

4. PROTEÓMICA CUANTITATIVA

Coordinadores: *Miren J. Omaetxebarria y Eva Rodríguez-Suárez*

Soluciones a Retos Analíticos en Proteómica Cuantitativa y Validación de Biomarcadores

Isidro Masana

Agilent Technologies – Barcelona

La cuantificación de péptidos y proteínas está adquiriendo cada vez una mayor importancia en proteómica. A medida que se van descubriendo potenciales candidatos a biomarcadores, su confirmación y validación -cada vez más- requiere herramientas analíticas capaces de cuantificar decenas-centenas de péptidos concretos, en un gran número de muestras con muy elevada sensibilidad y reducido tiempo de análisis. La nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con la tecnología de triple cuadrupolo (nano-LC/MS-QQQ) en su modalidad de MRM (“Multiple Reaction Monitoring”) proporciona hoy en día la mayor sensibilidad, robustez y selectividad para la cuantificación de “compuestos diana” (“target compounds”) en muestras complejas. La modalidad MRM también ofrece una alta precisión y un tiempo de ciclo muy rápido para poder cuantificar hasta unos pocos miles de péptidos en un solo análisis. Todo ello la convierte en la tecnología ideal para aplicaciones cuantitativas y especialmente para la validación de marcadores biológicos con alto rendimiento.

Retos analíticos: elevada sensibilidad

Comparando equipos de igual gama, los QqQ en MRM son capaces de proporcionar sensibilidades del orden de 20 veces mejores que otros sistemas de MS/MS que siempre proporcionan el espectro completo. Con QqQ se pueden llegar a cuantificar desde niveles muy bajos de atomoles con buena repetibilidad (Figura 1). Su mayor sensibilidad se debe a:

1° La total focalización de la detección por MRM en sólo los iones precursores y producto de interés (estos se irán programando en el tiempo).

2° Al efectuar MS/MS en el espacio, la sensibilidad del proceso de detección en un QqQ no se ve reducida por la coelución con otros péptidos mayoritarios. Con respecto a sistemas basados en realizar MS/MS en el tiempo (confinamiento/atrapado temporal de los iones en un espacio), los QqQ proporcionan una mayor y más robusta sensibilidad - menos “entorno dependiente”- pues ésta sólo se ve afectada por cambios en la respuesta debida a interacciones en el proceso de ionización de péptidos coeluyentes. En sistemas basados en el confinamiento de iones, además es habitual perder sensibilidad en la detección de péptidos minoritarios cuando éstos coeluyen con otros de mayoritarios o contaminantes del sistema; éstos generan una saturación de cargas en el espacio de atrapado de los iones que reduce la sensibilidad (por reducción en el tiempo de acumulación o cambio en la m/z medida).

Desde el punto de vista cromatográfico, los sistemas basados en nano-cromatografía (como p.e. el sistema HPLC-Chip/MS) [1] serán los que mayor sensibilidad proporcionen. Una buena cromatografía será también importante para minimizar las posibles supresiones en la ionización, y reducir así efectos adversos de la matriz de la muestra o coeluciones con péptidos mayoritarios. Otra posibilidad es la de utilizar sistemas de preconcentración selectiva del tipo de péptidos de interés; destaca el nuevo HPLC/Fosfo-Chip [2-3] que incluye una precolumna de óxido de titanio y permite automatizar la preconcentración selectiva de los péptidos fosforilados y su análisis por separado del resto de péptidos no fosforilados (que suelen estar presentes a concentraciones mucho más elevadas).

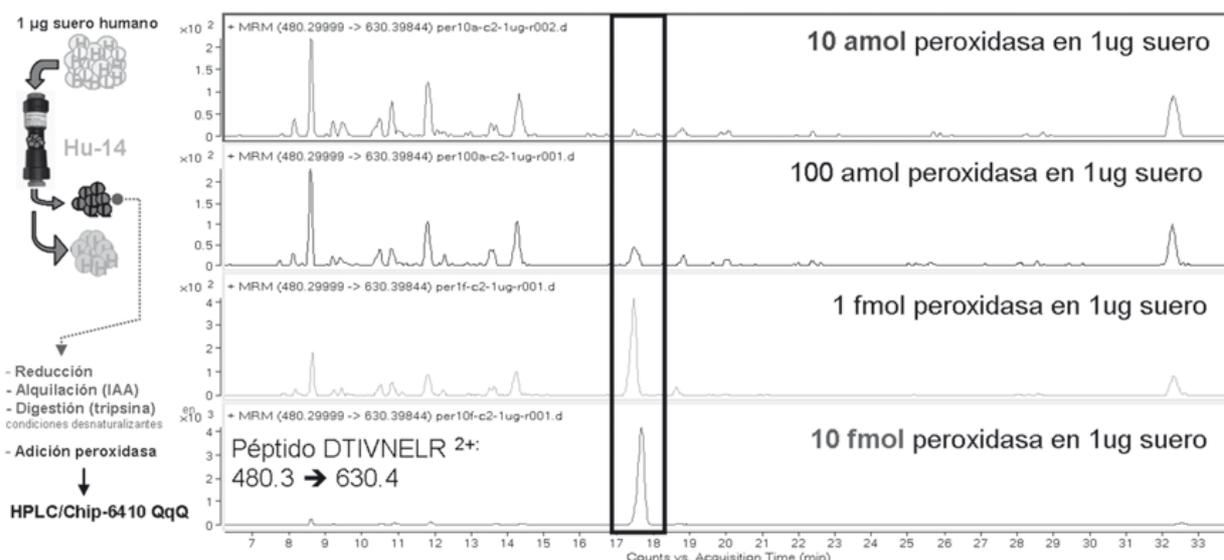


Figura 1. Cuantificación con Triple Cuadrupolo de 10 amol a 10fmol de peroxidasa en suero humano: MRM péptido ALELFR2+ (480.3 → 630.4).

Desde el punto de vista de preparación de muestra, su adecuada simplificación ayuda a mejorar muy considerablemente la sensibilidad. Eliminar proteínas mayoritarias [4], fraccionar las proteínas o péptidos por *pI* (Offgel Electroforesis) [5], por cromatografía (mRP-C18, SCX,..) o con los tradicionales geles son herramientas todas ellas muy útiles. Eliminar las 14 proteínas mayoritarias~94% proteína total (Hu-14 Column) y luego fraccionar la fracción de proteínas minoritarias por *pI* con un sistema de Offgel Electroforesis, que permite recoger directamente la muestra en solución líquida (compatible con LC/MS) con elevada resolución (hasta 0,1 unidades *pI*), es muy útil para separar isoformas y facilitar el estudio de modificaciones post-traduccionales.

Retos Analíticos: Rapidez

La elevada variabilidad de los sistemas biológicos conlleva tener que evaluar un elevado nº de individuos de cada una de las poblaciones sujetas a estudio, que exigirá el uso de métodos optimizados para un análisis rápido, robusto y con suficiente sensibilidad de los péptidos de interés. Para ello conviene disponer de sistemas de nano-cromatografía rápidos; capaces de proporcionar un mínimo volumen de retardo del gradiente, para evitar que el cambio de composición del eluyente tarde mucho tiempo (5-10min) en llegar a columna y retrase todo el cromatograma (primeros péptidos eluyendo al cabo de 10-15min). De los diversos tipos de sistemas de

nanoflujo, los basados en división de flujo suelen ser los que proporcionan volúmenes de retardo del gradiente más pequeños (en algunos sólo unos pocos centenares de nL) y permiten análisis más rápidos.

Otro punto a considerar es la rapidez del detector. Para una buena cuantificación se requerirán unos 10-15 puntos de medida a lo largo del pico (mínimo 8-10); en función del ancho del pico cromatográfico y del nº de péptidos coeluyentes a cuantificar se podrá definir el tiempo máximo de monitorización de cada transición. Los QqQ más rápidos permiten medir hasta +200 transiciones MRM distintas por segundo, unas 20 veces más rápido que el resto de sistemas MS/MS que, a lo sumo, suelen llegar a 10 MS/MS por segundo y limitan el nº de péptidos coeluyentes que se pueden cuantificar.

Referencias

[1] Fortier M, Bonneil E, Goodley P, Thibault P. Integrated Microfluidic Device for Mass Spectrometry-Based Proteomics and Its Application to Biomarker Discovery Programs. *Anal. Chem.* 2005; 77: 1631-1640.

[2] Mohammed S, Kraiczek K, Pinkse MW, Lemeer S, Benschop JJ, Heck AJ. Chip-Based Enrichment and NanoLC-MS/MS Analysis of Phosphopeptides from Whole Lysates. *J Proteome Res.* 2008; 7(4): 1565-71.

[3] Raijmakers R, Mohammed S, J.R Heck A.

- Lin D., Masana I., HPLC-FosfoChip: análisis selectivo de Fosfopéptidos por LC/MS. *Lifescienceslab* 2009; 5 :30-35.
- [4] Björhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum. *Proteomics* 2005; 5: 307–317.
- [5] Hubner N.C., Ren S., Mann M. Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics* 2008; 8(23-24):4862-72.
- [6] Kandasamy K, Pandey A, Molina H. Evaluation of Several MS/MS Search Algorithms for ETD Experiments. *Anal. Chem.* 2009; 81 (17): 7170–7180.

Luces y sombras de la cuantificación con iTRAQ

María Luz Valero, Virginia Rejas, Manuel Mateo Sánchez del Pino

Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia

La cuantificación de las diferencias entre dos o más estados fisiológicos de un sistema biológico es una de las tareas más importantes y difíciles en proteómica. En los últimos años se están desarrollando métodos de cuantificación basados en la espectrometría de masas como complemento a las técnicas más clásicas basadas en 2D PAGE. Los métodos más populares utilizan marcajes isotópicos diferenciales siendo uno de los más utilizados el sistema iTRAQ (Applied Biosystems).

Para obtener la máxima información de un experimento iTRAQ es fundamental un adecuado diseño del mismo. Según el problema biológico que queramos abordar será necesario utilizar un número de réplicas biológicas suficiente para discernir las variaciones intrínsecas a la muestra [1; 2] de las debidas al problema biológico en estudio. En el caso de experimentos complejos con elevado número de réplicas que impliquen varios experimentos iTRAQ será necesario introducir en todos los experimentos un estándar interno que permita posteriormente un análisis global de todas las muestras presentes en el estudio.

Preparación de la muestra

Una vez se dispone de un diseño experimental claro el primer paso es la preparación de las muestras. En nuestra experiencia es mejor partir de la mayor cantidad de proteína recomendada para evitar

problemas debidos al exceso de reactivos, como la formación de precipitados y la obturación de los sistemas cromatográficos.

Una vez elegidas y disponibles las muestras a analizar hemos de ponerlas en un medio adecuado para el análisis. En general, la precipitación es el método más usado en este paso. Para la elección del medio para redissolver las proteínas hay que tener en cuenta que sea compatible con los tratamientos de reducción, alquilación y digestión. Además, para el marcaje posterior ha de evitarse la presencia de aminos reactivos en el medio y de otros posibles nucleófilos como tioles. Con estas restricciones en ocasiones es difícil disolver la muestra, siendo necesaria una puesta a punto para cada tipo de extracto proteico. Tras disolver la muestra es necesario realizar una cuantificación fiable de la cantidad total de proteína presente en cada muestra.

Marcaje y separación de los péptidos

Las muestras marcadas diferencialmente se combinan y se elimina el exceso de reactivos y compuestos que podrían potencialmente interferir con la cromatografía líquida o el análisis de MSMS de los péptidos. En la mayoría de aplicaciones es necesario prefraccionar la mezcla de péptidos ya que las muestras suelen ser demasiado complejas para un único análisis LCMSMS.