

# ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES INDUCIDA POR EL ÁCIDO RETINOICO EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

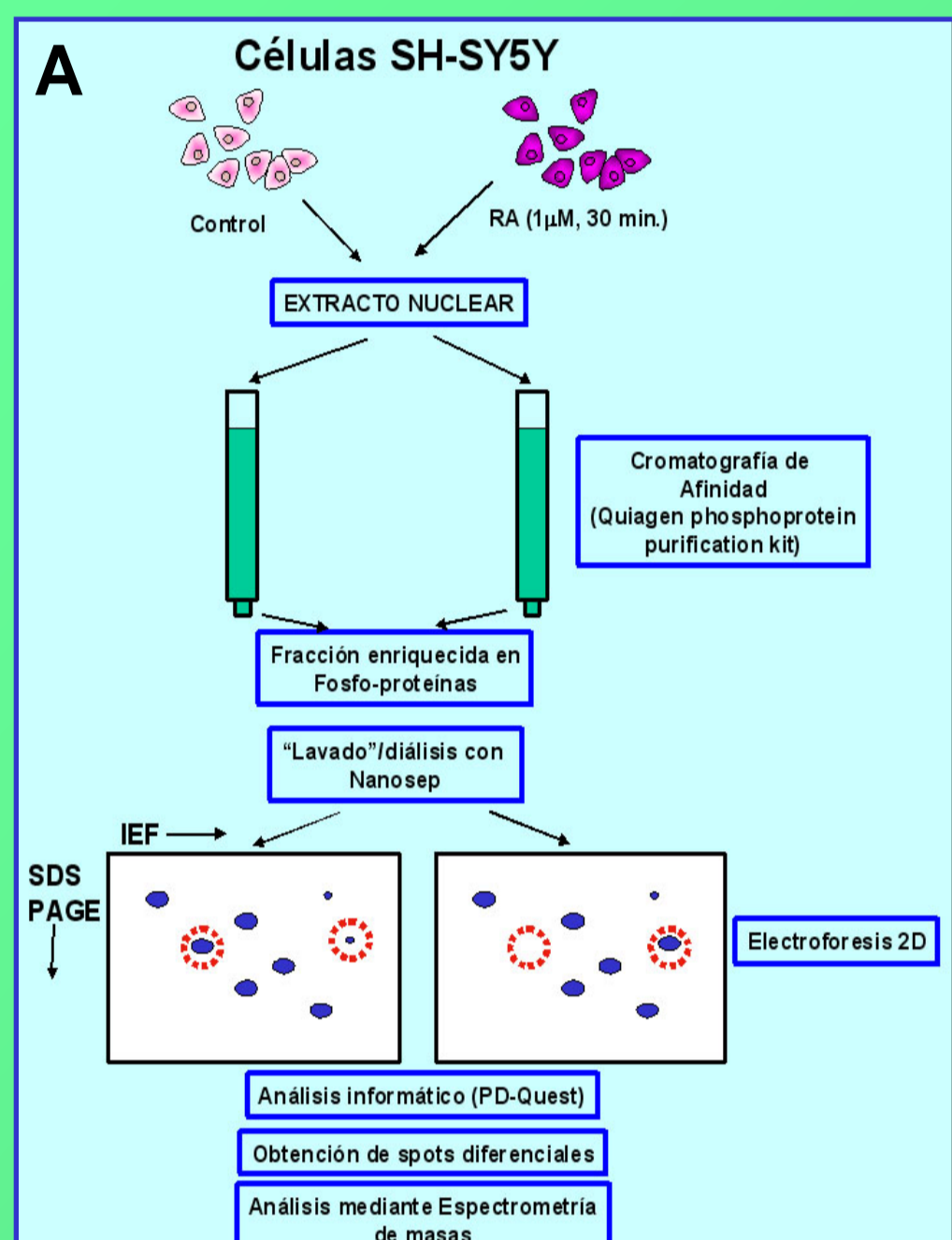


Emilio J. Laserna<sup>1</sup>, Luz Valero<sup>2</sup>, Manuel Sánchez del Pino<sup>2</sup>, Juan J. Calvete<sup>3</sup> y Domingo Baretino<sup>1</sup>

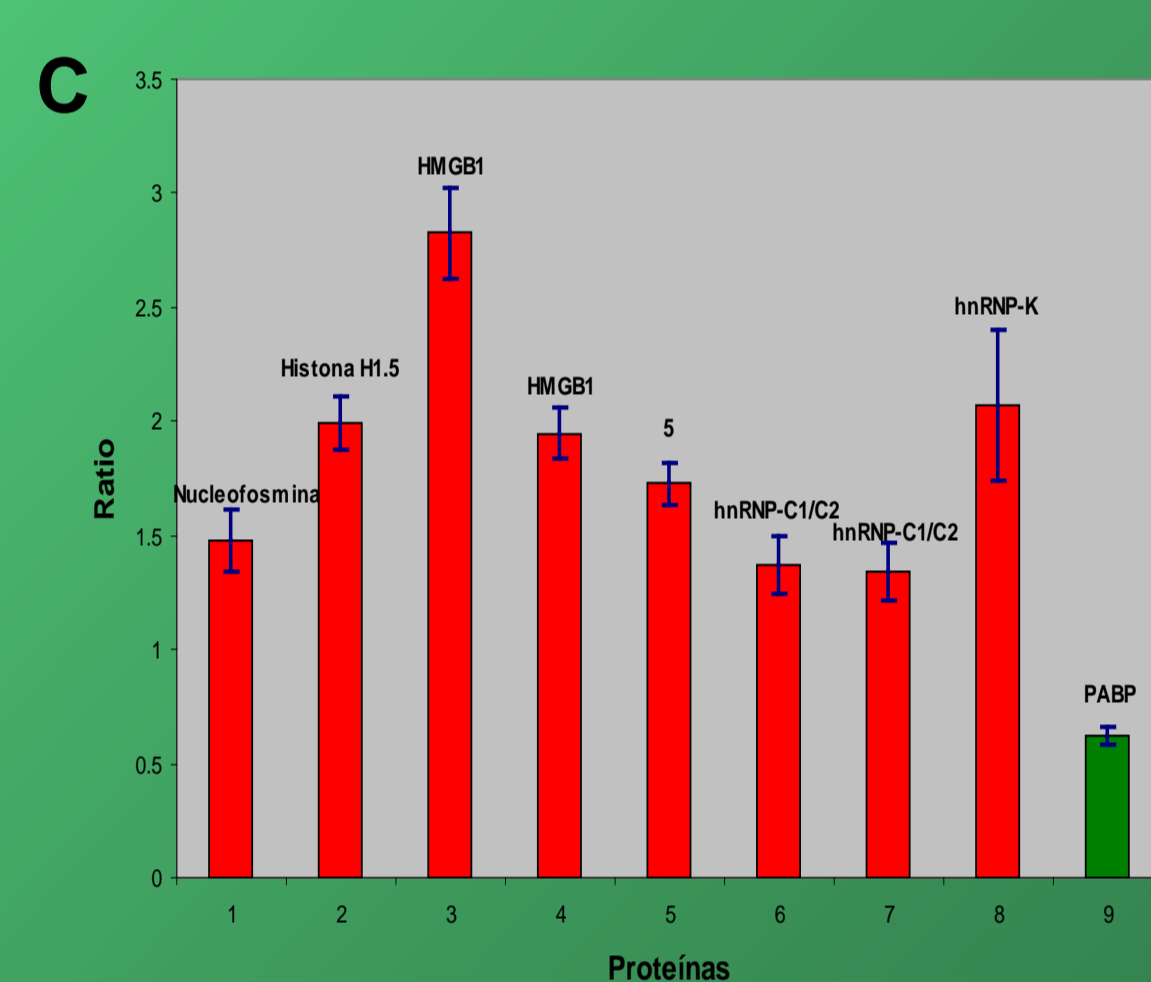
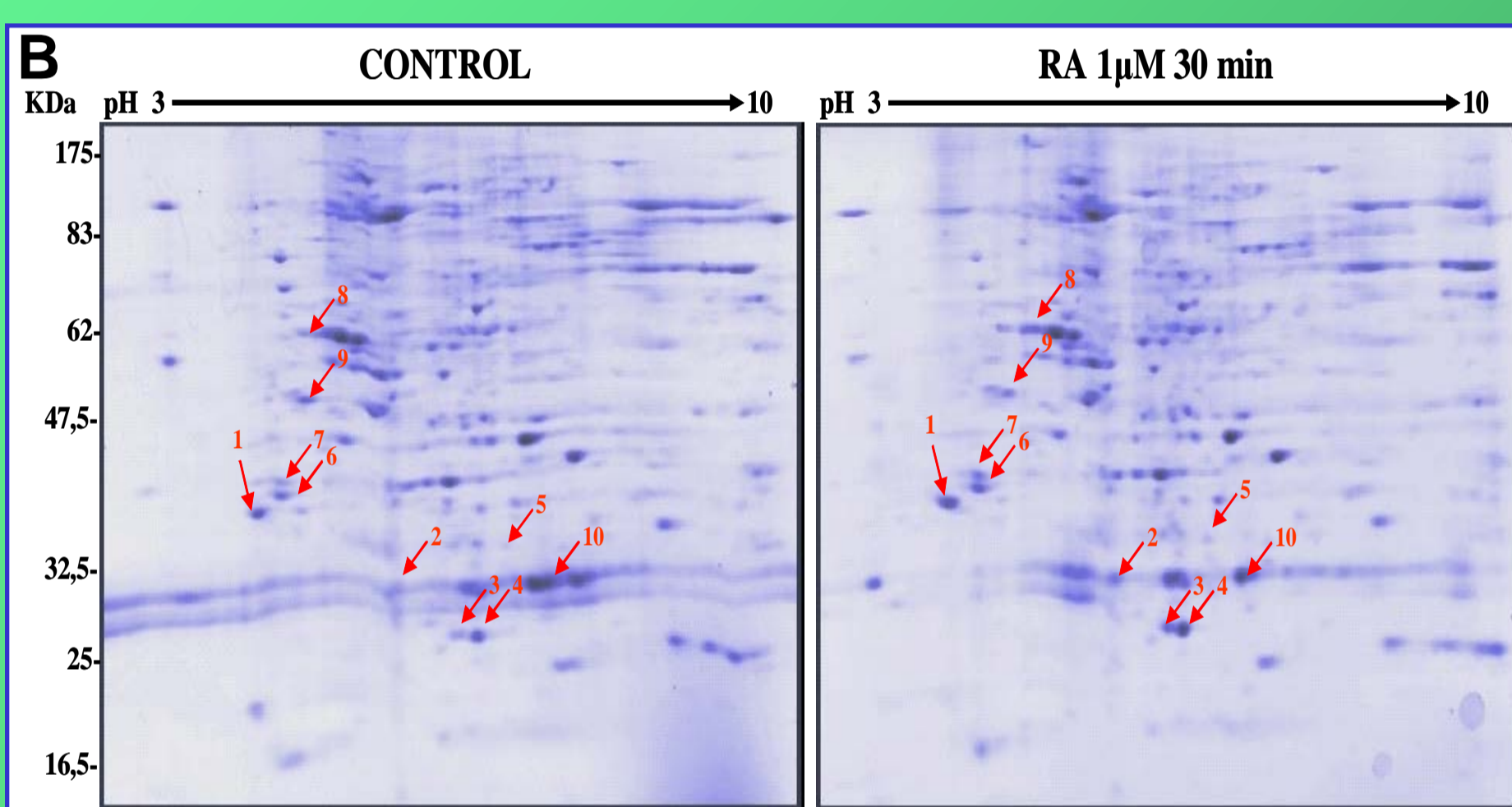
<sup>1</sup> Unidad de Biología de la Acción Hormonal. Dept. de Patología y Terapia Molecular y Celular. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). Jaime Roig, 11. 46010 Valencia (España). <sup>2</sup> Unidad de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Av. Autopista del Saler, 16. 46023 Valencia (España). <sup>3</sup> Unidad de Proteómica Estructural. Dept. de Genómica y Proteómica. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). Jaime Roig, 11. 46010 Valencia (España).

El Ácido Retinoico (RA), la forma activa de la vitamina A, induce en células de neuroblastoma SH-SY5Y la diferenciación neural. 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. En particular, el tratamiento con RA activa la vía de señalización PI3K/Akt y de la MAP quinasa ERK, siendo la activación de la primera un requisito necesario para la diferenciación neural. Para intentar descubrir proteínas novedosas diana de las acciones no genómicas del RA, iniciamos un abordaje proteómico, basado en la comparación de geles bidimensionales de extractos de fosfoproteínas nucleares (control y tratadas 30 min con RA) purificadas por cromatografía de afinidad. Esta estrategia nos permitió identificar por espectrometría de masas una serie de proteínas que varían su fosforilación en respuesta al tratamiento con RA: nucleofosmina/B23, hnRNP-C1/C2, hnRNP-K, HMGB1, PABP2 y la histona H1.5. La fosforilación de estas proteínas ha sido estudiada más a fondo mediante experimentos de desplazamiento horizontal en western blot bidimensional e inmunoprecipitación. Con el objetivo de superar las limitaciones que tiene esta estrategia proteómica tradicional y ampliar los resultados obtenidos, se recurrió a un ensayo LC-MS/MS basado en el iTRAQ (*isolated tags for relative and absolute quantification*) partiendo igualmente de proteínas nucleares previamente enriquecidas en fosfo-proteínas por cromatografía de afinidad. El iTRAQ permite cuantificar la cantidad relativa de proteínas hasta en cuatro muestras distintas. El número de proteínas identificadas es mucho mayor y los valores relativos para la cuantificación son muy precisos y sometidos a un test estadístico para hallar su significación. El análisis preliminar de los resultados obtenidos hasta el momento muestra que proteínas pertenecientes a un mismo grupo sufren modificaciones en su estado de fosforilación similares. Ambas estrategias conducen hacia la hipótesis de que el RA podría influir en la respuesta transcripcional asociada a la diferenciación a través de la fosforilación de proteínas nucleares, bien factores de transcripción específicos, bien proteínas que participan en procesos más generales (modificación de cromatina, procesamiento de mRNA, transporte al citoplasma, etc.).

## 1. Estudio proteómico basado en la comparación de geles bidimensionales de fosfo-proteínas



La comparación de los patrones bidimensionales de fracciones nucleares previamente enriquecidas en fosfo-proteínas (esquemático en Fig. 1A), permitió la selección de diversas manchas (o spots) que estaban diferencialmente expresadas (Fig. 1B). Un análisis cuantitativo de la variación media respecto al control y el error típico de las proteínas diferencialmente fosforiladas está representado en la figura 1C. Las manchas 1-8 muestran sobre-expresión, la mancha 9 infra-expresión y la mancha 10 desplazamiento horizontal. Estas manchas fueron extraídas e identificadas por espectroscopía de masas, bien mediante huella peptídica (Fig. 1D), bien mediante la secuenciación de alguno de sus péptidos (Fig. 1E). Todas ellas tienen una localización nuclear y varios sitios de fosforilación descritos. Se observaron diferencias respecto a los valores de peso molecular y pl teóricos en los casos de PABP2 y H1.5.

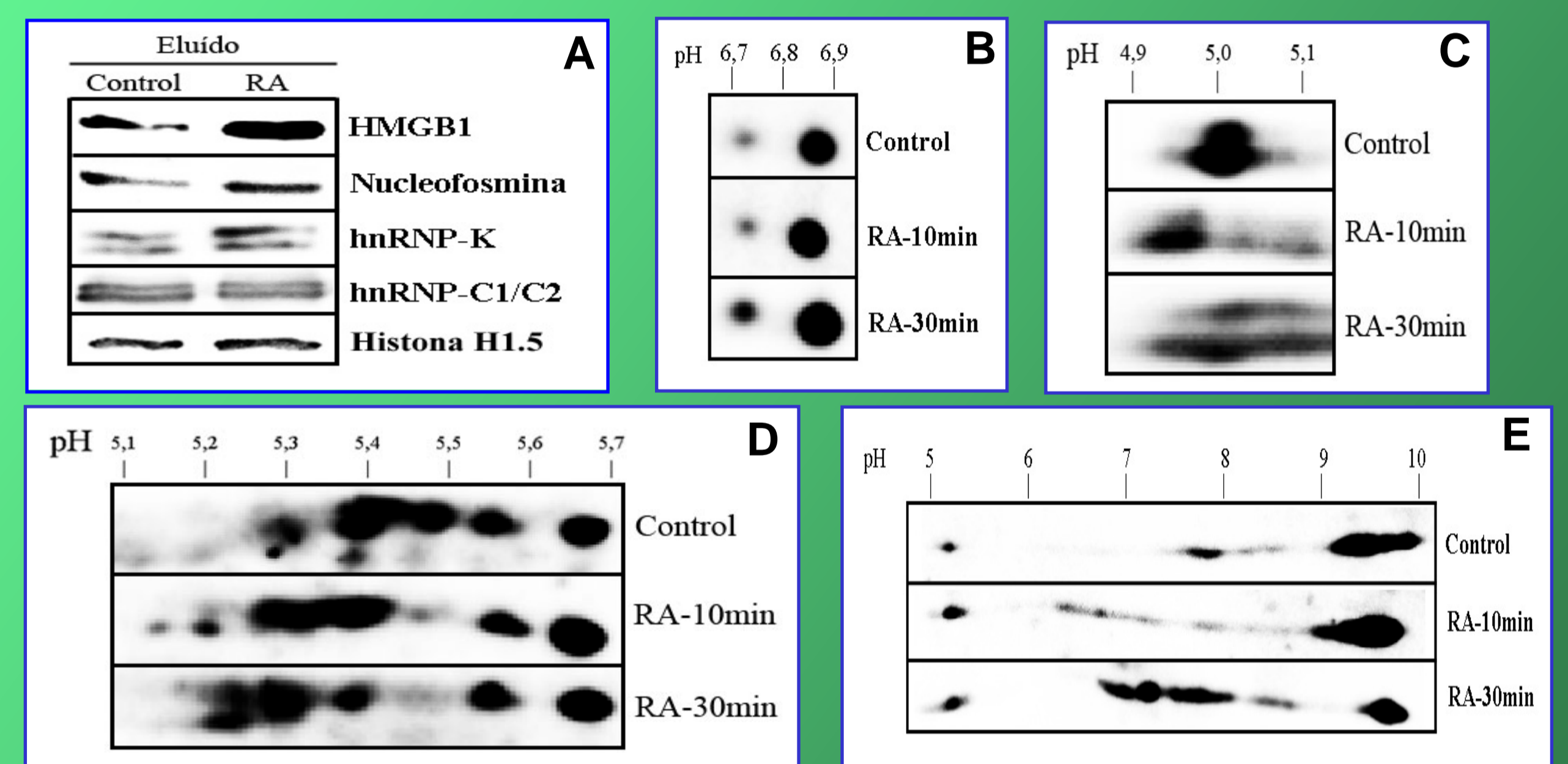


Número mancha	Proteína identificada	Número de péptidos "matched" distintos	Score E-value en BLAST	Cobertura de la secuencia total	Peso Molecular (KDa)	Punto Isoeléctrico
2 y 10	Histona H1.5	11	316 5x10 <sup>-14</sup>	41%	22	10,91
3 y 4	HMGB1	13	368 2x10 <sup>-13</sup>	67%	25	5,62
6 y 7	hnRNP-C1/C2	12	423 1x10 <sup>-17</sup>	31%	34	4,95
9	PABP2	7	71 1x10 <sup>-11</sup>	32%	33	5,13

Número mancha	Proteína identificada	Péptidos secuenciados	Peso Molecular (KDa)	Punto Isoeléctrico
1	Nucleofosmina	MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL DELHIVAEAAIMNYEGSPKIK	32,5	4,64
3 y 4	HMGB1	RPPSAFFLFCSEYRPK	24	5,62
6 y 7	hnRNP-C1/C2	MIAGQVLDINLAAEPK GFAFVQYVNER	34	4,95
8	hnRNP-K	NLPLPPPPPR ILSISADIEITGELKK IILDLSIESPIK	51	5,39
9	PABP2	GFAIYEFSDKESVR TSLALDESLFR	33	5,13

## 2. Estudio de la fosforilación mediante western blots 2D e inmunoprecipitaciones

Para validar la metodología empleada, en primer lugar, se compararon las cantidades de las proteínas identificadas en los eluidos enriquecidos en fosfoproteínas. Todas ellas mostraron un incremento en el fosfo-eluido del tratamiento con RA, aunque este fue menor del esperado para H1.5 y hnRNP-C1/C2 (Fig. 2A). Otra estrategia consistió en la realización de western blots bidimensionales con tiras IPG de pH 4-7, que mostraron un desplazamiento hacia formas más ácidas (y, por tanto, más fosforiladas) al tratar con RA, para HMGB1 (Fig. 2B), hnRNP-C1/C2 (Fig. 2C), hnRNP-K (Fig. 2D) y H1.5 (Fig. 2E). Finalmente, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación/western blot con Ac para las proteínas de interés y Ac para residuos fosforilados. Aunque el ensayo se realizó en los dos sentidos posibles, sólo se obtuvieron resultados positivos para hnRNP-C1/C2 y hnRNP-K. El signo positivo simboliza un resultado positivo y el signo negativo un resultado negativo. La combinación de ambos significa que se obtuvo un resultado positivo pero siendo la señal demasiado débil para ser considerada como válida. ND: no determinado (Fig. 2F y 2G).



Western	IP	IP	
		hnRNP-C	hnRNP-K
	P-Ser	+	+
	P-Thr	-	N.D.
	P-Tyr	+	-

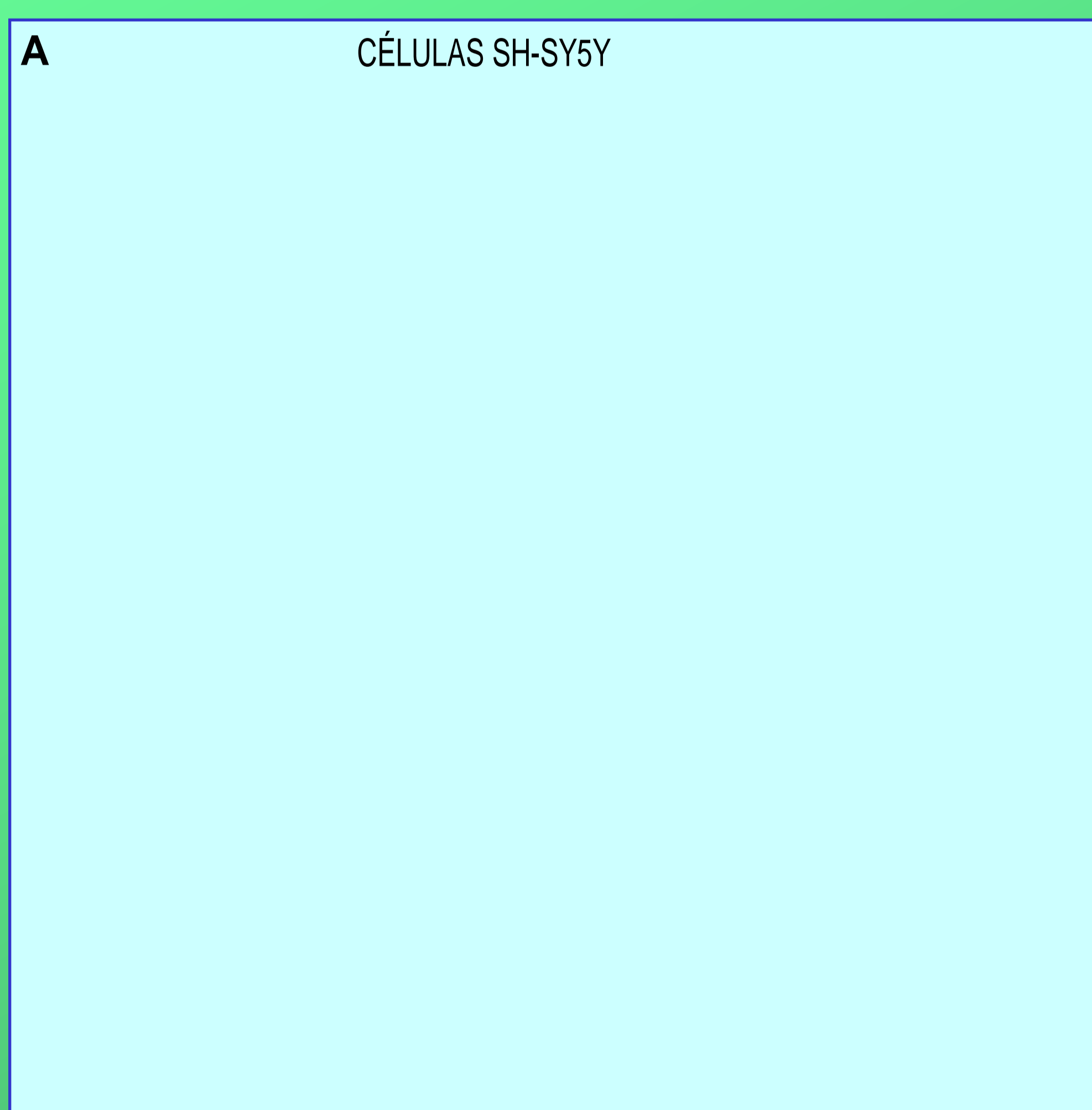
Western	IP	IP		
		P-Ser	P-Thr	P-Tyr
	hnRNP-C	+	-	+
	hnRNP-K	-	N.D.	-
	HMGB1	-	N.D.	-
	H1.5	-	+/-	N.D.
	NPM	+/-	-	N.D.

## 3. Estudio proteómico mediante iTRAQ de muestras de fosfo-proteínas y análisis de los resultados

Con el objetivo de incrementar el número de proteínas identificadas y la precisión de la cuantificación, recurrimos a una nueva estrategia proteómica conocida como iTRAQ. El iTRAQ es una técnica desarrollada por Applied Biosystems basada en el marcaje de los péptidos con isótopos isobáricos. Así, partiendo nuevamente de muestras enriquecidas en fosfo-proteínas nucleares empleando el kit de purificación de Qiagen, se compararon tres muestras: control, tratada con RA 15 min y tratada con RA 30 min (esquema en Fig.3A).

El protocolo de trabajo comienza con la reducción, alquilación y digestión enzimática con tripsina de las muestras. El conjunto de péptidos resultante es marcado con uno de los reactivos (cada muestra con un reactivo distinto) y a continuación todas las muestras son combinadas. El siguiente paso es la separación de los péptidos por cromatografía líquida (LC) multidimensional y su análisis mediante espectrometría de masas en tandem (MS/MS). La fragmentación por MS/MS da lugar a iones reporteros únicos ( $m/z = 114-117$ ) que son usados para la cuantificar las respectivas muestras (Fig. 3A, parte central).

Los resultados han sido interpretados hasta el momento desde tres puntos de vista: 1) Familias proteicas donde varios de sus miembros sufren cambios en su estado de fosforilación; 2) Búsqueda de sitios específicos de fosforilación, en base a los péptidos que el iTRAQ identifica como fosforilados; 3) Comparación bioinformática mediante FatioGO+ (una herramienta de Babelomics, servidor web desarrollado por el grupo de J. Dopazo) de las proteínas fosforiladas/desfosforiladas para encontrar grupos funcionales sobre-representados en uno u otro conjunto.



### 1) FAMILIAS PROTEICAS QUE SUFREN CAMBIOS EN SU FOSFORILACIÓN

Proteínas que aumentan su fosforilación	Proteínas que disminuyen su fosforilación
RNP heterogéneas nucleares (hnRNP)	Complejo exonucleasa RRP
Grupo de alta movilidad (HMG)	Proteínas de choque térmico (HSP)
Histonas	Importinas
U-snRNP	snRNP
Splicing factors ricos en arginina-serina	Proteínas de interacción con TATA box

### 3) COMPARACIÓN FUNCIONAL MEDIANTE FATIAGO+ (categorías de Biological Process de Gene Ontology)

Categorías significativas para el tratamiento con RA durante 15min:

FUNCION	Nivel	P-value	Sobre-representado
Complejo de ensamblaje proteína-DNA	5	1.38E-02	Fosforiladas
Organización y biogénesis de cromosomas (Eucariotas)	6	2.57E-02	Fosforiladas
Traducción	6	1.92E-02	Desfosforiladas
Procesado RNA	6	3.45E-02	Desfosforiladas

Categorías significativas para el tratamiento con RA durante 30min:

FUNCION	Nivel	P-value	Sobre-representado
RNA splicing, transesterificación con adenosina como nucleófilo	9	3.76E-04	Fosforiladas
Proteólisis	6	5.55E-03	Desfosforiladas
Organización y biogénesis del citoesqueleto de actina	7	9.78E-03	Desfosforiladas
Proceso catabólico de proteínas celulares	7	1.72E-02	Desfosforiladas

### 2) SITIOS DE FOSFORILACIÓN ESPECÍFICOS

El iTRAQ permitió identificar 37 sitios de fosforilación específicos, todos ellos correspondientes a P-Ser o P-Thr. De ellos, 9 son sitios no descritos en la bibliografía científica. Además, uno corresponde a una proteína que hasta el momento no había sido identificada como fosforilada, la Phx2A.

La tabla siguiente recoge los sitios de fosforilación novedosos identificados mediante el iTRAQ:

NP acceso	Proteína	Sitios fosforilación
Q9UIG0	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1B	Thr661
Q14839	Chromodomain helicase-DNA-binding protein 4 (CHD-4)	Thr242/Thr244
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	Ser127
P06748	Nucleophosmin (NPM)	Thr78
O14813	Paired mesoderm homeobox protein 2A (ARIX1)	Ser206
Q15424	Scaffold attachment factor B1	Thr340
Q14151	Scaffold attachment factor B2	Thr339
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2 (SAP 145)	Thr350