

Utilización de ProteoMiner para el análisis proteómico de muestras de líquido sinovial (LS) de pacientes con osteoartritis

Sonia García-Rodríguez¹, María Dulce Pérez-Mezcua¹, Antonio Rosal-Vela¹, Victoria Longobardo², Antonio Larios², Pilar Navarro¹, Raquel Largo³, Gabriel Herrero-Beaumont³, Jaime Sancho¹, Mercedes Zubiaur¹

¹Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBL-N), CSIC, Granada. ²Servicio de Proteómica, IPBL-N, CSIC, Granada. ³Servicio de Reumatología, Fundación Jiménez-Díaz, Madrid

Introducción

ProteoMiner o Combinatorial Peptide Ligand Libraries (CPLL) [1] actualmente están compuestas de una gran variedad de hexapéptidos sintetizados, que actúan de ligandos para las proteínas de las muestras. Y están siendo actualizadas como herramientas de gran utilidad para el mapeo de proteomas de distintos organismos. Esta herramienta permite el objetivo de reducir del rango dinámico de concentraciones en diversos tipos de muestras, como plasma y suero, disminuyendo la concentración de las proteínas más abundantes y el enriquecimiento en proteínas menos abundantes, de cara a una identificación de estas últimas, como paso previo a un posterior análisis proteómico [2]. Proteínas menos abundantes en las muestras biológicas son potencialmente de gran interés para el estudio de nuevo biomarcadores de enfermedad. El ProteoMiner que se ha utilizado en este trabajo es el distribuido por BioRad y se basa en una librería de hexapéptidos inmovilizados en una matriz en forma de bolitas y en un soporte cromatográfico. La librería contiene gran variedad de hexapéptidos sintetizados, que actúan de ligandos para las proteínas de las muestras.

Material y Métodos

Se ha utilizado el ProteoMiner con el objetivo de identificar nuevas proteínas en LS de pacientes con Osteoartritis. Las muestras se trataron con hialuronidasa (10 U/ml LS, 1h, agitación, 500 rpm, 37 °C, en Thermomix-Eppendorf, centrifugación 100g, 5 min., 4°C) [3]. 10 mg de muestra se trataron con ProteoMiner. La recuperación de proteínas observadas fue inferior al 1/50 del material inicial. 50 µg de muestra de LS tratado con hialuronidasa y 50 µg muestra eluida tras el ProteoMiner se sepa-

raron en un mismo gel 1-D, NOVEX (Invitrogen), 4-12%, 10 pocillos, buffer MES. Los geles se tiñeron con SYPRO Ruby, ~12hrs, T^A, se fijaron en 10% de metanol/7% de ácido acético, 60 min. T^A y se lavaron con agua bidestilada y se escanearon en un Typhoon.

Resultados

El análisis de imagen de los geles en el Typhoon indicó que a igual concentración de proteínas, las muestras eluidas después del ProteoMiner presentaron una disminución de proteínas más abundantes como albúmina e inmunoglobulinas y se observa también una mejor distribución de proteínas, principalmente de masa molecular <50 kDa bien separadas que no se observaban en las muestras no tratadas. Como primera aproximación se ha realizado la identificación de distintas proteínas por huella peptídica, mediante MALDI-TOF. Las bandas de los geles se picaron mediante un picador automático (3 - 4 spots/banda/pocillo). Las proteínas se reducen, alcalinizan, se pasan a una placa de 96 pocillos y se procede a la digestión con tripsina. Los péptidos se eluyeron mediante centrifugación usando de 5-10 µl al 60 % v/v ACN (acetonitrilo) y 0.1% v/v. El análisis de espectros se analiza por MASCOT en NCBIInr y Swis-Prot. Swiss-Prot, $p \leq 0.05$ (score de 56). Se identificaron por MS 48 proteínas diferentes en un total de 3 líquidos sinoviales de las cuales 19 aparecían exclusivamente en los eluidos del ProteoMiner y 29 preferentemente y/o exclusivamente en los LS no procesados, siendo éstas representantes de las proteínas más abundantes: albúmina sérica, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, etc. Por el contrario 15 de las 19 proteínas que se identificaron exclusivamente en los eluidos del ProteoMiner tenían masas moleculares de 10-30

kDa, siendo 3 de ellas fragmentos de proteínas más grandes, posiblemente productos de degradación.

Conclusiones

En este primer abordaje se ha demostrado que el ProteoMiner es una herramienta muy eficaz para conseguir el enriquecimiento en proteínas menos abundantes en líquidos sinoviales de pacientes con osteoartritis, identificándose nuevas proteínas que pueden tener relación con procesos inflamatorios latentes o menos obvios que en otras patologías articulares como la artritis reumatoide.

Agradecimientos

Ministerio Sanidad y Consumo-ISCIH-FIS, Proyecto: FIS06/1502 (M.Z.). CSIC; Proyecto: PI-200820I216 (M.Z.). Junta de Andalucía (J.A.), Consejería Innovación Ciencia y Empresa y Consejería Educación y Ciencia. Proyecto: PC08-CTS-

04046 (J.S. y M.Z.). Ministerio Educación y Ciencia (MEC)-Ministerio Ciencia e Innovación (MICINN) Proyecto: SAF-2008-03685 (J.S. y M.Z.). CSIC-Beca JAE Intro a M.D.P.-M.

Referencias

- [1] Righetti PG y Boschetti E. The ProteoMiner and the FortyNiners: searching for gold nuggets in the proteomic arena. *Mass Spectrom Rev* 2008; 27: 596-608.
- [2] Boschetti E y Righetti P G. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J Proteomics* 2008; 71: 255-264.
- [3] Herrero-Beaumont G, Guerrero R, Sanchez-Pernaute O, Acebes, C, et al. Cartilage and bone biological markers in the synovial fluid of osteoarthritic patients after hyaluronan injections in the knee. *Clin Chim Acta* 2001; 308: 107-115.

Estudio de la Estenosis Aórtica Valvular desde un punto de vista proteómico

Tatiana Martin-Rojas¹, Félix Gil-Dones¹, Luis F. López-Almodovar², Fernando de la Cuesta³, Gloria Álvarez-Llamas³, Fernando Vivanco³, Luis R. Padial⁴, María G. Barderas^{1,5}

¹Laboratorio Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, ²Unidad de Cirugía Cardíaca, Hospital Virgen de la Salud, SESCAM, Toledo, ³Departamento de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, ⁴Unidad de Cardiología, Hospital Virgen de la Salud, SESCAM, Toledo, ⁵Unidad de Proteómica, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo

En la actualidad diversos autores han señalado que la estenosis aórtica degenerativa comparte los mismos factores de riesgo que la enfermedad coronaria. Además, de compartir características histológicas con las placas ateroscleróticas, lo cual sugiere que la calcificación de la válvula aórtica es un proceso crónico inflamatorio similar a la aterosclerosis. La existencia de datos discordantes con esta teoría hace necesario el estudio de esta patología mediante la aplicación de nuevas técnicas proteómicas (2D-DIGE, LC-MS/MS, etc), con el objetivo de conseguir nuevos datos que puedan contribuir a la comprensión de los procesos implicados en esta

patología, junto con la identificación de nuevos biomarcadores pronóstico, diagnóstico y terapéuticos.

La estenosis aórtica (EA) degenerativa es una enfermedad de elevada prevalencia en los países desarrollados y es la responsable del mayor número de reemplazos valvulares aórticos. En la actualidad, diversos autores han señalado que comparte los mismos factores de riesgo que la aterosclerosis¹. Por ello, parece esencial profundizar en el conocimiento de la patogenia de la EA degenerativa como paso previo para establecer medidas de prevención de dicha enfermedad.