

Aplicación de proteómica cuantitativa y tecnología cHiPLC al estudio de secretomas

Jana Alonso¹, Arturo Roca-Rivada², María Pardo²

¹ Laboratorio de Proteómica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS-CHUS); ² Laboratorio de Endocrinología Molecular y Celular, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS)

janaalonsol@hotmail.com

El exceso de tejido adiposo característico del sobrepeso y obesidad, sobre todo a nivel abdominal o visceral, es responsable de la inflamación sistémica asociada y en consecuencia de enfermedades tales como la diabetes, cardiopatías, e incluso cáncer. El objetivo de este trabajo es la identificación y cuantificación de los factores proteicos secretados por los tejidos adiposos visceral (TAV) y subcutáneo (TAS) con el fin de obtener más información sobre la regulación que ejercen estos tejidos en la obesidad. Este estudio complementa un estudio previo donde analizamos mediante 2-DE los secretomas de tejido adiposo en diferentes localizaciones. En esta ocasión aplicamos el método CILAIR (comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates) para la cuantificación de proteínas secretadas a partir de explantes de TAV y TAS.

El secretoma de proteínas marcadas a partir de explantes de TAV y TAS se obtuvo siguiendo el abordaje experimental descrito por Roelofsen H., et al., 2009. El experimento se realizó por cuadruplicado a partir de explantes de tejido adiposo procedente de cuatro ratas macho distintas. Tras 26.5h en medio libre de Lys, para reducir al mínimo la [¹²C₆]Lys, los explantes fueron incubados 72h con [¹³C₆, ¹⁴N₂]Lys. El secretoma se concentró mediante ultrafiltración, se separó mediante SDS-PAGE, y las bandas resultantes se digirieron con tripsina para su posterior separación por el sistema cHiPLC. La identificación se ha llevado a cabo mediante MALDI-TOF/TOF y la cuantificación se ha determinado calculando el ratio entre los isótopos pesado/ligero usando el software Protein Pilot. Para confirmar si las proteínas identificadas son secretadas se ha utilizado el software SecretomeP.

El método de cuantificación CILAIR, hasta el momento poco extendido en los estudios de proteómica diferencial, es una buena alternativa al SILAC para el estudio cuantitativo de secreción de tejidos, dada su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad en estudio de secretomas.