

CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS POR CARBONILACIÓN EN DIVERSOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Alondra E. Díaz-Acosta* y Jorge Membrillo-Hernández**

Lab. de Microbiología y Genética Molecular, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. C.P. 04510, México, D.F.
E-mail: *alondradiaz@biomedicas.unam.mx; **jmh@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

El metabolismo celular aeróbico, al utilizar dioxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria causa inevitablemente la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) que oxidan cualquier macromolécula a su alcance (DNA, lípidos y proteínas). La investigación de los mecanismos de oxidación de proteínas se ha intensificado en los últimos 20 años debido a la creciente evidencia que ha correlacionado procesos como el envejecimiento y diversas patologías humanas con el aumento de la oxidación proteica. Las proteínas sufren varios tipos de oxidación; una de ellas, la formación de grupos carbonilo, ha sido utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos. A pesar de que se desconocen los mecanismos que vinculan oxidación proteica y procesos como proteólisis, apoptosis y reproducción nos encontramos cerca de descubrir el papel de la oxidación proteica en la fisiología celular.

Palabras Clave: Envejecimiento, Especies Reactivas de Oxígeno, estrés oxidativo, oxidación, proteólisis.

ABSTRACT

Production of Reactive Oxygen Species (ROS) is an unavoidable consequence of the aerobic metabolism. Due to the accumulating experimental data relating protein oxidation to cell processes such as ageing and diverse human diseases, research in this area has been greatly increased. Proteins undergo different types of oxidative modifications, in particular, the formation of carbonyl groups, has been extensively used in the studies focused on the determination of the extent of protein damage. Despite the fact that the mechanisms linking protein oxidation and cellular processes such as proteolysis, apoptosis or reproduction have yet to be elucidated, we are close to understand the role of protein oxidation in cell physiology.

Key Words: Ageing, Reactive Oxygen Species, oxidative stress, oxidation, proteolysis.

INTRODUCCIÓN

DE LA APARICIÓN DEL DIOXÍGENO EN LA TIERRA AL ESTRÉS OXIDATIVO

En la atmósfera de la Tierra primitiva prevalecía un ambiente reductor en el que surgieron las primeras manifestaciones de vida hace 3.5 millones de años. La vida entonces era por consecuencia anaeróbica, tal vez similar a los microorganismos anaerobios de nuestros días. Probablemente la vida hubiera estado confinada a organismos microscópicos marinos si las condiciones atmosféricas no hubieran sufrido un cambio radical: la aparición de dioxígeno (O_2) hace

aproximadamente 2.5 millones de años. Existe evidencia geológica que sustenta la hipótesis de que la evolución de la fotosíntesis en las algas verde-azules o cianobacterias tuvo como consecuencia la acumulación progresiva de O_2 . Las grandes cantidades formadas de este gas permitieron la formación de ozono (O_3) en la estratósfera, el cual creó un filtro de radiación ultravioleta (UV) solar. Este hecho podría haber beneficiado el desarrollo de vida en la Tierra, no sólo en las masas de agua terrestres. Sin embargo, para la vida anaeróbica existente, el dioxígeno pudo haber representado un agente tóxico, dado que muy probablemente los organismos presentes no contaban con mecanismos antioxidantes que los protegieran. Muchos organismos anaerobios debieron haber muerto en el camino de

la evolución hacia la aerobiosis; otros, se confinaron a nichos anóxicos y son tal vez los antecesores de la vida anaeróbica que hoy conocemos; aún otros, llegaron a desarrollar sistemas, no sólo de protección contra el dioxígeno, sino también mecanismos que aprovecharan su diferencia de potencial redox para obtención de energía¹.

La ventaja que presenta el dioxígeno para la obtención de energía por medio de cadenas de transporte de electrones lleva a olvidar su toxicidad. El dioxígeno es un diradical pues tiene dos electrones no apareados pero de *spin* o giro paralelo por lo cual no es *per se* altamente reactivo. No obstante, existen otras formas más reactivas de oxígeno conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs): el oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) como se muestra en la Figura 1.

La naturaleza inespecífica de algunas de las proteínas con actividad redox en la cadena respiratoria provoca la transferencia de electrones a cualquier aceptor con mayor potencial como el dioxígeno, cuya molécula es lo suficientemente pequeña y se introduce en el sitio activo de estas proteínas generando el anión radical superóxido y peróxido de hidrógeno por medio de reducciones secuenciales univalentes². Estas especies en realidad son poco reactivas y su toxicidad radica en que a partir de ellas se generan especies mucho más reactivas como el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$). Cuando el H_2O_2 se reduce con metales divalentes como el hierro y el cobre aceptando un electrón no apareado se produce el HO^{\cdot} por medio de la reacción de Fenton. Por otra parte, el $^1\text{O}_2$ se genera por la excitación del dioxígeno, la dismutación espontánea de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y la descomposición de H_2O_2 (ver Figura 1). El $^1\text{O}_2$ y el HO^{\cdot} reaccionan

rápidamente con DNA, proteínas y lípidos produciendo daños y cambios estructurales en las células que muchas veces son irreversibles. El desbalance entre la producción y la eliminación de EROs intracelularmente, a favor de su producción, se denomina estrés oxidativo^{3,4}.

Aunque la investigación sobre la oxidación de biomoléculas se ha centrado en DNA y lípidos, a lo largo de los últimos 20 años, diversos estudios han demostrado la importancia de la oxidación de proteínas en procesos celulares como el envejecimiento y ciertas patologías, lo cual ha fomentado los estudios en el área. Posiblemente la complejidad del estudio de proteínas como blancos de oxidación haya representado un gran reto experimental. Esta revisión se enfoca en desglosar algunos de los aspectos más relevantes y de los cuales tenemos mayor información con respecto a la oxidación proteica.

CAUSAS DE LA OXIDACIÓN PROTEICA

En general, cualquier factor que ocasione estrés oxidativo puede causar oxidación proteica, por ejemplo, la disminución en la eficiencia de los sistemas antioxidantes de defensa, el aumento en la producción de EROs, una disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas⁵⁻⁹.

La concentración intracelular de hierro también determina la producción de EROs y la carbonilación de proteínas^{10,11}. En levaduras, se ha demostrado que una mutante afectada en la síntesis de la proteína que almacena hierro, YFH1p, aumenta la carbonilación, probablemente porque aumentan también los niveles de hierro libre y la producción consecuente de EROs¹².

Los aumentos en la producción de EROs son característicos de células fisiológicamente viejas. Por ejemplo, se ha demostrado que la efectividad de la cadena respiratoria en mitocondrias de levadura depende de la edad de la célula, pues al envejecer disminuye la actividad de la ATP sintasa y aumenta la producción de superóxido¹³. Este aumento en la producción de EROs se lleva a cabo por un estancamiento en el flujo de electrones, lo que aumenta la probabilidad de reducir parcialmente la molécula de dioxígeno.

La actividad del proteosoma también disminuye en células viejas, en diversos tejidos humanos, en cultivos primarios y en bacterias, lo cual produce la acumulación de proteínas dañadas por diversos estreses que tienden a desnaturalizarse y agregarse en complejos hidrofóbicos cuya proteólisis es más difícil y con frecuencia requiere de proteínas accesorias que desagreguen dichos complejos¹⁴⁻¹⁶.

Adicionalmente, la oxidación de proteínas ocurre cuando aumenta la producción de sustratos más susceptibles. La

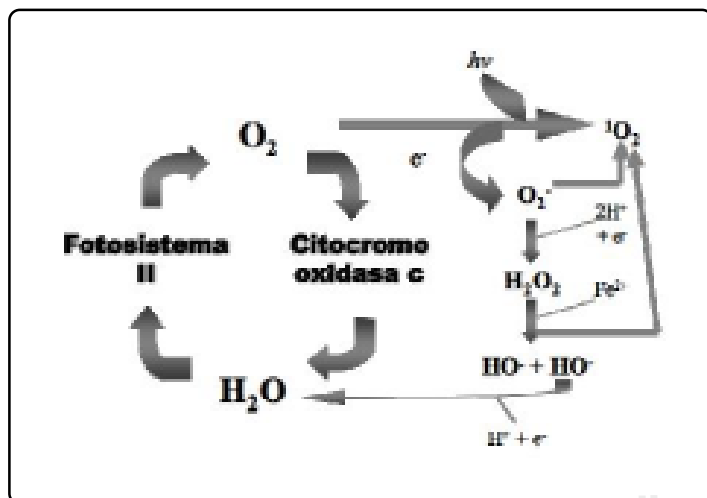


Figura 1. La fotosíntesis y la respiración aeróbica forman un ciclo continuo de oxidación del agua y reducción del dioxígeno que provoca que éste último se acumule en la atmósfera. Las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) producidas en el metabolismo aeróbico son el oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot})³.

susceptibilidad en este caso se debe al mal plegamiento de las proteínas o a la producción de péptidos incompletos por errores en la traducción, ya sea por el uso de antibióticos que interfieren con la traducción o bien por mutaciones que afectan la capacidad de los ribosomas de corregir errores. Esta oxidación es poco específica, comparada con la encontrada en células viejas pues cualquier sustrato no plegado o cuya síntesis fue abortada es un posible blanco de oxidación^{5,17}.

QUÍMICA DE LA OXIDACIÓN PROTEICA

La oxidación es la cesión o pérdida de electrones de los átomos de un elemento. A nivel molecular, la pérdida de electrones conlleva el cambio en el grado de oxidación de un grupo químico ya sea por reacción directa con especies reactivas de oxígeno o por reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidativo.

Varias especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar potencialmente con cualquier molécula dentro de la célula, ya sea ácido nucleico, lípido o proteína, y oxidarla. Cada EROs presenta un potencial de oxidación diferente de acuerdo a su reactividad. El daño oxidativo a DNA y lípidos ha sido extensamente descrito con anterioridad¹⁸⁻²¹, por lo que en esta revisión nos enfocaremos al daño oxidativo en proteínas.

El estudio de la oxidación de proteínas mediada por radicales libres comenzó a principios del siglo XX, en 1906²², con los reportes de Dakin sobre la oxidación de aminoácidos en sistemas de Fenton y con Hopkins, quien describió el papel del glutatión como un anti y prooxidante, dependiendo de la ausencia o presencia de metales de transición²³. A pesar de la creciente evidencia sobre el papel de la oxidación de proteínas en varios sistemas biológicos, el estudio de este tópico fue desplazado durante muchos años por el de oxidación en lípidos y DNA. Posiblemente, las diferencias en las consecuencias fisiológicas que a nivel celular representa la oxidación de una única molécula de DNA *versus* la que representa la oxidación de proteínas, de las que normalmente existe más de una copia y además, son resintetizables, así como la complejidad de las proteínas como blancos, de los productos y de los mecanismos de oxidación

podieron ser algunas de las causas de la poca atención que la oxidación proteica tuvo durante años.

Las proteínas poseen diversos grupos con diferentes grados de oxidación, los cuales pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. Dependiendo de la ERO a la que se expongan las proteínas la oxidación puede ser específica (como en el caso de oxidación catalizada por un metal, que daña a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre o con hierro libre por formación de radical hidroxilo) o inespecífica (como ocurre en la oxidación por radiación en la que se produce oxígeno en singulete).

La oxidación de proteínas también puede ser clasificada en reversible o irreversible como se resume en la Tabla I. La oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox, como en el caso de la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína. Otras formas de oxidación reversible son la glutatiónilación y la S-nitrosilación.

La oxidación irreversible de proteínas se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por reacción de proteínas con EROs, algunos de los cuales son radicales libres generados por radiación ionizante y por oxidación catalizada por un metal (OCM).

La radiación ionizante produce la radiólisis del agua lo cual forma radicales hidroxilo que al reaccionar con los hidrógenos de los carbonos α de la estructura central de las proteínas, generan radicales en carbonos relativamente estables (por deslocalización con los electrones en las funciones amida adyacentes). En presencia de oxígeno se genera el radical peroxilo el cual probablemente reaccione por medio de una eliminación que produce $\text{HO}_2\cdot$ y una imina que subsecuentemente se hidroliza y produce la ruptura del enlace peptídico. Alternativamente, el radical en carbono podría obtener un átomo de hidrógeno de

Modificación por oxidación	Tipo	Consecuencia y/o función
Carbonilación	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Nitración	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Formación de enlaces proteína-proteína	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Ruptura de enlaces peptídicos	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Glutatiónilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica
S-nitrosilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica

Tabla I. Posibles consecuencias del estrés oxidativo en la función proteica. La producción de EROs puede causar modificaciones químicas en proteínas. Dichas modificaciones, si son irreversibles, están normalmente asociadas con la pérdida permanente de la función y puede producir eliminación o acumulación de las proteínas dañadas. Las modificaciones reversibles normalmente se dan en cisteínas y pueden activar una función proteica o proteger al residuo de la oxidación.

algún grupo cercano, para generar un hidroperóxido que se descompondría en un radical alcoxilo y finalmente produciría también la ruptura del enlace peptídico²⁴⁻²⁶. En ausencia de oxígeno, un radical en carbono puede reaccionar con otro igual para formar derivados proteína-proteína.

La oxidación catalizada por un metal (OCM) se produce por reacción del H_2O_2 con un metal de transición (Fe^{2+}/Fe^{3+}) produciendo el radical hidroxilo ($HO\cdot$) (Reacción de Fenton) el cual, a su vez, reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes al sitio de unión a metal de la proteína. La localización de la reacción de oxidación proteica se debe a la alta reactividad del radical hidroxilo, el cual no se difunde fuera del sitio donde se genera, sino que reacciona inmediatamente con los residuos cercanos²⁷.

Existen modificaciones extensas en cadenas laterales de las proteínas, producto de la oxidación, entre ellas se encuentra la aparición de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), oxidación de residuos de histidina a oxo-histidina y otros productos de degradación²⁸, de fenilalanina a orto y meta-tirosina²⁹, la conversión de metionina a metioninsulfóxido³⁰ o la degradación oxidativa de triptofano a quinureninas³¹.

BLANCOS DE OXIDACIÓN

En general, el grado de daño oxidativo de un blanco específico depende de varios factores: la concentración del blanco, la constante de reacción del oxidante con el blanco, la localización del blanco con respecto al lugar de generación del oxidante, eventos oxidantes secundarios (reacciones en cadena), reacciones antioxidantes y reacciones de reparación. Con base en estas consideraciones de naturaleza meramente cinética, se han diseñado sistemas computacionales que predicen el grado de daño de diferentes macromoléculas³². Sin embargo, dentro de una célula, parecen ser muchas más las consideraciones a tomar en cuenta para predecir el grado de daño de una macromolécula dada, pues, a la fecha, los datos de modelaje computacional no son consistentes con la evidencia experimental.

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis³³. Aunque se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a oxidarse que otros, una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación.

La carbonilación ocurre principalmente en los residuos prolina, arginina y lisina, pues son los residuos más susceptibles a OCM³⁴. Los productos de la carbonilación de estos residuos son el

semialdehído glutámico (producto de la oxidación de arginina y prolina) y semialdehído aminoadípico (producto de la oxidación de lisina, ver primera parte de la figura dos para la formación de ambos semialdehídos).

La oxidación por generación de grupos carbonilo se lleva a cabo químicamente por cuatro rutas principales. La primera es la oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con EROs; los productos de la oxidación de dichos aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído α -aminoadípico a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina. Recientemente se demostró que los productos carbonilados, que cuantitativamente representan la mayor parte de una medición de carbonilación, son el semialdehído glutámico y en menor grado, el semialdehído aminoadípico³¹.

La segunda ruta de formación de grupos carbonilo involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de α -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo cual conlleva a la formación de péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado α -cetoacilo.

Las dos rutas de oxidación restantes implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilo reactivos formados previamente por reacción directa de biomoléculas con EROs; por ejemplo, por reacción de Michael del grupo amino de lisina, la entidad imidazol de histidina o el grupo sulfidril de cisteína con malondialdehído 4-hidroxi-2-nonenal y 2-propenal (ambos productos de la peroxidación lipídica) y por reacción de cetoaminas, cetoaldehídos y deoxiosonas, que son productos de la reacción de azúcares reductores o sus productos de oxidación, con el grupo amino de residuos de lisina (glicación y glicoxidación, respectivamente)³⁵.

Aunque en principio, cualquier proteína puede ser oxidada por carbonilación, los análisis de diversos organismos han demostrado que existe un patrón específico hacia la oxidación por carbonilación en organismos filogenéticamente no relacionados. Por ejemplo, en *Escherichia coli*, se identificó que el proteoma no se carbonila por igual, y que los blancos específicos no dependen de la cantidad de cierta proteína en un momento dado en el citoplasma. Las proteínas DnaK y GroEL (chaperonas de la familia de las Hsp70 y Hsp60, respectivamente), la proteína tipo histona H-NS, los factores de elongación EF-Tu y EF-G, glutamino sintetasa, glutamato sintasa, aconitasa, malato deshidrogenasa y piruvato cinasa son los blancos de oxidación preferenciales en *E. coli*^{6,36} y homólogos de estas proteínas también han sido identificadas como blancos específicos en plantas³⁷ y en cerebros de pacientes con Alzheimer³⁸.

A la fecha no existe un patrón claro que indique las características estructurales que debe tener una proteína para carbonilarse

preferencialmente. Anteriormente se creía que las proteínas que unen metales de transición, al ser más sensibles a OCM, deberían ser las más susceptibles a carbonilación. Sin embargo, pocas proteínas identificadas como las más carboniladas unen metales de transición, probablemente porque la coordinación a metales es diferente en cada proteína, lo cual cambia el potencial redox del metal de transición.

SISTEMAS DE REPARACIÓN CELULAR DE PROTEÍNAS OXIDADAS

La oxidación es, en la mayoría de los casos, una modificación no reversible a nivel celular por lo que una proteína oxidada puede perder su función, en especial si las oxidaciones tomaron lugar en aminoácidos directamente involucrados con el correcto plegamiento tridimensional del péptido, o bien, si tienen papeles en las interacciones proteína-sustrato-producto, en el caso de enzimas. La pérdida de la función ya sea estructural o enzimática tiene como consecuencia un desequilibrio en el metabolismo celular. Con frecuencia, la única manera de reparar la oxidación de proteínas es la proteólisis de los sustratos oxidados y la síntesis *de novo* de dichas proteínas. Sin embargo, no han sido descritos los procesos fisiológicos que involucran la degradación de aminoácidos provenientes de proteínas oxidadas; tal vez sean degradados como aminoácidos no oxidados, o bien dichos sistemas podrían no existir, por lo que la generación *de novo* implica el uso de aminoácidos recién adquiridos del medio o sintetizados.

De las diversas formas de oxidación proteica posibles, sólo existen mecanismos de reparación para cisteínas oxidadas que han formado puentes disulfuro y para metioninas oxidadas que han formado sulfóxidos.

Aunque la formación de puentes disulfuro implica un proceso oxidativo, a nivel celular existen diversos ejemplos de cambio de conformación y función de proteínas de acuerdo al estado redox de sus cisteínas, por ejemplo, la proteína OxyR, que sensa los niveles intracelulares de H_2O_2 y actúa como un factor transcripcional en presencia de esta ERO. En este caso, la oxidación de un par de aminoácidos implica una activación de la función y no una pérdida total de la misma. La formación de puentes disulfuro parece ser la única oxidación proteica con finalidad funcional.

El ambiente redox citoplasmático es fuertemente reductor, por lo cual bajo condiciones sin estrés, no se encuentran proteínas con rastros de oxidación, como los puentes disulfuro. El aumento de los niveles de puentes disulfuro en las proteínas, ocasionado por estrés oxidativo se ha referido como estrés disulfuro, el cual es reversible por la acción de dos sistemas de reducción dependientes de NADPH: el sistema tioredoxina (tioredoxina reductasa y tioredoxina) y el sistema glutaredoxina (glutatión reductasa, glutatión y tres glutaredoxinas). Estos sistemas están conservados tanto en procariotes como en eucariotes^{39,40}.

La segunda oxidación reversible es la oxidación de metioninas que es reparada por la enzima metionin sulfóxido reductasa. La producción de sulfóxidos genera dos estereoisómeros. La estereoespecificidad de la metionin sulfóxido reductasa, hace que no todos los metioninsulfóxidos generados sean reparables por la misma enzima. Existen dos isoformas de la enzima: MsrA y MsrB, la primera reduce el isómero R-(L-) y la segunda el S-(D-). Ambas isoformas se encuentran altamente conservadas en todos los organismos⁴¹⁻⁴³.

El porcentaje de producción de los dos estereoisómeros es variable y depende del oxidante y del sitio que ocupe la metionina dentro de la estructura proteica^{44,45}. Existen reportes que sugieren que dentro de una estructura proteica, las metioninas alrededor del sitio catalítico podrían ser preferencialmente oxidadas para evitar el paso de EROs al centro catalítico y así, la pérdida de la actividad⁴⁶.

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MEDIR LA CARBONILACIÓN

La oxidación de proteínas provocada por daño directo en lisinas, argininas, prolinas o treoninas, puede generar derivados carbonilos como aldehídos y cetonas²⁴. La carbonilación de proteínas es una oxidación más severa que la generación de metionin sulfóxidos y derivados de cisteína por lo que indican un estrés oxidativo más severo y representan un marcador de oxidación proteica estable.

Aunque la carbonilación es un indicador de oxidación no específico, analíticamente ha resultado más factible y reproducible la medición del grado de carbonilación que el de otros tipos de oxidación proteica como la conversión de tirosina a 3-clorotirosina, 3-nitrotirosina o ditirosina. En general, otros marcadores de oxidación proteica ocurren con una frecuencia menor en varios órdenes de magnitud, comparados a la carbonilación; por lo que se requiere de métodos mucho más sensibles y con frecuencia más costosos^{47,48}.

Los grupos carbonilo han sido detectados y cuantificados por conjugación con 2,4-dinitrofenilhidrazina, fluoresceín hidrazida o tiosemicarbazida, fluoresceinamina o bien, midiendo la incorporación de tritio después de la reducción con borohidruro tritado. La medición por conjugación de las entidades carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina se realiza tanto espectrofotométricamente como por ensayos inmunoquímicos (ver Figura 2).

La inmunodetección hace uso de anticuerpos contra el grupo dinitrofenilo y puede llevarse a cabo tanto por la técnica de *Western Blot*, separando las proteínas en una o dos dimensiones, como por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

CONSECUENCIAS METABÓLICAS DE LA OXIDACIÓN

A) LA OXIDACIÓN PROTEICA Y LAS CHAPERONAS MOLECULARES
La oxidación proteica es una condición de estrés celular que

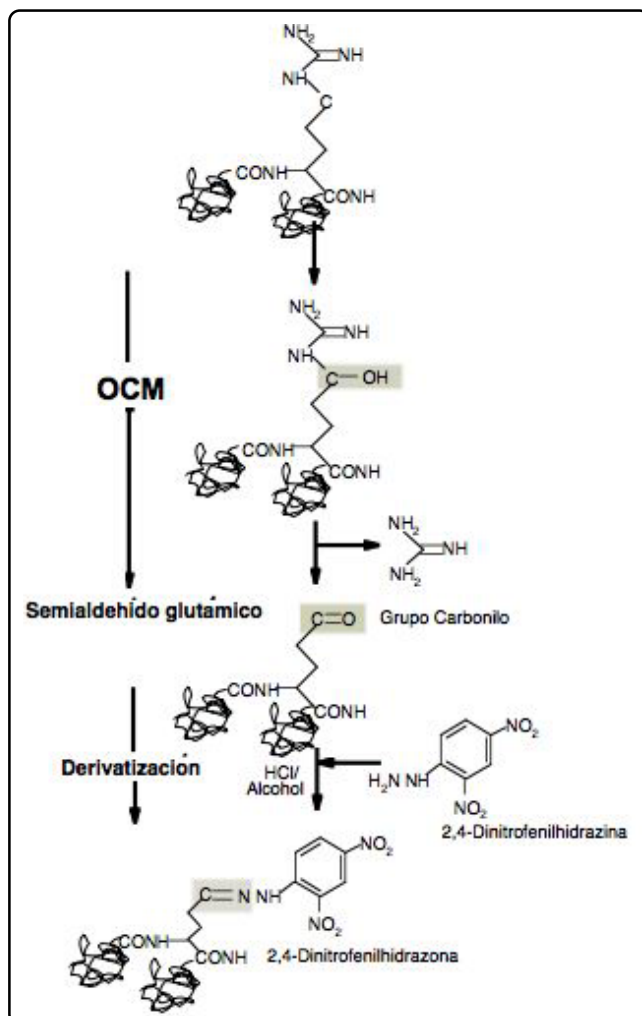


Figura 2. Carbonilación y derivatización. Formación de un semialdehído glutámico a partir de un residuo de arginina como consecuencia de OCM. Para detectar el grupo carbonilo formado se derivatiza con 2,4-dinitrofenilhidrazina. El grupo resultante, 2,4-dinitrofenilhidrazona puede ser detectado con anticuerpos monoclonales o policlonales (Modificado de Nyström³⁴).

ocasiona la inducción de las proteínas de un regulón específico de choque calórico o *Heat Shock Proteins* (Hsp). Aunque originalmente estas proteínas fueron descritas como de respuesta a choque calórico y muchos estudios describiendo su regulación genética han sido publicados, existe evidencia creciente de que éste no es el único estrés al que están vinculadas, pues se ha demostrado que también protegen durante estrés oxidativo, como se observa en la Figura 3⁴⁹⁻⁵¹. El mecanismo molecular de inducción de la síntesis de Hsp por estrés oxidativo es aún desconocido.

Nyström y colaboradores han reportado que la carbonilación de los blancos específicos del proteoma aumenta en cultivos en fase estacionaria tardía de *Escherichia coli* debido a la disminución en la eficiencia y fidelidad de la traducción, lo cual

produce una acumulación de sustratos que no se pliegan correctamente o que son abortados en el proceso^{5,6,17}. Recientemente se demostró que el mal plegamiento de las proteínas no es suficiente para inducir la síntesis de las Hsp, sino que requiere de la carbonilación de dichos sustratos, lo que sugiere que la oxidación proteica podría ser una marca o etiqueta de reconocimiento para las Hsp, no sólo los parches de aminoácidos hidrofóbicos que se exponen al desnaturalizarse las proteínas. La carbonilación preferencial de las chaperonas DnaK y GroEL a lo largo del crecimiento exponencial podría sugerir que participan en la protección de proteínas parcialmente oxidadas o con aminoácidos carbonilados como es el caso de la enzima etanol oxidoreductasa (AdhE) en *Escherichia coli*. DnaK parece sufrir una oxidación acumulativa que la desactiva y parece potenciar la inducción del regulón de Heat Shock en fase estacionaria⁵². Recientemente, nuestro grupo de investigación aportó evidencia que apoya esta hipótesis⁵¹.

El hecho de que las Hsp70 de organismos no relacionados hayan conservado la sensibilidad ante el estrés oxidativo, podría ser un indicador del papel de estas proteínas como sensores de oxidación.

B) OXIDACIÓN Y PROTEÓLISIS

Se ha demostrado que las proteínas oxidadas son mejores sustratos para los sistemas proteolíticos celulares tanto en procariotes como en eucariotes. Por ejemplo, la glutamino sintetasa carbonilada es degradada más rápido que la misma enzima no oxidadada, tanto por extractos crudos de *E. coli* como por purificaciones de proteinasas alcalinas tanto de *E. coli* como de hígado de rata^{53,54}. *E. coli* posee proteinasas específicas, dependientes de ATP, que degradan sustratos oxidados^{55,56}.

En general, se ha encontrado que las proteínas de diversos organismos (*E. coli*, eritrocitos y mitocondrias de hígado y corazón de rata) son más susceptibles a la degradación por proteasas si son expuestas previamente a sistemas de generación de EROs⁵⁷⁻⁵⁹.

En eucariotes, muchas proteínas intracelulares son degradadas por el complejo proteinasa multicatalítico o proteosoma. Se ha encontrado evidencia de que la oxidación proteica aumenta la ubiquitinación (el proceso de “etiquetado” para procesos proteolíticos en eucariotes) y esto a su vez, la proteólisis. Sin embargo, este mecanismo parece estar limitado a ciertos niveles de oxidación, pues el daño oxidativo severo causa una disminución en la capacidad proteolítica de la célula^{60,61}.

Lo anterior sugiere que la oxidación de proteínas podría ser un tipo de marcaje de proteínas que deben ser recicladas por los sistemas de proteólisis de la célula, es decir, un antecedente en procariotes a lo que es la ubiquitinación en eucariotes. Sin embargo, en eucariotes no es claro el papel de la oxidación en el reciclaje de proteínas; no se sabe si estos dos sistemas de

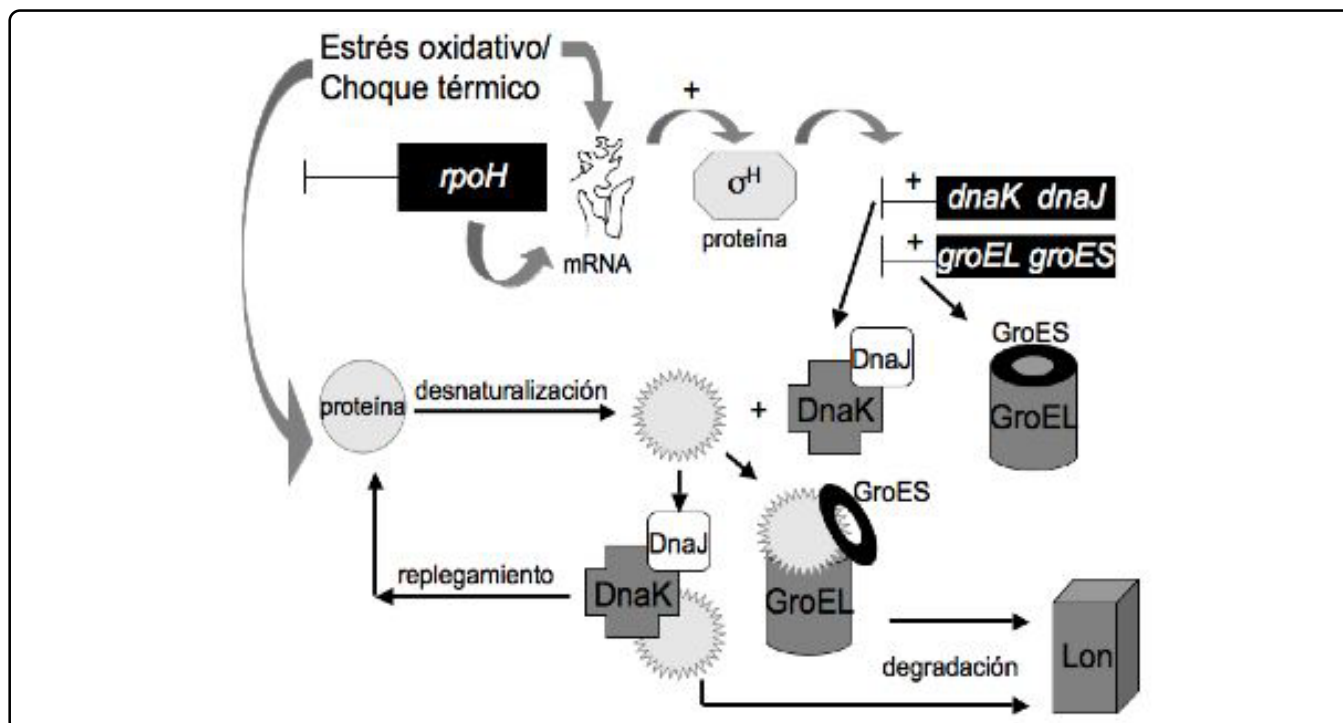


Figura 3. En *E. coli*, tanto el estrés oxidativo como el choque calórico aumentan la traducción del mRNA del gen *rpoH* que codifica para el factor sigma H. Al aumentar la síntesis de sigma H se transcriben genes del regulón de choque térmico como las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES, las cuales identifican proteínas desnaturalizadas y oxidadas tratando de repararlas, si esto no es posible las canaliza a los sistemas proteolíticos de la célula como la proteína Lon.

marcaje de proteínas que deben ser degradadas actúan en conjunto o independientemente, aunque existe evidencia de que una proteína carbonilada de *E. coli* es reconocida y degradada *in vitro* por el proteosoma de células de mamífero sin necesidad de ser ubiquitinada, por lo que la oxidación *per se* parece ser suficiente para que una proteína sea degradada^{62,63}.

La carbonilación, no obstante, pareciera ser una señal de degradación de proteínas sólo hasta cierto grado de oxidación. Se ha demostrado en la mitocondria eucariote que la proteína aconitasa es degradada sólo si está poco carbonilada, pues la carbonilación exhaustiva provoca que se formen agregados de alto peso molecular que son resistentes a la degradación por la proteasa mitocondrial Lon (homólogo de la proteasa Lon de *E. coli*)⁶⁴. Incluso, los agregados de alto peso molecular bloquean la actividad del proteosoma^{65,66}.

C) ENVEJECIMIENTO Y CARBONILACIÓN

Aunque no está claro si el aumento de la carbonilación es causa o consecuencia del envejecimiento celular, se ha identificado que la oxidación de proteínas (medida por carbonilación) correlaciona con la edad fisiológica de las células en diversos sistemas biológicos.

Los primeros estudios que relacionaron este fenómeno utilizaron eritrocitos y fibroblastos humanos y ratas de diferentes edades.

En fibroblastos, se demostró que el grado de carbonilación de muestras provenientes de pacientes pediátricos con progeria o Síndrome de Werner (envejecimiento temprano) era equiparable al de pacientes sanos de la tercera edad⁶⁷.

Recientemente, en cultivos senescentes (fase estacionaria tardía) de *E. coli*, Nyström y colaboradores, demostraron que las células podían ser clasificadas en dos tipos: no viables o no cultivables y viables o cultivables. Las células no viables mostraron una mayor carbonilación que las viables, lo cual pareciera describir un mecanismo de protección de la posible descendencia si las células tuvieran la oportunidad de dividirse nuevamente, donde se evita que las células que poseen muchas proteínas carboniladas y probablemente no funcionales o aberrantes sean incapaces de dividirse, evitando que pasen a las nuevas células proteínas carboniladas⁶⁸. Por otro lado, en cultivos en citocinesis de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el mismo grupo de investigación, describió que sí existe en células en división un mecanismo preferencial en donde, durante la gemación, la división es asimétrica pues las células nuevas no reciben proteínas carboniladas, detectables por los métodos utilizados, permaneciendo éstas en la célula más vieja⁶⁹. Este mecanismo parece estar vinculado a una selección por el citoesqueleto, específicamente por medio de la proteína Sir2p, que podría tener un papel en la organización de los filamentos de actina durante la citocinesis. Todavía no se conoce el mecanismo a detalle

pero mutantes en *sir2* no dividen asimétricamente las proteínas oxidadas en la gemación. Además, se ha descrito que los homólogos de Sir2p son determinantes del envejecimiento en gusanos y moscas⁶⁹⁻⁷³.

Un argumento que apoya la correlación entre envejecimiento y carbonilación es el hecho de que sólo en células que senescen se observa esta acumulación de oxidación en proteínas. En plantas, por ejemplo, donde no existe el concepto de envejecimiento no hay acumulación progresiva e irreversible de proteínas oxidadas. Se ha observado que en *Arabidopsis thaliana*, la carbonilación aumenta paulatinamente, pero baja drásticamente justo antes de la transición de la planta del estado vegetativo al reproductivo³⁷. Lo anterior parece describir un mecanismo adicional de protección de las nuevas células en contra de la oxidación.

Las diferencias observadas entre plantas y animales parecen indicar que la capacidad de dividirse está intrínsecamente relacionada con el nivel de oxidación proteico. Parecen existir mecanismos que bloquean la división en células viejas que han acumulado demasiadas proteínas dañadas y otros mecanismos que aseguran que las proteínas oxidadas permanezcan en las células madre, siendo el objetivo final de cada mecanismo “heredar” proteínas no carboniladas a las células nuevas.

D) ENFERMEDADES EN HUMANOS Y CARBONILACIÓN

Durante las últimas décadas, se ha correlacionado positivamente el aumento de proteínas carboniladas con ciertas patologías.

i. Enfermedades inflamatorias. La respuesta inmunológica innata incluye la activación de neutrófilos y macrófagos que generan EROs. La intención primaria de la producción localizada de estrés oxidativo puede ser el daño exhaustivo hacia las proteínas de agentes infecciosos invasores como bacterias y parásitos. Sin embargo, la inflamación crónica aumenta la difusión de las EROs producidas y el daño al tejido circundante, produciendo estrés oxidativo en el propio hospedero y una respuesta autoinmune⁷⁴.

ii. Diabetes. La diabetes es una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo y se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre y en etapas tardías excreción de glucosa en orina, debida a daño renal. Se han detectado altos niveles de proteínas carboniladas localizados con productos de glicoxidación y lipoxidación. El alto nivel de carbonilación de proteínas de plasma es característico de todos los pacientes diabéticos, independientemente de su edad y el avance y complicaciones de la enfermedad^{75,76}.

iii. Daño renal crónico. En pacientes con daño renal la generación de EROs aumenta en cada sesión de diálisis debido a una deficiencia crónica de los principales sistemas antioxidantes. En estos pacientes se encuentra un aumento en la oxidación de proteínas en plasma, principalmente albúmina (carbonilación y

formación de puentes disulfuro). Como consecuencia, los pacientes están expuestos a otras complicaciones como daño tisular y enfermedades cardíacas^{77,78}.

iv. Enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo que afecta principalmente las regiones cerebrales involucradas con el aprendizaje y la memoria. Estas regiones se reducen significativamente debido a la degeneración de sinápsis y a la muerte neuronal. El estrés oxidativo juega un papel importante, pues el nivel de proteínas y lípidos oxidados, así como la producción de EROs aumentan en las zonas afectadas. En la corteza cerebral y el hipocampo de pacientes con Alzheimer, las principales características son la presencia de nudos o agregados intracelulares neurofibrilares de la proteína asociada a microtúbulos, Tau, la cual está hiperfosforilada y carbonilada; también se encuentran placas o depósitos extracelulares de péptidos precursores de β -amiloide debido a que el procesamiento proteolítico disminuye, probablemente porque el sustrato esté carbonilado⁷⁹.

Por otro lado, se han detectado blancos de carbonilación que pueden ser importantes en determinar el mecanismo y la relación entre el daño oxidativo y la muerte neuronal. Los blancos identificados son glutamino sintasa, hidrolasa L-1 ubiquitina C-terminal, proteína 2 relacionada a dihidropirimidinas y α -enolasa. Con base en estos blancos, los mecanismos de muerte neuronal pueden ser la disminución de energía, inhibición de la degradación por el proteosoma y acortamiento de la longitud dendrítica con la consecuente disminución de la comunicación interneuronal^{80,81}.

v. Cataractogénesis. Existe un aumento dependiente de la edad del paciente en la carbonilación de las proteínas de la retina humana, lo cual predetermina la aparición de cataratas. Esta evidencia ha sido apoyada por los cambios físicos observados en el cristalino de vacas expuestos *in vitro* a sistemas de OCM, que asemejan a los ocurridos en muestras de ojos con cataratas^{34,82}.

CONCLUSIONES

A pesar del avance que en poco tiempo se ha tenido en el entendimiento de la oxidación proteica, todavía quedan muchas preguntas abiertas. Químicamente la causa de la oxidación de proteínas es todavía ambigua, pues aunque los mecanismos de oxidación de ciertos grupos pueden ser predecidos, existen limitantes experimentales para determinarlos. Incluso el probar un mecanismo preferencial de oxidación para una proteína no proporcionaría reglas generales, pues el ambiente químico de cada sustrato es diferente dependiendo de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de cada proteína, y aún más si existen cofactores metálicos coordinados. Todos estos factores que hacen a una proteína única para su función tienen como consecuencia que un mismo grupo químico presente un potencial redox diferente y, por lo tanto pueda o no participar de la oxidación por EROs.

La posibilidad de predecir blancos proteicos de oxidación en ciertas circunstancias, tal vez sería de más relevancia a nivel fisiológico. Sin embargo, con parámetros de la cinética clásica esto ha resultado poco representativo de lo que sucede *in vivo*. Todas estas variables ofrecen sin duda un campo interesante para la investigación de la química de la oxidación proteica.

El haber determinado que las chaperonas moleculares, ciertos factores de elongación y algunas enzimas del Ciclo de Krebs son invariablemente blancos de oxidación en diversos sistemas biológicos sugiere que la oxidación no es al azar ni obedece reglas cinéticas; en cambio podría actuar específicamente y limitar celularmente ciertos procesos como la síntesis de nuevas proteínas, y el metabolismo energético para evitar que se sigan acumulando electrones en enzimas con fugas que potencialmente pueden producir una mayor producción de EROs y por lo tanto más estrés oxidativo.

Las consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas es aún un tema de gran debate pues en la mayoría de los casos no puede definirse con precisión si la oxidación es causa o consecuencia. Lo que es claro es la correlación encontrada entre envejecimiento, la disminución en la capacidad de división celular o reproducción y ciertas patologías con el aumento de proteínas oxidadas.

Molecularmente, la posibilidad de que la oxidación sea un antecedente de la ubiquitinación para la degradación de proteínas representaría un mecanismo de marcaje no explorado y aún utilizado no sólo en bacterias sino posiblemente en eucariontes. No obstante, el reconocimiento de oxidación *per se* debe ser demostrado antes de proponer dicho mecanismo.

Otro aspecto importante que podría conllevar un mecanismo de preservación es el bloqueo de la viabilidad o capacidad reproductiva cuando el proteoma en general se encuentra oxidado. Posiblemente sea una forma de prevenir el “heredar” proteínas dañadas o una simple consecuencia del deterioro de la actividad metabólica general.

A nivel de diagnóstico clínico es de poca relevancia pues muchas enfermedades ocasionan la oxidación inespecífica de proteínas de plasma. A menos que se encontraran blancos específicos e invariables en fases tempranas de alguna enfermedad esta herramienta molecular podría ser utilizada en diagnosis.

Sin duda, la oxidación de proteínas representa un campo amplio de investigación dirigida a responder problemas concretos que tienen relevancia directa en la fisiología de todo ser vivo. La utilización de disparos de estrés oxidativo como señal de diferenciación celular pudiera ser sólo uno de los procesos programados en los que la célula utiliza la oxidación como marcaje. Finalmente, aunque las tendencias actuales indican que la oxidación de proteínas será estudiada con más énfasis desde

el punto de vista fisiológico, existen todavía varias incógnitas, como lo es si la oxidación es suficiente para provocar agregación proteica, que deben ser exploradas.

REFERENCIAS

1. Halliwell, B. & Gutteridge, J. Free Radicals in Biology and Medicine (Oxford University Press, Nueva York, 1999).
2. Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage. *Annu.Rev.Microbiol.* **57**:395-418 (2003).
3. Hansberg, W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*. **XXVI**:19-54 (2002).
4. Hansberg, W. La biología del dioxígeno en singulete. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **2(2)**:47-55 (1999).
5. Dukan, S., *et al.* Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**:5746-5749 (2000).
6. Dukan, S. & Nyström, T. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.* **12**:3431-3441 (1998).
7. Dukan, S. & Nyström, T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J.Biol.Chem.* **274**:26027-26032 (1999).
8. Ji, L.L., Dillon, D. & Wu, E.. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am.J.Physiol* **258**:918-923 (1990).
9. Nyström, T. Translational fidelity, protein oxidation and senescence: lessons from bacteria. *Aging Res.Rev.* **1**:693-703 (2002).
10. Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**:1220-1224 (1992).
11. Stadtman, E.R. & Levine, R.L. Protein oxidation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **899**:191-208 (2000).
12. Desmyter, L., *et al.* Expression of the human ferritin light chain in a budding yeast fraxatin mutant affects aging and cell death. *Exp.Gerontol.* **39**:707-715 (2004).
13. Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. & Nyström, T. Protein oxidation in G₀ cells of *Saccharomyces cerevisiae* depends on the state rather than the rate of respiration and is enhanced in *pos9* but not *yap1* mutants. *J.Biol.Chem.* **276**:35396-35404 (2001).
14. Friguet, B., Bulteau, A.L., Chondrogianni, N., Conconi, M. & Petropoulos, I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **908**:143-154 (2000).
15. Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T. & Davies, K.J.A. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I-effects of proliferative senescence. *FASEB J.* **14**:2495-2502 (2000).
16. Shringarpure, R. & Davies, K.J. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Rad.Biol.Med.* **32**:1084-1089 (2002).
17. Ballesteros, M., Fredriksson, A. Henriksson, J. & Nyström, T. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J.* **20**:5280-5289 (2001).
18. Sies, H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat. Res.* **299**:183-191 (1993).
19. Sies, H. & Menck, C.F. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat.Res.* **275**:367-375 (1992).
20. Humphries, K.M. & Sweda, L.I. Selective inactivation of a-

- ketoglutarate deshydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**:15835-15841 (1998).
21. Esterbauer, H., Schaur, R.J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad.Biol.Med.* **11**:81-128 (1991).
 22. Dakin, H.D. The oxidation of aminoacids with the production of substances of biological importance. *J.Biol.Chem.* **1**:171-176 (1906).
 23. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* **324**:1-18 (1997).
 24. Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J.Biol.Chem* **272**:20313-20316 (1997).
 25. Garrison, W.M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chem.Rev.* **87**:381-398 (1987).
 26. Davies, M.J. Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage. *Arch.Biochem.Biophys.* **336**:163-172 (1996).
 27. Stadtman, E.R. & Oliver, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J.Biol.Chem.* **266**:2005-2008 (1991).
 28. Heinecke, J.W. Biochemical evidence for a link between elevated levels of homocysteine and lipid peroxidation *in vivo*. *Curr.Atheroscler.Rep.* **2**:87-89 (1999).
 29. Lewisch, S.A. & Levine, R.L. Determination of 2-oxohistidine by aminoacid analysis. *Annal.Biochem.* **231**:440-446 (1995).
 30. Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L. & Stadtman, E.R. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* **107**:323-332 (1999).
 31. Requena, J.R., Levine, R.L. & Stadtman, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids* **25**:221-226 (2003).
 32. Davies, M.J.A. The oxidative environment and protein damage. *Biochem.Biophys.Acta* **1703**:93-109 (2005).
 33. Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl.Microbiol.* **3**:3-8 (2000).
 34. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**:1311-1317 (2005).
 35. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. Protein carbonylation in human diseases. *TRENDS in Molecular Medicine.* **9**:169-176 (2003).
 36. Tamarit, J., Cabiscol, E. & Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J.Biol.Chem.* **273**:3027-3032 (1998).
 37. Johansson, E., Olsson, O. & Nyström, T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J.Biol.Chem.* **279**:22204-22208 (2004).
 38. Castegna, A., et al. Protein identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Rad.Biol.Med.* **33**:562-571 (2002).
 39. Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J.Biol.Chem.* **272**:15661-15667 (1997).
 40. Aslund, F. & Beckwith, J. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell.* **96**:751-753 (1999).
 41. Etienne, F., Spector, D., Brot, N. & Weissbach, H. A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **300**:378-382 (2003).
 42. Spector, D., Etienne, F., Brot, N. & Weissbach, H. New membrane-associated and soluble peptide methionine sulfoxide reductases in *Escherichia coli*. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **302**:284-289 (2003).
 43. Picot, C.R., Perichon, M., Cintrat, J.C., Friguet, B. & Petropoulos, I. The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett.* **558**:74-78 (2004).
 44. Sharov, V.S. & Schoneich, C. Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free.Rad.Biol.Med.* **29**:986-994 (1999).
 45. Sharov, V.S., Ferrington, T.C., Squier, C. & Schoneich, C. Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* **455**:247-250 (1999).
 46. Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. & Stadtman, E. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:15036-15040 (1996).
 47. Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab.Rev.* **32**:307-326 (2000).
 48. Beal, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad. Biol. Med.* **32**:797-803 (2002).
 49. Echave, P. et al. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**:4626-4631 (2002).
 50. Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. & Jacob, U. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell* **17**:381-392 (2005).
 51. Díaz-Acosta, A., Sandoval, M.L., Delgado-Olivares, L. & Membrillo-Hernández, J. Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Arch.Microbiol.* **185**:429-438 (2006).
 52. Fredriksson, A., Ballesteros, M., Dukan, S. & Nyström, T. Induction of the heat shock regulon in response to increased mistranslation requires oxidative modification of the malformed proteins. *Mol.Micro.* **59**:350-359 (2005).
 53. Rivett, A.J. Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase. *J.Biol.Chem.* **260**:12600-12606 (1985).
 54. Rivett, A.J. Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J.Biol.Chem.* **260**:300-305 (1985).
 55. Davies, K.J.A. & Lin, S.W. Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. *Free Rad.Biol.Med.* **5**:215-223 (1988).
 56. Davies, K.J.A. & Lin, S.W. Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*. *Free Rad.Biol.Med.* **5**:225-236 (1988).
 57. Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J.Biol.Chem.* **262**:9895-9901 (1987).
 58. Pacifici, R.E., Salo, D.C. & Davies, K.J.A. Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radical Biol. & Med.* **7**:521-536 (1989).
 59. Marciat, O., Zhang, Y., Lin, S.W. & Davies, K.J.A. Mitochondria

- contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins *Biochem.J.* **254**:677-683 (1988).
60. Iwai, K., *et al.* Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **93**:15036-15040 (1988).
61. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K.J.A. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* **11**:526-534 (1997).
62. Roseman, J.E. & Levine, R.L. Purification of a protease from *Escherichia coli* with specificity for oxidized glutamine synthetase. *J.Biol.Chem.* **262**:2101-2110 (1987).
63. Rivett, A.J. & Levine, R.L. Metal catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes. *Arch.Biochem.Biophys.* **278**:26-34 (1990).
64. Bota, D.A., Van Remmen, H. & Davies, K.J.A. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett.* **532**:103-106 (2002).
65. Grune, T., Jung, T., Merker, K. & Davies, K.J.A. Decreased proteolysis caused by protein aggregates inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid and aggresomes during oxidative stress. Aging and disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **36**:2519-2530 (2004).
66. Grune, T., Merker, K., Sandig, G. & Davies, K.J.A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **305**:709-718 (2003).
67. Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. & Stadtman, E.R. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *J.Biol.Chem.* **262**:5488-5491 (1987).
68. Desnues, B., Gregori, G., Dunkan, S., Aguilaniu, H. & Nyström, T. Differential oxidative damage and expression of stress regulons in culturable and nonculturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep.* **4**:400-405 (2003).
69. Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. & Nyström, T. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a Sir2p dependent mechanism. *Science* **299**:1751-1753 (2003).
70. Guarente, L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.* **14**:1021-1026 (2000).
71. Tissenbaum, H.A. & Guarente, L. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**:227-230 (2001).
72. Sinclair, D.A. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech. Ageing Dev.* **123**:857-867 (2002).
73. Rogina, B. & Helfand, S.L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **101**:15998-16003 (2004).
74. Oliver, C.N. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch.Biochem.Biophys.* **253**:62-72 (1987).
75. Cakatay, U., *et al.* Oxidative protein damage in type 1 diabetic patients with and without complications. *Endocr.Res.* **26**:365-379 (2000).
76. Telci, A., *et al.* Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm.Metabol.Res.* **32**:40-43 (2000).
77. Himmelfarb, J., *et al.* Plasma protein oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* **58**:2571-2578 (2000).
78. Himmelfarb, J. & McMonagle, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* **60**:358-363 (2001).
79. Mattson, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* **430**:631-639 (2004).
80. Castegna, A., *et al.* Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Rad.Biol.Med.* **33**:562-571 (2002).
81. Castegna, A., *et al.* Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *J.Neurochem.* **82**:1524-1532 (2002).
82. Bosnia, F., *et al.* Protein oxidation and lens opacity in humans. *Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.* **41**:2461-2465 (2000).