

- disease. Clin Infect Dis 2005;40:1625-34.
- [4] De Llanos R, Querol A, Permán J, Gobernado M y Fernández-Espinar M T. Food and probiotic

strains from *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of systemic infection. Int J Food Microbiol 2006;110:286-90.

Análisis comparativo de diferentes aproximaciones para el estudio del proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Dolores Gutiérrez¹, M^a Luisa Hernaéz¹, Montserrat Martínez-Gomariz¹, María Posada¹, Concha Gil²

¹Unidad de Proteómica. Universidad Complutense de Madrid-Parque Científico de Madrid (UCM-PCM).

²Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

En los últimos años el gran desarrollo de los espectrómetros de masas y las técnicas de fraccionamiento de péptidos y proteínas ha permitido el estudio de muestras complejas de proteínas. A pesar de ello aún estamos lejos de conseguir el análisis completo de proteomas o subproteomas.

Saccharomyces cerevisiae es un organismo modelo desde el inicio en proteómica, para estimar la capacidad real de una tecnología dada en el estudio profundo de un proteoma. Además, cuando esta levadura esta creciendo en fase logarítmica hay evidencias de que más de 4500 proteínas son expresadas en un amplio rango dinámico, desde 100 copias por célula para aquellas proteínas menos abundantes hasta millones de copias por célula para las proteínas más abundantes. En la actualidad, se ha cubierto más del 50% de su proteoma, aplicando diferentes combinaciones de fraccionamiento y diferentes equipamientos de espectrometría de masas [1]

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) ha demostrado ampliamente su utilidad en la capacidad de separación de proteínas aportando gran información acerca del contenido proteico celular [2]. Sin embargo, presenta algunas desventajas importantes, como la limitada cantidad de muestra que se puede cargar en el gel, y la inadecuada resolución de proteínas hidrofóbicas o de elevado peso molecular. Alternativamente, las técnicas cromatográficas para la separación de péptidos y proteínas permiten reducir la complejidad de la muestra y aumentar el número de proteínas identificadas.

La técnica de separación mediante isoelectroenfoco en solución resuelve proteínas o péptidos en función de su punto isoeléctrico (pI). Las fracciones resultantes están en solución lo que permite acoplarlas a un segundo paso de fraccionamiento como cromatografía líquida y su posterior análisis por espectrometría de masas en *tandem* (MS/MS). Esta metodología parece altamente efectiva y reproducible siendo incluso compatible con la cuantificación de proteínas por marcaje con iTRAQ [3].

En este trabajo hemos diseñado cuatro aproximaciones proteómicas diferentes en las que se combinan diversas técnicas de fraccionamiento y análisis por espectrometría de masas para comparar la capacidad de las distintas estrategias para la caracterización del proteoma de esta levadura (Figura 1). Los experimentos se detallan a continuación:

Experimento 1: Proteínas intactas son separadas mediante isoelectroenfoco, utilizando tiras de 12 cm con un rango de PH de 3-10 con una resolución de 0.6, seguido de digestión triptica de cada fracción y nano-RP-HPLC acoplada *on-line* a ESI-MS/MS (LTQ) y *off-line* a MALDI-MS/MS (4800 MALDI-TOF/TOF de Applied Biosystems) para la identificación de proteínas. Experimento 2: Digestión triptica del extracto proteico seguido de separación de los péptidos según pI mediante *Off-Gel* usando las mismas tiras que para la separación de proteínas. Las diferentes fracciones se separaron mediante RP-HPLC acoplado a MS/MS de la misma manera que en el experimento 1. Experimento 3: Digestión de proteínas seguida de cromatografía bidimensional *off-line* (SCX y nano-RP-HPLC) acopladas a espectrometría

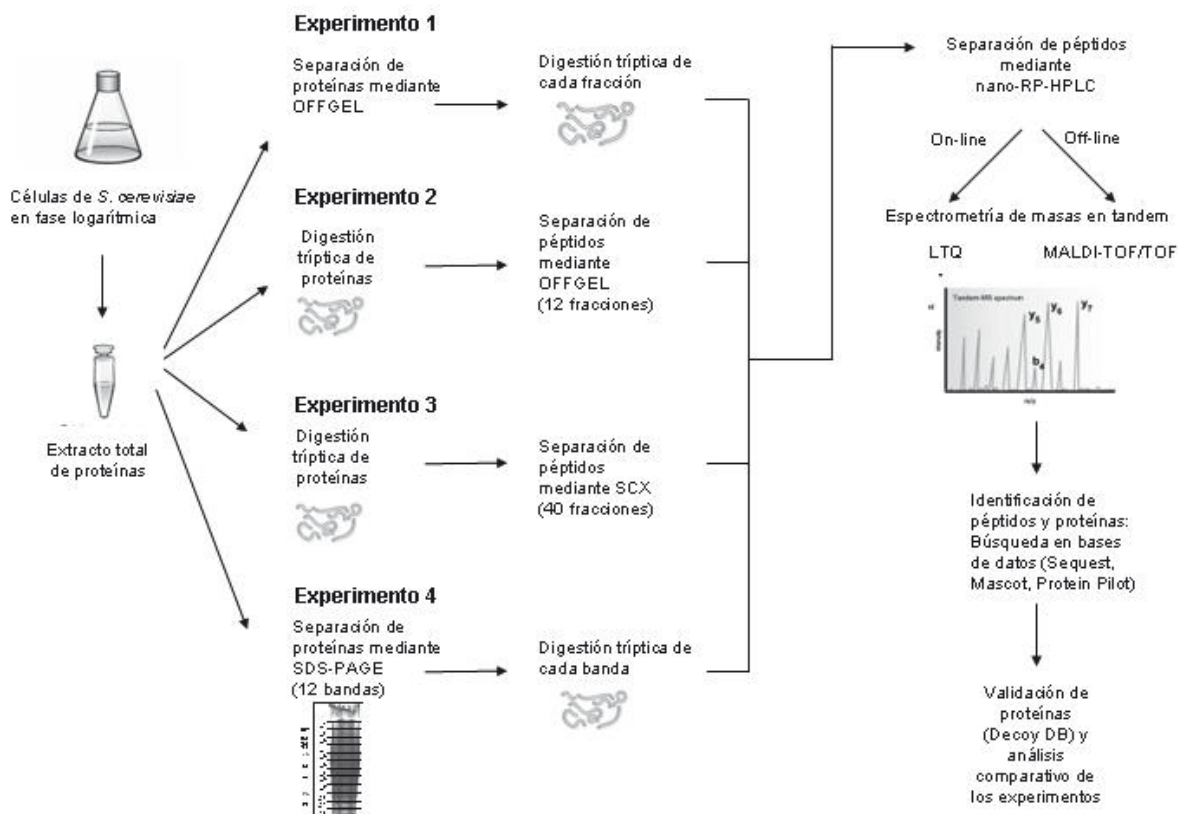


Figura 1. Esquema de trabajo de los cuatro experimentos

de masas en *tandem* en la misma forma que los experimentos anteriores. Experimento 4: Separación de proteínas mediante SDS-PAGE. Se corta el gel en 12 bandas, cada una de éstas se digiere por separado y los péptidos extraídos se analizan mediante nano-RP-HPLC y espectrometría de masas en *tandem* como se ha detallado anteriormente.

La finalidad de este estudio es comparar el efecto de las cuatro estrategias en relación a la identificación del proteoma de *S. cerevisiae* y analizar la capacidad de las distintas técnicas de fraccionamiento para detectar proteínas de baja abundancia. Este estudio nos facilitará información para decidir cuál es la aproximación de elección, con la tecnología que disponemos, para el análisis de mezclas complejas.

Agradecimientos

El análisis proteómico se ha realizado en la Unidad de Proteómica de la UCM-PCM, miembro de Proteored.

Referencias

[1] de Godoy LM, Olsen JV, de Souza GA, Li G, Mortensen P y Mann M. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Genome Biol* 2006;7:R50.

[2] Perrot M, Moes S, Massoni A, Jenoe P y Boucherie H. Yeast proteome map (last update). *Proteomics* 2009;9:4669-73.

[3] Chenau J, Michelland S, Sidibe J y Seve M. Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Sci* 2008;6:9.