

Aproximaciones metodológicas para el estudio del estado redox (tiol-disulfuro) de proteínas en muestras vegetales

Sira Echevarría-Zomeño¹, Per Hägglund² P, Birte Svensson², Ana María Maldonado Alconada¹, Jesús V. Jorrín Novo¹

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Grupo de Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola, Universidad de Córdoba, España. ² Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

Resumen

Para el estudio del estado redox (tiol-disulfuro) de las proteínas, se utilizan técnicas de bioquímica clásica y de proteómica, incluidas aquellas de segunda generación (DIGE, ICAT), basadas en el marcaje específico de restos de cisteína. Dichas técnicas de proteómica se han empezado a usar en el estudio de los mecanismos que median procesos de desarrollo y respuesta a estreses en humanos, mamíferos, organismos modelo tales como *Escherichia coli*, y en menor medida en plantas. Sin embargo, su potencial dista mucho de ser totalmente explotado. El objetivo de este trabajo es el de optimizar el uso de las técnicas DIGE e ICAT para el estudio del proteoma redox, utilizando *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo. La aplicación de estas técnicas ha puesto de manifiesto su utilidad para la caracterización del estado redox de las proteínas, pero también a demostrado la importancia de incluir en los experimentos controles adecuados para cada paso del protocolo.

Se conoce como proteoma redox al conjunto de proteínas susceptibles de cambiar su estado de oxidoreducción en respuesta a algún estímulo. Estas modificaciones, que afectan principalmente a los residuos de cisteína, pueden ser irreversibles (como la oxidación a ácido cisteico), lo que conlleva la pérdida de actividad biológica, o reversibles, en los que el grupo tiol se puede oxidar a puente disulfuro (cisteína-cisteína). Dichas modificaciones reversibles constituyen mecanismos de regulación de la actividad, vida media y patrón de interacción de la proteína [1-4].

En un experimento típico dirigido a la caracterización del proteoma redox, se utilizan técnicas basadas en gel y cromatográficas e incluyen etapas de i) extracción proteica, ii) marcaje de tioles libres mediante agentes tiol-reactivos (iodoacetamida, maleimida, glutatión) unidos a algún tipo de elemento marcador,

como biotina o sus conjugados, antígenos, o fluorocromos (monobromobimane, fluoresceína), iii) purificación o separación, por cromatografía o electroforesis y iv) cuantificación e identificación, mediante análisis de imagen y espectrometría de masas.

Las técnicas de proteómica cuantitativa de segunda generación que implican el marcaje específico de restos de cisteína, tales como DIGE o ICAT, se han empezado a utilizar en estudios del estado redox de proteínas en diversos sistemas como mamíferos [5], bacterias [6] y en menor medida, en plantas [7]. Para caracterizar el estado redox de las proteínas en *Arabidopsis thaliana*, en nuestro grupo se están optimizando las técnicas redox-DIGE y oxICAT. Estas técnicas se basan en el marcaje diferencial de los residuos oxidados y los reducidos. En nuestro caso, este marcaje se llevó a cabo en la misma muestra, en lugar de en dos muestras diferentes. El flujo de trabajo seguido se detalla en la Figura 1. La preparación de la muestra se llevó a cabo a pH ácido, lo que evita intercambios tiol-disulfuro y oxidaciones espontáneas, que se dan a pHs 7-9 [8]. Para poder utilizar los dos agentes en el mismo tubo de ensayo, fue necesario eliminar el exceso de reactivo en cada paso del proceso. En el experimento, se incluyeron controles en los que las muestras se redujeron completamente desde el principio, de manera que sólo uno de los reactivos marcadores debería detectarse en los resultados.

La aplicación de ambas técnicas puso de manifiesto la utilidad de las mismas para discriminar entre residuos oxidados y reducidos. Sin embargo, a la vista de los resultados de los controles con muestras reducidas (no mostrados), la eficiencia del proceso de marcaje es menor de la esperada, demostrando que la inclusión de este tipo de controles es de gran importancia para evaluar la validez del experimento y corregir el error generado por el marcaje residual.

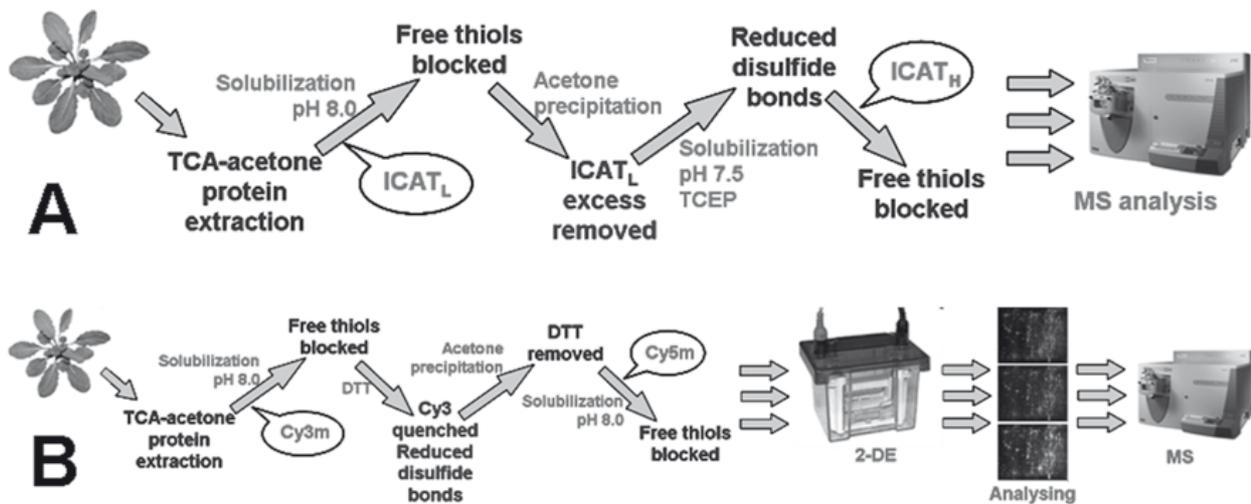


Figura 1. Esquema de las técnicas redox-ICAT (A) y redox-DIGE (B). Tras la extracción proteica, los marcajes se realizaron con ambos agentes en el mismo tubo de ensayo.

Referencias

- [1] Forman HJ y Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 2001;22:189-216.
- [2] Klatt P y Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000;267:4928-44.
- [3] Bonetto V y Ghezzi P, *Thiol-disulfide oxidoreduction of protein cysteines: old methods revisited for proteomics* en *Redox Proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases* (editores: Dalle-Donne Isabella, Scaloni Andrea y Butterfield D. Allan), JOHN WILEY & SONS, LTD.(2^a), Hoboken, New Jersey 2006, p. 976.
- [4] Bardwell JC. Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* 1994;14:199-205.
- [5] Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS y Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem* 2007;282:22040-51.
- [6] Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8197-202.
- [7] Hagglund P, Bunkenborg J, Maeda K y Svensson B. Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags. *J Proteome Res* 2008;7:5270-6.
- [8] Creighton TE. Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol* 1984;107:305-29.