UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA α MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE SUS DIANAS MOLECULARES

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Bioquímica, presenta

Pablo Barbeito González

Santiago de Compostela, julio de 2014

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Biología
Universidad de Santiago de Compostela

Manuel Freire Rama, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, **Concepción Sarandeses da Costa**, profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, y **Cristina Díaz-Jullien**, profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la memoria adjunta, titulada "**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA α MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE SUS DIANAS MOLECULARES**", presentada por el licenciado en Biología Molecular y Biotecnología Pablo Barbeito González para optar al grado de Doctor en Bioquímica, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela y, considerándola concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Fdo. Manuel Freire Rama Fdo. Concepción Sarandeses da Costa Fdo. Cristina Díaz-Jullien

Fdo. Pablo Barbeito González

Santiago de Compostela, 4 de julio de 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el profesor Manuel Freire Rama, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y compartir conmigo la pasión de una vida por el conocimiento de una proteína. La ProTα me acompañará siempre en mi vida.

A mis directoras, Concepción Sarandeses da Costa y Cristina Díaz Jullien, por los consejos diarios, conocimientos compartidos y ayuda que hicieron posible terminar este trabajo, lo que en algún momento no parecía tan claro.

Al profesor Guillermo Covelo Artos, por tratarme como un compañero y su disponibilidad para ayudarme.

Al profesor Primitivo Barja, por su preocupación y apoyo durante todos estos años.

A Juan, por hacer que el mantenimiento de los cultivos celulares fuese “darlle de comer aos peixes”, cuestionar los “porque siempre se hizo así”, su experiencia y ayuda en el trabajo diario.

A David Moreira por ser más que un compañero de laboratorio, por esos debates de los primeros años, las conversaciones diarias y por tu ayuda desinteresada.

A mi hermano y a Xiana, por sus apoyos y darme a mi sobrina, su fuerza y alegría han ayudado a terminar este trabajo.

A mis padres, por estar siempre apoyándome, animándome y ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo. Simplemente sin vosotros este trabajo sería imposible.

A Noela, todo lo que pueda decir es poco, gracias por estar ahí, por conocerme mejor que yo mismo...Muchísimas gracias.

Aos meus pais e a Noela

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....i

I. INTRODUCCIÓN.....1

1. LAS TIMOSINAS.....5
2. LAS TIMOSINAS α Y SU PRECURSOR.....6
3. ESTRUCTURA DE LA PROTIMOSINA α Y SU EXPRESIÓN EN LOS DIFERENTES TEJIDOS.....8
4. GENES DE LA PROTIMOSINA α.....13
5. CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTIMOSINA α.....14
6. EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTIMOSINA α.....17
   - 6.1. PROTEÓLISIS DE LA PROTIMOSINA α EN DIVERSOS TIPOS CELULARES.....17
   - 6.2. LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTIMOSINA α.....19
7. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA α.....23
   - 7.1. RELACIÓN ENTRE LA PROTIMOSINA α Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....23
   - 7.2. RELACIÓN DE LA PROTIMOSINA α CON LA ACTIVIDAD DE LA CROMATINA.....25
   - 7.3. LA PROTIMOSINA α EN LA ACTIVIDAD CITOPLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS.....30

II. OBJETIVOS.....35

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....39

1. MATERIAL BIOLÓGICO.....43
   - 1.1. CÉLULAS.....43
   - 1.2. ANTICUERPOS.....43
   - 1.3. OTROS PRODUCTOS.....44
2. MATERIAL NO BIOLÓGICO.....45
   - 2.1. MEDIOS DE CULTIVO.....45
   - 2.2. DISOLUCIONES Y TAMPONES.....45
   - 2.3. OTROS PRODUCTOS.....46

3. MÉTODOS.....48

3.1. CULTIVOS CELULARES.....48

3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....50

3.3. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....51

3.4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS.....51

3.5. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.....52

3.6. *IMMUNOWESTERN BLOT*.....52

3.7. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS INMUNOREACTIVOS CON ANTI-ProTα.....54

3.8. ROTURA DE LOS ENLACES DE FORMALDEHIDO POR TRATAMIENTO TÉRMICO.....55

3.9. IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B.....55

3.10. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....56

3.11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....57

3.12. ISOELECTROENFOQUE.....57

3.13. FPLC DE INTERCAMBIO IÓNICO.....57

3.14. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR.....58

3.15. ENSAYOS DE COINMUNOPRECIPITACIÓN.....58

3.16. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A ProTα.....59

3.17. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL.....60

3.18. ENSAYOS DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....61

IV. RESULTADOS.....63

1. ESTABILIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES TRANSITORIAS DE LA PROTα EN LINFOCITOS EN PROLIFERACIÓN MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE ENLACES CRUZADOS CON FORMALDEHIDO.....67

2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS INMUNOREACTIVOS CON ANTI-PROTα.....75

3. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES *IN VIVO* DE LA PROTα CON LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B.....84

4. ESTUDIO DE LA TRANSCENDENCIA BIOLÓGICA DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTα CON LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B.....101

5. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROT α EN CÉLULAS 293T.....126

V. DISCUSIÓN.....129

VI. CONCLUSIONES.....141

VII. BIBLIOGRAFÍA.....147

VIII. ANEXO.....I

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

a.a.: Amino**á**cido

Act D: Actinomicina **D**

Apaf-1: Factor **1** de **a**ctivación de **p**roteasas **a**poptóticas

Asn: Asparagina

ATP: Adenosin trifosfato

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl: Proto-oncogen de "**l**infoma de **c**elulas **B**"

BSA: Sero**a**lbumina **b**ovina

CBP: Proteína de unión a CREB (***CREB b**inding **p**rotein*)

Cdc: Ciclina (**C**iclo de **d**ivisión **c**elular)

Cdk: Quinasa dependiente de ciclina (***C**yclin **d**ependent **k**inase*)

cDNA: DNA complementario

CK-2: Casein quinasa 2 (***C**asein **k**inase **2***)

DAPI: 4´,6-diamino-fenilindol

DMEM: Medio esencial mínimo de **E**agle **m**odificado por **D**ulbecco

DMP: Dimetil**p**imelimidato

DMSO: Dimetil **s**ulf**o**xido

DNA: Acido **d**esoxirribo**n**ucleico

DTT: Ditio**t**reitol

EBNA3C: Antígeno **n**uclear **3C** del virus **E**pstein-**B**arr

EDTA: Acido **e**tilen**d**iamino**t**etr**a**cetico

EGTA: Acido **e**tilen**g**licol**t**etr**a**cetico

FBS: Suero **f**etal **b**ovino

FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteínas (***F**ast **P**rotein **l**iquid **c**hromatography*)

Glu: Glutamato

HAT: Acetil**t**ransferasa de **h**istonas

HEPES: Acido N-2-hidroxietilpiperacina-N´-2´-etanesulfonico

HMT: Metil**t**ransferasa de **h**istonas

hnRNP: Ribo**n**ucleo**p**roteína **n**uclear **h**eterogénea

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (***H**igh **p**erformance **l**iquid **c**hromatography*)

HRP: Peroxidasa de rábano (***H**orse**r**adish **p**eroxidase*)

IAPs: Proteína**s i**nhibidoras de la **a**poptosis

Ig: Inmuno**g**lobulina

INHAT: Complejo **in**hibidor de **a**cetil**t**ransferasas de **h**istonas

IP: Inmuno**p**recipitación

kDa: kilo**d**alton

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (***M**ajor **h**istocompability **c**omplex*)

mRNA: RNA mensajero

NAPs: Proteinas de ensamblaje de nucleosomas (***N**ucleosome **a**ssembly **p**roteins*)

NP-40: Nonidet **P-40**

NF-κB: Factor **n**uclear **κB**

PAGE: Electroforesis en **g**el de **p**oli**a**crilamida

PBS: Tampón fosfato salino (***P**hosphate **b**uffered **s**aline*)

PCAF: Factor **a**sociado a **p**300-**C**BP

PCNA: Antígeno **n**uclear de **c**elulas en **p**roliferacion

pI: Punto **i**soeléctrico

PK: Piruvato quinasa (***P**yruvate **k**inase*)

PKC: Proteína quinasa C (***P**rotein **k**inase **C***)

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

ProTα: Protimosina **α**

ProTαK: Proteína quinasa de la ProTα (***ProTα k**inase*)

RNA: Acido **r**ibo**n**ucleico

RPMI: Medio ***R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute*

SDS: Dodecil**s**ulfato **s**odico

Ser: Serina

SMAC: Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria

STATs: Proteínas transductoras de senal y activadoras de la transcripcion **(*S**ignal **t**ransducers and **a**ctivators of **t**ranscription*)**

STS: E*st*auro*s*porina

T3: 3**,** 3´, 5-triiodo-L-tironina

Tα$_1$: Timosina **α$_1$**

Tα$_{11}$: Timosina **α$_{11}$**

TBS: Tampón tris salino (***T**ris-**b**uffered **s**aline*)

TF5: Fracción de **t**imosina **5**

Thr: Treonina (***Thr**eonine*)

WB: Análisis ***W**estern **b**lot*

I. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS TIMOSINAS.....5

2. LAS TIMOSINAS α Y SU PRECURSOR.....6

3. ESTRUCTURA DE LA PROTIMOSINA α Y SU EXPRESIÓN EN LOS DIFERENTES TEJIDOS..8

4. GENES DE LA PROTIMOSINA α.....13

5. CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTIMOSINA α.....14

6. EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTIMOSINA α.....17

6.1. PROTEÓLISIS DE LA PROTIMOSINA α EN DIVERSOS TIPOS CELULARES.....17

6.2. LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTIMOSINA α.....19

7. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA α.....23

7.1. RELACIÓN ENTRE LA PROTIMOSINA α Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....23

7.2. RELACIÓN DE LA PROTIMOSINA α CON LA ACTIVIDAD DE LA CROMATINA.....25

i. Interacción de la ProTα con las histonas.....25

ii. Participación de la ProTα en la actividad de la cromatina.....26

iii. Relación de la ProTα con la actividad transcripcional.....28

7.3. LA PROTIMOSINA α EN LA ACTIVIDAD CITOPLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS.....30

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS TIMOSINAS

El papel esencial del timo en el desarrollo del sistema inmune se ha dirigido a la búsqueda intensiva, aislamiento e identificación de los factores tímicos biológicamente activos que pueden suplir muchas de las deficiencias ocasionadas por su extirpación, o potenciar la competencia inmunológica en individuos normales. A mediados de los sesenta, una fracción de timo de ternera denominada timosina (Goldstein *et al.,* 1966) mostró que potenciaba la inmunofunción en varios sistemas *in vitro* e *in vivo* (revisado en Low & Goldstein,. 1985). La preparación de timosina mejor conocida es un extracto de timo de ternera denominado fracción de timosina 5 (TF5), la cual contiene unos 30 polipéptidos termoestables con un peso molecular comprendido entre los 1 kDa y 15 kDa (Goldstein *et al.,* 1972; Hooper *et al.,* 1975; Low *et al.,* 1979a). El sistema de nomenclatura para las timosinas está basado en su punto isoeléctrico (pI): α para pI menores de 5, β para pI entre 5 y 7, y γ para pI mayores de 7 (indicado en la figura 1A).

El componente más característico de la TF5 es un polipéptido ácido (pI 4,2) denominado timosina α_1 ($T\alpha_1$). Este polipéptido fue el primer componente de la TF5 en ser purificado y secuenciado (Goldstein *et al.,* 1977): es un polipéptido de 28 aminoácidos, con una serina acetilada en el fragmento N-terminal y sin residuos aromáticos ni azufrados (figura 1A).

Otro componente α de la TF5 fue purificado más tarde y establecida su secuencia: la timosina α_{11} ($T\alpha_{11}$) (Caldarella *et al.,* 1983). La $T\alpha_{11}$ es un polipéptido de 35 aminoácidos relacionado estructuralmente con la $T\alpha_1$, pero contiene 7 aminoácidos adicionales en su extremo C-terminal (figura 1A). Este polipéptido es aproximadamente 4 veces menos abundante que la $T\alpha_1$ en la TF5, aunque muestra una actividad similar a la $T\alpha_1$ en algunos ensayos *in vivo*.

Los componentes β de la TF5 también han sido aislados y secuenciados. La timosina β_1 ha sido identificada como ubiquitina (Low *et al.,* 1979b); la timosina β_4 (el miembro más abundante de esta familia de péptidos) (Low *et al.,* 1981) y sus homólogos β_8, β_9 (Hannappel *et al.,* 1982b) y β_{10} (Hall *et al.,* 1990), así como sus derivados, han sido también aislados y sus estructuras establecidas.

Los efectos de las β-timosinas en la función inmunológica, de acuerdo con diversos ensayos biológicos (Low *et al.,* 1985), son menos relevantes que los de las α-timosinas. La ubicua distribución de las β-timosinas en extractos de tejidos de mamíferos (Hannappel *et al.,* 1982a), aves y anfibios (Erickson-Vitanen *et al.,* 1982), así como su expresión génica en diversos tejidos animales (Gómez-Márquez *et al.,* 1989a, 1996; Gómez-Márquez & Anadón, 2002), sugieren fuertemente que las β-timosinas tienen una función biológica más generalizada (incluso funciones celulares no relacionadas específicamente con el sistema inmune han sido descritas -revisado en Huff *et al.,* 2001-). En este sentido, las β-timosinas han sido caracterizadas como proteínas de unión a actina, y la función bioquímica de la timosina β_4 como péptido regulador de los mecanismos de polimeración de la actina es bien conocida (Safer *et al.,* 1991; Sanders *et al.,* 1992; Huff *et al.,* 2001).

La timosina β_4 está implicada en la reparación de tejidos lesionados (Goldstein *et al.,* 2005), en procesos de angiogénesis (Malinda *et al.,* 1997) y neovascularización (Smart *et al.,* 2007), en la movilidad celular, sinaptogénesis y otros fases relacionadas con la plasticidad sináptica (Bamburg & Bernstein, 1991), en la diferenciación neuronal (Carpintero *et al.,* 1995) y en el desarrollo cardiovascular (Gómez-Márquez *et al.,* 1996). Así, en estas y otras actividades biológicas (en las que la actina tiene un papel crucial) la timosina β_4 participa controlando el remodelado del citoesqueleto celular.

Las γ-timosinas no han sido caracterizadas.

2. LAS TIMOSINAS α Y SU PRECURSOR

La glándula tímica es un órgano linfoide en el que se produce la inmunocapacitación de los linfocitos T, responsables tanto de la inmunidad humoral como de la celular. A las timosinas α se les atribuía un papel como señalizadores moleculares de los linfocitos T en el timo, influenciando su diferenciación e inmunocapacitación dentro de este órgano. La interacción de las timosinas, y otros componentes del medio intratímico, con los linfocitos inmunológicamente incompetentes recién llegados a este órgano, procedentes de la médula ósea, propiciaría la generación de las diferentes poblaciones de linfocitos T capaces de ejercer la actividad inmunológica después de su exportación del timo a los demás tejidos del sistema inmune. Estas poblaciones de linfocitos T diferenciados: células CD4+, CD8+, y linfocitos T de

memoria, son las responsables de la inmunidad celular y también de la inmunidad humoral, puesto que cooperan con la actividad de los linfocitos B (Low & Goldstein, 1985).

La importancia aparente de las α-timosinas como efectores del desarrollo y de la función de los linfocitos dependientes del timo animó, desde 1977, la investigación dirigida a caracterizar el origen celular de estos polipéptidos y su función biológica.

Entre estos péptidos tímicos, la timosina α_1 era el más característico, siendo éste el primero en ser purificado (Goldstein *et al.,* 1977). El descubrimiento posterior de dos péptidos, la $T\alpha_{11}$ y la des-timosina α_1, que poseían la misma secuencia que la $T\alpha_1$ en su extremo N-terminal (Caldarella *et al.,* 1983), apoyaba la idea de la existencia de un precursor común.

La estrategia seguida para investigar si estos péptidos podrían estar sintetizados a partir de un precursor común fue la caracterización de los productos de la traducción *in vitro* de los mRNAs aislados de timo de ternera, empleando anticuerpos contra la timosina α_1. El análisis estructural de los productos inmunoprecipitados demostró la existencia de una proteína de 16 kDa (determinada mediante el protocolo de Weber & Osborn, 1969: en SDS-PAGE a pH 7) que incluye a la $T\alpha_1$ en su secuencia (Freire *et al.,* 1978) (figura 1B). El aislamiento del mRNA que codifica para esta proteína (Freire *et al.,* 1981; Rey-Campos *et al.,* 1983) confirmó la existencia de un precursor de la $T\alpha_1$ y apoyó la hipótesis original: la $T\alpha_1$ y quizás la $T\alpha_{11}$ eran generadas por proteólisis de un péptido de mayor tamaño.

Posteriormente, este precursor fue aislado y secuenciado de extractos de timo de rata (Haritos *et al.,* 1984b; Haritos *et al.,* 1985a) usando procedimientos que minimizaban la actividad proteolítica: el análisis de los componentes de los extractos tímicos preparados en estas condiciones indicaron la ausencia de la $T\alpha_1$ y la presencia de un polipéptido de mayor longitud con la secuencia de la $T\alpha_1$ en su extremo N-terminal, y que mostraba las características del precursor descrito previamente (Haritos *et al.,* 1984a). A esta proteína (figura 1C), de secuencia muy conservada, con alto contenido de residuos aminoacídicos ácidos y que contiene en su estructura la secuencia de las timosinas α, se la denominó protimosina α (ProTα).

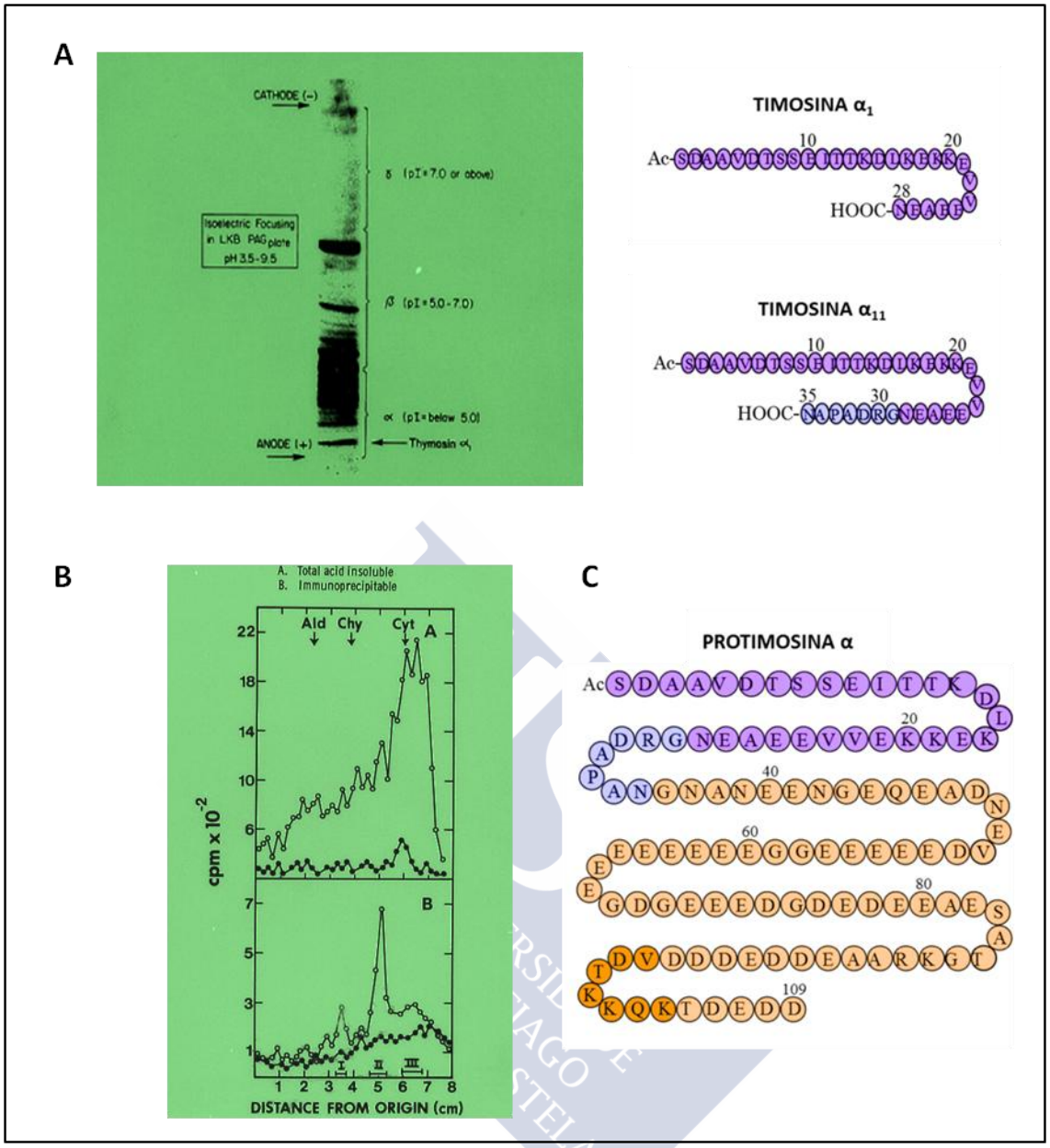


Figura 1. A) Composición de la TF5 de timo de ternera y secuencia de las timosinas α purificadas. B) Análisis por SDS-PAGE de los productos de traducción de mRNA de timo *in vitro*. C) Secuencia de la protimosina α

3. ESTRUCTURA DE LA PROTIMOSINA α Y SU EXPRESIÓN EN LOS DIFERENTES TEJIDOS

Posteriormente, la ProTα fue aislada en diferentes tejidos y secuenciada en humanos (Pan *et al.,* 1986), ternera (Panneerselvam *et al.,* 1988), cerdo (Economou *et al.,* 1988), ratón (Low *et al.,* 1990) y cabra (Frillingos *et al.,* 1991). Su estructura primaria se confirmó por

secuenciación de su cDNA procedente de células humanas (Eschenfeldt & Berger, 1986; Goodall *et al.,* 1986; Gómez-Márquez *et al.,* 1989b). Polipéptidos similares a la ProTα han sido hallados en otros vertebrados, incluyendo pollo y trucha, a concentraciones 30 veces menores que las encontradas en timo de ternera (Yialouris *et al.,* 1988); mientras que el mRNA de una proteína acídica que muestra una fuerte homología en su secuencia con la ProTα de mamíferos ha sido encontrado en rana, aunque los niveles celulares de esta proteína no han sido determinados (Aniello *et al.,* 2002). Al mismo tiempo, la ProTα procedente de rata (Frangou-Lazaridis *et al.,* 1988), ratón (Schmidt *et al.,* 1991), y cerdo (Wintero *et al.,* 1996) fueron clonadas y sus cDNA secuenciados.

Los resultados de estos trabajos concluyeron las siguientes características de esta proteína:

- La ProTα presenta una distribución tisular generalizada, lo que es indicativo de una función básica de esta proteína en la actividad de las células de mamífero no relacionada exclusivamente con la actividad del sistema inmunitario y la inmunocapacitación intratímica de los linfocitos T. Además, muestra una elevada concentración en las células (del orden de 0,2 pg/célula) (Franco *et al.,* 1992), muy superior a la de una hormona y a los demás polipéptidos timosínicos, esto último parece indicar que esta proteína es la principal responsable de la actividad biológica de las timosinas α.
- La ProTα es un polipéptido altamente acídico (pI 3,55, puede considerarse la proteína más acídica conocida en animales) con un peso molecular de 12,5 kDa. Posee entre 109-111 residuos aminoacídicos de los cuales los 28 primeros se corresponden con la secuencia de la timosina α_1, mientras que la des-timosina α_1 y la timosina α_{11} coinciden respectivamente con los primeros 24 y 35 aminoácidos. En su secuencia hay una gran proporción de residuos ácidos (Glu 37% y Asp 25%) que se localizan mayoritariamente en su región central, lo que le confiere un carácter ácido y altamente hidrofílico. No posee aminoácidos azufrados ni aromáticos (figuras 1B y 2).
- La ProTα humana se presenta en dos isoformas, que difieren en la existencia o no de un resto de ácido glutámico en la posición 39 de la molécula (Eschenfeldt & Berger, 1986), confirmando los datos obtenidos mediante la secuenciación de esta proteína (Pan *et al.,* 1986).
- La estructura primaria de la ProTα predice estructuras secundarias en hélice α y lámina β (Haritos *et al.,* 1985a); sin embargo, ningún tipo de estructura secundaria ha sido detectada en condiciones fisiológicas (Watts *et al.,* 1990; Gast *et al.,* 1995). A pH

neutro, la ProTα se mantiene como una cadena no plegada, debido probablemente a las repulsiones entre las cargas negativas (Watts *et al.,* 1990). Este hecho podría explicar su comportamiento anómalo en cromatografía de filtración molecular, donde se deduce un peso molecular unas 5 veces superior al que realmente posee (Haritos *et al.,* 1989). La ProTα no forma estructuras cuaternarias, encontrándose en forma de monómero (Gast *et al.,* 1995; Haritos *et al.,* 1989).

- Otras características estructurales destacables de la ProTα con importantes implicaciones funcionales son la acetilación de la Ser-N-terminal (Goldstein *et al.,* 1977; Michalewsky *et al.,* 1983; Sburlati *et al.,* 1993; Nogueira & Freire, 1985), la presencia de una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal (T^{100}KKQKT^{105}) (Gómez-Márquez & Segade, 1988; Manrow *et al.,* 1991; Rubtsov *et al.,* 1997) y la existencia en su secuencia de lugares de fosforilación para la caseín kinasa 2 (CK-2) en sus extremos N y C-terminal (Barcia *et al.,* 1992).

Entre las proteínas más reseñables que presentan homología con la ProTα se encuentra la paratimosina α, un péptido inicialmente aislado a partir de extractos tímicos de rata (Haritos *et al.,* 1985b, 1985c), que se halla distribuido en varios tejidos de mamíferos (Clinton *et al.,* 1989) y presenta una similitud del 43% con la ProTα (Komiyama *et al.,* 1986), y que se ha demostrado que interviene en el metabolismo de carbohidratos (Brand & Heinickel, 1991; Brand *et al.,* 1991).

Asimismo, la ProTα presenta un 47% de homología parcial con la proteína nuclear no histónica HMG1 (Otero *et al.*, 1993). Además, su dominio acídico central la asemeja a ciertos péptidos nucleares que interactúan con histonas, como la nucleoplasmina (Laskey *et al.,* 1978), N1/N2 (Kleinschmidt *et al.,* 1986), la nucleolina (Lapeyre *et al.,* 1987) o la nucleofosmina (Chang *et al.,* 1989).

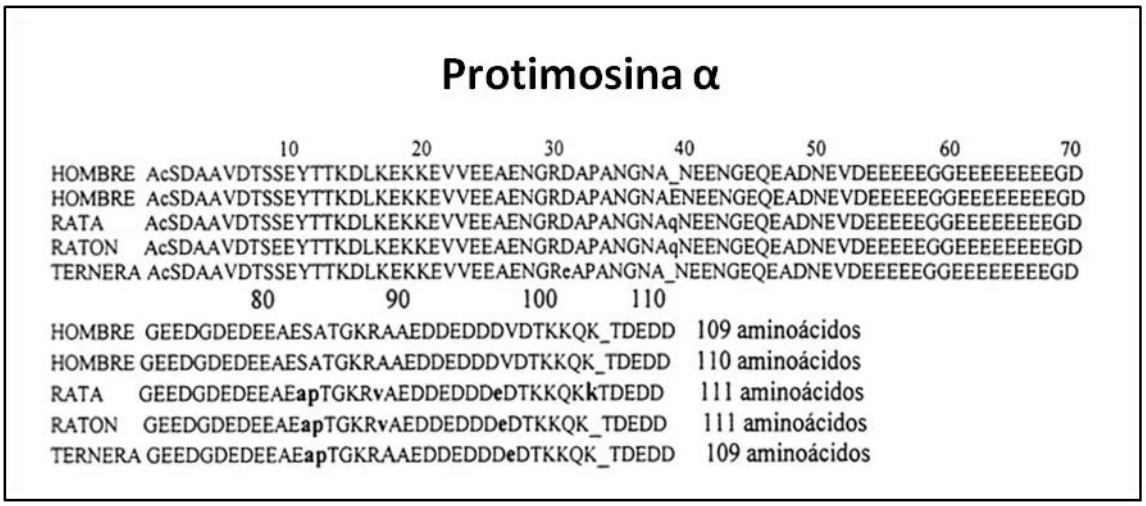


Figura 2. Comparación de la estructura primaria de la ProTα: humana (2 isoformas), de rata, murina y bovina. En negrita y minúscula se señalan los aminoácidos no conservados con respecto a la ProTα humana.

Los primeros estudios sobre la expresión de la ProTα en diferentes tejidos se llevaron a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia y de radioinmunoensayo. Utilizando la técnica de radioinmunoensayo, la ProTα se ha localizado fundamentalmente en timo, aunque también se ha encontrado en cerebro, hígado, riñón, pulmón y bazo de rata (Haritos *et al.,* 1984b). En humanos se ha inmunodetectado en timo (Dalakas *et al.,* 1981), encontrándose altos niveles en leucocitos y, en muy pequeña cantidad, en plasma (Panneerselvam *et al.,* 1987), atribuida a lisis celulares.

Estudios de nuestro laboratorio evaluando la distribución de la ProTα y $T\alpha_1$ (Franco *et al.,* 1992) y los niveles de mRNA (Bustelo *et al.,* 1991) en los diferentes tejidos de ratón mostraron que la ProTα se expresa principalmente en tejidos linfoides (figura 3). Además, el estudio de la expresión en otros tejidos y células demostró que la ProTα es expresada exclusivamente en tejidos de mamíferos.

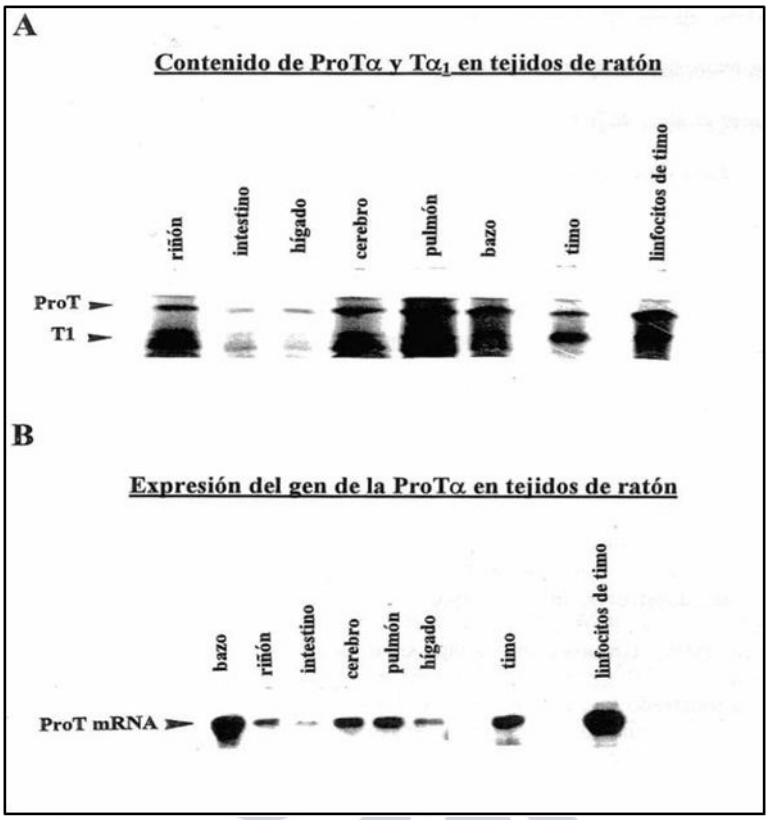


Figura 3. Distribución de la ProTα y expresión del gen de esta proteína en diversos tejidos de ratón. A) (Franco *et al.,* 1992). B) (Bustelo *et al.,* 1991).

Cabe destacar que la ProTα es sintetizada en polisomas libres y carece de secuencia de señal secretora (Eschenfeldt *et al.,* 1989), lo que indica que posee un sitio intracelular de acción, o que su liberación al medio extracelular ocurre por un mecanismo no convencional de secreción.

Por otra parte, la presencia de la ProTα en el suero (Panneerselvam *et al.,* 1987) y en los sobrenadantes de cultivos de timocitos (Franco *et al.,* 1989) debería, quizás, ser atribuida a la liberación de las células tímicas y otros tipos celulares a causa de la apoptosis.

4. GENES DE LA PROTIMOSINA α

Un completo estudio de la estructura del gen de la ProTα humana ha sido realizado (Eschenfeldt *et al.,* 1989) con el objetivo de identificar los miembros de la familia génica de esta proteína.

En humanos, el gen para la ProTα forma parte de una familia génica de 6 miembros en la que se incluyen 5 pseudogenes procesados, que carecen de intrones y no parece que produzcan transcritos *in vivo* (Manrow *et al.,* 1992; Rubtsov & Vartapetian, 1995), con los que posee una homología que varía entre el 30-90%. Ninguno de ellos contiene secuencia codificadora para un péptido señal N-terminal.

El gen que contiene intrones (4), exones (5) y las señales regulatorias clásicas, parece ser la única fuente de mRNA de la ProTα (Eschenfeldt *et al.,* 1989). Tiene un tamaño de 5 kilobases. Como regiones reguladoras de la transcripción presenta una caja TATA, una región rica en GC y dos cajas CCAAT (Eschenfeldt *et al.,* 1989). El gen ha sido mapeado en el cromosoma 2 humano (Szabo *et al.,* 1993).

Asimismo, se comprobó la existencia de un lugar de corte y empalme alternativo entre el segundo intrón y el tercer exón, que es el proceso responsable de la generación de las dos isoformas descritas para la ProTα a partir del producto de transcripción de un único gen (el mRNA de la ProTα en fibroblastos humanos tiene un codón interno de glutamato extra (Glu^{39}) con respecto al mRNA de bazo) (Manrow & Berger, 1993; Goodall *et al.,* 1986; Gómez-Márquez e*t al.,* 1989b).

Las rutas de señalización intracelular que controlan la expresión del gen de la ProTα no han sido bien caracterizadas. Sin embargo, se han propuesto varios factores de transcripción que regularían su expresión, incluyendo E2F (Szabo *et al.,* 1993) y c-myc (Eilers *et al.,* 1991; Desbarats *et al.,* 1996; Gaubatz *et al.,* 1994) como reguladores positivos, y el factor inhibidor de tumores p53 como un regulador negativo (Zhao *et al.,* 2000).

Así, E2F puede controlar directamente la expresión de la ProTα en el ciclo celular mediante la activación del promotor del gen de esta proteína.

Por otra parte, regiones reguladoras localizadas en el primer intrón del gen de la ProTα (elementos E-box) han sido propuestas como sitios de unión del heterodímero de factores Myc-Max para la estimulación de la transcripción de la ProTα (Gaubatz *et al.,* 1994). No

obstante, otros autores han puesto en duda la activación de la expresión del gen de la ProTα por parte de la proteína c-myc (Mol *et al.,* 1995).

Además, se ha encontrado que la regulación negativa de p53 sobre el gen de la ProTα implica un incremento de la actividad transcripcional de p53 y la acetilación de este factor como respuesta a la ProTα endógena (Kobayashi *et al.,* 2006).

Además del cDNA de la ProTα humana (Goodall *et al.,* 1986), se han clonado los correspondientes de rata (Frangou-Lazaridis *et al.,* 1988) y ratón (Schmidt & Werner, 1991). En rata no se ha llegado a identificar el gen de la ProTα, aunque se han aislado varios pseudogenes procesados (Dosil *et al.,* 1990).

La expresión del gen de la ProTα se ha evaluado también durante el desarrollo embrionario de ratón, donde se encontró restringida a las estructuras derivadas del ectodermo y mesodermo (Franco del Amo & Freire, 1995). Un trabajo posterior (centrado en la preimplantación del embrión de ratón) ha mostrado que el gen de la ProTα es transcripcionalmente inducido durante el estadío de dos células y el mRNA aumenta gradualmente durante los estadíos de mórula y blastocisto, inicialmente en clara dependencia de los niveles de proteína/mRNA myc maternos y después de los niveles de expresión de los diferentes genes de la familia myc específicos de cada estadío (Domashenko *et al.,* 1997).

Un estudio durante el desarrollo embrionario de rata demostró que el gen se encuentra regulado de forma específica según los tejidos, ya que en hígado, cerebro, riñón y testículos su expresión es mayor en periodos tempranos del desarrollo, mientras que en timo sus niveles prácticamente no varían (Dosil *et al.,* 1990).

No está claro todavía si en estos y otros animales existe solamente un único gen funcional de la ProTα.

5. CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTα

La concentración de la ProTα, como se ha indicado anteriormente, ha sido determinada en varios tejidos de mamíferos mediante inmunoensayo y mediante la evaluación directa de la concentración de la proteína purificada por técnicas cromatográficas. La tabla 1 resume estos valores.

En la cuantificación por determinación de la proteína purificada hay que tener en cuenta que las variaciones observadas son probablemente atribuibles al rendimiento en el procedimiento de separación cromatográfica. Procedimientos en los que se combinan técnicas de intercambio iónico y HPLC para aislar productos acídicos termoestables se demostraron muy eficientes para aislar ProTα (Hannappel *et al.,* 1982c; Haritos *et al.,* 1984a; Franco *et al.,* 1992).

Tejido	Concentración ProTα (µg/g tejido)
Hígado	42,6±5,5
Pulmón	76,6±9,5
Riñón	56,9±6,2
Corazón	44,0±5,0
Bazo	89,4±10,3
Músculo	27±3,2
Linfocitos T	92,5±9,2
Timo	116,3±12,4
Timocitos	123,4±14,9

Tabla 1. Concentración de ProTα en diferentes tejidos de rata. Los valores fueron determinados a partir de la ProTα purificada según Franco *et al.* (1992), excepto los de músculo, que se obtuvieron mediante RIA (Clinton *et al.,* 1989).

En cuanto a la distribución subcelular de la ProTα estudios de inmunohistoquímica han demostrado la presencia de la ProTα en el citoplasma y en el núcleo celular (Conteas *et al.,* 1990; Enkemann *et al.,* 2000; Vareli *et al.,* 2000), con una mayor presencia en el núcleo de células en proliferación (Conteas *et al.,* 1990).

Sin embargo, el análisis de la presencia de la ProTα en fracciones subcelulares obtenidas de los extractos isotónicos de diferentes tejidos muestran que está preferentemente ubicada en la fracción citosólica. En nuestro laboratorio (Franco *et al.,* 1992) y en el de otros grupos (Tsitsiloni *et al.,* 1989; Watts *et al.,* 1990; Smith *et al.,* 1993) han encontrado también que en extractos subcelulares la ProTα aparece en las fracciones citosólicas; de manera que sólo utilizando métodos extractivos en los que se utilizan condiciones especiales de bloqueo de los poros nucleares con citocalasina B se permite aislar

la ProTα en las fracciones nucleoplasmáticas (Manrow *et al.,* 1991), lo que demuestra un trasvase del núcleo al citoplasma de la ProTα durante el proceso extractivo. Esta localización de la ProTα en las fracciones citosólicas reproduce el comportamiento de muchas proteínas nucleares acídicas de estructura similar a la ProTα, como la nucleoplasmina (Laskey & Earnshaw, 1980), y la proteína HMG1 (Gordon *et al.,* 1981), entre otras que, a pesar de su función nuclear, aparecen en las fracciones citosólicas de los fraccionados subcelulares.

La presencia de una señal cariofílica en la región C-terminal de la ProTα involucrada en su localización nuclear, y su expresión sin un péptido señal de secreción (Manrow *et al.,* 1991; Watts *et al.,* 1990; Clinton *et al.,* 1991; Eschenfeldt & Berger, 1986; Goodall *et al.,* 1986; Eschenfeldt *et al.,* 1989), así como la interacción de la ProTα con proteínas implicadas en el transporte nuclear, incluyendo la Karioferina β, Rch-1, Ran y RCC-1 (Freire *et al.,* 2001) y con otras proteínas relacionadas con el transporte de RNA fuera del núcleo como Rev/Rex (Kubota *et al.,* 1995), apoyan la propiedad de la movilidad nuclear-citoplasmática de la ProTα. Estos resultados sugieren que la ProTα es una proteína que circula entre el núcleo y el citoplasma celular (y tiene una fuerte tendencia a liberarse del núcleo cuando las células son lisadas en tampones isotónicos o suplementados con detergentes), aunque reside predominantemente en el núcleo celular, y mantiene esta distribución mediante un transporte continuo (salida y reentrada) a través del poro nuclear (Enkemann *et al.,* 2000). La separación de complejos multiproteicos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos con afinidad por la ProTα mediante cromatografía sobre ProTα-Sepharosa constituye una evidencia de dianas nucleares y citoplasmáticas de la ProTα (Pérez-Estévez *et al.,* 1997; Freire *et al.,* 2001).

En este sentido, otros estudios de localización subcelular han indicado la posible asociación de la ProTα nuclear con la cromatina (Conteas *et al.,* 1990; Vareli *et al.,* 2000; Vareli & Frangou-Lazaridis, 2004). Así, en las células en interfase esta proteína presenta una distribución nuclear asociada con sitios activos de transcripción, mientras que durante la mitosis la ProTα colocaliza con la α-tubulina en el huso mitótico (Vareli *et al.,* 1995; Vareli & Frangou-Lazaridis, 2004).

6. EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTIMOSINA α

La ProTα es sintetizada en polisomas libres y al carecer de una secuencia de señal secretora (Eschenfeldt *et al.,* 1989) permanece en el interior celular donde sufre modificaciones post-traduccionales: proteólisis y fosforilación.

6.1. PROTEÓLISIS DE LA PROTIMOSINA α EN DIVERSOS TIPOS CELULARES

Cuando la ProTα fue aislada en 1984 de extractos de timo preparados en condiciones en las cuales la actividad proteolítica había sido prevenida (Haritos *et al. ,*1984a), la $T\alpha_1$ y la $T\alpha_{11}$ no eran detectadas en la separación de los extractos mediante HPLC de fase reversa. Este hecho llevó a la hipótesis de que la presencia de las timosinas α derivadas de la ProTα en la TF5 era un artefacto resultante de la proteólisis incontrolada durante su preparación. Sin embargo, experimentos realizados en nuestro laboratorio usando isoelectroenfoque indicaban que la $T\alpha_1$ estaba en realidad presente en extractos obtenidos en condiciones fuertemente desnaturalizantes (tejido congelado en N_2 líquido y extraído en tampón a 100°C) de diversos tejidos de mamíferos (Franco *et al.,* 1992; Freire *et al.,* 1985) (figura 3A).

La proteasa capaz de procesar de forma específica la ProTα para generar la $T\alpha_1$ fue caracterizada más tarde en nuestro laboratorio como la enzima legumaína ligada a la membrana de los lisosomas (Sarandeses *et al.,* 2003). La legumaína de mamíferos muestra elevada especificidad por un tipo de enlaces de asparagina (Dando *et al.,* 1999): concretamente, *in vitro*, la enzima únicamente corta en la secuencia de la ProTα enlaces Asn-Gly en posición 28-29 ($T\alpha_1$) y 35-36 ($T\alpha_{11}$) (Sarandeses *et al.,* 2003).

Este hallazgo es consistente con los resultados que indican la presencia natural de la $T\alpha_1$ en diferentes tejidos animales (Franco *et al.,* 1992), aunque el significado biológico del procesamiento de la ProTα y la presencia celular de la $T\alpha_1$ es desconocido.

A juzgar por el análisis de las timosinas α en extractos celulares preparados en condiciones de drástica inhibición de la proteólisis, esta proteasa muestra incluso una especificidad mayor *in vivo*, ya que solo la $T\alpha_1$ era detectada, a una concentración similar a la de ProTα, mientras que no se detectaba $T\alpha_{11}$ (en concordancia con estudios previos en tejidos de mamíferos) (Franco *et al.,* 1992). Sin embargo, no puede desecharse la posibilidad de que la aparente ausencia de $T\alpha_{11}$ sea debida a la rápida degradación de este péptido *in vivo* (la no detección del fragmento 29-109 o 36-109 de la ProTα en extractos celulares es

presumiblemente indicativa también de su rápida degradación *in vivo*). Así, la presencia de $T\alpha_{11}$ a bajas concentraciones en la fracción de timo de ternera TF5 (Caldarella *et al.,* 1983) podría deberse a las características del método usado para su preparación.

Las características del procesamiento *in vivo* de la ProTα sugieren que es realizado también por la legumaína. A la luz de estos resultados, los fallos previos en la detección de $T\alpha_1$ en extractos preparados bajo condiciones drásticas de desnaturalización (Haritos *et al.,* 1984a) pudiera ser atribuido a su anómalo comportamiento cromatográfico ya que en estos extractos la $T\alpha_1$ presenta una gran tendencia a agregarse, como evidencian los análisis de los componentes con alta retención en columnas de fase reversa de HPLC (Franco *et al.,* 1992; Freire *et al.,* 1985).

La amplia distribución de la $T\alpha_1$ (Franco *et al.,* 1992) y de la legumaína (Chen *et al.,* 1997) en diferentes tejidos sugiere que el procesamiento de la ProTα que origina $T\alpha_1$ es un proceso general en células de mamíferos. Además, tejidos que muestran una elevada actividad de la legumaína como los linfoides (Chen *et al.,* 1997; Manoury *et al.,* 1998) poseen unos elevados niveles de $T\alpha_1$. La estructura primaria altamente conservada de la ProTα (revisado Freire *et al.,* 2002), especialmente alrededor de los enlaces de Asn-Gly que corta la legumaína (Sarandeses *et al.,* 2003), proporciona argumentos que apoyan la visión de la proteólisis de la ProTα como un proceso generalizado.

Sin embargo, no está claro si el procesamiento de la ProTα por la legumaína es un simple paso en su catabolismo o si tiene algún significado biológico. La legumaína muestra una estricta especificidad por un grupo restringido de enlaces de asparagina, lo que ciertamente sugiere que es improbable que contribuya al catabolismo general de proteínas, pero sí su participación en procesados específicos de proteínas (Dando *et al.,* 1999). En este sentido, se ha identificado como una proteasa clave en el procesado de antígenos para su presentación por MHC de clase II (Manoury *et al.,* 1998). Estas consideraciones apoyan la teoría de que la proteólisis de la ProTα en linfocitos y otras células de mamíferos es un mecanismo selectivo y no una degradación inespecífica. Además, el hecho de que la $T\alpha_1$ esté presente en elevados niveles, similares a los de la ProTα, indica que puede tener una función biológica. La localización de la $T\alpha_1$ libre en el citoplasma, su demostrada incapacidad para migrar al núcleo (Manrow *et al.,* 1991), y su carencia de señal secretora (Eschenfeldt *et al.,* 1989) argumentan una función intracelular no nuclear para esta proteína, que puede estar relacionada o no con la ProTα.

6.2. LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTIMOSINA α

A inicios de los años 90 se demostró en experimentos realizados en nuestro laboratorio que la ProTα era fosforilada *in vitro* por la caseín quinasa-2 (CK-2) (Barcia *et al.,* 1992) en residuos de Ser y Thr localizados en su región N-terminal (aminoácidos 1-14 de su secuencia). Posteriormente, se encontró que la ProTα también resultaba fosforilada *in vivo* en residuos de Thr localizados en la secuencia de sus primeros 14 aminoácidos, en varios tipos celulares: timocitos, esplenocitos y células HeLa; en las cuales la fosforilación era dependiente de su actividad proliferativa (Barcia *et al.,* 1993). El estudio comparativo de los residuos de Thr fosforilados demostró que en células tumorales se fosforilaba el residuo Thr 7 (Díaz-Jullien *et al.,* 2011), mientras que en linfocitos no tumorales se fosforilaban los residuos Thr 7 y Thr 12 (Pérez-Estévez *et al.,* 1997) (figura 4).

En posteriores trabajos de nuestro laboratorio se aisló esta proteína quinasa en extractos de esplenocitos de ratón activados para proliferar (Pérez-Estévez *et al.,* 1997) (figura 4A). Esta proteína (ProTαK), a diferencia de la CK-2, fosforilaba a la ProTα en los mismos residuos de Thr que resultaban fosforilados *in vivo* (Pérez-Estévez *et al.,* 1997), tal como se indica en la figura 4B y C. Además, en este trabajo se confirmó que los niveles más elevados de actividad fosforilante de la ProTα se encontraban en los extractos citosólicos, y que solo la ProTαK y no la CK-2 era separada mediante cromatografía de afinidad sobre ProTα-Sepharosa en los extractos citosólicos de varios tipos celulares estudiados: hepatocitos y timocitos activados mitóticamente (ambos de ratón), cultivos subconfluentes de células HeLa y células NC37, en las cuales de nuevo la fosforilación era dependiente de su actividad proliferativa (Pérez-Estévez *et al.,* 1997).

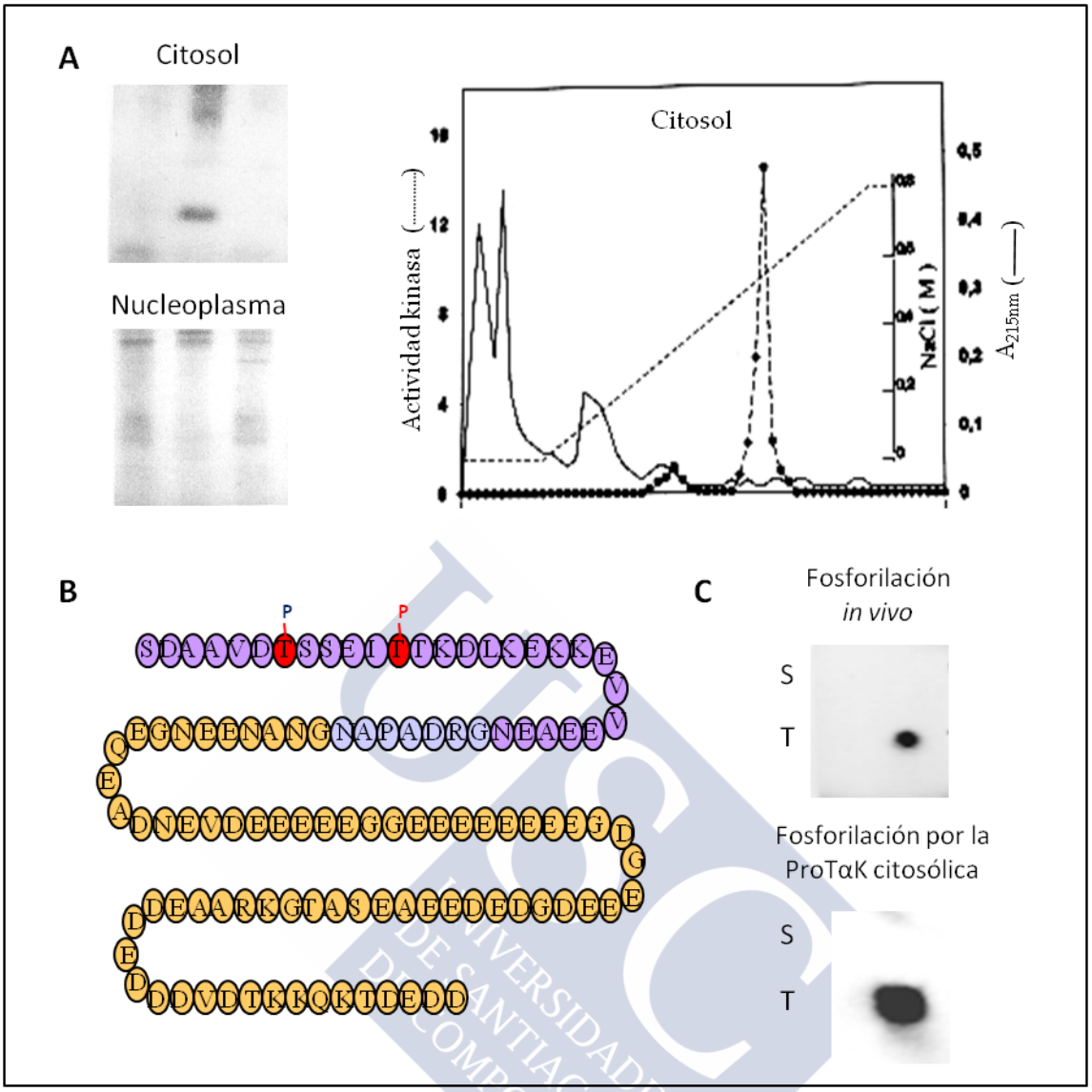


Figura 4. A) Caracterización de la ProTαK que fosforila la ProTα (Pérez-Estévez *et al.,* 1997). B) Secuencia de la ProTα con los residuos de Thr fosforilados: Thr 7 en células tumorales (Azul) (Díaz-Jullien *et al.,* 2011) y Thr 7 y Thr 12 en linfocitos no tumorales (Pérez-Estévez *et al.,* 1997). C) Residuos fosforilados *in vivo* y por la ProTαK citosólica (Pérez-Estévez *et al.,* 1997).

Los resultados del análisis de fosfoaminoácidos, junto con que la ProTαK citosólica no fosforila a la caseína, ni tampoco utiliza GTP como donador de fosfato, que en experimentos de inmunosupresión con anticuerpos contra la subunidad α de la CK-2 no se bloqueaba la actividad de la ProTαK (Pérez- Estévez *et al.,* 1997), y que el efecto de los cationes divalentes: Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, y Co^{+2} presente un patrón diferente en ProTαK y CK-2 (Pérez-Estévez *et al.,* 2000) descarta la posibilidad de que CK-2 sea la responsable de la fosforilación de la ProTα, al menos en esplenocitos.

Los datos de filtración en gel de la actividad ProTαK citosólica indican que la enzima tiene una masa molecular de 180 kDa; y el análisis SDS-PAGE de la enzima separada mediante HPLC señala que la actividad quinasa parece residir en una proteína de 60-64 kDa (Pérez-Estévez *et al.,* 1997). Estos resultados sugieren que la enzima forma una estructura oligomérica *in vivo*.

Por otra parte, estudios de la actividad ProTαK en diferentes fases del ciclo celular mostraron que, manteniendo una ubicación citosólica, esta sigue la misma evolución que la expresión de la ProTα (Pérez-Estévez *et al.,* 2000).

Una importante característica de la ProTαK en linfocitos de bazo activados para proliferar (concavalina A + interleuquina-2) es que su actividad es dependiente de un proceso de fosforilación, incluido en una ruta de señalización en la que está implicada la actividad PKC, aunque esta quinasa no fosforila directamente a la ProTαK (Pérez-Estévez *et al.,* 2000). La desfosforilación de la ProTαK anula su actividad (Pérez-Estévez *et al.,* 2000).

Recientemente en nuestro laboratorio se ha caracterizado a la ProTαK como la isoforma M2 de la piruvato quinasa (M2-PK) (Díaz-Jullien *et al.,* 2011). Lo que pone de manifiesto, por primera vez, una habilidad excepcional de la PK. En este trabajo se demuestra que solo una parte del contenido celular de la M2-PK (un 10%) en el citoplasma de las células en proliferación adquiere la capacidad para fosforilar a la ProTα debido a un proceso de fosforilación en residuos de Ser y Thr de la M2-PK. Esta fosforilación propicia una asociación en forma de trímero (180 kDa) de la M2-PK para generar la ProTαK más activa, frente a asociaciones monoméricas (60 kDa) y tetraméricas (240 kDa) menos activas.

Una habilidad similar de la M2-PK fue posteriormente demostrada, de manera que la actividad protein quinasa de esta enzima fue encontrada en M2-PK importada al núcleo en células tumorales, donde fosforila a la histona H3 (Yang *et al.,* 2012) y a STAT3 (Gao *et al.,* 2012), afectando a la activación de la transcripción. En la figura 5 se resume la evolución celular y las actividades de la M2-PK en células de mamíferos.

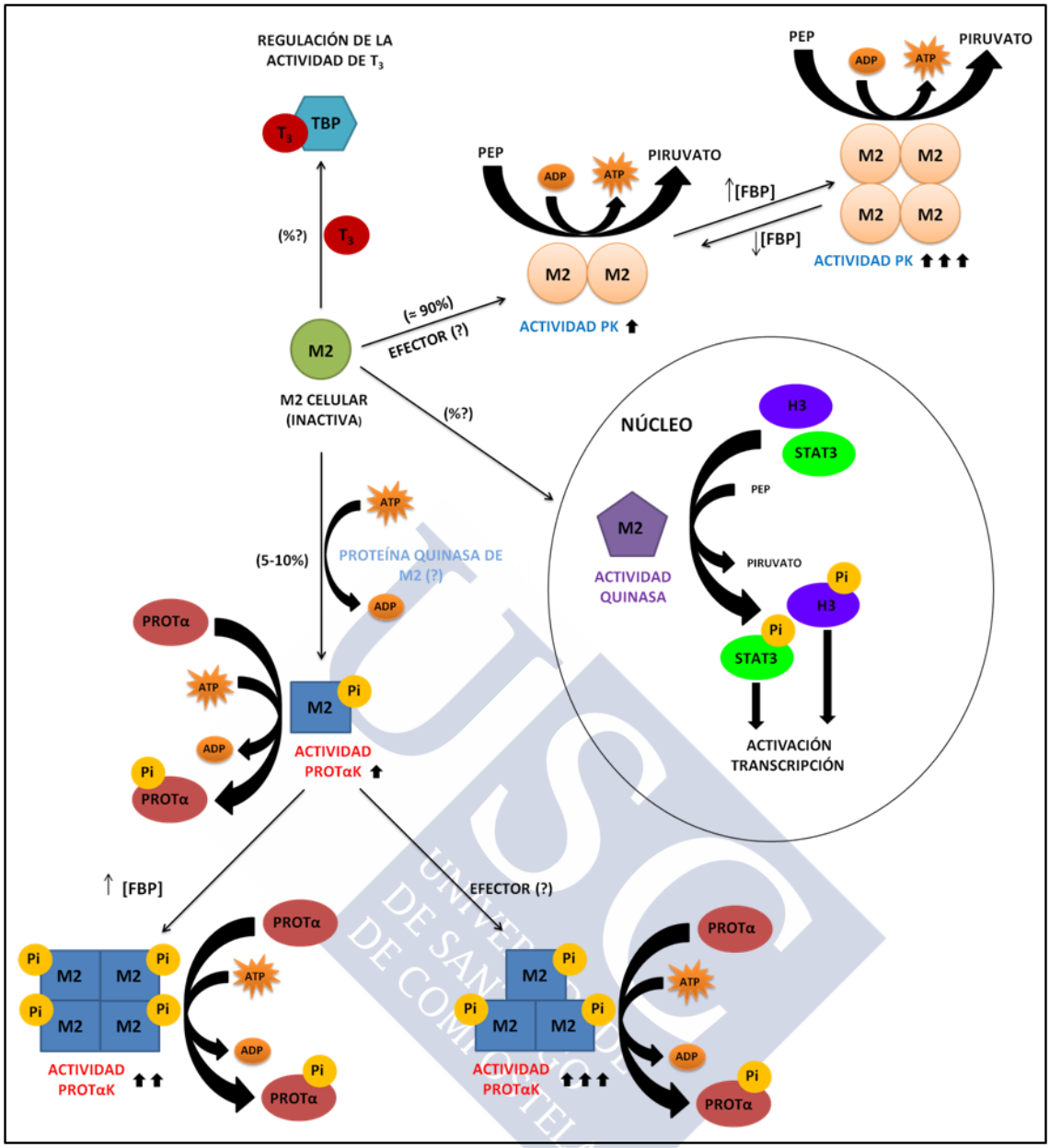


Figura 5. Efecto de diversos metabolitos y mecanismos reguladores en la estructura cuaternaria y actividades biológicas descritas para la proteína M2.

7. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA α

El descubrimiento de que la ProTα era el precursor de las timosinas α hizo que, en principio, se le asignara una función relacionada con la actividad inmunorreguladora de estas proteínas (Low & Goldstein, 1985). En este sentido se realizaron ensayos que encontraron que poseía mayores efectos protectores frente a infecciones de microorganismos oportunistas que la $T\alpha_1$ (Pan *et al.,* 1986; Salvin *et al.,* 1987), que sus niveles estaban disminuidos en ratones inmunodeprimidos (Low *et al.,* 1990) y que mostraba características inmunopotenciadoras (revisado en Piñeiro *et al.,* 2000). Sin embargo, estos efectos han sido atribuidos a mecanismos xenobióticos (Eschenfeldt *et al.,* 1989), ya que las características de la síntesis de la ProTα, su amplia distribución y elevada concentración en diversos tipos celulares, su regulación estructural con proteínas nucleares acídicas, y los experimentos de migración al núcleo (Watts *et al.,* 1989; Clinton *et al.,* 1991; Manrow *et al.,* 1991) apuntan hacia una función bioquímica intracelular de la ProTα en las células de mamíferos y descartan su supuesta función hormonal. Estas evidencias de una actividad intracelular de la ProTα se han fortalecido con la caracterización de una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal (Rubsov *et al.,* 1997), que demuestra necesariamente un cometido nuclear de esta proteína en células HeLa (Clinton *et al.,* 1991), COS (Manrow *et al.,* 1991), y 293 (Rubtsov *et al.,* 1997).

7.1. RELACIÓN ENTRE LA PROTIMOSINA α Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El estudio de la expresión del gen de la ProTα fue importante para avanzar en el esclarecimiento de la función que esta proteína pudiera desempeñar en la actividad de las células. Las investigaciones de los niveles de expresión de la ProTα y de su mRNA en linfocitos mitóticamente activados (Gómez-Márquez *et al.,* 1989; Franco *et al.,* 1992; Eschenfeldt *et al.,* 1989; Bustelo *et al.,* 1991) y en diferentes poblaciones celulares (Eschenfeldt *et al.,* 1989; Gómez-Márquez *et al.,* 1989; Zalvide *et al.,* 1992) demostraron una clara relación entre los niveles de expresión de la ProTα con la actividad proliferativa de estas células, con un incremento de la concentración del mRNA de esta proteína en células en división; sin embargo, este incremento era moderado en la mayoría de los tipos celulares estudiados (Bustelo *et al.,* 1991). La correspondencia observada entre los niveles del mRNA de la ProTα y los niveles de la propia ProTα confirmaron la traducción activa del mensajero de la ProTα en los diferentes tejidos.

De esta manera, la expresión del gen de la ProTα en linfocitos con mayor capacidad proliferativa era superior a la que presentaban los linfocitos con menor capacidad para proliferar. Este resultado parecía establecer una dependencia entre los niveles de la concentración celular de la ProTα y la actividad proliferativa de las células. Esta consideración se vio confirmada por los experimentos en los que se analizó la variación de la expresión del gen de la ProTα en células en las que se indujo la actividad proliferativa *in vitro* e *in vivo* (Bustelo *et al.,* 1991).

Los elevados niveles de mRNA de la ProTα permanecen casi invariables a lo largo del ciclo celular, aunque se aprecia un incremento en el tránsito de G1-S; sin embargo, la expresión del gen no parece estar ligada a la síntesis de DNA (Bustelo *et al.,* 1991). Este patrón ha sido corroborado por otros estudios en los que se determinaron los niveles del mRNA o de la ProTα (Zalvide *et al.,* 1992; Vareli *et al.,* 1996; Conteas *et al.,* 1990; Rosón *et al.,* 1990). No obstante, no hay evidencias de que la expresión de la ProTα regule directamente la mitosis, ya que la presencia de su mRNA no es suficiente para promover la progresión a lo largo del ciclo celular (Álvarez *et al.,* 1993).

La relación de la expresión de la ProTα con la proliferación celular también quedó señalada en experimentos de transfección en poblaciones celulares con un oligonucleótido antisentido complementario al mRNA de la ProTα, en los que se demuestra la paralización de la proliferación celular (Sburlati *et al.,* 1991; Rodríguez *et al.,* 1999). También en células HL-60 y NIH3T3 se observó que la sobreexpresión de la ProTα acelera la proliferación y retarda la diferenciación celular (Rodríguez *et al.,* 1998; Wu *et al.,* 1997); complementando los datos que demuestran que los elevados niveles del mRNA de la ProTα en las células en crecimiento logarítmico descienden cuando son inducidas a su diferenciación terminal (Smith *et al.,* 1993; Dosil *et al.,* 1993).

El hallazgo de un incremento de la expresión del gen de la ProTα en células tumorales refuerza la relación de esta proteína con la proliferación celular (Eschenfeldt *et al.,* 1986; Tsitsiloni *et al.,* 1993; Gómez-Márquez *et al.,* 1989b; Wu *et al.,* 1997; Álvarez *et al.,* 1993; Mori *et al.,* 1993). Los linfocitos de pacientes con linfomas, células con una alta actividad mitótica, poseen unos niveles de mRNA de la ProTα 4-6 veces superiores a los de las células normales (Gómez-Márquez *et al.,* 1989b; Conteas *et al.,* 1990; Álvarez *et al.,* 1993).

Los detalles moleculares de la relación existente entre la expresión del gen de la ProTα y la proliferación celular comenzaron con el descubrimiento de la capacidad de c-myc, una

proteína involucrada en división la celular, para promover la transcripción del gen de la ProTα (Eilers *et al.,* 1991; Gaubatz *et al.,* 1994). Aunque este hallazgo fue cuestionado (Mol *et al.,* 1995), posteriores resultados han confirmado el efecto de la proteína c-myc en la regulación de la expresión del gen de la ProTα (Wu *et al.,* 1997; Mori *et al.,* 1993; Vareli *et al.,* 1995; Lutz *et al.,* 1996; Kinoshita *et al.,* 1997; Ben-Yosef *et al.,* 1998).

De todas estas aportaciones, puede deducirse que la función de la ProTα está relacionada con la actividad proliferativa de las células, y los resultados derivados son consistentes con la teoría de que la ProTα es necesaria para la división celular. Asimismo, la demostrada capacidad de la ProTα para migrar al núcleo y los datos que muestran que la actividad proliferativa celular es concomitante con un incremento de la concentración nuclear de la ProTα (Conteas *et al.,* 1990) parecen indicar que la función de esta proteína en la división celular es realizada en el núcleo.

7.2. RELACIÓN DE LA PROTIMOSINA α CON LA ACTIVIDAD DE LA CROMATINA

i. Interacción de la ProTα con las histonas

La caracterización de proteínas que interaccionan con la ProTα en el núcleo de la célula ha propiciado progresos en la elucidación del mecanismo por el cual la ProTα está involucrada en el metabolismo nuclear.

Así, las histonas son las proteínas nucleares cuya capacidad para interaccionar *in vitro* con la ProTα fue demostrada en primer lugar. Algunos estudios han indicado que la ProTα interacciona solo con la histona H1 (Papamarcaki & Tsolas, 1994), mientras que otros experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que puede interactuar fuertemente las histonas H3, H4, H2A y H2B del octámero del nucleosoma (Díaz-Jullien *et al.,* 1996; Covelo *et al.,* 2006) mientras que con la histona H1 la interacción es mucho más débil (Freire *et al.,* 2001; Díaz-Jullien *et al.,* 1996). Los experimentos que indican la interacción de la ProTα con H1 no constituyen evidencias en contra de la interacción de esta proteína con otras histonas, ya que en estos casos no se habían realizado ensayos de inmunoprecipitación cruzada ni tampoco analizado la presencia de otras histonas en los componentes con afinidad por la ProTα.

Así, la demostración de la capacidad de la ProTα para interactuar *in vitro* con las histonas constituyó un paso importante en la caracterización funcional de esta proteína. En la

interacción con estas proteínas, más fuerte con las histonas H3 y H4, se ve implicada tanto la región menos acídica de la ProTα, localizada en su extremo N-terminal, como la secuencia poliacídica (con Glu y Asp entre los residuos 41 y 85) situada en la parte central de su estructura (figura 1C). En este sentido, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la $T\alpha_1$, el péptido correspondiente a los 28 primeros aminoácidos de la secuencia de la ProTα, también se une *in vitro* a las histonas del octámero con gran afinidad (Díaz-Jullien *et al.,* 1996), sugiriendo que esta región puede estar involucrada en la interacción *in vivo* de la ProTα con las histonas.

Esta capacidad de interacción de la ProTα con las histonas, similar a la que presentan otras proteínas acídicas de función nuclear como N1 y N2 de Xenopus (Kleinschmidt & Franke, 1982), que también muestran una afinidad preferente por las histonas H3 y H4, SET (Seo *et al.,* 2001; Kato *et al.,* 2011), ANP32A (Seo *et al.,* 2001, 2002; Matilla *et al.,* 2005), ANP32B (Tochio *et al.,* 2010) y otras proteínas de estructuras similares a la ProTα que han sido descritas en anfibios (Dingwall *et al.,* 1987) y levaduras (Ishimi & Kikuchi, 1991), es muy significativa a la hora de establecer una relación funcional de esta proteína en el proceso de la organización estructural del cromosoma y, más concretamente, del ensamblaje del nucleosoma.

En experimentos realizados en nuestro laboratorio se señaló una relación funcional para la interacción de la ProTα con las histonas *core* al demostrarse la capacidad de la ProTα para inducir el ensamblado de los nucleosomas *in vitro* (Díaz-Jullien *et al.,* 1996). Esta capacidad es independiente de H1 y dependiente de otras proteínas separadas en extractos de linfocitos mediante cromatografía de afinidad sobre ProTα (afines también a ATP).

Por otro lado, la capacidad de la ProTα para interactuar con las histonas está probablemente facilitada por su alta concentración intracelular, similar a la de las proteínas del octámero (aprox. una molécula de ProTα por nucleosoma) (Franco *et al.,* 1992; Palvimo & Linnala-Kankkunen, 1990; Sburlati *et al.,* 1990, 1993).

ii. Participación de la ProTα en la actividad de la cromatina

Otra aportación a la relación de la ProTα con el metabolismo nuclear se manifiesta en el estudio de la interacción de esta proteína con otras proteínas nucleares (Covelo *et al.,* 2006), en el que además de corroborar la afinidad de la ProTα por las histonas *core*, se demuestra la interacción con un complejo nuclear multiproteico, separado por cromatografía de afinidad, cuyos componentes incluyen enzimas modificadoras de histonas como las

acetiltransferasas de H3 y H4 y la metiltransferasa de H3, proteínas de unión a RNA/DNA como las ribonucleoproteínas (hnRNPs) A3, A2/B1 y R y las DNA helicasas de tipo II (dependientes e independientes de ATP), y proteínas del citoesqueleto como la β-actina y la vimentina. La presencia de acetiltransferasas (HAT) y metiltransferasas (HMT) de histonas en este complejo sugiere una posible función de la ProTα en la modificación estructural de H3 y H4, las histonas más significativas en el control de la actividad de la cromatina. Esta teoría se ve reforzada por la capacidad de la ProTα para interaccionar con proteínas que se unen a HATs, como el antígeno nuclear del virus Epstein-Barr (EBNA3C) (Cotter & Robertson, 2000; Subramanian *et al.,* 2002) y la proteína de unión a CREB (Karetsou *et al.,* 2002) (ambas con afinidad por la acetiltransferasa p300).

Otro trabajo realizado en nuestro laboratorio ha indicado que la ProTα interacciona con las proteínas PCNA, Cdk2, la ciclina A, cdc2, Cdk4, la ciclina B y las proteínas de transporte nuclear: la carioferina β1, Rch-1, Ran, y RCC1 (Freire *et al.,* 2001). La bien documentada implicación de la proteína PCNA (Kelman *et al.,* 1997) y de Cdk2 y la ciclina A (Fang & Newport, 1991; Cardoso *et al.,* 1993) en la replicación del DNA sugieren la posibilidad de que la ProTα pueda estar implicada en la actividad de replicación de la cromatina y en el control del ciclo celular.

Las características estructurales y funcionales de la ProTα sugieren que esta proteína forma parte del grupo de proteínas de mamíferos que interaccionan con histonas, proteínas acídicas, con las que la ProTα comparte una similitud estructural, que participan en mecanismos nucleares y citoplasmáticos, relacionados con la regulación de la cromatina y en algunos casos con la apoptosis. Son miembros de este grupo NAP1/NAP2 (Ishimi *et al.,* 1987; Rodríguez *et al.,* 2004), CAF-1 (Kaufman *et al.,* 1995), SET (Seo *et al.,* 2001; Fan *et al.,* 2003), ANP32A (Seo *et al.,* 2001, 2002; Fan *et al.,* 2003; Jiang *et al.,* 2003) y ANP32B (Tochio *et al.,* 2010;Roth *et al.,* 2001; Shen *et al.,* 2010): estas proteínas han sido implicadas en la regulación de la transcripción, en la replicación del DNA y en el ensamblaje de los nucleosomas en las células de mamíferos. Además, la ProTα muestra una marcada homología estructural con proteínas de unión a histonas descritas en otros organismos, especialmente la nucleoplasmina de anfibios (Dingwall *et al.,* 1987). La señal cariofílica en su extremo C-terminal, su larga región acídica central e incluso la propiedad de ser fosforilada son semejanzas que comparten la ProTα y estas proteínas de unión a histonas (Earnshaw, 1987). Ya que se ha demostrado que la nucleoplasmina y otras proteínas acídicas similares están involucradas en la movilidad del octámero de histonas dentro de la célula y en el remodelado de la cromatina (Philpott *et al.,*

2000), es plausible que la ProTα tenga una función similar en las células de mamíferos.

En este sentido, la participación de la ProTα en la organización estructural de la cromatina facilitaría la unión de las polimerasas de RNA y DNA favoreciendo la transcripción, la replicación y la reparación del DNA, de hecho, la ProTα colocaliza en el núcleo con la RNA polimerasa II activa (Enkemann *et al.,* 2000; Vareli *et al.,* 2000). Sin embargo, durante la mitosis, la ProTα permanece excluida del volumen ocupado por el DNA, probablemente para favorecer la condensación de éste (Enkemann *et al.,* 2000).

iii. Relación de la ProTα con la actividad transcripcional

Más argumentos a favor de la relación de la ProTα con la actividad de la cromatina vienen determinados por la caracterización de otras proteínas que interactúan con ella: el antígeno nuclear del Epstein-Barr virus (EBNA3C), el coactivador de la transcripción CBP (proteína de unión a CREB), la acetiltransferasa de histonas p300, la oncoproteína SET, el factor de transcripción STAT3 y el represor del receptor de estrógeno (REA).

La ProTα interacciona con el coactivador de la transcripción CBP *in vivo* e *in vitro* y estimula la transcripción génica a través de la reorganización de la estructura de la cromatina (Karetsou *et al.,* 2002). El sitio de interacción ha sido mapeado en el extremo N-terminal de CBP (residuos 1-771) y en una región rica en glutámico de la ProTα.

Evidencias experimentales muestran que la sobreexpresión de la ProTα potencia la actividad de transcripción de promotores dependientes de CBP como TRE y NF-KB; sin embargo, otro blanco de CBP, el promotor del gen de la clase II de MHC (Kretsovali *et al.,* 1998), no se ve afectado por la ProTα (lo que indica que otros factores adicionales, el estado de la cromatina del promotor y/o la composición del complejo coactivador están implicados en el mecanismo) (Karetsou *et al.,* 2002).

Se ha postulado que el efecto de la ProTα en la transcripción mediada por CBP podría ser ejercido sobre el estado de la cromatina del promotor o sobre la actividad enzimática de la propia CBP (Martínez-Balbas *et al.,* 1998).

Por otra parte, se ha encontrado que la acetiltransferasa de histonas p300, una proteína con gran homología a CBP, se une a la ProTα a través de su región C-terminal (Cotter & Robertson., 2000) colocalizando en dominios subnucleares discretos, y sugiriendo la implicación de ésta última en la regulación de la transcripción y la acetilación de histonas.

Además, algunos trabajos han confirmado que la ProTα se concentra en dominios nucleares que se superponen o engloban a sitios de transcripción activa (Vareli *et al.,* 2000).

La interacción de la ProTα con p300 y la actividad de acetilación resultante está a su vez regulada por la interacción de los complejos ProTα-p300 con el antígeno nuclear 3C del Epstein-Barr virus (EBNA3C) (Cotter & Robertson., 2000). Se ha demostrado que la ProTα y EBNA3C interaccionan con p300 específicamente en regiones idénticas a las de unión de otras proteínas reguladoras de la transcripción con esta acetiltransferasa: como E1A, E6, c- jun y E2F (Shikama *et al.,* 2000).

En base a estos datos se ha propuesto que la ProTα participaría en la descondensación de la cromatina y la acetilación de las histonas del octámero, resultando en la activación de la transcripción (Subramanian *et al.,* 2002).

Se ha demostrado también que la ProTα puede potenciar específicamente la activación de la transcripción mediada por el receptor de estrógeno eliminando el represor del receptor de estrógeno (REA) y favoreciendo el reclutamiento del coactivador SRC-1 (Martini *et al.,* 2000). Ya que el receptor de estrógeno es dependiente de CBP (Wang *et al.,* 2001), no debe ser desechada la posibilidad de que la ProTα pueda proveer al receptor de elevadas concentraciones de CBP y SRC-1. De acuerdo con estos resultados, se ha concluido que la ProTα no interactúa directamente con este receptor, pero modula la actividad de su complejo activador.

Asimismo, la interacción de la ProTα con el factor de transcripción STAT3 se ha relacionado con la actividad de este favoreciendo su movilización al núcleo (Yang *et al.,* 2004). En este proceso la ProTα actuaría como una chaperona de STAT3, que carece de señal cariofílica, por lo que la unión a la ProTα facilitaría su transporte al núcleo.

En conclusión, la capacidad de la ProTα para interactuar, ya sea directamente o a través de mediadores, con una gran variedad de proteínas implicadas en las actividades de la cromatina, refuerza la hipótesis de su implicación en ellas. De manera que las interacciones de la ProTα con las histonas, con las enzimas modificadoras de histonas, factores de transcripción y otras proteínas relacionadas con la cromatina serían responsables de la implicación de la ProTα en los procesos de transcripción, replicación, recombinación y reparación del DNA por mecanismos todavía no esclarecidos.

7.3. LA PROTIMOSINA α EN LA ACTIVIDAD CITOPLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS

En publicaciones aparecidas en los últimos años se ha descrito una actividad eminentemente citoplasmática de la ProTα relacionada con su implicación en la actividad apoptótica de células de mamíferos. En ellas se describe la participación de la ProTα en el control de la actividad de la apoptosis dependiente del apoptosoma (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010).

La apoptosis es la forma dominante de muerte celular programada durante el desarrollo embrionario, el recambio de tejidos y la respuesta celular al estrés. Este proceso se caracteriza por una variedad de cambios morfológicos, que incluyen la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, la contracción celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA cromosómico.

La activación de las proteasas específicas (caspasas) que participan en el mecanismo molecular de la apoptosis se produce por dos rutas principales en las células de los mamíferos: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (revisadas en Hengartner *et al.,* 2000).

La vía extrínseca comprende miembros de la familia de los receptores de muerte (como CD95, la proteína Fas o el receptor del factor de necrosis tumoral) que reciben señales pro-apoptóticas desde el exterior celular y reclutan y activan a la caspasa iniciadora 8, mediante moléculas adaptadoras como FADD.

La vía intrínseca es activada en respuesta a señales extracelulares o estímulos internos como daños en el DNA (revisado en Rich *et al.,* 2000). Se caracteriza por la liberación al citosol de moléculas desde la mitocondria, principalmente citocromo c, que marca un momento definido en la respuesta de las células de mamíferos a una variedad de estímulos que propician la vía intrínseca de la apoptosis (Goldstein *et al.,* 2000; Wang, 2001). El citocromo c liberado se une al factor 1 de activación de proteasas apoptóticas (Apaf-1) e induce un cambio conformacional que permite la asociación estable del deoxiadenosín trifosfato o adenosín trifosfato (dATP/ATP) a Apaf-1. Este evento dirige a la formación de un heptámero Apaf-1-citocromo c: el apoptosoma (Jiang & Wang., 2000; Acehan *et al.,* 2002). El apoptosoma recluta y activa a la procaspasa 9, la cual a su vez activa a las caspasas 3, 6 y 7 (Rodríguez & Lazebnik., 1999). Estas caspasas degradan muchos sustratos intracelulares provocando, finalmente la activación de nucleasas que originan la muerte celular por fragmentación del DNA (Thornberry & Lazebnik., 1998; Roy & Cardone, 2002).

La liberación de citocromo c y otros componentes mitocondriales está regulado por factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. La familia de las proteínas Bcl-2 controla el proceso de liberación del citocromo c por las mitocondrias como consecuencia de los estímulos apoptóticos, las proteínas Bax y Bak, que dentro de la familia Bcl-2 son factores pro-apoptóticos, inducen la permeabilidad de la membrana exterior de la mitocondria y la salida de citocromo c, y la actividad de estos factores puede ser bloqueada por Bcl-2, Bcl-x y Mcl-1, factores anti-apoptóticos también de la familia Bcl-2 (Chipuk *et al.,* 2010).

El control de la formación del apoptosoma a partir del citocromo c liberado, Apaf-1 y dATP, el reclutamiento de la caspasa 9, y el control de la actividad de las caspasas son importantes puntos de regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. El grupo de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) ejercen su función inhibiendo la activación de las caspasas (Wang, 2001; Deveraux & Reed., 1999). Su efecto es bloqueado por las proteínas Smac/Diablo y Omi/HtrA2 liberadas de las mitocondrias al citoplasma (Du *et al.,* 2000; Verhagen *et al.,* 2001; Hegde *et al.,* 2002).

De la proteína Hsp90 también se ha descrito su efecto anti-apoptótico funcionando como un inhibidor de la activación del apoptosoma, interaccionando con Apaf-1 y bloqueando la activación de las caspasas (Pandey *et al.,* 2000).

La proteína ANP32A (PHAPI), una proteína acídica relacionada con la actividad de la cromatina a través de su interacción con las histonas y en el control de su acetilación (Seo *et al.,* 2001, 2002; Fan *et al.,* 2006), se ha descrito en los últimos años como una proteína pro-apoptótica, como inductor de la actividad del apoptosoma y activador de las caspasas 9 y 3 (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010). Fue en el estudio *in vitro* de los mecanismos de actuación de ANP32A donde se describió, por primera vez, una función anti-apoptótica de la ProTα, en un proceso en el que se prevenía la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9, en lo que parecía ser un efecto antagónico de la ANP32A (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010).

Los mecanismos por los que se produce este efecto anti-apoptótico de la ProTα son desconocidos. Aunque, los experimentos de Jiang *et al.* (2003) y Qi *et al.* (2010) demuestran una directa implicación de ProTα en el control de la actividad del apoptosoma, varias publicaciones también sugieren mecanismos de la actividad anti-apoptótica de la ProTα relacionados con la actividad de Bcl-2 (Letsas *et al.,* 2005), con la asociación a STAT3 (Battle & Frank, 2002; Yang *et al.,* 2004), o también relacionada con la activación de los factores de transcripción que, como el CBP y NF-κB, pueden inducir la expresión de factores anti-

apoptóticos como TRAF, IAPs o proteínas de la familia Bcl-2 (Bui *et al.,* 2001; Shishodia *et al.,* 2002).

La interacción de ProTα con el péptido p8 se ha propuesto, también, como implicada en la actividad anti-apoptótica de ambos polipéptidos (Malicet *et al.,* 2006). Asimismo, la interacción del mRNA de ProTα con la proteína HuR, proteína de la familia Hu/ELAV que participa en el transporte y estabilización de mensajeros, en células en la que se ha inducido la apoptosis, se ha relacionado con la regulación de este proceso (Lal *et al.*, 2005).

Recientemente, en nuestro laboratorio, mediante experimentos de transfección de ProTα recombinante en los que se bloqueó su capacidad para ser fosforilada, demostramos que la fosforilación de ProTα es requerida para su actividad anti-apoptótica (Moreira *et al.,* 2013). En cualquier caso, permanece sin esclarecer la forma en la que se traduce la capacidad de la estructura de ProTα, aparentemente fosforilada, para ejercer el control de la apoptosis.

Con todo ello, y a pesar de lo que queda por esclarecer, podemos concluir que en referencia a su actividad biológica, la ProTα se comporta como una proteína multifuncional participando en procesos de actividad citoplasmática y nuclear, relacionados respectivamente con la apoptosis y la actividad proliferativa de las células. En la figura 6 se hace una representación esquemática de las actividades biológicas propuestas para la ProTα en células de mamíferos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

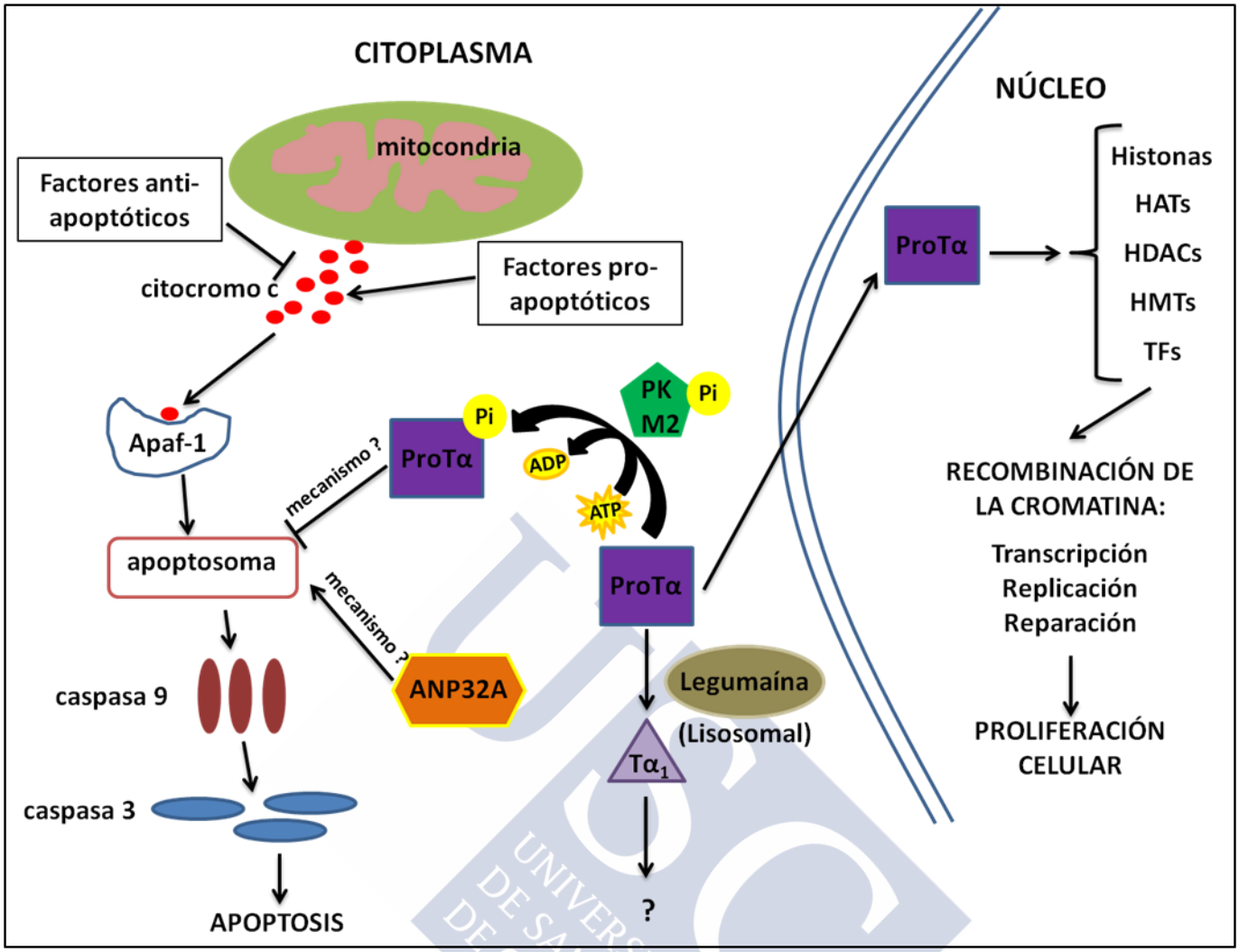


Figura 6. Modelo selectivo de las proteínas que regulan o son reguladas por la ProTα implicadas en rutas de proliferación, supervivencia y apoptosis celular.

Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que la ProTα se implica en estos procesos son todavía desconocidos.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

II. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

II. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Como queda reflejado en la descripción de las características de la actividad biológica de la ProTα presentadas en la Introducción de este trabajo, es clara su implicación en las actividades citoplasmática y nuclear de las células de mamíferos en procesos que especialmente influencian la vida celular. De manera que, interacciones de ProTα con diferentes proteínas propician en el citoplasma el control de la actividad apoptótica y en núcleo especialmente influencian la actividad proliferativa.

Nuestra investigación y la de otros grupos ha permitido caracterizar algunas de las proteínas que participan en la actividad nuclear de la ProTα: histonas, enzimas modificadoras de histonas, factores de transcripción, ribonucleoproteínas, etc. Todas ellas confluyendo en distintas facetas de la actividad de la cromatina de las cuales son desconocidos los mecanismos moleculares mediante los cuales se produce la participación de la ProTα.

Respecto a la actividad citoplasmática de la ProTα lo único hasta ahora establecido es su participación en la actividad apoptótica, que, como se ha indicado, parece relacionarse con su capacidad para la fosforilación y la interacción con componentes implicados en la actividad del apoptosoma. Pero tampoco son conocidos los mecanismos moleculares por lo que se produce esta y otras posibles actividades citoplasmáticas de la ProTα.

En cualquier caso, sí es clara la importancia de la ProTα en el control de la supervivencia de las células de mamíferos al influir en su actividad proliferativa y participar en el control de su muerte mediante la apoptosis.

Con todo ello, parece evidente que es necesario avanzar en el esclarecimiento de los mecanismos mediante los cuales la ProTα participa en las descritas actividades celulares. Con esta finalidad planteamos unos objetivos orientados a caracterizar interacciones con diferentes componentes celulares que nos ayuden a conocer los mecanismos de su función biológica.

Las características estructurales de la ProTα, una proteína muy acídica y con una inmunogenicidad muy baja, dificulta el aislamiento y caracterización de complejos de esta proteína que reflejen la composición de los componentes que interaccionan con ella *in vivo*. Por ello, llevamos a cabo una estrategia basada en la posibilidad de estabilizar las interacciones proteína-proteína, induciendo la formación de enlaces cruzados covalentes, *in vivo*, en células

de mamíferos. Usando para ello el formaldehido, un compuesto utilizado para estabilizar interacciones entre proteínas y entre proteínas y ácidos nucleicos, dada su fácil permeabilización celular y su capacidad para establecer enlaces cruzados reversibles entre componentes celulares sin distorsiones estereoquímicas.

De acuerdo con esta estrategia, nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Poner a punto un protocolo para la inducción de enlaces cruzados con formaldehido en cultivos de linfocitos en proliferación, células en las que la expresión de la ProTα es más elevada.

2- Establecidas las condiciones más favorables para la estabilización de complejos *in vivo*, por enlaces cruzados por formaldehido, procederemos a un fraccionamiento subcelular de los linfocitos tratados y a la identificación de posibles complejos en los que la ProTα esté presente. Llevando a cabo, para ello, la separación por SDS-PAGE de los diferentes fraccionados y al análisis por *immunowesternblotting*, usando anticuerpos que reconocen diferentes parte de la secuencia de la ProTα.

3- A los complejos inmunoreactivos de la ProTα, localizados en los diferentes subfraccionados celulares y purificados por SDS-PAGE, se les analizará su composición por espectrometría de masas, para establecer las estructuras de las proteínas que pudieran estar interactuando con la ProTα. Los inmunoensayos con anticuerpos contra las proteínas caracterizadas nos permitirán confirmar su habilidad para interaccionar con la ProTα, bien en el citoplasma o el núcleo o en ambos, de los linfocitos en proliferación.

4- Establecidas las interacciones de la ProTα en linfocitos en proliferación y con la intención de establecer su relación con las actividades celulares en las que se ha demostrado la implicación de la ProTα, procederemos a analizar la evolución de estas interacciones en células en la que se ha inducido un descenso de la actividad proliferativa y en células en la que se ha promovido la apoptosis. Utilizando para ello el mismo procedimiento que el indicado en el apartado 3. Esta experimentación debería contribuir a esclarecer los mecanismos moleculares por los que la ProTα se relaciona con la proliferación y la muerte de las células.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.....43

1.1. CÉLULAS.....43

1.2. ANTICUERPOS.....43

1.3. OTROS PRODUCTOS.....44

2. MATERIAL NO BIOLÓGICO.....45

2.1. MEDIOS DE CULTIVO.....45

2.2. DISOLUCIONES Y TAMPONES.....45

2.3. OTROS PRODUCTOS.....46

3. MÉTODOS.....48

3.1. CULTIVOS CELULARES.....48

3.1.1.Condiciones de manipulación.....48

3.1.2.Inicio de cultivos celulares.....48

3.1.3.Mantenimiento de los cultivos celulares.....48

3.1.4.Análisis del número y viabilidad celular.....49

3.1.5.Tratamiento con formaldehido.....49

3.1.6.Descenso de la actividad proliferativa celular.....49

3.1.7.Inducción de la apoptosis celular.....50

3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....50

3.2.1.Fraccionamiento subcelular.....50

3.2.2.Lisis nuclear.....50

3.3. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....51

3.4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS 51

3.5. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.....52

3.6. *IMMUNOWESTERN BLOT*.....52

3.7. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS INMUNOREACTIVOS CON ANTI-ProTα.....54

3.8. ROTURA DE LOS ENLACES DE FORMALDEHIDO POR TRATAMIENTO TÉRMICO.....55

3.9. IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B.....55

3.9.1.Identificación de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B.....55

3.9.2.Electroelución de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B.....55

3.10. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....56

3.11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....57

3.12. ISOELECTROENFOQUE.....57

3.13. FPLC DE INTERCAMBIO IÓNICO.....57

3.14. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR.....58

3.15. ENSAYOS DE COINMUNOPRECIPITACIÓN.....58

3.16. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A ProTα.....59

3.17. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL.....60

3.18. ENSAYOS DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....61

3.18.1. Preparación de extractos de células Jurkat apoptóticas.....61

3.18.2. Ensayos de actividad caspasa 9 y caspasa 3.....61

3.18.3. Extracción de DNA y electroforesis.....62

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. CÉLULAS

Células **Jurkat**: línea celular estable procedente de linfocitos T humanos.

Células **293T**: línea celular estable procedente de epitelio de riñón humano, que expresa el antígeno T del virus SV-40.

1.2. ANTICUERPOS

ANTICUERPO	ORIGEN	EPITOPO	APLICACIÓN/ENSAYO	CONCENTRACIÓN
Anti-NT-ProTα purificado (*Neosystem*)	Conejo	Extremo N-terminal de la ProTα (a.a. 1-21)	Detección de la ProTα y complejos (*western blot*) Inmunoprecipitación de la ProTα Citolocalización de la ProTα (microscopía de inmunofluorescencia)	1,5 µg/ml 10 µg/mg de proteína total d: 1/2.000
Anti-CT-ProTα purificado (*Neosystem*)	Conejo	Extremo C-terminal de la ProTα (a.a. 95-109)	Detección de la ProTα y complejos (*western blot*) Inmunoprecipitación de la ProTα	1,5 µg/ml 10 µg/mg de proteína total
Anti-SET (I2PP2A sc-25564, *Santa Cruz Biotechnology*)	Conejo	Extremo N-terminal de SET (a.a. 1-120)	Detección de SET y complejos (*western blot*) Inmunoprecipitación de SET Citolocalización de SET (microscopía de inmunofluorescencia)	d:1/500 o 1/1.000 10 µg/mg de proteína total d: 1/250

ANTICUERPO	ORIGEN	EPITOPO	APLICACIÓN/ENSAYO	CONCENTRACIÓN
Anti-ANP32A/B (ANP32A/B sc-292113, *Santa Cruz Biotechnology*)	Conejo	Extremo N-terminal de ANP32B (a.a. 1-163)	Detección de ANP32A y ANP32B y complejos (*western blot*) Inmunoprecipitación de ANP32A y ANP32B Citolocalización de ANP32A y ANP32B (microscopía de inmunofluorescencia)	d:1/500 o 1/.1000 10 µg/mg de proteína total d: 1/250
Anti-ANP32A (I1PP2A sc-5652, *Santa Cruz Biotechnology*)	Cabra	Extremo C-terminal de ANP32A (a.a.231-249)	Detección de ANP32A y complejos (*western blot*) Inmunoprecipitación de ANP32A Citolocalización de ANP32A (microscopía de inmunofluorescencia)	d:1/500 o 1/1.000 10 µg/mg de proteína total d: 1/250
Anti-conejo-HRP (2^{ario}) (*GE Healthcare BioSciences*)	Burro	IgG	*western blot*	d: 1/5.000
Anti-cabra-HRP (2^{ario}) (*Sigma*)	Conejo	IgG	*western blot*	d: 1/5.000
Anti-conejo - AlexaFluor-488 (2^{ario}) (*Invitrogen*)	Cabra	Cadena pesada de la IgG	Microscopía de inmunofluorescencia (emisión en verde)	d: 1/5.000
Anti-cabra - AlexaFluor-594 (2^{ario}) (*Invitrogen*)	Burro	Cadena pesada de la IgG	Microscopía de inmunofluorescencia (emisión en rojo)	d: 1/5.000

1.3. OTROS PRODUCTOS

La **ProTα** fue purificada de timocitos de ternera siguiendo el protocolo descrito por Franco *et al.,* 1992.

Seroalbúmina bovina (BSA) (Merck)

2. MATERIAL NO BIOLÓGICO

2.1. MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo en suspensión de las células Jurkat se empleó medio RPMI 1640 (*SIGMA*) pH 7,4 que contenía un 0,2% de $NaHCO_3$, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (*BioWhittaker*), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (*BioWhittaker*), refiriéndonos a este posteriormente como medio completo.

Para el cultivo en monocapa de la línea celular 293T se utilizó medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*SIGMA*) pH 7,4 que contenía un 0,2% de $NaHCO_3$, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (*BioWhittaker*), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (*BioWhittaker*), siendo este el medio completo.

2.2. DISOLUCIONES Y TAMPONES

- **PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na_2PO_4 y 1,5 mM KH_2PO_4.
- **Tampón de lisis celular:** 50 mM Tris-HCl pH7,4; 150 mM NaCl; 0,5% Nonidet P-40; conteniendo 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 5 mM EGTA; 1 mM EDTA; 5 µg/ml pepstatina; 5 µg/ml leupeptina y 10 mM NaF.
- **Tampón de diálisis A:** 20 mM Tris-HCl pH7,6; 75 mM NaCl; conteniendo 1 mM DTT y 0,5 mM PMSF.
- **Tampón de diálisis B:** 50 mM NH_4HCO_3 pH7,6; conteniendo 1 mM DTT y 0,5 mM PMSF.
- **Tampón de lisis nuclear:** 10 mM Tris-HCl pH8,5; 10% sacarosa; 0,1 M $MgCl_2$; conteniendo 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 5 mM EGTA; 1 mM EDTA; 5 µg/ml pepstatina; 5 µg/ml leupeptina y 10 mM NaF.
- **Tampón de equilibrado cromatografía de intercambio iónico (HiTrap Q HP y FPLC):** 20 mM Tris-HCl pH7,6; 75 mM NaCl; 1 mM DTT y 0,5 mM PMSF.
- **Tampón de muestra de Laemmli:** 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 4% β-mercaptoetanol y 10% glicerol.
- **Tampón de electroforesis SDS-PAGE 1X (Tris-glicina-SDS):** 25 mM Tris-HCl pH8,3; 192 mM glicina y 0,1% SDS.
- **Disolución de Azul Brillante de Coomassie R-250**: 0,1% Azul Brillante de Coomassie R-250; 41,66% metanol; 16,66% ácido acético.
- **Disolución decolorante**: 12,5% isopropanol, 10% metanol.

- **Tampón equilibrado de purificación de anticuerpos**: 10 mM Tris pH 7,5.
- **Tampón de lavado de purificación de anticuerpos:** 10 mM Tris pH 8,8.
- **Tampón de elución de purificación de anticuerpos 1:** 100 mM glicina pH 2,5.
- **Tampón de elución de purificación de anticuerpos 2:** 100 mM trietilamina pH 11,5.
- **Tampón de transferencia en condiciones ácidas:** 20 mM acetato sódico pH 4,5.
- **Tampón transferencia en condiciones estándar:** 50 mM Tris; 380 mM glicina; 0,1% SDS y 20% metanol.
- **TBST-1:** 20 mM Tris-HCl pH7,6; 137 mM NaCl y 0,2% Tween-20.
- **TBST-2:** 20 mM Tris-HCl pH7,4; 137 mM NaCl y 0,1% Tween-20.
- **Tampón de electroelución:** 50 mM NH_4CO_3 pH8,5.
- **Tampón de filtración molecular:** 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7,7.
- **Tampón borato:** 0,2 M borato sódico pH 9.
- **Tampón NET:** 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM KCl, 1 mM EDTA y 0,1% Nonidet P-40.
- **Tampón de equilibrado de la cromatografía de afinidad a ProTα:** 20 mM Tris-HCl pH7,6; 75 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF y 10 mM NaF.
- **Tampón de lisis de células Jurkat apoptóticas:** 20 mM HEPES-KOH pH 7,4; 20 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 0,05% CHAPS; 5 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 5 µg/ml pepstatina; 5 µg/ml leupeptina y 10 mM NaF.
- **Tampón de ensayos de actividad caspasa 9:** 20 mM HEPES-KOH pH 6,5; 20 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 0,05% CHAPS y 10 mM DTT.
- **Tampón de ensayos de actividad caspasa 3:** 20 mM HEPES-KOH pH 7,4; 20 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 0,05% CHAPS y 10 mM DTT.
- **Tampón TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA.

2.3. OTROS PRODUCTOS

i. SIGMA

DMSO

Tripsina-EDTA, solución al 0,25% (m/v).

Proteína G- agarosa

Estaurosporina: disuelta a una concentración patrón 1 mM en DMSO.

Tripas de diálisis con un tamaño de poro de 12 kDa.

Divinil sulfona al 97%.

Dimetilformamida

Poli-L-lisina: disuelta en agua *milliQ* a una concentración 0,1 mg/ml y esterilizada por filtración (0,22 µm).

DAPI, disuelto en agua *milliQ* (solucion patrón 10 mg/ml) y filtrado (0,22 µm).

Azul de tripán, solución al 0,4%.

Sepharosa 4B activada con CNBr

ii. Serva

Ditiotreitol (DTT), disuelto en agua destilada a una concentración patrón 100 mM.

Leupeptina: disuelta en agua *milliQ* a una concentración patrón 5 µg/µl

Pepstatina: disuelta en metanol a una concentración patrón 5 µg/µl

PMSF: solución patrón 100 mM en isopropanol.

iii. Calbiochem

Mowiol 4-88

iv. Whatman

Membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm.

v. Merck

Formaldehido, suministrado al 37%.

Etilendiamina

Glutaraldehido, suministrado al 50%.

vi. BIO-RAD

Precision Plus Protein Standards, All Blue

Agarosa

vii. *Millipore*

Concentradores Amicon, con un límite de exclusión de 10 kDa.

viii. *GE Healthcare BioSciences*

Geles PAG rango de pH 3,0-9,0

ix. *BACHEM*

Sustrato fluorogénico de la caspasa 9 (LEHD-AMC), disuelto en agua destilada a una concentración patrón 100 mM

Sustrato fluorogénico de la caspasa 3 (DEVD-AMC), disuelto en agua destilada a una concentración patrón 100 mM

3. MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. Condiciones de manipulación

La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles en el interior de una cabina de flujo laminar vertical *TELSTAR BioStar Plus*. Los cultivos se mantuvieron en el interior de un incubador *Heraeus*. El material desechable fue esterilizado en autoclave antes de su eliminación definitiva.

3.1.2. Inicio de los cultivos celulares

Los cultivos de células Jurkat y 293T se iniciaron a partir de alícuotas de 1 ml almacenadas en nitrógeno líquido, congeladas en un medio compuesto por un 90% de FBS y 10% de DMSO como agente crioprotector. Las alícuotas fueron calentadas en un baño a 37°C, centrifugadas (900xg durante 5 minutos) para retirar el medio de congelación, y resuspendidas a continuación en 5 ml del medio de cultivo completo correspondiente (10^6 células/ml).

3.1.3. Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células Jurkat fueron cultivadas en botellas *Pyrex* con agitación a 37°C, doblando el volumen del medio de cultivo con medio completo RPMI 1640 cuando alcanzaban a una media de 1 a $1{,}5 \cdot 10^6$ células/ml hasta obtener el volumen final deseado.

Las células 293T se mantuvieron en cultivo en frascos de 25 cm^2 a 37°C en atmósfera humidificada y con un 5% CO_2; los cultivos fueron tripsinizadas periódicamente cuando la monocapa en crecimiento alcanzaba un 60-70% de confluencia. Para ello, se eliminó el medio de cada frasco de cultivo y se añadió sobre las monocapas 2 ml de solución 0,25% tripsina-

EDTA durante 5 minutos. La solución fue retirada y las células resuspendidas en el volumen de medio completo DMEM necesario para obtener la dilución deseada; y cantidades iguales de células se repartieron en los frascos correspondientes.

3.1.4. Análisis del número y viabilidad celular

El recuento del número de células se realizó directamente a partir del cultivo empleando una cámara de Neubauer, y se determinó la viabilidad celular mediante la tinción de la muestra en proporción 1:1 con solución 0,4% azul de tripán.

3.1.5. Tratamiento con formaldehido

El tratamiento con formaldehido para la formación de enlaces cruzados se realizó siguiendo el procedimiento indicado en experimentos similares (Vasilescu *et al*., 2004; Huyen *et al*., 2004). Las células Jurkat en proliferación a una densidad de 1-1,5·10^6 células/ml fueron centrifugadas (900xg durante 10 minutos) para eliminar el medio de cultivo, resuspendidas en PBS a 37°C a razón de 5·10^6 células/ml e incubadas con formaldehido a una concentración final del 1% en el PBS durante 20 minutos a 37°C con agitación ocasional. La reacción de *cross-linking* se paró añadiendo a la suspensión celular glicina a una concentración final de 125 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió a la lisis celular.

En el caso de las células 293T, cuando alcanzaron una confluencia del 60-70% fueron tripsinizadas, centrifugadas (900xg durante 10 minutos) para eliminar la solución de tripsina y resuspendidas en PBS a 37°C. El resto del procedimiento fue igual al seguido con las células Jurkat.

3.1.6. Descenso de la actividad proliferativa celular

Para inducir el descenso de la actividad proliferativa, las células Jurkat en crecimiento exponencial (1-1,5·10^6 células/ml) fueron recogidas, centrifugadas (900xg durante 10 minutos) para eliminar el medio de cultivo y resuspendidas en el mismo volumen de medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos sin suero fetal bovino. Las células se cultivaron durante 60 horas a 37°C con agitación, siguiendo la vialidad celular, y se recogieron para realizar el *cross-linking* con formaldehido y la posterior lisis celular.

3.1.7. Inducción de la apoptosis celular

Las células Jurkat en proliferación a una concentración de 1 a $1,5 \cdot 10^6$ células/ml fueron centrifugadas (900xg durante 10 minutos) y resuspendidas en nuevo medio completo RPMI 1640 a una concentración de 10^7 células/ml. La apoptosis fue inducida por la adición de estaurosporina 1mM a una concentración final de 0,5 µM o 1 µM (adaptado de Jäkel *et al*., 2010), o por la adición de actinomicina D a una concentración final de 0,5µg/ml o 1µg/ml (adaptado de Kumarswamy *et al.,* 2009; Kleff *et al.,* 2000). Las células fueron incubadas durante 1, 2 o 4 horas a 37°C. Después de la incubación las células fueron recogidas para el tratamiento con formaldehido y lisadas.

3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

3.2.1. Fraccionamiento subcelular

Las células Jurkat y 293T fueron lisadas siguiendo el procedimiento de Feeney y colaboradores (1990) con modificaciones. Brevemente, las células fueron recogidas de los cultivos, lavadas dos veces con PBS a 4°C, resuspendidas en tampón de lisis celular a 4°C (10^8 células/ml) y mantenidas durante 30 minutos en hielo. A continuación, fueron homogeneizadas en un *potter* y centrifugadas (900xg durante 10 minutos a 4°C) para separar los núcleos. El sobrenadante fue ultracentrifugado (100.000xg durante 1 hora a 4°C) para obtener el extracto citoplasmático y posteriormente dializado en tripa de diálisis de 12 kDa de límite de exclusión durante 24 horas frente a tampón de diálisis A. Los núcleos se lavaron dos veces con PBS para su posterior lisis.

En las células Jurkat inducidas a apoptosis se realizó una lisis celular total, para lo que las células fueron lavadas dos veces con PBS, resuspendidas en tampón de lisis a 4°C (10^8 células/ml), sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación y homogeneizadas en un *potter*. El homogeneizado fue ultracentrifugado (100.000xg durante 1 hora a 4°C) para obtener el extracto celular y dializado en tripa de 12 kDa de límite de exclusión durante 24 horas frente a tampón de diálisis A.

3.2.2. Lisis nuclear

Los núcleos se lavaron con PBS y se resuspendieron en el tampón de lisis nuclear a una concentración de $2 \cdot 10^8$ núcleos/ml. Se les añadió DNasa (80 µg/ml) y RNasa (10 µg/ml), se

homogeneizaron en un *potter* y se incubaron durante 30 minutos a 25°C. Después, se realizó una segunda adición de DNasa y RNasa, se volvieron a homogeneizar y se incubaron 30 minutos a 25°C. El homogeneizado fue centrifugado (50.000xg, 15 minutos, 4°C) y el sobrenadante, el extracto nucleoplasmático, fue dializado en tripa de 12 kDa durante 24 horas frente a tampón de diálisis A.

3.3. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Alícuotas de los diversos extractos (de 20 a 25 mg) fueron separadas por cromatografía de intercambio iónico en una columna HiTrap Q HP (columna de intercambio aniónico de 1 ml -*GE Healthcare*-), siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, la columna fue lavada y equilibrada con el tampón de equilibrado. La muestra una vez centrifugada (1.500xg, 10 minutos, 4°C) y filtrada (0,22 µm), se cargó en la columna, se recogió la fracción no retenida (NR) y se lavó la columna con 5 ml de tampón de equilibrado. A continuación, se realizó una elución discontinua con tampón conteniendo 0,2 M; 0,5 M y 1 M NaCl, con 5 ml de cada tampón. Las fracciones de estos eluatos con contenido proteico, determinado por absorbancia a 280nm, se juntaron y se denominaron fracción 0,2M; 0,5M y 1M respectivamente.

Las fracciones NR; 0,2M; 0,5M y 1M fueron dializadas en tripa de 12 kDa de límite de exclusión durante 24 horas frente a tampón de diálisis B para su posterior concentración por liofilización. Las fracciones liofilizadas fueron resuspendidas en tampón 10 mM Tris-HCl pH7,6 y cuantificadas mediante el test de Bradford (Bradford, 1976).

3.4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS

Alícuotas (del orden de 70 µg) de los diferentes extractos celulares y de los fraccionados de intercambio iónico de células tratadas y no tratadas con formaldehido fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE), que constan de un gel concentrador del 4% de acrilamida y un gel separador del 15% o 8% de acrilamida, de dimensiones de 12x16 cm (*Protean II. BIO-RAD*) y un grosor de 0,75 mm.

A las muestras a analizar se les añadió tampón de muestra, se hirvieron, menos las muestras de extractos de células tratadas con formaldehido para evitar la ruptura de los enlaces cruzados, y se microfugaron. La electroforesis fue llevada a cabo junto con marcadores de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards, All Blue. BIO-RAD)*

Para la tinción con Azul de Coomassie los geles fueron sumergidos en la disolución de Azul Brillante de Coomassie R-250 de 4 horas a toda la noche a 25°C, con agitación, pasado este tiempo se les añadió solución decolorante.

3.5. PURIFICACION DE ANTICUERPOS

La purificacion de los anticuerpos anti-ProTα se realizó siguiendo el protocolo descrito por Harlow & Lane, 1988: los sueros anti-CT-ProTα y anti-NT-ProTα (*NeoSystem*) fueron centrifugados (3.000xg durante 30 minutos a 4°C) y se les añadió un volumen de solución saturada (4 M) de sulfato amónico (en agitación y mantenidos a temperatura ambiente durante 2 h). Después permanecieron durante 7 horas a 4°C y fueron centrifugados (3.000xg, 30 minutos, 4°C). Los sedimentos se secaron al aire 10 minutos y se resuspendieron en PBS en 1/2 del volumen inicial de suero. Finalmente, fueron dializados en tripas de diálisis de 12 kDa frente a PBS pH 7,4 a 4°C durante 24 horas.

A continuación, fueron incubados con una matriz de afinidad ProTα-Sepharosa (como se describe en el punto 3.16) en tampón de equilibrado durante 24 horas a 4°C en agitación. Se cargaron en columnas y se lavaron con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo 0,5 M NaCl. Se llevó a cabo una primera elución con tampón de elución 1. Y seguidamente, se realizó un lavado con tampón de lavado y una segunda elución con tampón de elución 2.

Las fracciones recogidas se combinaron y concentraron en Amicon (límite de exclusión de 10 kDa) a 3.000xg a 4°C en ciclos de 15 minutos. Cuando se alcanzó un volumen final en torno a 400-500 µl de eluido, se realizaron 5 ciclos de diálisis con 10 volúmenes de PBS.

La concentración final de anticuerpos purificados anti-NT-ProTα y anti-CT-ProTα en los eluidos concentrados y dializados se determinó en base a su absorbancia a 280 nm. Finalmente se congelaron a -20°C hasta su uso.

3.6. *IMMUNOWESTERN BLOT*

Alícuotas (del orden de 70 µg) de los diferentes extractos celulares y de los fraccionados cromatográficos de intercambio iónico fueron separadas por SDS-PAGE como se describe anteriormente.

Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa activadas para la retención de proteínas ácidas (Lauritzen *et al*., 1990). Brevemente, la activación se llevó a cabo mediante la incubación de la membrana de nitrocelulosa (0,2 µm) en una solución de 5% divinil sulfona y 10% dimetilformamida en 0,5 M $NaHCO_3/Na_2CO_3$ pH 10 durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave; seguidamente, fue incubada 30 minutos en 1% dietilamina y, finalmente, tratada con 1% glutaraldehido en 0,5 M $NaHCO_3/Na_2CO_3$ pH 10 durante 15 minutos. Tras el proceso, las membranas se lavaron en agua a 25°C durante 18 h. Las proteínas se transfirieron durante 12 horas a 45 mA constantes y 13 V a 4°C, en tampón acetato sódico 20 mM pH 4,5 (Karetsou *et al*., 1998; Covelo *et al*., 2006).

Cuando fue necesario se realizó mediante transferencia estándar a membranas de nitrocelulosa (0,2 µm) siguiendo el protocolo de Towbin (1979) a 50V durante 2 horas.

En ambos casos la inmunodetección se realizó según los protocolos estándar, utilizando TBS-T (TBST-2 para los anticuerpos anti-ProTα y TBST-1 para el resto de anticuerpos) para los lavados de las membranas y para los bloqueos e incubaciones con los anticuerpos específicos leche en polvo disuelta al 5% en TBS-T. Así, las membranas fueron bloqueadas e incubadas con los anticuerpos primarios, y secundarios conjugados con la enzima peroxidasa (HRP), a la concentración y tiempo que se indica a continuación:

ANTICUERPO PRIMARIO		**ANTICUERPO SECUNDARIO**
Anti-CT-ProTα purificado (*Neosystem*) 1,5 µg/ml	**4 horas/ 25°C. con agitación**	**Anti-conejo-HRP (ECL Western blotting analisis system, GE healthcare) d: 1/5.000, 1h30´/25°C.**
Anti-NT-ProTα purificado (*Neosystem*) 1,5 µg/ml	**4 horas/ 25°C. con agitación**	**Anti-conejo-HRP (ECL Western blotting analisis system, GE healthcare) d: 1/5.000, 1h30´/25°C.**
Anti-SET (*Santa Cruz Biotechnology*) d: 1/500 (Transferencia ácida) d: 1/1.000 (Transferencia estándar)	**2 horas/25°C+2horas/4°C con agitación**	**Anti-conejo-HRP (ECL Western blotting analisis system, GE healthcare) d: 1/5.000, 1h/25°C.**

ANTICUERPO PRIMARIO		ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti-ANP32A/B (*Santa Cruz Biotechnology*) **d: 1/500 (Transferencia ácida)** **d: 1/1.000 (Transferencia estándar)**	**2 horas/25°C+2horas/4°C con agitación**	**Anti-conejo-HRP (ECL Western blotting analisis system, GE healthcare)** **d: 1/5.000, 1h/25°C.**
Anti-ANP32A (*Santa Cruz Biotechnology*) **d: 1/500 (Transferencia ácida)** **d: 1/1.000 (Transferencia estándar)**	**2 horas/25°C+2horas/4°C con agitación**	**Anti-cabra-HRP (*Sigma*)** **d: 1/5.000, 1h/25°C.**

El revelado de las membranas se realizó utilizando el *kit* ECL (*Western blotting analisis system, GE Healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante, sobre una placa fotográfica (*Medical X-Ray Film*, *Fujifilm*), usando un revelador y fijador de Kodak (*Kodak GBX Developer and Replenisher* y *Kodak GBX Fixer and Replenisher*, respectivamente).

3.7. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS INMUNOREACTIVOS CON ANTI-ProTα

Alícuotas de las fracciones 1M (del orden de 70 µg) de intercambio iónico de extractos de células tratadas con formaldehido fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida, 0,75 mm grosor) y teñidas con Azul de Coomassie, y paralelamente analizadas mediante *western blot* con anti-ProTα (mediante transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6).

Después, se estableció la correspondencia entre los complejos detectados por *immunowestern* y las bandas de proteína visualizadas con Coomassie tomando como referencia los marcadores de peso molecular. Las bandas fueron cortadas del gel de acrilamida, lavadas con agua durante 2 horas a 25°C, y cargadas de nuevo en SDS-PAGE (15% acrilamida, 1 mm grosor) y teñidas con Azul de Coomassie o analizadas por *immunowestern blot* con anti-ProTα (mediante transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6). A continuación, las bandas inmunoreactivas fueron de nuevo cortadas del gel descartando impurezas, lavadas y analizadas mediante SDS-PAGE (15%

acrilamida, 1,5 mm grosor) y tinción de Coomassie o *immunowestern blot* con anti-NT-ProTα, anti-CT-ProTα, anti-SET o anti-ANP32A/B (en condiciones específicas para proteínas ácidas).

3.8. ROTURA DE LOS ENLACES DE FORMALDEHIDO POR TRATAMIENTO TÉRMICO

Las bandas de los complejos de la ProTα en el gel de acrilamida y de la propia ProTα purificadas como se describe en el apartado anterior fueron sometidas a tratamiento térmico para propiciar la ruptura de los enlaces cruzados del formaldehido.

Las bandas fueron cortadas en dos fragmentos: uno de un tercio y otro de dos tercios. El fragmento de dos tercios fue tratado con 100 µl tampón de muestra Laemmli 1,5X y sometido a 100°C durante 90 minutos. El fragmento de un tercio fue utilizado como control y no se sometió a tratamiento térmico. Ambos fragmentos fueron cargados en un gel de SDS-PAGE (15% de acrilamida, 1 mm grosor) y una vez terminada la electroforesis fueron teñidos con tinción de plata (*Silver Stain Pluis Kit. BIO-RAD*), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.9. IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B

3.9.1. Identificación de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B

Las proteínas SET, ANP32A y ANP32B fueron purificadas a partir de la fracción 1M de intercambio iónico de citoplasma de células Jurkat proliferantes no tratadas con formaldehido. Para ello, las proteínas de la fracción 1M (del orden de 70 µg) fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida, 0,75 mm grosor), teñidas con Coomassie, y cortadas las bandas de proteína correspondientes al tamaño molecular de SET, ANP32A y ANP32B. La identificación fue realizada mediante la separación por SDS-PAGE de alícuotas de las bandas, al igual que se hizo con los complejos de la ProTα, y visualizadas mediante tinción de Coomassie o analizadas por *immunowestern blot* con los anticuerpos anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B respectivamente (mediante transferencia en condiciones estándar como se describe en el punto 3.6).

3.9.2. Electroelución de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B

Alícuotas (del orden de 70 µg cada una) de la fracción 1M de intercambio iónico de citoplasma de células Jurkat no tratadas con formaldehido fueron separadas por SDS-PAGE

(15% acrilamida, 0,75 mm grosor) y teñidas con una disolución de cobre que marca la posición de las proteínas de manera reversible (Lee *et al*., 1987). El gel una vez acabada la electroforesis fue lavado brevemente con agua, incubado con la disolución de cobre (0,3 M $CuCl_2$) durante 10 minutos y lavado de nuevo con agua. A continuación, las bandas de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B fueron cortadas, lavadas con 0,25 M Tris pH 9; 0,25 M EDTA para eliminar los restos de la tinción de cobre y utilizadas para la electroelución.

Para la electroelución se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, las bandas (5 bandas de cada proteína) fueron cortadas en fragmentos de unos pocos milímetros, depositadas en los correspondientes tubos acoplados a una membranas de un poro de 12 kDa, electroeluidas con tampón de electroelución conteniendo 0,05% SDS en el cátodo y el mismo tampón sin SDS en el ánodo, durante 4 horas a 50 mA y 25°C, y finalmente electrodializadas en la misma carcasa de electroelución con el tampón sin SDS durante toda la noche a 20 mA y 4°C (*Model 422 Electro-Eluter, BIO-RAD*).

Las proteínas ya electroeluidas fueron recogidas, concentradas por liofilización y estimadas sus concentraciones a partir de cantidades conocidas de BSA mediante un análisis densitométrico (*software Quantity One* de *BIO-RAD*) de un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie.

3.10. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los complejos de la ProTα y las proteínas SET, ANP32A y ANP32B purificadas y contenidas en las bandas teñidas con Coomassie en geles de SDS-PAGE se analizaron mediante espectrometría de masas MS/MS en trampa iónica por nLC-ESI-Trampa (espectrómetro de masas *AMAZON ETD* de *BRUKER*), en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Santiago de Compostela.

Las bandas de los complejos de la ProTα se procesaron de dos formas diferentes previamente al análisis de espectrometría de masas. Así, las bandas de los complejos purificados y teñidos con Coomassie (punto 3.7) fueron cortadas en dos fragmentos iguales, uno antes del análisis de MS/MS se sometió a tratamiento térmico (a 100°C en 100 µl de agua *MilliQ* durante 90 minutos) para propiciar la ruptura de los enlaces de formaldehido previamente a la digestión con tripsina, y el otro fue sometido directamente al tratamiento con tripsina para su posterior análisis espectrométrico.

Además, se analizaron por espectrometría de masas las diferentes bandas en que se desdoblan los complejos de la ProTα en células en proliferación después del tratamiento térmico, que se describe en el punto 3.8.

Las bandas purificadas y teñidas con Coomassie de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B procedentes de extractos de células no tratadas con formaldehido se analizaron directamente por MS/MS.

3.11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα, anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B en los diferentes fraccionados fue determinada mediante un análisis densitométrico (*software Quantity One* de *BIO-RAD*) de los respectivos *immunowestern blot*, utilizando como referencia los análisis densitométricos de *blots* de cantidades conocidas de las proteínas ProTα, SET, ANP32A y ANP32B analizadas en paralelo.

3.12. ISOELECTROENFOQUE

El fraccionado 1M de intercambio iónico de extracto citoplasmático de células Jurkat proliferantes tratadas con formaldehido (200 µg por canal) fue separado por isoelectroenfoque. Este se llevó a cabo según lo descrito en trabajos previos (Franco *et al.,* 1992). Brevemente, las muestras fueron aplicadas en láminas PAG con un rango de pH 3,0-9,0 (*GE Healthcare BioSciences*) y separada 2,5 horas (2000 V, 25 mA, 25 W), usando una *LKB Multiphor isoelectric focusing cell* temostatizada a 10°C. El gel de isoelectroenfoque fue fijado con ácido tricloroacético/sulfosalicílico y teñido con Azul Brillante de Coomassie G.

3.13. FPLC DE INTERCAMBIO IÓNICO

Una alícuota (del orden de 8 mg) de extracto citoplasmático de células Jurkat tratadas con formaldehido fue cromatografiado mediante FPLC (*Fast Protein liquid chromatography*) en un aparato AKTA FPLC (*Pharmacia*) acoplado a una columna de intercambio iónico Mono Q de 5 ml (*Pharmacia*), siguiendo las indicaciones del fabricante. La cromatografía se realizó a un flujo constante de 1 ml/minuto. La columna fue lavada y equilibrada con el tampón de equilibrado. Después, la muestra fue centrifugada (1.500xg, 10 minutos, 4ºC), filtrada (0,22

µm) y cargada en la columna. Se recogió el volumen vacio y se lavó la columna con 5 ml de tampón de equilibrado. Finalmente, se realizó una elución continua con tampón de equilibrado conteniendo NaCl hasta una concentración final de 1 M, recogiéndose 70 fracciones de elución de 0,5 ml cada una.

Alícuotas de las fracciones (60 µl) fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y teñidas con Coomassie (como se describe en el punto 3.4) o analizadas por *immunowestern blot* con anti-ProTα, anti-SET y anti-ANP32A/B (mediante transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6).

3.14. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR

Alícuotas (del orden de 6 mg) de extracto citoplasmático de células Jurkat no tratadas con formaldehido fueron cromatografiadas en una columna Superdex 200 10/300 GL (*Tricorn, High Performance Columns Amersham*) en tampón de filtración molecular a un flujo de 0,45 ml/minuto. Se recogieron 19 fracciones de 1 ml hasta un volumen final de elución de 19 ml. Las últimas 10 fracciones fueron concentradas por liofilización, resuspendidas en agua (200 µl) y determinadas sus concentraciones por el test de Bradford (Bradford, 1976).

Las fracciones concentradas (20 µg de cada una) fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα, anti-SET y anti-ANP32A/B (mediante transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6).

3.15. ENSAYOS DE COINMUNOPRECIPITACIÓN

Los ensayos de coinmunoprecipitación en extractos citoplasmáticos (2 mg) de células Jurkat no tratadas con formaldehido se realizaron con 20 µg de los anticuerpos anti-CT-ProTα, anti-SET, anti-ANP32A, anti-ANP32A/B y anticuerpo preinmune acoplados a proteína G inmovilizada en agarosa (20 mg) según el protocolo descrito por Harlow & Lane, 1988. Brevemente, el acoplamiento a proteína G-agarosa se llevó a cabo en PBS durante 1 h a 4°C con agitación suave. A continuación, los complejos anticuerpo-proteína G fueron lavados con tampón borato, se les añadió dimetilpimelimidato (DMP) a una concentración final de 20 mM en el mismo tampón para una unión covalente y se incubaron durante 30 minutos con agitación. Finalmente, la reacción de acoplamiento se detuvo mediante la incubación con 0,1

M Tris-HCl pH 8, seguida de 2 lavados con tampón NET y resuspensión en PBS. Los complejos fueron obtenidos por centrifugación a 420xg durante 1 minuto.

En la inmunoprecipitación la muestra de extracto citoplasmático fue incubada primero con el anticuerpo preinmune acoplado a proteína G durante 2 horas a 4°C con agitación y a continuación, con el correspondiente anticuerpo (anti-CT-ProTα, anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B) durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Pasado ese tiempo, la mezcla de incubación se centrifugó (420xg durante un minuto) y los sedimentos resultantes, junto con los obtenidos de la incubación con el anticuerpo preinmune, fueron lavados 2 veces con tampón NET y 2 veces con PBS (5 minutos a 25°C con agitación). Los inmunoprecipitados se eluyeron con 40 µl de tampón de muestra 1,5X; se calentaron a 100°C durante 5 min y se microfugaron.

Los inmunocomplejos obtenidos y una alícuota (30 µg) del extracto citoplasmático fueron separados por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizados mediante *immunowestern blot.* Los inmunocomplejos precipitados con anti-CT-ProTα fueron inmunodetectados con los anticuerpos anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B (mediante transferencia en condiciones estándar), y los inmunoprecipitados con anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B fueron inmunodetectados con anti-CT-ProTα (mediante transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6).

3.16. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A ProTα

A la matriz de la columna de cromatografía Sepharosa 4B preactivada con CNBr se le acopló la ProTα purificada de timo de ternera (Franco *et al.,* 1992) según el procedimiento recomendado por el fabricante a una concentración de 1 mg proteína/ml de matriz. La eficacia del acoplamiento, que fue determinada por ensayo colorimétrico de la proteína no ligada (Bradford, 1976), fue siempre superior al 85%.

Una alícuota (15 mg) de extracto citoplasmático de células Jurkat no tratadas con formaldehido fue cromatografiada a través de 1 ml de matriz de ProTα-Sepharosa depositada en una columna y equilibrada en tampón de afinidad. Se recogió la fracción no retenida y se lavó la columna con el tampón afinidad conteniendo 0,15 M NaCl. Finalmente, la fracción de alta afinidad a la ProTα fue eluida con tampón de afinidad conteniendo 1 M NaCl, concentrada y dializada contra tampón de afinidad mediante centrifugación en concentradores Amicon (límite de exclusión de 10 kDa), y determinada su concentración por el test de Bradford (Bradford, 1976).

Alícuotas de la fracción de alta afinidad a la ProTα y de extracto citoplasmático (50 µg de cada uno) fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y respectivamente analizadas por *immunowestern blot* con anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B (mediante transferencia en condiciones estándar como se describe en el punto 3.6).

3.17. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia de las células Jurkat se siguió el protocolo de Tinari *et al.,* 2008. Brevemente, las células ($5 \cdot 10^5$) fueron centrifugadas (900xg, 5 minutos), lavadas con PBS y fijadas con 3,7% paraformaldehido en PBS (5 ml) durante 15 minutos a 25°C. Después, fueron lavadas 2 veces con PBS, resuspendidas en 20 µl PBS y depositadas sobe cubreobjetos previamente tratados con poli-L-Lisina (0,1 mg/ml). Después de 30 minutos a 25°C, fueron lavadas con PBS y permeabilizadas con 0,2% Tritón X-100 en PBS durante 2 minutos. Se lavaron de nuevo con PBS 3 veces y se incubaron con 3% BSA en PBS durante 1 hora a 25°C.

Los anticuerpos primarios fueron diluidos en 3% BSA en PBS (ver tabla) y la incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 25°C. Después de 4 lavados con PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en 3% BSA en PBS, incubándolos durante 45 minutos a 25°C en oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con DAPI diluido (0,2 µg/ml) en la mezcla de incubación de los anticuerpos secundarios.

Finalmente, se lavaron 2 veces con PBS, se añadió una gota de Mowiol 4-88 a los cubreobjetos y estos se montaron en el portaobjetos para su observación en un microscopio confocal espectral *Leica* TCS-SP_2 con software *Leica,* y la captura de imágenes se realizó con una cámara *Leica* DFC 350 FX.

PROTEÍNA	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
ProTα	anti-NT-ProTα (d: 1/2.000)	anti-conejo (d: 1/5.000) (*Alexa 488*)
SET	anti-SET (d: 1/250)	anti-conejo (d: 1/5.000) (*Alexa 488*)
ANP32A y ANP32B	anti-ANP32A/B (d: 1/250)	anti-conejo (d: 1/5.000) (*Alexa 488*)
ANP32A	anti-ANP32A (d: 1/250)	anti-cabra (d: 1/5.000) (*Alexa 594*)

3.18. ENSAYOS DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA

3.18.1. Preparación de extractos de células Jurkat apoptóticas

Las células Jurkat inducidas a apoptosis con estaurosporina o actinomicina D como se decribe en el punto 3.1.7 fueron lisadas siguiendo el protocolo descrito por Liu & Wang, 2000. Brevemente, las células fueron recolectadas de los cultivos por centrifugación (900xg, 10 minutos, 4°C), lavadas dos veces con PBS frio y resuspendidas en 5 volúmenes de tampón de lisis de células Jurkat apoptóticas a 4°C. Tras 30 minutos en hielo, la resuspensión celular fue homogeneizada en un *potter*, centrifugada (900xg durante 10 minutos a 4°C) y posteriormente, el sobrenadante fue ultracentrifugado (100.000xg durante 1 hora a 4°C) para obtener el extracto citoplasmático. La concentración de los extractos se determinó por el test de Bradford (Bradford, 1976).

3.18.2. Ensayos de la actividad caspasa 9 y caspasa 3

Las actividades caspasa 9 y 3 de los extractos citoplasmáticos obtenidos por el procedimiento descrito en el apartado anterior se ensayaron *in vitro* en una mezcla de reacción conteniendo 20 µg de extracto citoplasmático, los sustratos fluorogénicos de la caspasa 9 (LEHD-AMC) o de la caspasa 3 (DEVD-AMC) a una concentración final de 25 µM y

tampón de ensayo de actividad de la caspasa 9 (adaptado de Zou *et al.,* 2003) o tampón de ensayos de la actividad de la caspasa 3 (adaptado de Genini *et al.,* 2000) respectivamente hasta completar un volumen final de 100 µl.

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante el tiempo indicado en cada caso y la actividad de las caspasas 9 y 3 fue determinada en un fluorímetro F-2000 (*HITACHI*) a partir de la intensidad de la fluorescencia generada (excitación a 360 nm – emisión a 460 nm) por el resto fluorocrómico liberado tras la rotura del respectivo sustrato sintético.

3.18.3. Extracción de DNA y electroforesis

Las células apoptóticas fueron lisadas para extraer el DNA y comprobar su fragmentación nucleosómica según el procedimiento descrito por Labrada *et al*., 2002. Brevemente, las células se resuspendieron ($3{,}3 \cdot 10^7$ células/ml) en tampón TE con 1% SDS, se les añadió NaCl a una concentración final de 1M y se dejaron 12 horas a 4°C. Después se centrifugaron (10.000xg, 10 minutos), se recogió el sobrenadante, se ajustó la concentración de SDS a 0,5% y se incubó con proteinasa K y RNasa A a una concentración final de 200 µg/ml y 50 µg/ml durante 1 hora a 37°C. Seguidamente, el DNA fue extraído con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y precipitado con 2 volumenes de etanol 100% durante 5 minutos a 25°C. Se microcentrifugó durante 5 minutos y se resuspendió con 20 µl de TE con 50 µg/ml RNasa A.

El DNA recuperado fue visualizado mediante electroforesis en un gel de 1,5% agarosa con 0,5 µg/ml bromuro de etidio.

IV. RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV. RESULTADOS

1. ESTABILIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES TRANSITORIAS DE LA PROTα EN LINFOCITOS EN PROLIFERACIÓN MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE ENLACES CRUZADOS CON FORMALDEHIDO.....67

2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS INMUNOREACTIVOS CON ANTI-PROTα.....75

2.1. Identificación de los componentes en los complejos de la ProTα.....77

2.2. Cuantificación del nivel celular de la ProTα de los complejos.....82

3. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES *IN VIVO* DE LA PROTα CON LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B.....84

3.1. Estudio de la co-purificación cromatográfica.....84

3.2. Cuantificación de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres y asociadas en los complejos.....91

3.3. Estudio de las interacciones de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B mediante coinmunoprecipitación y afinidad a ProTα-Sepharosa.....95

3.4. Estudio de la citolocalización de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B mediante inmunofluorescencia.....98

4. ESTUDIO DE LA TRANSCENDENCIA BIOLÓGICA DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTα CON LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B.....101

4.1. Estudio de las interacciones de la ProTα en células con baja actividad proliferativa.....101

4.2. Estudio de las interacciones de la ProTα en células en apoptosis.....107

4.3. Análisis comparativo de las interacciones de la ProTα en células Jurkat en proliferación, con baja actividad proliferativa y en apoptosis.....115

4.4. Estudio de las interacciones de la ProTα en células en apoptosis inducida por Actinomicina D.....122

5. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROT α EN CÉLULAS 293T.....126

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV. RESULTADOS

1- ESTABILIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES TRANSITORIAS DE LA PROTα EN LINFOCITOS EN PROLIFERACIÓN MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE ENLACES CRUZADOS CON FORMALDEHIDO

El estudio de componentes celulares que forman parte de complejos resultantes de interacciones proteína-proteína débiles o transitorias es difícil de abordar únicamente con el uso de técnicas bioquímicas clásicas, dado que estos componentes pueden perderse en las condiciones de lavado usadas para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente. Esto se puede evitar induciendo, previamente a la purificación de los complejos, la formación de enlaces covalentes entre sus componentes mediante el uso de moléculas co-enlazadoras (*cross-linkers*) que unan químicamente las proteínas de forma estable. Una de estas moléculas es el formaldehido.

El formaldehido establece enlaces cruzados entre las proteínas a través de los grupos amino primarios de las lisinas y el nitrógeno del grupo amido del enlace peptídico. Además, presenta unas características que lo hacen útil para la identificación de interacciones proteína-proteína:

1. El formaldehido presenta una distancia corta de unión de solo 2Å, por lo que las proteínas que son ligadas deben de estar físicamente muy próximas.
2. Es permeable a las membranas celulares y bastante inespecífico, esto lo hace válido para la detección de un amplio rango de interacciones.
3. Es conocido que el formaldehido inactiva las enzimas casi inmediatamente a su adición a las células, manteniendo como si fuera una fotografía instantánea las interacciones que ocurren en el momento de la adición.
4. Una vez que la reacción de unión o *cross-linking* se completó, el producto puede ser sometido a condiciones no fisiológicas sin perder su estructura.
5. Las uniones o *cross-links* son reversibles, lo que permite un análisis posterior de los componentes del complejo.
6. El procedimiento de tratamiento de las células con formaldehido es simple.

Por estos motivos se usó el formaldehido para la estabilización de las posibles interacciones de la ProTα con otras proteínas en células de mamíferos en proliferación.

El tratamiento con formaldehido para la formación de enlaces cruzados se realizó en células Jurkat, una línea celular de linfoma humano de células T, ya que, como se describe en la introducción, los linfocitos presentan una alta concentración de la ProTα. En el procedimiento se siguieron las indicaciones de trabajos previos en los que se llevaron a cabo experimentos similares para caracterizar interacciones entre proteínas, para luego analizar estos complejos por espectrometría de masas (Vasilescu *et al*., 2004; Huyen *et al*., 2004). Las células Jurkat en proliferación se incubaron con 1% de formaldehido ($5 \cdot 10^6$ células/ml). A continuación, se lisaron las células para obtener los subfraccionados citosólico y nuclear, sus componentes fueron separados por SDS-PAGE y analizados, bien por tinción con Azul de Coomassie o determinada la presencia de la ProTα y de los posibles complejos de esta con otras proteínas por *immunowestern blot*. Esta inmunodetección se realizó usando dos anticuerpos policlonales anti-ProTα generados contra epitopos de su secuencia localizados en los segmentos N-terminal: anti-NT-ProTα (secuencia epitopo 1-21) y C-terminal: anti-CT-ProTα (secuencia epitopo 95-109) y purificados por afinidad a ProTα-Sepharosa (como se describe en Material y Métodos 3.5). La utilización de los dos anticuerpos facilita una mejor inmunocaracterización y conocimiento de los complejos de la ProTα, y por otra parte, el uso de estos anticuerpos va a permitir diferenciar la presencia de la Timosina α_1 ($T\alpha_1$) y de la propia ProTα en los complejos, puesto que el anticuerpo anti-CT-ProTα no detecta a la $T\alpha_1$ (Sarandeses *et al*., 2003). Además, una cuestión a tener en cuenta en los experimentos de *western blot* es la dificultad para retener a la ProTα en las membranas habitualmente usadas en estos análisis, debido a su pequeño tamaño (12,5 kDa) y carácter acídico (pI 3,55). Por ello, para la búsqueda de complejos de la ProTα se utilizó, además del procedimiento habitual, el procedimiento descrito previamente para transferir la ProTα (Covelo *et al*., 2006). Así, se realizó una transferencia específica de los diferentes fraccionados a membranas de nitrocelulosa activadas mediante el tratamiento con 1% glutaraldehido (como se describe en Material y Métodos 3.6). La figura 1 muestra el resultado del análisis por SDS-PAGE de los componentes citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células tratadas y sin tratar con formaldehido, teñidos con Azul de Coomassie o analizados por *immunowestern blot*.

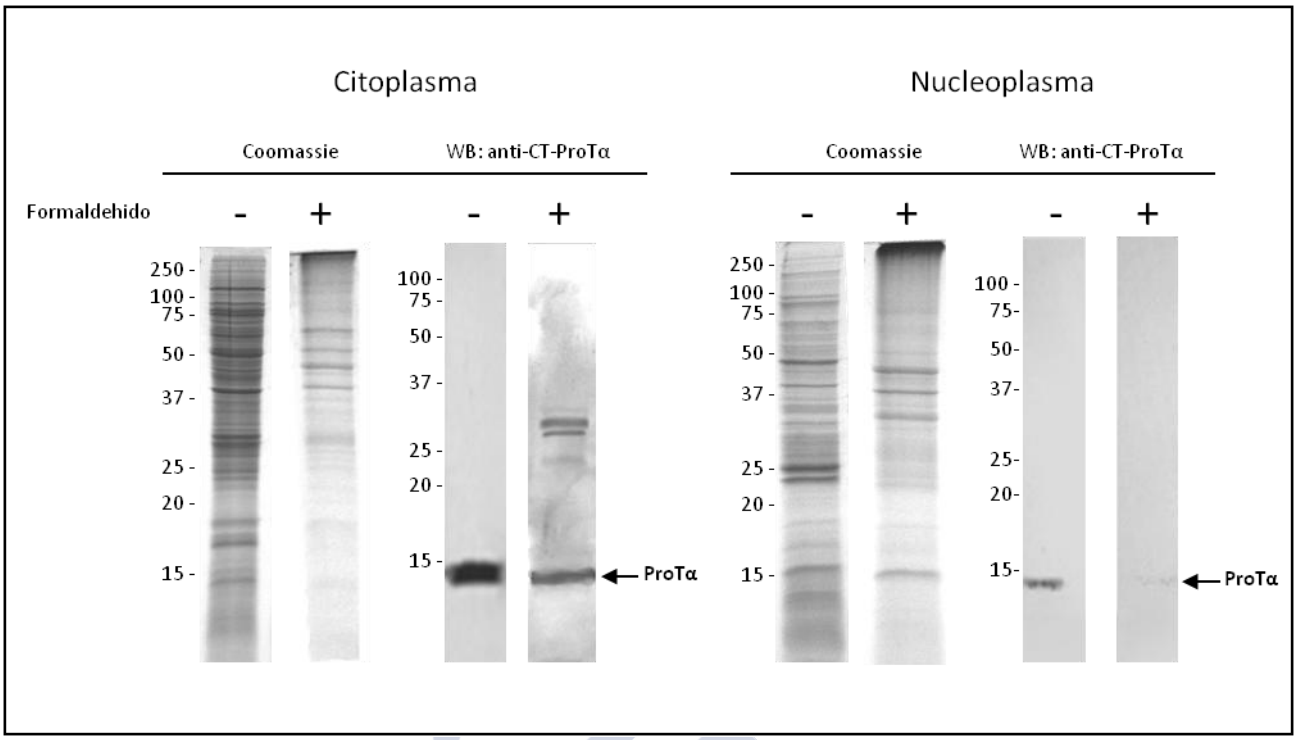


Figura 1. Análisis electroforético e *immunowestern blot* anti-ProTα de los componentes en extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat tratadas y no tratadas con formaldehido.
Alícuotas de los extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat, tratadas o no tratadas con 1% formaldehido, fueron separados por SDS-PAGE (15% acrilamida) y teñidos con Azul de Coomassie o analizados por *western blot* con anti-CT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6). Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa. La flecha indica la movilidad de la ProTα.

En la tinción con Azul de Coomassie se puede ver que las células Jurkat tratadas con formaldehido, debido a la capacidad de este para formar complejos estables entre proteínas, presentan un patrón de los componentes celulares diferente a las células sin tratar, apreciándose una clara disminución del número de bandas de proteína, una variación de los pesos moleculares de las mismas y una acumulación de material proteico de alto peso molecular en la cabeza del gel, más destacable en el caso del nucleoplasma. Este material presente en la cabeza del gel teñido con Coomassie podría corresponderse con grandes agregados proteicos mayores de 250 kDa que no logran penetrar en el gel de un tamiz de acrilamida del 15%, pero lo mismo sucede con geles de un menor tamiz de acrilamida del 8% (datos no mostrados). Los resultados no mostraron variación en el patrón de bandas cuando utilizamos una mayor concentración de formaldehido de 2% (datos no mostrados).

El análisis por *immunowestern* de estos extractos usando el anticuerpo anti-CT-ProTα revela que solo entre los componentes citoplasmáticos de células Jurkat tratadas con formaldehido se aprecian complejos inmunoreactivos con anti-CT-ProTα con una movilidad

inferior a la propia ProTα. Similar resultado se obtuvo utilizando el anticuerpo anti-NT-ProTα (datos no mostrados).

Dado que este análisis se realizó en geles del 15% de acrilamida se repitió el experimento de *immunowestern blot* empleando geles del 8% de acrilamida, para lograr una mayor migración de posibles complejos de la ProTα de mayor peso molecular, que no fuesen detectados en las condiciones anteriores. Los resultados no mostraron nuevos complejos inmunoreactivos a anti-CT-ProTα ni a anti-NT-ProTα diferentes a los anteriores tanto en el citoplasma como en el nucleoplasma (datos no mostrados).

En cuanto a la localización casi exclusivamente citoplasmática de la ProTα, especialmente en las células no tratadas y aparentemente también en las células tratadas con formaldehido, se ha demostrado que entre esta ProTα citosólica se incluye también y mayoritariamente la ProTα de ubicación nuclear, que con el proceso extractivo, aunque se mantengan unas cuidadas condiciones isotónicas, se produce un inevitable vertido en el citoplasma de la ProTα nuclear en todo tipo de células de mamíferos (Manrow *et al.,* 1991; Enkeman *et al*., 2000; Covelo *et al.,* 2006).

Para progresar en el estudio de los posibles complejos inmunoreactivos a anti-ProTα, con la finalidad de lograr un enriquecimiento en la cantidad de estos complejos de la ProTα y para ver si aparecen otros nuevos no detectables por su baja concentración, procedimos a separar los componentes citoplasmáticos y nucleoplasmáticos por cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía se llevo a cabo mediante una elución secuencial con diferentes concentraciones de NaCl (0,2M; 0,5M y 1M) (como se describe en Material y Métodos 3.3).

En el esquema de la figura 2 se resume el proceso de búsqueda de complejos de la ProTα con otras proteínas en células Jurkat.

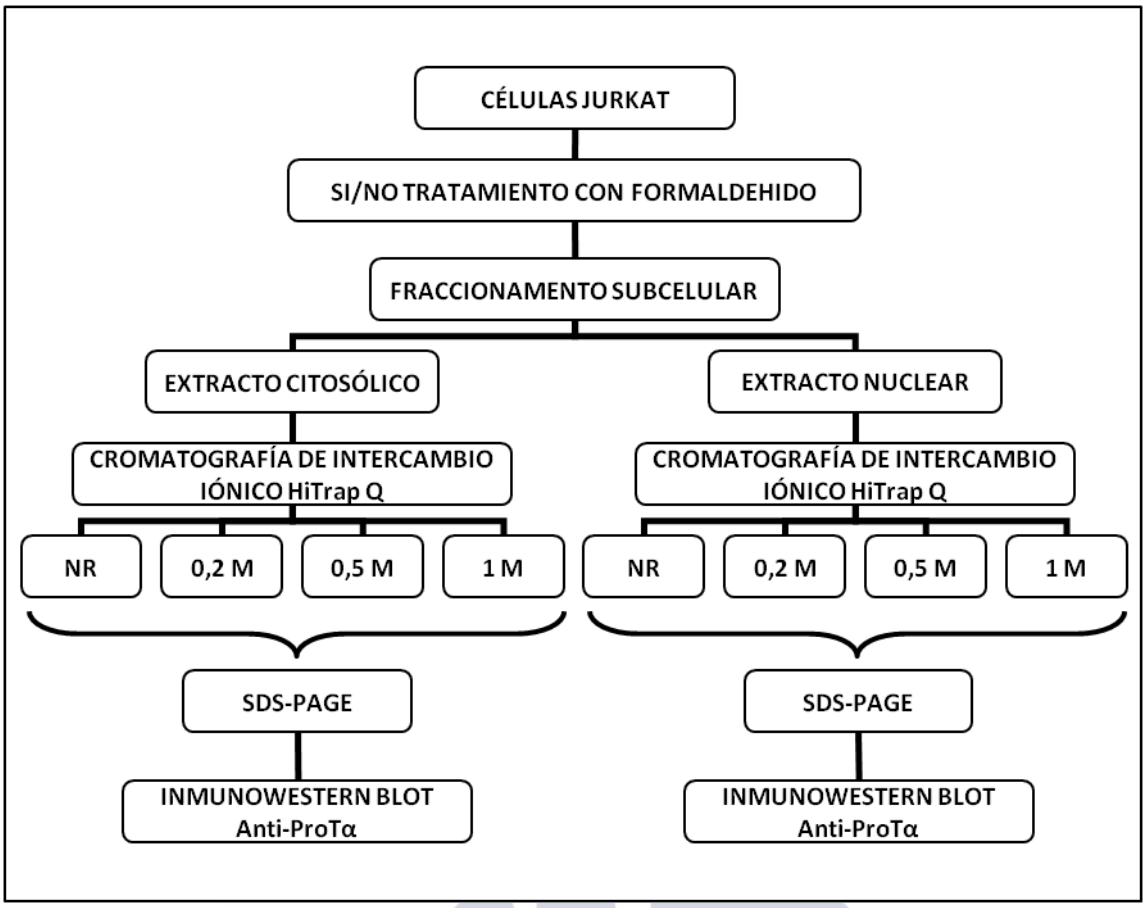


Figura 2. Esquema del proceso de búsqueda de complejos proteína-proteína inmunoreactivos a anticuerpos anti-ProTα.

Las concentraciones de proteína en los distintos extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat tratadas y sin tratar con formaldehido y sus fraccionados cromatográficos de intercambio iónico se presentan en la tabla 1. En la cuantificación se observa una notable diferencia en la concentración de proteína. El tratamiento con el formaldehido hace descender la concentración de la proteína soluble en un 60% en extractos citoplasmáticos y un 18% en nucleoplasmáticos. Diferencias que también se mantienen en los fraccionados de la cromatografía de intercambio iónico.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (µg/10^6 células)				
	EXTRACTO NO FRACCIONADO	FRACCIONES CROMATOGRAFÍA HiTrap Q			
		NR	0.2 M	0.5 M	1 M
Citoplasma (células sin tratar)	25,73±2,6	9,37±0,84	4,02±0,95	4,62±1,16	0,39±0,11
Citoplasma (células tratadas con formaldehido)	10,38±1,3	5,18±0,61	0,41±0,16	1,36±0,11	0,19±0,06
Nucleoplasma (células sin tratar)	9,58±1,8	1,98±0,23	1,18±0,17	2,34±0,57	0,10±0,03
Nucleoplasma (células tratadas con formaldehido)	7,8±1,13	1,05±0,21	0,33±0,12	1,69±0,50	0,07±0,01

Tabla 1: Concentración de los fraccionados de las cromatografías de intercambio iónico HiTrap Q.
Los subfraccionados celulares se cromatografiaron como se describe en Material y Métodos 3.3. La fracción NR es la fracción no retenida, y la 0,2M; 0,5M y 1M son las eluidas con tampón conteniendo la concentración indicada de NaCl. Todas las concentraciones se corresponden con medias±desviación típica de al menos cuatro experimentos diferentes.

El resultado del análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα de los diferentes fraccionados obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico de los subfraccionados citosólicos y nucleares de las células Jurkat tratadas o sin tratar con formaldehido se muestra en la figura 3.

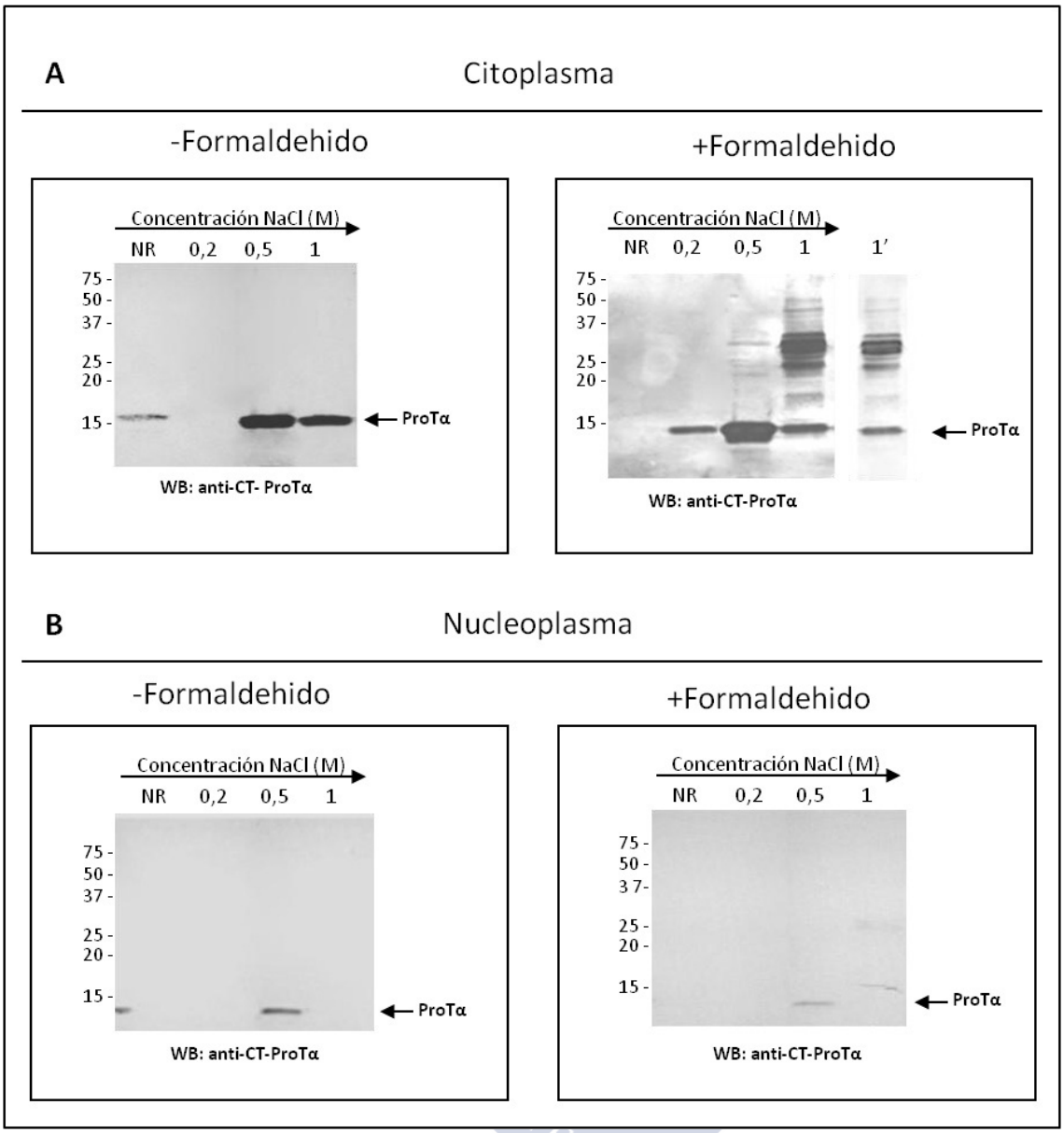


Figura 3. Análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα de los fraccionados de intercambio iónico de extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat sin tratar y tratradas con formaldehido.

A) *Immunowestern blot* anti-CT-ProTα de fraccionados de citoplasma.

Alícuotas de los distintos fraccionados eluidos con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M; 0,5M y 1M de células Jurkat sin tratar (-) o tratadas (+) con formaldehido, fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-CT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6). El canal 1´ (derecha del panel superior) se corresponde con una imagen con menos tiempo de revelado de la fracción 1M.

B) *Immunowestern blot* anti-CT-ProTα de fraccionados de nucleoplasma.

Alícuotas de los distintos fraccionados eluidos con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M; 0,5M y 1M de células Jurkat sin tratar (-) o tratadas (+) con formaldehido, fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-CT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6).

Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

De estos análisis se deduce la presencia de complejos inmunoreactivos al anticuerpo anti-CT-ProTα, especialmente ubicados en extractos citoplasmáticos, y se demuestra que la cromatografía de intercambio iónico fue muy eficaz en la concentración de los complejos, que se localizan exclusivamente entre los componentes más acídicos. Así, en la fracción 1M de citoplasma de células tratadas con formaldehido se observan siete complejos inmunoreactivos a anti-CT-ProTα en el rango de 50 kDa a 20 kDa, cuya visualización está favorecida en el canal 1´, correspondiente a un menor tiempo de revelado de los componentes eluidos con 1M NaCl. La presencia de estos complejos en la fracción 1M permite deducir que se tratan de complejos ácidos y por lo tanto las proteínas que acompañan a la ProTα pudieran ser también ácidas. Por el contrario, en el mismo análisis de las fracciones cromatográficas de nucleoplasma no se observa ningún complejo de la ProTα con movilidad inferior a 250 kDa, confirmándose lo observado en la figura 1.

El análisis con el anticuerpo anti-NT-ProTα no reconoció nuevos complejos ni en el citoplasma ni en el nucleoplasma (datos no mostrados). Esta doble inmunodetección confirma la presencia de la ProTα en una serie de complejos solubles estabilizados por el formaldehido en células Jurkat en proliferación.

Los mismos resultados se obtuvieron en el análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα y con anti-NT-ProTα de los fraccionados cromatográficos separados por SDS-PAGE en geles del 8% de acrilamida (datos no mostrados). No aparecieron nuevos complejos de mayor peso molecular tanto en las fracciones cromatográficas del citoplasma como del nucleoplasma que no pudiesen penetrar en el tamiz de un gel del 15% de acrilamida.

Por otra parte, en análisis de *immunowestern* con una transferencia realizada en condiciones estándar, no acídicas, no aparecen nuevos complejos inmunoreactivos con anti-CT-ProTα y con anti-NT-ProTα, y en los complejos de la ProTα en el rango de 35 kDa a 25 kDa se observa una mucha menor inmunoreactividad con los anticuerpos de la ProTα, probablemente por una menor eficiencia en la transferencia estándar (datos no mostrados).

2- PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS INMUNOREACTIVOS CON ANTI-PROTα

A continuación, iniciamos el estudio de los complejos solubles de la ProTα detectados mediante *immunowestern blot* en la fracción 1M de la cromatografía de intercambio iónico de citoplasma de células Jurkat tratadas con formaldehido. Primero, tratamos de establecer la correspondencia entre los complejos inmunodetectados y las proteínas presentes en los componentes de la fracción 1M separada por SDS-PAGE y teñida con Coomassie.

En la figura 4A se presenta la correspondencia entre las bandas de proteínas teñidas con Coomassie (asignadas como C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10) y los respectivos complejos de la ProTα inmunoreactivos según su movilidad electroforética. Para corroborar la correspondencia, las bandas indicadas en el gel teñido con Coomassie fueron fraccionadas en tres partes iguales y cada una separada por SDS-PAGE para una respectiva tinción con Coomassie o análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα y anti-NT-ProTα. En la figura 4B se puede observar el resultado de este análisis, del que se deduce que de las diez bandas de proteína analizadas solo seis fueron inmunoreactivas con ambos anticuerpos (C2, C5, C6, C7, C8 y C9), mientras que las bandas C1, C3, C4 y C10 no presentaron inmunoreactividad, bien por su baja concentración o por una baja inmunoreactividad en la fracción 1M. De acuerdo a su movilidad a estos seis complejos inmunoreactivos con anti-ProTα les asignamos los siguientes tamaños moleculares aparentes: C2-40 kDa, C5-34 kDa, C6-30 kDa, C7-28 kDa, C8-25k Da y C9-22 kDa.

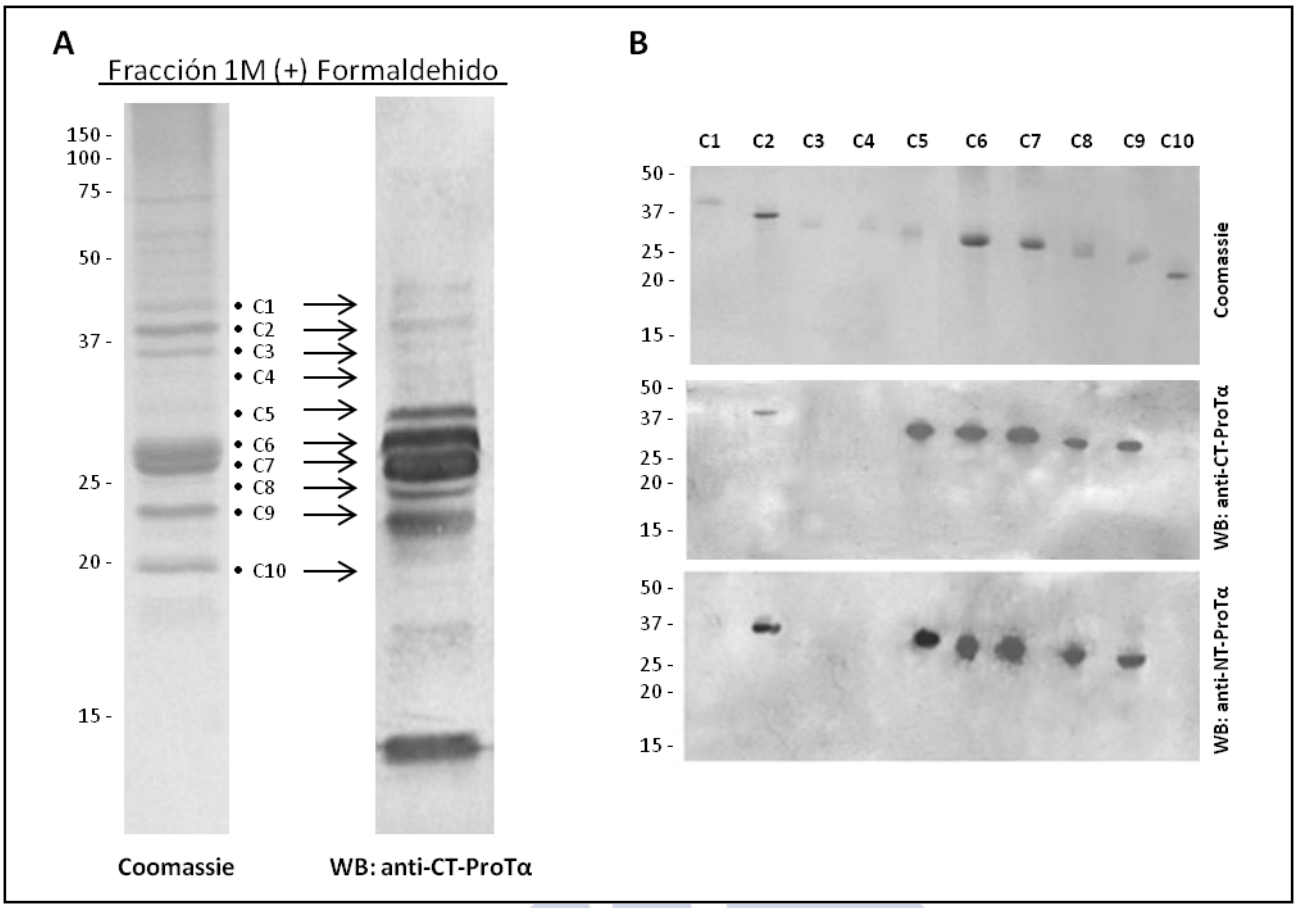


Figura 4. Análisis de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα de la fracción 1M de intercambio iónico de citoplasma de células Jurkat tratadas con formaldehido.
A) Identificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-CT- ProTα
Alícuotas de la fracción 1M del extracto citoplasmático de células Jurkat tratadas con formaldehido fueron separadas en paralelo por SDS-PAGE para su tinción con Coomassie o para su análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα. Se indica la correspondencia entre las bandas de proteína teñidas con Coomassie (C1 a C10) con los complejos del *immunowestern.*
B) Purificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα
Fragmentos de las bandas cortadas del gel teñido con Coomassie fueron separados por SDS-PAGE, teñidos con Coomassie o analizados por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα o anti-NT-ProTα (como se describe en Material y Métodos 3.7).

Para continuar con el estudio de los complejos se trató de determinar si las bandas inmunoreactivas con anti-ProTα se correspondían con complejos proteínicos estabilizados por el tratamiento con formaldehido, incluyendo en este análisis la banda con la movilidad de la ProTα en la fracción 1M. Para ello, alícuotas (dos tercios) de las bandas fueron sometidas a tratamiento térmico para propiciar la ruptura de los enlaces cruzados del formaldehido y separadas por SDS-PAGE. Alícuotas (un tercio) de las mismas bandas sin tratamiento térmico fueron paralelamente separadas por SDS-PAGE en los mismos geles.

El tratamiento térmico, como se aprecia en la figura 5, provoca la liberación de componentes de menor peso molecular en todos los complejos (C2-40 kDa, C5-34 kDa, C6-30 kDa, C7-28 kDa, C8-25 kDa y C9-22 kDa), y no en la banda con la movilidad de la ProTα. Lo que demuestra que estos complejos son el resultado de la asociación de varias proteínas con la ProTα. El patrón de proteínas observado en la figura 5 no varió aumentando el tiempo del tratamiento térmico (datos no mostrados). La identificación de las proteínas presentes en los complejos favorecerá la interpretación de los resultados de este experimento.

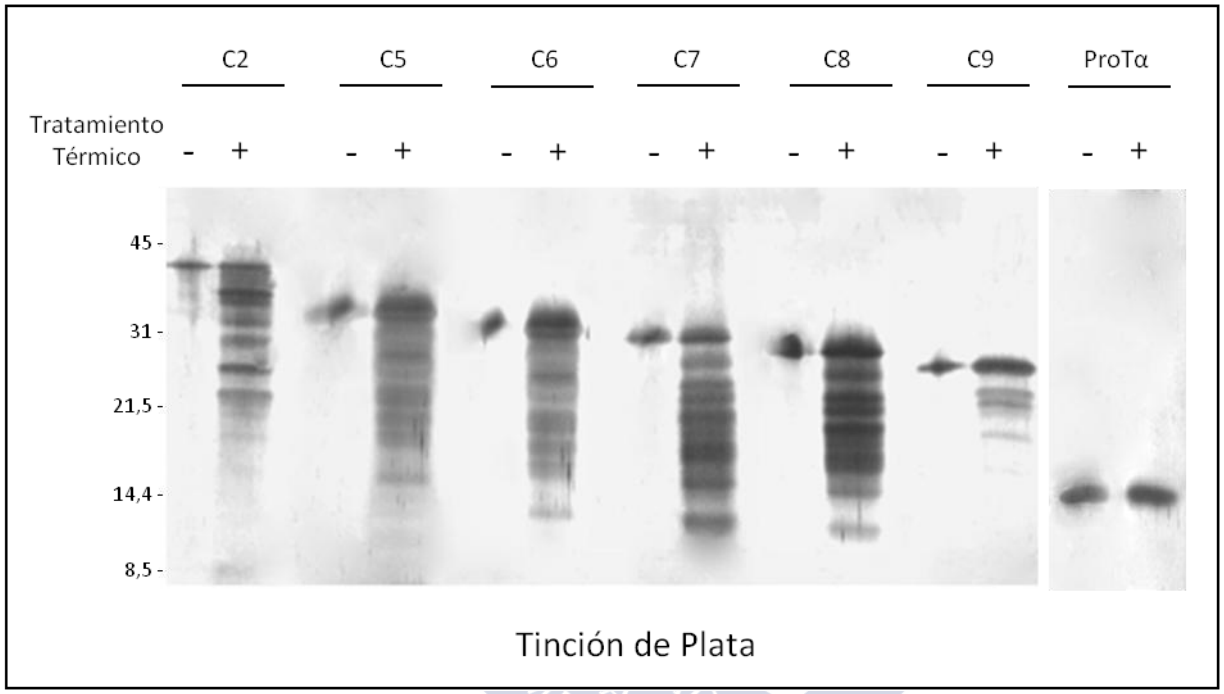


Figura 5. SDS-PAGE de las bandas con inmunoreactividad a anti-ProTα con y sin tratamiento térmico. Alícuotas de las bandas de las proteínas indicadas con tratamiento térmico (+) o no tratadas (-) correspondientes a los complejos inmunoreactivos con anti-ProTα fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con tinción de plata (como se describe en Material y Métodos 3.8). Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

2.1- Identificación de los componentes en los complejos de la ProTα

La caracterización de las proteínas que se asocian a ProTα en los complejos fue realizada por espectrometría de masas. Teniendo en cuenta que se trata de complejos proteicos con enlaces cruzados de formaldehido, el análisis se llevó a cabo a partir de los complejos purificados por SDS-PAGE, bien sometiendo el respectivo fragmento de acrilamida que los contiene a tratamiento térmico, para propiciar la ruptura de los enlaces de formaldehido, previamente al tratamiento con tripsina, o bien sometiendo los fragmentos directamente a la tripsinolisis. Además, se analizaron por espectrometría de masas las

diferentes bandas en que se desdoblan los complejos después del tratamiento térmico, que se muestran en la figura 5.

Los análisis (mostrados en la figura 1 del Anexo) indicaron que tanto las muestras sometidas a tratamiento térmico como las no tratadas presentaban los mismos componentes. Se encontraron solamente pequeñas diferencias en la espectrometría de alguna de las proteínas de los complejos, referidas a un ligero incremento del *score* y del número de péptidos identificados en muestras con tratamiento térmico.

Los resultados se resumen en la tabla 2, en la que se muestran los complejos inmunoreactivos con anti-ProTα ordenados por su movilidad electroforética en kDa y las proteínas identificadas en cada complejo dispuestas de mayor a menor *score* (siempre superior a 75).

El análisis espectrométrico de las bandas de los diferentes componentes de los complejos mostrados en la figura 5 (en la figura 2 del Anexo se muestran el análisis del complejo 40 kDa) reveló que las diferentes bandas liberadas por el tratamiento térmico de cada complejo se corresponden con asociaciones parciales de las proteínas del complejo original. Las bandas con la misma movilidad que la no tratada térmicamente presentan la misma composición que estas. Por lo que parece que con el tratamiento térmico no se consigue la completa reversión de los enlaces cruzados inducidos por el formaldehido.

A la vista de la composición de los seis complejos analizados llama la atención la presencia preponderante en estos complejos de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B, especialmente estas dos últimas, de manera que en cuatro de los seis complejos aparecen ambas ANP32A y ANP32B (complejos 30 kDa, 28 kDa, 25 KDa), o bien una de ellas ANP32A (complejo 34 kDa), mientras que SET aparece en los complejos 40 kDa y 22 kDa.

La proteína SET (también denominada PHAPII, TAF-I, I_2^{PP2A}) y las proteínas de la familia ANP32: ANP32A (también denominada PHAPI, pp32, I_1^{PP2A}) y ANP32B (también denominada PHAPI2, April) son proteínas multifuncionales de ubicación tanto citoplasmática como nuclear (Fan *et al.,* 2003; Kato *et al.,* 2011; Matilla & Radrizzani, 2005; Brennan *et al.,* 2000). Las secuencias de estas proteínas se muestran en la figura 6.

COMPLEJO (Movilidad electroforética)	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Células proliferantes
C2 (40 kDa)	• SET • β-actina • Proteína relacionada con MARCKS (MRP) • ProTα
C5 (34 kDa)	• Proteína mitocondrial transportadora de fosfato • Proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento, mitocondrial • ANP32A • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • ProTα • β-actina
C6 (30 kDa)	• ANP32A • ANP32B • ADP/ATP traslocasa 2 (ADT2) • ProTα • Subunidad α tipo 3 del proteasoma
C7 (28 kDa)	• ANP32A • ANP32B • ProTα
C8 (25 kDa)	• ANP32A • ANP32B • Proteina Rab-11A relacionada con Ras • ProTα
C9 (22 kDa)	• SET • ProTα

Tabla 2. Resumen de los resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M de citoplasma.

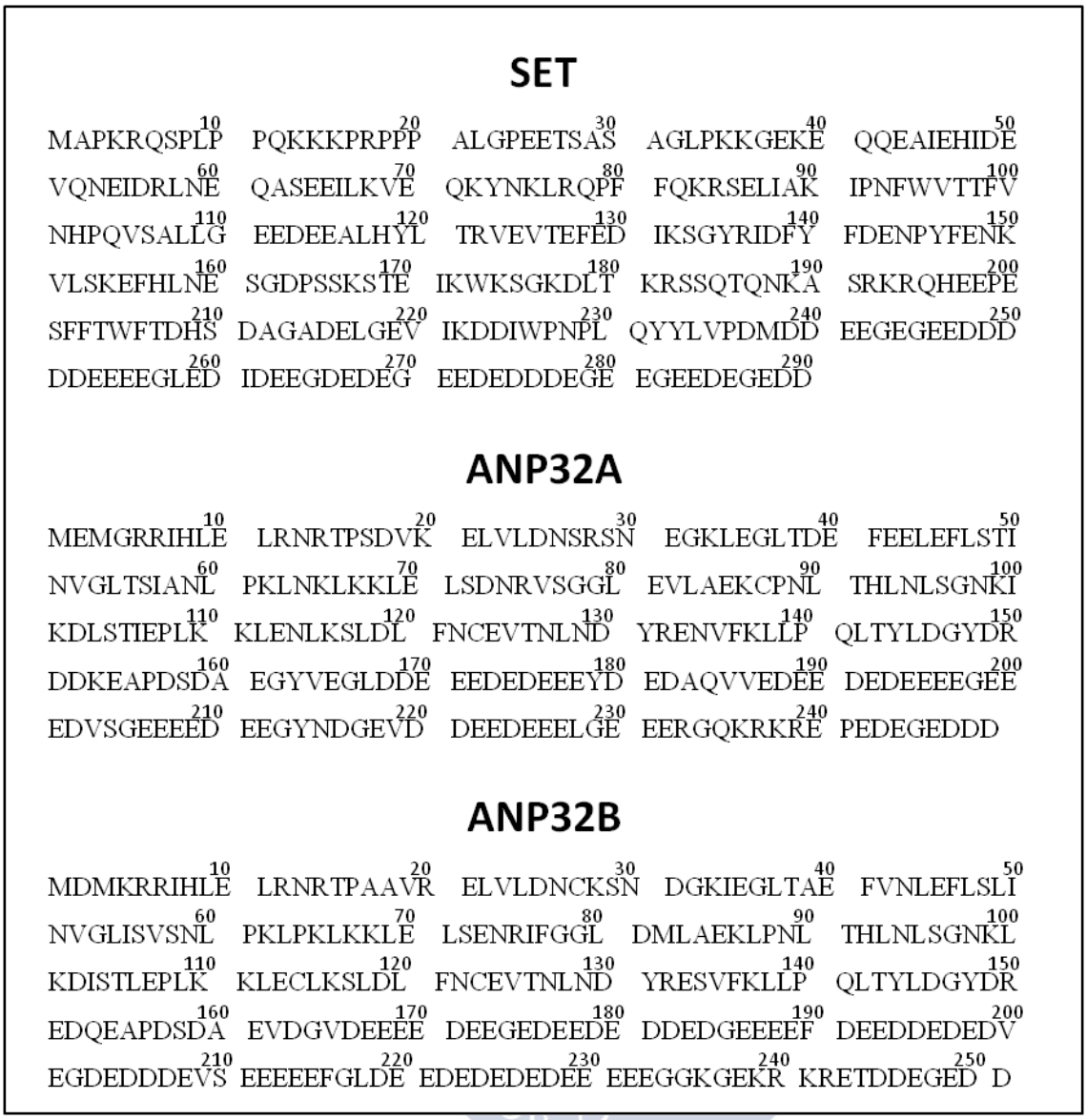


Figura 6. Secuencias de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B humanas.

Se tratan de proteínas estructuralmente relacionadas con la ProTα: amplia región acídica central, señal cariofílica y lugares de fosforilación (Ser y Thr) en su secuencia. Esta región de residuos de aminoácidos ácidos les confiere un pI muy bajo: 4,1 de SET; 3,8 de ANP32A y 3,8 de ANP32B.

La relación estructural les confiere, además, una importante similitud funcional de SET, ANP32A y ANP32B con la ProTα, especialmente como factores moduladores de la cromatina, funcionando como chaperonas de histonas facilitando la remodelación de los nucleosomas (Kato *et al.,* 2011; Matilla & Radrizzani, 2005; Tochio *et al.,* 2010), y también relacionadas con la modificación estructural de histonas. Así, se ha descrito la capacidad de un complejo de SET-

ANP32A (complejo INHAT) para regular la acetilación de las histonas (Seo *et al.,* 2001; Seo *et al.,* 2002).

Además de estas coincidencias en actividades funcionales de localización nuclear, hay que añadir que se han descrito las asociaciones de SET y ANP32A en actividades citoplasmáticas relacionadas con la apoptosis (Fan *et al.,* 2003; Jiang *et al.,* 2003; Fan *et al.,* 2006; Qi *et al.,* 2010), en algunas de las cuales la ProTα parece también estar implicada por mecanismos desconocidos en los que interviene también la ANP32A (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010). La ANP32B se ha relacionado también con la apoptosis (Roth *et al.,* 2001; Shen *et al.,* 2010), aunque en un mecanismo no relacionado con SET, ANP32A o la ProTα.

Por lo tanto, con la caracterización de estos complejos se demuestra por primera vez asociaciones *in vivo* de la ProTα con estas proteínas, que pudieran estar relacionadas con funciones comunes en la actividad biológica de las células Jurkat.

Respecto a las demás proteínas identificadas en los diferentes complejos, permiten relacionar, al menos a cuatro de los complejos: 40 kDa, 34 kDa, 30 kDa y 25 kDa, con actividades multifuncionales de ubicación citoplasmática, que de acuerdo con las actividades descritas para estas proteínas se corresponderían con mecanismos de proliferación, supervivencia y movilización de componentes celulares, tal es el caso de la β-actina (Lodish *et al.,* 2013) y la proteína relacionada con MARCKS (Sundaram et *al.*, 2004) del complejo 40 kDa. A esta propiedad responde la presencia de la subunidad α tipo 1 del proteasoma (Elenich *et al.,* 1999), la proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento (McGee *et al.,* 2011) y la propia β-actina en el complejo 34 kDa, aunque la presencia de la proteína mitocondrial transportadora de fosfato (Leung *et al*., 2008) en este complejo parece indicar una funcionalidad ligada a la actividad mitocondrial.

La presencia de la ADP/ATP traslocasa 2 mitocondrial (Liu & Chen, 2013) y la subunidad α tipo 3 del proteasoma (Elenich *et al.,* 1999) en el complejo 30 kDa, complejo que aparece en una mayor concentración que el de 34 kDa, denotaría una más preponderante función de localización citoplasmática–mitocondrial de los componentes de este complejo.

En cuanto al complejo de 25 kDa, la presencia de la proteína Rab-11A relacionada con Ras, implicada en la regulación del transporte entre membranas intracelulares de localización citoplasmática (Hutagalung & Novick, 2011), asociada a ANP32A, ANP32B y la ProTα, parece indicar también una función relacionada con la actividad citoplasmática en las células Jurkat.

Los complejos 28 kDa y 22 kDa, debido a las respectivas asociaciones exclusivas de ANP32A, ANP32B (en 28 kDa) y SET (en 22 kDa) con la ProTα, podrían relacionarse con actividades de localización citoplasmática y/o nuclear bien de carácter multifuncional o unifuncional.

Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia del formaldehido para estabilizar las interacciones de la ProTα con proteínas en células en proliferación. Asociaciones que derivan en la aparente formación de seis tipos diferentes de complejos, que tienen entre sus principales características su fuerte carácter acídico, que le confiere una baja masa molecular aparente electroforética. La no detección de complejos de la ProTα de aparente ubicación nuclear, relacionados con su demostrada interacción con histonas y otras proteínas relacionadas con la actividad de la cromatina, puede ser debida a la magnitud de los complejos que, tal como hemos demostrado previamente, presentan tamaños moleculares superiores a 700 kDa (Covelo *et al.,* 2006).

2.2- Cuantificación del nivel celular de la ProTα de los complejos

Una importante cuestión a resolver a continuación es establecer las proporciones del contenido celular de la ProTα implicada en las interacciones en los complejos descritos.

Para conocer la cantidad de la ProTα que está presente en sus complejos solubles se realizó un estudio densitométrico de los diferentes análisis de *immunowestern blot* de los extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de Jurkat tratadas y no tratadas con formaldehido y sus fraccionados cromatográficos, como los presentados en las figuras 1 y 3.

En la figura 7A se muestra la estimación de las concentraciones de la ProTα en extractos citoplasmáticos (118 ng/10^6células) y nucleoplasmáticos (6 ng/10^6células) de células Jurkat sin tratar con formaldehido, que se acompañan con la presentación de los niveles de la ProTα determinados en células tratadas con formaldehido: unos 39 ng/10^6células de ProTα no ligada a complejos y 10 ng/10^6células en los complejos solubles en extractos citoplasmáticos. Mientras que en los extractos nucleoplasmáticos se encontraron 2,2 ng/10^6células de ProTα libre y no se detecta su presencia en posibles complejos solubles.

En la figura 7B se representan las concentraciones relativas a la ProTα total en el citoplasma y nucleoplasma de células no tratadas con formaldehido, tanto de la ProTα libre de localización citoplasmática y nucleoplasmática (33%), como de la ligada a complejos solubles en el citoplasma (9%), de células tratadas con formaldehido. Y en la figura 7C se recoge la

abundancia relativa de los diferentes complejos solubles de la ProTα presentes en la fracción 1M de extractos citoplasmáticos.

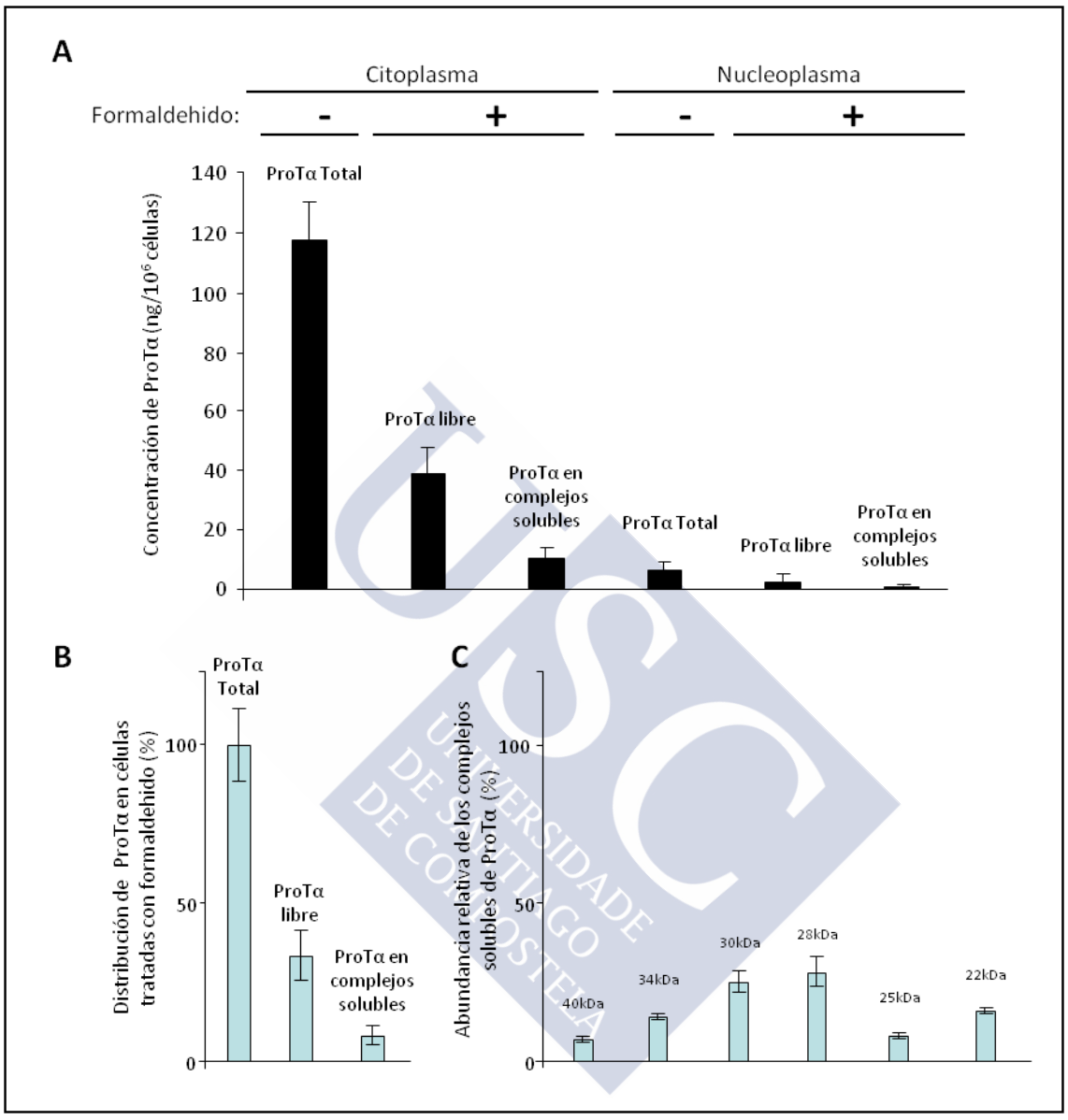


Figura 7. Cuantificación de la ProTα en células Jurkat tratadas y no tratadas con formaldehido.
A) Concentración de la ProTα en los extractos citoplasmáticos y nucleplasmáticos de células Jurkat tratadas y no tratadas con formaldehido.
El análisis densitométrico fue llevado a cabo como se describe en Material y Métodos 3.11.
B) Concentración relativa de la ProTα en células Jurkat tratadas y no tratadas con formaldehido
Concentraciones relativas al contenido total de la ProTα de la ProTα libre y ligada en complejos solubles en células tratadas con formaldehido. Analizadas tal como se indica en el panel A.
C) Concentraciones relativas de los complejos solubles de la ProTα de la fracción 1M de extractos citoplasmáticos.
La concentración de cada complejo de la ProTα fue relativizada a la concentración total de los complejos y representada en porcentaje.
Los valores son medias±desviación típica de cuatro análisis diferentes.

Estos datos confirman la predominante presencia de la ProTα en extractos citosólicos, debida a la descrita movilización al citoplasma de la ProTα nuclear durante el proceso extractivo en todo tipo de células, aún en condiciones isotónicas (Manrow *et al.,* 1991; Enkeman *et al*., 2000; Covelo *et al.,* 2006).

El tratamiento con formaldehido provoca la disminución de más de la mitad de la ProTα total, probablemente atrapada en complejos nucleares insolubles. Del resto, la mayoría de la ProTα está libre (33%) y solo un 10% se corresponde con la ProTα ligada a los seis complejos descritos de preferente localización citoplasmática. Refiriéndonos a estos complejos, sobresale la abundancia relativa de los complejos 30 kDa y 28 kDa que representan un 53% y contienen las proteínas ANP32A y ANP32B, que también están presentes en el complejo 34 kDa (14%) y 25 kDa (8%), los cuales destacan sobre los complejos 40 kDa y 22 kDa, que contienen la proteína SET y suman un 25% del total de los complejos de la ProTα.

El conjunto de estos resultados demuestra que solo una parte del contenido celular de la ProTα está implicada en las interacciones para constituir los complejos caracterizados, y, dadas las características de las proteínas presentes en estos complejos, estas interacciones parecen relacionarse con una función citoplasmática de la ProTα, especialmente relacionada con las actividades de SET, ANP32A y ANP32B.

3- ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES *IN VIVO* DE LA PROTα CON LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B

Para avanzar en la caracterización de las interacciones de la ProTα con las proteínas SET, ANP32A y ANP32B investigamos el comportamiento de estas proteínas en diferentes extractos de células Jurkat. Primero, analizando las capacidades de co-purificación de la ProTα con estas proteínas en extractos citoplasmáticos de linfocitos en separaciones cromatográficas, para después, pasar a demostrar la capacidad de coinmunoprecipitación y de afinidad a ProTα de SET, ANP32A y ANP32B, así como la localización celular de estas proteínas.

3.1- Estudio de la co-purificación cromatográfica

En primer lugar, se investigó el comportamiento de SET, ANP32A, ANP32B y de la propia ProTα en extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat tratadas y sin tratar con formaldehido realizando una cromatografía de intercambio iónico (como se describe

en Material y Métodos 3.3). Los diferentes fraccionados cromatográficos fueron analizados por *immunowestern blot* con los anticuerpos policlonales anti-SET y anti-ANP32A/B capaz de reconocer a ANP32A y ANP32B. El resultado se presenta en la figura 8.

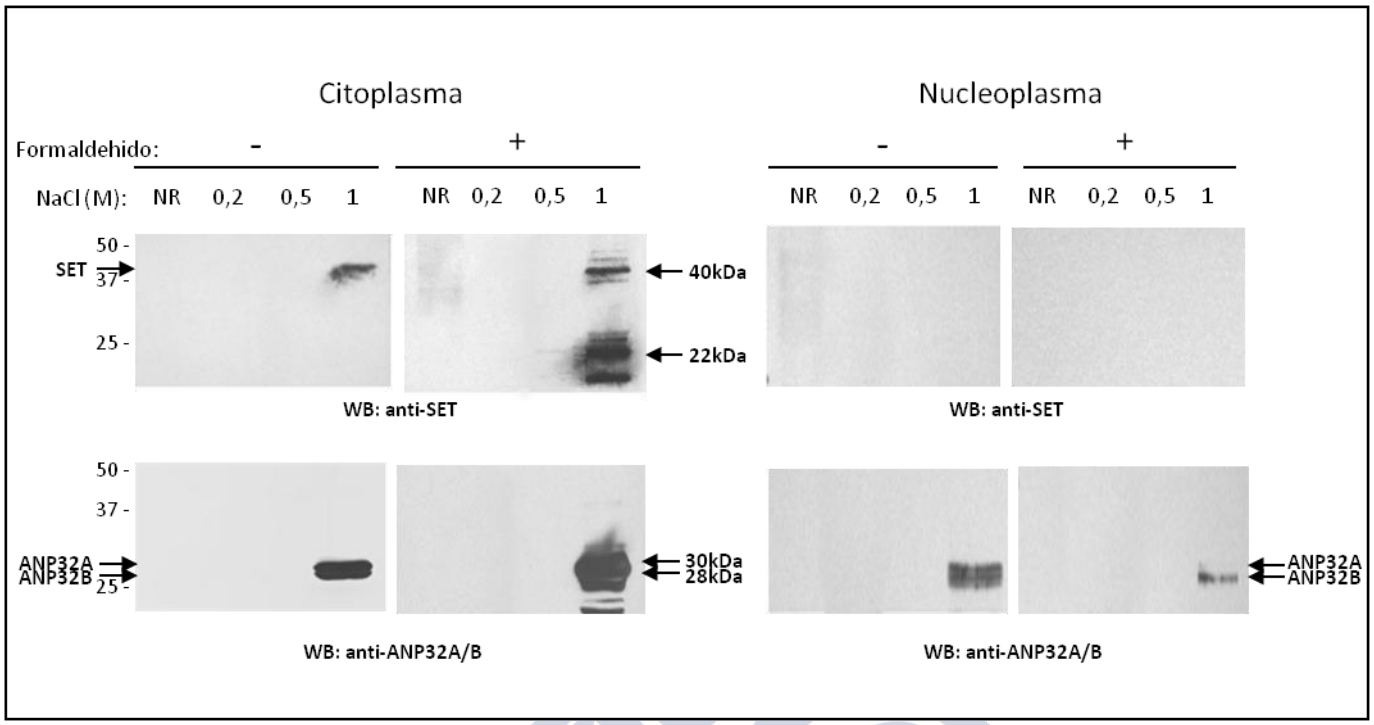


Figura 8. Análisis por *immunowestern blot* anti-SET y anti-ANP32A/B de los fraccionados de intercambio iónico de extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat sin tratar y tratradas con formaldehido.
Alícuotas de los fraccionados de citoplasma y nucleoplasma eluidos con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M, 0,5M y 1M de células Jurkat sin tratar (-) o tratadas (+) con formaldehido, fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-SET y anti-ANP32A/B (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6). Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

En los *blots* se puede apreciar como la proteína SET en las células no tratadas con formaldehido tiene exclusivamente una localización citoplasmática. Dada su prominente función nuclear (Kato *et al.,* 2011; Seo *et al.,* 2001), puede ser, como ocurre con la ProTα, que su exclusiva localización citoplasmática se debiera a un vertido del núcleo al citosol durante el proceso extractivo. En cambio, las proteínas ANP32A y ANP32B en los extractos de células Jurkat no tratadas con formaldehido presentan una localización citoplasmática y nuclear, aunque la cuantificación de estas proteínas en los *immunowestern blot* indica que en el citoplasma la concentración de ambas es 20 veces superior a la del núcleo.

Además, se puede observar la co-purificación, en las fracciones 1M, de las proteínas SET, ANP32A yANP32B entre los componentes más acídicos de los extractos de las células Jurkat, lo que, tal como se muestra en la figura 3, implica también una co-purificación con parte del contenido celular de la ProTα.

Del análisis de la figura 8 se deduce la coincidencia entre las movilidades de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres, de células no tratadas con formaldehido, con componentes inmunoreactivos con anti-SET y anti-ANP32A/B de las fracciones 1M de células tratadas, que a su vez, presentan movilidades coincidentes con complejos de la ProTα: 40 kDa, 30 kDa y 28 kDa. Coincidencia que pasamos a estudiar.

Para ello, nos propusimos purificar las proteínas SET, ANP32A y ANP32B entre los componentes acídicos que co-purifican en las fracciones eluidas con 1M NaCl en los extractos citoplasmáticos de células no tratadas con formaldehido, para compararlas con los componentes en la misma fracción 1M de citoplasma de células tratadas con formaldehido. Estos fraccionados fueron separados por SDS-PAGE y teñidos con Azul de Coomassie (Figura 9A). Las bandas del fraccionado 1M de las células sin tratar con formaldehido en el entorno de las movilidades de 40 kDa y 30-25 kDa marcadas con un asterisco en el panel A de la figura 9 (zonas de inmunoreactividad positiva con anti-SET y anti-ANP32A/B de la figura 8) fueron cortadas, purificadas y electroeluidas como se indica en Material y Métodos 3.9. Alícuotas de estas fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie o analizadas por *immunowestern blot* con anti-SET, ANP32A y anti-ANP32A/B. El resultado de este análisis, indicado en la figura 9B, junto con la espectrometría de masas de estas bandas (datos no mostrados) permitió identificar a las proteínas purificadas como SET, ANP32A y ANP32B con unas movilidades respectivas de: 40 kDa, 30 kDa y 28 kDa.

Como se deduce de la figura 9A, las movilidades de estas proteínas coinciden respectivamente con las de los complejos de la ProTα: C2-40 kDa, C6-30 kDa y C7-28 kDa. El análisis por *immunowestern blot* de los seis complejos de la ProTα indicados en la figura 9A, obtenidos por escisión de las bandas de dicho gel, usando anticuerpos anti-SET y anti-ANP32A/B, mostrado en la figura 9C, confirmó la coincidencia de las movilidades de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres con los complejos: C2-40 kDa, C6-30 kDa y C7-28 kDa, respectivamente. Además, se confirma la presencia de SET en el complejo C9-22 kDa y de ANP32A y ANP32B en el complejo C8-25 kDa, así como una débil señal de ANP32A en el complejo C5-34 kDa, lo que coincide con los resultados de la espectrometría de masas. Estos resultados indican que la separación electroforética hace indistinguible la movilidad de las

proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres, no enlazadas a la ProTα, de las que, respectivamente, aparecen unidas a ProTα en los complejos C2-40 kDa, C6-30 kDa y C7-28 kDa.

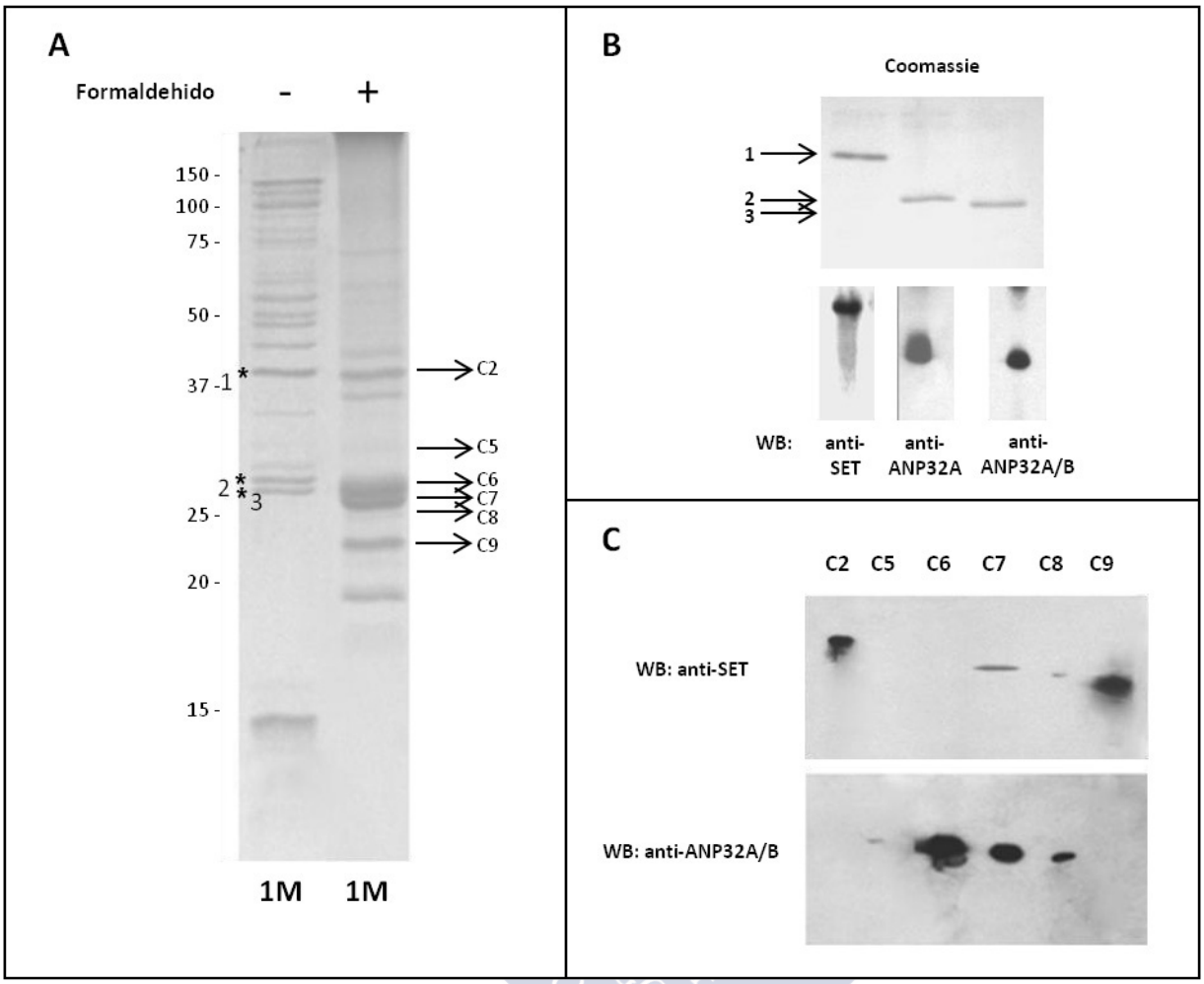


Figura 9. Purificación e identificación de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B en fracciones de células Jurkat sin tratar y tratadas con formaldehido.

A) Análisis de la movilidad electroforética de los fraccionados 1M de citoplasma de células Jurkat sin tratar y tratradas con formaldehido.

Alícuotas de los fraccionados 1M de citoplasma de células sin tratar (-) y tratadas (+) con formaldehido fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie. En la fracción 1M (-) se indica con un asterisco la región cuyas bandas coinciden con la movilidad de SET, ANP32A y ANP32B. En la fracción 1M (+) se señalan las bandas de los complejos de la ProTα identificados. Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

B) Análisis de las bandas de la misma movilidad que SET, ANP32A y ANP32B purificadas por electroforesis.

Las bandas de las proteínas del gel de 1M (-) del panel A indicadas con asterisco se cortaron y sus proteínas se obtuvieron por elución electroforética. Alícuotas de estas proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie (panel superior) o analizadas por *immunowestern blot* con anti-SET, anti-ANP32A o anti-ANP32A/B respectivamente (panel inferior) (como se describe en Material y Métodos 3.9).

C) Análisis de las bandas de los complejos de la ProTα por *immunowestern blot* con anti-SET y anti-ANP32A/B.

Las bandas de proteína asignadas como complejos de la ProTα en el gel 1M (+) en el panel A se cortaron. Alícuotas de cada banda fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por *immunowestern* con anti-SET (panel superior) o anti-ANP32A/B (panel inferior) (como se describe en Material y Métodos 3.7).

Llevamos a cabo, a continuación, un intento para separar y diferenciar las proteínas SET, ANP32A y ANP32B de sus complejos con la ProTα. Para esto se realizó una separación de estos componentes en extractos citoplasmáticos de células Jurkat tratadas con formaldehido por isoelectroenfoque (como se describe en Material y Métodos 3.12). El análisis no dio resultado, debido al muy bajo y estrecho rango de pI de estas proteínas (ProTα: pI 3,5; SET: pI 4,1; ANP32A: pI 3,8 y ANP32B: pI 3,8) (datos no mostrados). Aparentemente el elevado carácter acídico de estas proteínas y de la propia ProTα no solo altera el tamaño molecular aparente de los complejos de la ProTα, tal como refleja su movilidad electroferética, si no que también dificulta su separación cromatográfica.

En otro intento para separar y diferenciar estas proteínas de sus complejos procedimos a separar por FPLC de intercambio iónico mediante elución continua con NaCl un extracto citoplasmático de células tratadas con formaldehido. Alícuotas de las diferentes fracciones se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con Azul de Coomassie o bien por *immunowestern blot* usando los anticuerpos anti-ProTα, anti-SET y anti-ANP32A/B.

El resultado de este análisis se presenta en la figura 10. El panel A muestra el diagrama de elución por FPLC de un extracto citoplasmático de células Jurkat tratadas con formaldehido. En el panel B se recoge la separación por SDS-PAGE y tinción de Coomassie de alícuotas de las fracciones. De este análisis se deduce que los componentes con la movilidad electroforética de los complejos de la ProTα (ver figura 9A), cuyas posiciones se indican en el margen del panel B, eluyen entre los 17 y 23 ml. En los paneles C y D se presentan los análisis por *immunowestern blot* de las respectivas fracciones con anti-SET (panel C) y anti-ANP32A/B (panel D), los cuales indican la presencia esperada de SET en los complejos C2 y C9, y de ANP32A y ANP32B en los componentes marcados como C6 y C7. El *immunowestern blot* con anti-ProTα de los 17 a 23 ml (datos no mostrados) confirmó también la presencia de la ProTα entre los componentes con movilidad de C2, C6, C7 y C9.

Por lo tanto, estos resultados nos indican que la cromatografía de alta resolución no permite tampoco separar entre si los componentes más acídicos de las células tratadas con formaldehido que coinciden con los principales complejos en los que se caracterizó la presencia de la ProTα con la proteína SET (C2 y C9) y con ANP32A y ANP32B (C6 y C7). Además, no se observa diferencias entre las movilidades de SET, ANP32A y ANP32B nativas, que puedan considerarse indistinguibles de las de sus complejos con la ProTα.

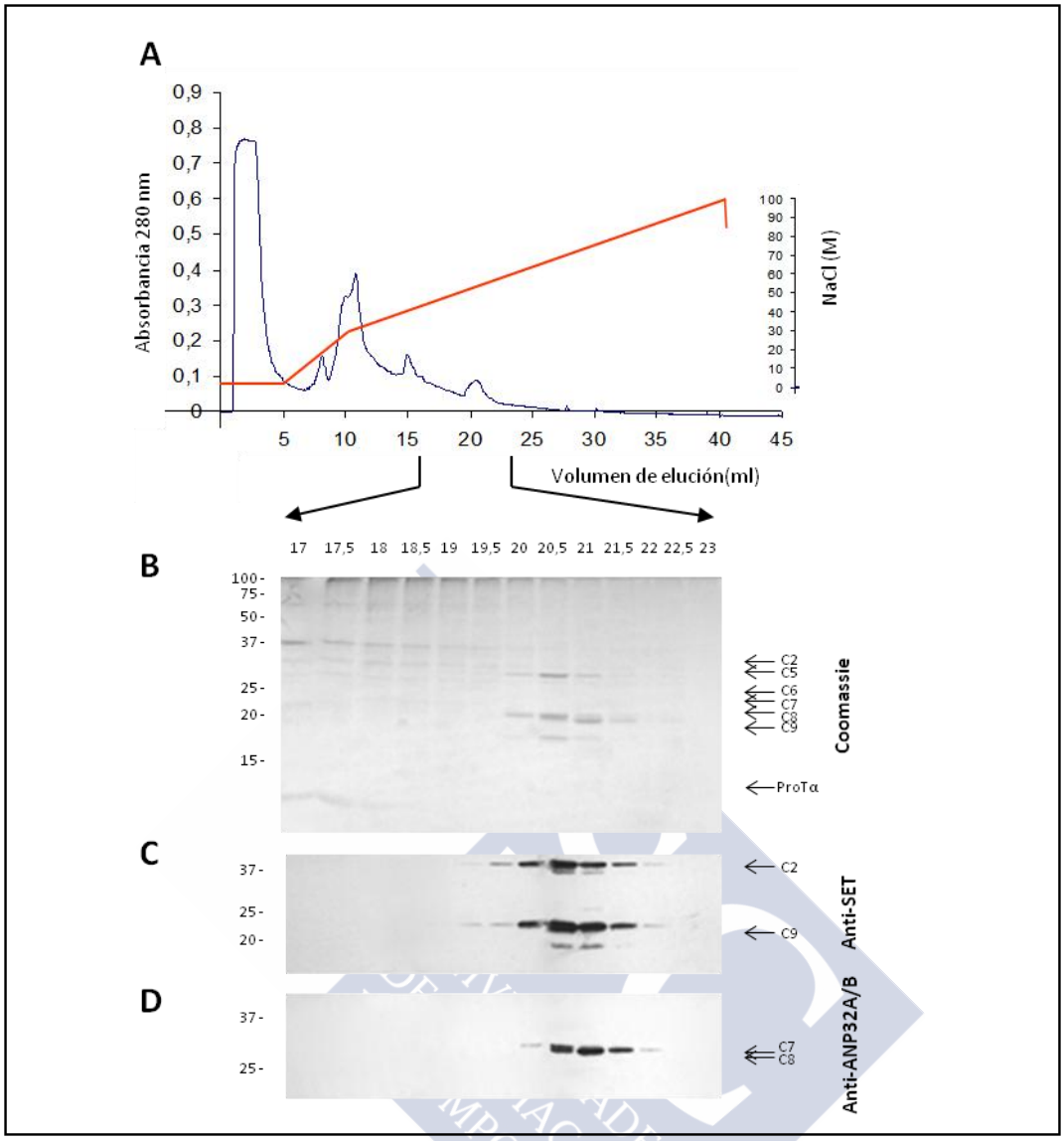


Figura 10. Análisis de la cromatografía de FPLC de intercambio iónico del citoplasma de células Jurkat tratadas con formaldehido.
Una alícuota de citoplasma de células Jurkat tratadas con formaldehido fue separada por FPLC y su diagrama de elución se muestra en el panel A. Alícuotas de las fracciones cromatográficas recogidas fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie (panel B) o analizadas por *immunowestern blot* con anti-SET (panel C) y anti-ANP32A/B (panel D) como se describe en Material y Métodos 3.13. Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

Con todo ello, dos posibilidades pueden explicar el comportamiento de las movilidades electroforéticas de SET, ANP32A y ANP32B; que en las células tratadas con formaldehido no son detectables estas proteínas en estado libre y las detectables están unidas en los complejos con la ProTα, o bien las proteínas libres presentan las mismas movilidades que C2-40 kDa, C6-30 kDa y C7-28 kDa.

Para contribuir a resolver esta cuestión y para confirmar las interacciones de la ProTα con SET, ANP32A y ANP32B realizamos experimentos en los que analizamos el comportamiento de estas proteínas en células Jurkat no tratadas con formaldehido.

En primer lugar, separamos por filtración molecular de alta presión los componentes citoplasmáticos de células Jurkat no tratadas con formaldehido. El resultado de esta cromatografía en la que se hizo un seguimiento de la elución de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B mediante *immunowestern blot* de alícuotas de las diferentes fracciones, usando los anticuerpos anti-ProTα, anti-SET y anti-ANP32A/B, se presenta en la figura 11. De él se desprende que una parte del contenido celular de la ProTα en el citoplasma de células Jurkat coeluye con SET, ANP32A y ANP32B, principalmente entre los componentes de tamaño molecular en el rango de los 35 kDa-40 kDa, con un participación similar de las cuatro proteínas. En una proporción mucho menor se aprecia una coelución de la ProTα y SET entre los componentes del orden de los 150 kDa.

Estos resultados parecen indicar que, además de la demostrada participación de una pequeña parte del contenido celular de la ProTα en los complejos (ver figura 7), solo una parte de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B parece participar en la formación de los complejos con la ProTα.

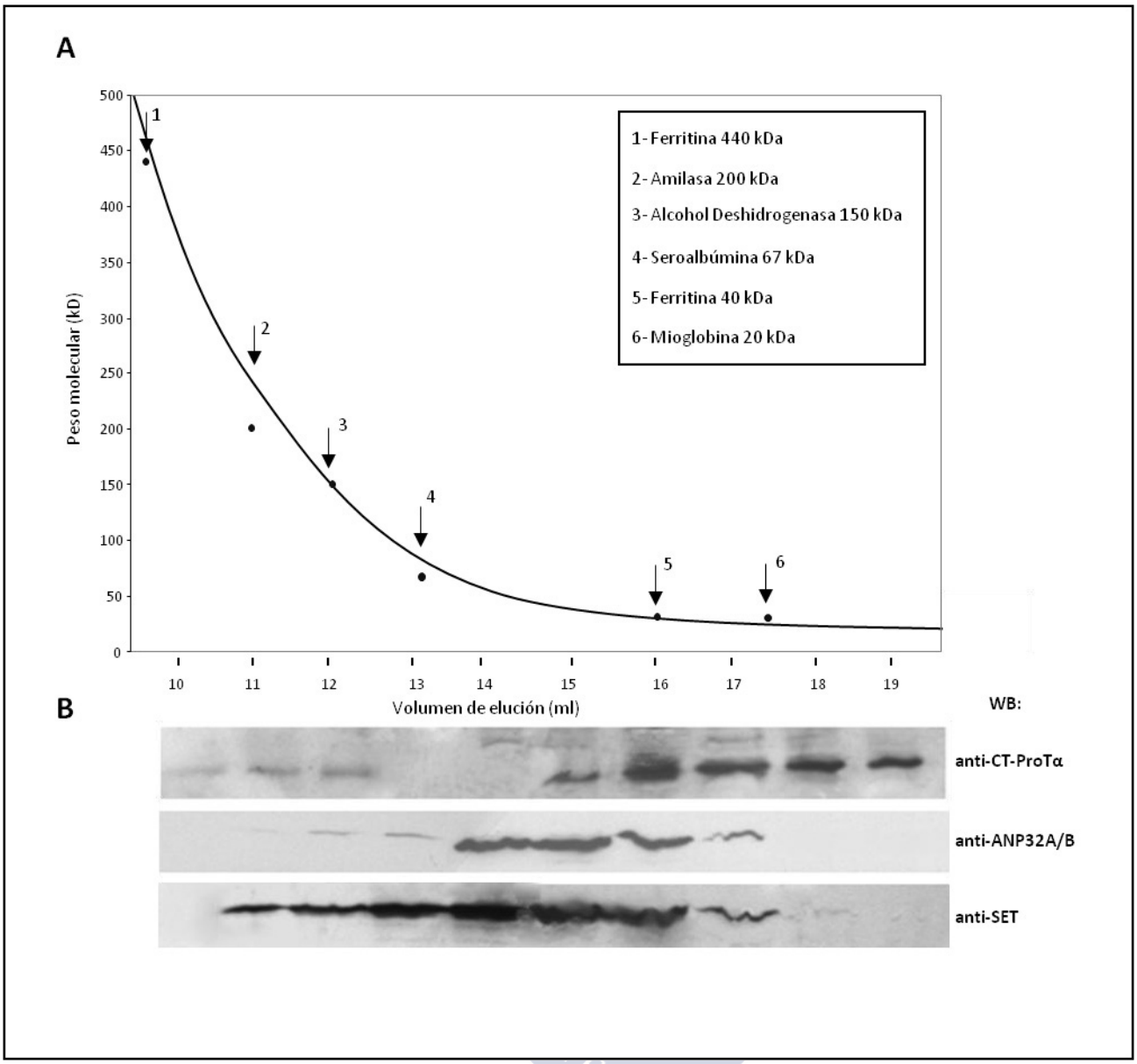


Figura 11. Análisis de la cromatografía de filtración molecular del citoplasma de células Jurkat no tratadas con formaldehido.
El panel A muestra el patrón de elución de los marcadores de peso molecular indicados en la figura. Alícuotas de las fracciones indicadas fueron analizadas mediante *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα, anti-ANP32A/B y anti-SET (panel B) como se describe en Material y Métodos 3.14.

3.2.- Cuantificación de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres y asociadas en los complejos

Una importante cuestión a resolver en el estudio de las interacciones de la ProTα con SET, ANP32A y ANP32B es establecer las concentraciones celulares de estas proteínas, para así, poder ponderar las proporciones de estas proteínas que pudieran interaccionar con la ProTα. Con el mismo procedimiento seguido para cuantificar la ProTα libre y ligada a los complejos

(presentado en la figura 7) llevamos a cabo una cuantificación de SET, ANP32A y ANP32B mediante el análisis densitométrico de los *immunowesterns* de fraccionados de células Jurkat sin tratar y tratadas con formaldehido similares al presentado en la figura 8, en los que se analizaron paralelamente cantidades conocidas de estas proteínas identificadas como se indica en la figura 9B, y recuperadas y concentradas por electroelución (como se describe en Material y Métodos 3.9.2).

En la figura 12 se presenta el histograma en el que se resume la cuantificación de estas proteínas en las células Jurkat en proliferación. De acuerdo con estos datos, aunque las concentraciones de SET, ANP32A y ANP32B son del orden de un 40% inferiores a la de la ProTα, los contenidos celulares de SET (67 ng/10^6 células), de ANP32A (62 ng/10^6 células) y de ANP32B (60 ng/10^6 células) son elevados, como corresponde a sus capacidades multifuncionales. Su papel similar al de la ProTα, de proteínas chaperonas de histonas con predominante localización nuclear (Kato *et al.,* 2011; Matilla & Radrizzani, 2005; Tochio *et al.,* 2010) es el principal responsable de la abundante presencia de estas proteínas, especialmente en células de mamíferos en proliferación. Las elevadas concentraciones de las histonas core propician, por tanto una abundante presencia de estas proteínas ácidas implicadas en su movilidad y actividad celular.

A juzgar por la distribución de estas proteínas en los extractos celulares, estas parecen comportarse como la ProTα. Es decir, se produce una salida del contenido nuclear de estas proteínas como consecuencia de su elevada permeabilidad a través de la membrana nuclear, acrecentada con el proceso extractivo. Las características estructurales de SET, ANP32A y ANP32B con señales cariofílicas (Kato *et al.,* 2011; Matilla & Radrizzani, 2005; Tochio *et al.,* 2010) y con una gran región acídica central como indica su secuencia (figura 6), las asemeja a la ProTα y a su comportamiento en los extractos celulares.

Como se muestra en la figura 12B, las concentraciones de SET, ANP32A y ANP32B que aparecen, bien libres o ligadas a complejos solubles después del tratamiento con formaldehido de las células Jurkat, es similar en las tres proteínas (en el rango de 45-34 ng/10^6 células) y del mismo orden que la concentración encontrada de la ProTα. Concentraciones que se corresponden principalmente con su contenido citoplasmático.

Dada esta cuantificación y de acuerdo con la demostrada participación de parte del contenido celular de la ProTα en la formación de los complejos y lo encontrado en el experimento de la filtración molecular, parece que también solo una parte de las proteínas

SET, ANP32A y ANP32B debería de estar presente en los complejos. Pero la co-emigración en electroforesis de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres con los complejos 40 kDa, 30 kDa y 28 kDa, hace difícil de cuantificar las concentraciones de estas proteínas que se incluyen en estos complejos de la ProTα. Los que si se pueden cuantificar son los complejos 34 kDa, 25 kDa y 22 kDa (datos no mostrados), que presentan unas concentraciones de SET, ANP32A y ANP32B en estos complejos en el rango del 12% del respectivo contenido celular de estas proteínas. Este porcentaje es indicativo de una parcial participación de estas proteínas en los complejos 34 kDa, 25 kDa y 22 kDa de la ProTα, propiedad que, de acuerdo con nuestros resultados precedentes, debería ser extensible a los complejos 40 kDa, 30 kDa y 28 kDa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

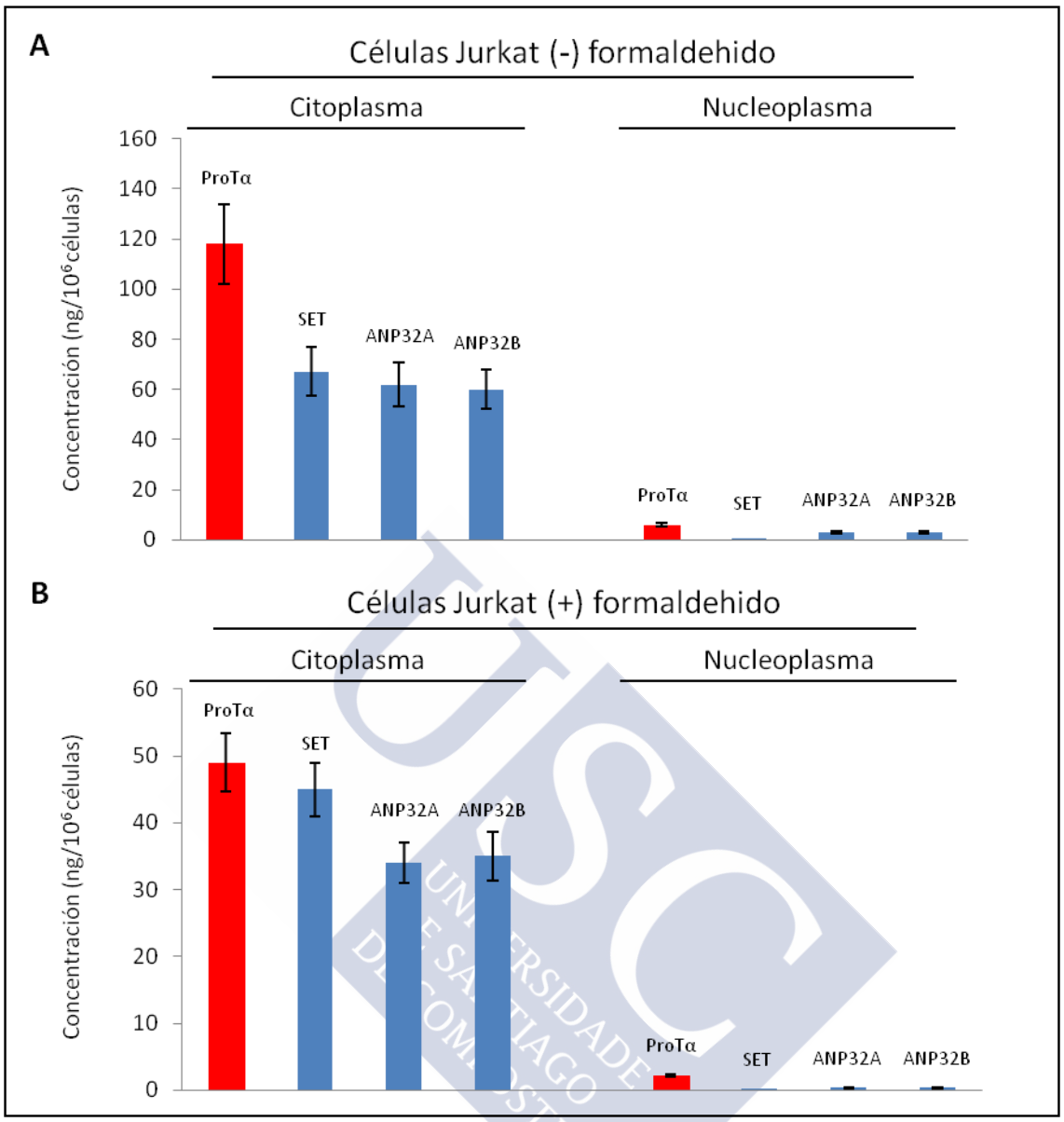


Figura 12. Cuantificación de SET, ANP32A y ANP32B en células Jurkat tratadas y no tratadas con formaldehido.

Concentración de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B en cálulas Jurkat no tratadas (A) y tratadas con formaldehido (B). El análisis densitométrico fue llevado a cabo como se describe en Material y Métodos 3.11 de experimentos de *immunowestern blot* como el presentado en la figura 8. La concentracíon de la ProTα (rojo) es la misma que la mostrada en la figura 7.

3.3- Estudio de las interacciones de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B mediante coinmunoprecipitación y afinidad a ProTα-Sepharosa

Con la finalidad de corroborar la capacidad de la ProTα para formar *in vivo* los complejos citoplasmáticos estabilizados por los enlaces de formaldehido se llevaron a cabo experimentos de coinmunoprecipitación, en los que se trató de determinar si los principales componentes de los complejos: SET, ANP32A y ANP32B interactúan con la ProTα. Para ello, extractos citoplasmáticos de células Jurkat no tratados con formaldehido fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos policlonales anti-SET, anti-ANP32A (que reconoce solo ANP32A), anti-ANP32A/B (que reconoce ANP32A y ANP32B) y anti-CT-ProTα. Los diversos inmunoprecipitados fueron separados por SDS-PAGE y sometidos a *immunowestern blot* con las diferentes combinaciones de anticuerpos indicadas en la figura 13, en la que se resumen los resultados de la inmunoprecipitación recíproca.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

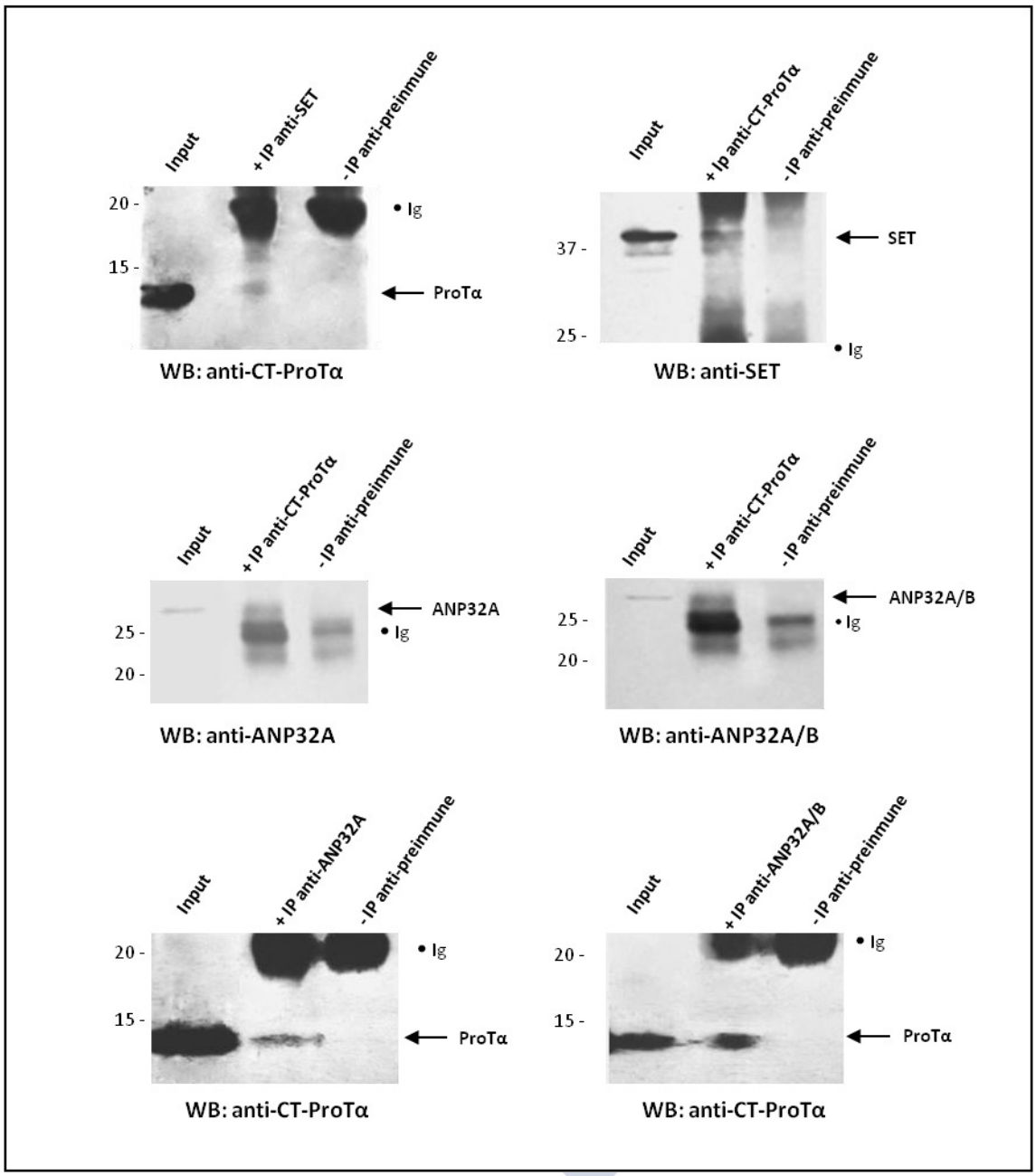


Figura 13. Análisis de coinmunoprecipitación de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B en citoplasma de células Jurkat no tratadas con formaldehido.
Alícuotas de extractos citoplasmáticos fueron incubados primero con el anticuerpo preinmune, y después con los anticuerpos anti-CT-ProTα, anti-SET, anti-ANP32A o anti-ANP32A/B. El material inmunoprecipitado más el citoplasma crudo fueron separados por SDS-PAGE y analizados por *immunowestern blot* con los anticuerpos que se indican en cada caso (como se describe en Material y Métodos 3.15).

Los resultados muestran la capacidad de la ProTα de coinmunoprecipitar con las proteínas SET, ANP32A y ANP32B de forma recíproca, puesto que con anti-CT-ProTα se forman inmunocomplejos en los que están presentes SET, ANP32A y ANP32B (aunque la proximidad de las movilidades de ANP32A y ANP32B con las cadenas ligeras de las IgGs dificulta la

visualización del inmnuprecipitado de estas proteínas), y con anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B se detectan inmunocomplejos en los que está la ProTα. La cuantificación densitométrica de los *western blots* indica una coinmunoprecipitación parcial de las respectivas proteínas. Teniendo en cuenta la dificultad de establecer relaciones fiables debido a las características de inmunoreactividad de los anticuerpos, especialmente los de anti-ProTα, con anti-CT-ProTα coinmunoprecipita un 5% de SET, ANP32A y ANP32B; con anti-SET un 3% de la ProTα, con anti-ANP32A un 3,5% y con anti-ANP32A/B coinmunoprecipita un 4% de la ProTα.

La capacidad de interacción de la ProTα con las proteínas SET, ANP32A y ANP32B también se estudió mediante cromatografía de afinidad a ProTα-Sepharosa. Así, extractos citoplasmáticos de Jurkat no tratadas con formaldehido se cargaron en una matriz de ProTα-Sepharosa y los eluidos de alta afinidad fueron analizados por *immunowestern blot* con los anticuerpos anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B.

El resultado de este análisis, figura 14, demuestra la capacidad de interacción de SET, ANP32A y ANP32B con la ProTα unida a Sepharosa. La densitometría de los *immunowestern blots* de esta figura muestra que sobre un 5-7% de la SET, ANP32A y ANP32B se unen a la ProTα.

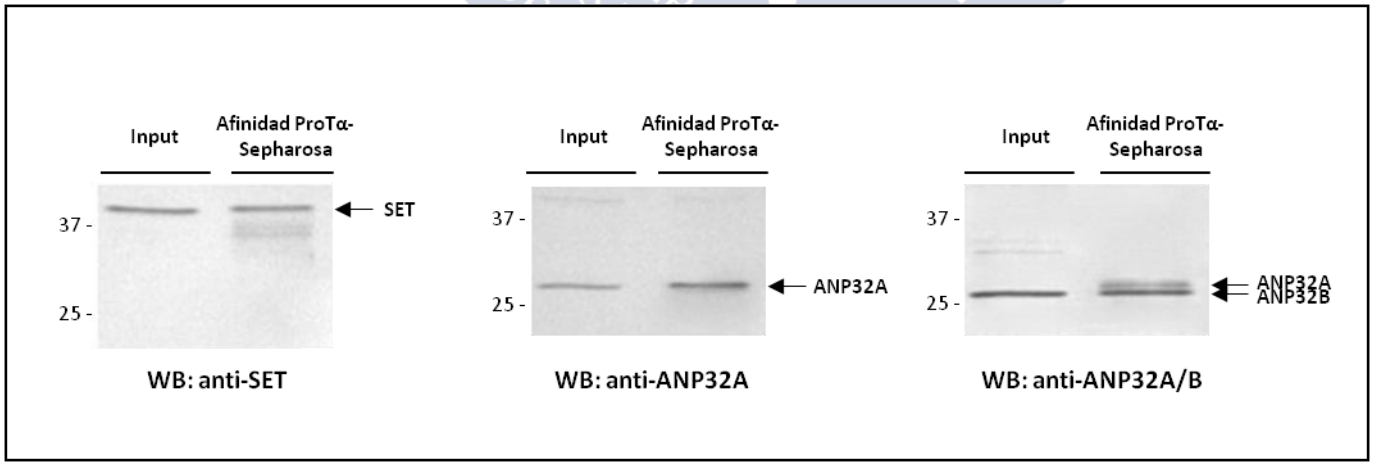


Figura 14. Análisis de la cromatografía de afinidad a ProTα-Sepharosa de citoplasma de células Jurkat no tratadas con formaldehido.
Alícuotas del extracto citoplasmático (*input*) y del eluido de alta afinidad de Sepharosa-ProTα (1M NaCl) fueron separados por SDS-PAGE y analizados por *immunowestern blot* con los anticuerpos anti-SET, anti-ANP32A y anti-ANP32A/B (como se describe en Material y Métodos 3.16). Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

Los datos de la cuantificación de la presencia de la ProTα en los complejos estabilizados por el formaldehido y de las proporciones en las que SET, ANP32A, ANP32B y la propia ProTα co-purifican en los experimentos de filtración molecular, coinmunoprecipitan o se unen a la ProTα en la cromatografía de afinidad, parecen confirmar que solo una parte del contenido celular de estas proteínas interaccionan entre si en el citoplasma de células Jurkat en proliferación. Esta circunstancia parece apoyar la idea de que las movilidades electroforéticas de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres, presentes en los extractos citoplasmáticos de células Jurkat tratadas con formaldehido, coincidirían en la separación electroforética con la movilidad de los complejos de la ProTα en los que estas proteínas están presentes: C2-40 kDa, C6-30 kDa y C7-28 kDa.

No hay que descartar el papel que puedan tener las otras proteínas en la organización de los complejos de la ProTα, así como, su propia modificación covalente (fosforilación principalmente) en la parcial inclusión del contenido celular de SET, ANP32A, ANP32B y ProTα en los complejos identificados.

3.4- Estudio de la citolocalización de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B mediante inmunofluorescencia

Para contribuir al conocimiento de la función celular de las interacciones de la ProTα con SET, ANP32A y ANP32B en células en proliferación, determinamos la localización celular de estas proteínas mediante ensayos de inmunofluorescencia en células Jurkat en proliferación. En la figura 15 se demuestra que en células Jurkat estas proteínas tienen una localización mayoritariamente nuclear, con una escasa localización citoplasmática. En células HeLa la ProTα presenta una distribución similar (Moreira *et al.,* 2013), y en cuanto a SET, ANP32A y ANP32B se ha demostrado una distribución similar en células HeLa y otros tipos celulares (Adachi *et al.,* 1994; Pan *et al.,* 2009; Fries *et al.,* 2007; Brennan *et al.,* 2000). Esto significa que solo una pequeña parte de estas proteínas participan en la función citoplasmática de las células en proliferación.

Esta distribución celular de la ProTα y de los principales componentes de los complejos: SET, ANP32A y ANP32B, concuerda con la localización citoplasmática de al menos 4 de los 6 complejos estabilizados por el formaldehido, y con el porcentaje, en el rango del 10%, que del contenido celular de estas proteínas se incluyen en los complejos caracterizados en las células Jurkat en proliferación. La mayoritaria localización nuclear de estas proteínas en estas células, funcionando como chaperonas de histonas y formando complejos de alto peso

molecular con otras proteínas nucleares implicadas en la remodelación de la cromatina, justificaría el alto porcentaje de la ProTα encontrado en forma insoluble, así como, de SET, ANP32A y ANP32B, debido a la magnitud y masa molecular aparente de los complejos estabilizados por el formaldehido que forman estas proteínas con las histonas y otras proteínas relacionadas con su actividad nuclear, tal como demostramos con la ProTα (Covelo et al., 2006). En este sentido no se puede descartar que otros complejos de la ProTα de localización citoplasmática pudieran no ser detectadas por las mismas circunstancias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

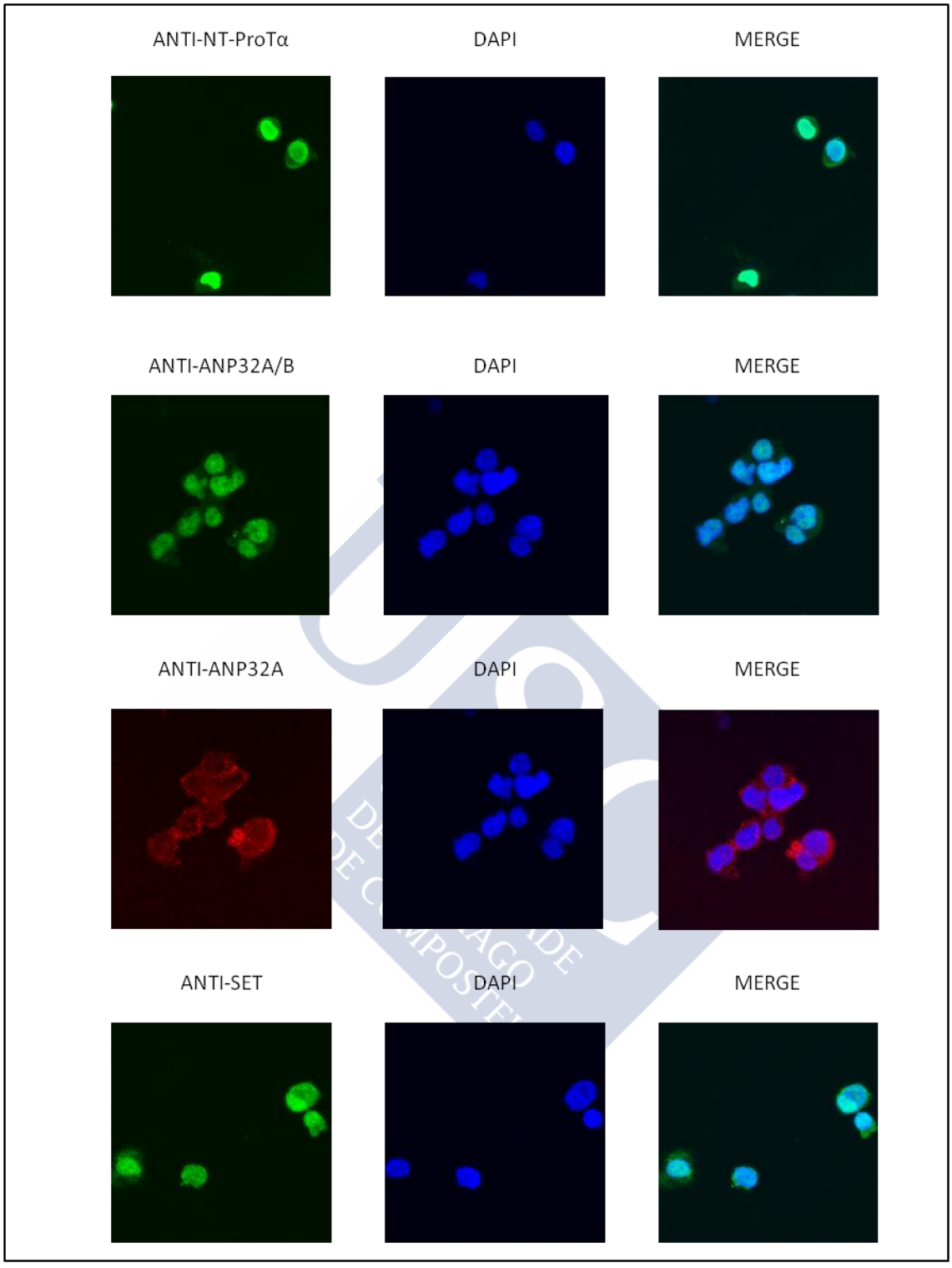


Figura 15. Estudio de la localización subcelular de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B en células Jurkat mediante microscopía de inmunofluorescencia.
Las células Jurkat fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti-NT-ProTα (verde), anti-ANP32A/B (verde), anti-ANP32A (rojo) y anti-SET (verde) como se describe en Material y Métodos 3.17. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La imagen *merge* consiste en una superposición de las otras 2. Cada experimento se realizó, al menos, 3 veces y las células mostradas en las imágenes son representativas de los efectos observados para las condiciones ensayadas.

4- ESTUDIO DE LA TRANSCENDENCIA BIOLÓGICA DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTα CON LAS PROTEÍNAS SET, ANP32A Y ANP32B

A fin de conocer la transcendencia que en la actividad celular pudieran tener las interacciones de la ProTα que hemos caracterizado en células en proliferación investigamos la evolución de estas interacciones. Primero, en células en las que se ha inducido el descenso de la actividad proliferativa por privación de suero en el medio de cultivo, y luego en células en las que se ha promovido la apoptosis, dado que la función citoplasmática descrita para la ProTα se relaciona con su implicación en este proceso (Jiang *et al.,* 2003, Qi *et al.,* 2010).

4.1- Estudio de las interacciones de la ProTα en células con baja actividad proliferativa

Las células Jurkat en proliferación (1-1,5·10^6 células/ml) fueron mantenidas en medio de cultivo sin suero durante 60 horas para reducir su actividad proliferativa (como se describe en Material y Métodos 3.1.6), al cabo de las 60 horas el crecimiento celular se detiene casi totalmente y el número de células se estabiliza (1,5-1,7·10^6 células/ml). Después, las células fueron tratadas con formaldehido y lisadas para obtener los componentes citoplasmáticos y nucleoplasmáticos, para su análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα. El resultado de este análisis que se muestra en la figura 16A indica, como en las células en proliferación, una localización predominantemente citoplasmática de la ProTα y de sus complejos estabilizados por el formaldehido.

A continuación, como se hizo con los extractos de las células en proliferación, se procedió a la separación de los extractos celulares mediante cromatografía de intercambio iónico con elución discontinua. Los distintos fraccionados recogidos fueron separados por SDS-PAGE y teñidos con Azul de Coomassie o analizados por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα. En este análisis los fraccionados de nucleoplasma no mostraron complejos inmunoreactivos con anti-ProTα (datos no mostrados), mientras que en los fraccionados de citoplasma, presentados en la figura 16B, se observa la presencia de complejos inmunoreactivos con anti-CT-ProTα entre los componentes más ácidicos, en la fracción 1M, con una movilidad electroforética similar a los complejos caracterizados en células en proliferación. El anticuerpo anti-NT-ProTα inmunodetectó los mismos complejos en el citoplasma y ninguno en el nucleoplasma al igual que con anti-CT-ProTα (datos no mostrados). Seguidamente, procedimos a purificar e identificar los componentes inmunoreactivos con anti-ProTα.

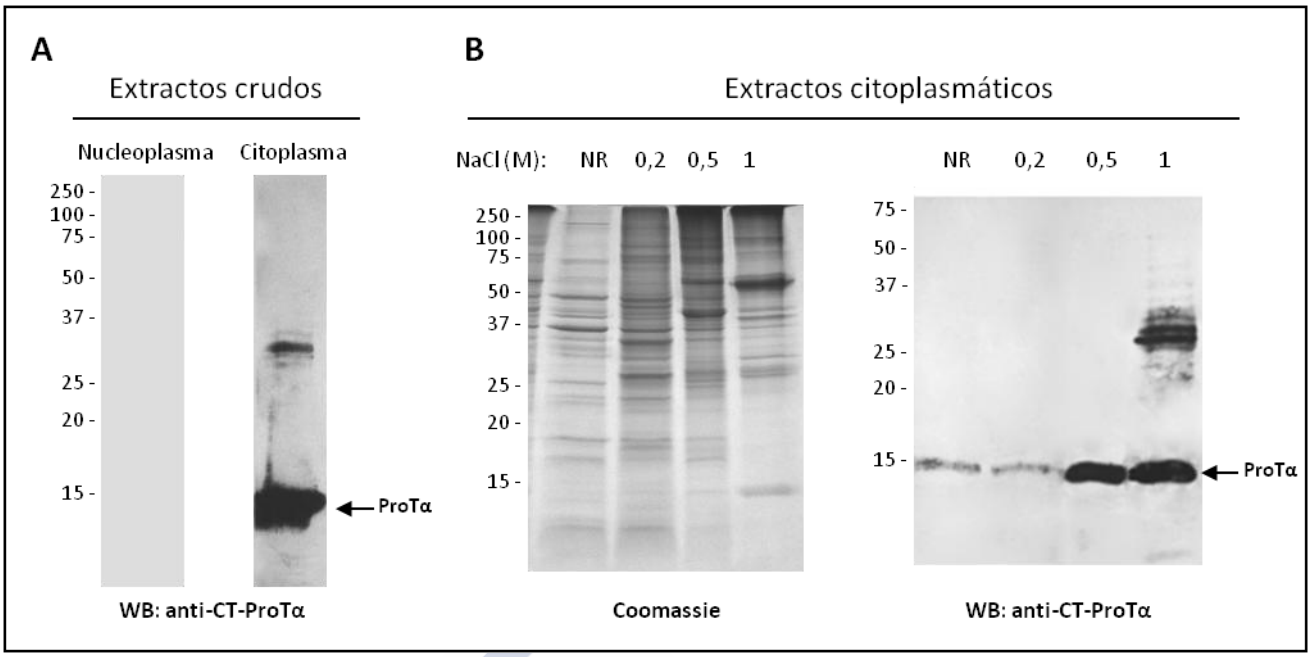


Figura 16. Análisis de los extractos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos de células Jurkat con baja actividad proliferativa tratradas con formaldehido.
A) *Immunowestern blot* con anti-CT-ProTα de los subfraccionados celulares.
Alícuotas de citoplasma y nucleoplasma crudo de células Jurkat tratadas con formaldehido fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-CT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6).
B) Análisis de los fraccionados cromatográficos de intercambio iónico de extractos citoplasmáticos.
Alícuotas las fracciones eluidas con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M, 0,5M y 1M de células Jurkat con baja actividad proliferativa tratadas con formaldehido fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y teñidas con Azul de Coomassie o analizadas por *western blot* con anti-CT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6).
Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

Para ello, primero se estableció la posible correspondencia entre los complejos inmunodetectados y las proteínas presentes en los componentes de la fracción 1M separada por SDS-PAGE y teñida con Azul de Coomassie, tal como se indica en la figura 17A.

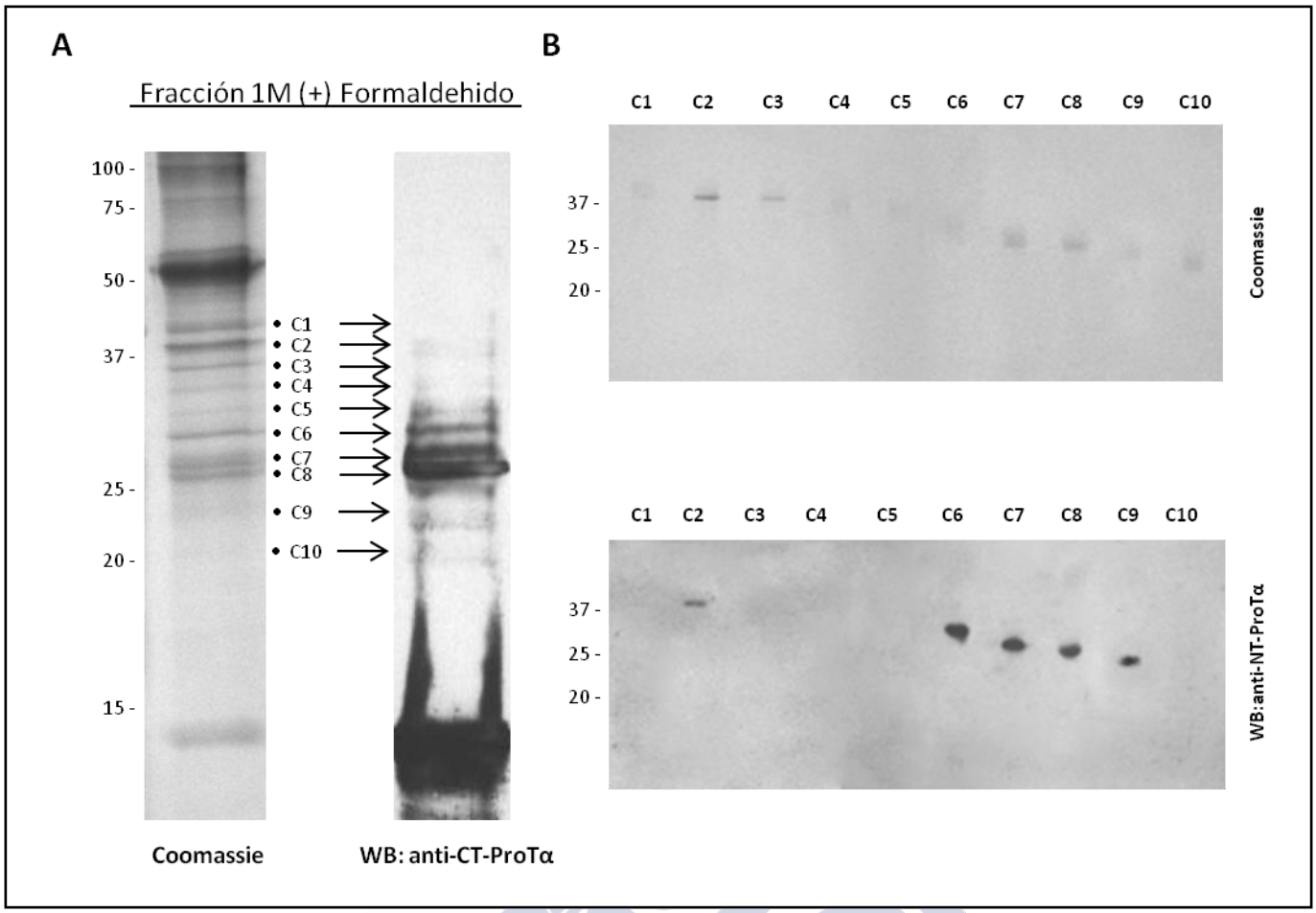


Figura 17. Análisis de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα de la fracción 1M de intercambio iónico de citoplasma de células Jurkat con baja actividad proliferativa tratadas con formaldehido.
A) Identificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-CT- ProTα
Alícuotas de la fracción 1M del extracto citoplasmático de células Jurkat con baja actividad proliferativa tratadas con formaldehido fueron separadas en paralelo por SDS-PAGE para su tinción con Coomassie o para su análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα. Se indica la correspondencia entre las bandas de proteína teñidas con Coomassie (C1 a C10) con los complejos del *immunowestern.*
B) Purificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα
Fragmentos de las bandas cortadas del gel teñido con Coomassie fueron separados por SDS-PAGE, teñidos con Coomassie o analizados por *immunowestern blot* con anti-NT-ProTα (como se describe en Material y Métodos 3.7).

Seguidamente, las bandas señaladas en el gel teñido con Azul de Coomassie correspondientes con los diferentes complejos determinados por *immunowestern* fueron cortadas y alícuotas de estas bandas separadas de nuevo por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie o sometidas a *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα y anti-NT-ProTα. El resultado de este análisis, figura 17B, indica que de las diez bandas de proteína analizadas solo cinco fueron inmunoreactivas (C2-40 kDa, C6-34 kDa, C7-30 kDa, C8-28 kDa y C9-22 kDa). En la figura 17B solo se muestra el *immunowestern blot* con anti-NT-ProTα, pero con anti-CT-ProTα

presenta el mismo resultado (datos no mostrados). Las bandas no inmunodetectadas pueden deberse bien a su baja concentración o una baja inmunoreactiviad en la fracción 1M.

Continuando con el estudio de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα purificadas, llevamos a cabo el tratamiento térmico para determinar si se correspondían con complejos estabilizados por el formaldehido. El resultado fue similar a con los complejos de células proliferantes presentado en la figura 5 (datos no mostrados).

Finalmente, se realizó la identificación de las proteínas que se asocian a ProTα en los complejos anteriores por espectrometría de masas, en las mismas condiciones descritas para los análisis de los complejos en células en proliferación. Las proteínas identificadas en los cinco complejos inmunoreactivos se resumen en la tabla 3 (resultados completos en la figura 3 del anexo), de la misma forma que en los complejos de la ProTα en células proliferantes: ordenados por su movilidad electroforética en kDa y las proteínas identificadas en cada complejo dispuestas de mayor a menor *score*.

Los cinco complejos inmunoreactivos con anti-ProTα presentan la misma movilidad electroforética que cinco de los seis complejos citoplasmáticos de células proliferantes, no detectándose el complejo de 25 kDa en células con baja actividad proliferativa. Como se puede ver en la tabla 3 su composición es también muy parecida. Así, las proteínas SET, ANP32A y ANP32B siguen siendo las proteínas preponderantes en los cinco complejos, cuya composición difiere sin embargo en alguno de sus componentes respecto a las caracterizadas en células en proliferación.

En los complejos en los que se mantiene la interacción de la ProTα con la proteína SET (40 kDa y 22 kDa) el descenso de la actividad proliferativa produce la pérdida de la interacción con la β-actina en el complejo 40 kDa y la presencia de tres nuevas proteínas en el complejo 22 kDa: la proteína Rab-11A relacionada con Ras (presente en el complejo 25 kDa de proliferantes), la proteína Rab-6A relacionada con Ras y el inhibidor 2 de la disociación Rho-GDP (Rho GDI 2), regulador del intercambio GTP/GDP de la proteína Rho; proteínas de localización citoplasmática e implicadas en el tráfico a través de las membranas intracelulares (Hutagalung & Novick, 2011; Takai *et al.*, 2001).

El complejo 34 kDa se caracteriza por la pérdida de la β-actina, la proteína mitocondrial transportadora de fosfato y ANP32A, que son sustituidas por: la tropomiosina α, proteína citosólica implicada en la estabilización de los filamentos de actina (Lin *et al.,* 2008); y las proteínas delta(3,5)-delta(2,4)-dionil-CoA isomerasa mitocondrial y la proteína transportadora

2-oxoglutarato/malato mitocondrial implicadas en la actividad mitocondrial (Filppula *et al.,* 1998; Monné *et al.,* 2013).

El descenso de la actividad proliferativa de las células induce también la pérdida de ANP32B del complejo 30 kDa, mientras que aparecen cuatro nuevas proteínas: la subunidad β tipo 7 del proteasoma, que acompaña a la subunidad α tipo 3 del proteasoma, presente también en el complejo de células en proliferación; y tres proteínas de la familia 14-3-3 (14-3-3 gamma, 14-3-3 zeta/delta y 14-3-3 beta/alpha), proteínas citoplasmáticas implicadas en el control de las rutas de señalización del ciclo celular y apoptosis (Morrison, 2009; Gardino & Yaffe, 2011)

En el complejo 28 kDa se produce la pérdida de la proteína ANP32A y la inclusión de la proteína 29 del Retículo Endoplasmático (ERp29), implicada en el procesamiento de proteínas en este orgánulo (Zhang & Richardson, 2011), y la Endopeptidasa Clp, proteasa de localización mitocondrial dependiente de ATP (Kang *et al.,* 2002).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COMPLEJO (Movilidad electroforética)	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Células no proliferantes
C2 (40 kDa)	• SET • Proteína relacionada con MARCKS (MRP) • ProTα
C6 (34 kDa)	• Proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento, mitocondrial • Tropomiosina α • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • Delta(3,5)-delta(2,4)dionil-CoA isomerasa, mitocondrial • Proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial • ProTα
C7 (30 kDa)	• ANP32A • Proteína 14-3-3 zeta/delta • Subunidad α tipo 3 del proteasoma • Subunidad β tipo 7 del proteasoma •Proteína 14-3-3 beta/alpha •ATP/ADP traslocasa 2 (ADT2) • ProTα • Proteína 14-3-3 gamma
C8 (28 kDa)	• ANP32B • Proteína 29 del retículo endoplasmático (ERp29) • ProTα • Endopeptidasa Clp, mitocondrial
C9 (22 kDa)	• Proteína Rab-11A relacionada con Ras • Inhibidor 2 de la disociación Rho-GDP (Rho GDI 2) • Proteína Rab-6A relacionada con Ras • SET • ProTα

Tabla 3. Resumen de los resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M de citoplasma de células Jurkat con baja actividad proliferativa.

4.2- Estudio de las interacciones de la ProTα en células en apoptosis

Dada la bien caracterizada implicación de la ProTα en el control citoplasmático de la apoptosis (Jiang *et al.*, 2003, Qi *et al.,* 2010), estudiamos las interacciones de la ProTα en células Jurkat en las que se ha inducido este proceso mediante estaurosporina (como se describe en Material y Métodos 3.1.7), un esteroide inhibidor de proteínas kinasas de amplio espectro que tiene la capacidad de inducir apoptosis mediante un mecanismo en el que se activa la vía del apoptosoma y por tanto las caspasas 9 y 3 (Manns *et al*., 2011).

En primer lugar, se analizó la influencia de la estaurosporina sobre la inducción de las actividades de la caspasa 9 y de la caspasa 3, con el objetivo de evaluar la capacidad para promover la activación del apoptosoma. Para esto, las células Jurkat en proliferación se trataron con estaurosporina (0,5 µM o 1 µM durante 1, 2 y 4 horas). Inmediatamente, las células fueron lisadas y en los sobrenadantes de los microcentrifugados se ensayaron las actividades caspasa 9 y caspasa 3 mediante la utilización de sustratos que llevan acoplados un marcador fluorescente.

En la figura 18 se muestra como la estaurosporina induce la activación de la caspasa 9, propia de la ruta apoptosómica; y la caspasa 3. La caspasa 9 sufre un incremento de su actividad por la acción de la estauroporina de 2,8 veces a las 2 horas y 3,8 veces a las 4 horas a una concentración de 0,5 µM, mientras que con 1 µM hay un aumento mayor de: 4,3 veces a 2 horas y 5,3 veces a las 4 horas. La caspasa 3 experimenta una subida de su actividad mayor que la caspasa 9, pero se mantiene la mayor inducción a concentraciones de 1 µM de estaurosporina. Además, se comprobó que el tratamiento con estaurosporina induce la fragmentación nucleosómica del DNA a las 4 horas de incubación con 0,5 µM de estaurosporina (datos no mostrados).

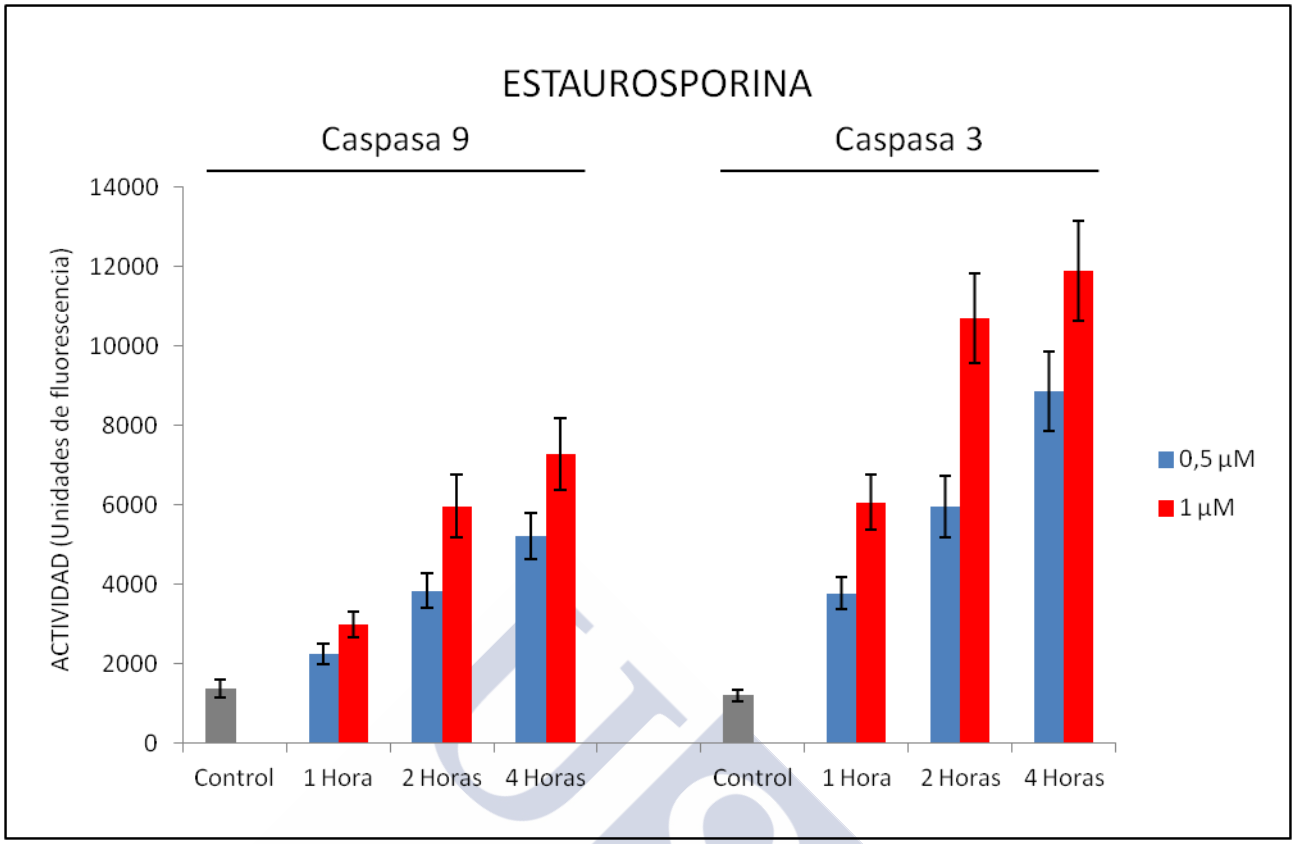


Figura 18. Análisis de la inducción de la apoptosis con estaurosporina en células Jurkat mediante la cuantificación de las actividades caspasa 9 y caspasa 3.
Las células Jurkat se trataron con estaurosporina 0,5 µM (Azul) o 1 µM (Rojo) durante 1, 2 y 4 horas, se lisaron y en el extracto citoplasmático se probaron las actividades caspasa 9 y caspasa 3 mediante ensayos de fluorescencia como se describe en Material y Métodos 3.18. Los controles son ensayos de actividades en extractos citoplasmáticos de células en proliferación.
Los valores son medias±desviación típica de tres análisis diferentes realizados por duplicado.

A la vista de los resultados anteriores, llevamos a cabo la inducción de apoptosis por tratamiento con estaurosporina 0,5 µM durante 2 horas para desencadenar una fase temprana de la activación de las caspasas 9 y 3, y por tanto de la ruta apoptótica dependiente del apoptosoma. Una vez inducida la apoptosis, las células fueron tratadas con formaldehido y lisadas. Alícuotas del extracto celular crudo o fraccionado por cromatografía de intercambio iónico con elución discontinua fueron separados por SDS-PAGE y teñidos con Azul de Coomassie o analizados por *immunowestern blot* con anti-ProTα. En la figura 19 se presentan los resultados de este estudio. En el análisis de *immunowestern blot* con anti-NT-ProTα del extracto crudo (figura 19A) se observa la presencia de componentes inmunoreactivos a tamaños superiores a 25 kDa. Además, se aprecia una diferencia en los componentes con la movilidad de la ProTα: se detectan dos componentes inmunoreactivos con anti-NT-ProTα. De acuerdo con nuestros datos (datos no mostrados) y datos publicados por otros investigadores

(Evstafieva *et al*., 2000) este patrón de inmunoreactividad de la ProTα se corresponde con el resultado de la degradación de la ProTα, que es cortada en la región C-terminal de su secuencia por las caspasa 3 y 7, activadas en la inducción apoptótica de las células. Esta proteólisis de la ProTα, que ocurre en el dominio $DDVD^{99}$ de su región C-terminal, hace que pierda la estructura del epitopo contra el que se ha generado el anticuerpo anti-CT-ProTα por lo que usando este anticuerpo solo se detecta la banda de menor movilidad (figura 19A), manteniéndose, sin embargo, la región N-terminal contra la que son inmunoreactivos el anticuerpo anti-NT-ProTα. La fragmentación observada de la ProTα confirmaría la inducción de la apoptosis en las células Jurkat.

El análisis de los fraccionados de la cromatografía de intercambio iónico mediante tinción con Coomassie e *immunowestern blot* se muestra en la figura 19B, en la que se observa que los componentes inmunoreactivos con anti-NT-ProTα, como en las células proliferantes y con baja actividad proliferativa, son acídicos, están en la fracción 1M y se sitúan en el rango de 50 kDa a 25 kDa. En el *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα se detectaron los mismos componentes con la excepción indicada de la no detección de la ProTα fragmentada (datos no mostrados).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

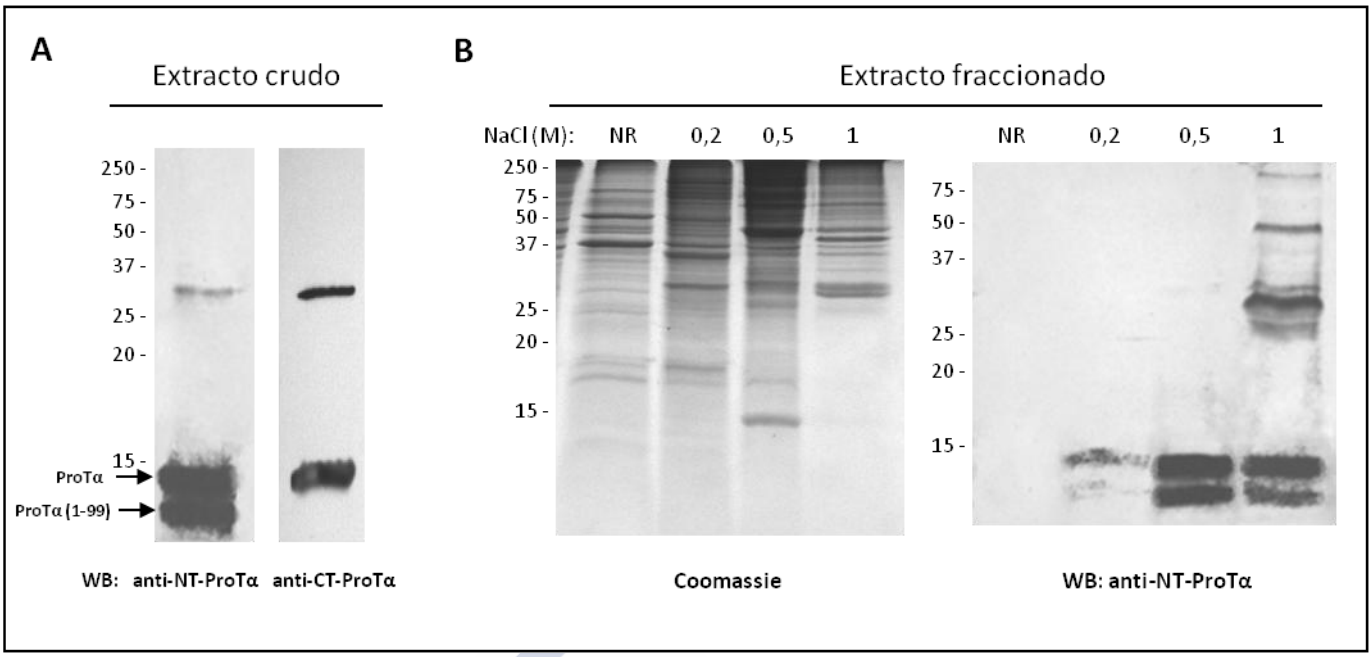


Figura 19. Análisis del extracto celular crudo y los fraccionados de intercambio iónico de células Jurkat en las que se ha inducido la apoptosis con estaurosporina (0,5 µM/2 horas) y tratadas con formaldehido.

A) *Immunowestern blot* con anti-NT-ProTα del extracto celular crudo.

Alícuotas del extracto celular crudo fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-NT-ProTα y anti-CT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6).

B) Análisis de los fraccionados cromatográficos de intercambio iónico de extracto de células Jurkat.

Alícuotas las fracciones eluidas con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M, 0,5M y 1M fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y teñidas con Azul de Coomassie o analizadas por *western blot* con anti-NT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en el punto 3.6

Paralelamente se analizaron marcadores de peso molecular que se indican en kDa.

Continuando con el estudio de los complejos de la ProTα en apoptosis, al igual que hicimos en células proliferantes y con baja actividad proliferativa, procedimos a la purificación de los complejos inmunoreactivos a anti-ProTα de la fracción 1M de células Jurkat inducidas a apoptosis con estaurosporina, seleccionando, inicialmente, las proteínas en el gel con las movilidades en el entorno de los complejos del i*mmunowestern*, tal como se indica en la figura 20A.

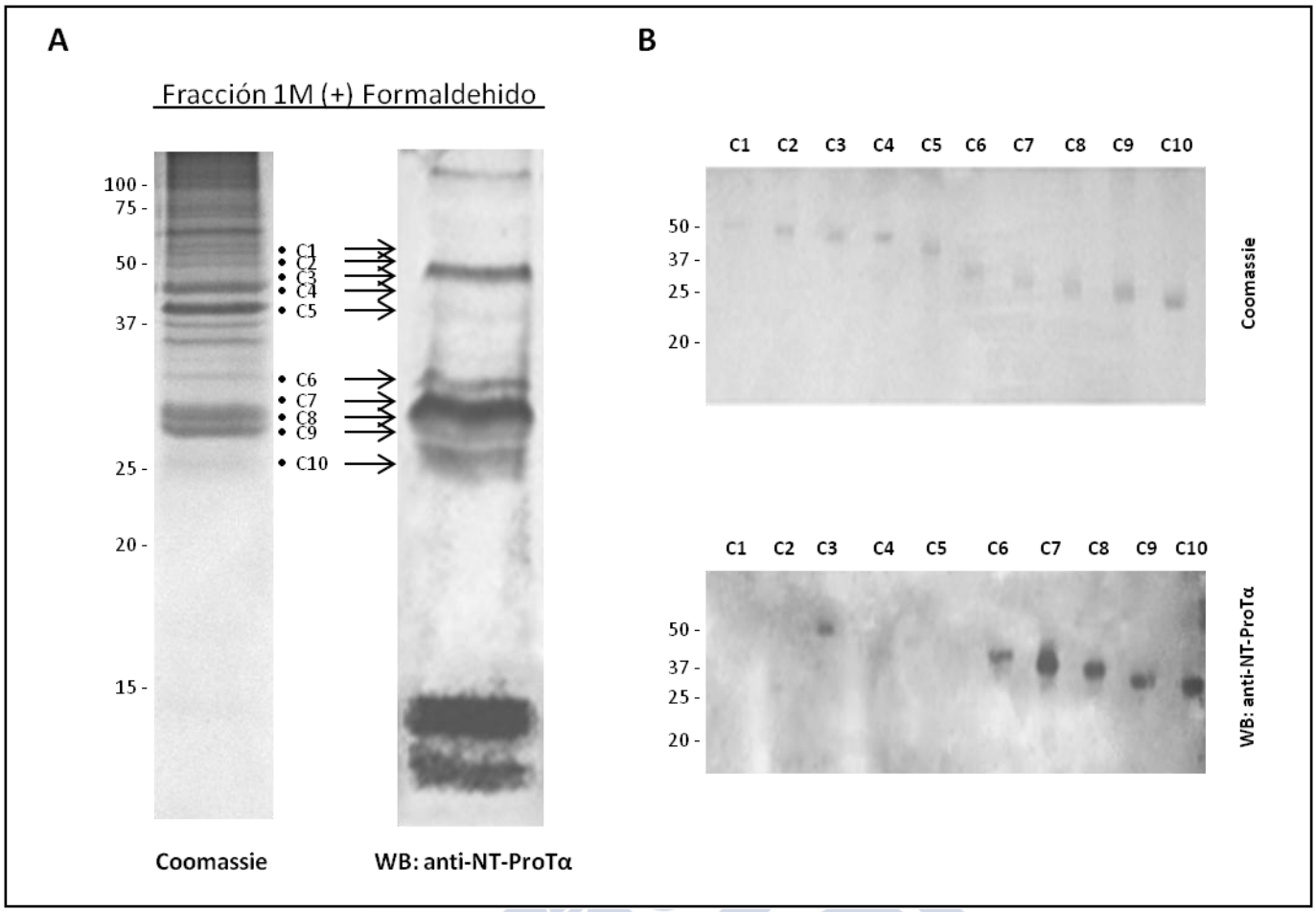


Figura 20. Análisis de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα de la fracción 1M de intercambio iónico del extracto celular de células Jurkat inducidas a apoptosis con estaurosporina y tratadas con formaldehido.

A) Identificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-NT- ProTα

Alícuotas de la fracción 1M del extracto citoplasmático de células Jurkat apoptóticas tratadas con formaldehido fueron separadas en paralelo por SDS-PAGE para su tinción con Coomassie o para su análisis por *immunowestern blot* con anti-NT-ProTα. Se indica la correspondencia entre las bandas de proteína teñidas con Coomassie (C1 a C10) con los complejos del *immunowestern.*

B) Purificación y caracterización de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα

Fragmentos de las bandas cortadas del gel teñido con Coomassie fueron separados por SDS-PAGE, teñidos con Coomassie o analizados por *immunowestern blot* con anti-NT-ProTα (como se describe en Material y Métodos 3.7).

Las bandas marcadas fueron cortadas y alícuotas de estas separadas por SDS-PAGE y analizadas tanto por tinción con Azul de Coomassie como por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα y con anti-NT-ProTα. Este análisis (figura 20B) indica que de las diez bandas examinadas solo seis (C3-50 kDa, C6-34 kDa, C7-32 kDa, C8-30 kDa, C9-28 kDa y C10-25 kDa) tienen inmunoreacividad a anti-NT-ProTα. Estas bandas también fueron inmunoreactivas con anti-CT-ProTα (datos no mostrados). Tres de estos complejos: C6-34 kDa, C8-30 kDa y C9-28 kDa presentan la misma movilidad que otros de los complejos descritos en células

proliferantes y con baja actividad proliferativa. Mientras que los complejos C3-50 kDa y C7-32 kDa son exclusivos de las células en las que se ha inducido apoptosis con estaurosporina. Y el complejo C10-25 kDa tiene un equivalente solo en células en proliferación.

Seguidamente, procedimos al tratamiento térmico de alícuotas de las bandas inmunoreactivas con anti-ProTα purificadas para inducir la rotura de los enlaces de formaldehido. El análisis por SDS-PAGE indicó que estas bandas mostraban un patrón en escalera como el de la figura 5, lo que confirmaba que se trataba de complejos (datos no mostrados).

Por último, alícuotas de estas bandas se analizaron por espectrometría de masas para identificar las proteínas que acompañan a la ProTα. Las proteínas encontradas en los diferentes complejos se resumen en la tabla 4 (resultados completos en la figura 4 del anexo), ordenados los complejos por su movilidad electroforética en kDa y las proteínas identificadas en cada complejo dispuestas de mayor a menor *score*.

Los resultados muestran como entre los componentes de los diferentes complejos de la ProTα en células Jurkat en las que se ha inducido apoptosis con estaurosporina, además de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B, aparecen proteínas relacionadas con actividades mitocondriales y con su control, proteínas implicadas en el tránsito intracelular en el citoplasma, proteínas reguladoras de un amplio espectro de rutas de señalización, como las proteínas de la familia 14-3-3, que presentan una especial significación en el control de la apoptosis (Morrison, 2009; Gardino & Yaffe, 2011) así como componentes del proteasoma.

COMPLEJO (Movilidad electroforética)	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Células apoptóticas
C3 (50 kDa)	• β-actina • Proteína VAT-1 • La subunidad 2 del complejo cit b-c_1, mitocondrial • Proteína de migración nuclear nudC • ProTα
C6 (34 kDa)	• 40S proteína ribosomal S3 • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • Delta(3,5)-delta(2,4)dionil-CoA isomerasa, mitocondrial • 60S proteína ribosomal L7 • Proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial • Proteína 14-3-3 epsilon • ProTα
C7 (32 kDa)	• Proteína 14-3-3 zeta/delta • Proteína 14-3-3 gamma • ATP/ADP traslocasa 2 (ADT2) • ATP/ADP traslocasa 3 (ADT3) • ANP32A • Subunidad α tipo3 del proteasoma • Captepsina D • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • ProTα
C8 (30 kDa)	• ANP32A • Proteína 14-3-3 zeta/delta • Subunidad α tipo 3 del proteasoma • ProTα • ATP/ADP traslocasa 2 (ADT2)
C9 (28 kDa)	• ANP32A • ANP32B • Proteína 14-3-3 zeta/delta • Subunidad α tipo 6 del proteasoma • Proteína 14-3-3 gamma • ProTα
C10 (25 kDa)	• SET • Proteína Rab-1A relacionada con Ras • Proteína Rab-1B relacionada con Ras • ProTα

Tabla 4. Resumen de los resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M del extracto celular de células Jurkat inducidas a apoptosis con estaurosporina.

La composición de los complejos de la ProTα en estas células apoptóticas presenta significativas diferencias respecto a las células en proliferación y con baja actividad proliferativa. Así, los complejos 50 kDa y 32 kDa aparecen únicamente en apoptosis. En el complejo 50 kDa la ProTα se asocia a proteínas relacionadas con la actividad citoesqueletal y señalizadora como la β-actina, la proteína VAT-1, con actividad ATPasa y localización mitocondrial-citoplasmática (Eura *et al*., 2006), y la proteína de migración nuclear nudC, de ubicación citoplasmática/nuclear que colocaliza con la tubulina y la dineína (Aumais *et al*., 2003); y con la actividad mitocondrial como la subunidad 2 del complejo cit b-c_1 (Hosokawa *et al*., 1989).

El complejo 32 kDa es un nuevo complejo en el que aparecen proteínas que también están presentes en otros complejos de la ProTα en células proliferantes y con baja actividad proliferativa: la ADP/ATP traslocasa 2, la ANP32A y la subunidad α tipo 3 y tipo 1 del proteasoma, así como, las proteínas 14-3-3 zeta/delta y 14-3-3 gamma que son comunes solamente con el complejo 30 kDa de células con baja actividad proliferativa. Mientras que son de exclusiva presencia en el complejo 32 kDa la ADP/ATP traslocasa 3, relacionada con la actividad mitocondrial (Liu & Chen, 2013), y la Catepsina D, proteasa ácida activa en la degradación de proteínas intracelulares (Benes *et al.,* 2008).

En lo que respecta a los complejos de la misma movilidad que los descritos en células Jurkat proliferantes y con baja actividad proliferativa: 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa, este último solo en proliferantes; estos difieren en la composición de algunos de sus componentes. Así, el complejo 34 kDa pierde la interacción con ANP32A respecto a células proliferantes, como el complejo de células con baja actividad proliferativa y contiene una proteína común al complejo del mismo tamaño en células proliferantes y de baja actividad proliferativa: la subunidad α tipo 1 del proteasoma, y las proteínas comunes solo al complejo de células con baja actividad proliferativa: las proteínas delta(3,5)-delta(2,4)-dionil-CoA isomerasa mitocondrial y la proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial, mientras que otras proteínas aparecen exclusivamente en este complejo: 40S proteína ribosomal S3, implicada en la regulación de la reparación del DNA y en la apoptosis (Zhang *et al.,* 1990); 60S proteína ribosomal L7, que desempeña un papel regulador en el aparato de traducción, inhibiendo la traducción libre de mRNAs (Hemmerich *et al.,* 1993); y la proteínas 14-3-3 epsilon, con una función similar al resto de las proteínas de la familia 14-3-3 (Morrison, 2009; Gardino & Yaffe, 2011).

En el complejo 30 kDa la ProTα mantiene la interacción con las proteínas presentes en las células proliferantes y con baja actividad proliferativa: ANP32A, la subunidad α tipo 3 del proteasoma y la ADP/ATP traslocasa 2. Mientras que la proteína 14-3-3 zeta/delta, que está incluida solo en el complejo de células con baja actividad proliferativa, sustituye a la ANP32B del complejo de proliferantes.

La ProTα se asocia en el complejo 28 kDa con las mismas proteínas ANP32A y ANP32B que constituyen el complejo del mismo tamaño en las células proliferantes, a las que se añaden las proteínas 14-3-3 zeta/delta, 14-3-3 gamma y la subunidad α tipo 6 del proteasoma, nueva subunidad componente del proteasoma.

El complejo 25 kDa de células apoptóticas tiene un equivalente en las células proliferantes que no aparece en células con una baja actividad proliferativa. Sin embargo, su composición es diferente, la ProTα se asocia a SET, que sustituye a ANP32A y ANP32B de proliferantes, y a las proteínas Rab-1A y Rab-1B relacionadas con Ras, que sustituyen a la proteína Rab-11A relacionada con Ras del complejo de células proliferantes y que están implicadas en el tráfico de componentes celulares a través de las membranas intracelulares en el citoplasma (Hutagalung & Novick, 2011).

4.3- Análisis comparativo de las interacciones de la ProTα en células Jurkat en proliferación, con baja actividad proliferativa y en apoptosis

A manera de recopilación de nuestra investigación, presentamos un análisis comparativo de los resultados obtenidos en el estudio de las interacciones de la ProTα en células Jurkat en proliferación y en situaciones en las que se induce un descenso de la actividad proliferativa y la apoptosis. En la figura 21 se resumen los análisis de *immunowestern blot* de los complejos de la ProTα, inmunodetectados en las células Jurkat en estos tres estadios de actividad, en la fracción 1M de la cromatografía de intercambio iónico, tal como se indicó en las figuras 3, 16 y 19. En los tres casos los complejos inmunoreactivos con anti-ProTα muestran una movilidad electroforética similar, sin embargo se aprecia una notable diferencia en la concentración de la ProTα presente en los complejos, que disminuye con el descenso de la actividad proliferativa y la inducción de la apoptosis. A la vez que se observa un incremento de la ProTα libre, tal como se deduce de la cuantificación densitométrica presentada en la figura 22.

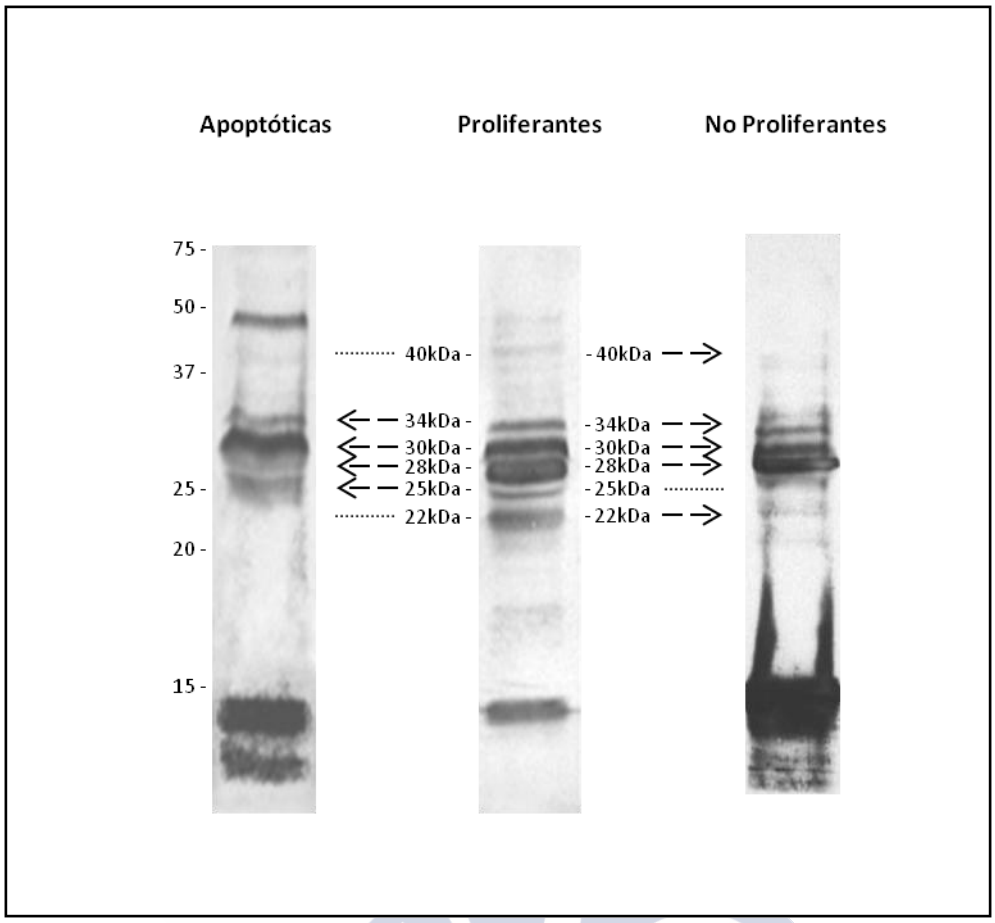


Figura 21. Resumen de los análisis por *immunowestern blot* con anti-ProTα de los fraccionados 1M de intercambio iónico de extractos de células Jurkat proliferantes, con baja actividad proliferativa y apoptóticas, tratradas con formaldehido mostrados en las figuras 3, 16 y 19.

Otra característica destacable en los análisis de *immunowestern blot* de los diversos complejos es que todos son inmunoreactivos a ambos anticuerpos de la ProTα generados contra parte de su secuencia N-terminal (anti-NT-ProTα) y C-terminal (anti-CT-ProTα). Esta propiedad contribuye a confirmar la presencia de la ProTα en todos ellos, pero no podemos descartar que la Timosina α_1 ($T\alpha_1$) pudiera estar incluida en todos o alguno de los complejos, ya que este polipéptido derivado del procesamiento de la ProTα que se corresponde con los primeros 28 aminoacidos de su secuencia, que está presente en el citoplasma de las células de mamíferos y es inmunoreactiva a los anticuerpos anti-NT-ProTα, pero no a anti-CT-ProTα (Sarandeses *et al* 2003). Los análisis de espectrometría de masas no resuelven esta cuestión, dado que los fragmentos de la ProTα identificados se incluyen en su región N-terminal, coincidente con la secuencia de la $T\alpha_1$.

Como aporte necesario a este estudio comparativo de la evolución de los complejos de la ProTα, realizamos la cuantificación de la ProTα libre y ligada a los complejos en células con

baja actividad proliferativa y apoptóticas, siguiendo el mismo procedimiento indicado para la cuantificación en las células proliferantes mostrado en el histograma de la figura 7, y que presentamos de nuevo en la figura 22. En los histogramas de la figura 22A se muestran los niveles de la ProTα libre y ligada a los complejos solubles en células proliferantes, con baja actividad proliferativa y apoptóticas obtenidos mediante el estudio densitométrico de análisis de *immunowestern blot* como los de las figuras 3, 16 y 19, respectivamente. De acuerdo con estos datos, se aprecia una notable diferencia entre las concentraciones de la ProTα ligada a complejos solubles estabilizados por el tratamiento con el formaldehido en las células en proliferación respecto a las observadas en células con baja actividad proliferativa o apoptóticas. De manera que, con el descenso de la actividad proliferativa la concentración de la ProTα ligada a complejos solubles es unas dos veces menor que la ligada en células proliferantes, y con la inducción de la apoptosis esta disminución es más acusada, unas cuatro veces menor.

Respecto a la ProTα no ligada a complejos, su concentración se mantiene dentro de un rango similar (39-42 ng/10^6 células) con el descenso de la actividad proliferativa con respecto a la de células en proliferación, pero en las células que inician su apoptosis esta es notablemente superior, del orden de 2 veces, incluyendo aquí la ProTα no ligada que aparece fragmentada por las caspasas 3 y 7.

En la figura 22B se comparan las concentraciones de los complejos citoplasmáticos solubles identificados en las células en los tres estadios estudiados a lo largo de este trabajo. El descenso de la actividad proliferativa resulta en una bajada general del orden del 50% del conjunto de las concentraciones de los complejos con las mismas movilidades que los caracterizados en células proliferantes, a la vez que desaparece el complejo 25 kDa. El descenso de las concentraciones de los complejos de la ProTα es todavía mayor, más de cuatro veces, en las células en apoptosis temprana, respecto a las concentraciones de los complejos de la misma movilidad en células proliferantes. Con la circunstancia de que desaparecen los complejos 40 kDa y 22 kDa, que son sustituidos por los nuevos complejos 50 kDa y 32 kDa, con unas concentraciones que no superan a la menor concentración de los complejos detectados en las células proliferante.

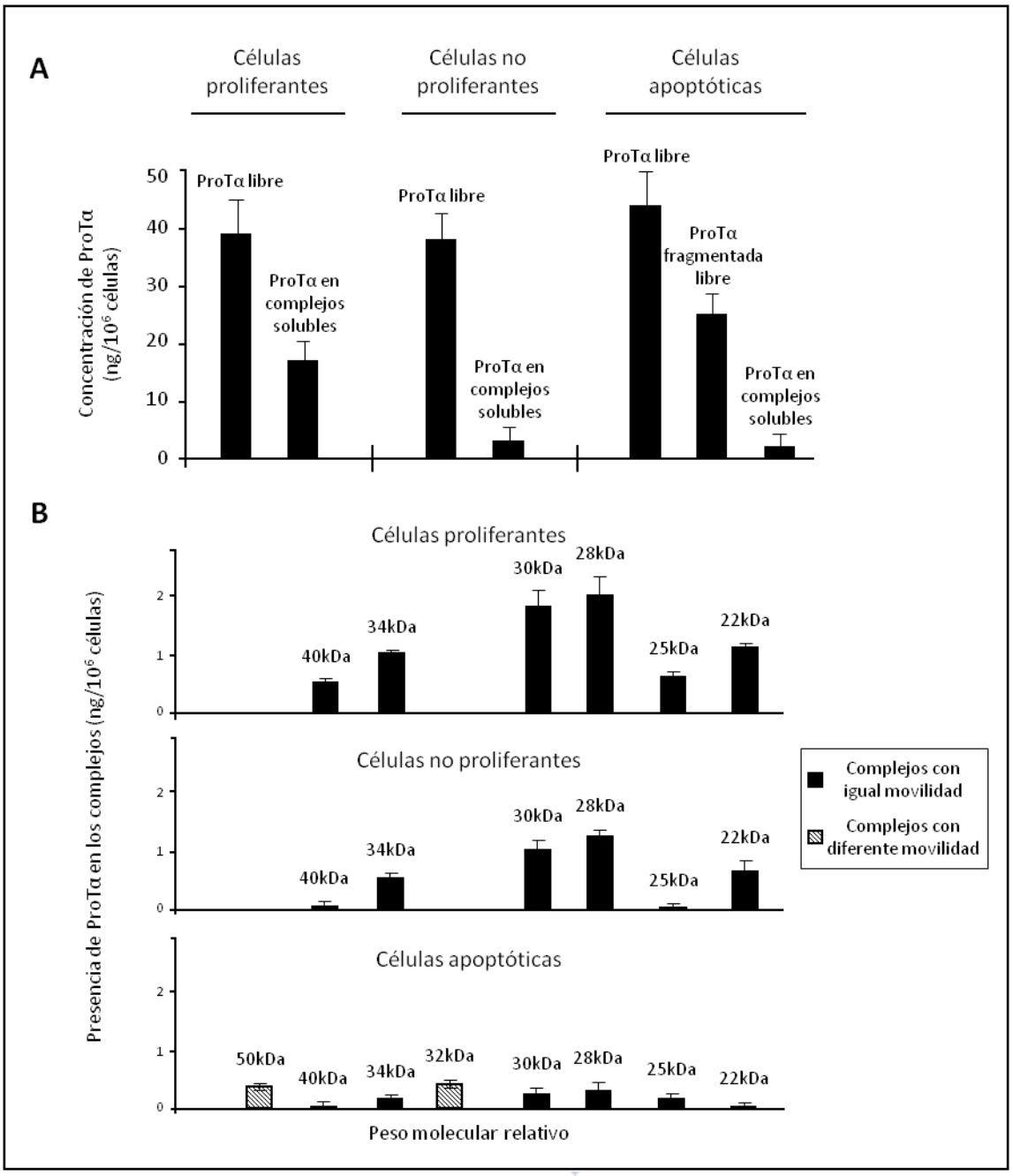


Figura 22. Cuantificación de la ProTα en células Jurkat proliferantes, con baja actividad proliferativa y apoptóticas, tratadas con formaldehido.

A) Concentración de la ProTα en las células Jurkat proliferantes, con baja actividad proliferativa y apoptóticas, tratadas con formaldehido.

El análisis densitométrico fue llevado a cabo como se describe en Material y Métodos 3.11 en experimentos de *immunowestern blot* como los mostrados en las figuras 3, 16 y 19.

B) Concentraciones de los complejos solubles de la ProTα de la fracción 1M de extractos citoplasmáticos en células proliferantes y con baja actividad prolifertativa, y de extracto celular de células apoptoticas.

El análisis densitométrico se realizó como en el apartado A.

Los valores son medias±desviación típica de al menos tres análisis diferentes.

La relación entre las estructuras de los diferentes complejos de la ProTα se resume en la tabla 5, en ella se muestra como los complejos 34 kDa, 30 kDa y 28 kDa presentes en células en proliferación también aparecen en células con baja actividad proliferativa y en apoptosis temprana. Esta coincidencia en la movilidad electroforética se refleja también en la presencia común de algunas de las proteínas que acompañan a la ProTα, de tal forma que el descenso de la actividad proliferativa y la inducción de la apoptosis, además de promover una disminución en la concentración de los diferentes complejos, afecta a la estructura de estos, al variar la composición de las diferentes proteínas que en ellos se integran, lo que modifica sus características como ya hemos indicado en los respectivos estudios y que resumimos a continuación.

Si nos fijamos en el complejo 34 kDa, vemos que el descenso de la actividad proliferativa induce la desaparición de la interacción de la ProTα con ANP32A, la proteína mitocondrial transportadora de fosfato y con la β-actina, que son sustituidas por la tropomiosina α, la delta(3,5)-delta(2,4)-dionil-CoA isomerasa mitocondrial y la proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial; mientras que se mantienen las relaciones de la ProTα con la proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento mitocondrial y la subunidad α tipo 1 del proteasoma. En la apoptosis en este complejo se mantiene la interacción de la ProTα con la subunidad α tipo 1 del proteasoma, también se pierde la interacción con ANP32A, la proteína mitocondrial transportadora de fosfato, la proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento mitocondrial y con la β-actina que son sustituidas por la delta(3,5)-delta(2,4)-dionil-CoA isomerasa mitocondrial y la proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial, que también están en células con baja actividad prolifertativa, y por las proteínas nuevas: 40S proteína ribosomal S3, 60S proteína ribosomal L7 y la proteína 14-3-3 epsilon.

En el complejo 30 kDa la bajada de la actividad proliferativa induce la pérdida de la interacción con ANP32B, que es sustituida por la subunidad β tipo 7 del proteasoma y las proteínas 14-3-3 gamma, 14-3-3 zeta/delta y 14-3-3 beta/alpha; manteniéndose la interacción de los demás componentes de este complejo: ANP32A, la ADP/ATP traslocasa 2 y la subunidad α tipo 3 del proteasoma. Con la inducción de la apoptosis la interacción con estas proteínas se mantiene, también se pierde la interacción con ANP32B, y aparece como nuevo componente la proteína 14-3-3 zeta/delta, presente en el mismo complejo en células con baja actividad proliferativa.

En el complejo 28 kDa las interacciones de la ProTα con ANP32A y ANP32B evolucionan de forma diferente. Se pierde la interacción de la ProTα con ANP32A al descender la actividad proliferativa y se mantienen las dos en apoptosis, pero en muy baja concentración, a la vez que aparecen nuevos componentes con la evolución de la actividad celular. La proteína 29 del retículo endoplasmático y la endopeptidasa Clp se incluyen en el complejo con el descenso de la proliferación, mientras que las proteínas 14-3-3 gamma, 14-3-3 zeta/delta y la subunidad α tipo 6 del proteasoma lo hacen en el complejo apoptótico.

En lo que respecta a los demás complejos y sus componentes, el complejo 40 kDa evoluciona de forma que con el descenso de la actividad proliferativa se pierde la interacción con la β-actina y con la apoptosis el complejo desaparece totalmente. Una evolución similar la presenta el complejo 22 kDa, que en células con baja actividad proliferativa incorpora las interacciones con las proteínas: Rab-11A relacionada con Ras, Rab-6A relacionada con Ras y el inhibidor 2 de la disociación Rho-GDP; y desaparece en la apoptosis. La presencia de estas proteínas de ubicación citoplasmática al descender la actividad proliferativa compartiendo la interacción de la ProTα con SET en este complejo refuerza la posibilidad de que el complejo 22 kDa (ProTα-SET) en células proliferantes sea de localización citoplasmática.

Es precisamente la inducción de la apoptosis la que produce la más notable variación de las dianas celulares de la ProTα. De manera general se produce un descenso de las concentraciones de los complejos de la ProTα y, además de las variaciones indicadas en su composición, surgen dos nuevos complejos: 50 kDa y 32 kDa. Complejos en los que se agrupan interacciones de la ProTα con proteínas relacionadas con la actividad mitocondrial y citoesqueletal, proteasas y proteínas relacionadas con la actividad apoptótica.

El complejo 25 kDa apoptótico similar en tamaño al caracterizado en células proliferantes presenta como más significativas diferencias la desaparición de la interacción con ANP32A y ANP32B, que son sustituidas en menor concentración por SET.

COMPLEJO (Movilidad electroforética)	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS		
	PROLIFERANTES	NO PROLIFERANTES	APOPTÓTICAS
50 kDa			• β-actina • Proteína VAT-1 • La subunidad 2 del complejo cit b-c_1, mitocondrial • Proteína de migración nuclear nudC • ProTα
40 kDa	• SET • β-actina • Proteína relacionada con MARCKS (MRP) • ProTα	• SET • Proteína relacionada con MARCKS (MRP) • ProTα	
34 kDa	• Proteína mitocondrial transportadora de fosfato • Proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento, mitocondrial • ANP32A • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • ProTα • β-actina	• Proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento, mitocondrial • Tropomiosina α • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • Delta(3,5)-delta(2,4)dionil-CoA isomerasa, mitocondrial • Proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial • ProTα	• 40S proteína ribosomal S3 • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • Delta(3,5)-delta(2,4)dionil-CoA isomerasa, mitocondrial • 60S proteína ribosomal L7 • Proteína transportadora 2-oxoglutarato/malato mitocondrial • Proteína 14-3-3 epsilon • ProTα
32 kDa			• Proteína 14-3-3 zeta/delta • Proteína 14-3-3 gamma • ATP/ADP traslocasa 2 (ADT2) • ATP/ADP traslocasa 3 (ADT3) • ANP32A • Subunidad α tipo3 del proteasoma • Captepsina D • Subunidad α tipo 1 del proteasoma • ProTα
30 kDa	• ANP32A • ANP32B • ADP/ATP traslocasa 2 (ADT2) • ProTα • Subunidad α tipo 3 del proteasoma	• ANP32A • Proteína 14-3-3 zeta/delta • Subunidad α tipo 3 del proteasoma • Subunidad β tipo 7 del proteasoma •Proteína 14-3-3 beta/alpha •ATP/ADP traslocasa 2 (ADT2) • ProTα • Proteína 14-3-3 gamma	• ANP32A • Proteína 14-3-3 zeta/delta • Subunidad α tipo 3 del proteasoma • ProTα • ATP/ADP traslocasa 2 (ADT2)
28 kDa	• ANP32A • ANP32B • ProTα	• ANP32B • Proteína 29 del retículo endoplasmático (ERp29) • ProTα • Endopeptidasa Clp, mitocondrial	• ANP32A • ANP32B • Proteína 14-3-3 zeta/delta • Subunidad α tipo 6 del proteasoma • Proteína 14-3-3 gamma • ProTα
25 kDa	• ANP32A • ANP32B • Proteína Rab-11A relacionada con Ras • ProTα		• SET • Proteína Rab-1A relacionada con Ras • Proteína Rab-1B relacionada con Ras • ProTα
22 kDa	• SET • ProTα	• Proteína Rab-11A relacionada con Ras • Inhibidor 2 de la disociación Rho-GDP (Rho GDI 2) • Proteína Rab-6A relacionada con Ras • SET • ProTα	

Tabla 5. Resumen de los resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M del extracto celular de células Jurkat proliferante, con baja actividad proliferativa e inducidas a apoptosis con estaurosporina.

En resumen, podemos concluir que la estabilización de las interacciones de la ProTα, inducidas por el tratamiento con formaldehido de las células Jurkat en proliferación, se concreta en la formación de complejos en los que se implica sobre un 10% del contenido de la ProTα. La composición de los complejos formados denota su origen citoplasmático y que, a juzgar por la estructura de sus componentes, parecen relacionarse principalmente con la actividad citoplasmática de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B. Actividad que, de acuerdo con las propiedades descritas para estas proteínas, se correspondería con el control de la apoptosis. De acuerdo con la cuantificación de estas proteínas y de los resultados de nuestra investigación, parece evidente que solo una parte del contenido celular de SET, ANP32A y ANP32B interaccionaría, así mismo, con una porción de la ProTα celular. El descenso de la actividad proliferativa promueve la disminución de más del 50% de las concentraciones de estos complejos, descenso que se acrecienta con la apoptosis, manifestándose una progresiva pérdida de la capacidad de interacción con estas proteínas, especialmente ANP32A y ANP32B. Las propiedades de los componentes que bajo estas condiciones se incorporan a los complejos confirman la ubicación citoplasmática de los complejos y la relación de estos con la actividad mitocondrial y con la actividad apoptótica promovida por estos orgánulos.

En el caso de las interacciones de la ProTα con ANP32A, su efecto sobre la supervivencia pudiera corresponderse con la capacidad de la ProTα para bloquear las actividades descritas para la ANP32A en extractos celulares, en los que esta proteína parece ejercer un efecto pro-apoptótico a través de la activación del apoptosoma, efecto que *in vitro* se ha demostrado que es contrarrestada por la ProTα (Jiang *et al.,* 2003). A falta de conocer los mecanismos moleculares por los cuales los diferentes complejos ejercen su papel en la actividad celular, de acuerdo con las funciones citoplasmáticas descritas para SET y ANP32B, estas podrían cooperar en la función anti-apoptótica de la ProTα.

4.4- Estudio de las interacciones de la ProTα en células en apoptosis inducida por Actinomicina D

Para profundizar en el conocimiento de la transcendencia biológica de los complejos de la ProTα, especialmente en lo que respecta a su relación con la actividad del apoptosoma, llevamos a cabo un experimento en el que hemos inducido la apoptosis de las células Jurkat con Actinomicina D (Act D) un antibiótico que inhibe las RNA polimerasas dependientes de DNA y por tanto la síntesis de RNA, induciendo apoptosis en diferentes tipos celulares por un mecanismo que, aunque no esclarecido, se caracteriza porque promueve la degradación

apoptótica del DNA en condiciones en las que no parece activarse la caspasa 9 y por tanto el apoptosoma (Kumarswamy *et al.,* 2009; Kleff *et al.,* 2000). Para ello, incubamos las células Jurkat en crecimiento exponencial con Act D 1 µg/ml (concentración usual para la rápida inducción de la apoptosis) durante diversos tiempos y en los extractos celulares determinamos las actividades de la caspasa 9 y caspasa 3. En la figura 23 se presenta el resultado de estos ensayos, en el que se comparan estas actividades con las obtenidas en células activadas con estaurosporina.

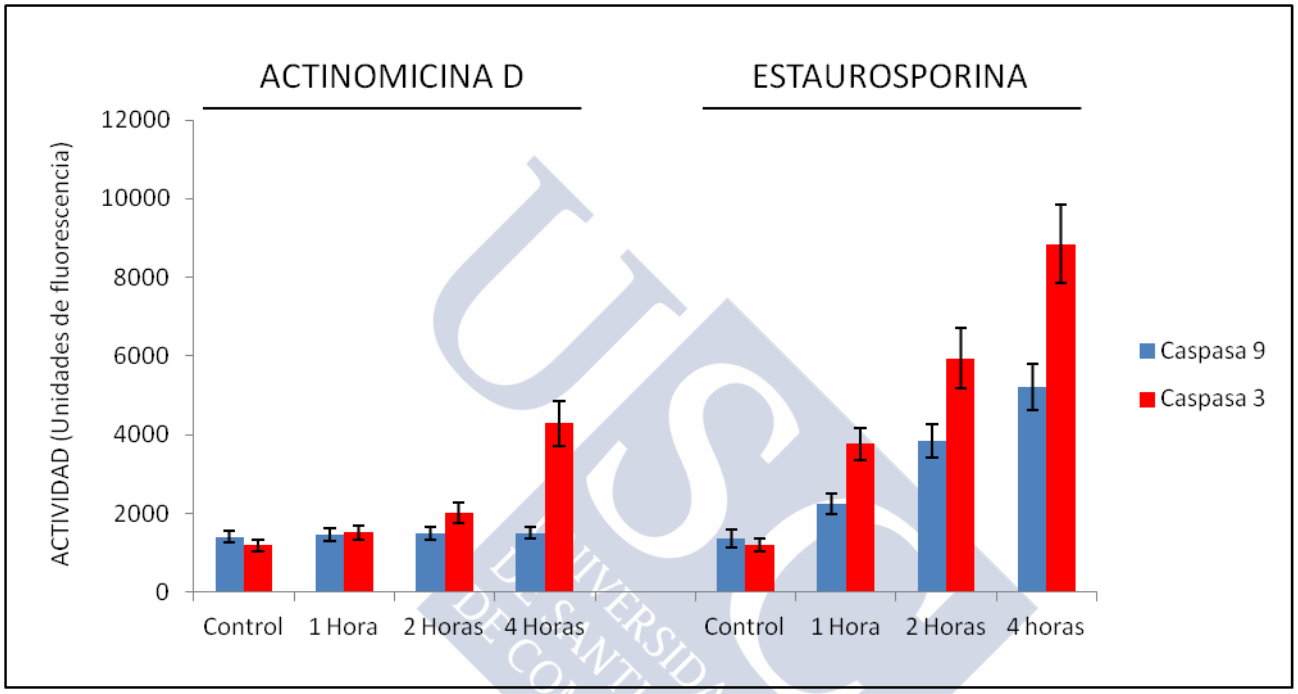


Figura 23. Análisis de la inducción de la apoptosis con actinomicina D y estaurosporina en células Jurkat mediante la cuantificación de las actividades caspasa 9 y caspasa 3.
En alícuotas de extacto citoplasmático de células Jurkat tratadas con Act D 1 µg/ml o estaurosporina 0,5 µM durante 1, 2 y 4 horas se probaron las actividades caspasa 9 y caspasa 3 como se describe en Material y Métodos 3.18. Los controles son ensayos de actividades de células en proliferación en ausencia de activadores. Los valores son medias±desviación típica de tres análisis diferentes realizados por duplicado.

Estos resultados indican que después de 4 horas de incubación con Act D no se aprecia activación de la caspasa 9 y solo después de ese tiempo se observa un modesto incremento de la caspasa 3, tal como se describe que ocurre en la activación apoptótica con Act D (Kumarswamy *et al.,* 2009; Kleff *et al.,* 2000). Este resultado, sin embargo, contrasta con los niveles de activación de las caspasas 9 y 3 alcanzada por la activación con estaurosporina, que se corresponde con la demostrada activación de la apoptosis por la vía apoptosómica (Manns *et al*., 2011).

Para estudiar la presencia de complejos de la ProTα en estas células apoptóticas inducidas por Act D procedimos a la separación cromatográfica por intercambio iónico de extractos de células incubadas con Act D 1 μg/ml durante 4 horas y tratadas con formaldehido, para su posterior análisis por *immunowestern blot*. En este análisis usando el anticuerpo anti-NT-ProTα, que se muestra en la figura 24A, no se observan complejos de la ProTα y se aprecia una muy ligera fragmentación de la ProTα (del orden del 5%), tal vez relacionada con la modesta activación de la caspasa 3 observada en la figura 34.

De este análisis se deduce un comportamiento diferente de los complejos de la ProTα del observado en las células Jurkat apoptóticas por el tratamiento con estaurosporina (ver figura 19). Hay que tener en cuenta que en las condiciones en las que se ha llevado a cabo el tratamiento con Act D, y tal como se ha descrito, en diferentes tipos celulares se produce una rápida paralización de la actividad del DNA y su fragmentación después de 2 horas, aunque su influencia en la actividad mitocondrial y en la aparición de la caspasa 3 activa es tardía, después de 4 horas de incubación (Kumarswamy *et al.,* 2009; Kleff *et al.,* 2000).En estas condiciones, la paralización de la actividad mitogénica puede explicar la total desaparición de complejos de la ProTα que pudieran relacionarse con la supervivencia celular. En cualquier caso, estaríamos ante un mecanismo de inducción de la apoptosis no relacionado con la activación del apoptosoma y por consiguiente de la caspasa 9 y de un alto nivel de la caspasa 3, que si ocurre con el tratamiento con estaurosporina, en el cual además se produce una rápida y cuantitativa proteólisis de la ProTα.

Con la finalidad de comprobar la evolución de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B en células Jurkat tratadas con Act D y para apreciar tanto su posible proteólisis como la formación de complejos con otras proteínas que no fueran la propia ProTα, llevamos a cabo la separación por SDS-PAGE de los diferentes fraccionados de intercambio iónico para su posterior análisis por *immunowestern blot* con los anticuerpos anti-SET y anti-ANP32A/B. El resultado mostrado en la figura 24B indica que los únicos componentes inmunoreactivos que aparecen entre los más acídicos (fracción 1M) presentan las movilidades electroforéticas de las propias SET, ANP32A y ANP32B. La tinción con Coomassie de la fracción 1M de células tratadas con Act D que se incluyen en la figura 24B indica un patrón de proteínas similar a la fracción 1M procedente de células tratadas con estaurosporina (ver figura 19). En estos patrones se observan proteínas con la movilidad de SET, ANP32A y ANP32B. En los resultados de *immunowestern blot* de la figura 24B también se aprecia la no fragmentación de estas proteínas en las células Jurkat tratadas con Act D.

Un posterior análisis de alícuotas de las bandas con las movilidades de SET, ANP32A y ANP32B de la fracción 1M de células apoptóticas inducidas por Act D por *immunowestern* con los respectivos anticuerpos demostró que se corresponden con SET, ANP32A y ANP32B. Y el tratamiento térmico y análisis por SDS-PAGE de alícuotas de estas bandas, para propiciar la ruptura de los enlaces de formaldehido, mostró que estas proteínas se encuentran libres sin formar complejos con otras (datos no mostrados).

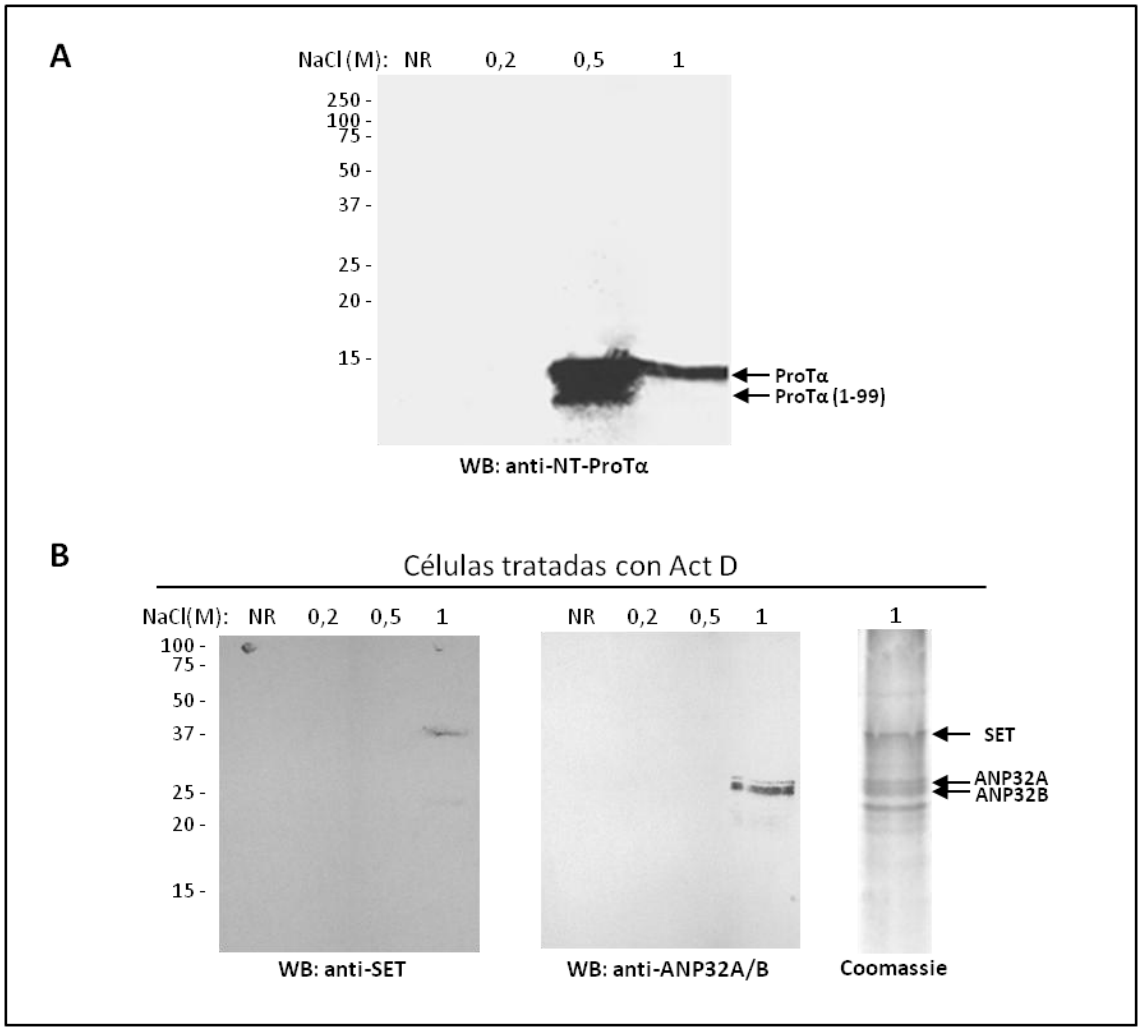


Figura 24. Análisis de los fraccionados de intercambio iónico de células Jurkat en las que se ha inducido la apoptosis con actinomicina D (1 µg/ml/4 horas) y tratadas con formaldehido.
A) *Immunowestern blot* anti-NT-ProTα de los fraccionados de intercambio iónico.
Alícuotas las fracciones eluidas con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M, 0,5M y 1M fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-NT-ProTα (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6).
B) *Immunowestern blot* anti-SET y anti-ANP32A/B de los fraccionados de intercambio iónico.
Alícuotas las fracciones eluidas con tampón (NR) o con tampón conteniendo NaCl 0,2M, 0,5M y 1M de fueron separadas por SDS-PAGE (15% acrilamida) y analizadas por *western blot* con anti-SET y anti-ANP32A/B (transferencia en condiciones específicas para proteínas ácidas como se describe en Materiales y Métodos 3.6).

5- ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROT α EN CÉLULAS 293T

Con el propósito de establecer si las interacciones de la ProTα caracterizadas en células Jurkat en proliferación podrían extenderse a otros tipos celulares de mamíferos, llevamos a cabo el análisis de las interacciones de la ProTα en células 293T, siguiendo el mismo procedimiento de estabilización de las interacciones con formaldehido que el realizado con las células Jurkat.

Los subfraccionados citoplasmáticos y nucleares de células 293T tratadas con formaldehido fueron fraccionados por cromatografía de intercambio iónico y las diferentes fracciones analizadas por *immunowestern blot* usando los anticuerpos anti-NT-ProTα y anti-CT-ProTα. Este análisis (datos no mostrados) indicó una distribución de proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα similar al obtenido en el estudio de los fraccionados de las células Jurkat proliferantes (ver figura 3). De manera que solo se observaron componentes inmunoreactivos con anti-ProTα en el rango entre 40 kDa-20 kDa, incluida la ProTα, en la fracción 1M de extractos citoplasmáticos. Los resultados fueron similares con los dos anticuerpos. En la figura 25A se muestran los análisis de alícuotas de las fracciones con 1M NaCl, teñidas con Coomassie o analizadas por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα. Se observa una coincidencia entre las proteínas teñidas con Coomassie con los componentes inmunoreactivos con anti-ProTα en el rango entre 40 kDa-22 kDa, similar a lo encontrado en el mismo fraccionado de células Jurkat. Las bandas indicadas en la figura 25A fueron cortadas y analizadas para confirmar su inmunoreactividad con anti-ProTα. El resultado de este análisis se muestra en la figura 25B, en el que se demuestra la presencia de seis complejos de la ProTα (40 kDa, 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa, 25 kDa y 22 kDa) de movilidades similares a los caracterizados en las células Jurkat en proliferación.

El tratamiento térmico para la ruptura de los enlaces de formaldehido y el análisis por espectrometría de masas demostró que se tratan de complejos de composición similar a la de los complejos descritos en las células Jurkat en proliferación (datos no mostrados).

Estos resultados parecen demostrar que el comportamiento de la ProTα encontrado en el citoplasma de las células Jurkat pudiera ser extensible a células de mamíferos en proliferación.

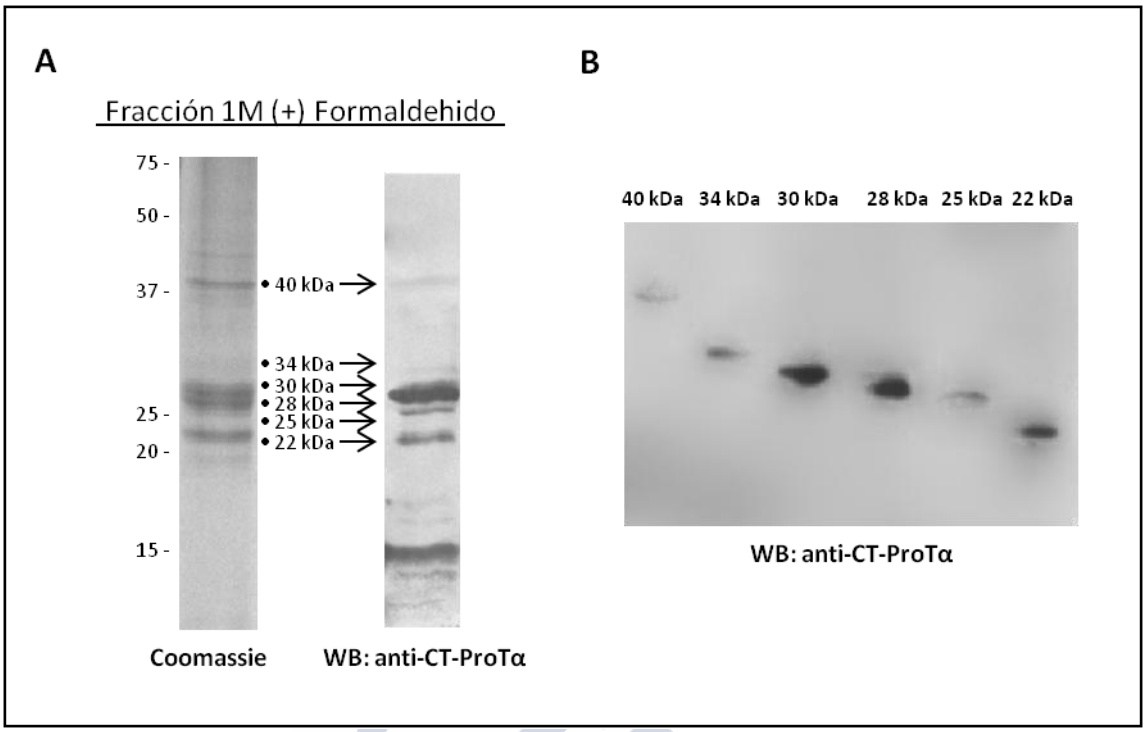


Figura 25. Análisis de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα de la fracción 1M de intercambio iónico de citoplasma de células 293T tratadas con formaldehido.

A) Identificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-CT- ProTα

Alícuotas de la fracción 1M del extracto citoplasmático de células 293T tratadas con formaldehido fueron separadas en paralelo por SDS-PAGE para su tinción con Coomassie o para su análisis por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα. Se indica la correspondencia entre las bandas de proteína teñidas con Coomassie (40, 34, 30, 28, 25 y 22 kDa) con los complejos del *immunowestern.*

B) Purificación de las proteínas inmunoreactivas con anti-ProTα

Fragmentos de las bandas cortadas del gel teñido con Coomassie fueron separados por SDS-PAGE y analizados por *immunowestern blot* con anti-CT-ProTα (como se describe en Material y Métodos 3.7).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V. DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V. DISCUSIÓN

La estabilización de interacciones proteína-proteína llevada a cabo por tratamiento de células Jurkat con formaldehido nos ha permitido aislar seis complejos que resultan de la interacción de la ProTα con otras proteínas, entre las que son principales componentes las proteínas SET, ANP32A y ANP32B. Estructuralmente estos complejos son muy acídicos como resultado del bajo punto isoeléctrico de las proteínas que los componen (pI entre 3,5-4.1). Esta propiedad confiere a los complejos un bajo tamaño molecular aparente en electroforesis y aunque ello dificulta su purificación por cromatografía de intercambio iónico, sin embargo, facilita una eficiente separación de los demás componentes de los extractos celulares y la posterior caracterización y purificación por SDS-PAGE.

De acuerdo con nuestros análisis los complejos son de localización citoplasmática y solo una porción, del orden del 10%, del contenido celular de la ProTα forma parte de ellos, con una asociación selectiva de ProTα/SET (complejos 40 kDa y 22 kDa) y de ProTα/ANP32A/ANP32B (complejos 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa). Así como, una especial asociación de ProTα/ANP32A en el complejo 34 kDa.

En referencia a la localización de la ProTα en los extractos celulares, es característica su predominante presencia citoplasmática resultado de la propiedad de vertido originado en los procesos de homogeneización, aún en condiciones isotónicas (Manrow *et al.,* 1991; Enkeman *et al*., 2000; Covelo *et al.,* 2006) y que contrasta con los análisis de inmuofluorescencia en los que se observa una muy preferente ubicación nuclear de la ProTα (figura 15). Con ellos, surge una controversia sobre el origen celular de los complejos de la ProTα. Sin embargo, y de acuerdo con la composición de estos complejos con la excepción del complejo ProTα/SET de 22 kDa, todas o algunas de las proteínas que aparecen en los demás complejos son de ubicación citoplasmática, por lo que ese 10% del contenido celular de la ProTα unida a los complejos debería, originalmente, tener una ubicación citoplasmática. De manera que el 33% del contenido celular de la ProTα que acompaña a los complejos en los extractos citosólicos de las células Jurkat tratadas con formaldehido pudiera corresponderse con la ProTα no enlazada a otras proteínas de origen tanto nuclear como citoplasmático. A este respecto hay que reseñar que el resto de la ProTα celular (un 60%) que no es detectada en los extractos celulares debería estar incluida en macrocomplejos con proteínas relacionadas con la actividad

nuclear de la ProTα, incluidas histonas, cuyo tamaño hemos demostrado que superan los 700 kDa (Covelo *et al.,* 2006).

En lo que respecta a las principales proteínas que están presentes en los complejos con la ProTα: SET, ANP32A y ANP32B, desde un punto de vista de su distribución celular son proteínas de prominente ubicación nuclear tal como se deduce de nuestros análisis de inmunofluorescencia (figura 15) y de lo descrito por otros autores (Adachi *et al.,* 1994; Pan *et al.,* 2009; Fries *et al.,* 2007; Brennan *et al.,* 2000). En cambio, en extractos de Jurkat (figura 8) la proteína SET aparece exclusivamente en la fracción citoplasmática mientras que ANP32A y ANP32B aparecen distribuidos en ambos extractos: nucleares y citoplasmáticos, aunque con una preferente localización citoplasmática, lo que es más acorde con el análisis de inmunofluorescencia. Dadas las características estructurales de estas proteínas similares a la ProTα, que se incluyen entre el grupo de proteínas acídicas de fácil movilidad núcleo-citoplasma, parecen presentar también una acusada tendencia a movilizarse al citoplasma con la homogeneización celular.

Dada la alta concentración celular de estas proteínas que se aproxima a la de la ProTα y la propia concentración de los complejos de la ProTα, parece que solo una parte del contenido celular de SET, ANP32A y ANP32B, tal vez en una proporción equimolecular, participa en los complejos de la ProTα con ubicación citoplasmática. La dificultad para separar la porción de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres de las que se encuentran formando parte de los complejos 40 kDa, 30 kDa y 28 kDa, en los que están unidas a la ProTα, dificulta el cálculo del porcentaje de estas proteínas que interaccionan con la ProTα en el citoplasma celular. Sin embargo, de los resultados obtenidos en nuestros experimentos de filtración molecular (figura 11), de coinmunoprecipitación (figura 13), de afinidad a ProTα (figura 14) y del análisis de inmunofluorescencia que muestra su distribución celular (figura 15) contribuyen a demostrar una asociación parcial del contenido celular de todas estas proteínas con la ProTα en el citoplasma de las células Jurkat. A este respecto, debemos de recordar que estas proteínas, como ocurre con la misma ProTα, se encuentran en las células a una concentración similar al de una histona *core* (Freire *et al.,* 2002), por lo que concentraciones del orden del 10% de cada una de estas proteínas, significa que los diferentes complejos pueden alcanzar, dentro del citoplasma de las células Jurkat en proliferación, niveles de concentración significativos en el metabolismo citoplasmático.

De acuerdo con la composición de los complejos, la ProTα muestra una preferente afinidad por las proteínas ANP32A y ANP32B (complejos 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa) en

las células en proliferación, en su conjunto más de 3 veces superior a los complejos 40 kDa y 22 kDa en los que se encuentra la proteína SET. Sin embargo, es claro que las demás proteínas que acompañan a la ProTα en los diferentes complejos deben de jugar un papel fundamental, tanto en la orientación de afinidades para dar lugar a la formación de los complejos diferenciados, como en la localización subcelular de cada uno de ellos. Esta influencia, además, debe de repercutir en la capacidad funcional, bien diferencial o coordinada, de los complejos formados. Aunque, hace unos años se ha publicado la capacidad de la ProTα para interaccionar con SET en extractos de células HeLa (Karetsou *et al*., 2004), en nuestro trabajo se muestra, por primera vez, la interacción *in vivo* de ProTα con SET, ANP32A, ANP32B y con los demás componentes de los complejos caracterizados, como un paso fundamental para esclarecer los mecanismos moleculares de las actividades de dichos complejos.

Evolución y posible función de los complejos en distintas condiciones celulares

La principal cuestión a resolver ahora es el establecer la significación biológica de estas interacciones de la ProTα. A este respecto, los más significativos componentes de los complejos son proteínas de las que se han descrito una preferente función nuclear relacionada con la actividad de la cromatina, tanto SET (Seo *et al.,* 2001), como ANP32A (Seo *et al.,* 2001, 2002) y ANP32B (Tochio *et al.,* 2010), a través de su capacidad de interaccionar con las histonas *core*, con enzimas modificadoras de histonas y proteínas relacionadas con las actividad de la cromatina, lo que constituye una capacidad funcional similar a la demostrada para la propia ProTα (Díaz-Jullien *et al.,* 1996; Covelo *et al.,* 2006; Freire *et al.,* 2001). No obstante, la estructura de los complejos de la ProTα que hemos caracterizado parece vincular a estas proteínas a una función citoplasmática junto con la ProTα. En lo hasta ahora publicado, la función citoplasmática de SET, ANP32A y ANP32B es su papel en el control de la supervivencia celular. De manera que se ha descrito el efecto anti-apoptótico de SET en el citoplasma como controlador de la actividad de la DNasa activada por Granzima A (GAAD) (Fan *et al.,* 2003). SET participa en el control de GAAD formando un complejo (complejo SET) con ANP32A, HMG2 (proteína que se une a DNA) y Ape 1 (enzima reparadora de DNA). La inducción de la apoptosis por un mecanismo independiente de caspasas promovido por la Granzima A provoca la degradación proteolítica de SET por este enzima, liberándose la actividad DNasa de GAAD para degradar el DNA. Los complejos de SET con la ProTα parecen no guardar relación con el descrito por Fan *et al*. (2003)

Por lo que respecta a ANP32A, además de la indicada interacción con SET en el control de una vía apoptótica no dependiente del apoptosoma, hay una extensa descripción del efecto

pro-apoptótico de esta proteína relacionado con la vía apoptosómica de la inducción de la apoptosis (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010). En esta vía se ha demostrado *in vitro* un efecto anti-apoptótico de la ProTα, antagonizando la acción de ANP32A en el citoplasma celular, por un mecanismo no esclarecido. Menos conocida es la función citoplasmática de ANP32B, se ha descrito un papel anti-apoptótico independiente de ProTα, relacionado con el control de la expresión del inhibidor de la apoptosis (XIAP) (Roth *et al.,* 2001), aunque no se conoce el mecanismo de esta implicación.

De acuerdo con nuestros resultados, las interacciones de la ProTα con estas proteínas, podían relacionarse con un mecanismo de control de la apoptosis inducida por la activación del apoptosoma. Por otra parte, las propiedades de las proteínas que acompañan a la ProTα en los complejos detectados en las células en proliferación, todas ellas implicadas en actividades multifuncionales de ubicación preferentemente citoplasmática, bien relacionadas con la actividad mitocondrial, vacuolar, proteolítica o del citoesqueleto, parecen indicar que la participación de los complejos de la ProTα en el posible control de la supervivencia celular se produciría por un mecanismo en el que el control de la permeabilidad mitocondrial y de la actividad proteolítica afectaría a la capacidad de iniciar la ruta de activación del apoptosoma.

Las características estructurales de los diferentes complejos nos indican una participación de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B en el control de la actividad celular de una manera diferente a lo que hasta ahora se había encontrado para estas proteínas. Las asociaciones diferenciadas de la ProTα con SET en los complejos 40 kDa y 22 kDa y de la ProTα con ANP32A y ANP32B en los complejos 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa, representan una novedad respecto a las asociaciones de SET-ANP32A descritas en el complejo SET con GAAD (Fan *et al.,* 2003) antes mencionado y en el complejo inhibidor de la acetilación de histonas *core* INHAT (Seo *et al.,* 2001, 2002). La presencia de los diferentes complejos permite especular sobre la posibilidad de que cada uno pudiera relacionarse con una participación individual en el mecanismo de regulación de la supervivencia o bien funcionar de una manera concertada con alguno o todos los demás. En cualquier caso, nuestro estudio sobre la influencia del descenso de la actividad proliferativa y la inducción de la apoptosis, permiten orientar un posible mecanismo de su participación en la actividad celular.

Así, las características del complejo 40 kDa denotan una relación de parte del contenido celular de la ProTα y SET con una actividad citoesqueletal vinculada a la β-actina y a la proteína relacionada con MARKS (MRP). La disminución de la concentración de la ProTα en este complejo y la pérdida de la interacción con la β-actina que conlleva una bajada de la

actividad proliferativa, así como la desaparición de este complejo con la inducción de la apoptosis, demuestra una correspondencia de la estructura del complejo con la proliferación celular. Dada la relación encontrada entre la actividad citoesqueletal de la β-actina y su efecto pro-apoptótico, relacionado con el control de la activación de las mitocondrias para iniciar la vía apoptosómica de la apoptosis (Tang *et al*., 2006) y el propio papel de MRP como reductor de la plasticidad de la β-actina (Sundaram *et al.,* 2004), hacen plausible el que un papel anti-apoptótico de la ProTα y SET podría resultar de su capacidad para prevenir la actividad pro-apoptótica de la β-actina, en la que colaboraría la interacción con la proteína MRP.

Por otra parte, la interacción de la ProTα con la β-actina, que ya en trabajos previos habíamos demostrado (Covelo *et al*., 2006; Freire *et al*., 2001) es una propiedad que la ProTα comparte con la timosina β_4. Este péptido, originalmente relacionado con la defensa inmunológica junto con las timosinas α (Goldstein *et al.*, 1972), posee la capacidad de interaccionar con la actina, participando en la regulación de su polimerización (Sanders *et al*., 1992; Huff *et al.,* 2001) y en la angiogénesis (Smart *et al*., 2007).

La interacción de la ProTα con la β-actina que encontramos en el complejo 50 kDa, que aparece solamente en la iniciación de la apoptosis inducida por estaurosporina, reforzaría la relación apoptótica de esta interacción. Además, la presencia en este complejo de las proteína VAT-1 (Eura *et al.,* 2006), la subunidad-2 del complejo cit b-c_1 (Hosokawa *et al.*, 1989) y la proteína de migración nuclear nudC (Aumais *et al*., 2003), todas ellas relacionadas con la actividad mitocondrial y la apoptosis, corroboran una función citoplasmática de la ProTα, relacionada con mecanismos de control de la actividad mitocondrial para iniciar la apoptosis.

Por lo que respecta a la función que pudiera desempeñar el complejo ProTα/SET de 22 kDa, la evolución de sus componentes con el descenso de la actividad proliferativa, con la incorporación de las proteína Rab11A y Rab6A, relacionadas con el control del tráfico entre membranas en el citoplasma (Hutagalung & Novick, 2011), y con la proteína Rho GDI 2, inhibidora del intercambio GDP/GTP de las proteínas Rho (Takai *et al.*, 2001), parece demostrar que este complejo ProTα/SET, que en las células en proliferación no aparece relacionado con otras proteínas, tendría una localización citoplasmática. De tal manera que la función del complejo, que desaparece con la apoptosis, podría estar vinculada al mantenimiento de la supervivencia celular por un mecanismo no conocido. En este sentido, el papel anti-apoptótico de la proteína Hsp90, relacionada con la ProTα debido a su capacidad para inhibir la apoptosis iniciada por las mitocondrias (Pandey *et al.,* 2000) en un mecanismo en el que se implica su capacidad para interaccionar con GTPasas y proteínas semejantes a Rab

(Kang *et al*., 2007, McClellan *et al*., 2007), pudiera tener una correspondencia en el papel del complejo ProTα/SET de 22 kDa.

De acuerdo con la evolución de las estructuras de los complejos en los que se manifiestan las interacciones de la ProTα con las proteínas ANP32A y ANP32B en células en las que se ha producido el descenso de la actividad proliferativa y la inducción de la apoptosis, que se muestra en la tabla 5, se aprecia también una relación de estos complejos con la supervivencia celular asociada con la actividad mitocondrial y la actividad proteolítica intracelular.

De acuerdo con la evolución de los componentes del complejo 34 kDa, en la que se manifiesta una permanente interacción con proteínas implicadas en la actividad mitocondrial, así como con proteínas de la familia 14-3-3 relacionadas con las vías de señalización en el mantenimiento de la supervivencia y muerte celular (Gardino & Yaffe, 2011), hacen pensar que este complejo pudiera estar vinculado con el control de la iniciación de la actividad apoptótica ligada a las mitocondrias. De manera que el descenso de la concentración de este complejo (figura 22) y la pérdida de la interacción con ANP32A y con la β-actina en células con baja actividad proliferativa y apoptóticas marcarían la pérdida de la capacidad para promover la supervivencia de las células proliferantes.

Una situación similar se refleja en la evolución del complejo 30 kDa. Se mantiene la relación entre la estructura del complejo y la actividad mitocondrial y la interacción con las proteínas de la familia 14-3-3, más acusado que en el complejo 34 kDa. El gran descenso de su concentración, 50% en células no proliferantes y 90% en células apoptóticas, que conlleva la pérdida de la capacidad de la ProTα para interaccionar con ANP32B y un descenso de su capacidad para interaccionar con los demás componentes del complejo, parece corresponderse con la pérdida de la actividad proliferativa y la inducción de la apoptosis. Por otra parte, la estrecha relación estructural entre el complejo 30 kDa en células no proliferantes con el complejos 32 kDa, que aparece exclusivamente en células apoptóticas, contribuye a relacionarlos con una función similar en el mantenimiento de la actividad proliferativa y la prevención de la apoptosis.

En el caso del complejo 28 kDa, la aparentemente exclusiva interacción de la ProTα con ANP32A y ANP32B en las células en proliferación no permite deducir su ubicación celular. Sin embargo, la presencia de proteínas como la endopeptidasa Clp de localización mitocondrial (Kang *et al.,* 2002) y la proteína ERp29, relacionada con el transporte reticular (Zhang &

Richardson, 2011), en el complejo de células no proliferantes, y la presencia de las proteínas 14-3-3 zeta/delta y gamma en el complejo apoptótico, parece demostrar su localización citoplasmática y, de forma similar al complejo de 30 kDa, su función estaría especialmente relacionada con el nivel de interacción con ANP32A. El descenso del grado de interacción con esta proteína, a medida que se bloquea la actividad proliferativa, marcaría el declive de la resistencia a la apoptosis.

Las características estructurales del complejo 25 kDa, en el que la interacción de la ProTα con ANP32A y ANP32B es compartida por su interacción con la proteína Rab11A, lo relaciona con una función citoplasmática vinculada con la supervivencia celular, por un mecanismo similar al descrito para el complejo de 28 kDa, tal como se deduce por su desaparición con el descenso de la actividad proliferativa y por su presencia residual en células apoptóticas, manteniendo una baja concentración de la ProTα unida a proteínas Rab y sustituyendo la proteína SET a las ANP32A y ANP32B.

De acuerdo, entonces, con el estudio de la evolución de los complejos estabilizados por formaldehido en células con diferente actividad proliferativa o apoptóticas, parece deducirse que las interacciones de la ProTα con SET y con ANP32A y ANP32B, se corresponden con capacidades de estas proteínas para prevenir la entrada en apoptosis de las células Jurkat en proliferación mediante un mecanismo en el que, de manera independiente o coordinada, estos complejos regularían la capacidad de las mitocondrias para activar la vía apoptosómica de la apoptosis. La caracterización de complejos de ProTα en células 293T, similares a los encontrados en células Jurkat indica que la participación de los complejos de ProTα con SET, ANP32A y ANP32B pudiera ser extensible a otras células de mamíferos. Nuestros resultados constituyen una novedosa aportación al esclarecimiento de los mecanismos de control *in vivo* de la actividad del apoptosoma. Estableciendo, por primera vez, la participación de la proteína SET en este proceso, a través de su inclusión en los complejos 40 kDa y 22 kDa de la ProTα. A la vez que se demuestra que el papel pro-apoptótico descrito para ANP32A (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010) parece ser controlado por su inclusión en los complejos 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa en los que la proteína ANP32B podría favorecer la acción anti-apoptótica de la ProTα. En cualquier caso, nuestros datos parecen demostrar una acción conjunta de ProTα/SET/ANP32A/ANP32B que, con la participación de componentes citoplasmáticos y mitocondriales, afectaría a la formación del apoptosoma. Lo que difiere del propuesto mecanismo en el que la ProTα inhibirá el ensamblado de los componentes del apoptosoma y ANP32A activará al complejo apoptosómico ya formado, según los resultados obtenidos

mediante experimentos en extractos celulares (Jiang *et al.,* 2003; Qi *et al.,* 2010). Hay que tener en cuenta que nosotros no encontramos interacciones de la ProTα con Apaf-1 ni otros componentes del apoptosoma, o con proteínas anti/pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, lo que concuerda con los resultados de estudios sobre la composición del apoptosoma (Twiddy *et al*., 2004). Tampoco detectamos interacciones de la ProTα con CAS o Hsp70, que se han descrito como cooperantes de ANP32A en la promoción de la actividad del apoptosoma *in vitro* (Kim *et al*., 2008). Lo que no descarta la posibilidad de que ANP32A pueda implicarse, por mecanismos diferentes a los aquí presentados, en el control de la actividad del propio apoptosoma.

Mediante experimentos de transfección de células 293T con vectores de expresión de ProTα mutada en Thr 7 para evitar su fosforilación, hemos demostrado recientemente la posible implicación de la ProTα fosforilada en Thr 7 por la isoforma M2 de la piruvato quinasa (M2-PK) en los mecanismos anti-apoptóticos de la ProTα en estas células, de manera que la sobreexpresión de la ProTα fosforilada favorecería la acción anti-apoptótica de ProTα (Moreira *et al.*, 2013). Dado que solo un 10% del contenido celular de la ProTα es fosforilada por la M2-PK, hace plausible que esta modificación estructural de la ProTα pudiera corresponderse con el porcentaje celular de esta proteína que se implica en la formación de los complejos citoplasmáticos reguladores de la supervivencia celular. Sin embargo, no encontramos fragmentos de ProTα fosforilados en los análisis de los diversos complejos por espectrometría de masas. Fallo tal vez achacable al agresivo tratamiento utilizado para la rotura previa de los enlaces de formaldehido en los complejos.

En experimentos de estabilización de complejos con formaldehido en células 293T transfectadas con ProTα mutada en Thr 7, no detectamos diferencias en la composición de complejos de la ProTα formados respecto a los encontrados en células transfectadas con el vector vacío (datos no mostrados). Ello pudiera ser debido a que no se puede evitar la expresión endógena de un 30-40% de la ProTα, que conlleva la presencia de ProTα nativa fosforilada (Díaz-Jullien *et al*., 2011; Moreira *et al*., 2013) por lo que la oferta de ProTα recombinante mutada tendría una opción limitada para desplazar a la ProTα fosforilada en la interacción con SET, ANP32A y ANP32B y los demás componentes en la formación de los complejos descritos.

Los datos aquí presentados constituyen una importante aportación al conocimiento de la biología de la ProTα, al demostrar una función citoplasmática de esta proteína aparentemente relacionada con la capacidad para frenar la apoptosis, promovida por mecanismos que implican una asociación con la actividad mitocondrial y del citoesqueleto,

contribuyendo así al mantenimiento de la actividad proliferativa de las células. Tal vez todo ello constituya una manifestación de la multifuncionalidad de ProTα, de manera que su actividad oncogénica sería el resultado del control citoplasmático de la apoptosis, simultaneando con su esencial papel en el metabolismo nuclear para propiciar la proliferación celular.

La futura investigación, en la que se pueda esclarecer el mecanismo molecular del funcionamiento de cada uno de los complejos aquí caracterizados, debería de contribuir a completar la panorámica de la biología de la ProTα.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. CONCLUSIONES

A partir de la actividad investigadora aquí presentada podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Utilizando el formaldehido como estabilizador de interacciones entre proteínas en células de linfoma T (Jurkat) en proliferación, hemos aislado seis complejos, en el rango de 40 kDa-22 kDa, inmunoreactivos contra anticuerpos de la ProTα que co-purifican con los componentes más acídicos de extractos citoplasmáticos de estas células.

2. Del análisis de estos complejos por espectrometría de masas se demuestra una novedosa y preferente afinidad de la ProTα por las proteínas SET, ANP32A y ANP32B:

   a) La ProTα se asocia con SET en el complejo 22 kDa y en el complejo 40 kDa, del que también forman parte la β-actina y la proteína relacionada con MRP.

   b) Los otros cuatro complejos se corresponden con asociaciones de la ProTα en las que predomina la presencia de ANP32A y ANP32B. Un complejo de 34 kDa en el que la ProTα se asocia a ANP32A y a la proteína mitocondrial transportadora de fosfato, la proteína de unión al subcomponente Q1 del complemento, la subunidad α tipo 1 del proteasoma y la β-actina. En los otros tres, la ProTα se asocia a ambas ANP32A y ANP32B en un complejo de 30 kDa, que incluye también la ADP/ATP traslocasa 2 mitocondrial y la subunidad α tipo 3 del proteasoma; en un complejo de 28 kDa con la única presencia de ambas proteínas, y en uno de 25 kDa junto con la proteína Rab-11A relacionada con Ras.

3. Del estudio de la distribución celular y del cálculo de las concentraciones de la ProTα, SET, ANP32A y ANP32B en células Jurkat proliferantes, se concluye que:

   a) Un 10% del contenido celular de la ProTα participa en las interacciones con los componentes de los complejos aislados, mientras que un 33% aparece libre en las células tratadas con formaldehido.

   b) Una parte, no superior al 20%, del contenido celular de cada una de las proteínas SET, ANP32A y ANP32B, parece incluirse en los diversos complejos de la ProTα. De forma que son preponderantes los complejos de la ProTα con ANP32A y ANP32B, un 75% en su conjunto, respecto a los complejos de la ProTα con SET, un 25%. Con

la peculiaridad de que las proteínas SET, ANP32A y ANP32B libres co-purifican, respectivamente, con los complejos 40 kDa, 30 kDa y 28 kDa.

4. La interacción de la ProTα con SET, ANP32A y ANP32B fue confirmada mediante ensayos de inmunoprecipitación cruzada, cromatografía de afinidad a ProTα y co-purificación cromatográfica. La mayoritaria localización nuclear de estas proteínas, demostrada por inmunofluorescencia, indica que solo un pequeño porcentaje del contenido celular de estas proteínas participa en las asociaciones citoplasmáticas.

5. La identificación de las demás proteínas que forman parte de los complejos de la ProTα, sugiere que dichos complejos son de localización citoplasmática y parecen relacionarse con mecanismos dependientes de la actividad mitocondrial y del citoesqueleto.

6. Del estudio del efecto que el descenso de la actividad proliferativa y la inducción de la vía apoptosómica en la apoptosis producen sobre las interacciones de la ProTα, se concluye que:

   a) La implicación de la ProTα en los complejos 40 kDa y 22 kDa es dependiente de la actividad proliferativa, ya que su descenso provoca una notable disminución de sus concentraciones, la pérdida de la interacción con la actina en el complejo 40 kDa y la unión a proteínas Rab acompañando a SET en el complejo 22 kDa. Ambos complejos desaparecen con la inducción de la apoptosis y quedan por esclarecer los mecanismos por los que estos complejos de ProTα-SET se implican en las actividades citosólicas relacionadas bien con la proliferación o con la apoptosis.

   b) La evolución de las interacciones de la ProTα con ANP32A, ANP32B y los demás componentes de los complejos 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa con el descenso de la actividad proliferativa y la inducción de la apoptosis, parecen indicar una función biológica, para estos complejos, implicada en el mantenimiento de la supervivencia celular. En este proceso, la ProTα ejercería un efecto anti-apoptótico bloqueando la actividad pro-apoptótica de la ANP32A. Mediante un mecanismo en el que se implicaría la ANP32B y las proteínas mitocondriales, proteasas y proteínas de la señalización y actividad citoplasmática que las acompañan en los diversos complejos. La composición de los complejos 50 kDa y 32 kDa de presencia exclusiva en células apoptóticas parece reforzar esta posibilidad.

7. De la comparación de la inducción de la apoptosis por actinomicina D y por estaurosporina, se confirma que los mecanismos por lo que se produce el control de la supervivencia celular y de la apoptosis por la ProTα, están relacionados con la ruta de activación del apoptosoma-caspasas efectoras. En este proceso se produce la rápida proteólisis de la ProTα, sin que se aprecie, en estas circunstancias, la fragmentación de SET, ANP32A o ANP32B.

8. Dado que en células 293T proliferantes se encontraron complejos de la ProTα con la misma movilidad electroforética y con una composición de proteínas similar a la de células Jurkat proliferantes, la actividad citoplasmática de la ProTα de control de la vía apoptosómica de la apoptosis parece ser un proceso generalizado en células humanas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VII. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. BIBLIOGRAFÍA

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. y Akey, C. W. 2002. *Three dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Mol. Cell. 9(2): 423-432.

Adachi Y, Pavlakis GN, y Copeland TD. 1994. *Identification of in vivo phosphorylation sites of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation breakproint in acute undifferentiated leukemia.* FEBS Lett. 340(3): 231-235.

Álvarez, C. V., Zalvide, J. B., Cancio, E., Dieguez, C., Regueiro, B. J., Vega, F. V. y Dominguez, F. 1993. *Regulation of prothymosin α mRNA levels in rat pituitary tumor cells*. Neuroendocrinology. 57(6): 1048-1056.

Aniello, F., Branno, M., De Rienzo, G., Ferrara, D., Palmiero, C. y Minucci, S. 2002. *First evidence of prothymosin α in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog Rana esculenta*. Mech. Dev. 110(1-2): 213-217.

Aumais, J. P., Williams, S. N., Luo, W., Nishino, M., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Lin, S-H., y Yu-Lee, L-I. 2003. *Role for NudC, a dinein associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis.*J. Cell Sci. 116: 1991-2003.

Bamburg, J. R. y Bernstein, B. 1991. *Actin and actin-binding proteins in neurons*. *In The Neuronal Cytoskeleton.* R. Burgoyne (Eds). 121-160. *Wiley-Liss. New York.*

Barcia, M. G., Castro, J. M., Diaz-Jullien, C. y Freire, M. 1993. *Prothymosin α is phosphorylated in proliferating stimulated cells*. J. Biol. Chem. 268(7): 4704-4708.

Barcia, M. G., Castro, J. M., Diaz-Jullien, C., Gonzalez, C. G. y Freire, M. 1992. *Prothymosin α is phosphorylated by casein kinase-2*. FEBS Lett. 312(2-3): 152-156.

Battle, T. E. y Frank, D. A. 2002. *The role of STATs in apoptosis*. Curr. Mol. Med. 2(4): 381-392.

Benes, P., Vetvicka, V. y Fusek, M. 2008. *Cathepsin D--many functions of one aspartic protease.* Crit Rev Oncol Hematol. 68(1): 12-28.

Ben-Yosef, T., Yanuka, O., Halle, D. y Benvenisty, N. 1998. *Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors*. Oncogene 17(2): 165-171.

Bradford, M. M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brand, I. A. y Heinickel, A. 1991. *Key enzymes of carbohydrate metabolism as targets of the 11.5-kDa Zn+2-binding protein (parathymosin).* J. Biol. Chem. 266(31): 20984-20989.

Brand, I. A., Heinickel, A. y Soling, H. D. 1991. *Localization of a 11.5 kDa Zn+2-binding protein (parathymosin) in different rat tissues. Cell type-specific distribution between cytosolic and nuclear compartment.* Eur. J. Cell. Biol. 54(1): 157-165.

Brennan, C. M., Gallouzi, I. E. y Steitz, J. A. 2000. *Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo*. J. Cell. Biol. 51(1): 1-14.

Bui, N. T., Livolsi, A., Peyron, J. F. y Prehn, J. H. 2001. *Activation of nuclear factor κβ and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of Iκβα.* J. Cell. Biol. 152(4): 753-764.

Bustelo, X. R., Otero, A., Gómez-Márquez, J. y Freire, M. 1991. *Expression of the rat prothymosin alpha gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration*. J. Biol. Chem. 266(3): 1443-1447.

Caldarella, J., Goodall, G. J., Felix, A. M., Heimer, E. P., Salvin, S. B. y Horecker, B. L. 1983. *Thymosin α11: A peptide related to thymosin α1 isolated from calf thymosin fraction 5*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80(24): 7424-7427.

Cardoso, M. C., Leonhardt, H. y Nadal-Ginard, B. 1993. *Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication*. Cell. 74(6): 979-992.

Carpintero, P., Anadón, R., del Amo, F., y Gómez-Márquez, J. 1995. *The thymosin β4 gene is strongly activated in neural tissues during early postimplantation mouse development.* Neurosci. Lett. 184(1): 63-66.

Chang, J. H. y Olson, M. O. 1989. *A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA*. J. Biol. Chem. 264(20): 11732-11737.

Chen, J. M., Dando, P. M., Rawlings, N. D., Brown, M. A., Young, N. E., Stevens, R. A., Hewittm E., Watts, C. y Barrett, A. J. 1997. *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. J. Biol. Chem. 272(12): 8090- 8098.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J. y Green, D.R. 2010. *The BCL-2 family reunion*. Mol Cell. 37(3): 299-310.

Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Panneerselvam, C. y Horecker, B. L. 1989. *Prothymosin α and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues.* Arch. Biochem. Biophys. 269(1): 256-263.

Clinton, M., Graeve, L., el-Dorry, H., Rodríguez-Boulan, E. y Horecker, B. L. 1991. *Evidence for nuclear targeting of prothymosin and parathymosin synthesized in situ*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(15): 6608-6612.

Conteas, C. N., Mutchnick, M. G., Palmer, K. C., Weller, F. E., Luk, G. D., Naylor, P. H., Erdos, M. R., Goldstein, A. L., Panneerselvam, C. y Horecker, B. L. 1990. *Cellular levels of thymosin immunoreactive peptides are linked to proliferative events: evidence for a nuclear site of action*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(9): 3269-3273.

Cotter, M. A. y Robertson, E. S. 2000. *Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin α*. Mol. Cell Biol. 20(15): 5722-5735.

Covelo, G., Sarandeses, C. S., Diaz-Jullien, C. y Freire, M. *Prothymosin α interacts with free core histones in the nucleus of dividing cells*. J. Biochem. 140: 627-637.

Dalakas, M., Engel, W. K., McClure, J. E. y Goldstein, A. L. 1981. *Immunocytochemical localization of thymosin α1 in thymic epithelial cells of normal and myasthenia gravis patients and thymic cultures*. J. Neurol. Sci. 50(2): 239-247.

Dando, P. M., Fortunato, M., Smith, L., Knight, C. G., McKendrick, J. E. y Barrett, A. J. 1999. *Pig kidney legumain: an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity.* Biochem. J. 339 (Pt 3): 743-749.

Desbarats, L., Schneider, A., Muller, D., Burgin, A. y Eilers, M. 1996. *Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells.* Experientia. 52(12): 1123-1129.

Deveraux, Q. L. y Reed, J. C. 1999. *IAP family proteins-suppressors of apoptosis*. Genes Dev. 13(3): 239-252.

Diaz-Jullien, C., Moreira, D., Sarandeses, C. S., Covelo, G., Barbeito, P. y Freire, M. 2011. *The M2-type isoenzyme of pyruvate kinase phosphorylates prothymosin α in proliferating lymphocytes*. Biochim. Biophys. Acta. 1814(2): 355-365.

Diaz-Jullien, C., Pérez-Estevez, A., Covelo, G. y Freire, M. 1996. *Prothymosin α binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay*. Biochim. Biophys. Acta. 1296(2): 219-227.

Dingwall, C., Dilworth, S. M., Black, S. J., Kearsey, S. E., Cox, L. S. y Laskey, R. A. 1987. *Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals*. EMBO J. 6(1): 69-74.

Domashenko, A. D., Latham, K. E. y Hatton, K. S. 1997. *Expression of myc-family, ycinteracting, and myc-target genes during preimplantation mouse development*. Mol. Reprod. Dev. 47(1): 57-65.

Dosil, M., Álvarez-Fernández, L. y Gómez-Márquez, J. 1993. *Differentiation-linked expression of prothymosin α gene in human myeloid leukemic cells*. Exp. Cell Res. 204(1): 94-101.

Dosil, M., Freire, M. y Gómez-Márquez, J. 1990. *Tissue-specific and differential expression of prothymosin α gene during rat development.* FEBS Lett. 269(2): 373-376.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X. 2000. *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell. 102(1): 33-42.

Earnshaw, W. C. 1987. *Anionic regions in nuclear proteins*. J. Cell Biol. 105(4): 1479-1482.

Economou, M., Seferiadis, K., Frangou-Lazaridis, M., Horecker, B. L. y Tsolas, O. 1988. *Isolation and partial characterization of prothymosin α from porcine tissues*. FEBS Lett. 233(2): 342-346.

Eilers, M., Schirm, S. y Bishop, J. M. 1991. *The MYC protein activates transcription of the α-prothymosin gene.* EMBO J. 10(1): 133-141.

Elenich, L. A., Nandi, D., Kent, A. E., McCluskey, T. S., Cruz, M., Iyer, M. N., Woodward, E. C., Conn, C. W., Ochoa, A. L., Ginsburg, D. B. y Monaco, J. J. 1999. *The complete primary structure of mouse 20S proteasomes*. Immunogenetics. 49(10): 835-842.

Enkeman, S. A., Ward, R. D. y Berger, S. L. 2000. *Mobility within the nucleus and neighboting cytosol is a key feature of Prothymosin-α.* J. Histochem. Cytochem. 48(10): 1341-1355.

Erickson-Vitanen, S., Ruggieri, S., Natalini, P. y Horecker, B. L. 1982. *Distribution of thymosin β4 in vertebrate classes*. Arch. Biochem. Biophys. 221(3): 570-576.

Eschenfeldt, W. H. y Berger, S. L. 1986. *The human prothymosin α gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(24): 9403-9407.

Eschenfeldt, W. H., Manrow, R. E., Krug, M. S. y Berger, S. L. 1989. *Isolation and partial sequencing of the human prothymosin α gene family. Evidence against export of the gene products.* J. Biol. Chem. 264(13): 7546-7555.

Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. y Mihara, K. J. 2006. *Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function*. J. Cell. Sci. 119: 4913-4925.

Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. y Lieberman, J. 2003. *Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor*. Cell. 112(5): 659-672.

Fan, Z., Zhang, H. y Zhang, Q. 2006. *Tumor suppressor pp32 represses cell growth through inhibition of transcription by blocking acetylation and phosphorylation of histone H3 and initiating its proapoptotic activity.* Cell Death Differ.13(9): 1485-1494.

Fang, F. y Newport, J. W. 1991. *Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes*. Cell. 66(4): 731-742.

Filppula, S. A., Yagi, A. , Kilpeläinen, S. H. , Novikov, D., FitzPatrick, D. R., Vihinen, M., Valle, D. y Hiltunen, J. K. 1998*. Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase from rat liver. Molecular characterization.* J Biol Chem. 2;273(1): 349-355.

Franco del Amo, F. y Freire, M. 1995. *The prothymosin α gene is specifically expressed in ectodermal and mesodermal regions during early postimplantation mouse embryogenesis*. FEBS Lett. 359(1): 15-19.

Franco, F. J., Diaz, C., Barcia, M. y Freire, M. 1992. *Thymosin α1 is a native peptide in several tissues*. Biochim. Biophys. Acta. 1120(1): 43-48.

Franco, F. J., Diaz, C., Barcia, M., Arias, P., Gómez-Márquez, J., Soriano, F., Méndez, E. y Freire, M. 1989. *Synthesis and apparent secretion of prothymosin α by different subpopulations of calf and rat thymocytes*. Immunology. 67(2): 263-268.

Frangou-Lazaridis, M., Clinton, M., Goodall, G. J. y Horecker, B. L. 1988. *Prothymosin α and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs*. Arch. Biochem. Biophys. 263(2): 305-310.

Freire, J., Covelo, G., Sarandeses, C., Díaz-Jullien, C. y Freire, M. 2001. *Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin α.* Biochem. Cell Biol. 79(2): 123-131.

Freire, M., Crivellaro, O., Isaacs, C., Moschera, S. y Horecker, B. L. 1978. *Translation of mRNA from calf thymus in the wheat germ system: Evidence for a precurssor of thymosin* a*1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(12): 6007-6011.

Freire, M., Díaz-Jullien, C. y Covelo, G. 2002. In Recent. Res. Devel. Proteins. *Developments in prothymosin α research*. Transworld Res. Netw. Kerala. 1: 257-276.

Freire, M., Hannappel, E., Rey, M., Freire, J. M., Kibo, H. K. y Horecker, B. L. 1981. *Purification of thymus mRNA coding for a 16.000 dalton polypeptide containing the thymosin* a*1 sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(1): 192-195.

Freire, M., Rey-Méndez, M., Gómez-Márquez, J. y Arias, P. 1985. *Evidence for the synthesis of thymosin α1 by calf thymocytes and for the production of this peptide by natural processing*. Arch. Biochem. Biophys. 239(2): 480-485.

Fries, B., Heukeshoven, J., Hauber, I., Grüttner, C., Stocking, C., Kehlenbach, R. H., Hauber, J. y Chemnitz, J. 2007. *Analysis of nucleocytoplasmic trafficking of the HuR ligand APRIL and its influence on CD83 expression*. J Biol Chem. 282(7): 4504-4515.

Frillingos, S., Frangou-Lazaridis, M., Seferiadis, K., Hulmes, J. D., Pan, Y. C. y Tsolas, O. 1991. *Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin α*. Mol. Cell. Biochem. 108(1): 85-94.

Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X. y Liu, Z. R. 2012. *Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase.* Mol. Cell. 45(5): 598-609.

Gardino, A. K. y Yaffe, M. B. 2011. *14-3-3 proteins as signalling interaction points for cell cycle control and apoptosis.* Semin Cell Dev Biol. 22: 688-695.

Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H. R., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarnecki, J. y Damaschun, G. 1995. *Prothymosin α: a biologically active protein with random coil conformation*. Biochemistry. 34(40): 13211-13218.

Gaubatz, S., Meichle, A. y Eilers, M. 1994. *An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin α gene by c-myc*. Mol. Cell. Biol. 14(6): 3853-3862.

Genini, D., Adachi, S., Chao, Q., Rose, D. W., Carrera, C. J., Cottam, H. B., Carson, D. A. y Leoni, L. M. 2000. *Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria*. Blood 96: 3537–3543.

Goldstein, A. L., Guha, A., Zatz, M., Hardy, M. A. y White, A. 1972. *Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69(7): 1800-1803.

Goldstein, A. L., Hannappel, E. y Kleinman, H. K. 2005. *Thymosin β4: actin sequestering protein moonlights to repair injured tissues*. Trends Mol. Med. 11(9): 421-429.

Goldstein, A. L., Low, T. L. K., McAdoo, M., McClure, J., Thurman, G. B., Rossio, J., Lai, C-Y., Chang, D., Wang, S-S., Harvey, C., Ramel, A. H. y Meienhofer, J. 1977. *Thymosin α1: Isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74(2): 725-729.

Goldstein, A. L., Slater, F. D. y White, A. 1966. *Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopietic factor (Thymosin)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56(3): 1010-1017.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. y Green, D. R. 2000. *The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant*. Nat. Cell. Biol. 2(3): 156-162.

Gómez-Márquez, J. y Anadón, R. 2002. *The β-thymosins, small actin-binding peptides widely expressed in the developing and adult cerebellum*. Cerebellum. 1: 95-102.

Gómez-Márquez, J. y Segade, F. 1988. *Prothymosin α is a nuclear protein*. FEBS Lett. 226(2): 217-219.

Gómez-Márquez, J., Dosil, M., Segade, F., Bustelo, X. R., Pichel, J. G., Domínguez, F. y Freire, M. 1989a. *Thymosin β4 gene. Preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells and lymphocytes*. J. Immunol. 143(8): 2740-2744.

Gómez-Márquez, J., Franco del Amo, F., Carpintero, P. y Anadón, R. 1996. *High levels of mouse thymosin β4 mRNA in differentiating P19 embryonic cells and during development of cardiovascular tissues*. Biochem. Biophys. Acta. 1306**:** 187-193.

Gómez-Márquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J. G., Bustelo, X. R. y Freire, M. 1989b. *The expression of prothymosin α gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation*. J. Biol. Chem. 264(15): 8451-8454.

Goodall, G. J., Domínguez, F. y Horecker, B. L. 1986. *Molecular cloning of cDNA for human prothymosin α*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(23): 8926-8928.

Gordon, J. S., Bruno, J. y Lucas, J. J. 1981. *Heterogeneous binding of high mobility group chromosomal proteins to nuclei*. J. Cell. Biol. 88(2): 373-379.

Hall, A. K., Hempstead, J. y Morgan, J. I. 1990. *Thymosin β10 levels in developing human brain and its regulation by retinoic acid in the HTB-10 neuroblastoma*. Mol. Brain Res. 8(2): 129-135.

Hannappel, E., Davoust, S. y Horecker, B. L. 1982b. Thymosins β8 and β9: *Two peptides isolated from calf thymus homologous to thymosin β4*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79(6): 1708-1711.

Hannappel, E., Davoust, S. y Horecker, B. L. 1982c. *Isolation of peptides from calf thymus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104(1): 266-271.

Hannappel, E., Xu, G-J., Morgan, J., Hempstead, J. y Horecker, B. L. 1982a. *Thymosin β4: A ubiquitous peptide in rat and mouse tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79(7): 2172-2175.

Haritos, A. A., Blacher, R., Stein, S., Caldarella, J. y Horecker, B. L. 1985a. *Primary structure of rat thymus prothymosin α*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(2): 343-346.

Haritos, A. A., Caldarella, J. y Horecker, B. L. 1985b. *Simultaneous isolation and determination of prothymosin α, parathymosin α, thymosin β4 and thymosin β10*. Anal. Biochem. 144(2): 436-440.

Haritos, A. A., Goodall, G. J. y Horecker, B. L. 1984a. *Prothymosin* a*: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin* a*1 in rat thymus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81(4): 1008-1011.

Haritos, A. A., Salvin, S. B., Blacher, R., Stein, S. y Horecker, B. L. 1985c. *Parathymosin α: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin α*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(4): 1050-1053.

Haritos, A. A., Tsolas, O. y Horecker, B. L. 1984b. *Distribution of prothymosin α in rat tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81(5): 1391-1393.

Haritos, A. A., Yialouris, P. P., Heimer, E. P., Felix, A. M., Hannappel, E. y Rosemeyer, M. A. 1989. *Evidence for the monomeric nature of thymosins*. FEBS Lett. 244(2): 287-290.

Harlow, E. y Lane, D. 1988. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. y Alnemri, E. S. 2002. *Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction*. J. Biol. Chem. 277(1): 432-438.

Hemmerich, P., von Mikecz, A., Neumann, F., Sözeri, O., Wolff-Vorbeck, G., Zoebelein, R. y Krawinkel, U. 1993. *Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from humans and rodents.* Nucleic Acids Res. 21(2): 223-231.

Hengartner, M. O. 2000. *The biochemistry of apoptosis*. Nature. 407(6805): 770-776.

Hooper, J. A., McDaniel, M. C., Thurman, G. B., Cohen, G. H., Schulof, R. S. y Goldstein, A. L. 1975. *Purification and properties of bovine thymosin*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 249: 125-144.

Hosokawa, Y., Suzuki, H., Toda, H., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1989. *Complementary DNA encoding core protein II of human mitochondrial cytochrome bc1 complex. Substantial diversity in the deduced primary structure from its yeast counterpart.* J. Biol. Cehm. 264: 13483-13488.

Huff, T., Muller, C. S. G., Otto, A. M., Netzker, R. y Hannapel, E. 2001. *β-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33(3): 205-220.

Hutagalung, A. H. y Novick, P. J. 2011. *Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology.* Physiol Rev 91: 119–149.

Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A.Jr, Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E. A., Mellert, H. S., Stavridi, E. S. y Halazonetis, T. D. 2004. *Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks.* Nature. 432(7015): 406-411

Ishimi, Y. y Kikuchi, A. 1991. *Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro*. J. Biol. Chem. 266(11): 7025-7029.

Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M. y Hanaoka, F. 1987. *Binding mode of nucleosomeassembly protein (AP-I) and histones*. Eur. J. Biochem. 162(1): 19-24.

Jäkel, A., Clark, H., Reid, K. B. y Sim, R. B. 2010. *The human lung surfactant proteins A (SP-A) and D (SP-D) interact with apoptotic target cells by different binding mechanisms.* Immunobiology. 215(7): 551-558.

Jiang, X. y Wang, X. 2000. *Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1.* J. Biol. Chem. 275(40): 31199-31203.

Jiang, X., Kim, H. E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S. C., Rosenberg, S. y Wang, X. 2003. *Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin α in a death regulatory pathway.* Science. 299(5604): 223-226.

Kang, B.H., Plescia, J., Dohi, T., Rosa, J., Doxsey, S.J. y Altieri, D.C. 2007. *Regulation of Tumor Cell Mitochondrial Homeostasis by an Organelle-Specific Hsp90 Chaperone Network.* Cell 131(2): 257–270.

Kang S. G., Ortega, J., Singh, S. K., Wang, N., Huang, N-N., Steven, A. C. y Maurizi, M. R. 2002. *Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP.*J. Biol. Chem. 277 (23): 21095–102.

Karetsou, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O. y Papamarcaki, T. 2002. *Prothymosin α interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription*. EMBO Rep. 3(4): 361-366.

Karetsou, Z., Martic, G., Tavoulari, S., Christoforidis, S., Wilm, M., Gruss, C. y Papamarcaki, T. 2004. *Prothymosin α associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation.* FEBS Lett. 577(3): 496-500.

Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C. Y., Tsolas, O., Becker, P. B. y Papamarcaki, T. 1998. *Prothymosin α modulates the interaction of histone H1 with chromatin*. Nucleic. Acids Res. 26(13): 3111-3118.

Kato, K., Okuwaki, M.y Nagata, K. 2011*. Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics.* J Cell Sci. 124(Pt 19): 3254-3265.

Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N. y Stillman, B. 1995. *The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication*. Cell. 81(7): 1105-1114.

Kelman, Z. 1997. *PCNA: structure, functions and interactions*. Oncogene. 14(6): 629-640.

Kim, H-E., Jiang, X., Du, F. y Wang, X. 2008. *PHAPI, CAS and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1.* Mol. Cell, 30: 239-247.

Kinoshita, T., Shirasawa, H., Shino, Y., Moriya, H., Desbarats, L., Eilers, M. y Simizu, B. 1997. *Transactivation of prothymosin α and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein*. Virology. 232(1): 53-61.

Kleeff, J., Kornmann, M., Sawhney, H. y Korc, M. 2000. *Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells.* Int J Cancer. 86(3): 399-407.

Kleinschmidt, J. A. y Franke, W.W. 1982. *Soluble acidic complexes containing histones H3 and H4 in nuclei of Xenopus laevis oocytes.*Cell. 29(3): 799-809.

Kleinschmidt, J. A., Dingwall, C., Maier, G. y Franke, W. W. 1986. *Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of Xenopus laevis.* EMBO J. 5(13): 3547-3552.

Kobayashi, T., Wang, T., Maezawa, M., Kobayashi, M., Ohnish, S., Hatanaka, K., Hige, S., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., Tanaka, J., Imamura, M., Hasegawa, K., Tanaka, Y. y

Brachmann, R. K. 2006. *Overexpression of the oncoprotein prothymosin α triggers a p53 response that involves p53 acetylation.* Cancer Res. 66(6): 3137-3144.

Komiyama, T., Pan, L. X., Haritos, A. A., Wideman, J. W., Pan, Y.C., Chang, M., Rogers, I. y Horecker, B. L. 1986. *The primary structure of rat parathymosin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(5): 1242-1245.

Kretsovali, A., Agalioti, T., Spilianakis, C., Tzortzakaki, E., Merika, M. y Papamatheakis, J. 1998. *Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with the class II transactivator*. Mol. Cell. Biol. 18 (11): 6777-6783.

Kubota, S., Adachi, Y., Copeland, T. D. y Oroszlan, S. 1995. *Binding of human prothymosin α to the leucine-motif/activation domains of HTLV-I Rex and HIV-1 Rev*. Eur. J. Biochem. 233(1): 48-54.

Kumarswamy, R., Seth, R. K., Dwarakanath, B. S.y Chandna, S. 2009. *Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells.* Int J Biochem Cell Biol. 41(6): 1430-1440.

Labrada, l., Bodelón, G., Viñuela, J. y Benavente, J. 2002. *Aviar reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction*. J. Virol. 76(16): 7932-7941.

Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K. y Gorospe, M. 2005. *Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin α*. EMBO J. 24(10): 1852-1862.

Lapeyre, B., Bourbon, H. y Amalric, F. 1987. *Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84(6): 1472-1476.

Laskey, R. A. y Earnshaw, W. C. 1980. *Nucleosome assembly*. Nature. 286(5775): 763- 767.

Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. y Finch, J. T. 1978. *Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA*. Nature. 275(5679): 416-420.

Lauritzen, E., Masson, M., Rubin, I. y Holm, A. 1990. *Dot immunobinding and immunoblotting of picogram and nanogram quantities of small peptides on activated nitrocellulose*. J. Immunol. Methods. 131(2): 257-267.

Lee, C., Levin, A. y Branton, D. 1987.*Copper staining: A five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels.* Anal. Biochem. 166 (2): 308-312.

Letsas, K. P., Frangou-Lazaridis, M., Skyrlas, A., Tsatsoulis, A. y Malamou-Mitsi, V. 2005. *Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions*. Pathol. Int. 55(11): 694-702.

Leung, A. W., Varanyuwatana, P. y Halestrap, A.P. 2008. *The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition.* J Biol Chem. 283(39): 26312-26323.

Lin, J. J-C. 2008*. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions.* Adv Exp Med Biol 644: 201-222.

Liu, X y Wang, X. 2000. *Cell-Free Systems for Monitoring Steps in Apoptosis Pathways*. *In vitro assays for caspase-3 activation and DNA fragmentation*. En Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. (ed.) Methods in Enzymology: Apoptosis. Academic Press. 322: 177-182.

Liu, Y. y Chen, X. J. 2013. *Adenine Nucleotide Translocase, Mitochondrial Stress, and Degenerative Cell Death.* Oxid Med Cell Longev. 2013: 1-10.

Lodish, H., Kaiser, C.A., Bretscher, A., Amon, A., Berk, A., Krieger, M., Ploegh, H. y Scott, M.P. (2013) *Cell Organization and Movement: Microfilaments*. En Byrd, M.L. (Ed.) Molecular Cell Biology 773-818. W.H. Freeman & Company,7º ed. New York.

Low, T. L. K. y Goldstein, A. L. 1979b. *The chemistry and biology of thymosin. II. Amino acid sequence analysis of thymosin α1 and polypeptide β1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 254(3): 987-995.

Low, T. L. K. y Goldstein, A. L. 1985. *Thymic hormones: An overview*. Meth. Enzymol. 116: 213-291.

Low, T. L. K., Hu, S. K. y Goldstein, A. L. 1981. *Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(2): 1162-1166.

Low, T. L. K., Pan, T. L. y Lin, Y. S. 1990. *Depression of prothymosin α production in murine thymus correlates with staphylococcal enterotoxin-B induced immunosuppression*. FEBS Lett. 273(1-2): 1-5.

Low, T. L. K., Thurman, G. B., McAdoo, M., McClure, J., Rossio, J. L., Naylor, P. H. y Goldstein, A. L. 1979a. *The chemistry and biology of thymosin. I. Isolation,characterization, and biological activities of thymosin α1 and polypeptide β1 from calf thymus.* J. Biol. Chem. 254(3): 981-986.

Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A. y Schwab, M. 1996. *Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of α-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells*. Oncogene 13(4): 803-812.

Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J. C., Neira, J. L. y Iovanna, J. L. 2006. *Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin α complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(8): 2671-2676.

Malinda, K. M., Goldstein, A. L. y H. K. Kleinman, H. K. 1997. *Thymosin β4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells.* FASEB J. 11: 474-481.

Manns, M., Daubrawa, S., Driessen, F., Paasch, F. Nadine Hoffmann, N., Löffler, A., Lauber, K.,Dieterle, A., Alers, S., Iftner, T.,Osthoff, K-S. Stork,B. y Wesselborg, S. 2011. *Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation ofcaspase-9 in the absence of Apaf-1.*The FASEB Journal.25 (9): 3250-3261.

Manoury, B., Hewitt, E. W., Morrice, N., Dando, P. M., Barrett, A. J. y Watts, C. 1998. *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature. 396(6712): 695-699.

Manrow, R. E. y Berger, S. L. 1993. *GAG triplets as splice acceptors of last resort. An unusual form of alternative splicing in prothymosin α pre-mRNA*. J. Mol. Biol. 234(2): 281-288.

Manrow, R. E., Leone, A., Krug, M. S., Eschenfeldt, W. H. y Berger, S. L. 1992. *The human prothymosin α gene family contains several processed pseudogenes lacking deleterious lesions*. Genomics 13(2): 319-331.

Manrow, R. E., Sburlati, A. R., Hanover, J. A. y Berger, S. L. 1991. *Nuclear targeting of prothymosin α*. J. Biol. Chem. 266(6): 3916-3924.

Martínez-Balbas, M. A., Bannister, A .J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M. y Kouzarides, T. 1998. *The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription*. EMBO J. 17(10): 2886-2893.

Martini, P. G, Delage-Mourroux, R., Kraichely, D. M. y Katzenellenbogen, B. S. 2000. *Prothymosin α selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity*. Mol. Cell. Biol. 20(17): 6224-6232.

Matilla, A. y Radrizzani, M. 2005. *The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats*. Cerebellum. 4(1):7-18.

McGee, A. M. y Baines, C. P. 2011. *Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death*. Biochem. J. 433: 119-125.

McClellan, A. J., Xia, Y., Deutschbauer, A. M., Davis, R. W., Gersterin, M. y Frydman, J. 2007. *Diverse Cellular Functions of the HSP90 Molecular Chaperone Uncovered Using Systems Approaches.* Cell 131(1):121-135.

Michalewsky, J., Gabriel, T. F., Winter, D. P., Makofske, R., Danho, W., Shively, J., Biemann, K. y Meienhofer, J. 1993. *Confirmation of the primary structure of thymosin α1 by microsequence analysis of limited acid and enzymatic hydrolysis fragments*. Int. J. Pept. Protein Res. 21(1): 93-99.

Mol, P. C., Wang, R. H., Batey, D. W., Lee, L. A., Dang, C. V. y Berger, S. L. 1995. *Do products of the myc proto-oncogene play a role in transcriptional regulation of the prothymosin α gene?.* Mol. Cell. Biol. 15(12): 6999-7009.

Monné, M., Miniero, D. V., Iacobazzi, V., Bisaccia, F. y Fiermonte, G. 2013. *The mitocondrial oxoglutarate carrier: from identification to mechanism*. J Bioenerg Biomembr. 45(1-2): 1-13.

Moreira, D., Díaz-Jullien, C., Sarandeses, C.S., Covelo, G., Barbeito, P. y Freire M. 2013. *The influence of phosphorylation of prothymosin α on its nuclear import and antiapoptotic activity*. Biochem Cell Biol. 91(4): 265-269.

Mori, M., Barnard, G. F., Staniunas, R. J., Jessup, J. M., Steele, G. D. Jr. y Chen, L. B. 1993. *Prothymosin α mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer*. Oncogene. 8(10): 2821-2826.

Morrison D.K. 2009. *The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development.* Trends Cell Biol. 19(1): 16-23.

Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galan, J.E. y Roy, C.R. 2011. *Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase.* Nature, 477: 103-106.

Nogueira, M. y Freire, M. 1985. *Characteristics of the translation of thymosin α1 precursor mRNA by cell-free wheat germ system. Evidence for the acetylation of thymosin α1 precursor*. Int. J. Biochem. 17(4): 533-536.

Otero, A., Bustelo, X. R., Pichel, J. G., Freire, M. y Gómez-Márquez, J. 1993. *Transcript levels of thymosin β4, an actin-sequestering peptide, in cell proliferation*. Biochim. Biophys. Acta. 1176(1-2): 59-63.

Palvimo, J. y Linnala-Kankkunen, A. 1990. *Identification of a low-Mr acidic nuclear protein as prothymosin α*. FEBS Lett. 277(1-2): 257-260.

Pan, L. X., Haritos, A. A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., Salvin, S. B. y Horecker, B. L. 1986. *Human prothymosin α: amino acid sequence and immunologic properties*. Arch. Biochem. Biophys. 250(1): 197-201.

Pan, W., da Graca, L. S., Shao, Y., Yin, Q., Wu, H. y Jiang X. 2009. *PHAPI/pp32 suppresses tumorigenesis by stimulating apoptosis.* J Biol Chem. 284(11): 6946-6954.

Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D. y Kharbanda, S. 2000. *Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90.* EMBO J. 19(16): 4310-4322.

Panneerselvam, C., Haritos, A. A., Caldarella, J. y Horecker, B. L. 1987. *Prothymosin α in human blood*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84(13): 4465-4469.

Panneerselvam, C., Wellner, D. y Horecker, B. L. 1988. *The amino acid sequence of bovine thymus prothymosin α*. Arch. Biochem. Biophys. 265(2): 454-457.

Papamarcaki, T. y Tsolas, O. 1994. *Prothymosin α binds to histone H1 in vitro*. FEBS Lett. 345(1): 71-75.

Pérez-Estévez, A., Díaz-Jullien, C., Covelo, G., Salgueiro, M. T. y Freire, M. 1997. *A 180-kDa protein kinase seems to be responsible for the phosphorylation of prothymosin α observed in proliferating cells.* J. Biol. Chem. 272(16): 10506-10513.

Pérez-Estévez, A., Freire, J., Sarandeses, C., Covelo, G., Díaz-Jullien, C. y Freire, M. 2000. *Properties of the protein kinase that phosphorylates prothymosin α*. Mol. Cell. Biochem. 208(1-2): 111-118.

Philpott, A., Krude, T. y Laskey, R. A. 2000. *Nuclear chaperones*. Semin. Cell. Dev. Biol. 11(1): 7-14.

Piñeiro, A., Bugía, B. M., Arias, M. P., Cordero, O. J. y Nogueira, M. 2001. *Identification of receptors for prothymosin α on human lymphocytes*. Biol. Chem. 382(10): 1473-1482.

Qi, X., Wang, L. y Du, F. 2010. *Novel small molecules relieve prothymosin α-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1.* Biochemistry. 49(9): 1923-1930.

Rey-Campos, J., Rey-Méndez, M. y Freire, M. 1983. *Synthesis of thymosin α1 precursor cDNA and purification of active mRNA by affinity chromatography.* Int. J. Biochem. 15(2): 155-157.

Rich, T., Allen, R. L. y Wyllie, A. H. 2000. *Defying death after DNA damage*. Nature. 407(6805): 777-783.

Rodríguez, J. y Lazebnik, Y. 1999. *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev. 13(24): 3179-3184.

Rodríguez, P., Ruiz, M. T., Price, G. B. y Zannis-Hadjopoulos, M. 2004. *NAP-2 is part of multi-protein complexes in HeLa cells*. J. Cell. Biochem. 93(2): 398-408.

Rodríguez, P., Vinuela, J. E., Álvarez-Fernández, L., Buceta, M., Vidal, A., Domínguez, F. y Gómez-Márquez, J. 1998. *Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells*. Biochem. J. 331 (Pt 3): 753-761.

Rodríguez, P., Vinuela, J.E., Álvarez-Fernández, L. y Gómez-Márquez, J. 1999. *Prothymosin α antisense oligonucleotides induce apoptosis in HL-60 cells*. Cell Death Differ. (1): 3-5.

Roson, E., Gallego, R., García-Caballero, T., Heimer, E. P., Felix, A. M. y Domínguez, F. 1990. *Prothymosin α expression is associated to cell division in rat testis*. Histochemistry. 94(6): 597-599.

Roth, W., Wagenknecht, B., Klumpp, A., Naumann, U., Hahne, M., Tschopp, J. y Weller, M. 2001. *APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis.* Cell Death Differ. 8(4): 403-410.

Roy, N. y Cardone, M. H. 2002. *The caspases: consequential cleavage*. En Jacobson, McCarthy N, (Eds.). Apoptosis the molecular biology of programmed cell death. Nueva York. Oxford University Press Inc.p 93-135.

Rubtsov Y. P. y Vartapetian A. B. 1995. *New intronless members of human prothymosin α genes*. Mol. Biol. (Mosk). 29(6): 1320-1325.

Rubtsov, Y. P., Zolotukhin, A. S., Vorobjev, I. A., Chichkova, N. V., Pavlov, N. A., Karger, E. M., Evstafieva, A. G., Felber, B. K. y Vartapetian, A. B. 1997. *Mutational analysis of human prothymosin α reveals a bipartite nuclear localization signal*. FEBS Lett. 413(1): 135-141.

Safer, D., Elzinga, M. y Nachmias, V. T. 1991. *Thymosin β4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable.* J. Biol. Chem. 266(7): 4029-4032.

Salvin, S. B., Horecker, B. L., Pan, L. X. y Rabin, B. S. 1987. *The effect of dietary zinc and prothymosin α on cellular immune responses of RF/J mice*. Clin. Immunol. Immunopathol. 43(3): 281-288.

Sanders, M.C., Goldstein, A.L., y Wang, Y. L.1992. *Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. 15;89(10): 4678-4682.

Sarandeses, C. S., Covelo, G., Díaz-Jullien, C. y Freire, M. 2003. *Prothymosin α is processed to thymosin α1 and thymosin α 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase*. J. Biol. Chem. 278(15): 13286-13293.

Sburlati, A. R., De La Rosa, A., Batey, D. W., Kurys, G. L., Manrow, R. E., Pannell, L. K., Martin, B. M., Sheeley, D. M. y Berger, S. L. 1993. *Phosphorylation of human and bovine prothymosin α in vivo.* Biochemistry. 32(17): 4587-4596.

Sburlati, A. R., Manrow, R. E. y Berger, S. L. 1991. *Prothymosin α antisense oligomers inhibit myeloma cell division*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(1): 253-257.

Schmidt, G. y Werner, D. 1991. *Nucleotide sequence of the murine prothymosin alpha cDNA and its deduced primary and secondary protein structure*. Biochim. Biophys. Acta. 1088(3): 442-444.

Seo, S. B., Macfarlan, T., McNamara, P., Hong, R., Mukai, Y., Heo, S. y Chakravarti, D. 2002. *Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex.* J Biol Chem. 277(16): 14005-14010.

Seo, S. B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S. y Chakravarti, D. 2001. *Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein*. Cell. 104(1): 119-130.

Shen, S. M., Yu, Y., Wu., Y. L., Cheng, J. K., Wang, L. S. y Chen, G. Q. 2010. *Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells.* Carcinogenesis. 31(3): 419-426.

Shikama, N., Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Lee, C. W., Cairns, W. y La Thangue, N. B. 2000. *Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators*. Mol. Cell Biol. 20(23): 8933-8943.

Shishodia, S. y Aggarwal, B. B. 2002. *Nuclear factor κβ activation: a question of life or death*. J. Biochem. Mol. Biol. 35(1): 28-40.

Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R. y Riley, P. R. 2007. *Thymosin β4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization*. Nature. 445: 177-182.

Smith, M. R., al-Katib, A., Mohammad, R., Silverman, A., Szabo, P., Khilnani, S., Kohler, W., Nath, R. y Mutchnick, M. G. 1993. *Prothymosin α gene expression correlates with proliferation, not differentiation, of HL-60 cells*. Blood. 82(4): 1127- 1132.

Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. y Robertson, E. S. 2002. *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin α interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation*. J. Virol. 76(10): 4699-4708.

Sundaram M, Cook HW, Byers DM. 2004. *The MARCKS family of phospholipid binding proteins: regulation of phospholipase D and other cellular components*. Biochem Cell Biol. 82(1): 191-200.

Szabo, P., Panneerselvam, C., Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Weksler, D., Whittington, E., Macera, M. J., Grzeschik, K. H., Selvakumar, A. y Horecker, B. L. 1993. *Prothymosin α gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2*. Hum. Genet. 90(6): 629-634.

Takai, Y., Sasaki, T. y Matozaki, T. 2001. *Small GTP-binding proteins.* Physiol Rev. 81(1):153-208.

Tang, H.L., Le, A-H.P. y Lung, H.L. 2006. *The increase in mitochondrial association with actin precedes Bax translocation in apoptosis.* Biochem. J. 396:1-5.

Thornberry, N. A. y Lazebnik, Y. 1998. *Caspases: enemies within*. Science. 281(5381): 1312-1316.

Tinari, A., Giammarioli, A.M., Manganelli, V., Ciarlo, L. y Marloni, W. 2008. *Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death.* En Khosravi-Far, Zakeri, Z., Lockshin, R.A. y Piacentini, M. (Ed.) Methods in Enzymology, Programmed Cell Death, General Principles for Studying Cell Death. Academic Press. 442: 1-26.

Tochio, N., Umehara, T., Munemasa, Y., Suzuki, T., Sato, S., Tsuda, K., Koshiba, S., Kigawa, T., Nagai, R. y Yokoyama, S. 2010. *Solution structure of histone chaperone ANP32B: interaction with core histones H3-H4 through its acidic concave domain*. J Mol Biol. 401(1):97-114.

Towbin, H., Staehelin, T. Y Gordon, J. 1979. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350-4354.

Tsitsiloni, O. E., Stiakakis, J., Koutselinis, A., Gogas, J., Markopoulos, C., Yialouris, P., Bekris, S., Panoussopoulos, D., Kiortsis, V. y Voelter, W. 1993. *Expression of α- thymosins in human tissues in normal and abnormal growth*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(20): 9504-9507.

Tsitsiloni, O. E., Yialouris, P. P., Sekeri-Pataryas, K. y Haritos, A. A. 1989. *Prothymosin α is not a nuclear polypeptide*. Experientia. 45(4): 332-334.

Twiddy, D., Brown, D. G., Adrain, C., Jukes, R., Martin, S. J., Cohen, G. M., MacFarlane, M. y Cain, K. 2004. *Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity in the native Apaf-1/caspase 9 apoptosome complex.* J. Biol. Chem. 279:19665-19682.

Vareli, K. y Frangou-Lazaridis, M. 2004. *Prothymosin α is localized in mitotic spindle during mitosis*. Biol. Cell. 96(6): 421-428.

Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M. y Tsolas, O. 1995. *Prothymosin α mRNA levels vary with c-myc expression during tissue proliferation, viral infection and heat shock*. FEBS Lett. 371(3): 337-340.

Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M., van der Kraan, I., Tsolas, O. y van Driel, R. 2000. *Nuclear distribution of prothymosin α and parathymosin: evidence that prothymosin α is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication*. Exp. Cell. Res. 257(1): 152-161.

Vareli, K., Tsolas, O. y Frangou-Lazaridis, M. 1996. *Regulation of prothymosin α during the cell cycle*. Eur. J. Biochem. 238(3): 799-806.

Vasilescu, J., Guo, X. y Kast, J. 2004. *Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry.* Proteomics. 4(12): 3845-3854.

Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R. L., Simpson, R. J. y Vaux, D. L. 2001. *HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins*. J. Biol. Chem. 277(1): 445-454.

Wang X. 2001. *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev. 15(22): 2922-2933.

Wang, W. y Shakes, D.C. 1996. *Molecular evolution of the 14-3-3 protein family.* J. Mol. Evol. 43: 384-398.

Watts, J. D., Cary, P. D., Sautiere, P. y Crane-Robinson, C. 1990. *Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins*. Eur. J. Biochem. 192(3): 643-651.

Weber, K. y Osborn, M. 1969. *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J. Biol. Chem. 244(16): 4406-4412.

Wintero, A. K., Fredholm, M. y Davies, W. 1996. *Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library: analysis of 839 clones*. Mamm. Genome. 7(7): 509-517.

Wu, C. G., Boers, W., Reitsma, P. R., van Deventer, S. J. y Chamuleau, R. A. 1997. O*verexpression of prothymosin α, concomitant with c-myc, during rat hepatic carcinogenesis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 232(3): 817-821.

Wu, C. L., Shiau, A. L. y Lin, C. S. 1997. *Prothymosin α promotes cell proliferation in NIH3T3 cells*. Life Sci. 61(21): 2091-2101.

Yang, C. H., Murti, A., Baker, S. J, Frangou-Lazaridis, M., Vartapetian, A. B., Murti, K. G. y Pfeffer, L. M. 2004. *Interferon induces the interaction of prothymosin α with STAT3 and results in the nuclear translocation of the complex*. Exp. Cell. Res. 298(1): 197-206.

Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Zheng, Y., Li, X., Liang, J., Xing, D., Aldape, K., Hunter, T., Alfred Yung, W. K. y Lu, Z. 2012. *PKM2 phosphoylates Histona H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis*. Cell. 150(4): 685-696.

Yialouris, P. P., Evangelatos, G. P., Soteriadis-Vlahos, C., Heimer, E. P., Felix, A. M., Tsitsiloni, O. E. y Haritos, A. A. 1988. *The identification of prothymosin α-like material in vertebrate lymphoid organs by a radioimmunoassay for the N-terminal decapeptide.* J. Immunol. Methods. 106(2): 267-275.

Zalvide, J. B., Cancio, E., Álvarez, C. V., Regueiro, B. J. y Domínguez, F. 1992. *Prothymosin α mRNA levels are invariant throughout the cell cycle*. J. Biol. Chem. 267(12): 8692-8695.

Zhang, D. y Richardson, D. R. 2011. *Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): an emerging role in cancer.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 43(1): 33-36.

Zhang, X. T., Tan, Y. M. y Tan, Y. H. 1990. *Isolation of a cDNA encoding human 40S ribosomal protein S3.* Nucleic Acid Res. Cell Sci. 18: 6689-6689.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H. y Levine, A. J. 2000. *The transcriptional program following p53 activation*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 65: 475-482.

Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S. W., Wu, J. C., Tomaselli, K. J. y Armstrong, R. C. 2003. *Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP*. J. Biol. Chem. 278(10): 8091-8098.

VIII. ANEXO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

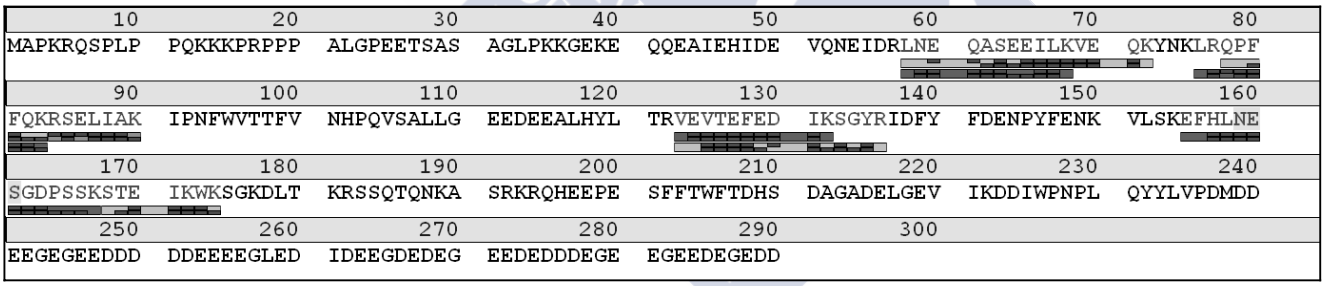
Name: 3b **Date:** May 31, 2013
Fraction:
Volume: **Concentration:**
Note: - Spots de Gel-1D, con tinción de Coomassie
- Dixestión tríptica, con reducción-alquilación, sen desalado
Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2013-06-03 10:42:48	/MANUEL FREIRE/23-03-11/GEL 2D/24-02-11/ ProteinAnalysisResults_5.05 - 49.44.mgf	Mascot	SwissProt

Protein 1: Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Accession: SET_HUMAN **Score:** 529.8
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta) **MW [kDa]:** 33.5
Database Date: 2012-06-04 **pI:** 4.1
Sequence Coverage [%]: 22.1
No. of unique Peptides: 9



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
558	4	637.2400	-149.61	2	23.3	69.9	0	58-68	R.LNEQASEEILK.V	
650	2	879.3500	-133.74	2	26.0	70.6	1	58-72	R.LNEQASEEILKVEQK.Y	
497	3	532.2300	-142.78	2	21.5	38.2	1	76-83	K.LRQPFFQK.R	
475	1	397.6400	-184.59	2	20.7	30.3	0	78-83	R.QPFFQK.R	
147	4	408.7200	-74.68	2	10.3	40.6	1	84-90	K.RSELIAK.I	
731	6	604.7300	-125.48	2	28.9	90.2	0	123-132	R.VEVTEFEDIK.S	
701	1	836.3300	-101.46	2	27.9	74.8	1	123-136	R.VEVTEFEDIKSGYR.I	
410	7	723.6900	-191.23	2	18.8	81.8	0	155-167	K.EFHLNESGDPSSK.S	
351	2	446.2000	-112.85	2	16.9	33.4	1	168-174	K.STEIKWK.S	

Protein 2: Actin, aortic smooth muscle - Homo sapiens (Human)

Accession: ACTA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)
Database Date: 2008-09-07
Modification(s): Oxidation

Score: 223.7
MW [kDa]: 42.0
pI: 5.1
Sequence Coverage [%]: 11.4
No. of unique Peptides: 4

Alias proteins:

Accession	Name	Description
ACTA_BOVIN	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, aortic smooth muscle - Bos taurus (Bovine)
ACTA_MOUSE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, aortic smooth muscle - Mus musculus (Mouse)
ACTA_RABIT	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, aortic smooth muscle - Oryctolagus cuniculus (Rabbit)
ACTA_RAT	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, aortic smooth muscle - Rattus norvegicus (Rat)

10	20	30	40	50	60	70	80
MCEEEDSTAL	VCDNGSGLCK	AGFAGDDAPR	AVFPSIVGRP	RHQGVMVGMG	QKDSYVGDEA	QSKRGILTLK	YPIEHGIITN
90	100	110	120	130	140	150	160
WDDMEKIWHH	SFYNELRVAP	EEHPTLLTEA	PLNPKANREK	MTQIMFETFN	VPAMYVAIQA	VLSLYASGRT	TGIVLDSGDG
170	180	190	200	210	220	230	240
VTHNVPIYEG	YALPHAIMRL	DLAGRDLTDY	LMKILTERGY	SFVTTAEREI	VRDIKEKLCY	VALDFENEMA	TAASSSSLEK
250	260	270	280	290	300	310	320
SYELPDGQVI	TIGNERFRCP	ETLFQPSFIG	MESAGIHETT	YNSIMKCDID	IRKDLYANNV	LSGGTTMYPG	IADRMQKEIT
330	340	350	360	370	380		
ALAPSTMKIK	IIAPPERKYS	VWIGGSILAS	LSTFQQMWIS	KQEYDEAGPS	IVHRKCF		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
321	1	488.6500	-159.15	2	16.0	44.6	0	21-30	K.AGFAGDDAPR.A	
121	1	401.8200	-95.76	3	9.4	49.3	0	42-52	R.HQGVMVGMGQK.D	Oxidation: 5, 8
259	1	599.6600	-174.66	2	14.1	67.0	0	53-63	K.DSYVGDEAQSK.R	
436	1	589.2000	-187.15	2	19.6	62.8	0	318-328	K.EITALAPSTMK.I	Oxidation: 10

Protein 3: MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL1 PE=1 SV=2

Accession: MRP_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04

Score: 89.9
MW [kDa]: 19.5
pI: 4.5
Sequence Coverage [%]: 7.7
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MGSQSSKAPR	GDVTAEEAAG	ASPAKANGQE	NGHVKSNGDL	SPKGEGESPP	VNGTDEAAGA	TGDAIEPAPP	SQGAEAKGEV
90	100	110	120	130	140	150	160
PPKETPKKKK	KFSFKKPFKL	SGLSFKRNRK	EGGGDSSASS	PTEEEQEQGE	IGACSDEGTA	QEGKAAATPE	SQEPQAKGAE
170	180	190	200				
ASAASEEEAG	PQATEPSTPS	GPESGPTPAS	AEQNE				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
315	1	687.2600	-103.00	2	15.8	89.9	0	11-25	R.GDVTAEEAAGASPAK.A	

Protein 4: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession:	PTMA_HUMAN	**Score:**	77.2
Database:	SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)	**MW [kDa]:**	12.2
Database Date:	2012-06-20	**pI:**	3.5
Modification(s):	Acetyl	**Sequence Coverage [%]:**	12.6
		No. of unique Peptides:	1

```
        10        20        30        40        50        60        70        80
MSDAAVDTSS EITTKDLKEK KEVVEEAENG RDAPANGNAE NEENGEQEAD NEVDEEEEEG GEEEEEEEEG DGEEEDGDED
        90       100       110       120
EEAESATGKR AAEDDEDDDV DTKKQKTDED D
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 34 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: 29-05-2012_A **Date:** May 31, 2012
Fraction:
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
Amazon_PhosphoETD_PE_2012-06-05 17:24:12	/MANUEL FREIRE/29-05-2012_A/GEL1D_A/1_ziptip_CID-ETD_A2_01_2119.D	Mascot	SwissProt
Amazon_PhosphoCID_PE_2012-06-05 17:23:02	/MANUEL FREIRE/29-05-2012_A/GEL1D_A/1_ziptip_CID-ETD_A2_01_2119.D	Mascot	SwissProt

Protein 1: Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLC25A3 PE=1 SV=2

Accession: MPCP_HUMAN **Score:** 383.5
Database: SwissProt(SwissProt_2012_03.fasta) **MW [kDa]:** 40.1
Database Date: 2012-04-03 **pI:** 10.1
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 16.6
No. of unique Peptides: 8

10	20	30	40	50	60	70	80
MFSSVAHLAR	ANPFNTPHLQ	LVHDGLGDLR	SSSPGPTGQP	RRPRNLAAAA	VEEQYSCDYG	SGRFFILCGL	GGIISCGTTH
90	100	110	120	130	140	150	160
TALVPLDLVK	CRMQVDPQKY	KGIFNGFSVT	LKEDGVRGLA	KGWAPTFLGY	SMQGLCKFGF	YEVFKVLYSN	MLGEENTYLW
170	180	190	200	210	220	230	240
RTSLYLAASA	SAEFFADIAL	APMEAAKVRI	QTQPGYANTL	RDAAPKMYKE	EGLKAFYKGV	APLWMRQIPY	TMMKFACFER
250	260	270	280	290	300	310	320
TVEALYKFVV	PKPRSECSKP	EQLVVTFVAG	YIAGVFCAIV	SHPADSVVSV	LNKEKGSSAS	LVLKRLGFKG	VWKGLFARII
330	340	350	360	370			
MIGTLTALQW	FIYDSVKVYF	RLPRPPPPEM	PESLKKKLGL	TQ			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
30	1	384.8415	-53.55	3	10.9	48.4	1	93-101	R.MQVDPQKYK.G	Oxidation: 1
133	1	454.5376	-87.22	3	16.0	60.2	0	190-201	R.IQTQPGYANTLR.D	
12	1	338.4909	-38.47	3	10.0	46.9	1	207-214	K.MYKEEGLK.A	Oxidation: 1
213	1	473.1942	-122.94	2	19.6	48.1	0	219-226	K.GVAPLWMR.Q	Oxidation: 7
106	2	412.1947	-89.60	2	14.7	42.8	0	241-247	R.TVEALYK.F	
118	1	431.2294	-60.85	2	15.3	42.4	0	296-304	K.GSSASLVLK.R	
77	1	339.8582	-44.21	3	13.4	42.9	1	296-305	K.GSSASLVLKR.L	
64	1	330.1888	-58.04	2	12.8	51.9	1	357-362	K.KLGLTQ.-	

Protein 2: Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1

Accession: C1QBP_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28
Modification(s): Oxidation

Score: 87.5
MW [kDa]: 31.3
pI: 4.6
Sequence Coverage [%]: 5.3
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MLPLLRCVPR	VLGSSVAGLR	AAAPASPFRQ	LLQPAPRLCT	RPFGLLSVRA	GSERRPGLLR	PRGPCACGCG	CGSLHTDGDK
90	100	110	120	130	140	150	160
AFVDFLSDEI	KEERKIQKHK	TLPKMSGGWE	LELNGTEAKL	VRKVAGEKIT	VTFNINNSIP	PTFDGEEEPS	QGQKVEEQEP
170	180	190	200	210	220	230	240
ELTSTPNFVV	EVIKNDDGKK	ALVLDCHYPE	DEVGQEDEAE	SDIFSIREVS	FQSTGESEWK	DTNYTLNTDS	LDWALYDHLM
250	260	270	280	290			
DFLADRGVDN	TFADELVELS	TALEHQEYIT	FLEDLKSFVK	SQ			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
266	1	819.3073	-85.58	2	22.1	87.5	0	105-119	K.MSGGWELELNGTEAK.L	Oxidation: 1

Protein 3: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN=ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta)
Database Date: 2011-07-12

Score: 86.4
MW [kDa]: 28.6
pI: 3.8
Sequence Coverage [%]: 6.8
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MEMGRRIHLE	LRNRTPSDVK	ELVLDNSRSN	EGKLEGLTDE	FEELEFLSTI	NVGLTSIANL	PKLNKLKKLE	LSDNRVSGGL
90	100	110	120	130	140	150	160
EVLAEKCPNL	THLNLSGNKI	KDLSTIEPLK	KLENLKSLDL	FNCEVTNLND	YRENVFKLLP	QLTYLDGYDR	DDKEAPDSDA
170	180	190	200	210	220	230	240
EGYVEGLDDE	EEDEDEEEYD	EDAQVVEDEE	DEDEEEEGEE	EDVSGEEEED	EEGYNDGEVD	DEEDEEELGE	EERGQKRKRE
250							
PEDEGEDDD							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
114	2	473.1983	-116.92	2	15.1	47.6	0	21-28	K.ELVLDNSR.S	
230	1	508.2693	-35.10	2	20.4	38.8	0	102-110	K.DLSTIEPLK.K	

Protein 4: Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1

Accession: PSA1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 85.7
MW [kDa]: 29.5
pI: 6.2
Sequence Coverage [%]: 6.5
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MFRNQYDNDV	TVWSPQGRIH	QIEYAMEAVK	QGSATVGLKS	KTHAVLVALK	RAQSELAAHQ	KKILHVDNHI	GISIAGLTAD
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
ARLLCNFMRQ	ECLDSRFVFD	RPLPVSRLVS	LIGSKTQIPT	QRYGRRPYGV	GLLIAGYDDM	GPHIFQTCPS	ANYFDCRAMS
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
IGARSQSART	YLERHMSEFM	ECNLNELVKH	GLRALRETLP	AEQDLTTKNV	SIGIVGKDLE	FTIYDDDDVS	PFLEGLEERP
250	**260**	**270**					
QRKAQPAQPA	DEPAEKADEP	MEH					

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
179	1	408.7675	10.76	2	18.1	49.3	0	108-115	R.LVSLIGSK.T	
173	1	443.7199	-116.19	2	17.8	36.5	0	209-217	K.NVSIGIVGK.D	

Protein 5: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	**100**	**110**	**120**				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Protein 6: Actin, cytoplasmic 1 - Homo sapiens (Human)

Accession:	ACTB_HUMAN	**Score:**	75.3
Database:	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	**MW [kDa]:**	41.7
Database Date:	2008-09-07	**pI:**	5.2
Modification(s):	Oxidation	**Sequence Coverage [%]:**	5.6
		No. of unique Peptides:	2

Alias proteins:

Accession	Name	Description
ACTB_BOVIN	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Bos taurus (Bovine)
ACTB_CANFA	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Canis familiaris (Dog)
ACTB_CAVPO	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Cavia porcellus (Guinea pig)
ACTB_CERAE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Cercopithecus aethiops (Green monkey) (Grivet)
ACTB_CHICK	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Gallus gallus (Chicken)
ACTB_HORSE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Equus caballus (Horse)
ACTB_MACFA	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Macaca fascicularis (Crab eating macaque) (Cynomolgus monkey)
ACTB_MESAU	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Mesocricetus auratus (Golden hamster)
ACTB_MOUSE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Mus musculus (Mouse)
ACTB_PANTR	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Pan troglodytes (Chimpanzee)
ACTB_PIG	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Sus scrofa (Pig)
ACTB_PONPY	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Pongo pygmaeus (Bornean orangutan)
ACTB_RAT	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Rattus norvegicus (Rat)
ACTB_SHEEP	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Ovis aries (Sheep)
ACTB_SPECI	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Spermophilus citellus (European suslik) (Citellus citellus)
ACTB_TRIVU	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Trichosurus vulpecula (Brush-tailed possum)

10	20	30	40	50	60	70	80
MDDDIAALVV	DNGSGMCKAG	FAGDDAPRAV	FPSIVGRPRH	QGVMVGMGQK	DSYVGDEAQS	KRGILTLKYP	IEHGIVTNWD
90	100	110	120	130	140	150	160
DMEKIWHHTF	YNELRVAPEE	HPVLLTEAPL	NPKANREKMT	QIMFETFNTP	AMYVAIQAVL	SLYASGRTTG	IVMDSGDGVT
170	180	190	200	210	220	230	240
HTVPIYEGYA	LPHAILRLDL	AGRDLTDYLM	KILTERGYSF	TTTAEREIVR	DIKEKLCYVA	LDFEQEMATA	ASSSSLEKSY
250	260	270	280	290	300	310	320
ELPDGQVITI	GNERFRCPEA	LFQPSFLGME	SCGIHETTFN	SIMKCDVDIR	KDLYANTVLS	GGTTMYPGIA	DRMQKEITAL
330	340	350	360	370	380		
APSTMKIKII	APPERKYSVW	IGGSILASLS	TFQQMWISKQ	EYDESGPSIV	HRKCF		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
73	2	488.6918	-73.62	2	13.2	38.7	0	19-28	K.AGFAGDDAPR.A	
4	1	401.8381	-50.72	3	8.6	36.6	0	40-50	R.HQGVMVGMGQK.D	Oxidation: 5, 8

COMPLEJO 30 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

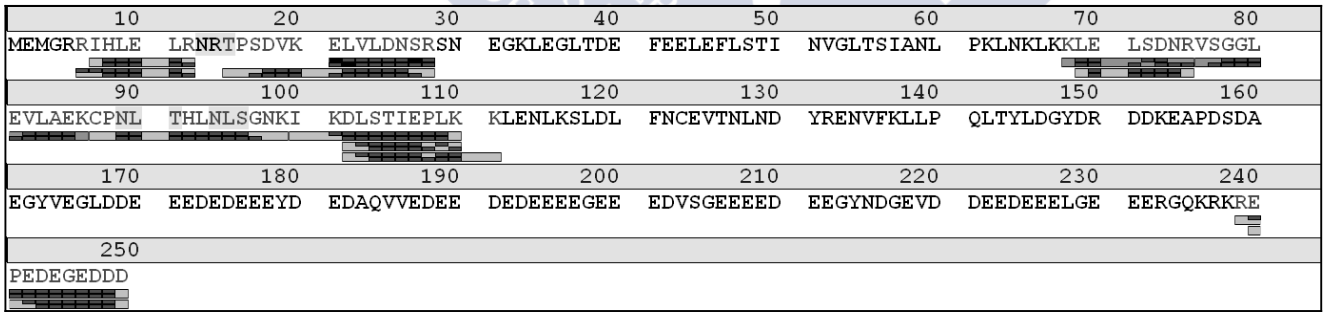
Name: 4b **Date:** May 31, 2013
Fraction:
Volume: **Concentration:**
Note: - Spots de Gel-1D, con tinción de Coomassie
- Dixestión tríptica, con reducción-alquilación, sen desalado
Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2013-06-03 10:49:10	/MANUEL FREIRE/23-03-11/GEL 2D/24-02-11/ ProteinAnalysisResults_5.62 - 50.48.mgf	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN **Score:** 755.2
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta) **MW [kDa]:** 28.6
Database Date: 2011-07-12 **pI:** 3.8
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 30.5
No. of unique Peptides: 13



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
371	4	468.7400	-107.76	2	17.9	40.5	1	6-12	R.RIHLELR.N	
441	4	390.7200	-51.09	2	20.3	34.0	0	7-12	R.IHLELR.N	
569	3	786.8100	-133.47	2	24.4	98.5	1	15-28	R.TPSDVKELVLDNSR.S	
392	8	473.1900	-134.45	2	18.6	45.5	0	21-28	K.ELVLDNSR.S	
250	5	487.7000	-137.17	2	13.7	45.5	1	68-75	K.KLELSDNR.V	
308	6	423.6400	-187.45	2	15.9	42.7	0	69-75	K.LELSDNR.V	
625	4	551.2400	-129.05	2	26.2	92.1	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
532	4	734.2600	-152.89	2	23.3	81.7	0	87-99	K.CPNLTHLNLSGNK.I	Carbamidomethyl: 1
576	4	628.8100	-105.99	2	24.7	63.5	1	100-110	K.IKDLSTIEPLK.K	
650	9	508.2000	-171.44	2	27.1	39.8	0	102-110	K.DLSTIEPLK.K	
521	4	572.2700	-112.91	2	23.0	41.6	1	102-111	K.DLSTIEPLKK.L	
135	3	653.1500	-136.70	2	10.1	73.7	1	239-249	K.REPEDEGEDDD.-	
168	3	575.0900	-171.67	2	11.0	57.5	0	240-249	R.EPEDEGEDDD.-	

Protein 2: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens GN =ANP32B PE=1 SV=1

Accession: AN32B_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation

Score: 404.1
MW [kDa]: 28.8
pI: 3.8
Sequence Coverage [%]: 18.3
No. of unique Peptides: 4

10	20	30	40	50	60	70	80
MDMKRRIHLE	LRNRTPAAVR	ELVLDNCKSN	DGKIEGLTAE	FVNLEFLSLI	NVGLISVSNL	PKLPKLKKLE	LSENRIFGGL
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
DMLAEKLPNL	THLNLSGNKL	KDISTLEPLK	KLECLKSLDL	FNCEVTNLND	YRESVFKLLP	QLTYLDGYDR	EDQEAPDSDA
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
EVDGVDEEEE	DEEGEDEEDE	DDEDGEEEEF	DEEDDEDEDV	EGDEDDDEVS	EEEEEFGLDE	EDEDEDEDEE	EEEGGKGEKR
250	**260**						
KRETDDEGED	D						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
408	3	495.6600	-181.28	2	19.3	38.7	0	21-28	R.ELVLDNCK.S	Carbamidomethyl: 7
256	1	494.6800	-191.46	2	14.1	39.7	1	68-75	K.KLELSENR.I	
310	1	430.6200	-249.00	2	16.1	36.9	0	69-75	K.LELSENR.I	
789	2	605.2200	-153.36	2	31.7	69.4	0	76-86	R.IFGGLDMLAEK.L	Oxidation: 7

Protein 3: ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7

Accession: ADT2_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28

Score: 158.7
MW [kDa]: 32.8
pI: 10.2
Sequence Coverage [%]: 12.8
No. of unique Peptides: 4

10	20	30	40	50	60	70	80
MTDAAVSFAK	DFLAGGVAAA	ISKTAVAPIE	RVKLLLQVQH	ASKQITADKQ	YKGIIDCVVR	IPKEQGVLSF	WRGNLANVIR
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
YFPTQALNFA	FKDKYKQIFL	GGVDKRTQFW	LYFAGNLASG	GAAGATSLCF	VYPLDFARTR	LAADVGKAGA	EREFRGLGDC
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
LVKIYKSDGI	KGLYQGFNVS	VQGIIIYRAA	YFGIYDTAKG	MLPDPKNTHI	VISWMIAQTV	TAVAGLTSYP	FDTVRRRMMM
250	**260**	**270**	**280**	**290**	**300**		
QSGRKGTDIM	YTGTLDCWRK	IARDEGGKAF	FKGAWSNVLR	GMGGAFVLVL	YDEIKKYT		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
412	2	568.7700	-128.24	2	19.5	38.9	0	34-43	K.LLLQVQHASK.Q	
470	1	428.6900	-148.34	2	21.4	33.6	0	73-80	R.GNLANVIR.Y	
611	2	488.7300	-95.63	2	25.7	47.1	0	97-105	K.QIFLGGVDK.R	
724	1	610.2600	-70.98	2	29.8	42.8	0	189-199	R.AAYFGIYDTAK.G	

Protein 5: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 93.9
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	1	733.7910	-75.60	2	17.2	93.9	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Protein 4: Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3 PE=1 SV=2

Accession: PSA3_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 92.2
MW [kDa]: 28.4
pI: 5.1
Sequence Coverage [%]: 4.7
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSSIGTGYDL	SASTFSPDGR	VFQVEYAMKA	VENSSTAIGI	RCKDGVVFGV	EKLVLSKLYE	EGSNKRLFNV	DRHVGMAVAG
90	100	110	120	130	140	150	160
LLADARSLAD	IAREEASNFR	SNFGYNIPLK	HLADRVAMYV	HAYTLYSAVR	PFGCSFMLGS	YSVNDGAQLY	MIDPSGVSYG
170	180	190	200	210	220	230	240
YWGCAIGKAR	QAAKTEIEKL	QMKEMTCRDI	VKEVAKIIYI	VHDEVKDKAF	ELELSWVGEL	TNGRHEIVPK	DIREEAEKYA
250	260						
KESLKEEDES	DDDNM						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
418	1	609.2400	-144.19	2	19.6	92.2	0	30-41	K.AVENSSTAIGIR.C	

COMPLEJO 28 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

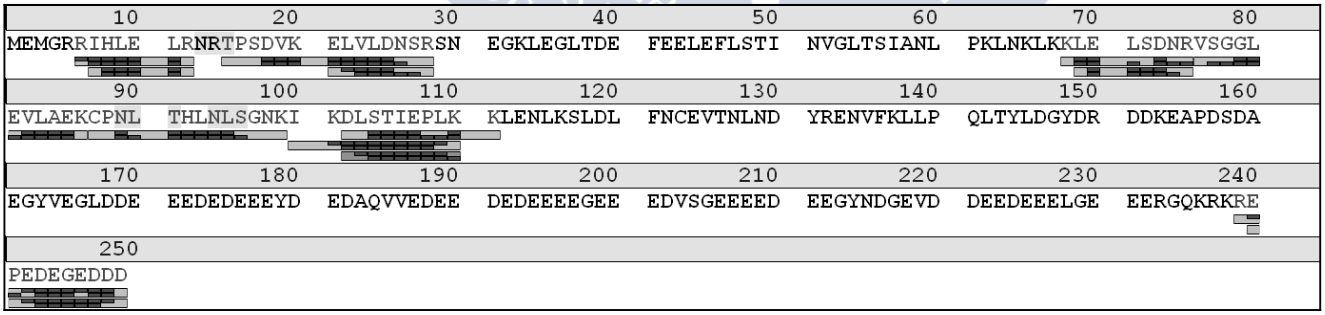
Name: 5b **Date:** May 31, 2013
Fraction:
Volume: **Concentration:**
Note: - Spots de Gel-1D, con tinción de Coomassie
- Dixestión tríptica, con reducción-alquilación, sen desalado
Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2013-06-03 10:50:36	/MANUEL FREIRE/23-03-11/GEL 2D/24-02-11/ ProteinAnalysisResults_4.48 - 52.30.mgf	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN **Score:** 657.2
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta) **MW [kDa]:** 28.6
Database Date: 2011-07-12 **pI:** 3.8
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 30.5
No. of unique Peptides: 13



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
402	3	468.7300	-129.09	2	18.3	45.8	1	6-12	R.RIHLELR.N	
481	5	390.6700	-179.05	2	20.8	34.1	0	7-12	R.IHLELR.N	
646	1	786.8100	-133.47	2	26.0	57.3	1	15-28	R.TPSDVKELVLDNSR.S	
424	2	473.1900	-134.45	2	19.0	40.3	0	21-28	K.ELVLDNSR.S	
264	1	487.7000	-137.17	2	13.7	34.0	1	68-75	K.KLELSDNR.V	
327	2	423.6500	-163.84	2	16.0	41.2	0	69-75	K.LELSDNR.V	
652	2	551.2200	-165.33	2	26.2	84.3	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
559	1	734.2300	-193.74	2	23.3	51.4	0	87-99	K.CPNLTHLNLSGNK.I	Carbamidomethyl: 1
635	4	628.7700	-169.59	2	25.7	71.0	1	100-110	K.IKDLSTIEPLK.K	
684	6	508.1800	-210.79	2	27.3	44.1	0	102-110	K.DLSTIEPLK.K	
553	2	572.2700	-112.91	2	23.1	38.5	1	102-111	K.DLSTIEPLKK.L	
158	1	653.1700	-106.09	2	10.1	68.4	1	239-249	K.REPEDEGEDDD.-	
169	1	575.0900	-171.67	2	10.6	48.2	0	240-249	R.EPEDEGEDDD.-	

Protein 2: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens GN =ANP32B PE=1 SV=1

Accession: AN32B_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation

Score: 510.6
MW [kDa]: 28.8
pI: 3.8
Sequence Coverage [%]: 20.3
No. of unique Peptides: 5

10	20	30	40	50	60	70	80
MDMKRRIHLE	LRNRTPAAVR	ELVLDNCKSN	DGKIEGLTAE	FVNLEFLSLI	NVGLISVSNL	PKLPKLKKLE	LSENRIFGGL
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
DMLAEKLPNL	THLNLSGNKL	KDISTLEPLK	KLECLKSLDL	FNCEVTNLND	YRESVFKLLP	QLTYLDGYDR	EDQEAPDSDA
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
EVDGVDEEEE	DEEGEDEEDE	DDEDGEEEEF	DEEDDEDEDV	EGDEDDDEVS	EEEEEFGLDE	EDEDEDEDEE	EEEGGKGEKR
250	**260**						
KRETDDEGED	D						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
447	6	495.7000	-100.59	2	19.7	45.4	0	21-28	R.ELVLDNCK.S	Carbamidomethyl: 7
278	4	494.7000	-151.04	2	14.3	62.4	1	68-75	K.KLELSENR.I	
331	4	430.6400	-202.56	2	16.3	41.8	0	69-75	K.LELSENR.I	
720	5	605.2400	-120.32	2	28.6	82.7	0	76-86	R.IFGGLDMLAEK.L	Oxidation: 7
190	3	395.6800	-121.82	2	11.3	44.8	1	111-116	K.KLECLK.S	Carbamidomethyl: 4

Protein 3: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 93.9
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	**100**	**110**	**120**				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	1	733.7910	-75.60	2	17.2	93.9	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 8
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:49:40	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/8_nLC-Trampalones_A4_01_2171.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN **Score:** 118.9
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta) **MW [kDa]:** 28.6
Database Date: 2011-07-12 **pI:** 3.8
Sequence Coverage [%]: 8.8
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MEMGRRIHLE	LRNRTPSDVK	ELVLDNSRSN	EGKLEGLTDE	FEELEFLSTI	NVGLTSIANL	PKLNKLKKLE	LSDNRVSGGL
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
EVLAEKCPNL	THLNLSGNKI	KDLSTIEPLK	KLENLKSLDL	FNCEVTNLND	YRENVFKLLP	QLTYLDGYDR	DDKEAPDSDA
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
EGYVEGLDDE	EEDEDEEEYD	EDAQVVEDEE	DEDEEEEGEE	EDVSGEEEED	EEGYNDGEVD	DEEDEEELGE	EERGQKRKRE
250							
PEDEGEDDD							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
376	1	551.2622	-88.78	2	20.1	72.4	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
361	2	628.8190	-91.68	2	19.4	46.5	1	100-110	K.IKDLSTIEPLK.K	

Protein 2: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens GN =ANP32B PE=1 SV=1

Accession: AN32B_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04

Score: 101.5
MW [kDa]: 28.8
pI: 3.8
Sequence Coverage [%]: 7.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MDMKRRIHLE	LRNRTPAAVR	ELVLDNCKSN	DGKIEGLTAE	FVNLEFLSLI	NVGLISVSNL	PKLPKLKKLE	LSENRIFGGL
90	100	110	120	130	140	150	160
DMLAEKLPNL	THLNLSGNKL	KDISTLEPLK	KLECLKSLDL	FNCEVTNLND	YRESVFKLLP	QLTYLDGYDR	EDQEAPDSDA
170	180	190	200	210	220	230	240
EVDGVDEEEE	DEEGEDEEDE	DDEDGEEEEF	DEEDDEDEDV	EGDEDDDEVS	EEEEEFGLDE	EDEDEDEDEE	EEEGGKGEKR
250	260						
KRETDDEGED	D						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
53	6	494.6733	-205.00	2	12.2	55.0	1	68-75	K.KLELSENR.I	

Protein 3: Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens GN=RAB11A PE=1 SV=3

Accession: RB11A_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20

Score: 95.9
MW [kDa]: 24.4
pI: 6.1
Sequence Coverage [%]: 9.7
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MGTRDDEYDY	LFKVVLIGDS	GVGKSNLLSR	FTRNEFNLES	KSTIGVEFAT	RSIQVDGKTI	KAQIWDTAGQ	ERYRAITSAY
90	100	110	120	130	140	150	160
YRGAVGALLV	YDIAKHLTYE	NVERWLKELR	DHADSNIVIM	LVGNKSDLRH	LRAVPTDEAR	AFAEKNGLSF	IETSALDSTN
170	180	190	200	210	220		
VEAAFQTILT	EIYRIVSQKQ	MSDRRENDMS	PSNNVVPIHV	PPTTENKPKV	QCCQNI		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
366	2	540.7167	-131.55	2	19.5	51.0	0	42-51	K.STIGVEFATR.S	
330	1	637.7463	-99.61	2	18.1	44.9	0	62-72	K.AQIWDTAGQER.Y	

Protein 4: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 22 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

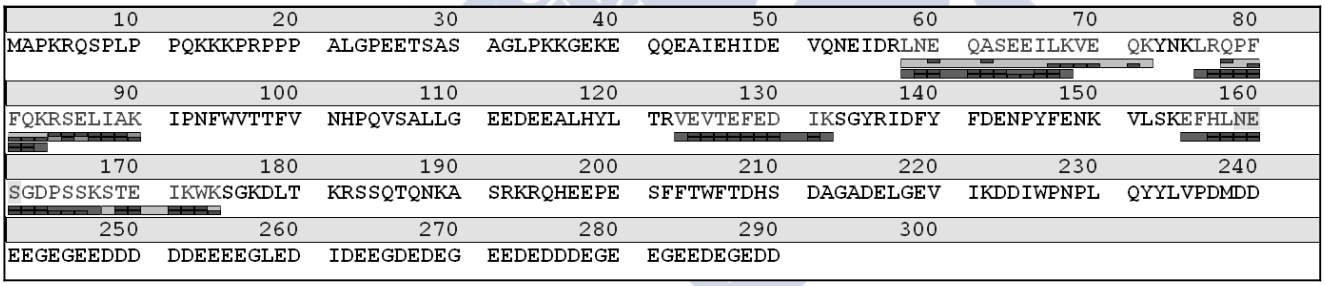
Name: 6b **Date:** May 31, 2013
Fraction:
Volume: **Concentration:**
Note: - Spots de Gel-1D, con tinción de Coomassie
- Dixestión tríptica, con reducción-alquilación, sen desalado
Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2013-06-03 10:52:52	/MANUEL FREIRE/23-03-11/GEL 2D/24-02-11/ ProteinAnalysisResults_4.16 - 55.47. mgf	Mascot	SwissProt

Protein 1: Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Accession: SET_HUMAN **Score:** 437.3
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta) **MW [kDa]:** 33.5
Database Date: 2012-06-04 **pI:** 4.1
Sequence Coverage [%]: 20.7
No. of unique Peptides: 8



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
537	5	637.2500	-133.92	2	23.2	73.5	0	58-68	R.LNEQASEEILK.V	
628	2	586.5700	-132.12	3	25.9	51.3	1	58-72	R.LNEQASEEILKVEQK.Y	
489	2	532.2200	-161.56	2	21.4	36.0	1	76-83	K.LRQPFFQK.R	
470	1	397.6400	-184.59	2	20.7	33.8	0	78-83	R.QPFFQK.R	
172	2	408.7000	-123.61	2	10.5	40.9	1	84-90	K.RSELIAK.I	
715	4	604.7200	-142.02	2	29.1	90.5	0	123-132	R.VEVTEFEDIK.S	
402	5	723.7000	-177.42	2	18.5	75.8	0	155-167	K.EFHLNESGDPSSK.S	
352	2	446.2000	-112.85	2	16.9	35.5	1	168-174	K.STEIKWK.S	

Protein 6: **Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2**

Accession:	PTMA_HUMAN	**Score:**	77.2
Database:	SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)	**MW [kDa]:**	12.2
Database Date:	2012-06-20	**pI:**	3.5
Modification(s):	Acetyl	**Sequence Coverage [%]:**	12.6
		No. of unique Peptides:	1

```
        10        20        30        40        50        60        70        80
MSDAAVDTSS EITTKDLKEK KEVVEEAENG RDAPANGNAE NEENGEQEAD NEVDEEEEEG GEEEEEEEEG DGEEEDGDED
        90       100       110       120
EEAESATGKR AAEDDEDDDV DTKKQKTDED D
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Figura 1. Resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M de citoplasma de células Jurkat proliferantes. Los complejos de la ProTα fueron sometidos a tratamiento térmico previamente a la lisis con tripsina como se indica en Material y Métodos 3.10.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BANDA 1 DEL COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES CON TRATAMIENTO TÉRMICO SEPARADO POR SDS-PAGE

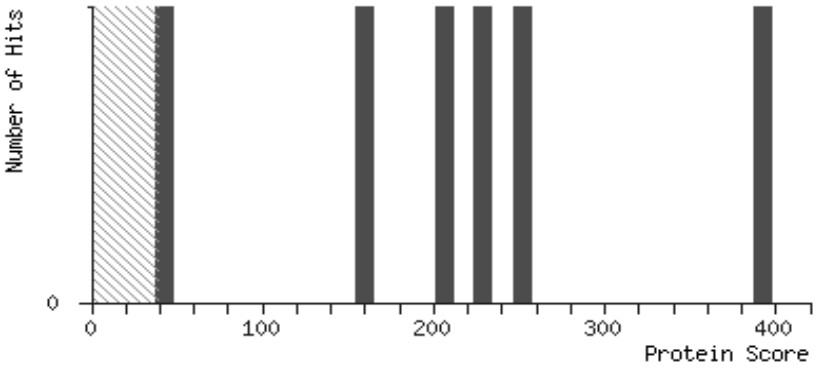
Mascot Search Results

User : 1
Email :
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 57.15 (515203 sequences; 181334896 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20266 sequences)
Timestamp : 25 May 2011 at 10:58:16 GMT

Pro SET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

3.

SET_HUMAN Mass: 33469 Score: 235 Matches: 12(12) Sequences: 3(3) emPAI: 0.53

Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
737	604.7300	1207.4454	1207.5972	-0.1518	0	82	2.6e-006	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
787	637.2600	1272.5054	1272.6561	-0.1506	0	(72)	3e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
788	425.1800	1272.5182	1272.6561	-0.1379	0	(44)	0.019	1	U	R.LNEQASEEILK.V
789	637.2700	1272.5254	1272.6561	-0.1306	0	(72)	3e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
790	637.2800	1272.5454	1272.6561	-0.1106	0	(46)	0.012	1	U	R.LNEQASEEILK.V
791	425.1900	1272.5482	1272.6561	-0.1079	0	(41)	0.031	1	U	R.LNEQASEEILK.V
792	637.3000	1272.5854	1272.6561	-0.0706	0	75	1.3e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
794	637.8000	1273.5854	1272.6561	0.9294	0	(55)	0.0014	1	U	R.LNEQASEEILK.V
881	723.7100	1445.4054	1445.6423	-0.2368	0	(68)	4.7e-005	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
882	723.7100	1445.4054	1445.6423	-0.2368	0	(66)	7.5e-005	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
886	723.7200	1445.4254	1445.6423	-0.2168	0	78	5.2e-006	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
888	723.7500	1445.4854	1445.6423	-0.1568	0	(56)	0.0011	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search

Enzyme : Trypsin

Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)

Variable modifications : Acetyl (N-term),Oxidation (M),Phospho (ST)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da (# ^{13}C = 1)

Fragment Mass Tolerance: ± 0.4 Da

Max Missed Cleavages : 1

Instrument type : ESI-TRAP

Number of queries : 1198

BANDA 2 DEL COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES CON TRATAMIENTO TÉRMICO SEPARADO POR SDS-PAGE

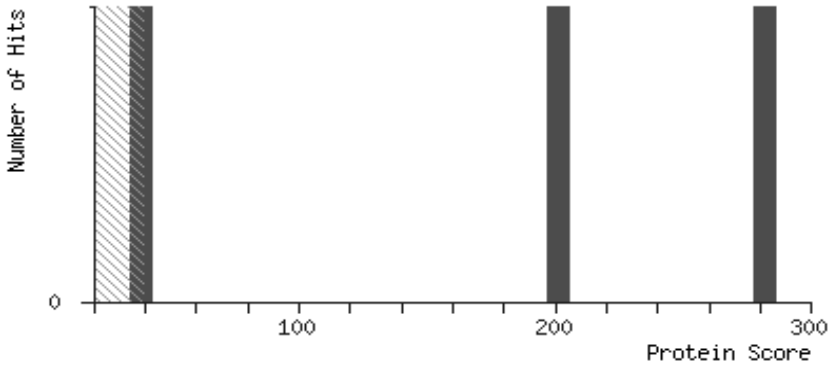
Mascot Search Results

User : 2
Email :
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 57.15 (515203 sequences; 181334896 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20266 sequences)
Timestamp : 25 May 2011 at 09:38:35 GMT

Prot SET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

1.

SET_HUMAN Mass: 33469 Score: 282 Matches: 7(7) Sequences: 4(4) emPAI: 0.53

Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
848	604.7400	1207.4654	1207.5972	-0.1318	0	(81)	3.4e-006	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
849	604.7500	1207.4854	1207.5972	-0.1118	0	86	9.7e-007	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
929	637.2800	1272.5454	1272.6561	-0.1106	0	69	5.2e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
930	637.2800	1272.5454	1272.6561	-0.1106	0	(66)	0.00011	1	U	R.LNEQASEEILK.V
1107	723.7200	1445.4254	1445.6423	-0.2168	0	70	3e-005	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
1112	723.7500	1445.4854	1445.6423	-0.1568	0	(66)	0.0001	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
1321	586.5800	1756.7182	1756.9206	-0.2025	1	56	0.001	1	U	R.LNEQASEEILKVEQK.Y

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Acetyl (N-term),Oxidation (M),Phospho (ST)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da (# ^{13}C = 1)
Fragment Mass Tolerance: ± 0.4 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 1486

BANDA 3 DEL COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES CON TRATAMIENTO TÉRMICO SEPARADO POR SDS-PAGE

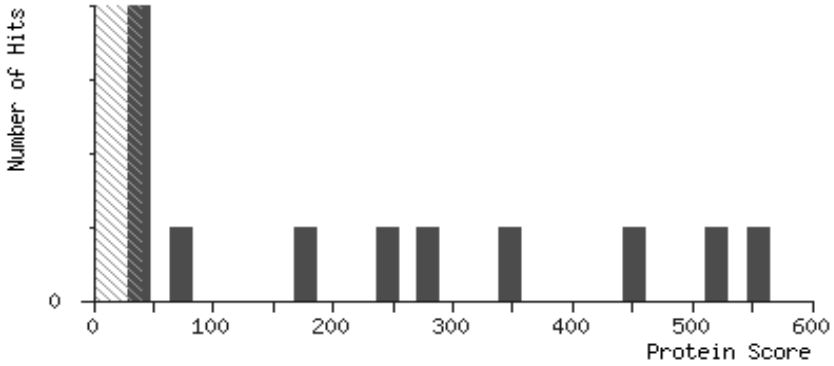
Mascot Search Results

User : 3
Email :
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 57.15 (515203 sequences; 181334896 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20266 sequences)
Timestamp : 25 May 2011 at 09:32:26 GMT

Pro SET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3
ACTA_HUMAN Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

6.

SET_HUMAN Mass: 33469 Score: 232 Matches: 7(7) Sequences: 3(3) emPAI: 0.38

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
870	604.7300	1207.4454	1207.5972	-0.1518	0	(40)	0.041	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
871	604.7400	1207.4654	1207.5972	-0.1318	0	78	7.2e-006	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
933	637.2700	1272.5254	1272.6561	-0.1306	0	70	4.3e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
935	637.2900	1272.5654	1272.6561	-0.0906	0	(69)	4.8e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
1031	723.7300	1445.4454	1445.6423	-0.1968	0	(44)	0.013	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
1032	723.7300	1445.4454	1445.6423	-0.1968	0	84	1.4e-006	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
1033	723.7400	1445.4654	1445.6423	-0.1768	0	(65)	0.00012	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S

9.

ACTA_HUMAN Mass: 42381 Score: 54 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.09

Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
859	599.7000	1197.3854	1197.5150	-0.1295	0	54	0.0016	1	U	K.DSYVGDEAQSK.R

Proteins matching the same set of peptides:

ACTB_HUMAN Mass: 42052 Score: 54 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)

BANDA 4 DEL COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES CON TRATAMIENTO TÉRMICO SEPARADO POR SDS-PAGE

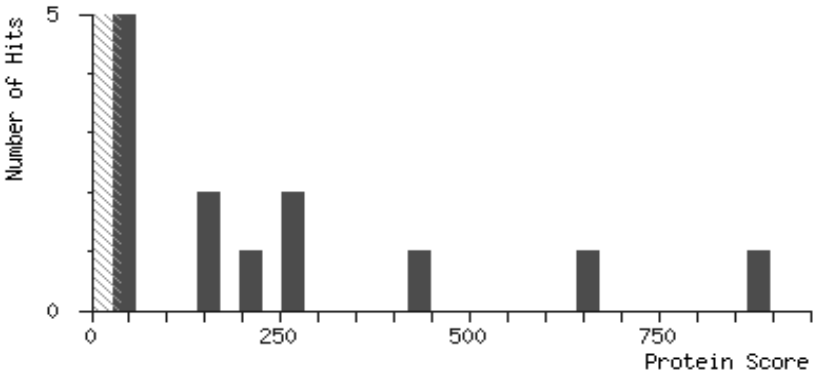
Mascot Search Results

User : 4
Email :
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 57.15 (515203 sequences; 181334896 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20266 sequences)
Timestamp : 25 May 2011 at 09:23:27 GMT

ProSET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

6.

SET_HUMAN Mass: 33469 Score: 225 Matches: 5(5) Sequences: 3(3) emPAI: 0.38
Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
759	604.7400	1207.4654	1207.5972	-0.1318	0	72	2.7e-005	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
809	637.2700	1272.5254	1272.6561	-0.1306	0	(68)	7.2e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
810	637.2800	1272.5454	1272.6561	-0.1106	0	75	1.4e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
915	723.7400	1445.4654	1445.6423	-0.1768	0	78	6.5e-006	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
916	723.7400	1445.4654	1445.6423	-0.1768	0	(59)	0.00046	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Acetyl (N-term),Oxidation (M),Phospho (ST)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da (# ^{13}C = 1)
Fragment Mass Tolerance: ± 0.4 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 1164

BANDA 5 DEL COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES CON TRATAMIENTO TÉRMICO SEPARADO POR SDS-PAGE

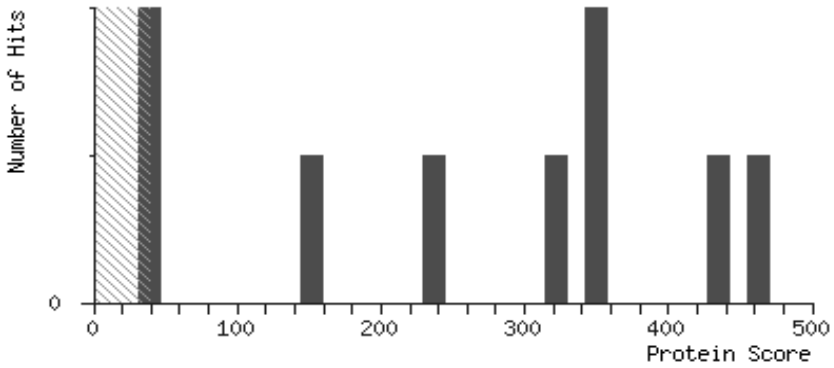
Mascot Search Results

User : 5
Email :
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 57.15 (515203 sequences; 181334896 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20266 sequences)
Timestamp : 25 May 2011 at 09:02:42 GMT

ProSET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

6.

SET_HUMAN Mass: 33469 Score: 235 Matches: 7(7) Sequences: 3(3) emPAI: 0.38
Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
967	604.7400	1207.4654	1207.5972	-0.1318	0	79	5.3e-006	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
1042	637.2700	1272.5254	1272.6561	-0.1306	0	(70)	4.8e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
1043	637.2900	1272.5654	1272.6561	-0.0906	0	(70)	4.3e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
1044	637.2900	1272.5654	1272.6561	-0.0906	0	77	8.3e-006	1	U	R.LNEQASEEILK.V
1153	723.7100	1445.4054	1445.6423	-0.2368	0	(62)	0.00017	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
1156	723.7400	1445.4654	1445.6423	-0.1768	0	79	4.4e-006	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S
1157	723.7400	1445.4654	1445.6423	-0.1768	0	(50)	0.0034	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Acetyl (N-term),Oxidation (M),Phospho (ST)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da (# ^{13}C = 1)
Fragment Mass Tolerance: ± 0.4 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 1484

BANDA 6 DEL COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS PROLIFERANTES CON TRATAMIENTO TÉRMICO SEPARADO POR SDS-PAGE

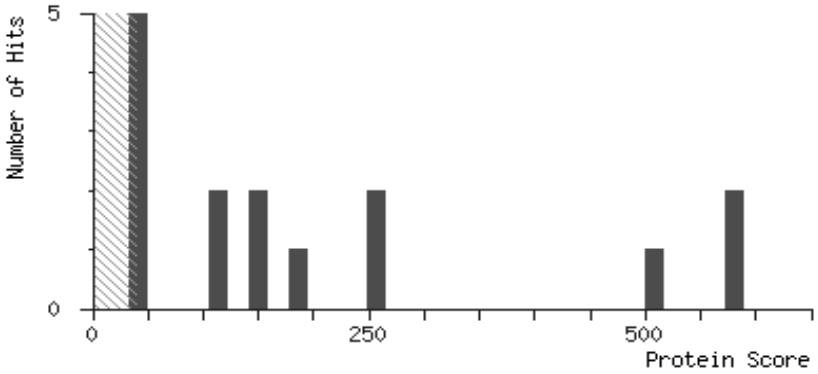
Mascot Search Results

User :6
Email :
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : SwissProt 57.15 (515203 sequences; 181334896 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20266 sequences)
Timestamp : 25 May 2011 at 08:56:50 GMT

Pro SET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3
ACTA_HUMAN Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Archive Report of Selected Matches

5.

SET_HUMAN Mass: 33469 Score: 241 Matches: 5(5) Sequences: 3(3) emPAI: 0.38

Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
818	604.7600	1207.5054	1207.5972	-0.0918	0	90	4e-007	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
819	604.7700	1207.5254	1207.5972	-0.0718	0	(72)	2.5e-005	1	U	R.VEVTEFEDIK.S
883	637.2800	1272.5454	1272.6561	-0.1106	0	70	4.5e-005	1	U	R.LNEQASEEILK.V
884	637.2900	1272.5654	1272.6561	-0.0906	0	(62)	0.0003	1	U	R.LNEQASEEILK.V
1031	723.7800	1445.5454	1445.6423	-0.0968	0	81	3.7e-006	1	U	K.EFHLNESGDPSSK.S

10.

ACTA_HUMAN Mass: 42381 Score: 104 Matches: 2(2) Sequences: 2(2) emPAI: 0.18

Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
538	488.6800	975.3454	975.4410	-0.0956	0	45	0.013	1	U	K.AGFAGDDAPR.A
810	599.7000	1197.3854	1197.5150	-0.1295	0	59	0.00055	1	U	K.DSYVGDEAQSK.R

Proteins matching the same set of peptides:

ACTB_HUMAN Mass: 42052 Score: 104 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)

Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1

ACTC_HUMAN Mass: 42334 Score: 104 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1

ACTG_HUMAN Mass: 42108 Score: 104 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1

ACTH_HUMAN Mass: 42249 Score: 104 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1

ACTS_HUMAN Mass: 42366 Score: 104 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=1 SV=1

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Acetyl (N-term),Oxidation (M),Phospho (ST)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da (# ^{13}C = 1)
Fragment Mass Tolerance: ± 0.4 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 1311

Figura 2. Resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de las bandas del complejo de la ProTα 40 kDa del fraccionado 1M de citoplasma de células Jurkat proliferantes.

El complejo de la ProTα 40 kDa fue sometido a tratamiento térmico, separado por SDS-PAGE como se describe en Material y Métodos 3.8 y las bandas que libera análizadas por espectrometría de masas.

COMPLEJO 40 kDa CÉLULAS NO PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: 29-05-2012_A **Date:** May 31, 2012
Fraction:
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
Amazon_PhosphoCID_PE_2012-06-05 17:21:56	/MANUEL FREIRE/29-05-2012_A/GEL1D_A/2_CID-ETD_A3_01_2121.D	Mascot	SwissProt

Protein 1: Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Accession: SET_HUMAN **Score:** 439.7
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta) **MW [kDa]:** 33.5
Database Date: 2012-06-04 **pI:** 4.1
Sequence Coverage [%]: 23.4
No. of unique Peptides: 9

10	20	30	40	50	60	70	80
MAPKRQSPLP	PQKKKPRPPP	ALGPEETSAS	AGLPKKGEKE	QQEAIEHIDE	VQNEIDRLNE	QASEEILKVE	QKYNKLRQPF
90	100	110	120	130	140	150	160
FQKRSELIAK	IPNFWVTTFV	NHPQVSALLG	EEDEEALHYL	TRVEVTEFED	IKSGYRIDFY	FDENPYFENK	VLSKEFHLNE
170	180	190	200	210	220	230	240
SGDPSSKSTE	IKWKSGKDLT	KRSSQTQNKA	SRKRQHEEPE	SFFTWFTDHS	DAGADELGEV	IKDDIWPNPL	QYYLVPDMDD
250	260	270	280	290	300		
EEGEGEEDDD	DDEEEEGLED	IDEEGDEDEG	EEDEDDDEGE	EGEEDEGEDD			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
181	4	637.2825	-82.92	2	17.3	78.6	0	58-68	R.LNEQASEEILK.V	
223	1	879.4192	-55.06	2	19.3	33.1	1	58-72	R.LNEQASEEILKVEQK.Y	
170	2	532.2221	-157.62	2	16.8	26.6	1	76-83	K.LRQPFFQK.R	
151	1	397.6764	-93.07	2	16.0	29.6	0	78-83	R.QPFFQK.R	
258	5	604.7528	-87.79	2	21.0	80.8	0	123-132	R.VEVTEFEDIK.S	
249	1	557.9419	-6.75	3	20.5	27.1	1	123-136	R.VEVTEFEDIKSGYR.I	
145	1	625.2756	-62.25	3	15.7	31.5	1	151-167	K.VLSKEFHLNESGDPSSK.S	
119	3	723.7719	-78.08	2	14.5	55.8	0	155-167	K.EFHLNESGDPSSK.S	
106	2	446.1954	-123.16	2	13.9	30.0	1	168-174	K.STEIKWK.S	

Protein 2: MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL1 PE=1 SV=2

Accession: MRP_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04

Score: 137.6
MW [kDa]: 19.5
pI: 4.5
Sequence Coverage [%]: 23.1
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MGSQSSKAPR	GDVTAEEAAG	ASPAKANGQE	NGHVKSNGDL	SPKGEGESPP	VNGTDEAAGA	TGDAIEPAPP	SQGAEAKGEV
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
PPKETPKKKK	KFSFKKPFKL	SGLSFKRNRK	EGGGDSSASS	PTEEEQEQGE	IGACSDEGTA	QEGKAAATPE	SQEPQAKGAE
170	**180**	**190**	**200**				
ASAASEEEAG	PQATEPSTPS	GPESGPTPAS	AEQNE				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
81	2	687.2237	-155.81	2	12.6	75.8	0	11-25	R.GDVTAEEAAGASPAK.A	
30	1	664.2711	-85.73	2	9.8	26.6	0	145-157	K.AAATPESQEPQAK.G	

Protein 3: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	**100**	**110**	**120**				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 34 kDa CÉLULAS NO PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 1 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 3
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:04:35	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_A/10-07-12/nLC_Trampa de Iones/3_nLC-Trampalones_A1_01_2149.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1

Accession: C1QBP_HUMAN **Score:** 168.7
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta) **MW [kDa]:** 31.3
Database Date: 2012-02-28 **pI:** 4.6
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 9.9
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MLPLLRCVPR	VLGSSVAGLR	AAAPASPFRQ	LLQPAPRLCT	RPFGLLSVRA	GSERRPGLLR	PRGPCACGCG	CGSLHTDGDK
90	100	110	120	130	140	150	160
AFVDFLSDEI	KEERKIQKHK	TLPKMSGGWE	LELNGTEAKL	VRKVAGEKIT	VTFNINNSIP	PTFDGEEEPS	QGQKVEEQEP
170	180	190	200	210	220	230	240
ELTSTPNFVV	EVIKNDDGKK	ALVLDCHYPE	DEVGQEDEAE	SDIFSIREVS	FQSTGESEWK	DTNYTLNTDS	LDWALYDHLM
250	260	270	280	290			
DFLADRGVDN	TFADELVELS	TALEHQEYIT	FLEDLKSFVK	SQ			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
385	2	819.3004	-94.00	2	22.2	85.8	0	105-119	K.MSGGWELELNGTEAK.L	Oxidation: 1
357	2	757.2835	-79.76	2	19.6	84.3	0	208-220	R.EVSFQSTGESEWK.D	

Protein 2: Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3

Accession: TPM4_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 164.8
MW [kDa]: 28.5
pI: 4.5
Sequence Coverage [%]: 13.3
No. of unique Peptides: 3

Alias proteins:

Accession	Name	Description
TPM4_PIG	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Sus scrofa GN=TPM4 PE=1 SV=3

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MAGLNSLEAV KRKIQALQQQ ADEAEDRAQG LQRELDGERE RREKAEGDVA ALNRRIQLVE EELDRAQERL ATALQKLEEA
        90        100        110        120        130        140        150        160
EKAADESERG MKVIENRAMK DEEKMEIQEM QLKEAKHIAE EADRKYEEVA RKLVILEGEL ERAEERAEVS ELKCGDLEEE
       170        180        190        200        210        220        230        240
LKNVTNNLKS LEAASEKYSE KEDKYEEEIK LLSDKLKEAE TRAEFAERTV AKLEKTIDDL EEKLAQAKEE NVGLHQTLDQ
       250
TLNELNCI
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
198	1	808.4434	685.56	2	15.7	48.9	0	14-27	K.IQALQQQADEAEDR.A	
109	2	508.2124	-97.56	2	13.7	58.1	0	45-54	K.AEGDVAALNR.R	
89	1	591.2444	-61.35	2	13.1	57.8	0	105-113	K.MEIQEMQLK.E	Oxidation: 1, 6

Protein 3: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 138.0
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 21.6
No. of unique Peptides: 2

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MSDAAVDTSS EITTKDLKEK KEVVEEAENG RDAPANGNAE NEENGEQEAD NEVDEEEEEG GEEEEEEEEG DGEEEDGDED
        90        100        110        120
EEAESATGKR AAEDDEDDDV DTKKQKTDED D
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	2	734.2414	538.16	2	17.0	90.0	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1
51	2	566.1731	-166.65	2	11.6	48.0	0	22-31	K.EVVEEAENGR.D	

Protein 4: Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1

Accession: PSA1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 123.9
MW [kDa]: 29.5
pI: 6.2
Sequence Coverage [%]: 9.5
No. of unique Peptides: 2

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MFRNQYDNDV TVWSPQGRIH QIEYAMEAVK QGSATVGLKS KTHAVLVALK RAQSELAAHQ KKILHVDNHI GISIAGLTAD
        90        100        110        120        130        140        150        160
ARLLCNFMRQ ECLDSRFVFD RPLPVSRLVS LIGSKTQIPT QRYGRRPYGV GLLIAGYDDM GPHIFQTCPS ANYFDCRAMS
       170        180        190        200        210        220        230        240
IGARSQSART YLERHMSEFM ECNLNELVKH GLRALRETLP AEQDLTTKNV SIGIVGKDLE FTIYDDDDVS PFLEGLEERP
       250        260        270
QRKAQPAQPA DEPAEKADEP MEH
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
302	3	673.2087	-203.78	2	17.4	65.1	0	197-208	R.ETLPAEQDLTTK.N	
14	2	676.2728	-81.70	2	10.2	58.8	0	244-256	K.AQPAQPADEPAEK.A	

Protein 5: Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN= ECH1 PE=1 SV=2

Accession: ECH1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_03.fasta)
Database Date: 2012-04-03
Modification(s): Oxidation

Score: 123.8
MW [kDa]: 35.8
pI: 9.2
Sequence Coverage [%]: 7.0
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MAAGIVASRR	LRDLLTRRLT	GSNYPGLSIS	LRLTGSSAQE	EASGVALGEA	PDHSYESLRV	TSAQKHVLHV	QLNRPNKRNA
90	100	110	120	130	140	150	160
MNKVFWREMV	ECFNKISRDA	DCRAVVISGA	GKMFTAGIDL	MDMASDILQP	KGDDVARISW	YLRDIITRYQ	ETFNVIERCP
170	180	190	200	210	220	230	240
KPVIAAVHGG	CIGGGVDLVT	ACDIRYCAQD	AFFQVKEVDV	GLAADVGTLQ	RLPKVIGNQS	LVNELAFTAR	KMMADEALGS
250	260	270	280	290	300	310	320
GLVSRVFPDK	EVMLDAALAL	AAEISSKSPV	AVQSTKVNLL	YSRDHSVAES	LNYVASWNMS	MLQTQDLVKS	VQATTENKEL
330							
KTVTFSKL							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
347	1	734.7588	-113.44	2	18.5	65.2	0	232-245	K.MMADEALGSGLVSR.V	Oxidation: 1, 2
6	1	458.7175	-89.48	2	9.6	58.6	0	268-276	K.SPVAVQSTK.V	

Protein 6: Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens GN=SLC25A11 PE=1 SV=3

Accession: M2OM_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Acetyl

Score: 98.6
MW [kDa]: 34.0
pI: 10.4
Sequence Coverage [%]: 5.1
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MAATASAGAG	GIDGKPRTSP	KSVKFLFGGL	AGMGATVFVQ	PLDLVKNRMQ	LSGEGAKTRE	YKTSFHALTS	ILKAEGLRGI
90	100	110	120	130	140	150	160
YTGLSAGLLR	QATYTTTRLG	IYTVLFERLT	GADGTPPGFL	LKAVIGMTAG	ATGAFVGTPA	EVALIRMTAD	GRLPADQRRG
170	180	190	200	210	220	230	240
YKNVFNALIR	ITREEGVLTL	WRGCIPTMAR	AVVVNAAQLA	SYSQSKQFLL	DSGYFSDNIL	CHFCASMISG	LVTTAASMPV
250	260	270	280	290	300	310	320
DIAKTRIQNM	RMIDGKPEYK	NGLDVLFKVV	RYEGFFSLWK	GFTPYYARLG	PHTVLTFIFL	EQMNKAYKRL	FLSG

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
106	2	721.2964	-106.64	2	13.6	98.6	0	2-17	M.AATASAGAGGIDGKPR.T	Acetyl: 1

COMPLEJO 30 kDa CÉLULAS NO PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 1 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 4
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

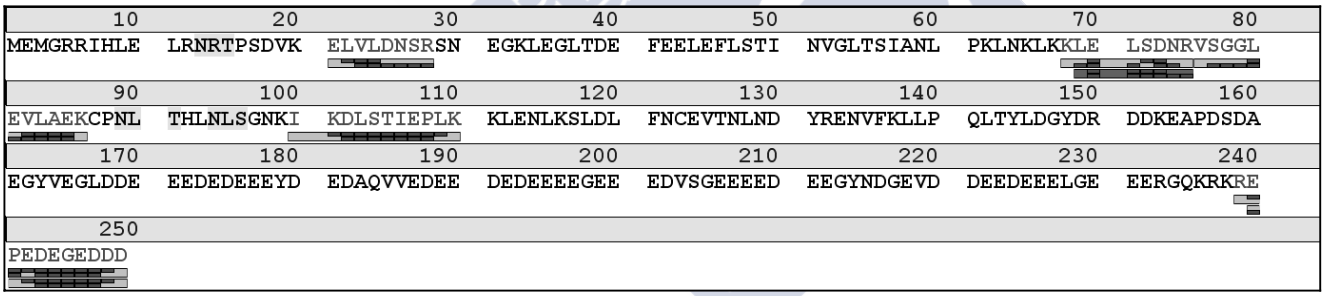
Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:04:58	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_A/10-07-12/nLC_Trampa de Iones/4_nLC-Trampalones_A3_01_2151.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN **Score:** 364.5
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta) **MW [kDa]:** 28.6
Database Date: 2011-07-12 **pI:** 3.8
Sequence Coverage [%]: 19.7
No. of unique Peptides: 7



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
168	5	473.1713	-173.97	2	15.4	42.8	0	21-28	K.ELVLDNSR.S	
49	1	487.7112	-114.21	2	12.0	39.4	1	68-75	K.KLELSDNR.V	
95	2	423.6290	-213.41	2	13.4	41.5	0	69-75	K.LELSDNR.V	
368	5	551.2414	-126.51	2	20.1	81.8	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
344	2	628.7914	-135.56	2	18.9	53.8	1	100-110	K.IKDLSTIEPLK.K	
18	1	653.1526	-132.72	2	9.3	63.8	1	239-249	K.REPEDEGEDDD.-	
21	2	575.1043	-146.81	2	9.5	41.5	0	240-249	R.EPEDEGEDDD.-	

Protein 2: 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1

Accession: 1433Z_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Acetyl, Oxidation

Score: 207.1
MW [kDa]: 27.7
pI: 4.6
Sequence Coverage [%]: 12.7
No. of unique Peptides: 3

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433Z_BOVIN	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1
1433Z_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Pongo abelii GN=YWHAZ PE=2 SV=1

```
10        20        30        40        50        60        70        80
MDKNELVQKA KLAEQAERYD DMAACMKSVT EQGAELSNEE RNLLSVAYKN VVGARRSSWR VVSSIEQKTE GAEKKQQMAR
90        100       110       120       130       140       150       160
EYREKIETEL RDICNDVLSL LEKFLIPNAS QAESKVFYLK MKGDYYRYLA EVAAGDDKKG IVDQSQQAYQ EAFEISKKEM
170       180       190       200       210       220       230       240
QPTHPIRLGL ALNFSVFYYE ILNSPEKACS LAKTAFDEAI AELDTLSEES YKDSTLIMQL LRDNLTLWTS DTQGDEAEAG
250
EGGEN
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
70	2	581.7343	-99.63	2	12.0	53.9	1	1-9	-.MDKNELVQK.A	Acetyl: 1; Oxidation: 1
157	2	774.7138	-189.26	2	14.3	108.3	0	28-41	K.SVTEQGAELSNEER.N	
26	1	445.2021	-114.54	2	10.4	46.4	0	61-68	R.VVSSIEQK.T	

Protein 3: Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3 PE=1 SV=2

Accession: PSA3_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 206.0
MW [kDa]: 28.4
pI: 5.1
Sequence Coverage [%]: 13.7
No. of unique Peptides: 3

```
10        20        30        40        50        60        70        80
MSSIGTGYDL SASTFSPDGR VFQVEYAMKA VENSSTAIGI RCKDGVVFGV EKLVLSKLYE EGSNKRLFNV DRHVGMAVAG
90        100       110       120       130       140       150       160
LLADARSLAD IAREEASNFR SNFGYNIPLK HLADRVAMYV HAYTLYSAVR PFGCSFMLGS YSVNDGAQLY MIDPSGVSYG
170       180       190       200       210       220       230       240
YWGCAIGKAR QAAKTEIEKL QMKEMTCRDI VKEVAKIIYI VHDEVKDKAF ELELSWVGEL TNGRHEIVPK DIREEAEKYA
250       260
KESLKEEDES DDDNM
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
340	2	565.7259	-97.68	2	17.7	63.1	0	21-29	R.VFQVEYAMK.A	Oxidation: 8
200	2	609.2391	-145.67	2	15.3	70.6	0	30-41	K.AVENSSTAIGIR.C	
43	2	836.2235	-106.22	2	10.9	73.8	1	242-255	K.ESLKEEDESDDDNM.-	Oxidation: 14

Protein 4: Proteasome subunit beta type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMB7 PE=1 SV=1

Accession: PSB7_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta)
Database Date: 2011-07-12
Modification(s): Oxidation

Score: 166.0
MW [kDa]: 29.9
pI: 8.8
Sequence Coverage [%]: 11.2
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MAAVSVYAPP	VGGFSFDNCR	RNAVLEADFA	KRGYKLPKVR	KTGTTIAGVV	YKDGIVLGAD	TRATEGMVVA	DKNCSKIHFI
90	100	110	120	130	140	150	160
SPNIYCCGAG	TAADTDMTTQ	LISSNLELHS	LSTGRLPRVV	TANRMLKQML	FRYQGYIGAA	LVLGGVDVTG	PHLYSIYPHG
170	180	190	200	210	220	230	240
STDKLPYVTM	GSGSLAAMAV	FEDKFRPDME	EEEAKNLVSE	AIAAGIFNDL	GSGSNIDLCV	ISKNKLDFLR	PYTVPNKKGT
250	260	270	280				
RLGRYRCEKG	TTAVLTEKIT	PLEIEVLEET	VQTMDTS				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
296	4	508.6736	-193.78	2	17.5	64.5	0	53-62	K.DGIVLGADTR.A	
27	1	518.6913	-118.18	2	10.2	43.1	0	63-72	R.ATEGMVVADK.N	Oxidation: 5
51	2	698.7178	-126.36	2	12.1	58.4	0	185-195	K.FRPDMEEEEAK.N	Oxidation: 5

Protein 5: 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3

Accession: 1433B_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 158.8
MW [kDa]: 28.1
pI: 4.6
Sequence Coverage [%]: 11.4
No. of unique Peptides: 3

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433B_MACFA	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein beta/alpha OS=Macaca fascicularis GN=YWHAB PE=2 SV=3
1433B_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein beta/alpha OS=Pongo abelii GN=YWHAB PE=3 SV=1

10	20	30	40	50	60	70	80
MTMDKSELVQ	KAKLAEQAER	YDDMAAAMKA	VTEQGHELSN	EERNLLSVAY	KNVVGARRSS	WRVISSIEQK	TERNEKKQQM
90	100	110	120	130	140	150	160
GKEYREKIEA	ELQDICNDVL	ELLDKYLIPN	ATQPESKVFY	LKMKGDYFRY	LSEVASGDNK	QTTVSNSQQA	YQEAFEISKK
170	180	190	200	210	220	230	240
EMQPTHPIRL	GLALNFSVFY	YEILNSPEKA	CSLAKTAFDE	AIAELDTLNE	ESYKDSTLIM	QLLRDNLTLW	TSENQGDEGD
250							
AGEGEN							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
11	1	524.1619	-91.22	2	9.2	41.4	0	21-29	R.YDDMAAAMK.A	Oxidation: 4, 8
77	1	452.1872	-163.01	2	12.2	41.5	0	63-70	R.VISSIEQK.T	
121	2	591.6495	-229.80	2	13.4	77.3	0	130-140	R.YLSEVASGDNK.Q	

Protein 6: ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7

Accession: ADT2_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28
Modification(s): Acetyl

Score: 110.6
MW [kDa]: 32.8
pI: 10.2
Sequence Coverage [%]: 6.7
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MTDAAVSFAK	DFLAGGVAAA	ISKTAVAPIE	RVKLLLQVQH	ASKQITADKQ	YKGIIDCVVR	IPKEQGVLSF	WRGNLANVIR
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
YFPTQALNFA	FKDKYKQIFL	GGVDKRTQFW	LYFAGNLASG	GAAGATSLCF	VYPLDFARTR	LAADVGKAGA	EREFRGLGDC
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
LVKIYKSDGI	KGLYQGFNVS	VQGIIIYRAA	YFGIYDTAKG	MLPDPKNTHI	VISWMIAQTV	TAVAGLTSYP	FDTVRRRMMM
250	**260**	**270**	**280**	**290**	**300**		
QSGRKGTDIM	YTGTLDCWRK	IARDEGGKAF	FKGAWSNVLR	GMGGAFVLVL	YDEIKKYT		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
359	1	476.1984	-93.09	2	19.5	54.3	0	2-10	M.TDAAVSFAK.D	Acetyl: 1
397	2	610.1695	-219.27	2	22.1	56.3	0	189-199	R.AAYFGIYDTAK.G	

Protein 7: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 93.9
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	**100**	**110**	**120**				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	1	733.7910	-75.60	2	17.2	93.9	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Protein 8: 14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2

Accession: 1433G_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation
Alias proteins:

Score: 90.1
MW [kDa]: 28.3
pI: 4.7
Sequence Coverage [%]: 6.9
No. of unique Peptides: 2

Accession	Name	Description
1433G_MOUSE	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2
1433G_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Pongo abelii GN=YWHAG PE=2 SV=3
1433G_RAT	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Ywhag PE=1 SV=2

10	20	30	40	50	60	70	80
MVDREQLVQK	ARLAEQAERY	DDMAAAMKNV	TELNEPLSNE	ERNLLSVAYK	NVVGARRSSW	RVISSIEQKT	SADGNEKKIE
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
MVRAYREKIE	KELEAVCQDV	LSLLDNYLIK	NCSETQYESK	VFYLKMKGDY	YRYLAEVATG	EKRATVVESS	EKAYSEAHEI
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
SKEHMQPTHP	IRLGLALNYS	VFYYEIQNAP	EQACHLAKTA	FDDAIAELDT	LNEDSYKDST	LIMQLLRDNL	TLWTSDQQDD
250							
DGGEGNN							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
20	2	524.1448	-123.84	2	9.5	39.5	0	20-28	R.YDDMAAAMK.N	Oxidation: 4, 8
64	1	452.1925	-151.30	2	12.4	50.5	0	62-69	R.VISSIEQK.T	

COMPLEJO 28 kDa CÉLULAS NO PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 1 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 6
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:05:21	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_A/10-07-12/nLC_Trampa de Iones/6_nLC-Trampalones_A6_01_2155.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens GN =ANP32B PE=1 SV=1

Accession: AN32B_HUMAN **Score:** 256.9
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta) **MW [kDa]:** 28.8
Database Date: 2012-06-04 **pI:** 3.8
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 12.0
No. of unique Peptides: 5

10	20	30	40	50	60	70	80
MDMKRRIHLE	LRNRTPAAVR	ELVLDNCKSN	DGKIEGLTAE	FVNLEFLSLI	NVGLISVSNL	PKLPKLKKLE	LSENRIFGGL
90	100	110	120	130	140	150	160
DMLAEKLPNL	THLNLSGNKL	KDISTLEPLK	KLECLKSLDL	FNCEVTNLND	YRESVFKLLP	QLTYLDGYDR	EDQEAPDSDA
170	180	190	200	210	220	230	240
EVDGVDEEEE	DEEGEDEEDE	DDEDGEEEEF	DEEDDEDEDV	EGDEDDDEVS	EEEEEFGLDE	EDEDEDEDEE	EEEGGKGEKR
250	260						
KRETDDEGED	D						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
25	2	494.6996	-151.85	2	12.1	55.0	1	68-75	K.KLELSENR.I	
57	2	430.6525	-173.54	2	13.1	41.2	0	69-75	K.LELSENR.I	
371	1	605.2481	-106.94	2	23.2	70.7	0	76-86	R.IFGGLDMLAEK.L	Oxidation: 7
334	2	628.7957	-128.73	2	19.1	44.5	1	100-110	K.LKDISTLEPLK.K	
349	2	508.1952	-180.88	2	20.5	45.5	0	102-110	K.DISTLEPLK.K	

Protein 2: Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4

Accession: ERP29_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Oxidation

Score: 173.8
MW [kDa]: 29.0
pI: 7.5
Sequence Coverage [%]: 13.4
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MAAAVPRAAF	LSPLLPLLLG	FLLLSAPHGG	SGLHTKGALP	LDTVTFYKVI	PKSKFVLVKF	DTQYPYGEKQ	DEFKRLAENS
90	100	110	120	130	140	150	160
ASSDDLLVAE	VGISDYGDKL	NMELSEKYKL	DKESYPVFYL	FRDGDFENPV	PYTGAVKVGA	IQRWLKGQGV	YLGMPGCLPV
170	180	190	200	210	220	230	240
YDALAGEFIR	ASGVEARQAL	LKQGQDNLSS	VKETQKKWAE	QYLKIMGKIL	DQGEDFPASE	MTRIARLIEK	NKMSDGKKEE
250	260	270					
LQKSLNILTA	FQKKGAEKEE	L					

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
250	2	624.1940	-141.90	2	17.0	55.2	0	60-69	K.FDTQYPYGEK.Q	
10	1	538.2146	-107.66	2	11.5	42.2	0	183-192	K.QGQDNLSSVK.E	
315	2	862.7756	-136.56	2	18.2	76.5	0	209-223	K.ILDQGEDFPASEMTR.I	Oxidation: 13

Protein 3: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 138.0
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 21.6
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	2	734.2414	538.16	2	17.0	90.0	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1
51	2	566.1731	-166.65	2	11.6	48.0	0	22-31	K.EVVEEAENGR.D	

Protein 4: Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CLPP PE=1 SV=1

Accession: CLPP_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Oxidation

Score: 72.2
MW [kDa]: 30.2
pI: 9.2
Sequence Coverage [%]: 4.3
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MWPGILVGGA	RVASCRYPAL	GPRLAAHFPA	QRPPQRTLQN	GLALQRCLHA	TATRALPLIP	IVVEQTGRGE	RAYDIYSRLL
90	100	110	120	130	140	150	160
RERIVCVMGP	IDDSVASLVI	AQLLFLQSES	NKKPIHMYIN	SPGGVVTAGL	AIYDTMQYIL	NPICTWCVGQ	AASMGSLLLA
170	180	190	200	210	220	230	240
AGTPGMRHSL	PNSRIMIHQP	SGGARGQATD	IAIQAEEIMK	LKKQLYNIYA	KHTKQSLQVI	ESAMERDRYM	SPMEAQEFGI
250	260	270	280				
LDKVLVHPPQ	DGEDEPTLVQ	KEPVEAAPAA	EPVPAST				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
306	2	703.7995	-72.94	2	18.0	72.2	0	215-226	K.QSLQVIESAMER.D	Oxidation: 10

COMPLEJO 22 kDa CÉLULAS NO PROLIFERANTES
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 1 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 7
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:05:46	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_A/10-07-12/nLC_Trampa de Iones/7_nLC-Trampalones_A7_01_2157.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens GN=RAB11A PE=1 SV=3

Accession: RB11A_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20

Score: 165.5
MW [kDa]: 24.4
pI: 6.1
Sequence Coverage [%]: 13.9
No. of unique Peptides: 3

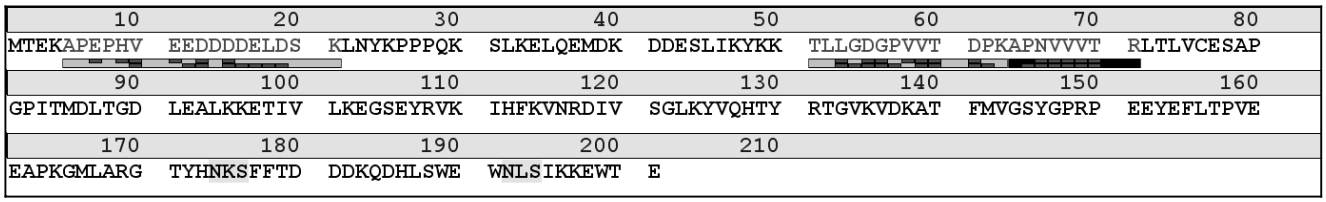
10	20	30	40	50	60	70	80
MGTRDDEYDY	LFKVVLIGDS	GVGKSNLLSR	FTRNEFNLES	KSTIGVEFAT	RSIQVDGKTI	KAQIWDTAGQ	ERYRAITSAY
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
YRGAVGALLV	YDIAKHLTYE	NVERWLKELR	DHADSNIVIM	LVGNKSDLRH	LRAVPTDEAR	AFAEKNGLSF	IETSALDSTN
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**		
VEAAFQTILT	EIYRIVSQKQ	MSDRRENDMS	PSNNVVPIHV	PPTTENKPKV	QCCQNI		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
355	3	522.2290	-152.03	2	18.1	49.9	0	14-24	K.VVLIGDSGVGK.S	
375	2	540.7308	-105.47	2	19.2	62.5	0	42-51	K.STIGVEFATR.S	
124	1	580.7013	-149.92	2	13.4	54.5	0	96-104	K.HLTYENVER.W	

Protein 2: Rho GDP-dissociation inhibitor 2 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIB PE=1 SV=3

Accession: GDIR2_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta)
Database Date: 2011-07-12

Score: 164.0
MW [kDa]: 23.0
pI: 4.9
Sequence Coverage [%]: 18.9
No. of unique Peptides: 3



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
187	2	647.1915	-125.66	3	14.5	52.6	0	5-21	K.APEPHVEEDDDDELDSK.L	
379	2	656.2607	-153.37	2	19.5	65.8	0	51-63	K.TLLGDGPVVTDPK.A	
93	1	428.2099	-107.59	2	12.6	45.5	0	64-71	K.APNVVVTR.L	

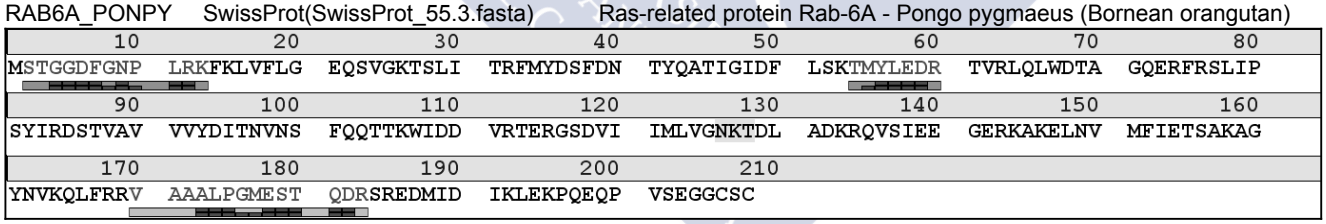
Protein 3: Ras-related protein Rab-6A - Homo sapiens (Human)

Accession: RAB6A_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)
Database Date: 2008-09-07
Modification(s): Acetyl, Oxidation

Score: 158.8
MW [kDa]: 23.6
pI: 5.3
Sequence Coverage [%]: 15.9
No. of unique Peptides: 3

Alias proteins:

Accession	Name	Description
RAB6A_PONPY	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Ras-related protein Rab-6A - Pongo pygmaeus (Bornean orangutan)



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
352	3	645.7632	-96.44	2	18.0	57.1	1	2-13	M.STGGDFGNPLRK.F	Acetyl: 1
126	1	472.1501	-133.45	2	13.4	44.7	0	54-60	K.TMYLEDR.T	Oxidation: 2
183	2	731.2573	-131.88	2	14.5	58.4	0	170-183	R.VAAALPGMESTQDR.S	Oxidation: 8

Protein 4: **Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3**

Accession: SET_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04

Score: 136.9
MW [kDa]: 33.5
pI: 4.1
Sequence Coverage [%]: 7.2
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MAPKRQSPLP	PQKKKPRPPP	ALGPEETSAS	AGLPKKGEKE	QQEAIEHIDE	VQNEIDRLNE	QASEEILKVE	QKYNKLRQPF
90	100	110	120	130	140	150	160
FQKRSELIAK	IPNFWVTTFV	NHPQVSALLG	EEDEEALHYL	TRVEVTEFED	IKSGYRIDFY	FDENPYFENK	VLSKEFHLNE
170	180	190	200	210	220	230	240
SGDPSSKSTE	IKWKSGKDLT	KRSSQTQNKA	SRKRQHEEPE	SFFTWFTDHS	DAGADELGEV	IKDDIWPNPL	QYYLVPDMDD
250	260	270	280	290	300		
EEGEGEEDDD	DDEEEEGLED	IDEEGDEDEG	EEDEDDDEGE	EGEEDEGEDD			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
340	2	637.2463	-139.72	2	17.6	73.1	0	58-68	R.LNEQASEEILK.V	
388	2	604.7297	-125.98	2	21.4	63.8	0	123-132	R.VEVTEFEDIK.S	

Protein 5: **Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2**

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Figura 3. Resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M de citoplasma de células Jurkat con baja actividad proliferativa.

Los complejos de la ProTα fueron sometidos a tratamiento térmico previamente a la lisis con tripsina como se indica en Material y Métodos 3.10.

COMPLEJO 50 kDa CÉLULAS APOPTÓTICAS
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 9
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:45:06	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/9_nLC-Trampalones_A6_01_2173.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Actin, cytoplasmic 1 - Homo sapiens (Human)

Accession: ACTB_HUMAN **Score:** 451.3
Database: SwissProt(SwissProt_55.3.fasta) **MW [kDa]:** 41.7
Database Date: 2008-09-07 **pI:** 5.2
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 20.0
No. of unique Peptides: 8

Alias proteins:

Accession	Name	Description
ACTB_BOVIN	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Bos taurus (Bovine)
ACTB_CANFA	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Canis familiaris (Dog)
ACTB_CAVPO	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Cavia porcellus (Guinea pig)
ACTB_CERAE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Cercopithecus aethiops (Green monkey) (Grivet)
ACTB_CHICK	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Gallus gallus (Chicken)
ACTB_HORSE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Equus caballus (Horse)
ACTB_MACFA	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Macaca fascicularis (Crab eating macaque) (Cynomolgus monkey)
ACTB_MESAU	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Mesocricetus auratus (Golden hamster)
ACTB_MOUSE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Mus musculus (Mouse)
ACTB_PANTR	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Pan troglodytes (Chimpanzee)
ACTB_PIG	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Sus scrofa (Pig)
ACTB_PONPY	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Pongo pygmaeus (Bornean orangutan)
ACTB_RAT	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Rattus norvegicus (Rat)
ACTB_SHEEP	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Ovis aries (Sheep)
ACTB_SPECI	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Spermophilus citellus (European suslik) (Citellus citellus)
ACTB_TRIVU	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	Actin, cytoplasmic 1 - Trichosurus vulpecula (Brush-tailed possum)

10	20	30	40	50	60	70	80
MDDDIAALVV	DNGSGMCKAG	FAGDDAPRAV	FPSIVGRPRH	QGVMVGMGQK	DSYVGDEAQS	KRGILTLKYP	IEHGIVTNWD
90	100	110	120	130	140	150	160
DMEKIWHHTF	YNELRVAPEE	HPVLLTEAPL	NPKANREKMT	QIMFETFNTP	AMYVAIQAVL	SLYASGRTTG	IVMDSGDGVT
170	180	190	200	210	220	230	240
HTVPIYEGYA	LPHAILRLDL	AGRDLTDYLM	KILTERGYSF	TTTAEREIVR	DIKEKLCYVA	LDFEQEMATA	ASSSSLEKSY
250	260	270	280	290	300	310	320
ELPDGQVITI	GNERFRCPEA	LFQPSFLGME	SCGIHETTFN	SIMKCDVDIR	KDLYANTVLS	GGTTMYPGIA	DRMQKEITAL
330	340	350	360	370	380		
APSTMKIKII	APPERKYSVW	IGGSILASLS	TFQQMWISKQ	EYDESGPSIV	HRKCF		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
124	11	488.6544	-150.15	2	13.5	70.2	0	19-28	K.AGFAGDDAPR.A	
3	2	602.1991	-141.10	2	8.9	41.4	0	40-50	R.HQGVMVGMGQK.D	Oxidation: 5, 8
77	2	599.6850	-132.98	2	12.0	69.0	0	51-61	K.DSYVGDEAQSK.R	
51	2	677.7216	-138.26	2	11.3	66.7	1	51-62	K.DSYVGDEAQSKR.G	
449	1	507.6724	-141.51	2	21.9	41.7	0	184-191	R.DLTDYLMK.I	Oxidation: 7
329	5	566.6407	-223.02	2	17.0	60.8	0	197-206	R.GYSFTTTAER.E	
239	2	589.2114	-167.80	2	15.7	59.1	0	316-326	K.EITALAPSTMK.I	Oxidation: 10
210	1	758.7556	-130.95	2	15.1	45.2	0	360-372	K.QEYDESGPSIVHR.K	

Protein 2: Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 PE= 1 SV=2

Accession: VAT1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 236.9
MW [kDa]: 41.9
pI: 5.9
Sequence Coverage [%]: 10.7
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDEREVAEA	ATGEDASSPP	PKTEAASDPQ	HPAASEGAAA	AAASPPLLRC	LVLTGFGGYD	KVKLQSRPAA	PPAPGPGQLT
90	100	110	120	130	140	150	160
LRLRACGLNF	ADLMARQGLY	DRLPPLPVTP	GMEGAGVVIA	VGEGVSDRKA	GDRVMVLNRS	GMWQEEVTVP	SVQTFLIPEA
170	180	190	200	210	220	230	240
MTFEEAAALL	VNYITAYMVL	FDFGNLQPGH	SVLVHMAAGG	VGMAAVQLCR	TVENVTVFGT	ASASKHEALK	ENGVTHPIDY
250	260	270	280	290	300	310	320
HTTDYVDEIK	KISPKGVDIV	MDPLGGSDTA	KGYNLLKPMG	KVVTYGMANL	LTGPKRNLMA	LARTWWNQFS	VTALQLLQAN
330	340	350	360	370	380	390	400
RAVCGFHLGY	LDGEVELVSG	VVARLLALYN	QGHIKPHIDS	VWPFEKVADA	MKQMQEKKNV	GKVLLVPGPE	KEN

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
76	1	828.2581	-161.13	2	12.0	99.7	0	6-22	R.EVAEAATGEDASSPPPK.T	
427	2	755.8092	-108.24	2	19.7	94.2	0	211-225	R.TVENVTVFGTASASK.H	
271	1	568.7126	-171.69	2	16.2	44.4	0	272-281	K.GYNLLKPMGK.V	Oxidation: 8

Protein 3: Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=1 SV=3

Accession: QCR2_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28
Modification(s): Oxidation

Score: 138.6
MW [kDa]: 48.4
pI: 9.3
Sequence Coverage [%]: 5.7
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MKLLTRAGSF	SRFYSLKVAP	KVKATAAPAG	APPQPQDLEF	TKLPNGLVIA	SLENYSPVSR	IGLFIKAGSR	YEDFSNLGTT
90	100	110	120	130	140	150	160
HLLRLTSSLT	TKGASSFKIT	RGIEAVGGKL	SVTATRENMA	YTVECLRGDV	DILMEFLLNV	TTAPEFRRWE	VADLQPQLKI
170	180	190	200	210	220	230	240
DKAVAFQNPQ	THVIENLHAA	AYRNALANPL	YCPDYRIGKV	TSEELHYFVQ	NHFTSARMAL	IGLGVSHPVL	KQVAEQFLNM
250	260	270	280	290	300	310	320
RGGLGLSGAK	ANYRGGEIRE	QNGDSLVHAA	FVAESAVAGS	AEANAFSVLQ	HVLGAGPHVK	RGSNTTSHLH	QAVAKATQQP
330	340	350	360	370	380	390	400
FDVSAFNASY	SDSGLFGIYT	ISQATAAGDV	IKAAYNQVKT	IAQGNLSNTD	VQAAKNKLKA	GYLMSVESSE	CFLEEVGSQA
410	420	430	440	450	460		
LVAGSYMPPS	TVLQQIDSVA	NADIINAAKK	FVSGQKSMAA	SGNLGHTPFV	DEL		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
421	2	626.1990	-179.07	2	19.1	59.5	0	232-241	K.QVAEQFLNMR.G	Oxidation: 9
238	2	815.8116	-137.00	2	15.6	82.0	0	360-375	K.TIAQGNLSNTDVQAAK.N	

Protein 4: Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1

Accession: NUDC_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_03.fasta)
Database Date: 2012-04-03
Modification(s): Oxidation

Score: 99.6
MW [kDa]: 38.2
pI: 5.1
Sequence Coverage [%]: 5.1
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MGGEQEEERF	DGMLLAMAQQ	HEGGVQELVN	TFFSFLRRKT	DFFIGGEEGM	AEKLITQTFS	HHNQLAQKTR	REKRARQEAE
90	100	110	120	130	140	150	160
RREKAERAAR	LAKEAKSETS	GPQIKELTDE	EAERLQLEID	QKKDAENHEA	QLKNGSLDSP	GKQDTEEDEE	EDEKDKGKLK
170	180	190	200	210	220	230	240
PNLGNGADLP	NYRWTQTLSE	LDLAVPFCVN	FRLKGKDMVV	DIQRRHLRVG	LKGQPAIIDG	ELYNEVKVEE	SSWLIEDGKV
250	260	270	280	290	300	310	320
VTVHLEKINK	MEWWSRLVSS	DPEINTKKIN	PENSKLSDLD	SETRSMVEKM	MYDQRQKSMG	LPTSDEQKKQ	EILKKFMDQH
330	340						
PEMDFSKAKF	N						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
211	1	496.1495	-197.47	2	15.1	43.2	0	197-204	K.DMVVDIQR.R	Oxidation: 2
115	2	518.1864	-125.20	2	13.2	59.3	0	276-284	K.LSDLDSETR.S	

Protein 5: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 93.9
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	1	733.7910	-75.60	2	17.2	93.9	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 34 kDa CÉLULAS APOPTÓTICAS
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 10
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:49:02	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/10_nLC-Trampalones_A7_01_2175.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: 40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2

Accession: RS3_HUMAN **Score:** 161.1
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta) **MW [kDa]:** 26.7
Database Date: 2012-06-04 **pI:** 10.3
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 17.3
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MAVQISKKRK	FVADGIFKAE	LNEFLTRELA	EDGYSGVEVR	VTPTRTEIII	LATRTQNVLG	EKGRRIRELT	AVVQKRFGFP
90	100	110	120	130	140	150	160
EGSVELYAEK	VATRGLCAIA	QAESLRYKLL	GGLAVRRACY	GVLRFIMESG	AKGCEVVVSG	KLRGQRAKSM	KFVDGLMIHS
170	180	190	200	210	220	230	240
GDPVNYYVDT	AVRHVLLRQG	VLGIKVKIML	PWDPTGKIGP	KKPLPDHVSI	VEPKDEILPT	TPISEQKGGK	PEPPAMPQPV
250							
PTA							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
342	2	712.2462	-129.74	2	18.2	72.9	0	28-40	R.ELAEDGYSGVEVR.V	
406	1	735.7849	-140.03	2	20.5	42.4	0	215-227	K.DEILPTTPISEQK.G	
136	1	795.3025	-126.65	2	14.6	45.7	0	228-243	K.GGKPEPPAMPQPVPTA.-	Oxidation: 9

Protein 2: Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1

Accession: PSA1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 144.9
MW [kDa]: 29.5
pI: 6.2
Sequence Coverage [%]: 14.1
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MFRNQYDNDV	TVWSPQGRIH	QIEYAMEAVK	QGSATVGLKS	KTHAVLVALK	RAQSELAAHQ	KKILHVDNHI	GISIAGLTAD
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
ARLLCNFMRQ	ECLDSRFVFD	RPLPVSRLVS	LIGSKTQIPT	QRYGRRPYGV	GLLIAGYDDM	GPHIFQTCPS	ANYFDCRAMS
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
IGARSQSART	YLERHMSEFM	ECNLNELVKH	GLRALRETLP	AEQDLTTKNV	SIGIVGKDLE	FTIYDDDDVS	PFLEGLEERP
250	**260**	**270**					
QRKAQPAQPA	DEPAEKADEP	MEH					

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
190	3	724.2615	-144.44	2	15.7	58.6	0	19-30	R.IHQIEYAMEAVK.Q	Oxidation: 8
325	1	673.2007	-215.66	2	17.8	44.4	0	197-208	R.ETLPAEQDLTTK.N	
25	2	676.2349	-137.74	2	10.9	41.9	0	244-256	K.AQPAQPADEPAEK.A	

Protein 3: Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECH1 PE=1 SV=2

Accession: ECH1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_03.fasta)
Database Date: 2012-04-03
Modification(s): Oxidation

Score: 129.5
MW [kDa]: 35.8
pI: 9.2
Sequence Coverage [%]: 7.0
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MAAGIVASRR	LRDLLTRRLT	GSNYPGLSIS	LRLTGSSAQE	EASGVALGEA	PDHSYESLRV	TSAQKHVLHV	QLNRPNKRNA
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
MNKVFWREMV	ECFNKISRDA	DCRAVVISGA	GKMFTAGIDL	MDMASDILQP	KGDDVARISW	YLRDIITRYQ	ETFNVIERCP
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
KPVIAAVHGG	CIGGGVDLVT	ACDIRYCAQD	AFFQVKEVDV	GLAADVGTLQ	RLPKVIGNQS	LVNELAFTAR	KMMADEALGS
250	**260**	**270**	**280**	**290**	**300**	**310**	**320**
GLVSRVFPDK	EVMLDAALAL	AAEISSKSPV	AVQSTKVNLL	YSRDHSVAES	LNYVASWNMS	MLQTQDLVKS	VQATTENKEL
330							
KTVTFSKL							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
380	2	734.7375	-142.42	2	18.9	83.9	0	232-245	K.MMADEALGSGLVSR.V	Oxidation: 1, 2
14	1	458.6903	-148.77	2	10.4	45.6	0	268-276	K.SPVAVQSTK.V	

Protein 4: 60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1

Accession: RL7_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Oxidation

Score: 118.7
MW [kDa]: 29.2
pI: 11.1
Sequence Coverage [%]: 7.3
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MEGVEEKKKE	VPAVPETLKK	KRRNFAELKI	KRLRKKFAQK	MLRKARRKLI	YEKAKHYHKE	YRQMYRTEIR	MARMARKAGN
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
FYVPAEPKLA	FVIRIRGING	VSPKVRKVLQ	LLRLRQIFNG	TFVKLNKASI	NMLRIVEPYI	AWGYPNLKSV	NELIYKRGYG
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
KINKKRIALT	DNALIARSLG	KYGIICMEDL	IHEIYTVGKR	FKEANNFLWP	FKLSSPRGGM	KKKTTHFVEG	GDAGNREDQI
250							
NRLIRRMN							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
119	1	410.6511	-169.98	2	14.3	47.9	0	128-134	K.ASINMLR.I	Oxidation: 5
418	2	585.7596	-146.95	2	21.8	70.7	0	167-177	R.IALTDNALIAR.S	

Protein 5: Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens GN=SLC25A11 PE=1 SV=3

Accession: M2OM_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Acetyl

Score: 108.6
MW [kDa]: 34.0
pI: 10.4
Sequence Coverage [%]: 5.1
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MAATASAGAG	GIDGKPRTSP	KSVKFLFGGL	AGMGATVFVQ	PLDLVKNRMQ	LSGEGAKTRE	YKTSFHALTS	ILKAEGLRGI
90	100	110	120	130	140	150	160
YTGLSAGLLR	QATYTTTRLG	IYTVLFERLT	GADGTPPGFL	LKAVIGMTAG	ATGAFVGTPA	EVALIRMTAD	GRLPADQRRG
170	180	190	200	210	220	230	240
YKNVFNALIR	ITREEGVLTL	WRGCIPTMAR	AVVVNAAQLA	SYSQSKQFLL	DSGYFSDNIL	CHFCASMISG	LVTTAASMPV
250	260	270	280	290	300	310	320
DIAKTRIQNM	RMIDGKPEYK	NGLDVLFKVV	RYEGFFSLWK	GFTPYYARLG	PHTVLTFIFL	EQMNKAYKRL	FLSG

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
114	3	721.2843	-123.42	2	14.2	108.6	0	2-17	M.AATASAGAGGIDGKPR.T	Acetyl: 1

Protein 6: 14-3-3 protein epsilon - Homo sapiens (Human)

Accession: 1433E_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)
Database Date: 2008-09-07
Modification(s): Oxidation

Score: 96.2
MW [kDa]: 29.2
pI: 4.5
Sequence Coverage [%]: 5.1
No. of unique Peptides: 1

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433E_BOVIN	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	14-3-3 protein epsilon - Bos taurus (Bovine)
1433E_CHICK	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	14-3-3 protein epsilon - Gallus gallus (Chicken)
1433E_MOUSE	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	14-3-3 protein epsilon - Mus musculus (Mouse)
1433E_RAT	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	14-3-3 protein epsilon - Rattus norvegicus (Rat)
1433E_SHEEP	SwissProt(SwissProt_55.3.fasta)	14-3-3 protein epsilon - Ovis aries (Sheep)

10	20	30	40	50	60	70	80
MDDREDLVYQ	AKLAEQAERY	DEMVESMKKV	AGMDVELTVE	ERNLLSVAYK	NVIGARRASW	RIISSIEQKE	ENKGGEDKLK
90	100	110	120	130	140	150	160
MIREYRQMVE	TELKLICCDI	LDVLDKHLIP	AANTGESKVF	YYKMKGDYHR	YLAEFATGND	RKEAAENSLV	AYKAASDIAM
170	180	190	200	210	220	230	240
TELPPTHPIR	LGLALNFSVF	YYEILNSPDR	ACRLAKAAFD	DAIAELDTLS	EESYKDSTLI	MQLLRDNLTL	WTSDMQGDGE
250	260						
EQNKEALQDV	EDENQ						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
370	2	732.2470	-148.77	2	18.8	96.2	0	30-42	K.VAGMDVELTVEER.N	Oxidation: 4

Protein 7: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 32 kDa CÉLULAS APOPTÓTICAS
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 11
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:48:14	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/11_nLC-Trampalones_B1_01_2177.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1

Accession: 1433Z_HUMAN **Score:** 258.7
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta) **MW [kDa]:** 27.7
Database Date: 2008-10-22 **pI:** 4.6
Sequence Coverage [%]: 16.3
No. of unique Peptides: 4

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433Z_BOVIN	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1
1433Z_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Pongo abelii GN=YWHAZ PE=2 SV=1

10	20	30	40	50	60	70	80
MDKNELVQKA	KLAEQAERYD	DMAACMKSVT	EQGAELSNEE	RNLLSVAYKN	VVGARRSSWR	VVSSIEQKTE	GAEKKQQMAR
90	100	110	120	130	140	150	160
EYREKIETEL	RDICNDVLSL	LEKFLIPNAS	QAESKVFYLK	MKGDYYRYLA	EVAAGDDKKG	IVDQSQQAYQ	EAFEISKKEM
170	180	190	200	210	220	230	240
QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	ILNSPEKACS	LAKTAFDEAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	DTQGDEAEAG
250							
EGGEN							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
10	1	408.6530	-149.60	2	9.7	47.4	0	12-18	K.LAEQAER.Y	
194	2	774.7405	-154.80	2	14.7	107.5	0	28-41	K.SVTEQGAELSNEER.N	
50	1	445.1637	-200.78	2	11.2	46.2	0	61-68	R.VVSSIEQK.T	
238	1	576.1945	-152.85	2	15.7	59.0	0	128-138	R.YLAEVAAGDDK.K	

COMPLEJO 30 kDa CÉLULAS APOPTÓTICAS
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 12
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

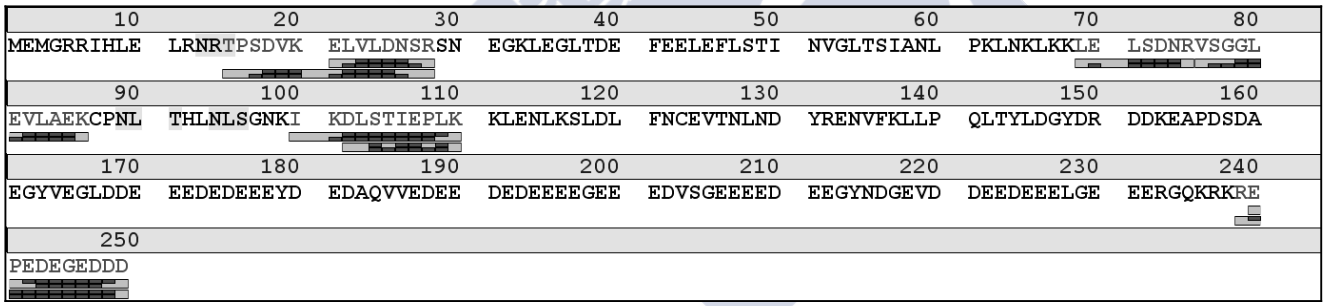
Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:47:24	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/12_nLC-Trampalones_B2_01_2179.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN **Score:** 475.9
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta) **MW [kDa]:** 28.6
Database Date: 2011-07-12 **pI:** 3.8
Sequence Coverage [%]: 21.7
No. of unique Peptides: 8



Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
413	2	786.8066	-137.79	2	19.9	84.9	1	15-28	R.TPSDVKELVLDNSR.S	
237	3	473.1583	-201.44	2	15.9	47.5	0	21-28	K.ELVLDNSR.S	
151	1	423.6349	-199.48	2	13.6	39.8	0	69-75	K.LELSDNR.V	
418	10	551.2523	-106.74	2	20.2	84.3	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
391	6	628.7791	-155.12	2	19.0	67.6	1	100-110	K.IKDLSTIEPLK.K	
429	1	508.2168	-138.39	2	20.7	38.5	0	102-110	K.DLSTIEPLK.K	
62	2	653.1159	-188.91	2	9.4	68.3	1	239-249	K.REPEDEGEDDD.-	
71	2	575.0770	-194.28	2	9.6	45.2	0	240-249	R.EPEDEGEDDD.-	

Protein 2: 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1

Accession: 1433Z_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Acetyl, Oxidation

Score: 227.2
MW [kDa]: 27.7
pI: 4.6
Sequence Coverage [%]: 15.5
No. of unique Peptides: 4

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433Z_BOVIN	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1
1433Z_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Pongo abelii GN=YWHAZ PE=2 SV=1

10	20	30	40	50	60	70	80
MDKNELVQKA	KLAEQAERYD	DMAACMKSVT	EQGAELSNEE	RNLLSVAYKN	VVGARRSSWR	VVSSIEQKTE	GAEKKQQMAR
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
EYREKIETEL	RDICNDVLSL	LEKFLIPNAS	QAESKVFYLK	MKGDYYRYLA	EVAAGDDKKG	IVDQSQQAYQ	EAFEISKKEM
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	ILNSPEKACS	LAKTAFDEAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	DTQGDEAEAG
250							
EGGEN							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
115	1	581.6527	-239.89	2	12.3	38.5	1	1-9	-.MDKNELVQK.A	Acetyl: 1; Oxidation: 1
59	1	408.6101	-254.56	2	9.4	39.1	0	12-18	K.LAEQAER.Y	
212	2	774.7270	-172.22	2	14.8	97.5	0	28-41	K.SVTEQGAELSNEER.N	
84	2	445.1968	-126.44	2	10.4	53.5	0	61-68	R.VVSSIEQK.T	

Protein 3: Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3 PE=1 SV=2

Accession: PSA3_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 178.5
MW [kDa]: 28.4
pI: 5.1
Sequence Coverage [%]: 13.7
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MSSIGTGYDL	SASTFSPDGR	VFQVEYAMKA	VENSSTAIGI	RCKDGVVFGV	EKLVLSKLYE	EGSNKRLFNV	DRHVGMAVAG
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
LLADARSLAD	IAREEASNFR	SNFGYNIPLK	HLADRVAMYV	HAYTLYSAVR	PFGCSFMLGS	YSVNDGAQLY	MIDPSGVSYG
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
YWGCAIGKAR	QAAKTEIEKL	QMKEMTCRDI	VKEVAKIIYI	VHDEVKDKAF	ELELSWVGEL	TNGRHEIVPK	DIREEAEKYA
250	**260**						
KESLKEEDES	DDDNM						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
355	1	565.6753	-187.12	2	17.8	51.7	0	21-29	R.VFQVEYAMK.A	Oxidation: 8
242	1	609.1953	-217.55	2	16.0	68.6	0	30-41	K.AVENSSTAIGIR.C	
90	2	836.1971	-137.79	2	11.1	59.6	1	242-255	K.ESLKEEDESDDDNM.-	Oxidation: 14

Protein 4: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 93.9
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	100	110	120				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	1	733.7910	-75.60	2	17.2	93.9	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

Protein 5: ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7

Accession: ADT2_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28
Modification(s): Acetyl

Score: 64.4
MW [kDa]: 32.8
pI: 10.2
Sequence Coverage [%]: 3.0
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MTDAAVSFAK	DFLAGGVAAA	ISKTAVAPIE	RVKLLLQVQH	ASKQITADKQ	YKGIIDCVVR	IPKEQGVLSF	WRGNLANVIR
90	100	110	120	130	140	150	160
YFPTQALNFA	FKDKYKQIFL	GGVDKRTQFW	LYFAGNLASG	GAAGATSLCF	VYPLDFARTR	LAADVGKAGA	EREFRGLGDC
170	180	190	200	210	220	230	240
LVKIYKSDGI	KGLYQGFNVS	VQGIIIYRAA	YFGIYDTAKG	MLPDPKNTHI	VISWMIAQTV	TAVAGLTSYP	FDTVRRRMMM
250	260	270	280	290	300		
QSGRKGTDIM	YTGTLDCWRK	IARDEGGKAF	FKGAWSNVLR	GMGGAFVLVL	YDEIKKYT		

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
411	2	476.1521	-190.31	2	19.8	64.4	0	2-10	M.TDAAVSFAK.D	Acetyl: 1

Protein 2: 14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2

Accession: 1433G_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 230.2
MW [kDa]: 28.3
pI: 4.7
Sequence Coverage [%]: 15.8
No. of unique Peptides: 3

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433G_MOUSE	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2
1433G_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Pongo abelii GN=YWHAG PE=2 SV=3
1433G_RAT	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Ywhag PE=1 SV=2

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MVDREQLVQK ARLAEQAERY DDMAAAMKNV TELNEPLSNE ERNLLSVAYK NVVGARRSSW RVISSIEQKT SADGNEKKIE
        90        100        110        120        130        140        150        160
MVRAYREKIE KELEAVCQDV LSLLDNYLIK NCSETQYESK VFYLKMKGDY YRYLAEVATG EKRATVVESS EKAYSEAHEI
       170        180        190        200        210        220        230        240
SKEHMQPTHP IRLGLALNYS VFYYEIQNAP EQACHLAKTA FDDAIAELDT LNEDSYKDST LIMQLLRDNL TLWTSDQQDD
       250
DGGEGNN
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
416	2	822.3046	-112.60	2	18.5	84.1	0	29-42	K.NVTELNEPLSNEER.N	
94	1	452.1811	-176.50	2	12.5	43.2	0	62-69	R.VISSIEQK.T	
236	3	540.7065	-140.02	2	15.7	56.9	0	133-142	R.YLAEVATGEK.R	

Protein 3: ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7

Accession: ADT2_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28
Modification(s): Acetyl

Score: 163.7
MW [kDa]: 32.8
pI: 10.2
Sequence Coverage [%]: 8.7
No. of unique Peptides: 3

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MTDAAVSFAK DFLAGGVAAA ISKTAVAPIE RVKLLLQVQH ASKQITADKQ YKGIIDCVVR IPKEQGVLSF WRGNLANVIR
        90        100        110        120        130        140        150        160
YFPTQALNFA FKDKYKQIFL GGVDKRTQFW LYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVGKAGA EREFRGLGDC
       170        180        190        200        210        220        230        240
LVKIYKSDGI KGLYQGFNVS VQGIIIYRAA YFGIYDTAKG MLPDPKNTHI VISWMIAQTV TAVAGLTSYP FDTVRRRMMM
       250        260        270        280        290        300
QSGRKGTDIM YTGTLDCWRK IARDEGGKAF FKGAWSNVLR GMGGAFVLVL YDEIKKYT
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
453	2	476.1672	-158.60	2	20.0	68.0	0	2-10	M.TDAAVSFAK.D	Acetyl: 1
458	1	488.7070	-142.69	2	20.4	50.6	0	97-105	K.QIFLGGVDK.R	
467	1	451.6711	-165.31	2	21.0	45.1	0	273-280	K.GAWSNVLR.G	

Protein 4: ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4

Accession: ADT3_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_02.fasta)
Database Date: 2012-02-28

Score: 144.4
MW [kDa]: 32.8
pI: 10.3
Sequence Coverage [%]: 9.4
No. of unique Peptides: 1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MTEQAISFAK DFLAGGIAAA ISKTAVAPIE RVKLLLQVQH ASKQIAADKQ YKGIVDCIVR IPKEQGVLSF WRGNLANVIR
        90        100        110        120        130        140        150        160
YFPTQALNFA FKDKYKQIFL GGVDKHTQFW RYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVGKSGT EREFRGLGDC
       170        180        190        200        210        220        230        240
LVKITKSDGI RGLYQGFSVS VQGIIIYRAA YFGVYDTAKG MLPDPKNTHI VVSWMIAQTV TAVAGVVSYP FDTVRRRMMM
       250        260        270        280        290        300
QSGRKGADIM YTGTVDCWRK IFRDEGGKAF FKGAWSNVLR GMGGAFVLVL YDELKKVI
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
466	1	603.1994	-159.29	2	21.0	50.9	0	189-199	R.AAYFGVYDTAK.G	

Protein 5: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta)
Database Date: 2011-07-12

Score: 124.8
MW [kDa]: 28.6
pI: 3.8
Sequence Coverage [%]: 8.4
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MEMGRRIHLE	LRNRTPSDVK	ELVLDNSRSN	EGKLEGLTDE	FEELEFLSTI	NVGLTSIANL	PKLNKLKKLE	LSDNRVSGGL
90	100	110	120	130	140	150	160
EVLAEKCPNL	THLNLSGNKI	KDLSTIEPLK	KLENLKSLDL	FNCEVTNLND	YRENVFKLLP	QLTYLDGYDR	DDKEAPDSDA
170	180	190	200	210	220	230	240
EGYVEGLDDE	EEDEDEEEYD	EDAQVVEDEE	DEDEEEEGEE	EDVSGEEEED	EEGYNDGEVD	DEEDEEELGE	EERGQKRKRE
250							
PEDEGEDDD							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
460	2	551.2131	-177.84	2	20.6	76.3	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
20	2	575.1020	-150.81	2	10.3	48.6	0	240-249	R.EPEDEGEDDD.-	

Protein 6: Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3 PE=1 SV=2

Accession: PSA3_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Oxidation

Score: 118.3
MW [kDa]: 28.4
pI: 5.1
Sequence Coverage [%]: 8.2
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MSSIGTGYDL	SASTFSPDGR	VFQVEYAMKA	VENSSTAIGI	RCKDGVVFGV	EKLVLSKLYE	EGSNKRLFNV	DRHVGMAVAG
90	100	110	120	130	140	150	160
LLADARSLAD	IAREEASNFR	SNFGYNIPLK	HLADRVAMYV	HAYTLYSAVR	PFGCSFMLGS	YSVNDGAQLY	MIDPSGVSYG
170	180	190	200	210	220	230	240
YWGCAIGKAR	QAAKTEIEKL	QMKEMTCRDI	VKEVAKIIYI	VHDEVKDKAF	ELELSWVGEL	TNGRHEIVPK	DIREEAEKYA
250	260						
KESLKEEDES	DDDNM						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
408	2	565.7095	-126.67	2	18.4	57.4	0	21-29	R.VFQVEYAMK.A	Oxidation: 8
256	2	609.2431	-139.10	2	16.0	62.4	0	30-41	K.AVENSSTAIGIR.C	

Protein 7: Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1

Accession: CATD_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_07.fasta)
Database Date: 2012-07-16
Modification(s): Oxidation

Score: 112.0
MW [kDa]: 44.5
pI: 6.1
Sequence Coverage [%]: 6.3
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MQPSSLLPLA	LCLLAAPASA	LVRIPLHKFT	SIRRTMSEVG	GSVEDLIAKG	PVSKYSQAVP	AVTEGPIPEV	LKNYMDAQYY
90	100	110	120	130	140	150	160
GEIGIGTPPQ	CFTVVFDTGS	SNLWVPSIHC	KLLDIACWIH	HKYNSDKSST	YVKNGTSFDI	HYGSGSLSGY	LSQDTVSVPC
170	180	190	200	210	220	230	240
QSASSASALG	GVKVERQVFG	EATKQPGITF	IAAKFDGILG	MAYPRISVNN	VLPVFDNLMQ	QKLVDQNIFS	FYLSRDPDAQ
250	260	270	280	290	300	310	320
PGGELMLGGT	DSKYYKGSLS	YLNVTRKAYW	QVHLDQVEVA	SGLTLCKEGC	EAIVDTGTSL	MVGPVDEVRE	LQKAIGAVPL
330	340	350	360	370	380	390	400
IQGEYMIPCE	KVSTLPAITL	KLGGKGYKLS	PEDYTLKVSQ	AGKTLCLSGF	MGMDIPPPSG	PLWILGDVFI	GRYYTVFDRD
410	420						
NNRVGFAEAA	RL						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
419	2	902.2897	-129.88	2	18.6	75.1	0	236-253	R.DPDAQPGGELMLGGTDSK.Y	Oxidation: 11
188	1	411.1317	1004.27	2	14.6	40.6	0	404-411	R.VGFAEAAR.L	

Protein 8: Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1

Accession: PSA1_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 98.3
MW [kDa]: 29.5
pI: 6.2
Sequence Coverage [%]: 9.5
No. of unique Peptides: 2

10	20	30	40	50	60	70	80
MFRNQYDNDV	TVWSPQGRIH	QIEYAMEAVK	QGSATVGLKS	KTHAVLVALK	RAQSELAAHQ	KKILHVDNHI	GISIAGLTAD
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
ARLLCNFMRQ	ECLDSRFVFD	RPLPVSRLVS	LIGSKTQIPT	QRYGRRPYGV	GLLIAGYDDM	GPHIFQTCPS	ANYFDCRAMS
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
IGARSQSART	YLERHMSEFM	ECNLNELVKH	GLRALRETLP	AEQDLTTKNV	SIGIVGKDLE	FTIYDDDDVS	PFLEGLEERP
250	**260**	**270**					
QRKAQPAQPA	DEPAEKADEP	MEH					

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
392	2	673.2742	-106.50	2	18.1	57.6	0	197-208	R.ETLPAEQDLTTK.N	
36	1	676.2348	-137.89	2	10.8	40.7	0	244-256	K.AQPAQPADEPAEK.A	

Protein 9: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MSDAAVDTSS	EITTKDLKEK	KEVVEEAENG	RDAPANGNAE	NEENGEQEAD	NEVDEEEEEG	GEEEEEEEEG	DGEEEDGDED
90	**100**	**110**	**120**				
EEAESATGKR	AAEDDEDDDV	DTKKQKTDED	D				

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 28 kDa CÉLULAS APOPTÓTICAS
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 13
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:46:36	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/13_nLC-Trampalones_B3_01_2180.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN =ANP32A PE=1 SV=1

Accession: AN32A_HUMAN **Score:** 176.1
Database: SwissProt(SwissProt_57.15.fasta) **MW [kDa]:** 28.6
Database Date: 2011-07-12 **pI:** 3.8
Sequence Coverage [%]: 11.6
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MEMGRRIHLE	LRNRTPSDVK	ELVLDNSRSN	EGKLEGLTDE	FEELEFLSTI	NVGLTSIANL	PKLNKLKKLE	LSDNRVSGGL
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
EVLAEKCPNL	THLNLSGNKI	KDLSTIEPLK	KLENLKSLDL	FNCEVTNLND	YRENVFKLLP	QLTYLDGYDR	DDKEAPDSDA
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
EGYVEGLDDE	EEDEDEEEYD	EDAQVVEDEE	DEDEEEEGEE	EDVSGEEEED	EEGYNDGEVD	DEEDEEELGE	EERGQKRKRE
250							
PEDEGEDDD							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
198	1	473.1796	-156.43	2	16.0	46.8	0	21-28	K.ELVLDNSR.S	
393	1	551.2783	-59.58	2	20.6	81.5	0	76-86	R.VSGGLEVLAEK.C	
17	1	575.0567	-229.57	2	10.1	47.8	0	240-249	R.EPEDEGEDDD.-	

Protein 2: Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens GN =ANP32B PE=1 SV=1

Accession: AN32B_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Oxidation

Score: 162.4
MW [kDa]: 28.8
pI: 3.8
Sequence Coverage [%]: 7.6
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MDMKRRIHLE	LRNRTPAAVR	ELVLDNCKSN	DGKIEGLTAE	FVNLEFLSLI	NVGLISVSNL	PKLPKLKKLE	LSENRIFGGL
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
DMLAEKLPNL	THLNLSGNKL	KDISTLEPLK	KLECLKSLDL	FNCEVTNLND	YRESVFKLLP	QLTYLDGYDR	EDQEAPDSDA
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
EVDGVDEEEE	DEEGEDEEDE	DDEDGEEEEF	DEEDDEDEDV	EGDEDDDEVS	EEEEEFGLDE	EDEDEDEDEE	EEEGGKGEKR
250	**260**						
KRETDDEGED	D						

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
51	4	494.6751	-201.37	2	12.8	55.2	1	68-75	K.KLELSENR.I	
106	1	430.6401	-202.33	2	14.2	39.1	0	69-75	K.LELSENR.I	
424	2	605.2195	-154.19	2	24.1	68.1	0	76-86	R.IFGGLDMLAEK.L	Oxidation: 7

Protein 3: 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1

Accession: 1433Z_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22
Modification(s): Acetyl, Oxidation

Score: 88.0
MW [kDa]: 27.7
pI: 4.6
Sequence Coverage [%]: 6.5
No. of unique Peptides: 2

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433Z_BOVIN	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1
1433Z_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein zeta/delta OS=Pongo abelii GN=YWHAZ PE=2 SV=1

10	20	30	40	50	60	70	80
MDKNELVQKA	KLAEQAERYD	DMAACMKSVT	EQGAELSNEE	RNLLSVAYKN	VVGARRSSWR	VVSSIEQKTE	GAEKKQQMAR
90	**100**	**110**	**120**	**130**	**140**	**150**	**160**
EYREKIETEL	RDICNDVLSL	LEKFLIPNAS	QAESKVFYLK	MKGDYYRYLA	EVAAGDDKKG	IVDQSQQAYQ	EAFEISKKEM
170	**180**	**190**	**200**	**210**	**220**	**230**	**240**
QPTHPIRLGL	ALNFSVFYYE	ILNSPEKACS	LAKTAFDEAI	AELDTLSEES	YKDSTLIMQL	LRDNLTLWTS	DTQGDEAEAG
250							
EGGEN							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
54	2	581.6956	-166.15	2	12.8	50.1	1	1-9	-.MDKNELVQK.A	Acetyl: 1; Oxidation: 1
10	1	408.6482	-161.34	2	9.6	39.3	0	12-18	K.LAEQAER.Y	

Protein 4: Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1

Accession: PSA6_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 86.7
MW [kDa]: 27.4
pI: 6.4
Sequence Coverage [%]: 5.3
No. of unique Peptides: 1

Alias proteins:

Accession	Name	Description
PSA6_BOVIN	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Bos taurus GN=PSMA6 PE=1 SV=1
PSA6_RAT	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Rattus norvegicus GN=Psma6 PE=1 SV=1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MSRGSSAGFD RHITIFSPEG RLYQVEYAFK AINQGGLTSV AVRGKDCAVI VTQKKVPDKL LDSSTVTHLF KITENIGCVM
        90        100        110        120        130        140        150        160
TGMTADSRSQ VQRARYEAAN WKYKYGYEIP VDMLCKRIAD ISQVYTQNAE MRPLGCCMIL IGIDEEQGPQ VYKCDPAGYY
       170        180        190        200        210        220        230        240
CGFKATAAGV KQTESTSFLE KKVKKKFDWT FEQTVETAIT CLSTVLSIDF KPSEIEVGVV TVENPKFRIL TEAEIDAHLV
       250
ALAERD
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
350	2	643.2701	-147.16	2	18.3	86.7	0	31-43	K.AINQGGLTSVAVR.G	

Protein 5: 14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2

Accession: 1433G_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)
Database Date: 2008-10-22

Score: 79.0
MW [kDa]: 28.3
pI: 4.7
Sequence Coverage [%]: 6.1
No. of unique Peptides: 1

Alias proteins:

Accession	Name	Description
1433G_MOUSE	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2
1433G_PONAB	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Pongo abelii GN=YWHAG PE=2 SV=3
1433G_RAT	SwissProt(SwissProt_56.1.fasta)	14-3-3 protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Ywhag PE=1 SV=2

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MVDREQLVQK ARLAEQAERY DDMAAAMKNV TELNEPLSNE ERNLLSVAYK NVVGARRSSW RVISSIEQKT SADGNEKKIE
        90        100        110        120        130        140        150        160
MVRAYREKIE KELEAVCQDV LSLLDNYLIK NCSETQYESK VFYLKMKGDY YRYLAEVATG EKRATVVESS EKAYSEAHEI
       170        180        190        200        210        220        230        240
SKEHMQPTHP IRLGLALNYS VFYYEIQNAP EQACHLAKTA FDDAIAELDT LNEDSYKDST LIMQLLRDNL TLWTSDQQDD
       250
DGGEGNN
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
62	1	452.1481	-249.47	2	13.0	39.7	0	62-69	R.VISSIEQK.T	

Protein 6: Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2

Accession: PTMA_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)
Database Date: 2012-06-20
Modification(s): Acetyl

Score: 77.2
MW [kDa]: 12.2
pI: 3.5
Sequence Coverage [%]: 12.6
No. of unique Peptides: 1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MSDAAVDTSS EITTKDLKEK KEVVEEAENG RDAPANGNAE NEENGEQEAD NEVDEEEEEG GEEEEEEEEG DGEEEDGDED
        90        100        110        120
EEAESATGKR AAEDDEDDDV DTKKQKTDED D
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
310	2	733.7842	-84.86	2	17.0	77.2	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1

COMPLEJO 25 kDa CÉLULAS APOPTÓTICAS
TRATAMIENTO TÉRMICO

Detailed Protein Report

Project Info

Name: MANUEL FREIRE **Date:** May 31, 2012
Note:

Sample Info & Protocols

Name: GEL 2 **Date:** May 31, 2012
Fraction: 14
Volume: **Concentration:**
Note: GEL1D: Comassie
- Digestión tríptica con Reducción-Alquilación, sin ZipTip.

Buffer: **Organism:** Homo Sapiens (Human)

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database
AMAZON_CID_Mascot_2012-07-19 10:45:51	/MANUEL FREIRE/29-05-2012/ GEL1D_B/17-07-12/nLC_Trampa de Iones/14_nLC-Trampalones_B4_01_2182.d	Mascot	SwissProt

Protein 1: Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3

Accession: SET_HUMAN **Score:** 214.3
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta) **MW [kDa]:** 33.5
Database Date: 2012-06-04 **pI:** 4.1
Sequence Coverage [%]: 11.7
No. of unique Peptides: 3

10	20	30	40	50	60	70	80
MAPKRQSPLP	PQKKKPRPPP	ALGPEETSAS	AGLPKKGEKE	QQEAIEHIDE	VQNEIDRLNE	QASEEILKVE	QKYNKLRQPF
90	100	110	120	130	140	150	160
FQKRSELIAK	IPNFWVTTFV	NHPQVSALLG	EEDEEALHYL	TRVEVTEFED	IKSGYRIDFY	FDENPYFENK	VLSKEFHLNE
170	180	190	200	210	220	230	240
SGDPSSKSTE	IKWKSGKDLT	KRSSQTQNKA	SRKRQHEEPE	SFFTWFTDHS	DAGADELGEV	IKDDIWPNPL	QYYLVPDMDD
250	260	270	280	290	300		
EEGEGEEDDD	DDEEEEGLED	IDEEGDEDEG	EEDEDDDEGE	EGEEDEGEDD			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
321	3	637.2463	-139.72	2	18.4	72.8	0	58-68	R.LNEQASEEILK.V	
377	8	604.6976	-179.06	2	21.6	72.5	0	123-132	R.VEVTEFEDIK.S	
135	3	723.7012	-175.76	2	15.2	68.9	0	155-167	K.EFHLNESGDPSSK.S	

Protein 2: Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens GN=RAB1A PE=1 SV=3

Accession: RAB1A_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_01.fasta)
Database Date: 2012-02-10
Modification(s): Oxidation

Score: 167.4
MW [kDa]: 22.7
pI: 5.9
Sequence Coverage [%]: 15.1
No. of unique Peptides: 3

Alias proteins:

Accession	Name	Description
RAB1A_RAT	SwissProt(SwissProt_2012_01.fasta)	Ras-related protein Rab-1A OS=Rattus norvegicus GN=Rab1A PE=1 SV=3
RAB1A_MOUSE	SwissProt(SwissProt_2012_01.fasta)	Ras-related protein Rab-1A OS=Mus musculus GN=Rab1A PE=1 SV=3
RAB1A_CANFA	SwissProt(SwissProt_2012_01.fasta)	Ras-related protein Rab-1A OS=Canis familiaris GN=RAB1A PE=1 SV=3

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MSSMNPEYDY LFKLLLIGDS GVGKSCLLLR FADDTYTESY ISTIGVDFKI RTIELDGKTI KLQIWDTAGQ ERFRTITSSY
        90        100        110        120        130        140        150        160
YRGAHGIIVV YDVTDQESFN NVKQWLQEID RYASENVNKL LVGNKCDLTT KKVVDYTTAK EFADSLGIPF LETSAKNATN
       170        180        190        200        210
VEQSFMTMAA EIKKRMGPGA TAGGAEKSNV KIQSTPVKQS GGGCC
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
373	1	658.7395	-142.39	2	21.4	55.4	0	62-72	K.LQIWDTAGQER.F	
15	1	462.6552	-150.21	2	9.8	41.2	0	112-119	R.YASENVNK.L	
5	2	531.6615	-162.40	2	9.3	70.8	0	176-187	R.MGPGATAGGAEK.S	Oxidation: 1

Protein 3: Ras-related protein Rab-1B OS=Homo sapiens GN=RAB1B PE=1 SV=1

Accession: RAB1B_HUMAN
Database: SwissProt(SwissProt_2012_05.fasta)
Database Date: 2012-06-04
Modification(s): Oxidation

Score: 140.1
MW [kDa]: 22.2
pI: 5.4
Sequence Coverage [%]: 16.9
No. of unique Peptides: 1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MNPEYDYLFK LLLIGDSGVG KSCLLLRFAD DTYTESYIST IGVDFKIRTI ELDGKTIKLQ IWDTAGQERF RTITSSYYRG
        90        100        110        120        130        140        150        160
AHGIIVVYDV TDQESYANVK QWLQEIDRYA SENVNKLLVG NKSDLTTKKV VDNTTAKEFA DSLGIPFLET SAKNATNVEQ
       170        180        190        200        210
AFMTMAAEIK KRMGPGAASG GERPNLKIDS TPVKPAGGGC C
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
50	1	486.4962	-166.12	3	12.1	43.5	0	173-187	R.MGPGAASGGERPNLK.I	Oxidation: 1

Protein 4: **Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2**

Accession:	PTMA_HUMAN	**Score:**	138.0
Database:	SwissProt(SwissProt_2012_06.fasta)	**MW [kDa]:**	12.2
Database Date:	2012-06-20	**pI:**	3.5
Modification(s):	Acetyl	**Sequence Coverage [%]:**	21.6
		No. of unique Peptides:	2

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
MSDAAVDTSS EITTKDLKEK KEVVEEAENG RDAPANGNAE NEENGEQEAD NEVDEEEEEG GEEEEEEEEG DGEEEDGDED
        90        100        110        120
EEAESATGKR AAEDDEDDDV DTKKQKTDED D
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
279	2	734.2414	538.16	2	17.0	90.0	0	2-15	M.SDAAVDTSSEITTK.D	Acetyl: 1
51	2	566.1731	-166.65	2	11.6	48.0	0	22-31	K.EVVEEAENGR.D	

Figura 4. Resultados de Espectrometría de MS/MS en trampa iónica de los complejos de la ProTα del fraccionado 1M del extracto de células Jurkat apoptóticas.
Los complejos de la ProTα fueron sometidos a tratamiento térmico previamente a la lisis con tripsina como se indica en Material y Métodos 3.10.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA