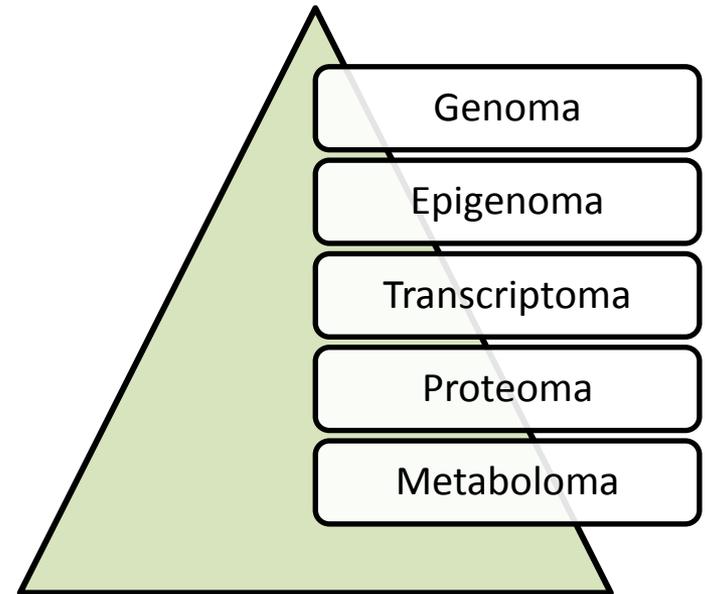
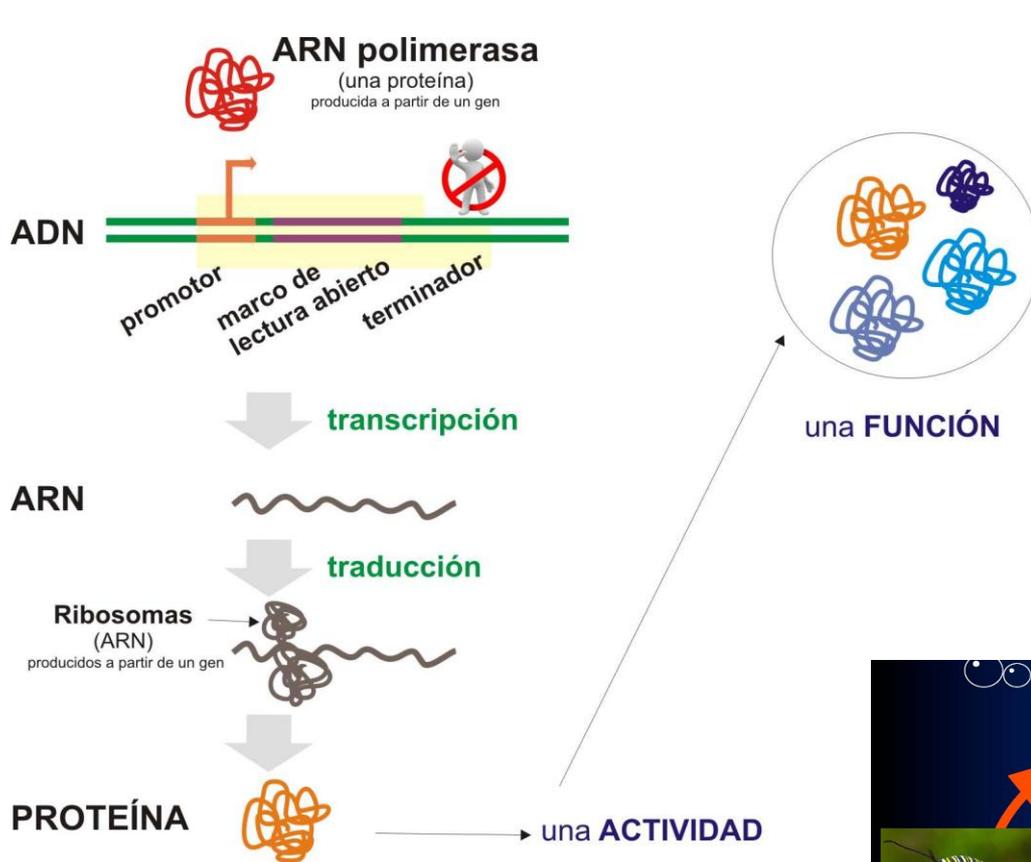


# Ingeniería Genética II

## Unidad X

### *Proteómica*

# Dinamismo de las moléculas



**Polipéptido ≠ Proteína**



# La proteómica incluye diversos campos de investigación

## PROTEÓMICA DESCRIPTIVA

Se propone **caracterizar** "todas" las proteínas que se **expresan** en un organismo, o en una subestructura celular, en una **condición dada**.

## PROTEÓMICA COMPARATIVA

Estudia **dos o más estados de un sistema** (una célula, un tejido, etc). Cuáles proteínas cambian cuando un organismo se somete a condiciones diferentes. Evalúa los cambios en la **expresión** de proteínas a nivel **cuantitativo**.

## PROTEÓMICA FUNCIONAL

Identificación de **grupos de proteínas** que se localizan en un mismo sitio celular y que operan en mutua **interacción**.

# Metodologías asociadas a la identificación de macromoléculas

ACIDOS  
NUCLEICOS



- Tecnologías NGS (*Next Generation Sequencing*): Tecnologías 454, Illumina, ABI SOLID, Ion Torrent, PacBio, Nanopore y SMRT seq.
- Microarreglos o *chips* de ADN.



BIOINFORMÁTICA

PROTEÍNAS



- Electroforesis.
- Cromatografía.
- Espectrometría de masa.
- Microarreglos o *chips* de proteínas.



BIOINFORMÁTICA

***Descripción de las metodologías  
asociadas a la detección y  
análisis de proteínas***

**Electroforesis bidimensional en geles de  
poliacrilamida (2D PAGE)**

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

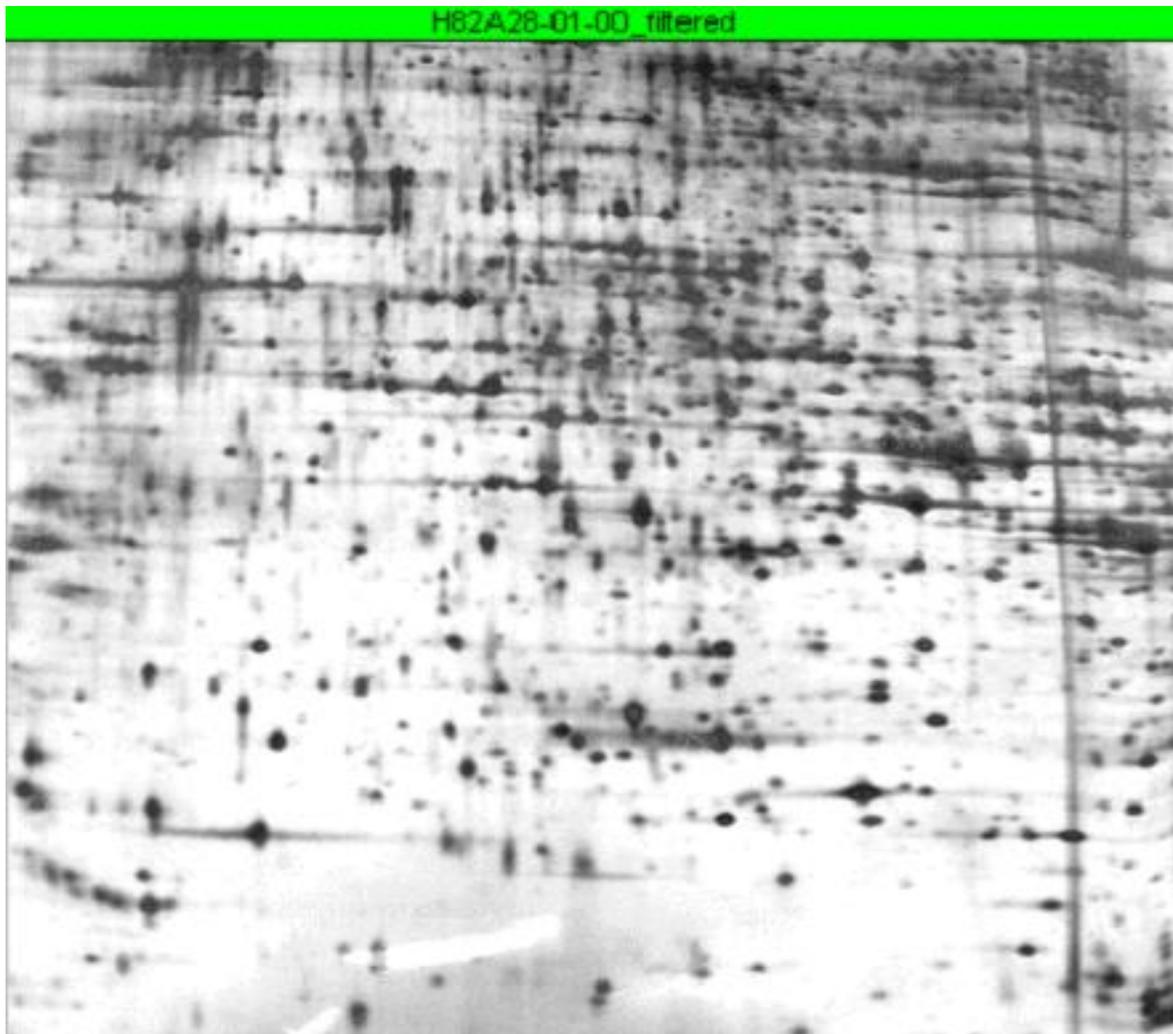
## Tecnología 2D PAGE

- Es la herramienta más utilizada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma.
- Permite la separación de cientos o miles de proteínas (“spots”) en un único gel, mostrando un patrón característico.
- La preparación de la muestra es el paso más crítico y clave en el éxito del experimento.

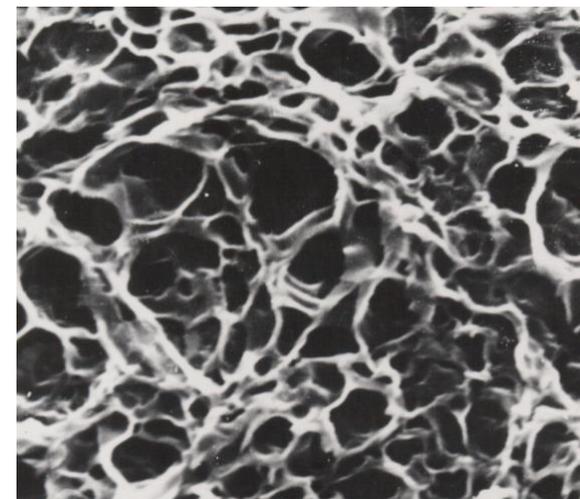
# Separación de mezclas complejas de proteínas por electroforesis bidimensional

pI=3.0

pI=10.0



120 kDa



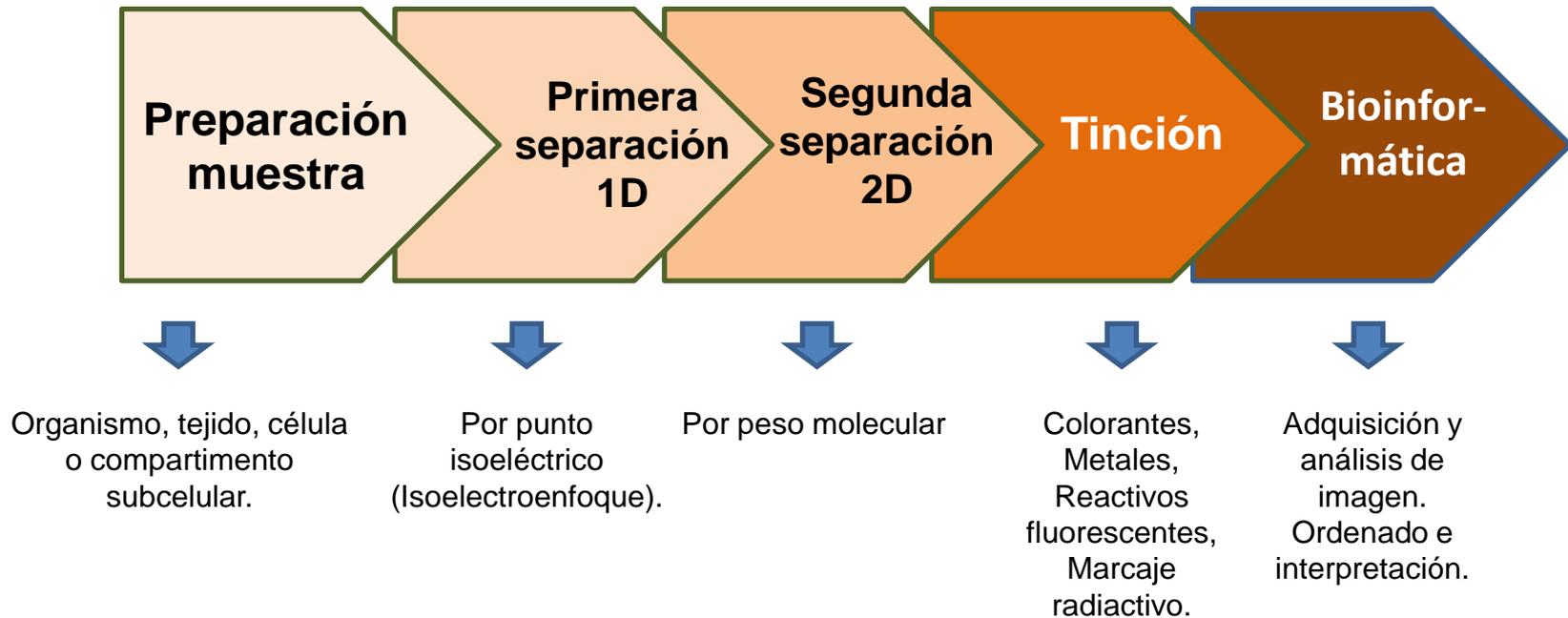
10 kDa



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología 2D PAGE

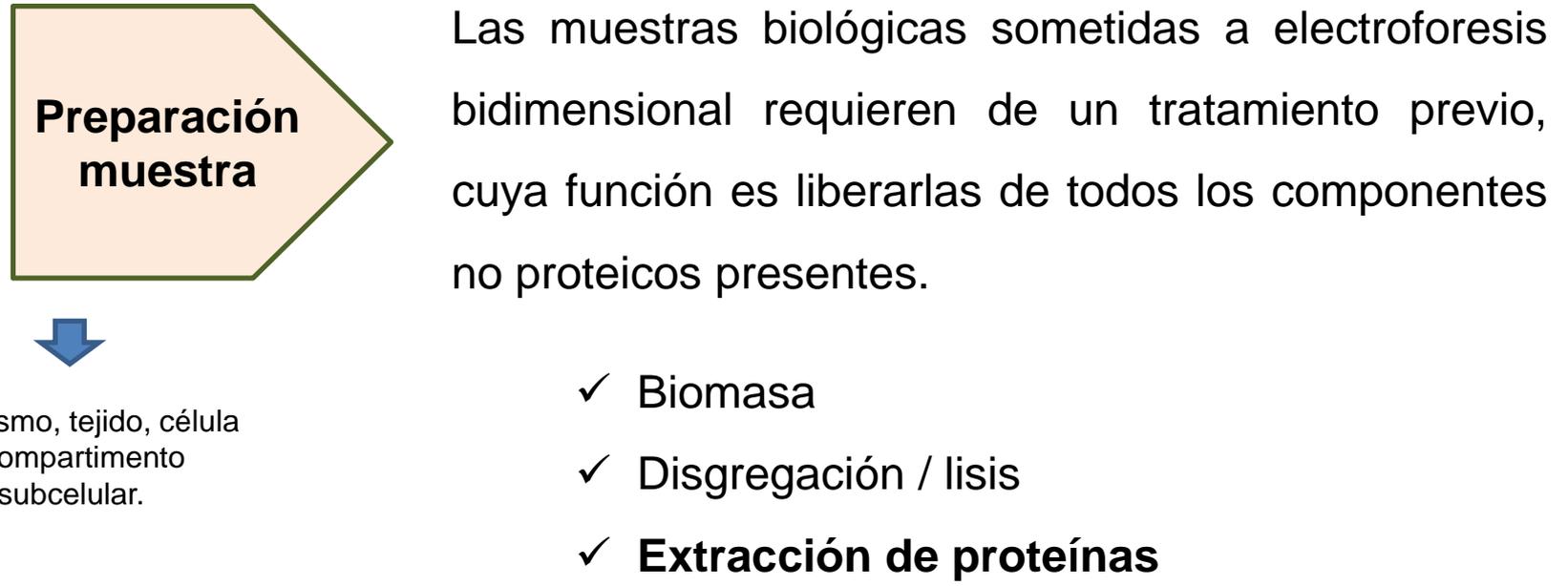
### Flujo de trabajo en la tecnología 2D PAGE



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología 2D PAGE

### Flujo de trabajo en la tecnología 2D PAGE



#### Preparación muestra

Organismo, tejido, célula  
o compartimento  
subcelular.

Las muestras biológicas sometidas a electroforesis bidimensional requieren de un tratamiento previo, cuya función es liberarlas de todos los componentes no proteicos presentes.

- ✓ Biomasa
- ✓ Disgregación / lisis
- ✓ **Extracción de proteínas**

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología 2D PAGE

### Flujo de trabajo en la tecnología 2D PAGE



Por punto  
isoelectrico  
(Isoelectroenfoque).

**Gel con un gradiente de pH:**

Las **proteínas migran** bajo la acción de un campo eléctrico hasta alcanzar la región del gel cuyos pH coinciden con sus **puntos isoelectricos**.



Equipo de Isoelectroenfoque:  
Protean IEF cell (Bio-Rad)

# Dos formas de construir un gradiente de pH en un gel

## ANFOLITOS PORTADORES

**Incorporar** a la muestra una mezcla de miles de moléculas orgánicas cargadas, **anfolitos**, que cubran todo el rango de pI y con alta capacidad tampón.

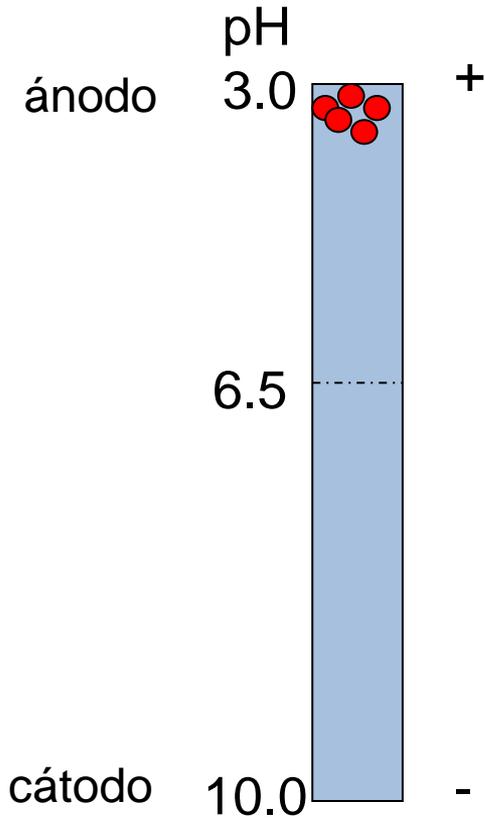
## GRADIENTES DE PH INMOVILIZADOS (IPGs)

**Copolimerizar** bajo un campo eléctrico una mezcla de miles de moléculas orgánicas cargadas, **immobilinas**, con la solución de gel. Las moléculas cargadas quedan inmóviles por enlaces covalentes.

# Ejemplo: Proteína con pI 6,5

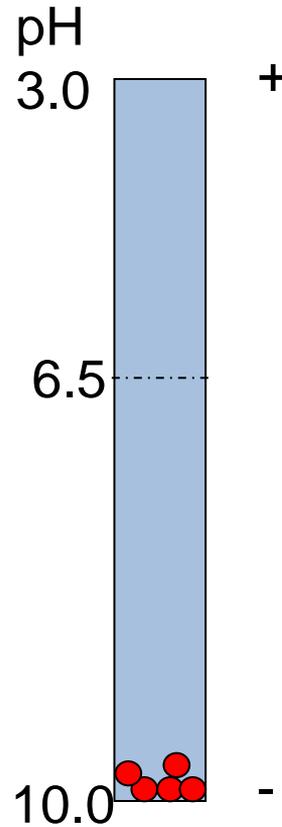
## Aplicación anódica

Cuando la proteína está a un pH por debajo de su pI, su carga es positiva

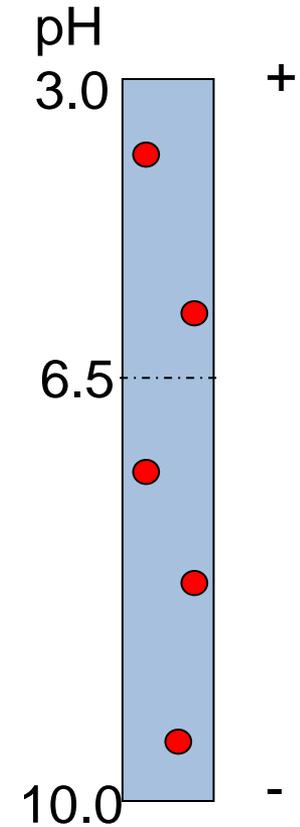


## Aplicación catódica

Cuando la proteína está a un pH superior a su pI, su carga es negativa



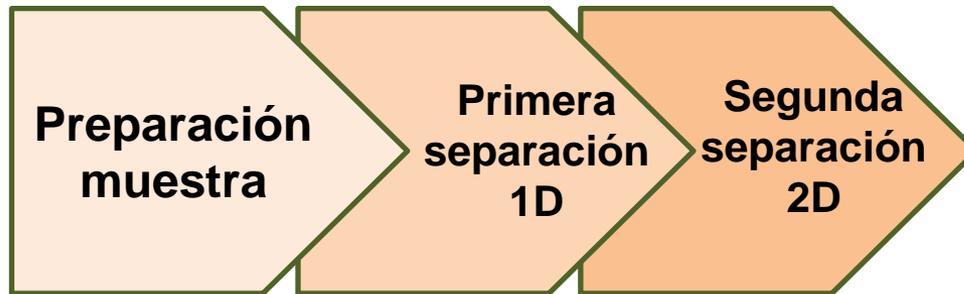
## Aplicación por rehidratación en todo el gel



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología 2D PAGE

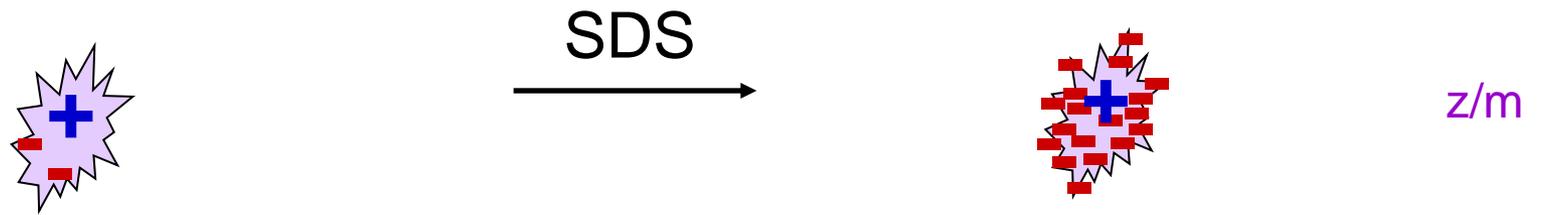
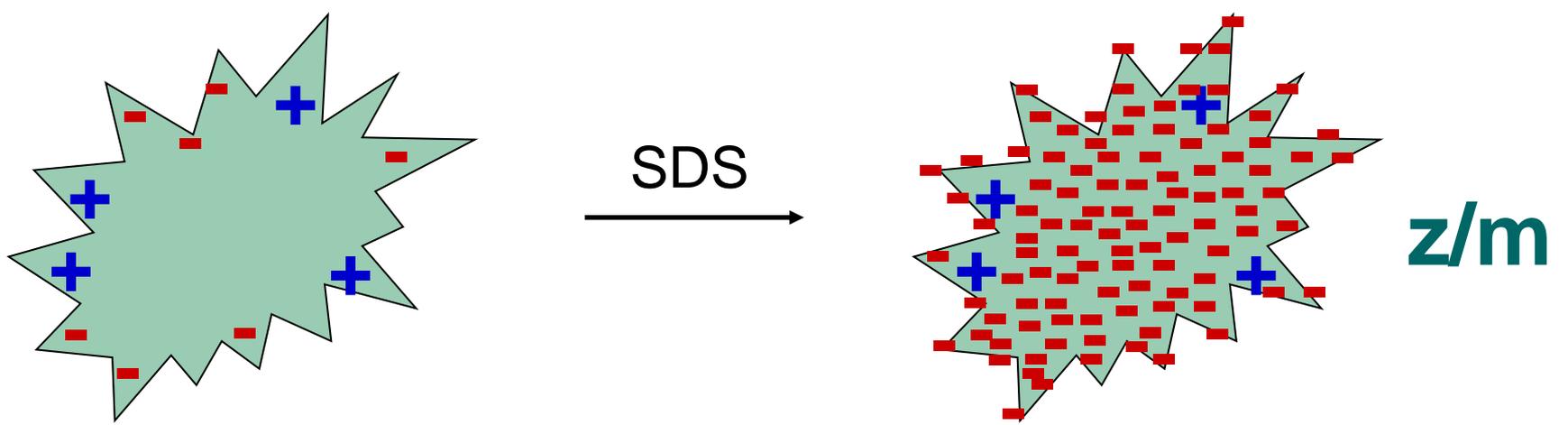
### Flujo de trabajo en la tecnología 2D PAGE



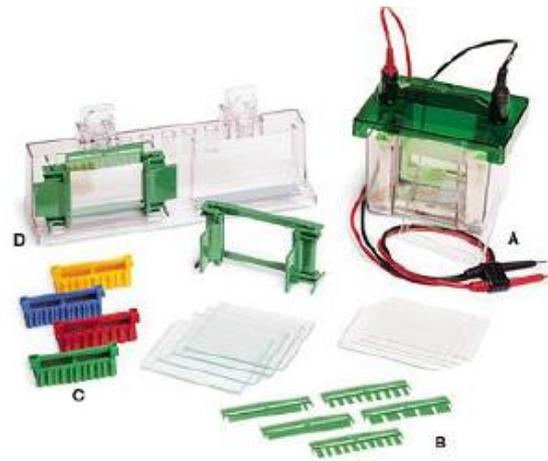
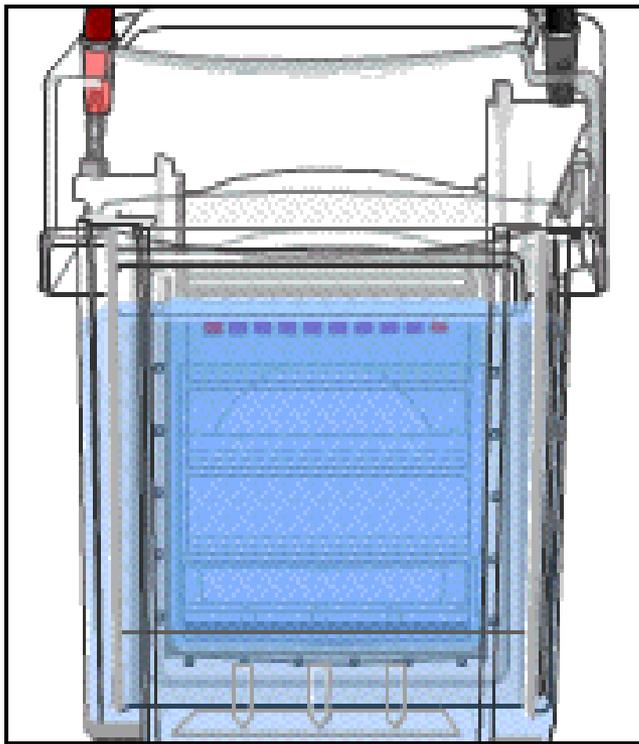
Por peso molecular

- ✓ El **SDS** homogeniza la densidad de carga ( $z/m$ ) de todas las proteínas.
- ✓ El principio de separación de la técnica de SDS-PAGE es el **tamaño de las moléculas**.
- ✓ Permite estimar la masa de una proteína (con referencia a marcadores de masa conocida).

# SDS (dodecil sulfato de sodio ): detergente aniónico



$$z/m = z/m$$



Equipo de Electroforesis Bidimensional:  
Mini Protean System (Bio-Rad)

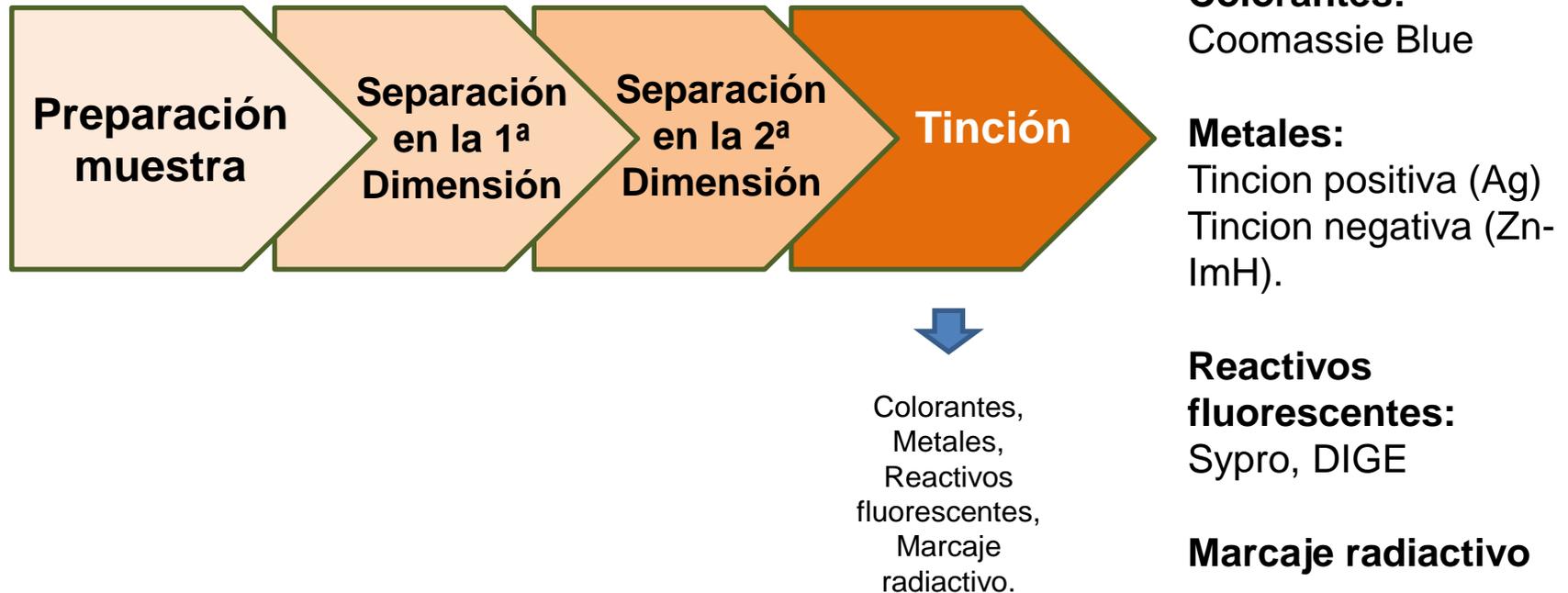


Equipo de Electroforesis Bidimensional:  
Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad)

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología 2D PAGE

### Flujo de trabajo en la tecnología 2D PAGE



# Propiedades de las técnicas de detección

## Sensibilidad (lo mínimo que detecta)

- Coomassie blue R-250: 100-200 ng
- Plata para espectrometría de masas: 100 ng
- Tinción inversa: 1-10 ng
- Plata con glutaraldehído: 1 ng
- Colorantes fluorescentes (Sypro): 1 ng-1 pg
- Fluorografía: 1 pg

## Rango dinámico (lo mínimo y lo máximo)

- Coomassie blue, Ag+ (+ laser scanner): 100
- Marcaje fluorescente (+ cámara CCD): > 10,000
- Marcaje isotópico (+ RX): 1,000
- Marcaje isotópico (+ Phosphorimage) : >100,000

# Adquisición y Análisis de Imagen

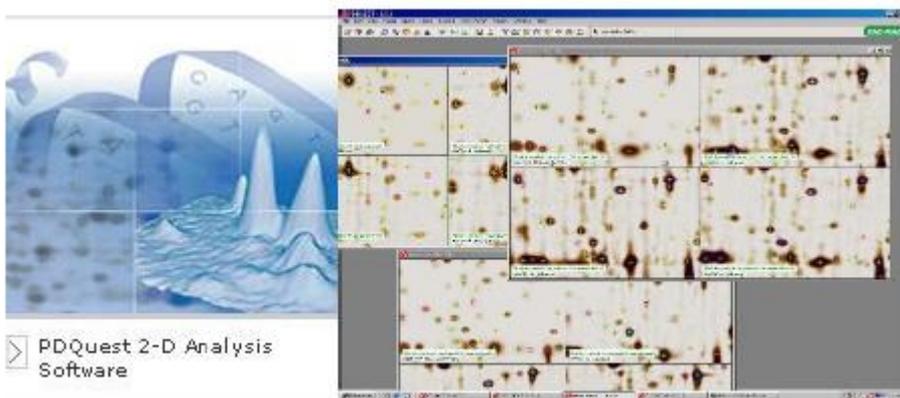
- Los geles (en los cuales hemos separados las proteínas) deben ser **digitalizados** para luego ser analizados con un sistema de **evaluación de imágenes**.
- Los instrumentos de adquisición de imágenes más comúnmente usados son los densitómetros, los escáneres de fluorescencia y los basados en tecnología CCD de alta resolución y sensibilidad.
- Todos ellos funcionan con **softwares** de análisis diseñados para detectar y cuantificar “**spots**” en las imágenes digitales así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés



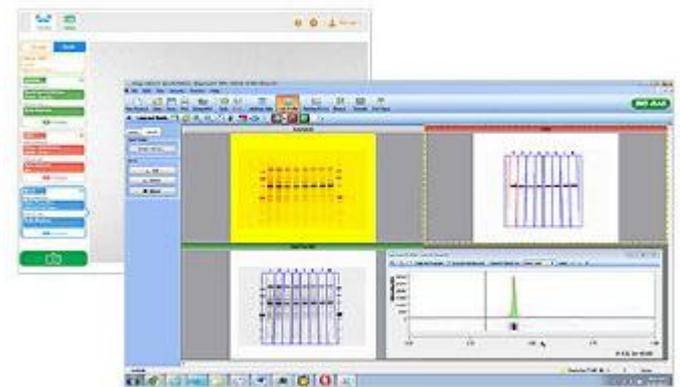
Escáner de Fluorescencia:  
FX ProPlus (Bio-Rad)



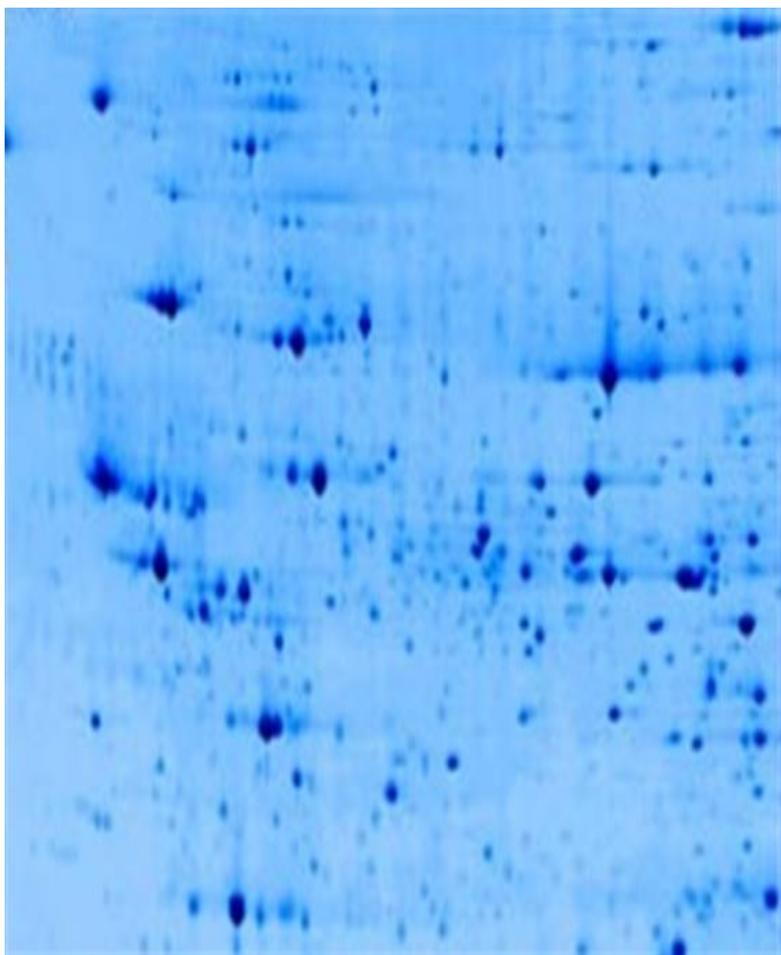
Sistema de adquisición de imágenes  
fluorescencia y UV  
(ChemiDoc MP System, Bio-Rad)



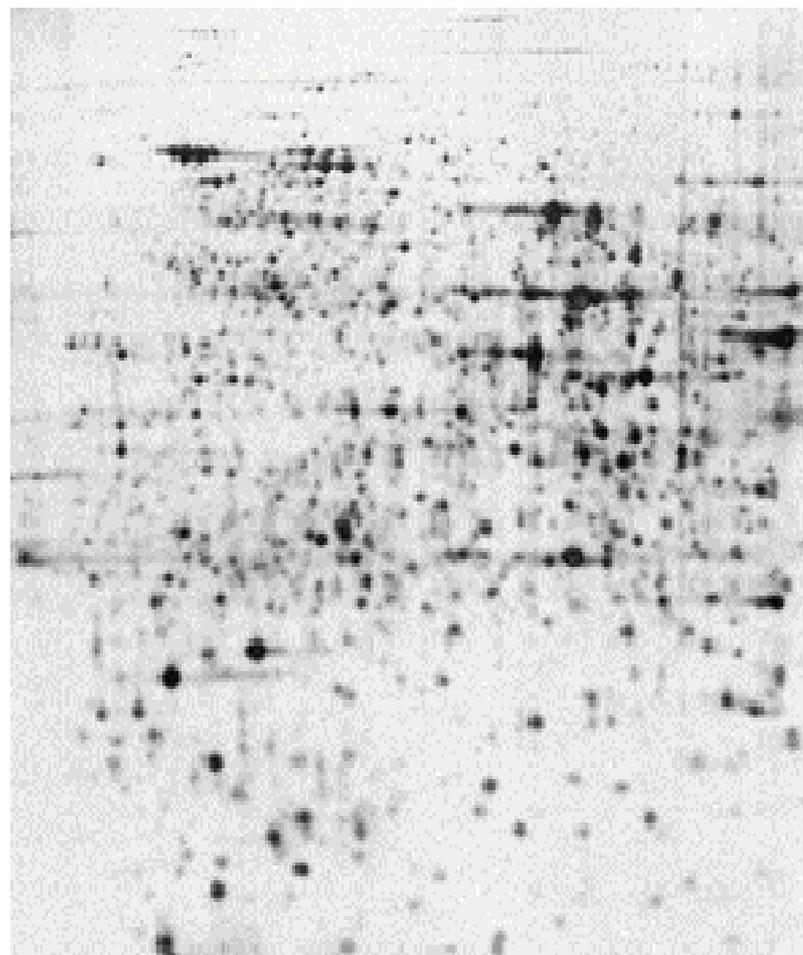
Software de análisis PDQuest 2-D (Bio-Rad)



Software de adquisición y análisis Image Lab  
(Bio-Rad)



**Tinción: Coomassie G-250**



**Tinción: Nitrato de plata**

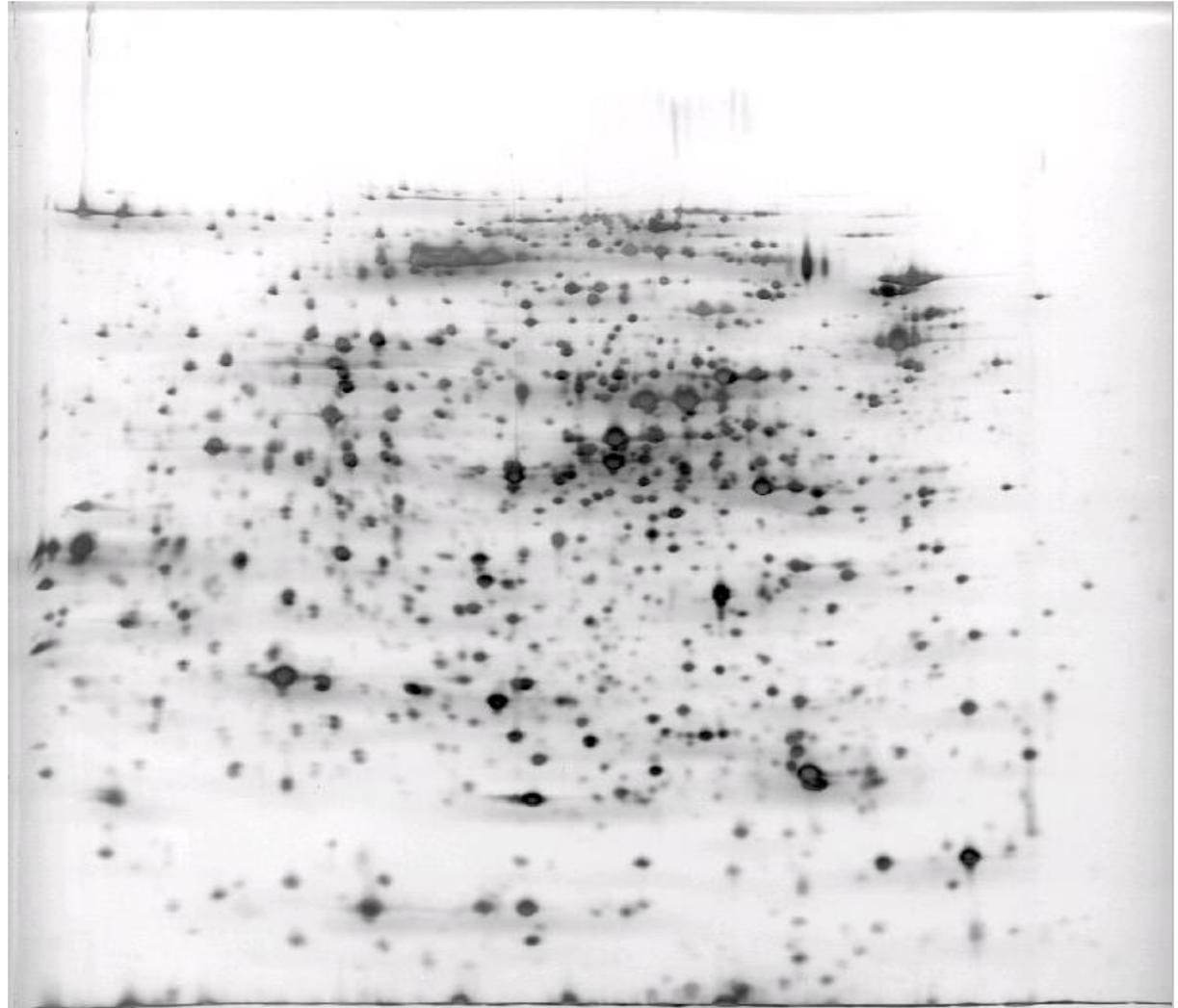


# Proteínas totales de *Escherichia coli*

El número de especies resueltas aumenta con el tamaño del gel

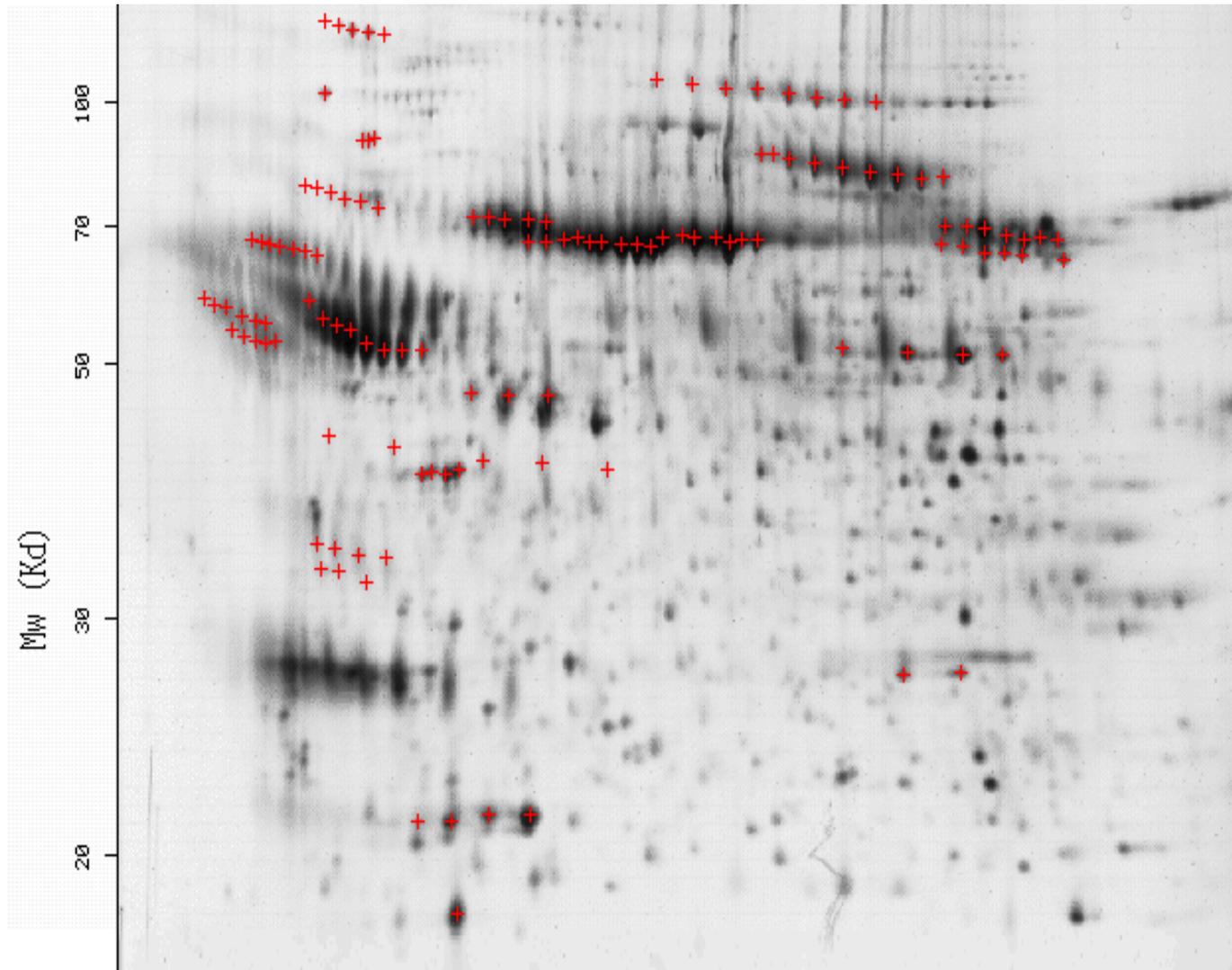


**7x7 cm**  
**859 spots**



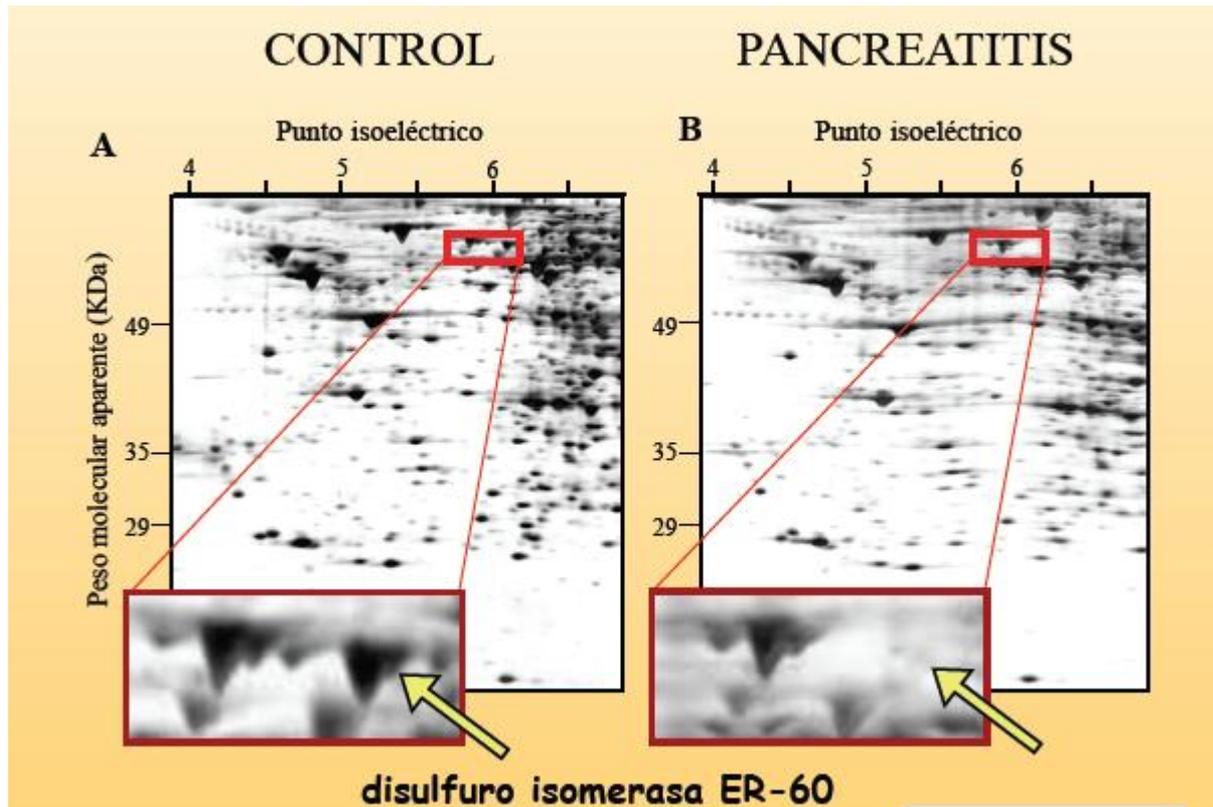
**18x20 cm**  
**1804 spots**

# 2D PAGE sigue siendo el único método que permite resolver isoformas

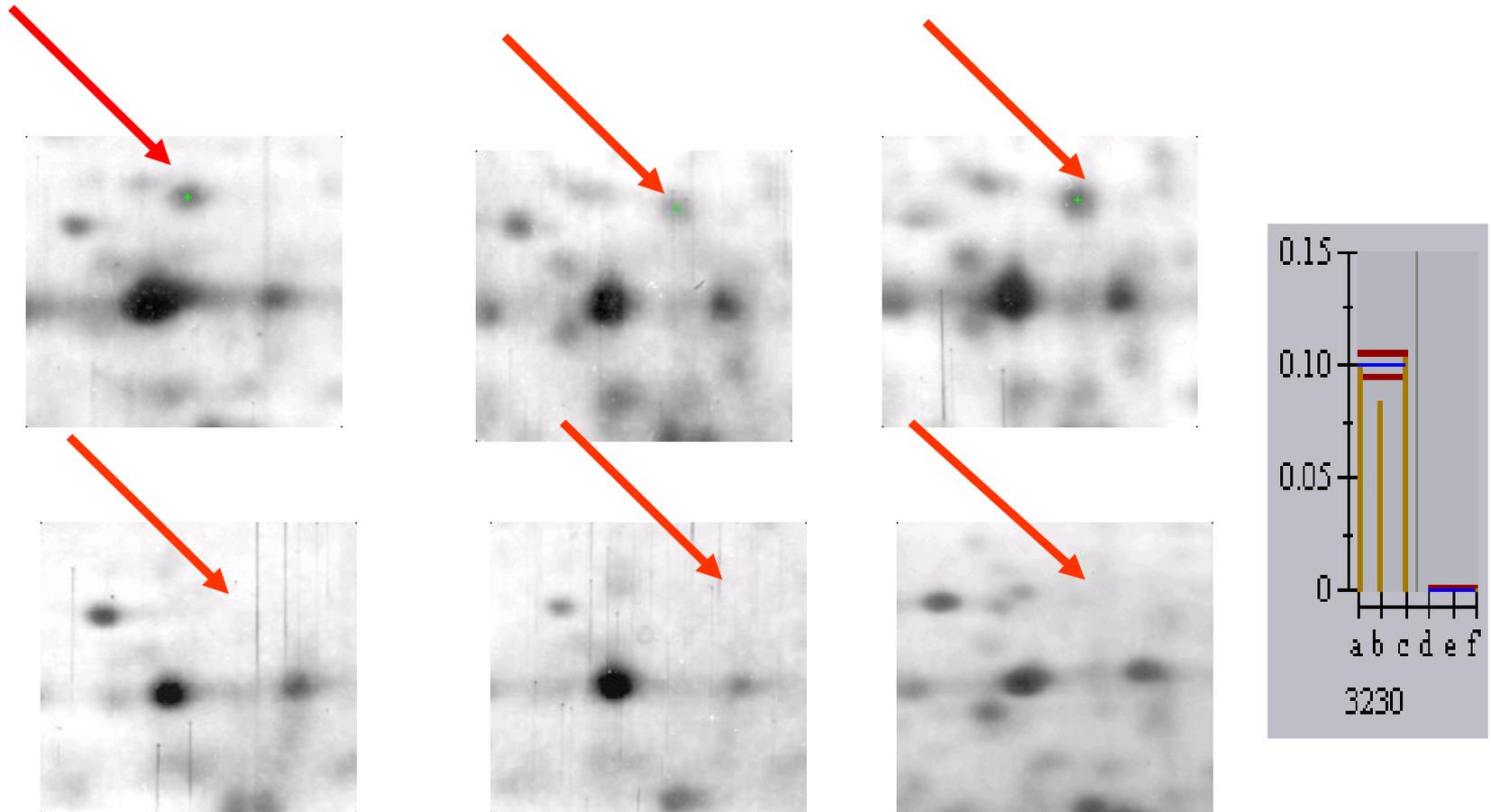


# Proteómica comparativa

Análisis proteómico diferencial en hígado de rata



# Proteómica comparativa, cambios en spot 3230

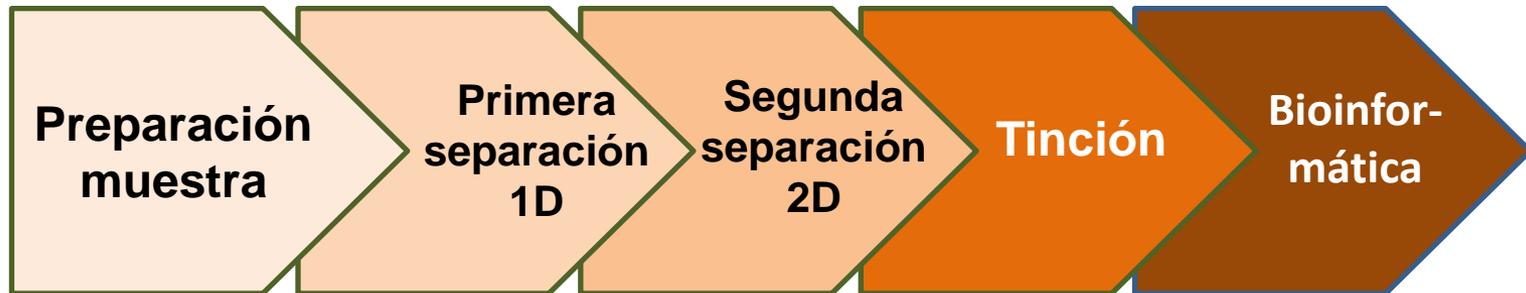


¡Cuidado!: incorrecto decir que “**no se expresa**” :  
Solo puedo afirmar que se **reduce** su expresión porque no la detecto.

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología 2D PAGE

### Flujo de trabajo en la tecnología 2D PAGE



Finalmente la identificación de las proteínas:  
Western blot, MALDI TOF, LC-MS/MS)

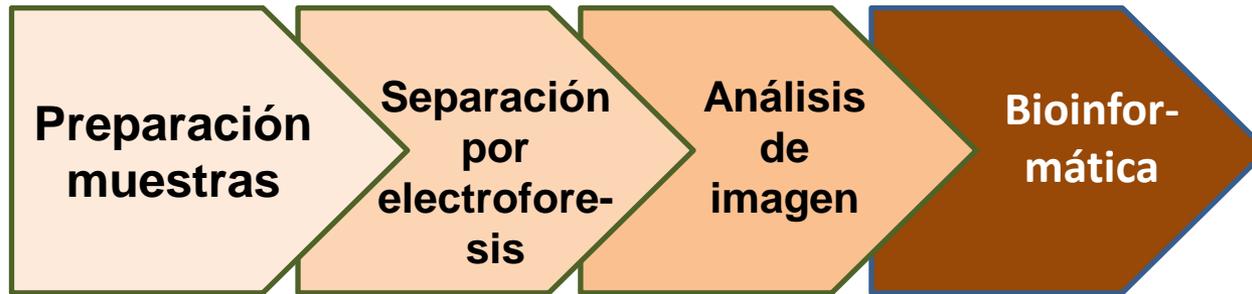
***Descripción de las metodologías  
asociadas a la detección y  
análisis de proteínas***

***Differential Gel Electrophoresis (DIGE)***

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología DIGE

Flujo de trabajo en la tecnología DIGE



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología DIGE

### Flujo de trabajo en la tecnología DIGE



#### Preparación muestras

- ✓ Organismos, tejidos, células o compartimentos subcelulares.
- ✓ Hasta tres extractos proteicos, por ej. un **control** y **dos tratados**, son marcados con diferentes colorantes fluorescentes (**Cy2**, **Cy3** y/o **Cy5**), y luego son mezclados.

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

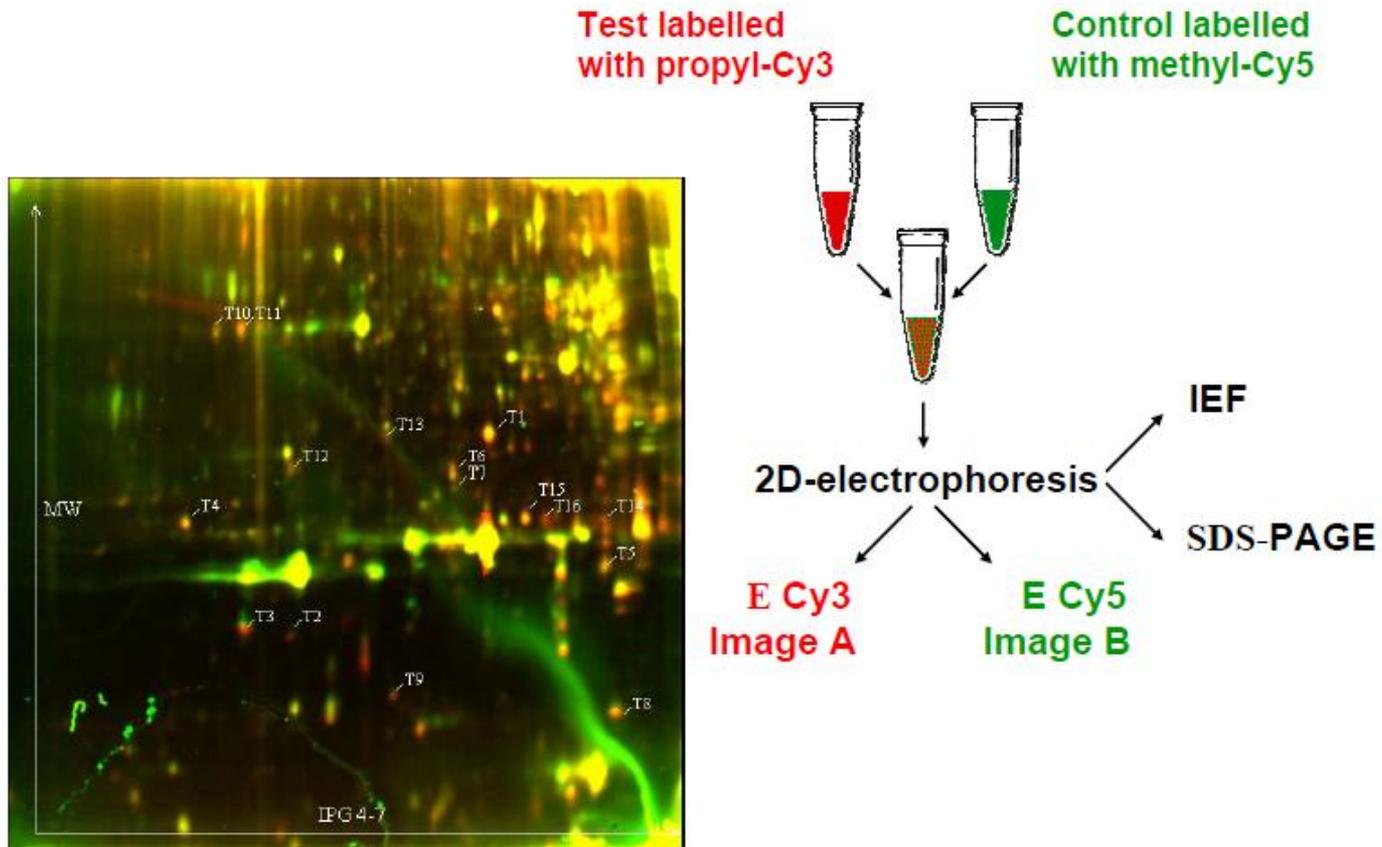
## Tecnología DIGE

### Flujo de trabajo en la tecnología DIGE



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

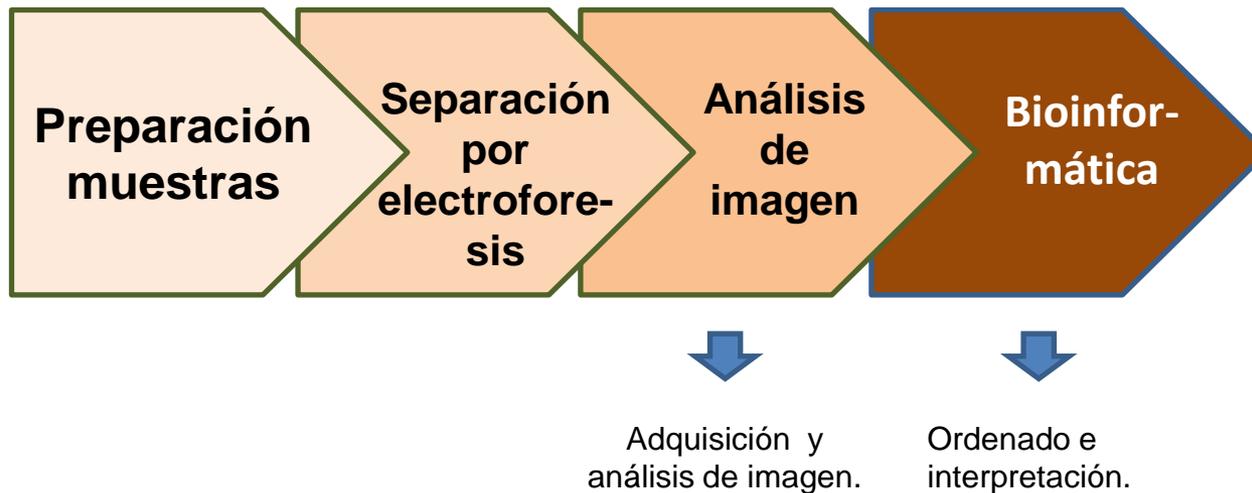
## Tecnología DIGE



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

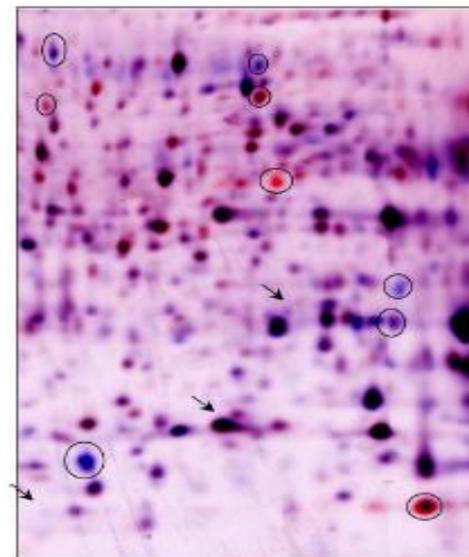
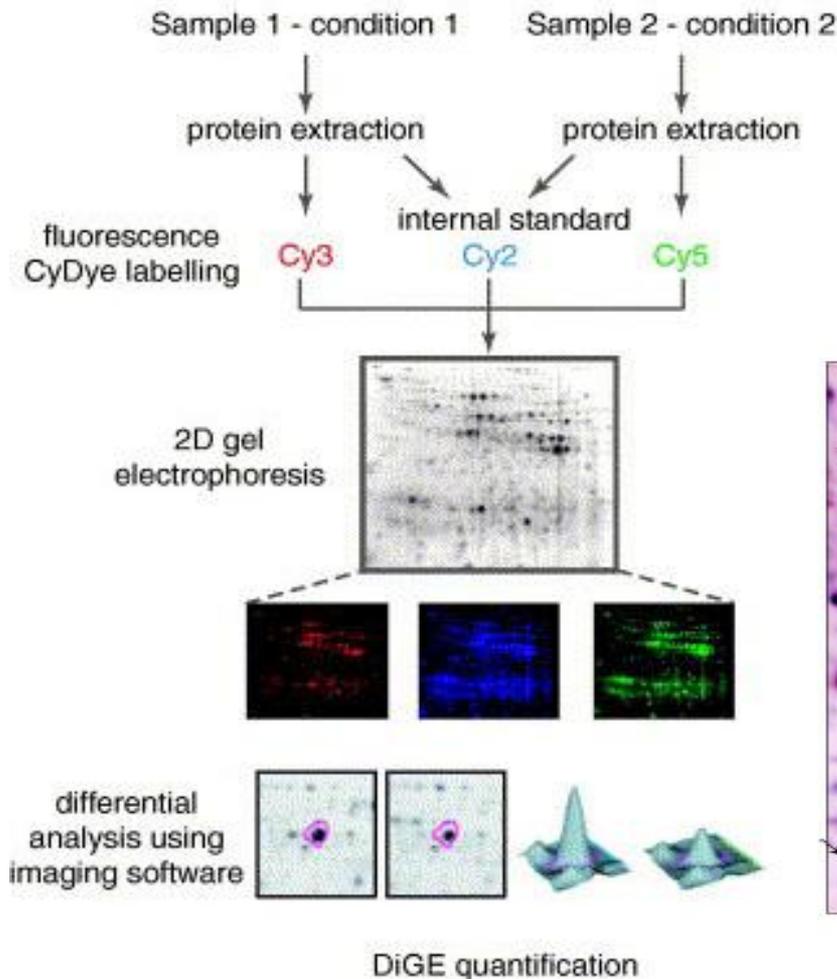
## Tecnología DIGE

### Flujo de trabajo en la tecnología DIGE

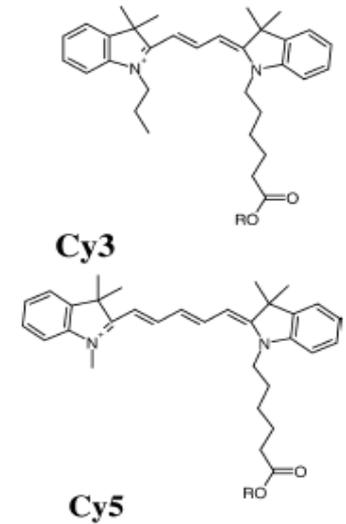


# Técnicas asociadas al estudio proteómico

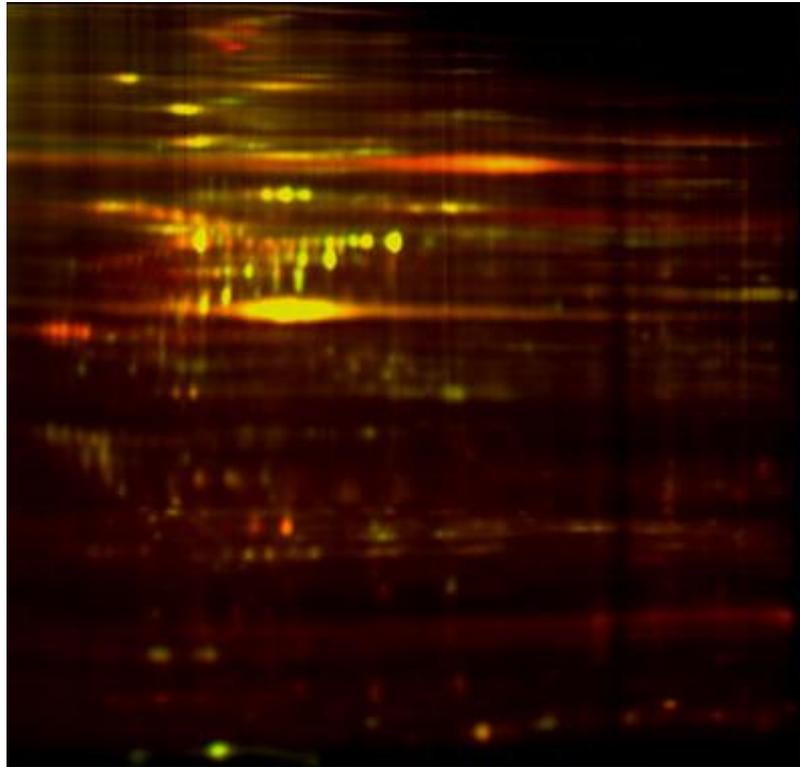
## Tecnología DIGE



Cy Dye Image



- **Cy3:** excitación – 540 nm  
emisión – 590 nm
- **Cy5:** excitación – 620 nm  
emisión – 680 nm



Electroforesis bidimensional de **tejido tumoral humano**. Extractos proteicos obtenidos a partir de una muestra tumoral/ normal de cáncer de colon fueron marcados con los **fluorocromos Cy3 y Cy5** y sometidos a **electroforesis bidimensional**.

**Las proteínas sobreexpresadas en tumores aparecen de color rojo, las reprimidas en tumores frente al normal aparecen de color verde.**

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Tecnología DIGE

### Ventajas

- Los colorantes fluorescentes tienen una respuesta lineal a la variación en la concentración de proteínas sobre 5 ordenes de magnitud.
- Hasta tres muestras en un único gel, elimina variación gel a gel.
- Posee una sensibilidad del sub-nanogramo.

### Desventajas

- Su principal desventaja es el alto costo involucrado en la adquisición del equipamiento y los reactivos necesarios, como los colorantes fluorescentes.
- Solo marca pocos residuos de Lys: algunas proteínas no se detectan.

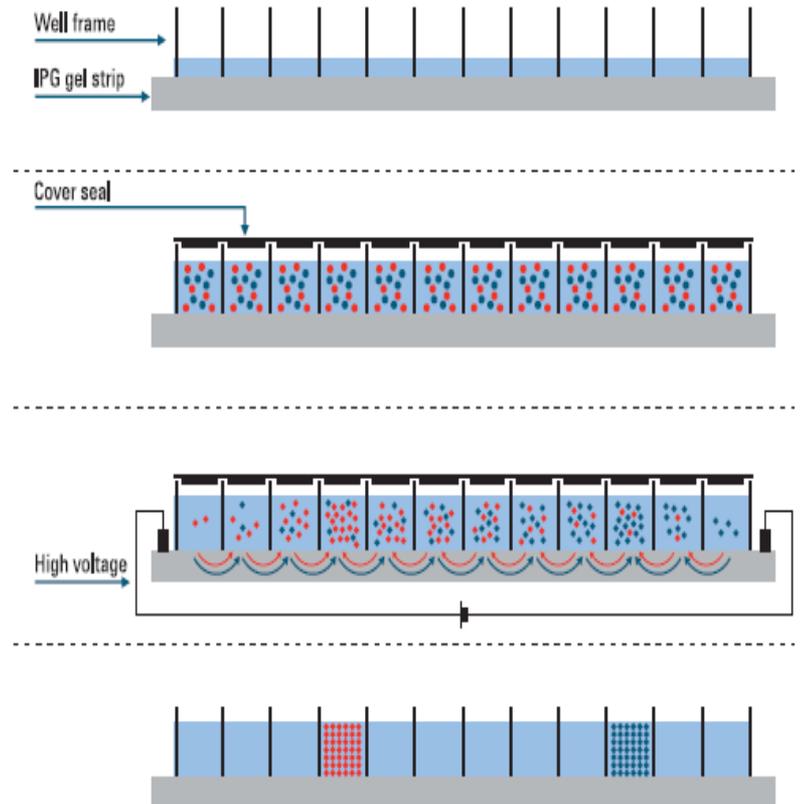
***Descripción de las metodologías  
asociadas a la detección y  
análisis de proteínas***

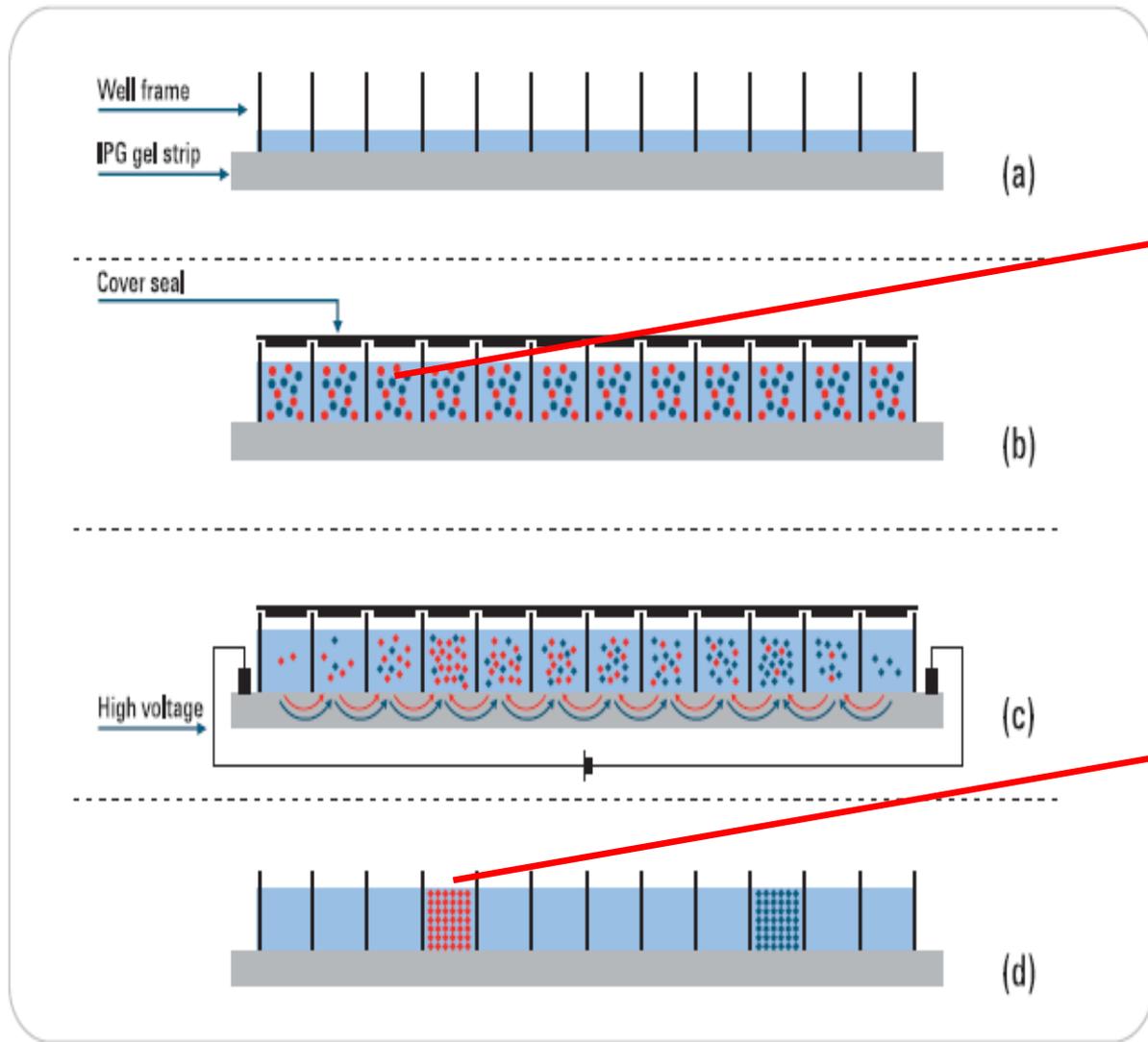
**Electroforesis OFF gel**

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Electroforesis OFF gel

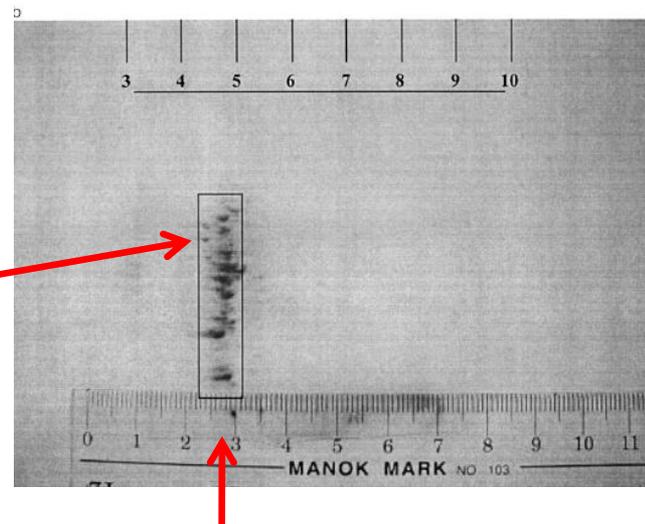
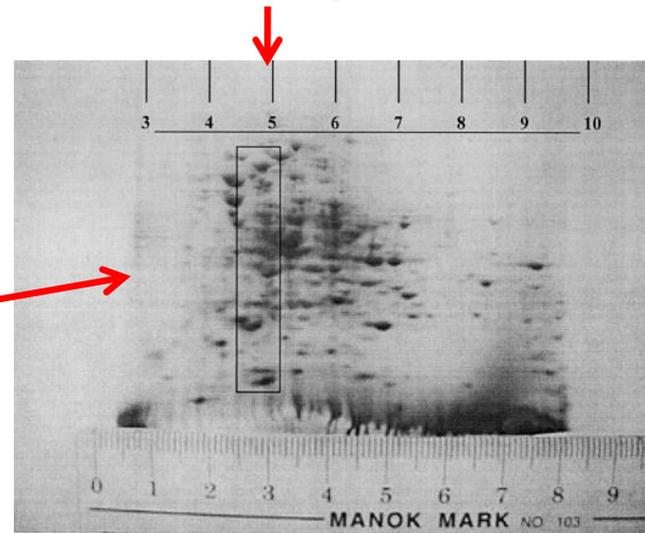
Es una separación por **focalización isoelectrica** sobre una tira de inmovilinas cubierta de una **solución**. Las proteínas o los péptidos se separan según su **pI** y se mantienen todo el tiempo en la solución que cubre la tira.





Fractionation principle

Muestra de partida



Una de las fracciones  
OFF Gel

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Electroforesis OFF gel

Separación OFF Gel según pI

```
graph TD; A[Separación OFF Gel según pI] --> B[Moléculas en solución]; B --> C["MALDI TOF<br/>HPLC LC MS-MS"];
```

Moléculas en solución

MALDI TOF  
HPLC LC MS-MS

***Descripción de las metodologías  
asociadas a la detección y  
análisis de proteínas***

**Espectrometría de masas**

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Espectrometría de masas

- Átomos o moléculas de una muestra son ionizados, con mayor frecuencia positivamente, **separados por su relación masa/carga** ( $m/z$ ) y posteriormente detectados y registrados.
- Posee una alta especificidad en la determinación del **peso molecular** de un compuesto. Su sensibilidad es muy elevada permitiendo la detección de una única molécula.
- **Aplicaciones en proteómica:** Determinación del **peso molecular** de la proteína intacta, obtención del **mapa peptídico** e **identificación de proteínas** de muestras biológicas (clínicas, alimentos, cultivos microbianos, plantas, etc.), identificación de polipéptidos y análisis de macromoléculas, polímeros, drogas y metabolitos.

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Espectrometría de masas

### Flujo de trabajo en la espectrometría de masas



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Espectrometría de masas

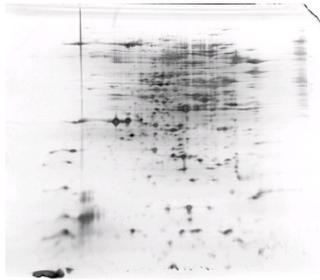
### Flujo de trabajo en la espectrometría de masas



#### Preparación muestra

- ✓ La manipulación de las muestras de proteínas debe realizarse siempre con guantes de látex sin polvo, para evitar la contaminación de muestras por queratinas.
- ✓ **Extracción de proteínas totales** de células, tejidos, fluídos, muestras biológicas (clínicas, alimentos, cultivos microbianos, plantas, etc).
- ✓ Proteínas **separadas en gel (1D, 2D)**.
- ✓ Las proteínas deben ser convertidas en **péptidos** mediante **proteólisis**, generalmente con **tripsina**.

# Preparación muestra



Estación Automática de picado de geles (Exquest Spot Cutter - Bio-Rad)

**Células, tejidos, fluidos, muestras biológicas, etc.**

Extracción de proteínas

Digestión con **tripsina**

Destinción

Reducción (DTT) y alquilación (iodoacetamida)

Deshidratación

Hidratación con **tripsina** y digestión (37°C, ON)

Extracción de los péptidos



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Espectrometría de masas

### Flujo de trabajo en la espectrometría de masas



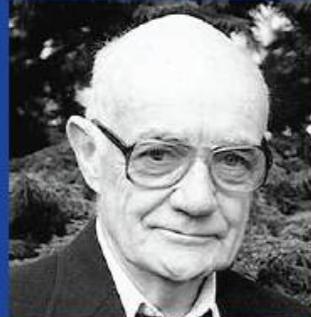
- ✓ Ionización por electrospray (**ESI: *Electrospray ionization***).
- ✓ Ionización por desorción con láser asistida por una matriz (**MALDI: *Matrix-assisted laser desorption/ionization***).

¼ Nobel Prize 2002

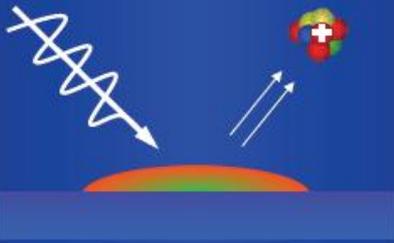


Koichi Tanaka

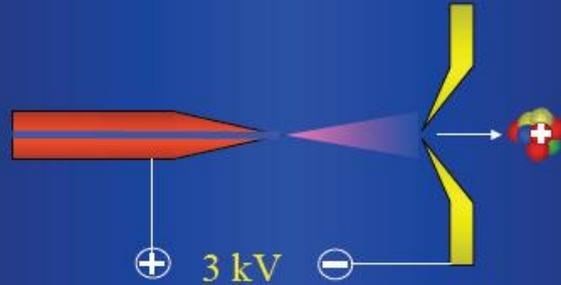
¼ Nobel Prize 2002



John Fenn



Matrix Assisted Laser Desorption



Electrospray

**ESI** constituye la mejor interfaz cuando **se acopla** la cromatografía de líquidos (**LC**) o la electroforesis capilar (**CE**) con **MS-MS**.

En muchos casos, se pueden determinar masas moleculares de macromoléculas con una precisión de  $\pm 0,005\%$ .

**MALDI** Análisis muy rápidos, algunos instrumentos que se encuentran en el mercado pueden procesar **cien muestras** en menos de diez minutos.

Permite la determinación de masas en un amplio intervalo, se pueden medir desde péptidos de pequeña masa hasta proteínas mayores de 100.000 Dalton (Da).

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

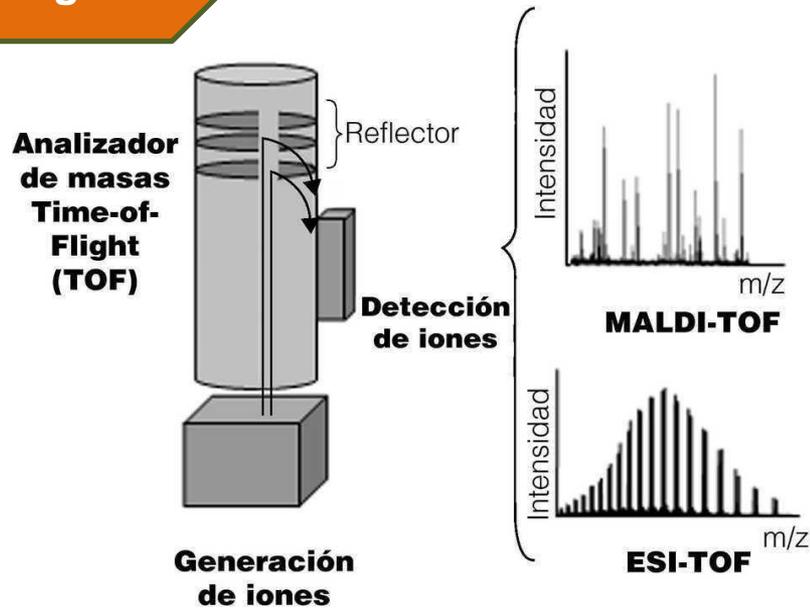
## Espectrometría de masas

### Flujo de trabajo en la espectrometría de masas



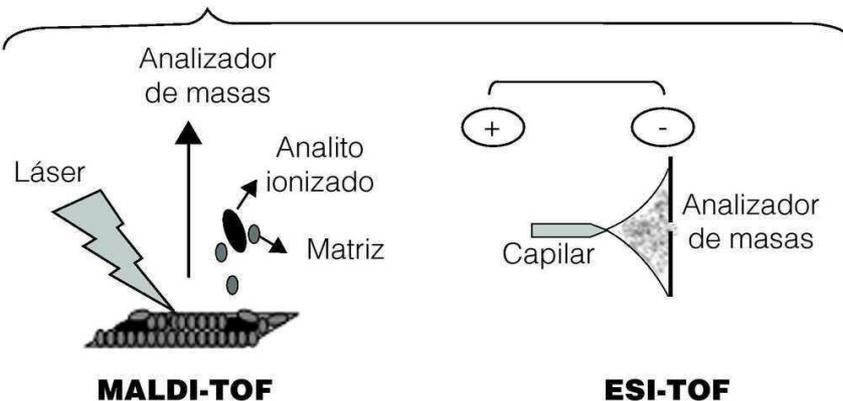
- ✓ Analizador de tiempo de vuelo (**TOF: *time of flight***).
- ✓ Los iones se separados por su relación masa/carga ( **$m/z$** ).
- ✓ Se mide el tiempo que necesitan los iones acelerados para recorrer una distancia ( $L$ ) hasta que impactan con el detector.

# Detección y registro



**MALDI-TOF:** la relación  $m/z$  suele ser equivalente a la **masa molecular** ( $m$ ) del analito, por lo que en el espectro típico se observa **un solo pico predominante**, correspondiente a dicha masa.

**ESI-TOF:** en el espectro se ven representados todos los iones generados a partir del analito en sus diferentes intensidades, de manera que se observan múltiples picos. En este caso, la masa molecular del analito se obtiene calculando la media de todas las masas moleculares relativas de cada ión obtenido.



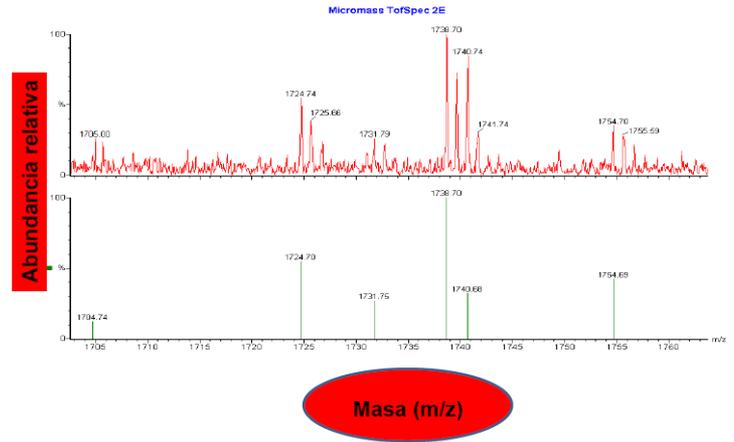
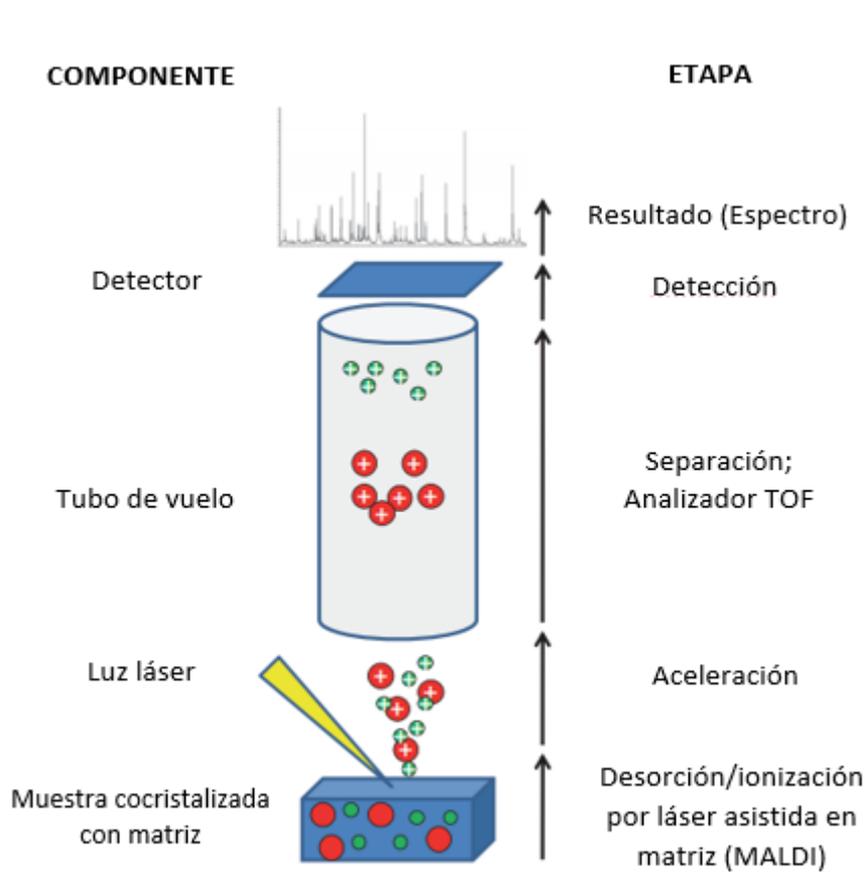
# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Espectrometría de masas

### Flujo de trabajo en la espectrometría de masas



Búsqueda en base de datos



Obtención de la **huella peptídica** por espectrometría de masas **MALDI-TOF**

**BASES DE DATOS**

...MAILAGGHSVRFGPKAF  
AEVNGETFYSRVITLSTNM  
FNEIIIISTNAQLATQFKYPN  
VVIDDENHNDKGPLAGIYTI  
MKQHPEEELFFVVSVDTPMI  
TGKAVSTLYQFLV ...

**In-silico digestion**

- MAILAGGHSVR  
- FGPK  
- AFAEVNGETFYSR  
- VITLSTNMFNEIIIISTNAQLATQFK  
- YPNVVIDDENHNDK  
...

**Ions peaklists**

- 340 . 695086
- 676 . 96063
- 498 . 8283
- 545 . 564
- 1171 . 967066
- 261 . 107346
- 342 . 51458
- 456 . 727405
- 363 . 68365

**Match**

- 361 . 107346
- 338 . 695086
- 676 . 96063
- 498 . 8283
- 1045 . 564
- 1171 . 967066
- 342 . 51458
- 457 . 827405
- 263 . 268453

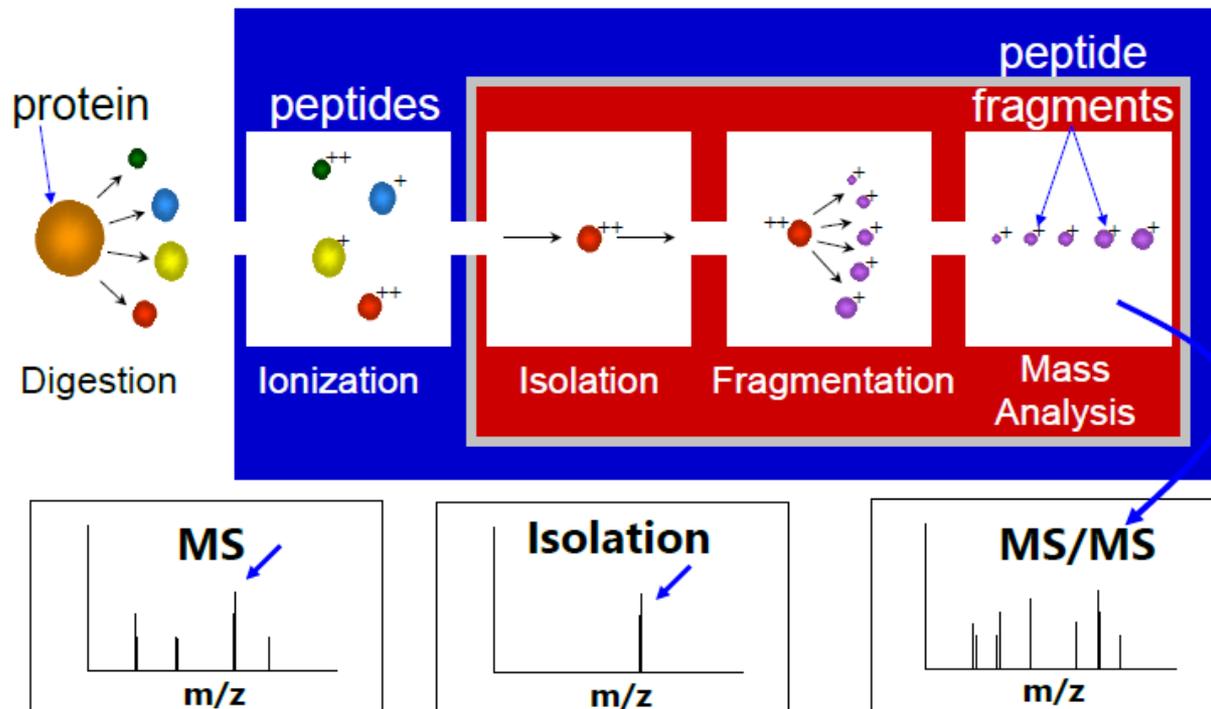
**Sequence database entry**

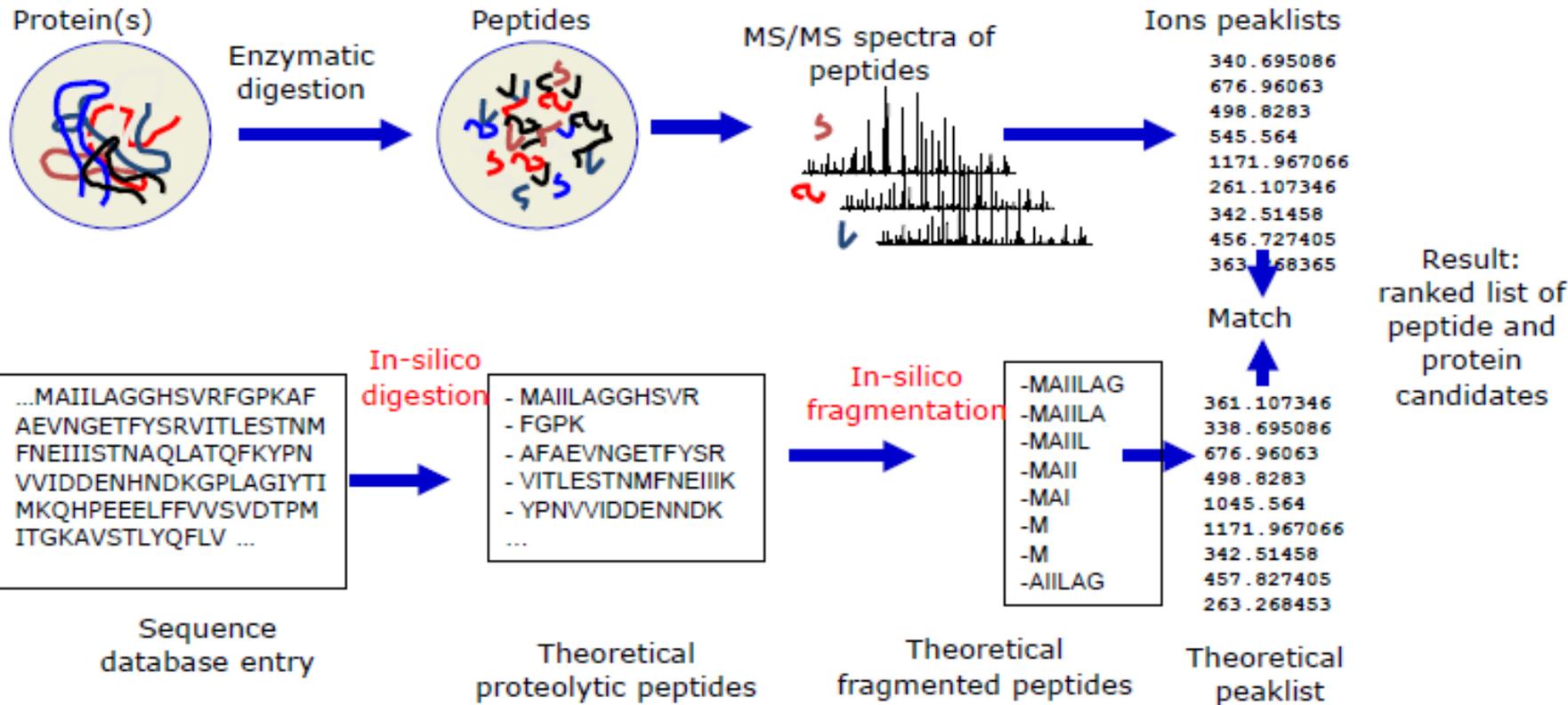
**Theoretical proteolytic peptides**

**Theoretical peaklist**

# Si no hay éxito en la identificación...

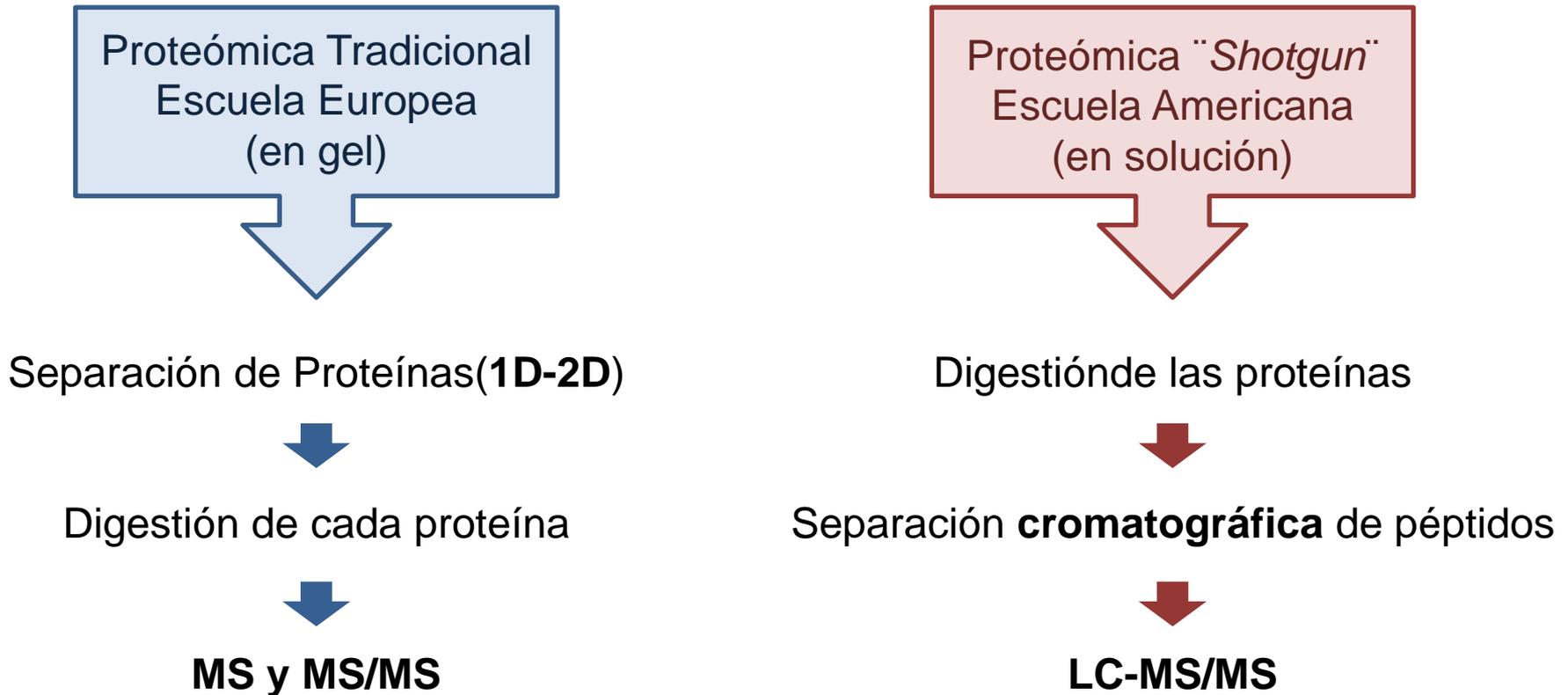
En un primer análisis de masas (**MS**) se determina el valor  $m/z$  de los péptidos, y **algunos de estos son seleccionados de forma individual, aislados y fragmentados**. Los fragmentos generados se separan y analizan en un segundo análisis de masas, obteniendo el espectro de fragmentación o **MS/MS** de cada péptido.





# Estrategias proteómicas

Muestras complejas, extractos proteicos (proteomas, subproteomas) ...



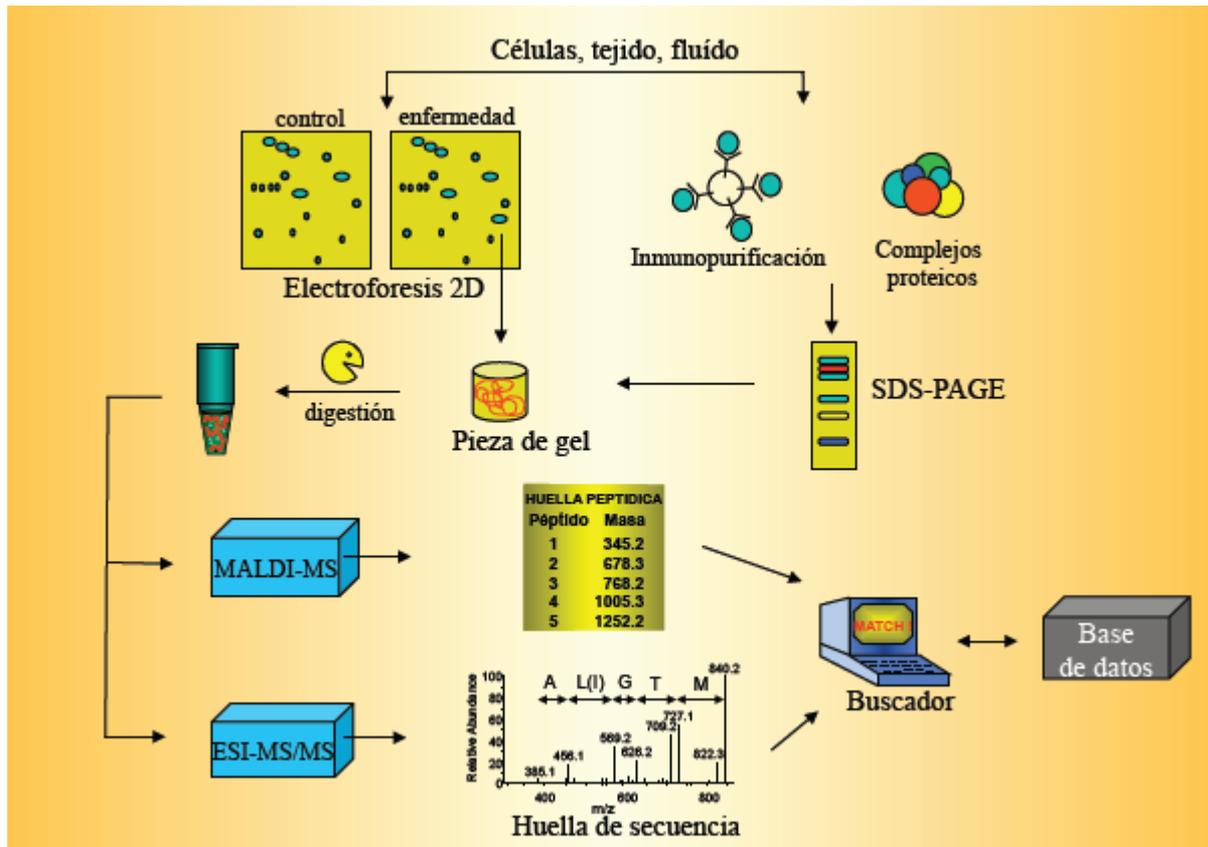
# Espectrometría de masas

## Estrategias proteómicas (proteómica tradicional)



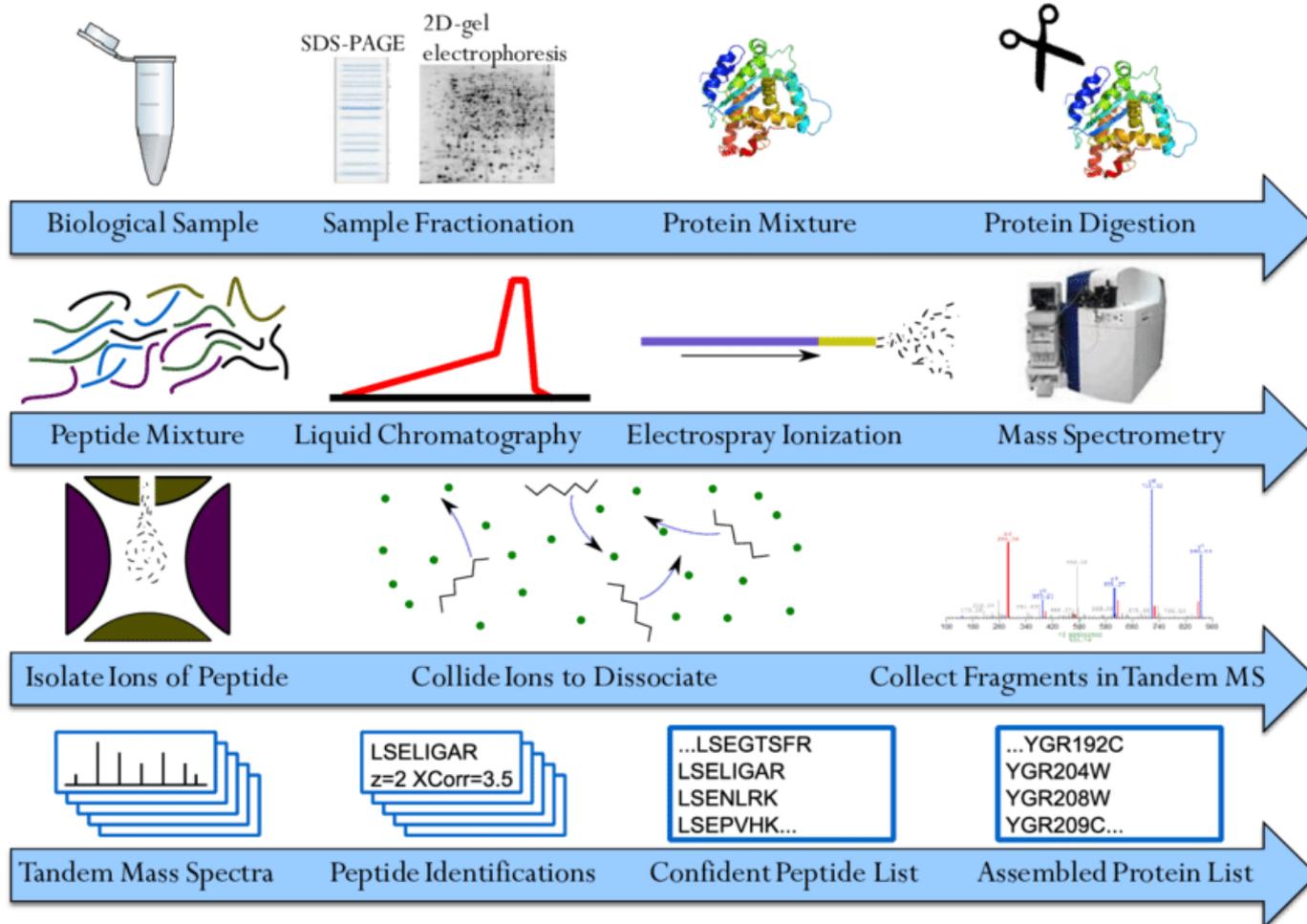
# Espectrometría de masas

## Estrategias proteómicas (proteómica tradicional)



# Espectrometría de masas

## Análisis a gran escala mediante proteómica *shotgun*



# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Espectrometría de masas

### Tecnología SELDI-TOF (Surface Enhance Laser Desortion Ionization Time Of Flight)

La mezcla de proteínas se coloca sobre una **superficie modificada** capaz de unir la proteína a detectar (superficies de captura de acero inoxidable, aluminio o chips de 1-2 mm de diámetro).

#### **Modificaciones de la superficie de captura:**

- 1- Químicamente activada (hidrofílicas, hidrofóbicas, con metales de afinidad inmovilizados, catiónicas o aniónicas, etc.).
- 2- Uniones específicas (pueden usarse como moléculas capturadoras ADN, anticuerpos u otras proteínas con capacidad de unir la proteína a detectar).

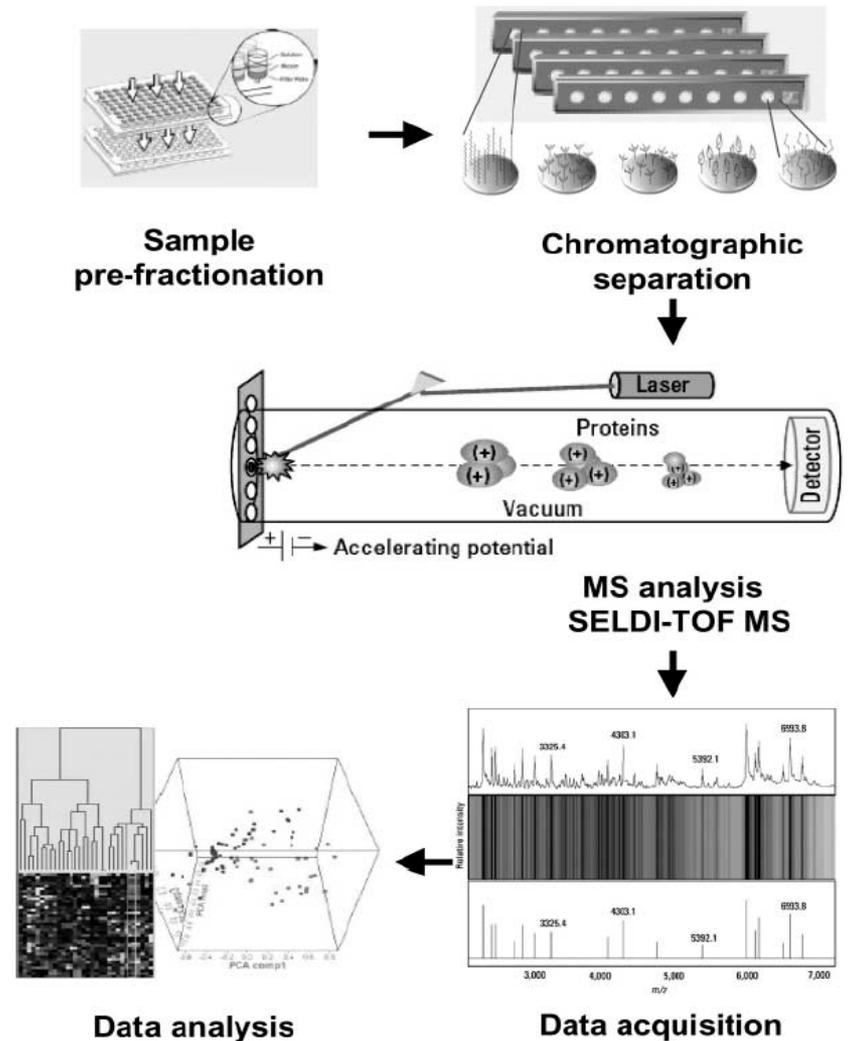
1- Colocar la muestra (suero, extracto de tejido, etc.) sobre el array (**captura de la proteína a detectar**).

2- Se realizan una serie de lavados cada vez mas estrictos para eliminar las proteínas que se unen a la superficie de forma inespecífica.

3- Se aplica un tratamiento con EAM (*energy absorbing molecules*) que hace posible la posterior desorción e ionización de la proteína.

4- Luego las proteínas son desorbidas e ionizadas por laser.

Se analiza el “Tiempo de vuelo” en el que se mide el tiempo que cada proteína ionizada tarda en alcanzar el extremo del tubo. Este tiempo depende de la masa de la proteína. El espectrómetro de masas nos permite aproximar la masa de la proteína a detectar.

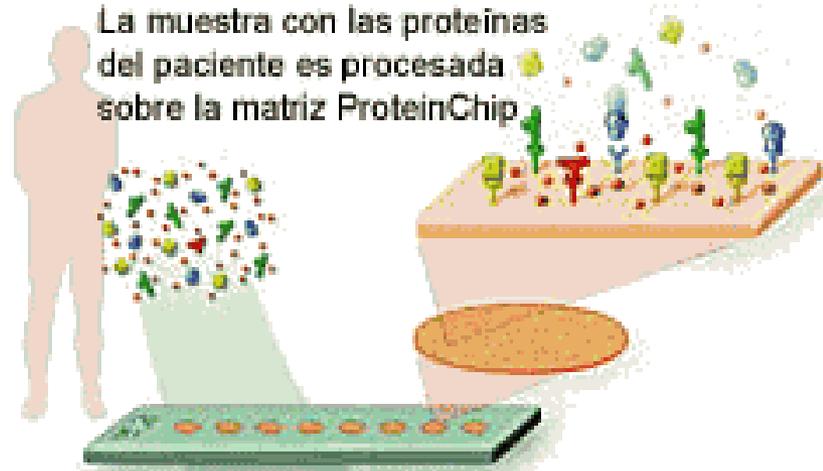


# Aplicación

Identificación de picos de proteínas expresadas diferencialmente en suero de pacientes con cáncer de ovario comparadas con pacientes sanos (Petricoin et al., 2002).

## Tecnología ProteinChip™ basada en SELDI\* \*(Desabsorción/Ionización por Láser de Superficie Mejorada)

La muestra con las proteínas del paciente es procesada sobre la matriz ProteinChip



Las proteínas de la muestra se unen a los "anzuelos" químicos o a las "zonas de amarre" biológicas situadas sobre la superficie de la matriz ProteinChip. Las proteínas de interés aparecen en rojo.

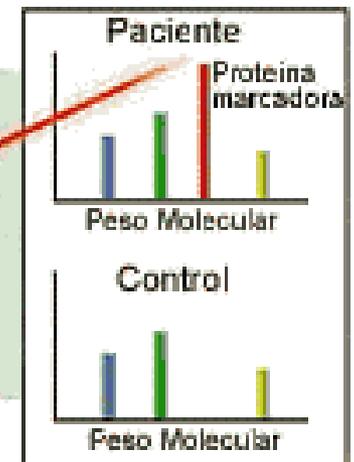
Se lavan las sustancias sobrantes para eliminar el "ruido" de la muestra



El láser ioniza las proteínas retenidas para detectar su masa (peso molecular)



El software revela la expresión de la proteína marcadora (en rojo) en la muestra del paciente al compararla con la muestra control



***Descripción de las metodologías  
asociadas a la detección y  
análisis de proteínas***

**Microarreglos o *chips* de proteínas**

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Microarreglos o *chips* de proteínas

- **Perfiles de expresión diferencial de proteínas.**
- **Interacciones proteína-proteína (interactoma).**

Se pueden clasificar en:

**Analíticos:** moléculas de naturaleza proteica (enzimas, péptidos, anticuerpos, antígenos, pequeñas moléculas sintéticas, etc) son inmovilizadas sobre un soporte sólido.

**Funcionales:** un subconjunto o el proteoma completo es utilizado para hacer el *array*.

# Técnicas asociadas al estudio proteómico

## Microarreglos o *chips* de proteínas

