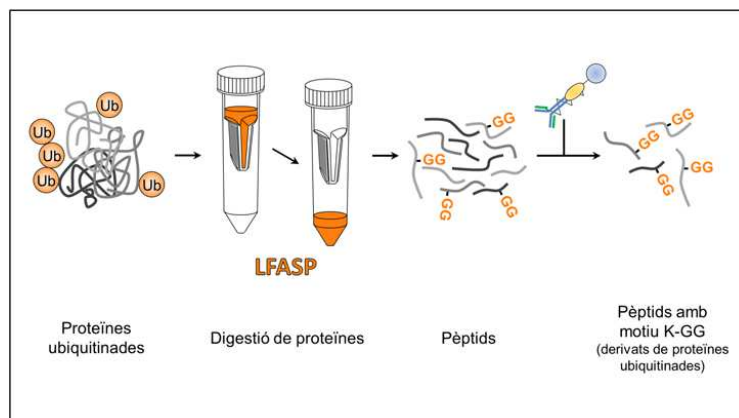


05/10/2017

La digestió de proteïnes es fa gran per ajudar en l'estudi de l'ubiquitinoma



El Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB ha desenvolupat un mètode de digestió de proteïnes a gran escala (LFASP) i demostrat la utilitat d'aquest mètode per a l'estudi de l'ubiquitinoma. L'LFASP s'està emprant per estudiar les dinàmiques en l'ubiquitinoma durant l'activació dels limfòcits T. Aquesta investigació obrirà les portes a la identificació i caracterització de noves dianes per al diagnòstic i el tractament de malalties humanes, incloent malalties immunològiques i el càncer.

A les nostres cèl·lules coexisteixen milers de proteïnes que actuen de manera coordinada en processos adaptatius de resposta a estímuls externs o interns. Aquest conjunt de proteïnes s'anomena proteoma i la disciplina que estudia els canvis en el proteoma per entendre processos cel·lulars complexos és la proteòmica. Les cèl·lules poden modular l'activitat de les seves proteïnes regulant-ne els seus nivells (mitjançant el control de la seva síntesi o degradació) i també mitjançant modificacions post-traduccionals, que poden determinar canvis en el grau d'activitat de les proteïnes, en la seva localització o en la interacció amb altres proteïnes.

Existeix un ampli ventall de modificacions post-traduccionals que inclou, entre

d'altres, l'addició reversible de petits grups químics, com és el cas de la fosforilació o l'acetilació, o de proteïnes petites com l'ubiquitina. Per interpretar el paper de les modificacions post-traduccionals en processos cel·lulars és necessari, d'una banda, poder detectar experimentalment quines proteïnes es modifiquen i, de l'altra, determinar com varien aquestes modificacions en diferents condicions experimentals.

En el nostre grup de recerca estudiem les modificacions post-traduccionals que intervenen en els processos d'activació dels limfòcits T humans, un model cel·lular per a l'estudi de la resposta immunitària i la transducció de senyal. Havent caracteritzat els processos de fosforilació que tenen lloc durant l'activació dels limfòcits T, el grup va iniciar un ambiciós projecte dedicat a la caracterització d'altres modificacions post-traduccionals rellevants com l'acetilació o la ubiquitinació (unió d'ubiquitina a una proteïna substrat) i a l'estudi de la interacció entre modificacions post-traduccionals. En aquest sentit, se sap que la ubiquitinació juga un paper important durant l'activació dels limfòcits T, però els llocs específics de modificació i les seves dinàmiques no s'han caracteritzat a gran escala.

Una estratègia experimental àmpliament utilitzada per a l'estudi de modificacions post-traduccionals consisteix en la digestió enzimàtica de les proteïnes en pèptids (generalment amb tripsina), la posterior purificació de pèptids que contenen una determinada modificació post-traduccional i, finalment, la identificació i localització de la modificació mitjançant l'ús d'espectrometria de masses. En l'estudi del proteoma modificat per ubiquitina (l'ubiquitinoma), la digestió amb tripsina genera pèptids que contenen el motiu K-GG, on dues glicines (GG) de la ubiquitina romanen unides a la lisina (K) de la proteïna modificada. Aquest motiu K-GG és reconegut per anticossos específics que permeten purificar els pèptids modificats i determinar els llocs d'ubiquitinació en la proteïna. Així, una digestió eficient és clau en la generació del motiu K-GG que reconeix l'anticòs.

Existeixen diferents estratègies per a la digestió de proteïnes, com ara la digestió en solució o en unitats d'ultrafiltració. Treballs previs d'estudi de l'ubiquitinoma han utilitzat digestió en solució i han de partit grans quantitats de mostra (de l'ordre de mil·ligrams) per compensar el fet que els pèptids modificats són poc abundants i afavorir així la seva detecció. La digestió de proteïnes en unitats d'ultrafiltració (FASP) és un mètode recent més eficient que la digestió de proteïnes en solució, però la seva aplicació s'havia restringit a la digestió de petites quantitats de mostra (de l'ordre de micrograms).

Nosaltres hem desenvolupat un mètode FASP a gran escala (LFASP) que permet digerir quantitats de mostra de l'ordre de mil·ligrams i hem avaluat l'ús d'aquest mètode en l'estudi de l'ubiquitinoma. Emprant aquesta metodologia, hem identificat uns 12000 pèptids ubiquitinats partint de 12 mg d'extracte proteic amb una selectivitat promig en la purificació superior al 70%. Els nostres resultats demostren que la digestió amb LFASP és eficient, robusta i reproduïble. A més, la comparació amb treballs de referència en l'estudi de l'ubiquitinoma demostra la superior eficiència de digestió del mètode LFASP.

Actualment, estem utilitzant l'LFASP per a l'estudi de les dinàmiques en

l'ubiquitinoma durant l'activació dels limfòcits T. Aquesta recerca revelarà aspectes importants dels mecanismes moleculars implicats en l'activació i les vies de senyalització en els limfòcits T i obrirà les portes a la identificació i caracterització de noves dianes per al diagnòstic i el tractament de malalties humanes, incloent malalties immunològiques i el càncer.

Agraïments:

Aquest treball s'ha dut a terme amb el suport del projecte BIO2013-46492-R, subvencionat pel Ministeri d'Economia i Competitivitat. A.C. és beneficiari d'un ajut postdoctoral Beatriu de Pinós (2014 BP-B 00168) subvencionat per la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya i pel 7è Programa Marc de la Unió Europea mitjançant el Programa COFUND de les Accions Marie Curie. El Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB és membre de ProteoRed, PRB2-ISCI i té el suport de la subvenció PT13/0001, del PE I+D+i 2013-2016, finançada per ISCI i FEDER.

Joaquín Abián

joaquim.abian.csic@uab.cat

Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC)
Universitat Autònoma de Barcelona

Albert Casanovas

albert.casanovas@iibb.csic.es

Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC)

Referències

[View low-bandwidth version](#)