

Desarrollo de metodologías para la detección de modificaciones postraduccionales en cisteínas (S-nitrosilación y oxidación) mediante aproximaciones proteómicas basadas en marcaje fluorescente y electroforesis bidimensional

Daniel Tello, Rubén Fernández-Rodríguez, Antonio Martínez-Ruiz

Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) pueden jugar un papel fundamental en mecanismos de señalización celular en diversos procesos fisiopatológicos. Entre los mecanismos moleculares por los que actúan, van cobrando importancia varios tipos de modificación reversible en cisteínas entre ellas la nitrosilación, tiolación y formación de ácido sulfénico, además de la formación de puentes disulfuro específicos. Debido a ello en los últimos años se ha puesto gran interés en la aplicación de diferentes métodos proteómicos para la detección e identificación de estas modificaciones postraduccionales “nitroxidativas”.

El método de “biotin switch” abrió paso a la identificación proteómica de proteínas S-nitrosiladas, y se ha modificado después para detectar otras modificaciones en cisteínas. Dicho método se basa en la sustitución de la modificación (nitrosotiol o cisteína oxidada) por biotina, previa reducción específica del tiol oxidado (ascorbato en el caso de nitrosotioles y DTT en el caso de cisteínas oxidadas). Una evolución del clásico “biotin switch” es el denominado “fluorescence switch”, en el cual se ha sustituido la biotina por un fluoróforo con capacidad para reaccionar con tioles libres.

Hemos desarrollado un método de “fluorescence switch”, con maleimida-fluoresceína como marcador, y empleando electroforesis bidimensionales, para la identificación de proteínas S-nitrosiladas, lo que nos ha permitido identificar proteínas sensibles a nitrosocisteína (CysSNO) en células endoteliales y denotar la importancia de la ruta de la tiorredoxina reductasa en la eliminación de nitrosotioles en macrófagos activados [1]. En este caso la identificación

se ha conseguido correlacionando el aumento en la señal correspondiente a la fluoresceína con el patrón de proteína total marcada con un reactivo que detecta proteína total en solución neutra (Lucy-565), de forma que pudiéramos obtener ambos patrones fluorescentes de forma simultánea en el mismo gel.

Este tipo de metodología proteómica la estamos aplicando a la detección e identificación de proteínas con cisteínas oxidadas en la respuesta fisiológica a hipoxia en diversos sistemas celulares. Se ha sustituido el marcador fluorescente maleimida-fluoresceína por Bodipy-FL, el cual presenta carga neta neutra, con lo que se elimina el desplazamiento en la migración de las proteínas en el isoelectroenfoque. Para observar diferencias pequeñas entre diferentes condiciones estamos aplicado una metodología basada en dos fluoróforos. Las muestras se marcan con Bodipy-FL o Bodipy-TMR y se cargan en el mismo gel bidimensional. Sin embargo, el análisis detallado de los resultados en ambos esquemas, para relacionarlos con el patrón de proteína total, requiere de un cambio en los protocolos de análisis respecto a los paquetes de software preparados para los esquemas habitualmente utilizados.

Referencias

- [1] Tello D, Tarín C, Ahicart P, Bretón-Romero R, Lamas S, Martínez-Ruiz A. A “fluorescence switch” technique increases the sensitivity of proteomic detection and identification of S-nitrosylated proteins. *Proteomics* 2009; in press. Published online with DOI 10.1002/pmic.200900070.