

Indice

RESUMEN.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 MITOCONDRIA: FUNCIÓN Y ROL COMO GENERADOR DE RADICAL SUPERÓXIDO	9
1.1.1 SUPERÓXIDO.....	9
1.2 ÓXIDO NÍTRICO.....	11
1.3 MITOCONDRIA COMO FUENTE DE PEROXINITRITO Y ESPECIES NITRANTES.....	12
1.3.1 PEROXINITRITO.....	12
1.4 NITRACIÓN DE TIROSINA COMO MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL	13
1.4.1 NITRACIÓN PROTEICA Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	15
1.4.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE NITRACIÓN PROTEICA.....	16
1.5 ENFOQUE EN DOS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES: CITOCROMO C Y MNSOD	16
1.6 CITOCROMO C.....	18
1.6.1 ACTIVIDAD PEROXIDASA DE CITOCROMO C Y CONFORMACIONES ALTERNATIVAS	19
1.6.2 TRANSICIÓN ALCALINA DE CITOCROMO C	20
1.6.3 NITRACIÓN DE CITOCROMO C POR PEROXINITRITO	21
1.6.4 OTRAS MODIFICACIONES RELEVANTES DE CITOCROMO C	21
1.6.5 CARDIOLIPINA.....	22
1.6.6 INTERACCIÓN CITOCROMO C CON CARDIOLIPINA Y OTROS LÍPIDOS.....	24
1.6.7 PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS: ROL DEL CITOCROMO C	24
1.6.8 ASPECTOS INMUNOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS DEL CITOCROMO C.....	26
1.7 SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	27
1.8 SUPERÓXIDO DISMUTASA DE COBRE Y CINC (CuZnSOD)	28
1.9 SUPERÓXIDO DISMUTASA DE MANGANESO (MNSOD)	30
1.9.1 NITRACIÓN DE MNSOD.....	33
1.9.2 CONTROVERSIAS FRENTE A LA CONSTANTE DE REACCIÓN DE MNSOD Y PEROXINITRITO.....	34
1.9.3 POLIMORFISMOS DE MNSOD ASOCIADOS A CÁNCER Y REACTIVIDAD AUMENTADA DE TIOLES.....	34
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36

2.1 MATERIALES	36
2.2 MÉTODOS	36
2.2.1 SÍNTESIS DE PEROXINITRITO	36
2.2.2 PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C NATIVO	36
2.2.3 EXPRESIÓN DE CITOCROMO C RECOMBINANTE NATIVO Y MUTADO EN TIROSINAS	37
2.2.4 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C MONONITRADO EN TIROSINA 97 Y 74 ..	37
2.2.5 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C CARBOXIMETILADO	38
2.2.6 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMELARES	38
2.2.7 EXPRESIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA DE MANGANESO	38
2.2.8 MNSOD MUTADA SITIO ESPECÍFICAMENTE	39
2.2.9 EXPRESIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA DE COBRE Y CINCO	39
2.2.10 MEDIDA DE CONCENTRACIÓN PROTEICA	40
2.2.11 GENERACIÓN DE FLUJOS (J) DE SUPERÓXIDO:	40
2.2.12 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FLUJOS DE ÓXIDO NÍTRICO	40
2.2.13 EXPOSICIÓN DE CITOCROMO C A PEROXINITRITO EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS UNILAMELARES CONTENIENDO CARDIOLIPINA	41
2.2.14 EXPOSICIÓN DE MNSOD Y CUZNSOD A FLUJOS DE ÓXIDO NÍTRICO	41
2.2.15 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	42
2.2.15.1 Actividad peroxidasa de citocromo c	42
2.2.15.2 Detección de actividad SOD por método de reducción de citocromo c	42
2.2.15.3 Geles de actividad SOD	42
2.2.15.4 Cinética de reacción de MnSOD con peroxinitrito	43
2.2.15.5 Determinación de la variación en la formación de oxígeno por peroxinitrito en presencia de MnSOD	43
2.2.16 MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS	43
2.2.16.1 Detección de 3-nitrotirosina proteica en citocromo c y MnSOD	43
2.2.16.2 Detección de radicales libres proteicos en SOD	44
2.2.16.3 Detección de formas modificadas de citocromo c	44
2.2.17 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DE MODIFICACIONES NITRO- OXIDATIVAS DE PROTEÍNAS	45
2.2.17.1 Análisis de modificaciones en citocromo c por espectrometría de masa (MALDI-TOF)	45
2.2.17.2 Cuantificación de la formación de 3-nitrotirosina en citocromo c	46
2.2.17.3 Detección de alquilación y confirmación de mutaciones en MnSOD por espectrometría de masa (Electro Spray)	47
2.2.18 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR)	47

2.2.18.1	Detección de radicales libres por EPR directo de citocromo c expuesto a peroxinitrito	47
2.2.18.2	Detección de radicales libres por EPR utilizando atrapadores de spin en citocromo c expuesto a peroxinitrito	47
2.2.18.3	Detección de radicales libres de citocromo c expuesto a peróxido de hidrógeno por EPR de baja temperatura	48
2.2.19	FLUORESCENCIA DE TRIPTÓFANO Y TIROSINA DE CITOCROMO C	48
2.2.20	ANÁLISIS ESTRUCTURAL	49
2.2.20.1	Geles nativos para identificación de estructura cuaternaria en MnSOD mutada	49
2.2.21	NMR PARAMAGNÉTICO Y DIAMAGNÉTICO DE CITOCROMO C EXPUESTO A CARDIOLIPINA	49
2.2.21.1	NMR Paramagnético	49
2.2.21.2	NMR Diamagnético	49
2.2.22	MÉTODOS <i>IN SILICO</i>	50
2.2.22.1	Simulaciones de Dinámica molecular y cálculos de energía libre	50
2.2.22.2	Simulaciones en GEPASI	50
2.2.22.3	Representación grafica de proteínas	50
3	<u>OBJETIVOS</u>	51
4	<u>RESULTADOS</u>	53
4.1	NITRACIÓN DE CITOCROMO C EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA	53
4.1.1	DETECCIÓN DEL AUMENTO DE NITRACIÓN DE CITOCROMO C EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA POR PEROXINITRITO	53
4.1.2	AUMENTO DE LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES PROTEICOS EN CITOCROMO C EXPUESTO A PEROXINITRITO EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA	55
4.1.3	IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES NITRADAS	58
4.1.4	IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DE LAS TIROSINAS NITRADAS DE CITOCROMO C POR PEROXINITRITO ESTUDIANDO EL EFECTO DE LA PRESENCIA DE CARDIOLIPINA	59
4.1.5	CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE 3-NITROTIROSINA POR ESPECTROMETRÍA DE MASA	62
4.1.6	EVALUACIÓN DE MODIFICACIONES EN EL TRP 59 POR FLUORESCENCIA	64
4.2	FORMACIÓN DE ESPECIES NITRANTES POR FLUJOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y SUPERÓXIDO EN PRESENCIA DE SOD Y EFECTO DE LAS MISMAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	66

4.2.1 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y NITRACIÓN DE CUZNSOD Y MNSOD EXPUESTAS A FLUJOS SIMULTÁNEOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y SUPERÓXIDO	66
4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE REACCIÓN DE MNSOD CON PEROXINITRITO 77	
4.2.3 ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE OXÍGENO POR PEROXINITRITO EN PRESENCIA DE MNSOD.....	79
4.3 CARACTERIZACIÓN POR NMR DE LA INTERACCIÓN DE CITOCROMO C Y CARDIOLIPINA 82	
4.3.1 ESTUDIOS DE NMR PARAMAGNÉTICO DE CITOCROMO EXPUESTO A CARDIOLIPINA..	82
4.3.2 NMR DIAMAGNÉTICO	86
4.4 ESTUDIO DE LA TOPOGRAFÍA DE LAS TIROSINAS DE CITOCROMO C DURANTE SU INTERACCIÓN CON CARDIOLIPINA	91
4.4.1 ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA DE LA INFLUENCIA DE CADA RESIDUO DE TIROSINA EN LA INTERACCIÓN CON CARDIOLIPINA.....*	92
4.4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA DE LOS DIFERENTES MUTANTES EN PRESENCIA DE CARDIOLIPINA.....	94
4.4.3 CAMBIOS DEPENDIENTES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA FLUORESCENCIA DE TIROSINAS Y TRIPTÓFANO, LA FORMACIÓN DE RADICALES PRÓTEICOS Y LA FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS EN CITOCROMO C EXPUESTO A CARDIOLIPINA.....	95
4.5 SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CITOCROMO C CARBOXIMETILADO Y SU INTERACCIÓN CON CARDIOLIPINA.....	98
4.6 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CITOCROMO C MONONITRADO PARA LA GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN FORMAS ALTERNATIVAS DE CITOCROMO C.....	103
4.7 ESTUDIOS COMPUTACIONALES DE LA INACTIVACIÓN DE MNSOD MEDIADA POR LA NITRACIÓN DE TIROSINA 34	107
4.8 MODIFICACIONES POR MUTACIONES PUNTUALES EN LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE MNSOD Y SENSIBILIDAD DE TIOLES.....	110
4.8.1 ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE TIOLES DE MNSOD NATIVA Y MUTADA A NIVEL DE ILE58TRE Y LEU60PHE.....	111
4.8.2 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS VARIANTES I58T Y L60F DE MNSOD	112
<u>5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</u>	<u>115</u>
<u>6 PERSPECTIVAS.....</u>	<u>122</u>

7	<u>PUBLICACIONES.....</u>	<u>124</u>
8	<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>125</u>
9	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>126</u>