

Identificación de Conexina 32 en membranas de mitocondria de hígado y de corazón en ratones Cx43KI32

Núñez E[&], Jorge I[&], Serrano H^{&§}, Martínez-Acedo P[&], Navarro PJ[&], Pérez D[&], Miró-Casas E[#], García Dorado D[#], Vázquez J.[&]

[&]Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, [§]Universidad de Puerto Rico, Arecibo, [#]Servicio de Cardiología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

Introducción

Las uniones gap (UG) son sistemas de comunicación de la membrana celular que une los citoplasmas de células adyacentes. Están constituidas por proteínas de membrana denominadas conexinas (Cx), que en grupos de seis rodean un poro de la membrana formando un hemicanal o conexón. Las UG permiten actividades de coordinación rápida como la contracción del músculo cardíaco o la transmisión de señales eléctricas neuronales. En el corazón predomina la Cx43, localizada principalmente a nivel de los discos intercalados (DI) del miocardio ventricular. El acondicionamiento isquémico (IP) (isquemia+reperfusión) retrasa la muerte de los cardiomiocitos tras un período prolongado de isquemia. La Cx 43 se expresa en los cardiomiocitos (Schulz et al., 2004) y está implicada en este proceso; sin embargo el estudio de la distribución subcelular de esta proteína no está clara todavía. Por otra parte, se ha observado que el acondicionamiento isquémico no tiene lugar en ratones Cx43KI32 (García-Dorado et al., 1997). El objetivo de este trabajo fue la identificación de Cx43 en membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata y estudio de la distribución mitocondrial de la Cx32 en ratones transgénicos Cx43KI32 mediante espectrometría de masas.

Material y métodos

El flujo metodológico se esquematiza en la Figura 1. Las proteínas extraídas de la mitocondria de hígado y corazón de ratón y de ratones Cx43KI32 se separan por SDS-PAGE y se someten a digestión trípica. Posteriormente, las muestras se analizan mediante espectrometría de masas. En primer lugar,

se realiza una búsqueda contra una base de datos de ratón para identificar los péptidos correspondientes a Cx43 y Cx32. Posteriormente, se utiliza la técnica SMIM (selected MS/MS ion monitoring) (Jorge et al., 2007), para concentrar la potencia de la trampa iónica lineal sobre los péptidos derivados de estas dos proteínas, llevando a cabo varias etapas de fragmentación (MS/MS) y subfragmentación (MS3).

Resultados

Se identificó, de forma completamente inequívoca, un péptido de la Cx43 en membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata (TYIISILFK) y dos péptidos de la Cx32 en mitocondria de hígado de ratón: LEGHGDPLHLEEVKR y LLSEQDGS-LKDILR. Estos péptidos no se identificaron en la mitocondria de corazón de ratones Cx43KI32.

Conclusiones

A partir de este estudio podemos concluir que mientras que la Cx43 se expresa en mitocondria de corazón de rata, la Cx 32 no se expresa en mitocondria de corazón de ratones Cx43KI32. El resultado apoya el papel de la Cx43 en el proceso de acondicionamiento isquémico.

Bibliografía

- García-Dorado D., Insete J., Ruíz-Meana M., González M.A. et al. 1997. *Circulation* 96: 3579-86
- Schulz R., Heusch G. 2004. *Cardiovascular Research* 62: 335-44
- Jorge I., Miró E., Villar M., Ortega-Pérez I. et al. 2007. *Journal of Mass Spectrometry* 42: 1391-1403

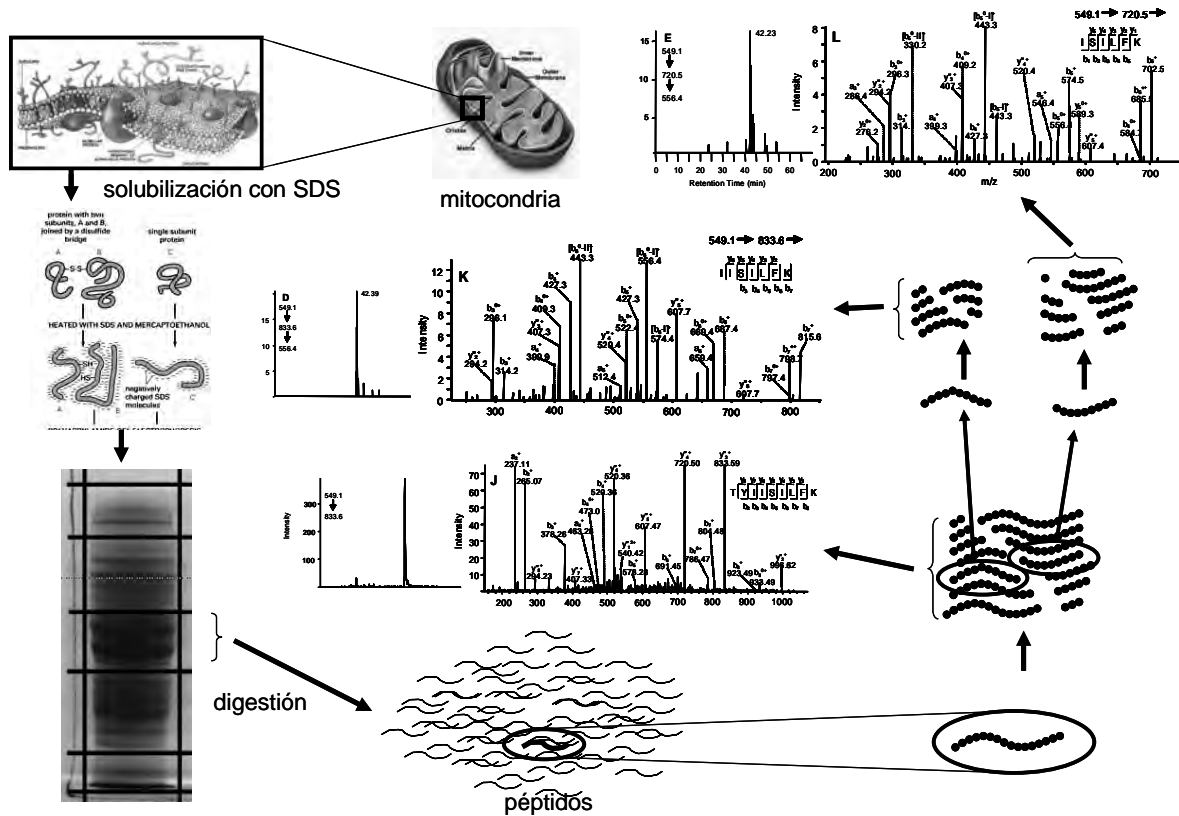


Figura 1. Esquema del proceso de identificación de Cx43 en la membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata

Perfil de expresión proteica diferencial de la infección porcina con PCV2 por SDS-PAGE, marcaje enzimático mediante isótopos estables (¹⁶O/¹⁸O) y trampa iónica.

Ramírez-Boo M¹., Serrano H²., Núñez E²., Jorge P²., Vázquez J.², Segalés Q.³, Garrido J. J.¹, Moreno A¹.

¹Dpt. Genética, Universidad de Córdoba- CSIC; Córdoba ²Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, CBMSO (CSIC-UAM); Madrid. ³Universitat Autònoma de Barcelona (CRSA); Barcelona.

Introducción

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es el agente primario causante del llamado síndrome del destete, enfermedad que afecta al sistema inmune y al patrón de expresión de muchas proteínas del cerdo. Con vistas a caracterizar los mecanismos inmunológicos implicados en la interacción cerdo-PCV2, hemos realizado estudios de expresión diferencial en ganglios linfáticos mediante una combinación

de SDS-PAGE, seguida de una digestión en gel de las proteínas separadas, marcaje de los péptidos con ¹⁶O/¹⁸O e identificación y cuantificación con trampa iónica lineal.

Material y métodos

Diez cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro (4 controles y 6 inoculados con PCV2) fueron sacrificados, comprobándose que habían de-