

PEDECIBA
Facultad de Ciencias
Facultad de Medicina
Instituto Pasteur
Montevideo

CEINBIO

Modificaciones
Postraduccionales
de Proteínas:
Ampliando el
Código Genético
Manual de Prácticos

Leonor Thomson y José M. Souza

Tabla de contenido

1. Fosforilación de proteínas durante la activación.....	2
macrofágica.....	2
<i>Objetivo</i>	2
Introducción	2
2. Modificación Nitroxidativa del Citocromo c.....	14

1. Fosforilación de proteínas durante la activación

macrofágica

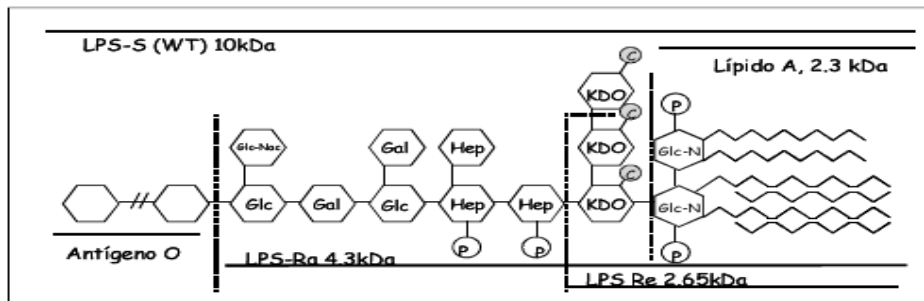
Objetivo

Demostrar que la activación macrofágica involucra procesos de señalización en los cuales participan quinasas de proteínas.

Introducción

La activación de los macrófagos se llevará a cabo mediante la exposición a dos conocidos estimuladores de la misma: un lipopolisacárido de la membrana de bacterias gram negativas (LPS), también conocido como antígeno O, y forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

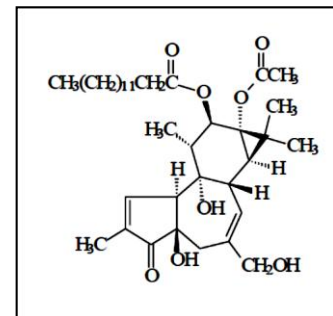
La estimulación macrofágica por LPS resulta en la activación del factor



Representación esquemática de la molécula de lipopolisacárido (LPS). LPS-S (WT): LPS liso (*wild type*) completo, LPS-Ra y Re: LPS rugoso (mutantes), Glc: Glucosa, Glc-Nac: N-acetil D- glucosamina, Gal: D-galactosa, Hep: 1-glicero-D-heptosa, Glc-N: D-glucosamina, P: fosfato, C: carboxilato (extraído de Henning, MF et al. Medicina (B. Aires) [online]. 2006, 66:263-273).

nuclear κ B (NF κ B) y de quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), que llevan a la producción de citoquinas y a la inducción de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2 o iNOS).

Por su parte, el PMA es un diéster de forbol y un potente estimulador tumoral que activa a la quinasas C (PKC), entre otros efectos estimula el ensamblaje y por tanto la activación de la NADPH-oxidasa o NOX2.



*Actividades***Lunes 13****1. Cultivo.**

- a. Lavar y cosechar las células (macrófagos J774) en medio de cultivo DMEM¹ fresco equilibrado a temperatura ambiente, empleando rastrillos estériles (cell scrapers).
- b. Contar las células en cámara de Neubauer (ver Anexo 4), y diluir las mismas hasta 2×10^5 células/10 mL de medio de cultivo equilibrado a temperatura ambiente.
- c. Preparar 8 frascos de 75 cm² con 20 mL de suspensión celular cada uno.
- d. Colocar los frascos en estufa a 37^o C en atmósfera de 5% CO₂.

2. Preparación de soluciones y geles

- a. Buffer de lisis: urea 8 M (4.8 g), CHAPS 2 % en un volumen final de 10 mL, con agua ultra pura (MQ).
- b. Preparación de dos (2) geles de poliacrilamida al 10% con SDS, con stacking 5% para 1D. Lavar los vidrios, separadores y peines muy bien antes de usarlos primero con agua jabonosa y luego con etanol, repetir la limpieza al culminar su uso.

- i. 7.9 mL H₂O
- ii. 6.7 mL acrilamida/bisacrilamida al 30%
- iii. 5 mL Tris 1.5 M pH 8.8
- iv. 0.2 mL SDS 10%
- v. 0.2 mL PSA 10%
- vi. 8 µL TEMED

Stacking

- vii. 3.4 mL H₂O
- viii. 0.83 mL acrilamida/bisacrilamida al 30%
- ix. 0.63 mL Tris 1.0 M pH 6.8
- x. 0.05 mL SDS 10%
- xi. 0.05 mL PSA 10%
- xii. 5 µL TEMED

- c. Preparar el doble de volumen de gel de corrida (i-vi) para preparar 4 geles para electroforesis 2D.

Precauciones: Debido a la toxicidad neurológica de la acrilamida, el uso de guantes y túnica es imprescindible (como siempre en el laboratorio). Evitar contacto con la piel.

¹ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), conteniendo glutamina (4 mM), piruvato de sodio (110 mg/L), glucosa (4.5 g/L) penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 mg/L) y 10 % suero bovino fetal (SBF) previamente inactivado por calor (30 min a 56 °C).

Martes 14**1. Activación celular.**

- a. Equilibrar el medio DMEM a 37° C.
 - b. Retirar el medio de los cultivos preparados el día anterior y adicionar 10 mL de medio DMEM fresco a cada frasco.
 - c. Rotular los frascos por duplicado y adicionarles:
 - i. Control (C): DMEM sin suero.
 - ii. LPS+PMA: LPS 80 µL de stock 1mg/mL (8 µg/mL final), PMA 40 µL de stock 1mg/mL (4 µg/mL final) cada 10 mL de DMEM sin suero.
2. Incubar en estufa por 1 hora.
 3. Adicionar ortovanadato de sodio (Na_3VO_4 , inhibidor de fosfatasa) 5 µL de una solución 200 mM (100 µM final), e incubar en estufa por 20 minutos adicionales.
 4. Descartar el medio y lavar con PBS equilibrado a temperatura ambiente dos veces, repetir con cada uno de los frascos.
 5. Recoger las células en 10 mL de PBS, empleando rastrillos.
 6. Centrifugarlas a 3000g por 15 minutos.
 7. Lisar empleando 500 µL de buffer de lisis y pasar las soluciones resultantes a tubos eppendorf rotulados adecuadamente.
 8. Determinar la concentración de proteína en cada una de las muestras mediante la técnica del ácido bicinconínico (ver Anexo 1).
 9. Realizar las diluciones correspondientes.
 - a. Para 1D: Preparar 50 µL de una solución que contenga 1 mg de proteína/mL en buffer de la muestra 4x, llevar a 100° C por 3 min. Reservar congelados a -20° C.
 - b. Para 2D: Preparar 500 µL una solución que contenga 400 mg de proteína/mL en buffer de rehidratación.
 10. Poner a rehidratar los strips para el IEF con 150 µL/strip de las soluciones que contienen las muestras preparadas en b, como se explica en el Anexo 2 e incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Miércoles 15

1. Correr la primera dimensión como se especifica en el Anexo 2. Luego de terminada la corrida reservar los cassetes a -80° C
2. Retirar del freezer las muestras para correr los geles 1D, equilibrar a temperatura ambiente.
3. Preparar el buffer de corrida 1x, sembrar las muestras y correr a 100V refrigerando.
4. Colocar uno de los geles a teñir con azul coloidal, y el otro gel a transferir por una hora a 100V a 4° C.
5. Bloquear toda la noche en solución de bloqueo.

Jueves 16

1. Continuar con el revelado del WB como se describe en el Anexo 3.
2. Desteñir el gel 1D colocado en azul coloidal usando agua destilada.
3. Documentar (escanear e imprimir) y cortar las bandas de interés de acuerdo al resultado obtenido en el WB. No olvidar tomar nota sobre el gel escaneado de las bandas cortadas.
4. Colocar las bandas cortadas en tubos eppendorf numerados con el número de banda correspondiente, congelar.
5. Segunda dimensión:
 - a. Retirar 2 strips y 2 geles del frío y equilibrar a temperatura ambiente.
 - b. Incubar los strips en las soluciones de DTT y IAA, como se describe en el protocolo de 2D.
 - c. Colocar los strips sobre los geles y correr la segunda dimensión como se describe en el protocolo correspondiente.
 - d. Mientras corre la segunda dimensión preparar la solución de transferencia y los contenedores para la tinción con coloidal y el bloqueo.
 - e. Colocar uno de los geles a teñir con coloidal y con el otro gel realizar la transferencia como se describe en el protocolo de Western Blot, poner a bloquear toda la noche.

Viernes 17

1. Western Blot 2D: Exponer la membrana a los anticuerpos primario y secundario como se describe en el Anexo 3.
2. Desteñir el gel 2D teñido con coloidal con agua destilada.
3. Documentar los resultados y cortar spots para estudios de masa, en particular donde puedan observarse diferencias entre el control y tratado. Congelar para digerir la semana próxima.

Lunes 20

1. Discusión de lo hecho hasta el momento y de la pertinencia de la realización de inmuno precipitación.
2. Decoloración de geles, scaneo y selección de bandas a cortar.

Martes 21- Jueves 23

1. Preparación de muestras para masa, ver Anexo 5.

*Anexo 1***Medida de concentración proteica utilizando ácido bicinónico (BCA) en placa de 96 well, con BSA como estándar.****Diluciones de albúmina bovina (BSA)**

BSA estándar (mg/mL)	BSA stock (2 mg/mL)	H₂O (MiliQ)
	μL	μL
1	200	200
0.8	160	240
0.6	120	280
0.4	80	320
0.2	40	360
0.1	20	380

Reactivo de trabajo: mezcle 50 partes de reactivo A (ej. 20 mL) con 1 parte de reactivo B (0.4 mL)

Muestras: diluciones apropiadas con concentración proteica aproximada de 0.2-1 mg/mL (por Abs 280 nm si es posible o calculando a partir de 25 μg/10⁶ células).

Procedimiento:

Cargue 25 μL de estándar y muestras en la placa, con sus replicas y diluciones correspondientes, agregue 200 μL de reactivo de trabajo, selle, e incube a 37^o C por 30 minutos.

Cuando la placa esté a temperatura ambiente, lea la absorbancia en lector de placas a 562 nm.

*Anexo 2***Protocolo para electroforesis 2-D
usando el ZOOM IPG-Runner System (Invitrogen)****1. Rehidratación**

Materiales:

- Buffer de Rehidratación
 - Agregar a 15 mL de agua nanopura: 12 gr de urea (8 M), 0.5 gr de CHAPS (2%), 125 μ L de ampholytes (según el pI de los strips), 0.5 mL de 0.1% bromophenol blue,
 - llevar a 25 mL y conservar a -20°C en alícuotas de 1 mL
 - Agregar DTT (20 mM final) inmediatamente antes de usar.
- Muestra
- Zoom strips.
- Zoom IPGRunner cassettes
- Cinta selladora
- **Guantes**

Procedimiento:

- Preparar la muestra proteica para cargar 10 μg para teñir con plata o 40-50 μg para Coomassie en un volumen final de 155 μl (la capacidad maxima de proteina es de 400 μg).
- Es muy importante que la concentración de sales en la muestra sea menor a **10 mM**, para lo cual lo más conveniente es disolver la muestra directamente en el buffer de corrida o si es necesario dializarla.
- Cargar la proteína en buffer de rehidratación en cada pozo localizado en el extremo redondeado del Cassette.
- Remueva el Strip (gel de la 1ra dimensión) del paquete
- Sostenga el Strip por el extremo básico (-) usando pinzas, con el gel mirando hacia arriba. Usando sus dedos para guiar el strip, deslice suavemente el extremo ácido (+) del strip dentro del canal a través del pozo, hasta que este extremo toque el final del canal. Evite la introducción de burbujas grandes.
- Selle los pozos con la cinta selladora provista. Ayude al sellado con un tubo o pipeta.
- Incube el cassette por 1, 2 horas o toda la noche a Temp. ambiente.

2. Enfoque Isoeléctrico (IEF)

Materiales:

- Agua Desionizada
- Papel de Filtro
- Fuente de poder
- Electrode Wicks

- Cuba (Zoom IPGRunner Mini-Cell)
- Guantes

Procedimiento:

- Remueva la cinta selladora y los dos dispositivos de carga del cassette, exponiendo el adhesivo del film de cobertura. Verifique que queden expuestas porciones del gel en los extremos catódicos y aniónicos del cassette. La posición del gel puede ajustarse usando pinzas.
- Coloque un papel de filtro provisto (electrode wicks) en cada extremo del Cassette sobre el adhesivo, usando las marcas negras de alineamiento. Asegure la unión aplicando presión suave.
- Adicione sobre los papeles de filtro 600 μ L de agua destilada (no ultrapura) a cada papel de filtro.
- Arme el sistema cuidando que los filtros hagan contacto con los electrodos. En caso de usar un solo cassette usar en el lado opuesto el cassette ciego (buffer dam). Deslizar el cassette en el interior de la cuba, seguido del soporte y trabar.
- Llenar la cámara externa con 600 mL de agua destilada, cuidando que **el agua no entre a la cámara interna.**
- Colocar adecuadamente la tapa, y conectar los cables a la fuente de poder.
- Encender y programar la fuente de poder como sigue:
- Para strips de rango amplio:
 - 175 V por 15 min, 175-2000V creciendo por 45 min, 2000 V por 30 min.
- Dependiendo de la calidad, y concentración de la muestra proteica y del rango de pH del strip puede ser necesario ajustar el tiempo de enfoque.
- Controlar que el azul de bromofenol fluya hacia el ánodo².
- Al final de la corrida apague el equipo, y desconecte los electrodos
- Desarmado de la cuba: primero descarte el agua, destrabe el sujetador y remueva el cassette.
- Apoye el cassette sobre una superficie plana, manténgalo firmemente mientras remueve la cubierta transparente.
- Remueva los strips usando pinzas
 - los strips pueden mantenerse a -80°C en un contenedor cerrado.

² Durante la corrida preparar: el gel y el buffer de corrida si no se prepararon antes (recomendado), la agarosa, y el buffer de equilibración (Ver página siguiente).

3. 2ª DIMENSION - SDS-PAGE

Material:

- **Buffer de equilibración** (preparar en tubo falcon de 50 mL): 50 mM Tris-HCl pH 8.8 (1.7 mL del buffer 1.5 M pH 8.8), 6 M Urea (18.02 g), 30 % Glicerol (15 mL), 2 % SDS (1 g), 0.002 % Azul de Bromofenol (1 mL de solución al 0.1%), llevar a 50 mL finales con agua MQ.
- DTT
- Iodoacetamida
- Agarosa 0.5% en buffer de corrida (Tris/Gly/SDS), disolver y mantener en baño de agua entre 55-65°C
- **Buffer de corrida** (Tris-Gly): 250 mM Tris-Base (30.3 g/L), 1.92 M Glicina (144 g/L), 1 % SDS (10 g/L), el pH debe ser ~8.3 **sin ajustar**.
- Gel
- Espátula
- Baño de agua a 55 o 65°C
- XCell SureLock Mini-Cell (la cuba)
- Marcador de peso molecular
- Soluciones de equilibración (preparar justo antes de usar):
 - 50 mg de DTT (65 mM) cada 5 mL de buffer de equilibración.
 - 116 mg de Iodoacetamida (126 mM) cada 5 mL de buffer de equilibración.

Procedimiento:

- Elimine cualquier exceso de líquido del cassette con toalla de papel.
- Remueva el film protector.
- Remueva un strip del cassette y colóquelo en el tubo falcon que contiene DTT, cuidando que la base plástica quede apoyada sobre la pared del tubo (no el gel).
- Incube en posición horizontal por 15 min, con agitación suave.
- Descarte el buffer tratando de escurrir el resto sobre una toalla de papel.
- Agregue el buffer conteniendo Iodoacetamida e incube de la misma manera por 15 min.
- Transcurrida la derivatización, extraiga y escurra el strip.
- Corte los extremos de plástico sobrantes e inserte el strip sobre el gel (2ª dimensión) asegurándose de que el gel de la 1ra dimensión mire hacia delante en el cassette. Controle que el strip quede bien alineado y sin burbujas.
- Agregue 400 µL de 0.5% agarosa al pozo que contiene el strip, cuidando de no sobrepasar al pozo que lleva el estándar de peso molecular.
- Colocar el gel en la cuba de electroforesis, el buffer de corrida y el estándar de peso molecular, correr a 100 V o como de costumbre, hasta que el frente llegue al borde del gel. Mientras corre la electroforesis preparar las soluciones y materiales para realizar la transferencia.

*Anexo 3 - Western Blot***Reactivos:**

Solución de lavado: 1X TBS-T: diluir al décimo la solución 10X de TBS y adicionarle 0.05% de Tween 20.

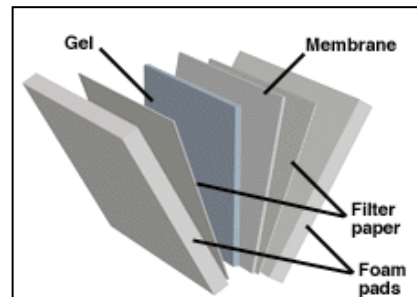
Solución de Bloqueo: Membrane Blocking Solution Invitrogen (Ref 00-0105) (También puede utilizarse como bloqueante una solución 1% BSA en TBS-T).

Diluciones del Ac y Conjugado: en solución 1X TBS-T

Procedimiento:

Hidratar el PVDF colocándolo unos segundos en metanol 100% y luego en buffer de transferencia por 15 min.

Preparar el sándwich de transferencia colocando en el centro el gel y la membrana de PVDF, y a cada lado papel de filtro y esponja, como se muestra en el esquema. Todo debe estar inmerso en la solución de transferencia y es muy importante que no queden burbujas entre el gel y la membrana porque impiden la transferencia de las proteínas.



No olvidar que las proteínas en el SDS-PAGE se encuentran cargadas negativamente, por lo cual debe colocarse el gel en el lado del cátodo (negro) y la membrana (PVDF) en el ánodo (rojo).

Transferencia: Se realiza la transferencia durante 1 hora a 100 V.

Bloqueo: El bloqueo se realiza incubando la membrana ON a 4°C en solución de bloqueo.

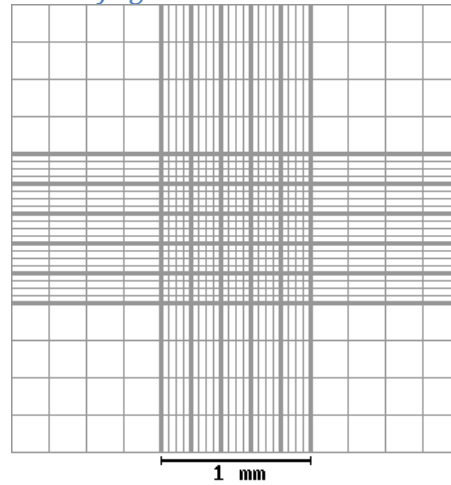
Lavados: 2 lavados de 10 min cada uno con TBS-T, en agitación.

Incubación con Ac primario: Escurrir e incubar la membrana durante 1 hora con una dilución 1/800 del anticuerpo anti-P-Tyr en TBS-T (PY Plus Mouse Ac. antiPTyr Invitrogen 136600). Para minimizar el gasto de anticuerpo lo que hacemos es poner sobre un vidrio un trozo de parafilm un poquito más grande que la membrana, luego colocamos la membrana, y sobre ésta la dilución del anticuerpo. (menos de 2 ml alcanza para cubrir la superficie). Se puede cubrir con algo mientras se incuba.

Lavados: Lavar incubando la membrana en un recipiente cerrado con al menos 50 ml de TBS-T, durante 5 min, en agitador orbital a velocidad media. Realizar 3 lavados.

Incubación con Ac secundario: Escurrir y cubrir la membrana con la solución de Anticuerpo anti-ratón conjugado con IRDye 800 CW 1/10000 (Odyssey) en TBS-T. Incubar durante 1 h a temp ambiente.

Lavados: Repetir igual que en el lavado previo.
Escurrir la membrana y escanear.

Anexo 4 – Recuento de macrófagos en cámara de Neubauer


- Luego de desprender los macrófagos de la superficie, homogeneice bien la solución para que las células no queden en el fondo.
- Tome 20 μL de medio con células y agregue 20 μL de Azul de Tripán
- Siembre 10 μL de la mezcla en cada hendidura para llenar la cámara a ambos lados
- Las células viables se verán refringentes y las muertas, azules.
- La cámara posee un alto de 0.1 mm
- Se deben contar las células contenidas en 5 cuadrantes de cada lado, un total de 10 cuadrantes.
- $0.1 \text{ mm} * 1 \text{ mm} * 1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \mu\text{L}$ es el volumen total de cada cuadrante.
- Las células totales presentes en los 10 cuadrantes se suman, y equivalen a N° de cél. / μL . Multiplique el valor obtenido *1000 para obtener N° de cél./mL
- Para obtener el N° de cél. totales en el volumen de la botella:
 $\text{N}^\circ \text{ de cél.}/\mu\text{L} * 1000 * \text{factor de dilución} * \text{Vol. total de medio en botella}$

Anexo 5. Preparación de muestras para espectroscopía de masa

Es muy importante prevenir la contaminación de las muestras con queratina, por lo que este procedimiento debe realizarse bajo condiciones muy limpias (túnica, guantes, flujo laminar).

PROCEDIMIENTO:

A. Corte del gel, desteñido y digestión con tripsina.

1. Corte las bandas (1D) o spots (2D) de interés con un bisturí.
2. Transfiera las piezas de gel a un tubo de microcentrífuga.
3. Desteña las piezas de gel de Coomassie, agregando 100 μL de bicarbonato de amonio 0.2 M pH 8/acetoniitrilo (1:1, vol/vol) e incube por 30 min a 30° C en un termomixer a 1400 rpm, remueva y descarte el buffer. Repita este paso dos veces.
4. Agregue 100 μL de acetoniitrilo e incube in la misma condición que en el paso previo. Cuando la pieza de gel se vuelva blanca y encoje, remueva el acetoniitrilo.
5. Las muestras ahora están listas para la digestión “en gel”. Agregue 10 μL de solución de tripsina (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tripsina en bicarbonato de amonio 67 mM pH 8) a cada spot.
6. Coloque los tubos con piezas de gel en un termóstato con circulación de aire e incube las muestras toda la noche a 37° C.

B. Extracción de los péptidos. Tenga cuidado especial en no perder las piezas de gel durante la extracción.

7. Tome el sobrenadante y consérvelo en tubos de microcentrífuga limpios.
8. Agregue 100 μL de buffer de extracción (60% acetoniitrilo/0.1% TFA) a cada tubo e incube por 1 hora a 30° C en un termomixer a 1400 rpm.
9. Colecte el sobrenadante in el mismo tubo usado en el paso 1 (NO descarte la pieza de gel).
10. Repita el paso 2 y colecte el sobrenadante in el mismo tubo que en el paso 2.
11. Seque en una cetrífuga de vacío por 45 min a 30° C (hasta que el volumen final sea de 20 μL).
12. Almacene a -20° C hasta el uso.

C. Remoción de sales de la muestra, concentración y aplicación en las placas del MALDI

13. Descongele las muestras
14. Moje la punta OMIX tips C18MB 10 μL , aspirando 20 μL de una solución al 50% acetoniitrilo en agua. Repita.
15. Equilibración: aspire 20 μL de la solución 0.1% TFA y descarte el solvente. Repita.
16. Aplique la muestra: aspire y dispense la muestra en los OMIX tips 10 veces.
17. Lave el tip aspirando 20 μL de la solución 0.1% TFA y descarte el solvente. Repita.

18. Eluya los péptidos aplicando 2.5 μ L de solución de matriz (CHCA en 60% acetonitrilo/0.1 % TFA) y dispense directamente en la placa del MALDI, fraccionada en 2 o 3 gotas.

2. Modificación Nitroxidativa del Citocromo c

1^{er} Día. Incubación de citocromo c con peroxinitrito: adición de peroxinitrito en bolo y flujos.

Determinación de la concentración de peroxinitrito: se realiza un espectro de 200 a 400 nm en NaOH 1 M diluyendo de la solución stock de peroxinitrito a 1:1000 o 1:500. Calcular la concentración en base al coeficiente de absorptividad molar a 302 nm de $1.67 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Reducción de citocromo c Fe^{3+} a citocromo c Fe^{2+} , se prepara una solución de citocromo c 500 μM en amortiguador fosfato de potasio y se adiciona ditionite de sodio sólido observando el cambio de color. Se incuba durante 15 min y se elimina el exceso de ditionite con una columna PD-10 previamente equilibrada con fosfato de potasio 200 mM DTPA 0.1 mM pH 7.0. Se mide la concentración de citocromo c reducido a 550 nm $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La adición en bolo de peroxinitrite se realiza de la siguiente forma: 200 μM de cytochrome c de corazón de caballo disuelto en amortiguador de fosfato de potasio 200 mM con 100 μM de DTPA, pH 7.0, se agrega peroxinitrito del stock para alcanzar concentraciones que correspondan a 1 mM cada bolo llegando a 18 mM final. Como control se realiza la adición reversa agregando a la solución amortiguadora el peroxinitrito y luego el citocromo c.

Adición de peroxinitrito en flujo. En condiciones similares a las descritas anteriormente, 200 μM de citocromo c en 200 mM de amortiguador fosfato de potasio con DTPA 100 μM pH 7.0, se inyecta el peroxinitrito con una jeringa con control de flujo (motor-driven syringe) a una velocidad de 0.13 mL/min durante 30 min con agitación continua en los tubos de reacción.

Observación de los cambios espectrales del citocromo c

Se registran los espectros de las distintas muestras de citocromo c control y tratadas con bolos de peroxinitrito en dos rangos de longitud de onda: 1- observación de la banda de Soret del citocromo c 330 a 430 nm, 2- de 550 a 650 nm y 3- de 650 a 750 nm. Ajustar las diluciones de citocromo c para optimizar la

señal del espectrofotómetro y colocar la misma concentración de citocromo c en la celda del espectrofotómetro. Se puede utilizar el $\epsilon_{410\text{ nm}} = 106\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para calcular la concentración de citocromo c.

2^{do} Día. Electroforesis del citocromo c

Se preparan dos geles de acrilamida al 12% con SDS (PAGE-SDS) utilizando las recetas estándares. También se prepara un gel nativo de acrilamida al 15% en amortiguador Tris-Gly 0.22 M pH 8.3 y con un gel espaciador de 3.5% (utilizar método de Adriana Cassina ver referencia más abajo).

Se selecciona las muestras para realizar las corridas de electroforesis. Las muestras para geles de SDS-PAGE son mezcladas con el amortiguador de carga con SDS y beta-mercaptoetanol y se incuban 5 min a 95°C previo al sembrado de los geles. Uno de los geles de SDS-PAGE se destina a la tinción con azul de Coomassie y el otro se destina a análisis por western-blot. Con este último gel se realiza una transferencia semi-seca. Luego de la transferencia (unos 60 min) se tiñe la membrana con rojo Ponceau para comprobar que la transferencia fue exitosa. El rojo Ponceau se lava con PBS. La membrana se deja toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo (PBS con 5 % de leche).

Las muestras para el gel nativo son seleccionadas y se mezclan con el correspondiente amortiguador de carga que posee azul de Coomassie y glicerol pero no SDS ni beta-mercaptoetanol, tampoco se someten estas muestras a desnaturalización térmica. Las muestras se cargan en el gel nativo pero se invierten los electrodos de la cuba de electroforesis a su uso habitual, corriendo las muestras del polo positivo (ánodo) hacia el polo negativo (cátodo). Este gel nativo se tiñe con azul de Coomassie.

3^{er} Día. Revelado de anticuerpo anti-nitrotirosina, preparación de las muestras para la digestión con tripsina y medidas de actividad peroxidática de las muestras de citocromo c.

La membrana se incubaba con el anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (dilución 1:2000) en PBS con Tween 0.6 % durante 60 min con agitación y a

temperatura ambiente. La membrana se lava con PBS-Tween 0.6% 4 veces durante 5 min cada vez. Se adiciona el anticuerpo secundario anti-rabbit (IR Dye 800 o 680) en una dilución 1:20.000 y se incuba durante 60 min con agitación a temperatura ambiente. Finalmente se lava la membrana en forma similar al anticuerpo primario con PBS-Tween 0.6 % y se revela en el Odyssey.

Del gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie se seleccionan muestras para realizar la digestión in-gel con tripsina para terminar de hacer esto en el Pasteur al día siguiente (ver Anexo 5).

Actividad peroxidasa o peroxidática del citocromo c. Se realizarán dos ensayos de actividad peroxidática del citocromo c uno utilizando ABTS y el otro utilizando luminol como sustratos oxidables respectivamente. El ensayo con ABTS se realiza con citocromo c 0.6 μM en amortiguador fosfato de potasio 100 mM, con DTPA 0.1 mM pH 7.2, ABTS 1.2 mM y se sigue espectrofotométricamente la formación de ABTS^+ a 420 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) frente al agregado de H_2O_2 1.2 mM final. El ensayo con luminol se realiza en placas de 96 wells sembrando citocromo c 100 nM en el mismo amortiguador fosfato de potasio-DTPA utilizado en el ensayo con ABTS y adicionando luminol 30 μM . La reacción se desencadena con el agregado de H_2O_2 1 mM final. Se lee la placa en función del tiempo durante 60 min midiendo la emisión total de luz.

4^{to} Día. Análisis por espectrometría de masa del citocromo entero y análisis de las muestras digeridas por tripsina.

Bibliografía:

Thomson, L. *et al*, Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems

Arch.Biochem.Biophys. (1995) 319(2):491-7.

Cassina, A. *et al*, Cytochrome c nitration by peroxynitrite *J Biol Chem* (2000) **275**(28), 21409-21415.

Batthyany, C. *et al*, Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite *Biochemistry* (2005) **44**(22):8038-46.

Souza, J.M. *et al*, Nitrocytochrome c: Synthesis, Purification and Functional Studies, *Methods in Enzymology* (2008) **441**:197-215