

## REVISIONES

### Proteómica aplicada al estudio bioquímico de las plaquetas sanguíneas y sus vías de activación

García A.

Investigador Ramón y Cajal. Dpto de Farmacología; Universidad de Santiago de Compostela. Edificio CACTUS; Campus Universitario Sur; 15782 Santiago de Compostela; e-mail: agarcia@usc.es

#### Resumen

Las plaquetas son pequeñas células carentes de núcleo que circulan en la sangre participando en la formación de coágulos en lugares de daño vascular. Desde un punto de vista patológico, la activación plaquetaria indeseada está asociada con las enfermedades trombóticas y cardiovasculares, hoy reconocidas como las principales causantes de muerte en el mundo occidental. El hecho de que las plaquetas carezcan de núcleo, y por tanto de información genómica relevante, hace de la proteómica una tecnología ideal para abordar su bioquímica. En los últimos años se ha progresado de forma significativa en la elucidación del proteoma de las plaquetas humanas en estado basal o no activado. Además, diversos grupos de investigación se han centrado en aplicar la proteómica al estudio de las principales vías de señalización responsables de la activación plaquetaria, lo que ha permitido la identificación de nuevas proteínas de señalización y membrana. En paralelo, también se ha analizado el fosfoproteoma y el secretoma de las plaquetas activadas. De esta manera, se están construyendo las bases para que en un futuro próximo la proteómica de plaquetas pueda contribuir al descubrimiento de nuevos biomarcadores y objetivos terapéuticos que permitan un mejor diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Este artículo revisará los últimos avances centrados en la aplicación de la proteómica al estudio de la biología de las plaquetas.

#### Palabras clave:

Plaquetas, vías de señalización intracelular, 2-DE, LC-MS/MS, fosfoproteoma.

#### I. Las plaquetas como objetivo farmacológico

Las plaquetas son pequeñas células sin núcleo que juegan un papel fundamental a la hora de salvar la vida al dar lugar a la formación de coágulos sanguíneos en lugares de daño vascular. Las plaquetas se originan a partir de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos, células gigantes presentes en la médula ósea. En condiciones normales, las plaquetas circulan como células quiescentes en la corriente sanguínea durante unos diez días, a una concentración media de  $150-400 \times 10^9/L$ , con mínimas interacciones con otros componentes de la sangre y las paredes de los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando la situación lo requiere y hay estímulos suficientes,

las plaquetas pueden reclutar toda una artillería de recursos anatómicos y funcionales para dar lugar a un coágulo hemostático, y de esa manera contribuir al cicatrizado de una herida. Así, cuando se daña el endotelio de un vaso sanguíneo, componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, se unen a receptores en la superficie de las plaquetas, activando vías de señalización intracelular que finalmente dan lugar a una reorganización del citoesqueleto – lo que conlleva cambios morfológicos rápidos y espectaculares -, agregación plaquetaria, y secreción granular (Watson *et al.*, 2001; García *et al.*, 2005).

Desde un punto de vista patológico, la activación plaquetaria indeseada y la correspondiente formación de trombos arteriales están implicadas en el

origen del infarto de miocardio y otras enfermedades trombóticas y cardiovasculares. Así, la aceptación de que las plaquetas juegan un papel fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis ha revolucionado el tratamiento farmacológico de las enfermedades cardiovasculares, y de hecho la aspirina es hoy en día un fármaco antiplaquetario esencial. También se han desarrollado con éxito otros fármacos basados en antagonistas de importantes receptores plaquetarios (Mehta *et al.*, 2001). En cualquier caso, la búsqueda de fármacos antiplaquetarios mejores y más seguros – minimizando los efectos secundarios – así como de biomarcadores que permitan predecir la susceptibilidad a padecer una enfermedad cardiovascular, es hoy en día una de las áreas más potentes en la investigación básica y clínica (Morrow *et al.*, 2007; Vasan, 2006).

Dado que las plaquetas carecen de núcleo, el análisis del proteoma es la mejor manera de abordar su bioquímica. Los análisis del genoma y del transcriptoma están limitados por los bajos niveles de ARNm presentes, y aunque hay estudios recientes que han abordado el estudio del transcriptoma de las plaquetas y de sus células precursoras, los megacariocitos, que han encontrado una correlación entre los ARNm y las proteínas más abundantes (McRedmon *et al.*, 2004; García *et al.*, Platelets 2007), el análisis molecular del transcriptoma de las plaquetas está limitado por el constante decaimiento de ARNm en ausencia de nueva transcripción génica, lo que limita la identificación de transcritos poco abundantes (Gnatenko *et al.*, 2003).

## II. Análisis del proteoma de las plaquetas

### A. Preparación de muestra

Las plaquetas son un buen objetivo para un estudio por proteómica dado que no tienen núcleo y se pueden obtener a partir de la sangre con un gran rendimiento y pureza. A partir de 100 mL de sangre se pueden obtener aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  plaquetas, a partir de las cuales es posible obtener entre 16 y 24 mg de proteína, dependiendo del método de extracción utilizado. A modo de ejemplo, un gel bidimensional de alta resolución (18 x 18 cm) necesita del orden de 700  $\mu$ g de proteína para un análisis adecuado; por lo tanto no es necesario partir de un volumen elevado de sangre.

El método utilizado para el aislamiento de las plaquetas es crucial. El objetivo es obtener una

muestra de alta pureza minimizando la activación plaquetaria. Es así mismo importante minimizar la contaminación de la muestra con otras células sanguíneas, como glóbulos rojos y leucocitos, así como con plasma, para evitar la interferencia causada por proteínas ajenas a las plaquetas. Dichas contaminaciones se pueden evitar cogiendo sólo la mitad superior del *plasma rico en plaquetas* (PRP) y usando filtros para eliminar leucocitos. La pureza de las plaquetas aisladas se puede estimar mediante inspección microscópica y por la ausencia de proteínas específicas de otras células sanguíneas, como las globinas (García *et al.*, 2005).

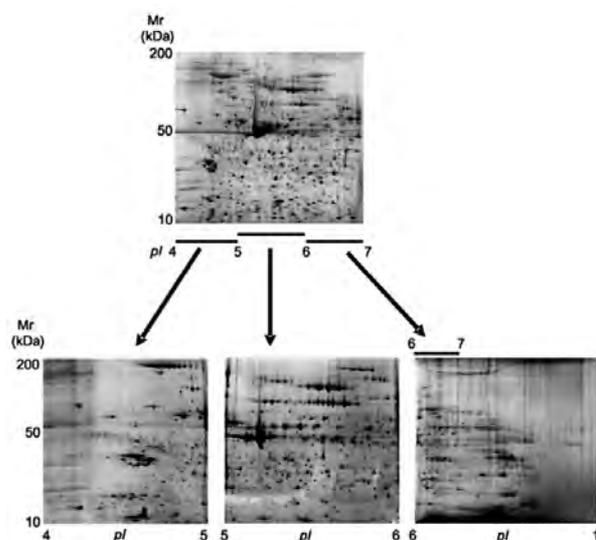
Es esencial extremar las precauciones para evitar la activación espontánea de las plaquetas durante su aislamiento. Sin embargo, no hay un método estándar aceptado de aislamiento, y es probable que variables como la elección de anticoagulante, el tampón de extracción, las velocidades de centrifugación, y la metodología en general, influyan en la naturaleza del proteoma obtenido. El protocolo a utilizar variará dependiendo de si se quiere trabajar con lisados celulares totales o con subproteomas (estudios de organelas, proteínas de membrana, secretomas, etc.). Otro tema fundamental es la mejora y estandarización de las condiciones de extracción de proteína. El método de extracción de proteína a utilizar, incluyendo el tampón donde las proteínas se disuelven para su separación / análisis, varía dependiendo de la aproximación experimental para el análisis proteómico. En general, es importante el usar inhibidores de proteasas y fosfatasa, así como evitar la presencia de sales, lípidos y ácidos nucleicos en la muestra final, lo que es especialmente relevante si el análisis proteómico se va a basar en electroforesis bidimensional (2-DE). Para obtener una muestra de proteína de alta pureza y mejorar la calidad de los geles 2D, especialmente en la región más básica, es recomendable el llevar a cabo una precipitación de proteínas seguida de una eliminación de lípidos. Una opción preferida – especialmente para el análisis de proteínas intracelulares mediante 2-DE – es el lisado de las plaquetas en nitrógeno líquido seguido de una precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) y acetona en presencia de inhibidores de proteasas. El precipitado de proteínas se lava a continuación con acetona fría para eliminar lípidos y se disuelve en un tampón adecuado para el enfoque isoeléctrico (primera dimensión de la 2-DE), de manera que permita conservar la carga nativa de las proteínas (García *et al.*, 2004a). Conviene resaltar que la preparación de la muestra y el tampón

utilizado para disolver las proteínas suelen variar entre grupos de investigación, lo que influye en la inter-reproducibilidad de los análisis entre distintos laboratorios.

### B. Análisis del proteoma de las plaquetas en estado basal

La electroforesis bidimensional lleva empleándose en el estudio de la biología de las plaquetas durante más de 30 años (García *et al.*, 2007). Sin embargo, no fue hasta el año 2000 cuando se inició el salto hacia delante que supuso el empezar a aplicar la espectrometría de masas al estudio del proteoma de las plaquetas, sacando partido al desarrollo que para la espectrometría de masas supuso el descubrimiento a finales de los 80s de métodos “blandos” de ionización de biomoléculas como el MALDI y el electrospray (Karas y Hillenkamp, 1988; Fenn *et al.*, 1989; Aebersold y Mann, 2003). Fue a partir de entonces cuando se inició el campo de la proteómica de plaquetas. En un primer estudio se identificaron 186 proteínas mediante MALDI-TOF, tras su separación mediante 2-DE, lo que también permitió obtener el primer mapa del proteoma de las plaquetas en un rango de pI de 3 a 10 (Marcus *et al.*, 2000). Este primer trabajo fue enseguida superado por las investigaciones que llevamos a cabo en el *Glycobiology Institute* de la Universidad de Oxford, que condujeron entre los años 2002 y 2004 a la publicación del estudio más exhaustivo del proteoma de las plaquetas humanas jamás realizado mediante 2-DE, permitiendo la obtención de un mapa con más de 2000 proteínas. Para ello, las proteínas fueron separadas mediante 2-DE, usando geles zoom con un gradiente estrecho de pH para el enfoque isoeléctrico (4-5, 5-6, 4-7, y 6-11) y geles en gradiente 9-16% (18 x 18 cm) para la segunda dimensión (SDS-PAGE) (Figura 1). Los geles se tiñeron con una tinción fluorescente altamente sensible, y los correspondientes *spots* con las proteínas de interés fueron cortados y las proteínas digeridas en el propio gel con tripsina antes de ser analizadas mediante LC-MS/MS. En total se identificaron más de 1000 proteínas correspondientes a 411 genes diferentes. El principal grupo de proteínas identificado se correspondió con proteínas de señalización (24%), y cabe resaltar que un 45% de las proteínas identificadas no habían sido descritas en plaquetas con anterioridad, lo que indicaba el gran potencial de la proteómica para el estudio bioquímico de las plaquetas (O'Neill *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004a). La identificación de un alto porcentaje de proteínas

de señalización supuso un impulso a la utilización de la proteómica para el estudio de la activación plaquetaria a nivel molecular, tal y como se repasará más adelante.



**Figura 1. Análisis del proteoma de las plaquetas humanas mediante 2-DE.** Se muestran los geles de pI 4-5, 5-6, 4-7, y 6-11. Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas y se pueden consultar en la página [www.bioch.ox.ac.uk/glycob/ogp](http://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/ogp). (Figura publicada originalmente en *Mass Spectrometry Reviews*. “García A, Watson S P, Dwek R A, Zitzmann N. 2005. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass spectrometry reviews* 24:918-930”. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproducida con permiso).

Un subgrupo de proteínas deficientemente analizado mediante 2-DE es el de las proteínas de membrana, principalmente debido a los conocidos problemas de solubilización de dichas proteínas en el tampón utilizado para la separación por enfoque isoeléctrico (primera dimensión). Aproximadamente un 30% de todas las proteínas se pueden describir como de membrana; sin embargo, sólo un 3% de las proteínas identificadas en los estudios de la Universidad de Oxford se correspondían con esa subclase. Uno de los métodos alternativos al 2-DE desarrollados recientemente es el llamado “combined fractional diagonal chromatography” (COFRADIC). Este método se basa en una reacción de modificación que altera el tiempo de retención de determinados péptidos (N-terminales, con cisteínas o con metioninas) en la columna de fase reversa en el nano HPLC previo al análisis por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Este procedimiento es aproximadamente 100 veces más sensible que el análisis basado en 2-DE y se puede llevar a cabo de una manera totalmente automatizada (Gevaert *et*

*al.*, 2003). La tecnología COFRADIC se ha aplicado al estudio del proteoma general de las plaquetas, permitiendo la identificación de un total de 641 proteínas, el grupo más extenso jamás identificado hasta el año 2005, destacando la identificación de un considerable número de proteínas de membrana (Martens *et al.*, 2005). Es precisamente esto último una de las principales ventajas de la tecnología COFRADIC respecto a la 2-DE. Una desventaja a resaltar sería la falta de información sobre el pI de las proteínas identificadas, lo que dificulta el análisis de modificaciones post-traduccionales (PTMs). Sin embargo, ambos métodos son complementarios, poniéndose de manifiesto que los métodos de separación “libres de geles” son capaces de solventar algunas de las limitaciones de la 2-DE.

### C. Prefraccionamiento subcelular combinado con 1D-SDS-PAGE: análisis de proteínas de membrana

Una de las mejores maneras de incrementar la cobertura del análisis del proteoma consiste en combinar estrategias de prefraccionamiento de las muestras con anterioridad a la electroforesis y al análisis por LC-MS/MS. Entre los principales métodos de prefraccionamiento se encuentran el uso de disoluciones de extracción más o menos potentes, precipitación selectiva, purificación por afinidad de proteínas individuales o de un complejo de proteínas, métodos de separación cromatográfica, eliminación de las proteínas más abundantes para mejorar la detección de las más escasas, y prefraccionamiento subcelular (García *et al.*, 2005). La combinación de estas estrategias con la separación mediante 1D-SDS-PAGE permite la identificación de muchas proteínas que son difíciles de analizar mediante 2-DE, como es el caso de las proteínas de membrana. Aproximadamente el 70% de las dianas farmacológicas existentes son proteínas de la membrana plasmática (Hopkins y Groom, 2002). Así pues, el mapeo de la superficie de las plaquetas podría contribuir a la identificación de nuevos objetivos farmacológicos y a un mejor conocimiento de los complejos de señalización anclados a la parte interior de dicha superficie. En los últimos años, dos grupos de investigación han liderado el estudio de proteínas de membrana en plaquetas. En 2005, el grupo de Sickmann y colaboradores presentó un primer estudio en el cual llevaron a cabo un prefraccionamiento y purificación de membranas a partir de plaquetas humanas, basado en un gradiente de sorbitol, lo que les permitió deshacerse de las proteínas del citoesqueleto, altamen-

te abundantes en las plaquetas. Así se obtuvo una fracción enriquecida en proteínas de membrana, que fue estudiada mediante separación de las proteínas por 1D-SDS-PAGE y posterior análisis por nano-LC-ESI-MS/MS (Moebius *et al.*, 2005). De las 297 proteínas identificadas en este estudio, 83 (28%) se correspondieron a proteínas de membrana, lo que indica el éxito del método en relación con los estudios antes mencionados basados en 2-DE. Este primer estudio fue complementado más recientemente con otro en el que la fracción enriquecida en proteínas de membrana fue obtenida mediante partición acuosa en dos fases, una conteniendo PEG 3350 y otra dextrano T500, seguida de prefraccionamiento en HPLC por columna de intercambio catiónico, para centrarse en el análisis de proteínas glicosiladas - ya que el mapeo de lugares de N-glicosilación en proteínas de membrana era el objetivo fundamental del trabajo - y análisis mediante nano-LC-ESI-MS/MS (Lewandrowski *et al.*, 2007). Así se identificaron 148 lugares de glicosilación en 79 proteínas diferentes, 89% de las cuales eran proteínas de membrana (64% de membrana plasmática).

Recientemente, Senis y colaboradores emplearon un abordaje global para el estudio del proteoma de la superficie de las plaquetas humanas mediante proteómica. Dicho abordaje se basó en la utilización de tres métodos diferentes para obtener fracciones enriquecidas en proteínas de membrana plasmática previo a su separación por 1D-SDS-PAGE e identificación por LC-MS/MS: cromatografía de afinidad por lectinas, cromatografía de afinidad biotín/NeutrAvidin, y electroforesis de flujo libre. Cada método permitió la identificación de proteínas de membrana desconocidas hasta entonces en plaquetas. A modo de ejemplo, que fue validado mediante el desarrollo de anticuerpos para estudios bioquímicos más detallados, se identificó la proteína G6b-B. Dichos estudios demostraron que esta proteína se fosforila en residuos tirosina y se asocia con la fosfatasa con dominios SH2, SHP-1, en plaquetas estimuladas lo que sugiere que puede jugar un papel novedoso limitando la activación plaquetaria (Senis *et al.*, 2007).

### D. Análisis del secretoma de las plaquetas

La combinación de cromatografía líquida bidimensional (LC/LC) - donde los péptidos se separan en dos dimensiones mediante cromatografía de intercambio catiónico y fase reversa - y MS/MS, ha sido clave para la caracterización del secretoma de las plaquetas recientemente llevado a cabo por Coppinger y col. (Coppinger *et al.*, 2004). Para dicho

análisis, las plaquetas fueron primeramente estimuladas con trombina (0.5 U/mL durante 3 min) para conseguir la máxima secreción posible a partir de los gránulos internos. La obtención de la fracción correspondiente a las proteínas liberadas tras la estimulación se consiguió mediante centrifugación. Las proteínas fueron a continuación digeridas con tripsina y la correspondiente mezcla peptídica analizada por LC/LC – MS/MS. El experimento se repitió tres veces, permitiendo la detección de forma consistente de 81 proteínas, consiguiéndose un éxito en cuanto a la reproducibilidad del análisis de un 80%. Cabe destacar que algunas de las proteínas identificadas no habían sido descritas en plaquetas con anterioridad, y que tres de ellas – secretogranin III, cyclophilin A, y calumenin – aparte de estar presentes en plaquetas, se identificaron de forma específica en lesiones ateroscleróticas humanas, lo que indica el potencial del estudio desde un punto de vista clínico.

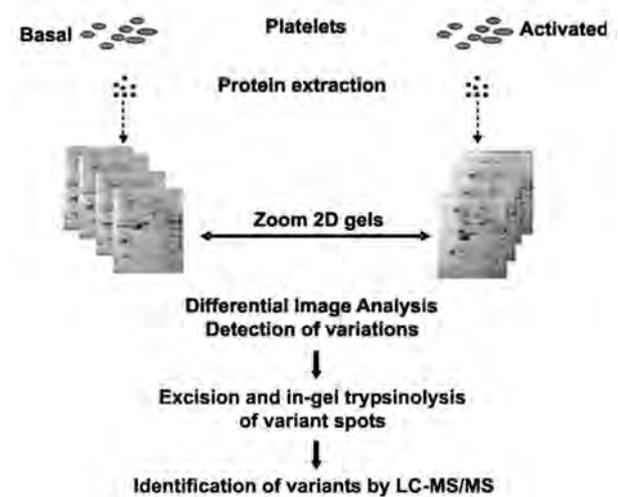
**E. Análisis de vías de señalización intracelular: el proteoma de las plaquetas activadas**

El proteoma de una célula puede sufrir cambios considerables con el paso del tiempo y en respuesta a estimulaciones puntuales. En el caso de las plaquetas, los mayores cambios en su proteoma tras su activación se deben a PTMs, ya que las plaquetas tienen una capacidad muy limitada de sintetizar proteínas *de novo*. Una de las principales PTMs es la fosforilación de las proteínas en residuos serina, treonina, o tirosina, ya que dichas fosforilaciones modulan cascadas de señalización intracelular en las plaquetas – responsables de la acción biológica de las mismas. El estudio del proteoma de las principales cascadas de señalización debe aportar información relevante sobre los mecanismos moleculares que regulan la activación plaquetaria, con las consiguientes implicaciones desde un punto de vista farmacológico.

Unos cuantos grupos de investigación se han dedicado a estudiar durante los últimos años el proteoma de las plaquetas humanas activadas. La mayoría de los estudios se han centrado en el proteoma de las plaquetas activadas con trombina, uno de los más poderosos agonistas plaquetarios. Aunque la trombina activa principalmente serina y treonina quinasas, y más débilmente tirosina quinasas, la baja eficiencia de anticuerpos anti serina y treonina para estudios por proteómica basados en inmunoprecipitaciones, hizo que varios de los estudios se centrasen en estudiar el fosfoproteoma - basado en tirosinas – de las

plaquetas activadas con trombina (Maguire *et al.*, 2002; Marcus *et al.*, 2003). Estos estudios se basaron en 1D-SDS-PAGE y 2-DE para la separación de las fosfoproteínas, y MALDI-TOF MS y LC-MS/MS para el análisis de las mismas. Se trata de trabajos fundamentalmente descriptivos, que abrieron el camino para futuras investigaciones, pero en los que no se profundizó en el significado biológico de los hallazgos obtenidos mediante proteómica.

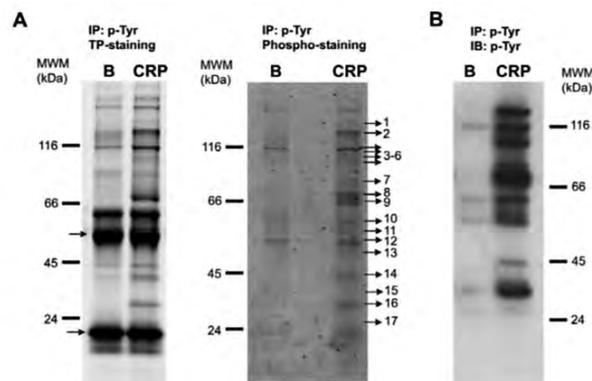
En el grupo de proteómica del *Oxford Glycobiology Institute*, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford (Reino Unido), nos hemos centrado en los últimos años en el análisis de las principales vías de activación en plaquetas, comenzando por la activación del receptor de trombina en humanos, PAR-1. En este primer trabajo, se abordó el estudio del proteoma de plaquetas activadas con *thrombin receptor activating peptide* (TRAP), agonista específico de PAR-1, comparado con el de plaquetas sin activar (García *et al.*, 2004b). El estudio proteómico se llevó a cabo en condiciones de inhibición de la agregación plaquetaria, y estuvo basado en 2-DE y MS (Figura 2).



**Figura 2. Diseño experimental de un análisis proteómico mediante 2-DE para estudiar vías de señalización intracelular en plaquetas.** Las proteínas procedentes de plaquetas basales y activadas son separadas mediante geles bidimensionales zoom (rango estrecho de pH). Tras un minucioso análisis de imagen diferencial, comparando los distintos grupos de geles, los spots de interés son extraídos del gel y las proteínas digeridas con tripsina. Las proteínas son identificadas por espectrometría de masas, idealmente LC-MS/MS. (Figura publicada originalmente en *Mass Spectrometry Reviews*. “García A, Watson S P, Dwek R A, Zitzmann N. 2005. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass spectrometry reviews* 24:918-930”. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproducida con permiso).

Así se identificaron 41 proteínas, correspondientes a 31 genes diferentes, que se regulaban diferencialmente tras estimular las plaquetas con TRAP. La mayor parte de dichas proteínas se correspondía con proteínas de señalización – como era de esperar – incluyendo varias cuya presencia en la cascada de señalización de PAR-1 y en las plaquetas en general era desconocida. Las proteínas más interesantes fueron validadas mediante experimentos clásicos de bioquímica y biología molecular basados en el uso de anticuerpos específicos. A modo de ejemplo, se identificó la proteína adaptadora *downstream of tyrosine kinases-2* (Dok-2), que se comprobó se fosforilaba en residuos tirosina en respuesta a la estimulación de las plaquetas con TRAP. Se comprobó que dicha fosforilación se potenciaba de forma significativa mediante señalización “de afuera hacia adentro” a través de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (principal receptor responsable de la agregación plaquetaria). Además, los estudios funcionales llevados a cabo revelaron la implicación de Dok-2 en otras cascadas de señalización, con la posibilidad de jugar un papel relevante en la activación plaquetaria. Este trabajo marcó la pauta a seguir para estudiar mediante proteómica vías de señalización en plaquetas, ilustrando como la proteómica puede ser muy relevante para la adquisición de información valiosa en este campo (Weyrich *et al.*, 2004). Siguiendo en esta línea, llevamos a cabo el estudio por proteómica más detallado jamás realizado sobre la cascada de señalización de la glicoproteína VI (GPVI), el principal receptor responsable de la activación de las plaquetas por colágeno (García *et al.*, 2006). Se trató de un abordaje global en el que las plaquetas fueron activadas con *collagen-related peptide* (CRP), un agonista específico para GPVI. Se comparó el proteoma de las plaquetas activadas y sin activar, centrándose el estudio en aquellas proteínas fosforiladas en residuos tirosina, ya que la mayoría de las proteínas conocidas de la vía de señalización de GPVI son de este tipo. El abordaje experimental se basó en 2-DE y MS por un lado, e inmunoprecipitaciones con un anticuerpo específico para fosfotirosina, seguidas de 1D-SDS-PAGE, tinción para fosfoproteínas y MS por el otro (Figura 3). De esta manera, se identificaron 96 proteínas que varían en respuesta a la activación de las plaquetas con CRP, incluyendo 11 nuevas. Cabe destacar que este estudio permitió identificar en una sola vez casi todas las proteínas conocidas que participan en la vía y algunas nuevas, como la proteína de membrana G6f, sobre las cuales se llevó a cabo una investigación más en detalle. En el caso de G6f, se vio que se fosforilaba en la Tyr-281 en respuesta a CRP y que dicha fosforilación permitía la unión de dicha

proteína a Grb2, una proteína adaptadora de especial relevancia en la vía de GPVI. Esto abrió nuevas vías de investigación sobre el significado biológico de G6f, que se están explorando en la actualidad.



**Figura 3. Análisis de las proteínas fosforiladas en tirosina tras estimular las plaquetas con CRP.** (A) Izquierda, tinción proteica total (fluorescente) de un gel 4-12% NuPAGE Bis-Tris donde se aprecian las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate) en plaquetas basales y estimuladas con CRP (las flechas indican las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada de la IgG); derecha, tinción de un gel equivalente visualizando sólo las fosfoproteínas (tinción con Pro-Q Diamond). Las bandas indicadas fueron extraídas del gel para su análisis. Las proteínas identificadas se pueden consultar en García *et al.*, 2006. (B) Similar a (A) pero en vez de teñir el gel, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (western blot), para visualizar las proteínas fosforiladas en residuos tirosina. B, plaquetas basales; CRP, plaquetas estimuladas con Collagen-related peptide (10  $\mu$ g/mL, 90 s); IB, inmunoblot; IP, inmunoprecipitación; TP, proteína total. (Figura publicada originalmente en *Proteomics*. “García A, Senis YA, Antrobus R, Hughes CE, et al. 2006. A global proteomics approach identifies novel phosphorylated signaling proteins in GPV-activated platelets: involvement of G6f, a novel platelet Grb2-binding membrane adapter. *Proteomics* 6:5332-5343”. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproducida con permiso).

Recientemente continuamos con la línea de investigación antes mencionada gracias a una colaboración entre las Universidades de Santiago de Compostela, Oxford y Birmingham. En la actualidad estamos analizando el proteoma de plaquetas adheridas a fibrinógeno (vía de señalización de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3), trabajando con plaquetas procedentes de individuos sanos y con enfermedades cardiovasculares (Senis y García, resultados no publicados).

### III. Conclusiones y perspectivas futuras

Esta revisión ha puesto de manifiesto como en los últimos años la proteómica ha contribuido a un

mejor conocimiento sobre la biología de las plaquetas, especialmente en lo que se refiere a análisis diferenciales que han permitido estudiar vías de señalización intracelular o las proteínas liberadas por las plaquetas tras su activación. Por supuesto ello no habría sido posible sin los grandes avances que en los últimos años se han llevado a cabo con la secuenciación del genoma humano y el desarrollo de la proteómica basada en la espectrometría de masas. Es previsible que en el futuro dichos avances continúen y que disminuyan los trabajos centrados en un mapeo general del proteoma y aumenten aquellos más específicos que hagan uso de la proteómica, combinada con métodos clásicos de bioquímica y biología molecular, para estudiar procesos biológicos concretos relevantes para las plaquetas. Así mismo, es esperable que la proteómica de plaquetas pueda ser aplicada de forma eficiente a la investigación traslacional. Ello sólo será posible si investigación clínica y básica caminan de la mano para poder llevar a cabo estudios coherentes, reproducibles y que ofrezcan resultados relevantes desde un punto de vista biomédico.

En resumen, estamos ante un futuro prometedor para la proteómica aplicada a la investigación sobre plaquetas, y cardiovascular en general. Los avances recientes en este joven campo de investigación, y los que tendrán lugar en un futuro próximo, permitirán aumentar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de activación plaquetaria e identificar nuevos biomarcadores y objetivos terapéuticos que mejoren el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades trombóticas y cardiovasculares.

#### IV. Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Yotis Senis y al Prof. Steve Watson, de la Universidad de Birmingham (Reino Unido), así como a la Dra. Nicole Zitzmann y al Prof. Raymond Dwek, de la Universidad de Oxford (Reino Unido), por su apoyo y colaboración. Así mismo quisiera expresar mi agradecimiento a las fuentes de financiación: Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto SAF2007-61773), Consellería de Educación de la Xunta de Galicia (ayuda para la creación de un grupo emergente), y Oxford Glycobiology Institute Endowment.

#### V. Bibliografía

Aebersold R, Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198-207.

- Coppinger J A, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, et al. 2004. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 103:2096-2104.
- Fenn J B, Mann M, Meng C K, Wong S F, Whitehouse C M. 1989. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64-71.
- García A, Prabhakar S, Brock C J, Pearce A C, et al. 2004a. Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4:656-668.
- García A, Prabhakar S, Hughan S, Anderson T W, et al. 2004b. Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. *Blood* 103:2088-2095.
- García A, Watson S P, Dwek R A, Zitzmann N. 2005. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass spectrometry reviews* 24:918-930.
- García A, Senis Y A, Antrobus R, Hughes C E, et al. 2006. A global proteomics approach identifies novel phosphorylated signaling proteins in GPV-activated platelets: involvement of G6f, a novel platelet Grb2-binding membrane adapter. *Proteomics* 6:5332-5343.
- García A, Senis Y, Tomlinson M G, Watson S P. 2007. Platelet genomics and proteomics. En: *Platelets* (Michelson A D, ed), pp: 99-116. Elsevier / Academic Press, Oxford, UK.
- Gevaert K, Goethals M, Martens L, Van Damme J, et al. 2003. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nature Biotechnology* 21:566-569.
- Gnatenko D V, Dunn J J, McCorkle S R, Weissmann D, et al. 2003. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* 101:2285-2293.
- Hopkins A L, Groom C R. 2002. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery* 1:727-730.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 daltons. *Analytical Chemistry* 60:2299-2301.
- Lewandrowski U, Zahedi R P, Moebius J, Walter U, et al. 2007. Enhanced N-glycosylation site analysis

- of sialoglycopeptides by strong cation exchange pre-fractionation applied to platelet plasma membranes. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:1933-1941.
- Maguire P B, Wynne K J, Harney D F, O'Donoghue N M, et al. 2002. Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics* 2:642-648.
- Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer H E. 2000. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* 21:2622-2636.
- Marcus K, Moebius J, Meyer H E. 2003. Differential analysis of phosphorylated proteins in resting and thrombin-stimulated human platelets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376:973-993.
- Martens L, Van Damme P, Van Damme J, Staes A. et al. 2005. The human platelet proteome mapped by peptide-centric proteomics: a functional protein profile. *Proteomics* 5:3193-31204.
- McRedmond J P, Park S D, Reilly D F, Coppinger J A, et al. 2004. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Molecular & Cellular Proteomics* 3:133-144.
- Mehta S R, Yusuf S, Peters R J, Bertrand M E, et al. 2001. Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial (CURE) investigators. *Lancet* 358:527-533.
- Moebius J, Zahedi R P, Lewandrowski U, Berger C, et al. 2005. The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 4:1754-1761.
- Morrow D A, Braunwald E. 2003. Future biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy. *Circulation* 108:250-252.
- O'Neill E E, Brock C J, von Kriegsheim A F, Pearce A C, et al. 2002. Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics* 2:288-305.
- Senis Y A, Tomlinson M G, García A, Dumon S, et al. 2007. A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:548-564.
- Vasan R S. 2006. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 113:2335-2362.
- Watson S P, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, et al. 2001. The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thrombosis and Haemostasis* 86:276-288.
- Weyrich A S, Zimmerman G A. 2004. Propelling the platelet proteome. *Blood* 103:1979.