

## Analysis of reversible and irreversible protein modifications upon oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe* by proteomic approaches

Sarela García-Santamarina, Susanna Boronat, Elena Hidalgo

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut. Universitat Pompeu Fabra

Reactive oxygen species (ROS) ( $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ) generated as a consequence of the oxygen metabolism in aerobic organisms, have important roles in cell signalling. However, if they reach concentrations beyond homeostatic levels they generate a situation of oxidative stress where damages to cellular components are produced. In the case of  $H_2O_2$ , even physiological levels may produce a chronic low level of stress, which progressively drives the cell into the aging process.

In order to understand the consequences of an oxidative stress situation in the cell, it is important to unravel which are the primarily biological targets of ROS and which are the consequences of such reactivity. Here we report the study of different types of modifications that ROS produce in proteins in *Schizosaccharomyces pombe*, under exogenous oxidative stress, by adding  $H_2O_2$  to the culture media, and also under endogenous oxidative stress, using mutant strains defective for ROS scavengers.

By 1D electrophoresis, we observe that reversible disulfide bond formation is increased upon both stresses, and in the case of  $H_2O_2$  treatment, the kinetics correlates with oxidative activation of the *S. pombe*  $H_2O_2$ -sensor Pap1. We also show how shifting the growth of the mutant strains from an anaerobic condition to an aerobic one results in differential irreversible carbonylation of proteins. We are extending these studies to the proteome level to identify the target proteins of both stresses. We have established a modification of the ICAT protocol to quantify the extent of reversible modified cysteines. In addition, we have established a 2D electrophoresis approach to identify targets of carbonyl modifications produced by oxidative stress. This would allow us to study the consequences of irreversible and reversible protein modifications and their biological relevance after situations of intrinsic and extrinsic oxidative stresses.

## La lipoproteína lipasa de rata se nitra *in vivo* en respuesta a la administración de lipopolisacárido

Albert Casanovas<sup>1</sup>, Montserrat Carrascal<sup>2</sup>, Joaquín Abián<sup>2</sup>, Miquel Llobera<sup>1</sup>, M. Dolores López-Tejero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España. <sup>2</sup>CSIC/UAB Proteomics Laboratory, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

La lipoproteína lipasa (LPL) juega un papel central en el metabolismo lipídico hidrolizando los triacilglicérols (TAG) plasmáticos. Una de las respuestas metabólicas características a la infección es la hipertrigliceridemia, que es consecuencia, al menos en parte, de la disminución de la actividad LPL de los tejidos. La administración de lipopolisacárido

(LPS) provoca una inhibición de la actividad LPL tisular a nivel postranscripcional [1,2] y un aumento de la producción de óxido nítrico (NO). Estudios anteriores han propuesto una relación causa/efecto entre el aumento de la síntesis de NO y la disminución de actividad LPL tisular [2] aunque no se ha determinado si esta interacción es directa o está

mediada por otros factores. En este trabajo hemos estudiado la potencial nitración *in vivo* de la LPL en respuesta a la administración de LPS en rata.

La administración de LPS produce un aumento de los TAG circulantes, de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible, de la producción de NO y una disminución generalizada de la actividad LPL en tejidos. De manera preliminar evaluamos la sensibilidad de la LPL a la nitración, tratando *in vitro* LPL bovina con peroxinitrito, una especie reactiva del nitrógeno (RNS). La nitración de tirosinas se ha definido como un marcador de la interacción de proteínas con RNS. Así, la nitración de la LPL bovina tratada con peroxinitrito se determinó mediante *Western blot* anti-nitrotirosina y mediante la identificación por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de secuencias específicas de la LPL que contenían tirosinas nitradas. Para la localización de nitrotirosinas mediante espectrometría de masas se compararon tres estrategias distintas de fragmentación MS/MS: (1) MS/MS dependiente de datos de los péptidos más abundantes, (2) MS/MS dependiente de datos de péptidos presentes en una lista de iones predefinida y (3) MS/MS secuencial siguiendo una lista de iones predefinida (Figura 1).

LPLb	MESKALLLLSVCLQSLTVSRGGVLAADRITGGKDFRDIKSFALRTPEDTAEDTCHLI	32
LPLr	MESKALLLVAGVWVQLQSLTAFRGVAAAD---GGRDFSDIESKFALRTPEDTAEDTCHLI	30
LPLb	PGVTESVANCHFNHSSKTEFWIHGWVITGCMYESVWFLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRA	92
LPLr	FGLADSVSNCHFNHSSKTEFWIHGWVITGCMYESVWFLVAALYKREPDSNVIVVDWLSRA	90
LPLb	QGHYFVSAGYTKLVGQDVAKFMWMADEFNYPLGNVHLGYSLGAAHAAGTAGSLTNKKVN	152
LPLr	QGHYFVSAGYTKLVGQDVAKFMWMADEFNYPLGNVHLGYSLGAAHAAGTAGSLTNKKVN	150
LPLb	RITGLDPAGNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLIHTFTRGSPGRSIGIQREWGHVDIYVNGG	212
LPLr	RITGLDPAGNFEYAEAPSRSPDDADFVDVLIHTFTRGSPGRSIGIQREWGHVDIYVNGG	210
LPLb	IFQFGCNIGEARVIAERGLGDVQVLCVCSHERSVHLFIDSLNEENPSKAYRCNSKEAF	272
LPLr	IFQFGCNIGEARVIAERGLGDVQVLCVCSHERSVHLFIDSLNEENPSKAYRCNSKEAF	270
LPLb	EKGLCLSCRKFNENNVGYEINKVRAKRSKMYLKTFRQMPYKVFHYQVKIHFSGTESNTY	332
LPLr	EKGLCLSCRKFNENNVGYEINKVRAKRSKMYLKTFRQMPYKVFHYQVKIHFSGTENDKQ	330
LPLb	TNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVSTNKYSFLLYTEVDIGELMLLKLKWIISDYSFVN	392
LPLr	NNQAFEISLYGTVAESENIPFTLPEVATNKYSFLIYTEVDIGELMLLKLKWIISDYSFVN	390
LPLb	SNWSSPFGFDIGKIRVKAGETQKQVIFCSREKMSYLOKGGKSPVIVFKCHDKSLNRKSG	450
LPLr	SDWSSPFSFVIEKIRVKAGETQKQVIFCAREKVSHLQKGGKDAAVFKCHDKSLK-KSG	447

**Figura 1.** Alineación de las secuencias de la LPL bovina y de rata y localización de las tirosinas nitradas detectadas. En la secuencia se indican las tirosinas nitradas detectadas en la LPL bovina (puntas de flecha negras) y en la LPL de rata (puntas de flecha blancas) utilizando una estrategia de fragmentación MS/MS secuencial sobre un listado de iones predefinido. En gris se indica la máxima cobertura esperable con el listado de iones barridos, mientras que la cobertura detectada experimentalmente se muestra en negrita. El péptido señal se indica en cursiva. Los aminoácidos están numerados empezando por el extremo N-terminal de la proteína madura. LPLb, LPL bovina; LPLr, LPL de rata.

La primera estrategia de fragmentación ofreció la máxima cobertura de secuencia, mientras que el tercer método permitió detectar un mayor número de tirosinas nitradas, mostrando una sensibilidad más

alta para este modo de barrido. Este análisis permitió detectar 8 residuos nitrados *in vitro* en la LPL bovina (Figura 1). El alto grado de homología entre la LPL bovina y la de rata permitieron el uso de los espectros MS/MS de péptidos nitrados de la LPL bovina como espectros de referencia para el análisis de una potencial nitración *in vivo* de la LPL de rata en respuesta a la administración de LPS. Para el estudio de la LPL de rata mediante herramientas proteómicas purificamos parcialmente la enzima a partir de homogenado de corazón mediante cromatografía de afinidad a heparina-Sepharose y resolvimos isoformas de pI de la LPL mediante electroforesis en 2 dimensiones, como describimos en trabajos anteriores [3]. Las isoformas de pI de la LPL se recortaron del gel, se digirieron con tripsina y los péptidos obtenidos se analizaron mediante MS/MS secuencial siguiendo una lista de iones predefinida (Figura 1). Este análisis llevó a la identificación de tres residuos de tirosina nitrados *in vivo* (en las posiciones 94, 164 y 316) en la LPL de corazón de rata tratada con LPS (Figura 1).

Este estudio es el primero en identificar residuos nitrados en la LPL, tanto *in vivo* como *in vitro*, y demuestra que la LPL es una diana de las RNS en el contexto de la endotoxemia [4]. Así, estos resultados sugieren que la nitración puede constituir un mecanismo nuevo de regulación de la actividad LPL tisular y abren las puertas a futuros estudios dirigidos al análisis de esta modificación en otras situaciones en las que se ha propuesto que la LPL puede estar regulada por NO.

**Referencias**

- [1] Gouni I, Oka K, Etienne J y Chan L. Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. *J Lipid Res* 1993;34:139-46.
- [2] Picard F, Kapur S, Perreault M, Marette A y Deshaies Y. Nitric oxide mediates endotoxin-induced hypertriglyceridemia through its action on skeletal muscle lipoprotein lipase. *FASEB J* 2001;15:1828-30.
- [3] Casanovas A, Carrascal M, Abián J, López-Tejero MD y Llobera M. Discovery of lipoprotein lipase pI isoforms and contributions to their characterization. *J Proteomics* 2009;72:1031-9.
- [4] Casanovas A, Carrascal M, Abián J, López-Tejero MD y Llobera M. Lipoprotein lipase is nitrated *in vivo* after lipopolysaccharide challenge. *Free Radic Biol Med* 2009;47:1553-60.