

Expresión diferencial de proteínas del citoesqueleto del macrófago tras la interacción con *Candida albicans*: Problemas en la normalización de las muestras

Jose Antonio Reales-Calderón¹, M^a Luisa Hernaez², M^a Dolores Gutiérrez², Gloria Molero¹, Concha Gil^{1,2}

¹Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. ²Unidad de Proteómica. Universidad Complutense de Madrid- Parque Científico de Madrid (UCM-PCM)

Abstract

El estudio del citoesqueleto de macrófagos murinos en la interacción con *Candida albicans* resulta de gran interés por los importantes cambios que ocurren en una célula fagocítica tras entrar en contacto con un “cuerpo extraño”. La fagocitosis conlleva alteraciones en el citoesqueleto de actina, tubulina y miosina y de las proteínas que se asocian a ellas (Arp2/3, Coronina, WASP, WAVE,...). Estudios previos basados en la obtención de subproteomas de macrófagos utilizando una extracción secuencial y analizados mediante 2D-DIGE, nos ha permitido observar un gran número de proteínas en la fracción enriquecida en citoesqueleto que aumentan su expresión tras interactuar con *C. albicans*. Sin embargo, sólo 3 proteínas pudieron ser identificadas. Con objeto de identificar un mayor número de proteínas hemos puesto a punto un método más específico para la extracción de proteínas de citoesqueleto. Utilizando esta estrategia nos hemos encontrado con que se produce un aumento considerable en la cantidad de proteína tras la interacción en comparación con el control, dificultando la normalización de las muestras a analizar.

Resultados Previos

Estudios previos de nuestro laboratorio de las proteínas presentes en diferentes subproteomas obtenidos por extracción secuencial con el kit ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit de Calbiochem y analizadas por DIGE, mostraron muchas proteínas con expresión diferencial en la fracción enriquecida en citoesqueleto. Sin embargo, pocas proteínas pudieron ser identificadas por encontrarse en muy baja concentración (Reales-Calderón J. A.; Martínez-Solano L.; Molero G.; Gil C.; resultados no publicados). Se analizó esta

fracción por cromatografía líquida, aumentando el número de proteínas identificadas y, revelando que en la muestra extraída con el kit había muy pocas proteínas propias de citoesqueleto.

Obtención de las muestras de citoesqueleto

Utilizando protocolos de extracción más específicos para proteínas de citoesqueleto, elegimos el descrito por Funchal [1], ligeramente modificado. Dicho método se basa en la utilización independiente de dos tampones con diferente concentración de sales: un tampón con alto contenido en sales (High-salt), con el cual se extrae la fracción enriquecida en filamentos intermedios de citoesqueleto; y otro de bajo contenido en sales (Low-salt), con el que se extraen fundamentalmente filamentos intermedios, tubulinas, actinas y proteínas asociadas al citoesqueleto.

El análisis preliminar de las muestras por cromatografía líquida puso de manifiesto un enriquecimiento muy importante en proteínas de citoesqueleto con respecto a la fracción extraída con el kit.

Extracción de las muestras de iTRAQ

Se realizó la extracción de proteínas de citoesqueleto con estos dos tampones, partiendo de un número constante de macrófagos, y realizamos 3 réplicas biológicas. Al cuantificar, observamos un aumento considerable (150%) de la cantidad de proteína de citoesqueleto en las muestras extraídas con el tampón High-salt procedentes de macrófagos que habían interactuado con *C. albicans* con respecto a los macrófagos control. Dichas diferencias en la cantidad de proteína no se producían en las muestras extraídas con el tampón Low-salt, como se puede observar en la Figura 1.

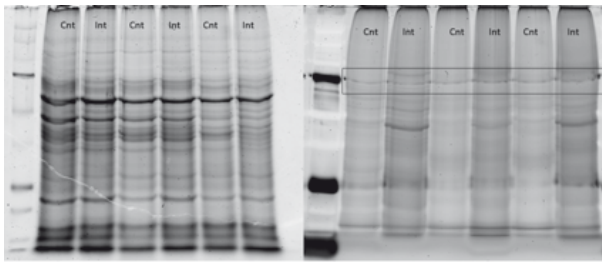


Figura 1. Geles monodimensionales teñidos con Coomassie Coloidal de muestras enriquecidas en proteínas de citoesqueleto. Izquierda: Tampón High-salt; Derecha: Tampón Low-Salt. Cnt: Macrófagos control; Int: Macrófagos tras la interacción con *C. albicans*.

Para realizar el iTRAQ habría que igualar la concentración de las muestras antes de marcar. Si lo hiciéramos con las muestras extraídas con el tampón High Salt, estaríamos aumentando las concentraciones de las proteínas de la muestra de los macrófagos control, alterando los resultados de la comparación. Con el objeto de cuantificar esta expresión diferencial tan importante, hemos decidido igualar en el número de células de partida en todos los casos y resuspender en el mismo volumen final antes de marcar con iTRAQ.

5.3 Proteómica de Parásitos

Problemática en la identificación de proteínas de parásitos

Javier Sotillo¹, Ana Pérez García¹, María Trelis¹, Dolores Bernal², Carla Muñoz-Antoli¹, José Guillermo Esteban¹, Rafael Toledo¹, Antonio Marcilla¹

¹Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de València

El principal problema al que se enfrentan los investigadores que trabajan en proteómica parasitaria es la falta de genomas completos de los parásitos estudiados. Tan solo se encuentran disponibles los de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*, [1,2], además de numerosas entradas de DNA depositadas en bases de datos. El hecho de que existan tantas entradas de *Schistosoma* en bases de datos de proteínas ha posibilitado la identificación de numerosas proteínas de otros trematodos como los echinostomátidos [3]. Sin embargo, no siempre

Vamos a comenzar el análisis de las muestras extraídas con el tampón Low-salt, el cual no plantea problemas de concentración y después se procederá al análisis de las muestras extraídas con el tampón High-salt, donde hay un aumento del 150% de las proteínas tras la interacción con la levadura.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología (proyecto BIO-2009-07654) por las ayudas financieras recibidas.

Referencias

- [1] Funchal C, de Almeida LM, Oliveira Loureiro S, Vivian L, de Lima Pelaez P, Dall Bello Pessutto F, *et al.* In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain research* 2003;11:111-8.

pueden usarse bases de datos de otros parásitos para la identificación debido a la falta de homología entre proteínas. Ha de tratarse de proteínas conservadas que mantengan una cierta homología entre diferentes géneros de parásitos. Además, en el caso de *Schistosoma*, casi la mitad de proteínas identificadas de sus transcriptomas no tienen función conocida o son incluso especie-específicas [4,5].

En el caso de *Echinostoma*, no sólo no se tiene el transcriptoma entero, sino que existen muy pocas