

Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC, Madrid

Jesús Vázquez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC, Madrid

Composición del grupo

Jesús Vázquez; Inmaculada Jorge; Horacio Serrano; Pedro J. Navarro; Pablo Martínez-Acedo; Daniel Pérez-Hernández; Estefanía Núñez.

Historia del grupo

Esta línea de investigación, dirigida por el Dr. Jesús Vázquez, fue creada en 1994 en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. El perfil tecnológico del grupo ha pivotado, desde su creación, alrededor de técnicas de química de proteínas, espectrometría de masas, proteómica y bioinformática.

Por este laboratorio han pasado numerosos investigadores jóvenes que se han formado en este campo, entre ellos Anabel Marina, Samuel Ogueta, Mónica Campillos, Margarita Villar, Daniel López-Ferrer, Salvador Martínez-Bartolomé, Mónica Carrera, Alberto Monteagudo, Alberto Jorge, Mercedes del Valle y Fernando Martín-Maroto.

Los primeros trabajos de nuestro grupo utilizaron técnicas de química de proteínas orientados al estudio de los factores reguladores de la expresión del promotor del gen *APOE* en relación con la enfermedad de Alzheimer. También hemos aplicado técnicas de Proteómica a la identificación sistemática de factores de transcripción que interaccionan con regiones de DNA, y hemos colaborado en varios proyectos relacionados con el uso de péptidos con acción fisiológica, y la caracterización de proteínas mediante técnicas clásicas.

Posteriormente el grupo se ha ido especializando en el estudio de péptidos y proteínas de interés biomédico mediante técnicas de Proteómica desarrolladas en el laboratorio. Se han aplicado las técnicas de caracterización sistemática de péptidos mediante espectrometría de masas tipo nanospray-trampa iónica e

interpretación manual de espectros de fragmentación y secuenciación *de novo* al estudio de los repertorios peptídicos presentados por moléculas MHC del tipo I y del tipo II, empleando técnicas de fragmentación múltiple de nuevo desarrollo. En otros trabajos, hemos utilizado las técnicas de mapeo peptídico mediante MALDI-TOF, en combinación sinérgica con las técnicas de fragmentación de péptidos mediante nESI-IT, para llevar a cabo proyectos de Proteómica de Mapa Celular, orientados a la identificación de antígenos de superficie, inhibidores de quinasas, activadores de células B, proteínas implicadas en la señalización celular vía receptores de adhesión leucocitaria y receptores de quimioquinas, y, como se ha descrito anteriormente, factores de transcripción y moduladores de factores de transcripción.

La caracterización de modificaciones postraduccionales y la identificación de aminoácidos implicados en funciones fisiológicas es una de las líneas en las que hemos puesto mayor interés. En este campo hemos demostrado que el MHC I puede presentar péptidos dimetilados procedentes de proteínas nucleares así como péptidos modificados en el extremo N-terminal, hemos caracterizado varios sitios de fosforilación fisiológicamente activos en factores de transcripción y en proteínas asociadas a microtúbulos, una glutationilación que modula el efecto transactivador de NF- κ B en función del estado redox celular, y una S-nitrosilación en la proteína Hsp90 que regula su actividad ATPasa e inhibidora de la eNO sintasa.

Nuestro laboratorio ha aplicado las técnicas de la Proteómica en campos de la Biotecnología que, como ocurre en tecnología de alimentos, requieren el estudio de especies no representadas en las bases de datos. Hemos demostrado la utilidad de las técnicas de fragmentación múltiple e interpretación de espectros de fragmentación en el estudio de especies marinas de alto interés biotecnológico e industrial, y hemos desarrollado un nuevo método para la identificación rápida de péptidos específicos de especie, de aplicabilidad general.

Recientemente, en el laboratorio hemos desarrollado técnicas novedosas para la digestión ultrarrápida de proteomas, hemos implementado técnicas de cromatografía bidimensional e identificación a escala masiva de péptidos mediante fragmentación, y hemos desarrollado algoritmos matemáticos para determinar la probabilidad y la tasa de error de las identificaciones. Finalmente, el grupo ha desarrollado técnicas de marcaje enzimático mediante isótopos estables (usando H_2O^{18}), para llevar a cabo cambios dinámicos en la expresión de proteínas a nivel de proteomas.

El laboratorio también posee experiencia previa en el desarrollo de modelos matemáticos para explicar procesos físicos, interacciones y procesos biológicos. Asimismo el grupo posee experiencia en el desarrollo de software para explotación comercial (software de secuenciación de novo de péptidos "DeNovoX 1.0" por la empresa Thermo Finnigan).

Objetivos científicos

En la actualidad los intereses científicos del grupo se centran principalmente en el análisis de los mecanismos moleculares que regulan la inducción génica durante la activación del endotelio cardiovascular, en colaboración con los Profs. Juan Miguel Redondo (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid) y Santiago Lamas (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). Estamos estudiando la regulación mediante fosforilación de la actividad de la familia de factores de transcripción NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), que regula la transcripción de genes de citoquinas implicados en la regulación y funcionalidad del sistema inmune, así como la respuesta angiogénica del endotelio vascular a la estimulación con VEGF mediante análisis proteómicos a gran escala utilizando técnicas de dilución isotópica estable. También estamos abordando la caracterización proteómica de modificaciones postraduccionales mediadas por estrés nitrosativo en endotelio.

El grupo también participa en proyectos orientados a la identificación de interacciones moleculares de receptores de adhesión y quimioatracción con proteínas reguladoras y del citoesqueleto, relevantes en la respuesta inflamatoria, en colaboración con el grupo del Prof. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid) y en el análisis proteómico

del mecanismo de acondicionamiento isquémico en membrana mitocondrial de miocitos, en colaboración con el Prof. David García-Dorado (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona), entre otros.

En paralelo el grupo continúa una intensa actividad de desarrollo de tecnologías innovadoras necesarias para abordar estos proyectos, incluyendo algoritmos para identificación y cuantificación a gran escala de proteomas y caracterización de modificaciones postraduccionales.

Proyectos financiados en convocatorias públicas

La actividad investigadora del grupo se ha financiado desde 1994 y de forma ininterrumpida mediante proyectos de investigación concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia y la Comunidad Autónoma de Madrid. El grupo ha disfrutado además de otras ayudas públicas y de empresas privadas y es miembro de la Red de Investigación Cardiovascular (RECAVA). Desde su creación el grupo ha participado en un total de 15 proyectos de investigación.

Publicaciones

(Últimos cuatro años)

- C. Piñeiro, J. Barrops-Velázquez, J. Vázquez, A. Figueras and J.M. Gallardo. Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. *J. Proteome Res.* 2, 127-135 (2003)
- A. Haro, M. Vélez, E. Goormaghtigh, S. Lago, J. Vázquez, D. Andreu, and M. Gasset. Reconstitution of holin activity with a synthetic peptide containing the 1-32 sequence region of EJH. *J. Biol. Chem.* 278, 3929-3936 (2003)
- M. Campillos, M.A. García, F. Valdivieso and J. Vázquez. Transcriptional activation by AP-2 is modulated by the oncogene DEK. *Nuc. Acid. Res.* 31, 1571-1575 (2003)
- M. Campillos, J.R. Lamas, M.A. García, M.J. Bullido, F. Valdivieso and J. Vázquez. Specific interaction of heterogeneous nucle-

- ar ribonucleoprotein A1 with the -219T allelic form modulates APOE promoter activity. *Nuc. Acid. Res.* 31, 3063-3070 (2003)
- J. Yagüe, A. Paradela, M. Ramos, S. Ogueta, A. Marina, F. Barahona, J.A. López de Castro and J. Vázquez. Peptide rearrangement during during quadrupole ion trap fragmentation: increased complexity in MS/MS spectra. *Analytical Chemistry* 75, 1524-1535 (2003)
 - D. López-Ferrer, S. Martínez-Bartolomé, M.Villar, M. Campillos, F. Martín-Maroto and J. Vázquez. Statistical model for large-scale peptide identification in databases from tandem mass spectra using SEQUEST. *Analytical Chemistry* 76, 6853-6860 (2004)
 - G. Díaz, B. Cañas, J.Vázquez, C.Nombela and J.Arroyo. Characterization of natural peptide ligands from HLA-DP2: new insights into HLA-DP peptide binding motifs *Immunogenetics* 56, 754-759 (2005)
 - Ortega, E.Cano, F.Were, M.Villar, J.Vázquez and J.M. Redondo. c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J.Biol.Chem.* 280, 20867-20878 (2005)
 - A. Martínez-Ruiz, L.Villanueva, C. González de Orduña, D. López-Ferrer, J. Vázquez, S. Lamas. S-Nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and eNOS regulatory activities. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 102, 8525-8530 (2005)
 - D. López-Ferrer, J. L. Capelo and J. Vázquez. Ultrafast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *J. Proteome Res.* 4, 1569-1574 (2005)
 - D. López-Ferrer, A. Ramos-Fernández, S. Martínez-Bartolomé, P. García-Ruiz and J. Vázquez. Quantitative proteomics using ¹⁶O/¹⁸O labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 4, S4-S11 (2006)
 - M. Villar, I. Ortega-Pérez, F. Were, E. Cano, J.M. Redondo and J. Vázquez. Systematic characterization of phosphorylation sites in NFATc2 by linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 4, S16-S27 (2006)
 - J.R. Hernández Fernaud J.R., A. Marina A., K. González K., J.Vázquez. and Falcón M. A.. Production, partial characterization and spectroscopic study of the extracellular lactase activity from *Fusarium proliferatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 70, 212-221 (2006)
 - S. Martínez-Martínez, A.Rodríguez, M. D. López, J.Vázquez and J.M.Redondo. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin-binding site. *J.Biol.Chem.* 281, 6227-6235 (2006)
 - M. Carrera, B. Cañas, C. Piñeiro, J. Vázquez, J. M.Gallardo. Identification of commercial hake and grenadier species by proteomic analysis of the parvalbumin fraction 2. *Proteomics* 6, 5278-5287 (2006)
 - D. López-Ferrer, B. Cañas, J. Vázquez, C. Lodeiro, R. Rial-Otero I. Moura and J. L. Capelo. Trends in sample Treatment for Protein Identification by Mass Spectrometry-Based Techniques. *Trends Anal.Chem.* 25, 996-1005 (2006)
 - V. Naranjo, M. Villar, M.P. Martín-Hernando, D. Vidal, U. Höfle, C. Gortazar, K.M. Kocan, J.Vázquez, J.de la Fuente. Proteomic and transcriptomic analyses of differential stress/inflammatory responses in mandibular lymph nodes and oropharyngeal tonsils of European wild boars naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Proteomics* 7, 220-231 (2007)
 - A. Ramos-Fernández, D. López-Ferrer, and J. Vázquez. Improved method for differential expression Proteomics using trypsin-catalyzed ¹⁸O labeling with a correction for labeling efficiency. *Mol. Cell Proteomics* (2007, en prensa)
 - S. Martínez Bartolomé, F. Martín-Maroto, D. López-Ferrer, M. Villar, A. Ramos-Fernández, J.P. García-Ruiz, and J Vázquez. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. En revisión