

PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA

TESIS DE DOCTORADO

*Estudios estructurales y funcionales de formas
modificadas de citocromo c:
Rol de la nitración de tirosinas y su efecto sobre
la coordinación del hemo*

Mag. Verónica Tortora

Facultad de Medicina – Universidad de la República

Orientador: Dr. Rafael Radi

Co-orientador: Dr. Laura Castro

Tribunal:

Dr. Gustavo Salinas

Dr. Carlos Robello

Dr. Leonardo Boechi





**Estudios estructurales y funcionales de
formas modificadas de citocromo *c*:
Rol de la nitración de tirosinas y su
efecto en la coordinación del hemo**

Mag. Verónica Tórtora

Centro de Investigaciones Biomédicas,
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad de la República

Montevideo, Diciembre 2014

A Pablo, por acompañarme a lo largo de todo este sinuoso camino

A Emma, por los abrazos de oso al volver a casa

Índice

Índice de páginas

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Generalidades del citocromo c.....	3
1.2. Funciones del citocromo.....	6
Cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	7
Actividad peroxidasa.....	8
Activación del apoptosoma.....	9
Acción sobre sistema de proteínas importadoras Erv1-Mia40.....	11
Rol sobre especies reactivas del oxígeno: productor o atrapador.....	11
1.3. Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la mitocondria y nitración proteica.....	12
1.4. Modificaciones nito-oxidativas del citocromo c.....	18
2. Objetivos.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
3. Metodología.....	26
3.1. Expresión y purificación de citocromo c nativo y sus distintos mutantes.....	26
3.2. Cuantificación y espectros del citocromo c.....	28
3.3. Medida de actividades físico-químicas.....	28
Actividad peroxidasa.....	28
Desaparición de la Banda de Soret.....	28
Reducción por ascorbato.....	29
3.4. Nitración y purificación de formas mono-nitradas de citocromo c... ..	29
3.5. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ¹ H.....	29
3.6. Titulación por pH seguida por absorbancia a 695 nm.....	30
3.7. Titulación por pH seguida por espectroscopia de resonancia Raman.....	30

3.8. Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	30
3.9. Determinación del potencial de reducción estándar.....	31
Electroquímica de especies adsorbidas.....	31
Electroquímica en solución.....	31
Espectroscopia SERRS.....	31
3.10. Exposición a oxidantes para evaluar nitración y polimerización...	32
Exposición a peroxinitrito.....	32
Exposición a peróxido de hidrógeno más óxido nítrico o nitrito.....	32
3.11. Análisis de Western Blot.....	32
Western Blot anti nitro-tirosina.....	33
Western Blot anti citocromo c.....	33
3.12. Análisis de Western Blot anti MnSOD humana.....	33
Western Blot anti nitro-tirosina.....	34
Western Blot anti cola de histidina.....	34
3.13. Respiración de mitoplastos.....	34
Preparación de mitoplastos depletados de citocromo c....	34
Medida de respiración mitocondrial.....	35
Medida de actividad citocromo oxidasa.....	35
3.14. Activación del apoptosoma.....	35
3.15. Síntesis de citocromo c nitrado de forma co-traducciona.....	36
3.16. Síntesis de citocromo c marcado con N ¹⁵	36
3.17. Expresión de citocromo c humano.....	37
Abreviaturas.....	37
4. Resultados y discusión.....	38
4.1. Expresión y caracterización de los mutantes de citocromo c.....	38
4.1.1. Expresión de citocromos recombinantes.....	38
4.1.2. Espectros de absorción de los citocromos c.....	41
4.1.3. Espectros de NMR paramagnético de los citocromos c.....	43
4.1.4. Caracterización bioquímica de los mutantes.....	45
Conclusiones parciales: 4.1. Expresión y caracterización de los mutantes de citocromo c.....	47

4.2. Determinación de valores de pKa para transición alcalina y potencial de reducción estándar.....	48
4.2.1. Determinación de pKa de la transición alcalina de los citocromos mono-nitrados.....	48
4.2.2. Determinación de pKa de la transición alcalina de los citocromos mutantes.....	55
4.2.3. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	59
4.2.4. Titulación por pH del mutante M80A.....	61
4.2.5. Determinación de los valores de potencial de reducción estándar.....	62
Conclusiones parciales: 4.2. Determinación de valores de pKa para transición alcalina y potencial de reducción estándar.....	67
4.3. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peroxinitrito.....	72
4.3.1. Nitración inducida por peroxinitrito.....	72
4.3.2. Polimerización inducida por peroxinitrito.....	73
Conclusiones parciales: 4.3. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peroxinitrito.....	76
4.4. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peróxido de hidrógeno más óxido nítrico o nitrito.....	78
4.4.1. Nitración inducida por H ₂ O ₂ más óxido nítrico o nitrito.....	78
4.4.2. Polimerización inducida por H ₂ O ₂ más óxido nítrico o nitrito.....	79
Conclusiones parciales: 4.4. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peróxido de hidrógeno más óxido nítrico o nitrito.....	81
4.5. Impacto en las actividades biológicas del citocromo c.....	84
4.5.1. Transferencia de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial.....	84
4.5.2. Activación del apoptosoma.....	89
Conclusiones parciales: 4.5. Impacto en las actividades biológicas del citocromo.....	91
4.6. Expresión de otras formas de citocromo c.....	95
4.6.1. Expresión de citocromo c nitrado co-traduccionalmente.....	95
4.6.2. Expresión de citocromo c marcado con N ¹⁵	100
4.6.3. Expresión de citocromo c humano.....	102

Conclusiones parciales: 4.6. Expresión de otras formas de citocromo <i>c</i>	105
5. Conclusiones generales y perspectivas.....	106
6. Publicaciones.....	109
7. Anexo 1.....	111
8. Referencias.....	114
9. Agradecimientos.....	135

Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema estructural del citocromo <i>c</i>	4
Figura 1.2. Esquema de las principales funciones del citocromo <i>c</i>	6
Figura 1.3. Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial...	7
Figura 1.4. Esquema del mecanismo de transferencia electrónica por el citocromo <i>c</i>	8
Figura 1.5. Esquema del mecanismo de desencadenamiento de la apoptosis.	10
Figura 1.6. Rutas de descomposición y reacciones del peroxinitrito.....	15
Figura 1.7. Esquema de la 3-nitrotirosina.....	15
Figura 1.8. Consecuencias biológicas de la nitración de proteínas mitocondriales por peroxinitrito.....	16
Figura 1.9. Efectos fisiológicos de la nitración del citocromo <i>c</i>	19
Figura 4.1. Expresión de los distintos mutantes de citocromo.....	39
Figura 4.2. Espectros de absorción de los citocromos <i>c</i> mutantes en tirosina..	41
Figura 4.3. Espectros de absorción del citocromo <i>c</i> nativo y M80A.....	42
Figura 4.4. Espectros de ¹ H NMR de los citocromos <i>c</i>	44
Figura 4.5. Espectros de ¹ H NMR de los citocromo M80A.....	45
Figura 4.6. Estudio bioquímico de los citocromos.....	46
Figura 4.7. Purificación de formas mono-nitradas de citocromo <i>c</i>	49
Figura 4.8. Titulación por pH de los nito-citocromo <i>c</i> seguida por NMR ¹ H.....	50
Figura 4.9. Ajuste de la titulación por pH de los nito-citocromo <i>c</i> seguida por NMR.....	51
Figura 4.10. Titulación por pH de los nito-citocromo <i>c</i> seguida por absorción a 695 nm.....	52

Figura 4.11.	Titulación por pH de los nito-citocromo <i>c</i> seguida por resonancia Raman a 413 nm.....	53
Figura 4.12.	Espectros de ¹ H NMR de los citocromos <i>c</i> Y48F, Y74F e Y97F a distintos pH.....	55
Figura 4.13.	Espectros de ¹ H NMR del citocromo <i>c</i> Y67F a distintos pH.....	58
Figura 4.14.	Titulación por pH de los citocromos mutantes seguida por absorción a 695 nm.....	56
Figura 4.15.	Titulación por pH el citocromo <i>c</i> nativo e Y67F seguida por resonancia Raman.....	57
Figura 4.16.	Espectros de dicroísmo circular de NO ₂ -Y74 e Y67F citocromo <i>c</i> ...	60
Figura 4.17.	Titulación por pH de citocromo M80A seguida por ¹ H NMR.....	61
Figura 4.18.	Voltagramas cíclicos a distintas velocidades de barrido.....	63
Figura 4.19.	Determinación del potencial de reducción estándar por Resonancia Raman.....	64
Figura 4.20.	Comparación de estructuras a pH neutro y alcalino.....	68
Figura 4.21.	Mecanismo propuesto para la ruptura del enlace Met80-Fe por la nitración de la Tyr74.....	69
Figura 4.22.	Esquema de los valores de potencial redox.....	71
Figura 4.23.	Nitración del citocromo <i>c</i> inducida por peroxinitrito.....	72
Figura 4.24.	Polimerización del citocromo <i>c</i> inducida por peroxinitrito.....	73
Figura 4.25.	Nitración y polimerización del citocromo <i>c</i> Y74,97F inducida por peroxinitrito.....	74
Figura 4.26.	Nitración y polimerización del citocromo <i>c</i> recombinante, comercial y cuádruple mutante en tirosinas inducida por peroxinitrito.....	75
Figura 4.27.	Esquema del mecanismo de polimerización del citocromo <i>c</i> inducida por peroxinitrito.....	77
Figura 4.28.	Nitración del citocromo <i>c</i> inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de nitrito.....	78
Figura 4.29.	Nitración del citocromo <i>c</i> inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de óxido nítrico.....	79
Figura 4.30.	Polimerización del citocromo <i>c</i> inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de nitrito.....	80
Figura 4.31.	Polimerización del citocromo <i>c</i> inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de óxido nítrico.....	80
Figura 4.32.	Perfil de nitración del citocromo <i>c</i> inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia a H ₂ O ₂ en presencia de NO ₂ ⁻ o [•] NO.....	82
Figura 4.33.	Respiración dependiente de succinato de los citocromos mutados	85

Figura 4.34.	Respiración dependiente de succinato para el citocromo <i>c</i> de caballo comercial.....	86
Figura 4.35.	Respiración dependiente de succinato del citocromo Y67F.....	87
Figura 4.36.	Actividad citocromo oxidasa.....	89
Figura 4.37.	Actividad caspasa 3 en citosol de células Jurkat.....	90
Figura 4.38.	Esquema del mecanismo propuesto para la transferencia de electrones entre los complejos III y IV.....	92
Figura 4.39.	Estudio evolutivo de genes de citocromo <i>c</i> eucariota.....	93
Figura 4.40.	Expresión de Mn-SOD humana nitrada co-traduccionalmente.....	97
Figura 4.41.	Expresión de citocromo <i>c</i> en vector inducible por L-arabinosa.....	98
Figura 4.42.	Expresión de citocromo <i>c</i> nativo y NO ₂ -Y67 y NO ₂ -Y74 genéticamente codificados.....	100
Figura 4.43.	Espectros de masa de los citocromos <i>c</i> recombinante.....	102
Figura 4.44.	Alineación de secuencia aminoacídica entre citocromo <i>c</i> de caballo y humano.....	103
Figura 4.45.	Expresión de citocromo <i>c</i> humano en vector inducible por L-arabinosa.....	104
Figura 7.1.	Caracterización del mutante de citocromo <i>c</i> E66Q.....	112
Figura 7.2.	Determinación del pKa de la transición alcalina del mutante E66Q	112

Índice de tablas

Tabla 1.1.	Principales modificaciones nitro-oxidativas estudiadas en el citocromo <i>c</i> y su impacto en su estructura y función.....	22
Tabla 2.1.	Condiciones de expresión de los distintos mutantes de citocromo <i>c</i> ..	27
Tabla 4.1.	Rendimiento de purificación de los distintos mutantes de citocromo <i>c</i>	40
Tabla 4.2.	Valores de pKa de transición alcalina para los citocromos mono-nitrados medidos por 3 técnica diferentes.....	54
Tabla 4.3.	Valores de pKa de transición alcalina para los citocromos mutantes medidos por 2 o 3 técnica diferentes.....	59
Tabla 4.4.	Valores de potencial redox para 3 técnicas diferentes.....	64
Tabla 4.5.	Relación de respiración dependiente de succinato de los citocromos mutados.....	88
Tabla 4.6.	Composición del medio mínimo optimizado para la expresión de citocromo <i>c</i>	96

Resumen

El citocromo *c* es una hemo proteína mitocondrial que participa en al menos dos procesos celulares críticos: la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y la iniciación de la apoptosis, cuando es liberado al citosol.

En su estructura se destaca un grupo hemo que se encuentra hexa-coordinado, siendo la His18 y la Met80 la quinta y sexta posición de coordinación, respectivamente. También se destacan 4 tirosinas altamente conservadas entre especies: dos cercanas al hemo (Tyr48 y Tyr67) y dos más expuestas al solvente (Tyr74 y Tyr97). Entre las modificaciones post-traduccionales que puede sufrir el citocromo se encuentra la nitración de estas tirosinas, y ha sido determinado que la nitración de la Tyr74 (que es una de las primeras que se nitra por el tratamiento con peroxinitrito) provoca un desplegado parcial del citocromo *c*, con sustitución de la Met80 por alguna lisina. Este cambio conformacional genera un aumento en la actividad peroxidasa, junto con una incapacidad de transportar electrones y de activar el apoptosoma. La coordinación del hemo también puede ser alterada en otras condiciones fisiológicas, como la unión a cardiolipina. Además, el enlace Met80-Fe puede romperse al aumentar el pH, en un proceso denominado transición alcalina ($pK_a = 9,3$).

En este trabajo estudiamos el rol de cada una de las 4 tirosinas, de la nitración sitio específica y de la coordinación del hemo en la estructura y funciones del citocromo *c*. Para esto generamos distintos mutantes del citocromo *c* y estudiamos varias de sus propiedades físico químicas, validando su uso como un buen modelo para realizar estudios mecanísticos.

Como caracterización de la conformación y estabilidad del grupo hemo se estudió el pK_a de la transición alcalina. Se destaca que el NO_2 Tyr74 citocromo *c* tiene una transición alcalina más temprana, mientras que el mutante Y67F presenta una transición muy tardía con un pK_a mayor a 11 unidades. Proponemos que la nitración de la Tyr74 genera una perturbación en el bucle que va de los aminoácidos 70 a 85 (Ω loop), que interfiere con la red de puentes de hidrógeno formados con el Glu66 y la Tyr67, que es lo que determina la ruptura del enlace Met80-Fe.

Además se determinaron los valores de potencial redox y se observó que, excepto el mutante en la Met80, que tiene un potencial redox muy negativo, ninguna de las mutaciones ni nitraciones afecta en gran medida este valor. A pesar de esto, se encontró que el citocromo mutante en la Tyr67, al igual que el NO_2 Tyr74, es incapaz

de transportar electrones por la cadena respiratoria. Otra vez se ve que la perturbación en el bucle 70-85 genera un movimiento cercano al hemo, y nuestros resultados apuntan a que la formación de un radical centrado en la Tyr67 es esencial para el mecanismo de transporte de electrones a través del citocromo *c* hacia la citocromo oxidasa.

Cuando estudiamos la nitración y polimerización por la exposición a oxidantes observamos que todos los mutantes de tirosina por fenilalanina presentaron menor nitración que el citocromo salvaje, pero los mutantes en las Tyr48 y Tyr67 presentaron también menos formación de agregados como fuera revelado por western blot anti-nitro-tirosina y anti-citocromo *c*. Propusimos un mecanismo a través del cual el peroxinitrito nitrifica en primer lugar las tirosinas más externas del citocromo *c*, quien debido a esta nitración adquiere una conformación más desplegada dejando las tirosinas que inicialmente estaban más internas, más accesibles para reaccionar con otros radicales y favorecer la polimerización del citocromo. Por la oxidación por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno más nitrito u óxido nítrico, la formación de radicales se da en las tirosinas cercanas al hemo, generando una nitración y polimerización que involucran estas tirosinas, junto con una nitración en la Tyr97.

1. Introducción

1.1. Generalidades del citocromo c

El citocromo *c* es una hemoproteína mitocondrial de aproximadamente 12.5 kDa, que se encuentra en una concentración > 1 mM en el espacio intermembrana (1), donde participa al menos en dos procesos celulares críticos: 1) en la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria, aceptando electrones desde la ubiquinona-citocromo *c* reductasa y transfiriéndoselos a la citocromo *c* oxidasa (2-4); y 2) es un participante clave en la apoptosis (muerte celular programada), al liberarse de la mitocondria al citosol llevando a la activación del apoptosoma al unirse a APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1) junto con ATP y procaspasa 9 (5,6). El citocromo también participa en el transporte de proteínas hacia la mitocondria y tiene un rol dual respecto al estado estacionario de especies reactivas del oxígeno, ya que puede actuar tanto como productor o atrapador de las mismas (7).

El citocromo *c* se encuentra unido a la membrana mitocondrial interna hacia el lado del espacio intermembrana. El citocromo *c* se une a los fosfolípidos a través de al menos dos sitios específicos (8,9). Dado que el citocromo *c* tiene un punto isoeléctrico cercano a 10 unidades de pH, debido a la presencia de 9 residuos de lisina altamente conservados que generan en la proteína tridimensional un parche de cargas positivas, la mayor parte del citocromo se encuentra unido a la membrana mediante interacciones electrostáticas. Si bien la mayor parte del citocromo se encuentra débilmente unido a las mismas, una fracción (aproximadamente 15%) se encuentra más fuertemente unido a fosfolípidos aniónicos, tales como la cardiolipina (10-12). La unión del citocromo *c* a las membranas involucra interacciones tanto electrostáticas, como hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno (10,11).

El citocromo *c* es codificado por ADN nuclear y sintetizado como un precursor que posee una pre-secuencia N-terminal de 61 aminoácidos. Dentro de esta pre-secuencia se encuentra una región que dirige al citocromo a la matriz mitocondrial, y es cortada por una proteasa cuando el citocromo se inserta en la membrana interna. Posteriormente se produce la unión covalente del grupo hemo a la apoproteína, reacción catalizada por la enzima citocromo *c* hemo liasa, generando un cambio conformacional que lleva al corte del resto de la pre-secuencia por una segunda proteasa (13).

El citocromo *c* de caballo está compuesto por una única cadena polipeptídica de 104 aminoácidos, con el grupo hemo unido covalentemente a las Cys14 y 17, dentro de una cavidad formada por aminoácidos altamente conservados entre especies (14).

El hierro hémico del citocromo *c* se encuentra hexacoordinado, siendo los residuos de His18 y Met80 la quinta y sexta posición de coordinación, respectivamente (15) (Fig. 1.1); y puede encontrarse tanto como Fe^{2+} o Fe^{3+} , con un potencial de reducción estándar (E^0) característico de + 260 mV (16,17).

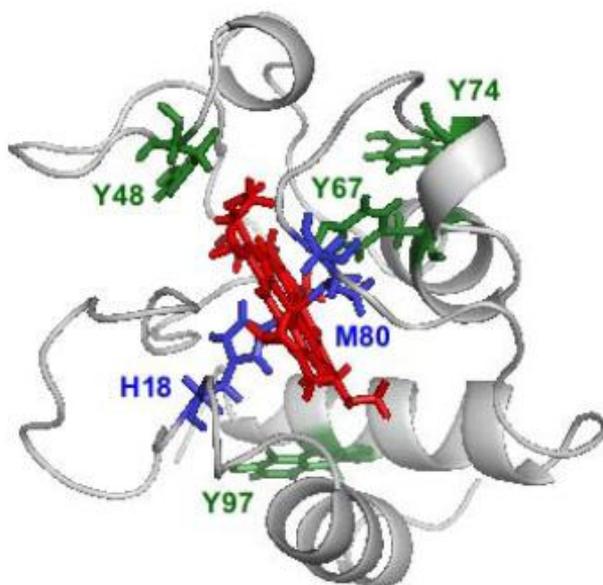


Figura 1.1. Esquema estructural del citocromo *c* mostrando residuos relevantes, como los aminoácidos que coordinan el hemo (His18 y Met80), y las 4 tirosinas conservadas. La estructura del citocromo *c* fue obtenida del Protein Data Bank, y la estructura realizada utilizando el programa Pymol (<http://pymol.sourceforge.net>).

Estas propiedades redox del hierro hémico son fundamentales para el desarrollo de las distintas actividades biológicas del citocromo *c*, ya que son las que le permiten al citocromo transferir electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria; y, si bien no están directamente relacionadas con su capacidad de activar el apoptosoma en el citosol, son las que permiten que el citocromo oxide selectivamente a la cardiolipina de membrana a la cual se encuentra unido, siendo este proceso fundamental para su liberación al citosol, donde ejerce su rol como efector de la apoptosis (18,19).

Esta estructura de coordinación del hemo del ferricitocromo *c* (citocromo c^{3+}) no es completamente rígida y puede variar con el pH, habiéndose descrito al menos 5 conformaciones distintas en un rango de pH entre 1 y 12 (20-22). La transición que ocurre entre la forma “neutra” (la forma predominante a pH 7) y la forma que se encuentra a pH alcalino recibe el nombre de “transición alcalina” (con un pKa característico de 9.3) (23-29) e involucra la pérdida de la coordinación entre el hierro hémico y la Met80, y su reemplazo por ligandos mas débiles, posiblemente la Lys72, Lys73 o Lys79 (23,24,28,30-32), que hacen que el hemo este más accesible al solvente o moléculas que puedan reaccionar con él.

Transformaciones análogas a la alcalina también puede darse a pH fisiológicos, por ejemplo mediante la asociación del citocromo *c* con fosfolípidos mitocondriales tales como la cardiolipina (8,33-35); la fosforilación de la Tyr48, tal como ha sido demostrado mediante el uso de fosfomiméticos en esa posición (36); o por mutaciones en la secuencia primaria del citocromo *c*, por ejemplo en su residuo de Phe82, ya sea por serina, glicina, leucina o isoleucina (28). Se ha observado que el citocromo *c* en su estado más desplegado, similar al “alcalino” tiene importantes implicancias en procesos celulares claves como la apoptosis celular (18).

Por otra parte, se destacan en la secuencia primaria del citocromo *c* de mamífero cuatro tirosinas una interna (Tyr67), una intermedia (Tyr48) y dos más accesibles al solvente (Tyr74 y Tyr97) (20) (Fig 1.1). Estas tirosinas son altamente conservadas entre especies, tal como lo muestra un trabajo realizado en el 2011 por Kapralov y colaboradores (19). En este trabajo se utilizaron secuencias de 406 proteínas de la familia del citocromo *c* en eucariotas que fueron alineadas para estudiar la conservación durante la evolución de cada una de las distintas tirosinas. Las 4 tirosinas del citocromo *c* de caballo mostraron ser altamente conservadas en la escala evolutiva, en especial la Tyr67, que aparece mutada solo en casos excepcionales, y únicamente por fenilalanina. La Tyr67 presenta una conservación similar a las Cys13 y Cys17, y a la His18, responsables de la coordinación del grupo hemo. No es sorprendente que esta tirosina sea la más conservada, ya que no solo se encuentra muy cercana al grupo hemo (4 Å) sino que también se encuentra en una orientación optima para reaccionar con él, ubicándose en las proximidades de la Met80, sexta posición de coordinación del hemo (19), por lo que podría tener un rol clave en la señalización desde y hacia el grupo hemo, fundamental para llevar a cabo las importantes funciones del citocromo *c*. El citocromo *c* de humano tiene además una quinta tirosina (Tyr46) pero este residuo tiene muy baja conservación evolutiva.

1.2. Funciones del citocromo c

El citocromo c es una proteína fundamental en el metabolismo celular. Tanto es así que los ratones que no expresan esta proteína no son compatibles con la vida, muriendo a la mitad del período gestacional (37). Mutantes sin citocromo c en *Arabidopsis* también mostraron severos trastornos en las primeras semanas del desarrollo embrionario (38).

El citocromo c tiene diversas funciones que están involucradas en la viabilidad de la célula, como es el transporte de electrones en la cadena respiratoria, un rol como antioxidante y la participación en un sistema de transporte de proteínas hacia la mitocondria. Por otro lado el citocromo c también tiene roles en situaciones de daño, o incluso muerte celular, en las cuales participa en la formación de oxidantes, peroxidación de lípidos de membrana e inducción de la apoptosis (7). Las principales funciones del citocromo c se esquematizan en la figura 1.2.

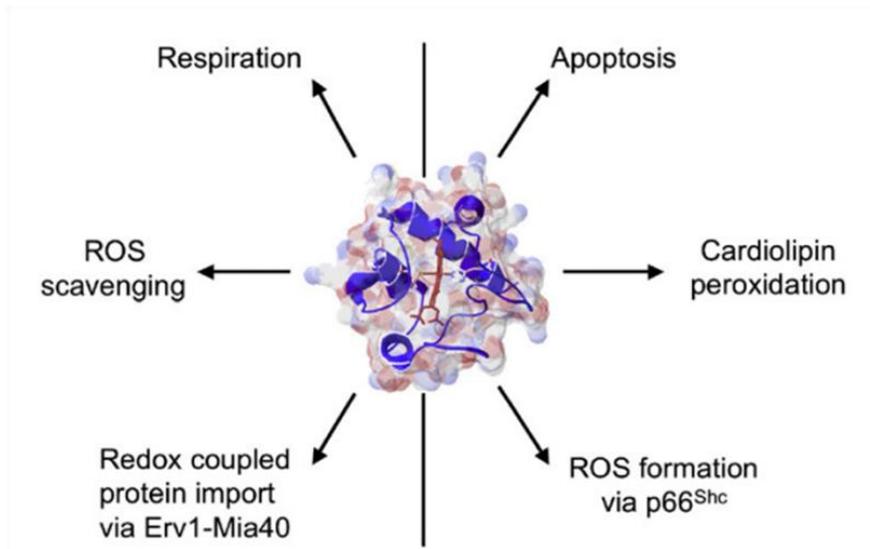


Figura 1.2. Esquema de las principales funciones del citocromo c.

A la izquierda de la figura se ven las funciones del citocromo c que tienen que ver con la vida de la célula: la participación en la respiración mitocondrial, el atrapamiento de especies reactivas del oxígeno y la acción acoplada con las proteínas importadoras Erv1-Mia40. A la derecha se esquematizan las funciones que están implicadas en procesos de deterioro y muerte celular: participación en la formación de especies reactivas del oxígeno, la peroxidación de cardiolipina y la muerte celular programada. *Extraída de Hüttemann, 2011, Mitochondrion.*

Cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Probablemente el rol mejor descrito del citocromo *c* es el de transporte de electrones por la cadena de respiración mitocondrial (Fig. 1.3).

Las mitocondrias son el principal sitio de control bioenergético de la célula, ya que son organelos capaces de acoplar la energía utilizada en el transporte de electrones para sintetizar ATP. El pasaje de electrones provenientes de los equivalente de reducción NADH y FADH₂, por los 4 complejos de la cadena respiratoria es el que genera el gradiente de protones que es utilizado por el complejo V para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (39) (Fig. 1.3).

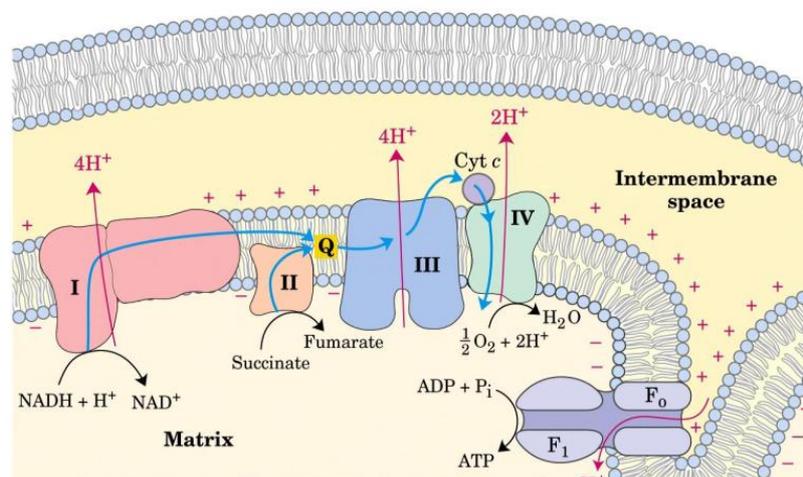


Figura 1.3. Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. *Extraída de Lenhinger, 2008, 5^a edición.*

Dado su capacidad de pasar entre los estados férrico y ferroso dentro de la célula, el citocromo *c* actúa como puente de electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria.

El complejo III de la cadena respiratoria (también llamado complejo bc1, o ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa) es un complejo multiproteico transmembrana que capta dos electrones de la ubiquinona reducida y se los transfiere de a uno al citocromo *c*. La estructura del complejo permite que, a medida que los electrones pasan desde la ubiquinona reducida al citocromo *c*, se produzcan cambios conformacionales que

permiten el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Fig 1.4).

Posteriormente, el citocromo *c* transfiere sus electrones al complejo IV (o complejo citocromo oxidasa) que a su vez, una vez que captó 4 electrones del citocromo *c*, los transfiere al O_2 para formar dos moléculas de agua. El complejo 4, también utiliza este movimiento para bombear protones hacia el espacio intermembrana (Fig. 1.4).

Estos bombeos de protones, junto con el del complejo I, generan un gradiente de protones transmembrana que da lugar a la formación de un gradiente químico-eléctrico, cuya energía de disipación se utiliza para la síntesis de ATP (39).

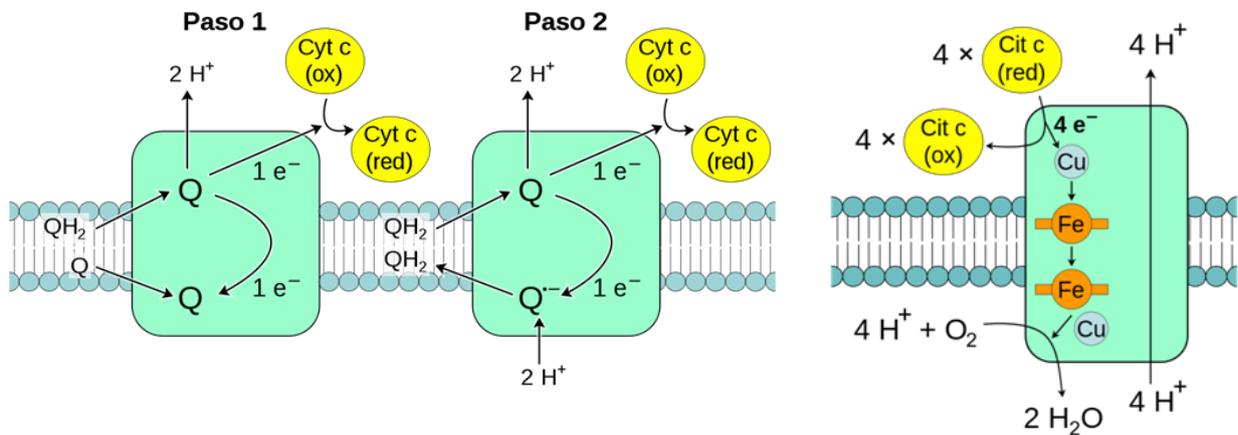


Figura 1.4. Esquema del mecanismo de transferencia electrónica por el citocromo *c*. A la derecha se observa la transferencia de electrones desde el complejo III al citocromo *c*. Mientras que a la izquierda se muestra la transferencia de electrones por el complejo IV. *Extraída de: wikipedia: citocromo c y fosforilación oxidativa*

Actividad peroxidasa

El citocromo *c* también tiene una actividad peroxidasa cuando reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (1). En condiciones estructurales en las que el hemo se encuentra coordinando con la Met80 el citocromo presenta una actividad peroxidasa de baja eficiencia catalítica, pero cuando el enlace Fe-Met80 se rompe se produce un importante aumento de la actividad peroxidasa del citocromo *c*. En condiciones fisiológicas, esta disrupción de la sexta posición de coordinación del hemo, con el consecuente aumento de actividad peroxidasa, se da por la unión del citocromo *c* a

fosfolípidos aniónicos como la cardiolipina (40), que generan un importante movimiento del loop formado por los aminoácidos 40-57, rompiendo las interacciones formadas entre estos aminoácidos y el grupo hemo, y aumentando la actividad peroxidasa del citocromo *c* (41). Este citocromo fuertemente unido a la cardiolipina, con alta actividad peroxidasa, es incapaz de transportar electrones (11).

Como veremos en la siguiente sección esta actividad peroxidasa aumentada tiene una importante implicancia en el inicio de la apoptosis, por su capacidad de iniciar una cascada de peroxidación en la membrana mitocondrial interna (1,18,40). Además, esta actividad peroxidasa del citocromo *c* lleva a la oxidación del hemo y aminoácidos adyacentes, incluyendo algunas tirosinas (42-45), que serán centro de estudio de este trabajo.

Activación del apoptosoma

Cuando es liberado de la mitocondria al citosol el citocromo *c* deja de participar en esta función fundamental para la vida celular y pasa a desencadenar la vía de la muerte celular programada (apoptosis) (Fig. 1.5). Esta vía de activación de la apoptosis dependiente de citocromo *c* se conoce como “vía mitocondrial de activación de la apoptosis” o “vía intrínseca” para diferenciarla de la “vía extrínseca” que se desencadena por señales extracelulares y no depende de la liberación del citocromo *c*.

La importancia del citocromo *c* en la activación del apoptosoma queda demostrada en un trabajo en el que generan una línea celular sin citocromo *c*, que muestra una marcada reducción de la activación de caspasa-3 cuando es tratada con estímulos pro-apoptóticos (37).

Cuando la célula recibe una señal que le indica que debe morir por apoptosis, una serie de proteínas pro-apoptóticas de la familia de las Bcl-2 (Bax y Bak), asociadas a un canal aniónico dependiente de voltaje generan poros en la membrana mitocondrial externa que permite la liberación de varias proteínas, incluyendo el citocromo *c*, desde el espacio intermembrana al citosol (46-48).

Esta liberación del citocromo *c* depende de su interacción con la cardiolipina y su actividad peroxidasa. En una primera etapa la cardiolipina migra hacia el lado externo de la membrana mitocondrial interna (49,50), pasando de ser un 20% de la composición de lípidos de la membrana a ser un 40% (51), y el citocromo forma un fuerte complejo con ella, que aumenta la actividad peroxidasa del citocromo *c* (52), y

lleva a la peroxidación específica de la cardiolipina (53,54). Esto genera la disociación del citocromo *c*, que no tiene tanta afinidad con la cardiolipina oxidada (55,56) y puede ser liberado al citosol, con ayuda de la cardiolipina que participa en la permeabilización de la membrana (18,57).

La liberación del citocromo *c* al citoplasma resulta en la asociación del citocromo *c* con el receptor del inositol-3-fosfato, que pasa a actuar como un canal de calcio en la membrana externa del retículo endoplasmático. La liberación del calcio al citoplasma es un punto clave en la inducción de la apoptosis (58).

En el citosol el citocromo *c* también activa la formación del el apoptosoma estableciendo un complejo con APAF-1, procaspasa-9 y ATP, que lleva a la activación de la caspasa-9 que, a su vez, es capaz de activar otras caspasas efectoras como las caspasas-3, -6 y -7, que son los pasos finales para el desencadenamiento de la apoptosis (5,6,59).

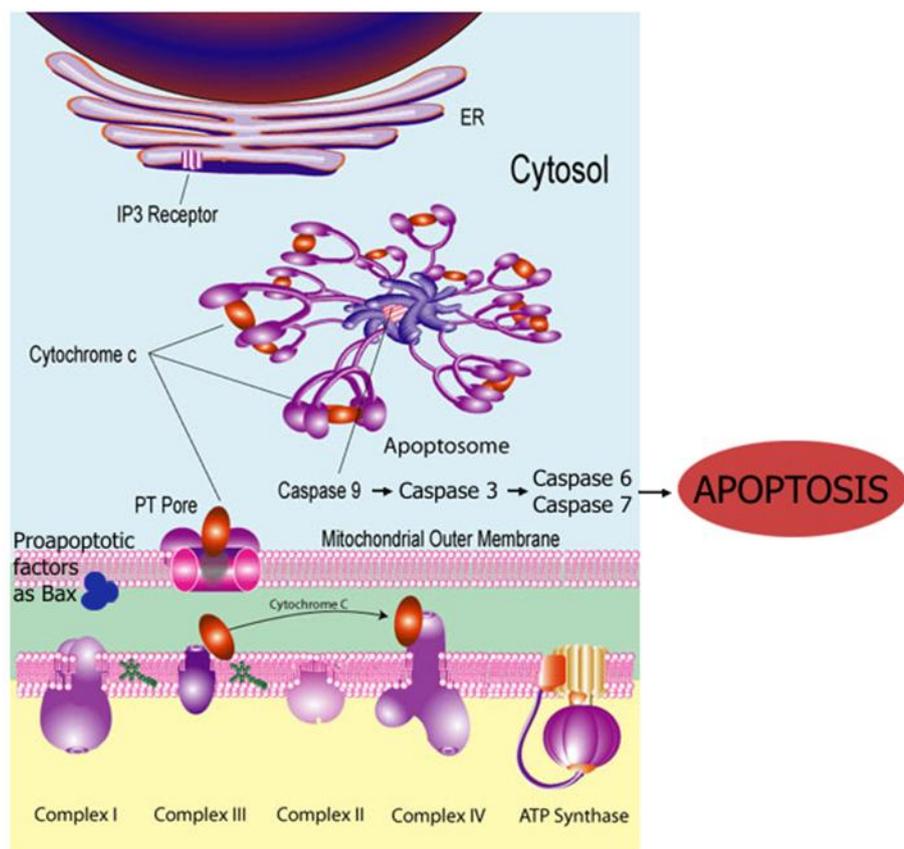


Figura 1.5. Esquema del mecanismo de desencadenamiento de la apoptosis. Se muestra esquemáticamente la liberación del citocromo *c* al citosol, la formación del apoptosoma y la activación de la apoptosis. *Extraída y modificada de Sigma-Aldrich, cytochrome c.*

La unión del citocromo *c* con APAF-1 está muy bien caracterizada, mostrando que los residuos 7, 25, 39, 62-65, y 72 del citocromo están implicados en esta interacción (60), siendo de gran relevancia el residuo de Lys72, ya que mutantes en este residuo son incapaces de activar el apoptosoma (60,61). Además, se ha visto que la estructura del citocromo *c* es fundamental para su capacidad de activar el apoptosoma, ya que citocromos mutantes M80A (62), o citocromos nitrados en la Tyr74 (63,64) son incapaces de promover la apoptosis.

Acción sobre sistema de proteínas importadoras Erv1-Mia40

Del proteoma mitocondrial, únicamente el 1% es codificado por el ADNmt, por lo tanto la mayor parte de las proteínas son sintetizadas en el citoplasma de la célula, y las proteínas con localización mitocondrial deben ser transportadas desde el citosol hacia la mitocondria. Las proteínas Erv1y Mia40 están implicadas en la importación de proteínas ricas en cisteínas, con dominios CX₃C y CX₉C, hacia el espacio intermembrana (7,65-67). Las proteínas importadas por esta vía ingresan a la mitocondria a través del transportador TOM, ubicado en la membrana mitocondrial externa, y todas ellas requieren la formación de un puente disulfuro entre residuos de cisteína para obtener su conformación funcional.

La formación de estos puentes disulfuros está catalizada por la proteína Mia40 (65), que es posteriormente reactivada mediante su oxidación por Erv1 (68). Erv 1 es una oxidasa de sulfhidrilos dependiente de FAD que acepta un par de electrones de Mia1 y los transfiere de a uno a dos moléculas de citocromo *c*. De esta manera el rol del citocromo *c* en este sistema es el de oxidar a Erv1 para cerrar el ciclo redox (68). El citocromo *c* cede los electrones al complejo IV de la cadena respiratoria, uniendo los procesos de transporte electrónico a la respiración mitocondrial. El destino de los electrones del citocromo *c* en levaduras, cuando estas se encuentran en un metabolismo anaeróbico, no está aún determinado (69).

Si bien este mecanismo de importación proteica mitocondrial no está presente en todas las especies es muy importante en mamíferos (70).

Rol sobre especies reactivas del oxígeno: productor o atrapador

Como veremos con más detalle en la siguiente sección la cadena de transporte electrónico mitocondrial puede generar la formación de especies reactivas del oxígeno

(ROS, del inglés reactive oxygen species), que pueden llevar a daño celular e incluso provocar la muerte de la célula.

El citocromo *c* tiene un rol dual en la homeostasis celular de estas ROS, ya que puede actuar tanto como un atrapador de las mismas, evitando que reaccionen con componentes celulares críticos, o como productor de ROS, principalmente mediante el pasaje de electrones a p66^{shc} (7).

Como antioxidante, el citocromo puede aceptar electrones del superóxido (O₂⁻) para regenerar el oxígeno, que queda utilizable en la cadena de respiración mitocondrial (71,72), y también puede disminuir la formación de H₂O₂ por parte del complejo I de la cadena respiratoria, a través de la inhibición del pasaje reverso de electrones desde el succinato al NAD⁺ (71,73).

Como productor de ROS el citocromo tiene un importante rol en la regulación del sistema de la p66^{shc}. La proteína p66^{shc} se encuentra regulada por ciclos reversibles de fosforilación y desfosforilación (74,75). Cuando es fosforilada en el residuo de Ser36, p66^{shc} induce la formación de ROS, y se ha visto, en modelos de ratón, que la fosforilación de esta proteína aumenta con la edad (76).

Bajo condiciones de estrés en la mitocondria, esta proteína p66^{shc} fosforilada puede recibir electrones del citocromo *c* y producir H₂O₂, convirtiéndose en una forma regulada de producir ROS, que puede dirigir a la célula a la muerte por apoptosis, ya que el propio H₂O₂ producido puede activar la actividad peroxidasa del citocromo *c* que lleva a la oxidación de la cardiolipina (77,78).

Modelos celulares carentes de la proteína p66^{shc} presentan una menor formación de ROS y un menor consumo de oxígeno, siendo ambos eventos revertidos cuando se revierte la falta de esta proteína mediante la transfección con un vector que codifica para p66^{shc} (79,80). Como consecuencia de esta disminución en la formación de ROS, ratones carentes de p66^{shc} viven un 30% más que los ratones salvajes, y presentan una menor incidencia de enfermedades asociadas con la edad como la arteriosclerosis (81-83).

Además, tanto las células como los modelos de ratones depletados de p66^{shc} son resistentes a la apoptosis inducida por distintos estímulos (82-86), consistente con una menor peroxidación de la cardiolipina por una menor formación de H₂O₂.

1.3. Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la mitocondria y nitración proteica

Como vimos previamente, durante el metabolismo celular aeróbico se producen especies reactivas del oxígeno tales como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y radical hidroxilo ($\cdot OH$). En células eucariotas, las fuentes celulares más importantes de ROS son la cadena respiratoria mitocondrial, las enzimas microsomales citocromo P450 oxigenasas, las NAD(P)H oxidasas asociadas a la membrana plasmática y el metabolismo peroxisomal de ácidos grasos (87).

El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 pueden ser producidos durante el proceso de respiración celular. Como dijimos anteriormente, la reducción completa de oxígeno molecular (O_2) a agua implica el pasaje de cuatro electrones desde la citocromo oxidasa terminal de la cadena respiratoria. Si bien la eficiencia del pasaje de electrones por la cadena respiratoria es muy alta, se estima que el 0,1 a 0,2% del O_2 consumido por las células no se reduce a agua, sino que es reducido por uno o dos electrones a $O_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 , respectivamente (88). De esta forma, la cadena de transporte electrónico mitocondrial, a través de fuga de electrones por los complejos I y III, es una importante fuente de formación de $O_2^{\cdot-}$ (89-92), especialmente cuando se encuentra en estado 3, cuando la tasa de respiración no es muy alta (93). Aunque en condiciones celulares se pueden formar altas tasas de $O_2^{\cdot-}$ (94), el $O_2^{\cdot-}$ se mantienen en un estado estacionario de aproximadamente 1×10^{-10} M (95) gracias a la existencia de sistemas antioxidantes específicos (93,94,96). Uno de los sistemas de detoxificación de $O_2^{\cdot-}$ más específicos de la mitocondria es la Mn-SOD (97,98), que descompone al $O_2^{\cdot-}$ en O_2 y H_2O_2 , convirtiendo la detoxificación de $O_2^{\cdot-}$ en una fuente de producción mitocondrial de H_2O_2 . El H_2O_2 se estima que se encuentra en una concentración estacionaria de cerca de 5×10^{-9} M (95). Además, el H_2O_2 puede ser formado enzimáticamente en la mitocondria por acción de las enzimas glicerol-fosfato deshidrogenasa y monoamina oxidasa (99,100).

El $O_2^{\cdot-}$ es un radical que debido a sus potenciales de reducción y oxidación (-0,33 V y 0,94 V con O_2 y H_2O_2 , respectivamente) (101) puede actuar tanto como reductor o como oxidante.

El óxido nítrico ($\cdot NO$) es un radical libre centrado en el nitrógeno formado por la oxidación del aminoácido L-arginina a citrulina, catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). Se han descrito 2 isoformas constitutivas:

la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), y una forma inducible (iNOS) (102-104). También ha sido descrita una isoforma mitocondrial (mtNOS) (105,106), aunque hay evidencia que sostiene que en realidad se trata de una nNOS producto de un corte y empalme (splicing) diferencial (107,108). El $\cdot\text{NO}$ es un radical altamente difusible, que en concentraciones en el rango de pM o nM actúa como mediador en muchos procesos fisiológicos tales como la regulación del tono vascular, la neurotransmisión y la modulación de procesos inflamatorios. A concentraciones en el rango de μM (como las producidas por la iNOS), el $\cdot\text{NO}$ tiene un efecto citotóxico, reaccionando predominantemente con otras especies paramagnéticas, incluyendo el hierro de hemoproteínas o centros Fe-S, O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, radicales proteicos y lipídicos (109,110).

Sin embargo, los mecanismos de toxicidad del $\cdot\text{NO}$ se deben fundamentalmente a la formación de otras especies más oxidantes como el peroxinitrito (109,111,112).

La reacción de combinación entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ transcurre a muy altas velocidades ($k \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y da lugar a la formación de peroxinitrito anión (ONOO^-) y su ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH) ($\text{pK}_a = 6.8$). En adelante nos referiremos a ONOO^- en forma genérica, refiriéndonos tanto a la forma aniónica como a la protonada.

Se ha determinado que distintas condiciones patológicas como la diabetes, la inflamación o algunas enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas llevan a una sobre producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ que derivan en una mayor formación de ONOO^- (113-121).

El ONOO^- puede oxidar por 1 o 2 electrones ($E^\circ +1.7$ y $+1.3$ V respectivamente) biomoléculas tales como tioles de bajo peso molecular (122,123), ciertos residuos aminoacídicos como cisteína, metionina y triptófano (124), hemoproteínas (125-127), y dióxido de carbono (CO_2) (128). Esta última reacción, que presenta una gran importancia biológica dada la alta concentración de CO_2 en los medios intracelulares (~ 2 mM), da lugar a la formación del anión nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO_2^-) que se homoliza dando lugar a la formación de radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$). Finalmente, una fracción del ONOO^- ($\sim 30\%$) sufre homólisis generando $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (129,130) (Fig. 1.6).

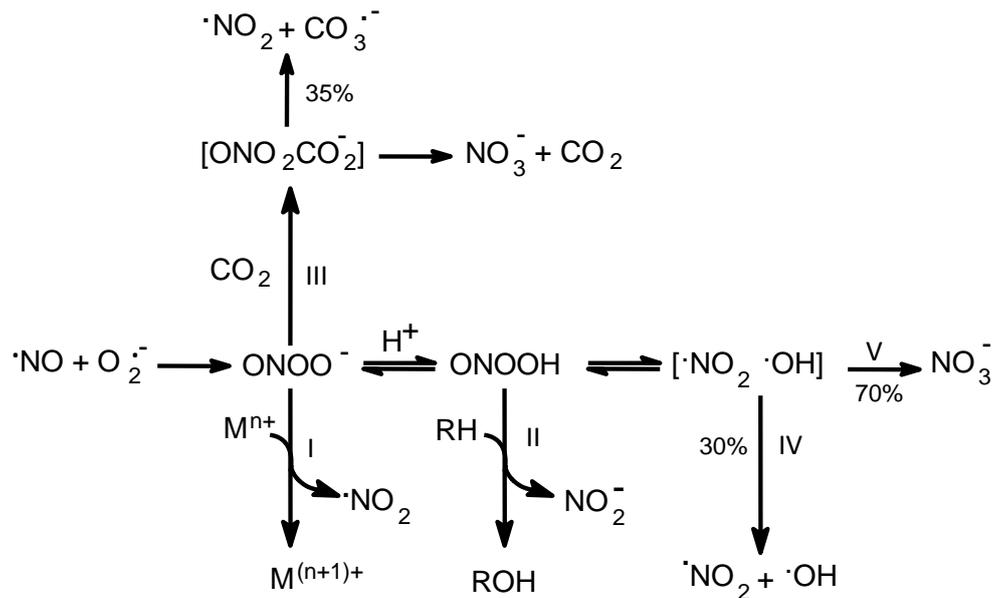


Figura 1.6. Rutas de descomposición y reacciones del peroxinitrito. La reacción controlada por difusión del $\cdot\text{NO}$ y el O_2^- da lugar a la formación de peroxinitrito anión (ONOO^-) y su ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH) ($\text{pKa} = 6.8$). El peroxinitrito puede reaccionar directamente con blancos moleculares (Rutas I y II), o puede reaccionar con CO_2 (Ruta III) para formar $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$. Una fracción del peroxinitrito (~30%) se homoliza generando $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (Ruta IV). *Figura extraída de Radi et al, 2001, Free Rad Biol Med.*

Además de oxidar biomoléculas, el ONOO^- puede actuar como agente nitrante. La nitración proteica es una modificación post-traducciona que consiste en la incorporación de un grupo nitro (NO_2) en la posición orto del anillo fenólico de los residuos tirosina de la proteína, para rendir 3-nitrotirosina (NO_2Tyr) (118) (Fig 1.7).

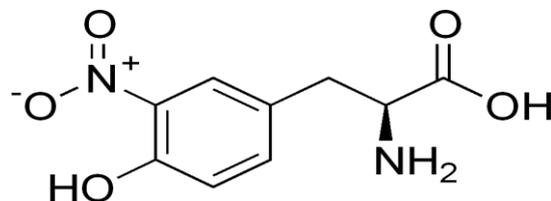


Figura 1.7. Esquema de la 3-nitrotirosina. La nitración de tirosina implica la incorporación de un grupo nitro en la posición orto del anillo fenólico de este aminoácido.

Aunque la nitración proteica *in vivo* es un proceso con un bajo rendimiento, es una importante huella de la formación y reacción de especies reactivas del nitrógeno; y puede determinar cambios en la función biológica mediante la modificación (pérdida o ganancia) de la función de las proteínas blanco (118,131) (Fig. 1.8).

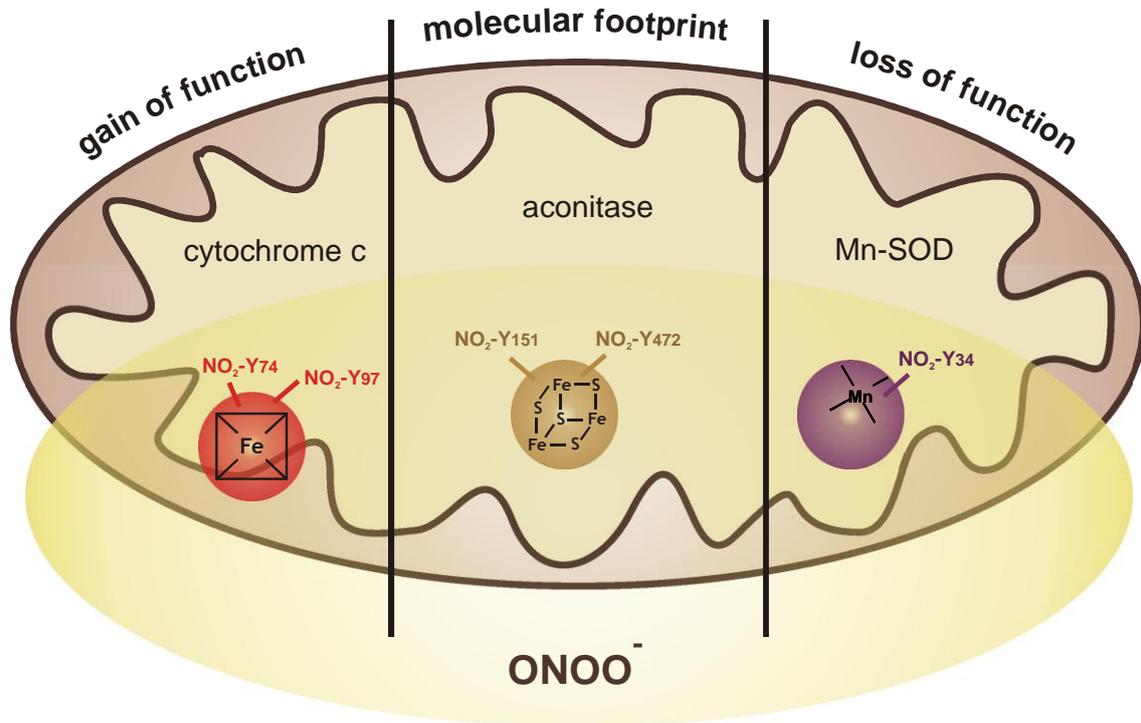


Figura 1.8. Consecuencias biológicas de la nitración de proteínas mitocondriales por peroxinitrito. La formación mitocondrial de ONOO^- da lugar a la nitración de proteína, que puede tener distintos efectos en su función. A la izquierda se esquematiza la nitración en las tirosinas del citocromo c que genera un cambio conformacional en el citocromo con una importante ganancia de función peroxidasa. En el centro se esquematiza la reacción del ONOO^- (o el radical carbonato, resultante de su reacción con CO_2) con el centro ferro-sulfurado de la aconitasa llevándola a una forma inactiva [3Fe-4S]. La aconitasa también es nitrada por radicales derivados del ONOO^- , pero la nitración no modifica la actividad de la enzima, siendo un marcador de la formación mitocondrial de ONOO^- . A la derecha se ve la reacción del ONOO^- con el centro de la MnSOD que lleva a la nitración sitio específica de la Tyr34 y la inactivación de la enzima. *Figura extraída de Castro et al, 2011, Free Radic Res.*

La pequeña cantidad de NO_2Tyr formada podría llevar a cuestionar su relevancia biológica, pero cabe destacar que es pequeño el número de proteínas que son preferentemente nitradas, y que la nitración esta focalizada en tirosinas específicas

(118). La adición de NO_2 a una tirosina disminuye el pKa de su grupo hidroxilo de 10.1 a 7.2, pudiendo llevar a alteraciones en la conformación de la proteína, derivando en la generación de epítopes antigénicos, alteración de la actividad catalítica, modulación de rutas metabólicas, e inhibición de la fosforilación de tirosinas (131).

Para tener una relevancia biológica, las modificaciones que llevan a una pérdida de función, requieren que una gran cantidad de proteína sea nitrada (118). Un ejemplo de estas proteínas es la superóxido dismutasa de manganeso mitocondrial (MnSOD), la cual se ha visto nitrada e inactivada en procesos inflamatorios tanto en modelos animales como en enfermedades humanas (132,133). Sin embargo, las modificaciones que llevan a una ganancia de función requieren de una pequeña fracción de proteína nitrada para generar un cambio biológico significativo (118). Ejemplo de esas proteínas son el citocromo c, que como ya mencionamos adquiere una fuerte actividad peroxidasa por su nitración (125,126,132); el fibrinógeno, que nitrado acelera la formación del coágulo (134); y la kinasa $C\epsilon$, cuya nitración promueve su activación y translocación (135).

Diferentes mecanismos de nitración proteica han sido propuestos *in vivo*. Los dos principales, llamados ruta del peroxinitrito y ruta de la hemo-peroxidasa, llevan a la formación simultánea de radical tirosilo (Tyr^\bullet) y dióxido de nitrógeno ($^*\text{NO}_2$), los cuales se combinan a una velocidad controlada por difusión para formar NO_2Tyr ($k = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Cuando el ONOO^- es el agente nitrante, el Tyr^\bullet se forma por la abstracción de electrones de residuos de tirosina por la acción de radicales derivados del ONOO^- (como el $^*\text{NO}_2$ o el OH^\bullet), que posteriormente reacciona con el $^*\text{NO}_2$ formado durante la hidrólisis del ONOO^- , para rendir NO_2Tyr . Alternativamente, peroxidasas tales como mieloperoxidasas o eosinofiloperoxidasas catalizan la oxidación de NO_2^- (a través de la formación del compuesto I) para dar $^*\text{NO}_2$. El $^*\text{NO}_2$ reaccionará con Tyr^\bullet formado por la propia enzima (vía compuesto II) para rendir NO_2Tyr (118).

La nitración también puede llevarse a cabo en membranas biológicas, ya sea en los lípidos o las proteínas que se encuentran en la membrana. Es importante destacar que el $^*\text{NO}$ y el $^*\text{NO}_2$, por tener carácter hidrofóbico, son capaces de concentrarse en las membranas (136,137) y así catalizar la nitración de sus componentes.

Alternativamente, dos moléculas de Tyr^\bullet pueden reaccionar entre sí formando un enlace 3,3'-ditirosina (138,139). Estos enlaces 3,3'-ditirosina pueden ser intra-moleculares, si los dos Tyr^\bullet pertenecen a la misma proteína; o inter-moleculares, si los

Tyr^r que lo forman se generaron en distintas proteínas. Estos enlaces intermoleculares son los responsables del entrecruzamiento de proteínas, ya sea con otra proteína igual o distinta a ella misma.

1.4. Modificaciones nito-oxidativas del citocromo c

El citocromo *c* es capaz de ser nitrado *in vivo*, tal como queda demostrado en diversos trabajos con modelos celulares o animales expuestos a distintas enfermedades asociadas con estrés nitro-oxidativo (117,140-142). Estudios *in vitro* realizados por nuestro y otros grupos mostraron que el citocromo *c* es capaz de nitrarse por diferentes mecanismos (143), que incluyen la reacción directa con los radicales derivados del ONOO⁻ (125,126), y la nitración por un mecanismo dependiente de nitrito (NO₂⁻) y H₂O₂ (144), o dependiente de [•]NO y H₂O₂ (145).

En dos trabajos de nuestro grupo se mostró que cuando el citocromo *c* es tratado con un exceso de ONOO⁻ se produce una nitración en la Tyr67 (126), tal como se había observado mediante el tratamiento con tetranitrometano (146,147); mientras que a bajas concentraciones de ONOO⁻, biológicamente más relevantes, aparecen dos especies mononitradas en las tirosinas más expuestas (Tyr74 y Tyr97) (125). A dosis más altas, todos los residuos de tirosina aparecen nitrados, incluyéndose formas di- y tri- nitradas que incluyen la nitración de la Tyr67 (125).

Las formas mononitradas en las Tyr74 y 97 exhiben cambios espectrales consistentes con la pérdida de coordinación de la Met80 con el grupo hemo, llevando al citocromo *c* a una forma similar a la “alcalina”, pero a pH fisiológico (Fig. 1.9 A). Esta “transición alcalina temprana” se refleja en una alteración en las funciones biológicas del citocromo *c*, que incluye un aumento en su actividad peroxidasa (125,126) (Fig. 1.9 B), siendo un ejemplo importante de una proteína a la cual la nitración le genera una ganancia de función.

Por otra parte, la nitración del citocromo *c* modifica sus propiedades redox, inhibiéndose la respiración mitocondrial cuando se reemplaza citocromo *c* nativo por citocromo *c* tratado con ONOO⁻ (64,125,126) (Fig. 1.9 C); así como inhibe su capacidad de activar al apoptosoma (64) (Fig. 1.9 D).

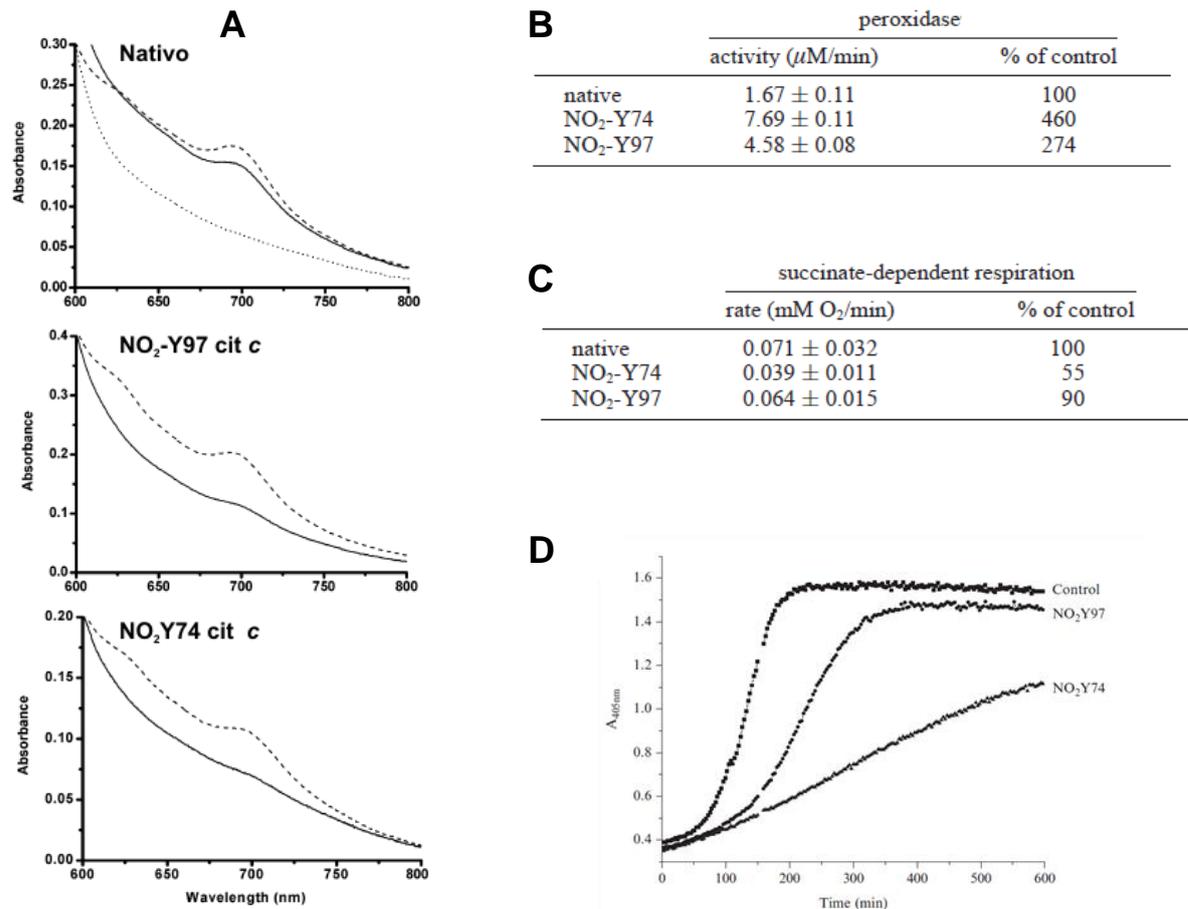


Figura 1.9. Efectos fisiológicos de la nitración del citocromo c. (A) Espectros de absorción mostrando la coordinación Met80-Fe a 695 nm, a pH 7,4 (línea sólida), pH 5,0 (línea rayada) y pH 10 (línea punteada, solo para citocromo c nativo). (B) Actividad peroxidasa de las formas mono-nitradas del citocromo c. (C) Consumo de oxígeno en mitocondrias de corazón depletadas de citocromo c. (D) Activación de caspasa-3 por las distintas formas del citocromo. Los paneles A, B y C de la figura fueron extraídos de Batthyany et al, 2005, *Biochemistry*; y el panel D de Souza et al, 2008, *Methods Enzimol*.

Trabajos de otros grupos demostraron que la nitración del citocromo humano en la Tyr48 no modifica su capacidad de transportar electrones a través de la cadena respiratoria, pero este nitro-citocromo es incapaz de activar el apoptosoma (148).

Además, como ya mencionamos, el citocromo c humano tiene una tirosina más que el de caballo (Tyr46) y se ha demostrado que esta tirosina también puede ser nitrada y esta nitración también tiene un impacto en las funciones del citocromo c (148). La nitración de este citocromo, ya sea en su Tyr46 o su Tyr48 lleva al citocromo c a una

forma de alto spin que es más rápidamente degradado por células Jurkat que el citocromo *c* salvaje (149).

Las alteraciones en la coordinación del hemo (ya sea por mecanismos oxidativos o no) también pueden llevar a cambios en la localización sub-celular del citocromo *c*. Por ejemplo, trabajos realizados en el laboratorio de la Dra. Joan Mannick (62), muestran que el citocromo *c* penta-coordinado (que posee la mutación M80A) es espontáneamente liberado de la mitocondria y transportado desde el citoplasma al núcleo. Dentro del núcleo el citocromo puede llegar a estar interactuando con el ADN (cabe destacar el carácter aniónico del ADN y el catiónico del citocromo *c*), y eventualmente estar oxidándolo por un mecanismo favorecido por la actividad peroxidasa del citocromo *c* (en especial del citocromo *c* penta-coordinado). De hecho, un estudio reciente muestra que el citocromo *c* de corazón de caballo es capaz de interactuar con segmentos de ADN (150). En células tratadas con ONOO⁻ (a dosis bajas) también se observó una translocación del citocromo *c* al núcleo, análogo a lo que ocurría con el citocromo *c* penta-coordinado sin evidencia de muerte celular (62).

En la mitocondria también puede estar operando un mecanismo de nitración dependiente de la actividad tipo peroxidasa del propio citocromo *c* (144). Ha sido bien determinado que el citocromo *c* tratado con H₂O₂ da lugar a la formación de un Tyr[•] de corta vida media, mediante la transferencia de un electrón desde un residuo de tirosina al anillo porfirínico del grupo hemo de la enzima (151). Esta formación de Tyr[•] puede estar catalizando tanto su polimerización, como su autonitración y la nitración de otras proteínas en presencia de H₂O₂ y NO₂⁻ (144,151), aumentando así el daño oxidativo. Los sitios de nitración por este mecanismo no han sido aún establecidos.

Además, este mecanismo de nitración “tipo hemoperoxidasa” del citocromo *c*, no ha podido ser completamente caracterizado ya que nunca se consiguió detectar en forma directa el complejo I. Es probable que este complejo sea muy inestable, y sea eliminado si no puede resolverse por un nuevo sustrato reductor puede llevar a la pérdida del grupo hemo. El complejo I de la hemoperoxidasa si ha sido detectado por modificaciones químicas que lo estabilizan, como la carboximetilación de la Met80 (152).

También ha sido reportado que el citocromo *c* puede ser fosforilado en residuos de tirosina (Tyr48 o Tyr97) (153,154). Si bien la protein-quinasa responsable de la fosforilación del citocromo *c* es aún desconocida, se sabe que esta fosforilación tiene importantes consecuencias sobre la función del citocromo *c*, siendo el fosfo-Tyr48-citocromo incapaz de transferir electrones a la citocromo *c* oxidasa (153-155), y su capacidad de unirse a la cardiolipina se ve notablemente disminuida (155), tal como se demostró utilizando fosfo-miméticos de citocromo *c* (sustitución de tirosina por glutamato). Además, también mediante el uso de fosfo-miméticos, se demostró que el citocromo *c* fosforilado en la Tyr48 presenta una transición alcalina temprana, y es incapaz de activar el apoptosoma (36,155), mientras que el fosforilado en la Tyr97 tiene variaciones en el entorno del hemo (153), y es mucho menos estable que el citocromo *c* salvaje (36).

El citocromo *c* también puede ser fosforilado en otros dos residuos que son la Thr28 y la Ser47 (156), aunque las consecuencias de estas fosforilaciones no están aún determinadas. A pesar de lo poco que se sabe sobre los mecanismos de fosforilación y desfosforilación, y los roles biológicos de estas modificaciones, se ha visto que la fosforilación presenta un patrón dependiente de tejido, llevando a proponer que puede tener un rol en la señalización celular, que podría constituir una nueva función del citocromo *c* (7).

Por otra parte, hay trabajos que reportan que el citocromo *c* es capaz de formar agregados poliméricos no reducibles por beta-mercaptoetanol por distintas condiciones fisiológicas (como la interacción con fosfolípidos aniónicos) (157) o patológicas, como la exposición a H₂O₂ (158). Aún más, el citocromo *c* es capaz de formar polímeros con otras proteínas como la α -sinucleína, en las placas de Lewi, y estos polímeros son dependientes de la formación de enlaces 3,3'-ditirosina (159).

Las tirosinas del citocromo *c* juegan también un rol fundamental en la apoptosis. Durante este proceso de muerte celular se ve una acumulación de productos de peroxidación de la cardiolipina, necesarios para la liberación de los factores pre-apoptóticos de la mitocondria al citosol. Se ha demostrado que esta peroxidación de la cardiolipina no se da al azar, sino que se da específicamente en complejos cardiolipina/citocromo *c*, y se ha podido detectar la formación de Tyr[•] en estos complejos (155), indicando que la transferencia de electrones hacia la cardiolipina se da por una ruta que involucra residuos tirosina del citocromo. Un trabajo realizado en

el laboratorio del Dr. Valerian Kagan, en el cual tuvimos una importante colaboración (19), mostró que la peroxidación de la cardiolipina de membrana depende directamente de la formación de un Tyr[•], en particular del que se forma con la tirosina más conservada, Tyr67.

Además de oxidar y nitrar tirosinas el estrés oxidativo puede llevar a la oxidación de otros residuos claves para la actividad del citocromo c, como la oxidación de Met80 a metionil-sulfoxido (151,160,161), resultando en un importante aumento en la actividad peroxidasa del citocromo c, y en un impedimento en su capacidad de transportar electrones a través de la cadena respiratoria (151,161), ambos efectos dados por el desplazamiento de la sexta posición de coordinación del hemo.

Por otra parte, agentes oxidantes tales como el hipoclorito (HOCl), que es generado por los neutrofilos durante procesos inflamatorios, lleva no solo a la oxidación de la Met80 sino también a la formación de otros radicales aminoacídicos, centrados fundamentalmente en residuos de lisina, y en menor medida de tirosina, que llevan a una agregación del citocromo c (151).

En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 1.1) se resumen las principales modificaciones nitro-oxidativas que han sido encontradas en el citocromo c y se resumen los principales impactos en la estructura y función del citocromo:

Tratamiento o forma de detección	Isoforma de citocromo c	Modificación	Consecuencias funcionales y/o estructurales	Referencia
Tratamiento con tetra-nitro-metano	Citocromo c de caballo	Nitración de Tyr67	* Incapacidad de transportar electrones. * Ligero aumento de la actividad peroxidasa.	Sokolovsky <i>et al</i> , Biochemistry, 1970
Tratamiento con peroxinitrito	Citocromo c de caballo	Nitración de Tyr74	* Sexta posición de coordinación parcialmente desplazada. * Aumento de actividad peroxidasa. * Incapacidad de transportar electrones. * Menos eficacia en activar el apoptosoma	Cassina <i>et al</i> , JBC, 2000. Batthyany <i>et al</i> , Biochemistry, 2005. Souza <i>et al</i> , Methods Enzymol, 2008.

		Nitración de Tyr97	<ul style="list-style-type: none"> * Ligero aumento de la actividad peroxidasa. * Pequeña disminución en la capacidad de transportar electrones. * Pequeña disminución en la capacidad de activar el apoptosoma. 	
Tratamiento con peroxinitrito	Citocromo c de ratón	Nitración en sitios no determinados	<ul style="list-style-type: none"> * Translocación del citocromo al núcleo. * No se activa el apoptosoma. 	Godoy <i>et al</i> , PNAS, 2009.
Tratamiento con peroxinitrito	Citocromo c humano	Nitración de Tyr46	<ul style="list-style-type: none"> * No tiene efecto sobre capacidad de transportar electrones. * Es incapaz de activar el apoptosoma. * Mayor susceptibilidad a ser degradado. 	García-Heredia <i>et al</i> , FEBS Lett, 2012. Días-Moreno <i>et al</i> , Biochim Biophys Acta, 2011.
		Nitración de Tyr48	<ul style="list-style-type: none"> * No tiene efecto sobre capacidad de transportar electrones. * Es incapaz de activar el apoptosoma. * Mayor susceptibilidad a ser degradado. 	
		Nitración de Tyr74	<ul style="list-style-type: none"> * Aumento de actividad peroxidasa. * Incapacidad de activar el apoptosoma. 	García-Heredia <i>et al</i> , Biochim Biophys Acta, 2010.
Tratamiento con peróxido de hidrógeno más nitrito u óxido nítrico	Citocromo c de caballo	Nitración en sitios no determinados	<ul style="list-style-type: none"> * Aumento de la actividad peroxidasa. * Capacidad de producir su auto-nitración o la nitración de otras proteínas. 	Castro <i>et al</i> , Arch Biochem Biophys, 2004. Chen <i>et al</i> , JBC, 2004.
Se aisló a partir de los órganos del animal	Citocromo c de vaca	Fosforilación de Tyr97	* Inhibición en el transporte de electrones	Lee <i>et al</i> , Biochemistry, 2006.
		Fosforilación de Tyr48	* Inhibición en el transporte de electrones	Yu <i>et al</i> , Biochim Biophys Acta, 2008.

Fosfo- miméticos (sustitución de tirosina por glutamato)	Citocromo c de vaca	Fosforilación de la Tyr48	* Disminución de la capacidad de transportar electrones. * Disminución de la afinidad por la cardiolipina. * Incapacidad de activar el apoptosoma.	Pecina <i>et al</i> , Biochemistry, 2010.
	Citocromo c humano	Fosforilación de la Tyr48	* Transición alcalina temprana. * Incapacidad de activar el apoptosoma	García-Heredia <i>et al</i> , J Biol Inorg Chem, 2011.
		Fosforilación de la Tyr97	* Disminución de la estabilidad de la proteína	
Determina- ción en músculos humanos	Citocromo c humano	Fosforilación de la Thr28	No determinado	Zhao <i>et al</i> , Molecular & cellular proteomics, 2011.
		Fosforilación de la Ser47	No determinado	
Exposición a hipoclorito	Citocromo c humano	Oxidación de Met80 a metionil- sulfóxido.	* Aumento de actividad peroxidasa.	Beck-Speier <i>et al</i> , FEBS Lett, 1988. Chen <i>et al</i> , JBC, 2002.
	Citocromo c de caballo		* Incapacidad de transportar electrones.	

2. Objetivos

Objetivo general

Estudiar los cambios estructurales y funcionales generados por modificaciones en la secuencia primaria del citocromo *c*, destacando el rol de la nitración sitio-específica, así como también el estado de coordinación de su grupo hemo.

Objetivos específicos

- Obtener mutantes de tirosina por fenilalanina, y mutantes de Met80 por alanina e isoleucina de citocromo *c* de caballo, para realizar estudios mecanísticos del citocromo *c*.
- Estudiar las distintas propiedades fisico-químicas del citocromo *c*, como los valores de pKa para la transición alcalina y el potencial de reducción estándar de los diferentes citocromos mutantes y mono-nitrados.
- Determinar el rol de las tirosinas sobre el estado conformacional y las modificaciones oxidativas post-traduccionales del citocromo *c* expuesto a distintos agentes oxidantes y nitrantes.
- Determinar el impacto de las distintas modificaciones en las actividades biológicas del citocromo *c*: actividad peroxidasa, transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial y capacidad de activar el apoptosoma.

3. Metodología

3.1. Expresión y purificación de citocromo c nativo y sus distintos mutantes

El citocromo *c* de corazón de caballo nativo fue expresado a partir del plásmido pJRhrsN2 (generosamente cedido al inicio de este trabajo por el Dr. Jon Rumbley, Chemistry Department, University of Minnesota, Duluth) que contiene resistencia a la ampicilina. Este plásmido codifica para el citocromo *c* de corazón de caballo y para la proteína hemo liasa (necesaria para la correcta inserción del hemo en el citocromo *c*), ambas bajo el control de un promotor *lac* (inducible por IPTG). Este citocromo presenta dos mutaciones respecto al citocromo de corazón de caballo que fueron introducidas para mejorar la expresión y plegamiento del citocromo *c* en los modelos de expresión bacteriana. Estas modificaciones son la sustitución de las histidinas 26 y 33 involucradas en la estabilización del citocromo *c* (162) por asparagina (H26N y H33N). En el correr de la tesis nos referiremos a este citocromo como nativo recombinante o simplemente nativo mientras que al citocromo provisto por Sigma Co. (que no tiene modificaciones en su secuencia primaria) lo denominaremos citocromo comercial.

Los distintos mutantes de citocromo *c* fueron obtenidos por mutagénesis dirigida a partir del mismo plásmido utilizando el kit “QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene.

Los plásmidos que codifican para los citocromo *c* nativo y mutantes fueron transformados en la cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3 (Invitrogen) para la expresión de las proteínas. Como algunos de los mutantes no crecían bien en esta cepa se probó la expresión en otras y al final del trabajo todos los citocromos se expresaron y purificaron en la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) que, estabilizando los ARNm que se producen en la bacteria, logran un mayor rendimiento de expresión de todos los mutantes y en algunos casos (como en el del mutante M80A), logra llevar la expresión de valores despreciables a rendimientos que permiten el trabajo con la proteína.

La expresión de los distintos citocromos fue puesta a punto para cada uno de los mutantes y se resumen en la tabla 2.1, pero en general todos los citocromos fueron purificados siguiendo el protocolo de Rumbley y colaboradores, con pequeñas modificaciones (163). Para esto se crece un precultivo de bacterias de 25 ml en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina durante toda la noche y se inocula en 0,5 a 1 litro de medio Terrific suplementado con el mismo antibiótico. El cultivo es

crecido bajo agitación vigorosa por varias horas, hasta que la absorbancia a 550 nm llegue a 0,8 unidades y la expresión del citocromo *c* se induce con el agregado de 0 a 0,5 mM IPTG. El cultivo se crece por 12 a 50 horas a 28 a 37° C (ver tabla 2.1).

Citocromo	Cantidad de Terrific (l)	IPTG (mM)	Tiempo de crecimiento (hs)	Temperatura de inducción (°C)
Nativo	1	0,8	50	30
Y48F	1	0,8	50	30
Y67F	1	0,5	50	30
Y74F	1	0,5	50	30
Y97F	0,5	0,5	50	30
Y74,97F	0,5	0,5	40	30
Y a F	0,5	0,5	40	30
E66Q	1	0	50	37
M80A	0,5	0,25	12	28

Tabla 2.1. Condiciones de expresión de los distintos mutantes de citocromo *c*.

Las células se cosechan por centrifugado y se resuspenden en 20 ml por litro de cultivo de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, suplementado con unos cristales de ADNasa y PMSF 1 mM, y se lisan por sonicado en un baño de hielo. Los restos celulares se remueven por centrifugación a 10.000 g por 10 minutos y el lisado se somete a una precipitación con sulfato de amonio 55% por media hora en frío. Las proteínas que precipitan se separan por una nueva centrifugación a 10.000 g por 10 minutos y el sobrenadante, que contiene al citocromo *c*, se dializa durante toda la noche contra buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,5, realizando 2 cambios de buffer. El citocromo *c* se pega a una columna de CM-Sepharose fast-flow (Amersham Biosciences) equilibrada con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,5. Posteriormente el citocromo se eluye con un gradiente de 80 a 300 mM de NaCl en el mismo buffer y las fracciones con una relación de absorbancia 410/280 nm igual o mayor a 4.0 se consideran puras y se juntan y concentran eliminando al mismo tiempo la sal utilizada en el gradiente de elución. La pureza de las muestras que se determina por la relación de absorbancia

entra la banda de Soret y la longitud de onda a la que absorben todas las proteínas (relación 410/280) y se verifica mediante corrida en gel al 15%, bajo condiciones desnaturalizantes.

3.2. Cuantificación y espectros del citocromo c

La cuantificación de los citocromos se realiza tanto por determinación de la concentración proteica por el método de Bradford (usando albúmina bobina como estándar para la curva de calibración) como por absorbancia a 410 nm, utilizando un valor de $\epsilon=106.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Los espectros de absorción fueron colectados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC.

Para la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR ^1H) las proteínas fueron disueltas en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,0, preparado en D_2O . Los espectros paramagnéticos fueron adquiridos con un espectrofotómetro Bruker Avance II de 600.13 MHz (^1H de frecuencia) con presaturación de la señal de agua durante el tiempo de relajación. Se utilizó una ventana espectral de 70 ppm, y el tiempo total de reciclaje fue de 300 ms.

3.3. Medida de actividades físico-químicas

Actividad peroxidasa. La actividad peroxidasa de los citocromos se determinó midiendo los productos de oxidación del Luminol por quimioluminiscencia. Para esto se incubaron 500 nM de los distintos citocromos con 1 mM Luminol y 1 mM H_2O_2 en buffer fosfato 200 mM pH 7,4, con 100 μM DTPA a 25° C. La oxidación fue seguida por quimioluminiscencia en un equipo BMG Lumistar Galaxy.

Como control, la actividad peroxidasa también fue medida siguiendo por fluorescencia del producto de oxidación del Amplex Red (resorufin). En esta técnica se incubaron 200 nM de los distintos citocromos con 100 μM Amplex Red (Molecular Probes-Invitrogen) y 100 μM H_2O_2 en buffer fosfato 200 mM pH 7,4, suplementado con 100 μM DTPA a 25° C. La fluorescencia del amplex red fue medida con un $\lambda_{\text{ex}}= 515 \text{ nm}$ y un $\lambda_{\text{em}}= 590 \text{ nm}$, en un equipo BMG Fluostar Galaxy.

Desaparición de la Banda de Soret. La desaparición (bleaching) en la banda principal de Soret inducida por H_2O_2 fue seguida incubando 4 μM citocromo c con 200 o 300 μM H_2O_2 en buffer fosfato 200 mM pH 7,4, con 100 μM DTPA a 25° C. Se midió la

absorbancia a 408 nm por 30 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC.

Reducción por ascorbato. La reducción del citocromo *c* por ascorbato fue medida incubando 10 μM citocromo *c* con 50 μM ascorbato en buffer fosfato 200 mM pH 7,4, suplementado con 100 μM DTPA a 25° C. La reducción del citocromo *c* fue seguida mediante la aparición de la banda a 550 nm, característica del citocromo reducido.

3.4. Nitración y purificación de formas mono-nitradas de citocromo *c*.

El citocromo *c* comercial, nativo recombinante, Y67F o E66Q (0,5 mM, 500 μL volumen final) fue nitrado mediante un flujo de peroxinitrito de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ por 20 minutos a partir de un stock de peroxinitrito 67 mM, según fue reportado por Batthyany y colaboradores en (125). La nitración se llevó a cabo en buffer fosfato de potasio 200 mM, con 0,1 mM DTPA, en presencia de bicarbonato de sodio.

Las formas mono-nitradas en las tirosinas 74 y 97 se purificaron por intercambio catiónico (columna TSK-Gel SP-5PW, 21,5 mm x 15 cm, Tosoh Bioscience) utilizando un equipo HPLC Aligent 1200 series (125). Los picos correspondientes a las $\text{NO}_2\text{-Tyr74}$ y $\text{NO}_2\text{-Tyr97}$ según (125) fueron colectados, re-purificados por la misma columna, y la nitración fue verificada por espectrometría de masa.

3.5. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^1H

Las muestras de citocromo *c* fueron liofilizadas en agua y resuspendidas en buffer fosfato 100 mM pH 7 preparado en 100% D_2O . Los espectros de NMR fueron adquiridos en un equipo Bruker Avance II a 600,13 MHz (^1H de frecuencia), con presaturación de la señal de agua durante el tiempo de relajación. Se usó una ventana de 70 ppm, y un tiempo de re-ciclado total de 300 ms. Los espectros fueron colectados a 25 y 35° C.

Para las titulaciones por pH, el pH se ajustó lo más cercano posible al valor deseado mediante la adición de base (NaOH) u ácido (HCl) disueltos en D_2O . Después de la realización de cada espectro se vuelve a medir el valor de pH y un promedio de ambos (obtenidos antes y después del experimento) es el reportado. Los valores de pH presentaron mínimas variaciones en las dos medidas, y fueron corregidos por el efecto isotópico del deuterio. Como es importante no cambiar la concentración de citocromo en cada experimento, para no afectar la intensidad de las medidas, la base y el ácido se usaron muy concentrados y se agregaron mínimas cantidades (se tocaba el ácido o

base con la punta de un tip y se sumergía en la solución de citocromo). Para verificar que efectivamente el citocromo no fue diluido en el experimento al terminar la titulación se vuelve al pH neutro de partida y se vuelve a tomar la medida para compararla con la inicial.

Los valores de pKa fueron determinados ajustando la intensidad de la señal del metilo 8, 3 y Met80 en función del pH a una función sigmoidea.

3.6. Titulación por pH seguida por absorbancia a 695 nm

Las muestras de citocromo *c* fueron resuspendidas en 50 mM pH 7. Dado el bajo coeficiente de absorción que tiene el citocromo *c* a 695 nm se utilizaron soluciones muy concentradas de citocromo *c* (500 μ M). Para no modificar la concentración de citocromo durante el experimento se prepararon dos soluciones de distinto pH (una ácida y otra alcalina) y se fueron mezclando en distinta proporción para obtener los distintos puntos a los distintos pH. Los espectros fueron tomados entre 650 y 800 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC a 25° C.

Los valores de pKa fueron determinados ajustando la intensidad de la señal a 695 nm en función del pH a una función sigmoidea.

3.7. Titulación por pH seguida por espectroscopia de resonancia Raman

Se tomaron espectros de Raman de los distintos citocromo *c* (100 μ M) en una celda rotatoria excitando tanto a 413 nm (3 mW, Spectra-Physics BeamLok 2060) para detectar la banda mayoritaria de Soret, como a 458 nm (8 mW, Coherent Innova 70c) para detectar la señal de la nitro-tirosina, usando un microscopio confocal acoplado a un espectrógrafo de estado simple (Jobin Yvon XY 800) equipado con un detector CCD.

Se le realizaron espectros a las soluciones de citocromo 200 μ M en buffer HEPES 20 mM, a distintos valores de pH y la proporción de citocromo “alcalino”/”ácido” se gráfico en función del pH. Los valores de pKa fueron determinados ajustando dichos a una función sigmoidea.

3.8. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Para los espectros de DC el citocromo *c* se resuspendió a una concentración 10 μ M final en 100 mM buffer fosfato pH 7, 9 y 11. Los espectros fueron tomados usando un

espectropolarímetro Jasco J-810, utilizando celdas termostatazadas de 0,1 cm de paso óptico.

3.9. Determinación del potencial de reducción estándar

El potencial redox de las distintas formas del citocromo *c* fueron determinaos por distintas técnicas con los citocromos adsorbidos o en solución.

Electroquímica de especies adsorbidas. Los experimentos de voltametría cíclica se realizaron con un potenciostato Gamry RER600. Se trabajó con electrodos de oro (pureza > 99.99%) de 1mm de diámetro recubiertos con una proporción 1:1 de 11-hidroxi-alcanotiol y 11-carboxi-alcanotiol. Los electrodos fueron primero oxidados en 10% HClO₄, aplicando un potencial de 3 V por 2 minutos, sonicados en 10% HCl por 15 minutos y posteriormente incubados con una mezcla 3:1 de H₂O₂:H₂SO₄ a 120 °C. Los electrodos fueron posteriormente sometidos a voltametrías cíclicas entre 0,2 y 1,6 V en 10% HClO₄ y lavados en agua y etanol. Los electrodos fueron recubiertos con monocapas autoensambladas mediante la incubación durante toda la noche con una solución 1 mM de una mezcla 1:1 de HS-(CH₂)₁₅-CH₂OH: HS-(CH₂)₁₅-COOH.

Los electrodos se incubaron con 500 μM de cada una de las proteínas durante 2 horas a temperatura ambiente para lograr la adsorción. Las medidas se realizaron en buffer fosfato de potasio 12,5 mM + sulfato de potasio 12,5 mM pH 7, previamente burbujeado con Ar para desplazar oxígeno presente. Se utilizó un alambre de platino como contraelectrodo y las medidas son referidas a un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3M.

Electroquímica en solución. Se trabajó con los mismos electrodos pero recubiertos con monocapas autoensambladas de HS-(CH₂)₅-CH₂OH. Las medidas se realizaron en una solución de proteína 500 μM en el mismo buffer del punto anterior. También se utilizó un alambre de platino como contraelectrodo y las medidas son referidas a un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3.5M.

Espectroscopia SERRS (del inglés: Surface Enhanced Resonant Raman Spectroscopy). Se utilizaron electrodos rotatorios de plata rugosados recubiertos con una proporción 1:1 de 11-hidroxi-alcanotiol y 11-carboxi-alcanotiol. Los electrodos de plata fueron pulidos mecánicamente y sometidos a ciclos de oxidación-reducción en 0,1 mM KCl y posteriormente incubadas en 1,5 mM de las soluciones de alcanotioles (mezcla 1:1 HS-(CH₂)₁₅-CH₂OH: HS-(CH₂)₁₅-COOH) por 24 horas.

Se tomaron espectros Raman de 150 μL de las distintas soluciones 0,1 mM en una celda rotatoria. Se irradió con un laser de Ar a 514 nm con una potencia de 13 mW. Los espectros de las formas oxidadas y reducidas se determinaron mediante el agregado de ferricianuro o ditionite. Posteriormente se realizaron espectros a distintos valores de potencial y a cada uno se determinó la proporción de citocromo oxidado/reducido de la muestra. El potencial fue controlado utilizando un potenciostato TeQ03. Todas las medidas fueron referidas a un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3.5 M.

3.10. Exposición a oxidantes para evaluar nitración y polimerización

Exposición a peroxinitrito. 100 μM de citocromo c fue expuesto a bolos de ONOO^- entre 0 y 1 mM en buffer fosfato 100 mM pH 7,4, suplementado con 100 μM DTPA.

Exposición a peróxido de hidrógeno más óxido nítrico o nitrito. 100 μM de citocromo c en un volumen final de 500 μL fue tratado con flujos de H_2O_2 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ a partir de un stock 50 mM (2 mM final), por 30 minutos más flujos de NO generados por NOC7 (1 mM) (Dojindo), que da un flujo inicial de 6,6 $\mu\text{M}/\text{min}$. Como la vida media del NOC-7 es de 5 minutos podemos asumir que a los 40 minutos todo el dador fue consumido, o generados por spermina nonoato (4 mM) (Dojindo), que presentaba un flujo inicial de 62 $\mu\text{M}/\text{min}$, y se dejó reaccionar 6 horas a 37°C (la vida media de este dador de NO a esta temperatura es de 39 minutos). La nitración y formación de agregados dio resultados consistentes con cualquiera de los dos dadores.

Alternativamente, 100 μM de citocromo c fue expuesto a un bolo de 1 mM nitrito de sodio, con el mismo flujo de H_2O_2 (1 $\mu\text{L}/\text{min}$ a partir de un stock 5 mM, 2 mM final). Los tratamientos se realizaron en buffer fosfato 100 mM pH 7,4, suplementado con 100 μM DTPA.

3.11. Análisis de Western Blot

El citocromo c control y tratado con los distintos oxidantes (2 μg) es separado por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 15%, y posteriormente transferido a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 mm, Hybond-C extra; Amersham) mediante transferencia semi-seca por 1 hora en un buffer de transferencia que contiene SDS.

Las membranas fueron bloqueadas con 3% leche descremada (Stain) en PBS por una hora a temperatura ambiente.

Western Blot anti nitro-tirosina. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (164) en PBS, 0,1% Tween 20 (buffer de lavado) por una hora. Después de lavar las membranas fueron incubadas con una dilución 1:15.000 del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con una sonda infrarroja (LI-COR) en buffer de lavado. El exceso de anticuerpo es removido por 3 lavados con buffer de lavado.

Western Blot anti citocromo c. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-citocromo c de caballo [7H8.2C12] (generosamente cedido por el Dr. Ronad Jemerson, Department of Microbiology, Northwestern University) en una dilución 1:5000 en buffer de bloqueo, por una hora. Después de lavar con el mismo buffer de lavado, las membranas fueron incubadas con una dilución 1:15.000 del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con una sonda infrarroja (LI-COR) en buffer de lavado. El exceso de anticuerpo es removido por lavado con buffer de lavado.

En ambos casos las membranas fueron reveladas mediante la detección de la sonda infrarroja usando un equipo Oddisey Infrared Imaging System.

Alternativamente, para ambos anticuerpos, las membranas fueron bloqueadas con albúmina bobina 5% en TBS (Tris saline buffer: Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.6) con 0,1% tween 20 durante toda la noche a 4°C. Las incubaciones se realizaron con las mismas diluciones de anticuerpo en buffer de bloqueo por una hora. Las membranas fueron lavadas con TBS 0,3% tween 20, e incubadas con una dilución 1:10.000 del anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo según corresponda) conjugado con peroxidasa de rabanito. El exceso de anticuerpo es removido por lavado con buffer de lavado. Las muestras son reveladas por quimioluminiscencia utilizando "luminol-enhanced chemiluminescence" (ECL; Amersham)

3.12. Análisis de Western Blot anti MnSOD humana

Cuando se corrieron muestras de MnSOD 4 µg de proteína pura, o 100 o 50 mg de bacterias que le expresan fueron corridos en geles de poliacrilamida-SDS al 12%, y posteriormente transferidos a las mismas membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con albúmina bobina 5% en TBS con 0,1% tween 20 durante toda la noche a 4°C.

Western Blot anti nitro-tirosina. Las membranas fueron reveladas como se explicó en la sección anterior.

Western Blot anti cola de histidina. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con una dilución 1:3000 de un anticuerpo monoclonal anti-cola de histidina [His.H8] en solución de bloqueo por una hora. Después de lavar las membranas con TBS 0,1% tween 20, fueron incubadas con una dilución 1:8.000 del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rabanito. El exceso de anticuerpo es removido por lavado con buffer de lavado.

Las membranas son reveladas por quimioluminiscencia utilizando "luminolenhanced chemiluminescence (ECL; Amersham)"

3.13. Respiración de mitoplastos

Preparación de mitoplastos depletados de citocromo c. Se trabaja con mitocondrias de riñón de ratas Wistar adultas macho, de 250 gs aproximadamente, y los mitoplastos con preparados como ha sido reportado en (126,144,165). A los animales se les suministra una dosis letal de pentobarbital intraperitoneal, 40 mg/Kg. Los riñones son extensivamente lavados en medio de respiración mitocondrial frío (MRM, KH_2PO_4 5 mM, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM, Sacarosa 0.3 M y albúmina 0,1%, pH 7,4 ajustado con KOH) y cortados en trozos bien pequeños, manteniéndolos siempre en frío. Los fragmentos de tejido se homogeneizan en un homogeneizador de vidrio y teflón en MRM. El homogeneinado se centrifuga a 1500 g a 4 °C y se descarta el pellet donde quedan los restos de tejido, células enteras y núcleos. El sobrenadante se centrifuga a 12000 g a 4 °C y se obtiene un pellet que corresponde a la fracción rica en mitocondrias (166,167). El pellet se resuspende en cantidad mínima de MRM frío (100 a 200 μl) y se mide la concentración de proteínas por el método de Bradford, obteniéndose mitocondrias a una concentración de alrededor de 80 mg/ml. Antes de preparar los mitoplastos se verifica por oximetría que las mitocondrias estén acopladas (se utiliza succinato 10 mM y posteriormente ADP 1 mM). Las mitocondrias se llevan a 2 mg/ml en 2 mM tris, pH 7,4, con 10 mM KCl, se dejan en ese medio por 10 minutos a 37 °C, y se centrifugan a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. El pellet se divide en dos fracciones: una que se resuspende en 2 mM tris pH 7,4 con 2 mM KCl, y se usa como control de mitoplastos con citocromo c, y otra que se resuspende en 2 mM tris pH 7,4 pero con 150 mM KCl para que tenga lugar la extracción del citocromo. Las dos fracciones son incubadas 10 minutos a 37 °C y posteriormente centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. El procedimiento se repite 2 veces y la concentración de

citocromo extraído de ambas fracciones es determinado por la absorbancia a 550 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) después de la adición de ditionite al sobrenadante. En la fracción con 10 mM KCl no se ve citocromo en el medio, mientras que en la fracción tratada con 150 mM KCl se ve la extracción de 0,5 nmoles de citocromo por mg de proteína, consistente con lo previamente reportado (126,144).

Medida de respiración mitocondrial. El consumo de oxígeno es evaluado en los mitoplastos depletados de citocromo c (0,05 mg/ml) en MRM en un oxímetro de alta resolución (Oroboros, Innsbruck, Austria). El equipo es calibrado con un 100% de aire el día de la medida en el mismo buffer. La respiración de los mitoplastos se evalúa frente al agregado de succinato 10 mM, observándose que los mitoplastos prácticamente no respiran, consistente con una buena extracción del citocromo c. Luego de verificado este bajo consumo de oxígeno se agrega citocromo c nativo y los distintos mutantes de tirosina (0,1 y 0,4 μM) y se observa la respiración con cada uno de ellos. Los datos son analizados usando el programa DatLab (Oroboros) que muestra la concentración de oxígeno en el tiempo, y el flujo de oxígeno que es la derivada primera del consumo de oxígeno en el tiempo.

Medida de actividad citocromo oxidasa. La actividad citocromo oxidasa se midió a partir de los mitoplastos de riñón de rata depletados de citocromo c, rotos mediante 3 ciclos de congelado/descongelado (0.05 mg/ml), con el agregado de los distintos citocromos reducidos (30 μM) en buffer tris 200 mM pH 7,4. La oxidación del citocromo c por acción del complejo se la citocromo oxidasa fue seguida espectrofotométricamente a 550 nm.

3.14. Activación del apoptosoma

La capacidad de activar el apoptosoma se mide en fracciones muy concentradas de proteínas citosólicas (58). Para preparar los extractos celulares libres de células a partir de células Jurkat T de linfocitos (ATTCC, TIB-152) (5×10^6 células/mL) las células son bajadas por centrifugación y lavada dos veces en buffer PBS frío. Las células se resuspenden en 5 volúmenes de buffer frío: HEPES-KOH 20 mM, pH 7,5; KCl 10 mM; MgCl_2 1,5 mM; EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ditionitrol 1 mM y una punta de espátula de coctel inhibidor de proteasas (Sigma, P8340) y se dejan en hielo por 15 minutos. Pasado este tiempo las células se rompen mediante pasaje por un homogeneizador de vidrio y teflón. Los núcleos y las células que no se rompieron se bajan por centrifugación a 1.000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante es centrifugado a 100.000 g por 1 hora a 4 °C para remover las mitocondrias, y el

sobrenadante resultante es colectado cuidadosamente y almacenado a -80 °C hasta el día de su uso.

La actividad caspasa 3 es evaluada siguiendo el corte de su sustrato colorimétrico AcDEVDpNA (Upstate, NY) a 405 nm. Para esto se incuban durante 10 horas extracto citosólico (4 mg/ml) con ATP 2 mM, dATP 2 mM, AcDEVDpNA 0,2 mM, y diferentes concentraciones de los citocromos nativo, mutados o nitrados (64).

3.15. Síntesis de citocromo c nitrado de forma co-traducciona

Para la purificación de formas nitradas co-traduccionalmente se partió de un modelo de expresión de la enzima superóxido dismutasa nitrada co-traduccionalmente, descrita por Neumann y colaboradores (168). Para esto bacterias de *E. coli* BL21 eran transformadas con el plásmido que codifica para el citocromo *c* y la hemo liasa, pero sustituyendo el codón de la tirosina que se quiere nitrar por el codón TAG (que es un codón de que no codifica para ningún aminoácido, sino que es un codón de terminación poco representado en bacterias); más el plásmido que codifica para un par tRNA/tRNA sintesasa que inserta específicamente NO₂Tyr en el codón TAG. Estas bacterias son crecidas toda la noche en 40 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de cloramfenicol, para mantener la selección de ambos plásmidos, a 37°C. Estos precultivos son cosechados por centrifugación e inoculados en 1 litro de medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄, 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, MgSO₄ 0,025 g/l; CaCl₂ 0,0015 g/l, tiamina 0,034 g/l, glucosa 2%), suplementado con 0.5 mM de NO₂-Tyr y los mismos antibióticos. El cultivo se deja crecer toda la noche en presencia de PMSF y 0,5 mM IPTG. Con este procedimiento no logramos obtener formas nitradas del citocromo *c*, pero ni siquiera logramos expresar el citocromo *c* nativo sin nitrar. Se realizaron variaciones sobre este procedimiento experimental que se describen en la sección de resultados 4.6.1.

3.16. Síntesis de citocromo c marcado con N¹⁵

El citocromo *c* marcado con N¹⁵ se expresó mediante precultivos de 10 mL crecidos en LB toda la noche y transferidos a medio mínimo durante 50 hs, a 30°C, 220 rpm. La inducción se realiza cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0,4 con 0,8 mM IPTG. La purificación se realizó igual que para los demás citocromos.

3.17. Expresión de citocromo c humano

La secuencia codificante del gen del citocromo c humano se mandó sintetizar y se clonó en un plásmido pBAD bajo el control de un promotor LAC, en tándem con la proteína hemo liasa. El plásmido se transformó en una cepa de *E. coli* BL21 star. El cultivo bacteriano se creció toda la noche en LB, y posteriormente se inoculó en medio terrific por 20 horas a 30 °C, 220 rpm. Cuando la D.O. alcanzó 0,5 unidades se indujo la expresión del citocromo con 0,02% L-arabinosa.

La purificación se realizó de la misma manera que la de citocromo c de caballo, como se describió previamente.

Abreviaturas

APAF-1, Apoptotic protease activating factor-1

DTPA, Pentaacetato de dietilentriamina

FADH₂, flavina adenina di-nucleotido reducido

H₂O₂, Peróxido de hidrógeno

IPTG, Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido

NADH, nicotinamida adenina di.nucleótido reucido

NMR, resonancia magnética nuclear

[•]NO, óxido nítrico

NO₂⁻, nitrito

NOC-7, 1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-3-methyl-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene

O₂^{-•}, radical superóxido

ONOO⁻, Peroxinitrito

PBS, Buffer fosfato salino

PMSF, Penta-metil sulfonil fluoride

TBS, Buffer tris salino

4. Resultados y discusión

4.1. Expresión y caracterización de los mutantes de citocromo c

El objetivo de esta primera sección es el de construir y validar distintos mutantes de citocromo c que puedan ser utilizados como modelos para entender distintos cambios conformacionales y mecanismos en los citocromos sin modificar o modificados por nitración, en las siguientes secciones de esta tesis.

4.1.1. Expresión de citocromos recombinantes

Para este trabajo se fueron expresando y purificando distintos mutantes de citocromo c. En primer lugar se plantearon sustituir cada una de las 4 tirosinas del citocromo c de corazón de caballo por fenilalanina, el cuádruple mutante en el que todas las tirosinas son sustituidas por fenilalanina, y además generar un mutante en la Met80, sustituyéndola por alanina o isoleucina. A medida que fue avanzando el proyecto expresamos y purificamos nuevos mutantes: el doble mutante Y74,97F, y el mutante E66Q.

Las mutaciones fueron introducidas en el plásmido pJRhrsN2 mediante mutagénesis dirigida, y posteriormente los plásmidos fueron transformados en la cepa de bacterias BL21 DE3 para expresar las proteínas.

Todos los citocromos nativos y mutantes fueron purificados con buenos rendimientos y altos grados de pureza, evidenciada tanto por relaciones de absorbancia a 410/280 nm mayores a 4 o por geles de acrilamida (Fig. 4.1 C). Los mutantes en cada una de las tirosinas por fenilalanina pudieron ser purificados con buenos rendimientos utilizando el protocolo publicado en (163) (Fig. 4.1), aunque posteriormente la expresión fue optimizada para cada uno de los mutantes tal como se describió en la sección de metodología (Tabla 2.1).

La expresión de los citocromos puede ser seguida mirando solamente el color de los cultivos de bacterias, que se tornan mucho más rojos, aún sin necesidad de lisar las bacterias (Fig. 4.1 A). El mutante al que le falta la sexta posición de coordinación fue más difícil de expresar, no pudiendo ser detectado a partir del protocolo publicado en (163) (Fig. 4.1 B).

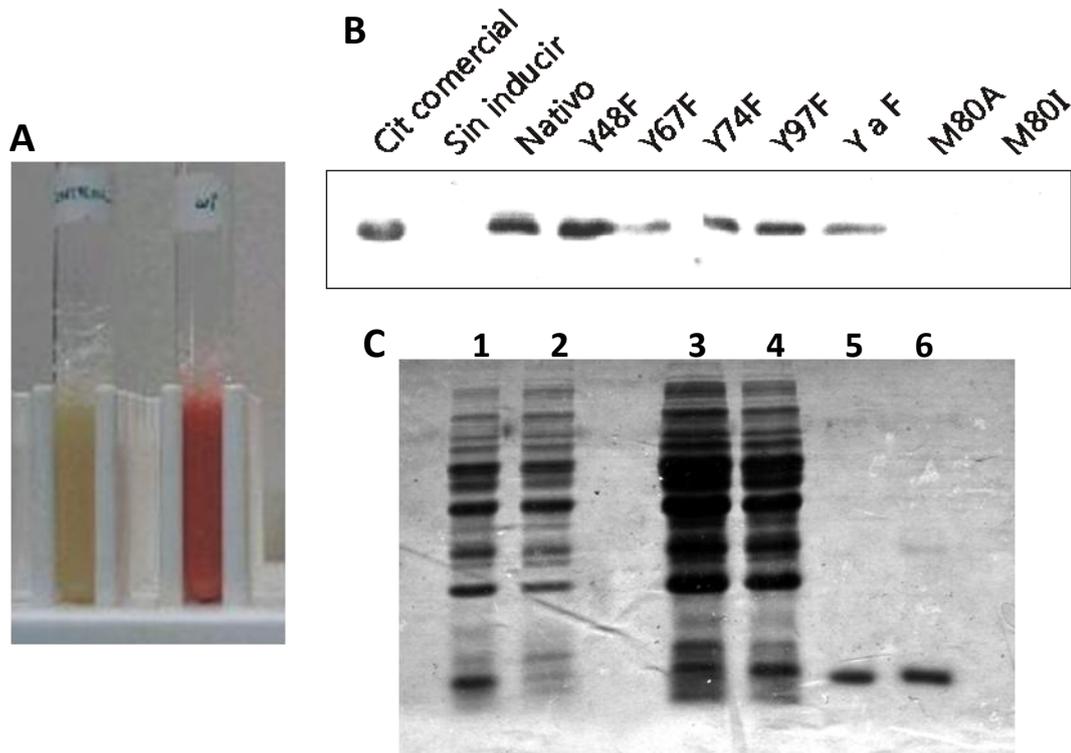


Figura 4.1. Expresión de los distintos mutantes de citocromo utilizando el protocolo de Rumbley y colaboradores. **(A)** Lisado de bacterias sin inducir o inducidas por 50 hs con 0,8 mM IPTG. **(B)** Western blot anti-citocromo c: Carril 1, citocromo c comercial (2 μ g); carriles 2 a 10 lisado de bacterias que expresan para los distintos citocromos (100 μ g): carril 2, nativo sin inducir (control negativo); carril 3, nativo; carril 4, Y48F; carril 5, Y67F; carril 6; Y74F; carril 7, Y97F; carril 8, cuádruple mutante; carril 9, M80A; y carril 10, M80I. **(C)** Gel de purificación del mutante Y74F teñido con coomasie blue (utilizado como ejemplo): Carril 1, células BL21 que sobre expresan citocromo c Y74F (50 μ g); carril 2, lo que no se pegó a la columna (50 μ g); carril 3, primer lavado de columna (100 μ g); carril 4, segundo lavado de columna (100 μ g); carril 5, Y74F pura (3 μ g); y carril 6; citocromo c nativo comercial (3 μ g).

Finalmente logramos, cambiando las condiciones del cultivo bacteriano, expresar el mutante M80A, aunque con bajos rendimientos de purificación. No fuimos capaces de sintetizar el mutante M80I. Suponemos que estos mutantes, al tener una actividad

peroxidasa muy aumentada respecto al citocromo *c* nativo (por tener una mayor exposición de su grupo hemo) es tóxico para las bacterias y por lo tanto ellas reprimen su expresión. La expresión de este mutante la logramos utilizando la cepa de bacterias BL21 Star (DE3) (Invitrogen) que estabiliza los ARNm, y al mismo tiempo bajando la temperatura, el tiempo y la cantidad de IPTG utilizada para la expresión. Finalmente comenzamos a utilizar la cepa de bacterias BL21 Star (DE3) para la expresión de todos los mutantes, mejorando un poco más los rendimientos de expresión. Los rendimientos promedio de purificación de cada uno de los distintos mutantes por litro de cultivo bacteriano se resumen en la tabla 4.1.

Citocromo	Rendimiento (mg)
Nativo	10
Y48F	4
Y67F	6
Y74F	5
Y97F	5
Y74,97F	3
Y a F	3
E66Q	8
M80A	0,5

Tabla 4.1. Rendimiento de purificación de los distintos mutantes de citocromo *c*. Se muestra el rendimiento de purificación promedio de cada citocromo expresado en gramos de proteína purificada por litro de cultivo.

Para comenzar la caracterización de los distintos mutantes evaluando los cambios conformacionales y de actividades que puedan darse en el citocromo *c* debido a las mutaciones introducidas, realizando distintos experimentos que se muestran en las secciones 4.1.2 a 4.1.4.

4.1.2. Espectros de absorción de los citocromos c

Entre estos estudios se encuentra la realización de espectros de absorción entre 380 y 600 nm. Los distintos mutantes de citocromo c en los aminoácidos que no participan en la coordinación del hemo no generan importantes modificaciones en el espectro de absorción del citocromo, ni en las formas reducidas ni oxidadas (Fig. 4.2). Esto nos habla de que las mutaciones no introducen variaciones estructurales en la región cercana al grupo hemo, ya que los espectros son sensibles a perturbaciones en dicha región. Además todos los espectros son iguales al espectro del citocromo comercial.

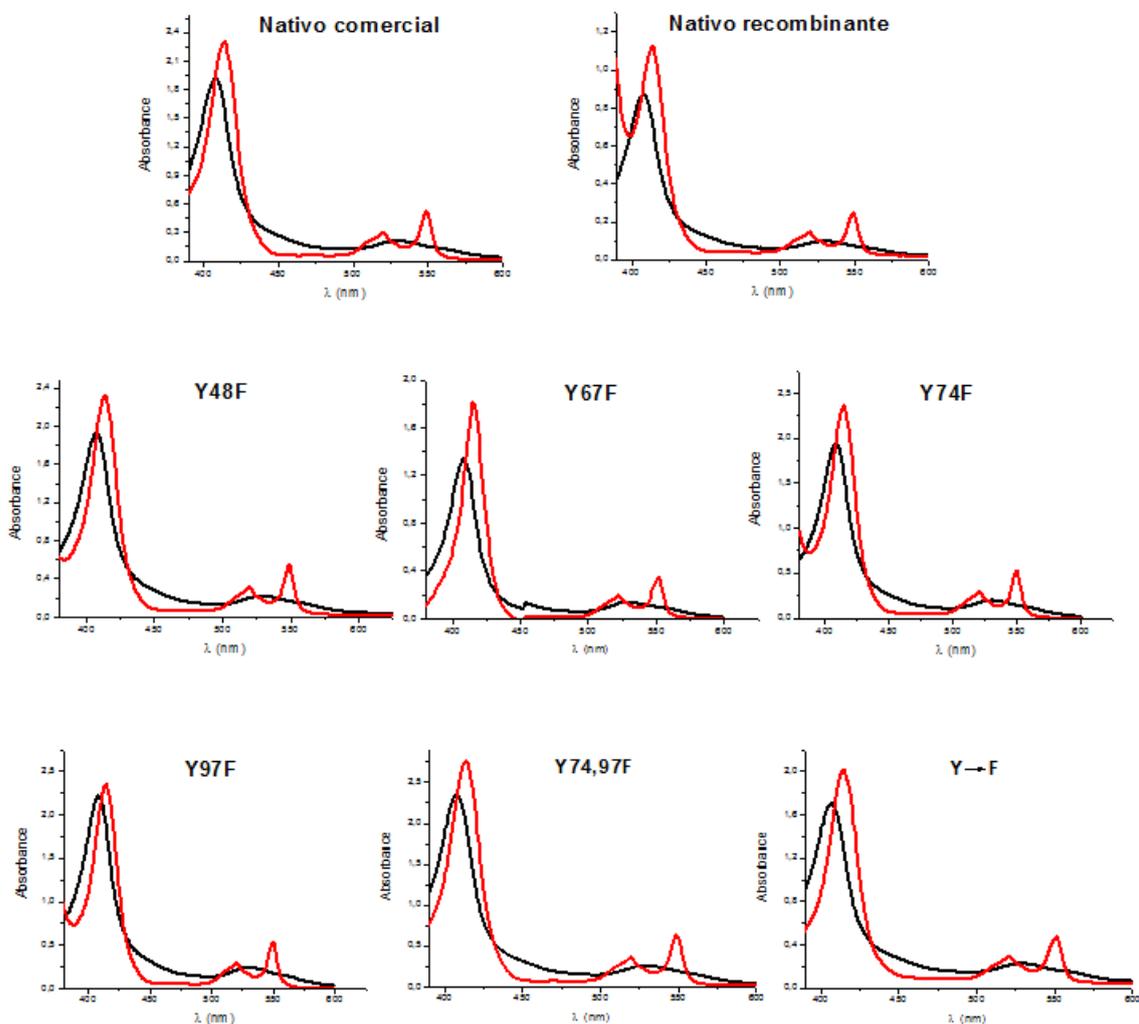


Figura 4.2. Espectros de absorción de los citocromos c mutantes en tirosina. Espectros de absorbancia de citocromo c nativo (comercial y recombinante), Y48F, Y67F, Y74F, Y97F, Y74,97F, y Y a F (20 μ M) tratados con ferricianuro de potasio (negro) o ditionite de sodio (rojo).

El mutante de citocromo *c* M80A presenta varias diferencias en el espectro de absorción, con un corrimiento hacia el azul de 2 nm en la banda de Soret mayoritaria, presenta dos picos a 620 and 665 nm (Fig. 4.3 A), y por supuesto, no presenta la banda a 695 nm característica de la interacción de la Met80 con el Fe hémico (Fig. 4.3 B).

Contrario a lo que pasa en el citocromo *c* nativo, la absorbancia en la banda de Soret del el citocromo *c* M80A reducido (citocromo c^{2+}) decae con respecto a la del oxidado (citocromo c^{3+}) (Fig. 4.3 A).

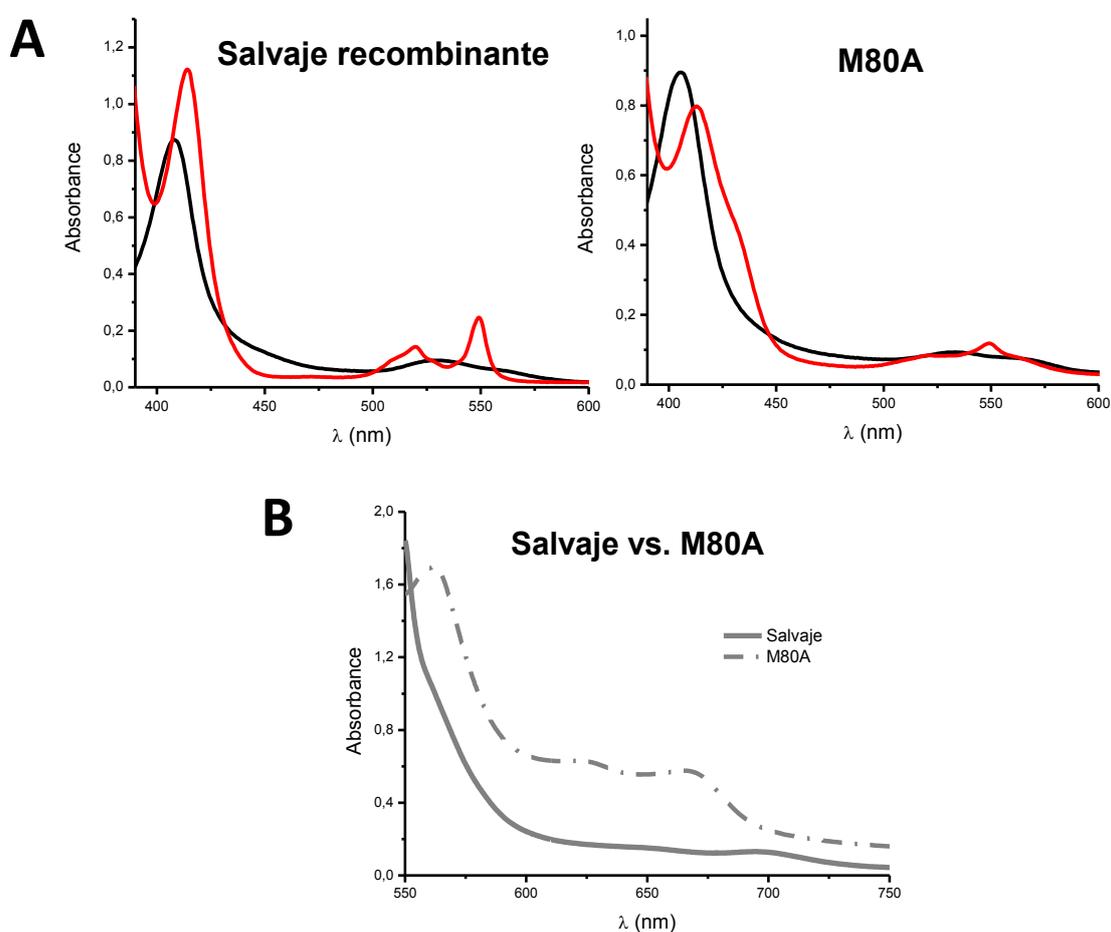


Figura 4.3. Espectros de absorción del citocromo *c* nativo y M80A. (A) Espectros de absorbancia de citocromo *c* nativo y M80A (10 μ M) tratados con ferricianuro de potasio (negro) o ditionite de sodio (rojo). **(B)** Espectro de absorbancia en la región de 550 - 750 nm del citocromo *c* nativo (sólido) y M80A (punteado) 200 μ M.

4.1.3. Espectros de NMR paramagnético de los citocromos c

Para caracterizar mejor la estructura de los mutantes de tirosina del citocromo *c* se realizaron espectros de NMR paramagnético ^1H de los mutantes a pH fisiológico. Esta técnica ha sido extensamente utilizada para caracterizar la movilidad de ligandos u otros residuos cercanos al hemo en las hemo-proteínas, y en particular en los citocromos (169-172).

Los ligandos del hierro hemico del citocromo *c* en la especie neutra se muestran en la figura 4.4 A. En el espectro de NMR del citocromo *c* nativo se observan varias señales por fuera del rango de señales diamagnéticas (de 10 a 0 ppm). La figura 4.4 B muestra el espectro del citocromo c^{3+} a pH cercano al neutro (pH 7,51), donde se observan las señales de resonancia correspondientes a los dos metilos del hemo y a la Met80, tal como fue asignado por (172). Las señales que corresponden a los metilos se observan en distinta posición cuando el citocromo está en la conformación a la que se encuentra a pH neutro (señales marcadas como 1), que cuando el citocromo se encuentra en su conformación alcalina (señales marcadas como 2). A la vez cada uno de esas señales en realidad se tratan de la resonancia de distintos grupos cercanos al hemo, que se muestran en la figura 4.4 A. La señal 1 muestra un pico que corresponde al metilo 8 en el citocromo en forma neutra (a aproximadamente 31,5 ppm), y un pico que corresponde al metilo 3 en el citocromo en forma neutra (a aproximadamente 30,5 ppm). El pico 2 muestra otros dos picos que, por tratarse de resonancias que se ven en la conformación alcalina, se ven muy chiquitos a este pH, pero corresponden al metilo 8 en la forma básica (aproximadamente 22 ppm) y a la histidina 18 (aproximadamente 21 ppm) (172). Entre el primer pico de las señales 1 y el primer pico de las señales 2 se ve claramente como un mismo grupo puede cambiar la posición de su señal resonante al cambiar la conformación del citocromo *c*.

Los mismos espectros fueron realizados para cada uno de los mutantes de tirosina por fenilalanina que mostraron tener una estructura cercana al grupo hemo igual a la del citocromo *c* nativo (Fig. 4.4). Todos los espectros de NMR se realizaron en varias pasantías en el instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Universidad de Rosario (Rosario, Argentina) en el laboratorio del Dr. Alejandro Vila.

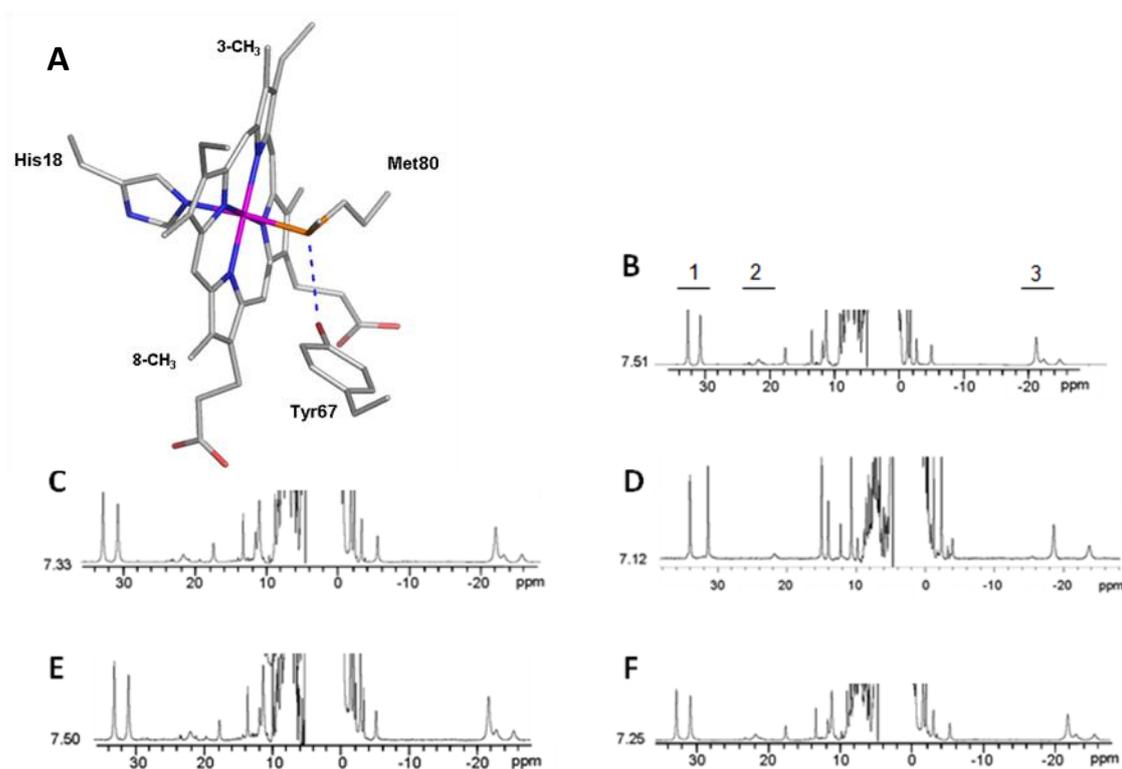


Figura 4.4. Espectros de ^1H NMR de los citocromos *c*. (A) Esquema representando los ligando del grupo hemo. (B-F) Espectros a pH cercanos al fisiológico del citocromo *c* nativo (B), Y48F (C), Y67F (D), Y74F (E) e Y97F (F), a valores de pH cercanos al fisiológico. Todos los espectros fueron adquiridos a 35° C en buffer fosfato 100 mM preparado en D_2O . En el panel (A) se indican las señales correspondientes a los metilos asociados al hemo predominantes en la forma “neutra” (1) o “alcalina” (2) del citocromo *c*, y la señal correspondiente a la coordinación Met80 hemo (3).

Sin embargo, como era de esperar al ver los cambios en el espectro de absorción anteriormente detallados, el mutante M80A si presenta diferencias con el citocromo *c* nativo. Para esto corrimos espectros a 25 y 35°C, y a ambas temperaturas, a valores de pH cercanos al fisiológico, se observó que el hierro del grupo hemo está en un equilibrio entre formas de alto espín (45 – 65 ppm) y formas de bajo espín (10 – 35 ppm) (Fig. 4.5). Este comportamiento es completamente distinto al que observamos para el citocromo nativo o mutante en cada una de las tirosinas, que solo existen en una forma de bajo espín, como el grupo hemo hexa-coordinado con la Met80. En el mutante M80A, la sexta posición de coordinación puede ser reemplazado por otro ligando (como la Lys72, Lys73 o Lys79) (23,24,28,30-32), o puede ser ocupado por una molécula inorgánica como puede ser el agua.

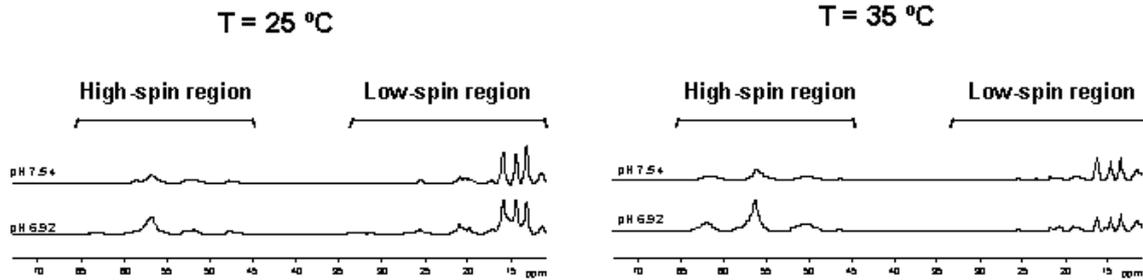


Figura 4.5. Espectros de ^1H NMR de los citocromo M80A a valores de pH cercanos al fisiológico. Los espectros fueron adquiridos a 25 y 35° C en buffer fosfato 100 mM preparado en D_2O .

4.1.4. Caracterización bioquímica de los mutantes

Para continuar la caracterización de los mutantes medimos varias actividades y propiedades de los citocromo *c* mutantes en comparación con el nativo.

Como ya se mencionó en la introducción el citocromo *c* presenta una actividad peroxidasa que en este trabajo evaluamos para los distintos mutantes (Fig. 4.6 A). La misma actividad fue medida por dos técnicas distintas: siguiendo la quimioluminiscencia del producto de oxidación del luminol, o siguiendo la fluorescencia de la oxidación de la fluoresceína. Ambas técnicas mostraron que todos los mutantes de tirosina por fenilalanina tienen valores de actividad peroxidasa similares a los del citocromo *c* nativo, mientras que el mutante M80A, que tiene su grupo hemo mucho más expuesto, presenta un valor de actividad 10 veces mayor al del citocromo *c* nativo.

Para continuar evaluando cambios en la estructura del citocromo *c* también realizamos ensayos de accesibilidad del hemo al solvente estudiando la capacidad que tiene el H_2O_2 (200 μM) de “blanquear” (del inglés: bleaching) la banda principal de Soret (a 408 nm) de citocromos nativo y mutantes (4 μM). Otra vez observamos que el efecto en los mutantes de tirosina es bastante similar al que se observa para el citocromo *c* nativo, pero que el decaimiento de la banda en la M80A es mucho mayor (Fig. 4.6 B). Este efecto en el mutante M80A probablemente se deba a que, al no estar la Met80 protegiendo el hemo, el H_2O_2 acceda más fácilmente al hemo provocando su destrucción.

Por último evaluamos la reducción de los distintos citocromos en presencia de ascorbato, volviendo a no observar diferencias importantes entre los mutantes de tirosinas y el nativo, pero si notando que todos los mutantes de tirosina son un poco

más sensibles a la reducción por ascorbato que el citocromo *c* nativo. Por otro lado, el mutante M80A no mostró reducirse por ascorbato (Fig. 4.6 C). Debido a que este mutante tiene su grupo hemo más expuesto, como pudimos determinar por el aumento de la actividad peroxidasa y la muy rápida degradación del hemo por H₂O₂, es difícil pensar que los reductores puedan no estar llegando al hemo, y es más probable pensar que este hemo tan expuesto puede estar siendo re-oxidado más rápidamente, y por eso no podamos detectar la forma reducida por la exposición a ascorbato.

Como control, todas las actividades y propiedades fueron evaluadas para el citocromo *c* recombinante en función con el citocromo *c* comercial y todas resultaron ser idénticas para estos dos citocromos.

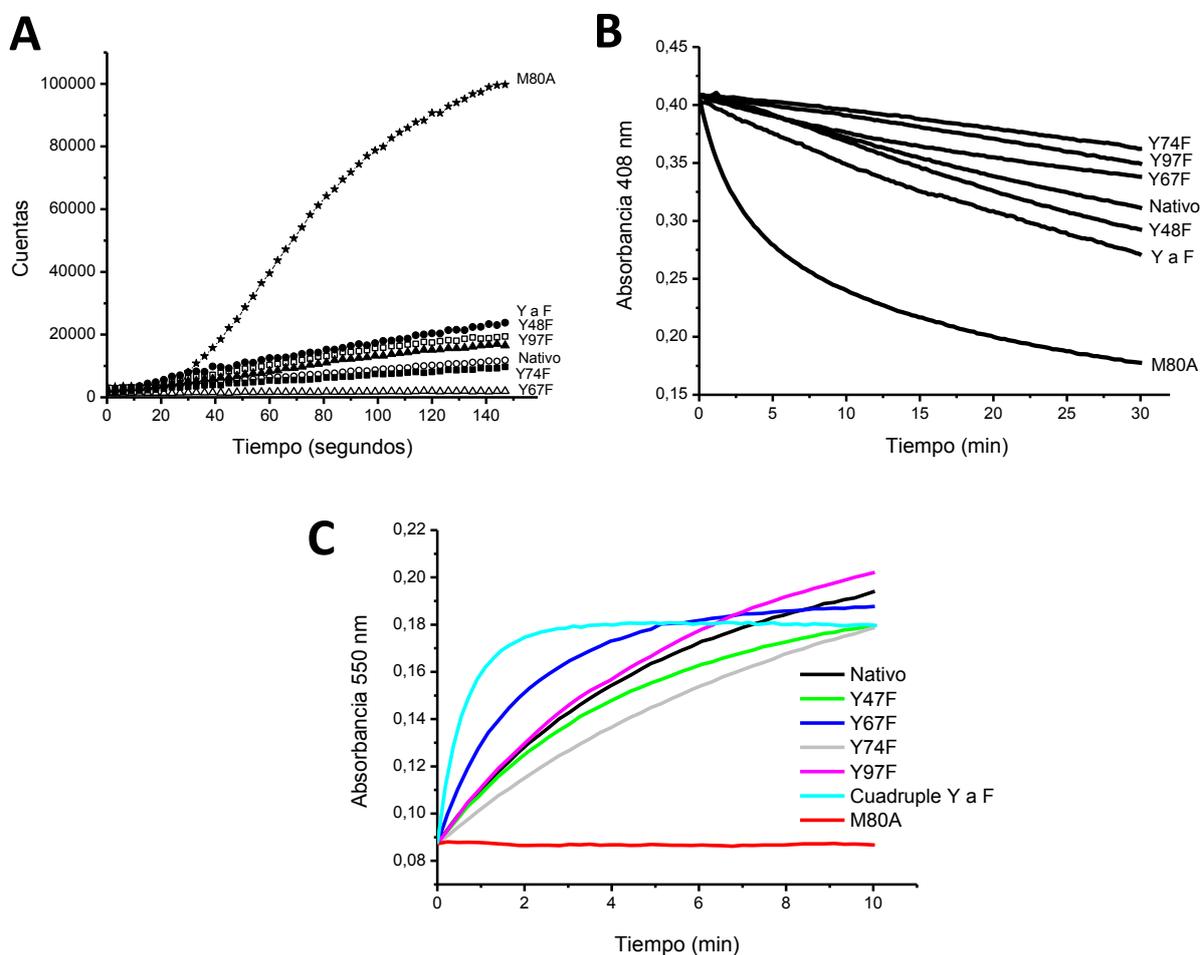


Figura 4.6. Estudio bioquímico de los citocromos. (A) La actividad peroxidasa de los citocromos mutantes (500 nM) fue seguida midiendo quimioluminiscentemente la oxidación del luminol. (B) Blanqueamiento en la banda de Soret (408 nm) del citocromo *c* (4 μM) inducida por 200 μM H₂O₂. (C) Reducción de los citocromos (10 μM) seguida a 550 nm en presencia de 50 μM ascorbato.

❖ **Conclusiones parciales: 4.1. Expresión y caracterización de los mutantes de citocromo c**

La puesta a punto de este sistema de mutación, expresión y purificación en bacterias del citocromo c, junto con la posterior validación estructural de los distintos mutantes nos va a permitir evaluar la participación de distintos residuos aminoacídicos en los procesos en los que está implicado el citocromo, aproximándonos a conocer los mecanismos de estos procesos: ya sea en la cadena de transporte mitocondrial, la movilidad estructural relacionada con distintos fenómenos como la nitración o transición alcalina, y los mecanismos que llevan a la nitración y polimerización del citocromo c.

Tomando en cuenta los resultados expuestos en esta sección podemos afirmar que los mutantes desarrollados constituyen un buen modelo para el estudio del citocromo c, siendo los mutantes en cada tirosina similares al nativo, tanto en estructura como en función, y completamente diferentes al mutante M80A, al que le sacamos la sexta posición de coordinación del hemo, generando un importante cambio en las propiedades de este citocromo.

Además, este sistema va a permitir el estudio de otros residuos aminoacídicos críticos, como el de los ligandos débiles que reemplazan la sexta posición de coordinación cuando la Met80 es desplazada (la Lys72, Lys 73 o Lys79), o el estudio de citocromos mutados que han sido detectados *in vivo* (como las mutaciones G41S (173) o Y48H (174) que ha sido encontrada en personas que padecen trombocitopenia), o también de los residuos que permiten la interacción del citocromo c con otras moléculas como la cardiolipina. En estas líneas nuestro grupo tiene una estrecha colaboración con tres importantes grupos que estudian la interacción del citocromo c con membranas lipídicas, así como en los cambios conformacionales que sufre el citocromo como consecuencia de estas interacciones: el grupo del Dr. Valerian Kagan (Center for Free Radical and Antioxidant Health and Department of Environmental and Occupational Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA), el grupo del Dr. Daniel Murgida (Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.), y el grupo de la Dra. Iseli Nantes (Centro Interdisciplinario de Investigación Bioquímica, Universidad de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, San Pablo, Brasil) (19,62,175-177).

4.2. Determinación de valores de pKa para transición alcalina y potencial de reducción estándar

El objetivo de esta sección es intentar determinar dos importantes propiedades físico químicas de los citocromo *c* modificados (ya sea por nitración o mutación). El valor de pKa de la transición alcalina nos va a dar información sobre la estructura cercana al grupo hemo, y la estabilidad de la misma (en términos de facilidad o dificultad para alterarla).

Esta transición alcalina puede ser seguida mediante técnicas de espectrofotometría, ya que el espectro UV del citocromo *c* “neutro” presenta una banda de absorción característica de 695 nm, que es indicativa del enlace hierro-sulfhidrilo entre la Met80 y el grupo hemo, y baja de intensidad hasta desaparecer completamente al aumentar el pH (20). Alternativamente, la banda de coordinación la Met80 con el hierro, así como otros cambios conformacionales en el entorno del grupo hemo pueden ser evaluados mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) paramagnética (171,172,178), y por espectroscopia de Resonancia Raman (176).

Por otro lado, el potencial de reducción estándar, es un parámetro crítico en el citocromo *c*, ya que es su valor de potencial el que le da la capacidad de transportar electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial entre los complejos III y IV.

4.2.1. Determinación de pKa de la transición alcalina de los citocromos mono-nitrados

Como ya se mencionó en la introducción, la nitración sitio específica del citocromo *c* genera cambios en su estructura y su funcionalidad, como una disminución en la banda a 695 nm (que refleja la coordinación entre la Met80 y el hierro del grupo hemo), un aumento en la actividad peroxidasa del citocromo, menor habilidad de transporte de electrones por la cadena respiratoria, y una menor capacidad de activar el apoptosoma; sin embargo, la determinación del valor del pKa de la transición alcalina para las formas mono-nitradas todavía no había sido determinado.

Con este objetivo se aislaron formas mono-nitradas del citocromo *c* en las Tyr74 y Tyr97. La nitración y purificación se hizo de acuerdo a (125) con la colaboración de la Dra. Verónica Demicheli (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República) y del Dr. Carlos Batthyány (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República e Instituto Pasteur de Montevideo).

Para esto se trató citocromo *c* comercial con un flujo de ONOO^- por 30 minutos, y las distintas formas nitradas fueron separadas por HPLC (Fig 4.7).

Los picos 2 y 3 de la figura 4.7 son re purificados por la misma columna obteniéndose formas mono-nitradas de citocromo *c* con una pureza mayor a un 99%.

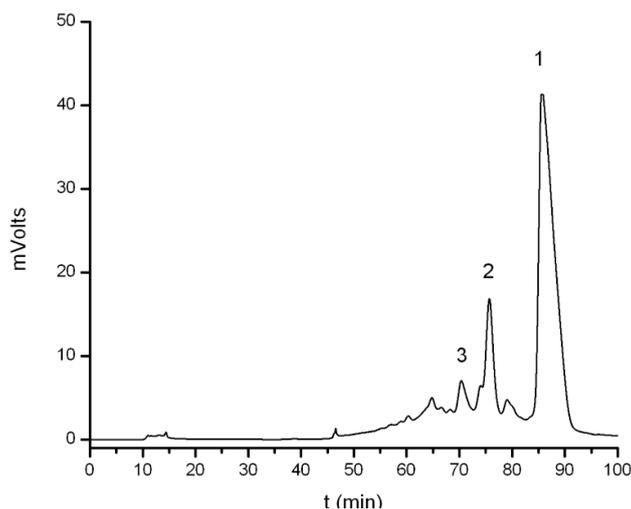


Figura 4.7. Purificación de formas mono-nitradas de citocromo *c*. El citocromo *c* es nitrado por un flujo de ONOO^- tal como se explica en metodología. 60 mg de muestra es separada en una columna preparativa de intercambio catiónico por HPLC, obteniéndose 3 picos mayoritarios: Citocromo *c* no modificado (pico 1), NO_2 -Y97-citocromo *c* (pico 2) y NO_2 -Y74-citocromo *c* (pico 3), tal como se confirmó por MALDI-TOF y mapeo peptídico en Batthyany *et al*, 2005, Biochemistry.

A partir de 60 mg de citocromo *c* tratado con ONOO^- se obtiene un rendimiento de aproximadamente 1,5 mg de NO_2 -Y74-citocromo *c* y 2 mg de NO_2 -Y97-citocromo *c*.

Con estas formas mono-nitradas del citocromo *c* se determinó el valor de pKa de la transición alcalina espectrofotométricamente, por NMR paramagnética (179) y por espectroscopia de resonancia Raman.

Mediante espectroscopia NMR ^1H se realizaron espectros iguales a los que mostramos en la figura 4.4, pero se realizan a distintos valores de pH entre 7 y 11 en buffer fosfato 100 mM preparado en un 100% de D_2O (Fig. 4.8). Tal como ha sido reportado (23-25,32), en el citocromo *c* nativo (Fig. 4.8 A) se observa que a medida que aumenta el pH va desapareciendo la señal de resonancia que indica la unión de la Met80 con el

hierro (señalada como 3 en la figura). Este cambio va acompañado de una pérdida de las señales correspondientes a la forma “neutra” (señaladas como 1) y una aparición de las correspondientes a la forma alcalina (señaladas como 2).

En la figura 4.8 B y C se ve la titulación de las dos especies de citocromo mononitradas. Las dos especies muestran las mismas especies involucradas en la transición alcalina que el citocromo *c* nativo, con la desaparición y aparición de señales resonantes en la misma posición. Sin embargo, el pH al cual esos cambios ocurren si cambia, y se observa una pequeña disminución en el valor de pKa para la transición alcalina en el NO₂-Y97-citocromo *c* (Fig. 4.8 B), y una marcada disminución para el NO₂-Y74-citocromo *c*, en el que ya a pH neutro se ve que la señal correspondiente a la Met80 es muy baja comparadas con las correspondientes a los metilos 3 y 8 (Fig. 4.8 C).

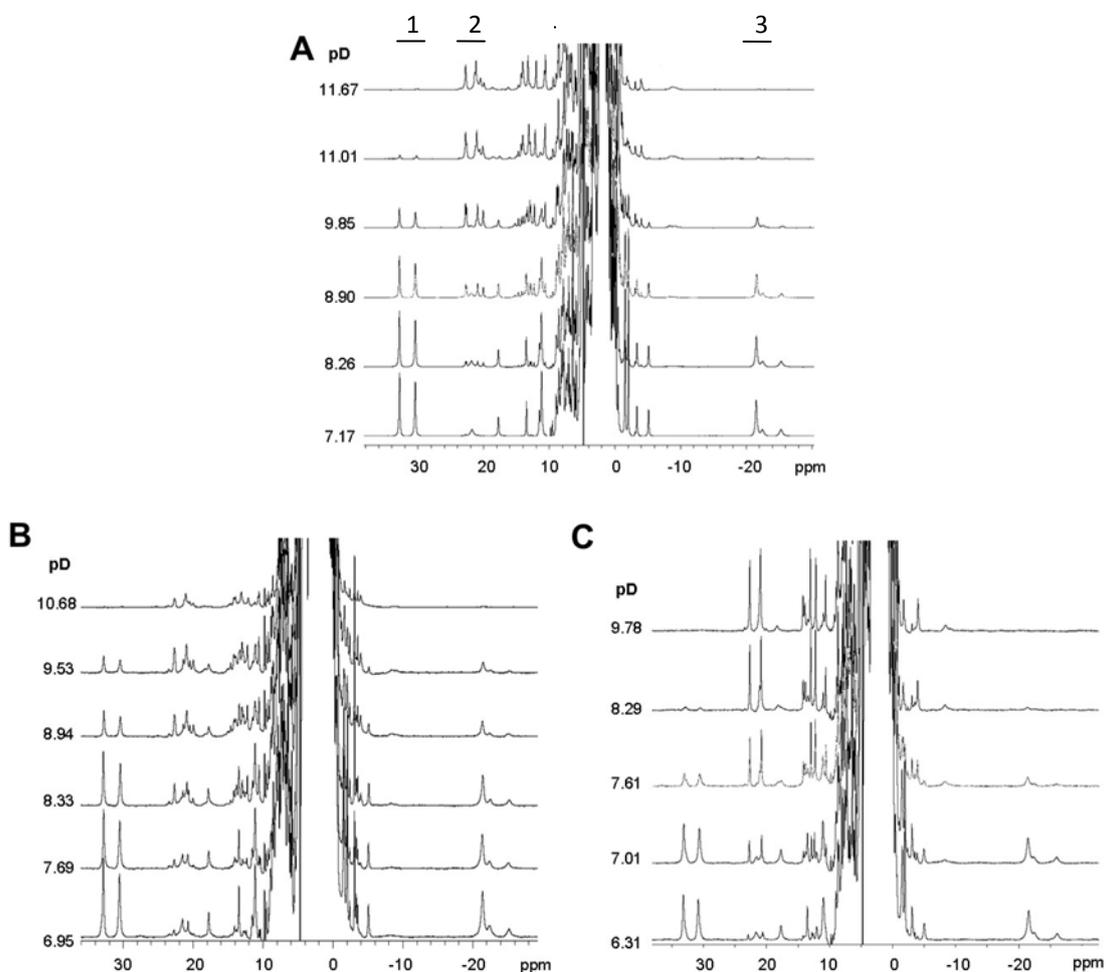


Figura 4.8. Titulación por pH de los nito-citocromo *c* seguida por NMR ¹H. Se realizaron espectros de NMR paramagnética ¹H del citocromo *c* nativo (**A**), NO₂-Y97 (**B**) y NO₂-Y74 (**C**) a distintos valores de pH. Los espectros fueron tomados a 35° C en buffer fosfato 100 mM preparado en 100% de D₂O.

Los valores de pKa para la transición alcalina se calcularon tanto por la desaparición de la señal de la Met80, como por la desaparición de la señal de los metilos 8 y 3 en la posición en la que se encuentran en la forma neutra del citocromo. Se muestra como ejemplo el ajuste de la desaparición de la señal del metilo 3 de la forma neutra para el citocromo NO₂-Y74 (Fig. 4.9).

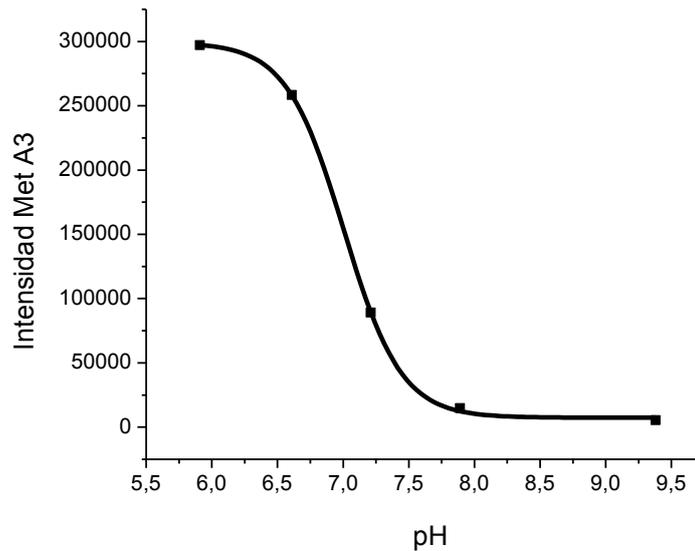


Figura 4.9. Ajuste de la titulación por pH de los nitocitocromo c seguida por NMR. Se muestra como ejemplo el ajuste según la altura de la señal del metilo 3 en la forma neutra (metilo A3) en función del pH para el citocromo NO₂-Y74. Los gráficos fueron ajustados a una función sigmoidea.

Los valores de pKa para la transición alcalina también fueron determinados espectrofotométricamente (179). Para esto se realizó una titulación de la banda a 695 nm a distintos valores de pH entre 5 y 12 (Fig. 4.10). El experimento completo se muestra como ejemplo para el citocromo *c* nativo recombinante en la figura 4.14 A donde se muestran los espectros centrados en 695 nm para el citocromo 200 μ M. En los distintos registros se puede ver cómo se va perdiendo la banda de a medida que va subiendo el pH. Para calcular los valores de pKa se determina para cada valor de pH la altura de la banda a 695 nm y se grafican en función del pH. Los gráficos para los citocromos nativo comercial, NO₂-Y74 y NO₂-Y97 se muestran en la figura 4.10.

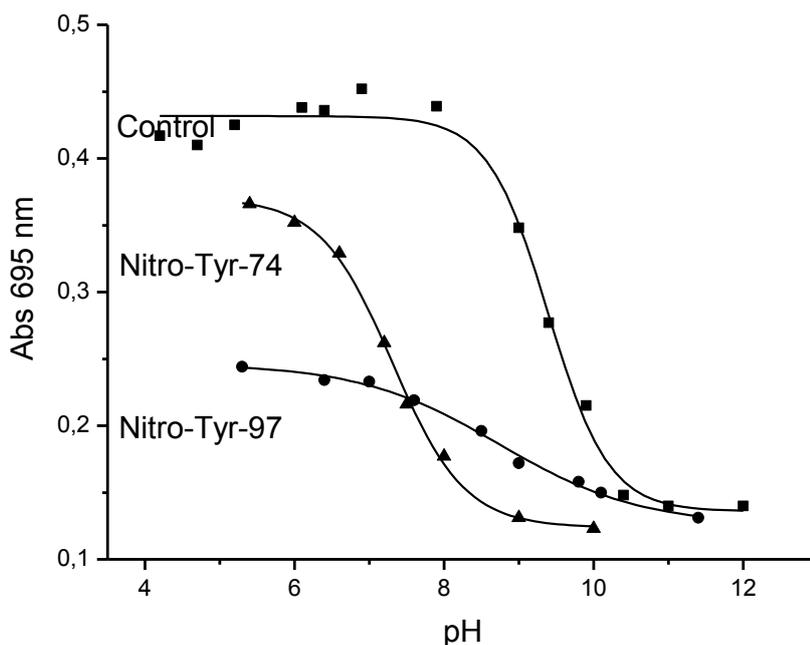


Figura 4.10. Titulación por pH de los nito-citocromo c seguida por absorción a 695 nm. Se realizaron espectros de absorción del citocromo c (500 μ M) nativo comercial (\blacksquare), NO₂-Y97 (\bullet) y NO₂-Y74 (\blacktriangle) a distintos valores de pH y se graficó la absorbancia a 695 nm en función del pH. Los gráficos fueron ajustados a una función sigmoidea.

El citocromo c comercial mostró un valor de pH de $9,4 \pm 0,1$ unidades, que es consistente con los valores previamente reportados, que van entre 8,9 y 9,5 unidades de pH, dependiendo de la isoforma de citocromo, al fuerza iónica y la temperatura (23-29,32). Como se ve en la figura, por esta técnica también se comprobó que el valor de pKa para el NO₂-Y97-citocromo c es ligeramente inferior al del citocromo c nativo, pero el NO₂-Y74-citocromo c presenta un valor de pKa 2 unidades menor.

Por último se realizaron las medidas de determinación de pKa a través de los espectros de Raman Resonante. Todos los experimentos de resonancia Raman fueron realizados en dos pasantías en el Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires en colaboración con el laboratorio del Dr. Daniel Murgida.

Como los citocromos presentan diferencias en su espectro Raman cuando se encuentran en una conformación neutra, a los que se encuentran en la forma alcalina (Fig. 4.11 A), puede calcularse a cada pH cual es la proporción de cada una de las dos especies. Los valores de pKa se determinan calculando para cada pH la proporción de citocromo en forma alcalina y graficándolo en función del pH (Fig. 4.11 B). Estos experimentos se realizaron siguiendo tanto la banda de Soret del citocromo (que se muestra en la figura 4.11) a 413 nm, como siguiendo la región a 458 nm, donde además del citocromo absorbe la nitro-tirosina, obteniéndose en ambos casos medidas de pKa consistentes.

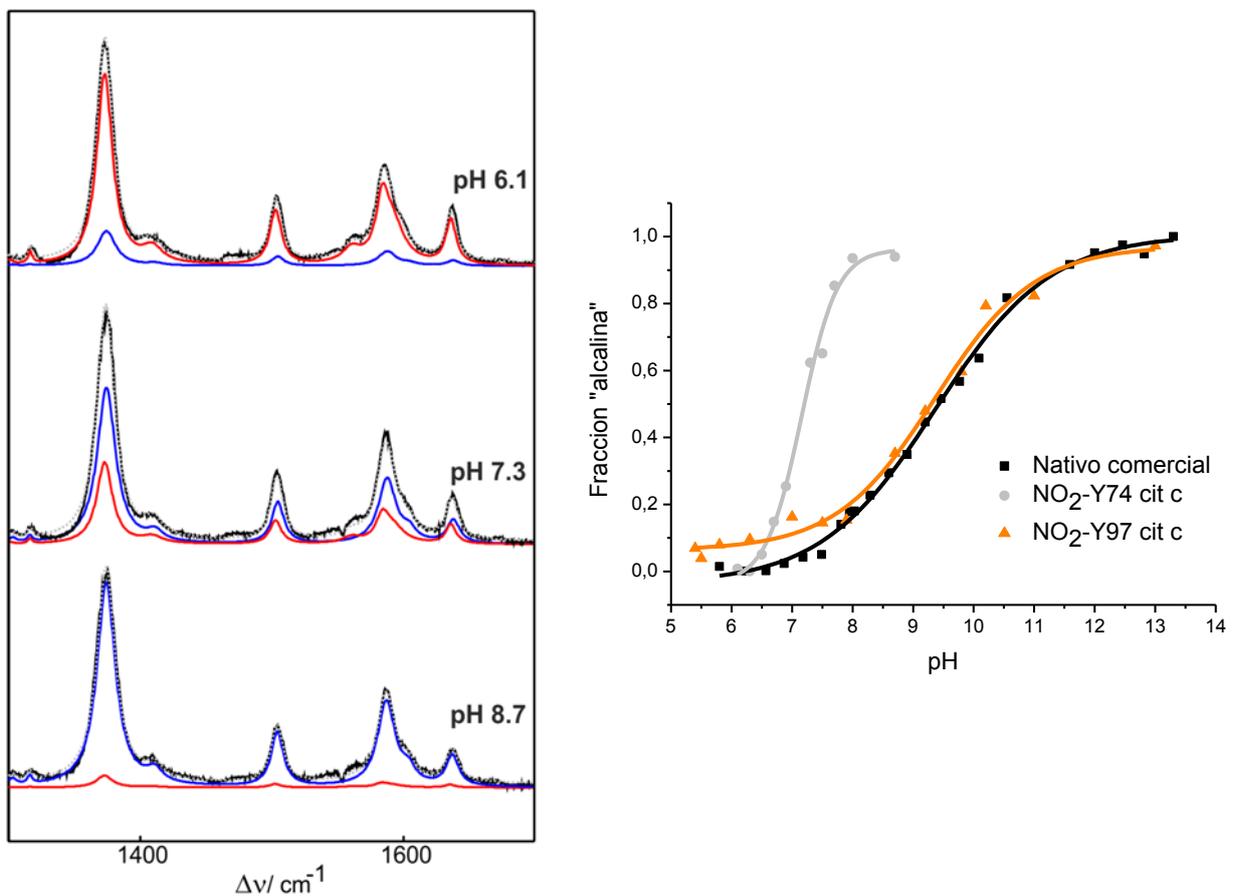


Figura 4.11. Titulación por pH de los nito-citocromo c seguida por resonancia Raman a 413 nm. (A) Representación de las señales del citocromo c a pH neutro (rojo) y a pH alcalino (azul). Como ejemplo, en los distintos paneles se ven en negro las señales medidas para el citocromo NO₂-Y74 y el porcentaje de coincidencia con el espectro neutro, y con el espectro alcalino. Se observa que a pH 7,3 ya hay una gran proporción del citocromo en forma alcalina. **(B)** Ajuste de la proporción de fracción alcalina en cada punto en función del pH. Los gráficos fueron ajustados a una función sigmoidea.

Los resultados de los valores de pKa calculados por las tres técnicas son consistentes entre si y se resumen en la tabla 4.2. Los valores de pKa de la transición alcalina de los mono-nitrados se comparan con el del citocromo c comercial debido a que fueron nitrados a partir de este citocromo.

Muestra	pKa		
	NMR	Absorbancia a 695 nm	Espectroscopia Raman
Nativo comercial	9,3 ± 0,1	9,4 ± 0,1	9,4 ± 0,1
NO₂-Y74	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,1
NO ₂ -Y97	8,6 ± 0,2	8,7 ± 0,2	9,4 ± 0,1

Tabla 4.2. Valores de pKa de transición alcalina para los citocromos mono-nitrados medidos por 3 técnica diferentes.

Estas diferencias en los valores de pKa provocan importantes cambios en la conformación del citocromo c a pH neutro, que quedan en manifiesto en los espectros de NMR (Fig. 4.8). Estas diferencias están de acuerdo con la actividad peroxidasa de estas especies, ya que se vio que el NO₂-Y97 citocromo c, que tiene una pequeña disminución en el valor de pKa, tiene un aumento moderado en la actividad peroxidasa del citocromo, mientras que la especie NO₂-Y74, que tiene un valor de pKa mucho más bajo que el nativo, también presenta una actividad peroxidasa mucho mayor (64,125).

También se pudo comprobar que en los citocromos mono-nitrados, en los cuales el enlace Met80-Fe está parcialmente desplegado, la sexta posición de coordinación no permanece libre, sino que es remplazado por otro residuo, ya que no se ve aparición de formas de alto espín en estos citocromos nitrados (Fig. 4.8). Esto es diferente a lo que ocurre con el mutante M80A, que al perder la sexta posición de coordinación, presenta una población de moléculas de citocromo c cuyo hierro no tiene la sexta posición de coordinación coordinando con moléculas orgánicas (Fig. 4.5 y Fig. 4.21) (179). Este hecho puede explicar las diferencias en las actividades y propiedades físico-químicas de los citocromos, ya que en ninguna de las especies mono-nitradas el hemo queda tan expuesto como en el mutante M80A.

4.2.2. Determinación de pKa de la transición alcalina de los citocromos mutantes

Los valores de pKa también fueron determinados para cada una de las mutantes de tirosina por fenilalanina (179).

Como se realizó para los citocromo *c* nitrados, se realizaron espectros de ^1H NMR a distintos pH. Los espectros de NMR muestran que la estructura en el entorno del grupo hemo del citocromo nativo recombinante y de los mutantes Y48F, Y74F y Y97F son similares a las del citocromo *c* nativo comercial, tanto en la forma neutra como en la forma alcalina (Fig. 4.12).

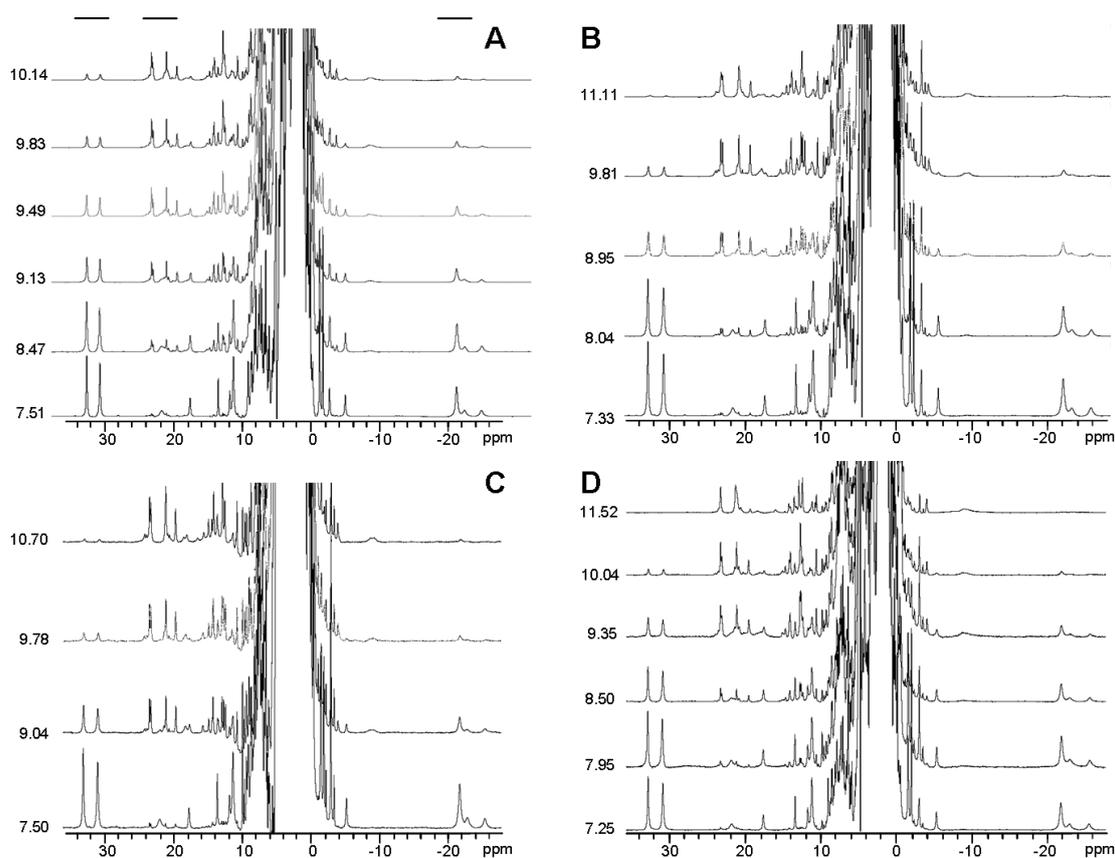


Figura 4.12. Espectros de ^1H NMR de los citocromos *c* Y48F, Y74F e Y97F a distintos pH. Titulación por pH de los citocromos *c* recombinantes (A) nativo; (B) Y48F; (C) Y74F; y (D) Y97F. Todos los espectros fueron adquiridos a 35° C en buffer fosfato 100 mM preparado en D_2O .

Los valores de pKa para estos simples mutantes tampoco presenta variaciones significativas con respecto al del citocromo *c* nativo, encontrándose en el orden de 9,1

– 8,6 unidades de pH (los ajustes no se muestran, pero se hicieron de forma análoga a como se mostró para los citocromos mono-nitrados).

En el caso del mutante Y67F (Fig. 4.13 A) el espectro de NMR muestra diferencias en la forma neutra con respecto al citocromo *c* nativo (Figura 4.13 B). Cabe recordar que la Tyr67 es la que se encuentra más próxima al grupo hemo, y en una ubicación capaz de interactuar con el residuo de Met80.

Los espectros a distintos pH (Fig. 4.13 A) muestran que la transición alcalina no fue completada aún a pH 11, indicando un valor de pKa muy superior al del citocromo *c* nativo.

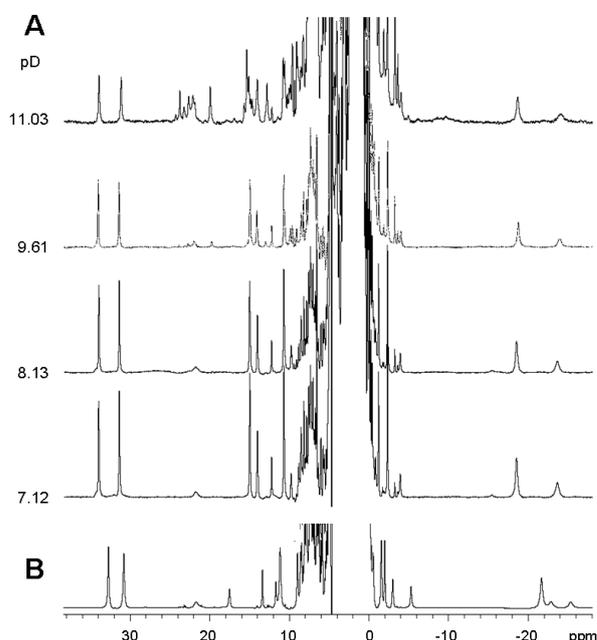


Figura 4.13. Espectros de ¹H NMR del citocromo *c* Y67F a distintos pH. (A) Titulación por pH del citocromo *c* Y67F. (B) Espectro de NMR del citocromo *c* nativo a pD 7.1. Los espectros fueron adquiridos a 35° C en buffer fosfato 100 mM preparado en D₂O.

Tal como se hizo para los citocromos mono-nitrados, el valor de transición alcalina también fue calculado siguiendo la desaparición de la banda a 695 nm (179). En el panel A de la figura 4.14 se muestran los espectros centrados en 695 nm del citocromo *c* nativo recombinante, que muestra la disminución de la absorción al subir el pH. En el panel B se muestra el ajuste de la intensidad de la banda en función del pH.

También se muestra el ajuste de un experimento análogo para cada uno de los citocromo *c* mutantes en tirosina (Fig. 4.14 C-F).

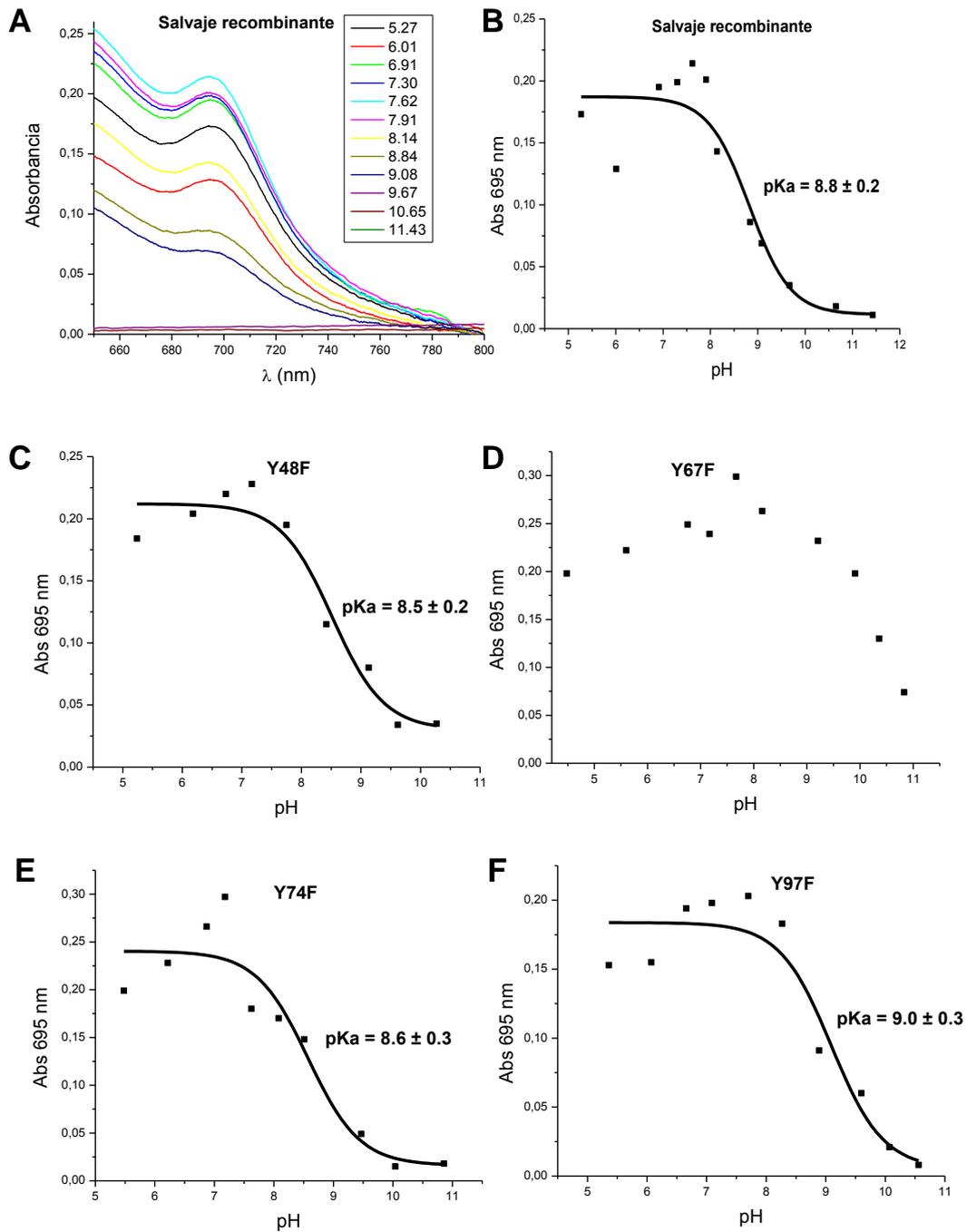


Figura 4.14. Titulación por pH de los citocromos mutantes seguida por absorción a 695 nm. Se realizaron espectros de absorción del citocromo c (500 mM) nativo recombinante a distintos pH (A). La altura de la banda se graficó en función del pH para los citocromos nativo recombinante (B), Y48F (C), Y67F (D); Y74F (E), Y97F (F). Los gráficos fueron ajustados a una función sigmoidea.

Los valores de pKa calculados son comparables a los que se calcularon por NMR, en donde se destaca que el mutante Y67F no es capaz de realizar la transición alcalina aún a altos valores de pH. Para la misma mutación en citocromo *c* de rata que había observado el mismo efecto, obteniéndose un valor de 10,7 unidades de pH para la transición alcalina (180). Estos resultados son consistentes con la importante interacción entre la Met80 y la Tyr67, que fue demostrada en otro trabajo en el que la Tyr67 del citocromo *c* de levadura era sustituida por fenilalanina observándose un movimiento de la cadena lateral de la Met80 en 0,7 Å, probablemente debido a la incorporación de una nueva molécula de agua en la región que ocupaba la Tyr67, sustituyendo el puente de hidrógeno formado por estos dos residuos (Met80-Tyr67) por un nuevo puente entre la Met80 y el agua (30). Además demostraron que la exposición del grupo hemo en el mutante Y67F era menor que en el citocromo nativo (30). En ese mismo trabajo también postularon que el puente de hidrógeno que se forma en la proteína nativa entre una molécula de agua con la Tyr67 es esencial para la flexibilidad del segmento de cadena polipeptídica cercano a este residuo (30).

El residuo de Tyr67 también ha mostrado ser fundamental para la estabilización de la estructura que se forma a bajos valores de pH en el citocromo *c* de levadura (181).

Como confirmación, al citocromo que presentó mayor variación en el valor del pKa se le estudió el mismo parámetro por espectroscopia de resonancia Raman (Fig. 4.15). Por este método también se confirmó un valor de pKa para este mutante mayor a 11 unidades.

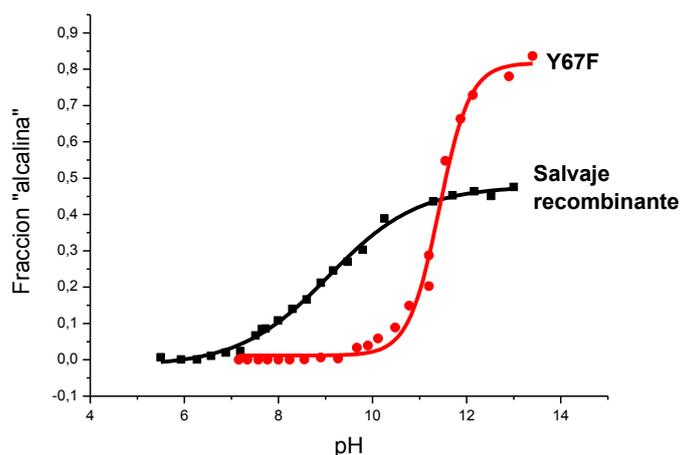


Figura 4.15. Titulación por pH el citocromo *c* nativo e Y67F seguida por resonancia Raman. Ajuste de la proporción de fracción alcalina en cada punto en función del pH. Los gráficos fueron ajustados a una función sigmoidea.

Los datos de los mutantes calculados por dos o las técnicas se resumen en la tabla 4.3.

Muestra	pKa		
	NMR	Absorbancia a 695 nm	Espectroscopia Raman
Nativo recombinante	9,1 ± 0,1	8,8 ± 0,2	9,1 ± 0,1
Y48F	8,6 ± 0,2	8,5 ± 0,2	-
Y67F	> 11	> 10,5	11,2 ± 0,1
Y74F	8,7 ± 0,2	8,6 ± 0,3	-
Y97F	8,6 ± 0,3	9,0 ± 0,3	-

Taba 4.3. Valores de pKa de transición alcalina para los citocromos mutantes medidos por 2 o 3 técnica diferentes.

4.2.3. Espectroscopia de dicroísmo circular

Las formas de citocromo *c* modificadas que mostraron tener afectado en mayor su valor de transición alcalinas fueron analizados por espectroscopia de dicroísmo circular, para estudiar mejor su estructura tridimensional (179).

El citocromo *c* nativo a pH neutro mostró su característico efecto Cotton a 410 nm (182,183), que corresponde con la banda mayoritaria de Soret en el espectro de absorción (Fig. 4.16 A). A pH alcalino, pH 11, el espectro muestra una banda positiva centrada a 405 nm, que refleja la estructura tridimensional que adquiere el citocromo a estos valores de pH.

En el caso del NO₂-Y74 citocromo *c*, este cambio empieza a ser notable ya a pH 9 (Fig. 4.16 B), mostrando que el citocromo adquiere una conformación similar a la alcalina a menores valores de pH, de acuerdo con la disminución en el valor de pKa de la transición alcalina para este citocromo *c* nitrado.

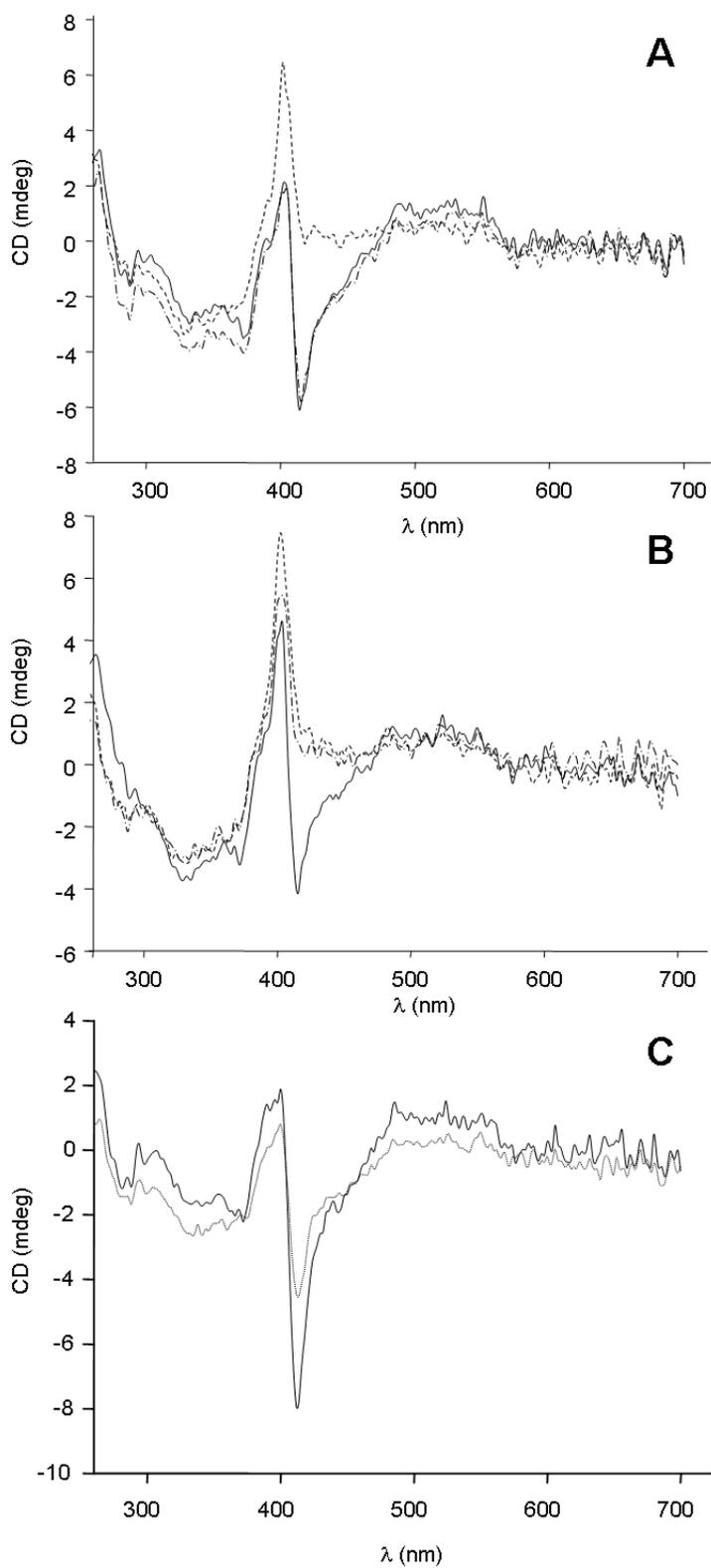


Figura 4.16. Espectros de dicroísmo circular de NO₂-Y74 e Y67F citocromo c. Espectros de DC en las regiones UV cercano y visible del citocromo c (10 μ M) nativo **(A)**, NO₂-Y74 **(B)** e Y67F **(C)**, medidos a pH 7 (línea sólida), pH 9 (línea con rayas y puntos), y pH 11 (línea punteada).

Los espectros de dicroísmo circular del mutante Y67F recolectados a pH 7 y 11 mostraron ser muy similares, sin la aparición de la banda centrada a 405 nm que refleja la aparición del citocromo en la conformación que adquiere el nativo a valores alcalinos de pH (Fig. 4.16 C). Otra vez, este resultado está de acuerdo con el valor de pKa encontrado para este mutante, el cuál muestra que no existe un gran cambio conformacional aún a pH 11.

4.2.4. Titulación por pH del mutante M80A

Para la mutante a la que le sacamos la sexta posición de coordinación del hemo, M80A, también realizamos una titulación por pH.

El resultado esperado es muy distinto al observado para los otros mutantes, ya que ya habíamos visto que presenta una estructura cerca al grupo hemo muy diferente a la del citocromo *c* nativo, con una serie de conformaciones de bajo y alto espín (Fig. 4.5) a valores de pH cercanos a 7.

En este experimento vimos que estas dos conformaciones de alto y bajo espín son inter-convertibles entre sí a medida que variamos el rango de pH (Fig. 4.17). Estas transiciones son análogas a las que fueron reportadas para el citocromo *c* M80A de levadura, pero con un cambio en el valor de pKa de transición (184).

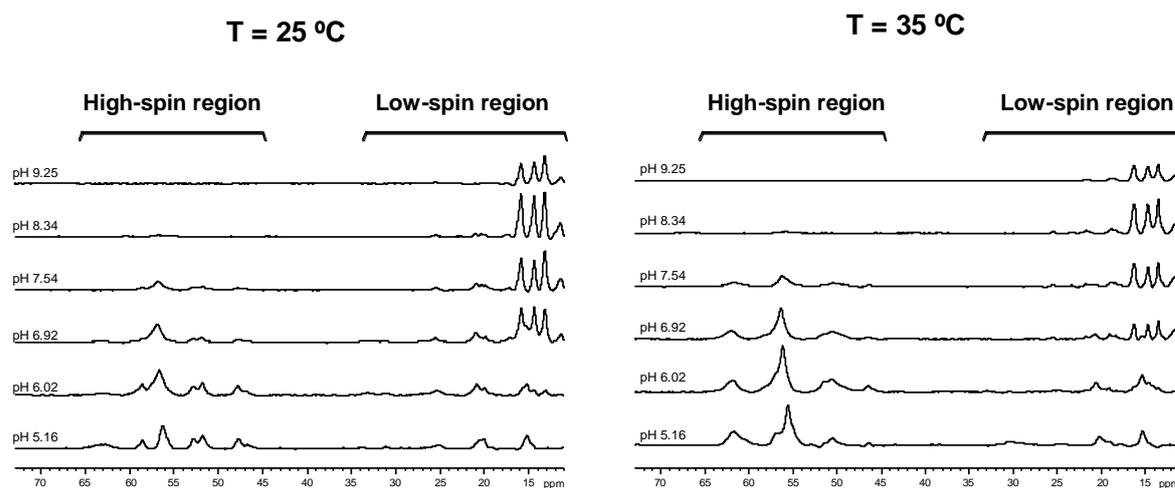


Figura 4.17. Titulación por pH de citocromo M80A seguida por ^1H NMR. Los espectros fueron adquiridos a valores de pH entre 5,16 y 9,25, a 25 y 35° C en buffer fosfato 100 mM preparado en D_2O .

4.2.5. Determinación de los valores de potencial de reducción estándar

De los distintos mutantes de tirosina por fenilamina no hay ningún reporte del valor de potencial redox, a excepción del mutante Y67F, del que fue calculado el potencial redox para la isoforma de rata y levadura (180,181). Para los citocromo *c* nitrados tampoco fue determinado el potencial redox, aunque se sabe que estos citocromos son menos eficaces en transportar electrones por la cadena respiratoria (64,126). En esta sección determinaremos los valores de potencial redox de los distintos citocromos para identificar su capacidad de transportar electrones por la cadena respiratoria.

En este trabajo, a cada una de las formas mutadas y mono-nitradas de los citocromos se les realizó una caracterización electroquímica, determinando su valor de potencial de reducción estándar (E^0) por distintas técnicas. Estos experimentos fueron realizados en una pasantía en la Universidad de Buenos Aires, en el laboratorio del Dr. Daniel Murgida.

Los E^0 de las distintas formas del citocromo fueron determinadas tanto en estado absorbido como en solución mediante voltametría cíclica, y espectroscopio Raman amplificada en superficies (SERRS, del inglés: surface-enhanced resonance Raman scattering).

Para el cálculo del valor de potencial por voltametría cíclica se realizaron voltagramas a diferentes velocidades de barrido, que para todos los mutantes adsorbidos a monocapas autoensambladas de alcanotioles. Estos experimentos se realizan variando el potencial que se le aplica a la proteína entre 400 y - 400 mV, y registrando la intensidad del sistema electroquímico, para la proteína absorbida al electrodo de trabajo. A medida que disminuye el potencial (cuando se pasa de 400 a - 400 mV) la proteína se reduce, mostrando un pico de reducción, y al invertir el potencial (de - 400 a 400 mV) se observa el pico de oxidación. Este proceso de transferencia de electrones mostro ser reversible para todas las proteínas estudiadas, ya que la intensidad del pico de oxidación y de reducción es la misma, y la posición de ambos picos no cambio al variar la velocidad de barrido. En la figura 4.18 A se muestra un voltagrama típico para distintas velocidades de barrido (en esta oportunidad se eligió el mutante Y74F como ejemplo, pero todos son similares, con pequeñas diferencias en las posiciones de los picos catiónicos y aniónicos, que determinan la diferencia en el valor de potencial redox).

Para el cálculo del valor de potencial por voltametría cíclica también se realizaron voltagramas a diferentes velocidades de barrido, pero utilizando electrodos de oro recubierto de monocapas de C5-CH₂OH, que para todos los mutantes presentan la

forma típica de las especies electroactivas en solución. Como ejemplo, en la figura 4.18 B se muestran los voltagramas del cuádruple mutante de tirosina por fanilalanina. Todos los mutantes mostraron voltagramas similares, con diferencias en las posiciones de los picos catiónicos y aniónicos. Para el mutante M80A fue imposible realizar la determinación del potencial redox por esta técnica ya que los voltagramas no daban la forma esperada.

En ambos casos el valor del potencial redox (E^0) se obtiene como el promedio del potencial de los picos catódicos y aniónicos.

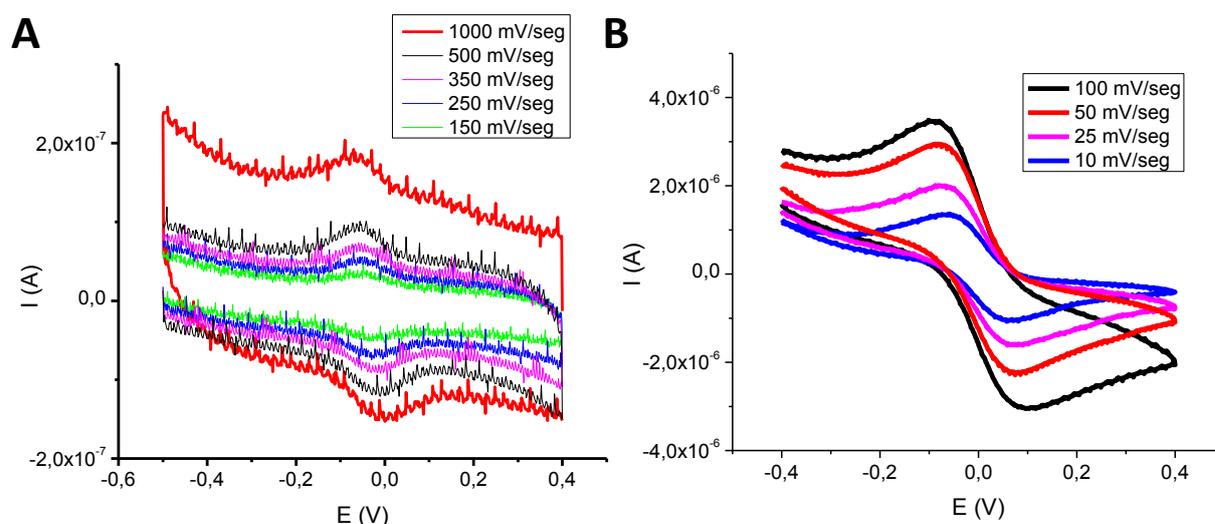


Figura 4.18. Voltagramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para (A) el citocromo Y74F (como ejemplo) adsorbidos sobre monocapas auto-ensambladas mixtas 1:1 de C10-COOH:C10-CH₂OH o (B) para el citocromo cuádruple mutante en tirosinas (también como ejemplo) en solución empleando electrodos de oro policristalino recubierto de monocapas autoensambladas de C5-CH₂OH.

Para la determinación del valor de E^0 por SERRS se realizaron espectros para distintos valores de potencial, en los cuales se determinó las concentraciones relativas de especies oxidadas y reducidas. En la figura 4.19 A se muestran los espectros oxidados y reducidos para el mutante Y48F (como ejemplo). El potencial redox se determina mediante un gráfico linealizado de Nerts, utilizando la relación entre las intensidades de las especies reducidas y oxidadas para cada potencial (Fig. 4.19 B). El potencial de reducción estándar se calcula como la ordenada en el origen del gráfico del potencial en función del logaritmo en base 10 de la intensidad de la forma reducida, sobre la intensidad de la oxidada (ver ecuación inserta en la figura 4.19 B). Por esta técnica tampoco fue posible determinar el potencial redox del mutante M80A, debido a que la determinación se hace excitando con un laser a 514 nm, y ya

habíamos determinado que este mutante no se reduce dando el pico de absorbancia a esta longitud de onda (ver Fig. 4.3 y 4.6).

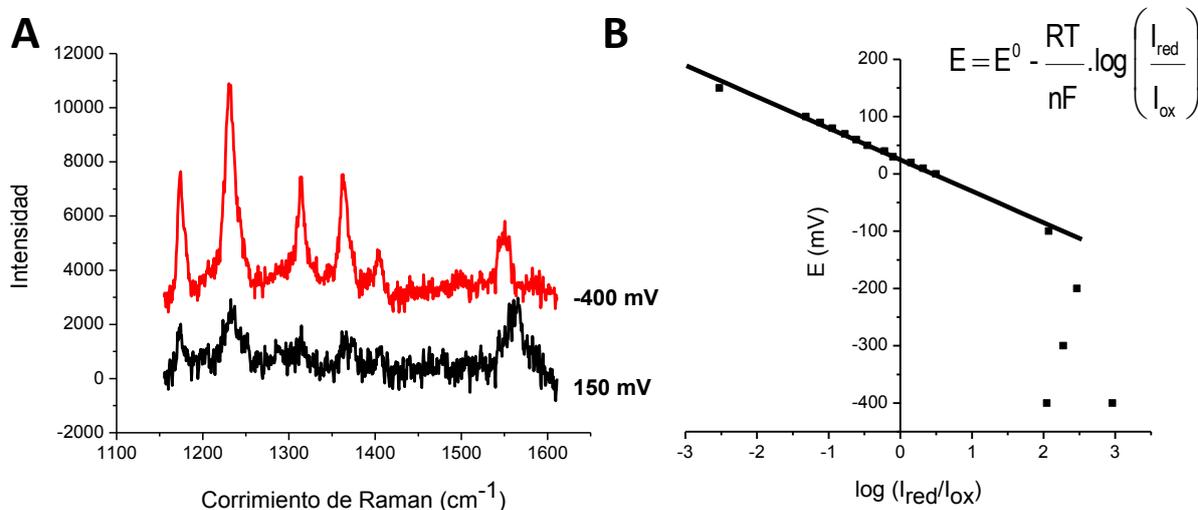


Figura 4.19. Determinación del potencial de reducción estándar por Resonancia Raman. (A) Espectros de las formas oxidadas y reducidas del citocromo Y48F (como ejemplo). **(B)** Linealización de Nerts para el mismo mutante.

Los datos obtenidos por todas las técnicas, referidos al electrodo de Ag/AgCl₂, se resumen en la tabla 4.4.

Muestra	E ⁰		
	SERRS	CV en solución	CV adsorbidas
Nativo	15 ± 2	49 ± 13	4 ± 2
Y48F	18 ± 2	55 ± 6	-18 ± 8
Y67F	-34 ± 2	16 ± 1	-38 ± 13
Y74F	-19 ± 1	31 ± 18	-28 ± 10
Y97F	1 ± 1	58 ± 12	9 ± 14
M80A	N.D.	N.D.	-333 ± 13
NO ₂ -Y74	-44 ± 2	9 ± 3	-41 ± 4
NO ₂ -Y97	-67 ± 2	7 ± 9	-32 ± 6

Tabla 4.4. Valores de potencial redox para 3 técnicas diferentes.

Los valores de potenciales obtenidos de los experimentos de voltametría cíclica en solución son confiables, es el método con el que se suelen reportar los potenciales de reducción ya que dependen únicamente de las propiedades de las proteínas estudiadas, y serán nuestra referencia. Todos los valores de potencial en este informe son referidos al electrodo de referencia de Ag/AgCl, hay que sumarle 223 mV para referirlos al electrodo normal de hidrógeno.

Cabe destacar que el citocromo *c* nativo recombinante se comporta igual al comercial, presentando el mismo valor de E^0 por las tres técnicas utilizadas.

Los valores del potencial redox para el mutante Y67F son entre 40 y 50 mV más negativo que para el citocromo nativo, para cualquiera de las técnicas empleadas. Estos datos son consistentes con lo que ya ha sido observado para el mutante Y67F de citocromo de rata, que presenta un corrimiento de 35 mV respecto al citocromo *c* nativo (180), y para el mismo mutante para el citocromo de levadura, que muestra un corrimiento de aproximadamente 50 mV (181). Estas diferencias podrían atribuirse a un entorno del hemo ligeramente más accesible al solvente, que estabiliza la forma reducida y por tanto disminuye el potencial de reducción estándar. También parece haber un cierto corrimiento para la Y74F, aunque este último está casi dentro del error experimental.

Con respecto a los citocromos mono-nitrados también se vio que la nitración de la proteína la lleva a valores de potencial más negativos, otra vez consistente con un entorno del hemo más accesible. En este caso, la nitración en la posición Tyr74 no mostró grandes diferencias con la nitración en la posición Tyr97.

Las técnicas con la proteína adsorbida podrían tener una relevancia mayor en relación a la fracción de citocromo *c* que se encuentra unido a la membrana, pero su interpretación es mucho más compleja y relativa, ya que las medidas observadas dependen no solo de las propiedades de las proteínas sino también de la forma en las que estas se adsorben al electrodo.

Los valores de potencial obtenidos por espectroscopia Raman muestran que los valores de potencial redox para el citocromo adsorbido en estas monocapas son todos más negativos, pero los resultados mostraron que todos los citocromos mutantes y nitrados no tiene alterada la coordinación del grupo hemo, a ningún valor de potencial, excepto el mutante M80A, que ya habíamos visto que se encontraba en dos conformaciones, una de ellas penta-coordinada con moléculas orgánicas.

Los resultados de voltametría cíclica de los citocromos adsorbidos son los más difíciles de interpretar aún ya que, además de la conformación de pegado de la proteína a la monocapa, también dependen de la cinética de transferencia electrónica, pero nos ayudó a verificar que el mutante M80A tiene un potencial de reducción estándar mucho más negativo que el resto de los mutantes.

❖ **Conclusiones parciales: 4.2. Determinación de valores de pKa para transición alcalina y potencial de reducción estándar**

Las variaciones en el entorno del hemo generan importantes variaciones en la estructura y propiedades físico-químicas del citocromo *c*. Esto quedó muy en manifiesto con el estudio del mutante M80A, que al faltarle la sexta posición de coordinación se encuentra en un equilibrio entre un citocromo con un hemo hexa-coordinado con otros residuos de la proteína, y una forma penta-coordinada, en la cual el hemo este probablemente coordinando con una molécula de agua. Estos cambios generan importantes consecuencias en las actividades/funciones del citocromo *c*, ya que no se ve la formación de las mismas especies al aumentar el pH, aumenta significativamente su actividad peroxidasa, aumenta la susceptibilidad a moléculas como el H₂O₂, y lleva su potencial de reducción estándar a valores muy negativos, que, debido a los potenciales de los complejos III y IV de la cadena respiratoria, lo convierte en un citocromo incapaz de actuar como transportador de electrones.

Otros cambios en el citocromo *c* llevan a cambios estructurales no tan marcados, pero que pueden también tener importantes repercusiones en las actividades o funciones de estos citocromos. En esta línea hicimos una importante caracterización de distintos citocromos mutantes en las tirosinas o mono-nitrados en los residuos de Tyr74 y Tyr97.

La estructura de la forma alcalina del citocromo *c* de levadura (con la mutación K79A) ha sido previamente determinada por espectroscopia NMR (23) observándose que era muy similar a la del citocromo *c* nativo, excepto por una región comprendida entre los residuos de Asn70 a Ile85, conocido como Ω -loop (23,185) (Fig. 4.20).

Entre los residuos comprendidos en el Ω -loop se encuentra la Tyr74, que en este trabajo demostramos que, cuando es nitrada, disminuye el valor del pKa de la transición alcalina en 2 unidades, promoviendo la ruptura del enlace Met80-Fe. Este efecto es específico de la nitración de este residuo, ya que la nitración de la Tyr97, que está a la misma distancia que el hemo, pero en el lado opuesto del Ω -loop (186), no afecta en esa magnitud el valor del pKa. Proponemos que la nitración en la Tyr74 genera, por si misma, una desestabilización del Ω -loop que promueve la ruptura del enlace entre el hemo y la Met80, que es otro aminoácido que también se encuentra en el Ω -loop. Otros cambios en ese residuo aminoacídico (Tyr74), como la sustitución por fenilalanina no tiene impacto en la coordinación del hemo a pH fisiológico.

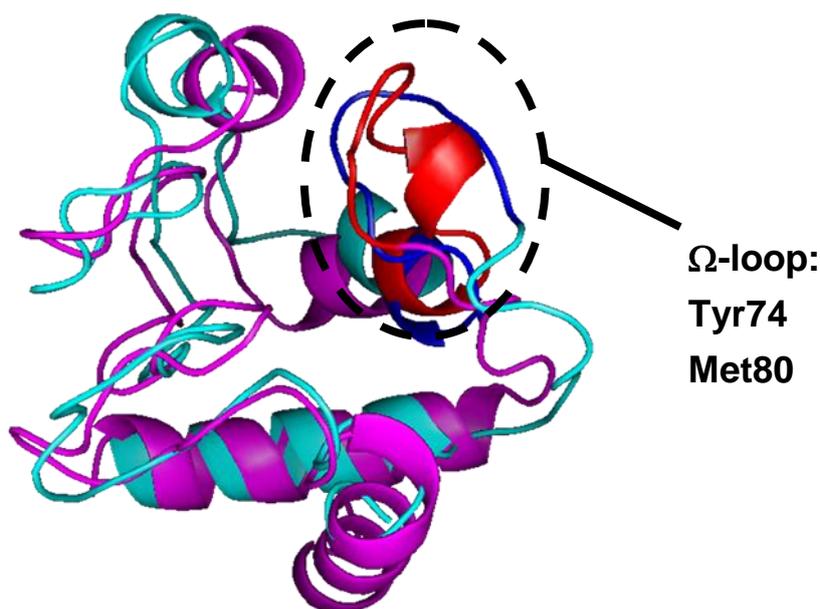


Figura 4.20. Comparación de estructuras a pH neutro y alcalino. Se muestra la representación del citocromo c de caballo a pH 7, neutro (celestre-azul) y del citocromo c de levadura a pH 11, alcalino (magenta-rojo). En punteado se resalta el Ω -loop, en el que se destacan los residuos de Tyr74 y de Met80.

El efecto de la nitración en la Tyr74 sobre el pKa de la transición alcalina está de acuerdo con el aumento de la actividad peroxidasa que se observa para esa especie mono-nitrada, y proponemos que genera una desprotonación en la tirosina, que promueve el intercambio del ligando axial Met80 por una lisina (176).

Una vez determinados todos los pKa nos preguntamos, en primer lugar, como la nitración en un residuo expuesto, como es la Tyr74, puede causar un impacto tan alto en la coordinación del hemo. Observando la estructura del citocromo c, y teniendo en cuenta el resultado obtenido para el mutante Y67F (pKa >11) propusimos un mecanismo por el cual el grupo nitro en la Tyr74 interaccionaría con la cadena lateral del Glu66, y su aminoácido posterior, la Tyr67 genera un puente de hidrógeno con la Met80, generando así la conexión entre la nitración de la tirosina y la coordinación del hierro (Fig 4.21) (179).

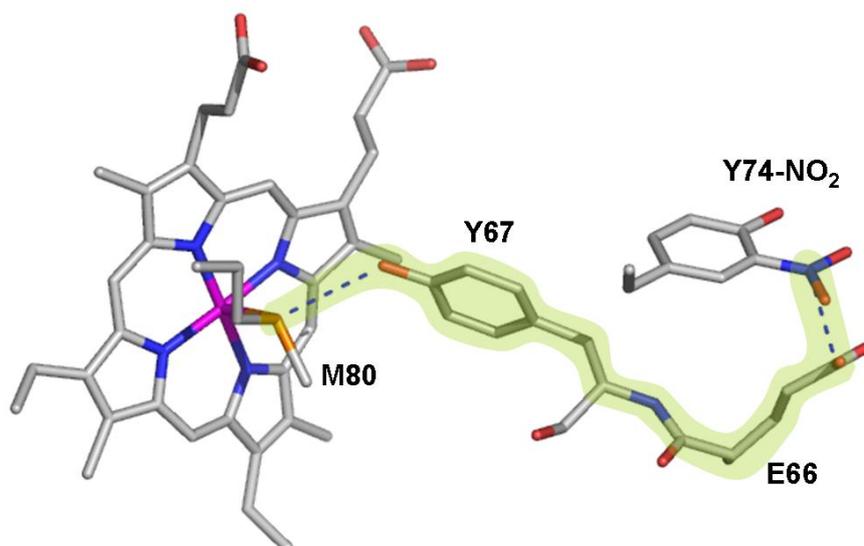


Figura 4.21. Mecanismo propuesto para la ruptura del enlace Met80-Fe por la nitración de la Tyr74.

Para verificar o refutar esta hipótesis planteamos purificar formas mono-nitradas en la Tyr74 del mutante Y67F, para después poder medirles el valor de pKa para la transición alcalina y ver si, en ausencia de la Tyr67, la nitración en la Tyr74 puede disminuir el valor de pKa de la transición alcalina. En la misma línea generamos, expresamos, purificamos y validamos un mutante sin Glu66, para también nitrarlo en la Tyr74 y evaluar el rol de este aminoácido en el cambio conformacional generado cuando se nitra la Tyr74. Estos experimentos no pudieron ser terminados aún, pero se muestra un avance del mutante construido en el anexo 1.

Este mecanismo propuesto también explicaría porque el efecto es específico para la nitración de la tirosina (y no se observa cuando la sustituimos por fenilalanina), ya que el cambio en el grupo hemo estaría originado por la formación de un nuevo puente de hidrógeno entre el Glu66 y el grupo nitro incorporado a la tirosina.

Además, tal como observamos en el espectro de absorción y en las medidas de distintas actividades de esta forma mono-nitrada realizadas en este trabajo y en trabajos anteriores, esta nitración tiene una importante relevancia fisiológica, ya que a pH neutro presenta una variación muy marcada respecto al citocromo salvaje, dejando al citocromo en un estado más desplegado con una mayor exposición del grupo hemo.

Sin embargo, cuando trabajamos con el mutante Y67F, no vimos cambios en los espectros de absorbancia, ni en las distintas actividades ensayadas a pH neutro. Esto se debe a que este mutante es estructuralmente similar al nativo en conformación neutra, sin ninguna perturbación en su grupo hemo. Sin embargo este residuo de Tyr67 mostró ser fundamental cuando se necesita alterar la estructura del citocromo *c*, para que adquiriera nuevas funciones, explicando el alto grado de conservación que presenta este residuo (19).

Las modificaciones en las tirosinas, ya sean por nitración o sustitución de sus aminoácidos constituyentes por otros, también llevan a alteraciones en el potencial redox del citocromo *c*. Estos cambios en el potencial redox probablemente se deban a modificaciones en el entorno del hemo, que pueden llevar a estabilizar o desestabilizar las formas oxidadas o reducidas de los citocromos. Cabe destacar que los citocromos que muestran mayor desviación en su valor de potencial redox son los que mostraron mayor cambio estructural, o sea los citocromos mono-nitrados y el mutante Y67F (Tabla 4.4 y Fig. 4.22).

Sin embargo estos cambios no serían de mayor importancia ya que todos son menores a los que se dan entre los complejos de la cadena respiratoria, por lo que cualquiera de ellos dejarían al citocromo *c* situado en la misma posición entre los complejos de la cadena respiratoria, si los ordenamos según su valor de potencial redox (Fig. 4.22). Por tanto, basado únicamente en su potencial redox, todos estos citocromos modificados serían capaces de transportar electrones por la cadena respiratoria. Trabajos previos de nuestro grupo habían observado que los nitro-citocromos *c* eran menos eficientes en promover la respiración de mitoplastos (126), pero esta incapacidad no puede ser explicada solamente por su cambio en el valor de potencial redox.

El mutante M80A, sin embargo, cambia su potencial a uno mucho más negativo, siendo incapaz de transferir electrones (Fig. 4.22), ya que por este valor de potencial es termodinámicamente incapaz de aceptar electrones del complejo III de la cadena respiratoria.

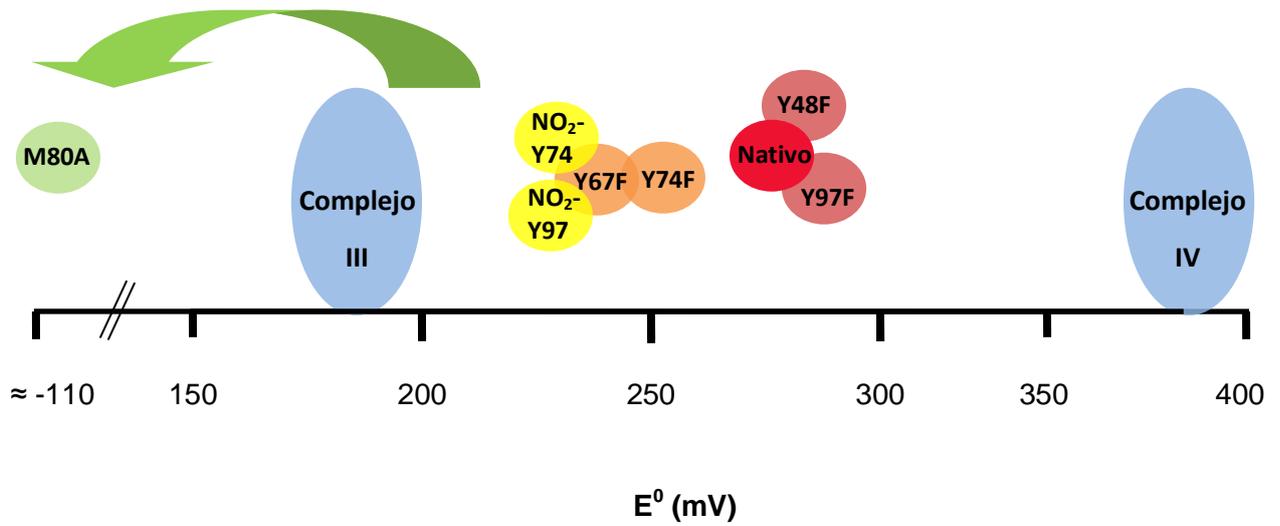


Figura 4.22. Esquema de los valores de potencial redox. Se esquematiza los potenciales de reducción redox referidos al electrodo normal de hidrógeno de los complejos III y IV de la cadena respiratoria, así como de los distintos citocromos nativo, mutantes en tirosina, en la Met80 y mono nitrados en las tirosinas Tyr74 y Tyr97. Como se muestra en la flecha verde el mutante M80A es el único que se sale de la ubicación que tenía entre los complejos III y IV.

4.3. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peroxinitrito

Los mecanismos moleculares que llevan a la nitración y polimerización del citocromo *c* por el tratamiento con ONOO^- no han sido determinados aún. En esta sección nos propusimos conocer un poco más del rol de cada una de las tirosinas en estos mecanismos mediante la nitración con bolos de ONOO^- .

4.3.1. Nitración inducida por peroxinitrito

Con el fin de elucidar el rol de cada una de las tirosinas en la nitración del citocromo *c* mediada por ONOO^- , expusimos a cada uno de los mutantes en tirosina del citocromo *c* (100 μM) a bolos de 0 a 1 mM de ONOO^- y los polímeros de citocromo *c* fueron separados en geles de acrilamida al 15% y transferidos a una membrana de nitro celulosa, para el posterior revelado con un anticuerpo anti-nitrotirosina (Fig 4.23).

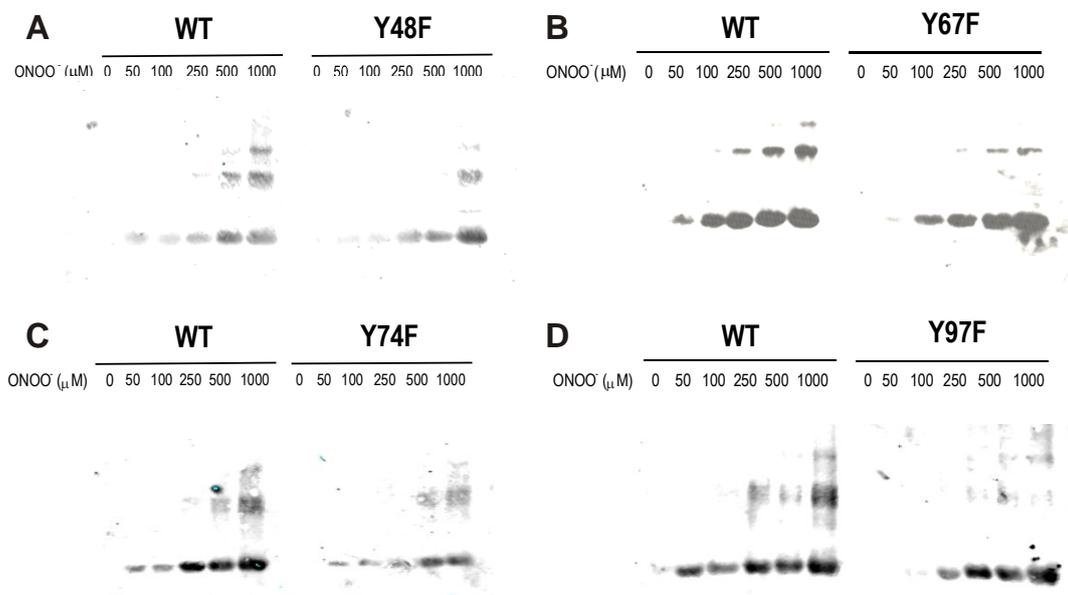


Figura 4.23. Nitración del citocromo *c* inducida por peroxinitrito. Citocromo *c* (100 μM) nativo o cada uno de los simples mutantes de tirosina Y48F (A), Y67F (B), Y74F (C), e Y97F (D) fueron tratados con bolos de ONOO^- (0 – 1 mM). Muestras conteniendo 2 mg de citocromo *c* son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti-nitrotirosina fueron realizados.

Como se ve en los diferentes paneles de la figura 4.23 todas las tirosinas tienen un rol en la nitración del citocromo *c* por bolos de altas concentraciones de ONOO^- , como queda en evidencia por la menor nitración (y menor formación de polímeros nitrados) que se ve en cada uno de los simples mutantes de tirosina con relación al citocromo *c* nativo.

4.3.2. Polimerización inducida por peroxinitrito

Los polímeros del citocromo *c* fueron estudiados con el mismo procedimiento que se uso para la nitración, tratando al citocromo *c* con bolos de ONOO^- , pero revelando los western blot con un anticuerpo anti citocromo *c*.

En cuanto a la polimerización, los mutantes en las tirosinas más externas del citocromo (Y74F e Y97F) muestran una polimerización comparable a la del citocromo *c* nativo (Fig 4.24 C y D), tanto en ausencia como en presencia de ONOO^- . Sin embargo, los mutantes en las tirosinas más internas (Y48F e Y67F) muestran mucho menos formación de polímeros respecto al citocromo *c* nativo (Fig 4.24 A y B).

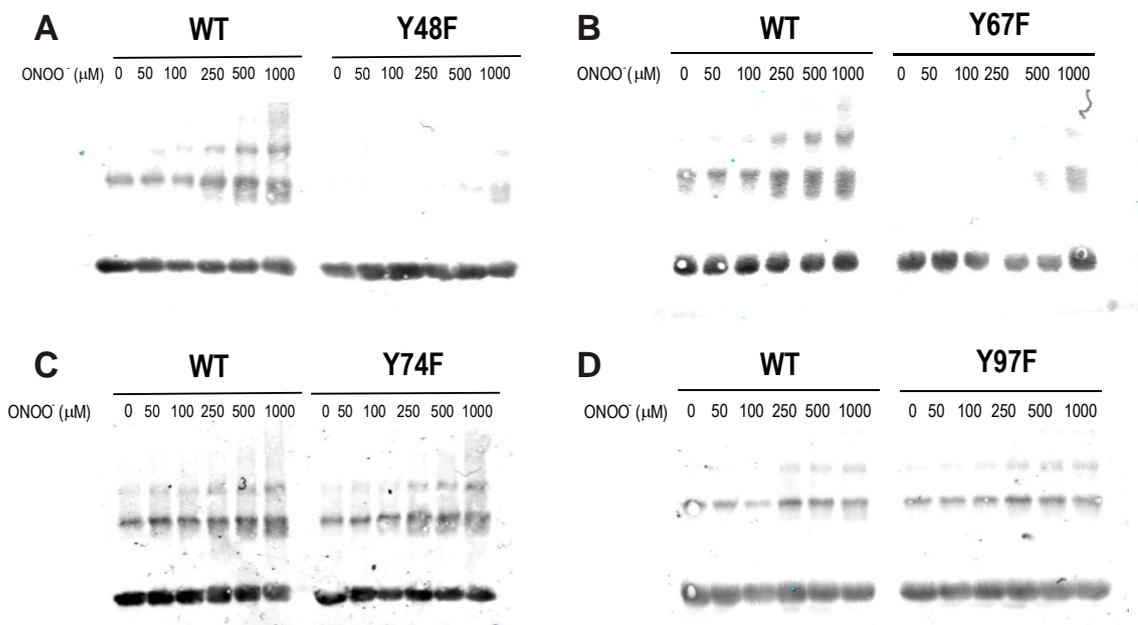


Figura 4.24. Polimerización del citocromo *c* inducida por peroxinitrito. Citocromo *c* (100 μM) nativo o cada uno de los simples mutantes de tirosina Y48F (A), Y67F (B), Y74F (C), e Y97F (D) fueron tratados con bolos de ONOO^- (0 – 1 mM). Muestras conteniendo 2 mg de citocromo *c* son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti citocromo *c* fueron realizados.

Estos datos nos sorprendieron al sugerir que son las tirosinas más internas la que tienen mayor rol en la polimerización del citocromo *c*. Para verificar esto expresamos y purificamos el doble mutante al que le sacamos las dos tirosinas más externas: Y74,97F. Después que verificamos estructural y bioquímicamente este mutante (ver sección 4.1) realizamos con él los mismos experimentos de nitración y polimerización (Fig. 4.25). Observamos que efectivamente este mutante es capaz de formar agregados, en una cantidad casi comparable que el nativo, presentando una nitración similar a la de los demás mutantes.

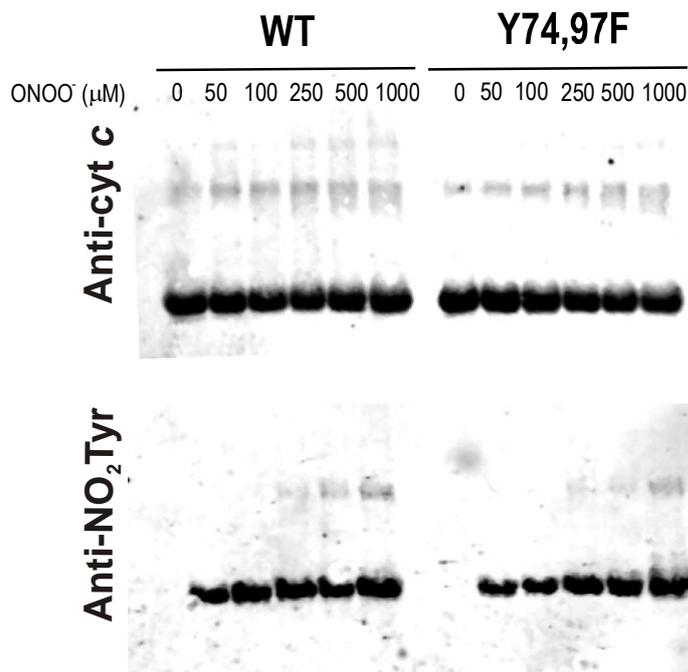


Figura 4.25. Nitración y polimerización del citocromo *c* Y74,97F inducida por peroxinitrito. Citocromo *c* (100 μ M) nativo e Y74,97F fueron tratados con bolos de ONOO⁻ (0 – 1 mM). Muestras conteniendo 2 mg de citocromo *c* son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti-nitrotirosina y anti-citocromo *c* fueron realizados.

Otros dos experimentos fueron realizados como control. Uno fue la comparación del citocromo *c* nativo recombinante en relación al citocromo *c* nativo comercial, que mostraron iguales niveles de nitración y polimerización (Fig. 4.26 A). El otro fue la expresión y purificación del cuádruple mutante, en el que todas las tirosinas fueron sustituidas por fenilalanina. Tal como era de esperarse este mutante no es capaz de polimerizarse ni de nitrarse (Fig. 4.26 B).

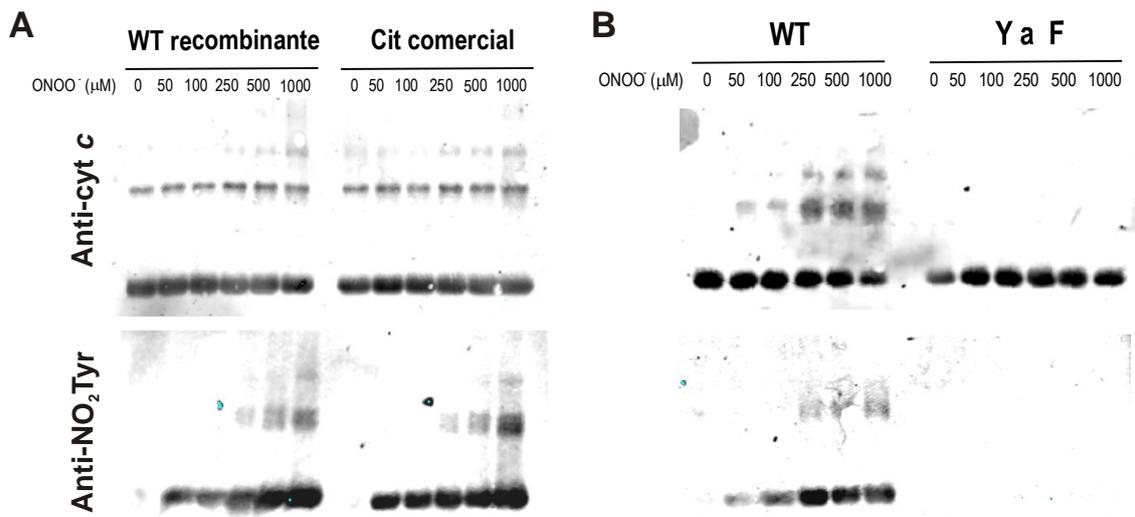


Figura 4.26. Nitración y polimerización del citocromo *c* recombinante, comercial y cuádruple mutante en tirosinas inducida por peroxinitrito. Citocromo *c* (100 μM) nativo recombinante y comercial (A) o cuádruple mutante de tirosinas por fenilalanina (B) fueron tratados con bolos de ONOO⁻ (0 – 1 mM). Muestras conteniendo 2 mg de citocromo *c* son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti nitrotirosina y anti citocromo *c* fueron realizados.

❖ **Conclusiones parciales:** 4.3. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peroxinitrito

Estos resultados, junto con los resultados obtenidos en la sección 4.2, muestran que el citocromo *c* se encuentra en equilibrio entre una conformación “nativa” a una conformación “parcialmente desplegada”. Esta conformación parcialmente desplegada deja a las tirosinas inicialmente más internas más expuestas al solvente, y disponibles para reaccionar con otros compuestos, como puede ser otro aminoácido del mismo citocromo para dar lugar a su polimerización.

En ausencia de un oxidante, a pH fisiológico, solo un 16% de las moléculas de citocromo *c* se encuentran en un estado parcialmente desplegado, con sus residuos de Tyr48 y Tyr67 más expuestos. Sin embargo, en presencia de ONOO^- , aún en bajas concentraciones, se produce en primer lugar la nitración de las tirosinas más externas (125); llevando a importantes cambios en la conformación del citocromo *c*. Como ya vimos en la sección 4.2.2 la nitración sitio específica en la Tyr74 lleva a una baja de 2 unidades en el pKa de la transición alcalina, dejando a un 50% de las moléculas de citocromo *c* en la conformación más desplegada y favoreciendo la interacción de las tirosinas más internas con moléculas tales como el ONOO^- , y de esta forma permite la polimerización a través de las tirosinas más internas, tal como observamos por el tratamiento con ONOO^- .

Proponemos un mecanismo (Fig. 4.27) por el cual el ONOO^- reacciona en un primer paso con las tirosinas más externas, nitrándolas y provocando un pasaje del citocromo a una forma más desplegada que deja más expuestas las Tyr48 y Tyr67. De esta manera, en un segundo paso, una nueva molécula de ONOO^- puede reaccionar con estas tirosinas dando lugar a la formación de un nuevo radical tirosilo, que en una tercera etapa puede reaccionar con el radical tirosilo de otra molécula de citocromo promoviendo su polimerización.

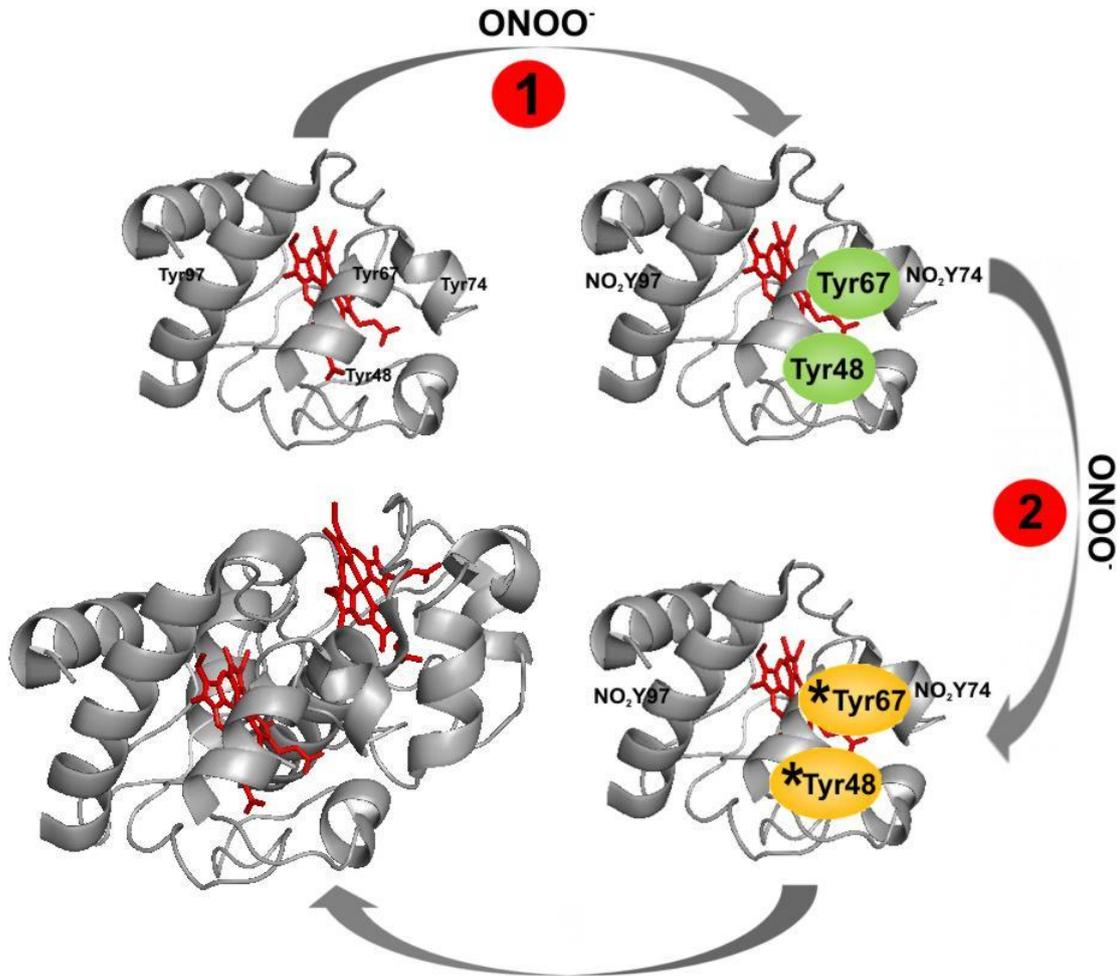


Figura 4.27. Esquema del mecanismo de polimerización del citocromo c inducida por peroxinitrito. En un primer paso el ONOO^- induce la nitración del citocromo c en las tirosinas más externas generando $\text{NO}_2\text{Y74}$ y $\text{NO}_2\text{Y97}$. Esta nitración, en especial en la Tyr74 genera un cambio conformacional que deja las Tyr48 y Tyr67 más expuestas al solvente (representadas como Tyr resaltadas en verde). Estas tirosinas más expuestas quedan más accesibles para que, en un segundo paso, otra molécula de ONOO^- reaccione con ellas para dar lugar a la formación de radical tirosilo (representadas como $*\text{Tyr}$ resaltadas en amarillo). Finalmente, dos o más citocromos con estos radicales tirosilo formados pueden reaccionar entre sí para dar lugar a la formación de polímeros de citocromo c.

4.4. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peróxido de hidrógeno más óxido nítrico o nitrito

Si bien los sitios de nitración preferenciales por un mecanismo que involucre la actividad peroxidasa del citocromo *c* no han sido determinados hasta el momento nos propusimos tener una primera aproximación al mecanismo de formación de radicales tirosilo cuando este mecanismo está operando mediante el estudio de la nitración y la polimerización de cada uno de los mutantes del citocromo expuesto a flujos de H₂O₂, más NO₂⁻ u [•]NO.

4.4.1. Nitración inducida por H₂O₂ más óxido nítrico o nitrito

Para evaluar la nitración del citocromo *c* inducida por un mecanismo tipo peroxidasa todos los mutantes de tirosina por fenilalanina fueron expuestos a flujos de H₂O₂ y NO₂⁻ (Fig. 4.28) o [•]NO (Fig. 4.29) tal como se describe en materiales y métodos, y se realizaron experimentos de western blot anti-nitro tirosina, tal como se realizó para la exposición a ONOO⁻.

H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₂ ⁻	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	WT	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F	WT	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F	WT	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F

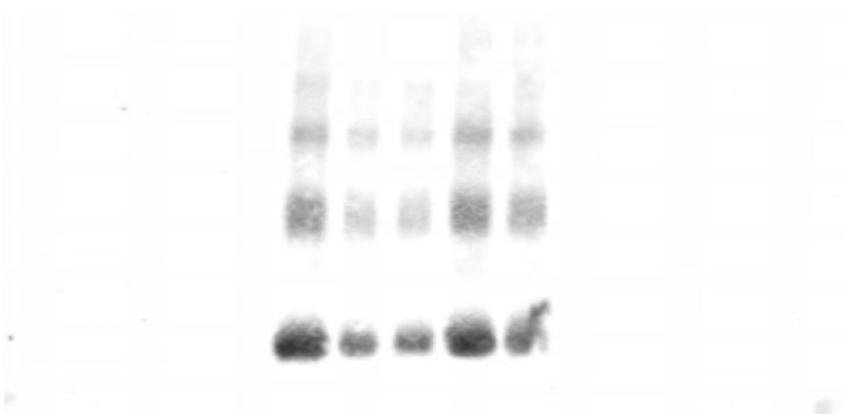


Figura 4.28. Nitración del citocromo *c* inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de nitrito. Citocromo *c* (100 μM) nativo o cada uno de los simples mutantes de tirosina fueron tratados con flujos de H₂O₂ más NO₂⁻. Muestras conteniendo 2 mg de citocromo *c* son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti nitro-tirosina fueron realizados.

H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
·NO	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	WT	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F	WT	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F	WT	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F

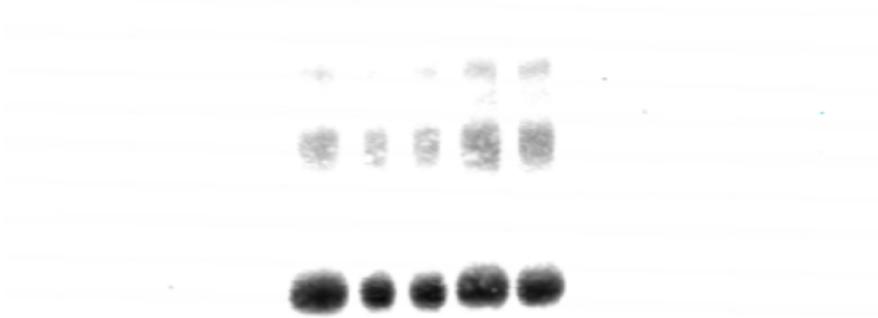


Figura 4.29. Nitración del citocromo c inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de óxido nítrico. Citocromo c (100 μM) nativo o cada uno de los simples mutantes de tirosina fueron tratados con flujos de H₂O₂ más ·NO. Muestras conteniendo 2 mg de citocromo c son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti nitro-tirosina fueron realizados.

Tal como era de esperarse, ya que fueron corridos como control negativo, la exposición a flujos de H₂O₂ únicamente no genera nitración del citocromo c, sin embargo, en presencia de NO₂⁻ o ·NO la nitración empieza a ser evidente, siendo los citocromos Y48F, Y67F y en un poco menor medida la Y97F las especies menos nitradas.

4.4.2. Polimerización inducida por H₂O₂ más óxido nítrico o nitrito

Cuando se evalúa la polimerización del citocromo c por la exposición a los mismos oxidantes (seguida por experimentos de western blot anti citocromo c, Fig. 4.30 y 4.31) se observa que el H₂O₂ por sí mismo es capaz de inducir la polimerización del citocromo c; pero la polimerización en los mutantes en las tirosinas más internas Y48F e Y67F es menor que el del citocromo c nativo, o mutante en las tirosinas más externas Y74F e Y97F.

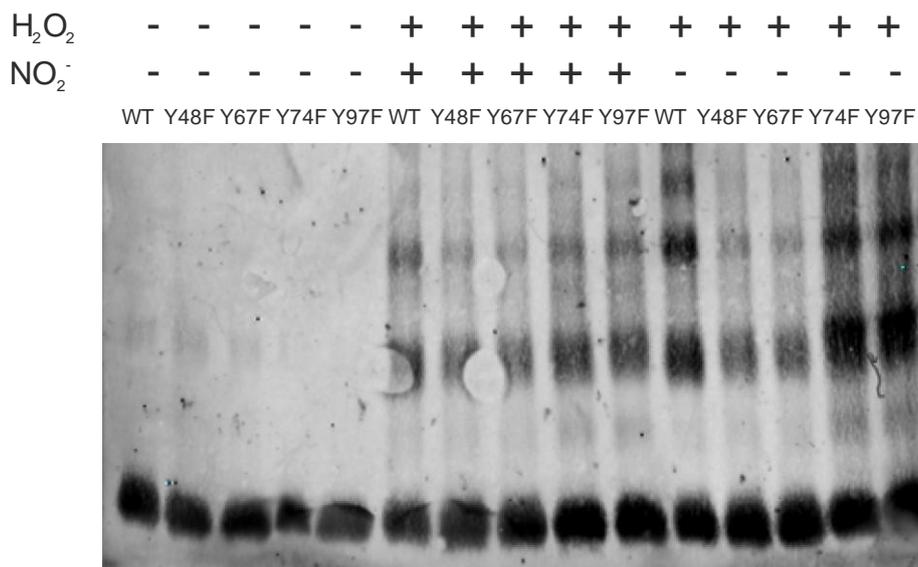


Figura 4.30. Polimerización del citocromo c inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de nitrito. Citocromo c (100 μM) nativo o cada uno de los simples mutantes de tirosina fueron tratados con flujos de H₂O₂ más NO₂⁻. Muestras conteniendo 2 mg de citocromo c son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti citocromo c fueron realizados.

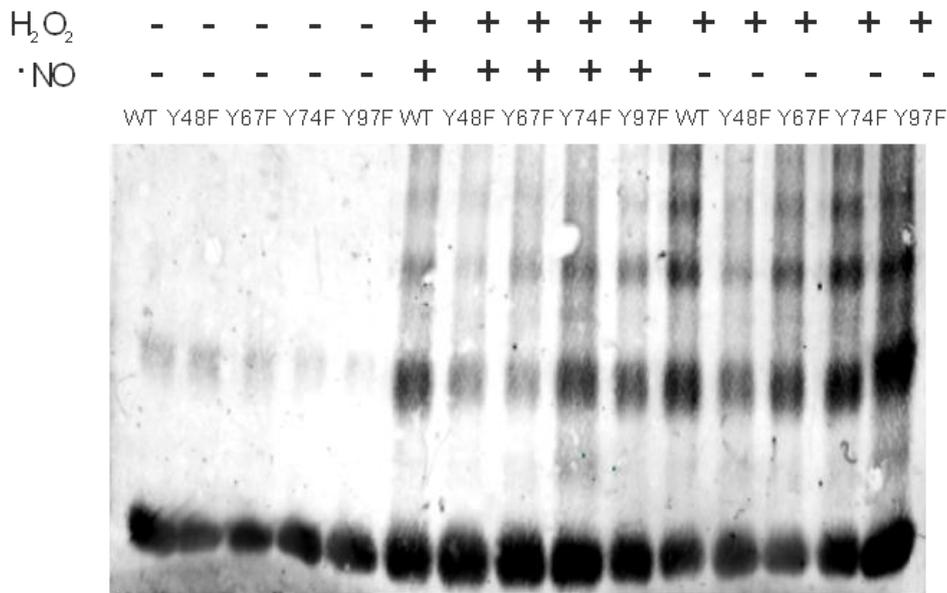


Figura 4.31. Polimerización del citocromo c inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de óxido nítrico. Citocromo c (100 μM) nativo o cada uno de los simples mutantes de tirosina fueron tratados con flujos de H₂O₂ más ·NO. Muestras conteniendo 2 mg de citocromo c son separadas en un gel de poliacrilamida y western blot anti citocromo c fueron realizados.

❖ **Conclusiones parciales:** 4.4. Estudio de los mecanismos de nitración y polimerización inducidos por peróxido de hidrógeno más óxido nítrico o nitrito

El H_2O_2 de hidrógeno por sí mismo es capaz de inducir la polimerización del citocromo c, siendo las tirosinas más internas (Tyr48 y Tyr67) las principales implicadas en este proceso. También hemos demostrado, en un trabajo en colaboración con el Dr. Valerian Kagan, que la formación del radical Tyr67, inducido por peróxido de hidrógeno, es fundamental para la oxidación de la cardiolipina (19).

A diferencia de cuando tratamos el citocromo c con $ONOO^-$, cuando lo tratamos con H_2O_2 y NO_2^- o H_2O_2 y *NO son también las tirosinas más internas las que parecen estar mayoritariamente implicadas tanto en la nitración como en la polimerización del citocromo.

Este hecho es consistente con que el H_2O_2 reacciona en un mecanismo tipo peroxidasa, que involucra al grupo hemo, por lo que resulta lógico pensar que la mayoría de los radicales tirosilos que se forman van a formarse en las tirosinas más cercanas al hemo.

En la nitración del citocromo por este mecanismo también está implicada la Tyr97, que si bien está más lejana al grupo hemo está muy expuesta al solvente, por lo que todo radical tirosilo que pueda formarse en esta tirosina está accesible para reaccionar con el *NO_2 o el *NO que se encuentre en el medio.

Resta por ser determinado si estas nitraciones en las tirosinas internas se observan en formas mono-nitradas, o di-nitradas con otras tirosinas como la Tyr97, y en esta línea estamos realizando experimentos análogos a los que se realizaron con el citocromo c tratado con $ONOO^-$ (125), pero para el citocromo tratado con estos oxidantes.

Las distintas especies nitradas por estos oxidantes se separaron por HPLC y se comparó con el perfil de nitración obtenido por $ONOO^-$, en el cual conseguimos están identificadas las especies nitradas (125) (Fig. 4.32).

Efectivamente obtuvimos resultados que son consistentes con los observados mediante western blot.

Cuando el citocromo se nitra por la exposición a H_2O_2 en presencia de NO_2^- observamos una importante nitración localizada en la Tyr97 y una modificación en el patrón de nitración de especies di- y tri-nitradas, que involucran las tirosinas más internas del citocromo *c* (Fig. 4.32 línea roja).

Cuando se nitra por H_2O_2 en presencia de NO también se observa una nitración en la Tyr97, aunque de menor magnitud, y se incrementa la formación de especies di- y tri-nitradas (Fig. 4.32 línea azul).

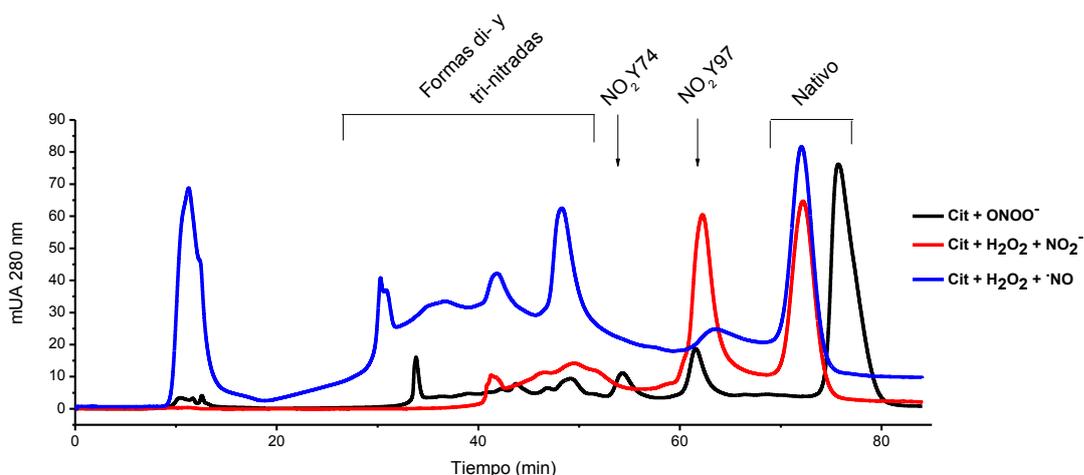


Figura 4.32. Perfil de nitración del citocromo *c* inducida por un mecanismo tipo peroxidasa en presencia a H_2O_2 en presencia de NO_2^- o NO . El citocromo *c* es nitrado por un flujo de H_2O_2 más NO_2^- (línea roja) o NO (línea azul) tal como se explica en metodología. 6 mg de muestra es separada en una columna preparativa de intercambio catiónico por HPLC, y el patrón de picos obtenidos se compara con el de la nitración del citocromo por $ONOO^-$, del cual se conoce las especies presentes en cada pico, que fueron descritas en Batthyany *et al*, 2005, *Biochemistry*.

Además pudimos comprobar que los rendimientos de nitración por la exposición a H_2O_2 en presencia de NO_2^- o NO son bajos, al igual a lo que ocurre con la nitración por $ONOO^-$. El citocromo que queda sin modificar sale con una diferencia de tiempo al tratado con $ONOO^-$, porque se encuentra en estado reducido, y no oxidado como sale después del tratamiento con $ONOO^-$.

Además resta saber el impacto de la nitración de las tirosinas más internas en las actividades fisiológicas del citocromo *c*. Hasta el momento esto no ha podido ser

realizado debido a que no hemos podido obtener formas puras de citocromo mono-nitrado en estas tirosinas, ya que el citocromo nitrado con ONOO^- , que es el que tenemos caracterizado y con el que trabajamos en esta tesis, solo nitra estas tirosinas cuando ya fueron nitradas las tirosinas más externas, Tyr74 y Tyr97.

Si con este sistema de nitración dependiente de H_2O_2 se observan formas mono-nitradas en las tirosinas más internas es posible que podamos purificarlas y así determinar el efecto de la nitración sitio específica de estas tirosinas en las actividades del citocromo *c*.

Alternativamente, estamos tratando de desarrollar un sistema de inserción co-traducciona l y sitio específico de NO_2Tyr , que una vez optimizados no va a permitir sintetizar formas mono-nitradas de citocromo *c* en cada una de sus tirosinas. Estos resultados se muestran en la sección 4.6.

4.5. Impacto en las actividades biológicas del citocromo c

Como parte del último objetivo de esta tesis nos propusimos estudiar el impacto de las distintas modificaciones que estudiamos en el transcurso de esta tesis sobre distintas actividades del citocromo c: la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, y la activación del apoptosoma.

4.5.1. Transferencia de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial

Como ya había sido determinado por nuestro grupo (64,126), la nitración sitio específica del citocromo c, ya sea en las Tyr74 o Tyr97, genera una disminución en la capacidad de transportar electrones por la cadena respiratoria, que es mucho más pronunciada cuando se nitra la Tyr74, que solo deja un 55% de actividad respiratoria, contra el 90% que se mantiene al nitrar la Tyr97 (64), tal como mostramos en la figura 1.6. Esta menor capacidad de transportar electrones no se debe a su potencial redox, que como demostramos anteriormente, se sitúa en valores que quedan entre el de los complejos III y IV de la cadena respiratoria (ver Fig 4.22).

Dado que la transferencia de electrones puede involucrar la formación de radicales en residuos de la proteína, y que pueden ser las tirosinas los aminoácidos que formen dichos radicales, quisimos adentrarnos más en el mecanismo de transferencia electrónica a través del citocromo c, estudiando como la sustitución de tirosinas por fenilalanina puede afectar la capacidad de transportar electrones entre los complejos III y IV, para los cuál preparamos mitoplastos a partir de riñón de rata y les removimos la mayor parte del citocromo c endógeno.

A continuación evaluamos la respiración con el agregado de succinato, que no aumenta mucho respecto a la condición sin sustrato, consistente con una buena extracción del citocromo c, y se le agregaron los distintos citocromo mutantes para estudiar la capacidad de respiración dependiente de succinato (Fig. 4.33 , 4.34 y 4.35).

La respiración por el agregado de 0,1 o 0,4 μ M de citocromo c nativo (Fig 4.33 A) aumentan 5 veces con respecto a la respiración anterior al agregado de citocromo.

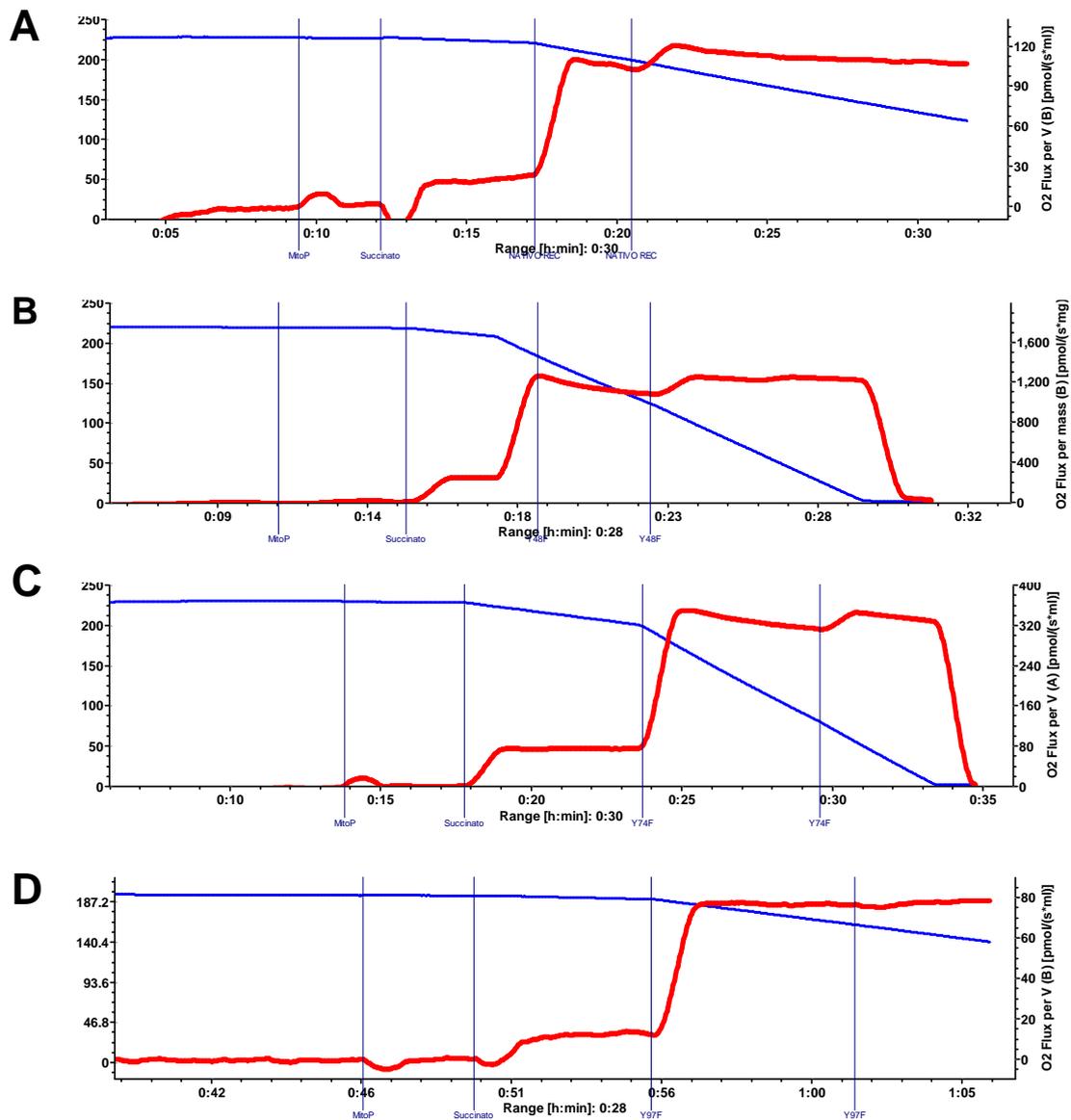


Figura 4.33. Respiración dependiente de succinato de los citocromos mutados. Mitoplastos depletados de citocromo *c* fueron puestos a respirar con succinato, y posteriormente se repuso el citocromo extraído con citocromo *c* nativo (A), Y48F (B), Y74F (C) e Y97F (D). En azul se observa la concentración de oxígeno en el tiempo (expresado en μM), y en rojo la pendiente en cada punto, o sea la derivada primera del consumo de oxígeno en el tiempo (expresada en nmol/seg). El primer evento representa la adición de los mitoplastos sin citocromo *c* (0,05 mg/ml), la segunda la adición de succinato (10 mM), la tercera los distintos citocromos 0,1 μM , y la cuarta la adición de citocromo para 0,4 μM final.

El mutante sin Tyr97 tiene la misma capacidad de transportar electrones por la cadena respiratoria (Fig. 4.33 D), mientras que los mutantes en las Tyr48 y Tyr74 presentan una actividad ligeramente menor, aproximadamente un 80% de la capacidad del citocromo *c* nativo (Figura 4.33 B y C).

Como control corrimos el citocromo *c* comercial, que muestra la misma capacidad de restablecer la respiración que el citocromo nativo recombinante (Fig. 4.34).

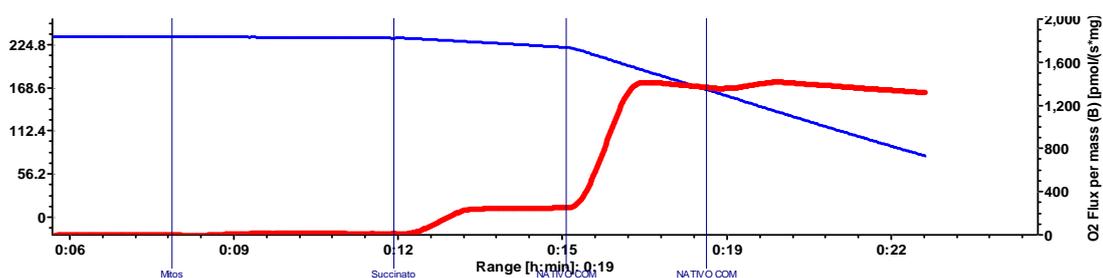


Figura 4.34. Respiración dependiente de succinato para el citocromo *c* de caballo comercial. Mitoplastos depletados de citocromo *c* fueron puestos a respirar con succinato, y posteriormente se repuso el citocromo extraído con citocromo *c* nativo comercial. En azul se observa la concentración de oxígeno en el tiempo (expresado en μM), y en rojo la pendiente en cada punto, o sea la derivada primera del consumo de oxígeno en el tiempo (expresada en nmol/seg). El primer evento representa la adición de los mitoplastos sin citocromo *c* ($0,05 \text{ mg}/\text{ml}$), la segunda la adición de succinato (10 mM), la tercera el citocromo comercial $0,1 \mu\text{M}$, y la cuarta la adición de citocromo para $0,4 \mu\text{M}$ final.

Más interesantemente, el mutante al que le falta la Tyr67 es prácticamente incapaz de transportar electrones por la cadena respiratoria, aumentando apenas la tasa de respiración con respecto a la respiración basal de los mitoplastos sin succinato (Fig. 4.35 A). Cuando a esos mitoplastos con citocromo Y67F, que presentan una tasa muy baja de consumo de O_2 se les adiciona citocromo nativo recuperan el total de su capacidad respiratoria (Fig. 4.35 B).

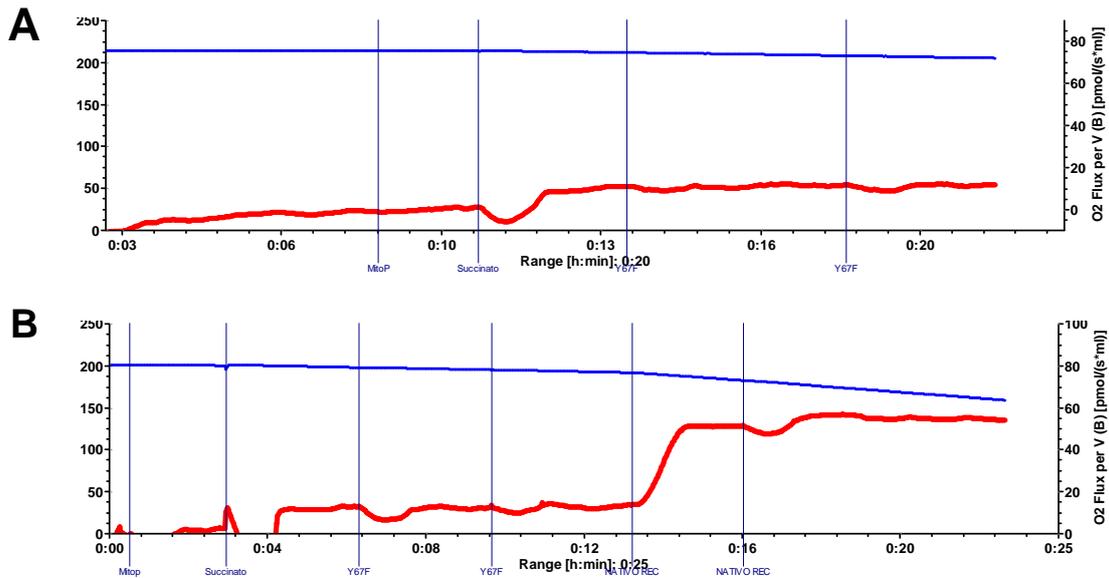


Figura 4.35. Respiración dependiente de succinato del citocromo Y67F. Mitoplastos depletados de citocromo *c* fueron puestos a respirar con succinato, y posteriormente se repuso el citocromo extraído con citocromo *c* Y67F (A) o Y67F y después citocromo nativo (B). En azul se observa la concentración de oxígeno en el tiempo (expresado en μM), y en rojo la pendiente en cada punto, o sea la derivada primera del consumo de oxígeno en el tiempo (expresada en nmol/seg). El primer evento del panel (A) representa la adición de los mitoplastos sin citocromo *c* (0,05 mg/ml), la segunda la adición de succinato (10 mM), la tercera el citocromo Y67F 0,1 μM , y la cuarta Y67F para 0,4 μM final. En el panel (B) se dan las mismas 4 adiciones pero después se adiciona citocromo nativo recombinante 0,1 μM y otra vez citocromo nativo para 0,4 μM final.

Dado que es metodológicamente imposible hacer las corridas de todos los mutantes en un día las distintas corridas se debieron realizar con varias preparaciones de mitoplastos, y la respiración basal con succinato puede cambiar un poco entre una y otra preparación. Esto nos llevó a cuestionarnos si esta diferencia inicial podía o no interferir en los resultados obtenidos. Para descartar este efecto se midió la respiración con citocromo *c* nativo para todas las preparaciones de mitoplastos, y para cada mutante se calculó la tasa de respiración, ya no en relación al consumo de oxígeno sin citocromo, sino en relación al consumo de oxígeno máximo del citocromo *c* nativo de ese día. Los resultados mostraron una tendencia idéntica a la observada calculando la tasa respecto a la respiración con succinato, validando así las medidas obtenidas.

Los resultados se resumen en la Tabla 4.5, en la que se muestra la respiración dependiente de succinato antes y después del agregado de cada uno de los citocromos mutantes. Los valores reportados hacen referencia al cociente del consumo de oxígeno después del agregado de citocromo *c* frente al consumo de oxígeno sin citocromo *c*, por lo que un valor de 1 significaría que el citocromo agregado no fue capaz de transportar electrones por la cadena de respiración mitocondrial, mientras que cuanto mayor es el valor más efectivo es el citocromo para transportar electrones.

	Consumo de oxígeno con cit <i>c</i> / consumo de oxígeno sin cit <i>c</i>				
	Nativo	Y48F	Y67F	Y74F	Y97F
0.1 μM cit <i>c</i>	5.24 \pm 0.36	4.15 \pm 0.63 *	1.18 \pm 0.03***	4.26 \pm 0.04 **	5.27 \pm 0.40
0.4 μM cit <i>c</i>	5.20 \pm 0.43	4.62 \pm 0.64	1.23 \pm 0.08 ***	4.64 \pm 0.18	5.62 \pm 0.36

Tabla 4.5. Relación de respiración dependiente de succinato de los citocromos mutados.

Para los distintos citocromos mutantes se expresa la relación entre la tasa de respiración en presencia de cada uno de los citocromos en relación a la respiración antes de agregar el citocromo.

* Estadísticamente diferente al control, $p \leq 0,05$

** Estadísticamente diferente al control, $p \leq 0,005$

*** Estadísticamente diferente al control, $p \leq 0,0001$

La respiración con el mutante de Met80 por alanina no fue medida ya que ya habíamos determinado que ese mutante tiene un potencial redox muy negativo respecto al nativo, por lo que es incapaz de transportar electrones entre los complejos III y IV (ver figura 4.22).

Dado que el citocromo Y67F no fue capaz de transportar electrones por los mitoplastos nos preguntamos si el problema estaría dado por la captación de electrones desde el complejo III, o la entrega al complejo IV. Para intentar determinar este mecanismo medimos la respiración dependiente de succinato partiendo de citocromo Y67F oxidado y reducido, pero los resultados fueron idénticos (lo mismo paso para los demás mutantes ensayados).

También medimos la actividad citocromo oxidasa para los citocromos nativo e Y67F. Para este ensayo se partió de una solución 30 μM de los citocromos reducidos, incubados con los mitoplastos rotos mediante 3 ciclos de congelado/descongelado. La oxidación de los citocromos por la actividad del complejo de la citocromo oxidasa fue medida a 550 nm (Fig. 4.36).

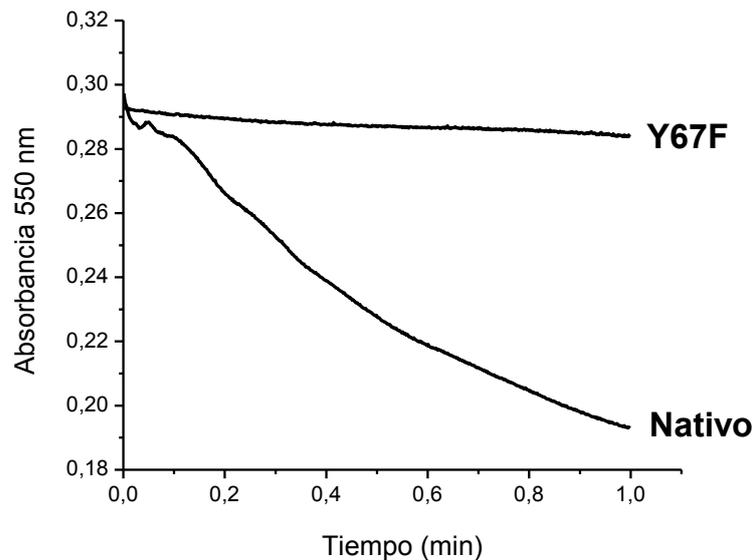


Figura 4.36. Actividad citocromo oxidasa. Mitoplastos depletados de citocromo *c* y rotos (0,05 mg/ml) fueron incubados con citocromo nativo o Y67F (30 μM) y su oxidación fue seguida mediante la disminución en la absorbancia a 550 nm.

Tal como muestra la bajada en la absorbancia a 550 nm, característica del citocromo reducido, vemos que el citocromo nativo es capaz de transferir sus electrones al complejo de la citocromo oxidasa, pero el mutante Y67F no es capaz.

4.5.2. Activación del apoptosoma

Modificaciones en la estructura del citocromo *c* también pueden llevar a cambios en su capacidad de activar el apoptosoma. Como hemos visto para el citocromo *c* nitrado en las Tyr74 y Tyr97 (aunque en mayor medida para la Tyr74), estas modificaciones llevan a una menor capacidad de activar el apoptosoma (64) (ver fig. 1.6).

Para determinar el impacto de la coordinación del hemo en esta disminución de la actividad realizamos los mismos experimentos de activación del apoptosoma, pero utilizando el mutante M80A (Fig. 4.37).

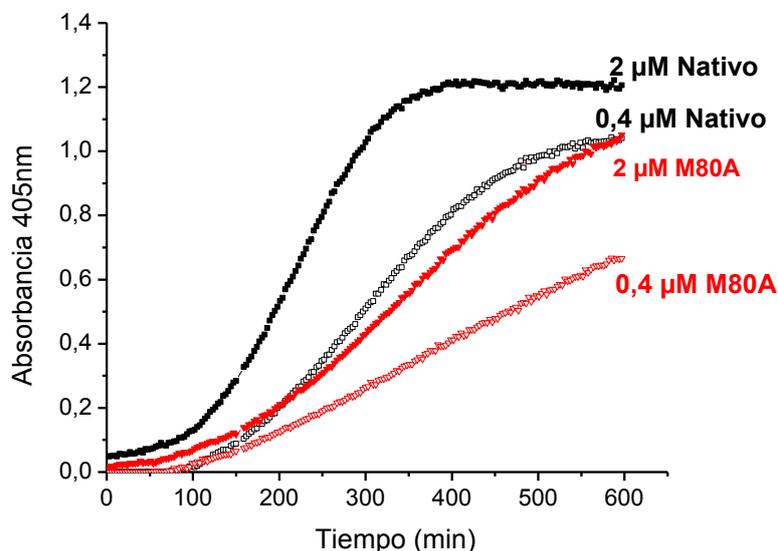


Figura 4.37. Actividad caspasa 3 en citosol de células Jurkat. Iguales concentraciones de citocromo *c* nativo o M80A (0,4 o 2,0 μ M) fueron incubados con extractos de células Jurkat en presencia de 2 mM dATP y 2 mM ATP. La actividad caspasa 3 fue medida siguiendo el clivaje del sustrato colorimétrico AcDEVDpNA a 405 nm.

Este resultado es consistente con lo que se había observado para el citocromo nitrado, y muestra que la coordinación del grupo hemo es esencial para promover la activación del apoptosoma por el citocromo *c*.

El citocromo *c* nitrado, con una mayor exposición del grupo hemo, es liberado desde la mitocondria al citosol (62), pero una vez en esa localización no es capaz de activar el apoptosoma como lo hace el citocromo *c* nativo.

❖ **Conclusiones parciales: 4.5. Impacto en las actividades biológicas del citocromo**

Ya habíamos discutido en la sección 4.2 el importante rol de la Tyr67 en la flexibilidad de la molécula de citocromo *c*, convirtiendo el citocromo sin esa tirosina en un citocromo mucho más rígido, que pierde la capacidad de romper el enlace Met80-Fe inducido por cambios en el pH.

En esta sección pudimos ver que ese residuo de tirosina también es central para la transferencia de electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, probablemente en el proceso de transferencia de electrones desde el citocromo *c* al complejo IV.

Esta incapacidad para transportar electrones de este mutante no se debe a que genera una diferencia de potencial redox ya que, como determinamos previamente, si bien es ligeramente diferente al del citocromo *c* nativo, lo sigue estando ubicado con un potencial intermedio entre los complejos III y IV, que permitiría el pasaje de electrones entre ellos. Planeamos que, o bien el residuo de Tyr67 debe de actuar directamente en el mecanismo de transferencia electrónica, tomando un electrón en algún paso del proceso, generando un radical tirosilo en la Tyr67 (Fig. 4.38), o bien este mutante genera un pequeño cambio conformacional que no es suficientemente grande para modificar en gran medida las propiedades fisico-químicas del citocromo que están relacionadas con la coordinación del grupo hemo, pero si lo suficiente para impedir el mecanismo de pasaje de electrones.

Previamente también habíamos demostrado que la formación de un radical en la Tyr67 también está implicada en otros procesos, como la peroxidación específica de la cardiolipina, esencial para la liberación de factores desencadenantes de la apoptosis (19). Además el enlace entre la Met80 y la Tyr67 puede romperse para que el citocromo pueda interconvertirse en dos estados que difieren en su energía de reorganización (175).

Este efecto es específico para la Tyr67, ya que los mutantes en las demás tirosinas fueron casi igual de eficientes que el citocromo *c* nativo en transportar electrones.

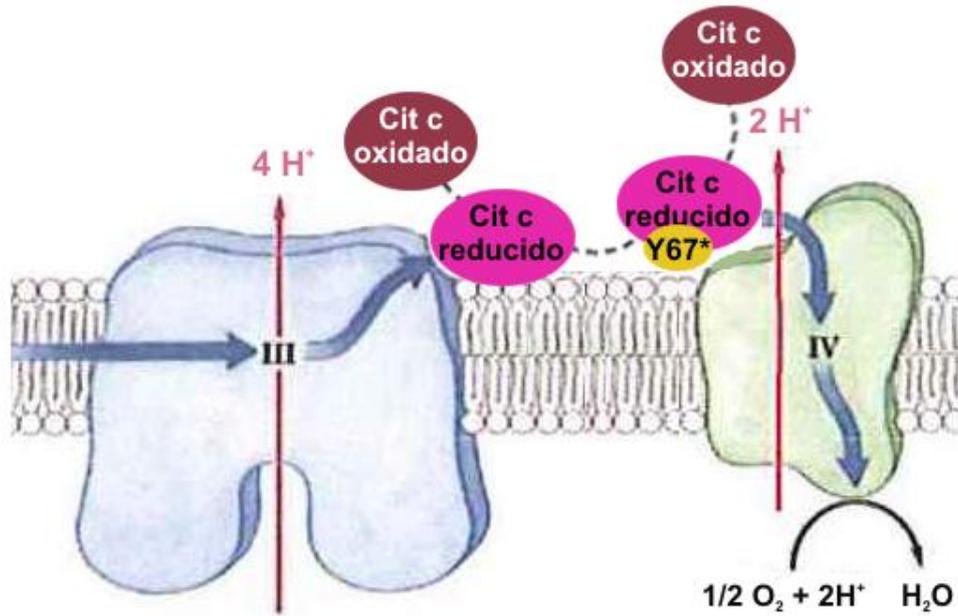


Figura 4.38. Esquema del mecanismo propuesto para la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El complejo III cede los electrones al citocromo oxidado para dar lugar a la formación de un citocromo reducido que transfiere internamente los electrones mediante un mecanismo que involucra la formación de un radical tirosilo en la Tyr67 (representado como Y67*, en amarillo), que termina cediendo los electrones al complejo IV, para volver a dar citocromo oxidado.

La importancia de este residuo de aminoácido queda de manifiesto si se observa el alto grado de conservación que ha tenido a lo largo de la evolución. En un trabajo en colaboración con el Dr. Andrés Iriarte y el Dr. Enrique Lessa (Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República) estudiamos la evolución de los genes del citocromo *c* (Fig. 4.39).

Este estudio muestra que la selección purificadora parece haber dominado la historia del citocromo *c*, y las razones dN/dS son menores a 1. Si bien todos los residuos de tirosina son altamente conservados, la Tyr67 es aún más conservada (al mismo nivel que la Cys17, His18, o Met80) y se encuentra mutada únicamente en 2 familias de protozoarios (género *Euglena* y *Ciliophora*), y en los dos casos está cambiada por fenilalanina.

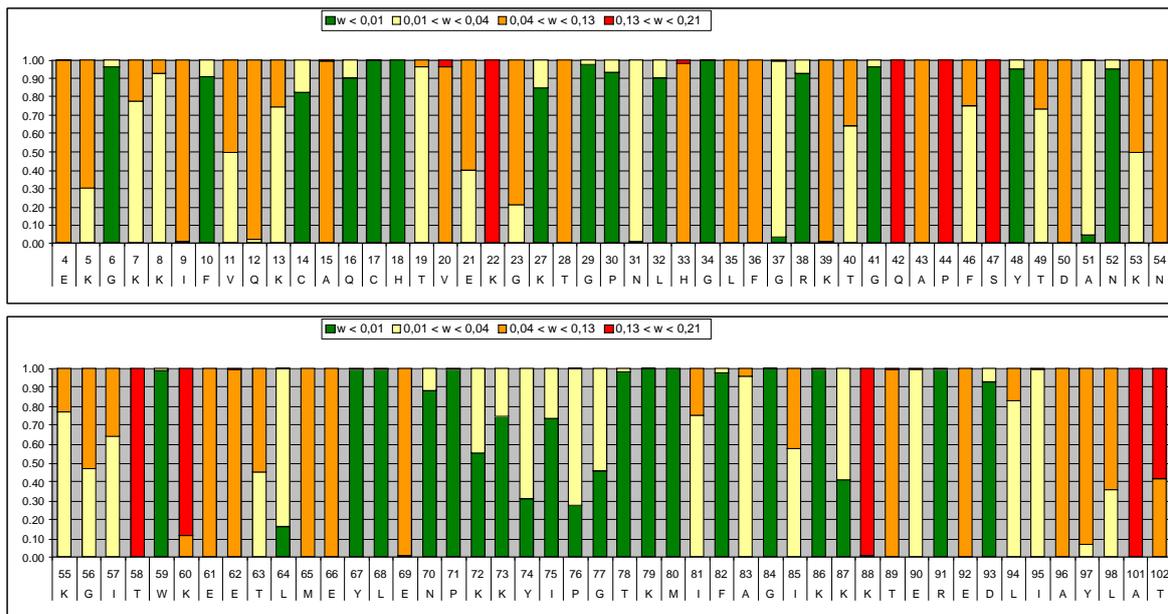


Figura 4.39. Estudio evolutivo de genes de citocromo c eucariota. El estudio fue llevado a cabo en 211 secuencias de citocromos c de eucariotas sin sitios ambiguos. Calculamos la tasa de evolución (w) de los diferentes sitios como la relación entre las tasas de cambios no sinónimos (dN) y sinónimos (dS). Se muestran los valores de w para los distintos residuos aminoacídicos definidos según *Equus caballus*. w refleja el tipo de selección actuante y su intensidad. En verde se ven los residuos más conservados, seguidos por los amarillos, naranjas y en rojo los menos conservados.

El trabajo realizado en esta tesis muestra que esta gran conservación de este residuo se debe a su importante rol tanto en la estructura y función del citocromo c, pudiendo transportar información desde y hacia el hemo, dando la señal para la ruptura entre la Met80 y el hierro hémico, que deja al citocromo c en una estructura parcialmente desplegada; y transportando electrones internamente para actuar como puente entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

En cuanto a la actividad del citocromo en la apoptosis pudimos verificar que la coordinación del hemo es esencial para la activación del apoptosoma, que es muy débilmente activado en el mutante M80A, que se encuentra parcialmente penta-coordinado, y solo parcialmente activado por el NO_2 -Y74-citocromo c, que ya hemos visto que está más desplegado que el citocromo c nativo, pero no tanto como el mutante M80A.

Resta verificar el rol de cada una de las tirosinas en la activación del apoptosoma, más allá de la actividad indirecta que la formación de radical tirosilo pueda tener en la peroxidación de cardiolipina (155).

4.6. Expresión de otras formas de citocromo c

Como parte de este proyecto, y de otros que tenemos en colaboración con otros laboratorios, en el transcurso de este trabajo de tesis se necesitó poner a punto la expresión de otras formas de citocromo c, ya sea modificados, marcados, o de otras especies. Estos experimentos se describen a continuación.

4.6.1. Expresión de citocromo c nitrado co-traduccionalmente

Dado los bajos rendimientos de citocromo c nitrado que se obtienen cuando se realiza una nitración química seguida de una separación de las distintas especies por HPLC, y la incapacidad de obtener formas mono-nitradas en las Tyr67 y Tyr48, se intentaron expresar y purificar formas nitradas del citocromo c de forma co-traduccionales, incorporando específicamente NO₂Tyr en cada una de las posiciones en las que había una tirosina en el citocromo nativo. Para esto se utilizará un par aminoacil-tRNA sintetasa/tRNA generado para la incorporación sitio-específica de NO₂Tyr, tal como se describe en (168). Para esto se realiza mutagénesis dirigida sobre el plásmido que codifica para la proteína blanco de modo de que un codón TAG sustituya a la tirosina que quiere ser cambiada por NO₂Tyr. Este plásmido es transformado en una bacteria que codifica para el par aminoacil-tRNA sintetasa/tRNA para la incorporación específica de NO₂Tyr en el codón TAG.

Como los mutantes de citocromo c nosotros los expresamos en un medio muy rico (medio terrific), antes de empezar a intentar tener formas mono-nitradas de citocromo c quisimos poner a punto la expresión de citocromo c en medio mínimo, lo cual llevó más tiempo de lo esperado. En el artículo original los cultivos se crecían en medio LB y se cosechaban para ser resuspendidos en medio Mínimo M9 (que se describe en materiales y métodos en el punto 3.15) pero nosotros, a pesar de cambiar varias variables en la expresión (tiempos, temperaturas, concentraciones de IPTG) no logramos la expresión del citocromo c nativo en medio M9. En un siguiente paso empezamos a agregar otros componentes al medio, como ácido aminolevulínico (ALA), pero sin obtener buenos resultados.

Luego de probar varios medios mínimos reportados para la expresión de proteínas llegamos a uno que tenía un rendimiento aceptable de citocromo c, de entre 0,5 y 1 mg por litro de cultivo. El medio mínimo utilizado, que fue modificado a partir del que utilizaros Cai y colaboradores (187), se resume en la tabla 4.6.

Componente	Concentración
KH ₂ PO ₄	13 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
Na ₂ HPO ₄	9 g/l
K ₂ SO ₄	2,4 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
FeSO ₄	0,06 g/l
CaCl ₂	0,06 g/l
MnCl ₂	0,012 g/l
ZnCl ₂	7 mg/l
CuCl ₂	3 mg/l
H ₃ BO ₃	0,2 mg/l
Molibdato de amonio	2,5 mg/l
EDTA	0,05 g/l
MgCl ₂	1 g/l
Tiamina	0,03 mg/l
Glucosa	5 g/l
Acido aminolevulínico	0,1 mM
Biotina	1 mg/l
Ácido fólico	1 mg/l
Piridoxal	1 mg/l
Riboflabina	0,1 mg/l

Tabla 4.6. Composición del medio mínimo optimizado para la expresión de citocromo c.

Una vez puesta a punto la expresión en medio mínimo pasamos a intentar expresar las 4 formas de citocromo *c* de corazón de caballo que tienen el codón TAG reemplazando cada uno de los codones que codificaban para las tironinas, co-transformandolas con el plásmido que codifica para el par tRNA/tRNA sintetasa utilizando este nuevo medio de cultivo en lugar del medio M9.

Para ninguna de las 4 posiciones pudimos insertar NO₂-Tyr en el citocromo c, obteniéndose siempre formas truncadas del mismo, que dejaban de transcribir el citocromo en la posición del codón TAG.

Para cada uno de los 4 mutantes de codón de tirosina por TAG se probaron cambiar tiempos y temperaturas de expresión, así como concentraciones de inductor, pero con ninguna condición se logró obtener formas nitradas del citocromo c.

En este punto quisimos verificar que el par tRNA/tRNA sintetasa estuviera funcionando bien por lo que nos propusimos reproducir los resultados de Neumann y colaboradores (168), insertando NO₂-Tyr en la posición 34 de la manganeso SOD. Se utilizó el mismo protocolo que ellos reportaron y se corrieron geles al 10% para evaluar la presencia de NO₂-SOD (Fig. 4.40). Efectivamente la enzima nitrada pudo ser expresada tal como vemos por a través de western blot anti-cola de histidina (Fig. 4.40 B) o anti-NO₂-Tyr (Fig. 4.40 C).

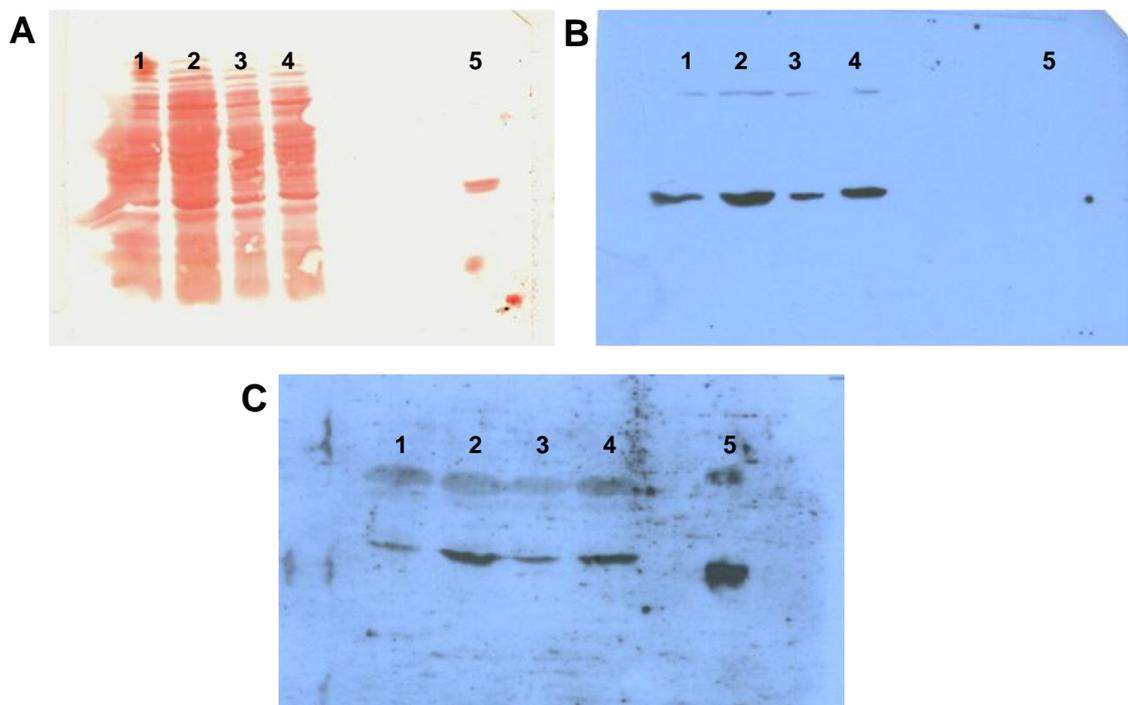


Figura 4.40. Expresión de Mn-SOD humana nitrada co-traduccionalmente. Se corrieron geles de poliacrilamida al 12% y se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa. En los carriles 1 y 3 se sembraron lisados de bacterias sin inducir (100 y 50 μ g respectivamente) y en los carriles 2 y 4 las mismas cantidades de lisados de bacterias inducidas con IPTG. En el último carril se sembró Mn-SOD humana (4 μ g) nitrada con un bolo de ONOO-. **(A)** Tinción con Ponceau de la membrana que se va a revelar con anticuerpo anti-cola histidina. **(B)** Western blot anti-cola de histidina, el punto que se ve a la derecha indica donde se veía la NO₂-Mn.SOD. **(C)** Western blot anti NO₂-Tyr.

Al mismo tiempo que nosotros verificamos que el sistema estaba funcionando bien y que el problema lo estábamos teniendo en la expresión del citocromo *c* se publicó un artículo en el que reportaban que habían tenido problemas con la incorporación de NO₂-Tyr en otra proteína (ribonucleotido reductasa) y planteaban alternativas para su expresión (188). Ellos optimizaron la expresión de su proteína sub-clonandola en un nuevo vector pBAD, pero inducible por L-arabinosa en lugar de por IPTG, y también sub-clonando 2 copias del par tRNA/tRNA sintetasa en otro vector también inducible por L-arabinosa, pero con otra resistencia.

Para probar si esta modificación podía servir para mejorar la inserción de NO₂Tyr en el citocromo, clonamos nuestro sistema de expresión en tándem del citocromo *c* con la hemo liasa a un vector pBAD, con resistencia a la ampicilina y volvimos a poner a punto la expresión del citocromo nativo con este plásmido en el medio mínimo que describimos anteriormente (tabla 4.6). Las condiciones de expresión óptimas se dieron con 40 a 48 horas de crecimiento a 37°C, induciendo a una D.O. de 0,4 con 0.2% L-arabinosa (Fig. 4.41). Con este procedimiento obtuvimos un rendimiento de 3 mg por litro de cultivo.

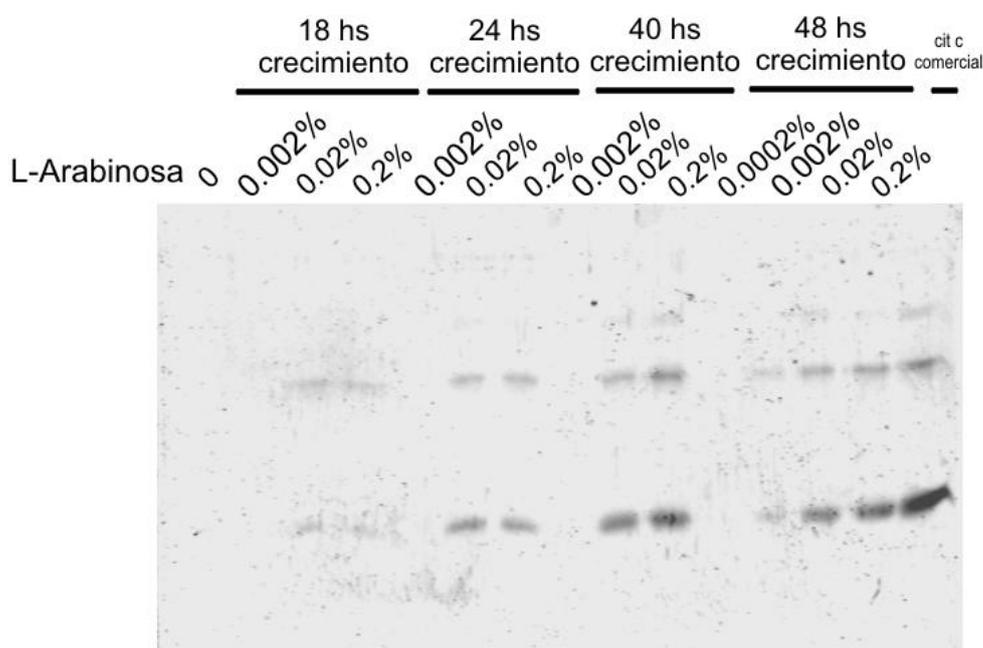


Figura 4.41. Expresión de citocromo *c* en vector inducible por L-arabinosa. Se corrieron geles de poliacrilamida al 15%, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con un anticuerpo anti citocromo *c*. En los distintos carriles se sembraron lisados de bacterias (50 mg) crecidas por distintos tiempos, con distintas concentraciones de L-arabinosa para inducir la expresión del citocromo *c*.

En paralelo, ante tantas dificultades para expresar el citocromo *c* nitrado en forma co-traduccional entablamos una colaboración con el Dr. Ryan Mehl (Profesor Asociado del Departamento de Biofísica y Bioquímica de la Universidad de Oregon, Estados Unidos), quien fue co-autor del artículo original donde nitraron sintéticamente la MnSOD (168). Ellos ya tenían la construcción en tándem de tRNA/tRNA sintetasa bajo la expresión de un promotor inducible por L-arabinosa, y probaron las distintas formas de citocromo Y-TAG, pero tampoco obtuvieron buenos resultados de expresión de las formas mono nitradas.

Este grupo de Oregón también había probado para otras proteínas la expresión en otro sistema que tiene uso de codones optimizado para bacterias, que se ha visto que aumenta los rendimientos de expresión proteico, y que fusiona la proteína con una sfGFP (superfolder Green Fluorescence Protein) que aumenta la solubilidad de la proteína blanco (189), al mismo tiempo que mejora los rendimientos de purificación. Este sistema tiene un sitio de corte de tipo TEV, para poder obtener la proteína nativa luego de su purificación, y está puesto a punto en vectores inducibles por lactosa o IPTG (190,191). Con este sistema se logró obtener buenos rendimientos de citocromo *c* nativo, cuando se induce con lactosa (Fig. 4.42), pero no se obtuvieron formas mono-nitradas del citocromo *c*, en ninguna de las 4 tirosinas.

Por último se utilizó otro vector con un promotor similar, inducible por lactosa, pero sin fusionar el citocromo con GFP, y se utilizó un par tRNA/tRNA sintetasa de segunda generación para la incorporación específica de NO₂-Tyr, optimizado por el mismo grupo de trabajo (192), y finalmente se logró expresar el citocromo nitrado específicamente en las Tyr67 y Tyr74. Cuando se usa un plásmido inducido por IPTG, se produce la expresión de la hemo liasa, pero no del citocromo *c* (Fig. 4.42).

Actualmente nosotros tenemos este sistema de expresión y queda pendiente y previsto para los próximos meses la purificación de la proteína y la validación de las mismas, especialmente mediante la comparación del NO₂-Y74 citocromo *c* obtenido por biología sintética con el obtenido por nitración química y posterior purificación.

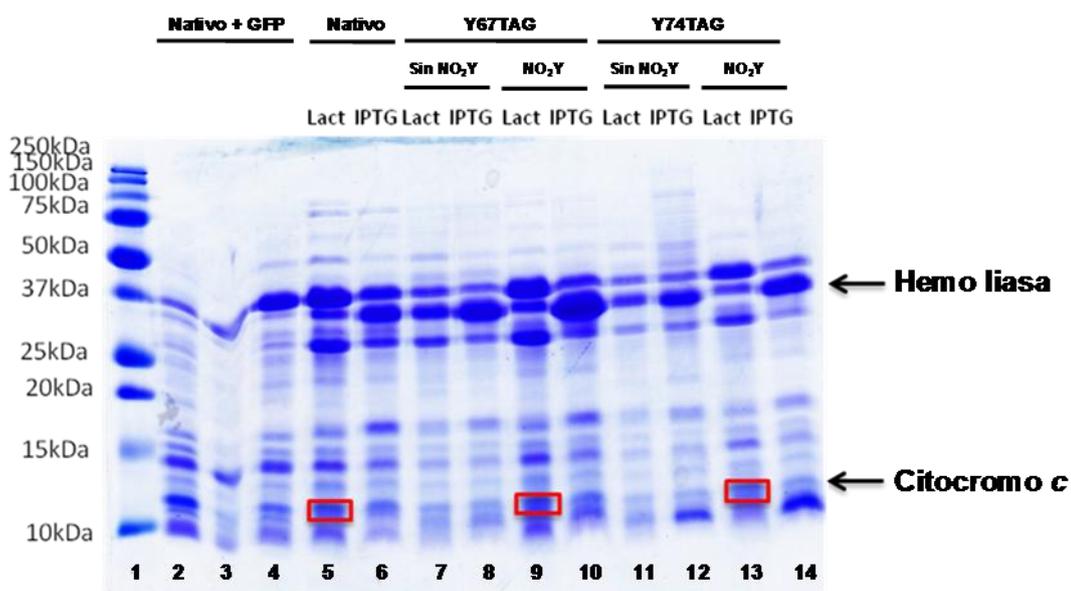


Figura 4.42. Expresión de citocromo c nativo y NO₂-Y67 y NO₂-Y74 genéticamente codificados. Se muestra la expresión de estos citocromos en dos sistemas, uno inducible por lactosa, y otro inducible por IPTG. Como control, cada uno de los citocromos son crecidos en presencia o ausencia de NO₂Tyr en el medio de cultivo. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 15% y teñidos con azul de Coomasie. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, construcción de citocromo nativo fusionado a GFP inducido por lactosa; carriles 3 y 4, citocromo nativo fusionado a GFP inducido por IPTG; carril 5, citocromo nativo inducido por lactosa; carril 6, citocromo nativo inducido por IPTG; carril 7, citocromo Y67TAG inducido por lactosa en un medio sin NO₂Y; carril 8, citocromo Y67TAG inducido por IPTG en un medio sin NO₂Y; carril 9, citocromo Y67TAG inducido por lactosa en un medio con NO₂Y; carril 10, citocromo Y67TAG inducido por IPTG en un medio con NO₂Y; carril 11, citocromo Y74TAG inducido por lactosa en un medio sin NO₂Y; carril 12, citocromo Y74TAG inducido por IPTG en un medio sin NO₂Y; carril 13, citocromo Y74TAG inducido por lactosa en un medio con NO₂Y; carril 14, citocromo Y74TAG inducido por IPTG en un medio con NO₂Y.

4.6.2. Expresión de citocromo c marcado con N¹⁵

En un proyecto en colaboración con el Dr. Alejandro Vila y la Dra. Verónica Demicheli se intentó determinar, mediante técnicas de NMR, cambios en la estructura del citocromo c al interaccionar con liposomas de cardiolipina.

Para esto expresamos citocromo *c* marcado con N^{15} , para poder detectar toda la molécula por esta técnica, y no solo la parte que está cercana al hemo, como se hizo para determinar los valores de pKa en la sección 4.2.

Para esto se utilizó el mismo medio mínimo que se puso a punto para el expresión de citocromo *c* nativo, pero sustituyendo el cloruro de amonio, por cloruro de amonio marcado con N^{15} .

El citocromo se creció toda la noche en 10 mL de LB y después se inoculó en 500 mL de medio mínimo marcado con ^{15}N . Se dejó crecer el citocromo por 50 horas y se realizó la purificación de forma análoga a cualquiera de los citocromos nativos o nitrados.

El rendimiento de expresión de este citocromo recombinante es bastante bajo, por crecerse en medio mínimo, habiéndose obtenido 3 mg de citocromo $c\text{-}^{15}N$ a partir de 4 litros de cultivo.

Para verificar la marca de este citocromo pasamos 250 μL de una solución 1 μM de citocromo *c* nativo sin marca (Fig. 4.43 A) y marcado (Fig. 4.43 B) por el espectrómetro de masas para detectar la marca de nitrógeno.

Como se puede ver en la figura 4.43, la diferencia entre el citocromo crecido en N^{14} y N^{15} es de 135 Da.

La diferencia que esperábamos es de 1 Da por cada nitrógeno que tiene el citocromo (Fig. 4.43 C): 104 de los grupos amino 104 aminoácidos de la cadena primaria, 19 de las lisinas, 2 de las argininas, 1 de la histidina, 1 del triptofano, 3 de la glutamina, 7 de la asparagina, por lo que esperábamos encontrar una diferencia de 137 Da.

Sin embargo, un 2% de los nitrógenos del medio son N^{14} (porque el precultivo es hecho en LB y pasado al cultivo en medio mínimo con una dilución 1/50), por lo que cada citocromo no va a incorporar el 100% de los átomos de N como N^{15} , sino que va a incorporar un 98%. El 98% de 137 es 134.3, por lo que la masa esperada para la población mayoritaria de citocromo *c* crecido en medio mínimo con N^{15} es: $12.280 + 134,3 = 12414,3$, muy similar a la masa obtenida de 12.415.

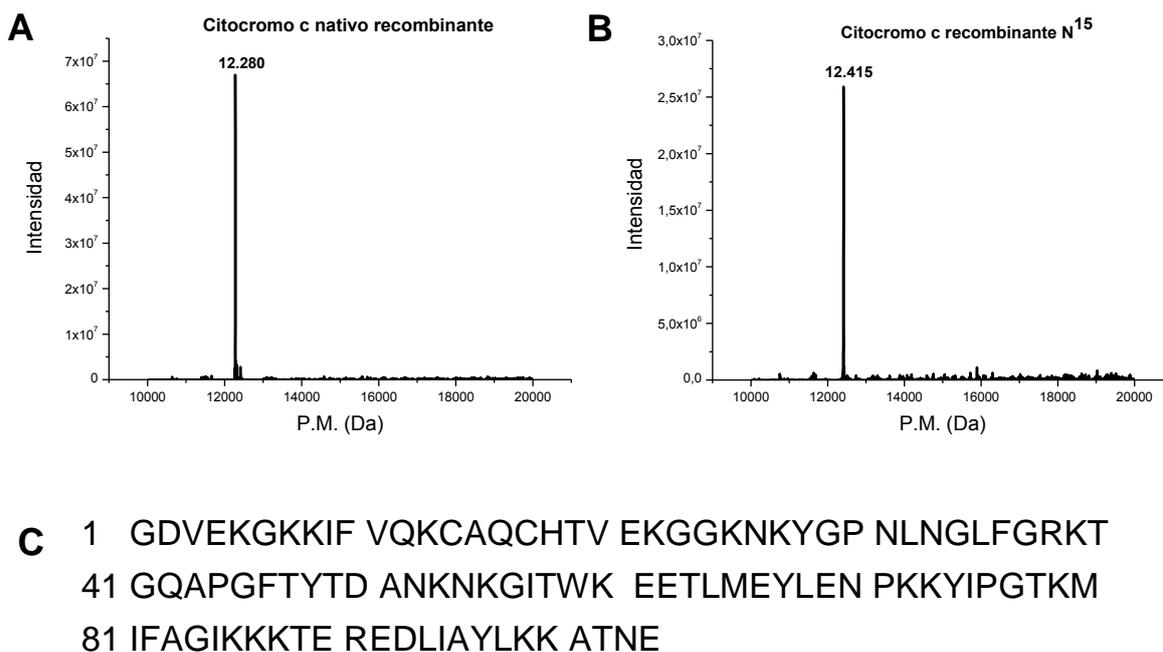


Figura 4.43. Espectros de masa de los citocromos c recombinante. Se muestran los espectros para el citocromo c sin marcar (**A**) que presenta una masa mayoritaria de 12.280 dáltons, y marcado con N¹⁵ (**B**) que muestra una masa de 12416 dáltons. En el panel (**C**) se muestra la secuencia del citocromo c de corazón de caballo con las dos modificaciones que se incorporaron para mejorar la estabilidad: H26N y H33N

4.6.3. Expresión de citocromo c humano

El citocromo c es una proteína presente en todas las especies animales y vegetales, con un alto grado de conservación, a tal punto que ha sido utilizado como un marcador de evolución (193). El citocromo c de caballo presenta un 90% de identidad aminoacídica con el citocromo c humano y más de un 94% de similitud (Fig. 4.44).

La mayoría de los trabajos realizados en citocromo c se ha realizado en la isoforma de caballo, ya que en un principio fue la que estaba comercialmente disponible, y por lo tanto es la mejor caracterizada estructural y bioquímicamente.

Esa misma isoforma fue la que se utilizó a lo largo de toda esta tesis, pero nos queda pendiente validar los resultados más importantes en el citocromo c humano. Además, en una nueva colaboración con el Dr. Alejandro Vila nos proponemos sintetizar

citocromo humano con un doble marcaje en carbono y nitrógeno, para hacer la asignación por NMR de esta isoforma, que aún no ha sido realizada.

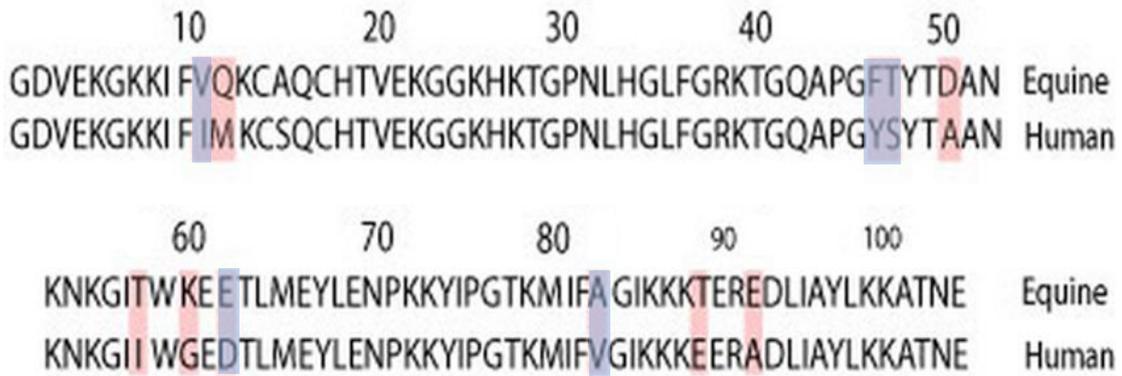


Figura 4.44. Alineación de secuencia aminoacídica entre citocromo c de caballo y humano. Se la alineación de secuencia de los dos citocromos resaltando en color los aminoácidos distintos entre ambas secuencias: en celeste se muestran los aminoácidos similares y en rosado los aminoácidos disimiles.

Con este fin se sintetizó la secuencia codificante del gen de citocromo c humano y se clonó en el plásmido pBAD inducible por arabinosa que ya había sido utilizado para expresar citocromo c recombinante de caballo (ver figura 4.40). Con un crecimiento del cultivo por 20 horas con 0,02% de L-arabinosa se lograron muy buenos rendimientos de expresión de citocromo tal como se ve por el color rojo de los cultivos (Fig. 4.45 A) o por ensayos de western blot anti citocromo c (Fig. 4.45 B). La purificación de esta proteína mostró un rendimiento de más de 15 mg por litro de cultivo.

Resta la expresión y purificación de más cantidad de esta isoforma de citocromo para repetir los experimentos más relevantes de este trabajo, así como la puesta a punto de la expresión de altos rendimientos de esta isoforma en medio mínimo, para realizar el doble marcaje que nos permita hacer la asignación por NMR de la proteína.

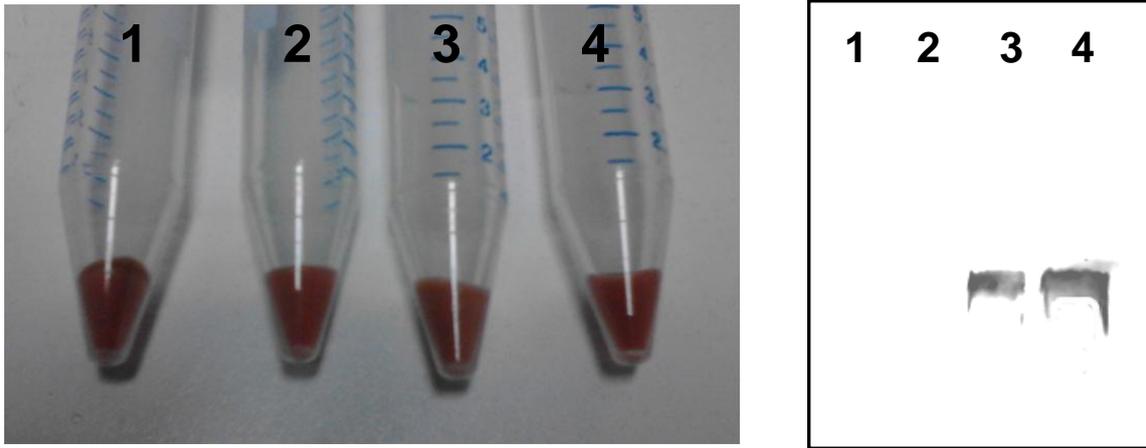


Figura 4.45. Expresión de citocromo c humano en vector inducible por L-arabinosa. (A) Las bacterias BL21 star transformadas con el plásmido que codifica para el citocromo c humano fueron crecidas por distintos tiempos con distintas concentraciones de L-arabinosa. Transcurrido el tiempo de crecimiento las células fueron cosechadas por centrifugado y se tomó una foto para ver el color debido a la alta expresión de citocromo c. Tubo 1: 20 hs, 0,02% L-arabinosa; Tubo 2: 20 hs, 0,2% L-arabinosa; Tubo 3: 40 hs, 0,02% L-arabinosa; Tubo 4: 40 hs, 0,2% L-arabinosa. **(B)** Como la expresión fue constante en todos los cultivos se eligió la condición de 20 hs de crecimiento con 0,02% L-arabinosa y las células se rompieron por sonicado. Muestras del lisado se corrieron en geles de poliacrilamida al 15% y se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con un anticuerpo anti citocromo c. **(C)** Carril 1: bacterias sin inducir (50 μ g); carril 2: bacterias sin inducir (100 μ g); carril 3: bacterias inducidas (50 μ g); carril 4: bacterias inducidas (100 μ g).

❖ **Conclusiones parciales: 4.6. Expresión de otras formas de citocromo c**

Esta parte del trabajo, que implicó mucho tiempo y fue desarrollándose en el transcurso de todo el trabajo de tesis, nos ha permitido la puesta a punto de otros sistemas de expresión de citocromos no mutantes, pero con variaciones respecto al citocromo c nativo de caballo.

Por un lado los citocromos marcados permite la mejor caracterización de los mismos por técnicas de NMR, pudiendo visualizar el total de la molécula y no solo los residuos más cercanos al hemo. Ya sea utilizando el citocromo de caballo, que ya ha sido asignado, y puede utilizarse para determinar sus cambios frente a distintas condiciones, como puede ser la asociación con fosfolípidos de membrana como la cardiolipína, o buscando asignar el citocromo c humano, que después podrá ser de utilidad para muchos trabajos, nuestros o de otros grupos.

Por otra parte, el poder obtener formas mono-nitradas de citocromo c es de gran importancia, especialmente en función de la optimización del sistema para obtener cantidades considerables de proteína mono-nitrada. Actualmente nosotros podemos obtener formas mono-nitradas de citocromo c en las tirosinas 74 y 97, pero los rendimientos de nitración/purificación son muy bajos, obteniéndose aproximadamente 1 mg de cada especie nitrada a partir de 40 mg de citocromo nativo tratado con ONOO⁻, por lo que poder obtener mayores cantidades de NO₂-Y74-citocromo c es fundamental para poder continuar con este proyecto, al mismo tiempo que nos permitiría realizar otros experimentos que muchas veces no se pueden hacer con la poca cantidad de proteína obtenida.

Y aún más, el sistema de nitración sito específica nos va a permitir obtener formas mono-nitradas de citocromo c en la Tyr67, que no podemos obtener por nitración química, por lo que este modelo nos va a permitir estudiar el efecto de la nitración de este residuo en las funciones y actividades del citocromo c. El efecto de la nitración de este residuo es muy importante si se tiene en cuenta que cuando el citocromo c es tratado con H₂O₂ este es uno de los residuos preferentemente nitrados.

5. Conclusiones generales y perspectivas

Este trabajo permitió una caracterización estructural y funcional del citocromo *c* de corazón de caballo, destacando el rol de aminoácidos claves, como la sexta coordinación del hemo, sus 4 tirosinas y de modificaciones nitro-oxidativas, como es la nitración sitio-específica de las tirosinas.

En esta línea se desarrollaron una serie de mutantes de citocromo *c*, en una primera instancia de sus 4 tirosinas por fenilalanina y de la Met80 por alanina, y a medida que avanzaba el proyecto se realizaron nuevos mutantes para verificar resultados obtenidos. Además se expresaron otros mutantes que no están directamente relacionados al trabajo de esta tesis, pero que permitieron establecer importantes colaboraciones con otros grupos, y contribuyeron a la caracterización estructural de este citocromo.

Este modelo permitió determinar el rol de distintos aminoácidos en las actividades del citocromo *c*.

Como se esperaba y había sido descripto para otros modelos de citocromo *c* la Met80, sexta posición de coordinación del hemo, es un residuo clave para mantener la estructura y funcionalidad del citocromo. Su sustitución por alanina da lugar a la formación de un citocromo más desplegado, que se encuentra entre dos poblaciones, una de ellas con el hemo hexa-coordinado con compuestos orgánicos, con el grupo hemo mucho más expuesto, lo que le confiere una mayor actividad peroxidasa y un potencial redox mucho más negativo que el del citocromo *c* nativo. Este cambio en el potencial redox le impide al citocromo M80A transportar electrones por la cadena respiratoria. Además, a pesar del gran aumento de actividad peroxidasa que tiene, es menos eficaz en activar el apoptosoma que el citocromo nativo. En condiciones fisiológicas no se ha encontrado este tipo de citocromo hexa-coordinado, sino que se han encontrado formas modificadas, con citocromos con su grupo hemo más expuesto, pero siempre hexa-coordinado, con ligandos alternativos como la Lys72, 72 o 79.

Una de estas condiciones que dejan al citocromo en una conformación parcialmente desplegada es la nitración de su tirosina, en especial la nitración de la Tyr74. A pesar de que el residuo de Tyr74 se encuentra alejado del grupo hemo, su nitración genera

un importante cambio conformacional que tiene grandes consecuencias en la funcionalidad del citocromo *c*, siendo el NO₂-Tyr74 citocromo incapaz de transportar electrones, y mucho menos efectivo en activar el apoptosoma. El rol fisiológico de esta nitración no está aún determinado, pero se ha visto que el citocromo nitrado migra específicamente al núcleo celular, pudiendo estar interactuando con el ADN y actuando como regulador de la expresión génica.

La Tyr67, que tiene una localización cercana al grupo hemo, adyacente al residuo de Met80, juega un rol en la apertura del citocromo *c*, por lo que cuando no está presente deja al citocromo en una estructura más rígida, que no permite la ruptura del enlace Met80-Fe. Este residuo es también fundamental para el mecanismo de transferencia electrónica, siendo el citocromo mutante Y67F incapaz de transportar electrones, a pesar de no presentar una importante variación en su valor de potencial redox. Además ha sido determinado que la oxidación de la cardiolipina, proceso imprescindible para que tenga lugar el comienzo de la apoptosis, también involucra a formación de un radical centrado en esta tirosina. Todos estos hechos muestran que la Tyr67 es un residuo fundamental para las distintas actividades del citocromo *c*, lo que explica su alta conservación entre especies.

En este trabajo también profundizamos en los mecanismos de oxidación por distintos oxidantes. Ya había sido determinado que el ONOO⁻ en primer lugar nitra las tirosinas más externas; y en este trabajo demostramos que esa nitración genera una apertura en citocromo que expone las tirosinas más internas (Tyr48 y Tyr67) que son las responsables de la polimerización del citocromo expuesto a ONOO⁻. Por otro lado, cuando el citocromo es tratado con H₂O₂ en presencia de NO₂⁻ o [•]NO son los residuos de tirosina más internos los más implicados tanto en la nitración como en la polimerización del citocromo *c*.

También pusimos a punto la purificación de formas marcadas del citocromo *c* para permitir su detección por técnicas de NMR, de citocromo *c* humano, para poder validar los resultados obtenidos en esta especie, y de citocromos mono-nitrados co-traduccionalmente en distintas tirosinas, para profundizar en el efecto de estas modificaciones en la estructura y función del citocromo.

Aún queda mucho trabajo por realizar para continuar con la caracterización del citocromo. En el corto plazo planeamos terminar los resultados que quedaron pendientes en esta tesis. Determinar el valor de pKa de la transición alcalina de los NO₂-Tyr74 Y67F y E66Q, para verificar o refutar la hipótesis de que la nitración en la tirosina 74 adelanta la transición alcalina mediante un pasaje de información hacia la Met80 a través de estos dos aminoácidos. Establecer los sitios preferenciales de nitración cuando está actuando un mecanismo tipo peroxidasa en presencia de H₂O₂, para ver si realmente hay una mayor nitración de las tirosinas más internas, como se infiere de la nitración de los distintos mutantes de tirosina. Aunque no se han encontrado tirosinas involucradas en la unión del citocromo c con APAF-1, restaría evaluar nuestros mutantes de tirosina por fenilalanina en su capacidad de activar el apoptosoma para confirmar si hay alguna tirosina involucrada en esta función del citocromo.

También estamos trabajando en la síntesis de citocromo nitrado co-traduccionamente, y en la optimización de la expresión del citocromo c humano, en particular en medio mínimo, para realizar un el doble marcaje que permita asignar las señales por NMR.

Si bien tenemos evidencias de que conformaciones alternativas al citocromo c nativo se pueden formar en cultivos celulares (62); quedaría por confirmar cuáles de estas especies pueden ser detectadas en distintas condiciones celulares fisiológicas, para lo cual en nuestro laboratorio se está intentando desarrollar un anticuerpo que reconozca formas modificadas del citocromo c pero no al citocromo c nativo. También queda por determinar si el citocromo c es efectivamente capaz de interactuar con el ADN en el núcleo y en caso de que se produzca interacción determinar su efecto en la expresión génica.

Además, el mecanismo de acción del citocromo c en sus otras funciones, en especial la interacción con Erv1 y p66^{shc} no está aún bien determinada, y la utilización de estas proteínas mutadas podría ser de utilidad para determinar la interacción del citocromo con las proteínas blanco en cada sistema.

6. Publicaciones

Verónica Tórtora[#], Luciano Abriata[#], Adriana Cassina[#], Mónica Marín, José María Souza, Laura Castro, Alejandro Vila y Rafael Radi. (2009) "Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome *c* triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies". *The Journal of biological chemistry* 284, 17-26. [#]Estos autores tienen igual participación en el trabajo; en la revista estos autores aparecen por orden alfabético.

Godoy, L. C., Munoz-Pinedo, C., Castro, L., Cardaci, S., Schonhoff, C. M., King, M., Tortora, V., Marin, M., Miao, Q., Jiang, J. F., Kapralov, A., Jemmerson, R., Silkstone, G. G., Patel, J. N., Evans, J. E., Wilson, M. T., Green, D. R., Kagan, V. E., Radi, R., and Mannick, J. B. (2009) "Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome *c* to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2653-2658

Kawai, C., Pessoto, F. S., Rodrigues, T., Mugnol, K. C., Tortora, V., Castro, L., Milicchio, V. A., Tersariol, I. L., Di Mascio, P., Radi, R., Carmona-Ribeiro, A. M., and Nantes, I. L. (2009) "pH-sensitive binding of cytochrome *c* to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis". *Biochemistry* 48, 8335-8342

Kapralov, A. A., Yanamala, N., Tyurina, Y. Y., Castro, L., Samhan-Arias, A., Vladimirov, Y. A., Maeda, A., Weitz, A. A., Peterson, J., Mylnikov, D., Demicheli, V., Tortora, V., Klein-Seetharaman, J., Radi, R., and Kagan, V. E. (2011) "Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome *c*/cardiolipin peroxidase complexes". *Biochimica et biophysica acta* 1808, 2147-2155

Laura Castro, Verónica Demicheli, Verónica Tórtora, y Rafael Radi. (2011) "Mitochondrial protein tyrosine nitration". *Free radical research* 45, 37-52

Damián Alvarez-Paggi, María Ana Castro, Verónica Tórtora, Laura Castro, Rafael Radi y Daniel Murgida. (2013) "Electrostatically driven second-sphere ligand switch between high and low reorganization energy forms of native cytochrome *c*". *Journal of the American Chemical Society* 135, 4389-4397

Daiana Capdevila, Damián Alvarez-Paggi, María Ana Castro, Verónica Tortora, Verónica Demicheli, Darío Estrin, Rafael Radi, y Daniel Murgida. (2014) "Coupling of tyrosine deprotonation and axial ligand exchange in nitrocytochrome *c*". *Chemical communications* 50, 2592-2594

Otras publicaciones durante el transcurso de estas tesis no relacionadas con este trabajo:

Fiorella Scandroglio, Verónica Tórtora, Rafael Radi y Laura Castro. (2014) "Metabolic control analysis of mitochondrial aconitase: influence over respiration and mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production". *Free radical research* 48, 684-693

Artículos en elaboración:

Los resultados de nitración del citocromo *c* están redactados para su publicación, y los estamos revisando y corrigiendo el manuscrito, mientras intentamos determinar los sitios preferenciales de nitración por un mecanismo tipo peroxidasa para agregarlo antes de ser enviado a una revista para su publicación.

Al mismo tiempo se está redactando otro manuscrito con los resultados de la medida del potencial redox de cada mutante, la capacidad de cada mutante en permitir la respiración celular, y la actividad citocromo oxidasa; y esperamos poder incluir los resultados de los pKa de la transición alcalina de los mutantes nitrados para finalizar la discusión que nosotros mismos planteamos en un artículo anterior.

7. Anexo 1

Para verificar la hipótesis del mecanismo de apertura del enlace Met80-Fe inducido por la nitración de la Tyr74, que se presentó en la figura 4.21, se sintetizó un nuevo mutante en el Glu66.

Este mecanismo proponía que el grupo nitro incorporado a la tirosina 74 interacciona mediante un puente de hidrógeno con el Glu66, adyacente a la Tyr67, que es la que interactúa con la Met80. Para verificarlo nuestra idea fue generar un nuevo mutante en el Glu66, y usar también el mutante Y67F, a los que queremos nitrar en la Tyr74 y ver si, en ausencia de estos aminoácidos que nosotros creemos responsables de la comunicación, la nitración de la Tyr74 puede o no adelantar la transición alcalina.

Para el nuevo mutante en el Glu66 se decidió sustituir el glutamato por glutamina para mantener la polaridad del aminoácido, intentando afectar lo mínimo posible la estructura y estabilidad de la molécula sin nitrar, pero a la vez intentando cambiar la red de puentes de hidrógeno para que no puedan emularse las interacciones que planteamos se dan en el citocromo nitrado sin modificaciones en su secuencia primaria. Además se ha visto que este mutante no tiene una gran diferencia en el valor de pKa respecto al citocromo nativo (194). Con otras mutaciones ya se ha visto un corrimiento en el pKa de la transición alcalina del citocromo sin nitrar; por ejemplo la sustitución del glutamato por glicina o alanina genera una disminución de una unidad en el valor de pKa (185), mientras que la sustitución por lisina genera un cambio aún mayor, de casi dos unidades (194).

Tal como hicimos para los otros mutantes, el citocromo E66Q generado se validó en su estructura y actividades fisicoquímicas, mostrando tener un espectro de absorbancia igual al del citocromo nativo (Fig. 7.1 A), y una degradación del grupo hemo inducida por peróxido (Fig. 7.1 B) y actividad peróxidasa (Fig. 7.1 C) comparable al citocromo nativo.

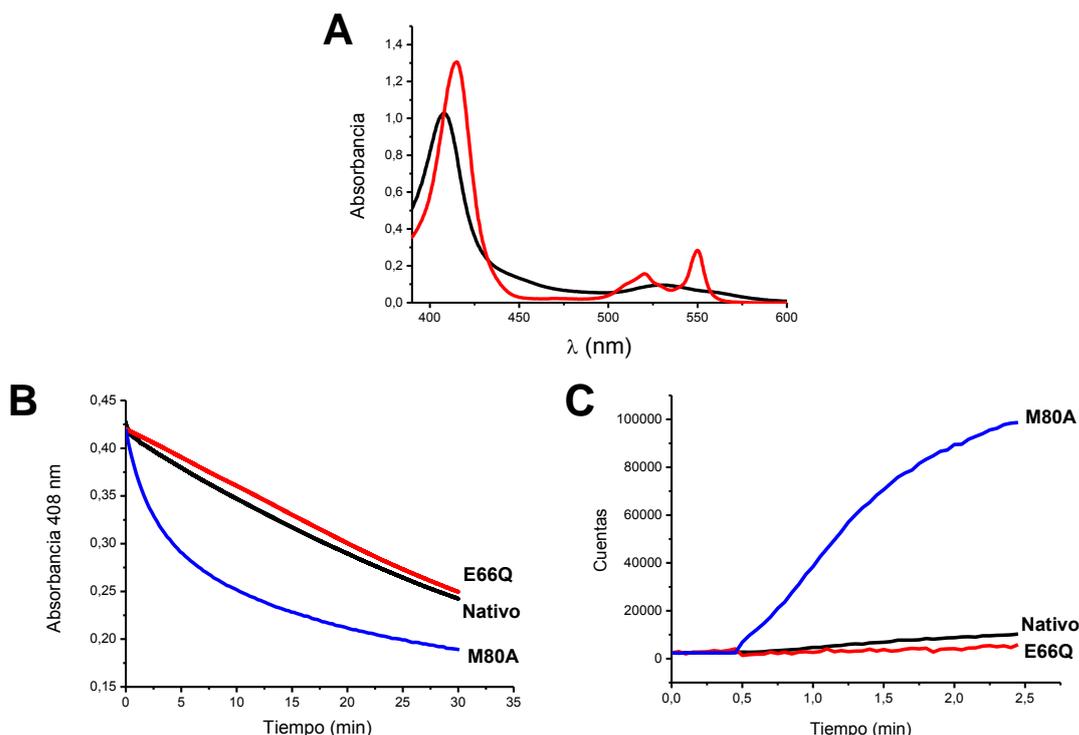


Figura 7.1. Caracterización del mutante de citocromo c E66Q. (A) Espectros de absorbancia de citocromo E66Q (10 μ M) tratado con ferricianuro de potasio (negro) o ditionite de sodio (rojo). (B) Blanqueamiento en la banda de Soret (408 nm) del citocromo c (4 μ M) nativo (negro), E66Q (rojo) y M80A (azul) inducida por 300 μ M H_2O_2 . (C) Actividad peroxidasa de los citocromos (500 nM) nativo (negro), E66Q (rojo) y M80A (azul).

Una vez validado este mutante se determinó su valor de pKa por método de la absorbancia de la banda a 695 nm (Fig. 7.2) tal como se describió previamente. Este mutante tiene un valor de pKa para la transición alcalina de 8,5, ligeramente menor al del citocromo c nativo, pero comparable al obtenido para cualquiera de los mutantes

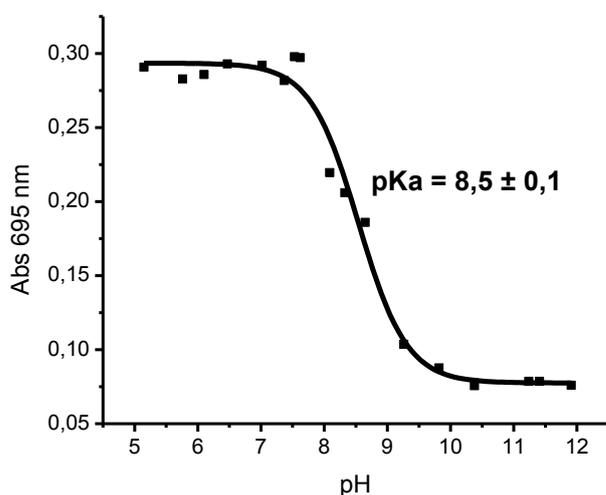


Figura 7.2. Determinación del pKa de la transición alcalina del mutante E66Q, seguida mediante la absorbancia de la banda a 695

de tirosina por fenilalanina.

Posteriormente se nitraron químicamente los mutantes Y67F y E66Q, que dieron perfiles de nitración similares al del citocromo *c* nativo, y las formas mono-nitradas en la Tyr74 fueron purificadas. La nitración de cada una de las tirosinas fue verificada por espectroscopía de masas. Estos experimentos fueron realizados en conjunto con la Lic. Florencia Tomasina y el Lic. Mauricio Mastrogiovanni (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República).

Los valores de pKa para estas especies nitradas se van a intentar determinar por un único método (espectroscopia Raman resonante) por la poca cantidad de muestra obtenida. Dado los rendimientos de expresión de los mutantes recombinantes, y los bajos rendimientos de nitración sitio específica de los citocromos, se necesitaron realizar muchas purificaciones de cada mutante para poder nitrarlas y obtener formas mono-nitradas de cada mutante para realizar estas medidas.

Lamentablemente, a pesar de haber podido obtener 2 mg de cada una de los mutantes nitrados en la Tyr74, no hemos podido determinar los valores de pKa por un problema con el láser a 413 nm del espectómetro Raman, pero queda pendiente realizarlas a la brevedad para poder verificar o refutar nuestra hipótesis.

8. Referencias

1. Radi, R., Turrens, J. F., and Freeman, B. A. (1991) Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Archives of biochemistry and biophysics* **288**, 118-125
2. Margoliash, E., and Schejter, A. (1996) How does a small protein become so popular? in *Cytochrome C : a multidisciplinary approach* (Scott, R. A., and Mauk, A. G. eds.), University Science Books, Sausalito, Calif. pp vi, 738 p.
3. Salamon, Z., and Tollin, G. (1997) Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes: effects on redox potentials. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **29**, 211-221
4. Wilkstrom, M., and Sarastre, M. (1984) *Bioenergetics*, Elsevier Science Pub. Co., Amsterdam ; New York, USA
5. Jiang, X., and Wang, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**, 87-106
6. Skulachev, V. P. (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS letters* **423**, 275-280
7. Huttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T. H., Kagan, V. E., Samavati, L., Doan, J. W., and Lee, I. (2011) The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* **11**, 369-381
8. Kawai, C., Prado, F. M., Nunes, G. L., Di Mascio, P., Carmona-Ribeiro, A. M., and Nantes, I. L. (2005) pH-Dependent interaction of cytochrome c with mitochondrial mimetic membranes: the role of an array of positively charged amino acids. *The Journal of biological chemistry* **280**, 34709-34717
9. Rytomaa, M., and Kinnunen, P. K. (1994) Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c. *The Journal of biological chemistry* **269**, 1770-1774
10. Cortese, J. D., Voglino, A. L., and Hackenbrock, C. R. (1995) Persistence of cytochrome c binding to membranes at physiological mitochondrial intermembrane space ionic strength. *Biochimica et biophysica acta* **1228**, 216-228

11. Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Potapovich, A. I., Kini, V., Amoscato, A. A., and Fujii, Y. (2004) Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free radical biology & medicine* **37**, 1963-1985
12. Tuominen, E. K., Wallace, C. J., and Kinnunen, P. K. (2002) Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *The Journal of biological chemistry* **277**, 8822-8826
13. Sherman, F., and Stewart, J. W. (1971) Genetics and biosynthesis of cytochrome c. *Annual review of genetics* **5**, 257-296
14. Margoliash, E., and Schejter, A. (1966) Cytochrome c. *Advances in protein chemistry* **21**, 113-286
15. Senn, H., and Wuthrich, K. (1985) Amino acid sequence, haem-iron coordination geometry and functional properties of mitochondrial and bacterial c-type cytochromes. *Q Rev Biophys* **18**, 111-134
16. Heineman, W. R., Norris, B. J., and Goelz, J. F. (1975) Measurement of enzyme E'values by optically transparent thin layer electrochemical cells. *Analytical chemistry* **47**, 79-84
17. Liu, G., Shao, W., Zhu, S., and Tang, W. (1995) Effects of axial ligand replacement on the redox potential of cytochrome c. *Journal of inorganic biochemistry* **60**, 123-131
18. Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, II, Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V., and Borisenko, G. G. (2005) Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* **1**, 223-232
19. Kapralov, A. A., Yanamala, N., Tyurina, Y. Y., Castro, L., Samhan-Arias, A., Vladimirov, Y. A., Maeda, A., Weitz, A. A., Peterson, J., Mylnikov, D., Demicheli, V., Tortora, V., Klein-Seetharaman, J., Radi, R., and Kagan, V. E. (2011) Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochimica et biophysica acta* **1808**, 2147-2155
20. Dickerson, R. E., and Timkovich, R. (1975) *The Enzymes*, 3d ed., Academic Press, New York,

21. Dopner, S., Hildebrandt, P., Rosell, F. I., Mauk, A. G., von Walter, M., Buse, G., and Soulimane, T. (1999) The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase. *European journal of biochemistry / FEBS* **261**, 379-391
22. Scott, R. A., and Mauk, A. G. (1996) *Cytochrome C : a multidisciplinary approach*, University Science Books, Sausalito, Calif.
23. Assfalg, M., Bertini, I., Dolfi, A., Turano, P., Mauk, A. G., Rosell, F. I., and Gray, H. B. (2003) Structural model for an alkaline form of ferricytochrome C. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 2913-2922
24. Ferrer, J. C., Guillemette, J. G., Bogumil, R., Inglis, S. C., Smith, M., and Mauk, A. G. (1993) Identification of Lys79 as an iron ligand in one form of alkaline yeast iso-1-ferricytochrome c. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7507-7508
25. Hong, X. L., and Dixon, D. W. (1989) NMR study of the alkaline isomerization of ferricytochrome c. *FEBS letters* **246**, 105-108
26. Moore, G. R., and Pettigrew, G. W. (1990) *Cytochromes c : evolutionary, structural, and physicochemical aspects*, Springer-Verlag, Berlin ; New York
27. Osheroff, N., Borden, D., Koppenol, W. H., and Margoliash, E. (1980) Electrostatic interactions in cytochrome c. The role of interactions between residues 13 and 90 and residues 79 and 47 in stabilizing the heme crevice structure. *The Journal of biological chemistry* **255**, 1689-1697
28. Pearce, L. L., Gartner, A. L., Smith, M., and Mauk, A. G. (1989) Mutation-induced perturbation of the cytochrome c alkaline transition. *Biochemistry* **28**, 3152-3156
29. Pettigrew, G. W., and Moore, G. R. (1987) *Cytochromes c : biological aspects*, Springer-Verlag, Berlin ; New York
30. Gadsby, P. M., Peterson, J., Foote, N., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1987) Identification of the ligand-exchange process in the alkaline transition of horse heart cytochrome c. *The Biochemical journal* **246**, 43-54
31. Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M. B., Dumont, M. E., and Mauk, A. G. (1998) Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome c. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome c and the alkaline conformational transition. *Biochemistry* **37**, 6124-6131

32. Rosell, F. I., Ferrer, J. C., and Mauk, A. G. (1998) Proton-Linked Protein Conformational Switching: Definition of the Alkaline Conformational Transition of Yeast Iso-1-ferricytochrome c. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11234-11245
33. Basova, L. V., Kurnikov, I. V., Wang, L., Ritov, V. B., Belikova, N. A., Vlasova, II, Pacheco, A. A., Winnica, D. E., Peterson, J., Bayir, H., Waldeck, D. H., and Kagan, V. E. (2007) Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry* **46**, 3423-3434
34. Muenzner, J. K., Biersack, B., Kalie, H., Andronache, I. C., Kaps, L., Schuppan, D., Sasse, F., and Schobert, R. (2014) Gold(I) biscarbene complexes derived from vascular-disrupting combretastatin A-4 address different targets and show antimetastatic potential. *ChemMedChem* **9**, 1195-1204
35. Nantes, I. L., Zucchi, M. R., Nascimento, O. R., and Faljoni-Alario, A. (2001) Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome c and its association with membrane interfaces. A CD and EPR investigation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 153-158
36. Garcia-Heredia, J. M., Diaz-Quintana, A., Salzano, M., Orzaez, M., Perez-Paya, E., Teixeira, M., De la Rosa, M. A., and Diaz-Moreno, I. (2011) Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome c behave as an anti-apoptotic switch. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **16**, 1155-1168
37. Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X., and Williams, R. S. (2000) Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* **101**, 389-399
38. Welchen, E., Hildebrandt, T. M., Lewejohann, D., Gonzalez, D. H., and Braun, H. P. (2012) Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et biophysica acta* **1817**, 990-1001
39. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2008) *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed., W.H. Freeman, New York
40. Kapralov, A. A., Kurnikov, I. V., Vlasova, II, Belikova, N. A., Tyurin, V. A., Basova, L. V., Zhao, Q., Tyurina, Y. Y., Jiang, J., Bayir, H., Vladimirov, Y. A., and Kagan, V. E. (2007) The hierarchy of structural transitions induced in

- cytochrome c by anionic phospholipids determines its peroxidase activation and selective peroxidation during apoptosis in cells. *Biochemistry* **46**, 14232-14244
41. Krishna, M. M., Lin, Y., Rumbley, J. N., and Englander, S. W. (2003) Cooperative omega loops in cytochrome c: role in folding and function. *Journal of molecular biology* **331**, 29-36
 42. Barr, D. P., Gunther, M. R., Deterding, L. J., Tomer, K. B., and Mason, R. P. (1996) ESR spin-trapping of a protein-derived tyrosyl radical from the reaction of cytochrome c with hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* **271**, 15498-15503
 43. Barr, D. P., and Mason, R. P. (1995) Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. An ESR spin trapping investigation. *The Journal of biological chemistry* **270**, 12709-12716
 44. Lawrence, A., Jones, C. M., Wardman, P., and Burkitt, M. J. (2003) Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 29410-29419
 45. Radi, R. A., Rubbo, H., and Prodanov, E. (1989) Comparison of the effects of superoxide dismutase and cytochrome c on luminol chemiluminescence produced by xanthine oxidase-catalyzed reactions. *Biochimica et biophysica acta* **994**, 89-93
 46. Bergstrom, C. L., Beales, P. A., Lv, Y., Vanderlick, T. K., and Groves, J. T. (2013) Cytochrome c causes pore formation in cardiolipin-containing membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 6269-6274
 47. Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14681-14686
 48. Renault, T. T., Floros, K. V., and Chipuk, J. E. (2013) BAK/BAX activation and cytochrome c release assays using isolated mitochondria. *Methods* **61**, 146-155

49. Liu, J., Dai, Q., Chen, J., Durrant, D., Freeman, A., Liu, T., Grossman, D., and Lee, R. M. (2003) Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 892-902
50. Schug, Z. T., and Gottlieb, E. (2009) Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 2022-2031
51. Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Bayir, H., Chu, C. T., Kapralov, A. A., Vlasova, I., Belikova, N. A., Tyurin, V. A., Amoscato, A., Epperly, M., Greenberger, J., Dekosky, S., Shvedova, A. A., and Jiang, J. (2006) The "pro-apoptotic genes" get out of mitochondria: oxidative lipidomics and redox activity of cytochrome c/cardiolipin complexes. *Chemico-biological interactions* **163**, 15-28
52. Belikova, N. A., Vladimirov, Y. A., Osipov, A. N., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Potapovich, M. V., Basova, L. V., Peterson, J., Kurnikov, I. V., and Kagan, V. E. (2006) Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* **45**, 4998-5009
53. Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Kochanek, P. M., Hamilton, R., DeKosky, S. T., Greenberger, J. S., Bayir, H., and Kagan, V. E. (2008) Oxidative lipidomics of programmed cell death. *Methods in enzymology* **442**, 375-393
54. Tyurina, Y. Y., Kini, V., Tyurin, V. A., Vlasova, I., Jiang, J., Kapralov, A. A., Belikova, N. A., Yalowich, J. C., Kurnikov, I. V., and Kagan, V. E. (2006) Mechanisms of cardiolipin oxidation by cytochrome c: relevance to pro- and antiapoptotic functions of etoposide. *Molecular pharmacology* **70**, 706-717
55. Iverson, S. L., and Orrenius, S. (2004) The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Archives of biochemistry and biophysics* **423**, 37-46
56. Nakagawa, Y. (2004) Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1011**, 177-184
57. Kagan, V. E., Bayir, H. A., Belikova, N. A., Kapralov, O., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Stoyanovsky, D. A., Wipf, P., Kochanek, P. M., Greenberger, J. S., Pitt, B., Shvedova, A. A., and Borisenko, G. (2009) Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free radical biology & medicine* **46**, 1439-1453

58. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157
59. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., and Haupt, Y. (2003) Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science* **116**, 4077-4085
60. Yu, T., Wang, X., Purring-Koch, C., Wei, Y., and McLendon, G. L. (2001) A mutational epitope for cytochrome C binding to the apoptosis protease activation factor-1. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13034-13038
61. Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X., and Mak, T. W. (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* **121**, 579-591
62. Godoy, L. C., Munoz-Pinedo, C., Castro, L., Cardaci, S., Schonhoff, C. M., King, M., Tortora, V., Marin, M., Miao, Q., Jiang, J. F., Kapralov, A., Jemmerson, R., Silkstone, G. G., Patel, J. N., Evans, J. E., Wilson, M. T., Green, D. R., Kagan, V. E., Radi, R., and Mannick, J. B. (2009) Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2653-2658
63. Garcia-Heredia, J. M., Diaz-Moreno, I., Nieto, P. M., Orzaez, M., Kocanis, S., Teixeira, M., Perez-Paya, E., Diaz-Quintana, A., and De la Rosa, M. A. (2010) Nitration of tyrosine 74 prevents human cytochrome c to play a key role in apoptosis signaling by blocking caspase-9 activation. *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 981-993
64. Souza, J. M., Castro, L., Cassina, A. M., Batthyany, C., and Radi, R. (2008) Nitrocytochrome c: synthesis, purification, and functional studies. *Methods in enzymology* **441**, 197-215
65. Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L. K., Schulze-Specking, A., Truscott, K. N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal* **23**, 3735-3746
66. Hoffman, M., and Hayon, E. (1973) Pulse radiolysis study of sulfhydryl compounds in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **77**, 990-996

67. Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G., and Lill, R. (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* **2**, 715-720
68. Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T., and Tokatlidis, K. (2005) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *Journal of molecular biology* **353**, 937-944
69. Herrmann, J. M., and Riemer, J. (2012) Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. *The Journal of biological chemistry* **287**, 4426-4433
70. Eckers, E., Petrunaro, C., Gross, D., Riemer, J., Hell, K., and Deponte, M. (2013) Divergent molecular evolution of the mitochondrial sulfhydryl:cytochrome C oxidoreductase Erv in opisthokonts and parasitic protists. *The Journal of biological chemistry* **288**, 2676-2688
71. Korshunov, S. S., Krasnikov, B. F., Pereverzev, M. O., and Skulachev, V. P. (1999) The antioxidant functions of cytochrome c. *FEBS letters* **462**, 192-198
72. Pereverzev, M. O., Vygodina, T. V., Konstantinov, A. A., and Skulachev, V. P. (2003) Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochemical Society transactions* **31**, 1312-1315
73. Wang, Z. B., Li, M., Zhao, Y., and Xu, J. X. (2003) Cytochrome C is a hydrogen peroxide scavenger in mitochondria. *Protein and peptide letters* **10**, 247-253
74. Pinton, P., Rimessi, A., Marchi, S., Orsini, F., Migliaccio, E., Giorgio, M., Contursi, C., Minucci, S., Mantovani, F., Wieckowski, M. R., Del Sal, G., Pelicci, P. G., and Rizzuto, R. (2007) Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* **315**, 659-663
75. Pinton, P., and Rizzuto, R. (2008) p66Shc, oxidative stress and aging: importing a lifespan determinant into mitochondria. *Cell cycle* **7**, 304-308
76. Lebedzinska, M., Duszynski, J., Rizzuto, R., Pinton, P., and Wieckowski, M. R. (2009) Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* **486**, 73-80

77. Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F., and Pelicci, P. G. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* **122**, 221-233
78. Sun, L., Xiao, L., Nie, J., Liu, F. Y., Ling, G. H., Zhu, X. J., Tang, W. B., Chen, W. C., Xia, Y. C., Zhan, M., Ma, M. M., Peng, Y. M., Liu, H., Liu, Y. H., and Kanwar, Y. S. (2010) p66Shc mediates high-glucose and angiotensin II-induced oxidative stress renal tubular injury via mitochondrial-dependent apoptotic pathway. *American journal of physiology. Renal physiology* **299**, F1014-1025
79. Nemoto, S., Combs, C. A., French, S., Ahn, B. H., Fergusson, M. M., Balaban, R. S., and Finkel, T. (2006) The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *The Journal of biological chemistry* **281**, 10555-10560
80. Nemoto, S., and Finkel, T. (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**, 2450-2452
81. Francia, P., delli Gatti, C., Bachschmid, M., Martin-Padura, I., Savoia, C., Migliaccio, E., Pelicci, P. G., Schiavoni, M., Luscher, T. F., Volpe, M., and Cosentino, F. (2004) Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* **110**, 2889-2895
82. Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**, 309-313
83. Napoli, C., Martin-Padura, I., de Nigris, F., Giorgio, M., Mansueto, G., Somma, P., Condorelli, M., Sica, G., De Rosa, G., and Pelicci, P. (2003) Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2112-2116
84. Orsini, F., Migliaccio, E., Moroni, M., Contursi, C., Raker, V. A., Piccini, D., Martin-Padura, I., Pelliccia, G., Trinei, M., Bono, M., Puri, C., Tacchetti, C., Ferrini, M., Mannucci, R., Nicoletti, I., Lanfrancone, L., Giorgio, M., and Pelicci, P. G. (2004) The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where

- it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates transmembrane potential. *The Journal of biological chemistry* **279**, 25689-25695
85. Pacini, S., Pellegrini, M., Migliaccio, E., Patrussi, L., Olivieri, C., Ventura, A., Carraro, F., Naldini, A., Lanfrancone, L., Pelicci, P., and Baldari, C. T. (2004) p66SHC promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. *Molecular and cellular biology* **24**, 1747-1757
86. Zaccagnini, G., Martelli, F., Fasanaro, P., Magenta, A., Gaetano, C., Di Carlo, A., Biglioli, P., Giorgio, M., Martin-Padura, I., Pelicci, P. G., and Capogrossi, M. C. (2004) p66ShcA modulates tissue response to hindlimb ischemia. *Circulation* **109**, 2917-2923
87. Castro, L., and Freeman, B. A. (2001) Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* **17**, 161, 163-165
88. Tahara, E. B., Navarete, F. D., and Kowaltowski, A. J. (2009) Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free radical biology & medicine* **46**, 1283-1297
89. Barja, G. (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **31**, 347-366
90. Barja, G., and Herrero, A. (1998) Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **30**, 235-243
91. Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* **552**, 335-344
92. Turrens, J. F., and Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal* **191**, 421-427
93. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* **128**, 617-630
94. Boveris, A., and Cadenas, E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS letters* **54**, 311-314

95. Cadenas, E., and Davies, K. J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* **29**, 222-230
96. Gardner, P. R., and Fridovich, I. (1991) Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *The Journal of biological chemistry* **266**, 19328-19333
97. Weisiger, R. A., and Fridovich, I. (1973) Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of biological chemistry* **248**, 4793-4796
98. Weisiger, R. A., and Fridovich, I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *The Journal of biological chemistry* **248**, 3582-3592
99. Drahota, Z., Chowdhury, S. K., Floryk, D., Mracek, T., Wilhelm, J., Rauchova, H., Lenaz, G., and Houstek, J. (2002) Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **34**, 105-113
100. Hauptmann, N., Grimsby, J., Shih, J. C., and Cadenas, E. (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Archives of biochemistry and biophysics* **335**, 295-304
101. Ilan, Y. A., Czapski, G., and Meisel, D. (1976) The one-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen/superoxide system. *Biochimica et biophysica acta* **430**, 209-224
102. Marletta, M. A. (1993) Nitric oxide synthase: function and mechanism. *Adv Exp Med Biol* **338**, 281-284
103. Marletta, M. A. (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of biological chemistry* **268**, 12231-12234
104. Marletta, M. A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927-930
105. Giulivi, C., Poderoso, J. J., and Boveris, A. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **273**, 11038-11043
106. Tatoyan, A., and Giulivi, C. (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **273**, 11044-11048

107. Elfering, S. L., Sarkela, T. M., and Giulivi, C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 38079-38086
108. Schild, L., Reinheckel, T., Reiser, M., Horn, T. F., Wolf, G., and Augustin, W. (2003) Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *Faseb J* **17**, 2194-2201
109. Cassina, A., and Radi, R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics* **328**, 309-316
110. Radi, R., Cassina, A., and Hodara, R. (2002) Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* **383**, 401-409
111. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**, C1424-1437
112. Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., and Castro, L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free radical biology & medicine* **33**, 1451-1464
113. Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Lynn, B., Markesbery, W. R., and Butterfield, D. A. (2003) Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of neurochemistry* **85**, 1394-1401
114. Ceriello, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Assaloni, R., Motz, E., Tonutti, L., and Taboga, C. (2001) Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* **44**, 834-838
115. Eleuteri, E., Di Stefano, A., Ricciardolo, F. L., Magno, F., Gnemmi, I., Colombo, M., Anzalone, R., Cappello, F., La Rocca, G., Tarro Genta, F., Zummo, G., and Giannuzzi, P. (2009) Increased nitrotyrosine plasma levels in relation to systemic markers of inflammation and myeloperoxidase in chronic heart failure. *International journal of cardiology* **135**, 386-390
116. Kooy, N. W., Lewis, S. J., Royall, J. A., Ye, Y. Z., Kelly, D. R., and Beckman, J. S. (1997) Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Critical care medicine* **25**, 812-819
117. Peluffo, G., and Radi, R. (2007) Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovascular research* **75**, 291-302

118. Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4003-4008
119. Reynolds, M. R., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2007) Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs". *Biochemistry* **46**, 7325-7336
120. Turko, I. V., Li, L., Aulak, K. S., Stuehr, D. J., Chang, J. Y., and Murad, F. (2003) Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 33972-33977
121. Turko, I. V., and Murad, F. (2003) Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats. *The Journal of biological chemistry* **278**, 35844-35849
122. Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *The Biochemical journal* **322 (Pt 1)**, 167-173
123. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* **266**, 4244-4250
124. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *The Journal of biological chemistry* **274**, 842-848
125. Batthyany, C., Souza, J. M., Duran, R., Cassina, A., Cervenansky, C., and Radi, R. (2005) Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite. *Biochemistry* **44**, 8038-8046
126. Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A., and Radi, R. (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *The Journal of biological chemistry* **275**, 21409-21415
127. Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R., and Radi, R. (1995) Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Archives of biochemistry and biophysics* **319**, 491-497
128. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on

- peroxynitrite-mediated oxidations. *Archives of biochemistry and biophysics* **333**, 49-58
129. Radi, R. (1995) Oxidative reactions of peroxynitrite in biological systems: direct attack versus the hydroxyl radical-like pathway. in *The oxygen paradox* (Ursini, F., and Davies, K. J. A. eds.), CLEUP University Press, Padova, Italy. pp 277-288
130. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free radical biology & medicine* **30**, 463-488
131. Schopfer, F. J., Baker, P. R., and Freeman, B. A. (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* **28**, 646-654
132. Castro, L., Demicheli, V., Tortora, V., and Radi, R. (2011) Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free radical research* **45**, 37-52
133. MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S., and Thompson, J. A. (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11853-11858
134. Vadseth, C., Souza, J. M., Thomson, L., Seagraves, A., Nagaswami, C., Scheiner, T., Torbet, J., Vilaire, G., Bennett, J. S., Murciano, J. C., Muzykantov, V., Penn, M. S., Hazen, S. L., Weisel, J. W., and Ischiropoulos, H. (2004) Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *The Journal of biological chemistry* **279**, 8820-8826
135. Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J. M., Bhatnagar, A., Tang, X. L., Wang, O., Cardwell, E., and Ping, P. (2002) Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. *The Journal of biological chemistry* **277**, 15021-15027
136. Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Sadowska-Krowicka, H., Clark, D. A., and Lancaster, J. R., Jr. (1998) Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *The Journal of biological chemistry* **273**, 18709-18713

137. Moller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R., and Denicola, A. (2005) Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* **280**, 8850-8854
138. Giulivi, C., Traaseth, N. J., and Davies, K. J. (2003) Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino acids* **25**, 227-232
139. Malencik, D. A., and Anderson, S. R. (2003) Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino acids* **25**, 233-247
140. Alonso, D., Encinas, J. M., Uttenthal, L. O., Bosca, L., Serrano, J., Fernandez, A. P., Castro-Blanco, S., Santacana, M., Bentura, M. L., Richart, A., Fernandez-Vizarra, P., and Rodrigo, J. (2002) Coexistence of translocated cytochrome c and nitrated protein in neurons of the rat cerebral cortex after oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience* **111**, 47-56
141. Cruthirds, D. L., Novak, L., Akhi, K. M., Sanders, P. W., Thompson, J. A., and MacMillan-Crow, L. A. (2003) Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion. *Archives of biochemistry and biophysics* **412**, 27-33
142. MacMillan-Crow, L. A., Cruthirds, D. L., Ahki, K. M., Sanders, P. W., and Thompson, J. A. (2001) Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy. *Free radical biology & medicine* **31**, 1603-1608
143. Souza, J. M., Peluffo, G., and Radi, R. (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free radical biology & medicine* **45**, 357-366
144. Castro, L., Eiserich, J. P., Sweeney, S., Radi, R., and Freeman, B. A. (2004) Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. *Archives of biochemistry and biophysics* **421**, 99-107
145. Chen, Y. R., Chen, C. L., Chen, W., Zweier, J. L., Augusto, O., Radi, R., and Mason, R. P. (2004) Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18054-18062
146. Schejter, A., Goldkorn, T., and Sokolovsky, M. (1971) Limited proteolysis of horse heart cytochrome c. *European journal of biochemistry / FEBS* **20**, 414-419
147. Sokolovsky, M., Aviram, I., and Schejter, A. (1970) Nitrocytochrome c. I. Structure and enzymic properties. *Biochemistry* **9**, 5113-5118

148. Garcia-Heredia, J. M., Diaz-Moreno, I., Diaz-Quintana, A., Orzaez, M., Navarro, J. A., Hervas, M., and De la Rosa, M. A. (2012) Specific nitration of tyrosines 46 and 48 makes cytochrome c assemble a non-functional apoptosome. *FEBS letters* **586**, 154-158
149. Diaz-Moreno, I., Garcia-Heredia, J. M., Diaz-Quintana, A., Teixeira, M., and De la Rosa, M. A. (2011) Nitration of tyrosines 46 and 48 induces the specific degradation of cytochrome c upon change of the heme iron state to high-spin. *Biochimica et biophysica acta* **1807**, 1616-1623
150. Wettstein, C., Kyne, C., A. M. D., Mohwald, H., Crowley, P. B., and Lisdat, F. (2014) Study of Cytochrome c-DNA Interaction - Evaluation of Binding Sites on the Redox Protein. *Nanoscale*
151. Chen, Y. R., Chen, C. L., Liu, X., Li, H., Zweier, J. L., and Mason, R. P. (2004) Involvement of protein radical, protein aggregation, and effects on NO metabolism in the hypochlorite-mediated oxidation of mitochondrial cytochrome c. *Free radical biology & medicine* **37**, 1591-1603
152. Prasad, S., Maiti, N. C., Mazumdar, S., and Mitra, S. (2002) Reaction of hydrogen peroxide and peroxidase activity in carboxymethylated cytochrome c: spectroscopic and kinetic studies. *Biochimica et biophysica acta* **1596**, 63-75
153. Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K., Doan, J. W., Grossman, L. I., and Huttemann, M. (2006) New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo. *Biochemistry* **45**, 9121-9128
154. Yu, H., Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K., and Huttemann, M. (2008) Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration. *Biochimica et biophysica acta* **1777**, 1066-1071
155. Pecina, P., Borisenko, G. G., Belikova, N. A., Tyurina, Y. Y., Pecinova, A., Lee, I., Samhan-Arias, A. K., Przyklenk, K., Kagan, V. E., and Huttemann, M. (2010) Phosphomimetic substitution of cytochrome C tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation. *Biochemistry* **49**, 6705-6714
156. Zhao, X., Leon, I. R., Bak, S., Mogensen, M., Wrzesinski, K., Hojlund, K., and Jensen, O. N. (2011) Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**, M110 000299

157. Alakoskela, J. M., Jutila, A., Simonsen, A. C., Pirneskoski, J., Pyhajoki, S., Turunen, R., Marttila, S., Mouritsen, O. G., Goormaghtigh, E., and Kinnunen, P. K. (2006) Characteristics of fibers formed by cytochrome c and induced by anionic phospholipids. *Biochemistry* **45**, 13447-13453
158. Rice, R. H., Lee, Y. M., and Brown, W. D. (1983) Interactions of heme proteins with hydrogen peroxide: protein crosslinking and covalent binding of benzo[a]pyrene and 17 beta-estradiol. *Archives of biochemistry and biophysics* **221**, 417-427
159. Bayir, H., Kapralov, A. A., Jiang, J., Huang, Z., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Zhao, Q., Belikova, N. A., Vlasova, I., Maeda, A., Zhu, J., Na, H. M., Mastroberardino, P. G., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Chu, C. T., Greenamyre, J. T., and Kagan, V. E. (2009) Peroxidase mechanism of lipid-dependent cross-linking of synuclein with cytochrome C: protection against apoptosis versus delayed oxidative stress in Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry* **284**, 15951-15969
160. Beck-Speier, I., Leuschel, L., Luippold, G., and Maier, K. L. (1988) Proteins released from stimulated neutrophils contain very high levels of oxidized methionine. *FEBS letters* **227**, 1-4
161. Chen, Y. R., Deterding, L. J., Sturgeon, B. E., Tomer, K. B., and Mason, R. P. (2002) Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity. *The Journal of biological chemistry* **277**, 29781-29791
162. Qin, W., Sanishvili, R., Plotkin, B., Schejter, A., and Margoliash, E. (1995) The role of histidines 26 and 33 in the structural stabilization of cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta* **1252**, 87-94
163. Rumbley, J. N., Hoang, L., and Englander, S. W. (2002) Recombinant equine cytochrome c in Escherichia coli: high-level expression, characterization, and folding and assembly mutants. *Biochemistry* **41**, 13894-13901
164. Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A. C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R., and Cayota, A. M. (1999) Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* **162**, 3356-3366
165. Radi, R., Sims, S., Cassina, A., and Turrens, J. F. (1993) Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and

- chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free radical biology & medicine* **15**, 653-659
166. Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D., and Wilson, M. T. (1987) *Mitochondria, a practical approach*, IRL Press, Oxford ; Washington, DC
167. Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L., and Telleri, R. (1994) Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics* **308**, 89-95
168. Neumann, H., Hazen, J. L., Weinstein, J., Mehl, R. A., and Chin, J. W. (2008) Genetically encoding protein oxidative damage. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 4028-4033
169. Bertini, I., Gori, G., Luchinat, C., and Vila, A. J. (1993) One- and two-dimensional NMR characterization of oxidized and reduced cytochrome c' from *Rhodocyclus gelatinosus*. *Biochemistry* **32**, 776-783
170. Bren, K. L., Gray, H. B., Banci, L., Bertini, I., and Turano, P. (1995) Paramagnetic ¹H NMR Spectroscopy of the Cyanide Derivative of Met80Ala-iso-1-cytochrome c. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8067-8073
171. Bren, K. L., Kellogg, J. A., Kaur, R., and Wen, X. (2004) Folding, conformational changes, and dynamics of cytochromes C probed by NMR spectroscopy. *Inorganic chemistry* **43**, 7934-7944
172. Feng, Y. Q., Roder, H., and Englander, S. W. (1990) Assignment of paramagnetically shifted resonances in the ¹H NMR spectrum of horse ferricytochrome c. *Biophysical journal* **57**, 15-22
173. Morison, I. M., Cramer Borde, E. M., Cheesman, E. J., Cheong, P. L., Holyoake, A. J., Fichelson, S., Weeks, R. J., Lo, A., Davies, S. M., Wilbanks, S. M., Fagerlund, R. D., Ludgate, M. W., da Silva Tatley, F. M., Coker, M. S., Bockett, N. A., Hughes, G., Pippig, D. A., Smith, M. P., Capron, C., and Ledgerwood, E. C. (2008) A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nature genetics* **40**, 387-389
174. De Rocco, D., Cerqua, C., Goffrini, P., Russo, G., Pastore, A., Meloni, F., Nicchia, E., Moraes, C. T., Pecci, A., Salviati, L., and Savoia, A. (2014) Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* **1842**, 269-274

175. Alvarez-Paggi, D., Castro, M. A., Tortora, V., Castro, L., Radi, R., and Murgida, D. H. (2013) Electrostatically driven second-sphere ligand switch between high and low reorganization energy forms of native cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 4389-4397
176. Capdevila, D. A., Alvarez-Paggi, D., Castro, M. A., Tortora, V., Demicheli, V., Estrin, D. A., Radi, R., and Murgida, D. H. (2014) Coupling of tyrosine deprotonation and axial ligand exchange in nitrocytochrome c. *Chemical communications* **50**, 2592-2594
177. Kawai, C., Pessoto, F. S., Rodrigues, T., Mugnol, K. C., Tortora, V., Castro, L., Milicchio, V. A., Tersariol, I. L., Di Mascio, P., Radi, R., Carmona-Ribeiro, A. M., and Nantes, I. L. (2009) pH-sensitive binding of cytochrome c to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis. *Biochemistry* **48**, 8335-8342
178. Bertini, I., Turano, P., and Vila, A. J. (1993) Nuclear magnetic resonance of paramagnetic metalloproteins. *Chemical reviews* **93**, 2833-2932
179. Abriata, L. A., Cassina, A., Tortora, V., Marin, M., Souza, J. M., Castro, L., Vila, A. J., and Radi, R. (2009) Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome c triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies. *The Journal of biological chemistry* **284**, 17-26
180. Luntz, T. L., Schejter, A., Garber, E. A., and Margoliash, E. (1989) Structural significance of an internal water molecule studied by site-directed mutagenesis of tyrosine-67 in rat cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3524-3528
181. Lett, C. M., Berghuis, A. M., Frey, H. E., Lepock, J. R., and Guillemette, J. G. (1996) The role of a conserved water molecule in the redox-dependent thermal stability of iso-1-cytochrome c. *The Journal of biological chemistry* **271**, 29088-29093
182. Blauer, G., Sreerama, N., and Woody, R. W. (1993) Optical activity of hemoproteins in the Soret region. Circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome c in aqueous solution. *Biochemistry* **32**, 6674-6679

183. Santucci, R., and Ascoli, F. (1997) The Soret circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80) axial bond in horse cytochrome c. *Journal of inorganic biochemistry* **68**, 211-214
184. Banci, L., Bertini, I., Bren, K. L., Gray, H. B., and Turano, P. (1995) pH-dependent equilibria of yeast Met80Ala-iso-1-cytochrome c probed by NMR spectroscopy: a comparison with the wild-type protein. *Chem Biol* **2**, 377-383
185. Maity, H., Rumbley, J. N., and Englander, S. W. (2006) Functional role of a protein foldon--an Omega-loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome c. *Proteins* **63**, 349-355
186. Bushnell, G. W., Louie, G. V., and Brayer, G. D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *Journal of molecular biology* **214**, 585-595
187. Cai, M., Huang, Y., Sakaguchi, K., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Craigie, R. (1998) An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in Escherichia coli. *Journal of biomolecular NMR* **11**, 97-102
188. Yokoyama, K., Uhlin, U., and Stubbe, J. (2010) Site-specific incorporation of 3-nitrotyrosine as a probe of pKa perturbation of redox-active tyrosines in ribonucleotide reductase. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 8385-8397
189. Pedelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature biotechnology* **24**, 79-88
190. Miyake-Stoner, S. J., Refakis, C. A., Hammill, J. T., Lusic, H., Hazen, J. L., Deiters, A., and Mehl, R. A. (2010) Generating permissive site-specific unnatural aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **49**, 1667-1677
191. Peeler, J. C., and Mehl, R. A. (2012) Site-specific incorporation of unnatural amino acids as probes for protein conformational changes. *Methods in molecular biology* **794**, 125-134
192. Cooley, R. B., Feldman, J. L., Driggers, C. M., Bundy, T. A., Stokes, A. L., Karplus, P. A., and Mehl, R. A. (2014) Structural basis of improved second-generation 3-nitro-tyrosine tRNA synthetases. *Biochemistry* **53**, 1916-1924

193. Margoliash, E. (1963) Primary Structure and Evolution of Cytochrome C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **50**, 672-679
194. Wallace, C. J., and Corthesy, B. E. (1986) Protein engineering of cytochrome c by semisynthesis: substitutions at glutamic acid 66. *Protein engineering* **1**, 23-27

9. Agradecimientos

A Rafael, por recibirme en su gran equipo, por la confianza que siempre deposita en mí. Por inculcarme el sentido de responsabilidad y rigor académico. Por alentarme a intentar las cosas que no salen siempre una vez más. Sus sugerencias y comentarios han sido fundamentales en todas las etapas de esta tesis.

A Laura, por su constante orientación en este proyecto. Por el tiempo dedicado a discutir cada experimento y cómo seguir en cada trancazo. Su esfuerzo e interés han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Y también le agradezco a Laura su amistad, su apoyo en las distintas etapas de la vida que van transcurriendo en paralelo con una tesis.

A Vero, mi compañera de escritorio, de tantos años de carrera. Gracias por las discusiones, por las críticas siempre positivas, por las canciones bizarras para levantar el ánimo y cargar las pilas los días largos.

A Seba, Noel, Lucía P., que me ayudaron tantas veces a discutir resultados y solucionar problemas.

A Fiorella y Lucía B. que estuvieron presentes en distintos momentos de esta tesis, siempre aportando ideas que sumaron mucho a este trabajo.

A Florencia y Mauricio, que corrieron como locos para que salieran los últimos resultados cuando estábamos contra reloj.

A Carlos B., que me recibió en su laboratorio y me enseñó mucho.

Es imposible nombrarlos uno a uno, pero a todos mis compañeros de laboratorio que aportaron tanto a esta tesis y a mi formación. Pero que fundamentalmente aportaron tanto a tener un hermoso ambiente de trabajo. Son un grupo humano del que uno se siente orgulloso de formar parte.

A Mónica, quien nos ayudaba con cada uno de los mutantes que íbamos diseñando, y siempre faltaba uno... gracias por abrirme las puertas de su laboratorio donde fue un gusto trabajar.

A Luciano y Alejandro, por recibirme en su laboratorio en Rosario y hacer malabares para obtener muchos resultados a partir de la poca muestra que teníamos.

A Damián, María Ana, Daiana y Daniel por hacerme sentir siempre bienvenida a su laboratorio en Buenos Aires. Por la productiva discusión de resultados y siempre estar dispuestos a probar un nuevo experimento.

A Gustavo, Carlos y Leonardo que aceptaron leer y ser parte del tribunal de esta tesis.

A PEDECIBA Biología, ANII, CSIC por el apoyo económico para realizar este trabajo a través de la financiación de proyectos, becas de posgrado, para pasantías y congresos.

A mis amigas: Luciana, Aline, Erika, por todo su apoyo en el transcurso de mi carrera, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podía contar con ellas.

A mis padres, por darme todo el apoyo posible en la vida. Por darme los recursos necesarios para hacer una carrera. Por enseñarme valores, principios, sentido de la perseverancia.

A mis abuelos por el amor constante e incondicional.

A mis suegros, mis cuñados y mis sobrin@s por compartir conmigo tantos buenos y malos momentos.

A Pablo por hacerme feliz. Por su constante motivación para seguir adelante. Por el enorme apoyo en el final de la tesis, cuando uno siente que no lo va a lograr.

A Emma por terminar de hacerme feliz. Porque un beso suyo compensa todo tipo de frustración cuando un experimento no dio como esperaba. Por los mimos constantes aún cuando esta tesis le robó mucho tiempo. Porque me ayudó a entender que las cosas más importantes no están en ninguna tesis, en ningún congreso ni en ningún artículo.