

Estudio comparativo de técnicas electroforéticas no desnaturalizantes para el análisis de complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*

Marzoa J., Sanchez.S, Abel A., Criado M.T., Ferreirós C.

Dep. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. USC

Introducción

Blue Native (BNE; Schägger 1991), Clear Native (CNE; Schägger 1994) y High Resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE; Wittig 2007) son técnicas analíticas no desnaturalizantes que permiten la separación de complejos proteicos en función de su tamaño sin alterar su estructura nativa, ya que utilizan detergentes suaves en la solubilización de los mismos. En la BNE se incluye el colorante aniónico Coomassie Blue G-250 tanto en la muestra como en el tampón de cátodo para conferir a los complejos la carga necesaria para su migración y evitar la formación de agregados. En la CNE no se emplea este colorante por lo que solo tendrán movilidad electroforética los complejos con carga negativa a pH neutro. En la hrCNE se utiliza una mezcla de detergentes neutros y aniónicos en el tampón de cátodo para provocar la formación de micelas que confieren a los complejos una carga negativa. Tras la separación nativa, una segunda dimensión en SDS-PAGE, permite la identificación e las subunidades que forman los distintos complejos. En este trabajo se compara el poder de resolución de cada una de las técnicas de separación y análisis de los complejos proteicos de membrana de *Neisseria meningitidis*.

Material y métodos

Para el análisis de los complejos se utilizaron vesículas de membrana externa (OMVs) de la cepa H44/76. Los complejos fueron extraídos de las OMVs utilizando ac. amino hexanóico. Posteriormente, la muestra se solubilizó con el detergente no iónico dodecyl- β -D-maltosido, eliminando el material no solubilizado mediante ultracentrifugación. El tratamiento de la muestra varió según el tipo de electroforesis. En la BNE, muestra y tampón de cátodo contienen Coomassie, al 0.5% y 0.002% respectivamente. En la CNE, ni la muestra ni el tampón de cátodo llevan colorante. En la hrCNE el

tratamiento de la muestra es igual que en la CNE, pero el tampón de cátodo contiene Dodecyl- β -D-maltosido 0.02% y Deoxicolato sódico 0.05%.

Resultados

Las principales diferencias encontradas entre los perfiles de las primeras dimensiones (fig. 1,A) se encuentran en los complejos comprendidos entre 130 y 230 KDa, correspondientes a complejos de porinas. BNE y hrCN ofrecen una buena resolución de los mismos, aunque se observan ciertas diferencias en sus pesos moleculares. En CNE no aparecen estos complejos sino uno de 350 KDa con muy baja definición, debido a la ausencia de un agente que confiera la carga negativa, necesaria para la migración hacia el ánodo. Las 2D en SDS-PAGE obtenidas a partir de las 1D nativas con BNE y hrCNE (fig.1, B y C) evidencian una mayor capacidad resolutive de la técnica hrCNE, ya que se consigue un muy buen enfoque de cada de las subunidades de los complejos proteicos, facilitando así su asignación a un determinado complejo.

Conclusión

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que hrCNE es la mejor técnica para la separación de complejos proteicos de membrana en su conformación nativa debido a su excelente enfoque y reproductibilidad.

Referencias

- Schägger H, Cramer W A, von Jagow G 1994. *Analytical Biochemistry* 217, 220-230.
- Schägger H, von Jagow G. 1991. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231
- Wittig I., Karas M, and Schägger H 2007. *Molecular & Cellular Proteomics*; 6 :1215-25.

Peptide approach as a clinical and diagnostic tool in patients with glomerular disease

Núñez A¹, Navarro M^{1,2}, Ara J², Fluvía L¹, Troya M², Bonet J², Pastor MC,² Romero R.²

¹ Germans Trias i Pujol Institute for Medical Research. Proteomics Unit. Badalona, 08916(BCN), Spain.

² Germans Trias i Pujol Hospital. Nephrology department. Badalona, 08916(BCN), Spain.

Introduction

Our aim was to validate a peptidomic pattern in urine as a model of non-invasive method of prediction to differentiate healthy fluid from those affected by a glomerular disease. This will be a starting point for a more ambitious study that will permit us to characterize more deeply peptides or a combination of them as potential biomarkers associated to such different disease patterns (Varghese, 2007).

Material and methods

After an extensive evaluation (Data presented at this same congress SeProt 2008) of peptidome separation method based in Magnetic Bead surfaces with different functionalities (hydrophobic interaction, cation exchange and metal affinity). We opted for a reversed phase C18 (Dynal) to automatically extract the peptidomic fraction. We considered 45 patients with the most representative glomerular disease (Membranose nephropathy, IgA nephropathy, Focal segmental glomerulosclerosis, minimal-change disease and others) and 10 healthy subjects. A MALDI-TOF mass spectrometer (Ultraflex; Bruker Daltonics) was used for peptidome profiling with minimal modifications to the standard parameters. All the peaks with a signal-to-noise (S/N) ratio >3 in an Mr range of 1000-10000 were collected and analyzed using Bruker Daltonics flexControl, flexAnalysis and ClinProTools (Zhang X., 2004; Ketterlinus R, 2005) bioinformatics software (Bruker Daltonics) that were gradually applied in order to obtain such model.

Results

The mass spectrometers data of the urines samples from glomerular disease with different proteinuria grades were considered to establish the different classification models. We applied and evaluated several statistical approaches (Quick Classifier, Support Vector Machine and Genetic Algorithm) to

determine the one with the best results in prediction value percentages. Performance and reliability of the constructed model were evaluated by cross and external validation using two additional sets of independently processed urine isolates. For the algorithm used we have chosen Genetic Algorithm which reach best values: 100% and 96% for recognition capacity and cross validation achievement respectively. This model was then evaluated for performance and reliability in disease prediction. For this we have used 13 extracts (other than the ones used for the model set-up) and 12 from them were correctly classified, presenting 90% of positive prediction value (12/13) and 100% of Non-positive prediction value (3/3). Likewise we obtained a Support Vector Machine model which permitted us to differentiate between nephrotic syndrome patients (proteinuria $\geq 3,5$ g/day) and healthy subjects with 100% and 86% for recognition capacity and cross validation achievement respectively.

Conclusions

The present study was carry out in order to generate a prediction model that will allow us the establishing a method to differentiate the patterns of glomerular disease from the healthy ones with enough sensitivity and specificity values. This approach will permit us to consider this bioinformatics implement when the samples collected are greater, as a valid and promising tool to establish a more ambitious study to differentiate the pathologies associated to proteinuria on the prediction level. By the same token, this study will constitute the reference that will permit us to characterize those pattern specific peptides using the adequate equipment.

References

Varghese S.A., Powell T.B., Budisavljevic M.N., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 18:913-922, 2007.