

el análisis de rHuEPO, en el que se puede observar la presencia de un cierto número de glicofomas. La interacción entre éstas y el recubrimiento del capilar determina la resolución obtenida en el análisis.

Junto al electroferograma (Figura 1) se muestra el espectro de masas de las glicofomas más abundantes y su deconvolución. La información que proporciona el espectro de masas deconvolucionado se ha utilizado para obtener el electroferograma de iones extraídos, que se puede observar superpuesto en la Figura 1.

En el caso de la NESP, su mayor grado de glicosilación provoca una interacción más fuerte con las paredes del capilar, dificultando la caracterización de sus glicofomas. Además, la eficacia y la resolución van disminuyendo con el número de análisis, sugiriendo la falta de estabilidad del recubrimiento utilizado. El uso de otros recubrimientos más estables, ha proporcionado resultados similares en la separación y caracterización de glicofomas de NESP y rHuEPO. En el caso de esta glicoproteína, se ha demostrado que, aunque el analizador de trampa iónica no es capaz de caracterizar completamente el elevado número de glicofomas de la rHuEPO, proporciona suficiente información para caracterizar las principales [3].

Conclusiones

Se ha llevado a cabo la identificación de las principales glicofomas de una glicoproteína intacta de considerable complejidad como es la rHuEPO, mediante el uso de la electroforesis capilar con capilares recubiertos acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica. Los resultados son menos significativos en el caso de NESP debido a su mayor grado de glicosilación. En ambos casos, la optimización correcta de los parámetros del analizador es crítica. La detección óptima de los analitos requiere el uso de un electrolito de separación extremadamente ácido, con el consiguiente deterioro en la estabilidad de los recubrimientos.

Bibliografía

- Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A., Lykos, M. A., *Exp Hematology* 2003, 31, 290-299.
- Lasne, F., Martin, L., Crepin, N., Ceaurriz, J., *Anal Biochem* 2002, 311, 119-126.
- Balaguer, E., Neusüß, C., *Anal. Chem.* 2006, 78, 5384-5393.
- Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Giménez, E., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 1451-1456.

Estudio de los cambios de expresión en el proteoma de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata en respuesta a un modelo de acondicionamiento isquémico

Serrano H[&], Jorge I[&], Martínez-Acedo P[&], Navarro PJ[&], Pérez-Hernández D[&], Nuñez E[&], Ramírez-Boo M[†], Bonzón E[&], Radfar A[&], Miró-Casas E[#], García D[#], Vázquez J.^{&1}

[&]Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España. [†]Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico en Arecibo, Puerto Rico, USA. [‡]Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba, España. [#]Servicio de Cardiología, Hospital Vall d' Hebron, Barcelona, España.

Introducción

El análisis de la expresión diferencial en proteínas es fundamental para entender los procesos biológicos y juega cada vez más un rol importante

en la biología y la investigación médica (Li *et al.*, 2003). En un trabajo anterior (Serrano *et al.* 2007) describimos un método para llevar a cabo una identificación y detección masivas de los cambios de expresión en proteínas de membrana mitocondrial.

Con objeto de profundizar en los mecanismos moleculares del proceso de acondicionamiento isquémico (IP) (isquemia+reperusión) en un modelo animal, proceso que se ha demostrado que retrasa la muerte de los cardiomiocitos tras un período prolongado de isquemia (García-Dorado et al., 1997), hemos utilizado el método descrito para estudiar los cambios de expresión que tienen lugar en el proteoma de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de ratas precondicionadas.

Material y métodos

El extracto de proteínas (100 µg) proviene de una preparación de membranas de mitocondria de tejido de miocardio de rata, según se describe (Holmuhamedov *et al.*, 1998; Ruiz-Maena et al., 1999). El proteoma se separó mediante SDS-PAGE en 5 fracciones que se sometieron a digestión en gel, marcaje isotópico estable de los péptidos resultantes con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, y análisis por trampa iónica lineal, según hemos descrito previamente (Serrano *et al.*, 2007) (Figura 1). Para el procesamiento y análisis de datos se utilizaron los programas pRatio y QuiXoT, desarrollados en nuestro laboratorio (Navarro *et al.*, 2007).

Resultados

Hemos identificado más de 600 proteínas mitocondriales, de las cuales hemos conseguido cuantificar 850 pares de péptidos, correspondientes a 385 proteínas. El análisis estadístico revela un aumento significativo de expresión en tres proteínas de membrana mitocondrial, y una disminución de expresión en cinco proteínas de membrana relacionadas con el metabolismo energético, de las cuales tres de ellas, que muestran el mismo cambio de expresión, pertenecen al mismo complejo.

Conclusiones

A través de este método hemos conseguido obtener algunas pistas del mecanismo molecular de los procesos relacionados con el acondicionamiento isquémico en la membrana mitocondrial. Estos re-

sultados sugieren que la metodología desarrollada podría permitir el estudio de diferencias de expresión de proteínas de membrana en diferentes modelos de interés.

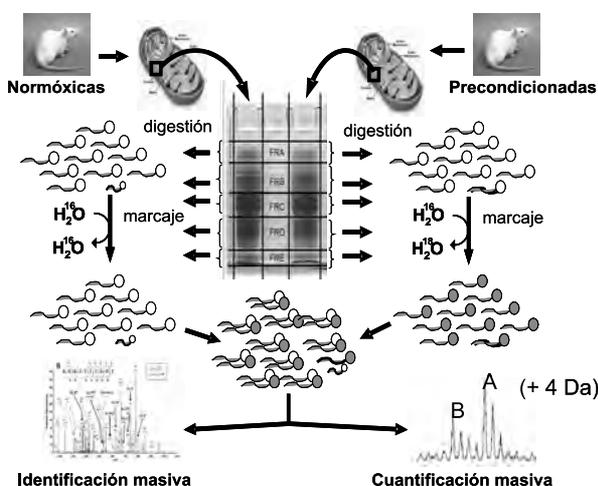


Figura 1. Procedimiento para el análisis de expresión diferencial en el proteoma de membrana mitocondrial en respuesta al pre-condicionamiento isquémico

Bibliografía

- Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A et al., American Journal of Physiology 1988, 44:H1567-76.
- Hynek R, Svensson B, Jensen ON, Barkholt V et al., Journal of Proteome Research 2006, 5: 3105-3113.
- García-Dorado D., Inserte J., Ruíz-Maena M., González M.A. et al., Circulation 1997, 96: 3579-86.
- Li XJ, Zhang H, Ranish JA, Aebersold R., Analytical Chemistry 2003, 75:6648-6657.
- Navarro PJ., Martínez P, Serrano H., Jorge I et al., Joint SEProt-EuPA Congress 2007, Valencia, Spain, February 10-14. Abstracts book, P 9, PP. 119.
- Ruíz-Maena M, García-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM et al., Circulation Research 1999, 85:280-7.
- Serrano H., Jorge I., Martínez-Acedo P, Navarro PJ, et al., Proteómica 2007, 0:29-34.