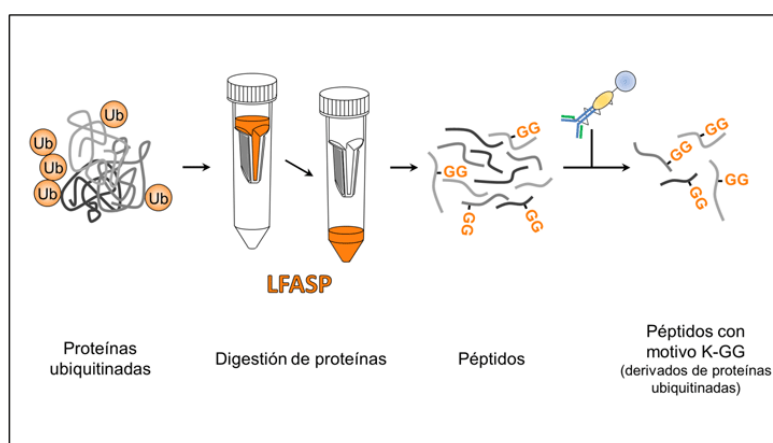


05/10/2017

La digestión de proteínas se hace grande para ayudar en el estudio del ubiquitinoma



El Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB ha desarrollado un método de digestión de proteínas a gran escala (LFASP) y demostrado la utilidad de este método para el estudio del ubiquitinoma. El LFASP se está utilizando para estudiar las dinámicas en el ubiquitinoma durante la activación de los linfocitos T. Esta investigación abrirá las puertas a la identificación y caracterización de nuevas dianas para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades inmunológicas y el cáncer.

En nuestras células coexisten miles de proteínas que actúan de manera coordinada en procesos adaptativos de respuesta a estímulos externos o internos. Este conjunto de proteínas se denomina proteoma y la disciplina que estudia los cambios en el proteoma para entender procesos celulares complejos es la proteómica. Las células pueden modular la actividad de sus proteínas regulando sus niveles (mediante el control de su síntesis o degradación) y también mediante modificaciones post-traduccionales, que pueden determinar cambios en el grado de actividad de las proteínas, en su localización o en la interacción con otras proteínas.

Existe un amplio abanico de modificaciones post-traduccionales que incluye, entre otros, la

adición reversible de pequeños grupos químicos, como es el caso de la fosforilación o la acetilación, o de proteínas pequeñas como la ubiquitina. Para interpretar el papel de las modificaciones post-traduccionales en procesos celulares es necesario, por un lado, poder detectar experimentalmente qué proteínas se modifican y, por otro, determinar cómo varían estas modificaciones en diferentes condiciones experimentales.

En nuestro grupo de investigación estudiamos las modificaciones post-traduccionales que intervienen en los procesos de activación de los linfocitos T humanos, un modelo celular para el estudio de la respuesta inmunitaria y la transducción de señal. Habiendo caracterizado los procesos de fosforilación que tienen lugar durante la activación de los linfocitos T, el grupo inició un ambicioso proyecto dedicado a la caracterización de otras modificaciones post-traduccionales relevantes como la acetilación o la ubiquitinación (unión de ubiquitina a una proteína sustrato) y al estudio de la interacción entre modificaciones post-traduccionales. En este sentido, se sabe que la ubiquitinación juega un papel importante durante la activación de los linfocitos T, pero los sitios específicos de modificación y sus dinámicas no se han caracterizado a gran escala.

Una estrategia experimental ampliamente utilizada para el estudio de modificaciones post-traduccionales consiste en la digestión enzimática de las proteínas en péptidos (generalmente con tripsina), la posterior purificación de péptidos que contienen una determinada modificación post-traduccionales y, finalmente, la identificación y localización de la modificación mediante el uso de espectrometría de masas. En el estudio del proteoma modificado por ubiquitina (el ubiquitinoma), la digestión con tripsina genera péptidos que contienen el motivo K-GG, donde dos glicinas (GG) de la ubiquitina permanecen unidas a la lisina (K) de la proteína modificada. Este motivo K-GG es reconocido por anticuerpos específicos que permiten purificar los péptidos modificados y determinar los sitios de ubiquitinación en la proteína. Así, una digestión eficiente es clave en la generación del motivo K-GG que reconoce el anticuerpo.

Existen diferentes estrategias para la digestión de proteínas, tales como la digestión en solución o en unidades de ultrafiltración. Trabajos previos de estudio del ubiquitinoma han utilizado digestión en solución y han partido de grandes cantidades de muestra (del orden de miligramos) para compensar el hecho de que los péptidos modificados son poco abundantes y favorecer así su detección. La digestión de proteínas en unidades de ultrafiltración (FASP) es un método reciente más eficiente que la digestión de proteínas en solución, pero su aplicación se había restringido a la digestión de pequeñas cantidades de muestra (del orden de microgramos).

Nosotros hemos desarrollado un método FASP a gran escala (LFASP) que permite digerir cantidades de muestra del orden de miligramos y hemos evaluado el uso de este método en el estudio del ubiquitinoma. Empleando esta metodología, hemos identificado unos 12000 péptidos ubiquitinados partiendo de 12 mg de extracto proteico con una selectividad promedio en la purificación superior al 70%. Nuestros resultados demuestran que la digestión con LFASP es eficiente, robusta y reproducible. Además, la comparación con trabajos de referencia en el estudio de la ubiquitinoma demuestra la superior eficiencia de digestión del método LFASP.

Actualmente, estamos utilizando el LFASP para el estudio de las dinámicas en el ubiquitinoma durante la activación de los linfocitos T. Esta investigación revelará aspectos importantes de los mecanismos moleculares implicados en la activación y las vías de señalización en los linfocitos T y abrirá las puertas a la identificación y caracterización de nuevas dianas para el diagnóstico y

el tratamiento de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades inmunológicas y el cáncer.

Agradecimientos:

Este trabajo se ha desarrollado con el apoyo del proyecto BIO2013-46492-R, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad. A.C. es beneficiario de una ayuda postdoctoral Beatriu de Pinós (2014 BP-B 00168) apoyada por la Secretaría de Universidades e Investigación del Departamento de Economía y Conocimiento de la Generalitat de Catalunya y por el 7º Programa Marco de la Unión Europea mediante el Programa COFUND de las Acciones Marie Curie. El Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB es miembro de ProteoRed, PRB2-ISCI y cuenta con el apoyo de la subvención PT13/0001, del PE I+D+i 2013-2016, financiada por ISCI y FEDER.

Joaquín Abián

joaquim.abian.csic@uab.cat

Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB
Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (CSIC)
Universitat Autònoma de Barcelona

Albert Casanovas

albert.casanovas@iibb.csic.es

Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB
Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (CSIC)

Referencias

Casanovas, Albert ; Pino-Llorente, Roberto; Carrascal, Monserrat; Abian Joaquim. **Large-Scale Filter-Aided Sample Preparation Method for the Analysis of the Ubiquitinome** *Anal. Chem.*, 2017, (89), (7), pp 3840–3846. DOI: [10.1021/acs.analchem.6b04804](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04804)

[View low-bandwidth version](#)