

Ayudas a la Investigación 2006 del Instituto

Alicantino de Cultura Juan Gil-Albert

Informe final

ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN
ELECTROQUÍMICA DE
PROTEÍNAS: NITRACIÓN DE
TIROSINA

María Deseada Esclapez Vicente
Departamento de Química Física
Universidad de Alicante

ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN ELECTROQUÍMICA DE PROTEÍNAS:
NITRACIÓN DE TIROSINA

1. Introducción
2. Procedimiento experimental y resultados obtenidos.
 - 2.1 Estudios de voltametría cíclica.
 - 2.2 Nitración electroquímica de lisozima sobre electrodos carbonáceos como diamante dopado con boro (BDD).
 - 2.3 Espectrometría de masas-ionización por electrospray con un analizador ciclotrónico (MS-ESI-FT-ICR)
 - 2.4 Determinación de la actividad de de las diferentes lisozimas modificadas.
 - 2.5 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear de alto campo para el estudio de cambios estructurales
 - 2.5.1 Experimentos HSQC.
 - 2.5.2 Experimentos TOCSY.
 - 2.5.3 Experimentos NOESY.
 - 2.5.4 Tratamiento de los datos obtenidos por RMN para la obtención de la estructura.
3. Conclusiones
4. Bibliografía consultada.
5. Agradecimientos
6. Participación en congresos.
7. Anexo.

1. Introducción.

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que ejecutan la mayor parte de las funciones vitales de las células: el reconocimiento molecular, el transporte de moléculas, la función estructural, la catálisis de las reacciones químicas, incluso la regulación de la expresión de los genes está determinada por proteínas que interactúan con el ADN. Entender estos procesos a nivel molecular es importante por sus consecuencias en el funcionamiento celular, ya que las modificaciones de los residuos originales de las proteínas podrían ocasionar el mal funcionamiento de la misma, lo que puede resultar en alteraciones de alguna vía metabólica. En otros casos, si la estructura de la proteína está modificada puede generar una pérdida de funciones, tales como la distrofia muscular y diversas encefalopatías debido a que las proteínas que participan en diversos procesos fundamentales pierden su conformación original o estructura nativa. Por ejemplo en la amiloidosis algunas de las proteínas nativas se convierten gradualmente en cadenas largas que forman fibrillas que precipitan en las células. Cabe mencionar que el 50% de los cánceres humanos encontrados hasta la fecha se deben primordialmente a mutaciones en una proteína.

En la comunidad científica y la sociedad en general, existe una gran preocupación por los efectos nocivos para la salud que provocan los agentes oxidantes, tales como radicales libres, presentes *in vivo* en condiciones de estrés oxidativo. Estos procesos se han observado en enfermedades como diabetes, arterosclerosis o Alzheimer entre otras. Los agentes oxidantes más importantes y comunes que se producen *in vivo* son el peroxinitrito [1], y el ácido hipocloroso. En este último caso, los compuestos clorados representan el único marcador para el daño oxidativo vía fagocitos. Los residuos de aminoácidos más susceptibles de sufrir oxidación, nitración o cloración son cisteína, tirosina, metionina y triptófano, además de presentar la formación de grupos carbonilo y una fragmentación no específica de la proteína. De todos estos, el que sufre con más asiduidad los efectos del peroxinitrito y ácido hipocloroso es la tirosina, dando lugar a especies hidroxiladas, diméricas, y en la mayoría de los casos tirosinas nitradas o cloradas, relacionadas con procesos inflamatorios. La formación de 3-nitrotirosina y 3-clorotirosina, ya sea en su forma libre como en una proteína, se usa como biomarcador de la producción de peroxinitrito y ácido hipocloroso en situaciones de estrés oxidativo.

Por todo esto, es de vital importancia el estudio de la modificación oxidativa de las proteínas por diferentes métodos, así como la evaluación en ambos casos de los efectos conformacionales y funcionales en las proteínas. Destacamos que la modificación electroquímica de proteínas ofrece una serie de ventajas respecto a los métodos clásicos proporcionando selectividad y especificidad, utilizando condiciones muy suaves de reacción y realizando reducciones y oxidaciones de un modo totalmente controlable. Sin embargo, las metodologías convencionales, tales como modificación química o ingeniería de proteínas, son totalmente complementarias con la metodología electroquímica cuando se acoplan para la

creación de nuevas proteínas modificadas, así como para manipular la naturaleza de la modificación. Una elección correcta de los parámetros electroquímicos introducirá la modificación deseada, permitiendo la retención de la actividad de la proteína, en la producción de proteínas modelo implicadas en disfunciones oxidativas [2] y la inmovilización de proteínas sobre matrices adecuadas para biosensores. Un punto fundamental, es trabajar con nuevos materiales electródicos que permitan modificar la proteína sin que se vea deteriorada en su estructura o función por su interacción con el electrodo, más allá de las modificaciones deseadas. Un material que presenta características muy sugerentes para su uso en este tipo de aplicaciones es el diamante dopado con boro (BDD) [3-5]. Debido principalmente a sus estabilidades, físicas, químicas y electroquímicas, los electrodos BDD ofrecen un gran abanico de posibilidades, incluso en la química de proteínas y ADN [4, 6, 7].

Por otro lado, la modificación de proteínas con el objeto de diseñar biosensores es una aplicación muy interesante de esta técnica. No solo es útil con la finalidad de reproducir los cambios que se producen en las proteínas “in vivo” para su estudio, sino que permite unir grupos funcionales a las moléculas en residuos específicos que pueden facilitar su posterior unión a electrodos que funcionen como sensores electroquímicos.

El principal objetivo de este proyecto consiste en determinar como afecta la nitración de residuos de tirosina a la estructura y la función biológica de proteínas, lo cual sería un primer paso para entender como se produce el progreso de las enfermedades relacionadas. Aunque en un principio se propuso trabajar con la proteína Transcetolasa-1 humana, por cuestiones de tiempo y presupuesto se ha aplicado todo el planteamiento inicial del proyecto a la modificación de la proteína modelo lisozima (fig. 1) que se ha nitrado por métodos electroquímicos. Posteriormente se utiliza la espectroscopia de resonancia magnética nuclear como la técnica clave para resolver la estructura tridimensional de las proteínas modificadas por nitración.. Esta técnica se complementó con otras de espectrometría de masas y determinación de la actividad entre otras.

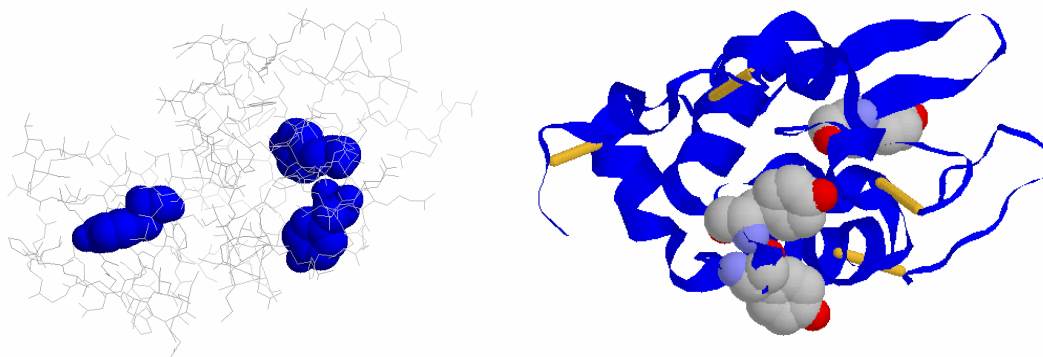
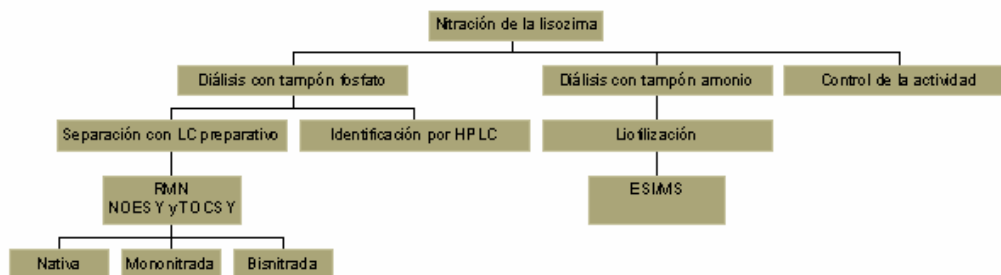


Figura1. Proteína lisozima, 14.3kDa y 129 aminoácidos. Los residuos tirosina indicados son los más susceptibles a la nitración de la proteína, de los cuales sólo se nitrán las posiciones 20 y 23, ya que el residuo 53 es poco accesible.

La lisozima es una enzima muy ampliamente distribuida entre los seres vivos, desde virus a eucariotas. La lisozima de clara de huevo está formada por una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos (14,6kDa) con cuatro enlaces disulfuro. La molécula tiene forma más o menos helicoidal, compuesta por varias hélices alfa y una lámina beta extendida formada por tres hojas beta. Su acción catalítica consiste en la rotura del enlace glicosídico beta (1-4) característico de los peptidoglicanos bacterianos cuyo disacárido constitutivo es N-acetil glucosamina (NAG)- N-acetil murámico (NAM). En el centro catalítico encontramos dos aminoácidos ácidos. Se trata de una catalisis ácido-base, en la que intervienen dos aminoácidos ácidos (Glu 35 y Asp 52). El pH tiene influencia en este mecanismo de catálisis porque cuando este aumenta el Glu se ioniza, mientras que si el pH disminuye es el Asp el que se protona. Su rasgo más llamativo es una hendidura (centro activo), en el sitio de fijación del sustrato que atraviesa la cara de la molécula, siendo su plegamiento más complejo. Además de encontrarse en la saliva y en las lágrimas, la lisozima está presente en el bazo, los pulmones, los leucocitos, el plasma, la leche y el cartílago. La deficiencia en lisozima, debida a mutaciones, ha sido asociada a displasias esqueléticas y a un aumento de la propensión a las infecciones.

2. Procedimiento experimental y resultados obtenidos.

La proteína modelo empleada, tal como se ha justificado fue la lisozima de clara de huevo liofilizada (14.3 kDa, 100.000 U/mg, de Fluka) (fig.1) y se siguió el siguiente esquema de trabajo tras los estudios previos por voltametría cíclica:



2.1. Estudios de voltametría cíclica.

Se realizaron voltametrías cíclicas con un sistema Autolab PGSTATS 30 empleando una célula electroquímica de un solo compartimiento y un contraelectrodo de platino. Como electrodo de referencia se empleó $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ (3M) en un capilar Luggin. El electrodo de trabajo empleado fue un electrodo de diamante dopado con boro (BDD) de 1cm^2 . En todo caso se emplearon disoluciones preparadas con agua ultrapura purificada ($18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Hydrophobic PTFE $0.45\mu\text{m}$) y desoxigenadas por burbujeo de una corriente de argón. Se caracterizó el comportamiento del electrodo con distintos tratamientos superficiales (pulido sobre alúmina, tratamiento catódico y tratamiento anódico) empleando en un principio el sistema

ferrocianuro/ferricianuro como sonda. Para ello se hacen voltametrías de ferricianuro 1mM sobre BDD, con los tres tratamientos utilizando como electrolito soporte 0.1 mM KCl en agua. Se ha realizado también el estudio voltamétrico de la electrooxidación de nitrito y tirosina en función del pretratamiento superficial del BDD. Además, se evaluó el efecto del pH en la oxidación de tirosina sobre el electrodo de BDD en un rango de pH de 10 a 7 para una concentración de 2mM de tirosina (fig2).

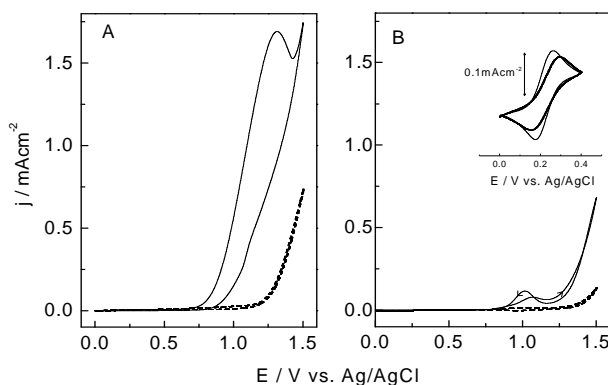


Figura 2 Voltagramas realizados empleando un electrodo de BDD para la oxidación de 6 mM NaNO_2 en disolución acuosa 50 mM en ajustado a pH 9.0 con (A) pretratamiento catódico y (B) pretratamiento anódico. Las líneas punteadas corresponden al blanco. El gráfico insertado muestra los voltagramas para 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ con 0.1M KCl en disoluciones acuosas, comparando ambos pretratamientos: catódico (línea sólida) y anódico (línea punteada). Se empleó en todos los casos $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ de velocidad de barrido, mostrándose el primer ciclo en cada caso.

Se observan importantes diferencias tanto en el potencial de pico como en la densidad de corriente obtenida. Claramente se obtienen una mayor densidad de corriente cuando se emplea un pretratamiento catódico del electrodo en contraposición al tratamiento anódico, que hace que el electrodo se comporte de igual modo que en una abrasión superficial con una pasta de alúmina $1\mu\text{m}$ /agua. Al representar la corriente de pico para la oxidación frente al cuadrado de la velocidad de barrido se obtiene una relación lineal, como se recoge en la bibliografía previa [8].

Finalmente, se realizaron también voltametrías cíclicas de lisozima en un rango amplio de pH y concentraciones con el objetivo de estudiar el comportamiento sobre la oxidación directa sobre el electrodo (datos no mostrados).

2.2. Nitración electroquímica de lisozima sobre electrodos carbonáceos como diamante dopado con boro (BDD).

Se ha estudiado la influencia de la concentración de nitrito, el pH del tampón y el tiempo de electrolisis en la evolución del proceso (figuras 4 y 5) y sobre las diferentes relaciones en concentración de mono y bisnitración de HEWL (datos no mostrados) empleando un sistema de reacción como el que se muestra en la figura 3. Así, en la figura 4 se observa la

evolución de la reacción a distintos pHs en función del tiempo de reacción y de la carga pasada. Se deduce que el proceso se encuentra favorecido a pH básico, siendo similar a pHs 9 y 10.

Puesto que la electrooxidación de la L-tirosina es pH dependiente, también se observó un aumento de 59mV por unidad de pH en el pico de oxidación, para una concentración 10 μ M de tirosina libre. A mayores concentraciones de tirosina no se observa este comportamiento lineal, debido a la funcionalización de la superficie del BDD o bien a su cubrimiento. Aunque no está claro el mecanismo de oxidación en proteínas que contienen tirosinas, Ranta et al [9] observaron que se necesitaban entre 2 y 3 electrones por cada tirosina integrada en un péptido cuando se empleaba carbón vítreo como electrodo de trabajo. Además, la cadena peptídica (en su longitud, composición y estructura) influye en las propiedades redox del grupo fenólico del residuo tirosil y la selectividad de la reacción, desplazando en general el pico de oxidación hacia potenciales más positivos respecto de la tirosina libre. En cambio, la oxidación del nitrito es independiente del pH en el intervalo de estudio [8]. Puesto que la nitración de la lisozima sí depende del pH, parece ser que el mecanismo más probable de reacción es aquel para el cual la oxidación de las tirosinas al radical tirosilato es uno de los pasos la formación de la proteína electronitrada.

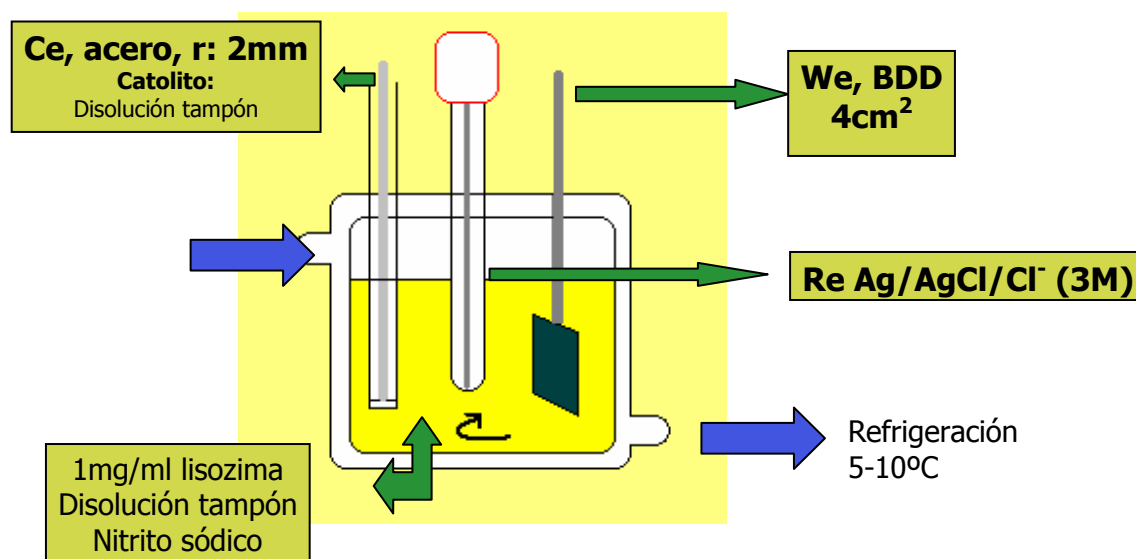


Figura 3. Esquema de la célula electroquímica en la que se llevó a cabo la reacción a 1.050V vs Ag/AgCl. El compartimento catódico se separa del anódico mediante una membrana de vidrio poroso no selectiva. El proceso se monitoriza midiendo la carga pasada y la absorbancia de la disolución a 430nm, 420nm y 550nm (Coeficiente de absorptividad molar de la nitrotirosina a 430 nm y pH =10.0, 4400 M⁻¹.cm⁻¹).

En la figura 5 se observa la evolución de la nitración electroquímica de la proteína lisozima (1 mg.mL⁻¹) a + 1.05 V en función de la carga pasada y para distintas concentraciones de nitrito sódico. Conforme menor es la concentración de nitrito, mayor es la eficiencia en carga pasada del proceso, observándose comportamientos similares para concentraciones 2 y 10 mM en nitrito. En cambio, desde el punto de vista del tiempo de reacción sí se observa que la

cantidad de producto obtenido para una concentración 100mM en nitrito es prácticamente el doble que para 2mM.

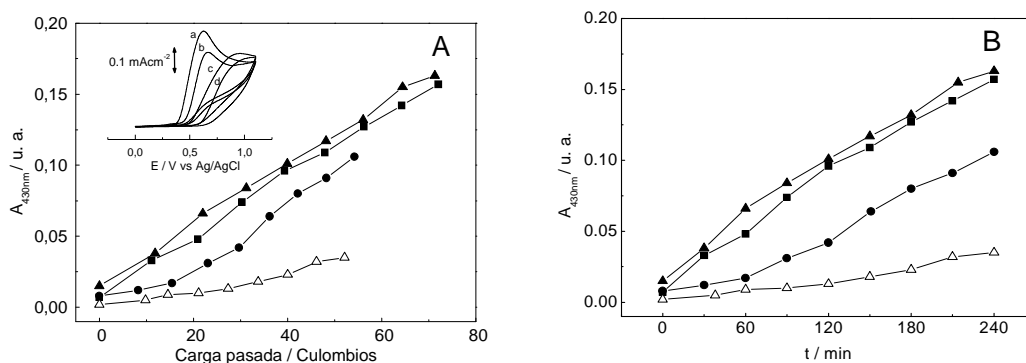


Figura 4. Nitración electroquímica de lisozima sobre un electrodo de BDD a diferentes pHs, en función de la carga pasada (A) y el tiempo de electrolisis (B). La lisozima ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) se nitró oxidativamente usando una disolución tampón 50 nitrito sódico y 50 mM bórax a pH 10.0 (▲), pH 9.0 (■), y pH 8.1 (●), mientras que a pH 7 se usó fosfato sódico 50 mM. En el gráfico insertado se muestran los voltagramas cíclicos (primer ciclo a $0.050\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) para la oxidación electroquímica de L-tirosina 2mM a diferentes valores de pH: a) pH 10.0, b) 9.0, c) 8.0 y d) 7.0 para las disoluciones reguladoras.

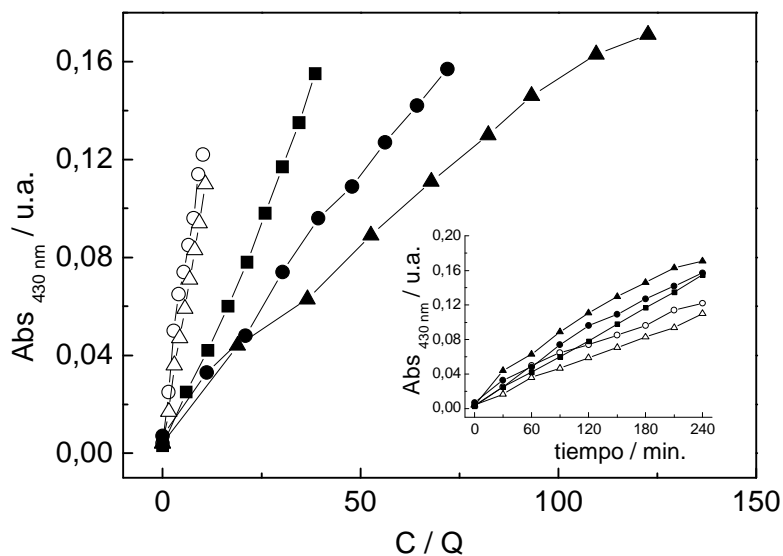


Figura 5. Evolución de la nitración electroquímica de lisozima ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a $+1.05\text{ V}$, en función de la carga pasada empleando un electrodo de trabajo BDD a diferentes concentraciones de nitrito sódico: 2 mM (○), 10 mM (△), 20 mM (■), 50 mM (●) y 100 mM (▲). El gráfico insertado muestra la evolución de la reacción en función del tiempo de electrolisis. Las disoluciones reguladoras contenían bórax 50mM ajustado a pH 9.0 con H_3BO_3 .

Tras el estudio previo se realiza la síntesis con las mejores condiciones de trabajo observadas. La nitración electroquímica de HEWL (hen egg white lysozyme) sobre electrodos tipo BDD tratados católicamente se han realizado a 1.050 V vs Ag/AgCl. Se emplea una disolución reguladora de bórax 50mM ajustado a pH 9.0 con H_3BO_3 y 50mM en nitrito sódico.

En la figura 6 se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla de reacción tras la electronitración de lisozima sobre un electrodo BDD a 1.050V (tampón 9.0, de la forma habitual, 50mM en nitrito sódico) en un sistema similar al mostrado en la figura. No se observan otros productos aparte de la formación de la proteína mononitrada (pico b) y la bisnitrada (pico a). En trabajos previos con otros sistemas se demostró que en primer lugar se produce la mononitración en residuo de tirosina 23, seguido de la formación de la especie bisnitrada al nitrarse la tirosina 20 también. En cambio no se produce especie mononitrada de la tirosina 20, de manera que no se nitra a no ser que lo haya hecho previamente la 23. Esto presupone un cambio estructural en el entorno del residuo 23 que posibilita esta reacción, inviable a partir de la proteína nativa. En la lisozima existe una tercera tirosina (53) que no se nitra al no encontrarse accesible al electrodo. En cambio este residuo sí se nitra por procedimientos químicos. Esto apoya la idea de la necesidad de la formación del radical tirosilato para que se dé la reacción.

De acuerdo con Halliwell [10], los tres posibles agentes nitrantes de proteínas son peroxinitrito, NO y NO₂, aunque en nuestro sistema no es posible la formación electroquímica del peroxinitrito. Por otro lado, los radicales. NO darían lugar a la formación de 3-nitrotirosina solo en presencia de radicales tirosilo (Tyr-O[•]) y especies reactivas de oxígeno (ROS) que darían lugar en primer lugar a *o*-nitrosotirosina que evolucionarían a la 3-nitrotirosina por reacción con estas especies oxigenadas (peróxidos y derivados de éstos) no presentes en nuestro sistema. Por otro lado, no hemos observado por espectrometría de masas en ningún momento la formación de *o*-nitrosotirosina. En lo que respecta a la nitración electroquímica de compuestos aromáticos, existen antecedentes como Cortona et al [11] que ha estudiado la nitración electroquímica del naftaleno usando platino como electrodo de trabajo en disoluciones acuosas con surfactantes no iónicos. Debido a su vida media, la concentración del radical NO₂[•] solo es apreciable en una fina capa en las cercanías del electrodo, menor que la capa de difusión del propio nitrito [12,13]. Esto restringe la reacción de nitración solo a las zonas más próximas al electrodo.

La nitración electrooxidativa de la lisozima es un proceso controlado por transferencia de materia limitado por el coeficiente de difusión de la enzima, de manera que la formación del radical tirosilo es la etapa determinante de la reacción. Sería esperable que al aumentar la concentración de nitrito aumentar, al producirse una mayor electrogeneración del radical correspondiente, aumentaría la eficiencia de la reacción, pero no es así, puesto que la difusión de la proteína al electrodo y la formación del radical tirosilo es lenta en relación a la formación del nitrosilo, y no puede producirse al acoplamiento de gran parte de los radicales de baja vida media.

La nitración de los residuos de tirosina suponen una disminución de tres unidades en el pKa de la tirosina, pasando de 10 a 7.2, debido al efecto electrón atrayente del grupo nitro introducido a la molécula, de modo que se produce una disminución en el punto isoeléctrico de

la lisozima.. Además, la selectividad de la reacción de nitración depende de la accesibilidad de los agentes nitrantes a los residuos tirosina y de otros muchos factores como la proximidad de residuos cargados, el tipo de entorno o el movimiento de la proteína en un disolvente dado. Como se ha comentado, el residuo tirosna más accesible al disolvente es el 23 (ver estructura 1lks en Protein Data Bank RCSB), con una parte de su anillo aromático apuntando hacia el exterior de la proteína, de modo que su interacción con el electrodo de diamante se encuentra más favorecida que para el resto. Por otro lado la tirosina 53 se encuentra oculta, y su nitración electroquímica es despreciable. En cambio, cuando la nitración se produce por métodos químicos (mediante el uso de tetranitrometano, por ejemplo) se produce también la proteína trisnitrada (se nitra Y53) al no necesitar interacción con ninguna superficie.

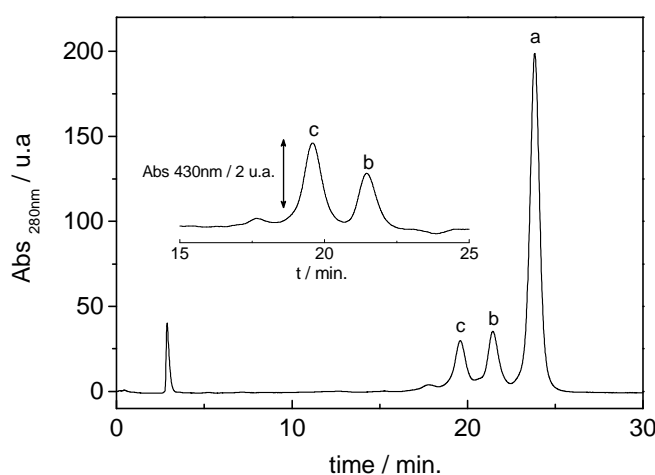


Figura 6. Cromatograma del crudo de reacción tras la electronitración de ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a $+ 1.050 \text{ V}$ en bórax 50 mM ($\text{pH } 9.0$ ajustado con ácido bórico) más 50 mM en nitrito sódico. sobre un electrodo de BDD. Lisozima sin modificar (pico a), mononitrada (pico b), bisnitrada (pico c), tras cuatro horas de reacción. Los cromatogramas se registran a 280 y 430 nm (gráfico insertado).

La separación de los dos productos de reacción obtenidos a partir de la nitración electro-oxidativa de HEWL se realizó mediante el uso de un FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), con un instrumento (Äkta Purifier de Amersham Pharmacia Biotech), utilizando una columna de intercambio catiónico. Tras la separación de la lisozima nativa mono y bisnitrada, respectivamente, se dializó extensivamente frente a un tampón de acetato amónico 10 mM a $\text{pH } 6.0$, mediante el uso de membranas de dialisis Spectra/Por de 500 Da MWCO para posteriormente se liofilizaron las muestras.

2.3 Espectrometría de masas-ionización por electrospray con un analizador ciclotrónico (MS-ESI-FT-ICR)

Las proteínas separadas y debidamente dializadas y liofilizadas se estudiaron por espectrometría de masas acoplado a un ionizador por electrospray (ESI), que demuestra la

incorporación de un grupo nitro en el residuo de tirosina 23 (incremento de masas de +45 Da) en uno de los productos y dos grupos nitro en las tirosinas 23 y 20 (incremento de mas de +90 Da) en el segundo producto para la nitración de la lisozima.

Para realizar los experimentos se disolvieron las muestras en una mezcla metanol/agua (1/1, 1% en ácido acético) a pH 3.0 y se introdujeron en el espectrómetro de masas a través de un sistema ESI (electrospray ionisation) y se empleó un analizador FT/ICR (fourier transform ion cyclotron resonance) en un sistema Bruker Billerica, USA. La fuente ESI operó a 4600 V y la diferencia de potencial empleada entre el capilar y el skimmer fue de +60 V. Los experimentos se realizaron a 293 ± 2 K y una presión de fondo de $2 \cdot 10^{-10}$ mbar en el analizador ICR. Se empleó proteína lisozima nativa como estándar interno de calibración.

La espectrometría masas demuestra que la proteína electro-oxidada (1.05 V vs Ag/AgCl) en ausencia de nitrito no produce ningún incremento de masa con respecto a la proteína nativa (fig8). La distribución de carga (m/z) obtenida para la lisozima mono y bisnitrada respectivamente presenta cambios sutiles en su conformación comparada con la proteína nativa.

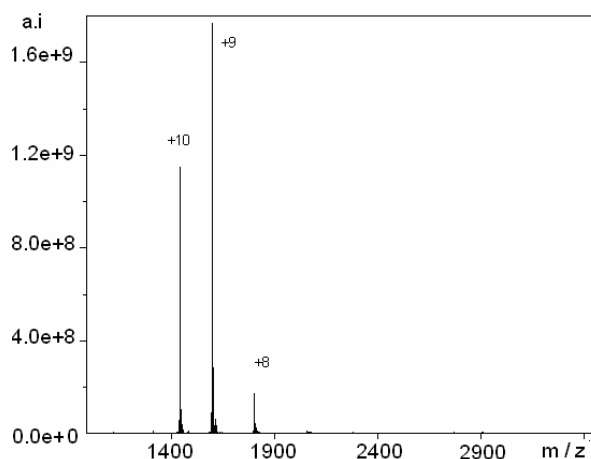


Figura 7. Espectro de masas por ionización de la proteína bisnitrada $20 \mu\text{M}$. Los números indican la carga del ión.

En las figuras 7 y 8 se muestran los espectros ESI-FTICR de espectrometría de masas por electro-spray con transformada de Fourier para la lisozima mononitrada y bisnitrada tanto sobre electrodos de BDD como sobre electrodos de platino, demostrándose en ambos casos un incremento de masa de +45 y +90 Da para las proteínas mono y bisnitradas respectivamente, que corresponden a las masas de los grupos nitro introducidos.

La distribución de los estados de carga para la lisozima mono y bisnitrada sobre el electrodo BDD muestra diferentes intensidades m/z en comparación con la proteína control oxidada (sometida a las mismas condiciones de reacción que las anteriores, pero sin nitrito en el medio). Así, para las proteínas mono y bisnitradas el pico más abundante es el correspondiente al ion +9, pero con distintas abundancias relativas para los +10 y +9 respectivamente (ver figura 6 y 7). Estos resultados pueden atribuirse a sutiles diferencias conformacionales entre las distintas especies.

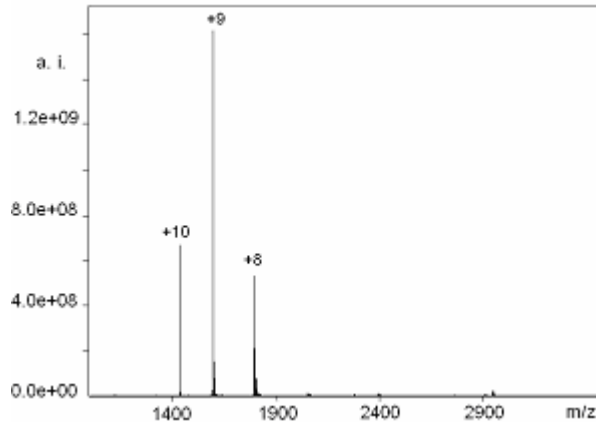


Figura 8. Espectro de masas por ionización de la proteína mononitrada 20 μ M. Los números indican la carga del ión.

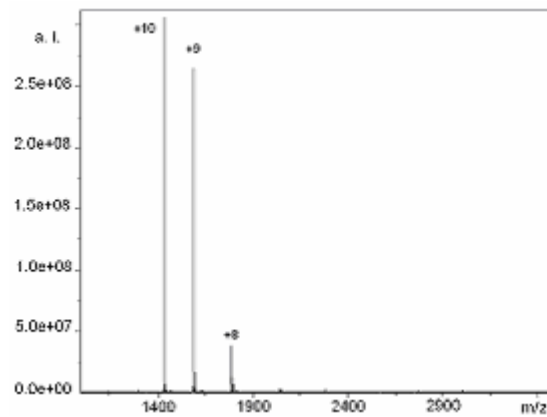


Figura 9. Espectro de masas por ionización de la proteína control oxidada 20 μ M. Los números indican la carga del ión.

2.4 Determinación de la actividad de de las diferentes lisozimas modificadas.

Se realiza el ensayo turbidimétrico con paredes celulares de *Micrococcus Lysodeikticus* (Luteus) para obtener la actividad de las diferentes lisozimas nitradas utilizando como electrodo el BDD (figura 10). Para la proteína expuesta a diferentes potenciales así como tiempo de electrólisis junto con las diferentes lisozimas nitradas se obtuvo que la actividad de las diferentes especies oxidadas y nitradas permanece inalterada, demostrando que el electrodo BDD es un material apropiado para la producción de nitroproteínas modelo.

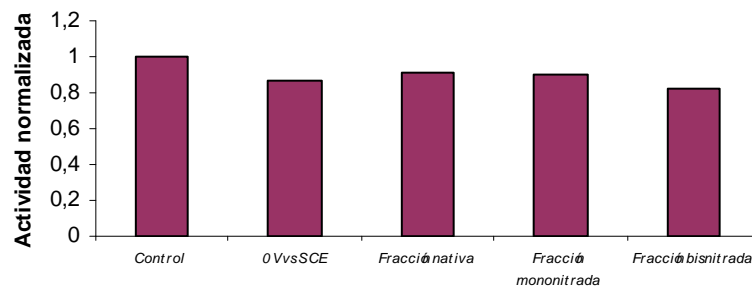


Figura 10. Resultados del ensayo turbidimétrico con *Micrococcus Lysodeikticus* (Luteus) para obtener la actividad de la proteína nitrada por el procedimiento descrito en la fig. 3 durante 120 minutos, hasta

obtener 0.52 moles de Y por mol de proteína. A una disolución de 0.3mg/ml de concentración de paredes celulares en 0.970mL 0.1M K_2HPO_4 pH 6.2 se añadió 0.030mL de disolución 1mg/mL de proteína en 0.1M K_2HPO_4 se determinó la absorbancia de la muestra a 450 nm en cubetas de plástico de 1 cm de camino óptico durante 20s. Una unidad de actividad de lisozima produce un cambio en la absorbancia a 450nm de 0.001 unidades por minuto.

Este estudio revela una pérdida en la actividad de la enzima del orden del 20-25% respecto a la proteína nativa como consecuencia de la nitración sufrida. En estudios previos realizados por el presente equipo de trabajo con electrodos de platino se observó una disminución de la actividad de la proteína mayor. Esto último se achacó a la fuerte adsorción de la proteína sobre el electrodo que la degradaba parcialmente. Uno de los objetivos de este trabajo es encontrar un material electródico capaz de modificar selectivamente proteínas sin interaccionar destructivamente con ellas, de manera que cualquier cambio inducido pudiera achacarse al grupo introducido y no adsorciones y posteriores rupturas de la molécula. Se ha podido comprobar que esto último es factible electrodos de diamante dopado con boro, de modo que se pueden generar proteínas nitradas para el estudio del estrés oxidativo o bien para introducirle puntos de anclaje para aplicaciones en biosensores.

Los electrodos BDD tienen importantes propiedades casi todas ellas relacionadas con su amplia ventana de potencial útil frente a los límites de formación de oxígeno e hidrógeno a partir del agua y su estabilidad superficial, pero por otro lado también cuentan con limitaciones comparadas con los electrodos metálicos. Así, en comparación con estos últimos presentan bajas cinéticas de reacción para aquellos casos en los que se precise una adsorción de los sustratos en procesos de transferencia multielectrónica. Pero obviamente, esto es una ventaja para nuestro objetivo ya que la adsorción y degradación de la proteína se ve minimizada, ya que se precisa poco contacto para la modificación selectiva de ciertos residuos. Esto concuerda con el hecho de que la actividad de la proteína se mantenga inalterada al exponerla a 0 y 1 V vs Ag/AgCl sin presencia de nitrito, aunque sí se observa una disminución de la actividad cuando se introduce nitrito en el medio de reacción.

2.5 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear de alto campo para el estudio de cambios estructurales.

Cada proteína presenta una secuencia específica de aminoácidos, esta secuencia también llamada estructura primaria contiene la información necesaria para que estas estructuras se plieguen o adquieran una estructura tridimensional específica para desarrollar una función. Los sucesivos niveles estructurales de las proteínas únicamente se obtienen si el “collar” de aminoácidos se dobla sobre sí mismo para obtener una estructura tridimensional específica. Actualmente se cuenta con un acervo de 31000 coordenadas de diferentes estructuras de resueltas a nivel atómico (<http://www.rcsb.org/pdb/>), entre las cuales se encuentra la lisozima, lo

que ha permitido diversificar e intensificar los estudios acerca de las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas.

La resonancia magnética nuclear (RMN) se lleva a cabo en disoluciones acuosas, de tal forma que las macromoléculas giran y vibran con movimiento térmico. La RMN detecta cambios químicos de los núcleos con espín diferente de cero. Este cambio depende del entorno en el que se encuentra el núcleo, esto es, tipo de átomos próximos y su distancia y tipo de unión a ellos. El resultado del análisis de RMN es un juego de estimados de las distancias entre pares específicos de átomos, llamados “constreñidos”. Estos constreñidos se obtienen a partir de pares de átomos unidos o no (a través de distancias o de enlaces o espacios). Con el número suficiente de constreñido, el número de configuraciones consistentes con los datos se convierte en finito [14]. El resultado es una mezcla de modelos en lugar de una sola estructura. A menudo las posiciones de los átomos en los distintos modelos es un promedio que se ajusta para obtener las distancias y ángulos normales (minimización). Con los datos de la RMN es posible determinar tanto la estructura secundaria como la terciaria. Sin embargo, es un requisito fundamental contar con la estructura primaria con antelación para facilitar el análisis de los espectros de RMN. En este caso se han empleado los datos disponibles en la bibliografía para la secuencia de aminoácidos de la lisozima [15].

Se han realizado los siguientes análisis de RMN a cada uno de los productos obtenidos, así como a la proteína nativa de partida en una concentración de proteína alrededor de 2mM, a pH 3 y 10% D₂O:

- Experimentos de correlación heteronuclear a un enlace (HSQC) (Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy), ¹³C α -H α HSQC a 308K, de resonancia magnética nuclear bidimensional de alto campo (500 MHz sin criosonda). Experimento de detección indirecta que muestra la correlación a un enlace de distancia entre núcleos distintos vía coherencia cuántica sencilla.
- Experimentos TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) a 308 K para las tres fracciones de proteína purificada. Experimento que muestra la correlación de núcleos que se encuentran formando un sistema de espín.
- Experimentos NOESY (Two dimensional Nuclear Overhauser Spectroscopy) a 308 K y 120 ms de tiempo de mezcla. Experimento que muestra efecto nuclear Overhauser entre dos protones. Este efecto es factible observarlo dado que requiere un tiempo muy largo que permita el intercambio de información sobre la proximidad de los núcleos que se encuentran cerca a través del espacio.

Con estos experimentos es posible determinar qué núcleos dentro de una molécula se encuentran acoplados entre sí. Este conocimiento nos permite determinar el número y tipo de protones que se encuentran a dos o a tres enlaces de distancia. La determinación de todos los

núcleos que se acoplan entre ellos mismos es una función muy importante en la determinación de estructuras proteicas. Al conjunto de estos núcleos se le llama un sistema de espín. En una proteína, al menos hay tantos sistemas de espín como número de aminoácidos. La interpretación de los experimentos en dos dimensiones es similar para todos ellos. Se requiere conocer las coordenadas de una señal fuera de la diagonal para conocer a los núcleos que están mostrando una correlación particular. Esta correlación particular la determina el tipo de experimento en dos dimensiones, por ejemplo, un experimento TOCSY mostrará la correlación escalar a dos y tres enlaces entre protones; el experimento NOESY genera señales fuera de la diagonal cuando los núcleos se encuentran próximos, a no más de 5 Angstroms de distancia tanto si se encuentran directamente enlazados como si no. El experimento NOESY es de gran utilidad ya que la integral de la señal en tres dimensiones es proporcional a la distancia entre los núcleos. Así, se logra determinar protones que se encuentran alejados en la secuencia de los aminoácidos, pero cercanos debido a la estructura tridimensional que presenta la proteína. Este experimento también permite asignar a los protones de aminoácidos que se encuentran contiguos, la llamada asignación secuencial y la determinación de NOE's a larga distancia que definirán la estructura terciaria o cuaternaria. Más adelante se tratará con mayor detalle este tema. Para la determinación de la estructura de una proteína se requiere asignar la totalidad de las señales de los espectros en dos dimensiones TOCSY. En esta forma se determina qué señales corresponden a un aminoácido en particular. Conociendo qué tipo de aminoácido corresponde a que grupo de señales y con la ayuda del experimento NOESY se asigna cada uno de los aminoácidos en la secuencia de la proteína. A través del experimento NOESY es posible estimar las distancias de los protones que se encuentran a menos de 5 Angstroms de distancia.

Mediante este tipo de correlaciones encontradas en los experimentos NOESY es posible asignar consecutivamente cada sistema de espín determinados con los experimentos TOCSY, adicionalmente, en este tipo de estructuras secundarias existen varios protones que se encuentran muy próximos, pese a no encontrarse localizados en aminoácidos consecutivos en la secuencia. Encontrar este tipo de correlaciones en los experimentos NOESY es lo que permite definir la estructura secundaria y la terciaria. A todos estos datos se les llama restricciones, que deben ser del orden de 10 parámetros por cada aminoácido. Una vez que todas las estructuras no varíen mucho, se dice que se tiene la estructura de la proteína. Hay que considerar que este proceso es cíclico, una vez que se tiene un buen número de restricciones, se calcula un número importante de estructuras. Con ellas se rectifica si las asignaciones hechas son correctas y, basándose en las estructuras obtenidas, se vuelven a buscar más NOES y constantes de acoplamiento. Este proceso iterativo se repite consistentemente en un proceso que puede durar meses hasta que la gran mayoría de las señales del experimento NOESY son asignadas y que las estructuras calculadas por los programas de dinámica molecular sean muy similares.

2.5.1 Experimentos HSQC.

En los experimentos HSQC de correlación C α -H α se muestran las correlaciones entre el C α de cada aminoácido con el H α de ese mismo aminoácido. Se obtienen gráficos en dos dimensiones donde el eje x corresponde al desplazamiento químico del H α y el eje y el desplazamiento del C α . En nuestro caso por tanto, debemos esperar un mínimo de 129 señales, tantas como aminoácidos presentes en nuestras estructuras [16]. Una modificación en la posición relativa de estos picos indicará un cambio en la estructura, de las proteínas modificadas respecto de la nativa. La modificación de la proteína se puede corroborar por tanto en estos espectros.

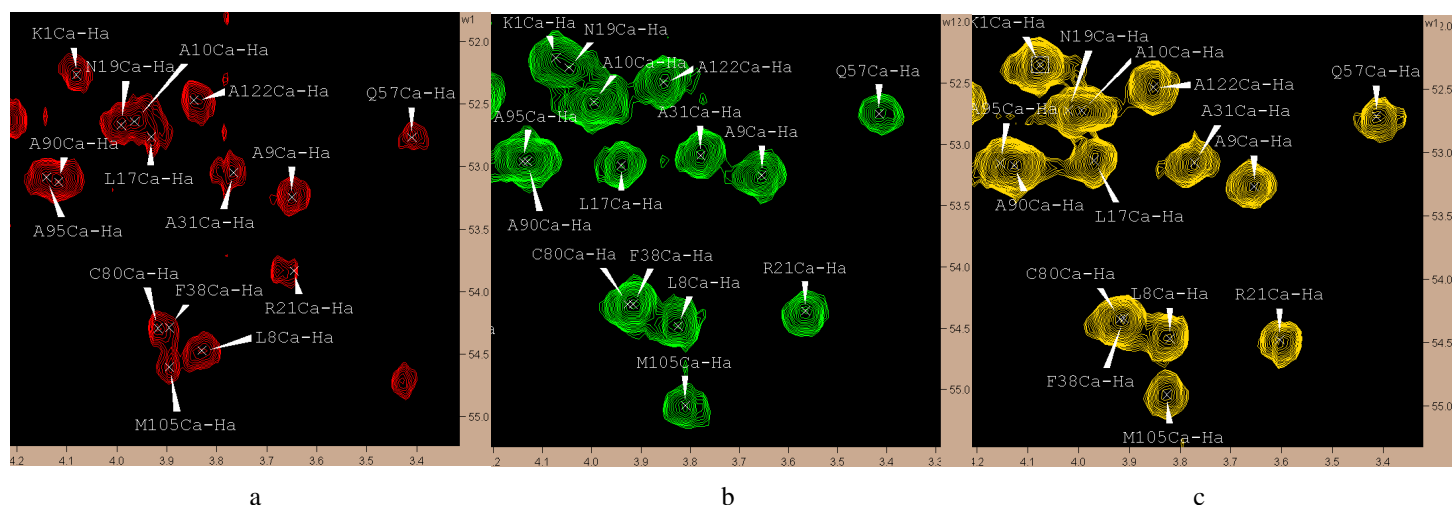


Figura 11. Región del espectro correspondiente a experimentos de correlación heteronuclear a un enlace, $^{13}\text{C}\alpha\text{-H}\alpha$ HSQC a 308K, de resonancia magnética nuclear bidimensional de alto campo (500 MHz) de las proteínas nitradas purificadas por HPLC a) nativa b) mononitrada c) bisnitrada. Se observa el efecto del grupo nitro sobre los residuos de aminoácidos de tirosina (Y), que provoca un desplazamiento de las señales correspondientes a los residuos más próximos a Y20 e Y23 en su estructura secundaria, como es el caso de N19 o L17, además de los residuos más próximos en su estructura tridimensional, como la M105.

La variación de señales correspondientes a residuos de aminoácidos que no se encuentran próximos a las nitrotirosinas en su estructura secundaria, pero sí en el espacio, implica un cierto cambio en la estructura tridimensional de la proteína (fig.11 y 12). Se observa que los mayores cambios se encuentran en los residuos de aminoácidos vecinos, tanto posteriores y anteriores a ambas tirosinas en la estructura primaria como en los que se encuentran en la hélice-a más próxima (V99 y M105).

En la figura 12 se han representado las diferencias que se encuentran en las posiciones de los picos (respecto de la coordenada correspondiente al protón). Se han marcado las diferencias más importantes en las posiciones observadas. Estas diferencias son especialmente importantes en el caso de la proteína bisnitrada, en comparación con la nativa. Este es un primer acercamiento a las posibles modificaciones que cabe esperar. En vista de los resultados

obtenidos esperamos que se produzca algún pequeño cambio estructural (además de los químicos y fisiológicos ya observados) en la proteína en las cercanías de los residuos modificados, los contiguos y los que se encuentran alrededor del residuo 100, que se encuentra en un bucle muy próximo en el espacio a los residuos modificados.

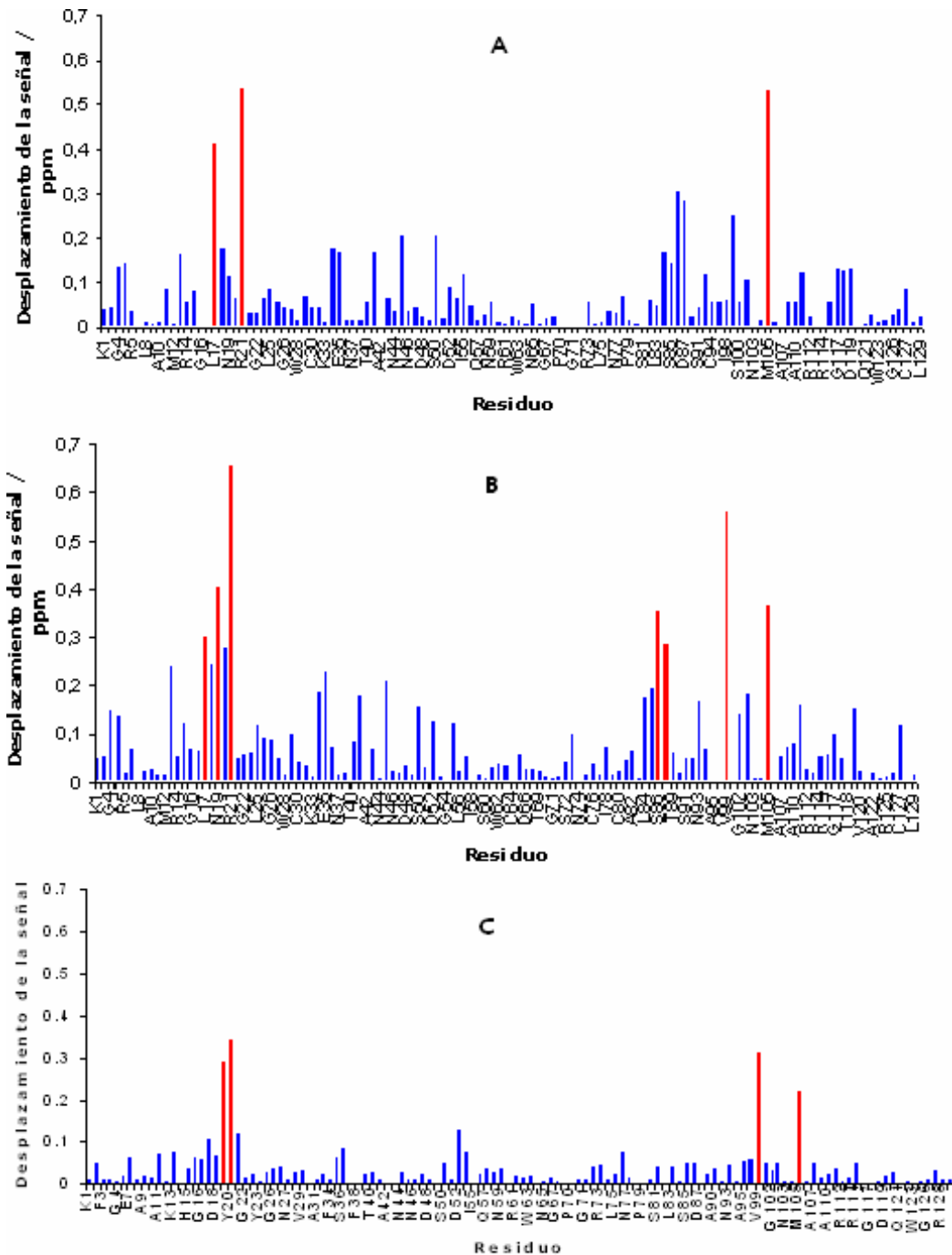


Figura 12. Variación del desplazamiento químico de los experimentos HSQC en la componente Ca entre las diferentes proteínas modificadas separadas por HPLC a) mononitrada y nativa b) bisnitrada y nativa y c) entre las dos proteínas nitradas.

2.5.2 Experimentos TOCSY.

Una vez identificados los 129 aminoácidos en el experimento HSQC, con ayuda de los datos disponibles en la bibliografía [15] se procede a identificar los 129 sistemas de espín en el experimento TOCSY. El procedimiento habitual consiste en localizar en el los sistemas que aparecen alineados en el espectro, donde el valor del eje x para cada punto corresponde al desplazamiento químico (en ppm) del NH de cada uno de los 129 aminoácidos que conforman la estructura de la proteína. En el eje y se representa el desplazamiento químico de los H que se encuentran en ese mismo residuo (formando un sistema de espín alineado) a una distancia entre 2 y 3 enlaces respecto del NH. Así, cada uno de los 20 tipos de aminoácidos presenta una estructura de puntos específica para su tipo en concreto, así, en los sistemas de las tirosinas vemos que es habitual encontrar tres picos alineados, correspondientes a las señales YHB3-NH, YHB3-NH y YHA-NH (fig. 11). En cada uno de estos espectros TOCSY se ha identificado y clasificado manualmente una media de 300 señales.

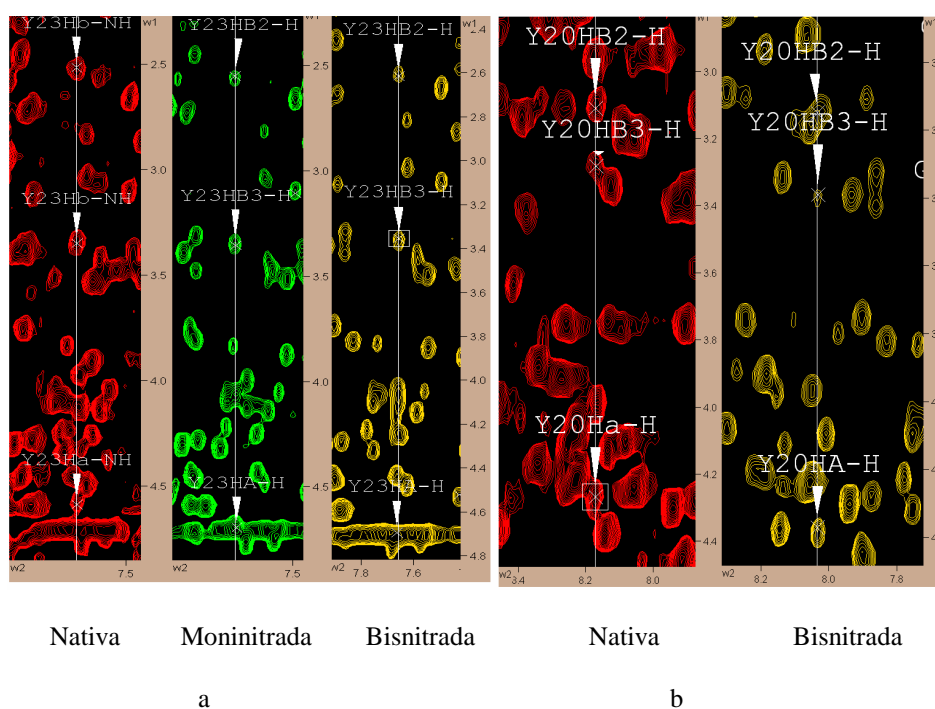


Figura 13. Regiones de los espectros TOCSY correspondientes a las tres fracciones de proteína purificada en las zonas correspondientes al sistema de espín de a) Y23 y al sistema de espín de b) Y20. Los experimentos se llevaron a cabo a 308K usando un espectrómetro 500 MHz Bruker y un tiempo de mezcla de 50 ms.

2.5.3 Experimentos NOESY.

El Efecto Nuclear Overhauser (NOE) es una interacción a través del espacio mediante la cual cambia la intensidad de la señal de un determinado núcleo cuando se irradia otro núcleo vecino (cercano en el espacio). Los espectros NOESY son en apariencia similares a los TOCSY, solo que en cada sistema de espín, además de aparecer las señales correspondientes a los H que

se encuentran en ese aminoácido en concreto aparecen además señales de otros H próximos en el espacio al NH de ese aminoácido pero no unidos a ese sistema por enlaces, con lo cual en cada sistema de saín aparecen unas diez señales nuevas que no aparecían en es espectro TOCSY. Estas señales nuevas que aparecen por la interacción espacial de los átomos, aunque se encuentren lejanos en su estructura primaria, son las que nos permiten realizar las simulaciones de las estructuras tridimensionales de la molécula. El NOE es una interacción dipolo-dipolo y como tal depende de la potencia r^{-6} y nos permite medir distancias interatómicas de pocos Å entre átomos. Las restricciones NOE se obtienen, normalmente, por integración de los picos en los experimentos NOESY. Las intensidades de los picos cruzados se integraron utilizando el programa SPARKY. Posteriormente estas intensidades se convierten en distancias interatómicas mediante el programa CALIBA.

	Picos NOESY correspondientes a Y20	Picos NOESY correspondientes a Y23
Nativa	Y20H-R21H, Y20H-G22HA3, Y20H-R21HA, Y20H-V99HG2, V99H-Y20HB2, W28H-Y20HB2, R21H-Y20HB3, L17H-Y20HB3	Y23H-R21HB2, Y23H-R21HG, Y23H-L25HB, Y23H-G22HA2, Y23H-V99HG, Y23H-M105HG, Y23H-N103HB2, V99H- Y23HA, W111H-Y23HA, G22H-Y23HB2, G104H-Y23HB2, W111H-Y23HB3
Mononitrada	Y20H-N19HB, Y20H-R21HA, Y20H-R21H, Y20H-V99HB, Y20H-V99HG2, G22H-Y20HB3, L17H-Y20HB3	Y23H-N103HB2, Y23H-R21HG, Y23H-G22HA2, Y23H-L25HE, Y23H-V99HG, Y23H-G22H3, Y23H-M105HG, Y23H-G104HA2, Y23H-N19HB2, G22H-Y23HB2, G104H-Y23HB2, N19H-Y23HB2, M105-Y23HB2
Bisnitrada	Y20H-N19HA, Y20H-V99HA, Y20H-V99HG2, Y20H-N19H, N19H-Y20HA, V99H-Y20HB2	Y23H-V99HB, Y23H-R21HB2, Y23H-G22HA2, Y23H-V99HA, Y23H-G22H3, Y23H-M105HA, Y23H-G104HA2, W28H-Y23HB2, Y20H-23HB2, N19H-Y23HB2

Fig. 14 Picos de cruce identificados en el espectro NOESY a 308K, con tiempo de mezcla de 120ms par alas proteínas modificadas y la nativa. en los sistemas de spin de Y20 y Y23. Las señales que no aparecen en el espectro de la proteína nativa se marcan en azul. El experimento se realizó en un sistema Bruker 500 MHz

En la tabla que se muestra en la figura 14 se corrobora lo que se esperaba desde la resolución y análisis del espectro HSQC, esto es, que existen pequeñas diferencias estructurales respecto de la proteína nativa, ya que aparecen distintos picos en los sistemas de espín. Esto significa que de un modo cualitativo los residuos modificados se encuentran ahora más próximos de residuos más alejados en la proteína nativa (el efecto opuesto también se observa).

2.5.4 Tratamiento de los datos obtenidos por RMN para la obtención de la estructura.

El procedimiento seguido para la obtención de las estructuras que se muestran a continuación a grandes rasgos es el siguiente:

- Se integran los picos obtenidos en los espectros NOESY de cada una de las muestras, puesto que guardan relación matemática con la distancia entre los átomos que involucran. Uso del programa SPARKY. Estos son los datos que posteriormente se trabajan en un entorno LINUX.
- Con el programa CALIBA se aplican los algoritmos matemáticos necesarios para transformar los valores de las integrales obtenidas en distancias entre átomos [17]. Este da una idea de los errores que puedan haberse cometido en el paso anterior, de manera que debe volverse al paso anterior hasta que ya no aparezcan errores.
- Con el programa XPLOR se calculan las 100 estructuras más probables para cada de las moléculas. Probablemente aparecerán varias violaciones debidas a errores en la integración o asignaciones de los espectros no detectados previamente [18].
- Se realizan pequeñas correcciones volviendo al primer punto de una forma cíclica (Refinamiento de la estructura) hasta obtener la estructura con la menor energía NOE posible, bajando cada vez el límite de incertidumbre admisible.
- Finalmente, las estructuras obtenidas en forma de ficheros tipo “pdb” que contienen la información estructural de la proteína pueden representarse en programas gráficos como el PYMOL.

XPLOR es uno de los programas más empleado en el cálculo de estructuras moleculares, tanto a partir de datos de RMN como de datos cristalográficos [18]. En este programa se introducen los datos de las distancias obtenidas mediante el programa CALIBA y se realiza un cálculo estructura, cuyo resultado puede visualizarse en programas gráficos como el PYMOL. En el programa XPLOR se fijaron las partes de la molécula no afectadas por la nitración y se comprobó si existía alguna variación en el resto de la estructura a través de las distancias entre residuos e intrarresiduo obtenidas en CALIBA.

El uso de estos programas, que a su vez resultan largos, tediosos (ha implicado la mayor parte del tiempo implicado en el proyecto) complicados de usar, permite resolver la estructura tridimensional de la proteína modificada. De este modo, se han resuelto la estructura tridimensional de la enzima lisozima mononitrada (en el residuo de tirosina 23) y bisnitrada (en los residuos de tirosina 23 y 20).

En la figura 15 muestran las mejores estructuras obtenidas para las proteínas mononitrada y bisnitrada, así como su comparación con la proteína nativa

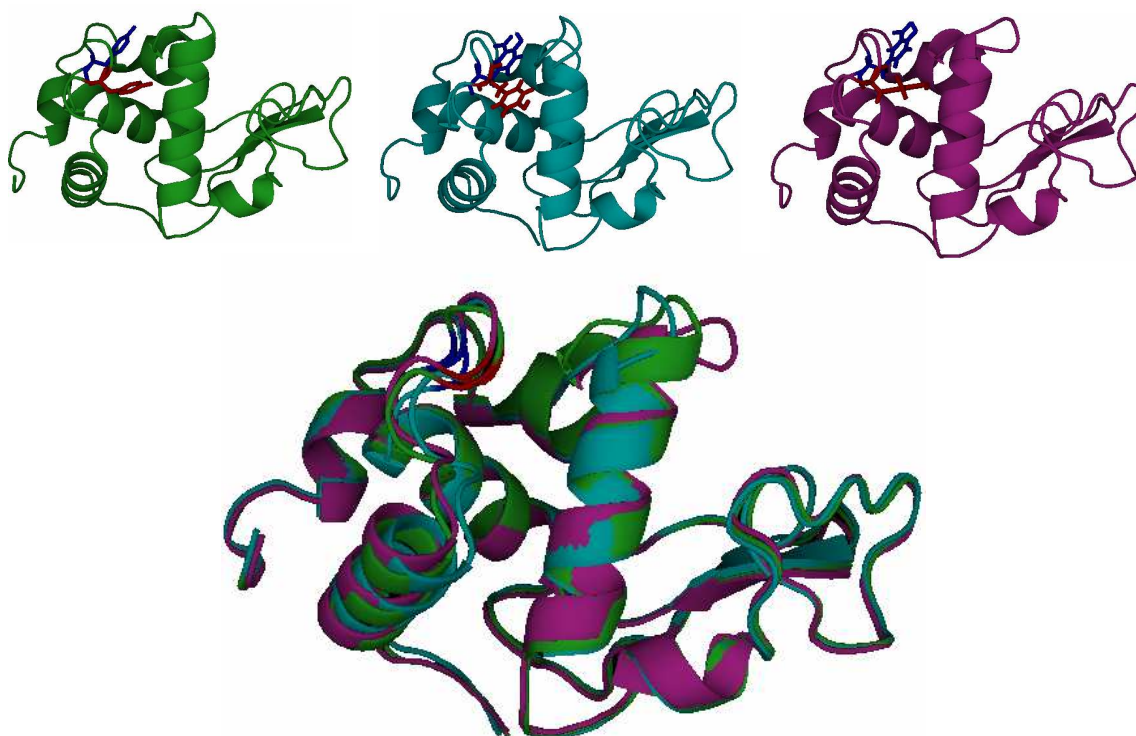


Figura 15. Estructura tridimensional de la lisozima (HEWL) en su forma nativa (color rosa) y la forma bisnitrada en los residuos de tirosina 20 y 23 (color azul).

3. Conclusiones.

Se ha comprobado que es posible realizar la modificación electroquímica de proteínas sobre electrodos de diamante dopado con boro sin que se produzcan otras alteraciones covalentes en la molécula, reteniendo la capacidad lítica de la proteína cuando esta se expone a un amplio intervalo de potencial entre 0 y 1.05 V vs Ag/AgCl, asumiendo que la adsorción de la proteína y su desnaturización como consecuencia de esta es prácticamente despreciable. Esto contrasta con experimentos previos usando otro tipo de electrodos metálicos como platino.

Por otro lado, la nitración electro oxidativa de la lisozima en presencia de nitrito como fuente de nitrógeno produce las proteínas mono y bisnitradas con un incremento de masa demostrado en ESI-FT-ICR de +45 y +90 Da respectivamente. La relación de proteína mononitrada formada respecto de la bisnitrada aumenta con el pH y la concentración de nitrito.

La mono y bisnitración de lisozima se puede corroborar en los espectros HSQC de correlación C α -H α . La variación de señales correspondientes a residuos de aminoácidos que no se encuentran próximos a las nitrotirosinas en su estructura secundaria, pero sí en el espacio, implica un cierto cambio en la estructura tridimensional de la proteína.

Se ha podido obtener el modelo de las estructuras en tres dimensiones de cada una de las proteínas modificadas electroquímicamente. Se ha podido comprobar que se producen sutiles cambios en la estructura en tres dimensiones de la proteína, en los residuos vecinos a las tirosinas que se modifican así como en el bucle que se encuentra enfrentado con ellas. Esto era esperable,

ya que se está introduciendo un grupo muy electronegativo en la molécula, cambiando no solo sus características ácido base e hidrofobicidad, sino que también se ven reflejados sus efectos en una disminución de su actividad fisiológica.

Se ha realizado un ciclo completo de la estrategia para el estudio de proteínas modificadas electroquímicamente, lo que permite extrapolar la experiencia adquirida y los resultados obtenidos a otras proteínas “no modelo” de mayor relevancia desde el punto de vista tecnológico, biológico o incluso médico

4. Bibliografía consultada.

- [1] H. Ischiropoulos, *Free Radical Biol. Med.*, 36 (2004) S3.
- [2] H Ischiropoulos, *A Gow. Toxicology*. 208 (2005) 299-303.
- [3] L. Ouattara, M.M. Chowdhry, C. Comminellis, *New Diamond Front. Carbon Technol.* 14 (2004) 239.
- [4] C Prado, G G Murcott, F Marken, J S Foord, R G Compton. *Electroanalysis*, 14 (2002) 975-979.
- [5] E J Fortin, E., J Chane-Tune, D Delabouglise, P Bouvier, T Livache, P Mailley, B Marcus, M Mermoux, J Petit, S Szunerits, E Vieil.. *Electroanalysis*, (2005)17: 517-526
- [6] H.R. Gu, X.D. Su, K.P. Loh, *Chemical Physical Letters*, 388 (2004) 483.
- [7] J.D. Zhang, M. Oyama, *Microchemical Journal*, 78 (2004) 217.
- [8] N. Spartau, T. N. Rao, D. A. Tryk, A. Fujishima, *J. Electrochem. Soc.* 148 (2001) E112.
- [9] V.P. Ranta, A. Urti, S. Auriola, *J. Chromatogr. A* 766 (1997) 85.
- [10] B. Halliwell, *FEBS Lett.* 411 (1997) 157.
- [11] M.N. Cortona, N.R. Vattorazzi, J.J. Silber, L.E. Sereno, *J. Electroanal. Chem.* 470 (1990) 157.
- [12] H. Feess, H. Wendt, *Ber. Bunsenges, Phys. Chem.* 85 (1981) 914.
- [13] H. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 256.
- [14] K. Wütrich (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*.
- [15] C Redfield, Christina. *NMR Mol. Biol* 109 (1990), 155-66.
- [16] M Sattler, J Schleucher, C Griesinger, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 34 (1999) 93-158.
- [17] P Guenter; Y Q Qian, G Otting, M Mueller, W Gehring, K Wuethrich, Kurt *Journal of Molecular Biology* 217(3) (1991) 531-540.
- [18] C D Schwieters, J J Kuszewski, N Tjandra, G M Clore. *J Magn. Reson* 1680, 65-73.

5- Participación en congresos.

El proyecto realizado ha dado lugar a las siguientes comunicaciones a congresos (VER ANEXO):

Autores: Walton, David J. ; Heptinstall, John, Mercer, Sadie, Peterson, Ian R.; Matters, Dominic; Mason Timothy J; Lorimer J Philip; Esclapez-Vicente, M Deseada; Iniesta, Jesús; Cooper, Helen

Título: MODIFICATION OF TYROSINE RESIDUES IN LYSOZYME BY ELECTROCHEMICAL, SONOCHEMICAL AND SONOELECTROCHEMICAL NITRATION

Tipo de participación: PÓSTER (Ver el primer póster del anexo)

Congreso: 10th meeting of European Society of Sonochemistry, ESS 10

Lugar de celebración: Hamburgo (ALEMANIA) Fecha: 04/06/2006 - 09/06/2006

Autores: María Deseada Esclapez-Vicente, Jesús Iniesta, Frutos Marhuenda-Egea, y Antonio Donaire

Título: ESTUDIOS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN PROTEÍNAS MODIFICADAS ELECTROQUÍMICAMENTE: NITRACIÓN DE TIROSINA

Tipo de participación: PÓSTER (ver el segundo póster del anexo)

Congreso: XXIX Congreso de la Sociedad Española de Biología Molecular

Lugar de celebración: Universidad Miguel Hernández de Elche Fecha: 07/09/2006 - 10/09/2006

Autores: M^a Deseada Esclapez-Vicente, Jesús Iniesta, Verónica Sáez, Frutos C. Marhuenda, Encarnación Martínez, A. Donairec and Mario Piccioli

Título: STRUCTURAL STUDIES BY NMR OF SELECTIVELY ELECTROCHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS: TYROSINE NITRATION OF HEN EGG WHITE LYSOZYME

Tipo de participación: PÓSTER (ver el tercer póster del anexo)

Congreso: III Biental del Grupo Español de Resonancia Magnética Nuclear

Lugar de celebración: San Juan (Alicante) Fecha: 15/10/2006 - 18/10/2006

6. Agradecimientos

Quisiera agradecer el apoyo ofrecido al presente trabajo al Instituto Alicantino de Cultura Juan Gil Albert, que ha financiado el proyecto con sus Ayudas a la Investigación de la Convocatoria 2006 en la modalidad de Proyectos de Investigación en Ciencias Experimentales y Técnicas.

También quiero hacer constar mi agradecimiento al departamento de Química Física de la Universidad de Alicante por permitirme usar sus instalaciones y servicios para el desarrollo del presente proyecto, especialmente al directo del proyecto, Dr. Jesús Iniesta Valcárcel. Por otro lado también ha sido imprescindible la colaboración de los profesores Frutos Marhuenda Egea (Departamento de Bioquímica y Agroquímica de la Universidad de Alicante), Prof. Mario Piccioli (Magnetic Resonance Center CERM de Universida de Florencia) y a Luis Alcaraz Mas (Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández) sin cuyos conocimientos técnicos y científicos acerca de la Resonancia Magnética Nuclear y tratamiento de los datos obtenidos no habría sido posible el gran proceso de aprendizaje que ha supuesto para mí este trabajo.

7. Anexo.