

Intelligent Use of Retention Time for Higher Order Multiple Reaction Monitoring Multiplexing – *Scheduled MRM™ Algorithm*

Antonio Serna Sanz

Applied Biosystems

The utility of Multiple Reaction Monitoring (MRM) on triple quadrupole based MS systems for biomarker verification/validation studies is currently an active area of investigation, driven by the well known sensitivity and selectivity attributes of this type of MS approach. As more extensive protein panels need to be monitored in a targeted way across multiple samples, higher MRM multiplexing is becoming essential for throughput. The challenges of assay development and running these large scale studies are becoming better understood, the need for rapid assay development, the need for higher multiplexing and the need for more robust assays are some of the key challenges.

In this work, the unique combination of triple quadrupole and ion trapping capabilities of the hybrid triple quadrupole - linear ion trap mass spectrometer (QTRAP® System) has been utilized to create 100s of high quality, specific MRM transitions for multiple peptides to many plasma proteins. Iterative analysis provided rapid refinement of MRM parameters without requiring synthetic peptides. Intelligent use of retention time using new acquisition software enables many more MRM transitions to be included in a single acquisition method, while maintaining good peak area reproducibility. The analytical reproducibility of the MRM method developed was found to be extremely high, even in plasma, with the majority of peptides being measured with %CV<10.

Obesidómica: caracterización del secretoma del tejido adiposo de diferentes localizaciones anatómicas

Arturo Roca-Rivada^{1,2,3}; Jana Alonso⁴; Omar Al-Massadi^{1,2,3}; Luisa María Seoane^{1,2}, Felipe Casanueva^{1,2,3}, María Pardo^{1,2}

¹Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición; ²Laboratorio de Endocrinología Molecular y Celular, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS); ³Departamento de Medicina (Universidad de Santiago de Compostela); ⁴Laboratorio de proteómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas (CHUS/SERGAS)

En los últimos años el tejido adiposo ha pasado de considerarse un órgano inerte con función exclusiva de almacén y movilización de ácidos grasos a calificarse como el órgano endocrino más grande y dinámico del cuerpo. Desde el descubrimiento de la leptina como principal hormona reguladora secretada por el tejido adiposo, han ido surgiendo más

moléculas llamadas adipokinas, implicadas en diferentes aspectos de la regulación del metabolismo. Sin embargo, las adipokinas descubiertas hasta ahora no llegan a explicar convincentemente los complejos mecanismos reguladores de la homeostasis energética ni el desarrollo de los procesos asociados a la obesidad u otros desórdenes alimentarios. Bajo

este contexto es necesaria la búsqueda de nuevas señales secretadas por este órgano para una mejor comprensión de su funcionamiento [1].

Hace tan solo unos pocos años que se empezó a aplicar las técnicas proteómicas al estudio del tejido adiposo; sin embargo, debido a diversas dificultades técnicas innatas a la naturaleza de este tejido, se ha avanzado poco comparado con estudios similares para otro tipo de tejidos. Los estudios sobre la secreción del tejido adiposo son recientes y escasos y hasta la fecha no se ha realizado un estudio comparativo entre los secretomas de los distintos tipos de depósitos grasos [1].

Objetivos

1. Optimización y puesta a punto de las técnicas de proteómica para aplicar al estudio de tejido adiposo procedente de distintos depósitos grasos;
2. Realización de un mapa de referencia de la secreción de tejido adiposo visceral, subcutáneo y gonadal;
3. Identificación y caracterización de proteínas secretadas específicas de cada tejido graso;
4. Estudio diferencial de los secretomas de los tres depósitos grasos en diferentes estados fisiológicos y nutricionales (*ad libitum*, ejercicio, anorexia y obesidad).
5. Validación y estudio fisiológico de proteínas identificadas de interés.

Métodos

Se ha usado como modelo experimental ratas macho Sprague Dawley en condiciones *ad libitum* para la realización de los mapas de referencia. Los explantes de tejido adiposo se incubaron *in vitro* y los secretomas resultantes se concentraron y precipitaron para ser sometidos a electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). Las proteínas identificadas se han caracterizado y clasificado según la base de datos UniProt y el software del servidor SecretomeP 2.0 atendiendo a la presencia/ausencia de péptido señal (SignalP) o su adherencia a una ruta de secreción no clásica. El estudio de expresión diferencial se está realizando con el software Ludesi REDFIN 3, Sweden.

Resultados

Hemos completado los tres primeros objetivos e identificado un total de 188 proteínas diferentes

del secretoma de grasa visceral, 87 de subcutánea y 91 de gonadal.

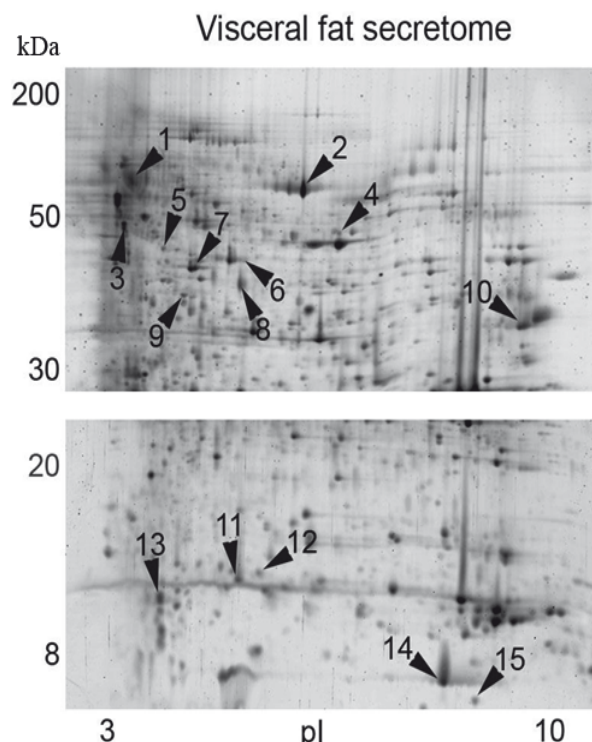


Figura 1. Proteínas comunes secretadas por los tres depósitos grasos. Localización en el secretoma de grasa visceral

El 58% de las proteínas de grasa visceral correspondieron a proteínas secretadas, el 54% en subcutánea y el 45% en gonadal (Tabla 1 y 2). Se han detectado adipocinas clásicas como la adiponectina y el retinol-binding protein 4, así como proteínas todavía no asociadas a este tejido que están siendo validadas.

Conclusiones

El análisis de los secretomas de tejido adiposo muestra patrones de secreción diferente dependiendo de la localización anatómica en condiciones *ad libitum* (Tabla 2). También se muestra la utilidad de la proteómica para la identificación de adipocinas ya conocidas implicadas en diversos procesos metabólicos, así como de proteínas con funciones no tan conocidas en este tejido. El siguiente paso será hacer un estudio diferencial bajo diferentes condiciones fisiológicas.

Tabla 1. Clasificación de las proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF de los tejidos adiposos visceral, subcutáneo y gonadal según los criterios: Proteínas totales, tipo de secreción y proteínas comunes entre los tres depósitos grasos.

	Visceral	Subcutánea	Gonadal
Proteínas identificadas totales	188	87	91
Proteínas secretadas totales	109	47	49
SignalP	31 (16,5%)	13 (15%)	20 (22%)
Ruta de secreción no clásica	78 (41%)	34 (39%)	29 (32%)
Proteínas comunes	27		
Proteínas secretadas comunes	15		

Tabla 2. Proteínas secretadas comunes a los tres depósitos grasos. De las 205 proteínas secretadas e identificadas por MALDI-TOF/TOF sólo 15 son comunes a los tres tipos de depósitos grasos.

Nº Spot	Secretome P2.0	Nombre Proteína	Nº Acceso
1	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT
2	SignalP	Serum albumin	ALBU_RAT
3	SignalP	Calreticulin	CALR_RAT
4	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
5	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
6	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
7	0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
8	SignalP	Cathepsin D	CATD_RAT
9	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
10	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
11	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
12	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT
13	0.698	Thioredoxin	THIO_RAT
14	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
15	SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT

Agradecimientos

CIBERobn (ISCIII), FIS (ISCIII), Merk-Serono y Fundación MM. A.R. está contratado por el programa Lucas Labrada (Xunta de Galicia); L.M.S. y M.P. son investigadoras del SNS Miguel Servet (SERGAS/ISCIII).

Referencias

- [1] Breitling R. Robust signaling networks of the adipose secretome. Trends in Endocrinol Metab 2009; 20: 1-7.