

## Caracterización de S-glutationilación de proteínas a nivel de proteoma. Dificultades

Esperanza Morato López<sup>1</sup>, Sira Echevarría Zomeño<sup>2</sup>, Anabel Marina Ramírez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Proteómica. C.B.M. "Severo Ochoa". CSIC-UAM

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba

La S-glutationilación no solo es una respuesta celular al estrés oxidativo, también es un mecanismo para la regulación postraduccional dinámica de proteínas reguladoras, estructurales y metabólicas. Estudios recientes han demostrado su implicación en la regulación de la señalización y rutas metabólicas de sistemas celulares [1, 2]. Por todo ello se están desarrollando métodos analíticos y proteómicos que permitan la caracterización de estas modificaciones donde la principal limitación a nivel de espectrometría de masas que hemos encontrado en nuestro laboratorio es la "calidad" de los espectros de fragmentación MS/MS.

Recibimos en nuestro laboratorio unas muestras para la caracterización de glutacionilaciones. El objetivo del trabajo era la identificación de sitios de glutacionilación de proteínas en el proteoma de *Arabidopsis thaliana* tras la infección con la cepa no virulenta de *Pseudomonas syringae*. Disponíamos del proteoma no infectado (NI), del proteoma incubado 4 h con un placebo (MgCl) y del proteoma infectado 4 h con la cepa de *P. syringae*. De cada proteoma disponíamos de tres condiciones: sin agente reductor, tratada con glutatión (GSH) y tratada con glutatión disulfuro (GSSH). Comenzamos el trabajo con las tres condiciones de la muestra NI, para lo cual confeccionamos tres geles SDS-PAGE, respectivamente, con el fin de digerir la muestra en gel concentrador y, de esta manera, limpiar el proteoma [3] (el tampón de muestra no contenía beta-mercaptoetanol ni DTT). Los péptidos obtenidos tras las digestiones se analizaron mediante LC-MS empleando un espectrómetro de masas LTQ (Thermo Fisher Scientific). Para la identificación de péptidos se empleó el software SEQUEST (Thermo Fisher Scientific), incluyendo la glutacionilación como modificación variable.

Al analizar los resultados observamos un alto número de glutacionilaciones identificadas tanto en la muestra NI como en la NI+GSH. El número de

péptidos identificados con un Xcorr > 2 fue muy similar (aproximadamente 200), así como fueron similares los valores de este parámetro entre los péptidos de ambas muestras. Analizamos de modo manual los espectros MS/MS con mejores puntuaciones sin confirmar ninguna glutacionilación en la muestra NI, pero demostrando S-glutationilación para la muestra NI+GSH. Las conclusiones preliminares de estos resultados son que este abordaje no permite la "automatización" en la identificación de glutacionilaciones en proteomas ya que no es posible establecer un punto de corte, puesto que espectros con el mismo valor de Xcorr pueden ser asignados como identificaciones correctas o incorrectas. El estudio en profundidad de los espectros MS/MS da una explicación a este hecho y es la "idiosincrasia" de los mismos para este tipo de modificación. La gran mayoría son especies M+3H<sup>+</sup>, probablemente debido a que en el glutatión el enlace entre el aspártico y la cisteína es tal que queda expuesto un nuevo extremo -NH<sub>2</sub> susceptible de protonación. Esto acompleja el patrón de fragmentación a la par que, en péptidos grandes, se pierde la zona alta del espectro (m/z > 2000). Son espectros con un alto nivel de "background" cuando los valores de Xcorr no son > 4, y se asemejan mucho a espectros de "contaminantes". Este hecho hace que un espectro con mal aspecto que no se corresponda con el péptido candidato tenga la misma puntuación, en ocasiones, que el que si se corresponde. Dentro del "background" podemos encontrar fragmentos procedentes del glutatión [4] como pérdida del glutámico, de todo el glutatión o de parte del mismo, pero no todos los fragmentos del espectro se pueden asignar a este patrón extra de fragmentación.

En consecuencia, las puntuaciones obtenidas empleando SEQUEST son, mayoritariamente, bajas, aún en las asignaciones correctas, lo que hace muy difícil establecer un criterio de calidad que es imprescindible para el estudio de modificaciones

a gran escala. El examen manual de los espectros sería impensable, solo factible cuando estudiamos modificaciones para una proteína única.

Quizás, un mayor conocimiento del mecanismo de fragmentación de estos péptidos pueda dar lugar a una mejora en la identificación correcta de los mismos y, de esta forma, hacer posible el estudio de esta modificación a nivel de proteoma.

## Referencias

- [1] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. "S-glutathionylation in protein redox regulation". *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43:883-898.
- [2] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A. "Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans". *Trends in Biochemical Sciences* 2008; 34, 2:85-96.
- [3] Bonzon-Kulichenko E, Pérez-Hernández D, Núñez E, Martínez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, Ramos MC, Sierra S, Martínez-Martínez S, Ruiz-Meana M, Miró-Casas E, García-Dorado D, Redondo JM, Burgos JS, Vázquez J. "A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling". *Mol Cell Proteomics*, 2009 (en revisión).
- [4] Borges C.R, Geddes T.J, Watson J.T, Kuhn D.M. "Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation. Potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition under oxidative stress". *J Biol Chem* 2002; 277:48295-48302.

## La inhibición de la síntesis de óxido nítrico durante la colestasis inducida experimentalmente reduce la lesión hepatocelular al facilitar la homeostasis de nitrosotioles

Laura M. López-Sánchez<sup>1</sup>, Fernando J. Corrales<sup>2</sup>, Montserrat Barcos<sup>3</sup>, Isabel Espejo<sup>3</sup>, Juan R. Muñoz-Castañeda<sup>1</sup>, Antonio Rodríguez-Ariza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Reina Sofía. Unidad de Investigación, IMIBIC, Córdoba, <sup>2</sup>Universidad de Navarra, Hepatology and Gene Therapy Unit, Pamplona, <sup>3</sup>Hospital Universitario Reina Sofía. Servicio de Análisis Clínicos, Córdoba

## Introducción

Las intervenciones que faciliten el metabolismo del óxido nítrico (NO) en etapas colestásicas tempranas pueden ayudar a mantener el estado redox de las proteínas hepáticas. Además, escasos estudios han explorado la participación de la S-nitrosilación de proteínas y el metabolismo de nitrosotioles (SNO) en la lesión hepatocelular por colestasis.

## Metodología

Se dividieron ratas macho Wistar (200-250 g) en 4 grupos (n=10): operación simulada (OS), ligadura del conducto biliar (BDL), y ratas BDL tratadas con el inhibidor de síntesis de NO S-metilisotiurea

(SMT, 25 mg/Kg) o con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA, 50 mg/Kg). La función hepática y NO plasmático se analizaron mediante ensayos bioquímicos. La proliferación ductular se determinó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina y se confirmó con inmunotinción específica (citoqueratina 19) de colangiocitos maduros. La fibrosis hepática se determinó mediante tinción con tricrómico de Masson. Se analizó la expresión de la bomba exportadora de productos conjugados (Mrp2), afectada en diversos modelos experimentales de colestasis, mediante western blot, y la de iNOS y la enzima nitrosoglutation reductasa (GSNOR, codificada por el gen ADH5 en humanos) por RT-PCR. Las proteínas S-nitrosiladas se detectaron y purificaron con el método "biotin-switch", una aproximación