

O2

Caracterización del secretoma asociado a metástasis de cáncer colorrectal mediante SILAC utilizando el sistema celular KM12

Marta Mendes¹, Rodrigo Barderas¹, María López-Lucendo¹, Roi Villar-Vázquez¹, Tamar San Hipólito-Marín¹, Alberto Peláez¹, Rubén A. Bartolomé¹, Sofía Torres¹, Ignacio Casal¹

¹Laboratorio de Proteómica Funcional, Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

m.mendes@cib.csic.es

El cáncer colorrectal (CCR) constituye la segunda causa de mortalidad asociada a cáncer en países desarrollados ya que más de la mitad de los pacientes desarrollan metástasis. En este trabajo hemos estudiado el secretoma asociado a metástasis de CCR mediante SILAC utilizando células de CCR que únicamente difieren en sus capacidades metastáticas. Así, hemos utilizado las células KM12C con pobre capacidad metastática y las células KM12SM con alto poder metastático hacia hígado.

Para ello, ambas líneas se cultivaron en medio SILAC durante seis duplicaciones para garantizar una incorporación completa de los aminoácidos ligeros o pesados. Finalmente, las células se sembraron a igual densidad incubándose durante 48 h en medio SILAC sin suero. Los medios condicionados obtenidos se cuantificaron, mezclaron en una relación 1:1 y se precipitaron. Las proteínas precipitadas se fraccionaron mediante PAGE-SDS y las 18 subfracciones obtenidas se digirieron con Tripsina y analizaron mediante LC-MS/MS en un LTQ Orbitrap Velos acoplado a un sistema Proxeon nLC. Los péptidos se cargaron en una columna de fase reversa, se eluyeron con un gradiente lineal de 180 min y se analizaron con un método de 'top 15', adquiriendo un scan de barrido seguido de las 15 fragmentaciones más intensas. Los espectros se analizaron utilizando el software Proteome Discoverer v1.3 y el motor de búsqueda MASCOT. Para la identificación de péptidos, el FDR se fijó en 0.01 con una variabilidad inferior al 20% entre ensayos. Se identificaron y cuantificaron un total de 1074 proteínas. Entre ellas, se observaron 65 proteínas diferencialmente secretadas al menos tres veces. Actualmente, hemos verificado la expresión diferencial de dos proteínas desreguladas y 4 proteínas sobreexpresadas en metástasis mediante técnicas complementarias. Se han testado cuatro de estas proteínas como potenciales biomarcadores diagnósticos de CCR cuantificándolas en suero de pacientes.