

- Rosengren A T, Salmi J M, Aittokallio T, Westerholm J *et al.* 2003. Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics* 3: 1936-1946.
- Sadowski P, Dunkley T P J, Shadforth I P, Dupree P *et al.* 2006. Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins. *Nature Protocols* 1: 1778-1789.
- Smit S, Hoefsloot H C J y Smilde A K. 2007. Statistical data processing in clinical proteomics. *Journal of Chromatography B* (en prensa, DOI 10.1016/j.jchromb.2007.10.042).
- Tong W, Hong H, Fang H, Xie Q *et al.* 2003. Decision forest: combining the predictions of multiple independent decision tree models. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43: 525-531.
- Verhoeckx K C, Gaspari M, Bijlsma S, van der Greef J *et al.* 2005. In search of secreted protein biomarkers for the anti-inflammatory effect of beta2-adrenergic receptor agonists: application of DIGE technology in combination with multivariate and univariate data analysis tools. *Journal of Proteome Research* 4: 2015-2023.
- Wasinger V, Cordwell S, Cerpa-Poljak A, Yan J *et al.* 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16: 1090-1094.
- Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, Ou K *et al.* 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *BioTechnology* 14: 61-65.
- Wilkins M R, Appel R D, Van Eyk J E, Chung M C M *et al.* 2006. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics* 6: 4-8.
- Zelditch M L; Swiderski D L; Sheets H D; Fink W L. 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Academic Press, Nueva York, Estados Unidos.

## El plasma ICP para la ionización elemental en Espectrometría de Masas: su aplicación en Proteómica Cuantitativa”

*Alfredo Sanz-Medel*

Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo (Asturias). E-mail: asm@uniovi.es

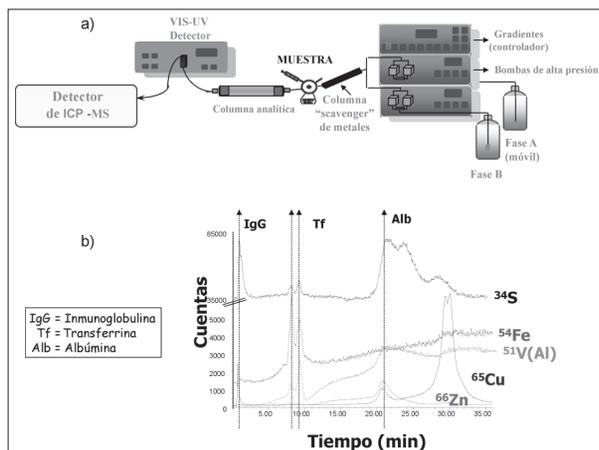
### Introducción

A estas alturas ya nadie discute que la Espectrometría de Masas (EM) se ha convertido en una de las técnicas clave, probablemente la más poderosa por su sensibilidad y aplicabilidad a problemas reales, para la caracterización de proteínas. No es de extrañar, pues, que las técnicas de EM ya clásicas (e.g. MALDI-MS y ESI-(MS)<sup>n</sup>) sean hoy imprescindibles en estudios de proteómica estructural y funcional. Asimismo, la importancia y aplicaciones de la EM analítica crece enormemente en los últimos años también en el área emergente de la biología de sistemas.

En cualquier caso, tales técnicas “convencionales” de EM proporcionan una información química

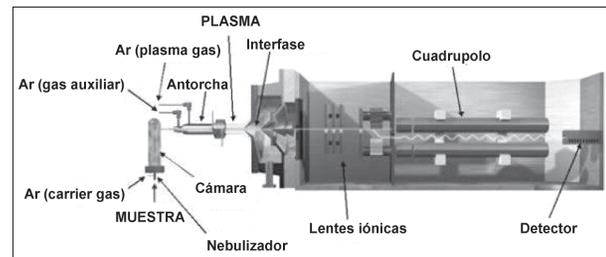
molecular, es decir, de las moléculas, de los aminoácidos, péptidos y proteínas buscados. Mucho menos conocida en el mundo de la Proteómica (mi asistencia a congresos de Espectrometría de Masas en los simposios dedicados a su aplicación en proteínas así lo corrobora de forma irrefutable) es la Espectrometría de Masas Elemental, que utiliza como fuente de ionización un plasma inducido de radiofrecuencias (el ICP-MS). En este caso, la información directa obtenida es atómica, es decir, de los elementos constitutivos de la biomolécula. Por eso, para conocer la naturaleza de la especie química concreta (biomolécula) donde se halla el elemento medido por ICP-MS es preciso acoplar ese detector a un sistema de separación previa y potente de la biomolécula estudiada (p.e. HPLC, CE o electroforesis 2D) en la

cual se halla dicho elemento. Desde luego, “el tiempo de retención” (p.e. en HPLC) da idea de la naturaleza química del compuesto que origina un pico cromatográfico dado y, por tanto, realizar un barrido de la presencia del elemento en estudio en los picos cromatográficos obtenidos (biocompuestos) con esta detección por ICP-MS es rapidísimo. Por ello, la técnica “híbrida” o acoplada HPLC-ICP-MS (ver esquema típico de la instrumentación y del tipo de cromatograma en la Figura 1) se ha desarrollado con gran rapidez en el campo del análisis de trazas metálicas en materiales biológicos. Dicha estrategia ha demostrado recientemente poseer también un extraordinario potencial para Proteómica, como una herramienta complementaria a las otras técnicas de EM moleculares. La capacidad excepcional del ICP-MS de monitorizar y determinar cualquier “heteroelemento” (significando así cualquier elemento en la biomolécula excepto los mayoritarios: C, H, O y N) de forma casi específica, con pocas interferencias y a niveles de ppt ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en muestras reales está hoy bien documentada.



**Figura 1.** a) Esquema del dispositivo instrumental típico de acoplamiento de una separación por HPLC seguida de una detección molecular (VIS-UV) y elemental (ICP-MS); b) Un cromatograma típico con detección “elemental” (por ICP-MS), siguiendo la pista simultáneamente a S, Fe, V, Al, Cu y Zn

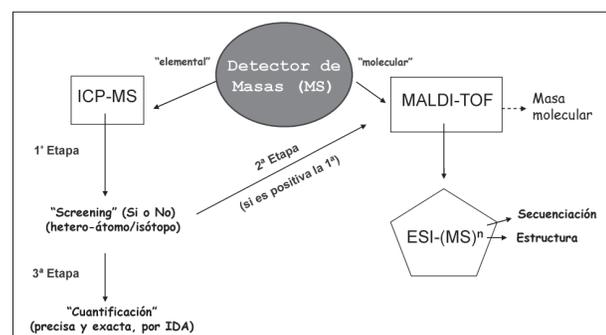
Gracias al empleo de un plasma tan robusto como el ICP para ionizar (ver un esquema de un ICP-MS completo en la Figura 2) en la zona más caliente de dicho plasma llegan a alcanzarse los  $10.000^\circ\text{K}$ , de modo que es posible conseguir el “screening” rápido y fiable de la presencia de heteroátomos (con la relación masa/carga,  $m/z$ , deseada) de gran importancia biológica (e.g. metales, semimetales, P, S, etc) y que son parte constitutiva de las proteínas de interés.



**Figura 2.** Un esquema de componentes de un ICP-MS clásico (de cuadrupolo)

## Concepto de Proteómica guiada por un heteroátomo

Tras una separación adecuada por HPLC y detección final por ICP-MS, mezclas muy complejas de proteínas u otras biomoléculas (e.g. metaloproteínas o selenoproteínas en un tejido) se pueden estudiar y determinar de modo rápido y con gran fiabilidad ya que el ICP-MS solo “ve” el heteroátomo (o hetero-isótopo,  $m/z$ ) deseado en dicha biomolécula. Esta estrategia de simplificar el problema inicial ha dado lugar muy recientemente a un concepto nuevo denominado “heteroatom(isotope)-tagged proteomics” (Sanz-Medel, 2008). Dicha estrategia consiste en la simplificación inicial de las complicadas mezclas de proteínas, resultantes de un material biológico real, gracias a emplear un detector elemental, el ICP-MS, que solo sigue la pista en tales mezclas a un heteroátomo(isótopo) dado. Como se ve en la Figura 3, que resume tal estrategia de trabajo, la detección inicial por ICP-MS (detector mucho más sensible y robusto que los MS más convencionales) permite hacer el primer “screening” de la presencia del heteroátomo deseado en cualquier biocompuesto separado de la mezcla (1ª etapa en la Figura 3). Si existe en el pico (compuesto) dicho elemento, se pasa a la 2ª etapa, la de aislar tal especie y proceder al escrutinio “molecular” de cada compuesto por MALDI- y/o ESI-(MS)<sup>n</sup>.



**Figura 3.** Una estrategia general de trabajo en “heteroatom-tagged proteomics”

Finalmente, una vez identificada/caracterizada la(s) biomolécula(s) de interés conteniendo el heteroátomo por tales técnicas, es posible proceder a la 3ª etapa, es decir, la cuantificación segura, fiable y exacta de la masa absoluta de la proteína seleccionada, sea por referencia a una curva de calibrado (con estándares) o bien recurriendo a la técnica de Disolución Isotópica.

La importancia del concepto de “heteroatom (isotope)-tagged proteomics” (es decir, “proteómica inicial guiada por la medida de un heteroátomo concreto”) se amplifica por la capacidad del ICP-MS para medir con precisión abundancias y relaciones isotópicas. Esta facultad abre nuevos horizontes en estudios cuantitativos (vía análisis por dilución isotópica) así como en estudios de metabolismo con isótopos “marcados” (que, contrariamente a lo que ocurre con los radioisótopos, son estables, no emiten radiación y pueden investigarse tras su administración en humanos).

Desde luego, el uso del ICP-MS en dichas estrategias no excluye el empleo de los métodos de EM ya clásicos (o “moleculares”). Por el contrario, su papel como “detector elemental e isotópico” es complementar a dichos métodos y técnicas “moleculares”, que siguen siendo indispensables para la identificación y caracterización de las biomoléculas que contenían el heteroátomo (moléculas que, tal vez, pudieron ser detectadas por primera vez utilizando el ICP-MS, debido a su gran sensibilidad).

La abrumadora importancia actual de las fuentes MALDI- o ESI- (MS) en Proteómica no se eclipsa por la aceptación de una nueva fuente de iones como el ICP que viene a complementar a las que ya recibieron la mitad del Premio Nobel de Química en 2002 (J. Fenn, por su introducción del Electrospray [ESI] y K. Tanaka por su trabajo con la “matrix-assisted laser-desorption ionization” [MALDI]).

### Algunas Aplicaciones ilustrativas

La importancia actual de esta “Proteómica guiada” por el ICP-MS (a través de un elemento o heteroátomo de importancia biológica) es cada vez más clara y trataré de ilustrarla brevemente, a tres niveles, con experimentos escogidos de nuestro propio laboratorio:

- a) “Screening” de metales en proteínas y en sus mezclas complejas (e.g. leche humana).
- b) Proteómica cuantitativa en modificaciones post-traduccionales de proteínas (PTMs)

“naturales”, p.e. en metaloproteómica y fosfoproteómica.

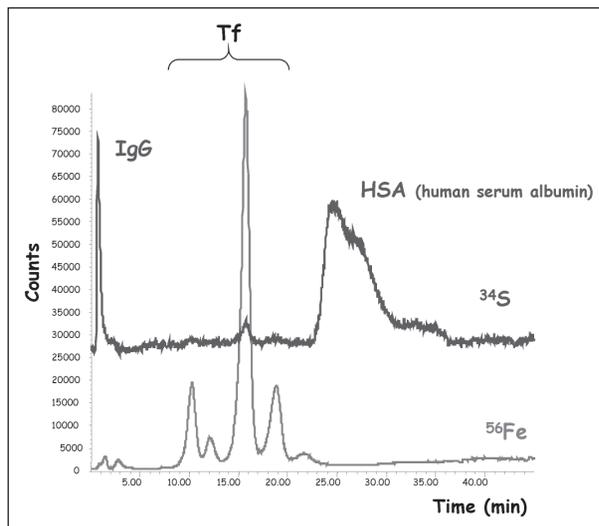
- c) Finalmente, el potencial del ICP-MS en PTMs realizadas “artificialmente”.

Una de las aplicaciones más interesantes del empleo de la estrategia HPLC-ICP-MS es, como hemos adelantado ya, la posibilidad de llevar a cabo un “screening” rápido y fiable de la presencia (o ausencia) de metales de interés (e.g. toxicológico o nutricional) en proteínas. Ejemplos ilustrativos de dicha aplicación se pueden ver en nuestros trabajos sobre la distribución y especiación de nutrientes esenciales en leche humana y sus proteínas (p.e. Fe, Cu, Zn, Se, I) y su comparación semicuantitativa con leches fórmula típicas utilizadas en los hospitales en alimentación de bebés prematuros y a término (Michalke *et al.*, 2007). Dicho trabajo puso de manifiesto la gran diferencia de composición molecular (“especiación química” de los elementos traza esenciales) entre la leche humana materna y las distintas leches “fórmula” utilizadas en alimentación de recién nacidos prematuros y a término.

El empleo de la estrategia HPLC-ICP-MS en la investigación cuantitativa de PTMs “naturales” en proteínas es otro campo de extraordinaria importancia y actualidad. Utilizando estrategias típicas de “especiación de Fe” en suero humano (ver Figura 4), hemos desarrollado importantes metodologías para la determinación exacta de las “glicofomas” de la transferrina. Tras un análisis por dilución isotópica (IDA) en línea, que utiliza <sup>57</sup>Fe enriquecido, es posible realizar determinaciones absolutas de la cantidad de cada una de las isoformas Fe-Tf del suero humano por HPLC-(IDA)ICP-MS. En dichos estudios se ha demostrado (3) que la cuantificación de tales isoformas individuales puede ser de gran utilidad como “biomarcadores” de enfermedades, p.e. en deficiencias genéticas en la glicosilación de proteínas (carbohydrate deficient transferrin, CDT) y en el control analítico de alcoholismo (ver Figura 4 y del Castillo *et al.*, 2005).

Otra de las PTMs de extraordinaria relevancia en Proteómica es la fosforilación, una modificación que regula, entre otros, los importantes procesos de señalización en las células y la eventual aparición de enfermedades relacionadas con disfunciones en dicha señalización (e.g. cáncer). Recientemente hemos demostrado los espectaculares resultados que se pueden conseguir utilizando HPLC capilar acoplada a un ICP-MS (que detecta el <sup>31</sup>P) para la determinación de fosfopéptidos, resultantes de la digestión

tríplica de mezclas complejas de proteínas fosforiladas (Pereira Navaza et al., 2007a). El impacto de estas técnicas para llevar a cabo investigaciones cuantitativas de pequeños cambios de la fosforilación (Pereira Navaza et al., 2008) y, sobre todo, en estudios de la cinética de dicha fosforilación de las proteínas en la célula ha sido reconocido muy recientemente en el mundo de la Biología Química (Pereira Navaza et al., 2007b).



**Figura 4.** Un cromatograma típico HPLC-ICP-MS, con detección de Fe y S simultáneas, de un suero humano (cada pico cromatográfico observado corresponde a una glicofor-ma diferente de transferrina)

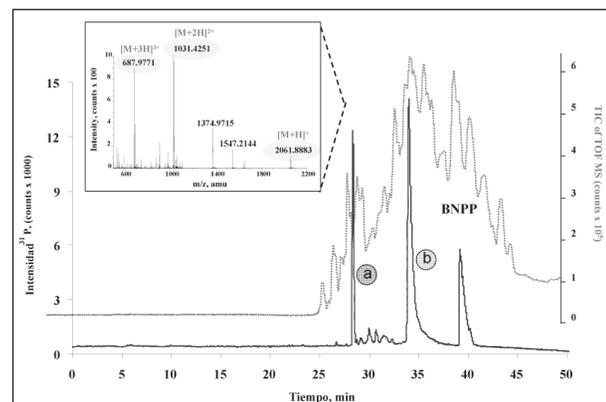
Para terminar esta breve exposición, solo una mirada al futuro: la estrategia comentada de “heteroatom(isotope)-tagged proteomics” solo puede usarse de forma directa en proteínas naturales que contienen los heteroátomos (e.g metales, Se, P, S, etc.). Sin embargo, hoy existen amplios y variados conocimientos sobre “bioconjugación” que permiten introducir artificialmente una “etiqueta” o marcador elemental (i.e. un heteroátomo) en las proteínas deseadas. Esta introducción, mediante un reactivo adecuado, haría que las proteínas sin heteroátomos pudieran también hacerse “visibles” y “medibles” para el ICP-MS. Hoy es ésta una posibilidad de futuro que podría ampliar el campo de utilización de estas estrategias de Proteómica “elemental”, aquí delineadas, a prácticamente todas las proteínas conocidas.

En resumen, los ejemplos ilustrativos expuestos han sido seleccionados de los trabajos de mi grupo en Oviedo, pero, desde luego, existen ya otros autores y trabajos muy importantes en esta línea (Lobinski et al., 2006) y todos ellos demuestran que el concepto

y estrategias denominadas “heteroatom(isotope)-tagged proteomics” ofrecen un interés y un potencial extraordinarios tanto desde el punto de vista analítico como bioquímico. En todo caso, si como parece cercano, en el futuro es posible extender su campo de acción a todas las proteínas (vía “etiquetado” o “marcado” con heteroátomos) este potencial se muestra ya tan atractivo como para animar a los “viejos” espectroscopistas atómicos a adentrarnos en un bosque nuevo tan atractivo, frondoso y lejano a nosotros como el de la Proteómica, particularmente el de la Proteómica cuantitativa (del Castillo et al., 2005; Pereira Navaza et al., 2007a). A su vez, solo si nuestros colegas bioquímicos, biólogos, médicos clínicos, etc. son conscientes y conocedores de estas técnicas y estrategias, y sobre todo de sus aplicaciones en Biociencia, dicho potencial de futuro podrá finalmente desarrollarse en toda su plenitud. En todo caso, multidisciplinaridad y cooperación interdisciplinaria es ahora la clave para hacer posible y eficaz ese esperable y prometedor desarrollo.

## Nota final

El objetivo de este resumen es solo dar a conocer en el mundo de la Proteómica de habla hispana el enorme potencial de estas metodologías de MS Elemental, derivadas del empleo de un moderno ICP-MS. El lector interesado en conocer más a fondo las aplicaciones y el sentido exacto de las Figuras (particularmente las Figuras 1, 4 y 5, que intentan abrir una ventana a las aplicaciones más ilustrativas/interesantes) puede consultar los detalles en las referencias bibliográficas escogidas.



**Figura 5.** Un cromatograma típico HPLC-ICP-MS, con detección de  $^{31}\text{P}$  (traza azul) y su comparación con el cromatograma más convencional HPLC-Electrospray (traza roja). La expansión del péptido “a” no es otra cosa que el espectro MALDI-TOF de dicha fracción “a” aislada (para confirmar su identidad)

## Referencias

- del Castillo Busto ME, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Meija J, Sanz-Medel A. 2005. *Analytical Chemistry* 77, 5615-5621.
- Lobinski R, Schaumlöffel D, Szpunar J. 2006. *Mass Spectrometry In Bioinorganic Analytical Chemistry. Mass Spectrometry Reviews* 25, 255-289.
- Michalke B, Fernández-Sánchez ML, Sanz-Medel A. 2007. Elemental speciation in human milk and substitute food for newborns. *The Determination of Chemical Elements in Food (Applications for Atomic Mass Spectrometry)*. Wiley & sons 3, 535-567.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. 2007a. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 569-571.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Carrascal M, Abian J, Sanz-Medel A. 2008. *Analytical Chemistry* 80, 1777-1787.
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. 2007b. *Chemical Biology (Instant Insight)* 2, B79.
- Sanz-Medel A. 2008. Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: screening and quantification of proteins and their post-translational modifications. *Analytical & Bioanalytical Chemistry (Trends)* 391, 885-894.

## Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas

*Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, Joaquim Ros, Jordi Tamarit*

Grup de Bioquímica de l'Estrés Oxidatiu, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida

### Resumen

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la formación y la destrucción de las especies reactivas del oxígeno. Una forma indirecta de determinar la existencia de estrés oxidativo es la medida de los productos derivados de la reacción de las especies reactivas del oxígeno con biomoléculas. En este sentido, la formación de grupos carbonilo en las proteínas ha sido uno de los marcadores de estrés oxidativo más estudiados debido a su estabilidad y fácil detección. Diversas herramientas proteómicas ofrecen un gran potencial para descubrir nuevas proteínas susceptibles al estrés oxidativo, cambios cuantitativos en el perfil de estas modificaciones bajo distintas condiciones biológicas, y para caracterizar el sitio exacto y tipo de modificación sufrida por una determinada proteína. En el presente trabajo se revisan las diferentes aproximaciones utilizadas para la detección de proteínas carboniladas y las herramientas proteómicas que permiten su identificación.

### Palabras clave:

Estrés oxidativo, oxidación de proteínas, grupos carbonilo, DNPH, proteómica redox.

### Introducción

El estrés oxidativo se describe como una situación en la cual las defensas antioxidantes son insuficientes para inactivar completamente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) [1]. Este desequilibrio entre la producción y la destrucción de ROS puede afectar a gran parte de los componentes celulares,

incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos [2-4]. Muchos de los cambios que ocurren durante el envejecimiento y durante la progresión de ciertas enfermedades son una consecuencia del estrés oxidativo [5-7]. Las proteínas se modifican oxidativamente al ser uno de los blancos principales de las ROS. Ello conlleva modificaciones estructurales