

Caracterización Proteómica del papel de Snail1 en diferenciación de fibroblastos murinos mediante SILAC

Alberto Peláez¹, Rodrigo Barderas¹, Raquel Batlle², María López-Lucendo¹,
Antonio García de Herreros², Ignacio Casal¹

¹Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid ²Programa de Investigación en Cáncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona

apelaez@cib.csic.es

Snail1 es un represor transcripcional asociado a diversas funciones en el desarrollo embrionario. En cáncer, Snail1 es un potente iniciador de la transición epitelio mesénquima (EMT). El objetivo de este trabajo es analizar el papel de este factor de transcripción en células mesenquimales murinas. Hemos caracterizado la expresión ectópica de Snail1 mediante SILAC utilizando la línea de fibroblastos 3T3-L1, una línea celular de preadipocitos comprometida a diferenciarse a adipocitos y derivada de células embrionarias de ratón.

Mediante la infección con retrovirus usando los vectores pRETRO-SUPER se generaron líneas celulares estables control y que sobreexpresan Snail1. Al ser Snail1 un factor de transcripción, nos centramos en el estudio de proteínas nucleares desreguladas mediante SILAC. Una vez confirmada la incorporación de los aminoácidos pesados, se realizó la mezcla 1:1 de las células control y Snail1 con diferente marcaje isotópico, se lisaron y fraccionaron para obtener las proteínas nucleares. Finalmente, la fracción nuclear se separó mediante geles SDS-PAGE, se digirieron con tripsina en gel las 20 subfracciones obtenidas y se analizaron mediante LC-MS/MS en un LTQ-Orbitrap Velos acoplado a un nanoHPLC con columna C18. El análisis de los espectros se realizó utilizando el método de 'top 15'. Los espectros se reanalizaron utilizando el software Proteome Discoverer v 1.3 con el motor de búsqueda de MASCOT y la base de datos UniProt de *Mus musculus*. En la identificación de péptidos, el FDR fue establecido en 0.01, con una variabilidad inferior al 20% entre ensayos.

Al final del proceso se encontraron un 60% de proteínas nucleares entre un total de 2125 proteínas identificadas, de las que 126 aparecían diferencialmente reguladas al menos dos veces por acción de Snail1. Finalmente, se ha verificado mediante técnicas complementarias la expresión diferencial de las proteínas identificadas y su papel en diferenciación.