

**APLICACIÓ DE TÈCNiques PROTEÒMIQUES
DE QUANTIFICACIÓ I VALIDACIÓ
EN RECERCA BIOMÈDICA**

Tesi Doctoral presentada per

Núria Colomé Calls

Per a obtenir el grau de

Doctora per la UAB

Tesi Doctoral realitzada en el Laboratori de Proteòmica
de l'Institut d'Oncologia de l'Hospital Vall d'Hebron
(VHIO), sota la supervisió dels Drs.

Francesc Canals i Iñaki Álvarez

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Octubre 2012

Dr. Francesc Canals

Dr. Iñaki Álvarez

Núria Colomé Calls

Als meus pares i al meu germà

Al Jordi

Al Francesc

Tothom deia que escriure els agraïments era la part més complicada i jo pensava, que va, si és la única que no em corregiran. Però és cert, posar per escrit la gratitud és difícil.

En primer lloc, vull donar les gràcies als meus directors de tesi, el Dr. Francesc Canals i el Dr. Iñaki Álvarez, per precipitar els fets i per les correccions a temps.

També vull agrair al Dr. Rafael Simó, al Dr. Iñaki Álvarez i al Dr. Joan Seoane que hagin permès que la col·laboració que hem mantingut formi part d'aquesta tesi.

Vull donar les gràcies al Francesc, per creure en mi, formar-me i consolidar el meu camí en el món de la proteòmica. Gràcies per la teva ajuda incondicional, la teva paciència i suport continu. Gràcies per l'esprint final i gràcies per tenir sempre la porta oberta.

Alhora, donar les gràcies a la Comissió de Seguiment de la tesi, la Dra. Carme Quero, la Dra. Montse Carrascal i la Dra. Marta Monge. A totes tres agrair-vos haver fet les coses com cal en la presentació-dinar anual d'aquests últims tres anys.

Gràcies Carme i Montse per formar part de la meva vida professional i personal des de fa tants anys, més de 10!. A vosaltres i al Dr. Joaquín Abián us haig d'agrair les meves primeres passes en el món de la proteòmica i el primer article!.

I la Marta?. Doncs va començar sent la Marta de la planta 14 i ara és una de les meves millors amigues. Gràcies per tenir temps per escoltar-me i aconsellar-me sempre que ho necessito i per deixar-me formar part del teu dia a dia. Gràcies per les

correccions. I gràcies, per endavant, per les llistes excel·lents que aviat espero necessitar.

Als companys de laboratori gràcies pel suport en la feina compartida i pels moments d'esbarjo. Gràcies Luna per la feina feta, demanada quasi sempre a contratemps ☺.

A la Marina i la Ma Ángeles gràcies per fer agradables les hores i hores davant el nostre amic, a vegades incompreensible i llunàtic, QTrap. I sobretot per no esgotar mai ni l'humor ni la paciència.

A l'Adelina agrair-li ser i estar tant quan les distàncies s'allarguen com quan s'escurcen.

Al Gerard Folch gràcies per fer tant fàcil el treball compartit.

Gràcies a la Núria Solde per fer la portada i haver il·lustrat dos dels moments més importants de la meua vida.

No vull oblidar-me dels meus amics, la Colla. Gràcies per l'amistat de tants anys i pel vostre interès.....per muntar una festa quan això s'acabi!.

Per acabar, donar les gràcies a la família, pel seu suport al llarg de tota la meua vida, i al Jordi, pels anys compartits, però sobretot per la paciència dels últims mesos. Carinyo, ja està!

A tots, moltes gràcies.

Pròleg

Aquesta tesi, desenvolupada en el Laboratori de Proteòmica de l'Institut d'Oncologia del Vall d'Hebron (VHIO), inclou tres estudis realitzats entre els anys 2005 i 2012.

El treball està estructurat en cinc parts: una introducció sobre les tècniques proteòmiques basades en espectrometria de masses, un capítol amb l'anàlisi proteòmica del fluid vitri per a identificar proteïnes candidates en la patogènesi de la retinopatia diabètica proliferativa (PDR), un capítol amb l'estudi de l'efecte del gen Regulador Autoimmune sobre el proteoma cel·lular mitjançant tècniques proteòmiques quantitatives, un capítol amb el treball proteòmic realitzat per a la identificació i validació d'una firma proteica indicadora de l'activitat de TGF β en glioblastomes i una discussió proteòmica final.

Cada capítol té la seva pròpia introducció, específica del problema biològic estudiat, i les seves pròpies conclusions. Al final de la tesi, a l'apartat de conclusions, es fa un recull de totes elles.

A cada capítol es presenten estratègies proteòmiques diferents. Aquestes aproximacions proteòmiques han estat implementades al laboratori, i inclouen des de tècniques clàssiques, com la electroforesi bidimensional (2-DE), a tècniques de recent utilització com els marcatges isotòpics o el seguiment d'una reacció seleccionada (SRM).

ÍNDEX

INDEX	11
ABREVIATURES	17
RESUM GENERAL	25
I.1. INTRODUCCIÓ	29
I.1.1. Proteòmica	31
I.1.2. Proteòmica d'expressió	32
I.1.3. Caracterització de les proteïnes per espectrometria de masses (MS)...	33
I.1.3.1. Espectrometria de masses	33
I.1.3.1.1. Fonts de ions: MALDI i ESI	35
I.1.3.1.2. Analitzadors	38
I.1.3.1.3. Combinacions de fonts de ions i analitzadors	43
I.1.3.2. Identificació de les proteïnes	44
I.1.3.2.1. Mapatge de masses peptídiques (PMF).....	44
I.1.3.2.2. Espectrometria de masses en tàndem o MS/MS	46
I.1.4. Preparació de la mostra	50
I.1.4.1. Fraccionament subcel·lular	50
I.1.4.2. Enriquiment de proteïnes amb modificacions postraduccionals	51
I.1.4.3. Depleció de proteïnes abundants	51
I.1.4.4. Extracció de proteïna	52
I.1.4.5. Precipitació de les proteïnes	54
I.1.4.6. Quantificació de les proteïnes	55
I.1.5. Proteòmica d'expressió basada en gel	57
I.1.5.1. Electroforesi bidimensional (2-DE)	57
I.1.5.2. Electroforesi diferencial en gel bidimensional (2D-DIGE)	63
I.1.6. Proteòmica d'expressió no basada en gel	65
I.1.6.1. Proteòmica quantitativa amb marcatge isotòpic	68
I.1.6.1.1. Marcatge isotòpic isobàric	68
I.1.6.1.2. Marcatge isotòpic no isobàric	70
I.1.6.2. Proteòmica quantitativa sense marcatge	75
I.1.6.3. Anàlisi de dades	78
I.1.6.4. Proteòmica quantitativa mitjançant el Seguiment d'una Reacció Seleccionada (SRM)	79
I.1.7. Comparació de les diferents estratègies de proteòmica d'expressió	82
OBJECTIUS	89
C-1. CAPÍTOL 1: Proteòmica del fluid vitri en la PDR	91
C-1.1. Resum	93
C-1.2. Introducció	95
C-1.2.1. Retinopatia Diabètica Proliferativa (PDR) i Forat Macular (MH) ...	95
C-1.2.2. Anàlisi proteòmica de l'humor vitri	96
C-1.3. Objectius	99
C-1.4. Material i Mètodes	101

C-1.4.1. Obtenció i selecció de les mostres	101
C-1.4.2. Concentració i extracció de proteïna per a la 2D-DIGE	102
C-1.4.2.1. Depleció de l'albumina i les IgGs	102
C-1.4.3. 2D-DIGE	103
C-1.4.3.1. Marcatge Fluorescent	103
C-1.4.3.2. IEF.....	103
C-1.4.3.3. Equilibració tires	104
C-1.4.3.4. Electroforesi bidimensional	104
C-1.4.3.5. Escaneig	105
C-1.4.3.6. Tinció total de les proteïnes	105
C-1.4.3.7. Anàlisi d'imatge	106
C-1.4.4. Retallat de les taques i digestió tròptica	107
C-1.4.5. Identificació de proteïnes per MS	107
C-1.4.6. Anàlisi per <i>western blot</i>	109
C-1.4.7. RT-PCR quantitativa en temps real	110
C-1.4.8. Anàlisi de les dades amb el <i>Ingenuity Pathways Analysis Software (IPA)</i>	111
C-1.5. Resultats	113
C-1.5.1. Experiments preliminars de 2-DE i depleció de l'HSA i les IgGs ...	113
C-1.5.2. Anàlisi comparativa dels proteomes d'humor vitri amb PDR o MH per 2D-DIGE	114
C-1.5.2.1. Concentració i extracció de proteïna	114
C-1.5.2.2. 2D-DIGE	116
C-1.5.2.3. Anàlisi d'imatge	118
C-1.5.3. Identificació per MS de les proteïnes diferencials	120
C-1.5.4. Validació dels resultats 2D-DIGE per <i>western blot (WB)</i>	121
C-1.5.5. Validació dels resultats 2D-DIGE per RT-PCR quantitativa en temps real	126
C-1.5.6. Xarxa IPA de les proteïnes diferencials obtingudes en l'experiment 2D-DIGE	128
C-1.6. Discussió	130
C-1.7. Conclusions	135
C-2. CAPÍTOL 2: Efecte d'AIRE en el proteoma cel·lular	137
C-2.1. Resum	139
C-2.2. Introducció	140
C-2.2.1. El gen Regulador AutoImmune (AIRE)	140
C-2.3. Objectius	145
C-2.4. Material i Mètodes	147
C-2.4.1. Línees cel·lulars i anticossos	147
C-2.4.2. Transfecció de HT93 i SK-Hep-1	147
C-2.4.3. Anàlisi per citometria de flux	148
C-2.4.4. Immunofluorescència	148

C-2.4.5. Pèl·let de cèl·lules	149
C-2.4.6. 2D-DIGE	149
C-2.4.7. Marcatge isotòpic ICPL	150
C-2.4.8. Identificació de les proteïnes per MS	152
C-2.4.8.1. Identificació de les proteïnes de les taques de l'experiment 2D-DIGE	152
C-2.4.8.2. Identificació i quantificació de les proteïnes de les bandes ICPL ..	153
C-2.4.9. Anàlisi amb el software IPA	154
C-2.4.10. Anàlisi per <i>western blot</i>	154
C-2.4.11. Assajos d'apoptosi	155
C-2.5. Resultats	157
C-2.5.1. Obtenció de les cèl·lules transfectades HT93-AIRE	157
C-2.5.2. Anàlisi proteòmic de les cèl·lules HT93 i HT93-AIRE	159
C-2.5.3. Comparació dels resultats proteòmics	163
C-2.5.4. Selecció de les proteïnes diferencials	164
C-2.5.5. Validació dels resultats proteòmics	167
C-2.5.6. Augment de l'apoptosi en les cèl·lules HT93-AIRE	169
C-2.6. Discussió	171
C-2.7. Conclusions	177
C-3. CAPÍTOL 3: Marcadors de la via de TGFβ en glioma	179
C-3.1. Resum	181
C-3.2. Introducció	183
C-3.3. Objectius	189
C-3.4. Material i Mètodes	191
C-3.4.1. Obtenció dels secretomes de cultius primaris de cèl·lules tumorals (PCTCs)	191
C-3.4.2. Anàlisi LC-MS sense marcatge del secretoma de PCTCs i quantificació per comptatge d'espectres	191
C-3.4.3. Anàlisi ICPL del secretoma de PCTCs	192
C-3.4.4. Anàlisi amb el software IPA	193
C-3.4.5. Creació del Mètode SRM	194
C-3.4.6. Anàlisi SRM del secretoma de PCTCs i adquisició depenent de la informació (IDA)	195
C-3.4.7. Anàlisi SRM del secretoma del PCTC1 tractat amb TGFβ1 i/o l'inhibidor LY215799	196
C-3.4.8. C-3.4.8. Anàlisi per western blot del PCTC1 tractat amb TGFβ1 i/o l'inhibidor LY215799	198
C-3.4.9. Anàlisi SRM de les mostres de CSF	198
C-3.4.10. Mesura dels nivells de TGFβ1 en els CSFs	200
C-3.4.11. Anàlisi per SRM de mostres de plasma	200
C-3.5. Resultats	203
C-3.5.1. Resultats de la fase de descobriment	203

C-3.5.1.1. Anàlisi per LC-MS sense marcatge del secretoma de PCTCs i quantificació per comptatge d'espectres	203
C-3.5.1.2. Anàlisi ICPL del secretoma de PCTCs	204
C-3.5.1.3. Proteïnes d'interès	205
C-3.5.2. Resultats de la fase de validació	208
C-3.5.2.1. Desenvolupament del mètode d'anàlisi per SRM	208
C-3.5.2.2. Validació de les proteïnes candidates per anàlisi SRM del secretoma del PCTC2+TGFβ1 tractat amb l'inhibidor LY215799	211
C-3.5.2.3. Posada a punt de l'anàlisi per SRM de CSFs	214
C-3.5.2.4. Anàlisi per SRM de mostres de CSFs de pacients amb glioma i altres tipus de tumors cerebrals	215
C-3.5.2.5. Anàlisi per SRM de mostres de plasma de pacients amb glioblastoma	219
C-3.6. Discussió	223
C-3.7. Conclusions	227
DISCUSSIÓ GENERAL	229
CONCLUSIONS	237
BIBLIOGRAFIA	241
ANNEX	253

ABREVIATURES

TAULA D' ABREVIATURES

Abreviatura	Català	English
1-DE	Electroforesi monodimensional	1-Dimensional electrophoresis
2-D	Bidimensional	Bidimensional
2D-DIGE	Electroforesi diferencial en gel bidimensional	Bidimensional-differential in gel electrophoresis
2-DE	Electroforesi bidimensional	2-Dimensional electrophoresis
AB	Bicarbonat amònic	Ammonium bicarbonate
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
ADH		Alcohol dehydrogenase
AIRE	Regulador autoimmune	Autoimmune regulator
APECED		Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
Apo		Apolipoprotein
ApoA1		Apolipoprotein A1
ApoH		Apolipoprotein H
APS	Persulfat amònic	Ammonium Persulfate
APS1	Síndrome poliendocrina autoimmune de tipus 1	Autoimmune polyendocrine syndrome type 1
Arg	Arginina	Arginine
Asp	Àcid aspàrtic	Aspartic acid
AZGP1		Zinc-alpha-2-glycoprotein
BCA	Àcid bicinconinic	Bicinchoninic acid
BPC	Cromatograma del pic base	Base peak chromatogram
C3		Complement C3 fragment 3f, 40 kDa
C4b		Complement C4b
C9		Complement C9
CA-IEF	Isoelectroenfocament amb amfòlits portadors	Carrier ampholyte isoelectric focusing
CARD	Domini de reclutament de caspases	Caspase-recruitment domain
CFB		Complement C3 fragment 3f, 40 kDa
CHAPS	Sulfonat de 3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamoni]-1-propà	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate
CID	Dissociació induïda per col·lisió	Collision-induced dissociation
ConA		Concanavilin A
cps	Comptatges per segon	Counts per second
CSF	Líquid cefaloraquidi	Cerebrospinal fluid
cTEC	Cèl·lula epitelial tímica cortical	Cortical thymic epithelial cells
CV	Coefficient de variació	Coefficient of variation
Cy	Cianina	Cyanine

ABREVIATURES

Abreviatura	Català	English
DAPI		4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DC	Cèl·lula dendrítica	Dendritic cells
DIGE	Electroforesi diferencial en gel	Differential in gel electrophoresis
D-MEM		Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfòxid	Dimethyl sulfoxide
DNA	Àcid desoxiribonucleic	Deoxyribonucleic acid
DRiPs	Productes ribosomals defectuosos	Defective ribosomal products
DTT	Ditiotreitòl	Dithiotreitol
ECD	Dissociació per captura d'electró	Electron-capture dissociation
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic	Ethylenediaminetetraacetic acid
EIC	Cromatograma del ió extret	Extracted ion chromatogram
ELISA	Assaig per immunoabsorció lligat a enzimes	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ESI	Ionització per electroesprai	Electrospray ionization
ETD	Dissociació per transferència d'electró	Electron-transfer dissociation
FA	Àcid fòrmic	Formic acid
FBS	Sèrum fetal boví	Fetal bovine serum
FDR		False discovery rate
FGA		Fibrinogen A
FT	Transformada de Fourier	Fourier transform
FWHM	Amplada de pic a mitja alçada	Full width at half height
GBM	Glioblastoma	
GIC	Cèl·lula iniciadora de glioma	Glioma-initiating cell
Glu	Àcid glutàmic	Glutamic acid
GndHCl	Clorur de guanidini	Guanidine hydrochloride
GPI	Glicosilfosfatidilinositol	Glycosylphosphatidylinositol
GRB2		Growth factor receptor-bound protein 2
HCCA	Àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic	α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid
HCl	Àcid clorhídric	
His	Histidina	Histidine
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució	High performance liquid Chromatography
HPLC-MS	Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses	High performance liquid chromatography-mass spectrometry
HSA	Albúmina de sèrum humà	Human serum albumin
HSC70		Heat shock cognate 71KDa
HSP27		Heat shock protein beta-1
HSP70		Heat shock 70kDa protein

Abreviatura	Català	English
HSR	Regió tenyida homogèniament	Homogeneously staining region
IAA	Iodoacetamida	Iodoacetamide
ICAT	Etiqueta isotòpica codificada d'afinat	Isotope-coded affinity tag
ICPL	Etiquetatge isotòpic codificat de proteïna	Isotope coded protein labeling
ID	Diàmetre intern	Internal diameter
IDA	Adquisició dependent informació	Information dependent acquisition
IEF	Isoelectroenfocament	Isoelectric focusing
IgG	Immunoglobulina G	Immunoglobulin G
IMAC	Cromatografia d'afinitat amb un metall immobilitzat	Immobilized metal affinity chromatography
IPA		Ingenuity pathways analysis
IPG	Gradient de pH Immobilitzat	Immobilised pH gradient
IPG-IEF	Isoelectroenfocament amb gradient de pH Immobilitzat	Immobilised pH gradient isoelectric focusing
IPI		International protein index
IR	Infraroig	Infrared
IRBP		Interstitial retinol-binding protein
IT	Trampa de ions/ trampa iònica	Ion trap
ITIH2		Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2
iTRAQ	Etiquetes isobàriques per a la quantificació relativa i absoluta	Isobaric tags for relative and absolute quantification
KO	Noquejats	Knockout
Ku80		ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
LC	Cromatografia líquida	Liquid chromatography
LC-MS	Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses	Liquid chromatography–mass spectrometry
LIF		Leukemia inhibitory factor
Lys	Lisina	Lysine
m/z	Relació massa-càrrega	Mass-to-charge ratio
MALDI	Desorció/ionització làser assistida per matriu	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MH	Forat macular	Macular hole
mRNA	RNA missatger	Messenger RNA
MS	Espectrometria de masses/ Espectròmetre de masses	Mass spectrometry/ Mass spectrometer
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem	Tandem mass spectrometry
mTEC	Cèl·lula epitelial tímica medul·lar	Medullary thymic epithelial cells
MW	Massa molecular	Molecular weight
NAC	N-acetil-L-cisteïna	N-Acetyl-L-cysteine

Abreviatura	Català	English
NCBI		National center for biotechnology information
NEPHGE	Electroforesi en gel amb pH no equilibrat	Nonequilibrium pH gradient electrophoresis
nESI	Ionització per electroesprai nano	nano Electrospray ionization
NLS	Senyal de localització nuclear	Nuclear-localization signal
NMR	Ressonància magnètica nuclear	Nuclear magnetic resonance
NP-40	Nonidet P-40	Nonidet P-40
OMS	Organització mundial de la salut	
p/v	pes/volum	weight/volume
PBS	Solució salina tamponada amb fosfats	Phosphate-buffered Saline
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
PCTC	Cultiu primari de cèl·lules tumorals	Primary cultured tumor cells
PDCD5		Programmed cell death protein 5
PDR	Retinopatia diabètica proliferativa	Proliferative diabetic retinopathy
PEDF		Pigment epithelium derived factor
PHD	Homeodominis planta	Plant homeodomains
pI	Punt Isoelèctric	Isoelectric point
PMF	Empremta de masses peptídiques	Peptide mass fingerprint
ppm	Parts per milió	Parts per million
PRR	Regió rica en prolines	Proline-rich region
PSD	Decaïment post font	Post-source decay
PTM	Modificació postraducciona	Posttranslational modification
PTP	Pèptids proteotòpics	Proteotypic peptides
PVDF		Polyvinylidene difluoride
Q	Quadrupol	Quadrupole
QqQ	Triple quadrupol	Triple stage quadrupole
RNA	Àcid Ribonucleic	Ribonucleic acid
RT	Temps de retenció	Retention time
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SA	Àcid sinapínic	Sinapinic Acid
SCH		Scheduled
SDS	Dodecilsulfat sòdic	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERPINC1		AntithrombinIII
SERPINF1		Pigment epithelium derived factor
SILAC	Etiquetatge amb isòtops estables d'aminoàcids en cultius cel·lulars	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture

Abreviatura	Català	English
SNC	Sistema nerviós central	
SRM	Seguiment d'una reacció seleccionada	Selected reaction monitoring
Std	Estàndard	Standard
TBP	Tributilfosfina	Tributylphosphine
TBS	Solució salina tamponada amb Tris	Tris buffered saline
TCA	Àcid tricloroacètic	Tricloroacetic acid
TCEP	Tris(2-carboxietil)-fosfina	Tris(2-carboxyethyl)-phosphine
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilediamina	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
TFA	Àcid Trifluoroacètic	Trifluoroacetic acid
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol	2,2,2-Trifluoroethanol
TGFβ	Factor de creixement transformant β	Transforming growth factor β
TGFβRI	Receptor de TGF β de tipus I	TGF β type I receptor
TGFβRII	Receptor de TGF β de tipus II	TGF β type II receptor
TIC	Cromatograma de ions total	Total ion chromatogram
TMT	Etiquetes de masses en tàndem	Tandem mass tags
TNF		Tumor necrosis factor
TOF	Temps de vol	Time of flight
TRA	Antigen restringit a teixit	Tissue-restricted antigens
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolat	Ultraviolet
v/v	volum/volum	volume/volume
VEGF		Vascular endothelial growth factor
WB		Western blot
WGA		Wheat germ agglutinin
XIC	Cromatograma del ió extret	Extracted ion chromatogram
z	Càrrega	
ZAG		Zinc-alpha-2-glycoprotein
ϵ	Coefficient d'extinció molar	

RESUM GENERAL

RESUM GENERAL

Les tècniques proteòmiques basades en l'espectrometria de masses (MS) permeten la caracterització de la complexa i dinàmica natura del proteoma. Aquestes eines han contribuït a entendre millor certes funcions biològiques i respostes cel·lulars i a obtenir biomarcadors específics per a l'estudi d'algunes malalties.

En aquest treball, es van utilitzar tècniques proteòmiques de quantificació i validació, basades en l'espectrometria de masses, en diferents estudis de recerca biomèdica.

En el primer estudi es va comparar el perfil de proteïnes del fluid vitri de pacients diabètics amb retinopatia diabètica proliferativa (PDR) amb el de pacients no diabètics amb forat macular idiopàtic (MH). L'anàlisi proteòmica comparativa es va fer amb el sistema d'electroforesi diferencial en gel bidimensional basat en el marcatge fluorescent (2D-DIGE). Per MS es van identificar 11 proteïnes diferencials entre els pacients amb PDR i els individus no diabètics. Cinc de les proteïnes diferencials es van validar per *western blot* en fluids vitris i per RT-PCR en retines. L'anàlisi proteòmica 2D-DIGE va servir per a identificar potencials candidats involucrats en la patogènesis de la PDR.

En el segon estudi es va avaluar l'efecte del gen Regulador AutoImmune (AIRE) mitjançant la comparació dels proteomes de cèl·lules epitelials transfectades o no amb AIRE. L'anàlisi comparativa es va realitzar combinant dues tècniques de proteòmica quantitativa: la 2D-DIGE i l'etiquetatge isotòpic codificat de proteïna (ICPL) en combinació amb cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS). Els resultats van mostrar un nivell incrementat de varies xaperones en les cèl·lules que expressaven AIRE, mentre que diferents proteïnes de interacció del citoesquelet es van trobar disminuïdes. A més, algunes proteïnes relacionades amb apoptosi tenien abundàncies diferencials entre unes cèl·lules

RESUM GENERAL

i les altres. Aquests resultats es van confirmar per *western blot* i citometria de flux. Finalment, assajos d'apoptosi amb annexin V i etopòsid van demostrar que les cèl·lules positives en AIRE patien més apoptosi espontània i eren menys resistents a la inducció d'apoptosi. Els resultats obtinguts van corroborar el paper d'AIRE com a inductor d'apoptosi.

En el tercer estudi, amb l'objectiu d'identificar possibles proteïnes biomarcadores de l'activitat TGF β en gliomes es van analitzar les proteïnes secretades en els cultius cel·lulars primaris derivats de tumors (PCTCs), tractats o no amb TGF β , mitjançant experiments quantitativs de LC-MS sense marcatge i ICPL. Es van identificar varies proteïnes candidates per a les que es van desenvolupar mètodes d'anàlisi de seguiment d'una reacció seleccionada (SRM) per a poder validar-les en mostres de líquid cefaloraquídi (CSF) i plasma de pacients amb glioma. Els resultats de l'anàlisi dels CSFs van mostrar una clara correlació entre els nivells de les proteïnes candidates i els nivells de TGF β en aquestes mostres. Igualment, a l'analitzar les proteïnes candidates per SRM en mostres de plasma de pacients amb glioma en fases alternades de tractament amb un inhibidor de TGF β es va observar que els nivells de les proteïnes d'interès eren modulades pel tractament. Aquestes proteïnes conformarien una firma proteica que podria ser útil pel diagnòstic i el seguiment del tractament dels pacients.

En conjunt, els resultats obtinguts en cada un dels tres estudis demostren la utilitat de l'anàlisi proteòmica en diferents aspectes de la investigació biomèdica.

INTRODUCCIÓ

I.1. INTRODUCCIÓ

I.1.1. Proteòmica

La proteòmica és la ciència que s'encarrega de l'estudi del proteoma. La paraula proteoma la utilitzà per primera vegada Marc R. Wilkins l'any 1994, com a equivalent lingüístic al de genoma. Amb el terme proteoma definim al conjunt de proteïnes expressades en una cèl·lula, teixit, organisme o fluid biològic en un moment determinat sota unes condicions específiques.

Les proteïnes són les responsables de dur a terme la majoria dels processos bioquímics que tenen lloc en els organismes vius. L'estudi dels seus nivells d'expressió, distribució, modificacions postraduccionals, estructures tridimensionals i funcions és necessari per a comprendre el funcionament de la cèl·lula i els seus estats patològics.

El coneixement del proteoma pot permetre el desenvolupament de mètodes de predicció i diagnosi de malalties i la creació de teràpies efectives per al seu tractament (Dunn 2000), (Liotta et al. 2001).

El proteoma és molt més complex i dinàmic que el genoma. Mentre que el genoma humà té entre 20000 i 25000 gens (Consortium International Human Genome Sequencing 2004), el número total de proteïnes s'ha estimat en més d'un milió (Jensen 2004). La recombinació gènica, la iniciació de la transcripció en promotors alternatius, la terminació diferencial de la transcripció i l'enllaçament alternatiu en la transcripció són els mecanismes que generen diferents formes transcrites de mRNA per a un únic gen (Ayoubi and Van De Ven 1996). Així doncs, un gen pot originar més d'una seqüència proteica i, a més, cada una d'aquestes proteïnes pot patir diferents modificacions postraduccionals.

Durant els darrers anys s'han desenvolupat dues aproximacions bàsiques per a l'estudi del proteoma. La denominada proteòmica d'expressió o proteòmica clàssica, mitjançant la qual

INTRODUCCIÓ

s'estudia de forma global l'expressió proteica d'un teixit, cèl·lula o fluid biològic en diverses condicions amb l'objectiu de trobar signatures proteiques específiques de l'estat fisiològic com a resultat de canvis de l'entorn, de l'estrès o de l'administració de fàrmacs.

Per altra banda la denominada proteòmica de mapa cel·lular o funcional, es dirigeix a l'estudi de grups seleccionats de proteïnes, com per exemple els complexos proteics, dels quals es determina la seva composició i estructura, les seves interaccions amb altres molècules, així com la seva localització i el seu moviment en la cèl·lula (Liotta et al. 2001).

I.1.2. Proteòmica d'expressió

La proteòmica d'expressió identifica i quantifica les proteïnes que es regulen en un teixit, cèl·lula o fluid biològic en diferents estats.

Per a l'estudi del proteoma s'utilitzen diferents tècniques de separació, identificació, anàlisi quantitativa i caracterització a gran escala de les proteïnes. Aquestes tècniques es troben en constant desenvolupament, essent cada vegada més automatitzades i sensibles.

Les metodologies més comuns utilitzades en proteòmica d'expressió es poden categoritzar de diferents maneres. Segons la tècnica de separació utilitzada es poden classificar en les basades en electroforesi en gel i les no basades en electroforesi en gel. En les basades en electroforesi en gel la quantificació de les diferències es fa en aquesta matriu tot i que les proteïnes són identificades per espectrometria de masses (MS). En les no basades en electroforesi en gel es sol treballar amb cromatografia líquida (LC) acoblada a espectrometria de masses (LC-MS) i tant la quantificació com la identificació de les proteïnes es fa a partir de les dades de MS.

També es poden dividir en estratègies de descobriment o dirigides. Les estratègies de descobriment intenten identificar i quantificar el màxim de proteïnes en un número reduït de mostres. Pel contrari la proteòmica dirigida es basa en la quantificació d'unes poques proteïnes escollides en un gran número de mostres.

Finalment podem parlar de tècniques de quantificació relativa o absoluta. Les tècniques de quantificació relativa es basen en la comparació dels nivells de les proteïnes a diferents mostres, mentre que les de quantificació absoluta serveixen per a determinar la concentració dels anàlits a les diferents mostres.

I.1.3. Caracterització de les proteïnes per espectrometria de masses (MS)

La caracterització de les proteïnes per MS és actualment una eina indispensable en el camp de la proteòmica i això ha estat possible gràcies a la creació de bases de dades amb les seqüències de gens i genomes i, entre d'altres àrees, l'avanç en el desenvolupament de mètodes de ionització de proteïnes (Aebersold and Mann 2003).

I.1.3.1. Espectrometria de masses

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica que permet mesurar, amb una elevada precisió, la relació massa-càrrega (m/z) i l'abundància de ions presents en una barreja, permetent l'anàlisi de les mostres tant de forma qualitativa com quantitativa.

Les parts principals d'un espectròmetre de masses (MS) són: la font de ions, l'analitzador i el detector (Figura I.1).

Les mostres a analitzar són introduïdes a la font de ions on els components de la mostra són convertits en ions en fase gasosa. Aquests ions es transfereixen a l'analitzador i són accelerats i separats segons la seva m/z mitjançant camps

INTRODUCCIÓ

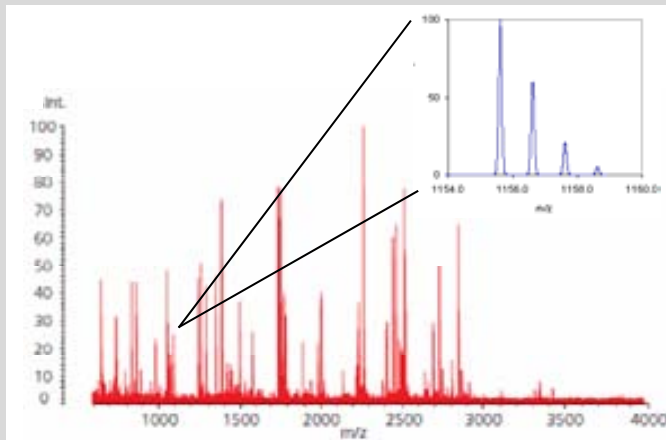
electromagnètics. Finalment el número de ions per a cada m/z és mesurat en el detector i digitalitzat en forma d'espectre de masses.

Relació massa-càrrega (m/z): És la relació entre la massa del ió i el número de carregues que té. Normalment, en el cas de les proteïnes i els pèptids tenim:

$$m/z = (M + nH^+) / n$$

M és la massa molecular del ió. Unitats: dalton (Da), H^+ és la massa atòmica de l' hidrogen i n és el número d'hidrògens units a l'espècie ionitzada ($n=1,2,\dots$)

Espectre de masses: És la representació de la intensitat vs. la relació m/z dels ions d'una mostra.



Les fonts de ions o sistemes de ionització més utilitzats per a l'anàlisi de pèptids i proteïnes són: la desorció/ionització làser assistida per matriu (MALDI) (Karas and Hillenkamp 1988) i l'electrosprai (ESI) (Fenn et al. 1989). Aquestes fonts es combinen generalment amb analitzadors de ions basats en sistemes de quadrupols (Q) (Paul and Steinwedel 1953), tubs de

temps de vol (TOF), o trapes de ions (IT) tot i que també existeixen els de sectors magnètics i els de transformada de Fourier (FT) (Figura I.1).

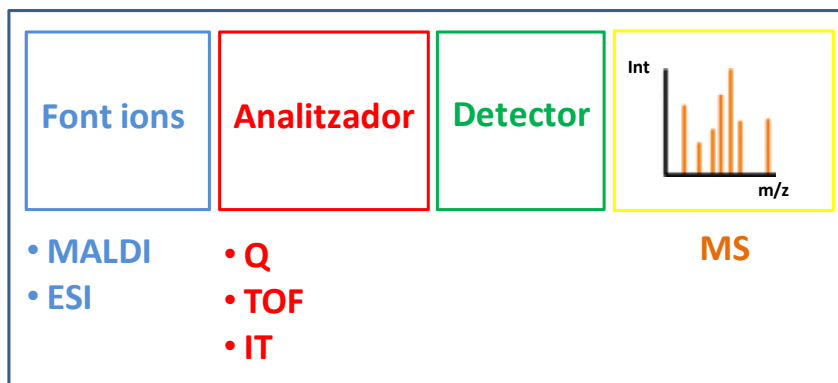


Figura I.1. Esquema general d'un espectròmetre de masses

I.1.3.1.1. Fonts de ions: MALDI i ESI

Durant molt de temps, l'espectrometria de masses, va estar restringida a petits compostos termostables per la falta de tècniques efectives per a ionitzar suaument i transferir les molècules ionitzades a la fase gas sense excessiva fragmentació. El desenvolupament, a finals dels anys 80, de les fonts MALDI i ESI va canviar dràsticament aquesta situació fent que els pèptids fossin analitzables per espectrometria de masses.

MALDI

La font de ions MALDI utilitza polsos de llum làser en la freqüència del UV o l'IR llunyà per a volatilitzar i ionitzar la mostra que està cocrystal·litzada amb un compost sòlid anomenat matriu (Figura I.2). La funció de la matriu és la incorporació i dispersió de les molècules de l'anàlit i l'absorció de l'energia de la radiació làser per a produir ions de l'anàlit a través de reaccions fotoquímiques. Les matrius més utilitzades per a l'anàlisi de pèptids i proteïnes

INTRODUCCIÓ

són l'àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic (HCCA) i l'àcid sinapínic (SA), respectivament.

En les fonts de ions MALDI els ions d'anàlit es formen principalment per protonació de les molècules per a donar, majoritàriament, ions mono carregats i, a vegades, ions amb dues o més carregues.

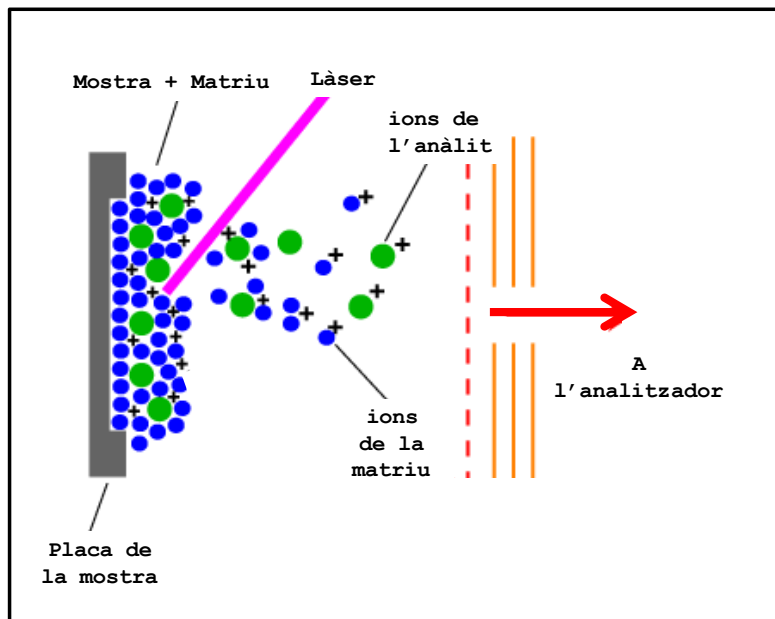


Figura I.2. Esquema d'una font MALDI (Adaptada de University of Bristol)

ESI

En la font de ions ESI la mostra en solució s'ionitza a pressió atmosfèrica quan és nebulitzada a la sortida d'un tub capil·lar per acció d'un fort camp elèctric. En la nebulització es formen unes gotes carregades que contenen els ions dels anàlits (Figura I.3, A). Aquestes gotes es van evaporant i la seva mida es va reduint fins al punt que la tensió electrostàtica a l'interior és tant gran que dona lloc a l'"explosió Coulombiana" i els ions passen a fase gasosa. Generalment, en aquest procés es formen ions doble o triple carregats (Figura I.3, B).

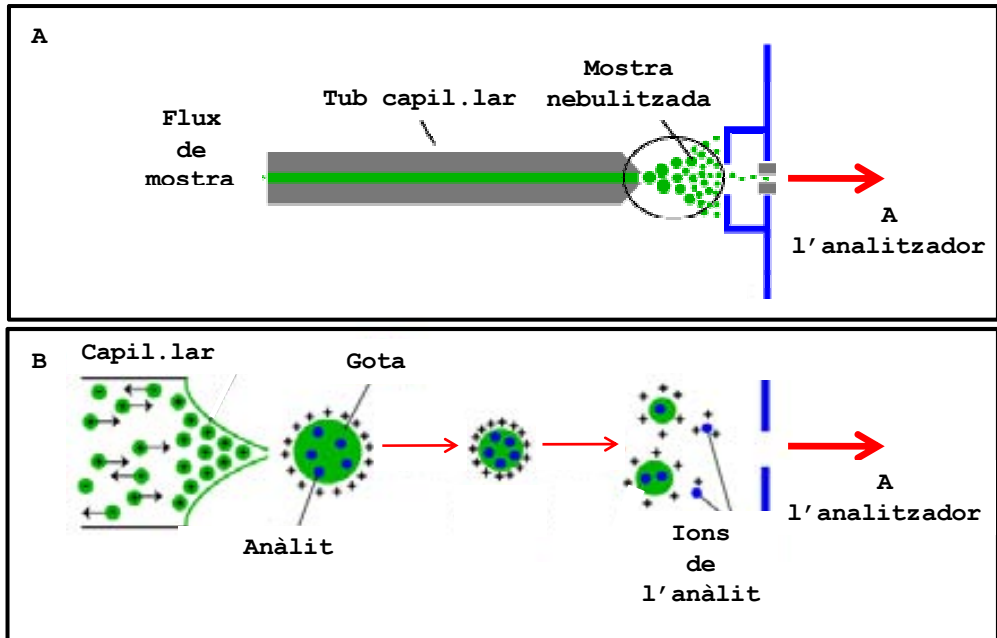


Figura I.3. A) Esquema d'una font ESI. B) Esquema del procés de formació dels ions en fase gas en la font ESI (Adaptada de University of Bristol)

El grau de càrrega d'un determinat ió depèn de la seva estructura (presència de grups àcids i bàsics) i del dissolvent utilitzat. En el cas dels pèptids i les proteïnes el número de carregues de l'espècie iònica està directament relacionat amb el número d'aminoàcids bàsics (Arg, Lys, His, extrem N-term) i àcids (Asp, Glu i extrem C-terminal) de la seqüència. Quant més gran sigui un pèptid més número d'aminoàcids, residus, capaçs d'adquirir càrrega tindrà i això en determinarà la seva m/z .

En proteòmica, les fonts ESI que es fan servir són una variant de la font desenvolupada per Fenn i s'anomenen fonts nanoesprai (nESI). Aquestes fonts han estat dissenyades amb l'objectiu de poder acoblar sistemes cromatogràfics, que treballen a fluxos per sota del microlitre per minut, als espectròmetres de masses. La diferència més gran entre les

INTRODUCCIÓ

fonts ESI i nESI és el diàmetre intern del capil·lar que conté la mostra d'aproximadament 500µm i <10µm respectivament.

Característiques de les fonts nESI:

- Flux de treball: 20-500nL/min.
- Mínim consum de mostra.
- Major eficiència en la ionització ja que quant més petites són les gotes produïdes en la nebulització més eficaç és la producció de ions.
- Més sensibles:
 - En disminuir la mida del esprai una fracció més gran de ions és introduïda cap a l'analitzador.
 - Augmenta la concentració a la que els pèptids son eluïts.

I.1.3.1.2. Analitzadors

Quadrupol

Els analitzadors de tipus quadrupol estan formats per quatre barres paral·leles. Cada parella de barres paral·leles està connectada elèctricament i un voltatge de radiofreqüència és aplicat entre una parella de barres i l'altra. D'aquesta manera es creen camps elèctrics oscil·lants que estableixen o desestabilitzen selectivament les trajectòries dels ions que passen a través del quadrupol (Figura I.4, A). Els quadrupols poden fer de filtres selectius de determinades m/z o permetre l'anàlisi de rangs grans de m/z.

La conformació més típica d'aquest tipus d'analitzadors són els triple quadrupols (QqQ) formats per tres quadrupols consecutius (Figura I.4, B). La forma de treball més comú en aquest tipus d'analitzador és que el primer quadrupol(Q1) fa de filtre per a transmetre un determinat ió fins al segon quadrupol (Q2), que és una càmera de col·lisió on el ió és

fragmentat i, per últim, el tercer quadrupol (Q3) també fa de filtre per a transmetre, en aquest cas, un determinat fragment fins al detector. Aquests instruments permeten treballar amb mètodes molt sensibles i específics per a l'anàlisi de ions coneguts.

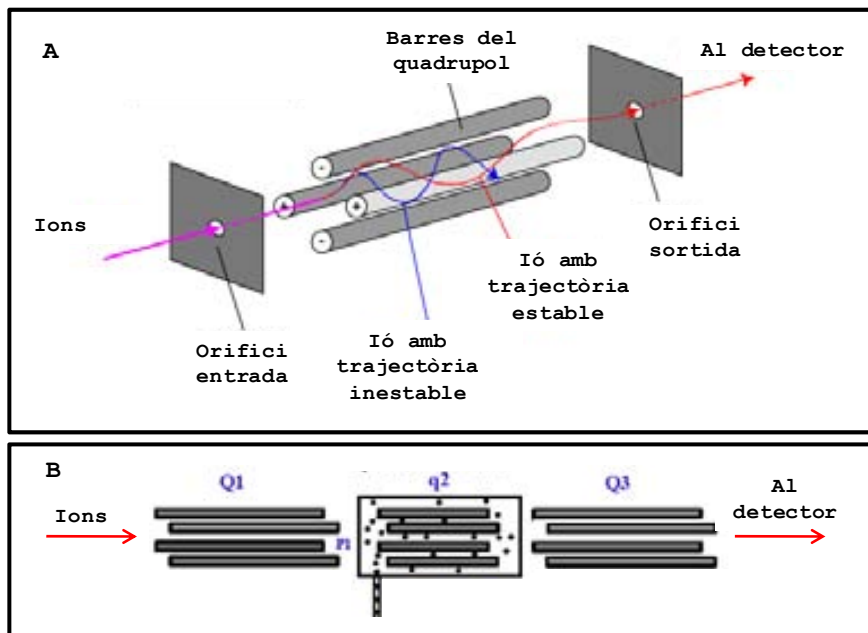


Figura I.4. A) Esquema d'un analitzador de tipus quadrupol. B) Conformació d'un analitzador de triple quadrupol (Adaptada de University of Bristol)

Temps de vol

En els instruments TOF es fa servir un camp elèctric per a accelerar els ions dins un potencial constant i mesurar el temps que triguen aquests ions a arribar al detector en el buit. Si una sèrie de ions tenen la mateixa càrrega, la seva energia cinètica serà idèntica, llavors les seves velocitats dependran únicament de les seves masses. Els ions més lleugers arribaran abans al detector i els més pesats trigaran més. A la pràctica, existeixen lleugeres diferències en les energies cinètiques de ions iguals i això es pot corregir gràcies al

INTRODUCCIÓ

reflector de ions que fa que arribin tots alhora al detector (Figura I.5).

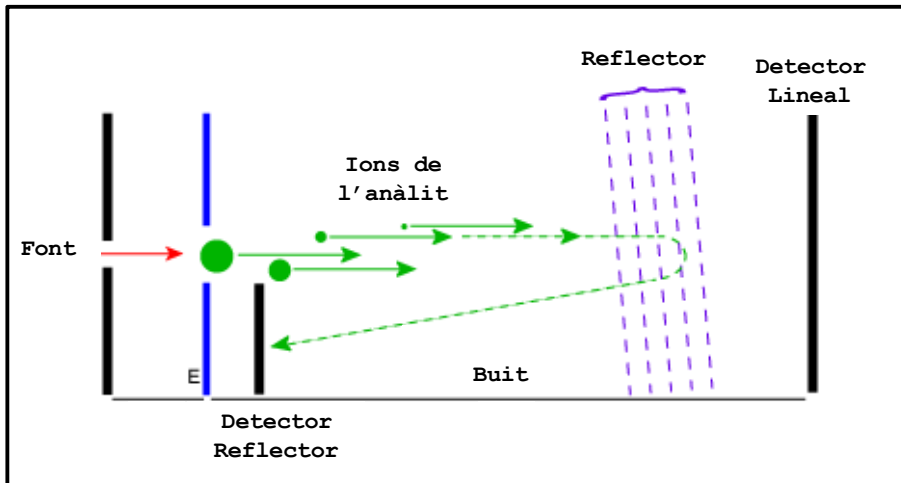


Figura I.5. Esquema d'un analitzador de temps de vol (Adaptada de University of Bristol)

L'energia potencial (E_p) d'un ió en un camp elèctric està relacionada amb la càrrega elemental (z_e) i la força del camp elèctric (voltage, U).

$$E_p = z_e U$$

Quan un ió és accelerat en un tub de vol amb un voltage constant, la seva energia potencial es converteix en energia cinètica (E_c).

$$E_p = E_c \quad E_c = (mv^2)/2 = z_e U$$

m és la massa del ió i v és la velocitat del ió una vegada accelerat.

Com que $v=d/t$ on d és la distància del tub de vol i t és el temps de vol del ió:

$$(m/2) (d/t)^2 = z_e U$$

Si una sèrie de ions tenen la mateixa càrrega, z_e serà igual i com d i U són constants, el temps de vol, t , només dependrà de la massa del ió.

$$t = (d/\sqrt{2U}) \sqrt{m/z_e}$$

El rendiment dels analitzadors TOF ha millorat molt, en particular pel que fa a la resolució i la precisió de massa. Actualment, una resolució més gran de 40000 és normal en molts instruments, i amb un calibratge correcte es poden aconseguir precisions de masses amb valors de poques parts per milió (<10ppm).

Trampa de ions

Existeixen diferents tipus de trampes de ions: les trampes tridimensionals, les trampes lineals i els orbitraps.

Les trampes tridimensionals estan formades per tres elèctrodes: un elèctrode anular i dos elèctrodes de superfície hiperbòlica anomenats elèctrodes de tancament (Figura I.6). Aquests elèctrodes creen un camp elèctric tridimensional on els ions són atrapats i expulsats de forma seqüencial. Per aïllar i separar les diferents relacions m/z es crea una rampa de radiofreqüències.

En el cas de les trampes lineals els ions són emmagatzemats en un quadrupol modificat, amb un elèctrode addicional a la sortida que permet atrapar els ions.

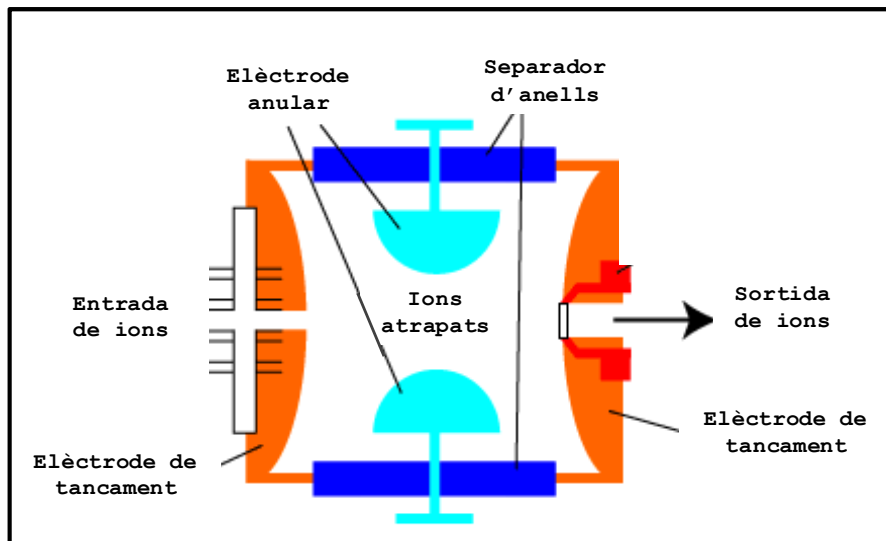


Figura I.6. Esquema d'una trampa de ions tridimensional (Adaptada de University of Bristol)

INTRODUCCIÓ

En general, aquests tipus d'instruments són molt robustos, relativament sensibles i barats, però tenen una baixa precisió de massa.

En els orbitraps els ions són electroestàticament atrapats en una òrbita al voltant d'un elèctrode central. L'elèctrode confina els ions de manera que orbiten i oscil·len endavant i endarrere.

Els orbitraps tenen una elevada resolució i precisió de massa, comparable als FT, i una alta sensibilitat, però actualment és un dels analitzadors més cars del mercat. Aquest tipus d'analitzador troba el seu màxim exponent en forma d'espectròmetre de masses híbrid amb una trampa lineal.

Paràmetres crítics d'un analitzador

Resolució: Aquest paràmetre determina la capacitat d'un analitzador per a separar dos senyals de m/z similars en un espectre de masses.

$$R = M / \Delta M$$

M : Relació massa-càrrega

ΔM : Amplada de pic de la massa. Aquesta amplada de pic es pot calcular a diferents alçades

Resolució (FWHM): És la resolució quan ΔM és calculada al 50% de l'alçada màxima del pic (Full Width at Half Maximum, FWHM)

Precisió de massa (ppm): És la mesura de la desviació entre la massa mesurada a l'analitzador i la massa real. Es sol donar el resultat en parts per milió.

$$P (\text{ppm}) = (M_m - M_r) * 10^6 / M_r$$

M_m : massa mesurada a l'analitzador

M_r : massa real

I.1.3.1.3. Combinacions de fonts de ions i analitzadors

Com ja s'ha comentat, els espectròmetres de masses són la combinació d'una font de ionització amb un o varis analitzadors.

Les presentacions i característiques més comuns dels espectròmetres de masses més usats en proteòmica es mostren en la taula I.1 (Domon and Aebersold 2006). La tria d'una presentació o un altre s'ha de fer en funció de l'anàlisi que es vulgui realitzar.

Un espectròmetre de masses amb una bona precisió de masses evita la identificació de falsos positius (identificació de pèptids i proteïnes que en realitat no estan en la mostra). Quant millor és la resolució menys solapament entre pics propers i millor es pot establir la càrrega dels pèptids. Altres característiques no descrites en la taula, i a tenir en compte, són la capacitat per a mesurar masses baixes o la possibilitat d'identificar modificacions postraduccionalis.

Taula I.1. Resum de les característiques dels espectròmetres de masses (un positiu indica dolent o baix i quatre bo o alt)

Característica	MALDI-TOF	ESI-IT	ESI-Q-TOF	ESI-QqQ	ESI-Orbitrap
Precisió de massa	+++	+	++++	+	++++
Resolució	+++	++	+++	+	++++
Sensibilitat	+++	++	++	++++	++++
Rang dinàmic	++	++	++	++++	+++

El MALDI-TOF és una de les tècniques més ràpides per a la identificació de pèptids i proteïnes i es caracteritza per la seva robustesa, senzillesa de maneig i capacitat d'automatització, així com per la seva alta sensibilitat i relativa tolerància a sals i d'altres interferències. El seu principal inconvenient és que no és evident acoblar en línia

INTRODUCCIÓ

la font MALDI a sistemes de separació com la cromatografia líquida.

Aquest espectròmetre de masses és el que es fa servir de forma estàndard per a identificar les proteïnes separades en gels bidimensionals per empremta de masses peptídiques (PMF).

L'espectrometria de masses ESI-IT s'utilitza per a la identificació a gran escala de proteïnes. En aquest cas les proteïnes de la barreja són digerides, separades per cromatografia líquida i els pèptids identificats per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS).

L'ESI-QqQ també s'utilitza acoblada a la cromatografia líquida i, com en l'ESI-IT, els pèptids són identificats per MS/MS. En aquest cas la conformació de l'analitzador amb tres quadrupols permet mesures quantitatives de forma dirigida, amb elevada especificitat i sensibilitat. Per això, actualment, aquests espectròmetres de masses són utilitzats per a la validació de proteïnes.

I.1.3.2. Identificació de les proteïnes

Existeixen dues aproximacions diferents per a la identificació de proteïnes. Quan les proteïnes intactes són ionitzades i introduïdes a l'analitzador es parla de l'estratègia "de dalt a baix" (*top-down*), per altra banda quan les proteïnes són enzimàticament digerides en petits pèptids, mitjançant una proteasa com per exemple la tripsina (l'enzim més utilitzat), analitzades amb l'espectròmetre de masses i identificades per PMF o MS/MS llavors es parla de l'estratègia "de baix-a dalt" (*bottom-up*).

I.1.3.2.1. Empremta de masses peptídiques (PMF)

El mètode més senzill per a la identificació de proteïnes mitjançant MS és l'anomenat empremta de masses peptídiques.

Una proteïna digerida per una determinada proteasa produeix una col·lecció de pèptids específics de la proteïna i la

proteasa. Quan la massa molecular d'aquests pèptids es determina per MS s'obté un llistat de masses (espectre de masses) que s'anomena empremta peptídica.

Per a que una proteïna es pugui identificar cal que la seva seqüència proteica o genòmica estigui emmagatzemada en una base de dades (SwissProt, NCBI, IPI). Per altra banda, els programes de cerca (MASCOT, Phenyx) són capaços de generar les empremtes peptídiques predites per a totes les proteïnes presents en la base de dades i en funció, entre d'altres paràmetres, de la proteasa utilitzada (habitualment s'utilitza la tripsina que talla específicament després dels residus bàsics lisina i arginina). Al comparar l'empremta experimental amb la virtual es genera un llistat de possibles proteïnes candidates, ordenades segons el nivell d'identitat trobat (puntuació) (Figura I.7).

La tècnica d'espectrometria de masses més freqüentment utilitzada per a l'anàlisi per PMF és el MALDI-TOF.

El PMF només s'utilitza per a la identificació de proteïnes pures o de barreges poc complexes de dos o tres proteïnes. Per això és l'anàlisi més usada en la identificació de les taques dels gels d'electroforesi bidimensional.

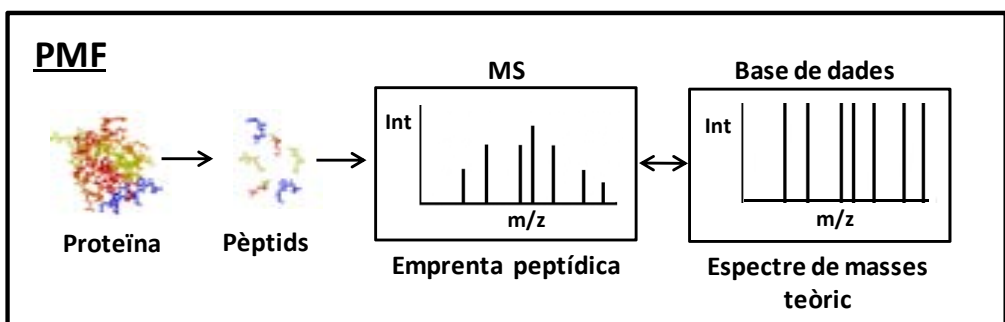


Figura I.7. Esquema d'una identificació per PMF

I.1.3.2.2. Espectrometria de masses en tàndem o MS/MS

L'espectrometria de masses en tàndem o MS/MS consisteix en la fragmentació d'un pèptid en l'espectròmetre de masses, mitjançant la col·lisió dels seus ions amb un gas inert. El patró de fragmentació (espectre de fragmentació) és característic de cada pèptid i permet determinar-ne la seva seqüència d'aminoàcids. Aquest patró de fragmentació depèn de la càrrega del pèptid, l'energia de col·lisió, el tipus de gas de col·lisió i la pressió en l'espectròmetre de masses.

Durant l'anàlisi per MS/MS els pèptids es fragmenten majoritàriament per qualsevol dels enllaços peptídics (CO-NH) de la cadena lineal, generant fragments de diferents tipus. La nomenclatura acceptada és la que es mostra en la figura I.8 (Roepstorff and Fohlman 1984), (Biemann 1992). Els fragments només es poden detectar si tenen com a mínim una càrrega. Si aquesta càrrega és retinguda en un fragment que conté l'extrem amino o N-terminal, el fragment pot ser de tipus a, b o c. Si la càrrega és retinguda en un fragment de l'extrem carboxílic o C-terminal aquest pot ser de tipus x, y o z. Un subíndex indica el número de residus del fragment. La càrrega dels fragments depèn dels protons incorporats en la ionització. Així, en la ionització MALDI els pèptids tríptics (obtinguts en la digestió amb la proteasa tripsina) i els seus fragments solen incorporar una sola càrrega, mentre que en la ionització ESI els pèptids tríptics generalment incorporen més d'una càrrega i els seus fragments poden tenir més d'una càrrega. També poden formar-se fragments interns, els més comuns dels quals són els imoni, derivats d'un sol aminoàcid. Els fragments que contenen dos o més aminoàcids interns són menys abundants.

Com ja hem comentat, l'energia de col·lisió és un dels paràmetres que determina el patró de fragmentació. En el cas dels espectròmetres de masses de tipus quadrupol i trampa

iònica es fan servir col·lisions de baixa energia per a induir la dissociació (CID) i aquestes generen bàsicament fragments de tipus y i b , produïts pel trencament de l'enllaç amida. En les IT, a més, és pot treballar amb energies de col·lisió que provoquen la dissociació per transferència (ETD) o captura d'electró (ECD), el que dóna fragments c , y i z . En aquests tipus de fragmentació, a diferència de la CID, no es fragmenten els enllaços làbils típics de modificacions postraduccionals (PTMs). Això és molt útil en la detecció d'aquestes modificacions. En els instruments MALDI-TOF, la fragmentació que es mesura és per un decaïment post font (PSD) i com en el cas dels Q i les IT es produeixen majoritàriament fragments y i b .

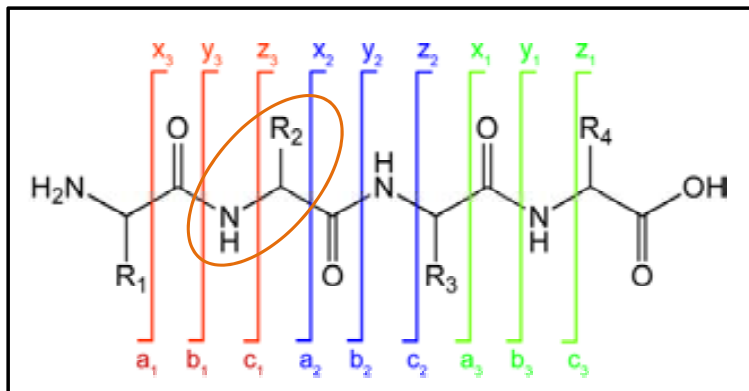


Figura I.8. Esquema de fragmentació per MS/MS. L'el·lipse es correspon amb el fragment intern imoni

Quan tenim adquirit l'espectre de fragmentació la seva identificació es fa, com en el cas del PMF, per comparació amb una base de dades. No és necessari que l'espectre de fragmentació expliqui tota la seqüència, això vol dir que a partir d'una seqüència parcial i la massa molecular del pèptid fragmentat n'hi ha prou per a identificar-lo i identificar la proteïna de la que en deriva (Figura I.9).

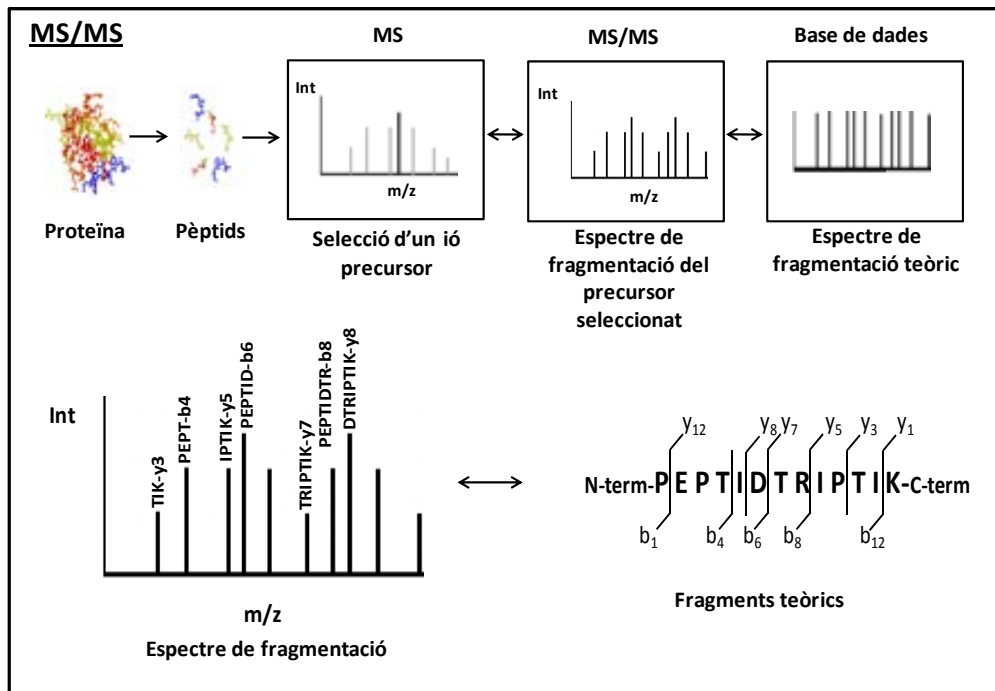


Figura I.9. Esquema d'una identificació per MS/MS

Tipus d'experiments d'espectrometria MS/MS

Hi ha quatre experiments principals d'anàlisi per MS/MS i són els que es mostren la figura I.10:

A) Escombrat del ió producte: És l'anàlisi més comuna i es basa en la generació d'un espectre de fragmentació per a la identificació de la seqüència d'aminoàcids d'un pèptid. Un ió seleccionat en el primer analitzador (MS1) és fragmentat per CID i els fragments resultants són analitzats en el segon analitzador (MS2). Aquest procés es repeteix per a diferents precursors.

B) Escombrat del ió precursor: En el MS2 es transmet un fragment específic cap al detector i en MS1 es fa un escombrat de totes les masses que poden haver donat el fragment. Aquest mètode es fa servir normalment per a detectar un conjunt de pèptids amb un grup funcional específic.

C) Escombrat de pèrdua neutre: Els dos analitzadors estan sincronitzats de manera que la diferència de massa dels ions que passen a través de MS1 i MS2 roman constant. La diferència de massa es correspon amb un fragment neutre que és perdut pel pèptid en la cel·la de col·lisió. D'aquesta manera es poden detectar grups funcionals específics com per exemple l'àcid fosfòric que es perd de pèptids amb residus serina o treonina fosforilats.

D) Seguiment d'una reacció seleccionada (SRM): Un ió precursor i un fragment específic d'aquest precursor es seleccionen a MS1 i MS2 respectivament. Aquesta anàlisi, molt sensible i específica, es fa servir per a detectar un pèptid concret de fragmentació coneguda dins una mostra complexa.

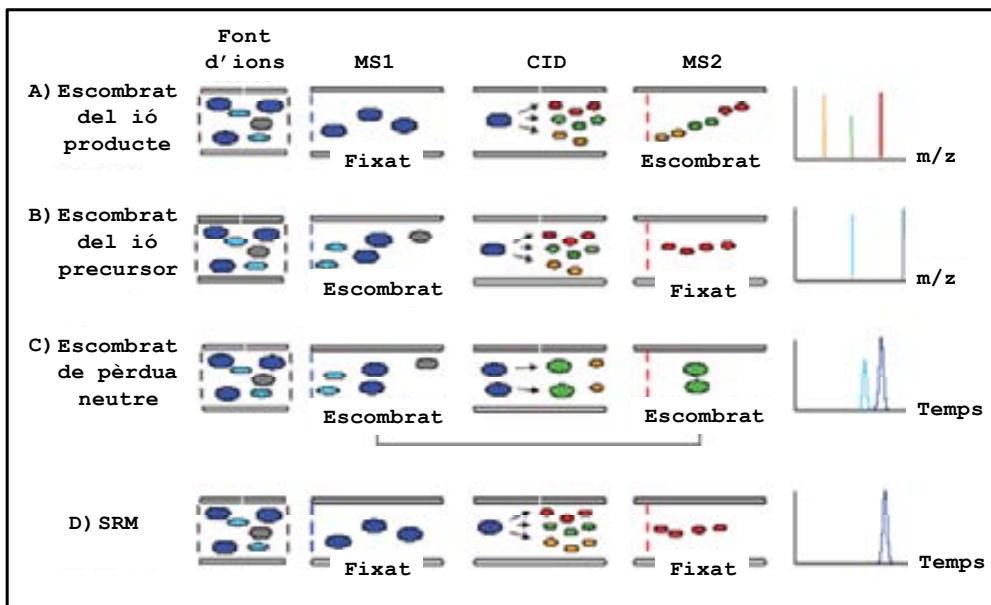


Figura I.10. Principals experiments d'espectrometria de masses en tàndem. Adaptada de l'article (Domon and Aebersold 2006)

Ió precursor o ió parental: *Espècie molecular amb càrrega elèctrica que pot dissociar-se per a formar fragments, un o més dels quals pot tenir càrrega (**ions producte**) i un o més poden ser espècies neutres.*

I.1.4. Preparació de la mostra

En gran part, la qualitat dels resultats d'un experiment depèn de la preparació de la mostra. Òbviament, no existeix un protocol universal de preparació de la mostra, així que cal optimitzar el protocol en funció del tipus d'experiment a realitzar i de l'objectiu d'aquest.

La preparació de la mostra pot incloure passos de ruptura cel·lular, fraccionament subcel·lular, enriquiment de certs tipus de proteïnes, eliminació de substàncies interferents i/o de proteïnes abundants i engloba processos de solubilització, disgregació, desnaturalització, reducció i quantificació de les proteïnes.

Alguns dels passos a tenir en compte es descriuen a continuació.

I.1.4.1. Fraccionament subcel·lular

El fraccionament subcel·lular és un conjunt de mètodes i tècniques que tenen com a objectiu, una vegada s'han disgregat les cèl·lules, obtenir fraccions pures o enriquides en un determinat component cel·lular, ja sigui un òrganul (mitocòndries, nuclis, etc.), una fracció de membrana (membrana total, plasmàtica, etc.), o un complex multiproteic. Aquestes fraccions pures es poden obtenir per centrifugació en gradient de densitat o per centrifugació diferencial, en ambdós casos un augment seqüencial de la velocitat de

centrifugació dona com a resultat la separació seqüencial dels orgànuls en funció de la seva densitat.

Altres mètodes de fraccionament són la cromatografia d'immunoafinitat o la immunoprecipitació. Existeixen gran número de *kits* comercials per a l'enriquiment de tot tipus d'orgànuls.

En qualsevol cas, el fraccionament subcel·lular permet disminuir la complexitat de les mostres analitzades i treballar amb fraccions enriquides en possibles proteïnes d'interès.

I.1.4.2. Enriquiment de proteïnes amb modificacions postraduccionals

Els mètodes d'enriquiment de proteïnes amb certes modificacions postraduccionals serveixen per a fraccionar el subproteoma directament relacionat amb certs esdeveniments biològics. Les proteïnes glicosilades, relacionades amb inflamació, adhesió cèl·lula-cèl·lula i senyalització cel·lular, es poden enriquir fent servir reïnes de lectina (p.e. *Concanavilin A (ConA)*, *Wheat Germ Agglutinin (WGA)*). Les proteïnes fosforilades, involucrades en la transducció de senyals, apoptosi, control del cicle cel·lular, etc., es poden fraccionar mitjançant cromatografia d'afinitat amb un metall immobilitzat (IMAC), anticossos o diòxid de titani. Molts d'aquest sistemes també són útils per a l'enriquiment d'aquestes PTMs a nivell de pèptid. En tots els casos el proteoma estudiat és molt menys complex i específic.

I.1.4.3. Depleció de proteïnes abundants

La depleció de les proteïnes abundants del sèrum, el plasma, la orina o el líquid cefaloraquídi humà, permet disminuir el rang dinàmic d'aquestes mostres, quedant desemascarades les proteïnes que es troben a baixa concentració.

INTRODUCCIÓ

La majoria de mètodes de depleció desenvolupats es basen en l'extracció selectiva de les proteïnes abundants, com l'albúmina (HSA) i les immunoglobulines G (IgGs), utilitzant mètodes d'afinitat.

Els mètodes d'afinitat es poden basar en compostos colorants, com el Blau d'Affi Gel, pels quals HSA presenta una alta afinitat, o en anticossos, molt més específics.

Actualment existeixen diferents kits comercials que tenen com a base un dels dos sistemes comentats anteriorment, i que permeten la depleció de fins a 20 de les proteïnes abundants, en general, de fluids biològics humans.

Un altre sistema és el ProteoMiner™ (Bio-Rad). Aquest consisteix en equalitzar la concentració de les proteïnes en mostres complexes, no és per tant un sistema de depleció (Boschetti and Giorgio Righetti 2008). Com en els casos anteriors, el ProteoMiner™ és un sistema d'afinitat format per una gran i diversa llibreria d'hexapèptids. En teoria, cada hexapèptid s'enllaça a una única proteïna de manera que les proteïnes abundants ràpidament saturen els seus lligands i l'excés és eliminat. En contrast, les proteïnes poc abundants són concentrades.

I.1.4.4. Extracció de proteïna

Per a poder marcar les proteïnes, separar-les per electroforesi mono o bidimensional o digerir-les i analitzar-les per LC-MS, cal que estiguin solubilitzades i completament disgregades. Una completa desnaturalització de la mostra assegura que cada proteïna estigui present en una única conformació i que s'hagin eliminat les agregacions i interaccions intermoleculares.

En general les solucions utilitzades per a l'extracció de proteïna solen incloure: un agent caotròpic neutre, que deixa les proteïnes amb tots els grups ionitzables exposats a la solució, un detergent, que assegura la solubilització de la

mostra i evita l'agregació a través d'interaccions hidrofòbiques i un agent reductor, que trenca els enllaços disulfur i manté la proteïna en estat reduït durant tot el procés.

També pot afavorir l'extracció, disgregació i solubilització de les proteïnes escalfar la mostra a 95°C i la utilització de vibracions ultrasòniques (sonicació), que a més a més trenquen el DNA que s'allibera en llisar les cèl·lules d'un medi biològic.

Per últim, es poden fer servir inhibidors de proteases i fosfatases per a evitar la degradació de les proteïnes per acció d'aquestes molècules, tot i que mantenir les mostres a 4°C minimitza aquest procés.

Extracció de proteïna per a l'anàlisi per electroforesi bidimensional (2-DE)

Les solucions utilitzades per a l'extracció de proteïna i posterior anàlisi per 2-DE utilitzen com agent caotrópic la urea, que es pot barrejar o no amb tiourea. La tiourea augmenta el poder de solubilització de la urea i la barreja d'agents afavoreix l'extracció de proteïnes de membrana.

Com a detergent al començament es solien fer servir compostos no iònics com el Nonidet P-40 (NP-40) o el Triton X-100. Estudis posteriors, però, van demostrar que els detergents zwitteriònics, com el CHAPS, són sovint més efectius (Perdew et al. 1983).

Com agents reductors es disposa d'un gran ventall, la selecció d'un en particular s'ha de realitzar en funció de les característiques de la mostra i del problema estudiat. Un dels primers reductors utilitzats va ser el β -mercaptoetanol. Però aquest s'ha vist desplaçat pel ditiotreitòl (DTT), un compost que es pot fer servir en concentracions menors que el β -mercaptoetanol. Altres agents reductors utilitzats són la tributilfosfina (TBP) i la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP),

INTRODUCCIÓ

capaces de reduir proteïnes resistents al DTT (Chan et al. 2002).

Extracció de proteïna per a l'anàlisi per LC-MS

Les solucions per a desnaturalitzar les proteïnes que han de ser analitzades per LC-MS solen utilitzar urea, clorur de guanidini (GndHCl), SDS o 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE).

Tant la urea com el GndHCl són agents caotròpics. La urea és el més comunament utilitzat però el GndHCl és més potent.

L'SDS és un detergent aniònic. És un bon desnaturalitzant però interfereix en la ionització dels pèptids en l'electrosprai i per tant, si s'utilitza ha de ser rentat.

El TFE és un solvent orgànic que funciona molt bé per a proteïnes solubles com les del plasma.

A més a més, les mostres solen ser reduïdes, generalment amb DTT, però com que aquest s'ha de preparar fresc, en molts kits comercials sovint és fa servir el TCEP com alternativa.

I.1.4.5. Precipitació de les proteïnes

La precipitació serveix bàsicament per a concentrar i separar les proteïnes de substàncies contaminants. Existeixen diferents protocols de precipitació que es poden dividir bàsicament en els basats en solvents orgànics, àcids, sals o barreges d'aquests.

Els solvents orgànics com l'acetona, l'etanol o l'acetonitril fan disminuir la polaritat del dissolvent en el que es troben les proteïnes provocant l'agregació i precipitació de les proteïnes.

Els àcids, com l'àcid tricloroacètic (TCA) o l'àcid fosfòric, fan disminuir el pH de la solució. En aquest cas es modifica la càrrega superficial de les proteïnes, desapareixen les interaccions electrostàtiques i disminueix la seva solubilitat.

Les sals, com el sulfat amònic, augmenten la força iònica del medi, això fa disminuir el grau d'hidratació dels grups iònics

i, com en el cas anterior, s'eliminen les interaccions electrostàtiques donant com a resultat la precipitació de les proteïnes.

Altres mètodes fan servir barreges dels reactius anteriors. Algunes de les més utilitzades són la precipitació de proteïnes amb metanol-cloroform o amb TCA-acetona. Com exemple, en el cas de la preparació dels extractes de proteïnes per a l'anàlisi per 2-DE es fa servir un kit de precipitació de proteïnes (2-D Clean-Up kit, GE) que assegura l'eliminació de substàncies que interfereixen amb l'isoelectroenfocament, com poden ser les sals, els lípids, els àcids nucleics, etc. Aquest kit es basa en la precipitació de les proteïnes amb la barreja TCA-acetona.

I.1.4.6. Quantificació de les proteïnes

La determinació de la concentració de les proteïnes de l'extracte a analitzar és un pas necessari per a poder triar la quantitat adient de mostra a processar i analitzar en funció de l'experiment a realitzar.

La concentració de proteïnes en una solució es pot determinar mesurant la seva absorbància a 280 nm (UV), mitjançant mètodes colorimètrics o per anàlisi d'aminoàcids.

Absorbància a 280nm

A 280nm es mesura l'absorbància que donen els aminoàcids amb cadenes laterals aromàtiques, per a aquesta determinació cal conèixer el coeficient d'extinció molar (ϵ) de la proteïna. Si es quantifiquen barreges complexes cal utilitzar un ϵ mitjanat, de manera que la quantificació deixa de ser acurada. A més, moltes substàncies absorbeixen a 280nm i poden distorsionar la quantificació. Per això, no és un mètode molt utilitzat.

Mètodes colorimètrics

En els mètodes colorimètrics es mesuren els canvis d'absorbància produïts en reaccionar les proteïnes amb certs

INTRODUCCIÓ

reactius. La concentració de proteïna es determina per interpolació a una corba estàndard feta amb concentracions conegudes d'una proteïna de referència pura.

Els més utilitzats són el de Lowry, Smith o Bradford (Lowry et al. 1951), (Smith et al. 1985), (Bradford 1976).

En el mètode de Lowry inicialment es forma un complex amb l'enllaç peptídic, aquest reacciona a continuació amb el folin-fenol que, al ser reduït, dona color.

El mètode de Smith o mètode de l'àcid bicinoninic (BCA) es basa en la reacció dels ions Cu^+ , produïts per la reducció dels ions Cu^{2+} per acció de les proteïnes, amb el reactiu BCA. Finalment el mètode de Bradford és un mètode senzill i ràpid que es basa en la determinació dels canvis d'absorbància produïts en una solució de blau de coomassie G250 quan aquest reacciona amb les proteïnes.

La utilització d'un o altre mètode depèn de la seva compatibilitat amb les mostres a quantificar ja que tots són prou sensibles i fàcils d'utilitzar. Però no tots tres mètodes són igual de tolerants a certes substàncies interferents com ara detergents, agents caotrópics o reductors. Davant la necessitat de quantificar les proteïnes en medis que contenen urea, tiourea, SDS o CHAPS, per a la seva millor solubilització, han aparegut kits basats en algun dels mètodes anteriors i compatibles amb aquestes substàncies. Un exemple és el *RCDCTM Protein assay* (BioRad). Aquest assaig, derivat del protocol de Lowry, permet la determinació de la concentració de proteïna en presència d'agents reductors i detergents.

Anàlisi d'aminoàcids

L'anàlisi d'aminoàcids és el mètode més acurat. En aquest assaig les proteïnes són hidrolitzades fent servir àcid clorhídric i els aminoàcids resultants són separats per intercanvi iònic. La concentració dels aminoàcids és proporcional a l'absorbància de la solució resultant en afegir un reactiu que forma un derivat amb color o fluorescent (en

funció del reactiu afegit). Aquest mètode però no és fàcil d'implementar al laboratori.

I.1.5. Proteòmica d'expressió basada en gel

I.1.5.1. Electroforesi bidimensional (2-DE)

El mètode més comú per a l'anàlisi quantitativa del proteoma en gel combina la electroforesi bidimensional amb l'espectrometria de masses.

La 2-DE consta de dues separacions electroforètiques consecutives: l'isoelectroenfocament (IEF), que separa les proteïnes en funció del seu pI, i l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE), on les proteïnes són separades segons la seva mida o massa molecular (MW) (O'Farrell 1975). Tant el IEF com la SDS-PAGE són capaces de resoldre entre 100 i 200 espècies de proteïnes. Quan aquestes tècniques es combinen en la 2-DE, es poden arribar a resoldre més de 10000 espècies proteiques (Klose and Kobalz 1995).

La 2-DE és una tècnica amb una llarga trajectòria que permet obtenir una imatge global de l'activitat cel·lular única i analitzar les proteïnes a gran escala de forma ràpida. Però té certes limitacions, que inclouen, la baixa solubilitat de les proteïnes de membrana, la pèrdua de proteïnes amb masses moleculars molt elevades o molt baixes i el limitat rang dinàmic.

Primera dimensió. Isoelectroenfocament

Les proteïnes són molècules amfòteres que quan es troben dissoltes en un suport on existeix un gradient de pH i s'aplica un voltatge, es mouen a través del gradient fins al punt on la seva càrrega neta és zero. El pH on la proteïna queda localitzada es correspon amb el seu pI. Aquest valor es troba normalment entre pH 3 i 10.

El IEF és un mètode electroforètic que aprofita aquest fenomen per a separar les proteïnes en funció del seu pI en un

INTRODUCCIÓ

gradient de pH. Avui en dia, aquesta tècnica permet la separació de proteïnes amb diferències de pI properes a la mil·lèsima d'unitat ($\Delta pI=0.0015$) (Gorg et al. 2009).

Càrrega neta: és la suma de totes les càrregues positives i negatives dels seus aminoàcids i dels seus grups amino i carboxi terminals.

Punt isoelèctric (pI): és el valor de pH on la càrrega neta de la proteïna és zero.

Existeixen diferents mètodes de separació per IEF que es diferencien per la forma com es prepara el gradient de pH: l'isoelectroenfocament amb amfòlits transportadors (CA-IEF), l'electroforesi amb gradient de pH no equilibrat (NEPHGE) i l'isoelectroenfocament amb gradient de pH immobilitzat (IPG-IEF). Tant el NEPHGE com el CA-IEF són mètodes poc reproduïbles. S'ha trobat que el gradient de pH pot variar d'experiment a experiment i de vegades es formen discontinuïtats que donen zones sense proteïnes en la separació. Aquests problemes es van solucionar amb el desenvolupament de l'IPG-IEF, que és el sistema més utilitzat en l'actualitat.

L'IPG-IEF utilitza tires de plàstic amb una capa de gel de poliàcrilamida i amfòlits enllaçats de forma covalent (Immobiline® acrilamida) (Bjellqvist et al. 1982), (Gorg et al. 1988). Aquestes tires d'IPG comercials presenten una alta reproductibilitat pel gradient de pH i es conserven deshidratades i congelades. Aquesta tècnica permet, a més a més, carregar quantitats més altes de proteïna, la qual cosa és especialment útil per a la identificació de proteïnes poc abundants.

El primer pas de l'IPG-IEF consisteix en la rehidratació de la tira amb un tampó específic, sota l'aplicació (rehidratació activa) o no (rehidratació passiva) d'un voltatge baix (50V). La mostra es pot dipositar en la tira durant la rehidratació o després d'aquesta. Si la mostra es carrega posteriorment es fa situant un carregador de mostra sobre la tira (mètode de *cup-loading*). Aquest mètode es sol utilitzar per a enfocar millor proteïnes bàsiques, col·locant el carregador de mostra prop del càtode.

En l'IEF, la separació de les proteïnes té lloc quan s'aplica un voltatge entre els extrems de la tira de gel. En la pràctica, l'IPG-IEF es porta a terme utilitzant gradients de voltatge programats que milloren la separació. Aquests gradients s'han d'optimitzar en funció de la mostra i de la mida i el rang de pH de la tira.

Segona dimensió. SDS-PAGE

Durant la segona dimensió les bandes de proteïnes separades en la tira d'IPG-IEF es separen segons la seva mida, mitjançant SDS-PAGE. Aquests gels es formen per copolimerització de l'acrilamida amb la bisacrilamida (Righetti 1989). El percentatge d'acrilamida en el gel pot ser constant (gel lineal) o pot variar al llarg d'aquest (gel de gradient). En augmentar el percentatge d'acrilamida, augmenta el nombre de cadenes curtes de poliacrilamida en el polímer, disminuint la mida dels porus. Els gels de gradient permeten l'obtenció d'imatges amb les proteïnes separades més homogèniament o l'anàlisi de zones on apareixen grups de proteïnes amb mobilitats molt semblants. Aquests gels però, són poc reproduïbles ja que es fa molt difícil crear sempre el mateix gradient de pH.

La presència de SDS tant en el gel com en la mostra fa que la càrrega elèctrica de les proteïnes no sigui un factor de separació en la segona dimensió. El SDS és un detergent aniònic que forma complexos amb les proteïnes, el resultat és

INTRODUCCIÓ

la incorporació de grans quantitats de SDS que emmascaren la càrrega de les proteïnes. Els complexos formats tenen una càrrega neta negativa constant per unitat de massa. D'aquesta manera, la separació electroforètica depèn únicament de la facilitat amb què una proteïna, empesa per un camp elèctric, pugui travessar l'espessa xarxa del polímer d'acrilamida, depèn doncs de la seva mida.

A diferència del IEF, on normalment es treballa amb gels comercials, els gels de poliacrilamida amb SDS es solen preparar en el laboratori.

Tinció

Les proteïnes separades en un gel cal que es puguin detectar per a ser quantificades, retallades i identificades, això s'aconsegueix amb la tinció. El que s'obté és una imatge de taques, més o menys rodones, corresponents a cada espècie proteica separada amb l'electroforesi bidimensional (Figura I.11).

Els mètodes de tinció utilitzen tints orgànics o metàl·lics, o bé compostos fluorescents o quimioluminiscent que s'enllacen a les proteïnes. També es poden utilitzar detectors de radioactivitat (perillós i car) si les proteïnes han estat marcades prèviament a la separació. Els principals factors que es tenen en compte per a la selecció d'un o altre mètode de tinció són la seva sensibilitat, el rang de concentracions dins el qual la tinció permet l'anàlisi quantitativa i la compatibilitat o no amb l'espectrometria de masses.

Probablement, el tint orgànic més utilitzat per a la visualització de proteïnes és el **Blau de Coomassie**. El mètode de tinció amb Blau de Coomassie consisteix en la saturació del gel amb el tint, les proteïnes tenen molta més afinitat per les molècules de tint que la matriu de poliacrilamida així que, després de destenyir el gel, aquestes ressalten sobre el fons més clar del suport. Aquest mètode té un cost baix i és fàcil d'utilitzar. Algunes de les limitacions d'aquesta

tècnica són la seva baixa sensibilitat (30-100ng), el curt rang dinàmic de linealitat i que és poc reproducible (Neuhoff et al. 1988).

Per a l'anàlisi global d'expressió proteica els mètodes de tinció més àmpliament usats són els basats en les **sals de plata**. En aquests mètodes els gels es saturen amb ions plata que interaccionen amb les proteïnes. Els ions no enllaçats s'eliminen de la matriu i l'enllaç proteïna-ió metàl·lic es redueix per a formar plata metàl·lica. La tinció amb plata més comuna utilitza nitrat de plata. En aquestes condicions es pot detectar fins a un nanogram de proteïna en el gel.

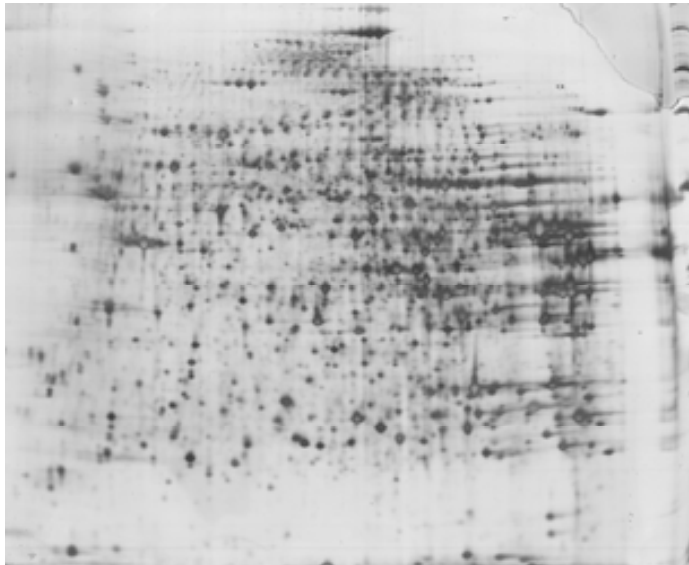


Figura I.11. Gel bidimensional, d'una mostra de fetge de ratolí, tenyit amb plata

Entre els mètodes de tinció amb plata, compatibles amb MS, descrits en la literatura es troben el de BLUM (Blum et al. 1987), el EMBL (Shevchenko et al. 1996) i el VORUM (Mortz et al. 2001). El principal problema de la tinció amb plata és la seva baixa reproductibilitat interassaig derivada del seu restringit rang dinàmic lineal (un ordre de magnitud) i dels

INTRODUCCIÓ

estrictes intervals de temps amb què s'han de portar a terme alguns dels passos. A més la tinció amb plata no és quantitativa ja que diferents proteïnes tendeixen a reaccionar diferent amb la plata.

Una alternativa a aquestes tincions és la utilització de **compostos fluorescents** com els compostos SYPRO™, el Deep Purple o el Flamingo. La sensibilitat d'aquests tipus de compostos és més alta que la del Blau de Comassie, si bé generalment no superen la de la plata (Yan et al. 2000). En contrapartida, presenten una millor reproductibilitat, rang de linealitat més ampli (3 ordres de magnitud) i major capacitat per a la quantificació de proteïnes de baixa intensitat que la tinció amb plata. A més donen menys problemes en la posterior identificació de les proteïnes per espectrometria de masses.

Anàlisi d'imatge

A partir de l'estudi de les imatges obtingudes amb la 2-DE podem identificar diferències en l'expressió proteica associades, per exemple, a la progressió d'una malaltia o la predisposició a la mateixa. Igualment es pot determinar l'efecte d'altres factors, com per exemple el de l'administració d'un determinat fàrmac o tòxic.

Donada la complexitat i variabilitat de les imatges d'un determinat proteoma, el seu estudi "visual" s'havia restringit a observacions qualitatives. La disponibilitat dels escàners i densitòmetres moderns per a l'obtenció de les imatges dels gels, així com la de programes d'ordinador per a l'anàlisi d'imatge han permès una anàlisi global d'expressió proteica molt més efectiva i una avaluació quantitativa precisa de les diferències observades. Els programes d'anàlisi d'imatge localitzen les taques, determinen la seva intensitat i comparen detalladament els canvis d'expressió entre imatges corresponents a diferents mostres. En la pràctica, i per tal de disminuir els efectes de la variabilitat experimental, es preparen diverses rèpliques per cada condició en estudi.

Existeixen diferents programes d'anàlisi d'imatge, com per exemple, Image Master 2D Platinum, Melanie i DeCyder (GE), PDQuest (Bio-Rad) o Progenesis Samespots (Nonlinear Dynamics). En el cas del Progenesis Samespots i de la última versió del Decyder produeixen, a partir de les diferents rèpliques, un gel virtual amb el perfil d'expressió proteica global que s'utilitza per a comparacions posteriors.

En general però, l'anàlisi d'imatge continua essent un procés en el que cal invertir molt de temps.

Finalment, les proteïnes tenyides es poden retallar, digerir i identificar mitjançant la seva anàlisi per MS. Normalment es fan servir espectròmetres de masses MALDI-TOF i la identificació per empremta de masses peptídiques.

I.1.5.2. Electroforesi diferencial en gel bidimensional (2D-DIGE)

Una de les limitacions de la 2-DE és la seva baixa reproductibilitat i baix rang dinàmic, però el desenvolupament de les tires comercials amb gradient de pH immobilitzat per al IEF (IPG-IEF), la possibilitat de polimeritzar molts gels a la vegada i, finalment, l'aparició del marcatge fluorescent 2D-DIGE han solucionat en part aquesta qüestió.

El mètode 2D-DIGE (Unlu et al. 1997), (Tonge et al. 2001) es basa en les propietats específiques de tres fluorocroms, la cianina-2 o Cy2, la cianina-3 o Cy3 y cianina-5 o Cy5. Aquests reactius marquen els grups amino èpsilon de les lisines de forma específica i covalent. La relació entre la quantitat de fluorocrom i proteïna fa que es marquin entre el 2 i el 5% dels grups amino. A aquest tipus de marcatge se l'anomena marcatge mínim. El marcatge mínim assegura que la quantificació es fa utilitzant molècules de proteïnes que s'han marcat en un únic residu de lisina.

Els principals avantatges de la 2D-DIGE són la seva sensibilitat i reproductibilitat.

Sensibilitat

Es poden detectar fins a 125 pg de proteïna i dóna una resposta lineal a la concentració de proteïna de fins a 4 ordres de magnitud.

Reproductibilitat

Com que existeixen tres fluorocroms diferents (Cy2, Cy3 i Cy5) això permet analitzar fins a tres mostres diferents en un mateix gel bidimensional. Cada un dels fluorocroms s'excita a una longitud d'ona diferent. Així doncs, cada una de les condicions es pot observar de manera individualitzada. A més, es pot introduir un mateix estàndard intern en cada gel (pool de totes les mostres a analitzar en l'experiment) de manera que totes les proteïnes presents en les mostres es troben representades. Aquest estàndard intern s'utilitza per a alinear tots els gels entre si evitant la variació entre gels i per a normalitzar els volums mesurats per a cada taca d'una mateixa proteïna als diferents gels de l'experiment. Això permet una quantificació acurada entre les mostres amb una significació estadística associada (Alban et al. 2003) (Figura I.12).

Anàlisi d'imatge

L'anàlisi d'imatge es fa utilitzant generalment el software DeCyder (GE) o Progenesis Samespots (Nonlinear Dynamics). En ambdós casos, l'anàlisi és molt més senzilla gràcies a l'estàndard intern que ajuda a alinear tots els gels entre si.

Tinció

Pel que fa a la tinció, en el cas del sistema 2D-DIGE, tot i que les proteïnes estan prèviament marcades, el marcatge és un marcatge mínim i permet visualitzar només un 2% de la proteïna total. A més, la part marcada de la taca pot estar lleugerament desplaçada respecte el 98% de la proteïna no marcada. Així, es fa necessari tenyir els gels amb qualsevol dels sistemes comentats anteriorment per a obtenir una imatge de la proteïna total.

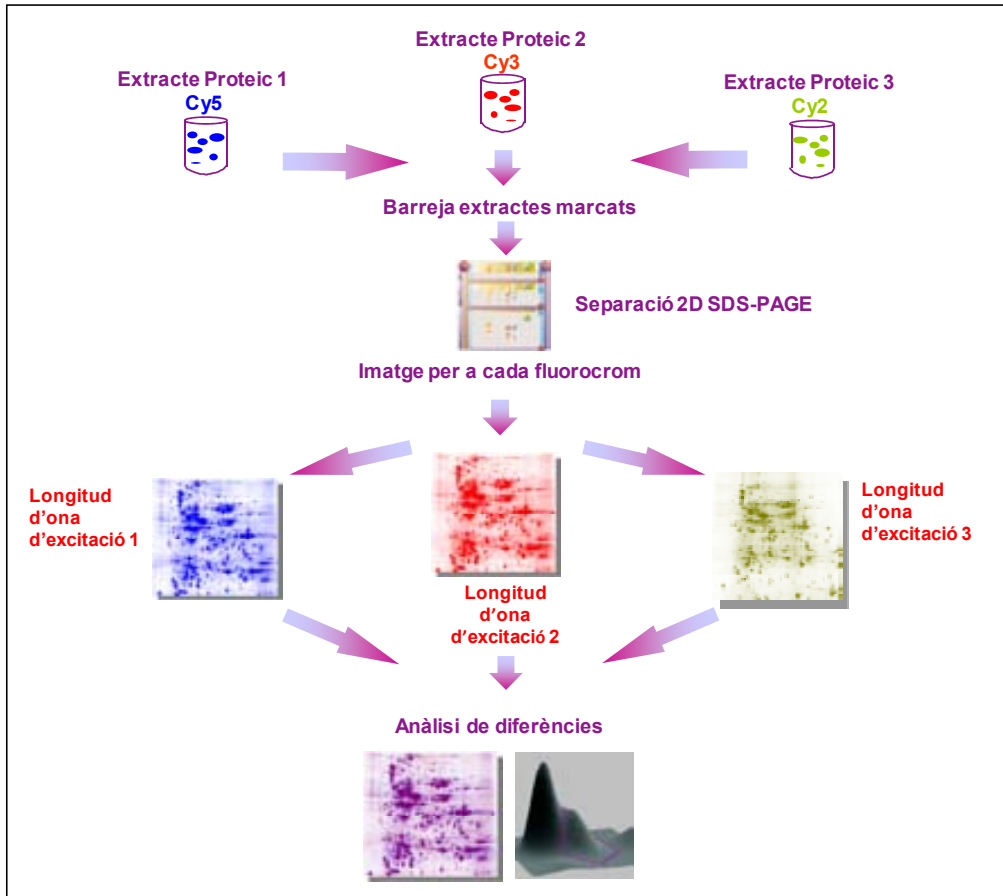


Figura I.12. Esquema del marcatge amb el sistema 2D-DIGE

I.1.6. Proteòmica d'expressió no basada en gel

En els últims anys, s'han desenvolupat tècniques proteòmiques no basades en gel com a alternativa als gels bidimensionals. Aquestes tècniques presenten avantatges respecte les tècniques en gel ja que donen una major cobertura del proteoma, rang dinàmic més ampli, podent-se identificar proteïnes poc abundants, i poden ser més ràpides i reproduïbles per a l'anàlisi de mostres complexes.

En general, la proteòmica d'expressió no basada en gels combina mètodes de marcatge isotòpic o no amb la cromatografia líquida de fase inversa i l'espectrometria de masses per a

INTRODUCCIÓ

l'anàlisi quantitativa de diferents poblacions de proteïnes. Com es tracta de barreges complexes, el processat de la mostra pot incloure diferents passos de fraccionament. Aquest fraccionament es pot dur a terme mitjançant un gel monodimensional (1-DE), isoelectroenfocament de proteïnes o pèptids, cromatografia d'intercanvi iònic, etc.

Cromatografia líquida

La cromatografia líquida és una tècnica que es fa servir per a la separació de barreges. La mostra és troba dissolta en el que s'anomena la fase mòbil i es fa passar a través d'una columna que conté un altre material que s'anomena fase estacionària. La separació es dona gràcies a la major o menor afinitat dels components de la barreja per la fase mòbil i la estacionària.

En proteòmica la LC que s'utilitza és l'anomenada cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). La columna on es porta a terme la cromatografia conté la fase estacionària i amb una bomba es mou la mostra i la fase mòbil a través de la columna fins a la font de ions (normalment ESI) de l'espectròmetre de masses. El cromatògraf i l'espectròmetre de masses es troben generalment acoblats en línia.

Existeixen diferents tipus de fases estacionàries: fase inversa (no polar), fase normal (polar), intercanvi iònic (catiònic o aniònic), exclusió per mida, etc. També es fan separacions multidimensionals que consisteixen en posar en línia dues o més fases estacionàries.

Per a cada fase estacionària es fa servir una fase mòbil i el conjunt permet separar barreges molt complexes com les obtingudes de la digestió d'extractes proteïcs.

El tipus de LC més utilitzada en proteòmica és la de fase inversa. Per aquesta LC la fase estacionària és una reïna apolar de sílice tractada amb RMe_2SiCl on R és una cadena alquílica com $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (C18) o C_8H_{17} , i la fase mòbil és una solució polar, aquosa. Les molècules o pèptids menys polars

són retinguts més temps per la fase estacionària i per tant elueixen de la columna més tard, mentre que les molècules polars eluiran abans. Aquesta separació dels pèptids es pot modificar i millorar, barrejant un solvent orgànic, com l'acetonitril, amb la fase mòbil i creant un gradient.

L'HPLC acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS o LC-MS) és la tècnica més utilitzada en les estratègies proteòmiques de *bottom-up*.

Cromatograma: És la representació de la intensitat dels senyals detectats (eix de les y) i el temps (eix de les x).

Temps de retenció (RT): És el temps que triga un anàlit a passar a través del sistema sota unes determinades condicions.

Cromatograma de ions total (TIC): Cromatograma on el senyal representat és la suma de les intensitats de tot el rang de masses detectades en cada punt de l'anàlisi.

Cromatograma del pic base (BPC): Aquest cromatograma és semblant al TIC però només es fa el seguiment de la intensitat del pic més intens a cada temps.

Cromatograma del ió extret (EIC o XIC): Un o més valors de m/z corresponents a un o més anàlits d'interès són extrets del total de dades de la cromatografia. Es fa un gràfic de la intensitat del senyal de cada m/z a cada punt de l'anàlisi.

I.1.6.1. Proteòmica quantitativa amb marcatge isotòpic

Els mètodes de proteòmica quantitativa amb marcatge isotòpic consisteixen en la derivatització química de determinats aminoàcids amb isòtops estables. Els pèptids marcats amb els diferents isòtops tenen propietats químiques idèntiques, però poden distingir-se a l'espectròmetre de masses.

Existeixen dos tipus de marcatges isotòpics, els isobàrics i els no isobàrics.

I.1.6.1.1. Marcatge isotòpic isobàric

En els mètodes quantitativs amb marcatge isotòpic isobàric cada una de les mostres a comparar es marca amb una versió diferent d'un reactiu químic isotòpic o etiqueta isotòpica que reacciona amb grups específics de les proteïnes o els pèptids. Cada versió del reactiu químic afegeix la mateixa massa però quan aquesta etiqueta és fragmentada per MS/MS dóna un fragment específic de la versió que s'anomena ió reporter i que és el que permet la comparació quantitativa.

Les mostres marcades es combinen i s'analitzen per LC-MS. Al fer-ho, el mateix pèptid en cada una de les mostres s'observa com a una única massa, independentment de la versió de la etiqueta amb que s'hagi marcat (tenen tots el mateix RT). Però quan aquesta massa és fragmentada, per una banda genera ions específics, que ajuden a determinar la seqüència peptídica, i per l'altre, dóna els ions reporters, de baix pes molecular, corresponents a la versió de la etiqueta amb que s'ha marcat cada una de les mostres. Les intensitats d'aquests ions reporters reflecteixen les abundàncies relatives del pèptid a cada una de les mostres avaluades (Figura I.13). La quantificació relativa d'una proteïna és el resultat de combinar les abundàncies relatives dels diferents pèptids que la identifiquen.

Dins els marcatges isobàrics trobem el marcatge isobàric amb etiquetes per a la quantificació relativa i absoluta (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification, iTRAQ) (Ross et al. 2004) i el marcatge amb etiquetes de masses en tàndem (Tandem Mass Tags, TMT) (Thompson et al. 2003).

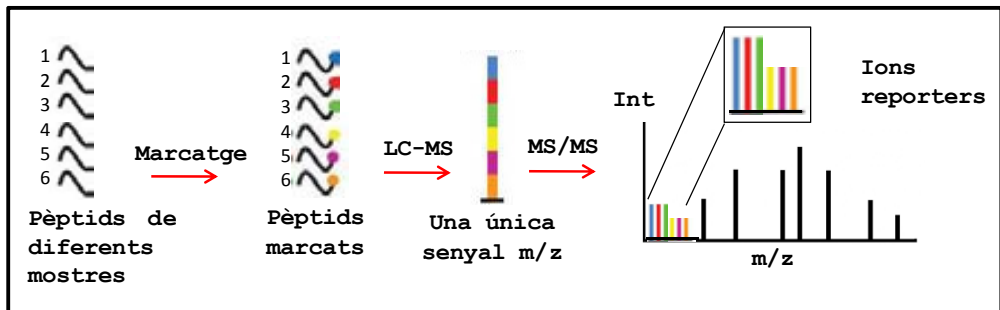


Figura I.13. Esquema del marcatge isobàric. Adaptada de (Ting et al. 2011)

iTRAQ i TMT

Tant en el marcatge iTRAQ com en el TMT es fan servir etiquetes que marquen de forma covalent els extrems N-terminal i els grups amino de les lisines formant un enllaç amida. Els dos tipus de marcatge es fan generalment a nivell de pèptid. En el cas de l'iTRAQ existeixen de forma comercial kits amb 4 i 8 etiquetes (iTRAQ-4plex i iTRAQ-8plex) diferents i en el cas del TMT fins a 6 versions (TMT-6plex).

L'estructura de cada una de les etiquetes isobàriques inclou tres regions, el grup NHS-ester amino reactiu, el grup normalitzador o equilibrant i el grup reporter. Cada una de les regions de l'etiqueta té la mateixa estructura química, però el grup reporter i el grup normalitzador contenen isòtops de carboni, nitrogen i/o oxigen substituïts a varies posicions que es compensen de manera que la combinació de les regions tenen la mateixa estructura i massa molecular total (Figura I.14).

En ambdues tècniques, el marcatge a nivell de pèptid fa que el número de pèptids quantificables sigui més gran que en el cas dels marcatges a nivell de proteïna. En contrapartida, en els marcatges a nivell de proteïna una vegada les mostres estan marcades es barregen i la resta del procés al que són sotmeses els afecta de la mateixa manera i queden minimitzades les variacions degudes al seu processament.

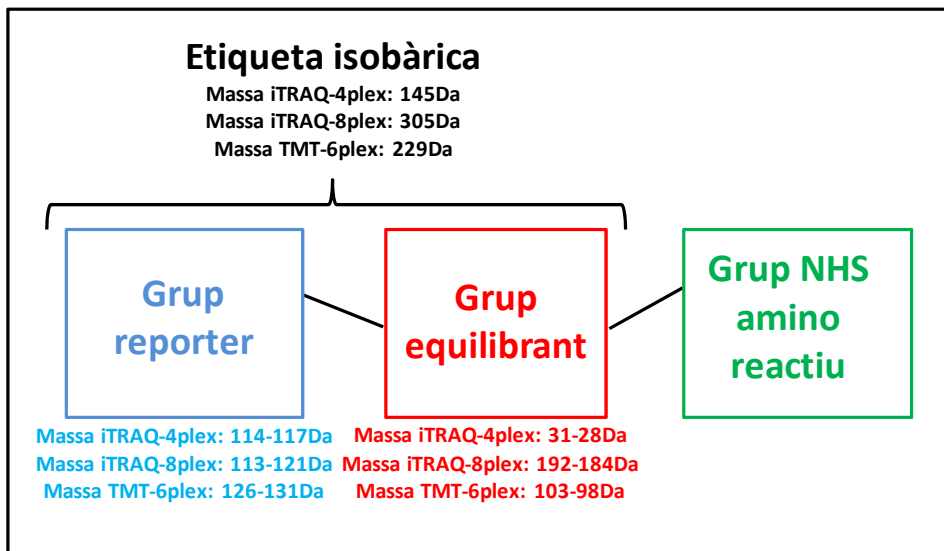


Figura I.14. Estructura general de les diferents versions de les etiquetes dels marcatges iTRAQ i TMT

I.1.6.1.2. Marcatge isotòpic no isobàric

En els mètodes quantitativs amb marcatge isotòpic no isobàric es fan servir estratègies que afegeixen isòtops d'àtoms o reactius químics isotòpics (etiquetes isotòpiques) que modifiquen la massa de les proteïnes o els pèptids. Les mostres marcades es combinen i s'analitzen per LC-MS. En els espectres de masses, per a un mateix pèptid, s'observen diferents senyals. Aquests senyals, es corresponen amb valors de massa que es troben a una distància igual a la diferència de massa que hi ha entre els reactius emprats per a marcar cada una de les mostres. La quantificació es fa mesurant la

relació d'àrees dels pics cromatogràfics dels EIC de cada una de les formes del pèptid. Les diferents versions isotòpiques d'un mateix pèptid elueixen en el mateix temps de retenció (Figura I.15).

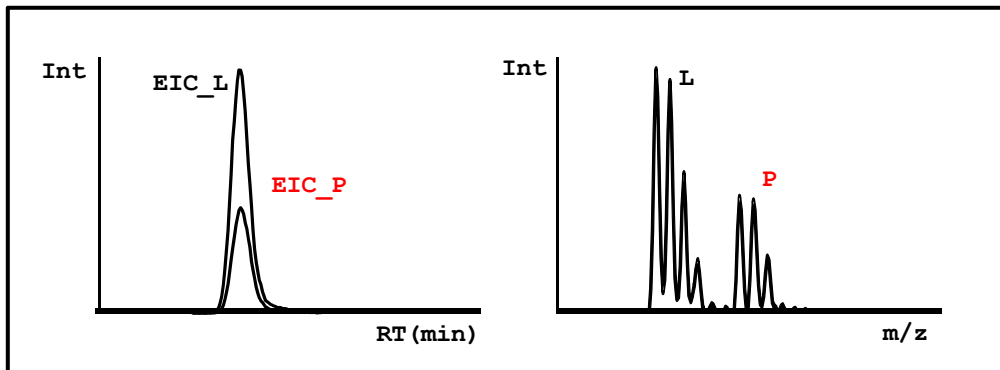


Figura I.15. A) Representació dels senyals de l'EIC del pèptid d'una mostra marcada isotòpicament amb la forma lleugera (L) d'un reactiu isotòpic no isobàric i una mostra marcada amb la forma pesada (P). B) Relacions m/z d'un pèptid marcat amb la forma L i la P del reactiu isotòpic no isobàric

Entre aquests mètodes trobem, el d'etiqueta isotòpica codificada d'afinat (Isotope-Coded Affinity Tag (ICAT)), el d'etiquetatge isotòpic codificat de proteïna (Isotope Coded Protein Labeling (ICPL)), el d'etiquetatge amb isòtops estables d'aminoàcids en cultius cel·lulars (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)), el de introducció de grups metil deuterats, el d'incorporació d'isòtops d'oxigen, etc.

ICAT

El mètode ICAT (Gygi et al. 1999) és un marcatge a nivell de proteïna que fa servir un reactiu químic format de tres elements: un grup reactiu capaç d'unir-se a les cisteïnes, l'aminoàcid que es marca, un enllaçant isotòpicament codificat (que existeix en dues versions, la lleugera i la pesada) i una etiqueta de biotina que serveix per a aïllar els pèptids

INTRODUCCIÓ

marcats. Aquest tipus de marcatge fa servir, en l'enllaçant isotòpicament marcat, el isòtop 13 del carboni (Figura I.16). A més, l'etiqueta de biotina és eliminable per acidificació i això afavoreix la ionització dels pèptids en la seva anàlisi per espectrometria de masses (Figura I.17). La ràtio de les àrees dels senyals dels EIC de la parella de pèptids marcats (lleuger i pesat) es quantifica per a poder determinar els nivells relatius de les proteïnes en les dues mostres comparades.

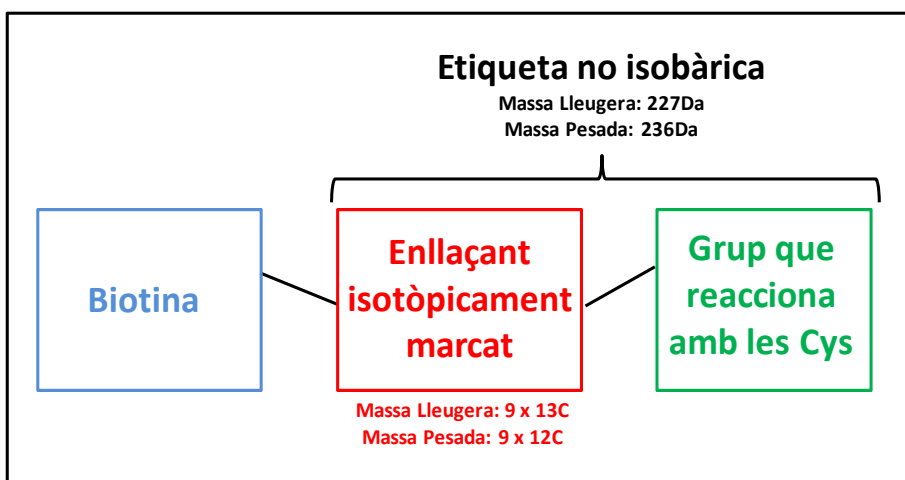


Figura I.16. Estructura de les diferents versions de les etiquetes del marcatge ICAT

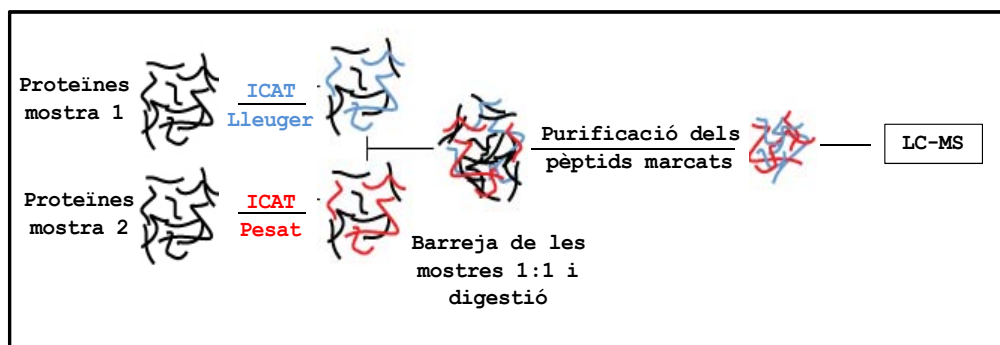


Figura I.17. Esquema de treball amb el marcatge ICAT

ICPL

El marcatge ICPL també fa servir un reactiu químic que marca a nivell de proteïna els grups N-terminal no bloquejats de les proteïnes i els grups amino de les lisines. Actualment existeixen fins a quatre versions d'aquest reactiu que fa servir isòtops de carboni i hidrogen (Figura I.19). Com en el cas de l'ICAT la ràtio del pics dels EIC dels pèptids marcats es fa servir per a quantificar les proteïnes en les mostres avaluades (Figura I.18).

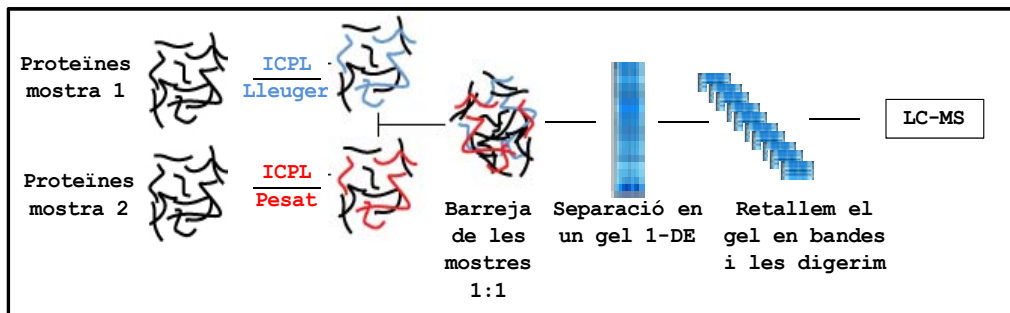


Figura I.18. Possible esquema de treball amb el marcatge ICPL

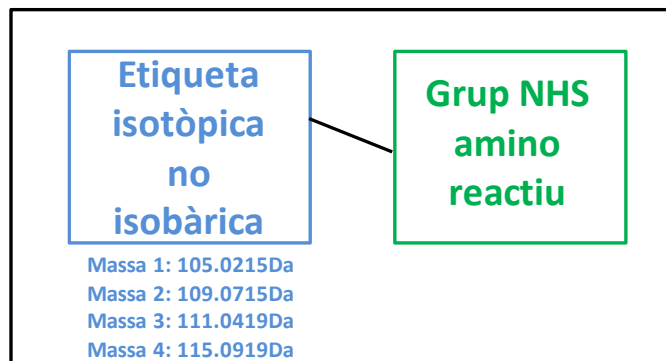


Figura I.19. Estructura de les diferents versions de les etiquetes del marcatge ICPL

Com ja s'ha comentat, tant en aquest mètode com en el de l'ICAT el marcatge es fa a nivell de proteïna, això té l'avantatge que una vegada marcades les mostres es combinen i es processen juntes. A més tot i que en el marcatge ICAT la

INTRODUCCIÓ

mostra es simplifica en poder enriquir els pèptids marcats amb la cua de biotina, la limitació es troba en que es marquen les cisteïnes i la representació d'aquest aminoàcid en les proteïnes és molt menor que la de lisines (aminoàcid marcat en el mètode ICPL). Per altra banda, en el marcatge ICPL si es digereix amb tripsina, en estar les lisines bloquejades pel marcatge, l'enzim només pot tallar per les arginines i això genera pèptids més llargs que poden ser més difícils d'analitzar per espectrometria de masses.

SILAC

El marcatge SILAC, a diferència dels anteriors, no és un marcatge químic sobre l'extracte de proteïna si no que és un marcatge metabòlic (Ong et al. 2002). Els assajos SILAC típics fan servir diferents formes isotòpiques de carboni i nitrogen dels aminoàcids lisina i arginina que són incorporats durant el creixement de les cèl·lules (Figura I.20).

En un experiment SILAC dos o tres poblacions de cèl·lules diferencialment marcades es barregen i es processen juntes, la seva digestió amb l'enzim tripsina dóna com a resultat que cada pèptid de la barreja està marcat (a excepció de l'extrem C-terminal de les proteïnes). Els pèptids són quantificats a partir dels senyals dels EIC i les proteïnes a partir dels valors mitjanats dels pèptids.

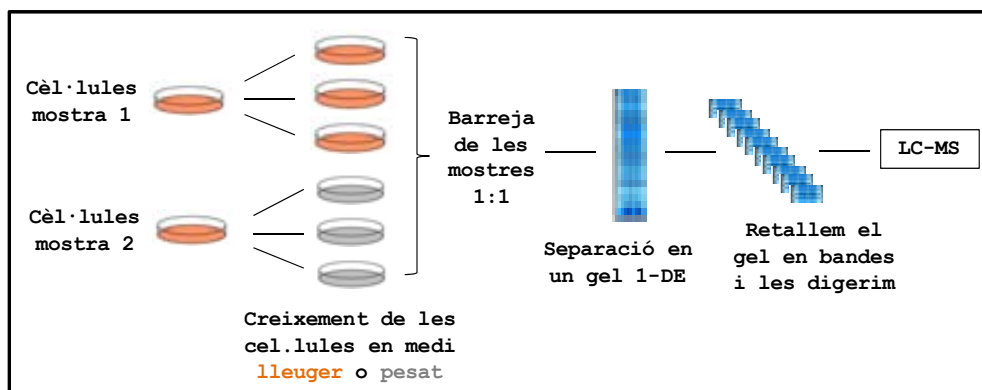


Figura I.20. Possible esquema de treball amb el marcatge SILAC

La limitació d'aquesta tècnica està en que només es pot aplicar a cultius cel·lulars (o a la dieta de ratolins, (Kruger et al. 2008)). En contrapartida, com el marcatge i la barreja de les mostres es fa en un estadi molt inicial de l'anàlisi, les variacions experimentals són mínimes.

Altres

Un altra mètode és l'anomenat dimetil. Aquest és un mètode ràpid i relativament barat que fa servir com a reactius el formaldehid i el cianoborohidrur de sodi en diferents formes isotòpiques. Amb aquest marcatge químic es derivatitzen, a nivell de pèptid, les amines primàries dels extrems N-terminal dels pèptids i les lisines a dimetilamines. Amb la combinació dels diferents isòtops dels reactius emprats es poden marcar fins a tres mostres diferents. Una de les febleses del mètode és que fa servir isòtops d'hidrogen i aquests es comporten lleugerament diferent en la separació cromatogràfica ja que el deuteri interacciona amb la fase estacionària de C18.

Finalment, el marcatge enzimàtic amb oxigen 16 i 18 (^{16}O / ^{18}O) és un mètode que aprofita el mecanisme proteolític de la tripsina per a incorporar dos àtoms d'oxigen de l'aigua lleugera (^{16}O) o pesada (^{18}O) en l'extrem C-terminal de cada nou pèptid digerit. És un mètode senzill però el problema d'aquest tipus de marcatge és que les mostres marcades i barrejades s'han de processar ràpidament (abans de 24h) ja que si no es produeix un fenomen d'intercanvi d'àtoms d'oxigen que fa que el marcatge sigui incomplet i dificulta la quantificació.

I.1.6.2. Proteòmica quantitativa sense marcatge

La proteòmica quantitativa sense marcatge és una alternativa a altres aproximacions quantitatives ja que permet la comparació a gran escala, només comparable als gels bidimensionals, de qualsevol tipus d'extracte proteic de forma ràpida i barata. En contrapartida, com que les mostres es processen i analitzen

INTRODUCCIÓ

per LC-MS per separat, hi ha més risc que es produeixin variacions experimentals.

La quantificació relativa es pot fer amb els senyals dels EIC, els mapes bidimensionals (2-D) dels ions o el comptatge d'espectres de fragmentació (Figura I.21). Aquestes dades s'ha vist que correlacionen amb l'abundància de les proteïnes a les mostres (Liu et al. 2004). En els mètodes de quantificació sense marcatge es mesuren bé els canvis grans però els petits són poc fiables i difícils de detectar en comparació a les estratègies amb marcatge isotòpic.

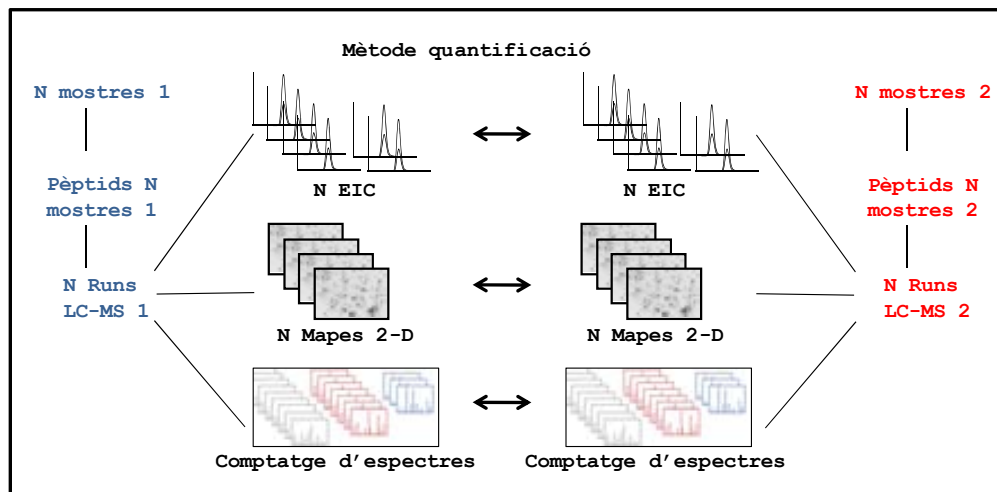


Figura I.21. Mètodes de quantificació i possible esquema de treball en proteòmica quantitativa sense marcatge

EIC

La quantificació relativa basada en el senyal del cromatograma dels ions extrets compara les àrees d'aquests EIC a les diferents mostres.

Mapes bidimensionals

La quantificació relativa mitjançant mapes bidimensionals fa servir la informació de m/z i del temps de retenció de cada pèptid. Per a cada mostra es construeix un mapa bidimensional, situant en l'eix de les x la m/z i en l'eix de les y el RT. La

comparació entre mostres és equivalent a la que es fa en els gels bidimensionals, en aquest cas però, el que s'alineen són els mapes bidimensionals dels cromatogrames de les anàlisis per LC-MS. La fàcil alineació d'aquests mapes depèn de la reproductibilitat dels temps de retenció dels pèptids en les diferents anàlisis i de la resolució de l'espectròmetre de masses.

Tant en la quantificació dels experiments sense marcatge basada en els mapes bidimensionals com en els EIC es poden adquirir els espectres de MS i els de MS/MS en la mateixa anàlisi, podent quantificar i identificar alhora, o es poden adquirir únicament els espectres de MS per a fer la quantificació i una vegada detectades les diferències fer una anàlisi de MS/MS per a identificar-les. L'avantatge de fer-ho per separat radica en que en no adquirir els espectres de fragmentació, els espectres de MS tenen un senyal millor.

Comptatge d'espectres

La quantificació relativa amb el comptatge d'espectres es basa en la comparació del número de vegades que un pèptid és fragmentat en l'espectròmetre de masses per a cada mostra.

Els espectres de fragmentació serveixen doncs per a identificar i quantificar alhora. La controvèrsia en aquest mètode es troba en que normalment, l'adquisició dels LC-MS es fa utilitzant l'exclusió dinàmica. Aquesta forma d'adquirir les dades fa que la quantificació pugui no ser acurada.

Exclusió dinàmica o activa: Paràmetre segons el qual una m/z que hagi estat seleccionada per a ser fragmentada és exclosa durant un cert temps per a que altres ions que elueixen en RT molt propers puguin ser seleccionats i fragmentats. D'aquesta manera es poden seqüenciar més número de pèptids diferents.

I.1.6.3. Anàlisi de dades

Quan s'aplica qualsevol de les aproximacions de LC-MS es genera un gran número de dades. Per a poder quantificar aquestes dades es necessiten softwares específics amb bons algorismes i eines estadístiques per a la correcta interpretació dels resultats (Taula I.2).

Cada casa comercial d'espectròmetres de masses sol tenir el seu propi software, però també n'existeixen de lliures que es poden descarregar gratuïtament. El problema és que cada casa comercial té el seu propi format de dades i moltes vegades els softwares no són compatibles.

Taula I.2. Softwares per a l'anàlisi de dades de LC-MS

Softwares	Marcatge Isobàric	Marcatge no Isobàric		Sense Marcatge			Pagina web de descarrega gratuïta
	ITRAQ/TMT	ICPL	SILAC	EIC	Mapes 2-D	Comptatge d'espectres	
ProteinScape ¹	x	x	x	x			
Warp-LC ¹	x	x	x				
MaxQuant ²	x	x	x				http://maxquant.org
ICPL-ESIQuant ²		x					http://www.biochem.mpg.de/lottspeich/technologies/ICPLQuant/index.html
ProteinPilot ³	x	x	x				
MASCOT ⁴	x	x	x				
Progenesis LC-MS ⁵					x		
Scaffold ⁶	x		x			x	
Proteome Discoverer ⁷	x		x				
IsobariQ ⁸	x						http://folk.uio.no/magnusar/isobariq

Els softwares són de: 1) Bruker Daltonics, 2) Max Planck Institute of Biochemistry, 3) ABSciex, 4) Matrix Science, 5) NonLinear Dynamics, 6) Proteome Software, 7) Thermo Scientific i 8) Biotechnology Centre of Oslo.

I.1.6.4. Proteòmica quantitativa mitjançant el Seguiment d'una Reacció Seleccionada (SRM)

Les estratègies proteòmiques vistes fins ara, basades o no en gel, formarien part del que s'ha definit com a proteòmica de descobriment, i permeten identificar i quantificar un gran número de proteïnes de forma no dirigida.

L'estratègia de SRM seria una tècnica de LC-MS de proteòmica dirigida, que consisteix en el seguiment i quantificació d'un número reduït de proteïnes d'interès. És una tècnica molt sensible, selectiva i té un excel·lent rang dinàmic (de 4-5 ordres de magnitud). L'estratègia de SRM és doncs, un complement ideal als estudis de proteòmica de descobriment, ja que pot servir per a verificar-ne i validar-ne els resultats obtinguts.

Tradicionalment la validació de proteïnes s'ha fet per tècniques immunològiques, com l'ELISA. Aquesta tècnica permet detectar la presència o absència de les proteïnes i mesurar-ne els canvis de concentració de forma senzilla. L'ELISA, té però, algunes limitacions. Generalment, es mesura només una proteïna per assaig, es necessiten varies hores per a obtenir resultats, el seu rang dinàmic és de tres ordres de magnitud i es necessiten anticossos específics no sempre disponibles.

Els mètodes de SRM podrien ser una alternativa als assajos ELISA ja que no tenen aquestes limitacions. Però, la sensibilitat dels mètodes basats en anticossos és molt superior a la dels mètodes de SRM. Per tant, els mètodes de SRM podrien necessitar passos d'enriquiment o fraccionament de les mostres.

En un experiment de SRM es parteix d'un grup de proteïnes d'interès obtingudes generalment d'experiments de proteòmica de descobriment previs o que han estat descrites a la bibliografia. Per a cada proteïna es defineixen varis pèptids proteotípics (PTP) que la identifiquin de forma única i estiguin distribuïts al llarg de la seqüència (Mallick et al.

INTRODUCCIÓ

2007). Per a cada pèptid cal triar un mínim de tres fragments que donin senyals de SRM específics i intensos. A cada parella de dades precursor-fragment se l'anomena transició. El seguiment d'aquestes transicions es pot fer gràcies a instruments d'espectrometria de masses de tipus triple quadrupol capaços de filtrar en Q1 la relació massa-càrrega del ió precursor, fragmentar aquest precursor en Q2 i aïllar-ne un fragment en Q3, com ja s'ha comentat a l'apartat d'analitzadors (Figura I.10 i I.22).

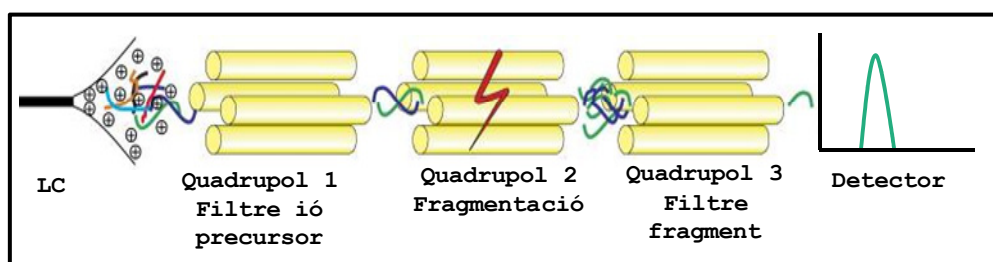


Figura I.22. Esquema d'anàlisi per SRM amb un instrument de triple quadrupol. Figura adaptada de (Lange et al. 2008)

Es poden dissenyar mètodes de SRM per a mesurar un gran nombre de proteïnes en un únic cromatograma, fins a mil si es fan servir mètodes programats amb els temps de retenció. Aquest mètodes programats de SRM només adquireixen les dades de cada pèptid al voltant del seu temps d'elució (Lange et al. 2008). Les dades dels pèptids proteotípics i dels fragments a partir dels quals es crea el mètode de SRM poden provenir d'experiments LC-MS prèviament analitzats, es poden trobar en bases de dades en línia que recullen resultats d'anàlisi d'altres experiments o es poden predir mitjançant softwares específics (Taula I.3).

L'objectiu final d'un experiment de SRM és la quantificació d'un grup de proteïnes en un cert nombre de mostres biològiques. En molts casos és suficient determinar els canvis relatius en la quantitat de proteïna. Això es fa comparant els

senyals de les transicions de les diferents mostres. Aquesta aproximació formaria part de les estratègies de quantificació relativa sense marcatge. De forma alternativa, es pot dur a terme una quantificació absoluta i determinar la concentració de les proteïnes a les mostres. Per a mesurar la concentració absoluta les versions marcades, amb isòtops estables, dels pèptids que es volen quantificar es fan servir com a patrons. Aquests patrons s'afegeixen en quantitats conegudes a les mostres i de la ràtio d'àrees dels senyals SRM entre la forma lleugera i pesada del pèptid es pot calcular la quantitat absoluta del pèptid a la mostra.

Per a l'anàlisi de les dades existeixen diferents softwares que es descriuen a la taula I.3.

Taula I.3. Recull de bases de dades i softwares per al disseny de mètodes i l'anàlisi de dades SRM

Bases de dades on line	Pàgina web
SRM Atlas	http://www.srmatlas.org
PRIDE	http://www.ebi.ac.uk/pride
Disseny de mètodes SRM	Font
MRM Pilot	ABSCIEX
TIQAM	http://tools.proteomecenter.org/TIQAM/TIQAM.html .
SRM Workflow	Thermo Scientific
VerifyE	Waters
Optimizer	Agilent Technologies
Skyline	https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view
Anàlisi de dades	Font
Analyst	ABSCIEX
Skyline	https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view

I.1.7. Comparació de les diferents estratègies de proteòmica d'expressió

Totes les estratègies de proteòmica d'expressió explicades són aproximacions útils per a identificar i quantificar els nivells de proteïna a diferents mostres. En la figura I.23 es representen les característiques generals, algunes ja comentades prèviament, entre tots els mètodes descrits, basats o no en electroforesi en gel.

La majoria dels mètodes fan servir algun tipus de marcatge, ja sigui químic, metabòlic o enzimàtic. Això ha millorat moltíssim la quantificació de diferències entre mostres ja que el marcatge permet barrejar-les i comparar-les de forma directe.

De totes les tècniques de descobriment comentades la 2D-DIGE juntament amb LC-MS sense marcatge són les que es poden aplicar, de forma pràctica, a un número més gran de mostres.

La 2D-DIGE és una tècnica que, gràcies al marcatge amb fluorocroms, ha solucionat part dels problemes de la 2-DE (rang dinàmic, sensibilitat i reproductibilitat). Com les mostres es marquen a nivell de proteïna i s'utilitza un pool de les mostres com a estàndard intern el nivell de variació experimental és molt baix, és doncs una tècnica molt reproducible. En contrapartida, aquest tipus d'anàlisi és molt laboriosa (fer els gels, l'anàlisi d'imatge, la identificació de les taques, etc.) i el marcatge encareix el procés. En la 2D-DIGE només les taques corresponents a proteïnes diferencials són identificades, però és molt útil per a tenir una visió global d'un proteoma.

En canvi, les tècniques basades en cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses donen molta més informació sobre la barreja de proteïnes, ja que totes les proteïnes mesurades en l'espectròmetre de masses són identificades, inclús les poc abundants o les de membrana. Però aquests mètodes són poc robustos, ja que el solapament de proteïnes

identificades entre replicues tècniques d'anàlisi de LC-MS s'ha vist que pot ser baix. La majoria de mètodes de LC-MS fan servir el marcatge amb isòtops i això, com en la 2D-DIGE, incrementa notablement el cost de l'experiment. A més, cal controlar molt bé el procés del marcatge per evitar marcatges incomplets.

D'aquestes tècniques, l'ITRAQ i el TMT són les que permeten comparar un número més gran de mostres. El marcatge és a nivell de pèptid, això fa que hi hagi més dades quantificables però pot haver-hi més variabilitat experimental. A més, ambdues tècniques requereixen d'espectròmetres de masses que siguin capaços de mesurar els ions reporters de les etiquetes a la zona de masses baixes.

L'ICPL i l'ICAT marquen a nivell de proteïna. Això permet disminuir la variabilitat del procés, però en canvi, el número de pèptids marcats per a fer la quantificació és menor que en les tècniques on el marcatge es fa a nivell de pèptid. En el cas de l'ICAT l'enriquiment dels pèptids marcats simplifica l'anàlisi però com el marcatge es fa en les cisteïnes és probable que es deixin de quantificar i identificar moltes proteïnes. L'ICPL en canvi marca les lisines, aminoàcid més present a les proteïnes.

Pel que fa al marcatge SILAC, el seu gran avantatge és la seva principal limitació i és que només es aplicable a cèl·lules en cultiu. La variabilitat experimental d'aquesta tècnica és molt baixa però només es poden comparar unes poques mostres. Un altre avantatge és que els aminoàcids que es fan servir per a marcar, la lisina i l'arginina, són tallats per la tripsina (la proteasa utilitzada habitualment) i això fa que tots els pèptids que s'obtenen en la digestió siguin quantificables.

Malgrat els avantatges que suposa marcar les mostres les tècniques sense marcatge es fan servir cada vegada més, ja que es poden aplicar, com ja hem comentat, a un número il·limitat

INTRODUCCIÓ

de mostres, de qualsevol tipus, i són barates. Això si, tenen el risc de patir molta variabilitat experimental.

Com a limitació general, les aproximacions per LC-MS, a diferència dels gels bidimensionals, no poden distingir entre diferents formes d'una mateixa proteïna.

La tècnica de SRM és la més sensible i selectiva de totes, però depèn quasi sempre de resultats obtinguts amb alguna de les tècniques anteriors ja que la seva principal aplicació és la validació de proteïnes d'interès com a alternativa a tècniques immunològiques, com l'ELISA. Es pot aplicar a qualsevol tipus de proteïna, és capaç de distingir entre isoformes i es poden monitoritzar modificacions postraduccionals.

Al final però, degut a la gran diversitat d'abundàncies i propietats de les proteïnes, és evident, que una sola tècnica d'anàlisi no és capaç de respondre amb eficàcia a totes les preguntes que ens plantegem sobre el proteoma. Tots els mètodes tenen avantatges i limitacions, de manera que, cada tècnica d'anàlisi proteòmica pot proporcionar informació complementària a les altres.

		2DE	DIGE	ICAT ICPL	iTRAQ TMT	SILAC	Sense marcatge ⁺	SRM	SRM Absoluta
Cèl·lules/ teixits									
Fraccionament/ Purificació									
Proteïnes									
Fraccionament									
Quantificació relativa per volum taques									
Pèptids									
Fraccionament									
Quantificació relativa per MS									
Quantificació relativa per MS/MS									
Precisió del procés		+	+++	+++	++	+++	+	++	++
Anàlisi a gran escala		+++	+++	+	++	+	+++	+++	+++
Rang dinàmic Lineal		1-3*log	4log	1-2log	2log	1-2log	2-3log	4-5log	4-5log
Cobertura quantitativa ⁺⁺		+	++	++	++	++	+++	+	+

Figura I.23. Descripció de diferents fluxos de treball i paràmetres típics de mètodes quantitius de proteòmica d'expressió. Els rectangles de color indiquen marcatge. El punt on les mostres es barregen es dibuixa amb una T. Rectangles separats indiquen processat de les mostres per separat i rectangles junts indiquen processos amb les mostres barrejades. Els rectangles en línia discontinua indiquen que una altra opció és possible. Figura basada en (Bantscheff et al. 2007).
*El valor depèn de la tinció feta servir.
+Paràmetres vàlids per a la quantificació basada en els senyals dels EIC i el comptatge d'espectres
++Proporció del proteoma que es pot quantificar en l'anàlisi

OBJECTIUS

OBJECTIUS

1. Estudi de la patogènesi de la retinopatia diabètica proliferativa mitjançant l'anàlisi proteòmica quantitativa, 2D-DIGE, del fluid vitri de pacients amb PDR.

2. Estudi del paper del gen Regulador AutoImmune per anàlisi proteòmica quantitativa combinada, 2D-DIGE i ICPL, de cèl·lules epitelials transfectades amb AIRE.

3. Cerca d'una firma proteica de l'activitat TGF β 1 en glioblastomes mitjançant anàlisis proteòmiques ICPL de descobriment en secretomes de cultius primaris i validació per SRM en CSF i plasma.

CAPÍTOL 1: PROTEÒMICA DEL FLUID VITRI EN LA PDR



C-1.1. Resum

En aquest estudi es va comparar el perfil de proteïnes del fluid vitri de pacients diabètics amb retinopatia diabètica proliferativa (PDR) amb el de pacients no diabètics amb forat macular idiopàtic (MH).

L'anàlisi proteòmica comparativa es va dur a terme utilitzant el sistema d'electroforesi diferencial en gel bidimensional basat en el marcatge fluorescent (2D-DIGE).

Es van identificar per espectrometria de masses 11 proteïnes amb abundància diferent (relació d'abundància >1.4 , $p < 0.05$), 8 de les quals es trobaven augmentades (*Zinc- α 2-glycoprotein* (ZAG), *Apolipoprotein* (Apo) A1, ApoH, *Fibrinogen A*, i factors del complement C3, C4b, C9 i Factor B) i 3 disminuïdes (*Pigment epithelial derived factor* (PEDF), *Interstitial retinol-binding protein* (IRBP) i *Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain* (ITIH2)), en els pacients amb PDR en comparació amb els individus no diabètics.

Cinc de les proteïnes diferencials, ZAG, C3, Factor B, PEDF i IRBP, és van validar per *western blot* en fluids vitris i per RT-PCR en retines.

L'anàlisi proteòmica 2D-DIGE, la qual permet una comparació quantitativa acurada, va servir per identificar potencials candidats involucrats en la patogènesis de la PDR.

C-1.2. Introducció

C-1.2.1. Retinopatia Diabètica Proliferativa (PDR) i Forat Macular (MH)

La retinopatia diabètica proliferativa és una seriosa complicació vascular del 80% de la gent que és diabètica durant 10 anys o més, i és la principal causa, en el món desenvolupat, de nous casos de ceguesa i deteriorament de la visió en adults amb menys de 40 anys (Congdon et al. 2003).

En la PDR es dona la secreció d'una proteïna anomenada *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) que provoca el creixement anormal de vasos sanguinis a la superfície de la retina (neovascularització) (Figura C-1.1, C). Aquest creixement dels vasos sanguinis, que a vegades poden sagnar, juntament amb la contracció dels teixits fibrosos acompanyants, poden distorsionar la retina produint greus i irreversibles pèrdues de visió.

Les investigacions dels processos relacionats amb la PDR i el test de noves teràpies es troba limitat en no disposar ni de mostres de retines, ni d'un model animal diabètic que reproduïxi rigorosament les característiques de la PDR humana. Per aquesta raó, l'humor vitri obtingut de pacients amb diabetis, mitjançant vitrectomia, és utilitzat normalment com a substitut de la retina en la recerca clínica.

La vitrectomia és la tècnica quirúrgica mitjançant la qual l'humor vitri és extret de l'ull i substituït per un gas o un líquid. Aquest procés s'utilitza com a tractament de diferents malalties oculars com el despreniment de retina, la hemorràgia vítrica o el forat macular.

Quan s'analitzen aquest tipus de mostres, existeixen dos factors a tenir en compte i que podrien portar a una interpretació errònia dels resultats. Primer, la hemorràgia vítrica, que sovint es dona a la PDR, pot produir un influx massiu de proteïnes del sèrum, qüestionant així la utilitat de l'humor vitri en l'estudi de la producció intraocular d'una

proteïna. Segon, l'alteració de la barrera de la sang de la retina que té lloc a la PDR produeix un increment de les proteïnes en el fluid vítric de pacients diabètics. En aquests casos el que s'ha observat són nivells de proteïna tres i quatre vegades més elevats en el vitri de pacients diabètics front a no diabètics (Burgos et al. 2000), (Simo et al. 2002a), (Simo et al. 2002b). Així, en aquests casos, un elevat nivell intravitri d'una determinada proteïna no necessàriament indicaria un increment en la producció intraocular, i potser només reflectiria un increment inespecífic dels nivells de proteïna deguts a la difusió del sèrum.

El MH és un petit forat que es produeix a la màcula, situada en el centre de la retina (Figura C-1.2) i responsable de la nostra visió al detall. Amb l'edat, l'humor vitri adherit a la retina es pot anar desenganxant creant el forat macular (Figura C-1.1, B). Al contrari que la PDR, el MH no és una malaltia relacionada amb la diabetis i la retina no es veu afectada per la neovascularització. Com ja s'ha comentat, el seu tractament, com en la PDR, consisteix en l'extracció de l'humor vitri mitjançant vitrectomia.

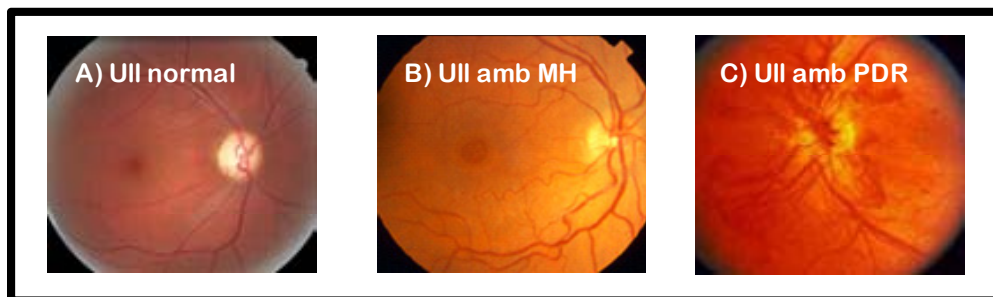


Figura C-1.1. Imatges de fons d'ull d'una retina normal (A), amb MH (B) i amb PDR (C)

C-1.2.2. Anàlisi proteòmica de l'humor vitri

Els fluids biològics són una font natural de material per a la recerca de biomarcadors proteics. La sang i l'orina són els més fàcils d'obtenir, però el fluid cerebroespinal, la saliva,

les llàgrimes o l'humor vitri també són objecte d'estudis relacionats amb la recerca de marcadors d'estats patològics com lesions renals i hepàtiques, malnutrició, càncer, SIDA, diabetis i problemes cardiovasculars i neurològics.

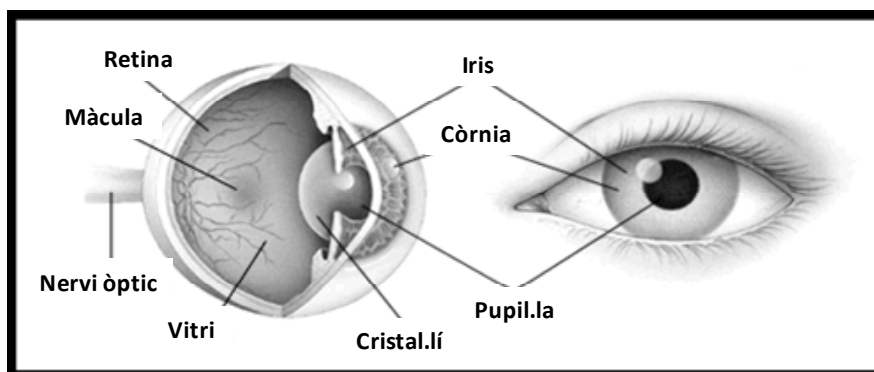


Figura C-1.2. Parts principals de l'ull humà

L'humor vitri és el líquid transparent de consistència gelatinosa que omple l'espai entre el cristal·lí i la retina de l'ull humà (Figura C-1.2). Conté majoritàriament fagòcits, no té vasos sanguinis i el 99% del seu volum és aigua amb sals, sucres i una xarxa de fibres de col·lagen amb àcid hialurònic.

De les proteïnes de l'humor vitri, l'HSA i les IgGs en són un percentatge molt elevat. Aquestes proteïnes, també són les majoritàries en mostres de sèrum i la seva alta concentració s'ha vist que és l'origen de diversos problemes en l'anàlisi proteòmica d'expressió diferencial en gel, ja que produeixen grans taques en els gels bidimensionals que impedeixen la visualització d'altres proteïnes i limiten la quantitat de mostra que pot ser analitzada. Per a solucionar aquest problema, s'han desenvolupat, per a l'anàlisi de sèrum, diferents mètodes d'afinitat que extreuen selectivament aquestes proteïnes. En aquest treball s'ha plantejat assajar aquests mateixos mètodes per a l'anàlisi de mostres d'humor vitri.

CAPÍTOL 1: PROTEÒMICA DEL FLUID VITRI EN LA PDR

La quantitat d'humor vitri disponible, respecte altres fluids biològics, es troba limitada, però diferents avenços en l'anàlisi del proteoma fan possible estudiar el perfil proteic de petites quantitats de mostra (Gorg et al. 2004).

L'humor vitri ha estat objecte de pocs estudis proteòmics. Per exemple, el grup de Nakanishi va utilitzar la 2-DE i l'MS per a iniciar un catàleg de proteïnes solubles presents en l'humor vitri (Nakanishi et al. 2002). Van identificar 56 tipus de proteïnes, algunes específiques de l'humor vitri de pacients amb PDR com el PEDF. En un treball posterior del mateix grup van fer servir la electroforesi monodimensional i l'espectrometria de masses per a, com en el cas anterior, fer un catàleg de les proteïnes de l'humor vitri d'un pacient amb PDR. En aquest cas van identificar fins a 84 proteïnes diferents, entre elles factors de creixement angiogènics i antiangiogènics (Koyama et al. 2003). Entre els dos treballs el grup va aconseguir descriure fins a 121 proteïnes del fluid vitri. Un altre estudi va analitzar un total de 59 mostres de pacients amb MH i PDR (26 i 33 respectivament) mitjançant 2-DE i MS. Van identificar 56 proteïnes diferents, però no es van descriure diferències quantitatives entre els dos tipus de mostres (Yamane et al. 2003). En el treball de Wu et al. van analitzar per 1-DE i MS diferents humors vitris control i amb PDR i van identificar 8 proteïnes, establint el que ells anomenen perfil proteic basal d'humors vitris normals, útil per a la comparació amb mostres d'espècimens amb alguna malaltia ocular (Wu et al. 2004). Finalment, l'anàlisi per 2-DE i MS fet per Ouchi mostra 8 proteïnes diferencialment expressades però en vitris de pacients amb edema macular diabètic (Ouchi et al. 2005).

Cap d'aquestes anàlisis proteòmiques prèvies va estudiar les diferències quantitatives en el perfil proteic de pacients amb PDR.

C-1.3. Objectius

- Optimització de les condicions experimentals per a l'anàlisi amb el sistema 2D-DIGE de les mostres d'humor vitri.
- Comparació quantitativa de mostres d'humor vitri de pacients amb retinopatia diabètica proliferativa i forat macular mitjançant el sistema 2D-DIGE.
- Identificació de nous candidats o dianes terapèutiques relacionades amb la patogènesi de la PDR.

C-1.4. Material i Mètodes

C-1.4.1. Obtenció i selecció de les mostres

Es van seleccionar 8 mostres d'humor vitri de pacients amb diabetis de tipus 1 i PDR i 10 mostres d'humor vitri de pacients no diabètics amb MH (Controls) del banc d'humors vitris de la Divisió d'Endocrinologia de la Unitat de Recerca en Diabetis de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. També es van obtenir cinc ulls de donants diabètics difunts i cinc més de donants no diabètics (Controls).

La mitjana d'edat dels pacients dels quals provenien les mostres eren properes (48.7 ± 11 i 48.3 ± 10 anys respectivament). Els criteris d'exclusió utilitzats van ser: intervenció vitreoretinal prèvia, fotocoagulació en els últims sis mesos, hemorràgia vítria recent (menys de tres mesos abans de la vitrectomia) o hemoglobina intravíttria $>5\text{mg/mL}$, fallada renal (creatinina $\geq 120\mu\text{mol/L}$) i patir qualsevol altra malaltia crònica. Els pacients que havien estat objecte de fotocoagulació làser en els últims sis mesos van ser exclosos perquè s'havia observat que utilitzant aquest procediment es donava una alteració significativa en l'equilibri dels factors de creixement intravíttri i l'activitat transcripcional de la retina (Wilson et al. 2003).

Les mostres d'humor vitri (0.5-1.2mL) obtingudes mitjançant vitrectomia (Simo et al. 2002a) es van transferir a un tub estèril i es van centrifugar a 16000g durant 5min a 4°C. Els sobrenedants es van congelar a -80°C fins al moment de ser utilitzats. Simultàniament es van recol·lectar mostres de sang, dels mateixos pacients, es van centrifugar a 3000g 10min a 4°C, per a obtenir-ne el sèrum, i també es van congelar a -80°C.

El protocol de recol·lecció de mostres va ser aprovat pel comitè ètic de l'hospital i els pacients van donar el seu consentiment. L'estudi es va portar a terme seguint els principis de la Declaració de Helsinki.

C-1.4.2. Concentració i extracció de proteïna per a la 2D-DIGE

Cada una de les deu mostres seleccionades (4 mostres d'humor vitri de pacients amb diabetis de tipus 1 i PDR i 6 mostres d'humor vitri de pacients no diabètics amb MH) es va concentrar fins a 30µL per ultrafiltració amb les membranes *Amicon Ultra de 5kDa* de punt de tall (Millipore, Billerica, MA, USA) i es va mesurar la concentració de proteïna amb el *RCDC Protein Assay Kit* (Bio-Rad, CA, USA). Dues de les mostres Control (MH5 i MH6) i les quatre mostres PDR (PDR1, PDR2, PDR3 i PDR4) tenien quantitat suficient de proteïna per a ser utilitzades individualment. Les altres quatre mostres Control es van haver d'ajuntar fent dos pools de dues mostres (MH1+MH2 i MH3+MH4).

C-1.4.2.1. Depleció de l'albúmina i les IgGs

Alíquotes de 1300µg de les mostres concentrades es van passar per les columnes d'afinitat *Albumin and IgG Removal kit* (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) per tal d'eliminar l'albúmina i les IgGs. Cada una de les mostres es va barrejar amb 750µL de la reïna d'afinitat i es va incubar en un agitador orbital durant 30min a temperatura ambient. La barreja es va passar a una columna amb una membrana per a separar la reïna de la solució i es va centrifugar a 6500g 5min. Les mostres deplecionades, aproximadament 500µl de filtrat, es van precipitar amb acetona (mostra: acetona 1:4 v/v), el pèl·let es va resuspendre amb tampó de lisi DIGE (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS p/v, 30mM Tris, pH 8.5), i en cas de ser necessari, es va ajustar el pH de cada mostra a 8.5±0.5. Finalment es va tornar a mesurar la concentració de proteïna.

C-1.4.3. 2D-DIGE**C-1.4.3.1. Marcatge Fluorescent**

Amb la concentració de les mostres ajustada a 5µg/µL es va preparar un pool o estàndard intern de 200µg de proteïna, amb la mateixa quantitat de cada una de les mostres, i es va marcar amb el fluorocrom Cy2 (Alban et al. 2003). També es van preparar 50µg de cada una de les mostres. La meitat de mostres de cada grup es va marcar amb el fluorocrom Cy3 i l'altra meitat amb el fluorocrom Cy5 (Taula C-1.1).

El marcatge es va fer afegint 400pmol de Cy en N,N-dimetilformamida per a cada 50µg de proteïna. La reacció de marcatge va tenir lloc durant 30min en gel i a la foscor. Passat aquest temps la reacció es va aturar afegint 1µL de lisina 10mM i incubant 10min més.

En acabat les mostres es van combinar segons el disseny experimental de la taula C-1.1.

Taula C-1.1. Disseny de l'experiment DIGE

Gel	Cy3	Cy5	estàndard intern Cy2
1	50µg MH1+MH2	50µg PDR1	50µg (6.25µg de cada una) MH(1+2, 3+4, 5,i 6) + PDR(1-4)
2	50µg MH5	50µg PDR2	50µg (6.25µg de cada una) MH(1+2, 3+4, 5,i 6) + PDR(1-4)
3	50µg PDR3	50µg MH3+MH4	50µg (6.25µg de cada una) MH(1+2, 3+4, 5,i 6) + PDR(1-4)
4	50µg PDR4	50µg MH6	50µg (6.25µg de cada una) MH(1+2, 3+4, 5,i 6) + PDR(1-4)

C-1.4.3.2. IEF

Cada combinació de mostres es va diluir a la meitat amb tampó de mostra DIGE 2X (7M urea, 2M tiourea, 4% p/v CHAPS, 2% p/v DTT, 2% v/v amfòlits pH 3-10). Per a l'IEF es va fer servir l'*Ettan IPGphor System* (GE Healthcare) (Figura C-1.3, A). Les mostres es van carregar utilitzant el sistema *Cup-Loading*, situant els carregadors a l'extrem àcid de les quatre tires

d'isoelectroefocament de 24cm i gradient de pH immobilitzat 3-10. Prèviament, aquestes tires s'havien incubat durant 16h amb 450µL de tampó de rehidratació (7M urea, 2M tiourea, 4% p/v CHAPS, 1% v/v amfòlits pH 3-10 i 97mM DeStreak (GE Healthcare)). El protocol d'IEF dut a terme va ser: Pas 1: step-n hold, 300 V, 3 h, Pas 2: Gradient, 1000 V, 6 h, Pas 3: Gradient, 8000 V, 3 h, Pas 4: Step-n-hold, 8000 V, 5:40 h

C-1.4.3.3. Equilibració tires

Les tires enfocades es van equilibrar en agitació, primer durant 15min en 6mL de solució reductora (6M urea, 100mM Tris pH 8.0, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS i 5mg/mL DTT) i després, retirada la solució anterior, 15 min més amb 6mL de solució alquilant (6M urea, 100mM Tris pH 8.0, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS i 22.5mg/mL iodoacetamida (IAA)).

C-1.4.3.4. Electroforesi bidimensional

La segona dimensió va durar 6h i es va fer utilitzant gels SDS-PAGE polimeritzats al 12.5% (41.7% acrilamida (barreja acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8%), 25% tampó de separació 4X (1.5M Tris pH 8.8), 1% SDS (SDS 10% p/v), 0.5% persulfat amònic (APS 10% p/v) i 0.03% TEMED, tot en v/v) en cassetes de vidre de baixa fluorescència (24x20 cm) (Figura C-1.3, B).

Les tires equilibrades es van depositar sobre els gels i es va segellar amb agarosa. Per a córrer el gels es va fer servir l'*Ettan DALT VI system* (GE Healthcare) (Figura C-1.3, C). En un primer pas es van aplicar 2.5W per gel durant 30min i, a continuació, 17W per gel fins que el front de blau de bromofenol de l'agarosa va arribar al final del gels. Durant l'electroforesi, el sistema es va refrigerar per circulació d'aigua a 20°C.

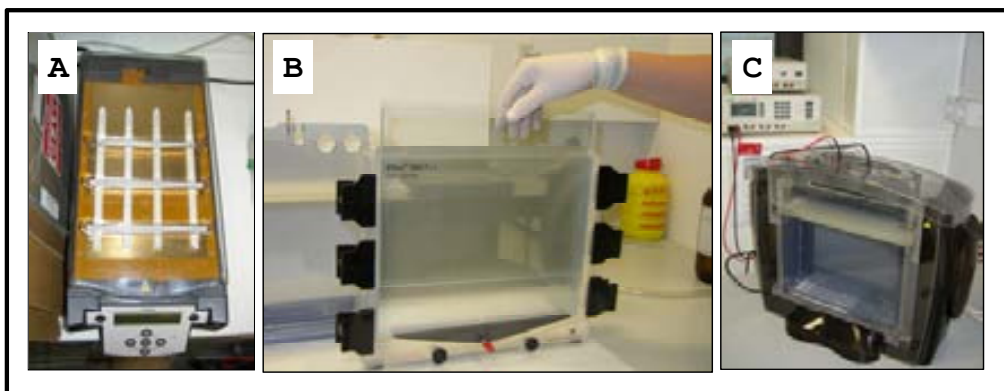


Figura C-1.3. Equipament per a la 2-DE. A) *Ettan IPGphor*, B) Cubeta de polimerització dels gels i C) *Ettan Dalt Six*

C-1.4.3.5. Escaneig

Cada gel es va escanejar amb l'escàner de fluorescència *Typhoon 9400* (GE Healthcare) (Figura C-1.4) a una resolució de 100 microns fent servir diferents longituds d'ona d'excitació i filtres d'emissió per a cada fluorocrom (Taula C-1.2).

Taula C-1.2. Paràmetres d'escaneig del *Typhoon 9400*

Cy	Filtre emissió (nm)	Laser excitació (nm)
Cy2	520	Blau (488)
Cy3	580	Verd (532)
Cy5	670	Vermell (633)



Figura C-1.4. Escàner de fluorescència *Typhoon 9400*

C-1.4.3.6. Tinció total de les proteïnes

Una vegada escanejats, els gels es van tenyir amb la tinció fluorescent *Flamingo* (Bio-Rad). Primer, els gels es van fixar (40% v/v etanol, 10% v/v àcid acètic) durant 24h i a continuació es van tenyir (10% v/v *Flamingo* en aigua) durant

3h a la foscor. En aquesta mateixa solució de tinció els gels es van emmagatzemar a 4°C.

C-1.4.3.7. Anàlisi d'imatge

Per a l'anàlisi de les imatges generades en l'escaneig dels gels 2D-DIGE es va utilitzar el software *Decyder 6.0* (GE Healthcare). El procés consta de diferents etapes:

Detecció de les taques: En aquest primer pas, es va fixar el número de taques aproximat que hi havia en el gel (ex:2500 taques) i automàticament el programa va fer la detecció de les taques.

Filtratge: Una vegada detectades les taques es van filtrar en funció de la pendent, l'àrea, l'alçada i el volum. D'aquesta forma es van eliminar de l'anàlisi taques corresponents a artefactes de l'electroforesi, la tinció, etc.

Alineament: Es va seleccionar com a imatge de referència (*Master gel*), la imatge del Cy2 del gel que tenia més taques i més ben resoltes. La resta d'imatges es van alinear automàticament amb aquesta imatge de referència amb l'ajut d'uns punts d'ancoratge.

Revisió: En acabat, manualment es va revisar que l'alineament de totes les imatges fos correcte.

Anàlisi estadística: Inicialment el software va calcular el volum normalitzat de cada una de les taques (ex: volum normalitzat taca X Gel 1= Volum de la taca X Gel 1 (Cy3 o Cy5)/ volum taca X en la imatge corresponent al estàndard intern (Cy2) del Gel 1). A continuació, cada conjunt de volums normalitzats (Cy3/Cy2 o Cy5/Cy2) es va corregir respecte la mediana de la seva distribució, assumint que la majoria de proteïnes no varia i per tant la distribució estaria centrada en 1. Un cop normalitzats i corregits els volums, per a l'anàlisi estadística es van crear els grups a comparar, el grup Control i el grup PDR, assignant cada imatge Cy3 o Cy5 al grup corresponent. Finalment es va calcular la variació de les

taques fent el quocient dels valors mitjanats de cada taca entre el grup PDR i el control.

C-1.4.4. Retallat de les taques i digestió triptica

El gel tenyit amb *Flamingo* es va fixar en una cel·lofana i es va obtenir la imatge de fluorescència escanejant a 532nm amb l'escàner *Typhoon 9400*. Cada una de les taques seleccionades es va alinear amb la imatge del gel tenyit amb *Flamigo* fent servir el *Decyder 6.0*. L'alineament va generar una taula de coordenades que van ser les que va utilitzar el robot *Ettan Spot Picker* (GE Healthcare) per a retallar les taques que es van digerir amb tripsina (Shevchenko et al. 1996). Per a la digestió es va fer un primer rentat de les taques amb 150µL de 25mM bicarbonat amònic (AB) durant 20min i dos rentats més amb 150µL de 50mM AB, 50% v/v acetonitril (ACN) de 20min cada un. A continuació, es van deshidratar amb 100% ACN durant 10min i es van rehidratar amb una solució de 40ng tripsina en 15µL de 25mM AB. Es van digerir les taques durant 3h a 37°C. Els pèptids es van extreure amb 0.2% v/v àcid trifluoroacètic (TFA), es van concentrar amb una placa amb microcolumnes de fase inversa (C18), la *96-well Zip Plate C18 del Montage in Gel Digest ZT Kit* (Millipore), i es van eluir amb 10µL de 0.1% v/v TFA, 50% v/v ACN per centrifugació.

C-1.4.5. Identificació de proteïnes per MS

Un microlitre dels digerits triptics de les taques es va carregar en una placa *AnchorChip* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Figura C-1.5) dipositant a sobre 2µL de matriu àcid α -ciano-4-hidroxicinamic a 0.3mg/mL, (2:1 etanol: matriu a 1mg/mL en acetona) i deixant evaporar a sequedat. L'adquisició dels espectres es va fer utilitzant un instrument *Ultraflex TOF/TOF* (Bruker Daltonics) (Figura C-1.5). El calibratge de les masses, mesurades amb l'espectròmetre de masses, es va fer de forma externa dipositant entre les mostres una barreja de

pèptids *calibration standard kit* (Bruker). Els espectres es van processar amb el software *Flex Analysis 2.2* (Bruker Daltonics). Les llistes de pics es van generar assignant les senyals, en el rang de m/z entre 800 i 4000, que tinguessin una relació senyal-soroll més gran de 3. Per a assignar els pics monoisotòpics, de les distribucions isotòpiques observades, es va utilitzar l'algoritme SNAP, inclòs en el *Flex Analysis*. Després d'eliminar els valors de m/z corresponents a ions de la matriu es va fer un calibratge estadístic intern. A continuació, els pics de les masses de pèptids de queratines i d'autòlisi de la tripsina es van eliminar. Aquestes llistes resultants es van utilitzar per a la identificació de les proteïnes per PMF, buscant en la base de dades *MSDB* (Imperial College, London) mitjançant el motor de recerca *MASCOT 2.0* i limitant la cerca a proteïnes humanes (141910 seqüències), posant la carbamidometilació de cisteïnes com a modificació fixa, l'oxidació de metionines com a variable, triant la tripsina com a proteasa, una tolerància en la massa de 50ppm i permetent un màxim de dos punts de tall de la proteasa no digerits.

El criteri per a considerar una identificació com a significativa va ser que la puntuació fos superior a 64 i la $p < 0.05$, juntament amb una cobertura de la intensitat de l'espectre $> 60\%$ (a menys que més d'una proteïna fos identificada en una mateixa taca). Per a totes les proteïnes identificades es va obtenir una puntuació mínima de 84 i una diferència més gran de 50 punts entre aquesta puntuació i la de la següent proteïna no homòloga.



Figura C-1.5. Placa Anchor Chip i espectròmetre de masses MALDI TOF/TOF UltraFlex TOF/TOF (Bruker)

C-1.4.6. Anàlisi per western blot

Alíquotes de les mostres fetes servir en l'experiment 2D-DIGE es van utilitzar per a validar per *western blot* cinc de les proteïnes trobades com a diferencials en comparar el fluid vitri de pacients amb PDR amb el de pacients no diabètics amb MH (ZAG, C3, Factor B, PEDF i IRBP).

Per a avaluar més a fons la validesa dels resultats obtinguts a l'anàlisi 2D-DIGE, es van analitzar per *western blot* vuit mostres addicionals (quatre PDR i quatre MH).

Les mostres de proteïna desnaturalitzada es van separar en un gel monodimensional de SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PVDF (Millipore) utilitzant una unitat Mini-protean Transfer II (Bio-Rad). Les membranes es van bloquejar incubant-les durant tota la nit en 5% de llet en pols. A continuació es van incubar amb els anticossos primaris contra anti-ZAG humana de conill (cedit amablement per L. M. Sánchez, Universitat d'Oviedo, Espanya), anti-C3 humana de cabra (Calbiochem, San Diego, CA, USA), anti-factor B humà de cabra (Quidel, San Diego, CA, USA), anti-PEDF humà de conill (Upstate, Charlottesville, VA, USA) i anti-IRBP humà de conill (anticossos amablement cedits per J. M. Nickerson, Emory

University, GA, USA). Després de rentar les membranes amb 0.1% Tween 20 en TBS es van deixar incubar amb anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa (Bio-Rad) durant una hora a temperatura ambient. Les bandes immunoreactives es van detectar amb un substrat quimioluminiscent (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL, USA). Les membranes es van exposar a films radiogràfics (Hyperfilm; GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK). Les imatges es van processar amb el sistema d'imatge Imaging Densitometer GS700 i es van quantificar amb el software Quantity One Analysis de Bio-Rad. Per a normalitzar les dades es va carregar en els gels una quantitat equivalent (5ug) de proteïna soluble de fluid vitri.

L'anàlisi per *western blot* de les proteïnes ZAG, C3, Factor B, PEDF i IRBP també es va fer en mostres de sèrum obtingudes durant la vitrectomia.

C-1.4.7. RT-PCR quantitativa en temps real

Es va aïllar el RNA total de teixits de retina de 10 ulls humans, obtinguts post-mortem (de 5 individus diabètics i 5 no diabètics), mitjançant el *RNeasy Mini Kit with DNase digestion* (Qiagen Distributors, IZASA, Barcelona, Espanya) i seguint les instruccions del proveïdor. Un microgram del RNA total es va utilitzar directament per a la transcripció inversa, que es va realitzar utilitzant iniciadors hexanucleòtids i reactius de *TaqMan Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Madrid, Espanya), en un volum de reacció de 50uL.

La RT-PCR quantitativa en temps real amb iniciadors específics (TaqMan pre-made gene expression assay Hs0017267; Applied Biosystems; Gene Bank RefSeq NM 000799.2) es va realitzar utilitzant 2µL de la reacció de transcripció inversa com a plantilla en una PCR amb el TaqMan Universal Mastermix. Després de 10min a 95°C, la reacció d'amplificació es va fer en 50 cicles (95°C durant 15s seguit de 60°C durant 60s) fent servir l'equipament Applied Biosystems 7000 (Applied

Biosystems). Cada mostra es va analitzar per duplicat i es van incloure controls negatius en cada experiment. Es van obtenir dades de quantificació relativa automàtica utilitzant el software ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) i fent servir el gen de la β -actina com a control endogen (Hs9999903_m1; Applied Biosystems).

C-1.4.8. Anàlisi de les dades amb el *Ingenuity Pathways Analysis Software (IPA)*

Per a l'anàlisi IPA es va crear una llista de les proteïnes diferencials que incloïa el codi d'accés de les proteïnes a la base de dades *SwissProt* i les ràtios d'abundància entre les mostres PDR i MH obtingudes amb el *Decyder 6.0*. Al carregar aquesta llista en el software IPA, aquest va crear, automàticament i utilitzant dades bibliogràfiques, una xarxa que mostra les interaccions funcionals entre les proteïnes de la llista o d'altres que les connecten entre elles.

C-1.5. Resultats

C-1.5.1. Experiments preliminars de 2-DE i depleció de l'HSA i les IgGs

Prèviament a l'experiment 2D-DIGE es van fer proves per a veure la quantitat de proteïna que es podia extreure de les mostres d'humor vitri, el perfil de proteïnes d'aquest tipus de mostra, la quantitat inicial de proteïna necessària per a poder fer la 2-DE després de l'eliminació de gran part de l'albumina i les IgGs, les dues proteïnes majoritàries observades en les mostres, i la millora que suposava la depleció. Aquests passos són necessaris per a optimitzar l'anàlisi proteòmica de l'humor vitri.

En mesurar la quantitat de proteïna de les mostres originals es va trobar que en general les mostres MH tenien menys proteïna que les PDR, eren més diluïdes. En fer la 2-DE de les mostres sense depleccionar, el resultat van ser uns gels amb un número baix de taques mal resoltes (Figura C-1.6, A).

L'interès en l'eliminació de l'HSA i les IgGs es basava en el fet que aquestes proteïnes emmascaraven les proteïnes minoritàries o simplement feien que no n'hi hagués quantitat suficient per fer-les visibles en un gel bidimensional. En depleccionar l'albumina i les IgGs es podia carregar més quantitat de les proteïnes minoritàries que per altra banda eren les més susceptibles de ser d'interès.

El protocol del mètode d'eliminació de l'albumina i les IgGs utilitzat descriu una recuperació, després de la depleció, de entre 150 i 220µg de proteïna si es parteix de 1mg de proteïna de sèrum. Es va fer la prova partint de 1mg de proteïna d'humor vitri i es van recuperar de l'ordre de 200µg. D'aquesta mostra depleccionada també es va fer un gel 2-D (Figura C-1.6, B).

A la figura C-1.6 es mostren les imatges que es van obtenir com a resultat de carregar 100µg de proteïna, d'abans i després de la depleció, en dues tires de 24cm i pH 3-10, fer

la segona dimensió en gels SDS-PAGE al 12.5% i tenyir cada un dels gels amb plata.

L'eliminació de l'albúmina i les IgGs va fer que millorés la qualitat del gel, s'observaven més número de taques i en millorava la resolució.

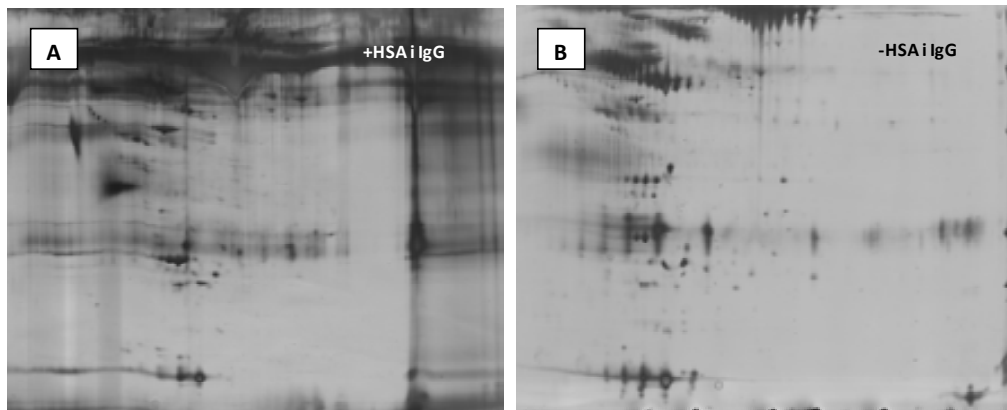


Figura C-1.6. Imatges corresponents a proteïnes d'humor vitri sense deplecionar (A) i deplecionades (B) separades per 2-DE (tires 24cm, pH 3-10, gels 12.5% tenyits amb plata)

C-1.5.2. Anàlisi comparativa dels proteomes d'humor vitri amb PDR o MH per 2D-DIGE

C-1.5.2.1. Concentració i extracció de proteïna

Per a fer l'anàlisi comparativa 2D-DIGE entre mostres PDR i MH es van seleccionar 4 mostres PDR i 6 mostres MH o Control (mostres amb menys quantitat de proteïna). Aquestes mostres Control (de les proteïnes presents a humors vitris de pacients no diabètics) són humors vitris obtinguts mitjançant vitrectomia, com en el cas de la PDR, de pacients amb MH, una patologia no relacionada amb la diabetis.

Es van crear dos pools de mostres control (MH1+MH2 i MH3+MH4) i la resta de mostres es van utilitzar individualment. El contingut mig de proteïna de les mostres inicials va ser $1.96 \pm 0.5 \text{ mg/mL}$ per les MH i $4.45 \pm 1.4 \text{ mg/mL}$ per les PDR. Després de la depleció de les proteïnes abundants es va recuperar

aproximadament el 20% del total de proteïna inicial (Taula C-1.3).

A la taula C-1.3 es mostren els valors de concentració de proteïna inicial per a les diferents mostres. També hi ha els valors de proteïna carregats a les columnetes de depleció de l'albumina i les IgGs, els micrograms recuperats i el percentatge de proteïna eliminada respecte a la quantitat de proteïna inicial.

Taula C-1.3. Taula de les mostres utilitzades a l'anàlisi 2D-DIGE

Mostra	Proteïna inicial (mg/ml)	Volum inicial (µl)	Proteïna inicial (µg)	Mostra carregada ^a (µg)	Mostra Recuperada ^b (µg)	Albumina +IgG ^c (µg)	Albumina +IgG ^c (%)
MH1+MH2	2.53	550.0	1394.0	1300.0	218.4	1081.6	83.2
MH3+MH4	1.54	850.0	1309.0	1300.0	371.2	856.8	69.8
MH5	2.30	700.0	1610.0	1300.0	212.7	1087.3	83.6
MH6	1.48	1000.0	1475.0	1300.0	113.8	1186.2	91.2
PDR1	6.10	750.0	4575.8	1300.0	226.0	1074.0	82.6
PDR2	3.21	1200.0	3856.8	1300.0	286.9	1013.1	77.9
PDR3	3.39	1200.0	4071.6	1300.0	172.8	1127.3	86.7
PDR4	5.11	1100.0	5617.7	1300.0	260.3	1039.7	80.0
Mitja MH	1.96	775	1447.0	1300.0	234.5	1065.5	82.0
Mitja PDR	4.45	1062.5	4530.5	1300.0	236.5	1063.5	81.8

^a Quantitat de mostra utilitzada per a la depleció

^b Quantitat de proteïna després de la depleció de l'albumina i les IgGs

^c Quantitat d'albumina i IgGs eliminada amb la columneta de depleció

La quantitat de proteïna recuperada després de la depleció va ser suficient per a realitzar l'experiment 2D-DIGE, ja que són necessaris 75 µg de cada mostra.

A més com que la depleció de l'HSA i les IgGs va eliminar aproximadament la mateixa fracció de proteïna en cada mostra i, tenint en compte que es va partir de la mateixa quantitat de proteïna a deplecionar, es va assumir que aquest procés no havia alterat significativament les ràtios d'abundància entre els dos grups de mostres per a altres proteïnes.

C-1.5.2.2. 2D-DIGE

El disseny de la 2D-DIGE va consistir en 4 gels. En cada gel es van córrer tres mostres, 50µg d'una mostra control, 50µg d'una mostra PDR i 50 µg de la mostra estàndard intern, cada una marcada amb un fluorocrom diferent (Taula C-1.1 apartat C-1.4.3.1).

L'electroforesi bidimensional de les mostres marcades amb els diferents fluorocroms va generar 12 imatges fluorescents (Figura C-1.7) i 4 imatges *Flamingo* (Figura C-1.7). En les imatges s'observa d'esquerra a dreta el rang de pI de 3 a 10 i de dalt a baix un rang de MW entre 200 i 15kDa (Gels polimeritzats al 12.5%)

Les imatges que es van obtenir estaven ben resoltes tot i que, fins i tot després de la depleció, una de les proteïnes majoritàries continuava essent l'HSA.

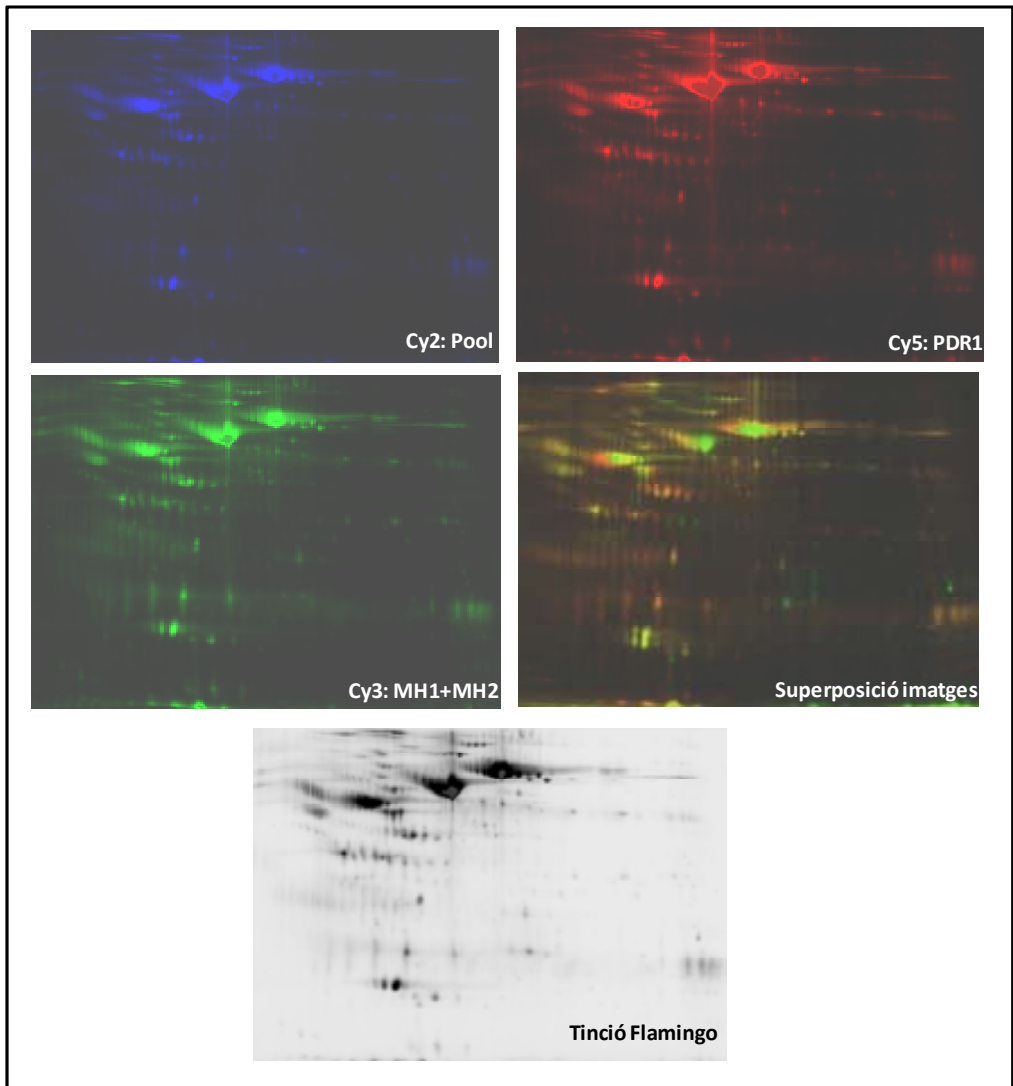


Figura C-1.7. Imatges fluorescents individuals de cada una de les mostres carregades en el gel 1, així com la imatge corresponent a la superposició de les tres i la de la tinció amb *Flamingo*

C-1.5.2.3. Anàlisi d'imatge

En l'anàlisi d'imatge, utilitzant el software *Decyder 6.0*, es van detectar unes 1400 taques.

Al comparar les mostres de pacients amb PDR amb les MH es va seleccionar una ràtio d'abundància de com a mínim 1.4 vegades. Es van trobar 41 taques que complien aquest criteri amb una $p < 0.05$ (Student's *t* test). Vint-i-vuit de les taques es trobaven incrementades i 13 disminuïdes (Figura C-1.8 i C-1.9). Com s'observa a la figura C-1.9, les proteïnes seleccionades mostren una variació entre els grups MH i PDR clarament significativa en comparació a la seva variabilitat entre individus.

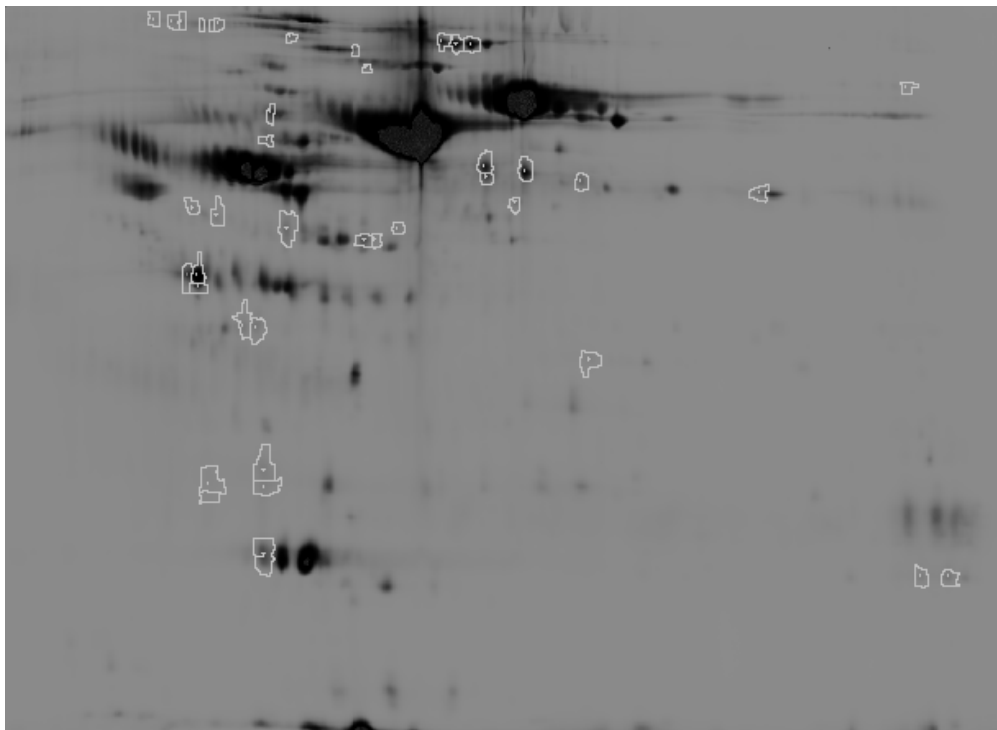


Figura C-1.8. Imatge amb la localització de les 41 taques diferencials

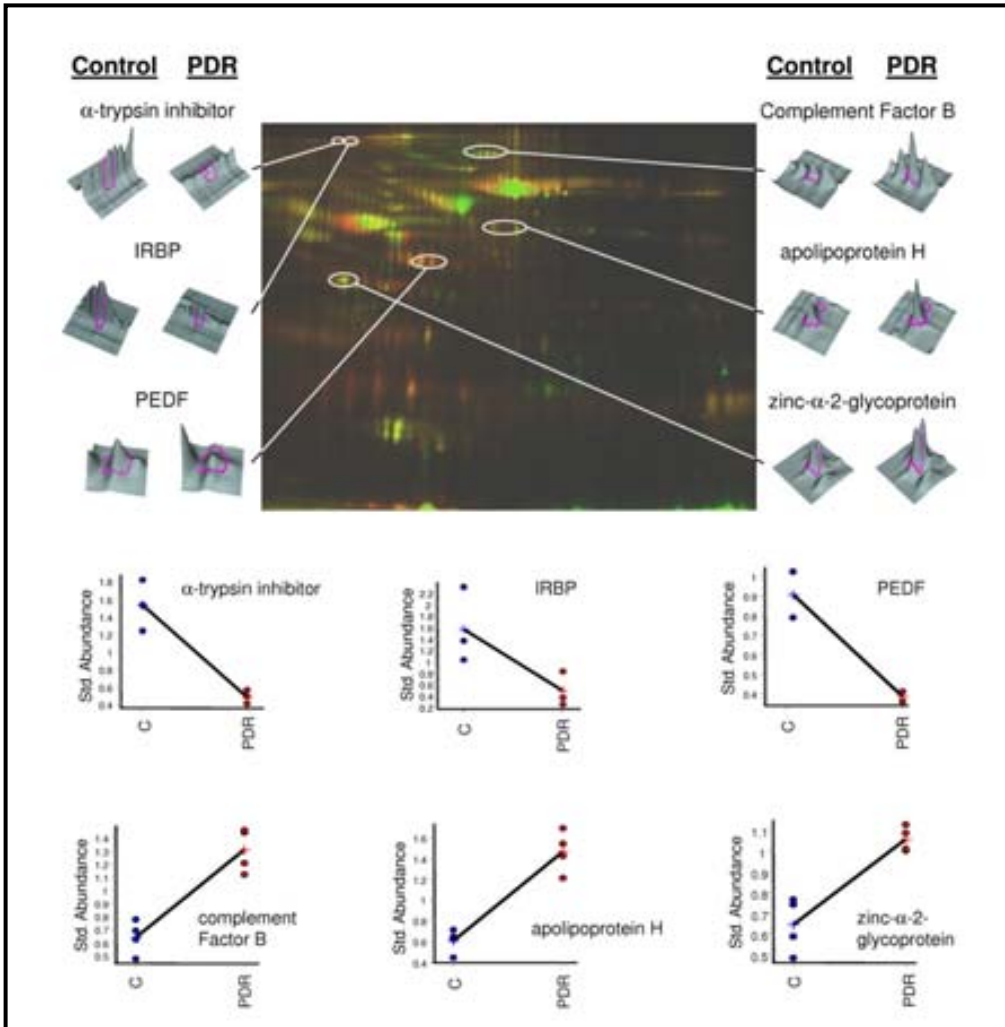


Figura C-1.9. Localització, representació en 3D, gràfic d'abundància i identificació de 6 de les taques diferencials (agafades com a exemple) entre PDR i MH (C). A l'esquerra de la figura trobem 3 de les taques disminuïdes i a la dreta 3 de les augmentades en la PDR

C-1.5.3. Identificació per MS de les proteïnes diferencials

Les 41 taques van ser retallades del gel, es van digerir amb tripsina i analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF/TOF. Es van poder identificar 30 de les taques retallades que es corresponien a 11 proteïnes diferents, 8 de les quals augmentaven i 3 disminuïen al comparar pacients amb PDR amb pacients amb MH. (Taula C-1.4). Totes les identificacions tenien una puntuació superior a 84 i un percentatge de cobertura d'intensitat de l'espectre superior al 60% (a no ser que hi hagués barreja).

Com es veu a la taula C-1.4, la major part de les proteïnes identificades apareixen en diverses taques. Això es podria explicar per la presència de diverses isoformes per a cada proteïna, probablement formes glicosilades. Les diferents taques resultarien de diferències en la glicosilació. En tots els casos, l'abundància relativa observada és similar per a totes les isoformes.

Les proteïnes que presentaven un augment en l'abundància van ser el Fibrinogen A, ZAG, ApoA1, ApoH i diferents membres del sistema del complement (factor B, C3, C9 i C4b). El complement C3 es va identificar en dos grups de taques amb masses moleculars d'uns 42kDa i 75kDa (relació d'abundància mitjanada PDR/MH 1.64 i 1.3, respectivament), coherent amb les dues bandes observades per *western blot*. Pel que fa al C4, es va observar amb una massa molecular d'uns 42kDa. Els pèptids identificats per aquesta proteïna es va veure que es corresponien amb un fragment de la seqüència assignat com a C4d-B (aminoàcids 957-1325).

De les proteïnes amb una abundància disminuïda es va identificar la PEDF, una proteïna amb propietats antiangiogèniques prèviament descrita per estar disminuïda en el fluid vítri de pacients amb PDR (Spranger et al. 2001), (Ogata et al. 2001b). La identificació d'aquesta proteïna

disminuïda, tal i com era d'esperar, va proporcionar un control intern a aquesta anàlisi proteòmica comparativa. Les altres dues proteïnes disminuïdes que es van identificar van ser la IRBP i la ITIH2.

C-1.5.4. Validació dels resultats 2D-DIGE per western blot (WB)

Per a validar els resultats obtinguts en l'anàlisi proteòmica es van triar cinc de les proteïnes diferencials per a ser assajades per *western blot*. Aquestes proteïnes són: ZAG, Complement C3 fragment 3f de 40kDa (C3) i complement Factor B, augmentades en el fluid vitri de pacients amb PDR, i PEDF i IRBP, disminuïdes en el fluid vitri de pacients amb PDR. Aquestes proteïnes es van analitzar en les mostres utilitzades en l'experiment 2D-DIGE i en un grup addicional de mostres d'humor vitri, quatre de tipus PDR i quatre MH (Figures C-1.10 i C-1.11)

Les proteïnes ZAG, C3 (fragment de 42kDa) i el Factor B (fragment 93kDa) es van trobar significativament augmentades en les mostres de pacients amb PDR en comparació a les mostres del grup control (9.57 ± 0.12 vs 6.99 ± 0.73 , $p=0.003$; 14.12 ± 0.21 vs 7.49 ± 0.29 , $p=0.018$; i 15.11 ± 3.12 vs 6.98 ± 1.34 , $p=0.005$; Figura C-1.10). Tant el C3 com el Factor B van presentar fragments addicionals indicant la presència dels seus productes d'activació. Els perfils observats en les mostres d'humor vitri es corresponien amb les cadenes natives α i β del C3 (115 i 75kDa) i la presència d'altres bandes més petites, essent la de 42kDa (fragment C3b (Cunnion et al. 2004)) la més aparent. Els perfils del Factor B presentaven una banda majoritària de 93kDa i dos fragments corresponents a 63kDa (Bb) i 30kDa (Ba) (Thomas et al. 2000).

Taula C-1.4. Identificacions per MALDI TOF/TOF de les taques diferencials entre PDR i MH

PDR/MH a	# taques ^b	Nom proteïna	Accés SwissProt	Teòric ^c		Observat ^d		Puntuació ^e	# Pep. assignats ^f	% Seq. ^g	% Int. ^h
				pI	MW(KDa)	pI	MW(KDa)				
6.23	1	Fibrinogen A, alpha polypeptide	P02671	5.8	91.3	9.2	22	114 (58)	8 (6)	13.5	68.4
2.16	5	Beta2-glycoprotein-I (apoH)	P02749	8.4	36.2	6.3	70	175 (44)	17 (16)	69.9	63.9
1.90	3	Complement factor B	P00751	6.7	83	6.0	100	181 (60)	27 (47)	44.1	66.4
1.72	4	ZAG	P25311	5.6	32	4.0	41	207 (54)	18 (20)	50.9	70.8
1.64	3	Complement C3	P01024	6.0	185	4.0	45	238 (88)	24 (17)	12.6	73.7
1.62	1	Complement C9	P02748	5.4	60.9	4.6	75	110(52)	14 (12)	36.4	81.1
1.57*	1	Complement C4-B (C4d-B fragment)	P0C0L5	5.0	40.6	4.0	42	84 (30)	8 (21)	36.5	28.1
1.43	3	apoA1	P02647	5.3	28.1	4.5	28	154 (44)	12 (8)	48.6	76
-2.58	2	ITIH2	P19823	5.8	72.4	3.8	130	89 (46)	15 (18)	19.4	70.9
-2.67	5	PEDF	P36955	5.9	44.5	6.5	50	146 (45)	16 (16)	41.9	80.4
-2.77	4	IRBP	P10745	5.0	133	4.1	137	208 (47)	34 (37)	44.5	79.9

a)relació d'abundància mitjanada per a cada proteïna calculada a partir dels valors de les diferents taques en que s'ha identificat. b)número de taques que es corresponen amb la mateixa proteïna. c)valors teòrics de pI i massa molecular de la proteïna calculats a partir de la seva seqüència aminoacídica. d)valors de pI i massa moleculars observats en el gel. e)valors de puntuació de la cerca MASCOT. En parèntesis es dona el valor de la següent proteïna identificada no homologa. f)número de masses de l'espectre assignades a la proteïna identificada. En parèntesis es dona el número de masses no assignades. g) percentatge de cobertura de seqüència. h)percentatge de la intensitat total de l'espectre cobert amb els pèptid assignats. *) El complement C4 es va identificar barrejat amb el C3. La ràtio d'abundància no es pot considerar precisa.

En contrast, les quantitats intravítrees de les proteïnes PEDF i IRBP es van veure significativament inferiors en el grup de mostres PDR en comparació a les control ((6.76±0.97 vs 18.25±8.9, p=0.03; i 6.48±0.79 vs 13.22 ± 4.98, p=0.04; Figura C-1.11).

No es van trobar diferències significatives en les proteïnes analitzades al comparar els sèrums de pacients amb PDR i d'individus control (Figures C-1.10 i C-1.11). Com que la proteïna IRBP és produïda únicament en l'ull no es va detectar en cap de les mostres de sèrum.

A més, al comparar les mitjanes de les ràtios d'abundància determinades per a les proteïnes analitzades per *western blot* amb les observades amb l'anàlisi proteòmica 2D-DIGE, es va trobar que les dades estaven ben correlacionades, tal i com es mostra a la figura C-1.12. Aquesta dada és especialment rellevant si tenim en compte que part de les mostres utilitzades per a fer les validacions per WB eren diferents a les utilitzades en l'experiment 2D-DIGE.

Ahora això confereix una major consistència a la idea que la depleció no va alterar significativament la comparació quantitativa de les mostres en l'anàlisi 2D-DIGE.

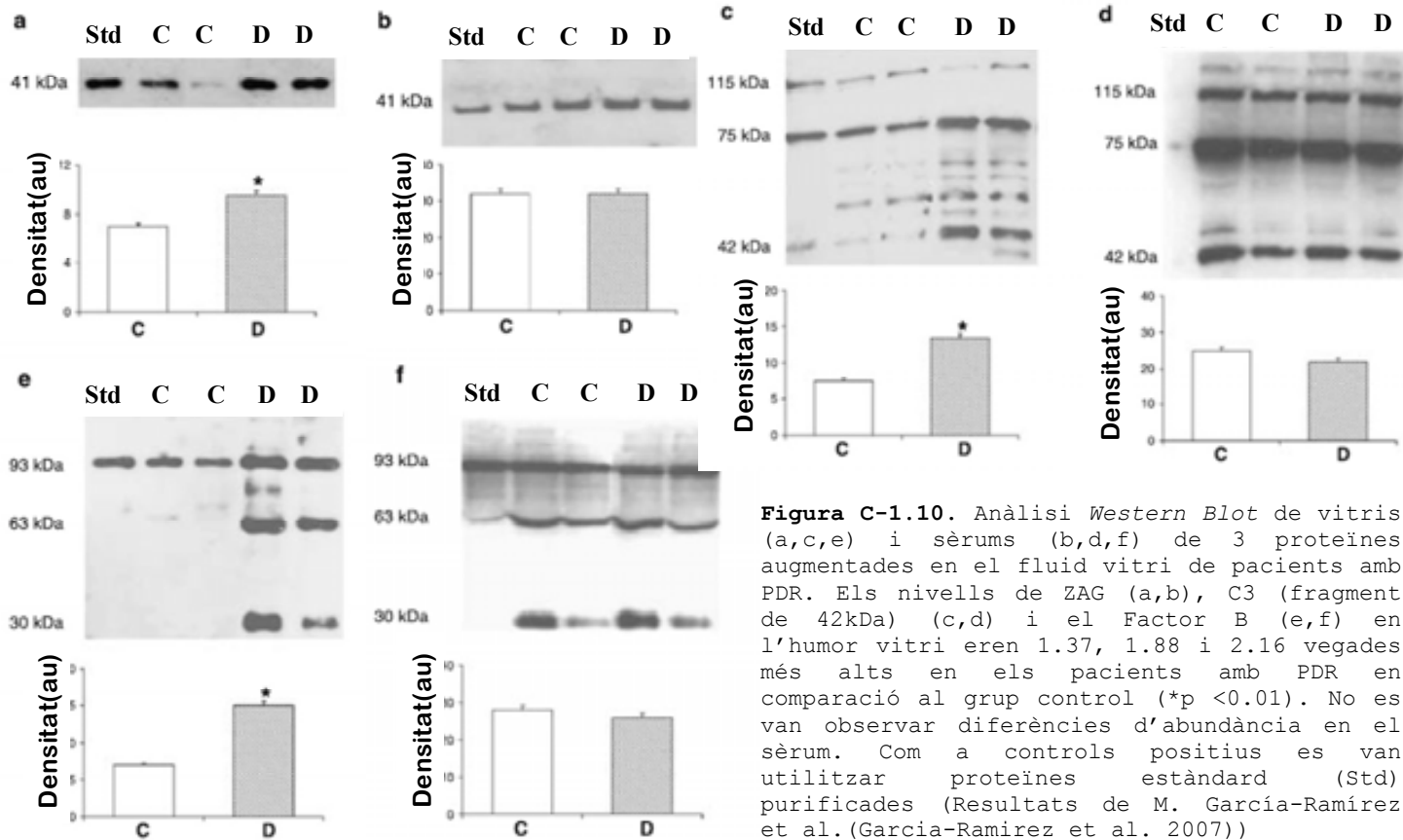


Figura C-1.10. Anàlisi *Western Blot* de vitris (a,c,e) i sèrums (b,d,f) de 3 proteïnes augmentades en el fluid vitri de pacients amb PDR. Els nivells de ZAG (a,b), C3 (fragment de 42kDa) (c,d) i el Factor B (e,f) en l'humor vitri eren 1.37, 1.88 i 2.16 vegades més alts en els pacients amb PDR en comparació al grup control (*p < 0.01). No es van observar diferències d'abundància en el sèrum. Com a controls positius es van utilitzar proteïnes estàndard (Std) purificades (Resultats de M. García-Ramírez et al. (García-Ramírez et al. 2007))

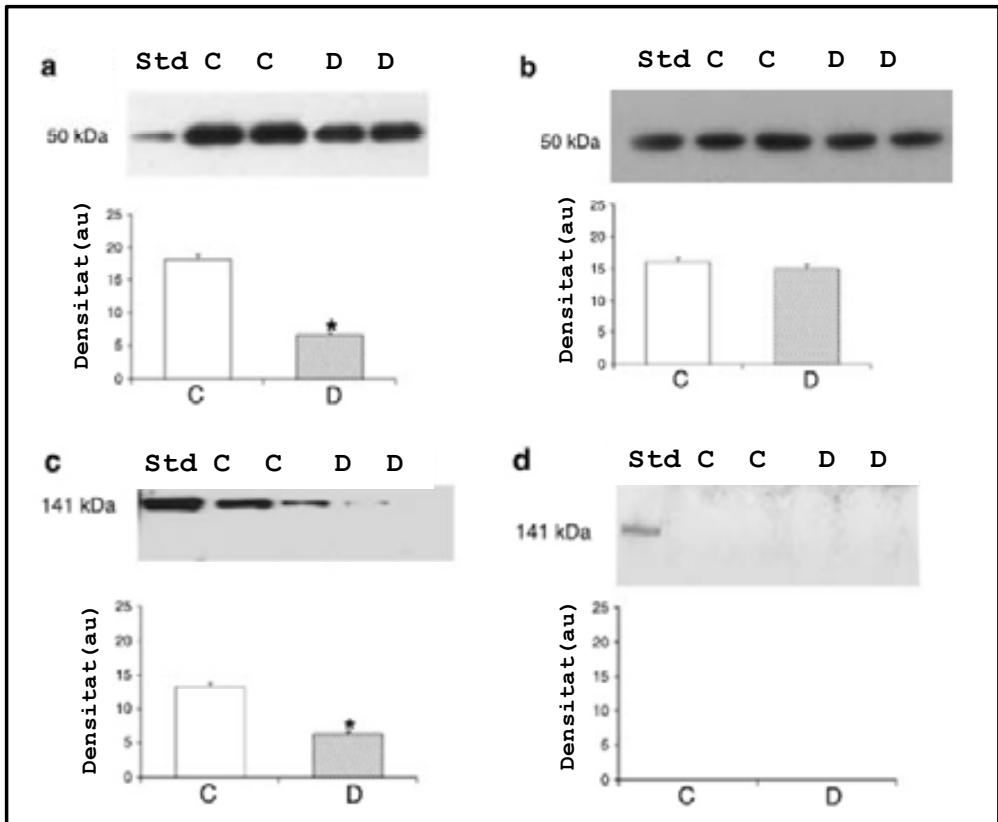


Figura C-1.11. Anàlisi *Western Blot* de vitris (a,c) i sèrums (b,d) de 2 proteïnes disminuïdes en el fluid vitri de pacients amb PDR. Els nivells de PEDF (a,b) i IRBP (c,d) es van trobar disminuïts 2.7 i 2 vegades, respectivament, en l'humor vitri de pacients amb PDR en comparació al grup control (*p <0.05). No es van observar diferències d'abundància en el sèrum. Com a controls positius, per a analitzar PEDF es va utilitzar una proteïna estàndard purificada i

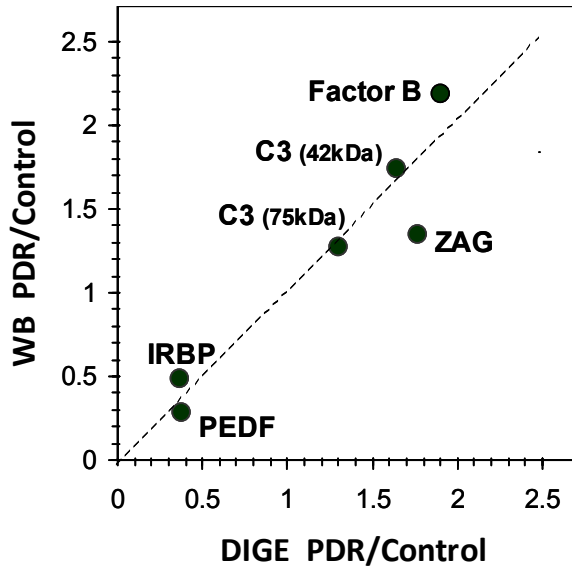


Figura C-1.12. Gràfic comparatiu de les ràtios d'abundància mesurades a partir de les anàlisis per WB i per 2D-DIGE

C-1.5.5. Validació dels resultats 2D-DIGE per RT-PCR quantitativa en temps real

Es van comparar els nivells d'expressió de mRNA entre retines diabètiques i no diabètiques corresponents a *AZGP1*, *C3*, *CFB*, *SERPINF1* i *RBP3* (els gens que codifiquen per les proteïnes ZAG, C3, Factor B, PDEF i IRBP respectivament) utilitzant 5 retines d'individus diabètics i 5 de no diabètics. Com es mostra a la figura C-1.13, a nivell de retina, l'expressió de mRNA de les proteïnes augmentades en els fluids vitris de pacients amb PDR també era més alta en les retines diabètiques que en les no diabètiques. Tot i així, la diferència només es va trobar com a estadísticament significativa per a *CFB*. Pel que fa a les proteïnes disminuïdes, els nivells de mRNA tant de *SERPINF1* com *RBP3* es van trobar disminuïts en les retines de donants diabètics respecte les de no diabètics, i la diferència era significativa per a PDEF.

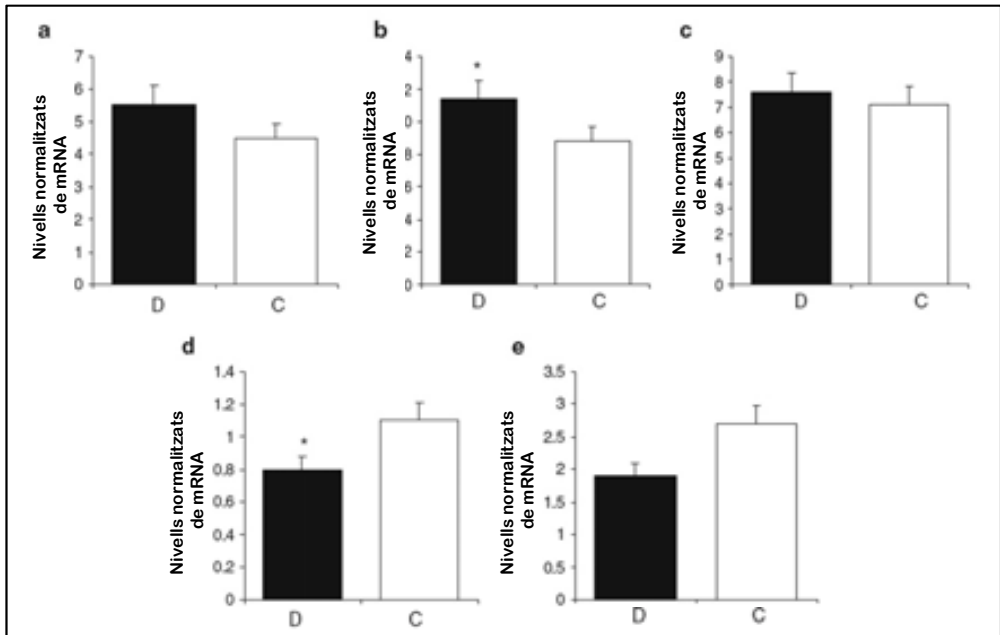


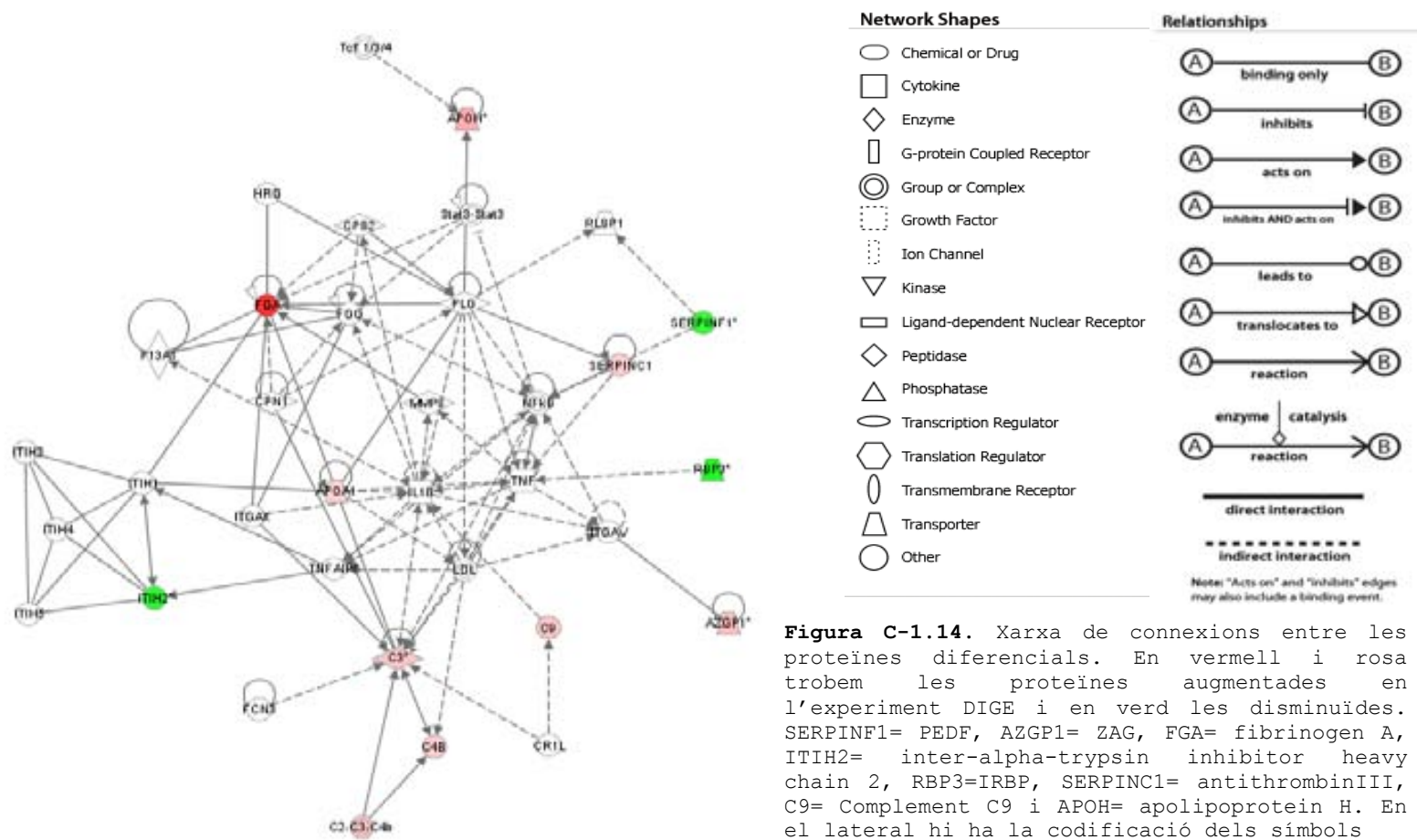
Figura C-1.13. Nivells de mRNA de AZGP1 (a), CFB (b), C3 (c), SERPINF1 (d) i RBP3 (e), com a mesura de RT-PCR en temps real en retines de donants no diabètics (C, barres blanques) i diabètics (D, barres negres). Dades d'expressió gènica ($\Delta\Delta Ct$) es mostren després de normalitzar per la β -actina. Els resultats es presenten com a mitjanes \pm SEM. * $p < 0.05$ vs el grup control (Resultats de M. García-Ramírez et al. (García-Ramírez et al. 2007))

C-1.5.6. Xarxa IPA de les proteïnes diferencials obtingudes en l'experiment 2D-DIGE

L'IPA és una eina per a identificar els mecanismes biològics, les vies i les funcions més rellevants d'un grup de dades experimentals o gens d'interès identificats en estudis proteòmics o genòmics.

La xarxa de connexions que es va obtenir per a les proteïnes amb abundàncies diferencials entre les mostres PDR i MH i identificades en l'experiment 2D-DIGE és la que es mostra en la figura C-1.14.

En la literatura hi ha diferents articles que relacionen les proteïnes de l'experiment 2D-DIGE amb d'altres que no s'han trobat en aquestes anàlisis però que estan molt relacionades amb la PDR, com per exemple, el tumor necrosis factor (TNF), la interleukine 1-beta o NF KappaB (Kawai et al. 2002), (Demircan et al. 2006), (Kern 2007), (Gustavsson et al. 2008). Aquesta anàlisi va permetre ampliar el nombre de candidats d'interès per al seu estudi posterior, més enllà dels directament identificats a l'experiment proteòmic 2D-DIGE.



C-1.6. Discussió

El vitri permet, de forma indirecte, explorar els processos que tenen lloc a la retina. Tot i això, hi ha poca informació que provingui de l'anàlisi proteòmica de les diferències quantitatives en l'abundància de les proteïnes intravitreals en els pacients amb PDR respecte els no diabètics. En aquest estudi es va optimitzar l'anàlisi proteòmica de l'humor vitri de diferents maneres. En primer lloc, es va facilitar la identificació de candidats potencials al deplecionar les dues proteïnes majoritàries (albúmina i IgGs) abans de l'electroforesi bidimensional. L'albúmina i les IgGs representen més del 80% del total de proteïna de l'humor vitri, i les seves grans taques en els gels bidimensionals emmascaren a les petites, que es corresponen amb les menys abundants, limitant-ne el seu estudi. A més, el sistema 2D-DIGE, que permet una quantificació precisa, es va fer servir per primera vegada per a analitzar mostres d'humor vitri. I els resultats es van validar per *western blot* en una tanda de mostres diferent. Per altra banda, es va evitar la utilització de mostres contaminades amb sang seleccionant els humors vitris amb nivells d'hemoglobina <5mg/mL. La diferència en els nivells de proteïna en els vitris de pacients amb PDR respecte els control es va determinar carregant la mateixa quantitat de proteïna total en els gels. Els humors vitris de pacients amb PDR van ser seleccionats amb molta cura per a minimitzar les variacions biològiques, que poguessin ser interpretades, de forma errònia, com a específiques de la malaltia. Fent servir aquesta innovadora aproximació es van identificar 11 proteïnes amb abundàncies diferencials en el fluid vitri de pacients amb PDR en comparació a individus control; vuit estaven augmentades (ZAG, ApoA1, ApoH, Fibrinogen A i diferents components dels sistema del complement com C4b, Factor B, C3 i C9) i tres disminuïdes de forma significativa (PEDF, IRBP i ITIH2). Les diferències observades en 5 d'aquestes 11

proteïnes (ZAG, C3, Factor B, PEDF i IRBP) es van analitzar i confirmar per *western blot*.

Tot i que, per *western blot*, en les mostres de sèrum no es van observar diferències entre els dos grups per a aquestes 5 proteïnes i malgrat la optimització comentada anteriorment, cal dir que l'augment de certes proteïnes en el vitri podria estar donat per la filtració de sang. Però es va trobar que les variacions en els nivells de mRNA, al comparar les retines de donants diabètics sense retinopatia clínicament detectable amb les retines control, eren coherents amb les trobades per 2D-DIGE i *western blot*. Per això, la producció a la pròpia retina, més que la difusió del sèrum per trencament dels vasos sanguinis formats per neovascularització, semblaria la raó de les diferències trobades en l'abundància de les proteïnes augmentades en els pacients diabètics. A més, aquest resultat suggereix que la producció diferencial de les 5 proteïnes candidates identificades mitjançant el sistema 2D-DIGE són un esdeveniment inicial de la retinopatia diabètica. La rellevància d'aquestes proteïnes en la patogènesis de la PDR es discuteix a continuació.

ZAG és una proteïna soluble de 41kDa identificada per Sánchez et al. (Sanchez et al. 1997) com a un factor eliminador dels lípids relacionat amb les molècules MHC de classe I. Tot i que les seves funcions biològiques no estan del tot estudiades, es creu que estaria involucrada en la regulació local de la funció del teixit adipós (Bao et al. 2005), (Bing et al. 2004), (Russell et al. 2003), (Gohda et al. 2003). ZAG també s'ha descrit, mitjançant anàlisis proteòmiques, com a factor limitant en la progressió de la PDR (Koyama et al. 2003), (Yamane et al. 2003). En aquest estudi es va confirmar aquest resultat. A més, tant la 2D-DIGE com l'anàlisi per *western blot* van indicar que la quantitat de ZAG era significativament més gran en el fluid vitri de pacients amb PDR en comparació als pacient no diabètics. No sabem perquè els nivells de ZAG

estaven incrementats en els vitris de pacients diabètics amb PDR, però cal tenir en compte que la hiperglucèmia està involucrada en la producció de ZAG (Gohda et al. 2003), i la expressió gènica de ZAG s'ha vist augmentada en ratolins amb nefropatia diabètica (Gohda et al. 2004). Evidentment, els mecanismes implicats en la producció intraocular de ZAG i el seu paper en la patogènesi de la retinopatia diabètica necessiten d'una investigació més a fons.

Diferents treballs han acumulat evidències que indiquen que els processos inflamatoris són importants en la PDR (Joussen et al. 2004), (Meleth et al. 2005), (Hernandez et al. 2005). En aquest estudi, diferents components del sistema del complement (C4b, Factor B, C3 i C9) es van trobar, per primera vegada, augmentats simultàniament en els pacients amb PDR en relació als individus control. C3 i el Factor B, així com els seus productes d'activació, es van confirmar com a incrementats en l'anàlisi per *western blot*. Tot i que l'activació del complement pot ser secundària a la inflamació, en un estudi en humans i retinopatia diabètica no proliferativa, Zhang et al (Zhang et al. 2002), van demostrar una activació inicial del complement associada amb una important i selectiva disminució dels nivells de CD55 i CD59, dos inhibidors del complement ancorats a membrana a través d'un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Aquests autors també mostren que C1q i C4, únics components de la via clàssica del complement, no van ser detectats en les retines diabètiques, fet que suggereix que la via alternativa és el mecanisme principal de l'activació del complement en estadis inicials de la retinopatia diabètica. En aquest estudi, a part del Factor B, component específic de la via alternativa d'activació, es van detectar alts nivells de C4 intravitri en individus amb PDR. Així doncs, la via clàssica d'activació també sembla estar implicada en estadis avançats de la PDR. De fet, el C4 intravitri s'ha trobat incrementat en pacients amb retinopatia

víttria proliferativa no diabètica (Grisanti et al. 1991). L'activació de la cascada del complement pot compondre i iniciar trombosi, leucostasi i apoptosi. Tots aquests processos estan involucrats en lesions vasculars de la retinopatia diabètica. També és interessant que en rates diabètiques s'ha vist que la inhibició de l'aldosa reductasa evita l'activació del complement en la paret de les venes de la retina i disminueix els nivells d'inhibidors del complement (Dagher et al. 2004). Així doncs, ja que la via del complement es pot manipular específicament de diferents maneres, pot representar una possible aproximació terapèutica en la retinopatia diabètica.

La proteïna PEDF és secretada principalment per les cèl·lules epitelials del pigment retinal, així com per altres teixits (Barnstable and Tombran-Tink 2004). Apart de les seves propietats neurotròfiques i neuroprotectores cada vegada hi ha més evidències que suggereixen que el PEDF és un dels inhibidors naturals més importants de l'angiogènesis, per això, el PEDF és el factor principal de l'activitat anti-angiogènica de l'humor vitri, on s'hi troba en quantitats abundants (Barnstable and Tombran-Tink 2004), (Dawson et al. 1999). La importància de la proteïna PEDF en les malalties neovasculares humanes es coneix gràcies a diferents estudis que mostren que la disminució dels nivells d'aquesta proteïna en el vitri estan associats amb la PDR (Spranger et al. 2001), (Ogata et al. 2001b). En aquest estudi es va confirmar una deficiència de PEDF en l'humor vitri de pacients amb PDR mitjançant anàlisis proteòmiques i *western blot*. Cal tenir en compte, que l'augment del PEDF en les cèl·lules epitelials proliferants del pigment retinal pot ser, en part, el responsable de l'èxit de la fotocoagulació en la reducció de la neovascularització (Ogata et al. 2001a). Per això, podria ser un dels candidats clars en el tractament de la PDR.

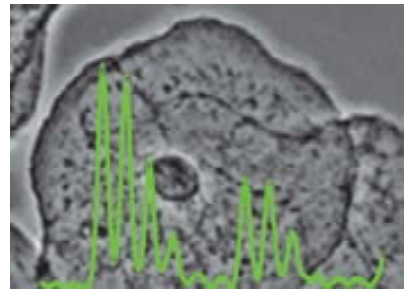
La IRBP és una glicoproteïna (140kDa) que constitueix el 70% de proteïna de la matriu de l'interfotoreceptor, i té una expressió restringida a aquest tipus de teixit (Chader 1989). IRBP té un paper important en el cicle visual (Liou et al. 1982), (Pepperberg et al. 1993). Per això els baixos nivells trobats en els pacients amb PDR podrien estar involucrats amb el deteriorament de la visió d'aquests pacients. La rellevància d'IRBP en la patogènesi de la PDR necessita de més estudi.

Existeixen dues limitacions en aquest estudi. El primer té a veure amb les limitacions intrínseques de la 2-DE en l'anàlisi de mostres complexes. Proteïnes amb masses moleculars molt altes o molt baixes són descartades de l'anàlisi pel propi procés d'electroforesi. Per això, inclús després de deplecionar les proteïnes abundants, tant la detecció en la 2-DE com la identificació per MS estan limitades per l'abundància de les proteïnes en la barreja, de la qual els components en menor quantitat escaparan sempre a l'anàlisi. Per això proteïnes candidates involucrades en la retinopatia diabètica que es troben a nivell de picograms per mL, com el VEGF, no poden ser identificades. La segona limitació és el reduït nombre de mostres que es van incloure en l'estudi, donat per la rigorosa selecció que es va fer. Això, però, va minimitzar la dispersió de les dades en cada grup. Les diferències observades per 2D-DIGE van ser validades per *western blot* amb una bona correlació quantitativa entre les dues tècniques. Així, tot i que en un grup de mostres més gran potser s'haguessin trobat altres proteïnes diferencials les presentades en aquest estudi també hi haguessin sigut.

C-1.7. Conclusions

- El sistema 2D-DIGE va permetre, per primera vegada, una comparació quantitativa de mostres d'humor vitri.
- El sistema 2D-DIGE va proporcionar la identificació de noves proteïnes candidates potencialment implicades en el desenvolupament de la PDR.
- La validació d'aquestes proteïnes per WB i RT-PCR va corroborar les dades quantitatives obtingudes amb el sistema 2D-DIGE.
- Serien necessaris estudis addicionals per a determinar el paper de les proteïnes candidates en la patogènesi de la PDR i el seu potencial com a dianes terapèutiques.

CAPÍTOL 2: EFECTE D'AIRE EN EL PROTEOMA CEL·LULAR



C-2.1. Resum

En aquest treball es va estudiar l'efecte del gen REgulador AutoImmune (AIRE) mitjançant la comparació dels proteomes de cèl·lules epitelials tiroïdals HT93 transfectades (HT93-AIRE) o no (HT93) amb AIRE. L'anàlisi comparativa es va realitzar utilitzant una estratègia conservadora que va combinar dues tècniques de proteòmica quantitativa: la 2D-DIGE i l'ICPL. Els resultats van mostrar un nivell incrementat de varies xaperones (*Heat shock 70kDa protein (HSP70)*, *Heat shock cognate 71kDa (HSC70)*, *Heat shock protein beta-1 (HSP27)* i *tubulin-specific chaperone A*) en les cèl·lules que expressaven AIRE, mentre que diferents proteïnes de interacció del citoesquelet (*Transgelin*, *Caldesmon*, *Tropomyosin Alpha-1 chain*, *Myosin regulatory light polypeptide 9* i *Myosin-9*) es van trobar disminuïdes. A més, algunes proteïnes relacionades amb apoptosi tenien abundàncies diferencials entre unes cèl·lules i les altres. Aquest resultat es van confirmar per *western blot* i citometria de flux. Finalment, assajos d'apoptosi amb annexin V i etopòsid van demostrar que les cèl·lules positives en AIRE patien més apoptosi espontània i eren menys resistents a la inducció d'apoptosi. Els resultats obtinguts van corroborar el paper d'AIRE com a inductor d'apoptosi.

C-2.2. Introducció

C-2.2.1. El gen **REGulador AutoImmune (AIRE)**

La Síndrome Poliendocrina Autoimmune de tipus 1 (APS1; OMIM 240300) també anomenada APECED (Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy) és una malaltia autoimmune autosòmica recessiva que afecta a molts teixits endocrins provocant candidiasis crònica i desordres ectodèrmics (Peterson and Peltonen 2005), (Vogel et al. 2002). De fet, l'APECED es caracteritza per almenys dos d'aquests tres trets clínics: hipoparatiroidisme, candidiasis i insuficiència suprarenal. La prevalença de l'APECED és baixa, essent més freqüent en poblacions com els jueus iranians (1:9000) (Zlotogora and Shapiro 1992), els sards (1:14400), i els finlandesos (1:25000) (Peterson and Peltonen 2005), (Vogel et al. 2002), (Aaltonen et al. 1994). Normalment, les malalties autoimmunes són síndromes complexes en les que hi participen factors genètics i ambientals que produeixen una pèrdua de tolerància als antigens propis. L'APECED està associada amb la pèrdua de la funció d'un únic gen identificat al 1997 com a AIRE (Consortium Finnish-German APECED 1997), (Nagamine et al. 1997). El gen es troba en la regió del cromosoma 21q22.3, i codifica una proteïna de 55kDa. En la passada dècada es van dedicar molts esforços per a elucidar l'estructura i funció d'AIRE, així com el seu paper en la autoimmunitat (Liiv et al. 2008), (Mathis and Benoist 2009).

AIRE conté diferents dominis estructurals, trobats en alguns reguladors transcripcionals i proteïnes que enllacen cromatina, un domini de reclutament de caspases (CARD), també referit com a regió tenyida homogèniament (HSR), un senyal de localització nuclear (NLS), un domini SAND (Sp100, AIRE, NucP41/75 i DEAF-1), dos homeodominis planta (PHD), una regió rica en prolines (PRR) i quatre seqüències LXXLL (Figura C-2.1). Els dominis CARD estan relacionats amb la dimerització de diferents proteïnes implicades en l'apoptosi o la

inflamació (Park et al. 2007), i poden ser els dominis responsables de l'oligomerització d'AIRE (Ramsey et al. 2002), (Pitkanen et al. 2001). Els dominis SAND estan presents en diferents modificadors transcripcionals que s'associen al DNA, tot i que l'especificitat del domini SAND d'AIRE encara és incerta. Les molècules que contenen PHD formen una família de proteïnes zinc-finger que inclouen proteïnes que enllacen el DNA. Els dominis PHD també estan implicats en les interaccions proteïna-proteïna (Bienz 2006) i en les interaccions amb histones metilades o no-metilades (Adams-Cioaba and Min 2009), (Mellor 2006). El PHD1 d'AIRE interacciona amb la histona H3K4 no-metilada (Org et al. 2008). Els LXXLL són motius d'interacció proteïna-proteïna i poden actuar com a motius que enllacen el receptor nuclear. Les proteïnes que interaccionen amb els LXXLL d'AIRE encara no s'han identificat. Fins ara, es coneixen, a tot el món, més de 60 mutacions diferents al llarg de la seqüència d'AIRE relacionades amb APECED, la majoria d'elles localitzades en els dominis CARD/HSR i PHD1.

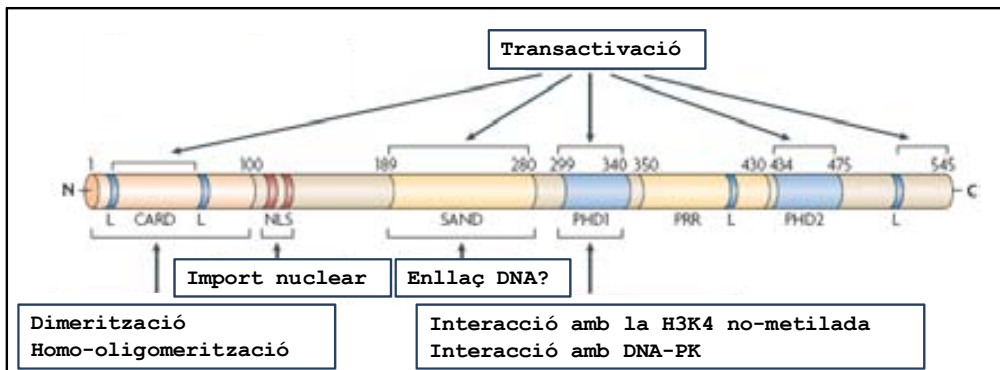


Figura C-2.1. Dominis, elements funcionals i funcions conegudes d'AIRE (Peterson et al. 2008)

AIRE s'expressa en el teixits limfoides, majoritàriament en el timus, tot i que es sap que també s'expressa en els nòduls limfàtics, la melsa i el fetge fetal (Heino et al. 1999). El

timus és el principal òrgan limfoide on maduren els timòcits i on es genera el repertori de les cèl·lules T immunocompetents. Per a ser eficient contra els patògens i per a evitar la pròpia reactivitat, el grup de cèl·lules T madures que surten del timus ha de mostrar un gran número d'especificitats diferents i no reaccionar amb les proteïnes pròpies. Per a generar aquest repertori és necessari que els timòcits passin per un extens procés de selecció, que inclou una selecció positiva, en la que principalment participa la interacció amb les cèl·lules epitelials tímiques corticals (cTECs), i una negativa, en la que participen les cèl·lules epitelials tímiques medul·lars (mTECs) i les cèl·lules dendrítiques (DCs). En el timus, AIRE és específicament expressada per les mTECs i en menys proporció per les DCs.

Per a aconseguir una tolerància central eficient, els pèptids mostrats per les cèl·lules presentadores cal que siguin una representació del proteoma que les cèl·lules T veuran en la perifèria incloent els antigens restringits a teixit (TRAs). Durant molts anys, l'expressió tímica dels TRAs no ha sigut clara, i la tolerància als TRAs havia estat assignada a mecanismes perifèrics de tolerància. Però, en els últims anys, la transcripció dels TRAs ha sigut completament demostrada en el timus. El paper d'AIRE en la tolerància central i la prevenció de l'autoimmunitat ha estat demostrada en models animals (Liston et al. 2003), (Gavanescu et al. 2007), (Kuroda et al. 2005), (Hou et al. 2009), (Misharin et al. 2009). Específicament, la pèrdua de la funció d'AIRE en els ratolins noquejats (KO) dóna com a resultat la presència de cèl·lules T reactives pròpies a diferents TRAs en la perifèria, les quals escapen de la selecció negativa en el timus. Experiments amb *arrays* de RNA, comparant l'expressió gènica en mTECs de ratolins KO versus ratolins *wild-type*, han demostrat que AIRE promou l'anomenada "expressió gènica promiscua" de diferents TRAs en aquestes cèl·lules (Anderson et al. 2002), (Derbinski

et al. 2005), indicant que AIRE regula l'expressió de molts TRAs. Es pot considerar doncs, que les mTECS reflecteixen l'expressió gènica perifèrica, tal i com es demostra en estudis en els que utilitzen diferents models animals (Anderson et al. 2002), (Kont et al. 2008) i teixits humans (Gotter et al. 2004). Articles recents han mostrat que AIRE afecta a la transcripció gènica en altres tipus de cèl·lules, modificant l'expressió d'un grup de gens parcialment solapats amb els expressats per les mTECS (Guerau-de-Arellano et al. 2008).

El paper d'AIRE com a regulador transcripcional és acceptat plenament, però, els mecanismes involucrats en la seva funció encara són desconeguts. A més, s'han proposat altres funcions per a AIRE. S'ha mostrat que AIRE interacciona amb DNA-PK, Ku70 i Ku80, totes involucrades en la maquinaria de reparació del DNA (Liiv et al. 2008). A més, s'ha reportat una activitat ubiquitina E3 ligasa per al domini PHD1 (Uchida et al. 2004), però no es va confirmar quan l'estructura d'aquest domini es va resoldre per ressonància magnètica nuclear (NMR) (Bottomley et al. 2005). També s'ha descrit, que Aire indueix l'apoptosi de les mTECs (Gray et al. 2007), el que podria afavorir la presentació-creuada dels TRAs per les DCs després de la fagocitosi de les cèl·lules AIRE⁺ apoptòtiques. Durant l'apoptosi, tenen lloc esdeveniments bioquímics i canvis morfològics específics que impliquen la reorganització del citoesquelet i la sobreexpressió de xaperones d'estrès.

L'efecte transcripcional d'AIRE en l'expressió gènica pot tenir lloc en diferents teixits i cèl·lules (Gardner et al. 2009). Fins ara, però, no s'ha estudiat com les modificacions transcripcionals mediades per AIRE afecten a la composició dels proteomes cel·lulars.

C-2.3. Objectius

- Comparació quantitativa mitjançant els sistemes 2D-DIGE i ICPL de cèl·lules epitelials tiroïdals transfectades i no transfectades amb AIRE.
- Identificació dels canvis mediats per la transcripció d'AIRE en el proteoma cel·lular de HT93.

C-2.4. Material i Mètodes

C-2.4.1. Línees cel·lulars i anticossos

Les línees cel·lulars que es van utilitzar van ser: HT93, que és una línea cel·lular epitelial de la tiroide transformada per infecció amb SV40 (Belfiore et al. 1991), i SK-Hep-1, que és una línea cel·lular derivada d'un carcinoma hepatocel·lular (Fogh and Trempe 1975) obtinguda de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Les cèl·lules es van créixer, en medi modificat *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D-MEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) i 200mM de L-glutamina (Invitrogen), en flascons de cultiu de 75 o 175cm² (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) a 37°C en 5% de CO₂.

Els anticossos primaris que es van utilitzar van ser: *anti-AIRE mAb 6.1* (Heino et al. 1999), *anti-caldesmon mAb* (Chemicon, Hampshire, U.K.) i *anti-HSP70 mAb* (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Els anticossos secundaris eren anti-IgG de ratolí marcat amb Alexa 488 (Invitrogen) i anti-IgG de ratolí marcat amb HRP (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), ambdós de cabra.

C-2.4.2. Transfecció de HT93 i SK-Hep-1

El gen AIRE es va clonar en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Les cèl·lules es van transfectar com es descriu a l'article d'Álvarez et al. (Alvarez et al. 2001). Aproximadament 5x10⁶ de cèl·lules es van tripsinitzar i rentar dues vegades amb PBS. Les cèl·lules es van resuspendre en 800µL de PBS, i després d'afegir 10µg de DNA, es van electroporar en una cubeta amb un espai de 4mm (BTX, Holliston, MA) a 960µF, 250V, 24Ω. A continuació, les cèl·lules es van incubar en gel durant 10min i es van dipositar en un flascó de 75cm². Llavors, les cèl·lules es van incubar a 37°C durant 24h, i després es va afegir 1mg/mL de G418. L'expressió d'AIRE en les cèl·lules resistents a G418 es va testar per citometria de flux i

immunofluorescència. Un control negatiu transfectat es va obtenir amb el pcDNA3.1 sol i utilitzant les mateixes condicions.

C-2.4.3. Anàlisi per citometria de flux

Aproximadament 5×10^5 cèl·lules es van rentar en tampó de tinció (SB: PBS amb 2% de FBS i 0.5% de *Triton X-100*), i es van incubar amb l'anticòs *anti-AIRE* mAb 6.1 (1 μ g/mL) en SB a temperatura ambient durant una hora. Les cèl·lules es van rentar un parell de vegades amb SB i es van incubar 1h amb l'anticòs de cabra anti-IgG de ratolí marcat amb Alexa 488 a temperatura ambient. Tot seguit, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb SB, es van resuspendre en 400 μ L de PBS i es van analitzar en un citometre de flux FACSCalibur (BD Biosciences-Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

C-2.4.4. Immunofluorescència

Aproximadament 5×10^4 cèl·lules es van dipositar en una placa de 24 pous, en els quals, prèviament s'havien col·locat cobreobjectes. Les cèl·lules es van incubar a 37°C durant 24h. Després es van rentar tres vegades, es van fixar amb 3.7% de formaldehid durant 20min a temperatura ambient, es van rentar tres cops més amb PBS i es van tenyir immediatament o es van guardar a 4°C en PBS per al seu posterior processat. Per a la tinció, les cèl·lules adherides als cobreobjectes es van permeabilitzar en SB durant 5min. Després, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs *anti-AIRE* mAb 6.1 (1 μ g/mL) en SB a temperatura ambient durant 45min. Els portaobjectes es van rentar amb PBS, i es van incubar amb SB durant 5min i després 45min amb l'anticòs secundari en SB. Les cèl·lules es van rentar en PBS, es van muntar en portaobjectes fent servir Fluomont (Dako Industries, Carpenteria, CA) i es van analitzar per microscòpia d'epifluorescència.

C-2.4.5. Pèl·let de cèl·lules

Les cèl·lules es van fer créixer fins a obtenir un 80% de confluència i llavors es van tripsinitzar, es van rentar tres vegades amb 20mM Tris/HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, es van comptar, es van fer pèl·lets de 1×10^7 de cèl·lules i es van congelar directament en nitrogen líquid (Alvarez et al. 2008). El pèl·lets secs es van mantenir en nitrogen líquid fins al moment de ser processats.

C-2.4.6. 2D-DIGE

Tres pèl·lets secs de HT93 i tres de HT93-AIRE que contenien 1×10^7 de cèl·lules es van llisar utilitzant el tampó de lisi DIGE (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS (p/v), 30mM Tris, pH 8.5). Els llisats es van sonicar tres vegades durant 10s amb pauses de 30s en gel. Els extractes cel·lulars es van centrifugar durant 10min a 13000g. Es van recollir els sobrenedants i se'n va determinar la concentració de proteïna amb el *kit RCDC Protein Assay* (Bio-Rad).

Per a generar l'estàndard intern es van barrejar 25µg de cada una de les 6 mostres de l'anàlisi, un total de 150µg, que es van marcar amb el fluorocrom Cy2. Cinquanta micrograms d'una mostra control i dues mostres transfectades amb AIRE es van marcar amb el Cy3 i 50µg de la resta de mostres es van marcar amb el Cy5 (Taula C-2.1). El marcatge amb els fluorocroms es va fer seguint el protocol descrit a l'apartat C-1.4.3.1 del capítol 1 (pàgina 103). En acabat, les mostres es van combinar segons el disseny experimental de la taula C-2.1.

La resta del procés de la 2D-DIGE es va realitzar tal i com es descriu de l'apartat C-1.4.3.2 al C-1.4.3.7 del capítol 1 (pàgines 103-106). Es van utilitzar tires de 24cm amb gradient de pH immobilitzat 3-10 lineal i gels polimeritzats al 12.5%. Els gels es van escanejar i es van tenyir amb la tinció fluorescent Flamingo. En l'anàlisi d'imatge els grups creats per a fer l'estadística de les taques van ser el HT93 i el

CAPÍTOL 2: EFECTE D'AIRE EN EL PROTEOMA CEL·LULAR

HT93-AIRE. Aquesta anàlisi va donar com a resultat una sèrie de taques d'interès que es van retallar dels gels i es van digerir amb tripsina tal i com es descriu a l'apartat C-1.4.4 (Capítol 1, pàgina 107).

Taula C-2.1. Disseny de l'experiment 2D-DIGE

Gel	Cy3	Cy5	estàndard intern Cy2
1	50µg HT93-AIRE 1	50µg HT93 2	50µg (8.33µg de cada una) HT93-AIRE 1/2/3 + HT93 1/2/3
2	50µg HT93-AIRE 2	50µg HT93 3	50µg (8.33µg de cada una) HT93-AIRE 1/2/3 + HT93 1/2/3
3	50µg HT93 1	50µg HT93-AIRE 3	50µg (8.33µg de cada una) HT93-AIRE 1/2/3 + HT93 1/2/3

C-2.4.7. Marcatge isotòpic ICPL

De les tres mostres HT93 i les tres HT93-AIRE, utilitzades en l'experiment 2D-DIGE, se'n van fer dos pools. Cada una de les barreges es va marcar amb el kit Serva ICPL. El marcatge es va fer utilitzant els reactius i el protocol recomanats pel fabricant.

Marcatge

Cent micrograms de cada una de les mostres es van reduir amb TCEP durant 30min a 60°C. A continuació es van alquilar amb IAA durant 30min a temperatura ambient i fosc i la reacció es va aturar amb N-acetil-L-cisteïna (NAC) incubant 15min a temperatura ambient. Després de la carbamidometilació, la barreja de les mostres HT93 es va marcar amb la versió lleugera (¹²C, L) del marcatge isotòpic ICPL i la barreja de mostres HT93-AIRE es va marcar amb la versió pesada (¹³C, H) del marcatge ICPL durant 2h a temperatura ambient. Per aturar el marcatge es va afegir hidroxilamina i es van deixar incubar durant 20min. També es va fer el marcatge invers, on 100µg de les mostres HT93 es van marcar amb la versió H del ICPL i

100µg de les mostres HT93-AIRE es van marcar amb la versió L. Les parelles de mostres HT93-HT93-AIRE inversament marcades es van barrejar, el pH es va ajustar a 11-12 afegint 2µL de 2N NaOH i després de 20min, les mostres es van neutralitzar amb 2µL 2N HCl.

SDS-PAGE

Les mostres es van precipitar mitjançant el 2-D *Clean-Up Kit* (GE Healthcare) i es van dissoldre en tampó de càrrega (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (p/v), 0.1% blau de bromofenol (p/v), 10% glicerol (v/v), 5% β-mercaptoetanol (v/v)). Les proteïnes es van separar en un gel monodimensional de SDS-PAGE al 12.5% (apartat C-1.4.3.4, Capítol 1, pàgina 104).

Tinció

El gel es va tenyir amb *Coomassie Colloidal*, inicialment es va fixar amb 45% metanol (v/v), 1% àcid acètic (v/v) durant 1h a temperatura ambient, retirada aquesta solució es va afegir la solució de tinció 17% sulfat amònic (p/v), 0.1% Coomassie G250 (p/v), 34% metanol (v/v), 0.5% àcid acètic (v/v) durant tota la nit a temperatura ambient. Finalment, es va retirar la solució de tinció i els gels es van rentar amb aigua fins a destenyir el fons.

Digestió

Cada carril del gel es va retallar en 20 bandes horitzontals. A cada banda es va afegir 100µL de 50mM AB durant 20min a temperatura ambient. Es va retirar aquesta solució i es van afegir 100µL de 50mM AB, 50% ACN (v/v) durant 20min a temperatura ambient. Aquest pas es va repetir. A continuació, havent retirat la solució anterior, es van afegir 200µL de 100% ACN durant 10min a temperatura ambient. Es va retirar la solució utilitzant una bomba de buit per a deixar les bandes ben seques, i es van cobrir les bandes amb tripsina (Promega, Madison, WI) a 2.6µg/µL en 25mM AB. Les bandes es van digerir durant tota la nit a 30°C. Passades unes 16 hores els pèptids es van extreure afegint 200µL de 0.2% TFA, 5% ACN (v/v) i

incubant 30min a temperatura ambient. L'extracte es va evaporar a sequedat i es va resuspendre en 20µL de 0.1% àcid fòrmic (FA) (v/v).

C-2.4.8. Identificació de les proteïnes per MS

C-2.4.8.1. Identificació de les proteïnes de les taques de l'experiment 2D-DIGE

PMF

Els digerits triptics de les taques retallades del gel 2D-DIGE es van analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF utilitzant l'instrument Ultraflex TOF-TOF (Bruker, Bremen, Alemanya) tal i com es descriu a l'apartat C-1.4.5 (Capítol 1, pàgina 107). Els espectres de masses es van processar amb el software *Flex Analysis 3.0* (Bruker) i es va utilitzar la versió 2.2 del motor de cerca MASCOT (Matrix Science Ltd., London, Regne Unit) per a buscar en la base de dades *SwissProt 57.0*, limitant la taxonomia a proteïnes humanes (20403 seqüències). Per a assignar una identificació com a bona el criteri va ser que la puntuació MASCOT fos significativa (puntuació >55, $p < 0.05$).

MS/MS

De forma alternativa, algunes de les taques, al no ser identificades per PMF es van identificar per espectrometria de masses MS/MS en una trampa d'ions Esquire HCT (Bruker) acoplada a un sistema nanoLC (Ultimate, LcPackings, Holanda). Inicialment, els digerits es van concentrar en una precolumna *PepMap nano* de 1mm de llargada i 300µm de diàmetre intern (ID) i després es van carregar en una columna *PepMap* de 15cm i 75µm ID (LC Packings). Els pèptids es van eluir amb un gradient d'ACN (Gradient: 0-60% de B en 22min, B= 80% ACN, 0.1% FA (v/v) en aigua a un flux de 300nL/min) a través d'una agulla *PicoTip* (New Objective, Woburn, MA) fins a la font nESI de la trampa d'ions. Els dos pics més intensos de cada escaneig de

MS (310-1500 m/z) es van fragmentar per MS/MS adquirint les masses entre 100 i 2800 m/z i utilitzant una exclusió dinàmica per a la selecció del precursor de 1.2min. L'amplitud de fragmentació MS/MS es va optimitzar de forma automàtica començant des de 0.6V. La identificació de les proteïnes es va fer utilitzant el Protein Scape 2.1 (Bruker) i el motor de cerca MASCOT. La base de dades i els paràmetres de cerca utilitzats van ser els mateixos que en les identificacions per PMF però utilitzant com a error del precursor 1.5Da i dels fragments de 0.5Da. Per a assignar les identificacions com a bones es va mirar que la puntuació MASCOT de l'espectre de fragmentació MS/MS del pèptid fos superior a la puntuació per homologia.

C-2.4.8.2. Identificació i quantificació de les proteïnes de les bandes ICPL

Els digerits triptics de les bandes ICPL es van analitzar per MS/MS tal i com es descriu en l'apartat anterior. Però a diferència de les taques, per a analitzar les bandes es va fer servir un gradient de 120 min.

La identificació i quantificació de les proteïnes es va fer processant les dades adquirides amb el Protein Scape 2.1 i el WARPLC 1.2 (Bruker), una plataforma de softwares que integren el processat de dades de LC-MS, la identificació de les proteïnes mitjançant la cerca en les bases de dades dels espectres de MS/MS i la quantificació basada en els EIC dels precursors. Les proteïnes es van identificar utilitzant el motor de cerca MASCOT i la base de dades SwissProt 57.0. Els espectres MS/MS es van buscar amb una tolerància de massa de 1.5Da pel precursor i 0.5Da pels fragments. Els paràmetres de cerca van ser els següents: talls de tripsina amb com a màxim 1 punt de tall no digerit, carbamidometilació de les proteïnes com a modificació fixa i oxidació de les metionines i marcatge ICPL de les lisines i els N-terminal de les proteïnes com a

modificació variable. El criteri per a assignar les identificacions com a positives va ser que la puntuació individual MASCOT dels espectres MS/MS dels pèptids fos més gran que la corresponent puntuació per homologia. El *False Discovery Rate* (FDR) per a les identificacions MASCOT es va mesurar fent una cerca en una base de dades aleatòria (Elias and Gygi 2007) i es va estimar com a inferior al 4%. Per a quantificar les ràtios HT93-AIRE/HT93 de les proteïnes es va calcular la mitja de les ràtios HT93-AIRE/HT93 dels pèptids identificats per a cada proteïna. Els casos on el coeficient de variació (CV) dels pèptids mitjanats era superior al 30% la quantificació es va revisar i corregir manualment. Les ràtios es van normalitzar centrant la mitjana de la distribució a 1, assumint que la majoria de proteïnes no varien.

C-2.4.9. Anàlisi amb el software IPA

Per a l'anàlisi IPA es va carregar al software una llista amb les proteïnes diferencials seleccionades, el seu codi d'accés a la base de dades *SwissProt* i les seves ràtios d'abundància. Aquest software va crear, automàticament i utilitzant dades bibliogràfiques, una xarxa que mostra les interaccions funcionals entre les proteïnes de la llista o d'altres que les connecten entre elles.

C-2.4.10. Anàlisi per western blot

Els experiments de *western blot* es van fer tal i com es descriu en l'article de Marcilla et al. (Marcilla et al. 2007).

Vint micrograms d'extractes proteics de HT93 i HT93-AIRE es van separar en un gel de SDS-PAGE monodimensional al 12.5% (apartat C-1.4.3.4, Capítol 1, pàgina 104). Les proteïnes separades es van sotmetre a una transferència electroforètica semiseca utilitzant membranes de nitrocel·lulosa a 0.8 mA/cm² durant 1h. Les membranes es van bloquejar durant 30min en T-

PBS (PBS amb 0.1% Tween) amb 5% llet desnatada, i després es van incubar amb els corresponents anticossos durant 2h a temperatura ambient. A continuació, les membranes es van rentar tres vegades amb T-PBS i es van incubar durant 1h amb un anticòs de cabra anti-IgG de ratolí marcat amb HRP a una dilució 1:5000. Les proteïnes específiques es van detectar mitjançant ECL (Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd., Ashrat, Israel).

C-2.4.11. Assajos d'apoptosi

Per a l'anàlisi de les cèl·lules apoptòtiques, 2×10^5 cèl·lules HT93 i HT93-AIRE es van sembrar en plaques de 60mm i 1.5×10^5 cèl·lules es van tenyir amb 5µL d'Annexin V-PE i 5µL de 7-AAD (7-aminoactinomicina) després de 24, 48 i 72h, tal i com descriu el protocol del fabricant de l'*Annexin V-PE Apoptosis Detection kit I* (BD Pharmingen). El percentatge de cèl·lules apoptòtiques primerenques (positives per a Annexin V-PE) o tardanes (positives per a 7-AAD) es van mesurar per citometria de flux (FACSCalibur, BD Biosciences) i es van analitzar amb el software *FlowJo7*. Per a estimar l'efecte de l'apoptosi induïda, a les 43h es va afegir etopòsid (100nM) als cultius cel·lulars i es va incubar 5h abans de recollir les cèl·lules. També es van analitzar per citometria de flux i les cèl·lules necròtiques van ser excloses de l'anàlisi.

C-2.5. Resultats

C-2.5.1. Obtenció de les cèl·lules transfectades HT93-AIRE

La línia cel·lular humana HT93 es va transfectar amb el cDNA humà d'AIRE clonat en el vector pcDNA3.1. Aproximadament un 70% de les cèl·lules expressaven AIRE tal i com es va confirmar mitjançant citometria de flux intracel·lular i microscòpia de immunofluorescència (Figura C-2.2, A i C). En les cèl·lules HT93 no transfectades no es va detectar l'expressió d'AIRE (Figura C-2.2, A i B).

Tal i com està descrit en la bibliografia, AIRE es va detectar de forma predominant en el nucli, ja sigui amb una expressió nuclear difusa (Figura C-2.2, D) o concentrada en forma de punts (Figura C-2.2, E). Tot i que les cèl·lules mostraven una tinció citoplasmàtica filamentosa, es van veure tant els perfils nuclears com els citoplasmàtics (Figura C-2.2, F) (Heino et al. 1999), (Bjorses et al. 1999), (Rinderle et al. 1999). Es va obtenir la mateixa distribució per a la línia cel·lular de carcinoma hepatocel·lular SK-Hep-1 transfectada amb AIRE.

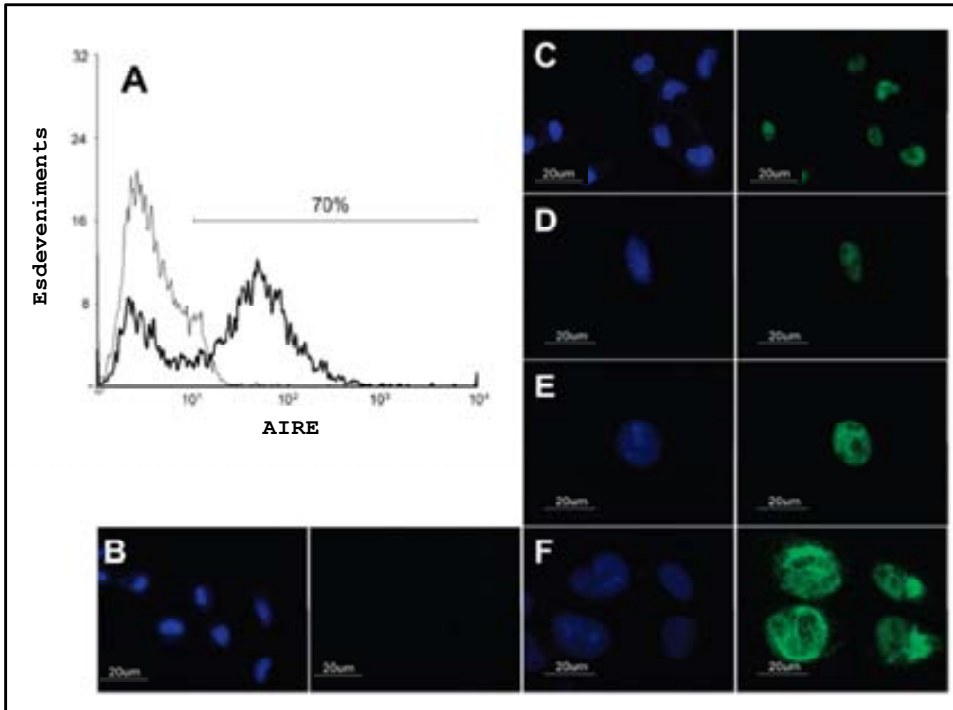


Figura C-2.2. Caracterització de la transfecció de les cèl·lules HT93 amb AIRE. A) Anàlisi per citometria de flux de l'expressió d'AIRE en HT93 (línea gris) i HT93-AIRE (línea negra). Les cèl·lules es van fixar, permeabilitzar i tenyir amb mAb 6.1 específic d'AIRE seguit de l'anticòs de cabra anti-IgG de ratolí marcat amb Alexa 488. (B-F) Anàlisi d'immunofluorescència de l'expressió d'AIRE. Després de 24h d'incubació a 37°C, les cèl·lules i els cobreobjectes es van fixar, permeabilitzar i incubar amb mAb 6.1 específic d'AIRE seguit de l'anticòs de cabra anti-IgG de ratolí marcat amb Alexa 488. AIRE no es va poder detectar en les cèl·lules HT93 (B), i dins les cèl·lules HT93-AIRE es va trobar localitzada a diferents estructures (C-F). Imatges de l'esquerra, tinció DAPI; imatges de la dreta, tinció 6.1

C-2.5.2. Anàlisi proteòmic de les cèl·lules HT93 i HT93-AIRE

Es van utilitzar dues tècniques proteòmiques per a estudiar els canvis induïts en el proteoma cel·lular quan s'expressava AIRE: 2D-DIGE i ICPL.

2D-DIGE

En primer lloc, les mostres es van analitzar en un experiment 2D-DIGE de tres gels. Per a evitar desviacions en els resultats degudes al marcatge de les proteïnes es va fer un marcatge creuat de les mostres per a que fossin marcades tant amb el fluorocrom Cy3 com el Cy5 (Taula C-2.1). L'estàndard intern, format per una barreja de la mateixa quantitat de cada una de les mostres de l'experiment, es va marcar amb el fluorocrom Cy2. En cada gel bidimensional es van separar, per IEF i SDS-PAGE, dues mostres i un estàndard intern. A partir de les imatges fluorescents de cada un dels gels es van analitzar els canvis d'intensitat de cada una de les taques, i se'n va fer una anàlisi estadística. Mitjançant l'experiment 2D-DIGE es van trobar 85 taques amb canvis d'abundància significatius ($p < 0.01$, t-test), majors de 1.5 vegades, entre les mostres HT93 i HT93-AIRE. Quaranta-tres d'aquestes taques estaven augmentades i 42 disminuïdes en les cèl·lules transfectades amb AIRE respecte les no transfectades (Figura C-2.3, A). A la figura C-2.3 B es mostra, com a exemple, una taca amb una intensitat més gran a les cèl·lules transfectades, mentre que, a la figura C-2.3 C es mostra una disminució. De les 85 taques diferencials 57 es van poder identificar per PMF, 23 de les quals es trobaven augmentades i 34 disminuïdes en les cèl·lules que expressaven AIRE (Arxiu excel Llista_Prot_DIGE del CD annex).

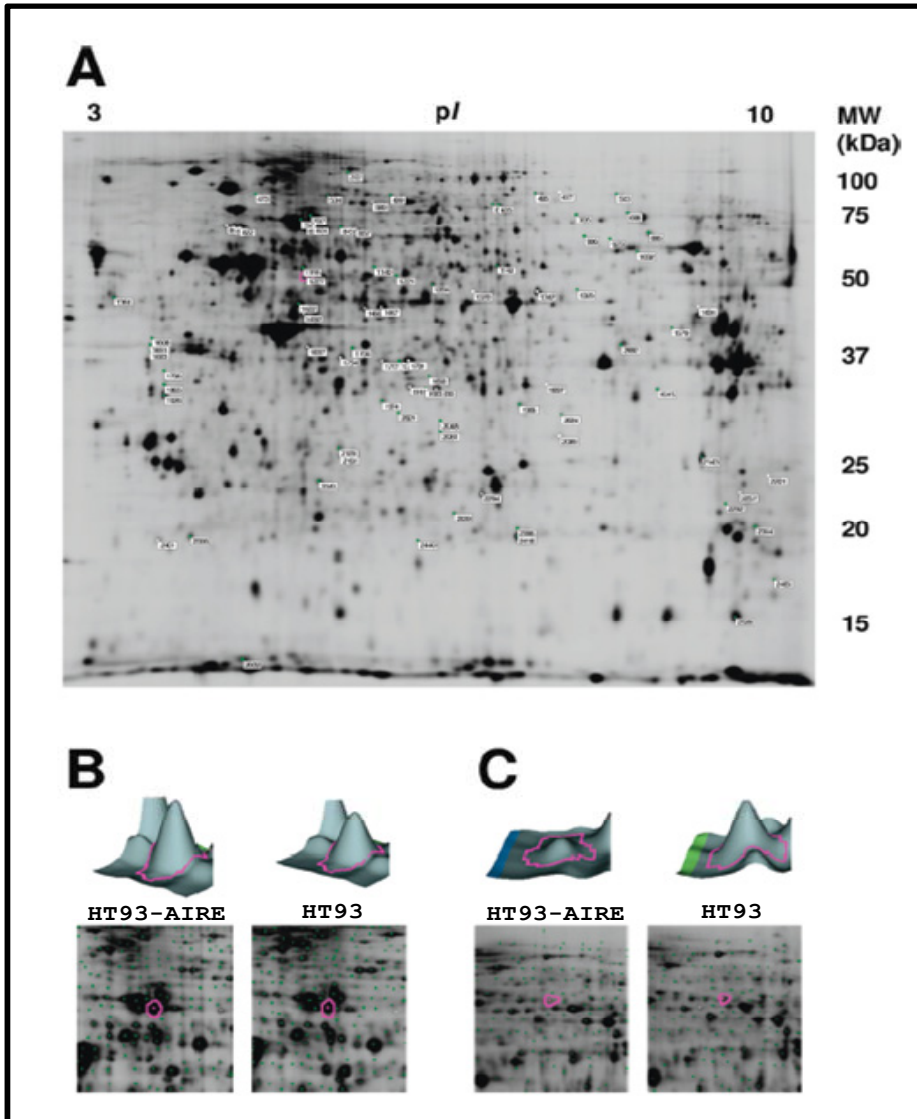


Figura C-2.3. 2D-DIGE de les cèl·lules HT93 i HT93-AIRE. Tinció Flamingo dels extractes proteics HT93 i HT93-AIRE separats en un dels gels 2D-DIGE. Les taques diferencials estan indicades. B) Representació tridimensional de la taca identificada com HSP70, proteïna incrementada en les cèl·lules HT93-AIRE. C) Representació tridimensional de la taca identificada com a Caldesmon, proteïna disminuïda en les cèl·lules HT93-AIRE

ICPL

En l'experiment ICPL, es van fer dos pools, un amb els extractes HT93 i un altre amb els HT93-AIRE que provenien de les mostres utilitzades en l'experiment 2D-DIGE. Per a evitar diferències degudes al marcatge es van fer dos experiments. Primer les cèl·lules HT93 es van marcar amb la forma lleugera del isòtop i HT93-AIRE amb la pesada (experiment ICPL1) i després es va fer el marcatge de forma inversa (experiment ICPL2) (Figura C-2.4 i Figura C-2.5).

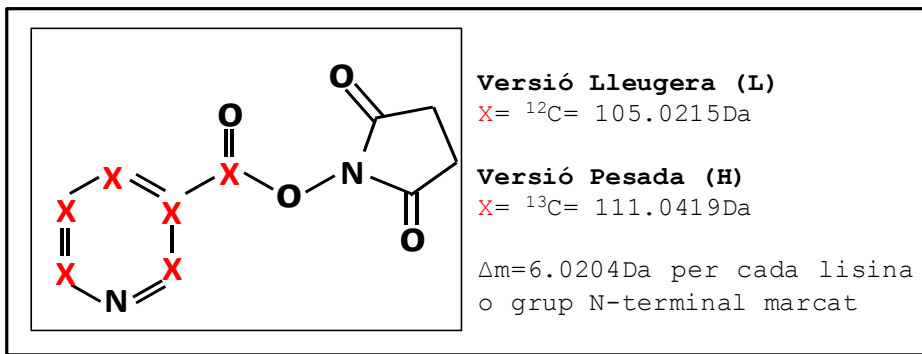


Figura C-2.4. Estructura del reactiu ICPL

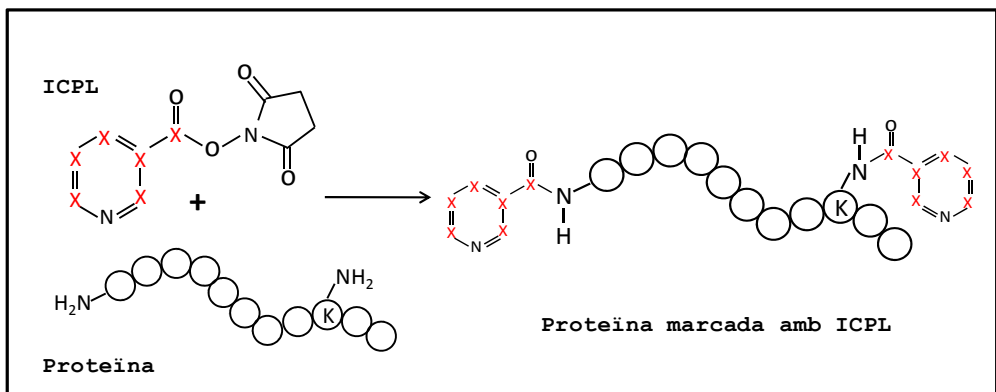


Figura C-2.5. Marcatge ICPL. Reacció química que es dóna entre el reactiu ICPL i els grups amino de les lisines i N-terminal de les proteïnes en que es forma un enllaç covalent amida

Per a cada experiment les mostres marcades es van barrejar i les proteïnes es van separar en un gel de monodimensional (Figura C2-6). En l'experiment ICPL1 es van identificar 565 proteïnes a partir de la seqüenciació de 1588 pèptids diferents (Arxius excel Llista_Prot_ICPL1 i Llista_Pep_ICPL1 del CD annex). D'aquestes proteïnes 29 es trobaven augmentades i 63 disminuïdes, més de 1.5 vegades, en les cèl·lules HT93-AIRE. En l'experiment ICPL2 es van identificar 606 proteïnes a partir de 1565 pèptids diferents. Quaranta-una proteïnes es van trobar augmentades i 57 disminuïdes, més de 1.5 vegades, en les cèl·lules HT93-AIRE (Arxius excel Llista_Prot_ICPL2 i Llista_Pep_ICPL2 del CD annex) (taula C-2.2). Al processar els resultats no es van identificar pèptids amb lisina no marcada amb el reactiu ICPL, fet que demostra la elevada eficiència del marcatge.

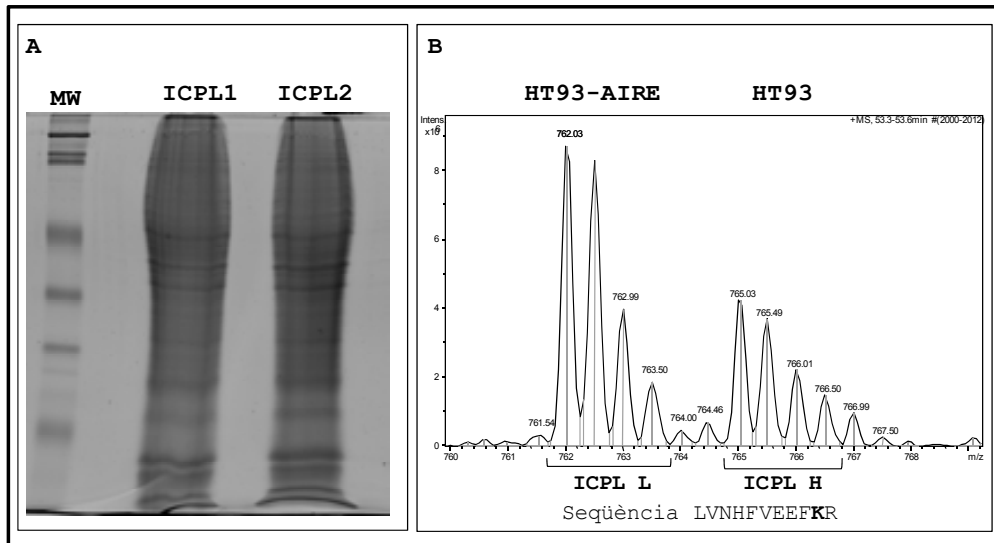


Figura C-2.6. A) Gel monodimensional, dels extractes cel·lulars marcats amb l'ICPL, tenyit amb Coomassie. 100µg per mostra i experiment es van separar en un gel SDS-PAGE al 12.5%. ICPL1: HT93 (ICPL L) + HT93-AIRE (ICPL H); ICPL2: HT93 (ICPL H) + HT93-AIR (ICPL L). B) Espectre d'una parella de pèptids ICPL de la proteïna HSP70, augmentada en les cèl·lules HT93-AIRE respecte les HT93 (ICPL1)

Taula C-2.2. Resum dels resultats obtinguts en cada un dels experiments ICPL

Experiment ICPL	ICPL1	ICPL2
# Pèptids identificats	1588	1565
# Proteïnes identificades	565	606
# Pèptids marcats	815	790
# Proteïnes quantificades	359	359
% Pèptids marcats	51.32	50.4
% Proteïnes quantificades	63.54	59.24
# Proteïnes quantificades amb 1 pep	212	207
# Proteïnes identificades amb 1 pep	239	292

C-2.5.3. Comparació dels resultats proteòmics

Es van comparar els resultats proteòmics obtinguts a partir de la 2D-DIGE i els ICPLs en termes de número de proteïnes identificades amb canvis d'abundància majors a 1.5 vegades i entre els dos experiments ICPL en termes de reproductibilitat de la tècnica.

Amb la tècnica 2D-DIGE es van identificar 51 proteïnes diferencials, amb l'ICPL1 92 proteïnes i amb l'ICPL2 98 proteïnes. Es va trobar que 7 proteïnes diferencials eren comuns als tres experiments, 11 ho eren entre l'experiment 2D-DIGE i el ICPL1, 8 entre el 2D-DIGE i el ICPL2 i 24 entre els experiments ICPL (Figura C-2.7).

Pel que fa a la comparació dels resultats dels dos experiments ICPL, entre els dos experiments es van identificar 815 proteïnes diferents, 565 a l'experiment ICPL1 i 606 a l'ICPL2. Només el 43.7% de les proteïnes totals era comú als dos experiments.

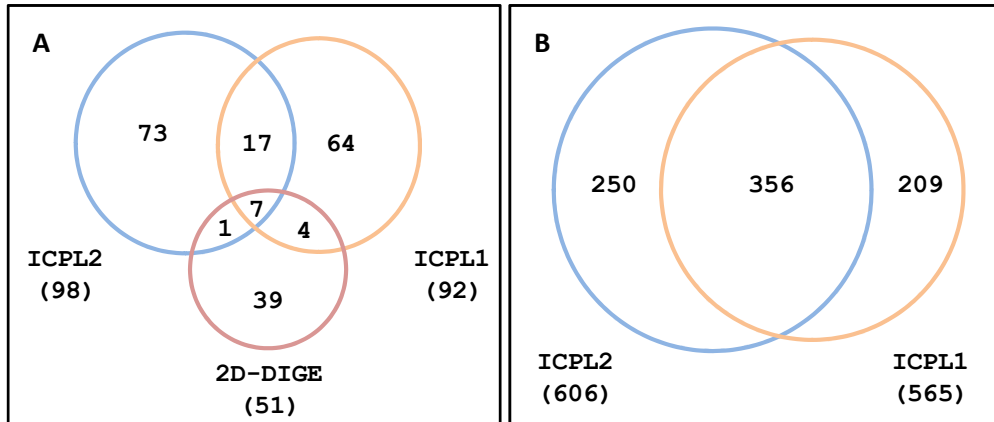


Figura C-2.7. Diagrames de Venn per a les proteïnes identificades en els experiments 2D-DIGE i ICPL. A) Representació del solapament que hi ha entre les proteïnes diferencials (relació HT93-HT93-AIRE >1.5) identificades en els experiments 2D-DIGE i ICPL. B) Representació del solapament que hi ha entre les proteïnes identificades en els experiments ICPL

C-2.5.4. Selecció de les proteïnes diferencials

Per a evitar possibles falsos positius a la llista de proteïnes diferencials entre les cèl·lules HT93 i HT93-AIRE es va seguir una estratègia conservadora. Per això es van seleccionar les proteïnes que eren significativament diferencials en almenys dos dels tres experiments proteòmics realitzats (2D-DIGE, ICPL1 i ICPL2) i que en el tercer experiment el resultat no fos contradictori. Seguint aquesta aproximació, es van trobar 29 proteïnes que complien aquests requisits: 10 estaven augmentades i 19 disminuïdes en les cèl·lules HT93-AIRE (Taula C-2.3).

Entre les proteïnes incrementades en les cèl·lules que expressaven AIRE es van identificar algunes xaperones, com la HSP27, la HSC70 i la *Tubulin-specific chaperone A*. Altres proteïnes que es van trobar augmentades van ser: *Superoxide dismutase*, *Nucleoside diphosphate kinase B*, *Ufm1-conjugating enzyme 1*, *Programmed cell death protein 5 (PDCD5)*, *RNA binding protein 39*, *WD repeat-containing protein 1* i *XTP3-*

transactivated gene A. Pel que fa a les proteïnes disminuïdes en les cèl·lules que expressaven AIRE es van identificar: *Mitochondrial very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase*, *PDZ and LIM domain protein 1*, *Galectin-1*, *Glucose-6-phosphate isomerase*, *60S ribosomal protein L5*, *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9*, *D-dopachrome decarboxylase*, *Adenine phosphoribosyl-transferase*, *PC4* and *SFRS1-interacting protein*, *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* i *Keratin, type 1 cytoskeletal 18* i *Protein NipSnap homolog 1*. El *Bcl-2-associated transcription factor 1* també es va quantificar com a disminuït en les cèl·lules HT93-AIRE i, curiosament, algunes proteïnes involucrades en el citoesquelet actina-miosina estaven disminuïdes en les cèl·lules AIRE positives: *Transgelin*, *Caldesmon*, *Tropomyosin alpha-1 chain*, *Myosin regulatory light polypeptide 9*, *Myosin-9* and *Stomatin-like protein 2*.

Per a identificar les vies afectades després de la transfecció d'AIRE es va fer una cerca amb l'IPA utilitzant la llista de gens que codifiquen per a les proteïnes identificades en els experiments 2D-DIGE i ICPL. Es va obtenir una xarxa centrada en el *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) en la qual algunes proteïnes involucrades en l'acció i estabilització dels filaments d'actina disminuïen després de l'expressió d'AIRE (Figura C-2.8).

Taula C-2.3. Proteïnes diferencials entre les cèl·lules HT93 i HT93-AIRE seleccionades^a

# Accés SwissProt	HT93-AIRE / HT93			Nom de la PROTEÏNA
	DIGE	ICPL 1	ICPL 2	
P49748	0,37	0,28	0,55	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Q01995	0,38	0,37	0,45	Transgelin
Q05682	0,57	0,48	0,30	Caldesmon
P09493	0,59	0,62	0,66	Tropomyosin alpha-1 chain
Q9BFW8	0,52	0,36		Protein NipSnap homolog 1
P24844	0,59	0,45	0,86	Myosin regulatory light polypeptide 9
P05783	0,62	0,63	0,48	Keratin, type I cytoskeletal 18
P35579	0,62	0,60	0,71	Myosin-9
O00151	-	0,49	0,36	PDZ and LIM domain protein 1
P09382	-	0,59	0,51	Galectin-1
P06744	-	0,39	0,54	Glucose-6-phosphate isomerase
P46777	-	0,67	0,55	60S ribosomal protein L5
Q9NYF8	-	0,47	0,55	Bcl-2-associated transcription factor 1
O00233	-	0,66	0,57	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9
P30046	-	0,59	0,59	D-dopachrome decarboxylase
Q9UJZ1	-	0,62	0,61	Stomatin-like protein 2
P07741	-	0,54	0,61	Adenine phosphoribosyltransferase
O75475	-	0,41	0,64	PC4 and SFRS1-interacting protein
P55072	-	0,58	0,64	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
P04792	1,53	1,93	1,82	Heat shock protein beta-1
P22392	1,57	1,52		Nucleoside diphosphate kinase B
P00441	1,60	1,61	1,94	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
P11142	2,28	1,30	1,60	Heat shock cognate 71 kDa protein
O75347	-	1,51	1,58	Tubulin-specific chaperone A
Q9Y3C8	-	1,62	2,88	Ufm1-conjugating enzyme 1
O14737	-	1,71	1,83	Programmed cell death protein 5
Q14498	-	2,25	1,54	RNA-binding protein 39
O75083	-	2,65	2,23	WD repeat-containing protein 1
Q9H773	-	2,66	2,12	XTP3-transactivated gene A protein

^a Només s'han inclòs les proteïnes incrementades o disminuïdes 1.5 vegades en almenys dos dels tres experiments

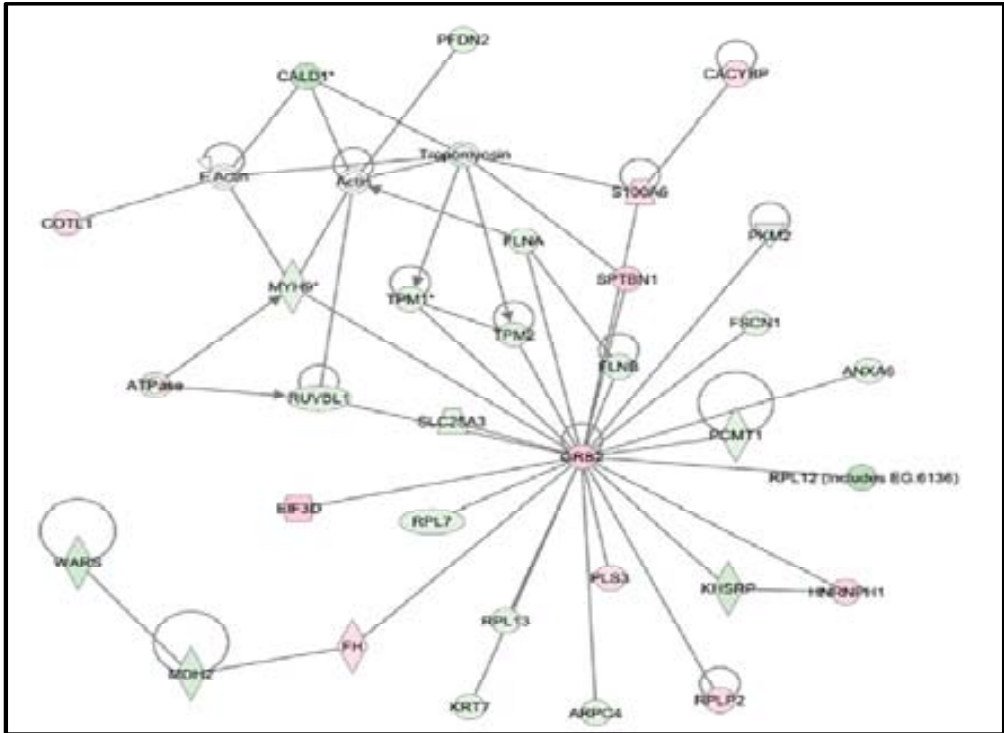


Figura C-2.8. Anàlisi IPA de les proteïnes diferencials obtingudes dels tres experiments proteòmics al comparar les cèl·lules HT93 amb les HT93-AIRE. Les proteïnes diferencials es van introduir en el software IPA i es va obtenir una xarxa amb GRB2 i l'actina en el centre de dos nodes. El color vermellós de les formes indica que el gen està augmentat i el verd que està disminuït. Els nodes blanc són proteïnes que no apareixen a la llista de proteïnes diferencials però que estan associades a la regulació d'algunes d'elles. Les línies indiquen interacció directa de les proteïnes mentre que les fletxes indiquen que "actua sobre"

C-2.5.5. Validació dels resultats proteòmics

Per a confirmar els resultats proteòmics obtinguts mitjançant les anàlisis 2D-DIGE i ICPL, dues de les proteïnes diferencials, la HSP70, augmentada en les cèl·lules HT93-AIRE, i la *Caldesmon*, disminuïda en les cèl·lules HT93-AIRE, es van validar per *western blot* i citometria de flux. La diferent quantitat d'aquestes proteïnes en els extractes proteics dels dos tipus cel·lulars es va confirmar per WB (Figura C-2.9, A carrils 1 i 2). També es van analitzar extractes de les cèl·lules HT93 transfectades amb el vector pcDNA3.1 sol per a

descartar que les diferències observades en la quantitat de les proteïnes fossin degudes al procés de transfecció (Figura C-2.9, A carril 3).

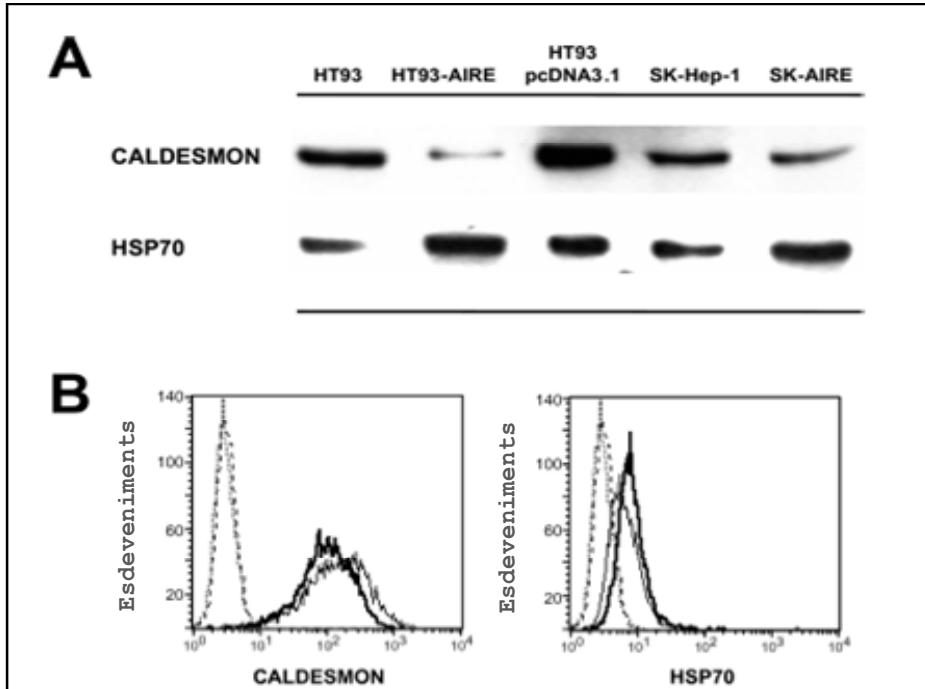


Figura C-2.9. Validació dels resultats proteòmics. A) Anàlisi per WB de Caldesmon i HSP70. Les proteïnes dels llisats cel·lulars es van separar en un gel i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa que es va incubar amb els anticossos anti-caldesmon o anti-HSP70 i a continuació amb l'anticòs de cabra anti-IgG de ratolí, finalment es va revelar per ECL. B) Anàlisi per citometria de flux de l'expressió de Caldesmon i HSP70 a les cèl·lules HT93 (línea gris) i HT93-AIRE (línea negra). Les cèl·lules es van fixar, permeabilitzar i tenyir amb els anticossos específics i a continuació amb l'anticòs de cabra anti-IgG de ratolí marcat amb Alexa 488. També es mostren controls negatius, les línees discontinues llargues són les cèl·lules HT93-AIRE i les curtes HT93

A més, els resultats es van confirmar utilitzant la línia SK-Hep-1, fet que indica que és l'expressió d'AIRE la que provocava les diferències en l'abundància de les proteïnes (Figura C-2.9, A carrils 4 i 5). Les dades també van ser confirmades per citometria de flux (Figura C-2.9, B).

C-2.5.6. Augment de l'apoptosi en les cèl·lules HT93-AIRE

Aquesta part del treball es va realitzar en col·laboració amb el Dr. Pärt Peterson (University of Tartu, Estonia).

Per a confirmar que les cèl·lules positives per a AIRE tenien incrementada l'apoptosi es van analitzar els marcadors *Annexin V-PE* i 7-AAD en cèl·lules HT93 i HT93-AIRE per a detectar apoptosi primerenca o tardana, respectivament, per citometria de flux. L'*Annexin V-PE* s'enllaça a la fosfatidilserina de la membrana de la cèl·lula en estadis inicials de l'apoptosi, mentre que 7-AAD s'intercala entre la doble cadena del DNA després de la fragmentació del DNA en estadis avançats del procés apoptòtic. Es va trobar que el número de cèl·lules positives per a *Annexin V-PE* i negatives per a 7-AAD estaven augmentades entre 2 i 3 vegades en les cèl·lules HT93-AIRE en comparació a les HT93, indicant apoptosi primerenca (Figura C-2.10, A).

L'augment de l'apoptosi en les cèl·lules positives per a AIRE era evident a les 24 i 48h i havia començat abans, ja que a les 72h la diferència era lleugerament menor, quan les cèl·lules negatives deuriem entrar, probablement, en apoptosi tardana, deguda a les llargues condicions de cultiu. Per a corroborar l'augment de l'apoptosi en les cèl·lules HT93-AIRE, es va estudiar la sensibilitat a l'estrès genotòxic induït per l'etopòsid, un conegut inhibidor de la topoisomerasa que provoca que es trenqui la doble cadena del DNA (Hande 1998). Igualment, es va observar un increment de l'apoptosi primerenca en les cèl·lules positives per a AIRE tot i utilitzar una concentració d'etopòsid relativament baixa (100nM) (Figura C-2.10, B).

Els resultats d'aquests experiments mostren que AIRE fa augmentar la mort cel·lular apoptòtica i això correlaciona amb

l'increment de l'expressió de la PDCD5 pro-apoptòtica en les cèl·lules HT93-AIRE.

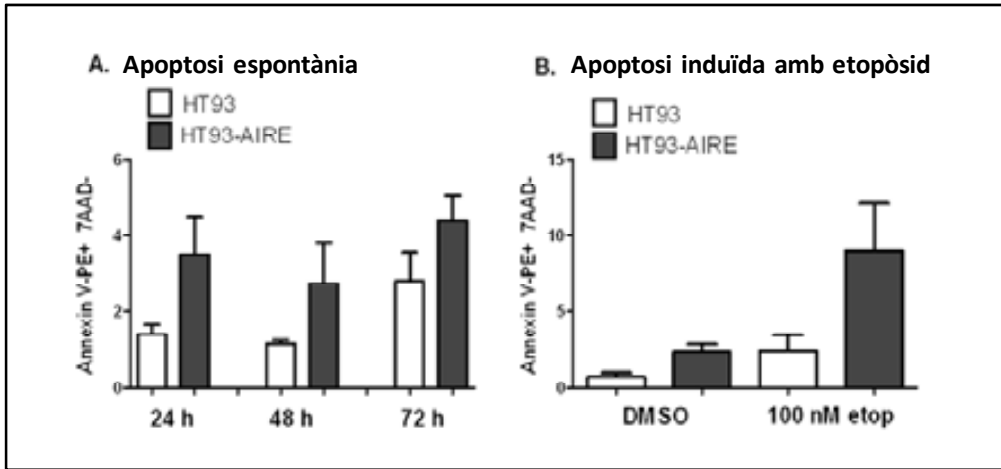


Figura C-2.10. Anàlisi de l'augment de l'apoptosi de les cèl·lules positives per a AIRE. A) Mesura per citometria de flux del percentatge de cèl·lules *Annexin V-PE+* i 7-AAD- en cultius HT93 i HT93-AIRE a tres punts al llarg del temps (24, 48 i 72h). B) Mesura de les cèl·lules apoptòtiques *Annexin V-PE+* i 7-AAD- després de tractar els cultius d'HT93 i HT93-AIRE amb 100nM etopòsid o DMSO durant 5h. En els dos panells es representen els resultats mitjanats de tres experiments i les seves desviacions estàndard

C-2.6. Discussió

Aquest estudi descriu la primera anàlisi sobre l'impacte de l'expressió d'AIRE en el proteoma de cèl·lules epitelials cultivades, per comparació de cèl·lules HT93 transfectades amb AIRE i no transfectades, utilitzant dues tècniques proteòmiques quantitatives, la 2D-DIGE i l'ICPL.

AIRE és una proteïna localitzada principalment en el nucli, tant en seccions de teixit com en cèl·lules en cultiu. Però també és detectada en els filaments citoplasmàtics en els transfectants que expressen AIRE gràcies al domini HSR (Pitkanen et al. 2001). La presència d'AIRE en les estructures filamentoses s'ha descrit en diferents línees cel·lulars, i en el nostre cas, les estructures tubulars positives per a AIRE es van observar en les línees cel·lulars HT93 i SK-Hep-1 transfectades, confirmant troballes prèvies. Aquesta localització extra-nuclear va suggerir funcions cel·lulars per a AIRE diferents a les establertes com a regulador transcripcional.

L'aproximació seguida en aquest estudi va ser una combinació de dues tècniques proteòmiques quantitatives diferents: 1) la 2D-DIGE basada en el marcatge diferencial fluorescent, la separació mitjançant gels 2-DE i la identificació de les proteïnes per PMF amb espectrometria de masses MALDI-TOF; i 2) l'ICPL, basat en el marcatge isotòpic diferencial, la separació en un gel 1-DE seguida de l'anàlisi per LC-MS. A diferència de la 2D-DIGE, en el cas de l'ICPL no es van fer replics biològiques, però cada mostra es va marcar tant amb l'isòtop lleuger com el pesat. Així doncs, la utilització de dos mètodes quantitius basats en marcatges diferents, la seqüenciació dels pèptids i el marcatge invers en les dues anàlisis hauria minimitzat la quantificació de diferències falses. Al comparar les proteïnes diferencials obtingudes en la 2D-DIGE i l'ICPL, es van trobar algunes proteïnes comuns en els diferents experiments però la majoria eren úniques per a

cada un d'ells. El que demostra aquest resultat és la complementarietat que existeix entre les diferents tècniques utilitzades. Així doncs, no existeix un mètode únic per a l'estudi dels proteomes, i cada tècnica presenta avantatges i inconvenients. Pel que fa als experiments ICPL (ICPL1, ICPL2), al comparar les proteïnes identificades en cada cas es va veure que la seva reproductibilitat era baixa, ja que, tot i ser replicues tècniques el solapament entre els dos grups de proteïnes era baix, això es va deure, probablement, a la limitada sensibilitat de l'instrument de MS utilitzat. Disposar de millors instruments de MS augmentaria la cobertura del proteoma que es podria identificar i quantificar. Aquestes anàlisis però, van generar, en global, un número més gran de proteïnes diferencials que la 2D-DIGE.

Per a la selecció de les proteïnes diferencials es va seguir un criteri conservador que potser va fer que part de la informació es perdés. Aquest és el cas d'algunes proteïnes relacionades amb el citoesquelet actina-miosina que es van detectar disminuïdes en cèl·lules que expressaven AIRE i que no es van incloure en la taula C-2.3 ja que no complien tots els requisits. Com exemple, l'augment de HSP70 en l'experiment 2D-DIGE només es va detectar en l'experiment ICPL com un augment de 1.48 vegades (quan per a ser considerat diferencial havia de ser >1.50), tot i això es va confirmar per WB i citometria de flux (Figura C-2.9). Malgrat aquestes dades, els canvis deguts a l'expressió d'AIRE es van observar de forma consistent.

Diferents xaperones, inclosa la HSP70, la HSP27 i la *Tubulin-specific chaperone A* estaven augmentades en les cèl·lules que expressaven AIRE, mentre que proteïnes relacionades amb el citoesquelet actina-miosina es van trobar disminuïdes en els transfectants.

Les xaperones són proteïnes d'estrès que poden ser induïdes com a resposta a apoptosi. De forma específica, HSP27 i HSP70

exerceixen les seves funcions inhibint alguns dels efectors clau de la maquinaria apoptòtica de la cèl·lula (Garrido et al. 2006). També es sap, que durant l'apoptosi té lloc el rearranjament del citoesquelet i algunes de les proteïnes principals del citoesquelet van disminuir en les cèl·lules transfectades. Una component dels filaments intermedis, la *cytokeratin 18*, que és tallada per caspasa durant l'apoptosi (Caulin et al. 1997), també es va trobar disminuïda en el proteoma de les cèl·lules HT93-AIRE. Finalment, van ser detectats amb abundància diferencial altres factors relacionats amb apoptosi, com el *Bcl-2-associated-transcription factor 1* i la *PDCD5*. Aquestes dades apuntaven a un augment de l'apoptosi i la corresponent resposta de supervivència cel·lular en les cèl·lules transfectades amb AIRE. Un paper d'AIRE com a inductor de l'apoptosi va ser descrit en un model de ratolí. Així, en mTECS de ratolí, les cèl·lules que expressaven AIRE mostraven característiques postmitotiques i una construcció codificant per AIRE-GFP induïa apoptosi en una línia cel·lular transfectada (Gray et al. 2007). A més, AIRE s'expressa en els testicles dels ratolins, on una onada primerenca d'apoptosi té lloc durant la espermatogènesi i és reduïda en els ratolins KO per Aire (Schaller et al. 2008). Aquest possible paper d'AIRE com a inductor de l'apoptosi es va demostrar amb la tinció amb *Annexin V* i 7-AAD. El domini CARD, que s'ha relacionat amb el reclutament de caspasa i la generació de senyals d'apoptosi (Hofmann et al. 1997), podria ser el domini d'AIRE involucrat en la inducció de l'apoptosi, tot i que per a confirmar-ho s'haurien de fer estudis addicionals.

Fa poc, s'ha publicat una descripció de l'interactoma d'AIRE. En aquest treball es van identificar quatre grups funcionals d'AIRE per a la interacció amb proteïnes i es va proposar un model de com AIRE pot exercir la seva funció (Abramson et al. 2010). Les proteïnes que componen l'interactoma d'AIRE són

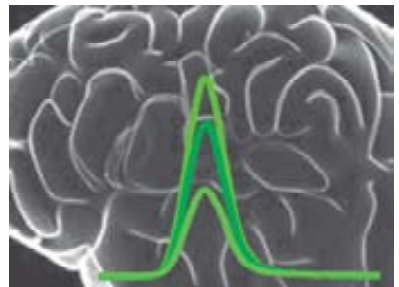
diferents a les proteïnes diferencials que descrivim en aquest treball. Els mètodes i objectius eren clarament diferents. En el nostre cas es volien identificar les proteïnes l'abundància de les quals es modifiques amb l'expressió d'AIRE, i no les proteïnes que interaccionaven amb AIRE. Algunes podrien coincidir, però la quantitat de les proteïnes que interaccionen amb AIRE no ha de canviar necessàriament després de l'expressió d'AIRE. El protocol per a identificar les proteïnes que interaccionen exclusivament amb AIRE utilitzava extractes nuclears, mentre que nosaltres vam analitzar l'extracte total de les cèl·lules. Això fa que la comparació entre els dos grups de proteïnes sigui una mica difícil, ja que moltes de les proteïnes diferencials es troben localitzades en el citosol. En el nostre cas, l'estudi de la fracció nuclear potser aportaria informació sobre funcions d'AIRE conegudes com la de regulador transcripcional o la de reparació del DNA. DNA-PK i Ku80 van ser identificades per Abranson et al. com a proteïnes que interaccionen amb AIRE (Abramson et al. 2010). AIRE interacciona amb les proteïnes DNA-PK, Ku70 i Ku80, involucrades en la maquinària de reparació del DNA, tal i com es va demostrar mitjançant experiments de *pull-down* (Liiv et al. 2008). Per 2D-DIGE, Ku80 (*ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2*) es va trobar disminuït en les cèl·lules que expressaven AIRE. La interacció d'AIRE amb aquestes proteïnes podria afectar a la reparació del DNA i provocar un increment de l'apoptosi. En efecte, les cèl·lules HT93-AIRE eren més sensibles que les no transfectades a l'agent genotòxic etopòsid (Figura C-2.10). L'efecte de l'etopòsid augmenta en les cèl·lules deficientes en Ku70 o Ku80, les quals poden esdevenir resistents després de la transfecció amb els gens Ku70 o Ku80 (Jin et al. 1998). La resposta a estrès induït per AIRE i la mort cel·lular podria ser el resultat de la transcripció simultània d'un gran nombre de gens, inclosos els TRAs. El nostre estudi no va permetre la

detecció de TRAs després de l'expressió d'AIRE. Hi ha diferents explicacions per això. Primer, AIRE podria necessitar altres factors per a controlar l'expressió dels gens que codifiquen per als TRAs. Així, en el pàncrees, AIRE controla l'expressió d'un grup de gens que es solapen però que són diferents dels controlats en el timus (Guerau-de-Arellano et al. 2008). Per altra banda, la expressió de TRA per mTECs és molt baixa, per tant la presència de proteïnes en gran quantitat podria interferir amb la detecció de les proteïnes en poca abundància. Un elevat número de gens són sobreexpressats en les mTECs de ratolins *wild-type* en comparació amb els *KO*. Si l'expressió ectòpica d'aquests gens es produeix simultàniament en la mateixa cèl·lula (Derbinski et al. 2008), l'expressió hauria de ser baixa per a permetre la viabilitat de la cèl·lula. A més, AIRE pot induir la transcripció del gen però pot ser que la completa traducció a proteïna no tingui lloc, i que proteïnes incompletes o productes ribosomals defectuosos (DRiPs) siguin degradats pel proteosoma (Yewdell et al. 1996). Les proteïnes desplegadas o incompletes són molt inestables en el citosol i són ràpidament degradades pel proteosoma o altres sistemes proteolítics. Finalment, tant la 2D-DIGE com l'ICPL necessiten d'un pas de SDS-PAGE, de manera que, en aquest treball, tots els pèptids a partir dels quals es va obtenir una seqüència o massa relativa havien de provenir de polipèptids amb una mida suficient per a ser retinguts en el gel.

C-2.7. Conclusions

- Aquest treball és la primera anàlisi proteòmica en la que s'estudia com l'expressió d'AIRE influeix en la composició del proteoma de cèl·lules epitelials humanes.
- La complementarietat de les proteïnes diferencials que es van obtenir en cada un dels experiments demostra la utilitat de fer servir diferents aproximacions proteòmiques.
- Els resultats van mostrar un perfil de proteïnes que indicaven un nivell d'apoptosi més elevat en les cèl·lules que expressen AIRE.
- La combinació de les diferents aproximacions proteòmiques utilitzades en aquest estudi van ser útils per a mostrar que AIRE pot jugar un paper en el control de l'autoimmunitat diferent del de la regulació transcripcional.

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGF β EN GLIOMA



C-3.1. Resum

Els gliomes són els tumors primaris més freqüents en el cervell i la via del factor de creixement transformant β (TGF β) està involucrada en un subgrup d'aquests. Actualment, TGF β s'està avaluant com a possible diana terapèutica. La definició d'una firma proteica de l'activitat TGF β en els gliomes ajudaria a seleccionar la població que es podria beneficiar d'una teràpia anti-TGF β i a fer el seguiment del tractament en els assajos clínics.

Amb l'objectiu d'identificar possibles proteïnes biomarcadores de l'activitat TGF β en gliomes es van analitzar les proteïnes secretades en cultius cel·lulars primaris derivats de tumors (PCTCs), tractats o no amb TGF β , mitjançant experiments quantitativs sense marcatge i ICPL. Es van identificar varies proteïnes candidates per a les que es van desenvolupar mètodes d'anàlisi SRM per a validar-les en mostres de líquid cefaloraquídi (CSF) i plasma de pacients amb glioma (Figura C-3.2). Al analitzar les mostres de CSF de pacients amb glioma i altres tipus de tumors cerebrals amb els mètodes de SRM els resultats van mostrar una clara correlació entre les proteïnes candidates i els nivells de TGF β 1 en aquestes mostres. Igualment, al analitzar les proteïnes candidates per SRM en mostres de plasma de pacients amb glioma en fases alternades de tractament amb un inhibidor de TGF β 1 es va observar que els nivells de les proteïnes d'interès eren modulats per l'efecte del tractament. Aquest conjunt de proteïnes constituïrien doncs una possible firma proteica útil per al diagnòstic i seguiment del tractament dels gliomes amb activitat TGF β .

C-3.2. Introducció

TGF β i càncer

El TGF β és una proteïna de la família de les citoquines secretada per diversos tipus de cèl·lules i que regula la proliferació cel·lular, la migració, l'adhesió, la diferenciació i la modificació del microambient.

En cèl·lules epitelials normals o tumors en estadis inicials TGF β és un potent inhibidor de la proliferació cel·lular i actua com a supressor tumoral. Però les cèl·lules tumorals tendeixen a escapar de l'efecte anti-proliferatiu de TGF β , ja sigui adquirint mutacions en els components de la via de senyalització (receptors TGF β o SMADs) (Figura C-3.1) o interrompent selectivament la resposta anti-proliferativa. Així doncs, en tumors avançats, TGF β esdevé un factor oncogènic que indueix proliferació, angiogènesis, invasió i metàstasis (Seoane 2006). Una expressió elevada de TGF β en tumors correlaciona amb malignitat elevada i un mal pronòstic (Seoane 2004). Les aproximacions terapèutiques actuals per a modular la senyalització TGF β inclouen: unió d'anticossos selectius al complex TGF β RII-TGF β RI (p.e. Lerdelimumab), inhibició intracel·lular de la quinasa TGF β RI (p.e. LY215799), degradació específica del mRNA de TGF β (p.e. AP-12009), per mitjà de RNAs antisentit, i segrest de TGF β mitjançant la fracció soluble de TGF β RII (TGF β RII-Fc) impedit la seva unió al receptor (Figura C-3.1).

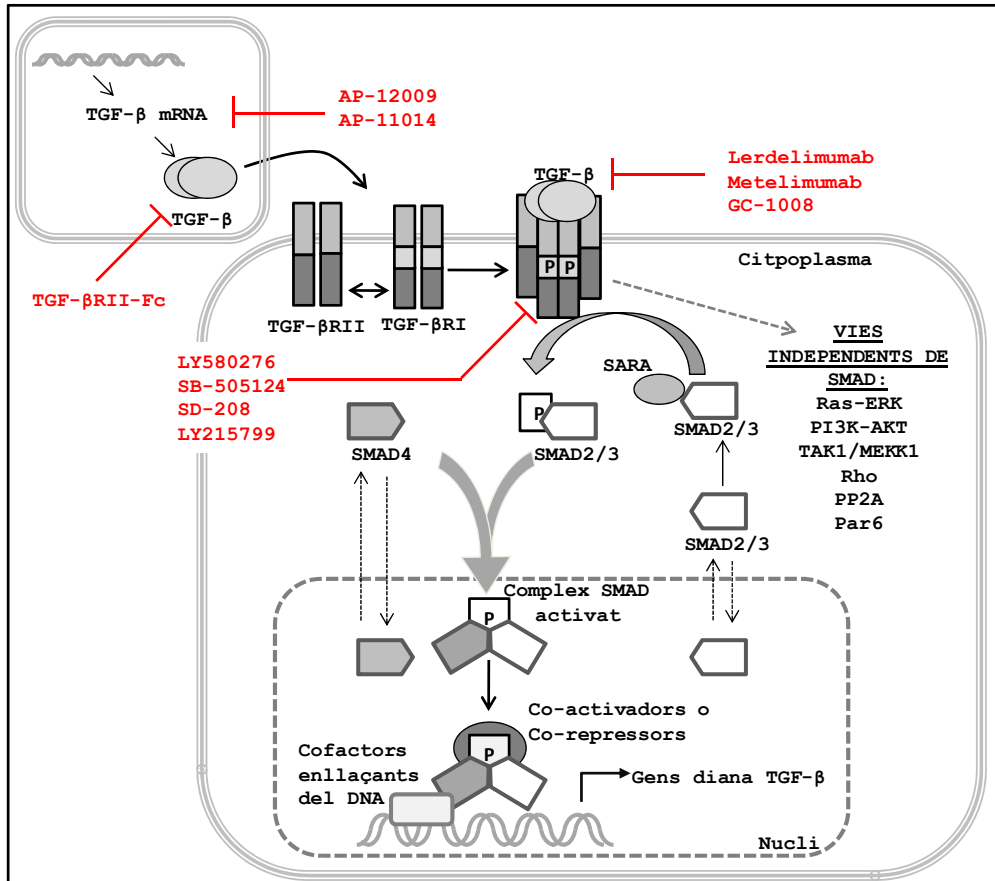


Figura C-3.1. Esquema de la via de senyalització de TGF β . TGF β s'uneix al receptor de tipus II (TGF β RII) i recluta el de tipus I (TGF β RI) al complex. TGF β RII fosforila (P) a TGF β RI. El receptor de tipus I activat té la capacitat de fosforilar SMADs (SMAD2/3) associats al receptor que són presentats per proteïnes ancorants com SARA. La forma fosforilada de SMAD2/3 s'associa amb SMAD4 i entra al nucli. En el nucli, el complex SMAD interacciona amb diferents cofactors d'unió a DNA així com co-activadors o co-repressors per a modular la transcripció de gens diana de TGF β . A més, depenent del context cel·lular TGF β pot activar vies de senyalització independents de SMAD com: Ras-ERK, PI3K-AKT, etc. En vermell trobem aproximacions terapèutiques, anticossos i inhibidors que poden modular la via de senyalització de TGF β . Basada en Seoane, Siegel et al. i Yingling et al. (Seoane 2006), (Siegel and Massague 2003), (Yingling et al. 2004)

Gliomes

Els gliomes són un grup heterogeni de tumors que es formen en el sistema nerviós central (SNC) i que deriven de les cèl·lules glials. Aproximadament la meitat dels casos de gliomes són tumors primaris mentre que l'altre meitat provenen de metàstasis de tumors extracranials.

Els gliomes es poden classificar segons el tipus de cèl·lules a les que s'assemblen, el grau histològic, que reflexa l'agressivitat del tumor, i la ubicació. Segons el tipus de cèl·lules tenim: ependimomes (cèl·lules ependimàries), astrocitomes (astròcits) i oligodendrogliomes (oligodendrocits). Segons el grau histològic l'Organització Mundial de la Salut (OMS) ha establert quatre graus: Grau I (menys agressiu i millor pronòstic), Grau II, Grau III i Grau VI (més agressiu i pitjor pronòstic). I segons la ubicació es classifiquen en: frontals, temporals, parietals, occipitals, etc.

Dels diferents tipus de tumors astrocitaris els més freqüents són els glioblastomes (GBM). Els glioblastomes són els tumors primaris intracranials més habituals en el cervell i els de major agressivitat (grau IV segons la OMS). En la majoria dels casos, malgrat rebre tractament, la supervivència no arriba als 14 mesos (Van Meir et al. 2010).

TGF β i Glioma

En els gliomes, la via de TGF β , entre d'altres, juga un paper molt important ja que està altament activada en els més agressius. S'ha descrit que una elevada activitat TGF β -fosfo-SMAD-2 confereix un pitjor pronòstic i fa que els gliomes siguin molt proliferants (Bruna et al. 2007). També s'ha vist que part de la resposta oncogènica a TGF β és deguda a l'efecte sobre la auto-renovació de les cèl·lules iniciadores de glioma (GICs). Aquest procés d'auto-renovació de les GICs és mediat pel *Leukemia inhibitory factor* (LIF) (Penuelas et al. 2009).

TGF β indueix la transcripció de LIF via un complex activat de Smad que s'uneix al promotor de LIF i LIF, a la vegada, promou l'auto-renovació i evita la diferenciació de les GICs. En pacients humans LIF està altament expressat en tumors amb elevats nivells de TGF β .

Malgrat els progressos en el coneixement dels mecanismes moleculars involucrats en la gènesi i progressió dels gliomes, el diagnòstic i tractament d'aquest tipus de tumors continua essent pèssim. Actualment, s'estan portant a terme assajos clínics amb inhibidors de la via de TGF β , amb resultats prometedors en un subgrup de pacients amb glioma. Trobar una firma de l'activitat TGF β en el CSF o el plasma de pacients amb glioma implicaria tenir un sistema no invasiu per a diagnosticar els pacients, caracteritzar la població que es podria beneficiar d'una teràpia anti-TGF β i fer el seguiment de la resposta al tractament.

En aquest treball, en una primera etapa, es va plantejar aplicar diferents anàlisis proteòmiques quantitatives de descobriment als secretomes de diferents cultius primaris derivats de cèl·lules tumorals (PCTCs) tractats o no amb TGF β per a trobar un conjunt de proteïnes candidates a formar part d'una possible firma proteica de l'activitat de TGF β . En una segona etapa, es van utilitzar mètodes de tipus SRM per a validar les proteïnes en mostres de secretoma, CFS i plasma, de forma successiva (Figura C-3.2).

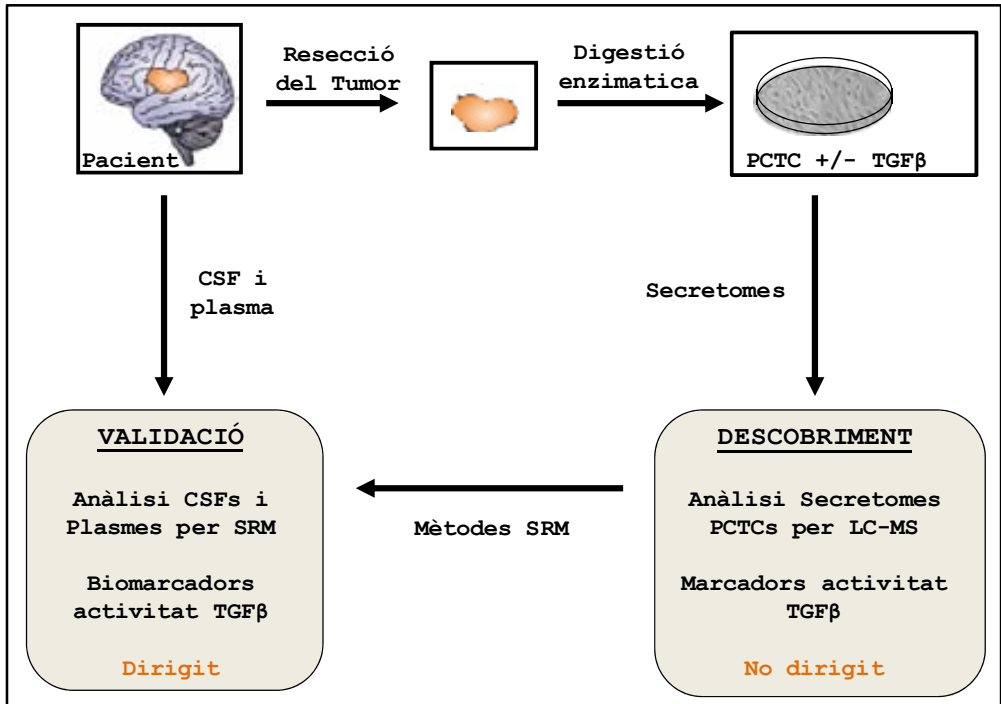


Figura C-3.2. Flux de treball portat a terme en aquest estudi

C-3.3. Objectius

- Trobar una firma proteica de l'activitat de TGF β en el secretoma de cultius primaris derivats de tumors (PCTC) de glioma.
- Validar aquesta firma proteica en el CSF i/o el plasma de pacients amb glioma.

C-3.4. Material i Mètodes**C-3.4.1. Obtenció dels secretomes de cultius****primaris de cèl·lules tumorals (PCTCs)****Obtenció dels PCTCs**

Es van obtenir mostres tumorals de cervell humà de l'Hospital Vall d'Hebron. El protocol clínic va ser aprovat per la junta del centre Vall d'Hebron i tenia el consentiment informat dels individus. Els tumors es van processar en els 30min posteriors a la resecció quirúrgica. Amb l'ajuda de dos bisturís, les mostres es van homogeneïtzar mecànicament. Posteriorment es van digerir enzimàticament amb 200U/mL de col·lagenasa I (Sigma) i 500U/mL de DNase I (Sigma) en PBS durant 2h a 37°C amb agitació constant i vigorosa. La suspensió de cèl·lules es va passar a través d'un sedàs 70 μ m i es va rentar amb PBS. Finalment, les cèl·lules es van resuspendre i cultivar en D-MEM amb 10% FBS.

Obtenció dels secretomes

Es van sembrar 3X10⁶ de cèl·lules del cultiu primari de glioma en dues plaques de 150mm de diàmetre. Un cop les cèl·lules van arribar a una confluència del 80%, es van rentar dues vegades amb PBS i es van incubar 24h amb D-MEM lliure de FBS. Després de 24h de deprivació, els PCTCs es van tractar segons s'indica a cada experiment. Passades 24h els medis de cultiu es van recollir i congelar a -80°C fins al moment de ser utilitzats.

C-3.4.2. Anàlisi LC-MS sense marcatge del secretoma de PCTCs i quantificació per comptatge d'espectres

Dues mostres de 4.5mL de medi de cultiu amb el secretoma d'uns PCTCs tractats i no tractats amb 100pM de TGF β 1 (PCTC1+TGF β 1 i PCTC1- \emptyset respectivament) es van concentrar amb les membranes *Amicon Ultra 5kDa CutOff* (Millipore) fins a 200 μ L. A continuació les proteïnes de les dues mostres es van precipitar amb el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare). El pèl·let

de proteïna es va resuspendre en 20 μ L de 6M GndHCl i la concentració de les mostres es va mesurar amb el *DC Protein Assay* (Bio-Rad). Dotze micrograms de cada una de les mostres es va barrejar 1:1 amb tampó de càrrega (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (p/v), 0.1% blau de bromofenol (p/v), 10% glicerol (v/v), 5% β -mercaptoetanol (v/v)) i es van córrer en un gel 1-DE al 10% (33.3% acrilamida (barreja acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%), 25% tampó de separació 4X (1.5M Tris pH 8.8), 1% SDS (SDS 10% p/v), 0.5% persulfat amònic (APS 10% p/v) i 0.03% TEMED, tot en v/v) fins que el front de blau de bromofenol va assolir una tercera part del gel. Cada carril parcialment corregut es va retallar en quatre bandes que es van digerir amb tripsina seguint el protocol descrit a l'apartat de Digestió del C-2.4.7 (Capítol 2, pàgina 150). Els digerits es van analitzar per LC-MS tal i com es descriu en l'apartat de MS/MS del C-2.4.8.1 (Capítol 2, pàgina 152).

La identificació de les proteïnes es va fer tal i com es descriu a l'apartat C-2.4.8.2 (Capítol 2, pàgina 153) fent la cerca tant a la base de dades humana com la bovina. La comparació quantitativa entre les mostres es va fer calculant les ràtios PCTC1+TGF β 1/PCTC1- \emptyset del número d'espectres de MS/MS assignats a cada proteïna. Els pèptids assignats tant a la proteïna humana com la bovina no es van tenir en compte en la quantificació.

C-3.4.3. Anàlisi ICPL del secretoma de PCTCs

Es van fer tres experiments ICPL fent servir entre 25 i 45mL de medi de cultiu amb el secretoma de dos PCTCs diferents (PCTC1 i PCTC2) tractats i no tractats amb 100pM de TGF β 1 (Taula C-3.1). Aquests medis es van concentrar fins a 200 μ L amb membranes *Amicon Ultra 5kDa CutOff* (Millipore). Les proteïnes es van precipitar amb el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare), es van resuspendre en 40 μ L de la solució de GndHCl del kit ICPL i la concentració de les mostres es va

mesurar amb el *DC Protein Assay* (Bio-Rad). Es van marcar entre 40 i 100 μ g de proteïna (Taula C-3.1) seguint el protocol descrit en l'apartat de Marcatge del C-2.4.7 (Capítol 2, pàgina 150). Les mostres marcades es van ajuntar tal i com es descriu a la taula C-3.1 i es van separar en gels monodimensionals al 10% (apartat C-3.4.2) i al 12.5% (apartat C-1.4.3.4, Capítol 1, pàgina 104). Cada carril es va retallar en 20 bandes que es van digerir amb tripsina tal i com es descriu a l'apartat Digestió del C-2.4.7 (Capítol 2, pàgina 150). La identificació i quantificació de les proteïnes per a cada experiment es va fer com es descriu a l'apartat C-2.4.8.2 (Capítol 2, pàgina 153). La cerca es va fer tant a la base de dades humana com la bovina. En aquest cas les ràtios calculades van ser mostra tractada amb TGF β 1 entre mostra no tractada. Els casos en que els pèptids mitjanats tenien un CV superior al 30% la quantificació es va revisar i corregir manualment. Els pèptids assignats tant a la proteïna humana com la bovina no es van tenir en compte en la quantificació.

Taula C-3.1. Taula de mostres marcades amb ICPL

Mostra	Volum medi condicionat (mL)	μ g proteïna marcats	Marcatge ICPL (L=Lleugera, H=Pesada)	Experiment ICPL
PCTC1- \emptyset	25	100	L	ICPL1
PCTC1+TGF β 1	25	100	H	
PCTC2- \emptyset	30	100	L	ICPL2
PCTC2+TGF β 1	30	100	H	
PCTC1- \emptyset	45	40	L	ICPL3
PCTC1+TGF β 1	45	40	H	

C-3.4.4. Anàlisi amb el software IPA

Per a l'anàlisi IPA, es va carregar al software la llista de proteïnes diferencials trobades en els experiments de

descobriments (sense marcatge i ICPL), amb el seu codi d'accés a la base de dades *SwissProt* i les ràtios d'abundància. Aquest software va crear, automàticament i utilitzant dades bibliogràfiques, una xarxa que mostra les interaccions funcionals entre les proteïnes de la llista o d'altres que les connecten entre elles.

C-3.4.5. Creació del Mètode SRM

Per a crear i posar apunt el mètode de SRM es van utilitzar dades experimentals de l'etapa de descobriment i dades *In Silico* obtingudes amb el software Protein Pilot 3.0 (Applied Biosystems). Inicialment, per a un total de 32 proteïnes (30 proteïnes diferencials de l'experiment de descobriment + la proteïna LIF + la proteïna *Alcohol dehydrogenase* (ADH) de llevat (estàndard intern)), es va crear un mètode SRM individual. Aquests mètodes de SRM incloïen els pèptids que complien les condicions següents: punts de tall específics de la proteasa utilitzada (ex: Lys i Arg per la tripsina), no contenien metionines (modificables per oxidació), no tenien punts de tall no digerits, la llargada mínima era de 6 aminoàcids i la m/z estava entre 350-1500Da. En aquesta posada a punt es van establir els temps de retenció per a les condicions cromatogràfiques utilitzades de cada un dels pèptids observats i es va optimitzar l'energia de col·lisió (CE). Es va comprovar que els pèptids proteotípics (PTP) seleccionats eren únics per a les proteïnes diana fent una cerca d'identitat de la seqüència d'aminoàcids contra la base de dades Uniprot i fent servir l'algoritme BLAST. Es va corroborar que les transicions observades per SRM es corresponguessin amb el pèptid del que es volia fer el seguiment fent una cerca amb el motor de cerca MASCOT dels espectres MS/MS obtinguts de l'adquisició dependent de la informació (IDA).

C-3.4.6. Anàlisi SRM del secretoma de PCTCs i adquisició dependent de la informació (IDA)

Digestió en solució

Es van digerir en solució les mostres PCTC2+TGF β 1 i PCTC1+TGF β 1 en 6M urea 50mM AB. Inicialment, a 100 μ g de cada una de les mostres se'ls va afegir 50pmols d'ADH (500fmols/ μ g de mostra). A continuació, les mostres es van reduir amb 3 μ L de 700mM DTT en 50mM AB durant 1h a temperatura ambient. A continuació es van afegir 8.6 μ L de 700mM IAA en 50mM AB i es va deixar incubar 30min a temperatura ambient en la foscor. Per a contrarestar l'excés de IAA es van afegir 15 μ L de NAC 500mM en 50mM AB 15min a temperatura ambient. Per a digerir les mostres primer es van diluir fins a 1M urea amb 50mM AB, a continuació es van afegir 10 μ L de tripsina a 1 μ g/ μ L i finalment es van deixar incubar durant tota la nit a 37°C. Per aturar i acidificar la digestió es va afegir 0.5% FA (v/v). Finalment, les mostres es van guardar a -20°C fins a ser analitzades per LC-MS.

SRM

Per a avaluar cada un dels mètodes SRM es va injectar 1 μ g de digerit en un Tempo Nano LC System (Applied Biosystems) acoblat a un espectròmetre de masses híbrid triple quadrupol-trampa d'ions lineal 4000-Q-TRAP LC-MS/MS (Applied Biosystems). La barreja de pèptids es va concentrar inicialment en una precolumna ZORBAX de 5mm i 300 μ m ID (Agilent Technologies, Alemanya) i a continuació es va carregar en una columna PepMap de 15cm i 75 μ m ID (LC Packings). Els pèptids es van eluir amb un gradient d'ACN (40% de B en 90min, B=98% ACN 0.1% FA, A= 2% ACN 0.1% FA) a 300nL/min i es van transferir a través d'una agulla (New Objective) a la font nanoESI de l'espectròmetre de masses. Es va fer servir un voltatge d'esprai de 2800V i una temperatura de 150°C en el tub de transferència dels ions. L'espectròmetre

de masses es va configurar per a treballar en mode SRM i IDA fent servir nitrogen com a gas de col·lisió.

En l'adquisició SRM el primer quadrupol (Q1) es va posar en resolució de massa baixa (1.5 Da) i el tercer quadrupol (Q3) a resolució de massa unitat (0.7 Da). Quan el senyal del fragment tenia una intensitat superior a 500 comptatges per segon (cps) s'activava l'adquisició IDA, on el ió parental era fragmentat un màxim de dues vegades i exclòs durant 30s. En l'adquisició IDA es va treballar amb la resolució de massa baixa tant en Q1 com en Q3 i omplint la trampa d'ions en mode dinàmic. L'espectre de MS/MS es va adquirir en el rang de m/z entre 250 i 1500.

Per a processar les dades de SRM es va fer servir el software Analyst (Applied Biosystems). Per a identificar els espectres de MS/MS adquirits amb el mode IDA es va utilitzar el motor de cerca MASCOT i la base de dades SwissProt humana. Els paràmetres utilitzats van ser: carbamidometilació de cisteïnes com a modificació fixa, tripsina com a proteasa, tolerància en la massa del precursor de 1.5Da i dels fragments de 0.5Da, i cap punt de tall de la proteasa no digerit.

El mètode final de SRM que contenia els pèptids i transicions per a fer el seguiment de totes les proteïnes es va acabar d'afinar introduint els temps de retenció, per a crear el mètode *Scheduled*, les CE òptimes i deixant d'adquirir els IDA. Per al mètode de SRM *Scheduled* es va establir una finestra de temps d'adquisició de 3min al voltant del temps de retenció de cada precursor a monitoritzar.

C-3.4.7. Anàlisi SRM del secretoma del PCTC1 tractat amb TGF β 1 i/o l'inhibidor LY215799

Quatre plaques de 150mm del PCTC1 es van deprivar de FBS durant 24h i es van incubar durant 24h més amb diferents tractaments: vehicle (\emptyset), 100pM TGF β 1, 2 μ M LY215799 (inhibidor del receptor 1 de TGF β 1 (TGF β R1)), o la combinació de TGF β 1 i

LY215799. Després d'aquest temps es van recollir uns 15mL de medi de cultiu que es van concentrar fins a 200 μ L amb membranes Amicon *Ultra de 3kDa CutOff* (Millipore). La proteïna es va precipitar fent servir el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare), el pèl·let es va resuspendre amb 25 μ L de 6M urea 50mM AB i la concentració es va mesurar amb el *DC Protein Assay* (Bio-Rad).

Digestió

Setze micrograms de cada una de les mostres es va digerir en solució tal i com es descriu a l'apartat C-3.4.6.

LC-MS/SRM

Un microgram de cada un dels digerits es va analitzar en un espectròmetre de masses 4000-Q-TRAP (Applied Biosystems) amb les condicions cromatogràfiques i el mètode SRM *Scheduled* descrits a l'apartat SRM del C-3.4.6.

Processat dels resultats

Per a processar els resultats de SRM es van fer servir els software *Analyst* i *MultiQuant* (Applied Biosystems). Per a calcular les quantitats relatives de cada una de les proteïnes monitoritzades amb el mètode SRM *Scheduled* es va fer servir la suma de les àrees de les tres transicions de cada pèptid. Per a normalitzar aquesta suma d'àrees per pèptid es va fer servir la suma de les àrees de les transicions del pèptid de seqüència EALDFFAR de la ADH (estàndard intern) (Suma Àrees pèptid mostra/ Suma àrees pèptid ADH). Aquest mateix pèptid juntament amb dos més de la pròpia ADH es van utilitzar per a controlar el procés de digestió de les mostres. La quantificació relativa entre les mostres es va fer calculant les ràtios dels senyals de cada un dels pèptids respecte el mateix pèptid a la mostra PCTC1- \emptyset (senyal pèptid X mostra Y/ senyal pèptid X mostra PCTC1- \emptyset).

C-3.4.8. Anàlisi per western blot del PCTC1 tractat amb TGF β 1 i/o l'inhibidor LY215799

Després de recollir el secretoma (sobrenadant) dels PCTC1 de l'apartat C-3.4.7, les cèl·lules es van lliurar amb tampó RIPA complementat amb inhibidors de proteases (Roche). L'extracte proteic total de cada una de les mostres es va quantificar amb el mètode *BCA Protein Assay kit* (Pierce). Trenta micrograms d'extracte proteic de cada mostra es van separar en un gel monodimensional SDS-PAGE al 8%. Després, les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa que es va bloquejar amb TBS 0.1% Tween-20 i 5% llet descremada. A continuació es va incubar amb l'anticòs contra p-SMAD2 (Millipore) i finalment les membranes es van incubar amb l'anticòs secundari contra ratolí conjugat amb HRP (GE, Healthcare). El resultat es va visualitzar per quimioluminescència utilitzant ECL (Millipore) i plaques autoradiogràfiques.

C-3.4.9. Anàlisi SRM de les mostres de CSF

Les mostres de CSF es van obtenir de L'Hospital Vall d'Hebron d'acord amb el comitè ètic del centre, seguint el protocol establert i amb el consentiment dels pacients. Aproximadament 5mL de cada CSF es van concentrar fins a 50 μ L amb un *Amicon Ultra* de 3kDa de punt de tall (Millipore) i es van quantificar amb el *DC Protein Assay* (Bio-Rad).

Depleció

Un màxim de 4mg de cada CSF concentrat es van deplecionar amb les columnetes *Albumin and IgG Depletion SpinTrap* (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant. Les proteïnes de l'elut final deplecionat es van precipitar fent servir el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare), el pèl·let es va resuspendre en 20 μ L 6M urea 50mM AB i la concentració de la mostra es va mesurar fent servir el *DC Protein Assay* (Bio-

Rad). Després de la depleció s'obtenia una quantitat mitja de proteïna corresponent al 20% de la inicial.

Gel monodimensional

Vint micrograms de 10 CSFs deplecionats i 20 μ g de les mateixes mostres no deplecionades es van separar en gels de 1-DE al 10% (apartat C-3.4.2). El gel es va tenyir amb Coomassie Colloidal tal i com es descriu a l'aparat Tinció del C-2.4.7 (Capítol 2, pàgina 150).

Digestió

Entre 40 i 100 μ g de proteïna de les mostres de CSF deplecionades i no deplecionades es van digerir en solució amb tripsina tal i com es descriu a l'apartat Digestió en solució del C-3.4.6. Per cada microgram de mostra a digerir es van afegir 500fmols de ADH com a patró intern.

LC-MS/SRM

Alguns dels digerits tríptics de les mostres no deplecionades es van analitzar amb els mètodes SRM de les proteïnes individuals no observades en el digerit en solució del secretoma PCTC2+TGF β 1. Es va injectar 1 μ g de digerit per mètode.

A més, 1 μ g dels CSFs deplecionats i no deplecionats es van analitzar amb el mètode SRM Scheduled.

En ambdós casos, les mostres es van analitzar en l'espectròmetre de masses 4000-Q-TRAP (Applied Biosystems) amb les condicions cromatogràfiques descrites a l'apartat C-3.4.6.

Processat dels resultats

El processat dels resultats es va fer tal i com es descriu a l'apartat Processat de resultats del C-3.4.7. En aquest cas la quantificació relativa per a cada un dels pèptids es va calcular entre cada una de les mostres respecte la mostra amb la concentració de TGF β 1 més baixa i per un altra banda respecta la mitja de la suma d'àrees de cada pèptid a les diferents mostres.

C-3.4.10. Mesura dels nivells de TGF β 1 en els CSFs

Els nivells de TGF β 1 en les mostres de CSF es van determinar mitjançant ELISA (R&D Systems), seguint les instruccions del fabricant.

C-3.4.11. Anàlisi per SRM de mostres de plasma

Es van obtenir mostres de plasma de pacients intervinguts de glioma i en tractament amb l'inhibidor LY215799. El protocol clínic va ser aprovat per la junta del Vall d'Hebron i els pacients van donar el seu consentiment. Es van recollir 5mL de plasma d'aquest pacients en tubs amb EDTA. Les mostres es van recollir després de la intervenció en períodes d'aproximadament quinze dies i en estadis en els que el pacient estava en tractament (ON) o no (OFF) amb l'inhibidor LY215799. Inicialment, cada una de les mostres incloses en l'estudi es van quantificar amb el *DC Protein Assay* (Bio-Rad).

Depleció

Setanta-dos microlitres, aproximadament 6mg, de cada una de les mostres de plasma es van deplecionar fent servir la columna per a *LC ProteoPrep 20 plasma Immunodepletion* (Sigma, St Louis, MO) (Taula C-3.2) en un aparell de cromatografia líquida Ettan-LC (GE, Healthcare) seguint les instruccions del fabricant. Per a cada mostra les proteïnes deplecionades es van recollir en sis fraccions de 2mL. Les diferents fraccions es van ajuntar, concentrar fins a 200 μ L fent servir *Amicons Ultra de 3kDa* (Millipore) de punt de tall i precipitar amb el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare). El pèl·let es va resuspendre en 30 μ L de 6M urea 50mM AB i es va quantificar amb el *DC Protein Assay* (Bio-Rad). Després de la depleció es va obtenir una quantitat mitja de proteïna que es corresponia amb el 4% de la inicialment carregada a la columna.

Taula C-3.2. Proteïnes eliminades amb la columna de LC *ProteoPrep 20 plasma Immunodepletion*

Albumin	Apolipoprotein A1
IgGs	Apolipoprotein A2
Transferrin	Apolipoprotein B
Fibrinogen	Acid-1-Glycoprotein
IgAs	Ceruloplasmin
α -2-Antitrypsin	Complement C4
Complement C3	Complement C1q
Haptoglobulin	Prealbumin
IgMs	IgDs
α -1-Antitrypsin	Plasminogen

Gel monodimensional

Vint micrograms de 9 mostres deplecionades i vint de les mateixes mostres no deplecionades es van separar en un gel monodimensional al 10% (veure apartat C-3.4.2). El gels es van tenyir amb Coomassie Colloidal seguint el protocol de l'aparat Tinció del C-2.4.7 (Capítol 2, pàgina 150).

Digestió

Cinquanta micrograms de cada una de les mostres deplecionades es van digerir en solució amb tripsina com es descriu a l'apartat Digestió en solució del C-3.4.6. Per cada microgram de mostra a digerir es van afegir 500fmols de ADH com a patró intern.

LC-MS/SRM

Un microgram de cada una de les mostres es va analitzar en un espectròmetre de masses 4000-Q-TRAP (Applied Biosystems) amb les condicions cromatogràfiques i el mètode SRM *Scheduled* descrits a l'apartat SRM del C-3.4.6.

Processat dels resultats

El processat dels resultats es va fer tal i com es descriu a l'apartat Processat dels resultats de C-3.4.7. En aquest cas

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGF β EN GLIOMA

la quantificació relativa per a cada un dels pèptids es va calcular entre les mostres de cada pacient. Finalment es van mitjanar els valors relatius per a cada proteïna.

C-3.5. Resultats

Aquesta part del treball es va fer en col·laboració amb el Dr. Joan Seoane i en Gerard Folch, membre del seu laboratori.

Com el treball està pendent d'una sol·licitud de patent, no es poden donar dades identificatives de les proteïnes candidates seleccionades. Per aquesta raó no es mostren els noms de les proteïnes ni les seqüències dels pèptids identificats en les anàlisis ICPL i SRM.

C-3.5.1. Resultats de la fase de descobriment

C-3.5.1.1. Anàlisi per LC-MS sense marcatge del secretoma de PCTCs i quantificació per comptatge d'espectres

Com a primer anàlisi, per a explorar els perfils proteics i les possibles diferències dels secretomes de PCTCs tractats o no amb TGF β 1, es va dur a terme un anàlisi proteòmica comparativa per LC-MS sense marcatge. Dotze micrograms de proteïna obtinguts per a cada un dels secretomes del PCTC1- \emptyset PCTC1+TGF β 1 es van fraccionar per electroforesi en un gel monodimensional fent una separació curta (Figura C-3.3). De cada un dels carrils es van retallar quatre bandes que es van digerir amb tripsina. La llista compilada de proteïnes va donar 52 proteïnes diferents identificades en el secretoma PCTC1- \emptyset i 60 identificades en el secretoma del PCTC1+TGF β 1. D'aquestes proteïnes, 14 tenien canvis relatius iguals o més grans a 1.5 basats en el comptatge d'espectres. Els resultats es mostren a la taula C-3.3.

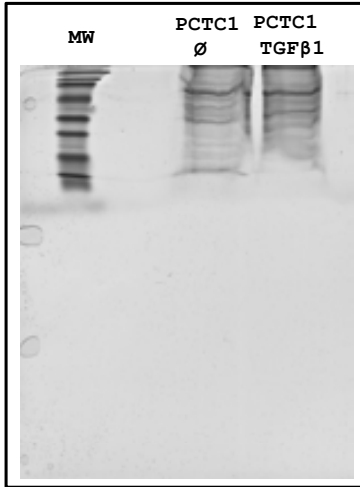


Figura C-3.3. Gel 1-DE al 10% i tenyit amb Coomassie Colloidal on s'han separat 12 μ g del secretoma del PCTC1-Ø i PCTC1+TGF β 1

C-3.5.1.2. Anàlisi ICPL del secretoma de PCTCs

Tenint en compte els resultats de l'experiment LC-MS sense marcatge, amb poques proteïnes i diferències no molt clares, es va plantejar fer un experiment amb el marcatge isotòpic ICPL, amb més quantitat de proteïna i un grau de fraccionament major. Un primer anàlisi ICPL es va fer amb els secretomes del PCTC1 tractat i sense tractar amb TGF β 1 (ICPL1). Es van marcar 100 μ g de cada una de les mostres, un cop marcades es van ajuntar 1:1 i es van separar en un gel monodimensional (Figura C-3.4). Aquesta separació en gel va fer evident que el rentat de les cèl·lules havia estat insuficient per a eliminar el FBS abans del tractament ja que com es mostra en la figura C-3.4, en el carril corresponent a l'experiment ICPL1 s'observa una banda molt majoritària que es correspon amb l'albúmina. A continuació, es van fer dos experiments més d'ICPL amb els secretomes de dos PCTCs diferents, PCTC2 (ICPL2) i PCTC1 (ICPL3), tractats i sense tractar amb TGF β 1. Per l'ICPL2 es van marcar 100 μ g de cada una de les mostres i per l'ICPL3 40 μ g. Com en l'experiment anterior, les mostres marcades es van ajuntar i separar en un gel monodimensional (Figura C-3.4). De cada un dels carrils es van retallar 20 bandes que es

van digerir amb tripsina. En tots tres experiments, aproximadament 2 μ g de proteïna dels digerits de cada una de les bandes es van analitzar per LC-MS. En l'experiment ICPL1 es van identificar 285 proteïnes, de les quals, 23 presentaven canvis superiors a 1.5 vegades. En el experiments ICPL2 i ICPL3 es van identificar 501 i 422 proteïnes, respectivament. D'aquestes, 111 eren diferencials per l'ICPL2 i 23 per l'ICPL3 (ràtio>1.5)

Al processar els resultats no es van identificar pèptids amb lisina no marcada amb el reactiu ICPL, fet que demostra que l'eficàcia del marcatge havia esta elevada.

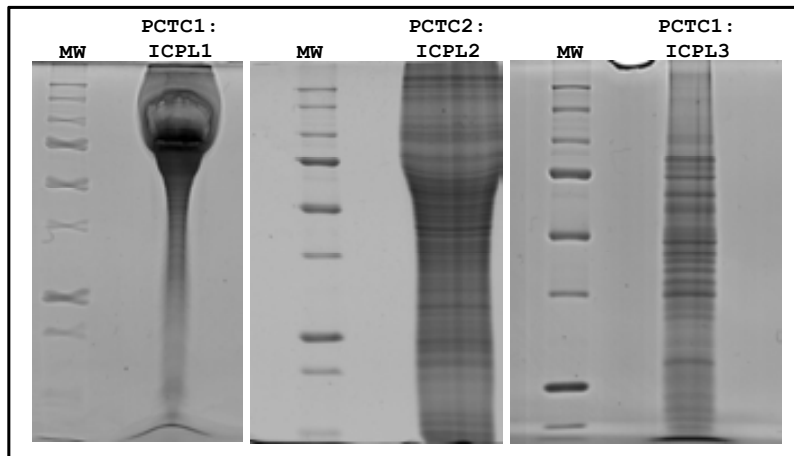


Figura C-3.4. Gels 1-DE de les mostres marcades amb l'ICPL i tenyits amb Coomassie Colloidal

C-3.5.1.3. Proteïnes d'interès

A partir dels quatre experiments de descobriment per LC-MS, un sense marcatge i tres amb marcatge ICPL, es van seleccionar 30 proteïnes per a les quals la seva ràtio d'abundància, en els secretomes tractats amb TGF β 1, augmentava com a mínim 1.5 vegades en almenys un dels quatre experiments (Taula C-3.3). Per a avaluar la relació de les proteïnes diferencials amb TGF β 1 o entre elles i la seva localització cel·lular es va fer una cerca amb el software IPA. Es va obtenir una xarxa on es

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGFβ EN GLIOMA

veu clarament que totes les proteïnes diferencials són proteïnes secretades. Tot i que la PROT_25 apareix en el citoplasma ha estat descrit que es pot trobar en l'espai extracel·lular. Cal destacar l'aparició de TGFβ1 com a nòdul de la xarxa ja que TGFβ1 no estava inclòs a la llista de proteïnes introduïdes en el software IPA, ja que no havia estat identificada en l'anàlisi de descobriment.

Taula C-3.3. Taula amb els resultats agrupats dels diferents experiments de descobriment

Nom	MW [kDa]	Localització Cel.lular	Sense marcatge	ICPL1	ICPL2	ICPL3
			PCTC1	PCTC1	PCTC2	PCTC1
			TGF/Cont	H/L Norm.	H/L Norm.	H/L Norm.
PROT 22	45.0	secretada	30.00	6.68	3.68	4.32
PROT 2	74.6	secretada	1.29	1.66	3.80	2.16
PROT 20	73.8	secretada	1.61	1.71	2.62	1.56
PROT 13	252.6	secretada	1.28	1.36	2.05	1.44
PROT 17	21.4	secretada		1.62		
PROT 30	44.6	secretada		1.59	1.98	
PROT 18	15.6	secretada		1.25	5.10	
PROT 7	108.5	secretada	1.61	1.04	3.19	
PROT 16	29.1	secretada	2.73	1.08	3.13	0.99
PROT 6	187.0	secretada		1.14	2.34	
PROT 9	35.2	secretada			3.49	
PROT 5	129.2	secretada			3.40	
PROT 27	34.6	secretada	0.97		3.39	
PROT 26	85.2	secretada			3.30	
PROT 19	47.4	secretada			2.97	
PROT 24	83.8	secretada			2.91	
PROT 11	38.3	secretada			2.75	
PROT 1	42.5	secretada			2.67	
PROT 8	108.5	secretada			2.62	
PROT 3	22.7	secretada			2.54	
PROT 28	49.1	secretada			2.35	
PROT 23	49.2	secretada			2.29	
PROT 25	82.5	secretada			2.12	
PROT 14	35.0	secretada			1.90	
PROT 10	28.7	secretada			1.81	
PROT 12	77.1	secretada			1.58	
PROT 21	53.9	secretada			1.52	
PROT 15	30.5	secretada			1.47	
PROT 29	129.3	secretada	4.55	1.25		1.10
PROT 4	42.6	secretada			1.47	

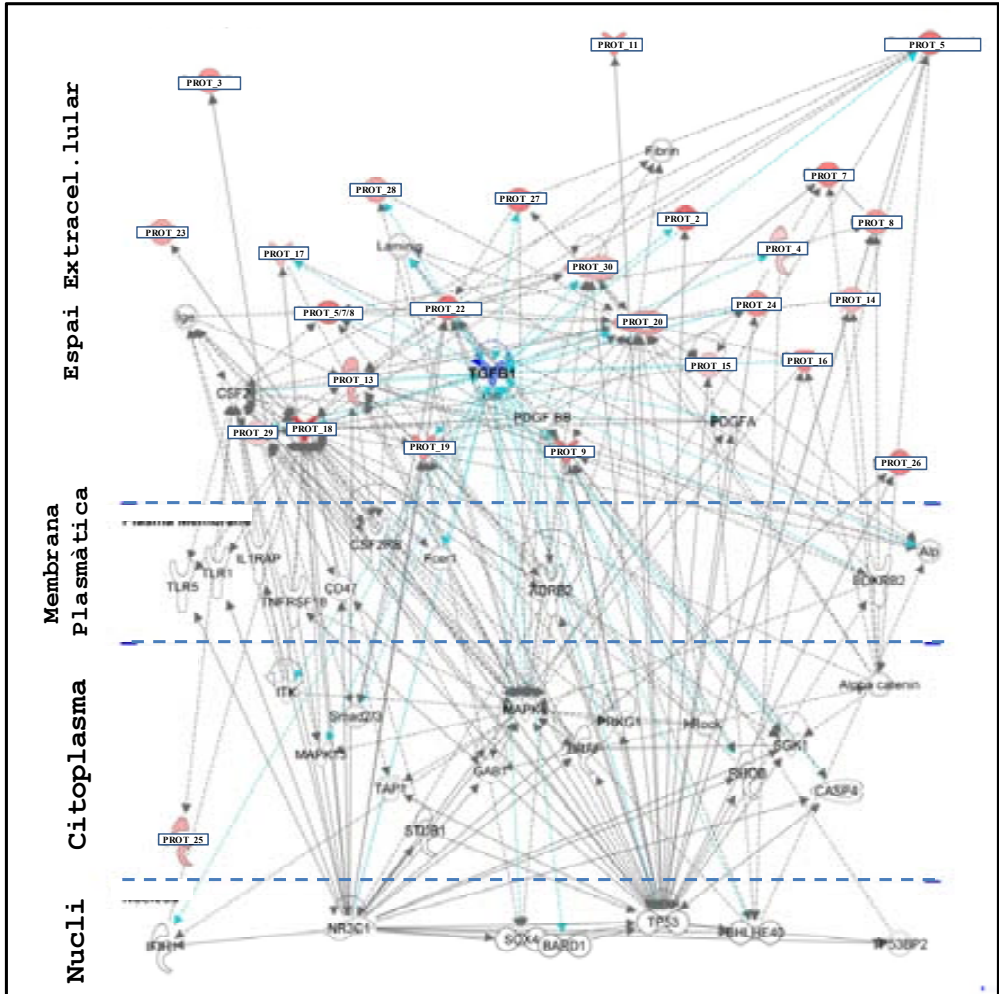


Figura C-3.4. Xarxa resultant de l'anàlisi IPA. Les proteïnes diferencials, augmentades en el secretomes dels PTCs tractats amb TGF β (en tons vermellors), apareixen localitzades a l'espai extracel·lular i tenen com a nòdul central TGF β

C-3.5.2. Resultats de la fase de validació

C-3.5.2.1. Desenvolupament del mètode d'anàlisi per SRM

Per a desenvolupar un mètode d'anàlisi per SRM per a les 30 proteïnes d'interès en mostres de CSF i plasma de pacients, inicialment es va treballar amb mostres de secretoma de PCTCs tractats amb TGF β 1 i amb algunes mostres de CSF deplecionat. Es van crear mètodes individuals de SRM per a cada proteïna candidata i també es van avaluar mètodes per a la ADH, utilitzada com a patró intern, i LIF, que com s'ha descrit a la introducció té un paper important en la resposta oncogènica a TGF β (Taula C-3.4).

Finalment, es va crear el mètode SRM *Scheduled* que contenia les proteïnes per a les quals havíem aconseguit trobar entre un i tres pèptids proteotípics i tres transicions (ions fragment) per cada massa parental. Per a tots els casos s'havia establert el temps de retenció i la CE òptima. A més, es va corroborar que les transicions observades per SRM es corresponguessin amb el pèptid del que es volia fer el seguiment fent una cerca amb MASCOT dels espectres MS/MS obtinguts en l'adquisició depenent de la informació. El mètode SRM *Scheduled* va permetre inferir la presència i quantificar 26 de les 30 proteïnes diferencials, LIF i el patró intern ADH a partir de 73 pèptids i 219 transicions (Figura C-3.5, Taula C-3.4). El mètode SRM *Scheduled*, com ja s'ha explicat, conté els temps de retenció als quals elueixen cada un dels pèptids del mètode. Això fa que durant l'anàlisi per LC-MS les masses parentals es filtrin i fragmentin en un espai de temps concret i no durant tota la cromatografia. Amb això s'aconsegueix millorar la definició dels pics dels EIC de les transicions. Els temps de retenció s'estableixen mitjançant la identificació dels espectres de fragmentació adquirits amb el mode IDA. Una vegada establerts els temps de retenció ja no cal adquirir els espectres de fragmentació, aconseguint

millorar una mica més el senyal de les transicions (Figura C-3.6).

Taula C-3.4. Proteïnes candidates i número de pèptids per proteïna inclosos en el mètode SRM *Scheduled*

Proteïna	#Pep Mètode SRM
PROT_1	1
PROT_2	3
PROT_3	
PROT_4	
PROT_5	3
PROT_6	3
PROT_7	3
PROT_8	3
PROT_9	2
PROT_10	
PROT_11	3
PROT_12	3
PROT_13	3
PROT_14	2
PROT_15	1
PROT_16	3
PROT_17	
PROT_18	3
PROT_19	2
PROT_20	3
PROT_21	3
PROT_22	3
PROT_23	3
PROT_24	3
PROT_25	3
PROT_26	2
PROT_27	3
PROT_28	2
PROT_29	3
PROT_30	1
LIF HUMAN	3
ADH YEAST	3

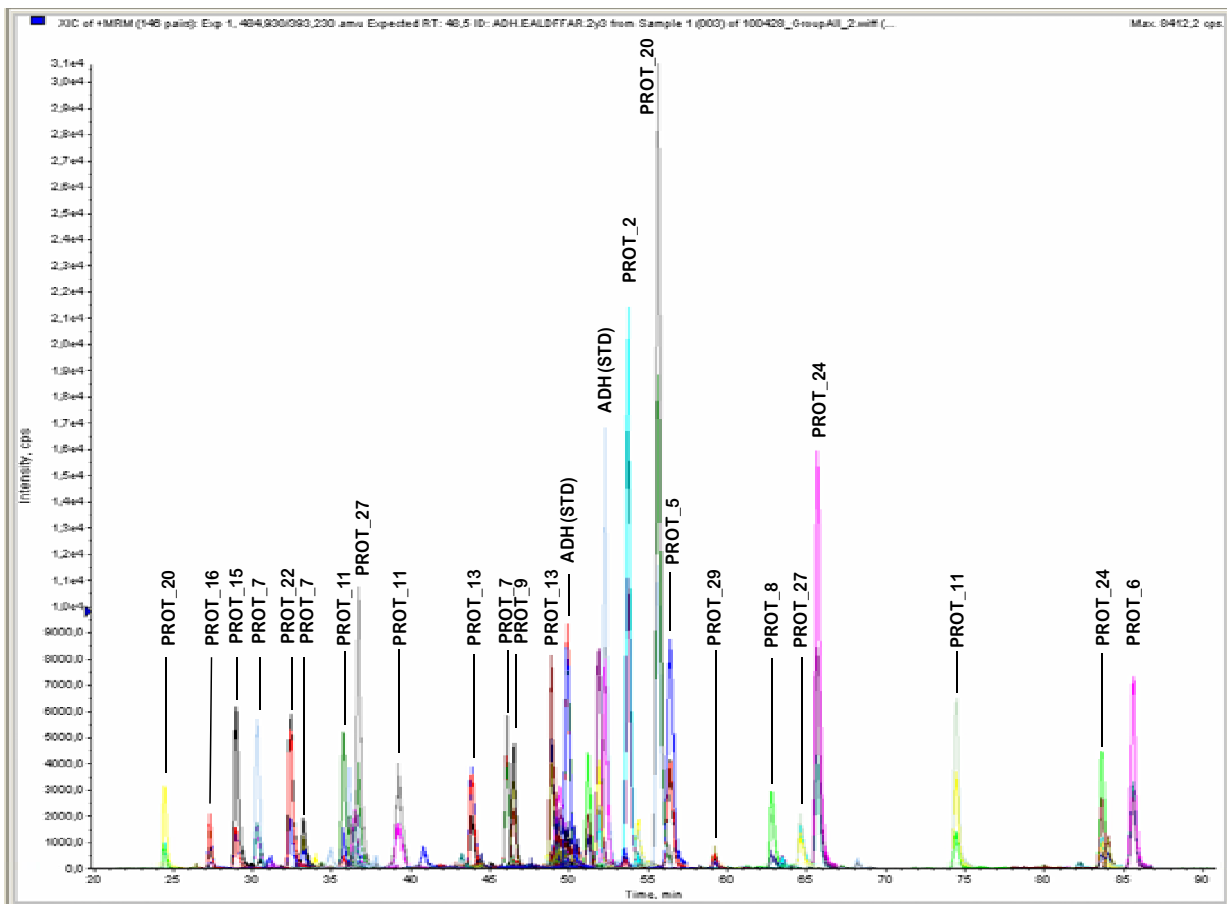


Figura C-3.5. EIC de les transicions observades per a diferents pèptids d'algunes de les proteïnes incloses en el mètode SRM *Scheduled* de la mostra PCTC2. Cada pic es correspon amb el senyal de les tres transicions de les quals es fa el seguiment per a un determinat pèptid

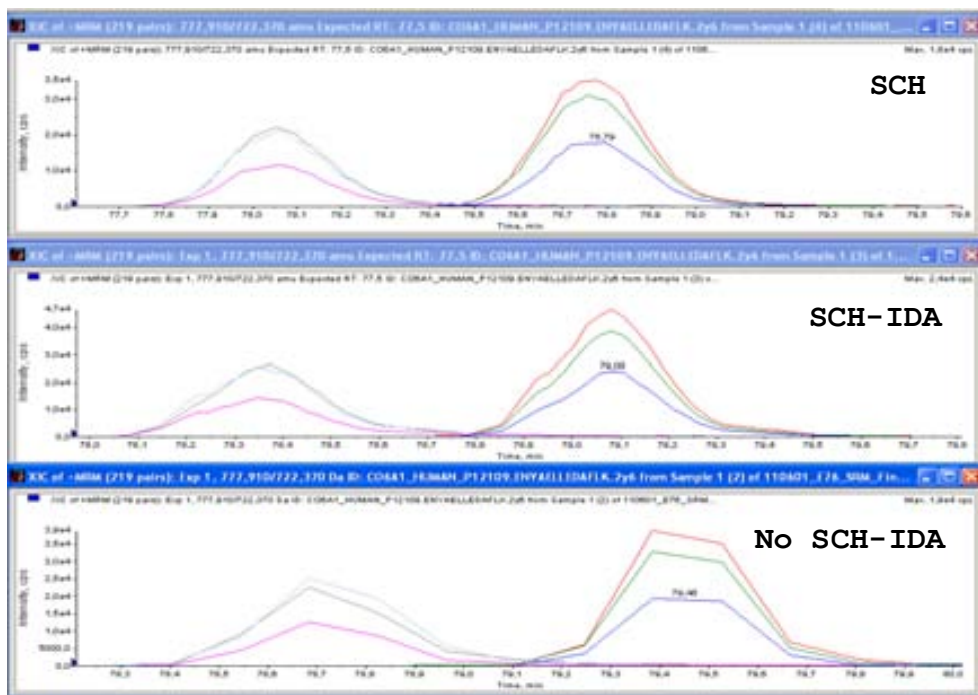


Figura C-3.6. EIC de les transicions de dos pèptids obtinguts amb el mètode SRM *Scheduled* (SCH), amb el mètode SRM *Scheduled* adquirint els espectres de fragmentació amb el mode IDA (SCH-IDA) i amb un mètode SRM no *Scheduled* i on es van adquirir els espectres de fragmentació amb el mode IDA

C-3.5.2.2. Validació de les proteïnes candidates per anàlisi SRM del secretoma del PCTC2+TGF β 1 tractat amb l'inhibidor LY215799

Es va dissenyar un experiment per avaluar la modulació de les proteïnes candidates trobades en l'experiment de descobriment per efecte del TGF β 1 i de l'inhibidor del receptor de TGF β 1 LY215799. Per això es van recollir els medis condicionats de quatre PCTCs: PCTC1- \emptyset , PCTC1+LY215799, PCTC1+TGF β 1 i PCTC1+TGF β 1+LY215799. A més, es van obtenir els llistats de les cèl·lules.

Com a control, per a corroborar l'activació de la via de TGF β 1 amb el tractament, i l'efecte de l'inhibidor LY215799, es van analitzar per western blot els nivells de p-SMAD2 en les

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGFβ EN GLIOMA

cèl·lules dels PCTC1 amb els quatre tractaments. Es va observar que, d'acord amb el que s'esperava, el tractament amb TGFβ1 fa augmentar el nivells de p-SMAD2 i aquests disminueixen al tractar les cèl·lules amb l'inhibidor del receptor I de TGFβ1, LY215799 (Figura C-3.7)

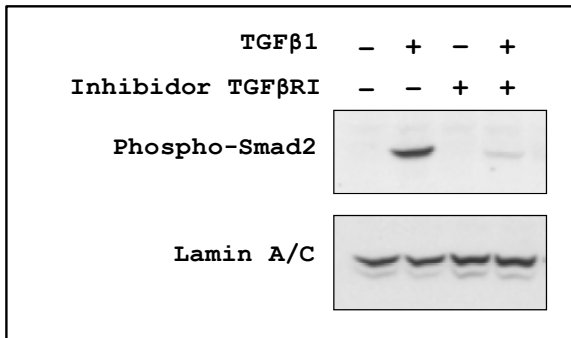


Figura C-3.7. Anàlisi western blot de les cèl·lules del PCTC1 tractades amb TGFβ i l'inhibidor LY215799

Un microgram de cada una d'aquestes mostres es va analitzar per LC-MS al 4000-Q-TRAP utilitzant el mètode SRM *Scheduled*. Es van poder detectar i quantificar 23 de les 27 proteïnes incloses en el mètode SRM *Scheduled*. Els valors que es presenten en els gràfics de la figura C-3.8 es corresponen a la suma de les àrees de les transicions de cada pèptid, normalitzades respecte la ADH, dividides pel valor del mateix pèptid a la mostra PCTC1-Ø. Es veu clarament que al tractar els PCTCs amb TGFβ1 es donava un augment en els nivells de tots els pèptids detectats d'entre 1.5 i 50 vegades. Al afegir l'inhibidor LY215799 als PCTCs, en tots els casos, es va observar una baixada dels nivells dels pèptids respecte el PCTCs tractats amb DMSO. Cal recordar que els cultius primaris provenen de la resecció de gliomes que tenen la via de TGFβ1 activa, per tant, pot ser que els nivells basals (Ø) es deguin en part a l'activitat TGFβ1 i al tractar amb l'inhibidor aquest nivells disminueixin. Aquests resultats confirmen que les proteïnes seleccionades són bones candidates a ser marcadors de l'activació de la via de TGFβ1.

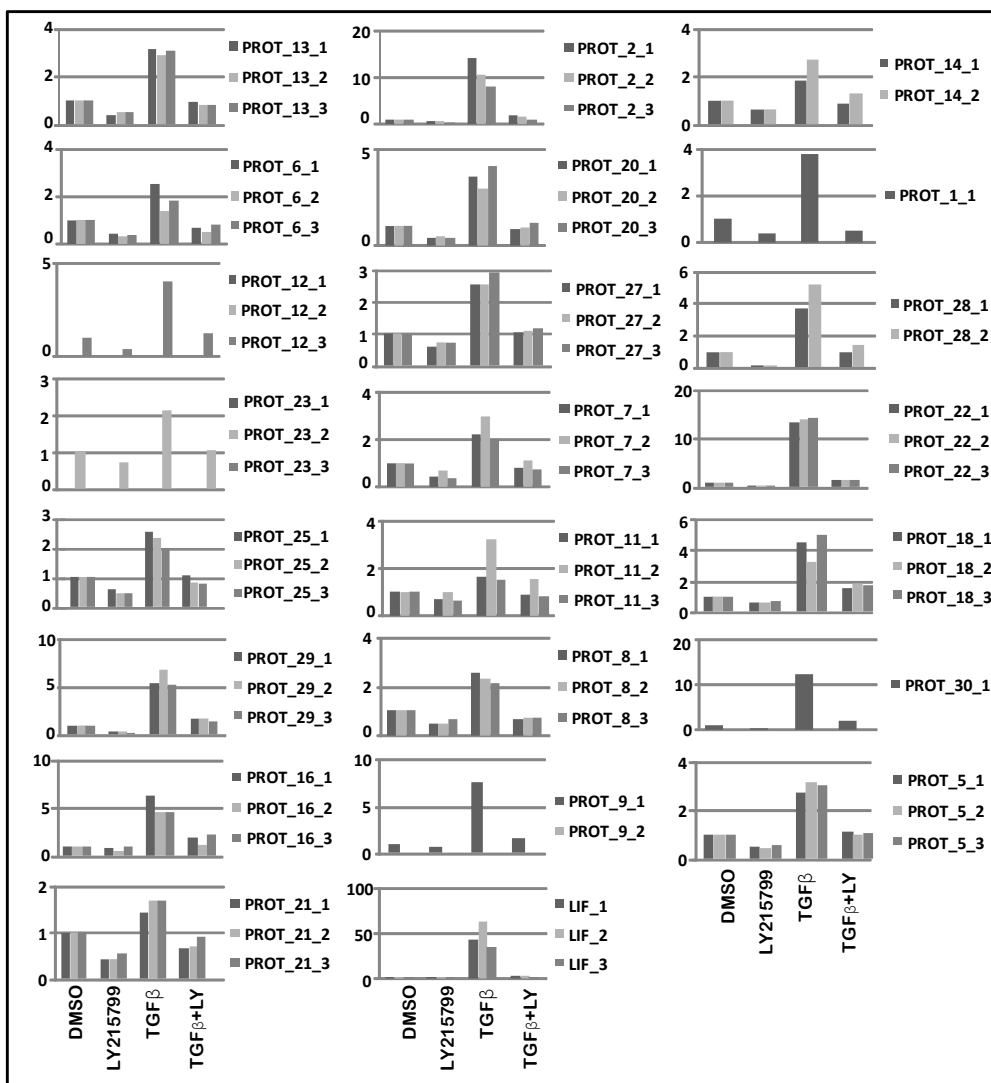


Figura C-3.8. Gràfics amb la variació de cada una de les proteïnes del mètode SRM Scheduled detectades i quantificades en el secretoma del PCTC1 en diferents condicions: PCTC1- \emptyset (DMSO), PCTC1-LY215799 (LY215799), PCTC1-TGF β 1 (TGF β) i PCTC1-TGF β -LY215799 (TGF β +LY)

C-3.5.2.3. Posada a punt de l'anàlisi per SRM de CSFs

El líquid cefaloraquídi, en estar en contacte directe amb el tumor, és el fluid on amb més probabilitat s'esperaria trobar reflectits els canvis en les proteïnes induïdes per TGF β 1 seleccionades a la fase de descobriment. Com es podia disposar de CSFs de pacients amb glioma i d'altres tipus de tumors cerebrals, es va plantejar la validació de les proteïnes candidates en mostres de CSF.

En el líquid cefaloraquídi, com el plasma i el sèrum, el 80% de la mostra està formada per albúmina i IgGs. Aquestes proteïnes fan que el rang dinàmic sigui molt gran, de manera que les proteïnes minoritàries són difícilment detectades. Tot i així, com la tècnica de SRM és molt sensible i específica es va decidir analitzar amb el mètode de SRM Scheduled un CSF sense deplecionar i el mateix CSF deplecionat amb una columneta *Albumin and IgG depletion SpinTrap* (GE, Healthcare). En ambdós casos, la mostra havia estat prèviament concentrada unes 100 vegades mitjançant una membrana *Amicon Ultra de 3kDa* (Millipore).

En el cas de l'anàlisi del CSF sense deplecionar únicament vam aconseguir detectar 4 pèptids de tres proteïnes diferents (PROT_16, PROT_27 i PROT_11). Pel contrari, l'anàlisi de la mostra deplecionada, en la qual havíem enriquit les proteïnes minoritàries unes 5 vegades, va permetre detectar i identificar 24 de les proteïnes candidates incloses en el mètode SRM Scheduled amb 61 pèptids i 183 transicions (Figura C-3.9). Les proteïnes que no es van detectar van ser la PROT_18, la PROT_26 i la PROT_30.

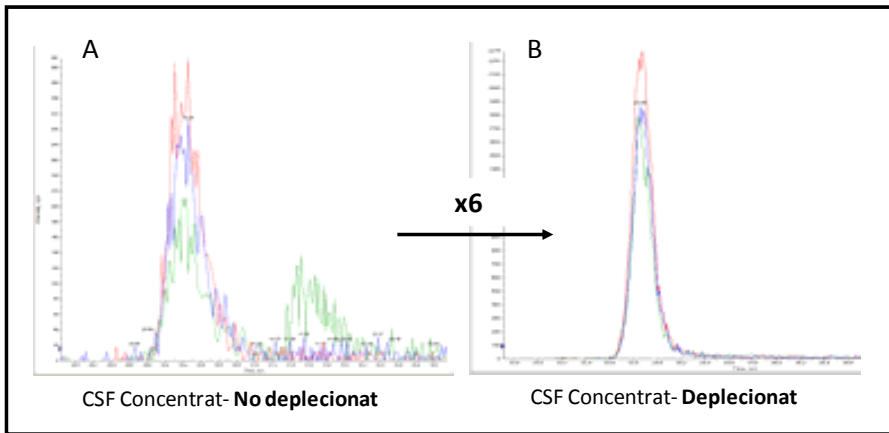


Figura C-3.9. EIC de les transicions d'un pèptid analitzat per SRM en una mostra de CSF (A) no deplecionat i (B) deplecionat amb la columneta *Albumin and IgG depletion SpinTrap* (GE, Healthcare)

C-3.5.2.4. Anàlisi per SRM de mostres de CSFs de pacients amb glioma i altres tipus de tumors cerebrals

Per a veure la correlació entre els nivells de TGF β 1 i els nivells de les proteïnes candidates a conformar la firma proteica de l'activitat de TGF β 1 es van analitzar per LC-MS amb l'espectròmetre de masses 4000-Q-TRAP i el mètode SRM Scheduled 13 mostres de CSF. D'aquestes 13 mostres 8 eren de pacients amb glioma i 5 de pacients amb un tumor cerebral no-glioma (2 meningiomes, 1 metàstasi i 2 meduloblastomes) amb nivells de TGF β 1 mesurats per ELISA entre 14 i 7800pg/mL. Es van excloure d'aquest anàlisi mostres que poguessin estar contaminades amb sang i totes les mostres es van deplecionar. La mateixa quantitat de proteïna de cada una de les mostres amb el patró intern ADH, es va digerir en solució amb tripsina i es va analitzar amb el mètode SRM *Scheduled*.

Per a veure la correlació entre els nivells de les proteïnes candidates i els nivells de TGF β 1 es van utilitzar les sumes

de les àrees dels EIC de les transicions de cada pèptid. Aquestes àrees es van normalitzar utilitzant la suma de les àrees de les transicions del pèptid EALDFFAR del patró intern (ADH). A continuació, els valors es van referir a quantitats per μL de CSF inicial (multiplicant pel factor micrograms de proteïna deplecionada/ μL de CSF deplecionats) i es va calcular la ràtio de cada una de les mostres respecte el CSF amb menys quantitat de TGF β 1. Els valors de diferents pèptids d'una mateixa proteïna es van mitjanar. Finalment, es va determinar la correlació entre la concentració de les proteïnes i TGF β 1 tant pel conjunt de les 13 mostres analitzades com pel subgrup format per les mostres de CSF de pacients amb glioma. A la taula C-3.5 es presenten els valors de R^2 corresponents. Es va trobar que 11 proteïnes presentaven valors de coeficients de correlació (R^2) amb la concentració de TGF β 1 superiors a 0.7 en el conjunt de totes les mostres i 12 proteïnes presentaven $R^2 > 0.7$ considerant només les mostres de gliomes. A la figura C-3.10 es mostren com exemple els gràfics de correlació per a dues proteïnes (LIF i PROT_29) que presenten una elevada correlació i per a una (PROT_11) que no presenta una correlació significativa. A més, per a varies proteïnes es van obtenir valors de R^2 entre 0.6 i 0.7.

A partir dels valors de la ràtio del senyal normalitzat de cada pèptid respecte la mitja del conjunt de valors es va fer el *Heat Map* que es mostra a la figura C-3.11. Aquest *Heat Map* permet veure que el conjunt de mostres corresponents a pacients amb glioma presenten, en general, nivells de les proteïnes superiors als de la mitja mentre que en els no-glioma els nivells, en la majoria dels casos, són inferiors.

Taula C-3.5. Valors de coeficients de correlació entre els nivells de les proteïnes candidates i la concentració de TGFβ1

Proteïna	R ² Glioma	R ² Glioma i No-glioma
PROT_1	0.832	0.847
PROT_2	0.865	0.760
PROT_5	0.001	0.056
PROT_6	0.890	0.883
PROT_7	0.548	0.538
PROT_8	0.622	0.681
PROT_9	0.445	0.567
PROT_11	0.016	0.017
PROT_12	0.490	0.550
PROT_13	0.872	0.894
PROT_14	0.007	0.070
PROT_15	0.632	0.533
PROT_19	0.782	0.808
PROT_16	0.001	0.026
LIF	0.831	0.858
PROT_20	0.642	0.493
PROT_21	0.765	0.798
PROT_22	0.842	0.873
PROT_23	0.796	0.407
PROT_24	0.595	0.637
PROT_25	0.887	0.892
PROT_26	0.000	0.126
PROT_27	0.782	0.788
PROT_28	0.003	0.015
PROT_29	0.959	0.965

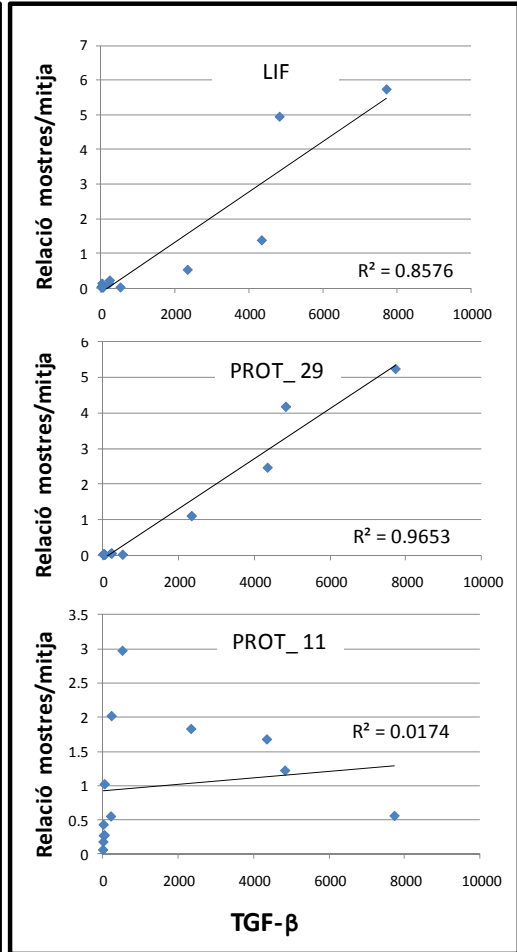


Figura C-3.10. Gràfics de la correlació de tres de les proteïnes candidates respecte la concentració de TGFβ

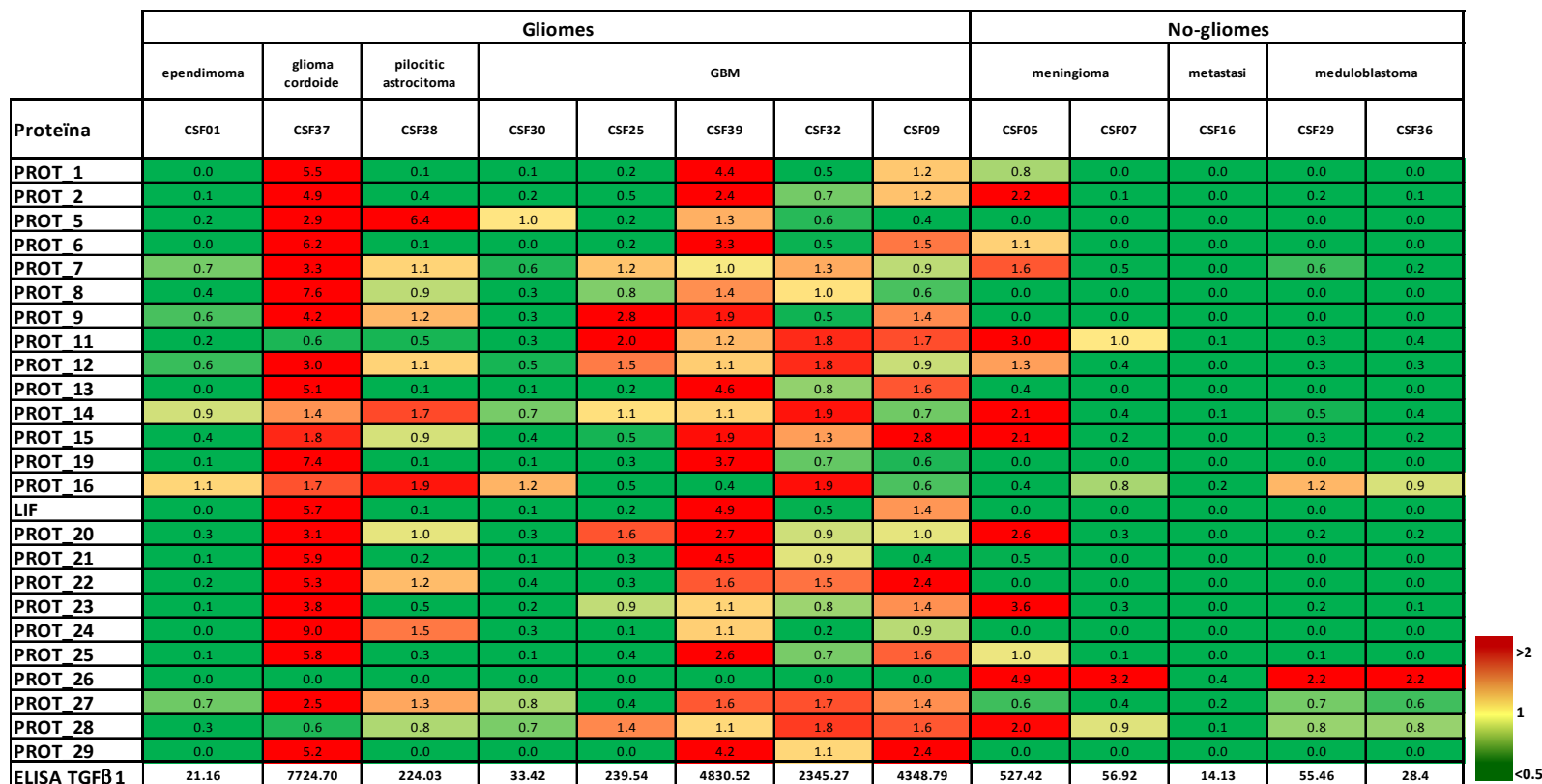


Figura C-3.11. Heat Map amb els valors de la ràtio entre els nivells de les proteïnes i la mitja de totes les mostres. Cada columna es correspon amb una mostra de CSF i cada fila hi han els valors per a cada una de les proteïnes analitzades. La intensitat dels colors s'ha assignat en funció dels valors de les ràtios. L'escala utilitzada esta definida en el lateral.

C-3.5.2.5. Anàlisi per SRM de mostres de plasma de pacients amb glioblastoma

Després dels resultats prometedors obtinguts amb les mostres de CSF i, tenint en compte que l'obtenció del CSF després de la operació pot suposar un risc per al pacient, es va pensar intentar detectar i validar les proteïnes candidates en mostres de plasma. El plasma es pot obtenir de forma senzilla i no invasiva en qualsevol moment.

Aquesta anàlisi es va fer utilitzant mostres de plasma de tres pacients amb glioblastoma que es trobaven dins un assaig clínic amb l'inhibidor del receptor I de TGF β 1 LY215799. Dels tres pacients avaluats en aquesta anàlisi, dos tenien activitat TGF β 1 en el tumor (P1 i P2) i un no (P3) d'acord amb els resultats previs d'anàlisi de RNA (nanosting) dels tumors, que van mostrar la presència d'una firma a nivell de RNA d'activitat TGF β 1. Les mostres es van obtenir d'estadis on els pacients rebien tractament amb l'inhibidor LY215799 (ON) i estadis on no rebien tractament (OFF). La idea era veure si les proteïnes candidates es modulaven en els diferents estadis com a resultat de la resposta al tractament anti-TGF β .

Com els CSFs, aquestes mostres també es van deplecionar, en aquest cas amb una columna que elimina les 20 proteïnes majoritàries del plasma aconseguint enriquir les mostres unes 25 vegades. La mateixa quantitat de proteïna de cada una de les mostres, juntament amb el patró intern ADH, es va digerir en solució amb tripsina i es va analitzar amb el mètode SRM *Scheduled* en l'espectròmetre de masses 4000-Q-TRAP. En aquestes mostres de plasma es van aconseguir detectar i identificar 15 de les proteïnes amb 36 pèptids i 108 transicions (Taula C-3.6).

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGF β EN GLIOMA

Taula C-3.6. Proteïnes i número de pèptids detectats per SRM i identificats en les mostres de plasma

Proteïna	#Pep Mètode SRM	Base de dades Plasma Proteome
PROT 1		
PROT 2	2	
PROT 3		
PROT 4		
PROT 5		
PROT 6	3	
PROT 7	2	
PROT 8		
PROT 9		x
PROT 10		
PROT 11	1	x
PROT 12	3	x
PROT 13	3	
PROT 14	2	x
PROT 15	1	
PROT 16	3	
PROT 17		x
PROT 18		x
PROT 19		x
PROT 20	3	x
PROT 21		x
PROT 22		
PROT 23	3	x
PROT 24	3	x
PROT 25	2	x
PROT 26		
PROT 27	2	
PROT 28		
PROT 29	3	
PROT 30		x
LIF HUMAN		x
ADH YEAST	3	

x) Proteïnes descrites com a observades per MS en el plasma segons la base de dades Plasma Proteome

En aquest cas, la quantificació relativa es va fer comparant les mostres en estadis ON i OFF per a cada pacient. Com en els CSFs, es van utilitzar les sumes de les àrees dels EIC de les transicions de cada pèptid. Aquestes àrees es van normalitzar utilitzant la suma de les àrees de les transicions del pèptid EALDFFAR del patró intern (ADH). A continuació, els valors es van referir a quantitats per μ L de plasma inicial (multiplicant pel factor micrograms de proteïna deplecionada/ μ L de plasma deplecionats). Es van calcular els valors corresponents a cada proteïna fent la

mitja dels valors mesurats pels diferents pèptids. Finalment es van calcular les relacions entre les parelles de dades en estadis ON i OFF de cada pacient. Amb les àrees normalitzades es van fer gràfics per a veure la modulació de les proteïnes al llarg del tractament amb l'inhibidor (Figura C-3.12). Aquests resultats també es representen en forma de *Heat Map* a la figura C-3.13. Es va observar que en els pacients P1 i P2 (positius per activitat TGF β 1 en el tumor) la majoria de proteïnes candidates augmentaven en estadis OFF i disminuïen en estadis ON. Pel contrari, en el cas del pacient P3 (negatiu per activitat TGF β 1 en el tumor) les proteïnes candidates no presentaven modulació per efecte del tractament amb l'inhibidor.

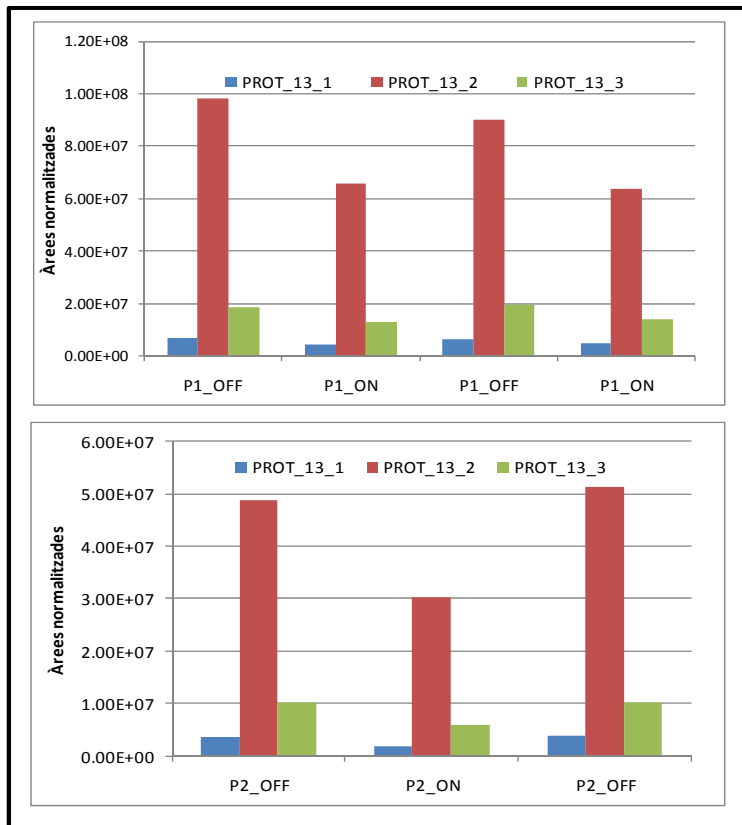


Figura C-3.12. Gràfics amb la suma d'àrees normalitzades dels EIC de les transicions dels diferents pèptids de la PROT_13 per a dos pacients amb glioblastoma, P1 (dalt) i P2 (baix), en estadis ON i OFF del tractament

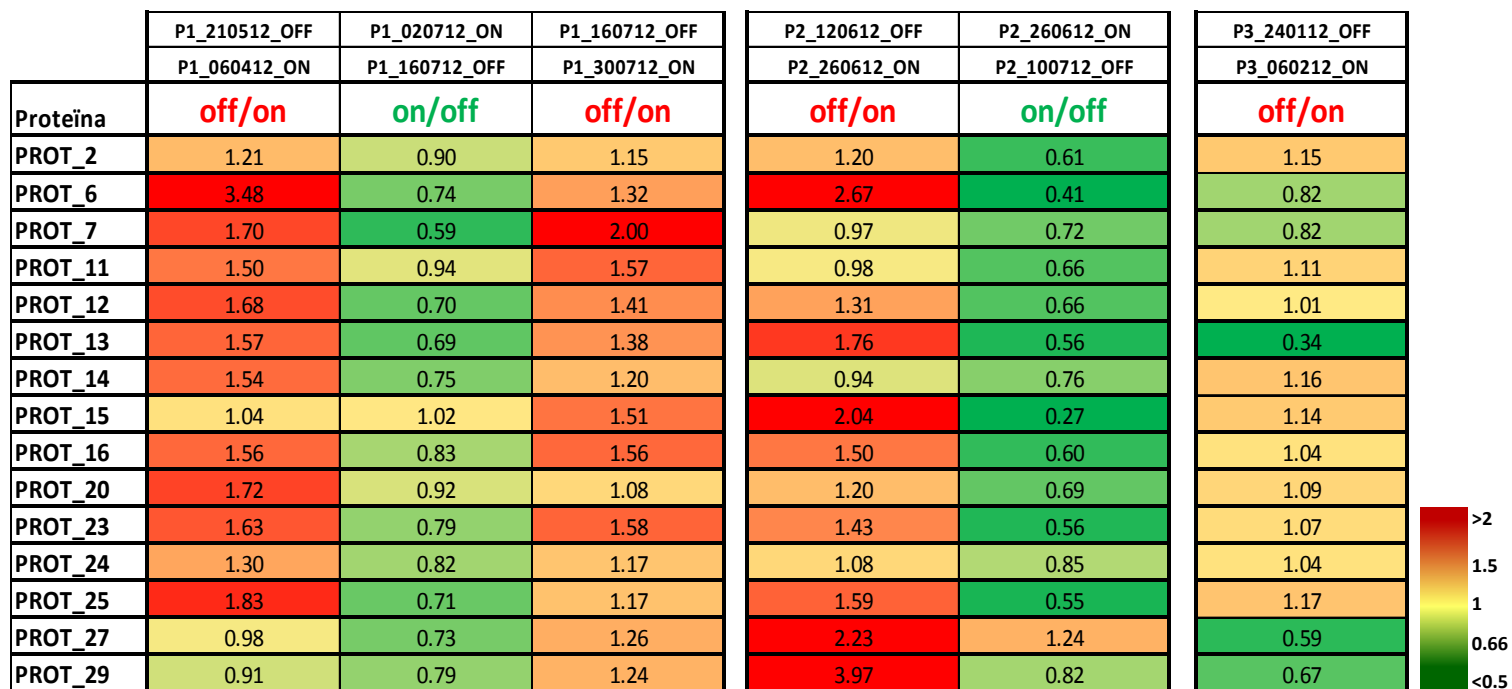


Figura C-3.13. Heat Map amb els valors de les ràtios OFF/ON i ON/OFF de diferents estadis del tractament de dos pacients (P1 i P2) TGF β 1 positius i un pacient (P3) TGF β negatiu. L'escala de colors utilitzada és definida en el lateral.

C-3.6. Discussió

Els glioblastomes són els tumors primaris més freqüents i agressius que es donen en el cervell. En aquest tipus de tumors la via de TGF β juga un paper molt important ja que està altament activada. Actualment, TGF β s'està avaluant com a possible diana terapèutica, per això és fa necessari disposar de marcadors que permetin la selecció prèvia de la població que es podria beneficiar d'aquest tipus de teràpia i la monitorització del tractament. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball era trobar un conjunt de proteïnes que indiquin activitat TGF β en els tumors.

En una primera fase, per a trobar les proteïnes candidates es van fer anàlisis proteòmiques de descobriment dels secretomes dels PCTCs. Els PCTCs de glioma són cèl·lules obtingudes directament d'una biòpsia del tumor del pacient, per això el secretoma d'aquestes cèl·lules representen el medi més semblant al líquid cefaloraquidi que envolta als tumors. Mitjançant els mètodes de LC-MS sense marcatge i ICPL es van trobar trenta proteïnes augmentades en els secretomes dels PCTCs tractats amb TGF β 1 respecte els no tractats. La bibliografia va mostrar que totes aquestes proteïnes eren secretades i estaven relacionades amb l'activitat de TGF β 1.

En una segona fase, la de validació, es va utilitzar un mètode de proteòmica dirigida, el SRM, per a fer el seguiment de les proteïnes candidates a conformar la firma proteica indicadora d'activitat TGF β 1 en diferents tipus de mostres. Per a posar a punt el mètode es van utilitzar el secretoma d'una mostra de PCTC tractada amb TGF β 1 i diferents mostres de CSF deplecionats. Amb el mètode final, *SRM Scheduled*, es podien detectar 27 de les 31 proteïnes candidates.

A continuació, el mètode de SRM creat es va aplicar al secretoma de PCTCs tractats amb TGF β 1 i un dels seus inhibidors, el LY215799, el mateix inhibidor que es dona en el tractament de pacients amb glioblastoma. Es va veure que els

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGF β EN GLIOMA

nivells de senyal dels pèptids de les proteïnes candidates augmentaven al tractar el PCTC amb TGF β 1 i disminuïen clarament al tractar el PCTC amb l'inhibidor. Aquests resultats van corroborar la validesa de totes les proteïnes candidates obtingudes en les anàlisis de descobriment.

En aquest punt, es va decidir avaluar per SRM les possibles proteïnes biomarcadores en les mostres de CFS de pacients amb glioma i altres tumors cerebrals no-glioma i veure si els nivells de les proteïnes correlacionaven amb la concentració de TGF β 1, mesurada per ELISA, a les mostres. A les mostres de CSF deplecionades es van poder detectar per SRM 24 de les proteïnes candidates. Els nivells de 12 proteïnes correlacionaven amb la concentració de TGF β 1 amb valors de R^2 més grans de 0.7. Entre les proteïnes amb bona correlació trobem LIF. Aquesta proteïna havia estat descrita com a induïda per l'activació de la via de TGF β 1, tot i que no havia estat detectada en l'anàlisi de descobriment.

Finalment, amb la idea de poder definir la firma proteica en un tipus de mostra obtinguda de forma menys invasiva que el CSF es va voler fer el seguiment de les proteïnes candidates en mostres de plasma. Per aquest motiu es van utilitzar mostres de plasma de pacients, amb glioma i altres tumors cerebrals, en tractament amb LY215799. En plasma amb el mètode de SRM es van aconseguir detectar 15 de les proteïnes candidates. Es va veure que en els dos pacients amb la via de TGF β 1 activa la majoria de proteïnes disminuïen quan els pacients eren tractats. En canvi, en el pacient amb la via de TGF β 1 no activa les proteïnes no eren modulades o la modulació no correlacionava amb el moment del tractament.

Es veritat que els canvis dels nivells d'aquestes proteïnes en el plasma podrien no estar relacionats directament amb l'activitat de TGF β en el tumor, per això serien necessaris estudis complementaris com per exemple l'anàlisi de mostres de CSF en estadis ON i OFF.

També es podria pensar en mesurar directament els nivells de TGF β 1 en el plasma. El problema és que en el plasma i ha un nivell molt elevat de TGF β 1 i no és esperable que la mesura dels nivells d'aquesta proteïna en sang reflecteixin l'activitat a nivell del tumor.

Per a poder avaluar la resta de proteïnes candidates que no han pogut ser detectades en el plasma per SRM, caldria posar a punt mètodes més sensibles, basats en anticossos, com l'ELISA. Igualment, caldria disposar d'aquests mètodes per a poder validar la utilitat de la firma proteica proposada a través d'anàlisis d'un nombre suficientment gran de mostres, en el context d'un assaig clínic. Tanmateix, els resultats d'aquest treball han demostrat la utilitat de la tecnologia SRM per a completar una primera fase de validació per a la qual no ha estat necessària la utilització de tècniques basades en anticossos, amb els avantatges que això comporta.

En conjunt, aquests resultats ens acosten una mica més a la definició d'una firma proteica útil per a la classificació dels pacients, la selecció de la població que es podria beneficiar de la teràpia anti-TGF β i el seguiment de l'evolució del tractament.

C-3.7. Conclusions

- En la fase de descobriment, l'ús de tècniques de proteòmica quantitativa de LC-MS, sense marcatge i ICPL, aplicades a secretomes de PCTCs, va permetre identificar trenta proteïnes candidates a formar part de la firma proteica indicadora de l'activitat TGF β .
- En la fase de validació, el mètode SRM aplicat a mostres de CSF de pacients amb glioma va mostrar que hi havia una elevada correlació entre els nivells de les proteïnes candidates i la concentració de TGF β 1.
- En la fase de validació, el mètode SRM aplicat a mostres de plasma de pacients amb glioma tractats amb l'inhibidor de TGF β , va servir per demostrar la modulació dels nivells d'algunes de les proteïnes candidates en resposta al tractament.
- Els resultats de l'estudi proteòmic de descobriment i validació van permetre proposar una firma proteica biomarcadora de l'activitat TGF β en pacients amb glioma.

DISCUSSIÓ GENERAL

DISCUSSIÓ GENERAL

En la recerca biomèdica, les tècniques d'anàlisi del proteoma estan donant un nou enfocament experimental global útil per a comprendre el funcionament de la cèl·lula i els seus estats patològics, amb l'objectiu de desenvolupar mètodes de predicció, diagnosi i tractament de les malalties. Per això, la proteòmica s'ha convertit en una de les àrees d'investigació més actives en l'era post-genòmica. Actualment, gràcies a la seqüenciació del genoma i a la millora de les tècniques analítiques i bioinformàtiques, la proteòmica basada en l'espectrometria de masses, és capaç d'identificar i quantificar un gran número de proteïnes d'un mateix proteoma. Tot i això, un únic mètode proteòmic no es capaç de cobrir totes les proteïnes presents en un proteoma, degut a l'elevada complexitat i l'ampli rang dinàmic que pot presentar.

En aquest treball, s'han aplicat diferents aproximacions proteòmiques de quantificació i validació per a l'estudi de diferents tipus de mostres i patologies. En cada cas, en funció dels objectius de l'estudi i de les eines de que es disposava, es va decidir quin flux de treball era més adient aplicar. Això no vol dir que altres mètodes no fossin també aplicables.

En el primer treball, on es va estudiar la patogènesi de la PDR, inicialment es va plantejar la necessitat i utilitat de fer servir algun mètode per a deplecionar les proteïnes majoritàries del fluid vitri. El problema general dels fluids biològics, com orina, plasma, líquid cefaloraquidi o fluid vitri, és la presència de proteïnes majoritàries, com l'albumina i les IgGs, que representen aproximadament un 80% de la mostra. Es va comprovar que l'ús d'anticossos específics per a l'eliminació de la major part de les proteïnes abundants permetia observar una part del proteoma que si no quedaria totalment emmascarat per aquestes. S'aconseguia doncs,

DISCUSSIÓ GENERAL

disminuir el rang dinàmic de concentració de les proteïnes, tot enriquint, les minoritàries.

Pel que fa a les tècniques proteòmiques, es va decidir utilitzar la 2D-DIGE perquè és una tècnica molt resolutiva i reproducible que podia aplicar-se, de forma eficient, a un número de rèpliques biològiques suficient per a avaluar la significació estadística de les diferències que s'observessin. Aquesta tècnica va permetre tenir una imatge global del proteoma del fluid vitri i alhora quantificar les proteïnes amb abundància diferencial entre les mostres de pacients diabètics amb PDR i no diabètics amb MH. D'aquesta manera es van detectar i identificar 11 proteïnes diferencials de les quals 5 es van validar per *western blot*. De la comparació de les relacions d'abundància obtingudes per a les 5 proteïnes validades en l'anàlisi 2D-DIGE i *western blot* es va veure que els valors correlacionaven molt bé i que per tant la depleció de les proteïnes majoritàries no havia alterat significativament la quantificació.

Un avantatge dels gels bidimensionals respecte a tècniques de LC-MS és que permeten la fàcil observació de modificacions postraduccionalment o fragments. En aquest cas vam trobar que certs grups de taques identificaven a la mateixa proteïna, això es podria explicar, en alguns casos, per la presència de diverses isoformes per a cada proteïna, probablement formes glicosilades. Pel que fa als fragments, es va observar que algunes proteïnes estaven truncades, ja que s'identificaven en taques amb pesos moleculars menors al teòric. Un cas molt clar és l'observació dels diferents fragments d'activació del complement.

La principal limitació d'aquesta tècnica és la detecció de proteïnes minoritàries per sota dels picograms. Per això proteïnes ja descrites per a la PDR com el VEGF no es van poder detectar.

Aquest treball, a més, va donar lloc a dos estudis més. Un sobre l'IRBP, que s'havia trobat disminuït en pacients diabètics amb PDR i un segon treball sobre l'ApoA1 i l'ApoH que es van trobar augmentades en els pacients diabètics amb PDR. El primer estudi va demostrar tant per 2D-DIGE com per WB que la concentració d'IRBP era significativament menor en els pacients diabètics amb PDR respecte els diabètics amb retinopatia diabètica no-proliferativa (NPDR) i en aquesta, era menor que en els controls (Garcia-Ramirez et al. 2009). En el segon, l'ApoA1 i l'ApoH, proteïnes per a les que s'havia observat un augment en aquest treball, però que no es van validar, van mostrar nivells augmentats en el fluid vitri i la retina de pacients diabètics respecte els controls (Simo et al. 2008). En conjunt, els resultats d'aquets estudis podrien ser rellevants en el desenvolupament de nous tractaments dirigits a reduir el desenvolupament de la retinopatia diabètica.

En el segon treball es va estudiar l'efecte de l'expressió d'AIRE en cèl·lules epitelials de la tiroide. En aquest cas les mostres estudiades eren extractes cel·lulars. El perfil proteic d'aquest tipus de mostres és molt més homogeni que el dels fluid biològics però és molt més complex.

Per a l'anàlisi quantitativa es van utilitzar dues tècniques proteòmiques, la 2D-DIGE i la LC-MS amb el marcatge ICPL. Del solapament dels resultats de les anàlisis proteòmiques es va obtenir que 29 proteïnes es trobaven amb abundàncies diferencials entre les cèl·lules transfectades i les no transfectades. La validació tant per western blot com per citometria de flux va confirmar els resultats proteòmics.

Les eines proteòmiques utilitzades van permetre descriure una nova funció per a AIRE. Aquest nou paper està relacionat amb l'augment de l'apoptosi en les cèl·lules transfectades. La identificació d'algunes proteïnes diferencials relacionades amb apoptosi ho van fer pensar, i els assajos d'apoptosi que

DISCUSSIÓ GENERAL

es van realitzar ho van confirmar. Podria semblar estrany no haver trobat evidències del paper conegut d'AIRE com a regulador transcripcional o en la reparació del DNA. Això es pot explicar per la complexitat que presenten els extractes cel·lulars. Per a millorar la cobertura del proteoma identificat i quantificat es podrien utilitzar tècniques de fraccionament cel·lular i/o diferents tècniques de separació electroforètiques (zooms IEF) i cromatogràfiques (diferents tipus de columnes o diferents llargades). També millorarien els resultats utilitzant instruments d'espectrometria de masses més sensibles. Una evidència relacionada amb això és el fet que ens els dos experiments d'ICPL el solapament entre les proteïnes identificades sigui només d'un 43.7% i que el número de proteïnes diferencials comuns als tres experiments fos només de 7. Al comparar les dues tècniques es va veure que el número de proteïnes diferencials observades en els experiments de LC-MS era molt més gran que en el d'electroforesi.

En qualsevol cas, l'ús de diferents tècniques de proteòmica quantitativa va permetre la selecció de proteïnes diferencials amb un risc molt baix de que es tractessin de falsos positius. D'altra banda va permetre ampliar el nombre de proteïnes diferencials ja que es van obtenir resultats comuns però també complementaris. De fet, de les proteïnes validades, la HSP70 es va identificar únicament per 2D-DIGE, la Caldesmon es va identificar en els tres experiments i la PDCD5 (la variació de la qual correlacionaria amb l'augment de l'apoptosi en les cèl·lules transfectades) es va identificar únicament en els experiments ICPL.

En el tercer treball, per a la cerca d'una firma proteica de l'activitat TGF β en els glioblastomes es va treballar amb el secretoma dels cultius primaris derivats de tumor (PCTCs) i amb fluids biològics, CSF i plasma. En tots tres tipus de mostres la contaminació amb proteïnes de sèrum suposava un problema. En el cas dels PCTCs aquesta contaminació provenia

de proteïnes de sèrum boví utilitzades en el medi de cultiu. Tot i rentar les cèl·lules abans del tractament amb TGF β al fer la cerca es van identificar moltes proteïnes bovines. En aquest cas la depleció es va haver de fer a nivell informàtic. Es va buscar quins pèptids eren idèntics a les proteïnes humanes i bovines i es van eliminar els pèptids comuns. Aquest és un problema que no sempre es té en compte al treballar amb secretomes. Com en el primer treball, les mostres de CSF i plasma es van haver de deplecionar, tot i que l'anàlisi es va fer per SRM, tècnica molt específica i sensible. Per a deplecionar les mostres es van utilitzar anticossos específics.

En aquest cas per a trobar les proteïnes candidates a conformar la firma proteica de l'activitat de TGF β en els glioblastomes es va fer una anàlisi proteomica de descobriment dels secretomes de diferents PCTCs. Trenta de les proteïnes augmentades en els secretomes dels PCTCs es van validar mitjançant una anàlisi dirigida per SRM en els propis secretomes i en els CSFs i els plasmes de pacients amb glioblastoma. Aquest treball demostra que els cultius primaris derivats de tumors són un model molt interessant per a la cerca de biomarcadors, ja que la major part de les proteïnes candidates seleccionades en la fase de descobriment van ser detectades i validades en mostres clíniques. A diferència dels altres treballs, en aquest cas tant la cerca de proteïnes candidates com la validació es va fer utilitzant únicament tècniques proteòmiques.

En conjunt, els resultats obtinguts en cada treball demostren la utilitat de l'anàlisi proteomica en diferents aspectes de la investigació biomèdica.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CAPÍTOL 1: PROTEÒMICA DEL FLUID VITRI EN LA PDR

- El sistema 2D-DIGE va permetre, per primera vegada, una comparació quantitativa de mostres d'humor vitri.
- El sistema 2D-DIGE va proporcionar la identificació de noves proteïnes candidates potencialment implicades en el desenvolupament de la PDR.
- La validació d'aquestes proteïnes per WB i RT-PCR va corroborar les dades quantitatives obtingudes amb el sistema 2D-DIGE.
- Serien necessaris estudis addicionals per a determinar el paper de les proteïnes candidates en la patogènesi de la PDR i el seu potencial com a dianes terapèutiques.

CAPÍTOL 2: EFECTE D'AIRE EN EL PROTEOMA CEL·LULAR

- Aquest treball és la primera anàlisi proteòmica en la que s'estudia com l'expressió d'AIRE influeix en la composició del proteoma de cèl·lules epitelials humanes.
- La complementaritat de les proteïnes diferencials que es van obtenir en cada un dels experiments demostra la utilitat de fer servir diferents aproximacions proteòmiques.
- Els resultats van mostrar un perfil de proteïnes que indicaven un nivell d'apoptosi més elevat en les cèl·lules que expressen AIRE.
- La combinació de les diferents aproximacions proteòmiques utilitzades en aquest estudi van ser útils per a mostrar que AIRE pot jugar un paper en el control de l'autoimmunitat diferent del de la regulació transcripcional.

CAPÍTOL 3: MARCADORS DE LA VIA DE TGF β EN GLIOMA

- En la fase de descobriment, l'ús de tècniques de proteòmica quantitativa de LC-MS, sense marcatge i ICPL, aplicades a secretomes de PCTCs, va permetre identificar trenta proteïnes candidates a formar part de la firma proteica indicadora de l'activitat TGF β .
- En la fase de validació, el mètode SRM aplicat a mostres de CSF de pacients amb glioma va mostrar que hi havia una elevada correlació entre els nivells de les proteïnes candidates i la concentració de TGF β 1.
- En la fase de validació, el mètode SRM aplicat a mostres de plasma de pacients amb glioma tractats amb l'inhibidor de TGF β , va servir per demostrar la modulació dels nivells d'algunes de les proteïnes candidates en resposta al tractament.
- Els resultats de l'estudi proteòmic de descobriment i validació van permetre proposar una firma proteica biomarcadora de l'activitat TGF β en pacients amb glioma.

Aquest treball ha donat lloc a dues publicacions (Els arxius en pdf es troben en el CD annex):

Garcia-Ramírez M., Canals F., Hernández , **Colomé N.**, Ferrer C., Carrasco E., García-Arumí J., Simó R. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence based difference gel electrophoresis(DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007 Jun; 50(6):1294-303.

Colome N, Collado J, Bech-Serra JJ, Liiv I, Antón LC, Peterson P, Canals F, Jaraquemada D, Alvarez I. Increased apoptosis after autoimmune regulator expression in epithelial cells revealed by a combined quantitative proteomics approach. *Journal of Proteome Research* 2010 May 7;9(5):2600-9.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen J, Bjorses P, Sandkuijl L, Perheentupa J, Peltonen L. 1994. An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21. *Nat Genet* 8: 83-87.
- Abramson J, Giraud M, Benoist C, Mathis D. 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140: 123-135.
- Adams-Cioaba MA, Min J. 2009. Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochem Cell Biol* 87: 93-105.
- Aebersold R, Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.
- Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3: 36-44.
- Alvarez I, Marti M, Vazquez J, Camafeita E, Ogueta S, Lopez de Castro JA. 2001. The Cys-67 residue of HLA-B27 influences cell surface stability, peptide specificity, and T-cell antigen presentation. *J Biol Chem* 276: 48740-48747.
- Alvarez I, Collado J, Daura X, Colome N, Rodriguez-Garcia M, Gallart T, Canals F, Jaraquemada D. 2008. The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis Rheum* 58: 1630-1639.
- Anderson MS, et al. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395-1401.
- Ayoubi TA, Van De Ven WJ. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb J* 10: 453-460.
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 389: 1017-1031.
- Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, Trayhurn P. 2005. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Lett* 579: 41-47.
- Barnstable CJ, Tombran-Tink J. 2004. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 23: 561-577.
- Belfiore A, Mauerhoff T, Pujol-Borrell R, Badenhoop K, Buscema M, Mirakian R, Bottazzo GF. 1991. De novo HLA class II and enhanced HLA class I molecule expression in SV40 transfected human thyroid epithelial cells. *J Autoimmun* 4: 397-414.
- Biemann K. 1992. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* 61: 977-1010.

BIBLIOGRAFIA

- Bienz M. 2006. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* 31: 35-40.
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ, Trayhurn P. 2004. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2500-2505.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6: 317-339.
- Bjorses P, Pelto-Huikko M, Kaukonen J, Aaltonen J, Peltonen L, Ulmanen I. 1999. Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures. *Hum Mol Genet* 8: 259-266.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improve silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99. 8.
- Boschetti E, Giorgio Righetti P. 2008. Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. *Biotechniques* 44: 663-665.
- Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M, Musco G. 2005. NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 280: 11505-11512.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bruna A, et al. 2007. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 11: 147-160.
- Burgos R, Mateo C, Canton A, Hernandez C, Mesa J, Simo R. 2000. Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care* 23: 80-83.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138: 1379-1394.
- Congdon NG, Friedman DS, Lietman T. 2003. Important causes of visual impairment in the world today. *Jama* 290: 2057-2060.
- Consortium F-GA. 1997. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17: 399-403.

- Consortium IHGS. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945.
- Cunnion KM, Hair PS, Buescher ES. 2004. Cleavage of complement C3b to iC3b on the surface of *Staphylococcus aureus* is mediated by serum complement factor I. *Infect Immun* 72: 2858-2863.
- Chader GJ. 1989. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): a model protein for molecular biological and clinically relevant studies. Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 7-22.
- Chan LL, Lo SC, Hodgkiss IJ. 2002. Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2: 1169-1186.
- Dagher Z, Park YS, Asnaghi V, Hoehn T, Gerhardinger C, Lorenzi M. 2004. Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 53: 2404-2411.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245-248.
- Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. 2006. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye* 20: 1366-1369.
- Derbinski J, Pinto S, Rosch S, Hexel K, Kyewski B. 2008. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 657-662.
- Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B. 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 202: 33-45.
- Domon B, Aebersold R. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312: 212-217.
- Dunn MJ. 2000. *From Genome to Proteome*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Elias JE, Gygi SP. 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4: 207-214.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71.
- Fogh J, Trempe G. 1975. Human tumor cell lines Pages 115-159. In *Human Tumor cells in Vitro*: Fogh, J.
- Garcia-Ramirez M, Canals F, Hernandez C, Colome N, Ferrer C, Carrasco E, Garcia-Arumi J, Simo R. 2007. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for

BIBLIOGRAFIA

- identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50: 1294-1303.
- Garcia-Ramirez M, Hernandez C, Villarroel M, Canals F, Alonso MA, Fortuny R, Masmiquel L, Navarro A, Garcia-Arumi J, Simo R. 2009. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 52: 2633-2641.
- Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ. 2009. AIRE in the thymus and beyond. *Curr Opin Immunol* 21: 582-589.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5: 2592-2601.
- Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. 2007. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4583-4587.
- Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y. 2003. Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 52: 2175-2181.
- Gohda T, et al. 2004. Altered mouse cholinephosphotransferase gene expression in kidneys of type 2 diabetic KK/TA mouse. *Metabolism* 53: 842-846.
- Gorg A, Postel W, Gunther S. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531-546.
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W. 2009. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 30 Suppl 1: S122-132.
- Gotter J, Brors B, Hergenbahn M, Kyewski B. 2004. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med* 199: 155-166.
- Gray D, Abramson J, Benoist C, Mathis D. 2007. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med* 204: 2521-2528.
- Grisanti S, Wiedemann P, Weller M, Heimann K, Zilles K. 1991. The significance of complement in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2711-2717.
- Guerau-de-Arellano M, Mathis D, Benoist C. 2008. Transcriptional impact of Aire varies with cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14011-14016.
- Gustavsson C, Agardh E, Bengtsson B, Agardh CD. 2008. TNF-alpha is an independent serum marker for proliferative

- retinopathy in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications*.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 17: 994-999.
- Hande KR. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 34: 1514-1521.
- Heino M, et al. 1999. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 821-825.
- Hernandez C, Segura RM, Fonollosa A, Carrasco E, Francisco G, Simo R. 2005. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med* 22: 719-722.
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22: 155-156.
- Hou Y, DeVoss J, Dao V, Kwek S, Simko JP, McNeel DG, Anderson MS, Fong L. 2009. An aberrant prostate antigen-specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans. *J Clin Invest* 119: 2031-2041.
- Jensen ON. 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 8: 33-41.
- Jin S, Inoue S, Weaver DT. 1998. Differential etoposide sensitivity of cells deficient in the Ku and DNA-PKcs components of the DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis* 19: 965-971.
- Joussen AM, et al. 2004. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Faseb J* 18: 1450-1452.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2301.
- Kawai S, Nakajima T, Hokari S, Komoda T, Kawai K. 2002. Apolipoprotein A-I concentration in tears in diabetic retinopathy. *Ann Clin Biochem* 39: 56-61.
- Kern TS. 2007. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 95103.
- Klose J, Kobalz U. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16: 1034-1059.
- Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS, Peterson P. 2008. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol Immunol* 45: 25-33.

BIBLIOGRAFIA

- Koyama R, Nakanishi T, Ikeda T, Shimizu A. 2003. Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792: 5-21.
- Kruger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubner CA, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Fassler R, Mann M. 2008. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 134: 353-364.
- Kuroda N, et al. 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* 174: 1862-1870.
- Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. 2008. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 4: 222.
- Liiv I, et al. 2008. DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity. *Biochim Biophys Acta* 1783: 74-83.
- Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF. 2001. Clinical proteomics: personalized molecular medicine. *JAMA* 286: 2211-2214.
- Liou GI, Bridges CD, Fong SL, Alvarez RA, Gonzalez-Fernandez F. 1982. Vitamin A transport between retina and pigment epithelium--an interstitial protein carrying endogenous retinol (interstitial retinol-binding protein). *Vision Res* 22: 1457-1467.
- Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4: 350-354.
- Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 76: 4193-4201.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Mallick P, et al. 2007. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 25: 125-131.
- Marcilla M, de Castro JA, Castano JG, Alvarez I. 2007. Infection with *Salmonella typhimurium* has no effect on the composition and cleavage specificity of the 20S proteasome in human lymphoid cells. *Immunology* 122: 131-139.
- Mathis D, Benoist C. 2009. Aire. *Annu Rev Immunol* 27: 287-312.
- Meleth AD, Agron E, Chan CC, Reed GF, Arora K, Byrnes G, Csaky KG, Ferris FL, 3rd, Chew EY. 2005. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4295-4301.

- Mellor J. 2006. It takes a PHD to read the histone code. *Cell* 126: 22-24.
- Misharin AV, Nagayama Y, Aliesky HA, Rapoport B, McLachlan SM. 2009. Studies in mice deficient for the autoimmune regulator (Aire) and transgenic for the thyrotropin receptor reveal a role for Aire in tolerance for thyroid autoantigens. *Endocrinology* 150: 2948-2956.
- Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Gorg A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 1: 1359-1363.
- Nagamine K, et al. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17: 393-398.
- Nakanishi T, Koyama R, Ikeda T, Shimizu A. 2002. Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor: comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 776: 89-100.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
- Ogata N, Tombran-Tink J, Jo N, Mrazek D, Matsumura M. 2001a. Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation. *Am J Ophthalmol* 132: 427-429.
- Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Sakamoto T, Matsumura M. 2001b. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 132: 378-382.
- Ong SE, Blagojev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1: 376-386.
- Org T, et al. 2008. The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep* 9: 370-376.
- Ouchi M, West K, Crabb JW, Kinoshita S, Kamei M. 2005. Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res* 81: 176-182.
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. 2007. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 25: 561-586.
- Paul W, Steinwedel H. 1953. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung* 8A 448.

BIBLIOGRAFIA

- Penuelas S, et al. 2009. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 15: 315-327.
- Pepperberg DR, Okajima TL, Wiggert B, Ripps H, Crouch RK, Chader GJ. 1993. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Mol Neurobiol* 7: 61-85.
- Perdew GH, Schaup HW, Selivonchick DP. 1983. The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal Biochem* 135: 453-455.
- Peterson P, Peltonen L. 2005. Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J Autoimmun* 25 Suppl: 49-55.
- Peterson P, Org T, Rebane A. 2008. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 948-957.
- Pitkanen J, Vahamurto P, Krohn K, Peterson P. 2001. Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. *J Biol Chem* 276: 19597-19602.
- Ramsey C, Bukrinsky A, Peltonen L. 2002. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum Mol Genet* 11: 3299-3308.
- Righetti PG. 1989. Of matrices and men. *J Biochem Biophys Methods* 19: 1-20.
- Rinderle C, Christensen HM, Schweiger S, Lehrach H, Yaspo ML. 1999. AIRE encodes a nuclear protein co-localizing with cytoskeletal filaments: altered sub-cellular distribution of mutants lacking the PHD zinc fingers. *Hum Mol Genet* 8: 277-290.
- Roepstorff P, Fohlman J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11: 601.
- Ross PL, et al. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3: 1154-1169.
- Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisalde MJ. 2003. Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1636: 59-68.
- Sanchez LM, Lopez-Otin C, Bjorkman PJ. 1997. Biochemical characterization and crystalization of human Zn-alpha2-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4626-4630.
- Schaller CE, Wang CL, Beck-Engeser G, Goss L, Scott HS, Anderson MS, Wabl M. 2008. Expression of Aire and the

- early wave of apoptosis in spermatogenesis. *J Immunol* 180: 1338-1343.
- Seoane J. 2004. p21(WAF1/CIP1) at the switch between the anti-oncogenic and oncogenic faces of TGFbeta. *Cancer Biol Ther* 3: 226-227.
- Seoane J. 2006. Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 27: 2148-2156.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.
- Siegel PM, Massague J. 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 807-821.
- Simo R, Lecube A, Segura RM, Garcia Arumi J, Hernandez C. 2002a. Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 134: 376-382.
- Simo R, Higuera M, Garcia-Ramirez M, Canals F, Garcia-Arumi J, Hernandez C. 2008. Elevation of apolipoprotein A-I and apolipoprotein H levels in the vitreous fluid and overexpression in the retina of diabetic patients. *Arch Ophthalmol* 126: 1076-1081.
- Simo R, Lecube A, Sararols L, Garcia-Arumi J, Segura RM, Casamitjana R, Hernandez C. 2002b. Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients: possible role in the development of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 25: 2282-2286.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Spranger J, et al. 2001. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 50: 2641-2645.
- Thomas A, Gasque P, Vaudry D, Gonzalez B, Fontaine M. 2000. Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int Immunol* 12: 1015-1023.
- Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C. 2003. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 75: 1895-1904.
- Ting L, Rad R, Gygi SP, Haas W. 2011. MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat Methods* 8: 937-940.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M. 2001. Validation and development of fluorescence two-

BIBLIOGRAFIA

- dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1: 377-396.
- Uchida D, et al. 2004. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med* 199: 167-172.
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-2077.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60: 166-193.
- Vogel A, Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Brabant G, Manns MP. 2002. The genetic background of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy and its autoimmune disease components. *J Mol Med (Berl)* 80: 201-211.
- Wilson AS, Hobbs BG, Shen WY, Speed TP, Schmidt U, Begley CG, Rakoczy PE. 2003. Argon laser photocoagulation-induced modification of gene expression in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 1426-1434.
- Wu CW, Sauter JL, Johnson PK, Chen CD, Olsen TW. 2004. Identification and localization of major soluble vitreous proteins in human ocular tissue. *Am J Ophthalmol* 137: 655-661.
- Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, Takamura H, Miyamoto-Myoken Y, Yoshizato K, Nabetani T, Tsugita A, Mishima HK. 2003. Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics* 2: 1177-1187.
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21: 3666-3672.
- Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. 1996. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* 157: 1823-1826.
- Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. 2004. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 3: 1011-1022.
- Zhang J, Gerhardinger C, Lorenzi M. 2002. Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 51: 3499-3504.
- Zlotogora J, Shapiro MS. 1992. Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews. *J Med Genet* 29: 824-826.

ANNEX

ANNEX

Llista d'arxius inclosos en el CD annex:

CAPÍTOL 1:

2007_Garcia-Ramirez_Diabetologia.pdf

2007_SupplementaryDiabetolpgia.docx

PMF_DIGE.pdf

CAPÍTOL 2:

2010_Colomé_JPR.pdf

Llista Prot DIGE.xls

PMF_DIGE.pdf

Llista Prot ICPL1.xls

Llista Pep ICPL1.xls

Llista Prot ICPL2.xls

Llista Pep ICPL2.xls

Portada dissenyada per Núria Soldevila



www.estudicomunicacio.com
677 21 41 10 nsoldevila@estudicomunicacio.com