

## Referencias

- del Castillo Busto ME, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Meija J, Sanz-Medel A. 2005. *Analytical Chemistry* 77, 5615-5621.
- Lobinski R, Schaumlöffel D, Szpunar J. 2006. *Mass Spectrometry In Bioinorganic Analytical Chemistry. Mass Spectrometry Reviews* 25, 255-289.
- Michalke B, Fernández-Sánchez ML, Sanz-Medel A. 2007. Elemental speciation in human milk and substitute food for newborns. *The Determination of Chemical Elements in Food (Applications for Atomic Mass Spectrometry)*. Wiley & sons 3, 535-567.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. 2007a. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 569-571.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Carrascal M, Abian J, Sanz-Medel A. 2008. *Analytical Chemistry* 80, 1777-1787.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. 2007b. *Chemical Biology (Instant Insight)* 2, B79.
- Sanz-Medel A. 2008. Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: screening and quantification of proteins and their post-translational modifications. *Analytical & Bioanalytical Chemistry (Trends)* 391, 885-894.

## Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas

*Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, Joaquim Ros, Jordi Tamarit*

Grup de Bioquímica de l'Estrés Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida

### Resumen

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la formación y la destrucción de las especies reactivas del oxígeno. Una forma indirecta de determinar la existencia de estrés oxidativo es la medida de los productos derivados de la reacción de las especies reactivas del oxígeno con biomoléculas. En este sentido, la formación de grupos carbonilo en las proteínas ha sido uno de los marcadores de estrés oxidativo más estudiados debido a su estabilidad y fácil detección. Diversas herramientas proteómicas ofrecen un gran potencial para descubrir nuevas proteínas susceptibles al estrés oxidativo, cambios cuantitativos en el perfil de estas modificaciones bajo distintas condiciones biológicas, y para caracterizar el sitio exacto y tipo de modificación sufrida por una determinada proteína. En el presente trabajo se revisan las diferentes aproximaciones utilizadas para la detección de proteínas carboniladas y las herramientas proteómicas que permiten su identificación.

### Palabras clave:

Estrés oxidativo, oxidación de proteínas, grupos carbonilo, DNPH, proteómica redox.

### Introducción

El estrés oxidativo se describe como una situación en la cual las defensas antioxidantes son insuficientes para inactivar completamente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) [1]. Este desequilibrio entre la producción y la destrucción de ROS puede afectar a gran parte de los componentes celulares,

incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos [2-4]. Muchos de los cambios que ocurren durante el envejecimiento y durante la progresión de ciertas enfermedades son una consecuencia del estrés oxidativo [5-7]. Las proteínas se modifican oxidativamente al ser uno de los blancos principales de las ROS. Ello conlleva modificaciones estructurales

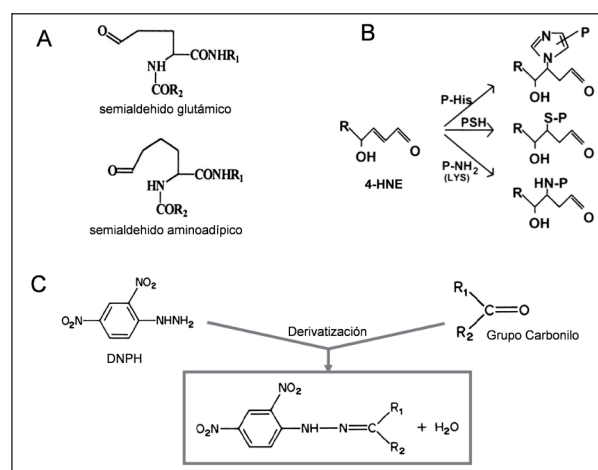
que, en general, suponen la pérdida total o parcial de su función [4, 8, 9]. En este sentido, la oxidación de proteínas juega un papel muy importante en el desarrollo del proceso de envejecimiento y de una lista muy extensa de enfermedades entre las que podríamos destacar la aterosclerosis, el cáncer, y diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson [10]. Muchos residuos de aminoácidos de las proteínas son susceptibles a la oxidación por varias especies reactivas del oxígeno. El producto de la oxidación de proteínas más ampliamente estudiado en los últimos años ha sido la formación de grupos carbonilo debido a su estabilidad y fácil detección. Por tanto, su cuantificación se ha convertido en el método más aceptado para medir el daño oxidativo en proteínas en situaciones donde el estrés oxidativo juega un papel relevante.

### Formación de grupos carbonilo

El estrés oxidativo puede causar modificaciones reversibles o irreversibles en las proteínas. Las modificaciones reversibles, generalmente en los residuos de cisteína, pueden ser reparadas mediante enzimas específicos como las glutaredoxinas o tioredoxinas [11, 12]. De la misma manera, la metionina se oxida fácilmente a metionina sulfóxido pudiendo ser reducida por la enzima metionina sulfóxido reductasa [13]. Habitualmente este tipo de modificaciones tienen la función de proteger ante el daño irreversible o de modular la función de las proteínas (regulación redox). Las modificaciones irreversibles no pueden ser reparadas, de forma que las proteínas inactivas se acumulan o son degradadas. Un ejemplo de modificaciones irreversibles es el caso de la carbonilación de las proteínas [14, 15].

Los grupos carbonilo pueden ser introducidos en las proteínas en diferentes sitios y por medio de diferentes mecanismos. Por un lado, los carbonilos son producidos en las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente en los residuos de prolina, arginina, lisina y treonina los cuales son oxidados a derivados aldehídos o cetonas [2, 16]. Este tipo de modificaciones se producen habitualmente por el ataque del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), que puede ser originado por radiación ionizante o por la reacción de cationes metálicos con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , reacción de Fenton). En este sentido merece la pena comentar que la mayoría de los carbonilos formados en las proteínas mediante la oxidación catalizada por cationes metálicos son el semialdehído glutámico derivado de la arginina y el semialdehído aminoadípico derivado de la lisina (Fig. 1A) [17].

Por otro lado, los grupos carbonilo pueden también ser generados por proteólisis de las proteínas tras el ataque de radicales  $\cdot\text{OH}$ , vía alfa-amidación o tras la oxidación de las cadenas laterales de residuos glutámico, dando lugar a la formación de un péptido en el cual el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado alfa-cetoacilo [16]. Existen también otros mecanismos que pueden dar lugar a la carbonilación proteica como la reacción con productos generados durante la peroxidación lipídica como 4-hidroxinonenal (4-HNE<sup>1</sup>) (Fig. 1B), 2-propenal (acroleína) y malondialdehído [18]. Este tipo de reacción denominada “Adición de Michael”, conlleva la adición de grupos aldehídos reactivos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina o lisina. Finalmente, grupos carbonilo reactivos pueden ser también generados por reacciones del grupo amino de los residuos de lisina con azúcares reducidos o por la oxidación de sus productos de reacción (glicación/glicoxidación), dando lugar a, por ejemplo, carboximetil lisina [2, 3].



**Figura 1. Formación de grupos carbonilo y derivatización mediante DNP.** A: productos generados por el ataque del radical  $\cdot\text{OH}$  a las cadenas laterales de arginina (semialdehído glutámico) y lisina (semialdehído aminoadípico) [17]; B: la reacción de 4-HNE con las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina y lisina conlleva la adición de grupos aldehídos reactivos a las proteínas [16]; C: formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona tras la reacción del DNP con grupos carbonilo.

### Medidas de daño oxidativo a proteínas: carbonilos

Debido a que las ROS son generalmente muy reactivas y tienen una vida media muy corta, una

<sup>1</sup> 4-HNE: 4-hidroxinonenal

forma indirecta de determinar la existencia de estrés oxidativo es la medida de los productos formados por la reacción de las ROS con biomoléculas. Dado que en el caso de las proteínas uno de los productos generados son los grupos carbonilo su cuantificación se ha convertido en un parámetro ampliamente aceptado de daño oxidativo en condiciones de estrés. Los grupos carbonilo han sido cuantificados de diversas formas. El método más comúnmente utilizado es el basado en su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH<sup>2</sup>) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona. Este método se basa en que el DNPH es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilo -formando una base de Schiff- para dar lugar a hidrazonas estables (Fig. 1C). El grupo dinitrofenilo (DNP<sup>3</sup>) puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm [8, 19]. Asimismo, debido a que existen excelentes anticuerpos comerciales contra el grupo dinitrofenilo [20, 21], la detección de grupos carbonilo puede realizarse mediante western blot, dot blot, inmunohistoquímica o ELISA. Se han desarrollado diversos métodos para la derivatización y la preparación de las muestras. La detección mediante western blot ha sido comúnmente denominada Oxi-blot. [10, 22-24].

Sin embargo otros métodos están emergiendo como alternativas al DNPH debido a que algunos autores cuestionan la estabilidad de la 2,4-dinitrofenilhidrazona en condiciones alcalinas o durante el almacenamiento prolongado. Entre los métodos alternativos más utilizados se encuentran los que utilizan la química de la hidrazida. Las hidrazidas reaccionan específicamente con los carbonilos de proteínas (principalmente en su forma aldehído) mediante la formación de una base de Schiff, la cual puede ser estabilizada por reducción con cianoborohidruro [25-27]. Las ventajas de esta aproximación no son sólo una mayor estabilidad del producto final de reacción sino también la presencia de un amplio catálogo de grupos funcionales acoplados a la hidrazida que permiten el diseño de diversas estrategias para la captura o detección de las proteínas carboniladas [28]. Entre estos grupos funcionales encontramos biotina, digoxigenina y diversos compuestos fluorescentes. De esta forma los grupos carbonilo pueden ser derivatizados con digoxigeni-

na-hidrazida, e identificados utilizando anticuerpos contra digoxigenina [29]. Una técnica similar puede ser utilizada derivatizando los grupos carbonilo con biotina-hidrazida, identificando las proteínas derivatizadas utilizando avidina marcada con fluoresceína [30]. Otro compuesto utilizado para la detección fluorescente de grupos carbonilo es la fluoresceína-5-tiosemicarbazida. El grupo tiosemicarbazida presenta una reactividad frente a los grupos carbonilo similar a la hidrazida [31].

Finalmente, otra aproximación para medir el contenido de carbonilos totales en una muestra biológica es la determinación de productos específicos como el semialdehído glutámico y el semialdehído aminoadípico mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas con dilución isotópica. Esta aproximación fue desarrollada por Requena y colaboradores y posteriormente utilizada para caracterizar la naturaleza de los distintos productos carbonilo presentes en muestras de enfermos de Alzheimer [17, 32].

### Identificación de proteínas oxidadas mediante herramientas proteómicas

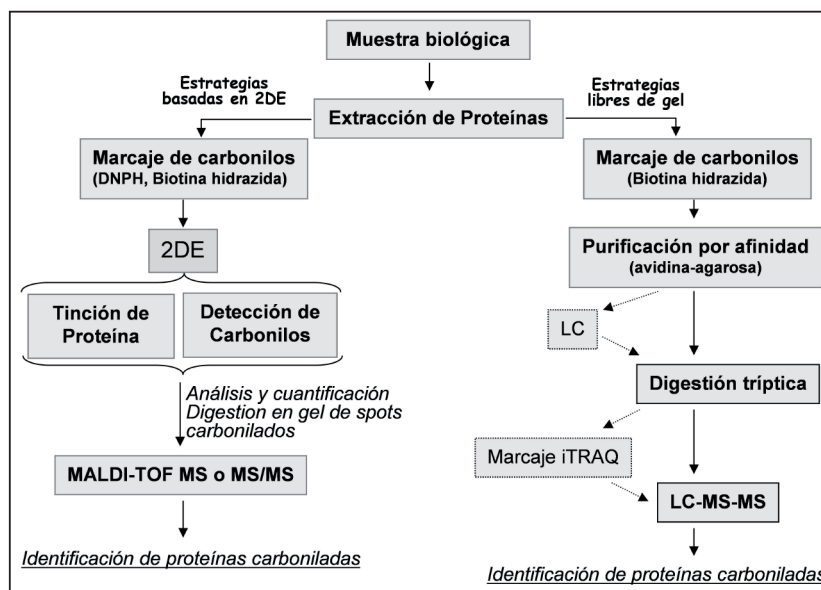
Podemos definir la “proteómica redox” como el conjunto de aproximaciones proteómicas que permiten la identificación de proteínas modificadas oxidativamente. La proteómica redox ofrece un gran potencial para descubrir nuevas proteínas susceptibles al estrés oxidativo, correlacionar cambios cuantitativos en el perfil de estas modificaciones con el estado de una enfermedad o con el envejecimiento, y para caracterizar el sitio exacto y tipo de modificación vía análisis MS/MS [3, 33]. Este tipo de aproximaciones pueden dar lugar a la identificación de grupos de proteínas selectivamente oxidadas en determinadas patologías y por tanto contribuir a aclarar los mecanismos moleculares involucrados en ellas. En esta revisión nos centraremos en la identificación de grupos carbonilo, uno de los productos de la oxidación de proteínas. Hasta la fecha diversos estudios proteómicos han demostrado que la carbonilación es altamente selectiva, debido a que en diferentes modelos de estudio se han identificado grupos de proteínas particularmente sensibles al estrés oxidativo. A continuación se revisan algunas de las estrategias utilizadas para la identificación de proteínas carboniladas. Un resumen de los estudios referidos puede encontrarse en la Tabla 1, mientras que en la Figura 2 se presenta una visión esquemática de las principales estrategias utilizadas.

<sup>2</sup> DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

<sup>3</sup> DNP: 2,4-dinitrofenilo

**Tabla 1.** Estudios en que se identifican proteínas carboniladas

Referencia	Organismo	Modelo	Compuesto	Estrategia	Proteínas identificadas
<i>Sistemas basados en electroforesis bidimensional</i>					
[40]	Levadura	Deficiencia en frataxina	DNP	2DE Oxi-blot	14
[39]	Cerebro humano	Enfermedad de Huntington	DNP	2DE Oxi-blot	4
[38]	Levadura	Envejecimiento	DNP	2DE Oxi-blot	16
[37]	Cerebro humano	Alzheimer	DNP	2DE Oxi-blot	4
[31]	Ratón	Envejecimiento	Fluorescein-5-Tiosemicarbazida	2DE/detección fluorescente	12
[30]	Levadura	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Biotina hidrazida	2DE/avidina-fluoresceína	20
[25]	Rata	Diabetes	Biotina hidrazida	2DE avidin blot	7
[48]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ciclo de vida	DNP	2DE Oxi-blot	5
<i>Sistemas libres de gel</i>					
[28]	Levadura	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Biotina hidrazida	Afinidad/LC/proteólisis/MS-MS	99
[26]	Mitocondria de rata	Basal	Biotina hidrazida + iTRAQ	Afinidad/proteólisis/iTRAQ/LC-MS-MS	200
[27]	Cerebro de ratón	Envejecimiento	Biotina hidrazida	Afinidad/LC/proteólisis/LC-MS-MS	100
[43]	Células tumorales	Tratamiento fotodinámico	Biotina hidrazida	Afinidad/IDE/proteólisis/ LC-MS-MS	81
[47]	Levadura	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reactivo de Girard	LC-MS/MALDI-MS-MS	36
[44]	Tejido adiposo	Obesidad	Biotina hidrazida	Afinidad/proteólisis/ LC-MS-MS	37

**Figura 2.** Visión esquemática de diversas estrategias analíticas utilizadas para la identificación y cuantificación de proteínas carboniladas.

### Sistemas basados en electroforesis bidimensional

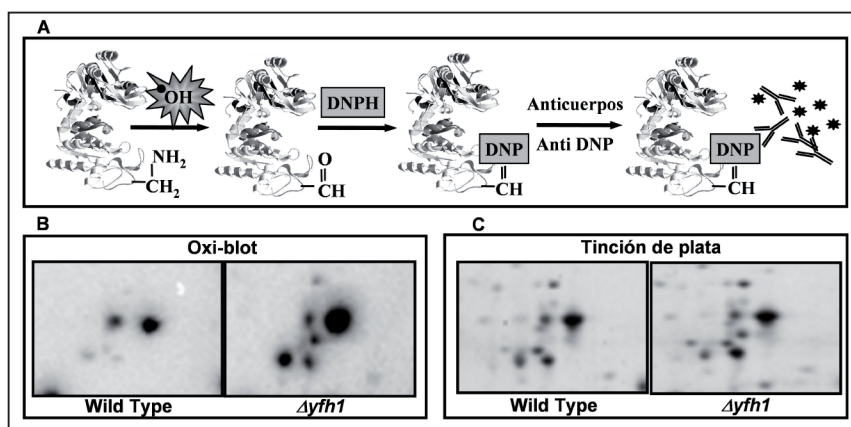
La electroforesis bidimensional (2DE) ha sido ampliamente utilizada para la identificación de proteínas carboniladas a partir de muestras complejas. La detección de esta modificación oxidativa se puede realizar mediante western blot con anticuerpos que reconocen directamente la modificación carbonilo en la proteína (por ejemplo: anti -4-HNE)[34], o bien con anticuerpos anti-DNP si la muestra ha sido pre-

viamente derivatizada con este compuesto [35-37]. Un ejemplo de este tipo de aproximación se muestra en la Figura 3. En otros casos, los carbonilos reactivos son marcados covalentemente con biotina-hidrazida y detectados en el gel mediante avidina-fluoresceína [30] o avidina-peroxidasa [25]. El uso de geles bidimensionales ha demostrado ser muy útil para la identificación de proteínas oxidadas, especialmente cuando se comparan dos condiciones fisiológicas [38-40]. Presenta la ventaja de poder contar por un lado con las imágenes obtenidas tras la detección del

grupo funcional unido a los carbonilos y por otro con aquellas obtenidas tras la tinción de los geles mediante colorantes de proteínas (tinción con plata, Sypro Ruby, Coomassie Brilliant blue, etc.). Esto permite la normalización de la señal de carbonilo respecto a la cantidad de proteína. Hay que tener en cuenta que como en cualquier análisis proteómico, el estudio de las proteínas carboniladas está sesgado a favor de aquellas proteínas más abundantes. Por tanto la determinación del nivel de carbonilación relativo de una determinada proteína es más informativo que el contenido total de proteína modificada. De lo contrario, aquellas proteínas abundantes pero con bajo contenido de carbonilos específicos pueden aparecer como predominantes en oxi-blot, mientras que

proteínas poco abundantes pero con niveles altos de carbonilación específica podrían pasar desapercibidas [10]. Asimismo un cambio en el nivel de expresión de una determinada proteína entre dos condiciones de estudio podría identificarse erróneamente como un cambio en el grado de daño de dicha proteína. En este sentido conviene destacar que diversos estudios basados en geles bidimensionales han permitido identificar proteínas poco abundantes como altamente sensibles al estrés oxidativo. Un ejemplo serían las chaperonas mitocondriales [40-42].

el daño a una proteína determinada. Sin embargo, esta estrategia no se acostumbra a utilizar ya que para resultar concluyente requeriría del desarrollo de aproximaciones específicamente encaminadas a ese fin. Una forma indirecta de validación de los resultados es la medida de las actividades enzimáticas de aquellas proteínas identificadas como oxidadas. Esta aproximación ha sido utilizada con éxito en diversos estudios [9, 38, 40], aunque su principal limitación se encuentra en el hecho de que solo puede aplicarse a enzimas para los cuales exista un método eficaz para medir su actividad enzimática.



**Figura 3. Formación de grupos carbonilo y detección mediante anticuerpos anti-DNP (Oxi-Blot).** **A:** El ataque de un radical  $\cdot\text{OH}$  a la cadena lateral de un aminoácido genera un grupo carbonilo. El DNP reacciona específicamente con el grupo carbonilo formándose una hidrazona estable que puede ser detectada inmunológicamente por medio de anticuerpos específicos anti-DNP. **B:** Detección de proteínas carboniladas en extractos celulares de dos cepas de levadura mediante 2DE y Oxi-Blot. **C:** La tinción de proteínas mediante plata de la misma región del gel bidimensional permite la normalización de los niveles de carbonilación. Puede observarse que diversas proteínas presentan un mayor grado de carbonilación en la cepa  $\Delta yfh1$  (para detalle ver ref. 40).

A pesar de la gran información obtenida mediante el análisis proteómico basado en geles, existen limitaciones de este tipo de aproximación para el caso de análisis a gran escala así como para la identificación de proteínas de membrana o proteínas poco abundantes. Por otro lado, el uso de geles bidimensionales presenta como principal problema la validación de los resultados obtenidos. La comparación de las imágenes obtenidas mediante tinción específica (anti-DNP, por ejemplo) y proteína total no siempre es fácil, y el criterio a seguir en cada trabajo queda en manos del investigador. La doble tinción fluorescente permite, en teoría, un mejor emparejamiento entre las distintas imágenes obtenidas. La confirmación mediante MS de la presencia de péptidos modificados podría ser una forma de confirmar

### Sistemas “libres de gel”

Diversos autores han explorado métodos libres de gel, basados en el enriquecimiento mediante afinidad de proteínas que presentan una modificación tipo carbonilo y su posterior detección mediante espectrometría de masas. Estas aproximaciones permitirían en

teoría obviar algunas de las limitaciones de los sistemas basados en 2DE descritas en el apartado anterior. Sin embargo la desventaja de estas aproximaciones es que no permiten un análisis cuantitativo del grado de carbonilación de las distintas proteínas identificadas en diferentes muestras, lo que limita su utilidad como herramienta para el estudio de cambios en el patrón de oxidación de proteínas en distintas condiciones biológicas. El sistema más utilizado para el enriquecimiento de las proteínas carboniladas es la cromatografía de afinidad de avidina, para carbonilos previamente derivatizados con biotina-hidrazida. Posteriormente las proteínas enriquecidas son digeridas y los péptidos obtenidos son identificados mediante LC-MS/MS [26-28, 43, 44]. Utilizando esta tecnología Soreghan y colaboradores identificaron 100 proteínas carboniladas en un único experimento a partir de homogenados de cerebro de ratones de diferentes edades. Entre ellas destacan receptores poco abundantes y proteínas mitocondriales implicadas en el metabolismo energético y en la respuesta a estrés, así como receptores con residuos de tirosina fosforilables. Además, fueron capaces de observar carbonilos en proteínas citoplasmáticas abundantes previamente identificadas mediante electroforesis bidimensional [27]. Una extensión de esta tecnología utilizando iTRAQ ha permitido distinguir las proteínas carboniladas de aquellas con afinidad a la avidina. De esta

forma se han logrado identificar 200 proteínas carboniladas en extractos mitocondriales de músculo de rata, lo cual muestra la gran susceptibilidad de este tipo de proteínas ante el estrés oxidativo [26]. Otra alternativa consiste en el fraccionamiento mediante LC de las proteínas derivatizadas con biotina-hidrazida tras su purificación mediante cromatografía de afinidad de avidina y previamente a su digestión. Utilizando esta aproximación "top-down" Mirzaei y Regnier identificaron 99 proteínas carboniladas en levaduras tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [28].

### Identificación del sitio de carbonilación

En los últimos años se han intentado desarrollar metodologías para identificar el aminoácido modificado oxidativamente. Esta información es importante para entender en profundidad los mecanismos oxidativos por los cuales se están produciendo los grupos carbonilo, así como para conocer los efectos funcionales que una modificación a un determinado aminoácido puede causar en la proteína. Existen diferentes estrategias analíticas para la detección del aminoácido modificado. La mayoría de estas metodologías están basadas en la observación de la variación de la masa molecular específica de un aminoácido modificado covalentemente, que es fácilmente detectable mediante mediciones de espectrometría de masas. En algunos de los estudios en que se ha usado la biotina-hidrazida para el marcaje y purificación de proteínas carboniladas, la identificación de péptidos biotinilados ha permitido confirmar la modificación oxidativa y asimismo conocer su localización [28, 43]. Por otro lado, la reacción de 4-HNE con los residuos de lisina, histidina y cisteína puede ser monitorizada en proteínas intactas, detectando los productos correspondientes con un incremento de 156 Da. Asimismo, puede ser identificado el péptido específico que lleva esta diferencia de masa [3, 34, 45]. Existe otra aproximación que permite la identificación mediante MALDI-TOF de péptidos modificados oxidativamente mediante la adición de DNP por reacción con 4-HNE. Los péptidos carbonilados pueden ser identificados por la diferencia de masa de 180 Da (correspondiente al DNP) existente entre muestras derivatizadas y sin derivatizar. Dada la baja estabilidad de la hidrazona en las condiciones habitualmente utilizadas en MALDI-TOF, esta estrategia requiere del uso de DNPH como matriz de ionización [46]. Finalmente, Mirzaei y Regnier utilizaron dos formas isotópicas del reactivo de Girard (que contiene un grupo hi-

drazida) para caracterizar el lugar de carbonilación de proteínas provenientes de extractos de levaduras tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [47].

Queda claro que las técnicas proteómicas están ayudando a profundizar en la detección, identificación y los mecanismos subyacentes en las modificaciones oxidativas de las proteínas. Con ello se contribuye a una mejor comprensión de la trascendencia de estas modificaciones a nivel celular. El impacto de ellas sobre la fisiología celular será, sin duda, el próximo reto, es decir, cómo se afecta el metaboloma de la célula como consecuencia de la alteración en la función de determinadas proteínas.

### Referencias

- [1] Cadenas, E.; Wefers, H.; Muller, A.; Brigelius, R.; Sies, H. Active oxygen metabolites and their action in the hepatocyte. *Studies on chemiluminescence responses and alkane production. Agents Actions Suppl* 11:203-216; 1982.
- [2] Stadtman, E. R.; Berlett, B. S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225-243; 1998.
- [3] Dalle-Donne, I.; Scaloni, A.; Giustarini, D.; Cavarra, E.; Tell, G.; Lungarella, G.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 24:55-99; 2005.
- [4] Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 10:389-406; 2006.
- [5] Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300; 1956.
- [6] Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495; 2005.
- [7] Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:722-728; 2007.
- [8] Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357; 1994.
- [9] Tamarit, J.; Cabisco, E.; Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Es-

- cherichia coli cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273:3027-3032; 1998.
- [10] Levine, R. L.; Stadtman, E. R. *Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology*. In: Dalle-Donne I., Scaloni, A., Butterfield, D. A., eds. *Redox Proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. United States of America: Wiley-Interscience; 2006: 123-168.
- [11] Lillig, C. H.; Berndt, C.; Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* 1780:1304-1317; 2008.
- [12] Oktyabrsky, O. N.; Smirnova, G. V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)* 72:132-145; 2007.
- [13] Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 18:93-105; 1995.
- [14] Stadtman, E. R.; Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207-218; 2003.
- [15] Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 ( Pt 1):1-18; 1997.
- [16] Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-20316; 1997.
- [17] Requena, J. R.; Chao, C. C.; Levine, R. L.; Stadtman, E. R. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:69-74; 2001.
- [18] Sayre, L. M.; Lin, D.; Yuan, Q.; Zhu, X.; Tang, X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev* 38:651-675; 2006.
- [19] Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478; 1990.
- [20] Shacter, E.; Williams, J. A.; Lim, M.; Levine, R. L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 17:429-437; 1994.
- [21] Keller, R. J.; Halmes, N. C.; Hinson, J. A.; Pumford, N. R. Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem Res Toxicol* 6:430-433; 1993.
- [22] Robinson, C. E.; Keshavarzian, A.; Pasco, D. S.; Frommel, T. O.; Winship, D. H.; Holmes, E. W. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem* 266:48-57; 1999.
- [23] Davies, S. M.; Poljak, A.; Duncan, M. W.; Smythe, G. A.; Murphy, M. P. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 31:181-190; 2001.
- [24] Buss, H.; Chan, T. P.; Sluis, K. B.; Domigan, N. M.; Winterbourn, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 23:361-366; 1997.
- [25] Oh-Ishi, M.; Ueno, T.; Maeda, T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. *Free Radic Biol Med* 34:11-22; 2003.
- [26] Meany, D. L.; Xie, H.; Thompson, L. V.; Arriaga, E. A.; Griffin, T. J. Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry. *Proteomics* 7:1150-1163; 2007.
- [27] Soreghan, B. A.; Yang, F.; Thomas, S. N.; Hsu, J.; Yang, A. J. High-throughput proteomic-based identification of oxidatively induced protein carbonylation in mouse brain. *Pharm Res* 20:1713-1720; 2003.
- [28] Mirzaei, H.; Regnier, F. Identification of yeast oxidized proteins: chromatographic top-down approach for identification of carbonylated, fragmented and cross-linked proteins in yeast. *J Chromatogr A* 1141:22-31; 2007.
- [29] Bautista, J.; Mateos-Nevado, M. D. Immunological detection and quantification of oxidized proteins by labelling with digoxigenin. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:419-423; 1998.
- [30] Yoo, B. S.; Regnier, F. E. Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis* 25:1334-1341; 2004.
- [31] Chaudhuri, A. R.; de Waal, E. M.; Pierce, A.; Van Remmen, H.; Ward, W. F.; Richardson, A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. *Mech Ageing Dev* 127:849-861; 2006.

- [32] Pamplona, R.; Dalfo, E.; Ayala, V.; Bellmunt, M. J.; Prat, J.; Ferrer, I.; Portero-Otin, M. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* 280:21522-21530; 2005.
- [33] Butterfield, D. A.; Sultana, R. Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. *Expert Rev Proteomics* 5:157-160; 2008.
- [34] Bennaars-Eiden, A.; Higgins, L.; Hertz, A. V.; Kappahn, R. J.; Ferrington, D. A.; Bernlohr, D. A. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem* 277:50693-50702; 2002.
- [35] Costa, V. M.; Amorim, M. A.; Quintanilha, A.; Moradas-Ferreira, P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med* 33:1507-1515; 2002.
- [36] Korolainen, M. A.; Goldsteins, G.; Alafuzoff, I.; Koistinaho, J.; Pirttila, T. Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain. *Electrophoresis* 23:3428-3433; 2002.
- [37] Castegna, A.; Aksenov, M.; Thongboonkerd, V.; Klein, J. B.; Pierce, W. M.; Booze, R.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82:1524-1532; 2002.
- [38] Reverter-Branchat, G.; Cabisco, E.; Tamarit, J.; Ros, J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem* 279:31983-31989; 2004.
- [39] Sorolla, M. A.; Reverter-Branchat, G.; Tamarit, J.; Ferrer, I.; Ros, J.; Cabisco, E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 45:667-678; 2008.
- [40] Irazusta, V.; Moreno-Cermeno, A.; Cabisco, E.; Ros, J.; Tamarit, J. Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radic Biol Med* 44:1712-1723; 2008.
- [41] Magi, B.; Ettore, A.; Liberatori, S.; Bini, L.; Andreassi, M.; Frosali, S.; Neri, P.; Pallini, V.; Di Stefano, A. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ* 11:842-852; 2004.
- [42] Cabisco, E.; Belli, G.; Tamarit, J.; Echave, P.; Herrero, E.; Ros, J. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:44531-44538; 2002.
- [43] Tsaytler, P. A.; M, C. O. F.; Sakharov, D. V.; Krijgsveld, J.; Egmond, M. R. Immediate protein targets of photodynamic treatment in carcinoma cells. *J Proteome Res* 7:3868-3878; 2008.
- [44] Grimsrud, P. A.; Picklo, M. J., Sr.; Griffin, T. J.; Bernlohr, D. A. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics* 6:624-637; 2007.
- [45] Grimsrud, P. A.; Xie, H.; Griffin, T. J.; Bernlohr, D. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 283:21837-21841; 2008.
- [46] Fenaille, F.; Tabet, J. C.; Guy, P. A. Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides within unfractionated digests using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 76:867-873; 2004.
- [47] Mirzaei, H.; Regnier, F. Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. *Anal Chem* 78:770-778; 2006.
- [48] Johansson, E.; Olsson, O.; Nystrom, T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279:22204-22208; 2004.