

Sesión de proteómica cuantitativa

Coordinadores: ¹Miren J. Omaetxebarría, ²Eva Rodríguez-Suárez

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology. University of the Basque Country. Leioa, Spain,

²Proteomics Unit, CIC bioGUNE, CIBERehd, ProteoRed, Technology Park of Bizkaia, Derio, Spain

El día 11 de Febrero de 2010, se dio inicio en la Universidad de Córdoba a las II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. Las Jornadas se estructuraron en seis sesiones que abarcaban los diferentes campos en el desarrollo tecnológico de técnicas proteómicas.

La sesión inaugural correspondió a la sesión sobre Proteómica Cuantitativa coordinada por Eva Rodríguez-Suárez (CIC bioGUNE) y Miren Josu Omaetxebarría (UPV/EHU).

La proteómica emergió como una disciplina robusta para el análisis cualitativo del proteoma. La andadura de la proteómica se forjó con la generación de listados de proteínas presentes en diferentes sistemas biológicos, lo cual indudablemente impulsó el avance de nuevas y mejores técnicas analíticas y bioinformáticas necesarias en aquel momento. Todo ello contribuyó al avance en la investigación proteómica y se comenzaron a dar pasos hacia una nueva dimensión: el análisis cuantitativo de los proteomas que permitiría el análisis diferencial de la abundancia de proteínas entre diferentes muestras, pudiendo obtenerse, por ejemplo, información comparativa entre muestras de pacientes sanos y enfermos. Durante años, los geles bidimensionales han proporcionado información cualitativa así como cuantitativa a la hora de comparar diferentes muestras o condiciones en sistemas biológicos bajo estudio. Aún hoy en día, esta técnica es utilizada en miles de laboratorios con resultados excelentes, más si cabe con el advenimiento de la técnica DIGE que ha permitido solventar los problemas de reproducibilidad ligados previamente a esta metodología. Sin embargo, el desarrollo de técnicas *gel-free* orientadas a la proteómica

cuantitativa ha supuesto un avance cualitativo y cuantitativo importante. No hay más que reparar en los títulos de las comunicaciones recibidas en la sesión de proteómica cuantitativa para concluir que la repercusión que las distintas técnicas de proteómica cuantitativa va a tener en la biología molecular clásica y en la búsqueda de biomarcadores es inminente. La cuantificación de cambios en las proteínas es clave a la hora de entender las alteraciones biológicas de los sistemas y para el descubrimiento de biomarcadores. Actualmente, la cromatografía de fase reversa en tándem a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) está siendo utilizada con éxito para la cuantificación de mezclas complejas de proteínas. Sin embargo, los resultados no son óptimos debido en gran medida al gran rango dinámico que presentan las muestras y la falta de algoritmos fidedignos que faciliten la cuantificación.

Las diferentes contribuciones presentaron resultados cuantitativos obtenidos a partir del análisis de muestras diversas utilizando técnicas de marcaje isobárico como iTRAQ (Luz Valero, Joan Josep Bech Serra, Juan Casado-Vela), marcaje no isobárico como ICPL (Joan Josep Bech-Serra), varios métodos *label-free* (Kerman Aloria-MS^E, Alex Campos-Spectral Counting, Joan Josep Bech-Serra-Progenesis LC-MS software) o el más utilizado en validación de biomarcadores, SRM o *targeted proteomics* (Madalina Opperman y Isidre Masana). No podemos olvidar la importancia del tratamiento estadístico de datos y la necesidad de desarrollar modelos estadísticos válidos en esta materia. Marco Trevisán-Herraz presentó un nuevo modelo estadístico extrapolable a diferentes métodos de marcaje isotópico y diferentes espectrómetros de masas.

Comentar además que el número de contribuciones fue relativamente bajo (8) evidenciando el carácter novedoso del tema y la dificultad ligada a este tipo de metodología.

La sesión se organizó de manera que las 5 presentaciones orales fueron de 15 minutos (10 minutos en el caso de casas comerciales) todo ello con el fin de favorecer la discusión, para la cual se dedicaron 25 minutos. Dicha discusión fue introducida y moderada por las coordinadoras valiéndose para ello de una revisión bibliográfica hecha con anterioridad a la sesión de modo que diversos artículos relevantes en el campo de la proteómica cuantitativa fueron presentados y comentados con el fin de promover el debate.

A continuación comentaremos brevemente las diferentes contribuciones a esta sesión de proteómica cuantitativa y mencionaremos los puntos que mayor interés suscitaron durante la discusión.

Presentaciones orales

1. “Soluciones a Retos Analíticos en Proteómica Cuantitativa y Validación de Biomarcadores”

Isidro Masana.

Agilent Technologies – Barcelona

Isidro Mansana nos presentó las últimas innovaciones de instrumentación y software que ha desarrollado Agilent para el análisis cuantitativo de péptidos mediante triple cuadrupolos. Un método de validación en Proteómica cada vez más extendido es el “targeted MS” para la detección y cuantificación de péptidos pre-seleccionados en muestras complejas. Los triple cuadrupolos ofrecen la posibilidad de desarrollar métodos de SRM (single reaction monitoring) o MRM (multiple reaction monitoring) en los que el tercer cuadrupolo se usa en un modo de no escaneo y se concentra en la medida de los analitos pre-determinados incrementando el límite de detección. Las ventajas de este método es que el péptido de interés se ve menos afectado por la complejidad de la muestra o el ruido; hay un límite de detección bajo y un mayor rango

dinámico; es más reproducible porque no se adquiere datos redundantes para el análisis y proporciona una cuantificación absoluta precisa de los péptidos que se quieren validar.

2. “Luces y sombras de la cuantificación con iTRAQ”

María Luz Valero.

Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia.

Durante esta presentación oral se discutió el marcaje isobárico con iTRAQ. Pese a que este marcaje isobárico se lleva utilizando más de seis años, las últimas publicaciones en revistas especializadas apuntan a que hay características intrínsecas de la cuantificación relativa a este marcaje isobárico que se han ignorado durante todo este tiempo y se deben tener en cuenta a la hora de analizar resultados derivados de un experimento iTRAQ. La contribución de péptidos isobáricos a un mismo set de iones reporteros provoca que no aparezcan ratios grandes utilizando esta técnica (*flattening effect*). La mayoría de las proteínas en dos muestras complejas a comparar están en una relación 1:1 y al co-eluir los reporteros provocan un descenso en el ratio total de las proteínas que exhiben grandes cambios. Asimismo, el hecho de que los iones reporteros de baja intensidad en un marcaje 8-plex (119 y 121) necesiten un número elevado de péptidos para poder lograr una cuantificación fiable desfavorece la cuantificación de las muestras marcadas con estos *tags*. En esta brillante exposición de la Dr. Luz-Valero repasamos estas y otras desventajas de este marcaje isobárico.

3. “Evaluation of MS^E based protein quantification method”

Kerman Aloria

Proteomics Core Facility-SGIker (ProteoRed).
University of the Basque Country. 48940 Leioa.

Dentro de las diferentes estrategias para el análisis cuantitativo de muestras biológicas, las técnicas *label-free* han emergido como una alternativa prometedora a los métodos basados en marcaje isotópicos. La innovadora metodología MS^E o “*data independent acquisition*” desarrollada por Waters Corporation fue uno de los temas tratados en la sesión que nos concierne. Como contraposición al DDA, en MS^E no se selecciona un precursor para su posterior fragmentación sino que se utilizan energías de colisión alternantes (alta y baja energía) de modo que se fragmentan todos los precursores en un determinado tiempo de retención. Una sola carrera nos dará información exacta de la masa del precursor y sus fragmentos que serán utilizados para su identificación, además de medir la intensidad del precursor, dato que será utilizado para la cuantificación relativa entre proteínas presentes en dos muestras a comparar. Dicha metodología se evaluó en una muestra conocida; posteriormente se llevó a cabo la cuantificación relativa de extractos totales de proteína de linfocitos salvajes frente a linfocitos E2F2^{-/-}. Los resultados obtenidos demuestran la robustez y reproducibilidad de la metodología MS^E para la cuantificación relativa en muestras complejas.

4. “Desarrollo de un Modelo Estadístico Universal para Proteómica Cuantitativa Mediante Marcaje Isotópico Estable”

Marco Trevisan-Herraz.

Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Madrid (CBMSO)

La necesidad de desarrollar modelos estadísticos para el tratamiento de datos de experimentos de proteómica cuantitativa basada en marcaje isotópico es evidente. En el

laboratorio de J. Vázquez han desarrollado recientemente un nuevo modelo estadístico jerárquico de efectos aleatorios para el análisis de los datos de expresión diferencial obtenidos por marcaje con ¹⁸O/¹⁶O y espectrometría de masas en trampa iónica lineal. Avanzando en esta dirección se ha abordado un proyecto cooperativo a gran escala entre varios grupos de investigación con el objetivo de extrapolar dicho modelo estadístico, de forma general, a los métodos de marcaje isotópico más comunes (SILAC y iTRAQ), y a otros espectrómetros de masas. Los resultados presentados mostraron la validez de forma universal del modelo estadístico jerárquico para todos los tipos de marcaje y todos los espectrómetros de masas utilizados, obteniéndose distribuciones que superan los test de normalidad a nivel de medida, a nivel de péptido y a nivel de proteína. Este modelo global ha sido implementado en la plataforma informática QuiXoT, en la que se han desarrollado interfaces para la entrada de datos obtenidos por diferentes motores de búsqueda, equipos y métodos de marcaje.

5. “Triple Quadrupole Mass Spectrometry-Based Peptide Assays Using Intelligent SRM (iSRM)”

Madalina Oppermann.

Thermo Fisher Scientific

Madalina Oppermann, de un modo análogo a Isidro Masana, nos presentó las últimas innovaciones de instrumentación y software que ha desarrollado Thermo Fisher Scientific para el análisis cuantitativo de péptidos mediante triples cuadrupolos utilizando la metodología SRM (targeted proteomics) que tan prometedores resultados está generando.

Posters

6. “iTRAQ-based quantitative analysis of protein mixtures with large fold change and dynamic range”

Juan Casado-Vela¹; María José Martínez-Esteso²; Eva Rodríguez¹; Eva Borrás³; Felix Elortza¹ and Roque Bru-Martínez².

¹Proteomics Platform. CIC bioGUNE, CIBERehd, ProteoRed. Technology Park of Bizkaia, Building 800. Derio, Spain.

² Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Spain

³ Servicio Proteómica. Universidad Pompeu Fabra. Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Dr. Aiguader 88. 08003 Barcelona, Spain

Dos muestras de cuatro y ocho proteínas son cuantitativamente evaluadas usando isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ). En concordancia con lo descrito en la presentación oral de la Dr. Luz-Valero se alcanza un *fold range* de 100 dependiendo del ión reportero utilizado. También se describe la estrategia utilizada para analizar este estándar en un Orbitrap LTQ usando fragmentación de alta energía de colisión (HCD).

7. “Label-free Quantitative Approaches in CSF Biomarker Discovery”

Alex Campos¹, Jacques Borg², Claudio Diema³, Marta Vilaseca³, Eliandre Oliveira¹

¹ Proteomics Platform, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain

² Neurochemistry Lab, Faculty of Medicine, Saint Etienne, France

³ Mass Spectrometry Core Facility, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain

Muestras de fluido cerebrospinal se utilizan para buscar biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas. Estrategias de inmunodepleción de las proteínas más

abundantes, cromatografía multi-dimensional a nivel de proteína y péptido y cuantificación libre de marcaje (*spectral counting method*) se combinan en este trabajo.

8. “A comparison of quantitative proteomics methodologies on a differential experiment on test samples”

Joan Josep Bech-Serra, Núria Colomé, Marta Monge, Francesc Canals.

Laboratori de Proteòmica, Programa de Recerca en Oncologia Mèdica. Institut de Recerca. Hospital Vall d’Hebron, Barcelona

Con el fin de valorar y contrastar el comportamiento de diferentes métodos de proteómica cuantitativa, se prepararon y compararon cuantitativamente dos muestras estándares. Las muestras consistían en una matriz de proteínas citoplasmáticas de *Escherichia coli* de complejidad media (alrededor de 100 proteínas), a la cual se añadieron 4 proteínas de mamífero en diferentes cantidades, en rangos desde fmol a pmol por microgramo de proteína total. Los ratios de las proteínas añadidas a la matriz entre las dos muestras iban desde 1.5:1 a 5:1.

Las mencionadas muestras se analizaron mediante diferentes metodologías:

- 2D-DIGE (4 réplicas técnicas x 2D gel/muestra)
- ICPL (a nivel de proteína y de péptido) (LC-MS)
- iTRAQ 8-plex (LC-MALDI)
- *Label-free* (cuatro carreras LC-MS de la digestión trípica de cada muestra; análisis mediante el software Progenesis LC-MS)

Los resultados de todos los métodos mencionados fueron evaluados a nivel de reproducibilidad y exactitud. Además tanto el comportamiento y la robustez de cada uno de los métodos empleados fueron discutidos.

Discusión

Dos temas acapararon la mayor parte de la discusión de esta sesión de Proteómica cuantitativa: el marcaje isobárico con iTRAQ y la cuantificación *label-free*. Las desventajas y limitaciones de iTRAQ comentadas en la presentación de Luz Valero fueron discutidas en profundidad. Además de lo mencionado anteriormente, se discutió sobre la imposibilidad de diferenciar péptidos que proviene de distintas isoformas que se identifican como una única proteína.

También se discutió sobre los requerimientos principales para poder llevar a cabo un experimento de cuantificación libre de marcaje con éxito, esto es, una cromatografía reproducible y resolutive que permita solapar espectros de distintas muestras e instrumentos de alta precisión y amplio rango dinámico. Un tema de debate generalizado tanto para usuarios de marcaje isotópico como para usuarios de cuantificación libre de marcaje es la necesidad de desarrollar software libre que permita integrar datos obtenidos con instrumentos de distintas casas comerciales.