ruptura y la desnaturalización proteica.

Para cada forma de la HsGS se construyeron curvas de *melting* por triplicado, en ausencia y en presencia de Mg^{2+} y ATP. Esto se debe a que ambas moléculas son ligandos estabilizadores de la enzima, según fue reportado para la HsGS recombinante WT en trabajos previos realizados por el Dr. Nicolás Campolo y su grupo de investigación, en el CEINBIO [180]. Estos estudios, que utilizaron el mismo protocolo experimental empleado en esta Tesina, reportaron un corrimiento muy importante del valor de T_m de la HsGS al añadir Mg-ATP al medio, de manera que este pasó de $(52,7 \pm 0,1)$ °C en ausencia de ligandos, a $(60,8 \pm 1,3)$ °C en presencia de los mismos. Así, la unión conjunta de Mg^{2+} y ATP a la HsGS WT habría provocado un aumento de 8,1°C en la T_m ; un cambio por demás significativo [180]. Considerando estos antecedentes, resulta relevante determinar si la misma estabilización puede observarse para HsGS Y171F e Y283F, siendo esta indicativa de la capacidad de la enzima de unir estos ligandos, contribuyendo esto a su estabilización estructural. Los resultados para HsGS Y171F e Y283F pueden observarse en las Figuras 18 y 19, respectivamente.

Curva de desnaturalización térmica de HsGS Y171F +/- Mg-ATP

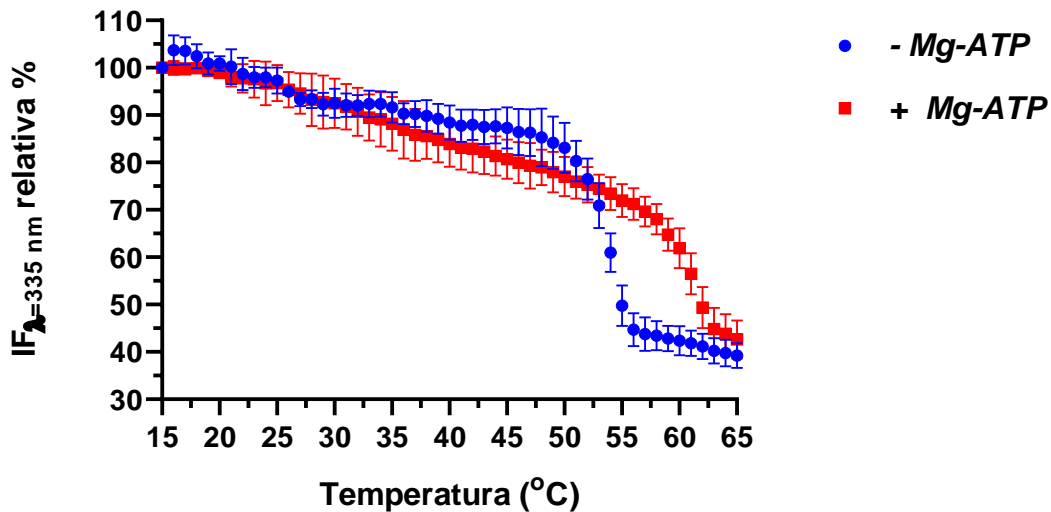


Figura 18. Curva de desnaturalización térmica de HsGS Y171F en ausencia (-) y en presencia (+) de Mg-ATP. Se irradió la muestra con luz a $\lambda=295$ nm y se detectó la intensidad de emisión fluorescente (IF) a $\lambda=335$ nm. En el gráfico se representa a la IF relativizada respecto a su valor inicial en cada corrida. Se grafican media y desvío estándar (SD) ($n=3$) en cada punto. Gráfica construida en Graphpad Prism 8.0.2.

Una vez procesados los datos crudos y representados tal como se ve en la Figura 18, se procedió entonces, al ajuste por regresión no-lineal de las tres réplicas individuales obtenidas para la desnaturalización térmica de HsGS Y171F en ausencia de Mg-ATP a una ecuación de desnaturalización térmica usando el software Graphpad Prism 8.0.2. Una vez hallada la curva de mejor ajuste, se determinó su punto de inflexión en cada caso, y promediando los tres valores, se obtuvo una T_m media de $(53,71 \pm 0,04)^\circ\text{C}$ para esta enzima, siendo este valor muy similar al reportado previamente para la HsGS WT. Asimismo, para la misma mutante en presencia de Mg-ATP se determinó (mediante idéntico procesamiento matemático) una T_m de $(62,57 \pm 0,95)^\circ\text{C}$, lo que se traduce en una estabilización de $8,86^\circ\text{C}$ al añadirse los ligandos de interés, que evidencia que la mutación Y171F no anula la capacidad de la enzima de unir a estas especies, siendo a su vez estabilizada en forma muy significativa (incluso más que lo reportado para la enzima WT) por ellas.

Los resultados correspondientes a la HsGS Y283F, por su parte, pueden verse en la Figura 19. A partir de los datos recabados en cada réplica del experimento, se procedió a la determinación de una T_m , promediándose luego los tres valores obtenidos, tal como se hizo para HsGS Y171F. EL valor de la T_m media determinada en ausencia de Mg-ATP para esta mutante de la HsGS fue de $(48,73 \pm 0,82)^\circ\text{C}$. Esta cifra resulta significativamente más baja que aquella reportada para la HsGS WT en trabajos previos en el CEINBIO, y que aquella determinada para la mutante HsGS Y171F en el marco de esta Tesina. Esto parecería estar indicando que la sustitución de la Tyr 283 por una Phe provoca una desestabilización perceptible de la estructura tridimensional de la enzima, haciéndola más sensible frente a la desnaturalización térmica que la HsGS WT. Así, se precisan menores temperaturas (menos energía en la forma de calor) para provocar la ruptura de las interacciones no-covalentes

que sustentan la estructura tridimensional de la HsGS Y283F, provocando su desnaturalización. Estos resultados sugieren que el grupo –OH fenólico de la Tyr 283 podría estar participando en la formación de interacciones débiles que contribuyen a la estabilización de la estructura proteica, de forma que su remoción, al sustituirse Tyr por Phe, desestabiliza la estructura y facilita el desplegamiento. A pesar de ello, al añadir Mg-ATP al buffer en el que se disuelve la enzima, se observa un comportamiento similar al constatado para la enzima WT y para la mutante Y171F, con un aumento considerable de la T_m , indicativo de una estabilización de la estructura por la unión de estas especies. La T_m obtenida para HsGS Y283F en presencia de Mg-ATP fue de $(59,81 \pm 1,3)$ °C. Esto se traduce en un incremento de 11,02 °C de la T_m de esta mutante al adicionarse los ligandos al medio. Así, se comprueba una vez más, que la mutante de interés retiene la capacidad de unirse a dichas especies, siendo estabilizada por las mismas.

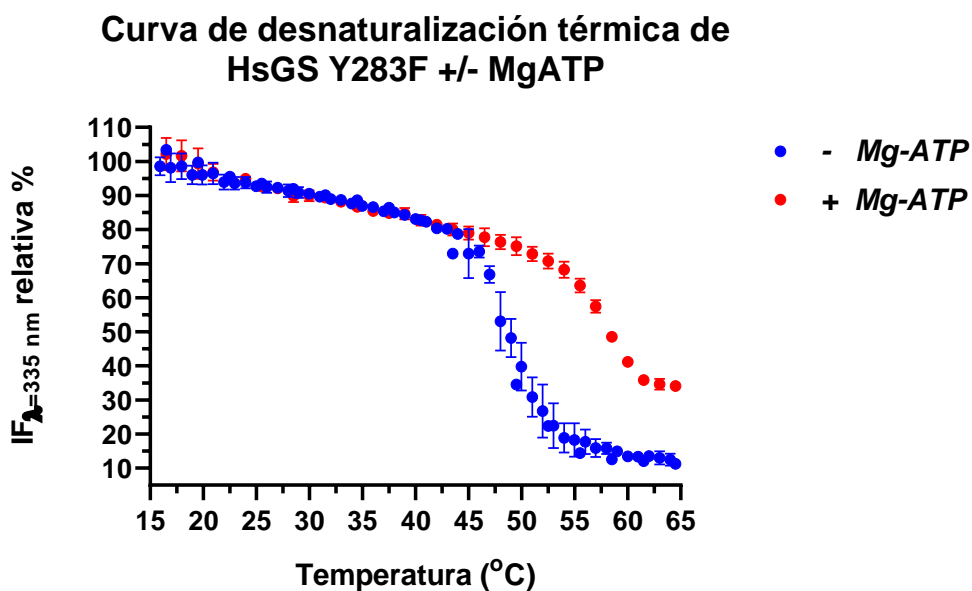


Figura 19. Curva de desnaturalización térmica de HsGS Y283F en ausencia (-) y en presencia (+) de Mg-ATP. Se irradió la muestra con luz a $\lambda=295$ nm y se detectó la intensidad de emisión fluorescente (IF) a $\lambda=335$ nm. En el gráfico se representa a la IF relativizada respecto a su valor inicial en cada corrida. Se grafican media y desvío estándar (SD) ($n=3$) en cada punto. Gráfica construida en Graphpad Prism 8.0.2.

Tomando en consideración todos los resultados expuestos, puede concluirse que la estabilidad térmica de la HsGS no se ve comprometida significativamente por la mutación Y171F, al tiempo que la mutación Y283F provoca una desestabilización moderada. A su vez, pudo establecerse que estas mutaciones sitio-específicas en ninguno de los casos inhiben la capacidad de la proteína de unirse a sus ligandos Mg^{2+} y ATP, que estabilizan conjuntamente logran una estabilización significativa de su estructura. Esto último sugiere que ninguna de las dos Tyr evaluadas participan en forma importante en la interacción con dichos ligandos, en tanto la misma toma lugar de idéntica forma tanto en su presencia como en su ausencia.

Una vez establecida la equivalencia a nivel de estructura y estudiadas las diferencias en estabilidad entre la HsGS WT, Y171F e Y283F, se procedió a la exposición de las tres formas de la enzima al poderoso agente nitro-oxidante endógeno ONOO⁻, con el objetivo de evaluar la capacidad del

mismo de provocar la modificación oxidativa de los diferentes residuos aminoácidos que componen a la enzima, así como, por este medio, desencadenar la pérdida de actividad enzimática de las distintas formas de HsGS. Luego de este tratamiento, se midió la actividad enzimática remanente y se caracterizó a la enzima tratada, mediante una batería de técnicas bioquímicas y proteómicas.

6.4 Puesta a punto del método de cuantificación del producto del ensayo de actividad γ -glutamyl-transferasa

Para la determinación de la actividad enzimática remanente de las diferentes muestras de HsGS luego de la incubación con ONOO^- , se optó por el ensayo de actividad γ -glutamyl transferasa, en detrimento de los ensayos biosintético (consistente en la realización *in vitro* de la reacción que toma lugar *in vivo*, de síntesis de Gln a partir de Glu y NH_3), y biosintético con NH_2OH en lugar de NH_3 [186, 187]. La razón detrás de esta decisión radica en los resultados de estudios de optimización llevados a cabo en el marco de trabajos previos del Dr. Nicolás Campolo en la temática. En ellos, al compararse los tres ensayos mencionados se concluyó que el ensayo de actividad γ -glutamyl transferasa mantiene condiciones de velocidades iniciales durante tiempos más prolongados que los otros dos (20-60 minutos para el ensayo de γ -glutamyl transferasa, dependiendo de la concentración de enzima utilizada, versus 5-60 minutos para los otros dos ensayos) y que, a su vez, la HsGS presenta mayor actividad específica para el mismo, entendiéndose a la actividad específica como una medida de la cantidad química de producto (en μmol) generada por minuto de reacción, por cada molécula de enzima nativa. Además, el ensayo escogido, al contrario que los otros dos, no requiere de la utilización de altas concentraciones de ATP como sustrato de la reacción. Asimismo, cabe destacar que el Pi, que estará presente en los ensayos de actividad en pequeñas cantidades debido a que las reacciones de exposición de la HsGS a ONOO^- son realizadas en buffer fosfato, actúa como un inhibidor de la actividad HsGS. En ese sentido, dado que el ensayo γ -glutamyl transferasa posee una actividad específica considerablemente mayor que los otros, requiere de cantidades menores de enzima, por lo que la cantidad de Pi que será arrastrado al ensayo de actividad será menor y ejercerá así un efecto inhibitorio que no será significativo.

A su vez, en los ya mencionados estudios previos también se lograron optimizar las condiciones de este ensayo de actividad para el mix de reactivos cuya composición se detalla en la sección Materiales y Métodos, estableciéndose que los parámetros ideales consisten en una concentración de 10 nM de decámero de HsGS y un tiempo de reacción de 15 minutos para la temperatura fisiológica, de 37°C [180].

El revelado de la reacción, según fue indicado previamente, se realizó a tiempo final mediante la adición de un volumen equivalente al de reacción de solución de terminación y revelado, consistente en FeCl_3 0,37 M y TCA 0,2 M en HCl 0,67 M. La adición de esta solución no solo provoca la finalización del proceso reactivo, sino que también permite la formación de un complejo entre el producto de la reacción (γ -glutamylhidroxamato) y el catión férrico adicionado; $[\text{Fe}^{3+} - \text{GlnNH}_2\text{OH}]$. Mientras que la solución *stop* por sí sola presenta una coloración amarilla, el complejo es de un color amarillado. En la Figura 20 se representan superpuestos los espectros de absorción de la solución de terminación en ausencia y en presencia de γ -glutamylhidroxamato 4 mM.

Espectros de absorción de solución de terminación +/- γ -glutamil-hidroxamato

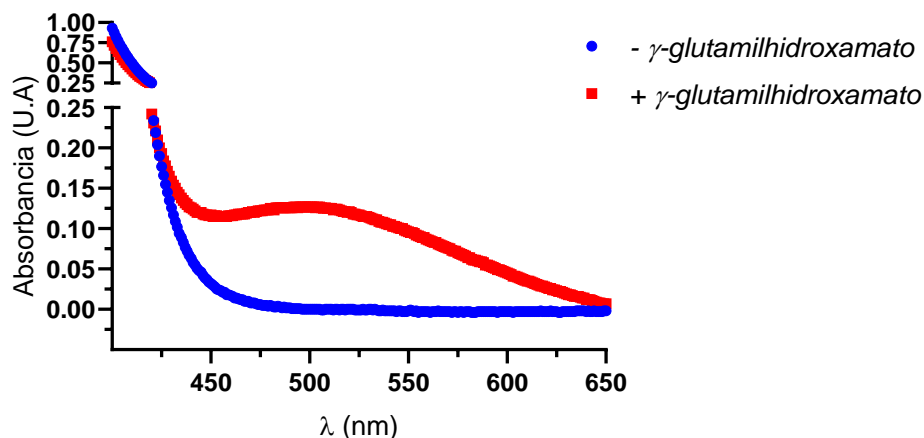


Figura 20. Espectros de absorción en el rango visible ($\lambda=400-650$ nm) para la solución de terminación de la reacción γ -glutamil-transferasa en ausencia y en presencia de una concentración 4 mM de su producto, el γ -glutamil-hidroxamato. Gráfico construido en Graphpad Prism 8.0.2.

Analizando dichos espectros puede constatarse que el complejo férrico con γ -glutamilhidroxamato presenta un pico de absorbancia cercano a 500 nm, siendo esta una región en la que la solución *stop* no absorbe por sí misma, en ausencia del producto de la reacción transferasa. Así, (dentro de un cierto intervalo de concentraciones) la absorbancia a dicha longitud de onda será directamente proporcional, de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer, a la concentración de $[\text{Fe}^{3+}\text{-GlnNHOH}]$, de forma tal que la medición de este parámetro fisicoquímico en los tubos con la reacción enzimática finalizada, nos permite estimar la concentración de γ -glutamilhidroxamato al tiempo final de la reacción en cada uno de ellos.

Con el objetivo de determinar el rango dentro del cual se mantiene la linealidad entre ambas magnitudes, así como el valor del coeficiente de extinción o absortividad molar para $[\text{Fe}^{3+}\text{-GlnNHOH}]$ a 500 nm ($\epsilon_{\lambda=500\text{nm}}$), se construyó una curva de calibración utilizando estándares de concentración conocida de γ -glutamilhidroxamato, desde los 0,5 hasta los 4 mM de concentración, por duplicado en todos los casos. Para ello se mezclaron 250 μL de cada solución estándar con un volumen equivalente de la misma solución de terminación que sería utilizada luego en los ensayos de inactivación. El resultado puede observarse en la Figura 21.

Así, se procedió al ajuste lineal de la curva, obteniéndose un coeficiente $R^2=0,9984$, indicativo de un altísimo correlato entre los datos representados y el modelo lineal aplicado, por lo que queda establecido el comportamiento lineal de la absorbancia a 500 nm respecto a la concentración de γ -glutamil-hidroxamato, a lo largo del rango de concentraciones evaluado (0,5 a 4 mM de GlnNHOH). Este resultado valida la utilización del método espectrofotométrico planteado para la cuantificación del producto generado a tiempo final en cada tubo de reacción, dentro de este intervalo de concentraciones. A su vez, a partir de la pendiente de la ecuación de la recta de mejor ajuste es posible obtener una estimación certera del valor de $\epsilon_{\lambda=500\text{nm}}$ para el complejo coloreado, que tendría un valor de $0,3321\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Curva de calibración de ensayo de actividad γ -glutamyl-transferasa

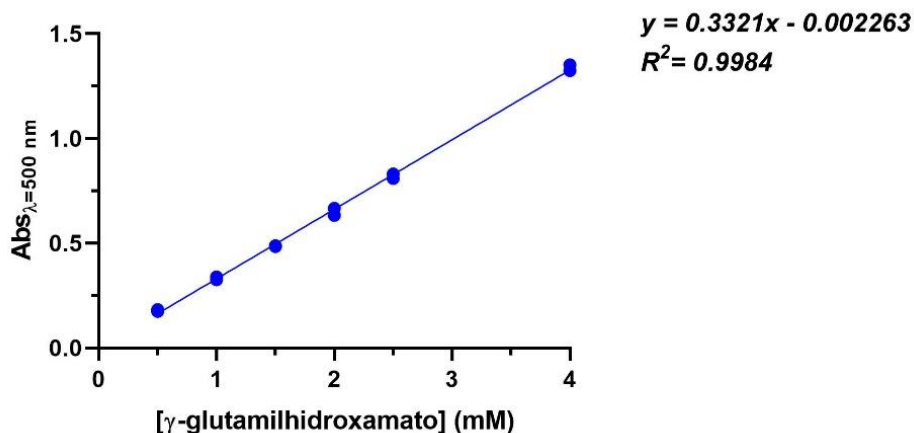


Figura 21. Curva de calibración para la absorbancia a $\lambda=500$ nm de $[\text{Fe}^{3+}\text{-GlnNH}_2\text{OH}]$. Se midió la absorbancia a dicha longitud de onda de soluciones estándar de concentraciones entre 0,5 y 4 mM de producto, por duplicado en cada caso y se representaron ambas réplicas. Arriba a la derecha se muestran los resultados del ajuste por regresión lineal tomando en cuenta los duplicados, así como el coeficiente R^2 como indicador de la bondad de dicho ajuste. Gráfico y ajuste realizados en Graphpad Prism 8.0.2.

A continuación, se evalúan los resultados obtenidos para los ensayos de inactivación y la caracterización bioquímica subsiguiente de las dos mutantes de interés: HsGS Y171F e Y283F, de manera individual, comparando en cada caso los resultados obtenidos con aquellos recabados para la enzima WT en idénticas condiciones.

6.5 Estudios comparativos de inactivación oxidativa por ONOO^- y caracterización bioquímica y proteómica subsiguiente de HsGS WT e Y171F

6.5.1 Ensayo comparativo de inactivación oxidativa por ONOO^- para HsGS Y171F y WT

Con el objetivo de determinar si la mutante Y171F de la HsGS presenta una sensibilidad diferente respecto a la enzima WT frente a la inactivación oxidativa por ONOO^- , se procedió a la incubación de soluciones de 0,2 mg/mL de la misma con ONOO^- 0, 50, 250 y 500 μM , adicionado en bolo en todos los casos, durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Luego, se extrajeron alícuotas de cada una de las muestras tratadas y se las sometió al ensayo de actividad γ -glutamyl transferasa, de acuerdo con el protocolo expuesto en Materiales y Métodos, obteniéndose como resultado el gráfico de la Figura 22.

Del análisis de dicha figura, en primer lugar, podemos concluir que la mutación sitio-específica introducida no compromete la capacidad de la enzima de verse inactivada por exposición a ONOO^- , en tanto se observa una disminución progresiva en la actividad enzimática transferasa al incrementarse la concentración de ONOO^- utilizada en el tratamiento previo. Así, puede concluirse que la HsGS Y171F presenta inactivación oxidativa dosis-dependiente con ONOO^- . Este hallazgo resulta relevante, considerando que si la mutación sitio-específica introducida hubiese eliminado el

residuo de Tyr clave, cuya nitración por ONOO^- yace detrás de la inactivación oxidativa de la HsGS, esperaríamos que dicha mutante presentara una actividad enzimática completamente insensible frente al tratamiento administrado. Así, la persistencia de la sensibilidad frente al mismo estaría indicando que la Tyr 171, a pesar de haber sido identificada previamente como una diana preferencial de nitración, no es esencial para la inactivación oxidativa de la enzima por ONOO^- . Esto no quiere decir, no obstante, que su modificación nitro-oxidativa sea irrelevante, necesariamente, o que esta no ejerza un rol en la pérdida de actividad enzimática sufrida por la HsGS al ser expuesta a ONOO^- (o a otros agentes oxidantes y/o nitrantes endógenos), pero sí nos indica que esta no resulta estrictamente necesaria para que se geste dicha inactivación, en tanto se comprobó experimentalmente que la misma puede tomar lugar incluso en una mutante de la HsGS completamente incapaz de sufrir la modificación de interés.

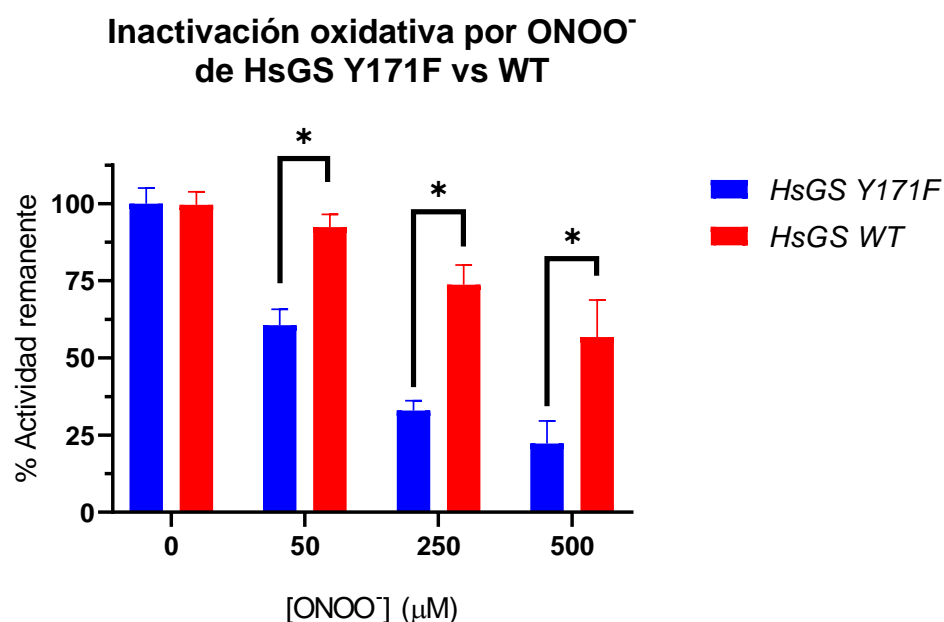


Figura 22. Resultados de la medición por triplicado de la actividad γ -glutamyl-transferasa remanente en las fracciones de HsGS Y171F tratadas con ONOO^- 0, 50, 250 y 500 μM . Se expresan los valores de actividad en forma relativa al valor medido para la enzima en ausencia de ONOO^- y se graficaron los valores promedio y el desvío estándar en cada condición. Los valores para la enzima WT fueron obtenidos de resultados para el mismo experimento, realizado en trabajos anteriores y se incluyeron para permitir la comparación. Gráfica construida en Graphpad Prism 8.0.2.

Adicionalmente, podemos observar que la actividad de la HsGS Y171F resulta incluso más sensible que la de la enzima WT frente al tratamiento con ONOO^- , entendiéndose por ello que se logra para esta mutante un mayor porcentaje de inactivación (una reducción más pronunciada de la actividad enzimática) al tratar a ambas formas de la enzima con idénticas concentraciones de ONOO^- . Para determinar si las diferencias observadas en el gráfico resultan estadísticamente significativas, se condujeron múltiples test T de Student, comparando los niveles de actividad remanente de cada forma de HsGS bajo cada condición de tratamiento. Este análisis reveló que existen diferencias

significativas entre los porcentajes de actividad remanente para la HsGS Y171F y WT en las tres condiciones de tratamiento evaluadas.

Así, para la HsGS WT tratada con ONOO^- 50 μM , la actividad remanente promedio es de 92,4%, mostrando una inactivación sutil, mientras que para HsGS Y171F esta es apenas de 60,6%, lo que habla de una pérdida de actividad mucho mayor, frente a concentraciones relativamente bajas del agente nitro-oxidante de interés. Mientras tanto, para 250 μM , las actividades remanentes son de 73,8% para HsGS WT y 32,9% para la mutante Y171F, y para 500 μM , los resultados fueron de 56,8% de actividad remanente para la enzima WT y 22,3% para la mutante. Estos resultados demuestran claramente, que la mutante Y171F presenta una sensibilidad mucho mayor que la enzima WT frente a la inactivación oxidativa por ONOO^- .

Este fenómeno puede parecer sorprendente, considerando los antecedentes mencionados de estudios conducidos en el CEINBIO en los que se había constatado por LC-MS/MS un elevado porcentaje de nitración de la Tyr 171 en la HsGS WT luego de su tratamiento con ONOO^- , que se asoció, asimismo, a una fuerte pérdida de actividad enzimática. Así, a primera vista estos hallazgos parecen sugerir la existencia de una correlación positiva entre la nitración de la Tyr 171 y la inactivación oxidativa de la HsGS. Esta aparente correlación podría inducirnos a pensar que la sustitución de esta Tyr extensamente modificada por una Phe incapaz de sufrir oxidación alguna, debería conducir a una menor sensibilidad de la HsGS Y171F frente a la inactivación por ONOO^- , al removerse uno de los blancos primordiales de la modificación oxidativa. Sin embargo, los resultados obtenidos contradicen en forma categórica a esta hipótesis.

Un análisis en profundidad de la problemática, cotejando los antecedentes conocidos y los resultados obtenidos en este trabajo, no obstante, revela que la contradicción es solo aparente. Se incluye, a continuación, una posible explicación: si bien la Tyr 171 constituye un blanco preferencial de nitración por los radicales derivados del ONOO^- , en lugar de que su modificación oxidativa medie la inactivación de la HsGS, quizás esta posea un rol protector, en tanto consume parte de los radicales oxidantes y nitrantes derivados del $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ (OH^\bullet , $^\bullet\text{NO}_2$, etc.) pero no parecería tener un efecto significativo sobre la estructura y, por ende, la actividad de la enzima. Así, la modificación de este residuo evitaría que esos mismos radicales actúen oxidando y/o nitrando otros aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica de la enzima, pudiendo esto acarrear consecuencias más importantes para la estructura y, por consiguiente, para la función de la HsGS. Así, al remover la Tyr 171 por mutación sitio-dirigida, se estaría re-direccionando una porción de los radicales, que terminarían reaccionando con otros aminoácidos de la cadena polipeptídica, causando mayores perjuicios a la estructura y a la actividad enzimática de la HsGS, lo que conduce a la mayor sensibilidad frente a inactivación por ONOO^- observada para la mutante Y171F, al compararla con la enzima WT.

6.5.2 SDS-PAGE y Western-Blot

Con el objetivo de acumular más información que pudiera corroborar o desmentir esta nueva hipótesis, procedí a la caracterización bioquímica de la HsGS Y171F tratada con las diferentes concentraciones de ONOO^- , empleando para ello una batería de estrategias bioquímicas.

El primer paso en este proceso fue la corrida de alícuotas de las diferentes fracciones de HsGS Y171F incubada con ONOO⁻ en los distintos carriles de un gel SDS-PAGE de 10% de entrecruzamiento, en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol. Este actúa reduciendo los enlaces –S-S- que pudieran haberse formado intra- o inter-molecularmente. El objetivo perseguido mediante la realización de este experimento fue el de determinar si el tratamiento con ONOO⁻ desencadena la formación de oligómeros y/o la agregación de la enzima en acúmulos mayores, en forma independiente de la formación de puentes –S-S-, lo que podría observarse como la aparición de bandas de menor desplazamiento electroforético que el de la enzima nativa al realizar el revelado del gel con el colorante de proteínas Azul de Coomassie. La obtención de la imagen se realizó con un scanner de fluorescencia Odyssey Li-Cor, ya que este equipo permite revelar la emisión correspondiente al propio colorante Coomassie. El experimento se realizó tanto para la HsGS Y171F sola, expuesta a concentraciones de ONOO⁻ desde 0 a 1000 μM, comparándose el patrón electroforético obtenido con aquel dilucidado en idénticas condiciones para HsGS WT en experimentos previos llevados a cabo por el Dr. Campolo (Figura 23), como en forma comparativa, para HsGS Y171F y WT expuestas a 0, 50, 250 y 500 μM ONOO⁻ (Figura 24).

SDS-PAGE para la GS WT e Y171F

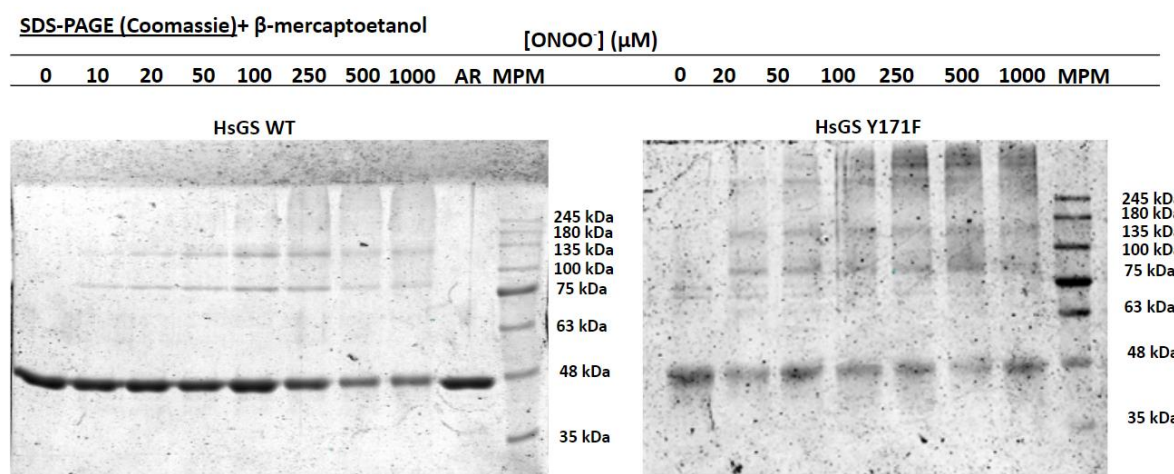


Figura 23. Resultados de los experimentos de SDS-PAGE reductora para HsGS WT e Y171F. Lado a lado se observan los resultados del escaneo de dos gels independientes, ambos de SDS-PAGE con 10% de entrecruzamiento, en presencia de β-mercaptoetanol. Sobre cada carril se indica la concentración de ONOO⁻ empleada en el tratamiento de la enzima. AR designa al proceso de adición reversa. MPM designa al marcador de peso molecular. La imagen del gel correspondiente a la HsGS WT fue obtenida de un trabajo previo del Dr. Nicolás Campolo, al tiempo que aquella correspondiente a HsGS Y171F se obtuvo en el marco de este trabajo.

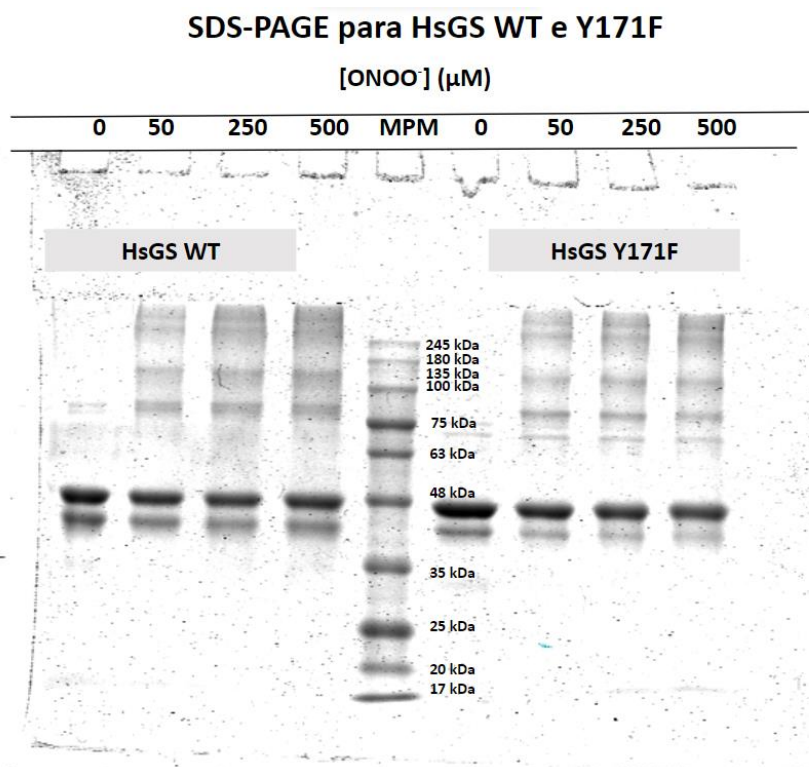


Figura 24. Resultados de SDS-PAGE reductora comparativa para HsGS WT e Y171F. Sobre cada carril se indica la concentración de ONOO⁻ empleada en el tratamiento de la enzima. MPM designa al marcador de peso molecular, cuyas bandas se identificaron mediante la leyenda al costado de cada imagen.

En la Figura 23, pues, se observan los resultados de la corrida de dos geles independientes: uno para la HsGS WT y otro para la mutante Y171F. En cada uno de ellos, se corrieron fracciones de la proteína que recibieron tratamiento previo con diferentes concentraciones de ONOO⁻, en un rango de 0 a 1000 μM. Además, en el gel correspondiente a la enzima WT se observa un carril correspondiente al experimento de adición reversa (AR). Se añadió esta condición a modo de control, para asegurar que las alteraciones observadas en los patrones migratorios de las fracciones de enzima tratadas responden a la modificación por ONOO⁻ en forma específica, y no por otros oxidantes, como lo pueden ser sus productos de decaimiento.

Así, de la comparación lado a lado de ambos geles, pueden extraerse varias conclusiones. Para empezar, en todos los carriles con proteína resulta claramente visible una banda de muy alta intensidad y de un elevado grado de pureza, cuyo desplazamiento electroforético es coincidente con el peso molecular de la HsGS nativa, de 43,3 kDa, tal como se había observado en el gel de análisis del proceso de purificación. Podemos asumir, entonces, que dicha banda se corresponde con la HsGS (WT o Y171F) en cada caso (siendo que la enzima silvestre y la mutante estudiada no difieren significativamente en su peso molecular). Asimismo, puede observarse que a medida que se incrementa la concentración de ONOO⁻ con la que se trató previamente a la proteína (en particular, por debajo de los 250 μM), se constata primero la aparición y luego el aumento en la intensidad de dos bandas principales de menor desplazamiento electroforético que el del decámero HsGS. La primera banda corresponde a un complejo proteico con un tamaño situado entre 75 y 100

kDa, según se extrae de la comparación de su desplazamiento con el de las diferentes bandas del marcador de peso molecular empleado. Se deduce, pues, que podría tratarse de una forma dimérica de la enzima, que se generaría producto de la acumulación de modificaciones oxidativas en cada decámero debidas al tratamiento con ONOO^- . La segunda banda, por su parte, presenta un desplazamiento electroforético que coincide aproximadamente con el de la banda del marcador de peso molecular que representa los 135 kDa. Esto sugiere que esta podría corresponder a un trímero de HsGS nativa, generado en forma dependiente de la modificación de la proteína por ONOO^- . Cabe destacar que, dado que el gel fue realizado en condiciones desnaturalizantes y reductoras (en presencia de SDS y β -mercaptoetanol), la formación de los dímeros y trímeros observados sería promovida por uniones covalentes no-reducibles (es decir, diferentes a $-S-S-$) entre distintas moléculas de proteína. Una posibilidad es que estos enlaces correspondan a diTyr inter-moleculares, generadas como consecuencia de la oxidación por un electrón de residuos de Tyr a Tyr^\bullet a manos de los radicales derivados del ONOO^- . Así, cuando dos Tyr^\bullet se encuentran espacialmente próximos entre sí, estos pueden interactuar entre sí, mediante reacciones de terminación radical-radical, dando lugar a uniones covalentes no reducibles entre dos moléculas de enzima.

A su vez, a concentraciones superiores de ONOO^- (500 y 1000 μM), estas bandas comienzan a perder intensidad, posiblemente producto de la formación de agregados aún mayores, que adquieren un tamaño tal que ya no ingresan a los poros del gel, y se acumulan en cambio sobre la línea de siembra o que precipitan en el tubo de reacción y no están presentes en la alícuota sembrada. Así, parecería que tanto la enzima WT como la mutante Y171F sufren una extensa modificación oxidativa producto del tratamiento con ONOO^- , que las llevaría a la formación de oligómeros y, eventualmente, de agregados (en forma independiente de $-S-S-$), siendo este un fenómeno de posible importancia en la pérdida de actividad observada tanto *in vivo* como *in vitro* para la enzima bajo condiciones de estrés oxidativo.

En la Figura 24, por su parte, podemos observar los resultados de un segundo experimento de SDS-PAGE reductora, en esta oportunidad de carácter comparativo, donde se sembraron en los diferentes carriles del gel, alícuotas de HsGS WT e Y171F que no fueron tratadas con ONOO^- (carriles 1 y 6) y que fueron tratadas con concentraciones de 50, 250 y 500 μM de este agente nitro-oxidante, tal como en el experimento de inactivación. En este gel también puede apreciarse en forma clara la aparición de una banda de muy alta intensidad con una migración coincidente con la esperable para la HsGS decamérica nativa, en todos los carriles. Puede visualizarse, asimismo, la aparición de formas oligoméricas y agregados independientes de $-S-S-$ (con menor desplazamiento electroforético) en respuesta al tratamiento con ONOO^- , en forma dosis-dependiente.

En este caso, se observa una mayor diversidad de bandas de bajo desplazamiento electroforético, pudiendo identificarse una vez más aquellas bandas presumiblemente correspondientes al dímero y al trímero de decámeros nativos (pesos moleculares entre 75 y 100 kDa, y cercano a 135 kDa, en cada caso), al igual que en el gel no-comparativo, pero también otras de desplazamiento aún menor. Estas, que corresponderían a complejos proteicos de pesos moleculares variables, que llegan a valores superiores a 245 kDa, se corresponderían con formas oligoméricas más complejas de la HsGS, de lo que puede deducirse que la oxidación de esta enzima por ONOO^- da lugar a la formación de una diversidad de oligómeros diferentes, con distintos tamaños y pesos moleculares, de manera independiente respecto a la formación de $-S-S-$.

A continuación, prosiguiendo con la caracterización de la HsGS Y171F tratada con diferentes concentraciones de ONOO^- , se realizaron ensayos de WB, empleando para ello anticuerpos específicos contra la HsGS (policlonales de conejo) y contra la modificación oxidativa de mayor interés en el tratamiento con ONOO^- de la enzima: la 3- NO_2 -Tyr (anticuerpos monoclonales murinos), de los que ya disponíamos en el laboratorio. Estos fueron reconocidos, a su vez, por anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse conjugados a fluorocromos con emisión fluorescente de color rojo y de color verde, respectivamente.

Los objetivos principales de este experimento son, en primer término, confirmar la identidad de la banda identificada como perteneciente a la HsGS en el ensayo de electroforesis, observando su marcación con fluorescencia roja, así como determinar si el tratamiento de la enzima con ONOO^- da lugar a la formación de 3- NO_2 -Tyr en la cadena polipeptídica de la enzima, observando a su vez si esta modificación ocurre en forma dosis-dependiente. En caso de que esto sea así, se esperaría observar una banda completamente roja a la altura correspondiente a la HsGS nativa en los carriles correspondientes a 0 μM de ONOO^- en cada membrana. Luego, a medida que nos vayamos desplazando hacia la derecha (hacia mayores concentraciones de ONOO^-), para cada forma de la enzima, se esperaría constatar una intensidad creciente de emisión fluorescente verde superpuesta a aquella banda, dando lugar a una coloración primero amarilla y luego verde. Los resultados obtenidos para este ensayo se observan en la Figura 25.

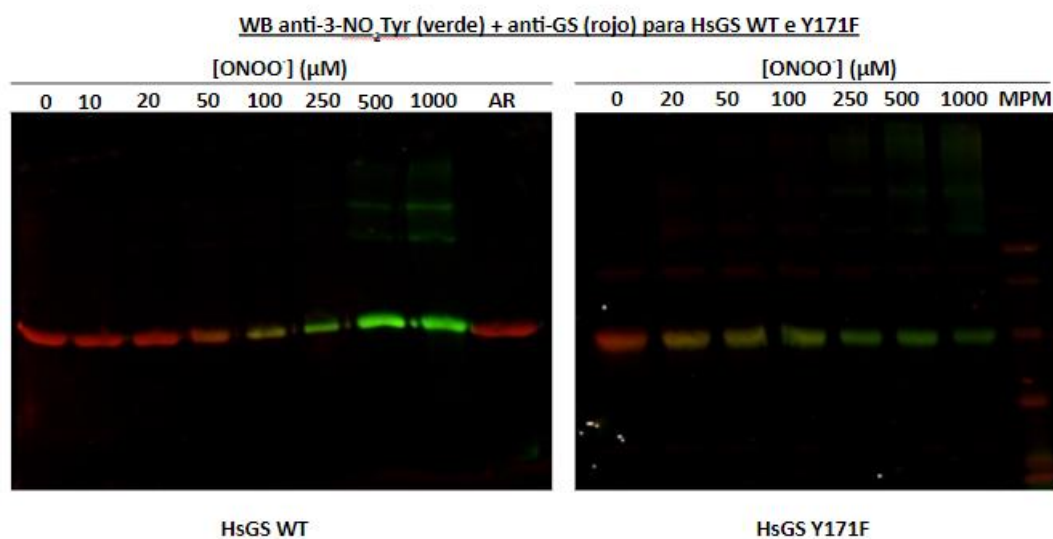


Figura 25. Resultados de Western Blot obtenidos para fracciones de HsGS Y171F tratadas con $[\text{ONOO}^-]= 0, 20, 50, 100, 250, 500$ y $1000 \mu\text{M}$. En verde se observa la marcación con anticuerpos anti-3- NO_2 -Tyr y en rojo la marcación con anticuerpos anti-HsGS. Se incluyen los resultados de un WB realizado en un trabajo previo para HsGS WT en idénticas condiciones, para permitir la comparación entre ambos. MPM designa al marcador de peso molecular y AR a la adición reversa de ONOO^- .

Efectivamente, al comparar lado a lado los resultados de los ensayos de WB para HsGS WT e Y171F tratadas con ONOO^- , se puede constatar que el patrón de bandas observado es muy similar. Se confirma, en efecto, la identidad de la banda cercana a los 48 kDa como la HsGS nativa, en tanto se observa una intensa marcación fluorescente roja. Asimismo, para ambas formas de la enzima se observa que el tratamiento con ONOO^- da lugar a la formación de 3- NO_2 -Tyr en forma dosis-

dependiente, lo que se constata como una aparición y un incremento en la intensidad de fluorescencia verde al desplazarnos desde la izquierda hacia la derecha de cada membrana a nivel de la banda de la HsGS. De igual forma, los complejos de mayor peso molecular presentan una sutil marcación con el anticuerpo anti-NO₂-Tyr, lo que confirma que la formación de los mismos ocurre en forma concomitante a la modificación por nitración de la proteína, aunque no necesariamente nos informa sobre una relación causa-efecto entre la modificación de interés y la formación de entrecruzamientos y la consecuente oligomerización enzimática.

A partir de la comparación lado a lado de los patrones de marcación observados en uno y otro ensayo WB, pueden deducirse diferencias en las tendencias de HsGS WT e Y171F a sufrir nitración por ONOO⁻. Por ejemplo, si se analizan las bandas correspondientes a HsGS en el carril de tratamiento con ONOO⁻ 20 μM en ambos WB, puede observarse una clara diferencia en el color de la marcación fluorescente, que es completamente roja para la enzima WT, indicando una ausencia de 3-NO₂-Tyr (a niveles significativos, que sean detectables por los anticuerpos), al tiempo que presenta una coloración amarilla para la mutante Y171F, señalando la aparición de la modificación de interés, incluso a esta concentración relativamente baja del agente nitro-oxidante de interés. Esto parecería indicar que no solo la sustitución de la Tyr 171 por una Phe, incapaz de oxidarse o nitrarse, no disminuye el nivel de modificación oxidativa de la enzima al ser esta expuesta a ONOO⁻, sino que incluso podría incrementarlo en forma moderada. Estos resultados resultan coherentes con aquellos obtenidos para el ensayo de actividad de la enzima tratada, que muestran que la HsGS Y171F sería más y no menos sensible que la HsGS WT frente a la inactivación oxidativa por ONOO⁻. Esto podría deberse a que la remoción de esta Tyr, de rol potencialmente protector, aumenta la disponibilidad de radicales derivados del ONOO⁻, que se consumen mediante la oxidación y/o nitración de otros aminoácidos sobre la enzima, de forma que estos, a su vez, contribuyen a una propagación más rápida del daño oxidativo a lo largo de la cadena polipeptídica, con consecuencias más importantes sobre la actividad enzimática.

6.5.3 Medición del nivel de oxidación de tioles

El siguiente paso en la caracterización comparativa del grado de modificación oxidativa experimentado por HsGS Y171F y WT, al someter a ambas a tratamiento con idénticas concentraciones de ONOO⁻, consistió en la medición de los niveles de oxidación de los grupos -SH proteicos, empleando para ello un método espectrofotométrico. Brevemente, dicho método se basa en la reacción, con estequiometría 1:1, entre el reactivo de Ellman o DTNB con los grupos funcionales -SH presentes en las proteínas, que genera como producto al cromóforo TNB, con un pico de absorción de la luz visible a 412 nm, a través del cual es posible determinar su concentración.

Los resultados obtenidos para dicho ensayo, realizado comparativamente para la HsGS WT e Y171F pueden observarse en la Figura 26.

Oxidación de tioles de HsGS WT e Y171F por ONOO⁻

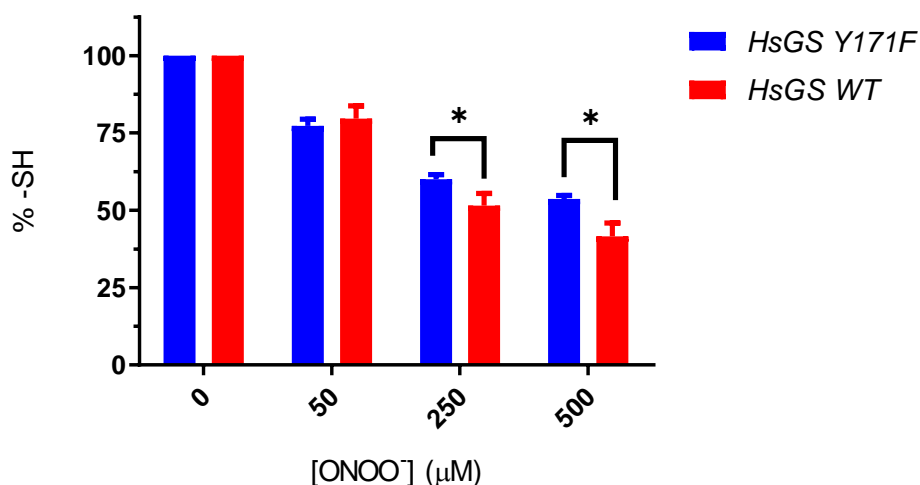


Figura 26. Resultados del ensayo de medición espectrofotométrica de la concentración de tioles para HsGS WT e Y171F luego del tratamiento con 0, 50, 250 y 500 μM de ONOO⁻, por medio de la reacción 1:1 con DTNB. Para cada condición, el experimento se realizó por triplicado, determinándose la concentración absoluta de tioles en la muestra y luego relativizado a su valor respecto al obtenido para la muestra de la misma serie que no recibió ONOO⁻. Gráfica construida en Graphpad Prism 8.0.2.

Se realizó, además, un análisis estadístico de tipo test T de Student múltiple para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de oxidación de -SH para cada concentración de ONOO⁻ entre la HsGS WT e Y171F. Como resultado de dicho análisis se obtienen diferencias estadísticamente significativa para dos de las tres concentraciones de ONOO⁻ evaluadas: 250 y 500 μM. Para [ONOO⁻]= 250 μM, el porcentaje medio de -SH reducidos en HsGS WT fue de 51,56%, al tiempo que el promedio obtenido para HsGS Y171F fue de 60,07 %. Mientras tanto, para la condición de [ONOO⁻]= 500 μM, el porcentaje promedio de -SH reducidos remanentes fue de 41,56 % en HsGS WT y de 53,70 % en HsGS Y171F. En ambos casos, entonces, observamos una misma tendencia, que parece sugerir que la enzima WT presenta un nivel moderadamente mayor de oxidación de sus -SH que la mutante Y171F frente a idénticas concentraciones de ONOO⁻. Así, estos resultados estarían señalando que la enzima mutante presenta grupos -SH con una sensibilidad ligeramente menor frente a oxidación por este agente nitro-oxidante endógeno. Los resultados recabados sugieren, pues, que la mayor sensibilidad frente a inactivación oxidativa constatada para la HsGS Y171F no respondería a un mayor nivel de oxidación de sus -SH, sino a un incremento en los niveles de modificación oxidativa de otros residuos a lo largo de su cadena polipeptídica, pudiendo tratarse de Tyr, Trp o Met, por ejemplo.

6.5.4 Análisis por HPLC-MS/MS-MRM

Finalmente, para profundizar en la caracterización diferencial de los patrones de modificación oxidativa de la HsGS Y171F y WT al ser expuestas ambas a ONOO⁻, se apeló a una estrategia proteómica basada en la técnica de HPLC-MS/MS, empleando a su vez un análisis de tipo MRM, utilizando un método previamente optimizado por el Dr. Campolo en trabajos previos en la temática [180]. El objetivo de este análisis es el de determinar qué residuos aminoacídicos están sufriendo modificación oxidativa y, en particular, qué modificación oxidativa están adquiriendo, al tratar a las diferentes formas de la enzima con distintas concentraciones de ONOO⁻. Este tipo de análisis también permite determinar el porcentaje de modificación de cada residuo enzimático.

Resulta de particular interés evaluar si existen cambios en el patrón de modificación oxidativa por ONOO⁻ de la HsGS, producto de la mutación Y171F, lo cual es esperable dado el rol de esta Tyr como blanco preferencial de nitración, así como a la luz de los resultados obtenidos para los ensayos de actividad y los otros ensayos de caracterización, que sugieren que la inhibición de la nitración de este residuo aminoacídico por mutación sitio-específica promueve un incremento en los niveles de modificación de otros aminoácidos proteicos, de carácter compensatorio, siendo estas modificaciones, posiblemente, las responsables del incremento en la sensibilidad frente al ONOO⁻ de la forma mutante de la enzima.

Para cada HsGS se analizaron únicamente dos condiciones de tratamiento con ONOO⁻; aquellas correspondientes a concentraciones de 50 y 500 μ M de dicha especie, en tanto no se esperaba encontrar diferencias significativas en los patrones de oxidación observados a 250 y 500 μ M. Luego de exponer HsGS (0,2 mg/mL) a dichas concentraciones de ONOO⁻, se realizó la digestión con tripsina de la proteína, y los péptidos resultantes fueron sometidos a HPLC, empleando una columna cromatográfica de fase reversa, lo que permite separar a los péptidos en función de su nivel de hidrofobicidad, de forma tal que aquellos menos polares se ven más retenidos en su pasaje por la columna y requieren más tiempo para eluir. Luego de su separación, los péptidos son inyectados en forma automática en el espectrómetro de masa, que los ioniza y volatiliza, seleccionando péptidos específicos para su fragmentación y la detección de ciertas transiciones particulares, correspondientes a péptidos específicos, nativos y modificados. Los niveles relativos de modificación de cada aminoácido fueron estimados a partir de las áreas correspondientes a los picos de la transición más intensa detectada para cada especie. Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Figura 27.

MS/MS-MRM para HsGS WT e Y171F tratadas con 50 y 500 μM ONOO⁻

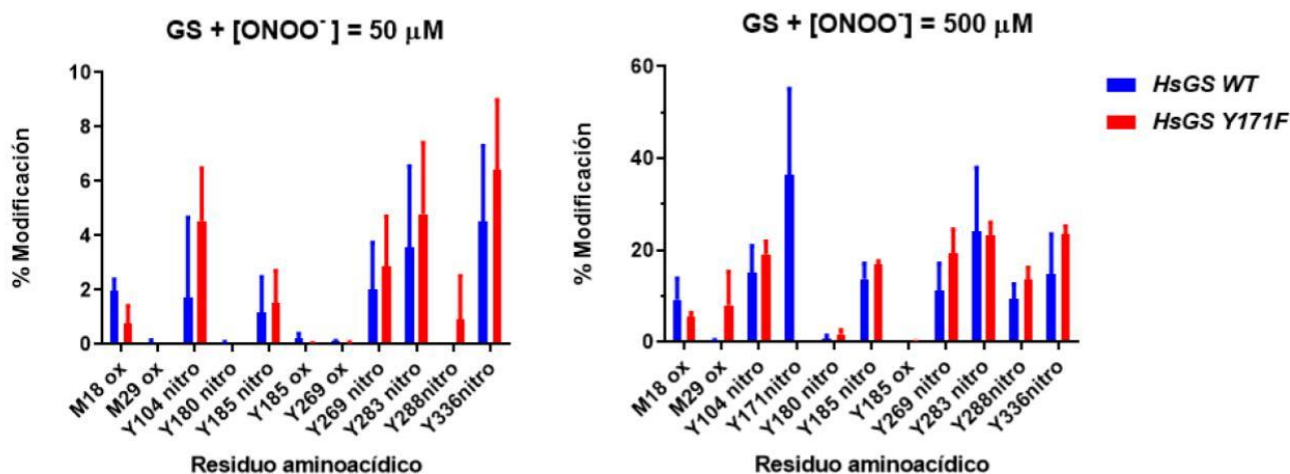


Figura 27. Resultados de los experimentos de cromatografía en fase líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) con análisis por monitoreo de múltiples reacciones (MRM). Se grafican lado a lado los porcentajes promedio de modificación observados a nivel de los diferentes residuos aminoacídicos de interés en la enzima HsGS WT e Y171F, bajo cada condición de tratamiento con ONOO⁻: a 50 y a 500 μM . Las barras de error corresponden al desvío estándar para $n=3$. Gráfico construido en Graphpad Prism 8.0.2.

Es necesario mencionar que el método empleado es semi-cuantitativo y que los porcentajes de modificación para cada aminoácido obtenidos a través de la aproximación relatada en Materiales y Métodos son valores eminentemente estimativos y deben ser entendidos como tales. Su mayor interés radica, precisamente, en que nos permiten hacer un análisis comparativo de los niveles de modificación de los distintos residuos en la enzima sometida a cierto tratamiento oxidante (haciendo posible, por ejemplo, identificar blancos principales de oxidación), no tanto en su valor absoluto, que debe ser utilizado con cautela, puesto que las intensidades correspondientes a la señal de la transición seguida para cada péptido pueden variar en forma importante, particularmente para los iones que presentan señales más modestas. Asimismo, es necesario tomar en cuenta la posibilidad (que no puede descartarse con un análisis a este nivel) de que los péptidos nativos y modificados se ionicen con eficiencias distintas, lo que podría dar lugar a errores en la determinación del porcentaje de modificación de los diferentes aminoácidos de interés. Más allá de dichas consideraciones, los datos obtenidos haciendo uso de esta estrategia experimental son de gran valía, sobre todo a la hora de diferenciar los sitios de nitración más importantes, de aquellos que solo se modifican marginalmente. Igualmente, la técnica resulta de enorme utilidad para el análisis comparativo de los patrones de modificación de dos formas de HsGS, sometidas a idéntico tratamiento.

Del análisis de los gráficos representados en la Figura 27, pues, es posible extraer el porcentaje de modificación oxidativa de cada residuo aminoacídico representado (se representan todos aquellos que mostraron un porcentaje significativo de modificación oxidativa). Como validación del método MRM utilizado, puede observarse que no se detectan transiciones correspondientes al péptido que

contiene a la Tyr 171 en ninguna de las fracciones de HsGS Y171F. Esto se debe, precisamente, a la sustitución sitio específica de la Tyr 171 por una Phe, lo que altera el coeficiente masa/carga (m/z) del tríptico que normalmente contiene a este residuo, y hace que no se detecten transiciones correspondientes al mismo, en tanto no se busca seleccionar al péptido modificado. Asimismo, al analizar la muestra correspondiente a las distintas formas de la HsGS en ausencia de tratamiento con ONOO^- , no se detectan señales para ninguno de los péptidos modificados siendo buscados (no representado), al tiempo que al incrementarse la concentración de este agente nitro-oxidante empleada en el tratamiento previo de las enzimas, se observa un aumento en la prevalencia de las formas modificadas oxidativamente en relación al total detectado para cada uno de los péptidos.

Al analizar visualmente los gráficos representados en la Figura 27 se observan diferencias en la distribución de las modificaciones oxidativas a lo largo de la cadena polipeptídica de las diferentes formas de la enzima. Un análisis estadístico, mediante un test T de Student múltiple, comparando los porcentajes de cada modificación de cada aminoácido en una y otra forma de la enzima, bajo cada una de las concentraciones de ONOO^- , nos indica, sin embargo, que no existen diferencias estadísticamente significativas. Esto, no obstante, no pareciera deberse a una coincidencia en los valores promedio, que difieren en forma constatable, sino a los amplios valores de SD asociados a la técnica. Las diferencias observables en los patrones de modificación oxidativa de HsGS WT e Y171F por ONOO^- cobran sentido a la luz de que se removió un residuo que constituía un blanco preferencial para la modificación oxidativa de la enzima por este agente nitro-oxidante, determinando que queden disponibles más radicales derivados del mismo para modificar otros residuos aminoácidos en la estructura proteica. Así, parecen observarse incrementos en los niveles de nitración de las Tyr 104, 269, 283, 288 y 336, así como en la oxidación de la Met 29, en una o ambas condiciones de tratamiento con ONOO^- , en HsGS Y171F al compararla con HsGS WT, si bien estos cambios son sutiles y no pueden considerarse estadísticamente significativos dada la dispersión obtenida en las diferentes réplicas.

De esta forma, si bien los resultados del experimento de LC-MS/MS no resultan confirmatorios, estos son coherentes con la hipótesis planteada respecto al rol de la Tyr 171 de la HsGS como un residuo protector de la actividad enzimática frente a la inactivación oxidativa por ONOO^- . Esto ocurriría a través del consumo por parte de esta Tyr de una porción importante de los radicales libres oxidantes y nitrantes, provenientes del ONOO^- , de forma tal que su modificación no causaría efectos significativos a nivel de la estructura o la función de la enzima. Así, en la mutante Y171F, el bloqueo de la nitración en la posición 171 de la cadena polipeptídica podría ser compensado por un incremento en la modificación oxidativa de otros residuos aminoácidos a lo largo de la misma, de forma que estas alteraciones podrían tener un mayor impacto sobre la estructura global y, por ende, sobre la función de la HsGS. Los resultados de este experimento sugieren que algunos posibles blancos de esta oxidación exacerbada podrían ser las Tyr 104, 269, 283, 288 o 336, de forma tal que el incremento en los niveles de nitración de una o más de estas Tyr podría estar detrás de la mayor sensibilidad de la mutante frente a inactivación oxidativa, pudiendo deducirse de ello que la modificación de algunos de estos residuos podría desempeñar un rol significativo en dicha pérdida de actividad, tanto *in vivo* como *in vitro*.

6.6 Estudios comparativos de inactivación oxidativa por ONOO⁻ y caracterización bioquímica y proteómica subsiguiente de HsGS WT e Y283F

Los mismos estudios comparativos llevados a cabo para la HsGS Y171F fueron replicados para una segunda mutante de la enzima; la HsGS Y283F, comparando siempre con la proteína silvestre, con el objetivo de determinar el rol de este segundo residuo de Tyr, también identificado como blanco preferencial de nitración por ONOO⁻, en la inactivación oxidativa de la enzima mediada por este agente nitro-oxidante endógeno.

6.6.1 Ensayo comparativo de inactivación oxidativa por ONOO⁻ para HsGS Y283F y WT

Al igual que con HsGS Y171F, se procedió al tratamiento de HsGS Y283F y HsGS WT con ONOO⁻ adicionado en bolo, alcanzándose concentraciones finales de 0, 50, 250 y 500 μM del mismo, con las que se incubó a la enzima durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se procedió a la determinación de la actividad γ -glutamyl transferasa remanente para cada forma de la HsGS, de acuerdo con el protocolo incluido en la sección Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la Figura 28.

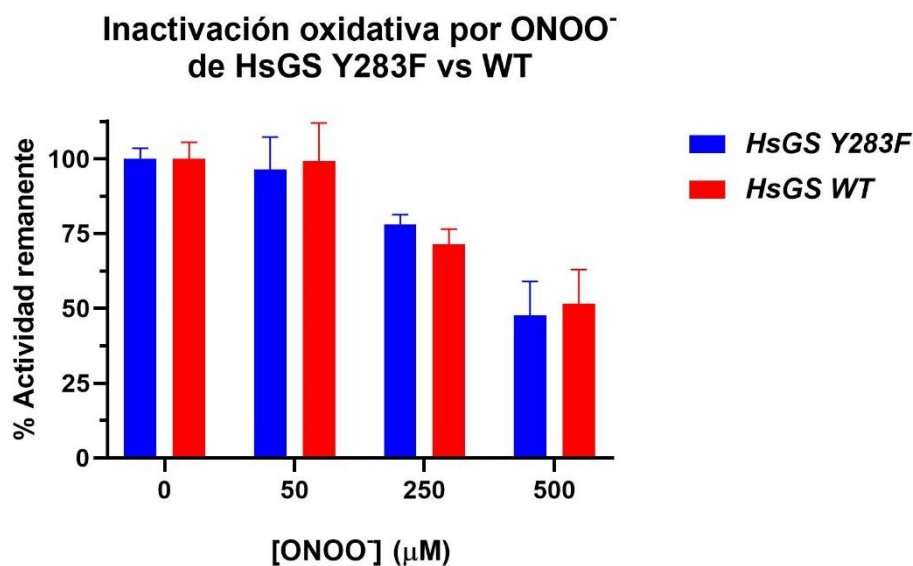


Figura 28. Resultados de medición por triplicado de la actividad γ -glutamyl-transferasa remanente en las fracciones de HsGS WT e Y283F tratadas con ONOO⁻ 0, 50, 250 y 500 μM . Se relativizaron los valores de actividad respecto al total constatado para cada forma de la enzima en ausencia de ONOO⁻ y se graficaron los valores promedio y el desvío estándar en cada condición. Gráfica construida en Graphpad Prism 8.0.2.

En primer lugar, cabe destacar que, tal como se demostró al realizar el mismo ensayo para la mutante Y171F, se comprueba que la HsGS Y283F presenta una actividad enzimática sensible al ONOO⁻, de manera que la exposición de la misma a dicho agente nitro-oxidante endógeno provoca una disminución significativa de la cantidad de γ -glutamylhidroxamato (producto) que la enzima es capaz de formar a tiempo final (15 minutos), bajo las condiciones determinadas como óptimas para este estudio. Así, se confirma una pérdida de actividad enzimática producto del tratamiento con

ONOO⁻, que, además, resulta ser dosis-dependiente, de forma que concentraciones mayores de esta ROS dan lugar a disminuciones más pronunciadas en actividad. De ello podemos concluir que la nitración de la Tyr 283 no resulta estrictamente necesaria para lograr la inactivación oxidativa de la HsGS, en tanto su sustitución por una Phe por mutagénesis sitio-específica no anula la capacidad de la enzima de sufrir inactivación oxidativa por ONOO⁻. A su vez, contrariamente a lo que se observó en el ensayo para HsGS Y171F, donde se constataron diferencias significativas en los patrones de pérdida de actividad por oxidación entre esta forma mutante y la enzima WT (con la mutante presentando una sensibilidad mayor), en el caso de la mutante Y283F los porcentajes de actividad remanente para ambos tipos de enzima coinciden casi exactamente para las tres concentraciones de ONOO⁻ evaluadas. Esto fue confirmado mediante la realización de un análisis estadístico por múltiples test T de Student, comparando los porcentajes de actividad remanente obtenidos para cada forma de la HsGS, bajo las tres condiciones de tratamiento con ONOO⁻, corroborándose la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de inactivación observados para HsGS WT e Y283F bajo las tres condiciones de tratamiento analizadas. Estos resultados nos estarían indicando que la remoción de la Tyr 283 de la estructura de la HsGS no provoca cambios en la susceptibilidad de la enzima a verse inactivada por oxidación mediada por ONOO⁻. Esto resulta sorprendente, sin embargo, considerando los antecedentes existentes, que consisten en estudios proteómicos conducidos previamente dentro del CEINBIO que señalaban a este residuo de Tyr como una importante diana de nitración por ONOO⁻ [180].

A la luz de dichos antecedentes, entonces, los resultados obtenidos en este trabajo pueden interpretarse de dos formas diferentes. Una primera interpretación podría llevarnos a la conclusión de que la nitración de esta Tyr particular no desempeñaría un rol relevante en la inactivación de la enzima por ONOO⁻, ya que al impedir la misma por mutación sitio-específica Tyr→Phe no se logra proteger a la enzima de la inactivación, y ni siquiera se altera el patrón observado de pérdida de actividad enzimática en función de la dosis de ONOO⁻ empleada en el tratamiento. Así, podría entenderse que si bien la Tyr 283 se nitra en forma importante en presencia de ONOO⁻, su modificación no acarrea consecuencias a nivel funcional para la enzima, de forma que la inhibición de esta modificación no resulta protectora, sino que, por el contrario no genera efecto alguno sobre la tendencia de la enzima a inactivarse al verse expuesta a dicha ROS. Por otra parte, una segunda interpretación de los mismos resultados podría suponer que quizás la modificación oxidativa de este residuo si bien no resulta esencial para lograr la inactivación enzimática por oxidación, sí puede desempeñar un rol relevante en la misma (sea este como *driver* de la inactivación o en calidad protectora, como la Tyr 171), pero que la mutación Tyr→Phe introducida da lugar a un redireccionamiento de los radicales derivados del ONOO⁻, que al no poder consumirse en la modificación de esta Tyr particular, se destinan a la oxidación o nitración de otros residuos aminoácidos cercanos cuya modificación produce un efecto idéntico sobre la estructura y la actividad de la enzima. Así, el efecto, protector o dañino, de la sustitución Tyr→Phe en la posición 283 de la HsGS se vería compensado casi exactamente por el incremento en la modificación oxidativa de otros residuos por los radicales no consumidos, con consecuencias indiferenciables sobre la estructura y la función de la HsGS. De esta manera, se da lugar a patrones indistinguibles de inactivación oxidativa en función de la concentración de ONOO⁻ para la enzima WT y la mutante Y283F, tal como se observa en la Figura 28, con la salvedad de que, en cada caso, dicha inactivación se estaría gestando a través de mecanismos bioquímicos diferentes.

Para determinar, entonces, si la mutación Y283F provoca alteraciones en los patrones de modificación oxidativa de HsGS que sean coincidentes con esta última hipótesis, se procede a la caracterización comparativa, bioquímica y proteómica, de las fracciones de HsGS Y283F y WT tratadas con ONOO⁻.

6.6.2 SDS-PAGE y Western Blot

Se procedió, entonces, a la realización de electroforesis SDS-PAGE, en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol. Al igual que para la mutante Y171F, se emplearon geles con un 10% de entrecruzamiento y al finalizar la corrida se revelaron las bandas de proteína usando el colorante Azul de Coomassie. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 29.

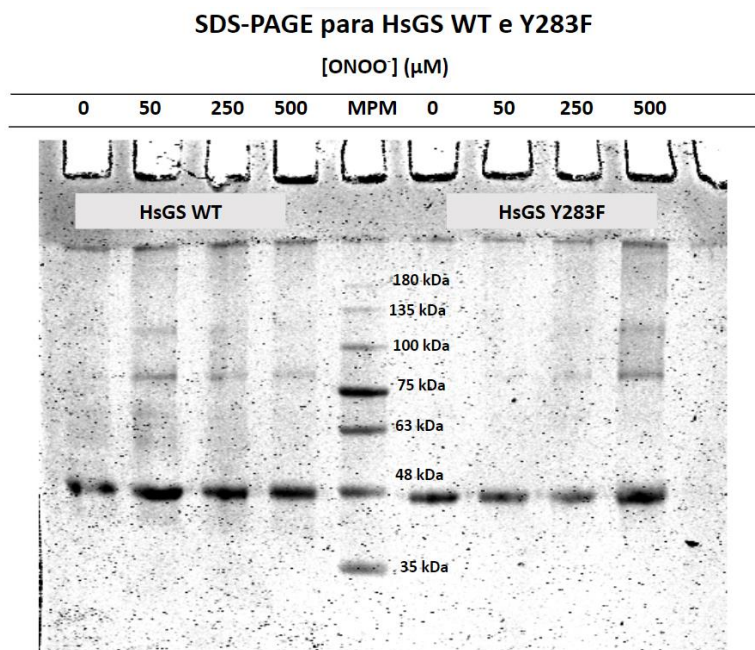


Figura 29. Resultados de los experimentos de SDS-PAGE comparativa, en presencia de β-mercaptoetanol, para fracciones de HsGS WT e Y283F tratadas con [ONOO⁻] = 0, 50, 250 y 500 μM. Sobre cada carril se indica la concentración de ONOO⁻ empleada en el tratamiento de la enzima. MPM designa al marcador de peso molecular.

Nuevamente, tanto para HsGS WT como para su mutante Y283F se observa en todos los carriles una banda de muy alta intensidad y de un elevado nivel de pureza a la altura migratoria esperada para el decámero HsGS (cercana a la banda correspondiente a 48 kDa del marcador de peso molecular empleado). A su vez, a medida que nos desplazamos de izquierda a derecha dentro de los carriles correspondientes a cada una de las dos formas de HsGS, se constata la aparición de bandas de menor desplazamiento electroforético, con una tinción más tenue. Esto puede interpretarse como la formación de un número limitado de oligómeros producto de la modificación oxidativa de la enzima por ONOO⁻, a través de la formación de interacciones covalentes diferentes de -S-S- (dadas las condiciones reductoras en que se realizó la corrida). En forma análoga a lo discutido anteriormente para la HsGS Y171F, estas uniones podrían consistir en dímeros Tyr-Tyr, entre

diferentes moléculas de HsGS nativa, dando lugar a dímeros, trímeros y luego oligómeros de mayor complejidad.

Es posible notar, sin embargo, que estas bandas aparecen por primera vez a menores concentraciones de ONOO^- en la HsGS WT que para su mutante Y283F, tal que en la enzima WT estas bandas comienzan a ser notorias para la condición de tratamiento con $[\text{ONOO}^-] = 50 \mu\text{M}$, al tiempo que para HsGS Y283F, estas recién pueden verse en el carril correspondiente a $[\text{ONOO}^-] = 250 \mu\text{M}$. Esto estaría sugiriendo, en forma cualitativa, que la mutación Y283F promovería un incremento en la tendencia de la HsGS hacia la formación de interacciones covalentes no reducibles inter-moleculares, favoreciendo por esta vía la formación de oligómeros. La disminución observada en la intensidad de las bandas de alto peso molecular entre los carriles correspondientes a $[\text{ONOO}^-] = 250$ y $500 \mu\text{M}$ para HsGS WT podría deberse, según se discutió anteriormente, a la agregación de los dímeros, trímeros y pequeños oligómeros sencillos, formando agregados complejos y desordenados, de muy alto peso molecular que, o bien no logran ingresar a los poros del gel por su gran tamaño, acumulándose entonces sobre la línea de siembra, o bien depositan en el tubo donde se realiza el tratamiento de la proteína y no son sembradas.

El siguiente paso en la caracterización bioquímica comparativa de la modificación oxidativa de HsGS Y283F versus HsGS WT fue la realización de ensayos de WB, empleando los mismos anticuerpos que se usaron para HsGS Y171F, de acuerdo con lo indicado en la sección Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 30.

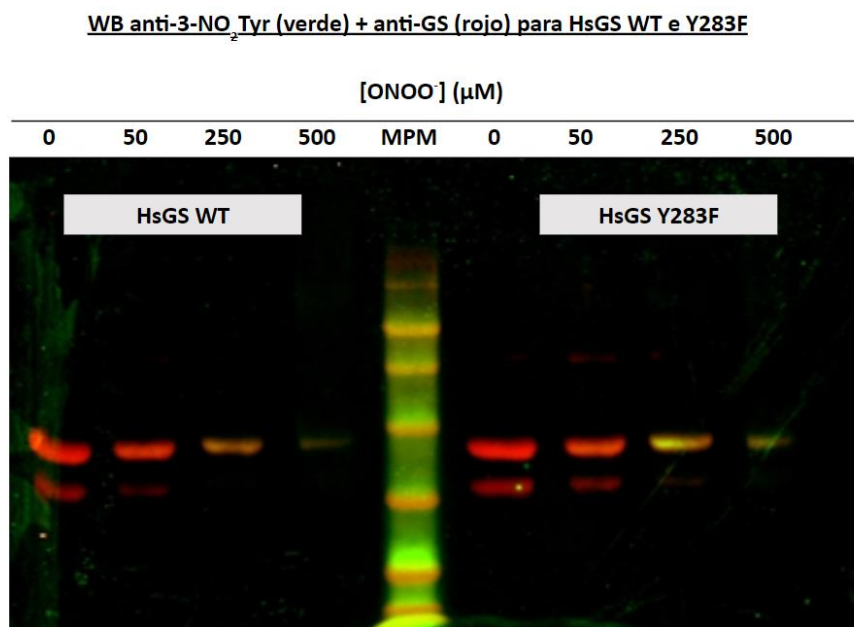


Figura 30. Resultados de Western-Blot comparativo para HsGS WT e Y283F tratadas con $[\text{ONOO}^-] = 0, 50, 250$ y $500 \mu\text{M}$. Las concentraciones de ONOO^- empleadas en el tratamiento de la proteína se denotan sobre cada carril. MPM designa al marcador de peso molecular.

Del análisis de dicha Figura se desprende, una vez más, la confirmación de la identidad de la banda principal de cada carril como HsGS, en tanto la misma queda marcada con fluorescencia de color rojo, indicando que hubo reconocimiento por los anticuerpos primarios anti-GS empleados. A su

vez, puede concluirse, nuevamente, que tanto para HsGS WT como Y283F, el tratamiento con ONOO⁻ da lugar a la formación de 3-NO₂-Tyr proteicas, en forma dosis-dependiente. Esto queda demostrado mediante la constatación de una ausencia total de marcación fluorescente verde en aquellos carriles sembrados con enzima que no recibió tratamiento previo con ONOO⁻, sumada a la observación de una marcación verde de intensidad creciente a medida que nos desplazamos de izquierda a derecha dentro del conjunto de muestras correspondientes a una misma forma de la enzima. Esta marcación verde responde al reconocimiento de los decámeros nativos de HsGS por anticuerpos monoclonales anti-3-NO₂-Tyr, indicando una prevalencia creciente de esta modificación oxidativa a medida que se incrementa la concentración de ONOO⁻ empleada en el tratamiento a la proteína; es decir, a medida que se somete a la enzima a insultos oxidativos de mayor intensidad. Comparando, entonces, los patrones de fluorescencia observados para HsGS WT e Y283F en función de la dosis administrada de ONOO⁻ no parecen existir diferencias significativas entre uno y otro, lo cual resulta coherente con los resultados del ensayo de inactivación oxidativa comparativa para ambas enzimas, de forma que parecería que la mutación sitio-específica Tyr→Phe en la posición 283 no ocasiona un cambio cuantitativo en el nivel de nitración experimentado por la enzima al ser expuesta a concentraciones crecientes de ONOO⁻.

6.6.3 Medición del nivel de oxidación de tioles

Continuando con la caracterización comparativa de los niveles de modificación oxidativa sufridos por la HsGS silvestre y su mutante Y171F luego de su exposición a ONOO⁻, se procedió a la medición de los niveles de oxidación de los grupos -SH de la cadena lateral de las Cys en una y otra forma de la enzima. Para ello se recurrió a la misma estrategia empleada para el estudio comparativo de HsGS WT e Y171F, descrita en forma exhaustiva en la sección Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos a partir de dicho ensayo pueden visualizarse en la Figura 31.

De la observación del gráfico contenido en dicha figura se desprende en forma inmediata que el tratamiento con ONOO⁻ es capaz de promover la oxidación dosis-dependiente de los grupos -SH presentes en HsGS Y283F, de forma tal que los porcentajes de -SH remanentes tienden a disminuir paulatinamente al incrementarse la [ONOO⁻] empleada en el tratamiento previo de la enzima.

Del análisis estadístico de los datos representados mediante múltiples tests T de Student, usando como criterio de significancia estadística un p-valor < 0,05, se extrae que existen diferencias significativas para los niveles de oxidación de -SH entre la enzima HsGS WT e Y283F bajo dos condiciones de tratamiento: a 50 y a 500 μM de ONOO⁻. En particular, a [ONOO⁻] = 50 μM el porcentaje medio de -SH remanentes para HsGS WT fue de 88,7%, al tiempo que este fue apenas de 51,7% para la enzima Y283F. Mientras tanto, para [ONOO⁻] = 500 μM, el porcentaje promedio de -SH remanentes fue de 46,0 % para HsGS WT y 32,9% para HsGS Y283F. Estos resultados demuestran que la mutación Y283F incrementa en forma estadísticamente significativa la sensibilidad de los -SH proteicos frente a oxidación por ONOO⁻. Este hallazgo resulta coherente con la hipótesis planteada anteriormente, de que la inhibición de la nitración a nivel de la Tyr 283 por mutación sitio-específica podría estar provocando un incremento compensatorio en los niveles de oxidación de otros residuos aminoacídicos cercanos a la misma en la cadena polipeptídica o en la estructura tridimensional de la HsGS, al tratar a la enzima con ONOO⁻. De esta forma, la sensibilidad equivalente frente a ONOO⁻ de la actividad de HsGS Y283F y WT podría responder, no tanto a la no-participación de la nitración de la Tyr 283 en el mecanismo de inactivación oxidativa de la enzima

silvestre, sino a la compensación de la incapacidad de la mutante de ser modificada en este sitio, con un incremento en los niveles de modificación oxidativa de otros residuos, incluyendo a la oxidación de Cys. El aumento en la prevalencia de estas otras modificaciones oxidativas podría provocar un efecto análogo e indiferenciable al de la nitración sobre la Tyr 283, haciendo que la susceptibilidad de HsGS Y283F frente a la inactivación oxidativa coincida con la de HsGS WT, aunque los mecanismos bioquímicos subyacentes que conducen a la inactivación de una y otra forma de la enzima sean distintos.

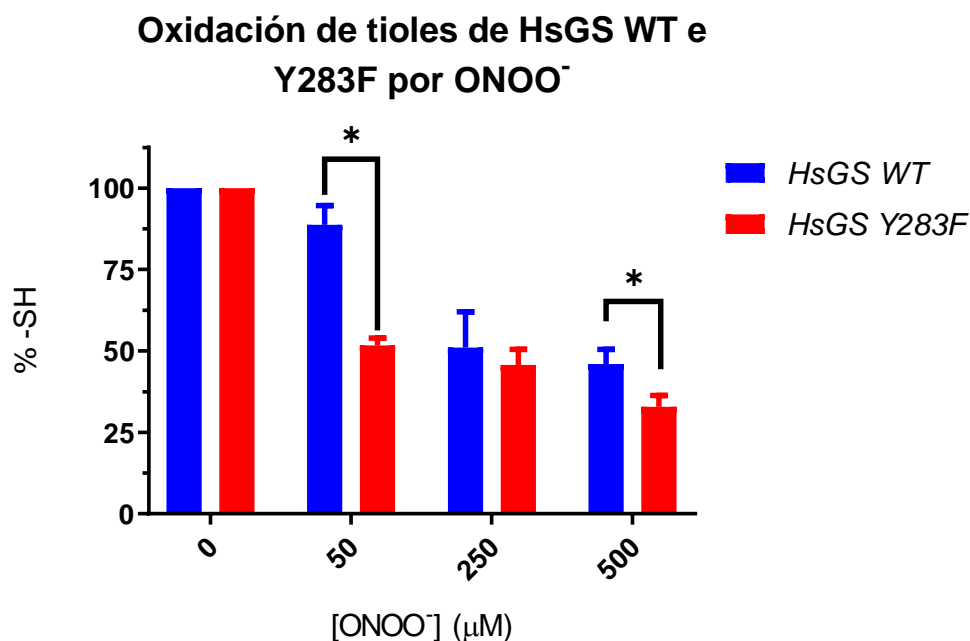


Figura 31. Resultados del ensayo de medición espectrofotométrica de la concentración de tioles para HsGS WT e Y283F luego del tratamiento con [ONOO⁻]= 0, 50, 250 y 500 μM, por medio de la reacción 1:1 con DTNB. Se realizaron medidas por triplicado real para cada condición de tratamiento, determinándose la concentración absoluta de tioles en la muestra y expresándose los valores en cada caso como porcentaje medio de tioles remanentes (tal que 100% = [-SH] para HsGS WT o Y283F + [ONOO⁻] = 0 μM). Gráfica y análisis estadístico realizados en Graphpad Prism 8.0.2.

6.6.4 Análisis por HPLC-MS/MS-MRM

Finalmente, al igual que con la mutante Y171F, se procedió al análisis por LC-MS/MS-MRM de las HsGS WT e Y283F, con el objetivo de comparar los patrones de modificación oxidativa de una y otra enzima. De la misma forma que para HsGS Y171F, se optó por analizar únicamente las proteínas sin tratar y tratadas con ONOO⁻ 50 y 500 μM, representándose los resultados correspondientes a estas dos últimas condiciones en la Figura 32.

Una vez más, constatamos el buen funcionamiento del método MRM utilizado para el análisis de los datos crudos, en tanto no se detectaron para la mutante Y283F señales correspondientes a las transiciones de iones “hijos” del péptido que contiene a esta Tyr en HsGS WT. Asimismo, para la corrida de LC-MS/MS de HsGS WT e Y283F en ausencia de tratamiento previo con ONOO⁻ no se

detectaron transiciones correspondientes a péptidos modificados oxidativamente, tal como cabe esperar. Estos resultados constituyen un control de calidad del método empleado.

MS/MS-MRM para HsGS WT e Y283F tratadas con 50 y 500 μM ONOO^-

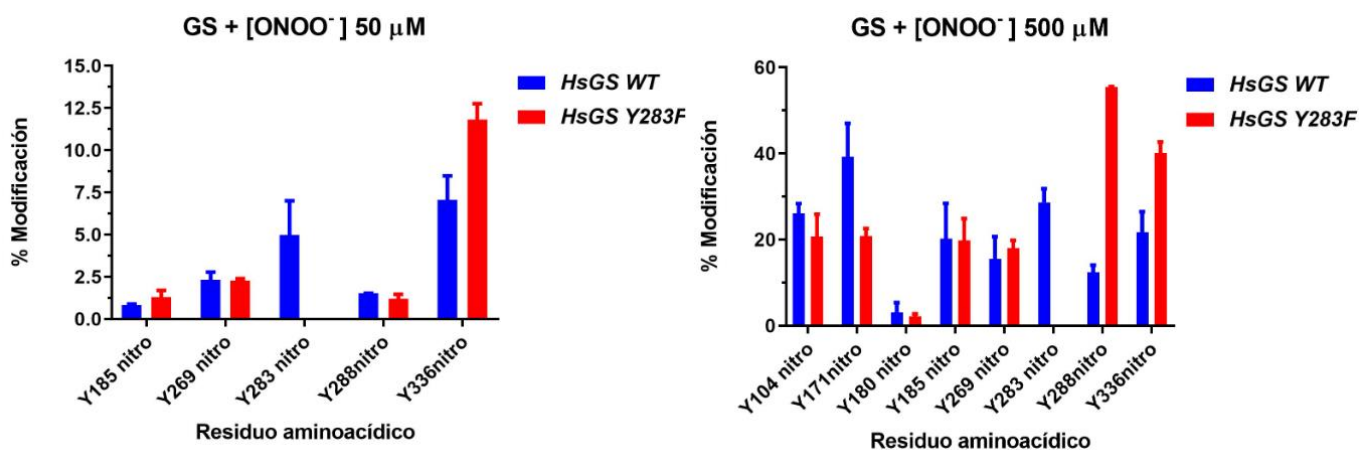


Figura 32. Resultados de los experimentos de cromatografía en fase líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) con análisis por monitoreo de múltiples reacciones (MRM). Se grafican lado a lado los porcentajes de modificación observados a nivel de los diferentes residuos aminoacídicos de interés en la enzima HsGS WT e Y283F, bajo dos condiciones de tratamiento con ONOO^- : a 50 y a 500 μM . Gráficos contruidos en Graphpad Prism 8.0.2.

Analizando los gráficos de la Figura 32, es posible observar que la mutación sitio-específica Y283F altera en forma visible los patrones de modificación oxidativa de la HsGS al exponerse la misma a ONOO^- . Sobre todo, al analizar el gráfico correspondiente a la condición de tratamiento con ONOO^- 500 μM , se observan importantes diferencias en los niveles a los que ocurren las nitraciones de tres residuos de Tyr particulares: la Tyr 171, que parece nitrarse más en HsGS WT que en HsGS Y283F, y las Tyr 288 y 336, donde parece ocurrir el fenómeno opuesto. Se realiza, entonces, un análisis estadístico consistente en múltiples tests T de Student, comparándose en cada caso el porcentaje de modificación oxidativa sobre un residuo aminoacídico entre la HsGS WT y la mutante Y283F. Este análisis arrojó como resultado que solo existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de modificación oxidativa de la Tyr 288, cuya nitración es más prevalente en HsGS Y283F que en HsGS WT. Así, mientras que para la HsGS WT sometida a tratamiento con $[\text{ONOO}^-] = 500 \mu\text{M}$, el porcentaje de nitración promedio a nivel de esta Tyr es de 12,4%, para HsGS Y283F este resulta muy superior, con un valor tan elevado como 55,5 %. Esto representa un incremento drástico en los niveles de oxidación de este aminoácido como consecuencia de la mutación Y283F.

Cabe destacar, asimismo, que los residuos Tyr 288 y Tyr 283 no solo se hallan extremadamente próximos a nivel de la secuencia lineal de cada cadena polipeptídica de HsGS, sino que además se ubican muy cercanos entre sí en la estructura tridimensional de la HsGS nativa, siendo la distancia entre ambos de apenas 9,64 Å de acuerdo con estructuras cristalográficas publicadas en PDB. Un esquema representando esta región de la HsGS puede encontrarse en la Figura 33 de este trabajo.

Dado que la Tyr 283 constituye un blanco preferencial de nitración por ONOO^- en la enzima WT, no resulta sino lógico que frente a la inhibición de la capacidad de la enzima de ser modificada oxidativamente en dicha posición, ocurra un re-direccionamiento de los radicales libres derivados del ONOO^- hacia la Tyr más próxima a nivel de la estructura enzimática, que es, entonces, la Tyr 288. El mayor nivel de modificación oxidativa de la Tyr 283 en comparación con la 288 en HsGS WT, que también fue observado por el Dr. Campolo en el marco de estudios previos en la temática [180] probablemente responda al mayor grado de exposición de la primera al entorno acuoso, lo que la torna más accesible a las ROS, incluyendo al ONOO^- y a sus radicales derivados, que son extremadamente polares y, en tanto tales, hidrofílicos. Por su parte, la Tyr 288 se encuentra en una posición más interna, de acceso más dificultoso para especies radicalares u oxidantes cargados. Así, cuando la Tyr 283 se encuentra disponible, como ocurre en HsGS WT, los radicales derivados del ONOO^- que se aproximan a esta región de la enzima reaccionan rápidamente con este residuo, nitrándolo. Así, pocos radicales logran acceder en estas condiciones a la Tyr 288, más resguardada, por lo que dicho residuo aparece solo marginalmente modificado. Por el contrario, en la mutante Y283F, donde la Tyr 283 fue sustituida por una Phe, los radicales incidentes en esta región ya no son consumidos en forma célere por la Tyr más expuesta y logran acceder a y reaccionar con la Tyr 288 en mayor grado, a pesar de su menor exposición superficial. Este modelo provee, entonces, una explicación convincente para el incremento radical en el nivel de modificación oxidativa observada en la Tyr 288 en la mutante de interés. De esta forma, parecería orquestarse un mecanismo de modificación oxidativa compensatoria, tal que la inhibición de la nitración de la Tyr 283 de la HsGS, provoca un incremento drástico en los niveles de nitración de su Tyr vecina.

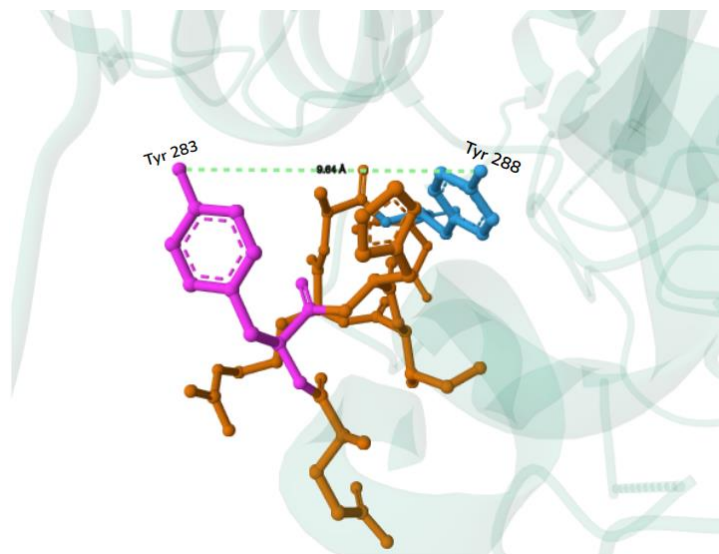


Figura 33. Análisis estructural de región de HsGS WT que contiene a los residuos de Tyr 283 y 288, mostrándose la distancia que separa a sus grupos $-\text{OH}$ terminal (9.64 Å).

A su vez, dada la enorme cercanía entre las Tyr 288 y 283 en la estructura tridimensional de la HsGS nativa, resulta razonable suponer que la adición de un grupo $-\text{NO}_2$ a la cadena lateral de cualquiera de estos dos residuos podría provocar idénticos efectos a nivel de la estructura de la enzima, y, por consiguiente, de su función (actividad enzimática). Dichos efectos estructurales (cambios de conformación, locales o extendidos) responden a las alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de la Tyr producto de la adición del grupo $-\text{NO}_2$. Por ejemplo, la nitración de las Tyr incrementa su

hidrofobicidad, al mismo tiempo que provoca una caída en el pKa de su –OH fenólico, favoreciendo su desprotonación y la consiguiente adquisición de una carga negativa. Así, esta modificación post-traducciona puede resultar en un cambio en una u otra dirección del nivel de polaridad del residuo aminoacídico, dependiendo de cuál de estos dos fenómenos prevalezca por sobre el otro. En uno u otro caso, se verá afectada la tendencia de la Tyr nitrada a quedar expuesta a nivel de la superficie proteica, interactuando con las moléculas de H₂O del entorno acuoso, lo que puede provocar cambios locales en el plegamiento proteico que a su vez pueden tener repercusiones funcionales (dada la íntima relación existente entre estructura y actividad enzimática). Cabe suponer, pues, que los cambios estructurales provocados por la nitración de las Tyr 283 o 288 serían semejantes entre sí, dada la cercanía de uno y otro aminoácido en la estructura proteica. De esta forma, el incremento en la nitración de la Tyr 288 podría compensar los efectos de la desaparición de la nitración en la posición 283 en forma casi exacta, proveyendo así una explicación satisfactoria para la ausencia de una diferencia en la sensibilidad frente a inactivación oxidativa por ONOO⁻ entre HsGS Y283F y WT. De este modo, ambas formas de HsGS podrían inactivarse en idéntica medida frente a la exposición a las mismas concentraciones de dicho agente nitro-oxidante, ocurriendo esto por mecanismos bioquímicos diferentes, tal que para la HsGS WT, la Tyr 283 podría tener un rol protagónico, al tiempo que para la HsGS Y283F, este papel sería ejercido por la Tyr 288.

En trabajos previos del Dr. Campolo en la temática, se construyó una mutante Y288F de la HsGS y se estableció que la misma presentaba una actividad basal mucho más baja que la de la enzima silvestre, así como una mayor tendencia a la agregación. Estos resultados parecerían sugerir que la Tyr 288 desempeña un rol importante en el mantenimiento de la integridad estructural y, por ende, de la actividad enzimática de la GS [180]. Así, podría sospecharse que su nitración ONOO⁻-dependiente podría resultar perjudicial para la actividad enzimática, constituyéndose en uno de los *drivers* de la inactivación de la HsGS Y283F por dicho agente nitro-oxidante. Los resultados obtenidos, entonces, podrían estar indicando que tanto la Tyr 283 en la HsGS WT como la Tyr 288 en la HsGS Y283F podrían participar en forma significativa en la inactivación oxidativa de la enzima, contribuyendo a la misma, aunque esto deberá ser confirmado mediante estudios subsiguientes.

7 Conclusiones y Perspectivas

En esta Tesina nos propusimos como objetivo principal esclarecer el rol de la nitración de las Tyr 283 y 171, identificadas anteriormente como dianas centrales de modificación, en la inactivación oxidativa de la enzima HsGS por ONOO⁻ *in vitro*. En la persecución de este cometido, se hizo uso de una batería de técnicas del laboratorio de bioquímica básica y biología molecular, así como de métodos proteómicos, que fueron empleados para realizar estudios comparativos de los niveles de inactivación enzimática y de la extensión de la modificación oxidativa de HsGS WT y sus mutantes Y171F e Y283F luego de su tratamiento con ONOO⁻. Todas las proteínas empleadas en este trabajo fueron producidas recombinantemente en *E.coli* BL21 Star, en el marco del mismo.

A partir de los resultados obtenidos, fue posible concluir que ninguna de las dos Tyr seleccionadas resulta en sí misma esencial para la inactivación oxidativa de la HsGS por ONOO⁻, en tanto la actividad de ambas formas mutantes de la enzima se vio resentida a partir de su tratamiento con esta especie nitrante y oxidante, en forma dosis-dependiente.

En cuanto al rol de la nitración de la Tyr 171 en este proceso, pudo constatarse que la sustitución de este residuo por una Phe provoca un incremento en la sensibilidad de la enzima frente a inactivación oxidativa por ONOO⁻. Esta sensibilidad exacerbada se ve acompañada, a su vez, por moderados incrementos en los niveles de oxidación de una multiplicidad de residuos a lo largo de la cadena polipeptídica enzimática. Esto parecería sugerir un rol protector para la Tyr 171 durante la exposición de la HsGS a insultos oxidativos, de manera que dicho residuo actuaría como una suerte de “antena” de oxidación, captando una porción significativa de los radicales nitrantes y oxidantes derivados del ONOO⁻ (en este caso), y sufriendo por consiguiente elevados niveles de nitración, pero con la particularidad de que dicha modificación no tendría un efecto significativo sobre la estructura y sobre la actividad enzimática GS. Así, la sustitución de dicha Tyr por una Phe provoca una sensibilidad acrecentada frente a la inactivación oxidativa por ONOO⁻, habiendo removido al residuo protector y permitido que los radicales que en la enzima WT son consumidos por este, reaccionaran con otros aminoácidos, causando mayores niveles de daño a la estructura y a la actividad enzimática.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los estudios comparativos de inactivación oxidativa para HsGS WT y su mutante Y283F revelaron que ambas formas de la enzima son igualmente sensibles frente a la inactivación por ONOO⁻. Sin embargo, mediante el uso de técnicas bioquímicas y proteómicas para la caracterización de los niveles de modificación oxidativa a lo largo de la cadena polipeptídica de cada forma de HsGS, se evidenció que los mecanismos bioquímicos subyacentes que conducen a dicha pérdida de actividad bien podrían ser diferentes para la mutante Y283F.

Así, los resultados de LC-MS/MS-MRM para HsGS Y283F y WT luego de su tratamiento con ONOO⁻, revelan que el bloqueo de la nitración en la posición 283 de la cadena polipeptídica provoca un aumento drástico en los niveles de nitración de la Tyr 288, que es la más próxima en el espacio al residuo mutado. En la enzima WT, que tiene a su Tyr 283 disponible, esta se constituye en un blanco preferencial para el ONOO⁻, probablemente debido a su elevado nivel de exposición al medio acuoso circundante, que la torna altamente accesible a dicho agente oxidante y a sus radicales derivados. Mientras tanto, la Tyr 288, que se proyecta hacia el interior de la cadena polipeptídica, presenta bajos niveles de nitración. En cambio, en la mutante Y283F, la Tyr 288 presenta un muy elevado nivel de modificación. Así, los resultados obtenidos sugieren que en HsGS Y283F los radicales oxidantes y nitrantes que normalmente son consumidos por la Tyr 283 serían, en cambio, re-dirigidos hacia la Tyr 288, con idénticas consecuencias sobre estructura y función enzimáticas, según queda sugerido, a su vez, por los resultados del ensayo comparativo de inactivación. Así, si bien se confirmó una vez más que la Tyr 283 actúa como blanco preferencial de nitración por ONOO⁻ en HsGS WT, la existencia de este mecanismo compensatorio en la mutante Y283F impidió determinar el papel que desempeña esta nitración a nivel del proceso de inactivación oxidativa de la HsGS.

A modo de perspectiva, entiendo que podría resultar de interés realizar estudios *in silico* para analizar las consecuencias estructurales de la nitración de las Tyr 283 y 288, de modo de dilucidar si estas modificaciones podrían desempeñar un papel relevante en la pérdida de actividad enzimática mediada por ONOO⁻, mediante la realización de simulaciones computacionales. Otra opción podría radicar en la producción por ingeniería genética de una nueva HsGS recombinante, que posea una doble-mutación Tyr→Phe, a nivel de los residuos de Tyr 283 y 288, sometiendo luego a la enzima pura a los mismos estudios realizados en el curso de este trabajo. De esta manera, podrían analizarse las consecuencias de la inhibición de la nitración sobre la Tyr 283 en ausencia de la

compensación de la misma, por incremento en la nitración de la Tyr 288 adyacente. No obstante, es posible que esta última estrategia plantee obstáculos adicionales. Esta consideración surge de la lectura de un trabajo previo realizado por el Dr. Campolo, en el cual se produjo una mutante Y288F de HsGS, con el objetivo de realizar una caracterización similar a la hecha en ese trabajo para HsGS Y171F e Y283F. Sin embargo, en el marco de esta caracterización se constató que la propia mutación introducida provoca consecuencias importantes a nivel de la estructura de la enzima, que presentó una actividad pobre incluso en ausencia de exposición a ONOO⁻ (aproximadamente 20% de la actividad medida para HsGS WT), así como un incremento en su tendencia a la agregación tanto en presencia como en ausencia de dicho agente nitro-oxidante [180]. En vistas de las complicaciones encontradas a la hora de caracterizar la respuesta frente a ONOO⁻ de HsGS Y288F, resulta razonable suponer que la doble-mutante propuesta presentará idénticas falencias, dificultando el análisis certero de los resultados, de recurrirse a esta segunda estrategia. Así, entiendo que la forma más relevante de continuar profundizando en la dilucidación del rol de la nitración de la Tyr 283 en la inactivación oxidativa de HsGS WT sería mediante simulaciones computacionales de su modificación, analizando las consecuencias a nivel de estructura de la misma, y determinando si estas podrían o no afectar a la capacidad de la enzima de actuar como catalizador en su reacción canónica.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una vez más que la inactivación oxidativa de la HsGS por ONOO⁻ es un proceso complejo y multi-causal, que implica la oxidación de múltiples residuos aminoacídicos sobre la cadena polipeptídica de dicha proteína, siendo la formación de 3-NO₂-Tyr la modificación de mayor prevalencia. A su vez, se evidenció que la nitración de diferentes residuos de Tyr puede acarrear distintas consecuencias estructurales y funcionales para la enzima, tal que la nitración de la Tyr 171 parecería ejercer un rol protector, al tiempo que la nitración de la Tyr 283 podría o no desempeñar un papel relevante para la pérdida de actividad enzimática.

La información recabada en el marco de esta Tesina supone un aporte a la comprensión más honda de los mecanismos bioquímicos implicados en la inactivación oxidativa de la HsGS, que ha sido extensamente observada en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, así como en individuos envejecidos. Un entendimiento en mayor profundidad de las vías que conducen a la pérdida de actividad de la GS tanto *in vivo* como *in vitro* podría no solo abrir la puerta a subsiguientes estudios sobre el rol de la misma en la fisiopatogenia de estas enfermedades, sino que también podría señalar posibles dianas moleculares para el desarrollo de tratamientos farmacológicos destinados a detener o ralentizar la progresión de dichas patologías.

8 Agradecimientos

En primer lugar, quisiera dar mi más profundo agradecimiento a mi tutor Nicolás Campolo, por su infinita amabilidad, paciencia, vocación de enseñar y amistad que realmente hicieron que este trabajo resultara tanto enormemente disfrutable como inmensamente enriquecedor. Cualquier formulación que elija darle a esta frase resulta insuficiente para agradecerle todo lo que debería.

En segundo lugar, quiero agradecerle a Rafael Radi por la oportunidad de incorporarme a su laboratorio, lo cual representa un gran honor, así como por la orientación provista en momentos clave en el curso de este trabajo. Asimismo, quisiera darle las gracias a otros integrantes del CEINBIO, como Mauri, por su enorme colaboración para la realización de los experimentos de LC-MS/MS, así como para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos de los mismos, y Ari, que fue quien me permitió acceder al equipo de dicroísmo circular, y me orientó en cada paso de la obtención de los espectros. Sin su colaboración, este trabajo nunca hubiera sido posible. Igualmente, quisiera agradecerles a todos los compañeros del laboratorio, por su disposición a ayudar frente a cualquier dificultad (¡y las hubo muchas!), así como por su alegría y sentido del humor, que hizo que cada día dedicado a este trabajo fuera un día lleno de risa.

Gracias a mis padres, por enseñarme desde chiquita la importancia de la curiosidad y por el inmenso sacrificio y esfuerzo que hicieron por darme la mejor educación en cada paso, soñando siempre en grande para mí. Gracias por su apoyo incondicional y por su amor inquebrantable.

Gracias a mis tíos, mis abuelos y mi prima Marti por ser mis más grandes hinchas. Gracias especialmente a mi abuelo Chito. Me siento muy afortunada de ser tu nieta.

Gracias a mi novio Pancho, por ver siempre lo mejor en mí, incluso cuando yo misma lo pierdo de vista. No sabía que podía sentir tanta paz y tanto amor al lado de alguien. Espero hacerte tan feliz como vos me haces a mí.

A mis amigas bioquímicas, Floca y Bru, con las que compartimos todos los altibajos de la carrera; reírme con ustedes siempre va a ser mi recuerdo favorito de Facultad. No podría haber pedido mejor compañía.

Gracias, también, a todos mis otros amigos, por regalarme días felices que me dieron la fuerza para encarar aquellos más duros.

9 Bibliografía

1. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. Sixth ed 2013, New York: W. H. Freeman and Company. 1336.
2. Erickson, R.H. and Y.S. Kim, *Digestion and absorption of dietary protein*. *Annu Rev Med*, 1990. **41**: p. 133-9.
3. Baynes, J.W. and M.H. Dominiczak, *Medical biochemistry / [edited by] John Baynes, Marek H. Dominiczak*. 4th ed. ed 2014, Philadelphia: Saunders.
4. Newsholme, P., et al., *Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function*. *Cell Biochem Funct*, 2003. **21**(1): p. 1-9.
5. Altman, B.J., Z.E. Stine, and C.V. Dang, *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(10): p. 619-34.
6. DeBerardinis, R.J. and T. Cheng, *Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(3): p. 313-24.
7. Mouilleron, S., et al., *Dynamics of glucosamine-6-phosphate synthase catalysis*. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **505**(1): p. 1-12.
8. Xiao, D., et al., *The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications*. *Amino Acids*, 2016. **48**(9): p. 2067-80.
9. Taylor, L. and N.P. Curthoys, *Glutamine metabolism: Role in acid-base balance**. *Biochem Mol Biol Educ*, 2004. **32**(5): p. 291-304.
10. Wright, G., et al., *Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies*. *Liver Int*, 2011. **31**(2): p. 163-75.
11. Frieg, B., et al., *Glutamine synthetase as a central element in hepatic glutamine and ammonia metabolism: novel aspects*. *Biol Chem*, 2021. **402**(9): p. 1063-1072.
12. Eid, T., et al., *Astrocytes and Glutamine Synthetase in Epileptogenesis*. *J Neurosci Res*, 2019. **97**(11): p. 1345-1362.
13. Alberts, B., J.H. Wilson, and T. Hunt, *Molecular biology of the cell*. 5th ed 2008, New York: Garland Science. xxiii, 1601, 90 p.
14. Choi, D.W. and D.M. Hartley, *Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death*. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 1993. **71**: p. 23-34.
15. Tymianski, M., et al., *Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons*. *J Neurosci*, 1993. **13**(5): p. 2085-104.
16. Verma, M., B.N. Lizama, and C.T. Chu, *Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration*. *Transl Neurodegener*, 2022. **11**(1): p. 3.
17. Bak, L.K., A. Schousboe, and H.S. Waagepetersen, *The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer*. *J Neurochem*, 2006. **98**(3): p. 641-53.
18. Rangroo Thrane, V., et al., *Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering*. *Nat Med*, 2013. **19**(12): p. 1643-8.
19. Kumada, Y., et al., *Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(7): p. 3009-13.
20. Pesole, G., et al., *Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(2): p. 522-6.
21. Krebs, H.A., *Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues*. *Biochem J*, 1935. **29**(8): p. 1951-69.

22. Levintow, L. and A. Meister, *Reversibility of the enzymatic synthesis of glutamine*. J Biol Chem, 1954. **209**(1): p. 265-80.
23. Speck, J.F., *The enzymatic synthesis of glutamine, a reaction utilizing adenosine triphosphate*. J Biol Chem, 1949. **179**(3): p. 1405-26.
24. Speck, J.F., *The enzymic synthesis of glutamine*. J Biol Chem, 1947. **168**(1): p. 403.
25. Krishnaswamy, P.R., V. Pamiljans, and A. Meister, *Activated glutamate intermediate in the enzymatic synthesis of glutamine*. J Biol Chem, 1960. **235**: p. PC39-40.
26. Pamiljans, V., et al., *Studies on the mechanism of glutamine synthesis; isolation and properties of the enzyme from sheep brain*. Biochemistry, 1962. **1**: p. 153-8.
27. van Rooyen, J.M., et al., *Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface*. Structure, 2011. **19**(4): p. 471-83.
28. Bernard, S.M. and D.Z. Habash, *The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling*. New Phytol, 2009. **182**(3): p. 608-620.
29. Joo, H.K., et al., *Structural Analysis of Glutamine Synthetase from Helicobacter pylori*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 11657.
30. Matthews, G.D., R.M. Gould, and L. Vardimon, *A single glutamine synthetase gene produces tissue-specific subcellular localization by alternative splicing*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5527-34.
31. Mathis, R., et al., *The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes*. J Mol Evol, 2000. **50**(2): p. 116-22.
32. Shin, D., S. Park, and C. Park, *A splice variant acquiring an extra transcript leader region decreases the translation of glutamine synthetase gene*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 175-84.
33. Wang, Y., et al., *Chromosomal mapping of a family of human glutamine synthetase genes: functional gene (GLUL) on 1q25, pseudogene (GLULP) on 9p13, and three related genes (GLULL1, GLULL2, GLULL3) on 5q33, 11p15, and 11q24*. Genomics, 1996. **37**(2): p. 195-9.
34. Krajewski, W.W., et al., *Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design*. J Mol Biol, 2008. **375**(1): p. 217-28.
35. Eisenberg, D., et al., *Structure-function relationships of glutamine synthetases*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 122-45.
36. Butterfield, D.A., et al., *Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2006. **22**(2): p. 223-32.
37. Liaw, S.H. and D. Eisenberg, *Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes*. Biochemistry, 1994. **33**(3): p. 675-81.
38. Stadtman, E.R., *The story of glutamine synthetase regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44357-64.
39. Woolfolk, C.A. and E.R. Stadtman, *Cumulative feedback inhibition in the multiple end product regulation of glutamine synthetase activity in Escherichiacoli*. Biochem Biophys Res Commun, 1964. **17**(4): p. 313-319.
40. Woolfolk, C.A. and E.R. Stadtman, *Regulation of glutamine synthetase. 3. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys, 1967. **118**(3): p. 736-55.
41. Kingdon, H.S., B.M. Shapiro, and E.R. Stadtman, *Regulation of glutamine synthetase. 8. ATP: glutamine synthetase adenyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the*

- regulatory properties of glutamine synthetase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(4): p. 1703-10.
42. Ferguson, A.R. and A.P. Sims, *The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase*. J Gen Microbiol, 1974. **80**(1): p. 159-71.
 43. Nguyen, T.V., et al., *p97/VCP promotes degradation of CRBN substrate glutamine synthetase and neosubstrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(14): p. 3565-3571.
 44. Nguyen, T.V., et al., *Glutamine Triggers Acetylation-Dependent Degradation of Glutamine Synthetase via the Thalidomide Receptor Cereblon*. Mol Cell, 2016. **61**(6): p. 809-20.
 45. Barnes, P.R., R.T. Hersh, and P.A. Kitos, *Regulation of glutamine synthetase in L cells by cortisol and L-glutamine*. In Vitro, 1974. **9**(4): p. 230-8.
 46. Kulka, R.G. and H. Cohen, *Regulation of glutamine synthetase activity of hepatoma tissue culture cells by glutamine and dexamethasone*. J Biol Chem, 1973. **248**(19): p. 6738-43.
 47. Abcouwer, S.F., B.P. Bode, and W.W. Souba, *Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner*. J Surg Res, 1995. **59**(1): p. 59-65.
 48. Moscona, M., N. Frenkel, and A.A. Moscona, *Regulatory mechanisms in the induction of glutamine synthetase in the embryonic retina: immunochemical studies*. Dev Biol, 1972. **28**(1): p. 229-41.
 49. Sarkar, P.K. and A.A. Moscona, *Glutamine synthetase induction in embryonic neural retina: immunochemical identification of polysomes involved in enzyme synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(6): p. 1667-71.
 50. Gorovits, R., et al., *Hormonal and non-hormonal regulation of glutamine synthetase in the developing neural retina*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **43**(1-2): p. 321-9.
 51. Haberle, J., et al., *Inborn error of amino acid synthesis: human glutamine synthetase deficiency*. J Inherit Metab Dis, 2006. **29**(2-3): p. 352-8.
 52. Haberle, J., et al., *Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient*. Mol Genet Metab, 2011. **103**(1): p. 89-91.
 53. Haberle, J., et al., *Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations*. N Engl J Med, 2005. **353**(18): p. 1926-33.
 54. Spodenkiewicz, M., et al., *Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis*. Biology (Basel), 2016. **5**(4).
 55. He, Y., et al., *Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis*. Dev Dyn, 2007. **236**(7): p. 1865-75.
 56. He, Y., et al., *Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death*. Glia, 2010. **58**(6): p. 741-54.
 57. Suarez, I., G. Bodega, and B. Fernandez, *Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia*. Neurochem Int, 2002. **41**(2-3): p. 123-42.
 58. Smith, C.D., et al., *Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10540-3.
 59. Hensley, K., et al., *Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation*. J Neurochem, 1995. **65**(5): p. 2146-56.
 60. Le Prince, G., et al., *Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type*. Neurochem Res, 1995. **20**(7): p. 859-62.
 61. Robinson, S.R., *Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes*. Neurochem Int, 2000. **36**(4-5): p. 471-82.

62. Anantharaman, M., et al., *Beta-amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLH/NLH X PS-1P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(5): p. 1608-18.
63. Aksenov, M.Y., et al., *Oxidative modification of glutamine synthetase by amyloid beta peptide*. *Free Radic Res*, 1997. **27**(3): p. 267-81.
64. Butterfield, D.A. and D. Boyd-Kimball, *Redox proteomics and amyloid beta-peptide: insights into Alzheimer disease*. *J Neurochem*, 2019. **151**(4): p. 459-487.
65. Olabarria, M., et al., *Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission?* *Mol Neurodegener*, 2011. **6**: p. 55.
66. Kulijewicz-Nawrot, M., et al., *Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex*. *ASN Neuro*, 2013. **5**(4): p. 273-82.
67. Souza, D.G., et al., *Astrocytes from adult Wistar rats aged in vitro show changes in glial functions*. *Neurochem Int*, 2015. **90**: p. 93-7.
68. Li, K.Y., et al., *Morphological and molecular alterations of reactive astrocytes without proliferation in cerebral cortex of an APP/PS1 transgenic mouse model and Alzheimer's patients*. *Glia*, 2020. **68**(11): p. 2361-2376.
69. Taverne, Y.J., et al., *Reactive oxygen species and the cardiovascular system*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 862423.
70. Murphy, M.P., et al., *Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo*. *Nat Metab*, 2022. **4**(6): p. 651-662.
71. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(51): p. 19683-19708.
72. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(10): p. 1465-9.
73. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Superoxide and nitric oxide: consequences of varying rates of production and consumption: a theoretical treatment*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(1): p. 137-41.
74. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(12): p. 4003-8.
75. Storz, P., *Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases*. *Sci STKE*, 2006. **2006**(332): p. re3.
76. Carballal, S., et al., *Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite*. *Biochemistry*, 2003. **42**(33): p. 9906-14.
77. Hawkins, C.L., D.I. Pattison, and M.J. Davies, *Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins*. *Amino Acids*, 2003. **25**(3-4): p. 259-74.
78. Winterbourn, C.C. and D. Metodiewa, *Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(3-4): p. 322-8.
79. Cheng, F.C., J.F. Jen, and T.H. Tsai, *Hydroxyl radical in living systems and its separation methods*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002. **781**(1-2): p. 481-96.
80. De Jesus-Bonilla, W., et al., *Formation of compound I and compound II ferryl species in the reaction of hemoglobin I from *Lucina pectinata* with hydrogen peroxide*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **390**(2): p. 304-8.
81. Zhang, R., et al., *Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(48): p. 46116-22.

82. Peskin, A.V. and C.C. Winterbourn, *Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(5): p. 572-9.
83. Stone, J.R. and S. Yang, *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(3-4): p. 243-70.
84. Mitozo, P.A., et al., *A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(1): p. 69-77.
85. Robbins, R.A., et al., *Nitric oxide, peroxynitrite, and lower respiratory tract inflammation*. Immunopharmacology, 2000. **48**(3): p. 217-21.
86. Robbins, R.A. and M.B. Grisham, *Nitric oxide*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(6): p. 857-60.
87. Zhang, J. and S.H. Snyder, *Nitric oxide in the nervous system*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35**: p. 213-33.
88. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
89. Augusto, O., et al., *Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 841-59.
90. Ferrer-Sueta, G. and R. Radi, *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals*. ACS Chem Biol, 2009. **4**(3): p. 161-77.
91. Radi, R., et al., *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4244-50.
92. Beckman, J.S., et al., *Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 438-45.
93. Radi, R., et al., *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(2): p. 481-7.
94. Yermilov, V., et al., *Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro*. Carcinogenesis, 1995. **16**(9): p. 2045-50.
95. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 662-80.
96. Ischiropoulos, H., et al., *Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 431-7.
97. Van der Vliet, A., et al., *Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion*. Biochem J, 1994. **303** (Pt 1)(Pt 1): p. 295-301.
98. Watts, B.P., Jr., M. Barnard, and J.F. Turrens, *Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells*. Arch Biochem Biophys, 1995. **317**(2): p. 324-30.
99. Ischiropoulos, H. and A.B. Al-Mehdi, *Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications*. FEBS Letters, 1995. **364**: p. 279-282.
100. Sampson, J.B., H. Rosen, and J.S. Beckman, *Peroxynitrite-dependent tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase, myeloperoxidase, and horseradish peroxidase*. Methods Enzymol, 1996. **269**: p. 210-18.
101. Romero, N., et al., *Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44049-57.
102. Herold, S. and K. Shivashankar, *Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate*. Biochemistry, 2003. **42**(47): p. 14036-46.
103. Floris, R., et al., *Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase*. Eur J Biochem, 1993. **215**(3): p. 767-75.

104. Gebicka, L. and J. Didik, *Mechanism of peroxynitrite interaction with cytochrome c*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(3): p. 815-23.
105. Crow, J.P., *Manganese and iron porphyrins catalyze peroxynitrite decomposition and simultaneously increase nitration and oxidant yield: implications for their use as peroxynitrite scavengers in vivo*. Arch Biochem Biophys, 1999. **371**: p. 41-52.
106. Daiber, A., et al., *The impact of metal catalysis on protein tyrosine nitration by peroxynitrite*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(3): p. 873-81.
107. Campolo, N., S. Bartesaghi, and R. Radi, *Metal-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems*. Redox Rep, 2014. **19**(6): p. 221-31.
108. Ferrer-Sueta, G., et al., *Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration*. Chem Rev, 2018. **118**(3): p. 1338-1408.
109. Radi, R., *Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant*. J Biol Chem, 2013. **288**(37): p. 26464-72.
110. Davies, M.J., *Protein oxidation and peroxidation*. Biochem J, 2016. **473**(7): p. 805-25.
111. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
112. Aicardo, A., et al., *Propagation of free-radical reactions in concentrated protein solutions*. Free Radic Res, 2018. **52**(2): p. 159-170.
113. Buxton, G.V., et al., *Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution)*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1988. **17**(2): p. 513-886.
114. Davies, K.J.A., S.W. Lin, and R.E. Pacifici, *Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. IV. Degradation of Denatured Protein*. J Biol Chem, 1987. **262**: p. 9914-9920.
115. Alvarez, B., et al., *Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration*. Chem Res Toxicol, 1996. **9**(2): p. 390-6.
116. Alvarez, B., et al., *Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 842-8.
117. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
118. Souza, J.M., G. Peluffo, and R. Radi, *Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker?* Free Radic Biol Med, 2008. **45**(4): p. 357-66.
119. Prütz, W.A., et al., *Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins*. Arch Biochem Biophys, 1985. **243**: p. 125-34.
120. Chen, S.N. and M.Z. Hoffman, *Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution*. Radiat Res, 1973. **56**(1): p. 40-7.
121. Solar, S., W. Solar, and N. Getoff, *Reactivity of OH with Tyrosine in Aqueous Solution Studied by Pulse Radiolysis*. J Phys Chem, 1984. **88**: p. 2091-2095.
122. Bartesaghi, S., et al., *Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes*. Chem Res Toxicol, 2010. **23**: p. 821-35.
123. Marquez, L.A. and H.B. Dunford, *Kinetics of Oxidation of Tyrosine and Dityrosine by Myeloperoxidase Compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 30434-30440.
124. Riordan, J.F., M. Sokolovsky, and B.L. Vallee, *Environmentally Sensitive Tyrosyl Residues. Nitration with Tetranitromethane*. Biochemistry, 1966. **6**: p. 358-361.
125. Abello, N., et al., *Protein Tyrosine Nitration : Selectivity , Physicochemical and Biological Consequences , Denitration , and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins*. J Proteome Res, 2009. **8**: p. 3222-3238.

126. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. *Acc Chem Res*, 2013. **46**: p. 550-9.
127. Savvides, S.N., et al., *Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite*. *J Biol Chem*, 2002. **277**: p. 2779-84.
128. Mostad, A. and S. Natarajan, *Crystal and molecular structure of 3-nitro-4-hydroxy-phenylalanine nitrate*. *Zeitschrift für Kristallographie*, 1990. **193**: p. 127-136.
129. Yee, C.S., et al., *Generation of the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase by Intein Chemistry : Insertion of 3-Nitrotyrosine at Residue 356 as a Probe of the Radical Initiation Process*. *Biochemistry*, 2003. **42**: p. 14541-14552.
130. Souza, J.M. and R. Radi, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **360**(2): p. 187-94.
131. Reisz, J.A., et al., *Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells*. *Blood*, 2016. **128**(12): p. e32-42.
132. Pierce, A., et al., *GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis*. *J Mol Biol*, 2008. **382**(5): p. 1195-210.
133. Pierce, A.P., et al., *Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(12): p. 1584-93.
134. Yamakura, F., et al., *Inactivation of Human Manganese-superoxide Dismutase by Peroxynitrite Is Caused by Exclusive Nitration of Tyrosine 34 to 3-Nitrotyrosine*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: p. 14085-14089.
135. MacMillan-Crow, L.A., J.P. Crow, and J.A. Thompson, *Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues*. *Biochemistry*, 1998. **37**: p. 1613-1622.
136. Moreno, D.M., et al., *Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration*. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **507**: p. 304-309.
137. Quint, P., et al., *Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(3): p. 453-8.
138. MacMillan-Crow, L.A., et al., *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**: p. 11853-11858.
139. Gray, K.D., et al., *Pulmonary MnSOD is nitrated following hepatic ischemia-reperfusion*. *Surgical Infections*, 2004. **5**: p. 166-173.
140. Salo, D.C., et al., *Superoxide Dismutase Undergoes Proteolysis and Fragmentation Following Oxidative Modification and Inactivation*. *J Biol Chem*, 1990. **265**: p. 11919-11927.
141. Coelho, F.R., et al., *Oxidation of the tryptophan 32 residue of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity triggers the non-amyloid aggregation of the enzyme*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(44): p. 30690-701.
142. Cassina, A.M., et al., *Cytochrome c Nitration by Peroxynitrite*. *J Biol Chem*, 2000. **275**: p. 21409-21415.
143. 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*, 2009. **284**: p. 17-26.
144. Chen, Y.R., et al., *Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 29781-91.

145. Gopalakrishna, R. and W.B. Anderson, *Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6758-62.
146. Chondrogianni, N., et al., *Protein damage, repair and proteolysis*. Mol Aspects Med, 2014. **35**: p. 1-71.
147. Wang, W. and C.J. Roberts, *Protein aggregation - Mechanisms, detection, and control*. Int J Pharm, 2018. **550**(1-2): p. 251-268.
148. Giasson, B.I., et al., *Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions*. Science, 2000. **290**(5493): p. 985-9.
149. Souza, J.M., et al., *Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 18344-9.
150. Reynolds, M.R., R.W. Berry, and L.I. Binder, *Site-Specific Nitration and Oxidative Dityrosine Bridging of the τ Protein by Peroxynitrite: Implications for Alzheimer's Disease*. Biochemistry, 2005. **44**: p. 1690-1700.
151. Sunico, C.R., et al., *Role of sulfiredoxin as a peroxiredoxin-2 denitrosylase in human iPSC-derived dopaminergic neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(47): p. E7564-E7571.
152. Levine, R.L., et al., *Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**: p. 2120-2124.
153. Grune, T., et al., *Proteolysis in Cultured Liver Epithelial Cells during Oxidative Stress*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 2344-2351.
154. Davies, K.J.A. and S.W. Lin, *Degradation of oxidatively denatured proteins in Escherichia coli*. Free Radic Biol Med, 1988. **5**: p. 215-223.
155. Raynes, R., L.C. Pomatto, and K.J. Davies, *Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways*. Mol Aspects Med, 2016. **50**: p. 41-55.
156. Basso, M., et al., *Characterization of detergent-insoluble proteins in ALS indicates a causal link between nitrative stress and aggregation in pathogenesis*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8130.
157. Peinado, M.Á., et al., *Proteomic characterization of nitrated cell targets after hypobaric hypoxia and reoxygenation in rat brain*. J Proteomics, 2014. **109C**: p. 309-321.
158. Shen, L., et al., *Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage*. J Proteomics, 2015. **123**: p. 101-13.
159. Boyd-Kimball, D., et al., *Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2005. **132**(2): p. 313-24.
160. Castegna, A., et al., *Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(4): p. 562-71.
161. Gorg, B., et al., *Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes*. Arch Biochem Biophys, 2006. **449**(1-2): p. 104-14.
162. Schliess, F., et al., *Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes*. Faseb J, 2002. **16**(7): p. 739-41.
163. Cimino, F., W.B. Anderson, and E.R. Stadtman, *Ability of nonenzymic nitration or acetylation of E. coli glutamine synthetase to produce effects analogous to enzymic adenylylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(2): p. 564-71.

164. Berlett, B.S., et al., *Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in Escherichia coli glutamine synthetase mimics adenylylation: relevance to signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1776-80.
165. Melo, P.M., et al., *Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of Medicago truncatula and is regulated by tyrosine nitration*. Plant Physiol, 2011. **157**(3): p. 1505-17.
166. Görg, B., et al., *Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration*. FEBS Lett, 2007. **581**: p. 84-90.
167. Gorg, B., et al., *Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1065-73.
168. Frieg, B., et al., *Mechanism of Fully Reversible, pH-Sensitive Inhibition of Human Glutamine Synthetase by Tyrosine Nitration*. J Chem Theory Comput, 2020. **16**(7): p. 4694-4705.
169. Fernandes, S.P., et al., *Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron*. Neurosci Lett, 2011. **490**(1): p. 27-30.
170. Kimura, K. and S. Sugano, *Inactivation of Bacillus subtilis glutamine synthetase by metal-catalyzed oxidation*. J Biochem, 1992. **112**(6): p. 828-33.
171. Levine, R.L., *Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system*. J Biol Chem, 1983. **258**(19): p. 11828-33.
172. Ma, Y.S., C.C. Chao, and E.R. Stadtman, *Oxidative modification of glutamine synthetase by 2,2'-azobis(2- amidinopropane) dihydrochloride*. Arch Biochem Biophys, 1999. **363**(1): p. 129-34.
173. Saha, A., et al., *Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(4): p. 653-9.
174. Reed, J.W., H.H. Ho, and W.L. Jolly, *Chemical syntheses with a quenched flow reactor. Hydroxytrihydroborate and peroxynitrite*. J Am Chem Soc, 1974. **96**: p. 1248-9.
175. Hughes, M.N. and H.G. Nicklin, *The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*. Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical, 1968(0): p. 450-452.
176. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
177. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
178. Webb, J.T. and G.W. Brown, *Some properties and occurrence of glutamine synthetase in fish*. Comp Biochem Physiol B, 1976. **54**(1): p. 171-5.
179. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys, 1959. **82**(1): p. 70-7.
180. Campolo, N., et al., *Multiple oxidative post-translational modifications of human glutamine synthetase mediate peroxynitrite-dependent enzyme inactivation and aggregation*. J Biol Chem, 2023. **299**(3): p. 102941.
181. Mariotti, M., et al., *Cross-linking and modification of fibronectin by peroxynitrous acid: Mapping and quantification of damage provides a new model for domain interactions*. J Biol Chem, 2021. **296**: p. 100360.
182. Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann, *Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics*. Anal Chem, 2003. **75**(3): p. 663-70.
183. Rappsilber, J., M. Mann, and Y. Ishihama, *Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1896-906.

184. Parks, T.D., et al., *Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase*. Anal Biochem, 1994. **216**(2): p. 413-7.
185. Kelly, S.M. and N.C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. Curr Protein Pept Sci, 2000. **1**(4): p. 349-84.
186. Gawronski, J.D. and D.R. Benson, *Microtiter assay for glutamine synthetase biosynthetic activity using inorganic phosphate detection*. Anal Biochem, 2004. **327**(1): p. 114-8.
187. Ronzio, R.A., et al., *Preparation and studies on the characterization of sheep brain glutamine synthetase*. Biochemistry, 1969. **8**(6): p. 2670-4.