



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

Análisis de la modulación funcional por nitroalquilación de sistemas antioxidantes mediada por lípidos nitrados

Aranda Caño, Lorena

Tutor/a: Juan Bautista Barroso Albarracín
Cotutor/a: Raquel Valderrama Rodríguez

Departamento de Biología Experimental

Junio, 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

Análisis de la modulación funcional por nitroalquilación de sistemas antioxidantes mediada por lípidos nitrados

Aranda Caño, Lorena

**Tutor/a: Juan Bautista
Barroso Albarracín**

**Cotutor/a: Raquel
Valderrama Rodríguez**

ÍNDICE

1. Resumen/Summary.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Óxido nítrico (NO).....	2
2.1.1. Señalización mediada por óxido nítrico.....	3
2.1.2. Modificaciones post-traduccionales por óxido nítrico.....	3
2.2. Ácidos grasos nitrados (NO ₂ -FA) o nitroalquenos.....	4
2.2.1. Formación de los ácidos grasos nitrados.....	4
2.2.2. Propiedades biológicas de los ácidos grasos nitrados.....	6
2.2.3. Ácido graso nitro-oleico (NO ₂ -OA).....	8
2.3. Peroxirredoxinas.....	9
2.3.1. Ciclo catalítico de las peroxirredoxinas.....	10
2.3.2. Peroxirredoxina 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.3.2.1. Ciclo catalítico de la peroxirredoxina 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3. Objetivos.....	13
4. Material y métodos.....	13
4.1. Síntesis de la peroxirredoxina 1 mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
4.2. Síntesis del ácido graso nitro-oleico.....	14
4.3. Tratamiento de la peroxirredoxina recombinante de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (Prx1p) con el ácido graso nitro-oleico.....	15
4.3.1. Análisis de la actividad enzimática.....	16
4.3.1.1. Análisis estadístico.....	16
4.3.2. Detección e identificación de la nitroalquilación mediante el análisis LC/MS/MS.....	16
4.3.2.1. Digestión.....	16
4.3.2.2. Desalado mediante columnas C18 por centrifugación...17	
4.3.2.3. Secuenciación de péptidos mediante el CL-MS/MS.....	18
4.3.2.4. Análisis de los datos de secuenciación.....	18
4.3.3. Análisis <i>in silico</i> de modelización molecular de la peroxirredoxina 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Prx1p).....	18
5. Resultados.....	19
5.1. Espectros de los productos de nitración del ácido oleico mediante	

resonancia magnética nuclear (RMN).....	19
5.2. Actividad enzimática de la peroxirredoxina de <i>S. cerevisiae</i> (Prxp1).....	22
5.3. Espectros del producto de nitroalquilación por el ácido graso nitro-oleico en la peroxirredoxina 1 mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	23
5.4. Análisis <i>in silico</i> de la modelización molecular de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
6. Discusión.....	32
7. Conclusiones.....	35
8. Bibliografía.....	36
Resumen de asignaturas del máster.....	44
Currículum vitae.....	49

1. RESUMEN/SUMMARY

El NO[•] es un radical libre gaseoso que actúa como molécula señalizadora en numerosos procesos biológicos, ejerciendo su acción principalmente a través de modificaciones post-traduccionales (PTMs), como la S-nitrosilación y la nitración de tirosinas proteicas. Estudios recientes han demostrado que tanto el NO[•] como algunos de sus derivados pueden interaccionar también con lípidos insaturados, generando moléculas denominadas lípidos nitrados, nitrolípidos o nitroalquenos (NO₂-FA). La capacidad señalizadora de los NO₂-FA reside fundamentalmente en la modulación de la función proteica a través de una PTM de aminoácidos nucleofílicos denominada nitroalquilación.

En el presente trabajo analizamos el efecto del tratamiento con ácido nitro-oleico (NO₂-OA) en la actividad enzimática del sistema de la Peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Prx1p), así mismo, identificamos las posibles dianas de nitroalquilación de la proteína así como la susceptibilidad de cada una de ellas a sufrir la modificación. Para ello, se utilizaron técnicas espectrofotométricas y técnicas de CL-MS/MS y se realizaron análisis de modelización molecular de la Prx1p *in silico*.

Los resultados de este estudio mostraron que la nitroalquilación de la Prx1p por el NO₂-OA provocaba una disminución significativa de la actividad catalítica dependiente de la concentración de lípido nitrado. Así mismo, se identificaron tres dianas de nitroalquilación con diferente susceptibilidad a nitroalquilarse, siendo la His 83 la que presentaba mayor tendencia a modificarse, seguida de la His 123 y de la Cys 91. En conclusión, el análisis de estos resultados indica que la nitroalquilación de la Prx1p por NO₂-OA puede constituir un mecanismo de control de la actividad de este sistema antioxidante.

NO[•] is a gaseous free radical that acts as a signaling molecule in numerous biological processes, exerting its action mainly through post-translational modifications (PTMs), such as S-nitrosylation and nitration of protein tyrosine. Recent studies have shown that both NO[•] and some of its derivatives may also interact with unsaturated lipids, generating molecules called nitrated lipids or nitroalkenes (NO₂-FA). The signaling capacity of NO₂-FA lies principally in the modulation of protein function through a PTM of nucleophilic amino-acids called nitroalkylation.

In this paper we analyze the effect of the treatment with nitro-oleic acid (NO₂-OA) on the enzymatic activity of system peroxiredoxin 1 mitochondrial of *Saccharomyces cerevisiae*

(Prx1p), likewise, we identify possible nitroalkylation targets and the susceptibility of each one to nitroalkylate. To do this, we used spectrophotometric techniques, LC-MS/MS techniques and molecular modeling analysis *in silico* of Prx1p.

The results of this study showed that nitroalkylation of Prx1p by NO₂-OA caused a significant decrease in catalytic activity depending on the concentration of nitrated lipid. Also, three nitroalkylation targets were identified with different susceptibility to nitroalkylate, being His 83 which showed the biggest tendency to be modified, followed by His 123 and Cys 91. In conclusion, the analysis of these results indicates that the nitroalkylation of Prx1p by NO₂-OA could control the activity of this antioxidant system.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Óxido nítrico (NO).

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO[•]) es un gas inorgánico incoloro, de pequeño tamaño, y es un radical libre debido a que presenta un electrón desapareado en su orbital externo, lo cual explica su elevada reactividad. El NO[•] presenta una vida media relativamente corta *in vivo* (menos de 10 s), siendo ligeramente soluble en agua y algo más soluble en solventes orgánicos (Stamler *et al.*, 1992; Hughes, 1999; Wojtaszek, 2000).

En mamíferos, el NO[•] procede de la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Para dicha síntesis, además se requiere la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobioptenina (THB) y de nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) (Palmer *et al.*, 1988).

Además, el NO[•] presenta naturaleza lipofílica que le permite atravesar las membranas celulares y de esta forma reaccionar con diferentes macromoléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, entre otras (Astier *et al.*, 2011).

2.1.1. Señalización mediada por óxido nítrico.

A pesar de su naturaleza reactiva, el NO[•] es capaz de actuar como molécula señalizadora en numerosos procesos biológicos. En la células animales, las vías de señalización mediadas por NO son típicamente dependientes o independientes de GMP cíclico (GMPc) (Hausladen *et al.*, 1998).

Las vías de señalización mediadas por NO[•] dependientes de GMPc son iniciadas por la activación inducida por NO de la guanilato ciclasa (Stamler, 1994). Esta activación da como resultado la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación de las plaquetas y también, interviene en los sistemas sensoriales incluyendo visualización y olfacción (Schmidt y Walter, 1994).

Las vías de señalización mediadas por NO independientes de GMPc se denominan reacciones de nitrosación (Hausladen *et al.*, 1998). En este caso, el NO actúa sobre proteínas (receptores, canales iónicos, enzimas y factores de transcripción) que poseen metales de transición y/o residuos de tiol y tirosina, estratégicamente situados a cada sitio alostérico o activo (Stamler, 1994).

2.1.2. Modificaciones post-traduccionales por óxido nítrico.

El óxido nítrico ejerce su acción principalmente a través de modificaciones post-traduccionales, tales como la S-nitrosilación y la nitración de tirosinas, modificaciones que pueden regular la función de las proteínas diana (Astier y Lindermayr, 2012).

La nitración de tirosinas proteicas, que está mediada principalmente por el peroxinitrito (ONOO⁻), consiste en la adición de radicales NO₂ a uno de los dos orto-carbonos equivalentes del anillo aromático de los residuos de tirosina generando 3-nitrotirosina (Gow *et al.*, 2004 ; Radi, 2004). Esta modificación puede provocar una ganancia, pérdida o ningún cambio en la función de la proteína (Souza *et al.*, 2008; Radi, 2013).

La S-nitrosilación consiste en la adición de un grupo NO a un tiol de cisteína que conduce a la producción de S-nitrosotioles (SNOs). Esta modificación, también puede alterar la función de una amplia variedad de proteínas (Hess *et al.*, 2005; Astier *et al.*, 2011).

2.2. Ácidos grasos nitrados (NO₂-FA) o nitroalquenos.

En este trabajo nos vamos a centrar en el estudio de los ácidos grasos insaturados nitrados (NO₂-FA), también conocidos como nitroalquenos o nitrolípidos. Estos actúan como mediadores de señalización del óxido nítrico, son químicamente más estables y tienen un tiempo de vida más largo, siendo excelentes moléculas en procesos de señalización celular (Geisler y Rudolph, 2012). Otro aspecto a tener en cuenta es que la conjugación de los dobles enlaces promueve reacciones de adición de radicales, haciendo a estos ácidos grasos conjugados mucho más reactivos en las reacciones de oxidación y nitración (Huyser *et al.*, 1966). Además son moléculas con potentes propiedades a nivel antiinflamatorio y cardiovascular (Mata-Pérez *et al.*, 2016).

2.2.1. Formación de los ácidos grasos nitrados.

Las especies reactivas tanto de oxígeno (ROS) como de nitrógeno (RNS) procedentes del estrés oxidativo y nitrosativo se consideraban inicialmente compuestos tóxicos, pero ahora se sabe que son mediadores de señalización que promueven una amplia gama de modificaciones en proteínas, ADN, aminoácidos y ácidos grasos insaturados (Baker *et al.*, 2004; Finkel, 2003).

Existen varias aproximaciones experimentales para la síntesis de ácidos grasos insaturados nitrados (Figura 1), como son la nitroselenación, la nitración en medio ácido y oxidación tanto por peroxinitrito como por otras especies derivadas del óxido nítrico. Aunque aún se desconoce el mecanismo de formación de nitrolípidos *in vivo* (Rubbo y Radi, 2008), pero numerosos trabajos *in vitro* señalan que las vías más probables involucran la reacción de los ácidos grasos con NO₂ (dióxido de nitrógeno), ONOO⁻, NO[•] o NO₂⁻ (nitrito) en medio ácido (Freeman *et al.*, 2008). En la actualidad se han descrito distintas hipótesis sobre las vías de formación de estas moléculas *in vivo*:

- El NO₂ es un potente agente oxidante y nitrante, que puede proceder de la autooxidación del óxido nítrico, especialmente en compartimentos hidrofóbicos (Fukuto *et al.*, 2012), de la homólisis del peroxinitrito o de la acidificación del nitrito a ácido nitroso a bajo pH (pH<4) (Trostchansky *et al.*, 2009), el cual produce en medios acuosos dióxido de nitrógeno (NO₂), trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y tetróxido de dinitrógeno (N₂O₄), todos ellos candidatos para mediar la reacción de nitración (Baker *et al.*, 2009). El dióxido de nitrógeno reacciona mediante un ataque al doble enlace

produciendo un radical β -nitroalquilo el cual bajo condiciones de baja tensión de oxígeno, reacciona con otra molécula de dióxido de nitrógeno formando un dinitroalcano y/o un nitro-nitrito alcano, intermediarios inestables que se descomponen a nitroalquenos. Alternativamente, la hidrólisis de los alcanos nitrogenados puede promover la formación de nitro-alcoholes (derivado nitrohidroxilo). Por el contrario, en ambientes con alta tensión de oxígeno predominarán reacciones de peroxidación lipídica (Figura 1) (Rubbo *et al.*, 2009).

- Otro mecanismo de nitración de los ácidos grasos es a través del peroxinitrito. Este se forma a partir de la reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido. El peroxinitrito junto con el ácido peroxinitroso son potentes oxidantes que pueden llevar a cabo la nitración de los ácidos grasos insaturados, siendo esta favorecida a bajas tensiones de oxígeno (Figura 1) (Rubbo *et al.*, 2009).
- La adición iónica del ión nitronio es otro mecanismo de formación de nitroalquenos por sustitución electrofílica en el doble enlace. Este ión nitronio se pueden formar a través de reacciones de transición metálica con el peroxinitrito (Figura 1) (Trostchansky y Rubbo, 2008).

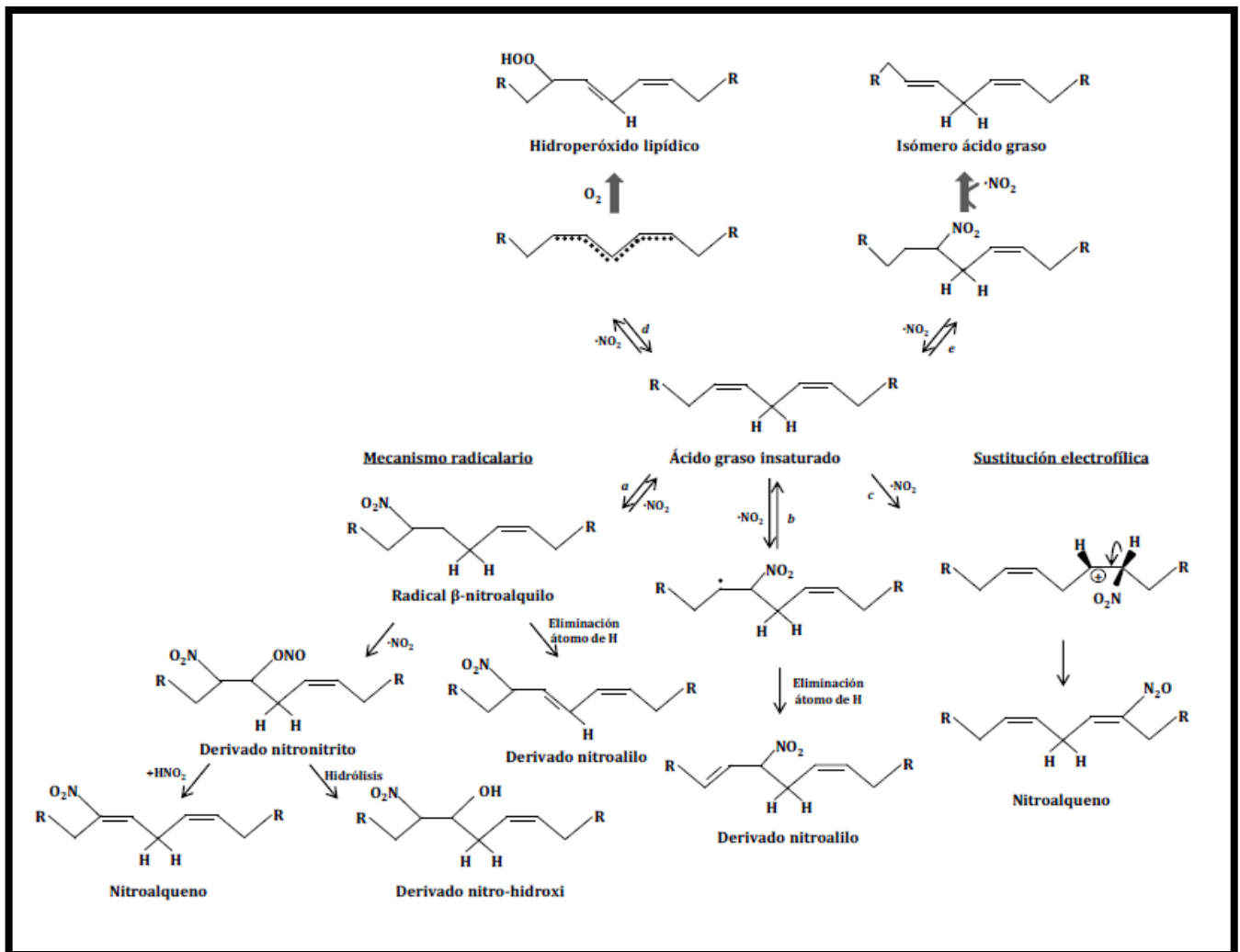


Figura 1. Síntesis de ácidos grasos nitrados (figura extraída de Trostchansky y Rubbo, 2008).

2.2.2. Propiedades biológicas de los ácidos grasos nitrados.

Las principales funciones biológicas de los ácidos grasos nitrados son:

- Capacidad de liberación de óxido nítrico ($NO^\cdot$). Los ácidos grasos nitrados pueden actuar como potentes donadores de $NO^\cdot$, capacidad que le ha otorgado a estas moléculas una función señalizadora (Faine *et al.*, 2010). Básicamente se han propuesto dos mecanismos para la liberación de NO en medio acuoso:
 - Una reacción de Nef modificada que involucra principalmente la formación de un intermediario nitroso que rápidamente decae para liberar HNO o NO (Geisler y Rudolph, 2012).

- Un reordenamiento del nitroalqueno a éster de nitrito seguido de una homólisis del enlace N-C para formar NO y el correspondiente grupo enol (Geisler y Rudolph, 2012).
- Estabilidad hidrofóbica. Los ácidos grasos nitrados son altamente estables en polietilenglicoles, alcoholes y otros solventes orgánicos menos polares. Por tanto, los nitroalquenos son estables en ambientes hidrofóbicos como las membranas celulares y las lipoproteínas, sirviendo así como reservorios endógenos (Freeman *et al.*, 2008).
 - Formación de aductos de Michael: nitroalquilación (Figura 2). La característica más sorprendente de estos ácidos grasos nitrados es su carácter electrofílico, es decir, son moléculas pobres en electrones que se encuentran atraídas por los nucleófilos, que son moléculas ricas en electrones (Chattaraj *et al.*, 2006). Por tanto, estos ácidos grasos nitrados pueden producir modificaciones post-traduccionales (Geisler y Rudolph, 2012). Debido a su estructura, el β -carbono adyacente al carbono unido al grupo nitro (α -carbono), tiene carácter de electrófilo débil y representa una diana excepcional para el ataque nucleofílico (Schopfer *et al.*, 2011). Esta reacción se denomina adición de Michael e implica la formación de un enlace covalente entre el nucleófilo y el electrófilo (Rudolph *et al.*, 2009). Esta reacción para los ácidos grasos nitrados se denomina específicamente nitroalquilación (Rubbo y Radi, 2008).

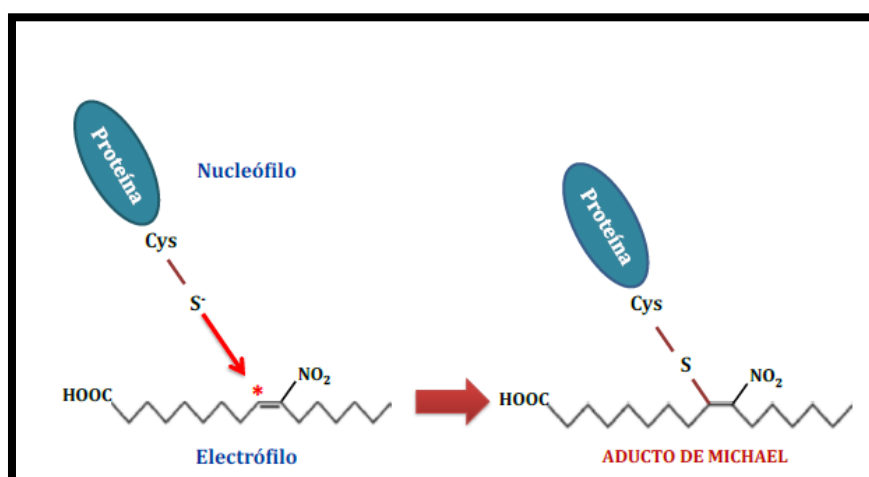


Figura 2. Reacción de nitroalquilación entre un nitroalqueno y el grupo tiol de la cisteína de una proteína (Figura extraída de Geisler y Rudolph, 2012).

Los principales nucleófilos biológicos son los grupos tiol de las cisteínas constituyentes de proteínas y del tripéptido antioxidante glutatión (GSH) que se

consideran nucleófilos débiles (están asociados a orbitales vacíos por lo que se polarizan y se oxidan más fácilmente) (Alexander *et al.*, 2006); las aminas primarias y secundarias de la lisina y la histidina que se consideran nucleófilos fuertes (son altamente electronegativos y más difíciles de polarizar) (Rudolph y Freeman, 2009). Los ácidos grasos insaturados nitrados reaccionan con residuos de cisteína e histidina, siendo éstas sus principales dianas (Rubbo and Radi, 2008). Hay que tener en cuenta que en sistemas biológicos no todos los grupos tioles (Cys-SH) de las cisteínas son capaces de reaccionar con electrófilos. Sólo el anión tiolato desprotonado de la cisteína (Cys-S⁻) es la especie reactiva más fácilmente sometida a oxidación o nitroalquilación (Netto *et al.*, 2007).

2.2.3. Ácido graso nitro-oleico (NO₂-OA).

El ácido graso nitro-oleico (NO₂-OA) pertenece a la familia de los ácidos grasos nitroalquenos electrofílicos formado por la reacción entre un ácido graso insaturado (ácido oleico), óxido nítrico (NO[•]) y nitrito (NO₂⁻), derivados del NO₂ que son promovidos por condiciones pro-oxidativas de inflamación.

El ácido oleico es un líquido oleoso e incoloro. Su fórmula química es C₁₈H₃₄O₂. Es un ácido graso monoinsaturado, es decir, que tiene sólo un doble enlace en su estructura química, concretamente en el carbono 9, por ello, pertenece al grupo de los omega 9 (ω-9) (Naik *et al.*, 1995).

En este trabajo utilizaremos este nitroalqueno por su gran abundancia en la naturaleza con respecto a los demás nitroalquenos y debido a su importancia biológica en numerosos procesos (Tabla 1) (Mata-Pérez *et al.*, 2016).

Tabla 1. Acción biológica del ácido graso nitro-oleico.

Nitroalqueno	Acción biológica	Referencia
NO ₂ -OA	Asociación directa proteína/membrana	(Gorcynski <i>et al.</i> , 2007)
	Inhibición del estímulo inflamatorio inducido por liberación de citoquinas	(Cui <i>et al.</i> , 2006)
	Inhibición de la expresión de genes mediados por NF-κB	(Wright <i>et al.</i> , 2006)
	Activación de PPARγ	(Lima <i>et al.</i> , 2003)
	Incremento del consumo de glucosa y la sensibilidad a la insulina	(Lima <i>et al.</i> , 2003)
	Inhibición de metaloproteinasas de la matriz (MMP)	(Bonacci <i>et al.</i> , 2011)
	Inhibición de la Keap1	(Kansanen <i>et al.</i> , 2011)
	Inhibición de GADPH	(Batthyany <i>et al.</i> , 2006)
	Inhibición del receptor de angiotensina	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
	Inhibidor de la xantina-oxidorreductasa	(Kelley <i>et al.</i> , 2008)
	Inhibición de epóxido hidrolasa soluble	(Charles <i>et al.</i> , 2011; Charles <i>et al.</i> , 2014)

2.3. Peroxirredoxinas.

Las peroxirredoxinas (Prxs) son una familia ubicua de enzimas antioxidantes que controlan los niveles de peróxido inducido por citoquinas, y en consecuencia, median en la transducción de señales en células de mamíferos (Rhee *et al.*, 2005).

Las Prxs son peroxidases que se encuentran en todos los organismos con la única excepción, de *Borrelia burgdorferi* y otras especies de *Borrelia*. Los mamíferos expresan seis tipos de proteínas Prx diferentes a partir de genes distintos (Prx I-Prx VI) (Veal *et al.*, 2007), y *E. coli* expresa tres (AhpC, Tpx y BCP) (Link *et al.*, 1997).

En bacterias, la principal función de la Prx consiste en mantener unos niveles intracelulares apropiados de H₂O₂ (Seaver y Imlay, 2001). En plantas, protegen el aparato fotosintético del daño oxidativo (Rouhier y Jacquot, 2005). En mamíferos, están implicadas en la regulación de procesos tales como la proliferación celular, la diferenciación, la muerte

celular y la señalización intracelular (Kang *et al.*, 2005; Veal *et al.*, 2007; Poole y Nelson, 2008). También se ha demostrado que estas proteínas se expresan de forma aberrante en el cáncer, afectando a la sensibilidad de las células a la radiación (Zhang *et al.*, 2009).

Actualmente, en mamíferos la familia de las Prx está constituida por seis subfamilias que presentan diferentes características estructurales y cinéticas (Soito *et al.*, 2010). Pero basándonos en el número de residuos de Cys que participan en la catálisis, se dividen en dos grupos:

- Prx 2-Cys, presentan dos residuos de cisteína que están directamente involucrados en la actividad enzimática, una actuando como peroxidática (Cp) y la otra como resolutive (CR).
- Prx 1-Cys, son aquellas que solo contienen un residuo de Cys, la cual actúa como peroxidática, careciendo de la Cys resolutive (Wood *et al.*, 2003).

2.3.1. Ciclo catalítico de las peroxirredoxinas.

A pesar de las diferencias estructurales y cinéticas, todas las Prxs comparten el mismo ciclo catalítico basado en un residuo conservado activo de cisteína, la Cys peroxidática (Cp), cuya función es reducir directamente los peróxidos.

El ciclo catalítico se puede dividir en tres etapas: la peroxidación, la resolución y el reciclado. En el primer paso, la Cp-S⁻ es oxidada a un ácido sulfénico (Cp-SOH) por el sustrato peróxido; en el segundo paso, se forma un disulfuro entre Cp y una segunda Cys resolutive (CR) proporcionada por la misma proteína (mecanismo de 2-Cys atípico) o por otra proteína (mecanismo de 2-Cys típico) o pequeña molécula (mecanismo 1-Cys). Por último, en el tercer paso, el reciclaje se produce por la reducción del disulfuro por otra proteína o una pequeña molécula tiol regenerándose los tioles libres, CP-SH y CR-SH (Figura 3) (Hall *et al.*, 2011).

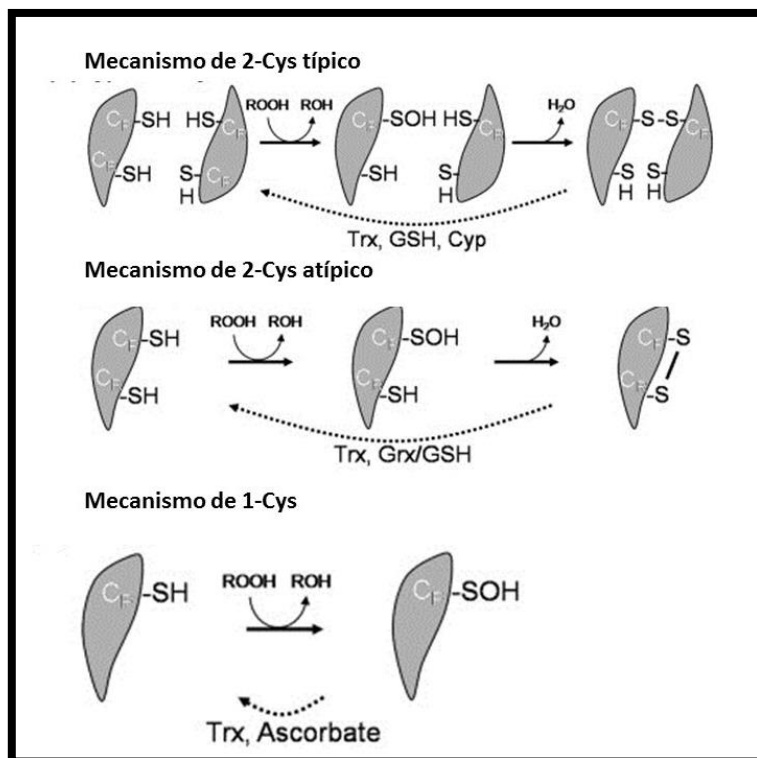


Figura 3. Mecanismos de acción de las peroxirredoxinas (Barranco-Medina *et al.*, 2009).

2.3.2. Peroxirredoxina 1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

La peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Prx1p) se encuentra codificada por el gen YBL064C ORF. La secuencia completa contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 6, 38, y 91 (Figura 4). Al estudiar las propiedades moleculares y bioquímicas de la Prx1p, se obtuvieron tres formas recombinantes.

- N21Prx1p, la cual fue diseñada de acuerdo a una matriz mitocondrial prediciendo el sitio de corte de la peptidasa entre Q21 y A22.
- N21 (S) Prx1p forma sintetizada por una mutagénesis dirigida, donde la Cys38 ha sido sustituida por serina.
- N39Prx1p forma recombinante que carece de los primeros 38 residuos, (Pedrajas *et al.*, 2000; Pedrajas *et al.*, 2010).

En realidad, el extremo N-terminal de la Prx1p madura presente en la matriz mitocondrial comienza en el residuo 39 como se ha determinado experimentalmente. Por lo tanto, la

proteína madura sólo contiene una cisteína, la Cys91 (Vögtle *et al.*, 2009). Concretamente para este trabajo se ha utilizado la forma N39Prx1p.

Este tipo de peroxirredoxina presenta la peculiaridad de poseer una sola cisteína en la secuencia, cisteína que es la encargada de llevar a cabo el ciclo catalítico, es decir, este residuo actúa como peroxidática (Kumar *et al.*, 2011).

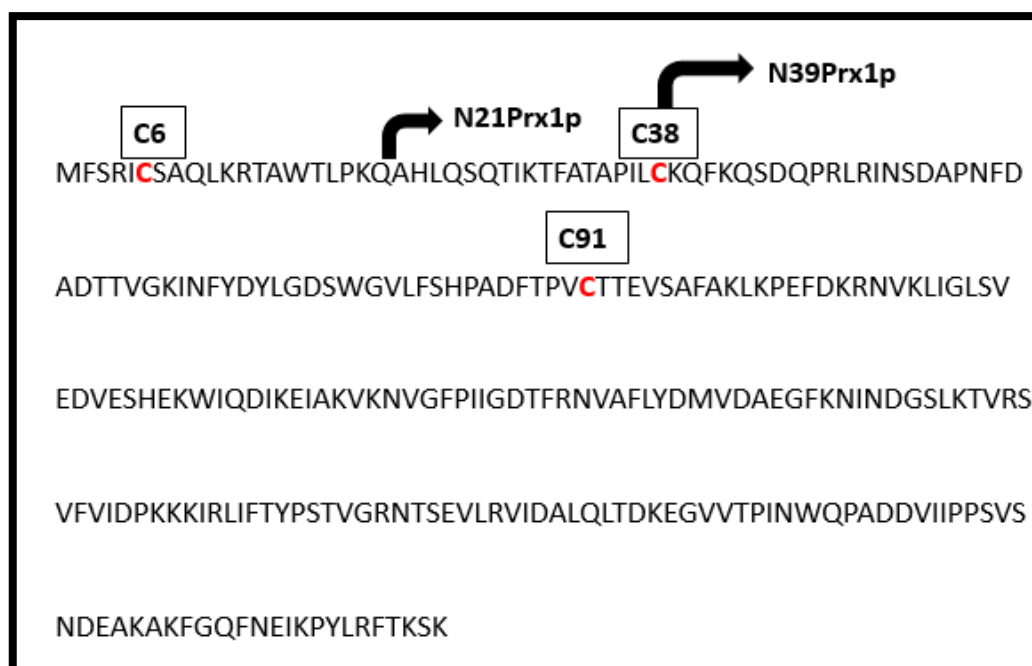


Figura 4. Secuencia de aminoácidos de las tres posibles formas recombinantes que codifican la peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.2.1. Ciclo catalítico de la peroxirredoxina 1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este caso, el ciclo catalítico consta también de tres etapas, pero debido a la existencia de una sola Cys, la cual es la peroxidática (Cp), la Cys resolutive (CR) es proporcionada por otra proteína o pequeña molécula. Estudios sobre ello, han demostrado que la tiorredoxina 3 mitocondrial (Trx3p), junto con la tiorredoxina reductasa 2 (TrxR2p), apoyan la actividad de la peroxirredoxina 1 de *S. cerevisiae* *in vitro* (Pedrajas *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios evidencian que la Trx3p no está implicada en el mecanismo *in vivo* (Greetham y Grant, 2009). Concretamente, lo que ocurre es que los peróxidos oxidan la cisteína formando ácido sulfónico, que luego pueden ser glutatiónilado a través de una

reacción con GSH. Este disulfuro mixto es un sustrato para la reducción por TrxR2p, que produce la regeneración de la Prx1 (etapa de reciclaje) (Pedrajas *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consistió en el análisis de la modulación funcional por nitroalquilación mediada por lípidos nitrados del sistema antioxidante constituido por la peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Para llevar a cabo este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Síntesis del ácido graso insaturado nitrado: ácido nitro-oleico (NO₂-OA).
- Obtención del sistema antioxidante, peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Identificación de las dianas de nitroalquilación de la peroxirredoxina 1 mitocondrial.
- Determinación del efecto producido por el ácido graso nitrado en la actividad del sistema antioxidante.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Síntesis de la peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.

La síntesis de la peroxirredoxina 1 mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Pedrajas *et al.* (2016). Para ello, se desarrolló un cultivo de *E. coli*, transformada con el vector de expresión pET15b-N39PRX1, en 250 mL de medio LB con 50 mg/mL de ampicilina, a 25° C y agitación. En la fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ = 0,5) se añadió IPTG (0,5 mM) y se continuó incubando a 25° C durante una noche.

Tras la incubación se recolectaron las células de *E. coli* por centrifugación a 5000xg durante 15 minutos a 4° C. El precipitado de células se disolvió en 10 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8, conteniendo NaCl 0,1M, 7 mg de lisozima y 150 µg de DNasa I. Seguidamente, las células se lisaron con un sonicador Bandelin Sonoplus HD 2070 MS 72 Titanium microtrip, durante 30 minutos a la máxima potencia permitida en pulsos de 1 segundo, utilizando un baño de agua-hielo para mantener la muestra en frío. El homogenado se centrifugó a 12000xg durante 15 min y el sobrenadante (ELC, extracto libre de células), tras filtrarlo, se pasó a través

de una columna IMAC (TALON Metal Affinity, Clontech), de 3 x 1 cm, equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 0,1M. La columna fue lavada con dicho tampón conteniendo imidazol 5mM y, finalmente, la proteína recombinante Histag-N39Prx1 se eluyó con TrisHCl 20 mM, pH 8 conteniendo NaCl 0,1M e imidazol 100mM. El flujo de la cromatografía fue de 1 mL/min.

Seguidamente, para eliminar la cola de histidina se añadió 1 U de trombina por mL de disolución de proteína purificada y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Finalmente, la preparación se dializó (membranas Spectrapor 1) frente a tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8 con NaCl 0,1M. La concentración de la proteína purificada se determinó en función de su coeficiente de extinción a 280nm ($\epsilon = 23950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2. Síntesis del ácido graso nitro-oleico.

Para la realización de este trabajo hemos sintetizado el ácido graso nitro-oleico según publicaciones anteriores (Baker *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2006) con una serie de modificaciones. Se trata de un proceso de nitroselenación. Para ello, se añadieron cloruro de mercurio (0.2407 g, 0.88 mmol), bromuro de fenilselenio (9 mg, 0.388 mmol) y nitrito sódico (48 mg, 0.7092 mmol) a una solución de ácido oleico comercial (Sigma) (0.1 g, 0.3546 mmol) en tetrahidrofurano: acetonitrilo (1:1, 11.7 ml). Esta mezcla se introdujo en un baño con hielo, alcanzándose una temperatura de unos -14 °C, durante 4 horas, a continuación, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos (todo ello en atmósfera de argón y en agitación). Tras este tiempo de incubación, la mezcla se filtró y el solvente se eliminó mediante vacío. El residuo resultante se resuspendió en tetrahidrofurano (2.2 ml), siempre bajo una atmósfera de argón. Una vez disuelto, se introdujo en un baño con hielo (0 °C) durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió peróxido de hidrógeno (0.4 ml de una solución al 30 %, 3.67 mmol). Transcurrida 1 hora de incubación la muestra se retiró del baño y se dejó atemperar. A continuación, se extrajo la muestra lipídica con hexano (13,34 ml) y, posteriormente, se lavó con una solución saturada de cloruro sódico. Para eliminar cualquier resto de agua que pudiera quedar en el extracto se añadió sulfato de magnesio hasta que este deje de formar grumos, producidos por la combinación con el agua. La muestra se filtró y el solvente se eliminó mediante vacío. El producto obtenido se resuspendió con una mezcla de solventes hexano: éter: ácido acético (80:20:1, v:v:v). El producto se purificó mediante una columna cromatográfica de sílica gel 60 (dimensiones de las partículas de sílica: 0,040; 0,8; 0,063mm), usando como solventes hexano: éter: ácido acético (80:20:1, v:v:v). Las diferentes fracciones se analizaron mediante cromatografía en capa fina sobre placas analíticas de sílica gel 60

desarrolladas en una mezcla de hexano: éter: ácido acético (70:30:1, v:v:v). Los productos lipídicos se visualizaron revelando las placas cromatográficas con yodo. Las fracciones que contenían el ácido graso nitro-oleico se combinaron y se eliminó el solvente en un rotavapor. A continuación, el producto evaporado se resuspendió en una mezcla de hexano: éter: ácido acético (70:30:1, v:v:v) y se realizó una TLC (cromatografía en capa fina) preparativa. Una vez desarrollada en el mismo sistema de solventes que en el que se disolvió la muestra, se reveló con luz ultravioleta y se observó la presencia de dos bandas. Las bandas correspondientes al nitro-oleico se rasparon, se extrajeron con éter, se evaporaron y se disolvieron en cloroformo deuterado para su análisis mediante RMN (resonancia magnética nuclear). El RMN nos permite comprobar que el ácido nitro-oleico sintetizado no está contaminado por otros residuos. Para el análisis de RMN se contó con la orientación del Dr. Manuel Melguizo Guijarro del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Jaén.

4.3. Tratamiento de la peroxirredoxina recombinante de *Sacharomyces cerevisiae* (Prx1p) con el ácido graso nitro-oleico.

El tratamiento de la peroxirredoxina recombinante con el ácido graso nitro-oleico se realizó en una proporción 1:5, utilizando las concentraciones de 10, 20, 40 y 50 μM de peroxirredoxina y las concentraciones de 50, 100, 200 y 250 μM de ácido graso nitro-oleico. Previamente a la incubación con el ácido graso nitrado, la peroxirredoxina, que se encontraba en un tampón HEPES (HEPES 50mM, pH 8), fue tratada con TECP 1mM (tris 2-carboxietil fosfina) durante 10 minutos en agitación, el cual es un agente reductor que rompe los puentes de disulfuro existentes entre las peroxirredoxinas, con el objeto de tener la proteína en forma monomérica.

Para eliminar el exceso del agente reductor las muestras fueron sometidas a una filtración por columnas (Protein Desalting Spin Columns, Thermo Scientific). Estas columnas previamente deben equilibrarse, para ello, primero se realiza una centrifugación a 1500xg durante un minuto para eliminar el líquido que las conserva, y después debemos añadir 400 μl del tampón HEPES 50mM, pH 8 y centrifugar a 1500xg durante un minuto, siendo necesario repetir este último proceso dos veces más. Tras equilibrarla, se filtra la muestra centrifugándola a 1500xg durante dos minutos.

A continuación, se añaden a las distintas concentraciones de Prx las diferentes concentraciones de nitrolípido indicadas anteriormente. Como control negativo se utilizó una

muestra de Prx (10 μ M) tratada con metanol (el mismo volumen que se añadió de nitrolípido, 5 μ l), ya que, el ácido graso nitrado iba disuelto en este compuesto.

4.3.1. Análisis de la actividad enzimática.

La determinación de la actividad enzimática se realizó espectrofotométricamente a 340 nm. Para ello, a las distintas muestras de peroxirredoxina, tratadas con diferentes concentraciones de ácido graso nitro-oleico como se ha mencionado en el apartado anterior, se le añadió NADPH 250 μ M, glutatión (GSH) 500 μ M, tiorredocina reductasa (TRR) 0,5 μ M, tiorredoxina (TRX) 5 μ M y en última instancia el sustrato, H₂O₂ 100 μ M, en un volumen total de 100 μ l. La actividad enzimática se expresó en mU de actividad enzimática por mg de proteína (mU/mg).

4.3.1.1. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa STATGRAPHICS Centurion, y los datos se analizaron mediante la prueba de la t de Student. Los datos se expresan como la media $\pm$ S.E.M. (error estándar de la media) y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,001$ (*).

4.3.2. Detección e identificación de la nitroalquilación mediante el análisis LC/MS/MS.

4.3.2.1. Digestión.

Se utilizaron 10 μ g de proteína de cada una de las siguientes muestras: 1) Prx1p 10 μ M+metanol; 2) Prx1p 10 μ M + 50 μ M de NO₂-OA; 3) Prx1p 20 μ M + 100 μ M de NO₂-OA; 4) Prx1p 40 μ M + 200 μ M de NO₂-OA; 5) Prx1p 500 μ M + 250 μ M de NO₂-OA. Para digerir las proteínas se añadió quimotripsina en ácido clorhídrico (HCl) 1mM (relación de enzima/proteína 1:20, 2,5 μ l de enzima 1mg/ml + 50 μ l de muestra) y se incubó durante 16 horas a 37°C en una estufa y agitación.

La quimotripsina es una enzima digestiva que puede realizar proteólisis. Está formada por una cadena polipeptídica de 245 residuos, con cinco enlaces disulfuro (-S-S-). Las dianas de la quimotripsina son fenilalanina (F), triptófano (w) y tirosina (Y) (Figura 5).

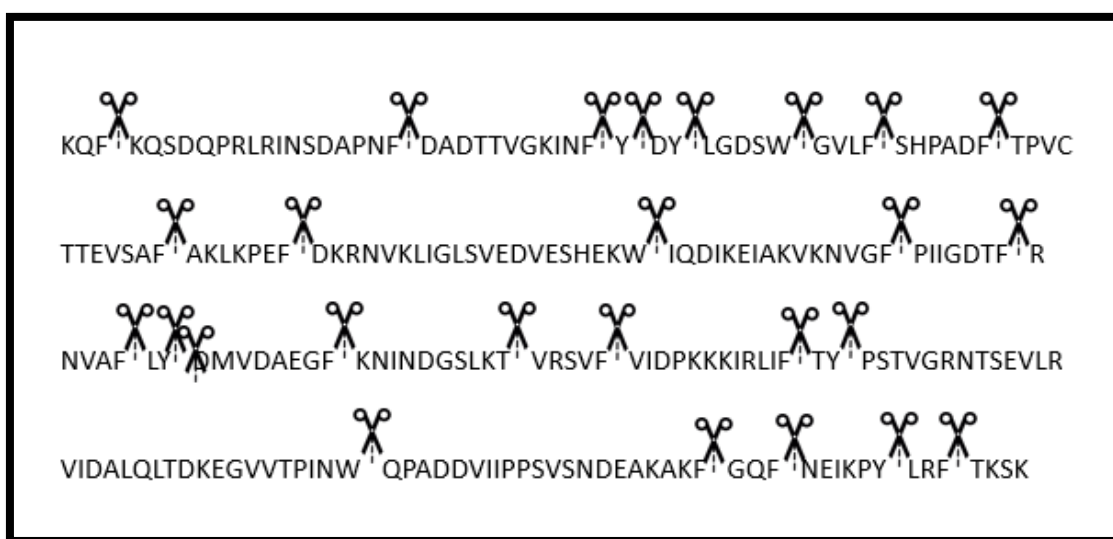


Figura 5. Péptidos generados por la digestión de la quimotripsina sobre la secuencia de la peroxirredoxina de *Saccharomyces cerevisiae* (Prx1p).

4.3.2.2. Desalado mediante columnas C18 por centrifugación.

Tras el tratamiento con quimotripsina, las muestras se desalaron utilizando columnas C18. El primer paso es activar las columnas, para ello, se añaden 200µl de la solución de activación (metanol 50%) y se centrifuga a 1500xg durante un minuto. Este paso se vuelve a repetir una vez más.

Continuamos con el equilibrado de la columna, adicionando 200µl de la solución de equilibrado (ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% y acetonitrilo (ACN) al 5%) centrifugando a 1500xg durante un minuto. Este paso también hay repetirlo una vez más.

A continuación, se añaden las muestras y centrifugamos a 1500xg durante un minuto. De manera que, nuestra proteína de interés se quedará retenida en la resina, separándose así de otras moléculas. Este paso también se vuelve a repetir para asegurarnos de que la proteína de interés se encuentra retenida.

Después añadimos 200µl de la solución de lavado (ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% y acetonitrilo (ACN) al 5%) y centrifugamos a 1500xg durante un minuto. Este paso se repite una vez más.

Finalmente se añaden 20µl del tampón de elución (acetonitrilo (ACN) al 70%) y se centrifuga a 1500xg durante un minuto, repitiendo el proceso una vez más.

El eluido obtenido se evaporó y se resuspendió en 35µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 1% y se centrifugó a 15000xg durante 5 minutos.

4.3.2.3. Secuenciación de péptidos mediante el CL-MS/MS.

Las muestras se inyectaron en un sistema cromatográfico equipado con una columna de pre-concentración C18 (75 µm id (diámetro interno) x 2 cm y un tamaño de partícula de 3µm) y una columna analítica (75 µm id (diámetro interno) x 50 cm y un tamaño de partícula de 2µm). Los péptidos se cargaron en la columna de pre-concentración utilizando 1 % de ácido fórmico como solvente. Los péptidos se eluyeron directamente a la columna analítica con un flujo de 200 nl/min utilizándose un gradiente de 8-65 % de ACN /0.1 % de ácido fórmico en 130 min. El sistema cromatográfico se conectó on-line a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher) realizándose el análisis en modo de barridos dependientes: un barrido completo utilizando el Orbitrap con una resolución de 70000 y 15 barridos de MS/MS (15 en modo HCD) sobre los precursores más abundantes.

4.3.2.4. Análisis de los datos de secuenciación.

La identificación de los péptidos en bases de datos se realizó utilizando el software Protein Discovery 1.4. de Thermo-Instruments, lo que permitió la obtención de los espectros de los productos de nitroalquilación.

La identificación positiva de los péptidos nitroalquilados se realizó a través de la búsqueda de los iones hijos que presentaban un incremento del peso molecular debido a la incorporación del nitro-oleico, lo que supone la adicción de 327 Da.

4.3.3. Análisis *in silico* de modelización molecular de la peroxirredoxina 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Prx1p).

El análisis *in silico* de modelización molecular de la peroxirredoxina 1 de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó con la colaboración del Dr. Francisco Javier López Jaramillo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

Para ello, la estructura tridimensional de la Prx1p de *S. cerevisiae* se modelizó en el programa Raptor X (<http://raptorex.uchicago.edu/>) utilizando como molde las estructuras de una

nueva enzima peroxidasa humana y la peroxirredoxina 6 de *Arenicola marina* (PDB: 1prx y 2v2g) (Choi *et al.*, 1998; Smeets *et al.*, 2008) con una identidad de 46,82% y 45,45%, respectivamente.

El análisis de la calidad de los modelos se llevó a cabo mediante el análisis estructural y el servidor de verificación (SAVES) en lo referente a la evaluación del entorno atómico no local (ANOLEA) (Melo y Feytmans, 1998), los perfiles tridimensionales mediante los programas Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997) y Procheck (Laskowski *et al.*, 1993).

La estimación del valor de pKa y el análisis de las interacciones se realizó con el programa PROPKA 3,1 (Olsson *et al.*, 2011). El algoritmo fue descrito originalmente por Li *et al.* (2005) como un método empírico muy rápido que permite conocer la estructura proteica basándose en la predicción de los valores de pKa en función de la estimación de los efectos de desolvatación y de las interacciones intraproteicas que provocan una modificación del valor de pKa estándar de los grupos ionizables.

5. RESULTADOS

5.1. Espectros de los productos de nitración del ácido oleico mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

Para apreciar mejor las características propias de los espectros del NO₂-OA hay que indicar que el procedimiento de síntesis empleado produce la nitración de carbonos vinílicos (carbonos adyacentes a un doble enlace), esto es, la sustitución del hidrógeno de un carbono vinílico por un grupo nitro.

Debido a la equivalencia en reactividad de los dos carbonos vinílicos del ácido oleico, su nitración genera dos isómeros de posición, uno con el grupo nitro (-NO₂) unido al carbono C(9) (que designaremos 9-NO₂-OA) y otro con el grupo nitro unido al carbono C(10) (que nombraremos 10-NO₂-OA) (Figura 6).

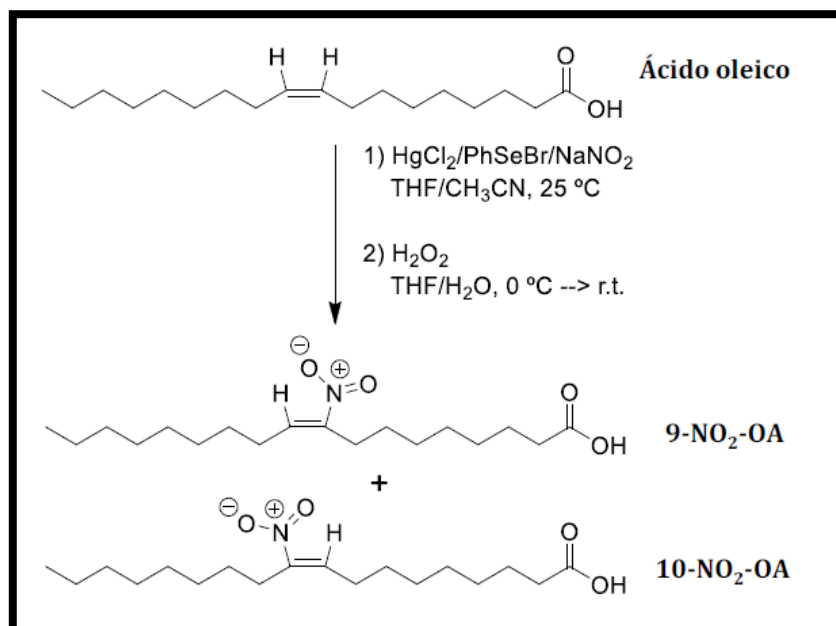


Figura 6. Isómeros resultantes de la nitración del ácido oleico.

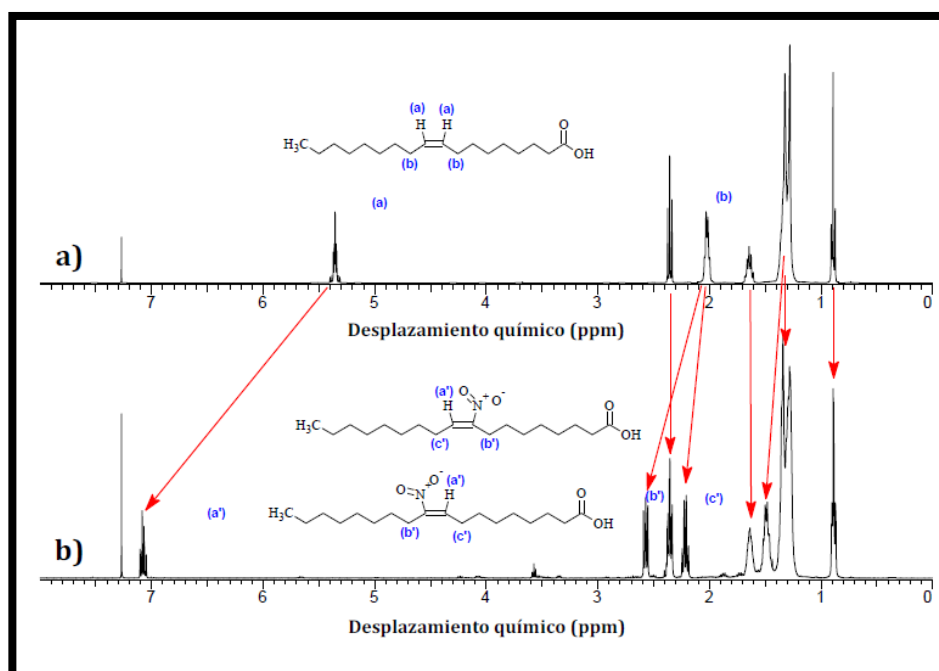


Figura 7. Comparación de los espectros de RMN de: a) ácido oleico; b) mezcla de isómeros del ácido nitro-oleico.

En la figura 7 se compara el espectro de RMN de cualquiera de los dos isómeros del ácido oleico nitrado con el espectro del ácido oleico, se puede apreciar el cambio estructural que produce la nitración. Ese cambio se manifiesta de forma más acentuada en las señales del espectro generadas por los grupos que están alrededor de la zona de nitración. Así, el único hidrógeno vinílico que queda en el ácido oleico nitrado experimenta un fuerte desapantallamiento debido a la vecindad del grupo nitro, que es un fuerte electrón-atrayente, de modo que la señal de ese hidrógeno aparece a 7.07-7.08 ppm, mientras que en el ácido oleico de partida aparecía a 5.36 ppm. La presencia del grupo nitro también da lugar a un importante desapantallamiento de los hidrógenos alílicos del ácido oleico nitrado, de modo que los hidrógenos alílicos de carbonos adyacentes al carbono nitrado desplazan su señal de resonancia desde 2.02 ppm (b) en el ácido oleico, hasta 2.57 ppm (b') en el nitro-oleico; el otro tipo de hidrógenos alílicos, los enlazados al carbono adyacente al C-H vinílico, se desplazan también desde 2.02 ppm (b) hasta 2.22 ppm (c') por efecto de la introducción del grupo nitro.

Los espectros de ambos isómeros nitrados (9-NO₂-OA y 10-NO₂-OA) son bastante similares, pues el patrón estructural de sustitución alrededor del grupo vinilo es muy similar para sus dos extremos, de modo que las diferencias originadas por introducción de un grupo nitro en uno u otro de los carbonos del grupo vinilo producen espectros muy parecidos. Nosotros hemos utilizado una mezcla de ambos isómeros debido a la dificultad de separarlos.

5.2. Actividad enzimática de la peroxirredoxina de *S. cerevisiae* (Prxp1).

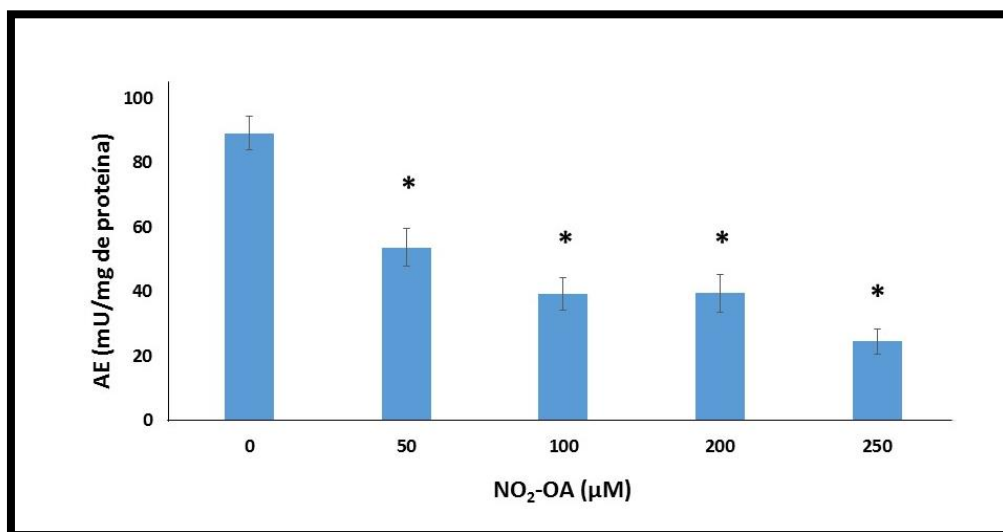


Figura 8. Actividad enzimática de la peroxirredoxina 1 mitocondrial de *S. cerevisiae* tras el tratamiento con diferentes concentraciones de ácido graso nitro-oleico: 0 (control), 50, 100, 200, 250 μM. Los valores que representan la actividad específica se muestran como la media de, al menos, tres experimentos independientes, expresándose en mU/mg de proteína, acompañado del error estándar de la media (S.E.M.) y un (*) cuando las diferencias entre tratamientos son significativamente diferentes desde un punto de vista estadístico ($p < 0,001$).

En la figura 8, podemos ver el efecto que produce la nitroalquilación de la peroxirredoxina de *S. cerevisiae*. La unión del ácido graso nitro-oleico a las dianas de nitroalquilación presentes en la enzima, provoca una disminución gradual de su actividad enzimática conforme se incrementan las concentraciones del ácido graso nitro-oleico. Concretamente, a la máxima concentración de nitro-oleico (250μM) se produce una disminución significativa de la actividad enzimática aproximadamente del 70% con respecto a la muestra control (Prx1p sin tratar con el nitrolípido), siendo esta disminución significativa desde un punto de vista estadístico. Además, las barras de error revelan que los resultados obtenidos son bastante homogéneos considerando cada tratamiento de manera individual.

5.3. Espectros del producto de nitroalquilación por el ácido graso nitro-oleico en la peroxirredoxina 1 mitocondrial de *S. cerevisiae*.

Tras la incubación de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *Saccharomyces cerevisiae* con distintas concentraciones de nitrolípido (NO₂-OA) se procedió a la digestión con quimotripsina y a la detección e identificación de las dianas nitroalquiladas mediante el análisis CL-MS/MS. En este caso, se apreciaron diferentes espectros que contenían distintos productos de nitroalquilación tal y como se describe a continuación.

En el primer caso, se identificó el péptido FSHPADF, que contenía la histidina 83, diana de nitroalquilación. Este péptido muestra susceptibilidad a la formación de los aductos de Michael (unión del ácido graso nitro-oleico a las aminas de la histidina) a partir de una concentración de NO₂-OA de 100µM. Tal y como observamos en la figura 9 (Paneles C, D y E), se aprecia un cambio en la masa molecular (MH⁺) del péptido, debido a la unión del NO₂-OA, el cual aporta 327 Da. La ruptura de este péptido generada por la ionización del ion precursor, genera una serie de iones hijos con carga positiva que corroboran que es la His 83 la que sufre la nitroalquilación, ya que, el ion hijo que contiene la diana de nitroalquilación también ve aumentada su masa en 327 Da, resultando el valor de 699,406 Da (372,166 Da + 327 Da). En cambio en los paneles A y B (Figura 9), en los que no se detectó nitroalquilación vemos que el peso molecular del ion hijo es de 372,166 Da.

Además, los péptidos modificados por NO₂-OA tienen una mayor hidrofobicidad, eluyendo con mayores tiempos de retención (RT) en comparación con los péptidos no modificados.

Aunque en este péptido la histidina 83 no se nitroalquila a una concentración de NO₂-OA 50µM, hemos obtenido resultados similares con el péptido SHPADF, el cual se encuentra incluido en el péptido anterior, en el que sí se detectó nitroalquilación tras el tratamiento con NO₂-OA 50µM.

A) 0 μ M NO₂-OA

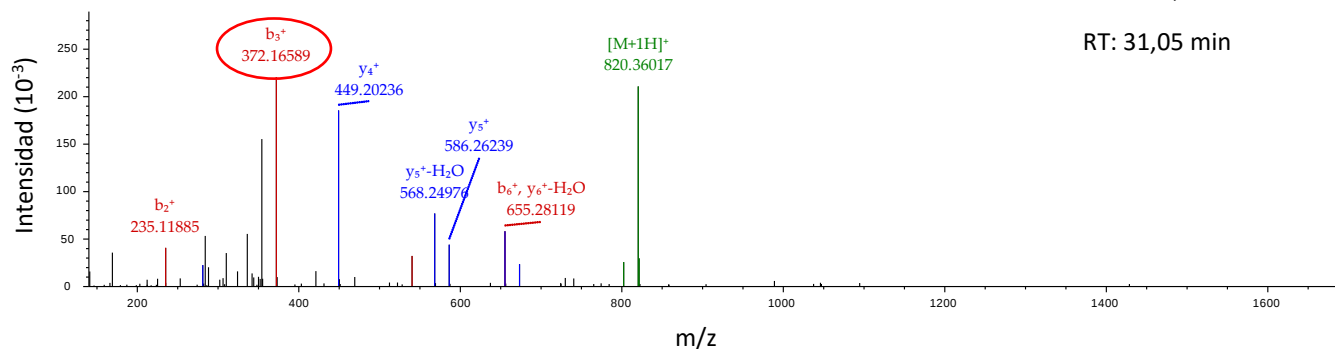
FSHPADF

His 83

Sin nitroalquilación

MH⁺: 820,36 Da

RT: 31,05 min



B) 50 μ M NO₂-OA

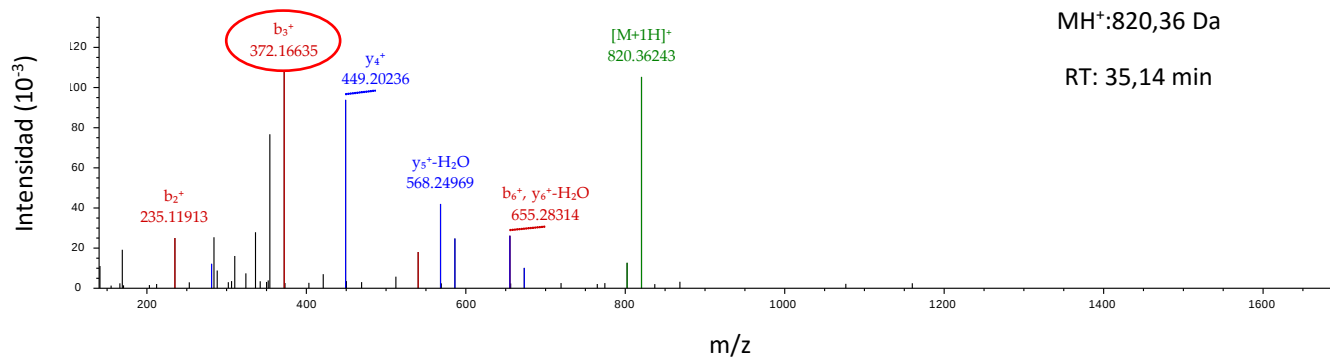
FSHPADF

His 83

Sin nitroalquilación

MH⁺:820,36 Da

RT: 35,14 min



C) 100 μ M NO₂-OA

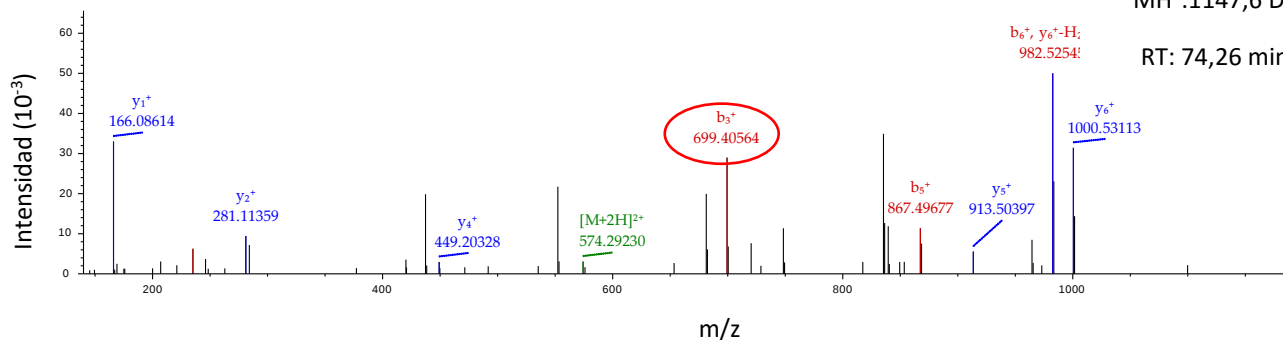
FSHPADF

His 83

Nitroalquilación

MH⁺:1147,6 Da

RT: 74,26 min



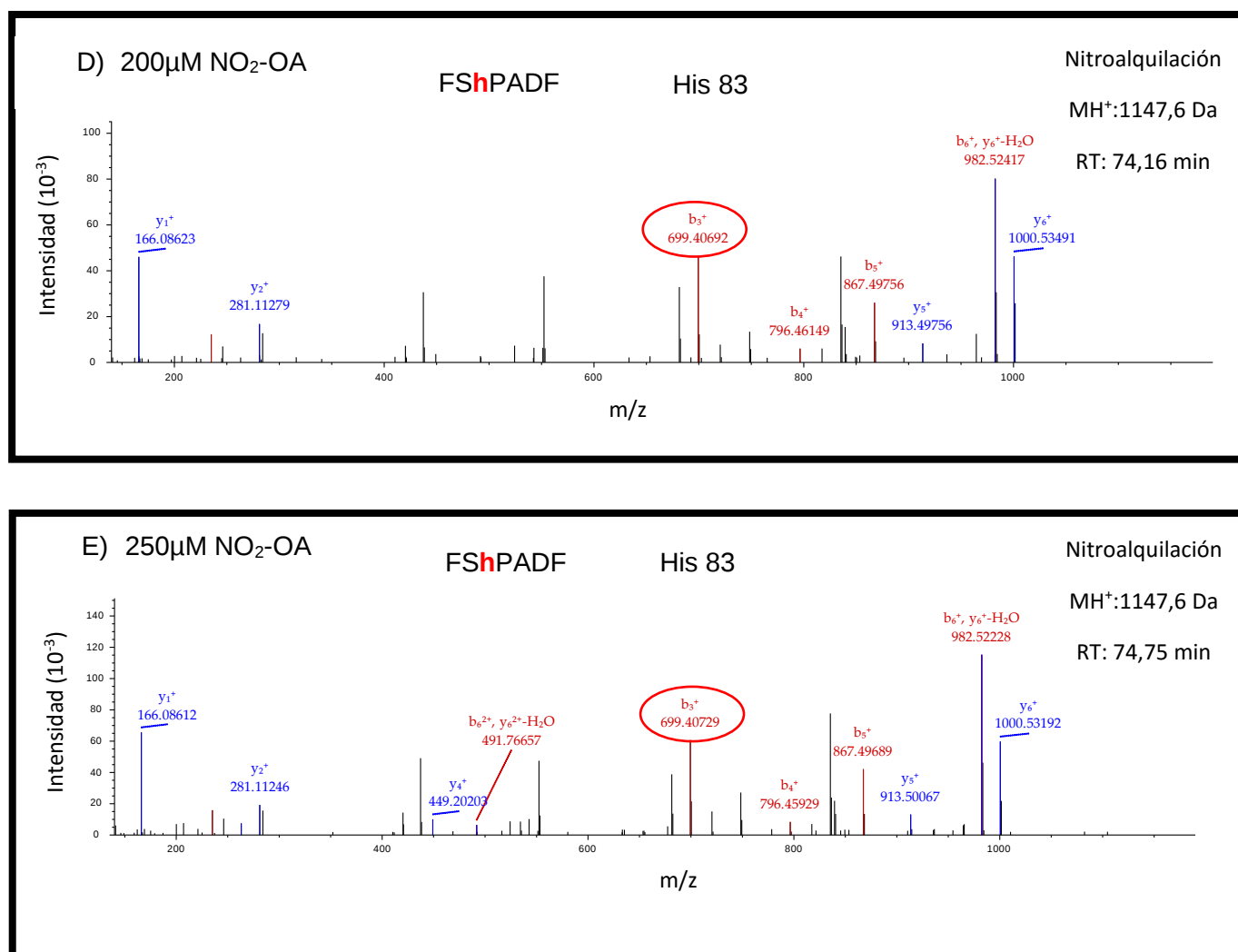
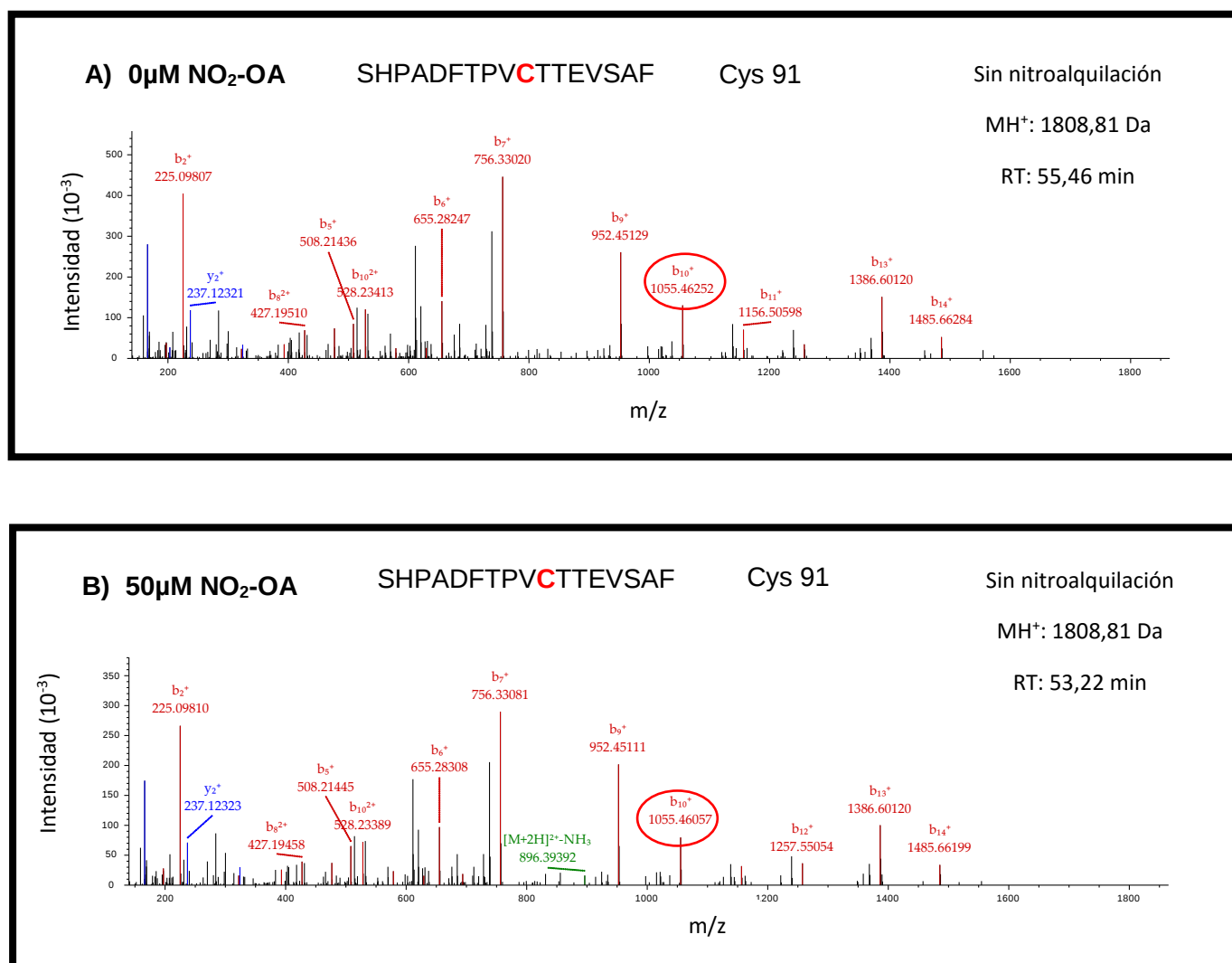


Figura 9. Comparación de los espectros obtenidos de un péptido (FSHPADF) por el análisis del LC-MS/MS. A) Espectro de la muestra control (peroxirredoxina tratada con metanol). B) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 50μM. C) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 100μM. D) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 200μM. E) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 250μM. Los iones de los fragmentos peptídicos están indicados con una “b” (color rojo) si la carga se encuentra retenida en el extremo N-terminal y con una “y” (color azul) si la carga se encuentra retenida en el extremo C-terminal, mientras que en color verde se encuentra representado el ion precursor que genera los iones hijos. El subíndice indica el número de residuos de aminoácidos en el fragmento considerado ya sea del extremo N-terminal o el extremo C-terminal. El superíndice indica la carga (+1 ó +2) del bloque de fragmentación. RT significa el tiempo de retención. MH⁺ representa el peso molecular del péptido+ una carga positiva. Con un círculo rojo se encuentra seleccionado el ion hijo que contiene la diana de nitroalquilación, siendo en este caso la histidina 83. El eje de la x está representado por la relación masa/carga (m/z) de los componentes del péptido. En la secuencia del péptido se encuentra resaltada (rojo y en negrita) la diana de nitroalquilación (His 83), la cual la vamos a encontrar en mayúscula cuando no se nitroalquile y en minúscula cuando se nitroalquile.

En la figura 10 se muestra un segundo péptido generado tras la digestión con quimotripsina (SHPADFTPVCCTTEVSAF) y analizado por CL-MS/MS. Este fragmento presenta una diana susceptible a la nitroalquilación, la Cys 91. Dicho proceso ocurre a concentraciones de NO₂-OA de 200 y 250 μM (Paneles D y E), puesto que únicamente en estos casos se observa un cambio en la masa molecular del péptido, debido a la unión del NO₂-OA, el cual aporta 327 Da adicionales. Dicho aumento de la masa molecular se corrobora en la masa del ion hijo que contiene la Cys 91, que pasa a ser de 1382,703 Da (1055,46 Da + 327 Da). Los paneles A, B y C, que se corresponden con las concentraciones de NO₂-OA de 0μM, 50μM y 100μM, en ellos vemos que el peso molecular del ion hijo es de 1055,46 Da, puesto que no se detecta nitroalquilación.

Además, los péptidos nitroalquilados tienen una mayor hidrofobicidad, eluyendo con mayores tiempos de retención (RT) en comparación con los péptidos no modificados.



C) 100 μ M NO₂-OA

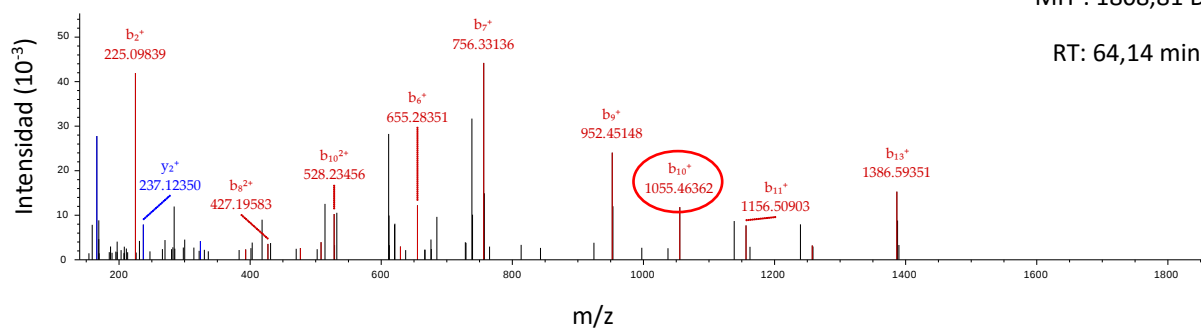
SHPADFTPV**C**TTEVSAF

Cys 91

Sin nitroalquilación

MH⁺: 1808,81 Da

RT: 64,14 min



D) 200 μ M NO₂-OA

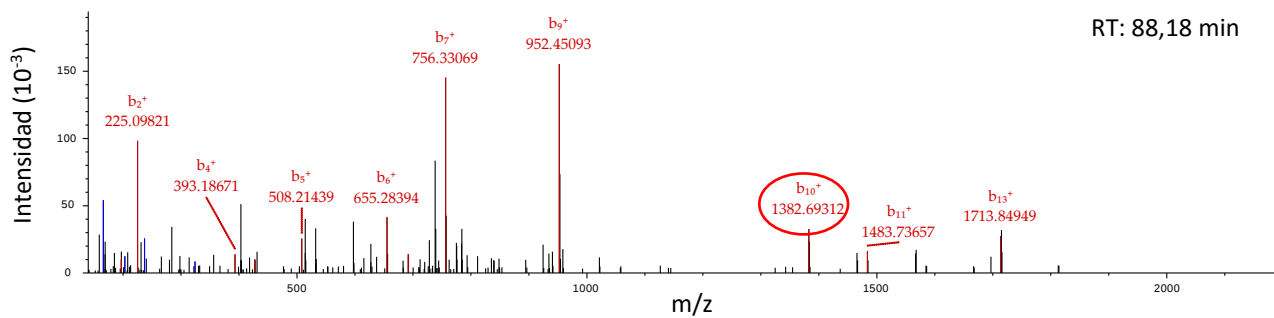
SHPADFTPV**C**TTEVSAF

Cys 91

Nitroalquilación

MH⁺: 2136,06 Da

RT: 88,18 min



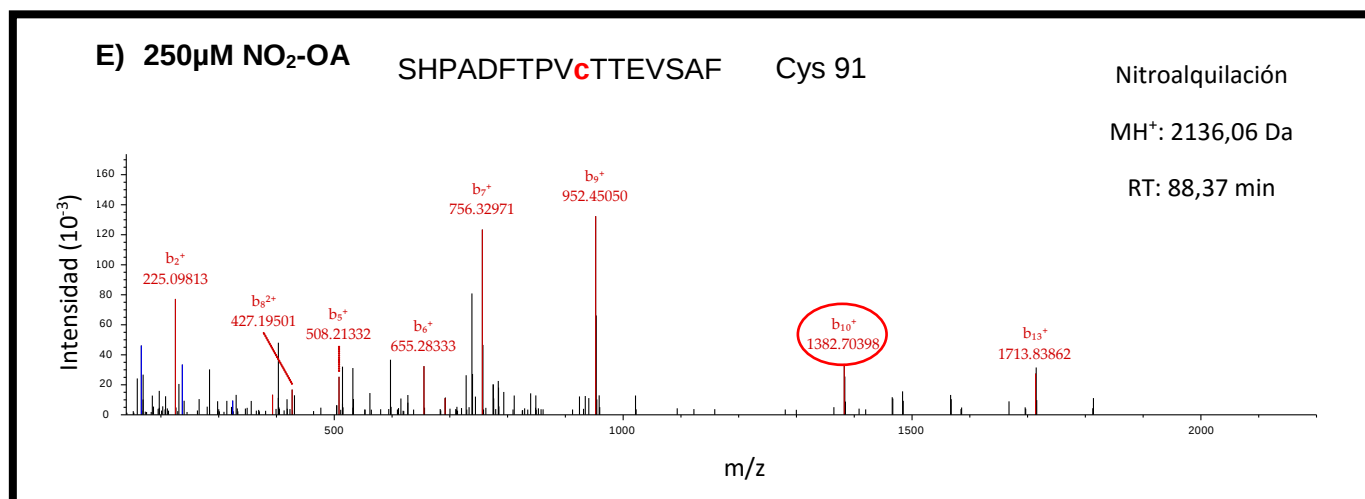


Figura 10. Comparación de los espectros obtenidos de un péptido (SHPADFTPVCTTEVSAF) por el análisis del LC-MS/MS. A) Espectro de la muestra control (peroxirredoxina tratada con metanol). B) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 50µM. C) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 100µM. D) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 200µM. E) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 250µM. Los iones de los fragmentos peptídicos están indicados con una “b” (color rojo) si la carga se encuentra retenida en el extremo N-terminal y con una “y” (color azul) si la carga se encuentra retenida en el extremo C-terminal, mientras que en color verde se encuentra representado el ion precursor que genera los iones hijos. El subíndice indica el número de residuos de aminoácidos en el fragmento considerado ya sea del extremo N-terminal o el extremo C-terminal. El superíndice indica la carga (+1 ó +2) del bloque de fragmentación. RT significa el tiempo de retención. MH⁺ representa el peso molecular del péptido+ una carga positiva. Con un círculo rojo se encuentra seleccionado el ion hijo que contiene la diana de nitroalquilación, siendo en este caso la cisteína 91. El eje de la x está representado por la relación masa/carga (m/z) de los componentes del péptido. En la secuencia del péptido se encuentra resaltada (rojo y en negrita) la diana de nitroalquilación (Cys 91), la cual la vamos a encontrar en mayúscula cuando no se nitroalquile y en minúscula cuando se nitroalquile.

En la figura 11 se muestra el péptido SVEDVESHEKW, que contiene a la His 123, una de las dianas de nitroalquilación presente en la secuencia de peroxirredoxina más susceptible de establecer un aducto de Michael, ya que, se nitroalquila a bajas concentraciones de NO₂-OA. Este NO₂-OA aporta 327 Da dando lugar a un incremento en el masa molecular del péptido, así como en la masa molecular del ion hijo. A concentraciones de 50µM, 100µM, 200µM y 250µM de NO₂-OA (Figura 11, paneles B, C, D y E) vemos que el peso molecular del ion hijo es de 926,53 Da (599,292 Da + 327 Da). Mientras que en el panel A, donde no se detecta nitroalquilación, el ion hijo presenta un peso molecular de 599,292 Da.

Además, los péptidos nitroalquilados presentan una mayor hidrofobicidad, eluyendo con mayores tiempos de retención (RT) en comparación con los péptidos controles.

A) 0 μ M NO₂-OA

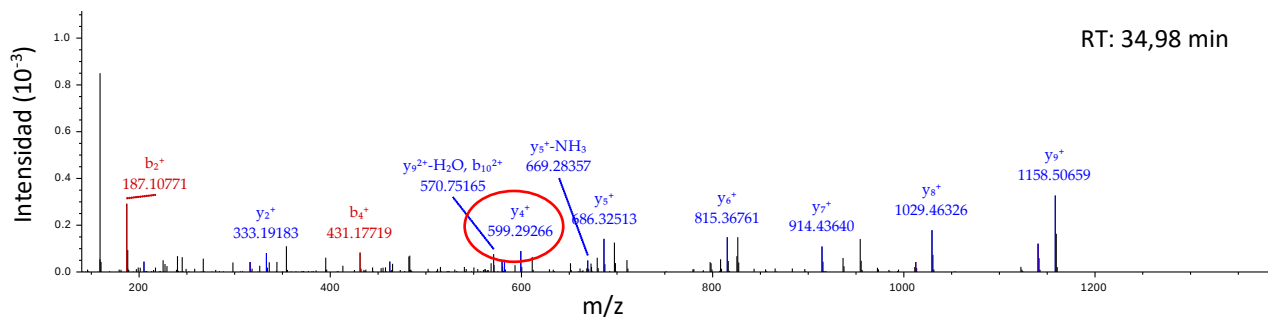
SVEDVES**h**EWK

His 123

Sin nitroalquilación

MH⁺: 1344,6 Da

RT: 34,98 min



B) 50 μ M NO₂-OA

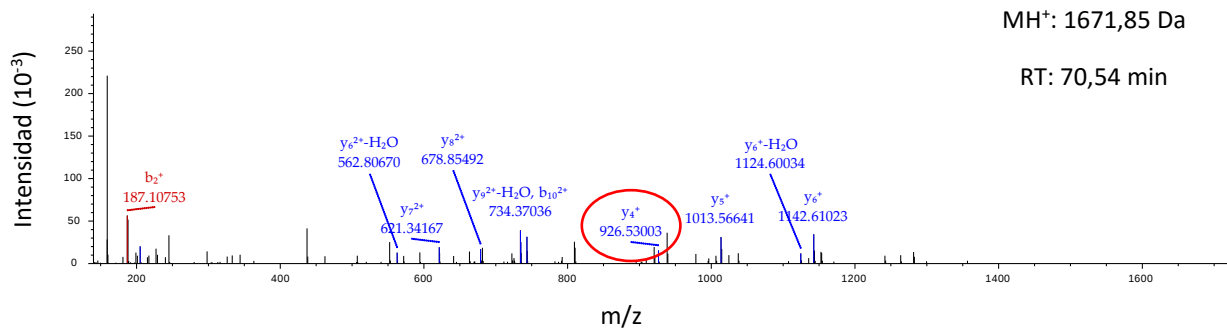
SVEDVES**h**EWK

His 123

Nitroalquilación

MH⁺: 1671,85 Da

RT: 70,54 min



C) 100 μ M NO₂-OA

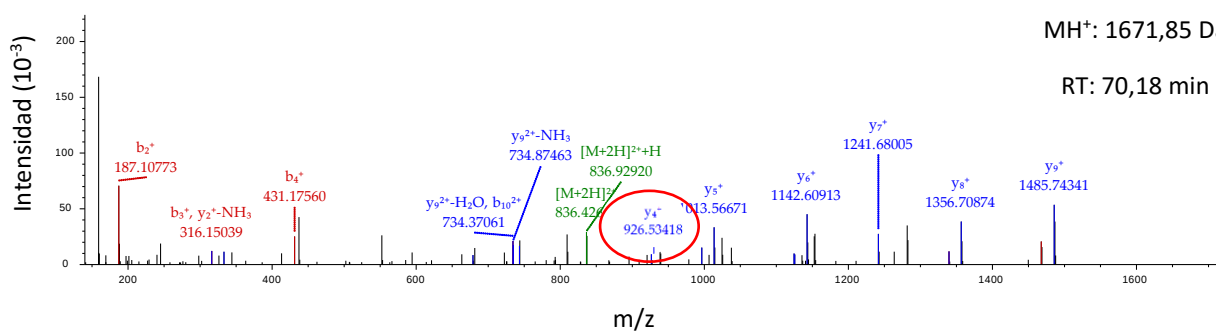
SVEDVES**h**EWK

His 123

Nitroalquilación

MH⁺: 1671,85 Da

RT: 70,18 min



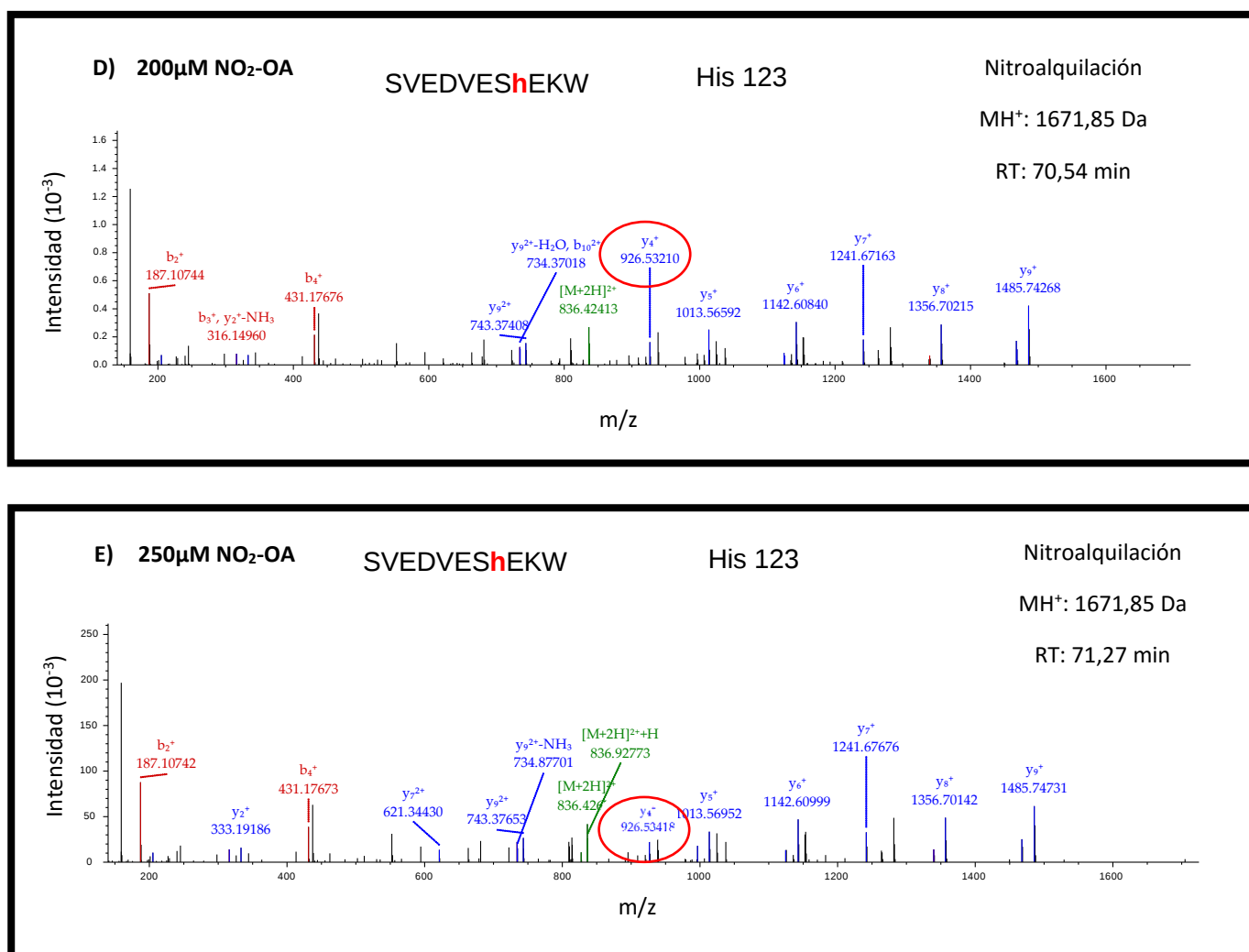


Figura 11. Comparación de los espectros obtenidos de un péptido (SVEDVESHEKW) por el análisis del LC-MS/MS. A) Espectro de la muestra control (peroxirredoxina tratada con metanol). B) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 50µM. C) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 100µM. D) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 200µM. E) Espectro de la muestra tratada con NO₂-OA 250µM. Los iones de los fragmentos peptídicos están indicados con una “b” (color rojo) si la carga se encuentra retenida en el extremo N-terminal y con una “y” (color azul) si la carga se encuentra retenida en el extremo C-terminal, mientras que en color verde se encuentra representado el ion precursor que genera los iones hijos. El subíndice indica el número de residuos de aminoácidos en el fragmento considerado ya sea del extremo N-terminal o el extremo C-terminal. El superíndice indica la carga (+1 ó +2) del bloque de fragmentación. RT significa el tiempo de retención. MH⁺ representa el peso molecular del péptido+ una carga positiva. Con un círculo rojo se encuentra seleccionado el ion hijo que contiene la diana de nitroalquilación, siendo en este caso la histidina 123. El eje de la x está representado por la relación masa/carga (m/z) de los componentes del péptido. En la secuencia del péptido se encuentra resaltada (rojo y en negrita) la diana de nitroalquilación (His 123), la cual la vamos a encontrar en mayúscula cuando no se nitroalquile y en minúscula cuando se nitroalquile.

Tabla 2. Principales péptidos nitroalquilados identificados por LC-MS/MS tras la digestión de la Prx1p, tras el tratamiento con distintas concentraciones de ácido graso nitro-oleico.

Péptidos	Cys	His	MH ⁺ (Da)	NO ₂ -OA			
				50μM	100μM	200μM	250μM
FS h PADF		His83	1147,6	+	+	+	+
SHPADFTPV c TTEVSAF	Cys91		2136,05			+	+
SVEDVES h EKW		His123	1671,84	+	+	+	+

Las principales dianas de nitroalquilación de la secuencia de la peroxirredoxina son la histidina 83, la cisteína 91 y la histidina 123, que se muestran en la tabla 2 marcadas con rojo y en minúscula. En esta tabla se observa que la histidina 123 y la histidina 83 se nitroalquilan a concentraciones de NO₂-OA inferiores mientras que la cisteína 91 requiere mayores concentraciones de NO₂-OA para nitroalquilarse. Todo ello, con una cobertura de identidad del 88% con respecto a la secuencia de la proteína disponible en la base de datos utilizada por el software Protein Discovery 1.4.

5.4. Análisis *in silico* de la modelización molecular de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con el objeto de analizar la diferente susceptibilidad a la nitroalquilación de las dianas observadas se procedió al análisis de la modelización molecular de estos residuos diana. En este caso, se apreció que tanto la Cys 91, la His 83 y la His 123 se localizaban en el centro activo de la molécula (Figura 12). Por otra parte, el análisis del modelo estableció que diferentes residuos de arginina cercanos modificaban la susceptibilidad de las dianas de nitroalquilación, disminuyendo los valores de pKa con respecto al teórico en el caso de la His 83 y la His 123, incrementándolo en el caso de la Cys 91 (Tabla 3). Estos cambios en los valores de pKa modificaban la susceptibilidad de las histidinas haciéndolas más nucleófilas y por tanto, más proclives a nitroalquilarse.

Tabla 3. Representación de los valores de pKa de las tres dianas de nitroalquilación, tras la modelización.

Residuo	pKa modelo	pKa teórico
His 83	1,62	6,5
Cys 91	13,41	9,0
His 123	4,17	6,5

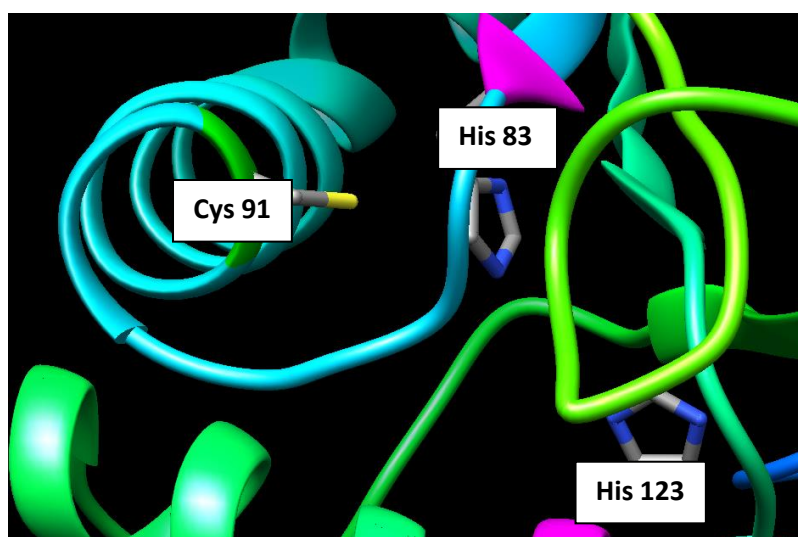


Figura 12. Modelización de la estructura terciaria del sitio activo de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *Saccharomyces cerevisiae*, donde se muestra la posición de las tres dianas de nitroalquilación: His 83, Cys 91 e His 123.

6. DISCUSIÓN

La modificación post-traducciona (PTM) denominada nitroalquilación tiene actualmente una gran importancia en el proceso de señalización celular y hasta ahora ha sido poco estudiada. Con el objeto de profundizar en esta modificación post-traducciona en sistemas antioxidantes responsables de los procesos de salubridad celular se eligió uno de los sistemas antioxidantes con mayor presencia en los seres vivos como es la peroxirredoxina, en concreto,

se estudió la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *Saccharomyces cerevisiae*. Este es un sistema que controla los niveles de peróxido generados en las situaciones de estrés oxidativo, evitando sobreproducciones descontroladas de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (Rhee *et al.*, 2005). En este sistema la actividad catalítica reside en la cisteína 91, residuo conservado encargado de llevar a cabo la reducción de H₂O₂ (Hall *et al.*, 2011). Se consideró además un sistema adecuado porque tiene una sola cisteína que podría ser un residuo nucleofílico que “a priori” podría ser una diana susceptible de nitroalquilarse.

Como agente nitroalquilante se seleccionó el ácido graso nitro-oleico (NO₂-OA) por su gran importancia biológica al estar implicado en numerosos procesos de señalización molecular en sistemas animales (Schopfer *et al.*, 2011). Entre ellos destacan su probada capacidad antiinflamatoria, ya que estimula la relajación de los vasos sanguíneos (Baker *et al.*, 2009); la inhibición de la función celular inflamatoria (Trostchansky *et al.*, 2007); la inducción de la expresión de la respuesta a choque térmico (HSR) (Gesiler y Rudolph, 2012); y la regulación de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (Bonacci *et al.*, 2011), entre otras funciones. Además, es un nitrolípido abundante en la naturaleza con respecto a los demás nitroalquenos como son el ácido nitro-araquidónico, el ácido nitro-linoleico y el ácido nitro-linolénico, y es más estable que los anteriores debido a su monoinsaturación (Schopfer *et al.*, 2011).

En la literatura científica los nitroalquenos se ha descrito que se aductan con los sistemas que participan en el mecanismo catalítico (tioredoxina (Trx) y tioredoxina reductasa (TrxR)), inhibiendo su actividad catalítica (Go *et al.*, 2007) y potenciando la oxidación de la Prx (Brown *et al.*, 2008). En nuestro estudio, la nitroalquilación de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *S. cerevisiae* con el ácido graso nitro-oleico generó un descenso gradual de la actividad enzimática (Figura 8) dependiente de las concentraciones de NO₂-OA utilizadas.

Por otra parte, el análisis de las dianas de nitroalquilación presentes en la peroxirredoxina se realizó mediante el análisis por CL-MS/MS (tabla 2), el cual reveló que la His 83 y la His 123 eran más susceptibles a nitroalquilarse que la Cys 91, la cual requería mayores concentraciones de NO₂-OA. Esto quizás pueda parecer una controversia, ya que, la bibliografía disponible manifiesta que las cisteínas al tratarse de nucleófilos débiles son más susceptibles a nitroalquilarse que las histidinas (Schopfer *et al.*, 2011), puesto que las cisteínas presentan orbitales vacíos por lo que se polarizan y se oxidan más fácilmente, mientras que las histidinas son nucleófilos fuertes, altamente electronegativos y más difíciles de polarizar (Coles, 1984). Por tanto, la unión del ácido nitro-oleico a la cisteína 91, que aparece a mayores concentraciones de nitrolípido, podría justificarse como una

nitroalquilación forzada, debido a la elevada concentración de nitrolípido ensayada. Además, hay que tener en cuenta que la cisteína a pesar de ser un nucleófilo débil y más susceptible a la nitroalquilación, no se encuentra en una zona superficial de la estructura proteica y presenta una menor accesibilidad que las histidinas, tal y como se observa en el análisis de modelización (Figura 12). Este análisis justificaría que la nitroalquilación observada en este residuo se produjera a concentraciones más elevadas de NO₂-OA.

Por otra parte, a través del proceso de modelización tridimensional (Tabla 3) hemos podido conocer los valores de pKa reales de los residuos de nitroalquilación y por tanto, la susceptibilidad de estos a nitroalquilarse. De hecho, aquellos residuos con un menor valor de pKa, presentan mayor capacidad de desprotonación (Sereda *et al.*, 1993) y por tanto, serán nucleófilos más susceptibles de unión al nitrolípido. El entorno de residuos que rodea a las dianas de nitroalquilación observadas, provoca un desplazamiento de los valores de pKa teóricos de estas dianas modulando así la susceptibilidad de nitroalquilación. De hecho, el modelo estableció que diferentes residuos de arginina cercanos modificaban la susceptibilidad de las dianas de nitroalquilación disminuyendo los valores de pKa con respecto al teórico, en el caso de la His 83 y la His 123, incrementándolo en el caso de la Cys 91. Por tanto, los residuos ordenados de mayor a menor susceptibilidad a nitroalquilarse serían: His 83 > His 123 > Cys 91.

En este trabajo postulamos que los residuos de histidina, identificados como dianas de nitroalquilación, presentan una funcionalidad que afecta a la actividad enzimática de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *S. cerevisiae*. Estudios en diferentes enzimas, como la catalasa y la Katgs, las cuales coinciden con las peroxirredoxinas en que usan el H₂O₂ como sustrato, se ha observado que los residuos de histidina (especialmente la His 123) intervienen en la desprotonación de la Cys peroxidática favoreciendo así la catálisis (Regelsberger *et al.*, 2000; Smulevich *et al.*, 2006). Otro ejemplo es la peroxidasa de rábano picante, donde la histidina 123 fue reemplazada por Ala, Val y Leu mediante mutagénesis dirigida, mostrando menores niveles de actividad catalítica (Rodríguez-Lopez *et al.*, 1996). La disminución de actividad enzimática observada en la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *S. cerevisiae* tras los tratamientos con el ácido nitro-oleico (Figura 8) puede justificarse fundamentalmente por el impedimento estérico que ocasiona la nitroalquilación de las histidinas en el proceso de catálisis, mientras que en el caso de la nitroalquilación de la cisteína peroxidática se afectaría la actividad catalítica como tal.

El análisis de estos resultados indica que la nitroalquilación de la Prx1p de *S. cerevisiae* por el ácido graso nitro-oleico puede constituir un mecanismo de control de la actividad de

este sistema antioxidante. De hecho, se podría postular el control de la actividad de este sistema antioxidante mediante los mecanismos que modulan la disponibilidad de este ácido graso nitrado a nivel mitocondrial y celular.

7. CONCLUSIONES

- La nitroalquilación de la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *Saccharomyces cerevisiae* provoca una disminución gradual de su actividad dependiente de la concentración de nitrolípido.
- Se identificaron como dianas susceptibles a nitroalquilación por el ácido nitro-oleico en la peroxirredoxina 1 mitocondrial (Prx1p) de *S. cerevisiae* la His 83, la His 123 y la Cys 91.
- Los estudios de modulación indican una diferente susceptibilidad a la nitroalquilación de las dianas identificadas, siendo la His 83 la que tendría más tendencia a nitroalquilarse seguida de la His 123, y finalmente la Cys 91.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alexander R. L., Bates D. J., Wright M. W., King S. B., and Morrow C. S. (2006). Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitrooleic acid-induced, PPAR γ -dependent transcription activation. *Biochemistry*, 45(25), 7889-7896.
- Astier J., Rasul, S., Koen E., Manzoor H., Besson-Bard A., Lamotte O., Jeandroz, S., Durner, J., Lindermayr, C., and Wendehenne, D. (2011). S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* 181, 527-533.
- Astier, J., and Lindermayr C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15193–15208.
- Baker P. R., Schopfer F. J., Sweeney, S., and Freeman B. A. (2004). Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), 11577-11582.
- Baker P.R., Schopfer F.J., O'donnell V.B., and Freeman B.A. (2009). Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* 46, 989-1003.
- Baker P.R., Schopfer F.J., O'donnell V.B., and Freeman B.A. (2009). Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* 46, 989-1003.
- Baker, P.R., Lin, Y., Schopfer, F.J., Woodcock, S.R., Groeger, A.L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M.H., Iles, K.E., and Baker, L.M. (2005). Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42464-42475.
- Barranco-Medina S., Lázaro J. J., & Dietz K. J. (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS letters*, 583(12), 1809-1816.
- Batthyany C., Schopfer F.J., Baker P.R., Duran R., Baker L.M., Huang Y., Cervenansky C., Branchaud B.P., and Freeman B.A. (2006). Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* 281, 20450-20463.

- Bonacci G., Schopfer F.J., Batthyany C.I., Rudolph T.K., Rudolph V., Khoo N.K., Kelley E.E., and Freeman B.A. (2011). Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *Journal of Biological Chemistry* 286, 16074-16081.
- Bonacci G., Schopfer F.J., Batthyany C.I., Rudolph T.K., Rudolph V., Khoo N.K., Kelley E.E., and Freeman B.A. (2011). Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *Journal of Biological Chemistry* 286, 16074-16081.
- Brown K.K., Eriksson S.E., Arnér E.S., and Hampton M.B. (2008). Mitochondrial peroxiredoxin 3 is rapidly oxidized in cells treated with isothiocyanates. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 494-502.
- Charles R.L., Burgoyne J.R., Mayr M., Weldon S.M., Hubner N., Dong H., Morisseau C., Hammock B.D., Landar A., and Eaton P. (2011). Redox regulation of soluble epoxide hydrolase by 15-deoxy- Δ -prostaglandin J2 controls coronary hypoxic vasodilation. *Circulation research* 108, 324-334.
- Charles R.L., Rudyk O., Prysyazhna O., Kamynina A., Yang J., Morisseau C., Hammock B.D., Freeman B.A., and Eaton P. (2014). Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 8167-8172.
- Chattaraj P. K., Sarkar U., Roy D. R. (2006). Electrophilicity index. *Chemical reviews*, 106(6), 2065-2091.
- Choi H. J., Kang S. W., Yang C. H., Rhee S. G., & Ryu S. E. (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5(5), 400-406.
- Coles B. (1984). Effects of modifying structure on electrophilic reactions with biological nucleophiles. *Drug metabolism reviews*, 15(7), 1307-1334.
- Cui T., Schopfer F.J., Zhang J., Chen K., Ichikawa T., Baker P.R., Batthyany C., Chacko B.K., Feng X., and Patel R.P. (2006). Nitrated fatty acids: endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *Journal of Biological Chemistry* 281, 35686-35698.
- Eisenberg D., Lüthy R., & Bowie J. U. (1997). [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396-404.
- Faine L.A., Cavalcanti D.M., Rudnicki M., Ferderbar S., Macedo S., Souza H.P., Farsky S.H., Boscá L., and Abdalla D.S.P. (2010). Bioactivity of nitrolinoleate: effects on adhesion

- molecules and CD40–CD40L system. *The Journal of nutritional biochemistry* 21, 125-132.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology*, 15(2), 247-254.
- Freeman B. A., Baker P. R., Schopfer F. J., Woodcock S. R., Napolitano A., and d'Ischia M. (2008). Nitro-fatty acid formation and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15515-15519.
- Fukuto J.M., Carrington S.J., Tantillo D.J., Harrison J.G., Ignarro L.J., Freeman B.A., Chen A., and Wink D.A. (2012). Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chemical research in toxicology* 25, 769-793.
- Geisler A. C., & Rudolph T. K. (2012). Nitroalkylation—a redox sensitive signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(6), 777-784.
- Go Y.-M., Halvey P.J., Hansen J.M., Reed M., Pohl J., and Jones D.P. (2007). Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. *The American journal of pathology* 171, 1670-1681.
- Gorczynski M.J., Huang J., Lee H., and King S.B. (2007). Evaluation of nitroalkenes as nitric oxide donors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17, 2013-2017.
- Gow A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A., and Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L262–L268.
- Greetham D. and Grant C.M. (2009). Antioxidant activity of the yeast mitochondrial 1-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol Cell Biol* 29: 3229–3240.
- Hall A, Nelson K, Poole LB, and Karplus PA. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 15: 795–815.
- Hausladen, A. and Stamler, J. (1998) Nitric oxide in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10345–10347.

- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E., and Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 150–166.
- Hughes, M.N. (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411, 263-272.
- Huyser E.S., Siegert F.W., Sinnige H.J., and Wynberg H. (1966). Free-Radical Reactions of 2-t-Butyl-1, 3-butadiene and 2, 3-Di-t-butyl-1, 3-butadiene. *The Journal of Organic Chemistry* 31, 2437-2441.
- Kang S. W., Rhee S. G., Chang T., Jeong W., & Choi M. H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*, 11(12), 571-578.
- Kansanen E., Bonacci G., Schopfer F.J., Kuosmanen S.M., Tong K.I., Leinonen H., Woodcock S.R., Yamamoto M., Carlberg C., and Ylä-Herttuala S. (2011). Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 286, 14019-14027.
- Kelley E.E., Batthyany C.I., Hundley N.J., Woodcock S.R., Bonacci G., Del Rio J.M., Schopfer F.J., Lancaster J.R., Freeman B.A., and Tarpey M.M. (2008). Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 36176-36184.
- Kumar C, Igbaria A, D'Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, Bachhawat AK, Delaunay-Moisan A, and Toledano MB. (2011). Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J* 30: 2044–2056.
- Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., & Thornton J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
- Li H., Robertson A. D., & Jensen J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), 704-721.
- Lima E.S., Di Mascio P., and Abdalla D.S. (2003). Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *Journal of lipid research* 44, 1660-1666.

- Link A. J., Robison K., & Church G. M. (1997). Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis*, 18(8), 1259-1313.
- Mata-Pérez C., de las Nieves Padilla M., Sánchez-Calvo B., Begara-Morales J. C., Valderrama R., & Barroso J. B. (2016). El AOVE contiene ácidos grasos nitrados: moléculas con potentes propiedades a nivel antiinflamatorio y cardiovascular. *Interempresas-Equipamiento para almanzaras*.
- Melo F., & Feytmans E. (1998). Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *Journal of molecular biology*, 277(5), 1141-1152.
- Naik A., Pechtold L. A., Potts R. O., & Guy R. H. (1995). Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. *Journal of controlled release*, 37(3), 299-306.
- Netto L.E.S., De Oliveira M.A., Monteiro G., Demasi A.P.D., Cussiol J.R.R., Discola K.F., Demasi M., Silva G.M., Alves S.V., and Faria V.G. (2007). Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 180-193.
- Olsson M. H., Søndergaard C. R., Rostkowski M., & Jensen J. H. (2011). PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), 525-537.
- Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-6.
- Pedrajas JR, Miranda-Vizuet A, Javanmardy N, Gustafsson JA, and Spyrou G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* 275: 16296–16301.
- Pedrajas JR, Padilla CA, McDonagh B, and Barcena JA. (2010). Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid Redox Signal* 13: 249–258.
- Pedrajas, J. R., McDonagh, B., Hernández-Torres, F., Miranda-Vizuet A., González-Ojeda, R., Martínez-Galisteo, & Bárcena, J. A. (2016). Glutathione is the resolving thiol for

- thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. *Antioxidants & redox signaling*, 24(3), 115-128.
- Poole L. B., & Nelson K. J. (2008). Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 18-24.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4003–4008.
- Radi, R. (2013). Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.* 46, 550–559.
- Regelsberger G., Jakopitsch C., Rüker F., Krois D., Peschek G. A., & Obinger C. (2000). Effect of distal cavity mutations on the formation of compound I in catalase-peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22854-22861.
- Rhee S, Chae H, Kim K (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38 (12): 1543-52.
- Rhee S, Chae H, Kim K (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38 (12): 1543-52.
- Rodriguez-Lopez J. N., Smith A. T., & Thorneley R. N. (1996). Recombinant horseradish peroxidase isoenzyme C: the effect of distal haem cavity mutations (His42→ Leu and Arg38→ Leu) on compound I formation and substrate binding. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1(2), 136-142.
- Rouhier N., & Jacquot J. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(11), 1413-1421.
- Rubbo H., and Radi R. (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1780, 1318-1324.
- Rubbo H., Trostchansky A., & O'Donnell V. B. (2009). Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Archives of biochemistry and biophysics*, 484(2), 167-172.
- Rudolph T. K., and Freeman B. A. (2009). Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Science signaling*, 2(90), re7.

- Schmidt, H.H.H.W. and Walter, U. (1994) NO at work. *Cell* 78, 919–925.
- Schopfer F. J., Cipollina C., & Freeman B. A. (2011). Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chemical reviews*, 111(10), 5997-6021.
- Seaver L. C., & Imlay J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7173-7181.
- Sereda T. J., Mant C. T., Quinn A. M., & Hodges R. S. (1993). Effect of the α -amino group on peptide retention behaviour in reversed-phase chromatography Determination of the pKa values of the α -amino group of 19 different N-terminal amino acid residues. *Journal of Chromatography A*, 646(1), 17-30.
- Smeets A., Loumaye E., Clippe A., Rees J. F., Knoops B., & Declercq J. P. (2008). The crystal structure of the C45S mutant of annelid *Arenicola marina* peroxiredoxin 6 supports its assignment to the mechanistically typical 2-Cys subfamily without any formation of toroid-shaped decamers. *Protein Science*, 17(4), 700-710.
- Smulevich G., Jakopitsch C., Droghetti E., & Obinger C. (2006). Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of inorganic biochemistry*, 100(4), 568-585.
- Soito L, Williamson C, Knutson ST, Fetrow JS, Poole LB, and Nelson KJ. (2010). Prex: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res* 39: D332–D337.
- 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.
- Stamler, J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931–936.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898-1902.
- Trostchansky A., and Rubbo H. (2008). Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 1887-1896.

- Trostchansky A., Möller M.N., Bartesaghi S., Botti H., Denicola A., Radi R., and Rubbo H. (2009). Nitric oxide redox biochemistry in lipid environments. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*.
- Trostchansky A., Souza J.M., Ferreira A., Ferrari M., Blanco F., Trujillo M., Castro D., Cerecetto H., Baker P.R., and O'donnell V.B. (2007). Synthesis, isomer characterization, and antiinflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* 46, 4645-4653.
- Veal E. A., Day A. M., & Morgan B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular cell*, 26(1), 1-14.
- Voigt FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, and Meisinger C. (2009). Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139: 428–439.
- Wojtaszek, P. (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry* 54, 1-4.
- Wood ZA. Schroder E. Harris JR. Poole LB. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 28:32–40.
- Wright M.M., Schopfer F.J., Baker P.R., Vidyasagar V., Powell P., Chumley P., Iles K.E., Freeman B.A., and Agarwal A. (2006). Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4299-4304.
- Zhang B., Wang Y., & Su Y. (2009). Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Letters*, 286(2), 154-160.
- Zhang J., Villacorta L., Chang L., Fan Z., Hamblin M., Zhu T., Chen C.S., Cole M.P., Schopfer F.J., and Deng C.X. (2010). Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circulation research* 107, 540-548.

RESUMEN DE ASIGNATURAS DEL MASTÉR

Seguridad en el Laboratorio y experimentación animal

Este curso ha tratado de mostrarnos la continua exposición a una gran gamma de riesgos a los que estamos sometidos cuando se trabaja en un laboratorio. Se ha llevado a cabo una visión de la legislación y prevención de riesgos laborales de forma general. Y se ha estudiado cada uno de los tipos de riesgo, entre los que podemos encontrar: biológicos, químicos, electromagnéticos, físicos y eléctricos. También se ha estudiado la normativa sobre experimentación humana y animal y el comité de bioética al que están sometidos, donde hemos aprendido a redactar una solicitud para el Comité de bioética, para trabajar con un determinado organismo que lo requiera. Los contenidos abordados en este curso se han visto reforzados por la impartición de una serie de charlas llevadas a cabo por profesionales de diferentes universidades, mostrándonos la importancia de adquirir las competencias anteriormente mencionadas y su aplicación desde los conceptos teóricos aprendidos durante el curso.

Proteómica y dinámica de proteínas

En este curso se estudian los procesos de plegamiento, recambio, degradación, maduración y transporte de proteínas y , a continuación, los principios, metodología y aplicaciones de la proteómica. Las técnicas de caracterización de proteínas y proteómica son herramientas fundamentales utilizadas en la investigación básica, biotecnológica y biomédica por lo que, en este curso, se trabajaron aspectos en los que las competencias finales se tradujeron en aprender a manejar bases de datos de biología molecular y darle un uso en tareas de investigación, conocer los fundamentos de la dinámica de proteínas y proteómica, diseñar y planificar experimentos de investigación así como diseñar estrategias experimentales alternativas, capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados . Por últimos llevamos a cabo un estudio práctico en el cual aplicamos la técnica 2-D PAGE, la cual nos permite separar a las proteínas en primer lugar en función de su punto isoeléctrico y posteriormente en un gel de poliacrilamida se separa según su tamaño. Estas nociones teórico-prácticas se han visto complementadas con una serie de charlas que han ahondado en el enfoque biotecnológico de la proteómica.

Regulación de la expresión génica y desarrollo

En este curso se realizan lecciones teórico-prácticas que pretenden profundizar en los conocimientos acerca de la regulación de la expresión de genes, tanto en procesos concretos como a lo largo del desarrollo de los organismos para lo cual se establecieron las competencias de manejar y extraer información de las bases de datos de biología molecular, saber manejar herramientas de Bioinformática, conocer los mecanismos de regulación génica, saber ejecutar experimentos e interpretar sus resultados. Para asentar los aspectos más importantes del curso se realizaron seminarios de búsqueda de información en la web y los conocimientos se vieron cumplimentados con una serie de charlas que ayudaron a entender los conceptos tratados en el curso.

Cultivos celulares, diferenciación y terapia celular

Este curso me permitió adquirir conocimientos de las técnicas básicas de cultivos celulares que más se manejan en el ámbito de la biotecnología y biomedicina con el consiguiente alcance de las competencias tales como el conocimiento de los fundamentos y el manejo de cultivos celulares, el uso del citómetro de flujo, el estudio de las técnicas relacionadas con cultivos de células animales, así como sus aplicaciones en el campo de la investigación biomédica y biotecnológica, el conocimiento de la importancia del uso de células cultivadas en investigación, las ventajas y desventajas de los cultivos celulares, la utilidad clínica e industria y el conocimiento de los procesos de diferenciación "in vitro" de células madre embrionarias.

Ingeniería genética avanzada

En este curso se pretende profundizar en la metodología que permite modificar genéticamente células, organismos diversos o plantas y mediante el cual se adquirirán las competencias de realizar en el laboratorio clonación de genes en vectores de expresión, saber aplicar la ingeniería genética a la mejora animal y vegetal, conocer la tecnología más moderna de genotipación y secuenciación y el desarrollo de la capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Para ello, se trató la base conceptual del conjunto de técnicas, se abordó su aplicación a la clonación y la obtención de organismos modificados genéticamente y se dio a conocer sus aplicaciones en biotecnología y biomedicina.

Biotecnología diagnóstica

Con este curso se pretendió proporcionar una visión global sobre técnicas moleculares de última generación aplicadas al diagnóstico, permitiéndonos la elección de aquellas más adecuadas en cada situación particular en el que, además se pretendió profundizar en la aplicabilidad y utilidad de los métodos de Citología e Histología molecular, ampliamente difundidos y aceptados en disciplinas biológicas y biomédicas. El curso nos permitió adquirir una serie de competencias tales como el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad y el cómo realizar el diagnóstico desde su base molecular y el tratamiento, el saber diseñar y planificar experimentos de investigación así como estrategias alternativas y el consecuente manejo de bibliografía y documentación científica, desarrollando así una capacidad crítica argumentativa reflejada en una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Los conocimientos adquiridos se verían asentados con la participación de una serie de conferenciantes expertos en biotecnología diagnóstica, vinculados con el mundo empresarial y hospitalario.

Estrés celular

En este curso, nos impartieron las nociones de las funciones biológicas de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) y del oxígeno (ROS), su reactividad bioquímica y enzimología, la producción de radicales de nitrógeno y oxígeno en situaciones de estrés, la metodología para la detección de estos radicales libres y la realización de diseños experimentales que permitan evidenciar diferentes comportamientos moleculares asociados a fenómenos de estrés celular. Las competencias que adquirimos en lo relativo al curso se vieron complementadas con unas sesiones prácticas en las que se realizó la determinación de la respuesta de la actividad de sistemas antioxidantes frente a situaciones de estrés en tejidos animales y la determinación de la actividad óxido nítrico sintasa con la consecuente realización de un cuaderno recogiendo los resultados y discusión de los resultados. Los contenidos impartidos en el curso se vieron puestos de manifiesto en la práctica científica con una serie de charlas abordadas por profesionales de este campo.

Patología molecular y celular

El programa de este curso ofrece la posibilidad de formación a nivel de la biología molecular mediante el conocimiento del origen de ciertas enfermedades cuya etiología sería difícil de comprender mediante escrutinio fenomenológico, en especial se centró en el cáncer. Por tanto, este curso, pretendió iniciarnos en el conocimiento de la etiología molecular de las enfermedades y en la aplicación de dicho conocimiento al diagnóstico y tratamiento de las mismas para alcanzar las competencias tales como conocer en profundidad las bases moleculares de la enfermedad y la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento, conocer los principios de la terapia génica. Además, para la completa asimilación de tales competencias y, para desarrollar una capacidad crítica y argumentativa así como saber utilizar bibliografía y documentación y diferentes bases de datos, se llevó a cabo análisis de trabajos de investigación y la defensa de sus resultados. Para la completa comprensión y el enfoque clínico de este curso se impartieron charlas donde se nos dio un enfoque clínico de la terapia del cáncer.

Enzimología aplicaciones biotecnológicas y clínicas

El objeto de este curso fue enseñarnos el gran número de utilidades que presenta las enzimas como son las aplicaciones industriales, biotecnológicas, para el diagnóstico y terapéuticas, junto con una visión introductoria de la misma. En prácticas aprendimos a medir los parámetros que caracterizan la actividad enzimática como son: V_{Max} , K_m , actividad específica, coeficiente de Hill, razón de actividad y eficiencia catalítica, realizándose un artículo sobre ello.

Biología molecular y celular del envejecimiento

El curso está diseñado para proporcionarnos una formación avanzada y una experiencia práctica de los procesos y mecanismos moleculares del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas así como potenciales terapias celulares y farmacológicas para su tratamientos, trabajando aspectos en los que las competencias finales se tradujeron en: aprender a manejar bases de datos de biología molecular y darle un uso en tareas de investigación, conocer en profundidad las bases moleculares de la enfermedad y la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento, conocer los principios de la terapia génica. Los contenidos impartidos nos proporcionaron una formación avanzada y una

experiencia práctica de los procesos y mecanismos moleculares del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, así como permitirnos abordar las terapias celulares y farmacológicas para su tratamiento, viéndose cumplimentada esta formación con una serie de charlas.

Biotecnología de la producción y purificación de proteínas recombinantes

Este curso fue básicamente práctico, ya que en él nos enseñaron la purificación de proteínas recombinantes y nativas. Las principales técnicas utilizadas fue la cromatografía de intercambio iónico y la de exclusión molecular. Cada uno de nosotros realizamos la purificación de un tipo de proteína, nativa o recombinante, para más tarde entregar una memoria del procedimiento realizado, así como los datos de rendimiento y las comprobaciones de que la purificación se realizó correctamente (SDS-PAGE y Western.blot)

Genómica, bioinformática y biología de sistemas

En este curso se ha estudiado diferentes aplicaciones informáticas que son muy útiles para el estudio de la biología. Se han estudiado un gran número de bases de datos donde podemos encontrar desde artículos publicados a toda aquella información se desee acerca de un gen, proteína, etc. (ensembl, NCBI, genamics, genome, genecards, expasy, dnapatents,... También se ha aprendido a trabajar y analizar secuencias mediante los programas (Bioedit, Plink, Haploview, FASTA, BLAST, CLUSTAL...) Hemos estudiado la estructura de una proteína y como representarla de forma tridimensional (RASMOL, Jmol). Y por últimos se aprendió al análisis de microarrays y se nos ha mostrado el estudio desde el punto de vista de la biología de sistemas



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN,

DIRECCIÓN GENERAL
DE UNIVERSIDADES

Currículum vitae

Impreso normalizado

Nombre: Lorena Aranda Caño

Fecha: 30/06/2016

APELLIDOS: Aranda Caño

NOMBRE: Lorena

SEXO: Mujer

DNI: 77365931A

FECHA DE NACIMIENTO:

10/01/1993

DIRECCION PARTICULAR: Av. de Andalucía Nº:40

CIUDAD: La Bobadilla (Jaén)

CÓDIGO POSTAL: 23669

TELEFONO: 638469817

FORMACIÓN ACADEMICA

Titulación: Grado en Biología. CENTRO: Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén FECHA: Julio de 2015

SITUACIÓN PROFESIONAL ACTUAL

ORGANISMO: Universidad de Jaén

FACULTAD, ESCUELA o INSTITUTO DEL C.S.I.C.: Facultad de Ciencias experimentales

DEPT./SECC./ UNIDAD ESTR.: Departamento de Biología Experimental (Área de Bioquímica)

CATEGORIA PROFESIONAL Y FECHA DE INICIO: Estudiante

DIRECCION POSTAL: Ed. B3, Paraje las Lagunillas, S/N; 23071 Jaén

TELEFONO (indicar prefijo, número y extensión): 953213097

IDIOMAS DE INTERES CIENTIFICO (R=regular,B=bien,C=correctamente)

IDIOMA: Inglés (B2 Trinity College London) HABLA C LEE C ESCRIBE C

IDIOMA: Francés HABL A B LEE B ESCRIBE B

OTROS

III Jornadas en seguridad alimentaria

Pre-experiencia laboral en los laboratorios Echevarne.

Colaboración con el departamento de biología experimental en el área de bioquímica y biología molecular.
