

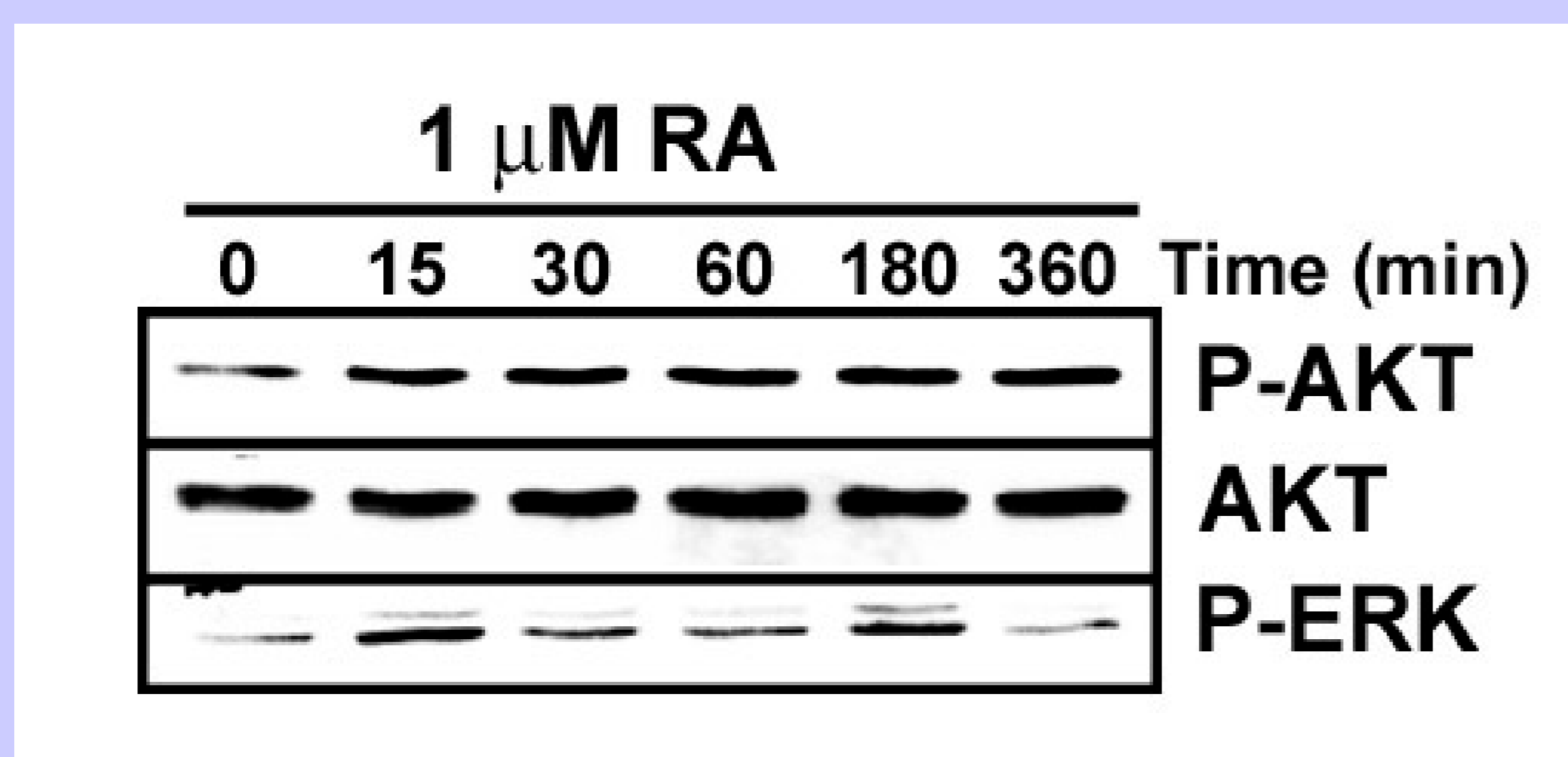
Análisis de los cambios en la fosforilación de proteínas inducidos por Acido Retinoico en células de Neuroblastoma



Emilio J. Laserna, Susana Masiá y Domingo Baretino
Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Valencia

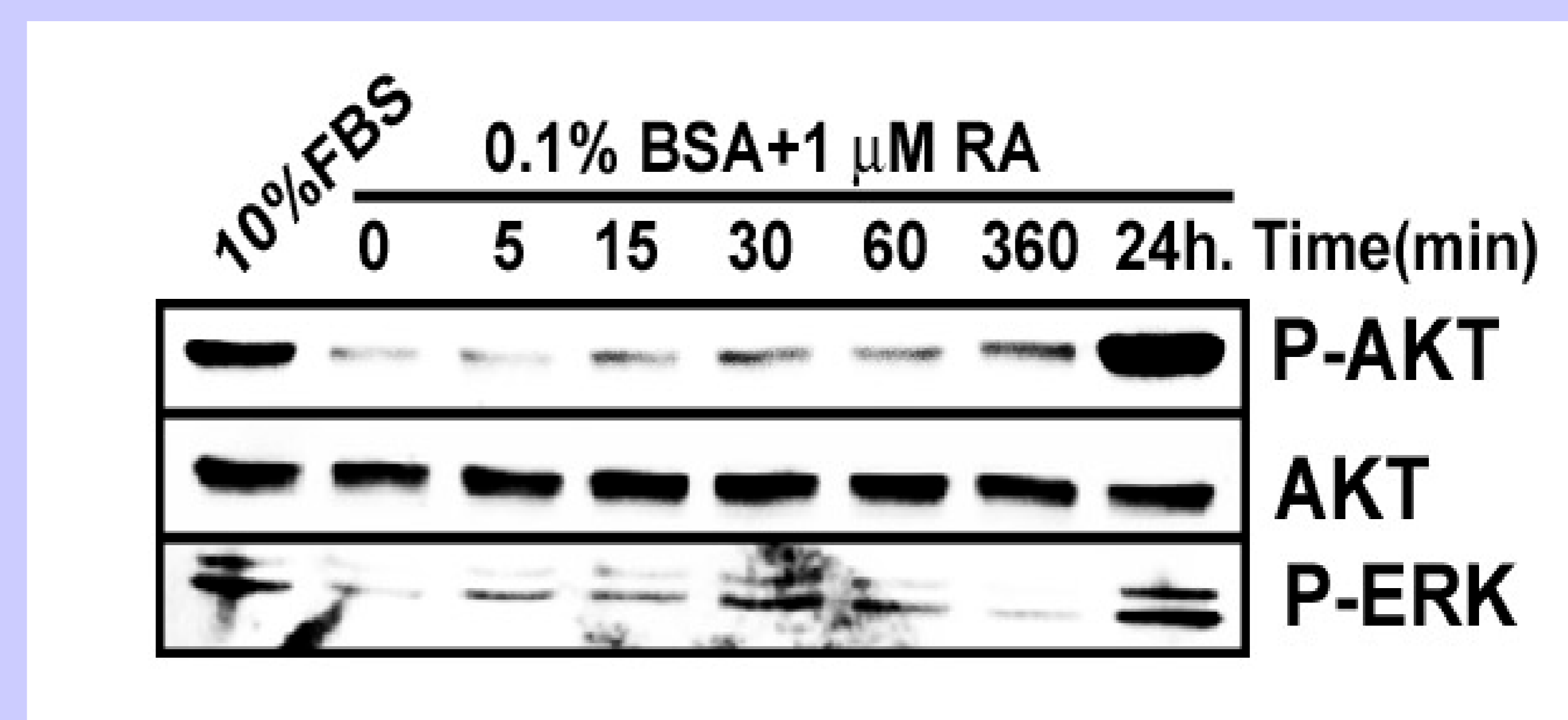
El Acido Retinoico (RA), la forma activa de la vitamina A, induce en células de neuroblastoma SH-SY5Y la diferenciación neural. Los efectos del RA están mediados por su Receptor RAR, que pertenece a la superfamilia de los Receptores Nucleares de Hormonas. Además de sus acciones transcripcionales clásicas regulando la expresión de genes concretos, el RA actúa también de un modo extra-genómico, modulando la actividad de rutas de transducción de señal. El tratamiento con RA activa, entre otras la vía de señalización, PI3K/Akt, cuya activación por RA es un requisito para la diferenciación neural (López-Carballo G. et al., J. Biol. Chem. 277, 25297-25304, 2002). Estamos interesados en conocer cuáles son las dianas de estas acciones extra-genómicas del RA en células de neuroblastoma, y que influencia pueden tener sobre la respuesta transcripcional a RA. Para ello hemos iniciado un abordaje proteómico, basado en el hecho de que el resultado final de estas acciones extra-genómicas debe ser un cambio en los patrones de fosforilación de proteínas específicas. Para ello realizamos un enriquecimiento en proteínas fosforiladas a partir de extractos nucleares o celulares totales de células control y tratadas con RA, mediante cromatografía de afinidad. Estos extractos enriquecidos en proteínas fosforiladas son separados mediante electroforesis bidimensional (IEF/SDS-PAGE), y los geles son analizados y comparados informáticamente para identificar las bandas expresadas diferencialmente en ambas condiciones. Finalmente, las manchas identificadas son aisladas del gel, digeridas con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF y LC/MS/MS).

1. Activación de PI3K/Akt y ERK1/2 por RA a través de una acción rápida no genómica del receptor nuclear RAR



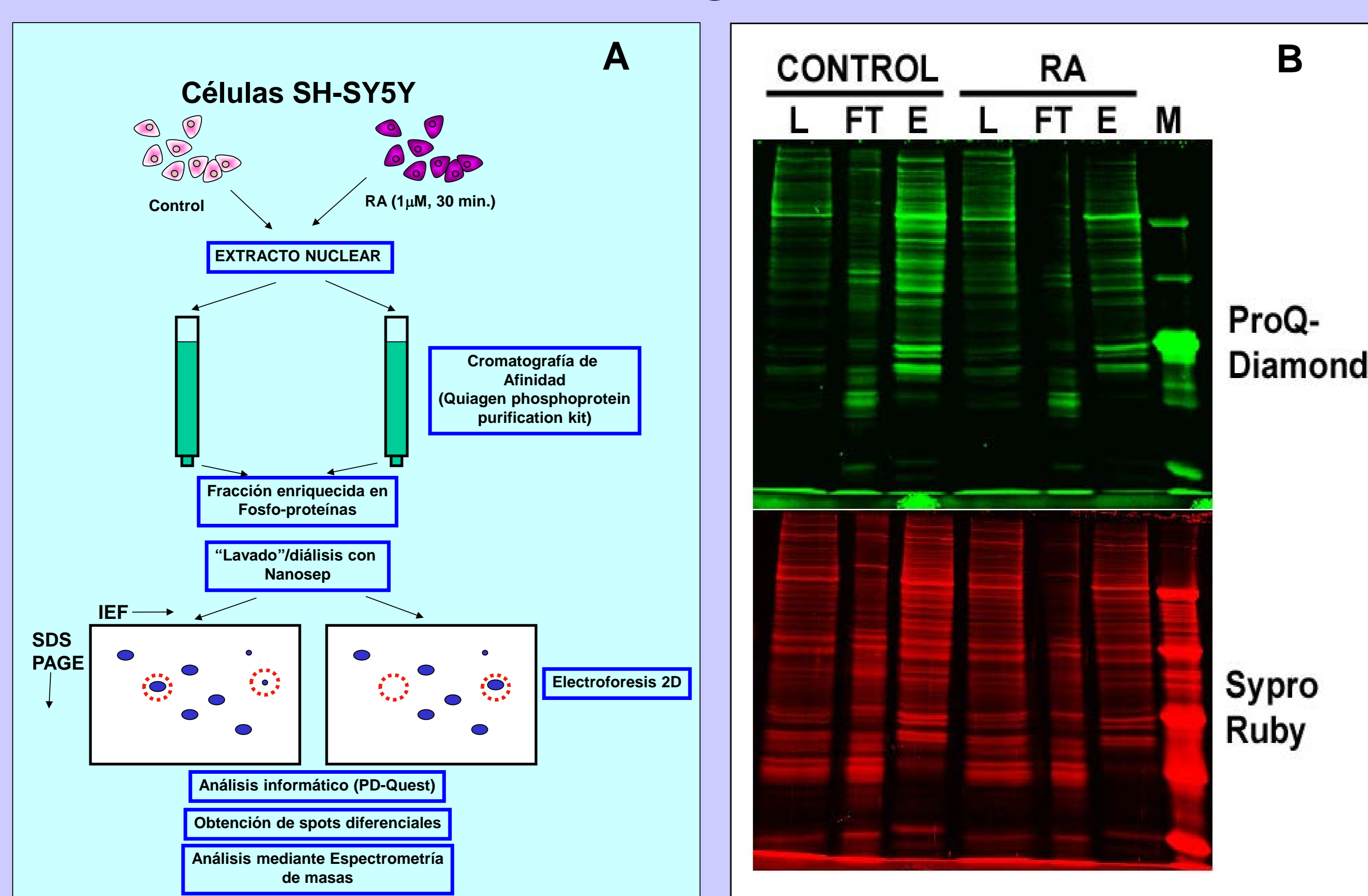
El RA es capaz de activar rápidamente (a través de una acción no genómica) las vías de señal de PI3K/Akt y ERK1/2 (del grupo de las MAPK), como demuestra el notable aumento respecto al control de las formas fosforiladas P-Akt y P-ERK. Como consecuencia, en ambos casos se desencadenarán cascadas de fosforilación que llegarán hasta factores de transcripción y otros reguladores transcripcionales nucleares que permitirán la regulación (inducción/represión) de ciertos genes.

2. La presencia de suero influye sobre la activación de PI3K/Akt y ERK1/2 por RA



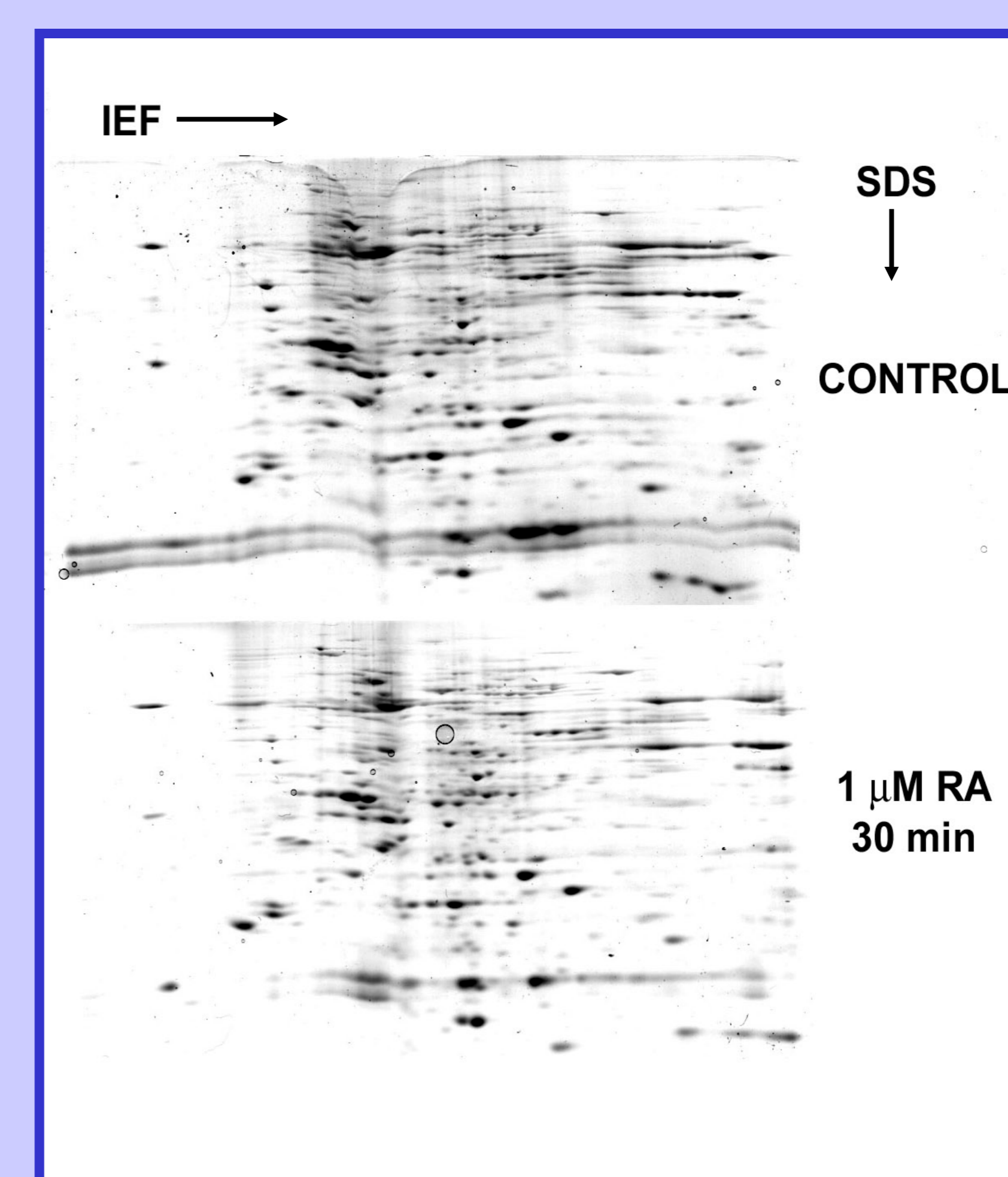
El suero juega un papel más relevante de lo esperado en la activación de las rutas de P-Akt y ERK1/2 por RA. Cuando se sustituye el medio normal con 10% de FBS por otro sin suero y con 0,1% de BSA, no sólo disminuye la actividad basal de Akt y ERK1/2, sino que además no se produce la inducción rápida por RA. Sin embargo, la activación de Akt y ERK1/2 sí se observa tras 24 h. de tratamiento con RA.

3. Purificación de fosfo-proteínas nucleares mediante cromatografía de afinidad



En la Fig. 3A se muestra un esquema del procedimiento seguido. La ultrafiltración (lavado) es crítica para la eliminación de iones que interfieren en el isoelectroenfoque. Para comprobar que el proceso de cromatografía funciona correctamente, se analizaron las fracciones: lisado nuclear (L), fracción no retenida (FT, "flow through") y eluido (E) en geles de SDS-PAGE. El gel fue teñido en primer lugar con la tinción ProQ-Diamond, específica de proteínas fosforiladas, y posteriormente con Sypro-Ruby para detectar proteínas totales. Los resultados muestran un incremento de la presencia de fosfoproteínas en el eluido.

4. Análisis de fosfo-proteínas nucleares mediante Electroforesis bidimensional



La electroforesis bidimensional se realiza utilizando tiras IPG ("Immobilized pH Gradient") de pH 3-10 para la primera dimensión (isoelectroenfoque) y geles SDS-PAGE al 12,5% para la segunda dimensión. Para una mayor resolución, también estamos utilizando tiras de rango de pH más estrecho, como de 4-7. A continuación, el análisis informático con el PD-Quest (BioRad) nos permite filtrar los geles y eliminar los artefactos creados por el "striking", para después identificar los "spots" diferenciales y los posibles cambios de expresión (spots sobre o infraexpresados).

AGRADECIMIENTOS: E. J. Laserna es becario FPI de la Generalitat Valenciana Financiado por el PNI+D+I (SAF2003-00311).