

## 2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

### Herramientas de cuantificación en fosfoproteómica: el uso de la tecnología híbrida triple cuadrupolo- trampa de iones 4000 QTRAP

Serna A.

Applied Biosystems Madrid.

La cuantificación es una técnica dentro de la proteómica que está adquiriendo una importancia creciente como herramienta fundamental para el entendimiento de numerosos procesos biológicos. En transducción de señal o en la búsqueda de biomarcadores, pequeños cambios en los niveles de ciertas proteínas o de sus isoformas, pueden en realidad esconder la clave para entender mejor ciertos mecanismos celulares. La fosforilación es una modificación post-traduccional que altera o modifica las características fisicoquímicas de las proteínas. Este cambio puede afectar a su solubilidad, a su estructura terciaria y en definitiva a su actividad o función. Estas variaciones no son más que los detonadores de otros cambios más profundos que van a concluir con una respuesta celular a un determinado estímulo. La fosforilación afecta a cerca del 30% del proteoma, y alrededor del 10% de esas fosforilaciones, representan cambios que regulan procesos

de vital importancia en la célula. Parece obvio por tanto, resaltar la importancia no solo de la identificación de las proteínas fosforiladas y sus residuos de fosforilación, sino sobre todo, de la cuantificación de los cambios en el equilibrio entre las distintas isoformas. Hemos de entender la fosforilación como un proceso altamente dinámico. Trabajar en la identificación de sitios de fosforilación requiere una sólida estrategia y equipos que gocen de cierta versatilidad y sensibilidad en el análisis. Si además queremos cuantificar los cambios que están ocurriendo, necesitamos equipos que ofrezcan un alto rango dinámico y una estrategia de cuantificación reproducible. En la siguiente exposición se destacará el papel que puede desempeñar en estos estudios los métodos de marcaje isobárico como el iTRAQ y la importancia de los métodos dirigidos de análisis (MRMs) empleando triples cuadrupolos, en la caracterización y cuantificación de fosfopéptidos.

### Monomeric and heterodimeric differential phosphorylation pattern in the Cyclin-A2/CDK2 complex

Casado-Vela, J.; Martinez, J.; Romero, S.; Casal, I.J.

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid

The Cyclin-A2/CDK2 is a protein heterodimer with kinase activity that plays a key role in centrosome duplication and meiotic cell division. In this study we used baculovirus-infected cells for the production of both, monomers and the heterodimer. We used a segmented linear ion trap mass spectro-

meter to identify the phosphorylated residues in *Mus musculus* Cyclin-A2 and CDK2 proteins, after individual expression in baculovirus and after formation of the heterodimer. By using a combination of trypsin and chymotrypsin digests to increase the sequence coverage and data dependent neutral loss

(DDNL) for phosphopeptide analysis, we identified a differential phosphorylation pattern before and after the formation of the protein complex. The analysis of the individual proteins showed that Cyclin-A2 is phosphorylated on two Ser residues (Ser14 and Ser421) and CDK2 on a single residue (Thr160). After the formation of the heterodimer Cyclin-A2 was phosphorylated only on Ser14 whereas CDK2 presented two Thr residues (Thr39 and Thr160). These results suggest that baculovirus expression represents an efficient system for the production of functional proteins and the analysis of authentic phosphorylation sites in regulatory proteins.

## References

- Abbas, T., Jha, S., Sherman, N.E., Dutta, A. *Cell Cycle*. 2007. 6: 843-852.
- Casado-Vela, J., Ruiz, E.J., Nebreda, A., Casal, I. *Proteomics*. 2007: 7, 2522-2529.
- Malumbres, M., Barbacid, M. *Nature Reviews in Cancer*. 2002. 1: 222-231.
- Ortega, S, Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., et al. *Nature Genetics*. 2003. 35: 25-37.

## Identificación de fosfopéptidos en células T humanas primarias mediante IMAC y $\text{TiO}_2$ secuencial

Casas V, Carrascal M, Ovelleiro D, Gay M, Abián J.

LP-CSIC/UAB, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Rosellón 161, 7 Planta, 08036 Barcelona, Spain.

### Introducción

La fosforilación de proteínas es uno de los principales mecanismos para la regulación de la función celular en eucariotas. El conjunto de proteínas fosforiladas de una célula, tejido u organismo constituye el denominado fosfoproteoma. Un mal funcionamiento de los mecanismos de fosforilación proteica puede tener graves implicaciones patológicas y pueden ser la causa o la consecuencia de enfermedades autoinmunes como la diabetes o la artritis reumatoide o de enfermedades que, como el cáncer, implican fallos en la regulación de la proliferación o diferenciación celular. Fármacos como la ciclosporina o la rapamicina son inhibidores de cinasas y fosfatasa. La identificación de nuevos sustratos de fosforilación y la caracterización de sus funciones así como de sus niveles en diversas condiciones son pasos necesarios tanto para mejorar la comprensión de los mecanismos celulares como para el desarrollo de nuevos fármacos. Con este objetivo en este trabajo se han puesto a punto tecnologías combinadas de purificación haciendo uso de columnas IMAC y  $\text{TiO}_2$  para la purificación de fosfopéptidos a partir de células T humanas purificadas de sangre periférica.

### Material y métodos

- *Preparación de las muestras*: los pellets enriquecidos en linfocitos T se obtuvieron a partir de concentrados leucoplaquetarios mediante centrifugación en gradiente de Ficoll, se lisaron en 6M urea, 50 mM Tris pH 7.4, DTT, inhibidores de fosfatasa y proteasas y las proteínas se precipitaron con 10% TCA y lavado con acetona y se separaron mediante SDS-PAGE. El gel se tiñó con Coomassie y se cortó en 11 bandas que se digirieron con tripsina. El extracto peptídico se evaporó y se redisolvió en 100  $\mu\text{l}$  de 250 mM AcOH/30% ACN
- *Purificación con IMAC y  $\text{TiO}_2$* : se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de fase Phos-Select a la mezcla de péptidos y se incubó durante 90 min. Los fosfopéptidos se eluyeron con 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1) El material no retenido se diluyó en 1M ácido glicólico, 5% TFA, 80% ACN y se cargó en una columna de  $\text{TiO}_2$  preparada en una punta de pipeta Gel Loader Tip (2). Los fosfopéptidos se eluyeron con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , pH 10.5 y con ACN al 30%.