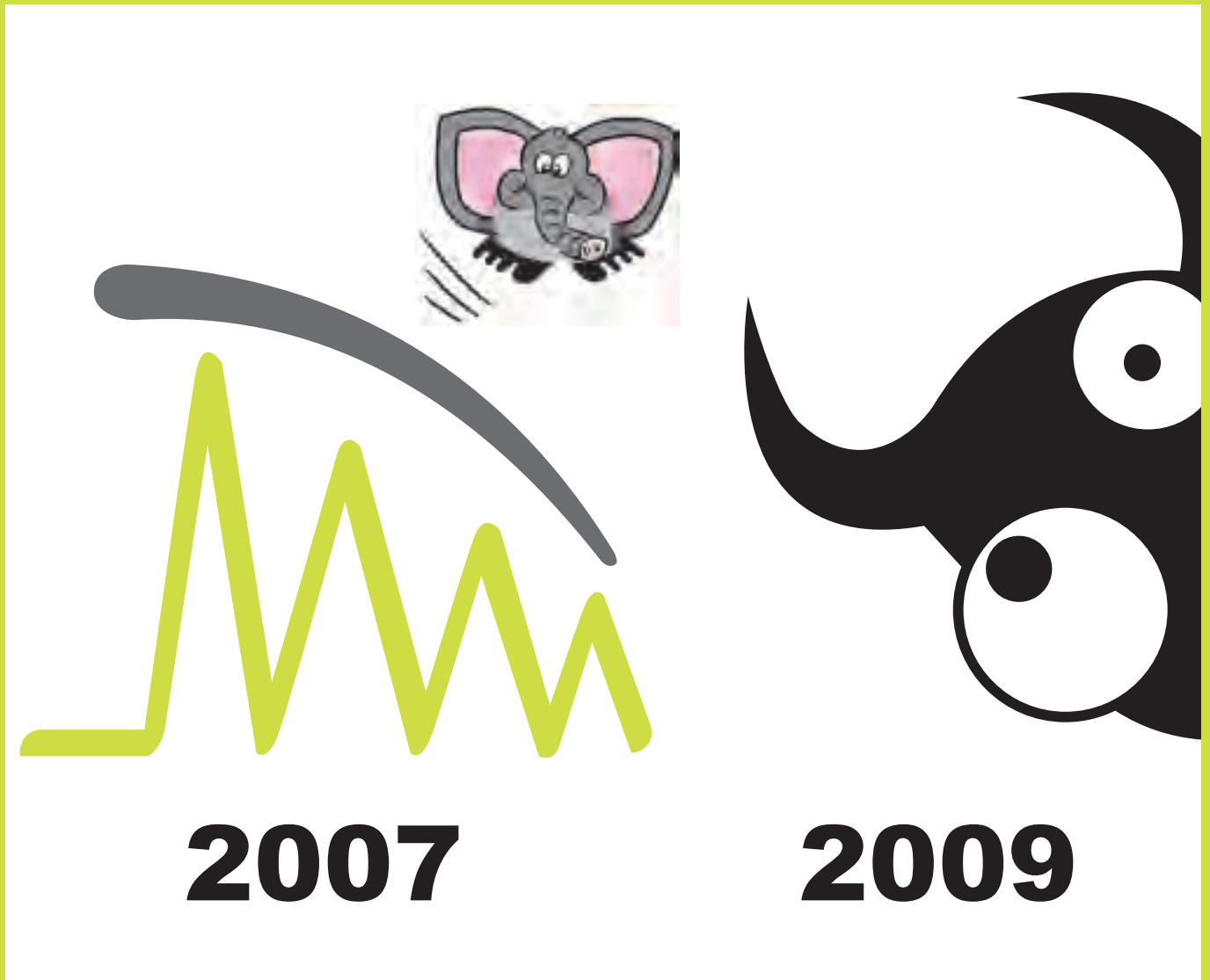


# PROTEÓMICA

Revista de la Sociedad Española de Proteómica

<http://www.cbm.uam.es/seprot/>

Número 0 • Julio 2007



**A Pamplona hemos de ir ...**



Servicio de Publicaciones  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



**SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PROTEÓMICA**





<http://www.cbm.uam.es/seprot>

**Sede social:** Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.  
 c/. Jaime Roig, 11. 46010 Valencia  
 Tel. 96 339 1778 • Fax 96 369 0800  
 C.I.F.: G-97465629.  
 N°. Registro Nacional de Asociaciones: 584180.

**Junta Directiva:**

Juan José Calvete.  
*Presidente*  
 Instituto de Biomedicina de Valencia  
 C.S.I.C.  
 jcalvete@ibv.csic.es

Concha Gil.  
*Vicepresidenta*  
 Departamento de Microbiología II.  
 Universidad Complutense de Madrid  
 conchagil@farm.ucm.es

Jesús V. Jorrín.  
*Secretario*  
 Universidad de Córdoba  
 bf1jonoj@uco.es

David Andreu.  
*Tesorero*  
 Universidad Pompeu Fabra. Barcelona  
 david.andreu@upf.edu

Juan Pablo Albar.  
*Vocal*  
 Centro Nacional de Biotecnología  
 U.A.M.-C.S.I.C. Madrid  
 jpalbar@cnb.uam.es

Fernando J. Corrales.  
*Vocal*  
 Universidad de Navarra  
 fcorrales@unav.es

Ángela Moreno.  
*Vocal*  
 Universidad de Córdoba-C.S.I.C.  
 ge1moloa@uco.es

Jesús M. Vázquez.  
*Vocal*  
 Centro de Biología Molecular "Severo  
 Ochoa". U.A.M.-C.S.I.C. Madrid  
 jvazquez@cbm.uam.es

# PROTEÓMICA

**Revista de la Sociedad Española  
 de Proteómica**

**Número 0, Julio 2007**

**COMITÉ EDITORIAL:**

Juan J. Calvete (IBV-CSIC, Valencia)  
 Fernando Corrales (CIMA, Pamplona)  
 Jesús V. Jorrín (UCO, Córdoba)  
 Ángela Moreno (CSIC-UCO, Córdoba)  
 Jesús Vázquez (CBMSO, Madrid)

**CORRESPONDENCIA EDITORIAL:**

Jesús V. Jorrín Novo. Dpto de Bioquímica y Biología  
 Molecular, Universidad de Córdoba. Campus de  
 Rabanales, Ed. Severo Ochoa (C6), 14071 Córdoba. E-  
 mail: jornadas-proteomica@uco.es.

**EDITA:**

Servicio de Publicaciones  
 UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**PROTEÓMICA.** Revista de la Sociedad Española de Proteómica

**Periodicidad:** Semestral (2 números por año: enero-febrero y julio-septiembre).

**Contenidos:** se publicarán artículos originales, comunicaciones breves, artículos de revisión, artículos de difusión, opiniones, notas, comentarios sobre cualquier aspecto relacionado con la proteómica. Se priorizarán artículos originales sobre aspectos metodológicos o de aplicación al estudio de sistemas biológicos. Incluye información sobre nuestra Sociedad, personas, grupos e instituciones que la componen.

**Idioma:** será el castellano, aunque se admiten contribuciones en otras lenguas, preferentemente inglés.

**Distribución:** España y Latinoamérica, aunque pretendemos que tenga un carácter internacional mediante la distribución a otros países. Se enviarán, sin coste alguno, a los socios de la SEProt, Unidades y Servicios, así como a instituciones y organizaciones públicas o privadas miembros de la sociedad o con actividad relevante en el campo de la proteómica.

**Publicación:** habrá una versión impresa, editada por el Servicio de Publicaciones de la UCO, y una versión "on-line" que aparecerá en la página web de la SEProt y de la Universidad de Córdoba.

**Editores:**

Jesús V. Jorrín (UCO, Córdoba)

Juan J. Calvete (IBV-CSIC, Valencia)

Fernando Corrales (CIMA, Pamplona)

Ángela Moreno (CSIC-UCO, Córdoba)

Jesús Vázquez (CBMSO, Madrid)

**Correspondencia editorial:**

Jesús V. Jorrín Novo. Dpto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Ed. Severo Ochoa (C6), 14071 Córdoba. E-mail: [jornadas-proteomica@uco.es](mailto:jornadas-proteomica@uco.es).

**Instrucciones a los autores:**

<http://www.cbm.uam.es/seprot/>

**Envío de los manuscritos:**

Mediante correo electrónico a: [jornadas-proteomica@uco.es](mailto:jornadas-proteomica@uco.es)

I.S.S.N.:

Depósito Legal: CO-1005-07

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.  
Campus de Rabanales. Ctra. Nacional IV, Km. 396. 14071 CÓRDOBA  
Tlfnos.: 957 21 21 65. Fax: 957 21 81 96  
<http://www.uco.es/publicaciones>  
Correo electrónico: [publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

Imprime: Argos Impresores S.L. Córdoba.

El Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, a los efectos previstos en el artículo 32.1, párrafo 2º, del vigente TRLPI, se opone expresamente a que cualquiera de las páginas de *Proteómica*, o partes de ellas, sean utilizadas para la realización de resúmenes de prensa. Cualquier acto de explotación de sus contenidos precisará de la oportuna autorización, que será concedida por CEDRO mediante licencia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Editorial: Proteómica, una nueva andadura editorial y un reto para la sociedad</b>	
<i>Jesús V. Jorrín Novo</i>	7
<b>Noticias de la SEProt</b>	
<i>Comité Editorial</i>	8
<b>Proteómica en la Universidad de Córdoba</b>	
<i>Enrique Aguilar</i>	10
<b>II Congreso de la SEProt / I Congreso de la EuPA</b>	
<i>Juan J. Calvete</i>	11
<b>Estrategias experimentales para el estudio del fosfoproteoma en células progenitoras de hígado de ratón (MLP-29)</b>	
<i>E. Santamaría, H. Hevia, J. Muñoz, J. Fernández-Irigoyen, V. Segura, J. Prieto, F.J. Corrales</i>	15
<b>Determinación del número de grupos sulfidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas</b>	
<i>J.J. Calvete</i>	21
<b>Quantitative proteomics of mitochondrial membrane proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O stable isotope labeling and linear ion trap mass spectrometry</b>	
<i>H. Serrano, I. Jorge, P. Martínez-Acedo, P.J. Navarro, D. Pérez-Hernández, E. Miró Casas, D.García-Dorado, J.Vázquez</i>	29
<b>ProteoRed: iniciativa española en proteómica. Su primer año de vida</b>	
<i>Juan Pablo Albar</i>	35
<b>Algunos avances, novedades y consideraciones en el proyecto HUPO</b>	
<i>Fernando J. Corrales</i>	41
<b>Quién es quién en el campo de la proteómica</b>	43
Grupo de estudio de interacciones parasito-hospedador en helmintiasis intestinales Universitat de Valencia	
<i>Antonio Marcilla</i>	44
Grupo de Proteómica. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea	
<i>Jesus M. Arizmendi, Asier Fullaondo, Kerman Aloria, Miren Josu Omaetxebarria, Mikel Azkargorta, Nerea Osinalde</i>	47
Grupo de Bioanálisis. Universidad de Barcelona	
<i>J. Barbosa</i>	49

Grupo de Biomarcadores Moleculares. Universidad de Vigo <i>Francisco Javier Rodríguez Berrocal</i>	52
Grupo de Proteómica. CIMA. FIMA y Universidad de Navarra. Pamplona <i>Fernando J. Corrales</i>	55
Grupo de Biología del Linfocito. Universidad de Santiago de Compostela <i>Montserrat Nogueira Álvarez</i>	58
Laboratorio de Señalización Intracelular. Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". Granada <i>Jaime Sancho López, Mercedes Zubiaur Marcos</i>	61
Grupo de Proteómica. Universidad CEU San Pablo. Madrid <i>Carmen Pérez García</i>	64
Laboratorio de Proteómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C. <i>Juanjo Calvete</i>	65
Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC, Madrid <i>Jesús Vázquez</i>	67
Bioquímica Vegetal y Agrícola-Proteómica Vegetal. Universidad de Córdoba <i>Jesús V. Jorrín Novo, Ana M. Maldonado Alconada</i>	70
<b>Tesis Doctorales</b>	73
<b>Instrucciones a los autores</b>	76
<b>Poetómica</b> <i>Jesús Vázquez</i>	78

## EDITORIAL

### “Proteómica”

#### *Una nueva andadura editorial y un reto para la sociedad*

La Reunión Fundacional de la SEProt tuvo lugar el 13 de abril de 2004 y el pasado mes de febrero celebramos en Valencia el II Congreso, en el que pudimos constatar que la sociedad, a pesar de su juventud, está totalmente consolidada. En tan sólo tres años son muchos los proyectos acometidos, tal y como queda reflejado en la página web y en los boletines publicados. Desde esta editorial quiero presentaros uno nuevo que, aunque ambicioso, es tremendamente ilusionante: la conversión de nuestro boletín en una revista científica en toda regla. Dicho proyecto ha estado siempre en la mente de los miembros de la Junta Directiva, y más concretamente de los que forman parte del Comité Editorial. Con este número cero que tenéis en vuestras manos, lo que parecía una utopía, es ya una realidad. Como lo difícil no es llegar, sino mantenerse y mejorar, desde aquí hago un llamamiento a todos y cada uno de los socios para que os impliquéis en el proyecto y contribuyáis con vuestros manuscritos.

Ante todo hay que dar las gracias a la Universidad de Córdoba, quien una vez más, nos ha dado todo su apoyo. El proyecto será financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Nuevas Tecnologías, con el Prof. E. Aguilar Benítez de Lugo a la cabeza, y el Servicio de Publicaciones.

La revista nace, como no podía ser de otra manera, con el nombre de “Proteómica”, siendo los miembros del Comité Editorial: Juanjo Calvete, Fernando Corrales, Jesús V. Jorrín, Ángela Moreno, y Jesús Vázquez. Se publicarán artículos originales, comunicaciones breves, artículos de revisión, artículos de difusión, opiniones, notas, comentarios sobre cualquier aspecto relacionado con la proteómica. Se priorizarán artículos originales sobre aspectos metodológicos o de aplicación al estudio de sistemas biológicos. Incluye información sobre nuestra Sociedad, personas, grupos e instituciones que la componen. Como garantía de calidad, todas las contribuciones serán revisadas por el comité editorial y los artículos originales, las comunicaciones breves y las revisiones serán evaluados científicamente por uno o dos revisores elegidos por el comité editorial. Habrá una versión impresa, que será recibida de forma gratuita por los socios de la SEProt y una versión “on-line”, de libre acceso, que aparecerá en la página web de la SEProt .

Podemos preguntarnos si es necesario una nueva revista y también podemos pensar que no lo es absoluto, pero démonos el beneficio de la duda y una oportunidad, ya que el tiempo dará y quitará razones. Empezamos planificando dos números por año, y esperamos que a medio plazo su número se vea incrementado. Estamos convencidos que la revista tendrá una enorme acogida, en especial entre los grupos latinoamericanos, aquellos españoles que hagan sus primeras incursiones en el área, y, sobre todo, entre los estudiantes de doctorado y postdoctorales jóvenes. También será un vehículo de enseñanza y transmisión de conocimientos de los grupos con experiencia y trayectoria contrastada.

Por último, y como la preocupación curricular la tenemos muy presente, la revista tendrá un ISSN, lo que facilitará su referenciado. Hasta donde lleguemos, en término de índice de impacto, dependerá de todos nosotros, y de nuestro trabajo diario en el laboratorio. El Comité Editorial, por su parte, no va a escatimar esfuerzos, dedicación, y trabajo.

*Jesús V. Jorrín Novo*

## Noticias de la SEProt

Son muchas las noticias surgidas en torno a nuestra Sociedad desde que, en junio del 2006, publicamos el último Boletín. De todas ellas os hemos tenido puntualmente informados a través de numerosos correos electrónicos o de la página web (<http://www.cbm.uam.es/seprot>), responsabilidades que han recaído, respectivamente, en Ángela Moreno y Jesús Vázquez. Desde aquí nuestro agradecimiento al trabajo, nunca bien pagado, de Salvador Martínez-Bartolomé (web máster) y Anabel Pozo (secretaría técnica).

Sin lugar a dudas el evento más importante ha sido la celebración del II Congreso de la SEProt, al que se le dedica un capítulo en este número. Fue todo un éxito que será rematado con la publicación de parte de los trabajos en el *Journal of Mass Spectrometry*. Hay que felicitar a nuestro Presidente y responsable del Congreso, así como al resto del Comité Organizador y a la Secretaría Técnica, con Amparo Martínez a la cabeza. Todos debemos congratularnos de tener una Sociedad que, a pesar de su juventud, está totalmente consolidada, con un número importante de socios, 160, y que, además, posee un enorme dinamismo. Esto no es óbice para que nos planteemos nuevos e importantes retos, como es el de la nueva revista *Proteómica*. Como nuestro Presidente manifestó durante la Asamblea General, es hora de ir pensando en la renovación de la Junta Directiva. Las fuerzas no son ilimitadas y el apoltronamiento en los cargos no es una práctica ni sana ni aconsejable. Es por ello que hacemos un llamamiento a nuestros socios, en especial a los más jóvenes, para que se aventuren en la presentación de nuevas candidaturas y programas que den un mayor impulso a la Sociedad.

Llama la atención el elevado número de cursos de proteómica programados durante el último año, en los que la Sociedad junto con otras entidades, como EuPA y ProteoRed, ha tenido un protagonismo importante. Como detrás de cada proyecto e iniciativa hay un nombre, en este apartado hay que mencionar el de Concha Gil, vocal de nuestra Sociedad y responsable del "Education Committee" de la EuPA.

ProteoRed, a la que le dedicamos un capítulo en este número, y cuyo responsable es Juan Pablo Albar, está jugando un papel muy importante en el desarrollo de la proteómica en nuestro país.

La puesta en marcha de una política de becas ha sido uno de nuestros principales caballos de batalla, una iniciativa liderada por nuestro tesorero, David Andreu. Una parte importante de nuestro limitado presupuesto se ha dedicado a este apartado, a pesar de que el número de solicitudes ha sido mínimo. Está, en este momento, abierta una convocatoria cuyo plazo acaba próximamente, y para la que ya ha habido varias peticiones.

La apuesta por la proteómica como disciplina o aproximación metodológica es, hoy en día una garantía de éxito, tanto desde el punto de vista científico como laboral. Hay que resaltar que el número de ofertas de trabajo, modalidad de beca o contrato, es mucho mayor que el de la demanda, y se nota la falta de gente joven formada en este campo. A través de nuestra página web hemos dado cumplida cuenta de todas y cada una de estas ofertas, procedentes tanto del sector público como del privado.

La SEProt tiene presencia en otras sociedades y organizaciones, como la EuPA de la que forma parte, ProteoRed, COSCE y SEBBM. En esta última, nuestro vocal, Fernando Corrales, es uno de los responsables del grupo de trabajo de Genómica y Proteómica, y, como tal encargado de organizar la correspondiente reunión del grupo dentro del próximo Congreso de la SEBBM, que tendrá lugar este septiembre en Málaga (<http://sebbm.bq.ub.es/XXX-Congreso/>).

La EuPA, Asociación de Sociedades de Proteómica Europeas, ha recibido el espaldarazo definitivo durante el pasado congreso de Valencia. Hay que destacar el papel que nuestra sociedad ha jugado en su creación y la presencia de miembros españoles en los diferentes comités: Juanjo Calvete (Funding), Concha Gil y Juan Pablo Albar (Education), Fernando Corrales (HUPO), y Jesús Jorrín (Conferences and Communication). En este último comité se ha trabajado en la puesta en marcha de una nueva revista, el "Journal of Proteomics", de la que, y a modo de primicia, avanzamos que Juanjo Calvete ha sido propuesto como "Editor in Chief". Esperamos que la presencia de grupos españoles en los artículos que aparezcan sea también significativa.

Por último, hacer mención de otras novedades, que aún a pesar de su menor relevancia, no dejan de

ser importantes. Una de ellas es la puesta en marcha de una iniciativa en la que está trabajando Jesús Vázquez, y que es la organización, en los años entre congresos, de un “workshop”, dirigido especialmente a, y organizado por, jóvenes científicos.

Recientemente se ha aprobado la siguiente acción COST “Plant Proteomics in Europe”, de la que habéis recibido puntal información. Esta iniciativa abre paso a otras futuras como son la de la creación

de grupos de trabajo enfocados a diferentes aspectos metodológicos o de aplicación.

La Sociedad, como queda reflejado en nuestra página web, se ha sumado a diferentes iniciativas, tales como la declaración de científicos y técnicos sobre la aplicación de la biotecnología en la mejora de plantas.

*Comité Editorial*

## La proteómica: una apuesta fundamental de la Universidad de Córdoba

*Enrique Aguilar Benítez de Lugo*

Vicerrector de Política Científica, Universidad de Córdoba

El funcionamiento de los seres vivos pluricelulares exige la comunicación y coordinación fina de la actividad de numerosos tipos de células. Y ello se lleva a cabo a través de numerosas señales que viajan entre las células. Los neurotransmisores recorren escasa distancia en la hendidura sináptica, mientras que otros compuestos, como las hormonas, necesitan ser transportadas por el torrente sanguíneo para llegar a sus órganos diana. El descubrimiento de la estructura del ADN por J.D. Watson y F.Crick (Nature, 1953) abrió una etapa revolucionaria en la biología permitiendo el conocimiento de los mecanismos que regulan la síntesis de proteínas, la división y diferenciación celular, las bases moleculares de múltiples patologías y un largo etc. El desarrollo de la genómica alcanza su culmen con la descripción del genoma humano y de otras especies animales y vegetales.

La genómica, sin embargo, nos ha mostrado también algunas de sus limitaciones. Los estudios de identificación y regulación de genes no aclaran que sucede "a posteriori" con las proteínas, siendo el estudio de sus modificaciones post-transcripcionales un campo nuevo con infinitas posibilidades. Nos permitirá conocer como los diferentes elementos intracelulares se relacionan entre sí y como unas células interactúan con el resto.

El estudio del proteoma, probablemente mucho más complejo que el del genoma, requiere científicos inquietos, costosos equipos en permanente re-

novación y técnicos con elevada formación. La participación española en el desarrollo de la genómica ha sido, de forma general, escasa y no acorde con un país que es la octava economía del planeta. Durante mucho tiempo la clase política ha minusvalorado la importancia de las universidades y la investigación; más aún, las propias universidades no hemos sabido colocar la investigación en el puesto de mando de nuestro quehacer diario.

Somos conscientes que las Universidades no pueden ser excelentes y relevantes en todas las áreas del conocimiento, pero si deben seleccionar con criterios válidos y perspectivas de futuro sus opciones. La proteómica se ha convertido en una de nuestras apuestas estratégicas de mayor relevancia, gracias al tesón de algunos de nuestros investigadores más responsables que han impulsando la creación de la Plataforma Andaluza de Genómica, Proteómica y Biocomputación, la participación en ProteoRed y la creación de un Servicio Central con grandes prestaciones. Igualmente hemos sido sede de diversas jornadas y cursos sobre proteómica y de la constitución de la Sociedad Española de Proteómica.

El nacimiento de *Proteómica* como la revista de la Sociedad debe ser saludada con alegría porque, sin duda, servirá de estímulo y acicate para todos. Desde ahora afirmamos, como M. Benedetti en su famoso poema, que podéis contar con la Universidad de Córdoba para esta ilusionante aventura. Gracias a todos por el esfuerzo y el entusiasmo desplegados.

## Congreso conjunto SEProt-EuPA: balance y reflexiones. O viceversa.

Juan J. Calvete

Durante los pasados días 10-14 de Febrero celebramos en Valencia, en el Auditorio *Santiago Grisolia* del Museo de las Ciencias *Príncipe Felipe*, el segundo congreso de nuestra Sociedad conjuntamente con el primer congreso de la European Proteomics Association. Esta circunstancia exigió una serie de modificaciones respecto al formato de organización de un evento a escala nacional, siendo quizás el más notable la adopción del inglés como idioma oficial del congreso. Además, no quisimos renunciar al enfoque iberoamericano que, con anterioridad a ser elegida la SEProt para albergar el congreso inaugural de la EuPA, habíamos decidido darle al congreso de Valencia. Hubo, que hacer malabarismos para elaborar un programa equilibrado a tres bandas y con un océano por medio. De ahí la coletilla de la denominación del congreso, "*joining both sides of the Atlantic ocean*". Establecer relaciones constantes, estables y fluidas con países latinoamericanos, tanto con aquellos en los que la proteómica es ya un soporte común en la investigación biológica, como con los países en los que la tecnología proteómica está en su infancia, debe ser un objetivo irrenunciable de la SEProt. Consecuentemente, el segundo congreso de nuestra Sociedad contó con una nutrida representación de conferenciantes de países latinoamericanos, incluyendo Argentina (1), Brasil (2), Cuba (2) y Uruguay (3). Frente a los 5 conferenciantes españoles invitados y los 12 ponentes de países miembros de la EuPA, nuestros colegas del otro lado del charco sumaron una cuota de participación del 30%. Echamos de menos la participación de colegas mexicanos, pero -a pesar de haber sido invitado- el Presidente de la Sociedad Mexicana de Proteómica declinó asistir. No obstante, las excelentes conferencias que impartieron los investigadores latinoamericanos evidenciaron que el desarrollo de la Proteómica, particularmente como herramienta de investigación biológica, constituye una decidida apuesta al sur de Rio Grande. A este respecto, y

desde un punto de vista cronológico, es interesante reseñar la reciente inauguración del Instituto Pasteur de Montevideo (IPM), fundado en parte por reinversión de la deuda externa uruguaya condonada por Francia, así como con aportaciones de la Fundación Pasteur y de la Comunidad Europea. El IPM (<http://www.pasteur.edu.uy>) abrió sus puertas en la capital administrativa del MERCOSUR en Diciembre del 2006 dotado de la más moderna tecnología en Biología Molecular y Estructural, Biofísica de Proteínas y Proteómica, y abanderando un ambicioso programa de desarrollo nacional y regional. En el otro extremo, hay que destacar el nivel de la proteómica que el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba, lleva aplicando de forma pionera en Latinoamérica a pesar de la precariedad de condiciones como consecuencia del absurdo bloqueo económico y tecnológico impuesto por el vecino al norte de Rio Grande. Representa, pues, un motivo de justicia científica, y de enorme satisfacción personal, que el premio SEProt a "*una contribución relevante en el campo de la Proteómica*", patrocinado por Promega y dotado con placa conmemorativa y 500 €, haya sido otorgado al Dr. Gabriel Padrón (CIGB) "por su contribución al desarrollo de la espectrometría de masas y su aplicación a la revolución proteómica" (Material suplementario, figura 1).

Otro motivo de orgullo para los organizadores del congreso y extensible, sin duda, a las asociaciones paraguas del evento, SEProt y EuPA, fue la impartición de la conferencia inaugural por John Fenn (Premio Nobel de Química del 2002 por su contribución al desarrollo de la técnica de ionización de macromoléculas por electrospray<sup>1</sup>). John Fenn es

<sup>1</sup>Fenn, J. (2003). *Electrospray Wings for Molecular Elephants*, Angew. Chem. Intl. Ed. 42: 3871-3894.

el primer Socio de Honor de la SEProt y, en reconocimiento por ello, al finalizar su conferencia recibió la placa conmemorativa cuyo texto reproduce la foto adjunta.

A sus casi 90 años, John nos mantuvo en vilo deambulando al borde del escenario, al tiempo que nos deleitaba con una visión personal y perspicaz de los acontecimientos más significativos que motivaron a un quimicofísico experto en combustión y propulsión de gases a adentrarse en el campo del análisis macromolecular. La Investigación Científica se basa en la observación, y Fenn, precisamente por su trayectoria profesional, estaba preparado para darse cuenta de que la expansión adiabática de un gas produce una caída súbita de la temperatura y, por tanto, una solvatación de las moléculas ionizadas que impide la interpretación de los correspondientes espectros de masas. La aplicación de una corriente de nitrógeno seco perpendicular a la salida del electrospray - entre otros ajustes instrumentales- fue el toque mágico que permitió obtener espectros limpios e interpretables de moléculas de complejidad creciente. Cito esta anécdota (quizás demasiado simplificada) como reflexión sobre la manera de investigar que está imponiéndose en muchos, demasiados, laboratorios de Proteómica. Me refiero a los proyectos de identificación masiva de proteínas que generan una enorme cantidad de datos, cuya validez debe ser refrendada por fríos e impersonales parámetros estadísticos que minimicen la tasa de error de las identificaciones automatizadas. Se pierde, en gran medida, la observación del detalle biológico, del cómo, del cuándo, del cuánto, del dónde. Quizás sea el inevitable reto de aplicar todo el potencial tecnológico lo que motive la realización de muchos proyectos de proteómica "*high-throughput*". Pero también es incuestionable que los avances tecnológicos de la Fórmula I proteómica son relevantes para la práctica cotidiana en la medida en que posibiliten una investigación cada vez más detallada de los sistemas biológicos. No trato de estigmatizar las estrategias proteómicas HT, sino más bien de establecer una unión indisoluble entre tecnología proteómica y la proteómica como herramienta en biología. Ambos aspectos de nuestra disciplina son vagones del mismo tren, la Biología de Sistemas. Tecnología y biología gozan, como los quarks, de libertad asintótica: no pueden existir aisladas, pues cuanto más se separan mayor es la fuerza atractiva entre ellas. En este sentido,

nuestra Sociedad, puede y debe desempeñar un rol pivotante entre los países fuertemente tecnológicos del ámbito EuPA y aquellos del otro lado del Atlántico en los que la tecnología proteómica está necesariamente supeditada a la Biología, como quedó patente en las conferencias de Rosario Durán, Silvia Moreno, Carlos Carmona, Carlos Robello, Gilberto Domont....

El lema del congreso "Proteómica y Patología" y el hecho de que el programa del evento exigiera dar más cancha a ponentes extranjeros que a los socios de la SEProt, han sido criticados en más de una ocasión. Aunque no les falta razón a los detractores del formato del congreso, debo decir que el término "patología" abarca cualquier alteración de la fisiología de los seres vivos, así como el estudio de los agentes causantes de la aberración fisiológica, sean unos y otros animales, vegetales, bacterias o virus. Además, para reconocer lo patológico hace falta definir lo fisiológico. Así expuesto, se hace difícil argumentar que algún grupo de investigación pudiera quedar excluido por el lema del congreso. Prueba de la amplitud temática del simposio fueron las sesiones dedicadas a herramientas y tecnología proteómicas, así como a proteómica no convencional. En este ámbito, quedó una vez más demostrado el poder de la imaginación y la capacidad detectivesca del maestro Righetti. Por su parte, en una vívida conferencia, Alfredo Sanz-Medel nos expuso los principios y potencialidades de la ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), una técnica de análisis inorgánico que es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud, y que puede llegar a desempeñar un papel relevante en fosfoproteómica. La glicoproteómica, una gran ausente del panorama proteómico español, también estuvo representada por dos de sus mejores valedores, el entrañable Peter Roepstorff y la meticulosa Jasna Peter-Katalinic.

Algunas estadísticas y datos para el archivo. El número total de participantes, incluyendo delegados inscritos, ponentes invitados, miembros de los diversos comités de EuPA y HUPO, profesores del Curso pre-congreso, expositores, etc. fue de alrededor de 360, provenientes de 22 países. Se presentaron 145 pósters y 37 comunicaciones orales cortas, elegidas entre los 40 resúmenes que

explícitamente lo solicitaron. Respecto a la participación de los socios de nuestra Sociedad, la organización científica del congreso reservó el

máximo número de comunicaciones orales cortas (40%) para los socios, especialmente los más jóvenes, de la SEProt.



*John Fenn recibe la placa conmemorativa como Socio de Honor de la SEProt de manos del Presidente de la Sociedad, Juanjo Calvete.*



Además del citado Premio SEProt-Promega, hubo otros. El Director Comercial de Bruker Daltonics para el sur de Europa, Alberto Sánchez Martínez, hizo entrega de los Premios SEProt-Bruker. En esta segunda edición se premiaron 2 artículos científicos publicados en el bienio 2005-2006 y dos presentaciones de grupos españoles al congreso en forma de panel. En la

modalidad de publicación científica resultaron galardonados los trabajos *Decoding serological response to Candida cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses*, Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C, *Mol Cell Proteomics* 5(1):79-96, y *Functional screening of serine*

*protease inhibitors in the medical leech Hirudo medicinalis monitored by intensity fading MALDI-TOF MS*, Yanes O, Villanueva J, Querol E, Avilés FX, Mol Cell Proteomics 4(10):1602-1613. En la modalidad de panel, el jurado seleccionó los pósters 45 (*Identification of new substrates of the metalloprotease ADAMTS1 using isotope coded protein labeling (ICPL)*, Canals F y cols.) y 8-9 (compartido) (*Large-scale quantitative proteomics of human vascular endothelial cells (HUVEC) stimulated by the angiogenic factor VEGF by stable <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O labelling*, Jorge, I y cols.; *A fully automated and integrated bioinformatic toolset for large-scale peptide identification and quantitation by stable <sup>18</sup>O isotope labelling*, Navarro, P. et al.). Por su parte, Applied Biosystems patrocinó los Premios SEProt-ABI para pósters presentados por grupos no españoles, que recayeron en: Pavel Rehulka (República Checa) por *Quantitation of intact proteins fractionated by ProteomeLab PF 2D system using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)* (p22) y Asif Abdul Rahaman (Alemania) por *Endothelial protein expression in response to laminar shear stress, role of the NOS-3 gene <sup>-786</sup>T>C polymorphism* (p33). Al igual que los anteriores, los Premios SEProt-ABI estuvieron dotados con 500 €y un diploma, que entregó Susanna Baqué, Representante de Ventas de ABI para España y Portugal, durante la cena del congreso. Quisiera expresar la ¡enhorabuena a todos los galardonados! y el agradecimiento de la SEProt a los patrocinadores de estos reconocimientos.

En el plano económico, los gastos totales ascendieron a 131.405,44 € mientras que los ingresos sumaron 129.316,62 €, aunque queda pendiente de resolución las ayudas que concede la Generalitat Valenciana para la organización de eventos científicos. Este balance casi milimétrico es obra de la excelente gestión de la Secretaria Técnica del Congreso, Amparo Martínez de la

Cátedra Santiago Grisolíá, Fundación Ciudad de las Artes y las Ciencias. ¡Gracias Amparo! Y, evidentemente, nuestro agradecimiento va también dirigido a las instituciones subvencionadoras del congreso (CSIC, MEC, Genoma España, Generalitat Valenciana -eso espero...), así como a los socios corporativos de la SEProt y demás empresas patrocinadoras del congreso (Abgent, ACS Publications, Agilent Technologies, Alfa Wassermann, AMS Biotechnology, Análisis Vénicos, Applied Biosystems, Beckman Coulter, Becton Dickinson, Bruker, Celta Ingenieros, GE Healthcare, Genoptics, Intavis, Nanoxis, Promega, Proxeon Bioinformatics, Sigma-Aldrich, ThermoFisher Scientific, Waters). Con la presentación de sus productos, los expositores nos mostraron hacia donde se dirige el futuro tecnológico de la Proteómica.

El congreso SEProt-EuPA fue clausurado con una conferencia en la que Emilio Gelpí, pionero de la espectrometría de masas en España, hizo un extenso recorrido histórico por las etapas más relevantes del desarrollo de esta técnica durante los últimos 40 años que posibilitaron cosas tan asombrosas como que John Fenn pusiera alas electronebulizadoras a elefantes moleculares!

Finalmente, se anunció que el tercer congreso de la Sociedad Española de Proteómica se celebrará en Pamplona bajo la batuta de Fernando Corrales. Retrospectivamente, resulta difícil acordarse de la tensión acumulada durante la organización del congreso de Valencia; todas las imágenes que consigo recuperar de mi caja negra evocan momentos entrañables (las caras de sorpresa de los galardonados al oír su nombre, un Premio *Nobel* firmando ejemplares del libro de resúmenes al personal del catering...). Así que ¡ánimo Fernando! que en el 2009 la SEProt al completo se pondrá el pañuelo rojo para pasear nuestra Proteómica por Pamplona.

## Estrategias experimentales para el estudio del fosfoproteoma en células progenitoras de hígado de ratón (MLP-29)

Enrique Santamaría, Henar Hevia, Javier Muñoz, Joaquín Fernández-Irigoyen, Victor Segura, Jesús Prieto, Fernando J. Corrales<sup>1</sup>

Unidad de Proteómica, Genómica y Bioinformática. Área de Hepatología y Terapia Génica. Universidad de Navarra. Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA).

### Resumen:

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional que juega un papel central en la regulación de procesos celulares esenciales y, por ello, la caracterización del fosfoproteoma y sus alteraciones es clave para establecer los mecanismos moleculares que permiten elaborar respuestas adaptativas o que condicionan la progresión de patologías. En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos que permiten abordar el estudio de fosfoproteínas basados en electroforesis, cromatografía y espectrometría de masas. Definir la estrategia experimental eligiendo la combinación de las técnicas más adecuada es esencial para asegurar la consecución de los objetivos que se plantean. En este trabajo hemos evaluado la capacidad y eficacia de varias metodologías para describir el fosfoproteoma de células hepáticas (MLP-29) en estado basal. En primer lugar, se analizó la especificidad de la tinción para fosfoproteínas Pro Q-diamond tras resolver los extractos proteicos en geles 2D. Paralelamente, se obtuvo una fracción enriquecida en fosfoproteínas que se resolvió tanto en geles SDS-PAGE en condiciones reductoras como en geles 2D para abordar su identificación mediante espectrometría de masas MALDI TOF o nanoLC-ESI-MS/MS. Adicionalmente, una fracción de la mezcla de fosfoproteínas se analizó mediante nanoLC-ESI-MS/MS sin fraccionamiento previo. Los resultados que hemos obtenido indican que las estrategias seguidas son complementarias ya que cada una aporta la identificación de un grupo de proteínas diferente y que por lo tanto es relevante en la definición del fosfoproteoma de las células MLP-29. Hasta ahora hemos identificado 136 proteínas fosforiladas, que han sido agrupadas en función del proceso biológico en el que están implicadas con el programa *Ingenuity*.

### Palabras clave:

Pro-Q Diamond, cromatografía de afinidad, fosfoproteína, espectrometría de masas

### Introducción

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes en la naturaleza ya que está implicada en la regulación de procesos celulares como metabolismo, homeostasis, transcripción, degradación de proteínas, señalización

celular, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Graves *et al.*, 1999). La secuenciación del genoma ha revelado que un 2-3% de los genes eucariotas probablemente codifiquen para proteínas kinasas, encargadas de transferir el grupo fosfato a su sustrato (Manning *et al.*, 2002) junto con más de 100 fosfatasa, encargadas de catalizar la reacción inversa (Venter *et al.*, 2001). Además, se ha estimado que el 30% de proteínas expresadas por una célula eucariota se fosforilan en algún momento de su ciclo (Hubbard *et al.*, 1993). La complejidad del proteoma hace que sea necesario disponer de métodos altamente selectivos para el enriquecimiento de proteínas fosforiladas que nos permitan identificar los residuos que incorporan el grupo fosfato y así definir el papel biológico de esta modificación.

<sup>1</sup> Correspondencia: Fernando J. Corrales. División de Hepatología y Terapia Génica. CIMA. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. 31008 Pamplona, España. Tel.: 34-948-194700; fax: 34-948-194718. Dirección e-mail: fjcorrales@unav.es.

Existen principalmente tres razones que hacen que el análisis del fosfoproteoma no pueda realizarse de una manera sencilla y directa (Larsen *et al.*, 2005). En primer lugar, la presencia de fosfatasa pueden defosforilar los residuos fosforilados por lo que es imprescindible inhibir su actividad durante la preparación y manipulación de la muestra. En segundo lugar, la estequiometría de la fosforilación es relativamente baja, ya que desde un punto de vista funcional, la modificación de una fracción de las moléculas es suficiente para orquestar una respuesta biológica (Larsen *et al.*, 2005). Además, muchas de las moléculas de señalización que son susceptibles de ser fosforiladas presentan unos niveles de expresión sumamente bajos, lo que sugiere la necesidad de un enriquecimiento previo al análisis. En tercer lugar, las proteínas pueden presentar varios estados de fosforilación implicando diferentes residuos y este perfil puede variar en función de la situación celular (Larsen *et al.*, 2005). En los últimos años se han realizado importantes avances metodológicos, y sin embargo, no existe una técnica que aplicada de forma individual nos permita conocer y caracterizar el fosfoproteoma de un sistema celular de una manera global y en un único experimento. Por eso, es necesario conocer la capacidad y eficacia de cada una de las posibles aproximaciones tecnológicas para combinarlas en una estrategia experimental que se ajuste a las necesidades del estudio de interés. En este trabajo queremos aportar nuestra experiencia en la aplicación de algunos de los métodos más utilizados en la actualidad al estudio del fosfoproteoma de células hepáticas MLP-29, considerando que los resultados obtenidos pueden ser de utilidad a otros investigadores a la hora de elaborar sus propias estrategias de análisis.

## Material y Métodos

**Reactivos.** Se utilizaron los siguientes reactivos: Tinción de Pro-Q Diamond (Molecular Probes), colorante Sypro Ruby (Bio-rad), kit de enriquecimiento de fosfoproteínas (Qiagen), tripsina (Promega). Los reactivos de electroforesis utilizados fueron de Bio-Rad.

**Cultivo celular.** Se utilizaron células progenitoras de hígado de ratón MLP-29. Las células se crecieron en medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal y 1% de glutamina-penicilina-estreptomomicina.

**Enriquecimiento en fosfoproteínas.** Para obtener lisados celulares enriquecidos en proteínas fosforiladas, se utilizó un kit de enriquecimiento en fosfoproteínas (Qiagen Ref. 37101) siguiendo las instrucciones del fabricante.

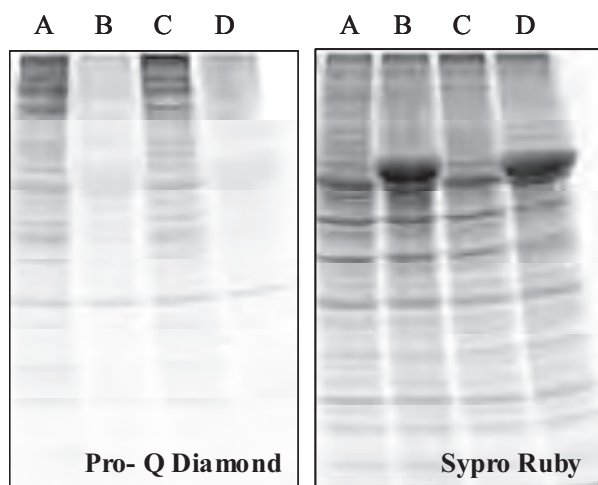
**Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional.** Tras lavar las células tres veces con PBS, se recogieron y la suspensión se centrifugó a 500 x g durante 10 min. El precipitado celular se homogenizó en tampón de lisis que contiene urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (v/v), DTT 1% (v/v) y anfólitos 3-10 0.5% (Bio-Rad). Los lisados se centrifugaron durante 1 hora a 75.000 rpm y 15°C. La electroforesis bidimensional se realizó como se ha descrito previamente (Santamaria *et al.*, 2003, 2006). Tanto la tinción con Pro-Q Diamond como la tinción Sypro Ruby se realizaron en las condiciones recomendadas por el fabricante.

**Identificación de las fosfoproteínas mediante espectrometría de masas.** La digestión de las bandas y el procesamiento del hidrolizado peptídico se realizaron como se ha descrito previamente (Fernandez-Irigoyen *et al.*, 2005). Los espectrómetros de masas utilizados han sido un MALDI-TOF GL-REF y un Q-TOF *micro* (Waters). Los datos de espectrometría de masas se procesaron con el software *Masslynx 4.0* (Waters). Para la identificación de las proteínas, se utilizaron los motores de búsqueda *Proteinlynx Global Server 2.0* (Waters) y *Phenyx* (Geneva Bioinformatics). Las bases de datos empleadas para las búsquedas fueron SwissProt (*Swiss-Prot Release 46.3*) y Ensembl (*Ensembl Mouse Release 29.33*). Sólo se tuvieron en cuenta las identificaciones coincidentes con ambos motores de búsqueda y con un valor de p asociado de 0.001 (el valor de p-value indica la probabilidad de encontrar al azar un péptido en una base de datos aleatorizada). Además, se calculó la tasa de error, definida como el porcentaje de asignaciones falsas esperadas considerando el umbral del valor de p anteriormente mencionado (información suplementaria). Finalmente, la clasificación e interpretación funcional de las proteínas identificadas se realizó con el programa *Ingenuity*.

## Resultados y discusión

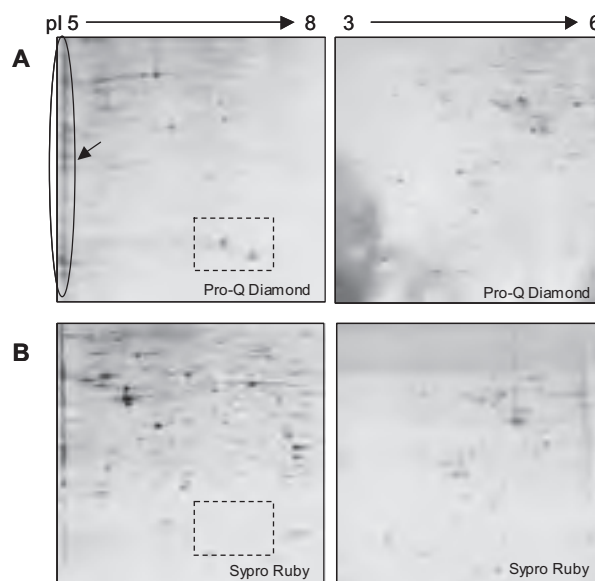
La forma más sencilla de analizar el fosfoproteoma de un sistema biológico es utilizar reactivos que detecten las fosfoproteínas en geles mono- o bidimensionales de manera selectiva. Desde 1970 se han descrito varios

métodos para teñir las fosfoproteínas (Cutting *et al.*, 1973, Debruyne *et al.*, 1983) pero hoy en día no se utilizan de manera rutinaria en los laboratorios por su baja especificidad y sensibilidad. En nuestro caso, hemos utilizado el método de tinción Pro-Q Diamond desarrollado recientemente (Schulenberg *et al.*, 2003). Este fluoróforo es capaz de discriminar entre proteínas fosforiladas y no-fosforiladas y es reversible. Además, es compatible con otros métodos de tinción fluorescente como Sypro Ruby. Esto hace posible la tinción secuencial con los 2 fluorocromos, facilitando la visualización de las fosfoproteínas y el perfil global de proteínas en un solo gel. Para valorar la especificidad de la tinción Pro-Q Diamond analizamos un mismo extracto antes y después de tratar con fosfatasa alcalina (figura. 1). De acuerdo con otros autores (Makrantonis *et al.*, 2005) la defosforilación disminuye el marcaje con Pro-Q Diamond, lo que sugiere que este fluoróforo se une preferencialmente a proteínas fosforiladas. Sin embargo, apreciamos un marcaje residual que puede resultar del rendimiento parcial de la enzima utilizada o de la interacción del fluoróforo con algunas proteínas no fosforiladas, quizás proteínas ácidas, como ocurre con otros métodos de selección de fosfoproteínas o fosfopéptidos.



**Figura 1. Especificidad de la tinción Pro-Q Diamond.** Los extractos de proteínas (20µg/pocillo) correspondientes a células MLP-29 se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras que inicialmente se tiñó con Pro-Q Diamond (izquierda) y posteriormente con la tinción total Sypro Ruby (derecha). Las calles A y C corresponden a los extractos celulares y las calles B y D corresponden a los mismos extractos tratados con fosfatasa alcalina. La pérdida en el marcaje de Pro-Q Diamond en las muestras tratadas con fosfatasa alcalina indica que el fluoróforo se une preferencialmente por las proteínas fosforiladas. La banda prominente que se observa al tratar con fosfatasa alcalina se debe a esa misma enzima.

Para investigar esta última posibilidad, se resolvieron los extractos proteicos mediante electroforesis bidimensional (figura. 2). Cuando se utilizó un rango de pH 5-8 observamos un perfil claramente diferente al teñir con Sypro Ruby o Pro-Q Diamond, sugiriendo la presencia de proteínas abundantes no fosforiladas y proteínas minoritarias fosforiladas. Sin embargo, ambas tinciones mostraron resultados similares cuando el isoelectroenfoco se realizó en un rango de pH 3-6, lo que apoyaría la hipótesis de que Pro-Q Diamond interacciona de forma no específica con proteínas ácidas.



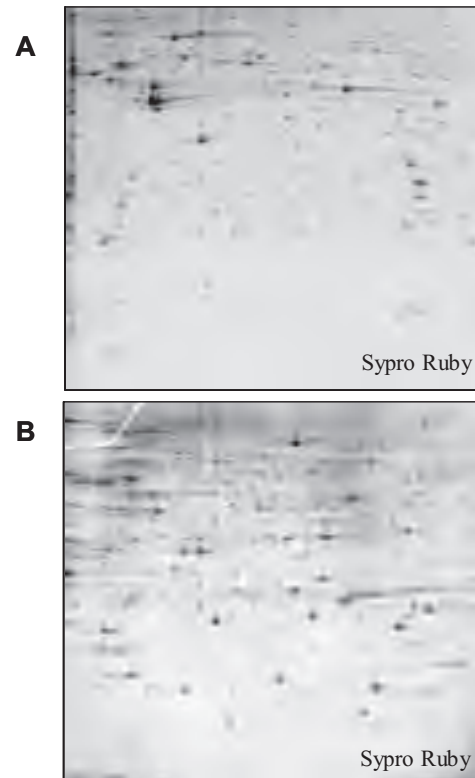
**Figura 2. Separación de extractos celulares de MLP-29 mediante electroforesis bidimensional utilizando diferente rango de pH.** Se ha utilizado 125µg de proteína A) Geles teñidos con Pro-Q Diamond. B) Geles teñidos con Sypro Ruby. La flecha indica proteínas mal resueltas en el rango de pH 5-8 (proteínas ácidas). Los cuadrados discontinuos muestran la presencia de dos proteínas altamente fosforiladas cuya abundancia es prácticamente indetectable con Sypro Ruby.

Dada la complejidad del proteoma y teniendo en cuenta la baja estequiometría de la fosforilación, utilizamos un método de enriquecimiento de fosfoproteínas basado en una cromatografía de afinidad (Metodiev *et al.*, 2004, Puente *et al.*, 2004, 2006). Partimos de 2.5mg de proteína total procedente de células MLP-29 con una concentración de 0.1mg/ml y tras realizar varios lavados, obtuvimos en el eluido 100 µg de proteína aproximadamente. Las proteínas así obtenidas mostraron una mayor tinción con Pro-Q Diamond que el extracto sin fraccionar (figura. 3) de lo que se deduce que la fracción purificada está enriquecida en proteínas fosforiladas o ácidas. Aunque la comparación de los

perfiles proteicos antes y después de la purificación indica una tinción similar de algunas proteínas, la pauta de proteínas es, en general, diferente, sugiriendo que el procedimiento ha permitido una purificación al menos parcialmente selectiva de fosfoproteínas (figura. 4). Tras la digestión con tripsina y el análisis de los péptidos trípticos mediante MALDI TOF MS identificamos 28 proteínas que corresponden a subunidades del proteosoma, proteínas del citoesqueleto y chaperonas moleculares, cuya fosforilación ha sido descrita en la literatura (información suplementaria). Si bien esta estrategia permitiría realizar estudios comparativos sencillos en base al análisis diferencial de los geles bidimensionales, las limitaciones inherentes a la 2DE junto con el bajo rendimiento de la cromatografía de afinidad utilizada para enriquecer la mezcla en fosfoproteínas nos condujeron a explorar otros métodos de análisis. La separación de la mezcla enriquecida mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y el posterior análisis nanoLC-ESI-MS/MS de los hidrolizados trípticos de las 4 secciones en las que se dividió el gel permitió identificar 65 proteínas potencialmente fosforiladas (información suplementaria). Este método no permite, sin utilizar un método de marcaje diferencial, realizar un análisis comparativo, pero incrementa el número de identificaciones debido, al menos en parte, a la falta de restricciones que impone la 2DE. En paralelo, analizamos un digerido tríptico de la mezcla enriquecida en fosfoproteínas mediante nanoLC-ESI-MS/MS sin separación electroforética previa. Los péptidos se separaron en una columna de fase reversa C18 conectada a un Q-TOF y se eluyeron mediante un gradiente lineal de acetonitrilo del 4 al 40% en 90 o 240 minutos. Conseguimos identificar 28 y 72 proteínas, respectivamente, cuya fosforilación ha sido previamente descrita en otros estudios (información suplementaria). En ambos casos observamos que la complejidad de la muestra excedía la capacidad analítica del instrumento lo que impone la necesidad de utilizar un fraccionamiento previo que evite la coelución de más de 3 iones diferentes en cada ciclo. En todos los análisis realizados mediante nanoLC-ESI-MS/MS, la tasa de error no superó el 4% (véase información suplementaria). La información obtenida a partir de los 4 métodos de análisis utilizados es complementaria. En total se consiguieron 193 identificaciones que correspondían a 136 proteínas únicas (información suplementaria). Entre ellas, el 8.08% (11 proteínas) se detectaron en tres de los análisis realizados, el 24.26% (33 proteínas) en dos y por último, el 67.64% (92 proteínas) en uno. El escaso solapamiento entre los grupos de proteínas identificadas indica que los métodos utilizados son complementarios y que, por lo tanto, el empleo de uno u otro sólo resolverá parcialmente el problema.



**Figura 3. Análisis mediante electroforesis bidimensional y posterior tinción con Pro-Q Diamond, de las proteínas fosforiladas enriquecidas mediante cromatografía de afinidad.** Para el enriquecimiento en fosfoproteínas se utilizó el kit de Qiagen (ref. 37101). La calle 1 corresponde a 10  $\mu$ g de extracto total de células MLP-29 mientras que la calle 2 corresponde a 10  $\mu$ g de proteína fosforilada purificada.

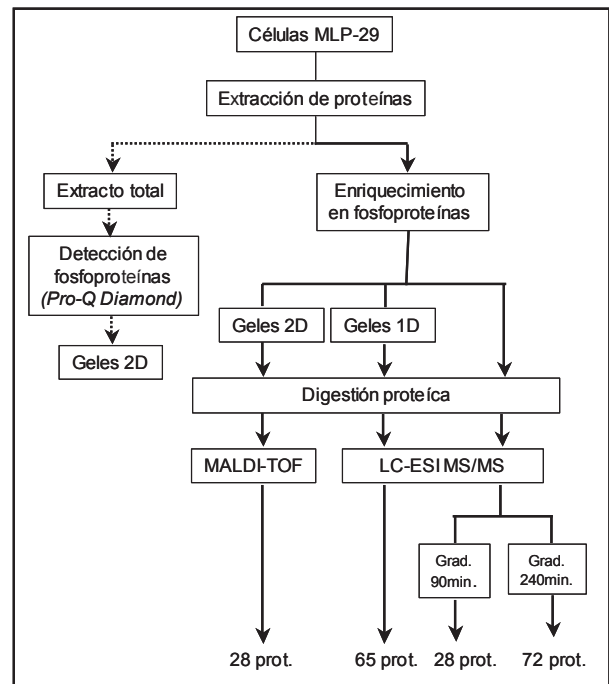


**Figura 4. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las muestras antes y después del proceso de purificación de fosfoproteínas mediante cromatografía de afinidad.** A) 125  $\mu$ g de extracto total de células MLP-29. B) 125  $\mu$ g de proteína fosforilada purificada de células MLP-29.

Uno de los aspectos más interesantes de la proteómica es integrar los resultados obtenidos para obtener conclusiones funcionales. En nuestro caso hemos analizado las fosfoproteínas identificadas con el programa *Ingenuity*, aplicación que permite obtener una visión general de los mecanismos y vías de señalización que relacionan un conjunto de proteínas entre sí. Las redes de interacción obtenidas convergían en la señalización de citoquinas como TGF- $\beta$ 1 y TNF y en factores de transcripción como p53 y MYC (información suplementaria). Por otra parte, las funciones biológicas en las que participan las proteínas identificadas están relacionadas con cáncer, ciclo celular, muerte celular, enfermedades hepáticas y crecimiento y proliferación celular.

En este trabajo se han descrito varias aproximaciones para el estudio del fosfoproteoma en un sistema celular (Esquema 1) que, como se deduce de los resultados, son complementarias entre sí. La elección de una u otra dependerá de los objetivos del estudio, por ejemplo, los análisis comparativos requerirán estrategias basadas en el análisis de geles bidimensionales o en separaciones cromatográficas de las especies peptídicas previo marcaje diferencial (SILAC, ICAT, ITRAQ) (Olsen *et al.*, 2006). En cualquier caso, de nuestro análisis del fosfoproteoma de células MLP-29, a nivel de proteína, se puede deducir que es necesario, en primer lugar, enriquecer la muestra utilizando métodos selectivos para fosfoproteínas. Sin embargo, la complejidad de la muestra resultante requiere la utilización de métodos adicionales de fraccionamiento que permitan aumentar el rendimiento de los análisis. En la

actualidad estamos aplicando métodos de selección de fosfopéptidos utilizando IMAC (Nuhse *et al.*, 2003, Gruhler *et al.*, 2005) y TiO<sub>2</sub> (Larsen *et al.*, 2005) a partir de los extractos ya enriquecidos en fosfoproteínas.



**Esquema 1. Principales técnicas utilizadas en el estudio del fosfoproteoma de la línea celular MLP-29.** Se han utilizado el colorante *Pro-Q Diamond* para teñir y visualizar las fosfoproteínas en geles 1D ó 2D y la cromatografía de afinidad para purificar las proteínas fosforiladas. Para la identificación de las fosfoproteínas se ha utilizado espectrometría de masas MALDI-TOF o nanoLC-ESI-MS/MS.

**Bibliografía**

Cutting J A. and Roth T F. 1973. Staining of phosphoproteins on acrylamide gel electropherograms. *Analytical Biochemistry* 54: 386-394.

Debruyne I. 1983. Staining of alkali-labile phosphoproteins and alkaline phosphatases on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 133: 110-115.

Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Sesma L, Muñoz, J. et al. 2005. Oxidation of specific methionine and tryptophan residues of apolipoprotein A-I in hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 5: 4964-4972.

Graves J D. and Krebs E G. 1999. Protein phosphoryla-

tion and signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* 82: 111-121.

Gruhler A, Olsen J V, Mohammed S, Mortensen P. et al. 2005. Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Molecular & Cellular Proteomics* 4: 310-327.

Hubbard M J. and Cohen P. 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in Biochemical Sciences* 18: 172-177.

Larsen M R, Thingholm T E, Jensen O N, Roepstorff P. et al. 2005. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures

- using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* 4: 873-886.
- Manning G, Whyte D B, Martinez R, Hunter T. et al. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- Makrantonis V, Antroubis R, Botting C H. and Coote P J. 2005. Rapid enrichment and analysis of yeast phosphoproteins using affinity chromatography, 2D-PAGE and peptide mass fingerprinting. *Yeast* 22: 401-414.
- Metodiev M V., Timanova A. and Stone D E. 2004. Differential phosphoproteome profiling by affinity capture and tandem matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 4: 1433-1438.
- Nuhse T S, Stensballe A, Jensen O N. and Peck S C. 2003. Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 2: 1234-1243.
- Olsen J V, Blagoev B, Gnad F, Macek B. et al. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648.
- Puente L G, Borris D J, Carriere J F, Kelly J F. et al. 2006. Identification of candidate regulators of embryonic stem cell differentiation by comparative phosphoprotein affinity profiling. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 57-67.
- Puente L G, Carriere J F, Kelly J F. and Megeney L A. 2004. Comparative analysis of phosphoprotein-enriched myocyte proteomes reveals widespread alterations during differentiation. *FEBS Letters* 574: 138-144.
- Puente L G, Voisin S, Lee R E. and Megeney L A. 2006. Reconstructing the regulatory kinase pathways of myogenesis from phosphopeptide data. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 2244-2251.
- Santamaria E, Avila M A, Latasa M U, Rubio A. et al. 2003. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3065-3070.
- Santamaria E, Muñoz J, Fernández-Irigoyen J, Sesma, L. et al. 2006. Molecular profiling of hepatocellular carcinoma in mice with a chronic deficiency of hepatic s-adenosylmethionine: relevance in human liver diseases. *Journal of Proteome Research* 5: 944-953.
- Schulenberg B, Aggeler R, Beechem J M, Capaldi R A. et al. 2003. Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *Journal of Biological Chemistry* 278: 27251-27255.
- Venter J C, Adams M D, Myers E W. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 91: 1304-1351.

## Determinación del número de grupos sulfidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas

Juan José Calvete

Laboratorio de Proteómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Jaime Roig 11, 46010 Valencia. Tel.: 96 339 1778; Fax: 96 369 0800; E-mail: jcalvete@ibv.csic.es

### Resumen:

En este artículo se exponen, discuten e ilustran principios generales y sencillos protocolos - basados en espectrometría de masas- para la cuantificación del número de cisteínas y enlaces disulfuro de proteínas monoméricas, homo- y heterodiméricas, y multiméricas.

### Palabras clave:

Cuantificación de cisteína, determinación de grupos sulfidrilo, enlace disulfuro, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas ESI.

### Introducción

Además de su relevancia funcional en proteínas que actúan mediante mecanismos de oxido-reducción (redox), de todos los aminoácidos proteicos, la cisteína es el único utilizado ampliamente durante la evolución para estabilizar la estructura espacial (terciaria o cuaternaria) de proteínas que, por su tamaño y/o secuencia, carecen de un núcleo hidrofóbico estable o de los elementos de estructura secundaria regular (hélice alfa, hojas beta) formadores de enlaces de hidrógeno (Cheek *et al.*, 2006). Por el contrario, los enlaces disulfuro son raros en proteínas termoestables. Los enlaces disulfuro intra- e intermoleculares se forman por oxidación de cisteínas espacialmente cercanas ( $\leq 5\text{\AA}$  entre los S $\gamma$ ) en las estructuras terciaria y cuaternaria, respectivamente.

Se acepta generalmente que el efecto estabilizador de un enlace disulfuro es debido a que su formación reduce los grados de libertad conformacional del estado desplegado, reduciendo así la entropía del estado desplegado (Anfisen y Scheraga, 1975; Thornton, 1981). El aporte energético de un enlace disulfuro a la conformación nativa es de 2.5-3.5 kcal/mol. El gran impacto estructural a bajo coste energético destaca la importancia de la ingeniería de enlaces disulfuro como un mecanismo evolutivo de la diversificación estructural ( y por tanto, funcional) de proteínas

que, como es el caso de muchas toxinas, están sometidas a evolución Darwiniana acelerada (Olivera, 2006; Calvete *et al.*, 2003a; Ménez, 2002). En el caso de serpientes y lagartos ponzoñosos, los venenos se originaron en etapas tempranas de su evolución por reclutamiento, y posterior transformación estructural y funcional, de proteínas ordinarias pertenecientes a un número reducido de familias proteicas (Fry *et al.*, 2006).

Una característica de estas proteínas es su alto contenido en cisteínas, las cuales usualmente se encuentran formando enlaces disulfuro. El número de cisteínas totales, reducidas (grupos sulfidrilo) y oxidadas (formando enlaces disulfuro), es en gran medida específico de cada familia de toxinas (Tabla 1) y tiene, por tanto, un valor taxonómico relevante. En efecto, un serio inconveniente a la hora de caracterizar mediante técnicas proteómicas el conjunto de proteínas presentes en los venenos de serpientes es la total carencia de bases de datos de genomas de reptiles. Una traba añadida es que, a pesar de que la base de datos pública UniProtKB/TrEMBL (v.35.3, 17 de Abril del 2007) (<http://us.expasy.org/sprot/>) contiene 932 secuencias de proteínas de serpientes ("viper") que representan a todas las familias de proteínas encontradas en los venenos, las estructuras primarias de toxinas de una misma familia varían enormemente debido a su diversificación estructural por evolución acelerada, impidiendo -por lo general- una identificación basada en el análisis de la huella

peptídica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se necesita, pues, recurrir a la secuenciación *de novo* mediante MS/MS y a la búsqueda posterior de similitud de secuencia (utilizando BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sin embargo, el orden de estos dos pasos puede invertirse, para nuestro provecho, si conocemos *a priori* en qué familia proteica englobar a una determinada toxina. Así, en aquellos casos en los que la calidad de los espectros de fragmentación no es suficiente para la secuenciación *de novo* completa de los iones peptídicos, este conocimiento nos permite generar un alineamiento múltiple de todas las proteínas homólogas conocidas que nos sirva entonces bien de guía para extender las secuencias parciales deducidas, bien para realizar un análisis tipo MS-BLAST (Shevchenko *et al.*, 2001) (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>) frente a una base de datos propia, específica y reducida.

## Contando cisteínas y enlaces disulfuro

### A. Proteínas monoméricas

La espectrometría de masas es, sin duda, la técnica idónea, por su sencillez y precisión, para determinar el contenido en cisteínas libres (grupos sulfidriilo, SH) y enlaces disulfuro (cistinas, S-S) de una proteína. Para ello, la muestra (típicamente una fracción cromatográfica eluída de una columna C18 de fase reversa) se divide en tres alícuotas y éstas se secan mediante centrifugación a vacío (SpeedVac) o liofilización. Las muestras se disuelven en 10 µl de tampón 50 mM HEPES, pH 9.0, conteniendo 5M cloruro de guanidina y 1 mM EDTA, y las proteínas se desnaturalizan a 85 °C durante 15 min. Una de las muestras (A) no será sometida a tratamiento posterior y se utilizará para medir la masa molecular de la proteína nativa ( $M_{NAT}$ ). A la muestra B se le añade un reactivo alquilante (4-vinilpiridina o yodoacetamida) hasta una concentración final de 10 mM y la mezcla se deja a temperatura ambiente (~25 °C) y en la oscuridad durante 1 hora. Esta muestra se utilizará para determinar la presencia de grupos sulfidriilo reactivos. Por último, la muestra C se reduce con 10 mM 1,4-ditioeritriol (DTE) durante 15 min. a 80 °C, y los grupos sulfidrilos se bloquean con un reactivo alquilante (4-vinilpiridina o

yodoacetamida)<sup>1</sup> (concentración final de 25 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad (Henschen, 1986). A continuación, las proteínas de las muestras A, B y C se purifican utilizando pipetas Zip-Tip C18 (Millipore) previamente activadas con una mezcla de acetonitrilo (ACN) al 70% y TFA al 0.1% y equilibradas en TFA al 0.1%. Tras la adsorción a la matriz C18 (5-6 ciclos de pipeteo), las Zip-Tip se lavan 5-6 veces con 0.1% TFA. Las proteínas libres de reactivos se eluyen con 3-5 µl de 70% ACN/0.1% TFA y sus masa moleculares se determinan mediante nanoESI-MS o MALDI-TOF MS utilizando ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) saturado en 70% ACN/0.1% TFA como matriz.

El número de grupos sulfidriilo reactivos ( $N_{SH}$ ) se calcula mediante la ecuación I:

$$N_{SH} = (M_{ALK} - M_{NAT})/M_R \quad (\text{ecuación I}),$$

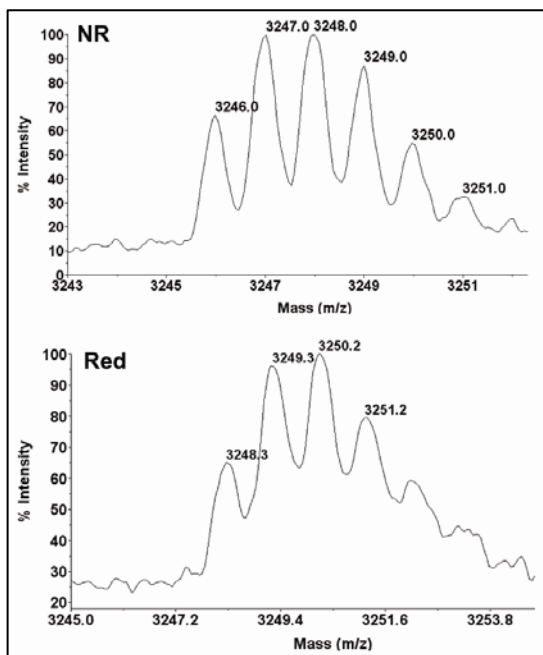
donde  $M_{ALK}$  representa la masa molecular de la proteína desnaturalizada, pero no reducida, incubada en presencia del reactivo alquilante (muestra B);  $M_{NAT}$  es la masa de la proteína nativa (muestra A), y  $M_R$  es el incremento de masa debido a la alquilación de un grupo sulfidriilo (105.3 Da para S-piridiletilación, si se utilizó 4-vinilpiridina como agente alquilante, y 57.1 Da por carbamidometilación por yodoacetamida).

El número total de cisteínas se determina entonces mediante la ecuación II:

$$N_{Cys} = [(M_{CM} - M_{ALK})/(M_R + 1)] + N_{SH} \quad (\text{ecuación II}),$$

<sup>1</sup> La yodoacetamida y la 4-vinilpiridina, en las concentraciones normalmente empleadas (exceso molar de 5 respecto a la concentración de residuos de cisteína o del reactivo reductor, lo que en la práctica equivale a concentraciones finales de 50-250 mM) son reactivos específicos para grupos sulfidriilo. La solubilidad de 4-VP en tampones acuosos es muy baja y debe emplearse para alquilar proteínas en presencia de cloruro de guanidino 5-6 M. Hay que tener también en cuenta que la piridiletilación aumenta la hidrofobicidad de las proteínas, por lo que, para las medidas espectrométricas, éstas deben ser manejadas en disoluciones conteniendo solventes orgánicos (ej. 70% acetonitrilo/0.1% TFA, que se emplea para desorber proteínas del material C18 de las pipetas Zip-Tip).

en la que  $M_{CM}$  es la masa de la proteína totalmente reducida y alquilada, y  $(M_R + 1)$  es el incremento de masa debido a la alquilación de un residuo de cisteína que previamente a la reducción formaba parte de un enlace disulfuro (106.3 Da o 58.1 Da, dependiendo de que se utilizara, respectivamente, 4-vinilpiridina o yodoacetamida como agente alquilante). En el caso de péptidos, cuya masa molecular puede ser determinada con precisión isotópica (ej. utilizando el reflectrón de un instrumento de tiempo de vuelo o mediante ionización por electrospray), nominalmente bastaría con reducir la muestra para determinar su contenido en S-S (Fig.1). Sin embargo, dado que la reducción de un enlace disulfuro produce un pequeño incremento de masa (+2 Da/S-S), cuando la exactitud de la medida es  $\leq 2$  Da, se hace necesario amplificar esa diferencia mediante la introducción de un grupo alquilante.



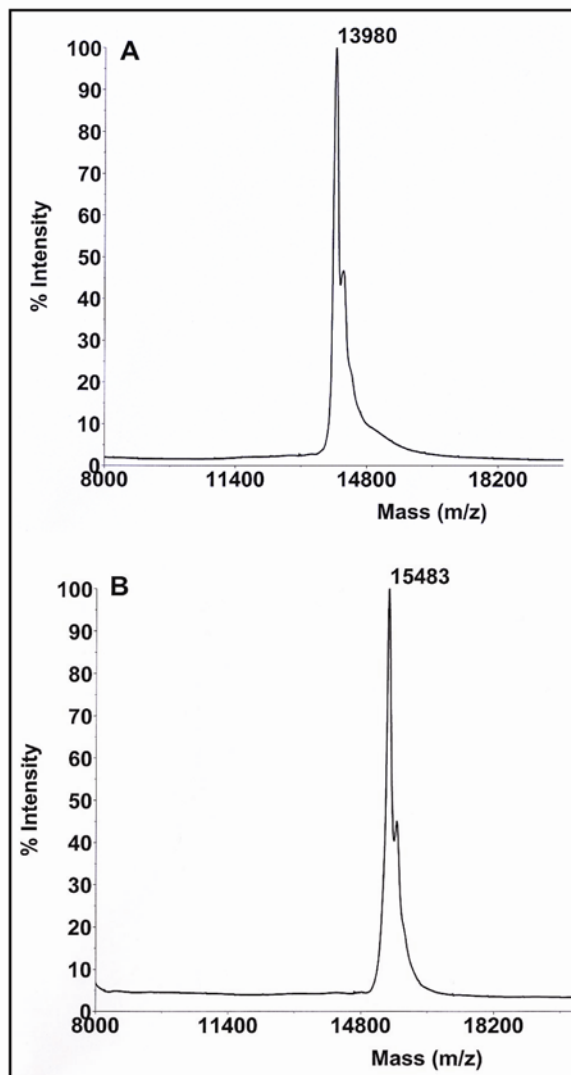
**Figura 1.** Espectros de masas obtenidos en un instrumento de tiempo de vuelo Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo reflector, mostrando la distribución isotópica de los iones. La diferencia de 2 Da entre las masas del péptido nativo (NR) y del reducido (Red) indica la existencia de un S-S intramolecular.

Finalmente, el número de enlaces disulfuro ( $N_{S-S}$ ) puede calcularse mediante la ecuación III:

$$N_{S-S} = (N_{cys} - N_{SH}) / 2 \text{ (ecuación III).}$$

Las unidades de masa en las ecuaciones I-III están expresadas en Daltons (1 Da o unidad de masa atómica unificada (1 u) = 1/12 de la masa del  $C_{12} = 1/N_A$  (gramos), siendo  $N_A$  el número de avogadro ( $1.66053886 \pm 0.00000028$ )  $\times 10^{-24}$  g).

Para ilustrar lo anteriormente expuesto examinemos la Figura 2.



**Figura 2.** Determinación del número de grupos sulfhidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando un espectrómetro Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems). Panel A, espectro de masas de la proteína nativa que resultó ser idéntico al de la proteína desnaturalizada, pero no reducida, y tratada con 4-vinilpiridina. Panel B, Masa molecular de la proteína completamente reducida y S-piridiletilada.

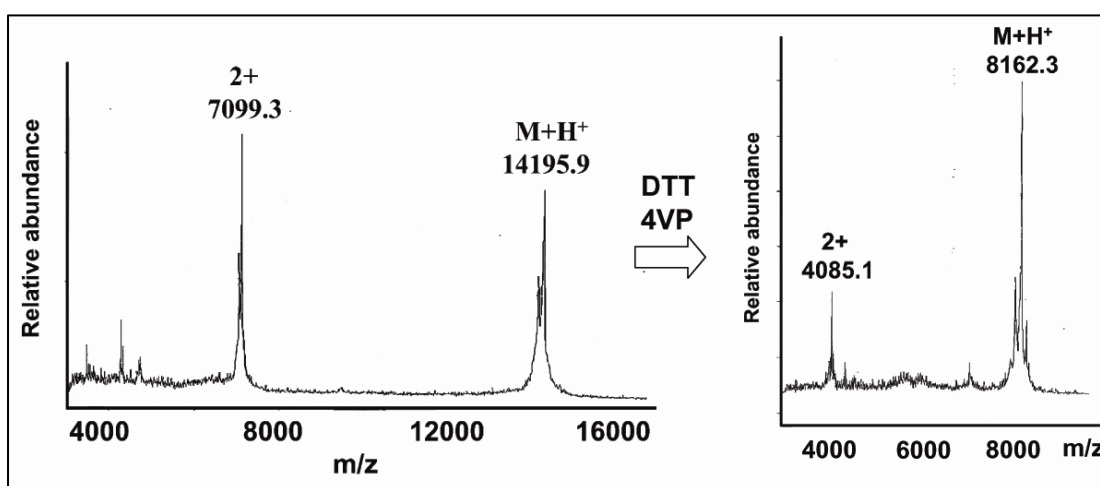
El panel A muestra el espectro de una proteína del veneno de *Sistrurus mliarius barboursi* purificada por HPLC de fase reversa (Juárez *et al.*, 2004). La masa de la proteína no

varió en presencia de 4-vinilpiridina ( $M_{NAT} = M_{ALK} = 13980$  Da), deduciéndose que la proteína no contiene cisteínas libres. Por otra parte, la masa molecular de la proteína reducida y S-piridiletalada ( $M_{CM}$ ) sufrió un incremento de  $15483 - 13980 = 1503$  Da,

indicando que la proteína posee un total de  $1503/106.3 = 14.1$  (14) residuos de cisteína, los cuales, en la proteína nativa, forman 7 enlaces disulfuro. Muy posiblemente se trata de una  $PLA_2$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de toxinas de venenos de serpientes de las familias Viperidae (víboras) y Crotalidae (crótalos, serpientes de cascabel) en función de su contenido de cisteínas y enlaces disulfuro. <sup>a</sup>, enlaces disulfuro intermoleculares; <sup>b</sup>, enlaces disulfuro intramoleculares;  $PLA_2$ , fosfolipasa tipo  $A_2$ ; CRISP, proteína rica en cisteínas; SVMP,  $Zn^{2+}$ -metaloproteasa de tipo PI de veneno de serpiente; DC, fragmento C-terminal de SVMP de tipo PIII (SVMP-PIII) compuesto por un dominio tipo disintegrina y un dominio rico en cisteínas; svVEGF, factor de crecimiento endotelial de veneno de serpiente; LAO, L-aminoácido oxidasa.

Rango de masa molecular (kDa)	Nº total de:		Familia proteica
	-SH	S-S	
1.6-2	-	1	Péptido natriurético
4-5	-	3	Miotoxina
	-	4	Disintegrin corta
6-8	-	3	Inhibidor tipo Kunitz
	-	5	Subunidad de disintegrina dimérica
	-	6	Disintegrina mediana
10-12	1	-	Ohanina
13-15	-	2	Cistatina
	-	(2 <sup>a</sup> + 4 <sup>b</sup> )	Disintegrina dimérica
	-	7	$PLA_2$
23-33	-	8	CRISP
	1	4	PI-SVMP
	-	6	Proteasa de serina
	-	(1 <sup>a</sup> + 3 <sup>b</sup> )	C-lectin $\alpha\beta$
	-	(1 <sup>a</sup> + 4 <sup>b</sup> )	svVEGF
	-	13	Fragment DC
46-58	-	3	LAO
	1	18	PIII-SVMP

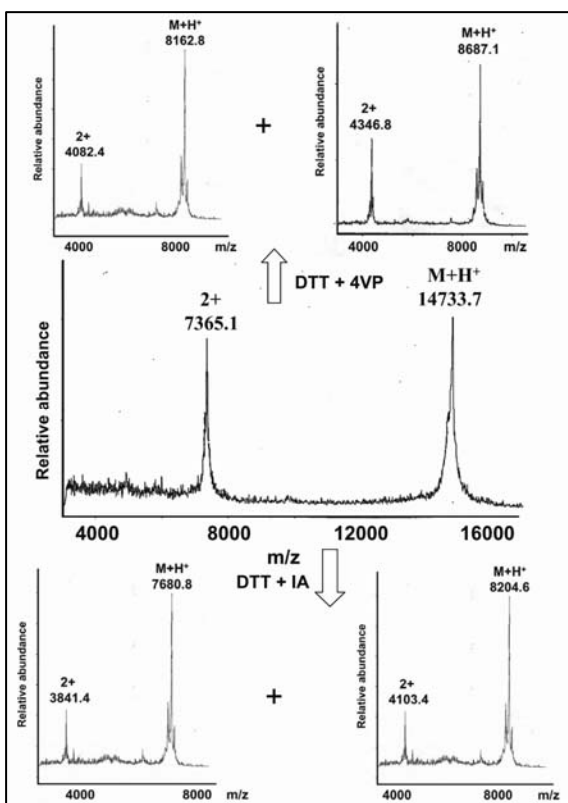


**Figura 3.** Espectros de masa MALDI-TOF (Voyager DE-Pro™, Applied Biosystems) de una proteína homodimérica nativa (izquierda) y de su subunidad (derecha) aislada por RP-HPLC tras reducción de sus S-S y S-piridiletalación de los grupos sulfidrilo formados.

De manera similar, la cuantificación del número total de residuos de cisteína de una proteína heterodimérica (LS) exige reemplazar el término  $M_{CM}$  de la ecuación II por la suma de las masas de las subunidades mayor (L) y menor (S) reducidas y alquiladas ( $M_{CM} L + M_{CM} S$ ):

$$N_{Cys} LS = [((M_{CM} L + M_{CM} S) - M_{ALK}) / (M_R + 1)] + N_{SH} \quad (\text{ecuación V}).$$

La figura 4 muestra los espectros de masas de una proteína de masa molecular  $M_{NAT} = M_{ALK} = 14733.7$  Da (panel central) y de sus subunidades aisladas tras reducción y alquilación con 4-vinilpiridina (4VP, paneles superiores) y con yodoacetamida (IA, paneles inferiores).



**Figura 4.** Espectros de masas MALDI-TOF (adquiridos como en las figuras 1 y 2) de una proteína heterodimérica nativa (panel central) y de sus subunidades S (izquierda) y L (derecha) aisladas mediante HPLC de fase reversa tras reducción de sus S-S y S-piridiletilación (paneles superiores) y carbamidometilación (paneles inferiores) de los grupos sulfidrilo generados.

Resulta evidente que se trata de una proteína heterodimérica y que ninguna de sus subunidades contiene grupos sulfidrilo. Por otra parte, los resultados de alquilación con 4VP o con IA, podemos determinar que el número total

de cisteínas ( $N_{Cys}$ ) del heterodímero LS es:  $[(8687.1 + 8162.8 - 14733.7)/106.3] = 19.9$  y  $[(8204.6 + 7680.8 - 14733.7)/ 58.1] = 19.8$ . Además, combinando los dos conjuntos de datos podemos determinar el número de cisteínas presentes en cada subunidad:

$$N_{Cys} L = (M_{VP} L - M_{IA} L) / (\Delta M_{VP} - \Delta M_{IA}) \quad (\text{ecuación VIa})$$

$$N_{Cys} S = (M_{VP} S - M_{IA} S) / (\Delta M_{VP} - \Delta M_{IA}) \quad (\text{ecuación VIb}),$$

En las ecuaciones VIa y VIb,  $(M_{VP} L - M_{IA} L)$  y  $(M_{VP} S - M_{IA} S)$  corresponden, respectivamente, a la diferencia entre las masas alquiladas con 4-vinilpiridina y con yodoacetamida de las subunidades mayor y menor, y  $(\Delta M_{VP} - \Delta M_{IA})$  es la diferencia entre el incremento de masa debido a la alquilación de un grupo tiol con 4-vinilpiridina ( $\Delta M_{VP}$ ) o con yodoacetamida ( $\Delta M_{IA}$ ) ( $106.3 - 58.1 = 48.2$ ). Utilizando los datos de la figura 4 se deduce que las subunidades L y S de la proteína de  $M_{NAT} 14733.7$  Da contienen, respectivamente,  $(8687.1 - 8204.6) / (106.3 - 58.1) = 10$  Cys y  $(8162.8 - 7680.8) / (106.3 - 58.1) = 10$  Cys. Debe tratarse, pues, de una disintegrina heterodimérica (Tabla 1).

Es necesario aclarar que, con independencia de los reactivos alquilantes que se utilicen en un experimento de doble marcaje -como el mostrado en la figura 4- las especies de mayor (o menor) masa molecular corresponden a la misma subunidad. Esta relación de proporcionalidad se cumple siempre que i) el número de cisteínas de la subunidad mayor sea igual o mayor que el de la subunidad menor ( $N_{Cys} L \geq N_{Cys} S$ ), o ii) en el caso de que  $N_{Cys} S > N_{Cys} L$ , la diferencia entre las masas moleculares de las subunidades mayor ( $M_{NAT} L$ ) y menor ( $M_{NAT} S$ ) sea superior a la diferencia entre el número de cisteínas de la subunidad menor ( $N_{Cys} S$ ) y el número de cisteínas de la subunidad mayor ( $N_{Cys} L$ ) multiplicada por el incremento de masa debido a la alquilación de un grupo tiol por el agente alquilante que genera mayor aumento de masa ( $M_{RH}$ ). Esta segunda condición puede expresarse de manera general mediante la ecuación VII:

$$(M_L - M_S) > (N_{Cys} S - N_{Cys} L) \times M_{RH} \quad (\text{ecuación VII}).$$

Aunque, tanto en el caso de proteínas homo- y heterodiméricas, los datos relativos a la cantidad de cisteínas de sus subunidades no permiten asignar el número de enlaces S-S intra- e intermoleculares, si que se puede formular de manera general que si una proteína dimérica no contiene grupos -SH, entonces tanto el número de S-S intracatenarios como el de S-S intermoleculares será par si las subunidades contienen un número par (2n) de cisteínas, e impar (2n-1) si el número de cisteínas de cada subunidad es impar. Nótese que no puede darse el caso de que una subunidad contenga 2nCys y la otra (2n-1) Cys.

### C. Proteínas multiméricas

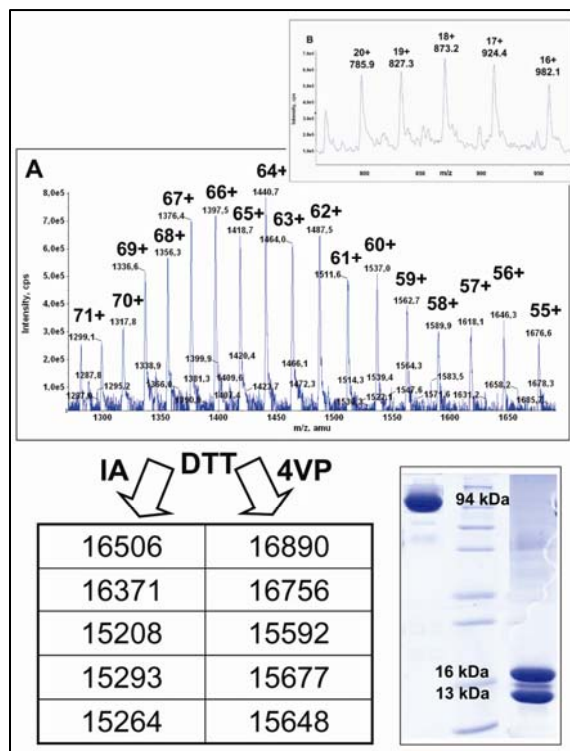
Conceptualmente, los mismos principios que se aplican para la determinación del contenido de sulfidrilos y enlaces disulfuro en proteínas diméricas son válidos para proteínas n-méricas, si bien, lógicamente, hay que modificar las ecuaciones anteriores. Así, el número total de cisteínas de una proteína multimérica ( $N_{Cys\ Mult}$ ) puede determinarse mediante una modificación de las ecuaciones II, IV y V:

$$N_{Cys\ Mult} = [(\sum M_{CM\ Sub}) - M_{ALK}] / (M_R + 1) + N_{SH} \quad (\text{ecuación VIII}),$$

donde  $\sum M_{CM\ Sub}$  es el sumatorio de las masas moleculares de todas las subunidades reducidas y alquiladas.

La figura 5 ilustra el protocolo seguido para establecer la estructura cuaternaria de una proteína multimérica (masas moleculares aparentes por SDS-PAGE:  $M_{NAT}$ , 94 kDa;  $M_{SUB}$ , 13-16 kDa). La masa molecular de la proteína nativa (92151 ± 11 Da) fue determinada mediante ionización por electrospray con un espectrómetro híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal (QTrap 2000, Applied Biosystems) (panel A). Mediante la ecuación VIa (o VIb), y partiendo de las masas moleculares determinadas para las subunidades aisladas por HPLC de fase reversa piridiletiladas y carbamidometiladas (tabla), se deduce que cada subunidad contiene un total de 8 cisteínas. Por tanto, las masas moleculares promedio calculadas para las subunidades nativas (con todas las cisteínas formando S-S) ( $M_{NAT\ Sub}$ )

son [ $M_{CM\ Sub} - (8 \times 58.1)$ ]: 16041 Da (SubA), 15906 Da (SubB), 14743 Da (SubC), 14828 Da (SubD) y 14799 Da (SubE). El  $\sum M_{NAT\ Sub\ A-E} = 76317$  Da. La diferencia entre este valor y la masa molecular de la proteína nativa es -15834 Da, indicando que la proteína nativa es hexamérica con una estequiometría cuaternaria  $[A(B)_2CDE]$ .



**Figura 5.** Espectros de masas adquirido mediante ionización por electrospray (ESI) en un espectrómetro QTrap 2000 (Applied Biosystems) de una proteína purificada del veneno de *Bitis nasicornis* (A) y de una de sus subunidades (B). La masa molecular aparente, por SDS-PAGE, de la proteína nativa es 94 kDa y la determinada por ESI-MS es 92151 ± 11 Da. La reducción y alquilación de esta proteína produjo las subunidades listadas en la tabla. El espectro ESI-MS mostrado en el panel B corresponde a la subunidad piridiletilada de 16756 Da.

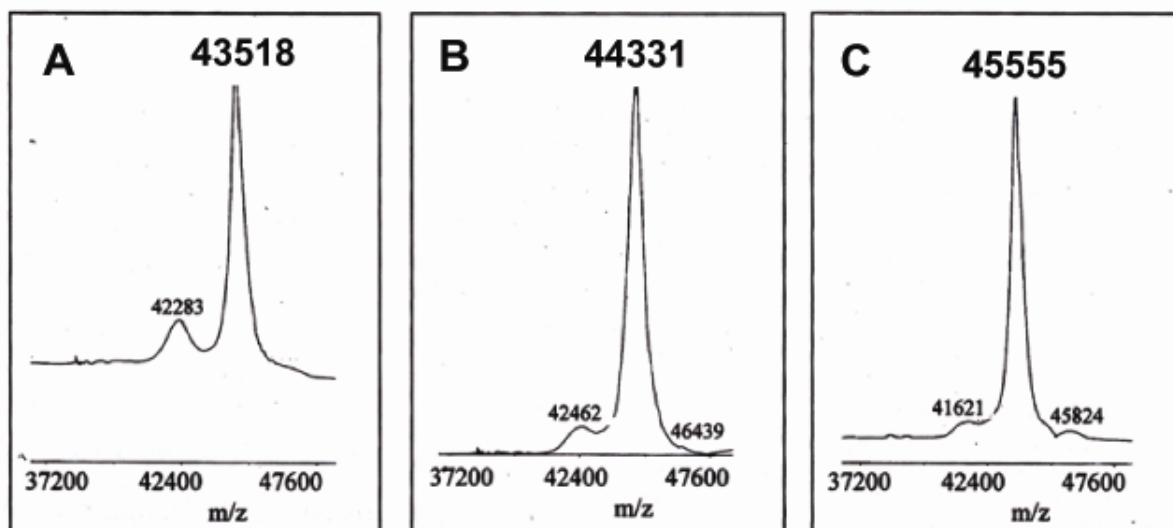
Este tipo de estructura supramacromolecular es típico de C-lectinas multiméricas formadas por la asociación cíclica de heterodímeros ( $\alpha\beta$ ). Cada dímero contiene 3 S-S intracatenarios, 1 S-S interdímero y se enlaza a otros dos dímeros mediante dos S-S, uno entre las cisteínas N-terminal (Cys1) de la subunidad  $\alpha$  y C-terminal (Cys8) de la subunidad  $\beta$  y otro entre las correspondientes cisteínas C-terminal de la subunidad  $\beta$  y N-terminal de la subunidad  $\alpha$  de dímeros vecinos. La proteína de 92 kDa puede describirse como un trímero de dímeros de

fórmula  $[(\alpha\beta)_2]_3$  o  $[\alpha\text{-SS-}\beta]_1\text{-Cys}_{\text{Cter}}\alpha\text{-Cys}_{\text{Nter}}\beta\text{-}[\alpha\text{-SS-}\beta]_2\text{-Cys}_{\text{Cter}}\alpha\text{-Cys}_{\text{Nter}}\beta\text{-}[\alpha\text{-SS-}\beta]_3\text{-Cys}_{\text{Cter}}\alpha\text{-Cys}_{\text{Nter}}\beta\text{-}[\alpha\text{-SS-}\beta]_1$  (Calvete *et al.*, 2003b). La asociación cabeza-cola de heterodímeros  $\alpha\beta$  es una solución evolutiva sencilla para formar polímeros de complejidad creciente,  $(\alpha\beta)_n$ , que desarrollen nuevas actividades biológicas. Pero esto es harina de otro costal...

### Otras consideraciones

La metodología descrita ha sido aplicada en nuestro laboratorio esencialmente para caracterizar toxinas de venenos de serpientes e ilustra los conceptos básicos aplicables teóricamente a cualquier otra proteína. La limitación práctica es la precisión con que puedan medirse las masas de las diversas especies moleculares. Ello no sólo depende de las características operativas del espectrómetro de masas sino también de las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Además, modificaciones postraduccionales como glicosilación (en particular con azúcares ácidos), sulfatación, fosforilación, etc. suelen producir poblaciones proteicas heterogéneas y afectan a las propiedades iónicas y, por tanto, al

proceso de ionización de las proteínas. La masa molecular de la proteína cuyo espectro de masas se muestra en la figura 5 pudo ser determinada por ESI-MS con una precisión de unas 120 ppm. Sin embargo, la proteína de la figura 6 (MAT, <http://au.expasy.org/uniprot/P13444>,  $M_{av}$  calculada = 43567 Da,  $N_{\text{CYS}} = 10$ ) no pudo ionizarse mediante electronebulización aunque si utilizando MALDI-TOF-MS. En este caso (Fig.6), se aprecia que los picos son más anchos que los iones de la figura 5 y, por tanto, de menor resolución. No obstante, incluso con una resolución nominal 10 veces inferior a ESI-MS (que puede mejorarse hasta  $\sim \pm 200$  ppm si se trabaja con un estándar interno y se optimiza el tiempo de extracción de los iones), un valor teórico de  $44000 \pm 50$  Da permite determinar con precisión suficiente la incorporación de un grupo piridiletil (alquilación de un solo grupo sulfidriilo), dado que un incremento de masa de 105.3 es 2.1 veces el error medio. Queda clara, pues, la importancia de amplificar lo más posible la diferencia de masa entre las especies  $M_{\text{NAT}}$ ,  $M_{\text{ALK}}$  y  $M_{\text{CM}}$  utilizando reactivos alquilantes que generen un incremento de masa ( $M_R$ ) mayor que el error experimental de la medida. Aunque los reactivos alquilantes más comunmente utilizados son yodoacetamida ( $M_R = 57.1$ ) y 4-vinilpiridina ( $M_R = 105.3$ ), la variedad de reactivos específicos de grupos



**Figura 6.** Espectros de masas de la proteína MAT nativa (A), MAT tratada con 4-vinilpiridina en condiciones desnaturalizantes pero no reductoras (B) y MAT reducida y piridiletilada (C) adquiridos mediante MALDI en un espectrómetro Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal y con 200 nseg de extracción retardada (DE, delayed extraction) de iones. La masa molecular promedio,  $M_{av}$ , de MAT fue 49 Da inferior a la  $M_{av}$  calculada (43567 Da). No obstante, dado que este error afecta, en principio, por igual a las medidas siguientes efectuadas con la misma calibración, el cálculo de  $N_{\text{SH}} = (44331 - 43518)/106.3 = 7.6$ ,  $N_{\text{CYS}} = (44555 - 43518)/106.3 = 9.75$ , y  $N_{\text{SS}} = (9.75 - 7.6)/2 = 1.07$  indicó claramente que 2 de las 10 cisteínas de la molécula estaban formando un enlace disulfuro y las restantes 8 estaban reducidas (Pérez-Sánchez *et al.* 2003).

tioles es grande, en particular los conjugados a fluoróforos diseñados para estudios de Biología Celular. Un ejemplo interesante es la eosina-5'-yodoacetamida. Este reactivo hidrosoluble (Molecular Probes, Invitrogen: <http://probes.invitrogen.com/media/msds/30450.html>) produce proteínas fluorescentes y genera un  $M_R = 830.8$ . Resulta, por tanto, muy sencillo investigar como paso previo a la cuantificación de  $N_{SH}$ , por SDS-PAGE tras el tratamiento con el fluoróforo, si una proteína contiene o no grupos

sulfhidro reactivos. También los reactivos biotinilados específicos para grupos tioles (ej. *N*-(biotinoyl)-*N'*-(iodoacetyl) ethylene diamine,  $M_R = 454.3$ , Molecular Probes, Invitrogen) representan alternativas útiles tanto para aislar, por cromatografía de afinidad utilizando streptavidina inmovilizada, proteínas que contengan grupos -SH, como para cuantificar cisteínas reducidas.

## Bibliografía

- Anfinsen CB, Scheraga HA. 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Advances in Protein Chemistry* 29: 205-300.
- Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Theakston RDG, Kisiel DG *et al.* 2003a. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochemical Journal* 372: 725-734.
- Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Marcinkiewicz C. 2003b. Venenos de serpientes. Diversificación estructural de proteínas ancestrales. *Investigación y Ciencia* Abril 2003: 33-35.
- Cheek S, Krishna S, Grishin NV. 2006. Structural classification of small, disulphide-rich protein domains. *Journal of Molecular Biology* 359: 215-237.
- Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ *et al.* 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, 439: 584-588.
- Henschen A. 1986. Analysis of cyst(e)ine residues, disulfide bridges, and sulfhydryl groups in proteins. *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Wittmann-Liebold *et al.*, eds.), Springer Verlag, Berlin, pp.244-255.
- Juárez P, Sanz L, Calvete JJ. 2004. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics* 4: 327-338.
- Ménez A (Ed.). 2002. *Perspectives in Molecular Toxinology*, John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK.
- Olivera BM. 2006. Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *Journal of Biological Chemistry* 281: 31173-31177.
- Sánchez-Pérez G, Gasset M, Calvete JJ, Majares MA. 2003. Role of an intrasubunit disulfide in the association state of the cytosolic homooligomer methionine adenosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 278: 7285-7293.
- Shevchenko A, Sunyaev S, Lobodo A, Shevchenko A *et al.* 2001. Charting the proteomes of organisms with insequenced genomes by MALDI-Quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Analytical Chemistry* 73: 1917-1926.
- Thornton JM. 1981. Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of Molecular Biology* 151: 261-287.

## Quantitative proteomics of mitochondrial membrane proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ stable isotope labeling and linear ion trap mass spectrometry

Horacio Serrano<sup>§&</sup>, Inmaculada Jorge<sup>&</sup>, Pablo Martínez-Acedo<sup>&</sup>, Pedro J. Navarro<sup>&</sup>, Daniel Pérez-Hernández<sup>&§</sup>, Elisabet Miró Casas<sup>#</sup>, David García-Dorado<sup>#</sup>, Jesús Vázquez<sup>&1</sup>

<sup>&</sup>Protein Chemistry and Proteomics Laboratory, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain, <sup>§</sup>Universidad de Puerto Rico, Arecibo, Puerto Rico, <sup>§</sup>Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain and <sup>#</sup>Servicio de Cardiología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

### Summary:

In spite of recent developments, the global analysis of membrane subproteomes is still a common obstacle. In this work we explore whether quantification of mitochondrial membrane proteins can be achieved by SDS-PAGE separation followed by in-gel digestion,  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  stable isotope labeling and peptide-centric identification and quantification by linear ion trap mass spectrometry. Using this approach we were able to identify more than fifty membrane proteins among a total of more than one hundred, from a preparation of 100  $\mu\text{g}$  crude mitochondrial membranes. A part of this proteome was split into two and subjected to comparative analysis by  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  stable isotope labeling. A very narrow distribution of ratios was obtained, showing no evident deviations from the 1:1 ratio in more than two hundred quantifications. Our data demonstrated that significant changes in protein expression levels higher than 1.5-fold or lower than 0.6-fold could be detected at the  $p < 0.05$  confidence level. Our results suggest that this method could be suitable for the large-scale identification and relative quantification of mitochondrial membrane proteomes, as well as other protein membrane preparations.

### Keywords:

Membrane proteins, Differential Expression Proteomics; Mitochondria;  $^{18}\text{O}$  labeling; Linear Ion Trap

### Introduction

About a third of all proteins encoded by genomes are estimated to be membrane proteins. Despite the importance of these proteins in living systems, the global analysis of membrane subproteomes is still a common obstacle (Hynek *et al.*, 2006). Separation and quantification of plasma membrane proteins was initially attempted by using two-dimensional gel electrophoresis, but this approach has a number of technical drawbacks that are well known in the

Proteomics community. Manipulation of membrane proteins is difficult due to their tendency to aggregation, and many of them fail to enter the isoelectric focusing gel in the first dimension and are hence lost; besides, other membrane proteins are known to remain undetected by conventional staining methods. Alternative methods have been proposed; in a recent report a combination of solvent-extraction and hydrophilic interaction chromatography followed by one-dimensional SDS-PAGE analysis was used for the analysis of the mitochondrial proteome (Carroll *et al.*, 2006). However, the applicability of these methods for protein quantification by stable isotope dilution is still unknown.

The analysis of differential protein expression is fundamental for the understanding of biological processes and plays an increasingly important role in biological and medical research (Li *et al.*, 2003).

<sup>1</sup> Address correspondence to: Jesús Vázquez, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain. E-mail: [jvazquez@cbm.uam.es](mailto:jvazquez@cbm.uam.es); phone: +34 91 497 8276, fax: +34 91 497 8087

Differential  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  stable isotope labeling of proteins in comparative samples is an increasingly more commonly used method for subsequent quantitative analysis by mass spectrometry (Heller *et al.*, 2003; Staes *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2006). In a recent report we have demonstrated that linear ion trap mass spectrometry is a suitable method for peptide quantification by  $^{18}\text{O}$  labeling (López-Ferrer *et al.*, 2006). Later, we presented a method to calculate labeling efficiency at the individual peptide level, improving the robustness and degree of automation of this technique (Ramos-Fernández *et al.*, 2007). This method is being applied to the quantitative proteomics analysis of HUVEC cells in response to pro-angiogenic factors (Jorge *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2007). This labeling technique has been used in combination with SDS-PAGE separation of proteins and in gel digestion for the analysis of phosphoproteins (Korbel *et al.*, 2005). However, the latter work was done by using high-resolution mass spectrometry and their application to the analysis of membrane proteins has still not been tested.

In this work we analyze the feasibility of performing differential expression experiments on the mitochondrial membrane proteome by a combination of one-dimensional SDS-PAGE followed by "in-gel" digestion of the separated proteins,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  peptide labeling and peptide identification and quantification by linear ion trap mass spectrometry.

## Material and methods

A protein extract from a preparation of rat heart mitochondrial membranes (100  $\mu\text{g}$ ), prepared from cardiac mitochondria as described (Holmuhamedov *et al.*, 1998; Ruiz-Maena *et al.*, 1999) were redissolved in 40  $\mu\text{l}$  buffer consisting of 8 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) glycerol, 25 mM Tris-Cl (pH6.8), 5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.01 % (w/v) bromophenol blue, and were separated using SDS-PAGE (12 % polyacrylamide gel, 8 x 8 cm). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad). The gel lanes were horizontally cut into 5 pieces (containing approx. 20  $\mu\text{g}$  of protein each), and each piece were subjected to digestion with porcine trypsin (Promega) at a substrate/protease ratio of 20:1 (w/w), as previously described (Shevchenko *et al.*, 2006). The resulting peptides from each piece were dried down and analyzed separately by RP-HPLC-MS/MS. For differential labeling, dried peptide fractions were incubated with immobilized trypsin (Pierce) in a reaction

mixture containing 20 % (v/v) acetonitrile, 100 mM ammonium acetate (pH 6.0), immobilized trypsin at a substrate/protease ratio of 200:1 (v/w), and  $^{18}\text{O}$  or  $^{16}\text{O}$  water at a substrate/water ratio of 1:1 (w/w). The samples were incubated overnight at 37 °C and mixed together just before MS/MS analysis.

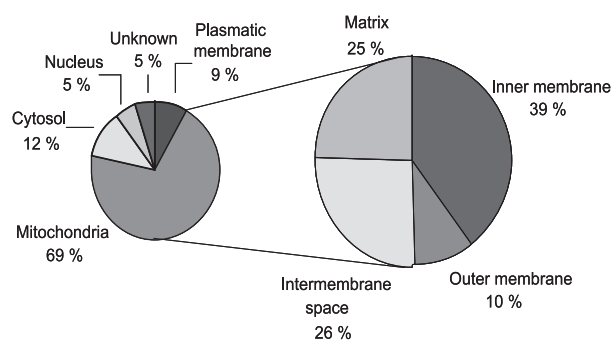
Peptides were analyzed by using a Surveyor LC system coupled to a LTQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo-Fisher) as described previously (Martínez-Ruiz *et al.* 2005; Ortega-Pérez *et al.* 2005), with minor modifications. Peptides were concentrated and desalted on a RP precolumn (0.32 x 30 mm, BioBasic-18, Thermo Electron) and on-line eluted on an analytical RP column (0.18 x 150 mm BioBasic-18, Thermo Electron), operating at 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  and using a 170-min gradient from 5 % to 40 % B (solvent A: 0.1 % formic acid (v/v); solvent B: 0.1 % formic acid (v/v), 80 % acetonitrile (v/v)). The linear ion trap was operated in a data-dependent ZoomScan- and MS/MS-switching mode using the six most intense precursors detected in a survey scan from m/z 400 to 1600. Zoom target parameters, number of microscans, normalized collision energy, and dynamic exclusion parameters were as described in López-Ferrer *et al.* (2005).

Protein identification in *Rattus norvegicus*-uni-prot.fasta database was carried out as described using SEQUEST (López-Ferrer *et al.* 2004) and statistical analysis and determination of error rates were performed after doing a normal and inverted database search by using the Probability Ratio method (Martínez-Bartolomé *et al.*, 2007 submitted; Navarro *et al.*, 2007). Peptide quantification from ZoomScan data were performed as described (López-Ferrer *et al.*, 2006; Ramos-Fernández *et al.*, 2007), using a program written in our laboratory (QuiXoT).

## Results and Discussion

We were interested in the analysis of the mitochondrial membrane proteome by multidimensional chromatography techniques; this approach required in solution digestion of the proteome followed by ion exchange fractionation of the resulting peptide pool and subsequent analysis by RP-HPLC-MS/MS, as described in other works (López-Ferrer *et al.*, 2004). After unsuccessful attempts to digest the mitochondrial membrane proteome by conventional in solution digestion techniques (data not shown),

we analyzed whether multidimensional analysis of these membrane proteins could be performed by using SDS-PAGE as a first separation step, followed by in-gel digestion of different gel regions and RP-HPLC-MS/MS analysis of peptides obtained from these fractions. For this end, a protein extract from a mitochondrial membrane preparation was subjected to SDS-PAGE; the gel was cut into five pieces, each piece was digested, and the resulting peptides analyzed separately by RP-HPLC-MS/MS (five runs), as described in the Material and Methods section. The MS/MS spectra were searched against *Rattus norvegicus*-uniprot database, as well as against an identical, inverted database, constructed by reversing the amino acid sequence of each one of the proteins. 1154 MS/MS spectra, corresponding to 524 unique peptides were selected for positive identification at a 5 % false discovery rate. They corresponded to 128 unique proteins. Analysis of the results according to Gene Ontology categories revealed a high proportion of mitochondrial membrane proteins. As shown in figure.1, 69 % of identified proteins were of mitochondrial origin, from which about a half of the proteins were from the inner or outer membrane (figure 1). More than fifty membrane proteins could be readily identified by this approach.



**Figure 1.-** Distribution of proteins identified in crude mitochondrial membrane extracts from rat heart, according to Gene Ontology categories of subcellular localization.

We then analyzed whether SDS-PAGE separation was compatible with stable isotope labeling procedures. Peptide labeling with  $^{18}\text{O}$  tags is performed by digesting the proteins with a proper endoprotease, typically trypsin, in the presence of  $^{18}\text{O}$ -water; this produces incorporation of two  $^{18}\text{O}$  atoms at the C-terminal end of peptides. It has been shown that proteolytic  $^{18}\text{O}$  labeling can be decoupled from protein digestion, so that the protease can be used in a separate step to label peptides after proteolysis has been taken place. This procedure has the advantage

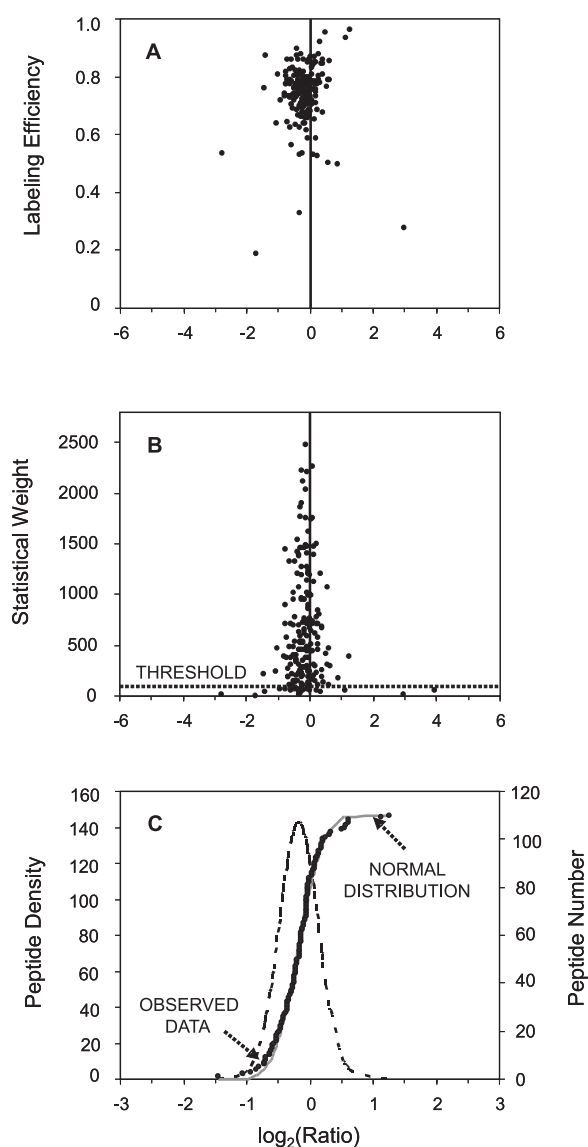
that labeling can be performed with a limited volume of  $\text{H}_2\text{O}^{18}$ , and the digestion and labeling conditions can be optimized separately (Yao *et al.* 2003). For this end, a preparation of membrane proteins, obtained by a similar procedure, was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions, and one of the gel lane regions was vertically cut into two identical pieces, which were in-gel digested separately. The resulting peptides from the two regions were labeled with  $^{16}\text{O}$  and  $^{18}\text{O}$ , respectively, as described above, and mixed together. The peptide mixture was then analyzed by C18 HPLC-linear ion trap mass spectrometry, by performing consecutive ZoomScans, for quantification, and MS/MS scans, for identification. A total of 216 MS/MS spectra, corresponding to 130 unique peptides were assigned to positive peptide identifications at the 5 % error rate. The peptides belonged to 60 different proteins. Analysis of peptide identification results revealed that 96 % of the peptides did not contain internal Lys or Arg residues not flanked by Pro residues. This data indicated that trypsin digestion proceeded with good yields in the “in gel” digestion process; this is a very important requisite for performing stable isotope labeling, since this ensures that protein quantification can be adequately performed at the peptide level.

Relative quantification of peptide pairs is performed as follows. For each peptide specie identified in the survey scan, the linear ion trap is programmed to execute a ZoomScan spectrum followed by a MS/MS spectrum; the first spectrum is used for quantification and the second one is used for peptide identification (López-Ferrer *et al.*, 2006). Only ZoomScan spectra for peptides identified by their MS/MS spectrum are taken into account (López-Ferrer *et al.*, 2006). This is done automatically by QuiXoT, a program written in C# that opens automatically the raw files and peptide identification results and shorts out the ZoomScan spectra corresponding to these species (Navarro *et al.*, 2007). Peptide quantification from the ZoomScan spectra is performed by QuiXoT using an algorithm described previously (Ramos *et al.*, 2007). The program fits the entire isotopic envelope to the sum of theoretical isotopic envelopes from four independent species, including the non-labeled specie from the unlabeled sample, as well as the non-labeled and mono- and di-labeled species from the labeled sample, according to a kinetic model that takes into account the rate of  $^{18}\text{O}$  incorporation (Ramos *et al.*, 2007). This allowed a precise calculation of labeling efficiency of each one of the quantified peptides, as well as the determination of the proportion of peptide coming from the unlabeled and labeled samples. Calculation of labe-

ling efficiency for each one of the quantified peptide pairs, particularly in large-scale experiments, is very important to avoid potential artifacts in this kind of techniques, since false protein expression changes may arise from incomplete incorporation of the isotope label to one of the peptide pairs. The performance of this method to control for incomplete labeling artifacts has been demonstrated in a previous work (Ramos *et al.*, 2007).

To analyze labeling efficiency, this parameter was plotted against the ratio of peptide intensities in the two samples in a  $\log_2$  scale (figure 2A); we have found this plot particularly appropriate to check the extent of isotopic labeling and its influence on relative peptide quantification. As shown in figure 2A, almost all peptides had a labeling efficiency higher than 0.6, and could therefore be used for quantification, since, as published previously, at these high efficiency levels the small variations that incomplete labeling produce on the peptide ratio are accurately taken into account by introducing a labeling efficiency correction (Ramos *et al.*, 2007). QuiXoT calculates a statistical weight that measures the accuracy of individual quantifications; higher weights correlate with a lower deviation in the ratio (figure 2B). Low-quality quantifications were automatically filtered out by using a statistical weight threshold of 50 (figure 2B); application of this filter eliminated only 5 % of the total number of quantifications. As shown in figure 2C, the calculated  $\log_2$ -ratios were closely clustered around zero (ratio 1:1) and the distribution of  $\log_2$  peptide ratios could be perfectly fitted to a normal distribution, which is the null-hypothesis for an experiment with no differential expression events, as described by others (Staes *et al.*, 2004; López-Ferrer *et al.*, 2006; Jorge *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2007). The Gaussian distribution was fitted with a mean of -0.16 and a SD of 0.31. The  $\log_2$  ratio distribution was very narrow, and our data demonstrated that significant changes in protein expression levels higher than 1.5-fold or lower than 0.6-fold could be detected at the  $p < 0.05$  confidence level.

Our results demonstrate that differential expression proteomics on the mitochondrial membrane proteome is possible by using SDS-PAGE separation, in gel-digestion; stable  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  isotope labeling and linear ion trap mass spectrometry. Direct comparison of protein expression levels of two samples analyzed by monodimensional SDS-PAGE does not, in general, allow detecting protein expression changes in complex mixtures due to the low protein resolution of this technique and the interference of



**Figure 2.-** Statistical analysis of peptide quantification results from the analysis of a fraction of a crude extract of mitochondrial membrane proteins. (A) Analysis of  $^{18}\text{O}$ -labeling efficiency as a function of the  $\log_2$ -ratio of quantified peptides. (B) Analysis of goodness of quantification (“statistical weight”). (C) Distribution of  $\log_2$  ratios at the peptide level. Threshold used to filter out low quality quantifications is indicated in B (broken line). The grey line in C represents the normal distribution that best-fits the experimental data; the corresponding peptide density distribution (broken line) is shown superimposed.

abundant proteins. However, our results suggest that by using this method as a first dimension together with stable isotope labeling, results similar to those obtained by multidimensional chromatography could be attained. Although we have focused this work in a preparation of mitochondrial membranes, we think that this method is of general applicability for mem-

brane proteins. Besides being particularly suitable for membrane proteins, since the presence of SDS in the gel electrophoresis step allows a good separation of these proteins and their posterior in gel digestion, this approach had several advantages over conventional in solution protocols. Among others, it allowed the analysis of detergent-containing samples, being this technical detail particularly relevant, since detergents are included in most protein extraction protocols, particularly those of membrane proteins. Also, SDS-PAGE was used as a first separating step, making it unnecessary to perform cation exchange chromatography separation of the peptide pool. Be-

sides, all the peptides from each one of the proteins were analyzed together in the same HPLC fraction, thus allowing a more straightforward protein identification and interpretation of quantification results. Finally, confirmation of tentative differential expression events can be easily performed in separate lanes by concentrating the analysis on gel zones where the protein is expected to migrate, making it unnecessary to repeat the whole experiment. We are applying this method to the analysis of changes in the mitochondrial membrane proteome from rat heart in response to pathological events such as hypertension and other myocardium-related events.

## References

- Carroll J, Fearnley M, Walker E. 2006. Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 16170-16175.
- Heller M, Mattou H, Menzel C, Yao X. 2003. Trypsin catalyzed  $^{16}\text{O}$ -to- $^{18}\text{O}$  exchange for comparative proteomics: tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-Ion Trap Mass Spectrometers. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 14: 704-718.
- Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A et al. 1998. Mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels modulate cardiac mitochondrial function. *American Journal of Physiology* 44: H1567-1576.
- Hynek R, Svensson B, Jensen ON, Barkholt V et al. 2006. Enrichment and identification of integral membrane proteins from barley aleurone by reversed-phase chromatography, SDS-PAGE, and LC-MS/MS. *Journal of Proteome Research* 5: 3105-3113.
- Jorge I, Serrano H, Martínez P, Navarro P et al 2007. Large-scale quantitative proteomics of human vascular endothelial cells (HUVEC) stimulated by the angiogenic factor VEGF by stable  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  isotopic labeling. Joint SEProt-EuPA Congress, Valencia, Spain, February 10-14. Abstracts book, P 8, PP. 118.
- Li XJ, Zhang H, Ranish JA, Aebersold R 2003. Automated statistical analysis of protein abundance ratios from data generated by stable-isotope dilution and tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75:6648-6657.
- López-Ferrer D, Martínez-Bartolomé S, Villar M, Campillos M et al. 2004. Statistical model for large-scale peptide identification in databases from tandem mass spectra using SEQUEST. *Analytical Chemistry* 76:6853-6860.
- López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, García-Ruiz P, Vázquez J 2005. Proteomic analysis of human stem cell differentiation by  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  isotopic labeling and linear ion trap mass spectrometry. I Congress of the Spanish Proteomics Society. Córdoba-Spain February 14-17.
- López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Martínez-Bartolomé S, García-Ruiz P et al. 2006. Quantitative proteomics using  $(^{16}\text{O})/(^{18}\text{O})$  labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 6 Suppl 1:4-S11.
- Martínez-Ruiz A, Villanueva L, González de Orduna C, López-Ferrer D et al., 2005. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:8525-8530.
- Navarro P., Martínez P., Serrano H., Jorge I et al. 2007. A full automated and integrated bioinformatic toolset for large-scale peptide identification and quantification by stable  $^{18}\text{O}$  isotope labeling. Joint SEProt-EuPA Congress, Valencia, Spain, February 10-14. Abstracts book, P 9, PP. 119.
- Nelson CJ, Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR 2006. A quantitative analysis of Arabidopsis plasma membrane using trypsin-catalyzed  $(^{18}\text{O})$  labeling. *Molecular and Cellular Proteomics* 5:1382-1395.

- Ortega-Perez I, Cano E, Were F, Villar M et al 2005. c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *Journal of Biological Chemistry* 280:20867-20878.
- Ramos-Fernández A., López-Ferrer D., Vázquez J., 2007. Improved method for differential expression proteomics using trypsin-catalyzed <sup>18</sup>O labeling with a correction for labeling efficiency. *Molecular and Cellular Proteomics* (in press).
- Ruíz-Maena M, García-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM et al. 1999. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na<sup>+</sup> through gap junctions. *Circulation Research* 85:280-7.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV et al. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1:2856-2860.
- Staes A, Demol H, Damme JV, Martens L et al. 2004. Global differential non-gel proteomics by quantitative and stable labeling of peptides with oxygen-18. *Journal of Proteome Research* 3: 786-791.

### Acknowledgements

This work was supported by grants CAM BIO/0194/2006, BIO2006-10085, Spanish Cardiovascular Research Network (RECAVA-II), the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Salud Carlos III, RECAVA) and by an institutional grant by Fundación Ramón Areces to CBMSO. H. S. is a predoctoral fellowship of the Dept. of Biology, University of Puerto Rico, Arecibo Campus (Certification 2005-06-60). I. J. is a postdoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## ProteoRed: iniciativa española en proteómica. Su primer año de vida

*Juan Pablo Albar*

Centro Nacional de Biotecnología, UAM-CSIC, Madrid

El Instituto Nacional de Proteómica o, abreviadamente, ProteoRed, [www.proteored.org](http://www.proteored.org), se creó por iniciativa de Genoma España como una Plataforma Tecnológica, a partir de laboratorios ya operativos, cuyo principal objetivo es coordinar, integrar y normalizar las actividades de los servicios de proteómica para garantizar el acceso de la comunidad científica a las tecnologías proteómicas.

El 1 de junio de 2006 ProteoRed cumplió 1 año desde su constitución oficial. Se constituyó con 15 laboratorios Socios, y durante de este año se ha gestionado la incorporación de otras 5 instituciones como Grupos Asociados (material suplementario, figura 1). Estas instituciones participan al mismo nivel que los socios en las actividades intrínsecas de ProteoRed, y se les ha proporcionado presupuesto para ello. Recientemente se ha incorporado el Complejo Hospitalario Juan Canalejo de A Coruña como sexto Grupo Asociado. Además, dos grupos portugueses colaboran y participan activamente en varios grupos de trabajo de ProteoRed.

Se ha contratado la totalidad del personal técnico previsto (22 Titulados Superiores Especializados), así como el personal administrativo para la unidad de coordinación.

A lo largo de este primer año de vida, ProteoRed ha centrado su actividad en mejorar la calidad de los servicios ofertados por sus laboratorios, tanto hacia los usuarios como en su funcionamiento interno, en alcanzar un consenso de precios, establecer un plan de formación, darse a conocer en los medios de comunicación tanto a través de su sitio Web como en eventos científicos de relevancia y en establecer contactos con otros centros y redes proteómicas a nivel internacional.

A continuación, se detallan las actividades realizadas y el estado actual de cada uno de los Grupos de Trabajo así como de la Unidad de Coordinación.

### Actividades desarrolladas por los grupos de trabajo

Se constituyeron todos los grupos de trabajo e iniciaron las actividades siguiendo las directrices recogidas en la Memoria ProteoRed.

A fecha 20 de Junio de 2006 se envió a la agencia financiadora, Genoma España, el informe anual actividades. Este artículo es una traducción casi literal del que allí se envió y puede ser consultado y “descargado”, en su versión original en inglés, en la parte privada del sitio Web de ProteoRed, como así mismo se puede hacer con las presentaciones PowerPoint de todos y cada uno de los eventos organizados por el Instituto Nacional de Proteómica. En aquel informe ya se declaraba que “Todos los Grupos de Trabajo (WG1-6) están plenamente operativos habiendo cumplido con creces todos los objetivos marcados”.

Los coordinadores de cada grupo de trabajo (tabla 1), presentaron un plan de acción en el primer Workshop de ProteoRed, celebrado en Miraflores de la Sierra, 26-27/09/2005; en el segundo Workshop de ProteoRed, celebrado en Bilbao, 3/05/2006 se pusieron en común los resultados correspondientes a las actividades realizadas a lo largo de la primera “anualidad” de ProteoRed.

### WG1. Desarrollo tecnológico y estandarización de protocolos

Los principales objetivos son:

- i) Comparación de los diferentes protocolos experimentales y los datos obtenidos tras su aplicación para posteriormente estandarizar los diferentes abordajes tanto tecnológicos como experimentales.

- ii) Análisis, chequeo, validación y optimización de las plataformas tecnológicas relevantes para un laboratorio de servicios de proteómica con el propósito de poder implementar estas tecnologías que se consideren de interés para ProteoRed.

En este contexto, los datos obtenidos de las diferentes plataformas se compararan para establecer la manera más adecuada de resolver problemas comunes de un laboratorio de servicios de proteómica.

Tabla 1. Estructura de los seis grupos de trabajo de ProteoRed con sus correspondientes coordinadores de grupo

<i>Grupo de trabajo</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Coordinadores</i>
WG 1	Desarrollo tecnológico y estandarización de protocolos	Juan Pablo Albar, Alberto Paradela
WG 2	Recolección y manipulado de muestras	Francesc Canals, Montserrat Carrascal
WG 3	Soporte bioinformático	José M <sup>a</sup> Carazo
WG 4	Escala de precios y organización funcional de los servicios de proteómica	Sonia Martínez, Félix Elortza
WG 5	Formación, educación y difusión	Concha Gil, José A. Bárcena
WG 6	Internacionalización y coordinación con otros consorcios o plataformas proteómicas internacionales	José M <sup>a</sup> Mato, Juan P. Albar, Concha Gil

De acuerdo con estos objetivos (Miraflores de la Sierra, Madrid, 26/27 de Septiembre 2005) se decidió tomar parte en el concurso del ABRF06. El grupo de investigación en estándares en proteómica del ABRF elaboró una mezcla relativamente compleja y bastante bien definida de proteínas para evaluar el nivel de rendimiento de los laboratorios participantes. La mezcla incluye 49 proteínas humanas, altamente puras (>95%) de diferentes orígenes (5 pmoles/proteína). Los laboratorios participantes eran libres de utilizar la metodología y la tecnología que estimasen conveniente para obtener el mayor número de identificaciones.

Los resultados de las identificaciones se presentaron en reunión anual de la ABRF que tuvo lugar en Long Beach, California (Febrero 2006). Una comparación extensiva de los resultados obtenidos por los miembros participantes de ProteoRed con los obtenidos por el resto de los participantes se expuso en la reunión de seguimiento de ProteoRed en Bilbao (Mayo 2006). Las principales conclusiones de esta comparación fueron:

- i) El porcentaje de laboratorios de ProteoRed que han participado en el evento ha sido del 80%.
- ii) Las aproximaciones experimentales y tecnológicas usadas por los miembros de Pro-

teoRed han sido similares a las descritas en el estudio general del ABRF por otros participantes.

- iii) Los resultados globales de ProteoRed reflejan exactamente el amplio rango de resultados expuestos en el concurso del ABRF06.
- iv) Los laboratorios participantes de ProteoRed obtuvieron un menor número de identificaciones erróneas, incluyendo un mayor porcentaje de laboratorios que presentaron un 100% de identificaciones correctas.
- v) Ningún laboratorio participante identificó el total de las 49 proteínas presentes en la muestra.
- vi) La mezcla de proteínas del ABRF no parece ser adecuada para el fraccionamiento utilizando 2D-PAGE y análisis por huella de masas peptídicas, PMF.
- vii) Algunas plataformas tecnológicas de identificación produjeron mejores resultados que otras, aunque con la experiencia y la pericia de los técnicos se pudo superar la falta de instrumentos de alta tecnología.

Globalmente, los miembros del WG1 de ProteoRed consideran esta actividad de gran interés y por

lo tanto las posteriores actividades de este grupo de trabajo han sido la nueva distribución de un nuevo estándar complejo de proteínas (suministrado amablemente por SIGMA-ALDRICH) y su posterior análisis. Para este nuevo análisis se han utilizado nuevos enfoques tanto experimentales y tecnológicos y sus resultados están siendo comparados con los obtenidos en el primer experimento del ABRF.

Se ha potenciado el uso de varios motores de búsqueda por lo que ha puesto a disposición de todos los miembros participantes una nueva licencia multiusuario de Phenyx (GeneBio, Suiza). Los resultados de este nuevo experimento han sido expuestos en la reunión de seguimiento del WG1 (Miraflores de la Sierra, Madrid, Noviembre 2006) y se pueden consultar en detalle en <http://www.proteored.org>.

## WG2. Recolección y manipulado de muestras

Los objetivos del WG2 se resumen en:

- i) Proporcionar a los miembros y usuarios de ProteoRed unos protocolos de recogida, preparación, almacenaje y distribución de muestras.
- ii) Seleccionar y distribuir periódicamente a los laboratorios de ProteoRed de muestras de referencia para garantizar la reproducibilidad y estandarización de las diferentes tecnologías proteómicas utilizadas en la red.

Las actividades llevadas a cabo por este WG para la consecución de los objetivos han sido:

- i) Revisión bibliográfica y a través de Internet de los protocolos de recogida y manipulado de muestras para experimentos de proteómica y la revisión de las recomendaciones de HUPO para la recogida de muestras humanas. Diseño de protocolos-patrón para la preparación y análisis 2D de muestras de diferentes orígenes. Todos los documentos y sus enlaces estarán disponibles a los miembros de ProteoRed a través de su aplicación Web.
- ii) Ensayo para validar un estándar de la técnica LC-ESI-MS por la mayoría de los laboratorios de ProteoRed y organizado por la Association of Biochemical Resource Fa-

cilities (ABRF). Algunos laboratorios han utilizado esta muestra para estandarizar sus técnicas 2D, pero tras los resultados obtenidos, la necesidad de preparar un estándar específico 2D es cada vez más evidente.

Durante la reunión de seguimiento del WG1-WG2 mantenida en Miraflores, Madrid en Marzo de 2006 se decidió llevar a cabo un experimento de estandarización de la separación electroforética 2D. El objetivo de este experimento es doble; examinar los protocolos de preparación de la muestra y la separación electroforética 2D en gel.

El laboratorio coordinador del WG2 preparó dos muestras estándar de un cultivo de la línea celular A431 de carcinoma epidérmico humano (es una mezcla compleja de proteínas y se consigue en grandes cantidades). Las muestras se distribuyeron junto con un cuestionario para catalogar la preparación de muestras, cuantificación proteica y protocolos de separación 2D.

Los resultados preliminares (selección de protocolos o tecnologías idóneas, etc) se presentaron en la reunión anual de ProteoRed (Bilbao, mayo 2006) y la evaluación final del estudio se ha presentado en la 2ª reunión de seguimiento (Miraflores de la Sierra, noviembre 2006).

## WG3. Soporte bioinformático

Los principales objetivos del WG3 a lo largo de este pasado año han sido:

1. Elaboración de un inventario de recursos para conocer la situación de recursos bioinformáticos de cada laboratorio. Para llevar a cabo este objetivo se envió un cuestionario a cada laboratorio, se preparó una base de datos con la información recogida, se hizo un estudio estadístico y se presentaron las conclusiones. Asimismo, se visitaron todos los laboratorios para completar la información sobre la situación particular de cada uno.
2. Mejora de la infraestructura bioinformática de ProteoRed mediante la interacción con el Instituto Nacional de Bioinformática (INB). La implantación de dos motores de búsqueda para la identificación de proteínas (MASCOT y PHENYX) esta siendo evaluada en colaboración con el nodo computacional del PCM-INB.

3. Desarrollo de una aplicación Web para automatizar las peticiones de servicio de cada laboratorio de ProteoRed. Este objetivo se está llevando a cabo en dos fases, un sistema global para registrar todas las peticiones de los clientes de ProteoRed y una integración en ProteoRed de las aplicaciones ya desarrolladas en cada laboratorio.
4. Estudiar una propuesta de estandarización de las comunicaciones entre todos los laboratorios de ProteoRed.
5. Valorar la implementación de un sistema LIMS (Laboratory information management system) o pseudo-LIMS en ProteoRed. Se están considerando dos posibilidades: una extensión de la aplicación Web en el área de la trazabilidad o la adquisición de un sistema LIMS profesional.
6. Colaborar con el WG5 (formación y educación) en la organización de cursos de formación en temas relacionados con la bioinformática. Este año se han organizado 2 cursos presenciales sobre "Bioinformatics applied to Proteomics" (Madrid, abril 2006) y "How to analyze 2-DE gels and Publishing 2-DE data" (Madrid, mayo 2006).

#### **WG4. Organización funcional del laboratorio y coordinación de la escala de precios**

Tras la identificación de una persona de contacto en cada laboratorio, la principal tarea de este grupo de trabajo ha sido la preparación de una lista detallada (agrupada en seis categorías fijas) de los servicios ofertados en sus laboratorios. Además, se distribuyeron dos modelos (del CNB-CSIC y del PCB) para calcular los precios de los servicios y poder establecer un rango de precios.

El análisis de los precios revela un alto grado de dispersión en los precios de cada servicio debido principalmente a las diferencias existentes entre los grupos (departamentos universitarios, fundaciones privadas, etc) y a la definición no homogénea de los servicios que se ofertan. Durante los primeros meses del año 2006, esta lista de servicios se reelaboró, reduciendo el número de categorías y detallando cada servicio.

En marzo de 2006 tuvo lugar la primera reunión en Barcelona. El objetivo de esta reunión

era la puesta en común de cada lista de precios exponiendo uno por uno los servicios ofertados; lo que incluye cada servicio y cómo se calculó el precio de ese servicio. Tras esta reunión se alcanzó un acuerdo sobre un rango de precios para cada servicio y el compromiso de que los grupos fuera de rango tomarían las medidas oportunas para adecuarse a esos precios el próximo año. Este documento final se presentó en la primera reunión anual de ProteoRed (Bilbao 2006) y se encuentra disponible en nuestro sitio Web.

Durante el próximo año se trabajará en la definición y la estandarización de los procedimientos comunes de trabajo, informes normalizados, etc

#### **WG5. Formación, educación y difusión de los servicios de proteómica**

El grupo de trabajo 5 ha completado con éxito los objetivos propuestos para el primer año de ProteoRed. Los cursos de formación desarrollados este año han tenido tres objetivos:

1. Formar a los nuevos técnicos de las unidades de proteómica de ProteoRed,
2. formar e informar a investigadores en general en el área de la proteómica, y
3. formar a los miembros de ProteoRed en nuevas técnicas de proteómica.

Se distribuyó un cuestionario para saber las necesidades y preferencias de formación de los distintos miembros de ProteoRed. Operativamente, este grupo de trabajo ha tenido varias tele-conferencias a lo largo de este año además de haber organizado una serie de cursos en colaboración tanto con el INB como con la EUPA.

La relación de cursos realizados es:

- Mesa redonda sobre las "Nuevas tecnologías en el diagnóstico y la investigación médica", incluido en la IX Conferencia Anual del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona, Noviembre 2005.
- Sesiones prácticas "Protein identification through MALDI TOF/TOF mass spectrometry". Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona, 7-9 de Noviembre de 2005.

- Curso “Bioinformática Aplicado a la Proteómica”. Campus de Rabanales, Córdoba, 23-24 de Marzo de 2006.
- Seminario “The Ludesi for Professional 2D gel image analysis”. Hospital Sant Pau, Barcelona, 8 de Marzo 2006.
- Curso “Bioinformática Aplicado a la Proteómica”. Fac. Farmacia UCM, Madrid, 3-5 de Abril de 2006. Realizado en colaboración con el INB.
- Curso “II curso práctico sobre Proteómica”. Campus de Rabanales, Córdoba, 15-19 de Mayo de 2006.
- Curso Avanzado de Proteómica: “Publishing 2-DE data”. Curso ProteoRed-EUPA (European Proteomics Association) en colaboración con el Swiss Bioinformatics Institute (SIB/SBI). Fac. CC. Químicas UCM, Madrid, 16-17 Mayo de 2006.
- Curso “2-DE DIGE Workshop”. Fac. Farmacia UCM, Madrid, 29-31 de Mayo de 2006.
- Curso “Training in Protein Identification”. Fac. CC. Químicas UCM, Madrid, 21-22 de Septiembre de 2006.

Asimismo estos cursos se repetirán actualizados en el próximo periodo (Junio 2006-Mayo 2007 en diferentes ciudades (Barcelona, Bilbao, Valencia, Córdoba, Salamanca).

Además, 3 cursos de ProteoRed se han preparado en colaboración con el grupo de formación de la EuPA: “Advanced proteomics technologies (ProteoRed-EuPA course), UCM, Madrid, Octubre 2006, el curso teórico “How to share our data” que coincidirá con el primer congreso europeo de la EuPA en Valencia, Febrero 2007 y un curso sobre fosfoproteómica con fecha aun por determinar.

#### **WG6. Internacionalización y coordinación con otros consorcios y plataformas internacionales**

Se han establecido contactos con otras redes de proteómica extranjeras, centros de investigación, consorcios y asociaciones mediante la participación activa en reuniones, congresos, videoconferencias y concursos como viene reflejado en la secciones de

reuniones y actividades desarrolladas, cursos realizados y contactos con otras redes internacionales.

A pesar de su corto periodo de vida, ya se han establecido contactos con importantes redes y asociaciones internacionales:

- Human Proteome Organisation, HUPO (HUPO-Liver and HUPO PSI-Proteomics Standard Initiatives).
- European Proteomics Association, EuPA
- Red Proteómica Portuguesa, Procura
- Red Portuguesa de Espectrometría de Masas, ITQB
- Finnish Center for Biotechnology, FCB.
- Swiss Institute of Bioinformatics, SIB
- Association of Biomolecular Resource Facilities, ABRF. Proteomics Standards

#### **Unidad de Coordinación**

El objetivo de la Unidad de Coordinación, ha sido y sigue siendo, organizar y coordinar todas las actividades que se realizan en los diferentes grupos de trabajo, así como llevar a cabo todas las iniciativas que implica constituir desde el inicio un Instituto a nivel nacional y darle a conocer entre la comunidad científica y empresarial nacional e internacional.

Algunas de las actividades más destacadas de la Unidad de Coordinación a lo largo de su primer año han sido:

- Informe sobre el equipamiento y software de todos los laboratorios, incluyendo los Grupos Asociados, y otro informe recopilando los servicios ofertados por cada laboratorio.
- Página Web completamente operativa, incluyendo una parte externa pública y privada dedicada a los clientes, así como una parte interna pública y privada para los miembros de ProteoRed.
- Anuncio publicado en la revista *Proteomics* de mayo de 2005.
- Expositores en la Feria Biospain-Biotech 2006, 18-20 septiembre 2006.

- Los 25 contratos previstos han sido formalizados.

El contacto y colaboración con Genoma España es continuo. Se han realizado informes de cada una de las reuniones, así como informes semestrales y anuales de situación.

Existe comunicación real y activa entre la Unidad de Coordinación y las Coordinaciones Asociadas, al igual que con los laboratorios. Desde la Unidad de Coordinación, los grupos de trabajo están respaldados y asistidos.

En diciembre de 2005 se actualizó el presupuesto para la 2ª anualidad, incrementándose en 500.000 euros para equipamiento.

Se estableció un Consejo Asesor Externo constituido por expertos mundiales en proteómica y bioinformática, que reporta dos ventajas fundamentales a ProteoRed: 1) asistencia y asesoramiento en el desarrollo a nivel interno de ProteoRed y 2) comunicación directa y cooperación con la comunidad proteómica y otras iniciativas científicas mundiales.

En resumen, ProteoRed está completamente operativo y todos los grupos de trabajo desarrollan sus actividades acorde con los planes de acción previstos. Como material suplementario (tabla 1) se relacionan las reuniones y actividades más relevantes desarrolladas.

Se han establecido numerosos contactos con medios de comunicación, revistas y asociaciones relevantes del sector:

Presentación en el Ministerio de Sanidad y Consumo de las Plataformas Tecnológicas de Genoma España, "El Semanal" del periódico "El Mundo" 7 de julio de 2005, "Cinco Días" 5 de Septiembre de 2005.

Existe una fuerte relación de colaboración con la Sociedad Española de Proteómica, SEPROT. En el primer boletín de la Sociedad, aparece un amplio artículo acerca de ProteoRed elaborado por el Coordinador General de ProteoRed, Juan Pablo Albar.

Artículo publicado en la revista "European Pharmaceutical Review", Issue 3, 2005. José M. Mato, Isabel Pérez-Mato, Félix Elortza de CIC BioGUNE y Julio Font de Noray Bioinformatics, S.L.

Artículo-resumen de la presentación de ProteoRed en el HLPP Internacional Workshop Newsletter del HLPP JPAlbar, de próxima publicación.

Anuncio en la contraportada (a toda página) del número especial de Proteomics dedicado al 1er Congreso de la SEProt, Marzo de 2006.

Artículo científico en el 1er número de de la revista Practical Proteomics (2006) 1, 73-76, nueva publicación de Proteomics.

## Algunos avances, novedades y consideraciones en el proyecto HUPO

Fernando J. Corrales

Unidad de Proteómica. Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA) y Universidad de Navarra. Pío XII, 55. 31008 Pamplona

En noviembre del año pasado se celebró, en Long Beach, el quinto congreso anual de la *Human Proteome Organization* (HUPO), en el que se presentaron algunas novedades y los recientes progresos de las distintas iniciativas que integran este gran proyecto. En líneas generales quedó clara la creciente capacidad de la comunidad proteómica para generar cantidades masivas de información que son cada vez más eficazmente integradas, compartidas y accesibles gracias a los recursos bioinformáticos generados por la *Proteomics Standard Initiative* (PSI). Es obvio que la interacción e intercambio de recursos e información entre los grupos integrantes de las diferentes iniciativas es una de las ventajas que proporciona la HUPO, una asociación que evoluciona hacia la creación de una plataforma común para la investigación en proteómica, estandarizando protocolos y flujos de trabajo, estableciendo criterios de análisis y fiabilidad y diseminando la información generada en formatos accesibles para la comunidad científica. Es por ello importante promover la participación de todos, no sólo los grupos integrantes de las iniciativas, si se pretenden conseguir consensos generales. La EUPA, a través de su comité de interacción EUPA-HUPO, está trabajando intensamente en esta dirección. Las reuniones específicas de las iniciativas ya han sido abiertas en este último congreso, se están definiendo cauces de interacción e influencia entre el consejo de HUPO y las sociedades de proteómica nacionales así como el papel a jugar por la EUPA en la definición de nuevas iniciativas. Hay ya algunos nuevos proyectos que se están poniendo en marcha como la iniciativa cardiovascular, liderada por Mike Dunn, que ha despertado un gran interés y en la que están ya participando grupos españoles como el de Fernando Vivanco.

Los progresos que se están realizando en todas las iniciativas son realmente impresionantes y esto no es solo debido a la generación masiva de información derivada de la aplicación de las más modernas tecnologías, si no al esfuerzo por definir estrategias experimentales más eficaces e interpretar e integrar

los datos en formatos acordes a las directrices marcadas por la PSI facilitando su validación, intercambio y accesibilidad. Particularmente relevantes me parecieron las contribuciones de la *Human Disease Glycomics/Proteome Initiative* (HGPI) y de la *Human Antibody Initiative* (HAI). La HGPI se inició en el 2004 con la participación de grupos europeos, estadounidenses, asiáticos y de Oceanía. Su objetivo es la caracterización del glicoma humano en biofluidos para identificar biomarcadores glucídicos de utilidad en el diagnóstico, monitorización y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, cáncer, inflamación, enfermedades relacionadas con el estilo de vida y alteraciones congénitas de la glicosilación. Para ello se plantea desarrollar nueva metodología basada en espectrometría de masas y abordar dos estudios piloto: análisis estructural de N-glicanos de glicoproteínas estándar como la transferrina y la IgG y establecimiento de metodología fiable de aplicación en el estudio de pacientes. Para definir las técnicas a aplicar y demostrar su capacidad, 20 laboratorios diferentes están analizando las dos proteínas mencionadas anteriormente, ambas N-glicosiladas, para determinar los oligosacáridos asociados, su abundancia relativa y los sitios de glicosilación. Estos métodos tendrán, en mi opinión, un gran impacto en el sector de diagnóstico y serán de gran utilidad en el desarrollo de la glicómica funcional y en biología de sistemas.

La HAI tiene como objetivos el impulsar y facilitar la utilización de anticuerpos en proteómica. Se han planteado dos actividades paralelas: la generación de un catálogo de anticuerpos validados y la creación de un atlas de expresión y localización de proteínas humanas en tejido normal y patológico. En ambos casos se planteó la creación de bases de datos con la información generada de libre acceso. El reto a largo plazo (se plantean 10 años), es generar colecciones de anticuerpos contra todas las proteínas humanas y utilizar estos reactivos para explorar funcionalmente los correspondientes antígenos, sus variantes e interacciones. La estrategia global contempla la expresión de proteínas recom-

binantes a gran escala y la subsiguiente generación de anticuerpos que permitirán establecer patrones de expresión, evaluar el papel funcional de proteínas en modelos celulares y purificar proteínas y sus complejos asociados para posteriores análisis bioquímicos y estructurales. Ya se han desarrollado los métodos para alcanzar estos objetivos:

- Algoritmos informáticos que permiten la identificación de regiones codificantes idóneas para la expresión de proteínas recombinantes y para la producción de anticuerpos específicos.
- Un sistema de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* robusto.
- Producción sistemática de anticuerpos asociada con sistemas de purificación de sueros policlonales basada en el antígeno correspondiente.
- Procedimientos sistematizados para la utilización de los anticuerpos, en particular mediante arrays de tejidos.

La disponibilidad de los métodos desarrollados así como, por ejemplo, la amplia librería de construcciones y proteínas recombinantes generados, tienen un tremendo valor en sí mismos. Pero quizás, lo más impresionante es el *Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>). Se trata de una base de datos cuya segunda versión se ha hecho pública en el mes de noviembre, que contiene los más de 1.500 anticuerpos disponibles y más de 1.200.000 imágenes histológicas. Cada uno de los anticuerpos se ha utilizado para teñir con técnicas de inmunohistoquímica secciones de tejido normal y tumores. Además, para complementar los patrones de expresión en tejido, se han incluido imágenes correspondientes a las líneas celulares más ampliamente utilizadas y mejor caracterizadas, así como muestras de individuos normales y de pacientes con leucemia/linfoma. En definitiva, el impacto de esta iniciativa en el campo de la proteómica y en su proyección en el sector clínico es, en mi opinión, claro y, desde luego, merece mucho la pena echar un vistazo a la página web de Protein Atlas. Muchas de las proteínas que tanto nos interesan tienen ya su anticuerpo validado y definido su perfil de expresión.

## QUIÉN ES QUIÉN EN EL CAMPO DE LA PROTEÓMICA



**Grupo de estudio de interacciones parasito-hospedador en helmintiasis intestinales. Universitat de Valencia**

**Grupo de Proteómica. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea**

**Grupo de Bioanálisis. Universidad de Barcelona**

**Grupo de Biomarcadores Moleculares. Universidad de Vigo**

**Grupo de Proteómica. CIMA, FIMA y Universidad de Navarra. Pamplona**

**Grupo de Biología del Linfocito. Universidad de Santiago de Compostela**

**Laboratorio de Señalización Intracelular. Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Granada**

**Grupo de Proteómica. Universidad CEU San Pablo. Madrid**

**Laboratorio de Proteínica Estructural. Instituto de Biomedicina de Valencia. C.S.I.C.**

**Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC. Madrid.**

**Bioquímica Vegetal y Agrícola-Proteómica Vegetal. Universidad de Córdoba**

## Grupo de estudio de interacciones parasito-hospedador en helmintiasis intestinales. Universitat de Valencia

Antonio Marcilla

Dpto. Parasitología, Facultat de Farmacia, Universitat de Valencia, Valencia

### Componentes del grupo

José Guillermo Esteban Sanchís, Profesor Titular de Parasitología; Rafael Toledo Navarro, Profesor Titular de Parasitología; Antonio Marcilla Díaz, Profesor Titular de Parasitología; Dolores Bernal Membrilla, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular; Carla Muñoz Antolí-Candela, Profesora Contratada Doctora de Parasitología; Antonio Marín Pérez, Profesor Asociado de Parasitología; Javier Sotillo Gallego, Becario FPI-MEC; Melissa Higón Valero, Becaria FPU-MEC; Ana Pérez García, Becaria UVEG; Desamparados Vidal Lapiedra, estudiante de doctorado

### Historia del grupo

En el Departamento de Biología Celular y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Valencia se inició una línea de investigación sobre trematodiasis intestinales, en concreto sobre aquellos pertenecientes a la Familia Echinostomatidae, dirigida por el Dr. Jose Guillermo Esteban a inicios de 1990. Se realizaron estudios de diversa índole: helmintofaunísticos, morfoanatómicos, taxonómicos, quetotáxicos, ecológicos e incluso biológicos, reproduciendo experimentalmente el ciclo vital triheteroxeno de diversas especies de echinostomátidos, lo que permitió la descripción de dos nuevas especies para la Ciencia.

Gracias a todos estos estudios se pudo llevar a cabo numerosas publicaciones en revista de la especialidad, así como numerosas Tesis de Licenciatura, Trabajos de Investigación y Tesis Doctorales. Así, la primera Tesis Doctoral leída sobre esta temática fue la del Dr. Rafael Toledo (finales de 1992). A ella le siguió la de la Dra. Carla Muñoz (finales de 1997).

En 2002 se une al grupo el Dr. Antonio Marcilla, quien tras doctorarse en 1991 trabajando en la caracte-

rización de proteínas estructurales de la pared celular del hongo patógeno *Candida albicans*, trabajó durante 3 años en los National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) en la identificación de moléculas importantes dentro de las rutas de transducción de señales en células tumorales (mielomonocitos y basófilos). Tras un periodo de más de un año en el Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia, regresa al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Valencia donde permanece hasta 1998, para posteriormente incorporarse como Profesor al Departamento de Parasitología de dicha Facultad.

En 2004 se une al grupo la Dra. Dolores Bernal, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de Valencia, quien se había formado en técnicas de Biología Molecular y Proteómica en el Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia, y en estancias en el Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School (Boston, MA, USA), donde trabajó en el estudio de proteínas implicadas en la transducción de señales por insulina. Su aportación en la elaboración de análisis mediante geles bidimensionales de diversos extractos de parásitos ha sido fundamental para poner a punto dicha tecnología en el grupo.

La formación en técnicas de estudio de proteínas se ha continuado con estancias de los miembros del grupo en diversos laboratorios extranjeros. Así, el Dr. Toledo realizó una estancia como Profesor Visitante en el Parasite Immunology & Pathology Laboratory, Medical School, Universidad de Puerto Rico (San Juan, Puerto Rico), que ha favorecido la aplicación de nuevas técnicas a la caracterización de moléculas inmunogénicas de *Echinostoma* spp. en modelos animales (véase trabajos relacionados más recientes en listado adjunto). La Dra. Muñoz ha realizado estancias en los laboratorios del Institute für Biologie, Friedrich Alexander Universität Erlangen (Nuremberg, Alemania), donde pudo estudiar los fenómenos de interacción parásito-hospedador a nivel de primer hospedador intermediario y, pos-

teriormente en el Institute of Biomedical and Life Science, University of Glasgow (Glasgow, UK), donde se formó en el estudio de la respuesta inmune de tipo celular.

### Objetivos científicos

Estudio de las interacciones parásito-hospedador en helmintiasis intestinales (trematodiasis y nematodiasis) a distintos niveles: biológico, inmunológico, patológico y molecular (genómico y proteómico). El estudio a nivel molecular tiene como fin la caracterización de moléculas parasitarias específicas con aplicabilidad tanto en el diseño de nuevas técnicas de diagnóstico como en el tratamiento de dichas parasitosis intestinales.

### Proyectos financiados en convocatorias públicas

- Helmintos de mamíferos silvestres en Andalucía.
- Seroprevalencia de enfermedades infecciosas de etiología viral, bacteriana y parasitaria en la provincia andina de Cajamarca (Perú).
- Aplicabilidad del modelo experimental *Echinostoma* – roedores al conocimiento proteómico de las helmintiasis intestinales.
- Técnicas de Proteómica aplicadas al sistema *Echinostoma*-roedor: un modelo experimental para el estudio de las helmintiasis intestinales.
- Contribución al conocimiento de las relaciones parásito-hospedador en helmintiasis intestinales: estudio de las interacciones moleculares en el sistema *Echinostoma*-roedor.

### Publicaciones

Las publicaciones a las que ha dado lugar los anteriores proyectos, desde el año 2000, se recogen como material suplementario en la publicación “on

line”. Seguidamente incluimos las aparecidas en los últimos dos años:

- Toledo, C. Monteagudo, A. Espert, B. Fried, J.G. Esteban and A. Marcilla, 2006. *Echinostoma caproni*: intestinal pathology in the golden hamster, a highly compatible host, and the Wistar rat, a less compatible host. *Experimental Parasitology*, 12:164-171.
- Toledo (R.) & Fried (B.), 2005. Echinostomes as experimental models in adult-vertebrate host interactions. *Trends in Parasitology*, 21: 251-254.
- Bernal (D.), Carpena (I.), Espert (A.M.), De la Rubia (J.E.), Esteban (J.G.), Toledo (R.) & Marcilla (A.), 2006. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. *Proteomics*, 6: 2835-2843.
- Toledo (R.), Carpena (I.), Espert (A.), Sotillo (J.), Muñoz-Antoli (C.) & Esteban (J.G.), 2006. A quantitative approach to the experimental transmission success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in rats. *Journal of Parasitology*, 92: 16-20.
- Muñoz-Antolí (C.), Trelis (M.), Toledo (R.) & Esteban (J.G.), 2006. Infectivity of *Echinostoma friedi* miracidia to different snail species under experimental conditions. *Journal of Helminthology*, 80: 323-325.
- Toledo (R.), Esteban (J.G.) & Fried (B.), 2006. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Advances in Parasitology*, 63: 285-365.

### Colaboraciones

- Dr. J. Fernando Bornay. Facultad de Medicina. Universidad Miguel Hernandez. Alicante.
- Dr. Rafal Igual Adell. Servicio de Microbiología. Hospital Francisco de Borja. Gandía. Valencia.
- Dr Bernard Fried. Lafayette College. Easton. Pensilvania. USA.

- Dr. Peter M. Brophy. School of Biological Sciences. University of Liverpool. Liverpool. UK.
- Dr. Carlos Carmona. Unidad de Biología Parasitaria. Instituto de Higiene. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
- Unidad de Genómica y Proteómica, Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

## Grupo de Proteómica. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

*Jesus M. Arizmendi, Asier Fullaondo, Kerman Aloria, Miren Josu Omaetxebarria, Mikel Azkargorta, Nerea Osinalde*

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco

### Componentes del grupo

Jesus M. Arizmendi, Profesor Asociado de Bioquímica y Biología Molecular; Asier Fullaondo, Profesor Asociado de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal; Kerman Aloria, Técnico Superior del Servicio General de Investigación de Genómica y Proteómica; Miren Josu Omaetxebarria, Investigadora post-doctoral; Mikel Azkargorta, Estudiante de doctorado; Nerea Osinalde, Estudiante de doctorado

### Historia del grupo

Nuestro grupo de investigación se creó en 2004 y promovió la creación de la Unidad de Proteómica del Servicio General de Investigación de Genómica y Proteómica de la Universidad. Desde entonces cumple una doble misión. Por una parte, se encarga del servicio mencionado, y por otra desarrolla diversos proyectos de investigación basados en metodología proteómica.

Como se ha mencionado anteriormente, además de ser los responsables del Servicio de Proteómica (integrado en Proteored), nuestro grupo desarrolla varios proyectos de investigación. Estos proyectos son de dos tipos. Por una parte, estamos involucrados en proyectos de investigación que tienen como objetivo el desarrollo de tecnología proteómica. Concretamente, participamos junto con el CIC bioGUNE en el proyecto HUPO de hígado y en otro de desarrollo de técnicas proteómicas de cuantificación y análisis de modificaciones post-traduccionales.

Por otro lado, participamos en un proyecto de investigación coordinado por la Dra. Ana M. Zubiaga que analiza de una forma multidisciplinar los factores de transcripción E2F en ratones. La

familia de factores de transcripción E2F consta de 8 miembros (E2F1-8) y desarrolla un papel fundamental en la regulación de la progresión a través del ciclo celular. Todos ellos poseen un alto grado de homología estructural y similitud en cuanto a la secuencia consenso que reconocen, pero presentan diferencias que les confieren características específicas tanto en la interacción con otras proteínas como en la función que desempeñan. Así, E2F1-3a han sido denominados E2F “activadores”, mientras que E2F3b-8 son considerados E2F “represores” debido a la función principal que desempeñan sobre sus genes diana. La función mejor conocida de los factores de transcripción E2F es la relacionada con el control del ciclo celular pero trabajos recientes también relacionan la actividad de miembros de esta familia con procesos tan diversos como la inducción a la apoptosis, morfogénesis, regulación metabólica o respuesta al daño del DNA. Nuestro grupo de investigación está comparando los perfiles de expresión proteica de linfocitos T de ratones salvajes con los de ratones deficientes en E2F2, habiendo comprobado la desregulación de genes relacionados con señalización mediada por TCR, supervivencia celular y respuesta a stress, explicando el fenotipo hiperproliferativo que presentan los ratones deficientes en E2F2. En este mismo proyecto, también estamos analizando las interacciones que E2F2 tiene con otras proteínas.

### Colaboraciones

- Dra. Ana Zubiaga. CIC bioGUNE
- Dr. Arturo Muga. UPV-EHU
- Dr. Ole N. Jensen. University of Southern Denmark
- Dr. Albert Heck. Utrech University.

## Publicaciones

- Omaetxebarria MJ, Elortza F, Hägglund P, Hooper N, Arizmendi JM, Jensen ON (2006) Characterization of GPI-anchored peptides by hydrophilic interaction (HILIC) and MALDI tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78, 3335-3341
- Azkargorta M, Arizmendi JM, Elortza F, Alkorta N, Zubiaga AM, Fullaondo A (2006) Differential protein profiles in E2F2-deficient T lymphocytes. *Proteomics* 6, S42-S50
- Fernández-Saiz V, Moro F, Arizmendi JM, Acebrón SP, Muga A (2006) Ionic contacts at DnaK substrate binding domain involved in allosteric regulation of lid dynamics. *J. Biol. Chem.* 281, 7479-7488
- Agirregabiria M, Blanco FJ, Berganzo J, Fullaondo A, Zubiaga AM, Mayora K, Ruano-López JM (2006) Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of proteins in microchannels made of SU-8 films. *Electrophoresis* 27, 3627-3634
- Kolkman A, Daran-Lapujade P, Fullaondo A, Olsthoorn MM, Pronk JT, Slipjer M, Heck AJ (2006) The effect of carbon and nitrogen limitation on the yeast proteome studied by metabolic stable isotope labeling and mass spectrometry. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0026
- Romijn EP, Christis C, Wieffer M, Gouw JW, Fullaondo A, van der Sluijs P, Braakman I, Heck AJ (2005) Expression clustering reveals detailed co-expression patterns of functionally related proteins during B cell differentiation: a proteomic study using a combination of one-dimensional gel electrophoresis, LC-MS/MS, and stable isotope labeling by amino acids. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1297-1310
- Agirregabiria M, Blanco FJ, Berganzo J, Arroyo MT, Fullaondo A, Mayora K, Ruano-López JM (2005) Fabrication of SU-8 multilayer microstructures based on successive CMOS compatible adhesive bonding and releasing steps. *Lab Chip* 5, 545-552

## Grupo de Bioanálisis. Universidad de Barcelona

*J. Barbosa*

Dpto. Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Barcelona

### Componentes del grupo

J. Barbosa, Catedrático de Universidad; V. Sanz-Nebot, Profesora Titular de Universidad; F. Benavente, Profesor Lector; E. Hernández, Becaria; E. Jiménez, Becaria; P. Moya, Becaria; M. Borges, Becaria; R. Palomares, Becaria.

### Historia del grupo

Los trabajos de nuestro grupo de investigación están enfocados al desarrollo y propuesta de métodos de purificación, separación, detección y caracterización de péptidos, proteínas y glicoproteínas de gran interés en campos como el farmacológico, biomédico, alimentario y biotecnológico. Se utilizan para ello las técnicas que ofrecen las mejores prestaciones, es decir: la cromatografía de líquidos (LC) y la electroforesis capilar (CE) acopladas a diferentes tipos de analizadores de masas (MS), como trampas iónicas (IT), tiempo de vuelo (TOF) o triplecuadrupolo (QQQ). A fin de purificar las muestras y aumentar la sensibilidad, se desarrollan métodos de preconcentración en línea con CE-ES-MS y LC-ES-MS, de extracción en fase sólida (SPE) y de inmunofinidad (IA), proyectando métodos tridimensionales por SPE-CE-ES-MS o IA-CE-ES-MS. Estas metodologías se aplican a series de sustancias de interés, en medios biológicos, tales como series de neuropéptidos, eritropoyetina (EPO), transferrina (Tr) o priones (PrP).

El grupo de Bioanálisis, encuadrado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona, desarrolla sus trabajos, desde hace más de dos décadas, inicialmente enfocados al desarrollo de métodos analíticos de sustancias de gran interés terapéutico en diferentes materiales biológicos, utilizando técnicas novedosas. Ello ha permitido que los egresados del grupo hayan sido absorbidos rápidamente por las empresas de nuestro

entorno, lo que a la larga puede favorecer el desarrollo por parte del grupo, de trabajos de transferencia del conocimiento en el entorno industrial. Las publicaciones realizadas han sido numerosas a lo largo de estos años, muchas de ellas sobre bioanálisis de sustancias de interés farmacológico y otras relacionadas con el diagnóstico de enfermedades. Las series de sustancias estudiadas han sido numerosas y en diferentes materiales biológicos.

### Objetivos científicos

Las investigaciones del grupo tienen como objetivos generales aplicar los estudios de preconcentración, cromatográficos, electroforéticos y de espectrometría de masas, desarrollados previamente, a la purificación, separación y caracterización de series de hormonas peptídicas y proteínas y de glicofomas proteicas de gran interés en muestras biológicas. Todo ello, aplicando técnicas que ofrecen buenas prestaciones en la actualidad como: MALDI-TOF, LC-ES-QQQ, CE-ES-TOF, CE-ES-IT, SPE-CE-ES-IT entre otras. Se proyecta así continuar los estudios, complejos pero de gran actualidad e interés en numerosos campos, sobre la preconcentración, separación y caracterización de glicofomas proteicas. La principal hipótesis de la que se parte es considerar la diferente glicosilación y en consecuencia el distinto perfil electroforético, que pueden presentar las glicoproteínas recombinantes y las endógenas, lo que se puede aprovechar para el control del dopaje de EPO, o bien las diferencias entre glicoproteínas normales o patológicas para el diagnóstico de enfermedades, como el síndrome de glicosilación deficiente, el alcoholismo o las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET). Los objetivos concretos pueden resumirse en:

- Bioanálisis de series de neuropéptidos y series de proteínas, de gran interés clínico, en sueros humanos. Aplicaciones al diagnóstico de enfermedades.

- Preconcentración, detección y caracterización de eritropoyetina (EPO) y de su análogo hiperglicosilado (NESP) en fluidos biológicos por ALC-IACE-ES-MS.
- Desarrollo de métodos de diagnóstico de glicosilación deficiente congénita y de alcoholismo.
- Desarrollo de metodologías de purificación, detección y caracterización de priones en materiales biológicos de ganado vacuno, utilizando técnicas acopladas ALC-IACE-ES-MS. Aplicaciones al diagnóstico de EETs.

### Proyectos financiados en convocatorias públicas

- Preconcentración, detección y caracterización de priones en materiales biológicos por cromatografía de líquidos y electroforesis capilar de afinidad acoplada a la espectrometría de masas.
- Purificación, separación, caracterización y secuenciación de isoformas y glicofomas de proteínas y glicoproteínas contenidas en materiales biológicos de gran interés farmacológico y biomédico.
- Detección y caracterización de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) y NESP en orina por electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masa con preconcentración en línea (IACE-MS).
- Sistema molecular totalmente automático para el estudio de proteínas o fracciones proteicas inhibitoras de la coagulación sanguínea. EUREKA.

### Publicaciones

- V. Sanz-Nebot, F. Benavente, I. Toro, J. Barbosa. Evaluation of Chromatographic vs. Electrophoretic Behavior of a Series of Therapeutical Peptide Hormones. *J. Chromatogr. A*, 985, 411-423 (2003).
- V. Sanz-Nebot, P. Gonzalez, I. Toro, A. Ribes, J. Barbosa. Characterization of Hu-

man Transferrin glycoforms by Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 798, 1-7 (2003).

- V. Sanz-Nebot, B. Andón, J. Barbosa. Characterization of Metallothionein Isoforms from Rabbit Liver by Liquid chromatography Coupled to Mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 796, 379-393 (2003).
- V. Sanz-Nebot, F. Benavente, A. Vallverdú, N.A. Guzmán, J. Barbosa. Separation of Recombinant Human Erythropoietin glycoforms by Capillary Electrophoresis Using Volatile Electrolytes. Assessment of Mass Spectrometry for the Characterization of EPO Glycoforms. *Anal. Chem*, 756, 5220-5229 (2003).
- V. Sanz-Nebot, F. Benavente, I. Toro, J. Barbosa. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Approach for the characterization and purification of grüne synthetic peptide hormones. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 377, 306-315 (2003).
- V. Sanz-Nebot, F. Benavente, I. Toro, J. Barbosa. Separation and characterization of complex crude mixtures produced in the synthesis of therapeutic peptide hormones by Liquid Chromatography coupled to Electrospray Mass Spectrometry (Lc-ES-MS). *Analítica Chimica Acta*, 521, 25-36 (2004).
- V. Sanz-Nebot, E. Balaguer, F. Benavente, J. Barbosa. Comparison of a Sheathless and Sheath Flow Electrospray Interfaces for the CE-ESI-MS of Analysis of Peptides. *Electrophoresis*, 26, 1457-1465 (2005).
- V. Sanz-Nebot, F. Benavente, E. Gimenez, J. Barbosa. Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser-Desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for analysis of the Novel Erythropoiesis Stimulating protein (NESP). *Electrophoresis*, 26, 1454-1456, (2005).
- F. Benavente, E. Balaguer, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. Modelling migration behavior of peptide hormones in capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1117, 94-102, (2006).

- Balaguer E, Demelbauer U, Pelzing M, Sanz-Nebot V, Barbosa J, Neuss C. Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis - electrospray - time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 27, 2638-2650 (2006).
- V. Sanz-Nebot, F. Benavente, E. Hernández, J. Barbosa. Evaluation of electrophoretic behaviour of opioid peptides. Separation by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 577, 68-76, (2006).
- V. Sanz-Nebot, B. Andón, J. Barbosa. Separation and Characterization of Rabbit Liver Apothioneins by CE-TOF-MS. *Electrophoresis*, 27, 3661-3670, (2006).

## Grupo de Biomarcadores Moleculares. Universidad de Vigo

*Francisco Javier Rodríguez Berrocal*

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología. Universidad de Vigo

### Componentes del grupo

Francisco Javier Rodríguez Berrocal, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular; María Páez de la Cadena Tortosa, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular; Vicenta Soledad Martínez Zorzano, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular; Ana María Rodríguez Piñeiro; Paula Álvarez Chaver, becaria; Mónica Martínez Fernández, becaria; Andrés García Lorenzo, estudiante de Tercer Ciclo; Sabela Búa Aguín, estudiante de Tercer Ciclo; Sonia Blanco Prieto, estudiante de Tercer Ciclo.

### Historia del grupo

Los miembros del equipo de investigación en Proteómica de la Universidad de Vigo trabajan en los laboratorios del Área de Bioquímica y Biología Molecular ubicados en la Facultad de Biología de dicha Universidad. Están integrados en un grupo más amplio que investiga desde el año 1994 en temas relacionados con Biomarcadores Moleculares, y cuyo principal objetivo es la obtención de nuevas pruebas de diagnóstico, de pronóstico y de seguimiento para distintos tipos de cáncer. Nuestros primeros estudios seguían un enfoque clásico evaluando el valor como marcadores de moléculas de las que ya se conocía o sospechaba su relación con los procesos tumorales. De este modo hemos investigado tanto glicoproteínas como monosacáridos mediante valoraciones enzimáticas, métodos electroforéticos e inmunológicos. Con este tipo de estudios comprobamos, por ejemplo, que algunas moléculas, como el CD26, tienen utilidad para el diagnóstico y el pronóstico en el cáncer colorrectal mientras que otras, como la alfa-L-fucosidasa, podrían ser utilizadas tanto en el pronóstico como durante el seguimiento postoperatorio de pacientes de cáncer de cabeza y cuello, permitiendo la detección de recidivas.

Sin embargo, es cada vez más evidente que la detección y el seguimiento de los procesos tumorales requieren no un único marcador, sino una combinación de varios. Ésta se considera la opción ideal en la actualidad, ya que la valoración de un conjunto de moléculas posibilita una mejora tanto de la sensibilidad como de la especificidad de una prueba. Las técnicas proteómicas, que incluyen varias tecnologías de separación de proteínas a gran escala, son adecuadas para este tipo de estudios, no sólo porque permiten la observación y comparación de miles de proteínas a la vez, sino porque permiten realizar los análisis sin un conocimiento *a priori* de las proteínas que finalmente van a presentar un potencial valor clínico. Esto incrementa las probabilidades de hallar nuevas moléculas, cuya relación con el cáncer no se hubiera demostrado previamente.

En la búsqueda de marcadores tumorales por comparación de mapas proteicos obtenidos mediante electroforesis bidimensional, nuestro grupo ha seguido distintas aproximaciones. Una de ellas consiste en la detección de proteínas que presenten diferencias en sus niveles de expresión (mayor o menor cantidad de proteína) entre individuos sanos y enfermos. Este tipo de estudios lo hemos llevado a cabo en pacientes de cáncer colorrectal, analizando tanto proteínas presentes en el suero como proteínas de membrana de los tumores de pacientes. En ambos casos hemos identificado numerosas proteínas cuya expresión se altera en relación con la patología, siendo la mayoría de ellas proteínas relacionadas con la proliferación celular, la apoptosis y la señalización celular, por lo que en principio todas ellas son candidatas a marcadores tumorales.

En relación a esta aplicación clínica de la proteómica, es evidente que la detección de proteínas alteradas en pacientes no garantiza su utilidad como marcadores tumorales, por lo que es preciso llevar a cabo su validación. Esto supone en la actualidad un cuello de botella en este tipo de estudios. Aunque actualmente existen numerosos trabajos en los que se identifican proteínas alteradas en distintas enfermedades, son muy escasos, por no decir

inexistentes, aquellos en los que se comprueba la utilidad de esas proteínas como marcadores de la enfermedad. Además, estas pruebas de validación se realizan en suero o plasma y muchas veces no confirman los resultados obtenidos en los estudios proteómicos. Pensamos que, en parte, esto se debe a la existencia de isoformas que corresponden a una misma proteína con diferentes modificaciones post-traduccionales. En nuestro laboratorio, de los potenciales marcadores tumorales identificados en los estudios anteriores, elegimos para su validación la proteína clusterina. Esta proteína presenta formas tisulares citoplasmáticas y nucleares, siendo también secretada a fluidos biológicos como el suero. El interés de esta proteína radica en su implicación en diversos procesos neoplásicos, ejerciendo funciones tanto pro- como antiapoptóticas. Por ello, y aprovechando las técnicas proteómicas disponibles, hemos estudiado las diversas isoformas séricas de la clusterina (Rodríguez-Piñeiro *et al.*, 2006), observando un complejísimo patrón en individuos sanos que difiere del que existe en suero de pacientes con cáncer colorrectal. Así, detectamos una expresión alterada de, al menos, 16 N-glicofomas y el aumento, exclusivamente en pacientes, de una forma de clusterina, constituida por al menos 5 isoformas, y probablemente con una glicosilación aberrante. Actualmente tratamos de identificar, separar y purificar las isoformas que estén alteradas por la enfermedad con el objetivo aún lejano de generar anticuerpos específicos para su detección.

Una segunda aproximación proteómica para la búsqueda de marcadores tumorales consiste en utilizar los propios mapas bidimensionales como herramienta diagnóstica. En este sentido hemos empleado, por un lado, pruebas estadísticas multivariantes aplicadas a los niveles de expresión proteica y, por otro, un método morfométrico-geométrico denominado análisis de deformaciones relativas, que permite la detección de cambios casi inapreciables en la posición de algunas proteínas en los mapas bidimensionales. Estos cambios son el reflejo de pequeñas variaciones en el punto isoelectrico y la masa molecular, que pueden ser debidas a modificaciones post-traduccionales aberrantes producto del proceso tumoral. Hemos comprobado que todas estas técnicas, aplicadas a los mapas bidimensionales, pueden servir como herramienta diagnóstica, puesto que permiten la discriminación entre individuos sanos y enfermos. Además, en el último caso, el método permite detectar la contribución de cada proteína a la distinción de los grupos, por lo que *a posteriori* pueden seleccionarse las proteínas

con mayor importancia y llevar a cabo su validación como marcador tumoral.

Finalmente, comentar que nuestro grupo colabora también con un grupo de Genética de la Universidad de Vigo aplicando técnicas proteómicas para realizar estudios de especiación en moluscos. En estos trabajos la mayor dificultad estriba en la práctica inexistencia de secuencias de estas especies en las bases de datos, lo que complica la identificación de proteínas, obligando en muchos casos a su secuenciación. Acostumbrados a trabajar con proteínas humanas, todavía sorprende el poco avance alcanzado en proteómica en relación con estos organismos marinos.

### Publicaciones y patentes

- Álvarez-Chaver, P., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Rodríguez-Berrocal, F.J., Martínez-Zorzano, V.S., Páez de la Cadena, M. (2007). Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (3): 529-540.
- Martínez-Fernández, M., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Oliveira, E., Páez de la Cadena, M., Rolán-Alvarez, E. The proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation (enviada).
- Páez de la Cadena Tortosa, M., Rodríguez Piñeiro, A.M., Carvajal Rodríguez, A., Rolán Alvarez, E., Rodríguez Berrocal, F.J., Martínez Fernández, M. (2005). "Procedimiento para la detección de estados patológicos en humanos mediante la realización de un análisis morfométrico-geométrico de deformaciones relativas en mapas proteicos." Código de la patente: ES200502984.
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Ayude, D., Rodríguez-Berrocal, F.J., Páez de la Cadena, M. (2004). Concanavalin A chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 803 (2): 337-343

- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Carvajal-Rodríguez, A., Rolán-Álvarez, E., Rodríguez-Berrocal, F.J., Martínez-Fernández, M., Páez de la Cadena, M. (2005). Application of relative warp analysis to the evaluation of two-dimensional gels in proteomics: studying isoelectric point and relative molecular mass variation. *Journal of Proteome Research*, 4 (4): 1318-1323
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Páez de la Cadena, M., López-Saco, A., Rodríguez-Berrocal, F.J. (2006). Differential expression of serum clusterin isoforms in colorectal cancer. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5 (9): 1647-1657.
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Rodríguez-Berrocal, F.J., Páez de la Cadena, M. (2007). Improvements in the search for potential biomarkers by proteomics: application of principal component and discriminant analyses for two-dimensional maps evaluation. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 849 (1-2): 251-260.

## Grupo de Proteómica. CIMA

*Fernando J. Corrales*

Unidad de Proteómica. Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA) y Universidad de Navarra. Pamplona.

### Componentes del grupo

Fernando J. Corrales. Profesor Asociado; María Isabel Mora. Técnica; Carmen Miqueo. Técnica; Sonia Beaumont. Técnica; Enrique Santamaría, Contratado postdoctoral; Joaquín Fernández, Contratado postdoctoral; Javier Muñoz, Contratado postdoctoral; Laura Sesma, Becaria; Virginia Sánchez, Becaria; Leticia Odriozola, Becaria.

### Historia del grupo

La Unidad de proteómica del CIMA es, por una parte, un servicio de apoyo a la investigación que facilita medios tecnológicos así como la formación de investigadores a través de la organización de cursos y seminarios. Sin embargo, siempre hemos entendido que es esencial mantener líneas de investigación activas que incentiven la incorporación de los nuevos avances tecnológicos y el desarrollo de métodos de análisis que se ajusten a las necesidades de la investigación biomédica actual. Con esta idea, hemos configurado un grupo homogéneo integrado por tecnólogos, responsables del mantenimiento y ejecución de las técnicas ya establecidas y científicos con diverso grado de experiencia que utilizan las nuevas aproximaciones tecnológicas en el desarrollo de sus proyectos. Una vez comprobada la eficacia y establecido un método de análisis fiable y reproducible, las nuevas técnicas se incorporan a la rutina del servicio.

En la actualidad, nuestro grupo está integrado por 3 técnicos, 3 becarios predoctorales y 3 postdoctorales. En la parte técnica, María Isabel Mora es la responsable de la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional, de la plataforma DIGE y del análisis de proteínas mediante huella peptídica (MALDI TOF). Carmen Miqueo se ocupa de la caracterización de proteínas y otras biomoléculas mediante nanoLC-ESI-MS/MS. Finalmente Sonia Beaumont se encarga de las técnicas de separación

basadas en HPLC, FPLC y rotofor. Todas ellas realizan una inestimable contribución al desarrollo de las líneas de investigación que a continuación se resumen. En cuanto a los proyectos de investigación, Laura Sesma con Virginia Sánchez son responsables de definir la actividad biológica de la prohibitina, proteína que participa en el control de procesos celulares esenciales como la proliferación y la apoptosis, así como las alteraciones con implicaciones en el desarrollo de enfermedades hepáticas. Laura es además la responsable de coordinar las actividades de nuestro laboratorio en relación con ProteoRed. Enrique Santamaría, Joaquín Fernández y Javier Muñoz han caracterizado el proteoma hepático de un modelo experimental de esteatohepatitis no alcohólica y hepatocarcinoma. La información obtenida se ha combinado con el análisis de muestras humanas para identificar potenciales biomarcadores tempranos tanto en tejido como en suero, y definir algunos de los mecanismos implicados en la progresión de estas enfermedades. Este proyecto sirvió además para poner a punto las técnicas de proteómica tradicionales. Joaquín ha caracterizado la actividad de la metiltioadenosina fosforilasa (proteína que se ha asociado al proceso de transformación y desdiferenciación de hepatocitos) y su regulación por radicales libres, tanto con la proteína purificada como en un modelo celular, definiendo los residuos de cisteína implicados en este proceso y el mecanismo molecular que implica la formación de intermediarios oxidados y el establecimiento de puentes disulfuro. Los estudios de espectrometría de masas destinados a identificar dichos puentes disulfuro se están realizando en colaboración con el laboratorio de proteómica del CIPF liderado por Manuel M. Sánchez del Pino. Javier ha caracterizado extensivamente la NDUFA10, una subunidad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial cuya deficiencia se ha implicado en la enfermedad de Parkinson, mediante la interpretación *de novo* de los espectros de fragmentación correspondientes a 130 especies peptídicas que son el resultado de diversas modificaciones. Enrique ha analizado la capacidad de diferentes técnicas para estudiar

fosfoproteomas y en la actualidad está aplicando el conocimiento generado en el estudio de las alteraciones inducidas por inhibidores del proteasoma en el patrón de fosfoproteínas de células hepáticas. Además Enrique está desarrollando un proyecto cuyo objetivo es caracterizar el mecanismo de acción de virus oncolíticos, de potencial utilidad en el tratamiento del hepatocarcinoma, mediante el estudio de las alteraciones a nivel de proteoma inducidas en hepatocitos primarios y líneas celulares hepáticas transformadas para así impulsar el desarrollo de nuevas generaciones de virus más efectivos y específicos. Leticia Odriozola, reciente incorporación a nuestro grupo, es actualmente la responsable de un trabajo cuyo objetivo es la identificación de marcadores de fibrosis hepática en suero y orina mediante la combinación de electroforesis bidimensional y cromatografía líquida con espectrometría de masas. Además en este proyecto estamos utilizando SELDI TOF en colaboración con el grupo del CNB liderado por Juan Pablo Albar. Finalmente es necesario destacar la labor de Angel Rubio, Víctor Segura y Elisabeth Guruceaga que se encargan del mantenimiento y desarrollo de los recursos bioinformáticos que son esenciales para el eficaz funcionamiento de la unidad.

### Colaboraciones

- Dr. Javier Corral. Universidad de Murcia.
- Dr. Antonio Rodríguez Ariza. Hospital Reina Sofía de Córdoba.
- Dra. Ana Patiño. Clínica Universitaria de Navarra.
- Dr. Pablo Ortiz. Digna Biotech.
- Dr. Rubén Hernández. CIMA

### Proyectos de investigación

- Caracterización funcional de la prohibitina. Implicación en el desarrollo de enfermedades hepáticas y hepatocarcinoma mediante técnicas de proteómica. Ministerio de Educación y Ciencia.
- Targeted herpes simplex virus (HSV-1)-derived oncolytic vectors to kill hepato-

cellular carcinomas (THOVLEN). STREP FP6-2004-LIFESCIHEALTH-5 018649.

- Biología de sistemas: desarrollo de software para la integración de datos derivados de análisis de expresión de genes y proteínas a escala genómica. PROFIT FIT-340000-2005-353.
- Financiación como grupo integrado en el Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed concedida por Genoma España.
- Aproximación proteómica para la determinación de dianas asociadas con el diagnóstico, la respuesta al tratamiento y el desarrollo de metástasis en el osteosarcoma infantil. Gobierno de Navarra.

### Publicaciones

- Lapaque (N.), Takeuchi (O.), Corrales (F.), Akira (S.), Morrión (I.), Howard (J.), & Gorvel (J.P.), 2006.- Differential inductions of TNF- $\alpha$  and I $\kappa$ B by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular Microbiology*. 8(3): 401-413.
- Santamaría (E.), Muñoz (J.), Fernández-Irigoyen (J.), Sesma (L.), Mora (M.), Berasain (C.), Lu (S.), Mato (J.), Prieto (J.), Avila (M.), and Corrales (F.), 2006.-Molecular profiling of hepatocellular carcinoma in mice with a chronic deficiency of hepatic S-adenosylmethionine. Relevance in human liver diseases. *Journal of Proteome Research*. 5(4):944-953.
- Moreno (B.), Hevia (H.), Santamaría (M.), Sepulcro (J.), Muñoz (J.), García-Trevijano (E.), Corrales (F.), Avila (M.), Villoslada (P.), 2006.- Methylthioadenosine suppresses T cell activation and reverse brain autoimmune disease. *Annals of Neurology*. 60(3):323-334.
- Lopez-Sanchez (L.), Collado (J.), Corrales (F.), Lopez-Cillero (P.), Montero (J.), Fraga (E.), Serrano (J.), De La Mata (M.), Muntane (J.), Rodriguez-Ariza (A.), 2007.- S-nitrosation of proteins during d-galactosamine-induced cell death in human hepatocytes. *Free Radic Res*. 41(1):50-61.

- Rubio (A.), Guruceaga (E.), Vázquez-Chantada (M.), Sandoval (J.), Martínez-Cruz (L.), Segura (V.), Sevilla (J.), Podhorski (P.), Corrales (F.), Torres (L.), Rodríguez (M.), Aillet (F.), Ariz (U.), Caballería (J.), Martín-Duce (A.), Lu (S.), Martínez-Chantar (M.), Mato (J.), 2007.- Gene-pathway identification associated with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*. 46(4):708-18
- Santamaría (E.), Muñoz (J.), Fernández-Irigoyen (J.) and Corrales (F.), 2007.- Towards the discovery of new biomarkers of hepatocellular carcinoma by proteomics. *Liver Internacional*. 163-173.

## Grupo de Biología del Linfocito. Universidad de Santiago de Compostela

Montserrat Nogueira Álvarez

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela.

### Componentes del grupo

Montserrat Nogueira Álvarez; Pilar Árias Crespo; Francisco J Salgado; Oscar Cordero Santamaría; Ana Canda-Sánchez; Amparo Pérez Díaz; Carla Varela.

### Historia del grupo

Nuestras investigaciones comenzaron con los trabajos sobre Protimosina  $\alpha$  (ProT  $\alpha$ ), un péptido muy ácido (50% de glutámico/aspártico). Su alto grado de conservación filogenética sugería un papel muy importante, describiéndose de hecho a lo largo de estos años funciones tanto intracelulares (división celular) como extracelulares muy dispares. Desde el principio nuestro grupo se centró en las funciones extracelulares, describiendo cómo ProT  $\alpha$  aumentaba la citotoxicidad de células NK o la proliferación y secreción de IL-2 en PBMC estimulados por PHA. Dentro del estudio de ProT  $\alpha$  resultaba también esencial la caracterización del receptor de superficie que daba cuenta de estas funciones extracelulares. Se diseñó un sistema de marcaje radioactivo ( $^{125}\text{I}$ ) para ProT  $\alpha$  que permitió identificar dos receptores específicos, uno de baja y otro de alta afinidad. Estos receptores eran regulados por el estado de la célula y se internalizaban tras su interacción con ProT  $\alpha$ . Experimentos posteriores nos permitieron estimar la masa molecular relativa de las proteínas de unión a ProT  $\alpha$  siendo ésta de 31, 29 y 19 kDa. Por otra parte, desde finales de los 90 se empezó a ver que muchas proteínas de señalización celular se encontraban asociadas en la superficie celular a microdominios (rafts lipídicos) de composición sensiblemente diferenciada de su entorno. Nos preguntamos si el receptor de ProT  $\alpha$  se encontraba también concentrado en estas regiones de membrana. Nuestros resultados indicaron, sin lugar a duda, una fuerte asociación con rafts lipídicos, la formación de agregados tras la unión a su ligando ("cap like structures") así como la participación activa de los

rafts en los procesos de transducción de señales. Esperamos, en breve, poder aportar más datos acerca de este receptor, de los componentes de la cascada de señalización intracelular así como de la estructura primaria de las proteínas que lo constituyen.

Aparte de ProT  $\alpha$ , CD26 es también objetivo de la investigación farmacéutica y básica. Ecto-peptidasa multifuncional presente en un amplio espectro de células, presenta un papel muy relevante en diabetes y artritis reumatoide, así como en progresión/agresividad tumoral y obesidad. Su expresión está regulada en linfocitos T se la ha relacionado con el control de la actividad de citoquinas y quimioquinas así como de rutas clave de adhesión y señalización vía integrinas o CD45, respectivamente. Nuestros estudios comenzaron en el año 1997, describiendo un espectacular incremento de CD26 y de su actividad dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en linfocitos T activados, especialmente T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, coestimulados con IL-12. A pesar de que en el año 1991 se había descrito coexpresión/interacción de CD26 y CD45R0 en células T de memoria en ese mismo artículo obtuvimos datos que indicaban que IL-12 tenía un efecto totalmente opuesto sobre la expresión de ambas moléculas, causando una disminución de la expresión de CD45R0. Este dato fue de notable importancia para investigaciones futuras. En el año 2000 también publicamos que el aumento de expresión de CD26 dependiente de IL-12 era debido a procesos postranscripcionales.

En 2003 demostramos que CD26 y CD45R0 estaban presentes tanto en fracciones raft como no-raft de células T en reposo y activadas, variando su presencia relativa de acuerdo con las condiciones de activación. Propusimos y demostramos entonces un modelo de interacción de tipo *cis* dependiente de IL-12, en el cual los mayores niveles de CD26 generados por la citoquina estaban regulando el desplazamiento de CD45R0 fuera de rafts y, con ello, la actividad fosfatasa de CD45. Además, comenzamos los trabajos con el receptor de IL-12 (IL-12R). IL-12R está formado por dos subunidades (IL-12R $\alpha$ 1 e IL-12R $\alpha$ 2) que carecen de actividad enzimática

intrínseca, por lo que la cascada de transducción de señales es a través de la vía Jak/STAT, en donde Jak2, Tyk2 y STAT4 son componentes esenciales. Por eso, y a raíz de los datos anteriormente comentados, nuestro grupo planteó una hipótesis en la cual la salida de CD45R0 (fosfatasa de tirosina) de zona raft tenía como objetivo su acercamiento a Tyk2, una quinasa Janus que interacciona con IL-12R $\beta$ 1 y que es sustrato de CD45. Tyk2 quedaría de esta forma defosforilada e inactivada. Todo ello relacionaría a CD26 con un mecanismo de «retroalimentación negativa» para desconectar la señalización desencadenada a través de IL-12R. Además, IL-12, como ocurre con otras citoquinas, podría también activar otras vías de señalización aparte de la clásica Jak/STAT, como las MAP quinasa Raf-Mek1-Erk1/2 o la familia Src, lo cual podría relacionarse con el enriquecimiento en rafts de ciertas moléculas de señalización o la inducción de proliferación celular en linfocitos T; estaba claro que para todo ello habría que investigar la topología de IL-12R  $\alpha$  1 e IL-12R  $\alpha$  2 en linfocitos T humanos.

Avanzando en esta línea, hemos demostrado recientemente que la IL-12 es capaz de inducir fosforilación y activación de la cascada de MAPK quinasa Raf-Mek1-Erk1/2 y que la activación de estas quinasa es dependiente de la integridad de las regiones raft de membrana plasmática. Estos resultados nos hicieron sospechar que alguna o las dos proteínas ( $\beta$ 1 $\beta$ 2) que conforman el receptor de IL-12, podrían estar en microdominios raft. De hecho, aparte de analizar mediante geles bidimensionales las especies proteicas de los rafts lipídicos y la influencia de IL-12 sobre esta composición, obtuvimos resultados que nos indicaban que, en ausencia de IL-12, IL-12R $\beta$ 2 se encontraba fundamentalmente en zona raft e IL-12R $\beta$ 1 en regiones no-raft, provocando la presencia de IL-12 una primera señal  $\beta$ 2-dependiente y un desplazamiento de IL-12R $\beta$ 2 a zonas no raft, en donde podría asociarse con IL-12R $\beta$ 1 y mediar una señal  $\beta$ 1 $\beta$ 2-dependiente. Todos estos resultados están recogidos en un trabajo pendiente de publicar (“Lipid rafts and how to regulate signalling via IL-12R through protein positioning on cell membrane.”).

Aparte de CD45R0, CD26 interacciona con otras proteínas en la superficie como adenosín deaminasa (ectoADA). Una serie de estudios de microscopía confocal fueron diseñados para revelar la posible relación entre IL-12 y otras citoquinas (IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ ) con la expresión, regulación y ubicación en la superficie celular de CD26, ecto-ADA y CD45R0. También estudiamos la influencia de CD26 en la vía

de transporte de ADA hacia la superficie celular. Fruto de estos estudios se descubrió que la presencia de ecto-ADA era independiente de la actividad del gen, que sus niveles estaban controlados por citoquinas, que ecto-ADA se unía sólo parcialmente a CD26 y que CD26 no formaba parte de la vía de secreción del ADA intracelular. Hipotetizamos, además, que ecto-ADA podía estar relacionado en diversos contactos célula-célula. Finalmente, a lo largo de estos años también publicamos diversos trabajos sobre CD26 soluble (sCD26) como biomarcador. En dos trabajos se estudió el valor potencial diagnóstico y pronóstico de CD26s en pacientes con carcinoma colorectal. El otro se corresponde con una colaboración con el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago que se sigue manteniendo hoy en día en la que estudiamos la presencia de IL-12, IL-15, CD26s y ADA en pacientes con artritis reumatoide. Como prolongación natural de estos estudios hemos puesto a punto un método de análisis de muestras de suero que permite eliminar con volúmenes de partida mayores de lo habitual albúmina e inmunoglobulinas totales. También se está comenzando a analizar, mediante geles bidimensionales, los sueros fraccionados de individuos sanos y de pacientes a los que se les ha diagnosticado recientemente una artritis reumatoide, a la búsqueda de un biomarcador temprano de esta enfermedad.

## Objetivos científicos

Como su propio nombre indica este grupo utiliza como modelo de trabajo los linfocitos T humanos y tiene actualmente dos grandes objetivos. El primero de ellos, encuadrado en lo que podríamos denominar investigación básica, es profundizar en el modelo de mosaico fluido de la membrana biológica, analizando los movimientos laterales de sus distintos componentes (especialmente proteínas y lípidos) así como su segregación en determinados microdominios (“rafts” o balsas lipídicas) en respuesta a estímulos mediados por el receptor de la célula T (TCR) o receptores de citoquinas y factores de crecimiento. Asimismo, este primer objetivo también engloba estudiar si esa segregación puede afectar a la señalización de esos receptores, potenciándola, inhibiéndola o modificando de algún modo su funcionalidad. Para ello investigamos mediante distintas técnicas proteómicas/interactómi-

cas y de inmunofluorescencia la dinámica de varias moléculas de la superficie del linfocito T (CD26, CD45, IL-12R, receptor de Protimosina  $\alpha$ ), así como la influencia de las asociaciones transitorias con otros receptores en los procesos de transducción de señales al interior celular. El segundo de los objetivos, en cambio, pertenece más al ámbito de la investigación aplicada, ya que pretende la búsqueda de biomarcadores séricos de detección temprana de artritis reumatoide mediante el uso de distintas estrategias proteómicas.

### Proyectos financiados en convocatorias públicas

- Estudio de la actividad citotóxica de linfocitos activados por IL-2.
- Una aproximación a los mecanismos de modulación de la inmunocapacitación de células T por hormonas tímicas
- Inmunoregulación por protimosina-alfa: mecanismo molecular de acción en células T y estudio preliminar en inmunoterapia adoptiva.
- Activación de la citotoxicidad endógena de células naturales asesinas (NK) humanas por la hormona tímica protimosina-alfa.
- Mecanismo molecular de activación de células naturales asesinas (NK) por protimosina alfa. Posibilidades terapéuticas.
- Receptor de protimosina alfa: caracterización estructural y biológica.
- Mecanismo molecular de protimosina alfa como modificador de la respuesta biológica.
- Detección de biomarcadores de artritis reumatoide mediante técnicas proteómicas.
- Proteínas que interaccionan con CD26 en la membrana plasmática: un estudio proteómico y funcional
- Red de Biotecnología aplicada al ámbito de las ciencias de la salud.
- Interacción de proteínas de membrana como nuevo mecanismo de control de receptores de citoquinas.

### Colaboraciones

- Dr. M.N. Jones, Reader of Biochemistry, Medical School, Manchester University.
- Dr. F. Bell, Professor of Immunology, School of Biological Sciences, Manchester University.
- Dr. A. Magee, Professor of Membrane Biology, Imperial College London, Section of Cell and Molecular Biology.
- Dr. R. Franco y Dra. C. Lluís, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona.
- Dr. F. Sánchez-Madrid, Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa, Madrid.
- Dr. J. Rodríguez-Berrocal y Dra. M. Paez de la Cadena, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Vigo.
- Dr. J. Viñuela y Dr. A. Mera-Varela, del Servicio de Inmunología y del Servicio de Reumatología respectivamente del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.
- Jaime Sancho. Instituto de Parasitología y Biomedicina. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Granada

### Publicaciones

Se recogen como material suplementario en la publicación "on line".

## Laboratorio de Señalización Intracelular. Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (Granada)

*Jaime Sancho López, Mercedes Zubiaur Marcos*

Departamento de Biología Celular e Inmunología. Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Granada

### Componentes del grupo

Jaime Sancho López, Investigador Científico del CSIC; Mercedes Zubiaur Marcos, Investigadora contratada Programa Ramón y Cajal; Pilar Muñoz Fernández, Becaria predoctoral; Esther J. Pavón Castellero, Becaria predoctoral; Esther Zumaquero Martínez, Becaria predoctoral.

- 2) Papel de CD38 en la regulación de los procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes.
- 3) Identificación de moléculas señalizadoras como dianas terapéuticas.
- 4) Desarrollo de modelos celulares y animales para el estudio de enfermedades autoinmunes e inflamatorias

### Objetivos científicos

La línea principal de investigación del laboratorio es el estudio de la transducción de señales y la identificación de moléculas señalizadoras como posibles dianas terapéuticas o biomarcadores de enfermedad, con especial énfasis en aquellas modificaciones postraduccionales que favorecen o impiden la transmisión de señales activadoras al interior de las células. Nuestro grupo tiene especial interés en utilizar las nuevas tecnologías proteómicas a estos estudios, en particular a la comprensión de las bases moleculares de enfermedades relacionadas con alteraciones en la señalización intracelular.

### Línea y sublíneas de investigación

#### Línea:

- Transducción de señales e identificación de biomarcadores en fluidos biológicos y células de pacientes con enfermedades autoinmunes u otras enfermedades.

#### Sublíneas:

- 1) Proteómica de sueros y células en enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

### Proyectos financiados en convocatorias públicas

- Relación funcional entre las señales de transducción mediadas por el receptor para el antígeno (complejo TCR/CD3) y CD38 en los linfocitos T que controlan la enfermedad inflamatoria del intestino.
- Papel de CD38 en la función de los linfocitos T que regulan procesos inflamatorios inducidos por infecciones y procesos tumorales.
- Identificación por técnicas de proteómica de los complejos señalizadores utilizados por los linfocitos T reguladores en las enfermedades autoinmunes.
- Papel de CD38 en la regulación de los procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes.
- Descubrimiento de biomarcadores de enfermedades autoinmunes.
- Compartimentación subcelular y enfermedad. Nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.
- Marcadores proteómicos de riesgo cardiovascular en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico.

## Colaboraciones

- Dr. Ángel Corbí, CIB-CSIC, Madrid.
- Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid.
- Dr. Norberto Ortego y Dr. José Luis Callejas, Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico, Granada.
- Dr. Javier Salmerón, Servicio de Digestivo, Hospital Clínico, Granada.
- Dr. Enrique Raya, Servicio de Reumatología, Hospital Clínico, Granada.
- Dr. Gabriel Herrero-Beaumont, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.
- Dr. Fabio Malavasi, Universidad de Turín, Turín.
- Dr. Cox Terhorst, Harvard Medical School, Boston.
- Dr. Bernard Malissen, Institute d'Immunologie, Marseille-Luminy.
- Dr. Wowa Maslinski, Institute of Rheumatology, Varsovia.
- Dr. Leopoldo Santos-Argumedo, CINVESTAV, México.
- Guirado, M., de Aós, I., Orta, T., Rivas, L., Terhorst, C., Zubiaur, M., and Sancho, J. 2002. Phosphorylation of the N-terminal and C-terminal CD3- $\epsilon$ -ITAM tyrosines is differentially regulated in T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 574-581. Publicado electrónicamente el 20 de febrero de 2002: doi:10.1006/bbrc.2002.6492.
- Howie, D., Simarro, M., Sayos, J., Guirado, M., Sancho, J., and Terhorst, C. 2002. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood.* 99, 957-965.
- Deaglio, S., Zubiaur, M., Gregorini, A., Bottarel, F., Ausiello, C.M., Dianzani, U., Sancho, J., and Malavasi, F. 2002. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood.* 99, 2490-2498.
- Muñoz, P., Navarro, M.C., Pavón, E.J., Salmerón, J., Malavasi, F., Sancho, J., and Zubiaur, M. 2003. CD38 Signaling in T Cells Is Initiated within a Subset of Membrane Rafts Containing Lck and the CD3- $\zeta$  Subunit of the T Cell Antigen Receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 50791-50802. Publicado electrónicamente el 30 de septiembre de 2003. doi: 10.1074/jbc.M308034200.
- Pavón, E.J., Muñoz, P., Navarro, M.C., Raya-Alvarez, E., Callejas-Rubio, J.L., Navarro-Pelayo, F., Ortego-Centeno, N., Sancho, J., and Zubiaur, M. 2006. Increased association of CD38 with lipid rafts in T cells from patients with systemic lupus erythematosus and in activated normal T cells. *Mol. Immunol.* 43, 1029-1039. doi:10.1016/j.molimm.2005.05.002.
- Pavón, E. J., Muñoz, P., Lario, A., Longobardo, V., Martin, A. B., Callejas-Rubio, J. L., Raya-Alvarez, E., Ortego-Centeno, N., Zubiaur, M., and Sancho, J. 2005. Mass spectrometric proteome analysis of plasma from patients with Systemic Lupus Erythematosus: Increased presence of haptoglobin  $\alpha 2$  polypeptide chains over the  $\alpha 1$  isoforms. *Proteomics.* 6, S282-S292. doi: 10.1002/pmic.20050404.

## Publicaciones

- Mallone, R., Funaro, A., Zubiaur, M., Baj, G., Ausiello, C., Tachetti, C., Sancho J., Grossi, C., and Malavasi, F. 2001. Signaling through CD38 induces Natural Killer (NK) cell activation. *Int. Immunol.* 13, 397-409.
- Zubiaur, M., Fernández, O., Ferrero, E., Salmerón J., Malavasi, F., Malissen, B., and Sancho, J. 2002. CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/PKB and Erk activation in the absence of the CD3- $\zeta$  immune receptor tyrosine-based activation motifs. *J. Biol. Chem.* 277, 13-22. Publicado *on line* el 31 de octubre de 2001. doi:10.1074/jbc.M107474200.

- Caparrós, E., Muñoz, P., Sierra-Filardi, E., Serrano-Gómez, D., Puig-Kröger, A., Rodríguez-Fernández, J.L., Mellado, M., Sancho, J., Zubiaur, M., and Corbi, A.L. 2006. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 107(10):3950-3958. doi: 10.1182/blood-2005-03-1252.
- Guirado, M., de Aós, I., Orta, T., Zheng, D., Rivas, L., Terhorst, C., Zubiaur, M., Sancho, J. 2001. Signaling capacity of the T cell receptor is positively regulated by the binding of Lck to the N-terminal tyrosine of the CD3-ε ITAM. En: *Proceedings of the 14th European Immunology Meeting EFIS2000*. Ed: Mackiewicz, A., Kurpisz, M., Zeromski, J. Monduzzi Editore, Bologna, Italia. pp. 693-699.
- Zubiaur, M., Guirado M., Terhorst, C., Malavasi, F., and Sancho, J. 2001. Role of the CD3-γδε transducing module in CD38-mediated signaling in Jurkat T cells. En: *Proceedings of the 14th European Immunology Meeting EFIS2000*. Ed: Mackiewicz, A., Kurpisz, M., Zeromski, J. Monduzzi Editore, Bologna, Italia. pp. 685-691.
- Guirado M., de Aós, I., Muñoz, C., Terhorst, C., Zubiaur, M., Sancho, J. 2002. Insights into T cell antigen receptor (TCR) signaling: CD3-ε is more than a signal amplifier. *Inmunología*. 21, 92-101.

- 3) Técnicas de aislamiento y caracterización de proteínas: inmunoprecipitaciones, técnicas de Western-blot, ensayos *in vitro* de actividad cinasa, *arrays* de proteínas.
- 4) Sistemas de reconstitución *in vivo* en células COS o linfocitos T
- 5) Expresión de proteínas de fusión en bacterias, sistema de los dos híbridos, sistemas de genes reporteros y animales transgénicos.
- 6) Microscopía confocal y de célula viva para determinar la localización de proteínas señalizadoras en linfocitos T polarizados.

### Tesis doctorales (desde el año 2001)

- Título: Implicaciones funcionales de la asociación de proteínas que contienen dominios SH2 con un motivo de activación presente en la subunidad CD3-ε del receptor para el antígeno de los linfocitos T.  
 Doctorando: María Guirado Torres. Calificación: Sobresaliente “Cum Laude” por unanimidad.
- Título: Mecanismos de transmisión de señales por receptores de activación de linfocitos T.  
 Doctorando: Teresa Orta García. Calificación: Sobresaliente “Cum Laude” por unanimidad.
- Título: CD38: Una proteína involucrada en ontogenia, activación, funciones efectoras y memoria de linfocitos T murinos.  
 Doctorando: Claudia Sandoval. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México. Clasificación: Sobresaliente “Cum Laude” por unanimidad.

### Técnicas

- 1) Geles bidimensionales e identificación de proteínas por MALDI-TOFF.
- 2) Cultivo de líneas celulares y producción de anticuerpos monoclonales.

## Grupo de Proteómica. Universidad CEU San Pablo. Madrid

*Carmen Pérez García*

Facultad de Farmacia. Universidad CEU San Pablo. Madrid

### Componentes

Carmen Pérez García; Luís Fernando Alguacil Merino; Elisa Garrido Pérez; Carmen del Castillo Aguado

### Historia del grupo

El grupo de Proteómica de la Universidad San Pablo CEU comenzó a funcionar a mediados del 2004, tras una estancia de Carmen Pérez García en el laboratorio del Dr. Desiderio (Univ. Tennessee, USA) con el fin de familiarizarse con la electroforesis 2D y la Espectrometría de Masas. Sin embargo, hasta principios de 2006, y gracias a la concesión de un proyecto del Ministerio de Sanidad, no se ha podido contar con el equipamiento y el personal necesario.

### Objetivos científicos

- Estudiar las variaciones del proteoma relacionadas con el abuso de drogas.
- Proyectos financiados en convocatorias públicas.
- Investigación de las bases biológicas de las conductas adictivas mediante estudios de expresión diferencial de genes y proteínas (FIS 05/2503).

### Publicaciones más recientes

- Garrido E, Pérez-García C, Alguacil LF, Díez-Fernández C. "The  $\alpha$ -2-adrenoceptor antagonist yohimbine reduces glial fibrillary acidic protein upregulation induced by chronic morphine administration" *Neuroscience Letters* 383: 141-144 (2005).

- Alguacil LF, Pérez-García C, Bocos C y Toda S. "Contribución de las nuevas técnicas genómicas y proteómicas al estudio de la patogenia de las enfermedades mentales y al desarrollo de la psicofarmacología" En: *Historia de la Neuropsicofarmacología* (2ª Edición) Tomo III. López-Muñoz, F y Alamo, C (eds) Panamericana. Madrid 2006, pp: 1707-1747.
- Alonso E, Garrido E, Díez-Fernández C, Pérez García C, Herradón G, Ezquerro L, Deuel T y Alguacil LF. "Yohimbine prevents morphine-induced changes of glial fibrillary acidic protein in brainstem and  $\alpha$ 2-adrenoceptor gene expression in hippocampus". *Neurosci. Letters* 163: 147- 150 (2007).

### Congresos

- Castillo C., Garrido E., Alguacil, LF., Morales L., Alonso E., Salas E. y Pérez-García C. "Proteomic analysis of the nucleus accumbens of rats with different vulnerability to cocaine addiction." *Joint Congress of the Spanish Proteomics Society and the European Proteomics Association. Valencia, Febrero, 2007.*

### Equipamiento

- PROTEAN IEF System (Bio-Rad)
- PROTEAN Plus Dodeca Cell (Bio-Rad)
- PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad)
- Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)
- Dodeca Stainer (Bio-Rad)
- Densitómetro GS-800 (Bio-Rad)
- Software PD Quest (Bio-Rad)

## Laboratorio de Proteínica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.

Juanjo Calvete

Instituto de Biomedicina de Valencia. CSIC

### Componentes del grupo

Juanjo Calvete, Profesor de Investigación CSIC; Libia Sanz, Investigadora contratada; Paula Juárez, Postdoctoral contratada; Pedro Cid, Becario FPII; Alicia Pérez, Ayudante de Investigación CSIC; José Escolano, Ayudante FPII contratado; Alejandro Botella, FPII en prácticas

### Historia del grupo

El laboratorio de Proteínica Estructural se estableció hace casi una década cuando el Instituto de Biomedicina de Valencia comenzó a funcionar en 1998. Con anterioridad, el Investigador Principal había desarrollado su carrera investigadora en el campo de la Química de Proteínas (caracterización de la integrina plaquetaria  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) en Madrid (Instituto de Química-Física "Rocasolano", CSIC, Tesis Doctoral, 1981-1985), Toronto (Banting Institute, 1987), Max-Planck de Bioquímica (Martinsried, 1988-1992), y Hanover (Facultad de Veterinaria, 1993-1998; proteínas del plasma seminal de mamíferos que participan en la fecundación). La trayectoria investigadora del Investigador Principal puede resumirse en la frase de Francis Crick "*If you want to study function, study structure*", filosofía que sigue siendo esencialmente válida en los proyectos que el laboratorio de Proteínica Estructural lleva a cabo en la actualidad. Entendemos que la Química es el lenguaje de la Biología y que para comprender su gramática es necesario un abordaje multidisciplinar. Así pues, estudiamos cuestiones relativas a los mecanismos de la diversificación estructural, funcional y evolutiva de proteínas mediante las técnicas clásicas (aislamiento de proteínas, secuenciación de Edman) y modernas (espectrometría de masas) de la Química de Proteínas, los métodos biofísicos de determinación de estructuras proteicas (difracción de rayos X y RMN), y -cada vez con más intensidad-

los protocolos de la Biología Molecular (clonaje y expresión de proteínas recombinantes; caracterización de la estructura génica). Para diferenciar nuestro interés en estudiar detalladamente correlaciones estructura-función de proteínas de la corriente que aplica técnicas proteómicas para estudiar a gran escala de los componentes de los sistemas biológicos, hemos acuñado el término "Proteinómica": el estudio detallado de proteínas utilizando técnicas proteómicas, moleculares y estructurales. Actualmente estamos aplicando la proteinómica en la determinación de enlaces disulfuro y su impacto estructural y funcional en diversas proteínas, así como para dilucidar la evolución de la estructura y la función de las disintegrinas, un grupo de proteínas presentes en venenos de víboras y serpientes de cascabel que antagonizan la función de receptores de la familia de las integrinas. Además, hemos desarrollado protocolos para investigar la composición proteica de venenos de serpientes. La estrategia, denominada "snake venomics" incluye la separación por HPLC de fase reversa de las toxinas, la determinación de la secuencia N-terminal, masa y número de cisteínas (SH y SS) de fracciones proteicas puras y, para aquellas fracciones que contienen mezclas de proteínas, la caracterización mediante SDS-PAGE seguido de digestión triptica de las bandas proteicas y secuenciación *de novo* de los iones peptídicos (MS/MS). Para ello contamos con una unidad de proteómica compuesta por un sistema de cromatografía HPLC ETTAN (Amersham Biosciences), un secuenciador automático N-terminal Procise 492 (Applied Biosystems), un digestor automático de proteínas ProGest (Genomic Solutions), y espectrómetros de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro y ESI-MS/MS QTrap 2000 (ambos de Applied Biosystems). La venómica es un campo de investigación reciente, en parte debido a que el hecho de no disponer de ninguna base genómica de ningún reptil hace inviable la automatización de las identificaciones de proteínas. Quizás por ello, una búsqueda en PubMed utilizando "snake venomics" muestre sólo 3 trabajos,

todos ellos de nuestro laboratorio. No obstante, los estudios venómicos son relevantes para investigar la evolución de los venenos, descubrir nuevas toxinas de potencial interés biomédico, o para definir el conjunto mínimo de epítomos que un ideal suero anti-ofídico debiera bloquear para neutralizar la acción del veneno. A este respecto, el Laboratorio de Proteínica Estructural forma parte de una red temática CYTED, cuyo objetivo es el desarrollo de antivenenos más potentes y específicos frente a serpientes de Iberoamérica. A este respecto, el Laboratorio de Proteínica Estructural forma parte de una red temática CYTED (206PI0281, 2007-2010), cuyo objetivo es el desarrollo de antivenenos más potentes y específicos frente a serpientes de Iberoamérica, y tiene vínculos con el Instituto Clodomiro Picado, San José (CR) (Acciones Integradas CSIC-Universidad de Costa Rica: 2006CR0010 Caracterización proteómica de venenos de serpientes de relevancia médica en Centroamérica). Mantenemos también colaboraciones en el ámbito de la venómica con los investigadores estadounidenses Czarek Marcinkiewicz (Temple University, Philadelphia), H. Lisle Gibbs (Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, Ohio State University) y Steve P. Mackessy (School of Biological Sciences, University of Northern Colorado).

El laboratorio de Proteínica Estructural no participa en la red de servicios ProteoRed ni ofrece otro tipo de servicio, ni interno ni externo. Sin embargo, y aunque con nuestros propios proyectos estamos como la humedad de Valencia en un día de poniente, ¡saturados!, siempre hemos hecho un hueco a colaboraciones que nos reporten diversión en la ejecución y el rédito científico que representa llevar a cabo proyectos que requieren de un abordaje proteínico no convencional ni automatizado.

### Proyectos financiados en convocatorias públicas

- Venómica: Proteínica Estructural y Funcional de Disintegrinas y de otras Proteínas de Interés Biomédico.
- Enfoque “top-down” aplicado a la venómica.
- Evolución de la familia de las disintegrinas y evaluación del uso de la disintegrina jerdostatina para la visualización *in vivo* de angiogénesis dependiente de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ .

### Publicaciones

- Pérez-Sánchez G, Gasset M, Calvete JJ, Pajares MA (2003) Role of an intrasubunit disulfide in the association state of the cytosolic homo-oligomer methionine adenosyltransferase. *J Biol Chem* 278: 7285-7293.
- Calvete JJ, Revert F, Blanco M, Cervera J, Tárrega C, Sanz L, Revert-Ros F, Granero F, Pérez-Payá E, Hudson BG, Saus J. (2006) Conformational diversity of the Goodpasture antigen, the noncollagenous-1 domain of the  $\alpha_3$  chain of collagen IV. *Proteomics* 6: S237-S244.
- Arolas JL, Bronsoms S, Ventura S, Avilés FX, Calvete JJ (2006) Characterizing the tick carboxypeptidase inhibitor: Molecular basis for its two-domain nature. *J Biol Chem* 281: 22906-22916.
- Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, Sanz L (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45: 1063-1074.
- Calvete JJ (2005) Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Curr Pharm Des* 11: 829-835.
- Calvete JJ, Juárez P, Sanz L (2007) Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom* (en prensa).

### Tesis Doctorales defendidas

- 2003: M<sup>a</sup> Paz Moreno Murciano, *Estudios estructurales de disintegrinas de venenos de serpientes*.
- 2006: Francisca Gallego del Sol, *Estudios estructurales de lectinas vegetales*.
- 2007: Paula Juárez Gómez, *Venómica. Mecanismos moleculares y evolutivos de la diversificación estructural de la familia de las disintegrinas*.
- 2007: Celso Shiniti Nagano, *Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y vegetales superiores*.

## Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC, Madrid

Jesús Vázquez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC, Madrid

### Composición del grupo

Jesús Vázquez; Inmaculada Jorge; Horacio Serrano; Pedro J. Navarro; Pablo Martínez-Acedo; Daniel Pérez-Hernández; Estefanía Núñez.

### Historia del grupo

Esta línea de investigación, dirigida por el Dr. Jesús Vázquez, fue creada en 1994 en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. El perfil tecnológico del grupo ha pivotado, desde su creación, alrededor de técnicas de química de proteínas, espectrometría de masas, proteómica y bioinformática.

Por este laboratorio han pasado numerosos investigadores jóvenes que se han formado en este campo, entre ellos Anabel Marina, Samuel Ogueta, Mónica Campillos, Margarita Villar, Daniel López-Ferrer, Salvador Martínez-Bartolomé, Mónica Carrera, Alberto Monteagudo, Alberto Jorge, Mercedes del Valle y Fernando Martín-Maroto.

Los primeros trabajos de nuestro grupo utilizaron técnicas de química de proteínas orientados al estudio de los factores reguladores de la expresión del promotor del gen *APOE* en relación con la enfermedad de Alzheimer. También hemos aplicado técnicas de Proteómica a la identificación sistemática de factores de transcripción que interaccionan con regiones de DNA, y hemos colaborado en varios proyectos relacionados con el uso de péptidos con acción fisiológica, y la caracterización de proteínas mediante técnicas clásicas.

Posteriormente el grupo se ha ido especializando en el estudio de péptidos y proteínas de interés biomédico mediante técnicas de Proteómica desarrolladas en el laboratorio. Se han aplicado las técnicas de caracterización sistemática de péptidos mediante espectrometría de masas tipo nanospray-trampa iónica e

interpretación manual de espectros de fragmentación y secuenciación *de novo* al estudio de los repertorios peptídicos presentados por moléculas MHC del tipo I y del tipo II, empleando técnicas de fragmentación múltiple de nuevo desarrollo. En otros trabajos, hemos utilizado las técnicas de mapeo peptídico mediante MALDI-TOF, en combinación sinérgica con las técnicas de fragmentación de péptidos mediante nESI-IT, para llevar a cabo proyectos de Proteómica de Mapa Celular, orientados a la identificación de antígenos de superficie, inhibidores de quinasas, activadores de células B, proteínas implicadas en la señalización celular vía receptores de adhesión leucocitaria y receptores de quimioquinas, y, como se ha descrito anteriormente, factores de transcripción y moduladores de factores de transcripción.

La caracterización de modificaciones postraduccionales y la identificación de aminoácidos implicados en funciones fisiológicas es una de las líneas en las que hemos puesto mayor interés. En este campo hemos demostrado que el MHC I puede presentar péptidos dimetilados procedentes de proteínas nucleares así como péptidos modificados en el extremo N-terminal, hemos caracterizado varios sitios de fosforilación fisiológicamente activos en factores de transcripción y en proteínas asociadas a microtúbulos, una glutationilación que modula el efecto transactivador de NF- $\kappa$ B en función del estado redox celular, y una S-nitrosilación en la proteína Hsp90 que regula su actividad ATPasa e inhibidora de la eNO sintasa.

Nuestro laboratorio ha aplicado las técnicas de la Proteómica en campos de la Biotecnología que, como ocurre en tecnología de alimentos, requieren el estudio de especies no representadas en las bases de datos. Hemos demostrado la utilidad de las técnicas de fragmentación múltiple e interpretación de espectros de fragmentación en el estudio de especies marinas de alto interés biotecnológico e industrial, y hemos desarrollado un nuevo método para la identificación rápida de péptidos específicos de especie, de aplicabilidad general.

Recientemente, en el laboratorio hemos desarrollado técnicas novedosas para la digestión ultrarrápida de proteomas, hemos implementado técnicas de cromatografía bidimensional e identificación a escala masiva de péptidos mediante fragmentación, y hemos desarrollado algoritmos matemáticos para determinar la probabilidad y la tasa de error de las identificaciones. Finalmente, el grupo ha desarrollado técnicas de marcaje enzimático mediante isótopos estables (usando  $H_2O^{18}$ ), para llevar a cabo cambios dinámicos en la expresión de proteínas a nivel de proteomas.

El laboratorio también posee experiencia previa en el desarrollo de modelos matemáticos para explicar procesos físicos, interacciones y procesos biológicos. Asimismo el grupo posee experiencia en el desarrollo de software para explotación comercial (software de secuenciación de novo de péptidos "DeNovoX 1.0" por la empresa Thermo Finnigan).

## Objetivos científicos

En la actualidad los intereses científicos del grupo se centran principalmente en el análisis de los mecanismos moleculares que regulan la inducción génica durante la activación del endotelio cardiovascular, en colaboración con los Profs. Juan Miguel Redondo (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid) y Santiago Lamas (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). Estamos estudiando la regulación mediante fosforilación de la actividad de la familia de factores de transcripción NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), que regula la transcripción de genes de citoquinas implicados en la regulación y funcionalidad del sistema inmune, así como la respuesta angiogénica del endotelio vascular a la estimulación con VEGF mediante análisis proteómicos a gran escala utilizando técnicas de dilución isotópica estable. También estamos abordando la caracterización proteómica de modificaciones postraduccionales mediadas por estrés nitrosativo en endotelio.

El grupo también participa en proyectos orientados a la identificación de interacciones moleculares de receptores de adhesión y quimioatracción con proteínas reguladoras y del citoesqueleto, relevantes en la respuesta inflamatoria, en colaboración con el grupo del Prof. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid) y en el análisis proteómico

del mecanismo de acondicionamiento isquémico en membrana mitocondrial de miocitos, en colaboración con el Prof. David García-Dorado (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona), entre otros.

En paralelo el grupo continúa una intensa actividad de desarrollo de tecnologías innovadoras necesarias para abordar estos proyectos, incluyendo algoritmos para identificación y cuantificación a gran escala de proteomas y caracterización de modificaciones postraduccionales.

## Proyectos financiados en convocatorias públicas

La actividad investigadora del grupo se ha financiado desde 1994 y de forma ininterrumpida mediante proyectos de investigación concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia y la Comunidad Autónoma de Madrid. El grupo ha disfrutado además de otras ayudas públicas y de empresas privadas y es miembro de la Red de Investigación Cardiovascular (RECAVA). Desde su creación el grupo ha participado en un total de 15 proyectos de investigación.

## Publicaciones

(Últimos cuatro años)

- C. Piñeiro, J. Barrops-Velázquez, J. Vázquez, A. Figueras and J.M. Gallardo. Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. *J. Proteome Res.* 2, 127-135 (2003)
- A. Haro, M. Vélez, E. Goormaghtigh, S. Lago, J. Vázquez, D. Andreu, and M. Gasset. Reconstitution of holin activity with a synthetic peptide containing the 1-32 sequence region of EJH. *J. Biol. Chem.* 278, 3929-3936 (2003)
- M. Campillos, M.A. García, F. Valdivieso and J. Vázquez. Transcriptional activation by AP-2 is modulated by the oncogene DEK. *Nuc. Acid. Res.* 31, 1571-1575 (2003)
- M. Campillos, J.R. Lamas, M.A. García, M.J. Bullido, F. Valdivieso and J. Vázquez. Specific interaction of heterogeneous nucle-

- ar ribonucleoprotein A1 with the -219T allelic form modulates APOE promoter activity. *Nuc. Acid. Res.* 31, 3063-3070 (2003)
- J. Yagüe, A. Paradela, M. Ramos, S. Ogueta, A. Marina, F. Barahona, J.A. López de Castro and J. Vázquez. Peptide rearrangement during during quadrupole ion trap fragmentation: increased complexity in MS/MS spectra. *Analytical Chemistry* 75, 1524-1535 (2003)
  - D. López-Ferrer, S. Martínez-Bartolomé, M.Villar, M. Campillos, F. Martín-Maroto and J. Vázquez. Statistical model for large-scale peptide identification in databases from tandem mass spectra using SEQUEST. *Analytical Chemistry* 76, 6853-6860 (2004)
  - G. Díaz, B. Cañas, J.Vázquez, C.Nombela and J.Arroyo. Characterization of natural peptide ligands from HLA-DP2: new insights into HLA-DP peptide binding motifs *Immunogenetics* 56, 754-759 (2005)
  - Ortega, E.Cano, F.Were, M.Villar, J.Vázquez and J.M. Redondo. c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J.Biol.Chem.* 280, 20867-20878 (2005)
  - A. Martínez-Ruiz, L.Villanueva, C. González de Orduña, D. López-Ferrer, J. Vázquez, S. Lamas. S-Nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and eNOS regulatory activities. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 102, 8525-8530 (2005)
  - D. López-Ferrer, J. L. Capelo and J. Vázquez. Ultrafast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *J. Proteome Res.* 4, 1569-1574 (2005)
  - D. López-Ferrer, A. Ramos-Fernández, S. Martínez-Bartolomé, P. García-Ruiz and J. Vázquez. Quantitative proteomics using <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 4, S4-S11 (2006)
  - M. Villar, I. Ortega-Pérez, F. Were, E. Cano, J.M. Redondo and J. Vázquez. Systematic characterization of phosphorylation sites in NFATc2 by linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 4, S16-S27 (2006)
  - J.R. Hernández Fernaud J.R., A. Marina A., K. González K., J.Vázquez. and Falcón M. A.. Production, partial characterization and spectroscopic study of the extracellular lactase activity from *Fusarium proliferatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 70, 212-221 (2006)
  - S. Martínez-Martínez, A.Rodríguez, M. D. López, J.Vázquez and J.M.Redondo. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin-binding site. *J.Biol.Chem.* 281, 6227-6235 (2006)
  - M. Carrera, B. Cañas, C. Piñeiro, J. Vázquez, J. M.Gallardo. Identification of commercial hake and grenadier species by proteomic analysis of the parvalbumin fraction 2. *Proteomics* 6, 5278-5287 (2006)
  - D. López-Ferrer, B. Cañas, J. Vázquez, C. Lodeiro, R. Rial-Otero I. Moura and J. L. Capelo. Trends in sample Treatment for Protein Identification by Mass Spectrometry-Based Techniques. *Trends Anal.Chem.* 25, 996-1005 (2006)
  - V. Naranjo, M. Villar, M.P. Martín-Hernando, D. Vidal, U. Höfle, C. Gortazar, K.M. Kocan, J.Vázquez, J.de la Fuente. Proteomic and transcriptomic analyses of differential stress/inflammatory responses in mandibular lymph nodes and oropharyngeal tonsils of European wild boars naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Proteomics* 7, 220-231 (2007)
  - A. Ramos-Fernández, D. López-Ferrer, and J. Vázquez. Improved method for differential expression Proteomics using trypsin-catalyzed <sup>18</sup>O labeling with a correction for labeling efficiency. *Mol. Cell Proteomics* (2007, en prensa)
  - S. Martínez Bartolomé, F. Martín-Maroto, D. López-Ferrer, M. Villar, A. Ramos-Fernández, J.P. García-Ruiz, and J Vázquez. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. En revisión

## Bioquímica Vegetal y Agrícola-Proteómica Vegetal. Universidad de Córdoba

Jesús V. Jorrín Novo, Ana M. Maldonado Alconada

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba

### Componentes del grupo

Jesús V. Jorrín Novo, Profesor Titular de Universidad; Ana M. Maldonado Alconada, Contratada del Programa de Retorno Junta Andalucía; Esther Pérez Pérez, Contratada postdoctoral; Miguel Curto Ruiz, Estudiante de Doctorado; Sira Echevarría Zomeño, Estudiante de Doctorado; José Valero Galván, Estudiante de Doctorado; Anabel Pozo, Técnico de Laboratorio; Sylvia Jean Baptiste, Estudiante de último curso de Ingeniero Agrónomo.

### Historia del Grupo

En el año 2003, y dentro del Grupo de Investigación Bioquímica Vegetal y Agrícola (Universidad de Córdoba, PAI: AGR-164), el Dr. Jorrín inició una línea de investigación sobre proteómica vegetal, estando ésta vinculada a un proyecto recién iniciado. No fue un salto en el vacío, ya que entroncaba con su perfil, experiencia y actividad investigadora en el campo del estudio y purificación de proteínas vegetales, objetivo central de su Tesis Doctoral. Durante su estancia postdoctoral en la "Samuel Roberts Noble Foundation" (Ardmore, Oklahoma, USA) puso a punto y aplicó la técnica de electroforesis bidimensional en el estudio y caracterización de la síntesis *de novo* de proteínas, y más concretamente de isoformas de la fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), utilizando como sistema experimental modelo suspensiones celulares de alfalfa. La historia entre los años 1990 y 2003, cuando iniciamos nuestros primeros experimentos en proteómica, es bien conocida y común, con unas pocas excepciones, para todos los que hoy en día utilizamos esta herramienta: la secuenciación de genomas, el desarrollo de técnicas de espectrometría para el análisis de péptidos y de la bioinformática.

Nuestro grupo de proteómica vegetal está, hoy en día, consolidado, siendo uno de los referentes

en este campo tanto a nivel nacional como internacional. A ello ha contribuido, en cierta medida, nuestra labor en pos de la proteómica española, con la organización del congreso "Seminars in Proteomics UCO-2003" (el primero celebrado en España), la puesta en marcha de la Sociedad Española de Proteómica (SEProt) y la organización de su primer congreso ("I Congreso de la Sociedad española de Proteómica, Universidad de Córdoba, febrero 2005). Los logros del grupo tienen tras de sí el esfuerzo y trabajo de, fundamentalmente, las Dras. Ana M. Maldonado y M<sup>a</sup> A. Castillejo (actualmente contratada en la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba). La Dra. Maldonado se incorporó al grupo en el año 2004 tras realizar una estancia postdoctoral en el laboratorio del Prof. Chris Lamb en centros de reconocido prestigio tales como el Salk Institute (La Jolla, USA) y John Innes Centre (Norwich, UK). Posee una amplia experiencia en el campo de la biología molecular vegetal, y más concretamente en el de la interacción planta-patógeno. Otras personas, como es el caso de la Dra. Inmaculada Jorge (actualmente en el grupo de Jesús Vázquez, CNB-UAM, Madrid), también han contribuido de forma significativa.

En el ámbito de la Universidad, y como no podía ser de otra forma, el grupo tiene un doble objetivo: académico y científico. En cuanto al primero, participamos en la docencia de asignaturas en las que la proteómica, en mayor o menor medida, ha sido incluida en su programa teórico y práctico. Estas son asignaturas de grado (Biotecnología y Metabolismo Celular, 4º curso de la Titulación de Agrónomos y de Montes) o de doctorado (Bioquímica de Proteínas y Proteómica, como parte del antiguo Programa de Doctorado "Experimentación en Biociencias", en la actualidad transformado en el Máster "Biotecnología Celular Molecular y Genética"). Nos hemos responsabilizado y/o participado activamente en la organización de diferentes cursos, tales como "Primer Curso Práctico de Proteómica UCO-2004", "Segundo Curso Práctico de Proteómica UCO-2004", Biotecnología (Cursos de Verano, Córdoba 2005,

2006 y 2007), amén de otros en colaboración con compañías privadas (Applied Biosystems, Bio-Rad, Termo, Integromics). La labor docente se completa con la dirección de Tesis Doctorales (una ya presentada, la de la Dra. Castillejo, una, que se defenderá en el 2007, la tesis de M. Curto, y tres más en fase de realización-S. Echevarría, D. Ariza y J. Valero). Durante estos cuatro años han visitado y realizado estancias en nuestro laboratorio diferentes investigadores y estudiantes de doctorado tanto nacionales como de otros países: Francisco J. Fernández Acero (Universidad de Cádiz), Luis Valledor (Universidad de Oviedo), Martha Hernández y Aurora Pérez (Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, Cuba), Laura de la Canal y Marcela Pinedo (Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), Universidad Nacional de Mar del Plata,), Besma Sghaier (Universidad de Sfax, Túnez).

Nuestros proyectos de investigación van dirigidos al estudio, a nivel molecular, de los mecanismos de respuesta y resistencia/tolerancia de las plantas a estreses bióticos (bacterias, hongos y plantas parásitas) y abióticos (sequía). Aunque basándonos en una aproximación de proteómica, también utilizamos otras de bioquímica clásica, histología y transcrición. Como sistemas experimentales utilizamos plantas modelo tales como *Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula*, plantas de cultivo, fundamentalmente leguminosas y, en menor medida girasol, y especies forestales (encina, alcornoque y pino). En general, y por lo que respecta a la proteómica, utilizamos una estrategia de proteómica de expresión diferencial, basada en la plataforma clásica de gels bidimensionales y MS, habiendo recientemente hecho alguna incursión en las denominadas técnicas de proteómica de segunda generación (DIGE e iTRAQ). En este año 2007 hemos empezado una nueva línea, la de las modificaciones postraduccionales, con el estudio del proteoma redox ("disulfide proteome", nitrosilación y glutationilación) en *Arabidopsis*, en el contexto de las respuesta de defensa frente a patógenos. Como no solo de pan vive el hombre, nuestro grupo se ha embarcado en un proyecto nuevo y muy ilusionante, encuadrado dentro del programa europeo SysMo (modelización de sistemas), en el que se utiliza levaduras como sistema modelo; es un proyecto en colaboración con el Prof. J. Ramos (Microbiología, Universidad de Córdoba) y pretende ahondar en el conocimiento de la homeostasis catiónica.

Como he dicho anteriormente, hemos de reconocer que nuestro grupo, *sensus stricto*, no es un grupo de proteómica, y en lo que hace referencia a la espectrometría de masas e bioinformática, somos más usuarios que investigadores. Es por ello que desde estas líneas queremos agradecer la ayuda recibida por diferentes Servicios de Proteómica (el de la Universidad de Córdoba, el del CNIC, el de la Universidad Complutense) y colaboradores, aunque habría que denominarlos amigos, con una trayectoria contrastada en el campo de la espectrometría de masas de péptidos: Christof Lenz (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), Juanjo Calvete (CIB-CSIC, Valencia), Jesús Vázquez (CBM-UAM, Madrid), y Juan A. López (CNIC, Madrid). A todos ellos, muchas gracias. Algunos de los proyectos citados anteriormente, se llevan o han llevado a cabo, amén de los investigadores mencionados, en colaboración con los Dres. R. Navarro (Ingeniería Forstal, Universidad de Córdoba), José Ramos (Microbiología, Universidad de Córdoba), E. Dumas-Gaudot (INRA, Dijon, Francia), y J. Durner (Institute for Biochemical Plant Pathology, GSF, Munich-Alemania).

### Proyectos financiados con fondos públicos

- Mecanismos de resistencia a especies de plantas parásitas del género *Orobanche* y desarrollo de estrategias de manejo integrado
- Proteoma redox: nitrosilación y glutationilación de proteínas como mecanismos de regulación de la respuesta de defensa de las plantas a patógenos
- Plant proteomics in Europe
- Gene interaction networks and models of cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*
- New Strategies to Improve Grain Legumes for Food and Feed
- Aproximación de genómica funcional (proteómica y transcriptómica) para la investigación de la diversidad de planta en respuesta a estreses bióticos y abióticos, en *Quercus ilex*, *Quercus suber* y *Pinus piaster*
- El proteoma redox comparado

## Publicaciones

- Jorrín, J.V., Maldonado, A., Castillejo, M.A. 2007. Plant proteome analysis: a 2007 update. *Proteomics* 7 (en prensa).
- Fernández-Acero.F.J, Jorge.I, Calvo.E, Vallejo.I, Carbú.M, Camafeita.E, Garrido. C, López.J.A, Jorrin.J and Cantoral.J.M. 2007. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. *Archives of Microbiology* 187: 207-215.
- Castillejo MA, Maldonado AM, Dumas-Gaudot E, Fernández-Aparicio M, Susín R, Rubiales D, Jorrín J. 2007. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* (en prensa)
- Castillejo, M.A., Maldonado, A.M., Jorrín, J.V. 2007. Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. (sometido).
- Rispaill N., Dita M-A., González-Verdejo C., Pérez-De-Luque A., Castillejo M-A., Prats E., Román B., Jorrín J. And Rubiales D. 2007. Plant Resistance to Parasitic Plants: Current Approaches for an Old Foe. *New Phytologist* 173: 703-12.
- Rossignol.M, Peltier.JB, Mock.H.P, Matros. A, Maldonado.A, Jorrín.J. 2006. Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. *Proteomics* 6:5529-5548.
- Curto, M., Camafeita, E., Lopez, J.A., Maldonado, A.M., Rubiales, D., Jorrín, J.V. 2006. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics* S1'06: 163-174.
- Jorge I, Navarro, RM, Lenz C, Ariza D, Jorrín J. 2006. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics* S1'06: 207-214.
- Jorrín, J.V., Rubiales, D., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Maldonado, A., Castillejo, M.A., Curto, M. 2006. Proteomics: a promising approach to study biotic stresses in legumes. A review. *Euphytica* 147: 37-47.
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Camafeita LE, López JA, Cantoral JM, Jorrin J. 2006. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* S1'06: 88-96.
- Echevarría-Zomeño, S., Pérez-De-Luque, A., Jorrín, J., Maldonado, A.M. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57:4189-4200
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. & Cameron, R.K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2002 419: 399-403
- Jorge, I., Navarro, M., Lenz, C., Ariza, D., Porras, C., Jorrín, J. 2005. . The Holm Oak leaf proteome. Analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification by MS/MS de novo sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5: 222-234.
- Jorrín, J., Bárcena, J.A., Calvete, J.J. 2005. Report on the First Congress of the Spanish Proteomics Society. *Proteomics*, 5, 2712-2715.
- Cánovas.M, Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrín, J., Mock, H.P., Rossignol, M. 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- Castillejo, M.A., Amiour, N., Dumas-Gaudot, E., Rubiales, D., Jorrín, J.V. 2004. A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry* 65: 1817-1828.

## TESIS DOCTORALES

### Caracterización de los receptores del activador tisular del plasminógeno (tPA) en cáncer de páncreas

*Oriol Roda Noguera*

Universidad Pompeu Fabra

**Directores:** David Andreu (Universidad Pompeu Fabra), Pilar Navarro (Instituto Municipal de Investigación Médica), Barcelona. Universidad Pompeu Fabra, Mayo 2006

El activador tisular del plasminógeno (tPA) es una serín-proteasa componente del sistema plasminógeno-plasmina, responsable de la eliminación de coágulos de fibrina en la sangre. También participa en procesos de migración y remodelación celular, degradando la matriz extracelular. Finalmente, el sistema está implicado en procesos tumorales, especialmente de invasión y metástasis.

Estudios previos han descrito la sobreexpresión de tPA en cáncer de páncreas. Aunque el tPA es una proteína esencialmente soluble, presente en el plasma y el medio extracelular, puede también unirse a la membrana celular a través de ciertos receptores. Éstos aumentan la capacidad catalítica del tPA y la consiguiente producción de plasmina, pero también pueden facilitar otras funciones independientes de aquélla.

En esta tesis nos hemos planteado identificar y caracterizar receptores del tPA que faciliten su acción en la progresión tumoral en cáncer de páncreas. La tesis se divide en los siguientes capítulos.

**1. New insights into tPA/Annexin A2 interaction** (Roda et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278, 5702-5709).

La anexina A2 (AnxA2), descrita como receptor de tPA en células endoteliales, está también sobreexpresada en células tumorales, lo cual sugiere una posible implicación como receptor de tPA en dicho sistema. Se ha descrito que los residuos 7-12 de AnxA2 (LCKLSL) constituyen una zona de unión

a tPA, en base al efecto inhibitorio de un péptido con dicha secuencia sobre la interacción tPA/AnxA2.

En base a dichos datos se diseñó una “peptidoteca” con diversas modificaciones sobre la secuencia LCKLSL consenso, con vistas a una mejor caracterización de la citada interacción tPA/AnxA2 y en especial del papel de los diferentes residuos. Sorprendentemente, el estudio del efecto inhibitorio de los diferentes péptidos indicó como único requisito la presencia de una Cys (o también Hcy) en la secuencia. El mecanismo de inhibición se investigó por espectrometría de masas. Los resultados indicaron que la presencia de un grupo tiol en la secuencia del péptido comportaba la unión de éste a la Cys8 de AnxA2, mediante un enlace disulfuro, con lo que el lugar de interacción con tPA quedaba bloqueado. Este resultado confirmaba la importancia de la región N-terminal de AnxA2, en especial de Cys8, para la interacción, pero a la vez ponía en entredicho que el motivo LCKLSL fuera el determinante específico de la interacción tPA/AnxA2.

**2. A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells** (Roda et al. 2006. *Proteomics* S6: 36-41).

Experimentos realizados en nuestro laboratorio, junto con otros trabajos, sugerían que AnxA2 no es el único receptor de tPA en páncreas. Además, se ha descrito un papel mitogénico de tPA independiente de plasminógeno, sólo explicable en parte por la interacción con AnxA2. Todo ello hacía especialmente relevante la búsqueda de nuevos receptores de tPA

en páncreas, a fin de localizar otras posibles dianas terapéuticas, a ser posible más específicas de páncreas, e identificar el correspondiente mecanismo de señalización.

Para ello se desarrolló un método de captura por afinidad (“*pull-down*”) de proteínas capaces de unirse a tPA-Sefarosa, con posterior análisis proteómico de las mismas por electroforesis bidimensional y análisis de huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las muestras analizadas fueron, por una parte, lisados totales de la línea tumoral pancreática PANC-1, así como una fracción purificada de dominios “*raft*”, ricos en colesterol, en los que se ha ya descrito la presencia de AnxA2. Los resultados se compararon con los obtenidos en un experimento paralelo con células HUVEC, a fin de filtrar únicamente las proteínas específicas de células pancreáticas.

Se identificaron un total de 31 proteínas capaces de unirse a tPA en células tumorales pancreáticas. De ellas se seleccionaron las que, de acuerdo con datos bibliográficos, tenían mayores posibilidades de ser receptores de tPA. Los resultados se validaron por “*western blot*”, para proteínas ya descritas como receptores de tPA en otros tipos celulares (alfa-enolasa, AnxA2, citoqueratinas 8 y 18), o para otras proteínas con posibilidades de serlo (cortactina y galectina 1).

### **3. Identification of a new tissue-plasminogen activator receptor: galectin-1 mediates tPA functions in pancreatic cancer**

Dada su localización en membrana y algunas otras características, la galectina 1 (gal 1), una de las proteínas identificadas en el anterior estudio proteómico, aparecía como un candidato plausible a receptor del tPA. Con todo, su expresión en cáncer de páncreas se ha relacionado siempre con el estroma circundante a la masa tumoral y no con el tumor en sí. En el tercer capítulo de la tesis hemos llevado a

cabo la caracterización bioquímica de la interacción tPA/gal 1, así como la determinación de la expresión de gal1 en células tumorales pancreáticas. Finalmente, hemos llevado a cabo algunos experimentos para determinar la relevancia biológica de dicha interacción.

En primer lugar se analizó por “*western blot*” a expresión de gal 1 en una batería de líneas celulares originarias de tumores pancreáticos, así como una línea de fibroblastos procedentes de un cáncer de pulmón. Ello permitió demostrar la expresión de gal1 en la mayoría de dichas líneas. También se verificó la interacción gal 1/tPA en algunas de ellas mediante un ensayo “*pull down*”.

En segundo lugar, se efectuó un estudio *in vitro* de la interacción, tanto mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore) como por “*pull-down*” con la proteína recombinante. Los resultados se compararon con los obtenidos con AnxA2 y galectina 3 (otra lectina descrita como sobre-expresada en cáncer pancreático) y permitieron concluir que la gal 1 interacciona directamente con tPA, con una afinidad comparable a la de AnxA2 y notablemente superior a la de gal 3.

Se realizaron también estudios de inmunofluorescencia en experimentos de curación de herida en cultivos celulares a fin de determinar la localización de gal 1 y su eventual colocalización con tPA. Los resultados indicaron que gal 1 se expresa esencialmente en el frente de cierre de la herida, lo cual sugiere un posible papel en los procesos de invasión y progresión tumoral. Además, colocaliza con tPA, lo cual añade plausibilidad a la hipótesis de gal 1 como receptor de tPA.

Finalmente, se estudió la activación de la MAP quinasa Erk1/2 inducida por tPA sobre células tratadas con siRNA supresor de gal 1, así como una línea de fibroblastos embrionarios de un ratón “*knock out*” deficiente en gal 1. Los resultados demostraron que la inducción de fosforilación de Erk1/2 por parte de tPA se ve inhibida en las células deficientes en gal 1, lo cual corrobora la implicación de gal 1 en la señalización mitogénica de tPA.

## Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas.

Francisco Javier Fernández Acero

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz

**Directores:** Jesús Manuel Cantoral Fernández, Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera. Universidad de Cádiz, junio 2006

La proteómica es una de las tecnologías que mayor interés está despertando en los últimos años. Son numerosos los estudios realizados en distintos microorganismos, pero aún son escasos los estudios realizados en hongos filamentosos. Por este motivo nos propusimos realizar una aproximación al proteoma de *Botrytis cinerea*, uno de los hongos fitopatógenos más importantes ya que afecta a una gran variedad de cultivos, en cualquier órgano de la planta y en cualquier estadio de desarrollo.

En primer lugar se llevó a cabo la optimización del protocolo para la obtención y estudio del proteoma de *B. cinerea* con el objetivo de determinar un perfil proteómico de referencia que nos permitiera: i) caracterizar las proteínas mayoritarias presentes en el hongo en condiciones de cultivo estándar, ii) determinar si alguna de estas proteínas están relacionadas con la patogenicidad y, iii) buscar aquellas proteínas susceptibles de convertirse en dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fungicidas. Para ello se compararon distintos protocolos de extracción y solubilización. La solubilización de proteínas en tampón fosfato y posterior precipitación mediante acetona y ácido tricloroacético resultó ser el mejor de los métodos ensayados. Los geles 2-DE teñidos con Comassie revelaron entre 380-400 especies proteicas ("spots"), comprendidas entre los 14 y 85 kDa y entre 5,4 y 7,7 de pI. Se seleccionaron 22 para su identificación, mediante MALDI-TOF o ESI-Trampa iónica. Entre estas proteínas se encontraron distintas formas de malato deshidrogenasa (MDH) y gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GADPH).

En segundo lugar se realizó un estudio de proteómica de expresión diferencial, comparando el proteoma de dos cepas de *B. cinerea* con distinta virulencia. Los extractos proteicos fueron analizados mediante 2-DE, revelándose diferencias cuantitativas y cualitativas entre los perfiles proteicos de ambas cepas. Se identificaron 27 especies, 17 de las cuales fueron identificadas como MDH, todas ellas específicas o sobreexpresadas en la cepa más virulenta, lo que indicaría el posible papel de dichas enzimas en los procesos infectivos. La GADPH también es expresada de forma específica en la cepa más virulenta. Además se identificaron otras proteínas de interés como la ciclofilina o el factor transcripcional metE/metH. La diferencia de expresión proteica entre cepas pueden adscribirse a las diferencias de virulencia entre las cepas.

El trabajo incluyó un estudio sobre la eficacia de 7 nuevos fungicidas racionales contra dos especies de *Phytophthora* spp. para determinar la eficacia de estos compuestos y ampliar su espectro de actuación. En general, todos estos compuestos demostraron su actividad fungistática, con porcentajes de inhibición del crecimiento por encima del 46% a 100 ppm. Estos datos indicarían un buen comportamiento de estos compuestos a escala terapéutica.

Las tres partes de las que consta esta Tesis Doctoral se han materializado en tres publicaciones: *Proteomics* (Fernández-Acero et al, 2006, S6, 88-96), *Archives of Microbiology* (Fernández-Acero et al, 2006, DOI 10.1007/s00203-006-0188-3) y *Journal of Phytopathology* (Fernández-Acero et al, 2006, 154, 1-6).

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Proteómica es la revista oficial de la Sociedad Española de Proteómica. Su periodicidad será semestral (enero-febrero y julio-septiembre) y será publicada por el Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.

Esta revista publicará artículos originales y comunicaciones breves de contenido científico o técnico, así como artículos de revisión, y opiniones, notas o comentarios sobre cualquier aspecto relacionado con la proteómica. Incluirá información sobre nuestra Sociedad y sobre los socios, grupos e instituciones que la componen. El idioma será el castellano, aunque se admitirán contribuciones en otras lenguas, preferentemente el inglés. Aunque *Proteómica* se distribuirá preferentemente en España y Latinoamérica, pretende tener un carácter internacional, extendiendo su distribución a otros países. Esta revista se envía, sin coste alguno, a los socios de la SEProt, a Unidades y Servicios que trabajen en este campo, y a instituciones y organizaciones públicas o privadas vinculadas a la sociedad o con actividad relevante en el campo de la proteómica. Existirá una versión impresa, editada por el Servicio de Publicaciones de la UCO, y una versión "on-line" que aparecerá en la página web de la SEProt y de la Universidad de Córdoba.

Todas las contribuciones serán revisadas por el comité editorial, y su formato deberá ajustarse a las instrucciones que se adjuntan. Los artículos originales, las comunicaciones breves y las revisiones serán evaluados científicamente por uno o dos revisores elegidos por el comité editorial. Todas las contribuciones reflejan la opinión de sus autores y no necesariamente la opinión del Comité Editorial ni de la Junta Directiva de la SEProt.

Los manuscritos se enviarán por correo electrónico, a la dirección [jornadas-proteomica@uco.es](mailto:jornadas-proteomica@uco.es). Los artículos originales y las revisiones deberán ir acompañados de una carta de presentación del trabajo (cover letter) y tendrán una extensión máxima de 15 páginas A4; las comunicaciones breves también deberán incluir una carta de presentación y tendrán una extensión máxima de 8 páginas A4; el resto de las contribuciones tendrá una extensión máxima de 4 páginas. Para el cálculo de la extensión se tendrán en cuenta, además del texto, las figuras, las tablas,

las ilustraciones y las referencias. No se considera la publicación en color, por lo que las ilustraciones, fotografías y gráficos aparecerán en blanco y negro. Deberán enviarse, en archivos separados, por una parte el texto y las tablas (preferentemente en Word) y por otra las figuras (en formato pdf, a 250-300 dpi de resolución y al tamaño de impresión final). Los autores deberán verificar que los detalles de las figuras se imprimen a partir de los ficheros con la calidad requerida y que el texto que incluyan las figuras sea legible al tamaño de reproducción final. Las tablas y leyendas de figuras deben ir al final del texto. El texto debe ajustarse al siguiente formato: letra Times New Roman, tamaño 12, doble espacio, páginas y líneas numeradas, justificación total.

Los artículos originales deben tener las siguientes secciones:

1. Portada. Incluirá el título, la lista de autores (nombre y apellido(s)) y su filiación, y los datos completos del autor con el que se mantendrá la correspondencia. La filiación de los autores, en el caso de que exista más de una, se indicará mediante un símbolo en formato superíndice detrás del nombre de cada autor.
2. Resumen (máximo de 250 palabras) y palabras clave (máximo de 6, separadas por comas).
3. Introducción. Deberá evitarse una revisión demasiado extensa del tema y deberá justificar adecuadamente el contenido del trabajo.
4. Materiales y métodos. Esta sección deberá ser breve, limitándose a describir los procedimientos que sean novedosos y referenciando aquellos ya descritos. Las descripciones tendrán el suficiente detalle para permitir la repetición de los experimentos.
5. Resultados.
6. Discusión. Los Resultados y la Discusión podrán agruparse en una única sección.
7. Referencias.
8. Agradecimientos.

Las abreviaturas se incluirán como nota al pie de página la primera vez que aparezcan en el texto. Como norma general, no deben incluirse abreviaturas ni en el título ni en el resumen.

Las referencias deben citarse en el texto, entre paréntesis, de acuerdo al siguiente formato: (Jorrín, 2007), (Calvete y Corrales, 2007) o (Vázquez *et al.*, 2007). Las referencias a trabajos que no hayan sido publicados no se incluirán en la sección de Referencias; dichos trabajos deberán citarse, en el texto y entre paréntesis de acuerdo al siguiente formato: (resultados no publicados), (manuscrito enviado), (J. Jorrín, comunicación personal).

Las publicaciones serán citadas en la sección de Referencias en orden alfabético y de acuerdo a los siguientes ejemplos:

- Vázquez J, Calvete J J, Corrales F, Jorrín J. et al. (si hay más de 4 autores) 2007. Título. Revista (en extenso) volumen: página inicial-final.
- Vázquez J, Calvete J J, Corrales F, Jorrín J. et al. (si hay más de 4 autores) 2007. Título. Revista (en extenso) (en prensa, DOI ).
- Vázquez J, Calvete J J, Corrales F, Jorrín J. et al. (si hay más de 4 autores) 2007. Título del capítulo. En: título del libro (J Vázquez, J J Calvete, J Jorrín, F Corrales, eds.), pp: 350-364. Editorial, ciudad, país.
- Vázquez J, Calvete J J, Corrales F, Jorrín J. et al. (si hay más de 4 autores) 2007. Título del trabajo. I Congreso de la Sociedad Española de Proteó-

mica, Valencia 10-14 febrero 2007. Libro de resúmenes, contribución P 28, PP. 57.

- Castillejo MA. 2005. Título. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.

Las tablas y figuras llevarán numeración arábica y se citarán en el texto en el siguiente formato: tabla 3, figura 2. Las tablas deberán llevar un título y podrán incluir notas a pie de tabla, que se referirán al contenido de la tabla usando símbolos en formato superíndice. Todas las figuras deberán llevar una leyenda conteniendo un título lo más representativo posible del contenido de la figura, en negrita, y un texto explicativo lo más conciso posible; la descripción detallada o la interpretación de la figura, en su caso, deberá hacerse en el texto del manuscrito.

Las comunicaciones breves deben ajustarse al mismo formato que los artículos originales, y contendrán un resumen (máximo 250 palabras), una lista de palabras clave (máximo de 6, separadas por comas), una única sección conteniendo el texto principal, y las referencias y agradecimientos, además de las tablas y figuras. El texto principal deberá introducir adecuadamente el tema, explicar la metodología utilizada, y comentar y discutir los resultados.

Los artículos de revisión tendrán un formato libre pero deberán incluir un Resumen (máximo 250 palabras) y una lista de palabras clave (máximo de 6, separadas por comas). El resto de las contribuciones tendrá un formato libre. Todas las contribuciones deberán respetar el formato de los artículos originales en cuanto a tablas, figuras, abreviaturas y referencias.

## POETÓMICA

**“High Throughput”**

*Una obsesión de números me guía;  
un vendaval de trazas y fragmentos,  
un huracán de péptidos hambrientos  
me velan en la noche y en el día.*

*Desayuno proteínas de utopía;  
los espectros me acechan por momentos,  
insinuando series, elementos  
y databases en la lejanía.*

*Los quicios de mi estrés se queratinan  
tiznando de secuencias las mañanas;  
no son cromatogramas, son montañas*

*donde riscos de isótopos se inclinan.  
Y en mi libro las letras no son tales,  
sino aminoácidos a raudales.*

**Jesús Vázquez**





- Principal
- Sobre la SEProt
- Socios e Inscripciones
- Congresos, Actividades y Anuncios
- Proteómica, revista de la SEProt
- Enlaces
- Archivo

## Novedades

### - Proteómica: nueva revista de la SEProt

[Anuncio de la revista e invitación a participar](#)  
[Instrucciones para los autores \(actualizadas en Abril 2007\)](#)

