



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
ESCUELA DE QUÍMICA**

**ROL DE TRIPTÓFANO Y TIROSINA EN LAS MODIFICACIONES
OXIDATIVAS DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
INDUCIDAS POR RADICALES PEROXILLO Y ANIÓN RADICAL
CARBONATO**

JUAN DAVID FIGUEROA ALEGRIA

Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en
Química.

Director de Tesis : **Dr. Camilo López Alarcón**

Santiago de Chile, Mayo de 2022

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**ROL DE TRIPTÓFANO Y TIROSINA EN LAS MODIFICACIONES
OXIDATIVAS DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA INDUCIDAS
POR RADICALES PEROXILO Y ANIÓN RADICAL CARBONATO**

Tesis presentada por:

Juan David Figueroa Alegría

Para optar al Grado Académico de Doctor en
Química.

APROBADA POR:

Dr. Octavio Hernán Monasterio Opazo
Prof. Examinador

.....

Dr. Germán Günther Sapunar
Prof. Examinador

.....

Dr. Carlos Pessoa Mahana
Prof. Examinador

.....

Dr. Nelson Patricio Barrera Rojas
Prof. Examinador

.....

Dr. Camilo López Alarcón
Prof. Director de Tesis

.....

MAYO - 2022

Agradecimientos

“Yo creo en Dios ‘gracias a la’ ciencia. No ‘a pesar de’ la Ciencia”

William D. Phillips, Premio nobel en Física

Agradezco a todo el grupo Free radicals and protein oxidation (FR-PROT) y en especial a mi director de tesis y mentor Camilo López, quien me ha brindado su apoyo incondicional y su amistad durante toda mi estancia en el programa de doctorado. Gracias por todo el tiempo dedicado a cultivar en mi conocimiento, que es uno de las cosas más valiosas que un ser humano puede recibir de otro. El profesor Camilo, ha aportado de forma invaluable en mi proceso de formación como investigador. Gracias a su impecable trayectoria, he podido conocer y colaborar con personas reconocidas a nivel mundial en el área de oxidación de proteínas. También quiero agradecer especialmente a Sebastián Reyes, por su gran amistad, por apoyarme siempre y aportarme conocimientos, ideas e introducirme al área de la bioquímica. Al Dr. Benito por su paciencia al enseñarme las técnicas de trabajo en el laboratorio, por su amistad y por toda su desinteresada disposición a ayudarme y aportarme ideas. A Anita Zárate, por toda su colaboración en que hicieron posible la publicación del segundo paper de esta tesis. A Javiera Cortés por su amistad y apoyo, le deseo muchos éxitos en la culminación de su doctorado. A Javier y a Matías, a quienes les deseo muchos éxitos en su carrera profesional. Al programa de doctorado y a sus profesores, en especial a los profesores(as) Angélica fierro, Mario Faúndez y Margarita Aliaga por su apoyo, al profesor Mario Aranda y al profesor Eduardo Silva, por su buena disposición siempre a escucharme y aportarme. También al profesor Alexis Aspée de la USACH por su colaboración.

Agradezco a mi comité de tesis, los profesores Monasterio, Günther, Pessoa y Barrera, por todas sus contribuciones, sugerencias y comentarios que permitieron enriquecer esta tesis y que sin su ayuda no hubiese sido posible.

Agradezco a la vicerrectoría de investigaciones de la UC, por financiar mi estancia en Chile. Los proyectos FONDECYT 1180642 y 1220459 adjudicados al profesor Camilo López y que permitieron financiar el trabajo experimental de mi tesis. El proyecto FONDEQUIP EQM130032 que hizo posible acceder al UPLC-MS/MS.

Quiero también agradecer al gobierno de Canadá y a la beca ELAP que hizo posible financiar parte de mi estadía de investigación en ese país. Al Dr. Emilio Alarcón que me recibió en su grupo de investigación (BEaTS) en el Heart institute de la Universidad de Ottawa (Canadá). El Dr. Alarcón me dio todo su apoyo incondicional y buscó financiamiento para mi estadía en Canadá. Del Dr. Alarcón y de Marcelo Muñoz pude aprender mucho del trabajo en grupos de investigación grandes e interdisciplinarios y les agradezco su amistad y aportes a mi formación.

Quiero dedicar esta tesis a mi madre Lilí Alegría y a la memoria de mi Abuela Carme Jutinico, quienes me han apoyado siempre y me han brindado todo su amor. Gracias a todos sus esfuerzos yo pude estudiar y formarme como ser humano. Gracias a mi familia y amigos, en especial Carolay por escuchar siempre mis seminarios y a Sarah por siempre acompañarme a pesar de la distancia y por haberme alegrado la vida durante mi la pandemia.

Lista de abreviaciones

AAPH: diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-aminopropano)

ANS: ácido 8-anilino-1-napftaleno-sulfónico

$\text{CO}_3^{\bullet-}$: anión radical carbonato

DC: dicroísmo circular

di-Trp: di-triptófano

di-Tyr: di-tirosina

DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina

ERO: especies reactivas de oxígeno

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

LS: dispersión de luz

Met: metionina

MetSO: metionina sulfóxido

NADP^+ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

$\text{ROO}^{\bullet}$: radicales peroxilo

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato
sódico

SEC: cromatografía de exclusión por tamaño

Tyr: tirosina

Trp: triptófano

UPLC-MS/MS: cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplado a
espectrometría de masas

Índice general	Página
Índice de figuras	II
Índice de esquemas	III
Índice de tablas	III
Resumen	IV
Abstract	V
 Capítulo I. Introducción, hipótesis y objetivos	 1
I.1 Introducción	1
I.2 Hipótesis	6
I.3 Objetivos	6
 Capítulo II. Parte experimental	 7
II.1 Materiales	7
II.2 Metodología	7
 Capítulo III. Resultados y discusión	 18
III.1 Generación de ROO• y CO ₃ • ⁻ y oxidación de aminoácidos libres (Tyr y Trp).	19
III.2 Oxidación de G6PD inducida por ROO• y CO ₃ • ⁻	27
III.3 Oxidación de G6PD mediada por cloramina T	46
 Capítulo IV. Conclusiones	 51
 Capítulo V. Referencias	 52

Índice de figuras

Figura 1. Estructura tridimensional de G6PD de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4
Figura 2. Consumo de Trolox mediado por los ROO•.....	21
Figura 3: Dependencia del consumo de Trolox, inducido por CO ₃ • ⁻ , con su concentración inicial.....	22
Figura 4. Detección de entrecruzamientos por UPLC-MS/MS	23
Figura 5. Formación de di-Tyr inducida por ROO•.....	25
Figura 6. Consumo de Trp y formación de di-Trp mediada por la exposición de Trp a los ROO•.....	26
Figura 7. Cambios en la actividad enzimática de G6PD inducidos por los ROO• y el CO ₃ • ⁻	28
Figura 8. Actividad enzimática remanente de G6PD posterior a su exposición a los ROO• y el CO ₃ • ⁻	29
Figura 9. Cambios en la masa molecular determinados por SDS-PAGE de muestras de G6PD expuestas a ROO• y el CO ₃ • ⁻	30
Figura 10. Análisis por SEC en condiciones denaturantes de muestras de G6PD expuestas a ROO• y CO ₃ • ⁻	36
Figura 11. Dependencia de la actividad residual de G6PD con el tiempo de incubación en presencia de AAPH.	33
Figura 12. Dependencia de la actividad de G6PD con el flujo de ROO•.....	34
Figura 13: Inactivación de G6PD mediada por ROO• en presencia de G6P y NADP ⁺	35
Figura 14. Consumo de aminoácidos y formación de MetSO en G6PD tratada con ROO•.....	36
Figura 15. Análisis por UPLC-MS/MS de los productos de oxidación de Trp en G6PD.....	38

Figura 16. Espectros de DC y cambios en el contenido de estructura secundaria de G6PD en muestras expuestas a denaturación térmica, química y ROO•.....	41
Figura 17. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de G6PD expuesta a los ROO• derivados del AAPH.....	42
Figura 18. Análisis por electroforesis en condiciones no denaturantes (panel A) y SEC (paneles B y C) de muestras de G6PD expuestas a AAPH.....	43
Figura 19. Intensidad de LS (normalizada) a diferentes tiempos de incubación de G6PD con AAPH	44
Figura 20. Cambios en el espectro de ANS mediados por muestras de G6PD pre-tratadas con AAPH	46
Figura 21. Pérdida de actividad y modificaciones oxidativas sobre los residuos de Met de G6PD inducidas por cloramina T.....	47
Figura 22. Oxidación de G6PD inducida por cloramina T: estudios por SEC, SDS-PAGE, DC y fluorescencia de ANS.....	48
Figura 23. Modificaciones en la secuencia primaria de G6PD inducidas por los ROO• derivados del AAPH.	49

Índice de esquemas

Esquema 1. Mecanismo catalítico propuesto para G6PD de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	27
---	----

Índice de tablas

Tabla 1. Dosis de ROO• y CO ₃ • ⁻ determinadas utilizando PGR y Trolox como sondas oxidables.....	22
Tabla 2. Productos de oxidación generados en muestras de G6PD expuestas a ROO•.....	39

Resumen

La enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) cumple un rol importante en sistemas biológicos. Es la primera enzima de la ruta de las pentosas fosfato, vía fundamental para la síntesis de nucleótidos y para la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), cofactor clave para mantener la homeostasis redox intracelular. Aunque se ha sugerido en sistemas biológicos una relación entre los niveles de especies reactivas (ERO) y la actividad de G6PD, son pocos los estudios que han investigado la oxidación de esta enzima y sus consecuencias funcionales. En el presente trabajo de tesis se planteó como hipótesis que las modificaciones oxidativas sobre G6PD, mediadas por radicales peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$) y radical anión carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), dependen de la dosis de radicales y de la disponibilidad de residuos susceptibles a la oxidación. Tales procesos afectarían la actividad catalítica e inducirían cambios en la masa molecular de la proteína, con participación de Trp y Tyr en procesos de entrecruzamiento. En función de dicha hipótesis, se estudió la oxidación de aminoácidos libres (Trp y Tyr) y G6PD, con especial énfasis en la formación de especies di-Tyr, di-Trp y Tyr-Trp, como también en los mecanismos de inactivación de la enzima. Se desarrollaron metodologías por espectrometría de masas (UPLC-MS/MS) para detectar las especies entrecruzadas y se establecieron condiciones experimentales para modular la dosis de los radicales libres. Los resultados obtenidos demostraron que la exposición de Trp y Tyr a diferentes flujos radicalarios no mostró una relación con la formación de di-Tyr y di-Trp. En condiciones experimentales similares, la oxidación de G6PD se asoció con pérdida de la actividad enzimática mediante un proceso dependiente de la dosis, pero no del flujo radicalario. Se determinó una pérdida de 40% de actividad después de la incubación de la enzima con 60 mM de AAPH por 90 minutos. La inactivación de G6PD se relacionó con cambios en su contenido de estructura secundaria como también con un aumento de bolsillos hidrofóbicos. Estos fenómenos indicarían desplegamiento proteico probablemente relacionado con la oxidación de residuos específicos de Met y Trp. Esto último demostrado a través de experimentos desarrollados empleando cloramina T, un oxidante no biológico, específico de residuos de Met. Los resultados obtenidos permiten plantear que la exposición a oxidantes de G6PD conduce a la pérdida de su actividad catalítica lo que puede ser relevante a nivel celular. No obstante, se requieren nuevas investigaciones que permitan establecer, bajo condiciones celulares, la importancia de tales procesos.

Abstract

The enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) has a relevant role in biological systems. This is the first enzyme of the pentose phosphate pathway, an important route for nucleotides synthesis and production of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), a pivotal cofactor to maintain the intracellular redox homeostasis. In spite of the suggested association between the levels of reactive oxygen species (ROS) and G6PD activity, only a few studies have investigated the oxidation of this enzyme and the functional consequences. In the present thesis, it was hypothesized that oxidative modifications on G6PD, mediated by peroxy ($\text{ROO}^\bullet$), and carbonate radicals ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) depend on the radical dose and availability of susceptible amino acids. These processes would affect the catalytic activity of G6PD and would induce changes on its molecular mass, involving participation of Tyr and Trp in covalent crosslinks. It was studied the oxidation of free amino acids (Tyr and Trp), as well as G6PD, with particular emphasis in the production of di-Tyr, di-Trp and Tyr-Trp crosslinks, and the mechanisms of G6PD inactivation. Methodologies (amongst others) by using mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to detect crosslinks were developed, determining the better conditions to modulate the dose of radicals and the detection of crosslinks. Obtained results demonstrated that the exposure of Trp and Tyr to different radical fluxes is not necessary reflected in changes in the production of di-Tyr and di-Trp. Under similar experimental conditions, oxidation of G6PD was related to loss of enzymatic activity involving a process dependent on the radical dose, but not on the radical flux. It was determined a loss of 40% of enzymatic activity after incubation of G6PD with 60 mM AAPH for 90 min. This inactivation was related to changes in the secondary structure, as well as with exposure of hydrophobic pockets of G6PD. These results would reflect protein unfolding, probably associated with oxidation of specific Met and Trp residues, mediated by $\text{ROO}^\bullet$. The latter was demonstrated by studies employing chloramine T, a non-biological oxidant with specificity to Met residues. As a whole, the obtained results of this thesis, allow to postulate that exposure of G6PD to oxidants leads to loss enzymatic activity by mechanisms depending on the oxidant, which could be of relevance for cells. Nonetheless, new investigations aimed to determine, under cellular conditions, the importance of these processes are necessary.

Capítulo I. Introducción, Hipótesis y Objetivos

I.1 Introducción

Las proteínas son macromoléculas indispensables para el funcionamiento de los sistemas biológicos. Su alta abundancia en el medio celular (68% en peso seco) y su variada composición, las convierten en el blanco principal de especies oxidantes.¹ Durante los procesos oxidativos, las cadenas laterales de los amino ácidos son modificadas generándose hidroperóxidos, alcoholes, grupos carbonilos y otros productos de oxidación, los que pueden estar asociados con la acumulación de productos potencialmente tóxicos.² Esto puede inducir cambios estructurales afectando la funcionalidad biológica de las proteínas.^{1,3}

Se ha demostrado que los organismos vivos generan, como parte de su metabolismo celular, especies oxidantes, entre las que se destacan las especies reactivas de oxígeno (ERO).⁴ Los procesos oxidativos mediados por ERO dependen de diferentes factores siendo uno de ellos la reactividad de la especie oxidante implicada. ERO con baja o moderada reactividad gatillan la oxidación de proteínas en los residuos más susceptibles (como cisteína, metionina, triptófano y tirosina), mientras que ERO altamente reactivas oxidan de manera inespecífica incluyendo también los enlaces peptídicos.³ Los radicales peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$) son una ERO generada en sistemas biológicos durante la oxidación de lípidos de membranas (lipoperoxidación).⁵ Son oxidantes moderados ($E^\circ = 1 \text{ V}$),⁶ que pueden abstraer electrones o átomos de hidrógeno de las macromoléculas formando radicales secundarios en el blanco oxidable y posteriormente los correspondientes productos de oxidación.⁷ Otra ERO de relevancia biológica es el anión radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$).⁸ El $\text{CO}_3^{\bullet-}$ tiene un potencial de reducción ($E^\circ = 1,78 \text{ V}$) mayor que el del $\text{ROO}^\bullet$,⁹ no obstante, al igual que el $\text{ROO}^\bullet$, es una especie selectiva. La concentración de su precursor (ion bicarbonato HCO_3^-) es alta en el medio fisiológico (25 mM),¹⁰ lo que implica que bajo determinadas condiciones, su formación puede ser

favorecida. Una fuente biológica de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ a nivel intracelular se relaciona con la actividad peroxidasa de la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1).¹¹ En presencia de H_2O_2 , la SOD1 libera $\text{CO}_3^{\bullet-}$ al medio, induciendo su propia oxidación y dimerización, como también la oxidación de las macromoléculas presentes en su entorno.¹²

Tanto $\text{ROO}^\bullet$ como $\text{CO}_3^{\bullet-}$ pueden abstraer un átomo de hidrógeno desde las cadenas laterales de los aminoácidos tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) generando radicales tirosilo ($\text{Tyr}^\bullet$) y triptofanilo ($\text{Trp}^\bullet$), respectivamente. Ambos radicales ($\text{Tyr}^\bullet$ y $\text{Trp}^\bullet$) se estabilizan mediante la deslocalización del electrón desapareado en los sistemas aromáticos correspondientes (fenoxilo para $\text{Tyr}^\bullet$ e indoilo para $\text{Trp}^\bullet$).¹³ Por otra parte, $\text{Tyr}^\bullet$ y $\text{Trp}^\bullet$ reaccionan lentamente con O_2 ($k \sim 10^3$ y $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente).^{14,15} A pesar de ello, como consecuencia de su oxidación se forman mayoritariamente productos oxigenados, entre ellos, 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) para la oxidación de Tyr, N-formilquinurenina (NFK) y quinurenina (Kyn), para la oxidación de Trp.^{3,16} $\text{Tyr}^\bullet$ y $\text{Trp}^\bullet$ también pueden experimentar reacciones de término radical-radical.¹⁷ En estos procesos los radicales se recombinan formando entrecruzamientos covalentes como di-tirosina (di-Tyr), di-triptófano (di-Trp) y tirosina-triptófano (Tyr-Trp). Su velocidad de formación se favorecería a altas dosis y flujos de las fuentes oxidantes.^{18,19} Existe numerosa información acerca de la formación de di-Tyr,²⁰ no obstante, la formación de di-Trp ha sido estudiada de manera más limitada.²¹ Actualmente, las investigaciones relacionadas con la formación y consecuencias de di-Tyr son posibles gracias a la disponibilidad comercial de estándares y anticuerpos que permiten su detección y cuantificación desde péptidos y proteínas.^{20,22} Por ejemplo, di-Tyr ha sido detectada en muestras *post mortem* de agregados covalentes de la proteína sinucleína de pacientes con Parkinson.²³ Desafortunadamente, no se disponen de estándares comerciales de di-Trp y Tyr-Trp. Ello impide su cuantificación en muestras complejas, limitándose las investigaciones a su detección

mediante espectrometría de masas.^{18,24} A pesar de ello, se ha demostrado que di-Trp participa en el entrecruzamiento intermolecular de la enzima SOD1 humana, inducido por la acción de $\text{CO}_3^{\bullet-}$, lo que se ha propuesto como mecanismo para explicar en parte la etiología de esclerosis amiotrófica lateral familiar.²⁵ A pesar de las limitaciones en el área, a la fecha existe consenso en que la oxidación mono-electrónica de Tyr y Trp pueden derivar en la formación de entrecruzamientos covalentes (enlaces di-Tyr, di-Trp y Tyr-Trp).¹⁸ No obstante, el grado (cantidad) de producción y las consecuencias asociadas son fuertemente dependientes del tipo de proteína y oxidante.

La enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) cumple un rol importante en sistemas biológicos. G6PD es la primera enzima de la ruta de las pentosas fosfato, vía fundamental para la síntesis de nucleótidos y en especial para la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), cofactor clave para el metabolismo celular. G6PD cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato (G6P) a 6-fosfoglucono- γ -lactona conjuntamente con la reducción de NADP^+ a NADPH.²⁶ El NADPH es indispensable para mantener el estado redox celular, es un cofactor necesario para enzimas que regulan los mecanismos de defensa antioxidante.²⁷ Por ejemplo, el basado en la actividad de la enzima glutatión reductasa, enzima que está encargada del reciclaje de glutatión.²⁸ En este contexto se ha demostrado que G6PD cumple un rol fundamental en la neutralización de ERO en eritrocitos.²⁹ Se ha demostrado que una disminución de la actividad enzimática de G6PD involucra una disminución de los mecanismos de defensa de los eritrocitos, lo que conlleva a que ante una perturbación redox se genere hemólisis, desencadenándose episodios de anemia.²⁹ G6PD está ampliamente distribuida y conservada en función en la naturaleza.^{30,31} En el caso de la enzima proveniente del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* en su conformación nativa se encuentra como un homodímero.^{14,32} Cada monómero contiene un sitio activo en el que los aminoácidos ácido aspártico (Asp178) y His241

conforman la diada catalítica (ver Figura 1, creada desde la base de datos Uniprot, cód. P11411, G6PD_LEUME).³³ Adyacente a ellos se encuentra una histidina (His179) la que participa en la interacción con el sustrato G6P (His179).^{33,34} Esta proteína carece de residuos de Cys, contiene 10 residuos de Met, 21 de Tyr y 7 Trp por cada unidad monomérica; la distribución de los residuos de Met, Tyr y Trp se presenta en la **Fig. S1** (Anexo 1). En general estos residuos en G6PD tienen una baja exposición al solvente, aunque cerca del 50% de ellos están en regiones no estructuradas (*loops*).³²⁻³⁵

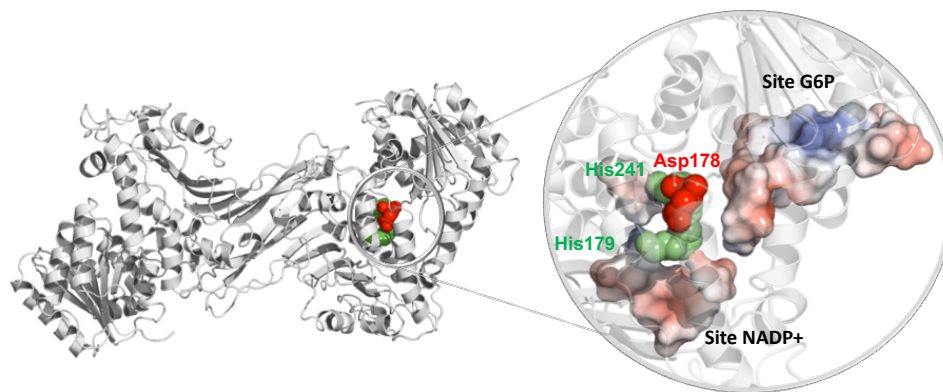


Figura 1. Estructura tridimensional de G6PD de *Leuconostoc mesenteroides*. En rojo se destaca Asp178 y en verde His179 y His241. Los sitios de unión de NADP⁺ y el sustrato G6P se indican en modo superficie. La estructura corresponde al cristal código PDB 1DPG (<https://www.rcsb.org/s>).

A pesar de la relación directa entre ERO y la actividad de G6PD, son pocos los trabajos que han investigado los procesos oxidativos de las ERO sobre G6PD. Szweda y Stadtman reportaron una disminución en la actividad de G6PD (*L. mesenteroides*) expuesta a iones de hierro (Fe²⁺) en presencia de H₂O₂.³⁶ El proceso de inactivación fue dependiente de la concentración de Fe²⁺ y se explicó por la unión específica del Fe²⁺ en el sitio activo de la enzima.³⁶ Este proceso oxidativo no generó cambios importantes en la conformación nativa de la proteína, sin embargo, condujo a cambios

estructurales evidenciados por un aumento de los bolsillos hidrofóbicos de la proteína.³⁷ Posteriormente, Arenas y col., reportaron que la exposición de G6PD a ROO• generaba modificaciones en residuos de Met, Trp y Tyr, conjuntamente con la formación de agregados covalentes.³⁸ Más recientemente, Leinisch y col.,³⁹ demostraron que ROO• y oxígeno singlete (¹O₂) inducen una disminución en la actividad de G6PD, conjuntamente con la formación de entrecruzamientos intra-moleculares con participación de residuos de Tyr y Trp.³⁹

Considerando el rol clave que tiene G6PD para los sistemas biológicos, su contenido en residuos oxidables (como Trp, Tyr y Met) y el limitado conocimiento acerca de su oxidación mediada por ERO, en la presente tesis se propuso estudiar los procesos oxidativos inducidos por ROO• y CO₃•⁻ sobre esta enzima. Se evaluó si estos procesos afectan su funcionalidad, así como, la posible contribución que tendría la oxidación de Tyr y Trp sobre estos sucesos. La exposición de G6PD a ROO• desencadenó un conjunto de procesos incluyendo la oxidación específica de residuos de Met y cambios conformacionales y estructurales que derivaron en la pérdida de la actividad catalítica.

I.2 Hipótesis de trabajo

La exposición de G6PD a radicales peróxilo ($\text{ROO}^\bullet$) y a anión radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) inducirá modificaciones oxidativas que dependerán de las dosis de los radicales y de la disponibilidad de los residuos susceptibles a la oxidación. Se espera que estos procesos afecten la actividad catalítica de la G6PD y se traduzcan en cambios en la masa molecular con participación de Trp y Tyr en reacciones conducentes a entrecruzamiento proteico.

I.3 Objetivos

Objetivo general

Estudiar los procesos oxidativos sobre G6PD mediados por $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y el posible rol de Trp y Tyr en procesos de entrecruzamiento proteico y en cambios de la actividad enzimática.

Objetivos específicos:

- Evaluar la oxidación de aminoácidos libres, por técnicas cromatográficas y por espectrometría de masas, inducida por $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\text{ROO}^\bullet$.
- Determinar, mediante electroforesis y cromatografía de exclusión molecular, los cambios en la masa molecular de G6PD mediados por $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\text{ROO}^\bullet$.
- Evaluar el consumo de aminoácidos, la formación de productos de oxidación y productos entrecruzados durante la oxidación de G6PD mediada por $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\text{ROO}^\bullet$.
- Determinar el mecanismo de inactivación de G6PD inducido por los oxidantes en estudio.

Capítulo II. Parte Experimental

II.1 Materiales

Tirosina, triptófano, ácido dietilentriamina penta acético (DTPA), quinurenina (Kyn), 3,4-dihidroxifenil-alanina (L-DOPA), ácido trifluoroacético (TFA), tio-anisol, rojo de pirogalol (PGR), Trolox, 1,2 etanoditiol, ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfónico (ANS), ácido metasulfónico (MSA), Cu/Zn superóxido dismutasa bovina (bSOD1) y acrilamida (40%) fueron adquiridos desde Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). El isómero (orto-orto) de di-Tyr y N-formilquinurenina (NFK) fueron obtenidos desde la empresa Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). Fosfatos mono y di sódico, junto con metanol y acetonitrilo (ACN) (grado HPLC) fueron adquiridos desde Merck (Darmstadt, Alemania). El complejo de cobalto III ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$) estuvo disponible en el Laboratorio de Radicales Libres y Oxidación de Proteínas (sintetizado previamente según Basolo y col.).⁴⁰ Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides*, fue expresada en *E. coli* según Olavarria y col.⁴¹

II.2 Metodología

II.2.1 Fuentes de $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$

Generación de $\text{ROO}^\bullet$ desde la termólisis del AAPH: Las muestras en estudio se incubaron a 37 °C en presencia de AAPH (186 o 60 mM a menos que se especifiquen otras concentraciones), en tampón fosfato de sodio 75 mM pH 7,4. Con la finalidad de recuperar el O_2 consumido, las soluciones fueron aireadas cada 30 minutos durante 30 segundos con una bomba de aire. Una vez incubadas, todas las soluciones fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Generación de $\text{ROO}^\bullet$ desde la fotólisis del AAPH: La fotólisis de AAPH fue realizada en un foto-reactor equipado con 8 lámparas UV-A ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$). Las lámparas se dispusieron sobre las paredes laterales del reactor (4 en cada pared). Las soluciones (1,2 mL) se irradiaron por 3 min en una celda

de cuarzo (de paso óptico de 5 mm, con 2 paredes esmeriladas), dispuesta en el centro del reactor, con las caras no esmeriladas paralelas a las paredes laterales del reactor. Las muestras en estudio fueron irradiadas en presencia de AAPH (1 o 10 mM) en tampón fosfato de sodio 75 mM pH 7,4. Todas las muestras irradiadas se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Generación de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ a partir de la fotólisis del complejo de cobalto III: La generación del $\text{CO}_3^{\bullet-}$ se realizó siguiendo la metodología descrita por Figueroa y col.⁴² Para ello, las muestras (amino ácidos libres, 0,5 mM) fueron preparadas en tampón fosfato de sodio 75 mM pH 7,4 conteniendo 0,1 mM de DTPA y 4 mM del complejo de cobalto (III) ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$). Las soluciones (1,9 mL) fueron dispuestas en una celda de cuarzo de paso óptico de 5 mm e irradiadas a 254 nm durante 3 min en atmósfera de N_2 . Todas las muestras irradiadas se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Generación de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ desde la actividad peroxidasa de bSOD1: El $\text{CO}_3^{\bullet-}$ se generó a partir de la actividad peroxidasa de bSOD1 siguiendo el método utilizado por Figueroa y col.⁴² Para ello, Las muestras en estudio (G6PD, 3mg/mL) se incubaron durante 30 minutos a 25 °C con bSOD1 (3 μM) en presencia de 2 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en tampón bicarbonato de sodio (200 mM pH 7,4) con 0,1 mM de DTPA. La reacción fue detenida por la adición de catalasa. Posteriormente las enzimas fueron retiradas utilizando filtros amikon de 10 kDa, y las muestras almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

II.2.2 Determinación de las dosis de $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$

Uso de Trolox como sonda oxidable: Las dosis de $\text{ROO}^\bullet$ generadas desde la termólisis y fotólisis de AAPH, como también de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ generado desde la actividad peroxidasa de bSOD1, se determinaron siguiendo el consumo de Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, por cromatografía

líquida de alta eficiencia (HPLC). Para ello, soluciones de Trolox (0,05 – 1,0 mM) fueron expuestas a los sistemas generadores de radicales descritos anteriormente. La cuantificación de Trolox se realizó a partir del área bajo la curva de su pico cromatográfico (registrado a 290 nm) utilizando una curva de calibración (50-1000 μ M) preparada en tampón fosfato de sodio 75 mM pH 7,4. Los análisis por HPLC se realizaron en un sistema Agilent 1200 system, equipado con un auto-muestreador (mantenido a 4 °C) y un detector de arreglo de diodos (DAD), Agilent 1260 series. Las muestras (20 μ L) fueron inyectadas en una columna Hibar® 250 $\times$ 4,3 mm RP-18 encapada (tamaño de partícula de 5 μ m), a 40 °C, utilizando como fase móvil fosfato di-ácido de potasio (KH_2PO_4) 0,01 M ajustado a pH 2,6 con ácido orto-fosfórico/acetonitrilo (40/60). Se utilizó un flujo de 1,2 mL/min y el tiempo de corrida fue de 10 min.

Determinación de la dosis de radicales mediante el uso de PGR como sonda: La determinación de la dosis de $\text{ROO}^\bullet$ generada desde la termólisis de AAPH se realizó determinando la velocidad consumo del compuesto PGR. Para ello, una solución de PGR (30 μ M) conteniendo AAPH (186 mM) se incubó a 37 °C y se siguió la cinética de consumo de PGR por espectrofotometría UV-vis a 540 nm. La dosis del $\text{CO}_3^{\bullet-}$, generado desde la actividad peroxidasa de bSOD1, se realizó utilizando la metodología propuesta por Figueroa y col.,⁴² para lo cual se determinaron las cinéticas de desaparición del PGR a 540 nm a diferentes tiempos de la reacción (0, 10, 20 y 30 minutos).

II.2.3 Oxidación de Trp y Tyr mediada por $\text{ROO}^\bullet$: formación de entrecruzamientos covalentes

Determinación del consumo de Tyr y Trp expuestos a $\text{ROO}^\bullet$: Los aminoácidos libres Tyr y Trp (1 mM) fueron expuestos de manera independiente los $\text{ROO}^\bullet$ generados desde la termólisis y fotólisis del AAPH (10 y 186 mM respectivamente). Tyr y Trp fueron separados y cuantificados por HPLC, utilizando curvas de calibración construidas con estándares

comerciales (en un rango de 50-1000 μM). El método cromatográfico se desarrolló usando un modo isocrático, con KH_2PO_4 15 mM (fase A) y una disolución de metanol/agua al 80% (fase B) como fases móviles, en una relación 94/6% para el análisis de Tyr. Para Trp se utilizaron las mismas fases móviles, pero en una relación de 90% de A y 10% de B. La detección de Tyr y Trp se realizó utilizando un detector de fluorescencia (FLD) Agilent 1260 series, excitando a 280 y siguiendo la emisión a 320 y 360 nm respectivamente.

Detección de entrecruzamientos con participación de Tyr y Trp: La cuantificación de di-Tyr formada desde la exposición de Tyr (1 mM) a ROO $\bullet$, se realizó utilizando una curva de calibración empleando un estándar comercial de di-Tyr (2,5-50 μM) solubilizado en agua ultra pura. Los análisis se realizaron utilizando el mismo método descrito anteriormente para la determinación del consumo de Tyr. La di-Tyr se detectó por FLD excitando a 280 nm y siguiendo la emisión a 410 nm. La detección de los entrecruzamientos di-Tyr, Tyr-Trp y di-Trp se realizó por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UPLC) utilizando un equipo Ekspert acoplado a un detector de espectrometría de masas con triple cuadrupolo (ABSciex 4500, Triple QuadTM), siguiendo las condiciones descritas por Figueroa y col.⁴³ De manera resumida, se utilizó el modo de monitoreo de reacción seleccionado (SRM) con polaridad positiva, en el cual se recolectaron Q1 y Q3 para di-Trp (407 $\rightarrow$ 203), di-Tyr (361 $\rightarrow$ 315) y Tyr-Trp (384 $\rightarrow$ 203 y 384 $\rightarrow$ 367). Los espectros de masas-masas (MS/MS) fueron registrados utilizando un tamaño de paso de 0,1 Da de los iones seleccionados, con un rango de exploración de 50 a 1000 Da. La cromatografía se realizó utilizando un gradiente de una fase móvil A (0,1% de ácido fórmico en agua) y B (50:50 metanol:agua conteniendo 1% de ácido fórmico) a un flujo de 0,8 mL min⁻¹. La gradiente se inició con un 100% de fase A por 2 min, luego disminuyó hasta un 20% a los 30 minutos. Posteriormente, la fase A retornó al 100% al minuto 35. El tiempo de equilibrio de fases fue de 5 minutos.

II.2.4 Oxidación de G6PD mediada por ROO•

Determinación de la actividad enzimática y parámetros cinéticos (Michaelis-Menten): La determinación de la actividad de G6PD se realizó siguiendo el método reportado por Cosgrove y col.,²⁶ con algunas modificaciones. Las muestras de G6PD (3 mg/mL) se diluyeron en tampón fosfato de sodio (75 mM, pH 7,4) hasta una concentración de 10 µg/mL. 100 µL de esta solución fueron adicionados a 900 µL de una solución de β -NADP⁺ (400 µM). La reacción se inició por la adición de 1 mL de G6P (4 mM). La actividad enzimática de las muestras se determinó midiendo la aparición de NADPH a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453. La cuantificación de la actividad enzimática se realizó a partir de las pendientes de la parte lineal (inicial) de las cinéticas. La determinación de la Km de β -NADP⁺ se realizó en un rango entre 5,9 µM y 14,25 mM, manteniendo la concentración de G6P en 2 mM. Para determinar la Km de G6P se utilizó un rango de concentraciones entre 0,035 y 30 mM de G6P utilizando una concentración constante de β -NADP⁺ de 180 µM.

Protocolo de oxidación de G6PD: Soluciones de G6PD (3 mg/mL) conteniendo AAPH (10 - 275 mM) en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4, fueron incubadas a 37 °C por 3 horas (termólisis de AAPH) o sometidas a irradiación por 3 min (fotólisis de AAPH). AAPH fue removido por filtración y las muestras almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

Consumo de amino ácidos en muestras de G6PD expuestas a ROO•: El contenido de amino ácidos en muestras de G6PD incubadas con AAPH fue determinado por el método de derivatización pre-columna con el reactivo OPA en muestras hidrolizadas. Alícuotas de 200 µL de G6PD (3 mg/mL) (muestras control y oxidadas), se transfirieron a viales de vidrio. Se adicionaron 50 µL de TCA al 50% p/v y se incubaron a 4 °C por 5 min. Luego, las soluciones se centrifugaron durante 10 min a 9000 rpm a 4 °C. Los pellets obtenidos fueron lavados con acetona fría y secados bajo una atmósfera de N₂. Una vez secos, a cada pellet de proteína se les añadieron

150 μ L de ácido metasulfónico (4 M) con 0,2% p/v de triptamina. Los viales de vidrio fueron ubicados en un sistema Pico-Tag eliminándose el O₂ realizando 5 ciclos consecutivos de vacío e inyección de N₂ (10 min de vacío, 30 segundos de corriente de N₂). Las muestras al vacío se incubaron durante 18 h a 110 °C en una estufa. Posteriormente, las muestras se enfriaron hasta temperatura ambiente y se neutralizaron agregando 150 μ L de NaOH (4 M). Finalmente, las muestras neutralizadas se filtraron utilizando filtros Pall Nanosep de 0,2 μ m. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Las muestras hidrolizadas se diluyeron 25 veces en agua ultra pura (Mili-Q) y se transfirieron a viales de 1,5 mL de HPLC dispuestos en un auto muestreador (mantenido a 8 °C). Las muestras se derivatizaron antes de ser inyectadas. Para ello, una alícuota de 20 μ L de cada muestra se mezclaron con 40 μ L de OPA activado, las soluciones se incubaron por 1 min. Posteriormente se inyectaron 20 μ L en una columna Hibar® 250 $\times$ 4.3 mm RP-18 encapada (tamaño de partícula de 5 μ m) mantenida a 40 °C. Las muestras se eluyeron usando un gradiente de la fase A (acetato de sodio 50 mM pH 5,3; 20% metanol; 2,5% THF) y fase B (acetato de sodio 50 mM pH 5,3; 80 % metanol; 2,5% THF) a un flujo de 0,8 mL/min. La gradiente se inició con 100% de fase A durante 7 min, luego disminuyó hasta un 50% a los 17 min. Posteriormente, la fase A se redujo hasta 0% en el minuto 25 y esta condición se mantuvo durante 1 minuto. Finalmente, la fase A retornó a 70% al minuto 32; el tiempo de equilibrio de fases fue de 5 minutos. La detección se realizó por fluorescencia (λ_{ex} = 340 nm y λ_{em} = 440 nm). La identificación de cada pico cromatográfico se realizó por comparación con los tiempos de retención de una mezcla comercial de que contiene estándares de cada amino ácido analizado. Para determinar la concentración de cada aminoácido se realizaron curvas de calibración utilizando la mezcla comercial de aminoácidos en un rango de concentraciones de 0 a 20 μ M. Estos valores fueron divididos por el área de la señal de Leu en las muestras y multiplicado por el número de residuos que contiene la proteína, extraídos desde su secuencia (Uniprot cod. P11411, G6PD_LEUME).

Detección y cuantificación de productos de oxidación: Se determinaron productos de oxidación no específicos (grupos carbonilo e hidroperóxidos) como también específicos (productos de oxidación de Trp y Tyr) en muestras de G6PD hidrolizadas en medio ácido (MSA). La cuantificación de los carbonilos totales se realizó de acuerdo al método basado en la derivatización con DNPH,⁴⁴ determinando la absorbancia a 370 nm en un lector de microplacas. Para ello, 100 μ L de proteína fueron incubados con 500 μ L de DNPH (0,2%, preparado en HCl 2N) durante 40 min en oscuridad. Posteriormente las proteínas fueron precipitadas en TCA (20% en concentración final) y centrifugadas 10 min a (1970 g). Los pellets de proteína obtenidos se lavaron 3 veces con una solución 1/1 de agua/acetato de etilo y luego se re-disolvieron en guanidina 6 M. La concentración de carbonilos fue estimada utilizando el coeficiente de extinción molar del producto hidrazona ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁴⁴ La cuantificación de los hidroperóxidos se realizó mediante el ensayo de FOX.^{45,46} Para ello, 20 μ L de muestras de G6PD (3 mg/mL) se incubaron con 200 μ L del reactivo de FOX (constituido por la mezcla 125 μ M de anaranjado de xilenol y 0,25 mM de sulfato amónico ferroso en ácido sulfúrico 25 mM) durante 30 min. Posteriormente se determinó la absorbancia en un lector de placas a 560 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración realizada con H_2O_2 en un rango de 0 a 100 μ M. Para el análisis de los productos específicos de Trp y Tyr, las muestras de G6PD se diluyeron 5 veces y se analizaron por UPLC-MS/MS siguiendo el método descrito por Figueroa y col.⁴³ Los productos de oxidación de Tyr y Trp se analizaron en modo SRM, los Q1 y Q3 se reportan en la **Tabla S1** (Anexo 2). Utilizando un estándar comercial se cuantificó Kyn (209 $\rightarrow$ 94), NFK (237 $\rightarrow$ 118) y DOPA (198 $\rightarrow$ 152). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que las descritas anteriormente (para la detección de entrecruzamientos con participación de Tyr y Trp).

Cambios en la masa molecular de G6PD inducidos por ROO•: Los cambios

en la masa molecular de G6PD mediados por las modificaciones oxidativas en estudio se determinaron por electroforesis capilar en condiciones denaturantes y no denaturantes, cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión de luz (LS).

Para los análisis por electroforesis en condiciones denaturantes (no nativas, SDS-PAGE), a 30 μ L de las muestras de G6PD (3 mg/mL, 54,4 μ M) oxidadas y no oxidadas (control) se les añadieron 10 μ L de tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 con 2% de dodecilsulfato sódico (SDS), 10% glicerol, 100mM de β -mercaptoetanol y 0,02% azul de bromofenol). La mezcla se incubó a 90 °C por 5 min y se cargó en el gel. Se utilizó un estándar de masas moleculares (10 – 250 kDa) para establecer las masas de las bandas generadas. Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles se fotografiaron utilizando un lector UVP, utilizando el software Gel Max Imager. El monómero de G6PD se cuantificó por SEC en condiciones no nativas siguiendo el protocolo utilizado por Reyes y col.,⁴⁷ con modificaciones menores. Para ello, muestras de G6PD (3 mg/mL) se diluyeron en una razón de 1:5 en tampón fosfato (75 mM, pH 7,4) con 0,1% de SDS y posteriormente se incubaron durante 10 min a 90 °C. Una alícuota de 20 μ L de cada muestra se inyectó a una columna de exclusión por tamaño Phenomenex SEC-s3000, conectada a una bomba cuaternaria (PU-4180) y un detector PAD (MD-4010), ambos sistemas controlados con una interface Jasco LC-NetII/ADC. La cromatografía se realizó en modo isocrático utilizando como fase móvil el tampón fosfato 75 mM, pH 7,4 con 0,1% de SDS a temperatura ambiente y un flujo de 0,8 mL/min. La detección se realizó monitoreando la longitud de onda de 210 nm.

Para los análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) se siguieron las recomendaciones de Agilent Technologies, 2015.⁴⁸ Alícuotas de (10 μ L) de la enzima (3 mg/mL) fueron mezcladas con 10 μ L del tampón de carga (623 mM de Tris pH 6,8, glicerol al 20% y azul de bromofenol en un 0,02%). Se utilizó una concentración del 10% y 4% de

poliacrilamida, para el gel separador y concentrador, respectivamente. La electroforesis se realizó a corriente constante aplicando 50 mA por gel durante 50 minutos, en un tampón de corrida (pH 8,3) que contenía 192 mM de glicina y 25 mM de Tris. Los cambios en el dímero de G6PD fueron determinados en condiciones no denatürantes mediante un análisis por SEC. Las diferentes muestras de G6PD (3 mg/mL) se diluyeron en una razón de 1:5 en tampón fosfato (75 mM, pH 7,4) y una alícuota de 20 μ L se inyectó a una columna de exclusión por tamaño Phenomenex SEC-s3000. La cromatografía fue realizada en modo isocrático utilizando como fase móvil el buffer fosfato 75 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente y un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó monitoreando la intensidad a $\lambda = 220$ nm. Finalmente, la formación de agregados de G6PD como resultado de su exposición a ROO $\bullet$, se determinó mediante LS de acuerdo a Plomer y Gafni.⁴⁹ Para ello, se determinó la señal de dispersión de luz en las soluciones de G6PD (tratadas y no tratadas con AAPH) siguiendo la intensidad a $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm ($\lambda_{\text{em}} = 450$ nm) en un fluorímetro Perkin Elmer LS-55.

Modificaciones conformacionales de G6PD gatilladas por ROO $\bullet$: Los cambios conformacionales asociados a las modificaciones oxidativas de G6PD generadas por su exposición a ROO $\bullet$ fueron estudiados por dicroísmo circular (DC) y siguiendo la fluorescencia de la sonda ANS. El contenido de la estructura secundaria en muestras de G6PD se determinó por DC. Soluciones de G6PD (3 mg/mL), tratadas y no tratadas con AAPH, fueron diluidas en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4) hasta una concentración de 0,15 mg/mL y transferidas a celdas de cuarzo de paso óptico de 0,2 mm. Los espectros se adquirieron en un equipo Jasco j-1500 (Jasco Inc., Easton, MD, USA) equipado con un peltier para el control de la temperatura. Los espectros, se midieron a 25 °C en un rango de 195 a 250 nm. Los espectros fueron deconvolucionados con la herramienta online BESTSEL.⁵⁰ Para registrar espectros DC de la proteína totalmente desplegada, se desarrollaron experimentos (25 °C) en presencia de guanidinio (3 M), como también de G6PD a alta temperatura (80 °C). Por

otra parte, considerando la capacidad de la sonda ANS para interaccionar con bolsillos hidrofóbicos de proteínas y la factibilidad de seguir dicho proceso por fluorescencia,⁵¹ se desarrollaron tales experimentos utilizando muestras de G6PD (oxidada y no oxidada). El procedimiento experimental fue realizado de acuerdo a Gómez-Manzo y col.,⁵² con algunas modificaciones. Las muestras de G6PD oxidadas y sus respectivos controles (3 mg/mL) se diluyeron a una concentración final de 0,4 mg/mL (7,2 μ M) en una solución de ANS 164 μ M en tampón fosfato de sodio (75 mM pH 7,4). Los espectros de fluorescencia se registraron a 37 °C en un fluorímetro PerkinElmer LS55, utilizando una celda de 200 μ L, en un rango entre 420-640 nm con $\lambda_{\text{ex}} = 387$ nm.

II.2.5 Oxidación de G6PD mediada por cloramina T

Protocolo de oxidación y ensayos: Se incubaron (a 25 °C) soluciones de G6PD (3 mg/mL) con Cloramina T (0,01; 0,1 y 10 mM) en tampón fosfato de sodio (75 mM pH 7,4) durante 20 min. Luego de la incubación, el exceso de cloramina T se removió utilizando filtros amikon de 10 kDa. Las muestras oxidadas se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Los cambios en la actividad enzimática, consumo de aminoácidos (método de OPA), cambios en la masa molecular (SDS-PAGE, SEC nativo), contenido de estructura secundaria (DC) y bolsillos hidrofóbicos (fluorescencia de ANS) se estudiaron de acuerdo a las metodologías descritas previamente.

Análisis por espectrometría de masas de muestras de G6PD expuestas a cloramina T: Las modificaciones en la estructura primaria de G6PD inducidas por cloramina T fueron determinadas siguiendo la metodología descrita por Reyes y col.,⁴⁷ con algunas modificaciones. La digestión enzimática se realizó utilizando dos sistemas: LysC y tripsina. Los análisis de los péptidos generados fueron realizados en un espectrómetro de masas Impact II ESI-QTOF (Bruker Daltonics) en modo positivo conectado a un sistema de cromatografía Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). La identificación y el mapeo de las modificaciones de los péptidos fueron

realizados utilizando el software MaxQuant (versión 1.6.1.0). El grado de modificación particular de los residuos fue calculado con los paquetes del software de Bruker (DataAnalysis y QuantAnalysis).

II.2.6 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante la aplicación de un t-test no paramétrico desapareado empleando el programa computacional Prism 7 u Origin 8®. Los datos (en gráficos) indicados con un asterisco corresponden a aquellos con una diferencia estadística ($p < 0,05$) respecto a sus controles.

Capítulo III. Resultados y discusión

Tyr y Trp son de especial interés en la química de oxidación de proteínas ya que representan uno de los blancos principales de las ERO.^{1,3} A diferencia de otros blancos oxidables, se desconocen mecanismos de reparación de productos (por ej. enzimática) que permitan revertir el daño sobre estos residuos, lo que implicaría que su oxidación es de carácter irreversible en sistemas biológicos.⁴ En el primer paso de la oxidación de Tyr y Trp se genera un radical intermediario (Tyr[•] o Trp[•]) el que posteriormente reacciona con O₂.^{1,3} Los productos generados por esta vía son diversos, incluyendo a grupos carbonilos, hidroperóxidos, endoperóxidos y alcoholes, entre otros.^{1,16} Adicionalmente, se pueden formar, por reacciones radical-radical entrecruzamientos covalentes entre las cadenas laterales de Tyr y Trp.¹⁸ La oxidación mono-electrónica de Cys también puede llevar a la formación de entrecruzamientos covalentes (puentes disulfuros), pero a diferencia de las especies derivadas de Tyr y Trp, estos pueden ser reducidos en medios biológicos.^{4,53} Los entrecruzamientos covalentes, generados por procesos de oxidación inducidos por ERO han sido detectados en múltiples proteínas,^{18,54} entre ellas G6PD.³⁹ En particular, los productos entrecruzados de Tyr y Trp pueden mediar agregación irreversible de proteínas y estar involucrados en la pérdida de su funcionalidad biológica.^{18,55} Dadas sus propiedades, los entrecruzados de Tyr y Trp como Tyr-Tyr (di-Tyr), Tyr-Trp y Trp-Trp (di-Trp), podrían ser considerados como marcadores de oxidación proteica.^{18,54} Si bien se han detectado tales especies en proteínas aisladas, y péptidos, sólo se dispone del estándar comercial de di-Tyr (o,o'-di-tirosina).^{18,20} En el caso de di-Trp, se ha detectado su formación durante la oxidación de ciertas proteínas y péptidos inducida por irradiación en presencia de fotosensibilizadores como riboflavina y ácido quinurénico,^{56,57} radiaciones ionizantes (por radiólisis de pulso) y CO₃^{•-}.^{19,21} Debido a la relevancia de G6PD en sistemas biológicos y al potencial efecto de las modificaciones oxidativas inducidas por especies reactivas, en la presente tesis se estudió la oxidación de G6PD mediada por ROO[•] y CO₃^{•-}. En una

primera etapa se estudió la dosis y flujo de los ROO• y CO₃•⁻ generados en diferentes sistemas (termólisis, fotólisis y enzimático). Posteriormente se evaluó la influencia del flujo radicalario en la oxidación de Trp y Tyr libres y en la formación de entrecruzamientos. En la segunda etapa se estudiaron los cambios en la funcionalidad de G6PD mediados por tales radicales. Considerando los resultados obtenidos se definieron estudios sistemáticos utilizando ROO• como oxidante. Especial énfasis se dio a los procesos de entrecruzamiento covalente con participación de residuos de Tyr y Trp, y su efecto en la inactivación de la enzima.

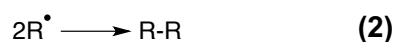
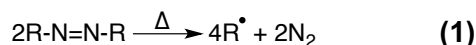
III.1 Generación de ROO• y CO₃•⁻ y oxidación de amino ácidos libres (Tyr y Trp).

Como fuente de ROO• se utilizó AAPH, un azocompuesto ampliamente utilizado para tales fines,⁷ mientras que el CO₃•⁻ fue generado desde la actividad peroxidasa de bSOD1. Se determinaron las dosis y flujos radicalarios generados en los diferentes sistemas utilizando dos compuestos fenólicos como sondas oxidables: Trolox y PGR.^{58,59}

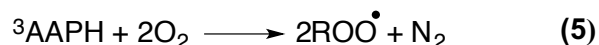
III.1.1 AAPH como fuente de ROO•

La termólisis de AAPH involucra un rompimiento homolítico del enlace C-N que conduce a la generación de dos radicales alquilo R• los que pueden recombinarse formando productos no radicalarios (R-R), o pueden reaccionar con O₂ (proceso controlado por difusión, $k \sim 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para formar ROO• (**Reacciones 1-3**).^{60,61} A partir de la constante de velocidad de descomposición de AAPH ($1,36 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a 37 °C, pH 7,4) es posible estimar la velocidad de producción de ROO• según:^{60,62}

$$\text{Velocidad de producción} = k_e[\text{AAPH}]$$



La generación de radicales desde el AAPH también se ha descrito desde su fotólisis.^{63,64} Estudios han establecido que la irradiación de AAPH con UV-A (λ_{ex} 365 nm) conduce a la formación de un estado singlete excitado ($^1\text{AAPH}$) que puede pasar, mediante cruce entre sistemas, a un estado triplete excitado ($^3\text{AAPH}$) (**Reacciones 4-5**).⁶³ Este último puede ser apagado por O_2 generando $\text{ROO}^\bullet$ ($k = 2,3 \pm 0,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{7,64}



La sonda Rojo de pirogalol (PGR) fue utilizada para determinar la velocidad de generación (flujo radicalario) de $\text{ROO}^\bullet$ generados desde la termólisis de AAPH. A partir de las cinéticas de consumo de PGR (seguidas a 560 nm), se establecieron las velocidades de consumo a tiempos iniciales de reacción (t_0). Utilizando una estequiometría de la reacción de PGR con $\text{ROO}^\bullet$ igual a 2,0,⁵⁹ se determinó una producción de $15,4 \pm 2,1 \mu\text{M}/\text{min}$ lo que concuerda con el valor teórico esperado ($15,2 \mu\text{M}/\text{min}$).⁶² La concentración total de $\text{ROO}^\bullet$ (dosis) producidos en 30 min fue de $462 \pm 60 \mu\text{M}$ (**Tabla 1**).^{62,65} Este valor fue corroborado utilizando Trolox, un análogo de la vitamina E que se oxida con una estequiometría igual a 2,0.^{62,65} El consumo de Trolox, determinado por HPLC-DAD, muestra un valor de $200 \mu\text{M}$ de manera independiente de la concentración inicial de Trolox (**Fig. 2**). Este valor implica que la dosis de $\text{ROO}^\bullet$ generada fue de $444 \pm 50 \mu\text{M}$ y $428 \pm 56 \mu\text{M}$ para la termólisis y fotólisis de AAPH, respectivamente (**Tabla 1**).

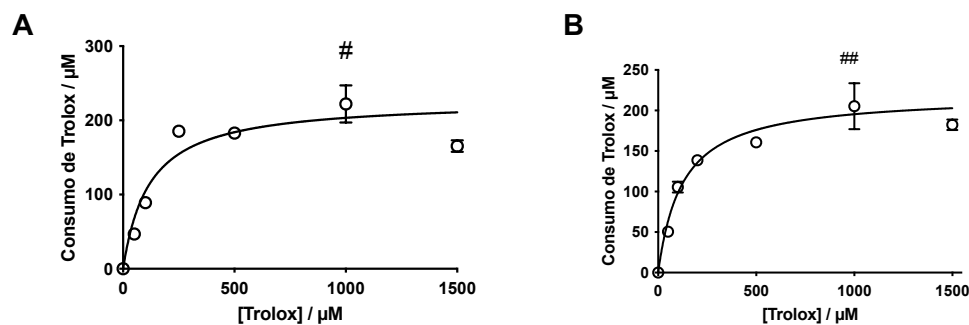
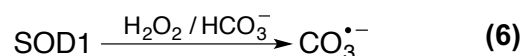


Figura 2. Consumo de Trolox mediado por ROO•. Panel A: Consumo del Trolox en función de su concentración inicial posterior a su incubación con 186 mM de AAPH a 37 °C durante 30 min (termólisis). Panel B: Consumo de Trolox al ser expuesto a la fotólisis de AAPH 10 mM ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm) durante 3 min. Los resultados son el promedio de experimentos desarrollados en triplicado con excepción de # y ## que fueron repetidos 9 y 15 veces, respectivamente.

III.1.2 bSOD1 como fuente $\text{CO}_3^{\bullet-}$

Se ha demostrado que el $\text{CO}_3^{\bullet-}$ es generado por la actividad peroxidasa de la enzima bSOD1.^{10,11} Como mecanismo se ha propuesto que el H_2O_2 reacciona en el sitio activo de la enzima formando un aducto oxidante entre radical hidroxilo y el ion cobre de la enzima. Cuando esta especie oxidante se encuentra en presencia de iones bicarbonato, estos son oxidados a $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (**Reacción 6**).^{66,67}



La velocidad de generación de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ fue determinada a partir de la velocidad de consumo del PGR en presencia del sistema bSOD1/ H_2O_2 /bicarbonato.⁴² El consumo de PGR en función del tiempo (**Fig. S2**, Anexo 1) de incubación con el sistema bSOD1/ H_2O_2 /bicarbonato muestra que a los 30 minutos se consumieron $225,6 \pm 17 \mu\text{M}$ lo que equivaldría a una dosis de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ de $451 \pm 34 \mu\text{M}$ (**Tabla 1**).⁴² Esta dosis fue corroborada mediante el consumo de Trolox, de acuerdo a los resultados presentados en la **Fig. 3** para concentraciones de Trolox de 1,0 y 1,5 mM. Como se

presenta, se determinó un consumo de $233 \pm 48 \mu\text{M}$, lo que asumiendo una estequiometria de reacción de 2, equivale a una dosis de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ de $465 \pm 96 \mu\text{M}$ (Tabla 1).

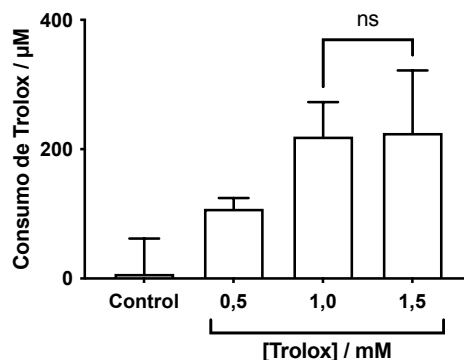


Figura 3. Dependencia del consumo de Trolox, inducido por $\text{CO}_3^{\bullet-}$, con su concentración inicial. Soluciones de Trolox (0,5, 1 y 1,5 mM) se expusieron a la actividad peroxidasa de bSOD1 ($3 \mu\text{M}$), durante 30 minutos. La cuantificación de Trolox se realizó por HPLC-DAD en fase reversa.

Las dosis de $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ determinadas experimentalmente se muestran en la **Tabla 1**. Los resultados indican que fue posible generar una misma dosis desde los diferentes sistemas, destacándose que los $\text{ROO}^\bullet$ fueron generados a dos flujos (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis de $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ determinadas utilizando PGR y Trolox como sondas oxidables.

Sistema radicalario / radical	Dosis PGR (μM) / flujo ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Dosis Trolox (μM) / flujo ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Termólisis de AAPH / $\text{ROO}^\bullet$	462 ± 60 / $15,4 \pm 0,2$	444 ± 50 / $14,8 \pm 1,7$
Fotólisis de AAPH / $\text{ROO}^\bullet$	---	428 ± 56 / 143 ± 18
Actividad peroxidasa SOD1 / $\text{CO}_3^{\bullet-}$	451 ± 34 / $\sim 15 \pm 1$	465 ± 96 / $\sim 15,5 \pm 3$

III.1.3 Oxidación de Tyr y Trp

Con el objetivo de generar los entrecruzamientos en estudio (di-Tyr, di-Trp y Tyr-Trp) se procedió a oxidar Tyr y Trp como aminoácidos libres mediante su exposición a $\text{CO}_3^{\bullet-}$, según lo reportado por Paviani y col.²¹ Los $\text{CO}_3^{\bullet-}$ fueron generados desde la descomposición fotoquímica del complejo de cobalto (III) $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_3$.^{12,21} Con la finalidad de aumentar el rendimiento, las soluciones conteniendo Tyr y/o Trp y el complejo de cobalto (4 mM) se irradiaron, bajo condiciones anaeróbicas (N_2), por 3 min a 254 nm. Los productos entrecruzados fueron separados y detectados por UPLC-MS/MS (Fig. 4).⁴³

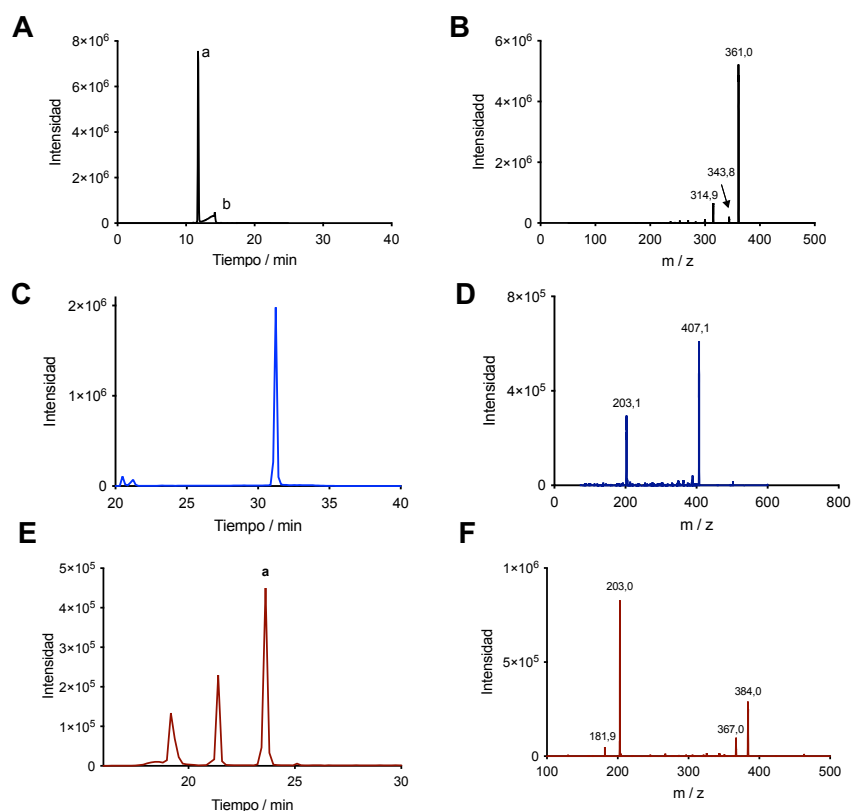


Figura 4. Detección de entrecruzamientos por UPLC-MS/MS. Soluciones de Trp y/o Tyr y el complejo de cobalto (III) fueron irradiadas a 254 nm, en atmósfera de N_2 y analizadas por UPLC-MS/MS en modo de monitoreo de reacción seleccionado (SRM). En los paneles A, C y E, se muestra los SRM para di-Tyr ($361 \rightarrow 315$ m/z), di-Trp ($407 \rightarrow 203$ m/z) y Tyr-Trp ($384 \rightarrow 367$ m/z), mientras que sus respectivos espectros MS/MS se muestra en los paneles B (di-Tyr, señal a del panel A), C (di-Trp) y D (Tyr-Trp, señal a del panel E).

Como se observa en la **Fig. 4**, se detectaron dos especies de di-Tyr, siendo el pico cromatográfico principal atribuido a la presencia del isómero orto-orto di-Tyr. En el caso de las irradiaciones de Trp en presencia del complejo de Co(III) se detectó un pico mayoritario con $m/z = 407$ y fragmentación 203. Esto de acuerdo con lo reportado para dímeros de Trp; di-Trp.²¹ La irradiación de soluciones que contenían mezclas de Tyr y Trp generaron picos cromatográficos atribuibles a isómeros de los entrecruzados del tipo Tyr-Trp. Estos estudios permitieron seleccionar las mejores condiciones experimentales como también del equipo UPLC-MS/MS para una óptima formación y detección de las especies en estudio. A partir de ello, fue posible establecer su formación en presencia de AAPH en diferentes condiciones experimentales (flujo radicalario).

Para ello, la oxidación de Tyr y Trp (1 mM) se estudió a una dosis fija de $\text{ROO}^\bullet$ ($\sim 450 \mu\text{M}$) pero generada a diferentes flujos, que abarcan desde 15 $\mu\text{M}/\text{min}$ (generado por termólisis de AAPH), hasta $\sim 143 \mu\text{M}/\text{min}$ (fotólisis de AAPH). La detección de Tyr y Trp se realizó por HPLC-FLD siguiendo la fluorescencia a 320 y 360 nm (λ_{ex} 280 nm), respectivamente. En los experimentos controles no se observó un consumo de los aminoácidos, lo que indicó que fueron estables a la incubación a 37 °C e irradiación a 365 nm. El consumo de Tyr expuesta a la termólisis y fotólisis del AAPH fue de 58 ± 11 y $77 \pm 9 \mu\text{M}$, valores que representan un $5,8 \pm 1,1$ y $7,7 \pm 0,9\%$ de consumo respectivamente. La formación de di-Tyr fue cuantificada por HPLC en fase reversa (**Fig. S3**, Anexo 1) con detección de fluorescencia (λ_{ex} 280 nm / λ_{em} 420 nm). En las muestras de Tyr expuestas a la termólisis y fotólisis de AAPH se detectó la presencia de di-Tyr (**Fig. 5**, paneles A y B). La concentración de di-Tyr determinada fue en $4,4 \pm 1,5$ y $4,0 \pm 1 \mu\text{M}$ para la Tyr expuesta a la termólisis y fotólisis del AAPH, respectivamente. Esto implicaría que el aumento del flujo radicalario de $\text{ROO}^\bullet$ desde 15 a 150 $\mu\text{M}/\text{min}$ (termólisis y fotólisis de AAPH), no afectó la formación de di-Tyr. Este resultado no mostró una asociación directa entre un aumento de flujo radicalario y un aumento en la formación de di-Tyr, lo que se podría

explicarse por la formación de oligómeros u otros productos de oxidación de Tyr.^{68,69}

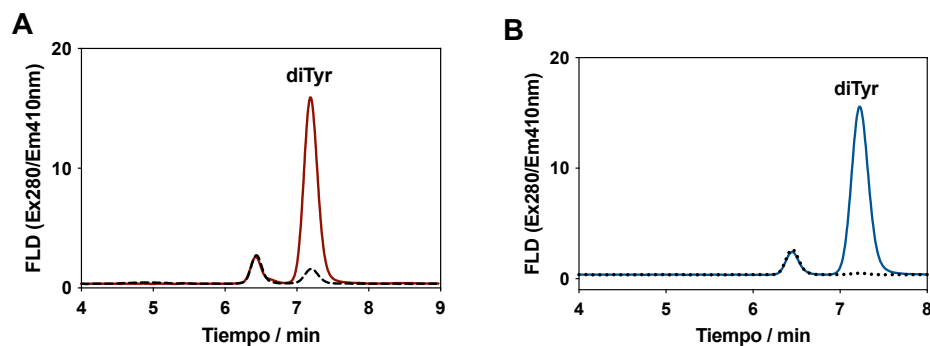


Figura 5. Formación de di-Tyr inducida por ROO•. Tyr (1 mM) se expuso a la termólisis y fotólisis de AAPH. La detección di-Tyr se realizó por HPLC-FLD en fase reversa (λ_{ex} 280 nm / λ_{em} 420 nm). En el Panel A se muestran los cromatogramas obtenidos durante la oxidación de Tyr inducida por ROO• generados por la termólisis de AAPH (186 mM) a tiempo inicial 0 (----) y después de 30 min (—). En el Panel B se muestran los cromatogramas obtenidos por el proceso de fotólisis de AAPH (10 mM) a tiempo inicial 0 (····) y después de 3 min (—). Los resultados corresponden al promedio de $n = 13$.

Posteriormente se evaluó la oxidación de Trp inducida por diferentes flujos de ROO•. Los consumos de Trp generados por la termólisis y fotólisis de AAPH, fueron de 188 ± 31 y 119 ± 26 μ M, respectivamente (**Fig. 6**, panel A). Al igual que los estudios de di-Tyr, la formación de entrecruzamientos di-Trp se evaluó por UPLC-MS/MS en fase reversa. La detección del di-Trp se realizó en modo SRM utilizando la transición $407 \rightarrow 203$ m/z. En las muestras de Trp expuestas al flujo de radicales de ~ 15 μ M/min no fue detectado di-Trp, sin embargo, en condiciones de flujo de 150 μ M/min (**Fig. 5**, panel B) fue posible detectar la señal de di-Trp.

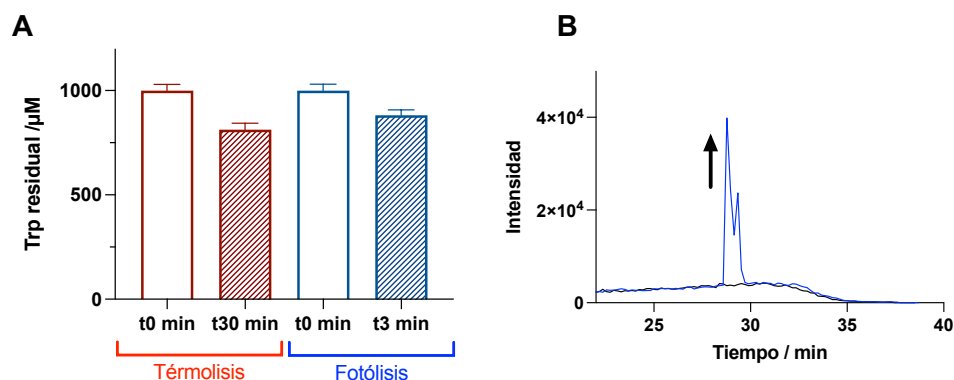


Figura 6. Consumo de Trp y formación de di-Trp mediada por la exposición de Trp a los ROO•. Trp (1 mM) fue expuesto a la termólisis y fotólisis de AAPH en tampón fosfato de sodio 75 mM, pH 7,4. La termólisis se realizó con 186 mM de AAPH a 37 °C, por 30 min. En el panel A se presenta la concentración de Trp residual antes y después de su exposición a ROO•. El panel B muestra la detección de di-Trp por UPLC-MS/MS con SRM (407→203); en presencia de la termólisis (—) y fotólisis (—) de AAPH.

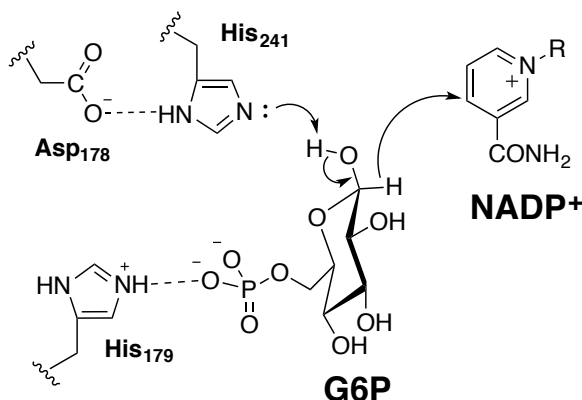
Los resultados presentados en la **Fig.6** evidenciaron que un aumento del flujo de radicales ROO• (en un orden de magnitud) indujo a una mayor formación de di-Trp. Estos resultados indicarían que el aumento del flujo radicalario generó un aumento del estado estacionario de los radicales Trp• favoreciendo su recombinación ($k \sim 5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).¹⁹

Los resultados presentados permitieron establecer las condiciones experimentales para generar una dosis conocida de ROO• y CO₃•⁻, y en el caso de ROO•, establecer diferentes flujos radicalarios. Adicionalmente, se establecieron las condiciones y metodologías para generar y detectar productos entrecruzados de Tyr y Trp; di-Tyr y di-Trp. Tales aproximaciones fueron aplicadas a los estudios de oxidación de G6PD y la potencial participación de entrecruzamiento del tipo di-Tyr y di-Trp en la inactivación enzimática inducida por ROO•.

III.2 Oxidación de G6PD inducida por $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$

III.2.1 Cambios en actividad enzimática y masa molecular de G6PD inducidos por $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$

La G6PD es una enzima intracelular que cataliza la primera reacción del ciclo de las pentosas fosfato en la que se oxida la glucosa 6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona.^{29,33} Presenta un mecanismo enzimático secuencial ordenado, que se inicia con la unión del sustrato nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADP^+) para posteriormente unirse el segundo sustrato que corresponde a la G6P. En la isoforma de G6PD proveniente de *Leuconostoc mesenteroides* existen tres residuos clave para la acción catalítica; la His179 que interacciona con el grupo fosfato de G6P y la diada catalítica constituida por el Asp178 y la His241 la que actúa como base abstrayendo un protón del grupo hidroxilo (OH) del carbono 1 (C1) de G6P. Paralelamente se transfiere un hidruro desde C1 de la G6P al C4 del NADP^+ , generándose NADPH (**Esquema 1**).^{26,33}



Esquema 1. Mecanismo catalítico propuesto para G6PD de *Leuconostoc mesenteroides*.²⁶

El NADPH formado posee una banda de absorbancia con un máximo a 340 nm (banda que no está presente en el NADP^+) lo que permite seguir la actividad enzimática de G6PD por espectrofotometría ultravioleta (**Fig. 7**, panel A). La G6PD del organismo *Leucosnotoc mesenteroides*, utilizada en

esta tesis, se caracterizó previo a su oxidación. Para ello, se determinaron las constantes de Michaelis-Menten (K_m) del cofactor NADP^+ y del sustrato G6P. Para NADP^+ se obtuvo una $K_m = 10,42 \pm 1,95$, mientras que la K_m de G6P fue de $199,77 \pm 28,68 \mu\text{M}$ (**Fig. S4**, Anexo 1). Ambos valores están en el rango reportado en la literatura.^{26,35,36}

La exposición de G6PD a dosis definidas de $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ afectó la actividad enzimática. Las cinéticas presentadas en la **Fig. 7**, paneles B, C y D, corresponden a los resultados obtenidos para muestras de G6PD expuestas a flujos de $\text{ROO}^\bullet$ de 15 (panel B) y 150 (panel C) $\mu\text{M}/\text{min}$, ambos generando una dosis de $\sim 450 \mu\text{M}$. El panel D corresponde a G6PD expuesta a 450 μM de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (flujo inicial de 15 $\mu\text{M}/\text{min}$).

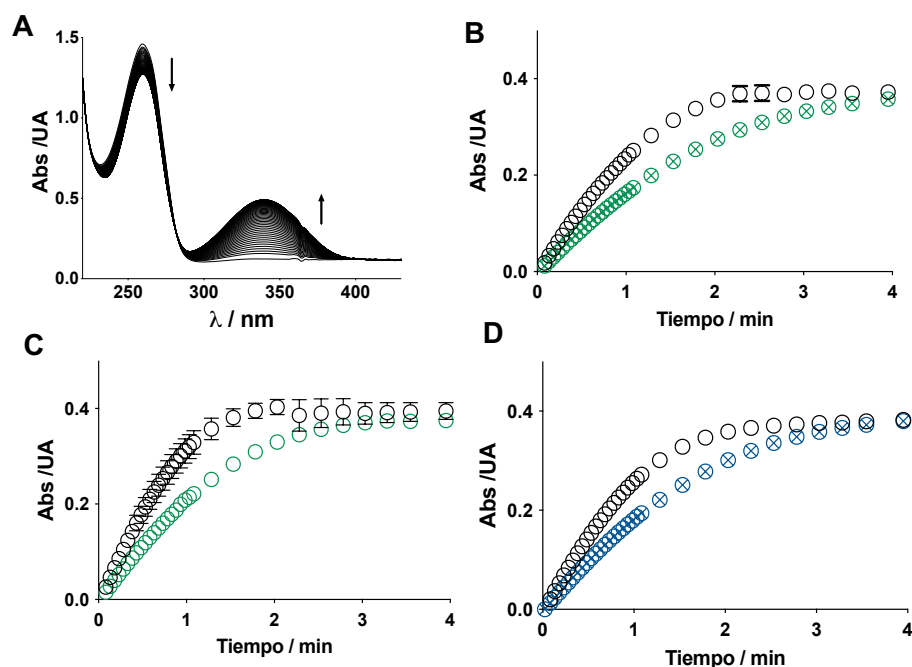


Figura 7. Cambios en la actividad enzimática de G6PD inducidos por los $\text{ROO}^\bullet$ y el $\text{CO}_3^{\bullet-}$. El Panel A presenta los espectros UV-vis de formación de NADPH a partir de la actividad catalítica de G6PD. En los paneles B, C y D se muestra formación de NADPH (a 340 nm) en muestras de G6PD expuestas a $\text{ROO}^\bullet$ generados por fotólisis y termólisis de AAPH (paneles B y C, respectivamente) y al $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (panel D). (○) = controles (G6PD incubada en ausencia de las fuentes de radicales); G6PD expuesta a fotólisis (⊗) y termólisis (⊙) de AAPH y a $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (⊗).

Los perfiles cinéticos presentados en la **Fig. 7** mostraron que la exposición de la enzima a los oxidantes indujo una disminución en la actividad enzimática. Esto se evidenció por una menor velocidad inicial, la que, expresada en términos porcentuales, se reflejó en una actividad remanente de 67 ± 4 , 63 ± 7 y $68 \pm 4\%$ para termólisis y fotólisis de AAPH y $\text{CO}_3^{\bullet-}$, respectivamente (**Fig. 8**). En consecuencia, no se observaron diferencias significativas en la inactivación de la enzima mediada por ambas especies radicalarias.

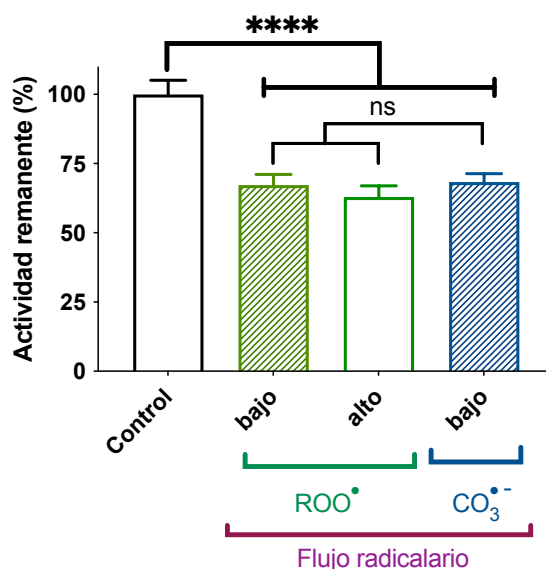


Figura 8. Actividad enzimática remanente de G6PD posterior a su exposición a los $\text{ROO}^{\bullet}$ y el $\text{CO}_3^{\bullet-}$. La actividad remanente fue expresada en (%) y fue calculada desde las cinéticas presentadas en la **Fig. 7**. **** indica un valor estadístico de $p = 0,0023$.

Con la finalidad de establecer si la inactivación de G6PD mediada por $\text{ROO}^{\bullet}$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ se relaciona con procesos de entrecruzamiento covalente se desarrollaron estudios por electroforesis y SEC. Como se presenta en la **Fig. 9**, se observó una banda intensa correspondiente al monómero de la enzima (~ 50 kDa). El perfil electroforético correspondiente a las muestras expuestas a flujos de 15 y 150 $\mu\text{M}/\text{min}$ de $\text{ROO}^{\bullet}$ (termólisis y fotólisis, respectivamente), mostró la formación de agregados covalentes. En

particular, se registró una banda con masa molecular cercana a 75 kDa que puede corresponder a la unión covalente de un monómero de G6PD con un péptido (de masa molecular menor a 20 kDa). Esto implicaría fragmentación y posterior agregación de la proteína. Adicionalmente, se detectaron bandas correspondientes a la masa molecular de dímeros y trímeros, lo que está de acuerdo con lo reportado por Arenas y col.³⁸ Similarmente, los geles de las muestras de G6PD expuestas a $\text{CO}_3^{\bullet-}$ evidenciaron la presencia de bandas correspondientes a agregados de alta masa molecular.

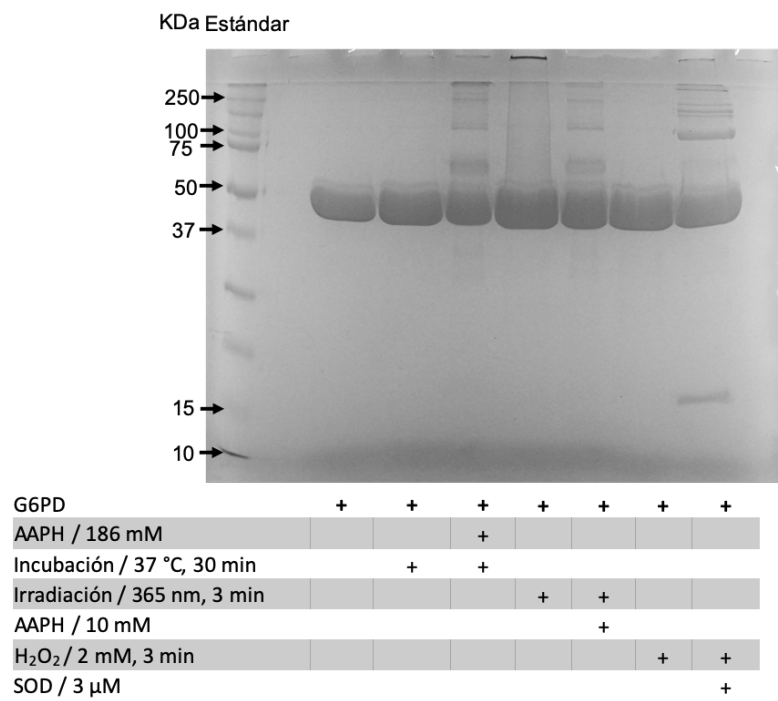


Figura 9. Cambios en la masa molecular determinados por SDS-PAGE de muestras de G6PD expuestas a ROO• y CO₃^{•-}.

Para cuantificar los cambios en la masa molecular de G6PD inducidos por ROO• y CO₃^{•-} se realizaron ensayos por cromatografía líquida de exclusión molecular (SEC) en condiciones denaturantes. El análisis de las muestras control (G6PD incubada en ausencia de oxidantes) mostró un único pico cromatográfico de alta intensidad (detectado a 210 nm) con tiempo de

retención de 10 min (**Fig. 10**). Se observó una disminución importante de la intensidad (y área bajo la curva) de dicha señal en todas las muestras pre-tratadas con $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Este comportamiento fue interpretado como un consumo del monómero de G6PD gatillado por los procesos oxidativos (**Fig. 10**). En las muestras de G6PD expuestas a $\text{CO}_3^{\bullet-}$ se observó un segundo pico cromatográfico (15,8 min) correspondiente a la enzima bSOD1.

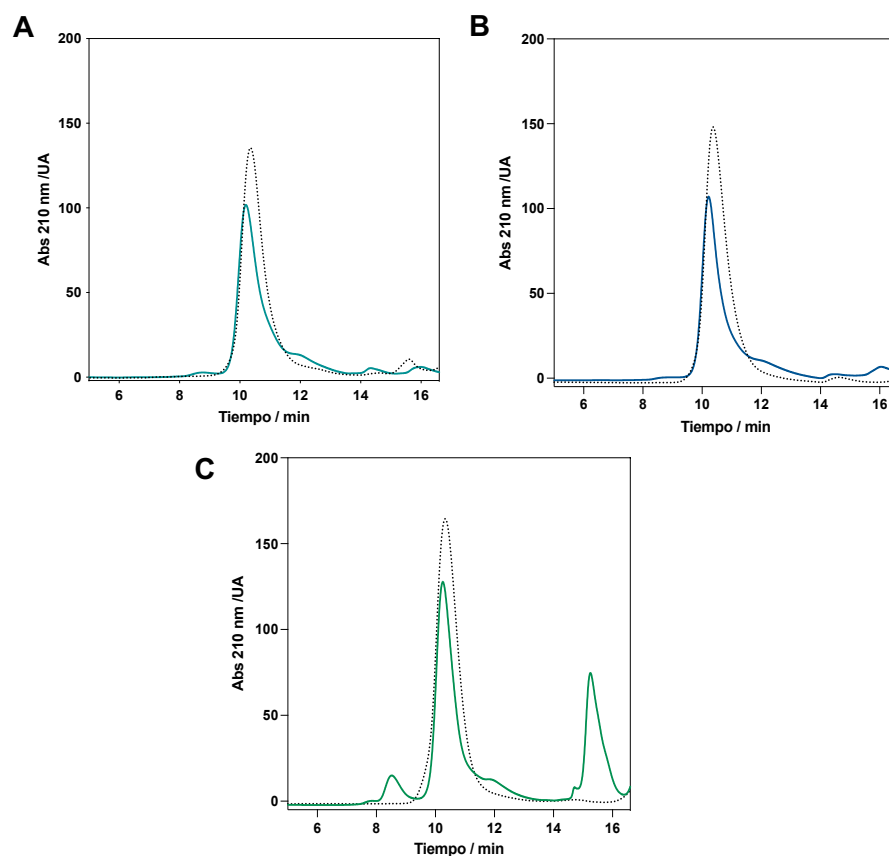


Figura 10. Análisis por SEC en condiciones denaturantes de muestras de G6PD expuestas a $\text{ROO}^\bullet$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron expuestas a $\text{ROO}^\bullet$ producidos por la termólisis (panel A) y fotólisis (panel B) de AAPH y a $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (panel C). Las líneas punteadas corresponden a los controles (G6PD incubada en ausencia de oxidantes), mientras que las líneas continuas corresponden a las muestras de G6PD oxidadas.

La disminución del monómero de G6PD se cuantificó a partir de los cambios en el área bajo la curva (ABC) de los picos cromatográficos. Se determinaron valores del ABC correspondientes a 71 ± 12 , 72 ± 9 y $67 \pm 7\%$ para los ROO• generados por termólisis y fotólisis de AAPH, y $\text{CO}_3^{\bullet-}$, respectivamente (**Fig. 10**). Estos resultados indican que los consumos del monómero de la proteína (~30%) son de la misma magnitud que la disminución de la actividad enzimática descrita anteriormente para estas mismas muestras (~34%). Los consumos monoméricos fueron similares para todos los sistemas oxidantes. Por tal razón, con el objetivo de explorar en profundidad los mecanismos que llevan a la oxidación de la enzima, como también a la pérdida de su actividad enzimática, se desarrollaron estudios sistemáticos empleando ROO• como agentes oxidantes.

III.2.2 Rol de la oxidación de aminoácidos y el desplegamiento proteico en la inactivación de G6PD mediada por ROO•

Inactivación de G6PD inducida por ROO•: Se determinó la actividad de G6PD (3 mg/mL) a diferentes tiempos de incubación (37 °C) en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de AAPH. En presencia de AAPH 10 mM, no se observó pérdida de actividad enzimática durante los primeros 90 minutos de incubación (**Fig. 11**, panel A). Sin embargo, a tiempos superiores a 90 min, se observó una disminución de la actividad alcanzando un $83 \pm 4\%$ de la actividad inicial luego de 210 min de exposición a AAPH (**Fig. S5**, panel A, Anexo 1). En ausencia de AAPH, la actividad de G6PD no fue afectada durante el mismo periodo de tiempo (**Fig. S5**, panel B, Anexo 1). Al igual que AAPH 10 mM, concentraciones superiores (40 y 60 mM) también mostraron un tiempo de latencia (definido como el tiempo en que no se determinaron cambios en la actividad enzimática). Se registró un tiempo de latencia de 30 y 20 minutos para AAPH 40 y 60 mM, respectivamente (**Fig. 11**, panel A). En presencia de 186 mM de AAPH la actividad decayó inmediatamente, no detectándose la presencia de tiempo de latencia en los perfiles cinéticos.

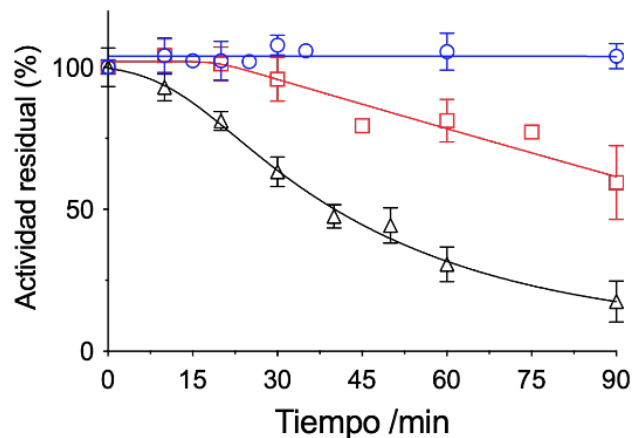


Figura 11. Dependencia de la actividad residual de G6PD con el tiempo de incubación en presencia de AAPH. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron incubadas con 10 (○), 60 (□) y 186 (△) mM de AAPH a 37 °C. La actividad es presentada como porcentaje de la actividad inicial (actividad residual).

Considerando los tiempos de latencia y la dosis de radicales, se determinó que, en promedio, $\sim 88 \mu\text{M}$ de $\text{ROO}^\bullet$ fueron necesarios para inducir cambios en la actividad enzimática de G6PD. Asumiendo que todos los $\text{ROO}^\bullet$ generados reaccionaron con G6PD (**Fig. S6**, Anexo 1), este valor implicaría que fueron necesarios 1,6 moles de $\text{ROO}^\bullet$ por cada mol de G6PD para inducir cambios en su actividad enzimática. Se determinaron los valores de K_m para G6P y NADP^+ para muestras controles de G6PD como también para G6PD pre-tratada con AAPH (60 mM, 90 min). Las K_m calculadas para las muestras oxidadas de G6PD fueron de $6,7 \pm 1,3$ y $288,8 \pm 43,3 \mu\text{M}$ para NADP^+ y G6P, respectivamente. Estos resultados no difieren significativamente con los valores obtenidos para la enzima control; $K_m = 10,42 \pm 1,95$ y $199,77 \pm 28,68 \mu\text{M}$ para NADP^+ y G6P, respectivamente (**Fig. S4**, Anexo 1). En consecuencia, es posible establecer que la oxidación de G6PD inducida por $\text{ROO}^\bullet$ seguiría un mecanismo asociado a un modelo de dos estados (activo-inactivo). Es decir, la oxidación de la enzima conlleva a una disminución en el número de moléculas de enzima activa. Por tanto, una disminución de un $40.6 \pm 8.5\%$ (90 min con 60 mM AAPH) equivaldría a que se inactivó una concentración de $22 \mu\text{M}$ de enzima.

Por otra parte, al comparar la disminución de la actividad enzimática para una dosis única de ROO• (~450 µM), pero generada a diferentes flujos radicalarios, se observó una inactivación similar para todos los sistemas (**Fig. 12**). Este resultado implicaría que reacciones de término radical-radical (que deberían ser influenciadas por el flujo radicalario) no participan en la inactivación de G6PD.

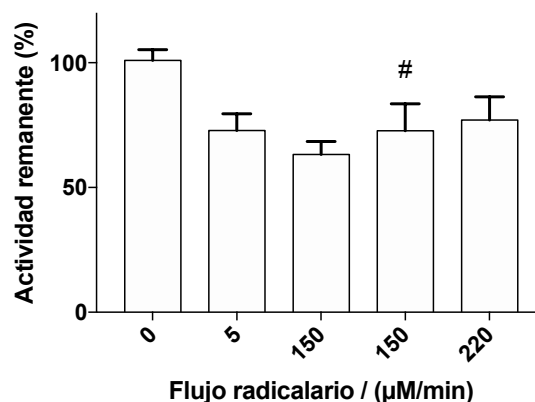


Figura 12. Dependencia de la actividad de G6PD con el flujo de ROO•. Soluciones de G6PD (3 mg / mL) fueron incubadas con diferentes concentraciones de AAPH y diferentes tiempos. Cada condición generó diferentes flujos radicalarios, pero una misma dosis total (~450 µM). Adicionalmente G6PD fue expuesta a la fotólisis de AAPH 10 mM (#).

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de oxidación de proteínas mediados por ROO• se basan en la abstracción de un átomo de hidrógeno o un electrón desde las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, generándose un radical secundario (G6PD•), el que por reacciones de término radical-radical puede formar di-Tyr, di-Trp y Tyr-Trp, entre otros entrecruzados.¹⁸ Los resultados presentados en la **Fig. 12** muestran que un aumento en el flujo de ROO• (de 15 a 150 µM), no se tradujo en cambios en la actividad enzimática. Esto implicaría que la inactivación de la enzima no está mayoritariamente relacionada con la formación de entrecruzados covalentes. En línea con lo propuesto por Leinisch y col.,³⁹ quienes reportaron formación de entrecruzamientos intramoleculares, se propone que las reacciones de término radical-radical no juegan un rol preponderante en la inactivación de la enzima mediada por ROO•.

Adicionalmente, se investigó si la presencia de G6P y NADP^+ afectan la inactivación de la enzima mediada por $\text{ROO}^\bullet$. Soluciones de G6PD (3 mg / mL) se expusieron a la termólisis de AAPH (60 mM) en presencia de ambos ligandos (G6P o NADP^+) en una proporción de 1:100 (proteína:ligando). Las cinéticas de inactivación mostraron un comportamiento similar en ausencia y presencia de G6P y NADP^+ lo que indicaría que los sitios de unión no se afectaron directamente por $\text{ROO}^\bullet$ y/o AAPH (**Fig. 13**).

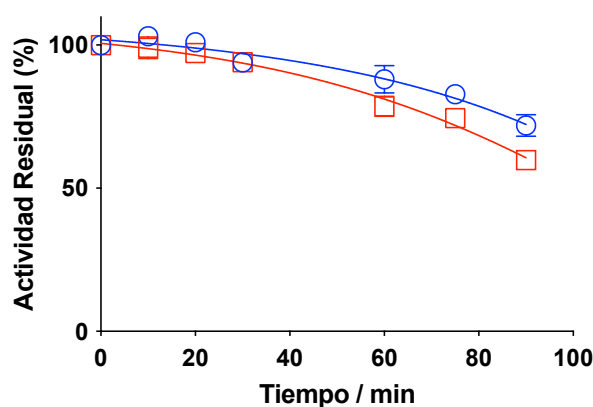


Figura 13. Inactivación de G6PD mediada por $\text{ROO}^\bullet$ en presencia de G6P y NADP^+ . Soluciones de G6PD (3 mg/mL) y los sustratos G6P (○) o NADP^+ (□) en una relación 1:100 (5,4 mM), fueron incubadas con AAPH (60 mM) a 37 °C. Las cinéticas de inactivación son presentadas como actividad residual (%).

Consumo de aminoácidos y formación de productos de oxidación: Para cuantificar el consumo de los aminoácidos de G6PD, como resultado de su exposición a $\text{ROO}^\bullet$, muestras de G6PD (3 mg/mL) expuestas a la termólisis de AAPH 60 mM durante 20 y 90 min fueron sometidas a hidrólisis ácida, derivatización con OPA y análisis por HPLC-FLD en fase reversa. A tiempos iniciales de incubación, la concentración de aminoácidos determinada estuvo de acuerdo con lo esperado según la secuencia primaria de la proteína (**Fig. S7**, paneles A y B, Anexo 1). Como se presenta en la **Fig. 14**, en el tiempo de latencia (20 min de incubación con AAPH 60 mM) no se detectaron cambios significativos en la concentración de

aminoácidos, en particular de aquellos susceptibles de oxidación (Tyr, Trp, His, Met). Tampoco se observó producción de MetSO, el principal producto de oxidación de Met. En general el método de hidrólisis y derivatización con OPA tiene una alta variabilidad con coeficientes de variación aprox. de 10%. Por ello, si bien no se detectaron cambios significativos, no se puede descartar consumos (bajos) de amino ácidos durante el tiempo de latencia.

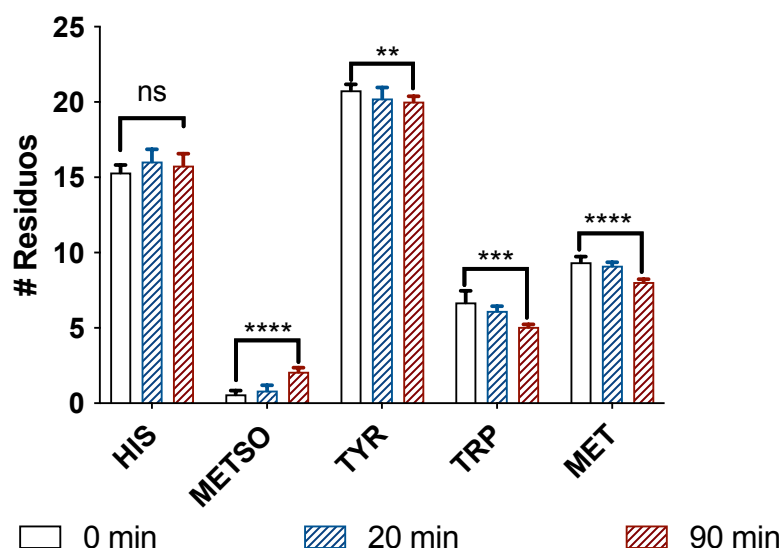


Figura 14. Consumo de aminoácidos y formación de MetSO en G6PD tratada con ROO•. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron incubadas a 37 °C en presencia de AAPH (60 mM). Alícuotas tomadas a 0, 20 y 90 min fueron sometidas hidrólisis ácida. El consumo de aminoácidos fue determinado por HPLC-FLD previa derivatización con OPA. Los resultados son expresados en número de residuos normalizados con Leu. ** $p = 0,0036$; *** $p = 0,0004$; **** $p < 0,0001$ con respecto al control.

A los 90 min de incubación (AAPH 60 mM) se determinó un consumo significativo de residuos con respecto al tiempo inicial. Se consumieron en total 3,9 moles de residuos por mol de proteína (1,7 moles de Trp, 1,4 de Met y 0,8 de Tyr). Estos valores equivalen a un consumo de 0,5 moles de aminoácidos consumidos por cada mol de ROO• introducido al sistema (0,2 moles de Trp y Met y 0,1 mol de Tyr). Trp fue el principal blanco de ROO•, representando al 44% del total de residuos consumidos, seguido por Met

(36%) y Tyr (20%). Estos resultados concuerdan con los resultados reportados por Leinisch y col,³⁹ quienes reportaron, en base a estudios de proteómica, un patrón de oxidación similar. Tales estudios mostraron que los residuos de Trp en posición 403 (~60%) y 328 (~20%) fueron los principales residuos oxidados. La oxidación para el caso de Met fue más deslocalizada; 5 de los 10 residuos demostraron altos índices de oxidación.³⁹ Estos resultados indicarían que la oxidación de residuos específicos de Trp y/o Met está relacionada con la inactivación de la enzima.

Se analizaron, por espectrometría de masas (UPLC-MS/MS), los productos de oxidación de Trp y Tyr. En el caso de Trp se investigó la formación de quinurenina (Kyn) y productos con $m/z = 221$ y 237 , que corresponden a la adición de uno y dos átomos de oxígeno (+16 y +32, respectivamente) a Trp ($m/z = 205$). Estos productos pueden generarse desde reacciones del radical peroxilo de Trp ($\text{Trp-OO}^\bullet$) y corresponden a hidroperóxidos (Trp-OOH), dioles (Trp-(OH)_2) o alcoholes simples (Trp-OH).^{57,70} Las muestras de G6PD incubadas en ausencia (controles) y presencia de AAPH (60 mM) fueron hidrolizadas, diluidas 5 veces en agua ultrapura, y analizadas por UPLC-MS/MS. Como se presenta en la **Fig. 15**, se detectaron las señales correspondientes a los productos de oxidación de Trp en las muestras de G6PD pre-tratadas con AAPH durante 20 y 90 min. Los resultados muestran la formación de productos después de 20 min incubación con AAPH, tiempo en que la actividad enzimática no se afectó. En base a datos reportados en literatura y a la comparación con un estándar comercial, se detectó y cuantificó a Kyn en modo SRM ($209 \rightarrow 94$). Con respecto a las muestras control, la intensidad de la señal aumentó 5 y 41 veces para 20 y 90 min de incubación, respectivamente (**Fig. 15**, paneles A y B). Los resultados mostraron la formación de $1 \mu\text{M}$ de Kyn a los 90 min de incubación. El producto Trp +16 ($m/z = 221$), detectado en modo SRM ($221 \rightarrow 175$, con tiempo de retención de 16,6 min), mostró un aumento de su señal en 3 y 13 veces con respecto al control, para 20 y 90 min de

incubación, respectivamente (**Fig. 15**, panel C). El espectro MS/MS fue similar al reportado por Ronsein y col.,⁷¹ para un alcohol de Trp (Trp-OH) (**Fig. 15**, panel D). Se detectaron dos señales con la transición SRM 237 → 146, con elución a 11,7 y 12,8 min. Ambas señales corresponden a productos con Trp +32, relacionadas con hidroperóxidos y dioles. Debido a su baja intensidad no fue posible adquirir su espectro de MS/MS.

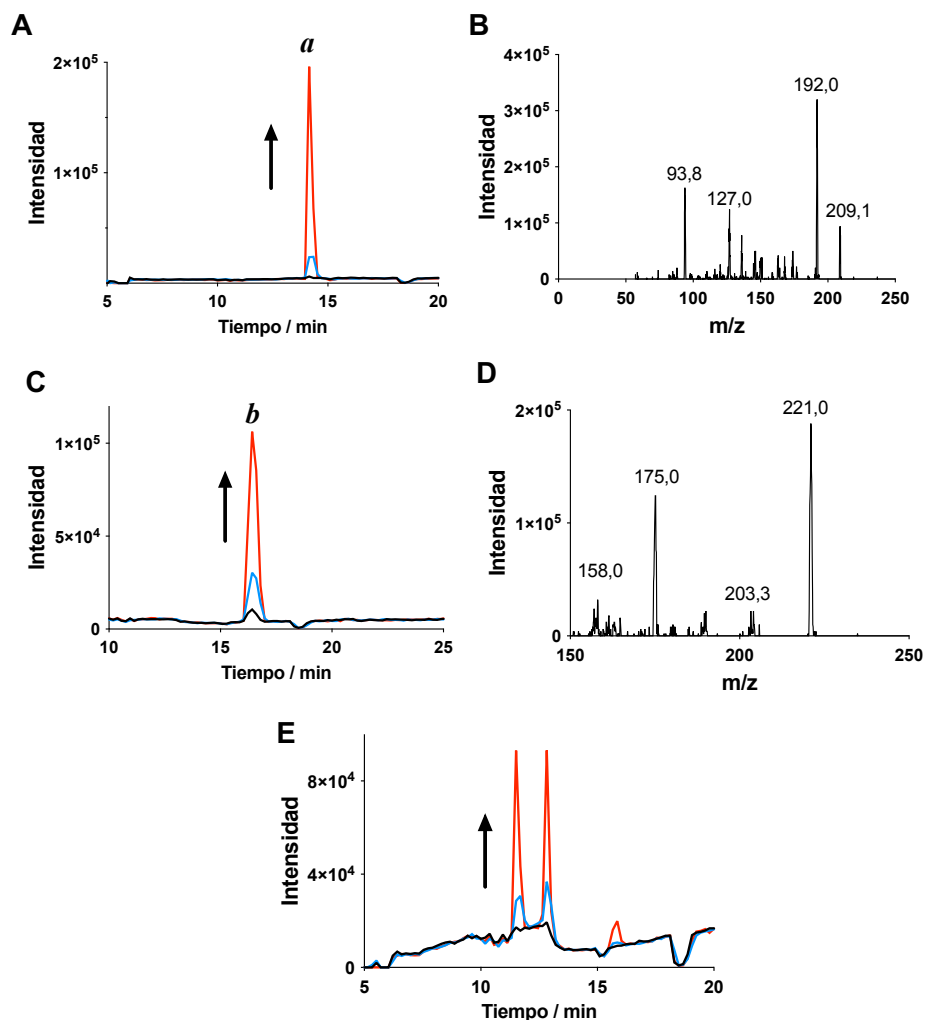


Figura 15. Análisis por UPLC-MS/MS de los productos de oxidación de Trp en G6PD. Muestras de G6PD (3 mg/mL) control (—) e incubadas durante 20 (—) y 90 (—) min con AAPH (60 mM), fueron hidrolizadas químicamente y analizadas por UPLC-MS/MS. Los paneles A, C y E presentan los cromatogramas para las transiciones (SRM) 209 → 94; 221 → 175 y 237 → 146, respectivamente. Paneles B y D: Espectros MS/MS para la señal (a) y (b), respectivamente.

En el caso de Tyr se exploró por UPLC-MS/MS la formación de di-Tyr y L-DOPA. Ambos productos no fueron detectados en las muestras de G6PD expuestas a AAPH (60 mM) lo que está de acuerdo con el menor grado de oxidación de este residuo. Por HPLC-FLD se determinó una producción de MetSO de $76,2 \pm 14,7 \mu\text{M}$, lo que corresponde a la formación de 1,4 moles por mol de proteína y 0,18 moles por mol de ROO[•]. Estos resultados muestran un balance de masas para la oxidación de Met a MetSO. No obstante, debido a la amplia variabilidad de productos y a la limitada disponibilidad comercial de estándares, no fue posible establecer el balance de masas para la oxidación de Trp. En la **Tabla 2** se presentan las concentraciones de los productos cuantificados (Kyn y MetSO), como también la producción de grupos carbonilos e hidroperóxidos, dos productos no específicos de oxidación de proteínas. Como se presenta, en presencia de AAPH 60 mM, se determinó una concentración de grupos carbonilo de $9,2 \pm 3,2$ y $23,8 \pm 1,9 \mu\text{M}$ después de 20 y 90 minutos de incubación, respectivamente. En cuanto a los hidroperóxidos, se cuantificaron $2,0 \pm 1,0$ y $2,7 \pm 1,2 \mu\text{M}$ después de 20 y 90 minutos de incubación, respectivamente. Estos estudios demostraron que en ambas fases (latencia e inactivación), se generaron procesos oxidativos.

Tabla 2. Productos de oxidación generados en muestras de G6PD expuestas a ROO[•]. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron incubadas con AAPH (60 mM) a 37 °C durante 20 (tiempo de latencia) y 90 (tiempo de inactivación) min. Se cuantificó Kyn, MetSO, carbonilos totales y hidroperóxidos.

	<i>Kyn</i>	<i>MetSO</i>	<i>Carbonilos</i>	<i>Hidroper.</i>
<i>Fase latencia (20 min)</i>				
<i>Producción / μM</i>	---	---	$9,2 \pm 3,2$	$2,3 \pm 1,1$
<i>Por mol de ROO[•]</i>	---	---	$9,6 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-2}$
<i>Por mol de proteína</i>	---	---	0,17	0,04
<i>Fase Inact. (90 min)</i>				
<i>Producción / μM</i>	$\approx 1,0$	$76,2 \pm 14,7$	$23,8 \pm 1,9$	$2,7 \pm 1,2$
<i>Por mol de ROO[•]</i>	$\approx 2,3 \times 10^{-3}$	0,18	$5,5 \times 10^{-2}$	$6,25 \times 10^{-3}$
<i>Por mol de proteína</i>	$\approx 0,0018$	1,4	0,44	0,05

Estructura secundaria e integridad dimérica de G6PD: Se investigó si la exposición de G6PD a ROO• afecta su estructura secundaria y dimérica de la enzima. Se desarrollaron estudios por dicroísmo circular (DC), fluorescencia de sondas específicas (ANS), cromatografía de exclusión molecular y electroforesis. Por DC se determinó el patrón de G6PD (control). El espectro obtenido está de acuerdo con el reportado previamente por Bulteau y col.⁷² El espectro presentó un perfil con una alta contribución de hélices alfa con dos mínimos a 207 y 217 y un máximo a 190 nm (**Fig. 16**). Resultados de acuerdo con una proteína globular con 486 residuos; 168 en hélices alfa y 83 en láminas betas.³² Para establecer los cambios en el espectro DC asociados al desplegamiento de G6PD se incubó la proteína a 80 °C por 10 minutos. Como estrategia alternativa se utilizó cloruro de guanidinio (GdmCl) (3 M) como agente caotrópico. En ambas condiciones se registró una pérdida completa de la actividad enzimática, como también del patrón de DC (**Fig. 16**, panel A).^{49,73} Los espectros DC de muestras de G6PD pre-tratadas con AAPH (60 mM) son presentados en la **Fig. 16**, panel B. Como se observa, los espectros DC de G6PD oxidada mostraron una menor intensidad (negativa). Para las muestras incubadas por 20 minutos con AAPH se observó un cambio discreto tanto en las bandas negativas (207 y 217 nm) como en la banda positiva (195 nm), mientras que a los 90 minutos de incubación los cambios fueron más significativos. Para cuantificar tales cambios, los espectros fueron de-convolucionados lo que permite determinar las contribuciones al espectro de las hélices alfa, laminas beta, giros y otras contribuciones. Estos análisis evidenciaron un cambio en la contribución de las hélices alfa en función del tiempo de incubación con AAPH. A tiempo inicial, la contribución de las hélices fue del 14%, mientras que a 20 y 90 min fue de 13,4 y 8,2%, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que la integridad de las hélices alfa, como también de la conformación plegada de la enzima son relevantes para su actividad. A 20 min de incubación con AAPH, condición en que no se observaron cambios en la actividad enzimática, la contribución de las hélices alfa fue mínimamente alterada.

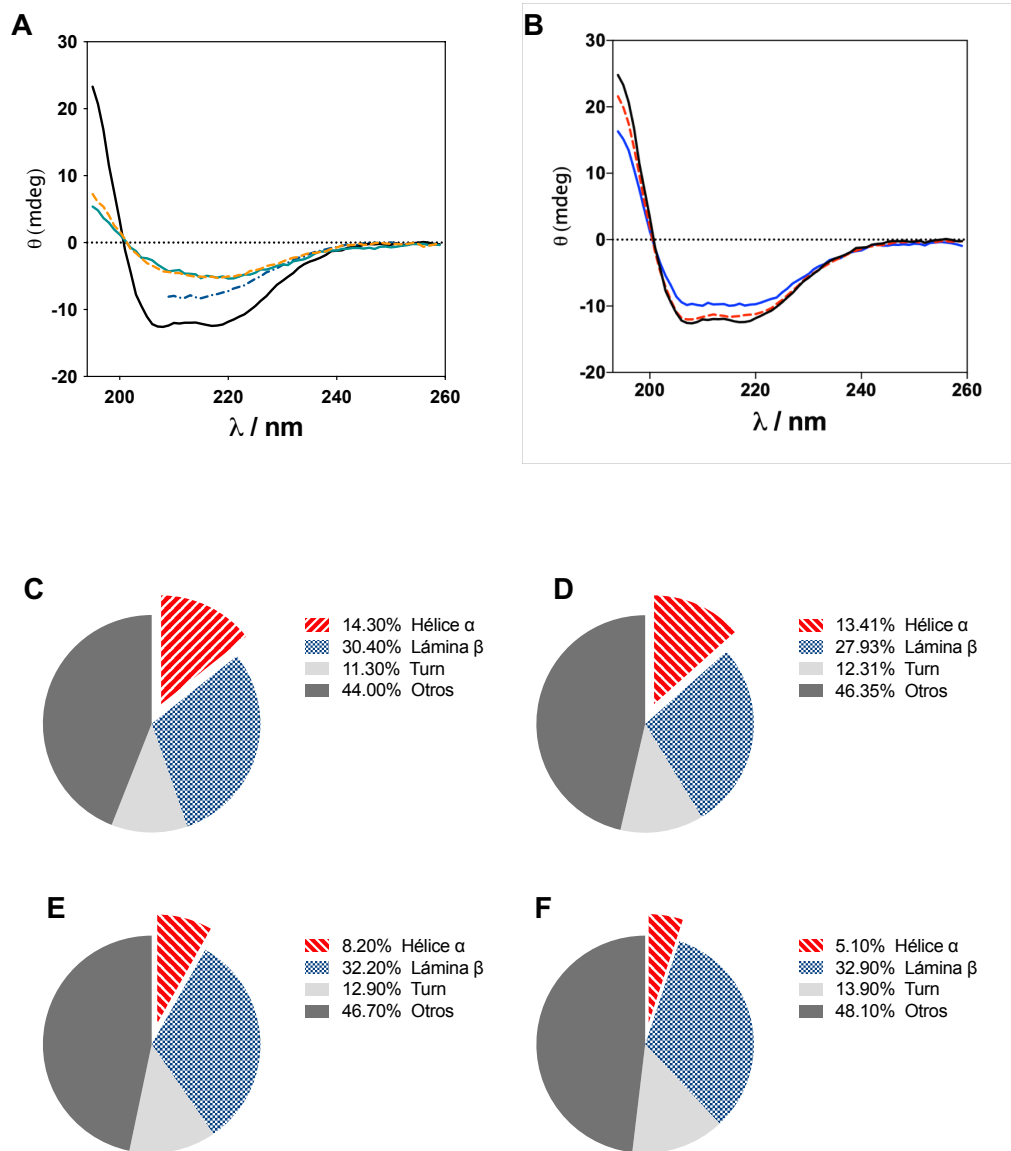


Figura 16. Espectros de DC y cambios en el contenido de estructura secundaria de G6PD en muestras expuestas a denaturación térmica, química y ROO•. Panel A: Espectros de DC de soluciones de G6PD (0,15 mg/mL) control (—), tratada térmicamente a 80 °C (---), a 80-25 °C (—) y en presencia de GdmCl 3 M (---). Panel B: Espectros DC de muestra control y G6PD tratada con AAPH (60 mM) a 0 (—), 20 (---) y 90 (—) min. Los paneles C a F corresponden a de-convoluciones de los espectros DC de G6PD expuesta a AAPH a tiempos de 0 (panel C), 20 (panel D) y 90 (panel E) min y a la G6PD denaturada térmicamente a 80 °C (panel F).

Para determinar si el proceso oxidativo mediado por ROO• (20 y 90 min de incubación con AAPH) induce cambios en la masa molecular de la proteína, se realizaron ensayos por electroforesis de poliacrilamida en condiciones denaturantes. En las muestras no oxidadas (controles) se identificó en los geles una banda de masa molecular de alrededor de 50 kDa correspondiente a la masa molecular del monómero de G6PD (54 kDa). En las muestras incubadas con AAPH se observó un patrón similar al presentado anteriormente en presencia de 186 mM de AAPH (**Fig. 9**).

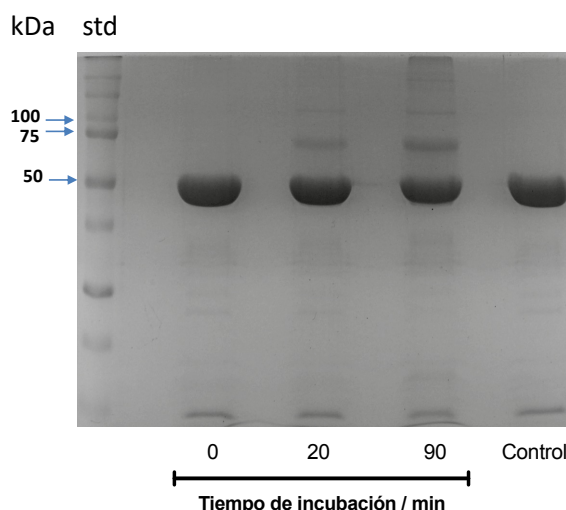


Figura 17. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de G6PD expuesta a los ROO• derivados del AAPH. Soluciones de G6PD (3 mg / mL) se incubaron a 37 °C en ausencia (control) y presencia de AAPH (60 mM). Alícuotas tomadas a 0, 20 y 90 minutos de incubación fueron analizadas por SDS-PAGE. Control = G6PD incubada en ausencia de AAPH.

La forma activa de la G6PD consta de dos subunidades monoméricas que interaccionan para conformar un dímero activo (no covalente). Para explorar si la oxidación mediada por ROO• generó cambios en la entidad dimérica (activa) de la enzima, lo que se traduciría en cambios en su actividad, se estudió la oxidación de G6PD a través de geles en condiciones nativas. Paralelamente las muestras fueron analizadas, en condiciones nativas, por cromatografía de exclusión por tamaño.

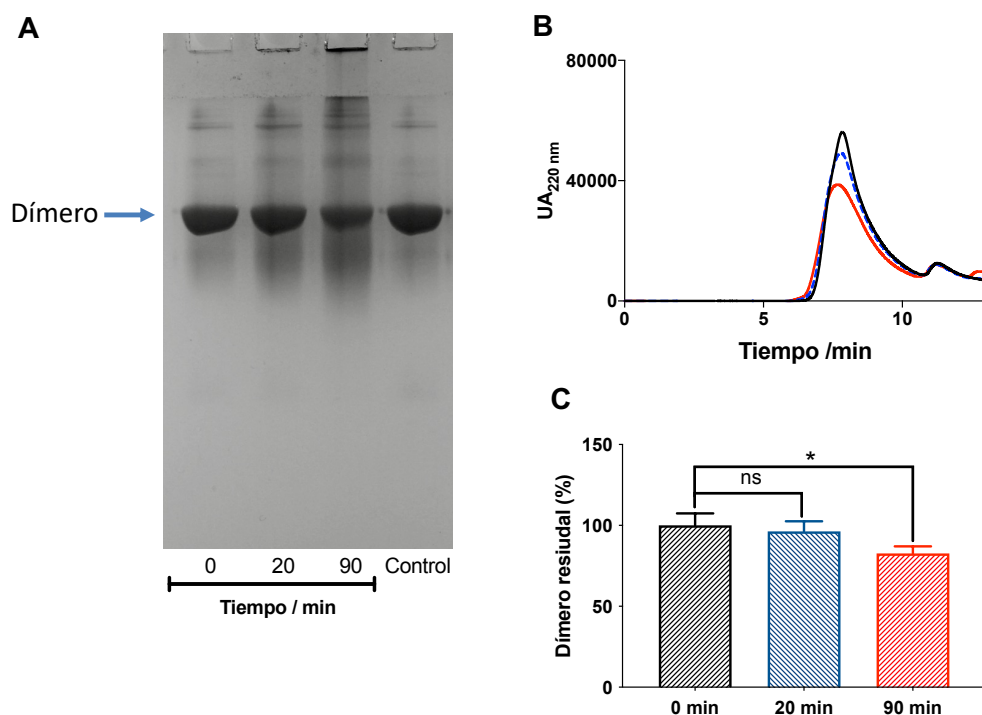


Figura 18. Análisis por electroforesis en condiciones no denaturantes (panel A) y SEC (paneles B y C) de muestras de G6PD expuestas a AAPH. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) se incubaron a 37 °C en ausencia (control) y presencia de AAPH (60 mM) a tiempos de 0, 20 y 90 min. Panel A: patrón electroforético de G6PD pre-tratada con AAPH. Control = G6PD incubada en ausencia de AAPH. Panel B: Cromatogramas SEC de muestras tratadas con AAPH; tiempo inicial (0 min,—), y después de 20 (---) y 90 (—) min de incubación. Panel C: Cuantificación (%) del área bajo la curva de cromatogramas SEC. * indica una diferencia estadística de $p = 0,0225$.

Tanto los geles y SEC (condiciones no denaturantes) mostraron que a los 20 minutos de incubación con AAPH (60 mM) no se generaron cambios en la cantidad de las entidades diméricas. Es decir, no se observaron cambios en la intensidad de la banda dimérica (**Fig. 18**, panel A), ni en el área bajo la curva del pico cromatográfico (SEC, **Fig. 18** paneles B y C). Sin embargo, en las muestras incubadas durante 90 minutos con AAPH, se observó una notoria disminución de la banda del dímero con un concomitante aumento de bandas dispersas en las zonas de menor y mayor masa molecular. Se observó acumulación de agregados de alta masa molecular en los bolsillos del gel (**Fig. 18**, panel A). Las muestras incubadas por 90 minutos con

AAPH dieron cuenta de un pico cromatográfico (SEC) con un área bajo la curva significativamente menor, representando un $83 \pm 4\%$ del área inicial (**Fig. 18**, paneles B y C). Considerando que cada monómero de G6PD contiene un único sitio catalítico, la disminución en la concentración de dímeros (17%) concuerda con la disminución en la actividad catalítica determinada a los 90 minutos de incubación con AAPH ($\sim 60 \pm 13\%$). En consecuencia, la inactivación de G6PD inducida por fenómenos de oxidación podría explicarse por una disminución de dímeros activos (posiblemente asociada a desplegamiento proteico) lo que podría desencadenar procesos de agregación. Con la finalidad de demostrar esto último, se realizaron estudios por dispersión de luz (LS). Para ello, soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron incubadas con AAPH (60 mM) y se determinó la intensidad de LS.⁴⁹ Los resultados fueron expresados como fracción normalizada con respecto a la intensidad inicial (F/F0). Como se observa en la **Fig. 19**, hasta los 60 min de incubación no se observaron cambios en la dispersión de luz. Sin embargo, a los 90 min, la intensidad de LS aumentó significativamente en comparación al tiempo inicial (**Fig. 19**). Estos resultados son compatibles con los análisis por electroforesis y SEC, evidenciando una relación entre disminución de dímeros, formación de agregados e inactivación de la enzima.

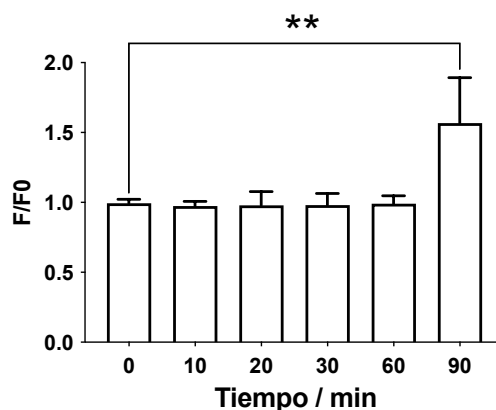


Figura 19. Intensidad de LS (normalizada) a diferentes tiempos de incubación de G6PD con AAPH. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) se incubaron en presencia de AAPH (60 mM) a 37 °C. A tiempos definidos de incubación se determinó la intensidad de la señal LS (Em 450 / Ex 450). ** indica una diferencia estadística de $p = 0,0025$.

Por otra parte, para obtener más antecedentes acerca de los cambios en la dinámica conformacional de G6PD asociados a los procesos oxidativos de la enzima, se desarrollaron ensayos utilizando la sonda hidrofóbica ANS. Esta sonda interacciona con sitios cargados positivamente de proteínas como son las cadenas laterales de Lisina y Arginina.^{74,75} En ambientes hidrófobos la sonda emite una mayor intensidad de fluorescencia y presenta un desplazamiento hipsocrómico,⁵¹ comportamiento que es utilizado para estudiar la presencia o formación de sitios (bolsillos) hidrofóbicos en proteínas. Alícuotas de soluciones de G6PD pre-tratadas con AAPH (60 mM) fueron adicionadas a una solución de ANS, se registraron los espectros de emisión (420-640 nm) y se determinó la intensidad de fluorescencia a 492 nm (excitación = 387 nm). Como se presenta en la **Fig. 20**, la intensidad de fluorescencia del ANS no fue afectada por muestras de G6PD tratada por 20 min con AAPH. Sin embargo, a tiempos superiores, se observó un notorio aumento, alcanzando una intensidad alrededor de dos veces superior al tiempo inicial (**Fig. 20**, panel B). Paralelamente, se observó un desplazamiento hipsocrómico en los espectros de ~20 nm (**Fig. 20**, panel A) de acuerdo con lo esperado para entornos más hidrofóbicos.⁷⁴⁻⁷⁶ Estos resultados son compatibles con cambios en los entornos de la sonda atribuidos a un mayor acceso a sitios hidrofóbicos expuestos al solvente generados por fenómenos de desplegamiento. Comparativamente con el perfil de actividad, se observó una relación inversa mostrando que los cambios en intensidad de fluorescencia de ANS estarían asociados a la disminución de la actividad catalítica. Tal asociación está también en línea con los cambios en la concentración de dímeros y con el aumento en la intensidad de LS (formación de agregados). Estos resultados indicarían que cambios en la estabilidad estructural y el plegamiento de G6PD, como resultado de los procesos oxidativos generados por los ROO[•], están relacionados con los procesos de inactivación.

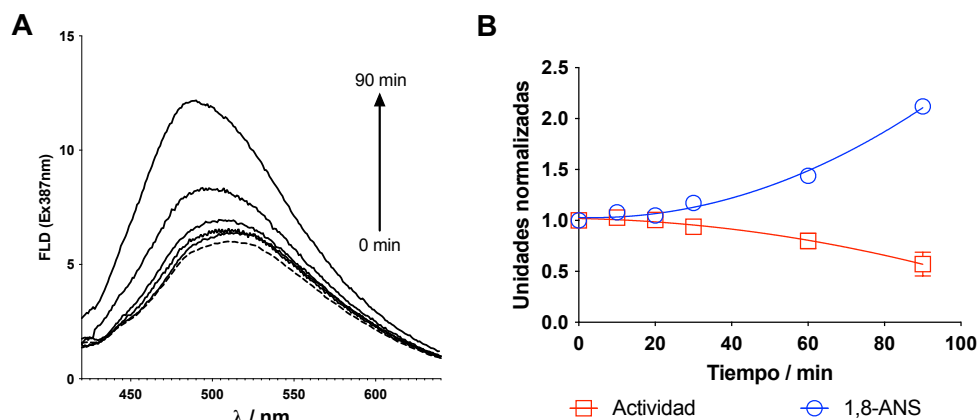


Figura 20. Cambios en el espectro de ANS mediados por muestras de G6PD pre-tratadas con AAPH. Alícuotas de soluciones de G6PD (3 mg/mL) incubadas con AAPH (60 mM) a 37 °C fueron adicionadas a una solución de ANS (164 μM conc. final). Después de 5 min se registraron espectros de fluorescencia de ANS (panel A) y la intensidad de fluorescencia a 492 nm normalizada al tiempo inicial (panel B). Longitud de onda de excitación = 387 nm. El panel B presenta también los valores normalizados de actividad enzimática residual.

III.3 Oxidación de G6PD mediada por Cloramina T

La cloramina T es una especie oxidante no biológica, caracterizada por su especificidad para oxidar residuos de Met en péptidos y proteínas.⁷⁷ Por tal razón, en la presente tesis se procedió a oxidar a la G6PD con cloramina T, de manera de investigar la influencia de la oxidación de residuos de Met en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron exponiendo G6PD (54 μM) a cloramina T (0,01; 0,1 y 10 mM) a 25 °C. Las muestras tratadas con cloramina T 0,01 mM no sufrieron pérdida de actividad. Sin embargo, al exponer G6PD a 0,1 mM de cloramina T, se observó una disminución de la actividad, determinándose una actividad remanente del $63 \pm 6\%$ después de la incubación (**Fig. 21**, panel A). G6PD expuesta a 10 mM de cloramina T mostró una pérdida total de actividad. Muestras de G6PD tratadas con 0,1 mM de cloramina T evidenciaron un consumo de 1,7 moles de Met por mol de G6PD (**Fig. 21**, panel B). No se observó consumo de Tyr o Trp. El análisis por UPLC-MS/MS de los péptidos generados por procesos de hidrólisis enzimáticas de las muestras mostró

una cobertura de la proteína de 95%, y la modificación oxidativa de seis de los diez residuos de Met de la proteína. El residuo mayormente modificado fue la Met237, la que presentó un 60% de modificación. Los residuos restantes de Met (117, 146, 185, 419 y 424) presentaron niveles bajos de modificaciones (**Fig. 21**, panel C). Interesantemente, el residuo Met237 se encuentra a 4 Å de la diada catalítica de la enzima, por lo que su oxidación podría inducir cambios en el sitio catalítico e inactivación.

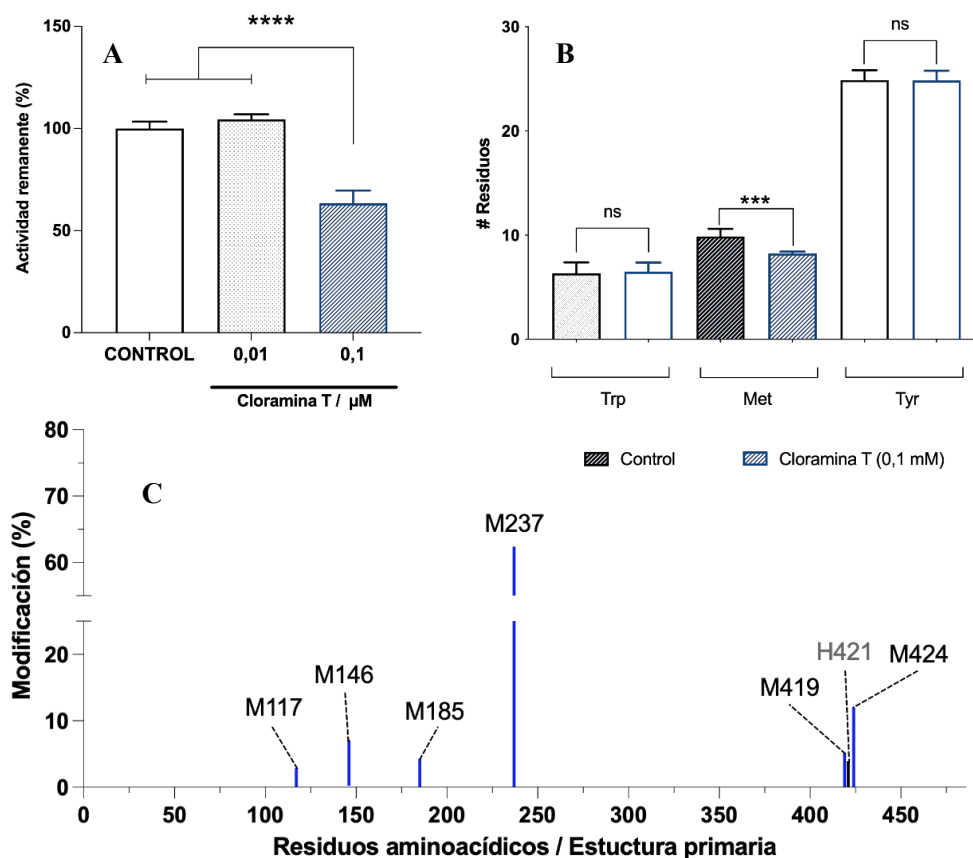


Figura 21. Pérdida de actividad y modificaciones oxidativas sobre los residuos de Met de G6PD inducidas por cloramina T. Muestras G6PD (3 mg/mL) se incubaron en ausencia (control) y presencia de cloramina T (0,01 y 0,1 mM) a 25 °C durante 30 minutos. Panel A: Actividad remanente de G6PD determinada después de su incubación con cloramina T. Panel B: Contenido de Trp, Tyr y Met en G6PD antes y después de su exposición a 0,1 mM de cloramina T. Panel C: Análisis por UPLC-MS/MS de muestras pre-tratadas de G6PD con cloramina T (0,1 mM). (***) y (****) indican diferencias estadísticas con valores de $p = 0,0002$ y $p = 0,0003$, respectivamente.

Los análisis realizados por SEC en condiciones nativas, demostraron que la oxidación inducida por cloramina T (0,01 y 0,1 mM) no genera cambios significativos en la conformación nativa de la enzima (**Fig. 22**, panel A), mientras que el análisis por SDS-PAGE (en condiciones denaturantes) no evidenció cambios en el monómero de la proteína (**Fig. 22**, panel B). Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos por DC y fluorescencia de ANS (**Fig. 22**, paneles B y C) muestran que el proceso de inactivación mediado por cloramina T, no se relaciona con cambios en la conformación nativa de G6PD.

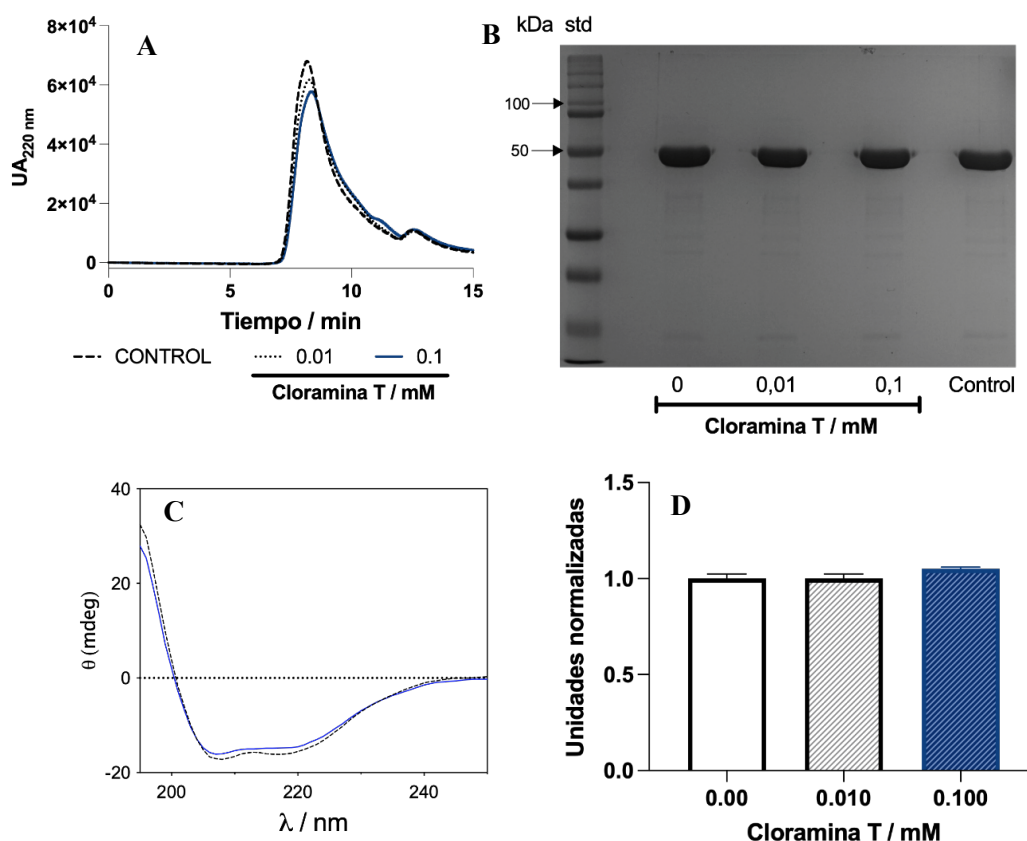


Figura 22. Oxidación de G6PD inducida por cloramina T: estudios por SEC, SDS-PAGE, DC y fluorescencia de ANS. Panel A: cromatogramas SEC de muestras de G6PD control (---) y expuesta a cloramina T 0,01 (···) y 0,1 (—) mM. Experimentos (SEC) desarrollados en condiciones nativas. Paneles B, C y D: SDS-PAGE, DC y fluorescencia de ANS de muestras de G6PD pretratadas con cloramina T. En el panel B se presenta el espectro DC del control (---) y G6PD incubada con cloramina T 0,1 mM (—).

Para comprender con mayor detalle el proceso oxidativo que la cloramina T y el AAPH inducen sobre G6PD, se realizó un análisis comparativo con lo reportado por Leinisch y col.³⁹

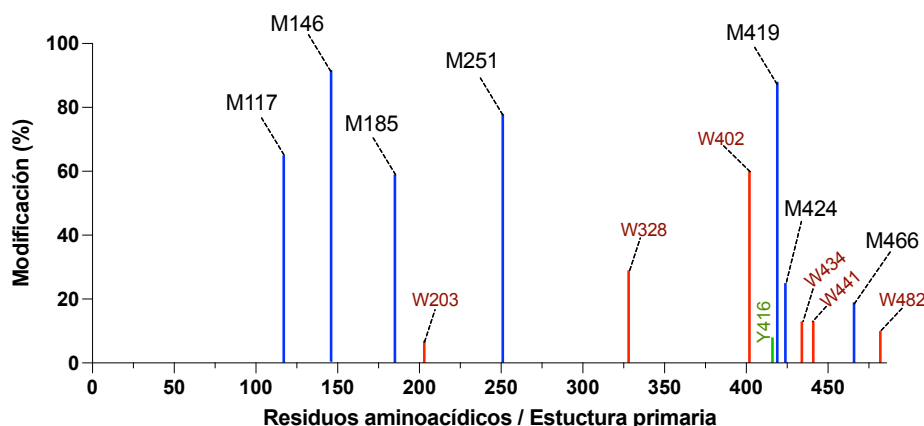


Figura 23. Modificaciones en la secuencia primaria de G6PD inducidas por los ROO• derivados del AAPH. Datos tomados de Leinisch y col.³⁹

Los datos de proteómica reportados por Leinisch y col.,³⁹ muestran que las muestras de G6PD incubadas con AAPH presentaron modificaciones (mayor a 60%) de 6 residuos de Met (117, 146, 185, 251 y 419). Met424 se modificó en un ~20%. Estas modificaciones, conjuntamente con los cambios de Trp, darían cuenta de una inactivación del ~30%.³⁹ Una comparación de ambos trabajos (AAPH *versus* cloramina T) muestra que sólo en el caso de la oxidación de G6PD inducida por ROO•, se modificó el residuo Met251, sin embargo, datos por publicar (del grupo del laboratorio), en donde se describió la oxidación de G6PD con peroxinitrito, demuestran que este residuo (M251) no induce los cambios estructurales descritos con AAPH.

Los residuos modificados con ambos oxidantes (ROO• y cloramina T), no están expuestos al solvente (según análisis de estructura cristalina, PDB: 1DPG). Sin embargo, los residuos de Met 424 y 117, que fueron levemente modificados con cloramina T, y el residuo de Trp328 (que solo fue modificado por ROO•) se encuentran próximos a residuos con alto grado

de exposición al solvente, lo que sugiere flexibilidad estructural y puede facilitar su oxidación. Considerando los cambios conformacionales de G6PD gatillados por ROO[•], los resultados sugieren que la oxidación de estos residuos (Met424, 117 y Trp328) estarían relacionados con la pérdida de la integridad dimérica de la enzima y posterior inactivación.

Capítulo IV. Conclusiones

Los entrecruzamientos covalentes del tipo di-Tyr, di-Trp y Tyr-Trp, generados por reacciones radical-radical durante la oxidación de aminoácidos libres, no están asociados al flujo de anión radical carbonato y radicales peroxilo. La formación de tales especies (di-Tyr y Tyr-Trp) no explicaría la pérdida de actividad enzimática de G6PD gatillada por procesos oxidativos mediados por radicales peroxilo. La inactivación de G6PD se explica principalmente por fenómenos de desplegamiento proteico relacionados con la oxidación de residuos específicos de Met y/o Trp, lo que prevalece a tiempos largos de exposición de G6PD a radicales peroxilo.

Los resultados emanados de la presente tesis demuestran que la exposición de G6PD a radicales peroxilo desencadena un conjunto de modificaciones que derivan en una pérdida considerable de actividad enzimática. Esto podría reflejarse en consecuencias biológicas, tanto en la disponibilidad de cofactores reducidos como en la síntesis de nucleótidos. No obstante, se requieren nuevas investigaciones que permitan establecer, por ejemplo, bajo condiciones celulares, la importancia de tales procesos.

Capítulo V. Referencias

- (1) Davies, M. J. Protein Oxidation and Peroxidation. *Biochem. J.* **2016**, 473 (7), 805–825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>.
- (2) Bachi, A.; Dalle-Donne, I.; Scaloni, A. Redox Proteomics: Chemical Principles, Methodological Approaches and Biological/Biomedical Promises. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (1), 596–698. <https://doi.org/10.1021/cr300073p>.
- (3) Davies, M. J. The Oxidative Environment and Protein Damage. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, 1703 (2), 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>.
- (4) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press, **2015**, 73. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- (5) Niki, E. Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 47 (5), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>.
- (6) Buettner, G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300 (2), 535–543. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
- (7) López-Alarcón, C.; Fuentes-Lemus, E.; Figueroa, J. D.; Dorta, E.; Schöneich, C.; Davies, M. J. Azocompounds as Generators of Defined Radical Species: Contributions and Challenges for Free Radical Research. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, 160 (May), 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.021>.
- (8) Augusto, O.; Miyamoto, S. Oxygen Radicals and Related Species. In *Principles of Free Radical Biomedicine. Volume 1*; Pantopoulos, K., Schipper, H. M., Eds.; Nova Science Publishers, 2011; pp 1–23.
- (9) Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. C. X.; De Menezes, S. L. Nitrogen Dioxide and Carbonate Radical Anion: Two Emerging Radicals in Biology. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32 (9), 841–859. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00786-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00786-4).
- (10) Ramirez, D. C.; Gomez-Mejiba, S. E.; Corbett, J. T.; Deterding, L. J.; Tomer, K. B.; Mason, R. P. Cu,Zn-Superoxide Dismutase-Driven Free Radical Modifications: Copper- and Carbonate Radical Anion-Initiated Protein Radical Chemistry. *Biochem. J.* **2009**, 417 (1), 341–353. <https://doi.org/10.1042/BJ20070722>.
- (11) Liochev, S. I.; Fridovich, I. Mechanism of the Peroxidase Activity of Cu, Zn Superoxide Dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48 (12), 1565–1569. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.036>.
- (12) Paviani, V.; Queiroz, R. F.; Marques, E. F.; Di Mascio, P.; Augusto, O. Production of Lysozyme and Lysozyme-Superoxide Dismutase Dimers Bound by a Ditryptophan Cross-Link in Carbonate Radical-Treated Lysozyme. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 89, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.015>.
- (13) Karmakar, S.; Datta, A. Understanding the Reactivity of $\text{CO}_3^{\bullet-}$ and $\text{NO}_2 \cdot$ Radicals toward S-Containing and Aromatic Amino Acids. *J.*

- Phys. Chem. B* **2017**, *121* (32), 7621–7632. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b05186>.
- (14) Fang, X.; Jin, F.; Jin, H.; Sonntag, C. von. Reaction of the Superoxide Radical with the N-Centered Radical Derived from N-Acetyltryptophan Methyl Ester. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, No. 2, 259–264. <https://doi.org/10.1039/a706979k>.
 - (15) Hunter, E. P. L.; Desrosiers, M. F.; Simic, M. G. The Effect of Oxygen, Antioxidants, and Superoxide Radical on Tyrosine Phenoxyl Radical Dimerization. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *6* (6), 581–585. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90064-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90064-6).
 - (16) Sharma, V. K. Reactive Oxygen Species. In *Oxidation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*; Rokita, S. E., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2012**, 122–204. <https://doi.org/10.1002/9781118482469.ch4>.
 - (17) Giulivi, C.; Traaseth, N. J.; Davies, K. J. A. Tyrosine Oxidation Products: Analysis and Biological Relevance. *Amino Acids* **2003**, *25* (3–4), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0013-0>.
 - (18) Fuentes-Lemus, E.; Häggglund, P.; López-Alarcón, C.; Davies, M. J. Oxidative Crosslinking of Peptides and Proteins: Mechanisms of Formation, Detection, Characterization and Quantification. *Molecules* **2022**, *27* (1), 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules27010015>.
 - (19) Carroll, L.; Pattison, D. I.; Davies, J. B.; Anderson, R. F.; Lopez-Alarcon, C.; Davies, M. J. Formation and Detection of Oxidant-Generated Tryptophan Dimers in Peptides and Proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *113* (August), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.020>.
 - (20) Houée-Lévin, C.; Bobrowski, K.; Horakova, L.; Karademir, B.; Schöneich, C.; Davies, M. J.; Spickett, C. M. Exploring Oxidative Modifications of Tyrosine: An Update on Mechanisms of Formation, Advances in Analysis and Biological Consequences. *Free Radic. Res.* **2015**, *49* (4), 347–373. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1007968>.
 - (21) Paviani, V.; Galdino, G.; dos Prazeres, J.; Queiroz, R.; Augusto, O. Dityryptophan Cross-Links as Novel Products of Protein Oxidation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *29* (5), 925–933. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170239>.
 - (22) DiMarco, T.; Giulivi, C. Current Analytical Methods for the Detection of Dityrosine, a Biomarker of Oxidative Stress, in Biological Samples. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26* (1), 108–120. <https://doi.org/10.1002/mas.20109>.
 - (23) Al-Hilaly, Y. K.; Biasetti, L.; Blakeman, B. J. F.; Pollack, S. J.; Zibae, S.; Abdul-Sada, A.; Thorpe, J. R.; Xue, W. F.; Serpell, L. C. The Involvement of Dityrosine Crosslinking in α -Synuclein Assembly and Deposition in Lewy Bodies in Parkinson's Disease. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39171>.
 - (24) Häggglund, P.; Mariotti, M.; Davies, M. J. Identification and Characterization of Protein Cross-Links Induced by Oxidative Reactions. *Expert Rev. Proteomics* **2018**, *15* (8), 665–681.

<https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1509710>.

- (25) Medinas, D. B.; Gozzo, F. C.; Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Augusto, O. A Dityryptophan Cross-Link Is Responsible for the Covalent Dimerization of Human Superoxide Dismutase 1 during Its Bicarbonate-Dependent Peroxidase Activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49* (6), 1046–1053. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.018>.
- (26) Cosgrove, M. S.; Naylor, C.; Paludan, S.; Adams, M. J.; Levy, H. R. On the Mechanism of the Reaction Catalyzed by Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, *Biochemistry* **1998**, *37* (9), 2759–2767. <https://doi.org/10.1021/bi972069y>.
- (27) Siddhartha Singh. Regulation and Properties of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: A Review. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *4* (1), 1–19. <https://doi.org/10.5897/ijppb11.045>.
- (28) Wang, X. M.; Ma, Y. Y.; Huang, C.; Li, J. S.; Wan, Q.; Bi, Y. R. Involvement of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Reduced Glutathione Maintenance and Hydrogen Peroxide Signal under Salt Stress. *Plant Signal. Behav.* **2008**, *3* (6), 394–395. <https://doi.org/10.4161/psb.3.6.5404>.
- (29) Mehta, A.; Mason, P. J.; Vulliamy, T. J. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2000**, *13* (1), 21–38. <https://doi.org/10.1053/beha.1999.0055>.
- (30) Ishak, S. D.; Razali, S. A.; Kamarudin, M. S.; Abol-Munafi, A. B. Data on PCR Primer Design for Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Gene and the Effects of Dietary Carbohydrate Levels on Its Expression in the Liver of Malaysian Mahseer (Tor Tambroides). *Data Br.* **2020**, *31*, 105916. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105916>.
- (31) Notaro, R.; Afolayan, A.; Luzzatto, L. Human Mutations in Glucose 6-phosphate Dehydrogenase Reflect Evolutionary History. *FASEB J.* **2000**, *14* (3), 485–494. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.3.485>.
- (32) Rowland, P.; Basak, A. K.; Gover, S.; Levy, H. R.; Adams, M. J. The Three-Dimensional Structure of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc Mesenteroides* Refined at 2.0 Å Resolution. *Structure* **1994**, *2* (11), 1073–1087. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00110-3).
- (33) Cosgrove, M. S.; Gover, S.; Naylor, C. E.; Vandeputte-Rutten, L.; Adams, M. J.; Levy, H. R. An Examination of the Role of Asp-177 in the His-Asp Catalytic Dyad of *Leuconostoc Mesenteroides* Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: X-Ray Structure and PH Dependence of Kinetic Parameters of the D177N Mutant Enzyme, *Biochemistry* **2000**, *39* (49), 15002–15011. <https://doi.org/10.1021/bi0014608>.
- (34) Cosgrove, M. S.; Naylor, C.; Paludan, S.; Adams, M. J.; Levy, H. R. On the Mechanism of the Reaction Catalyzed by Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, *Biochemistry* **1998**, *37* (9), 2759–2767. <https://doi.org/10.1021/bi972069y>.
- (35) Naylor, C. E.; Gover, S.; Basak, A. K.; Cosgrove, M. S.; Levy, H. R.; Adams, M. J. NADP⁺ and NAD⁺ Binding to the Dual Coenzyme Specific Enzyme *Leuconostoc Mesenteroides* Glucose 6-Phosphate

Dehydrogenase: Different Interdomain Hinge Angles Are Seen in Different Binary and Ternary Complexes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57* (5), 635–648. <https://doi.org/10.1107/S0907444901003420>.

- (36) Szweda, L. I.; Stadtman, E. R. Iron-Catalyzed Oxidative Modification of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc Mesenteroides*. Structural and Functional Changes. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (5), 3096–3100. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50699-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50699-8).
- (37) Friguet, B.; Szweda, L. I.; Stadtman, E. R. Susceptibility of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Modified by 4-Hydroxy-2-Nonenal and Metal-Catalyzed Oxidation to Proteolysis by the Multicatalytic Protease. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311* (1), 168–173. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1222>.
- (38) Arenas, A.; López-Alarcón, C.; Kogan, M.; Lissi, E.; Davies, M. J.; Silva, E. Chemical Modification of Lysozyme, Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, and Bovine Eye Lens Proteins Induced by Peroxyl Radicals: Role of Oxidizable Amino Acid Residues. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26* (1), 67–77. <https://doi.org/10.1021/tx300372t>.
- (39) Leinisch, F.; Mariotti, M.; Rykaer, M.; Lopez-Alarcon, C.; Häggglund, P.; Davies, M. J. Peroxyl Radical- and Photo-Oxidation of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Generates Cross-Links and Functional Changes via Oxidation of Tyrosine and Tryptophan Residues. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *112* (May), 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.025>.
- (40) Basolo, F.; Murmann, R. K.; Whitney, J. E.; Rollinson, C. L. Acidopentamminecobalt(III) Salts. In *Inorganic Syntheses*; Jr., J. C. B., Ed.; 1953; Vol. 4, pp 171–176. <https://doi.org/10.1002/9780470132357.ch56>.
- (41) Olavarria, K.; De Ingeniis, J.; Zielinski, D. C.; Fuentealba, M.; Muñoz, R.; McCloskey, D.; Feist, A. M.; Cabrera, R. Metabolic Impact of an NADH-Producing Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in *Escherichia Coli*. *Microbiology* **2014**, *160* (12), 2780–2793. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082180-0>.
- (42) Figueroa, J. D.; Fuentes-Lemus, E.; Dorta, E.; Melin, V.; Cortés-Ríos, J.; Faúndez, M.; Contreras, D.; Denicola, A.; Álvarez, B.; Davies, M. J.; et al. Quantification of Carbonate Radical Formation by the Bicarbonate-Dependent Peroxidase Activity of Superoxide Dismutase 1 Using Pyrogallol Red Bleaching. *Redox Biol.* **2019**, *24* (April), 101207. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101207>.
- (43) Figueroa, J. D.; Zárate, A. M.; Fuentes-Lemus, E.; Davies, M. J.; López-Alarcón, C. Formation and Characterization of Crosslinks, Including Tyr–Trp Species, on One Electron Oxidation of Free Tyr and Trp Residues by Carbonate Radical Anion. *RSC Adv.* **2020**, *10* (43), 25786–25800. <https://doi.org/10.1039/D0RA04051G>.
- (44) Hawkins, C. L.; Morgan, P. E.; Davies, M. J. Quantification of Protein Modification by Oxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46* (8), 965–988. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.007>.

- (45) Gay, C.; Collins, J.; Gebicki, J. M. Determination of Hydroperoxides by the Ferric-Xylenol Orange Method. *Redox Rep.* **1999**, *4* (6), 327–328. <https://doi.org/10.1179/135100099101535052>.
- (46) Morgan, P. E.; Dean, R. T.; Davies, M. J. Protective Mechanisms against Peptide and Protein Peroxides Generated by Singlet Oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36* (4), 484–496. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.021>.
- (47) Reyes, J. S.; Fuentes-Lemus, E.; Aspée, A.; Davies, M. J.; Monasterio, O.; López-Alarcón, C. M. Jannaschii FtsZ, a Key Protein in Bacterial Cell Division, Is Inactivated by Peroxyl Radical-Mediated Methionine Oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *166* (February), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.003>.
- (48) Agilent Technologies. Size Exclusion Chromatography for Biomolecule Analysis. **2015**, 9–11.
- (49) Plomer, J. J.; Gafni, A. Renaturation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc Mesenteroides* after Denaturation in 4 M Guanidine Hydrochloride: Kinetics of Aggregation and Reactivation. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1993**, *1163* (1), 89–96. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90283-W](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90283-W).
- (50) Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y. H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (24), E3095–E3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- (51) Ota, C.; Tanaka, S.; Takano, K. Revisiting the Rate-Limiting Step of the ANS–Protein Binding at the Protein Surface and Inside the Hydrophobic Cavity. *Molecules* **2021**, *26* (2), 420. <https://doi.org/10.3390/molecules26020420>.
- (52) Gómez-Manzo, S.; Terrón-Hernández, J.; De la Mora-De la Mora, I.; González-Valdez, A.; Marcial-Quino, J.; García-Torres, I.; Vanoye-Carlo, A.; López-Velázquez, G.; Hernández-Alcántara, G.; Oria-Hernández, J.; et al. The Stability of G6PD Is Affected by Mutations with Different Clinical Phenotypes. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (11), 21179–21201. <https://doi.org/10.3390/ijms151121179>.
- (53) Hanschmann, E.-M.; Godoy, J. R.; Berndt, C.; Hudemann, C.; Lillig, C. H. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: From Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19* (13), 1539–1605. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4599>.
- (54) Hawkins, C. L.; Davies, M. J. Detection, Identification, and Quantification of Oxidative Protein Modifications. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (51), 19683–19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>.
- (55) Paviani, V.; Junqueira de Melo, P.; Avakin, A.; Di Mascio, P.; Ronsein, G. E.; Augusto, O. Human Cataractous Lenses Contain Cross-Links Produced by Crystallin-Derived Tryptophanyl and Tyrosyl Radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *160* (July), 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.020>.

- (56) Sormacheva, E. D.; Sherin, P. S.; Tsentalovich, Y. P. Dimerization and Oxidation of Tryptophan in UV-A Photolysis Sensitized by Kynurenic Acid. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *113* (July), 372–384. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.007>.
- (57) Silva, E.; Barrias, P.; Fuentes-Lemus, E.; Tirapegui, C.; Aspee, A.; Carroll, L.; Davies, M. J.; López-Alarcón, C. Riboflavin-Induced Type 1 Photo-Oxidation of Tryptophan Using a High Intensity 365 Nm Light Emitting Diode. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *131* (October 2018), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.026>.
- (58) Morita, M.; Naito, Y.; Yoshikawa, T.; Niki, E. Plasma Lipid Oxidation Induced by Peroxynitrite, Hypochlorite, Lipoxxygenase and Peroxyl Radicals and Its Inhibition by Antioxidants as Assessed by Diphenyl-1-Pyrenylphosphine. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.005>.
- (59) Atala, E.; Aspée, A.; Speisky, H.; Lissi, E.; López-Alarcón, C. Antioxidant Capacity of Phenolic Compounds in Acidic Medium: A Pyrogallol Red-Based ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Assay. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *32* (2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.007>.
- (60) López-Alarcón, C.; Fuentes-Lemus, E.; Figueroa, J. D.; Dorta, E.; Schöneich, C.; Davies, M. J. Azocompounds as Generators of Defined Radical Species: Contributions and Challenges for Free Radical Research. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *160* (May), 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.021>.
- (61) Neta, P.; Grodkowski, J.; Ross, A. B. Rate Constants for Reactions of Aliphatic Carbon-Centered Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1996**, *25* (3), 709–988. <https://doi.org/10.1063/1.555978>.
- (62) Niki, E. Free Radical Initiators as Source of Water- or Lipid-Soluble Peroxyl Radicals. In *Methods in Enzymology*; 1990; Vol. 186, pp 100–108. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86095-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86095-D).
- (63) Shao, J.; Geacintov, N. E.; Shafirovich, V. Oxidative Modification of Guanine Bases Initiated by Oxyl Radicals Derived from Photolysis of Azo Compounds. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (19), 6685–6692. <https://doi.org/10.1021/jp100686j>.
- (64) Shao, J.; Geacintov, N. E.; Shafirovich, V. Oxidation of 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine by Oxyl Radicals Produced by Photolysis of Azo Compounds. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23* (5), 933–938. <https://doi.org/10.1021/tx100022x>.
- (65) Niki, E.; Saito, M.; Yoshikawa, Y.; Yamamoto, Y.; Kamiya, Y. Oxidation of Lipids, XII. Inhibition of Oxidation of Soybean Phosphatidylcholine and Methyl Linoleate in Aqueous Dispersions by Uric Acid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1986, pp 471–477. <https://doi.org/10.1246/bcsj.59.471>.
- (66) Sankarapandi, S.; Zweier, J. L. Bicarbonate Is Required for the Peroxidase Function of Cu,Zn-Superoxide Dismutase at Physiological PH. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (3), 1226–1232. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1226>.

- (67) Liochev, S. I.; Fridovich, I. A Story of Cu,Zn Superoxide Dismutase, Peroxymonocarbonate, and Pseudo-Second-Order Rate Constants. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53* (10), 1988–1990. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.019>.
- (68) Reid, L. O.; Vignoni, M.; Martins-Froment, N.; Thomas, A. H.; Dántola, M. L. Photochemistry of Tyrosine Dimer: When an Oxidative Lesion of Proteins Is Able to Photoinduce Further Damage. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18* (7), 1732–1741. <https://doi.org/10.1039/C9PP00182D>.
- (69) Brady, J. D.; Sadler, I. H.; Fry, S. C. Pulcherosine, an Oxidatively Coupled Trimer of Tyrosine in Plant Cell Walls: Its Role in Cross-Link Formation. *Phytochemistry* **1998**, *47* (3), 349–353. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00592-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00592-X).
- (70) Gracanin, M.; Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Davies, M. J. Singlet-Oxygen-Mediated Amino Acid and Protein Oxidation: Formation of Tryptophan Peroxides and Decomposition Products. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47* (1), 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.015>.
- (71) Ronsein, G. E.; de Oliveira, M. C. B.; de Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. Characterization of O₂ (1Δg)-Derived Oxidation Products of Tryptophan: A Combination of Tandem Mass Spectrometry Analyses and Isotopic Labeling Studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (2), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.08.016>.
- (72) Bulteau, A.; Verbeke, P.; Petropoulos, I.; Chaffotte, A.-F.; Friguet, B. Proteasome Inhibition in Glyoxal-Treated Fibroblasts and Resistance of Glycated Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase to 20 S Proteasome Degradation in Vitro. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (49), 45662–45668. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105374200>.
- (73) Verma, A.; Suthar, M. K.; Doharey, P. K.; Gupta, S.; Yadav, S.; Chauhan, P. M. S.; Saxena, J. K. Molecular Cloning and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Brugia Malayi*. *Parasitology* **2013**, *140* (7), 897–906. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000115>.
- (74) Matulis, D.; Lovrien, R. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation. *Biophys. J.* **1998**, *74* (1), 422–429. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77799-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77799-9).
- (75) Gasymov, O. K.; Glasgow, B. J. ANS Fluorescence: Potential to Augment the Identification of the External Binding Sites of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2007**, *1774* (3), 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.01.002>.
- (76) Latypov, R. F.; Liu, D.; Gunasekaran, K.; Harvey, T. S.; Razinkov, V. I.; Raibekas, A. A. Structural and Thermodynamic Effects of ANS Binding to Human Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Protein Sci.* **2008**, *17* (4), 652–663. <https://doi.org/10.1110/ps.073332408>.
- (77) Shechter, Y.; Burstein, Y.; Patchornik, A. Selective Oxidation of Methionine Residues in Proteins. *Biochemistry* **1975**, *14* (20), 4497–4503. <https://doi.org/10.1021/bi00691a025>.

ANEXOS

Anexo 1: Figuras suplementarias

Anexo 2: Tablas suplementarias

Anexo 3: Publicaciones generadas de la presente tesis

Anexo 1

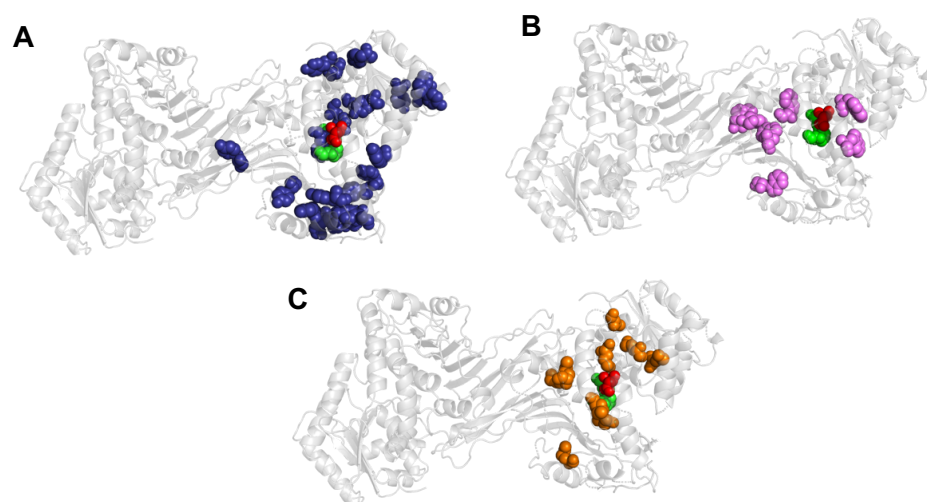


Figura S1. Residuos oxidables de G6PD. Se destacan los aminoácidos Tyr (azul, panel A), Trp (rosado, panel B) y Met (naranja, panel C). Adicionalmente se destaca en rojo Asp178 y en verde His179 y His241. La estructura corresponde al cristal código PDB 1DPG (<https://www.rcsb.org/s>).

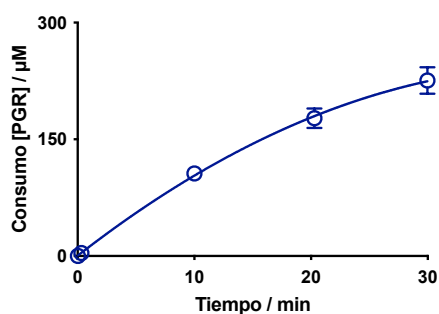


Figura S2. Dependencia del consumo de PGR con el tiempo de incubación con el sistema bSOD1/H₂O₂/HCO₃⁻. Soluciones de PGR (30 μM) fueron incubadas con bSOD1(3 μM)/H₂O₂(2 mM) en tampón bicarbonato (200 mM, pH 7,4 con 0,1 mM de DTPA). La concentración inicial de PGR se mantuvo constante adicionando alícuotas cada diez minutos (concentración final de 30 μM). Se determinaron las velocidades de disminución de la absorbancia a 540 nm a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20 y 30 min).⁴²

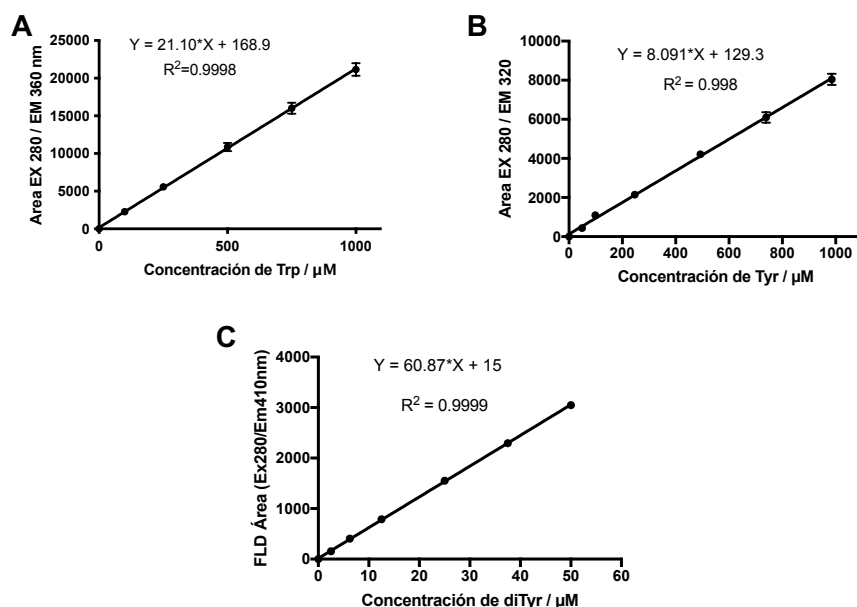


Figura S3. Curvas de calibración para la cuantificación de Trp, Tyr y di-Tyr. En los paneles A y B, se muestran las curvas de calibrado realizadas por HPLC-FLD con estándares de Trp y Tyr, en un rango de concentraciones de 50 a 1000 μM. En el panel C, se muestra la curva de calibrado de di-Tyr realizada con un estándar comercial, en un rango de concentraciones de 2,5 a 50 μM.

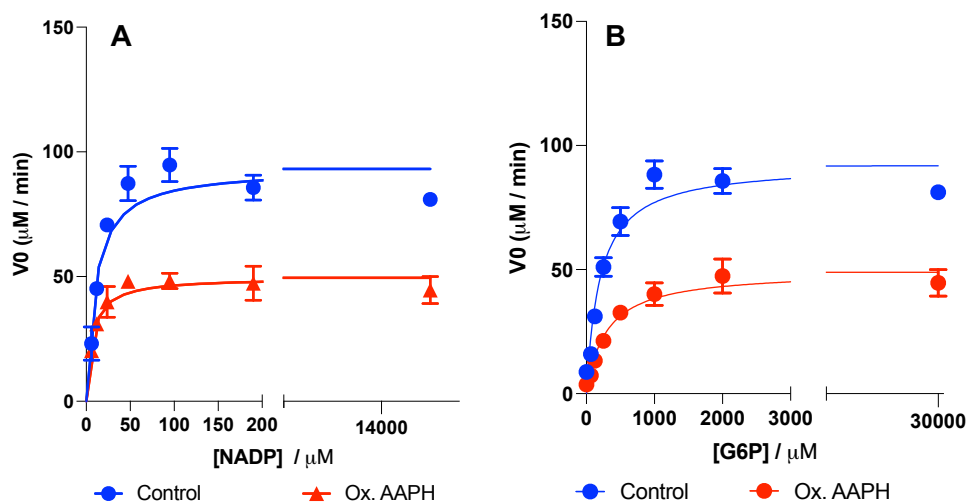


Figura S4. Dependencia de la velocidad inicial de la producción de NADPH con la concentración de sustratos de G6PD (NADP⁺ y G6P) (gráficas Michaelis-Menten). A partir de estos gráficos se determinaron los valores de Km NADP⁺ (panel A) y G6P (panel B). Control = (●), G6PD incubada con AAPH 60 mM por 90 min (●).

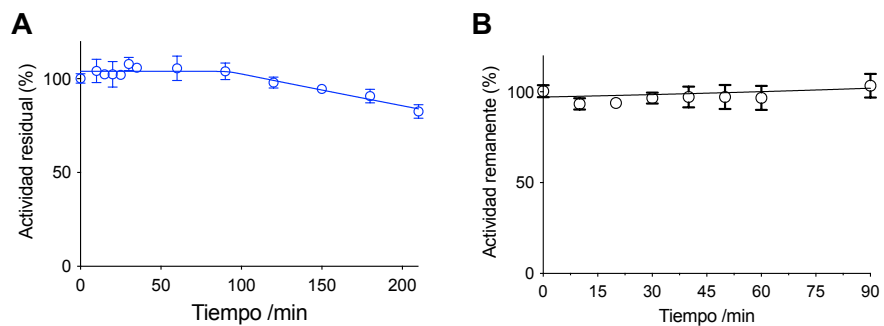


Figura S5. Efecto de ROO• sobre la actividad catalítica de G6PD. Soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron incubadas a 37 °C en presencia (panel A) y en ausencia (control, panel B) de AAPH 10 mM.

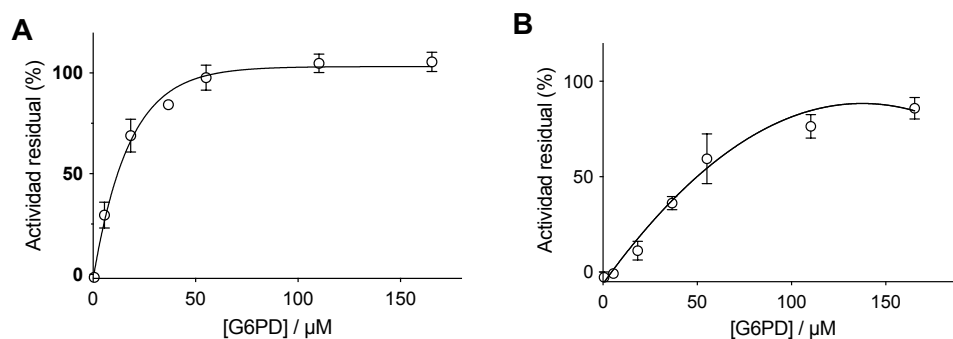


Figura S6. Dependencia de la actividad residual de G6PD con su concentración inicial después de 20 (panel A) y 90 (panel B) min de incubación con AAPH 60 mM.

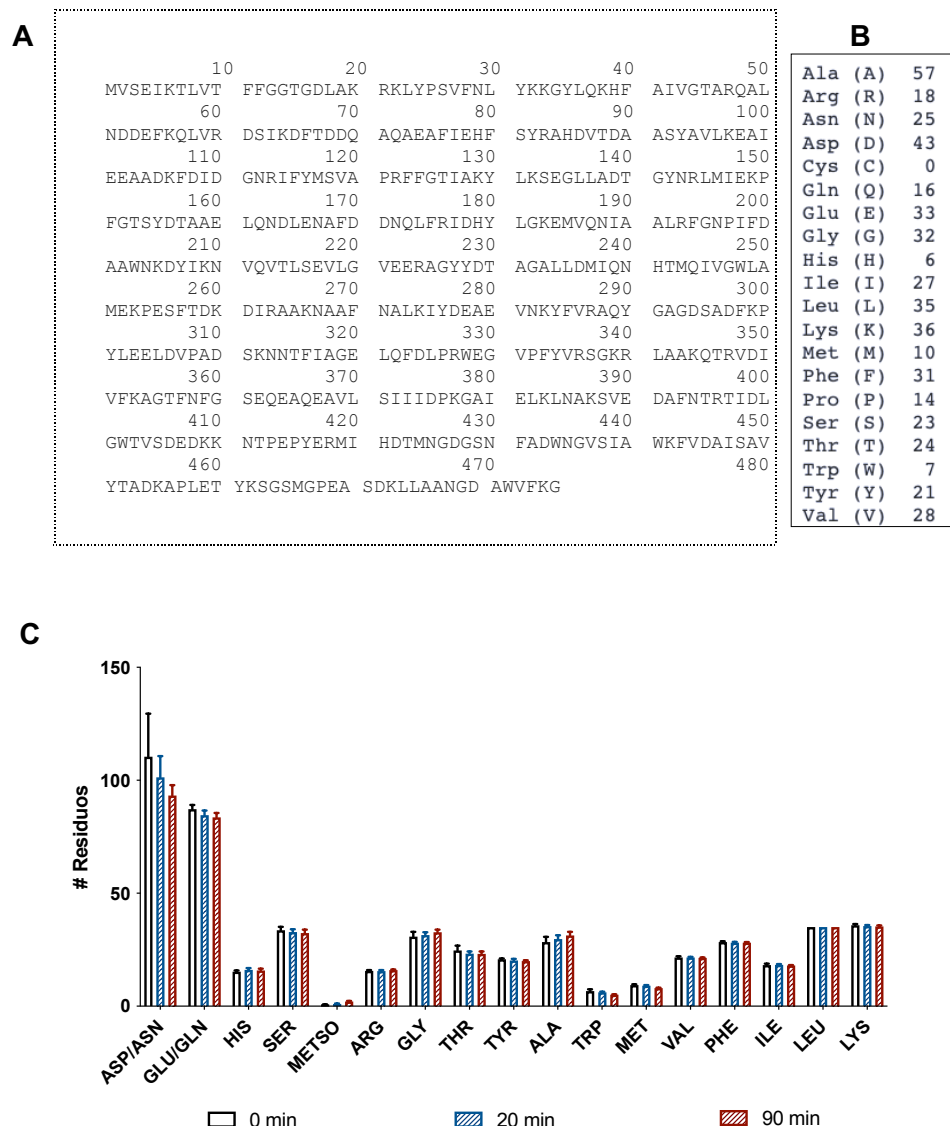


Figura S7. Secuencia primaria (panel A), número de residuos (panel B) y contenido total de aminoácidos de G6PD. Panel A: soluciones de G6PD (3 mg/mL) fueron incubadas a 37 °C en presencia de AAPH (60 mM) en tampón fosfato 75 mM y pH 7,4. El consumo de aminoácidos fue determinado por HPLC-FLD previa derivatización con OPA. Los resultados fueron expresados en número de residuos por molécula de G6PD a tiempo 0 (barras blancas), 20 (barras con líneas azules) y 90 (barras con líneas rojas) min de incubación. Datos presentados en paneles A y B tomados desde la secuencia reportada en la base de datos Uniprot: P11411, G6PD_LEUME.

Anexo 2

Tabla S1. Transiciones Q1 y Q3 utilizadas para la determinación de productos de oxidación de Tyr y Trp por UPLC-MS/MS (modo SRM).

Q1 representa el ion molecular de la especie ionizada y Q3 es un ion hijo generado desde Q1.

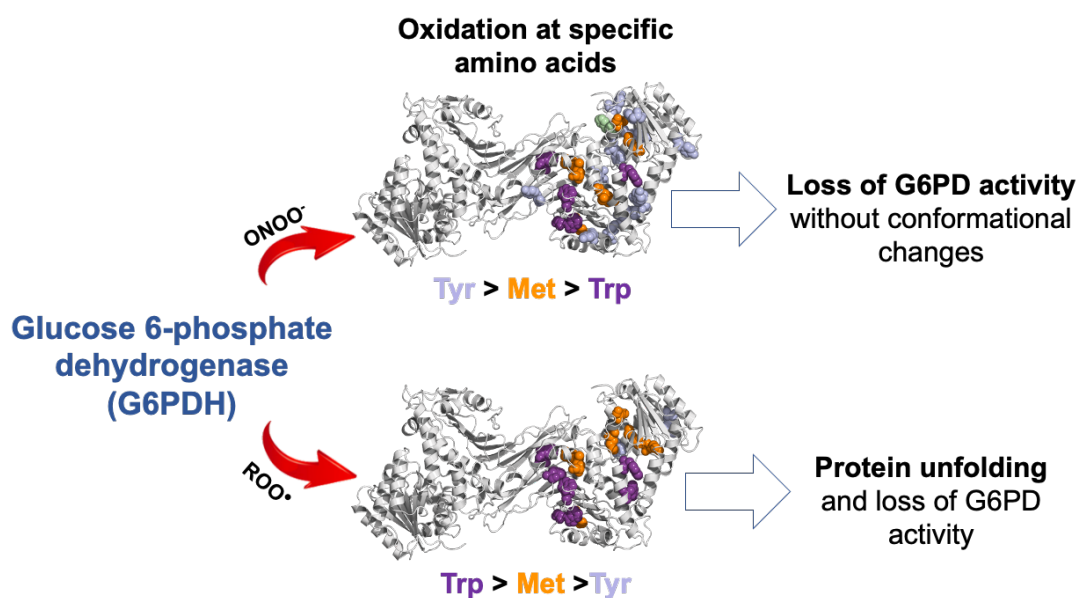
Compuesto	Q1	Q3
<i>Trp</i>	205	146
<i>Kyn</i>	209	194
<i>NFK</i>	237	220
<i>di-Trp</i>	407	203
<i>Tyr</i>	182	165
<i>DOPA</i>	198	152
<i>di-Tyr</i>	361	315
<i>Tyr-Trp</i>	384	182
<i>Tyr-Trp</i>	384	203
<i>Tyr-Trp</i>	384	367

ANEXO 3

Role of amino acid oxidation and protein unfolding in the peroxy radicals and peroxynitrite-induced inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase

Juan David Figueroa, Eduardo Fuentes-Lemus, Juan Sebastián Reyes, Matías Loaiza, Margarita E. Aliaga, Angélica Fierro, Fabian Leinisch, Per Hägglund, Michael J. Davies, and Camilo López-Alarcón*

GRAPHICAL ABSTRACT



Sometido a Free Radical Biology and Medicine

Mayo, 2022

Role of amino acid oxidation and protein unfolding in peroxyl radical
and peroxynitrite-induced inactivation of glucose-6-phosphate
dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*

Juan David Figueroa,^a Eduardo Fuentes-Lemus,^b Juan Sebastián Reyes,^a Matías
Loaiza,^a Margarita E. Aliaga,^a Angélica Fierro,^c Fabian Leinisch,^b Per Häggglund,^b
Michael J. Davies,^b and Camilo López-Alarcón^{a*}

^a Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Química y de Farmacia,
Departamento de Química Física, Santiago, Chile.

^b University of Copenhagen, Department of Biomedical Sciences, Copenhagen,
Denmark.

^c Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Química y de Farmacia,
Departamento de Química Orgánica, Santiago, Chile.

* Corresponding author: C. López-Alarcón (clopezr@uc.cl).

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 25786

Formation and characterization of crosslinks, including Tyr–Trp species, on one electron oxidation of free Tyr and Trp residues by carbonate radical anion[†]

Juan David Figueroa,^{‡a} Ana María Zárate,^{‡a} Eduardo Fuentes-Lemus,^{IDa} Michael J. Davies^{IDb} and Camilo López-Alarcón^{ID*ab}

Dityrosine and ditryptophan bonds have been implied in protein crosslinking. This is associated with oxidative stress conditions including those involved in neurodegenerative pathologies and age-related processes. Formation of dityrosine and ditryptophan derives from radical–radical reactions involving Tyr[•] and Trp[•] radicals. However, cross reactions of Tyr[•] and Trp[•] leading to Tyr–Trp crosslinks and their biological consequences have been less explored. In the present work we hypothesized that exposure of free Tyr and Trp to a high concentration of carbonate anion radicals (CO₃^{•−}), under anaerobic conditions, would result in the formation of Tyr–Trp species, as well as dityrosine and ditryptophan crosslinks. Here we report a simple experimental procedure, employing CO₃^{•−} generated photochemically by illumination of a Co(III) complex at 254 nm, that produces micromolar concentrations of Tyr–Trp crosslinks. Analysis by mass spectrometry of solutions containing only the individual amino acids, and the Co(III) complex, provided evidence for the formation of *o,o'*-dityrosine and isodityrosine from Tyr, and three ditryptophan dimers from Trp. When mixtures of Tyr and Trp were illuminated in an identical manner, Tyr–Trp crosslinks were detected together with dityrosine and ditryptophan dimers. These results indicate that there is a balance between the formation of these three classes of crosslinks, which is dependent on the Tyr and Trp concentrations. The methods reported here allow the generation of significant yields of isolated Tyr–Trp adducts and their characterization. This technology should facilitate the detection, and examination of the biological consequences of Tyr–Trp crosslink formation in complex systems in future investigations.

Received 5th May 2020
Accepted 28th June 2020

DOI: 10.1039/d0ra04051g

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

The formation and accumulation of crosslinked proteins is associated with the etiology of multiple human diseases, as well as ageing-related processes.^{1–4} Consequently, there is a considerable interest from biochemical and health researchers in the detection, characterization, and quantification of such species. Crosslinking of proteins can be triggered by oxidative stress conditions, including those initiated by free radicals (FR[•] in Scheme 1), with this resulting in the formation of secondary free radicals on the side chains of susceptible amino acids (protein[•] in Scheme 1).⁵ Multiple reaction pathways are known for protein[•], including, under aerobic environments, those involving O₂ (pathway A in Scheme 1) that yield protein peroxy

radicals (protein–OO[•]) and subsequently hydroperoxides. The latter can extend the original damage through further metal-ion catalyzed reactions.^{1,6,7} Other oxygenated products, such as alcohols and carbonyl groups are commonly produced, with hydroperoxides being intermediates in the formation of some of these species.^{1,6,7}

Depending on the structural characteristics of the proteins, their environment, and the O₂ concentration, new covalent bonds can also be formed by protein[•], as a consequence of radical–radical reactions. As presented in pathway B of Scheme 1, such processes can result in inter-molecular crosslinks, mediating protein dimerization, oligomerization and aggregation, as well intra-molecular crosslinks. The formation of both inter- and intra-molecular cross-linked species can affect the biological functionality of proteins.

Disulfide and dityrosine bonds are produced physiologically during posttranslational processing of proteins, with this giving stabilized tertiary and quaternary structures.^{5,8–10} This allows proteins to generate the conformation and structure required for their biological function.^{5,8–11} In contrast to this

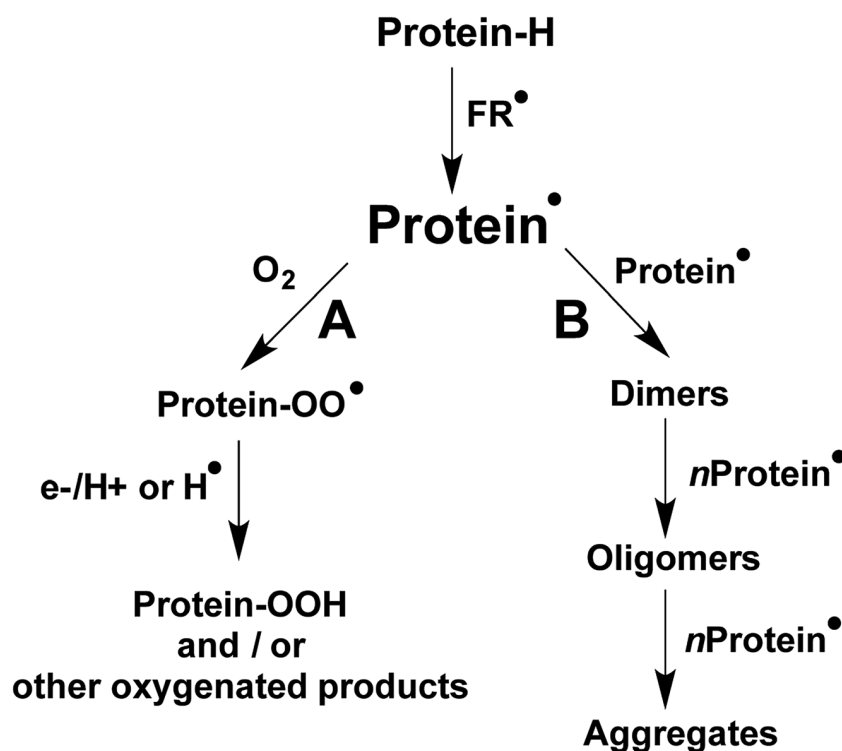
^aPontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Química y de Farmacia, Departamento de Química Física, Santiago, Chile. E-mail: clopezr@uc.cl

^bUniversity of Copenhagen, Department of Biomedical Sciences, Copenhagen, Denmark

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ra04051g

[‡] Both authors contributed equally to this work.





Scheme 1 Reactions pathways derived from protein secondary free radicals (protein•). Pathway A represents the main reactions mediated by O₂, while pathway B shows protein crosslinking (both inter- and intra-molecular processes) resulting from radical–radical reactions.

physiological role, the formation of other disulfides and dityrosine has been associated with the etiology and development of oxidative stress-related pathological conditions and diseases.¹² These species can be generated from self-reactions of thiyl (Cys•) and tyrosyl (Tyr•) radicals (with dimerization rate constants, k , $\approx 10^8$ and $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^{9,10} Other reactions can also contribute to the formation of disulfides (e.g. reactions of sulfenic acids and RS-NO species).^{13–15} The formation of such non-intended crosslinks can alter the native structure of proteins, and give rise to dysfunctional species. For example, internal disulfide bonds promote the stabilization of an unfolded domain of γ -crystallins, resulting in inter-molecular interactions and protein aggregation, a process involved in the development of cataracts.^{12,16} Dityrosine bonds have been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative pathologies,^{17,18} including the crosslinking of α -synuclein in Parkinson's disease, with the formation of oligomers favoring intracellular amyloid fibril deposition in Lewy bodies,¹⁷ and the dimerization of amyloid-beta (A β) in Alzheimer's disease, which promotes aggregation and deposition in amyloid plaques.¹⁸ The role of dityrosine in these pathologies has been strongly supported by analytical investigations (e.g. by fluorescence, electrochemical, and mass spectroscopy, MS) of post-mortem brain sections.^{17,19} Such studies, as well as others that have reported elevated levels of dityrosine in atherosclerotic plaques, human blood fluids, and bovine milk, have resulted in the widespread use of dityrosine as a marker of protein damage.^{20–25} Dietary intake of dityrosine has also been linked with toxicity, on the

basis of studies that have reported metabolic alterations in mice after intragastric administration of pure dityrosine.²⁶

Trp oxidation has also been associated with both positive and negative biological effects. Recent studies have shown that some Trp oxidation products, such as specific hydroperoxide isomers, can act as important signaling molecules and mediators of vascular tone,²⁷ but other reports have linked the formation of ditryptophan resulting from radical–radical reactions of Trp• (with $k \approx 2\text{--}6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)²⁸ with multiple pathological conditions.^{29,30} Thus, the formation of ditryptophan from peroxidase reactions has been implicated in the dimerization of human superoxide dismutase 1 (hSOD1),³¹ and the formation of non-amyloid hSOD1 aggregates in amyotrophic lateral sclerosis (ALS).^{32–34} Ditryptophan bonds have also been detected in crosslinked lysozyme, caseins, crystallin proteins, and mixed lysozyme-hSOD1 species, as a result of protein modification by multiple oxidants and photochemical reactions.^{35–40}

Despite the increasing number of reports on ditryptophan formation, the significance of this species in human disease, and the factors that modulate its formation are not fully understood. Recent data indicate that ditryptophan yields are diminished under aerobic conditions due to the occurrence of competing reactions involving O₂, and that multiple ditryptophan isomers, including both C–C and C–N linked species can be formed.^{41,42} Reaction with O₂ may limit the participation of Tyr• and Trp• in protein crosslinking, though the rate constants for reaction of both radicals with O₂ are modest ($k \leq 10^6 \text{ M}^{-1}$



s^{-1} for Trp $\cdot$ (ref. 43) and $< 10^3 M^{-1} s^{-1}$ for Tyr $\cdot$ (ref. 44)). The properties and structure of a protein can also modulate the steady state concentration of these species,⁴³ and their reaction with other species including $O_2^{\cdot-}$ (ref. 45) and reducing agents such as GSH and ascorbic acid.^{44,46,47} In contrast to these relatively slow reactions, the rate constants for dimerization of Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$ are rapid ($k > 10^8 M^{-1} s^{-1}$ (ref. 28 and 44)), and this might result in cross reaction between Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$ leading to Tyr-Trp adducts; these species are poorly characterized. Tyr-Trp crosslinks have been reported in a cytochrome c peroxidase mutant, with these generated *via* a peroxide-dependent process,⁴⁸ in the vicinity of the active site of a catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*,⁴⁹ and in oxidized samples of lysozyme and glucose 6-phosphate dehydrogenase.^{36,37,50} Studies on these species have however been limited by a lack of information on the structure of these species, methods that allow their detection and characterization, and authentic standards that would facilitate their quantification.

In the present work we hypothesized that exposure of free Tyr and Trp to a high concentration of oxidants under anaerobic conditions, would result in the formation of significant yields of Tyr-Trp. We report a novel and simple experimental procedure, employing photochemically-generated carbonate anion radicals ($CO_3^{\cdot-}$), to produce Tyr-Trp crosslinks at micromolar concentrations allowing their characterization. This can be achieved with minimal formation of ditryptophan and dityrosine, suggesting that the formation of these crossed dimers is a favorable reaction. These data should be useful for future investigations aimed at understanding the role that Tyr-Trp crosslinks play in biology, pathology, pharmacology and food technology.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr), and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) were purchased from Sigma Aldrich. The *ortho,ortho* isomer of dityrosine (*o,o'*-dityrosine) was supplied by Toronto Research Chemicals (Toronto, CA). Methanol, disodium hydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All the solvents employed were HPLC or LC-MS grade. $[Co(NH_3)_5(CO_3)]NO_3$ was synthesized according to the procedure reported by Basolo *et al.*⁵¹ Thus, 30 g of $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ in 15 mL of water was added to 45 g of ammonium carbonate dissolved in 45 mL of water, followed by the addition of 75 mL of concentrated ammonia. The solution was bubbled with air for 24 h, and cooled in an ice bath, and the solid product recrystallized by dissolving it in 55 mL of water at 90 °C and then slowly cooling in an ice bath. Pure crystals were isolated, and used in the experiments.

2.2 Illumination set-up

Solutions (1.9 mL) were placed into a quartz cell (internal dimensions: $4.2 \times 1.0 \times 0.5$ cm) sealed with a septum and illuminated inside a photoreactor containing eight Xe lamps (λ_{max} 254 nm) with four lamps each side of the cell (optical path

0.5 cm). Solutions were stirred constantly, and the incident light absorbed ($I_{abs} = 2.3 \times 10^{-5}$ Einstein per min, in 1.9 mL of illuminated solution) was assessed using as reference the decomposition quantum of Tyr ($\Phi = 9 \times 10^{-3}$ mol per Einstein) at 254 nm.⁵² Considering a quantum yield of $CO_3^{\cdot-}$ formation from the photodecomposition of $[Co(NH_3)_5(CO_3)]NO_3$ of $\Phi = 9 \times 10^{-2}$ mol per Einstein,⁵³ a rate of $CO_3^{\cdot-}$ production of 367 $\mu M min^{-1}$ was determined. This implies that after 3 min illumination a total dose of $CO_3^{\cdot-}$ of 1.1 mM was produced.

2.3 Consumption of Trp and Tyr elicited by $CO_3^{\cdot-}$

Solutions (1.9 mL) containing either Trp, Tyr or their mixtures (50–1000 μM final concentration) and DTPA (0.1 mM) were prepared in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) and illuminated for 3 min as indicated in Section 2.2, in the absence and presence of $[Co(NH_3)_5(CO_3)]NO_3$ (4 mM). Prior to illumination, solutions were bubbled with N_2 for 50 min. Subsequently, 262 μL of a fresh $[Co(NH_3)_5(CO_3)]NO_3$ stock solution (29 mM in phosphate buffer 75 mM, pH 7.4) were added (to give a final concentration of 4 mM) and N_2 bubbled for a further 10 min. After illumination (3 min), the samples were centrifuged at 2800g for 5 min and stored at -80 °C until analysis.

Consumption of Trp and Tyr was assessed by transferring 300 μL of the samples to HPLC vials and analysis using an Agilent 1200 system equipped with an Agilent 1260 series auto sampler (with the samples kept at 4 °C) and Agilent 1260 series diode array (DAD) and fluorescence (FL) detectors. Samples (20 μL) were injected on to a reversed phase column (Hibar® 250 $\times$ 4.3 mm RP-18 endcapped (particle size 5 μm) Phurospher®STAR, Millipore, maintained at 40 °C), and eluted using a gradient of buffer A (0.1% formic acid in water) and buffer B (50 : 50 methanol: water containing 1% formic acid) at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . Buffer A was kept at 100% for the first 2 min, before decreasing to 20% over 30 min. Subsequently, buffer A was returned to 100% over 35 min with a further equilibration phase of 5 min. The DAD detector was set at 280 nm, while FL detection was carried out using λ_{ex} 280 and λ_{em} 360 nm. Data analysis was carried out using OpenLab Software (Santa Clara, CA). Quantification of Trp and Tyr was determined from the area under the curve of the corresponding chromatographic peaks employing calibration curves constructed using commercial standards.

2.4 Detection of dityrosine, ditryptophan and Tyr-Trp by mass spectrometry

Samples were analyzed using an Eksptert Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC) ABSciex 4500 system coupled to a triple quadrupole detector (Triple Quad™). The chromatographic conditions, stationary and elution buffers, were the same as those described in Section 2.3. Mass detection was carried out under a positive polarity mode employing an Information Dependent Acquisition (IDA) scanning method with the first criteria being the search for intense peaks from 1 to 1 exceeding 1000.0 counts. The acquisition period was 40.45 min with a mass tolerance of 250.0 mDa, and an enhanced resolution scan was employed to confirm the charge state and/or isotope pattern. No dynamic background



subtraction nor rolling collision energy were employed. In addition, selected reaction monitoring (SRM) MS was used with positive polarity, and employing a Turbo Spray™ system as ion source (electrospray ionization), to collect Q1 and Q3 of Trp, Tyr, and their oxidation products. MS² spectra were collected using a step size of 0.1 Da of selected parent ions, with a MS² scan range of 50–1000 Da. The collision energy and declustering potentials were 15 and 56 V, respectively. N₂ was used as nebulizing gas, the temperature inside the nebulization chamber was set at 600 °C.

The SRM mode was also set to detect ions arising from specific oxidation products corresponding to Trp+16, Trp+32 (hydroperoxides and *N*-formylkynurenine), and Tyr+16 (3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA). For crosslinked species, the following ions were examined: dityrosine (Q1 361/Q3 315), ditryptophan (Q1 407/Q3 203) and Tyr-Trp (Q1 384/Q3 203, or Q1 384/Q3 367).

2.5 Quantification of dityrosine by HPLC-FL and UPLC-MS

Production of dityrosine was analyzed and quantified by fluorescence (FL), as described previously,⁵⁴ and by MS. Samples (10 µL) were injected on to a reversed phase column (Hibar® 250 × 4.3 mm RP-18 endcapped (particle size 5 µm) Phurospher®-STAR, Millipore) maintained at 40 °C, and separated by gradient elution using buffer A (100 mM sodium perchlorate, 10 mM, H₃PO₄) and buffer B (80% aqueous methanol), at flow rate of 0.8 mL min⁻¹. Fluorescence detection was carried out using λ_{ex} 280 and λ_{em} 410 nm. Mass detection was achieved employing SRM mode to follow the fragmentation of the base peak 361 → 315 employing 86 V for declustering potential (DP), a collision energy (CE) of 85 V and a collision cell exit potential (CXP) of 18 V. Quantification of dityrosine was determined from the area under the curve (AUC) of the chromatographic peaks employing calibration curves (1–100 µM for FL detection, 1–50 µM for mass analysis) generated using the commercial *o,o'*-dityrosine standard (ESI Fig. 1 and 2†). Analysis of FL data was carried out using OpenLab Software (Santa Clara, CA), while for MS analysis, calibration curves were generated, and data analysis carried out using the software Analyst (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

2.6 Data and statistical analysis

The data reported are from measurements carried out in triplicate on at least two or three independent experiments. Analysis employed Graphpad Prism 7.0a software. With the exception of ESI Fig. 1 and 2,† data are presented as means ± SD. Statistical analysis of data presented in Fig. 5A for χ_{Tyr} = 0.95 and 1, was carried out by Student's *t*-test, using Graphpad Prism 7.0a software.

3. Results

UV illumination of [Co(NH₃)₅(CO₃)]NO₃ at 254 nm results in the release of CO₃^{•-}.^{39,53} Under the experimental conditions employed the complex was illuminated at a rate of 9 × 10⁻³ Einstein per min, giving a CO₃^{•-} flux of 367 µM min⁻¹.⁵³ Reaction of this species with Tyr and Trp, results in one-electron

oxidation of the aromatic rings, and formation of the Tyr-derived phenoxyl radical, Tyr[•], and the Trp-derived indolyl radical, Trp[•], as a result of rapid deprotonation of the initial radical-cations. In the absence of O₂, subsequent rapid radical-radical reactions generate the respective dimers.

3.1 Formation dityrosine and ditryptophan elicited by CO₃^{•-} from the individual parent amino acids

Illumination of individual solutions of Tyr and Trp (each 500 µM) with [Co(NH₃)₅(CO₃)]NO₃ (4 mM), resulted in the consumption of both residues, with 332 and 298 µM of Tyr and Trp, remaining after 3 min (Fig. 1A). In control illumination systems, in the absence of the Co(III) complex, no Tyr, and approximately 50 µM Trp consumption was detected (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B, the consumption of both amino acids mediated by CO₃^{•-}, increased in a manner that was dependent on the initial concentration of the amino acid. Both amino acids showed a similar slight down curvature in the consumption *versus* initial concentration plots, probably as a result of increasing light absorption by the amino acid instead of the [Co(NH₃)₅(CO₃)]NO₃ complex. The similarity of the curves for both residues suggests a similar stoichiometry of reaction. For both amino acids, a stoichiometric factor (*n*), defined as the moles of CO₃^{•-} trapped per mole of amino acid, of about 5.5, and 3.7 was determined for initial concentrations of 0.5 and 1 mM, respectively.

The formation of specific Tyr and Trp oxidation products, both dimers and oxygenated (*m/z* +16 and +32) species, was analyzed by MS. In all cases, no oxygenated products were detected consistent with effective deoxygenation of the solutions. ESI Fig. 3† depicts a representative chromatogram for *m/z* +32 ions, obtained for Trp under aerobic and anaerobic atmospheres. UPLC-MS analysis of illuminated Tyr-containing solutions and the Co(III) complex, showed the presence of two peaks with *m/z* 361, with these eluting at 11.7 and 14.2 min (Fig. 2A, peaks a and b, respectively). These signals showed similar MS/MS spectra with fragmentations 361 → 315, and 361 → 344 (Fig. 2B and C). This is in agreement with dimerization of Tyr[•] and the formation of two isomers linked by C–C and C–O bonds (*o,o'*-dityrosine and isodityrosine), respectively. Peak a (at 11.7 min, Fig. 2A) co-eluted with the commercial standard of *o,o'*-dityrosine (ESI Fig. 2A†), allowing its identification as this isomer. Analysis by HPLC-FL showed the presence of a single peak that eluted at the same time as the commercial standard (ESI Fig. 4†), consistent with the known fluorescent properties of *o,o'*-dityrosine. Peak b (detected by UPLC-MS, Fig. 2A) was not observed by HPLC-FL, indicating that this is (non-fluorescent)⁵⁵ isodityrosine. Based on the ion intensities of the obtained mass spectra, apparently a higher yield of the *o,o'*-dityrosine isomer than isodityrosine, was produced.

Commercial *o,o'*-dityrosine standard was used to construct calibration curves for both the UPLC-MS and HPLC-FL experiments (ESI Fig. 1 and 2†). As UPLC-MS allowed the detection of both isomers, this technique was used to quantify these materials in working solutions, with the assumption that isodityrosine responded in a similar manner to *o,o'*-dityrosine. To



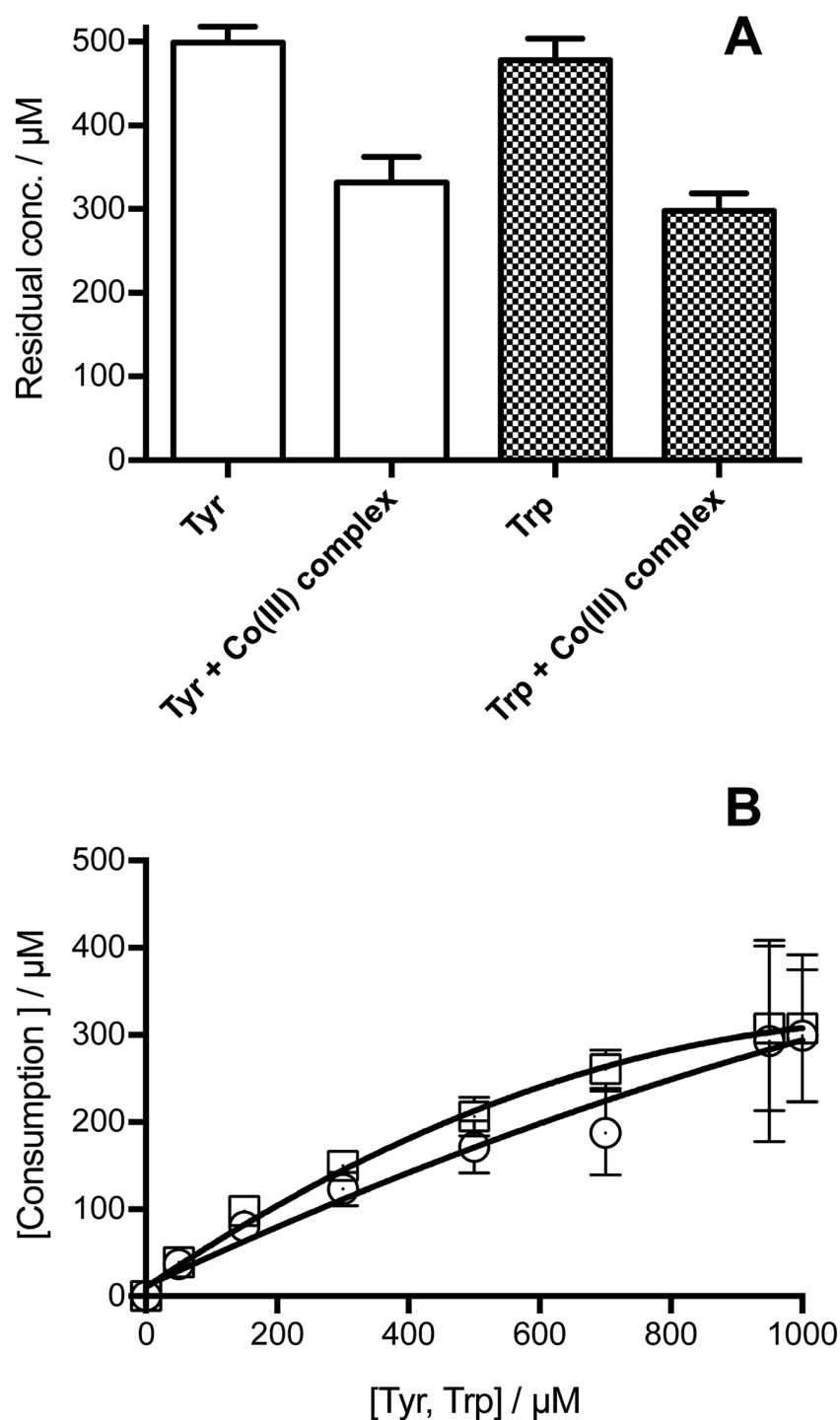


Fig. 1 Illumination of free Tyr, or free Trp, as individual amino acids in the presence of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ results in consumption of Tyr and Trp. Panel A: consumption of Tyr and Trp determined for solutions containing each amino acid at 0.5 mM illuminated at 254 nm for 3 min in the absence or presence of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ (4 mM), under a N_2 atmosphere. Panel B: dependence of the consumed Tyr ($\circ$) and Trp ($\square$) with their initial concentration. All solutions were prepared in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA) and bubbled with N_2 for 1 h prior to illumination. Consumption of amino acids was assessed by HPLC with fluorescence detection as described in Material and methods.

assess the total production yield of dityrosine (the di-Tyr acronym representing both isomers), solutions containing Tyr (50–1000 μM) and $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ (4 mM) were illuminated (as above), and the sum of the area under the curve (AUC)

of the peaks corresponding to *o,o'*-dityrosine, and isodityrosine isomers interpolated in the calibration curve ($[\text{AUC}] = 507\,781 + 931\,044 [o,o'\text{-dityrosine}, \mu\text{M}]$, $r^2 = 0.9990$). The data obtained for di-Tyr formation (expressed as μM) were employed to determine



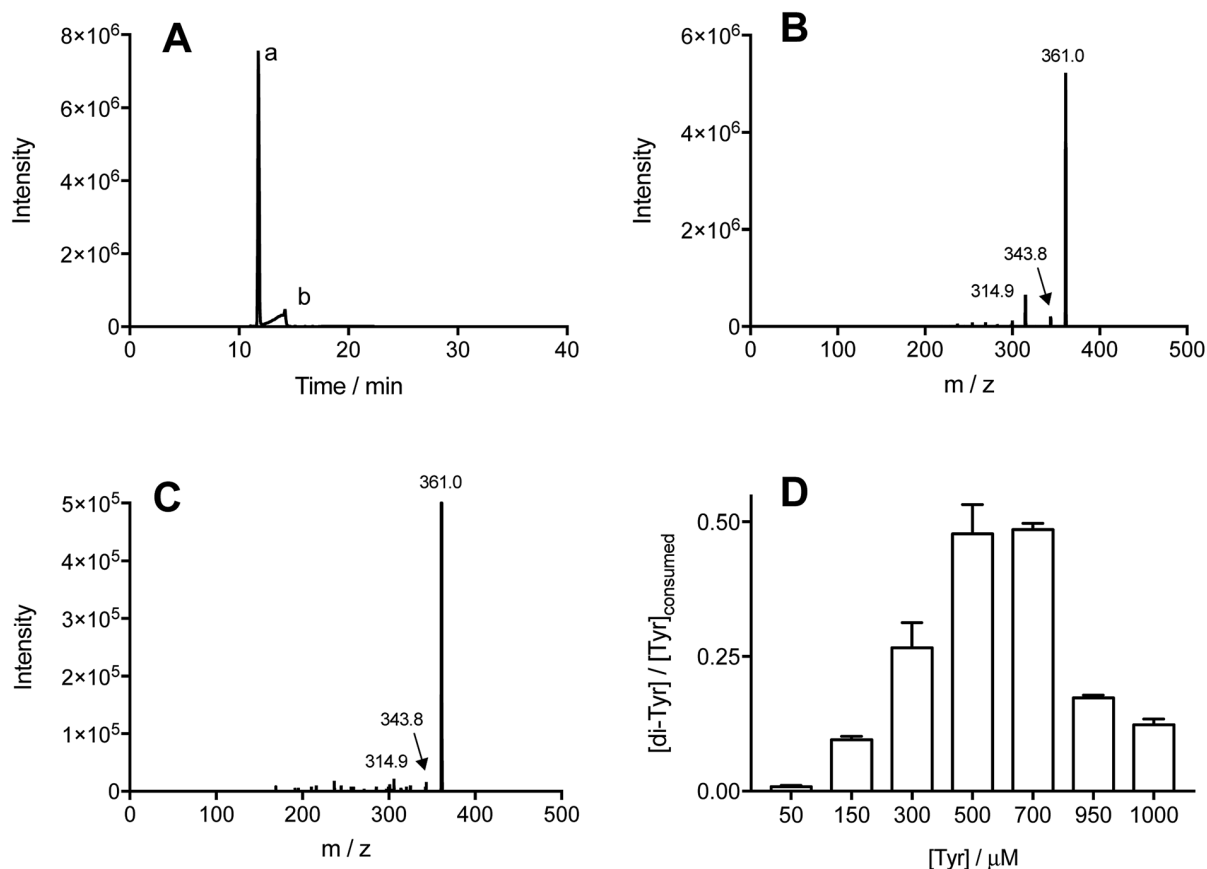


Fig. 2 Illumination of free Tyr in the presence of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ induces formation of di-Tyr. Tyr solutions (1 mM) in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA) were illuminated for 3 min at 254 nm in the presence 4 mM of the $\text{Co}(\text{III})$ complex, under a N_2 atmosphere. Formation of di-Tyr was detected by mass spectrometry (MS, selected reaction monitoring, SRM) as described in the Material and methods section. Panel A: MS/MS chromatogram obtained for ions that undergo the transition m/z 361 $\rightarrow$ 315. Panels B and C present representative MS/MS spectra obtained for peak a (11.7 min) and peak b (14.2 min) presented in A, respectively. Panel D shows the ratio between di-Tyr concentration and consumed Tyr, for experiments carried out at Tyr concentrations between 50 and 1000 μM .

the mass balance for Tyr oxidation. If the consumed Tyr leads exclusively to di-Tyr, the expected ratio $[\text{di-Tyr}]/[\text{Tyr}]_{\text{consumed}}$ should be 0.5; as two moles of Tyr are necessary to produce one mole of di-Tyr. Fig. 2D presents the experimentally determined ratio at different initial Tyr concentrations. At both low (50–300 μM) and also at high (950–1000 μM) Tyr concentrations, values <0.5 were determined, whereas at 500 and 700 μM Tyr, the ratio was close to the 0.5 expected for complete transformation of Tyr to di-Tyr.

In the case of Trp, MS analysis of solutions illuminated in the presence of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$, provided evidenced the exclusive formation of ditryptophan dimers (di-Trp, ions with m/z 407). Three peaks were detected at retention times >20 min (Fig. 3A). Two of these (20.5 and 21.2 min) showed low intensities (<150 000 counts for $[\text{Trp}] = 1$ mM, Fig. 3A), while the third peak (31.2 min) was of significantly higher intensity (2×10^6 counts for Trp 1 mM, Fig. 3A). This implies that under these conditions (N_2 atmosphere) formation of one di-Trp isomer is favored (Fig. 3A). The MS/MS spectrum of this peak, and also the lower intensity species, showed characteristic m/z 407 $\rightarrow$ 203 transitions (Fig. 3B). Analysis by HPLC with DAD and FL

detection showed the presence of a peak at 32.7 min with a low intensity ($\text{mUA} = 1.16$ at 280 nm, ESI Fig. 5†). This species displayed a UV-vis spectrum with a band at 290 nm, and an emission fluorescence band at 346 nm on excitation at 280 nm (Fig. 3C). This signal is attributed to the di-Trp isomer detected at 31.2 min by UPLC-MS.

3.2 Formation of Tyr-Trp induced by $\text{CO}_3^{\bullet-}$ in solutions containing Tyr and Trp

Illumination, under an atmosphere of N_2 , of solutions containing Tyr (500 μM), Trp (500 μM), and $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ (4 mM), resulted in the exclusive production of di-Tyr, di-Trp and Tyr-Trp crosslinks, as determined by UPLC-MS. The chromatograms showed the presence of three peaks (at 19.2, 21.4 and 23.6 min) with m/z 384, with MS/MS spectra showing fragmentations to give ions at 367 and/or 203 (Fig. 4A). Each of the peaks (a, b and c in Fig. 4A) showed 384 $\rightarrow$ 367 fragmentations, while only two (peaks b and c in Fig. 4A) showed 384 $\rightarrow$ 203 transitions. These data indicate that at least three different Tyr-Trp isomers are formed with slightly different MS/MS fragmentation patterns. Peak a showed fragmentation to 367,



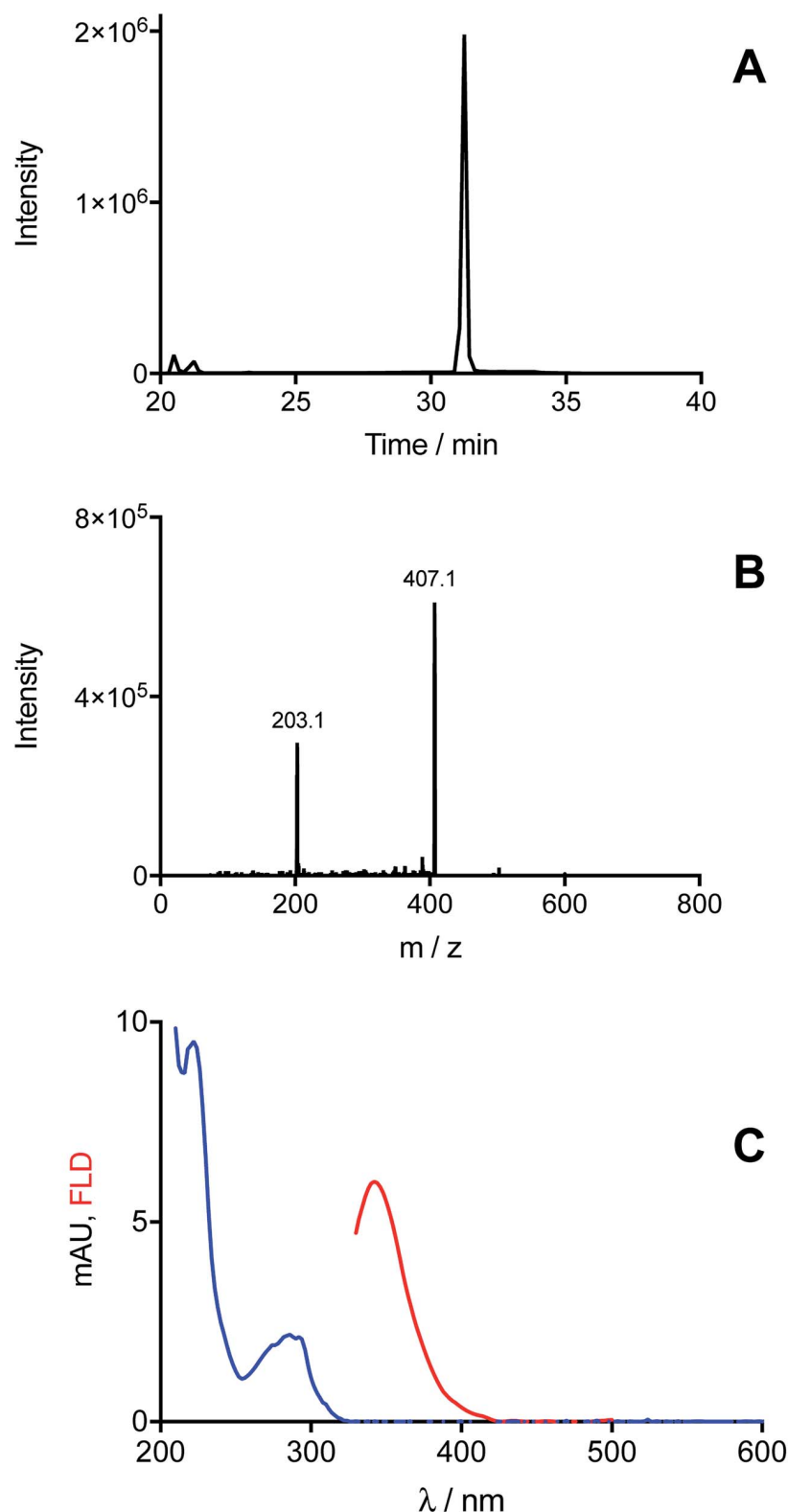


Fig. 3 Illumination of free Trp in the presence of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ induces formation of di-Trp. Trp solutions (1 mM) in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA) were illuminated for 3 min at 254 nm in the presence 4 mM of the Co(III) complex, under a N_2 atmosphere. Production of di-Trp was detected by MS (selected reaction monitoring, SRM). Panel A: MS/MS chromatogram obtained for ions that undergo the transition m/z 407 $\rightarrow$ 203. Panel B shows a representative MS/MS spectrum obtained for the peak detected at 31.2 min. Panel C represents the UV-visible (blue line) and fluorescence emission spectrum (red line) of di-Trp separated by HPLC and detected by DAD and fluorescence detectors.



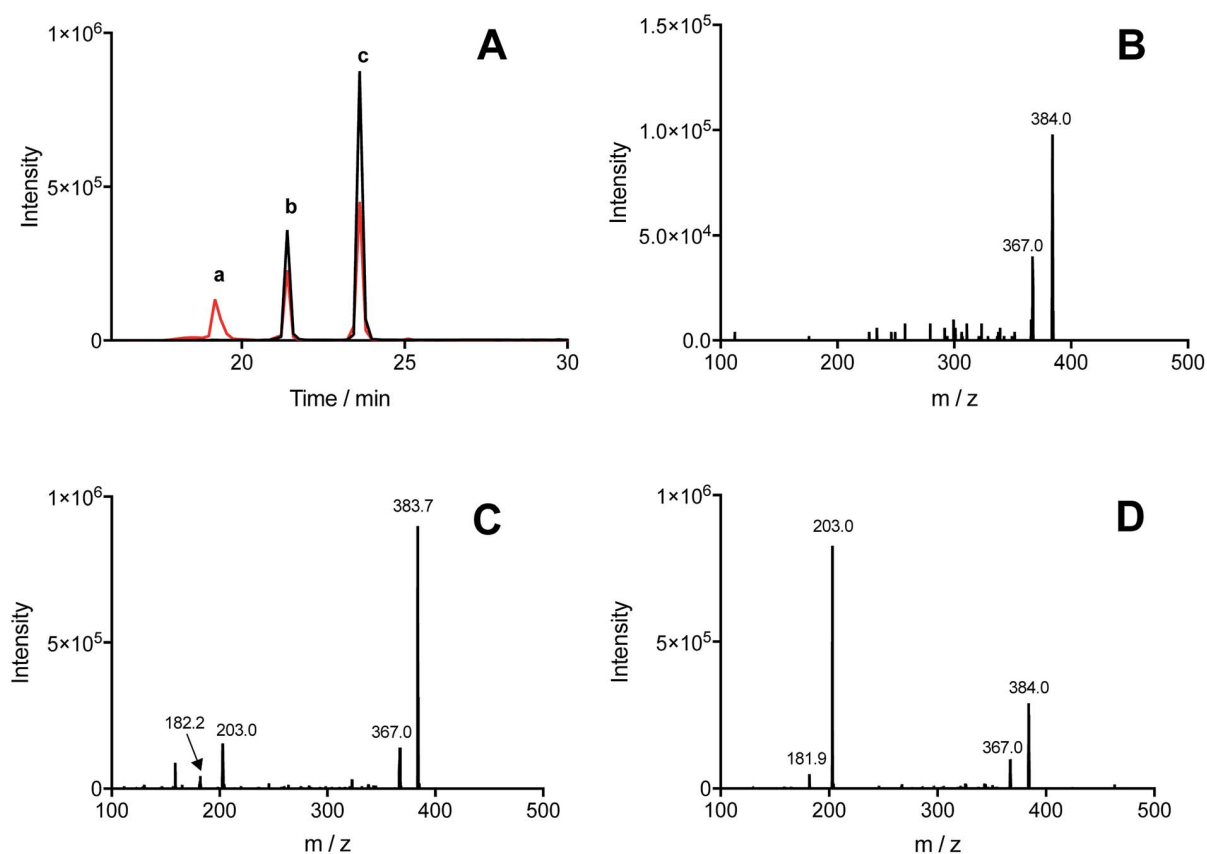


Fig. 4 Illumination of solutions containing a mixture of free Tyr and Trp in the presence of the $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ results in the formation of Tyr–Trp adducts. Solutions containing 500 μM of Tyr and 500 μM of Trp (1 mM total concentration) in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA) were illuminated for 3 min at 254 nm in the presence of 4 mM of the Co(III) complex, under a N_2 atmosphere. Tyr–Trp adducts were detected by MS (selected reaction monitoring, SRM) in samples exposed to light, but not in controls (non-illuminated solutions). Panel A: MS/MS chromatogram obtained for ions undergoing a m/z 384 → 203 transition (black line) and m/z 384 → 367 transitions (red line). Panels B, C, and D show representative MS/MS spectra of peaks a, b and c, indicated in panel A (19.2, 21.4, and 23.6 min), respectively.

without significant formation of a m/z 203 ion (Fig. 4B), whilst peaks b and c generated both the 367 and 203 ions, but with different intensity patterns (Fig. 4C and D). In addition to these Tyr–Trp species, di-Tyr (361 → 315) and di-Trp (407 → 203) were also detected at variable levels (ESI Fig. 6†).

The dependence of each signal (di-Tyr, di-Trp and Tyr–Trp) on the concentration of the parent amino acids (Tyr and Trp) were analyzed. Data obtained with a total amino acid concentration of 500 μM are presented in Fig. 5, where $\chi_{\text{Tyr}} = 0$ indicates a solution containing only Trp, and $\chi_{\text{Tyr}} = 1$ corresponds to a solution containing only Tyr. As indicated in Fig. 5A, between χ_{Tyr} values of 0.05 and 0.95, the production of di-Tyr increased in a χ_{Tyr} dependent manner. Interestingly, at $\chi_{\text{Tyr}} = 1.0$ (*i.e.* only 500 μM Tyr) the AUC for the di-Tyr peaks showed no significant differences that those obtained for $\chi_{\text{Tyr}} = 0.95$ ($p^* < 0.05$) (Fig. 5A). In the case of di-Trp, higher AUC values were observed at $\chi_{\text{Tyr}} = 0$ and 0.05 (Fig. 5B). At $\chi_{\text{Tyr}} > 0.5$, low intensity di-Trp peaks were detected by UPLC. As expected, Tyr–Trp adducts (their UPLC-MS peaks) were only detected between $\chi_{\text{Tyr}} = 0.05$ and 0.95 (Fig. 5C). The AUC of such peaks (*i.e.* those with transitions 384 → 367) showed a bell-shaped curve with a maximum at $\chi_{\text{Tyr}} = 0.5$ (Fig. 5C). At a total amino acid

concentration of 1 mM, the relationship between di-Tyr, di-Trp and Tyr–Trp crosslinks with the value of χ_{Tyr} was similar, however a more marked decrease in di-Trp was observed at 0.3, while the maximum yield of Tyr–Trp was reached at 0.7 (ESI Fig. 7†).

The consumption of both amino acids in these mixed amino acid systems illuminated in the presence of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ was assessed by HPLC-FL. As shown in Fig. 6A, with a total amino acid concentration of 1 mM, Tyr consumption increased as its initial concentration increased (*i.e.* increasing χ_{Tyr} values), though with a slight down curvature. Trp consumption showed the inverse relationship with χ_{Tyr} , also showing a curvature. These results are similar to those obtained detected for the individual amino acid solutions (Fig. 1B).

For the χ_{Tyr} values where the mass balance implies near complete conversion of Tyr to di-Tyr, Tyr consumption should equate solely to the formation of di-Tyr and Tyr–Trp crosslinks. In this zone, low values of the $[\text{di-Tyr}]/[\text{Tyr}]_{\text{consumed}}$ ratio were determined (Fig. 6B), together with a similar level of Tyr and Trp consumption. In such conditions, the difference between the concentration of Tyr consumed and di-Tyr formed should equate to the extent of formation of Tyr–Trp. At $\chi_{\text{Tyr}} = 0.5$, the



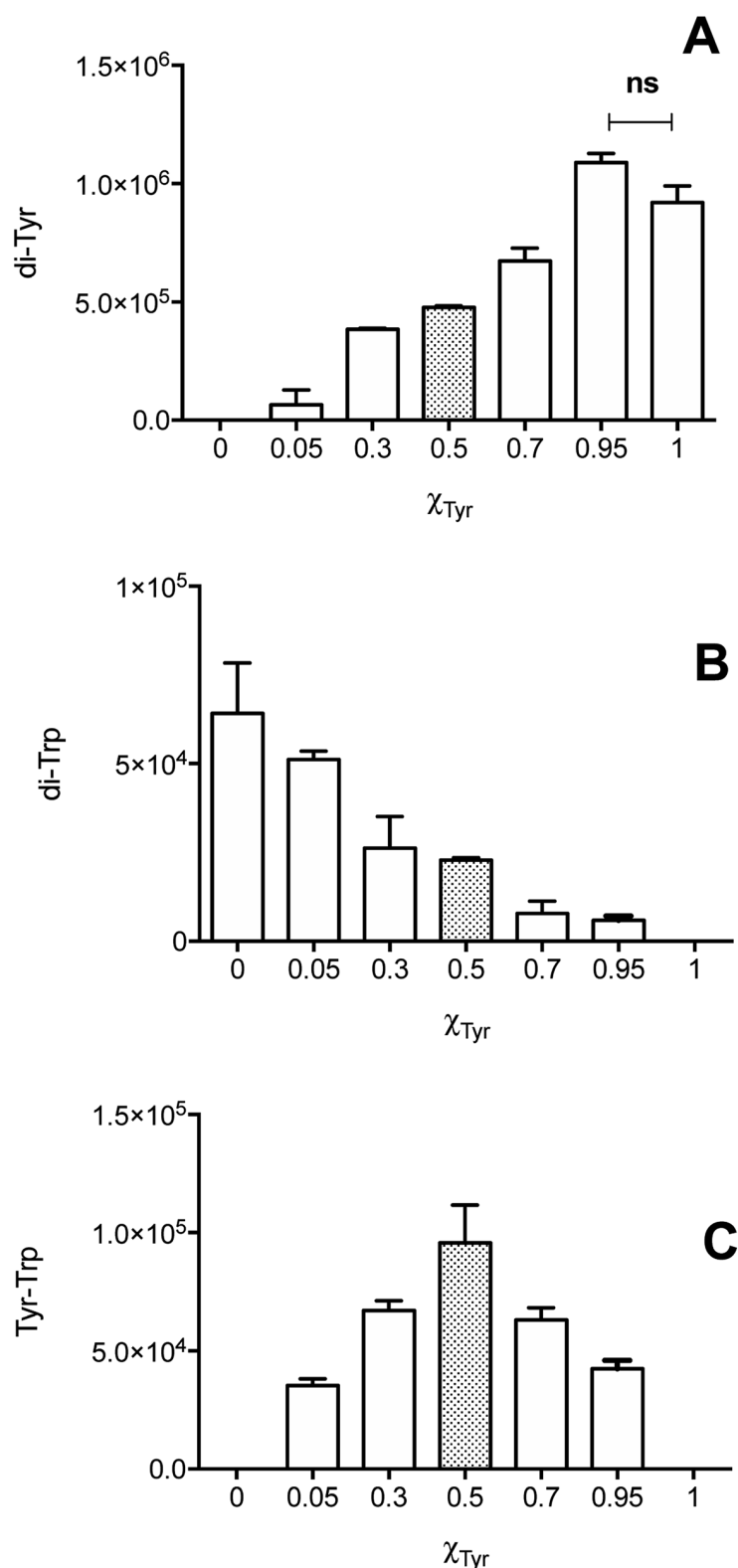


Fig. 5 Formation of di-Tyr, di-Trp and Tyr-Trp depends on the concentration of Tyr and Trp. Solutions containing Tyr and Trp (500 μM total concentration) in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA) were illuminated for 3 min at 254 nm in the presence of 4 mM $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$, under a N_2 atmosphere. The area under the curve of the chromatographic peaks for di-Tyr (m/z 361 $\rightarrow$ 315 transition, panel A), di-Trp (m/z 407 $\rightarrow$ 203 transition, panel B), and Tyr-Trp (m/z 384 $\rightarrow$ 367 transition, panel C), were determined by MS as described in the Material and methods section. The concentrations of Tyr and Trp were expressed as molar fraction of Tyr (χ_{Tyr}), with $\chi_{\text{Tyr}} = 0$ indicating a solution containing 500 μM Trp with no Tyr, and $\chi_{\text{Tyr}} = 1$, a solution containing 500 μM Tyr and no Trp. In panel A, ns indicates no significant difference ($p > 0.05$) as determined by Student's t -test.



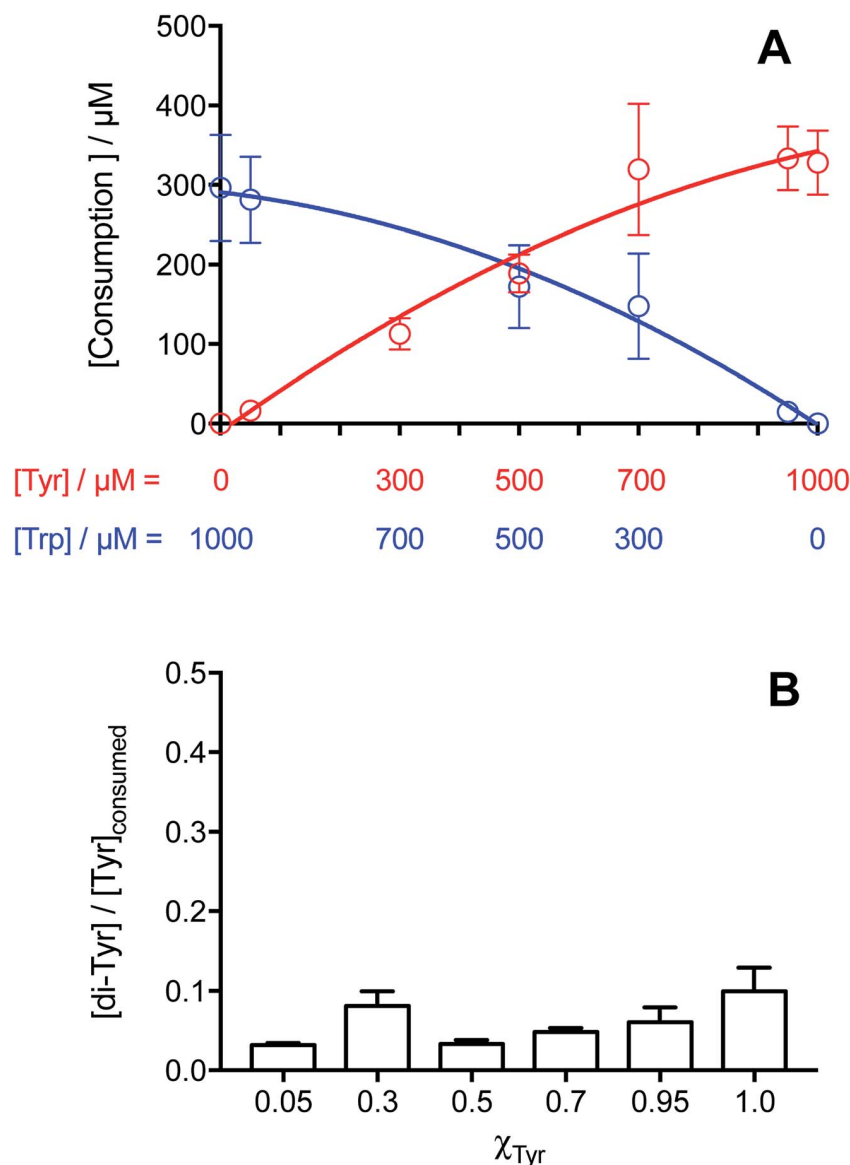


Fig. 6 Consumption of Tyr and Trp in solutions containing both amino acids and $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ depends on the concentration of each amino acid residue. Panel A depicts the consumption (in μM) of Tyr (red symbols) and Trp (blue symbols) at the different molar fractions (expressed as amino acid concentration). Panel B shows the ratio between $[\text{di-Tyr}]$ and consumed Tyr, for experiments carried out employing various Tyr and Trp mixtures.

consumption of Tyr was $\sim 189 \mu\text{M}$, and the yield of di-Tyr formed was $6 \mu\text{M}$ (and hence a $[\text{di-Tyr}]/[\text{Tyr}]_{\text{consumed}}$ ratio of ~ 0.03), giving a yield of Tyr-Trp formation of $\sim 177 \mu\text{M}$. This value is similar to that for Trp consumption, and consistent with the very low levels of di-Trp detected (ESI Fig. 7B†).

4. Discussion

Oxidation of proteins, leading to crosslinking, oligomerization and aggregation, is closely associated with a number of human pathologies, and particularly neurodegenerative diseases.^{1–4} It has been reported that dityrosine formation, arising from self-reaction of two $\text{Tyr}^\bullet$, contributes to the observed inter-

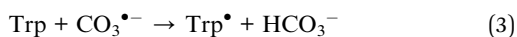
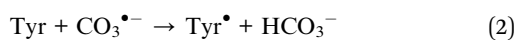
molecular crosslinks. Furthermore, the detection of this species is increasingly being used as a marker of protein damage and oxidative stress.^{20–23} It is therefore increasingly accepted that $\text{Tyr}^\bullet$ are critical intermediates in both protein oxidation in general, and especially protein crosslinking. The reactions of other protein-derived radicals (protein $^\bullet$ in Scheme 1) are less well explored, even though it is well established that Trp residues are one of the most susceptible residues to oxidation.⁵⁶ Thus formation of $\text{Trp}^\bullet$, and cross-reaction with $\text{Tyr}^\bullet$ to produce Tyr-Trp crosslinks, was hypothesized to be an alternative pathway to the formation of protein dimers and aggregation. This tenet is supported by the detection of both intra- and inter-molecular Tyr-Trp bonds in a number of systems.^{36,37,48–50,57} In



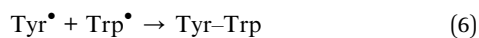
spite of this, little effort has been expended on understanding the factors that control the formation, accumulation and biological consequences of the generation of this type of species. This is probably, at least in part, due to the absence of robust methods to detect and quantify these adducts. In the present work we have shown that exposure of mixtures of free Tyr and Trp to high concentrations of $\text{CO}_3^{\bullet-}$, generates, under anaerobic conditions, high concentrations of Tyr–Trp crosslinks. The system involves photochemical decomposition of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ (reaction (1)) to produce $\text{CO}_3^{\bullet-}$,^{39,53} a strong oxidant ($E^0 = 1.78$ V, pH 7.0) that induces one-electron oxidation of targets. Little data support the occurrence of addition reactions with this species.⁵⁸

$\text{CO}_3^{\bullet-}$ is generated in biological environments by secondary reactions of peroxyxynitrite in the presence of CO_2 , during turnover of the enzyme xanthine oxidase, by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of hSOD1,⁵⁸ and *via* reaction of hydroxyl radicals (from the Fenton reaction) with the ubiquitous biological species bicarbonate.⁵⁹ In the case of hSOD1 peroxidase activity, $\text{CO}_3^{\bullet-}$ have been implicated in protein dimerization and the formation of non-amyloid hSOD1 aggregates.^{31–34}

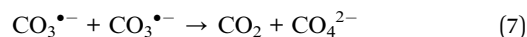
For Tyr and Trp, reaction with $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (reactions (2) and (3)) occurs with rate constants of 4.5×10^7 and $7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively.⁶⁰



In the absence of O_2 , the major likely reactions are self-reactions of $\text{Tyr}^{\bullet}$ and $\text{Trp}^{\bullet}$, to give dityrosine and ditryptophan, respectively, and cross-reaction between these species to generate Tyr–Trp dimers (reactions (4) to (6)).



As shown in Fig. 1A, similar extents of Tyr and Trp consumption were detected after illumination of solutions containing the Co(III) complex and 500 μM of either Tyr or Trp. This indicates that, independent of the differences in the kinetics of oxidation (with k for Trp being significantly higher, see above), both amino acids are consumed with similar stoichiometries. The relationship between the consumption of Tyr and Trp with their initial concentration, also showed a similar behavior, highlighting a downward curvature at initial concentrations $>500 \mu\text{M}$ (Fig. 1B). The increase in Tyr and Trp consumption with higher initial concentrations implies that excess $\text{CO}_3^{\bullet-}$ are generated in the system, with the alternative fate of excess $\text{CO}_3^{\bullet-}$ being reaction (7), which has $k 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁶¹



Therefore, under our experimental conditions, one-electron oxidation of Tyr and Trp (reactions (4) and (5), respectively) occurs in parallel with self-reaction of $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (reaction (7)). These data are consistent with the observed high stoichiometric factor (n) detected for both amino acids, and imply that not all the generated $\text{CO}_3^{\bullet-}$ react with Tyr or Trp.

Analysis of dityrosine formation in solutions of free Tyr exposed to $\text{CO}_3^{\bullet-}$ showed the formation of two isomers by UPLC-MS, with a single species detected by HPLC-FL (Fig. 2A and ESI Fig. 4†). This behavior indicates that both the thermodynamically-favored (C–C bonded) species *o,o'*-dityrosine ($\Delta G = -195.4 \text{ kJ mol}^{-1}$), and the alternative C–O bonded isomer isodityrosine ($\Delta G = -119.2 \text{ kJ mol}^{-1}$) are produced.⁶² Interestingly, lower concentrations of Tyr gave rise to a lower yield of the isodityrosine isomer relative to *o,o'*-dityrosine (data not shown) suggesting that its production is favored by a high steady state concentration of $\text{Tyr}^{\bullet}$. It should be noted that the yield of dityrosine is often quantified by fluorescence (*e.g.* after HPLC separation), an approach that does not detect isodityrosine. This is unfortunate as the latter appears to be important in some biological contexts, including the crosslinking of plant cell glycoproteins,^{63–65} and reactions mediated by human phagocytes.⁵⁵ In order to determine whether (under the conditions employed) the extent of Tyr consumption could be explained solely by the formation of dityrosine isomers (di-Tyr), the ratio of $[\text{di-Tyr}]/[\text{Tyr}]_{\text{consumed}}$ was determined at different initial Tyr concentrations. As depicted in Fig. 2D, at Tyr concentrations lower than 500 μM (*i.e.* 50, 150, and 300 μM), as well as at high concentrations (950 and 1000 μM), values significantly <0.5 were determined. This may be due to the occurrence of further reactions of di-Tyr isomers, including the formation of oligomers. In the low concentration regime, the high fluxes of $\text{CO}_3^{\bullet-}$ might be expected to facilitate such processes, whilst with high Tyr concentrations, a decreased yield of $\text{CO}_3^{\bullet-}$ production due to a higher absorption of light of the parent Tyr could explain the low values of the $[\text{di-Tyr}]/[\text{Tyr}]_{\text{consumed}}$ ratio. With moderate concentrations of Tyr (*e.g.* 500 and 700 μM) (Fig. 2D) (ESI Fig. 7A†), values close to the expected value of 0.5 were obtained, indicating that all the oxidized Tyr are converted to di-Tyr (reaction (4)). Thus, there appears to be a delicate balance between the concentrations of $\text{CO}_3^{\bullet-}$ and Tyr required to produce a maximum (quantitative) yield of di-Tyr.

Dimerization of Trp residues and consequent protein crosslinking has been less well studied than with di-Tyr, though a number of examples have been reported in the literature.^{31,36,37,40} Pulse radiolysis studies indicate that dimerization of $\text{Trp}^{\bullet}$ occurs with $k \sim 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for both free and peptide Trp residues.²⁸ Exposure of Trp-containing peptides and lysozyme to Co^{60} γ -radiation, peroxyxynitrous acid (ONOOH), or $\text{CO}_3^{\bullet-}$ derived from the bovine SOD1/hydrogen peroxide system, has been reported to yield at least four ditryptophan isomers (detected as ions with m/z 407 by MS), and with different retention times; this consistent with the delocalization of the unpaired electron across the indole ring of $\text{Trp}^{\bullet}$ with significant spin density present at N1 and C3 of the pyrrole ring, as well as carbon atoms of the benzene ring.²⁸ Interestingly, this



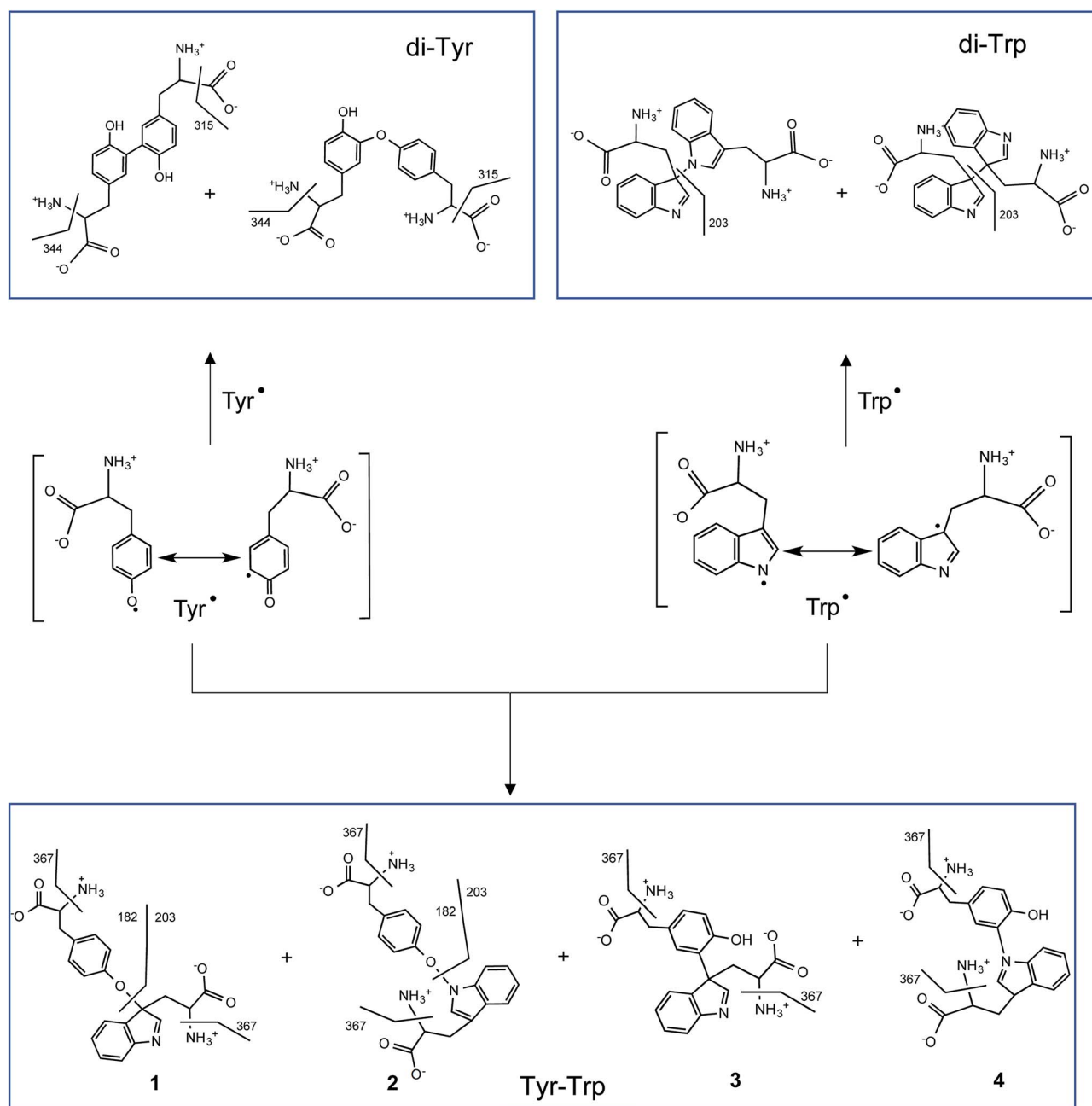


Fig. 7 Proposed radical-radical reactions giving rise to di-Tyr, di-Trp and Tyr-Trp formation. It should be noted that only some of the possible resonance structures are depicted for the delocalization of the unpaired electron in Tyr• and Trp•. Crosslinks involving C–O, C–C, O–N and C–N bonds, and their proposed fragmentation pathways are presented. Some of the di-Trp and Tyr-Trp dimers are likely to be stereoisomeric pairs (those formed at C3 of Trp due to reaction at either face of the indole ring, see Carroll *et al.*,²⁸) these are not indicated for reasons of clarity.

study did not detect Trp dimers with $\text{CO}_3^{\bullet-}$,²⁸ a result that is inconsistent with the current study; this may be due to the presence of O_2 and/or the low flux of $\text{CO}_3^{\bullet-}$ employed in this previous work.^{28,66} Photo-oxidation of free Trp and its *N*-acetyl derivative employing the photosensitizers kynurenic acid⁴¹ and riboflavin⁴² has also resulted in the detection of ditryptophan isomers, with these processes being influenced by the presence of O_2 . Of particular interest is the detection of five ditryptophan dimers, and a trimer on exposure of free Trp to high intensity 365 nm light in the presence of riboflavin, a system that

generates a high steady state concentration of Trp•.⁴² In the present work, we took advantage of the photolabile $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ complex to produce $\text{CO}_3^{\bullet-}$, and high yields of Trp dimers. This resulted in the detection of four ditryptophan species (di-Trp, detected as species with *m/z* 407 ions, and fragmentation ions with *m/z* 203), however one of these species was considerably favored (Fig. 3A).

UPLC-MS/MS studies of Trp and Tyr mixtures (250 μM each amino acid) exposed to $\text{CO}_3^{\bullet-}$, showed formation of di-Tyr, di-Trp and Tyr-Trp crosslinks. The latter were evidenced by the



presence of two peaks with m/z 384 (consistent with the expected mass of a single-charged ion from a Tyr–Trp crosslink) and fragmentation ions with m/z 367, 203 and 182 (ESI Fig. 6†). Interestingly, with solutions containing 500 μM of each amino acid, the same chromatographic species were detected, together with an additional species that eluted at 19.2 min, and only gave a fragment ion with m/z 367, and not m/z 203 and 182 ions (Fig. 4). The transition m/z 384 $\rightarrow$ 203 is consistent with the formation of Tyr and Trp ions, while the ion with m/z 367 results from deamination at the α -carbon of either the Tyr or Trp moiety (Fig. 7). We speculate that the m/z 384 $\rightarrow$ 203 fragmentation arises from the presence of species with relatively weak C–O or C–N bonds (structures 1 and 4 in Fig. 7), whereas the species that only undergoes deamination (*i.e.* m/z 384 $\rightarrow$ 367) has a much stronger C–C bond (*i.e.* structure 3 in Fig. 7). In a number of these cases, the species are likely to be stereoisomer pairs, as addition of the Tyr phenoxyl radical, or the C3 radical on the phenol ring, could occur at C3 on the indole ring of Trp *via* either face. Another alternative crosslinked species where the radical centered on the indole nitrogen of Trp, links to the phenol oxygen of Tyr (*i.e.* structure 2 in Fig. 7), is likely to be very labile due to the weak nature of the N–O bond, and is unlikely to be detected under the MS conditions employed here.

Crosslinking between Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$ (reaction (6)) to give Tyr–Trp, appears to compete with self-reactions of these radicals to give di-Tyr and di-Trp (reactions (4) and (5)). This competition will depend on the kinetic rate constants of each process, as well as the concentrations of Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$. If the rate constant for reaction (6) is of the same order of magnitude as those for reactions (4) and (5), as would seem likely, it would be expected that the efficiency of Tyr–Trp formation would depend on the relative concentrations of Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$ and hence the concentrations of the parent amino acids. On this basis equimolar concentrations of Tyr and Trp might be expected to favor the formation of similar yields of Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$ and hence higher levels of Tyr–Trp than di-Tyr and di-Trp. This is consistent with the observed data that show that the maximum Tyr–Trp AUC is observed at around $\chi_{\text{Tyr}} = 0.5$ (Fig. 5C and ESI Fig. 7C†). Overall these results suggest that cross-termination reactions of Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$ is a facile and competitive process, especially when compared to self-reaction of Tyr $\cdot$ (to give di-Tyr) and Trp $\cdot$ (to give di-Trp), with the pattern of Tyr and Trp consumption assessed in mixtures of both amino acids resembling the behavior observed when each amino acid was studied separately (Fig. 1B *versus* Fig. 6A). However, the absolute quantification of each of isomer species and potential remains to be accomplished, with only some of the potential complement of di-Trp and Tyr–Trp isomers detected by MS both in this study and previously.²⁸ Whether the ‘missing’ isomers (*cf.* Fig. 7) are not formed in significant yields, or are formed but just not detected, remains to be established.

5. Conclusions

Photochemical decomposition of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{CO}_3)]\text{NO}_3$ has been shown to produce high yields of $\text{CO}_3^{\cdot-}$, and hence dimers from Tyr (di-Tyr) and Trp (di-Trp), together with high (micromolar) concentrations of Tyr–Trp crosslinks under an atmosphere of

N_2 . The relative yield of each species depends on the initial concentrations of Tyr and Trp, as well as the yields of Tyr $\cdot$ and Trp $\cdot$. The experimental methods presented here allow ready formation of Tyr–Trp adducts, and these should be easily adapted to allow generation of authentic standards, and isotope-labelled materials for use in more complex systems where these species might be detected and characterized by the specific parent and fragment ions, and the corresponding transitions, by MS. These data will hopefully guide future investigations into the presence, and biological consequences of Tyr–Trp crosslink formation.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Abbreviations

di-Tyr	<i>o,o'</i> -Dityrosine (3,3'-dityrosine) and isodityrosine
di-Trp	Ditryptophan dimers
HPLC	High performance liquid chromatography
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
FL	Fluorescence spectrophotometry

Acknowledgements

This work was supported by Fondecyt grant no 1180642 (to CLA) and the Novo Nordisk Foundation (Laureate grant: NNF13OC0004294 to MJD). CLA also thanks FONDEQUIP (EQM130032) for an equipment grant.

References

- M. J. Davies, *Biochem. J.*, 2016, **473**, 805–825.
- A. Krisko and M. Radman, *Open Biol.*, 2019, **9**, 180249.
- E. H. Sharman, *Reactive oxygen species and protein oxidation in neurodegenerative disease*, Springer, Cham, 2016, pp. 199–212.
- E. R. Stadtman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, **928**, 22–38.
- C. L. Hawkins and M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1504**, 196–219.
- C. L. Hawkins and M. J. Davies, *J. Biol. Chem.*, 2019, **294**, 19683–19708.
- C. López-Alarcón, A. Arenas, E. Lissi and E. Silva, *Biomol. Concepts*, 2014, **5**, 119–130.
- M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2005, **1703**, 93–109.
- B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 2015.
- C. Houée-Lévin, K. Bobrowski, L. Horakova, B. Karademir, C. Schöneich, M. J. Davies and C. M. Spickett, *Free Radical Res.*, 2015, **49**, 347–373.
- B. P. Partlow, M. B. Applegate, F. G. Omenetto and D. L. Kaplan, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2016, **2**, 2108–2121.

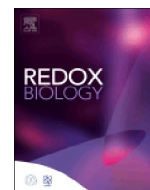


- 12 E. Lévy, N. El Banna, D. Baille, A. Heneman-Masurel, S. Truchet, H. Rezaei, M.-E. Huang, V. Béringue, D. Martin and L. Vernis, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 3896.
- 13 K. Wolhuter, H. J. Whitwell, C. H. Switzer, J. R. Burgoyne, J. F. Timms and P. Eaton, *Mol. Cell*, 2018, **69**, 438–450.e5.
- 14 K. A. Broniowska and N. Hogg, *Antioxid. Redox Signaling*, 2012, **17**, 969–980.
- 15 A. C. Krämer, A. Torreggiani and M. J. Davies, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 10258–10269.
- 16 E. Serebryany, J. C. Woodard, B. V. Adkar, M. Shabab, J. A. King and E. I. Shakhnovich, *J. Biol. Chem.*, 2016, **291**, 19172–19183.
- 17 Y. K. Al-Hilaly, L. Biasetti, B. J. F. Blakeman, S. J. Pollack, S. Zibae, A. Abdul-Sada, J. R. Thorpe, W.-F. Xue and L. C. Serpell, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 39171.
- 18 Y. K. Al-Hilaly, T. L. Williams, M. Stewart-Parker, L. Ford, E. Skaria, M. Cole, W. Bucher, K. L. Morris, A. Sada, J. R. Thorpe and L. C. Serpell, *Acta Neuropathol. Commun.*, 2013, **1**, 83.
- 19 K. Hensley, M. L. Maidt, Z. Yu, H. Sang, W. R. Markesbery and R. A. Floyd, *J. Neurosci.*, 1998, **18**, 8126–8132.
- 20 C. Giulivi, N. J. Traaseth and K. J. A. Davies, *Amino Acids*, 2003, **25**, 227–232.
- 21 G.-R. Wu, M. Cheserek, Y.-H. Shi, L.-Y. Shen, J. Yu and G.-W. Le, *Ann. Nutr. Metab.*, 2015, **66**, 44–50.
- 22 T. DiMarco and C. Giulivi, *Mass Spectrom. Rev.*, 2007, **26**, 108–120.
- 23 A. Annibal, G. Colombo, A. Milzani, I. Dalle-Donne, M. Fedorova and R. Hoffmann, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2016, **1019**, 147–155.
- 24 E. Fuentes-Lemus, E. Silva, F. Leinisch, E. Dorta, L. G. Lorentzen, M. J. Davies and C. López-Alarcón, *Food Chem.*, 2018, **256**, 119–128.
- 25 T. K. Dalsgaard, J. H. Nielsen, B. E. Brown, N. Stadler and M. J. Davies, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 7939–7947.
- 26 Y. Yang, H. Zhang, B. Yan, T. Zhang, Y. Gao, Y. Shi and G. Le, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 6957–6971.
- 27 C. P. Stanley, G. J. Maghzal, A. Ayer, J. Talib, A. M. Giltrap, S. Shengule, K. Wolhuter, Y. Wang, P. Chadha, C. Suarna, O. Prysyazhna, J. Scotcher, L. L. Dunn, F. M. Prado, N. Nguyen, J. O. Odiba, J. B. Baell, J.-P. Stasch, Y. Yamamoto, P. Di Mascio, P. Eaton, R. J. Payne and R. Stocker, *Nature*, 2019, **566**, 548–552.
- 28 L. Carroll, R. F. Anderson, C. Lopez-Alarcon and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, **113**, 132–142.
- 29 M. Ehrenshaft, L. J. Deterding and R. P. Mason, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, **89**, 220–228.
- 30 J. Mizdrak, R. J. W. Truscott, J. F. Jamie and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, **44**, 1108–1119.
- 31 D. B. Medinas, A. H. Iglesias and O. Augusto, *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, **49**, 1046–1053.
- 32 F. R. Coelho, A. Iqbal, E. Linares, D. F. Silva, F. S. Lima, I. M. Cuccovia and O. Augusto, *J. Biol. Chem.*, 2014, **289**, 30690–30701.
- 33 E. Pokrishevsky, L. McAlary, N. E. Farrawell, B. Zhao, M. Sher, J. J. Yerbury and N. R. Cashman, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 15590.
- 34 S. Grimm, A. Hoehn, K. J. Davies and T. Grune, *Free Radical Res.*, 2011, **45**, 73–88.
- 35 P. S. Sherin, E. A. Zelentsova, E. D. Sormacheva, V. V. Yanshole, T. G. Duzhak and Y. P. Tsentalovich, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8827–8839.
- 36 E. Fuentes-Lemus, M. Mariotti, J. Reyes, F. Leinisch, P. Häggglund, E. Silva, M. J. Davies and C. López-Alarcón, *Free Radic. Biol. Med.*, 2020, **152**, 61–73.
- 37 E. Fuentes-Lemus, M. Mariotti, P. Häggglund, F. Leinisch, A. Fierro, E. Silva, C. López-Alarcón and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, 2019, **143**, 375–386.
- 38 E. Fuentes-Lemus, E. Silva, P. Barrias, A. Aspee, E. Escobar, L. G. Lorentzen, L. Carroll, F. Leinisch, M. J. Davies and C. López-Alarcón, *Free Radic. Biol. Med.*, 2018, **124**, 176–188.
- 39 V. Paviani, R. F. Queiroz, E. F. Marques, P. Di Mascio and O. Augusto, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, **89**, 72–82.
- 40 E. D. Savina, Y. P. Tsentalovich and P. S. Sherin, *Free Radic. Biol. Med.*, 2020, **152**, 482–493.
- 41 E. D. Sormacheva, P. S. Sherin and Y. P. Tsentalovich, *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, **113**, 372–384.
- 42 E. Silva, P. Barrias, E. Fuentes-Lemus, C. Tirapegui, A. Aspee, L. Carroll, M. J. Davies and C. López-Alarcón, *Free Radic. Biol. Med.*, 2019, **131**, 133–143.
- 43 L. P. Candeias, P. Wardman and R. P. Mason, *Biophys. Chem.*, 1997, **67**, 229–237.
- 44 E. P. L. Hunter, M. F. Desrosiers and M. G. Simic, *Free Radic. Biol. Med.*, 1989, **6**, 581–585.
- 45 L. Carroll, D. I. Pattison, J. B. Davies, R. F. Anderson, C. Lopez-Alarcon and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, 2018, **118**, 126–136.
- 46 J. M. Gebicki, T. Nauser, A. Domazou, D. Steinmann, P. L. Bounds and W. H. Koppenol, *Amino Acids*, 2010, **39**, 1131–1137.
- 47 L. K. Folkes, M. Trujillo, S. Bartesaghi, R. Radi and P. Wardman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, **506**, 242–249.
- 48 B. Bhaskar, C. E. Immoos, H. Shimizu, F. Sulc, P. J. Farmer and T. L. Poulos, *J. Mol. Biol.*, 2003, **328**, 157–166.
- 49 Y. Yamada, T. Fujiwara, T. Sato, N. Igarashi and N. Tanaka, *Nat. Struct. Biol.*, 2002, **9**, 691–695.
- 50 F. Leinisch, M. Mariotti, M. Rykaer, C. Lopez-Alarcon, P. Häggglund and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, **112**, 240–252.
- 51 F. Basolo, R. K. Murmann, J. E. Whitney and C. L. Rollinson, *Inorganic Syntheses.*, 1953, **4**, 171–176.
- 52 F. Jin, J. Leitich and C. von Sonntag, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1995, **92**, 147–153.
- 53 V. W. Cope, S.-N. Chen and M. Z. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 3116–3121.
- 54 C. L. Hawkins, P. E. Morgan and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, **46**, 965–988.
- 55 J. S. Jacob, D. P. Cistola, F. F. Hsu, S. Muzaffar, D. M. Mueller, S. L. Hazen and J. W. Heinecke, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 19950–19956.
- 56 J. Butler, E. J. Land, W. A. Prütz and A. J. Swallow, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1982, **705**, 150–162.



- 57 P. Häggglund, M. Mariotti and M. J. Davies, *Expert Rev. Proteomics*, 2018, **15**, 665–681.
- 58 D. B. Medinas, G. Cerchiaro, D. F. Trindade and O. Augusto, *IUBMB Life*, 2007, **59**, 255–262.
- 59 E. Illés, A. Mizrahi, V. Marks and D. Meyerstein, *Free Radic. Biol. Med.*, 2019, **131**, 1–6.
- 60 S. Chen and M. Z. Hoffman, *Radiat. Res.*, 1973, **56**, 40–47.
- 61 O. Augusto, M. G. Bonini, A. M. Amanso, E. Linares, C. C. X. Santos and S. L. De Menezes, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 841–859.
- 62 S. Karmakar and A. Datta, *J. Phys. Chem. B*, 2017, **121**, 7621–7632.
- 63 S. Waffenschmidt, J. P. Woessner, K. Beer and U. W. Goodenough, *Plant Cell*, 1993, **5**, 809–820.
- 64 M. A. Held, L. Tan, A. Kamyab, M. Hare, E. Shpak and M. J. Kieliszewski, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 55474–55482.
- 65 S. C. Fry, *Biochem. J.*, 1982, **204**, 449.
- 66 J. D. Figueroa, E. Fuentes-Lemus, E. Dorta, V. Melin, J. Cortés-Ríos, M. Faúndez, D. Contreras, A. Denicola, B. Álvarez, M. J. Davies and C. López-Alarcón, *Redox Biol.*, 2019, **24**, 101207.





Quantification of carbonate radical formation by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of superoxide dismutase 1 using pyrogallol red bleaching

Juan David Figueroa^a, Eduardo Fuentes-Lemus^a, Eva Dorta^{a,b}, Victoria Melin^c,
Javiera Cortés-Ríos^d, Mario Faúndez^d, David Contreras^c, Ana Denicola^e, Beatriz Álvarez^f,
Michael J. Davies^g, Camilo López-Alarcón^{a,*}

^a Departamento de Química Física, Facultad de Química y de Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile

^b Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^c Laboratorio de Recursos Renovables, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile

^d Departamento de Farmacia, Facultad de Química y de Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile

^e Laboratorio de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^f Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^g Department of Biomedical Sciences, Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark

ARTICLE INFO

Keywords:

Carbonate radical anion
Superoxide dismutase
Hydrogen peroxide
Pyrogallol red
Peroxidase activity
Human SOD-1
Bovine SOD-1
EPR
DMPO
ABTS

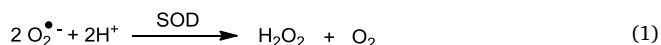
ABSTRACT

Carbonate radicals ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) are generated by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of cytosolic superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD, SOD-1). The present work explored the use of bleaching of pyrogallol red (PGR) dye to quantify the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation from bovine and human SOD-1 (bSOD-1 and hSOD-1, respectively). This approach was compared to previously reported methods using electron paramagnetic resonance spin trapping with DMPO, and the oxidation of ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid). The kinetics of PGR consumption elicited by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ was followed by visible spectrophotometry. Solutions containing PGR (5–200 μM), SOD-1 (0.3–3 μM), H_2O_2 (2 mM) in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4) showed a rapid loss of the PGR absorption band centered at 540 nm. The initial consumption rate (R_i) gave values independent of the initial PGR concentration allowing an estimate to be made of the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release of $24.6 \pm 4.3 \mu\text{M min}^{-1}$ for 3 μM bSOD-1. Both bSOD-1 and hSOD-1 showed a similar peroxidase activity, with enzymatic inactivation occurring over a period of 20 min. The single Trp residue (Trp³²) present in hSOD-1 was rapidly consumed (initial consumption rate $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M min}^{-1}$) with this occurring more rapidly than hSOD-1 inactivation, suggesting that these processes are not directly related. Added free Trp was rapidly oxidized in competition with PGR. These data indicate that PGR reacts rapidly and efficiently with $\text{CO}_3^{\cdot-}$ resulting from the peroxidase activity of SOD-1, and that PGR-bleaching is a simple, fast and cheap method to quantify $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release from bSOD-1 and hSOD-1 peroxidase activity.

1. Introduction

Superoxide radical anions, $\text{O}_2^{\cdot-}$, are generated in biological systems by several mechanisms including electron leakage from the mitochondrial electron transport chain, by a number of enzymes (e.g. the NADPH oxidase family, xanthine oxidase, uncoupled nitric oxide synthases), by autooxidation of a wide range of endogenous compounds (e.g. catechols, thiols), redox cycling of exogenous compounds (e.g. quinones, paraquat), and by autooxidation of metal ion- O_2 complexes (e.g. oxyhemoglobin and oxymyoglobin) [1]. The major fate of $\text{O}_2^{\cdot-}$ is dismutation to generate hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2 , which can occur either spontaneously or catalyzed by the enzyme superoxide dismutase (SOD)

(reaction (1)).



Under physiological conditions, the H_2O_2 produced via reaction (1) is rapidly removed by enzymes including catalase, peroxiredoxins, and glutathione peroxidases [1]. Thus, SOD and these enzyme families work in a coordinated manner to maintain the redox status of cells and biological fluids, inhibiting (or delaying) the damage triggered by reactive oxygen species (ROS) [1]. Nonetheless, in environments with high H_2O_2 concentrations, such as inflammatory conditions or inside peroxisomes, the cytosolic isoform of SOD (Cu,Zn-SOD, SOD-1) displays a bicarbonate- or CO_2 - dependent peroxidase activity [2–7]. The

* Corresponding author.

E-mail address: clopezr@uc.cl (C. López-Alarcón).

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101207>

Received 26 February 2019; Received in revised form 17 April 2019; Accepted 23 April 2019

Available online 27 April 2019

2213-2317/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

chemical mechanism is still controversial, however, it is known that H_2O_2 reacts with the catalytic copper ion (Cu^{2+}) of SOD-1 generating a copper-bound oxidant. This is proposed to oxidize bicarbonate (HCO_3^-) to give the carbonate radical anion ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) [8], or react with His residues of the protein ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ also can react with His) to inactivate the enzyme [7,9].

$\text{CO}_3^{\cdot-}$ is a powerful oxidant ($E_{\text{red}}^0 = 1.78 \text{ V}$) and a highly reactive species [3], which is able to diffuse away from the catalytic site of SOD-1 to induce oxidation of surrounding molecules. A significant target appears to be the single tryptophan (Trp^{32}) residue of human SOD-1 (hSOD-1) [3,10], and it has been reported that $\text{CO}_3^{\cdot-}$ -mediated oxidation of this residue to Trp-derived indolyl radicals is involved in the covalent dimerization (and oligomerization) of hSOD-1 through the formation of covalent Trp-Trp dimers [10]. This process may be of pathological relevance as $\text{CO}_3^{\cdot-}$ induced unfolding, oligomerization, and nonamyloid aggregation of hSOD-1 has been suggested as a contributing factor in triggering familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS, also known as motor neurone disease, MND, or Lou Gehrig's disease) [11]. The formation of Trp-Trp cross-links in hSOD-1 dimers, or between different proteins or peptides, have been proposed as a marker of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation in biological systems [12–14]. Tyr residues, which are not present in hSOD-1, are also prone to oxidation by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ to the corresponding phenoxyl radicals [15,16]. Further reaction of these radicals results in the formation of Tyr-Tyr or Tyr-Trp bonds and cross-linking of protein disulfide isomerase [17].

Further studies have demonstrated that $\text{CO}_3^{\cdot-}$ can be formed via multiple other pathways, including Fenton reactions in the presence of bicarbonate buffers [18], by pulsed laser light [19], in photochemical reactions employing Co(III) carbonate complexes [14,20], in xanthine oxidase turnover [21], via radiolysis [22–24], and in peroxynitrite-mediated processes in the presence of CO_2 [4,13,25–28]. These data together with information on the powerful oxidizing capacity and high reactivity of this species, have stimulated further studies on the physiological significance of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation.

In the context of SOD-1-mediated generation of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ through its peroxidase activity, determination of the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ production is of particular value and importance. A number of oxidizable probes have been employed in this regard, together with spectroscopic techniques. Thus, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ -mediated oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein to dichloro-fluorescein [29,30], dihydrorhodamine 123 to rhodamine [30,31], and ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) to $\text{ABTS}^{\cdot+}$ [7,32] have been examined. Electron paramagnetic resonance (EPR) with spin trapping has also been used to estimate the yield of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation from the SOD-1-related peroxidase activity [14,21,33]. In the presence of the spin trap DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide), $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generates a spin adduct with a 1:2:2:1 hyperfine coupling pattern identical to that formed by the hydroxyl radical, $\text{HO}^{\cdot}$, and assigned to DMPO-OH. The formation of this species has been rationalized in terms of one-electron oxidation of the spin trap and subsequent reaction with water to give the hydroxyl adduct, DMPO-OH [33].

In spite of the considerable interest in the production and biochemical implications of $\text{CO}_3^{\cdot-}$, few data have been reported regarding the quantification of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ production by SOD-1 in the presence of H_2O_2 and bicarbonate (HCO_3^-). In the light of our knowledge and experience using pyrogallol red (PGR, pyrogallolsulfonephthalein) as a probe to assess the generation of other oxidants [34–38], we hypothesized that $\text{CO}_3^{\cdot-}$ -mediated bleaching of the optical absorbance band of PGR at $\sim 540 \text{ nm}$ might allow quantification of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation by SOD-1/ H_2O_2 / HCO_3^- systems. Furthermore, the kinetic profiles of PGR consumption would allow to estimate the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release, through a simple, fast and cheap methodology. This assay is a rapid and convenient way to quantify (or standardize) production of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ through the peroxidase activity of SOD-1, and may be an effective tool to examine the chemistry of protein oxidation/crosslinking mediated by the SOD-1/ H_2O_2 / HCO_3^- system.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Superoxide dismutase from bovine erythrocytes (bSOD-1) was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) whilst the recombinant wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase (hSOD-1) was expressed in *E. coli* and purified by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography and gel filtration as described by Álvarez et al. [39]. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO), pyrogallol red (PGR), diethylenetriaminepenta acetic acid (DTPA), manganese (IV) oxide (MnO_2), and L-tryptophan were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO), hydrogen peroxide (H_2O_2) and isopropanol were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All buffers and solutions were prepared with ultrapure water.

2.2. Production and detection of $\text{CO}_3^{\cdot-}$

$\text{CO}_3^{\cdot-}$ was generated via the peroxidase activity of bSOD-1 or hSOD-1 ($0.3\text{--}30 \mu\text{M}$ per dimer) in the presence of H_2O_2 ($1\text{--}10 \text{ mM}$) and DTPA (0.1 mM) in freshly-prepared HCO_3^- buffer (200 mM) adjusted with CO_2 to pH 7.4.

2.2.1. Detection of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ by EPR

$\text{CO}_3^{\cdot-}$ was detected by EPR spin trapping using DMPO (50 mM) [14,33]. Samples containing bSOD-1, H_2O_2 and DTPA, in HCO_3^- (200 mM , pH 7.4) or phosphate buffer (75 mM , pH 7.4) were transferred into a BRAND capillary. Then, were sealed and introduced in the EPR cavity inside of an EPR sample tube (ER 221TUB/, 4 mm I.D.). The EPR spectra were recorded at 18°C at X-band frequencies ($\sim 9 \text{ GHz}$) using a Bruker EMX instrument. The concentration of the DMPO-OH spin adduct (in arbitrary units) was measured as the intensity of the peaks as no variation in the line width was apparent. The potential role of $\text{HO}^{\cdot}$ in the formation of DMPO-OH was examined in control experiments carried out in the presence of DMSO (5 mM) or isopropanol (5 mM) with which $\text{HO}^{\cdot}$ reacts at near diffusion controlled rates ($k \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [1].

2.2.2. Oxidation of ABTS elicited by $\text{CO}_3^{\cdot-}$

Formation of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ from ABTS induced by the SOD-1/ H_2O_2 / HCO_3^- system was followed by UV-visible spectrophotometry and EPR. Solutions containing ABTS (30 or $100 \mu\text{M}$), bSOD-1 ($3 \mu\text{M}$ per dimer), H_2O_2 (2 mM), and DTPA (0.1 mM) were incubated in HCO_3^- buffer (200 mM , pH 7.4). These solutions were placed in a thermostated cell of an Agilent 8453 spectrophotometer, and kinetics were followed at 740 nm . For EPR analysis, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ was also generated using MnO_2 , with solutions of ABTS ($100 \mu\text{M}$) and MnO_2 (25 mg mL^{-1}) in phosphate buffer (75 mM , pH 7.4) and DTPA (0.1 mM) incubated for 3 min . Excess MnO_2 was then removed by filtration using $0.2 \mu\text{m}$ filters (Merck, Millex-FG; $0.20 \mu\text{m}$), and solutions transferred via syringe to a capillary Aqua X cell in a Bruker 4108 TMH/9701 instrument. EPR spectra were recorded as described above.

2.3. Consumption of PGR by $\text{CO}_3^{\cdot-}$

PGR solutions ($15\text{--}200 \mu\text{M}$) were prepared in HCO_3^- buffer (200 mM , pH 7.4) and incubated with bSOD-1 or hSOD-1 ($0.3\text{--}30 \mu\text{M}$ per dimer), H_2O_2 ($1\text{--}10 \text{ mM}$), and DTPA (0.1 mM). PGR consumption was followed spectrophotometrically by measuring the absorbance decrease at wavelengths between 540 and 590 nm , employing an Agilent 8453 spectrophotometer. Slopes at $t = 0 \text{ min}$ of normalized absorbance (A/A_0) versus time plots were obtained using the best fitting curve, and employing to determine initial consumption rates of PGR (initial slope of kinetic profiles multiplied by initial PGR concentration).

2.4. Monitoring intrinsic fluorescence changes of hSOD-1 and free Trp elicited by $\text{CO}_3^{\cdot-}$

Solutions containing each SOD-1 (3 μM per dimer), H_2O_2 (2 mM) and DTPA (0.1 mM) in HCO_3^- buffer (200 mM) adjusted at pH 7.4, were incubated at 37 °C in a quartz cuvette placed in the holder of a LS-55 PerkinElmer fluorimeter. The intrinsic fluorescence of hSOD-1, associated with its single Trp residue, was followed at 360 nm (using λ_{ex} 295 nm). Oxidation of free Trp (6 μM), induced by the mixture of bSOD-1 (3 μM as dimer), H_2O_2 (2 mM) and DTPA (0.1 mM) in HCO_3^- buffer was followed employing the same wavelengths of hSOD-1.

2.5. Data and statistical analysis

Results were obtained from experiments carried out in triplicate from at least three independent experiments. Data are presented as means $\pm$ SD. Data were considered to be statistically different from controls when $p < 0.05$, as determined by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test (carried out using Origin 8.0).

3. Results

3.1. EPR and UV-visible studies of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation by HCO_3^- -dependent bSOD-1 peroxidase activity

Fig. 1 shows EPR spectra obtained after 3 min incubation of bSOD-1



Fig. 1. Formation of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ from the peroxidase activity of bSOD-1 assessed by EPR employing DMPO as spin trap. Solutions, in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4), with or without bSOD-1, H_2O_2 (2 mM), DTPA (0.1 mM) and DMPO (50 mM) were incubated in the EPR cell at 20 °C. a–c: EPR spectra registered after 3 min incubation of solutions containing bSOD-1 at 0.3, 3 and 30 μM (as dimer), respectively. d: EPR spectrum obtained in the absence of bSOD-1. e: EPR spectrum obtained in the presence of bSOD-1 (3 μM), but incubated in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) with DTPA (0.1 mM). Representative data from $n = 3$ independent experiments.

(0.3–30 μM) and H_2O_2 (2 mM) in HCO_3^- buffer containing DTPA (0.1 mM) and DMPO (50 mM). In agreement with previous reports [21,33], a quartet signal with intensity ratios of 1:2:2:1 was detected with hyperfine coupling constants $a_N = a_H = 1.49$ mT. This signal is assigned to the DMPO-OH spin adduct arising from $\text{CO}_3^{\cdot-}$ -mediated oxidation of the spin trap to give the DMPO radical-cation and subsequent reaction with H_2O [4]. Low intensity triplet species were also registered in some spectra, which could be associated with secondary products derived from DMPO-OH [40]. Control incubations containing all the reagents with the exception of bSOD-1 (Fig. 1, spectrum d), or with the enzyme but using phosphate buffer (75 mM, pH 7.4, spectrum e in Fig. 1) with DTPA 0.1 mM, did not yield this adduct species. With the complete incubation system and HCO_3^- buffer, the inclusion of isopropanol or DMSO at 5 mM did not modulate the intensity of the observed signal in a significant manner, discounting a role for $\text{HO}\cdot$ in the generation of this species (data not shown). The intensity of the DMPO-OH signal did not show a direct linear relationship with bSOD-1 concentration; with 3 μM bSOD-1 the spectral intensity (which is directly proportional to the radical concentration) was 3.5- and 1.5-fold higher than that detected with 0.3 and 30 μM bSOD-1 respectively (Fig. 1). The observed bell shaped concentration dependence is believed to arise from the difference in the rate of spin trap oxidation to DMPO-OH, induced by $\text{CO}_3^{\cdot-}$, and a rapid SOD-1-dependent decay of the spin adduct (data not shown). The latter may reflect over-oxidation of DMPO-OH by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ or a SOD-bound intermediate, with a consequent loss of the spin adduct signal. These data clearly indicate limitations in the use of the EPR spin trapping method for quantifying $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generation.

Oxidation of ABTS to the corresponding radical cation ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) has been employed previously to examine $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation by SOD-1 peroxidase activity [5]. The generation of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ was followed by both EPR and UV-visible spectrophotometry. Incubation of ABTS with the bSOD-1/ H_2O_2 system in HCO_3^- buffer containing DTPA 0.1 mM, as described above, gave rise to a weak EPR signal (black spectrum, Fig. 2A) assigned to $\text{ABTS}^{\cdot+}$. The assignment of this signal to $\text{ABTS}^{\cdot+}$, was confirmed by experiments employing MnO_2 as the oxidant [41], with this reaction system yielding a strong, well-defined, spectrum from $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (red spectrum, Fig. 2A). Formation of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ by the bSOD-1/ H_2O_2 / HCO_3^- system was also confirmed by visible spectrophotometry. As shown in Fig. 2B, incubation of ABTS with bSOD-1/ H_2O_2 in HCO_3^- buffer containing DTPA 0.1 mM, lead to the formation of the characteristic spectrum of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ with well-defined absorbance bands at ~ 405 nm and in the region 600–850 nm, with a maximum at 740 nm characteristic of this species [42]. Time course studies on the intensity of the absorbance band at 740 nm (Fig. 2C) showed that a maximum intensity (~ 0.2 AU) was reached after 9 min incubation, followed by a clear diminution over time, with this decreasing to ~ 0.07 AU at 83 min. This biphasic dependence clearly limits the use of ABTS oxidation as a tool to quantify $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation.

3.2. Bleaching of PGR induced by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generated from HCO_3^- dependent bSOD-1 peroxidase activity

Fig. 3A shows the changes in the optical absorbance spectrum of PGR elicited by incubation of PGR (60 μM) with bSOD-1/ H_2O_2 in HCO_3^- buffer containing 0.1 mM DTPA. A decrease at 540 nm was observed together with formation of a new band at 395 nm. Control experiments in the absence of H_2O_2 (data not shown) showed that the presence of bSOD-1 did not alter the absorbance spectrum of PGR, consistent with the lack of a strong binding of the dye to the protein. Thus the changes in PGR absorbance are attributed to oxidation of free PGR. Direct molecular oxidation of PGR by H_2O_2 appears not to be a major contributor, as incubation of PGR with varying concentrations of H_2O_2 (2–10 mM) in HCO_3^- buffer with 0.1 mM DTPA, but no bSOD-1, gave only minor changes in absorbance (data not shown) when compared to the complete system.

The kinetics of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ -mediated bleaching of PGR was examined at

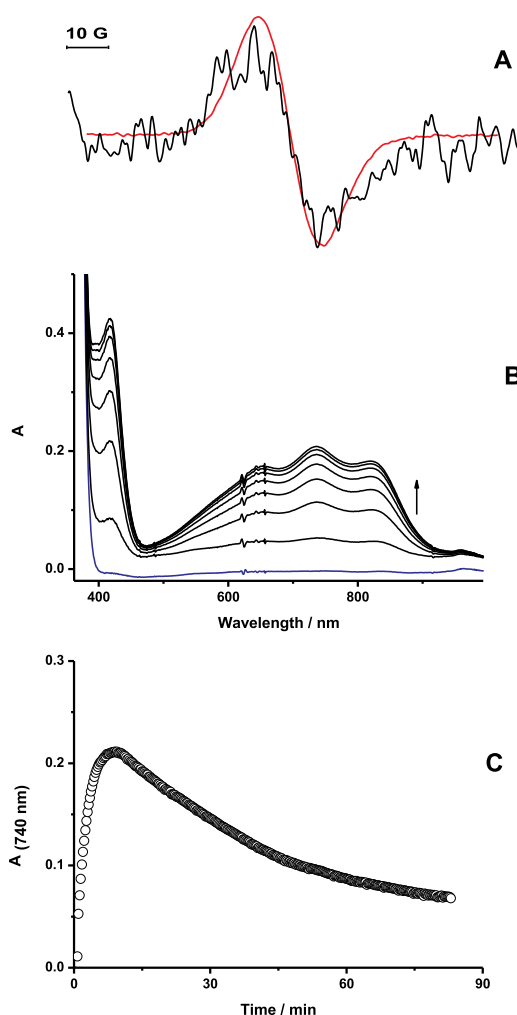


Fig. 2. Oxidation of ABTS to $\text{ABTS}^{\bullet+}$ by $\text{CO}_3^{\bullet-}$ derived from the peroxidase activity of bSOD-1. Panel A: EPR spectra obtained after 3 min incubation of solutions containing either ABTS 100 μM and MnO_2 (25 mg L^{-1}), red line, or ABTS (30 μM), bSOD-1 (3 μM), H_2O_2 (2 mM), and DTPA (0.1 mM), black line. Originally, the latter signal (black spectrum) had a gain 30 times lower than the red EPR signal. To compare both results, signals were normalized. Panel B: UV-visible spectra recorded during the incubation of ABTS (30 μM) and a bSOD-1 (3 μM)/ H_2O_2 (2 mM) system in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM). Blue line; spectrum registered at zero incubation time. The plot shows the spectra over the time period 0–9 min, the arrow indicates the progressive increase of the sample absorbance. Panel C: Kinetic profile of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ formation followed at 740 nm. Representative data from $n = 3$ independent experiments.

wavelengths between 540 and 590 nm depending on the PGR concentration employed, with the wavelength chosen to keep the maximum absorbance below 1 AU (the upper limit for linear absorbance responses on most spectrophotometers). These experiments showed a fast decrease in absorbance over the range 540–590 nm (see, for example, Fig. 3B for data obtained at 580 nm) together with a concomitant matching increase in absorbance at 395 nm. The latter increase in absorbance showed a small diminution at long time points after complete consumption of parent PGR (Fig. 3B), consistent with further modification of the product formed from PGR. However the initial rates of change in absorbance for both bands are not significantly different and, in the first minutes of reaction, a good isobestic point was detected at ~ 440 nm consistent with stoichiometric conversion of PGR to a single product. This behavior was observed only in the presence of HCO_3^- , as reactions carried out in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4)

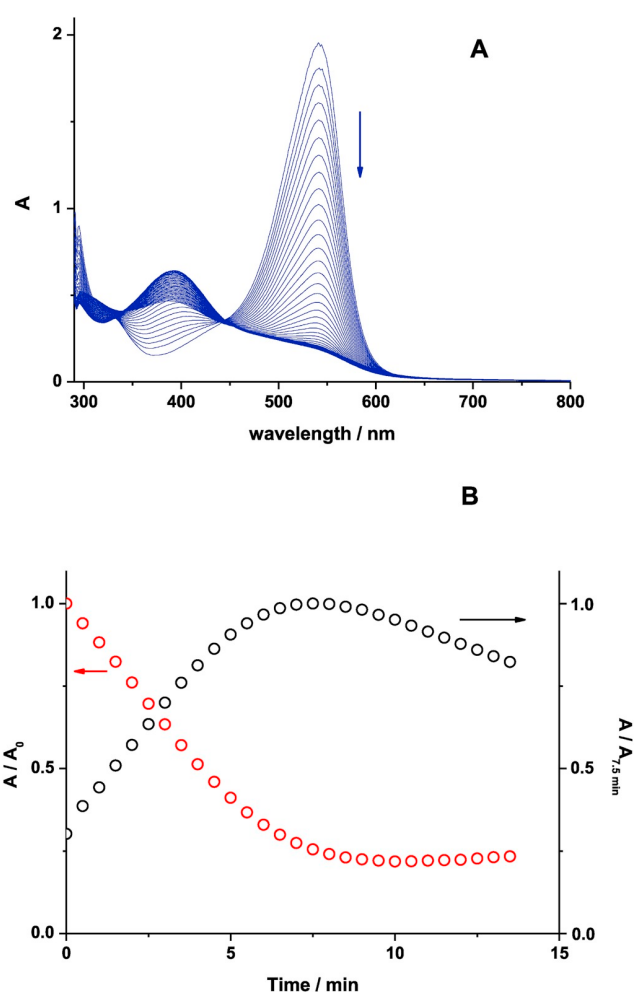


Fig. 3. Bleaching of PGR induced by $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Solutions of PGR (60 μM) in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4) and DTPA (0.1 mM) were incubated in the presence of bSOD-1 (3 μM) and H_2O_2 (2 mM). Panel A: changes in the UV-visible spectrum of PGR recorded during the incubation, the arrow indicates the decrease of the absorbance intensity in the 500–600 nm region. As the absorbance value at 540 nm was higher than 1.0, kinetic profiles for these samples were followed at longer wavelengths (usually 570–590 nm). Panel B: Kinetic profiles of PGR bleaching followed at 580 nm (red circles), and oxidized product(s) followed at 395 nm (black circles). Data at 395 were normalized with absorbance at 7.5 min (maximum intensity). Representative data from $n = 3$ independent experiments.

with DTPA 0.1 mM gave rise to negligible (with 0.3 μM bSOD-1), or very limited (with 3 μM bSOD-1) absorbance changes (Supplementary Figs. 1A and B, respectively), indicating that PGR bleaching is directly associated with $\text{CO}_3^{\bullet-}$ production. Addition of HCO_3^- (1 mM) to phosphate-buffered solutions containing PGR/bSOD-1/ H_2O_2 restored the bleaching activity (Supplementary Fig. 1B).

In HCO_3^- buffer, the bSOD-1/ H_2O_2 mixture induced PGR bleaching with a linear initial dependence of the consumption rate (R_i , in $\mu\text{M min}^{-1}$) with increasing bSOD-1 concentration, described by the expression $y = 0.113 + 5.0x$, with $r^2 = 0.998$ (Fig. 4). Thus each micromolar of bSOD-1 added to the reaction solutions increased the R_i value (in $\mu\text{M min}^{-1}$) by 5-fold. On the other hand, with a fixed concentration of bSOD-1 of 0.3 μM , the R_i values were independent of the initial PGR concentration over the range 5–200 μM (Fig. 5). With a 10-fold higher concentration of bSOD-1 (i.e. 3 μM), an increase in R_i with increasing PGR concentration was observed over the range 5–30 μM . However with PGR concentrations > 30 μM , the R_i values were

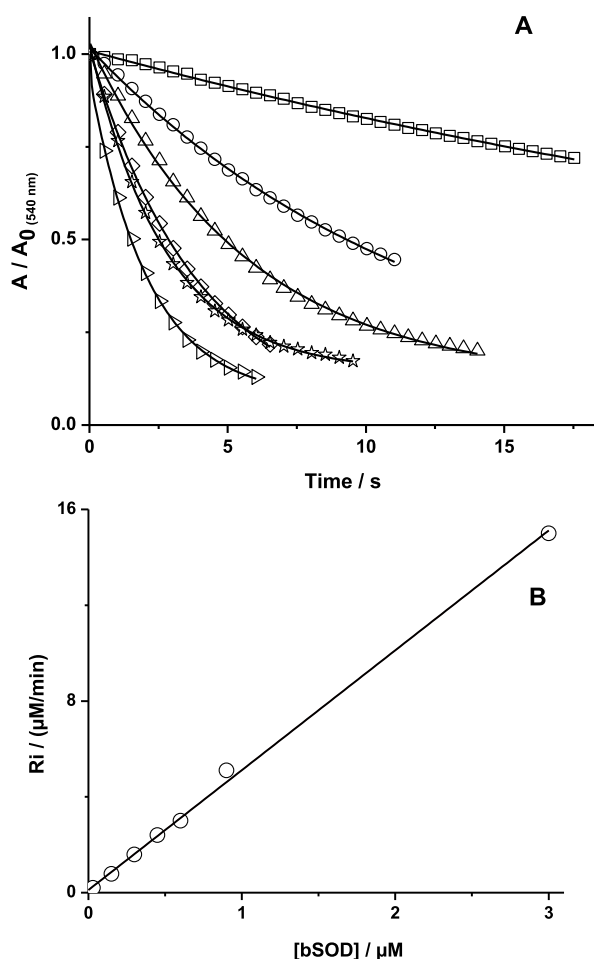


Fig. 4. Time course (panel A) and initial consumption rates (R_i , panel B) of PGR (15 μM) oxidation as consequence of its incubation with different concentrations of bSOD-1 (0.03 μM ; $\circ$ 0.15 μM ; $\triangle$ 0.3 μM ; $\diamond$ 0.45 μM ; $\star$ 0.6 μM ; $\triangleright$ 0.9 μM) in bicarbonate buffer solution (200 mM, pH 7.4) with DTPA (0.1 mM).

independent of the initial PGR concentration and reached a mean value of $12.3 \pm 2.1 \mu\text{M min}^{-1}$ (Fig. 6). These data indicate that as long as the PGR concentration is significantly high over the SOD concentration (by ~ 10 -fold) the R_i values are not dependent on PGR concentration, therefore could be considered as accurate indicators of the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ production.

As the bovine and the human isoform of SOD-1 show marked sequence identity and similarity, PGR consumption induced by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ was also examined with the human isoform. Control experiments indicated that, as with bSOD-1, the hSOD-1 did not alter the UV-visible spectrum of PGR. Under identical experimental conditions with complete oxidation systems containing 3 μM SOD-1, H_2O_2 2 mM, and 30 μM PGR, the kinetic profiles for PGR bleaching gave statistically-identical ($p = 0.3535$) R_i values of 10.9 ± 1.9 and $9.6 \pm 1.0 \mu\text{M min}^{-1}$ for bSOD-1 and hSOD-1, respectively.

To test if the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generation was constant from bSOD-1 or hSOD-1, after total PGR bleaching, new aliquots of PGR were added to the incubations. If the generation rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ is constant, similar R_i values would be expected for additional cycles of PGR consumption. Initial studies (Supplementary Fig. 2) showed that this is the case with the thermo-labile azo compound AAPH (100 mM), which produces peroxyl radicals at a constant rate for several hours [43], with similar R_i values obtained for the first and second cycles of PGR bleaching. However, for both SOD-1 enzymes, the initial PGR consumption rates decreased with increasing numbers of reaction cycles (Fig. 7A),

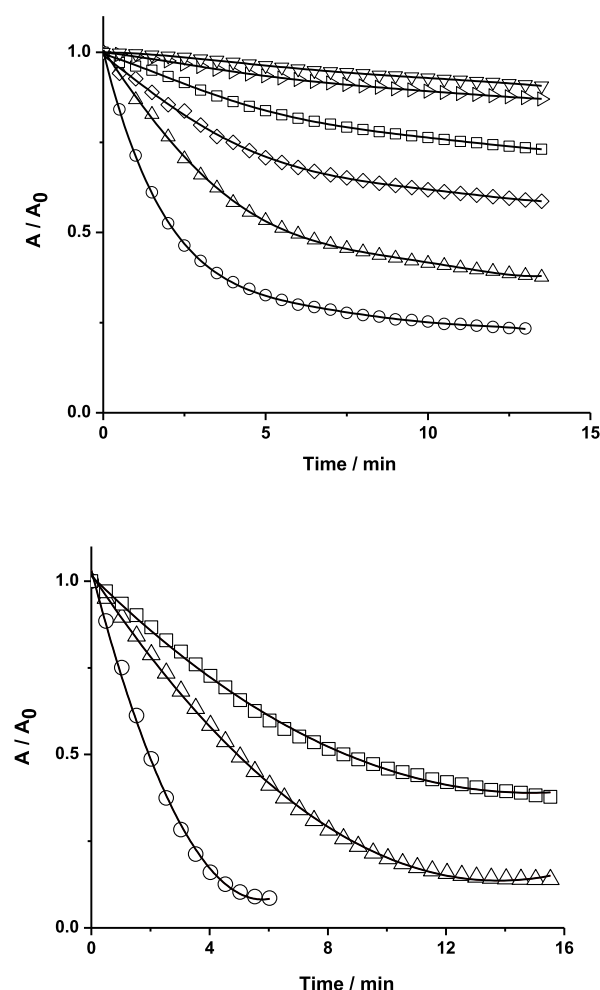


Fig. 5. Kinetic profiles of PGR consumption elicited by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ at different PGR concentrations. Solutions were incubated in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4) in the presence of H_2O_2 (2 mM), DTPA (0.1 mM), and 0.3 (panel A) or 3 (panel B) μM bSOD-1. Panel A: [PGR] = 5 ($\circ$), 15 ($\triangle$), 30 ($\diamond$), 40 ($\square$), 100 ($\triangleright$), and 200 (∇) μM . Panel B: [PGR] = 15 ($\circ$), 60 ($\triangle$), and 200 ($\square$) μM . Depending on the PGR concentration, the kinetics were followed at wavelengths between 540 and 590 nm. Representative data from $n = 3$ independent experiments.

consistent with time-dependent inactivation of both enzymes. When the bSOD-1 system was preincubated in the absence of PGR, and PGR then added after 10 min, kinetic profiles (Fig. 7B) compatible with those depicted in Fig. 7A were obtained. This implies that SOD-1 inactivation is not associated with the presence of PGR. Quantitatively, inactivation of both enzymes was reflected in a decrease of R_i to 60% (bSOD-1) and 75% (hSOD-1) of the initial values after 10 min, and to $\sim 20\%$ after 20 min (Supplementary Fig. 3).

As previous studies have reported oxidation of the single Trp (Trp32) of hSOD-1, by $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generated by the peroxidase activity of the enzyme [5,10], we examined the intrinsic fluorescence of hSOD-1 (3 μM per dimer) during incubation with H_2O_2 (2 mM) in HCO_3^- buffer. The time course data (Fig. 8A) indicate a fast loss of intrinsic Trp fluorescence with an initial consumption rate of $1.3 \pm 0.2 \mu\text{M min}^{-1}$, and only 10% of the initial fluorescence intensity detected after 10 min. This decrease was inhibited by the presence of PGR (15 μM), with this inducing a lag time of ~ 5 min (Fig. 8A), and beyond this time point, a slower rate of fluorescence decreased than in the absence of PGR.

To compare the efficiency of bSOD-1 and hSOD-1 as oxidant source (i.e. their ability to generate $\text{CO}_3^{\cdot-}$), the consumption of free Trp (6 μM)

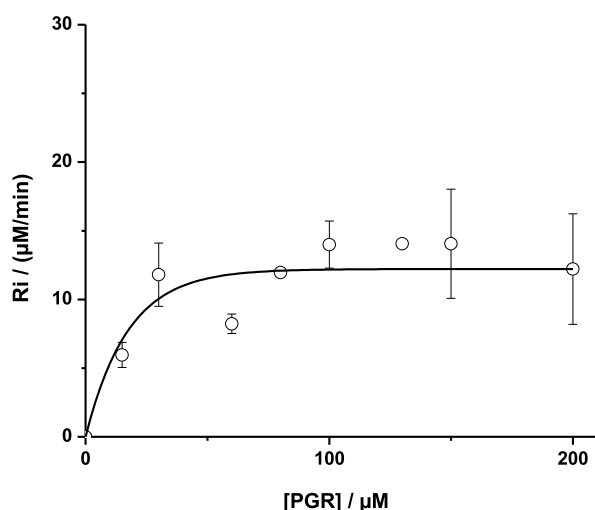


Fig. 6. Dependence on rate of PGR consumption rate (R_i) with initial PGR concentration. Solutions of PGR (15–200 μM) in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4) and DTPA (0.1 mM) were incubated in the presence of bSOD-1 (3 μM) and H_2O_2 (2 mM). R_i values were determined as described in Material and Methods section.

mediated by the complete bSOD-1 system was examined. Fig. 8B shows the time course of free Trp fluorescence loss in the absence and presence of 15 μM PGR. In the absence of PGR the initial consumption rate was $2.7 \pm 0.1 \mu\text{M min}^{-1}$, and complete consumption was observed after 4 min. In the presence of PGR, similar behavior was observed to that described above for hSOD-1 (Fig. 8A), consistent with competitive oxidation of Trp and PGR by $\text{CO}_3^{\cdot-}$, with PGR being the more sensitive target.

4. Discussion

The peroxidase activity of SOD-1 has been the subject of considerable research, as under conditions of high H_2O_2 and HCO_3^- levels, oxidative effects associated with the formation of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ have been reported [5,8,13,14,31]. In particular, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ -mediated self-oxidation of bSOD-1 and hSOD-1 can occur, with this resulting in conversion of the (single) Trp32 residue in the human isoform, to tryptophan-derived indolyl radicals and inter-molecular covalent Trp-Trp bonds [10]. Thus, contrary to the traditional role of SOD-1 as an antioxidant (protective) enzyme, the production of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ indicates that under certain circumstances this enzyme can be a source of highly-reactive and damaging oxidants. The $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formed can react not only with readily oxidized residues in the generating protein (His, Trp and Tyr residues of bSOD-1 or hSOD-1), but also is able to damage other biological targets such as proteins and peptides [12–14,44]. These processes, together with the reaction of peroxynitrite with $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ which results in the generation of peroxynitrosocarbonate and subsequently $\text{CO}_3^{\cdot-}$ from homolysis of this adduct [3], and potential formation by Fenton chemistry in HCO_3^- buffers [18], have positioned $\text{CO}_3^{\cdot-}$ as a relevant oxidant in biological milieu.

Formation of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ by the peroxidase activity of SOD-1 has been demonstrated by EPR employing DMPO as the spin trap [4,14,33]. These data have been confirmed here, with the detection of DMPO-OH spin adduct arising from reaction of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ with DMPO ($k = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [33]) and subsequent hydroxylation [4,33] (Fig. 1). Quantification of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ using this method has however been shown in this study to be compromised by the instability of the DMPO-OH spin adduct [14], with the rate of decay being dependent on the SOD concentration and further reactions, potentially resulting in an underestimation of the $\text{CO}_3^{\cdot-}$ concentration. The relationship between instability of DMPO-OH and bSOD-1 concentration could be related to disproportionation of

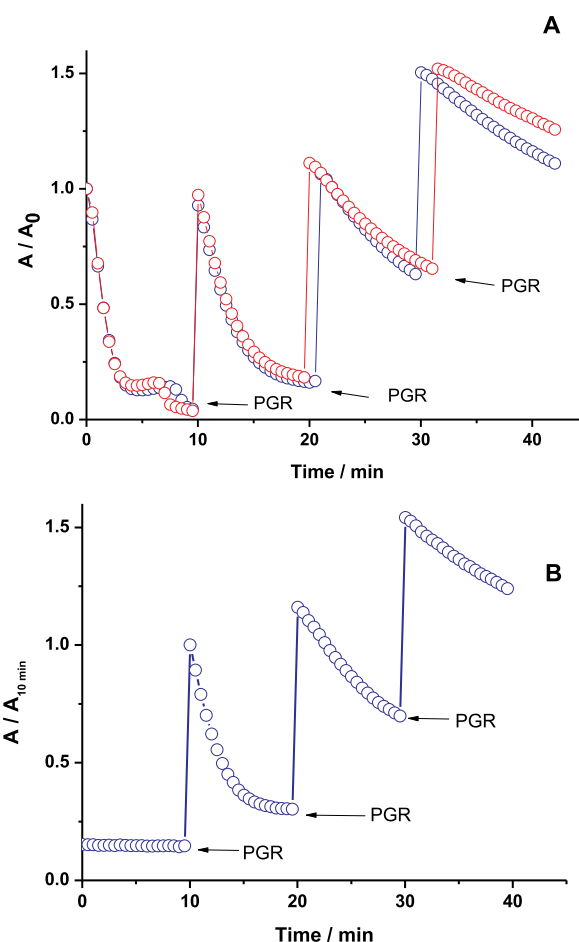


Fig. 7. Kinetic profiles of consecutive PGR oxidation cycles. Panel A: Solutions of PGR (30 μM) were incubated with bSOD-1 (blue circles) or hSOD-1 (red circles), 3 μM , H_2O_2 (2 mM) in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4) containing DTPA (0.1 mM). Absorbance intensity changes were followed at 570 nm. After PGR consumption, further aliquots (30 μL) of PGR (1 mM) were added as indicated by arrows. Panel B: reaction system as in panel A, but the bSOD-1/ H_2O_2 system was first pre-incubated in the absence of PGR. After 10 min incubation, aliquots (30 μL) of PGR (1 mM) were added as indicated by arrows. Representative data from $n = 3$ independent experiments.

DMPO-OH spin adduct which depends on the square of the $\text{CO}_3^{\cdot-}$ concentration [45].

The formation of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ by the bSOD-1/ H_2O_2 /DTPA/ HCO_3^- system has also been examined here, and previously [5], using ABTS as oxidizable target. ABTS oxidation produces $\text{ABTS}^{\cdot+}$, a well-known stable and colored free radical [46]. Formation of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ has been employed to detect $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [5] as well as other oxidants (e.g., $\text{NO}_2^{\cdot}$ [47]). In contrast, bleaching of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ has widely used to assess antioxidant capacity of natural and synthetic compounds [46]. The EPR data obtained here showed the formation of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ by the bSOD-1 system, but the resulting EPR spectrum was of low intensity (Fig. 2A); the identity of the observed signal was confirmed by independent generation of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ using MnO_2 [41]. Spectrophotometric analysis of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ formation from ABTS at 740 nm by the bSOD-1/ H_2O_2 /DTPA/ HCO_3^- system, showed that $\text{ABTS}^{\cdot+}$ was generated efficiently with a maximum absorbance intensity detected after 9 min using 3 μM bSOD-1 and 2 mM H_2O_2 in HCO_3^- buffer. However, the absorbance from $\text{ABTS}^{\cdot+}$ was not stable over time, with the intensity decreasing by 70% with increasing incubation time (Fig. 2C). This probably reflects secondary reactions between $\text{ABTS}^{\cdot+}$ and $\text{CO}_3^{\cdot-}$ which, under conditions of H_2O_2 excess, generate over-oxidation products in a similar manner to that

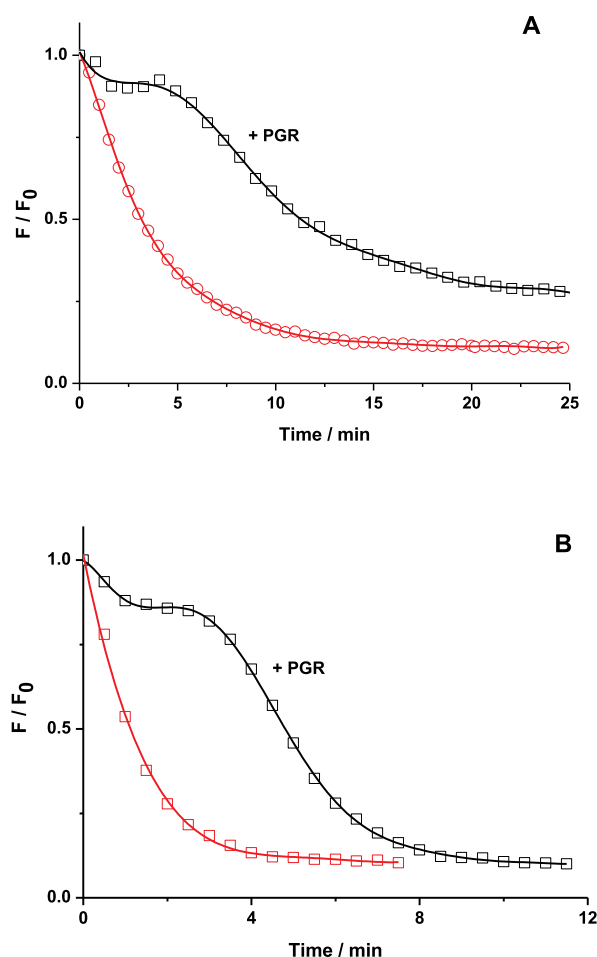


Fig. 8. Consumption of Trp and protection by PGR. Solutions containing bSOD-1 or hSOD-1 (3 μ M as dimer), H_2O_2 (2 mM) and DTPA (0.1 mM) were incubated in bicarbonate buffer (200 mM, pH 7.4). Trp consumption was followed by fluorescence as described in the Materials and Methods section. Panel A: Consumption of the single Trp residue of hSOD-1 (Trp^{32}) in the absence of PGR (red circles) and in the presence of PGR (15 μ M, black squares). Panel B: Consumption of free Trp (6 μ M) induced by bSOD-1/ H_2O_2 system in the absence of PGR (red squares) and presence of PGR (15 μ M, black squares). Representative data from $n = 3$ independent experiments.

reported for encapsulated horseradish peroxidase [48].

Altogether these data indicate that both EPR spin trapping, and the used of ABTS (with either EPR or spectrophotometric detection) have limited use for quantifying $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation. These approaches are, however, valuable qualitative tools for examining $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation under the experimental conditions employed.

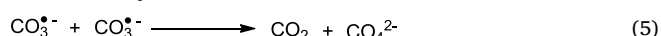
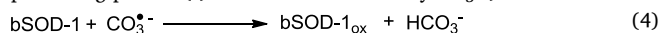
PGR has been employed previously as a probe to determine the antioxidant capacity of pure polyphenols and complex mixtures against a variety of reactive species, including $\text{NO}_2^{\cdot}$, HOCl , $\text{RO}_2^{\cdot}$, and $\text{O}_2^{\cdot-}$ [37]. The kinetics of these reactions are usually followed by the bleaching of the optical absorption band centered at 540 nm (at pH 7.4) [36–38,49]. The loss of this absorbance is accompanied by formation of a new band at 395 nm with a well-defined isosbestic point at ~ 440 nm, as evidenced in the first minutes of reaction [49]. This behavior is reported to relate to a two-electron process (i.e. one mol of PGR is oxidized by 2 mol of the reactive species) generating a quinone derivative [37].

PGR is bleached to only a very minor extent by H_2O_2 at concentrations < 3 mM, and that PGR does not bind strongly to bSOD-1 or hSOD-1, as evidenced by minimal changes to the shape and intensity of the UV–visible spectrum of PGR in the presence versus absence of the

enzymes (data not shown). However, in the presence of bSOD-1 and H_2O_2 , a fast bleaching of PGR was detected in HCO_3^- (but not phosphate) buffer in the presence of DTPA 0.1 mM (Fig. 3, and Supplementary Fig. 1). Consistent with PGR oxidation by $\text{CO}_3^{\cdot-}$. The minimal reactions involved in this process can be represented by reactions (2) and (3).



At low PGR concentrations not all the $\text{CO}_3^{\cdot-}$ appears to react with PGR, but secondary reactions involving bSOD-1 or self-reactions of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ also likely to occur (reactions (4) and (5) with bSOD-1_{ox} representing product(s) of bSOD-1 oxidation by $\text{CO}_3^{\cdot-}$).



At high PGR concentrations all the $\text{CO}_3^{\cdot-}$ appear to react with the added probe (i.e. reactions (4) and (5) are minimal), as the rate of PGR consumption has been shown to be independent of its initial concentration, and directly proportional to the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation. The kinetic data presented in Fig. 5 have allowed the initial rates of consumption of PGR (R_i) to be determined. At the lowest bSOD-1 concentration studied (0.3 μ M per dimer), R_i was independent of the initial PGR concentration, but at higher levels of bSOD-1 (3 μ M), R_i increased for PGR concentrations between 5 and 30 μ M. However, with high PGR levels (> 30 μ M), R_i was independent of the initial PGR concentrations, implying that all $\text{CO}_3^{\cdot-}$ were removed by PGR (zero order kinetic limit in PGR). Under these conditions, R_i is related to the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release by equation (6):

$$R_{\text{CO}_3^{\cdot-}} = n R_i \quad (6)$$

Where R_i is the initial rate of PGR bleaching, n is the stoichiometric factor (defined as the number of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ trapped by PGR), and $R_{\text{CO}_3^{\cdot-}}$ is the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release.

Under conditions where there is an excess of H_2O_2 and HCO_3^- , $R_{\text{CO}_3^{\cdot-}}$ depends on the SOD-1 concentration (Fig. 4). Considering the maxima R_i values, obtained at PGR concentrations > 30 μ M (with 3 μ M bSOD-1, Fig. 6), and assuming $n = 2$ [37], a rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release of 24.6 ± 4.3 $\mu\text{M min}^{-1}$ with 3 μ M bSOD-1 can be estimated. This value, which is in the order of kinetic data of NADPH oxidation [50], represents a specific peroxidase activity close to 0.3 ± 0.1 units/mg (defining one unit as the amount of bSOD-1, in mg, that generates 1 μ M of $\text{CO}_3^{\cdot-} \text{ min}^{-1}$). The estimated rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ release (24.6 ± 4.3 $\mu\text{M min}^{-1}$) means a turnover (kcat) value of 8.3 min^{-1} , which is very similar of the determined from data depicted in Fig. 4 (10 min^{-1}).

In line with the structural similarity of bSOD-1 and hSOD-1 (83% homology), and published data showing similar peroxidase activity for both enzymes [31], comparable R_i values were determined for bSOD-1 and hSOD-1; 10.9 ± 1.9 and 9.6 ± 1.0 $\mu\text{M min}^{-1}$, respectively, with 3 μ M enzyme. However, the rate of formation does not appear to be stable over time as a result of reactions occurring within, or close to the active site, which lead to SOD-1 inactivation. Thus in experiments in which new aliquots of PGR were added after initial bleaching, decreasing R_i values were detected with the SOD systems for different cycles of PGR consumption (Fig. 7A). This effect was not detected when AAPH was employed as the radical source, where a constant flux of radicals is formed over several hours of incubation [43]. This decrease in R_i , which is believed to reflect inactivation of SOD-1, was not related to the presence PGR, as the addition of PGR to preincubated solutions of bSOD-1 gave the same pattern of decreasing R_i values (Fig. 7B). The same behavior was observed for both bSOD-1 and hSOD-1 (Supplementary Fig. 3), with R_i values reaching close to 6.8 and 2.0 $\mu\text{M min}^{-1}$ detected after 10 and 20 min incubation, respectively. This represents a decrease in the peroxidase activity of 38 and 24% after 10 min incubation for bSOD-1 and hSOD-1, respectively, and close to 80%

after 20 min. The similarity of these values suggests a common mechanism of inactivation. To explore the possible participation of the single Trp³² residue in hSOD-1 in inactivation, the loss of the intrinsic fluorescence arising from this amino acid was followed during incubations with H₂O₂ in HCO₃⁻ buffer, in the absence of PGR. The fluorescence significantly decreased over time with an initial consumption rate of $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M min}^{-1}$, with only 17% remaining after 10 minutes (Fig. 8A). At this time point however, the peroxidase activity of hSOD-1 was 76% of the initial value (Supplementary Fig. 3), indicating that these two events are divorced from each other. This result, together with the similarity in the rates of loss of peroxidase activity of the two enzymes (Supplementary Fig. 3), and the absence of Trp³² from the bovine protein, suggests that oxidation of Trp³² of hSOD-1 does not (directly) initiate the decrease of activity, which is in line with inactivation of SOD1 due to oxidation of the histidine residues at its catalytic site [8,39]. This conclusion does not exclude the role that Trp³² plays in formation of Trp-Trp bonds (leading to hSOD-1 dimerization and aggregation), or the production of *N*-formylkynurenine or kynurenine on hSOD-1 oxidation [5,8,10,11,14].

Consumption of hSOD-1 Trp³² was compared with that for free Trp (at the same concentration, 6 μM) elicited by the peroxidase activity of bSOD-1. As presented in Fig. 8B, an efficient consumption of free Trp was observed, with an initial consumption rate ($2.9 \pm 0.2 \mu\text{M min}^{-1}$) approximately 2-fold higher than for Trp³². The later is in agreement with the oxidation of both Trp³² and free Trp induced by AAPH-derived free radicals [51]. PGR (15 μM) protected both Trp³² and free Trp (induced by bSOD-1) from consumption, as reflected by lag times of 3.5 and 5 min in the kinetic profiles of fluorescence decrease for Trp³² and free Trp, respectively (Fig. 8). From these lag times, and considering $n = 2$, $R_{\text{CO}_3^{\cdot-}}$ values of 8.5 and 6 $\mu\text{M min}^{-1}$ were estimated for both systems. These values are lower than $R_{\text{CO}_3^{\cdot-}}$ determined from data presented in Figs. 4 and 6. Such difference can be explained by the low PGR concentrations employed in the experiments reported in Fig. 8, implicating the participation of reactions (4) and (5).

5. Conclusions

These results show that PGR reacts with the $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generated from the peroxidase activity of SOD-1. At high PGR concentrations, the initial consumption rates (R_i) reflect the rate of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formation, giving a rate of $24.6 \pm 4.3 \mu\text{M min}^{-1}$ with 3 μM (dimeric) SOD-1. From the kinetic data for PGR consumption, we determined a high rate of SOD-1 inactivation during the first 20 min of reaction. In the case of the human isoform this inactivation appears to be unrelated to Trp³² consumption. The PGR bleaching protocol described here therefore appears to be a simple, fast and inexpensive assay to determine $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generation from the peroxidase activity of SOD-1 under isolated protein conditions. It should however, be noted that PGR is not selective for $\text{CO}_3^{\cdot-}$ which could limit the use of this probe in complex systems.

Acknowledgments

This work was supported by FONDECYT (grant n°1180642). JDF acknowledges a VRI fellowship from PUC. MJD gratefully acknowledges financial support from the Novo Nordisk Foundation (Laureate grant: NNF13OC0004294).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101207>.

References

- [1] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 5th ed., *Free Radic. Biol. Medic.* (2015) United Kingdom: Oxford.
- [2] S.I. Liochev, I. Fridovich, CO₂ enhanced peroxidase activity of SOD1: the effects of pH, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1444–1447.
- [3] O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C.X. Santos, S.L. De Menezes, Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 841–859.
- [4] D.B. Medinas, G. Cerchiaro, D.F. Trindade, O. Augusto, The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer, *IUBMB Life* 59 (2007) 255–262.
- [5] H. Zhang, C. Andreopoulos, J. Joseph, J. Crow, B. Kalyanaram, The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and α -synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1355–1365.
- [6] S. Sankarapandi, J.L. Zweier, Bicarbonate is required for the peroxidase function of Cu, Zn-superoxide dismutase at physiological pH, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1226–1232.
- [7] S.P.A. Goss, R.J. Singh, B. Kalyanaram, Bicarbonate enhances the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28233–28239.
- [8] D.C. Ramirez, S.E. Gomez-Mejia, J.T. Corbett, L.J. Detering, K.B. Tomer, R.P. Mason, Cu,Zn-superoxide dismutase-driven free radical modifications: copper- and carbonate radical anion-initiated protein radical chemistry, *Biochem. J.* 417 (2009) 341–353.
- [9] K. Chandran, J. McCracken, F.C. Peterson, W.E. Antholine, B.F. Volkman, B. Kalyanaram, Oxidation of histidine residues in copper – zinc superoxide dismutase by bicarbonate-stimulated peroxidase and thiol oxidase activities: pulse EPR and NMR studies, *Biochemistry* 49 (2010) 10616–10622.
- [10] D.B. Medinas, F.C. Gozzo, L.F.A. Santos, A.H. Iglesias, O. Augusto, A tryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1046–1053.
- [11] F.R. Coelho, A. Iqbal, E. Linares, D.F. Silva, F.S. Lima, I.M. Cuccovia, O. Augusto, Oxidation of the tryptophan 32 residue of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity triggers the non-amyloid aggregation of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 30690–30701.
- [12] L. Carroll, D.I. Pattison, J.B. Davies, R.F. Anderson, C. Lopez-Alarcon, M.J. Davies, Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 113 (2017) 132–142.
- [13] V. Paviani, G. Galdino, J. dos Prazeres, R. Queiroz, O. Augusto, V. Paviani, G.T. Galdino, J.N. dos Prazeres, R.F. Queiroz, O. Augusto, Dityryptophan cross-links as novel products of protein oxidation, *J. Braz. Chem. Soc.* 29 (2017) 925–933.
- [14] V. Paviani, R.F. Queiroz, E.F. Marques, P. Di Mascio, O. Augusto, Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a dityryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 72–82.
- [15] G.E. Adams, J.E. Aldrich, R.H. Bisby, R.B. Cundall, J.L. Redpath, R.L. Willson, Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions of inorganic radical anions with amino acids, *Radiat. Res.* 49 (1972) 278–289.
- [16] S. Chen, M.Z. Hoffman, Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution, *Radiat. Res.* 56 (1973) 40–47.
- [17] A. Iqbal, V. Paviani, A.I. Moretti, F.R.M. Laurindo, O. Augusto, Oxidation, inactivation and aggregation of protein disulfide isomerase promoted by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of human superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.* 557 (2014) 72–81.
- [18] E. Illés, A. Mizrahi, V. Marks, D. Meyerstein, Carbonate-radical-anions, and not hydroxyl radicals, are the products of the Fenton reaction in neutral solutions containing bicarbonate, *Free Radic. Biol. Med.* 131 (2019) 1–6.
- [19] M.M. Zhang, D.L. Rempel, M.L. Gross, A fast photochemical oxidation of proteins (FPOP) platform for free-radical reactions: the carbonate radical anion with peptides and proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 131 (2019) 126–132.
- [20] C. Busset, P. Mazellier, M. Sarakha, J. De Laat, Photochemical generation of carbonate radicals and their reactivity with phenol, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 185 (2007) 127–132.
- [21] M.G. Bonini, S. Miyamoto, P. Di Mascio, O. Augusto, Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51836–51843.
- [22] L. Gebicka, J. Didik, J.L. Gebicki, Reactions of heme proteins with carbonate radical anion, *Res. Chem. Intermed.* 35 (2009) 401–409.
- [23] M. Carlsson, D. Stenman, M. Jonsson, T. Reitberger, Reactivity of the carbonate radical anion towards carbohydrate and lignin model compounds, *J. Wood Chem. Technol.* 23 (2003) 47–69.
- [24] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N.E. Geacintov, The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 24621–24626.
- [25] A. Denicola, B.A. Freeman, M. Trujillo, R. Radi, Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations, *Arch. Biochem. Biophys.* 333 (1996) 49–58.
- [26] S. Goldstein, G. Czapski, Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO₂: evidence for carbonate radical production, (1998), *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3458–3463.
- [27] R. Radi, Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 26464–26472.
- [28] E.C. Kennett, M.J. Davies, Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 389–400.
- [29] H. Zhang, J. Joseph, M. Gurney, D. Becker, B. Kalyanaram, Bicarbonate enhances

- peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1013–1020.
- [30] P. Wardman, Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 995–1022.
- [31] R.F. Queiroz, V. Paviani, F.R. Coelho, E.F. Marques, P. Di Mascio, O. Augusto, The carbonylation and covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity is inhibited by the radical scavenger tempol, *Biochem. J.* 455 (2013) 37–46.
- [32] A. Baseggio Conrado, S. Maina, H. Moseley, A. Francioso, L. Mosca, E. Capuozzo, M. Fontana, Carbonate anion radical generated by the peroxidase activity of copper-zinc superoxide dismutase: scavenging of radical and protection of enzyme by hypotaurine and cysteine sulfinic acid, in: D.H. Lee, S.W. Schaffer, E. Park, H.W. Kim (Eds.), *Taurine 10. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 975, Springer, Dordrecht, 2017.
- [33] M.N. Alvarez, G. Peluffo, L. Folkes, P. Wardman, R. Radi, Reaction of the carbonate radical with the spin-trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance, and kinetic-competition studies, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 1523–1533.
- [34] M. Takashima, M. Horie, M. Shichiri, Y. Hagihara, Y. Yoshida, E. Niki, Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1242–1252.
- [35] J. Cortés-Ríos, M.J. Torres, M.P. Campos-Bustamante, J. Romero-Parra, M.E. Letelier, D. Pessoa-Mahana, H. Chung, M. Faúndez, NADPH oxidase activity: spectrophotometric determination of superoxide using pyrogallol red, *Anal. Biochem.* 536 (2017) 96–100.
- [36] M. Faúndez, M. Rojas, P. Bohlé, C. Reyes, M.E. Letelier, M.E. Aliaga, H. Speisky, E. Lissi, C. López-Alarcón, Pyrogallol red oxidation induced by superoxide radicals: application to evaluate redox cycling of nitro compounds, *Anal. Biochem.* 419 (2011) 284–291.
- [37] E. Atala, G. Velásquez, C. Vergara, C. Mardones, J. Reyes, R.A. Tapia, F. Quina, M.A. Mendes, H. Speisky, E. Lissi, M.S. Ureta-Zañartu, A. Aspée, C. López-Alarcón, Mechanism of pyrogallol red oxidation induced by free radicals and reactive oxidant species. A kinetic and spectroelectrochemistry study, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 4870–4879.
- [38] C. López-Alarcón, E. Lissi, A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of pyrogallol red with peroxy radicals, *Free Radic. Res.* 40 (2006) 979–985.
- [39] B. Alvarez, V. Demicheli, R. Durán, M. Trujillo, C. Cerveñansky, B.A. Freeman, R. Radi, Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 813–822.
- [40] J.M. Fontmorin, R.C. Burgos Castillo, W.Z. Tang, M. Sillanpää, Stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide as a spin-trap for quantification of hydroxyl radicals in processes based on Fenton reaction, *Water Res.* 99 (2016) 24–32.
- [41] C. Henriquez, C. Aliaga, E. Lissi, Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedures, *Int. J. Chem. Kinet.* 34 (2002) 659–665.
- [42] B.S. Wolfenden, R.L. Willson, Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (0) (1982) 805–812.
- [43] E. Niki, Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 100–108.
- [44] D.C. Ramirez, S.E. Gomez Mejiba, R.P. Mason, Mechanism of hydrogen peroxide-induced Cu,Zn-superoxide dismutase-centered radical formation as explored by immuno-spin trapping: the role of copper- and carbonate radical anion-mediated oxidations, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 201–214.
- [45] Y. Kirino, T. Ohkuma, T. Kwan, Spin trapping with 5, 5-dimethylpyrroline-N-oxide in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 29–34.
- [46] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [47] A.A. Salem, A.A. Soliman, I.A. El-Haty, New spectrophotometric method for determining nitrogen dioxide in air using 2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline)-6-sulfonic acid-diammonium salt and passive sampling, *Anal. Chem. Insights* 6 (2011) 37–44.
- [48] E.N. Kadnikova, N.M. Kostic, Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 18 (2002) 39–48.
- [49] C. López-Alarcón, E. Lissi, Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities, *Free Radic. Res.* 39 (2005) 729–736.
- [50] S.I. Liochev, I. Fridovich, Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 34674–34678.
- [51] E. Fuentes-Lemus, E. Dorta, E. Escobar, A. Aspée, E. Pino, M.L. Abasq, H. Speisky, E. Silva, E. Lissi, M.J. Davies, C. López-Alarcón, Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: role of alkoxyl and peroxy radicals, *RSC Adv.* 6 (2016) 57948–57955.