

References

- [1] Rowland L.P., Shneider N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med*, 2001; 344:1688–1700.
- [2] Ryberg H and Bowser R. Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Review of Proteomics*, 2008; 5: 249-262.
- [3] Abdi F, Quinn JF, Jankovic J et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis*. 2006; 9:293-348.

Optimum method designed for 2D-DIGE of arterial intima and media isolated by laser microdissection

*Fernando de la Cuesta¹, Gloria Álvarez-Llamas¹, Irene Zubiri¹, Aroa Sanz-Maroto¹, Alicia Donado², Luis Rodríguez-Padial⁴, Ángel García-Pinto², María González-Barderas^{*5}, Fernando Vivanco^{1,6}*

¹Department of Immunology. Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. ²Cardiac Surgery Unit. Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ³Department of Pathology. Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain. ⁴Department of Cardiology. Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain. ⁵Department of Vascular Pathology. Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM, Toledo, Spain. ⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

Introduction

Tissue proteomic studies on atherosclerosis have traditionally focused on whole artery extracts from biopsy or necropsy origin. Arterial intima and media layers are both involved in atherosclerotic development. In the present work, we describe an optimum method which employs the combination of Laser Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC) and 2D-DIGE saturation labelling to investigate the human intima and media subproteomes isolated from atherosclerotic (coronary and aorta) or non-atherosclerotic (preatherosclerotic coronary) arteries.

Methods

Coronary biopsies from patients undergoing bypass surgery and coronary and aorta necropsies were immediately washed in saline and freeze embedded with OCT. Intima and media were isolated by LMPC with a Microbeam System (PALM Micro-laser). Several methods for staining (hematoxylin, cresyl violet), protein extraction and DIGE labelling were tested in order to achieve the better protocol

for 2-DE analysis of human arterial layers. First of all, a spin column chromatographic step with Protein Desalting Spin Columns (Pierce) was assayed in order to minimize negative effects from remaining stain. In addition, different lysis buffers were tested to assure efficient extraction of arterial layers proteome, which is problematic due to highly acidic myofibrillar proteins and presence of calcium.

Results

Concerning staining methods, both hematoxylin and cresyl violet were found to negatively affect protein extraction and IEF. A chromatographic spin column step prior to saturation DIGE labelling improved substantially 2-DE gels, permitting the use of both stains for human arterial layers proteomic analysis. Ethanol solved cresyl violet minimizes proteases action and facilitates visualization of arterial tissue. For this reasons this stain was chosen for further analysis. Optimal DIGE labelling conditions were set at 1nmol TCEP and 2nmol Dye, so that free dye deleterious effects were minimized. The addition of SDS, and in a higher extend DTT, on lysis buffer significantly increased protein solubilization,

particularly on high molecular weight proteins as visualized on 2-DE gels. Finally, LMPC method was checked by LC-MS/MS to assure correct layers isolation. 22 and 38 proteins were identified from in-solution digested preatherosclerotic coronary intima

and media extracts, respectively. Although some proteins are common between layers, due to similar cell types present; differential proteins are specific of contractile phenotype of VSMCs in the media and proliferative in the intima.

Identificación de péptidos específicos de cáncer colorrectal mediante el uso de librerías de fagos T7 impresas en microarrays

Ingrid Babel¹, Rodrigo Barderas¹, Victor Moreno², Ivan Cristobo¹, Gabriel Capellá², Ignacio Casal¹

¹ Laboratorio de proteómica funcional. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid. ² Instituto Catalán de Oncología (ICO) Barcelona

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer con mayor mortalidad en España por su tardía diagnosis. Actualmente, la herramienta de clasificación del CCR (clasificación de Dukes) se basa en observaciones histopatológicas como pueden ser la invasión de la capa muscular intestinal, los nódulos linfáticos adyacentes o la progresión metastática. Aunque se han realizado diversos estudios genómicos usando microarrays de DNA no se ha conseguido obtener una mejor clasificación [1-2]. La identificación de proteínas que puedan revelar diferencias en los estadios de diferenciación neoplásica sería muy importante para el conocimiento de la enfermedad, un mejor diagnóstico del CCR y para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Aunque se han identificado muchas proteínas como diferencialmente expresadas en CCR utilizando diferentes técnicas proteómicas [3] hasta ahora se han descrito muy pocas como marcadores eficientes de CCR.

Los autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con cáncer son biomarcadores indicativos de la enfermedad porque las proteínas modificadas antes o durante la formación del tumor pueden inducir una respuesta inmune una vez liberadas [4-6]. Así, la caracterización de la respuesta inmune en pacientes con cáncer constituye una nueva alternativa para la identificación de biomarcadores específicos de CCR, útiles para su diagnosis temprana

En este estudio, hemos usado una estrategia proteómica alternativa a los microarrays de proteínas recombinantes basada en el uso de microarrays de

fagos para identificar autoanticuerpos asociados a CCR. Se construyeron cuatro librerías de fagos que contenían cDNA de tejido de pacientes con CCR, que fueron cribadas con sueros de pacientes con CCR para identificar aquellos péptidos desplegados en la superficie de los fagos reconocidos por autoanticuerpos específicos de CCR. Se imprimieron un total de 1536 fagos T7 en soportes de nitrocelulosa y tras su cribado con 15 sueros normales y 15 tumorales se identificaron 128 fagos inmunogénicos que diferenciaban entre pacientes con CCR e individuos sanos. El punto de corte del False Discovery Rate se ajustó a 0.22. De los fagos que mostraron mayor reactividad en pacientes que en sueros control, únicamente 55 fagos presentaron una secuencia única.

La inmunoreactividad se verificó mediante ELISA utilizando 5 fagos elegidos por su homología con una proteína conocida. Dichos 5 Fagos contenían secuencias homólogas a MST1, SLC33A1, SREBF2, SULF1 y GTF2i. MST1 se describió como una proteína reactiva a autoanticuerpos de pacientes con CCR en nuestro estudio previo realizado con microarrays de proteínas humanas [7]. Por otra parte, en un análisis de expresión diferencial de genes SULF1 se observó sobreexpresada en CCR [8]. Mediante ensayo de ELISA utilizando una colección de 96 sueros, 50 de pacientes con cáncer colorrectal y 46 de individuos sanos, se obtuvieron curvas de ROC (Receiver Operating Characteristic) con áreas debajo de la curva entre 0.57 y 0.63. Sin embargo, su poder discriminatorio aumentó hasta una especificidad y sensibilidad de 78.6% y 66%,