



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Puesta a punto del análisis del acetiloma
mediante electroforesis bidimensional y
espectrometría de masas.**

Beatriz Julia Almarán Alarcón

Grado de Bioquímica

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 41540870H

Trabajo tutelado por Dr. Adamo Valle Gómez
Departamento de *Biología Fonamental i Ciències de la Salut*

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
		x		x

Palabras clave del trabajo:
Acetiloma, resveratrol, sirtuinas, cáncer colorrectal, proteómica.

1. Índice

1	Resumen.....	1
2	<i>Abstract</i>	1
3	Introducción.	2
3.1	Modificaciones post-traduccionales.	2
3.2	El acetiloma.....	3
3.3	Técnicas de análisis proteómico.	3
3.4	Cáncer de colon.....	4
3.5	Resveratrol.	5
3.6	Sirtuinas.....	6
4	Objetivos.	8
5	Materiales y métodos.....	8
6	Resultados.	12
7	Discusión.	17
8	Conclusión.	25
9	Abreviaturas.....	26
10	Bibliografía.	26

1 Resumen.

Las modificaciones post traduccionales juegan un papel fundamental en todos los mecanismos celulares, y son las principales responsables de la gran complejidad del proteoma. Una de estas modificaciones es la acetilación: la adición de un grupo acetilo en el grupo ϵ -amina de los residuos de lisina. Ésta se encuentra implicada en la regulación de proteínas pertenecientes a muchos procesos celulares, entre ellos la regulación de la expresión génica y del metabolismo. En la regulación del acetiloma participan enzimas lisina acetiltransferasas y lisina desacetilasas. Entre las últimas, destacan las sirtuinas: una familia de proteínas cuya actividad es dependiente de NAD^+ , muy conservadas a nivel evolutivo y que, en mamíferos, consta de siete miembros. Dentro de esta familia posee un especial interés por su papel en las células cancerosas la sirtuina 1 (SIRT1), a la cual se le han atribuido propiedades tanto en la supresión como en el desarrollo tumoral, constituyendo por lo tanto una potencial diana terapéutica en el diseño de fármacos antineoplásicos. Esta desacetilasa es activada por una fitoalexina de la familia de los estilbenos cuya presencia es notable en la piel de las uvas: el resveratrol. En el presente trabajo se propuso analizar los efectos del resveratrol sobre el acetiloma de la línea celular de cáncer colorrectal SW620, mediante técnicas de análisis proteómico. Así, se llevó a cabo la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional, la detección de proteínas acetiladas mediante *immunoblotting* y, finalmente, su identificación por espectrometría de masas, a partir de la cual se obtuvieron como resultado algunas proteínas de relevancia en la patogenia del cáncer en las que la acetilación juega un papel importante como mecanismo de regulación.

2 Abstract.

Post-translational modifications have an important role in all cellular mechanisms, and are one of the main elements involved in the proteome complexity. One of these modifications is acetylation: the addition of an acetyl group to the ϵ -amino group of lysine residues. It is responsible for the regulation of proteins which belong to a wide range of cellular processes, such as metabolism and gene expression. There are two kinds of enzymes involved in the acetylome regulation: lysine acetyltransferases and lysine deacetylases. Sirtuins standing out among the last group: they are a highly evolutionarily conserved protein family with NAD^+ dependant activity. One of these members, sirtuin 1 (SIRT1), has special interest due to its role in tumor development. This protein has been attributed both tumor promotion and suppressor activity, making it potentially useful in antitumoral drug improvement. Resveratrol, a phytoalexin belonging to the stilbene family, has been identified as a SIRT1 activator. The aim of this study was to determine resveratrol effects upon the acetylome of SW620 colorectal cell line, using proteomic analysis approaches. Thus, protein separation was carried out by bidimensional electrophoresis, followed by immunoblotting assays. Identification was achieved through mass spectrometry, which resulted in the detection of proteins involved in cancer pathogeny, where acetylation is an important regulation mechanism.

3 Introducción.

3.1 Modificaciones post-traduccionales.

El año 2003 marcó un hito en la historia de la ciencia ya que fue el año en el que se completó la secuencia del genoma humano¹. Los resultados del Proyecto Genoma Humano estipularon el número de genes en torno a los 20 000 y 25 000, el cual se había estimado en una cifra notablemente superior debido al número de proteínas que constituyen el proteoma humano².

El hecho de que el proteoma humano posea una diversidad tan amplia respecto a la cantidad de genes que conforman el genoma se explica gracias a la existencia de un gran número de mecanismos celulares implicados en la modificación tanto del transcrito como de la cadena polipeptídica, los cuales permiten generar a partir de un único gen una gran variedad de productos proteicos diferentes (*figura 1*). Entre estos mecanismos implicados en la complejidad del proteoma se encuentran las modificaciones post traduccionales (PTM, del inglés *Post Translational Modifications*).

Las PTM engloban un amplio conjunto de modificaciones covalentes en las que se convierte un aminoácido codificado en un aminoácido no estándar a través de una reacción enzimática, como por ejemplo la fosforilación, la glicosilación, la ubiquitinación y la acetilación, entre otras³. Los enzimas implicados en la catálisis de dichas reacciones comprenden un gran grupo que incluye enzimas quinasas, fosfatasas, transferasas y ligasas, encargadas de la adición (o eliminación) de diferentes grupos funcionales y compuestos a los residuos de la cadena polipeptídica.

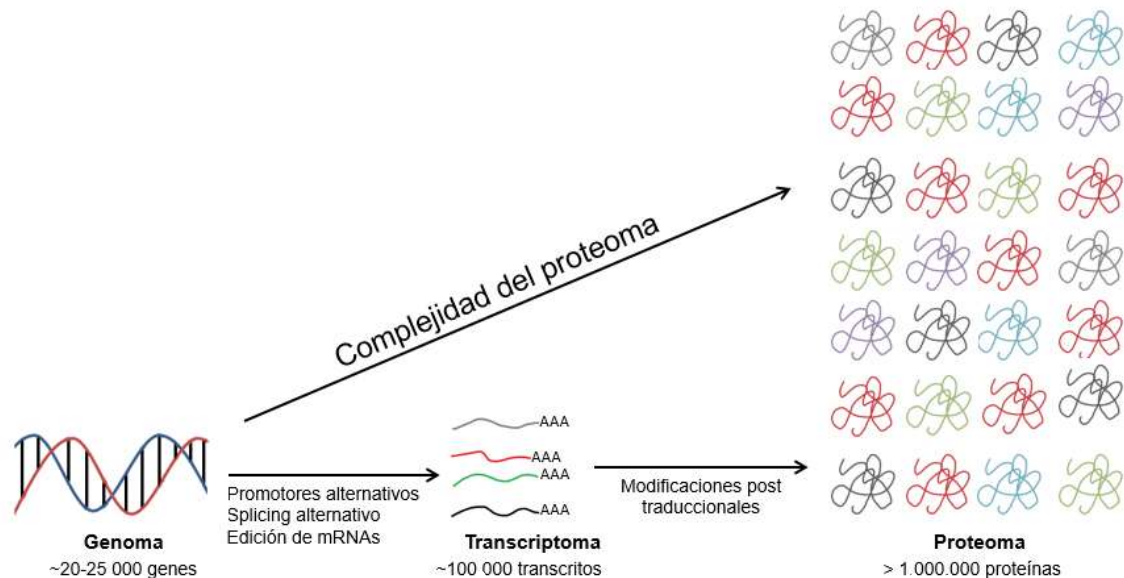


Figura 1. A partir de diferentes mecanismos implicados en la transcripción tales como el uso de promotores alternativos, el splicing alternativo y la edición de los mensajeros; y de modificaciones post-traduccionales, se consigue la generación de las más de un millón de proteínas que conforman el proteoma humano, frente a los 20 000 – 25 000 genes del genoma⁴.

Además de su papel en la diversidad proteómica, las PTM constituyen cambios dinámicos que varían en función de la respuesta a numerosos estímulos y que afectan a la actividad proteica, constituyendo un punto clave de la regulación de la actividad proteica, crucial en multitud de procesos celulares.

3.2 El acetiloma.

La N-acetilación es una PTM que consiste en la adición de un grupo acetilo al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina. Esta reacción es catalizada mediante un grupo de enzimas denominados lisina acetiltransferasas (KATs), y es revertida mediante las lisina desacetilasas (KDACs), como se ilustra en la *figura 2*.

La acetilación fue inicialmente descrita en histonas en el año 1964, y se propuso como mecanismo de la regulación de la expresión génica mediante la modulación del empaquetamiento de los nucleosomas⁵. No obstante, no fue hasta treinta años más adelante que se identificó la primera proteína no histónica regulada por acetilación, p53⁶. A raíz de este descubrimiento la acetilación de proteínas no histónicas cobró mayor importancia, y los avances en las técnicas de análisis en el campo de la proteómica permitieron que en el año 2006 se realizara el primer análisis global de la acetilación de proteínas, el cual reveló la presencia de alrededor de 1 750 proteínas que sufrían esta PTM⁷. Así, surgió el término acetiloma, el cual hace referencia al conjunto de proteínas acetiladas. Debido a la reversibilidad de la acetilación el acetiloma es dinámico y variable, dependiendo del tipo celular y la situación fisiopatológica.

3.3 Técnicas de análisis proteómico.

La mayoría de las metodologías implicadas en el estudio del proteoma siguen un esquema basado en una serie de pasos que consisten en el aislamiento de las proteínas con la PTM deseada mediante técnicas de enriquecimiento de las muestras; su separación, para la cual se utilizan técnicas tales como la electroforesis bidimensional, la cromatografía de interacción hidrofóbica o la cromatografía de intercambio catiónico, entre otras; y finalmente su identificación por espectrometría de masas. En el presente trabajo, las técnicas utilizadas para la separación e identificación de las proteínas fueron la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas acoplada a la técnica de ionización MALDI-TOF (del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time of Flight*).

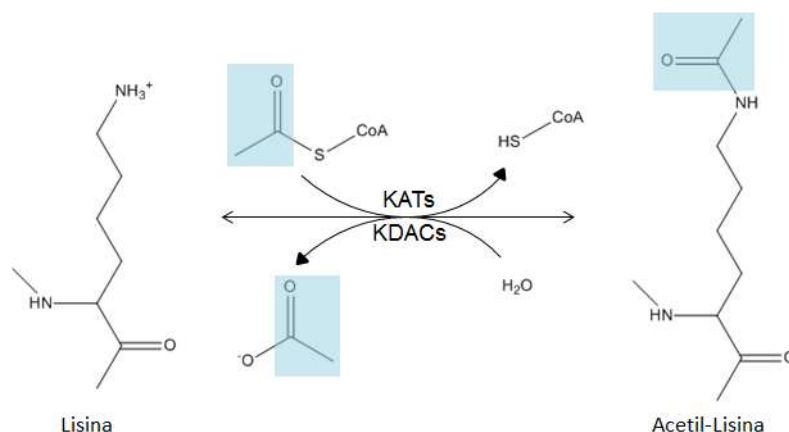


Figura 2. Reacción de acetilación del aminoácido lisina llevada a cabo por enzimas lisina acetiltransferasas (KATs), y de desacetilación, mediada por enzimas lisina desacetilasas (KDACs).

Electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional es un método de separación, en este caso de proteínas, que combina las técnicas de isoelectroenfoque (IEF, del inglés *isoelectric focusing*) y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

La técnica de IEF para la separación en la primera dimensión se realiza sobre tiras de gel de poliacrilamida que poseen un gradiente de pH inmovilizado, de manera que al añadir la muestra y aplicar una diferencia de voltaje, las proteínas adquieren carga neta dependiendo de la zona de pH en la que se encuentren, y migran hacia el correspondiente electrodo de carga opuesta. En su camino, las proteínas van variando su carga neta en función de su recorrido por el gradiente de pH, de manera que quedan inmovilizadas cuando alcanzan la zona de pH donde su carga neta es 0, es decir, su punto isoeléctrico. En la segunda dimensión, el SDS junto con otros agentes desnaturizantes contribuye a mantener la desnaturalización de las moléculas, y además les proporciona una carga negativa, de manera que la velocidad de migración de las proteínas dependerá del tamaño de las mismas.

Así, mediante la combinación de ambas técnicas, se procede a la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico y su tamaño, de manera que cada una ocupa una posición específica en el gel bidimensional, a partir del cual pueden ser extraídas, digeridas y sometidas a su identificación por espectrometría de masas.

Espectrometría de masas: MALDI-TOF.

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite determinar la composición de una muestra mediante la ionización de los compuestos, para la posterior determinación de su relación masa/carga (m/z) con un espectrómetro.

La identificación de proteínas mediante la técnica MALDI-TOF se basa en la detección de los péptidos que conforman una proteína previamente digerida, los cuales generan una huella peptídica (*peptide mass fingerprint*) característica, que posteriormente es introducida en una base de datos de secuencias de proteínas.

Para la identificación de los péptidos, éstos son integrados en una matriz donde mediante láser son ionizados (MALDI). Los péptidos ionizados pasan entonces al analizador del tiempo de vuelo (TOF), donde cada péptido presentará un tiempo de vuelo diferente en función de su relación m/z . Así, se detectan los péptidos y se genera un espectro de masas, el cual es utilizado para la identificación de la proteína.

El desarrollo de estas técnicas proteómicas tanto de separación como de identificación ha facilitado sobremanera el estudio de las PTM, pudiéndose así describir mejor los mecanismos implicados en su regulación y el papel que ejercen sobre multitud de procesos celulares tanto fisiológicos como patológicos, entre ellos el cáncer.

3.4 Cáncer de colon.

Se denomina cáncer de colon a aquellas neoplasias originadas en la última porción del intestino grueso, e incluye en base a su origen histológico a los adenocarcinomas, los tumores escirrosos y los tumores de diferenciación endocrina⁸.

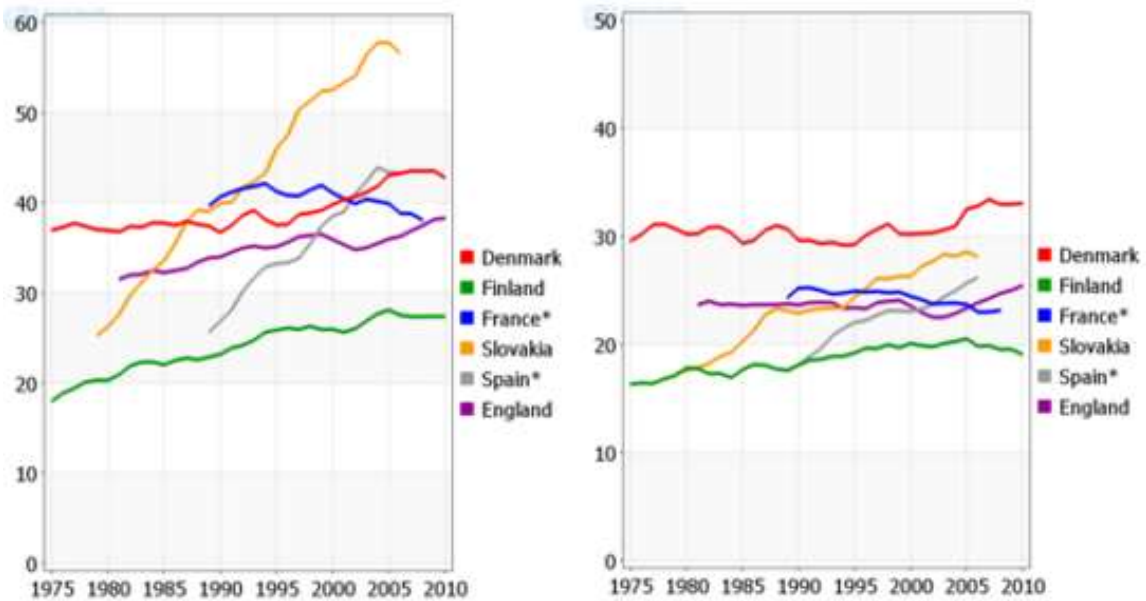


Figura 3. Incidencia del cáncer colorrectal en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en algunos países europeos. Se puede observar una tendencia ascendente en las últimas décadas, siendo ésta mucho más acrecentada en los hombres⁹.

En cuanto a su epidemiología es difícil establecer cifras concretas puesto que la mayoría de estudios epidemiológicos consideran de manera conjunta el cáncer de colon y de recto. Se ha observado que el cáncer colorrectal afecta por igual a hombres (en los cuales constituye el tercer tipo de cáncer más común) y mujeres (el segundo tipo de cáncer más común), y que tiene mayor incidencia en las regiones desarrolladas, la cual ha sufrido una tendencia ascendente en las últimas décadas (*figura 3*). A pesar de ello, presenta una tasa de mortalidad relativamente baja: en 2012 se calcula que hubo 694.000 defunciones debido a este carcinoma⁹.

Se trata por lo tanto de un carcinoma que, por lo general, presenta una buena prognosis; no obstante, la mayoría de las defunciones asociadas a este cáncer se encuentran asociadas a la recidiva derivada de una resección quirúrgica incompleta. Su tratamiento se basa mayoritariamente en la resección quirúrgica que, en los estadios más avanzados, se acompaña de quimioterapia coadyuvante, siendo la capecitabina y el oxaliplatino los fármacos antineoplásicos más utilizados⁸.

Para el presente trabajo se utilizó la línea celular SW620, la cual fue establecida por A. Leibovitz et al., proveniente de la metástasis en un nódulo linfático de un varón caucásico de 51 años cuyo carcinoma primario era un adenocarcinoma colorrectal¹⁰.

3.5 Resveratrol.

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un estilbenoide sintetizado por algunas plantas en respuesta a estímulos nocivos. Una de sus principales fuentes es la uva, concretamente su piel, por lo que su presencia es notable en el vino tinto¹¹. Es

sintetizado en dos formas isoméricas, *cis* y *trans*, siendo esta última la forma más activa (figura 4). Presenta además numerosas formas glucosídicas mediante su unión a diferentes monosacáridos.

El resveratrol tiene efecto sobre un gran número de procesos celulares, entre los cuales destacan la parada del ciclo celular, la inducción de los procesos autofágicos y apoptóticos, y la disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*)¹². Resulta de especial importancia su papel en el envejecimiento, puesto que se ha demostrado que es capaz de aumentar el tiempo de vida máximo (*lifespan*) en especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*; y estudios en ratones han reportado la disminución de varios signos de envejecimiento en ratones tratados con este compuesto¹³. Además, se le atribuyen propiedades

antioxidantes y anticarcinogénicas, por lo que resulta evidente el interés en su estudio como potencial agente terapéutico. De hecho, se han realizado, y se siguen realizando, una gran variedad de ensayos clínicos en pacientes con patologías como la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad de Alzheimer y diversos carcinomas, entre ellos el colorrectal¹⁴. Cabe destacar que un factor limitante en su uso terapéutico es su baja biodisponibilidad a causa de su rápida metabolización; no obstante, se ha demostrado en experimentos *in vitro* una elevada acumulación de resveratrol en células de la línea de adenocarcinoma colorrectal Caco-2, por lo que las células del epitelio intestinal constituyen una importante diana biológica debido a su accesibilidad a los componentes de la dieta y a los compuestos administrados por vía oral¹⁵.

Entre las actividades anticarcinogénicas del resveratrol figura la disminución de la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y del factor de transcripción NF- κ B (factor potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas); la parada del ciclo celular mediante la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina 2, 4 y 6 (CDKs, del inglés *cyclin dependent kinase*), así como la disminución de los niveles de las ciclinas D1 y E; la inducción de la apoptosis mediante el aumento de la actividad de p53 y la disminución de la proteína antiapoptótica Bcl2; y finalmente la disminución de la angiogénesis y la metástasis mediante la regulación negativa del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α , del inglés *hypoxia-inducible factor*) y de las metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés *matriz metalloproteinases*)¹⁶. Además, el resveratrol también es capaz de activar e inducir la síntesis de la sirtuina 1¹⁷.

3.6 Sirtuinas.

Las sirtuinas son una familia de proteínas con actividad lisina desacetilasa dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺). En mamíferos conforman esta familia siete proteínas (SIRT1-7), las cuales poseen diferente localización subcelular: SIRT 1 y SIRT 2 poseen localización citoplasmática y nuclear; SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se encuentran en el compartimento mitocondrial; y SIRT 6 y SIRT7 se ubican en el núcleo¹⁸.

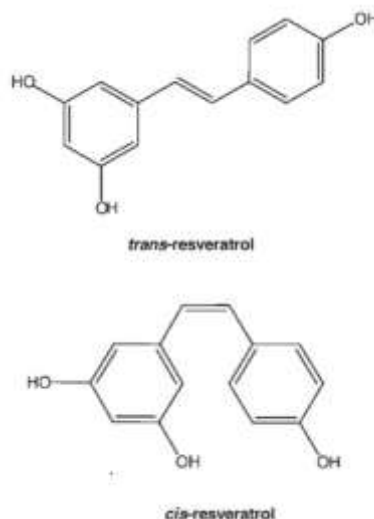


Figura 4. Estructura química de los isómeros *trans-resveratrol* y *cis-resveratrol*.

Poseen actividad histona desacetilasa, pero también presentan un gran número de proteínas sustrato no histónicas, entre ellas factores de transcripción y enzimas metabólicos, con lo cual se encuentran implicadas en una amplia variedad de procesos celulares tales como los procesos metabólicos, el envejecimiento y la respuesta frente al estrés y la restricción calórica^{17,19}.

SIRT 1.

SIRT 1 es el miembro más estudiado de la familia de las sirtuinas, a la cual se le han atribuido tanto propiedades de supresor tumoral como de promotor de la tumorigénesis²⁰. Por ello, se ha centrado la atención en el estudio de pequeñas moléculas capaces de regular su actividad como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer. Entre estas moléculas se encuentra el resveratrol, el cual posee la capacidad de activar a la SIRT 1²¹.

En cuanto al papel de SIRT1 en la tumorigénesis cabe destacar el incremento de los niveles del protooncogén c-myc; la disminución de la actividad de p53 mediante su desacetilación, disminuyendo así el proceso de apoptosis dependiente de p53 frente a daño en el ADN y estrés oxidativo; y el aumento de los procesos de reparación del material genético nuclear y de mantenimiento de la estabilidad genómica²². No obstante, este último rol de SIRT1 en la reparación del ADN es a la vez supresor y promotor tumoral: en las células normales, SIRT1 promueve la estabilidad genómica mediante la reparación de alta fidelidad del ADN, mientras que en las células cancerosas SIRT1 activa mecanismos de reparación de menor fidelidad, permitiendo así la supervivencia celular a costa de una mayor tasa de mutación en el material genético²³.

Por otro lado, las actividades de SIRT1 en su faceta de supresor tumoral comprenderían la inhibición de vías implicadas en la progresión tumoral. Entre ellas destaca la inhibición de NF-κB, el cual es un factor de transcripción mediador de la respuesta inflamatoria y la supervivencia celular, así como responsable de la transcripción de MMPs, por lo que su inhibición a través de SIRT1 implicaría una disminución de la capacidad invasiva y metastática. SIRT1 también inhibe la actividad de HIF-1, disminuyendo así el potencial angiogénico tumoral²². Además, como se ha mencionado previamente, SIRT1 participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica de las células normales mediante la activación de mecanismos de reparación del ADN de alta fidelidad, previniendo la aparición de mutaciones implicadas en la transformación maligna celular.

Por lo tanto, debido a la dualidad de la función de SIRT1 en cuanto a su papel como promotor y supresor tumoral, resulta evidente la necesidad de realizar un mayor número de estudios que permitan discernir los mecanismos oncogénicos en los que se encuentra implicada, puesto que constituye una potencial diana en el desarrollo de terapias antineoplásicas.

4 Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo es poner a punto una metodología sencilla que permita realizar un *screening* del acetiloma de la línea celular de cáncer colorrectal SW620. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- La puesta a punto de la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional e inmunoblot Anti-Acetil-Lisina.
- El análisis del efecto de un activador de sirtuinas, el resveratrol, sobre el acetiloma de la línea celular de cáncer colorrectal SW620.
- La identificación de proteínas de interés mediante espectrometría de masas.

5 Materiales y métodos.

Planteamiento.

Con la finalidad de diseñar una metodología para el análisis del acetiloma mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas en una línea celular de cáncer colorrectal, los cultivos fueron divididos en dos grupos: un grupo que fue tratado con resveratrol, y otro que fue tratado con el vehículo (0,03% DMSO), sirviendo de control. Estas seis muestras se procesaron simultáneamente obteniendo sus lisados celulares y someténdolas a una electroforesis bidimensional para realizar la separación de su contenido proteico mediante punto isoeléctrico y tamaño. Los geles obtenidos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que fue incubada con un anticuerpo anti-Acetil-Lisina, para poder discernir la fracción acetilada. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el *software* PDQuest (Bio Rad Laboratories) y se seleccionaron los *spots* candidatos para el análisis por espectrometría de masas. Paralelamente, una de las muestras control se sometió al mismo proceso pero, en lugar de realizar el Western Blot, los geles obtenidos tras la SDS-PAGE se fijaron y tiñeron para así poder realizar la digestión *in gel*. Las imágenes obtenidas se emparejaron con las imágenes de los geles previamente teñidos con azul de Coomassie, a partir de los cuales se picaron los *spots* correspondientes a las proteínas acetiladas seleccionadas para su posterior identificación mediante huella peptídica utilizando la espectrometría de masas MALDi-TOF. Este planteamiento se representa en el diagrama de flujo de la *figura 5*.

Cultivo celular.

Las células SW620 (ATCC; Manassas, VA, EE.UU) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS, 0,03% de DMSO y 1% de penicilina y estreptomina. Al grupo tratado se le añadió resveratrol 10 μ M (Sigma-Aldrich®) mientras que el grupo control se trató únicamente con el vehículo (0,03% DMSO), y ambos fueron incubados durante 48 horas a 37 °C al 5% de CO₂.

Obtención del lisado celular.

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se procedió a la eliminación del medio y se realizaron tres lavados con tampón STE (250 mM sacarosa, 5 mM Tris, 2 mM EGTA). Las células se rascaron en 800 μ L de tampón de lisis (8,4 M urea, 2,4 M tiourea, 5% CHAPS, 50 mM DTT y 1% anfolitos IPG), y los extractos se homogeneizaron en polytron durante un minuto y se sonicaron a amplitud media durante 30 segundos. Posteriormente se añadieron 2 mM de $MgCl_2$ y benzonasa 150 U/ml, para mayor degradación de los ácidos nucleicos, y se incubaron a temperatura ambiente sin agitación durante una hora y en rotación en noria durante otra hora. Finalmente se

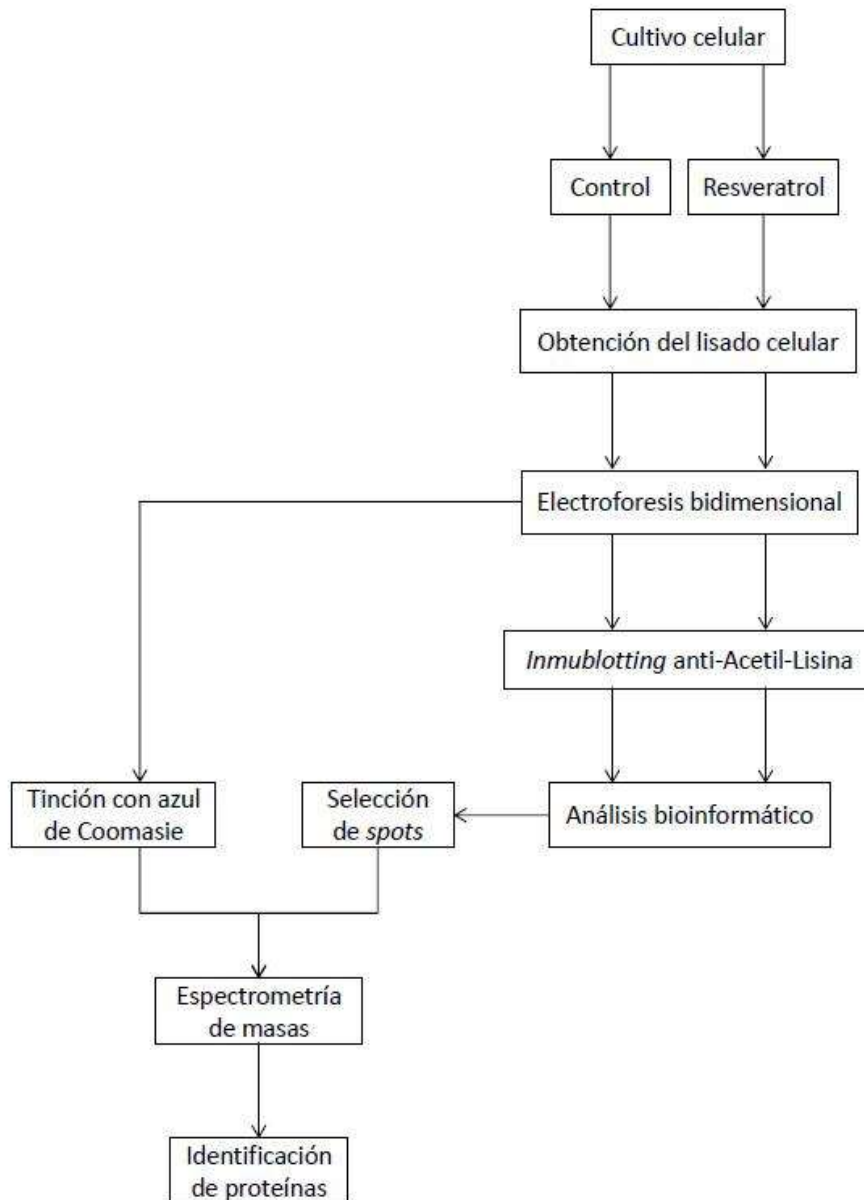


Figura 5. Diagrama de flujo del planteamiento experimental. A partir de los cultivos celulares, los cuales se dividieron en dos grupos: control y resveratrol, se obtuvo el lisado celular. Éste fue sometido a electroforesis bidimensional y a inmunoblotting con anticuerpos anti-Acetil-Lisina, y los resultados obtenidos fueron comparados mediante análisis bioinformático. Una vez seleccionados los spots de interés, se procedió a la tinción con azul de Coomassie de un gel bidimensional de uno de los grupos control, a partir del cual se realizó la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas.

realizó una centrifugación a 10 000x g durante treinta minutos a partir de la cual se tomaron los sobrenadantes, cuyo contenido proteico fue determinado mediante el método de Bradford.

Electroforesis bidimensional.

A partir de los extractos celulares anteriores se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 100 µg de proteína. Para conseguir un volumen final de 125 µl, se añadió la diferencia de tampón de rehidratación (8 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromofenol, 0,5% anfólitos IPG y 100 mM HED). Este volumen se dispuso en las bandejas de carga (evitando la formación de burbujas) y posteriormente se depositaron las tiras *ReadyStrip™ IPG Strips* (Bio Rad Laboratories; Hercules, CA), de un rango de pH de 3 a 7, previamente descongeladas. Finalmente se añadió aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra y favorecer la rehidratación de la tira, y se dejó absorber durante 24 horas.

Una vez rehidratadas las tiras se procedió a su separación por punto isoeléctrico. Para ello se dispusieron en la bandeja de isoelectroenfoque, donde se sometieron a 10 000 Vh con un voltaje final de 4 000 V (PROTEAN IEF System, Bio Rad Laboratories). Posteriormente, Las tiras fueron reequilibradas con tampón de reequilibración (6M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8,8)) al cual se adicionó 1% DTT para el primer paso de reducción y 5% IAA para el segundo paso de alquilación; ambos de 15 minutos. La separación por tamaño de la segunda dimensión se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, colocando las tiras de manera adyacente al gel permitiendo su transferencia entre ambos geles y sometiéndolas a un potencial de 200 V durante 45 minutos.

Inmunoblotting.

Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que, tras su bloqueo con una solución de TBS con 5% de leche en polvo no grasa y 0,05% de Tween-20 durante una hora, fueron incubadas con un anticuerpo anti-Acetil-Lisina (#9441, Cell Signaling Technology®) *overnight*. Posteriormente se realizaron lavados con tampón Tris-TBS-Tween-20 (0,05% de Tween-20 en TBS) y la incubación durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Finalmente, tras realizar de nuevo lavados con Tris-TBS, se utilizó el kit *Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent* para la obtención de la señal quimioluminiscente a partir de la cual se obtuvieron las imágenes con el densitómetro *XRS ChemiDoc* (Bio Rad Laboratories). También se realizó la determinación de la α -tubulina (SC-52836, Santa Cruz Biotechnology) como *housekeeping*, previa eliminación del anticuerpo primario mediante un paso de *stripping* con NaOH 0,5 M.

Análisis de imágenes.

Las imágenes obtenidas se procesaron con el *software* Quantity One (Bio Rad Laboratories). Con la finalidad de establecer diferencias en los niveles de expresión se procedió a su análisis con el *software* PDQuest (Bio Rad Laboratories), seleccionando así las proteínas que serían sometidas posteriormente al análisis por espectrometría de masas.

Tinción de geles.

Para la tinción de las proteínas con azul de Coomasie se realizó un primer paso de fijación (7% ácido acético, 40% metanol) y, seguidamente, se realizó la tinción (80% azul de Coomasie, 20% metanol) *overnight*. Posteriormente se realizaron sucesivos pasos de desteñido (10% ácido acético, 25% metanol) y aclarado (25% metanol y agua destilada). Seguidamente, para la obtención de las imágenes se utilizó el escáner GS-800™ *Calibrated Imaging Densitometer* (Bio Rad Laboratories).

Digestión "in gel".

Los *spots* de interés fueron picados manualmente del gel mediante el uso de una pipeta. Para desteñirlas y secarlas se realizó un lavado con 25 mM NH_4HCO_3 , dos lavados con 25 mM NH_4HCO_3 , 50% acetonitrilo; y, finalmente, un lavado con acetonitrilo. Las muestras fueron rehidratadas e incubadas *overnight* con 10 μl de tripsina (TPCK *porcine trypsin*, Sigma-Aldrich®) en una solución 25 mM NH_4HCO_3 . La extracción de los péptidos se llevó a cabo mediante la adición de 10 μl de acetonitrilo durante 15 minutos y de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) durante 30 minutos. Tras la sonicación de las muestras durante 5 minutos, éstas se concentraron en un sistema de vacío *SpeedVac Vacuum system* (Savant Instruments, Inc) y se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Cabe destacar que, debido a la alta sensibilidad de las técnicas de espectrometría de masas, resulta sumamente importante realizar todos los procedimientos previos a su identificación tratando de minimizar las fuentes de contaminación al máximo.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Las proteínas fueron identificadas a partir de su huella peptídica mediante espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz acoplada a un analizador del tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS). La identificación se realizó a partir de 1 μl de las muestras de proteínas digeridas, el cual se depositó en una placa de MALDI (*Polished Steel*, Bruker Daltonics), y se le añadió 1 μl de matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzoico en 70/30 acetonitrilo/agua con un 0,1% de TFA), y posteriormente se dejó secar al aire. Los espectros de masa se obtuvieron con un espectrómetro de masas Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipado con un láser de 200 Hz con las siguientes condiciones de operación: *Ion source* 1= 19,0 kV, *Ion source* 2= 16,65 kV, *Lents*= 8,25 kV, *Reflector*= 21,00 kV, *reflector* 2= 9,70 kV. Para la calibración del espectro se utilizó el *peptide calibration standard II* de Bruker Daltonics. Finalmente, a partir del espectro de péptidos obtenido se realizó la búsqueda de la proteína en la base de datos *Swiss-Prot*, utilizando el algoritmo de búsqueda del MASCOT (*Matrix Sciences*).

6 Resultados.

1. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional e inmunoblot anti-Acetil-Lisina.

Con la finalidad de poner a punto una metodología sencilla que permitiera hacer un screening del acetiloma se realizó una electroforesis bidimensional seguida de técnicas de *immunoblotting*. La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en dos dimensiones: la primera, mediante el uso de tiras con un gradiente de pH de 3 a 10, permitió su separación en función del punto isoeléctrico; la segunda, mediante un gel de poliacrilamida al 12%, permitió separarlas en función de su peso molecular. Posteriormente, para poder detectar las proteínas acetiladas, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, en la cual se pudo realizar la incubación con anticuerpos anti-Acetil-Lisina. Tras el revelado y la obtención de la imagen se llevó a cabo un procedimiento de *stripping* que permitió eliminar el anticuerpo primario y volver a incubar la misma membrana con α -tubulina, el *housekeeping*. Los resultados obtenidos se muestran en la *figura 6*.

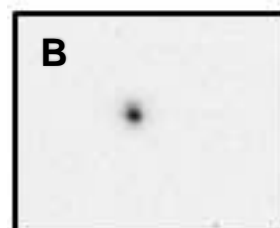
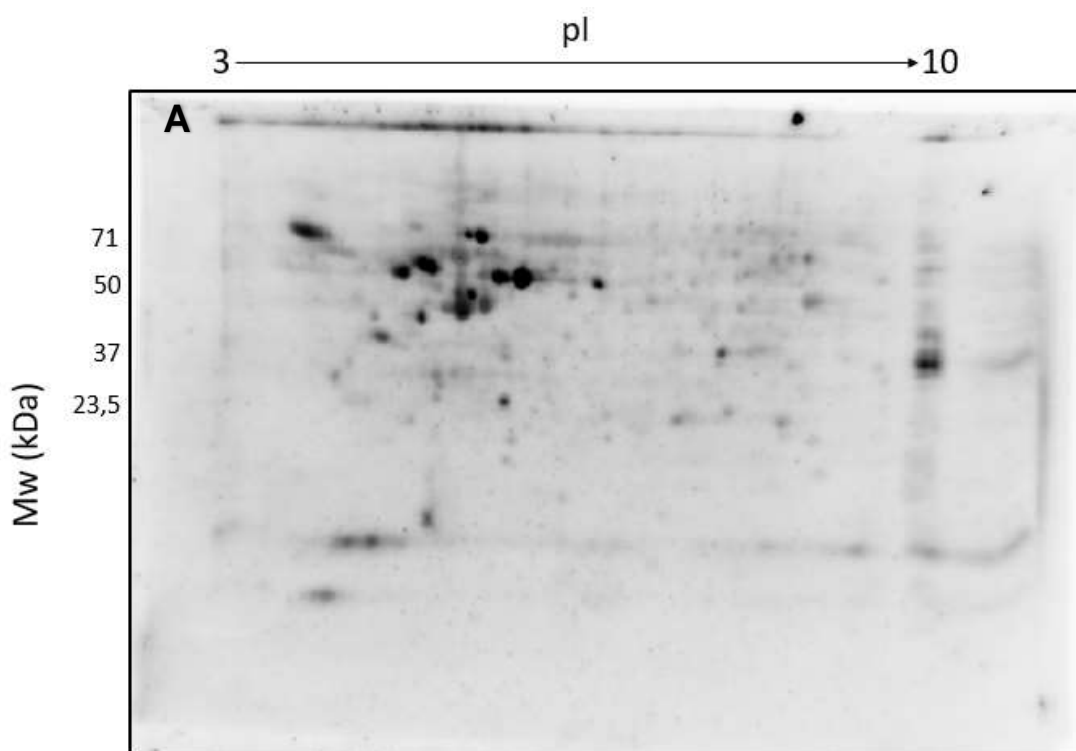


Figura 6. A) Imagen obtenida con el densitómetro XRS ChemiDoc (Bio Rad Laboratories) de una membrana incubada con anticuerpo anti-Acetil-Lisina, a partir del lisado celular de la línea de cáncer colorrectal SW620. B) Imagen de una sección de la misma membrana tras haber sido sometida a un paso de *stripping* e incubada de nuevo con anticuerpo primario anti- α -Tubulina.

2. Análisis del efecto del resveratrol sobre el acetiloma de la línea de cáncer colorrectal SW620.

Para el análisis de los efectos del resveratrol sobre el acetiloma de la línea SW620 se realizaron dos grupos de tres muestras: un grupo control y un grupo tratado con resveratrol 10 μ M (de ahora en adelante grupo resveratrol). Las muestras fueron procesadas de manera simultánea mediante la metodología descrita anteriormente para la separación de proteínas, obteniendo así tres imágenes (una por cada muestra, numeradas del 1 al 3) de cada grupo, como muestra la *figura 7*. En las imágenes se puede apreciar a simple vista una distribución similar de las proteínas acetiladas más

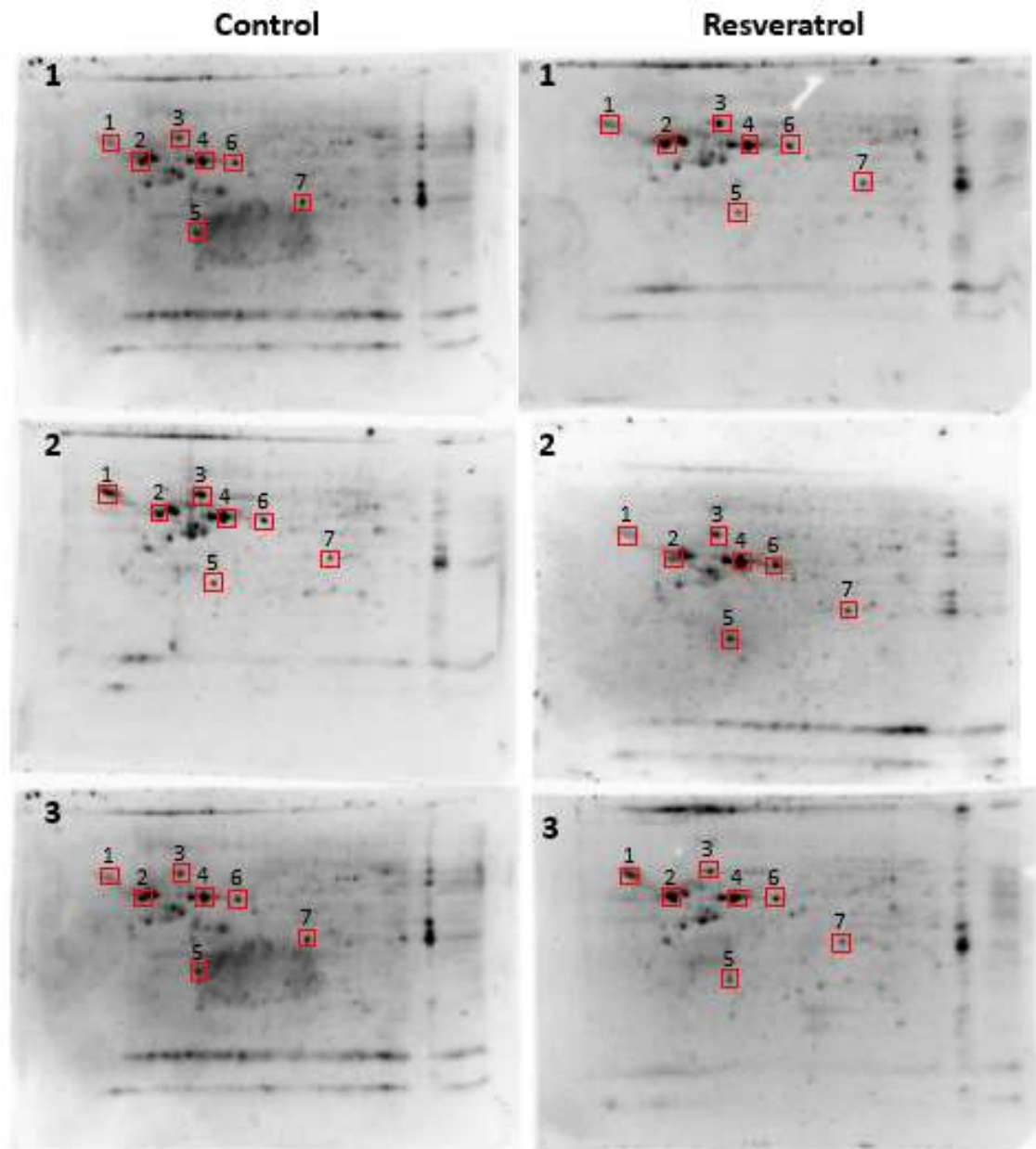
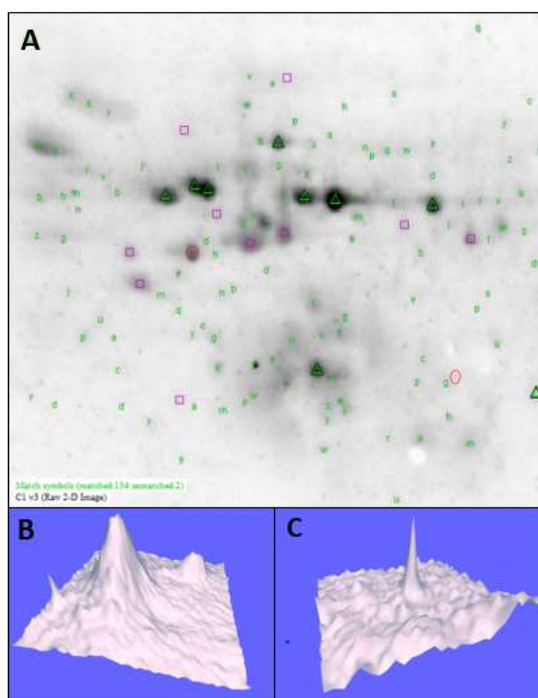


Figura 7. Imágenes obtenidas con el densitómetro XRS ChemiDoc (Bio Rad Laboratories) tras el procesamiento de las muestras de los grupos control (izquierda) y resveratrol (derecha) mediante electroforesis bidimensional, transferencia a una membrana e inmunodetección con anticuerpos anti-Acetil-Lisina. En las imágenes se han encuadrado y enumerado algunos de los spots más representativos, pudiendo apreciarse un patrón similar en la distribución de las dianas de acetilación.

representativas, algunas de las cuales se han encuadrado e identificado con un número para facilitar la visualización y la comparación entre las diferentes membranas. No obstante, para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de los efectos del resveratrol sobre el acetiloma se recurrió a la herramienta de *software* bioinformático PDQuest (Bio Rad Laboratories).

El *software* PDQuest permite la visualización y el análisis de imágenes de geles electroforéticos bidimensionales; sin embargo, en este caso el análisis se realizó sobre las membranas obtenidas a partir de la transferencia e inmunodetección de dichos geles, visualizándose únicamente aquellas proteínas a las cuales se había unido el anticuerpo anti-Acetil-Lisina. El objetivo era analizar las diferencias entre las imágenes obtenidas del grupo control y el grupo resveratrol.

Una vez obtenidas las imágenes de las membranas, el primer paso consistió en cargar las imágenes en el *software* asegurando mediante la edición de las mismas que el tamaño y orientación eran idénticos, a fin de facilitar el emparejado de los *spots*. Realizado esto, se procedió a la detección de *spots* en las membranas, paso para el cual el programa posee herramientas basadas en la detección automática de la distribución densitométrica Gaussiana típica de las proteínas separadas mediante electroforesis bidimensional (*figura 8*). Además, el programa permite también diferenciar entre *spots* y *speckles* (ruido de fondo de aspecto granular), como se muestra en la *figura 8*. Después, a partir de los *spots* detectados de cada membrana, se generó una nueva imagen filtrada y en tres dimensiones, creando digitalmente una representación tridimensional de los *spots* originales. Seguidamente, se creó un *Matchset Master*, es decir, una imagen sintética formada a partir de los *spots* de las diferentes membranas (*figura 9*).

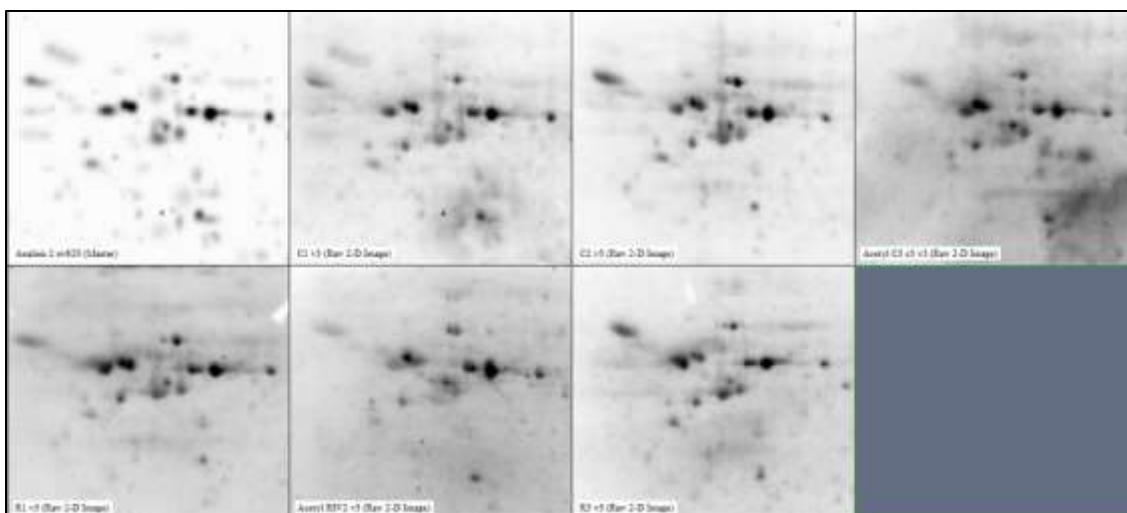


Posteriormente, se procedió al análisis de los datos. Para ello en primer lugar se seleccionaron aquellas imágenes que pertenecían al grupo control y aquellas que pertenecían al grupo resveratrol. Para llevar a cabo un análisis cuantitativo lo recomendable es normalizar las imágenes, para lo cual el programa dispone de una serie de métodos: normalizar en función de la densidad total de la imagen, en función de la cantidad de muestra cargada, en función de un valor especificado, etc.

Figura 8. A) Imagen de una sección de la membrana de la muestra control 1 en el *software* PDQuest. En ella se pueden observar con letras verdes los *spots* autoemparejados por el mismo programa, con recuadros violetas los *spots* emparejados manualmente, los *spots* sin emparejar con círculos rojos y, finalmente, los landmarks, con triángulos verdes. Los landmarks son *spots* referencia usados para alinear y posicionar los geles antes de realizar el emparejamiento. B) Representación bidimensional de un *spot* frente a una mancha o *speckle* (C). Puede apreciarse la apariencia gaussiana típica de las proteínas que conforman el *spot* en contraposición al pico no gaussiano del *speckle*.

En otras aplicaciones de esta técnica se utiliza la intensidad total de los geles o de los *spots* válidos para normalizar los datos. No obstante, con estas muestras no se consideró que fuera un método de normalización válido ya que *los spots* que se visualizaron eran exclusivamente de proteínas acetiladas, por lo que su intensidad dependía del grado de acetilación de las mismas. Esto implicaba que las diferencias entre grupos podrían ser grandes, por lo que no pudo utilizarse este criterio de normalización.

En un principio se pretendía normalizar las imágenes en base a los datos del *housekeeping*, la α -tubulina; sin embargo, debido a la elevada variabilidad de los resultados a la hora de llevar a cabo la cuantificación de dicha proteína, no se pudo realizar la comparación entre los grupos control y resveratrol. Además, puesto que no se hallaron diferencias significativas a nivel cualitativo entre los dos grupos, se puede concluir que el análisis de los efectos del resveratrol sobre el acetiloma de la línea de cáncer colorrectal SW620 fue insatisfactorio. No obstante, a pesar de ello, se consideró interesante realizar la identificación de los *spots* de proteínas acetiladas más representativos de las imágenes.



3. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas se seleccionaron los *spots* candidatos a partir de la imagen *Matchset Master*. Con la finalidad de llevar a cabo la extracción de las proteínas se realizó de nuevo una electroforesis bidimensional a partir de una de las muestras control, pero esta vez, en lugar de realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se procedió a la tinción del gel con azul de Coomassie. Seguidamente, se realizó la extracción manual de las proteínas del gel mediante una punta de pipeta, y se sometieron a un protocolo de digestión *in gel*. Puesto que en la imagen *Matchset Master* a partir de la cual se seleccionaron los *spots* tan sólo aparecían las proteínas acetiladas, mientras que en el gel se encontraban teñidas todas las proteínas, la dificultad de este paso estribaba en la extrapolación de la localización

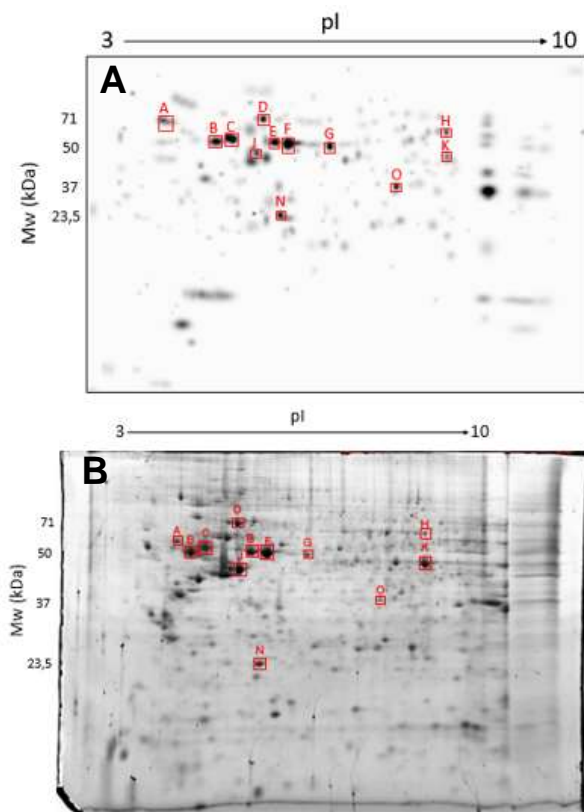


Figura 10. A) Matchset Master con los spots elegidos para proceder a la identificación por espectrometrías de masas. B) Gel teñido con azul de Coomasi en el cual se han señalado los mismos spots, a partir del cual se realizó la extracción y digestión in gel.

de los spots a extraer desde la membrana hasta el gel, en el cual el número de proteínas presentes era considerablemente mayor (figura 10).

Una vez extraídas las proteínas y realizada su digestión con tripsina, éstas fueron identificadas mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Los resultados representados en la tabla 1 se obtuvieron a partir de la búsqueda en la base de datos Swiss-Prot mediante el algoritmo del MASCOT (Matrix Sciences).

Tabla 1. Resultados obtenidos tras la identificación mediante espectrometría de masas mediante la búsqueda de la huella peptídica en la base de datos Swiss-Prot, junto con el score y el porcentaje de cobertura (coverage) obtenidos. Todas las proteínas corresponden a la especie *Homo sapiens*.

Spot	Proteína	Score	Coverage (%)
B	Tubulin beta chain	95	49
C	Tubulin alpha-1B chain	88	58
D	Heat shock cognate 71 kDa protein	123	51
E	Keratin, type II cytoskeletal 8	147	81
F	Keratin, type II cytoskeletal 8	219	78
G	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	57	56
J	Keratin, type I cytoskeletal 18	159	67
K	Alpha-enolase	80	65
N	Glutathione S-transferase P	72	72
O*	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	85	4

*Debido a complicaciones para su identificación, la muestra fue sometida a un segundo análisis MS/MS.

Además, dos muestras fueron identificadas como proteínas bovinas (*Bos taurus*): *alpha-S1-casein* y *alpha-2-HS-glycoprotein*. Se trata de contaminación posiblemente

procedente del suero fetal bovino utilizado para los cultivos celulares, así como de la leche en polvo que se utiliza rutinariamente para el bloqueo de las membranas, que pudiesen haber contaminado en algún momento el material utilizado con los geles.

En cuanto a las proteínas obtenidas en la identificación, las cuales se ha comprobado mediante búsqueda en la base de datos *Uniprot* que todas ellas presentan residuos susceptibles de sufrir acetilación, encontramos:

- Queratinas.
- Tubulinas.
- Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas.
- Glutación S-transferasa.
- *Heat shock cognate 71 kDa Protein*, también conocida como hsc70.
- α -enolasa.

Las queratinas y tubulinas constituyen proteínas estructurales típicas del tejido epitelial. En cuanto a la glutación S-transferasa, es una enzima encargada de la conjugación de glutación reducido a un extenso número de compuestos hidrofóbicos electrófilos, tanto exógenos como endógenos. Por otro lado, las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), son proteínas de unión a RNA nuclear heterogéneo que se encuentran implicadas en el procesamiento de los pre-mRNAs, así como en el transporte y metabolismo de los mRNAs. Además, se ha establecido la sobreexpresión de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea H (hnRNP H, del inglés *heterogenous nuclear ribonucleoprotein H*) en algunos tumores tales como adenocarcinomas de páncreas, hepatocelulares y gástricos²⁴. Finalmente, otras dos proteínas de interés identificadas son la hsc70 (chaperona) y la α -enolasa (enzima glucolítico), puesto que también se ha descrito su sobreexpresión en las células cancerosas, y juegan un papel importante en el desarrollo de dicha patología^{25,26}.

7 Discusión.

Las PTMs juegan un papel fundamental en numerosos procesos celulares tales como la regulación de la expresión génica, la transmisión de señales a través de rutas celulares o el control metabólico, entre otros. Existen una amplia variedad de modificaciones post-traduccionales, y la gran mayoría de las proteínas poseen aminoácidos susceptibles de sufrir una o varias de estas modificaciones, lo cual se traduce en un amplio abanico de posibilidades que permiten llevar a cabo una fina regulación de la actividad proteica. Entre estas modificaciones, una de las más estudiadas es la acetilación: la adición de un grupo acetilo en el grupo ϵ -amino de residuos de lisina. Ésta, descrita inicialmente en histonas⁵, desempeña un amplio rango de funciones a nivel fisiológico, y la presencia de un desequilibrio en su regulación que altere la homeostasis del acetiloma se ha relacionado con patologías como el cáncer, la diabetes y algunos desórdenes neurológicos^{27,28}.

A raíz del descubrimiento de la importancia de la acetilación en procesos tanto fisiológicos como patológicos, han surgido un gran número de estudios dirigidos a una

mayor comprensión de su rol en diferentes condiciones ambientales y tipos celulares. Los descubrimientos y el avance en estos estudios han ido de la mano de la evolución en técnicas aplicadas a la proteómica, como la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas. El desarrollo de estas técnicas, junto con la creación de bases de datos bioinformáticas de secuencia de proteínas, ha allanado el camino del estudio de las mismas, permitiendo una mayor facilidad a la hora de realizar su separación y su posterior identificación.

Siguiendo esta línea, se pretendía la puesta a punto de un método sencillo para realizar un *screening* del acetiloma de la línea de cáncer colorrectal SW620. La realización únicamente de una electroforesis bidimensional antes de realizar la digestión e identificación de las proteínas por espectrometría de masas hubiera permitido la separación de la fracción proteica total de las células, las cuales hubieran podido visualizarse seguidamente mediante tinción. No obstante, con la finalidad de detectar tan sólo la fracción acetilada, se procedió a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana que posteriormente fue incubada con anticuerpos anti-Acetil-Lisina. De esta manera, como muestra la *figura 6*, se consiguió realizar la detección de dianas de acetilación mediante la separación electroforética bidimensional e *immunoblotting*, como indicaba el primer objetivo.

Con la finalidad de establecer si la metodología planteada era apta para analizar el efecto sobre el acetiloma de la línea celular SW620, se procedió al tratamiento de dicha línea celular con resveratrol. Esta fitoalexina, para la cual se han descrito numerosas propiedades anti-tumorales (supresión del ciclo celular, inducción de la apoptosis y supresión de la invasión y metástasis), es capaz de inducir la síntesis y promover la activación de la sirtuina 1 (SIRT 1)¹⁷. Las sirtuinas constituyen una familia de proteínas muy conservadas a nivel evolutivo que poseen actividad desacetilasa dependiente de NAD⁺, las cuales actúan sobre una amplia variedad de proteínas sustrato, entre ellas histonas, factores de transcripción y enzimas metabólicas, participando en numerosos procesos celulares. Por lo tanto, dada su actividad desacetilasa y su amplio rango de proteínas diana, se quiso valorar los efectos de su activación mediante resveratrol sobre el acetiloma de la línea SW620.

Sin embargo, la técnica de *screening* llevada a cabo no demostró ser lo suficientemente eficiente como para realizar un análisis exitoso de los efectos del resveratrol sobre dicha línea. A pesar de que la detección de dianas de acetilación se mostró en un principio exitosa, la posterior comparación entre los grupos control y *resveratrol* no reveló la presencia de diferencias significativas en el acetiloma a nivel cualitativo, ni permitió el análisis a nivel cuantitativo. La gran variabilidad mostrada en la intensidad de las imágenes obtenidas tras la transferencia y la incubación con anticuerpos anti-Acetil-Lisina induce a pensar que la dificultad a la hora de realizar el análisis radica en la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, más que en errores del procedimiento experimental previo al *immunoblotting*.

Un indicativo de que probablemente el principal factor implicado en el análisis fallido del acetiloma de ambos grupos fuese la transferencia lo constituyen los niveles del *housekeeping* utilizado, la α -tubulina. La cuantificación de sus niveles después de realizar la incubación sobre la misma membrana tras el paso de *stripping*, los cuales se esperaba que mostrasen cierta homogeneidad entre muestras al tratarse de una proteína expresada constitutivamente, presentaron gran variabilidad tanto entre grupos

como entre muestras del mismo grupo. Esta disparidad en los resultados sugirió que el rendimiento no era igual a la hora de realizar las transferencias del gel a la membrana, lo cual tuvo dos implicaciones: por una parte, que la intensidad de las proteínas en cada membrana estaba sujeta a la eficiencia del proceso de transferencia realizado para esa misma membrana y, por otra parte, la imposibilidad de realizar la normalización de las imágenes mediante los valores obtenidos a partir de una proteína *housekeeping*. Si a esto último añadimos el hecho de que ninguno de los otros criterios de normalización se adecuaban al análisis que se pretendía realizar, el resultado fue que no pudo llevarse a cabo la comparación cuantitativa entre ambos grupos.

Otro factor que pudo estar implicado en la deficiencia del análisis fue la unión del anticuerpo anti-Acetil-Lisina a los residuos acetilados. Ésta se realizó mediante la incubación de las membranas con un anticuerpo anti-Acetil-Lisina monoclonal. El éxito de dicha unión depende, además de las condiciones de incubación, de la eficacia y especificidad de los anticuerpos. Por ello, para maximizar esta unión, se ha descrito el uso de mezclas de anticuerpos mono y policlonales²⁹, por lo que su uso constituiría una estrategia para mejorar el *immunoblotting* permitiendo un mayor reconocimiento de las lisinas acetiladas, así como la unión a proteínas que presentasen menor grado de acetilación o se encontrasen en menor cantidad en alguno de los grupos, permitiendo así su posterior análisis.

Por otro lado, un aspecto importante a considerar también a la hora de realizar el análisis es el método de obtención de la imagen y la calidad de ésta. Las imágenes de las membranas se obtuvieron con el densitómetro XRS ChemiDoc (Bio Rad Laboratories) mediante la detección de la señal quimioluminiscente generada por la enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario al actuar sobre un sustrato. Para la obtención de las imágenes del gel se utilizó el escáner *GS-800™ Calibrated Imaging Densitometer* (Bio Rad Laboratories), las imágenes del cual poseen una mayor resolución que las obtenidas con el densitómetro. Pese a que lo más óptimo hubiera sido obtener las imágenes de las membranas mediante el escáner, éste no permitía la detección de la señal de quimioluminiscencia, por lo que la obtención de las imágenes con una peor resolución fue una limitación que tuvo que asumirse.

En base a estos inconvenientes, dos propuestas para mejorar los resultados del análisis comparativo del acetiloma serían:

- Enriquecer la muestra de proteínas acetiladas.
- Evitar el paso de transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

El paso de enriquecimiento de las muestras, es decir, la captura de las proteínas acetiladas a partir de los lisados celulares, podría realizarse a través de la purificación mediante inmunofinidad de las proteínas acetiladas con el uso de anticuerpos anti-Acetil-Lisina conjugados a un soporte sólido, como por ejemplo cuentas (*beads*) de agarosa²⁹. La introducción de este paso implicaría la eliminación de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa para su detección inmunológica, por lo que podrían evitarse las limitaciones derivadas de este paso previamente mencionadas. El protocolo quedaría así modificado como representa el esquema de la *figura 11*.

En cuanto a la identificación de los *spots* más representativos presentes en las membranas, fueron identificadas diez proteínas mediante espectrometría de masas (*tabla 1*). Entre estas, se identificaron proteínas pertenecientes a la familia de las

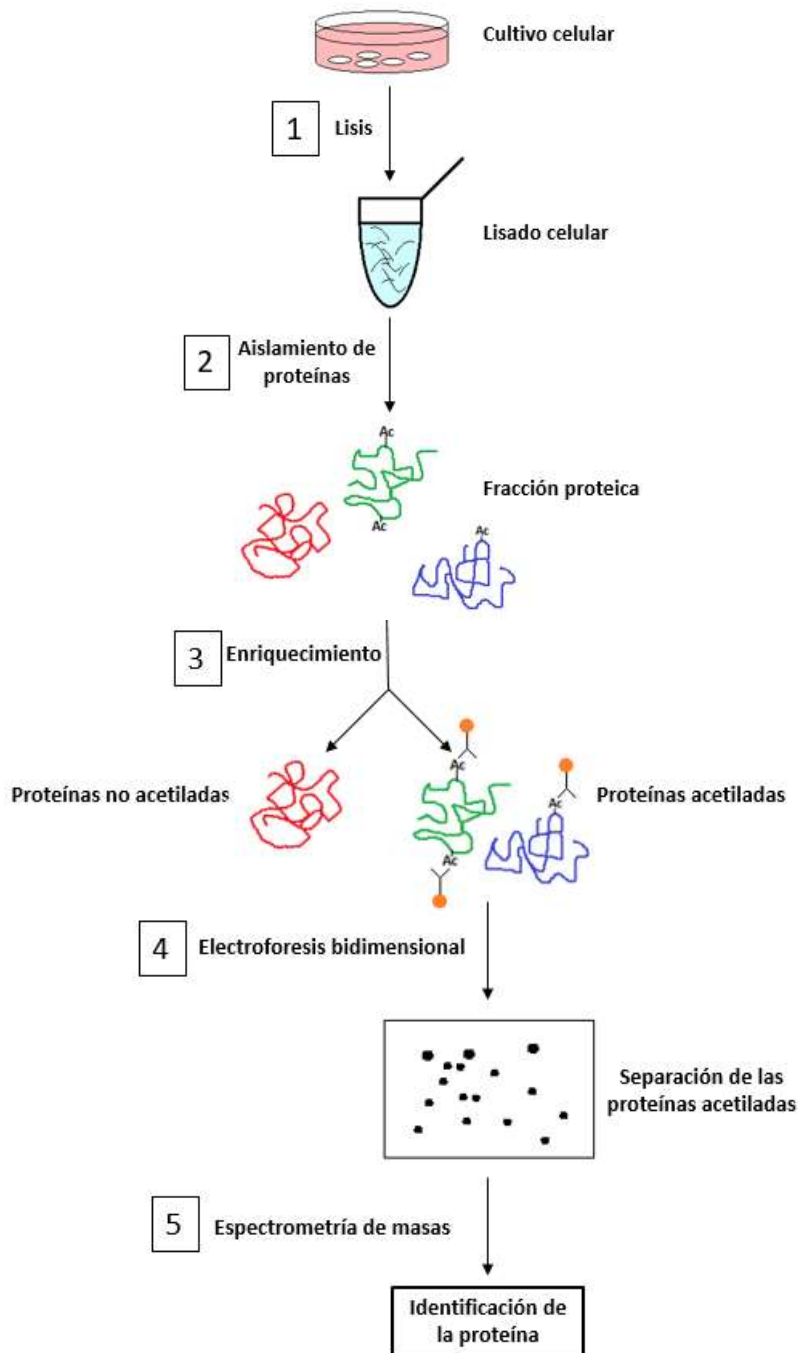


Figura 11. Esquema del protocolo propuesto para la mejora del análisis cuantitativo del acetiloma de líneas celulares. 1) Lisis a partir de las células en cultivo para la obtención del lisado celular. 2) Aislamiento de las proteínas del lisado. 3) Enriquecimiento de la muestra mediante la detección de las proteínas acetiladas por inmunofinidad con anticuerpos anti-Acetil-Lisina conjugados a un soporte sólido, por ejemplo como cuentas de agarosa (círculos naranjas). 5) Separación de las proteínas acetiladas por electroforesis bidimensional. 6) Espectrometría de masas a partir de los spots obtenidos en el gel e identificación de la proteína.

tubulinas (*tubulin β chain* y *tubulin α -1B chain*) y a la familia de las queratinas (*keratin type II cytoskeletal 8* y *keratin type I cytoskeletal 18*), las cuales son constituyentes estructurales típicos de las células epiteliales. Cabe destacar que se ha descrito la sobreexpresión de la *tubulin β chain* y la *keratin type II cytoskeletal 8* mediante el análisis proteómico de cultivos primarios de carcinomas colorrectales, y ambas se han propuesto como biomarcadores de este tipo de adenocarcinoma³⁰. Por lo tanto, estas proteínas podrían tener un papel en la patogenia del cáncer más allá de su mera función estructural.

Sin embargo, cuatro de las proteínas identificadas merecen especial atención debido a su función en las células cancerosas. Éstas son la glutatión S-Transferasa, la ribonucleoproteína nuclear heterogénea H, la *heat shock cognate 71 kDa protein* y la enolasa, las cuales se describen a continuación con más detalle.

Glutatión S-Transferasa P1.

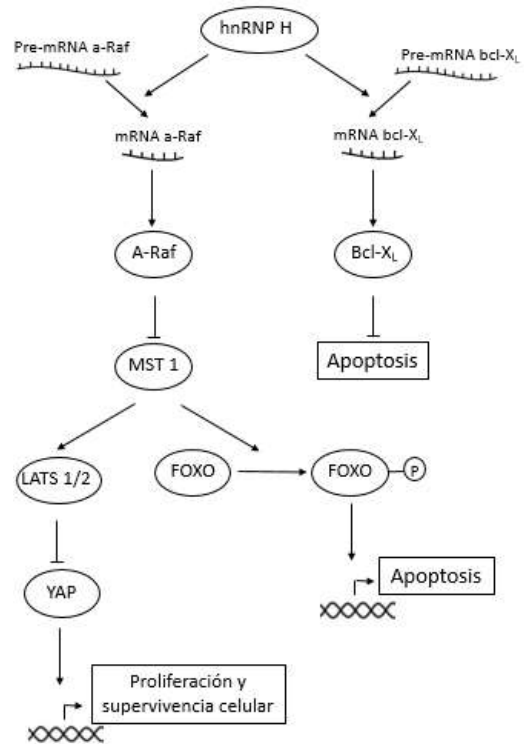
La Glutatión S-Transferasa P1 (GSTP1) forma parte de la familia de las Glutatión S-transferasas, unos enzimas detoxificantes de clase II que catalizan la conjugación de glutatión a una amplia variedad de sustratos. Por ello, poseen un papel citoprotector, y se encuentran implicadas en el desarrollo de resistencia a fármacos³¹. De hecho, se ha observado su sobreexpresión en diversos carcinomas, entre ellos el colorrectal³². Además, parece ser que GSTP1 se encuentra implicada no sólo en la detoxificación de sustancias citotóxicas, sino también en la reducción de especies radicales de oxígeno presentes en las células tumorales³³. Por lo tanto, la presencia de este enzima en las células cancerosas se correlaciona con una mayor resistencia frente fármacos antineoplásicos y daño oxidativo, proporcionando una mayor supervivencia celular ante ambientes hostiles.

Ribonucleoproteína nuclear heterogénea H.

La ribonucleoproteína nuclear heterogénea H (hnRNP H) forma parte de la familia de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas. Los miembros de esta familia participan en la formación de complejos de RNA y proteínas localizados en el núcleo celular, y están implicados en el procesamiento de los pre-mRNAs transcritos mediante procesos como el *splicing* alternativo, y su conversión a mRNAs maduros y traducibles³⁴.

HnRNP H, cuya sobreexpresión se ha descrito en numerosos carcinomas²⁴, está implicada por una parte en el procesamiento del mRNA de la proteína Bcl-X_L, antiapoptótica, por lo que una presencia aumentada de esta proteína en las células cancerosas conlleva una mayor cantidad de mRNA de Bcl-X_L funcional, otorgando así un mecanismo de resistencia a la apoptosis³⁵. Por otra parte, la hnRNP H es necesaria para el *splicing* de A-Raf, el cual participa en la disminución de la apoptosis y el aumento de la proliferación y supervivencia celular mediante la inhibición de MST 1 (*Macrophag Stimulating 1*). MST 1, homóloga de la quinasa Hippo descrita en *Drosophila melanogaster*, forma parte de una vía de señalización de supresión tumoral. Actúa

Figura 12. Papel de hnRNP H sobre la apoptosis y la supervivencia celular. La sobreexpresión de hnRNP H en células cancerosas conduce a un aumento de los mRNAs maduros y funcionales de la proteína Bcl XL, lo cual implica una disminución de la apoptosis, y de A-Raf. A su vez, A-Raf inhibe a MST-1, una proteína quinasa. Su inhibición conlleva a la disminución de la actividad proapoptótica de proteínas de la familia FOXO, así como un aumento de la expresión de genes de proliferación y supervivencia celular gracias al factor de transcripción Yap, cuya actividad no se encuentra inhibida por Lats 1/2.



umentando la tasa apoptótica a través de la fosforilación de proteínas de la familia *forkhead box* (FOXO), factor de transcripción de genes proapoptóticos como FasL³⁶; y de la inhibición a través de LATS 1/2 (*large tumor suppressor*) del factor de transcripción YAP (*yes-associated protein*), el cual está involucrado en la transcripción de genes de proliferación y supervivencia celular³⁷. Por lo tanto, la sobreexpresión de la proteína hnRNP H en células cancerosas se asociaría con una mayor tasa proliferativa a través de su papel en la maduración de los mRNAs de la proteína Bcl-XL y A-Raf (figura 12).

Se ha demostrado que el tratamiento de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con tricostatina (TSA), un inhibidor de enzimas desacetilasas, previene la degradación proteosómica de la ribonucleoproteína hnRNP H. Esto sugiere que la acetilación de dicha proteína juega un papel importante en su estabilidad y resistencia frente a la degradación³⁸.

Heat shock cognate 71 kDa protein.

La familia *heat shock protein 70* (Hsp70s) engloba un conjunto de proteínas que participan en la síntesis proteica, ayudando al correcto plegamiento de las cadenas polipeptídicas y evitando la formación de agregados proteicos. Además, actúan frente a proteínas mal plegadas y desnaturalizadas mediante su replegamiento, o bien induciendo su degradación proteosómica cuando la reparación no es posible. Juegan por tanto un importante papel en la homeostasis proteica y en la respuesta a estrés proteotóxico que sufren las células cancerosas.

Un miembro de esta familia es la *heat shock cognate 71 kDa Protein*, también conocida como Hsc70. Esta proteína, a diferencia de otros integrantes de la familia Hsp70s, que actúan únicamente en condiciones de estrés, contribuye a mantener la homeostasis proteica tanto en condiciones normales como bajo estrés. Una de las proteínas que contribuyen a su regulación es la histona desacetilasa 6 (HDAC6), la cual

se encuentra sobreexpresada en cáncer³⁹. Mediante la desacetilación de dos residuos de lisina de Hsc70, HDAC6 contribuye a un aumento de su actividad chaperona permitiendo su dimerización con Hsp 40, una cochaperona (*figura 13*)⁴⁰.

Hsc70 se encuentra expresada constitutivamente en células cancerosas, pero frente a estrés proteotóxico abandona su función de ayuda en el plegamiento cotraduccional a favor de la reparación de proteínas mal plegadas implicadas en la supervivencia de estas células, evitando así su degradación²⁶. Uno de sus sustratos es Rab1, una proteína oncogénica miembro de la familia *Rab small GTPase*. Rab1, además de mediar el tráfico de membranas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, participa en la activación de rutas mitogénicas, entre ellas mTOR⁴¹. De esta manera, Hsc70 prima la viabilidad de la actividad de proteínas implicadas en la supervivencia de las células cancerosas, como Rab1, en detrimento a su actividad como asistente del plegamiento cotraduccional (*figura 13*).

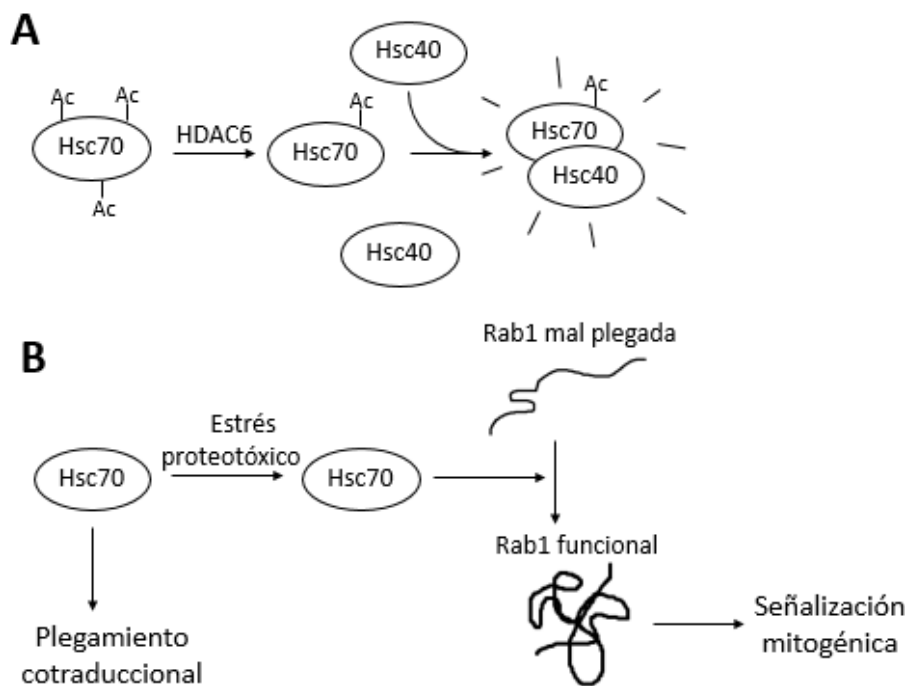


Figura 13. A) Regulación de la actividad de Hsc70 mediante la desacetilación de dos residuos a través de HDAC6. Esto permite su asociación con la cochaperona Hsc40, formando un dímero funcional. B) En respuesta al estrés, Hsc70 abandona su actividad asistiendo el plegamiento de proteínas en síntesis y media el replegamiento de proteínas mal plegadas, entre ellas Rab1, implicada en la señalización mitogénica de las células cancerosas.

α -Enolasa.

La α -enolasa es una proteína multifuncional cuya sobreexpresión se ha descrito en numerosas líneas celulares de cáncer, entre ellas la línea SW620⁴². Es susceptible de sufrir varias modificaciones post traduccionales, destacando la fosforilación, metilación y acetilación²⁵. A pesar de que posee numerosas funciones, su papel en las células cancerosas gira en torno a dos acciones principales: como enzima glucolítico y como receptor de plasminógeno.

Como enzima glucolítico presenta una localización citosólica, donde cataliza la deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, reacción para la que necesita como cofactor el ion magnesio (Mg^{2+}). Su sobreexpresión permite una mayor actividad de la vía glucolítica característica de la mayoría de células cancerosas, las cuales realizan preferentemente la oxidación parcial de la glucosa seguida de un proceso de fermentación láctica, en lugar de completar su oxidación mediante el ciclo de Krebs, lo cual es conocido como Efecto Warburg⁴³.

Para su actividad como receptor de plasminógeno se localiza en la membrana celular, donde permite la activación de dicha molécula. Se desconocen los mecanismos mediante los cuales esta enzima se asocia con la membrana celular, aunque se ha postulado que las modificaciones post traduccionales, como la acetilación, podrían estar implicadas en ello⁴⁴. Mediante la unión a plasminógeno permite su activación a través de la proteína activadora de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), dando lugar a plasmina. Unida a la α -enolasa, la plasmina se encuentra protegida de su degradación frente a la enzima α 2-antiplasmina (α 2-AP), y puede ejercer su acción degradativa sobre la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) de manera directa, e indirecta, activando pro-metaloproteinasas de matriz (proMMPs) mediante escisión proteolítica²⁵. Así, juega un papel fundamental en la migración e invasión de las células cancerosas (figura 14).

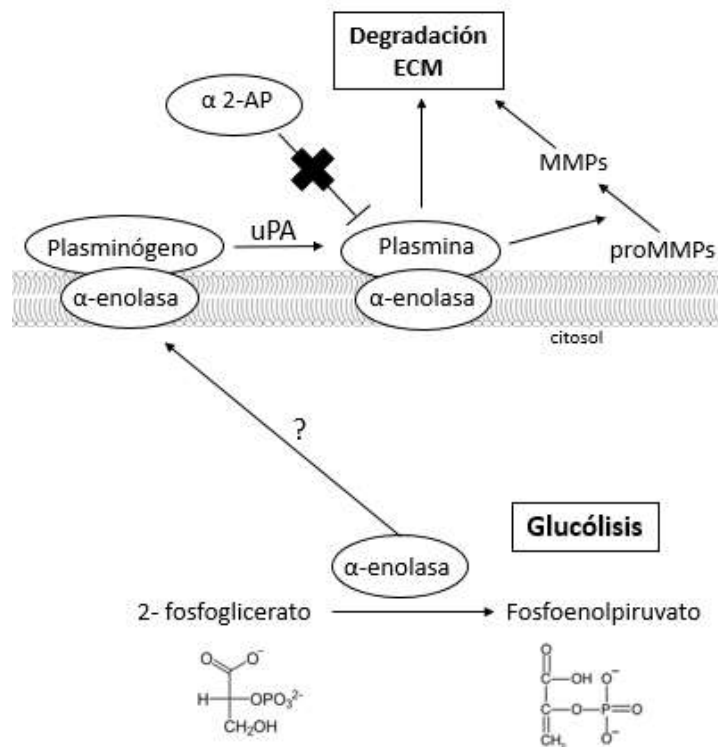


Figura 14. Principales funciones de la α -enolasa en las células cancerosas. Por una parte, contribuye a la obtención de energía mediante la vía glucolítica al catalizar la deshidratación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato y, por otra, actúa en la degradación de la matriz celular mediante la protección de la inhibición de la plasmina, la cual degrada la matriz extracelular mediante su acción directa sobre ella y a través de la activación de metaloproteinasas. Adaptado de López-Aleman et al.²⁵

Por lo tanto, la identificación de los *spots* seleccionados mediante espectrometría de masas mostró resultados interesantes, ya que puso de manifiesto la presencia de proteínas acetiladas de gran relevancia en la fisiopatología del cáncer.

La importancia de la acetilación en la regulación de este proceso patológico la convierte en un tema de estudio clave para un mejor conocimiento de la fisiología de estas células. Aún queda un largo camino por recorrer para conocer todos los mecanismos implicados en el desarrollo de esta enfermedad, no obstante, los avances en el campo de la biología molecular proporcionan cada vez más nuevas herramientas que ofrecen perspectivas esperanzadoras para descifrar los mecanismos moleculares que subyacen a esta patología.

8 Conclusión.

Con la finalidad de realizar el *screening* del acetiloma de la línea celular de cáncer colorrectal SW620 se llevó a cabo la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional seguida de *immunoblotting* con anticuerpos anti-Acetil-Lisina, lo cual proporcionó buenos resultados. No obstante, a la hora de analizar las variaciones en el análisis tras el tratamiento con un activador de sirtuinas, el resveratrol, la técnica no mostró ser lo suficientemente adecuada, lo cual se debió principalmente a los problemas derivados del paso de transferencia de las proteínas del gel a la membrana. Una posible estrategia para evitar este paso sería realizar el aislamiento de las proteínas acetiladas antes de someter la muestra a la electroforesis bidimensional, a través un paso de enriquecimiento mediante el uso de anticuerpos anti-Acetil-Lisina unidos a un soporte sólido.

En cuanto a la identificación de los *spots* más representativos obtenidos tras el *immunoblotting*, se identificaron proteínas de gran interés en las células cancerosas. Entre ellas, cabe destacar la glutatión S-transferasa P1, implicada en la detoxificación de un amplio rango de compuestos, y que juega un papel citoprotector relacionado con el desarrollo de resistencia a fármacos; la ribonucleoproteína nuclear heterogénea H, cuya presencia se relaciona con una disminución de los mecanismos de apoptosis y un aumento de la proliferación y supervivencia celular; la *heat shock cognate 71 kDa protein*, la cual participa en la respuesta a proteínas mal plegadas, proporcionando a la célula resistencia frente a estrés proteotóxico; y, finalmente, la α -enolasa, un enzima cuyo papel es fundamental tanto en la obtención de energía a través de la vía glucolítica como en la capacidad invasiva y metastática de las células cancerosas, a través de su participación en la vía de activación de las metaloproteinasas de matriz.

9 Abreviaturas.

- **AP:** antiplasmina
- **CDK:** quinasas dependientes de ciclina
- **COX:** ciclooxigenasa
- **DMEM:** Medio Mínimo Esencial de Eagle modificado por Dulbecco
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DTT:** ditioneitol
- **ECM:** matriz extracelular
- **EGTA:** ácido tetraacético de etilenglicol
- **FBS:** suero fetal bovino
- **GST:** glutatión S transferasa
- **HDAC:** histona desacetilasa
- **HIF:** factor inducible por hipoxia
- **hnRNP:** ribonucleoproteína nuclear heterogénea
- **HSC:** *heat shock cognate*
- **HSP:** *heat shock protein*
- **IAA:** yodoacetamida
- **IEF:** isoelectroenfoque
- **MALD-TOF:** desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz acoplada a un analizador del tiempo de vuelo
- **MMPs:** metaloproteinasas de matriz
- **NF- κ B:** factor potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- **PTM:** modificación post traduccional
- **ROS:** especies radicales de oxígeno
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
- **TSA:** tricostatina
- **uPA:** proteína activadora de plasminógeno tipo uroquinasa

10 Bibliografía.

1. Human Genome Sequencing Consortium International. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–45 (2004).
2. Kim, M.-S. *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575–81 (2014).
3. Zhao, Y. & Jensen, O. N. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* **9**, 4632–4641 (2009).
4. Overview of Post-Translational Modification. at <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>
5. Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786–94 (1964).
6. Gu, W. & Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595–606 (1997).
7. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major.pdf. **834**, (2009).

8. Cáncer de colon - National Cancer Institute. at <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/tratamiento-colorrectal-pdq#section/_269>
9. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. at <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>
10. SW620 [SW-620] ATCC ® CCL-227™. at <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=es>
11. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J. & Crozier, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3337–3340 (2002).
12. Yang, T., Wang, L., Zhu, M., Zhang, L. & Yan, L. Properties and molecular mechanisms of resveratrol: A review. *Pharmazie* **70**, 501–506 (2015).
13. Kasiotis, K. M., Pratsinis, H., Kletsas, D. & Haroutounian, S. A. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* **61**, 112–120 (2013).
14. Resveratrol in treating patients with colorectal cancer that can be removed by surgery. at <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00433576?term=resveratrol+AND+colorectal+cancer&rank=2>>
15. Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E. & Walle, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. isposition* **32**, 1377–1382 (2004).
16. Elena M Varoni, Alfredo Fabrizio Lo Faro, Javad Sharifi-Rad, M. I. Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. *Front. Nutr.* **3**, (2016).
17. Han, G. *et al.* Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discov. Ther.* **9**, 1–12 (2015).
18. Morris, B. J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **56**, 133–71 (2013).
19. Morselli, E. *et al.* Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* **1**, e10 (2010).
20. Fang, Y. & Nicholl, M. B. A dual role for sirtuin 1 in tumorigenesis. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 2634–6 (2014).
21. Gertz, M. *et al.* A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One* **7**, e49761 (2012).
22. Prashanth, J. R. *et al.* Sirtuin inhibitors as anticancer agents. *Futur. Sci.* **6**, 1659–75 (2014).
23. Roth, M. & Chen, W. Y. Sorting out functions of sirtuins in cancer. *Oncogene* **33**, 1609–20 (2014).
24. Honoré, B., Baandrup, U. & Vorum, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. *Exp. Cell Res.* **294**, 199–209 (2004).
25. Díaz-Ramos, À., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A. & López-Alemany, R. α -enolase, a multifunctional protein: Its role on pathophysiological situations. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, (2012).

26. Tanaka, M. *et al.* Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
27. Arif, M., Senapati, P., Shandilya, J. & Kundu, T. K. Protein lysine acetylation in cellular function and its role in cancer manifestation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1799**, 702–716 (2010).
28. Batta, K., Das, C., Gadad, S., Shandilya, J. & Kundu, T. K. Reversible acetylation of non histone proteins: role in cellular function and disease. *Subcell. Biochem.* **41**, 193–212 (2007).
29. Zhang, K., Tian, S. & Fan, E. Protein lysine acetylation analysis: current MS-based proteomic technologies. *Analyst* **138**, 1628–36 (2013).
30. Gan, Y., Chen, D. & Li, X. Proteomic analysis reveals novel proteins associated with progression and differentiation of colorectal carcinoma. *J. Cancer Res. Ther.* **10**, 89–96
31. Singh, S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **75**, 1–15 (2015).
32. McIlwain, C. C., Townsend, D. M. & Tew, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* **25**, 1639–1648 (2006).
33. Kanwal, R. *et al.* Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Mol. Carcinog.* **53**, 8–18 (2014).
34. HNRNPH1 - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H - Homo sapiens (Human) - HNRNPH1 gene & protein. at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P31943>>
35. Garneau, D., Revil, T., Fiset, J.-F. & Chabot, B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* **280**, 22641–50 (2005).
36. Fu, Z. & Tindall, D. J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* **27**, 2312–9 (2008).
37. Qin, F., Tian, J., Zhou, D. & Chen, L. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases. *Cell Biosci.* **3**, 31 (2013).
38. Koumbadinga, G. A. *et al.* Increased stability of heterogeneous ribonucleoproteins by a deacetylase inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1849**, 1095–1103 (2015).
39. Aldana-Masangkay, G. I. & Sakamoto, K. M. The role of HDAC6 in cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 875824 (2011).
40. Zhang, L. *et al.* Proteomic identification and functional characterization of MYH9, Hsc70, and DNAJA1 as novel substrates of HDAC6 deacetylase activity. *Protein Cell* **6**, 42–54 (2014).
41. Yang, X.-Z. *et al.* Rab1 in cell signaling, cancer and other diseases. *Oncogene* **1–6** (2016).
42. Katayama, M. *et al.* Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg. Today* **36**, 1085–93 (2006).
43. Capello, M., Ferri-Borgogno, S., Cappello, P. & Novelli, F. α -enolase: A promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J.* **278**, 1064–1074 (2011).

44. Bottalico, L. A., Kendrick, N. C., Keller, A., Li, Y. & Tabas, I. Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in an alpha-enolase isoform. *Arterioscler. Thromb.* **13**, 264–75 (1993).