

Desarrollo de una metodología de detección fluorescente para la detección del S-nitrosoproteoma y aplicación a células endoteliales

Martínez-Ruiz A¹, Tarín C¹, Lamas S²

¹Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Melchor Fernández Almagro, 3 – 28029 Madrid; ²Instituto “Reina Sofía” de Investigaciones Nefrológicas, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu, 9 – 28040 Madrid

Introducción

La S-nitrosilación de proteínas se está estudiando actualmente como una modificación postraduccional no enzimática que puede constituir un nuevo paradigma en señalización celular (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004, 2007). El estudio del S-nitrosoproteoma se inició prácticamente con la invención de la técnica del “cambio por biotina” o “*biotin switch*” (Jaffrey et al., 2001). Sin embargo, esta técnica presenta aún algunas limitaciones, entre las cuales se puede destacar su reducida sensibilidad.

Material y métodos

Se han preparado extractos de células endoteliales de la línea EA.hy926 tratadas con 1 mM S-nitrosocisteína (CysSNO), según hemos descrito previamente (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004, 2006). El método de derivatización consta de dos pasos, incluyendo la precipitación con acetona tras cada paso: 1) bloqueo con N-etilmaleimida; 2) reducción con ácido ascórbico y marcaje simultáneo con maleimida fluorescente o maleimida-biotina.

Resultados y conclusiones

Al cambiar la química de la derivatización para utilizar reactivos basados en maleimidias, se hicieron controles para comprobar especificidad y ausencia de reacciones secundarias en cada paso de la reacción. Posteriormente se ha comprobado la especificidad del método comparando células en estado basal o nitrosiladas con CysSNO, usando maleimida-biotina y comparándolo con el método de “cambio por biotina” ya establecido. Se han comprobado especialmente las condiciones de marcaje para evi-

tar reacciones secundarias de la maleimida marcada. Finalmente, se han realizado geles bidimensionales de los extractos derivatizados, detectando simultáneamente fluoresceína y marcaje de proteína total con Lucy565 (Fluka), observándose un buen número de proteínas marcadas, aun empleando una cantidad sensiblemente menor de proteína que en nuestro trabajo anterior.

Aunque estos resultados aún tienen que ser analizados en mayor detalle, hemos desarrollado una metodología que permite aprovechar varias ventajas del marcaje fluorescente y separación en 2D-PAGE para su aplicación al estudio del S-nitrosoproteoma: mayor sensibilidad en la detección e identificación de proteínas, cuantificación relativa mediante el empleo de varios fluoróforos. Asimismo, el desarrollo de la derivatización con maleimida permite también el análisis por otras metodologías proteómicas de los sitios precisos de marcaje provenientes a S-nitrosilaciones.

Bibliografía

- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., Snyder, S. H. *Nat Cell Biol* 2001, 3, 193-197.
- Martínez-Ruiz, A., Lamas, S. *Cardiovasc Res* 2004, 62, 43-52.
- Martínez-Ruiz, A., Lamas, S. *Arch Biochem Biophys* 2004, 423, 192-199.
- Martínez-Ruiz, A., Lamas, S., in: Vivanco, F. (Ed.), *Cardiovascular Proteomics*, Humana Press, Clifton, N.J. 2006, pp. 215-224.
- Martínez-Ruiz, A., Lamas, S. *Cardiovasc Res* 2007, 75, 220-228.