



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Sub-área: Bioquímica
PEDECIBA - Universidad de la República



INACTIVACIÓN OXIDATIVA DE LA GLUTAMINA SINTETASA HUMANA

**Efectos estructurales y aspectos
cuantitativos durante la pérdida de
función por daño oxidativo**

Nicolás Campolo Halty
Orientador: Dr. Rafael Radi
Co-orientador: Dra. Silvina Bartesaghi

**Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas
(CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República
Abril de 2023, Montevideo, Uruguay**

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. El ciclo del nitrógeno.....	2
2.2. Metabolismo del nitrógeno en mamíferos	4
2.2.1. <i>Catabolismo de los aminoácidos</i>	4
2.2.2. <i>Excreción de los grupos amino: el ciclo de la urea</i>	5
2.2.3. <i>Biosíntesis de los aminoácidos y compuestos derivados</i>	6
2.3. Metabolismo y funciones de la glutamina.....	7
2.3.1. <i>La glutamina en el metabolismo intermediario</i>	8
2.3.2. <i>La glutamina en la detoxificación del amonio</i>	10
2.3.3. <i>La glutamina en el mantenimiento del equilibrio ácido-base</i>	10
2.3.4. <i>La glutamina en el sistema nervioso central</i>	12
2.4. Las glutamina sintetasas	14
2.4.1. <i>La familia de las glutamina sintetasas</i>	14
2.4.2. <i>Estructura de la glutamina sintetasa</i>	15
2.4.3. <i>Mecanismo catalítico de la glutamina sintetasa</i>	18
2.4.4. <i>Regulación de la glutamina sintetasa</i>	20
2.4.5. <i>La glutamina sintetasa en la patología del sistema nervioso central</i>	20
2.5. Especies reactivas del oxígeno en sistemas biológicos	22
2.5.1. <i>Origen de las ROS: generación de superóxido (O_2^{\bullet})</i>	22
2.5.2. <i>Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y especies derivadas</i>	24
2.5.3. <i>Óxido nítrico ($\bullet NO$) y oxidantes derivados</i>	25
2.5.4. <i>Aspectos bioquímicos del peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)</i>	26
2.6. Modificaciones oxidativas postraduccionales de proteínas.....	27
2.6.1. <i>Aspectos generales de la modificación oxidativa de proteínas</i>	28
2.6.2. <i>Factores que afectan la selectividad de los oxidantes</i>	31
2.6.3. <i>Nitración de residuos de tirosina a 3-nitrotirosina</i>	31
2.6.4. <i>Consecuencias biológicas de la modificación oxidativa de proteínas</i>	33
2.6.5. <i>Inactivación oxidativa de la glutamina sintetasa</i>	35
3. Hipótesis de trabajo	37
4. Objetivos	37
5. Materiales y métodos	38
5.1. Reactivos	38

5.2. Expresión de HsGS.....	38
5.3. Purificación de HsGS	38
5.4. Medidas de actividad HsGS	39
5.5. Exposición de HsGS a ONOO ⁻ y otros oxidantes	40
5.6. Análisis por SDS-PAGE, western- y dot-blot	41
5.7. Cuantificación de tioles proteicos y NO ₂ Tyr por espectrofotometría	42
5.8. Cuantificación de aminoácidos en hidrolizados totales de HsGS por cromatografía líquido de ultra alta resolución (UHPLC)	42
5.9. Identificación de las modificaciones nitro-oxidativas en la HsGS por espectrometría de masa.....	43
5.9.1. <i>Identificación de péptidos conteniendo NO₂Tyr por HPLC-MS/MS en equipo QTRAP 4500</i>	43
5.9.2. <i>Identificación de sitios de modificación oxidativa y entrecruzamiento por nLC-MS/MS en equipo Orbitrap Fusion</i>	43
5.9.3. <i>Cuantificación relativa de péptidos modificados por Multiple Reaction Monitoring (MRM)</i>	45
5.10. Estudios de agregación de la HsGS	45
5.11. Separación de las fracciones insolubles y solubles de HsGS oxidada	46
5.12. Estudios de desnaturalización térmica.....	46
5.13. Estudios de gel filtración	46
5.14. Análisis estadístico	47
6. Resultados	48
6.1. Expresión y purificación de la HsGS	48
6.2. Puesta a punto de los ensayos de actividad	48
6.3. Inactivación de la HsGS por ONOO ⁻ y análisis de las modificaciones nitro-oxidativas de aminoácidos.....	50
6.4. Modificaciones por nitración y dimerización de los residuos de Tyr en la HsGS por ONOO ⁻	54
6.5. La inactivación de la HsGS por ONOO ⁻ está mediada por oxidantes de un electrón	58
6.6. Estudios de la inactivación de cinco mutantes Tyr→Phe de HsGS por ONOO ⁻	63
6.7. Agregación de la HsGS inducida por ONOO ⁻	71
6.8. La oxidación de tioles media la agregación inducida por oxidantes de la HsGS	72
6.9. Estudio de distintos factores asociados a la agregación de la HsGS inducida por oxidantes.....	75
6.10. Efecto de la unión de MgATP en la estabilidad de la HsGS y su agregación inducida por oxidantes.....	79

7. Discusión	83
7.1. Modificación oxidativa de la HsGS por ONOO ⁻ y su vínculo con la inactivación	83
7.2. Análisis del rol de la nitración de Tyr336 en la inactivación de la HsGS	88
7.3. Agregación de la HsGS inducida por oxidantes: rol de la oxidación de Cys	89
7.4. Efectos de la unión de ligandos sobre la agregación de la HsGS.....	91
7.5. Relevancia biológica de la modificación oxidativa de la HsGS.....	93
8. Conclusiones y perspectivas	95
9. Agradecimientos	98
10. Referencias	99
ANEXO	120

Abreviaturas

ABAP: 2,2'-azobis (2-amidinopropano); **A β :** péptido β -amiloide; **ADN:** ácido desoxirribonucleico; **ADP:** adenosín difosfato; **Ala:** alanina; **ALS:** esclerosis lateral amiotrófica; **AMP:** adenosín monofosfato; **AR:** adición reversa; **Arg:** arginina; **ARN:** ácido ribonucleico; **ARNm:** ARN mensajero; **AscH:** ácido ascórbico; **Asp:** aspartato; **ATP:** adenosín trifosfato; **BCA:** ácido bicinconínico; **β -ME:** β -mercaptoetanol; **α -CG:** α -cetoglutarato; **Cl⁻:** anión cloruro; **CO₂:** dióxido de carbono; **CO₃^{•-}:** radical anión carbonato; **Cys:** cisteína; **Cys-Cys:** cistina; **DF:** desferrioxamina; **DiTyr:** 3,3'-ditirosina; **DOPA:** 3-hidroxitirosina; **DTNB:** 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico); **DTPA:** ácido dietilentriaminopentaacético; **DTT:** 1,4-ditiotreitol; **EEATs:** transportadores de aminoácidos excitatorios de alta afinidad; **Fe:** hierro; **Fe⁴⁺=O:** oxo-ferrilo; **FeCl₃:** cloruro férrico; **GABA:** ácido γ -aminobutírico; **GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; **Gln:** glutamina; **GlnNHOH:** γ -glutamilhidroxamato; **GLS:** glutaminasa; **Glu:** glutamato; **Gly:** glicina; **GOGAT:** glutamato sintasa; **GPx:** glutatión peroxidasa; **GS:** glutamina sintetasa; **GSH:** glutatión; **H⁺:** protón; **H₂O:** agua; **H₂O₂:** peróxido de hidrógeno; **HCl:** ácido clorhídrico; **HCO₃⁻:** bicarbonato; **His:** histidina; **HOCl:** ácido hipocloroso; **HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución; **HsGS:** glutamina sintetasa humana; **IAA:** iodoacetamida; **KH₂PO₄:** fosfato de potasio dibásico; **KCl:** cloruro de potasio; **KPi:** buffer fosfato de potasio; **Lys:** lisina; **Met:** metionina; **MetSO:** metionina sulfóxido; **Mg:** magnesio; **MgCl₂:** cloruro de magnesio; **Mn:** manganeso; **MnCl₂:** cloruro de manganeso; **MRM:** *multiple reaction monitoring*; **MS:** espectrometría de masa; **MSA:** ácido metanosulfónico; **MSO:** L-metionina sulfoximina; **N:** nitrógeno; **N₂:** nitrógeno molecular; **Na₂HAsO₄:** arsenato de sodio; **NaCl:** cloruro de sodio; **NAD⁺:** nicotinamida adenina dinucleótido; **NADP⁺:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **NaHCO₃:** bicarbonato de sodio; **NaNO₂:** nitrito de sodio; **NaOH:** hidróxido de sodio; **NaPi:** buffer fosfato de sodio; **-NH₂:** grupo amino; **NH₂OH:** hidroxilamina; **NH₃:** amoníaco; **NH₄⁺:** amonio; **NH₄Cl:** cloruro de amonio; **NH₄HCO₃:** bicarbonato de amonio; **NiSO₄:** sulfato de níquel; **[•]NO:** óxido nítrico; **[•]NO₂:** radical dióxido de nitrógeno; **NO₂⁻:** nitrito; **-NO₂:** grupo nitro; **NO₂Tyr:** 3-nitrotirosina; **NO₃⁻:** nitrato; **NOS:** óxido nítrico sintasa; **iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible; **NOX:** NADPH oxidasa; **O₂:** oxígeno molecular; **O₂^{•-}:** radical anión superóxido; **[•]OH:** radical hidroxilo; **ONOO⁻:** peroxinitrito; **ONOOH:** ácido peroxinitroso; **OPA:** *o*-ftalaldialdehído; **Phe:** fenilalanina; **Pi:** fosfato; **PiPi:** pirofosfato; **Pro:** prolina; **PRPP:** 5-fosforribosil 1-pirofosfato; **Prx:** peroxirredoxina; **R[•]:** radical centrado en carbono; **RO[•]:** radical alcoxilo; **ROH:** alcohol alifático; **ROO[•]:** radical peroxilo; **ROOH:** hidroperóxido; **ROS:** especies reactivas del oxígeno; **RS[•]:** radical centrado en azufre; **-S⁻:** tiolato; **-SH:** tiol o sulfhidrilo; **SNC:** sistema nervioso central; **SOD:** superóxido dismutasa; **-SOH:** ácido sulfénico; **-S-S-:** disulfuro; **TB:** medio *terrific broth*; **TCA:** ácido tricloroacético; **TCEP:** tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato; **Trp:** triptófano; **Tyr:** tirosina; **Tyr[•]:** radical tirosilo; **TyrO⁻:** tirosinato; **UHPLC:** cromatografía líquida de ultra alta resolución.

1. Resumen

La glutamina sintetasa (GS), que cataliza la síntesis ATP-dependiente de L-glutamina a partir de L-glutamato y amoníaco, es una enzima ubicua y altamente conservada que juega un rol esencial en el metabolismo del nitrógeno a lo largo de todos los dominios de la vida. En vertebrados se expresa una única isoforma de GS de manera tejido-específica; uno de sus principales sitios de expresión es el sistema nervioso central, donde se localiza en el citosol de astrocitos y su actividad permite sostener el ciclo glutamato-glutamina en las sinapsis glutamatérgicas, siendo así esencial para el mantenimiento de la homeostasis cerebral. De hecho, se han asociado niveles o actividad de GS disminuidos con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, atribuyéndose estas alteraciones a la modificación oxidativa postraduccional de la proteína. En ese sentido, la principal hipótesis indica que la nitración del residuo tirosina (Tyr) 336 de la GS humana (HsGS), como consecuencia de la producción endógena de peroxinitrito (ONOO^-), el producto de la reacción entre los radicales óxido nítrico y superóxido, es responsable de la pérdida de actividad.

En este trabajo de tesis se planteó realizar un análisis profundo de la inactivación oxidativa de la HsGS recombinante *in vitro* por ONOO^- , con el objetivo de evaluar desde una perspectiva más global cómo las modificaciones oxidativas ocasionan la pérdida de función de la HsGS. Para ello, se expuso HsGS pura a ONOO^- , se determinó el efecto sobre la actividad enzimática y se realizaron distintos estudios bioquímicos, analíticos y proteómicos para caracterizar la modificación oxidativa de la proteína.

El tratamiento de la HsGS con ONOO^- causó una pérdida de actividad dosis-dependiente, al tiempo que provocó la modificación oxidativa de residuos de cisteína, metionina, tirosina y triptófano. A través del mapeo peptídico por LC-MS/MS empleando una digestión con tripsina combinada de las muestras en $\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$, se identificaron hasta 10 sitios de nitración de Tyr y cinco tipos de entrecruzamientos vía uniones ditirosina. Estudios por LC-MS/MS-MRM permitieron la determinación de los niveles relativos de las principales modificaciones, hallándose que los residuos de Tyr 171, 185, 269, 283 y 336 fueron los principales blancos de nitración; no obstante, mutantes tirosina→fenilalanina de HsGS revelaron que la nitración de ninguno de estos por sí sola es responsable de la inactivación enzimática. Por otra parte, se encontró que el ONOO^- fue capaz de inducir la agregación de la HsGS, impactando aún más en su actividad. La oxidación de cisteínas de la HsGS resultó ser esencial en promover este fenómeno, dado que logró ser prevenido con la reducción de tioles de la enzima oxidada y, además, pudo ser inducida por oxidantes más específicos como el peróxido de hidrógeno y la diamida.

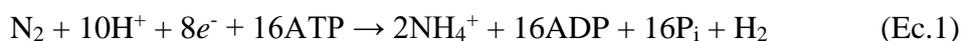
En conjunto, los resultados obtenidos indican que múltiples eventos oxidativos en varios sitios de la proteína son responsables de la inactivación y agregación de la HsGS, lo que sugiere que mecanismos notoriamente más complejos que los postulados previamente estarían implicados en la pérdida de función de la HsGS observada en el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas.

2. Introducción

La glutamina sintetasa es una enzima ancestral, ubicua y altamente conservada a lo largo de los tres dominios de la vida. Su actividad permite la asimilación del nitrógeno inorgánico en múltiples organismos, lo que la ubica en una posición central en el ciclo del nitrógeno en la tierra, al tiempo que también desempeña un rol crítico en el metabolismo del nitrógeno en mamíferos. Por esto, alteraciones en su función pueden tener un gran impacto sobre múltiples aspectos metabólicos en el ser humano, como la regulación de la concentración de amonio en sangre y la sinapsis glutamatérgica en el sistema nervioso central. En ese sentido, la producción de oxidantes biológicos derivados del oxígeno representa un mecanismo capaz de conducir a una pérdida de la actividad de la glutamina sintetasa *in vivo*, algo que se ha vinculado con distintos procesos patológicos, como la enfermedad de Alzheimer. En esta sección, se realizará un repaso acerca de aspectos fundamentales del ciclo del nitrógeno, el metabolismo del nitrógeno en mamíferos, el rol de la glutamina y la glutamina sintetasa. Además, se mencionarán los aspectos generales de la producción de oxidantes biológicos, la oxidación de proteínas, y su conexión con la pérdida de actividad de la glutamina sintetasa.

2.1. El ciclo del nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para la vida; es el cuarto elemento más abundante en la biomasa y es requerido en las macromoléculas biológicas más esenciales, incluyendo las proteínas, los ácidos nucleicos y las clorofilas. El nitrógeno biológicamente disponible (“nitrógeno fijado”), soluble y utilizable por los organismos, es habitualmente el principal nutriente limitante en la mayoría de los ambientes superficiales de la Tierra [1]. Es por esto que la mayoría de los organismos ejercen un control estricto en el uso de sus compuestos nitrogenados. La fuente más abundante del nitrógeno es el aire, compuesto en un 78% de nitrógeno molecular (N₂). Las limitantes existentes respecto a la disponibilidad del N utilizable se deben a que, pese a esto, relativamente pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas utilizables por los organismos vivos. En la biósfera, los procesos metabólicos de las diferentes especies actúan de forma interdependiente para lograr recuperar y reutilizar el N biológicamente disponible en un amplio ciclo del nitrógeno (Figura 2.1). Dicho ciclo tiene por primer paso la fijación del nitrógeno atmosférico por acción de bacterias fijadoras de nitrógeno para producir amoníaco (NH₃) o amonio (NH₄⁺). La conversión del N₂ en NH₄⁺ en condiciones biológicas es una reacción de óxido-reducción por 8 electrones que conlleva la hidrólisis de 16 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) y es catalizada por un complejo de proteínas muy conservado denominado complejo de la nitrogenasa (Ec. 1). La elevada estabilidad del triple enlace N≡N hace que en condiciones biológicas la reacción ocurra a través de un mecanismo complejo y energéticamente muy costoso.



Si bien el amoníaco puede ser utilizado por la mayoría de los organismos vivos, la mayor parte del NH₃ que alcanza el suelo es convertido en nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻) por acción de bacterias que obtienen su energía de la oxidación del NH₃. No obstante, las plantas y muchas bacterias son capaces de incorporar y reducir fácilmente NO₂⁻ y NO₃⁻

por acción de nitrito y nitrato reductasas; así, las plantas obtienen NH_3 que es incorporado a los aminoácidos, y los animales utilizan a éstas como fuente de aminoácidos, obteniendo de este modo el nitrógeno necesario. Cuando los organismos mueren, la degradación de sus proteínas por los microorganismos devuelve el NH_3 al suelo, donde es nuevamente convertido por las bacterias nitrificantes en NO_2^- y NO_3^- . Finalmente, el N puede ser devuelto al aire a través del proceso de desnitrificación, en el cual ciertas bacterias, en condiciones anaeróbicas, utilizan al NO_3^- como aceptor final de electrones de una cadena transportadora transmembrana y lo reducen a N_2 . De este modo, se mantiene un equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico [2].

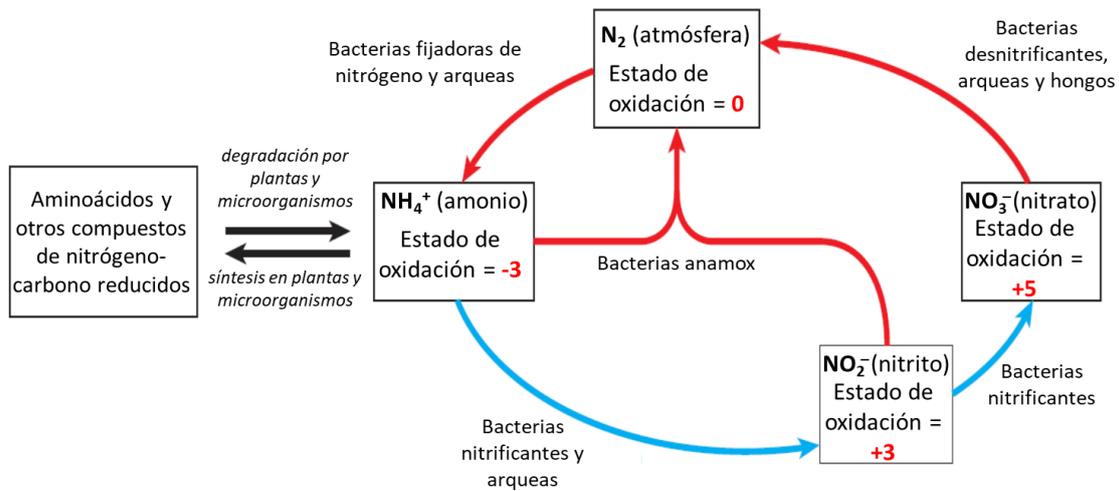
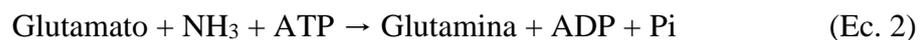
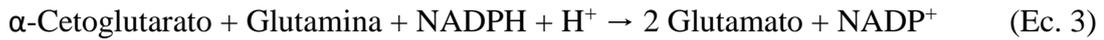


Figura 2.1. El ciclo del nitrógeno. El ciclo comienza con la conversión del N_2 atmosférico en NH_4^+ por bacterias y arqueas fijadoras de nitrógeno y permite que el N adquiera formas asimilables para la mayoría de los organismos. Las reacciones indicadas con flechas rojas tienen lugar principal o exclusivamente en ambientes anaeróbicos. Adaptado de [2].

En la mayoría de los organismos, el NH_4^+ es la principal forma de N inorgánico que resulta directamente asimilado en compuestos orgánicos nitrogenados; esto ocurre a través de reacciones sencillas y ampliamente distribuidas que implican la síntesis de los aminoácidos glutamina (Gln) y glutamato (Glu), que juegan un rol central en el metabolismo del nitrógeno de los seres vivos. La más relevante y conservada de estas reacciones de asimilación de NH_4^+ es su incorporación a una molécula de Glu para sintetizar Gln (Ec. 2); este proceso, que ocurre en dos pasos, requiere de la hidrólisis de una molécula de ATP y es catalizado por la glutamina sintetasa (GS):



En bacterias y plantas, esta reacción permite directamente incorporar el nitrógeno inorgánico del ambiente; la Gln así obtenida, además de estar disponible para múltiples funciones, puede en estos organismos convertirse en Glu mediante la reacción catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT, por glutamina:oxoglutarato aminotransferasa), en la cual la Gln actúa como dador de nitrógeno para la aminación reductiva del α -cetoglutarato (α -CG), un intermediario del ciclo del ácido cítrico (Ec. 3):



A través de estas dos reacciones, muchos organismos consiguen mantener niveles suficientes de Glu y Gln para satisfacer sus necesidades de compuestos nitrogenados, siempre que dispongan de suficiente amonio en el ambiente. La enzima GOGAT no se encuentra presente en animales, que cuentan con mecanismos diferentes para mantener las concentraciones de glutamato requeridas [2-4].

2.2. Metabolismo del nitrógeno en mamíferos

Los mamíferos obtienen la mayor parte del nitrógeno necesario a partir de los aminoácidos derivados de las proteínas de la dieta. Normalmente, las proteínas ingeridas experimentan una serie de procesos de degradación complejos que son provocados por las enzimas hidrolíticas originadas en el estómago, páncreas e intestino delgado. El resultado de esta actividad proteolítica es una mezcla de aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos que son rápida y eficientemente absorbidos por los enterocitos. Los dipéptidos y tripéptidos se hidrolizan posteriormente hasta sus aminoácidos constituyentes dentro del enterocito, pasando finalmente los aminoácidos libres desde el enterocito hasta la sangre portal, donde serán conducidos al hígado para el metabolismo energético o biosintético, o bien se distribuirán a otros tejidos para satisfacer necesidades similares [2,5,6].

2.2.1. *Catabolismo de los aminoácidos*

Dependiendo del estado metabólico del organismo, los aminoácidos absorbidos provenientes de las proteínas de la dieta podrán seguir varios destinos, que incluyen: el catabolismo de los aminoácidos para su contribución al metabolismo energético, su aporte a las reservas de aminoácidos esenciales o su uso directo para la síntesis de proteínas corporales o diversos compuestos nitrogenados, como neurotransmisores y hormonas. Similares destinos pueden seguir los aminoácidos libres provenientes de la degradación y recambio de las proteínas tisulares, lo cual dependerá nuevamente del estado metabólico [6]. La Figura 2.2 resume el panorama general del catabolismo de los aminoácidos en mamíferos. En los animales, los aminoácidos experimentarán la degradación oxidativa en situaciones metabólicas tales como dietas ricas en proteínas, que proveen más aminoácidos de los requeridos, o durante la inanición, cuando se recurre a los aminoácidos de las proteínas endógenas para obtener energía y/o sintetizar glucosa. En estas situaciones, los aminoácidos experimentan en primer lugar la pérdida de su grupo amino (-NH₂), para convertirse en sus respectivos α -cetoácidos (el esqueleto carbonado de los aminoácidos). Estos α -cetoácidos pueden ser oxidados completamente a dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) o proveer unidades de tres o cuatro carbonos que pueden servir como sustratos para la síntesis de glucosa a través de la gluconeogénesis. El proceso de degradación de aminoácidos, al igual que el de carbohidratos y ácidos grasos, converge en las vías catabólicas centrales, pudiendo los esqueletos carbonados de la mayoría de los aminoácidos ingresar al ciclo del ácido cítrico [2].

Durante la degradación de los aminoácidos de la dieta en el hígado, los grupos -NH₂ de la mayoría de los aminoácidos son transferidos al α -CG mediante reacciones de transaminación (no hay desaminación neta), formando Glu, el cual podrá a continuación

entregar su grupo amino para que ingrese en las distintas rutas de metabolización. Una parte de estos grupos amino puede ser reciclado y utilizado en una variedad de procesos biosintéticos; no obstante, el exceso de grupos $-NH_2$ es mayormente convertido en urea y excretado en la orina. En tejidos extrahepáticos, el exceso de NH_4^+ liberado durante el catabolismo de aminoácidos es convertido en el grupo amida de la Gln, la cual representa una forma de transporte inocuo del NH_4^+ en la sangre para que sea captado por el hígado y metabolizado a urea; el metabolismo de la glutamina será abordado con mayor detalle más adelante. Debido a su rol central en el metabolismo general del nitrógeno en mamíferos, la Gln y el Glu se encuentran ambos presentes en concentraciones más elevadas que el resto de los aminoácidos en la mayoría de los tejidos [2].

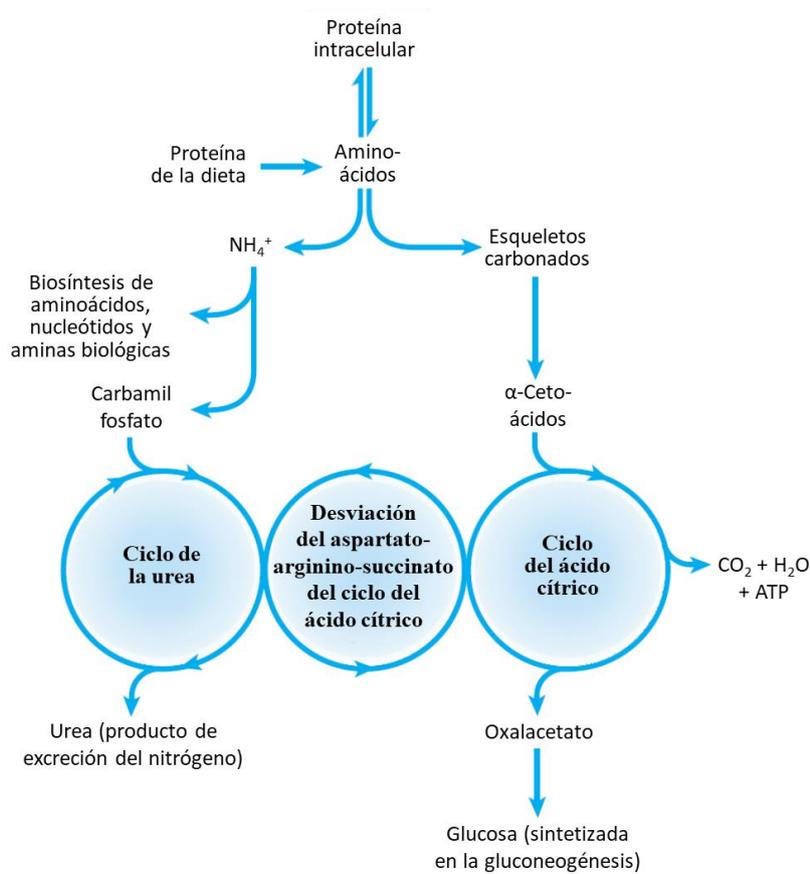


Figura 2.2. Representación esquemática del panorama general del catabolismo de los aminoácidos en mamíferos. El catabolismo de los aminoácidos, tanto endógenos como provenientes de la dieta, comienza con la remoción del grupo amino de los mismos y la posterior metabolización del grupo amino y los esqueletos carbonados por rutas separadas pero interconectadas. Adaptado de [2].

2.2.2. Excreción de los grupos amino: el ciclo de la urea

Una vez que los grupos amino de los aminoácidos catabolizados en el hígado han sido colectados en forma de Glu, deben ser removidos de éste para prepararlos para su excreción en forma de urea. Para esto, el Glu es transportado desde el citosol de los hepatocitos hacia la mitocondria, donde experimentará una reacción de desaminación oxidativa catalizada por la enzima L-glutamato deshidrogenasa; esta enzima es la única

conocida en mamíferos capaz de emplear tanto nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) como aceptor de los electrones (Ec. 4):



El NH₄⁺ producido, en caso de no requerirse para fines biosintéticos, será canalizado hacia la síntesis de urea, el principal producto de excreción del nitrógeno en mamíferos, a través de una ruta conocida como el ciclo de la urea. La síntesis de urea ocurre casi exclusivamente en el hígado; la urea sintetizada en los hepatocitos luego pasa a la circulación, desde donde llega a los riñones para su eliminación en la orina.

El ciclo de la urea comienza en la mitocondria con el ingreso del primer grupo -NH₂ al ciclo, el cual es derivado del NH₄⁺ de la matriz mitocondrial. Este NH₄⁺ se combina en primer lugar con bicarbonato (HCO₃⁻) en una reacción ATP-dependiente catalizado por la carbamil fosfato sintetasa I, para formar carbamil fosfato. A continuación, el carbamil fosfato cede su grupo carbamilo a la ornitina, formando citrulina, la cual pasa hacia el citosol. Allí, tendrá lugar la siguiente reacción, en la cual será incorporado el segundo grupo amino a ser eliminado en forma de urea, el cual es cedido por el aspartato (Asp). En dicha reacción, ocurre una condensación entre el grupo amino del Asp y el grupo carbonilo de la citrulina, formándose argininosuccinato y consumiéndose una molécula de ATP. El argininosuccinato será luego escindido para producir arginina (Arg) y fumarato y finalmente, en la última reacción del ciclo, la Arg es escindida por acción de la arginasa citosólica para producir urea y ornitina. La ornitina resultante será transportada hacia la mitocondria para iniciar una nueva ronda del ciclo de la urea. Globalmente, la síntesis de una molécula de urea requiere de la energía aportada por la hidrólisis de cuatro grupos fosfato de alta energía, utilizando en el proceso un NH₄⁺ mitocondrial y el grupo amino de una molécula de Asp, que representan los dos grupos -NH₂ que son eliminados a través de la molécula de urea [2].

2.2.3. Biosíntesis de los aminoácidos y compuestos derivados

La biosíntesis de los aminoácidos implica la síntesis de los esqueletos carbonados de los α-cetoácidos correspondientes, que proceden de intermediarios de la glucólisis, del ciclo del ácido cítrico o de la ruta de las pentosas fosfato. El nitrógeno entra en estas rutas a través de los principales dadores de grupos -NH₂ anteriormente mencionados: el Glu y la Gln. No obstante, los seres humanos son capaces únicamente de sintetizar los esqueletos carbonados de aproximadamente la mitad de estos α-cetoácidos. Los aminoácidos cuya síntesis no puede ser llevada a cabo endógenamente se denominan aminoácidos esenciales y deben ser aportados por la dieta. Se denominan por el contrario aminoácidos no esenciales a aquellos que pueden ser sintetizados a partir de precursores no aminoacídicos. Existe además un pequeño grupo de aminoácidos que no son esenciales en sí dado que se pueden sintetizar, pero a partir de aminoácidos esenciales, como es el caso de la tirosina (Tyr). Las vías metabólicas que forman los aminoácidos nutricionalmente esenciales se encuentran en plantas y bacterias y son relativamente complejas y costosas energéticamente, en comparación con las vías de biosíntesis de aminoácidos no esenciales; evolutivamente, los mamíferos han encontrado una ventaja conservando las rutas de síntesis de aminoácidos más sencillas y perdiendo la capacidad de sintetizar aquellos que implican procesos más complejos [2,6].

Además de su papel como unidades estructurales de péptidos y proteínas, los aminoácidos son precursores biosintéticos de una serie de compuestos nitrogenados, como neurotransmisores, hormonas, mediadores de la inflamación, moléculas transportadoras y efectoras [6]. En estos casos, los aminoácidos son directamente convertidos en compuestos relacionados, que generalmente conservan los grupos amino de los aminoácidos en su estructura final. Tal es el caso, por ejemplo, de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), el ácido γ -aminobutírico (GABA), la serotonina y la histamina. No obstante, hay otros procesos biosintéticos en los cuales la participación de los aminoácidos implica su acción como dadores de grupos $-NH_2$, como ocurre en la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas. En estos casos, juega un rol clave la Gln aportando el N de su grupo amida en la construcción de los anillos de purinas o pirimidinas; el Asp contribuye también con su grupo amino en este proceso (Figura 2.3). Un ejemplo de esto es el primer paso en la síntesis de las bases de purina: esta reacción implica la transferencia de un grupo amino por parte de la Gln al derivado de la ribosa 5-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP), formando 5-fosforribosilamina y liberando Glu y pirofosfato (PP_i) (Figura 2.3). Un hecho interesante a destacar es que parte de estos átomos de N incorporados en los nucleótidos de purina terminan siendo excretados no como urea sino en forma de ácido úrico durante el metabolismo de las purinas ingeridas y del recambio de nucleótidos de los ácidos nucleicos [2].

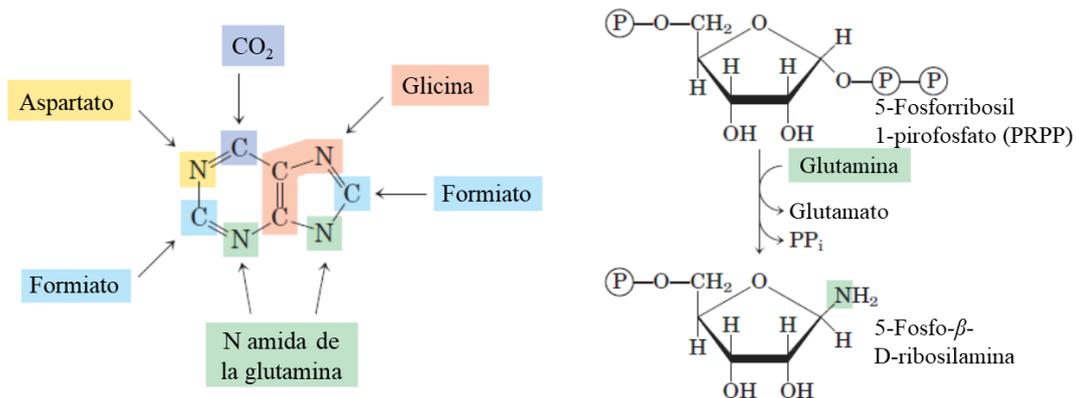


Figura 2.3. Participación de la glutamina en el proceso de síntesis de purinas. El nitrógeno amida de la glutamina es la fuente de dos de los átomos de nitrógeno del anillo de las purinas (*izquierda*). Uno de ellos es incorporado en el primer paso comprometido de la síntesis, cuando la glutamina actúa como dador de grupo amino en la formación de 5-fosforribosilamina (*derecha*). Imagen generada a partir de [2].

2.3. Metabolismo y funciones de la glutamina

En las secciones anteriores, se evidenció el rol central que la Gln desempeña en el metabolismo del nitrógeno en mamíferos, donde su síntesis no cumple una función de asimilación de N del ambiente como ocurre en plantas y microorganismos, sino que juega un rol esencial en el transporte del amonio producido en tejidos extrahepáticos por la circulación. A continuación, se profundizará más sobre las implicancias biológicas de su síntesis y las distintas funciones que cumple la Gln endógenamente.

2.3.1. La glutamina en el metabolismo intermediario

La Gln es el α -aminoácido libre más abundante del plasma humano; sus concentraciones plasmáticas normalmente se encuentran entre 0,5-0,8 mM, constituyendo entre un 20-25% del total de aminoácidos circulantes. Es también el aminoácido libre más abundante a nivel intracelular en muchos tipos celulares, particularmente en el músculo, donde representa aproximadamente un 40% del pool de aminoácidos libres [7-9]. La mayoría de los tejidos de mamíferos son capaces de sintetizar Gln, pero durante períodos de rápido crecimiento o en ciertos estados patológicos, la demanda celular de Gln (en particular por los riñones, tracto gastrointestinal y el sistema inmune) excede la capacidad de síntesis endógena, por lo se vuelve un aminoácido esencial (se la suele considerar por lo tanto como un aminoácido “condicionalmente” esencial). Las células en rápida proliferación, como las de la mucosa intestinal, los linfocitos o las células tumorales, presentan una altísima avidez por la Gln, lo que refleja la gran versatilidad de ésta como nutriente y mediador de otros procesos [9,10].

El mantenimiento de niveles elevados de Gln en la sangre provee de una fuente fácilmente utilizable de carbono y nitrógeno para sostener las necesidades biosintéticas y energéticas de las células, así como también al mantenimiento de la homeostasis celular general. Los destinos metabólicos de la Gln pueden, en términos generales, dividirse en reacciones que utilizan la Gln por su nitrógeno γ (síntesis de nucleótidos y hexosaminas) y aquellas que utilizan ya sea su nitrógeno α o su esqueleto carbonado, que en realidad emplean como sustrato al Glu y no a la Gln [10]. La Gln es captada por las células a través de uno de los múltiples transportadores (ej: SLC1A5), que podrán así metabolizarla, o bien, exportarla en intercambio por otros aminoácidos a través de antiportadores, como el LAT1 [11]. La Figura 2.4 ilustra las principales funciones de la Gln en el metabolismo intermediario, entre las que se destacan:

- **Producción de energía.** A nivel intracelular, la glutamina puede ser convertida en Glu y NH_4^+ por acción de las glutaminasas (GLS) mitocondriales (Ec. 5).



A continuación, el Glu puede ser convertido en α -CG, el cual puede ingresar al ciclo del ácido cítrico y conducir a la generación de ATP. Las células en proliferación, como enterocitos, linfocitos y fibroblastos suelen metabolizar la Gln de esta manera como un sustrato productor de energía [9,10].

- **Síntesis de aminoácidos no esenciales.** El nitrógeno de la glutamina contribuye a mantener los niveles de aminoácidos en la célula a través de la acción de las transaminasas. Además, el Glu originado a partir de la Gln es utilizado para la síntesis de prolina (Pro) y Asp, cuyas funciones exceden su uso para la síntesis de proteínas [9,10].
- **Síntesis de nucleótidos.** Como se mencionó anteriormente, el N de la Gln contribuye directamente a la síntesis *de novo* de los nucleótidos de purinas y pirimidinas, haciendo de la Gln un nutriente esencial durante la proliferación celular [10].
- **Biosíntesis de hexosaminas.** Otra de las rutas de biosíntesis en las cuales la Gln actúa como dador de grupo amino es la de las hexosaminas, precursores de la síntesis de varias macromoléculas estructurales. El paso limitante en la formación de las hexosaminas es catalizado por la enzima glucosamina 6-fosfato sintasa, la cual

transfiere el grupo amida de la Gln a la fructosa 6-fosfato para producir glucosamina 6-fosfato, intermediario fundamental para las reacciones de N- y O-glicosilación [10,12].

- **Síntesis de glutatión y aporte de equivalentes de reducción.** La Gln puede contribuir en gran medida al mantenimiento del estado redox de las células, principalmente a través de su contribución a la síntesis de glutatión (GSH) y de la reducción del NADP^+ a NADPH a través de la glutamato deshidrogenasa [9].
- **Activación de vías de señalización.** Dada la relevancia de la Gln en el metabolismo anabólico, las células han desarrollado mecanismos de control del crecimiento dependientes de Gln, que incluyen la modulación de vías de transducción de señales. Uno de los ejemplos más estudiados de esto es el de la activación de la vía de señalización de mTOR a través del complejo 1 de mTOR (mTORC1), que lleva a la estimulación del metabolismo anabólico (ej: estímulo de la síntesis de proteínas) y a la supresión del metabolismo catabólico. Además, una variedad de trabajos han reportado la habilidad de la Gln para modular la expresión génica en cultivos celulares y promover de este modo la proliferación celular [10,13].

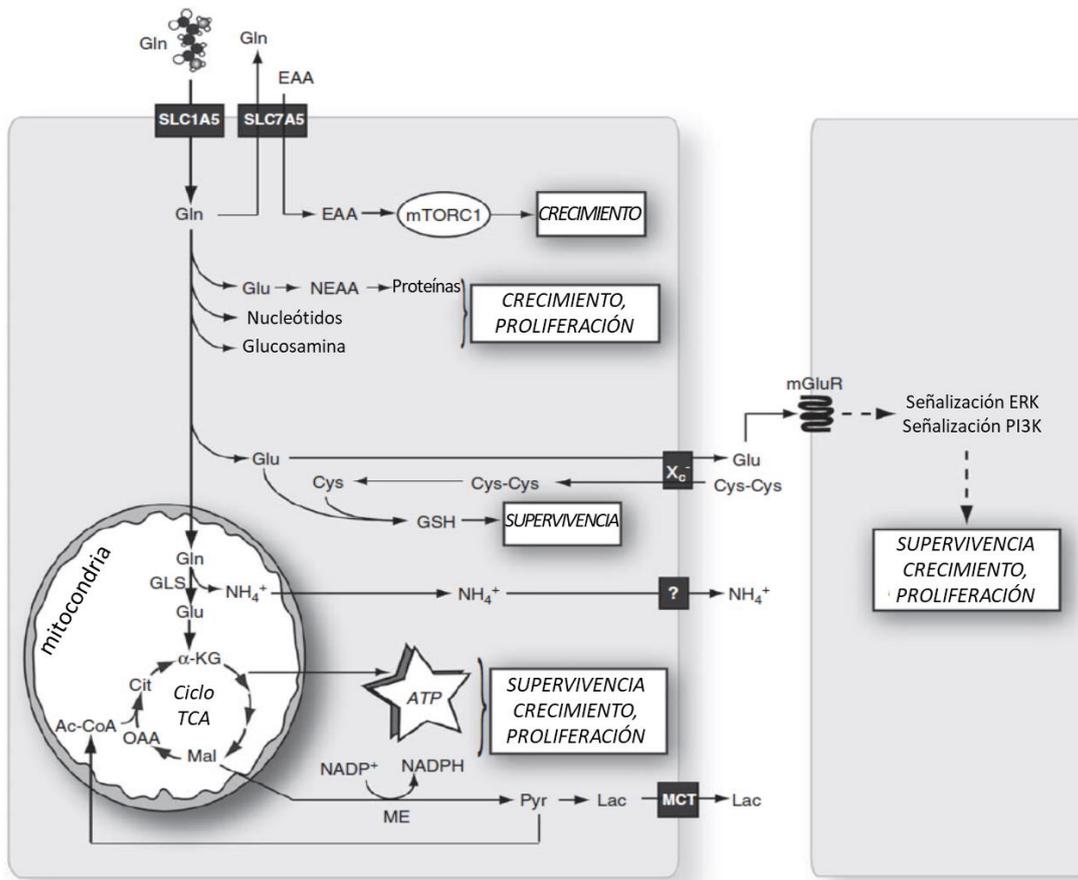


Figura 2.4. Resumen de las principales vías del metabolismo intermediario en las cuales la glutamina puede ser procesada a nivel intracelular. La Gln, tras su ingreso a las células por transportadores (SLC1A5), puede o bien ser exportada en intercambio por aminoácidos esenciales o ser metabolizada por múltiples vías, que podrán promover la supervivencia, crecimiento y proliferación celular. EAA: aminoácidos esenciales; NEAA: aminoácidos no esenciales; Cys: cisteína; GLS: glutaminasa; $\alpha\text{-KG}$: α -cetoglutarato; Ciclo TCA: ciclo del ácido cítrico; Mal: malato; OAA: oxalacetato; Cit: citrato; Ac-CoA: acetil-CoA; ME: enzima mállica; Pyr: piruvato; Lac: lactato. Modificado de [10].

2.3.2. La glutamina en la detoxificación del amonio

Como se mencionó previamente, el catabolismo de los aminoácidos genera como subproducto NH_4^+ , el cual debido a su elevada toxicidad debe ser rápidamente metabolizado hacia productos no tóxicos o de excreción. La síntesis de urea representa la principal vía de detoxificación del amonio en mamíferos. No obstante, en múltiples pasos previos del metabolismo del nitrógeno, la síntesis de Gln por acción de la GS (Ec. 1) constituye una forma necesaria y transitoria de remover el NH_4^+ y evitar su acumulación en el plasma durante las etapas intermedias. El hígado desempeña un rol fundamental en este proceso [2].

El intestino es uno de los principales órganos productores de NH_4^+ , no solo debido a que las células del epitelio intestinal catabolizan gran parte de la Gln ingerida sino también porque utilizan la Gln plasmática como su principal nutriente energético. Este NH_4^+ pasa a la circulación y es transportado a través de la vena porta hacia el hígado, que será el encargado de detoxificarlo junto con el NH_4^+ producido por el catabolismo de los aminoácidos dentro de los propios hepatocitos. Este proceso es llevado a cabo a través de dos mecanismos que se relacionan con la expresión diferencial de varias enzimas dentro de zonas discretas del acino hepático (Figura 2.5). A nivel de los hepatocitos periportales, la expresión de altos niveles de GLS y de enzimas del ciclo de la urea llevan a que la mayor parte del NH_4^+ portal sea empleado inicialmente para la síntesis de urea, a través de una ruta de alta capacidad pero de baja afinidad. Los niveles de expresión de estas enzimas en los hepatocitos disminuyen progresivamente a medida que la sangre difunde por el espacio sinusoidal, por lo que esta función se va perdiendo. En contraste, la pequeña población de hepatocitos que rodean las vénulas terminales (perivenosas) presenta una alta expresión de GS. La función de estos hepatocitos es metabolizar los iones NH_4^+ remanentes (que no fueron convertidos en urea) por acción de la GS, enzima que presenta una alta afinidad por el NH_4^+ , llevando a la formación de Gln; la síntesis secuencial de urea o Gln crea un sistema altamente eficiente para garantizar que los niveles plasmáticos de NH_4^+ se mantengan en valores no tóxicos [8,14,15]. Si bien la síntesis hepática de urea representa la principal forma de procesar tanto los NH_4^+ plasmáticos (provenientes del intestino en gran medida) como los que son transportados desde otros tejidos principalmente en forma de Gln, la acción detoxificadora de los hepatocitos perivenosos a través de la reacción de la GS es de gran relevancia en el balance global. Diversos estudios en modelos animales donde se moduló la expresión de la GS hepática por técnicas de biología molecular (eliminación del gen o sobreexpresión) han evidenciado la importancia de este mecanismo en la homeostasis del amonio a nivel sistémico [16-18].

2.3.3. La glutamina en el mantenimiento del equilibrio ácido-base

El metabolismo en el ser humano es productor de distintos tipos de ácidos, siendo el CO_2 el principal de éstos, debido a que es un subproducto mayoritario de la actividad catabólica celular. Al ser un ácido volátil, logra ser excretado rápidamente a través de los pulmones. Los ácidos procedentes de fuentes diferentes al CO_2 , como el ácido láctico, los cetoácidos (ácido acetoacético y β -hidroxibutírico) y algunos ácidos inorgánicos (sulfúrico, fosfórico) se conocen como ácidos no volátiles y deben ser excretados por vía renal. A pesar de la gran cantidad de hidrogeniones que se producen a diario, su concentración en plasma se mantiene dentro de un margen muy controlado (pH 7.37-

7.43), lo cual es esencial para el mantenimiento de la estructura y función de la mayoría de las biomoléculas [6,8].

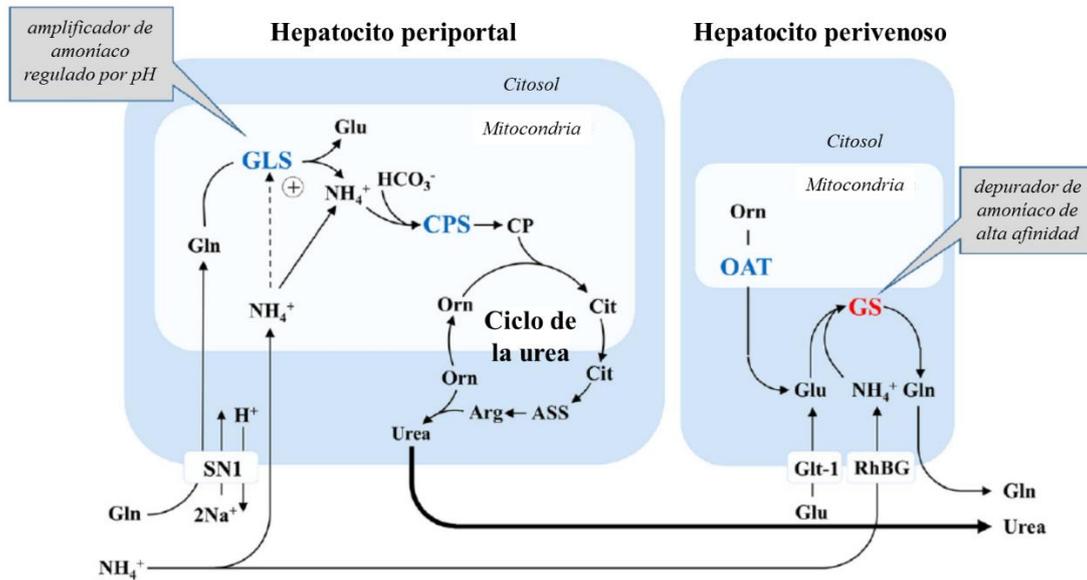


Figura 2.5. Organización funcional del metabolismo hepático del NH_4^+ y la Gln. La remoción del amoníaco a través de la producción de urea o glutamina está organizada secuencialmente en el acino hepático siguiendo el flujo sanguíneo. A nivel de los hepatocitos periportales, el NH_4^+ y la Gln son captados para sintetizar urea, en un proceso de alta capacidad pero baja afinidad. El NH_4^+ remanente es captado por los hepatocitos perivenosos y convertido en Gln por acción de la GS, a través de un mecanismo de alta afinidad para la remoción de NH_4^+ . Adaptado de [15].

Los riñones desempeñan un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis ácido-base por su capacidad de controlar la excreción de ácido en la orina y la síntesis de HCO_3^- en plasma; la metabolización de la Gln por parte de los riñones contribuye en esta función, pero es especialmente significativa en situaciones de acidosis metabólica. Aproximadamente el 20% de la Gln plasmática es filtrada por los glomérulos e ingresa en la luz de la nefrona; a continuación, es reabsorbida por las células epiteliales del túbulo contorneado proximal y la gran mayoría de la misma es devuelta hacia la sangre. Una pequeña fracción de esta Gln es utilizada por las propias células, que la metabolizan a nivel mitocondrial por las vías descritas anteriormente hasta α -CG, produciéndose dos NH_4^+ . Las bajas actividades de la glutaminasa y de los transportadores mitocondriales de Gln en condiciones ácido-bases normales aseguran que sólo una fracción menor de la Gln sea metabolizada. No obstante, durante la acidosis metabólica, una de las principales respuestas adaptativas a nivel renal consiste en el incremento de la catabolización de la Gln y el subsecuente aumento de la amoniogénesis y la gluconeogénesis. Para esto, la dirección del transporte basolateral de Gln se revierte para lograr que las células de los túbulos proximales extraigan Gln tanto del filtrado glomerular como de la sangre, al tiempo que también se activa el transporte de la Gln hacia las mitocondrias. El objetivo de esta adaptación metabólica es, por un lado, producir NH_3 para la eliminación de protones (H^+) en la orina como NH_4^+ , y, por otra parte, generar HCO_3^- que será transportado hacia la sangre para compensar parcialmente la acidosis.

En situaciones de acidosis crónica, los riñones pueden extraer hasta más de un tercio de la Gln plasmática total. Esto se consigue a través de un sistema adaptativo de acción lenta pero muy eficiente, que implica el aumento en la expresión de los genes de la glutaminasa mitocondrial, la glutamato deshidrogenasa mitocondrial y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica en las células del epitelio tubular. Esta respuesta es una consecuencia directa del descenso sostenido en el pH intracelular que ocurre en la acidosis metabólica crónica, que ocasiona una estabilización de los ARN mensajeros (ARNm) de la GLS y glutamato deshidrogenasa, al tiempo que incrementa la transcripción del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Esta respuesta renal que implica un uso aumentado de la Gln plasmática se acompaña por una adaptación del hígado, que pasa de ser un consumidor a un productor neto de glutamina. Parte de esto se debe a la respuesta diferencial que presentan al descenso en el pH la glutaminasa (menor actividad) y la glutamina sintetasa (mayor actividad). Si bien como consecuencia de esto la síntesis de urea se ve disminuida, dado que el nitrógeno de la Gln es utilizado para la excreción renal de amonio, la excreción total de nitrógeno permanece constante [8,19-21].

2.3.4. La glutamina en el sistema nervioso central

A nivel del sistema nervioso central (SNC) la Gln desempeña un rol central en la neurotransmisión glutamatérgica (y también en la dependiente de GABA), formando una lanzadera de metabolitos conocida como el ciclo glutamato-glutamina. Este ciclo funciona como un mecanismo de lograr un manejo correcto del Glu en un contexto particular como es la sinapsis neurona-neurona, en donde participan células cuyas habilidades metabólicas son limitadas [22].

La neurotransmisión glutamatérgica ocurre mayormente dentro de los confines de una sinapsis tripartita, formada por la neurona presináptica, la neurona postsináptica y una célula de la glía, en general, un astrocito (Figura 2.6). El ciclo comienza con la liberación del Glu almacenado en vesículas sinápticas por parte de la neurona presináptica hacia la hendidura sináptica. Luego de su liberación hacia el espacio extracelular, el Glu puede unirse tanto a los receptores ionotrópicos (NMDA y AMPA) como metabotrópicos (mGluR1-8) de la membrana plasmática de la neurona post- y presináptica y células de la glía. Tras la unión, estos receptores inician una serie de respuestas a nivel intracelular, que incluyen la despolarización de la membrana, activación de cascadas de señalización intracelular, modulación de la síntesis de proteínas y eventualmente de la expresión génica. El Glu liberado debe regularse estrechamente para que sus niveles extracelulares no se mantengan elevados más de lo necesario estimulando la actividad de los receptores; esta regulación es esencial para garantizar una neurotransmisión óptima y prevenir la potencial excitotoxicidad. El mecanismo a través del cual ocurre la remoción del Glu de la hendidura sináptica es a través de transportadores de aminoácidos excitatorios de alta afinidad (EATs) localizados en las células gliales vecinas. Así, estas células captan el Glu y luego lo convierten en Gln a través de la acción de la GS; esta actividad permite que se mantengan bajos los niveles de Glu a nivel intracelular para que pueda seguir siendo captado. La Gln así sintetizada es luego transportada de vuelta hacia la neuronas presinápticas, que la hidrolizará a través de la reacción de la glutaminasa para volver a obtener Glu, que se almacenará nuevamente en vesículas, disponibles para iniciar otro evento de neurotransmisión [23]. Este ciclo, además de garantizar la rápida remoción del

Glu extracelular, permite que éste sea reciclado y devuelto de una forma no tóxica a las neuronas, células con una limitada capacidad para sintetizar Glu a partir de glucosa. Cuando la glutaminasa convierte dentro de la neurona a la Gln en Glu, libera también una molécula de NH_4^+ , la cual debe ser transportada fuera de la neurona y captada por los astrocitos para que la utilicen en la síntesis de Gln. De este modo, la reacción de la GS en este contexto es esencial para prevenir la excitotoxicidad glutamatergica, garantizar el aporte suficiente del precursor del neurotransmisor Glu a las neuronas glutamatergicas y evitar que se acumule el NH_4^+ generado por la glutaminasa [22].

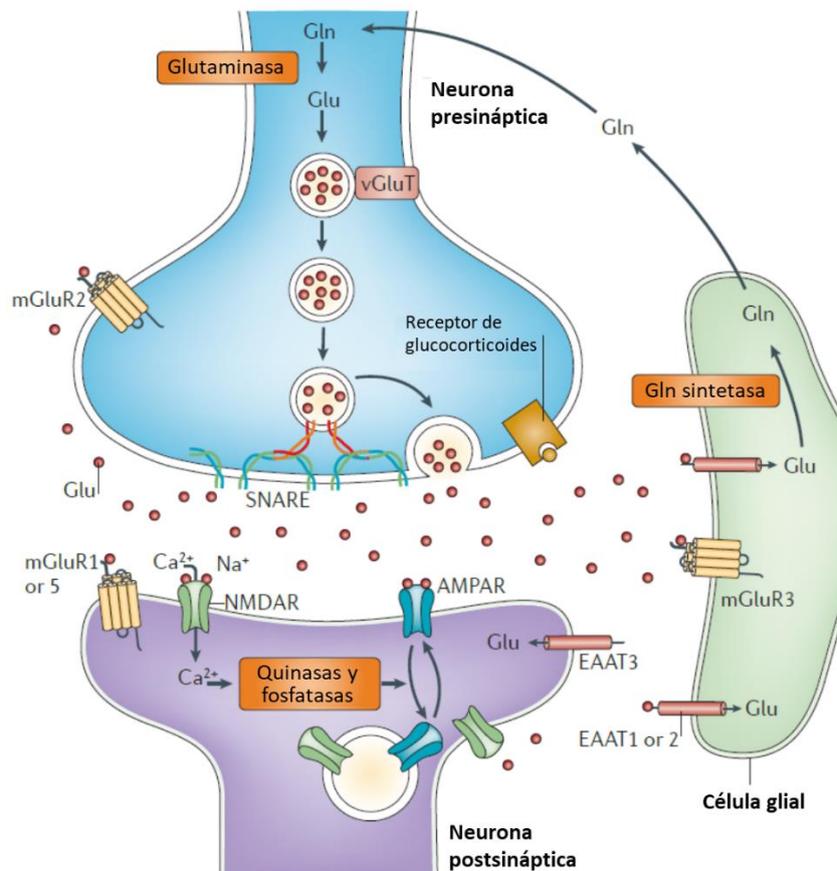


Figura 2. 6. Representación esquemática de una sinapsis glutamatergica. El neurotransmisor glutamato (Glu), que se encuentra almacenado en vesículas intracelulares en la neurona presináptica, es liberado hacia la hendidura sináptica durante la neurotransmisión. El Glu liberado podrá unirse a receptores de membrana de la neurona pre- y postsináptica y de células de la glía, induciendo una serie de eventos a nivel intracelular. La remoción del Glu del espacio extracelular es llevado a cabo por las células de la glía (astrocitos principalmente), que a nivel intracelular la convierten en glutamina (Gln) por acción de la glutamina sintetasa. Finalmente, la Gln es liberada y captada por las neuronas presinápticas, que la convertirán en Glu a través de la glutaminasa, completando así el ciclo glutamato-glutamina. Editado de [23].

El ciclo glutamato-glutamina tiene una alta actividad, siendo la Gln derivada de los astrocitos el sustrato cuantitativamente más importante para el reabastecimiento del pool de Glu neuronal. Dado que el Glu es también empleado para sostener el metabolismo energético celular, este ciclo no opera de manera estequiométrica. La pérdida oxidativa del Glu debe corresponderse con una síntesis adecuada *de novo* de Glu, lo cual ocurre

principalmente en los astrocitos y requiere de una anaplerosis suficiente para generar un incremento neto en intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Así, la homeostasis neuronal de Glu se encuentra bajo un estricto control astrocitario. Debido al papel fundamental que el mantenimiento de la homeostasis celular del Glu desempeña para sostener la función normal del cerebro, cuando los estrictos mecanismos de regulación del metabolismo del Glu en la sinapsis glutamatérgica se ven comprometidos, pueden llevar a la patología del SNC, como se observa en diversas enfermedades neurodegenerativas [24]. Ciertos aspectos de esto serán discutidos más adelante.

2.4. Las glutamina sintetasas

El rol clave de la GS en diversos aspectos del metabolismo del nitrógeno de los seres vivos se describió en las secciones anteriores, y evidencia el gran interés que ha despertado su estudio desde la segunda mitad del siglo XX hasta la actualidad. La biosíntesis de Gln a partir de Glu y NH_3 fue inicialmente observada en preparados de tejido animal por Hans A. Krebs en 1935, quien además propuso que dicha reacción requería de energía [25]. Durante los años posteriores, diversos estudios con muestras biológicas aportaron información adicional acerca de las características de esta reacción [26-29], y el desarrollo de métodos para la purificación de la enzima de cerebro de oveja permitió profundizar aún más acerca de las propiedades de la GS [30]. En esta sección se describirán las principales características bioquímicas de esta enzima, así como también se hará mención a la evidencia existente sobre la implicancia de su pérdida de función en la patología del SNC.

2.4.1. La familia de las glutamina sintetasas

Debido a su rol crítico en la asimilación del nitrógeno inorgánico, las GSs constituyen una familia de enzimas ubicuas y muy conservadas entre todos los dominios de seres vivos, desde organismos unicelulares primitivos hasta los vertebrados superiores [31]. Se ha postulado que los genes que codifican a las GSs constituyen uno de los genes funcionales más antiguos en la historia evolutiva [32] y que éstos representan excelentes “relojes moleculares” que pueden ser usados para la realización de estudios filogenéticos [33]. La superfamilia de las GSs puede categorizarse en tres clases distintas de genes, llamados GSI, GSII y GSIII, cuyas proteínas correspondientes se caracterizan por diferencias en secuencia, pesos moleculares, número de subunidades y ciertos aspectos funcionales. La distribución de estas tres clases de GS es variable dentro de los tres dominios de la vida; las GSI y GSIII se encuentran mayoritariamente en bacterias y arqueas, mientras que las GSII son características de eucariotas. No obstante, se han encontrado genes GSII en procariotas así como también genes de GSI y GSIII en ciertos eucariotas, por lo que se ha propuesto que estas tres superfamilias génicas surgieron antes de que ocurriera la divergencia entre procariotas y eucariotas [34-37]. En este sentido, se ha observado en vertebrados que un gen del tipo GSI ha evolucionado en una proteína catalíticamente inactiva del cristalino del ojo llamada lengsina, cuya función específica se desconoce pero su secuencia y estructura poseen una similitud importante con las GSI típicas de procariotas [38,39].

En la mayoría de los eucariotas existen distintas isoformas de GSII, codificadas por distintos genes, que presentan distinta localización subcelular y patrones de expresión en

diferentes tejidos. Así, en plantas, existen isoformas de GS citosólicas (GS1) y de los cloroplastos (GS2) que son codificadas por una pequeña familia de genes; por ejemplo, en *Medicago truncatula*, se expresan cuatro genes de GSs, dos del tipo GS1 y dos del tipo GS2 [40]. Por su parte, en *Drosophila melanogaster*, se expresan dos isoformas de GS, codificadas por distintos genes (*gsI* y *gsII*), que presentan también diferente localización subcelular (mitocondrial o citosólica), tisular y una expresión diferencial según las etapas del desarrollo [41,42]. Sin embargo, en la mayoría de los vertebrados, existe una única isoforma de GS, a pesar de que la misma presenta una expresión tejido específico y puede localizarse tanto a nivel mitocondrial como citosólico. En este caso, el splicing alternativo del único gen de GS es responsable de la diferente localización subcelular al generar un ARNm que porta una secuencia que dirigirá la importación de la proteína traducida a la mitocondria, o que carece de la misma y por tanto mantendrá la proteína en el citosol. Así, el splicing alternativo tejido específico logra que a nivel hepático, la GS tenga localización mitocondrial, mientras que a nivel cerebral se localice en el citosol. [43]. En mamíferos, el gen de la GS tiene aproximadamente 10 kb de largo, se organiza en siete exones y seis intrones y se transcribe en un ARNm de 2.8 o 1.4 kb con extremos 3' variables [44-46]. En el genoma humano existe un gen funcional de la GS (GLUL) localizado en el cromosoma 1q25, un pseudogen procesado (GLULP) en el cromosoma 9p13 y tres homólogos no caracterizados (GLULL1, GLULL2 y GLULL3), que se ubican en los cromosomas 5q33, 11p15 y 11q24 [47].

2.4.2. Estructura de las glutamina sintetasas

La estructura tridimensional de las tres clases de glutamina sintetasas se conoce actualmente [31,48-50]. Todas son proteínas homo-oligoméricas grandes compuestas por dos anillos cerrados que se asocian a través de una interfaz y se disponen con simetría dihédrica (Figura 2.7)[31]. En todos los casos, los sitios activos se localizan en la interfaz entre dos monómeros de cada anillo [49] y sólo pueden formarse cuando los monómeros se asocian en una estructura cerrada dado que requiere de la disposición opuesta de los dominios N- y C-terminal de cada subunidad [31]. El sitio activo presenta una forma de “doble embudo”, en el cual el ATP y el Glu se unen en extremos opuestos, y contiene tres sitios para la unión de metales divalentes que están ocupados por manganeso (Mn^{2+}) o magnesio (Mg^{2+}), que cumplen roles estructurales y catalíticos [51].

A pesar de estas similitudes en la estructura global, existen ciertas diferencias entre las estructuras de las tres clases de GS. A nivel de estructura primaria, el largo de la cadena de cada monómero varía, siendo en promedio las GSI de unos 360 aminoácidos, las GSII de 450 aminoácidos y las GSIII de 730 aminoácidos. Las GSIII son el tipo más divergente en términos estructurales, presentando menos de un 10% de identidad de secuencia con las GS de clase I y II. No obstante, a nivel de estructura secundaria y terciaria, las tres clases de GS comparten arquitecturas y topologías comunes, no solo a nivel del sitio activo [31]. Las GS de clase I y III son oligómeros dodecaméricos formados por dos anillos hexaméricos de subunidades con 12 sitios activos que se localizan entre los monómeros. El dodecámero se mantiene unido principalmente mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno entre los anillos hexaméricos [31,50,51]. Por su parte, las GS de clase II se disponen de manera similar pero son en cambio oligómeros decaaméricos, formados por la interacción de dos anillos pentaméricos y teniendo de este modo 10 sitios activos por molécula de enzima [48,49].

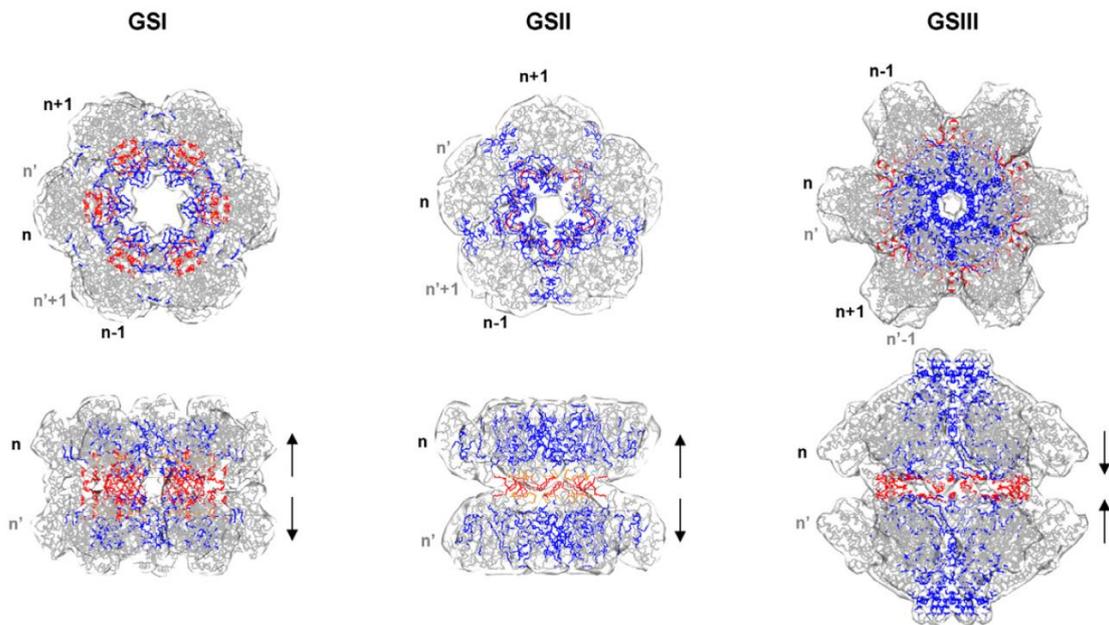


Figura 2.7. Estructura cuaternaria de las tres clases de GS e interfaces involucradas. Se muestran ejemplos representativos de la estructura cuaternaria de las GS de clase I (*S. typhimurium*), II (*Z. mays*) y III (*B. fragilis*). Los contactos intra-anillo se indican en azul, mientras que los contactos inter-anillo se muestran en rojo [31].

Las primeras estructuras de GSs de mamíferos (canina y humana) fueron publicadas en 2008 por Krajewski *et al*, quienes obtuvieron estructuras para la enzima en ausencia y presencia de distintos ligandos [49]. Al pertenecer a las GSII, ambos tipos de GS se disponen en una estructura cuaternaria como la ya descrita (Figura 2.8A-B). La estructura individual de una cadena polipeptídica consiste de un meandro N-terminal (residuos 3-24) y dos dominios compactos: la unidad N-terminal (residuos 25-112), conocida como dominio β -*grasp*, y el dominio catalítico hacia el lado C-terminal (residuos 113-373). El meandro N-terminal establece contactos con subunidades vecinas en el núcleo del pentámero. Entre cada dominio β -*grasp* se establecen múltiples interacciones adicionales, así como también con el dominio catalítico de la subunidad vecina más cercana, estabilizando aún más el pentámero. Las interacciones entre los pentámeros son mucho menos extensas e involucran a los loops que componen los residuos 150-156 de cada subunidad; estas interacciones son principalmente del tipo de van der Waals, con la excepción de diez enlaces de hidrógeno que se forman entre los átomos de la cadena principal de los residuos de fenilalanina (Phe) 154. Cuando la cristalización se realizó en presencia de cloruro de magnesio (MgCl_2), se encontró un átomo de Mg^{2+} por subunidad y también iones cloruro (Cl^-) unidos. Por su parte, en presencia de cloruro de manganeso (MnCl_2) y ATP, se encontraron cuatro átomos de Mn^{2+} y un Cl^- por subunidad, así como un adenosín difosfato (ADP) y un fosfato (Pi). Cada decámero de GS posee 10 sitios activos, localizado cada uno en la interfase de dos subunidades adyacentes en un anillo pentamérico. El dominio β -*grasp* N-terminal de una subunidad interacciona con la hoja plegada β altamente curvada del dominio catalítico C-terminal de la siguiente subunidad,

formando de este modo un bolsillo en forma de embudo que se orienta hacia afuera del pentámero.

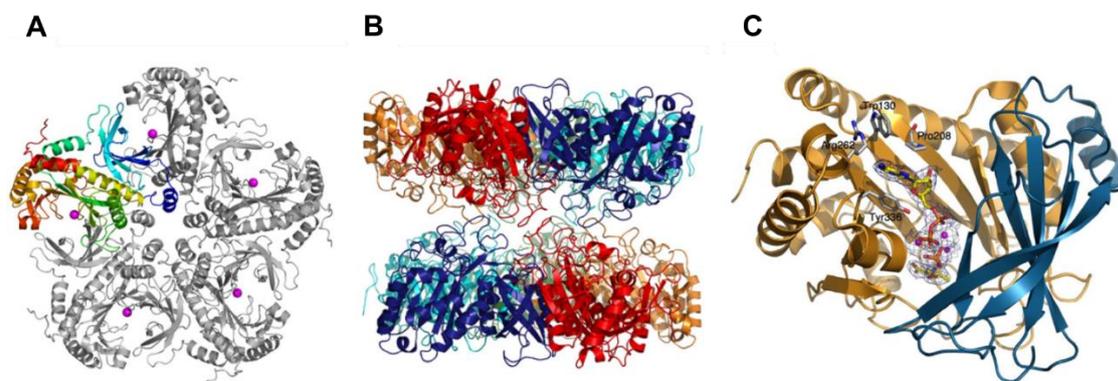


Figura 2.8. Estructura tridimensional de la GS de mamífero. (A) Estructura tridimensional de un pentámero de GS canina en ausencia de sustratos. Para una subunidad, se indica en azul-cian el dominio β -*grasp* N-terminal, y el resto (coloreado de verde a rojo) representa el dominio catalítico C-terminal. Se muestran en esferas magentas los átomos de Mg^{2+} en la posición n1, en las cavidades en forma de embudo del sitio activo. (B) Decámero de GS canina, vista con un giro de 90° respecto a la estructura en (A), donde se observan los contactos débiles entre los pentámeros. Las subunidades en cada pentámero se muestran coloreadas de azul a rojo. (C) Estructura del sitio activo de la HsGS uniendo ADP, MSO-P y Mn^{2+} . El dominio β -*grasp* N-terminal se muestra en azul, mientras que el dominio catalítico C-terminal se indica en dorado. Los residuos hidrofóbicos conservados que interactúan con la adenina del ADP se representan como barras y esferas. Imágenes extraídas de [49].

La estructura cristalográfica de la GS humana (HsGS) obtenida en presencia de $MnCl_2$, ATP y el inhibidor específico L-metionina sulfoximina (MSO) representa la imagen más completa de las interacciones existentes en el sitio activo de las GS de mamífero (Figura 2.8C). El anillo de adenina del ADP yace en un bolsillo hidrofóbico delimitado por los residuos triptófano (Trp) 130, Arg262, Tyr336 y Pro208, todos ellos residuos altamente conservados en las GS eucariotas. Los grupos α - y β -fosfato del ADP establecen un gran número de interacciones con las cadenas laterales de la proteína, así como también con dos de los tres iones Mn^{2+} del sitio activo. Los átomos polares del MSO fosforilado (MSO-P), el cual se uniría en la misma posición que el sustrato Glu, establecen una o más interacciones con la proteína, ya sea directamente o a través de contactos mediados por los tres átomos de Mn^{2+} . El único átomo de Mg^{2+} que se observó en la estructura de la *apo* GS es el que ocupa la posición n1, la más dependiente de los contactos con la proteína, por lo que su unión ocurre aún en ausencia de sustratos. En cambio, en la estructura de HsGS obtenida en presencia de ligandos, se observaron tres cationes divalentes (Mn^{2+}), lo que sugiere que estos dos cationes adicionales (posiciones n2 y n3) se unirían solo cuando el ATP y el Glu ingresan al sitio activo [49].

La comparación de las estructuras obtenidas en ausencia (GS canina) y presencia de ligandos (HsGS) permite observar cambios conformacionales que ocurren en las inmediaciones del sitio activo en respuesta a la unión de MnADP/MSO-P. Los mayores movimientos de la cadena principal involucran los residuos 311-337 del dominio catalítico, junto con los residuos 63-77 del dominio β -*grasp* de la subunidad adyacente. Además, las cadenas laterales de los residuos 70-74 adoptan una estructura más ordenada

cuando se unen los ligandos. En términos generales, los movimientos involucrados implican un cierre del sitio activo cuando se une el nucleótido y unos pocos cambios adicionales cuando ocurre la unión del sustrato aminoacídico. No ocurren cambios alostéricos dentro o entre los pentámeros en respuesta a la unión de los sustratos [49].

2.4.3. Mecanismo catalítico de la glutamina sintetasa

Desde los estudios iniciales sobre la síntesis enzimática de Gln a partir de Glu y NH_3 se propuso un modelo en dos pasos para el mecanismo de reacción implicado, el cual implica un primer paso de formación del intermediario activado γ -glutamilfosfato a través de la transferencia de un fosforilo desde el ATP, seguido de un segundo paso en el cual el ataque nucleofílico del NH_3 sobre este intermediario libera el P_i y produce Gln [29,51,52].

A partir de estructuras cristalográficas obtenidas para la GS de *S. typhimurium* en presencia de distintos ligandos (sustratos y análogos) se logró proponer un modelo estructural para el mecanismo de reacción de la GS de clase I [51,53,54]. El mecanismo propuesto (Fig. 2.9) comienza con la unión secuencial de los sustratos ATP y Glu: es importante la entrada inicial al sitio activo del ATP ya que su unión genera un desplazamiento del residuo Arg359 que incrementa la afinidad de la GS por unir Glu. A continuación, dos de los iones metálicos unidos a la enzima polarizan el grupo γ -fosfato del ATP haciendo el átomo de fósforo más positivo y favoreciendo así el ataque nucleofílico del Glu para formar el intermediario γ -glutamilfosfato; participa en esta transferencia de fosforilo también el residuo Arg339. La generación de ADP por este proceso induce el movimiento del residuo de Asp50' de la subunidad adyacente para formar así el sitio de unión del ion amonio. Al unirse amonio a dicho sitio, la cadena lateral del Asp50' acepta un protón del ion NH_4^+ , formando así NH_3 , que a continuación podrá realizar el segundo ataque nucleofílico sobre el carbono δ del γ -glutamilfosfato para formar un intermediario tetraédrico. Este intermediario es estabilizado mediante interacciones con el segmento flexible formado por los residuos 324-328, principalmente a través de la unión salina entre el grupo γ -amino del intermediario (cargado positivamente) con la cadena lateral cargada negativamente del residuo Glu327. Esta unión genera un cierre del sitio activo que bloquea la hidrólisis aberrante del γ -glutamilfosfato y la salida del Glu. Finalmente, ocurre la hidrólisis del intermediario tetraédrico, generándose la salida del grupo P_i ; además, el Glu327 acepta un protón del grupo γ -amino del intermediario produciendo así finalmente el producto Gln. La ausencia de interacciones entre el producto Gln con el Glu327 libera el segmento flexible 324-328, lo cual permite que el Gln difunda desde el sitio activo y permitiendo que la enzima pueda recibir nuevamente sustratos e iniciar otro ciclo catalítico. Debido a la conservación de la mayoría de los residuos involucrados en este mecanismo entre organismos muy simples y complejos, este modelo estructural podría aplicarse también a las GS de clase II [51].

Más recientemente, mediante estudios computacionales de dinámica molecular con una aproximación mixta de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM), se describió el mecanismo de la reacción catalizada por la HsGS a partir de las estructuras cristalográficas disponibles, obteniéndose así información con nivel de detalle atómico acerca del mecanismo catalítico de síntesis de Gln por una GS de clase II [55]. A través de este enfoque, se confirmó que el mecanismo de catálisis de la HsGS transcurre de modo similar al descrito en el modelo estructural de la GS de tipo I. Ambos pasos de la

reacción pueden describirse como sustituciones nucleofílicas bimoleculares (S_N2), que implican la transferencia del grupo fosfato del ATP al Glu, que activa a este último para el segundo ataque nucleofílico, llevado a cabo por el NH_3 . Para la primera de estas reacciones, es esencial la interacción entre el grupo guanidinio de la Arg319 (Arg339 en GSI) con el fosfato γ del ATP, como se había descrito en el modelo anterior, lo que permite que la reacción de transferencia de fosforilo sea exérgica, con un ΔG de $-8,0$ kcal/mol y una pequeña energía de activación de 5 kcal/mol. En este paso también contribuye la cadena lateral del Glu136, que mediante su interacción con el grupo amino del sustrato Glu, ayuda a posicionarlo en el sitio activo para la reacción de transferencia de fosforilo. Además, la formación del intermediario γ -glutamilfosfato se ve fuertemente favorecida por la conformación totalmente cerrada del bucle flexible del Glu305 (análogo al segmento 324-328 de la GSI), algo que depende de la interacción por enlace de hidrógeno entre el Glu305 y el Asp62' (Asp50' en GSI).

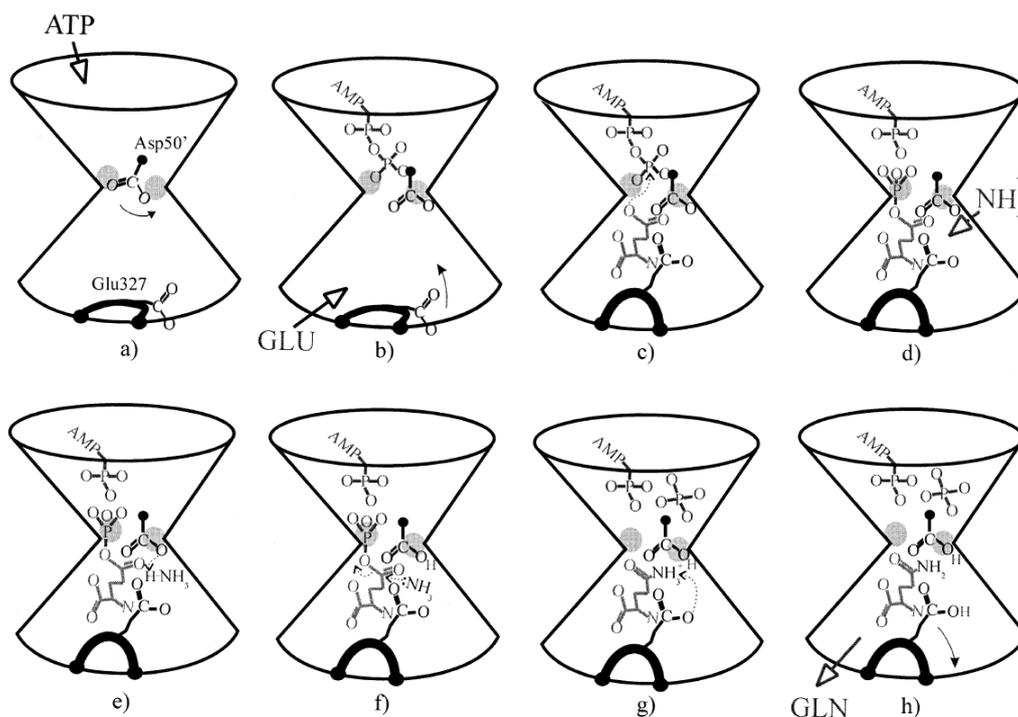


Figura 2.9. Representación esquemática del modelo estructural propuesto para la catálisis de la GS. Se muestran ocho pasos en los que se representa un sitio activo de GS, en forma de doble embudo, con los dos iones Mn^{2+} indicados como dos esferas grises. La unión de los sustratos, dinámica de los segmentos flexibles y la catálisis se ilustran en las imágenes consecutivas (a-h). Extraído de [51].

El segundo paso, que consiste en el ataque nucleofílico del NH_3 sobre el carbono δ del intermediario, presentó un ΔG de reacción de prácticamente 0, con una barrera de energía libre de 19,0 kcal/mol, lo que convierte a este en el paso limitante de la reacción. Para que tenga lugar, tienen que ocurrir dos transferencias de H^+ . En primer lugar, el NH_4^+ debe perder un protón y convertirse en NH_3 , un buen nucleófilo; en este proceso, el fosfato del intermediario γ -glutamilfosfato podría estar implicado en la deprotonación del NH_4^+ , en lugar del Asp62', sugerido anteriormente. Además, la protonación de este fosfato lo transformaría en un mejor grupo saliente para la sustitución nucleofílica. Luego de

formado, el ataque nucleofílico del NH_3 genera el intermediario tetraédrico, que experimentará la segunda transferencia de H^+ , desde el grupo $-\text{NH}_3^+$ al grupo carboxilato del Glu196; esta transferencia indica el final del estado de transición y determina que la reacción progrese hacia la formación de productos [55].

2.4.4. Regulación de la glutamina sintetasa

La GS de procariotas se encuentra regulada por diferentes mecanismos que implican al mismo tiempo la regulación alostérica y la modificación covalente de la enzima [56]. La regulación alostérica es llevada a cabo por múltiples productos finales del metabolismo de la Gln, como histidina (His), Trp, glicina (Gly), alanina (Ala), adenosín monofosfato (AMP), carbamil fosfato, glucosamina 6-fosfato y NAD^+ ; cada uno de estos efectores ejerce solamente una inhibición parcial, pero su acción en conjunto posee un efecto sinérgico notorio [57,58]. Esta regulación actúa en superposición con la inhibición de la GS por la adenililación (incorporación de AMP) reversible de un residuo específico de Tyr, conservado entre las GS procariotas. Tanto la reacción de adenililación como la remoción de dicha modificación son catalizadas por una enzima adenililtransferasa, que forma parte de una compleja cascada enzimática que responde a los niveles de Gln, α -CG, ATP y Pi. La adenililación de estos tipos de GS la vuelve más sensible a los inhibidores alostéricos [2,59-61].

Las GSII de eucariotas no están sujetas a regulación por adenililación (carecen de la porción C-terminal que incluye el residuo de Tyr modificado) ni a retroinhibición alostérica [62]; la evidencia actual indica que en vertebrados, la regulación de la GS se logra principalmente a través del control de los niveles de la proteína. Por un lado, como sugirieron observaciones tempranas en cultivos celulares [63,64], se encontró que los niveles elevados de Gln promueven la degradación de la GS eucariota por el proteasoma. Esto ocurre mediante un mecanismo que implica la acetilación de los residuos de lisina (Lys) 11 y 14 de la GS (ubicadas en una porción N-terminal no presente en GS bacterianas) por acción de las acetiltransferasas CBP y p300, su reconocimiento por la proteína cereblon del complejo ubiquitina-ligasa cullin-RING 4 (CRL4) y la posterior ubiquitinación de la proteína, que conduce a su degradación por el proteasoma [65]. En este proceso, sería esencial además la participación de la proteína VCP/p97, capaz de remover las subunidades de GS ubiquitinadas del resto del decámero para que las mismas puedan ser degradadas [66]. No obstante, aún resta definir cómo las células sensan los niveles extracelulares de Gln para provocar la acetilación de las dos Lys; proteínas como mTOR o la propia GS podría ser responsable de esto.

Por otra parte, los niveles celulares de GS en vertebrados también han demostrado estar sujetos a regulación transcripcional por glucocorticoides, algo que fue observado en diversos cultivos celulares [67-69] y extensamente estudiado en retina de embriones de pollo, y que estaría relacionado con la expresión temporal y específica en ciertas células de la GS [70-73]. La presencia de elementos de respuesta a glucocorticoides en la región *upstream* del gen de la GS permite que su expresión se incremente cuando los receptores de glucocorticoides se encuentran activos tras unir ligandos como el cortisol [74-76].

2.4.5. La glutamina sintetasa en la patología del sistema nervioso central

La actividad GS es esencial en el mantenimiento de la función de diversos tejidos, por lo que su correcto funcionamiento es necesario para el mantenimiento de la

homeostasis del organismo. La evidencia más contundente de esto lo aportan los escasos reportes clínicos de mutaciones puntuales deletéreas de GS en pacientes humanos, causantes de una deficiencia de Gln congénita con malformación cerebral severa, convulsiones, disfunción multiorgánica y muerte neonatal [77-81]. Estudios con modelos animales sometidos a la delección parcial (tejido-específico) o total del gen de la GS dan cuenta también del rol esencial de la proteína para las funciones normales del organismo y la sobrevivencia embrionaria y neonatal [16,82-85].

Por otra parte, existen numerosos reportes en la literatura en los cuales se vinculan cambios en los niveles o actividad de la GS con la patología del SNC. El rol clave de la actividad GS en el mantenimiento de la sinapsis glutamatérgica (y en el control de los niveles de NH_4^+) determina que su afectación pueda resultar en una disfunción de la astrogliá, capaz de impactar fuertemente en la supervivencia neuronal, lo que sugiere una relación causal en este tipo de reportes [86]. La mayor parte de la evidencia obtenida del análisis de pacientes humanos y modelos animales apunta a un posible rol de la pérdida de función GS en el SNC en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. En 1991, Smith y colaboradores encontraron por primera vez que la actividad GS en cerebros de pacientes fallecidos con enfermedad de Alzheimer era menor que en los de pacientes control; a su vez, ambas actividades se veían disminuidas con respecto a muestras de controles de menor edad, sugiriendo así que la pérdida de esta actividad ocurriría durante el envejecimiento normal [87]. Resultados similares fueron obtenidos unos años después, en los cuales se encontró una menor actividad GS en las regiones del cerebro de pacientes con Alzheimer que manifestaban los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad (ej: depósitos de placas seniles) respecto a cerebros control [88]. Además, Le Prince y colegas observaron que los niveles de GS en cerebros humanos *post mortem* afectados por Alzheimer presentaban una disminución a medida que ocurría un incremento en el número de placas seniles y depósitos de péptido βA4 en dichas muestras, sin verse afectados los niveles de ARNm de la proteína [89]. Estudios de inmunohistoquímica en cerebros humanos también verificaron la disminución de la GS en astrocitos, particularmente en las proximidades de las placas seniles [90,91]. Muchos de estos hallazgos fueron también recapitulados en estudios con modelos animales de la enfermedad de Alzheimer, contribuyendo así a establecer el concepto de que la actividad GS resulta afectada en dicha patología [92-95]. Si bien esto no implica necesariamente un rol de la pérdida de actividad GS en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, existe evidencia de que la disrupción del ciclo glutamato-glutamina en modelos animales, causada por la inhibición farmacológica de la GS, puede causar alteraciones en el comportamiento, estado de ánimo y memoria temporal, perturbaciones en los patrones de sueño, amnesia, confusión y reducción de la conciencia, cambios típicamente observados en la enfermedad de Alzheimer [90,96-99]. Es posible entonces que los cambios en la actividad GS observados en cerebros de pacientes y el impacto resultante en la neurotransmisión glutamatérgica se relacione estrechamente con estas manifestaciones propias de la enfermedad.

En algunos de los trabajos con cerebros de pacientes fallecidos con Alzheimer se observó, junto las alteraciones en la GS, un incremento en el grado de oxidación de proteínas en las mismas regiones del tejido [87,88]. Esto llevó a que se planteara la hipótesis de que el daño oxidativo, consecuencia de la producción aumentada de oxidantes en el contexto de la enfermedad, causaría la pérdida de función GS observada,

capaz de impactar posteriormente el correcto funcionamiento de la sinapsis glutamatergica y contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. En las secciones posteriores se hará un repaso más en detalle de la evidencia existente *in vitro* e *in vivo* de modificación oxidativa de la GS y las principales hipótesis de cómo esto se relaciona con la pérdida de actividad enzimática.

2.5. Especies reactivas del oxígeno en sistemas biológicos

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) son moléculas reactivas derivadas del oxígeno molecular (O₂) que se forman como un subproducto natural del metabolismo aerobio. El término ROS engloba un amplio rango de especies químicas con diferentes propiedades y reactividades, que pueden ser de naturaleza radicalar o no radicalar y que tienen en común el hecho de presentar una mayor reactividad que el O₂ (Tabla 2.1). Está ampliamente aceptado hoy en día el rol fisiológico de estas ROS, no solo en estados patológicos sino también en la homeostasis celular. Si bien bajo condiciones normales la concentración de estas especies se encuentra estrechamente controlada y mantenida en niveles en los que pueden actuar como moléculas señalizadoras, bajo ciertas condiciones fisiopatológicas puede ocurrir una producción excesiva de las mismas y resultar en el daño de diversas biomoléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [100,101].

2.5.1. Origen de las ROS: generación de superóxido (O₂^{•-})

La producción de ROS a nivel fisiológico tiene como punto de partida la formación del radical anión superóxido (O₂^{•-}), la cual ocurre a través de la reducción monolectrónica del O₂. En condiciones basales, esto puede suceder a través de diversas rutas, siendo las más relevantes la cadena transportadora de electrones mitocondrial (complejos I y III) y las enzimas NADPH oxidasa (NOX) y xantina oxidasa. En comparación con otros radicales biológicos, es una especie poco reactiva, capaz de actuar tanto como un agente reductor o como un agente oxidante. Al ser una especie cargada en condiciones fisiológicas (pK_a = 4,8), no puede atravesar libremente las membranas biológicas, aunque puede hacerlo a través de canales aniónicos. A nivel celular, el destino del O₂^{•-} está determinado principalmente por la actividad de las enzimas superóxido dismutasas (SODs), que catalizan la dismutación del O₂^{•-} en O₂ y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Ec. 6).



Si bien la dismutación del O₂^{•-} puede ocurrir espontáneamente en medio acuoso ($k \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), la acción de las SODs acelera notablemente la reacción ($k = 1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [102]. La principal reacción alternativa que compite con la dismutación es la reacción del O₂^{•-} con el radical óxido nítrico ([•]NO), la cual tiene una constante de velocidad aún mayor ($k \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que la catalizada por la SOD, y da lugar a la formación del anión peroxinitrito (ONOO⁻) (Ec. 7). El grado de consumo de O₂^{•-} por esta vía dependerá del tejido y la situación considerada, lo cual determinará la disponibilidad de [•]NO para reaccionar [103].



Tabla 2.1. Resumen de las principales especies oxidantes presentes en sistemas biológicos y aspectos más relevantes de su reactividad.

ROS	Fórmula química	Reactividad
Radical anión superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Reactividad selectiva, no ataca a la mayoría de las moléculas biológicas Puede reducir metales de transición (Fe^{3+} , Cu^{2+}) Reacciona muy rápidamente con el óxido nítrico ($k_2 > 10^9 M^{-1}s^{-1}$) para dar peroxinitrito ($O_2^{\cdot-} + \cdot NO \rightarrow ONOO^-$) y con otros radicales para formar hidroperóxidos ($O_2^{\cdot-} + R^{\cdot} + H^+ \rightarrow ROOH$) Puede dañar ciertas enzimas que contienen centros Fe-S
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	No reactivo con la mayoría de las biomoléculas Reacciona lentamente con la mayoría de los tioles (ej: $k \approx 1 M^{-1}s^{-1}$ para el GSH) pero más rápidamente con ciertos residuos de Cys proteicos, particularmente con aquellos de bajo pK_a Reacciona con ciertos metales de transición para producir $\cdot OH$ Los blancos principales en medios biológicos son grupos hemo, tioles y enzimas peroxidadas Reacciona con CO_2 para formar peroximonocarbonato (HCO_4^-), de mayor reactividad
Radical hidroxilo	$\cdot OH$	Reacciona de manera indiscriminada; reacciona con lo que se encuentre de manera adyacente a él a velocidades casi controladas por difusión
Peroxinitrito (la mezcla fisiológica de peroxinitrito, $ONOO^-$ y su forma protonada más reactiva, el ácido peroxinitroso, $ONOOH$; pK_a 6.8)	$ONOO^-/ONOOH$	Reacciona directamente con tioles y metales de transición con constantes de hasta $10^7 M^{-1}s^{-1}$; reacciona con CO_2 para formar nitrosoperoxycarbonato ($ONOOCO_2^-$) Puede oxidar directamente varias biomoléculas más o generar $\cdot OH$ y $\cdot NO_2$ a través de su homólisis ($ONOOH \rightarrow \cdot NO_2 + \cdot OH$), aunque una reacción más prominente es su isomerización a NO_3^- ($ONOOH \rightarrow NO_3^- + H^+$) La reacción con CO_2 también puede dar lugar a radicales oxidantes ($ONOO^- + CO_2 \rightarrow ONOOCO_2^- \rightarrow 35\% (CO_3^{\cdot-} + \cdot NO_2) + 65\% (CO_2 + NO_3^-)$)
Radical anión carbonato	$CO_3^{\cdot-}$	Formado mediante la reacción del CO_2 con peroxinitrito y por la reacción de HCO_3^- con $\cdot OH$ Moderadamente reactivo, puede oxidar la guanina en el ADN, cisteína, tirosina y triptófano
Ácidos hipohalosos (ácido hipocloroso, hipobromoso)	$HOCl$ $HOBr$	Oxidantes fuertes, reacciona principalmente con tioles y metioninas Las reacciones con aminas generan cloraminas/bromaminas secundarias, las cuales retienen una menor (aunque todavía considerable) capacidad oxidante Reaccionan rápido con tiocianato (SCN^-), presente en altos niveles en muchos fluidos corporales, para generar HOSCN, menos reactivo y altamente específico para tioles
Oxígeno singulete	1O_2	Estado del O_2 con una configuración electrónica singulete que posee una reactividad mucho mayor que el estado basal del O_2 triplete. Puede formarse por reacciones de fotosensibilización en las cuales moléculas como las porfirinas, riboflavina, bilirrubina y clorofila absorben luz y transfieren esta energía al O_2 ; también puede formarse mediante reacciones químicas de radicales peróxido y $HOCl$
Radical dióxido de nitrógeno	$\cdot NO_2$	Un importante contaminante atmosférico, se genera también a partir del peroxinitrito y la oxidación del nitrito (NO_2^-) por enzimas peroxidadas Oxida rápidamente compuestos ricos en electrones (ej: ascorbato y tioles) Experimenta reacciones de adición con radicales derivados de tirosina, triptófano, lípidos y bases del ADN para generar productos nitrados (ej: 3-nitrotirosina, nitrotriptófanos, nitrolípidos y bases nitradas del ADN) Algunos productos nitrados tienen funciones señalizadoras

Existen otras reacciones directas entre el $O_2^{\cdot-}$ y distintos blancos celulares, que son capaces de dañar ciertas biomoléculas; se destaca dentro de estas la reacción con los centro ferrosulfurados de enzimas deshidratasa, como la aconitasa, capaz de causar su inactivación. A pesar del daño que puede ocasionar mediante estas reacciones, el principal

potencial citotóxico del $O_2^{\cdot-}$ yace en su capacidad de dar lugar a otros oxidantes más potentes, como el H_2O_2 y el $ONOO^-$ [104].

2.5.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y especies derivadas

De naturaleza no radicalar y neutro, el H_2O_2 es un agente oxidante débil de gran relevancia biológica que es capaz de difundir a través de las membranas celulares [105]. A nivel celular, participa en diversas reacciones de oxidación, siendo la más relevante de éstas la oxidación de los grupos sulfhidrilo o tioles (-SH), tanto de bajo peso molecular como proteicos, a su respectivo grupo sulfénico (-SOH), capaz de evolucionar rápidamente a un enlace disulfuro (-S-S-) en presencia de más grupos -SH [106]. Si bien este tipo de reacciones suele asociarse al daño oxidativo de proteínas, a bajos niveles, el H_2O_2 podría actuar como un agente señalizador en vías de transducción de señales a través de la oxidación de grupos -SH de ciertas proteínas blanco [107].

Los metales de transición, como el hierro (Fe) y el Mn, en distintos estados de oxidación, son otro de los blancos principales del H_2O_2 . Estas reacciones, además de poder tener un impacto en la función de metaloproteínas, tienen la capacidad de generar especies oxidantes secundarias de mayor reactividad. Por ejemplo, el H_2O_2 puede oxidar directamente por dos electrones al hierro férrico (Fe^{3+}) de grupos hemo de hemoproteínas, formando un intermediario oxo-ferrilo ($Fe^{4+}=O$) y un catión radical centrado en la porfirina, altamente reactivos (Ec. 8) [103].



Los intermediarios $O=Fe^{4+}P^{\cdot+}$ (como el llamado compuesto I de las peroxidasas) y sus derivados reducidos por un electrón ($O=Fe^{4+}$, análogamente llamados compuesto II) constituyen especies altamente reactivas, capaces de oxidar por reacciones de un electrón una gran variedad de sustratos (ej: ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos) que no pueden ser modificados directamente por el H_2O_2 [108,109]. Además, cuando estos intermediarios son generados en ciertas enzimas peroxidasas propias de las células del sistema inmune (ej: mieloperoxidasa), pueden llevar a la formación de oxidantes por dos electrones secundarios, como el ácido hipocloroso (HOCl), que resulta de la oxidación del Cl^- y posee una reactividad considerablemente más elevada que la del H_2O_2 [110,111].

Por otra parte, con metales reducidos como el hierro ferroso (Fe^{2+}), el H_2O_2 puede actuar como un oxidante por un electrón, descomponiéndose así en un ion hidroxilo (OH^-) y un radical hidroxilo ($\cdot OH$), en una reacción conocida como reacción de Fenton (Ec. 9) [103].



El $\cdot OH$ generado mediante esta reacción es una especie extremadamente reactiva; se trata de la molécula más oxidante presente en sistemas biológicos, capaz de reaccionar con un gran número de biomoléculas con constantes de velocidad en el orden de 10^9 - $10^{10} M^{-1}s^{-1}$, lo que constituye esencialmente una reactividad limitada por difusión. Puede de este modo oxidar al ADN, lípidos y proteínas, tanto a nivel del esqueleto polipeptídico como de las cadenas laterales de los aminoácidos [112-114].

Para protegerse de la toxicidad potencial del H_2O_2 , las células cuentan con numerosos sistemas antioxidantes encargados de descomponerlo, entre los que se

destacan la catalasa, las peroxirredoxinas (Prx) y las glutatión peroxidasa (GPx). Mientras que las catalasas catalizan la descomposición de dos moléculas de H₂O₂ a H₂O y O₂ sin necesidad de otros sustratos, las Prx y GPx reducen una molécula H₂O₂ a H₂O, quedando en un estado oxidado y precisando de otros sustratos para reducirse a su estado inicial [115].

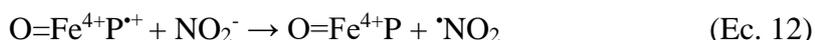
2.5.3. Óxido nítrico (*NO) y oxidantes derivados

El radical *NO es un mensajero intracelular presente en los organismos vertebrados que participa en diversos procesos fisiológicos, como la modulación del flujo sanguíneo, la agregación plaquetaria, la actividad neuronal y la defensa del huésped frente a patógenos [116]. Es sintetizado en diversas células y tejidos por tres isoformas de las óxido nítrico sintasas (NOS): la NOS neuronal (nNOS), la NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible (iNOS). Estas tres isoformas catalizan la producción de *NO y L-citrulina a partir de Arg y O₂, utilizando NADPH como agente reductor. Los principales efectos señalizadores del *NO se logran a través de la producción de GMP cíclico (cGMP) por parte de la guanilato ciclasa, enzima que se activa tras la unión del *NO al grupo hemo [117]. A pesar de mediar numerosos procesos fisiológicos, el *NO puede actuar también como molécula citotóxica y mediador patogénico cuando es producido en cantidades elevadas. Se ha relacionado al *NO con diversos estados patológicos, como artritis, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares e infarto de miocardio, entre otras. Si bien es una especie radicalar, no es en sí mismo una especie de elevada reactividad; más allá de que es capaz de reaccionar directamente con ciertos blancos intracelulares (ej: metales de transición de metaloproteínas o radicales lipídicos o proteicos), el principal potencial citotóxico del *NO yace en su capacidad de dar lugar a especies considerablemente más reactivas durante su oxidación, como el radical dióxido de nitrógeno (*NO₂) y el ONOO⁻ (Ec. 7), elementos clave para explicar el rol del *NO en procesos patogénicos [103,116,118-120].

La autooxidación del *NO en presencia de O₂, que en última instancia termina produciendo NO₂⁻, es una vía que puede derivar en la formación de *NO₂ (Ecs. 10-12). No obstante, la relevancia biológica de estas reacciones estaría limitada a condiciones de producción excesiva de *NO [121,122].



El NO₂⁻ generado como producto de decaimiento del *NO podría eventualmente convertirse en *NO₂ también, particularmente a través de su oxidación por un electrón mediada por los estados oxidados de ciertas hemoperoxidasas (Ecs. 13-14) [123].

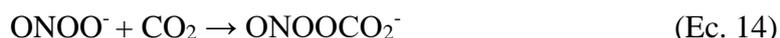


A diferencia del *NO, el *NO₂ es una especie capaz de participar en una gran variedad de reacciones, que incluyen la recombinación con otras especies radicalares, la adición a dobles enlaces, la transferencia electrónica y la abstracción de átomos de hidrógeno de

enlaces carbono-hidrógeno de compuestos insaturados, fenoles y -SH. Las reacciones del $\cdot\text{NO}_2$ con radicales lipídicos y proteicos son particularmente relevantes dado que llevan a la formación de lípidos y proteínas nitradas [121].

2.5.4. Aspectos bioquímicos del peroxinitrito (ONOO^-)

El ONOO^- es un oxidante fuerte de corta vida que se genera *in vivo* por la reacción controlada por difusión entre los radicales $\cdot\text{NO}$ y O_2^- [124,125]. En condiciones fisiológicas, el ONOO^- se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso (ONOOH ; $\text{pK}_a = 6,8$); ambas especies pueden participar en diversas reacciones de oxidación por uno o dos electrones con biomoléculas, como ciertos aminoácidos o metales de transición de metaloproteínas [126-128]. Además, a través de múltiples vías, el ONOO^- lleva a la formación de radicales oxidantes secundarios, capaces de mediar la oxidación y nitración de un gran número de biomoléculas por reacciones de un electrón, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, ampliando notablemente la capacidad oxidante y citotóxica del ONOO^- [129-135]. Una de las vías principales en que esto sucede es a través de la reacción del ONOO^- con CO_2 , uno de sus principales blancos a nivel fisiológico (Ec. 14). Esta reacción genera el aducto nitrosoperoxicarboxilato (ONOOCO_2^-), que decae espontáneamente a NO_3^- y CO_2 con la producción de radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y $\cdot\text{NO}_2$ con un rendimiento de aproximadamente 35% [136,137].



La reacción del ONOO^- con diversos centros metálicos de transición también lleva a la generación de especies oxidantes fuertes por un electrón, que incluyen los intermediarios oxo-ferrilo ya mencionados ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}\text{P}^{\cdot+}/\text{O}=\text{Fe}^{4+}\text{P}$) y $\cdot\text{NO}_2$ [138-141]. En última instancia, la producción de radicales a partir del ONOO^- puede ocurrir durante su decaimiento; el ONOOH es capaz de experimentar la ruptura homolítica del enlace O-O (homólisis catalizada por H^+ del ONOO^-) generando con un rendimiento no mayor al 30% $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$, decayendo el resto a NO_3^- . Sin embargo, esta reacción es lenta ($k = 0,9 \text{ s}^{-1}$ a 37°C y $\text{pH } 7,4$) en comparación con las reacciones directas del ONOO^- con otros blancos presentes en sistemas biológicos, por lo que constituye un componente menos relevante de la reactividad *in vivo* del ONOO^- [122,126,142].

Los grupos -SH, tanto de bajo peso molecular como proteicos, son uno de los blancos principales del ONOO^- en condiciones biológicas, debido a que la reacción entre el ONOOH y los tiolatos ($-\text{S}^-$) puede ser particularmente rápida (ej: peroxirredoxinas) y a la existencia de altas concentraciones de estos grupos a nivel celular [126]. Esta reacción implica un ataque nucleofílico del $-\text{S}^-$ sobre el ONOOH , que deriva en la reducción de este último por dos electrones a NO_2^- y transformando al -SH en su respectivo -SOH. Considerando la cisteína (Cys), la reacción entre el ONOO^- y los grupos -SH es aproximadamente 3 órdenes de magnitud más rápida que la del H_2O_2 , algo que se cumple para la mayoría de los -SH, salvo para aquellos de enzimas especializadas en la reducción del H_2O_2 . A diferencia de las anteriores vías mencionadas, la descomposición del ONOO^- por reacción con grupos -SH no genera especies oxidantes secundarias, por lo que estas reacciones representan la mejor estrategia a nivel celular para evitar los efectos citotóxicos de este oxidante. En ese sentido, las Prx constituyen uno de los principales sistemas antioxidantes capaces de detoxificar catalíticamente el ONOO^- debido a su alta concentración, las elevadas constantes de reacción y la amplia distribución en los distintos

compartimientos celulares [143]. No obstante, cuando el ONOO^- media la oxidación de residuos de Cys críticos de ciertas proteínas, puede llevar a efectos deletéreos en la función de las mismas (como se discutirá más adelante), por lo que estas reacciones también pueden tener una contribución importante a los efectos tóxicos del ONOO^- . La Figura 2.10 esquematiza las principales vías de reacción del ONOO^- en sistemas biológicos.

La Figura 2.11 resume algunas de las vías de formación de los oxidantes biológicos mencionados en los párrafos anteriores.

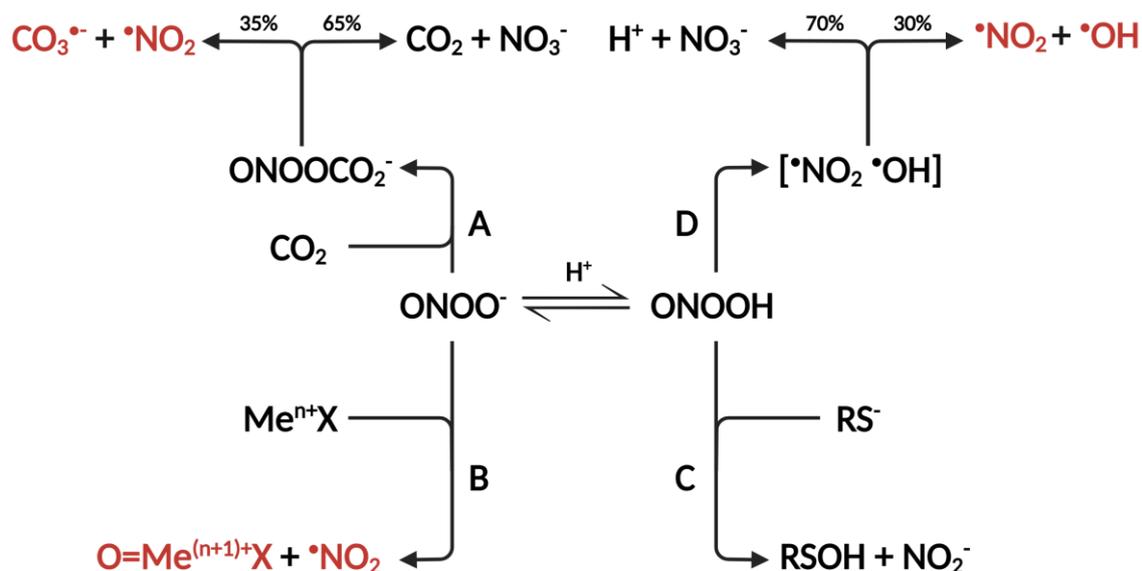


Figura 2.10. Principales destinos del peroxinitrito en sistemas biológicos. El anión ONOO^- y su forma ácida, el ONOOH ($\text{pK}_a = 6,8$), coexisten a valores de pH fisiológico y pueden experimentar reacciones directas con diversos blancos. La reacción del ONOO^- con CO_2 (A) genera el aducto ONOOCO_2^- , el cual puede homolizarse con hasta un 35% de rendimiento a $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3^{\cdot-}$, decayendo el resto a CO_2 y NO_3^- . Una variedad de centros metálicos de transición (Me^{n+}X) pueden reducir al ONOO^- por un electrón (B), generando $\cdot\text{NO}_2$ y un intermediario oxo-ferrilo ($\text{O}=\text{Me}^{(n+1)+}\text{X}$). Alternativamente, otros metales de transición pueden reducir al $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ por dos electrones produciendo NO_2^- y $\text{O}=\text{Me}^{(n+2)+}\text{X}$ (no mostrado). Los grupos sulfhidrilo en su forma aniónica (RS^-) pueden reducir por dos electrones al ONOOH a NO_2^- (C), oxidándose a su respectivo ácido sulfénico (RSOH). Finalmente, el ONOOH puede decaer por homólisis (D) a $\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$ con rendimientos máximos de 30%, convirtiéndose el resto en NO_3^- . Las especies indicadas en rojo corresponden a los oxidantes por un electrón fuertes derivados de las vías A, B y D, que son responsables de gran parte del daño oxidativo asociado al ONOO^- .

2.6. Modificaciones oxidativas postraduccionales de proteínas

En los organismos vivos, el daño por los distintos oxidantes biológicos de formación endógena o exógena alcanza a todos sus componentes: ácidos nucleicos (ADN, ARN), lípidos, proteínas, carbohidratos y especies de bajo peso molecular. Las proteínas, principales componentes de la mayoría de los sistemas biológicos (~70% de la masa seca de células y tejidos), representan el principal blanco de las especies oxidantes ya que además de su elevada concentración (1-3 mM en plasma, 5-10 mM en células) poseen altas constantes de velocidad para la reacción con los distintos oxidantes. Un gran número

de oxidantes por un electrón (ej: $\cdot\text{OH}$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\cdot\text{NO}_2$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{R}\cdot$, etc.) y por dos electrones (ej: H_2O_2 , ONOO^- , HOCl , ROOH , etc.), así como también los complejos oxo-metálicos, pueden modificar las proteínas de manera diversa. Inclusive, ciertos productos de oxidación secundarios (como aldehídos y quinonas) pueden promover modificaciones adicionales. En conjunto, todas estas especies pueden generar una gran variedad de modificaciones postraduccionales capaces de alterar la composición, estructura, carga, hidrofobicidad/hidrofilicidad, plegamiento y función de aminoácidos y proteínas [111,144,145].

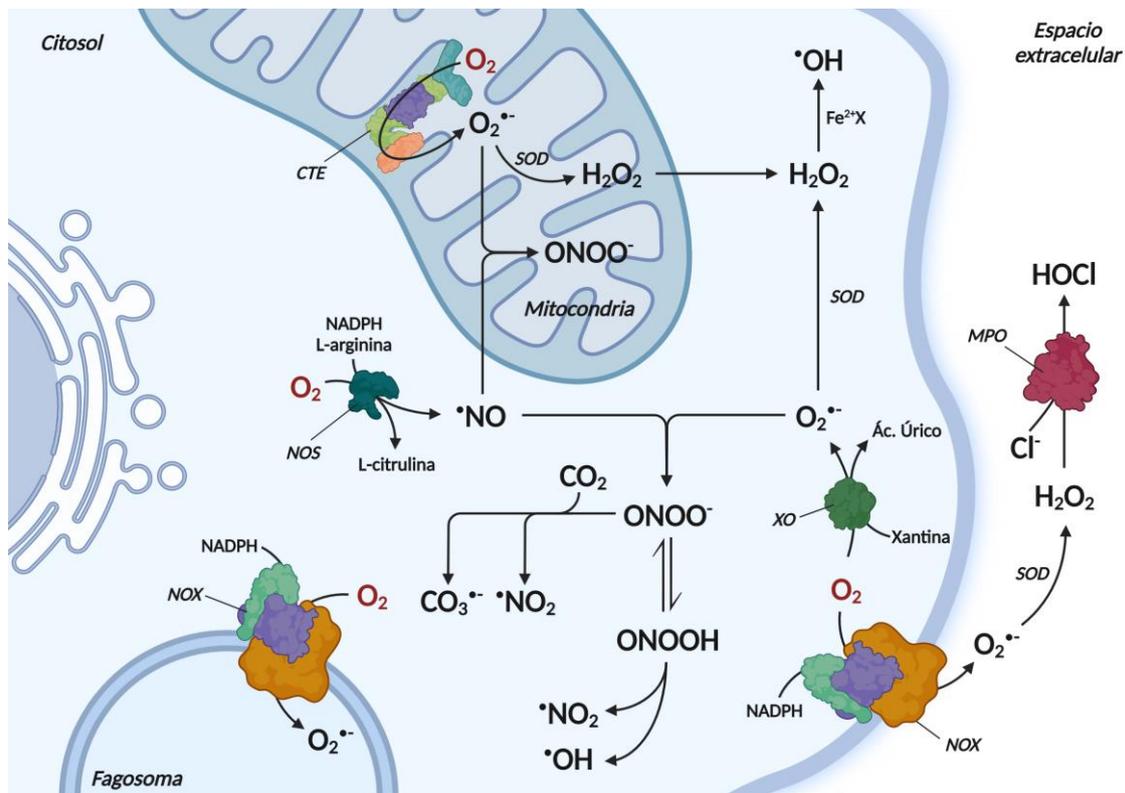


Figura 2.11. Principales vías de formación de especies oxidantes en sistemas biológicos. La formación de ROS en sistemas biológicos suele iniciarse a partir de la reducción monoelectrónica del O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$, el cual luego podrá participar en la formación de una serie de oxidantes de mayor reactividad. Alternativamente, la producción de $\cdot\text{NO}$ por las NOS, que utilizan O_2 , amplía las especies oxidantes que se pueden generar a partir del $\text{O}_2^{\cdot-}$. CTE: cadena transportadora de electrones; SOD: superóxido dismutasa; NOS: óxido nítrico sintasa; NOX: complejo de la NADPH oxidasa; XO: xantina oxidasa; MPO: mieloperoxidasa. Imagen creada con BioRender.com.

2.6.1. Aspectos generales de la modificación oxidativa de proteínas

Si bien las cadenas laterales de los aminoácidos son el principal blanco de las especies oxidantes, el esqueleto polipeptídico puede también ser atacado por ciertas especies radicalares. Debido a que en general son más reactivos, los oxidantes por un electrón suelen ser capaces de producir un mayor número de modificaciones oxidativas distintas sobre un mayor número de residuos aminoacídicos que los oxidantes por dos electrones. La mayoría de las reacciones de radicales con las proteínas pueden ocurrir a través de tres vías: (i) abstracciones de átomos de H de enlaces C-H, S-H, O-H, o N-H; (ii) abstracción de electrones de sitios ricos en electrones; y (iii) adición a centros ricos en electrones (anillos aromáticos y especies sulfuradas) [146]. Las reacciones de la vía (i)

generan radicales centrados en átomos de carbono (R^{\bullet}), de azufre (RS^{\bullet} , como el radical cisteinilo), de nitrógeno (principalmente radicales derivados del Trp) y de oxígeno (mayormente radicales fenoxilo derivados de la Tyr). La mayoría de los radicales R^{\bullet} , inclusive los generados por la oxidación de las cadenas laterales alifáticas, pueden reaccionar con O_2 a velocidades prácticamente controladas por difusión ($k \sim 10^9 M^{-1}s^{-1}$) para dar lugar a radicales peroxilo (ROO^{\bullet}). Alternativamente, y cuando las concentraciones de R^{\bullet} son lo suficientemente elevadas, su recombinación puede originar la formación de entrecruzamientos covalentes (R-R). Por su parte, los radicales aminoacídicos centrados en S, O y N reaccionan con el O_2 mucho más lentamente, lo que favorece que los mismos puedan formar entrecruzamientos [111,145].

Los radicales altamente reactivos, como el $^{\bullet}OH$, reaccionan con una selectividad muy baja [147,148], mientras que los menos reactivos pueden presentar una selectividad notoria. Como la mayoría de los radicales de relevancia biológica son electrofílicos, reaccionan preferencialmente con sitios ricos en electrones, lo que resulta en el daño sobre un conjunto específico de cadenas laterales de aminoácidos. Estos incluyen los aminoácidos sulfurados Cys, metionina (Met), y cistina (Cys-Cys), los residuos aromáticos Trp, Tyr y Phe y la His. La especie oxidante considerada y el entorno particular de cada aminoácido (lo cual afecta su ionización), entre otros factores, determinarán cual tipo de reacción será más favorable que ocurra (ej: abstracción de átomo de H o adición), lo cual dictará también los productos finales que puedan formarse [111,145]. La Figura 2.12 muestra la estructura química de algunos de los productos de oxidación de cadenas laterales de aminoácidos más comunes.

Los oxidantes por dos electrones (no radicalares) presentan generalmente una selectividad mucho mayor que la mayoría de los radicales, debido a la existencia de barreras energéticas mayores para muchas de estas reacciones. Por ejemplo, el $ONOO^-$ es capaz de oxidar directamente por dos electrones las cadenas laterales de residuos de Cys, Met y Trp, generando distintos productos oxigenados [122,145,149,150]. Por su parte, el HOCl reacciona principalmente con aminoácidos sulfurados generando una mezcla de especies, aunque también es capaz de hacerlo a menores velocidades con nucleófilos nitrogenados (His, grupo α -amino y Lys), Trp y Tyr. Finalmente, como ya se comentó, el H_2O_2 , al igual que otros peróxidos orgánicos, presentan una baja reactividad, siendo selectivos para la oxidación generalmente a bajas velocidades de residuos de Cys y en menor medida de Met [145,151]. En la Tabla 2.1 fueron presentados algunos de los principales aspectos referentes a la selectividad de los principales oxidantes biológicos respecto a la modificación oxidativa de proteínas.

Las especies radicalares lo suficientemente oxidantes, como el $^{\bullet}OH$ y el radical alcóxilo (RO^{\bullet}), pueden dañar también el esqueleto polipeptídico de las proteínas, principalmente a través de la abstracción de átomo de H del carbono α . Las reacciones subsiguientes del radical R^{\bullet} formado inicialmente en este proceso puede resultar en la fragmentación del esqueleto principal del polipéptido [146,152,153].

Como se mencionó, el O_2 puede participar activamente durante el proceso de oxidación de proteínas, al ser capaz de reaccionar con distintos radicales proteicos, en particular los centrados en carbono, llevando a la formación de ROO^{\bullet} . Cuando estos radicales son generados en cadenas laterales alifáticas, su capacidad oxidante les permite

2.6.2. Factores que afectan la selectividad de los oxidantes

Múltiples factores influyen sobre el grado de daño que un oxidante puede ocasionar, incluyendo la accesibilidad del oxidante al residuo blanco (ej: los residuos de Trp suelen estar enterrados dentro de la estructura de las proteínas, con baja accesibilidad al solvente) y las interacciones electrostáticas con residuos de la superficie. Debido a esto, las especies neutras pueden causar un mayor daño que las cargadas, incluso en sitios lejanos de su lugar de formación. Además, las especies neutras suelen ser mejores electrófilos y proveer mejores grupos salientes, como ocurre para los pares ácido base ONOOH/ONOO⁻ y HOCl/OCl. La ionización de las cadenas laterales cuando ceden un H⁺ incrementa su densidad electrónica, lo que aumenta su capacidad para actuar como nucleófilos y favorece su oxidación; las cadenas laterales de Cys y Tyr son un claro ejemplo de esto, al ser más reactivas en sus formas -S⁻ y tirosinato (TyrO⁻) [122,145].

Los residuos fácilmente oxidables, como Tyr, Cys y Trp, pueden experimentar reacciones de transferencia electrónica de largo alcance y de este modo funcionar como sumideros de radicales dentro y entre proteínas [155,156]. Así, la oxidación inicial en un sitio de la proteína puede ser rápidamente transferida a otro residuo ubicado a una distancia considerable. Dado que los residuos de Tyr y Trp tienen similares potenciales de reducción por un electrón, la formación de un radical en un residuo puede resultar en un equilibrio entre ambos residuos. Como consecuencia, las reacciones de terminación de los radicales (ej: dimerización de dos radicales en Tyr, Trp o su recombinación con [•]NO₂ para dar productos nitrados) pueden ocurrir a través del radical más accesible o reactivo y no en el sitio inicial de formación [145].

2.6.3. Nitración de residuos de tirosina a 3-nitrotirosina

Una de las modificaciones oxidativas de proteínas más estudiada, y que ha despertado gran interés tras la identificación de la formación de [•]NO y ONOO⁻ en sistemas biológicos a finales del siglo XX, es la nitración de residuos de Tyr a 3-nitrotirosina (NO₂Tyr). Esta modificación implica la sustitución de un H por un grupo nitro (-NO₂) en uno de los carbonos en posición *orto* respecto al grupo -OH del anillo fenólico de la Tyr, y ha sido ampliamente asociada a procesos patológicos tanto agudos como crónicos [157]. En sistemas biológicos, ocurre a través de reacciones radicalares en un proceso en dos pasos: en primer lugar, el anillo fenólico de la Tyr es oxidado por un electrón a su respectivo radical tirosilo (Tyr[•]), y a continuación, ocurre la adición del radical [•]NO₂ al Tyr[•] formando así el producto no radicalar NO₂Tyr [122,141]. Varias de las especies radicalares mencionadas anteriormente son capaces de generar Tyr[•]: [•]OH [158], CO₃^{•-} [159], [•]NO₂ [160], O=Me⁽ⁿ⁺¹⁾⁺X [109], ROO[•] [161]; debido a que el ONOO⁻ puede dar lugar a la formación de varios de ellos, al tiempo que también genera [•]NO₂, representa el principal agente nitrante *in vivo*. Los mecanismos radicalares que llevan a la formación de NO₂Tyr pueden además dar lugar a productos de oxidación secundarios, siendo los más relevantes la 3,3'-ditirosina (DiTyr), formada por la recombinación de dos Tyr[•], y la 3-hidroxitirosina (DOPA), que se forma principalmente como consecuencia de la adición inicial del [•]OH sobre la Tyr. La Figura 2.13 esquematiza los mecanismos que llevan a la formación de NO₂Tyr en condiciones biológicas.

La incorporación de un grupo -NO₂ en el carbono 3 del anillo fenólico de la Tyr produce ciertos cambios en las propiedades fisicoquímicas del aminoácido, lo cual puede

eventualmente generar un impacto sobre la estructura y/o función de la proteína implicada. Uno de los efectos más notorios de la nitración es un descenso en el valor del pK_a del grupo -OH fenólico de la Tyr de aproximadamente 3 unidades de pH (desde 10-10,3 en la Tyr a 7,2-7,5 en la NO_2 Tyr, puede variar según el entorno en que se encuentren en una proteína). De este modo, mientras que el -OH de la Tyr es neutro a pH fisiológico, cerca de un 50% de estos grupos estarán ionizados (como fenolato, $-O^-$) en la NO_2 Tyr [162-164]. No obstante, cuando se encuentra en su forma protonada, la NO_2 Tyr es más hidrofóbica que la Tyr [165-167]. Entonces, según el entorno, la nitración podrá incrementar la hidrofobicidad del residuo de Tyr, haciéndolo más propenso a moverse hacia regiones más hidrofóbicas de la proteína, o, por el contrario, podrá promover la disociación del -OH fenólico, aumentando la hidrofiliidad del residuo y favoreciendo su exposición al solvente. Así, la nitración puede inducir cambios conformacionales locales en regiones específicas de una proteína [168]. Además, la incorporación de un grupo $-NO_2$ voluminoso en la cadena lateral del residuo de Tyr puede adicionar restricciones estéricas [169,170]. El potencial de reducción estándar para la oxidación por un electrón de la Tyr a Tyr^\bullet también es una propiedad que se ve afectada por la nitración, al volverse unos 200-300 mV más positivo y pudiendo así impedir procesos de transferencia electrónica en proteínas [171]. Estas propiedades particulares determinan que la nitración de residuos de Tyr a NO_2 Tyr en una proteína puede tener ciertas consecuencias funcionales sobre la misma, como se comentará más adelante.

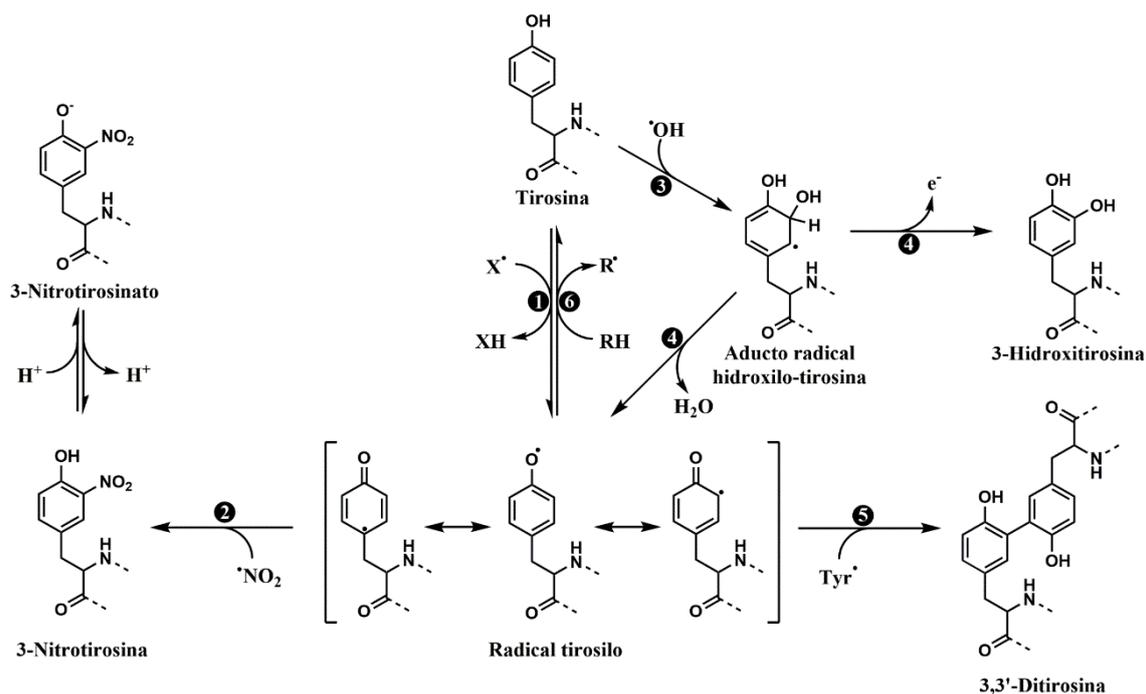


Figura 2.13. Reacciones radicalares implicadas en la oxidación y nitración de tirosina. La tirosina puede ser oxidada por varios oxidantes por un electrón (X^\bullet) a radical tirosilo (1), el cual puede a continuación reaccionar con $\bullet NO_2$ para producir NO_2 Tyr (2). Debido a su menor pK_a , la NO_2 Tyr se disocia parcialmente a su respectivo fenolato a pH fisiológico. Además, el $\bullet OH$ puede adicionarse sobre el anillo fenólico de la tirosina (3), generando un radical hidroxitirosilo que puede deshidratarse a radical tirosilo o perder un electrón para convertirse en el producto estable 3-hidroxitirosina (4). Más allá de reaccionar con $\bullet NO_2$, los radiales tirosilo pueden recombinar entre ellos para formar el producto de oxidación 3,3'-ditirosina (5). Distintos agentes reductores biológicos (RH) pueden reducir a los radicales tirosilo de vuelta a tirosina (6), previniendo de este modo la formación de productos nitrados y oxidados. X^\bullet : $CO_3^{\bullet-}$, $O=Me^{(n+1)+X}$, $\bullet NO_2$, ROO^\bullet , RO^\bullet . **RH**: glutatión (GSH), ácido ascórbico (AscH), ácido úrico (UACh).

2.6.4. Consecuencias biológicas de la modificación oxidativa de proteínas

La oxidación de proteínas genera una alteración en la composición química de la misma que puede tener una serie de consecuencias, como: cambios en su estructura (cambios conformacionales, alteración en el plegamiento, fragmentación, agregación), en su función (en general pérdida, pero ocasionalmente una ganancia de función) o en su recambio (mayor o menor degradación). La acumulación de proteína modificadas oxidativamente se ha asociado directamente al envejecimiento y a distintas patologías, que incluyen enfermedades neurodegenerativas (ej: Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica), sepsis, hipertensión, daño por isquemia-reperfusión, daño renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística y artritis reumatoidea, entre otras. Si bien es probable que en algunos casos esto sea simplemente una asociación (es decir, la oxidación no es causante de la enfermedad sino una consecuencia de otros procesos nocivos), el daño oxidativo sería, en algunos casos, un factor contribuyente [145,172].

La alteración de la función proteica ha sido ampliamente estudiada, existiendo numerosos ejemplos en los cuales la oxidación de aminoácidos críticos del sitio activo deriva en la inactivación de enzimas. Si bien para muchos de estos ejemplos no existe información detallada sobre los mecanismos moleculares que conectan la oxidación con la pérdida de actividad, hay algunos casos específicos donde esta correlación se ha logrado establecer *in vitro*, existiendo además evidencias de su ocurrencia *in vivo*. Un ejemplo es el de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuya actividad se ve notablemente afectada por la oxidación de un residuo de Cys del sitio activo (Cys152 en la GAPDH humana) que participa en la catálisis, algo que se ha probado *in vitro* [173,174] y ha sido observado en muestras biológicas [175-177]. Otro ejemplo es el de la SOD dependiente de manganeso (MnSOD) humana, cuya inactivación por ONOO⁻ ocurre por la nitración de un residuo de Tyr cercano al sitio activo, Tyr34, tanto *in vitro* como *in vivo* [178,179]. Las restricciones estéricas impuestas por el grupo -NO₂, junto con la disociación del grupo -OH a la forma fenolato de la Tyr34 que se ve favorecida por la nitración y genera repulsión electrostática, en conjunto, crean una barrera energética elevada para la entrada del O₂⁻ al sitio activo (Figura 2.14) [180,181]. Si bien, para que esta inactivación por nitración tuviese un impacto biológico sería necesario que una fracción considerable de la MnSOD se hallase modificada en la Tyr34 (más de un 10% como mínimo), existe evidencia de que esto estaría sucediendo en distintos estados patológicos [179,182-184].

Aunque considerablemente menos frecuente, hay ciertos casos en los que la modificación oxidativa de las proteínas conlleva una ganancia de función en lugar de una pérdida. Esto permitiría que una cierta modificación, aunque sea en rendimientos bajos, tenga un efecto biológico significativo. Un ejemplo muy representativo de esto es el caso del citocromo c (Cyt c), que experimenta un incremento de su actividad peroxidasa por modificaciones oxidativas, como la nitración de la Tyr74 [185,186] o la oxidación de la Met80 [187], capaces de desplazar a la Met80 de la sexta posición de coordinación del hemo.

En general, las modificaciones oxidativas de proteínas dan lugar a proteoformas menos termoestables que se caracterizan por la exposición de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie y cambios en el plegamiento. Esto, además de impactar sobre la actividad,

puede conducir a la agregación de las proteínas oxidadas, algo que en el contexto del daño oxidativo también se ve favorecido por la formación de entrecruzamientos covalentes. La agregación inducida por el daño oxidativo es una de las principales áreas de estudio en el campo, debido principalmente a su vínculo con diversas patologías y con el envejecimiento. [172]. Si bien existe una vasta evidencia en la literatura conectando oxidación de proteínas con su agregación, son menos los ejemplos en los cuales se lograron establecer los mecanismos implicados con claridad. Uno de ellos es el de la SOD dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) humana, para la que se demostró que la modificación oxidativa del residuo de Trp32 era capaz de inducir la agregación no-amiloide de la proteína [188]. Similarmente, se observó que la oxidación del residuo de Met46 promovía la agregación de la GAPDH humana al generar perturbaciones en la estructura nativa de la enzima [189]. En otros casos, como el de la proteína supresora de tumores p16^{INK4A}, la modificación oxidativa (en este caso, formación de un dímero disulfuro) ocasiona rearrreglos estructurales drásticos, que derivan en la agregación de la proteína en forma de fibras amiloides [190].

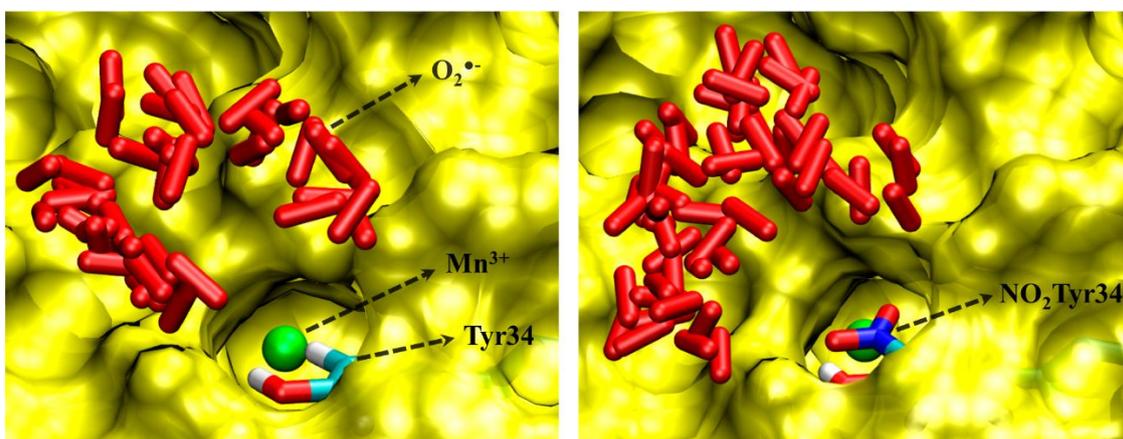


Figura 2.14. Inactivación de la MnSOD por nitración de la tirosina 34. La imagen representa una vista esquemática del canal de acceso del $O_2^{\bullet-}$ al sitio activo de la MnSOD, donde se ubica el átomo de manganeso (Mn^{3+}) y el residuo de tirosina 34 (Tyr34). La superficie de la enzima se muestra en amarillo. En condiciones normales, el $O_2^{\bullet-}$ puede acceder al Mn^{3+} en el sitio activo a través del canal de acceso (*izquierda*). Cuando la Tyr34 se encuentra nitrada a NO_2Tyr34 , el grupo $-NO_2$ bloquea el acceso al canal (*derecha*), al tiempo que también favorece la ionización del $-OH$ fenólico a pH fisiológico (no mostrado). Ambos factores impiden la entrada del $O_2^{\bullet-}$ al sitio activo debido a restricciones estéricas y repulsión electrostática. Imagen adaptada de [122].

Las proteínas oxidadas tienden a acumularse a nivel celular si no logran ser degradadas de manera efectiva; para evitar esto, las células cuentan con sistemas proteolíticos para llevar a cabo la degradación de proteínas modificadas oxidativamente [172]. Desde comienzos de la década de 1980, varios grupos han estudiado la relación entre la oxidación de una proteína y su susceptibilidad a la degradación proteolítica. Para la mayoría de las proteínas, la oxidación suave o moderada estimula la degradación por parte de los sistemas proteolíticos intracelulares, mientras que el daño oxidativo severo tiende a causar una disminución en la susceptibilidad a la proteólisis, debido principalmente a la agregación y los entrecruzamientos [191-194]. Esta degradación selectiva de proteínas oxidadas es llevada a cabo a nivel intracelular principalmente por

el proteasoma 20S, el cual es capaz de detectar modificaciones estructurales en las proteínas oxidadas y promover su degradación [195-199]. Así, los cambios conformacionales que suceden a causa de la oxidación de las proteínas llevan a la exposición de residuos hidrofóbicos, capaces de ser reconocidos por el proteasoma 20S. Tras esto, la proteína podrá ser internalizada y degradada de manera ubiquitina-independiente, evitando la acumulación de productos de oxidación no funcionales y que podrían eventualmente formar agregados proteicos resistentes a la degradación [200]. Además del proteasoma 20S, otro sistema que tendría una relevancia destacada en el control de los niveles de proteínas oxidadas a nivel mitocondrial es la proteasa ATP-dependiente Lon, responsable principal del control de calidad y degradación de las proteínas en la mitocondria [172,201].

La degradación de proteínas modificadas oxidativamente constituye un mecanismo de defensa importante en el control de los niveles de proteínas oxidadas, especialmente para aquellas proteínas que han sufrido modificaciones irreversibles (ej: carbonilos, oxidación de Trp, Tyr, etc.). Sin embargo, gran parte de las modificaciones que experimentan los residuos de Cys y Met, los más susceptibles al daño oxidativo, pueden ser reparadas por sistemas enzimáticos celulares. Puntualmente, la oxidación de Cys a formas -SOH y -S-S- pueden revertirse mediante los sistemas tiorredoxina/tiorredoxina reductasa y glutarredoxina/glutati6n/glutati6n reductasa, a partir del poder reductor del NADPH. Por su parte, las modificaciones de Cys a 6cido sulf6nico pueden ser reparadas mediante la participaci6n tambi6n de las enzimas sulfirredoxinas, enzimas que podr6n tambi6n participar en la reparaci6n de las Cys modificadas por S-nitrosilaci6n. En el caso de la oxidaci6n de Met a su forma sulf6xido, tanto en prote6nas como en forma libre, la acci6n de las metionina sulf6xido reductasas A y B se encarga de revertir la modificaci6n, utilizando tambi6n electrones que provienen del NADPH a trav6s del sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa [172,202].

2.6.5. Inactivaci6n oxidativa de la glutamina sintetasa

Como se mencion6 previamente, en ciertos estudios, se observ6 que la disminuci6n en la actividad GS en pacientes con Alzheimer se acompa1aba de un mayor grado de oxidaci6n de la prote6na, sugiriendo una relaci6n causal entre ambos fen6menos. En ese sentido, diversos trabajos han estudiado la inactivaci6n *in vitro* de la GS de distintos organismos por modificaciones postraduccionales oxidativas, en particular, por nitraci6n de residuos de Tyr. Inicialmente, estudios con la GS de *Escherichia coli* evidenciaron que la nitraci6n de residuos de Tyr por exposici6n de a tetranitrometano se acompa1aba de alteraciones funcionales en la GS [203]; esto mismo fue observado posteriormente luego del tratamiento de la enzima con ONOO⁻ [204]. Estudios con GS de eucariotas, adem6s, demostraron tambi6n que la exposici6n de la GS de mam6fero [205,206] o la isoforma GS1a de planta [40] a ONOO⁻ causaba una p6rdida de actividad enzim6tica junto con la nitraci6n de residuos de Tyr. Puntualmente, para la GS ovina, se identific6 como blanco de nitraci6n al residuo de Tyr336, que participa en la uni6n a ATP/ADP, sugiri6ndose que esto mediaba la inactivaci6n [206]; simulaciones por din6mica molecular apoyaron esta hip6tesis [207]. Para el caso de la GS1a de la planta *Medicago truncatula*, sin embargo, se propuso que la nitraci6n del residuo de Tyr167 (correspondiente a la Tyr171 de la GS humana) era responsable de la inactivaci6n, seg6n resultaba de estudios por mutag6nesis sitio dirigida. Adem6s, otra isoforma del mismo organismo, GS2a, result6

también inactivada por ONOO⁻, pero aparentemente por un mecanismo que implicaba la modificación de residuos de Cys [40]. Sin embargo, en estos trabajos no se evaluó en detalle el proceso de inactivación oxidativa; por ejemplo, no se estudiaron en buena medida otras modificaciones oxidativas típicamente ocasionadas por el ONOO⁻ (ej: oxidación de Cys, formación de DiTyr), así como tampoco se logró un mapeo peptídico por espectrometría de masa (MS) más profundo de los residuos modificados. Teniendo esto en consideración, no puede descartarse la posibilidad de que sean otras las modificaciones que estén detrás de la pérdida de actividad enzimática, algo que resulta por demás necesario de considerar dado que existen reportes de inactivación de la GS por exposición a otros oxidantes que no tienen la capacidad de nitrar [208-211].

Además de estas caracterizaciones parciales realizadas *in vitro*, existen diversos estudios en los que se detectó la modificación oxidativa de la GS en muestras biológicas, siendo frecuentemente la nitración una modificación hallada. A nivel hepático, se logró encontrar a la GS nitrada luego de la administración intraperitoneal de LPS a ratas, condición en la cual se registró también una disminución en su actividad [206]. En un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés), la GS fue identificada nitrada en fracciones insolubles de médula espinal; además, la cantidad de GS presente en estas fracciones era considerablemente mayor para los ratones ALS respecto a los ratones control, lo que podría indicar una predisposición de la GS a agregar en dicho contexto patológico [212]. También se encontró GS nitrada en corteza cerebral de rata luego de la exposición de los animales a condiciones de hipoxia-reoxigenación [213]. Por su parte, en sistemas celulares, se observó que la GS resulta nitrada luego del tratamiento de astrocitos primarios de rata con citoquinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ) [214] o con NH₄⁺ [215], donde su actividad también resultó afectada. Finalmente, numerosos estudios adicionales reportaron la presencia de niveles elevados de GS oxidada (por formación de carbonilos) en pacientes humanos [216] o modelos animales de enfermedad de Alzheimer [217], en cerebros de pacientes con deterioro cognitivo leve [218] e incluso en cerebros de rata a las cuales se les inyectó péptido β -amiloide por vía intracerebral [219]. Esta evidencia indica que en determinadas condiciones fisiopatológicas, típicamente asociadas a estrés oxidativo (inflamación, isquemia-reperfusión, enfermedades neurodegenerativas, etc), la GS, tanto a nivel hepático como del SNC, resulta nitrada y oxidada, lo que mediaría la pérdida de actividad enzimática y podría generar consecuencias como hiperamonemia o excitotoxicidad glutamatérgica.

3. Hipótesis de trabajo

La evidencia existente indica que existe una pérdida de función de la GS en enfermedades neurodegenerativas y durante el envejecimiento; si bien se desconoce las bases moleculares de esta pérdida, se la ha asociado a la elevada producción de oxidantes asociada a estos estados. En ese sentido, nuestra hipótesis de trabajo postula que la modificación oxidativa postraduccional de aminoácidos de la proteína podría ocasionar cambios a nivel de la estructura y función de la proteína, lo que explicaría las observaciones mencionadas. Además, se plantea que esta pérdida de actividad enzimática ocurriría no a través de la modificación de un único residuo crítico, sino a través de la oxidación de varios sitios de la proteína.

4. Objetivos

Objetivo general

Elucidar los mecanismos moleculares de inactivación oxidativa de la glutamina sintetasa humana (HsGS) desde un enfoque bioquímico detallado, incluyendo herramientas analíticas, proteómicas y de biología estructural, a efectos de entender el proceso mediante el cual esta enzima resulta afectada en sistemas biológicos en condiciones de estrés nitro-oxidativo.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar la inactivación oxidativa de la HsGS recombinante por peroxinitrito *in vitro*, analizado desde un punto de vista cuantitativo y semi-cuantitativo los aminoácidos que resultan modificados
- 2) Identificar y analizar la formación de entrecruzamientos covalentes entre subunidades de HsGS como parte del daño oxidativo
- 3) Estudiar los procesos de agregación proteica de la HsGS inducidos por modificaciones oxidativas

5. Materiales y métodos

5.1. Reactivos

Todos los reactivos y soluciones fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (Merck) a menos que se indique lo contrario. El plásmido pNIC28-Bsa4 conteniendo la secuencia correspondiente a los aminoácidos 5-365 de la HsGS y un péptido N-terminal de 22 aminoácidos, conteniendo un tag de 6 His y un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV (ID de la construcción GLULA-c004), fue provisto por el Structural Genomics Consortium (SGC) [49]. Las variantes mutantes Tyr→Phe de la HsGS fueron generados por mutagénesis sitio dirigida a partir del plásmido GLULA-c004 por la empresa de biotecnología GenScript. El ONOO⁻ fue sintetizado a partir de nitrito de sodio (NaNO₂) y H₂O₂ (Mallinckrodt Chemicals) en medio ácido, seguida de la inmediata alcalinización con hidróxido de sodio (NaOH) concentrado, como fue descrito previamente [220,221]. Los stocks de ONOO⁻ fueron almacenados en NaOH concentrado a - 80°C, determinándose su concentración antes de su uso mediante medidas de absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [222].

5.2. Expresión de HsGS

Células BL21 (DE3) star de *Escherichia coli* fueron transformadas con el plásmido pNIC28-Bsa4 a través de la técnica de shock térmico [223,224]. Las células transformadas fueron seleccionadas mediante su cultivo en placas conteniendo medio Luria-Bertani (LB)-agar suplementadas con 50 µg/mL de kanamicina (AppliChem). Luego, se inocularon pre-cultivos de medio LB (25 mL) conteniendo 100 µg/mL de kanamicina con colonias de bacterias transformadas y los mismos fueron incubados overnight a 37°C bajo agitación (220 rpm) en una incubadora MaxQ 6000 (Thermo Scientific). A continuación, los pre-cultivos fueron transferidos a 1 L de medio de cultivo Terrific Broth (TB) conteniendo 100 µg/mL de kanamicina e incubados a 37°C bajo agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 2 (aproximadamente 4 hs). La expresión de la HsGS en dichos cultivos se indujo posteriormente mediante el agregado de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG, bioWORLD) 0,5 mM e incubando overnight a 18°C. Tras esto, las células fueron recolectadas (centrifugación a 4500 g, 15 min) a 4°C y los pellets se resuspendieron en **buffer A**, compuesto por fosfato de sodio (NaPi) 50 mM pH 7,5 conteniendo cloruro de sodio (NaCl) 0,5 M, tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (TCEP) 0,5 mM y glicerol 10% (v/v), suplementado en este caso también con imidazol 10 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las suspensiones celulares así obtenidas fueron luego lisadas por sonicación (Branson Sonifier 450) y clarificadas por centrifugación (40 min, 15000 g, 4°C); los sobrenadantes se recolectaron y fueron empleados para la purificación de la HsGS.

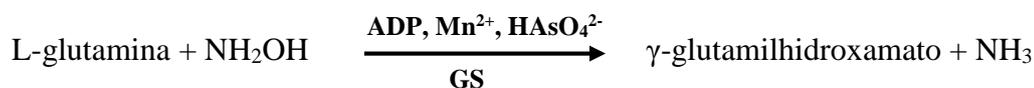
5.3. Purificación de HsGS

Los sobrenadantes de los lisados celulares fueron filtrados (filtros de acetato de celulosa de 0,2 µm) y luego pasados a través de una columna HisTrapTM HP (GE Healthcare) de 5 mL cargada con sulfato de níquel (NiSO₄) previamente equilibrada con buffer A conteniendo imidazol 10 mM. A continuación, la columna fue lavada

sucesivamente con soluciones de buffer A conteniendo: imidazol 10 mM (50 mL), imidazol 25 mM (50 mL), imidazol 50 mM (40 mL) e imidazol 100 mM (25 mL). Durante todo el proceso se colectaron alícuotas (lisado celular, fracción no unida y lavados sucesivos con imidazol) para realizar el seguimiento del proceso de purificación. Finalmente, la HsGS recombinante fue eluida mediante el pasaje por la columna de buffer A conteniendo imidazol 500 mM; durante el proceso de elución, se tomaron alícuotas de 1 mL y la concentración de proteínas de cada una de ellas fue estimada a través de su absorbancia a 280 nm. Aquellas alícuotas con una absorbancia a 280 nm mayor a 0,5 fueron sometidas a un procedimiento de cambio de buffer a una solución de **buffer B** (hepes 30 mM pH 7,5 conteniendo NaCl 0,3 M, TCEP 2 mM y glicerol 10%) utilizando una columna HiTrap™ desalting (GE Healthcare) conectada a un equipo ÄKTA start (Cytiva). Las muestras de HsGS así obtenidas en buffer B fueron concentradas en conjunto utilizando filtros de centrifugación Amicon Ultra (Merck Millipore) con un corte de 100 kDa y por último almacenadas a -80°C en alícuotas de 200 µL (concentración final ~ 10 mg/mL).

5.4. Medidas de actividad HsGS

La actividad GS fue determinada a través del ensayo de la reacción γ -glutamyltransferasa, que se basa en la síntesis de γ -glutamylhidroxamato (GlnNHOH) a partir de Gln e hidroxilamina (NH₂OH) catalizada por la GS en presencia de Mn²⁺, arsenato de sodio (Na₂HAsO₄) y ADP, como se describió previamente [206,225]:

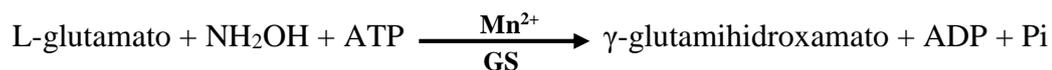


Típicamente, el ensayo fue realizado como sigue: se incubó HsGS (concentración 10 nM de decámero) durante 15 minutos a 37°C con L-glutamina 60 mM, NH₂OH 30 mM, Na₂HAsO₄ 20 mM, ADP 0,4 mM y MnCl₂ 1,5 mM en buffer imidazol 60 mM pH 6,8 (volumen final total de 250 µL). Para facilitar la realización de los ensayos, se prepararon previo a la realización de las reacciones mezclas de los sustratos con una concentración 10/9X de forma de agregar 225 µL de dicha mezcla a cada tubo y completando el restante volumen (25 µL) con la cantidad de enzima a usar y H₂O. La reacción fue terminada mediante el agregado de un volumen equivalente de solución de terminación/revelado, que consistió en cloruro férrico (FeCl₃) 0,37 M y ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M en ácido clorhídrico (HCl) 0,67 M. La cantidad de producto (GlnNHOH) formada fue determinada espectrofotométricamente a 500 nm (absorbancia correspondiente al complejo [Fe³⁺-GlnNHOH]) en un lector de placas de 96 pocillos (Varioskan Flash, Thermo Scientific) y su concentración calculada a través de una curva de calibración elaborada con GlnNHOH puro. Las condiciones ideales para la realización del ensayo descritas (tiempo de incubación, concentración de enzima) fueron puestas a punto mediante la realización de cursos temporales de formación de producto, para garantizar las condiciones de velocidad inicial dado que se trata de un ensayo a punto final.

De manera complementaria, para verificar la identidad y estado de la proteína purificada, se realizaron medidas de la actividad biosintética de la GS (Ec. 2), determinando la cantidad de fosfato inorgánico liberado luego de la incubación de HsGS

con sus sustratos fisiológicos, como fuera reportado previamente [226]. En este caso, se incubaron distintas concentraciones de HsGS (10-200 nM decámero) durante 10-30 minutos a 37°C en un volumen final de 100 µL con L-glutamato 50 mM, cloruro de amonio (NH₄Cl) 40 mM, ATP 10 mM y MnCl₂ 5 mM en buffer imidazol 100 mM pH 6,8. Para finalizar la reacción a los tiempos indicados, se tomaron 50 µL de la mezcla de reacción y se mezclaron con 150 µL de la solución de terminación/revelado (mezcla 1:2 de molibdato de amonio y ácido ascórbico en HCl) en una placa de 96 pocillos. Luego de 5 minutos de incubación para el desarrollo de color en los pocillos, se agregaron 150 µL de una solución de 2% citrato de sodio tribásico y 2% ácido acético para detener el desarrollo de color. Finalmente, luego de dejar equilibrar por 15 minutos, se cuantificó el fosfato liberado por la reacción a través de la detección del complejo fosfomolibdato reducido (azul de molibdeno) generado mediante medidas de absorbancia a 655 nm, utilizando una curva de calibración elaborada con fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄).

Finalmente, para la realización de ciertos controles, la actividad fue determinada por un tercer ensayo que combina ciertas características de los anteriores [227]. Dicho ensayo es una variación de la reacción fisiológica de la GS (Ec. 2) en la cual se sustituye el NH₃ por NH₂OH, lo que lleva a que se genere como producto GlnNHOH, el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 500 nm al formar un complejo de coordinación con Fe³⁺, como se mencionó antes:



En este caso, el ensayo se llevó a cabo incubando HsGS (10-200 nM decámero) por 10-30 minutos a 37°C con Glu 50 mM, NH₂OH 125 mM, 10 mM ATP y 5 mM MnCl₂ en buffer imidazol 100 mM pH 6,8 (volumen final de 250 µL). Luego de transcurrido el tiempo de la reacción, la misma fue terminada utilizando la solución de terminación descrita anteriormente (FeCl₃ 0,37 M y TCA 0,2 M en HCl 0,67 M) y el producto formado fue determinado a 500 nm.

5.5. Exposición de HsGS a ONOO⁻ y otros oxidantes

Antes de realizar las reacciones de oxidación, las alícuotas de HsGS a utilizar (almacenadas en buffer B a -80°C) fueron incubadas con 1,4-ditiotreitol (DTT) 10 mM durante 30 minutos en hielo y luego desaladas a través de una columna HiTrapTM desalting a un buffer fosfato de potasio (KPi) 100 mM pH 7,3 conteniendo cloruro de potasio (KCl) 0,1 M y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 0,1 mM. Este procedimiento permitió reducir eventuales oxidaciones reducibles que se pudieran haber originado durante los pasos previos y obtener la HsGS pura en un buffer adecuado para realizar las reacciones. Luego de realizado el cambio de buffer, la concentración de proteína fue determinada utilizando el ensayo del ácido bicinonínico (BCA, Sigma) [228]. Típicamente, la exposición de la HsGS a ONOO⁻ fue realizada en muestras de 200 µL conteniendo 0,2 mg/mL de HsGS (4,62 µM concentración de monómero) en buffer KPi 100 mM pH 7,3 conteniendo 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA. Diferentes concentraciones de ONOO⁻ fueron agregadas en un volumen de 5 µL a temperatura ambiente (bajo agitación en vórtex) y luego de una incubación de 5 minutos se tomaron alícuotas para llevar a cabo los distintos análisis. Luego de la adición del ONOO⁻, se determinó el pH

de las muestras para verificar que los cambios fueran mínimos ($< 0,1$ unidades de pH). Como un control adicional en estos experimentos, con la finalidad de validar que los efectos observados fueran debidos al ONOO⁻ en sí mismo y no debido a sus productos de descomposición (principalmente NO₃⁻) o cantidades remanentes de los precursores de su síntesis (NO₂⁻ y H₂O₂) se realizó la adición reversa (AR) del ONOO⁻. Este control se llevó adelante permitiendo que el ONOO⁻ se descomponga en buffer KPi previo al agregado de la HsGS a las muestras de reacción (es decir, se prepararon los tubos agregando el buffer, luego el ONOO⁻ y tras incubarlo 5 minutos a temperatura ambiente, se agregó la proteína). En algunos experimentos, con la finalidad de inhibir las reacciones de oxidación por especies radicalares, se agregó desferrioxamina (DF) 1 mM a las muestras de reacción previo al agregado del ONOO⁻. Para evaluar el efecto del CO₂ en las reacciones de oxidación mediadas por ONOO⁻, las reacciones fueron realizadas como se describió previamente, pero en buffer KPi 100 mM pH 7,3 conteniendo 0,1 M KCl, 0,1 mM DTPA y 25 mM bicarbonato de sodio (NaHCO₃). Para estudiar la dependencia de las reacciones con el pH, la HsGS fue desalada previo a realizar las reacciones a 0,1 M KCl y luego expuesta a 500 μM ONOO⁻ en buffers KPi 100 mM de valores de pH en el rango 6,1-8,3 conteniendo 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA.

La oxidación de la proteína por H₂O₂ se realizó incubando HsGS a concentración 0,2 mg/mL con distintas concentraciones de H₂O₂ en buffer KPi 100 mM pH 7,3 conteniendo 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA por 1 hora a 37°C; las reacciones fueron terminadas mediante el agregado de 10 nM catalasa (Fluka BioChemika) y se tomaron distintas alícuotas para los análisis posteriores. Por otra parte, la oxidación de la proteína por radicales peroxilo implicó la incubación en condiciones similares de HsGS con el dador termolábil de ROO[•] 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (ABAP, Wako) en una concentración 10 mM a 37°C durante 120 minutos (flujo de radicales peroxilo de 0,3 μM/min [161]), tomándose alícuotas a diferentes tiempos para el análisis. Finalmente, la oxidación por diamida fue realizada mediante la exposición de HsGS 0,2 mg/mL a diferentes concentraciones de diamida (25-1000 μM) en buffer KPi 100 mM pH 7,3 conteniendo 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA a 37°C durante 1 hora.

5.6. Análisis por SDS-PAGE, western- y dot-blot

La caracterización electroforética de las muestras de HsGS expuestas a ONOO⁻ y otros oxidantes se realizó utilizando geles SDS-PAGE 10% en ausencia o presencia de β-mercaptoetanol (β-ME); las proteínas fueron teñidas utilizando azul Coomassie. Para los análisis por western-blot, se transfirieron las muestras separadas por SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (Odyssey, Li-Cor Biosciences) utilizando un equipo de electrotransferencia semi-seca Hoefer TE 70 (Amersham Biosciences). Luego de esto, la membrana fue bloqueada con leche 5% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente, lavada con PBS conteniendo Tween 0,1% y posteriormente incubada con anticuerpos monoclonales anti-NO₂Tyr (Invitrogen, número de clona HM11, dilución 1/1000) o anticuerpos monoclonales anti-DiTyr (JaICA, número de clona 1C3, dilución 1/1000). Tras esto, la membrana fue lavada nuevamente e incubada con anticuerpos policlonales anti-GS (Abcam, 1/2000). Finalmente, y tras otro ciclo de lavado, se agregaron anticuerpos secundarios anti-mouse y anti-rabbit conjugados con sondas de emisión IR680 e IR800 (Li-Cor Biosciences) y la membrana fue revelada en un scanner de

fluorescencia Odyssey Li-Cor. Complementariamente, los análisis por dot-blot fueron realizados de manera análoga luego de la adición directa de 2,5 μL de cada muestra en una membrana de nitrocelulosa; luego de revelar la imagen, las señales fueron cuantificadas por densitometría y las intensidades de las señales correspondientes a NO_2Tyr y DiTyr fueron normalizadas a su correspondiente señal de inmunoreactividad anti-GS (relaciones de intensidad $\text{NO}_2\text{Tyr/GS}$ o DiTyr/GS) y expresadas como relativas al control sin tratar. Todas las adquisiciones y procesamiento de las imágenes fueron realizadas utilizando el software Image Studio (Li-Cor).

5.7. Cuantificación de tioles proteicos y NO_2Tyr por espectrofotometría

La concentración de $-\text{SH}$ en las muestras de HsGS fue determinada por medidas de espectrofotometría mediante reacción con 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). Para esto, la HsGS expuesta a oxidantes fue precipitada mediante el agregado de 5 volúmenes de acetona fría e incubación por 20 minutos a -20°C . Luego de centrifugar las muestras (18000 g, 30 minutos, 4°C), los pellets fueron disueltos en cloruro de guanidinio 6 M preparado en buffer tris 20 mM pH 7,2 y se agregó a continuación DTNB 1 mM a partir de un stock 20 mM preparado en etanol. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente (en oscuridad), los niveles de $-\text{SH}$ fueron cuantificados a través de medidas de absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 13880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [229]. Las concentraciones absolutas de NO_2Tyr fueron determinadas para ciertas condiciones experimentales siguiendo un procedimiento similar. Brevemente, tras el tratamiento de la HsGS con ONOO^- , la proteína fue precipitada y redisuelta en un volumen de cloruro de guanidinio correspondiente a un 20% del volumen original (para concentrar las muestras en un factor de 5). Una vez disueltos los pellets, el pH de las muestras fue ajustado a 10 utilizando NaOH y el contenido de NO_2Tyr fue determinado a 430 nm ($\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [230].

5.8. Cuantificación de aminoácidos en hidrolizados totales de HsGS por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)

El contenido aminoacídico de HsGS nativa y tratada por ONOO^- fue determinado a través de la hidrólisis total de la proteína con ácido metanosulfónico (MSA) seguido de la separación y cuantificación por UHPLC de los aminoácidos resultantes marcados, como fuera reportado previamente [144,231]. Para esto, las muestras de HsGS tratadas (200 μg en viales de hidrólisis de vidrio) fueron precipitadas con TCA 10%, los pellets lavados dos veces con acetona fría y resuspendidos en MSA 4 M conteniendo triptamina 0,2% (w/v). A continuación, los viales fueron colocados en tubos de hidrólisis Pico-Tag, se removió el oxígeno mediante la aplicación de 3 ciclos de vacío/ N_2 y se los incubó bajo vacío overnight a 110°C . Tras la incubación, las muestras se dejaron enfriar, se neutralizaron con NaOH, fueron filtradas a través de filtros de 0,2 μm Pall Nanosep y se diluyeron 10 y 100 veces con H_2O . El análisis de los aminoácidos fue finalmente llevado a cabo en un sistema de UHPLC Shimadzu Nexera realizando la derivatización pre-columna de los aminoácidos con la sonda fluorescente *o*-ftalaldialdehído (OPA) y la separación de los aminoácidos en una columna de fase reversa C18 (Phenomenex Kinetex 2.6 μm EVO 150 x 3 mm, 40°C), con la detección fluorescente de los aminoácidos marcados usando λ_{ex} 340 nm y λ_{em} 440 nm [231]. Para la identificación y cuantificación

de los picos, se utilizó una mezcla comercial de estándares de aminoácidos (Sigma). La concentración de cada aminoácido fue corregida por los distintos pasos de dilución para obtener los valores de concentración presentes en los tubos de reacción.

5.9. Identificación de las modificaciones nitro-oxidativas en la HsGS por espectrometría de masa

Para identificar los residuos de la HsGS que resultan modificados por ONOO⁻, se utilizaron diferentes aproximaciones experimentales basadas en espectrometría de masa que permitieron la obtención de información complementaria y semi-cuantitativa.

5.9.1. Identificación de péptidos conteniendo NO₂Tyr por HPLC-MS/MS en equipo QTRAP 4500

La identificación específica de los residuos de Tyr que resultan nitrados en la HsGS tras su exposición a ONOO⁻ fue realizada empleando un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo con trampa lineal de iones QTRAP 4500 (ABSciex) acoplado a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Infinity 1260 (Agilent). Esta aproximación se basó en la detección del ion imonio derivado de los residuos de NO₂Tyr (m/z 181) y la posterior fragmentación de los iones precursores, como se describió previamente [232,233]. Para este análisis, se realizó la digestión de 40 µg de HsGS tratada con ONOO⁻ incubándola con tripsina (Sigma) a 37°C overnight siguiendo protocolos estándar para la digestión de proteínas en solución, que incluyen la reducción (con DTT) y alquilación (con iodoacetamida, IAA) de los residuos de Cys [234]. Luego de realizada la digestión, la mezcla de péptidos resultante fue liofilizada, disuelta en H₂O nanopura para alcanzar una concentración final correspondiente a 9,24 µM y sometida a análisis por HPLC-MS/MS. La separación de los péptidos por cromatografía fue realizada en una columna GRACE Vydac 218TP C18, 5 µ, 2,1 x 150 mm a 25°C, con un flujo de 250 µL/min (volumen de inyección muestra = 5 µL); la fase móvil A fue ácido fórmico 0,1% en H₂O y la fase B ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo y el gradiente empleado fue el siguiente: 0-5 min, 2% B; 5-95 min, 2-45% B; 95-100 min, 45% B; 30 min re-equilibrado con 2% B. Los datos adquiridos fueron analizados utilizando el servidor web Mascot (Matrix Science) para la identificación de la secuencia de los péptidos (MS/MS Ions Search) con los siguientes parámetros: Database: SwissProt (AA)(Taxonomy - All entries) + contaminants (AA); Enzyme: Trypsin, Allow up to 1 missed cleavages; Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Oxidation (HW), Nitro (W), Nitro (Y); Peptide tolerance: 1.2 Da; MS/MS tolerance: 0.6 Da; Peptide charge: 1+, 2+, 3+.

5.9.2. Identificación de sitios de modificación oxidativa y entrecruzamiento por nLC-MS/MS en equipo Orbitrap Fusion

Un análisis más profundo por MS/MS de la caracterización de las modificaciones oxidativas de la HsGS fue realizado a través de un escaneo completo y espectrometría de masa en tándem data-dependiente en un analizador de masa Orbitrap, de acuerdo al procedimiento descrito por Mariotti *et al* [235]. Dicho protocolo conllevó la realización de la digestión con tripsina de las muestras de HsGS tratadas con ONOO⁻ en soluciones de H₂¹⁶O y H₂¹⁸O, para permitir la identificación de los entrecruzamientos covalentes no

reducibles que pudieran formarse durante los eventos oxidativos [231,235]. Brevemente, luego de su tratamiento con ONOO⁻, las muestras de HsGS (20 µg) fueron secadas en vacío en un equipo Speedvac (Thermo Scientific) y posteriormente redisueltas en 20 µL de urea 8 M en Tris-HCl 50 mM pH 8,0; a continuación fueron reducidas con DTT y alquiladas con IAA. Tras esto, las muestras de proteína alquilada fueron divididas en dos fracciones para realizar la digestión con tripsina en soluciones de bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) preparadas tanto en H₂¹⁶O como en H₂¹⁸O; ambas digestiones fueron realizadas agregando tripsina (Promega) en una relación 50:1 (proteína:tripsina) e incubando a 37°C overnight (muestras en H₂¹⁶O) o por 24 hs (muestras en H₂¹⁸O). Los péptidos resultantes luego de la digestión fueron sometidos a extracción en fase sólida empleando discos de fase reversa C18 empaquetados en tips de pipeta (StageTip) como se describió previamente [235-237]. Luego de que los péptidos fueron eluidos, se los secó en Speedvac y finalmente se los resuspendió en 10 µL de H₂¹⁶O y H₂¹⁸O, respectivamente. Finalmente, los péptidos fueron mezclados en una relación 1:1 inmediatamente antes de su separación y análisis en un equipo de nano-cromatografía EASY-nLC 1000 acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion (Thermo Scientific). La separación fue realizada en una columna EASY-Spray (Pepmap Thermo Fisher Scientific; 3 µm, C18 15 x 75 µm) a un flujo de 250 nL/min y un gradiente de solventes A (ácido fórmico 0,1%) y B (acetonitrilo 80% y ácido fórmico 0,1%). La adquisición de datos en el equipo Orbitrap Fusion fue realizada utilizando tres métodos complementarios para lograr tanto la identificación de las modificaciones oxidativas de aminoácidos como la de los sitios de entrecruzamiento, como se detalla en la referencia [235].

Para la identificación de los péptidos no entrecruzados tanto en su forma nativa como modificada, los datos crudos (.raw) obtenidos mediante el método de adquisición universal por nLC-MS/MS fueron analizados utilizando el software MaxQuant 1.6.1.0 [238]. Los parámetros de búsqueda empleados fueron los siguientes: First search peptide tolerance: 20 ppm; Main search peptide tolerance: 4.5 ppm; Digestion: Trypsin/P with 2 Max. missed cleavages; Fixed modifications: Carbamidomethyl (C); Variable modifications: Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term), Nitration (Y, W), Oxidation (Y, H); PSM FDR: 0.01, Protein FDR: 0.01; Database: recombinant HsGS fasta sequence, contaminants included. Luego de realizado el análisis de identificación, se estimó el grado de modificación de cada uno de los péptidos que fuera encontrado modificado oxidativamente, los resultados obtenidos del análisis en MaxQuant, junto con los datos crudos, fueron reanalizados utilizando el software Skyline 4.1.0 [239]. A través de este software se aplicó un método de MS1-filtering que permitió identificar los picos de MS1 correspondientes a cada péptido identificado y realizar una cuantificación relativa a partir de las áreas de dichos picos. A partir de estas áreas, se estimó el porcentaje de modificación de cada sitio en los péptidos, determinando la relación entre el área del péptido modificado y la suma de las áreas de todas las formas halladas (nativa y modificada) para dicho péptido.

La identificación de los sitios de entrecruzamiento en la HsGS expuesta a ONOO⁻ fue realizada a través de las aproximaciones descritas en la referencia [235], basándose en la detección de las diferencias de masa de + 8 Da que se observan en los péptidos entrecruzados debido al marcaje isotópico con ¹⁸O durante la digestión en H₂¹⁸O. Esta identificación fue realizada a partir de los datos adquiridos a través de métodos de MS/MS dirigidos en el cual se seleccionaron los grupos de señales que presentaron diferencias de

masa de 4, 6 y 8 Da, y una vez realizada la validación manual de los espectros (ej: confirmación de la presencia de las diferencias de + 8 Da en los precursores), su confirmación por métodos dirigidos para la fragmentación de dichos precursores. Se utilizaron en este procedimiento de identificación y validación los softwares MassAI (University of Southern Denmark) y Proteome Discoverer 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Para maximizar la capacidad de identificar los entrecruzamientos, cuyo rendimiento de formación suele ser bajo, además de realizarse el análisis de las muestras digeridas en solución como se describió más arriba, se realizó la digestión también de muestras idénticas pero previamente separadas en una columna de gel filtración Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva). Dicho paso implicó el fraccionamiento de la HsGS tratada con ONOO⁻ en una fase móvil NaPi 50 mM pH 7,4 con 150 mM NaCl conteniendo 0,1% SDS, para separar las subunidades entrecruzadas de forma covalente (y no reducible) de los monómeros no entrecruzados. Así, la digestión de las fracciones de mayor peso molecular que el monómero permitió obtener muestras enriquecidas en los péptidos entrecruzados para complementar el análisis e incrementar la posibilidad de su detección por MS/MS.

5.9.3. Cuantificación relativa de péptidos modificados por Multiple Reaction Monitoring (MRM)

A partir de los datos de fragmentación MS/MS obtenidos para los distintos péptidos identificados mediante los métodos descritos anteriormente, se diseñó un método dirigido de Multiple Reaction Monitoring (MRM) para detectar específicamente los péptidos nativos y modificados más relevantes. Este método permitió realizar la estimación mediante otra aproximación de los porcentajes de modificación de cada péptido, en diversas condiciones experimentales, utilizando el espectrómetro de triple cuadrupolo QTRAP 4500. La detección de cada péptido fue realizada mediante el seguimiento simultáneo de tres transiciones distintas (Q1: ion precursor; Q3: tres iones y o *b* seleccionados, los cuales presentaron señales intensas y preferentemente contenían los residuos que sufren la oxidación); las áreas de los picos de los péptidos nativos y modificados se obtuvieron mediante el software Analyst (Sciex) y las mismas fueron utilizadas para la estimación del porcentaje de modificación de cada residuo. Las muestras de HsGS utilizadas para este análisis fueron digeridas con tripsina siguiendo el procedimiento descrito en el punto anterior (sin incluir H₂¹⁸O), los péptidos extraídos mediante el protocolo de StageTips, secados, resuspendidos en ácido fórmico 0,1% y separados en HPLC mediante idéntico procedimiento al descrito en el punto 5.9.1, para ser finalmente analizados en el espectrómetro acoplado usando el método de MRM diseñado.

5.10. Estudios de agregación de la HsGS

La agregación de la HsGS inducida por la exposición a oxidantes fue seguida a través de medidas de turbidez en el tiempo como se describió previamente [189]. Típicamente, muestras de HsGS (0,2 mg/mL, 200 µL) expuestas a oxidantes (como se explicó anteriormente) fueron seguidamente transferidas a una placa de 96 pocillos. Tras esto, las muestras fueron cubiertas con 80 µL de aceite mineral y finalmente se realizaron medidas de absorbancia a 405 nm cada 5 minutos durante 12 hs a 37°C utilizando un lector de

placas Varioskan Flash (Thermo Scientific). Este procedimiento se repitió para la realización de los estudios de agregación de HsGS bajo distintas condiciones (ej: efecto de reductores, CO₂, pH, etc). Para estudiar si la HsGS agregada era capaz de inducir la agregación de la proteína nativa no tratada, se trató inicialmente HsGS con 500 μM ONOO⁻, se la dejó agregar a 37°C por 90 minutos y luego se mezclaron diferentes cantidades de este material agregado (0, 5, 10 y 20 μg) con HsGS nativa (0,2 mg/mL, 200 μL); la agregación de estas mezclas se estudió a continuación siguiendo el método anteriormente descrito.

5.11. Separación de las fracciones insolubles y solubles de HsGS oxidada

La separación de la HsGS agregada insoluble de la proteína soluble fue realizada luego de la exposición de HsGS (0,5 mg/mL) a 500 μM ONOO⁻ en buffer KPi a temperatura ambiente. Tras el tratamiento, las muestras fueron incubadas a 37°C por 30 minutos para permitir que ocurra la agregación. Luego de esto, las muestras fueron centrifugadas por 30 minutos a 18500 g (a 4°C) para remover el material insoluble. Finalmente, los sobrenadantes fueron recolectados y la proteína remanente cuantificada por el ensayo del BCA. La actividad específica de la HsGS fue medida en los sobrenadantes (fracción soluble, 30 minutos) y comparada con la de las mezclas de proteína soluble e insoluble inmediatamente (0 minutos) y 30 minutos luego de la exposición a ONOO⁻. Para el análisis por HPLC-MS/MS-MRM, los pellets fueron disueltos en urea 8 M preparada en buffer tris 50 mM pH 8,0 y digeridos con tripsina como se describió más arriba; por su parte, los sobrenadantes fueron en primer lugar secados en Speedvac y luego sometidos a un procedimiento idéntico.

5.12. Estudios de desnaturalización térmica

La estabilidad de la HsGS fue estudiada siguiendo la fluorescencia del Trp (λ_{ex} 295 nm, λ_{em} 335 nm) en un espectrofluorímetro Jasco. Brevemente, se incubó HsGS (0,2 mg/mL) en presencia o en ausencia de los ligandos MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 20 mM y ATP 10 mM, o luego de su exposición a 50 μM ONOO⁻, en un volumen final de 500 μL, y la fluorescencia fue medida a lo largo del rango de temperaturas 15-65°C (con un incremento de temperatura de 1,5°C/min). Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación correspondiente a una curva de desnaturalización térmica considerando líneas de base no lineales para obtener los valores de las temperaturas de melting aparentes (T_m) [240].

5.13. Estudios de gel filtración

El estudio del estado de oligomerización de la HsGS, así como la influencia que tiene sobre éste la unión de MgATP, fue llevada a cabo en una columna de gel filtración Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Como fase móvil, se usó buffer NaPi 20 mM pH 7,4 conteniendo 0,1 M KCl, 0,1 mM DTPA y 1 mM β-ME; para evaluar el efecto del MgATP, el buffer fue suplementado con 5 mM ATP y 20 mM MgCl₂. Para cada corrida, se inyectaron 100 μL de HsGS 4 mg/mL preparada en el buffer usado como fase móvil

(con o sin MgATP) y se la eluyó en un equipo HPLC Gilson a un flujo de 0,4 mL/min durante 75 minutos con un registro continuo de la absorbancia a 280 nm. La calibración de pesos moleculares de la columna se llevó a cabo utilizando un kit comercial de marcadores de peso molecular (Merck) en el rango 12-200 kDa, con la inclusión además de ferritina (PM 440 kDa); para la determinación del volumen muerto se utilizó azul dextrano.

5.14. Análisis estadístico

Los resultados presentados están expresados como promedio \pm desvío estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes. Los gráficos y el análisis estadístico fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 8. Las comparaciones estadísticas entre dos grupos se hicieron mediante el análisis por test *t* no pareado, mientras que las comparaciones entre más de dos sets de datos fueron hechas a través de un test ANOVA de una vía con un análisis *post-hoc* de Tukey; para ambos casos, se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

6. Resultados

6.1. Expresión y purificación de la HsGS

El primer paso, y esencial para el desarrollo del presente trabajo, consistió en la expresión y purificación de la HsGS recombinante. Esta etapa comenzó con la transformación de bacterias BL21 (DE3) star de *E. coli* con el plásmido GLULA-c004 (Fig. 6.1A), construcción que posee los aminoácidos 5-365 de la HsGS junto con una cola N-terminal de 6 His para su purificación y un sitio de corte para la proteasa TEV, diseñado para realizar el clivaje del tag N-terminal luego de la purificación [241,242]. Siguiendo un procedimiento de transformación por shock térmico, se logró la transformación de las bacterias, las cuales fueron seleccionadas por su resistencia adquirida a kanamicina. Una vez obtenidas las bacterias transformadas, se realizaron cultivos de las mismas en medio TB para lograr la inducción de la expresión de la HsGS. Los lisados bacterianos obtenidos de estos cultivos fueron sometidos al procedimiento de purificación descrito en la sección Materiales y Métodos, que se basa en la cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Luego de pasar el lisado por la columna pre-cargada con iones Ni^{2+} y realizar lavados sucesivos con buffers conteniendo concentraciones crecientes de imidazol (10-100 mM), la proteína fue eluída mediante el pasaje de buffer A con 500 mM imidazol. El análisis del proceso de purificación por SDS-PAGE y western blot mostró la obtención de una banda de gran intensidad con altísimo nivel de pureza, de un peso molecular acorde al esperado para las subunidades de la HsGS recombinante (43306 Da) en condiciones desnaturalizantes y que además presentó reactividad contra los anticuerpos policlonales anti-GS (Fig. 6.1B). Además, el análisis por espectrometría de masas de la proteína purificada entera (en equipo QTRAP 4500) confirmó el peso molecular esperado (Fig. 6.1C). Luego de validada la identidad de la proteína obtenida, se realizaron ensayos de actividad para confirmar su estado nativo (ver más abajo) y finalmente la HsGS pura fue almacenada a -80°C en alícuotas de 200 μL ($\sim 10 \text{ mg/mL}$ proteína) en buffer B. En estas condiciones de almacenamiento, la proteína se mantuvo activa y utilizable por un período de al menos dos meses. Como paso final luego del proceso de purificación, se intentó realizar el corte del tag N-terminal utilizando proteasa TEV recombinante pura disponible. No obstante, los ensayos realizados no lograron una remoción apreciable del tag, por lo que dicha porción aminoacídica fue mantenida en la proteína utilizada a lo largo del trabajo. Es importante mencionar que en el trabajo original en el cuál se purificó la HsGS a partir del plásmido aquí usado, que derivó en la elucidación de su estructura tridimensional [49], tampoco se logró remover dicho tag.

6.2. Puesta a punto de los ensayos de actividad

Como confirmación final del correcto estado de la HsGS purificada, se realizaron distintos ensayos de actividad GS (γ -glutamyl transferasa, biosintético y biosintético con NH_2OH en lugar de NH_3) con las fracciones purificadas. Dado que estos ensayos son a punto final y no se puede realizar un registro continuo de la formación de producto o desaparición de sustrato, se determinó en primera instancia la generación de producto a lo largo de una incubación de 5-60' cortando la reacción a distintos tiempos para los tres

ensayos, de modo de establecer además las condiciones óptimas para la realización de los ensayos en los experimentos posteriores (Fig. 6.2).

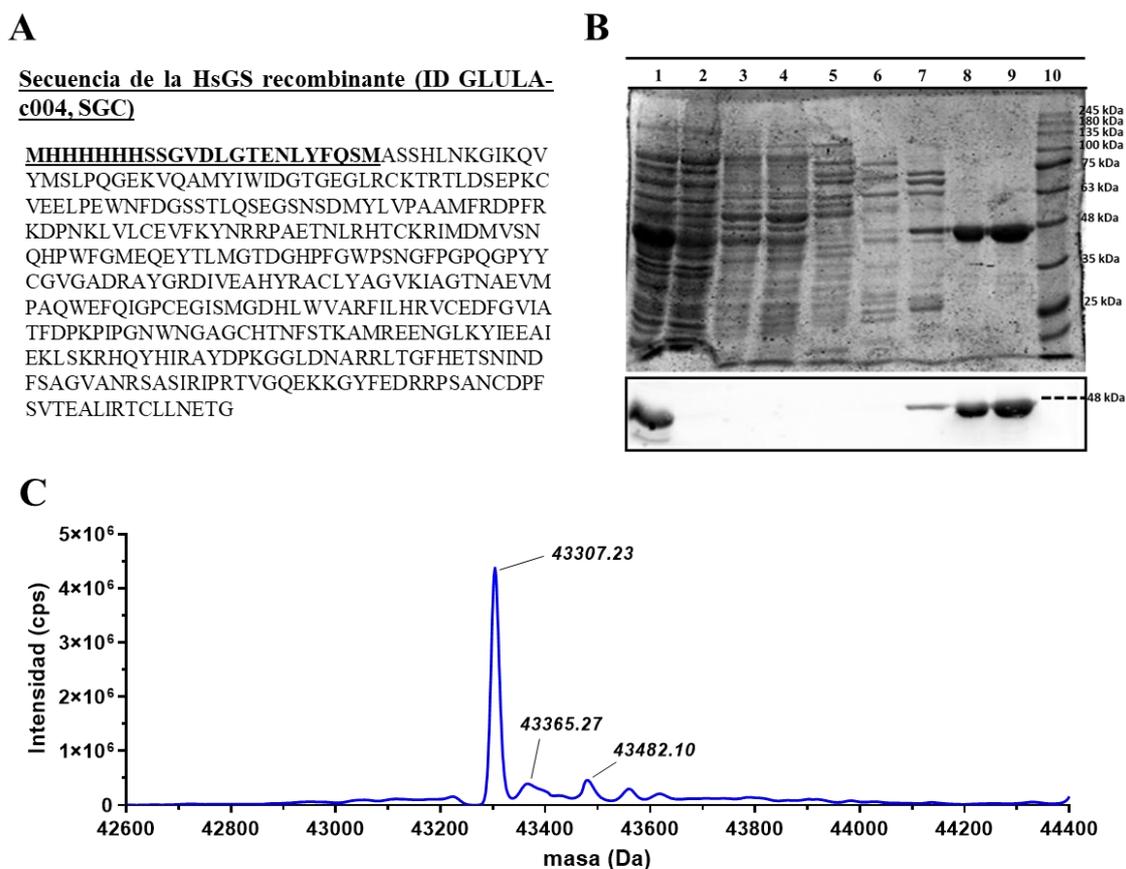


Figura 6.1. Purificación y caracterización de la HsGS recombinante. (A) Secuencia de aminoácidos del constructo de HsGS recombinante utilizado (el tag N-terminal se muestra resaltado en negrita). (B) Análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras (arriba) y western blot (abajo) del proceso de purificación de HsGS recombinante. 1: lisado bacteriano; 2: fracción no unida (flow-through); 3-4: lavados con 10 mM imidazol; 5: lavado con 25 mM imidazol; 6: lavado con 50 mM imidazol; 7: lavado con 100 mM imidazol; 8-9: fracción eluída con 500 mM imidazol (5 y 10 µg); 10: marcador de peso molecular. (C) Caracterización por MS de la proteína purificada entera para la determinación del peso molecular.

El ensayo γ -glutamyl transferasa mostró una velocidad de formación de GlnNHOH constante durante largos períodos de tiempo (20-60 min) para todo el rango de concentraciones de enzima empleadas (1-20 nM decámero), presentando valores de actividad específica de (77 ± 11) U/mg (Fig. 6.2A). Sin embargo, la formación de GlnNHOH mediante la versión modificada del ensayo biosintético presentó en general condiciones de velocidad inicial por períodos de tiempo menores (5-60 min según la concentración de GS) y llevó a una formación de producto considerablemente menor, pese a utilizarse 10 veces más enzima, como refleja su actividad específica de $(3,7 \pm 0,2)$ U/mg (Fig. 6.2B). Por su parte, el ensayo de actividad biosintético (fisiológico) presentó similitudes respecto a este último, con cursos temporales de formación de Pi lineales en la mayoría de los casos hasta 20-30 min y valores de actividad específica de $(2,3 \pm 0,3)$ U/mg (Fig. 6.2C). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió emplear el ensayo de actividad γ -glutamyl transferasa en los estudios posteriores (el ensayo de actividad más ampliamente utilizado en la bibliografía) debido a su mayor actividad específica, a que presenta formación de producto constante durante mayores tiempos y no requiere el uso

de altas concentraciones de ATP como reactivo en el ensayo. De cualquier modo, se realizaron controles utilizando el ensayo biosintético con NH_2OH para verificar los resultados de inactivación oxidativa, como se verá más adelante. Si bien dicho ensayo, al depender de una reacción prácticamente análoga a la fisiológica, representaría una mayor relevancia biológica, su aplicación en los estudios de inactivación oxidativa de la HsGS no es viable pues esta actividad se ve notoriamente inhibida por las altas concentraciones de fosfato (datos no mostrados) que se arrastran del buffer en el cual se realizaron las reacciones. De modo similar, la aplicación del ensayo de actividad fisiológica basado en la determinación de Pi es inviable pues el fosfato arrastrado del buffer donde se realizan las reacciones supera la cantidad que pudiera formarse en el ensayo de actividad. Como un último control de la proteína purificada, se observó que la actividad γ -glutamyl transferasa es susceptible a inhibición por el inhibidor específico de la GS MSO [243,244] (Fig. 6.2D). En función de estos resultados, se establecieron como condiciones experimentales para la determinación de la actividad GS en los experimentos de inactivación oxidativa el uso de 10 nM de decámero de HsGS y la incubación con los sustratos durante 15 min a 37°C.

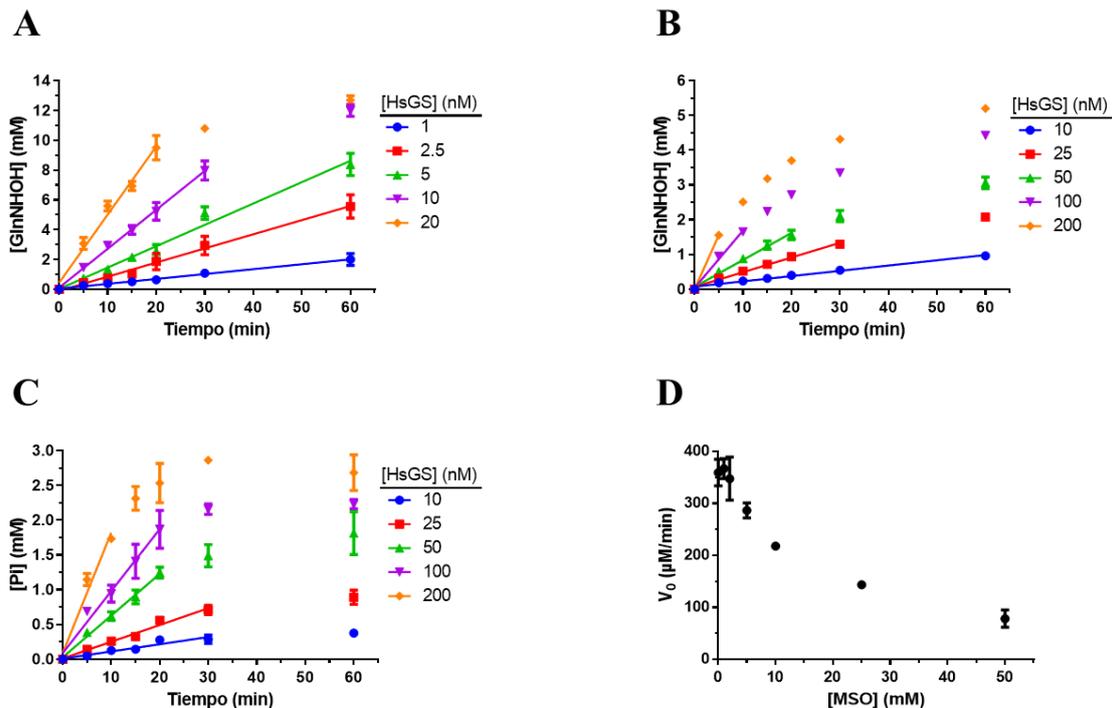


Figura 6.2. Caracterización y puesta a punto de tres ensayos de actividad GS e inhibición por MSO. Para establecer las condiciones ideales para la realización de los tres ensayos a punto final para la medida de actividad GS, se realizaron cursos temporales de formación de producto: (A) ensayo γ -glutamyl transferasa; (B) reacción ATP-dependiente de síntesis de GlnNHOH a partir de Glu y NH_2OH ; (C) ensayo fisiológico de síntesis de Gln. (D) Inhibición de la actividad γ -glutamyl transferasa de la HsGS por el inhibidor específico MSO. Los datos se muestran como promedio \pm SD ($n = 3$).

6.3. Inactivación de la HsGS por ONOO^- y análisis de las modificaciones nitrooxidativas de aminoácidos

Habiendo caracterizado la HsGS obtenida mediante el proceso de purificación, así como puesto a punto las condiciones para realizar las medidas de actividad, se

comenzaron a realizar los estudios de inactivación oxidativa de la proteína por ONOO⁻. Se expuso entonces 0,2 mg/mL HsGS (4,62 μM monómero) a ONOO⁻ (50-1000 μM, agregado como un bolo único) a temperatura ambiente (21°C) y tras una incubación de 5 minutos se tomaron alícuotas de las muestras para realizar las determinaciones de actividad remanente y análisis de las modificaciones de la proteína por diversas técnicas bioquímicas (Fig. 6.3). El tratamiento con ONOO⁻ causó una pérdida de actividad HsGS dosis-dependiente, detectándose una pérdida de actividad de ~60% para el tratamiento con 1000 μM ONOO⁻ (Fig. 6.3A). Como control, también se evaluó la pérdida de actividad luego del tratamiento con ONOO⁻ mediante el ensayo de síntesis ATP-dependiente de GlnNHOH a partir de Glu y NH₂OH, obteniéndose resultados similares (Anexo, Fig. 1). El análisis por SDS-PAGE de las muestras reveló que el tratamiento con ONOO⁻ a concentraciones de 10 μM y mayores indujo a la formación tanto de entrecruzamientos covalentes reducibles (uniones disulfuro) como no reducibles (uniones no-disulfuro) correspondientes a dímeros, trímeros y especies de mayor peso molecular, resultando en una disminución notoria de la cantidad de proteína monomérica (banda a 43 kDa) (Fig. 6.3B). La cuantificación por densitometría de las bandas de los geles reductores permite observar con mayor claridad cómo, a medida que aumenta la concentración de ONOO⁻, disminuye el porcentaje de proteína que aparece como monómero y por el contrario incrementa la cantidad de las demás especies, predominando dímeros y trímeros a bajas concentraciones de ONOO⁻ y las especies de mayor tamaño a concentraciones más elevadas (Anexo, Fig. 2).

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, se evaluó de manera inicial la modificación de residuos de Tyr de la HsGS a NO₂Tyr y DiTyr luego del tratamiento (Fig. 6.3C-F). El análisis por western blot mostró una inmunoreactividad anti-NO₂Tyr intensa a nivel de la banda correspondiente al monómero pero también de las bandas correspondientes a especies entrecruzadas, especialmente a altas concentraciones de ONOO⁻ (Fig. 6.3C). La cuantificación de las señales de obtenidas mediante el análisis por dot blot mostró como el contenido total de NO₂Tyr incrementó casi 40 veces en términos relativos para el tratamiento con 1000 μM ONOO⁻ respecto al control no tratado (Fig. 6.3D). Por su parte, se evidenció la formación mediante western blot de DiTyr (Fig. 6.3E); tanto las bandas correspondientes al monómero como las de las especies entrecruzadas (en particular la de los trímeros) presentaron inmunoreactividad anti-DiTyr. Estos resultados sugieren que estaría ocurriendo la formación de DiTyr tanto a nivel intramonómero como entre distintas subunidades, siendo posiblemente estos enlaces los responsables de la generación de las especies entrecruzadas mediante uniones covalentes no reducibles. Tanto en el western blot como en la cuantificación del dot blot anti-DiTyr correspondiente (Fig. 6.3F) se aprecia que el incremento que ocurre en los niveles de esta modificación es considerablemente menor que el observado para la formación de NO₂Tyr.

El análisis por SDS-PAGE de las muestras de HsGS tratadas con ONOO⁻ reveló la formación de entrecruzamientos tanto reducibles como no reducibles; la formación de uniones de tipo disulfuro indica que los residuos de Cys de la proteína resultan oxidados por el tratamiento. Para evaluar en mayor profundidad esta modificación, se determinaron los niveles de grupos -SH en la HsGS mediante reacción con DTNB. La exposición a distintas concentraciones de ONOO⁻ causó un consumo importante de grupos -SH de la HsGS (la proteína contiene 11 Cys/monómero), perdiéndose ~ 10 μM -SH (2

Cys/monómero HsGS) tras el agregado de 50 μM ONOO⁻ y $\sim 28 \mu\text{M}$ -SH (6 Cys/monómero HsGS) luego de adicionar 1000 μM ONOO⁻ (Fig. 6.3G). En conjunto, la exposición de la HsGS a distintos excesos de ONOO⁻ (de $\sim 10:1$ a $200:1$ ONOO⁻:monómero de HsGS) ocasionó una pérdida de actividad HsGS dosis-dependiente, lo que se acompañó con la modificación nitro-oxidativa de residuos de Tyr y Cys.

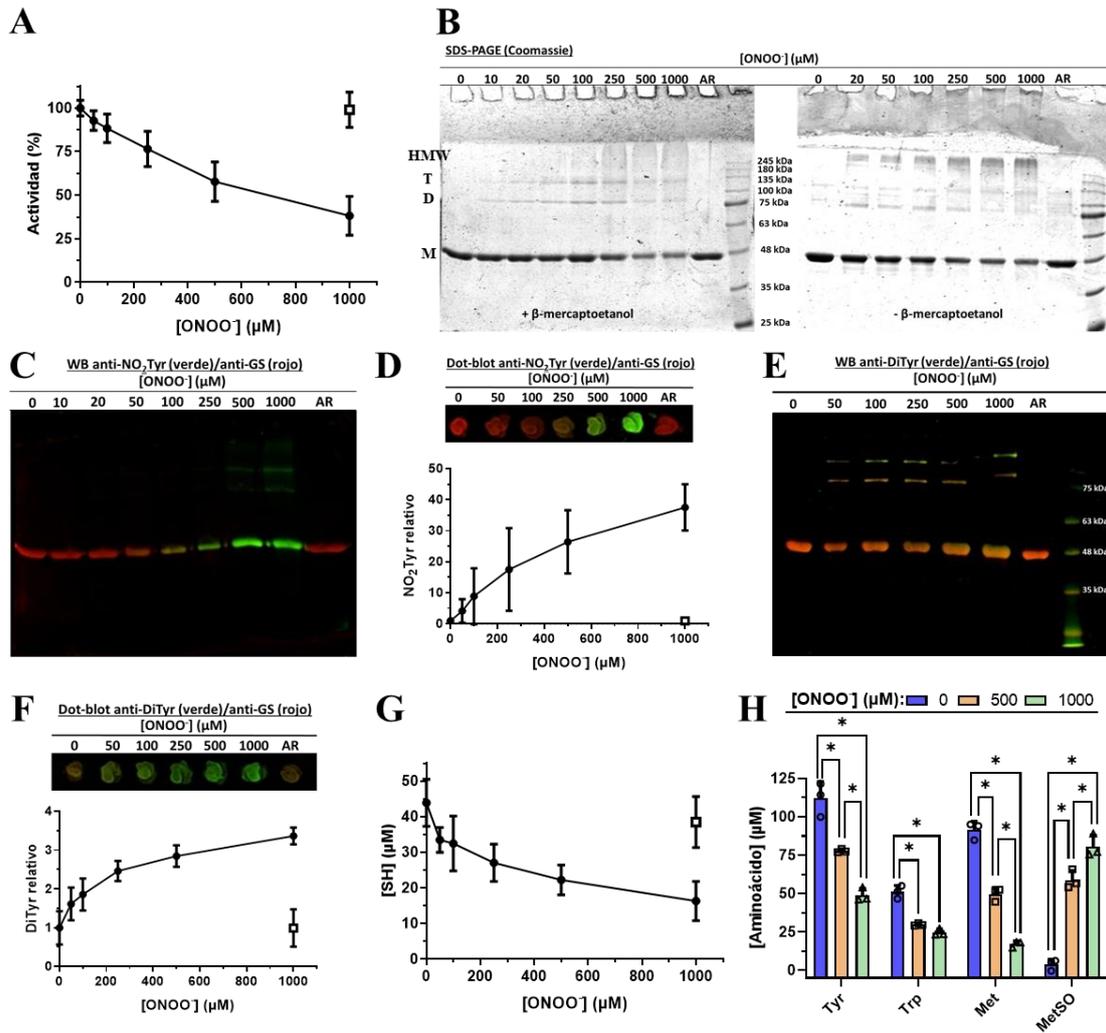


Figura 6.3. Inactivación de la HsGS por ONOO⁻ y análisis de las principales modificaciones oxidativas. Se expuso HsGS (0,2 mg/mL, 4,62 μM monómero) a 50-1000 μM ONOO⁻ en buffer KPi pH 7,3 conteniendo KCl 0,1 M y DTPA 0,1 mM. A continuación, se tomaron alícuotas de las muestras para la caracterización mediante distintos estudios. (A) Actividad HsGS relativa, expresada como % de la muestra sin tratar (100% actividad = 61,4 U/mg) (n = 18). (B) Análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. M: monómero; D: dímero; T: trímero; HMW: especies de mayor peso molecular. (C) Detección de NO₂Tyr mediante western blot (+ β -ME); la reactividad anti-NO₂Tyr se muestra en verde, la anti-GS en rojo. (D) Niveles de NO₂Tyr relativos, determinados a través de la cuantificación densitométrica de los dot blots anti-NO₂Tyr. La relación anti-NO₂Tyr/anti-GS para cada muestra se expresa en relación al control sin tratar (n = 9). (E) Detección de DiTyr por western blot (+ β -ME); la reactividad anti-DiTyr se muestra en verde, la anti-GS en rojo. (F) Niveles de DiTyr relativos determinados por dot-blot (n = 6). (G) Cuantificación de tioles mediante reacción con DTNB (n = 9). En los paneles A, D, F y G, los cuadrados abiertos representan la adición reversa (AR) de ONOO⁻. (H) Cuantificación de aminoácidos totales de HsGS (0,4 mg/mL) expuestos a ONOO⁻ (500-1000 μM) a través de la detección por fluorescencia de conjugados de aminoácido-OPA por UHPLC (n = 3). Los datos están representados como promedio \pm SD. *, $p < 0,05$ mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de Tukey.

Bajo las condiciones experimentales empleadas, el ONOO⁻ es capaz de oxidar múltiples residuos aminoacídicos tanto a través de reacciones directas como a través de sus radicales derivados (ver Introducción). Por lo tanto, para obtener un panorama más amplio acerca de las modificaciones que el ONOO⁻ ocasiona en la HsGS, se realizó la hidrólisis total en medio ácido de muestras de proteína tratada y posteriormente se cuantificaron los aminoácidos constituyentes de la proteína por UHPLC. El método empleado permite la detección y cuantificación de la mayoría de los aminoácidos a través de su conjugación con el reactivo OPA, permitiendo además detectar el aminoácido MetSO, principal producto de oxidación de Met. Luego de tratar HsGS (0,4 mg/mL) con 500 y 1000 μM ONOO⁻, se observó una disminución significativa de residuos de Tyr, Trp y Met, sin detectarse cambios significativos en los niveles de ninguno de los restantes aminoácidos nativos analizados; en paralelo con esto, se encontró un aumento significativo en la formación de MetSO (Fig. 6.3G y Anexo, Fig. 3). Estos resultados, en conjunto con las observaciones anteriores, indican que Tyr, Trp, Met y Cys son los principales aminoácidos que resultan modificados de manera cuantitativamente relevante luego de que la HsGS es expuesta a ONOO⁻.

Para caracterizar de manera más profunda las modificaciones oxidativas sobre estos aminoácidos, se realizó la digestión con tripsina de muestras de HsGS tratadas con ONOO⁻ (100 y 500 μM) y los péptidos resultantes fueron analizados por nLC-MS/MS en un sistema Orbitrap Fusion para realizar el mapeo peptídico, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (Sección 5.9.2). Para todas las muestras analizadas, se obtuvo una cobertura de secuencia mayor a 80%, identificándose una gran cantidad de péptidos de la HsGS tanto en forma nativa como modificada oxidativamente (Anexo, Tabla I). De los aminoácidos que se encontraron como blancos principales de los oxidantes, el mapeo peptídico logró los siguientes porcentajes de cobertura: un 80% de los residuos de Tyr (12/15), un 71% de los residuos de Trp (5/7), un 69% de los residuos de Met (9/13) y un 91% de los residuos de Cys (10/11, alquilados con IAA). Los sitios no cubiertos por este análisis posiblemente sean a causa de que se localizan en posiciones en que la digestión con tripsina hace que sean contenidos en péptidos muy cortos o muy largos que no logran ser correctamente identificados. Con respecto a las modificaciones postraduccionales oxidativas, diversos residuos de Tyr fueron detectados nitrados y oxidados (a DOPA), junto con varios residuos de Met oxidados y un número limitado de residuos de Trp nitrados.

Para tener una primera aproximación a los niveles relativos de cada una de estas modificaciones detectadas, los resultados obtenidos del mapeo fueron reanalizados junto con los datos crudos mediante una aproximación de MS1-filtering en el software Skyline [239], que permitió la detección e integración de los picos de MS1 correspondientes a los péptidos identificados (Figura 6.4 y Anexo Fig. 4). En total, se encontraron nitrados nueve residuos de Tyr en las muestras de HsGS expuestas a ONOO⁻ (más la Tyr del tag N-terminal), cinco de los cuales se hallaron también oxidados. De estos residuos, los mayores niveles de nitración (> 30% para 500 μM ONOO⁻) se detectaron para los residuos Tyr185, Tyr269, Tyr288 y Tyr336. Además, tres residuos de Trp se encontraron nitrados, pero sus niveles fueron menores que para la mayoría de los residuos de Tyr. Siete residuos de Met se detectaron como MetSO; para la mayoría de ellas, los niveles de modificación fueron elevados, pero una buena parte de esta oxidación pudo haber ocurrido durante el

procesamiento de las muestras dado que también se detectaron niveles significativos de estas modificaciones en el control, a diferencia de las otras modificaciones. Estos resultados indican que residuos de Tyr, Trp y Met localizados en múltiples sitios dentro de la HsGS pueden ser modificados por el ONOO⁻, y que la modificación no se localiza en sitios o regiones específicas de la estructura de la proteína.

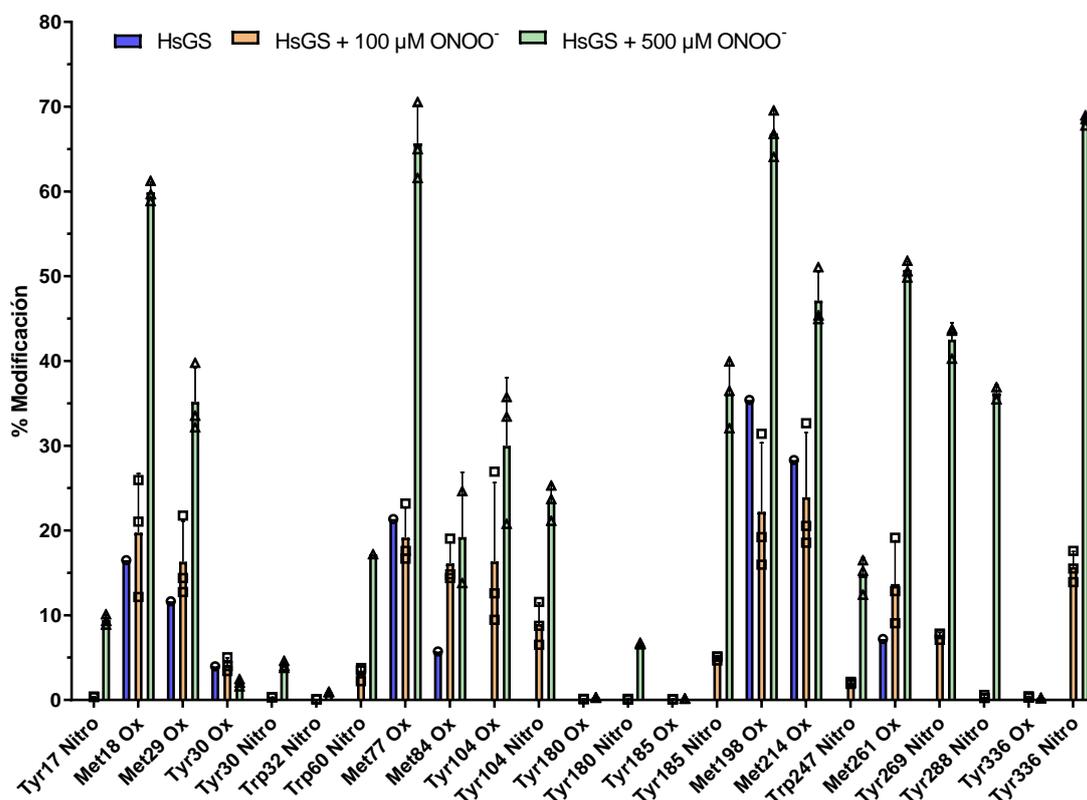


Figura 6.4. Estimación de los niveles de modificación relativa de residuos específicos mediante aproximación MS1-filtering. Análisis por el método MS1-filtering empleando el software Skyline a partir de los datos crudos obtenidos del análisis por nLC-MS/MS de las muestras de HsGS tratadas y de la lista de péptidos identificados a través del software MaxQuant. Se obtuvo en el programa el área de los picos correspondientes a las formas nativas y modificadas de cada péptido y las mismas fueron usadas para estimar el porcentaje de modificación de cada residuo. Los datos se muestran como promedio ± SD (n = 3).

6.4. Modificaciones por nitración y dimerización de los residuos de Tyr en la HsGS por ONOO⁻

Teniendo en cuenta que los residuos de Tyr fueron identificados como uno de los principales blancos de oxidación por ONOO⁻ y que, además, las principales hipótesis existentes en la bibliografía acerca de la inactivación oxidativa de la GS postulan a la nitración de Tyr como la modificación responsable de la pérdida de función [40,205-207], se realizaron a continuación una serie de estudios para caracterizar en profundidad la modificación de estos residuos. En primer lugar, para obtener datos cuantitativos de los niveles totales de NO₂Tyr formados, se expuso HsGS a mayores concentraciones de ONOO⁻ (0,1 - 5,0 mM) y luego de medir la actividad enzimática remanente se realizó la

cuantificación de NO₂Tyr por espectrofotometría a 430 nm. Frente al tratamiento con elevadas concentraciones de ONOO⁻ de 5 mM, se obtuvo una inactivación completa de la HsGS (Fig. 6.5A), lo que se acompañó de un incremento en las concentraciones de NO₂Tyr desde ~ 3 μM (para 0,1 mM ONOO⁻) hasta ~ 22 μM (para 5 mM ONOO⁻), que equivaldría a la presencia de ~ 5 residuos de NO₂Tyr por monómero de HsGS (Fig. 6.5B).

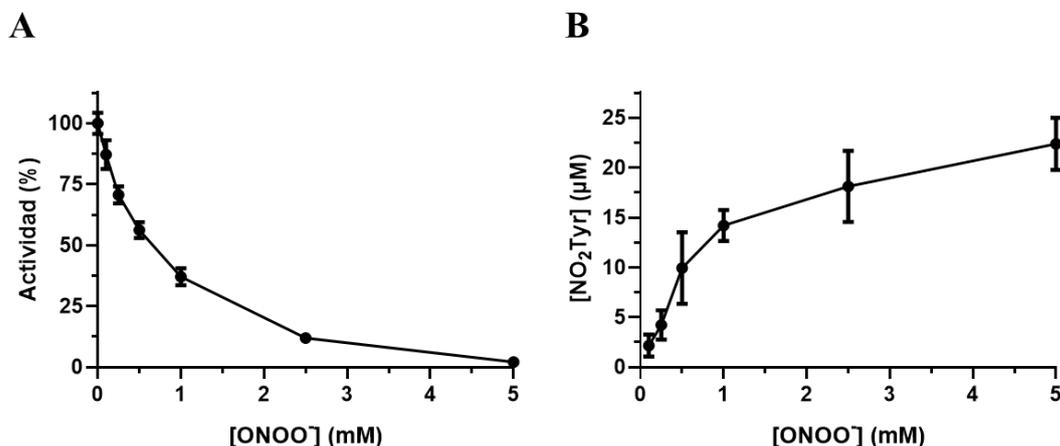


Figura 6.5. Análisis cuantitativo de la nitración de residuos de Tyr en la HsGS por ONOO⁻. Se expuso HsGS (0,2 mg/mL) a ONOO⁻ (0,1-5,0 mM) en buffer KPi y se evaluó la inactivación y concentración de NO₂Tyr. **(A)** Medidas de actividad relativa en las muestras tratadas (100% = 61,5 U/mg). **(B)** Cuantificación de NO₂Tyr por espectrofotometría a 430 nm, luego de precipitar y resuspender las muestras en cloruro de guanidinio 6 M (1/5 del volumen original) y ajustar el pH a > 10. Los datos se muestran como promedio ± SD (n = 9).

Para complementar el análisis por MS/MS presentado anteriormente, se realizó un análisis por HPLC-MS/MS dirigido específicamente a la detección e identificación de péptidos conteniendo NO₂Tyr a través de la detección del ion imonio de la NO₂Tyr [233] (ver Materiales y Métodos, sección 5.9.1). Este análisis se llevó a cabo a partir de muestras de HsGS expuestas a ONOO⁻ (50-1000 μM), digeridas con tripsina y sometidas al método de HPLC-MS/MS mencionado, y llevó a la identificación de varios de los sitios de nitración vistos con el análisis anterior, así como también permitió encontrar como sitio de nitración a la Tyr171, no detectada como nitrada mediante el análisis previo (Anexo, Tabla II). Entonces, a partir de las dos aproximaciones de espectrometría de masa, se identificaron en total 10 residuos de Tyr de la HsGS en forma de NO₂Tyr, además de los otros residuos (Trp, Met) encontrados como blanco de modificaciones nitro-oxidativas.

Con el objetivo de poder lograr una mejor caracterización los eventos de nitración de Tyr, se elaboró, a partir de los resultados obtenidos mediante los experimentos de MS/MS comentados anteriormente, un método de análisis MRM por HPLC-MS/MS para poder evaluar desde un punto de vista semicuantitativo los niveles de las principales modificaciones oxidativas bajo distintas condiciones experimentales en el espectrómetro QTRAP 4500 disponible en nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos, sección 5.9.3). Dicho método se elaboró a partir de los espectros obtenidos para los péptidos modificados (y sus formas nativas) hallados previamente, seleccionando para cada péptido tres transiciones ion parental (Q1) → ion hijo (Q3), eligiendo para este fin tres iones (y o b) que presentaron buena intensidad y, preferentemente, retuvieron el sitio de

modificación (Anexo, Tabla III). Al aplicar este análisis a muestras de HsGS expuestas a ONOO^- (Fig. 6.6) se observaron resultados similares a los obtenidos mediante el análisis por MS1-filtering: ciertos residuos de Tyr fueron los principales blancos de nitración, siendo Tyr171 el principal sitio de nitración en la HsGS junto con Tyr283. Por el contrario, este método reveló que Tyr288 no resulta nitrado en cantidades tan elevadas como sugirió el análisis anterior. En conjunto, esta aproximación indica que los principales blancos de nitración en la HsGS son Tyr171, Tyr185, Tyr269, Tyr283 y Tyr336, siendo los niveles de nitración en estos residuos lo suficientemente elevados como para tener un impacto cuantitativamente relevante sobre la actividad. El residuo Tyr104 también presentó niveles elevados de nitración, pero el hecho de que se haya detectado nitrado en niveles considerables en la condición control e incluso más en la adición reversa hacen que este valor sea poco confiable. Cabe mencionar que los valores de porcentaje de modificación obtenidos a través de esta aproximación representan una estimación y los valores específicos deben tomarse con cuidado, dado que las intensidades con las cuales se detecta cada péptido varían considerablemente, en especial para los iones de menor intensidad. También es importante considerar la posibilidad de que los péptidos nativos y sus formas modificadas se ionicen con diferentes eficiencias, lo que podría sesgar los resultados. Más allá de estas consideraciones, esta estrategia experimental representa una herramienta de gran utilidad para lograr distinguir los sitios de nitración principales (ej: Tyr171, Tyr336) de los menores (ej: Tyr17, Tyr180).

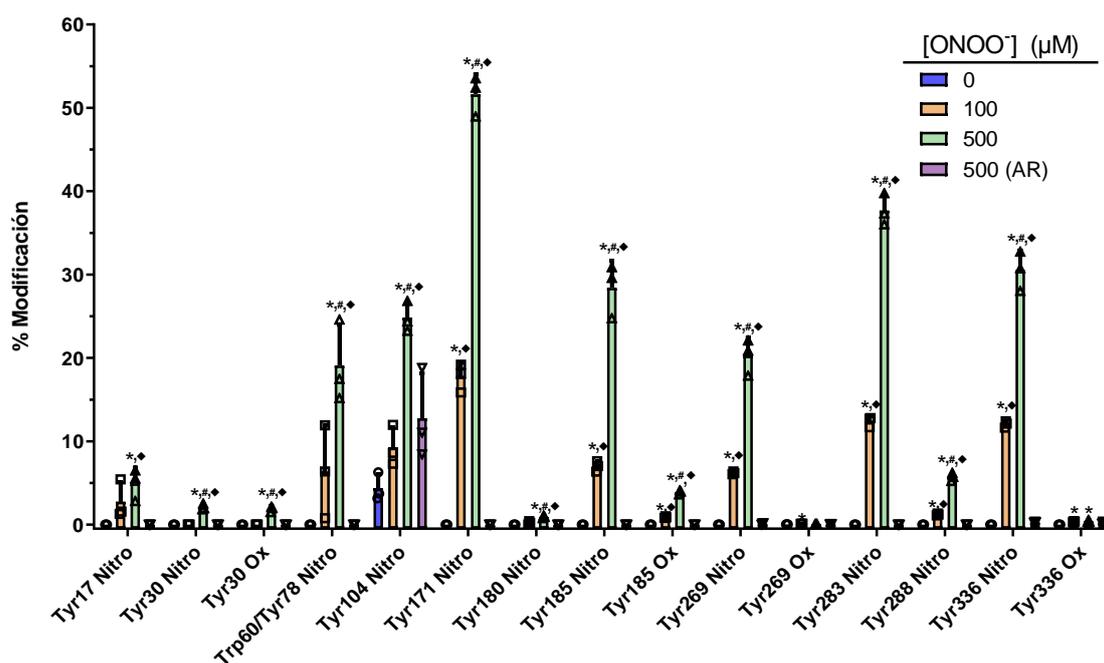


Figura 6.6. Análisis semicuantitativo de la nitración de residuos de Tyr de la HsGS por ONOO^- . Luego de exponer HsGS (0,2 mg/mL) a ONOO^- 100 o 500 μM , se realizó la digestión con tripsina de la proteína y los productos resultantes fueron analizados por MRM-HPLC-MS/MS para la detección dirigida de ciertos péptidos específicos (nativos y modificados). Los niveles relativos de la modificación de cada residuo fueron estimados a partir de las áreas de los picos de la transición más intensa detectada para cada especie. Los datos se muestran como promedio \pm SD (n = 3). *, $p < 0,05$ vs 0 μM ONOO^- ; #, $p < 0,05$ vs 100 μM ONOO^- ; †, $p < 0,05$ vs AR, mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de Tukey. El grupo Trp60/Tyr78 Nitro indica que la transición detectada para el péptido nitrado que contiene los residuos Trp60 y Tyr78 no posee información suficiente de la secuencia para discriminar entre las dos posibilidades de nitración.

Además de su conversión en NO₂Tyr y DOPA, el análisis por western y dot blot reveló que los residuos de Tyr de la HsGS también son oxidados a DiTyr, lo que conduce a la formación de entrecruzamientos covalentes entre subunidades de la HsGS. La identificación de los residuos involucrados en la formación de entrecruzamientos covalentes por espectrometría de masa representa un desafío metodológico considerable, dificultad que además se acentúa en este caso por los bajos rendimientos de formación. En ese sentido, la estrategia más ampliamente utilizada para lograr la secuenciación de péptidos entrecruzados es la del marcaje isotópico con ¹⁸O de los grupos carboxilo C-terminales que se originan cuando la digestión con tripsina de la proteína se realiza en H₂¹⁸O [231,235,245-249]. Las proteasas de serina como la tripsina tienen la capacidad de incorporar dos átomos de ¹⁸O al nuevo extremo C-terminal que surge al catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico, generando así un péptido con una diferencia de + 4 Da respecto a la masa que tendría al ser digerido en H₂¹⁶O. En cambio, cuando ocurre la digestión en H₂¹⁸O de un péptido entrecruzado, al poseer dos extremos C-terminales, se generará una diferencia de masa de + 8 Da con respecto a la masa originada al realizar su digestión en H₂¹⁶O. De este modo, la diferencia de + 8 Da puede ser utilizada como una marca característica para la identificación y caracterización de péptidos entrecruzados. Además, el fraccionamiento previo de las muestras por técnicas separativas como gel filtración o SDS-PAGE puede llevar al enriquecimiento de las especies entrecruzadas y favorecer así su detección a través de la estrategia mencionada anteriormente.

En función de lo explicado, se optó por la estrategia de marcaje isotópico con ¹⁸O para intentar mapear los sitios de entrecruzamiento no reducibles (a través de DiTyr, en principio) que se forman en la HsGS frente al tratamiento con ONOO⁻. Para aumentar las posibilidades de detectar estas especies, además de realizar la digestión en H₂¹⁸O directamente (digestión en solución) de las muestras, también se realizó el fraccionamiento de las muestras por gel filtración en condiciones desnaturalizantes (SDS 0,1% en buffer fosfato) previo a su digestión para purificar distintos tipos de especies entrecruzadas. Para este paso previo, luego del tratamiento de la HsGS con ONOO⁻, se realizó la reducción y alquilación de las muestras (20 µg proteína) en presencia de SDS 1% y se las sometió a separación por gel filtración en una columna Superose 6 Increase 10/300 GL con registro continuo de absorbancia a 280 nm. Para el caso de la HsGS sin tratar, se obtuvo un único pico con un volumen de elución de ~ 15,5 mL (elución del monómero de HsGS); por su parte, para las muestras tratadas con 100 y 500 µM, se observaron además dos picos adicionales con volúmenes de elución de ~ 13 y 14 mL (Fig. 6.7A) que corresponderían a especies de mayor peso molecular formadas por uniones covalentes no-disulfuro de monómeros de HsGS. Para caracterizar mejor las fracciones colectadas de los distintos picos, se realizó su análisis por electroforesis SDS-PAGE 10%; se confirmó así que la fracción 15 (pico mayoritario) corresponde al monómero, mientras que las fracciones 11-13 se componen de dímeros y trímeros y las 9-10 de tetrámeros y pentámeros covalentes (Fig. 6.7B). De este modo, la digestión con tripsina de las fracciones conteniendo especies de mayor peso molecular libres de monómero representan muestras enriquecidas en entrecruzamientos y podrían favorecer su identificación por MS/MS. Por este motivo, para los experimentos de nLC-MS/MS con marcaje con ¹⁸O se utilizaron tanto las muestras no fraccionadas (digestión en solución directa) y distintas fracciones obtenidas de la separación por gel filtración (F12-13 y F15).

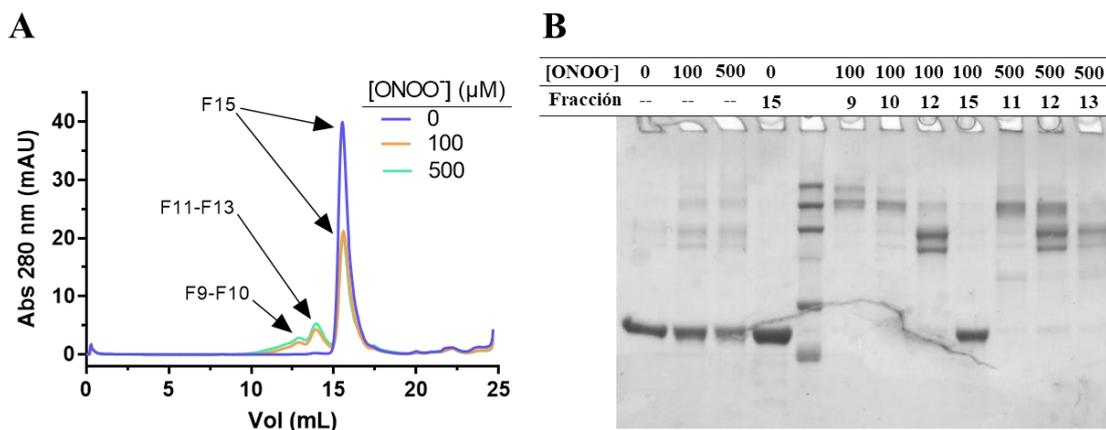


Figura 6.7. Fraccionamiento por gel filtración en condiciones reductoras de muestras de HsGS tratadas con ONOO⁻. (A) Luego de exponer HsGS (0,2 mg/mL) a ONOO⁻ (100-500 μM), las muestras reducidas, alquiladas y desnaturalizadas fueron separadas en una columna Superose 6 Increase 10/300 GL en NaPi 50 mM pH 7,4 con 150 mM NaCl y 0,1% SDS a un flujo de 0,5 mL/min con detección continua a 280 nm. Las flechas indican las principales fracciones colectadas. (B) Análisis por SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras de las fracciones obtenidas de la separación de las muestras por gel filtración. Se muestra la tinción con Coomassie. La concentración de ONOO⁻ se indica en μM.

A través del análisis descrito anteriormente de las muestras digeridas en H₂¹⁶O y H₂¹⁸O se lograron detectar un total de cinco entrecruzamientos diferentes a través de uniones DiTyr, que involucran a seis residuos distintos de Tyr (Tabla 6.I): Tyr288-Tyr269, Tyr269-Tyr269, Tyr288-Tyr283, Tyr336-Tyr336 y Tyr30-Tyr180. Todos estos tipos de entrecruzamiento fueron hallados en muestras de HsGS tratadas con 100 μM ONOO⁻, por lo menos en tres réplicas de las muestras digeridas en solución y en algunos casos también en fracciones obtenidas de la separación por gel filtración. Su identificación fue evaluada y validada manualmente a partir de los datos obtenidos por los distintos métodos de análisis por MS/MS (adquisición y dirigido), empleando distintos modos de fragmentación de los precursores (HCD y EThcD), evaluando la presencia de los marcajes isotópicos y analizando específicamente los iones generados a partir de los posibles precursores de especies entrecruzadas (ej: iones hijos que retengan los sitios de entrecruzamiento aumentan la confiabilidad de la identificación) (Fig. 6.8, Anexo, Fig. 5). Un hecho que además aporta confiabilidad a la identidad de los entrecruzamientos encontrados es que todos los residuos de Tyr implicados en los mismos fueron también detectados como NO₂Tyr, modificación que, al igual que la dimerización, ocurre a través de la formación transitoria del intermediario Tyr^{*}. No se identificaron entrecruzamientos de ningún otro tipo (Tyr-Trp, Trp-Trp, Lys-Tyr, Lys-His o His-His) en las muestras.

6.5. La inactivación de la HsGS por ONOO⁻ está mediada por oxidantes de un electrón

En los experimentos descritos hasta aquí, las reacciones de modificación de la HsGS por ONOO⁻ caracterizadas pueden ocurrir tanto a causa de las reacciones de oxidación directas por dos electrones del par ONOO⁻/ONOOH como debido a las reacciones de oxidación por un electrón mediadas por los radicales derivados del ONOO⁻ (en este caso, ^{*}NO₂ y ^{*}OH resultantes de la homólisis del ONOOH). Teniendo en cuenta los principales

blancos de modificación detectados, las reacciones directas podrían contribuir a la oxidación de residuos de Cys, Met y Trp, mientras que las oxidaciones por un electrón podrían mediar la oxidación de Cys, Met, Trp y Tyr.

Tabla 6.I. Identificación de entrecruzamientos DiTyr en muestras de HsGS expuestas a 100 μ M ONOO \cdot . Se muestran los cinco tipos diferentes de entrecruzamientos hallados a través del análisis por nLC-MS/MS empleando marcaje isotópico con 18 O. Muestra en la cual se identificó hace referencia al tipo de muestra analizada en la cual se encontró la especie (digestión del total en solución o fracciones de separación por gel filtración).

Residuos involucrados	Secuencia del entrecruzamiento	Masa péptido a	Masa péptido b	Masa teórica	Masa experimental	Error (ppm)	Muestra en la cual se identificó
Tyr288, Tyr269	AY ²⁸⁸ DPK- ^Y 269IEEAIEK	592,2857	993,5018	1583,7716	1583,7632	4,21	Solución
Tyr269	^Y 269IEEAIEK- ^Y 269IEEAIEK	993,5018	993,5018	1984,9877	1984,9834	4,178	Solución, F12, F13
Tyr288, Tyr283	AY ²⁸⁸ DPK-RHQY ²⁸³ HIR	592,2857	1008,5366	1598,8064	1598,7954	5,35	Solución, F15
Tyr336	G ^Y 336FEDR-G ^Y 336FEDR	785,3344	785,3344	1568,6529	1568,6438	5,8	Solución, F12, F13
Tyr30, Tyr180	VQAMY ³⁰ IWIDGTGEGLR-DIVEAH ^Y 180RACLYAGVK	1823,888	1879,924	3701,7961	3701,79	3,213	Solución, F15

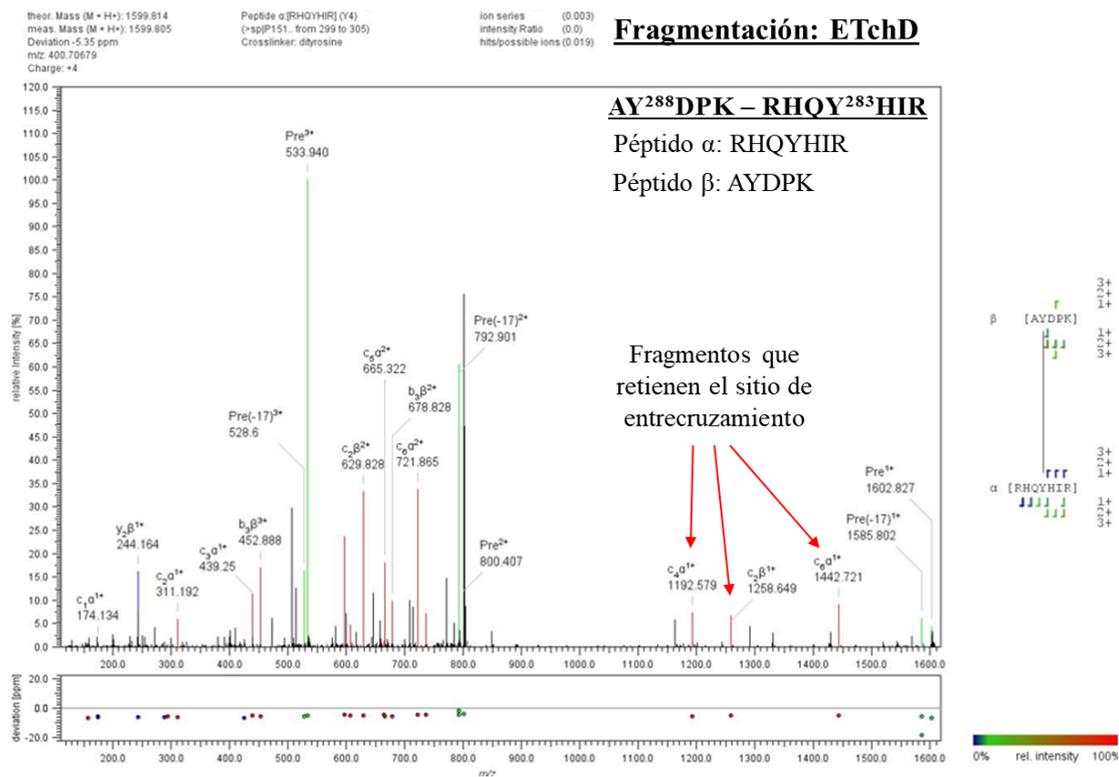


Figura 6.8. Espectro MS/MS asignado al entrecruzamiento entre Tyr288-Tyr283. Se muestra el espectro obtenido mediante fragmentación ETchD asignado al entrecruzamiento Tyr288-Tyr283, donde se indican las señales asignadas. Se especifican además las señales asignadas a fragmentos que retienen el sitio de entrecruzamiento.

Para examinar cuál de estas rutas de modificación oxidativa de la proteína es la principal responsable de su inactivación, se realizó en primer lugar el tratamiento de la

HsGS con ONOO⁻ en ausencia o presencia de 1 mM DF, un quelante de Fe y atrapador de especies radicalares [250-252]. De este modo, es de esperar que la DF, presente en elevadas concentraciones, reaccione con las especies [•]NO₂ y [•]OH evitando que éstas modifiquen oxidativamente a la HsGS, sin impedir las reacciones directas del ONOO⁻ sobre la proteína (Fig. 2.10). La inactivación de la HsGS por ONOO⁻ fue ampliamente prevenida por la presencia de DF (Fig. 6.9A), lo que se vio acompañado por un importante descenso en los niveles de entrecruzamientos covalentes no-reducibles (DiTyr) pero solo por una modesta disminución en la formación de entrecruzamientos de tipo disulfuro (Fig. 6.9B). Además, los análisis por western y dot blot mostraron que la DF causó una inhibición completa de la nitración de Tyr mediada por ONOO⁻ (Figs. 6.9C-D); sin embargo, no se observó ningún efecto de la DF en la oxidación de residuos de Cys (Fig. 6.9E). Estos resultados sugieren que la inactivación de la HsGS mediada por ONOO⁻ ocurre principalmente a través de mecanismos que involucran reacciones de oxidación y modificación por un electrón dependientes de [•]NO₂ y [•]OH, más que por las reacciones de oxidación directa del par ONOO⁻/ONOOH con la HsGS.

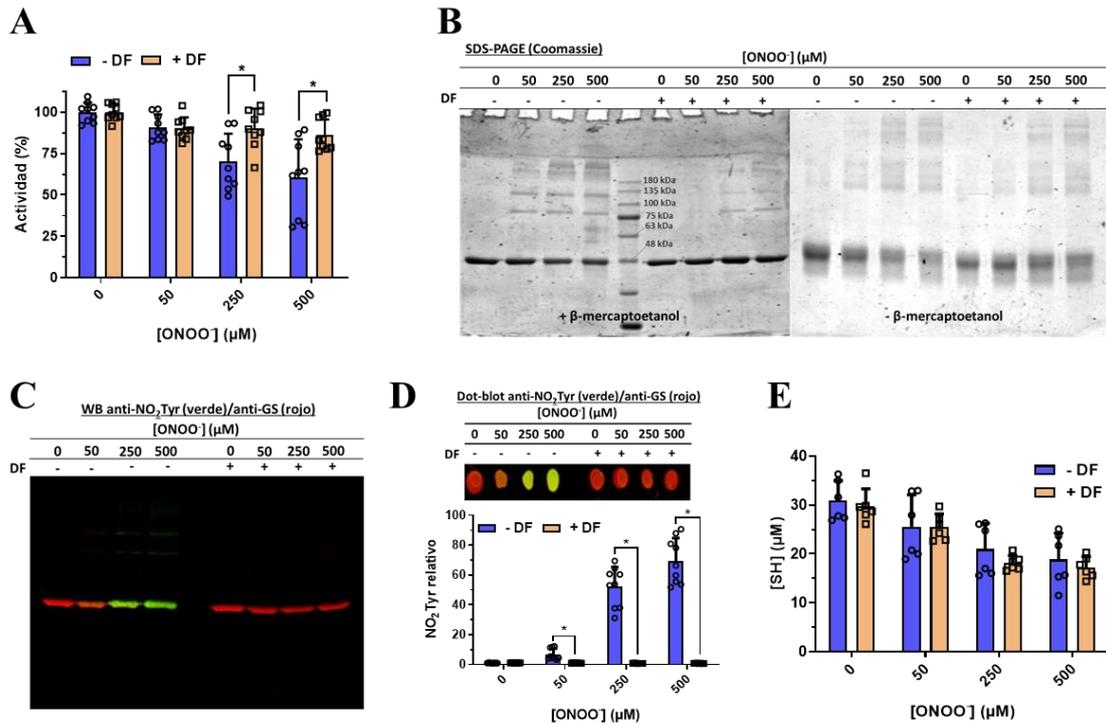


Figura 6.9. Efecto de la desferrioxamina en la inactivación y modificación oxidativa de la HsGS por ONOO⁻. Se expuso HsGS (0,2 mg/mL) a ONOO⁻ (50-500 μM) en buffer KPi pH 7,3 tanto en ausencia (- DF) como en presencia (+ DF) de 1 mM desferrioxamina. Luego del tratamiento, se tomaron alícuotas para realizar la caracterización de las muestras. **(A)** Medidas de actividad enzimática (n = 9), expresada como relativa a cada control (100% = 59,9 U/mg y 55,0 U/mg, - DF y + DF, respectivamente). **(B)** Análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. **(C)** Detección de NO₂Tyr por western blot. **(D)** Determinación de niveles relativos de NO₂Tyr por dot blot; la relación de intensidades anti-NO₂Tyr (verde)/anti-GS (rojo) para cada muestra se expresan como relativas al respectivo control sin tratar (n = 9). **(E)** Cuantificación de tioles en la HsGS mediante ensayo con DTNB (n = 6). Los datos se muestran como promedio ± SD. *, *p* < 0,05 (- DF vs + DF) mediante análisis por test *t* no pareado.

Para obtener mayor información acerca del rol de las reacciones mediadas por radicales en la inactivación de la HsGS, se realizó el tratamiento de la proteína con ONOO^- en presencia de 25 mM NaHCO_3 , en equilibrio con $\sim 1,2$ mM CO_2 , que debido a su capacidad de reaccionar con el ONOO^- ($k = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 25°C [136]) competirá con las reacciones directas del ONOO^- con la proteína al tiempo que también modulará la producción de radicales derivados de la descomposición del ONOO^- , aumentando el rendimiento de producción de radicales e incrementando su selectividad (por la producción de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en lugar de $\cdot\text{OH}$) [122] (Fig. 2.10). En presencia de CO_2 , se observó una mayor inactivación de la HsGS frente al tratamiento con ONOO^- (Fig. 6.10A), lo que fue acompañado de un incremento en la formación de entrecruzamientos no reducibles (Fig. 6.10B), de NO_2Tyr (Fig. 6.10C-D) y de DiTyr (Fig. 6.10E). No se vieron diferencias significativas en el grado de oxidación de residuos de Cys de la HsGS por la presencia del CO_2 (Fig. 6.10F), sugiriendo que su oxidación estaría ocurriendo tanto a través de la reacción directa como a través de los radicales derivados del ONOO^- . En conjunto, los datos obtenidos tanto a través de la inhibición (uso de DF) como de la estimulación (uso de CO_2) de las vías radicalares indican que modificaciones oxidativas como la nitración y dimerización de Tyr estarían mediando la pérdida de actividad, mientras que la oxidación de residuos de Cys no tendría un impacto directo en la actividad enzimática.

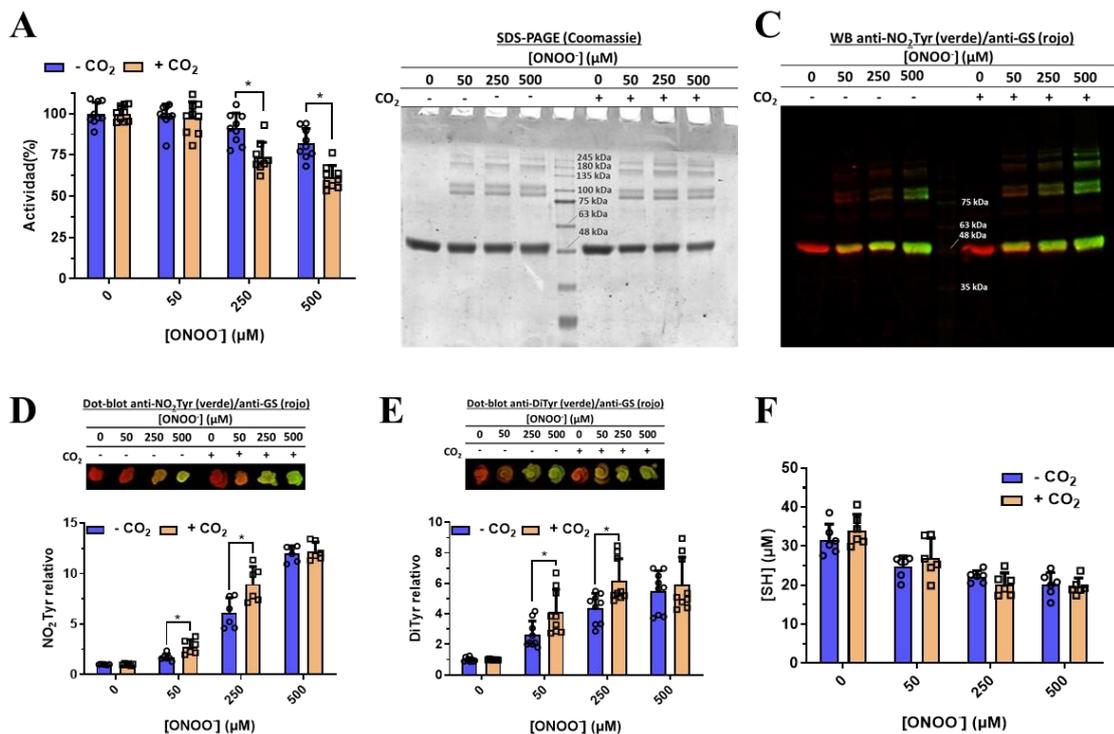


Figura 6.10. El CO_2 incrementa la inactivación oxidativa de la HsGS mediada por ONOO^- . Para determinar el efecto del CO_2 , se expuso HsGS (0,2 mg/mL) a ONOO^- (50-500 μM) en buffer KPi pH 7,3 en ausencia (- CO_2) o presencia (+ CO_2) de NaHCO_3 25 mM y luego del tratamiento se caracterizaron las muestras. **(A)** Medidas de actividad enzimática ($n = 9$), expresada como relativa a cada control (100% = 51,3 U/mg y 50,0 U/mg, - CO_2 y + CO_2). **(B)** Análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se muestra la tinción con Coomassie. **(C)** Detección de NO_2Tyr por western blot en muestras tratadas. **(D)** Determinación de NO_2Tyr por dot blot ($n = 6$); se expresan las intensidades NO_2Tyr normalizadas como relativas a cada control. **(E)** Detección de niveles de DiTyr por dot blot ($n = 9$), expresados relativos a cada control. **(F)** Cuantificación de tioles de la HsGS mediante reacción con DTNB ($n = 6$). Los datos se representan como promedio \pm SD. *, $p < 0,05$ (- CO_2 vs + CO_2) mediante análisis por test t no pareado.

Como una tercera aproximación para profundizar en los mecanismos y reacciones que ocasionan la pérdida de actividad HsGS por ONOO⁻, se evaluó el efecto del pH en dichos procesos. La química del ONOO⁻ y su reactividad (directa o indirecta) con proteínas son altamente sensibles a los cambios de pH, tanto por su propia naturaleza ácido-base como por la de varios de los blancos aminoacídicos [122,126,127,149,253,254]. De este modo, a través de los cambios de pH se consigue modular en cierto grado los patrones de modificación de la HsGS por ONOO⁻, variando los rendimientos de las principales modificaciones caracterizadas y evaluando cuál o cuáles de ellas se correlacionan con una mayor pérdida de actividad. Se realizó entonces la exposición de HsGS a un bolo único de 500 μM ONOO⁻ en buffers KPi como los utilizados siempre pero con valores de pH en el rango 6,2-8,5. Luego del agregado de ONOO⁻, se tomaron alícuotas para realizar las distintas mediciones; en ese sentido, todas las medidas de actividad fueron realizadas en iguales condiciones de pH (6,8 aportado por el buffer de la mezcla de reactivos) y además se realizaron controles sin tratar a cada valor de pH para asegurar que la sola incubación de la enzima a distintos valores de pH (por más que sean tiempos cortos) no sea un factor que afecte la actividad. Efectivamente, la actividad específica de las muestras no tratadas (- ONOO⁻) no se vio afectada por la incubación de la proteína en el rango de pH 6,2-8,5 (Fig. 6.11A).

La pérdida de actividad de la HsGS luego de la exposición a 500 μM ONOO⁻, que mostró una variación mínima en el rango de 6,5-7,4, tendió a ser considerablemente mayor a valores de pH > 7,4 (Fig. 6.11B). A su vez, el análisis por SDS-PAGE de las muestras tratadas reveló que la formación de entrecruzamientos covalentes, especialmente los no reducibles, aumentó de manera importante a valores de pH mayores (Fig. 6.11D). Con respecto a la modificación oxidativa de los residuos de Tyr, se observaron niveles máximos de formación de NO₂Tyr a pH ~ 7,4 con un descenso de los mismos tanto a valores de pH más ácidos como más alcalinos (Fig. 6.11C); la formación de DiTyr determinada por dot blot no varió mucho en el rango de pH 6,2-7,4 pero presentó un incremento muy notorio a valores de pH > 7,4 (Fig. 6.11E). El grado de oxidación de residuos de Cys también presentó un aumento relevante a valores de pH más elevados (Fig. 6.11F). Finalmente, se determinaron los niveles relativos de nitración de los distintos residuos de Tyr mediante MRM-MS/MS a tres valores diferentes de pH (6,2, 7,4 y 8,6), para evaluar si además de los cambios globales observados, hay algún tipo de variación más notoria en algún residuo puntual al cambiar el pH. Para la mayoría de los residuos, la nitración fue significativamente mayor a pH 7,4 que a pH 6,2 (aproximadamente el doble o más), pero no presentó diferencias significativas entre los valores de pH 7,4 y 8,6 a excepción del residuo Tyr180, el cuál es de todos modos un blanco muy minoritario (Fig. 6.11G).

En conjunto, estos resultados indican que la inactivación oxidativa de la HsGS es un proceso complejo que no puede explicarse por un único tipo de modificación oxidativa sobre un único residuo. El hecho de que las mayores pérdidas de actividad por ONOO⁻ fueron detectadas a valores de pH en que la nitración de Tyr no fue máxima sugiere que estos dos procesos no se relacionan directamente de modo causal. Por el contrario, la formación de DiTyr y la oxidación de Cys fueron máximas a valores de pH en los cuáles la inactivación también fue la mayor, sugiriendo la posibilidad de que estas modificaciones estén más relacionadas con la pérdida de actividad mediada por ONOO⁻.

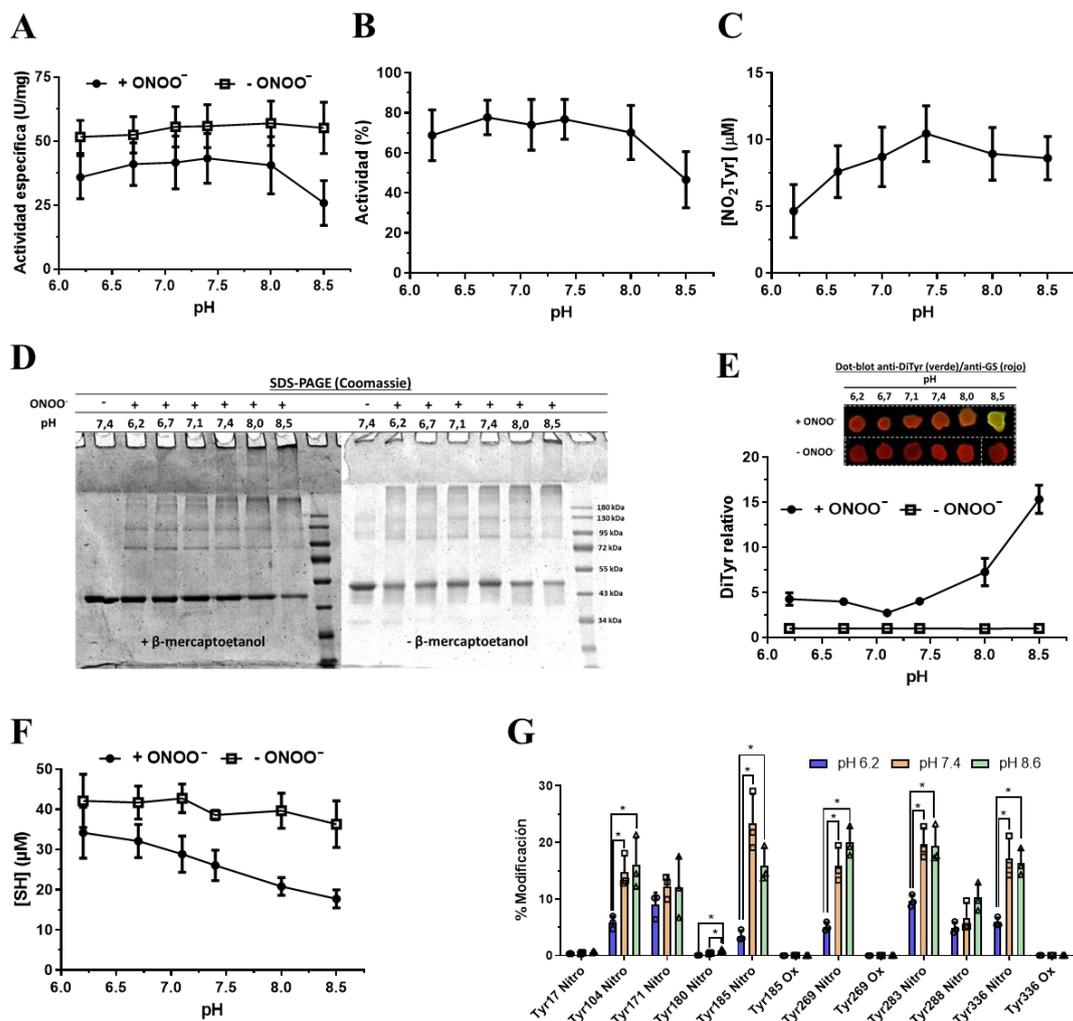


Figura 6.11. Efecto del pH en la inactivación por ONOO⁻ de la HsGS. Se expuso HsGS (0,2 mg/mL) a un bolo de 500 µM ONOO⁻ en buffer KPi de valores de pH en el rango 6,2-8,5 y se caracterizó la inactivación y modificación de la proteína. **(A)** Actividad específica de HsGS tratada y sin tratar a diferentes valores de pH (n = 12). **(B)** Actividad relativa de las muestras tratadas para los distintos pH, expresada como % del respectivo control de pH (ver panel A) (n = 12). **(C)** Cuantificación de NO₂Tyr por espectrofotometría en muestras expuestas a ONOO⁻ a distinto pH (n = 9). **(D)** Análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras de HsGS tratada con ONOO⁻ en el rango de pH 6,2-8,5. **(E)** Determinación de la formación de DiTyr a los distintos valores de pH; los valores se expresan como relativos a cada control (n = 3). **(F)** Cuantificación de tioles a los diferentes valores de pH para muestras de HsGS tratadas o no tratadas con ONOO⁻ (n = 6). **(G)** Cuantificación relativa del grado de modificación de residuos de Tyr por ONOO⁻ mediante MRM-HPLC-MS/MS a tres valores de pH seleccionados (n = 3). Los datos se muestran como promedio ± SD. *, p < 0,05 mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de Tukey.

6.6. Estudios de la inactivación de cinco mutantes Tyr→Phe de HsGS por ONOO⁻

Los resultados obtenidos hasta aquí no permiten establecer una relación directa entre la pérdida de función HsGS y la modificación oxidativa de algún residuo particular, a diferencia de lo que se había planteado previamente en donde se atribuía la inactivación por ONOO⁻ a la nitración de la Tyr336 [206,207]. Si bien se halló que la HsGS resulta nitrada en residuos de Tyr de manera cuantitativamente relevante, y que la Tyr336 es uno de los principales blancos de nitración, hubo otros residuos de Tyr que fueron nitrados en

igual o mayor medida. Además de esto, se encontraron más modificaciones oxidativas inducidas por el ONOO^- en la HsGS que la nitración de Tyr, siendo necesario considerar múltiples posibilidades para explicar la pérdida de función. En ese sentido, para lograr discriminar más en detalle el rol que juegan las modificaciones de los residuos de Tyr (sea por nitración o por oxidación), se generaron una serie de variantes mutantes de HsGS en residuos de Tyr seleccionados, que fueron sustituidos por residuos de Phe (ver *Materiales y Métodos*). Los residuos de Tyr elegidos para el diseño de los mutantes fueron aquellos que presentaron altos niveles de nitración y/o fueron identificados como participantes en la formación de entrecruzamientos DiTyr. De este modo, se adquirieron los siguientes mutantes Tyr(Y)→Phe(F): Y171F, Y185F, Y269F, Y288F y Y336F. Para la expresión y purificación de las proteínas mutantes en bacterias BL21, se siguieron los mismos protocolos empleados para la enzima WT. En general, se obtuvieron rendimientos de purificación comparables con la HsGS WT, a excepción del mutante Y185F que fue el que se obtuvo en menores cantidades; la pureza de las fracciones fue en todos los casos similar, lo que permitió el desarrollo de los experimentos de manera análoga a lo hecho con la proteína salvaje.

En primer lugar, una vez purificados los mutantes, se realizaron medidas de actividad específica de las proteínas y se estudió su susceptibilidad a la inactivación por ONOO^- (Fig. 6.12). En ausencia de tratamiento con ONOO^- , los mutantes Y171F, Y185F y Y336F presentaron actividades específicas comparables a las de la enzima WT. Por su parte, el mutante Y269F presentó una actividad específica levemente menor que el WT, mientras que el mutante Y288F presentó valores considerablemente menores (disminución de ~80% de la actividad específica respecto al WT). Todos los mutantes mostraron una disminución en su actividad específica luego de su exposición a ONOO^- , independientemente de los valores en condiciones control, presentando en la mayoría de los casos pérdidas de actividad mayores que el WT (Fig. 6.12).

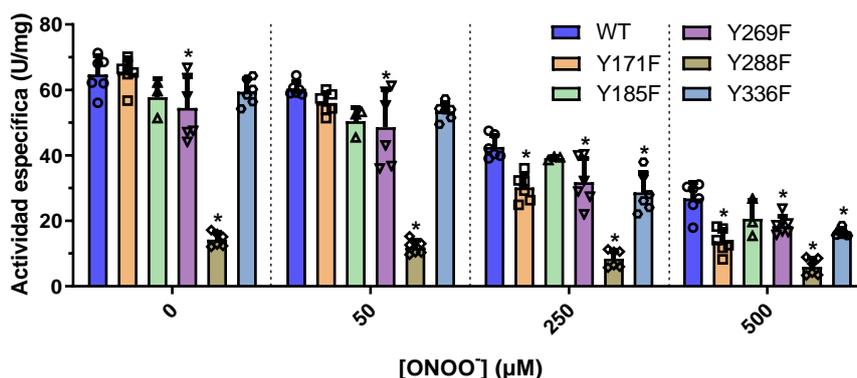


Figura 6.12. Medidas de actividad específica de los cinco mutantes Tyr→Phe de la HsGS. Luego de su purificación, se realizaron medidas de actividad específica de los cinco mutantes y de la HsGS WT en condiciones control (0 μM) o tratadas con ONOO^- (50-500 μM). En todos los casos, se utilizó una concentración de HsGS de 0,2 mg/mL y se la expuso a ONOO^- en buffer KPi 100 mM pH 7,3 con 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA. Los datos se muestran como promedio \pm SD (n = 6). *, $p < 0,05$ mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de Tukey (comparación vs WT).

Para evaluar mejor el distinto grado de susceptibilidad a la inactivación por ONOO^- de los mutantes, se compararon las pérdidas relativas de actividad de cada variante con respecto al WT (normalizadas a cada control); además, se analizó la modificación oxidativa de manera general de cada mutante en comparación con la proteína WT para identificar posibles correlaciones entre ambos procesos. La pérdida de actividad HsGS para el mutante Y171F, que carece del principal blanco de nitración, fue significativamente mayor que para la HsGS WT, indicando una mayor susceptibilidad a la inactivación por ONOO^- (Fig. 6.13A). El análisis por SDS-PAGE tanto en condiciones no reductoras como reductoras no evidenció grandes diferencias en la formación de entrecruzamientos covalentes (Fig. 6.13B). Si bien, por un lado, la cantidad de entrecruzamientos detectados parece mayor en el WT, la banda del monómero presentó un descenso mayor para la HsGS Y171F; esto podría sugerir que en realidad la falta de Tyr171 favorece la formación de entrecruzamientos, generando especies de peso molecular más elevado que no ingresan al gel y por lo tanto no logran ser detectados. Los niveles de nitración, detectados mediante dot (Fig. 6.13C) y western blot (Fig. 6.13D) fueron levemente menores para la HsGS Y171F con respecto a la WT, lo que en principio era esperable dado que carece del residuo que es más preferentemente nitrado. No se observaron diferencias significativas con respecto a la formación de DiTyr (Fig. 6.13E) o a la oxidación de residuos de Cys (Fig. 6.13F) luego del tratamiento con ONOO^- . Entonces, la mayor pérdida de actividad observada para el mutante Y171F con respecto al WT no se correlacionó con un incremento en ninguna de las modificaciones oxidativas en residuos de Tyr y Cys, al tiempo que también sugiere que la modificación de la Tyr171 no es un determinante principal de la inactivación de la enzima.

La variante mutante Y185F de la HsGS resultó inactivada en igual grado que la HsGS WT (Fig. 6.14A); a su vez, no se observaron diferencias importantes en el análisis por SDS-PAGE entre las dos formas de proteína (Fig. 6.14B) ni se hallaron diferencias significativas en los niveles relativos de NO_2Tyr (Fig. 6.14C) o DiTyr (Fig. 6.14D) formados luego de exponer la HsGS WT e Y185F a ONOO^- . De manera similar, la inactivación del mutante de HsGS Y269F no presentó diferencias significativas con respecto a la de la enzima WT (Fig. 6.15A); tampoco se observaron diferencias en el análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras, aunque en condiciones no reductoras la pérdida de monómero en el mutante fue más pronunciada (Fig. 6.15B). El análisis de la nitración de residuos de Tyr presentó resultados un poco contradictorios: por un lado, mediante western blot, el mutante Y269F presentó niveles de reactividad anti- NO_2Tyr entre similares a levemente menores que la HsGS WT (Fig. 6.15C), mientras que a través de dot blot la HsGS Y269F mostró niveles relativos de NO_2Tyr significativamente mayores que la WT (Fig. 6.15D). Finalmente, los niveles de DiTyr analizados por dot blot (Fig. 6.15E) y el consumo de grupos -SH (Fig. 6.15F) no presentaron diferencias significativas entre la HsGS WT y la Y269F.

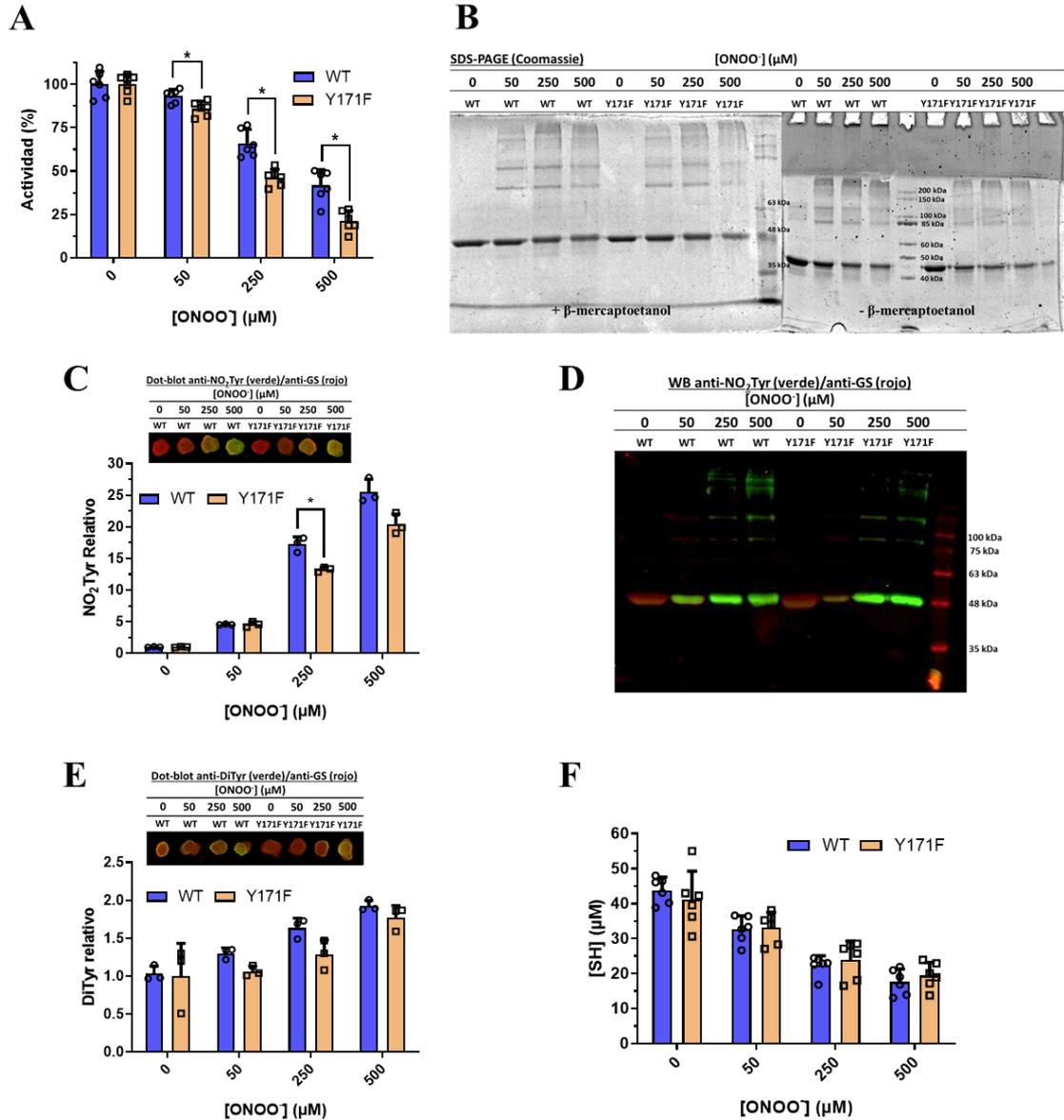


Figura 6.13. Inactivación por ONOO⁻ del mutante de HsGS Y171F. Se expuso en paralelo a ONOO⁻ la HsGS Y171F y WT (0,2 mg/mL) en buffer KPi pH 7,3 y a continuación se realizaron distintos estudios bioquímicos. **(A)** Medidas de actividad relativa en muestras tratadas (n = 6). **(B)** Análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. **(C)** Determinación de niveles relativos de NO₂Tyr por dot blot (n = 3). **(D)** Análisis de la formación de NO₂Tyr por western blot. **(E)** Determinación de niveles de DiTyr relativos por dot blot (n = 3). **(F)** Cuantificación de tioles en las muestras por reacción con DTNB (n = 6). Los datos se representan como promedio ± SD. *, *p* < 0,05 (WT vs Y171F) mediante análisis por test *t* no pareado.

El mutante de HsGS Y288F, como se describió previamente (Fig. 6.12), presentaba una actividad específica basal considerablemente más baja que el WT; independientemente de eso, se evaluó su inactivación relativa y modificación por ONOO⁻ de manera comparativa con el WT. Normalizando los valores de actividad respecto a cada control, no se observaron diferencias significativas en la pérdida de actividad de la HsGS Y288F respecto a la WT luego del tratamiento con ONOO⁻ (Fig. 6.16A). El análisis comparativo por SDS-PAGE de las muestras tratadas mostró en condiciones reductoras

una menor formación de entrecruzamientos covalentes (dímeros y trímeros principalmente) para el mutante Y288F respecto al WT, si bien la pérdida de intensidad del monómero fue relativamente similar (Fig. 6.16B). Bajo condiciones no reductoras, no obstante, el mutante presentó una desaparición del monómero mayor que el WT, sugiriendo una mayor formación de uniones de tipo disulfuro (Fig. 6.16B). Respecto a la formación de NO₂Tyr y DiTyr luego del tratamiento con ONOO⁻, no se observaron diferencias significativas entre la HsGS WT y la Y288F (Fig. 6.16C-D). En correlación con lo visto en el análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, el consumo de Cys fue mayor para la HsGS Y288F que para el WT (Fig. 6.16E).

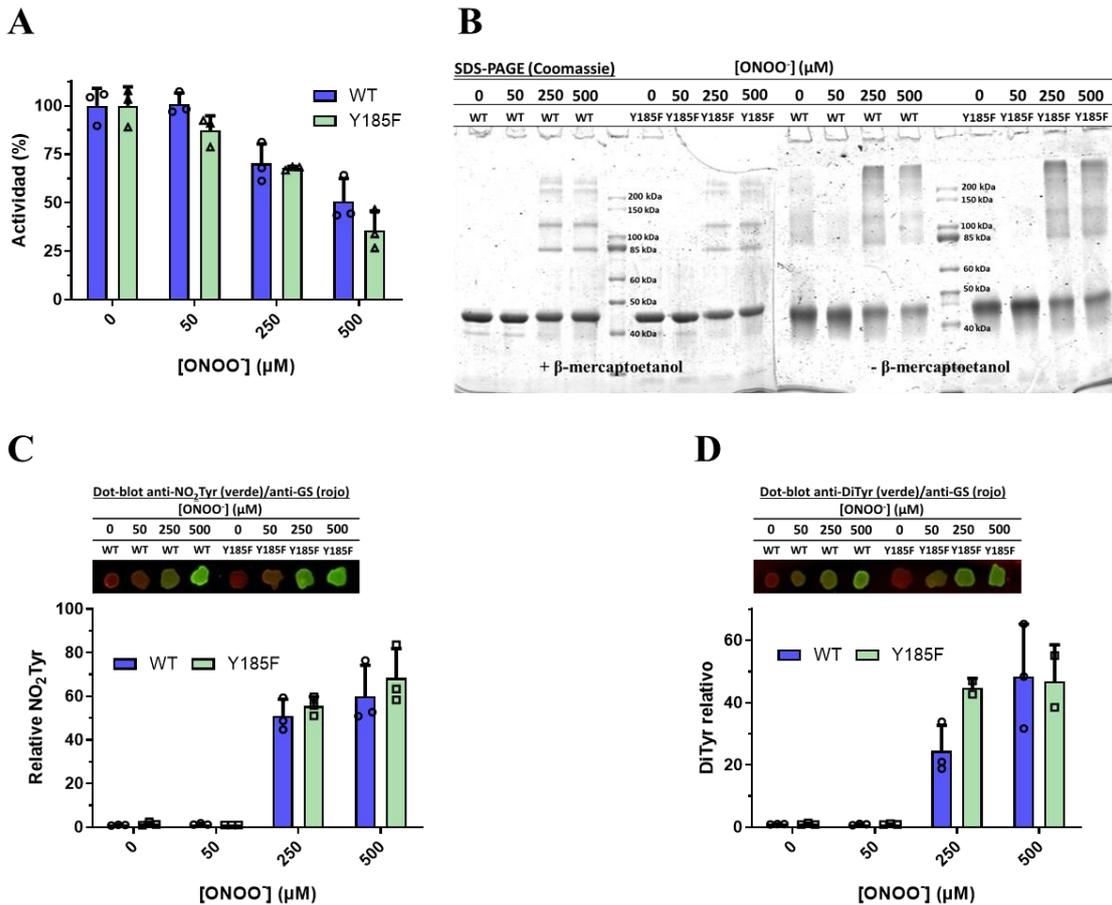


Figura 6.14. Estudio comparativo de la inactivación de la HsGS Y185F por ONOO⁻. Tras exponer HsGS WT y mutante Y185F (0,2 mg/mL) a ONOO⁻ en buffer KPi pH 7,3 se tomaron alícuotas para caracterizar la inactivación y modificación oxidativa de las dos proteínas. **(A)** Medidas de actividad relativa, normalizadas a cada control. **(B)** Análisis por SDS-PAGE de las muestras tratadas, en condiciones reductoras y no reductoras. **(C)** Determinación de los niveles relativos de NO₂Tyr mediante dot blot. **(D)** Evaluación por dot blot de la formación de DiTyr. Los datos se representan como promedio ± SD (n = 3).

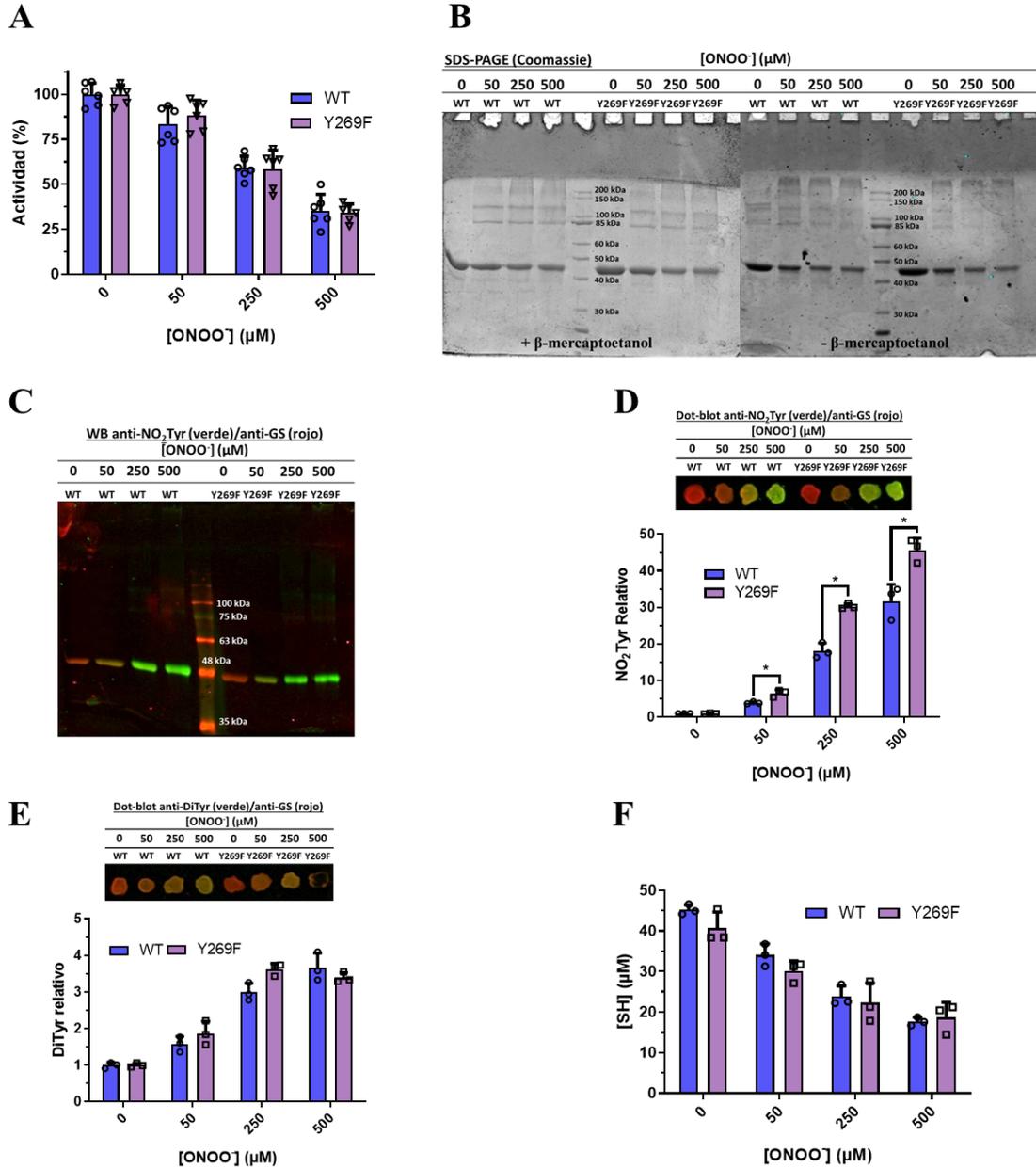


Figura 6.15. Estudio de la inactivación por ONOO⁻ del mutante de HsGS Y269F. Se evaluó el proceso de inactivación oxidativa por ONOO⁻ de la HsGS Y269F en comparación con el WT mediante: (A) medidas de actividad relativa (n = 6); (B) análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras; (C) formación de NO₂Tyr por western blot; (D) determinación de los niveles relativos de NO₂Tyr y (E) DiTyr por dot blot (n = 3); (F) determinación de la oxidación de Cys por espectrofotometría (n = 3). Los datos se representan como promedio ± SD. *, *p* < 0,05 (WT vs Y269F) mediante análisis por test *t* no pareado.

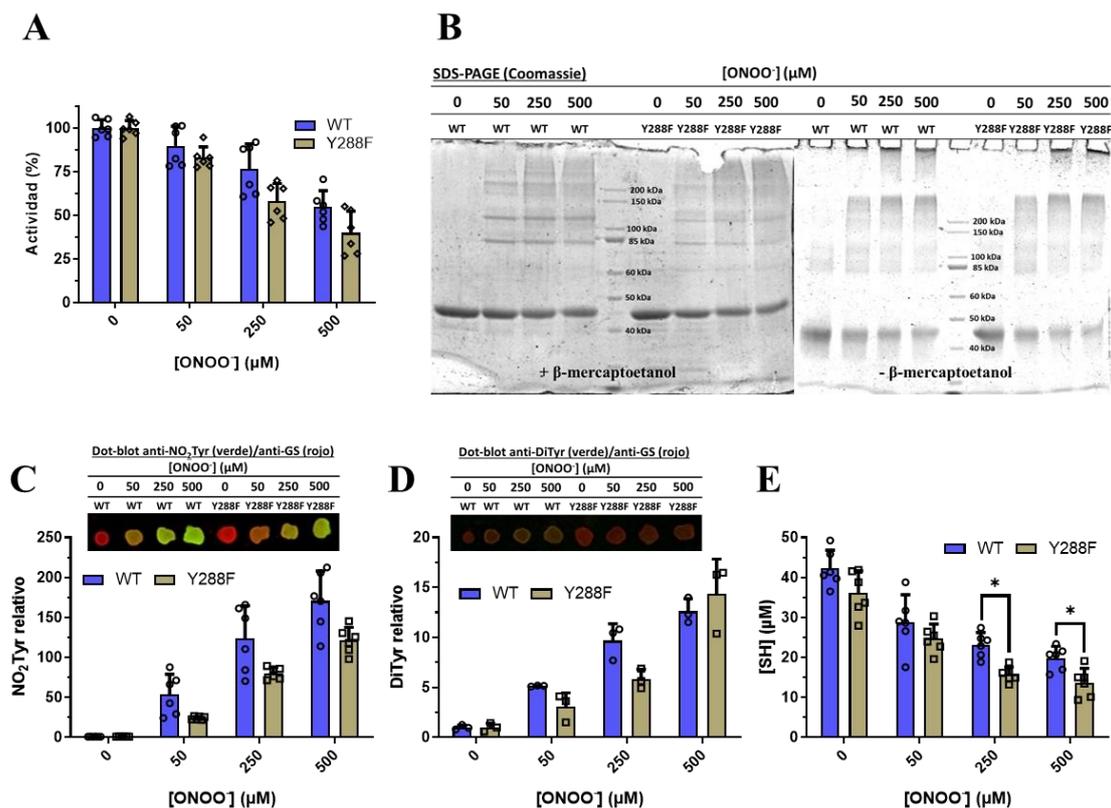


Figura 6.16. Inactivación por ONOO⁻ del mutante de HsGS Y288F. Se expuso HsGS WT e Y288F a ONOO⁻ (50-500 μM) y luego del tratamiento se realizaron distintos ensayos para caracterizar el proceso. **(A)** Medidas de actividad enzimática relativa a cada control (n = 6). **(B)** Estudio por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras de las muestras tratadas. **(C)** Análisis de los niveles relativos de NO₂Tyr por dot blot (n = 6). **(D)** Niveles relativos de DiTyr determinados mediante dot blot (n = 3). **(E)** Cuantificación de grupos -SH en las muestras expuestas a ONOO⁻ (n = 6). Los datos se representan como promedio ± SD. *, *p* < 0,05 (WT vs Y288F) mediante análisis por test *t* no pareado.

Por último, se estudió la inactivación del mutante Y336F por ONOO⁻ en comparación con la enzima WT (Fig. 6.17). Como se observó con el mutante que carecía de la Tyr171, la variante Y336F resultó inactivada por ONOO⁻ en mayor medida que la HsGS WT (Fig. 6.17A). La formación de entrecruzamientos covalentes no reducibles no presentó grandes diferencias, más allá de que la cantidad de entrecruzamientos parece ser mayor para Y336F tratada con 50 y 250 μM ONOO⁻ (Fig. 6.17B). El análisis por western blot reveló un menor grado de formación de NO₂Tyr para la HsGS Y336F respecto a la WT (Fig. 6.17C), aunque mediante cuantificación por espectrofotometría no se vieron diferencias significativas (Fig. 6.17D). Tampoco se observaron diferencias entre la susceptibilidad a la oxidación de residuos de Cys entre ambas formas de HsGS (Fig. 6.17E). Para evaluar la posibilidad de que la falta del residuo Tyr336, uno de los principales blancos de nitración, genere una redirección de los radicales oxidantes que incremente el grado de oxidación de otros blancos, se determinaron los niveles de modificación de los principales residuos por MRM luego del tratamiento con ONOO⁻ de ambas proteínas. Efectivamente, el tratamiento con 500 μM ONOO⁻ del mutante Y336F llevó a un incremento en el grado de nitración de los residuos Tyr269, Tyr283 y Tyr288, con respecto a la HsGS WT (Fig. 6.17F). De este modo, la ausencia de Tyr336 produjo

una mayor nitración en otros residuos; dado que dicho mutante resultó inactivado en mayor medida que el WT, existe la posibilidad que la nitración en alguno de estos sitios se correlacione con la pérdida de función por modificaciones oxidativas, como se discutirá más adelante.

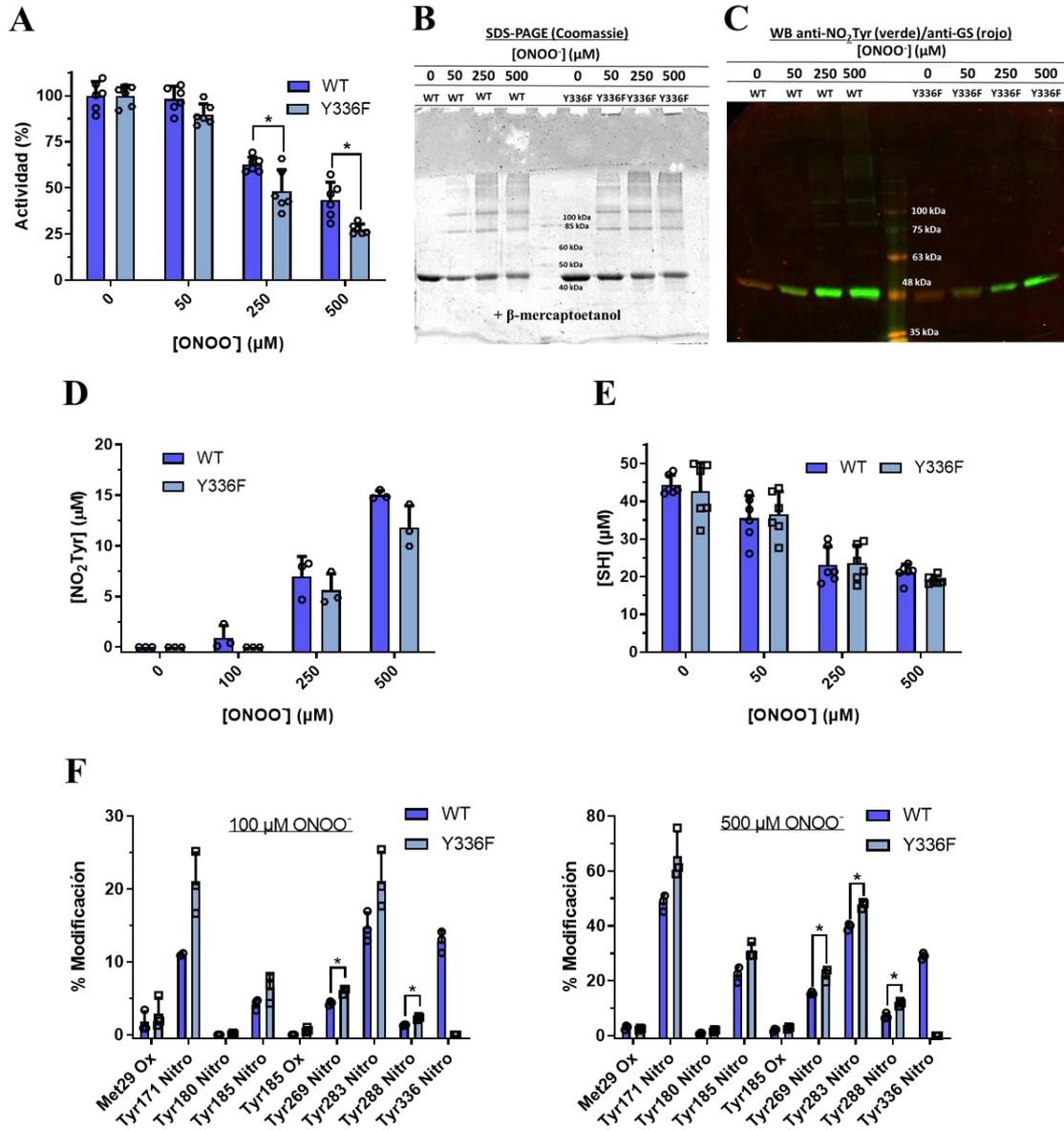


Figura 6.17. Estudio comparativo de la inactivación oxidativa de la HsGS Y336F por ONOO⁻. Luego de exponer HsGS WT e Y336F a ONOO⁻, se estudió la inactivación y modificación oxidativa de ambas proteínas. **(A)** Medidas de actividad enzimática, relativas a cada control (n = 6). **(B)** Estudio de la formación de entrecruzamientos covalentes no reducibles por SDS-PAGE. **(C)** Detección de NO₂Tyr en muestras tratadas con ONOO⁻ mediante western blot. **(D)** Determinación cuantitativa de los niveles de NO₂Tyr por espectrofotometría. **(E)** Cuantificación de grupos -SH libres mediante reacción con DTNB. **(F)** Evaluación del grado de modificación de los principales residuos mediante HPLC-MS/MS-MRM, luego de la digestión con tripsina de HsGS WT e Y336F expuesta a ONOO⁻. Los datos se representan como promedio ± SD. *, *p* < 0,05 (WT vs Y336F) mediante análisis por test *t* no pareado.

6.7. Agregación de la HsGS inducida por ONOO⁻

Los análisis por electroforesis SDS-PAGE de muestras de HsGS tratadas con ONOO⁻ revelaron la formación de entrecruzamientos covalentes de tipo reducibles (disulfuro) y no reducibles (DiTyr); estas uniones dieron lugar mayormente a formas covalentemente unidas con pesos moleculares mayores al monómero pero menores al esperado para el decámero nativo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se observó también la formación de especies de peso molecular más elevado, que no lograron ingresar a los geles empleados, principalmente cuando éstos se hicieron en condiciones no reductoras. Además, en muchos casos, se observó que las soluciones de HsGS oxidadas con ONOO⁻ se volvían turbias aproximadamente una hora luego del tratamiento, algo que además fue más apreciable cuando se hicieron pruebas utilizando concentraciones de enzima más elevadas (1,0 mg/mL). Todas estas observaciones sugerían que la oxidación de la HsGS por ONOO⁻ estaba induciendo la agregación e insolubilización de la proteína, más allá de generar los entrecruzamientos observados. Por lo tanto, se examinó en detalle la susceptibilidad de la HsGS a sufrir un proceso de agregación macromolecular luego de resultar oxidada por ONOO⁻ y la relevancia que tiene este proceso en la inactivación oxidativa de la proteína.

En primer lugar, se realizaron medidas de actividad HsGS durante un período de 2 horas luego de su exposición a un bolo único de ONOO⁻, de modo de evaluar si las pérdidas de actividad ya caracterizadas se veían acentuadas con el paso del tiempo. Entones, se agregó ONOO⁻ (50-500 μ M) a HsGS (0,2 mg/mL) en buffer KPi pH 7,3 a temperatura ambiente y 5 minutos después (para asegurar la total descomposición del ONOO⁻) se incubaron las muestras a 37°C bajo agitación suave, removiéndose alícuotas a distintos tiempos para realizar medidas de actividad enzimática. Si bien la pérdida de actividad HsGS a los 5 minutos fue comparable con los valores reportados anteriormente (ej: Fig. 6.3A), se detectó para todas las muestras tratadas un descenso adicional significativo de la actividad a tiempos de incubación mayores (Fig. 6.18A). Por ejemplo, tras la adición de 50 μ M ONOO⁻, la pérdida de actividad a los 5 minutos fue de sólo un 10%, pero luego de las 2 horas de incubación se incrementó a ~ 40%. Estas disminuciones en la actividad HsGS fueron incluso mayores durante las incubaciones por 2 hs para las muestras tratadas con 250 y 500 μ M ONOO⁻. Dado que el ONOO⁻ se descompone completamente en cuestión de segundos bajo las condiciones experimentales empleadas (buffer pH 7,3), la pérdida de actividad HsGS observada durante la incubación a 37°C por 2 hs se debería a procesos secundarios lentos que son consecuencia de las modificaciones oxidativas inducidas por el ONOO⁻, ya sea directamente o indirectamente (a través de sus radicales derivados) durante su descomposición. La explicación más probable de esta observación sería la agregación no covalente de la HsGS oxidada. Para examinar esta posibilidad en mayor profundidad, se estudió la formación de agregados a través de medidas de turbidez a 405 nm. Para ello, se expuso HsGS a un bolo único de ONOO⁻ bajo las condiciones experimentales habituales, se transfirieron las muestras a una placa de 96 pocillos y se las incubó a 37°C por 12 hs realizándose medidas de turbidez durante el proceso (Fig. 6.18B). Tras el tratamiento de HsGS (0,2 mg/mL) con distintas concentraciones de ONOO⁻ (50-1000 μ M), se observó una fase inicial de latencia de 15-20 minutos, la cual fue seguida por un incremento significativo en la turbidez a lo largo de los 30-60 minutos. A esto le siguió un incremento mucho menos pronunciado de la turbidez durante los 60 minutos siguientes hasta alcanzar finalmente una meseta. Tanto

la pendiente inicial como la amplitud de las curvas fueron mayores al aumentar la concentración de ONOO⁻ agregada. Cuando se realizó el agregado de una concentración fija de ONOO⁻ (500 μM) a concentraciones crecientes de HsGS (0,05-1,0 mg/mL), se obtuvieron curvas similares (Fig. 6.18C); en este caso, la pendiente del tramo inicial y la amplitud tendieron a aumentar a mayores concentraciones de proteína, pero de manera parcialmente diferente a lo observado en el caso anterior. Estos resultados indican que el ONOO⁻ es capaz de promover la agregación de la HsGS a través de su modificación oxidativa inicial, más allá de causar una inactivación de la misma, siendo este proceso dependiente del tiempo responsable de pérdidas considerables de función de la HsGS luego de su exposición a ONOO⁻.

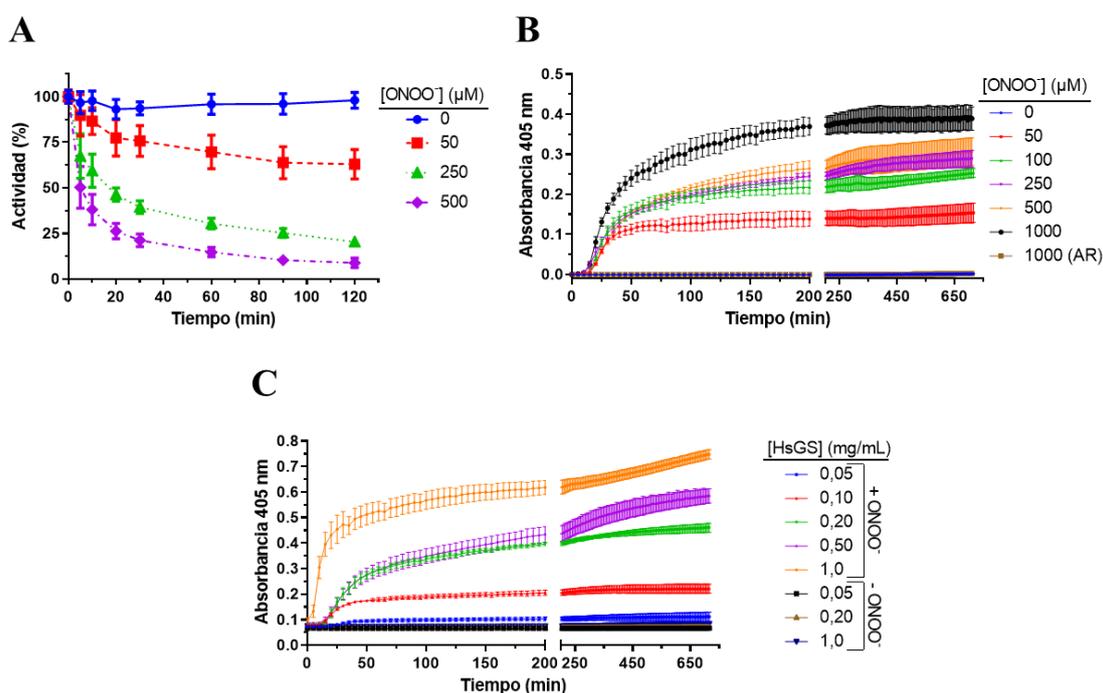


Figura 6.18. Agregación de la HsGS inducida por ONOO⁻. (A) Pérdida de actividad HsGS en función del tiempo luego de exponer la proteína (0,2 mg/mL) a un bolo único de ONOO⁻ (50-500 μM) e incubarla durante 120 minutos a 37°C. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para realizar medidas de actividad; los valores se expresan como relativos al control sin tratar a tiempo 0 (100% = 58,7 U/mg, n = 6). (B) La agregación de la HsGS (0,2 mg/mL) luego de su tratamiento con ONOO⁻ (50-1000 μM) fue seguida mediante medidas de turbidez (absorbancia a 405 nm) por un período de 12 hs (n = 3). (C) Agregación de la HsGS (0,05-1,0 mg/mL) por 12 hs tras su exposición a 500 μM ONOO⁻ (n = 3). Los datos se representan como promedio ± SD.

6.8. La oxidación de tioles media la agregación inducida por oxidantes de la HsGS

Estudios previos realizados con la GS de cerebro de oveja habían reportado que la proteína era propensa a agregar bajo ciertas condiciones experimentales, entre ellas, la exposición a agentes alquilantes de tioles (ej: *N*-etilmaleimida, NEM) [227,255]. Por este motivo, se examinó la posibilidad de que la modificación de residuos de Cys de la HsGS estuviera siendo responsable de inducir la agregación de la proteína luego de su exposición a ONOO⁻. Para probar esto, se expuso HsGS a un bolo único de ONOO⁻ (50-500 μM), luego de incubar 1 minuto a temperatura ambiente (para permitir la completa

descomposición del ONOO^- y sus radicales derivados) se agregó DTT 10 mM para reducir los tioles que resultaron oxidados por el tratamiento y finalmente se incubó la proteína a 37°C por 2 hs bajo agitación suave. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos para realizar medidas de actividad y evaluar los cambios en el tiempo luego de su tratamiento inicial con el oxidante. Nuevamente, se observó una pérdida considerable de actividad HsGS durante el período de incubación tras la adición de ONOO^- ; sin embargo, esta pérdida se logró prevenir de manera significativa cuando la enzima fue tratada con DTT luego de su oxidación inicial por ONOO^- (Fig. 6.19A-B). Un resultado similar se obtuvo cuando se empleó GSH en lugar de DTT como el agente reductor de $-\text{SH}$; sin embargo, no se observó tal efecto al sustituir el DTT por ascorbato (AscH), un reductor por un electrón (Fig. 6.19B). En línea con estos resultados, la agregación de la HsGS se logró prevenir de manera muy notoria cuando, luego de la exposición de la HsGS a ONOO^- , se incubó la proteína a 37°C en presencia de DTT (Fig. 6.19C). Estos datos sugieren que la oxidación de residuos de Cys inducida por el ONOO^- puede mediar la agregación de la HsGS, causando así una pérdida adicional de actividad enzimática, por encima de la que ocasionan las modificaciones oxidativas rápidas, causadas por los radicales derivados del ONOO^- , sobre aminoácidos clave.

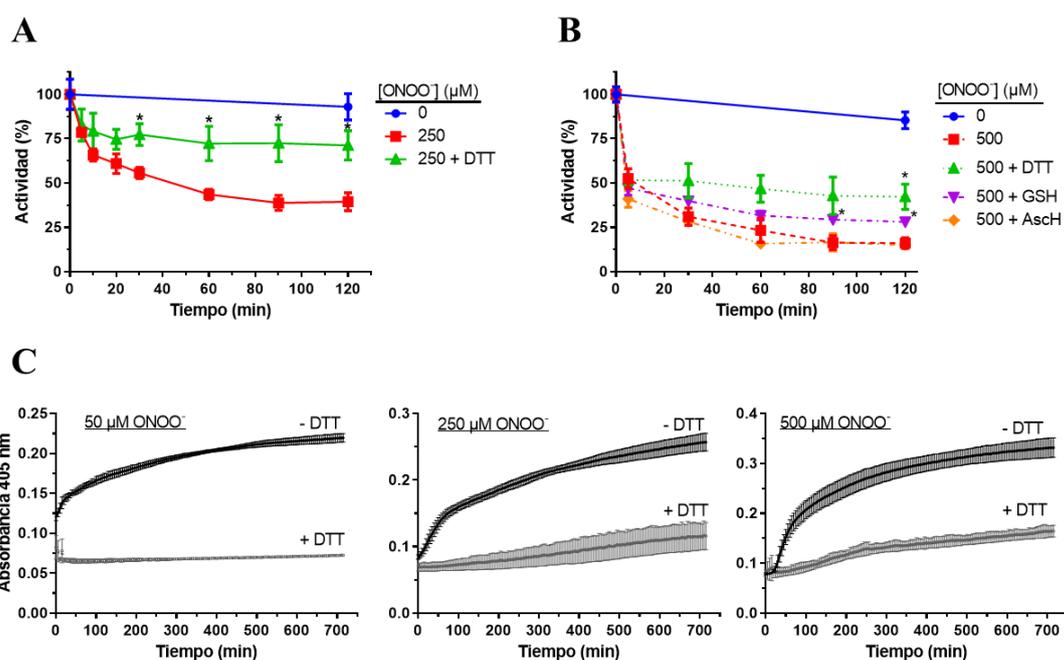


Figura 6.19. Inhibición de la agregación de la HsGS causada por ONOO^- mediante la reducción de los tioles oxidados. (A) Se expuso HsGS (0,2 mg/mL) a ONOO^- en buffer KP_i y tras 1 minuto a temperatura ambiente se agregó DTT 10 mM para reducir los tioles oxidados. Luego, se incubó la proteína a 37°C por 2 hs y se tomaron alícuotas a distintos tiempos para realizar medidas de actividad (100% = 62,2 U/mg). (B) Igual que A pero tras agregar 500 μM ONOO^- y con la inclusión de glutatión (GSH) y ácido ascórbico (AscH) como reductores. (C) De manera alternativa, tras la reducción de los tioles oxidados con DTT, se colocaron las muestras de HsGS en una placa de 96-pocillos y se incubó a 37°C por 12 hs para realizar medidas de turbidez. Los datos se representan como promedio \pm SD (n = 3). *, $p < 0,05$ (vs + ONOO^- solo) mediante análisis por test t no pareado.

Para examinar esta posibilidad con mayor profundidad, se evaluó la capacidad del H_2O_2 y la diamida, dos oxidantes alternativos por dos electrones que tienen como blanco

principal los residuos de Cys, para promover la agregación de la HsGS. La incubación de la HsGS con H_2O_2 (0,1-5 mM) en buffer KPi pH 7,3 durante 1 hora a 37°C provocó una pérdida importante de actividad enzimática de manera dosis-dependiente (Fig. 6.20A), aunque no tan marcada como la ocasionada por el ONOO^- . Esta pérdida de actividad se acompañó de una disminución considerable del contenido de $-\text{SH}$ de la proteína (Fig. 6.20C) y de la formación de entrecruzamientos covalentes reducibles y agregados de alto peso molecular (Fig. 6.20B), sólo detectados en condiciones no reductoras. Además, mediante medidas de turbidez en el tiempo, se observó que la incubación de la HsGS con H_2O_2 produjo su agregación (Fig. 6.20D).

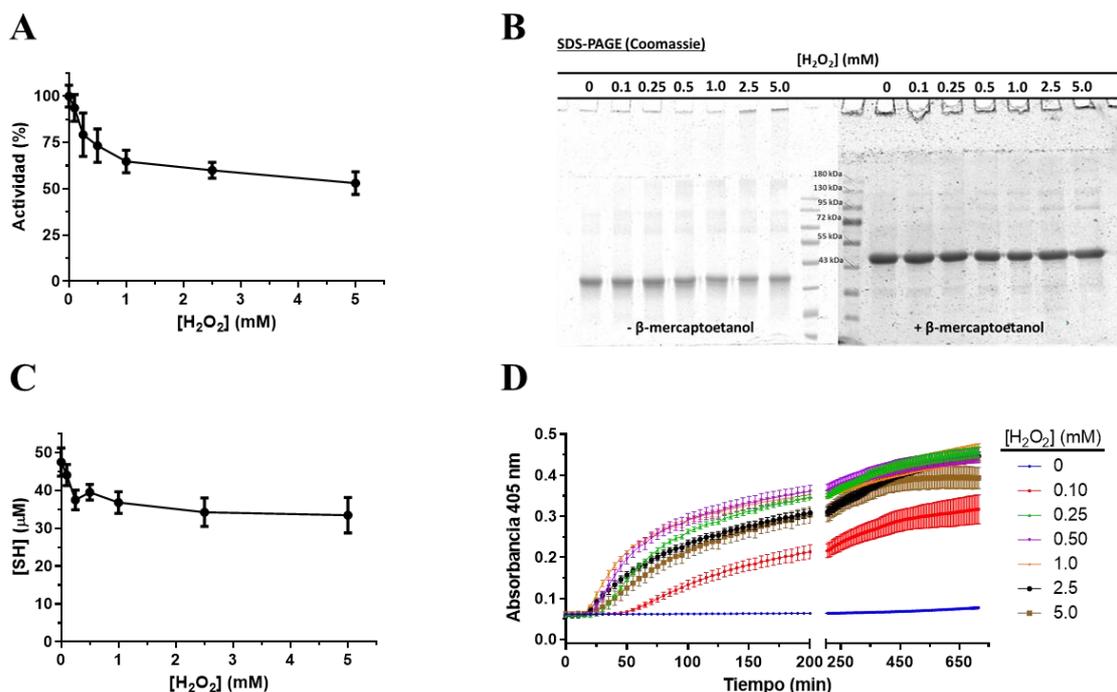


Figura 6.20. Pérdida de función HsGS por H_2O_2 mediada por la oxidación de tioles y agregación proteica. Se realizó la oxidación de la HsGS (0,2 mg/mL) incubándola con H_2O_2 (0,1-5 mM) durante 1 hora a 37°C en buffer KPi 100 mM pH 7,3 con KCl 0,1 M y 0,1 mM DTPA. Las reacciones fueron luego terminadas mediante el agregado de catalasa 50 nM y se tomaron alícuotas para: (A) medidas de actividad enzimática (100% = 64,5 U/mg, n = 9); (B) análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras; y (C) cuantificación de tioles por espectrofotometría (n = 3). (D) La agregación de la proteína fue estudiada incubando directamente 0,2 mg/mL HsGS con las cantidades indicadas de H_2O_2 en una placa de 96 pocillos durante 12 hs a 37°C , realizándose medidas de turbidez cada 5 minutos (n = 3). Los datos se representan como promedio \pm SD.

Si bien estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la oxidación de residuos de Cys estaría promoviendo la agregación de la HsGS, dado que el H_2O_2 es capaz también de oxidar los residuos de Met a menores velocidades [111], no puede descartarse la posibilidad de que esas modificaciones participen también en el proceso de agregación. Por lo tanto, para confirmar el rol de la oxidación de Cys como evento desencadenante de la agregación de la HsGS, se realizó el tratamiento de la enzima con el oxidante específico de $-\text{SH}$ diamida [256]. La incubación de la HsGS con diamida provocó una disminución muy marcada de la actividad enzimática, al tiempo que también causó la oxidación de residuos de Cys e indujo la agregación de la proteína de manera dosis

dependiente (Fig. 6.21). En conjunto, estos resultados indican que la oxidación de Cys es suficiente para inducir la agregación de la HsGS, lo que lleva asociado una pérdida de actividad enzimática.

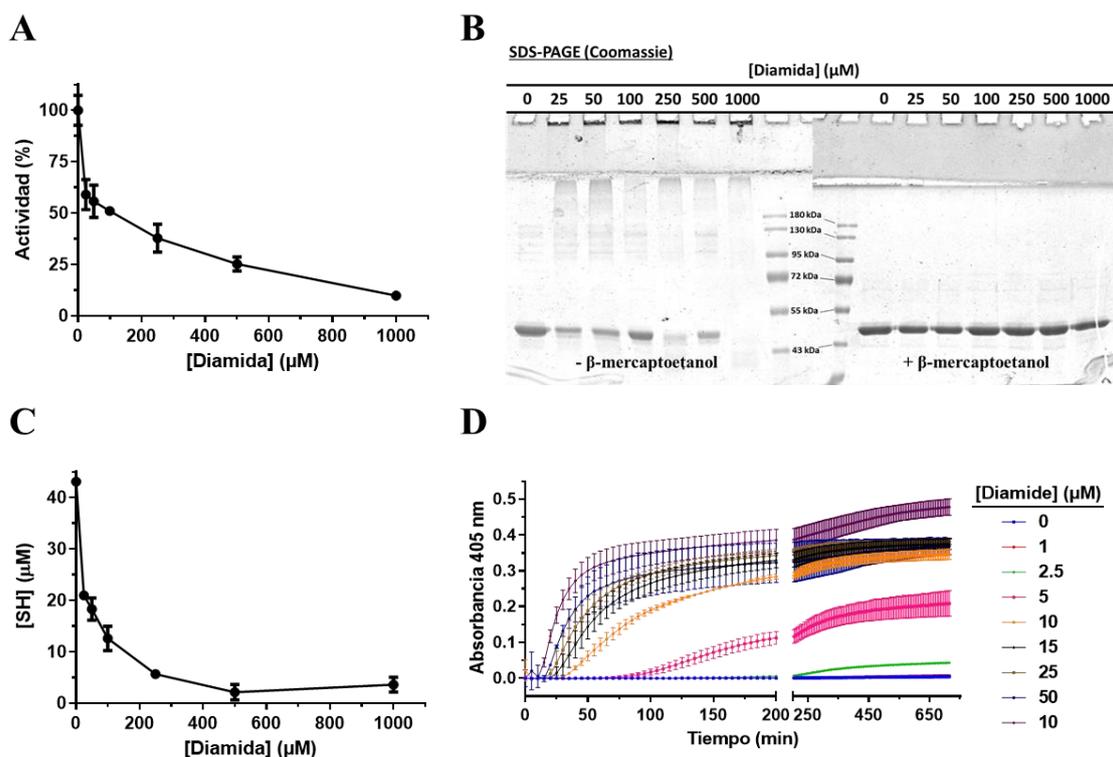


Figura 6.21. Oxidación de la HsGS por diamida. Se incubó HsGS (0,2 mg/mL) con diamida (25-1000 μM) a 37°C por 1 hora en buffer fosfato pH 7,3. Luego de la incubación, se tomaron alícuotas de cada muestra para realizar: **(A)** determinaciones de actividad enzimática (100% = 72,6 U/mg), **(B)** SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y **(C)** cuantificación de tioles. **(D)** La agregación de la HsGS inducida por diamida se evaluó a través de medidas de turbidez a 405 nm por 12 hs a 37°C en una placa de 96 pocillos. Los datos se representan como promedio ± SD (n = 3).

6.9. Estudio de distintos factores asociados a la agregación de la HsGS inducida por oxidantes

Con la finalidad de obtener más información respecto a los mecanismos involucrados en la agregación de la HsGS por oxidantes, se evaluó la capacidad de oxidantes alternativos por un electrón de inducir dicho proceso. En ese sentido, se expuso HsGS a un flujo de radicales ROO' mediante la incubación de la proteína con el dador ABAP a 37°C por 2 hs. En estas condiciones, se observó una pérdida completa de actividad HsGS luego de 120 minutos de incubación, junto con la formación de entrecruzamientos covalentes no reducibles y un rápido y marcado aumento en la turbidez de la solución (Fig. 6.22). La cinética de agregación presentó una buena correlación con la dependencia temporal de la pérdida de actividad, apoyando así la conexión entre ambos procesos. La inclusión de DF (1 mM) en la mezcla de reacción generó un retraso tanto en la inactivación como en la agregación de la HsGS inducida por ABAP (Fig. 6.22). Por su parte, el agregado de NO₂⁻ al sistema de reacción, el cual podría ser oxidado por los radicales peroxilo para producir [•]NO₂ y causar la nitración de residuos de Tyr, solo tuvo

efectos menores, los cuales consistieron en un pequeño retraso en la agregación y pérdida de actividad (Fig. 6.22). Por lo tanto, en estas condiciones de oxidación mediada por ROO^\bullet , la nitración de Tyr, que se detectó tras 120 minutos de incubación (Fig. 6.22C), no incrementó ni la pérdida de actividad ni la agregación de la HsGS. Entonces, la agregación de la HsGS puede ser inducida por la oxidación de Cys a través de reacciones de oxidación por un electrón, en un contexto en el cual además la ocurrencia de otras modificaciones puede tener un impacto sobre este proceso, ya sea aumentando (ej: DiTyr) o disminuyendo (ej: NO_2Tyr) la agregación.

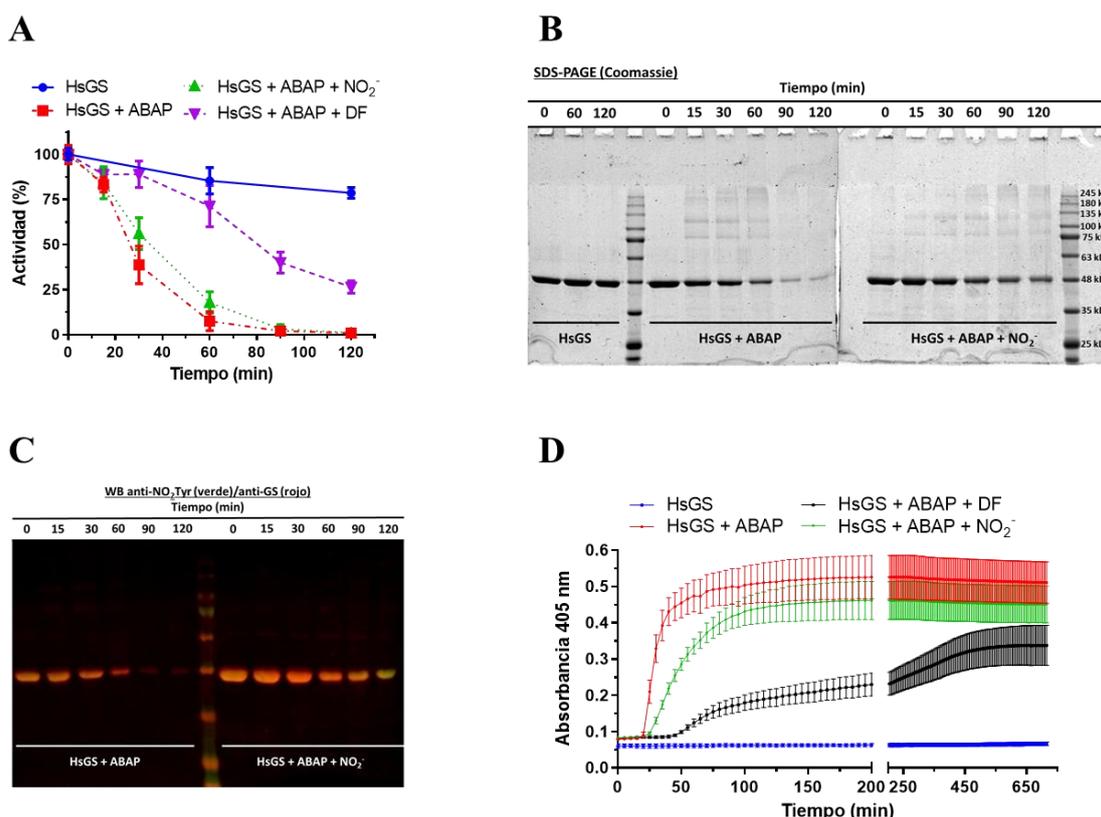


Figura 6.22. Efectos de la oxidación de la HsGS por el dador de radicales peroxilo ABAP. Se incubó HsGS (0,2 mg/mL) con ABAP 10 mM a 37°C en buffer KPi 100 mM pH 7,3 conteniendo 0,1 M KCl y 0,1 mM DTPA por 2 horas; alternativamente, se agregó a la mezcla 1 mM DF o 20 mM NaNO_2 . Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se las analizó mediante: (A) medidas de actividad (100% = 66,2 U/mg); (B) SDS-PAGE en condiciones reductoras; y (C) western-blot anti- NO_2Tyr . (D) La agregación de la HsGS inducida por ABAP se siguió mediante medidas de turbidez luego de la incubación de la enzima con ABAP 10 mM a 37°C por 12 hs; se incluyó además en algunas condiciones DF o NaNO_2 . Los datos se muestran como promedio \pm SD (n = 3).

Para seguir profundizando en el estudio de este proceso, se evaluó también el efecto de la presencia de CO_2 sobre la agregación de la HsGS inducida por ONOO^- . Anteriormente, se había visto que el CO_2 llevaba a una mayor inactivación de la HsGS por ONOO^- , aumentando además la formación de NO_2Tyr y DiTyr, pero sin modificar de manera significativa la oxidación de Cys (Fig. 6.10). Cuando la HsGS fue tratada con ONOO^- en presencia de CO_2 , se observó una mayor agregación de la proteína, con un incremento de la turbidez más pronto, con una pendiente mayor y alcanzando una amplitud más elevada (Fig. 6.23A). En función de la caracterización anterior realizada,

estos resultados sugieren entonces que si bien la oxidación de Cys es un evento clave para la agregación de la HsGS, otras modificaciones oxidativas en otros aminoácidos podrían también contribuir en dicho proceso. Ahora bien, las diferencias observadas podrían deberse también a una diferencia cualitativa en la oxidación de Cys entre ambas condiciones, dado que en ausencia de CO_2 podría ocurrir principalmente por reacción directa mientras que en presencia de CO_2 sería por reacciones mediadas por radicales derivados, alcanzando blancos diferentes. Además del efecto del CO_2 , se estudió también la agregación de la HsGS inducida por ONOO^- a diferentes valores de pH, análogamente a como se realizó anteriormente para el estudio de la inactivación oxidativa (Fig. 6.11). Así, se expuso HsGS a $500 \mu\text{M}$ ONOO^- a distintos valores de pH y se evaluó la agregación de la proteína mediante medidas de turbidez. La HsGS presentó una mayor tendencia a agregar luego de que la adición del ONOO^- se hiciera a pH ácido con respecto a pH fisiológico; esta tendencia fue incluso mayor cuando se la expuso a ONOO^- a pH alcalino (Fig. 6.23B). La incubación de la HsGS a pH 8,6 en ausencia de ONOO^- fue suficiente para provocar un aumento significativo de la turbidez en el tiempo (Fig. 6.23C), sugiriendo entonces que condiciones de pH no-óptimas pueden afectar la estabilidad de la proteína de manera de causar su agregación.

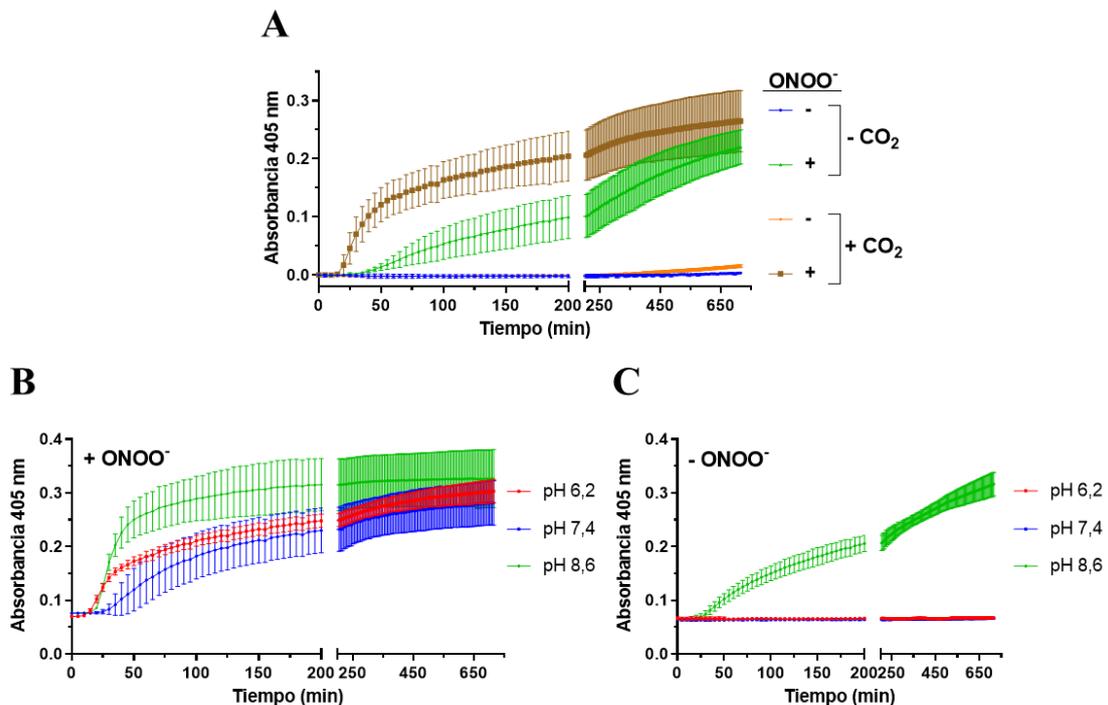


Figura 6.23. Estudio del efecto del CO_2 y el pH en la agregación de la HsGS inducida por ONOO^- . (A) Comparación de la agregación de la HsGS tras el agregado de ONOO^- $250 \mu\text{M}$ en ausencia o presencia de CO_2 . (B) Agregación de la HsGS luego del agregado de ONOO^- $500 \mu\text{M}$ a distintos valores de pH. (C) Controles correspondientes a las condiciones del gráfico (B), en los cuales no se agregó ONOO^- a las muestras de HsGS. Los datos se muestran como promedio \pm SD ($n = 3$).

La agregación por ONOO^- de los distintos mutantes Tyr \rightarrow Phe de HsGS también fue estudiada en comparación con la proteína WT, para evaluar si la modificación de los residuos mutados podría estar influyendo de alguna forma en dicho proceso (Fig. 6.24A-E). Las medidas de turbidez en el tiempo mostraron una tendencia a agregar luego del

tratamiento con ONOO^- similar a la de la proteína WT para la variante Y171F (Fig. 6.24A), levemente menor para la mutante Y269F (Fig. 6.24C) y ligeramente aumentada para la variante Y185F (Fig. 6.24B) y la Y336F (Fig. 6.24E). La situación más particular fue la presentada por el mutante Y288F, que presentó una tendencia a agregar tras el agregado de ONOO^- considerablemente mayor que la WT e incluso mostró un incremento en la turbidez muy significativo en ausencia de tratamiento con oxidante, comparable a la que presentó la proteína WT expuesta a $500 \mu\text{M}$ ONOO^- (Fig. 6.24D). Este resultado apoya la idea de que el residuo Tyr288 tiene un rol esencial en el mantenimiento de la estructura de la HsGS (su actividad específica basal fue de menos de un 20% de la del WT), por lo que su nitración, si bien es menor en términos cuantitativos, podría tener un impacto relevante en la función de la proteína.

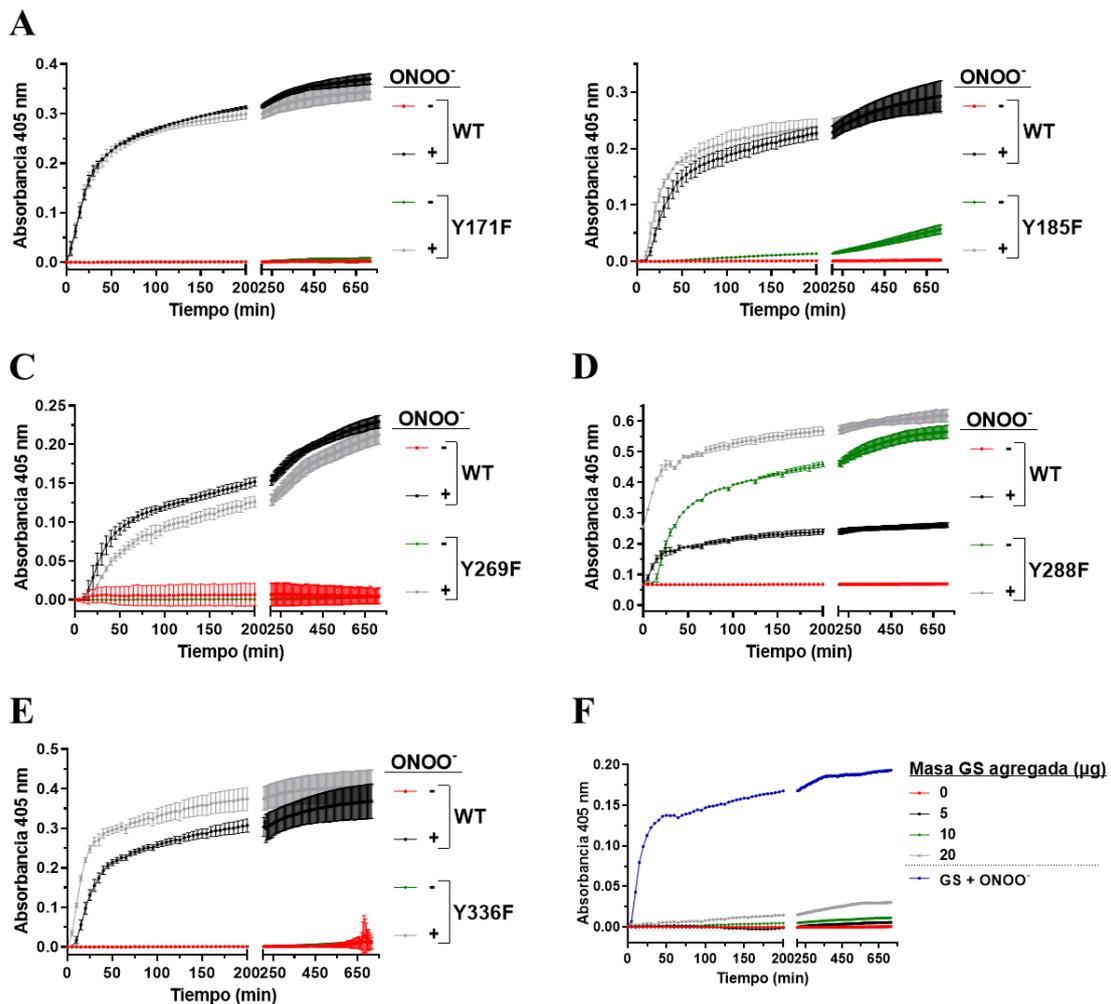


Figura 6.24. Agregación de los mutantes Tyr→Phe de HsGS por ONOO^- y evaluación de la agregación inducida por proteína pre-agregada. Se expuso HsGS ($0,2 \text{ mg/mL}$) WT o mutante a ONOO^- $500 \mu\text{M}$ y se incubó en placa de 96 pocillos a 37°C durante 12 hs realizándose medidas de turbidez cada 5 min. (A) Y171F; (B) Y185F; (C) Y269F; (D) Y288F; (E) Y336F. (F) Se incubó HsGS ($0,2 \text{ mg/mL}$) con diferentes cantidades de HsGS pre-agregada (0-20 μg) y se evaluó la agregación por medidas de turbidez como anteriormente. Los datos se muestran como promedio \pm SD ($n = 3$).

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la oxidación de residuos de Cys induce la agregación de la HsGS y que únicamente la enzima modificada experimenta

dicho proceso, sin promover la agregación de la HsGS no modificada (ver Fig. 6.18B, la amplitud de las curvas depende de la cantidad de oxidante empleado). Para validar esta observación, se examinó la posibilidad de que HsGS ya agregada sea capaz de inducir la agregación de HsGS nativa siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y métodos (5.10). La adición de distintas cantidades de HsGS agregada por tratamiento con ONOO⁻ (0-20 µg) fue incapaz de inducir la agregación de HsGS nativa sin tratar (Fig. 6.24F); por lo tanto, únicamente la fracción de moléculas de HsGS que han experimentado oxidación de Cys estaría formando agregados.

Finalmente, para verificar que la pérdida de actividad dependiente del tiempo observada es efectivamente debido a la agregación de la HsGS modificada y pérdida de proteína soluble, se realizaron medidas de actividad específica antes y después de la remoción del material insoluble. Para esto, se expuso HsGS (0,5 mg/mL) a ONOO⁻ (500 µM), se tomaron alícuotas inmediatamente para realizar medidas de actividad y a continuación se incubó la proteína a 37°C por 30 minutos. Luego de este tiempo, se midió nuevamente la actividad en la mezcla (conteniendo tanto proteína soluble como insoluble) y a continuación las muestras fueron centrifugadas para remover la HsGS precipitada. La proteína remanente en el sobrenadante fue cuantificada y se determinó la actividad de dicha HsGS soluble. Luego de la exposición inicial a ONOO⁻ (t = 0 min, total), no se detectó una pérdida significativa de HsGS con respecto a la muestra control; sin embargo, 30 minutos después (t = 30 min, total), la actividad específica de la muestra tratada presentó un descenso significativo con respecto al control sin tratar (Fig. 6.25A). Luego de la remoción de la proteína insoluble, la actividad específica de la muestra tratada volvió a ser similar a la del control (t = 30 min, soluble), al igual que se había observado inmediatamente después de la exposición de la proteína a ONOO⁻ (Fig. 6.25A). Esto confirma entonces que la pérdida de actividad HsGS observada a medida que pasa el tiempo luego de su exposición a un bolo único de ONOO⁻ es consecuencia de la precipitación de la proteína agregada. Para obtener más información acerca de los factores que determinan este proceso, se sometieron tanto los pellets como los sobrenadantes a digestión con tripsina y posterior análisis por HPLC-MS/MS para determinar los niveles relativos de modificación de residuos de Tyr, como se hizo anteriormente. No se observaron diferencias significativas respecto al grado de modificación de los residuos de Tyr entre las fracciones soluble e insoluble, sugiriendo que su modificación no es un factor principal en la promoción de la agregación de la HsGS bajo estas condiciones (Fig. 6.25B).

6.10. Efecto de la unión de MgATP en la estabilidad de la HsGS y su agregación inducida por oxidantes

Los datos obtenidos hasta aquí sugieren que la agregación de la HsGS es consecuencia de una pérdida global de la estabilidad de la proteína que puede resultar como consecuencia de la exposición a oxidantes (mediada posiblemente por la oxidación de Cys), valores de pH lejanos del fisiológico o la presencia de mutaciones puntuales en sitios críticos (ej: Y288F). Estudios previos reportaron que ciertos ligandos, como el Mg²⁺, Mn²⁺ y los nucleótidos de adenina pueden ayudar a mantener la estabilidad de la GS y promover el ensamble de su estructura decaamérica [255,257,258]. Además, se

observó que la incubación de la GS de mamífero con Mg^{2+} y ATP puede prevenir la pérdida de actividad ocasionada por agentes alquilantes de -SH [258,259].

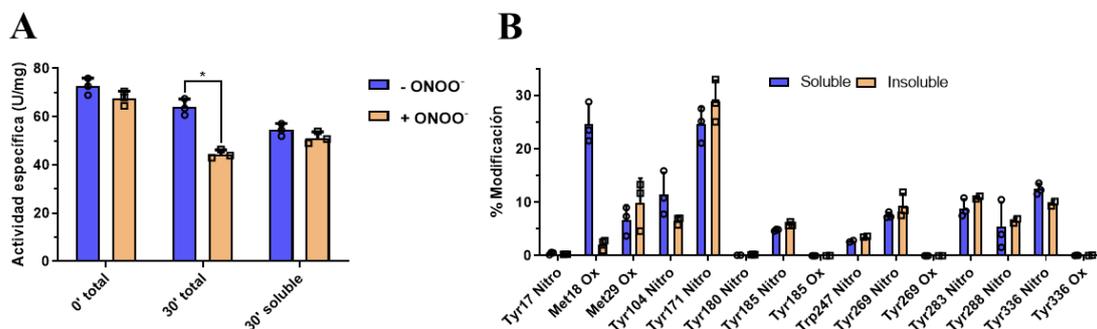


Figura 6.25. Caracterización de la proteína soluble e insoluble luego del tratamiento con ONOO⁻. Se expuso HsGS (0,5 mg/mL) a un bolo único de ONOO⁻ (500 μ M) y se la incubó 30 minutos a 37°C; luego de esto, se separó la proteína insoluble por centrifugación a 18.500 g por 30 minutos. Los sobrenadantes se colectaron y la proteína remanente fue cuantificada. **(A)** Determinación de actividad específica en las muestras inmediatamente después de la adición del ONOO⁻ (0' total), luego de incubar 30 minutos a 37°C (30' total) y en los sobrenadantes correspondientes, luego de remover la proteína insoluble (30' soluble). **(B)** Análisis por MRM-MS/MS de los productos de digestión con tripsina de la HsGS soluble e insoluble tratada con ONOO⁻ e incubada a 37°C por 30 minutos. Los datos se muestran como promedio \pm SD (n = 3). *, $p < 0,05$ (- ONOO⁻ vs + ONOO⁻) mediante análisis por test t no pareado.

Para evaluar los efectos de la unión de los ligandos mencionados en el contexto de pérdida de función por daño oxidativo, se estudió la oxidación, pérdida de actividad y agregación de la HsGS inducida por H_2O_2 en ausencia o presencia de MgATP. La incubación de la HsGS con H_2O_2 (0,1-1 mM) por 1 hora a 37°C causó una disminución significativa de la actividad enzimática y del contenido de -SH, llevando también a la formación de entrecruzamientos reducibles de subunidades de HsGS, como se observó anteriormente. Sin embargo, estos efectos fueron atenuados por la presencia de MgATP en la solución (Fig. 6.26A-C), siendo muy destacable la inhibición observada de la agregación de la HsGS por H_2O_2 en presencia de MgATP (Fig. 6.26D). El hecho de que la oxidación de Cys (visto tanto por cuantificación espectrofotométrica como por SDS-PAGE) haya sido menor en presencia de MgATP sugiere que el efecto observado sobre la pérdida de actividad y la agregación se debe a que la unión del ligando promueve cambios conformacionales en la proteína que de algún modo protegen a ciertas Cys clave de ser oxidadas. No obstante, parte del efecto podría deberse a un aumento en la estabilidad global de la proteína tras la unión del MgATP, lo cual disminuiría la tendencia de la HsGS oxidada a agregar. Para evaluar esta última posibilidad, se realizaron estudios de desnaturalización térmica de la HsGS mediante medidas de fluorescencia de los residuos de Trp de la proteína a lo largo del intervalo de 15 a 65°C, tanto para la proteína sola como en presencia de ligandos. En presencia de MgATP, la curva de desnaturalización (curva de *melting*) presentó un corrimiento muy marcado hacia la derecha, incrementándose el valor de T_m de ($52,7 \pm 0,1$) °C para la HsGS sola a ($60,8 \pm 1,3$) °C para la proteína unida a MgATP (Fig. 6.26E). Cuando el estudio se hizo en presencia únicamente de Mg^{2+} , se observó igualmente un aumento en la estabilidad de la proteína respecto a la condición en ausencia de ligandos, pero menos importante que en

presencia de MgATP, siendo el valor de T_m de $(55,0 \pm 0,2)$ °C. Por lo tanto, la unión de ligandos, además de proteger ciertas Cys críticas de la oxidación, proporciona un aumento considerable de la estabilidad de la HsGS, lo que en conjunto la hace más resistente a la agregación inducida por oxidantes. En contraste a esto último, la exposición de la HsGS a ONOO^- provocó un cambio en la forma de la curva de desnaturalización, sugiriendo que la proteína modificada oxidativamente, portadora posiblemente de alteraciones conformacionales, adoptó un mecanismo de desnaturalización diferente. Además, se obtuvo un valor levemente disminuido de T_m de $(50,3 \pm 1,2)$ °C, consistente con una proteoforma menos estable con predisposición a agregar en comparación a la HsGS no tratada (Fig. 6.26E).

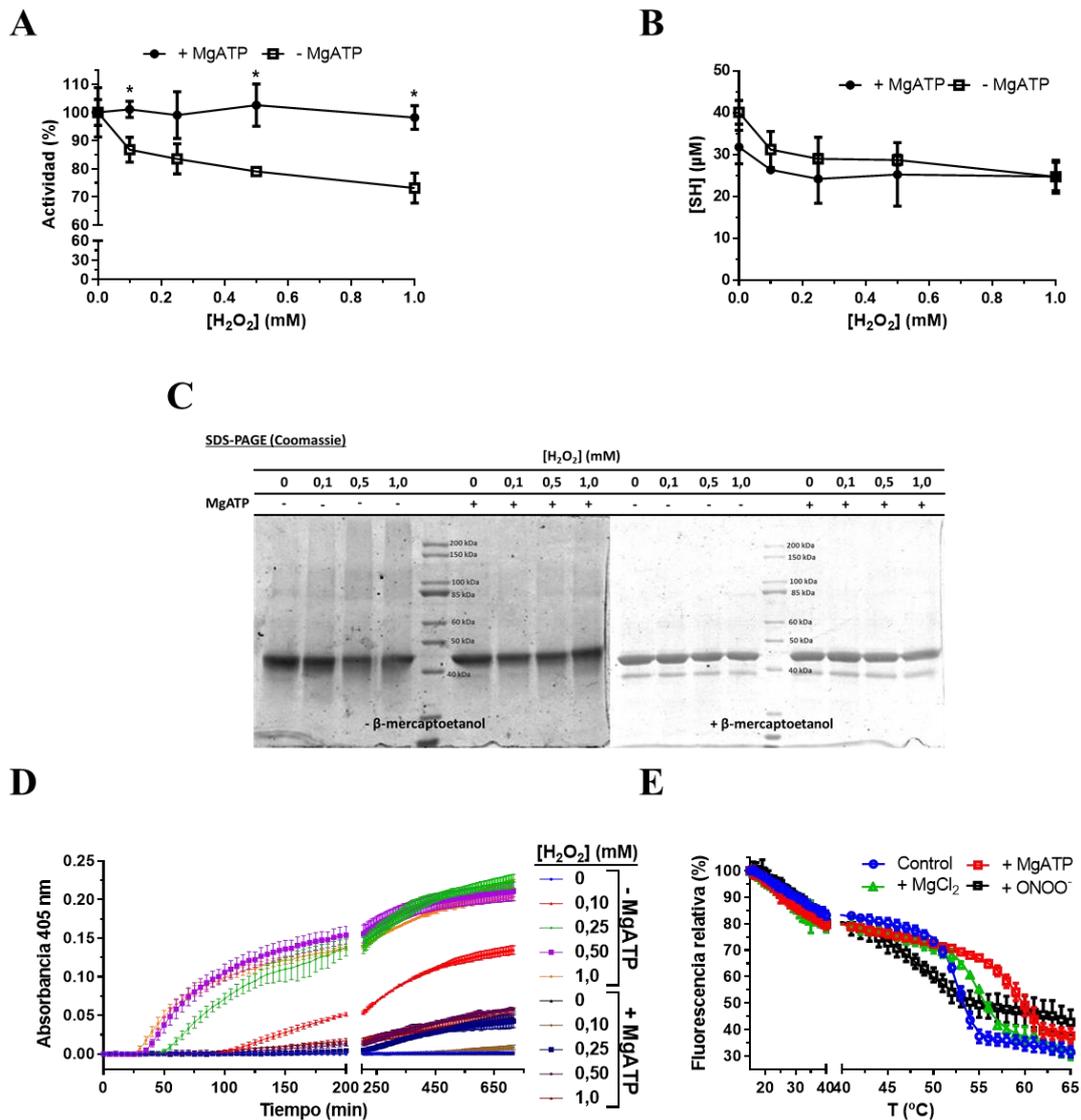


Figura 6.26. Efecto de la unión de MgATP en la agregación de la HsGS por H_2O_2 y en la estabilidad proteica. Se incubó HsGS (0,2 mg/mL) con H_2O_2 (0,1-1,0 mM) durante 1 hora a 37°C tanto en ausencia como presencia de ATP 10 mM y MgCl_2 20 mM. Luego de detener las reacciones con catalasa, se tomaron alícuotas para: **(A)** medidas de actividad (100% = 63,4 y 48,7 U/mg, - y + MgATP); **(B)** cuantificación de tioles, y **(C)** análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. **(D)** Estudio de la agregación de la HsGS por H_2O_2 en ausencia y presencia de MgATP mediante medidas de turbidez. **(E)** La desnaturalización térmica de la HsGS sola, unida a MgATP o Mg^{2+} , o tratada con ONOO^- , fue evaluada siguiendo la disminución de la fluorescencia del Trp al incrementar la temperatura. Los datos se muestran como promedio \pm SD ($n = 3$). *, $p < 0,05$ (- MgATP vs + MgATP) mediante análisis por test t no pareado.

Estas observaciones respecto a los efectos de la unión del MgATP en la oxidación, agregación y estabilidad térmica de la proteína podrían deberse a que la unión de dicho ligando favorezca el ensamblaje de la estructura decamérica de la HsGS, como se comentó anteriormente. Para evaluar esta posibilidad, se llevaron a cabo estudios de gel filtración en ausencia o presencia de MgATP para determinar si el peso molecular aparente de la HsGS se veía afectado. La HsGS nativa en buffer fosfato eluyó principalmente como un único pico a ~ 16 mL, con una fracción minoritaria a ~ 14,5 mL; este perfil de elución no se vio alterado por la presencia de MgATP (Fig. 6.27), sugiriendo que su unión no está induciendo la oligomerización de la proteína en las condiciones experimentales empleadas. Por lo tanto, los efectos observados del MgATP no se explicarían por un cambio en el estado de oligomerización de la proteína, si no por los motivos explicados anteriormente.

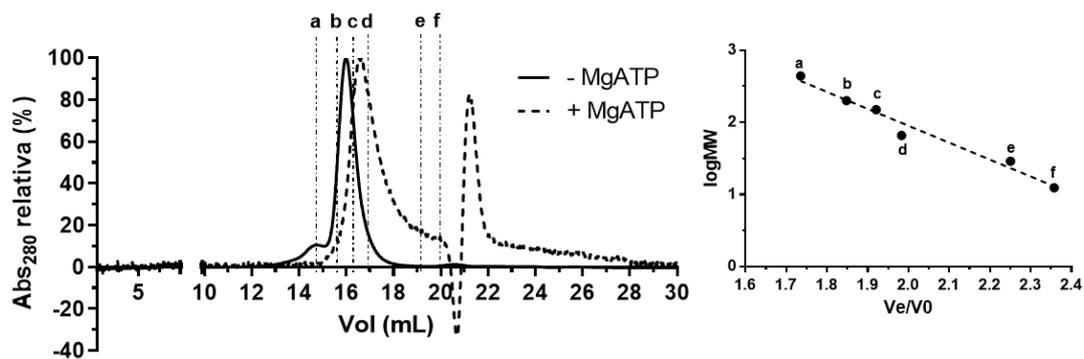


Figura 6.27. Estudio del efecto de la unión del MgATP en el estado de oligomerización de la HsGS mediante gel filtración. El estado de oligomerización de la HsGS (4,0 mg/mL) fue estudiado en una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 GL tanto en ausencia (- MgATP) como en presencia (+ MgATP) de ATP 5 mM y MgCl₂ 10 mM (*izquierda*). Para la estimación del peso molecular (MW), se emplearon estándares de proteínas comerciales, junto con azul dextrano para la determinación del volumen muerto (V₀), se construyó el gráfico de logMW vs V_e/V₀ y se realizó la regresión lineal del mismo (*derecha*). Las proteínas utilizadas para la calibración de MW fueron: **a**, ferritina (440 kDa); **b**, β-amilasa (200 kDa); **c**, alcohol deshidrogenasa (150 kDa); **d**, albúmina bovina (66 kDa); **e**, anhidrasa carbónica (29 kDa); **f**, citocromo c (12 kDa).

7. Discusión

Mediante la aplicación combinada de técnicas analíticas, bioquímicas, moleculares y proteómicas, se obtuvo una cantidad relevante de evidencia experimental que ayuda a comprender los mecanismos implicados en la inactivación oxidativa de la HsGS. Si bien numerosos trabajos previos habían ya demostrado la susceptibilidad de la GS de distintas especies a la inactivación por oxidantes, los mecanismos involucrados no habían logrado establecerse con claridad, en gran medida debido a la falta de una caracterización profunda de las modificaciones postraduccionales oxidativas que ocasionaba la exposición a oxidantes. La principal hipótesis existente indicaba que la nitración del residuo de Tyr336 de la HsGS ocasionaba la pérdida de actividad, cuando ésta se encontraba en su estado ionizado, al impedir la correcta interacción con los nucleótidos de ATP/ADP en el sitio activo [207]. Los resultados obtenidos en este trabajo, no obstante, sugieren que los mecanismos involucrados en la inactivación oxidativa de la HsGS son notoriamente más complejos.

7.1. Modificación oxidativa de la HsGS por ONOO⁻ y su vínculo con la inactivación

En primer lugar, se observó que el tratamiento de la HsGS con ONOO⁻, además de ocasionar una marcada disminución en la actividad, llevó a la modificación significativa de residuos de Cys, Met, Tyr y Trp (Fig. 6.3 y Anexo Fig. 3). Los principales productos de oxidación identificados, tanto mediante enfoques bioquímicos como proteómicos, fueron disulfuros de Cys (evidenciado por la formación de entrecruzamientos reducibles en SDS-PAGE, podrían haberse formado otros productos), MetSO, NO₂Tyr, DiTyr y NO₂Trp (posiblemente productos de oxidación de Trp también, pero debido a su gran diversidad no se incluyeron sus variantes en las bases de datos de análisis por MS/MS) (Fig. 6.3-6.4, Anexo Tabla I). Esto ya establece que, a diferencia de lo que la mayoría de los trabajos anteriores habían probado, la exposición de la HsGS a ONOO⁻ induce otras modificaciones oxidativas aparte de la nitración de residuos de Tyr. El mapeo peptídico realizado por MS/MS permitió identificar los sitios en los que ocurrieron las mencionadas modificaciones (Anexo, Tabla I-II), y a través de distintos enfoques (MS1-filtering usando el software Skyline, experimentos de MRM) se estimaron los porcentajes de dichas modificaciones (Fig. 6.4 y 6.6). Por tanto, se encontró no solo que distintos tipos de residuos son modificados por ONOO⁻, sino que además, en varios sitios de la proteína. La Figura 7.1 muestra, a modo de resumen, la ubicación en la estructura de la proteína de los principales residuos modificados identificados por MS/MS, indicándose según el color el porcentaje estimado de modificación de cada uno de ellos.

El antecedente de identificación por MS/MS de los residuos de GS que resultan modificados por ONOO⁻ había identificado únicamente a la Tyr336 como blanco de nitración [206]. Aquí, se identificaron un total de 10 residuos de Tyr como sitios de nitración, siendo los principales blancos Tyr171, Tyr185, Tyr269, Tyr283 y Tyr336 (no se incluyó como blanco principal al residuo Tyr104 ya que se detectaron niveles significativos de nitración en dicho sitio en el control, e incluso mayores en la adición reversa del ONOO⁻). Todos ellos presentaron porcentajes de modificación de entre 20-50% tras el tratamiento de la enzima con 500 μM ONOO⁻, lo que representa valores suficientemente elevados como para generar un impacto en la actividad enzimática. Si

bien estos porcentajes constituyen estimados, si se los utiliza para realizar cálculos absolutos de NO₂Tyr a los que corresponderían (tomando en cuenta que para cada residuo el 100% es la concentración de enzima usada, 4,62 μM), se obtienen valores totales de NO₂Tyr formados para HsGS tratada con 500 μM ONOO⁻ que son consistentes con los valores determinados de NO₂Tyr por espectrofotometría. Así, la aproximación empleada por MRM para la estimación de los niveles de modificación de los distintos residuos representa una técnica de gran utilidad para identificar los blancos preferenciales y menores de nitración, algo que resulta clave en la búsqueda de explicar la inactivación por dicha modificación.

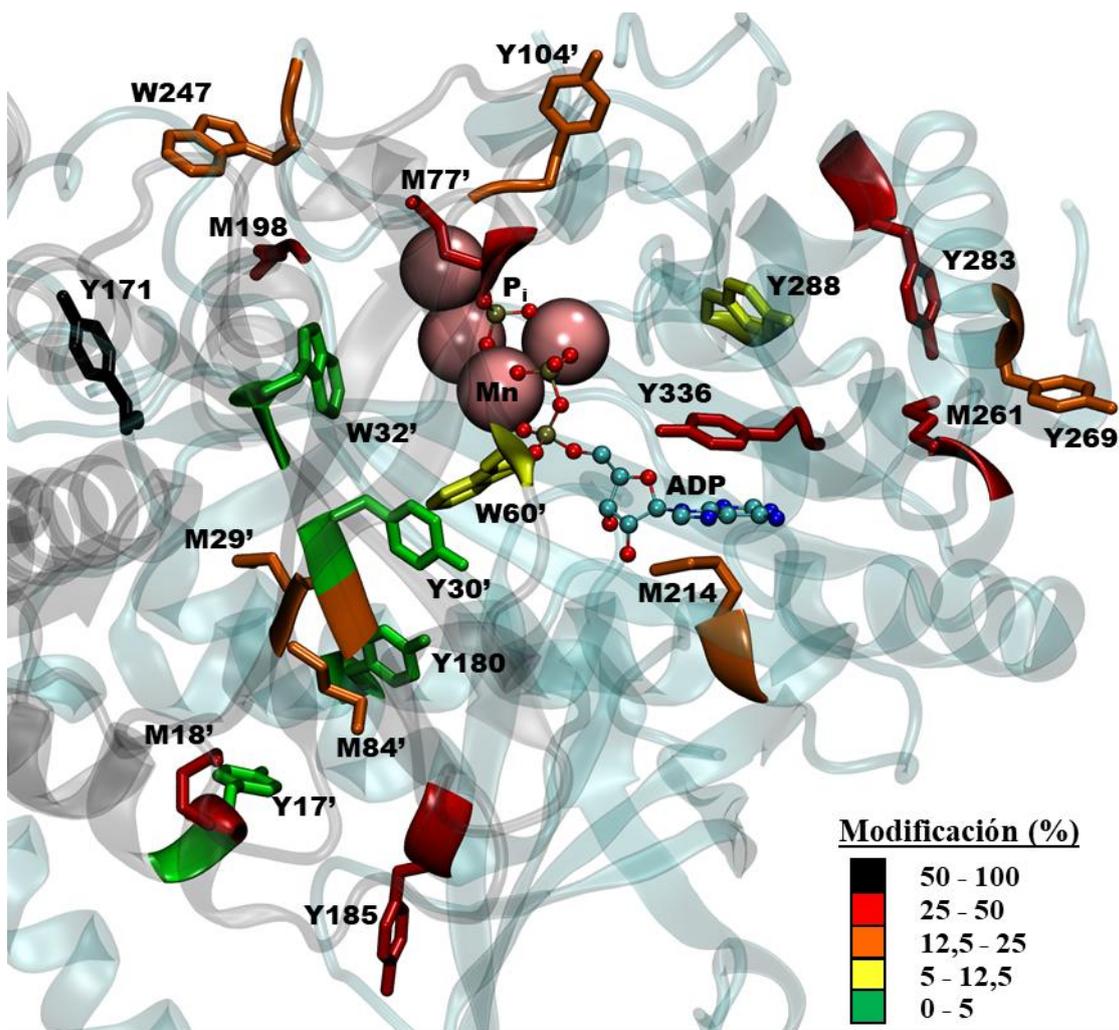


Figura 7.1. Mapeo estructural de los principales residuos modificados oxidativamente en la HsGS tratada con ONOO⁻. Se indica la ubicación en la estructura de la HsGS (se muestra un sitio activo entre dos monómeros) los residuos de Tyr, Trp y Met que se identificaron modificados, así como el grado de modificación de los mismos, indicado por el color, según su estimación a través de los análisis por MS1-filtering o MRM. Los residuos de Cys, que también fueron blanco de oxidación, no se incluyen dado que los mismos no fueron mapeados en el análisis por MS. La imagen tridimensional de la HsGS con Mn y ADP unidos fue creada utilizando el software VMD 1.9.3 a partir de la estructura PDB ID 2QC8.

Además de la modificación por nitración, se evidenció la dimerización de residuos de Tyr a DiTyr (Fig. 6.3 y Fig. 6.8). El análisis por MS permitió identificar la formación de cinco tipos diferentes de entrecruzamientos Tyr-Tyr que involucran seis residuos diferentes de Tyr. El hecho de que estos residuos hayan sido también identificados como

NO₂Tyr apoya las identificaciones realizadas, dado que ambas modificaciones requieren de la formación de un Tyr^{*} intermediario. De cualquier manera, es necesario realizar un análisis estructural de la HsGS, considerando las restricciones estéricas asociadas a la formación de DiTyr, para determinar la factibilidad de que estas uniones se logren dar; esta clase de análisis también permitiría definir si los entrecruzamientos formados son de tipo intramoleculares (entre residuos de Tyr de un mismo monómero) o intermoleculares (entre residuos de Tyr de diferentes monómeros, ya sean de un mismo o de diferentes decámeros) (Fig. 7.2). Por ejemplo, los entrecruzamientos Tyr269-Tyr269 y Tyr336-Tyr336 son necesariamente intermoleculares entre diferentes decámeros, dado que no se encuentran lo suficientemente cerca dentro de un mismo decámero (Fig. 7.2A-B); este tipo de uniones podría cumplir algún rol en los procesos de agregación de la proteína. El entrecruzamiento Tyr283-Tyr288 posiblemente sea de tipo intramolecular debido a la cercanía espacial existente entre las cadenas laterales de estos residuos dentro de un mismo monómero (Fig. 7.2C). Además, esta unión fue identificada en las muestras correspondientes a las fracciones separadas por gel filtración correspondientes a monómeros (Fig. 6.7, Tabla 6.I). Por su parte, el entrecruzamiento Tyr269-Tyr288 es más complicado de explicar (Fig. 7.2A); dentro de un mismo polipéptido, estos residuos se encuentran demasiado distantes (> 20 Å) como para asumir que se trata de una unión intramolecular. Tampoco es probable que se trate de una unión intermolecular dentro de un mismo decámero dado que sus distancias entre diferentes subunidades son todavía más elevadas. No obstante, dado que el residuo Tyr288 tiene una localización bastante interior dentro de la estructura proteica, tampoco sería sencillo clasificar el entrecruzamiento como intermolecular entre diferentes decámeros. Posiblemente, la formación de esta unión sea secundaria a la modificación previa de ciertos aminoácidos que ocasionan alteraciones en la estructura de la proteína. Finalmente, el entrecruzamiento Tyr30-Tyr180 podría ser de tipo intermolecular dentro de un mismo decámero, dado que ambos residuos se encuentran demasiado enterrados en la estructura como para interactuar con sus contrapartes en otro decámeros, pero la distancia entre Tyr30 y Tyr180 de monómeros adyacentes en un mismo anillo pentamérico es de ~ 10 Å (Fig. 7.2A). Sin embargo, este entrecruzamiento se identificó también en fracciones de separación por gel filtración correspondientes a monómero, sugiriendo que pueda ser de tipo intramolecular. Esto último parece poco probable teniendo en cuenta los ~ 30 Å que los separan dentro de un mismo monómero. La formación de cualquiera de estos tipos de entrecruzamientos vía DiTyr podría tener algún impacto sobre la estructura y dinámica de la proteína, contribuyendo también a la pérdida de actividad enzimática. De cualquier manera, es de esperar que cuantitativamente estos productos de oxidación solo representen una fracción menor de la modificación total de residuos de Tyr, como se evidencia en los análisis por SDS-PAGE reductor (comparar intensidad de las bandas entrecruzadas con la del monómero). Son necesarios estudios posteriores para determinar la relevancia de estos entrecruzamientos DiTyr en el proceso de inactivación oxidativa de la HsGS.

A partir de la información obtenida acerca de los residuos de Tyr que resultaban preferencialmente nitrados o participaban en la formación de entrecruzamientos DiTyr tras la exposición a ONOO⁻, se diseñaron y adquirieron cinco variantes mutantes de HsGS en las cuales se sustituyó uno de éstos residuos de Tyr relevantes por Phe. Estos mutantes fueron Y171F, Y185F, Y269F, Y288F e Y336F. La sustitución del residuo de Tyr por Phe representa una estrategia de gran utilidad para estudiar el impacto que tiene la

modificación del residuo de Tyr sustituido, debido a que la Phe presenta una reactividad hacia los oxidantes que es considerablemente menor y por ende no generará los productos de oxidación que suceden sobre el residuo original. Así, cuando la modificación de un residuo de Tyr, por ejemplo, por nitración, es responsable de la pérdida o ganancia de función de una enzima, la sustitución de dicho residuo por Phe suele hacer a la proteína resistente a experimentar dicho efecto [260-262].

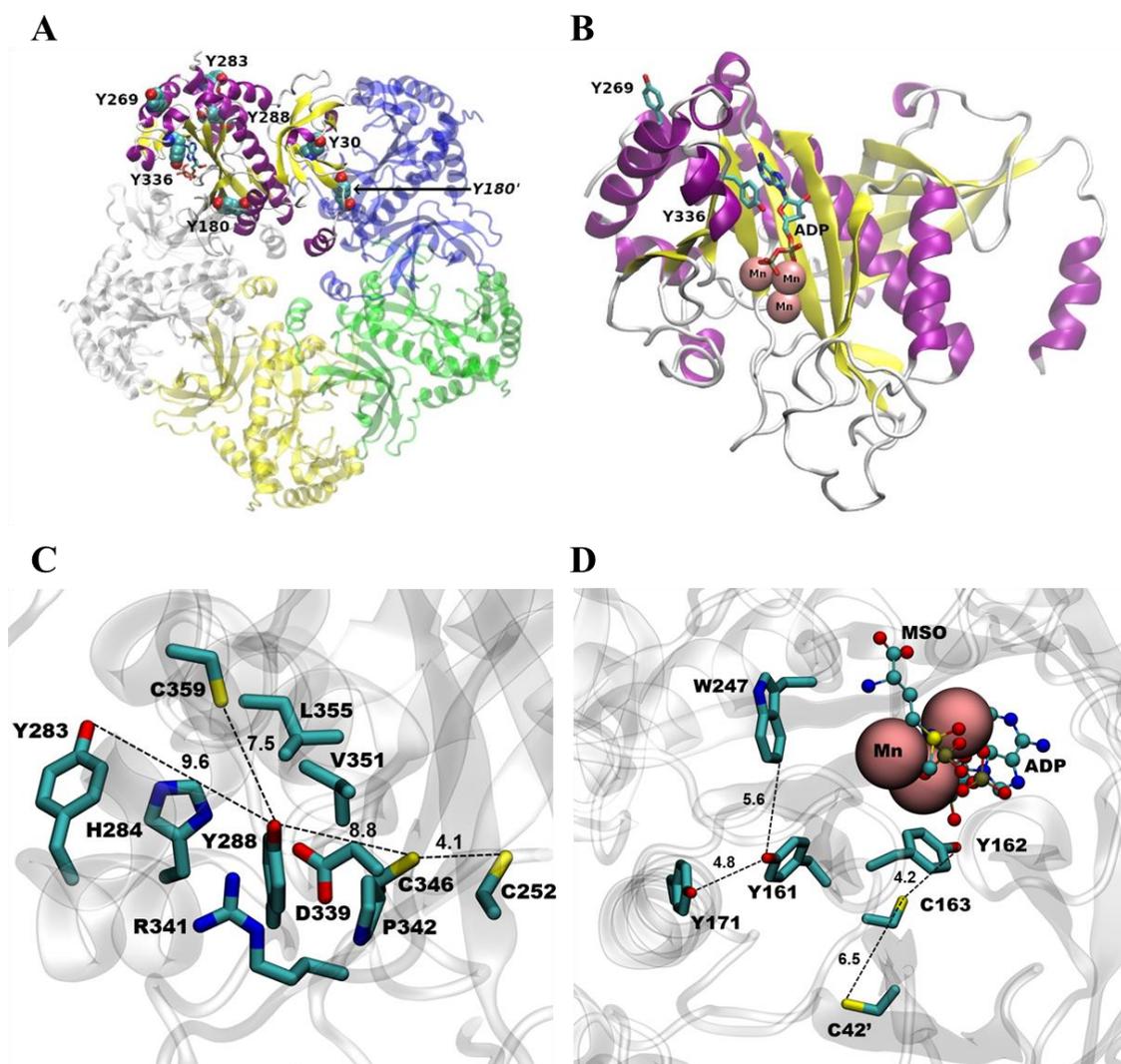


Figura 7.2. Análisis estructural de ciertos residuos de Tyr que son blanco de oxidación por los radicales derivados del ONOO⁻. (A) Estructura global de un anillo pentamérico de HsGS, mostrando la ubicación dentro de una subunidad de los seis residuos de Tyr que se identificaron formando entrecruzamientos DiTyr. (B) Localización específica dentro de un monómero de los residuos de Tyr 269 y 336, ambos hallados como NO₂Tyr y DiTyr. Se muestra también el ADP y los iones Mn²⁺ en el sitio activo. (C) Vista de la estructura que rodea al residuo Tyr288, incluyendo la Tyr283 y los residuos de Cys 252, 346 y 359. (D) Análisis de los principales aminoácidos redox-activos localizados en las cercanías de Tyr171, los cuáles podrían participar en reacciones de transferencia electrónica. Se muestran también los ligandos ADP, MSO y Mn²⁺ en el sitio activo. En (C) y (D), las líneas punteadas indican las distancias entre los átomos, que se expresan en Å. Las estructuras fueron generadas en el software VMD 1.9.3 a partir de la estructura PDB ID 2QC8.

Dado que los cinco mutantes Tyr→Phe de la HsGS utilizados fueron susceptibles a la inactivación por ONOO⁻ (Fig. 6.12), la nitración de ninguno de estos residuos por sí sola sería responsable de la inactivación de la enzima observada. De cualquier manera, la

caracterización del proceso de inactivación y modificación postraduccional por ONOO⁻ de los distintos mutantes en comparación con la HsGS WT puede aportar información adicional que ayude en la comprensión de los mecanismos implicados.

El mutante de HsGS Y171F resultó inactivado por ONOO⁻ en mayor medida que la enzima WT (Fig. 6.13), sugiriendo que la nitración de Tyr171 (principal sitio de nitración), en lugar de ser un evento relevante en la inactivación de la HsGS, sería más bien una reacción capaz de proteger a la enzima al desviar los oxidantes de los blancos críticos. La alta exposición al solvente de la Tyr171 podría facilitar su modificación oxidativa, algo que además estaría favorecido por la presencia de varias cadenas laterales redox-activas en las proximidades, que podrían estabilizar el radical sobre Tyr171 (Fig. 7.2D). Esto podría explicar los elevados niveles de nitración hallados para este residuo: fácilmente accesible a los oxidantes por un electrón y generación de un Tyr[•] que podría verse estabilizado mediante la interacción con los residuos cercanos, aumentando su vida media y por tanto las probabilidades de reaccionar con [•]NO₂. Por otra parte, la oxidación inicial de la Tyr171 podría representar una vía de oxidar los mencionados residuos sitiados en las proximidades a través de reacciones de transferencia electrónica [263]. De ocurrir, este proceso podría eventualmente conducir a la oxidación de la Tyr162 del sitio activo, o a la formación de una unión -S-S- intermolecular entre los residuos Cys163 y Cys42' (Fig. 7.2D). Es interesante mencionar que el resultado obtenido para este mutante contrasta con resultados previos obtenidos para la GS1a de *M. truncatula* [40], para la que se había propuesto que la nitración de Tyr167, correspondiente por alineación de secuencias a la Tyr171 de la HsGS, era responsable de la pérdida de actividad enzimática tras exposición a ONOO⁻. No obstante, dicha conclusión se tomó basándose únicamente en el hecho de que el cambio del residuo Tyr167 por Phe hizo a la proteína mucho más resistente a la inactivación por tetranitrometano, un agente nitrante sintético. En ningún momento del trabajo se verificó por MS que en efecto el residuo Tyr167 resultaba nitrado, así como tampoco se verificó que la sustitución de dicho residuo por Phe hacía también a la enzima resistente a la inactivación por ONOO⁻.

Un caso interesante de analizar es el del mutante Y288F, dado que esta variante presentó en condiciones basales una actividad específica muy baja con respecto a la HsGS WT; esto sugiere que las alteraciones que ocurran en este sitio podrían tener un gran impacto sobre la estructura y función de la HsGS. El análisis estructural muestra que la Tyr288 es un residuo con una localización interior en la estructura proteica que presenta un grupo -OH fenólico rodeado por diversas cadenas laterales cargadas (residuos de His, Arg y Asp) (Fig. 7.2C). Es posible entonces que tanto la pérdida de dicho grupo -OH cuando el residuo es sustituido por Phe, así como los cambios impuestos por la incorporación de un grupo -NO₂ cuando el residuo se nitra, puedan romper las interacciones que probablemente se establecen alrededor del -OH fenólico, ocasionando así alteraciones estructurales. Esto significaría que la nitración de la Tyr288 sería un factor contribuyente a la inactivación oxidativa de la HsGS bajo las condiciones experimentales empleadas, aunque cuantitativamente menor debido a los bajos rendimientos de nitración en este sitio. La baja exposición al solvente de este residuo explicaría la baja nitración de este residuo, si bien sus niveles de modificación no fueron tan bajos como para otros residuos poco expuestos (ej: Tyr180). En ese sentido, la modificación oxidativa de este residuo de baja accesibilidad podría verse facilitada por la oxidación de Tyr283 (que se encuentra a 9,6 Å de distancia), residuo que presenta una

alta exposición al solvente y se encontró como uno de los blancos principales de nitración. Entonces, la formación de un Tyr[•] en la posición 283 podría representar una posible vía para oxidar al residuo Tyr288; esta posibilidad resulta más factible si se toma en cuenta que se identificó un entrecruzamiento DiTyr entre los residuos Tyr283-Tyr288. Otro aspecto interesante respecto a la Tyr288 es su proximidad a dos residuos de Cys, que son, Cys346 y Cys359 (Fig. 7.2C); esto abre la posibilidad a que la presencia de un Tyr[•] en la posición 288 pueda ser reparada por cualquiera de estos residuos de Cys. Además, si a través de este mecanismo se formara un radical cisteinilo sobre Cys346, las reacciones de transferencia electrónica en cadena podrían también incluir al residuo de Cys252, ubicado a ~ 4 Å, y eventualmente llevar a la formación de una unión -S-S- entre estas dos Cys.

7.2. Análisis del rol de la nitración de Tyr336 en la inactivación de la HsGS

La principal hipótesis existente con relación a la inactivación oxidativa de la GS de mamífero implica la nitración de Tyr336, un residuo conservado entre las GS eucariotas que interacciona con los nucleótidos de adenina en el sitio activo [49]. Esta hipótesis surgió a partir de experimentos *in vitro* en los cuales la GS ovina resultó inactivada por ONOO⁻, siendo la Tyr336 el único residuo identificado como nitrado por MS [206]. Posteriormente, simulaciones de dinámica molecular [207] hechos sobre la HsGS dieron apoyo a esta idea al proponer un mecanismo de inactivación, en el cual la NO₂Tyr336 desprotonada (cargada negativamente), pero no la forma neutra, dificulta la unión del ATP. Esto fue validado parcialmente por experimentos realizados a pH 4,0 (al cual la NO₂Tyr336 estaría en forma neutra), que mostraron una mínima pérdida de actividad enzimática para la enzima nitrada por ONOO⁻ en comparación con la inactivación observada a pH 7. No obstante, en este último caso, no se comprobó que de hecho el residuo Tyr336 resultaba nitrado por el tratamiento, al tiempo de que múltiples factores podrían estar explicando los hallazgos cuando se comparan las actividades enzimáticas a dos valores de pH tan distantes. En este trabajo, se detectó a la Tyr336 como un sitio principal de nitración, lo que permitiría *a priori* atribuirle a este residuo un rol en la pérdida de función HsGS como consecuencia de la exposición a ONOO⁻. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren un escenario mucho más complejo en el cual la nitración de Tyr336 sería solo uno de los múltiples eventos oxidativos que llevan a la pérdida de actividad HsGS por daño oxidativo. De hecho, si la nitración de la Tyr336 fuera el único factor clave responsable de la inactivación de la HsGS por ONOO⁻, el mutante Y336F debería de haber sido más resistente a la inactivación que la enzima WT, cuando en realidad se observó justamente lo contrario (Fig. 6.17). Esto no significa necesariamente que la nitración de Tyr336 no está involucrada en la pérdida de actividad HsGS, dado que la ausencia de Tyr336 podría resultar en la oxidación de otros blancos (Fig. 6.17F) cuya modificación tiene un impacto mayor sobre la actividad.

Es importante igualmente considerar que existen diferencias experimentales notorias entre el presente estudio y los trabajos de Görg *et al* [206] y Frieg *et al* [207]. Estos estudios emplearon una concentración de GS en los experimentos *in vitro* de 5 µg/mL (~ 0,115 µM GS monómero), la cual fue expuesta a excesos de ONOO⁻ en el rango de 4 a 400:1, mientras que en el presente trabajo, la concentración de HsGS utilizada fue generalmente 40 veces mayor (200 µg/mL, ~ 4,6 µM monómero) y se la trató con excesos de ONOO⁻ de ~ 10 a 200:1. Estas diferencias pueden generar que la química observada

durante las reacciones sea diferente en cada caso por dos razones: primero, la relación entre reacciones directas *versus* indirectas del ONOO⁻ pueden variar, favoreciéndose las oxidaciones por dos electrones bajo condiciones de alta concentración de proteína; segundo, el estado de oligomerización de la GS puede ser diferente, dado que la concentración de proteína es un factor determinante en este equilibrio [257]. Así, es posible que en las condiciones experimentales aquí empleadas, las reacciones directas de oxidación del ONOO⁻ sobre, por ejemplo, Cys, se vean favorecidas respecto a las mencionadas referencias. Además, la formación de entrecruzamientos observada aquí puede no ser tan factible en soluciones muy diluidas de GS. Si el estado de oligomerización fuera diferente entre los estudios (por ejemplo, alta proporción de monómero en los otros estudios), el patrón de modificación oxidativa podría también ser considerablemente distinto. Finalmente, es importante considerar el efecto que la elevada concentración proteica y el hacinamiento molecular pueden tener en la modulación de procesos accesorios al daño oxidativo como la ocurrencia de cadenas de propagación radicalares dependientes de O₂ y la agregación proteica [154,264,265]. De cualquier manera, se realizaron también experimentos de inactivación comparativa de la HsGS WT y la Y336F bajo las condiciones experimentales utilizadas por los otros autores, obteniéndose un resultado similar al anterior, es decir, la proteína Y336F se inactiva en mayor medida que la WT (Anexo, Fig.6). Por lo tanto, las diferencias en las concentraciones empleadas no sería un factor que lleve a mecanismos de inactivación por ONOO⁻ distintos.

En el trabajo realizado por Frieg *et al* [207], la actividad GS fue determinada mediante un ensayo acoplado que se basa en la reacción fisiológica de la GS, a diferencia del ensayo empleado mayoritariamente en este trabajo. Es posible que dicho ensayo, que utiliza ATP durante la catálisis, sea más sensible a la inactivación que el ensayo γ -glutamyltransferasa, que usa en cambio cantidades catalíticas de ADP. De acuerdo a la hipótesis propuesta por estos autores la nitración de Tyr336 afectaría la unión del ATP; la Tyr336 participa en esta unión a través de interacciones de *stacking* entre el anillo fenólico y el anillo de la adenina del nucleótido, por lo que sería esperable que la unión de ADP también se viera modificada y el uso de ensayos diferentes no represente un factor crítico. De hecho, los controles realizados al comienzo de este trabajo no mostraron diferencias importantes entre la inactivación de la HsGS medida a través del ensayo γ -glutamyltransferasa y uno que utiliza ATP (Anexo, Fig. 1), por lo que difícilmente esto sea un elemento relevante en los resultados obtenidos. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo no apoyan la hipótesis de que la nitración de la Tyr336 es la principal causa de inactivación de la HsGS por ONOO⁻.

7.3. Agregación de la HsGS inducida por oxidantes: rol de la oxidación de Cys

Durante el establecimiento inicial de las condiciones experimentales en las cuales realizar el tratamiento de la HsGS con ONOO⁻, se observó que en ciertas situaciones, como el uso de concentraciones elevadas de proteína (1,0 mg/mL) o el agregado de ONOO⁻ como infusión lenta, la proteína precipitaba en el tubo. Esto llevó a que se utilizara en los experimentos una concentración de HsGS de 0,2 mg/mL y que fuera necesario analizar las muestras en los minutos inmediatos al agregado del bolo ONOO⁻ para los estudios de inactivación de la enzima. No obstante, esa observación se volvió en

sí misma un tema interesante a abordar, dado que parecía ser una consecuencia directa de la exposición al oxidante y podría representar un proceso biológicamente relevante. De hecho, estudios previos habían reportado efectos similares bajo una variedad de condiciones, incluyendo la exposición a agentes alquilantes de $-SH$, iones de metales divalentes, altas concentraciones y congelado de la proteína liofilizada [227,255,257,258]. Para la GS procariota, además, se observó mediante microscopía electrónica que la proteína de *E. coli* agregaba en forma de manojos de tubos ordenados frente al agregado de $MnCl_2$ [266]. Estas observaciones indican que la GS presenta una tendencia a agregar bajo distintas condiciones, siendo posible entonces que el daño oxidativo represente otro evento disparador.

Mediante medidas de turbidez, se evidenció la agregación de la HsGS tras su exposición a $ONOO^-$ en un proceso que ocurre con relativa rapidez, en su mayoría dentro de las primeras dos horas luego del agregado del bolo único de $ONOO^-$ y que lleva a que ocurra una pérdida de actividad enzimática a lo largo del tiempo (Fig. 6.18). Dado que esto ocurrió luego del agregado de un oxidante de corta vida media que lleva a la rápida oxidación de la proteína y se descompone en cuestión de segundos, estos cambios no serían a causa de eventos oxidativos que se den a lo largo del tiempo sino que evidenciarían cambios que sufre la proteína luego de ser oxidada. Mediante distintas aproximaciones, que incluyeron el uso del agente reductor de $-SH$ DTT (Fig. 6.19), así como de oxidantes más específicos para residuos de Cys (H_2O_2 y diamida) (Fig. 6.20-21), se comprobó que la oxidación de ciertos residuos de Cys críticos de la HsGS estaría induciendo la agregación de la proteína. Estos hallazgos sugieren que existen residuos de Cys esenciales para el mantenimiento de la estructura nativa de la proteína y que su modificación química, ya sea por oxidación o por alquilación (como se reportó previamente [227,255]), altera la estructura nativa de la HsGS y lleva a su agregación. De cualquier manera, los resultados sugieren que existen otros factores que influyen también sobre la agregación de la HsGS, como surge del hecho de que la proteína sin tratar agregó a valores de pH no óptimos (Fig. 6.23), o de que la mutante Y288F agregó considerablemente en ausencia de oxidante (Fig. 6.24). Es posible que si bien la oxidación de Cys sea necesaria para desencadenar la agregación, el grado de otras modificaciones oxidativas (como la formación de entrecruzamientos DiTyr) pueda también facilitarla; los experimentos realizados con CO_2 sugieren esto, dado que la agregación de la HsGS por $ONOO^-$ fue mayor en presencia de CO_2 (Fig. 6.23) pese a que la oxidación de Cys no presentó diferencias (Fig. 6.10). La Figura 7.3 esquematiza las principales consecuencias del tratamiento de la HsGS con $ONOO^-$ respecto a la modificación oxidativa de la proteína, su inactivación y agregación.

Como se muestra en este trabajo, la agregación de la HsGS inducida por la oxidación de $-SH$ es cuantitativamente relevante en términos de la pérdida global de actividad enzimática ocasionada por la oxidación. Además, representa una vía de pérdida de función GS asociada a la producción de oxidantes en sistemas biológicos que no se limita a la producción de $ONOO^-$. Más allá de la evidencia *in vitro* de agregación de la GS, existe cierta evidencia *in vivo* que sugiere que esto podría también estar ocurriendo bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, en un modelo murino de ALS, se encontró a la GS en fracciones insolubles de médula espinal en niveles considerablemente mayores que en los animales control. Asimismo, la GS se encontró también nitrada, sugiriendo que el estrés oxidativo asociado con la ALS puede promover tanto la modificación oxidativa como la

agregación de la proteína [212]. Por otra parte, en cultivos de levadura, se observó que la GS tenía una tendencia a formar focos de agregación citosólicos y aparecía enriquecida en fracciones insolubles de lisados celulares bajo condiciones de estrés nutricional y térmico [267]. Estos ejemplos podrían conectarse con los hallazgos mostrados en este trabajo, siendo la oxidación de Cys de la proteína la causa que ocasione la agregación e insolubilización de la GS en sistemas biológicos bajo condiciones de estrés. Los mecanismos específicos que conectan la oxidación de Cys con la agregación restan aun ser definidos; en ese sentido, la identificación de los residuos de Cys involucrados constituye un factor clave para lograr una mayor comprensión del proceso de agregación de la HsGS.

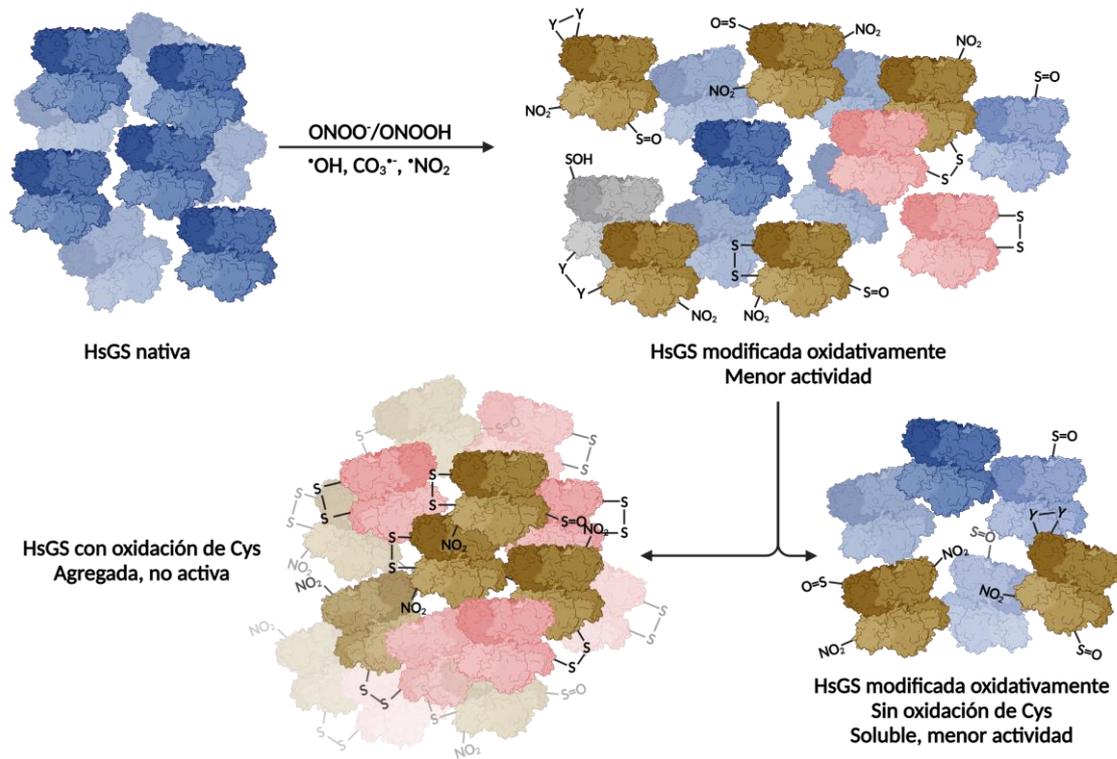


Figura 7.3. Resumen de la modificación oxidativa de la HsGS por ONOO⁻ y sus oxidantes derivados y sus principales consecuencias. El tratamiento de la HsGS con ONOO⁻ genera, tanto por reacciones directas como a través de los radicales derivados, la modificación oxidativa de la proteína. Se genera así una mezcla de especies que portan distintas oxidaciones, como nitración de Tyr y Trp (-NO₂), oxidación de Met (-S=O), formación de DiTyr (-Y-Y-) y oxidación de Cys (-SOH, -S-S-), junto con HsGS no modificada, que presenta globalmente una actividad disminuida. Con el paso del tiempo, las formas de HsGS que han sufrido la modificación oxidativa de Cys (posiblemente a -S-S-) tienden a formar agregados insolubles que carecen de actividad. Las formas restantes pueden permanecer en solución y presentarán una actividad menor a la HsGS nativa a causa de las diversas modificaciones oxidativas que poseen. Imagen creada con BioRender.com.

7.4. Efectos de la unión de ligandos sobre la agregación de la HsGS

Un hecho a destacar dentro de los estudios realizados fue la capacidad de la unión de MgATP para prevenir la agregación de la HsGS tras su incubación con H₂O₂ (Fig. 6.26). Los estudios por SDS-PAGE (Fig. 6.26C) y de cuantificación con DTNB (Fig. 6.26B)

sugieren que la HsGS unida a MgATP se ve protegida de sufrir la oxidación de los residuos de Cys que inducen la agregación de la proteína. Además, la estabilidad térmica de la HsGS unida a MgATP fue significativamente mayor que la de la enzima sin ligandos (Fig. 6.26E), lo que podría también explicar la protección a la agregación aportada por los ligandos. No se pudo evidenciar un efecto del MgATP sobre el estado de oligomerización de la HsGS (Fig. 6.27), por lo que en estas condiciones no estaría ejerciendo un rol en la estructura cuaternaria de la proteína, algo que en teoría también podría ser un factor determinante de la tendencia de la proteína a agregar. Resultados similares habían sido reportados previamente en una variedad de trabajos, en los cuales se observó que la unión de ligandos (especialmente nucleótidos de adenina y Mn^{2+}/Mg^{2+}) incrementaba la estabilidad de la proteína y prevenía su agregación por diversos estímulos [30,49,227,255,259]. Por lo tanto, existe evidencia fuerte de que la unión de MgATP, el primer sustrato que ingresa al sitio activo durante la catálisis, promueve la adopción de una estructura proteica de mayor estabilidad, que se encuentra protegida de la modificación química de ciertos residuos de Cys y por lo tanto es significativamente más resistente a la agregación.

En virtud de lo anterior, la caracterización detallada de cómo la unión del MgATP afecta la estructura y estabilidad de la HsGS constituye un elemento esencial para comprender la conexión entre la oxidación de Cys y los mecanismos de agregación de la proteína. El estudio en que se obtuvo por primera vez la estructura cristalográfica de la GS de mamífero aporta cierta información al respecto, dado que dentro de las estructuras obtenidas se encuentra la de la GS canina en ausencia de ligandos y la de la HsGS en presencia de ligandos [49]. A través de la superposición de las estructuras, se observan cambios conformacionales específicos que ocasionan mayormente un cierre del sitio activo en respuesta a la unión del nucleótido, junto con algunos cambios adicionales (Fig. 7.4). Pese a lo discreto de estos movimientos, el efecto que tiene sobre la susceptibilidad de la HsGS a agregar por modificación oxidativa de los residuos de Cys es muy marcado. El análisis de cómo estos cambios influyen sobre la exposición de los residuos de Cys al solvente, o sobre las distancias entre distintos residuos de Cys, puede proveer una primera aproximación para comprender tanto cómo ocurre la agregación de la HsGS así como el efecto protector de la unión de los ligandos.

Así como la unión del MgATP ofreció protección frente a la agregación inducida por oxidantes, es posible que pueda actuar también como un agente protector respecto a la inactivación oxidativa causada por el $ONOO^-$. No obstante, debido a la capacidad de los nucleótidos de adenina para reaccionar con los radicales derivados del $ONOO^-$, esto no pudo ser evaluado. De hacerse el experimento de agregado de $ONOO^-$ a la HsGS en presencia de concentraciones de ATP como las empleadas, es de esperar que todo efecto de los oxidantes se vea inhibido producto de que el ATP (el no unido a la enzima preferentemente) actúa como un atrapador de radicales. Por tanto, no podría obtenerse información útil para poder concluir si la presencia de ATP o ADP en el sitio activo previene, además de la agregación, la inactivación oxidativa. Lo que se evaluó igualmente fue la capacidad del MgATP de prevenir la agregación de la HsGS luego de que la misma fuera tratada con $ONOO^-$ (es decir, se agregó primero el oxidante y luego de un minuto el MgATP), no observándose en ese caso ninguna protección a la agregación (datos no mostrados). Por lo tanto, la eventual unión de MgATP una vez de que los residuos de Cys han sido modificados no es suficiente para prevenir la agregación.

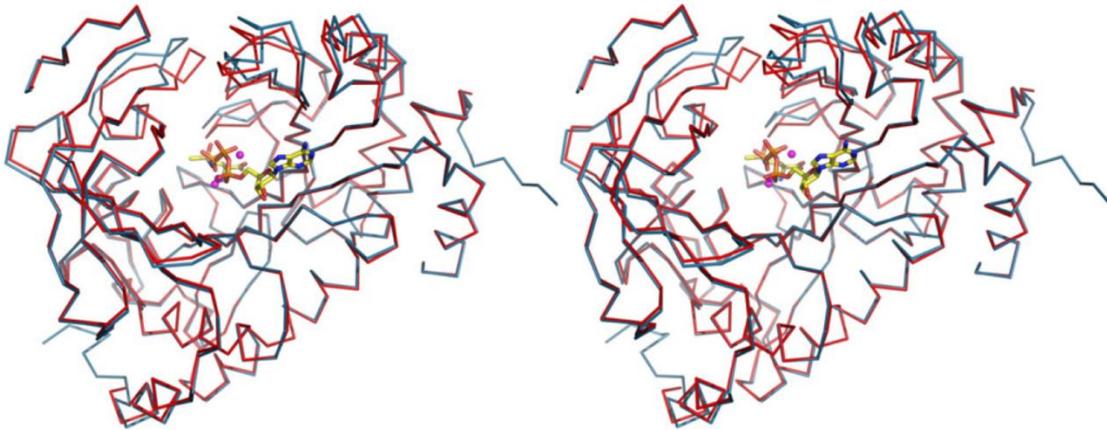


Figura 7.4. Cambios conformacionales en las proximidades del sitio activo de la GS de mamífero tras unión de ligandos. Se muestran superpuestas las estructuras (esqueleto principal) de la HsGS/MnADP/MnSO-P (en rojo) y la GS canina sin ligandos (en azul). Las estructuras representan una porción del dominio catalítico de una subunidad junto con parte del dominio “β-grasp” de la subunidad contigua (formando el sitio activo entre ambas). Se muestran en el sitio activo los ligandos MSO-P y ADP de la HsGS, al igual que los átomos de Mn^{2+} de ambas como esferas magenta.

Evidentemente, el efecto tan marcado de la unión del MgATP sobre la susceptibilidad de la HsGS a agregar determina que, en condiciones biológicas normales, la proteína podría hallarse relativamente protegida de sufrir la oxidación de residuos de Cys críticos para desencadenar dicho proceso. Teniendo en cuenta que las concentraciones intracelulares de ATP típicamente se encuentran entre 1-10 mM [268-271] y que el valor de K_m para el ATP es de entre 2-3 mM [272], es de esperar que una fracción importante de la HsGS se encuentre con ATP unido. De este modo, la fracción de HsGS que no se encuentre uniendo ATP sería más susceptible a sufrir la agregación producto de la oxidación de Cys, mientras que ambas formas podrían, en principio, verse afectadas por la modificación oxidativa por oxidantes de un electrón que lleven a una pérdida de actividad. La evidencia *in vivo* presentada más arriba da cuenta de que, pese a estas consideraciones, ambos procesos estarían ocurriendo en sistemas biológicos, particularmente en condiciones fisiopatológicas.

7.5. Relevancia biológica de la modificación oxidativa de la HsGS

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia, dando cuenta de un 60-70% de los casos a nivel mundial. Se estima que un 10% de las personas mayores a 65 años tienen Alzheimer, aumentando este estimado a un 32% al considerar los individuos mayores de 85 años. Los pacientes con esta enfermedad presentan una pérdida gradual de la memoria y las funciones cognitivas. Los marcadores patológicos característicos del Alzheimer a nivel cerebral son las placas de péptidos β -amiloide ($A\beta$) y la presencia de ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada. En función de la aparición temporal de las patologías amiloide y tau, así como de evidencia de que la sobreproducción de $A\beta$ conduce a la enfermedad de Alzheimer, se ha propuesto la hipótesis de la cascada amiloide explicar el desarrollo de la enfermedad. Dicha hipótesis postula que la acumulación de $A\beta$, principalmente a nivel de la corteza cerebral e hipocampo, es el evento inicial que lleva a una cascada de efectos posteriores que en

última instancia resultan en el daño neuronal. No obstante, existe una evidencia cada vez mayor de que esta hipótesis por sí sola no es capaz de explicar muchos aspectos de la patogénesis del Alzheimer, lo que sugiere que otros procesos patológicos también están implicados. En los últimos años, diversos estudios han planteado que la neuroinflamación, es decir, la respuesta inflamatoria dentro del SNC, estaría desempeñando un rol vital en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer [273].

Si bien aún hay muchos aspectos que no se comprenden plenamente, está bien establecido que los astrocitos y la microglía son reguladores importantes de la respuesta inflamatoria del SNC. Por este motivo, al considerarse un rol de la neuroinflamación en la patogénesis del Alzheimer, se ha planteado que estos tipos celulares están directamente implicados en el proceso. El hecho de que en análisis de cerebros post-mortem de pacientes con Alzheimer o en modelos animales de la enfermedad se encuentren habitualmente ambos tipos celulares en áreas con elevada patología A β o tau aporta más evidencia a esto, al sugerir una relación directa entre la producción de A β y la neuroinflamación [274-276]. Si bien en condiciones fisiológicas tanto astrocitos como microglía participan en la homeostasis del A β , degradando tanto péptidos solubles como formas oligoméricas y agregados (a través de su fagocitosis) evitando así su acumulación, se ha demostrado también que ciertas especies de A β pueden inducir la activación de estas células, llevándolas a adoptar un fenotipo proinflamatorio con potencial neurotóxico. Este efecto tendría lugar cuando distintas especies de A β (en particular los oligómeros pequeños) son reconocidos a través de receptores de reconocimiento de patrón, tales como los receptores de tipo Toll (ej: TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6), CD14, CD47, integrina α 6 β 1 y receptores *scavenger*. El reconocimiento a través de estos receptores conduce a la activación de las vías moleculares que inducen los cambios fenotípicos en microglía y astrocitos, al tiempo que llevan a la producción por parte de estas células de citoquinas proinflamatorias (ej: IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α), la citoquina antiinflamatoria TGF β , quimioquinas (ej: MCP1), varias moléculas de adhesión celular, *NO (mediante inducción de la iNOS) y ROS (mediante activación de las NOX), todos mediadores capaces de llevar a la disfunción y muerte neuronal. Además, las citoquinas proinflamatorias así producidas pueden propagar la señal, conduciendo a la activación de más células, estableciendo así un ambiente inflamatorio a nivel del SNC, que en el contexto de la enfermedad de Alzheimer no logra ser resuelto, volviéndose un proceso inflamatorio crónico que sería un factor determinante en el desarrollo de la enfermedad [273,276-278].

Entonces, durante las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer, la activación de microglía y astrocitos a causa de la producción elevada de A β generaría un contexto neuroinflamatorio que se caracterizaría, entre otros factores, por una elevada producción de especies oxidantes a causa de la activación de las NOX y la inducción de la iNOS. En esas condiciones los distintos componentes celulares del SNC, incluyendo los astrocitos, se verían expuestos a un flujo continuo y significativo de oxidantes tales como H₂O₂ y ONOO⁻, lo que podría resultar en la modificación oxidativa de múltiples componentes, entre ellos, la GS. De este modo, los mecanismos de inactivación y agregación inducida por oxidantes de la GS estudiados en este trabajo podrían estar ocurriendo durante etapas tempranas de la enfermedad, derivando en una deficiencia funcional de los astrocitos respecto a su rol como sostén de las sinapsis glutamatérgicas. Las consecuencias directas de esta disfunción serían un aumento en los niveles de Glu extracelular, lo que promovería la excitotoxicidad neuronal, así como un menor reciclaje del neurotransmisor (mediante

su conversión a Gln) pudiendo ocasionar un déficit del mismo a nivel de las neuronas presinápticas (ver Fig. 2.6). Estas alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica, principal sinapsis excitatoria del SNC, puede entonces generar un impacto en diversos procesos cognitivos, como se comentó anteriormente (Introducción, sección 2.4.5), contribuyendo al desarrollo de las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad, incluso en etapas tempranas, previo a que ocurra una muerte neuronal considerable (Fig. 7.5).

8. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se estudió la inactivación oxidativa de la HsGS por ONOO^- mediante una combinación de técnicas bioquímicas, analíticas, moleculares, estructurales y proteómicas. A diferencia de los estudios anteriores, se observó que la inactivación causada por exposición a ONOO^- se acompaña de múltiples modificaciones oxidativas en diversos residuos de Cys, Met, Trp y Tyr. En el caso puntual de los residuos de Tyr, se encontró la nitración a NO_2Tyr de 10 residuos (de un total de 15), hallándose niveles de modificación cuantitativamente relevantes para varios de ellos. No obstante, mediante estudios usando mutantes Tyr→Phe de gran parte de estos residuos, no se logró encontrar una correlación directa entre su modificación y la inactivación. Además, se encontró que el tratamiento con ONOO^- induce la formación de entrecruzamientos covalentes mediante DiTyr, logrando identificarse 5 tipos de uniones DiTyr que involucraron 6 residuos diferentes de Tyr. Al igual que para los residuos de Tyr, la oxidación de Cys (a disulfuros posiblemente) y de Met (a MetSO) fueron significativas desde un punto de vista cuantitativo; no obstante, en ninguno de los casos se logró establecer un vínculo directo con la inactivación. Por otra parte, se observó que la oxidación de Cys por ONOO^- y otros oxidantes induce la agregación de la HsGS en el tiempo, lo cual genera un impacto aun mayor sobre la funcionalidad de la proteína.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la inactivación oxidativa de la HsGS es un proceso complejo y multifacético, que ocurre principalmente a través de la modificación preferentemente por reacciones radicalares de diversos aminoácidos, alteraciones en la estabilidad de la proteína y agregación dependiente de la oxidación de Cys. Los datos obtenidos aquí contribuyen a comprender los mecanismos bioquímicos implicados en la inactivación y agregación de la HsGS que se observa en enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento, revisando el concepto de que una única modificación oxidativa, tal como la nitración de Tyr, da cuenta de la pérdida de función.

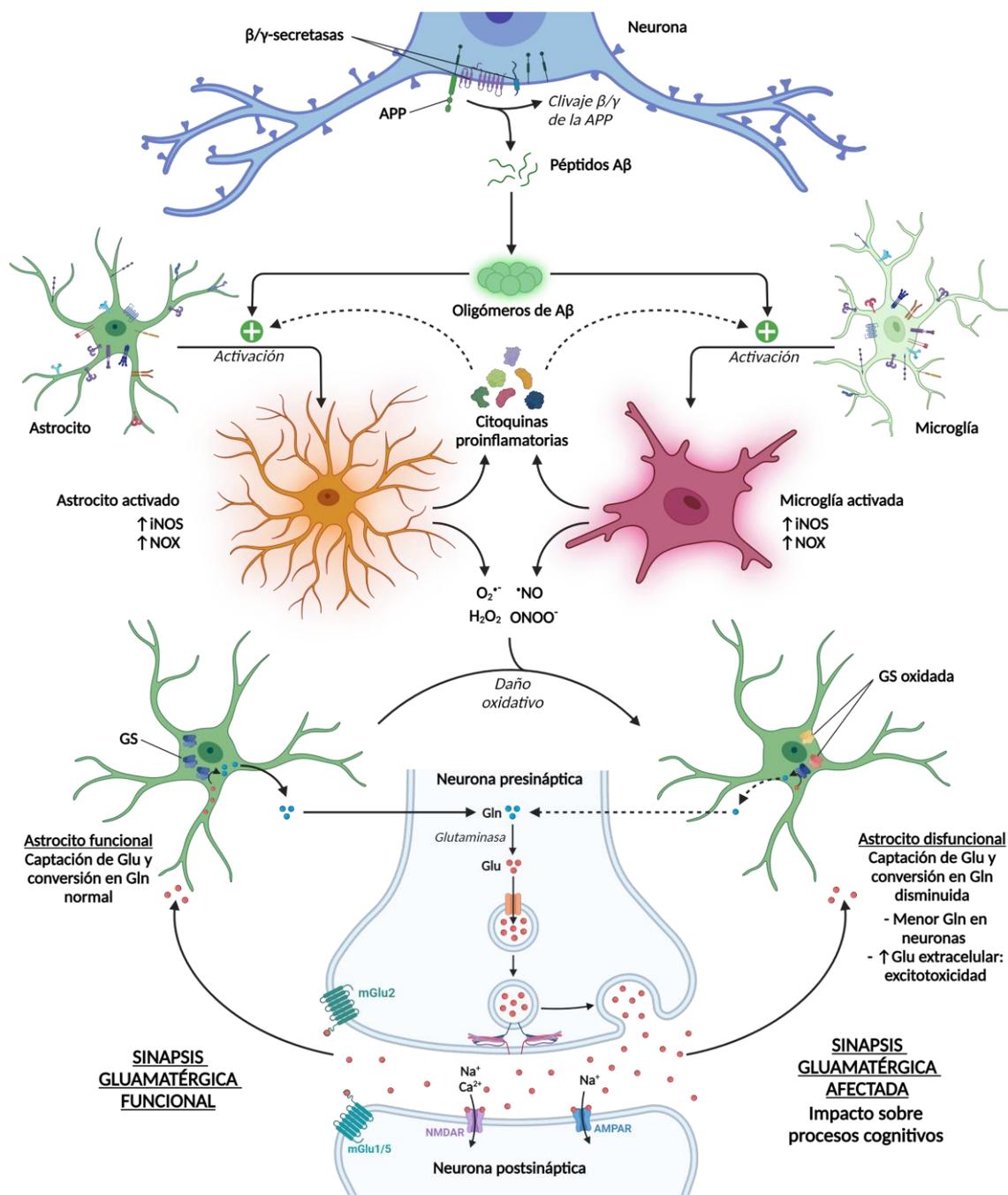


Figura 7.5. Modificación oxidativa de la GS en el contexto de la enfermedad de Alzheimer y consecuencias funcionales. La acumulación de péptido β -amiloide (A β) a nivel extracelular favorece su oligomerización y agregación, formando eventualmente fibras insolubles que son el componente principal de las placas seniles. Varias especies agregadas de A β , principalmente oligómeros pequeños, pueden ser reconocidas por receptores de reconocimiento de patrón de astrocitos y microglía, lo que conduce a la activación de estas células y la adopción de un fenotipo proinflamatorio que deriva en la secreción de citoquinas proinflamatorias (que podrán activar más células) y la producción de especies oxidantes. Estos oxidantes podrán finalmente mediar la modificación oxidativa de la GS astrocitaria, llevando a una pérdida de su función. La falta de GS activa conlleva una incapacidad funcional de estos astrocitos, que no serán capaces de sostener apropiadamente la sinapsis glutamatérgica, pudiendo presentarse entonces alteraciones cognitivas a causas de una neurotransmisión por Glu afectada. APP: proteína precursora amiloidea; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; NOX: NADPH oxidasa; GS: glutamina sintetasa; Glu: glutamato; Gln: glutamina; NMDAR/AMPA: receptores ionotrópicos de Glu; mGlu1/2/5: receptores metabotrópicos de Glu. Imagen creada con BioRender.com.

Para profundizar más en la elucidación de los mecanismos moleculares que llevan a la inactivación y agregación de la HsGS, así como también a su ocurrencia *in vivo*, es necesaria la realización de una serie adicional de estudios. Continuando la línea de este trabajo, resta aun evaluar la inactivación por ONOO⁻ de nuevos mutantes Tyr→Phe en los cuales se sustituyan residuos potencialmente relevantes no probados actualmente, tales como Tyr283 y Tyr104. Ambos residuos (principalmente Tyr283) presentaron una modificación significativa, por lo que su contribución en el proceso de inactivación oxidativa amerita su estudio. Asimismo, tanto para estos nuevos mutantes como para algunos de los ya disponibles, el análisis de los niveles de modificación por MRM (tal como se hizo para el mutante Y336F) puede arrojar nueva información relevante acerca de las modificaciones que se relacionan con una mayor pérdida de actividad. Una de las principales interrogantes que quedó por responder es cuáles son los residuos de Cys involucrados en la agregación de la HsGS. Para ello, es necesario realizar experimentos de MS/MS específicos diseñados para identificar las Cys que son blanco de oxidación; luego, utilizando mutantes en que se sustituyan dichas Cys, se podría evaluar el rol de la oxidación de cada una de ellas en la agregación. Conocer los mecanismos que conectan la oxidación de Cys con la agregación representa un factor clave en el entendimiento de la pérdida de función por daño oxidativo de la HsGS.

Otro aspecto clave para continuar el análisis de la inactivación oxidativa de la GS es evaluar su ocurrencia en sistemas celulares. En ese sentido, el paso inicial sería estudiar la pérdida de actividad GS en cultivos de astrocitos sometidos a oxidantes exógenos o endógenos (estimulando su producción por ejemplo mediante el agregado de citoquinas proinflamatorias). Si bien existen estudios donde ya se ha comprobado la inactivación y nitración de la GS en cultivos de astrocitos, no existe mucha información al respecto. Estudiar si la modificación oxidativa de la GS en cultivos ocurre de manera similar a lo observado para la HsGS pura en este trabajo, y especialmente, si la agregación tiene lugar, constituyen elementos clave para comprender la relevancia biológica de los resultados obtenidos hasta ahora.

Los resultados principales de este trabajo se encuentran publicados en la siguiente referencia:

- Campolo, N., Mastrogiovanni, M., Mariotti, M., Issoglio, F.M., Estrin, D., Hägglund, P., Grune, T., Davies, M.J., Bartesaghi, S., and Radi, R. (2023) Multiple oxidative post-translational modifications of human glutamine synthetase mediate peroxynitrite-dependent enzyme inactivation and aggregation. *J. Biol. Chem.* **299**, 102941.

Además, durante el desarrollo de la tesis, se publicaron los siguientes trabajos relacionados a la modificación oxidativa de proteínas y a la glutamina sintetasa:

- Issoglio, F.M., Campolo, N., Zeida, A., Grune, T., Radi, R., Estrin, D.A., and Bartesaghi, S. (2016) Exploring the catalytic mechanism of human glutamine synthetase by computer simulations. *Biochemistry* **55**, 5907-5916.
- Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Álvarez, B., and Radi, R. (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem. Rev.* **118**, 1338-1408.

- Campolo, N., Issoglio, F.M., Estrin, D.A., Bartesaghi, S., and Radi, R. (2020) 3-Nitrotyrosine and relative derivatives in proteins: precursors, radical intermediates and impact in function. *Essays Biochem.* **64**, 111-133.
- Ott, C., Tomasina, F., Campolo, N., Bartesaghi, S., Mastrogiovanni, M., Leyva, A., Batthyány, C., Meinel, W., Grune, T., and Radi, R. (2021) Decreased proteasomal cleavage at nitrotyrosine sites in proteins and peptides. *Redox Biol.* **46**, 102106.

9. Agradecimientos

A mis orientadores, Rafael y Silvina, quienes me han acompañado desde un principio en el área de la bioquímica redox hace más de diez años y lo han hecho desde entonces, brindándome desde siempre las mejores condiciones posibles para el desarrollo de esta Tesis.

A Mauri, quien también me ha acompañado desde el comienzo y contribuyó de manera fundamental en este trabajo al diseñar y llevar a cabo los experimentos de MS/MS realizados en el CEINBIO. Además, por su contribución siempre presente en múltiples discusiones de resultados, ayuda para resolver los problemas técnicos con los equipos y toda clase de problemas.

A los distintos colaboradores del exterior que formaron parte de este trabajo: de la Universidad de Buenos Aires, al Dr. Darío Estrin y al Dr. Federico Issoglio; de la Universidad de Copenhague, al Dr. Michele Mariotti, al Dr. Per Hägglund y el Dr. Michael J. Davies; y del German Institute of Human Nutrition, al Dr. Tilman Grune y la Dra. Christiane Ott.

A Vero Tórtora, por su gran ayuda al comienzo del proyecto con la transformación de bacterias y la expresión de la proteína.

A Marcela, incorporada en el grupo recientemente, fundamental para que el mutante Y185F sea purificado, siempre con ánimos de aprender y seguir adelante con los aspectos pendientes del proyecto.

A Pao por los varios litros de medio de cultivo y preparados durante todos los años transcurridos.

A los integrantes de la CAS, Dra. Rosario Durán, Dr. Daniel Peluffo y Dr. Horacio Botti, por el seguimiento y aportes realizados.

A las agencias financiadoras por el apoyo recibido en becas de posgrado y financiación de proyectos y distintas actividades: la Comisión Académica de Posgrado (CAP), CSIC, ANII, PEDECIBA y la Alexander von Humboldt Foundation.

A los geniales amigos y amigas del Call Center y adeptos (de ayer y hoy), ese lugar maravilloso del cual tuve el gusto de ser su primer residente fijo y con los años recibí cada vez más compañía: Mauri (nuevamente), Flo, Gabi, Ine, Jenny, Mechi, Danielito, Santi M., Nikito, Clari, Verita, Caro C., Santi S. y Alfo. Representan sin lugar a duda el principal sostén de todo esto. Gracias por tanto.

A todos los demás amigos y compañeros del Departamento y CEINBIO. Compartir el día a día con tanta gente maravillosa es el mayor privilegio que puedo tener. Y saber que lo expreso con sinceridad hace que sea digno de agradecer, no solo ahora sino cada día. Sea para discutir cuestiones académicas, para conversar sobre cualquier cosa, pasar el rato, divertirse, reír, etc., nunca falta gente. Gracias por su apoyo y por estar.

A la Facultad de Medicina, por permitirme desempeñarme y desarrollarme como docente desde el año 2011, y por poseer un encanto tan particular que, si volviera el tiempo atrás, sin dudas la elegiría como mi casa de estudios. Si optara por seguir una carrera no vinculada al arte, claro está.

10. Referencias

1. Zhang, X., Ward, B. B., and Sigman, D. M. (2020) Global Nitrogen Cycle: Critical Enzymes, Organisms, and Processes for Nitrogen Budgets and Dynamics. *Chem Rev* **120**, 5308-5351
2. Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2013) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth ed., W. H. Freeman and Company, New York
3. Wang, M., Shen, Q., Xu, G., and Guo, S. (2014) Chapter One - New Insight into the Strategy for Nitrogen Metabolism in Plant Cells. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (Jeon, K. W. ed.), Academic Press. pp 1-37
4. Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M. M., Pithon-Curi, T. C., and Curi, R. (2003) Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* **21**, 1-9
5. Erickson, R. H., and Kim, Y. S. (1990) Digestion and absorption of dietary protein. *Annu Rev Med* **41**, 133-139
6. Baynes, J. W., and Dominiczak, M. H. (2014) *Medical biochemistry / [edited by] John Baynes, Marek H. Dominiczak*, 4th ed. ed., Saunders, Philadelphia
7. Bergstrom, J., Furst, P., Noree, L. O., and Vinnars, E. (1974) Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol* **36**, 693-697
8. Taylor, L., and Curthoys, N. P. (2004) Glutamine metabolism: Role in acid-base balance*. *Biochem Mol Biol Educ* **32**, 291-304
9. Altman, B. J., Stine, Z. E., and Dang, C. V. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **16**, 619-634
10. DeBerardinis, R. J., and Cheng, T. (2010) Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313-324
11. Bhutia, Y. D., Babu, E., Ramachandran, S., and Ganapathy, V. (2015) Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res* **75**, 1782-1788

12. Mouilleron, S., Badet-Denisot, M. A., Badet, B., and Golinelli-Pimpaneau, B. (2011) Dynamics of glucosamine-6-phosphate synthase catalysis. *Arch Biochem Biophys* **505**, 1-12
13. Xiao, D., Zeng, L., Yao, K., Kong, X., Wu, G., and Yin, Y. (2016) The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids* **48**, 2067-2080
14. Wright, G., Noiret, L., Olde Damink, S. W., and Jalan, R. (2011) Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver Int* **31**, 163-175
15. Frieg, B., Gorg, B., Gohlke, H., and Haussinger, D. (2021) Glutamine synthetase as a central element in hepatic glutamine and ammonia metabolism: novel aspects. *Biol Chem* **402**, 1063-1072
16. Qvartrkhava, N., Lang, P. A., Gorg, B., Pozdeev, V. I., Ortiz, M. P., Lang, K. S., *et al.* (2015) Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5521-5526
17. Hakvoort, T. B., He, Y., Kulik, W., Vermeulen, J. L., Duijst, S., Ruijter, J. M., *et al.* (2017) Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification. *Hepatology* **65**, 281-293
18. Soria, L. R., Nitzahn, M., De Angelis, A., Khoja, S., Attanasio, S., Annunziata, P., *et al.* (2019) Hepatic glutamine synthetase augmentation enhances ammonia detoxification. *J Inherit Metab Dis* **42**, 1128-1135
19. Hwang, J. J., and Curthoys, N. P. (1991) Effect of acute alterations in acid-base balance on rat renal glutaminase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J Biol Chem* **266**, 9392-9396
20. Squires, E. J., Hall, D. E., and Brosnan, J. T. (1976) Arteriovenous differences for amino acids and lactate across kidneys of normal and acidotic rats. *Biochem J* **160**, 125-128
21. Curthoys, N. P., and Gstraunthaler, G. (2001) Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F381-390
22. Bak, L. K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H. S. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* **98**, 641-653
23. Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., and Sanacora, G. (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* **13**, 22-37
24. Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., *et al.* (2021) Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* **196**, 108719
25. Krebs, H. A. (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* **29**, 1951-1969

26. Levintow, L., and Meister, A. (1954) Reversibility of the enzymatic synthesis of glutamine. *J Biol Chem* **209**, 265-280
27. Speck, J. F. (1947) The enzymic synthesis of glutamine. *J Biol Chem* **168**, 403
28. Speck, J. F. (1949) The enzymatic synthesis of glutamine, a reaction utilizing adenosine triphosphate. *J Biol Chem* **179**, 1405-1426
29. Krishnaswamy, P. R., Pamiljans, V., and Meister, A. (1960) Activated glutamate intermediate in the enzymatic synthesis of glutamine. *J Biol Chem* **235**, PC39-40
30. Pamiljans, V., Krishnaswamy, P. R., Dumville, G., and Meister, A. (1962) Studies on the mechanism of glutamine synthesis; isolation and properties of the enzyme from sheep brain. *Biochemistry* **1**, 153-158
31. van Rooyen, J. M., Abratt, V. R., Belrhali, H., and Sewell, T. (2011) Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure* **19**, 471-483
32. Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. A., Thompson, C. J., *et al.* (1993) Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3009-3013
33. Pesole, G., Bozzetti, M. P., Lanave, C., Preparata, G., and Saccone, C. (1991) Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 522-526
34. Bernard, S. M., and Habash, D. Z. (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol* **182**, 608-620
35. Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y., and Cullimore, J. V. (2000) The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *J Mol Evol* **50**, 116-122
36. Joo, H. K., Park, Y. W., Jang, Y. Y., and Lee, J. Y. (2018) Structural Analysis of Glutamine Synthetase from *Helicobacter pylori*. *Sci Rep* **8**, 11657
37. Valderrama-Martin, J. M., Ortigosa, F., Avila, C., Canovas, F. M., Hirel, B., Canton, F. R., *et al.* (2022) A revised view on the evolution of glutamine synthetase isoenzymes in plants. *Plant J* **110**, 946-960
38. Wyatt, K., White, H. E., Wang, L., Bateman, O. A., Slingsby, C., Orlova, E. V., *et al.* (2006) Lengsin is a survivor of an ancient family of class I glutamine synthetases re-engineered by evolution for a role in the vertebrate lens. *Structure* **14**, 1823-1834
39. Wistow, G., Bernstein, S. L., Wyatt, M. K., Behal, A., Touchman, J. W., Bouffard, G., *et al.* (2002) Expressed sequence tag analysis of adult human lens for the NEIBank Project: over 2000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants. *Mol Vis* **8**, 171-184
40. Melo, P. M., Silva, L. S., Ribeiro, I., Seabra, A. R., and Carvalho, H. G. (2011) Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiol* **157**, 1505-1517

41. De Pinto, V., Caggese, C., Prezioso, G., and Ritossa, F. (1987) Purification of the glutamine synthetase II isozyme of *Drosophila melanogaster* and structural and functional comparison of glutamine synthetases I and II. *Biochem Genet* **25**, 821-836
42. Caggese, C., Caizzi, R., Barsanti, P., and Bozzetti, M. P. (1992) Mutations in the glutamine synthetase I (gsI) gene produce embryo-lethal female sterility in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* **13**, 359-366
43. Matthews, G. D., Gould, R. M., and Vardimon, L. (2005) A single glutamine synthetase gene produces tissue-specific subcellular localization by alternative splicing. *FEBS Lett* **579**, 5527-5534
44. Shin, D., Park, S., and Park, C. (2003) A splice variant acquiring an extra transcript leader region decreases the translation of glutamine synthetase gene. *Biochem J* **374**, 175-184
45. Kuo, C. F., and Darnell, J. E., Jr. (1989) Mouse glutamine synthetase is encoded by a single gene that can be expressed in a localized fashion. *J Mol Biol* **208**, 45-56
46. van de Zande, L., Labruyere, W. T., Arnberg, A. C., Wilson, R. H., van den Bogaert, A. J., Das, A. T., *et al.* (1990) Isolation and characterization of the rat glutamine synthetase-encoding gene. *Gene* **87**, 225-232
47. Wang, Y., Kudoh, J., Kubota, R., Asakawa, S., Minoshima, S., and Shimizu, N. (1996) Chromosomal mapping of a family of human glutamine synthetase genes: functional gene (GLUL) on 1q25, pseudogene (GLULP) on 9p13, and three related genes (GLULL1, GLULL2, GLULL3) on 5q33, 11p15, and 11q24. *Genomics* **37**, 195-199
48. Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., *et al.* (2006) Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J Biol Chem* **281**, 29287-29296
49. Krajewski, W. W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T. A., Karlberg, T., and Mowbray, S. L. (2008) Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J Mol Biol* **375**, 217-228
50. Yamashita, M. M., Almassy, R. J., Janson, C. A., Cascio, D., and Eisenberg, D. (1989) Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *J Biol Chem* **264**, 17681-17690
51. Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M., and Rotstein, S. H. (2000) Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 122-145
52. Midelfort, C. F., and Rose, I. A. (1976) A stereochemical method for detection of ATP terminal phosphate transfer in enzymatic reactions. Glutamine synthetase. *J Biol Chem* **251**, 5881-5887
53. Liaw, S. H., Pan, C., and Eisenberg, D. (1993) Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine, and serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4996-5000

54. Liaw, S. H., and Eisenberg, D. (1994) Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* **33**, 675-681
55. Issoglio, F. M., Campolo, N., Zeida, A., Grune, T., Radi, R., Estrin, D. A., *et al.* (2016) Exploring the Catalytic Mechanism of Human Glutamine Synthetase by Computer Simulations. *Biochemistry* **55**, 5907-5916
56. Stadtman, E. R. (2001) The story of glutamine synthetase regulation. *J Biol Chem* **276**, 44357-44364
57. Woolfolk, C. A., and Stadtman, E. R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. 3. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **118**, 736-755
58. Woolfolk, C. A., and Stadtman, E. R. (1964) Cumulative feedback inhibition in the multiple end product regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichiacoli*. *Biochem Biophys Res Commun* **17**, 313-319
59. Shapiro, B. M., Kingdon, H. S., and Stadtman, E. R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. VII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 642-649
60. Kingdon, H. S., Shapiro, B. M., and Stadtman, E. R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. 8. ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1703-1710
61. Anderson, W. B., and Stadtman, E. R. (1971) Purification and functional roles of the P I and P II components of *Escherichia coli* glutamine synthetase deadenylylation system. *Arch Biochem Biophys* **143**, 428-443
62. Ferguson, A. R., and Sims, A. P. (1974) The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* **80**, 159-171
63. Arad, G., Freikopf, A., and Kulka, R. G. (1976) Glutamine-stimulated modification and degradation of glutamine synthetase in hepatoma tissue culture cells. *Cell* **8**, 95-101
64. Crook, R. B., and Tomkins, G. M. (1978) Effect of glutamine on the degradation of glutamine synthetase in hepatoma tissue-culture cells. *Biochem J* **176**, 47-52
65. Nguyen, T. V., Lee, J. E., Sweredoski, M. J., Yang, S. J., Jeon, S. J., Harrison, J. S., *et al.* (2016) Glutamine Triggers Acetylation-Dependent Degradation of Glutamine Synthetase via the Thalidomide Receptor Cereblon. *Mol Cell* **61**, 809-820
66. Nguyen, T. V., Li, J., Lu, C. J., Mamrosh, J. L., Lu, G., Cathers, B. E., *et al.* (2017) p97/VCP promotes degradation of CRBN substrate glutamine synthetase and neosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3565-3571
67. Kulka, R. G., and Cohen, H. (1973) Regulation of glutamine synthetase activity of hepatoma tissue culture cells by glutamine and dexamethasone. *J Biol Chem* **248**, 6738-6743

68. Kulka, R. G., Tokins, G. M., and Crook, R. B. (1972) Clonal differences in glutamine synthetase activity of hepatoma cells. Effects of glutamine and dexamethasone. *J Cell Biol* **54**, 175-179
69. Barnes, P. R., Hersh, R. T., and Kito, P. A. (1974) Regulation of glutamine synthetase in L cells by cortisol and L-glutamine. *In Vitro* **9**, 230-238
70. Moscona, M., Frenkel, N., and Moscona, A. A. (1972) Regulatory mechanisms in the induction of glutamine synthetase in the embryonic retina: immunochemical studies. *Dev Biol* **28**, 229-241
71. Sarkar, P. K., and Moscona, A. A. (1973) Glutamine synthetase induction in embryonic neural retina: immunochemical identification of polysomes involved in enzyme synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1667-1671
72. Gorovits, R., Yakir, A., Fox, L. E., and Vardimon, L. (1996) Hormonal and non-hormonal regulation of glutamine synthetase in the developing neural retina. *Brain Res Mol Brain Res* **43**, 321-329
73. Abcouwer, S. F., Bode, B. P., and Souba, W. W. (1995) Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. *J Surg Res* **59**, 59-65
74. Zhang, H. Y., and Young, A. P. (1991) A single upstream glucocorticoid response element juxtaposed to an AP1/ATF/CRE-like site renders the chicken glutamine synthetase gene hormonally inducible in transfected retina. *J Biol Chem* **266**, 24332-24338
75. Fahrner, J., Labruyere, W. T., Gaunitz, C., Moorman, A. F., Gebhardt, R., and Lamers, W. H. (1993) Identification and functional characterization of regulatory elements of the glutamine synthetase gene from rat liver. *Eur J Biochem* **213**, 1067-1073
76. Esbaugh, A. J., and Walsh, P. J. (2009) Identification of two glucocorticoid response elements in the promoter region of the ubiquitous isoform of glutamine synthetase in gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R1075-1081
77. Haberle, J., Gorg, B., Toutain, A., Rutsch, F., Benoist, J. F., Gelot, A., *et al.* (2006) Inborn error of amino acid synthesis: human glutamine synthetase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **29**, 352-358
78. Haberle, J., Gorg, B., Rutsch, F., Schmidt, E., Toutain, A., Benoist, J. F., *et al.* (2005) Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N Engl J Med* **353**, 1926-1933
79. Haberle, J., Shahbeck, N., Ibrahim, K., Hoffmann, G. F., and Ben-Omran, T. (2011) Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. *Mol Genet Metab* **103**, 89-91
80. Spodenkiewicz, M., Diez-Fernandez, C., Rufenacht, V., Gemperle-Britschgi, C., and Haberle, J. (2016) Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis. *Biology (Basel)* **5**

81. Unal, O., Ceylaner, S., and Akin, R. (2019) A Very Rare Etiology of Hypotonia and Seizures: Congenital Glutamine Synthetase Deficiency. *Neuropediatrics* **50**, 51-53
82. He, Y., Hakvoort, T. B., Vermeulen, J. L., Lamers, W. H., and Van Roon, M. A. (2007) Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis. *Dev Dyn* **236**, 1865-1875
83. He, Y., Hakvoort, T. B., Vermeulen, J. L., Labruyere, W. T., De Waart, D. R., Van Der Hel, W. S., *et al.* (2010) Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death. *Glia* **58**, 741-754
84. Zhou, Y., Dhaher, R., Parent, M., Hu, Q. X., Hassel, B., Yee, S. P., *et al.* (2019) Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochem Int* **123**, 22-33
85. Lee, H. W., Osis, G., Handlogten, M. E., Lamers, W. H., Chaudhry, F. A., Verlander, J. W., *et al.* (2016) Proximal tubule-specific glutamine synthetase deletion alters basal and acidosis-stimulated ammonia metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* **310**, F1229-1242
86. Suarez, I., Bodega, G., and Fernandez, B. (2002) Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int* **41**, 123-142
87. Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., *et al.* (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10540-10543
88. Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., *et al.* (1995) Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* **65**, 2146-2156
89. Le Prince, G., Delaere, P., Fages, C., Lefrancois, T., Touret, M., Salanon, M., *et al.* (1995) Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochem Res* **20**, 859-862
90. Robinson, S. R. (2000) Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochem Int* **36**, 471-482
91. Robinson, S. R. (2001) Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **66**, 972-980
92. Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhatsky, A., and Rodriguez, J. J. (2011) Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Mol Neurodegener* **6**, 55
93. Kulijewicz-Nawrot, M., Sykova, E., Chvatal, A., Verkhatsky, A., and Rodriguez, J. J. (2013) Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro* **5**, 273-282

94. Souza, D. G., Bellaver, B., Raupp, G. S., Souza, D. O., and Quincozes-Santos, A. (2015) Astrocytes from adult Wistar rats aged in vitro show changes in glial functions. *Neurochem Int* **90**, 93-97
95. Li, K. Y., Gong, P. F., Li, J. T., Xu, N. J., and Qin, S. (2020) Morphological and molecular alterations of reactive astrocytes without proliferation in cerebral cortex of an APP/PS1 transgenic mouse model and Alzheimer's patients. *Glia* **68**, 2361-2376
96. Gibbs, M. E., O'Dowd, B. S., Hertz, L., Robinson, S. R., Sedman, G. L., and Ng, K. T. (1996) Inhibition of glutamine synthetase activity prevents memory consolidation. *Brain Res Cogn Brain Res* **4**, 57-64
97. Ng, K. T., O'Dowd, B. S., Rickard, N. S., Robinson, S. R., Gibbs, M. E., Rainey, C., *et al.* (1997) Complex roles of glutamate in the Gibbs-Ng model of one-trial aversive learning in the new-born chick. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 45-54
98. Kant, D., Tripathi, S. s., Qureshi, M. F., Tripathi, S., 2nd, Pandey, S., Singh, G., *et al.* (2014) The effect of glial glutamine synthetase inhibition on recognition and temporal memories in the rat. *Neurosci Lett* **560**, 98-102
99. Son, H., Kim, S., Jung, D. H., Baek, J. H., Lee, D. H., Roh, G. S., *et al.* (2019) Insufficient glutamine synthetase activity during synaptogenesis causes spatial memory impairment in adult mice. *Sci Rep* **9**, 252
100. Taverne, Y. J., Bogers, A. J., Duncker, D. J., and Merkus, D. (2013) Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 862423
101. Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., *et al.* (2022) Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab* **4**, 651-662
102. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2007) The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med* **42**, 1465-1469
103. Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4003-4008
104. Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**, 18515-18517
105. Storz, P. (2006) Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Sci STKE* **2006**, re3
106. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **27**, 322-328
107. Stone, J. R., and Yang, S. (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* **8**, 243-270
108. Zhang, R., Brennan, M. L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., *et al.* (2002) Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* **277**, 46116-46122

109. Marquez, L. A., and Dunford, H. B. (1995) Kinetics of Oxidation of Tyrosine and Dityrosine by Myeloperoxidase Compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J Biol Chem* **270**, 30434-30440
110. Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2001) Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med* **30**, 572-579
111. Davies, M. J. (2016) Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* **473**, 805-825
112. Slivka, A., and Cohen, G. (1985) Hydroxyl radical attack on dopamine. *J Biol Chem* **260**, 15466-15472
113. Buettner, G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* **300**, 535-543
114. Kehrer, J. P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43-50
115. Mitozo, P. A., de Souza, L. F., Loch-Neckel, G., Flesch, S., Maris, A. F., Figueiredo, C. P., *et al.* (2011) A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. *Free Radic Biol Med* **51**, 69-77
116. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**, 315-424
117. Martinez-Ruiz, A., Cadenas, S., and Lamas, S. (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* **51**, 17-29
118. Wink, D. A., and Mitchell, J. B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **25**, 434-456
119. Heiss, L. N., Lancaster, J. R., Jr., Corbett, J. A., and Goldman, W. E. (1994) Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 267-270
120. Piacenza, L., Zeida, A., Trujillo, M., and Radi, R. (2022) The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. *Physiol Rev* **102**, 1881-1906
121. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* **32**, 841-859
122. Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartsaghi, S., Carballal, S., Romero, N., *et al.* (2018) Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev* **118**, 1338-1408
123. van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B., and Cross, C. E. (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* **272**, 7617-7625

124. Blough, N. V., and Zafiriou, O. C. (1985) Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* **24**, 3502-3504
125. Goldstein, S., and Czapski, G. (1995) The reaction of NO. with O₂⁻ and HO₂[·]: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* **19**, 505-510.
126. Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* **4**, 161-177
127. 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. *J Biol Chem* **266**, 4244-4250
128. Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., *et al.* (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **298**, 438-445
129. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **288**, 481-487
130. Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M. D., Pignatelli, B., and Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* **16**, 2045-2050
131. Szabo, C., and Ohshima, H. (1997) DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* **1**, 373-385
132. Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., *et al.* (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **298**, 431-437
133. Van der Vliet, A., Smith, D., O'Neill, C. A., Kaur, H., Darley-Usmar, V., Cross, C. E., *et al.* (1994) Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J* **303** (Pt 1), 295-301
134. Watts, B. P., Jr., Barnard, M., and Turrens, J. F. (1995) Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells. *Arch Biochem Biophys* **317**, 324-330
135. Ischiropoulos, H., and Al-Mehdi, A. B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Letters* **364**, 279-282
136. Lymar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc* **117**, 8867-8868
137. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* **333**, 49-58
138. Crow, J. P. (1999) Manganese and iron porphyrins catalyze peroxynitrite decomposition and simultaneously increase nitration and oxidant yield: implications for their use as peroxynitrite scavengers in vivo. *Arch Biochem Biophys* **371**, 41-52

139. Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur J Biochem* **215**, 767-775
140. Daiber, A., Bachschmid, M., Beckman, J. S., Munzel, T., and Ullrich, V. (2004) The impact of metal catalysis on protein tyrosine nitration by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 873-881
141. Campolo, N., Bartesaghi, S., and Radi, R. (2014) Metal-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems. *Redox Rep* **19**, 221-231
142. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1620-1624
143. Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* **288**, 26464-26472
144. Hawkins, C. L., Morgan, P. E., and Davies, M. J. (2009) Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* **46**, 965-988
145. Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (2019) Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem* **294**, 19683-19708
146. Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 196-219
147. Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., and Ross, A. B. (1988) Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **17**, 513-886
148. Davies, K. J., Delsignore, M. E., and Lin, S. W. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* **262**, 9902-9907
149. Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol* **9**, 390-396.
150. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J Biol Chem* **274**, 842-848
151. Hawkins, C. L., Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* **25**, 259-274
152. Davies, M. J. (1996) Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage. *Arch Biochem Biophys* **336**, 163-172
153. Morgan, P. E., Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2012) Quantification of hydroxyl radical-derived oxidation products in peptides containing glycine, alanine, valine, and proline. *Free Radic Biol Med* **52**, 328-339

154. Aicardo, A., Mastrogiovanni, M., Cassina, A., and Radi, R. (2018) Propagation of free-radical reactions in concentrated protein solutions. *Free Radic Res* **52**, 159-170
155. Prutz, W. A., Butler, J., Land, E. J., and Swallow, A. J. (1980) Direct demonstration of electron transfer between tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 408-414
156. Petruk, A. A., Bartesaghi, S., Trujillo, M., Estrin, D. A., Murgida, D., Kalyanaraman, B., *et al.* (2012) Molecular basis of intramolecular electron transfer in proteins during radical-mediated oxidations: computer simulation studies in model tyrosine-cysteine peptides in solution. *Arch Biochem Biophys* **525**, 82-91
157. Souza, J. M., Peluffo, G., and Radi, R. (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* **45**, 357-366
158. Solar, S., Solar, W., and Getoff, N. (1984) Reactivity of OH with Tyrosine in Aqueous Solution Studied by Pulse Radiolysis. *J Phys Chem* **88**, 2091-2095
159. Chen, S. N., and Hoffman, M. Z. (1973) Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution. *Radiat Res* **56**, 40-47
160. Prütz, W. A., Mönig, H., Butler, J., and Land, E. J. (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch Biochem Biophys* **243**, 125-134
161. Bartesaghi, S., Wenzel, J., Trujillo, M., López, M., Joseph, J., Kalyanaraman, B., *et al.* (2010) Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chem Res Toxicol* **23**, 821-835
162. Riordan, J. F., Sokolovsky, M., and Vallee, B. L. (1966) Environmentally Sensitive Tyrosyl Residues. Nitration with Tetranitromethane. *Biochemistry* **6**, 358-361
163. Sokolovsky, M., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1967) Conversion of 3-nitrotyrosine to 3-aminotyrosine in peptides and proteins. *Biochem Biophys Res Comm* **27**, 20-25
164. Abello, N., Kerstjens, H. A. M., Postma, D. S., and Bischoff, R. (2009) Protein Tyrosine Nitration : Selectivity , Physicochemical and Biological Consequences , Denitration , and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. *J Proteome Res* **8**, 3222-3238
165. Chopineaux-Courtois, V., Reymond, F., Bouchard, G., Carrupt, P.-A., Testa, B., and Girault, H. H. (1999) Effects of Charge and Intramolecular Structure on the Lipophilicity of Nitrophenols. *J Am Chem Soc* **121**, 1743-1747
166. Abraham, M. H., Du, C. M., and Platts, J. A. (2000) Lipophilicity of the Nitrophenols. *J Org Chem* **65**, 7114-7118
167. De Filippis, V., Frasson, R., and Fontana, A. (2006) 3-Nitrotyrosine as a spectroscopic probe for investigating protein – protein interactions. *Prot Sci* **15**, 976-986

168. Radi, R. (2013) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* **46**, 550-559
169. Savvides, S. N., Scheiwein, M., Bohme, C. C., Arteel, G. E., Karplus, P. A., Becker, K., *et al.* (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem* **277**, 2779-2784
170. Mostad, A., and Natarajan, S. (1990) Crystal and molecular structure of 3-nitro-4-hydroxy-phenylalanine nitrate. *Zeitschrift für Kristallographie* **193**, 127-136
171. Yee, C. S., Seyedsayamdost, M. R., Chang, M. C. Y., Nocera, D. G., and Stubbe, J. (2003) Generation of the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase by Intein Chemistry : Insertion of 3-Nitrotyrosine at Residue 356 as a Probe of the Radical Initiation Process. *Biochemistry* **42**, 14541-14552
172. Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguet, B., *et al.* (2014) Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med* **35**, 1-71
173. Souza, J. M., and Radi, R. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **360**, 187-194
174. Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Halsey, W. A., Jr., Schraufstatter, I. U., Sauerheber, R. D., Spragg, R. G., *et al.* (1988) Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **263**, 1665-1675
175. Reisz, J. A., Wither, M. J., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T., Issaian, A., Yoshida, T., *et al.* (2016) Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. *Blood* **128**, e32-42
176. Pierce, A., Mirzaei, H., Muller, F., De Waal, E., Taylor, A. B., Leonard, S., *et al.* (2008) GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol* **382**, 1195-1210
177. Pierce, A. P., de Waal, E., McManus, L. M., Shireman, P. K., and Chaudhuri, A. R. (2007) Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **43**, 1584-1593
178. Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., and Murayama, K. (1998) Inactivation of Human Manganese-superoxide Dismutase by Peroxynitrite Is Caused by Exclusive Nitration of Tyrosine 34 to 3-Nitrotyrosine. *J Biol Chem* **273**, 14085-14089
179. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11853-11858
180. Moreno, D. M., Martí, M. A., De Biase, P. M., Estrin, D. A., Demicheli, V., Radi, R., *et al.* (2011) Exploring the molecular basis of human manganese superoxide

- dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration. *Arch Biochem Biophys* **507**, 304-309
181. Quint, P., Reutzel, R., Mikulski, R., McKenna, R., and Silverman, D. N. (2006) Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation. *Free Radic Biol Med* **40**, 453-458
 182. 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 Radic Biol Med* **31**, 1603-1608
 183. Guo, W., Adachi, T., Matsui, R., Xu, S., Jiang, B., Zou, M.-H., *et al.* (2003) Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Phys. Heart Circ Phys* **285**, H1396-H1403
 184. Gray, K. D., MacMillan-Crow, L.-A., Simovic, M. O., Stain, S. C., and May, A. K. (2004) Pulmonary MnSOD is nitrated following hepatic ischemia-reperfusion. *Surgical Infections* **5**, 166-173
 185. Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., *et al.* (2000) Cytochrome c Nitration by Peroxynitrite. *J Biol Chem* **275**, 21409-21415
 186. Abriata, L. A., Cassina, A., Tórtora, V., Marín, M., Souza, J. M., Castro, L., *et al.* (2009) Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome c triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies. *J Biol Chem* **284**, 17-26
 187. 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. *J Biol Chem* **277**, 29781-29791
 188. Coelho, F. R., Iqbal, A., Linares, E., Silva, D. F., Lima, F. S., Cuccovia, I. M., *et al.* (2014) Oxidation of the tryptophan 32 residue of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity triggers the non-amyloid aggregation of the enzyme. *J Biol Chem* **289**, 30690-30701
 189. Samson, A. L., Knaupp, A. S., Kass, I., Kleifeld, O., Marijanovic, E. M., Hughes, V. A., *et al.* (2014) Oxidation of an exposed methionine instigates the aggregation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **289**, 26922-26936
 190. Gobl, C., Morris, V. K., van Dam, L., Visscher, M., Polderman, P. E., Hartlmuller, C., *et al.* (2020) Cysteine oxidation triggers amyloid fibril formation of the tumor suppressor p16(INK4A). *Redox Biol* **28**, 101316
 191. Levine, R. L., Oliver, C. N., Fulks, R. M., and Stadtman, E. R. (1981) Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2120-2124
 192. Davies, K. J. A., Lin, S. W., and Pacifici, R. E. (1987) Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. IV. Degradation of Denatured Protein. *J Biol Chem* **262**, 9914-9920

193. Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., and Davies, K. J. A. (1995) Proteolysis in Cultured Liver Epithelial Cells during Oxidative Stress. *J Biol Chem* **270**, 2344-2351
194. Davies, K. J. A., and Lin, S. W. (1988) Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med* **5**, 215-223
195. Giulivi, C., Pacifici, R. E., and Davies, K. J. A. (1994) Exposure of Hydrophobic Moieties Promotes the Selective Degradation of Hydrogen Peroxide-Modified Hemoglobin by the Multicatalytic Proteinase Complex, Proteasome. *Arch Biochem Biophys* **311**, 329-341
196. Grune, T., Merker, K., Sandig, G., and Davies, K. J. A. (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Comm* **305**, 709-718
197. Pacifici, R. E., Kono, Y., and Davies, K. J. A. (1993) Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem* **268**, 15405-15411
198. Grune, T., Blasig, I. E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R., and Davies, K. J. (1998) Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J Biol Chem* **273**, 10857-10862
199. Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., and Davies, K. J. A. (2003) Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem* **278**, 311-318
200. Raynes, R., Pomatto, L. C., and Davies, K. J. (2016) Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med* **50**, 41-55
201. Ugarte, N., Petropoulos, I., and Friguet, B. (2010) Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **13**, 539-549
202. Sunico, C. R., Sultan, A., Nakamura, T., Dolatabadi, N., Parker, J., Shan, B., *et al.* (2016) Role of sulfiredoxin as a peroxiredoxin-2 denitrosylase in human iPSC-derived dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E7564-E7571
203. Cimino, F., Anderson, W. B., and Stadtman, E. R. (1970) Ability of nonenzymic nitration or acetylation of *E. coli* glutamine synthetase to produce effects analogous to enzymic adenylylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 564-571
204. Berlett, B. S., Friguet, B., Yim, M. B., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1996) Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylylation: relevance to signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1776-1780
205. Görg, B., Qvarthava, N., Voss, P., Grune, T., Häussinger, D., and Schliess, F. (2007) Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett* **581**, 84-90
206. Gorg, B., Wettstein, M., Metzger, S., Schliess, F., and Haussinger, D. (2005) Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology* **41**, 1065-1073

207. Frieg, B., Gorg, B., Qvartrkhava, N., Jeitner, T., Homeyer, N., Haussinger, D., *et al.* (2020) Mechanism of Fully Reversible, pH-Sensitive Inhibition of Human Glutamine Synthetase by Tyrosine Nitration. *J Chem Theory Comput* **16**, 4694-4705
208. Fernandes, S. P., Dringen, R., Lawen, A., and Robinson, S. R. (2011) Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron. *Neurosci Lett* **490**, 27-30
209. Kimura, K., and Sugano, S. (1992) Inactivation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase by metal-catalyzed oxidation. *J Biochem* **112**, 828-833
210. Levine, R. L. (1983) Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. *J Biol Chem* **258**, 11828-11833
211. Ma, Y. S., Chao, C. C., and Stadtman, E. R. (1999) Oxidative modification of glutamine synthetase by 2,2'-azobis(2- amidinopropane) dihydrochloride. *Arch Biochem Biophys* **363**, 129-134
212. Basso, M., Samengo, G., Nardo, G., Massignan, T., D'Alessandro, G., Tartari, S., *et al.* (2009) Characterization of detergent-insoluble proteins in ALS indicates a causal link between nitrative stress and aggregation in pathogenesis. *PLoS One* **4**, e8130
213. Peinado, M. Á., Hernández, R., Peragón, J., Ovelleiro, D., Pedrosa, J. Á., and Blanco, S. (2014) Proteomic characterization of nitrated cell targets after hypobaric hypoxia and reoxygenation in rat brain. *J Proteomics* **109C**, 309-321
214. Gorg, B., Bidmon, H. J., Keitel, V., Foster, N., Goerlich, R., Schliess, F., *et al.* (2006) Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Arch Biochem Biophys* **449**, 104-114
215. Schliess, F., Gorg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H. J., Herrmann, A., *et al.* (2002) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *Faseb J* **16**, 739-741
216. Castegna, A., Aksenov, M., Aksenova, M., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Pierce, W. M., *et al.* (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* **33**, 562-571
217. Shen, L., Chen, C., Yang, A., Chen, Y., Liu, Q., and Ni, J. (2015) Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage. *J Proteomics* **123**, 101-113
218. Butterfield, D. A., Poon, H. F., St Clair, D., Keller, J. N., Pierce, W. M., Klein, J. B., *et al.* (2006) Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **22**, 223-232
219. Boyd-Kimball, D., Sultana, R., Poon, H. F., Lynn, B. C., Casamenti, F., Pepeu, G., *et al.* (2005) Proteomic identification of proteins specifically oxidized by

- intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* **132**, 313-324
220. Saha, A., Goldstein, S., Cabelli, D., and Czapski, G. (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic Biol Med* **24**, 653-659
 221. Reed, J. W., Ho, H. H., and Jolly, W. L. (1974) Chemical syntheses with a quenched flow reactor. Hydroxytrihydroborate and peroxynitrite. *J Am Chem Soc* **96**, 1248-1249
 222. Hughes, M. N., and Nicklin, H. G. (1968) The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, 450-452
 223. Mandel, M., and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159-162
 224. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580
 225. Webb, J. T., and Brown, G. W. (1976) Some properties and occurrence of glutamine synthetase in fish. *Comp Biochem Physiol B* **54**, 171-175
 226. Gawronski, J. D., and Benson, D. R. (2004) Microtiter assay for glutamine synthetase biosynthetic activity using inorganic phosphate detection. *Anal Biochem* **327**, 114-118
 227. Ronzio, R. A., Wilk, S., Rowe, W. B., and Meister, A. (1969) Preparation and studies on the characterization of sheep brain glutamine synthetase. *Biochemistry* **8**, 2670-2674
 228. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85
 229. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77
 230. Riordan, J. F., Sokolovsky, M., and Vallee, B. L. (1967) The Functional Tyrosyl Residues of Carboxypeptidase A. Nitration with Tetranitromethane. *Biochemistry* **6**, 3609-3617
 231. Degendorfer, G., Chuang, C. Y., Mariotti, M., Hammer, A., Hoefler, G., Hagglund, P., *et al.* (2018) Exposure of tropoelastin to peroxynitrous acid gives high yields of nitrated tyrosine residues, di-tyrosine cross-links and altered protein structure and function. *Free Radic Biol Med* **115**, 219-231
 232. Batthyany, C., Bartesaghi, S., Mastrogiovanni, M., Lima, A., Demicheli, V., and Radi, R. (2017) Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid Redox Signal* **26**, 313-328
 233. Petersson, A. S., Steen, H., Kalume, D. E., Caidahl, K., and Roepstorff, P. (2001) Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **36**, 616-625

234. Gundry, R. L., White, M. Y., Murray, C. I., Kane, L. A., Fu, Q., Stanley, B. A., *et al.* (2009) Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 10**, Unit10 25
235. Mariotti, M., Leinisch, F., Leeming, D. J., Svensson, B., Davies, M. J., and Hagglund, P. (2018) Mass-Spectrometry-Based Identification of Cross-Links in Proteins Exposed to Photo-Oxidation and Peroxyl Radicals Using (18)O Labeling and Optimized Tandem Mass Spectrometry Fragmentation. *J Proteome Res* **17**, 2017-2027
236. Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003) Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* **75**, 663-670
237. Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896-1906
238. Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372
239. Schilling, B., Rardin, M. J., MacLean, B. X., Zawadzka, A. M., Frewen, B. E., Cusack, M. P., *et al.* (2012) Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **11**, 202-214
240. Eftink, M. R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J* **66**, 482-501
241. Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., and Dougherty, W. G. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem* **216**, 413-417
242. Stols, L., Gu, M., Dieckman, L., Raffin, R., Collart, F. R., and Donnelly, M. I. (2002) A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif* **25**, 8-15
243. Ronzio, R. A., Rowe, W. B., and Meister, A. (1969) Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* **8**, 1066-1075
244. Rowe, W. B., Ronzio, R. A., and Meister, A. (1969) Inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. Studies on methionine sulfoximine phosphate. *Biochemistry* **8**, 2674-2680
245. Medinas, D. B., Gozzo, F. C., Santos, L. F., Iglesias, A. H., and Augusto, O. (2010) A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. *Free Radic Biol Med* **49**, 1046-1053
246. Liu, M., Zhang, Z., Cheetham, J., Ren, D., and Zhou, Z. S. (2014) Discovery and characterization of a photo-oxidative histidine-histidine cross-link in IgG1 antibody utilizing (1)(8)O-labeling and mass spectrometry. *Anal Chem* **86**, 4940-4948

247. Leinisch, F., Mariotti, M., Hagglund, P., and Davies, M. J. (2018) Structural and functional changes in RNase A originating from tyrosine and histidine cross-linking and oxidation induced by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* **126**, 73-86
248. Hagglund, P., Mariotti, M., and Davies, M. J. (2018) Identification and characterization of protein cross-links induced by oxidative reactions. *Expert Rev Proteomics* **15**, 665-681
249. Mariotti, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Hagglund, P., and Davies, M. J. (2021) Cross-linking and modification of fibronectin by peroxy nitrous acid: Mapping and quantification of damage provides a new model for domain interactions. *J Biol Chem* **296**, 100360
250. Denicola, A., Souza, J. M., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1995) Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-like reactivity of peroxy nitrite: role of the hydroxamic groups. *Free Radic Biol Med* **19**, 11-19
251. Bartesaghi, S., Trujillo, M., Denicola, A., Folkes, L., Wardman, P., and Radi, R. (2004) Reactions of desferrioxamine with peroxy nitrite-derived carbonate and nitrogen dioxide radicals. *Free Radic Biol Med* **36**, 471-483
252. Davies, M. J., Donkor, R., Dunster, C. A., Gee, C. A., Jonas, S., and Willson, R. L. (1987) Desferrioxamine (Desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide. *Biochem J* **246**, 725-729
253. Perrin, D., and Koppenol, W. H. (2000) The quantitative oxidation of methionine to methionine sulfoxide by peroxy nitrite. *Arch Biochem Biophys* **377**, 266-272
254. Ramezani, M. S., Padmaja, S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxy nitrite. *Chem Res Toxicol* **9**, 232-240
255. Wilk, S., Meister, A., and Haschemeyer, R. H. (1969) Studies on the subunit structure of ovine brain glutamine synthetase. *Biochemistry* **8**, 3168-3174
256. Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B., and Correa, W. S. (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* **37**, 593-596
257. Denman, R. B., and Wedler, F. C. (1984) Association-dissociation of mammalian brain glutamine synthetase: effects of metal ions and other ligands. *Arch Biochem Biophys* **232**, 427-440
258. Wilk, S., Meister, A., and Haschemeyer, R. H. (1970) Dissociation of native octameric brain glutamine synthetase to a tetramer by treatment with N-acetylimidazole. *Biochemistry* **9**, 2039-2043
259. Rao, D. R., Beyreuther, K., and Jaenicke, L. (1973) A comparative study of pig and sheep-brain glutamine synthetases: tryptic peptides and thiol groups. *Eur J Biochem* **35**, 582-592
260. Blanchard-Fillion, B., Souza, J. M., Friel, T., Jiang, G. C., Vrana, K., Sharov, V., et al. (2001) Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxy nitrite. *J Biol Chem* **276**, 46017-46023

261. Ji, Y., Neverova, I., Van Eyk, J. E., and Bennett, B. M. (2006) Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite. *J Biol Chem* **281**, 1986-1991
262. Aggarwal, S., Gross, C. M., Rafikov, R., Kumar, S., Fineman, J. R., Ludewig, B., *et al.* (2014) Nitration of tyrosine 247 inhibits protein kinase G-1alpha activity by attenuating cyclic guanosine monophosphate binding. *J Biol Chem* **289**, 7948-7961
263. Martinez, A., Peluffo, G., Petruk, A. A., Hugo, M., Piñeyro, D., Demicheli, V., *et al.* (2014) Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of Trypanosoma cruzi iron-superoxide dismutases (Fe-SODs) A and B: disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolec. *J Biol Chem* **289**, 12760-12778
264. Fuentes-Lemus, E., Reyes, J. S., Gamon, L. F., Lopez-Alarcon, C., and Davies, M. J. (2021) Effect of macromolecular crowding on protein oxidation: Consequences on the rate, extent and oxidation pathways. *Redox Biol* **48**, 102202
265. Biswas, S., Bhadra, A., Lakhera, S., Soni, M., Panuganti, V., Jain, S., *et al.* (2021) Molecular crowding accelerates aggregation of alpha-synuclein by altering its folding pathway. *Eur Biophys J* **50**, 59-67
266. Valentine, R. C., Shapiro, B. M., and Stadtman, E. R. (1968) Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from Escherichia coli. *Biochemistry* **7**, 2143-2152
267. O'Connell, J. D., Tsechansky, M., Royal, A., Boutz, D. R., Ellington, A. D., and Marcotte, E. M. (2014) A proteomic survey of widespread protein aggregation in yeast. *Mol Biosyst* **10**, 851-861
268. Greiner, J. V., and Glonek, T. (2021) Intracellular ATP Concentration and Implication for Cellular Evolution. *Biology (Basel)* **10**
269. Gribble, F. M., Loussouarn, G., Tucker, S. J., Zhao, C., Nichols, C. G., and Ashcroft, F. M. (2000) A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J Biol Chem* **275**, 30046-30049
270. Imamura, H., Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., *et al.* (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15651-15656
271. Traut, T. W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**, 1-22
272. Listrom, C. D., Morizono, H., Rajagopal, B. S., McCann, M. T., Tuchman, M., and Allewell, N. M. (1997) Expression, purification, and characterization of recombinant human glutamine synthetase. *Biochem J* **328** (Pt 1), 159-163
273. Leng, F., and Edison, P. (2021) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* **17**, 157-172
274. Serrano-Pozo, A., Mielke, M. L., Gomez-Isla, T., Betensky, R. A., Growdon, J. H., Frosch, M. P., *et al.* (2011) Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **179**, 1373-1384

275. Marutle, A., Gillberg, P. G., Bergfors, A., Yu, W., Ni, R., Nennesmo, I., *et al.* (2013) (3)H-deprenyl and (3)H-PIB autoradiography show different laminar distributions of astroglia and fibrillar beta-amyloid in Alzheimer brain. *J Neuroinflammation* **10**, 90
276. Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., *et al.* (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **14**, 388-405
277. Newcombe, E. A., Camats-Perna, J., Silva, M. L., Valmas, N., Huat, T. J., and Medeiros, R. (2018) Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **15**, 276
278. Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., and Zimmer, E. R. (2019) Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med* **25**, 77-95

ANEXO

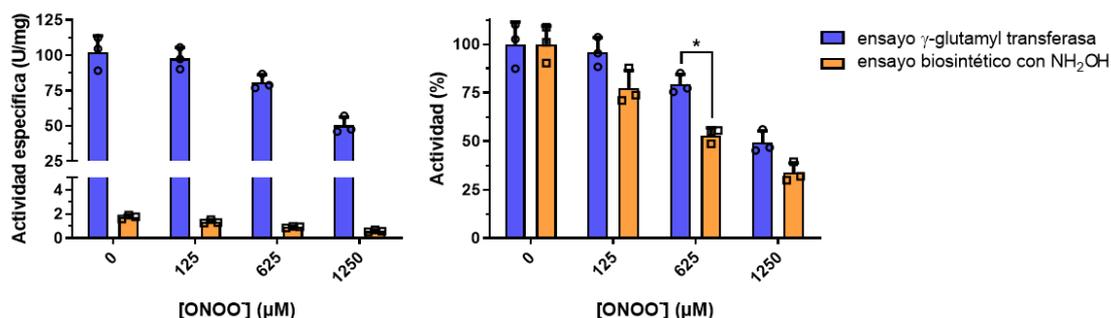


Figura 1. Comparación de la inactivación de la HsGS por ONOO⁻ mediante dos ensayos de actividad diferentes. Se expuso HsGS (0,5 mg/mL) a 125-1250 µM ONOO⁻ en buffer KPi pH 7,3 a temperatura ambiente y tras una incubación no mayor a 5 minutos se tomaron alícuotas para realizar medidas de actividad. Para el ensayo γ -glutamyl transferasa, se incubó HsGS 10 nM decámero con la mezcla de sustratos durante 15 minutos a 37°C; para el ensayo biosintético con NH₂OH, se empleó en cambio una concentración de HsGS de 50 nM decámero, y se la incubó por 30 minutos a 37°C con la mezcla de sustratos correspondiente. (A) Actividad específica medida a través de cada ensayo. (B) Actividad relativa expresada como % del control (0 µM ONOO⁻) para cada ensayo. Los datos se representan como promedio \pm desvío estándar (n = 3). *, $p < 0,05$ mediante análisis por prueba t no pareada.

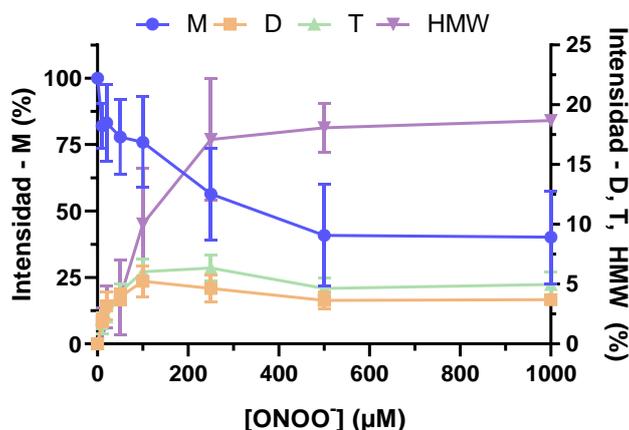


Figura 2. Cuantificación densitométrica del análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras de muestras de HsGS expuestas a ONOO⁻. La intensidad de cada una de las diferentes especies presentes en el análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 6.3B) fue medida por densitometría a partir de la imagen escaneada del gel utilizando el software Image Studio (LiCor). Los valores de intensidad fueron normalizados con respecto a la intensidad de la banda del monómero de la muestra control (0 µM ONOO⁻) y expresada como % de la misma. Las intensidades relativas de las bandas del monómero se grafican en el eje Y de la izquierda; las intensidades relativas de las bandas de dímeros (D), trímeros (T) y especies de mayor peso molecular (HMW) se grafican en el eje Y de la derecha. Los datos se muestran como promedio \pm desvío estándar (n = 3).

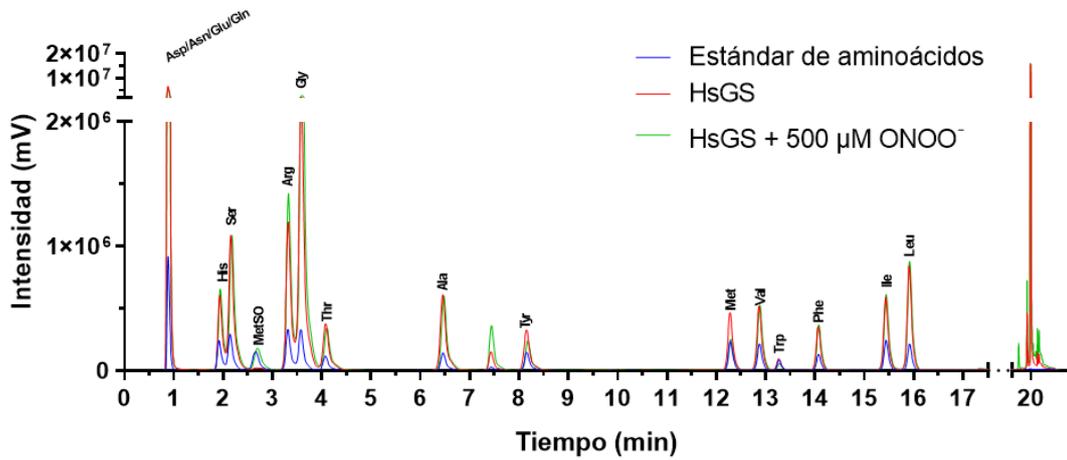
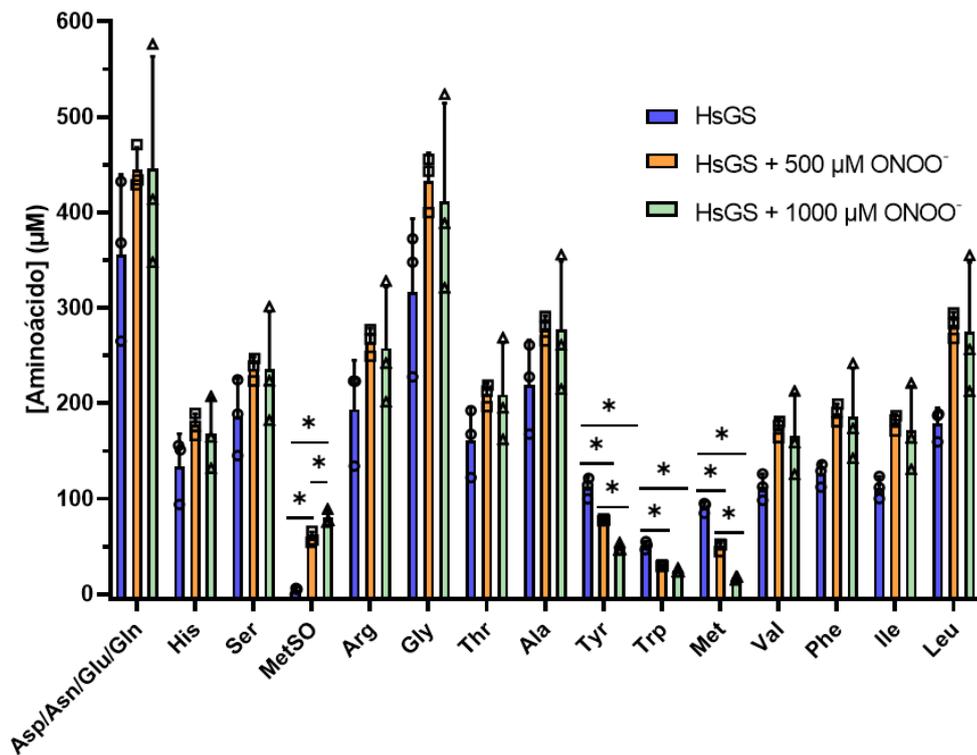
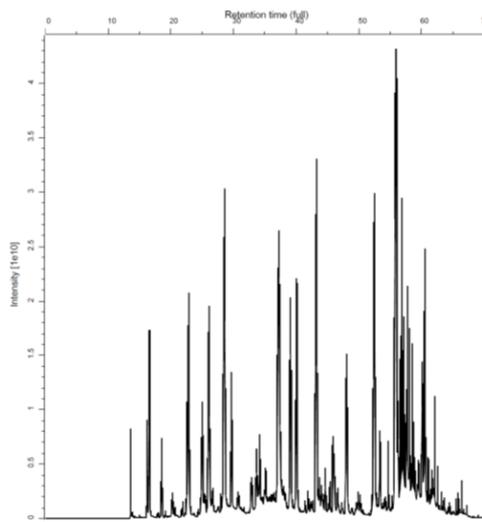
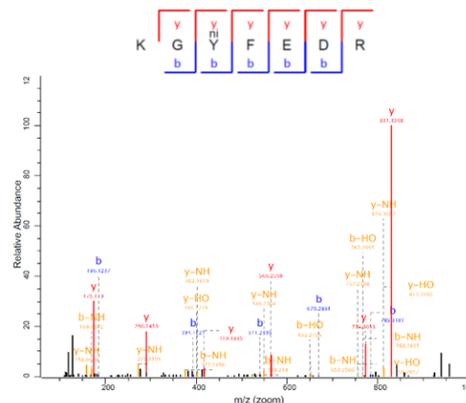
A**B**

Figura 3. Análisis de aminoácidos en hidrolizados de HsGS por UHPLC. (A) Cromatogramas representativos de hidrolizados de HsGS control y tratada con ONOO⁻, junto con un mix de estándares de aminoácidos. (B) Concentraciones de aminoácidos obtenidas para todas las especies detectadas. Los datos se presentan como promedio \pm desvío estándar ($n = 3$). *, $p < 0,05$ mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de Tukey.

1) Análisis en MaxQuant de HsGS + 500 μ M ONOO⁻

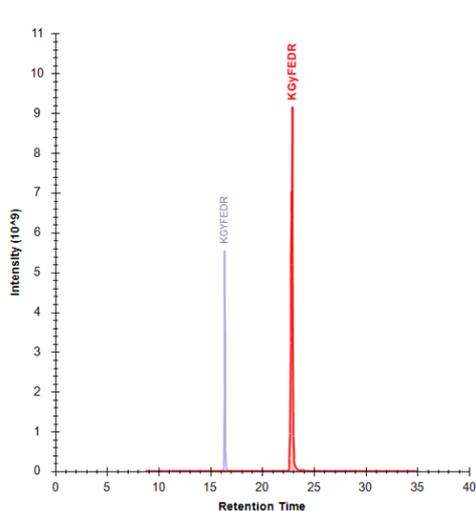


Cromatograma de corriente iónica total (TIC)

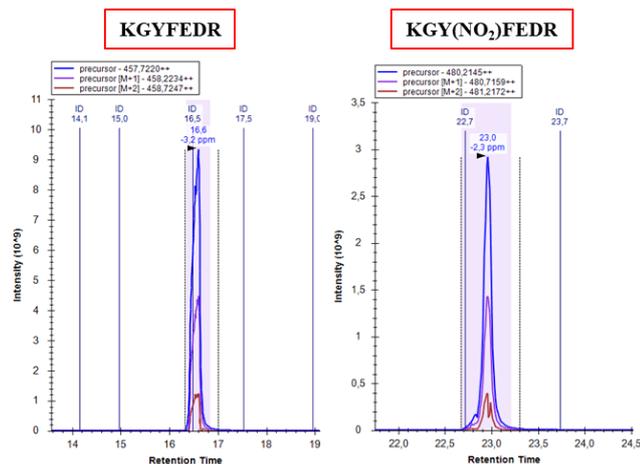


Identificación de péptidos mediante el motor de búsqueda Andrómeda; generación de la biblioteca espectral incluyendo los tiempos de retención de las especies identificadas.

2) Extracción y procesamiento de los cromatogramas en Skyline



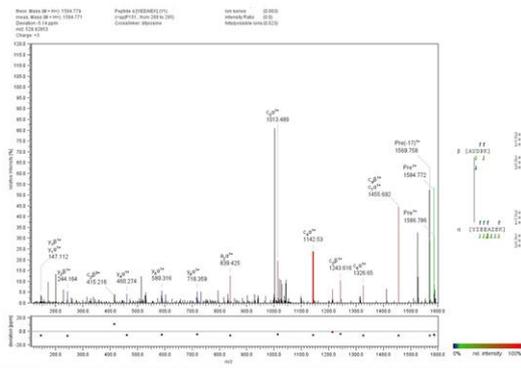
Generación del cromatograma de corriente iónica extraída (XIC) para cada especie identificada.



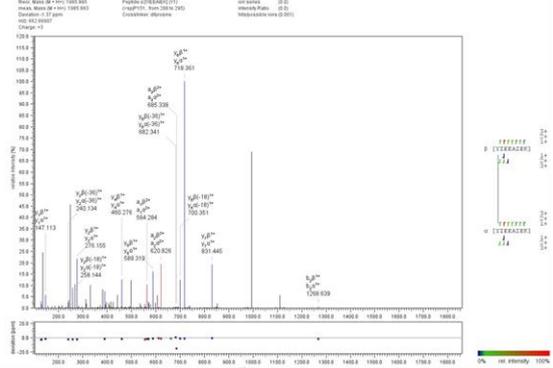
Pico MS1 asignado a las especies identificadas mediante el análisis por MS/MS en MaxQuant (se indican los tiempos de retención a los cuales fue hallado). Se muestran los picos extraídos para tres isótopos del precursor (M, M+1 y M+2); la comparación de sus áreas con la distribución isotópica teórica permite una mayor validación.

Figura 4. Resumen del procedimiento bioinformático empleado para procesar los datos de nLC-MS/MS y obtener los niveles relativos de modificaciones oxidativas de aminoácidos. En primer lugar, los datos crudos adquiridos en el equipo Orbitrap Fusion fueron analizados mediante MaxQuant para lograr la identificación de los distintos péptidos tripticos. Posteriormente, dicha información (junto con el archivo crudo) fue insertada en el software Skyline para realizar la extracción de las corrientes iónicas asociadas al precursor (MS1) de cada especie identificada. Los picos MS1 de cada especie fueron integrados y a partir de las áreas se estimaron los porcentajes de modificación en los distintos sitios de la proteína.

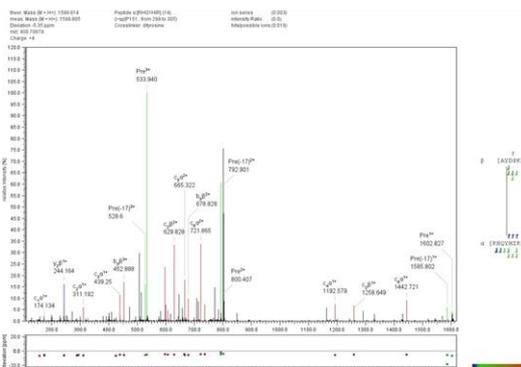
AY288DPK – Y269IEEAIEK



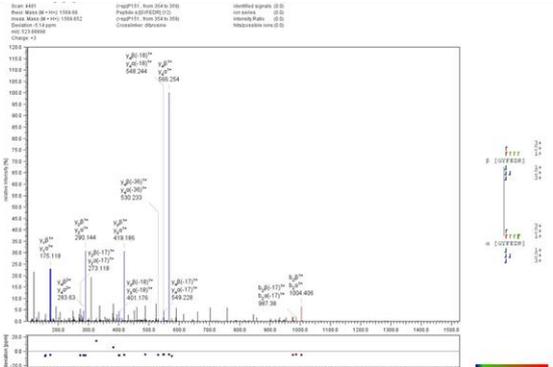
Y269IEEAIEK – Y269IEEAIEK



AY288DPK – RHQY283HIR



GY336FEDR – GY336FEDR



VQAMY30IWIDGTGEGLR – DIVEAHY180RACLYAGVK

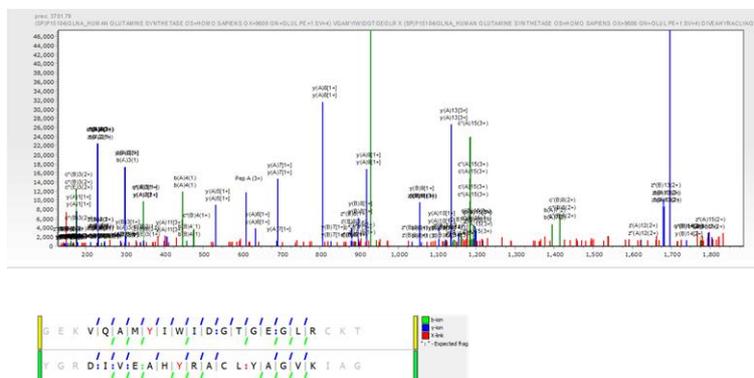


Figura 5. Identificación de entrecruzamientos DiTyr en muestras de HsGS expuesta a ONOO⁻. Se muestran espectros de MS/MS de los cinco entrecruzamientos covalentes DiTyr identificados mediante el análisis por nLC-MS/MS con marcaje con ¹⁸O en productos de digestión con tripsina de HsGS expuesta a ONOO⁻.

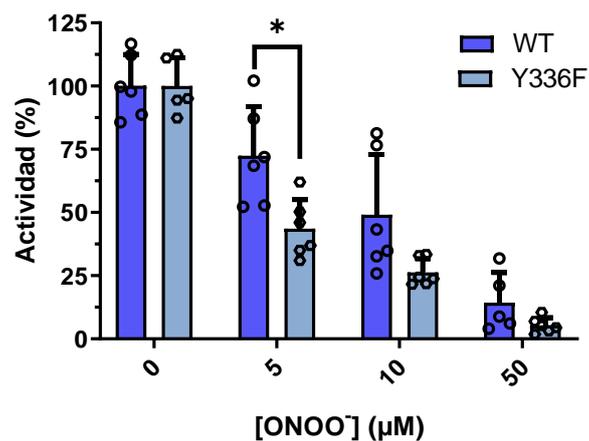


Figura 6. Inactivación comparativa de la HsGS WT y la mutante Y336F por ONOO⁻ bajo las condiciones experimentales empleadas por Görg *et al* [206]. Con el objetivo de evaluar si las distintas condiciones experimentales bajo las que se expuso la GS a ONOO⁻ podrían llevar a diferentes resultados, se estudió también la inactivación por ONOO⁻ de la HsGS WT y la Y336F en las condiciones usadas por Görg *et al* [206]. Así, se expuso HsGS WT y mutante Y336F (5 μg/mL) a ONOO⁻ (5-50 μM) a temperatura ambiente y tras una incubación no mayor a 5 minutos se realizaron medidas de actividad γ -glutamyl transferasa. Los datos se representan como promedio \pm desvío estándar (n = 6). *, $p < 0,05$ mediante análisis por prueba t no pareada.

Tabla I. Identificación de péptidos nativos y modificados en muestras de HsGS digeridas con tripsina tras su exposición a ONOO⁻. Luego de tratar HsGS con ONOO⁻, se realizó la digestión con tripsina de la proteína y la mezcla de péptidos se analizó mediante nLC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masa Orbitrap Fusion (Thermo Scientific). Los datos .raw obtenidos fueron analizados utilizando el software MaxQuant de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. La tabla indica los péptidos identificados para una muestra de 0,2 mg/mL HsGS tratada con 500 μ M ONOO⁻. Los aminoácidos modificados oxidativamente se indican en negrita y con la variación de masa indicada entre corchetes. PEP Score: probabilidad de error posterior de la asignación del péptido; Modif.: modificación.

Secuencia del péptido	m/z	Carga	PEP Score	Error (ppm)	Modif.	Res. Modif.
AC[+57]LYAGVK	441,2311	+2	0,00070 3	0,1663 7		
AC[+57]LY[+16]AGVK	449,2285	+2	0,01474 7	0,1376 6	Ox (Y)	Tyr185
AC[+57]LY[+45]AGVK	463,7236	+2	0,00087 5	0,2771 5	Nitro (Y)	Tyr185
AMREENGLKYIEEAIEK	675,0103	+3	2,91E- 12	- 0,3414		
AM[+16]REENGLKY[+16]IEEAIEK	685,6736 17	+3	2,06E- 11	- 0,5626	Ox (M); Ox (Y)	Met26 1; Tyr269
AM[+16]REENGLKY[+45]IEEAIEK	695,3370 04	+3	9,35E- 25	0,3665 1	Ox (M); Nitro (Y)	Met26 1; Tyr269
AM[+16]REENGLKYIEEAIEK	680,3420	+3	1,07E- 08	0,0283 1	Ox (M)	Met26 1
AMREENGLKY[+16]IEEAIEK	680,3420	+3	8,44E- 18	- 0,1871	Ox (Y)	Tyr269
AMREENGLKY[+45]IEEAIEK	690,0054	+3	2,33E- 25	- 0,1065	Nitro (Y)	Tyr269
AYDPKGGLDNAR	426,2142	+3	1,39E- 07	- 0,1210		
AY[+16]DPKGGLDNAR	431,5458	+3	0,01987 4	0,0496 0	Ox (Y)	Tyr288
AY[+45]DPKGGLDNAR	441,2092	+3	4,54E- 07	- 0,1943	Nitro (Y)	Tyr288
AYGRDIVEAHYR	483,9126	+3	3,09E- 17	0,0808 4		
AY[+16]GRDIVEAHYR	489,2443	+3	1,54E- 07	NaN	Ox (Y)	Tyr171
C[+57]VEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFR	1289,571	+3	8,31E- 12	0,0426 6		
C[+57]VEELPEW[+45]NFDGSSTLQSEGSNSDM[+16]YLVPAAMFR	1309,898	+3	0,02814 1	0,7026	Nitro (W); Ox (M)	Trp60; Met77
C[+57]VEELPEW[+45]NFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFR	1304,566	+3	0,00021 0	0,2001 3	Nitro (W)	Trp60
C[+57]VEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM[+16]Y[+16]LVPAAMFR	1305,566	+3	0,02862 8	0,4343 6	2 Ox (M); Ox (Y)	Met77; Tyr78; Met84
C[+57]VEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM[+16]Y[+45]LVPAAMFR	1315,229	+3	0,00597 4	- 0,2228	2 Ox (M); Nitro (Y)	Met77; Tyr78; Met84
C[+57]VEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM[+16]Y[+45]LVPAAMFR	1309,898	+3	0,02012 1	0,2074 2	Ox (M); Nitro (Y)	Met77; Tyr78
C[+57]VEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM[+16]YLVPAAMFR	1294,903	+3	0,01303 5	0,3280 5	Ox (M)	Met77
DIVEAHYR	501,7538	+2	1,19E- 09	0,3031 6		
DIVEAHY[+16]R	509,7513	+2	1,65E- 06	0,2267 6	Ox (Y)	Tyr180

DIVEAHY[+45]R	524,2463	+2	6,00E-10	-	0,2631	Nitro (Y)	Tyr180
DPFRKDPNK	372,8647	+3	0,00549	-	1,4222		
DPNKLVLVC[+57]EVFK	731,3921	+2	4,82E-45	-	0,2899		
DPNKLVLVC[+57]EVFKY[+16]NR	637,6646	+3	3,78E-25	-	0,3319	Ox (Y)	Tyr104
DPNKLVLVC[+57]EVFKY[+45]NR	647,3280	+3	2,17E-06	-	0,4611	Nitro (Y)	Tyr104
EENGLKYIEEAIEK	555,6174	+3	3,91E-09	-	0,9571		
EENGLKY[+16]IEEAIEK	560,9491	+3	3,87E-45	0,2086		Ox (Y)	Tyr269
EENGLKY[+45]IEEAIEK	570,6125	+3	1,28E-72	0,4640	2	Nitro (Y)	Tyr269
GGLDNAR	351,6801	+2	8,95E-06	-	0,1040		
GIKQVYMSLPQGEK	526,6167	+3	7,16E-05	-	1,1708		
GIKQVYM[+16]SLPQGEK	531,9484	+3	4,40E-05	-	0,0762	Ox (M)	Met18
GYFEDR	393,6745	+2	0,00051	-	0,0980		
GY[+16]FEDR	401,6719	+2	0,00075	-	0,289	Ox (Y)	Tyr336
GY[+45]FEDR	416,1670	+2	6,60E-06	-	NaN	Nitro (Y)	Tyr336
GYFEDRRPSANC[+57]DPFSVTEALIR	675,8263	+4	1,18E-60	-	0,4379		
GY[+16]FEDRRPSANC[+57]DPFSVTEALIR	679,8251	+4	6,89E-08	-	0,3226	Ox (Y)	Tyr336
GY[+45]FEDRRPSANC[+57]DPFSVTEALIR	687,0726	+4	1,07E-25	-	0,3532	Nitro (Y)	Tyr336
HQY[+45]HIR	449,7176	+2	4,82E-06	-	0,5286	Nitro (Y)	Tyr283
HQY[+45]HIRAY[+45]DPK	380,1775	+4	0,03891	-	0,1261	2 Nitro (Y)	Tyr283 ; Tyr288
IAGTNAEVMPAQWFEQIGPC[+57]EGISMGDHLWVAR	1224,246	+3	1,32E-61	-	1,0364		
IAGTNAEV[M][+16]PAQW[+45]JEFQIGPC[+57]EGISMGDHLWVAR	1244,573	+3	0,00792	-	2,0206	Ox (M); Nitro (W)	Met19 8; Trp202
IAGTNAEVMPAQW[+45]JEFQIGPC[+57]EGIS[M][+16]GDHLWVAR	1244,573	+3	1,97E-05	-	0,3507	Nitro (W); Ox (M)	Trp202 ; Met21 4
IAGTNAEV[M][+16]PAQWFEQIGPC[+57]EGIS[M][+16]GDHLWVAR	1234,909	+3	2,08E-06	-	1,5988	2 Ox (M)	Met19 8; Met21 4
IAGTNAEV[M][+16]PAQWFEQIGPC[+57]EGISMGDHLWVAR	1229,578	+3	8,63E-09	-	0,3553	Ox (M)	Met19 8
IAGTNAEVMPAQWFEQIGPC[+57]EGIS[M][+16]GDHLWVAR	1229,578	+3	7,49E-14	0,0910	6	Ox (M)	Met21 4
IAGTNAEVMPAQW[+45]JEFQIGPC[+57]EGISMGDHLWVAR	1239,241	+3	0,00020	-	2,4693	Nitro (W)	Trp202
KDPNKLVLVC[+57]EVFK	530,6288	+3	1,91E-12	-	NaN		
KGYFEDR	457,7220	+2	5,61E-14	-	0,2725		
KGY[+16]FEDR	465,7194	+2	0,00042	-	0,8553	Ox (Y)	Tyr336
KGY[+45]FEDR	480,2145	+2	2,57E-15	-	0,2701	Nitro (Y)	Tyr336
LTGFHETSININDFSAGVANR	717,3469	+3	4,74E-35	-	1,3329		

LVLC[+57]EVFK	504,2833	+2	3,10E-06	NaN		
LVLC[+57]EVFKYNR	480,9271	+3	9,75E-05	0,1442		
LVLC[+57]EVFKY[+16]NR	486,2588	+3	7,94E-24	8	Ox (Y)	Tyr104
LVLC[+57]EVFKY[+45]NR	743,3796	+2	5,89E-17	0,4254	Nitro (Y)	Tyr104
MHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMASHLNK	860,3955	+4	0,016958	1,9138		
M[+16]HHHHHSSGVDLGTENLY[+16]FQSM[+16]ASSHLNK	872,3917	+4	7,29E-14	0,2838	2 Ox (M); Ox (Y)	N-terminal tag
M[+16]HHHHHSSGVDLGTENLY[+45]FQSM[+16]ASSHLNK	879,6393	+4	1,64E-38	0,6170	2 Ox (M); Nitro (Y)	N-terminal tag
M[+16]HHHHHSSGVDLGTENLY[+45]FQSMASHLNK	875,6405	+4	3,19E-47	0,2274	Ox (M); Nitro (Y)	N-terminal tag
MHHHHHSSGVDLGTENLY[+45]FQSM[+16]ASSHLNK	700,7139	+5	0,014551	2,2961	Ox (M); Nitro (Y)	N-terminal tag
M[+16]HHHHHSSGVDLGTENLYFQSM[+16]ASSHLNK	868,3930	+4	1,65E-26	0,3832	2 Ox (M)	N-terminal tag
M[+16]HHHHHSSGVDLGTENLYFQSMASHLNK	864,3943	+4	2,53E-14	0,3935	Ox (M)	N-terminal tag
MHHHHHSSGVDLGTENLYFQSM[+16]ASSHLNK	864,3943	+4	4,37E-08	2,3395	Ox (M)	N-terminal tag
QVYMSLPQGEK	640,3212	+2	5,18E-12	NaN		
QVY[+16]M[+16]SLPQGEK	656,3161	+2	1,01E-07	NaN	Ox (Y); Ox (M)	Tyr17; Met18
QVY[+45]M[+16]SLPQGEK	670,8112	+2	4,39E-11	0,1120	Nitro (Y); Ox (M)	Tyr17; Met18
QVY[+45]MSLPQGEK	662,8137	+2	1,77E-16	0,5761	Nitro (Y)	Tyr17
QVYM[+16]SLPQGEK	648,3186	+2	3,73E-12	0,6729	Ox (Y)	Tyr17
QVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLR	1023,844	+3	0,033231	0,1229		
QVY[+16]MSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLR	1029,176	+3	0,006343	0,3588	Ox (Y)	Tyr17
RHQY[+45]HIR	352,1812	+3	0,000822	NaN	Nitro (Y)	Tyr283
RLTGFHETSNINDFSAGVANR	769,3806	+3	1,89E-58	0,4991		
RPAETNLR	478,7672	+2	2,34E-10	0,6156		
RPSANC[+57]DPFSVTEALIR	644,9914	+3	6,84E-20	NaN		
RPSANC[+57]DPFSVTEALIRTC[+57]LLNETG	941,1251	+3	1,27E-05	0,2572		
SASIRIPR	450,2747	+2	3,36E-10	0,1082		
TC[+57]LLNETG	907,4190	+1	0,000379	0,5614		
TLDSEPK	395,2031	+2	0,003216	0,3038		
VC[+57]EDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGC[+57]HTNFSTK	884,9145	+4	7,65E-28	3,46E-01		
VC[+57]EDFGVIATFDPKPIPGNW[+45]NGAGC[+57]HTNFSTK	896,1608	+4	0,018643	0,6004	Nitro (W)	Trp247

VQAMYIWIDGTGEGLR	904,9536	+2	3,02E-34	-	2,59E-01		
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>Y</u> [+16] <u>IW</u> [+45]IDGTGEGLR	943,4411	+2	8,05E-11	6,74E-01	Ox (M); Ox (Y); Nitro (W)	Met29; Tyr30; Trp32	
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>Y</u> [+16] <u>IW</u> IDGTGEGLR	920,9485	+2	2,90E-25	8,06E-01	Ox (M); Ox (Y)	Met29; Tyr30	
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>Y</u> [+45] <u>IW</u> [+45]IDGTGEGLR	957,9362	+2	3,37E-07	1,44E-01	Ox (M); Nitro (Y); Nitro (W)	Met29; Tyr30; Trp32	
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>Y</u> [+45] <u>IW</u> IDGTGEGLR	935,4436	+2	4,09E-25	-	Ox (M); Nitro (Y)	Met29; Tyr30	
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>Y</u> <u>IW</u> [+45]IDGTGEGLR	935,4436	+2	5,98E-18	-	Ox (M); Nitro (W)	Met29; Trp32	
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>Y</u> <u>IW</u> IDGTGEGLR	912,9511	+2	4,92E-25	4,53E-01	Ox (M)	Met29	
VQAM <u>Y</u> [+16] <u>IW</u> IDGTGEGLR	912,9511	+2	2,47E-11	7,91E-01	Ox (Y)	Tyr30	
VQAM <u>Y</u> [+45] <u>IW</u> [+45]IDGTGEGLR	949,9387	+2	1,79E-07	1,7239	Nitro (Y); Nitro (W)	Tyr30; Trp32	
VQAM <u>Y</u> [+45] <u>IW</u> IDGTGEGLR	927,4462	+2	3,09E-25	0,3714	Nitro (Y)	Tyr30	
VQAMY <u>IW</u> [+45]IDGTGEGLR	927,4462	+2	6,01E-19	0,9716	Nitro (W)	Trp32	
YIEEAIEK	497,7582	+2	0,000343	-	0,0177		
<u>Y</u> [+16]IEEAIEK	505,7557	+2	0,007725	0,0088	Ox (Y)	Tyr269	
<u>Y</u> [+45]IEEAIEK	520,2508	+2	3,83E-06	-	2,23E-01	Nitro (Y)	Tyr269
YIEEAIEKLSK	661,8637	+2	0,00028	0,2512			
<u>Y</u> [+45]IEEAIEKLSK	684,3563	+2	1,67E-11	1,29E-01	Nitro (Y)	Tyr269	
YNRRPAETNLR	463,9164	+3	8,64E-24	-0,690			
<u>Y</u> [+45]NRRPAETNLR	478,9114	+3	9,91E-08	-0,640	Nitro (Y)	Tyr104	

Tabla II. Identificación de péptidos conteniendo 3-nitrotirosina en muestras de HsGS tratadas con ONOO⁻. Muestras de proteína expuesta a 50-1000 μ M ONOO⁻ fueron digeridas con tripsina y analizadas mediante HPLC-MS/MS a través de la identificación del ion precursor de iones imonio de la NO₂Tyr en un espectrómetro de masa QTRAP 4500 (ABSciex).

Secuencia del péptido	m/z	Carga	Delta m/z	Score	Modificaciones	Residuo modificado
MTTSASSHLNK	588,42	+2	-0,7309	4		
QVYMSLPQGEK	640,35	+2	0,0645	48		
QVYMSLPQGEK	670,86	+2	0,0992	20	Oxidación (M); Nitro (Y)	Tyr17; Met18
QVYMSLPQGEKVQAMYIWIDG TGEGLR	1023,99	+3	0,4458	39		
QVYMSLPQGEKVQAMYIWIDG TGEGLR	1034,29	+3	-0,6471	14	2 Oxidación (M)	Met18; Met29
VQAMYIWIDGTGEGLR	905,04	+2	0,1781	66		
TLDSEPK	789,48	+1	0,0859	20		
LVLCEVFKYNR	476,94	+3	0,0624	41	Nitro (Y)	Tyr104
AYGRDIVEAHYR	483,94	+3	0,0735	31		
AYGRDIVEAHYR	498,92	+3	0,0242	37	Nitro (Y)	Tyr171
DIVEAHYR	524,25	+2	0,0149	19	Nitro (Y)	Tyr180
ACLYAGVK	412,73	+2	0,0152	65		
ACLYAGVK	435,25	+2	0,0652	65	Nitro (Y)	Tyr185
IAGTNAEVM ⁺ PAQWEFQIGPCEG ISMGDHLWVAR	1210,73	+3	0,488	20	Oxidación (M)	
VCEDFGVIATFDPKPIPGNWNG AGCHTNFSTK	1160,68	+3	0,4204	20		
VCEDFGVIATFDPKPIPGNWNG AGCHTNFSTK	1146,90	+3	0,1044	16	Oxidación (W)	Trp247
EENGLKYIEEAIEK	555,73	+3	0,3321	29		
EENGLKYIEEAIEK	570,66	+3	0,1308	12	Nitro (Y)	Tyr269
YIEEAIEK	520,27	+2	0,0455	42	Nitro (Y)	Tyr269
YIEEAIEKLSK	456,58	+3	0,0315	28	Nitro (Y)	Tyr269
AYDPKGGLDNAR	441,22	+3	0,0544	49	Nitro (Y)	Tyr288
RLTGFHETSNINDFSAGVANR	769,46	+3	0,2462	58		
LTGFHETSNINDFSAGVANR	717,45	+3	0,3037	64		
GYFEDRRPSANCDPFSVTEALIR	900,81	+3	0,1338	14		

Tabla III. Transiciones diseñadas para la detección de péptidos seleccionados mediante *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)-HPLC-MS/MS. A partir de los datos de mapeo peptídico obtenidos a través del análisis por MS/MS en el equipo Orbitrap Fusion y en el QTRAP 4500, se desarrolló un método de MRM para la detección de péptidos seleccionados de la HsGS (que fueron encontrados modificados oxidativamente) por análisis por HPLC-MS/MS-MRM en el espectrómetro de masa QTRAP 4500 (ABSciex). Prec/Frag: indica si la especie es un precursor (precursor ion) o fragmento (product ion).

Prec/Frag	Prec Ion m/z	Prod Ion m/z	Carga	Serie	Secuencia	Nº residuo modificado
Precursor Ion	640,3120		2+		QVYMSLPQGEK	
Product Ion	640,3120	558,2900	1+	y5	PQGEK	
Product Ion	640,3120	391,2000	1+	b3	QVY	
Product Ion	640,3120	1052,5100	1+	y9	YMSLPQGEK	
Precursor Ion	662,8137		2+		QVY(+45)MSLPQGEK	Y17 Nitro
Product Ion	662,8137	558,2900	1+	y5	PQGEK	Y17 Nitro
Product Ion	662,8137	436,1800	1+	b3	QVY(+45)	Y17 Nitro
Product Ion	662,8137	1097,4900	1+	y9	Y(+45)MSLPQGEK	Y17 Nitro
Precursor Ion	648,3186		2+		QVYM(+16)SLPQGEK	M18 Ox
Product Ion	648,3186	558,2900	1+	y5	PQGEK	M18 Ox
Product Ion	648,3186	391,2000	1+	b3	QVY	M18 Ox
Product Ion	648,3186	1068,5000	1+	y9	YM(+16)SLPQGEK	M18 Ox
Precursor Ion	670,8112		2+		QVY(+45)M(+16)SLPQGEK	Y17 Nitro, M18 Ox
Product Ion	670,8112	558,2900	1+	y5	PQGEK	Y17 Nitro, M18 Ox
Product Ion	670,8112	436,1800	1+	b3	QVY(+45)	Y17 Nitro, M18 Ox
Product Ion	670,8112	1113,4900	1+	y9	Y(+45)M(+16)SLPQGEK	Y17 Nitro, M18 Ox
Precursor Ion	904,9536		2+		VQAMYIWIDGTGEGLR	
Product Ion	904,9536	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	
Product Ion	904,9536	593,2800	1+	b5	VQAMY	
Product Ion	904,9536	1379,7000	1+	y12	YIWIDGTGEGLR	
Precursor Ion	912,9511		2+		VQAM(+16)YIWIDGTGEGLR	M29 Ox
Product Ion	912,9511	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	M29 Ox
Product Ion	912,9511	609,2700	1+	b5	VQAM(+16)Y	M29 Ox
Product Ion	912,9511	1379,7000	1+	y12	YIWIDGTGEGLR	M29 Ox
Precursor Ion	927,4462		2+		VQAMY(+45)IWIDGTGEGLR	Y30 Nitro
Product Ion	927,4462	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	Y30 Nitro
Product Ion	927,4462	638,2600	1+	b5	VQAMY(+45)	Y30 Nitro
Product Ion	927,4462	1424,6800	1+	y12	Y(+45)IWIDGTGEGLR	Y30 Nitro
Precursor Ion	912,9511		2+		VQAMY(+16)IWIDGTGEGLR	Y30 Ox
Product Ion	912,9511	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	Y30 Ox
Product Ion	912,9511	609,2700	1+	b5	VQAMY(+16)	Y30 Ox
Product Ion	912,9511	1395,6900	1+	y12	Y(+16)IWIDGTGEGLR	Y30 Ox

Precursor Ion	927,4462		2+		VQAMYIW(+45)IDGTGEGLR	W32 Nitro
Product Ion	927,4462	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	W32 Nitro
Product Ion	927,4462	593,2800	1+	b5	VQAMY	W32 Nitro
Product Ion	927,4462	1424,6800	1+	y12	YIW(+45)IDGTGEGLR	W32 Nitro
Precursor Ion	935,4436		2+		VQAM(+16)Y(+45)IWIDGTGEGLR	M29 Ox/Y30 Nitro
Product Ion	935,4436	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	M29 Ox/Y30 Nitro
Product Ion	935,4436	654,2600	1+	b5	VQAM(+16)Y(+45)	M29 Ox/Y30 Nitro
Product Ion	935,4436	1424,6800	1+	y12	Y(+45)IWIDGTGEGLR	M29 Ox/Y30 Nitro
Precursor Ion	920,9485		2+		VQAM(+16)Y(+16)IWIDGTGEGLR	M29 Ox/Y30 Ox
Product Ion	920,9485	689,3600	1+	y7	GTGEGLR	M29 Ox/Y30 Ox
Product Ion	920,9485	625,2700	1+	b5	VQAM(+16)Y(+16)	M29 Ox/Y30 Ox
Product Ion	920,9485	1424,6800	1+	y10	WIDGTGEGLR	M29 Ox/Y30 Ox
Precursor Ion	1289,5709		3+		CVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMY LVPAAMFR	
Product Ion	1289,5709	692,3500	1+	y6	PAAMFR	
Product Ion	1289,5709	1043,4500	1+	b8	CVEELPEW	
Product Ion	1289,5709	1198,6100	1+	y10	MYLVPAAMFR	
Precursor Ion	1304,5660		3+		CVEELPEW(+45)NFDGSSTLQSEGSNS DMYLVPAAMFR	W60 Nitro
Product Ion	1304,5660	692,3500	1+	y6	PAAMFR	W60 Nitro
Product Ion	1304,5660	675,2800	2+	b10	CVEELPEW(+45)NF	W60 Nitro
Product Ion	1304,5660	1198,6100	1+	y10	MYLVPAAMFR	W60 Nitro
Precursor Ion	1294,9026		3+		CVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM(+ 16)YLPAAMFR	M77 Ox
Product Ion	1294,9026	692,3500	1+	y6	PAAMFR	M77 Ox
Product Ion	1294,9026	631,2800	1+	b5	CVEEL	M77 Ox
Product Ion	1294,9026	1067,5700	1+	y9	YLPAAMFR	M77 Ox
Precursor Ion	1309,8976		3+		CVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM(+ 16)Y(+45)LVPAAMFR	M77 Ox/Y78 Nitro
Product Ion	1309,8976	692,3500	1+	y6	PAAMFR	M77 Ox/Y78 Nitro
Product Ion	1309,8976	1374,6200	1+	y11	DM(+16)Y(+45)LVPAAMFR	M77 Ox/Y78 Nitro
Product Ion	1309,8976	1112,5600	1+	y9	Y(+45)LVPAAMFR	M77 Ox/Y78 Nitro
Precursor Ion	1315,2292		3+		CVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDM(+ 16)Y(+45)LVPAAM(+16)FR	M77 Ox/Y78 Nitro/M84 Ox
Product Ion	1315,2292	708,3500	1+	y6	PAAM(+16)FR	M77 Ox/Y78 Nitro/M84 Ox
Product Ion	1315,2292	1043,4500	1+	b8	CVEELPEW	M77 Ox/Y78 Nitro/M84 Ox
Product Ion	1315,2292	1275,5900	1+	y10	M(+16)Y(+45)LVPAAM(+16)FR	M77 Ox/Y78 Nitro/M84 Ox
Precursor Ion	480,9271		3+		LVLCEVFKYNR	
Product Ion	480,9271	727,3900	1+	y5	FKYNR	
Product Ion	480,9271	213,1600	1+	b2	LV	
Product Ion	480,9271	1115,5300	1+	y8	CEVFKYNR	
Precursor Ion	743,3796		2+		LVLCEVFKY(+45)NR	Y104 Nitro

Product Ion	743,3796	772,3700	1+	y5	FKY(+45)NR	Y104 Nitro
Product Ion	743,3796	213,1600	1+	b2	LV	Y104 Nitro
Product Ion	743,3796	1160,5200	1+	y8	CEVFKY(+45)NR	Y104 Nitro
Precursor Ion	486,2587		3+		LVLCEVFKY(+16)NR	Y104 Ox
Product Ion	486,2587	743,3800	1+	y5	FKY(+16)NR	Y104 Ox
Product Ion	486,2587	213,1600	1+	b2	LV	Y104 Ox
Product Ion	486,2587	1131,5300	1+	y8	CEVFKY(+16)NR	Y104 Ox
Precursor Ion	463,9164		3+		YNRRPAETNLR	
Product Ion	463,9164	800,4300	1+	y7	PAETNLR	
Product Ion	463,9164	1102,5400	1+	b9	YNRRPAETN	
Product Ion	463,9164	590,3200	1+	b4	YNRR	
Precursor Ion	478,9114		3+		Y(+45)NRRPAETNLR	Y104 Nitro
Product Ion	478,9114	800,4300	1+	y7	PAETNLR	Y104 Nitro
Product Ion	478,9114	1147,5200	1+	b9	Y(+45)NRRPAETN	Y104 Nitro
Product Ion	478,9114	635,3000	1+	b4	Y(+45)NRR	Y104 Nitro
Precursor Ion	501,7538		2+		DIVEAHYR	
Product Ion	501,7538	774,3900	1+	y6	VEAHYR	
Product Ion	501,7538	675,3200	1+	y5	EAHYR	
Product Ion	501,7538	328,1900	1+	b3	DIV	
Precursor Ion	524,2463		2+		DIVEAHY(+45)R	Y180 Nitro
Product Ion	524,2463	819,3700	1+	y6	VEAHY(+45)R	Y180 Nitro
Product Ion	524,2463	720,3100	1+	y5	EAHY(+45)R	Y180 Nitro
Product Ion	524,2463	328,1900	1+	b3	DIV	Y180 Nitro
Precursor Ion	509,7513		2+		DIVEAHY(+16)R	Y180 Ox
Product Ion	509,7513	790,3800	1+	y6	VEAHY(+16)R	Y180 Ox
Product Ion	509,7513	691,3200	1+	y5	EAHY(+16)R	Y180 Ox
Product Ion	509,7513	328,1900	1+	b3	DIV	Y180 Ox
Precursor Ion	441,2311		2+		ACLYAGVK	
Product Ion	441,2311	650,3900	1+	y6	LYAGVK	
Product Ion	441,2311	537,3000	1+	y5	YAGVK	
Product Ion	441,2311	508,2200	1+	b4	ACLY	
Precursor Ion	463,7237		2+		ACLY(+45)AGVK	Y185 Nitro
Product Ion	463,7237	695,3700	1+	y6	LY(+45)AGVK	Y185 Nitro
Product Ion	463,7237	582,2900	1+	y5	Y(+45)AGVK	Y185 Nitro
Product Ion	463,7237	553,2100	1+	b4	ACLY(+45)	Y185 Nitro
Precursor Ion	449,2286		2+		ACLY(+16)AGVK	Y185 Ox
Product Ion	449,2286	666,3800	1+	y6	LY(+16)AGVK	Y185 Ox

Product Ion	449,2286	553,3000	1+	y5	Y(+16)AGVK	Y185 Ox
Product Ion	449,2286	232,0800	1+	b2	AC	Y185 Ox
Precursor Ion	1224,2462		3+		IAGTNAEVMPAQWFEQIGPCEGISMGD HLWVAR	
Product Ion	1224,2462	1171,5700	1+	y10	SMGDHLWVAR	
Product Ion	1224,2462	887,4000	1+	b9	IAGTNAEVM	
Product Ion	1224,2462	1369,6600	1+	b13	IAGTNAEVMPAQW	
Precursor Ion	918,4364		4+		IAGTNAEVMPAQWFEQIGPCEGISMGD HLWVAR	
Product Ion	918,4364	1171,5700	1+	y10	SMGDHLWVAR	
Product Ion	918,4364	887,4000	1+	b9	IAGTNAEVM	
Product Ion	918,4364	1369,6600	1+	b13	IAGTNAEVMPAQW	
Precursor Ion	1229,5778		3+		IAGTNAEVM(+16)PAQWFEQIGPCEGIS MGDHLWVAR	M198 Ox
Product Ion	1229,5778	1171,6000	1+	y10	SMGDHLWVAR	M198 Ox
Product Ion	1229,5778	903,4200	1+	b9	IAGTNAEVM(+16)	M198 Ox
Product Ion	1229,5778	781,4500	1+	y6	HLWVAR	M198 Ox
Precursor Ion	922,4352		4+		IAGTNAEVM(+16)PAQWFEQIGPCEGIS MGDHLWVAR	M198 Ox
Product Ion	922,4352	1171,6000	1+	y10	SMGDHLWVAR	M198 Ox
Product Ion	922,4352	903,4200	1+	b9	IAGTNAEVM(+16)	M198 Ox
Product Ion	922,4352	1385,6500	1+	b13	IAGTNAEVM(+16)PAQW	M198 Ox
Precursor Ion	1239,2412		3+		IAGTNAEVMPAQW(+45)EFQIGPCEGIS MGDHLWVAR	W202 Nitro
Product Ion	1239,2412	1171,5700	1+	y10	SMGDHLWVAR	W202 Nitro
Product Ion	1239,2412	903,4200	2+	b5	IAG	W202 Nitro
Product Ion	1239,2412	781,4500	1+	y6	HLWVAR	W202 Nitro
Precursor Ion	922,4352		4+		IAGTNAEVMPAQWFEQIGPCEGISM(+1 6)GDHLWVAR	M214 Ox
Product Ion	922,4352	1187,5600	1+	y10	SM(+16)GDHLWVAR	M214 Ox
Product Ion	922,4352	887,4000	1+	b9	IAGTNAEVM	M214 Ox
Product Ion	922,4352	1369,6600	1+	b13	IAGTNAEVMPAQW	M214 Ox
Precursor Ion	1234,9094		3+		IAGTNAEVM(+16)PAQWFEQIGPCEGIS M(+16)GDHLWVAR	M198 Ox/M214 Ox
Product Ion	1234,9094	1187,5600	1+	y10	SM(+16)GDHLWVAR	M198 Ox/M214 Ox
Product Ion	1234,9094	903,4200	1+	b9	IAGTNAEVM(+16)	M198 Ox/M214 Ox
Product Ion	1234,9094	1385,6500	1+	b13	IAGTNAEVM(+16)PAQW	M198 Ox/M214 Ox
Precursor Ion	884,9145		4+		VCEDFGVIATFDPKPIPGNWNAGAGCHT NFSTK	
Product Ion	884,9145	834,4100	1+	y7	HTNFSTK	
Product Ion	884,9145	1479,6400	1+	y13	WNGAGCHTNFSTK	
Product Ion	884,9145	708,2700	1+	b6	VCEDFG	
Precursor Ion	1179,5502		3+		VCEDFGVIATFDPKPIPGNWNAGAGCHT NFSTK	
Product Ion	1179,5502	834,4100	1+	y7	HTNFSTK	
Product Ion	1179,5502	1479,6400	1+	y13	WNGAGCHTNFSTK	

Product Ion	1179,5502	708,2700	1+	b6	VCEDFG	
Precursor Ion	896,1608		4+		VCEDFGVIATFDPKPIPGNW(+45)NGA	W247 Nitro
Product Ion	896,1608	834,4100	1+	y7	GCHTNFSTK	
Product Ion	896,1608	1179,5200	1+	y11	HTNFSTK	W247 Nitro
Product Ion	896,1608	708,2700	1+	b6	GAGCHTNFSTK	W247 Nitro
Precursor Ion	1194,5453		3+		VCEDFG	W247 Nitro
Product Ion	1194,5453	834,4100	1+	y7	VCEDFGVIATFDPKPIPGNW(+45)NGA	
Product Ion	1194,5453	1001,9400	2+	y18	GCHTNFSTK	W247 Nitro
Product Ion	1194,5453	708,2700	1+	b6	HTNFSTK	W247 Nitro
Precursor Ion	675,0103		3+		PIPGNW(+45)NGAGCHTNFSTK	W247 Nitro
Product Ion	675,0103	901,4200	1+	b8	VCEDFG	W247 Nitro
Product Ion	675,0103	994,5100	1+	y8	AMREENGLKYIEEAIEK	
Product Ion	675,0103	1122,6000	1+	y9	AMREENGL	
Precursor Ion	680,3420		3+		YIEEAIEK	
Product Ion	680,3420	917,4100	1+	b8	KYIEEAIEK	
Product Ion	680,3420	994,5100	1+	y8	AM(+16)REENGLKYIEEAIEK	M261 Ox
Product Ion	680,3420	1122,6000	1+	y9	AM(+16)REENGL	M261 Ox
Precursor Ion	690,0054		3+		YIEEAIEK	M261 Ox
Product Ion	690,0054	901,4200	1+	b8	KYIEEAIEK	M261 Ox
Product Ion	690,0054	1039,4900	1+	y8	AMREENGLKY(+45)IEEAIEK	Y269 Nitro
Product Ion	690,0054	1167,5900	1+	y9	AMREENGL	Y269 Nitro
Precursor Ion	680,3420		3+		Y(+45)IEEAIEK	Y269 Nitro
Product Ion	680,3420	901,4200	1+	b8	KY(+45)IEEAIEK	Y269 Nitro
Product Ion	680,3420	1010,5000	1+	y8	AMREENGLKY(+16)IEEAIEK	Y269 Ox
Product Ion	680,3420	1138,6000	1+	y9	AMREENGL	Y269 Ox
Precursor Ion	695,3370		3+		Y(+16)IEEAIEK	Y269 Ox
Product Ion	695,3370	917,4100	1+	b8	KY(+16)IEEAIEK	Y269 Ox
Product Ion	695,3370	1039,4900	1+	y8	AM(+16)REENGLKY(+45)IEEAIEK	M261 Ox/Y269 Nitro
Product Ion	695,3370	1167,5900	1+	y9	AM(+16)REENGL	M261 Ox/Y269 Nitro
Precursor Ion	685,6736		3+		Y(+45)IEEAIEK	M261 Ox/Y269 Nitro
Product Ion	685,6736	917,4100	1+	b8	KY(+45)IEEAIEK	M261 Ox/Y269 Nitro
Product Ion	685,6736	1010,5000	1+	y8	AM(+16)REENGLKY(+16)IEEAIEK	M261 Ox/Y269 Ox
Product Ion	685,6736	1138,6000	1+	y9	AM(+16)REENGL	M261 Ox/Y269 Ox
Precursor Ion	497,7582		2+		Y(+16)IEEAIEK	M261 Ox/Y269 Ox
Product Ion	497,7582	718,3600	1+	y6	KY(+16)IEEAIEK	M261 Ox/Y269 Ox
Product Ion	497,7582	406,2000	1+	b3	YIEEAIEK	
Product Ion	497,7582	535,2400	1+	b4	EIEEAIEK	
Product Ion					YIE	
Product Ion					YIEE	

Precursor Ion	520,2508		2+		Y(+45)IEEAIEK	Y269 Nitro
Product Ion	520,2508	718,3600	1+	y6	EEAIEK	Y269 Nitro
Product Ion	520,2508	451,1800	1+	b3	Y(+45)IE	Y269 Nitro
Product Ion	520,2508	580,2200	1+	b4	Y(+45)IEE	Y269 Nitro
Precursor Ion	505,7557		2+		Y(+16)IEEAIEK	Y269 Ox
Product Ion	505,7557	718,3600	1+	y6	EEAIEK	Y269 Ox
Product Ion	505,7557	589,3200	1+	y5	EAIEK	Y269 Ox
Product Ion	505,7557	460,2800	1+	y4	AIEK	Y269 Ox
Precursor Ion	427,2250		2+		HQYHIR	
Product Ion	427,2250	716,4000	1+	y5	QYHIR	
Product Ion	427,2250	588,3000	1+	y4	YHIR	
Product Ion	427,2250	429,2000	1+	b3	HQY	
Precursor Ion	449,7175		2+		HQY(+45)HIR	Y283 Nitro
Product Ion	449,7175	761,3700	1+	y5	QY(+45)HIR	Y283 Nitro
Product Ion	449,7175	633,3100	1+	y4	Y(+45)HIR	Y283 Nitro
Product Ion	449,7175	474,1700	1+	b3	HQY(+45)	Y283 Nitro
Precursor Ion	426,2142		3+		AYDPKGGLDNAR	
Product Ion	426,2142	702,3500	1+	y7	GGLDNAR	
Product Ion	426,2142	830,4500	1+	y8	KGGLDNAR	
Product Ion	426,2142	235,1100	1+	b2	AY	
Precursor Ion	441,2092		3+		AY(+45)DPKGGLDNAR	Y288 Nitro
Product Ion	441,2092	702,3500	1+	y7	GGLDNAR	Y288 Nitro
Product Ion	441,2092	645,3300	1+	y6	GLDNAR	Y288 Nitro
Product Ion	441,2092	280,0900	1+	b2	AY(+45)	Y288 Nitro
Precursor Ion	457,7220		2+		KGYFEDR	
Product Ion	457,7220	786,3400	1+	y6	GYFEDR	
Product Ion	457,7220	729,3200	1+	y5	YFEDR	
Product Ion	457,7220	349,1900	1+	b3	KGY	
Precursor Ion	480,2145		2+		KGY(+45)FEDR	Y336 Nitro
Product Ion	480,2145	831,3300	1+	y6	GY(+45)FEDR	Y336 Nitro
Product Ion	480,2145	774,3100	1+	y5	Y(+45)FEDR	Y336 Nitro
Product Ion	480,2145	394,1700	1+	b3	KGY(+45)	Y336 Nitro
Precursor Ion	465,7194		2+		KGY(+16)FEDR	Y336 Ox
Product Ion	465,7194	802,3400	1+	y6	GY(+16)FEDR	Y336 Ox
Product Ion	465,7194	745,3200	1+	y5	Y(+16)FEDR	Y336 Ox
Product Ion	465,7194	365,1800	1+	b3	KGY(+16)	Y336 Ox
Precursor Ion	393,6745		2+		GYFEDR	

Product Ion	393,6745	566,2600	1+	y4	FEDR	
Product Ion	393,6745	419,1900	1+	y3	EDR	
Product Ion	393,6745	221,0900	1+	b2	GY	
Precursor Ion	416,1670		2+		GY(+45) FEDR	Y336 Nitro
Product Ion	416,1670	566,2600	1+	y4	FEDR	Y336 Nitro
Product Ion	416,1670	419,1900	1+	y3	EDR	Y336 Nitro
Product Ion	416,1670	266,0800	1+	b2	GY(+45)	Y336 Nitro
Precursor Ion	465,7194		2+		GY(+16) FEDR	Y336 Ox
Product Ion	465,7194	566,2600	1+	y4	FEDR	Y336 Ox
Product Ion	465,7194	419,1900	1+	y3	EDR	Y336 Ox
Product Ion	465,7194	237,0900	1+	b2	GY(+16)	Y336 Ox
Precursor Ion	675,8263		4+		GYFEDRRPSANCDPFSVTEALIR	
Product Ion	675,8263	702,4100	1+	y6	TEALIR	
Product Ion	675,8263	1293,6000	1+	b11	GYFEDRRPSAN	
Product Ion	675,8263	1453,6300	1+	b12	GYFEDRRPSANC	
Precursor Ion	687,0726		4+		GY(+45) FEDRRPSANCDPFSVTEALIR	Y336 Nitro
Product Ion	687,0726	702,4100	1+	y6	TEALIR	Y336 Nitro
Product Ion	687,0726	1338,5800	1+	b11	GY(+45) FEDRRPSAN	Y336 Nitro
Product Ion	687,0726	1498,6100	1+	b12	GY(+45) FEDRRPSANC	Y336 Nitro
Precursor Ion	679,8251		4+		GY(+16) FEDRRPSANCDPFSVTEALIR	Y336 Ox
Product Ion	679,8251	702,4100	1+	y6	TEALIR	Y336 Ox
Product Ion	679,8251	1309,5900	1+	b11	GY(+16) FEDRRPSAN	Y336 Ox
Product Ion	679,8251	1469,6200	1+	b12	GY(+16) FEDRRPSANC	Y336 Ox
Precursor Ion	483,9337		3+		AYGRDIVEAHYR	
Product Ion	483,9337	675,4114	1+	y5	EAHYR	
Product Ion	483,9337	563,2800	1+	b5	AYGRD	
Product Ion	483,9337	676,3200	1+	b6	AYGRDI	
Precursor Ion	498,9337		3+		AY(+45) GRDIVEAHYR	Y171 Nitro
Product Ion	498,9337	675,4114	1+	y5	EAHYR	Y171 Nitro
Product Ion	498,9337	608,2800	1+	b5	AY(+45) GRD	Y171 Nitro
Product Ion	498,9337	721,3200	1+	b6	AY(+45) GRDI	Y171 Nitro