

ceramide species (Cer16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:1 and 24:0) were detected using multiple reactions monitoring (MRM). Absolute quantification was performed by addition of non-naturally occurring Cer 17:0 as internal standard prior to extraction. The method was proven to be linear between 1 and 200 nM.

**Results**

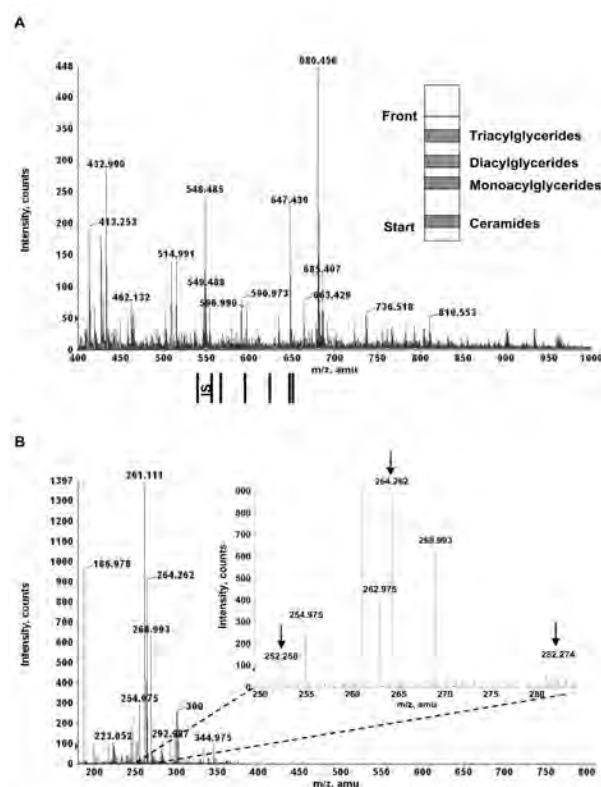
The total ceramide content in rat WAT was approximately 35 pmol/mg of tissue, from which the most abundant were Cer 24:0 (m/z 650.6), Cer 16:0 (m/z 538.6) and Cer 24:1 (m/z 648.6), representing ca. 38, 28 and 20%, respectively, from the total ceramide content.

**Conclusions**

This rapid methodology might be applied to the study of the role of ceramides in WAT metabolism, and could have important implications for obesity and type II diabetes research.

**References**

Merrill, A. H., Jr., and C. C. Sweeley. 1996. D. E. Vance and J. Vance, editors. Elsevier, Amsterdam. 309339.  
 Han, X., and R. W. Gross. 2003. J. Lipid Res. 44: 10711079  
 Gu M, Kerwin JL, Watts JD, Aebersold R. Anal Biochem 244: 347-356, 1997



**Figure.** (A) Representative survey TOF MS spectrum of a ceramide band obtained from a lipid extract of rat WAT by preparative TLC. The m/z of prospective ceramide precursors are designated by vertical bars. Inset: a schematic TLC run with hexane/ethylacetate (5/1, v/v) with assigned bands of various lipid classes. (B) MS/MS spectrum acquired from the precursor with m/z 538.6 (Cer 16:0). The ceramide-specific fragments m/z 252.27, 264.27, 282.27 used for the quantification are designated with arrows in the inset.

**Análisis diferencial del proteoma de dos cepas de *Aspergillus carbonarius* con diferente nivel de producción de ocratoxina a mediante electroforesis bidimensional**

Crespo A <sup>1,2</sup>, Rodríguez S <sup>1</sup>, Martínez P <sup>1,2</sup>, Gil J. <sup>1,2</sup>

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Universitat de Valencia. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Valencia, Spain <sup>1</sup>. Departamento de Biotecnología. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). P.O. 73, 46100, Burjassot, Valencia, Spain <sup>2</sup>.

**Introducción**

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por algunas especies de hongos de los gé-

neros *Aspergillus* y *Penicillium*. Dicha micotoxina presenta propiedades carcinogénicas, nefrotóxicas, teratogénicas y neurotóxicas (Bacha et al., 1993). La ingesta más importante de OTA proviene de los

cereales, sin embargo, recientemente se han detectado grandes concentraciones de OTA en vino, zumo de uva, uvas pasas, cacao, café, cerveza y especias (Abarca et al., 1994; Battilani y Pietri, 2002; Cabañes et al., 2002; Taniwaki et al., 2003).

Los últimos estudios demuestran que las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (*Aspergillus* negros) son la principal fuente de contaminación por OTA de muchos de estos alimentos (Cabañes et al., 2002), siendo *A. carbonarius* la especie con mayor porcentaje de cepas ocratoxigénicas (Belli et al., 2004). Este trabajo de investigación pretende ampliar el conocimiento existente a cerca de las rutas metabólicas implicadas en la producción de la micotoxina a través del estudio diferencial de dos proteomas de *Aspergillus carbonarius* correspondientes a una cepa altamente productora y otra que presenta muy escasa producción de OTA.

## Material y métodos

- Extracción de proteínas con fenol: Nos basamos en un protocolo diseñado para la extracción de proteínas de tejidos vegetales (Hurkmand y Tanaka, 1986) y se realizaron algunas modificaciones. Se trituraron finamente en un mortero 2 g de micelio, previamente crecido en placas con CYA, congelado a -80 °C. Se añadieron 6 ml de tampón de extracción (0.7 M sacarosa, 0.1 mM PMSF, 2% p/v β-mercaptoetanol) y se homogeneizaron 2 veces en con un politrón (20000 rpm 30 s). A continuación se añadió un volumen de fenol (pH 8) y se agitó a 4 °C durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifugó (10000 g, 15 minutos) y se recogió la fase fenólica. Se repitió la extracción un total de tres veces. Se precipitaron las proteínas a -20°C con 5 volúmenes de 100 mM acetato amónico en metanol. Después, se lavó el pellet 3 veces con metanol (-20 °C) y tres veces con acetona (-20 °C). El pellet se resuspendió con tampón pre-IEF (7M urea, 2M tiourea, 1% p/v NP-40).
- Electroforesis bidimensional de proteínas: Se cargaron 75 µg de proteína total durante la rehidratación de los geles. Las proteínas se separaron mediante isoelectroenfoque en inmobilinas de 24 cm y rango de pH 4-7 en un IPGphor (GE Healthcare) con el siguiente programa: 0 a 500 V en 2 h, 500 a 1000

V en 2 h, 1000 a 5000 V en 2h, 5000 a 8000 V en 4 h y 8000 V 8 h. Las proteínas se separaron según su masa en un SDS-PAGE 12.5 % acrilamida. Los geles se revelaron mediante tinción de plata utilizando un protocolo compatible con espectrometría de masas (Shevchenko et al., 1996).

- Análisis de los geles. Se analizaron mediante el programa PDQuest (BioRad) tres réplicas de las dos cepas cuyo proteoma se comparaba utilizando el criterio cuantitativo de una diferencia de 2 veces en intensidad y el estadístico t-student con un de 95% de confianza para considerar un cambio como significativo.

## Resultados

La preparación de los extractos de proteínas para la electroforesis de geles bidimensionales es un paso crítico y esencial para la correcta resolución de las proteínas del extracto y la reproducibilidad de los resultados. La presencia en los hongos filamentosos de una pared celular robusta y pigmentos de melanina influye enormemente sobre ello. Inicialmente se emplearon los protocolos de extracción de proteínas descritos en la bibliografía (Shimizu y Wariishi, 2005; Kniemeyer et al., 2005) para hongos filamentosos. Estos protocolos no resultaron apropiados para *Aspergillus carbonarius* debido a la gran cantidad de pigmentos de melanina que se extraen junto a las proteínas. La extracción de proteínas con fenol consiguió que los pigmentos no interfirieran en la migración. Se obtuvo un rendimiento de proteínas de 0,86 g/g de micelio y se visualizaron un total de 960 spots/gel con amplio rango de pesos moleculares y PIs (Figura 1).

La comparación de los geles bidimensionales realizados a partir de los extractos de proteínas del micelio de las cepas productora y no productora permitió la identificación de 31 proteínas diferenciales que podrían tener implicación en las rutas metabólicas de producción de ocratoxina A.

## Conclusiones

Se ha conseguido la separación por electroforesis bidimensional del proteoma de *Aspergillus carbonarius*. La comparación de los proteomas obtenidos ha permitido detectar proteínas diferenciales potencialmente implicadas en la producción de ocratoxina A.

## Bibliografía

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G and Cabañes, F.J., *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 2650-2652.
- Bacha, H., Maaroufi, K., Achour, A., Hammami, M., Ellouz, F., and Creppy, E.E., *Colloq. INSERM*, 1993, 231, 101–110.
- Battilani, P., Pietri A., *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108, 639–643
- Belli, N., Pardo, E., Marin, S., Farré, G., Ramos, A.J. and Sanchis, V. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, **84**, 541–546.
- Cabañes, F.J., Accensi F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Minués, S and Pons, A., *International Journal Food Microbiology*, 2002, 79, 213-215.
- Hurkmand, W.J., Tanaka, C.K., *Plant Physiology*, 1986, 81, 802-806.
- Kniemeyer, O., Lessing, F., Scheibner, O., Hertweck, C. Brakhage, A.A., *Curr. Genet.*, 2005, 17, 1-12.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., *Anal. Chem.*, 1996, 68, 850-858.
- Shimizu, M., Wariishi H., *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 247, 17-22.
- Taniwaki, M., Pitt, J.L., Teixeira, A and Lamanaka B.T., *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82, 173-179.

## Functional and quantitative proteomics using SILAC in cancer research

*Luque-García JL, Epifano C, Casal JI*

Protein Technology Unit. Spanish National Cancer Research Center (CNIO)

In recent years, mass spectrometry-based proteomics has emerged as a powerful tool in cancer research and the importance of quantitation strategies has become appreciated. Several methods based on stable isotope coding and MS have been established and have become increasingly popular as alternatives to 2D-PAGE-based methods (Gorg *et al.*, 2005). Among these methods, stable-isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) has shown great promise for the simultaneous identification and quantitation of complex protein mixtures (Mann, 2006). Here we present two applications of functional and quantitative proteomics in cancer research. In the first approach, the discovery of novel FGFR3-related effectors and signaling mechanisms is being addressed. FGFR3 is one of the four receptor-tyrosine kinases that respond to fibroblast growth factor (FGF) and its overexpression has been related to bladder cancer, cervical carcinomas and multiple myeloma. In our experiments a bladder cancer cell line (RT112) and the HEK293 cell line stably transfected with FGFR3 are being used together with the SILAC strategy to compare protein expression levels in pY IPs from cells stimulated or unstimulated with

FGF9/heparine with the aim to propose a signaling network for this receptor. This would help to understand the role of FGFR3 in cancer and the pathways that confer the oncogenic potential and how they differ from the “healthy” situation. In our second approach, two colorectal cancer cell lines (KM12C and KM12SM) representing two stages of cancer progression (metastatic vs. non-metastatic) are being used to compare differences in protein expression. The study has been focused on the membrane proteome since 2/3 of the current protein targets for drugs are membrane proteins. Differentially expressed proteins are providing us clues for the discovery of novel potential biomarkers and drug targets for colorectal cancer and to better understand the mechanisms involved in cancer progression.

## Bibliografía

- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. 2005. *Proteomics* 4:3665-3685.
- Mann, M. 2006. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:952-958.