

Aplicación del iTRAQ para el análisis de proteínas de membrana implicadas en la glicosilación en levaduras¹

Raquel Martínez-López¹, Pilar Ximénez-Embún², Dolores Gutiérrez², Lucía Monteoliva¹, J. Arroyo¹, María Molina¹, Concha Gil¹

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

Introducción

La glicosilación de proteínas constituye una de las modificaciones postraduccionales más relevantes y mayoritaria. Como modelo eucariota en el estudio de la glicosilación se ha utilizado la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La mayoría de las proteínas presentes tanto en la pared celular como en las membranas fúngicas están glicosiladas. En este trabajo se ha estudiado la expresión diferencial de proteínas presentes en la fracción de membrana, enriquecida en proteínas glicosiladas, de una cepa parental SEY6210 respecto a un mutante defectuoso en el proceso de O-glicosilación (*pmt4Δ*). Debido a la naturaleza de estas proteínas se seleccionó el método de marcaje isobárico "iTRAQ", no basado en gel, para su estudio.

Materiales y métodos

Para la extracción de proteínas de membrana se llevó a cabo la eliminación de la pared celular de la levadura mediante la formación de protoplastos. Tras la rotura mecánica de los mismos y ultracentrifugación de la muestra en un gradiente de sacarosa se obtuvo la fracción enriquecida en membranas. El posterior tratamiento de dicha fracción con carbonato sódico (abre vesículas) y el detergente ASB, condujo a la obtención final de la muestra enriquecida en proteínas de membrana.

Puesto que la metodología iTRAQ permite comparar hasta 4 muestras simultáneamente, cada cepa se marcó por duplicado utilizando los reporters 114 y 116 para dos alícuotas de la cepa parental; y 115 y 117 para dos alícuotas de la cepa mutante. Así

podimos estimar la reproducibilidad del marcaje sobre una misma réplica biológica, exactamente en las mismas condiciones experimentales (Gan *et al.*, 2007). La muestra resultante se separó mediante 2D-LC *off-line*. El eluido, aplicado de forma automática sobre una placa, se analizó mediante MALDI-TOF/TOF. Los espectros se enfrentaron contra la base de datos SwissProt usando MASCOT como motor de búsqueda. Los ratios de interés se calcularon utilizando el área bajo la curva de cada ion marcador y se normalizaron respecto a la mediana.

Resultados

De 458 proteínas identificadas (CI%>95%), sólo se consideraron aquellas con 2 ó más péptidos: 240 (CI%>99.99%). Al enfrentar la muestra mutante frente a la control, y teniendo en cuenta la reproducibilidad del marcaje, se observa que un porcentaje importante de las proteínas del mutante han disminuido su expresión. Cabe destacar entre estas proteínas subexpresadas en el mutante, proteínas implicadas o relacionadas con el proceso de glicosilación como Ktr3p, Anp1p, Dpm1p, Stt3p y Mnn1p.

En la actualidad se están analizando nuevas réplicas biológicas.

Referencias

Gan, C. S.; Chong, P. K.; Pham, T. K.; Wright, P. C. 2007. Technical, Experimental, and Biological Variations in Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ). *Journal of Proteome Research* 6: 821-827.

¹ Este trabajo se presentó en las "I Jornadas Bienales de Proteómica" (SEProt, Sitges, 21-22 febrero 2008)