

Estudio comparativo del perfil proteico de cepas silvestre (BY4741) y mutante (trk1,2) de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de ayuno en K⁺

Miguel Curto¹, Clara Navarrete², Luis Valledor³, María Luisa Hernández⁴, José Ramos², Jesús Jorrín¹

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, España. ² Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Córdoba, España. ³ Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Área de fisiología vegetal, Universidad de Oviedo, Oviedo, España. ⁴ Departamento de Microbiología II, Facultad de farmacia, Universidad Complutense de Madrid- Parque Científico de Madrid (UCM-PCM). Madrid, España.

Resumen

Se ha llevado a cabo el estudio comparativo del proteoma de las cepas silvestre (BY4741) y mutante (trk1,2) de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones limitantes de K⁺, utilizando electroforesis bidimensional acoplada a MS. En respuesta al ayuno en K⁺ se observó un marcado descenso del contenido en proteínas en extractos celulares y del número de spots en geles bidimensionales, tanto en la variedad silvestre como la mutante. Los spots que presentaron diferencias cualitativas o cuantitativas, estadísticamente significativas, entre cepas se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF). Tras la identificación mediante búsqueda en base de datos (UniProtKB-SwissProt; limitada a la taxonomía de *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast)) las proteínas se agruparon de acuerdo a su función. El ayuno en potasio causó una disminución en enzimas del metabolismo energético y del metabolismo de aminoácidos, así como a proteínas de respuesta a estrés.

Este trabajo forma parte del proyecto TRANSLUCENT (<http://www.translucent-network.org/>),

cuyo objetivo es analizar los mecanismos implicados en la homeostasis catiónica [1] usando como sistema modelo *S. cerevisiae*. Mediante una aproximación de proteómica de expresión diferencial basada en electroforesis bidimensional, se ha intentado identificar cambios en el contenido en proteínas como resultado de la doble mutación en los genes que codifican proteínas transportadoras de K⁺ (TRK1 y TRK2) [1], y en condiciones de ayuno en K⁺. En un trabajo preliminar, el proteoma de las dos cepas (silvestre y doble mutante) se comparó en las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento, con concentraciones óptimas (50 mM

ClK) de K⁺ en el medio [2]. Se realizaron extracciones de proteínas [3] y geles bidimensionales (IEF en el rango de pH 5-8; SDS-PAGE 12 %; tinción con Coomassie coloidal) [4] de WT y trk1,2 a 0 (control), 30, 60, 180 y 300 tras la eliminación del K⁺. Se detectó un descenso progresivo con el tiempo de ayuno tanto en el contenido en proteínas del extracto como en el número de spots resueltos, siendo este efecto más acusado en la cepa mutante que en la silvestre (Figura 1). Se picaron los spots que mostraron diferencias cualitativas o cuantitativas, estadísticamente significativas, 303 en total, se sometieron a digestión triptica, analizándose los péptidos resultantes por MS (MALDI-TOF-TOF). Tras la búsqueda en bases de datos (UniProtKB-SwissProt; limitada a la taxonomía de *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast)) utilizando el software MASCOT [5], se identificaron 171 proteínas, que se agruparon según su función (Figura 2). El ayuno en potasio causó una disminución en enzimas del metabolismo energético y del metabolismo de aminoácidos, así como a proteínas de respuesta a estrés. Entre las proteínas identificadas, las relacionadas con el estrés y/o reacciones de defensa, metabolismo de nucleótidos y transcripción, fueron las que presentaron mayores cambios entre cepas, siendo más abundantes en la cepa silvestre.

Agradecimientos

Agradecemos el trabajo desarrollado, por la Dra. Hanna Sychrova (Departamento del transporte de membrana, Instituto de fisiología, Republica Checa, Praga), con las cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo. Así como al proyecto "Gene interaction networks and models of cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* -TRANSLUCENT" por financiar este trabajo.

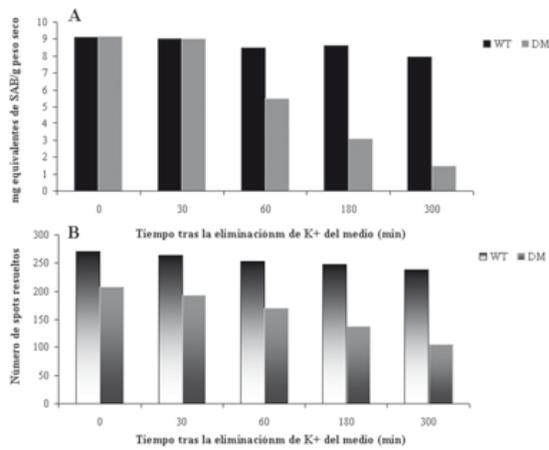


Figura 1. A. Contenido en proteínas en extractos de la cepa silvestre y doble mutante a distintos tiempos tras la eliminación de K⁺ del medio. B. Número de spots resueltos en dichos extractos, en el rango de pH 5-8 y Mr 6-95 KDa.

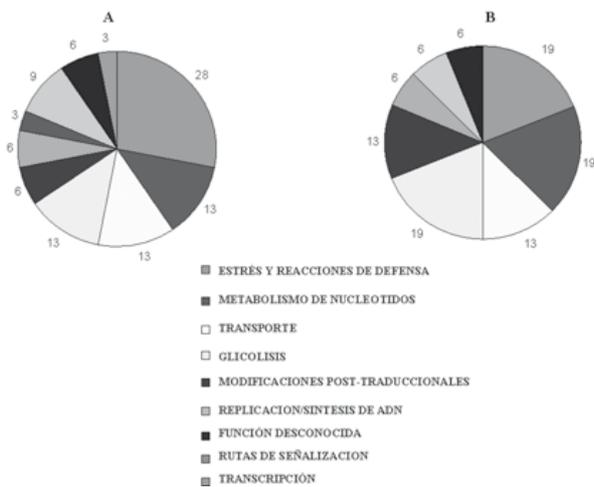


Figura 2. Agrupación funcional de las proteínas afectadas por el ayuno en potasio. A. Cepa silvestre; B. Doble mutante. Datos expresados en porcentaje.

Referencias

[1] Rodríguez-Navarro A y Ramos J. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of bacteriology, 1984; 159: 940-45.

[2] Curto M, Ramos J, Gutierrez L, Gil C, Jorriñ J, Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* wild and potassium transport-affected mutant strains. Joint congress of the spanish society and the latin american human proteome organization. 2009 ; Pamplona.

[3] Damerval C, De Vienne D, Zivy M, Thiellement H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, 1986; 7: 52-54.

[4] Mathesius U, Keijzers G, Natera SHA, Weinman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. Proteomics 2001; 1: 1424-40.

[5] Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis, 1999; 20: 3551-67.