

Sesión de modificaciones postraduccionales

Coordinadores: ¹Antonio Martínez-Ruiz, ²Marina Gay, ³Pablo Martínez-Acedo, ²Montserrat Carrascal

¹ Servicio de Inmunología, Hospital de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, España

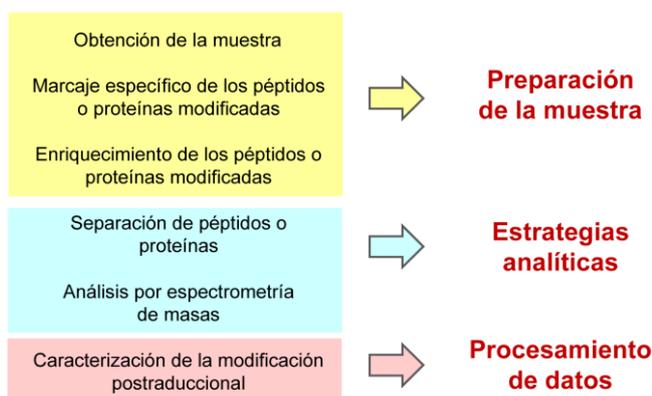
² Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Edificio M-UAB, Barcelona, España

³ Protein Chemistry & Proteomics Laboratory, CBM, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco, Madrid, España

Introducción

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas juegan un papel muy importante en casi todos los aspectos de la función celular. Su caracterización es de gran importancia para comprender los mecanismos celulares, tanto los fisiológicos como los implicados en situaciones patológicas. Existe un gran número de modificaciones y según el tipo de modificación, los procedimientos utilizados, y por tanto el flujo de trabajo, varían en cualquiera de las etapas del procedimiento. En nuestra sesión quisimos ordenar las presentaciones en tres grupos en función de la etapa que en cada trabajo se consideraba clave para la caracterización de la modificación.

Consideramos tres puntos clave en la identificación de modificaciones postraduccionales: (1) preparación de la muestra, (2) estrategias analíticas y (3) procesamiento de los datos (Ver gráfico).



De esta manera evitábamos la mera clasificación por el tipo de modificación que se estudiaba, intentando destacar los aspectos comunes a distintas modificaciones que pueden compartir aproximaciones metodológicas relativamente similares.

1. Preparación de la muestra

En este apartado se agruparon los trabajos en los que la obtención de la muestra, el marcaje específico o el enriquecimiento de los péptidos o proteínas modificadas eran la parte fundamental de la estrategia experimental. Estos trabajos incluían modificaciones redox en cisteínas (S-nitrosilación y oxidaciones reversibles por DTT), carbonilación y fosforilación.

En la primera comunicación, Laura M. López-Sánchez, del Hospital Reina Sofía en Córdoba, presentó su trabajo sobre un modelo de daño hepático por colestasis inducida en el que observan que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico reduce el daño [1]. Mediante la técnica de *biotin switch* (un protocolo en tres pasos para reducir y biotinilar específicamente cisteínas nitrosiladas) consiguen marcar selectivamente las proteínas que sufren S-nitrosilación (formación de nitrosotioles, R-S-N=O, en cisteínas). De esa manera se evaluaron los niveles globales de proteínas S-nitrosiladas, observando un aumento en los animales con la lesión inducida, pero no tanto en los animales lesionados y tratados con

inhibidor. Además, se describen 25 proteínas que pueden ser dianas de S-nitrosilación en los hígados lesionados, lo que abre el paso a estudios más detallados.

Sarela García-Santamarina, de la *Universitat Pompeu Fabra* en Barcelona, aborda el estudio de modificaciones oxidativas reversibles e irreversibles en *Schizosaccharomyces pombe* sometidas a estrés oxidativo por H₂O₂ o por delección de genes de la respuesta antioxidante [2]. El estudio de la formación de carbonilos en proteínas se lleva a cabo mediante derivatización específica con hidrazidas y su posterior detección mediante inmunodetección o fluorescencia. Así, localizan las proteínas modificadas mediante solapamiento de los perfiles 2DE derivados de la tinción específica con la señal de proteína total. Por otro lado, también mediante derivatización de las cisteínas con procedimientos similares al *biotin switch*, consiguen detectar un aumento en oxidaciones en cisteínas reversibles por DTT (incluyendo puentes disulfuro y sulfenilaciones) en ambas situaciones de estrés oxidativo. Utilizando en la derivatización los reactivos ICAT, cuantifican las cisteínas oxidadas en dos muestras distintas, con lo que pueden estudiar mejor la relevancia de estas modificaciones en estrés oxidativo intrínseco y extrínseco.

Daniel Tello, del Hospital de La Princesa en Madrid, nos mostró el desarrollo de nuevas metodologías para la detección de cisteínas modificadas empleando derivatizaciones con reactivos fluorescentes (*fluorescence switch*) y 2DE [3]. Empleando ascorbato como reductor, marcan de forma selectiva cisteínas nitrosiladas, identificando dianas de esta modificación tras un tratamiento con nitrosotiol, o dianas de desnitrosilación por la ruta de la tiorredoxina. Además, mediante reducción con DTT, observaron oxidaciones reversibles en cisteínas, un procedimiento que se puede aplicar en distintos contextos, no sólo de daño oxidativo, sino también de señalización, como la respuesta a hipoxia. Finalmente planteó posibles mejoras como son la utilización de varios fluoróforos para analizar varias muestras, o la necesidad de cambiar los protocolos de análisis respecto a los

paquetes de software empleados para 2DE.

Ana Maldonado-Alconada y Sira Echevarría-Zomeño (de la Universidad de Córdoba), además de organizar estupendamente las Jornadas y estar atentas a todos los detalles de estos días, tuvieron tiempo de presentar en sendos pósters sus resultados en cuanto al estudio de modificaciones redox de cisteínas en plantas. Ana presentó un estudio en el que se describen proteínas S-nitrosiladas (S-nitrosiloma ó S-nitrosoproteoma) en la respuesta defensiva en *Arabidopsis thaliana* empleando el *biotin switch*, consiguiendo identificar más de 100 proteínas susceptibles de ser modificadas [4]. Por su parte, Sira nos mostró diferentes aproximaciones metodológicas dirigidas a estudiar el estado redox de cisteínas en muestras vegetales marcando de forma diferencial los residuos reducidos y oxidados [5]. Para ello, se emplearon derivatizaciones fluorescentes (DIGE) y con isótopos (ICAT, para cuantificación en MS), mostrando las dificultades de estas aproximaciones y la necesidad de incorporar controles que evalúen bien la eficiencia de marcaje de los distintos estados de la cisteína. Con este mismo objetivo, Brian McDonagh, también de la Universidad de Córdoba, presentó en un póster otra metodología distinta utilizando el marcaje iTRAQ sobre una proteína modelo [6].

Y finalmente, Nerea Osinalde, de la Universidad del País Vasco, presentó en un póster la identificación de un nuevo punto de fosforilación en el factor de transcripción E2F1 [7]. En este caso utilizó una metodología de “doble enriquecimiento” a partir de extractos celulares que consistía en la inmunoprecipitación de la proteína y el posterior enriquecimiento selectivo de los péptidos trípticos fosforilados con columnas de óxido de titanio. Se puede destacar la importancia del resultado dado que se trata de una fosforilación endógena en un factor de transcripción, una proteína poco abundante pero cuya regulación por modificación postraducciona puede ser muy importante funcionalmente.

Estrategias analíticas

En cuatro de los trabajos presentados, la optimización de la estrategia analítica utilizando técnicas de separación de péptidos y proteínas acopladas al análisis por espectrometría de masas, era el paso clave en la identificación de la modificación.

María Ramírez-Boo, del University Medical Center de Ginebra, nos mostró un estudio dirigido a la identificación y cuantificación de proteínas glicosiladas en sangre [8]. El trabajo incluye el marcaje de la muestra con $^{13}\text{C}_6$ -glucosa y el posterior enriquecimiento en péptidos glicosilados mediante cromatografía de afinidad por boronatos. El análisis de estos péptidos glicosilados mediante espectrometría de masas implicó un barrido HCD-MS² y un CID-MS³ sobre pérdidas neutras específicas de péptidos que contienen glucosa (162.05 y 84.04 Da). La información cuantitativa se obtuvo a partir de las áreas de los cromatogramas de iones de los precursores. Esta estrategia la aplicaron con éxito a muestras de plasma humano y a lisados de eritrocitos, identificando hasta 161 puntos de glicosilación.

Albert Casanovas, de la Universidad de Barcelona, presentó un trabajo sobre la potencial nitración de la lipoproteína lipasa (LPL) de rata *in vivo* en respuesta a la administración de lipopolisacárido [9]. La nitración global de la proteína se determinó mediante *western-blot* anti-nitrotirosina. Para la identificación de las tirosinas nitradas se realizó, en primer lugar, una comparación de tres estrategias distintas de fragmentación mediante MS/MS estableciendo el método que conseguía detectar un mayor número de tirosinas nitradas: análisis mediante MS/MS secuencial siguiendo una lista de iones predefinida y derivada de las masas de los potenciales péptidos modificados. Así, se consiguieron identificar por primera vez péptidos nitrados tanto *in vitro* como *in vivo* en la LPL, sugiriendo nuevos mecanismos de regulación de dicha proteína.

En cuanto a la aportación de las casas comerciales a nuestra sesión, Keith Compson, de Waters Corporation, mostró métodos

alternativos de fragmentación (ETD), y estudios de movilidad de iones para la identificación de modificaciones postraduccionales en un espectrómetro de masas qTOF [10], mientras que Isidro Masana, de Agilent Technologies, presentó una nueva tecnología para el análisis selectivo de fosfopéptidos mediante LC-MS [11]. Se trata de un chip que incluye una columna de enriquecimiento empaquetada con RP1-TiO₂-RP2 y que permite en un solo experimento el análisis por separado de péptidos fosforilados y no fosforilados.

Procesamiento de datos

Debido a la utilización de métodos de enriquecimiento y de barridos específicos el procesamiento de los datos aumenta sensiblemente en complejidad respecto a otros análisis proteómicos, siendo actualmente un paso fundamental en el flujo de trabajo.

Recibimos dos resúmenes en esta sección. Anabel Marina, del CBM, nos mostró las dificultades que supone la caracterización de S-glutationilación de proteínas a nivel de proteoma [12]. Analizaron distintas muestras en tres condiciones: sin agente reductor, tratadas con glutatión y tratada con glutatión disulfuro. Usando el motor de búsqueda SEQUEST identificaron un alto número de péptidos con glutatiónilación, tanto en las muestras tratadas como sin tratar. Sin embargo, cuando analizaron manualmente los espectros de MS/MS con mayor puntuación detectaron que las identificaciones de péptidos modificados en las muestras no tratadas eran incorrectas mientras que en las muestras tratadas eran correctas. Esta mala asignación automática podría derivar del hecho de que este tipo de péptidos son en su gran mayoría especies $\text{M}+3\text{H}^+$ lo que complica su patrón de fragmentación y que además se trata de espectros con un alto nivel de ruido. Estos resultados ponen en evidencia que la identificación de péptidos con S-glutationilación es un proceso que aun requiere de un análisis más detallado para poder realizar estudios a gran escala.

David Ovelleiro, del Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB, nos presentó el flujo de trabajo desarrollado para la caracterización cualitativa y cuantitativa del fosfoproteoma [13]. El trabajo se centra en la resolución de los problemas derivados del trabajo con un subproteoma, del cálculo lo más automático posible de las identificaciones correctas y de la correcta asignación del punto de fosforilación dentro de secuencias peptídicas que contienen varios sitios potenciales. También nos mostró las mejoras en la fiabilidad de las identificaciones mediante la utilización de diversos motores de búsqueda en paralelo y nos dio unas pinceladas sobre los posibles formatos de almacenamiento de los datos, un tema que actualmente todavía no se ha estandarizado.

Referencias

- [1]. López-Sánchez, L., et al., La inhibición de la síntesis de óxido nítrico durante la colestasis inducida experimentalmente reduce la lesión hepatocelular al facilitar la homeostasis de nitrosotioles. *Proteómica* 2010; 5: 86.
- [2]. García-Santamarina, S., S. Boronat, and E. Hidalgo, Analysis of reversible and irreversible protein modifications upon oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe* by proteomic approaches. *Proteómica* 2010; 5: 91.
- [3]. Tello, D., R. Fernández-Rodríguez, and A. Martínez-Ruiz, Desarrollo de metodologías para la detección de modificaciones postraduccionales en cisteínas (S-nitrosilación y oxidación) mediante aproximaciones proteómicas basadas en marcaje fluorescente y electroforesis bidimensional. *Proteómica* 2010; 5: 90.
- [4]. Maldonado, A., et al., Deciphering the S-Nitrosylome of *Arabidopsis thaliana* during the defense response. *Proteómica* 2010; 5: 83.
- [5]. Echevarría-Zomeño, S., et al., Aproximaciones metodológicas para el estudio del estado redox (tiol-disulfuro) de proteínas en muestras vegetales. *Proteómica* 2010; 5: 81.
- [6]. McDonagh, B., A. Padilla, and J. Bárcena, Application of iTRAQ reagents to relatively quantify the reversible redox state of cysteines. *Proteómica*, *Proteómica* 2010; 5: 93.
- [7]. Osinalde, N., et al., Identification of a new phosphorylation site in E2F1 transcription factor. *Proteómica* 2010; 5: 77.
- [8]. Ramírez-Boo, M., et al., Strategies for proteomic analysis of blood glycosylated proteins. *Proteómica* 2010; 5: 72.
- [9]. Casanovas, A., et al., La lipoproteína lipasa de rata se nitra in vivo en respuesta a la administración de lipopolisacárido. *Proteómica* 2010; 5: 91.
- [10]. Compson, K., et al., Liquid chromatography - electron transfer dissociation and ion mobility studies on a QTOF mass spectrometer. *Proteómica* 2010; 5: 71.
- [11]. Massana, I., et al., HPLC - FosfoChip una nueva tecnología para el análisis selectivo de fosfopéptidos mediante LC/MS. *Proteómica* 2010; 5: 75.
- [12]. Morato, E., S. Echevarría-Zomeño, and A. Marina, Caracterización de S-glutionilación de proteínas a nivel de proteoma. *Dificultades. Proteómica* 2010; 5: 85.
- [13]. Ovelleiro, D., M. Carrascal, and J. Abian, Establecimiento de un flujo de trabajo efectivo en la caracterización cualitativa y cuantitativa del fosfoproteoma. *Proteómica* 2010; 5: 79.