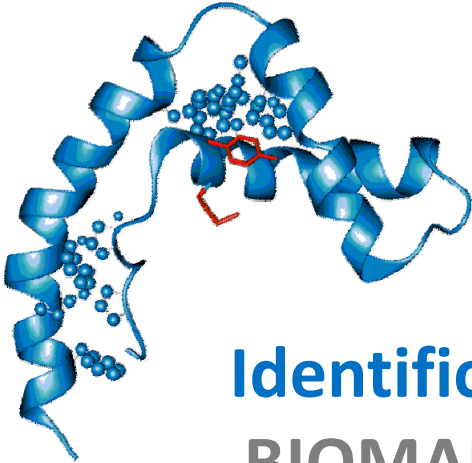


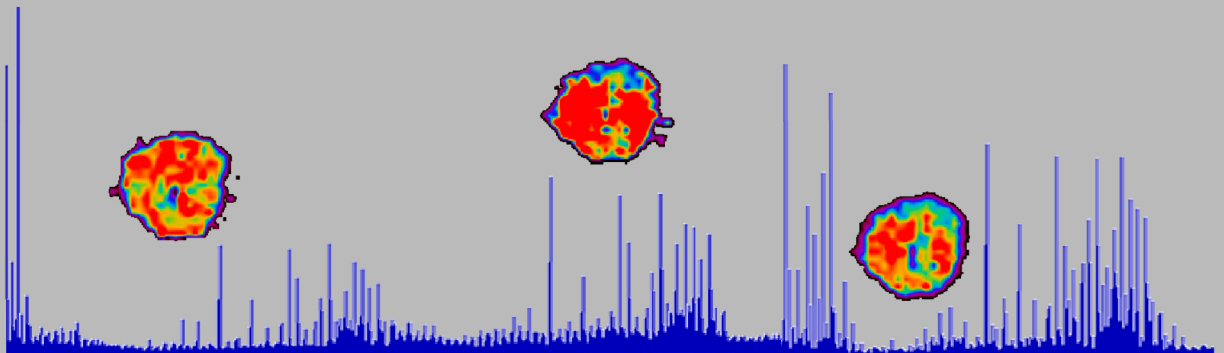


Departamento de Medicina  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Universidad de A Coruña



# Identificación de nuevos BIOMARCADORES de la CONDROGÉNESIS de células madre mesenquimales de pacientes con artrosis mediante TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Beatriz Rocha Loureda  
A Coruña 2015







# **Identificación de nuevos BIOMARCADORES de la CONDRÓGENESIS de células madre mesenquimales de pacientes con artrosis mediante TÉCNICAS PROTEÓMICAS**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
INTERNACIONAL

**Beatriz Rocha Loureda**

---

**TESIS DOCTORAL**

**2015**

Directores: Dr. Francisco Javier Blanco García y Dra. Cristina Ruiz Romero

Tutor: Isaac Fuentes Boquete

Grupo de Proteómica-Servicio de Reumatología-Instituto de Investigación  
Biomédica de A Coruña



**Dr. Francisco Javier Blanco García** e **Dra. Cristina Ruiz Romero**, directores desta tese de doutoramento,

**CERTIFICAN:**

Que o presente traballo, que leva por título **“Identificación de novos biomarcadores de la condrogénesis de células madre mesenquimales de pacientes con artrosis mediante técnicas proteómicas”** foi realizado por **Beatriz Rocha Loureda** baixo a nosa dirección no Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, e reúne as condicións necesarias de orixinalidade e rigor científico para optar ao grado de doutor internacional en Ciencias da Saúde.

A Coruña, a 21 de Xaneiro de 2015.

Asdo. Dr. Francisco J. Blanco

Asdo. Dra. Cristina Ruiz



**Dr. Isaac Fuentes Boquete**, profesor do Departamento de Medicina da Facultade de Ciencias da Saúde na Universidade da Coruña (UDC),

**CERTIFICA:**

Que o presente traballo, que leva por título **“Identificación de novos biomarcadores de la condrogénesis de células madre mesenquimales de pacientes con artrosis mediante técnicas proteómicas”** foi realizado por **Beatriz Rocha Loureda** baixo a miña tutela dende o Departamento de Medicina da UDC, e reúne as condicións necesarias de orixinalidade e rigor científico para optar ao grado de doutor internacional en Ciencias da Saúde.

A Coruña, a 21 de Xaneiro de 2015.

Asdo. Dr. Isaac Fuentes Boquete





Parte de la investigación incluida en esta tesis ha sido realizada bajo la supervisión del Dr. Ron M.A. Heeren, profesor adjunto y director del laboratorio de espectrometría de masas de imagen biomolecular en el Instituto AMOLF de Amsterdam, y la Dra. Berta Cillero Pastor, durante una estancia de investigación predoctoral en 2013.

Part of the research included in this thesis has been carried out under the supervision of Dr. Ron M.A. Heeren, PhD, Associate Professor, leader of the Biomolecular Imaging Mass Spectrometry (BIMS) in the FOM Institute AMOLF in Amsterdam, and Dra. Berta Cillero Pastor, PhD, during a predoctoral fellowship in 2013.





*Aos meus pais*

*A Mar e a Dani*



## AGRADECIMENTOS

Hai moita xente que dalgún xeito participou no desenvolvemento desta tese. Por iso, conxuntamente, quero darlles as grazas a todos aqueles que me axudaron durante estes cinco anos e que contribuíron con paciencia e moito humor a crear un ambiente que de seguro botarei de menos.

En primeiro lugar gustaríame agradecer a Paco Blanco e a Cristina Ruiz, os meus directores de tese, por darme a oportunidade de comezar no mundo da investigación. Pola súa axuda, por proporcionarme os medios necesarios para levar a cabo este traballo e por transmitirme sempre o punto de vista máis optimista. Tamén a Isaac, o meu titor, por guiarme coas xestións burocráticas que conleva a presentación dunha tese.

Ó meu grupo de proteómicos, sen dúbida, os mellores compañeiros que puider ter. Ás miñas compañeiras e amigas “Antoñitas”: Vale, Carol e Luchi. Grazas por ensinarme e axudarme día a día e tamén por guiarme coa vosa experiencia. Grazas polo afecto recibido, por aguantarme, por compartir tantos momentos inesquecibles dentro e fóra do laboratorio. Grazas por facer da “U” de proteómica o meu lugar favorito. Grazas pola vosa amizade. Quérovos. A Patri e Jesús, mil grazas pola vosa dedicación e axuda. A todos, grazas. Non creo que sexades conscientes de canto vos debo.

A todos os compañeiros do INIBIC, grazas por axudarme en todo o que precisei. Ó grupo de Xenómica en xeral, pero en especial a Ángel e a María, pola simpatía que vos caracteriza, polo trato especial á hora de obter os reactivos da PCR, pola vosa amabilidade á hora de explicarme calquera dúbida, sempre estivestes ahí. Grazas pola vosa amizade e por animarme durante estes últimos meses. Ó grupo de inflamados, en especial á miña Romi. Grazas por compartir conmigo a experiencia dunha estancia lonxe da casa, foi moi doado convivir contigo. Grazas por coidarme, pola pizza dos xoves, polas rutas en bici, polas sesións de tele e palomitas, por facerme sentir como si estivera na casa. A Mariajo e Tamara,

gracias pola vosa axuda na sala de cultivos e por contar con vos para todo o que necesitei. A Puri e a Noa, pola vosa disposición a axudarme en multitude de tarefas. A Fani, Estefa, Sara, Merce, Isa, Dolo, Juan, Raquel, Paula, Marta... gracias polo bo ambiente de traballo.

A todos os membros do laboratorio de proteómica CSIC da Universidade Autónoma de Barcelona, en especial a Montse, gracias pola túa colaboración. A Vanessa, Roberto, Óscar e Joan, gracias pola axuda inestimable.

A Ron Heeren e a todo o seu grupo do Instituto AMOLF de Ámsterdam por permitirme formar parte del durante 6 meses e acollerme como a unha máis da familia. Gracias en especial a Berta, por compartir esta experiencia conmigo, por integrarme no grupo dende o primeiro día que cheguei, polas charlas con café de máquina ás 5 da tarde cando todos se ían, polas comidas fóra do horario europeo, por facerme sentir cada día máis cómoda. GRACIAS. A Gert pola súa axuda e paciencia intentando explicarme o PCA e por facerme ver que os holandeses teñen “gracia”. A Eleni por recibirme cada día cun agradable sorriso. Ao meu compañeiro de cuarto Nicholas, gracias por alegrarme todas as mañás. A Bryn, Anne, Guzel, Nadine, Sarfaraz, Mark, Shane, Karolina... Gracias a todos.

Aos amigos de fóra do laboratorio, Ana, Olga, Fati, Iván, Cris, David, Alba gracias pola vosa axuda incondicional e confianza.

A Dani, por comprenderme e apoiarme dende o primeiro día que inicié esta aventura. Gracias por transmitirme día a día o teu optimismo e simpatía. Gracias por crer en mín. Gracias por tanto.

E por suposto á miña familia. En especial a meus pais, irmá, e avoa. Gracias por apoiarme sempre en todo o que fago, polo voso afecto e confianza e por animarme a seguir sen importar as dificultades. Esta tese é por e para vos.

**Gracias.**

## RESUMO

A capacidade de diferenciación das células nai mesenquimais (MSCs) cara os condrocitos, nun proceso coñecido como condroxénese, outorga a estas células un gran potencial terapéutico para a reparación dos defectos da cartilaxe característicos de enfermidades reumáticas como a artrose. Non obstante, os mecanismos moleculares que participan neste proceso de diferenciación non son de todo coñecidos. As técnicas proteómicas posibilitan analizar globalmente a actividade celular, xa que permiten obter perfís proteicos que proporcionan información sobre as conexións existentes entre as proteínas e as rutas ou procesos celulares nos que participan. Neste traballo empregáronse diferentes metodoloxías proteómicas para estudar os mecanismos moleculares que participan na diferenciación condroxénica das MSCs obtidas da medula ósea, co fin de identificar novos marcadores condroxénicos que poidan empregarse na monitorización de terapias celulares encamiñadas á reparación da cartilaxe.

Inicialmente estandarizouse a marcaxe metabólica SILAC nas MSCs illadas de medula ósea para levar a cabo os estudos proteómicos cuantitativos. Unha vez optimizado este método, a súa aplicación permitiunos describir as proteínas intracelulares cuxa abundancia altérase durante o proceso de diferenciación das MSCs. Os niveis de expresión de 65 proteínas moduláronse significativamente entre os dous estadios celulares analizados (indiferenciado (día 2) e diferenciado (día 14)). A maior parte destas proteínas estaban implicadas no metabolismo celular e na glucólise. En base a este traballo, decidimos realizar outro estudo no que aplicamos a dobre marcaxe SILAC seguido da análise nanoLC-ESI-MS para identificar e cuantificar as proteínas secretas polas MSCs ós días 2 e 14 do proceso de condroxénese. Mediante esta estratexia, detectáronse cambios significativos na abundancia de 34 proteínas entre os dous tempos analizados. A maior parte das proteínas aumentadas a día 14 son proteínas relacionadas coa matriz extracelular da cartilaxe, e entre elas validamos mediante inmunoensaio o incremento do proteoglicano 4 (PRG4) e TIMP1 como potenciais biomarcadores da diferenciación condroxénica. Finalmente, comprobouse a utilidade das técnicas

de imaxen mediante espectrometría de masas (MS Imaging) para a caracterización de lípidos involucrados no proceso de diferenciación. Neste último estudo demostramos que as MSCs metabolizan a esfingomielina durante a diferenciación condroxénica, e que a fosfocolina e os seus derivados son posibles marcadores de indiferenciación das MSCs.

## RESUMEN

La capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs) hacia condrocitos, en un proceso conocido como condrogénesis, concede a estas células un gran potencial terapéutico para la reparación de los defectos del cartílago característicos de enfermedades reumáticas como la artrosis. Sin embargo, los mecanismos moleculares que participan en este proceso de diferenciación no son del todo conocidos. Las técnicas proteómicas posibilitan analizar globalmente la actividad celular, ya que permiten obtener perfiles proteicos que proporcionan información sobre las conexiones existentes entre las proteínas y las rutas o procesos celulares en las que participan. En este trabajo se han empleado diferentes metodologías proteómicas para estudiar los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación condrogénica de las MSCs obtenidas de médula ósea, con el fin de identificar nuevos marcadores condrogénicos que puedan emplearse en la monitorización de terapias celulares encaminadas a la reparación del cartílago.

Inicialmente se estandarizó el marcaje metabólico SILAC en MSCs aisladas de médula ósea para llevar a cabo los estudios proteómicos cuantitativos. Una vez optimizado este método, su aplicación nos permitió describir las proteínas intracelulares cuya abundancia se altera durante el proceso de diferenciación de las MSCs. Los niveles de expresión de 65 proteínas se modularon significativamente entre los dos estadios celulares analizados (indiferenciado (día 2) y diferenciado (día 14)). La mayor parte de estas proteínas estaban involucradas en el metabolismo celular y en la glucólisis. En base a este trabajo, decidimos realizar otro estudio en el que aplicamos el doble marcaje SILAC seguido de un análisis nanoLC-ESI-MS para identificar y cuantificar las proteínas secretadas por las MSCs a los días 2 y 14 del proceso condrogénico. Mediante esta estrategia, se detectaron cambios significativos en la abundancia de 34 proteínas entre los dos tiempos analizados. La mayor parte de las proteínas aumentadas a día 14 son proteínas relacionadas con la matriz extracelular del cartílago, y entre ellas validamos mediante inmunoensayo el incremento de proteoglicano 4 (PRG4)

y TIMP1 como potenciales biomarcadores de diferenciación condrogénica. Finalmente, se comprobó la utilidad de las técnicas de imagen mediante espectrometría de masas (MS Imaging) para la caracterización de lípidos involucrados en el proceso de diferenciación. En este último estudio demostramos que las MSCs metabolizan la esfingomielina durante la diferenciación condrogénica, y que la fosfocolina y sus derivados son posibles marcadores de indiferenciación de MSCs.



## ABSTRACT

The differentiation capacity of mesenchymal stem cells (MSCs) towards chondrocytes, in a process called chondrogenesis, provides them a great therapeutic potential for the repair of cartilage defects in rheumatic diseases such as osteoarthritis (OA). However, the molecular mechanisms underlying the chondrogenesis process are still in part unknown. Proteomic tools enable us to globally analyze cellular activity, obtaining proteomic profiles that provide us information about the present connections between proteins and cellular pathways. In this work, we have employed different proteomic strategies in order to elucidate the molecular mechanisms involved in the chondrogenesis process of bone marrow MSCs, with the purpose of identify new chondrogenic markers useful for molecular monitorization in cell therapy-based approaches for cartilage repair.

Firstly, we standardized SILAC labeling in bone marrow MSCs in order to carry out quantitative proteomic experiments. Once the SILAC method was optimized, its application allowed us to describe the modulations of intracellular proteins during the chondrogenic differentiation of MSCs. 65 proteins exhibited a significant modulation of their levels between the two different stages of chondrogenic differentiation (day 2 vs. day 14). Most of these proteins were involved in cellular metabolism and glycolysis. Next, we employed a double-SILAC strategy, followed by nanoLC-ESI-MS analysis, to identify and quantify the extracellular proteins of MSCs at days 2 and 14 of chondrogenesis. Using this methodology, we found alterations in the abundance of 34 proteins between the two time points evaluated. Most of the proteins increased at day 14 were cartilage-specific ECM proteins. Proteoglycan 4 (PRG4) and TIMP1 were validated by immunoassays so both have a valuable potential use as biomarkers of chondrogenic differentiation. Finally, we confirmed the utility of mass spectrometry imaging (MSI) for the characterization of the lipids involved in chondrogenesis. In this study, we confirmed that MSCs mobilize the sphingomyelin during their differentiation

toward chondrocytes and the phosphocholine-related lipids could be markers of the undifferentiated stage.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.- ARTROSIS.....</b>	<b>3</b>
1.1. Definición y prevalencia.....	3
1.2. Factores de riesgo.....	4
<b>2.- BIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.....</b>	<b>7</b>
2.1. Estructura y función del cartílago articular.....	7
2.2. Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago articular..	9
2.3. Reparación de las lesiones del cartílago articular.....	12
2.3.1. Técnicas de reparación: la microfractura.....	13
2.3.2. Técnicas de regeneración.....	13
2.3.3. Técnicas de sustitución.....	14
<b>3.- CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....</b>	<b>15</b>
3.1. Definición y biología de las células madre mesenquimales.....	15
3.2. El proceso de condrogénesis.....	18
3.3. Aplicación de las MSC para la reparación del cartílago articular..	22
<b>4.-PROTEÓMICA.....</b>	<b>22</b>
4.1. Proteoma y secretoma.....	22
4.2. Metodología utilizada en proteómica.....	28
4.2.1. Extracción y digestión de proteínas.....	28
4.2.2. Separación de proteínas.....	31
4.2.2.1. Métodos de separación basados en gel.....	31
4.2.2.2. Métodos de separación cromatográficos.....	33
4.2.3. Espectrometría de masas-MS.....	36

4.2.3.1. Métodos de ionización.....	37
4.2.3.2. Analizadores de masa.....	40
4.2.3.3. Identificación de proteínas mediante MS.....	46
4.2.4. Cuantificación de proteínas.....	47
4.2.4.1 Cuantificación de proteínas basada en gel.....	47
4.2.4.2. Cuantificación de proteínas basada en MS.....	49
4.2.5. MS Imaging.....	58
4.2.5.1. Aplicaciones de MSI en lipidómica.....	60
4.2.5.2. Metodología y avances actuales en MSI.....	63
4.2.5.3. Instrumentación y análisis de datos para MSI..	69
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULOS.....</b>	<b>77</b>
<u>Artículo I</u> : Análisis proteómico cuantitativo de la condrogénesis de las MSCs de médula ósea mediante marcaje metabólico.....	79
<u>Artículo II</u> : Caracterización de marcadores proteicos del proceso condrogénico mediante el análisis del secretoma de MSCs.....	95
<u>Artículo III</u> : Caracterización de marcadores lipídicos del proceso de condrogénesis mediante MS Imaging.....	109
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
Discusión artículo I.....	125
Discusión artículo II.....	133
Discusión artículo III.....	141
Consideraciones finales.....	145
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>179</b>
<u>Anexo I</u> : Material suplementario del artículo I.....	181
<u>Anexo II</u> : Material suplementario del artículo II.....	183
<u>Anexo III</u> : Material suplementario del artículo III.....	185

<u>Anexo IV</u> : Artículo IV, en el que desarrollamos por primera vez la metodología SILAC en nuestro laboratorio y que constituyó el punto de partida de esta Tesis Doctoral.....	189
<u>Anexo V</u> : Relación de artículos no directamente relacionados con el objetivo de esta Tesis en los que he participado en mi etapa predoctoral.....	200



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>2-DE</b>	Electroforesis bidimensional ( <b>2-Dimensional Electrophoresis</b> )
<b>2D-DIGE</b>	Electroforesis bidimensional diferencial en gel ( <b>2-Dimensional Difference Gel Electrophoresis</b> )
<b>9-AA</b>	9-Aminoacridina ( <b>9-Aminoacridine</b> )
<b>AA</b>	Ácido araquidónico ( <b>Arachidonic Acid</b> )
<b>ACI</b>	Implantación de condrocitos autólogos ( <b>Autologous Chondrocyte Implantation</b> )
<b>ACN</b>	Acetonitrilo ( <b>Acetonitrile</b> )
<b>ADSCs</b>	Células madre mesenquimales de tejido adiposo ( <b>Adipose Derived Stem Cells</b> )
<b>AMIC</b>	Condrogénesis autóloga inducida por matriz ( <b>Autologous Matrix Induced Chondrogenesis</b> )
<b>ASC</b>	Células madre adultas ( <b>Adult Stem Cells</b> )
<b>BMPs</b>	Proteínas morfogenéticas del hueso ( <b>Bone Morphogenetic Proteins</b> )
<b>BMSCs</b>	Células madre mesenquimales de médula ósea ( <b>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells</b> )
<b>CBB</b>	Azul de Coomassie ( <b>Coomassie Brilliant Blue</b> )
<b>Cer</b>	Ceramida ( <b>Ceramide</b> )
<b>CHAPS</b>	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1-Propanosulfonato] (3-[(3- <b>Cholamidopropyl</b> )dimethylammonio]-1-Propanesulfonate)
<b>CHCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( <b><math>\alpha</math>-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid</b> )
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión ( <b>Collision-Induced Dissociation</b> )
<b>CM</b>	Medio condicionado o secretoma ( <b>Conditioned Medium</b> )
<b>COMP</b>	Matriz oligomérica de la matriz del cartílago ( <b>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</b> )
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2 ( <b>Ciclooxigenase-2</b> )
<b>DA</b>	Análisis discriminante ( <b>Discriminant Analysis</b> )

<b>DAGs</b>	Diacilgliceroles ( <i>Diacylglycerols</i> )
<b>DESI</b>	Ionización electrospray por desorción ( <i>Desorption Electrospray Ionization</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol ( <i>Dithiothreitol</i> )
<b>ECM</b>	Matriz extracelular ( <i>Extracellular Matrix</i> )
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>ESC</b>	Células madre embrionarias ( <i>Embryonic Stem Cells</i> )
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray ( <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>FA</b>	Ácido fórmico ( <i>Formic Acid</i> )
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>FT-ICR</b>	Espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer</i> )
<b>GAGs</b>	Glicosaminoglicanos ( <i>Glycosaminoglycans</i> )
<b>HA</b>	Ácido hialurónico ( <i>Hyaluronic Acid</i> )
<b>HDACs</b>	Histona Deacetilasas ( <i>Histone Deacetylases</i> )
<b>IAA</b>	Iodacetamida ( <i>Iodacetamide</i> )
<b>ICAT</b>	Marcaje de afinidad codificado por isótopos ( <i>Isotope-Coded Affinity Tag</i> )
<b>IEC</b>	Cromatografía de intercambio iónico ( <i>Ion Exchange Chromatography</i> )
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque ( <i>Isoelectric Focusing</i> )
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo I ( <i>Insulin Growth Factor-I</i> )
<b>IL</b>	Interleuquina ( <i>Interleukin</i> )
<b>ITO</b>	Óxido de indio y estaño ( <i>Indium Tin Oxide</i> )
<b>ITRAQ</b>	Etiqueta isotópica para cuantificación relativa y absoluta ( <i>Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification</i> )
<b>LC</b>	Cromatografía líquida ( <i>Liquid Chromatography</i> )
<b>LIT</b>	Trampa de iones lineal ( <i>Linear Ion Trap</i> )



<b>LTD</b>	Trampa lineal cuadrupolar ( <i>Linear Trap Quadrupole</i> )
<b>MACI</b>	Implantación de condrocitos autólogos en una matriz ( <i>Autologous Chondrocyte Implantation Membrane</i> )
<b>MAGs</b>	Monoacilglicérols ( <i>Monoacylglycerols</i> )
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> ).
<b>mg</b>	Miligramos ( <i>Milligrams</i> )
<b>ml</b>	Mililitros ( <i>Milliliters</i> )
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas de la matriz ( <i>Matrix Metalloproteinases</i> )
<b>MRM</b>	Monitorización de reacciones múltiples ( <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
<b>MSCs</b>	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
<b>MSI</b>	Espectrometría de masas de imagen ( <i>Mass Spectrometry Imaging</i> )
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de masas en tándem ( <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>m/z</b>	Relación masa/carga ( <i>mass/charge</i> )
<b>NCAM</b>	Molécula de adhesión celular neural ( <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> )
<b>Nd-YAG</b>	Láser de óxido de itrio y aluminio dopado con neodimio ( <i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>OA</b>	Artrosis ( <i>Osteoarthritis</i> )
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales ( <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PCs</b>	Fosfatidilcolinas ( <i>Phosphatidylcholines</i> )
<b>PEs</b>	Fosfatidiletanolaminas ( <i>Phosphatidylethanolamines</i> )
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2 ( <i>Prostaglandin E2</i> )
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico ( <i>Isoelectric point</i> )

<b>PIs</b>	Fosfatidilinositoles ( <i>Phosphatidylinositols</i> )
<b>PMF</b>	Huella peptídica ( <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> )
<b>PRGs</b>	Proteoglicanos ( <i>Proteoglycans</i> )
<b>PTM</b>	Modificaciones postraduccionales ( <i>Posttranslational Modifications</i> )
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno ( <i>Polyvinylidene Difluoride</i> )
<b>Q</b>	Cuadrupolo ( <i>Quadrupole</i> )
<b>RP</b>	Fase reversa ( <i>Reverse Phase</i> )
<b>SAX</b>	Cromatografía de intercambio aniónico ( <i>Strong Anion Exchange Chromatography</i> )
<b>SCX</b>	Cromatografía de intercambio catiónico ( <i>Strong Cation Exchange Chromatography</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular ( <i>Size-Exclusion Chromatography</i> )
<b>SILAC</b>	Marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivos celulares ( <i>Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture</i> )
<b>SIMS</b>	Espectrometría de masas de iones secundarios ( <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i> )
<b>SMs</b>	Esfingomielinas ( <i>Sphingomyelins</i> )
<b>STs</b>	Sulfátidos ( <i>Sulfatides</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor transformador del crecimiento beta ( <i>Transforming Growth Factor beta</i> )
<b>TIMP</b>	Inhibidor de tejidos de metaloproteinasas ( <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumoral Necrosis Factor alpha</i> )
<b>UCMSCs</b>	Células madre mesenquimales de cordón umbilical ( <i>Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells</i> )
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic Acid</i> )
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético ( <i>Trifluoroacetic Acid</i> )
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo ( <i>Time Of Flight</i> )

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Imágenes representativas de una articulación de rodilla sana y artrósica.....	3
<b>Figura 2</b>	Estructura del cartílago articular hialino.....	7
<b>Figura 3</b>	Estructura de un agregado de proteoglicanos.....	8
<b>Figura 4</b>	Representación gráfica del condrocito articular.....	9
<b>Figura 5</b>	Procesos biológicos responsables del desequilibrio del metabolismo del cartílago hacia los procesos catabólicos.....	10
<b>Figura 6</b>	Estrategias actuales para el tratamiento de las lesiones articulares.....	12
<b>Figura 7</b>	Procesos de diferenciación de las células madre mesenquimales.....	17
<b>Figura 8</b>	Fases y regulación de la condrogénesis.....	19
<b>Figura 9</b>	Modelo de condrogénesis <i>in vitro</i> basado en la formación de micromasas.....	21
<b>Figura 10</b>	Principales aplicaciones de la proteómica.....	23
<b>Figura 11</b>	Tipos de estrategias proteómicas utilizadas en la actualidad...	28
<b>Figura 12</b>	Esquema representativo de la técnica de electroforesis diferencial en gel (DIGE).....	33
<b>Figura 13</b>	Componentes básicos de un espectrómetro de masas.....	37
<b>Figura 14</b>	Ejemplos de los sistemas de ionización utilizados en espectrometría de masas.....	39
<b>Figura 15</b>	Tipos de analizadores de masas más empleados en proteómica.....	42
<b>Figura 16</b>	Aproximaciones metodológicas para la identificación de proteínas.....	46
<b>Figura 17</b>	Aproximación label-free para la cuantificación de proteínas....	52
<b>Figura 18</b>	Flujo de trabajo de un marcaje iTRAQ.....	53

<b>Figura 19</b>	Flujo de trabajo en un experimento SILAC.....	55
<b>Figura 20</b>	Esquema general de un flujo de trabajo MALDI-MSI.....	59
<b>Figura 21</b>	Estructuras de los lípidos más comunes.....	61
<b>Figura 22</b>	Dispensadores automáticos de matriz.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Criterios para la caracterización de las MSCs.....	18
<b>Tabla 2</b>	Estudios realizados sobre el secretoma de las MSCs mediante técnicas proteómicas.....	25
<b>Tabla 3</b>	Proteasas comúnmente empleadas en la digestión de proteínas.	30
<b>Tabla 4</b>	Características de los espectrómetros de masas híbridos más empleados en proteómica.....	45
<b>Tabla 5</b>	Principales características de los métodos de tinción más frecuentes.....	48
<b>Tabla 6</b>	Aminoácidos marcados con isótopos estables empleados para el marcaje SILAC.....	56
<b>Tabla 7</b>	Valores m/z de iones producidos durante el análisis MS/MS de los diferentes lípidos.....	62
<b>Tabla 8</b>	Tipos de matrices utilizadas actualmente en MS Imaging.....	66
<b>Tabla 9</b>	Espectrómetros de masas disponibles comercialmente para MALDI-MSI.....	70



# INTRODUCCIÓN



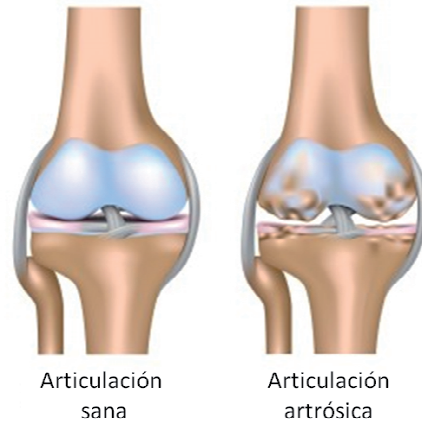


## 1.- ARTROSIS

### 1.1. Definición y prevalencia

La artrosis (OA) es la patología reumatológica más frecuente en los países occidentales. Estudios de prevalencia muestran que, en España, la artrosis de rodilla afecta al 10.2% de la población adulta (5.7% en hombres y 14% en mujeres), y la artrosis de manos al 6.2% (2.3% de los hombres y 9.5% de las mujeres) [1]. La frecuencia con que afecta a las personas aumenta con la edad, sobre todo a partir de los 40-50 años, ya que se trata de una enfermedad asociada al envejecimiento del cuerpo humano. El impacto de la OA se aprecia al tener en cuenta que es la primera causa de incapacidad laboral permanente y la segunda de incapacidad laboral transitoria, una de las causas más frecuentes de discapacidad en el anciano, y que supone uno de los motivos más comunes de consulta en atención primaria.

La OA se ha definido clásicamente como una enfermedad articular degenerativa caracterizada por la degradación progresiva del cartílago, la inflamación de la membrana sinovial y la esclerosis del hueso subcondral. Sin embargo, en la actualidad la OA engloba además otros cambios patológicos como la formación de osteofitos en los márgenes del hueso, la degeneración de los ligamentos y, en la rodilla, la degeneración del menisco y la hipertrofia de la cápsula articular [2]. También se han observado cambios en los músculos periarticulares, nervios y



**Figura 1.** Imágenes representativas de una articulación de rodilla sana y artrósica. Imagen adaptada de mundoasistencial.com

acumulaciones de grasa que pueden contribuir a la OA. En la Figura 1 se muestran las diferencias estructurales entre una articulación de rodilla sana y con artrosis.

### 1.2. Factores de riesgo

La OA es una enfermedad de origen multifactorial, e influyen en ella tanto factores sistémicos como factores biomecánicos locales. Los factores sistémicos engloban la edad, el sexo, los factores genéticos y la densidad ósea. Los factores locales son generalmente de naturaleza biomecánica y comprenden la obesidad, la actividad física, los traumatismos y el tipo de profesión [3, 4].

#### ➤ Edad y sexo

La edad es el factor de riesgo más fuertemente relacionado con la artrosis [5]. Tanto la prevalencia como la incidencia de la enfermedad se incrementan con el aumento de la edad en cualquier articulación que se considere. De hecho, el 50% de las personas mayores de 65 años muestran signos radiológicos de la enfermedad, y dicha enfermedad afecta a más del 80% de la población mayor de 75 años. Este factor parece estar relacionado con la existencia de cambios anatómicos, estructurales y bioquímicos que favorecerían la degeneración del cartílago articular en las personas mayores. La prevalencia de la artrosis en la mujer por debajo de los 50 años es similar a la del género masculino. Sin embargo, por encima de esa edad, la incidencia y severidad de la enfermedad se incrementa mucho más en la mujer [6]. Esta diferencia entre ambos géneros puede explicarse por la pérdida de las hormonas sexuales, como los estrógenos. Además, se ha visto que el cartílago articular de la rodilla es significativamente más grueso en los hombres que en las mujeres, incluso después de ajustar por edad, índice de masa corporal (BMI, del inglés *body mass index*) y actividad física. Sin embargo, no está claro que las mujeres tengan una tasa de pérdida de volumen de cartílago más acelerada que los hombres.

### ➤ Factores genéticos

Los factores genéticos también se asocian con la OA, especialmente con la OA de manos y cadera [7]. De hecho, se estima que dichos factores suponen entre un 40-65% del riesgo de desarrollar artrosis. En los últimos años se han descrito varias posiciones fijas del cromosoma (o *loci*) asociadas a la OA. En 2011 se describieron 3 de ellas: GDF5, que codifica para el factor de crecimiento y diferenciación 5, cromosoma 7q22 y MCF2L [8-10]. Un estudio de asociación de genoma completo o GWAS publicado en 2012 describe 5 nuevos *loci* asociados con el riesgo de desarrollar artrosis [11]. Uno de ellos se localiza en el cromosoma 3, en el gen que codifica para la nucleostemina (GNL3). Otro se localiza en el cromosoma 6, entre el gen que codifica para la FILIP1 (proteína 1 de interacción con la filamina A) y la SENP6 (peptidasa específica de sentrina). Los demás se localizan en el cromosoma 9 (cerca del gen que codifica para la astrotactina 2, o ASTN2) y en el cromosoma 12 (uno cerca del gen que codifica para la ligasa KLHDC5 y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea PTHLH, y otro cerca del gen que codifica para el enzima carbohidrato sulfotransferasa 11, o CHST11).

### ➤ Densidad mineral ósea

Se ha descrito que las personas con mayor densidad mineral ósea tienen un riesgo más elevado de padecer artrosis [12]. Es probable que ello pueda reflejar un mayor estrés biomecánico sobre el cartílago, favoreciendo su degradación.

### ➤ Obesidad

La obesidad se ha descrito como factor de riesgo especialmente en la OA de rodilla [13]. Diferentes estudios muestran que un índice de masa corporal (BMI) elevado incrementa el riesgo de sufrir OA de rodilla [14]. De hecho, se ha visto que la pérdida de peso de unos 5 kg (descenso de 2 unidades en el BMI) es capaz de reducir el riesgo de incidencia de artrosis de rodilla hasta en un 50%, especialmente en las mujeres [15]; resultados que han sido validados en un estudio reciente [16]. Los efectos de la obesidad en la OA pueden deberse a la

sobrecarga mecánica ejercida por el aumento de peso. Además, hoy en día se sabe que el tejido adiposo es un tejido metabólicamente activo y que produce adipocinas, como la adiponectina, la leptina y la resistina, que podrían actuar sobre el cartílago y facilitar la aparición de la enfermedad, aunque su papel en la OA aún no está claro [17, 18]. La obesidad también está significativamente asociada con la incidencia de la artrosis de manos [19]. Sin embargo, la asociación entre la obesidad y la artrosis de cadera no es evidente y dicha asociación es menos fuerte que la que existe con la rodilla o la mano [20, 21].

### ➤ **Actividad física, tipo de profesión y traumatismo**

La actividad física puede ser beneficiosa, ya que fortalece los músculos periarticulares ayudando a estabilizar la articulación. De hecho, se ha observado que los niveles de actividad normales no son causa de OA. Sin embargo, las actividades físicas o el deporte de alta intensidad (que exponen repetidamente las articulaciones a traumatismos importantes) aumentan el riesgo de sufrir OA [22].

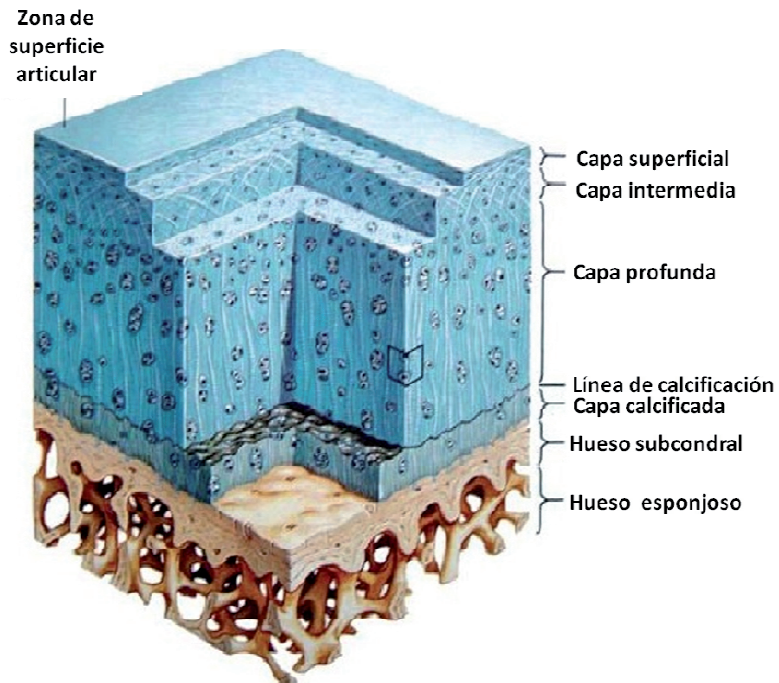
Además de ciertos deportes como el fútbol, algunas profesiones que requieren la función continuada de ciertas regiones anatómicas durante largos períodos de tiempo han sido relacionadas con el desarrollo de la OA. Trabajos específicos como los mineros o los albañiles se han asociado con la artrosis de rodilla (debido al riesgo de rotura de menisco) y lumbar [23]. Además, aquellas profesiones en las que se requiere el uso de las manos, como la sujeción con pinzas repetidamente, se han asociado con la artrosis de manos [24].

Ciertos estudios indican que los traumatismos sobre las articulaciones pueden conducir a la aparición posterior de la artrosis [13]. Se ha descrito que un traumatismo previo sobre la rodilla tiene un riesgo 5-6 veces superior de artrosis de rodilla en el hombre y 3 veces en la mujer. En otro estudio también se encontró un alto riesgo de artrosis de rodilla en individuos que habían sufrido un traumatismo articular en su juventud [25].

## 2.- BIOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

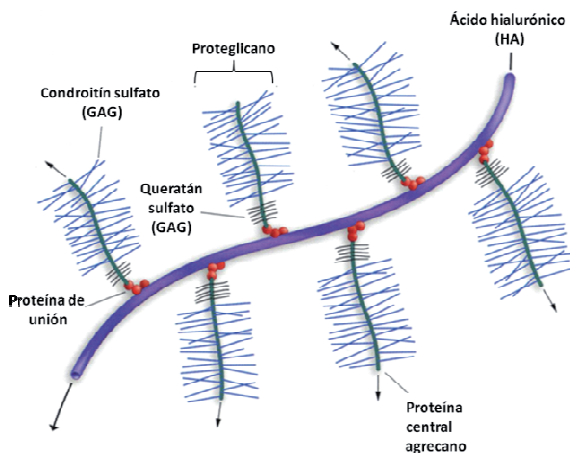
### 2.1. Estructura y función del cartílago articular

El cartílago articular (que es el tejido característicamente más afectado en la OA) es un tejido conectivo especializado, avascular, aneural y alinfático, constituido por una matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) y por un único tipo de células, los condrocitos. La ECM representa el 97-98% del volumen total del cartílago y se compone principalmente de agua (70-80%) y colágeno (10-30%), así como de proteoglicanos (PRGs) y otras proteínas (5-10%) [26]. La estructura en capas del cartílago se representa en la Figura 2.



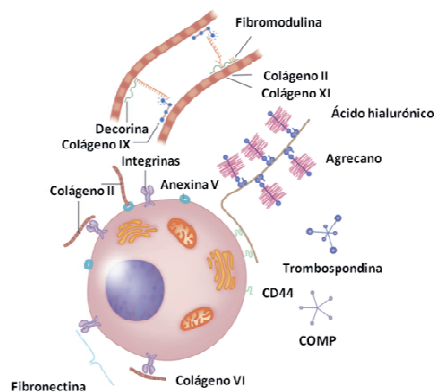
**Figura 2.** Estructura del cartílago articular hialino, en la que se diferencian las cuatro capas que lo forman: la capa superficial o de deslizamiento, la capa intermedia o de transición, la capa profunda o radial y la capa calcificada. Imagen modificada de ELSEVIER.INC-NETTERIMAGES.COM

El contenido de agua de la matriz se distribuye de forma desigual a lo largo de las diferentes capas del cartílago. Su concentración es más alta en la capa superficial y va disminuyendo gradualmente a medida que aumenta la profundidad [27]. El 90-95% del colágeno del cartílago articular es de tipo II, que forma una malla de fibras tridimensional que confiere al tejido resistencia a la tensión. Además, en el cartílago se encuentran otros tipos de colágenos (VI, IX, XI, XII y XIV) en cantidades menores. Por su parte, los PRGs son macromoléculas muy hidrofílicas que se disponen entre las fibras de colágeno. Su elevada carga negativa hace que se retengan grandes cantidades de agua en la ECM, protegiendo al cartílago de las fuerzas de compresión. Los PRGs están constituidos por un eje central de naturaleza proteica al que se unen, mediante enlaces covalentes, cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), que son polisacáridos como el condroitín 4 y 6 sulfato, el dermatán sulfato o el queratán sulfato (Figura 3). El ácido hialurónico (HA) es otro GAG que tiene la función de enlazar entre sí los diversos PRGs, formando agregados que ocupan los espacios entre la malla de colágeno.



**Figura 3.** Estructura de un agregado de proteoglicanos. La estructura de un proteoglicano se basa en la unión covalente de cadenas de glicosaminoglicanos a un eje central formado por el agregano. Además, esta estructura se une al ácido hialurónico mediante proteínas de unión formando agregados de gran tamaño. Modificada de vps108743.ovh.net.

La fibromodulina, la decorina y el biglicano son algunos ejemplos de los PRGs presentes en el cartílago. El cartílago articular además contiene proteínas que no son PRGs ni colágenos. Las más representativas son la ancorina, la fibronectina y la COMP (del inglés, *cartilage oligomeric matrix protein*), que están involucradas en el mantenimiento de la estructura del cartílago y en los mecanismos de reparación. Los condrocitos constituyen solamente el 2-3% del volumen total del cartílago. Son células de morfología redondeada sin actividad mitótica detectable y con una tasa de actividad baja (Figura 4). Estas células se encargan de la síntesis y el mantenimiento de los componentes de la ECM, por lo tanto, son fundamentales para el desarrollo, crecimiento, reparación y mantenimiento del cartílago articular.

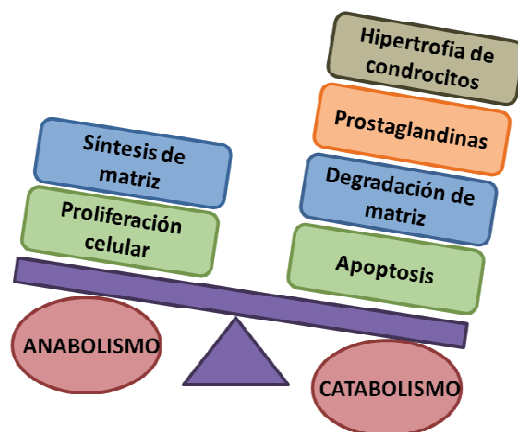


**Figura 4.** Representación gráfica del condrocito articular. Esta célula expresa receptores como CD44 e integrinas que interactúan con las macromoléculas adyacentes de la matriz extracelular. Adaptada de [28].

## 2.2. Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago articular

El cartílago articular adulto sano mantiene un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de ECM) y catabólicos (degradación de ECM). Generalmente, estos dos tipos de reacciones están en equilibrio y las moléculas destruidas son reemplazadas inmediatamente por moléculas nuevas. Sin embargo, en la artrosis,

este equilibrio entre la síntesis y la degradación se ve alterado produciéndose una mayor degradación que síntesis. El origen de este desplazamiento hacia los procesos catabólicos no se conoce con exactitud, aunque en los últimos años se han descrito algunas de las vías de señalización y factores de transcripción que están implicados (Figura 5).



**Figura 5.** Procesos biológicos responsables del desequilibrio del metabolismo del cartílago hacia los procesos catabólicos, que sucede en la artrosis.

Las reacciones anabólicas del cartílago se mantienen por la acción de factores de crecimiento, citoquinas antiinflamatorias e inhibidores de las proteasas. Los factores de crecimiento más estudiados son el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y del factor transformador del crecimiento (TGF- $\beta$ ). IGF-I interviene en el remodelado del cartílago debido a su capacidad para estimular la síntesis de proteoglicanos y contrarrestar las actividades de las citoquinas catabólicas [29, 30]. Entre los FGF más estudiados están el FGF-2, el FGF-9 y el FGF-18 [31]. El TGF- $\beta$  promueve las reacciones anabólicas mediante la inducción de la expresión de los inhibidores de tejido de metaloproteasas (TIMP, del inglés *tissue inhibitors of metalloproteinases*).



Además, diferentes isoformas del TGF- $\beta$  y de las BMPs son capaces de inducir la diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales (MSCs) *in vitro*.

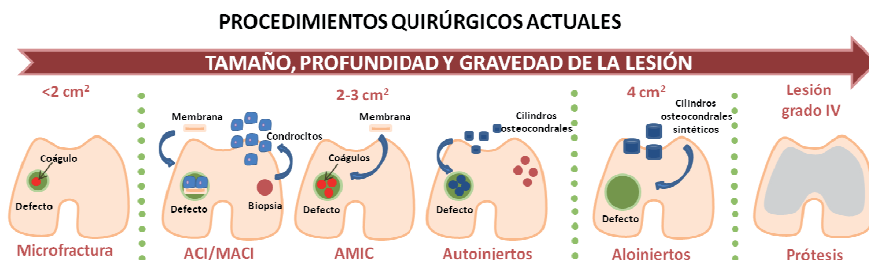
El principal grupo de citoquinas inhibitoras o antiinflamatorias involucradas en la patogénesis de la OA son la IL-4, la IL-10, la IL-13 y la IL-1Ra. Estas moléculas inhiben las proteasas que degradan el cartílago y revierten algunos efectos de las citoquinas catabólicas. Los inhibidores de las proteasas (TIMPs) controlan la actividad de las metaloproteasas de la matriz (MMPs, del inglés *matrix metalloproteinases*), que son los enzimas responsables de la degradación de la ECM del cartílago.

Los procesos catabólicos del cartílago se llevan a cabo principalmente por la acción de las proteasas. Hay varios tipos de proteasas, pero las MMPs son las que tienen una mayor relación con la degradación del cartílago. Hasta la fecha se han descrito 28 tipos de MMPs encargadas de degradar diferentes moléculas como colágenos, proteoglicanos, gelatina o fibronectina [32]. Por otra parte, las citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), también inducen reacciones catabólicas en el cartílago. El papel de ambas citoquinas en la artrosis se ha estudiado ampliamente [33]. La IL-1 $\beta$  es capaz de estimular su propia síntesis y la de otras moléculas como la prostaglandina E2 (PGE2) y el enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2). Además, induce la expresión de otras interleuquinas proinflamatorias como la IL-6 y la IL-8, estimula también la síntesis de otras moléculas mediadoras de la inflamación como el factor inhibidor de la leucemia (LIF), diversas MMPs y aumenta los niveles de óxido nítrico (NO). El TNF- $\alpha$ , al igual que la IL-1 $\beta$ , induce la síntesis de MMPs y otras proteasas, así como las citoquinas IL-6, IL-17, IL-18, implicadas asimismo en la degradación del cartílago. También aumenta la producción de NO, COX-2 y PEG2 [34].

### 2.3. Reparación de las lesiones del cartílago articular

El cartílago articular hialino tiene una baja capacidad de regeneración, lo que se debe parcialmente a su naturaleza avascular. Esta capacidad se deteriora con la edad, y además depende de la profundidad de la lesión [35]. Las lesiones que afectan únicamente al cartílago articular se denominan lesiones condrales, mientras que si el defecto afecta también al hueso subcondral reciben el nombre de lesiones osteocondrales. En general, la reparación de estas últimas se inicia a partir de las MSCs procedentes de la médula ósea del hueso subcondral [36]. Por lo tanto, en este caso, la reparación va a depender de la edad del paciente y del tamaño y localización de la lesión [37]. Además, a diferencia de las lesiones condrales, la reparación de las lesiones osteocondrales se realiza mediante la formación de tejido fibroso o fibrocartílago.

En la actualidad existen diferentes procedimientos que buscan reparar y regenerar el cartílago articular (Figura 6). Generalmente, estas técnicas siguen dos estrategias distintas: las basadas en el uso de células vivas (o terapias celulares) y las basadas en la ingeniería tisular (uso de *scaffolds* o andamiajes de materiales biocompatibles que dan soporte y facilitan la reparación del daño tisular) [38]. A su vez, las terapias celulares se pueden basar en el uso de células maduras diferenciadas (condrocitos o explantes de cartílago) o de células madre.



**Figura 6.** Estrategias actuales para el tratamiento de las lesiones articulares. ACI, implante de condrocitos autólogos; MACI, implante de condrocitos autólogos en una matriz; AMIC, condrogénesis autóloga inducida por matriz. Figura adaptada de [39].

### 2.3.1. Técnicas de reparación: la microfractura

El fundamento de la microfractura se basa principalmente en la capacidad condrogénica de las MSCs. Inicialmente, se localiza la lesión y se limpia todo el cartílago dañado. A continuación, se hacen unas perforaciones de aproximadamente 3-4 mm en la placa subcondral, con el fin de conseguir un sangrado. La sangre contiene MSCs, fibrina y plaquetas que van a formar un “supercoágulo”, que más tarde será transformado por las MSCs en tejido de reparación [40]. El principal inconveniente de esta técnica es que el tejido de reparación que se forma es similar al fibrocartílago, un tejido poco organizado con grandes cantidades de colágeno tipo I. Además, sus propiedades biomecánicas son inferiores a las del cartílago articular hialino normal, con lo que la ECM de este tejido puede romperse fácilmente con el tiempo conduciendo al paciente al desarrollo de una OA secundaria [35].

### 2.3.2. Técnicas de regeneración

- **Implantación de condrocitos autólogos (ACI).** La técnica ACI utiliza condrocitos autólogos expandidos *in vitro* y periostio (o una membrana de colágeno artificial) para reparar las lesiones del cartílago. La técnica ACI se comenzó a aplicar en la práctica clínica en 1994 [41]. Esta técnica se inicia con una artroscopia para obtener una biopsia de cartílago sano. A continuación, las células se extraen y se expanden *in vitro* hasta obtener un número de células suficiente ( $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>). Seguidamente, las células cultivadas se implantan en la lesión articular, y el periostio o las membranas artificiales comercialmente disponibles (Chondrogide®/ Restore®) se fijan a la lesión. Finalmente, la lesión se sutura y se sella con gel de fibrina [42].
- **Implantación de condrocitos autólogos en una matriz (MACI).** En este caso se implantan los condrocitos adheridos a membranas o en matrices tridimensionales como colágeno I y III, ácido hialurónico, etc. Esta membrana constituye un soporte tridimensional para las células y debería

reunir una serie de requisitos para el adecuado desarrollo tisular, entre los cuales estarían la distribución uniforme de las células en la estructura tridimensional, que facilite la difusión de las moléculas y que la degradación de la misma se produzca a igual ritmo que el reemplazamiento por el tejido nuevo. Después de la colocación de la membrana con las células, ésta se sella y se recubre con fibrina o suturas [43, 44].

- **Condrogénesis autóloga inducida por matriz (AMIC).** La técnica AMIC combina el procedimiento de la microfractura con el uso de una membrana artificial de colágeno tipo I/III (Chondro-Gide®). Mediante la microfractura, las MSCs migran desde el hueso subcondral hasta la lesión formando el “supercoágulo”, previamente descrito, que es estabilizado mediante la membrana de colágeno que recubre la lesión. Este soporte estimula la diferenciación de las MSCs y por consiguiente, la formación de un tejido de reparación muy similar al cartílago hialino normal.

Este conjunto de técnicas basadas en el uso de condrocitos autólogos presenta serios inconvenientes. Muchos investigadores creen que únicamente las pequeñas lesiones del cartílago pueden tratarse con esta técnica, y que incluso después de la aplicación de la ACI muchas de las lesiones persisten en el tejido. Además, se ha descrito que durante la expansión *in vitro* los condrocitos sufren un cierto grado de dediferenciación, perdiendo por lo tanto su morfología y sus funciones especializadas [45]. Las limitaciones atribuidas a este tipo de técnicas han motivado la búsqueda de procedimientos alternativos para la reparación del cartílago, como las técnicas de terapia celular basadas en el uso de células madre.

### 2.3.3. Técnicas de sustitución

Las técnicas de sustitución se emplean para la reparación de las lesiones osteocondrales.

- **Autoinjertos: mosaicoplastia.** Esta técnica consiste en colocar cilindros osteocondrales en la zona de lesión. Los cilindros se obtienen de una zona normal del cartílago, y al ser de diferentes tamaños pueden rellenar entre el 90-100% de la lesión. Esta técnica está recomendada generalmente para lesiones pequeñas (2-3 cm<sup>2</sup>). La clave de la misma es restaurar el contorno del defecto o lesión y cubrirlo con cartílago hialino, procurando dejar el mínimo espacio entre los injertos para evitar la formación de fibrocartílago. Algunos de los inconvenientes que pueden producirse son el hundimiento de la superficie del injerto y las diferencias en la orientación tisular y en el grosor del cartílago hialino de las zonas donante y receptora.
- **Aloinjertos.** Los aloinjertos se utilizan para el tratamiento de lesiones osteocondrales mayores de 3 cm de diámetro. Están indicados en pacientes de hasta 50 años de edad y cuando se produce una pérdida de hueso subcondral importante. La ventaja de este tipo de injertos es que se adaptan perfectamente al tamaño y curvatura de la lesión. El inconveniente surge durante la conservación del cartílago, ya que reduce la viabilidad de las células, lo que repercute en la recuperación de la morfología del cartílago.

### 3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

#### 3.1. Definición y biología de las células madre mesenquimales

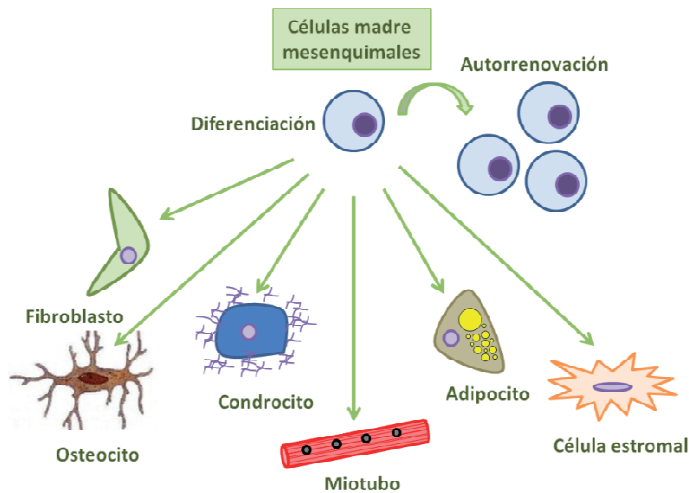
Una célula madre o progenitora es una célula indiferenciada capaz de autorrenovarse y mantener su estado indiferenciado, o dividirse y diferenciarse en otros tipos celulares. Se pueden dividir en dos tipos en función de su origen: las células madre embrionarias (ESCs, del inglés *embryonic stem cells*) y las células madre adultas (ASCs, del inglés *adult stem cells*). Las ESCs son células totipotentes ya que pueden diferenciarse en células de las tres capas embrionarias. No

obstante, esta elevada capacidad de proliferación restringe su aplicación. Por ello, la mejor opción terapéutica en la actualidad es la utilización de las células madre adultas derivadas del mesodermo, las células madre mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stem cells*).

El término “células madre mesenquimales” fue introducido por Caplan [46] en base a la habilidad de estas células para diferenciarse hacia tejidos de origen mesenquimal. Desde entonces, ha existido una gran controversia entre los investigadores en cuanto a la nomenclatura y propiedades de estas células. En base a los diferentes métodos de aislamiento, las MSCs han recibido distintos nombres tales como células estromales de médula ósea (BMSCs, del inglés *bone marrow stromal cells*) [47], células inducibles de multilinaje adultas aisladas de médula ósea (MIAMI, del inglés *marrow-isolated adult multipotent inducible cells*) [48] o células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs, del inglés *progenitor multipotent stem cells*) [49]. En 2005, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso el término de “células mesenquimales estromales” para referirse a la población de células adherentes al plástico aisladas de médula ósea u otros tejidos, reservando el término de células madre mesenquimales para aquellas con capacidad de diferenciación a grasa, hueso y cartílago [50]. A lo largo de esta tesis hemos decidido utilizar el término “células madre mesenquimales”, dado que las células aisladas de médula ósea que se obtienen mediante el protocolo de extracción utilizado en nuestro laboratorio son capaces de diferenciarse a células de la línea mesodérmica [51].

Las células madre mesenquimales (MSCs) poseen dos propiedades importantes: la capacidad de autorrenovación (que facilita su expansión *in vitro*) y la capacidad para diferenciarse a células de la línea mesodérmica como son los adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Figura 7). Las fuentes celulares más comunes de MSCs son la médula ósea y el tejido adiposo [52], pero pueden aislarse a partir de otros muchos tejidos como la membrana sinovial [53], el hueso trabecular [54], el músculo [55], etc. Se ha descrito que su frecuencia en los tejidos disminuye con la

edad [56], y más importante aún, que el tejido de origen parece conferirles características particulares [57, 58]. Esta variabilidad puede relacionarse con el hecho de que las MSCs son en realidad una población heterogénea de células. Además, la heterogeneidad de las MSCs depende a su vez de los métodos de aislamiento y las condiciones de expansión.



**Figura 7.** Procesos de diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs). Las MSCs tienen la habilidad de mantener su estado indiferenciado mediante su autorrenovación o de dividirse y diferenciarse a células especializadas.

De hecho, y debido a la ausencia de un marcador común, la definición de una MSC se realiza en función del cumplimiento de 3 criterios mínimos: su capacidad de adherencia al soporte de cultivo (plástico), la presencia de varios marcadores de superficie celular y la ausencia de marcadores de linaje hematopoyético, y por último, su capacidad de diferenciación *in vitro* a los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico, determinados generalmente mediante tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterios para la caracterización de las MSCs.

<b>1</b>	<b>Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar</b>		
<b>2</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Positivo (<math>\geq 95\%</math>)</b>	<b>Negativo (<math>\leq 2\%</math>)</b>
		<b>CD44</b>	<b>CD14</b>
		<b>CD73</b>	<b>CD34</b>
		<b>CD90</b>	<b>CD45</b>
		<b>CD105</b>	<b>HLA-DR</b>
<b>3</b>	<b>Diferenciación <i>in vitro</i>: osteoblastos, adipocitos y condrocitos</b>		

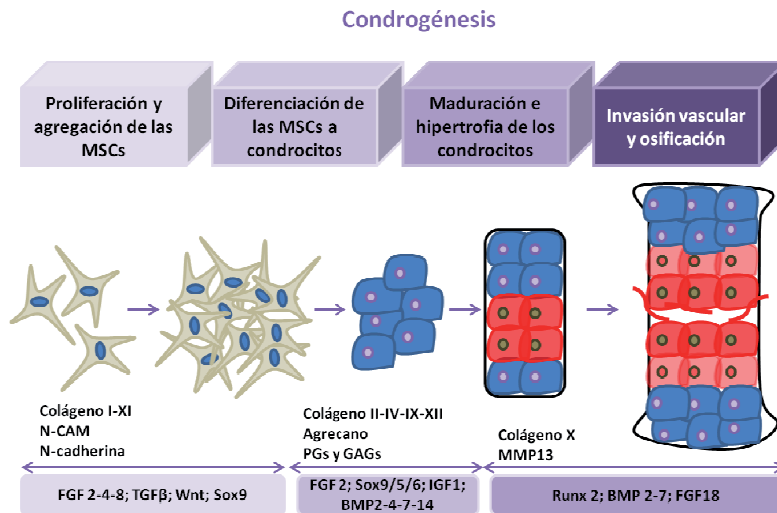
### 3.2. El proceso de condrogénesis

#### ✓ Definición de condrogénesis

El proceso mediante el cual las MSCs se diferencian hacia condrocitos recibe el nombre de condrogénesis [59]. La condrogénesis es la fase más temprana del desarrollo del esqueleto. *In vivo*, este proceso se inicia con el reclutamiento, proliferación y condensación de un grupo de MSCs formando los nódulos condrogénicos (Figura 8). El inicio de la condensación está asociado a un incremento en la actividad del enzima hialuronidasa. Este enzima degrada el ácido hialurónico, que es un glicosaminoglicano de alto peso molecular (PM) ampliamente distribuido en la mayoría de los tejidos embrionarios y adultos. Este ácido es el componente mayoritario de la ECM de las células mesenquimales y su función es prevenir las interacciones célula-célula y facilitar la migración celular, por lo que para que las células se agreguen es necesario degradar dicho ácido. La condensación de las células también está asociada a la aparición de moléculas de adhesión celular, tales como la N-cadherina neural (Cdh2), la molécula de adhesión celular neural (N-CAM) y la tenascina-C. Después de la condensación, el proceso condrogénico continua hacia la diferenciación de las MSCs a condrocitos. En este paso, las células modifican su morfología y empiezan a sintetizar proteínas específicas de la ECM del cartílago como los colágenos tipo II, VI, IX y XI (Col II, VI,



IX y XI), diferentes PRGs y GAGs, principalmente agregano y condroitín sulfato. Finalmente, si el proceso no se detiene, los condrocitos se hipertrofian, entran en apoptosis e inician la osificación endocondral, proceso que conduce a la calcificación de la matriz cartilaginosa, la invasión vascular y finalmente a la formación del hueso [60, 61].



**Figura 8.** Fases y regulación de la condrogénesis. PRGs, proteoglicanos; GAGs, glicosaminoglicanos; N-CAM, moléculas de adhesión celular neural; MMP13, metaloproteasa de la matriz 13; TGFβ, factor de crecimiento transformante β; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; IGF1, factor de crecimiento insulínico tipo I; BMP, proteína morfogenética del hueso.

### ✓ Regulación de la condrogénesis

La condrogénesis está regulada por un número importante de moléculas, entre las que se incluyen factores de transcripción, factores de crecimiento solubles, proteínas de la ECM y factores epigenéticos.

Entre los factores de transcripción nucleares involucrados en la condrogénesis, Sox9 ha sido el más estudiado. Este factor se activa en los inicios de la

diferenciación y controla la expresión de los genes que codifican para los colágenos anteriormente descritos y proteoglicanos como el agregano, el biglicano y el versicano, imprescindibles todos ellos para la formación de la ECM del cartílago. Por lo tanto, estas moléculas son indicadoras del grado de diferenciación de las MSCs hacia cartílago. Otros factores de transcripción miembros de la familia Sox, como Sox5 y Sox6, cooperan con Sox9 en la activación de estos genes [62]. Durante la fase de hipertrofia, los condrocitos sobreexpresan el factor de transcripción Runx2. Este factor de transcripción osteogénico activa la expresión de genes que codifican para el colágeno X (Col X), la fosfatasa alcalina y las metaloproteasas de la matriz (MMP-13) [63, 64]. Recientemente, se ha descrito que Sox9 suprime la expresión de Runx2, aboliendo la fase de hipertrofia de los condrocitos [65].

Además de los factores de transcripción, los factores solubles como los factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y factores de la familia Wnt también intervienen en la regulación del proceso condrogénico [66]. Entre ellos, el TGF- $\beta$  es un factor de crecimiento que se expresa al principio de la condensación condrogénica y que promueve la síntesis de fibronectina (proteína que aumenta la expresión de N-CAM) y la deposición de proteoglicanos.

Por otro lado, hay ciertas proteínas de la ECM que interactúan con las moléculas de adhesión celular activando rutas de señalización intracelulares que inician la transición de las MSCs a condrocitos. Este es el caso de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP). Esta proteína interactúa con otras proteínas de la ECM, incluyendo la fibronectina, diferentes colágenos, matrilinas y proteoglicanos como el agregano que participan también en la diferenciación hacia condrocitos [67, 68]. Los proteoglicanos de la ECM inicial, tales como el sindecano, versicano y perlecano, intervienen en la agregación y condensación de las MSCs.

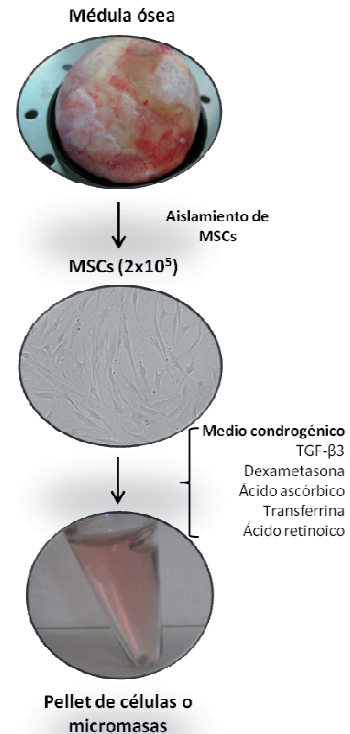
Finalmente, se conoce que el proceso de condrogénesis también está regulado por mecanismos epigenéticos, ya que tanto la modificación de las histonas,

mediante deacetilasas (HDACs), como la metilación del ADN, influyen en el proceso condrogénico. Además, ciertas enzimas HDACs suprimen la expresión de genes específicos del cartílago como es el Col II [69].

### ✓ La condrogénesis *in vitro*

Existen numerosos protocolos para inducir la diferenciación *in vitro* de las MSCs hacia condrocitos [70]. En nuestro trabajo, hemos utilizado un modelo de condrogénesis basado en la formación de agregados celulares de alta densidad, también llamados micromasas [71], a partir de MSCs aisladas de médula ósea (Figura 9). De esta forma, la alta densidad celular que se consigue con el cultivo tridimensional en micromasa permite las interacciones célula-célula estimulando a las MSCs a imitar los eventos de condensación y diferenciación que ocurren durante la formación del cartílago hialino *in vivo*. Las micromasas están formadas entre 200.000 y 500.000 células, según la bibliografía [72-74]. Se forman por centrifugación y el *pellet* resultante suele

incubarse en 500  $\mu$ l de medio condrogénico. El medio condrogénico suele estar formado por un medio esencial mínimo como el DMEM, suplementado con los agentes inductores de la condrogénesis. Estos agentes deberían comprender al menos: (1) ácido ascórbico o un análogo del mismo ya que promueve la formación de una ECM rica en colágenos [75]; (2) una fuente de hierro, normalmente transferrina; y (3) un factor de crecimiento transformante  $\beta$  como las proteínas BMP2/4/6 o TGF $\beta$ 1/2/3 (en nuestro caso hemos utilizado la isoforma 3 del TGF $\beta$ ).



**Figura 9.** Modelo de condrogénesis *in vitro* basado en la formación de micromasas.

Se ha descrito que las diferentes isoformas del factor difieren en su capacidad para estimular la diferenciación. De hecho, se ha descrito que las isoformas TGF $\beta$  2 y TGF $\beta$  3 son más condroinductoras que la de tipo TGF $\beta$  1, ya que incrementan los niveles de ARNm de una gran variedad de genes del cartílago incluyendo el Col II, el agregano y la COMP [76]. Otro componente del medio condrogénico es el glucocorticoide dexametasona [71, 77].

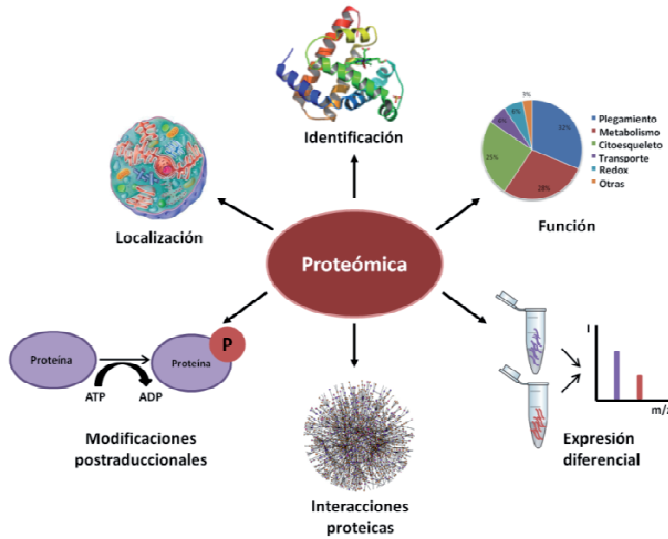
### **3.3. Aplicación de las células madre mesenquimales para la reparación del cartílago articular**

En la actualidad, la aplicación clínica de las MSCs para reparar el cartílago se debe principalmente a dos de sus características: a su capacidad de diferenciarse a condrocitos, restaurando por tanto la pérdida de la morfología y función del cartílago, y por otro lado, a su habilidad para secretar múltiples moléculas, como factores de crecimiento, citocinas y quimioquinas [78]. En este último contexto, se ha descrito que las MSCs pueden suprimir la proliferación y la actividad de los linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) así como de las células T [79, 80]. Entre las moléculas secretadas se incluyen la IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2 y galectina-1 [81, 82]. Estas moléculas intervienen en procesos celulares como la inmunidad, fibrosis, apoptosis, angiogenesis, mitosis y diferenciación [83].

## **4.- PROTEÓMICA**

### **4.1. Proteoma y secretoma**

La proteómica es la disciplina encargada de abordar el estudio de los proteomas, que son la totalidad de proteínas expresadas en un momento dado en un organismo, órgano, tejido o célula. Esta técnica no sólo comprende la identificación y cuantificación a gran escala de las proteínas, sino también el estudio de su localización, modificación, interacción y función de las proteínas (Figura 10) [84].



**Figura 10.** Principales aplicaciones de la Proteómica.

El término proteoma, entendido como el conjunto de todas las proteínas expresadas por un genoma, se empleó por primera vez en 1995 [85]. A diferencia del genoma, el proteoma es muy dinámico, ya que su composición varía dependiendo de factores tanto internos como externos, tales como el medio ambiente, edad, sexo, enfermedad, etc. que aumentan enormemente su complejidad. Además, en el estudio del proteoma se han de englobar las posibles interacciones y modificaciones postraduccionales (PTMs) que experimentan las proteínas, y que son imprescindibles para su función biológica. De hecho, hasta el momento se han descrito alrededor de 200 posibles PTMs diferentes, lo que da idea de la gran complejidad del proteoma celular [86].

Por su parte, el secretoma se define como el conjunto de moléculas (entre las que se incluyen las proteínas), que son producidas y secretadas por una célula, tejido u organismo en un momento determinado o bajo ciertas condiciones. Este término fue empleado por primera vez por Tjalsma y colaboradores en el año 2000 [87]. Las proteínas secretadas constituyen un importante subproteoma, y

están codificadas por aproximadamente el 10% del genoma humano [88]. Entre ellas encontramos componentes de la ECM y también moléculas reguladoras que participan en la mayoría de los procesos fisiológicos, como señalización celular, diferenciación, invasión, metástasis, adhesión celular, angiogénesis y apoptosis [89].

En la actualidad, el análisis proteómico del proteoma y secretoma de las MSCs está siendo posible gracias a los avances tecnológicos y metodológicos producidos en las últimas décadas en los procesos de separación de proteínas (como la cromatografía líquida (LC) y la electroforesis bidimensional (2-DE)), en la espectrometría de masas (MS), en el campo de la bioinformática y también en los métodos de aislamiento, expansión y diferenciación de las MSCs. La aplicación de la proteómica para el estudio de las MSCs no sólo pretende obtener información sobre la biología de estas células, sino también sobre los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación de las mismas hacia los distintos tipos celulares.

Las primeras técnicas utilizadas para el estudio del proteoma de las MSCs se centraban en el empleo de la 2-DE para separar las proteínas y la espectrometría de masas para su identificación. En 2004, se describió el primer perfil proteico de las MSCs obtenidas a partir de médula ósea usando la 2-DE [90]. Poco después, Feldmann y colaboradores describieron el perfil proteico de las MSCs aisladas de cordón umbilical usando la misma aproximación [91]. En ambos estudios, los mapas proteicos bidimensionales muestran las alteraciones en el proteoma de las MSCs después de ser estimuladas con el factor de crecimiento TGF $\beta$ -3. Sin embargo, los perfiles proteicos más completos de las MSCs se obtuvieron un año después mediante la combinación de algún tipo de marcaje de proteínas seguido de la técnica SDS-PAGE para el fraccionamiento de la muestra y del análisis por LC-MS/MS para la identificación y cuantificación del mayor número de proteínas posible [92, 93].

Por su parte, las dos estrategias principales utilizadas para el análisis proteómico del secretoma de las MSCs son, por un lado, el uso combinado de la separación de proteínas seguido de la identificación de las mismas mediante MS y, por otro lado, los ensayos inmunológicos (ELISA, Luminex®). El primer estudio centrado en el análisis de este subproteoma de las MSCs se realizó en 2003 [94]. Desde entonces hasta la fecha, se han publicado más de 30 trabajos relacionados con el secretoma de las MSCs (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estudios realizados sobre el secretoma de las MSCs mediante técnicas proteómicas.

Org. <sup>a)</sup>	Fuente de MSCs	Tratamiento	Tiempo de condicionado	Tipo de muestra	Técnica proteómica	Ref.
Humano	BMSCs/MIAMI I	Análisis comparativo de BMSCs (expansión 21% O <sub>2</sub> ) vs células MIAMI (expansión a 3% O <sub>2</sub> )	No se menciona	CM completo	Array de citoquinas Bio-Plex™	[95]
Rata	ADSCs	Ninguno	24 h	CM completo (10% suero)	microarray de cDNA / ELISA	[96]
Rata	BMSCs	Ninguno	24 h	CM completo	ELISA	[96]
Rata	BMSCs	Transducción con gen GATA-4	24 h	CM libre de suero	ELISA	[97]
Ratón	BMSCs	Efectos del secretoma de MSCs sobre la diferenciación de células T	4 h	Co-cultivo de células T con CM procedente de MSCs	ELISA	[98]
Humano	ADSCs	bFGF, EGF y LPS	12 días	CM completo (10% suero)	ELISA	[99]
Humano	ADSCs	TNF	24 h	Medio comercial	ELISA	[100]
Humano	ADSCs	Hipoxia (1% y 21% O <sub>2</sub> )	72 h	CM completo (5% suero)	ELISA	[101]
Humano	BMSCs	Respuesta inflamatoria en la enfermedad de Gaucher	24 h	CM libre de suero	ELISA/array de anticuerpos para citoquinas RayBio®	[102]
Humano	BMSCs	Hipoxia	7 días	CM completo	Ensayo Luminex®	[95]
Ratón	BMSCs	Efectos del secretoma de MSCs sobre la proliferación y producción de citoquinas de	48 h	CM completo	Ensayo Luminex®	[103]

		las células T				
Humano	UCMSCs	Ninguno	24, 48, 72 y 96 h	CM libre de suero	Ensayo Luminex®	[104]
Humano	ADSCs	Ninguno	24, 48, 72 and 96 h	CM libre de suero	Ensayo Luminex®	[104]
Humano	BMSCs	Diferenciación osteogénica	48 h	CM completo	Array de anticuerpos para angiogénesis RayBio® /ELISA	[105]
Humano	BMSCs	Incubación sin suero para producir factores angiogénicos	24 h	CM libre de suero	Array de anticuerpos para angiogénesis RayBio® /ELISA	[106]
Humano	BMSCs	Ninguno	No se menciona	CM completo	Array de anticuerpos para citoquinas RayBio®	[94]
Rata	BMSCs	Diferenciación osteogénica y condrogénica	No se menciona	CM completo	Array de anticuerpos para citoquinas RayBio®	[107]
Ratón	BMSCs	CM procedente de MSCs suprime la producción de Ig por parte de las células plasmáticas	No se menciona	CM completo	Array de anticuerpos para citoquinas RayBio®	[108]
Rata	ADSCs	Ninguno	24 h	CM libre de suero	Array de anticuerpos para citoquinas RayBio® /ELISA	[109]
Humano	Tejido adiposo	Ninguno	24 h	CM completo	Array de anticuerpos para citoquinas RayBio® /ELISA	[110]
Humano	MSCs derivadas de la línea celular HuES9.E1	Ninguno	3 días	CM libre de suero	Array de anticuerpos para citoquinas RayBio® /LC-MS/MS	[111]
Humano	UCMSCs	Ninguno	4 días	CM libre de suero	Array de citoquinas RayBio®	[112]
Ratón	BMSCs	Ninguno	42 h	CM libre de suero	LC-MS/MS	[113]
Ratón	BMSCs	Ninguno	42 h	Lisado celular (búsqueda de proteínas potencialment e secretadas)	LC-MS/MS	[114]
Humano	BMSCs	Diferenciación osteogénica	12 and 16 h	CM libre de suero	LC-MS/MS	[115]
Humano	BMSCs	Diferenciación osteogénica	24 h	CM libre de suero	LC-MS/MS	[116]
Humano	BMSCs	Diferenciación osteogénica	24 h	CM libre de suero	LC-MS/MS	[117]
Ratón + Humano	BMSCs	Diferenciación neural	24 h	CM libre de suero	LC-MS/MS	[97]
Humano	ADSCs	TNF	48 h	CM libre de	LC-MS/MS	[118]

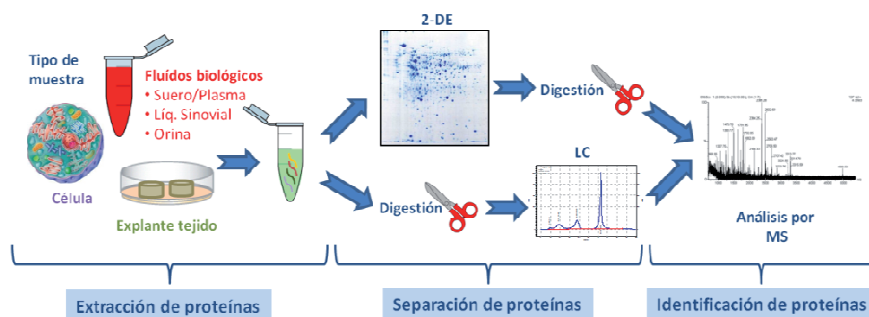


Humano	BMSCs	Efectos del secretoma de MSCs sobre la reparación del epitelio pulmonar	24 h	suero CM completo (0.2% suero)	LC-MS/MS	[119]
Equino	BMSCs	Diferenciación condrogénica y osteogénica	4 días	CM libre de suero	LC-MS/MS/ Array de anticuerpos para angiogénesis	[120]
Humano	BMSCs	Ninguno	24 h	Microvesículas aisladas a partir del CM libre de suero	1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[116]
Humano	ADSCs	Diferenciación adipogénica y osteogénica	6 h	CM libre de suero	1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[121]
Humano	UCMSCs	Diferenciación condrogénica	12 h	CM libre de suero	1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[122]
Humano	BMSCs	B, NCT, NCA y diferenciación condrogénica	21 días	CM completo	1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[123]
Rata	Tejido adiposo	Insulina	48 h	CM libre de suero	2DE LC-MS/MS	[124]
Ratón	Células A549 (MSCs)	Ninguno	48 h	CM completo	2DE + LC-MS/MS	[125]
Humano	ADSCs	Diferenciación adipogénica	16 h	CM libre de suero	2DE + MS/MS	[126]
Ratón	BMSCs	bFGF	32 h	CM libre de suero	SILAC + 1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[127]
Humano	BMSCs	Diferenciación osteogénica	18 h	CM libre de suero	SILAC + 1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[128]
Humano	BMSCs	Diferenciación condrogénica	24 h	CM libre de suero	SILAC + 1D SDS PAGE + LC-MS/MS	[129]
Humano	Tejido adiposo	Ninguna	48-114 h (72 h para SILAC)	CM libre de suero	SILAC + 1D SDS PAGE + LC-MS/MS/SELDI	[130]
Ratón	Preadipocitos 3T3-L1	Diferenciación adipogénica	18 h al final de los 0,1,3,5 y 7 días	CM libre de suero	SILAC + LC-MS/MS	[131]

a) Organismo del que se obtienen las MSCs; CM, medio condicionado o secretoma; BMSCs, células madre mesenquimales de médula ósea; ADSCs, células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo; UCMSCs, células madre mesenquimales de cordón umbilical; MIAMI, células adultas aisladas de médula ósea multilínea inducibles; bFGF, factor de crecimiento fibroblástico básico; EGF, factor de crecimiento epidérmico; LPS, lipopolisacárido; TNF, factor de necrosis tumoral; B, basal NCT, células de la notocorda en tejido nativo; NCA, células de la notocorda en bolas de alginato; SELDI, ionización por láser inducida en superficie; SILAC, marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivos celulares; LC-MS/MS, cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem.

## 4.2. Metodología utilizada en proteómica

El esquema básico de cualquier experimento en proteómica conlleva la extracción de proteínas, su separación y su identificación mediante espectrometría de masas (MS) (Figura 11). La selección de la estrategia proteómica utilizada depende del tipo de muestra a analizar (células, fluidos, explantes de tejido...) y del tipo de instrumento disponible en el laboratorio.



**Figura 11.** Tipos de estrategias proteómicas utilizadas en la actualidad. Cualquier experimento en proteómica supone la extracción de proteínas a partir de la muestra, su separación y su identificación por MS. En este esquema se representa por un lado la estrategia de separación basada en geles bidimensionales (2-DE), y por otro la separación de las proteínas mediante cromatografía líquida (LC). En ambos casos la identificación de las proteínas se realiza por MS. Adaptada de Ruiz-Romero y colaboradores [132].

### 4.2.1. Extracción y digestión de proteínas

En investigación biomédica, la extracción de proteínas suele realizarse a partir de tejidos, cultivos celulares o biofluidos. En esta introducción nos centraremos en describir la metodología de extracción de proteínas a partir de micromasas, ya que son los tipos de muestras que hemos empleado en el desarrollo de este trabajo.

Las micromasas son agregados de células madre mesenquimales formados por centrifugación a partir de cultivos celulares. Generalmente, en un tubo de

propileno cónico se colocan 250.000 células, que se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos. El *pellet* celular (o micromasa) resultante se cultiva durante un cierto tiempo en función del experimento. En los estudios que se han realizado para esta Tesis, las micromasas se cultivaron durante 14 días en un medio condrogénico. A continuación, las micromasas recogidas a diferentes tiempos de la condrogénesis (días 2 y 14) se congelaron y se homogenizaron en tampón de lisis con la ayuda de un molino mezclador.

Por su parte, el análisis del secretoma procedente de las micromasas requiere el cultivo de las mismas en un medio de cultivo sin suero bovino fetal (FBS). Para ello, las micromasas se lavan primeramente con PBS o medio sin FBS para eliminar las proteínas contaminantes procedentes del suero del cultivo, y a continuación se cultivan en medio sin FBS. El tiempo de incubación en este último medio depende del tipo celular, pero normalmente oscila entre las 12-48 horas. Seguidamente, el medio condicionado (CM) se recoge y centrifuga para eliminar los restos de células muertas. A continuación, el secretoma puede concentrarse mediante el uso de amicones de 3-10 kDa, o bien ser directamente sometido a precipitación de sus proteínas con ácido tricloroacético (TCA).

En ambos casos, las proteínas extraídas se desnaturalizan por calor o a través de agentes químicos como la urea o detergentes como el dodecil sulfato sódico (SDS) o el 3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) [133]. La presencia de estos agentes desnaturalizantes interfiere negativamente en los procesos posteriores de digestión enzimática y análisis por MS de la muestra, por lo que su cantidad en la muestra debe mantenerse al mínimo. Una vez desnaturalizadas, las proteínas se reducen y alquilan con el fin de prevenir su agregación a través de la formación de enlaces o puentes disulfuro entre los grupos tiol de las cisteínas. Los agentes reductores más empleados son el ditioneitol (DTT), el beta-mercaptoetanol o la tributilfosfina (TBP), mientras que la iodacetamida (IAA) es el alquilante más común [134]. Finalmente, para posibilitar el análisis por MS, las proteínas han de ser digeridas enzimáticamente para obtener sus péptidos

resultantes. Los enzimas más utilizados para la digestión de proteínas se recogen en la Tabla 3. En general, estos enzimas proteolíticos, también llamados proteasas, difieren en la especificidad del punto de corte entre los residuos aminoacídicos de la proteína.

**Tabla 3.** Proteasas comúnmente empleadas en la digestión de proteínas.

Proteasa	Punto de corte	Uso en proteómica
Tripsina	Lys, Arg (C)	Digestion proteolítica común
Quimotripsina	Phe, Trp, Tyr (C)	Digestión con múltiples proteasas
Elastasa	Aminoácidos aromáticos y sin carga	no Digestión con múltiples proteasas
Proteinasa K	Aminoácidos alifáticos, aromáticos o hidrofóbicos seguido de Try	Digestión no específica de proteínas de unión a membrana
Endopeptidasa Lys-C	Lys (C)	Enzima alternativa a la tripsina para aumentar la longitud de los péptidos; marcaje con O <sub>18</sub>
Endopeptidasa Lys-N	Cualquier aminoácido seguido de Lys (N)	Aumenta la longitud de los péptidos
Endopeptidasa Glu-C	Glu seguido de cualquier aminoácido	Digestión con múltiples proteasas; marcaje con O <sub>18</sub>
Endopeptidasa Arg-C	Arg (C)	Digestión con múltiples proteasas
Endopeptidasa Asp-N	Cualquier aminoácido seguido de Asp	Digestión con múltiples proteasas

Lys, lisina; Arg, arginina; Phe, fenilalanina; Trp, triptófano; Tyr, tirosina; Glu, ácido glutámico; Asp, ácido aspártico; C, extremo carboxilo terminal; N, extremo amino terminal.

La tripsina es el enzima más empleado para llevar a cabo la digestión proteica. Esta proteasa rompe el enlace peptídico entre los residuos de lisina (Lys) o arginina (Arg), con la excepción de los casos en que la Lys o Arg estén N-ligadas a un ácido aspártico, o en algunos casos en los que una prolina precede a una Lys o Arg [135]. Tras la digestión triptica, los péptidos resultantes tienen carga positiva, lo que favorece su ionización en el análisis por MS. Además, el uso de la tripsina es

rentable dado su bajo coste y alta eficiencia de digestión. La digestión con este enzima suele realizarse durante toda la noche, no pudiendo superar el tiempo de digestión las 16 horas. La temperatura empleada habitualmente es de 37°C, aunque en algún estudio se comprueba que a 50-60°C se reduce la autólisis del propio enzima y se disminuye el tiempo de digestión [136].

#### **4.2.2. Separación de proteínas**

El fraccionamiento o separación de la muestra es un paso clave en los estudios proteómicos ya que reduce la complejidad de la misma, incrementando el número de proteínas identificadas y mejorando la detección de aquellas que se encuentran en concentraciones más bajas. Las muestras proteicas pueden fraccionarse mediante dos estrategias generales: las basadas en gel (como la electroforesis) y las basadas en cromatografía líquida, también denominadas gel-free.

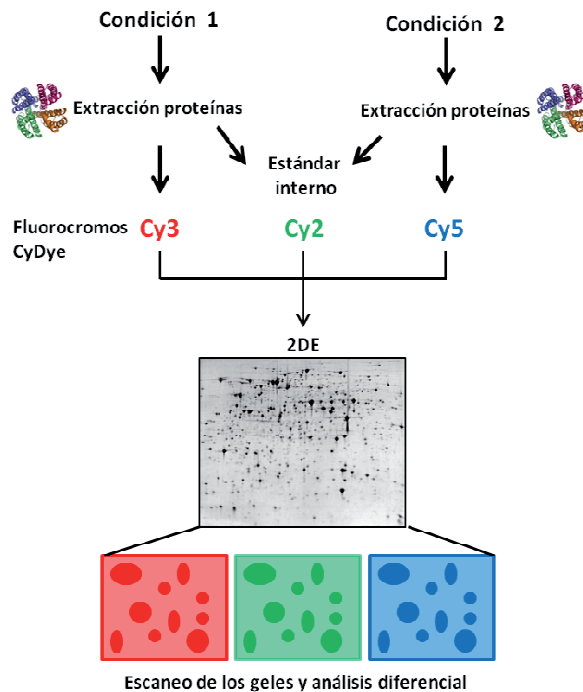
##### **4.2.2.1. Métodos de separación basados en gel**

El método de separación en gel más ampliamente utilizado en la actualidad es la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes o SDS-PAGE. Los geles de poliacrilamida son polímeros de acrilamida y generalmente N,N-metilenbisacrilamida que forman una red porosa a través de la cual las proteínas migran en función de la relación PM/carga. El tratamiento de las muestras con dodecil sulfato sódico (SDS) proporciona carga neta negativa a las proteínas, eliminando la carga intrínseca de las mismas. De esta forma, la migración de las proteínas en el gel depende únicamente de su PM.

La electroforesis bidimensional (2-DE) es otro método de fraccionamiento, desarrollado por tres grupos de forma independiente en el año 1975 [137, 138]. Esta técnica combina dos pasos de separación con el fin de incrementar la resolución en los análisis de mezclas complejas de proteínas, y por ello ha sido muy utilizada en proteómica. En la 2-DE, las proteínas se fraccionan en primer lugar mediante isoelectroenfoque (IEF), mediante el que las proteínas se separan

en función de su punto isoelectrico (pI), y a continuación se realiza una segunda separación basada en SDS-PAGE. La 2-DE presenta diversas ventajas como la alta capacidad de resolución de numerosas proteínas en una sola muestra y la visualización directa de las proteínas intactas de la muestra analizada (a diferencia de la cromatografía líquida). Esta técnica proteómica es una de las más empleadas para los análisis comparativos y permite la identificación de las diferentes isoformas proteicas y de sus PTMs. En cuanto a sus limitaciones, una de ellas es la incapacidad para resolver proteínas con pIs extremos ( $pI > 11/pI < 3$ ), o proteínas con un peso molecular mayor a 120 kDa. Además, no es lo suficientemente sensible para detectar proteínas poco abundantes y la reproducibilidad entre los geles es difícil de conseguir [139] ya que es poco automatizable.

La electroforesis diferencial en gel (DIGE, del inglés *Diference gel electrophoresis*) es una variación de la 2-DE desarrollada en 1997 [140] con el fin de resolver las limitaciones anteriormente descritas en cuanto a reproducibilidad. En esta técnica las proteínas de las muestras a comparar se marcan con fluorocromos diferentes que derivan de la cianina CyDye (denominados Cy2, Cy3 y Cy5) que se unen covalentemente al grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas de las proteínas. Después del marcaje, las muestras marcadas con fluorocromos distintos y un estándar interno (mezcla de todas las muestras a comparar) se mezclan y se separan en un único gel. Ello reduce la variabilidad entre geles, posibilitando una cuantificación más precisa de las proteínas y mejorando la reproducibilidad (Figura 12). Las diferentes longitudes de onda de absorción y emisión de los fluorocromos permiten obtener el perfil de proteínas diferenciales de cada muestra a partir del mismo gel. Además, la alta sensibilidad de los marcadores CyDye aumenta el rango dinámico para la cuantificación.



**Figura 12.** Esquema representativo de la técnica de electroforesis diferencial en gel (DIGE). Tras la extracción de proteínas de las dos muestras a comparar se procede con el marcaje. Las dos muestras (condición 1 y condición 2) se marcan con los fluorocromos Cy3 y Cy5 respectivamente, mientras que el estándar interno, formado por una mezcla de cantidades iguales de las dos condiciones, se marca con Cy2. A continuación, se mezclan las tres muestras marcadas y se separa la mezcla mediante electroforesis bidimensional. Finalmente, los gels se escanean a diferentes longitudes de onda y se realiza el análisis diferencial de las imágenes obtenidas.

#### 4.2.2.2. Métodos de separación cromatográficos

Las limitaciones de las técnicas de separación basadas en gel han favorecido el desarrollo de técnicas de separación basadas en la cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas. A diferencia de la 2-DE, las técnicas de cromatografía permiten el análisis automatizado de un mayor número de muestras y gran sensibilidad. Sin embargo, la detección de isoformas y PTMs

resulta más complicada con este método. De ahí, que la elección del método de separación dependa de la muestra o estudio a realizar.

En todos los tipos de cromatografía los componentes de una mezcla se separan por su interacción con una fase estacionaria y una fase móvil. En la LC, la muestra se disuelve en una fase móvil líquida que se hace pasar a través de una fase estacionaria sólida que se encuentra fija dentro de una columna. Existen diversos tipos de cromatografía líquida en función de la fase estacionaria utilizada: de fase reversa (RP), de exclusión molecular (SEC), de intercambio iónico (IEC) (catiónico (SCX) o aniónico (SAX)) o de afinidad [141].

- **Cromatografía de fase reversa (RP).** En la cromatografía de fase reversa las proteínas se separan en base a su polaridad. Es un tipo de cromatografía de reparto donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar. Las fases estacionarias son hidrocarburos de 4, 8 y 18 átomos de carbono, conocidos como C4, C8 y C18, aunque las matrices C18 son las más empleadas. La fase móvil suele estar formada por solventes orgánicos como propanol o acetonitrilo (ACN). En este tipo de cromatografía los péptidos, de naturaleza hidrofóbica, quedan retenidos en la fase estacionaria. De manera que al ir aumentando el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil se va produciendo la separación gradual de los péptidos, primero los más hidrofílicos y a continuación los más hidrófobos.
- **Cromatografía de exclusión molecular (SEC).** En la cromatografía de exclusión molecular las proteínas se separan en función de su tamaño molecular. En este caso no se producen interacciones entre las proteínas y la fase estacionaria. La fase estacionaria es un gel poroso por donde discurren las moléculas a separar. El diámetro de tamaño del poro determina la separación, de manera que si las proteínas son más grandes no pueden penetrar a través de los poros y son excluidas. Por tanto, estas proteínas eluyen más rápidamente que las proteínas más pequeñas, que



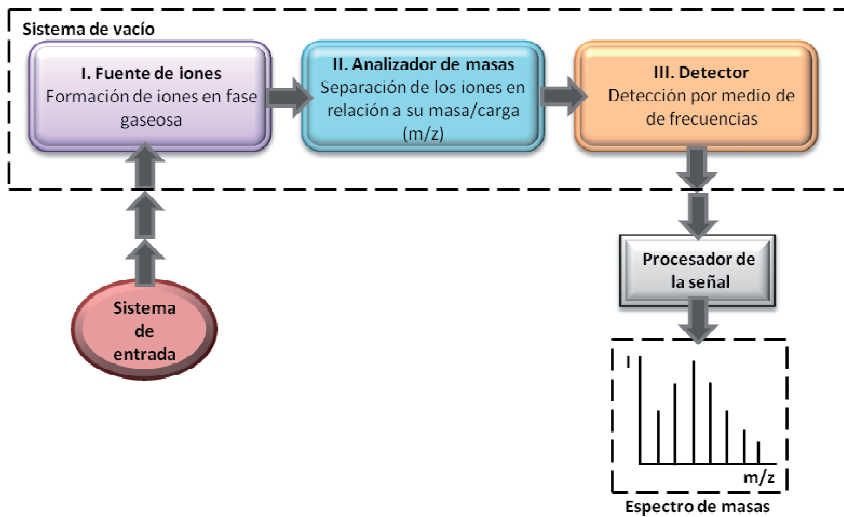
sí pueden penetrar a través de los poros y permanecen más tiempo en la columna, por lo que eluyen en último lugar.

- **Cromatografía de intercambio iónico (IEC).** En la cromatografía de intercambio iónico las proteínas se separan en función de su carga. En este tipo de cromatografía las proteínas con carga opuesta a la de la fase estacionaria quedan retenidas. La elución de las proteínas retenidas se realiza aumentando la fuerza iónica de la fase móvil, de forma que las proteínas con menos carga eluyen primero y las de mayor carga eluyen al final. Hay dos tipos de cromatografía de intercambio iónico en función de la carga de la fase estacionaria: intercambio catiónico (fase estacionaria cargada negativamente) o intercambio aniónico (fase estacionaria cargada positivamente). En proteómica, la cromatografía de intercambio catiónico se ha empleado mucho para la separación de muestras complejas de péptidos.
- **Cromatografía de afinidad.** En la cromatografía de afinidad las proteínas se separan por su afinidad o capacidad de unión a un ligando específico de la fase estacionaria. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente al ligando. Este ligando puede ser un anticuerpo (inmunocromatografía), un ión metálico (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), un enzima, una lectina, etc. Después de la unión al ligando, las proteínas de interés se eluyen mediante el empleo de una solución que contiene un ligando libre o un compuesto que desestabilice la interacción ligando-proteína. La principal ventaja de este método es su alta selectividad.
- **Cromatografía multidimensional.** Debido a la gran complejidad de las muestras biológicas, la opción de separación más utilizada hoy en día en proteómica es la cromatografía multidimensional [142]. Este tipo de cromatografía combina dos o más métodos cromatográficos basados en mecanismos de separación diferentes. En la actualidad, la combinación generalmente utilizada es la que emplea una primera separación de

intercambio catiónico (SCX) seguida de una cromatografía de fase reversa. En este modelo, el primer método cromatográfico proporciona una alta capacidad de carga mientras que la fase reversa elimina las sales y contaminantes de las muestras, proporciona una buena resolución en la separación de los péptidos y puede ser directamente acoplada al espectrómetro de masas.

### 4.2.3. Espectrometría de masas-MS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la proteómica para la identificación de las proteínas y la caracterización de sus PTMs. La identificación de proteínas mediante MS consta de una serie de pasos: la ionización de la muestra, la separación de los iones según su relación masa/carga ( $m/z$ ) y, por último, la detección de los iones. Estos pasos dependen del tipo de espectrómetro de masa utilizado. Los espectrómetros de masas están formados básicamente por una fuente de iones, un analizador y un detector. En la Figura 13 se representan los componentes principales de un espectrómetro de masas. El sistema de entrada introduce la muestra en la fuente de iones, donde se generan iones en fase gaseosa a partir de mezclas en estado sólido o líquido. Dichos iones atraviesan posteriormente un analizador de masas, donde se separan en función de su relación  $m/z$ . Finalmente, los iones llegan al detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que pueda ser procesada, almacenada e interpretada, dando lugar al espectro de masas.



**Figura 13.** Componentes básicos de un espectrómetro de masas.

#### 4.2.3.1. Métodos de ionización

##### 🚧 Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)

La espectrometría de masas SIMS utiliza la alta energía (5-25 KeV) de partículas cargadas de un haz de iones primarios, como por ejemplo,  $\text{Ar}^+$ ,  $\text{Ga}^+$ ,  $\text{In}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , que se aceleran y se hacen impactar sobre la superficie de la muestra. La energía cinética asociada de los iones primarios se transfiere a la muestra tras el impacto. Esta transferencia de energía induce una cascada de colisiones entre átomos y moléculas de la superficie que se liberan de la misma cuando su energía cinética es mayor que la energía de enlace del sustrato, formando iones (iones secundarios) que son los que proporcionan la información cualitativa y cuantitativa sobre la composición molecular de las muestras [143].

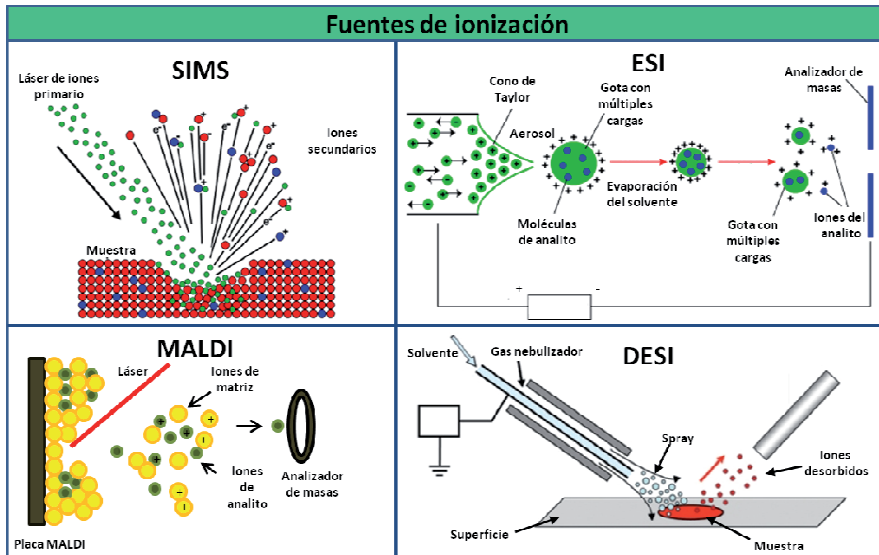
La técnica SIMS principalmente desorbe e ioniza elementos y pequeñas moléculas. El rango de masas utilizado está limitado a un valor de  $m/z$  de 1000

por la amplia fragmentación de la superficie, aunque el uso de una matriz como las utilizadas para MALDI (descrito a continuación) puede superar este límite y mejorar la detección para masas más elevadas. La principal ventaja de esta técnica es la posibilidad de proporcionar una elevada resolución espacial.

En SIMS se hace una distinción entre el modo estático y el modo dinámico. Estas dos aproximaciones difieren en el grado de daño sobre la superficie y se usan para propósitos diferentes. El SIMS estático usa una dosis de iones primarios más baja y minimiza la interacción de los iones a la mono-capa de moléculas en la parte superior [144]. Por su parte, el SIMS dinámico es más destructivo, ya que utiliza una dosis de iones primarios mayor que resulta en interacciones en las capas más profundas de la superficie a estudiar. El SIMS estático se utiliza para *imaging* cualitativo [145], mientras que el SIMS dinámico se emplean en estudios de imagen cuantitativos elementales [146].

### **Desorción/Ionización láser asistida por matriz (MALDI)**

La técnica MALDI se ha utilizado habitualmente para el estudio de proteínas, péptidos, polímeros y lípidos debido a su capacidad para generar iones. Un experimento de MALDI-MS requiere que la muestra se coloque sobre una superficie conductora a la cual se le añade matriz para favorecer la ionización. La adición de la matriz permite la extracción de las moléculas de la muestra, la formación de los cristales de la misma conjuntamente con el analito y la absorción de la energía del láser para una ionización suave de las moléculas. Una vez depositada la matriz, la muestra se irradia con un láser, que induce la desorción y la ionización de los cristales, realizando un barrido de la superficie a analizar. Los iones formados en estado gaseoso se separan según su relación  $m/z$  por el analizador de masa. De esta manera, la técnica MALDI permite analizar no sólo digeridos de proteínas, sino también áreas de tejido con un rango de masas de 500 a más de 100.000  $m/z$ .



**Figura 14.** Ejemplos de los sistemas de ionización utilizados en espectrometría de masas.

### ⚡ Ionización por electrospray (ESI)

En la ionización por electrospray, la muestra disuelta en una fase móvil volátil, se bombea a través de un fino capilar metálico, en cuyo extremo se aplica un potencial eléctrico elevado (3-6 kV). Este potencial crea un fuerte campo eléctrico, que produce reacciones de oxidación-reducción que provocan que el líquido emerja como gotas finas cargadas eléctricamente. Estas gotas causan la desorción de los iones, que alcanzan la fase gaseosa. La formación del electrospray ocurre a presión atmosférica y es generalmente asistida por un flujo de nitrógeno. Una importante característica de la fuente de ionización ESI es su tendencia a producir iones multicargados, lo que origina espectros de masas complicados pero mejora la exactitud de las mediciones de masas elevadas.

### ⚡ Ionización electrospray por desorción (DESI)

La técnica de ionización electrospray por desorción (DESI) se produce mediante la interacción de gotas cargadas generadas por electrospray con la superficie de la

muestra. El impacto de las gotas con la superficie produce una segunda generación de gotas cargadas con moléculas de la superficie a analizar disueltas en el interior. Estas gotas evolucionan en el proceso de electrospray para generar los iones en forma gaseosa que son dirigidos hacia el interior del espectrómetro de masas [147, 148].

Los iones medidos a partir de la superficie de los tejidos por DESI son principalmente lípidos monocargados, por lo que su uso se limita principalmente a estudios de lipidómica [148, 149]. Esta técnica, en general proporciona una resolución espacial menor que las técnicas SIMS o MALDI aunque no necesita un tratamiento previo de la muestra.

#### 4.2.3.2. Analizadores de masa

Los analizadores de masa permiten la separación de los iones en base a su relación  $m/z$  (Figura 15). De los cuatro grandes grupos en que pueden dividirse los analizadores de masas: analizadores de sectores (eléctricos y/o magnéticos), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF), y de confinamiento de iones (trampa iónica, orbitrap y analizadores de resonancia ciclotrónica de iones, ICR), sólo los primeros no tienen una utilización amplia en proteómica. Cada analizador tiene un rango de masas, velocidad de análisis, resolución, sensibilidad, transmisión de iones y rango dinámico característico.

##### Analizador de tiempo de vuelo-TOF

En un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF), los iones son extraídos de la fuente de ionización e inmediatamente son acelerados mediante la acción de un campo eléctrico para lograr la uniformidad en sus energías cinéticas antes de que entren al analizador. Debido a que los iones que entran en el analizador tienen (idealmente) la misma energía cinética, de acuerdo con la ecuación  $E_c = (1/2)mv^2$ , las velocidades de llegada al detector son inversamente proporcionales a sus masas. Es decir, los iones más pesados tienen una velocidad menor y tardan más tiempo en llegar al detector, mientras que los

iones más pequeños tienen una velocidad mayor y son los primeros en llegar al detector. Por tanto, los analizadores TOF miden el ratio  $m/z$  en base al tiempo que tardan los iones en llegar al detector.

Los analizadores de tipo TOF tienen una transmisión iónica eficiente (50-100%) por lo que son instrumentos muy sensibles. Sin embargo, su deficiencia principal es el poder de resolución, lo que tiene su origen en que iones de igual  $m/z$  presentan cierta dispersión en los valores de energía cinética después de la aceleración, y por lo tanto iones de un valor de  $m/z$  dado se superponen con los valores de  $m/z$  próximos al detector. Esta deficiencia se compensa mediante la utilización de un reflector iónico electrostático, denominado reflectrón. El reflectrón es un campo eléctrico que actúa como espejo devolviendo los iones hacia el tubo de vuelo con una dirección opuesta a la inicial y en un determinado ángulo, alargando el espacio que tienen que recorrer los iones. Así, estos iones impactarán al detector al mismo tiempo que aquellos iones más lentos que tienen el mismo valor de  $m/z$  y penetran menos en el mismo. Este sistema TOF-reflectrón incrementa el poder de resolución pero limita el rango de masa que puede analizarse. Este tipo de analizadores evolucionaron con el tiempo, introduciendo una celda de colisión (CID) para producir la fragmentación de los iones que se seleccionan en un primer analizador de tiempo de vuelo ( $TOF_1$ ), y posteriormente separar los fragmentos generados en un segundo tiempo de vuelo ( $TOF_2$ ), obteniendo los espectros de fragmentación o espectros de MS/MS. Este último tipo de instrumentos se conocen como TOF/TOF y tienen una mayor resolución y exactitud de masa. La fragmentación o disociación se produce por la colisión de iones con un gas inerte que se introduce en la CID, generalmente nitrógeno. Este tipo de analizador se suele emplear con la fuente de ionización de tipo MALDI.

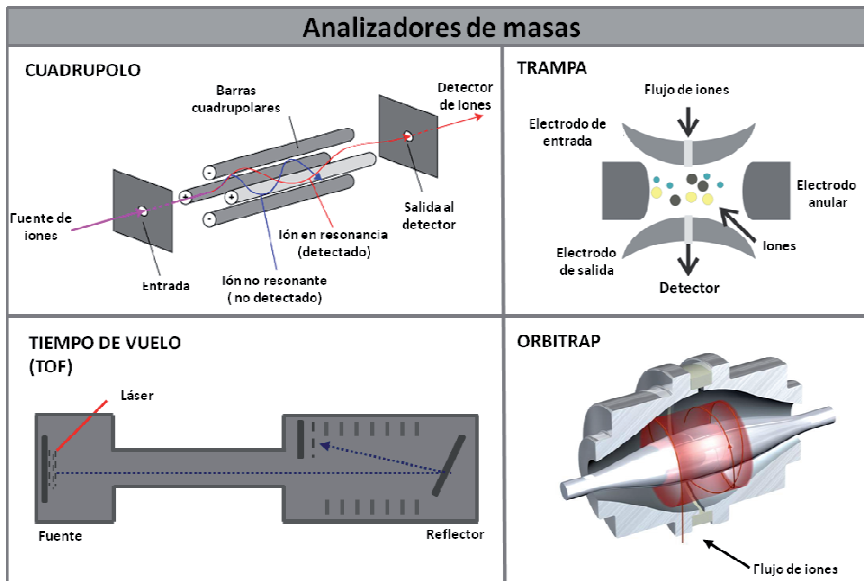


Figura 15. Tipos de analizadores de masas más empleados en proteómica.

✚ **Analizador de cuadrupolo**

Un cuadrupolo está formado por cuatro barras cilíndricas paralelas equidistantes a un eje central imaginario, a las que se aplica un potencial de corriente continua, sobre el que se superpone un potencial de radiofrecuencia. Los iones atraviesan el interior de las barras y el campo creado en ellas actúa a modo de filtro, determinando qué iones alcanzarán el detector. Algunos iones alcanzarán el detector dependiendo del campo de radiofrecuencia aplicado, así como de su relación  $m/z$ , mientras que los demás se desestabilizan y chocan contra las barras. Variando la intensidad del campo de radiofrecuencia puede lograrse que salgan sucesivamente del analizador iones de diferentes  $m/z$  y generarse un espectro de masas. Un espectrómetro de masas puede utilizar varios cuadrupolos situados uno después del otro. El más empleado en proteómica es el triple cuadrupolo por su capacidad de fragmentar los iones obteniendo espectros MS/MS. En este aparato, el primer cuadrupolo separa los iones procedentes de la fuente iónica, en



el segundo se realiza la fragmentación de los iones con un gas inerte, y en el tercero se analizan los iones resultantes de la fragmentación. Este tipo de analizador se suele emplear con fuentes de ionización de tipo ESI.

### **Analizador de trampa de iones**

Este tipo de analizadores permiten el confinamiento de iones durante tiempos prolongados dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos o magnéticos. Consta de un electrodo que constituye un anillo central y dos electrodos colectores, y la separación de los iones se produce almacenando los iones en el espacio central y manipulando su movimiento en el tiempo. El campo se crea aplicando un sistema de radiofrecuencias en el anillo central. Los iones procedentes de la fuente de ionización penetran en el electrodo colector y según su  $m/z$  y el campo aplicado, circulan en una órbita estable o se desestabilizan pasando al detector.

Un rasgo adicional de la trampa es que ésta permite aislar iones individuales que luego pueden excitarse para su fragmentación por CID con moléculas de helio introducidas en la trampa. Los fragmentos generados pueden ser a su vez seleccionados y fragmentados de nuevo en la misma trampa, de forma que el sistema equivale a un sistema de espectrometría de masas en tándem múltiple. Este proceso de aislamiento/fragmentación puede realizarse repetidamente y, si bien en la práctica del análisis proteómico raramente se requieren más de 3 de estas etapas, las trampas iónicas comerciales son capaces de realizar  $MS^n$  con  $n=15$ . Este tipo de analizadores tienen una resolución limitada y una relativamente baja capacidad de atrapar iones, lo que ha conducido al desarrollo de la trampa de iones lineal (LIT, *linear ion trap*) o la trampa lineal cuadrupolar (LTQ, *linear trap quadrupole*).

Un tipo especial de trampa de iones es el orbitrap (trampa orbital). En ella, los iones son introducidos de forma perpendicular y adquieren un movimiento radial alrededor del electrodo central, con un movimiento axial periódico cuya

frecuencia es una función de su valor  $m/z$ . El orbitrap es quizás el analizador de iones más joven en espectrometría de masas, aunque por sus características (principalmente su alta resolución y su velocidad de análisis) se ha introducido rápidamente en el área de la proteómica. Está comercializado por una única compañía, ThermoFisher, acoplado a un LTQ que se utiliza para la acumulación de iones y su inyección en el Orbitrap, así como para llevar a cabo la fragmentación de iones en alguno de sus modos de espectrometría de masas en tándem.

El analizador de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR) es otro tipo de trampa de iones. En este caso, el centro del analizador consiste en un campo eléctrico cuadrupolar combinado con un campo magnético homogéneo que permite confinar los iones en su interior (el campo cuadrupolar confina los iones axialmente mientras que el campo magnético lo hace radialmente). Esta celda ICR puede tomar diferentes formas con un número variable de electrodos. La FT-ICR se basa en la utilización del proceso de resonancia ciclotrónica para la determinación de la masa de un ión. Los iones en movimiento perpendicular a un campo magnético adquieren una trayectoria circular de una frecuencia de giro (frecuencia ciclotrónica) que depende de su relación  $m/z$  y del valor del campo. Como en el caso del orbitrap, el FT-ICR se utiliza acoplado a un sistema de inyección de iones, generalmente una trampa LTQ.

### **Analizadores de masas híbridos**

En los últimos años, los analizadores han evolucionado con el objetivo de mejorar muchas de sus características como la resolución y la exactitud de masa. Con esta finalidad han surgido los espectrómetros de masas híbridos, que están formados por la combinación de más de un analizador de masas. En la Tabla 4 podemos ver las combinaciones de analizadores más comúnmente empleados en el campo de la proteómica.

**Tabla 4.** Características de los espectrómetros de masas híbridos más empleados en proteómica.

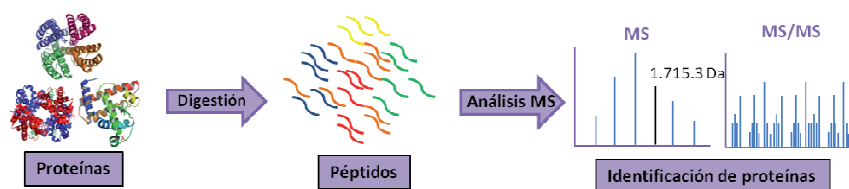
Instrumento	Aplicaciones	Resolución	Exactitud de masa	Sensibilidad	Rango dinámico	Rapidez de escaneo
LIT (LTQ)	Identificación ("bottom-up"), LC-MS <sup>n</sup> , análisis de muestras complejas	2000	100 ppm	Femtomoles	1x10 <sup>4</sup>	Rápida
TQ	Cuantificación (SRM, MRM), análisis de muestras de complejidad media	2000	100 ppm	Atomoles	1x10 <sup>6</sup>	Moderada
LTQ-Orbitrap	Identificación ("top-down") y cuantificación, PTM	100000	2 ppm	Femtomoles	1x10 <sup>4</sup>	Moderada
LTQ-FTICR Q-FTICR	Identificación ("bottom up"/"top down") y cuantificación, PTM	500000	< 2 ppm	Femtomoles	1x10 <sup>4</sup>	Baja
Q-TOF IT-TOF	Identificación ("bottom up"/"top down"), PTM	10000	2-5 ppm	Atomoles	1x10 <sup>6</sup>	Moderada Rápida
Q-LIT	Cuantificación (SRM, MRM), análisis de muestras de complejidad media	2000	100 ppm	Atomoles	1x10 <sup>6</sup>	Moderada Rápida
TTOF	Identificación/cuantificación	40000	< 2 ppm	Atomoles	1x10 <sup>5</sup>	Rápida

LIT: trampa de iones lineal; LTQ: trampa lineal cuadrupolar; TQ: triple cuadrupolo; Orbitrap: trampa orbital; FTICR: transformada de Fourier resonancia iónica ciclotrónica; Q: cuadrupolo; TOF: tiempo de vuelo; IT: trampa de iones; TTOF: triple TOF; PTM: modificaciones postraduccionales; MRM: monitorización de reacción múltiple; SRM: monitorización selectiva de reacción. Modificada de [150].

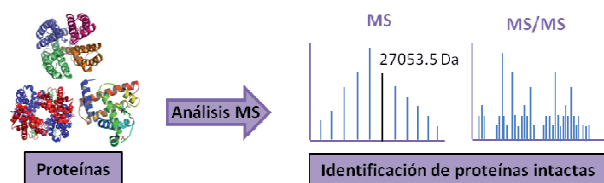
### 4.2.3.3. Identificación de proteínas mediante MS

Las proteínas pueden identificarse siguiendo dos aproximaciones: “de abajo-arriba” o “de arriba-abajo” (“bottom-up o top-down”). En la estrategia “bottom-up”, la identificación de las proteínas se realiza a partir de los fragmentos peptídicos obtenidos tras una digestión enzimática (habitualmente con tripsina). En la “top-down”, las proteínas se identifican a partir de espectros de masas de proteínas intactas, que se fragmentan en su totalidad en el espectrómetro de masas sin digestión proteolítica previa. En ambos casos, la identificación de las proteínas se realiza comparando las masas experimentales con las masas teóricas resultantes de una digestión *in silico* a partir de una base de datos proteómica o genómica [151].

#### A) Aproximación “Bottom Up”



#### B) Aproximación “Top Down”



**Figura 16.** Aproximaciones metodológicas para la identificación de proteínas. En la aproximación denominada “botom up” (A), la identificación de proteínas presentes en una muestra se realiza a través del análisis por MS y/o MS/MS de los péptidos resultantes de digerir las proteínas con un enzima proteolítico. En la aproximación denominada “top down” (B), la identificación de las proteínas se realiza a través de los espectros de MS y/o MS/MS de las proteínas intactas.

Uno de los métodos más empleados para la identificación de proteínas es el que se conoce con el nombre de huella peptídica (*peptide mass fingerprint* o PMF). La identificación de proteínas mediante PMF requiere la separación previa de las proteínas de interés mediante electroforesis mono-(SDS-PAGE) o bidimensional (2-DE), la digestión de las mismas *in situ*, en el gel, y la extracción de los péptidos para su análisis por MS. Finalmente, las proteínas se identifican en base a los péptidos que se obtienen tras la digestión.

Cuando el espectro de masas obtenido o huella peptídica no es suficiente para obtener una identificación con confianza puede usarse el espectro de fragmentación obtenido por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En este caso, los espectros de fragmentación adquiridos para cada péptido se correlacionan con los espectros teóricos contenidos en bases de datos.

Otro método de identificación de proteínas basado en datos de MS/MS es la secuenciación *de novo*, que consiste en la interpretación manual de los espectros para obtener la secuencia de aminoácidos.

#### **4.2.4. Cuantificación de proteínas**

En la actualidad, la proteómica cuantitativa está ganando terreno con respecto a la identificativa, ya que muchas veces no es suficiente saber qué proteínas están presentes en la muestra, sino que también es necesario conocer cómo varían sus niveles de expresión entre los diferentes tipos de muestras sujetas a estudio.

##### **4.2.4.1. Cuantificación de proteínas basada en gel**

Los métodos de cuantificación basados en gel requieren la separación previa de las proteínas mediante electroforesis y su posterior visualización empleando algún tipo de tinción. Generalmente, las proteínas pueden teñirse mediante colorimetría mediante el uso por ejemplo de la tinción azul de Coomassie (CBB; *Coomassie Brilliant Blue*) [152] o la tinción de plata [153-155], y mediante fluorescencia con la tinción de SYPRO Ruby [156] o los fluorocromos CyDye. La

aplicación de un método u otro depende de factores como la sensibilidad, el rango lineal, el equipo de adquisición de imagen disponible o la compatibilidad con las técnicas de identificación posteriores. En la Tabla 5 se recogen las características de estos métodos de tinción.

**Tabla 5.** Principales características de los métodos de tinción más frecuentes. Adaptada de Miller y colaboradores [157].

Método	Detección	Sensibilidad	Rango lineal	Compatibilidad con MS
<b>Azul de Coomassie</b>	Colorimetría	10-100 ng	++	++
<b>Tinción de plata</b>	Colorimetría	0.1-1 ng	+	+
<b>SYPRO Ruby</b>	Fluorescencia	1ng	++++	+++
<b>DIGE</b>	Fluorescencia	<1ng	++++	++

El azul de Coomassie es un colorante que se une de forma reversible a los grupos amino de las proteínas. En proteómica se utilizan dos tipos: el R-250 y el G-250 (coloidal). Este tipo de tinción es muy fácil de usar, tiene un bajo coste y presenta una alta compatibilidad con los análisis de MS. Sin embargo, esta tinción presenta una baja sensibilidad, del orden de 10-100 nanogramos (ng) de proteína para el R-250 y 10-30 ng para el CCB coloidal [158].

El protocolo más utilizado de tinción de plata consiste en el uso de nitrato de plata y formaldehído seguido del revelado mediante una solución de carbonato cálcico, aunque existen otros protocolos alternativos [159]. La tinción de plata es un método bastante sensible ya que permite la detección de cantidades de proteína del orden de 1 ng [157]. Uno de los inconvenientes de la tinción de plata es que la reacción de tinción se detiene en un cierto momento para prevenir la sobresaturación de la señal. Esta acción genera problemas en la reproducibilidad de los geles teñidos. Las principales limitaciones de este tipo de tinción son su

incompatibilidad con el análisis de MS posterior y su reducido rango dinámico (de uno a dos órdenes de magnitud), que la hacen poco adecuada para la cuantificación.

Más recientemente se han desarrollado métodos de tinción fluorescentes que han mejorado la cuantificación de proteínas en geles 2-DE. En este tipo de tinciones, las proteínas se marcan con fluorocromos antes o después de la electroforesis, y se detectan al ser excitadas con luz ultravioleta o láser. Además, presentan una mayor sensibilidad, aunque tienen inconvenientes como el elevado coste y la necesidad de sistemas de captación de imagen específicos. La tinción de SYPRO Ruby utiliza un mecanismo de tinción similar al CBB coloidal, basado en la utilización de un reactivo que contiene metales tipo rutenio y se une a los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas. La tinción SYPRO Ruby es tan sensible como la tinción de plata, pero es más sencilla y reproducible, compatible con el análisis MS y posee un elevado rango dinámico [160].

También existen otros métodos de tinción fluorescentes que se aplican antes de realizar la separación de las proteínas, y que consisten en incorporar moléculas fluorescentes a la muestra de proteínas a estudiar. Los fluorocromos derivados de la cianina CyDye, que se emplean en la técnica DIGE, son los más utilizados [140].

#### **4.2.4.2. Cuantificación de proteínas basada en MS**

Los métodos de cuantificación basados en MS pueden aplicarse tanto para estimar la abundancia absoluta como relativa de los niveles de proteína. En general, la cuantificación de las proteínas en proteómica suele ser relativa, debido a la indisponibilidad de patrones de concentración conocida para poder crear curvas de calibrado y así realizar una cuantificación absoluta.

Una de las estrategias de cuantificación más robusta es la que se lleva a cabo marcando las proteínas o péptidos mediante isótopos estables, de manera que una de las muestras se marca con un isótopo ligero, mientras que la/s otra/s se marcan con isótopos pesados. Los péptidos así marcados producen, en el análisis

de MS, parejas o grupos de picos con una diferencia de masa característica a la de los isótopos usados. La abundancia relativa de los péptidos puede medirse por comparación de las intensidades o áreas descritas bajo estos picos. Alternativamente, los péptidos pueden marcarse mediante marcadores isobáricos, en cuyo caso los péptidos presentarán la misma masa tras su marcaje pero producirán fragmentos iónicos distinguibles en el análisis de MS/MS, que pueden ser usados para la cuantificación. Este tipo de marcajes diferenciales de las proteínas o péptidos permite la cuantificación relativa de las proteínas o péptidos de una muestra en un único análisis *shotgun*.

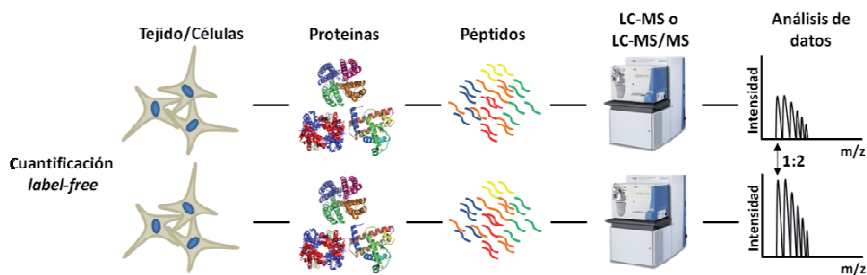
En general, las técnicas de marcaje isotópico están basadas en la cuantificación a nivel de los espectros de MS, de manera que se buscan las señales que difieren entre sí por una variación específica en su relación  $m/z$  y la concentración relativa de un péptido dado se obtiene por comparación de las intensidades de las señales correspondientes. Estas técnicas permiten el análisis simultáneo de un número limitado de muestras, mientras que las técnicas de marcaje isobárico, basadas en los espectros de MS/MS, permiten el análisis de un número mayor de muestras. Los isótopos estables pueden incorporarse metabólicamente, químicamente o enzimáticamente a las proteínas o péptidos presentes en la muestra [161, 162]. En el marcaje metabólico, los isótopos se incorporan a las proteínas durante el crecimiento de las células en cultivo. Por su parte, la incorporación enzimática se lleva a cabo durante la digestión trípica de las proteínas, mientras que en el marcaje químico las proteínas o péptidos se marcan mediante exposición a los reactivos con los que se produce su marcaje isotópico.

Todos estos métodos proporcionan información cuantitativa relativa. Para la cuantificación absoluta de las proteínas se utilizan las técnicas de dilución isotópica. La cuantificación absoluta mediante dilución isotópica consiste en añadir a la propia muestra una cantidad conocida de patrones marcados isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  de los mismos péptidos a cuantificar. Estos péptidos se separan por cromatografía conjuntamente con la muestra a la que se han



adicionado (eluyen al mismo tiempo de retención pero con distinta masa). Finalmente, a partir del ratio entre el péptido sin marcar (muestra) y el marcado se podrá calcular la concentración absoluta del péptido, y por consiguiente de la proteína (si el péptido es específico/exclusivo de esa proteína). Ejemplos de métodos de cuantificación absoluta son el PSAQ (*Protein Standard for Absolute Quantification*) que utiliza proteínas completas marcadas isotópicamente como estándares internos que se añaden a la muestra inicial [163] o el método AQUA (*'Absolute Quantification'*) que utiliza péptidos sintéticos que se añaden a la muestra durante o después de la digestión enzimática [164].

En la actualidad, también se han desarrollado métodos proteómicos que permiten la cuantificación de proteínas sin el uso de ningún tipo de marcaje. Esta aproximación “sin marcaje” o *label-free* se basa principalmente en el conteo de los espectros generados por las proteínas identificadas en el análisis MS/MS (en inglés *“spectral counting”*). La cuantificación se realiza comparando el número de espectros de MS/MS identificados de la misma proteína en cada experimento de LC-MS/MS (Figura 17). Este tipo de cuantificación presenta una menor precisión en comparación con los métodos basados en marcaje con isótopos estables. Además, como los péptidos pueden ionizar de manera diferente en cada uno de los experimentos, sus intensidades pueden variar de un análisis a otro, dificultando su correcta cuantificación. Sin embargo, las recientes mejoras en la instrumentación han aumentado enormemente la reproducibilidad, por lo que este método es cada vez más empleado ya que permite cuantificar un mayor rango dinámico de concentraciones, y en general es una metodología mucho más sencilla y barata [165].



**Figura 17.** Aproximación *label-free* para la cuantificación de proteínas.

Otra técnica *label-free* empleada en la cuantificación de proteínas diana poco abundantes procedentes de mezclas complejas es lo que se llama *Selected Reaction Monitoring (SRM)* o *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*. Esta técnica generalmente se lleva a cabo en un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo, donde el Q1 actúa como filtro aislando el ión precursor, en el Q2 se produce la fragmentación del ión y Q3 selecciona los fragmentos específicos del ión. La MRM permite el análisis de un gran número de muestras y es cada vez más empleada para la verificación de los resultados de experimentos proteómicos.

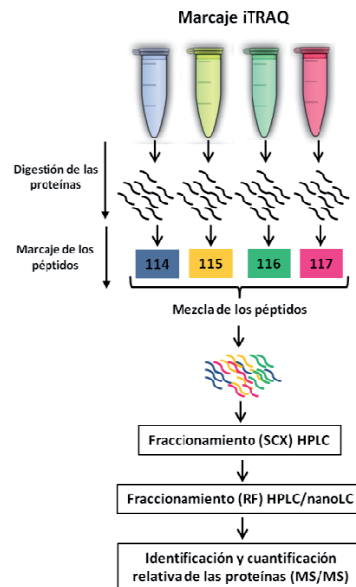
#### ✓ **Marcaje químico mediante isótopos estables: ICAT, iTRAQ**

El marcaje químico se usa habitualmente para incorporar isótopos estables a las proteínas o péptidos. Los isótopos estables más generalmente usados son los de hidrógeno/deuterio ( $^1\text{H}/^2\text{H}$ ), carbono ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ). Algunos de los reactivos incluyen un marcador para aislar los péptidos marcados, como en el caso del ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*) cuyo marcador es la biotina. La metodología empleada para el marcaje isotópico de proteínas y péptidos ha sido ampliamente descrita [161, 166, 167].

En el marcaje ICAT, el reactivo de marcaje es la iodacetamida (IAA), que se une covalentemente con los grupos sulfhidrilos de las cisteínas [168]. Además, la IAA lleva unido un marcador de biotina, que permite la purificación de los péptidos

que han sido marcados mediante cromatografía de afinidad por avidina. La iodacetamida y la biotina del reactivo pesado están unidos por ocho átomos de deuterio, mientras que en el reactivo ligero se unen por ocho átomos de hidrógeno. También existe una versión de los reactivos ICAT en la que se usan isótopos de carbono ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) en vez de los de hidrógeno [169]. En un experimento ICAT, las proteínas de dos muestras a comparar se marcan con el reactivo ligero o pesado, se mezclan y se digieren con tripsina. Los péptidos resultantes se purifican por cromatografía de afinidad, se separan por nanocromatografía líquida (nanoLC) y se analizan por MS. Los péptidos se cuantifican por comparación de las áreas que describen los picos de cada péptido ligero o pesado, y se identifican por MS/MS.

En el año 2004, Applied Biosystems desarrolló un nuevo marcaje isotópico llamado iTRAQ (*Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification*) [170]. En la actualidad se pueden comparar hasta 8 muestras de forma simultánea, debido al desarrollo de ocho formas isotópicamente diferentes de los reactivos iTRAQ [171]. Los reactivos iTRAQ están constituidos por un grupo reactivo, un grupo compensador y un grupo reportero. El grupo reactivo es un derivado de la N-hidroxisuccinimida y reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina y el extremo N-terminal de todos los péptidos. Durante el análisis MS/MS de los péptidos marcados, los grupos reporteros se liberan de los mismos y pueden ser detectados en el espectro como picos con una relación  $m/z$  de 113,1; 114,1; 115,1; 116,1; 117,1; 118,1; 119,1 y 121,1 en la versión de ocho



**Figura 18.** Flujo de trabajo de un marcaje iTRAQ. Una vez que las diferentes muestras de péptidos han sido marcadas con los distintos reactivos iTRAQ, éstas se combinan y se tratan como una muestra única para el análisis siguiente. Durante la obtención de los espectros de MS/MS, cada marcador isobárico produce un ión reportero único que además de identificar la muestra de la que procede, indica la abundancia relativa del péptido al que se encontraba unido antes de su fragmentación.

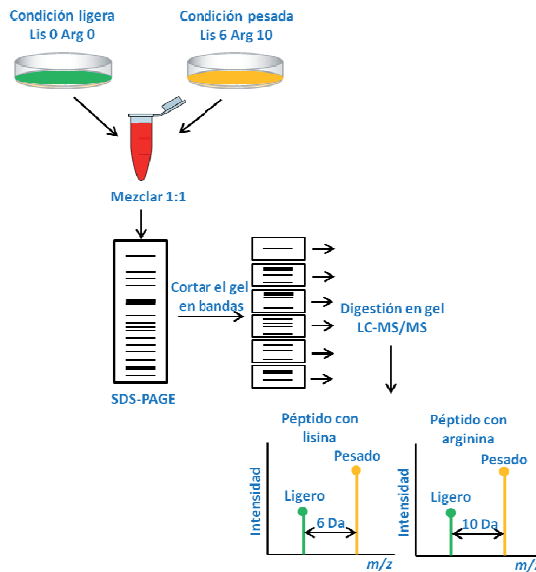
reactivos, o de 114,1 a 117,1 en la de cuatro. El grupo compensador ecualiza las masas de las distintas formas isotópicas de los reactivos, de manera que la masa total de cada uno sea la misma. Por consiguiente, dado que la suma de las tres partes de cada reactivo es constante, un péptido marcado es detectado como un pico único en el espectro MS, pero, como cada grupo reportero difiere en su PM, los fragmentos originados tras la ruptura de cada marcador se observan como picos distintos en el espectro de MS/MS. Así, la concentración relativa de los péptidos se obtiene por comparación de las intensidades de las señales MS/MS de estos grupos reporteros. En un experimento iTRAQ, las proteínas se digieren con tripsina y los péptidos resultantes se marcan con los distintos reactivos. Seguidamente, las muestras marcadas se combinan, se fraccionan por cromatografía y las fracciones resultantes se analizan por LC-MS/MS. El análisis MS/MS permite tanto la identificación como la cuantificación. A diferencia del ICAT, el iTRAQ no reduce la complejidad de la muestra, por lo que el fraccionamiento de la misma es muy importante. La Figura 18 representa los diferentes pasos por los que pasa un experimento iTRAQ.

### ✓ **Marcaje metabólico mediante isótopos estables-SILAC**

Los isótopos estables también pueden incorporarse metabólicamente a las proteínas sintetizadas por células en cultivo. Para ello, las células se cultivan en medio enriquecido con isótopos estables (medio pesado), tales como sales marcadas con  $^{15}\text{N}$ , glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  o aminoácidos marcados con distintos isótopos estables [161]. De esta forma, durante el crecimiento celular, las células incorporan los isótopos estables a las proteínas que sintetizan. Las proteínas obtenidas de las células cultivadas en medio normal y pesado se combinan al inicio del experimento de proteómica por lo que la preparación de la muestra y fraccionamiento afectará a ambas condiciones por igual.

El marcaje metabólico más utilizado hoy en día en el campo de la proteómica es el SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) [172]. En esta técnica, las células se cultivan tanto en un medio normal como en un medio

suplementado con aminoácidos marcados con isótopos estables. Así, tanto las formas nativas (ligeras), como los aminoácidos marcados (pesados) son incorporados a las proteínas celulares durante la síntesis proteica, lo que genera una diferencia de masa predecible entre ellos (Figura 19). Esta incorporación no interfiere con el crecimiento celular, pues las proteínas que contienen los aminoácidos ligeros o pesados son químicamente idénticas, por lo que deben separarse igual a lo largo de una cromatografía o una SDS-PAGE. Sin embargo, la incorporación de este tipo de aminoácidos conduce a la síntesis de proteínas con distinta masa, por lo que las proteínas ligeras y pesadas se discriminan fácilmente mediante espectrometría de masas.



**Figura 19.** Flujo de trabajo en un experimento SILAC. Inicialmente, una población de células se cultiva en un medio con las variantes ligeras de los aminoácidos arginina y lisina mientras que la otra población se cultiva en presencia de las versiones marcadas de dichos aminoácidos. A continuación, las proteínas obtenidas de las dos condiciones se combinan en un ratio de 1:1 y se separan mediante SDS-PAGE. El gel se corta en varias bandas y éstas son digeridas con tripsina. La mezcla de péptidos resultante se analiza mediante LC-MS/MS. La cuantificación de las proteínas se realiza comparando la versión ligera y pesada de los péptidos correspondientes en el espectro de MS.

En la estandarización del marcaje SILAC hay que tener en cuenta el tipo de aminoácidos utilizados para realizar el marcaje, el uso de suero dializado y la interconversión del aminoácido arginina a prolina. La combinación de los aminoácidos arginina y lisina es la más utilizada en SILAC, ya que los péptidos que resultan de la digestión con tripsina contienen uno de estos residuos en la posición C-terminal. Las versiones marcadas de ambos aminoácidos comercialmente disponibles se resumen en la Tabla 6. Un criterio importante a la hora de elegir los aminoácidos es que la diferencia de masa entre el par de péptidos (ligero/pesado) sea de al menos 4 Da. Debido a que las células de los mamíferos requieren un medio de cultivo suplementado con suero para su óptimo crecimiento, los aminoácidos libres presentes en dicho suero pueden ser captados por las células durante su crecimiento. De ahí que sea aconsejable utilizar un suero dializado en lugar de un suero normal, ya que el suero dializado no contiene cantidades detectables de aminoácidos [172].

**Tabla 6.** Aminoácidos marcados con isótopos estables empleados para el marcaje SILAC.

Aminoácidos (PM)	Isótopo estable	Diferencia de masa
L-lisina HCl (186.6)	4,4,5,5-D	4 Da
L-lisina 2HCl (223.1)	4,4,5,5-D	4 Da
L-lisina HCl (188.6)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub>	6 Da
L-lisina 2HCl (225.1)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub>	6 Da
L-lisina HCl (190.6)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	8 Da
L-lisina 2HCl (227.1)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	8 Da
L-arginina HCl (214.6)	<sup>15</sup> N <sub>4</sub>	4 Da
L-arginina HCl (216.6)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub>	6 Da
L-arginina HCl (220.6)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub>	10 Da
L-arginina HCl (221.6)	<sup>15</sup> N <sub>4</sub> D7	11 Da
L-arginina HCl (227.6)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> D7	17 Da

PM, peso molecular; HCl, cloruro de hidrógeno; D, deuterio; C, carbono; N, nitrógeno; Da, Dalton.

Uno de los principales inconvenientes del marcaje SILAC es la interconversión metabólica de los aminoácidos que puede producirse durante el marcaje. Este particular problema ocurre cuando empleamos el aminoácido arginina ya que es un precursor metabólico en la biosíntesis de la prolina. La interconversión metabólica entre la arginina y la prolina supone la formación de dos picos distintos ( $\text{Arg-}^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_4 + \text{Pro-}^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ ) para aquellos péptidos marcados con arginina y que contienen prolina. Esto origina una subestimación en la abundancia de los péptidos pesados afectando a la cuantificación [173]. Normalmente, esta conversión se produce cuando se suministra un exceso de arginina al medio de cultivo, por lo que las alternativas para evitar este tipo de conversión son, por un lado, reducir la concentración de arginina en el medio de cultivo o, por otro lado, suplementar el medio con el aminoácido prolina.

La mayor ventaja que proporciona la técnica SILAC es que, al mezclar las muestras desde el inicio del flujo de trabajo, nos aseguramos que cualquier pérdida o alteración que se produzca a lo largo del mismo afecte por igual a todas ellas. Por su parte, la mayor limitación de esta técnica reside en su única aplicabilidad para estudios sobre muestras de proteínas procedentes de células en cultivo, siendo imposible el análisis de proteínas procedentes de fluidos corporales. Los experimentos típicos SILAC permiten comparar dos o tres muestras, pero también es posible la comparación de hasta 5 muestras mediante la combinación de dos o más experimentos SILAC de triple marcaje que tengan en común al menos una muestra [131].

#### ✓ **Marcaje enzimático con isótopos estables- Marcaje $^{18}\text{O}$**

En este tipo de marcaje los péptidos se marcan con isótopos estables durante su digestión enzimática. En esta técnica, las proteínas extraídas de dos muestras distintas se digieren con tripsina en un tampón que incluye  $\text{H}_2\text{}^{16}\text{O}$  ó  $\text{H}_2\text{}^{18}\text{O}$  [174]. El isótopo  $^{18}\text{O}$  del agua es transferido al extremo C-terminal de los péptidos durante la reacción de digestión y estos péptidos son luego fraccionados y analizados por

MS. Una de las limitaciones de esta técnica es la baja eficiencia de incorporación del  $^{18}\text{O}$  durante la digestión, lo que dificulta la cuantificación.

### 4.2.5. MS Imaging

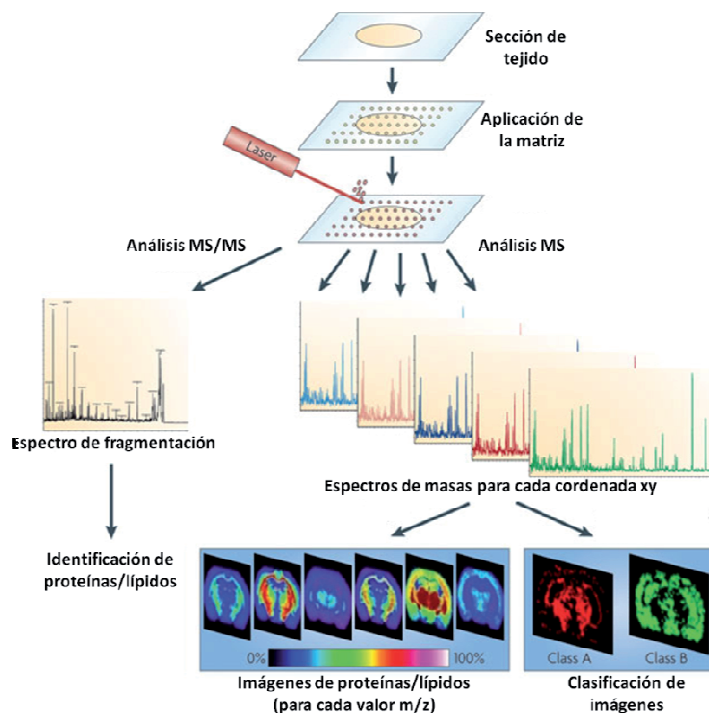
La técnica *MS Imaging* (MSI) es una nueva tecnología que permite la detección, localización e identificación de diferentes moléculas (metabolitos, lípidos, péptidos y proteínas) a través del análisis *in situ* de secciones de tejido. El objetivo de esta técnica es obtener esta información con la mayor resolución posible, sin comprometer la distribución espacial original de las moléculas de interés, con una sensibilidad que permita obtener información biológica relevante, y sin la necesidad de usar reactivos de fluorescencia, radioactividad o inmunohistoquímica [175].

La técnica MSI se basa en la adquisición de un espectro de masas en cada punto dentro de un área definida sobre un tejido, obteniendo así una colección de espectros de masas de toda el área analizada, que contiene la información sobre la composición molecular del mismo. Los espectros obtenidos se promedian y a partir del espectro promedio es posible visualizar la distribución de cada uno de los iones moleculares presentes en los espectros. Este tipo de análisis se realiza mediante un mapa de pixels de intensidades moleculares, en el cual se puede visualizar la intensidad de cada compuesto mediante un código de colores, y compararlo con la imagen histológica.

Esta técnica consta de cuatro pasos: la preparación de la muestra, la desorción e ionización de las moléculas, la separación de las moléculas en el espectrómetro de masas y la obtención de las imágenes. La figura 20 muestra los pasos a seguir en cualquier experimento de MALDI-MSI. En MSI la preparación de la muestra es sencilla ya que las moléculas se detectan directamente sobre la misma. Es necesario tener en cuenta que durante el seccionamiento de la muestra y la aplicación de la matriz, las moléculas pueden difundir dentro del tejido perdiendo su posición original. Esto afecta a la reproducibilidad de los datos, pudiendo



complicar su análisis o afectando a la calidad de la imagen obtenida. Por otra parte, el tiempo de análisis de la muestra y de obtención de la imagen depende de la resolución espacial seleccionada y el tamaño de la muestra a analizar. La resolución espacial obtenida en cada experimento MSI depende a su vez de la técnica de ionización utilizada. La técnica de ionización MALDI puede alcanzar una resolución espacial de 10  $\mu\text{m}$  [176], mientras que mediante SIMS se obtiene una resolución espacial menor a 1  $\mu\text{m}$ . Por ello, en experimentos en los que se necesita una alta resolución espacial se utiliza preferentemente la técnica de ionización SIMS, que permite llegar a diferenciar estructuras subcelulares [177]. Como contraposición, el análisis por SIMS convencional limita el tamaño de los iones detectados a 1000  $m/z$ , debido a la alta fragmentación que se produce durante la ionización [178].



**Figura 20.** Esquema general de un flujo de trabajo MALDI-MSI. El primer paso consiste en obtener secciones del tejido y colocarlas en portaobjetos conductores. El segundo paso conlleva la aplicación de matriz sobre los distintos cortes de tejido para su posterior análisis por espectrometría de masas

(MS). A partir de este estudio se obtienen por un lado los espectros de masas de cada coordenada xy para el análisis de las moléculas, y por otro los espectros de fragmentación para la identificación de las mismas en bases de datos. El siguiente paso consiste en visualizar la distribución de cada valor m/z dentro del tejido (obtención de imágenes), y realizar análisis estadísticos para clasificar las imágenes. Adaptada de [179].

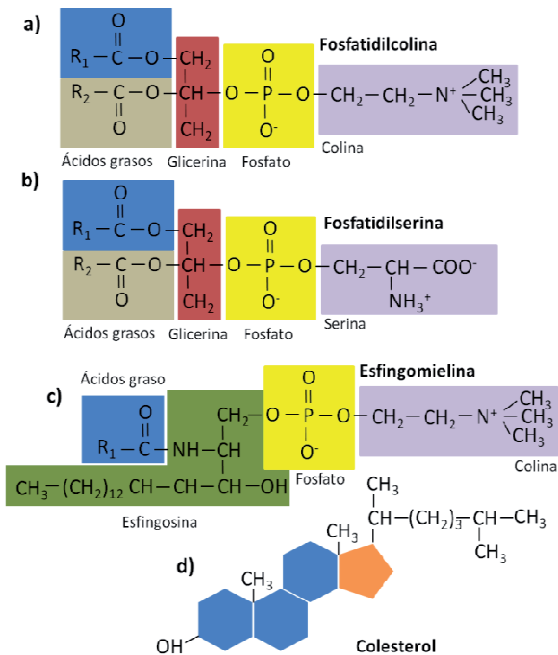
La presencia de múltiples moléculas en la sección de tejido como proteínas, lípidos, carbohidratos, sales, iones procedentes de la matriz, influye negativamente en el proceso de ionización y puede limitar el número de moléculas detectadas [180]. Este proceso recibe el nombre de supresión de iones y se produce cuando una molécula está presente en exceso sobre otra, o se ioniza más fácilmente que otra [181, 182]. Por ejemplo, los lípidos, carbohidratos y sales promueven la formación de aductos y afectan a la cocrystalización con la matriz, lo que afecta a la calidad del espectro de masas y al número de moléculas detectadas por MS [183]. Este fenómeno puede minimizarse lavando el tejido previamente a su análisis por MSI.

### **4.2.5.1. Aplicaciones de MSI en lipidómica**

La tecnología MSI se ha utilizado para el análisis global de lípidos. Los lípidos son componentes de las membranas celulares de las células (fosfolípidos, colesterol), participan en los procesos de señalización celular (diacilgliceroles, ceramidas, esteroides, prostaglandinas) [184] y son almacenados en las células como fuente de energía (triacilgliceroles) [185].

Algunos ejemplos de las estructuras lipídicas más comunes se representan en la Figura 21. Los fosfolípidos constituyen la principal clase de lípidos presentes en las células. Están presentes en la membrana celular y en las lipoproteínas del suero [186], y son los lípidos más abundantes en el cerebro [187]. En los fosfolípidos, dos grupos hidroxilo del glicerol están esterificados con dos cadenas diferentes de ácidos grasos, mientras que el tercer grupo hidroxilo está esterificado con una molécula de fosfato. El grupo fosfato puede además estar esterificado con un

alcohol como el inositol, glicerol, colina, serina o etanolamina dando lugar a los diferentes subtipos de fosfolípidos. Además, los ácidos grasos contienen normalmente un número par de átomos de carbono y pueden ser saturados (16:0, 18:0) o insaturados (16:1, 18:1, 18:2) [185].



**Figura 21.** Estructuras de los lípidos más comunes: fosfolípidos (a y b), esfingolípidos (c) y esteroides (d).

Casi todos los métodos de ionización usados para MSI: MALDI [188], DESI [189] y SIMS [190], se han empleado en el análisis de los lípidos. En general, la mayoría de los lípidos presentes en los tejidos se ionizan fácilmente debido a sus grupos polares (por ejemplo,  $m/z$  184.1 para la fosfocolina). Las fosfatidilcolinas (PCs), las esfingomielinas (SMs) y el colesterol se ionizan en el modo ión positivo, mientras que los fosfatidilinositoles (PIs), las fosfatidiletanolaminas (PEs) y los sulfátidos (STs) se ionizan en el modo ión negativo [191]. En el modo ión positivo los iones pueden estar protonados ( $[M+H]^+$ ), sodiados ( $[M+Na]^+$ ) o potasiados ( $[M+K]^+$ ),

mientras que en el modo ión negativo, la mayoría de los lípidos se detectan como iones deprotonados ( $[M-H^+]$ ), lo que permite una fácil identificación. La estructura de los lípidos puede determinarse con la ayuda de una herramienta disponible en internet llamada LMSD (LIPID MAPS Structure Database). Esta base de datos permite identificar los lípidos en función de su valor m/z. Para la identificación de los lípidos éstos deben fragmentarse mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El espectro de fragmentación resultante es característico de cada lípido. La Tabla 7 muestra los iones producidos durante la fragmentación de diferentes lípidos, que permiten la identificación de los mismos.

**Tabla 7.** Valores m/z de iones producidos durante el análisis MS/MS de los diferentes lípidos.

Lípido	m/z	Molécula
<b>Fosfatidilcolina</b>	59	Trimetilamina
	147	1,2-fosfodiéster cíclico sodiado
	163	1,2-fosfodiéster cíclico potasiado
	184	Fosfocolina
<b>Fosfatidiletanolamina</b>	141	Fosfoetanolamina
	163	Fosfoetanolamina sodiada
<b>Fosfatidilserina</b>	87	Serina
	185	Fosfoserina
	207	Fosfoserina sodiada
<b>Fosfatidilinositol</b>	162	Inositol
	223	Grupo fosfoinositol
	241	Grupo fosfoinositol
	297	Grupo fosfoinositol
<b>Fosfatidilglicerol</b>	153	Grupo fosfoglicerol
	171	Grupo fosfoglicerol + agua
<b>Esfingomielina</b>	59	Trimetilamina
	147	1,2-fosfodiéster cíclico sodiado
	163	1,2-fosfodiéster cíclico potasiado
	184	Fosfocolina
	264	Esfingosina

#### 4.2.5.2. Metodología y avances actuales en MSI

El flujo de trabajo de cualquier experimento de MSI se inicia con la preparación de la muestra. Este proceso es relativamente simple, sin embargo, debe realizarse rápidamente y con mucho cuidado para evitar la degradación y la posible deslocalización de las moléculas de interés. Los parámetros clave para una buena preparación de la muestra son: el almacenaje y estabilización de la muestra inmediatamente después de su obtención, la inclusión y el seccionamiento de la muestra y finalmente, la elección y aplicación de la matriz [192]. En esta sección también se hace referencia a la instrumentación (analizadores de masas) y herramientas informáticas que se utilizan hoy en día para el análisis de datos en MSI.

##### ❖ Almacenaje y estabilización de la muestra

El protocolo habitual empleado para el almacenamiento del tejido es congelarlo inmediatamente después de su extracción en isopentano líquido o nitrógeno líquido y mantenerlo guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. De esta manera se minimiza la degradación de las proteínas y la oxidación de otras moléculas, así como los cambios a nivel metabólico. Otra posibilidad es usar metanol o isopropanol a temperaturas de  $-70^{\circ}\text{C}$  o menores. Hay que tener en cuenta que es necesario mantener la morfología del tejido en este paso para facilitar la obtención de réplicas biológicas del mismo.

La segunda forma de almacenamiento más común es la fijación de las muestras en formaldehído y su inclusión en bloques de parafina (FFPE). Esta manera de conservar el tejido no es la más adecuada para la técnica de MSI, puesto que el formaldehído reacciona con los grupos amino de aminoácidos básicos como la arginina y la lisina, formando con frecuencia puentes metilénicos entre dichos aminoácidos [193, 194] que originan el entrecruzamiento de las proteínas (cross-linking), lo que obstaculiza la desorción e ionización de las moléculas por MALDI. Por ello, las muestras FFPE no pueden analizarse directamente por MSI, y se

requieren protocolos especiales para asegurar la eliminación de la parafina (que actúa como supresor de iones) y la digestión de las proteínas [195].

Por último, en MSI se han aplicado diferentes estrategias para prevenir o minimizar el proceso de degradación molecular. Entre ellas se encuentra la fijación a través de la radiación de microondas, limitada a muestras pequeñas y que se ha optimizado para cerebro de ratón [196]. Como método de estabilización alternativo ha surgido recientemente el Denator, un instrumento que puede utilizarse para cualquier tipo de muestra, independientemente de la forma y el tamaño de la misma. Además, el Denator utiliza una combinación de temperatura y presión que previene la deformación de la muestra e inactiva/desnatura los enzimas responsables de la degradación de las moléculas presentes en el tejido [197].

### ❖ Inclusión y seccionamiento de la muestra

La inclusión de la muestra en un material de soporte facilita su manejo y seccionamiento. El OCT es un medio de inclusión sintético muy empleado en histología, ya que favorece la realización de cortes en el criostato a temperaturas muy bajas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Sin embargo, los medios de inclusión como el OCT, el agar o la sacarosa, así como otros medios de inclusión basados en polímeros utilizados comúnmente en técnicas de histología, son incompatibles con MALDI ya que se ionizan fácilmente y actúan como supresores de iones [198]. Un método alternativo consiste en el empleo de la gelatina, que carece de polímeros y por tanto, proporciona espectros de masas con menos ruido de fondo, no interfiriendo en el análisis espectral [199]. Otros medios de inclusión compatibles con MSI son la poli[N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida] [200] o la carboximetil-celulosa [201].

Para MSI, las secciones histológicas suelen tener entre 5-20  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes muy delgados son frágiles y difíciles de manipular, y además se desgarran con facilidad. Por otro lado, las secciones de tejido demasiado gruesas son más

resistentes al paso de la electricidad y necesitan más tiempo de secado, lo que puede originar la deformación de las mismas [198]. Por regla general, las muestras suelen cortarse con un espesor de 10-20  $\mu\text{m}$ , correspondiente al diámetro de una célula de mamífero. De esta manera, al seccionar el tejido la mayoría de las células se cortan exponiendo su contenido intracelular para el análisis por MSI [198]. Finalmente, las secciones de tejido obtenidas se transfieren a portaobjetos comúnmente usados en histología, o portaobjetos eléctricamente conductores revestidos con óxido de indio y estaño (ITO). Después del montaje, las muestras deben secarse inmediatamente en un desecador de vacío, con el fin de evitar la deslocalización de las moléculas.

#### ❖ Elección de la matriz

La elección de la matriz depende del tamaño y de las propiedades químicas de las moléculas que quieran analizarse. Generalmente, los diferentes tipos de matrices utilizados en los análisis MALDI convencionales se usan en MSI [182, 202]. En la Tabla 8 se resumen las matrices más comúnmente empleadas en MSI, indicando el tipo de matriz y el área de aplicación de la misma. Entre ellas, el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y el ácido sinapínico (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, SA) son las matrices más utilizadas. El SA se utiliza para el análisis de proteínas de alto PM (PM >2kDa), mientras que la matriz CHCA se utiliza normalmente para el análisis de péptidos (500-2000 Da) [198, 203]. Por su parte, para el análisis de pequeñas moléculas como lípidos o fármacos se emplean la matriz 2,6-dihidroxiacetofenona (DHA) [191] o la matriz DHB [203].

La formación de picos de matriz durante la ionización de la misma dificulta la interpretación del espectro de masas, y como consecuencia el análisis MALDI-MSI de los compuestos de bajo PM. Además, muchas de las matrices usadas convencionalmente limitan la reproducibilidad y la resolución espacial de los análisis debido a la formación de cristales de gran tamaño y la distribución no homogénea de la matriz. De ahí que hoy en día se estén desarrollando nuevas

matrices para mejorar la sensibilidad y la reproducibilidad de los experimentos de MSI [204-206], tales como las matrices iónicas sólidas (SIM), las matrices iónicas líquidas (LIM), el 2-mercaptobenzotiazol (MBT) [207] y las nanopartículas de oro (AuNPs) [208]. Finalmente, la 9-aminoacridina (9-AA) también se ha empleado como matriz en el análisis MSI de fosfolípidos y sulfátidos [209].

**Tabla 8.** Tipos de matrices utilizadas actualmente en MS Imaging.

Matriz	Abreviatura	Aplicación	Tipo
Ácido alfa-ciano-4 hidroxicinámico [210, 211]	CHCA	Péptidos, proteínas pequeñas, glicopéptidos,	Cristalina
Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico [205, 212]	SA	Péptidos y proteínas de gran tamaño, lípidos	Cristalina
Ácido 2,5-dihidroxi benzoico [213, 214]	DHB	Azúcares, proteínas, péptidos, nucleóticos, fosfolípidos, fármacos	Cristalina
2,6-dihidroxiacetofenona [205, 212]	DHA	Fosfolípidos, fármacos	Cristalina
CHCA/anilina [211]	-	Péptidos	Iónica sólida
CHCA/N,N-dimetilanilina [211]	-	Péptidos	Iónica sólida
CHCA/2-amino-4-metil-5-nitropiridina [211]	-	Péptidos	Iónica líquida
CHCA/n-butilamina [215]	CHCAB	Péptidos, lípidos	Iónica líquida
2,4,6-Trihidroxiacetofenona [216]	THAP	Nucleótidos, lípidos (TAGs, FLs, SLs)	Cristalina
Ácido 3-hidroxicicolínico [204, 205]	3-HPA	Nucleótidos, péptidos, glicoproteínas	Cristalina
9-aminoacridina [209]	9-AA	Fosfolípidos, cardiolipinas	Cristalina
4-paranitroanilina [217]	PNA	Lípidos	Cristalina

La concentración de la matriz debe ajustarse antes de la aplicación de la misma, ya que afecta a la extracción y difusión de las moléculas. Generalmente, el rango óptimo de concentración de la matriz SA es de 10-30 mg/ml para el análisis de proteínas, mientras que la de CHCA es de 10-20 mg/ml para el análisis de péptidos [203]. Por otro lado, el tamaño de los cristales de la matriz influye en la resolución espacial. En MSI la resolución espacial disminuye cuando los cristales de matriz



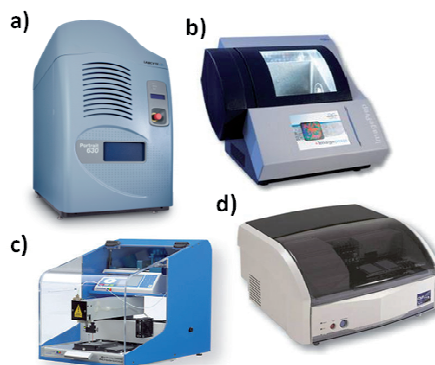
son muy grandes ( $>100\ \mu\text{m}$ ), ya que al cubrir una región grande del tejido las moléculas se extraen de varias células a la vez. La resolución espacial de la imagen en MSI está limitada por el diámetro del dispensador de matriz y del láser. Cuando el diámetro del dispensador es menor que el diámetro del láser, la resolución espacial depende únicamente del diámetro del láser ( $50\text{-}150\ \mu\text{m}$ ).

#### ❖ Aplicación de la matriz

Los diferentes métodos de deposición de matriz dependen de la resolución espacial que se requiera para el análisis MSI, y se centran en la cristalización homogénea de la matriz en pequeños cristales, permitiendo así la extracción de grandes cantidades de moléculas sin que se produzca la difusión de las mismas en el tejido. Los métodos de aplicación de la matriz incluyen métodos manuales, como la deposición de gotas mediante una pipeta y la nebulización neumática, en la que la muestra se aplica mediante un pulverizador o un aerógrafo de los utilizados habitualmente en aplicaciones de cromatografía de capa fina [175]. Los

métodos manuales de aplicación son poco reproducibles, de ahí que se hayan desarrollado dispensadores automáticos. Estos últimos ofrecen una mejor reproducibilidad y control sobre los procesos de extracción de las moléculas (Figura 22). Los

parámetros de aplicación deben optimizarse para cada tipo de tejido, ya que la calidad del análisis MSI depende del grado de cobertura de matriz, de la humedad de la superficie de la muestra durante su aplicación y del espesor de la misma. En ambos casos se necesitan múltiples pasos de aplicación para cubrir todo el tejido. Sin embargo, el exceso de matriz puede suprimir la señal de las moléculas [203].



**Figura 22.** Dispensadores automáticos de matriz: Portrait 630 (a), ImagePrep (b), SunCollect (c) y CHIP (d).

Para prevenir el exceso, la capa de matriz puede monitorizarse bajo un microscopio hasta obtener el espesor deseado.

Los dispensadores automáticos se dividen en dos clases: los que depositan la matriz en gotas individuales (*spotters*) o los que la depositan como una fina capa (*sprays*).

- ✓ **Spotters:** la disolución de matriz se aplica en forma de pequeñas gotas con un dispositivo piezoeléctrico a modo de una impresora de inyección de tinta. Esta técnica permite la deposición de pequeños volúmenes por punto (picolitros) y por ciclo. Cada punto de matriz tiene un diámetro de unos 100-200  $\mu\text{m}$  o incluso menores, dependiendo de la cantidad total de matriz aplicada por cada ciclo. La deposición es precisa, altamente reproducible y las gotas son uniformes. Debido al gran tamaño de la gota, su uso es más adecuado cuando no se necesita una gran resolución espacial (200-500  $\mu\text{m}$ ). Para realizar MSI con mayor resolución, el tamaño de los cristales de matriz debe ser igual o menor que el tamaño de un solo pixel. Los *spotters* permiten realizar múltiples rondas de deposición de matriz para aumentar la extracción de las moléculas. Entre los aparatos comercialmente disponibles y más ampliamente utilizados están el CHIP (Shimadzu) [218], el Portrait 630 (Labcyte) [183] y el SunCollect (SunChrom) [219].
- ✓ **Sprays:** estos dispensadores pulverizan la matriz de forma controlada, produciendo una capa de matriz fina y homogénea sobre el tejido. Este método de aplicación se emplea para la obtención de imágenes de alta resolución ya que los cristales que se forman tienen un tamaño menor a 100  $\mu\text{m}$ . Entre este tipo de dispensadores, los más utilizados hoy en día son el ImagePrep (Bruker Daltonics) [220] y el TM-Sprayer™ (Leaptec) [221]. El ImagePrep produce un aerosol de matriz creado por vaporización vibracional bajo condiciones controladas en un sistema cerrado. El sistema incorpora un sensor óptico que mide la luz dispersada por la capa

de matriz que se deposita en la muestra de tejido, lo que proporciona un control sobre el tamaño de la gota. Además, permite evaluar a tiempo real la humedad del tejido, el espesor de la matriz y el grado de secado, posibilitando limitar el efecto de difusión en la superficie y el tiempo de interacción entre la matriz y los analitos. El equipo es ideal para la aplicación de pequeñas cantidades de matriz (hasta 10 ml) y da lugar a una capa homogénea con cristales de diámetro entre 20 y 50  $\mu\text{m}$ . Además, puede utilizarse fácilmente para aplicar enzimas con el fin de realizar experimentos de digestión sobre el tejido [220].

Existen otros métodos de aplicación de matriz, pero únicamente se han descrito para el análisis de lípidos debido a que el tiempo de interacción entre el analito y la matriz es limitado. Estas metodologías son la sublimación de matriz [222] y la matriz molida [223]. En ambos casos, la matriz se aplica sobre el tejido sin utilizar disolventes, por lo que el efecto de la difusión es limitado.

#### **4.2.5.3. Instrumentación y análisis de datos para MSI**

Durante los últimos años ha habido diferentes desarrollos técnicos con el objetivo de incrementar la velocidad de análisis, la resolución y exactitud de masa, la capacidad de realizar experimentos de MS/MS y la resolución espacial en el campo del MSI. La mayoría de los experimentos de MSI se realizan mediante espectrómetros de masa de tipo TOF (Tabla 9). El analizador de masas de tipo TOF puede combinarse con un analizador de masas de tipo Q dando lugar al espectrómetro de masas qTOF o OA (aceleración ortogonal)-TOF, extremadamente útiles en MSI. Los espectrómetros de masas con analizadores TOF proporcionan una gran velocidad de análisis para MALDI-MSI. Sin embargo, el poder de resolución de masas es menor que con otras técnicas, lo que puede ocasionar pérdida de información química y espacial. Así, hay otras técnicas establecidas o en desarrollo para contrarrestar esta limitación, como pueden ser la movilidad iónica, el MALDI FT-ICR o el MALDI-Orbitrap. Otro de los objetos de mejora de la técnica de MSI ha sido la resolución espacial. En el caso del SIMS, la

resolución espacial es elevada por el pequeño tamaño de haz de iones. Sin embargo, en MALDI la resolución espacial no sólo está limitada por el tamaño del foco del láser sino también por el tamaño de los cristales de matriz depositados sobre el tejido.

**Tabla 9.** Espectrómetros de masas disponibles comercialmente para MALDI-MSI.

Instrumento	Láser	Rango de masas	Resolución	Programa	Formato datos
<b>5800 MALDI TOF/TOF™</b>	Nd-YAG 1000 Hz	Completo	50 µm	4800 Img TissueView	Analyze
<b>4800 Plus MALDI TOF/TOF™</b>	Nd-YAG 200 Hz	Completo	50 µm	4800 Img, TissueView	Analyze
<b>UltrafleXtreme (TOF/TOF)</b>	smartbea m-II 1000 Hz	Completo	10 µm	FlexImaging, CreateTarget, AnalyzeThis!, Biomap	Xmass XML
<b>Solarix M (FTSM)</b>	smartbea m-II 1 Hz	100-10 kDa	20 µm	FlexImaging, Biomap	Xmass XML
<b>JMS-S3000 SpiralTOF™ (TOF/TOF)</b>	Nd:YLF 250Hz	500 kDa (lineal) (30kDa (espiral)	30 µm	msTornado, Biomap	imzML
<b>AXIMA QIT™ (IT-TOF)</b>	N <sub>2</sub>	20 kDa	100 µm	Axima2Analyze	Analyze
<b>AXIMA Assurance (TOF)</b>	N <sub>2</sub> 50 Hz	500 kDa (lineal)	100 µm	Axima2Analyze	Analyze
<b>AXIMA (TOF; TOF/TOF)</b>	N <sub>2</sub> 50 Hz	500 kDa (lineal) 80 kDa (reflectrón)	100 µm	Axima2Analyze	Analyze
<b>MALDI LTQ XL (IT)</b>	N <sub>2</sub> 60 Hz	50 – 4000 Da	60 µm	LTQ Tune, ImageQuest	RAW, imzML
<b>MALDI LTQ Orbitrap (IT-Orbitrap)</b>	N <sub>2</sub> 60 Hz	50 – 4000 Da	60 µm	LTQ Tune, ImageQuest	RAW, imzML
<b>MALDI LTQ Orbitrap XL (IT-Orbitrap)</b>	N <sub>2</sub> 60 Hz	50 – 4000 Da	60 µm	LTQ Tune, ImageQuest	RAW, imzML

<b>MALDI SYNAPT G2</b>	Nd-YAG	40 kDa	60/200 $\mu\text{m}$	MassLynx,	XML
<b>HDMS</b>	1 kHz			Biomap	
<b>(Q-TOF)</b>					
<b>MALDI SYNAPT G2</b>	Nd-YAG	40 kDa	60-200 $\mu\text{m}$	MassLynx,	XML
<b>MS</b>	1 kHz			Biomap	
<b>(Q-TOF)</b>					

MALDI: Desorción/ionización por láser asistida por matriz; IT: trampa de iones; LTQ: trampa lineal cuadrupolar; Q: cuadrupolo; Orbitrap: trampa orbital; FTMS: transformada de Fourier; TOF: tiempo de vuelo; Nd-YAG: láser de óxido de itrio y aluminio dopado con neodimio; Nd-YLF: láser de óxido de itrio y fluoruro de litio dopado con neodimio; Hz: hercio. Adaptada de [www.maldi-msi.org](http://www.maldi-msi.org).

Conjuntamente con el desarrollo del trabajo experimental de MSI, se han desarrollado en los últimos años una gran cantidad de programas informáticos para la visualización y formación de imágenes. Estos programas controlan la adquisición y procesamiento de los datos de MSI para generar las imágenes de los iones. Entre algunos de los programas informáticos más utilizados hoy en día en MSI están el BioMap de Novartis, el FlexImaging de Bruker Daltonics y el AMOLF's "datacube". El programa informático Biomap es uno de los más usados ya que es compatible con diferentes formatos de datos de imagen. Este programa representa las imágenes en 4 dimensiones y permite visualizar el espectro de masas de cualquier región de interés (ROI) o punto seleccionado de la muestra. Además, se pueden seleccionar las masas de interés sobre el espectro de masas y observar su distribución en la muestra analizada. Otros grupos de investigación han desarrollado sus propios programas de análisis [207].

Los espectros de masas generados en un experimento de MSI muestran alrededor de 400 o 500 picos por muestra, por lo que la interpretación manual de los datos es muy complicada. Para facilitar este trabajo se han desarrollado también programas basados en herramientas estadísticas que ayudan a interpretar los datos. El análisis de componentes principales (PCA) es un tipo de análisis estadístico que se utiliza ampliamente en estudios con muchas variables, por lo que este tipo de análisis es fácilmente aplicable en los estudios de MSI. El PCA es un método estadístico no supervisado que se usa para identificar grupos que

presenten variables correlacionadas muy próximas entre sí. En el caso del MSI se utilizan las coordenadas espaciales y la masa e intensidad de los picos en el espectro de masas. Otro tipo de análisis utilizado es el análisis discriminante (DA), un método estadístico supervisado que calcula la combinación de variables que proporcionan la máxima separación entre grupos previamente definidos. También se ha utilizado el “clustering” jerárquico [224], en el que los conjuntos de datos se agrupan por similitud, obteniendo un gráfico en forma de árbol que separa clases para cada espectro. Las ramas del árbol que están más alejadas presentan mayores diferencias que las que están más cercanas.

## **OBJETIVOS**





El objetivo principal de esta tesis es estudiar el proceso de condrogénesis de las células madre mesenquimales mediante técnicas proteómicas, con el fin de identificar nuevos biomarcadores de este proceso para su aplicación en estrategias de terapia celular encaminadas a la reparación del cartílago.

Para la consecución de este objetivo principal nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Estandarizar y optimizar el marcaje metabólico SILAC en las células madre mesenquimales, con el fin de realizar estudios de proteómica cuantitativa basados en cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS).
2. Estudiar mediante la técnica SILAC las alteraciones en el proteoma de las células madre mesenquimales sometidas a diferenciación condrogénica.
3. Determinar mediante la técnica SILAC las alteraciones en el secretoma de las células madre mesenquimales sometidas a diferenciación condrogénica.
4. Aplicar la tecnología MS Imaging para la identificación y localización de marcadores lipídicos del proceso de condrogénesis.



# CAPÍTULOS



## **Artículo I. Análisis proteómico cuantitativo de la condrogénesis de las células madre mesenquimales de médula ósea mediante marcaje metabólico**

Las células madre mesenquimales (MSCs) residentes en la médula ósea y en los tejidos sinoviales próximos a la articulación poseen la capacidad de diferenciarse a condrocitos (el único tipo celular presente en el cartílago maduro), en un proceso conocido como condrogénesis. Debido a la capacidad que tienen las MSCs para expandirse y diferenciarse *in vitro* a este tipo celular, estas células encierran un enorme potencial terapéutico. De hecho, se espera que en un futuro cercano puedan ser usadas en medicina regenerativa para tratar enfermedades que actualmente carecen de tratamiento efectivo, como es el caso de la artrosis. Sin embargo, el conocimiento que existe en la actualidad acerca de los mecanismos moleculares que intervienen en este proceso de diferenciación condrogénica es bastante limitado, debido principalmente a la falta de marcadores condrogénicos bien definidos.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar el marcaje metabólico SILAC en el modelo de condrogénesis *in vitro* utilizado en nuestro laboratorio, con el fin de aplicar dicha técnica para estudiar las alteraciones que se producen en el proteoma de las MSCs en las primeras fases de la diferenciación condrogénica.

Con este objetivo, en primer lugar se aislaron MSCs a partir de la médula ósea obtenida de tres donantes. A continuación, se realizó un ensayo de proliferación para analizar el crecimiento de las células en diferentes medios de cultivo y comprobar que la adición de los aminoácidos pesados no afectaba al crecimiento celular. Una vez seleccionado el medio de cultivo, se determinó el pase en el que la eficacia del marcaje alcanzaba prácticamente el 100%. Una vez verificada la completa incorporación de los aminoácidos pesados, el proceso de diferenciación se indujo utilizando un sistema de cultivo tridimensional en micromasa. Para ello, los *pellets* de células fueron cultivados durante 14 días en un medio condrogénico que contenía, además de otros factores, 10 ng/ml TGF- $\beta_3$ . Las micromasas se

recogieron a diferentes tiempos de la condrogénesis para realizar el estudio proteómico, y también para evaluar mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas y PCR a tiempo real el proceso de diferenciación en nuestras condiciones de estudio. Las proteínas se extrajeron a partir de las micromasas obtenidas a día 2 (muestra sin marcar) y a día 14 (muestra marcada), se cuantificaron mediante el ensayo Bradford y se mezclaron en proporción 1:1. Seguidamente, cada mezcla de proteínas se separó en un gel al 10% de poliacrilamida y cada carril se dividió en 10 bandas. Cada banda se digirió con tripsina y los péptidos resultantes se separaron mediante nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nanoLC-MALDI-TOF/TOF). La identificación y cuantificación de las proteínas se realizó con el software ProteinPilot 2.0.

El análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real reveló un incremento en la expresión de genes marcadores de condrocitos como el colágeno tipo II, el agregano y el factor de transcripción Sox9 a los 14 días de diferenciación condrogénica. A su vez, los estudios histológicos confirmaron la formación de proteoglicanos y glicosaminoglicanos sulfatados después de los 14 días de condrogénesis. Estos resultados mostraron que se estaba produciendo una buena diferenciación en nuestras condiciones de cultivo. Mediante la combinación del marcaje SILAC y la tecnología nanoLC-MS/MS se pudieron identificar 622 proteínas diferentes en los extractos proteicos de las micromasas. Entre ellas, los niveles de 65 proteínas se modulaban significativamente durante el proceso condrogénico. La mayor parte de las mismas, 51, se encontraron aumentadas a día 14 y están principalmente relacionadas con el metabolismo celular y la ruta de la glucólisis. Entre ellas destacamos la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la enolasa (ENOA), la fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1) o la fosfoglicerato mutasa (PGAM1). Otras proteínas de interés que se encontraron incrementadas a día 14 con respecto al día 2 son la gelsolina (GELS) y la vimentina (VIME), ambas implicadas en la organización del citoesqueleto. También la fibronectina y el colágeno tipo VI, componentes característicos de la ECM de los condrocitos

maduros, aparecieron aumentadas a día 14. Por otro lado, 19 proteínas mostraron un descenso en su expresión a día 14 con respecto al día 2. Aunque algunas de ellas participan en la síntesis de proteínas como la glicil-tRNA sintetasa (SYG) o la fosfoserina aminotransferasa (SERC), otras participan en procesos de transporte como la perilipina 3 (PLIN3) y en la remodelación del citoesqueleto como la proteína caldesmón (CALD1) o la tropomiosina (TPM4).

En definitiva, la identificación y cuantificación de los dos estados celulares (células indiferenciadas/diferenciadas) revela los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación condrogénica.





# Metabolic Labeling of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for the Quantitative Analysis of their Chondrogenic Differentiation

Beatriz Rocha,<sup>†</sup> Valentina Calamia,<sup>†</sup> Jesús Mateos,<sup>†</sup> Patricia Fernández-Puente,<sup>†</sup> Francisco J. Blanco,<sup>\*,†,‡</sup> and Cristina Ruiz-Romero<sup>\*,†,‡</sup>

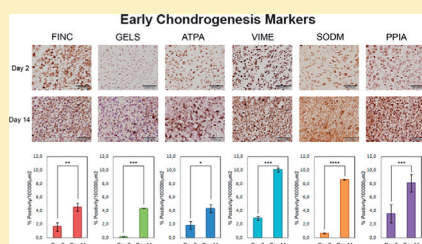
<sup>†</sup>Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII Proteomics Group, INIBIC-Hospital Universitario de A Coruña, 15006-A Coruña, Spain

<sup>‡</sup>CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III-A, Coruña, Spain

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** Human mesenchymal stem cells (hMSCs), residing in bone marrow as well as in the synovial lining of joints, can be triggered to differentiate toward chondrocytes. Thus, hMSCs harbor great therapeutic potential for the repair of cartilage defects in osteoarthritis (OA) and other articular diseases. However, the molecular mechanisms underlying the chondrogenesis process are still in part unknown. In this work, we applied for the first time the stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) technique for the quantitative analysis of protein modulation during the chondrogenic differentiation process of hMSCs. First, we have standardized the metabolic labeling procedure on MSCs isolated from bone marrow (hBMSCs), and we have assessed the quality of chondrogenesis taking place in these conditions. Then, chondrogenic differentiation was induced on these labeled cells, and a quantitative proteomics approach has been followed to evaluate protein changes between two differentiation days. With this strategy, we could identify 622 different proteins by LC–MALDI-TOF/TOF analysis and find 65 proteins whose abundance was significantly modulated between day 2 and day 14 of chondrogenesis. Immunohistochemistry analyses were performed to verify the changes on a panel of six proteins that play different biological roles in the cell: fibronectin, gelsolin, vimentin, alpha-ATPase, mitochondrial superoxide dismutase, and cyclophilin A. All of these proteins were increased at day 14 compared to day 2 of chondrogenic induction, thus being markers of the enhanced extracellular matrix synthesis, cell adhesion, metabolism, and response to stress processes that take place in the early steps of chondrogenesis. Our strategy has allowed an additional insight into both specific protein function and the mechanisms of chondrogenesis and has provided a panel of protein markers of this differentiation process in hBMSCs.

**KEYWORDS:** mesenchymal stem cells, chondrogenesis, proteomics, SILAC, bone marrow, chondrocytes, cartilage



## INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated multipotent cells. With a capacity to self-renew, they can be found in several adult tissues. Due to their properties, MSCs can be expanded *in vitro* and represent a promising source for cell-based therapy.<sup>1</sup> From those available sources for MSCs isolation, bone marrow is the most commonly used. Bone marrow MSCs (BMSCs) are well-characterized multipotent cells, which can differentiate into different cell types including osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes.<sup>2</sup> The process by which MSCs differentiate toward chondrocytes is called chondrogenesis.<sup>3</sup>

The chondrogenic potential of BMSCs turns them into an interesting alternative for cell-based therapy of cartilage defects. Chondrogenesis includes mesenchymal cell condensation and chondrocyte differentiation. There are a number of protocols for the induction of an *in vitro* differentiation of BMSCs toward mature chondrocytes, which mimic the processes that occur *in vivo*.

To induce mesenchymal condensation and cell-to-cell interactions, MSCs are cultured in three-dimensional, high density aggregates (pellet culture),<sup>4,5</sup> and in the presence of factors that stimulate chondrogenic differentiation, such as dexamethasone<sup>6</sup> and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ),<sup>7</sup> which is one of the earliest signals in chondrogenic condensation.<sup>8</sup> Despite the high interest focused on chondrogenesis, the absence of well-defined markers hampers the studies on this process and is one of the main underlying causes for the lack of knowledge on its molecular mechanisms.

Proteomic strategies have been repeatedly followed in the recent years in order to increase the knowledge on the biology of MSCs from different origins, as well as on their differentiation processes.<sup>9,10</sup> In this work, we have chosen to study a model developed and characterized in the last years in

Received: June 25, 2012



our laboratory.<sup>11</sup> This model, which makes use of MSCs derived from the bone marrow of femoral condyles, has recently suggested its putative usefulness to promote repair of articular cartilage defects in a cell therapy-based strategy.<sup>12</sup> From all quantitative proteomics approaches, stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) has proven its robustness and accuracy for the differential study of proteins from cell cultures.<sup>13</sup> We have recently applied this technique, followed by LC–MALDI-TOF/TOF analysis, for the study of primary cultured human articular chondrocytes. With this strategy, we have been able to evaluate in a quantitative way the effect of proinflammatory cytokines<sup>14</sup> or pharmaceuticals<sup>15</sup> on their protein profile. In the present work, we first aimed to standardize the SILAC technique in our hBMSC model for quantitative proteomic purposes, and then to employ this methodology to study the proteome alterations that occur in the first steps of chondrogenic differentiation.

## 82 ■ MATERIALS AND METHODS

### 1. Isolation and Culture of Human Bone Marrow MSCs

Bone marrow samples were obtained as trabecular bone biopsy specimens from the femoral heads of six patients undergoing hip arthroplasty at the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. The average age of the patients was 70 years (range 65–74 years). The study has been approved by the Ethics Committee of Galicia, and all patients gave their informed consent. Cells were isolated from trabecular bone marrow samples by washing the femoral heads with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza Biowittaker, BE12–604F) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% (volume/volume) of penicillin (100 units/ml)-streptomycin (100 µg/ml) (Invitrogen). The resulting cell suspension was filtered (using a filter of 41 µm) and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. After removing the supernatant by decantation, the cell pellet was resuspended in DMEM medium with 20% FBS and then plated at a seeding density of  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 48 h, the medium was replaced to remove nonadherent hematopoietic cells. Culture media was replaced every 4 days until passage 2, after which cells were cultured in a commercial expansion medium for SILAC (Thermo Scientific, 88201).

### 2. Preparation of SILAC Labeling Medium

The expansion medium was supplemented with glucose (4.5 g/L), 10% dialyzed FBS (Thermo Scientific, 88212) and 10% antibiotics but lacking arginine and lysine. Heavy SILAC amino acids L-lysine-HCl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (Silantes, 352042) and L-arginine-HCl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub> (Silantes, 356032) and the standard forms L-lysine-HCl-<sup>12</sup>C<sub>6</sub> (Silantes, 350042) and L-arginine-HCl-<sup>12</sup>C<sub>6</sub><sup>14</sup>N<sub>4</sub> (Silantes, 350032) were supplemented to the medium at 28 mg/L and 146 mg/L for the arginine and lysine, respectively. Medium was then sterile filtered before use. For cell labeling,  $5 \times 10^4$  MSCs (P2) from each donor were seeded in two 25-cm<sup>2</sup> culture flasks (for the light and heavy 115 conditions). After reaching 80% confluence, cells were recovered from the culture flasks by trypsinization, and were subcultured every 6–7 days until achieving complete 118 incorporation of the labeled amino acids (passage 5–6).

### 3. Cell Proliferation Assay

Cell viability was evaluated by Trypan blue dye exclusion throughout the work. However, to monitor the growth rate of the hBMSCs in the conditions of our study, we employed the

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] assay. With this aim, the CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, WI) kit was used following the manufacturer's instructions. Cells were seeded into 96-well plates in triplicate in the different media employed in our study (SILAC expansion medium and SILAC standard DMEM medium, both supplemented with light and heavy amino acids). A cell titration assay was performed for each medium (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 10000). After 5 days at 37 °C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atm, 10 µL of combined MTS/PMS (phenazine methosulfate) solution were added to each well. After 3 h, the absorbance at 490 nm was recorded using an ELISA plate reader (Labsystems Multiskan Plus Plate Reader).

### 4. Chondrogenic Differentiation Assay

In order to induce chondrogenesis, a micromass three-dimensional culture system was used.<sup>4</sup> Briefly, a total of  $25 \times 10^5$  cells were placed in a 15-ml conical polypropylene tube and centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 21 °C. Ten differentiations were carried out per donor. The pellets (1 pellet/tube) were cultured, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>, in 500 µL commercial chondrogenic differentiation medium (Pierce Biotechnology, 88203) supplemented with 15% dialyzed FBS, 1% penicillin (100 units/mL)-streptomycin (100 µg/mL) and either normally or isotopically labeled arginine and lysine. Medium was replaced every 2 days. Micromass pellets were harvested at different times of chondrogenesis (2 and 14 days) for mRNA (mRNA), proteomic, and histologic analyses.

### 5. Histologic and Immunohistochemical Analyses of Micromass Pellets

Micromass pellets (one per donor) were frozen in OCT embedding matrix (BDH Chemicals, Poole, U.K.) and cut at 4 µm with a cryostat (Leica Microsystems, Barcelona, SP) for histological evaluation. Sections were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.6 and stained with Safranin-O and Alcian Blue (all from Sigma-Aldrich) to evaluate the distribution of matrix and production of cartilage proteoglycans. In addition, some sections were stained with Masson's Trichrome to assay collagen fibers and Toluidine Blue, which allows assessing metachromatic staining of cartilage matrix due to proteoglycan content. Other sections were immunostained with monoclonal antibodies against type I (COL1, 1:1000, Abcam, Cambridge, U.K.), type II (COL2, 1:200, Chemicon, Temecula, CA) and type X collagens (COL10, 1:1000, Sigma). Biotinylated secondary antibodies were detected with a peroxidase-labeled biotin-streptavidin complex (Vectastain Elite kit; Vector Laboratories, Perborough, U.K.) with diaminobenzidine substrate (1:1000, Vector Laboratories). Normal human cartilage was used as a positive control for the detection of COL2, OA human cartilage was used as a positive control for COL10, and normal human skin was used as a positive control for COL1. Normal mouse serum was used as a negative control for all tests. For the verification analyses, the monoclonal antibodies employed in the IHC assays were: FINC (Santa Cruz), GELS (Sigma), VIME (Abcam), ATPA (BD Biosciences), SODM (BD Biosciences) and PPIA (Santa Cruz).

A densitometric analysis of the images was performed to quantify the relative abundance of those proteins detected in the immunohistochemical analyses. With this aim, at least three images from the same assay were quantified with AnalySIS Image Processing software 5.0 (Olympus Soft Imaging

Table 1. Primers Employed in This Study for the Evaluation of Chondrogenesis

gene name	forward primer (5'–3')	reverse primer (3'–5')	mRNA ID number
Aggrecan (Agg)	gcctacgaagcaggctatga	gcaaccgataggctctga	BC036445
Collagen type 1 (Col1)	gtgatcgtgctctgttgg	caccatctgtgagcctctct	NM_000088
Collagen type 2 (Col2)	gtgtcagggccaggatgt	teccatgtgcagacacagat	NM_001844
Sox9	gtaccgcagctgcacaac	tcgctctgcttcagaaagtc	NM_000346
60S Acidic ribosomal protein P0 (Rplp0)	tctacaccctgaagtgtgat	caatctgcagacagactgg	NM_053275

182 Solutions GmbH, Münster, Germany), using the staining  
183 intensity assigned by the program for the immunohistochem-  
184 istry values. Data were expressed as the percentage of positive  
185 staining intensity of those sections examined under the same  
186 magnification and light microscopy conditions. The total area  
187 of each micromass was used to normalize all values of  
188 intensities.

#### 6. Real-time PCR Assays

189 Total RNA from MSCs pellet cultures at 2 and 14 days was  
190 extracted using the Trizol L.S. reagent (Invitrogen), according  
191 to the manufacturer's instructions. Three micromasses per  
192 donor were employed for this analysis. RNA concentration was  
193 determined through a Nanodrop ND-100 spectrophotometer  
194 (Nanodrop, Wilmington, VA) at 260 nm. The purity of RNA  
195 was assessed by measuring the  $A_{260}/A_{280}$  ratio. A total of 1  $\mu$ g  
196 RNA was used for the first-strand cDNA (cDNA) synthesis  
197 using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit  
198 (Roche). The reverse transcription (RT) reaction was  
199 performed in a 20  $\mu$ L reaction volume containing reverse  
200 transcriptase (10 units), random hexamer primers (60  $\mu$ M),  
201 anchored-oligo (dT)<sub>18</sub> primer (2.5  $\mu$ M) and dNTPs (1 mM  
202 each) at 25 °C for 10 min, followed by 30 min at 55 °C and 5  
203 min at 85 °C to inactivate the enzyme. Quantitative real-time  
204 PCR was performed to assess the expression of cartilage specific  
205 markers (AGG, COL2A1, SOX9), and a gene associated with  
206 hypertrophic or OA cartilage (COL1A1). The reaction was  
207 carried out in a 20  $\mu$ L reaction volume containing 10  $\mu$ L of the  
208 SYBR Green mix, 2  $\mu$ L of the RT reaction mixture, and 0.3  $\mu$ L  
209 (0.3  $\mu$ M) each primer using LightCycler 480 SYBR Green I  
210 Master (Roche Applied Science). The PCR program consisted  
211 of initial preincubation for activation of Taq polymerase at 95  
212 °C for 5 min, followed by 50 cycles of denaturation of DNA at  
213 95 °C for 10 s, annealing at 61 °C for 5 s, and extension at 72  
214 °C for 7 s. Primers for COL1A1, COL2A1, SOX9, AGG, and  
215 RPLP0 (housekeeping gene) were designed using Universal  
216 Probe Library tool available at Roche Web site (<http://www.>  
217 [roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)). Details of primer sequences are  
218 listed in Table 1. The threshold cycle ( $C_t$ ) value for each gene  
219 of interest was measured for each RT sample and normalized  
220 against RPLP0. Data were analyzed with method  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  and  
221 expressed as relative expression levels of the two times of  
222 chondrogenesis (14 vs 2).

#### 7. Cell Lysis and In-solution Digestion

223 To determine the incorporation rate of heavy amino acids, cells  
224 cultured in heavy-labeled expansion medium during 5 passages  
225 were collected. First, cells were washed with PBS twice and  
226 trypsinized from culture flasks followed by centrifugation at  
227 1500 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the  
228 pellet was resuspended in 30  $\mu$ L lysis buffer composed of 6 M  
229 urea, 2 M thiourea and 25 mM ammonium bicarbonate (all  
230 from Sigma). Then, cell lysate was clarified by centrifugation.  
231 Protein concentration was determined using Bradford assay  
232 prior to digestion. After reduction with 1.25 mM dithiothreitol

(Sigma) for 1 h at 37 °C and alkylation with 5 mM  
233 iodoacetamide (Sigma) for 45 min in the dark at room  
234 temperature, protein sample was digested with trypsin  
235 (Promega) (1:20 enzyme/substrate ratio), at 37 °C overnight,  
236 in a final volume of 50  $\mu$ L 25 mM ammonium bicarbonate to  
237 reduce the urea concentration to 2M. After incubation, the  
238 reaction was stopped by acidifying with trifluoroacetic acid  
239 (Sigma) to a pH lower than 2. Tryptic peptides from the  
240 solution digestion were cleaned up and desalted with a solid  
241 phase extraction Nu-Tips C<sub>18</sub> (Glygen Corporation, Columbia,  
242 MD) to remove urea, salts, undigested proteins and trypsin that  
243 would interfere with the LC–MS/MS analysis. Peptides were  
244 loaded on the tips, after washing with 10 column volumes of  
245 0.1% TFA, peptides were twice eluted with 50  $\mu$ L of 70% ACN,  
246 0.1% TFA.  
247

#### 8. Protein Separation and In-gel Digestion

The proteomic experiments were conducted in triplicate.  
248 Micromasses from the two different time points (2 and 14  
249 days) were broken using a mixer mill (Retsch, MM200)  
250 provided with zirconium oxide grinding balls and homogenized  
251 in 15  $\mu$ L lysis buffer (6 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 30  
252 mM Trizma-base). Six micromasses per donor were employed  
253 for the proteomic analysis. Equal amounts of protein from each  
254 sample were mixed 1:1 according to the measured protein  
255 concentrations. Fifteen micrograms of protein mixtures were  
256 subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
257 (PAGE) and visualized using colloidal blue staining. The  
258 gel lane was cut into 10 slices of similar size, and then each piece  
259 was destained using 50% acetonitrile/50% 25 mM ammonium  
260 bicarbonate solution. After destaining, samples were reduced  
261 with 10 mM dithiothreitol for 30 min at 56 °C and alkylated  
262 with 50 mM iodoacetamide for 10 min in the dark. Gel pieces  
263 were dehydrated in 100% ACN and then incubated overnight  
264 in 6.66 ng/ $\mu$ L trypsin (Roche) solution (in 25 mM ammonium  
265 bicarbonate) at 37 °C. The tryptic peptide mixtures were  
266 extracted from the gel pieces with 50% ACN/0.1% TFA.  
267

#### 9. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS) Analysis

LC–MS/MS analysis was carried out using a Tempo nanoLC  
269 System (Eksigent). Five microliters of the peptide mixture were  
270 injected at a flow rate of 15  $\mu$ L/min on a C<sub>18</sub> precolumn  
271 (Michrom, 0.5  $\times$  2 mm) where peptides were concentrated and  
272 desalted for 10 min. The precolumn was online coupled to a  
273 reversed-phase column (Integratit C<sub>18</sub>, Proteoep II, 75  $\mu$ m id,  
274 10.2 cm, 5  $\mu$ m, 300 Å, New Objective, USA), and the peptides  
275 were separated using a gradient of 5–45% buffer B (80% ACN,  
276 0.1% TFA) over 120 min with constant flow of 350 nL/min.  
277 Peptides were mixed with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid  
278 spotted onto MALDI plate each 15 s using a Sun Collect  
279 MALDI Spotter/Micro-Fraction Collector (SunChrom Wis-  
280 senschaftliche Geräte GmbH, Germany). Mass spectrometry  
281 analysis was performed on a 4800 MALDI-TOF/TOF  
282 instrument (ABSciex) with a 200 Hz repetition rate  
283

C

dx.doi.org/10.1021/pr300572r | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

284 (Nd:YAG laser). MS full scan spectra were acquired from 800  
285 to 4000  $m/z$ . A total of 1500 laser shots were accumulated for  
286 each TOF-MS spectrum at an optimized fixed laser setting.  
287 Tandem MS mode was operated with 1 kV collision energy  
288 with CID gas (air) over a range of 60  $m/z$  to  $-20 m/z$  of the  
289 precursor mass value. Precursor mass window was 300 ppm  
290 (fwhm) in reflective mode. A minimum of 800 and a maximum  
291 of 1500 laser shots were accumulated with laser stop conditions  
292 set at ten product ion peaks of S/N (signal-to-noise, ratio) >  
293 100 at an optimized, fixed laser setting with metastable  
294 suppressor option on. Data-dependent tandem MS settings  
295 included acquisition of up to 20 most intense ion signals per  
296 spot. If two or more consecutive spots in an LC run with  
297 precursor  $m/z$  were within 200 ppm tolerance, the spot with  
298 the maximum S/N was subjected to tandem MS analysis.

#### 10. Protein Identification and Database Searching

299 For protein identification, MS/MS spectra acquired by 4000  
300 Series Explorer software were searched with ProteinPilot 3.0  
301 (ABSciex) against the Uniprot-SwissProt protein database  
302 (release version 2010\_12; November, 2010; 12769092 entries),  
303 using the Paragon Algorithm. The parameters for searching  
304 were oxidation of methionine residue, heavy Lys and heavy Arg  
305 with delta mass of 6 and 10 Da, respectively, as variable  
306 modifications, and iodoacetamide alkylation of cysteine residue  
307 as a fixed modification. A maximum of one missed cleavage was  
308 allowed and trypsin was the digestion agent. Only proteins  
309 identified with at least two distinct peptides with 95%  
310 confidence and a ProtScore (ProteinPilot Software protein  
311 confidence measure) of at least 1.3 were taken into account for  
312 the relative quantification. Data were normalized for loading  
313 error by bias correction. The PSPEP program was used  
314 independently to calculate false discovery rates. Searches  
315 against a concatenated database containing both forward and  
316 reversed sequences allowed the false discovery rate to be kept at  
317 1%. Protein quantification was also performed by ProteinPilot  
318 3.0 software, which automatically calculated the protein  
319 abundance as ratios of the areas of the monoisotopic peaks of  
320 labeled versus nonlabeled peptides. In the final list of quantified  
321 proteins we only consider significant changes those with ratio  
322  $\geq 1.3$  or  $\leq 0.75$  and a  $p$ -value  $\leq 0.05$ . Uniprot database was used  
323 to classify modulated proteins into different biological  
324 processes. Pro Group Algorithm

#### 11. Statistical Analysis

325 Each experiment was repeated at least three times. The  
326 statistical significance of the differences between mean values  
327 was determined using a two-tailed  $t$ -test, considering significant  
328  $p$ -values  $\leq 0.05$ . In the proteomic analysis, normalization tools  
329 and statistical package from the ProteinPilot software were  
330 employed. Only those changes with a  $p$ -value  $\leq 0.05$  and a ratio  
331  $\geq 1.3$  (or  $\leq 0.75$ ) were considered significant. Where  
332 appropriate, results are expressed as the mean  $\pm$  standard error.

### RESULTS

#### Standardization of Metabolic Labeling in hBMSCs

335 We pursued to perform a quantitative proteomic analysis on the  
336 hBMSCs obtained in our laboratory by employing the SILAC  
337 strategy. With this objective, we first standardized the protocol  
338 for a full metabolic labeling of these cells in culture. This  
339 standardization consisted in analyzing the cellular growth in the  
340 SILAC media, performing titration assays to determine the  
341 minimal amount of arginine that allows normal cell growth

while preventing its metabolic conversion to proline, and finally  
the assurance of complete incorporation of the labeled amino  
acids (100% efficiency) in the previously defined conditions of  
culture.

The hBMSCs were isolated according to a procedure  
previously published by our group.<sup>11</sup> Cells in the second  
passage were tested for viability and growth rate, either in the  
commercial expansion media for SILAC (Thermo Scientific)  
and in DMEM for SILAC, both supplemented with light  
heavy Arg and Lys and dialyzed FBS. A proliferation assay was  
carried out to evaluate growth in the presence of the different  
isotopes, and to choose the expansion media for the labeling  
procedures. The assay showed a better growth of the cells in  
the commercial expansion media than in DMEM, regardless of  
the isotopic composition of the added amino acids (Supple-  
mentary Figure 1, Supporting Information). Cell growth  
increased an average of  $24.40 \pm 3.61\%$  with a highly significant  
difference ( $p < 0.001$ ). After the confirmation of normal  
growth, lysine and arginine concentrations were titrated for the  
SILAC assay, and we decided to expand the cells with the  
standard concentration of Lys (146 mg/L) but with a lower  
amount of Arg (28 mg/mL). These conditions allowed us to  
avoid quantitation errors potentially introduced by the arginine  
to proline conversion in previous studies employing chondrocytes.<sup>14,15</sup>

Once the cell culture conditions were established, cells were  
expanded until a complete incorporation of the heavy amino  
acids was achieved. To evaluate this, cells were grown with  
heavy arginine and lysine as the only source for the respective  
amino acids. An aliquot was collected at different passages,  
lysed in urea buffer, digested in solution and analyzed by  
MALDI-TOF/TOF MS. Incorporation efficiencies, on average  
above 98%, were evaluated by the assessment of SILAC ratios  
observed in the labeled versions. Figure 1 shows a  
representative graphic of the heavy amino acid incorporation  
in the hBMSCs following our cell culture procedures after five  
passages. At this step, an incorporation of both lysine and  
arginine above 98% was quantified in the detected peptides.

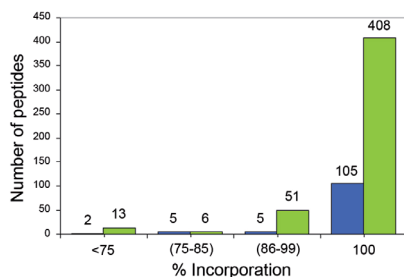


Figure 1. Evaluation of SILAC labeling efficiency in hBMSCs. Cells were grown for five passages with heavy arginine and lysine as the only source for the respective amino acids, lysed in urea buffer, digested in solution and analyzed by nanoLC-MS. Incorporation efficiencies, all above 98%, were evaluated by the assessment of SILAC ratios observed in the labeled versions of 117 lysine-containing peptides (blue) and 478 arginine-containing peptides (green). The graphic shows a representative experiment.

380 This percentage rose to almost 100% in the next passage.  
381 Therefore, we decided to expand the cells for six passages to  
382 achieve a complete labeling, which is essential for assuring high  
383 quantification accuracy and data reproducibility in the next  
384 phases of this work.

### 385 Chondrogenic Differentiation of hBMSCs in the SILAC 386 Experiments

387 Once the cells were fully labeled, we started performing the  
388 chondrogenesis experiments in order to evaluate the differ-  
389 entiation in the conditions of our study. With this aim, cells  
390 were cultured in three-dimensional cultures (micromasses),  
391 according to standard procedures previously established in our  
392 group.<sup>11,16</sup> For the stimulation of chondrogenesis in our  
393 hBMSCs, we employed a commercial chondrogenic medium  
394 lacking Arg and Lys (Pierce), and collected micromasses at two  
395 days of differentiation (day 2 and day 14) to evaluate if it was  
396 taking place properly.

397 First, we employed this chondrogenesis model to perform  
398 transcription analysis on well-known chondrocyte markers,  
399 such as type II collagen (COL2, specific for cartilaginous  
400 tissues), aggrecan (AGG, a large proteoglycan which is a major  
401 component of extracellular matrix of cartilaginous tissues) and  
402 the transcription factor SOX9, which is known to play a key  
403 role in chondrogenesis.<sup>17</sup> The primers used for this study are  
404 listed in Table 1. The real-time PCR analysis was performed on  
405 RNA isolated from six independent differentiations. As shown  
406 in Figure 2, a clear upregulation of Type II Collagen gene (8.6-  
407 fold) was found at day 14 when compared to day 2 with  
408 statistical significance ( $p = 0.013$ ). An analogous result was  
409 detected for aggrecan (5.7-fold) and SOX9 (2.2-fold), although

12

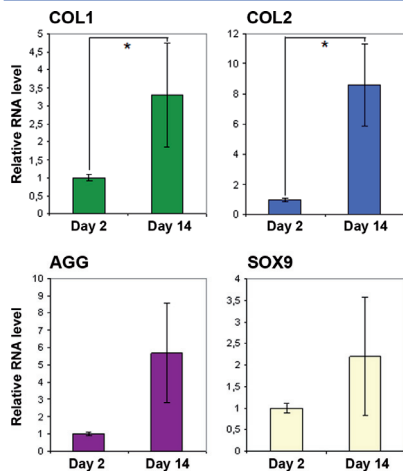


Figure 2. Transcriptional evaluation of the chondrogenesis of SILAC-labeled MSCs. Real-time PCR assays were carried out to measure gene expression of chondrocyte and MSC markers. Data represent the mean (SE) of three independent experiments in duplicate (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.005$  vs basal). Error bars indicate standard deviation of the mean (\*  $p < 0.05$  vs basal).

the high variability of expression found at day 14 for these two  
genes did not allowed to get statistically significant results.

Histochemical and Immunohistochemical analyses were also  
performed on the micromasses, in order to study their  
characteristics. Specifically, the micromasses ( $n = 6$ ) were  
stained with Safranin-O and Alcian Blue to evaluate the  
distribution of matrix and production of cartilage proteoglycans  
(Figure 3A). In addition, some sections were stained with  
Masson's Trichrome (to assay collagen fibers) and Toluidine  
Blue (which allows assessing metachromatic staining of  
cartilage matrix due to proteoglycan content). Immunolocaliza-  
tion assays were also performed, including the detection of a  
cartilage marker such as Type II collagen (COL2), a bone  
marker (COL1), and a marker of chondrocyte hypertrophy  
(type X collagen, COL10). Altogether, our results clearly show  
a proper matrix formation at day 14 of the chondrogenic  
induction, illustrated by the representative images of Figure 3B.

### Proteomic Characterization of the SILAC-labeled hBMSC Undergoing Chondrogenic Differentiation

Once we confirmed that the differentiation process was taking  
place correctly, we collected micromasses at day 2 (cultured in  
light medium) and day 14 (cultured in heavy medium) to  
evaluate in a quantitative way the differential proteomic profile  
of both types of structures. Three biological replicates were  
analyzed in this study. Proteins were extracted from the  
micromasses using a bead mill, and they were subsequently  
mixed 1:1 (heavy:light) and separated by SDS-PAGE in a 10%  
polyacrylamide gel. Then, the gel lanes were cut into 10 slices  
of similar size, and proteins in each slice were in-gel digested  
with trypsin. Finally, the correspondent peptides were extracted  
and analyzed by nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS. Data were  
collected from the approximately 480 spots that were deposited  
on the MALDI plate per LC run.

The data analysis was carried out using ProteinPilot software,  
which allowed the identification of 622 different proteins in the  
hBMSCs proteome (after protein grouping with the ProGroup  
algorithm), 486 of them with more than one peptide at 95%  
confidence. These proteins, together with the identification  
data obtained by the software (score, protein coverage and  
number of peptides), are listed in Supplementary Table 1  
(Supporting Information).

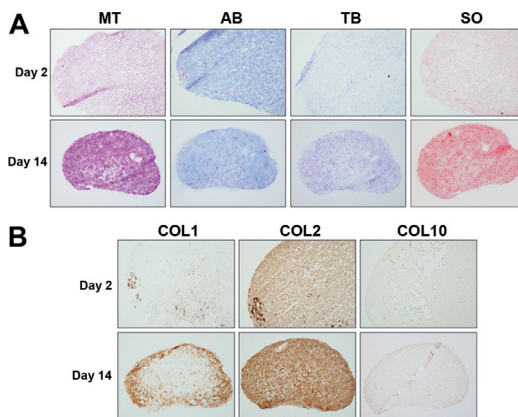
### Quantification of the Proteins Altered during Chondrogenesis

The relative quantification of the proteins was performed by the  
calculation of the SILAC ratios with ProteinPilot software. By  
these means, we were able to quantify 595 different proteins  
(96% of those identified). 64 proteins were found to be  
quantitatively modulated at day 14 of chondrogenesis when  
compared to day 2, with a  $p$ -value  $< 0.05$ . Supplementary Table  
2 lists all the unique peptides employed for the quantification  
of the altered proteins. From these, most of them, 51, were  
increased at an advanced stage of differentiation, and are shown  
in Table 2. We identified several proteins related with cellular  
metabolism and the glycolytic pathway in the proteomic  
analysis, and all of them were increased at day 14. Other  
relevant functional groups that were found altered between the  
two steps of chondrogenesis are involved in protein synthesis  
and turnover, cytoskeleton organization and chaperones/stress  
response (Figure 4A). Regarding characteristic ECM proteins,  
two chains from type VI collagen and fibronectin were also  
increased at day 14 compared to day 2. Finally, several annexins

E

dx.doi.org/10.1021/pr300572r | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX-XXX





**Figure 3.** (A) Histochemical and (B) immunohistochemical analyses of hBMSCs micromasses. Representative images of the assays are shown ( $n = 6$ ). Analysis was carried out at the two different stages of chondrogenic differentiation (day 2 and day 14) selected for the proteomic analysis. MT, Masson Trichrome; AB, Alcian Blue; TB, Toluidine Blue; SO, Safranin O; COL1, Type I collagen; COL2, Type II collagen; COL10, Type X collagen.

471 displayed an analogous modulation during chondrogenic  
472 induction.

473 Inversely, 14 proteins were detected as decreased at day 14  
474 when compared to day 2 with statistical significance. These  
475 proteins are listed in Table 3, and they are mainly related with  
476 protein synthesis and cytoskeleton organization (Figure 4B).

#### 477 Verification Assay of a Panel of Putative Protein 478 Biomarkers of Chondrogenesis

479 We then pursued to verify the modulation of a panel of those  
480 proteins identified as increased with the advance in the  
481 differentiation process. With this aim, immunohistochemistry  
482 analyses were performed to evaluate the abundance of a set of  
483 six proteins, each of them involved in different gene ontology  
484 groups according to the biological process in which they  
485 participate: fibronectin (FINC, cartilage ECM structure),  
486 gelsolin (GELS, actin-related protein), vimentin (VIME, an  
487 intermediate filament), ATP synthase subunit alpha (ATPA,  
488 energy production), manganese superoxide dismutase (SODM,  
489 redox processes) and peptidyl-prolyl cis–trans isomerase A  
490 (PPIA, with a role in protein folding). Images were obtained  
491 from the micromasses at day 2 and day 14 of differentiation ( $n$   
492 = 6). As illustrated in Figure 5, all six proteins increase with  
493 statistical significance at a more advanced stage of chondro-  
494 genesis. A densitometric analysis was performed on all the  
495 images in order to acquire quantitative data on the  
496 immunostaining. By this strategy, the mean increase was  
497 quantified as 2.80-fold for FINC, 29.22-fold for GELS, 3.50-fold  
498 for VIME, 2.37-fold for ATPA, 14.78-fold for SODM and 2.28-  
499 fold for PPIA. The graphical representation of these  
500 quantitative results, expressed in % positivity per analyzed  
501 area, is also shown in Figure 5.

#### 502 ■ DISCUSSION

503 Damaged or degenerated articular cartilage has limited capacity  
504 for regeneration. It is an avascular tissue; therefore, the normal

505 mechanisms of tissue repair-involving humoral factors and  
506 recruitment of stem/progenitor cells to the damaged site-  
507 cannot take place correctly.<sup>18,19</sup> To solve this drawback, the use  
508 of autologous or allogenic stem cells has been suggested as an  
509 alternative therapeutic approach for the treatment of cartilage  
510 defects.<sup>20</sup> The interest in MSCs and their possible application  
511 in cell therapy have resulted in a better understanding of the  
512 basic biology of these cells. However, the variety of stem cell  
513 sources and the heterogeneity of strategies employed on the *in*  
514 *vitro* models complicate a better understanding on the  
515 molecular events that drive the differentiations.

516 Proteomics approaches provide a high power to unravel  
517 these complex processes. Over the last years, several proteomic  
518 approaches have been followed to characterize different  
519 populations of MSCs,<sup>21</sup> including the identification of proteins  
520 responsible for their osteogenic<sup>22–24</sup> and adipogenic<sup>25,26</sup>  
521 differentiation. Most recently, two proteomic strategies have  
522 been followed to characterize the protein modulations that  
523 occur specifically during the chondrogenic differentiation of  
524 MSCs: one consisting of an iTRAQ-based analysis of a murine  
525 embryonic mesenchymal cell line,<sup>27</sup> whereas the other  
526 employed a DIGE strategy on a novel chondrogenesis model  
527 employing MSCs from umbilical cord stroma.<sup>28</sup> In the present  
528 study, we have applied an alternative strategy based on stable  
529 isotope labeling of MSCs proteins throughout their expansion  
530 in order to evaluate, in a quantitative way, those changes that  
531 occur in their proteome during their differentiation toward  
532 chondrocytes. Optimization of the SILAC technique on  
533 hBMSCs prior to the chondrogenesis analyses will be of great  
534 value to achieve a high quantification accuracy and robustness  
535 in our LC–MALDI-TOF/TOF workflow.<sup>29</sup> Metabolic labeling  
536 strategies have enabled the study of individual protein turnover  
537 and global proteome dynamics in cells and whole organisms.<sup>30</sup>  
538 Furthermore, they have demonstrated their usefulness for the  
539 large scale analysis of the subset of secreted proteins, as they

F

doi.org/10.1021/pr300572r | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 2. Proteins Quantified by SILAC and LC–MALDI-TOF/TOF as Increased during the First 14 Days of Chondrogenic Differentiation of hBMSCs

acc no <sup>a</sup>	protein name	abbrev <sup>b</sup>	peptides		ratio (day 14/day 2) <sup>c</sup>	p <sup>f</sup>	EF <sup>g</sup>
			ID <sup>e</sup>	quant <sup>d</sup>			
Glycolysis/Metabolism							
P15121	Aldose reductase	ALDR	3	3	4.81	0.0063	1.5201
P06733	Alpha-enolase	ENOA	33	26	2.29	0.0001	1.1994
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA	11	7	2.59	0.0020	1.4915
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB	11	10	2.63	0.0000	1.2659
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	5	5	1.56	0.0634	1.4425
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYL2	14	10	1.61	0.0019	1.3628
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P	22	15	2.15	0.0001	1.2761
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	11	11	1.57	0.0158	1.3834
P00338	L-Lactate dehydrogenase A chain	LDHA	28	13	2.49	0.0001	1.3158
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	LYAG	2	2	3.45	0.0480	>2
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	6	6	1.38	0.0028	1.5116
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	14	8	9.09	0.0041	1.8369
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	19	12	3.86	0.0002	1.3193
P18669	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	21	11	1.86	0.0011	1.3351
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	AT1A1	2	2	2.81	0.0049	1.5653
P29401	Transketolase	TKT	11	10	2.31	0.0003	1.3054
P60174	Triosephosphate isomerase	TPIS	32	15	3.76	0.0000	1.3118
DNA, RNA, Protein synthesis and turnover							
P15144	Aminopeptidase N	AMPN	16	14	3.14	0.0001	1.2663
P07858	Cathepsin B	CATB	18	11	4.16	0.0001	1.4113
P07339	Cathepsin D	CATD	12	6	1.92	0.0064	1.3586
P26641	Elongation factor 1-gamma	EF1G	4	2	1.62	0.0181	1.3504
Q93077	Histone H2A type 1-C	H2A1C	6	2	8.16	0.0419	>2
P62805	Histone H4	H4	9	8	8.05	0.0000	1.2293
Q6NZ12	Polymerase I and transcript release factor	PTRF	4	4	2.41	0.0002	1.3759
Cytoskeleton-related proteins							
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	7	5	1.33	0.0541	1.6452
P61158	Actin-related protein 3	ARP3	7	4	1.26	0.0482	1.2593
P06396	Gelsolin	GELS	7	6	2.37	0.0007	1.6319
P07437	Tubulin beta chain	TBB5	24	4	1.91	0.0044	1.4639
P68371	Tubulin beta-2C chain	TBB2C	21	3	2.33	0.0088	1.4551
P08670	Vimentin	VIME	93	41	1.60	0.0326	1.2575
Chaperones and stress							
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78	40	25	1.42	0.0059	1.2593
P14625	Endoplasmic reticulum chaperone protein	ENPL	11	9	1.20	0.0022	1.4000
P30041	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	PRDX6	4	4	1.90	0.0484	1.7154
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	7	5	1.76	0.0015	1.2535
P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM	21	10	18.03	0.0225	1.7432
ECM proteins							
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2	18	7	8.75	0.0116	1.8071
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3	67	28	8.21	0.0000	1.6749
P02751	Fibronectin	FN1	26	17	4.78	0.0234	1.4797
Cell proliferation							
P35232	Prohibitin	PHB	5	4	3.29	0.0309	1.4901
Q99623	Prohibitin-2	PHB2	10	8	3.70	0.0016	1.3491
O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	2	2	6.26	0.0314	>2
Other							
P07355	Annexin A2	ANXA2	61	27	2.07	0.0107	1.1729
P09525	Annexin A4	ANXA4	8	5	1.66	0.0718	1.5456
P08758	Annexin A5	ANXA5	40	24	2.29	0.0491	1.3955
P08133	Annexin A6	ANXA6	19	9	2.23	0.0072	1.6486
Q03135	Caveolin-1	CAV1	4	2	2.75	0.0118	1.8777
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1	6	4	2.11	0.0172	1.4864
Q08431	Lactadherin	MFGM	10	8	1.32	0.0257	1.4448
P02545	Prelamin-A/C	LMNA	51	37	2.76	0.0000	1.3598
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	BGH3	8	6	14.78	0.0003	>2
Q9BVK6	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	TMED9	5	2	3.33	0.0000	1.4964

Table 2. continued

<sup>a</sup>Protein accession number according to Swiss-Prot and TrEMBL databases. <sup>b</sup>Protein abbreviation. <sup>c</sup>Number of peptides matched for the identification by ProteinPilot software. <sup>d</sup>Number of peptides employed for the quantification by ProteinPilot software. The sequence of these peptides is shown in Supplementary Table 2, Supporting Information. <sup>e</sup>Quantification ratio of the protein at day 14 versus day 2 of differentiation. <sup>f</sup>*p*-Value of the quantification, calculated by ProteinPilot software. <sup>g</sup>Error factor of the quantification, calculated by ProteinPilot software.

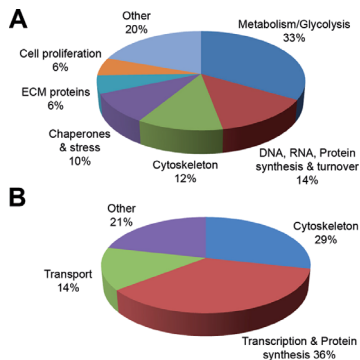


Figure 4. Cellular role of the modulated proteins identified in the proteomic analysis. (A) From the set of proteins increased at day 14; (B) from the set of proteins decreased at day 14.

540 allowed to discriminate newly synthesized proteins from those  
541 from the FCS present in the cell cultures.<sup>14</sup> Very recently, a  
542 SILAC-based proteomics study was performed to determine  
543 the differential secretome profile of hBMSCs and articular  
544 chondrocytes in culture.<sup>31</sup> However, the authors expanded the

545 cells in SILAC medium only for 10 days, which we have  
546 checked is not enough for achieving a proper metabolic labeling  
547 of the newly synthesized proteins. Labeling efficiency is  
548 essential for an accurate quantification; therefore, our expansion  
549 times have been extended up to six weeks (four passages) in  
550 order to obtain an average of 98–100% labeling of the cells.  
551 The confirmation of complete labeling provides higher  
552 robustness to the quantitative results.

553 The approach led to the identification of 622 different  
554 proteins in BMSCs by LC–MALDI-TOF/TOF analysis  
555 (Supplementary Table 1, Supporting Information). The great  
556 majority of the identified proteins have a predicted intracellular  
557 location, which indicates the usefulness of the present approach  
558 (limiting the micromass culture up to day 14) for the evaluation  
559 of early modulations inside the cells, rather than analyzing  
560 tissue formation. Thus, we failed to identify typical cartilage  
561 proteins such as type II collagen or aggrecan (whose expression  
562 was previously confirmed by transcriptional analysis), but  
563 detected instead several proteins related with metabolism,  
564 cytoskeleton modulation, signaling processes, protein synthesis  
565 or cell adhesion. This is consistent with our previous  
566 characterization of the chondrocyte proteome,<sup>32</sup> in which no  
567 type II collagen or aggrecan could be identified, but either  
568 depicted the high abundance of cytoskeleton-related proteins,  
569 annexins and metabolic proteins in the chondrocyte. Moreover,  
570 the protein profile identified in this work exhibits also  
571 similarities to the recently reported of chondrocyte secre-  
572 tome.<sup>14</sup> In the latter study, fibronectin, type I collagen, type VI  
573 collagen and tenascin were found among the most abundant

Table 3. Proteins Quantified by SILAC and LC–MALDI-TOF/TOF as Decreased during the First 14 Days of Chondrogenic Differentiation of hBMSCs

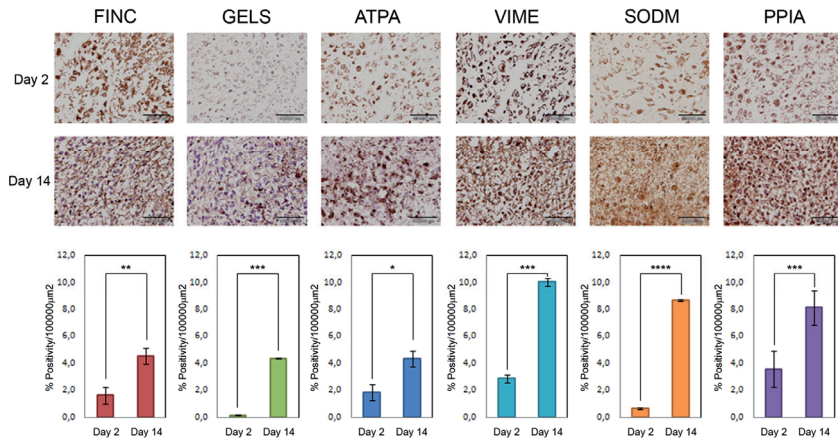
acc no <sup>a</sup>	protein name	abbrev <sup>b</sup>	peptides		ratio (day 14/day 2) <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>f</sup>	EF <sup>g</sup>
			ID <sup>c</sup>	quant <sup>d</sup>			
Transcription and Protein synthesis							
P29692	Elongation factor 1-delta	EF1D	2	2	0.72	0.0401	1.4122
P41250	Glycyl-tRNA synthetase	SYG	4	3	0.33	0.0388	1.5511
Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	SERC	2	2	0.07	0.0100	1.5651
QJ5365	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	2	2	0.07	0.0227	>2
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PP1B	8	2	0.14	0.0008	1.5530
Cytoskeleton-related proteins							
Q05682	Caldesmon	CALD1	4	4	0.04	0.0075	1.3605
Q9Y490	Talin-1	TLN1	13	10	0.38	0.0035	1.3588
Q01995	Transgelin	TAGL	8	7	0.07	0.0000	1.2189
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	7	6	0.29	0.0115	1.9141
Transport							
O60664	Perilipin-3	PLIN3	3	2	0.25	0.0474	1.2811
Q9YSX1	Sorting nexin-9	SNX9	4	4	0.09	0.0282	>2
Other							
P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	2	2	0.03	0.0188	>2
Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3L3	2	2	0.04	0.0105	1.4159

<sup>a</sup>Protein accession number according to Swiss-Prot and TrEMBL databases. <sup>b</sup>Protein abbreviation. <sup>c</sup>Number of peptides matched for the identification by ProteinPilot software. <sup>d</sup>Number of peptides employed for the quantification by ProteinPilot software. The sequence of these peptides is shown in Supplementary Table 2, Supporting Information. <sup>e</sup>Quantification ratio of the protein at day 14 versus day 2 of differentiation. <sup>f</sup>*p*-Value of the quantification, calculated by ProteinPilot software. <sup>g</sup>Error factor of the quantification, calculated by ProteinPilot software.

H

dx.doi.org/10.1021/pr300572r | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX





**Figure 5.** Immunohistochemistry assays on a panel of six proteins increased in hBMSC at day 14 after induction of chondrogenic differentiation. Representative images of the immunohistochemistry are shown in the top panel ( $n = 6$ ). Black bars correspond to  $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . The lower panel is a graphical representation of the quantitative data obtained by densitometry analysis of the images with Analysis<sup>D</sup> software, and normalized to evaluated area (in  $\mu\text{m}^2$ ). \*  $p < 0.1$ ; \*\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.01$ ; and \*\*\*\*  $p < 0.001$  vs day 2. ATPA, alpha subunit of ATP synthase; FINE, fibronectin; GELS, gelsolin; PPIA, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (cyclophilin A); SOD2, superoxide dismutase 2; VIME, vimentin.

574 proteins secreted by chondrocytes (in terms of ProteinPilot  
575 hits). Accordingly, the present work has detected as greatly  
576 abundant type VI collagen (which has a pericellular location in  
577 cartilage) and fibronectin, and also identified tenascin and type  
578 I collagen with a high score.

579 Sixty-four of the identified proteins were found to be  
580 quantitatively altered at day 14 of chondrogenesis when  
581 compared the initial steps (day 2). Some of these proteins  
582 were recently characterized by 2D-DIGE as modulated in a  
583 chondrogenesis model of umbilical cord stroma cells.<sup>28</sup> These  
584 include some metabolism-related proteins (ENOA, NNMT,  
585 PGAM1 or TPIS), chaperones (GRP78, PRDX6 and SODM),  
586 annexins (ANXA2 and ANXA6) and vimentin. Although  
587 employing MSCs from a different origin, and performing  
588 alternative procedures for chondrogenesis induction, the  
589 similarities found between these two approaches suggest a  
590 global unique protein pattern of the intracellular chondrogenic  
591 differentiation process, independent of the *in vitro* model  
592 employed. Analogously, annexins-2, -5, and -6 were also found  
593 increased in the analysis by iTRAQ on a murine embryonic  
594 mesenchymal cell line.<sup>27</sup> Nevertheless, apart from annexins and  
595 a few more proteins, a minimal correlation was found between  
596 our results and those from the latter study, probably due to the  
597 essential differences between the two experimental approaches.

598 Immunohistochemistry assays were carried out on the  
599 micromasses to verify and localize modulations on a panel of  
600 proteins participating in different functional groups. For the  
601 verification assays, we focused on those proteins increased as a  
602 consequence of the chondrogenic induction (Table 2). Among  
603 those proteins related with cartilage ECM formation, we  
604 detected the increase of two type VI collagen chains and FINE  
605 at day 14 of chondrogenic induction. Expression of type VI  
606 collagen gene has been reported to increase at early stages of

607 chondrogenesis in hMSCs cultured in three-dimensional  
608 alginate gels,<sup>33</sup> thus supporting the data obtained in our  
609 study at the protein level. On the other hand, IHC analysis of  
610 FINE demonstrated that this increase was remarkable in the  
611 newly synthesized ECM of the micromass, while at day 2 the  
612 protein holds an essential intracellular location (Figure 5).  
613 FINE is a high-molecular weight glycoprotein of the  
614 extracellular matrix that binds to integrins and extracellular  
615 matrix components such as collagen, fibrin and heparan sulfate  
616 proteoglycans, and is essential for cartilage ECM formation.<sup>34</sup>  
617 Our results are supported by recent findings suggesting that  
618 fibronectin is a critical mediator for TGF- $\beta$ -specific production  
619 balance of 2 major proteoglycans, aggrecan and versican, during  
620 chondrogenesis.<sup>35</sup> Modulation of FINE in the differentiation  
621 process appears as a key mechanism for ECM formation, as it  
622 has been lately demonstrated how FINE-mimetic ligands  
623 regulate BMSC chondrogenesis in three-dimensional hydro-  
624 gels.<sup>36</sup>

625 Seven proteins identified as increased at day 14 were  
626 involved in the cytoskeletal organization, which highlights the  
627 important regulatory functions of these proteins in a variety of  
628 cellular processes, including proliferation, cell adhesion, and  
629 differentiation.<sup>37</sup> However, whereas actin and tubulin have  
630 established roles regulating developmental chondrogenesis,  
631 until most recently there was no evidence supporting a specific  
632 function for proteins such as GELS and VIME in this  
633 differentiation process. GELS is induced by integrin signaling,  
634 and its up-regulation in BMSCs undergoing BMP2-induced  
635 chondrogenesis has been reported at the gene level by  
636 microarray analysis.<sup>38</sup> On the other hand, the intermediate  
637 filament VIME has lately turned up as a positive regulator of  
638 adult hBMSC chondrogenesis in a siRNA-based study.<sup>39</sup> As  
639 happened with FINE, both GELS and VIME proteins appeared

640 with remarkable increased abundance in hBMSC micromasses  
641 at day 14 of chondrogenic induction (Figure 5) when  
642 compared to day 2.

643 Interestingly, the largest functional group of modulated  
644 proteins included those involved in metabolic processes, an  
645 essential topic to understand chondrogenesis, cartilage  
646 physiology and pathophysiology.<sup>40</sup> All of the identified  
647 proteins, including the ATPA (whose modulation was also  
648 verified by IHC), were increased at day 14 of chondrogenesis.  
649 Furthermore, most of them participate in the glycolysis process,  
650 suggesting an enhanced glycolytic activity induced by the  
651 chondrogenic differentiation that is consistent with the  
652 glycolytic nature of cartilage. Accordingly, a recent work was  
653 carried out to study the metabolism of MSCs during  
654 proliferation and differentiation, and demonstrated how  
655 MSCs differentiated specifically toward the chondrogenic (but  
656 not osteogenic) lineage had significantly reduced oxygen  
657 consumption after 24 h in culture, indicating a shift toward a  
658 predominantly glycolytic metabolism,<sup>41</sup> which was dependent  
659 on the culture conditions. Our current results provide support  
660 to the key role of metabolic changes (particularly an enhanced  
661 glycolysis) in the regulation of MSCs differentiation processes.  
662 Finally, we also verified by IHC the increase of two proteins  
663 related with the stress response: SODM and PPIA (Figure 5).  
664 SODM is a major intracellular antioxidant protein, whose  
665 reduction was recently characterized in osteoarthritic chon-  
666 drocytes by a DIGE-based proteomics strategy.<sup>42</sup> The detected  
667 increase after chondrogenic induction, also noticed by the RNA  
668 arbitrarily primed PCR fingerprinting technique (RAP-PCR) in  
669 a chondrogenesis model of BMSCs induced by TGF- $\beta$ 1  
670 exposure,<sup>43</sup> and in the referenced chondrogenesis model of  
671 umbilical cord stroma cells,<sup>28</sup> might be a mark of increased  
672 oxidative stress in the micromasses. The high abundance of  
673 PPIA (also known as Cylophilin A) detected at day 14 could be  
674 a further indicator of this stress. PPIA is an ubiquitous  
675 chaperone protein<sup>44</sup> that has been widely studied as secreted by  
676 vascular smooth muscle cells (VSMCs) in response to reactive  
677 oxygen species (ROS).<sup>45</sup> In chondrocytes, PPIA is produced in  
678 response to activation of stress pathways<sup>46</sup> or pathologic  
679 conditions.<sup>47</sup> The presence of increased ROS, as suggested by  
680 our finding of high SODM and PPIA abundance, might be of  
681 main importance in the modulation of several early differ-  
682 entiation mechanisms. While ROS levels have been shown to  
683 regulate inhibition of proliferation and modulate initiation of  
684 the hypertrophic changes in chondrocytes in a mice model,<sup>48</sup> a  
685 recent work showed its increase during the chondrogenic  
686 differentiation of ATDC5 cells and primary chondrocytes  
687 derived from mouse embryos, and demonstrated that ROS  
688 generated by NADPH oxidases 2 and 4 are essential for survival  
689 and differentiation in the early stage of chondrogenesis.<sup>49</sup>

## 690 ■ CONCLUSIONS

691 Altogether, the present work has fulfilled two main objectives:  
692 the standardization and optimization of a robust metabolic  
693 labeling strategy on hBMSCs for quantitative proteomics  
694 analyses, and the evaluation of the first steps of their  
695 chondrogenic differentiation. The first objective has provided  
696 us a useful model for carrying out further quantitative studies  
697 on both intracellular and secreted proteins in cells isolated from  
698 different donors (either healthy or suffering articular  
699 pathologies). The second objective has led to a panel of  
700 putative early chondrogenesis markers, which have increased  
701 the knowledge on the molecular mechanisms of this process

and will be undoubtedly useful for its molecular monitoring  
in cell therapy-based approaches for cartilage repair.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

Supplementary Table 1. List of the 622 proteins identified in  
this work in hBMSCs undergoing chondrogenic differentiation.  
Identification parameters obtained with ProteinPilot software  
are provided, including Score, % coverage, number of peptides  
found at 95% confidence, and % of coverage with the identified  
peptides having confidence greater than or equal to 95%.  
Supplementary Table 2. Unique peptides used for the  
quantification of the altered proteins with ProteinPilot software.  
Supplementary Figure 1. Growth rate of hBMSC in our study,  
as determined by an MTS-based proliferation assay. The  
graphic shows the comparison of four different conditions:  
MSCs expansion medium supplemented with light amino acids  
(blue dots), MSCs expansion medium with heavy Arg and Lys  
(green squares), DMEM for SILAC with light amino acids  
(yellow triangles) and DMEM for SILAC with heavy Arg and  
Lys (pink crosses). This material is available free of charge via  
the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Grupo de Proteómica, Servicio de Reumatología INIBIC-  
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña C/Xubias, 84,  
15006-A Coruña, Spain. Tel: 34-981-178272. Fax: 34-981-  
178273. E-mail: Cristina.Ruiz.Romero@sergas.es; Francisco.  
Blanco.Garcia@sergas.es.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors express appreciation to the Pathology Service and  
to Mrs. Lourdes Sanjurjo and Mrs. Dolores Velo from the  
Orthopaedics Department of the CHU A Coruña for providing  
samples, to Tamara Hermida and Maria José Sánchez for  
hBMSCs isolation and characterization, and to Purificación  
Filgueira and Noa Goyanes for their help in the histochemistry  
assays. This study was supported by grants from Fondo  
Investigación Sanitaria-Spain (CIBER-CB06/01/0040 and PI-  
08/2028), Secretaria I+D+I Xunta de Galicia  
(10CSA916058PR), and Consellería de Sanidade Xunta de  
Galicia (PS08/62). B.R. (FI10/866), J.M. (CA11/00050) and  
P.F.-P. (CA09/00458) are supported by Fondo Investigación  
Sanitaria-Spain. C.R.-R. is supported by the Miguel Servet  
program from Fondo Investigación Sanitaria-Spain (CP09/  
00114).

## ■ REFERENCES

- (1) Hombach-Klonisch, S.; Panigrahi, S.; Rashedi, I.; Seifert, A.; Alberti, E.; Pocar, P.; Kurpisz, M.; Schulze-Osthoff, K.; Mackiewicz, A.; Los, M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential—perspectives and therapeutic applications. *J. Mol. Med.* **2008**, *86* (12), 1301–14.
- (2) Pittenger, M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *449*, 27–44.
- (3) Goldring, M. B.; Tsuchimochi, K.; Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.* **2006**, *97* (1), 33–44.

J

dx.doi.org/10.1021/pr300572r | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

- 758 (4) Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. L.; Goldberg, V. M.; Yoo, 826  
759 J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal 827  
760 progenitor cells. *Exp. Cell Res.* **1998**, *238* (1), 265–72. 828
- 761 (5) DeLise, A. M.; Stringa, E.; Woodward, W. A.; Mello, M. A.; Tuan, 829  
762 R. S. Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro 830  
763 model for chondrogenesis and cartilage maturation. *Methods Mol. Biol.* 831  
764 **2000**, *137*, 359–75. 832
- 765 (6) Derfoul, A.; Perkins, G. L.; Hall, D. J.; Tuan, R. S. The proteomic 833  
766 Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human 834  
767 human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage 835  
768 extracellular matrix genes. *Stem Cells* **2006**, *24* (6), 1487–95. 836
- 769 (7) Spagnoli, A.; O'Rear, L.; Chandler, R. L.; Granero-Molto, F.; 837  
770 Mortlock, D. P.; Gorska, A. E.; Weis, J. A.; Longobardi, L.; Chytil, A.; 838  
771 Shimer, K.; Moses, H. L. TGF-beta signaling is essential for joint 839  
772 morphogenesis. *J. Cell Biol.* **2007**, *177* (6), 1105–17. 840
- 773 (8) Tuli, R.; Tuli, S.; Nandi, S.; Huang, X.; Manner, P. A.; Hozack, 841  
774 W. J.; Danielson, K. G.; Hall, D. J.; Tuan, R. S. Transforming growth 842  
775 factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progen- 843  
776 itor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase 844  
777 and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (42), 41227–36. 845
- 778 (9) Park, H. W.; Shin, J. S.; Kim, C. W. Proteome of mesenchymal 846  
779 stem cells. *Proteomics* **2007**, *7* (16), 2881–94. 847
- 780 (10) Maurer, M. H. Proteomic definitions of mesenchymal stem cells. 848  
781 *Stem Cells Int.* **2011**, *2011*, 704256. 849
- 782 (11) Cicione, C.; Diaz-Prado, S.; Muinos-Lopez, E.; Hermida- 850  
783 Gomez, T.; Blanco, F. J. Molecular profile and cellular characterization 851  
784 of human bone marrow mesenchymal stem cells: donor influence on 852  
785 chondrogenesis. *Differentiation* **2010**, *80* (2–3), 155–65. 853
- 786 (12) Hermida-Gomez, T.; Fuentes-Boquete, I.; Gimeno-Longas, M. 854  
787 J.; Muinos-Lopez, E.; Diaz-Prado, S.; de Toro, F. J.; Blanco, F. J. Bone 855  
788 marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen 856  
789 promote in vitro the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng.* 857  
790 *Part A* **2011**, *17* (7–8), 1169–79. 858
- 791 (13) Ong, S. E.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in 859  
792 cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *359*, 860  
793 37–52. 861
- 794 (14) Calamia, V.; Rocha, B.; Mateos, J.; Fernandez-Puente, P.; Ruiz- 862  
795 Romero, C.; Blanco, F. J. Metabolic labeling of chondrocytes for the 863  
796 quantitative analysis of the interleukin-1-beta-mediated modulation of 864  
797 their intracellular and extracellular proteomes. *J. Proteome Res.* **2011**, 865  
798 *10* (8), 3701–11. 866
- 799 (15) Calamia, V.; Fernandez-Puente, P.; Mateos, J. U.; Lourido, L.; 867  
800 Rocha, B.; Montell, E.; Verges, J.; Ruiz-Romero, C.; Blanco, F. J. 868  
801 Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate 869  
802 compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte 870  
803 proteomes. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (6), M111.013417. 871
- 804 (16) Gimeno, M.; Maneiro, E.; Rendal, E.; Ramallal, M.; Sanjurjo, L.; 872  
805 Blanco, F. Cell therapy: a therapeutic alternative to treat focal cartilage 873  
806 lesions. *Transplant. Proc.* **2005**, *37* (9), 4080–3. 874
- 807 (17) Akiyama, H. Control of chondrogenesis by the transcription 875  
808 factor Sox9. *Mod. Rheumatol.* **2008**, *18* (3), 213–9. 876
- 809 (18) Steinert, A. F.; Ghivizzani, S. C.; Rethwilm, A.; Tuan, R. S.; 877  
810 Evans, C. H.; Noth, U. Major biological obstacles for persistent cell- 878  
811 based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9* 879  
812 (3), 213. 880
- 813 (19) Hardingham, T.; Tew, S.; Murdoch, A. Tissue engineering: 881  
814 chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res.* **2002**, *4* (Suppl 3), S63–8. 882
- 815 (20) Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal stem cells in osteo- 883  
816 arthritic diseases. *Regen. Med.* **2011**, *6* (6 Suppl), 44–51. 884
- 817 (21) Li, G.; Chan, C. Y.; Wang, H.; Kung, H. F. Proteomic analysis of 885  
818 human mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *698*, 443– 886  
819 57. 887
- 820 (22) Sun, H. J.; Bahk, Y. Y.; Choi, Y. R.; Shim, J. H.; Han, S. H.; Lee, 888  
821 J. W. A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic 889  
822 differentiation of human mesenchymal stem cell. *J. Orthop. Res.* **2006**, 890  
823 *24* (11), 2059–71. 891
- 824 (23) Choi, Y. A.; Lim, J.; Kim, K. M.; Acharya, B.; Cho, J. Y.; Bae, Y. 892  
825 C.; Shin, H. I.; Kim, S. Y.; Park, E. K. Secretome analysis of human 893  
826 BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in 894  
827 osteoblast differentiation. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (6), 2946–56. 895
- (24) Kim, S.; Min, W. K.; Chun, S.; Lee, W.; Chung, H. J.; Choi, S. J.; 896  
828 Yang, S. E.; Yang, Y. S.; Yoo, J. I. Protein expression profiles during 829  
830 osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from 830  
831 human umbilical cord blood. *Tohoku J. Exp. Med.* **2010**, *221* (2), 141– 831  
832 50. 832
- (25) Lee, H. K.; Lee, B. H.; Park, S. A.; Kim, C. W. The proteomic 833  
834 analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem 834  
835 cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **2006**, *6* (4), 835  
836 1223–9. 836
- (26) Jeong, J. A.; Ko, K. M.; Park, H. S.; Lee, J.; Jang, C.; Jeon, C. J.; 837  
838 Koh, G. Y.; Kim, H. Membrane proteomic analysis of human 838  
839 mesenchymal stromal cells during adipogenesis. *Proteomics* **2007**, *7* 839  
840 (22), 4181–91. 840
- (27) Ji, Y. H.; Ji, J. L.; Sun, F. Y.; Zeng, Y. Y.; He, X. H.; Zhao, J. X.; 841  
842 Yu, Y.; Yu, S. H.; Wu, W. Quantitative proteomics analysis of 842  
843 chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells 843  
844 by iTRAQ labeling coupled with on-line two-dimensional LC/MS/ 844  
845 MS. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9* (3), 550–64. 845
- (28) De la Fuente, A.; Mateos, J.; Lesende-Rodriguez, I.; Calamia, V.; 846  
847 Fuentes-Boquete, I.; de Toro, F. J.; Arufe, M. C.; Blanco, F. J. 847  
848 Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new 848  
849 chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesen- 849  
850 chymal stem cells. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (2), M111 010496. 850
- (29) Ong, S. E.; Foster, L. J.; Mann, M. Mass spectrometric-based 851  
852 approaches in quantitative proteomics. *Methods* **2003**, *29* (2), 124–30. 852
- (30) Schilling, O.; Overall, C. M. Proteomic discovery of protease 853  
854 substrates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11* (1), 36–45. 854
- (31) Polacek, M.; Bruun, J. A.; Elvenes, J.; Figenschau, Y.; Martinez, 855  
856 I. The secretory profiles of cultured human articular chondrocytes and 856  
857 mesenchymal stem cells: implications for autologous cell trans- 857  
858 plantation strategies. *Cell Transplant.* **2011**, *20* (9), 1381–93. 858
- (32) Ruiz-Romero, C.; Lopez-Armeda, M. J.; Blanco, F. J. Proteomic 859  
860 characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool 860  
861 for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 861  
862 **2005**, *5* (12), 3048–59. 862
- (33) Xu, J.; Wang, W.; Ludeman, M.; Cheng, K.; Hayami, T.; Lotz, J. 863  
864 C.; Kapila, S. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal 864  
865 stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Eng. Part A* **2008**, 865  
866 *14* (5), 667–80. 866
- (34) K Adler, K. E.; Hill, A.; Canty-Laird, E. G. Collagen 867  
868 fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers 868  
869 and nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20* (5), 495–501. 869
- (35) Kutsuna, T.; Inoue, H.; Takeda, H.; Takahashi, T.; Yamamoto, 870  
871 H.; Miura, H.; Higashiyama, S. Fibronectin regulates proteoglycan 871  
872 production balance in transforming growth factor-beta1-induced 872  
873 chondrogenesis. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *28* (5), 829–34. 873
- (36) Connelly, J. T.; Petrie, T. A.; Garcia, A. J.; Levenston, M. E. 874  
875 Fibronectin- and collagen-mimetic ligands regulate bone marrow 875  
876 stromal cell chondrogenesis in three-dimensional hydrogels. *Eur. Cell* 876  
877 *Mater.* **2011**, *22*, 168–76. Discussion: 176–7. 877
- (37) Woods, A.; Wang, G.; Beier, F. Regulation of chondrocyte 878  
879 differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J. 879*  
880 *Cell Physiol.* **2007**, *213* (1), 1–8. 880
- (38) Djouad, F.; Delorme, B.; Maurice, M.; Bony, C.; Apparailly, F.; 881  
882 Louis-Plence, P.; Canovas, F.; Charbord, P.; Noel, D.; Jorgensen, C. 882  
883 Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal 883  
884 stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9* (2), R33. 884
- (39) Bobick, B. E.; Tuan, R. S.; Chen, F. H. The intermediate 885  
886 filament vimentin regulates chondrogenesis of adult human bone 886  
887 marrow-derived multipotent progenitor cells. *J. Cell Biochem.* **2010**, 887  
888 *109* (1), 265–76. 888
- (40) Mobasher, A.; Vannucci, S. J.; Bondy, C. A.; Carter, S. D.; 889  
890 Innes, J. F.; Arteaga, M. F.; Trujillo, E.; Ferraz, I.; Shakibaei, M.; 890  
891 Martin-Vasallo, P. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: 891  
892 a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and 892  
893 cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol. Histopathol.* **2002**, *17* (4), 893  
894 1239–67. 894

- 895 (41) Pattappa, G.; Heywood, H. K.; de Bruijn, J. D.; Lee, D. A. The  
896 metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and  
897 differentiation. *J. Cell Physiol.* **2011**, *226* (10), 2562–70.
- 898 (42) Ruiz-Romero, C.; Calamia, V.; Mateos, J.; Carreira, V.;  
899 Martinez-Gomariz, M.; Fernandez, M.; Blanco, F. J. Mitochondrial  
900 dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed  
901 by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase  
902 points to a redox imbalance. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8* (1), 172–89.
- 903 (43) Schedel, J.; Lowin, T.; Kujat, R.; Judex, M.; Scholmerich, J.;  
904 Nerlich, M.; Muller-Ladner, U.; Angele, P. RAP-PCR fingerprinting  
905 reveals time-dependent expression of matrix-related molecules  
906 following stem-cell based TGFbeta1-induced chondrocyte develop-  
907 ment. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *27* (4), 519–23.
- 908 (44) Wang, P.; Heitman, J. The cyclophilins. *Genome Biol.* **2005**, *6*  
909 (7), 226.
- 910 (45) Satoh, K.; Nigro, P.; Matoba, T.; O'Dell, M. R.; Cui, Z.; Shi, X.;  
911 Mohan, A.; Yan, C.; Abe, J.; Illig, K. A.; Berk, B. C. Cyclophilin A  
912 enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin  
913 II-induced aortic aneurysms. *Nat. Med.* **2009**, *15* (6), 649–56.
- 914 (46) Catterall, J. B.; Rowan, A. D.; Sarsfield, S.; Saklatvala, J.; Wait,  
915 R.; Cawston, T. E. Development of a novel 2D proteomics approach  
916 for the identification of proteins secreted by primary chondrocytes  
917 after stimulation by IL-1 and oncostatin M. *Rheumatology (Oxford)*  
918 **2006**, *45* (9), 1101–9.
- 919 (47) Ruiz-Romero, C.; Carreira, V.; Rego, I.; Remeseiro, S.; Lopez-  
920 Armada, M. J.; Blanco, F. J. Proteomic analysis of human osteoarthritic  
921 chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis.  
922 *Proteomics* **2008**, *8* (3), 495–507.
- 923 (48) Morita, K.; Miyamoto, T.; Fujita, N.; Kubota, Y.; Ito, K.;  
924 Takubo, K.; Miyamoto, K.; Ninomiya, K.; Suzuki, T.; Iwasaki, R.; Yagi,  
925 M.; Takaiishi, H.; Toyama, Y.; Suda, T. Reactive oxygen species induce  
926 chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J. Exp. Med.*  
927 **2007**, *204* (7), 1613–23.
- 928 (49) Kim, K. S.; Choi, H. W.; Yoon, H. E.; Kim, I. Y. Reactive oxygen  
929 species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for  
930 chondrogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (51), 40294–  
931 302.

## **Artículo II. Caracterización de marcadores proteicos del proceso condrogénico mediante el análisis del secretoma de MSCs.**

El secretoma se define como el conjunto de moléculas producidas y secretadas por una célula, tejido u organismo en un momento determinado o bajo ciertas condiciones. Durante los últimos años, se han publicado numerosos estudios proteómicos en los que se caracterizan las proteínas presentes en el secretoma de las MSCs durante su diferenciación a osteoblastos (osteogénesis) y a adipocitos (adipogénesis). Sin embargo, apenas existen trabajos que describan los perfiles de proteínas secretadas por las MSCs en diferenciación condrogénica. El estudio del secretoma de las MSCs en condrogénesis nos permite evaluar la formación de la ECM, esencial para el desarrollo del cartílago, y a su vez, determinar nuevos marcadores de diferenciación que podrían aplicarse en técnicas de terapia celular encaminadas a la reparación del cartílago.

En este artículo nos planteamos identificar y cuantificar las proteínas presentes en el secretoma de las MSCs durante los primeros estadios del proceso de condrogénesis. Para ello, en este trabajo empleamos una aproximación proteómica en la que se combina el doble marcaje metabólico SILAC con nanoLC-ESI-MS/MS.

Para realizar este estudio se aislaron MSCs a partir de la médula ósea de pacientes con artrosis. Estas MSCs se cultivaron con diferentes variantes isotópicas de los aminoácidos arginina (Arg) y lisina (Lys) (Arg6, Lys4 para una de las poblaciones y Arg 10, Lys8 para la segunda población) durante 4-6 semanas, hasta conseguir un marcaje completo del proteoma. Una vez marcadas, ambas poblaciones se cultivaron en sistemas de cultivo tridimensional o micromasas y en presencia de factores condrogénicos para inducir el proceso de diferenciación. A diferentes tiempos de la condrogénesis (días 2 y 14), las micromasas se lavaron en medio sin suero bovino fetal (FBS) y se incubaron durante 24 horas en un medio sin FBS suplementado con los factores condrogénicos y los aminoácidos marcados. Al cabo de ese tiempo, el secretoma o medio condicionado (CM) se recuperó y se

clarificó por centrifugación. Seguidamente, las proteínas presentes en el CM se precipitaron con ácido tricloroacético y su concentración se determinó mediante el método de Bradford. A continuación, las mezclas de proteínas procedentes de las dos condiciones a comparar se combinaron en proporción 1:1 en función de su cantidad (aproximadamente 8 µg), y se separaron mediante SDS-PAGE. Cada carril se dividió en 8 bandas y cada una se digirió con tripsina mediante el uso de un digestor automático. La mezcla de péptidos resultante se analizó mediante nanoLC-ESI-MS/MS en un LTQ-Orbitrap XL. La identificación y cuantificación de las proteínas se realizó mediante el software MaxQuant 1.2.2.5. Las técnicas de inmunohistoquímica y Western Blot se utilizaron para validar los posibles candidatos a biomarcadores condrogénicos. Por otro lado, las micromasas empleadas en el estudio se recogieron para evaluar el proceso de condrogénesis.

Estudios inmunohistoquímicos confirmaron la síntesis progresiva de moléculas de la ECM del cartílago (colágeno tipo II, agregano y condrotín sulfato 6) durante los 14 días de la diferenciación, lo que nos sugiere que las MSCs mantienen su capacidad condrogénica en nuestras condiciones de cultivo. Además, el análisis proteómico permitió la identificación y cuantificación de 221 proteínas extracelulares, de las cuales 34 resultaron estar moduladas significativamente durante el proceso de condrogénesis. Entre ellas, 30 proteínas se encontraron elevadas en el secretoma recogido a día 14 en comparación con el secretoma del día 2. La mayor parte de estas proteínas son estructurales y entre ellas destacamos marcadores típicos del cartílago, como la proteína oligomérica del cartílago (COMP) o el proteoglicano 4 (PRG4, cuyo incremento se verificó mediante inmunohistoquímica en las micromasas), y también marcadores anticatabólicos como TIMP1 y TIMP2, marcadores del desarrollo del cartílago como el versicano/CSPG2 y un marcador de condrogénesis previamente descrito como la proteína ácida del cartílago 1 (CRAC1). Otras proteínas de interés mostraron un descenso en su expresión a día 14 con respecto a día 2, de las cuales dos son marcadores de indiferenciación (CD90 y CSPG4).

La identificación y cuantificación de las proteínas secretadas por las MSCs bajo diferenciación condrogénica nos proporcionó una amplia información sobre los cambios que se producen en la síntesis de la ECM en las primeras etapas del proceso de condrogénesis. Además, los resultados obtenidos nos permitieron identificar las proteínas que intervienen en la regulación extracelular de este proceso, y que pueden tener utilidad biomarcadora del mismo.





## Secretome Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells Undergoing Chondrogenic Differentiation

Beatriz Rocha,<sup>†</sup> Valentina Calamia,<sup>†</sup> Vanessa Casas,<sup>‡</sup> Montserrat Carrascal,<sup>‡</sup> Francisco J. Blanco,<sup>†,§</sup> and Cristina Ruiz-Romero<sup>†,||,\*</sup>

<sup>†</sup>Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII Proteomics Group, INIBIC—Hospital Universitario de A Coruña, C/Xubias 84, 15006-A Coruña, Spain

<sup>‡</sup>CSIC/UAB Proteomics Laboratory, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 08193-Bellaterra, Spain

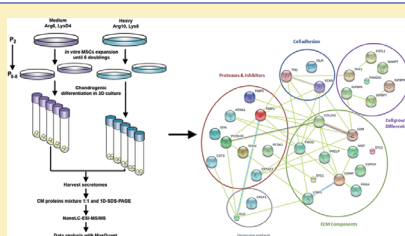
<sup>§</sup>RIER-RED de Inflamación y Enfermedades Reumáticas, INIBIC—CHUAC, 15006-A Coruña, Spain

<sup>||</sup>CIBER-BBN Instituto de Salud Carlos III, INIBIC—CHUAC, 15006-A Coruña, Spain

### Supporting Information

**ABSTRACT:** Human mesenchymal stem cells (hMSCs) can be triggered to differentiate toward chondrocytes and thus harbor great therapeutic potential for the repair of cartilage defects in osteoarthritis (OA) and other articular diseases. However, the molecular mechanisms underlying the chondrogenesis process are still in part unknown. In this work, we followed a double-stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) strategy to evaluate the quantitative modulation of the secretome of stem cells isolated from bone marrow (hBMSCs) during the first steps of their chondrogenic differentiation. Analysis by LC-ESI-MS/MS led to the identification of 221 proteins with a reported extracellular localization. Most of them were characteristic of cartilage extracellular matrix, and 34 showed statistically significant quantitative alterations during chondrogenesis. These include, among others, cartilage markers such as Proteoglycan 4 or COMP, anticatabolic markers (TIMP1), reported markers of cartilage development (Versican), and a suggested marker of chondrogenesis, CRAC1. Altogether, our work demonstrates the usefulness of secretome analysis for understanding the mechanisms responsible for cartilage matrix formation, and it reports a panel of extracellular markers potentially useful for the evaluation of tissue development in cell therapy- or tissue engineering-based approaches for cartilage repair.

**KEYWORDS:** cartilage, chondrogenesis, mesenchymal stem cells, secretome, SILAC, osteoarthritis



## 1. INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic pathology. It is related to aging and is characterized primarily by cartilage degradation.<sup>1</sup> Despite its high prevalence, there is currently limited knowledge about the molecular mechanisms that participate in cartilage destruction. The most generally accepted theory points to the imbalance between anabolic and catabolic processes in the extracellular matrix (ECM) of the cartilage as a key factor in OA physiopathology.

Bone marrow stem cells (BMSCs) are well-characterized multipotent cells, which can differentiate into different cell types, including adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes.<sup>2</sup> The process by which MSCs differentiate toward chondrocytes and begin secreting the molecules that form the cartilage extracellular matrix is called chondrogenesis.<sup>3</sup> The chondrogenic potential of BMSCs turns them into an interesting alternative for cell-based therapy of cartilage defects.<sup>4</sup> There are a number of protocols for the induction of an *in vitro*

differentiation of BMSCs toward mature chondrocytes, which mimic the processes that occur *in vivo*.<sup>5</sup> To induce mesenchymal condensation and cell-to-cell interactions, MSCs are cultured in three-dimensional, high density aggregates (pellet culture),<sup>6</sup> and in the presence of factors that stimulate chondrogenic differentiation, such as dexamethasone and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), which is one of the earliest signals in chondrogenic condensation.<sup>7</sup> In the last years, a human BMSC (hBMSC) model of chondrogenesis has been developed and characterized in our laboratory.<sup>8</sup> This model, which makes use of MSCs derived from the bone marrow of femoral condyles, has recently suggested its putative usefulness to promote repair of articular cartilage defects in a cell therapy-based strategy.<sup>9</sup>

Received: October 17, 2013

Proteomic strategies have been recently followed in order to increase the knowledge of the biology of MSCs from diverse sources, as well as of their differentiation processes.<sup>10</sup> Among all quantitative proteomics approaches, stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) has proven its accuracy for the differential study of proteins from cell cultures.<sup>11</sup> We have lately applied this technique, followed by LC-MALDI-TOF/TOF analysis, for the study of the effect of proinflammatory cytokines<sup>12</sup> or pharmaceuticals<sup>13</sup> on primary cultured human articular chondrocytes. Furthermore, we have most recently standardized the SILAC technique to evaluate the modulations in the protein profile of our hBMSC model during the initial stages of chondrogenesis.<sup>14</sup> This work allowed an additional insight into both specific protein function and the mechanisms of early chondrogenesis, and we provided a panel of protein markers of this differentiation process in hBMSCs, such as vimentin, gelsolin, fibronectin, or cyclophilin A.

The evaluation of cartilage ECM formation, however, is difficult to be achieved on total cell extracts. As happened in proteomic studies on chondrocytes,<sup>15,16</sup> analysis of newly formed chondrocyte micromasses led to the preferential identification of intracellular proteins (which are more abundant in these type of preparations), whereas those that are secreted by the cells for the synthesis and maintenance of the tissue ECM remain masked. Therefore, in the present work we pursued quantitative data of the specific subset of proteins secreted by hBMSC (secretome) from osteoarthritis patients during the early steps of chondrogenesis. To avoid possible quantitation artifacts from the fetal bovine serum (FBS) employed in the cell culture, we decided to carry out a double-SILAC strategy that enables the specific screen of proteins synthesized and secreted by the labeled cells.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Human Bone Marrow Procurement

Bone marrow samples were obtained as trabecular bone biopsy specimens from femoral heads of patients undergoing total hip replacement surgery at the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. Informed consent was obtained from the patients before surgery. The study was approved by the Ethics Committee of Galicia. The three donors that were employed for the proteomic analysis were two women and one man of 68–77 years old (average age 72). For the verification assays (Western blot and immunohistochemistry), cells from the other five different donors were used: three men and two women of 53–77 years old (average age 67 years).

### 2.2. Cell Culture and SILAC Labeling

Human BMSCs were isolated from trabecular bone marrow samples by washing the femoral heads with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza Biowittaker, BE12-604F) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin (100 units/mL)-streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen). Then, cells were filtered and plated for their expansion in DMEM medium with 20% FBS, as previously described.<sup>14</sup> Then,  $5 \times 10^4$  cells were seeded in SILAC (DMEM) 4.5 g/L glucose deficient in arginine and lysine, supplemented with 10% dialyzed FBS (dFBS), 2 mM L-glutamine, and antibiotics, containing also 28 mg/L L-arginine-HCl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>14</sup>N<sub>4</sub> (Arg6) and 73 mg/L L-lysine-HCl-4,4,5,5-D<sub>4</sub> (Lys4) (medium) or L-arginine-HCl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub> (Arg10) and L-lysine <sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub> (Lys8) (heavy) (all from Silantes). Cells were

subcultured every week until achieving 100% labeling (passages 5–6).

### 2.3. Chondrogenic Differentiation Assay of SILAC Cell Populations

Chondrogenic differentiation was performed using a micromass three-dimensional culture system.<sup>5</sup> Briefly, a total of  $2.5 \times 10^3$  cells were placed into a 15-mL conical polypropylene tube and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Fifteen differentiation experiments were carried out with cells from each independent donor. Then, cell pellets (1 pellet/tube) were cultured for 14 days in 500 µL of chondrogenic medium<sup>17</sup> containing  $10^{-3}$  M dexamethasone,  $10^{-7}$  M retinoic acid, 10 µL/ml ascorbic acid, 10 µL/mL transferrin, and 10 ng/mL TGF-β<sub>3</sub> and supplemented with 15% dialyzed FBS, antibiotics, and the isotopically labeled amino acids. Medium was changed every two days. Chondrogenesis was evaluated by immunohistochemical and Real-Time PCR analyses of collagens and proteoglycans as previously described.<sup>14</sup>

### 2.4. Collection and Preparation of Conditioned Media for Analysis by Mass Spectrometry

On days 2 and 14 of differentiation, the micromasses were washed three times in serum-free media to remove the amount of serum contaminating proteins. Then, the micromasses were grouped into five tubes (3 micromasses/tube) containing 200 µL of the corresponding serum-free labeling medium. After 2 h, the medium was removed and discarded. Fresh serum-free labeling medium with the differentiation inducers was added to each tube and incubated overnight. After combining the media from the five tubes corresponding to the same experiment, 1 mL of conditioned medium (CM) was collected, centrifuged, and syringe-filtered (0.22 µm pore size, Millex-GV) to remove cell debris and remaining particles. Proteins in the CM were precipitated with 0.02% (w/v) sodium deoxycholate for 10 min and then with 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) overnight at 4 °C. Precipitates were harvested by centrifugation at 10 min at 4 °C and then washed twice with ice-cold acetone. The protein pellets were air-dried and solubilized in 20 µL of lysis buffer (6 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Trizma-base). Protein concentration was measured using the Bradford protein assay. Typically, around 4–6 µg of protein was obtained for each experimental condition (day 2 or day 14) per donor.

### 2.5. One Dimensional (1D)-SDS PAGE and in-Gel Digestion with Trypsin

Protein samples from the two different points collected from cells from each donor were mixed in a 1:1 ratio according to measured protein concentrations. Each mixed sample (8 mg each) was separated on 8% SDS-PAGE gel and stained with Colloidal Blue to visualize proteins. Gel lanes were cut into 8 slices, and then each slice was cut in half, with the two halves being further processed as technical duplicates of the study. In-gel digestion of the 48 was performed using an automatic digester (Digest MSPro, Intavis). Briefly, gel slices were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) in 20 mM ammonium bicarbonate at 57 °C for 30 min. This was followed by alkylation with 50 mM iodoacetamide (IAA) in 20 mM ammonium bicarbonate for 30 min. Enzymatic digestion was performed overnight (12 h) with 12.5 ng/µL sequencing grade modified trypsin (Promega) at 37 °C. Resulting peptides were extracted with 50% acetonitrile (ACN)/0.25% trifluoroacetic

acid (TFA), concentrated in a SpeedVac, and dissolved in buffer A composed of 1% formic acid (FA) in 5% methanol.

#### 2.6. NanoLC-ESI-MS/MS Analysis

Eluted peptides were subjected to online LC-MS/MS on an Agilent 1200 nanoflow system (Agilent Technologies) connected to an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nano-electrospray ion source (Proxeon Biosystems, Odense, DK). Each peptide mixture was injected and concentrated on a 5 mm × 0.3 mm precolumn (Zorbax C18 silica beads, 5 μm diameter, 300 Å pore size) at 20 μL/min for 10 min. This was followed by peptide separation on a 10 cm long, 75 μm i.d. C18 column (Vydac MS Columns, Grace Davison Discovery Sciences) at a constant flow rate of 400 nL/min over 120 min using a multistage linear gradient of buffer B (0.1% FA in 100% ACN) as follows: 0–100 min, 3–40% B; 100–106 min, 40–90% B; 106–120 min, 90–100% B. Each sample was analyzed in duplicate. Mass spectra ( $m/z$  400–1800) were acquired with the Orbitrap in data-dependent acquisition (DDA) mode with a resolution of 100,000 at  $m/z$  400. The ten most abundant ions in the linear ion-trap were sequentially selected for sequencing by collision-induced dissociation, using a collision energy of 35%. Ions already selected for fragmentation were dynamically excluded for 45 s. Other mass spectrometric parameters included a spray voltage of 1.8 kV, and the temperature of the heated capillary was 200 °C.

#### 2.7. Data Analysis

The acquired raw files were analyzed with the MaxQuant software (version 1.2.2.5). MS/MS spectra were searched with a Andromeda search engine against the Swiss-Prot human database version 2012\_07, which contains 20,231 entries. MaxQuant analysis included an initial search with a precursor mass tolerance of 20 ppm, the results of which were used for mass recalibration. In the main Andromeda search, precursor mass and fragment mass had an initial mass tolerance of 6 ppm and 20 ppm, respectively. The search included cysteine carbamidomethylation as fixed modification and N-terminal acetylation, methionine oxidation, and Arg and Lys SILAC versions (medium and heavy) as variable modifications. The second peptide identification option in Andromeda was enabled. For statistical evaluation of the data obtained, the posterior error probability (PEP) was used. A false discovery rate (FDR) of 0.01 for proteins and peptides was required. Enzyme specificity was set to trypsin, allowing for cleavage N-terminal to proline. Minimal peptide length was set to six amino acids, and a maximum of two missed cleavages was allowed. To match identifications across different replicates and adjacent fractions, the “match between runs” option in MaxQuant was enabled within a time window of 2 min. Gene ontology (GO) enrichment analysis on the identified proteins was performed using DAVID v6.7.<sup>18</sup> This tool and Uniprot database were employed for functional annotation and search of extracellular proteins. Quantification of SILAC pairs was performed by MaxQuant with standard settings using a minimum ratio count of 2. Statistical analysis was done with Perseus tools available in the MaxQuant environment. The Perseus software was used to calculate significance  $B$ , a  $p$  value dependent on the protein intensities to determine whether a protein was significantly regulated.<sup>19</sup> Proteins were considered modulated if their significance  $B$  values were <0.05 in two of the three biological replicates. String software (<http://string-db.org/>) was employed to visualize protein interaction networks

between the set of extracellular proteins modulated by the chondrogenic induction.

#### 2.8. Western Blot Assays

Western blot analyses were performed following standard procedures. Briefly, 10 μg of secreted proteins were loaded and resolved using 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The separated proteins were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon P; Millipore Co., Bedford, MA, USA) by electroblotting and probed with a specific antibody against TIMP1 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and then digitized using the LAS 3000 image analyzer. Equivalent loadings were verified by Ponceau Red (Sigma) staining after transference.

#### 2.9. Immunohistochemical Analysis of Micromass Pellets

Micromasses from five OA patients different from those selected for the proteomics analyses were frozen in an optimal cutting temperature (OCT) embedding matrix (BDH Chemicals, Poole, U.K.) and cut at 4 μm with a cryostat (Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Sections were then fixed in acetone (Sigma) and immunostained with a monoclonal antibody against Proteoglycan 4/Lubricin (PRG4, 1:500, Abcam, Cambridge, U.K.). The peroxidase/DAB ChemMate DAKO EnVision detection kit (Dako, Barcelona, Spain) was used to determine antigen–antibody interactions. Negative staining controls were achieved by omitting the primary antibody. Samples were visualized using an optical microscope. A densitometric analysis of the images was performed with AnalySIS Image Processing software 5.0 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany), using the staining intensity assigned by the program for the immunohistochemistry values. Data were expressed as the percentage of positive staining intensity of those sections examined under the same magnification and light microscopy conditions. The total area of each micromass was used to normalize values of intensities.

### 3. RESULTS

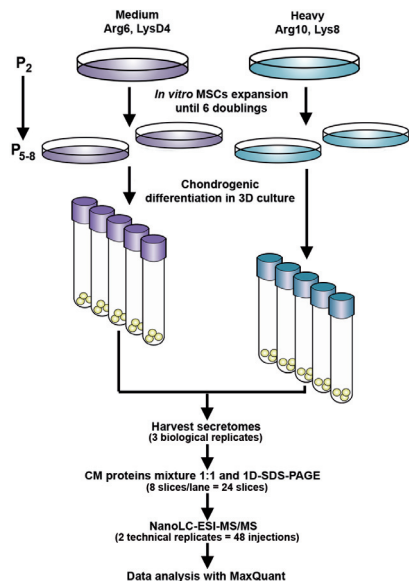
#### 3.1. Preparation of Metabolically Labeled hBMSCs Secretomes

We had previously standardized in our laboratory the SILAC labeling of hBMSCs (Lys6, Arg10), to enable performing quantitative proteomics analyses of their chondrogenic differentiation.<sup>14</sup> In the present work, we aimed to focus on the subset of secreted proteins (secretome) of these cells during chondrogenesis, in order to facilitate the identification of ECM proteins, which are essential for cartilage development. The workflow of the procedure that we have followed is described in Figure 1.

With this objective, a protocol for the double labeling of the cells (medium: Lys4, Arg6. heavy: Lys8, Arg10) was developed. For the standardization, we assessed a normal cellular growth in these SILAC media, and we also measured a high degree of incorporation of the labeled amino acids (near 100% efficiency) in the previously defined conditions of culture (Supporting Information Figure 1).

C

[doi.org/10.1021/pr401030n](https://doi.org/10.1021/pr401030n) | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 1.** Workflow of the procedure. Two populations of hBMSCs from three different donors were grown with isotope variants of lysine and arginine (Arg6, Lys4 for the “medium” labeling and Arg10, Lys8 for the “heavy” labeling) during 4–6 weeks, until achievement of full labeling. The labeled populations were then subjected to differentiation in 3D cultures (micromasses) supplemented with chondrogenic inducers for 2 or 14 days. Proteins in the conditioned media (CM) from the two cell populations were combined and resolved into eight fractions by 1D-SDS-PAGE. After in-gel digestion, the resulting peptide mixtures were analyzed in duplicate by LC coupled online to an LTQ-Orbitrap XL MS, and quantified using the MaxQuant software.

### 3.2. Chondrogenic Differentiation of hBMSCs in the SILAC Experiments

Once the cells from the three donors were fully labeled, the chondrogenic differentiation was induced. With this aim, cells were grown in three-dimensional cultures (micromasses), according to standard procedures previously established in our group.<sup>8</sup> For the stimulation of chondrogenesis, we employed a homemade medium with DMEM lacking Arg and Lys, and TGF- $\beta_3$  among other chondrogenic inducers.<sup>20</sup> Then, micromasses were collected at two days of differentiation (day 2 and day 14), as established previously to evaluate if the early steps of chondrogenesis were taking place properly.<sup>14</sup>

With this aim, the micromass pellets were used to perform verification studies of the chondrogenesis, whose results are illustrated in Figure 2. These studies pursued evaluation of the differentiation potential of the stem cells that are under investigation and are an essential step in this work, considering the advanced age of the donors that were used in this study and the fact that aging has been reported to reduce the

chondrogenic potential of MSCs.<sup>21</sup> The analyses included assessment of gene expression by real-time PCR of known chondrocyte markers,<sup>22</sup> such as type II collagen (COL2) or aggrecan (ACAN) and also of type I collagen (COL1, a bone marker). The real-time PCR analyses were performed on mRNA isolated from five independent differentiations using cells from the three donors included in the study. As shown in Figure 2A, a clear up-regulation was found for COL2 at day 14 when compared to day 2 ( $p < 0.01$ ), demonstrating the expression of the most typical cartilage marker. Furthermore, a slight up-regulation could be detected for ACAN, whereas COL1 was down-regulated ( $p < 0.01$ ).

Immunohistochemical (IHC) analyses were also performed on the micromasses, in order to study their characteristics. In this case, results were obtained from three independent differentiations. Representative images of the assays are shown in Figure 2B. Specifically, we evaluated the presence and localization of the same three markers as in the transcriptional analysis (COL2, ACAN, and COL1) and also chondroitin-6-sulfate (CH6S), a sulfated glycosaminoglycan that is an important structural component of cartilage. Altogether, our results clearly show a proper matrix formation in the micromasses employed for the proteomic analysis at day 14 of the chondrogenic induction with the SILAC chondrogenic media.

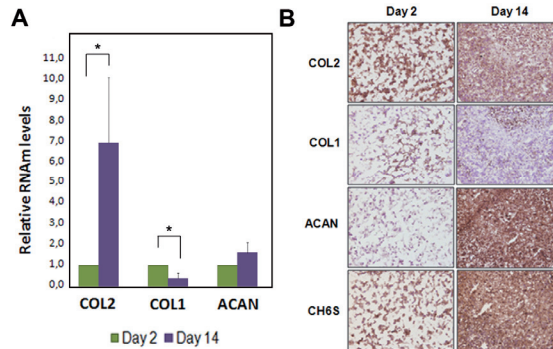
### 3.3. Characterization of the SILAC-Labeled Secretome of hBMSCs Undergoing Chondrogenic Differentiation

The next step of the study consisted in the shotgun proteomic analysis of the secretome preparations. Conditioned media were collected and processed as described in the Materials and Methods section. A SDS-PAGE gel was run to separate the proteins from the heavy/medium mixtures of samples from the three biological replicates in a first dimension (Supporting Information Figure 2). Then, each gel column was cut into eight slices, and the peptides obtained after the in-gel digestion of their proteins were subjected to nanoLC-MS/MS analysis as described in the Materials and Methods. The proteomic study led to the identification of 1043 different proteins (788 of them with more than one peptide) after protein grouping performed by MaxQuant software. These proteins are listed in the Supporting Information Table 1, together with their identification parameters. Several ECM-related proteins were found among those proteins identified with the highest number of peptides, including fibronectin, the basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (Perlecan), and several collagens. A gene ontology enrichment analysis was also performed with DAVID bioinformatics resources<sup>18</sup> and demonstrated the significant enrichment of extracellular proteins in our samples (Supporting Information Table 2), since the highest statistical significances were found for GO terms relative to ECM and the keywords “ECM” and “secreted”.

Further bioinformatic analyses using the DAVID tools and Uniprot database were performed to categorize those proteins that have an extracellular localization previously predicted or described in the databases. 221 proteins, which are listed in Supporting Information Table 2, matched the gene ontology term Cellular Component FAT (GOTERM\_CC\_FAT), “extracellular region” (GO:0005576). From these, 179 are also associated with the SwissProt keyword “secreted”, and 194 were predicted to contain a signal peptide in their sequence. Analysis of sequence features enlarged the list of proteins that

D

dx.doi.org/10.1021/pr401030n | J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 2.** Chondrogenic differentiation of hBMSCs in the SILAC experiments. The differentiation of the hBMSCs in the double-SILAC media was evaluated by real-time PCR (A) and immunohistochemical (B) assays on days 2 and 14 of chondrogenic induction, by analyzing the expression of the chondrocyte phenotype. (A) mRNA expression of COL2, COL1, and ACAN by real-time PCR. Gene expression data were normalized to the expression of HPRT and presented as the mean of five independent experiments in duplicate ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ) relative to day 2. Error bars indicate standard deviation of the mean. (B) IHC of COL2, COL1, ACAN, and CH6S on hBMSCs micromasses. COL2, Type II collagen; COL1, type I collagen; ACAN, aggrecan; CH6S, chondroitin 6 sulfate.

have a predicted signal peptide to 306, but we decided to include in the table only those showing any other evidence of being extracellular. Supporting Information Table 2 also shows the experimental molecular weight range of these proteins (corresponding to the gel slice where the protein was identified).

#### 3.4. Proteins Differentially Secreted during the Chondrogenesis of Osteoarthritic hBMSCs

The next step aimed to evaluate quantitative differences of the protein expression of the identified proteins between two early steps of chondrogenesis, day 2 and day 14. The utility of these two time points for describing the molecular mechanisms of early chondrogenic differentiation was established previously by our group,<sup>14</sup> since it enables the comparison of two different stages of three-dimensional cultures: from the newly formed micromass (day 2) to a moment in which, although still in the early steps of tissue formation, an increased expression of ECM proteins such as type II collagen and proteoglycans has been demonstrated<sup>8</sup> (day 14). In the present work, the protein modulations of proteins secreted from the 3D cultures under chondrogenic induction have been calculated by the comparison of the correspondent SILAC ratios (medium/heavy) for each peptide using MaxQuant software and the Perseus tool.<sup>19</sup>

Table 1 lists the 34 extracellular proteins displaying statistically significant ( $p < 0.05$ ) quantitative differences between the two stages of chondrogenesis, as calculated with Perseus. The results are shown as Logarithm 10 of the normalized ratios between the signal from the heavy-labeled peptide (H, day 14) and the medium-labeled peptide (M, day 2). As shown in the table, most of them were increased at day 14. Interestingly, these include several typical structural proteins of the ECM of cartilage, such as cartilage acidic protein 1 (CRAC1), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), lumican (LUM), chondroitin sulfate proteoglycan core protein 2 (CSPG2/versican), prolagrin (PRELP), or proteoglycan 4 (PRG4/lubricin). On the other hand, the only

four proteins detected with a significant reduction in their amounts at day 14 compared to day 2 were pentraxin-related protein (PTX3), tenascin (TENA), Thy-1 membrane glycoprotein (THY1), and chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4).

To facilitate the interpretation of the results, a functional interaction network of the modulated proteins was searched using the String software. As illustrated in Figure 3, those pathways modulated during chondrogenesis of hBMSCs belong to four major functional classes: ECM structural components (some of its members have been mentioned above), proteases and their inhibitors, cell growth or differentiation factors, and cell adhesion processes.

#### 3.5. PRG4 and TIMP1 Secretion Is Increased at Day 14 of Chondrogenesis

To further investigate the presence of some of these proteins in the secretomes of hBMSC undergoing chondrogenesis with the aim of exploring their potential usefulness as markers of early differentiation, we performed antibody-based analyses on samples from six independent differentiation experiments using hBMSC of other osteoarthritic donors, at days 2 and 14 of differentiation.

The micromasses from three differentiations were employed to perform immunohistochemical assays for PRG4 (Figure 4A), a well-defined zonal marker of the superficial layer of cartilage.<sup>23</sup> As shown in the figure, this protein was markedly increased in the samples at day 14. Image analysis software was employed to quantify this difference, which was found to be statistically significant (3.2-fold increased at day 14 vs day 2,  $p < 0.01$ , Figure 5A).

On the other hand, the supernatants collected from the other three differentiations were used to evaluate the abundance of the metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1) by Western blot assays (Figure 4B). TIMP1 has been proposed as a marker of cartilage and synovial metabolism.<sup>24</sup> A clear band of 23 kDa, corresponding to TIMP1, was detected at day 14 compared to

E

doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00000



**Table 1.** Extracellular Proteins Modulated during the Early Steps of Chondrogenesis That Were Identified in the hBMSCs Secretomes

acc. no.	entry	protein name	log <sub>10</sub> ratio H/M <sup>a</sup>	DEV <sup>b)</sup>	sig. B <sup>c)</sup>	ratio H/M count <sup>d)</sup>
Q9NQ79	CRAC1	cartilage acidic protein 1	1.256	0.28	0.022	10
P49747	COMP	cartilage oligomeric matrix protein	1.362	0.64	0.003	170
Q6UVK1	CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	-1.595	0.31	0.022	21
P10909	CLUS	clusterin	0.766	0.16	0.024	20
P08123	CO1A2	collagen $\alpha$ -2(I) chain	0.862	0.26	0.012	19
P01034	CYTC	cystatin-C	1.430	0.21	0.003	5
O75462	CRLF1	cytokine receptor-like factor 1	1.224	0.31	0.018	2
Q8IXL6	DMP4	extracellular serine/threonine protein kinase Fam20C	0.644	0.09	0.039	6
P02794	FRIH	ferritin heavy chain	0.413	0.16	0.030	37
Q06828	FMOD	fibromodulin	1.465	0.06	0.003	19
Q12841	FSTL1	folistatin-related protein 1	1.024	0.23	0.026	24
O14498	ISLR	immunoglobulin superfamily leu-rich repeat protein	0.869	0.14	0.013	29
P22692	IBP4	insulin-like growth factor-binding protein 4	1.592	0.18	0.001	44
P24592	IBP6	insulin-like growth factor-binding protein 6	1.261	0.27	0.011	20
Q16270	IBP7	insulin-like growth factor-binding protein 7	1.411	0.33	0.007	16
QJ4766	LTBP1	latent-transforming growth factor beta-binding protein	0.598	0.28	0.037	15
P51884	LUM	lumican	0.733	0.13	0.047	20
P08493	MGP	matrix gla protein	1.318	0.17	0.000	2
P01033	TIMP	metalloproteinase inhibitor 1	1.631	0.30	0.001	79
P16035	TIMP2	metalloproteinase inhibitor 2	0.988	0.18	0.042	24
P29120	NEC1	neuroendocrine convertase 1	1.034	0.25	0.041	22
P43490	NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	0.627	0.32	0.012	10
P26022	PTX3	pentraxin-related protein PTX3	-1.232	0.15	0.032	6
QJ5113	PCOC1	procollagen C-endopeptidase enhancer 1	1.229	0.27	0.009	30
P51888	PRELP	prolargin	1.420	0.39	0.006	6
Q92954	PRG4	proteoglycan 4	0.360	0.12	0.048	42
Q92743	HTRA1	serine protease HTRA1	1.029	0.22	0.028	9
P52823	STC1	stanniocalcin-1	1.152	0.16	0.038	31
O76061	STC2	stanniocalcin-2	0.814	0.23	0.006	5
P24821	TENA	tenascin	-1.403	0.28	0.023	133
P04216	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein	-1.203	0.14	0.031	9
P10646	TFPI1	tissue factor pathway inhibitor	1.097	0.15	0.004	5
P48307	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	0.957	0.10	0.006	10
P13611	CSPG2	versican core protein	0.514	0.17	0.043	44

<sup>a</sup>Log<sub>10</sub> ratio H/M normalized: logarithm 10 of the normalized ratios H (day 14)/M (day 2). <sup>b</sup>Standard deviation of log<sub>10</sub> ratio H/M normalized. <sup>c</sup>Significance B: *p*-value. <sup>d</sup>Ratio H/M count: number of redundant peptides (SILAC pairs) used for quantitation.

day 2. An analogous experiment was run using protein extracts from chondrocytes (intracellular and secreted proteins), and we could bear out that the band detected in the hBMSC supernatants was the same as that of the chondrocyte secretome samples.

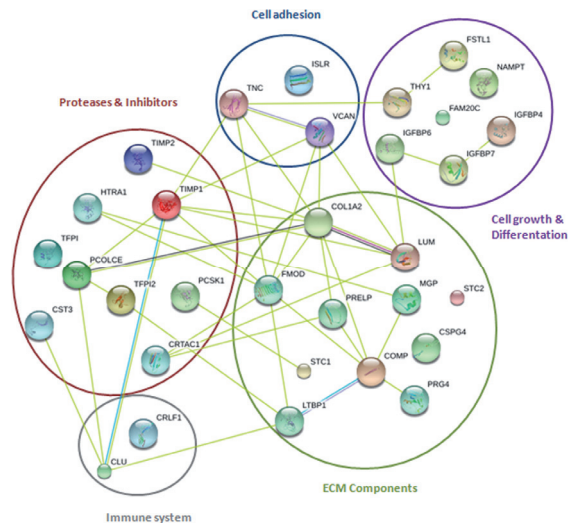
#### 4. DISCUSSION

The formation of the articular cartilage extracellular matrix (ECM) network depends on the synthesis and interaction of a number of molecules, mainly proteins, secreted by the chondrocytes or carried by the bloodstream to the synovial joint. However, when this tissue is damaged, it has a very limited regeneration capacity. This is due to its avascularity and the specific characteristics of its ECM, mainly composed of large molecules such as collagens or proteoglycans.<sup>25</sup> To solve this problem, the use of autologous or allogenic stem cells has been suggested as an alternative therapeutic approach for the treatment of cartilage defects.<sup>26</sup> MSCs have been identified in healthy and diseased cartilage, and they appear to retain at least some potential to regenerate cartilage *in vivo*.<sup>27</sup>

The interest in MSCs and their possible application in cell therapy have resulted in a better understanding of the basic

biology of these cells. Nevertheless, although some proteomic approaches have been followed to analyze the protein modulations that occur during the differentiation of MSCs toward chondrocytes,<sup>28,29</sup> so far no proteomic study has examined in a quantitative way the extracellular environment of these cells during chondrogenesis. Most recently, only two secretome analyses have been performed to study the osteogenic process: the first one compared the protein profiles of conditioned media from undifferentiated hBMSCs and osteoblasts at day 6 after osteogenesis induction using a label-free approach,<sup>30</sup> whereas the second one quantified the temporal dynamics of the human hMSC secretome during *ex vivo* osteoblast differentiation by pulsed SILAC labeling.<sup>31</sup>

In this work, we have decided to carry out a metabolic labeling strategy to quantitatively describe for the first time the profile of proteins secreted by hBMSC undergoing chondrogenesis. This technique was first standardized in our group using human articular chondrocytes<sup>12</sup> and at that time highlighted the usefulness of secretome analyses for the study of cartilage-specific ECM proteins, which was most recently confirmed by a comparative analysis of proteins secreted by chondrocytes from medial and lateral femur condyles.<sup>32</sup> In fact,

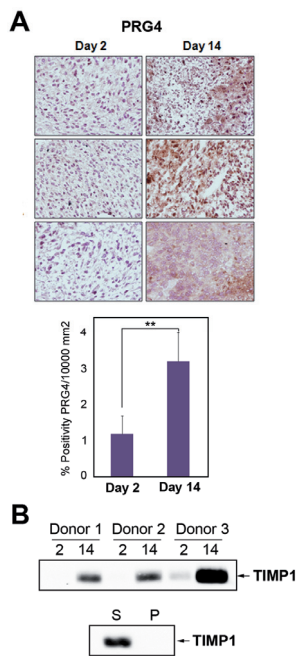


**Figure 3.** Functional network of the extracellular proteins modulated in the hBMSC secretome during chondrogenesis. The String software was employed to perform the analysis on the proteins listed in Table 1, by establishing their known or predicted interactions.

our previous work performed on whole micromass extracts up to day 14 of chondrogenesis (when the ECM formation is still in its infancy and the major component of the 3D structure are cells), failed to detect proteins with a predicted extracellular localization, except for the most abundant ones, such as fibronectin or type VI collagen.<sup>14</sup> On the contrary, the present study on conditioned media allowed the identification of at least 221 extracellular proteins (those with reported evidence of extracellular localization, Supporting Information Table 3), including many molecules that had been identified in secretomes from chondrocytes<sup>12</sup> and are recognized to participate in the formation of cartilage matrix. Out of these 221, only 23 were identified in the previous analysis of hBMSC micromasses under chondrogenic factors.<sup>14</sup> The characterization of the subset of extracellular proteins, however, was accompanied by the identification of many known intracellular proteins. The problem of intracellular contamination is inherent to secretome studies, as the cell-conditioned medium consists of proteins that are not only secreted but also shed from the cell surface and intracellular proteins released into the supernatant in exosomes or due to cell lysis, apoptosis, and necrosis.<sup>33</sup> To avoid this, a novel strategy has been ultimately developed to enrich the conditioned media preparations specifically on newly synthesized proteins using click chemistry and pulsed SILAC.<sup>34</sup> This approach not only diminishes the detection of cell lysis-derived proteins but also enables performing the secretome studies without the need of serum starvation and washing. In our workflow, however, this step was mandatory to reduce the high background of bovine serum-derived peptides. Nevertheless, we limited the serum deprivation to the last steps of media collection and processed

in parallel samples from the two conditions that were compared (day 2 and day 14) in order to diminish the detection of unintended cell responses caused by the starvation. On the other hand, processes of cell lysis in our preparations were extremely difficult to restrain, due to the specific characteristics of the micromass culture, and it is believed they are the main cause for the unexpected high proportion of intracellular proteins found in the reported secretome profile. Therefore, we decided to classify the identified proteins according to their predicted localization and then to focus specifically on the quantitative differences of the group of known ECM.

The use of a double-SILAC method enabled the robust quantification of these proteins, avoiding contamination artifacts from the serum employed in the cell culture.<sup>34</sup> From the subset of proteins that were found to be quantitatively altered with statistical significance between the two early steps of chondrogenesis (Table 1), the most represented functional group corresponded to ECM structural components. All of them were increased at day 14 and have a valuable potential use as markers of early ECM formation. Among these, proteoglycan 4 (PRG4/SZP/Lubricin) is produced by superficial zone chondrocytes<sup>35</sup> and has potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in the tissue metabolism.<sup>36</sup> PRG4 plays an important role in articular joint physiology,<sup>37</sup> and its loss of accumulation in cartilage may have a role in the pathology of osteoarthritis.<sup>38</sup> Ultimately, this protein has turned into an essential marker in approaches for tissue engineering of cartilage,<sup>39</sup> with its being expression upregulated in articular chondrocytes by members of the TGF- $\beta$  and BMP superfamilies.<sup>40</sup> Interestingly, this effect is further observed in this work in hBMSCs from osteoarthritis patients, demonstrat-



**Figure 4.** Proteoglycan 4 (PRG4) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1) are increased at day 14 of chondrogenesis. (A) Presence of PRG4 was determined by immunohistochemical analysis. Representative images of the results obtained on cells from three different donors are shown. The graphic represents the densitometry data obtained by analysis of the images with AnalySIS software. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean of five independent experiments.  $**P < 0.01$ . (B) The presence of TIMP1 was evaluated by Western blot assays on the secretomes from MSCs of three independent donors undergoing chondrogenesis at day 2 or day 14, as shown in the figure. The same assay was performed on protein extracts from human articular chondrocytes extracellular (S, secretome) and intracellular proteins (P, proteome), to illustrate the extracellular localization of TIMP1.

ing their ability to synthesize and accumulate PRG4 in the newly formed ECM (Figure 4A). This is especially relevant taking into account the recently reported chondroprotective effect of PRG4, whose expression protects against development of osteoarthritis in mice.<sup>41</sup>

Another protein that is also increased at day 14 of chondrogenic differentiation and was previously investigated as a marker of osteoarthritis is the metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1).<sup>42</sup> Secretion of this protein was recently found to be increased in chondrocytes from the medial condyle of the knee when compared to those of the lateral condyle.<sup>32</sup> Furthermore, an imbalance between metalloproteinases (particularly MMP-3 and MMP-13) and their inhibitors was reported as a pathogenic

factor for OA and rheumatoid arthritis.<sup>43</sup> This hypothesis was later supported by the fact that expression of TIMP1 was reduced in osteoarthritic cartilage.<sup>44</sup> In the present work, we demonstrate the synthesis and secretion of TIMP1 from osteoarthritic hBMSCs subjected to chondrogenic factors. Further work is required to establish if its expression levels are the same as those obtained with cells from normal donors.

Moreover, this study describes several other putative differentiation markers that can be detected by mass spectrometry analyses on hBMSCs supernatants. Among those proteins increased during the early stages of chondrogenesis, cartilage acidic protein 1 (CRAC1/CEP-68) gene was previously reported as up-regulated in mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation and thus suggested as a new marker for stem-cell-based chondrogenic tissue engineering.<sup>45</sup> Another interesting protein is Versican core protein (CSPG2), which has a role in positively regulating the formation of the mesenchymal matrix and the onset of chondrocyte differentiation through the attached chondroitin sulfate chains.<sup>46</sup> As being transiently expressed in mesenchymal condensation areas during tissue morphogenesis, it facilitates chondrogenesis and joint morphogenesis by localizing TGF- $\beta$  in the extracellular matrix and regulating its signaling.<sup>47</sup> Other attractive cartilage-characteristic proteins that were increased at day 14 are matrix Gla protein (MGP), which is thought to act as an inhibitor of bone formation and cartilage calcification,<sup>48</sup> and cartilage oligomeric matrix protein (COMP), which maintains the structural integrity of cartilage via its interaction with other extracellular matrix proteins and also mediates the interaction of chondrocytes with the cartilage ECM through interaction with cell surface integrin receptors.<sup>49</sup> This protein has been one of the putative biomarkers of rheumatic disorders most extensively studied, as it can be detected in the serum and the synovial fluid of patients suffering from this kind of pathologies.<sup>50</sup>

Finally, the analysis of those proteins whose expression is decreased with the progression of the differentiation can also be useful for a better understanding of the chondrogenic process. In this group, we could only detect four proteins with significant differences between the two time points that were analyzed. Interestingly, two of them are known markers of undifferentiation: Thy-1 membrane glycoprotein (THY1/CD90) is a very well-known cell surface marker of progenitor cells,<sup>51</sup> whereas chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4/MCSP) has been classically associated to melanomas and characterized as a valuable marker for several incompletely differentiated precursor cells.<sup>52</sup>

Altogether, this work demonstrates the utility of secretome analyses on hBMSCs for understanding those mechanisms responsible for cartilage matrix formation, elucidating those pathways underlying the early steps of tissue development. Being the first study to face this objective, we have been able to describe a panel of proteins differentially secreted by the stem cells during early chondrogenesis, thus increasing the knowledge of the molecular mechanisms of this process. The quantitative data reported for these markers will be highly useful for the molecular monitoring of matrix formation in cell therapy- or tissue engineering-based approaches for cartilage repair.

H

dx.doi.org/10.1021/pr401030n1.J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

Lists of proteins in the secretome preparations; GO enrichment analysis of the proteins identified in the present work; and proteins with a previously described extracellular location that were identified in the conditioned media of hBMSCs undergoing chondrogenesis. Figures showing evaluation of SILAC labeling efficiency in hBMSCs and the one dimensional SDS-PAGE gel employed for protein separation. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: 34-981-176399. Fax: 34-981-176398. E-mail: [cristina.ruiz.romero@sergas.es](mailto:cristina.ruiz.romero@sergas.es).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors express appreciation to the Pathology Service from the Orthopaedics Department of the CHU A Coruña for providing bone marrow samples, and to Joan Villanueva from CSIC/UAB for his help with the LC-MS/MS analysis. C.R.-R. is recipient of a Miguel Servet grant (CP09/00114) from ISCIII-Spain. This work was supported in part through funding from the Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER-CB06/01/0040; P112/00329; P111/02397; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; and Proteo-Red/ISCIII); Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, FEDER (European Community), and Xunta de Galicia (Grant 10 PXIB 310153 PR and Red Gallega REDICENT).

## ■ REFERENCES

- Blanco, F.; Guitián, R.; Vázquez-Martul, E.; de Toro, F.; Galdo, F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41* (2), 284–9.
- Pittenger, M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *449*, 27–44.
- Goldring, M. B.; Tsuchimochi, K.; Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.* **2006**, *97* (1), 33–44.
- Gupta, P. K.; Das, A. K.; Chullikana, A.; Majumdar, A. S. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* **2012**, *3* (4), 25.
- Djouad, F.; Bony, C.; Canovas, F.; Fromiguet, O.; Reme, T.; Jorgensen, C.; Noel, D. Transcriptomic analysis identifies Foxo3A as a novel transcription factor regulating mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Cloning Stem Cells* **2009**, *11* (3), 407–16.
- Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. L.; Goldberg, V. M.; Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* **1998**, *238* (1), 265–72.
- Tuli, R.; Tuli, S.; Nandi, S.; Huang, X.; Mannerqq, P. A.; Hozack, W. J.; Danielson, K. G.; Hall, D. J.; Tuan, R. S. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (42), 41227–36.
- Cicione, C.; Diaz-Prado, S.; Muinos-Lopez, E.; Hermida-Gomez, T.; Blanco, F. J. Molecular profile and cellular characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells: donor influence on chondrogenesis. *Differentiation* **2010**, *80* (2–3), 155–65.
- Hermida-Gomez, T.; Fuentes-Boquete, I.; Gimeno-Longas, M. J.; Muinos-Lopez, E.; Diaz-Prado, S.; de Toro, F. J.; Blanco, F. J. Bone marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen

promote in vitro the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng., Part A* **2011**, *17* (7–8), 1169–79.

(10) Maurer, M. H. Proteomic definitions of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* **2011**, *2011*, 704256.

(11) Ong, S. E.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *359*, 37–52.

(12) Calamia, V.; Rocha, B.; Mateos, J.; Fernandez-Puente, P.; Ruiz-Romero, C.; Blanco, F. J. Metabolic labeling of chondrocytes for the quantitative analysis of the interleukin-1-beta-mediated modulation of their intracellular and extracellular proteomes. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (8), 3701–11.

(13) Calamia, V.; Fernandez-Puente, P.; Mateos, J.; Lourido, L.; Rocha, B.; Montell, E.; Vergés, J.; Ruiz-Romero, C.; Blanco, F. J. Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte proteomes. *Mol. Cell Proteomics* **2011**, *11* (6), M111.013417.

(14) Rocha, B.; Calamia, V.; Mateos, J.; Fernandez-Puente, P.; Blanco, F. J.; Ruiz-Romero, C. Metabolic Labeling of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for the Quantitative Analysis of their Chondrogenic Differentiation. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (11), 5350–5361.

(15) Calamia, V.; Ruiz-Romero, C.; Rocha, B.; Fernández-Puente, P.; Mateos, J.; Montell, E.; Vergés, J.; Blanco, F. J. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12* (4), R138.

(16) Koo, J.; Kim, K. I.; Min, B. H.; Lee, G. M. Differential protein expression in human articular chondrocytes expanded in serum-free media of different medium osmolalities by DIGE. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (5), 2480–7.

(17) Arufe, M. C.; De la Fuente, A.; Fuentes-Boquete, I.; De Toro, F. J.; Blanco, F. J. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J. Cell Biochem.* **2009**, *108* (1), 145–55.

(18) Huang, d. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (1), 44–57.

(19) Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (12), 1367–72.

(20) Puetzer, J. L.; Pettite, J. N.; Lobo, E. G. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng., Part B: Rev.* **2010**, *16* (4), 435–44.

(21) Kanawa, M.; Igarashi, A.; Ronald, V. S.; Higashi, Y.; Kurihara, H.; Sugiyama, M.; Sasaki, T.; Pan, H.; Kato, Y. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. *Cytotherapy* **2013**, *15* (9), 1062–72.

(22) Merceron, C.; Portron, S.; Vignes-Colombeix, C.; Rederstorff, E.; Masson, M.; Lesoeur, J.; Source, S.; Sinquin, C.; Collic-Jouault, S.; Weiss, P.; Vinatier, C.; Guicheux, J. Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells* **2012**, *30* (3), 471–80.

(23) Schumacher, B. L.; Hughes, C. E.; Kuettnner, K. E.; Catterson, B.; Aydelotte, M. B. Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J. Orthop. Res.* **1999**, *17* (1), 110–20.

(24) Roos, H.; Dahlberg, L.; Hoerner, L. A.; Lark, M. W.; Thonar, E. J.; Shinmei, M.; Lindqvist, U.; Lohmander, L. S. Markers of cartilage matrix metabolism in human joint fluid and serum: the effect of exercise. *Osteoarthritis Cartilage* **1995**, *3* (1), 7–14.

(25) Hardingham, T.; Tew, S.; Murdoch, A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res.* **2002**, *4* (Suppl 3), S63–8.

(26) Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal stem cells in osteo-articular diseases. *Regen. Med.* **2011**, *6* (6 Suppl), 44–51.

(27) Grogan, S. P.; Miyaki, S.; Asahara, H.; D'Lima, D. D.; Lotz, M. K. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage:

- normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2009**, *11* (3), R85.
- (28) Ji, Y. H.; Ji, J. L.; Sun, F. Y.; Zeng, Y. Y.; He, X. H.; Zhao, J. X.; Yu, Y.; Yu, S. H.; Wu, W. Quantitative proteomics analysis of chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by iTRAQ labeling coupled with on-line two-dimensional LC/MS/MS. *Mol. Cell Proteomics* **2010**, *9* (3), 550–64.
- (29) De la Fuente, A.; Mateos, J.; Lesende-Rodriguez, I.; Calamia, V.; Fuentes-Boquete, I.; de Toro, F. J.; Arufe, M. C.; Blanco, F. J. Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells. *Mol. Cell Proteomics* **2012**, *11* (2), M111 010496.
- (30) Kim, J. M.; Kim, J.; Kim, Y. H.; Kim, K. T.; Ryu, S. H.; Lee, T. G.; Suh, P. G. Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. *J. Cell Physiol.* **2013**, *228* (1), 216–24.
- (31) Kristensen, L. P.; Chen, L.; Nielsen, M. O.; Qanie, D. W.; Kratchmarova, I.; Kassem, M.; Andersen, J. S. Temporal profiling and pulsed SILAC labeling identify novel secreted proteins during ex vivo osteoblast differentiation of human stromal stem cells. *Mol. Cell Proteomics* **2012**, *11* (10), 989–1007.
- (32) Stenberg, J.; Ruetschi, U.; Skjoldbrand, E.; Karrholm, J.; Lindahl, A. Quantitative proteomics reveals regulatory differences in the chondrocyte secretome from human medial and lateral femoral condyles in osteoarthritic patients. *Proteome Sci.* **2013**, *11* (1), 43.
- (33) Piersma, S. R.; Fiedler, U.; Span, S.; Lingnau, A.; Pham, T. V.; Hoffmann, S.; Kubbutat, M. H.; Jimenez, C. R. Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (4), 1913–22.
- (34) Eichelbaum, K.; Winter, M.; Berriel Diaz, M.; Herzig, S.; Krijgsveld, J. Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30* (10), 984–90.
- (35) Schumacher, B. L.; Block, J. A.; Schmid, T. M.; Aydelotte, M. B.; Kuettner, K. E. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311* (1), 144–52.
- (36) Flannery, C. R.; Hughes, C. E.; Schumacher, B. L.; Tudor, D.; Aydelotte, M. B.; Kuettner, K. E.; Caterson, B. Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *254* (3), 535–41.
- (37) Rhee, D. K.; Marcelino, J.; Baker, M.; Gong, Y.; Smits, P.; Lefebvre, V.; Jay, G. D.; Stewart, M.; Wang, H.; Warman, M. L.; Carpten, J. D. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115* (3), 622–31.
- (38) Elsaid, K. A.; Jay, G. D.; Warman, M. L.; Rhee, D. K.; Chichester, C. O. Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52* (6), 1746–55.
- (39) Klein, T. J.; Schumacher, B. L.; Blewis, M. E.; Schmidt, T. A.; Voegtline, M. S.; Thonar, E. J.; Masuda, K.; Sah, R. L. Tailoring secretion of proteoglycan 4 (PRG4) in tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (6), 1429–39.
- (40) Niikura, T.; Reddi, A. H. Differential regulation of lubricin/superficial zone protein by transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein superfamily members in articular chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **2007**, *56* (7), 2312–21.
- (41) Ruan, M. Z.; Erez, A.; Guse, K.; Dawson, B.; Bertin, T.; Chen, Y.; Jiang, M. M.; Yustein, J.; Gannon, F.; Lee, B. H. Proteoglycan 4 expression protects against the development of osteoarthritis. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5* (176), 176ra34.
- (42) Lohmander, L. S.; Hoernner, L. A.; Dahlberg, L.; Roos, H.; Bjornsson, S.; Lark, M. W. Stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury. *J. Rheumatol.* **1993**, *20* (8), 1362–8.
- (43) Martel-Pelletier, J.; McCollum, R.; Fujimoto, N.; Obata, K.; Cloutier, J. M.; Pelletier, J. P. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* **1994**, *70* (6), 807–15.
- (44) Kevorkian, L.; Young, D. A.; Darrah, C.; Donell, S. T.; Shepstone, L.; Porter, S.; Brockbank, S. M.; Edwards, D. R.; Parker, A. E.; Clark, I. M. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50* (1), 131–41.
- (45) Steck, E.; Benz, K.; Lorenz, H.; Loew, M.; Gress, T.; Richter, W. Chondrocyte expressed protein-68 (CEP-68), a novel human marker gene for cultured chondrocytes. *Biochem. J.* **2001**, *353* (Pt2), 169–74.
- (46) Kamiya, N.; Watanabe, H.; Habuchi, H.; Takagi, H.; Shinomura, T.; Shimizu, K.; Kimata, K. Versican/PG-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (4), 2390–400.
- (47) Choocheep, K.; Hatano, S.; Takagi, H.; Watanabe, H.; Kimata, K.; Kongtawelert, P. Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (27), 21114–25.
- (48) Luo, G.; Ducey, P.; McKee, M. D.; Pinero, G. J.; Loyer, E.; Behringer, R. R.; Karsenty, G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **1997**, *386* (6620), 78–81.
- (49) Chen, F. H.; Thomas, A. O.; Hecht, J. T.; Goldring, M. B.; Lawler, J. Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (38), 32655–61.
- (50) Morozzi, G.; Fabroni, M.; Bellisai, F.; Pucci, G.; Galeazzi, M. Cartilage oligomeric matrix protein level in rheumatic diseases: potential use as a marker for measuring articular cartilage damage and/or the therapeutic efficacy of treatments. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2007**, *1108*, 398–407.
- (51) Fickert, S.; Fiedler, J.; Brenner, R. E. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6* (5), R422–32.
- (52) Legg, J.; Jensen, U. B.; Broad, S.; Leigh, I.; Watt, F. M. Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development* **2003**, *130* (24), 6049–63.

### Artículo III. Caracterización de marcadores lipídicos del proceso de condrogénesis mediante MS Imaging

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas que representan una importante fuente de energía y de almacenamiento en el organismo. Son los componentes estructurales mayoritarios de las membranas biológicas y actúan como transportadores de proteínas. Además, estas moléculas parecen intervenir en la regulación del proceso de condrogénesis. De hecho, se ha descrito que una reducción en la síntesis de colesterol suprime el crecimiento del hueso en longitud y la condrogénesis de la placa de crecimiento, y, se ha publicado recientemente el efecto positivo del enzima ceramidasa (cuya función es producir esfingosina a partir de la ceramida) en la condrogénesis de las MSCs obtenidas de médula ósea.

Por otro lado, el desarrollo y avance de nuevas tecnologías, como la técnica MS Imaging ha posibilitado el estudio a gran escala de los lípidos, o lipidómica. Debido a ello, en este trabajo nos planteamos identificar y localizar los lípidos implicados en el proceso de condrogénesis empleando MS Imaging, una técnica que permite no sólo detectar e identificar multitud de moléculas sobre secciones de tejido, sino también visualizar la distribución espacial de las mismas.

Para hacer este estudio mediante MS Imaging se trabajó con MSCs obtenidas de médula ósea de pacientes con artrosis. Las MSCs aisladas se expandieron durante varias semanas y se cultivaron en micromasas durante 14 días para inducir el proceso de condrogénesis. Seguidamente, las micromasas recogidas a los días 2 y 14 de la condrogénesis se embebieron en gelatina y se seccionaron en cortes de 10  $\mu\text{m}$ . Los cortes obtenidos se depositaron sobre portaobjetos regulares y analizaron por duplicado mediante MALDI-MSI en los modos ión positivo y negativo. Para este análisis, los cortes se desecaron y se cubrieron con dos matrices diferentes, CHCA para el análisis de los lípidos en modo ión positivo y 9-AA para el modo ión negativo. Las diferentes determinaciones se realizaron en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-Q-TOF en el rango de masas de 100 a

1000 Da. Por otro lado, las mediciones mediante TOF-SIMS se realizaron sobre cortes recogidos en portaobjetos ITO y recubiertos con partículas de oro.

En el análisis realizado en modo positivo, los principales lípidos diferenciales entre los días 2 y 14 de la condrogénesis se identificaron en el rango de masas de 600 a 900 Da. Además, se detectaron otros lípidos específicos de cada una de las condiciones analizadas en rangos de masa inferiores. Un ejemplo es el de la fosfocolina ( $m/z$  184.1), presente principalmente en las micromasas recogidas a los dos días del inicio de inducción de la condrogénesis. Por su parte, diferentes ácidos grasos, como el ácido araquidónico y el ácido  $\omega$ -3 docosahexaenoico, mostraron diferencias de abundancia entre los dos tiempos de condrogénesis analizados según los experimentos en modo ión negativo. En definitiva se identificaron un total de 20 lípidos distintos pertenecientes principalmente a dos clases de lípidos: fosfolípidos y esfingolípidos.

La distribución espacial de los lípidos en las micromasas se examinó mediante el programa Biomap. No fue posible determinar ningún patrón de localización específico dentro de la micromasa para ninguno de los lípidos. Por ello, y con el fin de encontrar posibles diferencias en la distribución de los mismos, decidimos analizar las secciones de micromasas mediante la tecnología SIMS, que es la única herramienta en MS Imaging que permite determinar la distribución de pequeñas moléculas a una mayor resolución espacial. El análisis TOF-SIMS reveló principalmente diferencias en la distribución espacial de la colina ( $m/z$  104.1) y la fosfocolina ( $m/z$  184.1) entre los dos tiempos de condrogénesis evaluados.

Los análisis de las micromasas procedentes de las MSCs mediante MS Imaging sugieren que el metabolismo de los lípidos interviene en el proceso condrogénico y demuestran la utilidad de las técnicas MS Imaging para identificar posibles marcadores condrogénicos.

APTARA	PMIC	pmic201400260	Dispatch: November 6, 2014	CE:
	Journal	MSP No.	No. of pages: 12	PE: XXXXX

Proteomics 2014, 00, 1–12

DOI 10.1002/pmic.201400260

1

## RESEARCH ARTICLE

## Characterization of lipidic markers of chondrogenic differentiation using mass spectrometry imaging

Beatriz Rocha<sup>1</sup>, Berta Cillero-Pastor<sup>2</sup>, Gert Eijkel<sup>2</sup>, Anne L. Bruinen<sup>2</sup>, Cristina Ruiz-Romero<sup>1,3</sup>, Ron M. A. Heeren<sup>2</sup> and Francisco J. Blanco<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII Proteomics Group, INIBIC – Hospital Universitario de A Coruña, A Coruña, Spain

<sup>2</sup> Biomolecular Imaging Mass Spectrometry (BIMS), FOM Institute AMOLF, Amsterdam, The Netherlands

<sup>3</sup> CIBER-BBN Instituto de Salud Carlos III, INIBIC-CHUAC, A Coruña, Spain

<sup>4</sup> RIER-RED de Inflamación y Enfermedades Reumáticas, INIBIC-CHUAC, A Coruña, Spain

Mesenchymal stem cells (MSC) are an interesting alternative for cell-based therapy of cartilage defects attributable to their capacity to differentiate toward chondrocytes in the process termed chondrogenesis. The metabolism of lipids has recently been associated with the modulation of chondrogenesis and also with the development of pathologies related to cartilage degeneration. Information about the distribution and modulation of lipids during chondrogenesis could provide a panel of putative chondrogenic markers. Thus, the discovery of new lipid chondrogenic markers could be highly valuable for improving MSC-based cartilage therapies. In this work, MS imaging was used to characterize the spatial distribution of lipids in human bone marrow MSCs during the first steps of chondrogenic differentiation. The analysis of MSC micromasses at days 2 and 14 of chondrogenesis by MALDI-MSI led to the identification of 20 different lipid species, including fatty acids, sphingolipids, and phospholipids. Phosphocholine, several sphingomyelins, and phosphatidylcholines were found to increase during the undifferentiated chondrogenic stage. A particularly detected lipid profile was verified by TOF secondary ion MS. Using this technology, a higher intensity of phosphocholine-related ions was observed in the peripheral region of the micromasses collected at day 14.

### Keywords:

Cartilage / Chondrogenesis / Lipids / MS imaging / Mesenchymal stem cells



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

**Correspondence:** Dr. Francisco J. Blanco García, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, C/ Xubias, 84, 15006-A Coruña, Spain

**Fax:** 34-981-176398

**E-mail:** fblagar@sergas.es

**Abbreviations:** 9-AA, 9 aminoacridine; AA, arachidonic acid; ASAH1, N-acylsphingosine amidohydrolase; BMSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cell; Cer, ceramide; DF1, first discriminant function; DA, discriminant analysis; DAG, diacylglycerols; DHA, docosahexaenoic acid; FA, fatty acid; hBMSC, human BMSC; MSC, mesenchymal stem cells; MSI, mass spectrometry imaging; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PL, phospholipid; RT, room temperature; SIMS, secondary ion MS; SPM, sphin-

Received: June 7, 2014

Revised: September 5, 2014

Accepted: October 20, 2014

## 1 Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells that have unique properties of self-renewal, proliferation, and potential for multilineage differentiation [1]. Although MSCs can be isolated from various adult mesenchymal tissues, currently they are typically extracted from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) or umbilical cords, and subsequently induced to differentiate into cell types, such as adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes [2]. Chondrogenesis is the process by which MSCs differentiate toward chondrocytes and begin secreting the molecules that form

gomyelin; SMPD1, sphingomyelin phosphodiesterase 1; SPHK1, sphingosine kinase 1

Colour Online: See the article online to view Figs. 1–4 in colour.

the cartilage extracellular matrix [3]. Because of their chondrogenic potential, MSCs have been recognized as promising candidates for cell-based therapies of cartilage defects [4].

Chondrogenesis includes mesenchymal cell condensation and chondrocyte differentiation, processes that are induced by the culture of MSCs in three-dimensional, high density aggregates (pellet or micromass culture) [5] with factors, such as transforming growth factor  $\beta$  [6]. The presence of these factors is one of the earliest signals in chondrogenic condensation [7]. Models of chondrogenesis based on BMSCs have been developed and characterized in an attempt to promote cell therapy-based strategies of cartilage repair [4,5]. However, the lack of knowledge on the precise molecular mechanisms participating in this differentiation process, as well as the absence of well-defined markers for chondrogenesis, have hindered achievement of satisfactory results [8].

Recent studies have highlighted the importance of lipid metabolism in the modulation of chondrogenesis. For example, the role of cholesterol in the regulation of growth plate chondrogenesis [9] and skeletal development [10] was recently established. Other studies found a positive effect of acid ceramidase (an essential compound to maintain the metabolic balance of several important bioactive lipids, such as ceramide or sphingosine) on the chondrogenesis of BMSCs [11]. Other reports indicate that there is a close association between altered lipid metabolism and cartilage degenerative diseases, such as osteoarthritis (OA) [12], which has recently been found to be related to hypercholesterolemia [13] and altered levels of phospholipids in the synovial fluid [14]. Thus, the global analysis of lipidic modulations during chondrogenesis might provide important information on the molecular mechanisms participating in this process.

The large-scale study of lipids, lipidomics, has captured the attention of the scientific community in recent years because of the potential value of its use for discovery of novel biomarkers, signaling pathway relationships, or disease molecular mechanisms [15, 16]. Technological progress has also facilitated the emergence of this new field of research, providing innovative possibilities for the structural analysis of lipids and their role in cellular metabolism. MS imaging (MSI) is a high-throughput technique for determining and visualizing the spatial distribution of biomolecules in thin tissue sections [17]. Direct MSI analyses of tissue sections can obtain biomolecular profiles from very small samples with little tissue disruption. These techniques include MALDI, secondary ion MS (SIMS), desorption electrospray ionization, and others.

In the present study, we employed both MALDI-MSI and TOF-TOF-SIMS for the identification and localization of lipids in a model of chondrogenesis developed in our laboratory [18]. This model of three-dimensional human BMSC cultures (micromasses) has recently shown potential usefulness to promote repair of articular cartilage defects in a cell therapy-based strategy [19]. We had already performed a comprehensive analysis of the intracellular and extracellular protein modulations in this model at days 2 and 14 of chondrogenesis

[20,21]. The further definition of characteristic differential lipidic profiles in this model of chondrogenesis will be valuable for the discovery of novel markers of chondrogenesis.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals and materials

Gelatin,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 9-aminoacridine (9-AA), and PEG were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Water, ACN, ethanol, methanol, and TFA were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands).

### 2.2 Samples procurement and processing

Bone marrow samples were obtained as trabecular bone biopsy specimens from femoral heads of consenting donors undergoing total hip replacement at the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. The study was approved by the Ethics Committee of Galicia. Human BMSCs (hBMSCs) isolated from three donors (68–84 years old) were used for this study. Following hBMSCs isolation and expansion, chondrogenic differentiation was achieved using the previously described micromass three-dimensional culture system [20]. Micromasses were collected at 2 and 14 days of chondrogenic differentiation and embedded in 10% gelatin. Samples were then cut into 10  $\mu$ m thickness sections using a cryostat (Leica Microsystems, Barcelona, SP) and placed on conventional microscope slides for MALDI imaging or on 25 mm  $\times$  50 mm  $\times$  1.1 mm indium tin oxide high conductivity slides (Delta Technologies, CO, USA) with a specific surface resistance of 4–8  $\Omega$  for TOF-SIMS measurements. The slides were then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Two sections of micromasses for each time-point of chondrogenesis from each of three donors were analyzed in both positive and negative ion approaches by MALDI-MSI. TOF-SIMS experiments were performed in the positive ion mode.

### 2.3 Matrix application

Before matrix application, slides were first placed in a desiccator box at  $4^{\circ}\text{C}$  and defrosted for 10 min, and then placed inside a vacuum desiccator at room temperature (RT) for 20 min to prevent molecular delocalization. For positive ion mode MALDI-MSI experiments, CHCA matrix solution was prepared at 10 mg/mL in 70% methanol and 30%  $\text{H}_2\text{O}$  containing 0.2% TFA. A 9-AA matrix solution at a final concentration of 10 mg/mL was prepared in 70% ethanol and 30%  $\text{H}_2\text{O}$  and used for the negative ion mode MALDI-MSI analysis. Micromass sections were homogeneously covered by the matrix solution using a vibrational sprayer (ImagePrep; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Briefly, the coating step consisted of 45 cycles was repeated three times. Each cycle contained three phases in which a matrix layer was added by a spray of



20 s followed by 20 s of incubation time and 30 s of drying time (influx of nitrogen). The glass slide was turned 180° after each coating step of 45 cycles.

## 2.4 MALDI-MSI

Tissue sections were optically scanned prior to MALDI-MSI experiments using a 2400 dots per inch desktop scanner (HP, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The resulting images were imported into the MALDI Imaging Pattern Creator software (Waters Corporation, Manchester, UK). The samples were then analyzed by a MALDI-Q-TOF SYNAPT HDMS instrument (Waters) equipped with a 200-Hz Nd:YAG laser. The data were acquired in the positive and negative V-reflection mode with a 100  $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  raster size (100  $\mu\text{m}$  pixel size), within the 100–1000  $m/z$  range. Instrument calibration was performed using a standard calibration mixture of PEG (An equimolar mixture of PEG 100, PEG 400, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000, and PEG 3000, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) with a MW range of 100–3000 Da. Data were visualized using Biomap 3.7.5.5 software (Novartis Pharma, Basel, Switzerland). MS data were normalized according to the TIC per spectrum to eliminate variations in the ionization efficiency or matrix deposition. Peak average intensities were calculated for each mass of interest.

## 2.5 Multivariate statistical analysis and data interpretation following MALDI-MSI

PCA and discriminant analysis (DA), were used to search for spectral similarities and differences between the samples using an in-house built ChemoneTricks toolbox for MATLAB version 2011b (The MathWorks, Natick, Massachusetts). The MS raw data were first converted to the MATLAB format, followed by spectral binning to 0.1 Da bins for MALDI and 0.05 Da bins for TOF-SIMS. Peak picking was performed with the in-house built PEAPI software [22]. DA was performed employing the double-stage PCA approach [23]. All on-pellet spectra were included in the analysis. The number of principal components used as input for DA for MALDI was limited to one quarter of the total number spectra to prevent overfitting of the DA model. For TOF-SIMS the highest ranked principal components that account for 80% of the variance were selected as input for DA. DA was utilized to select the peaks with the highest differences between the micromasses at day 2 and 14 of chondrogenesis. A specific group number (1 for day 2 samples and 2 for day 14 samples) was assigned to the spectra from each time of chondrogenesis. DA was performed on this data. To determine the reproducibility on a per donor level, a second group layout was created in which the spectra from each individual donor/day combination were assigned a unique group number (donor1 day2: group 1; donor1 day2: group 2; donor2 day2: group 3 etc.). After data analysis,  $m/z$  values of interest were selected for further identification.

## 2.6 Lipid identification by MS/MS analysis

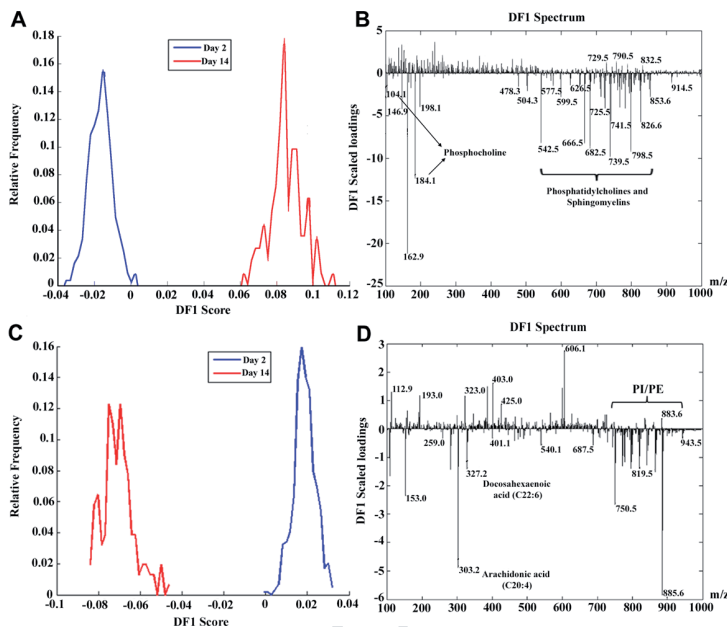
Lipid identification was performed in both positive and negative ion modes using a MALDI-Q-TOF SYNAPT HDMS system (Waters) after completing MALDI-MSI experiments on different micromass slices. Lipid ion precursors were selected within a 1 Da selection window and fragmented using 20–30 V collision energy applied in the trap cell. The obtained spectra were processed using MassLynx software (Waters). The MS/MS fragmentation pattern from each selected mass was used to identify the lipids of interest and to assign them to previously classified lipid- $m/z$  identifications in the LIPID Metabolites and Pathways Strategy Structure Database (LMSD) [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org), and from relevant literature.

## 2.7 TOF-SIMS acquisition and processing

Slides were defrosted and dried in a vacuum desiccator at RT for 20 min, followed by gold coating using a Quorum Technologies (Newhaven East Sussex, UK) SC7460 sputter coater equipped with a FT707 quartz crystal microbalance stage and a FT690 film thickness monitor to deposit a 2 nm gold layer. TOF-SIMS experiments were performed on a Physical Electronics TRIFTII (Eden Prairie, Minnesota, USA) TOF-SIMS equipped with a 22 KeV energy (2–3 nA) current  $\text{Au}^{1+}$  primary ion beam. Image areas of 1.8 mm  $\times$  1.8 mm were acquired as a mosaic of 32  $\times$  32 tiles, each containing 256  $\times$  256 pixels. The raster size was set at 56  $\mu\text{m}$  and the acquisition time was 63.8 s per tile. The data were visualized using WinCandence software version 4.4.0.17 (Physical Electronics, Chanhassan, MN, USA).

## 2.8 Real-time PCR assays

Total RNA from MSC pellet cultures at 2 and 14 days was extracted using the Trizol L.S. reagent (Invitrogen, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions. Between three and five micromasses per donor were employed for this analysis. A total of 1  $\mu\text{g}$  RNA was used for the first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis using the SuperScript<sup>®</sup> VILO cDNA Synthesis kit (Life Technologies). The reverse transcription (RT) reaction was performed in a 10  $\mu\text{L}$  reaction volume containing SuperScript<sup>®</sup> VILO<sup>™</sup> Mastermix (2  $\mu\text{L}$ ) and the RNA (8  $\mu\text{L}$ ) at 25°C for 10 min, followed by 60 min at 42°C and 5 min at 85°C to inactivate the enzyme. Quantitative real-time PCR was performed to assess the expression of the three enzymes involved in sphingomyelin metabolism (SMPD1, N-acylsphingosine amidohydrolase (ASAHI), and SPHK1). All reactions were performed in 96-well plates using the LightCycler 480 instrument (Roche, Basel, Switzerland). The reaction was carried out in a 20  $\mu\text{L}$  total volume containing 10  $\mu\text{L}$  of the LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master, 2.5  $\mu\text{L}$  of the RT reaction mixture, 0.7  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{M}$ ) of each primer, 0.2  $\mu\text{L}$  of probe



**Figure 1.** The spectra of all pellets collected at days 2 and 14 of chondrogenic differentiation after positive and negative MALDI-MSI were analyzed using PCA and discriminant analysis (DA) to classify specific lipids at each time point. (A and B) Histogram distribution and spectra loading plot of first discriminant function (DF1) scores after positive ion MALDI-MSI measurements. DF1 negative scores are specific to day 2 samples and positive scores to day 14 samples. In the low mass range of the spectra, the phosphocholine head group ( $m/z$  184.1) as well as a related ion at  $m/z$  198.1 are primarily detected at day 2. The higher frequency of mass peaks at day 2 in the mass range from 680 to 860 indicates a higher content of PCs and SMs at this time point. (C and D) Histogram distribution and spectra loading plot of DF1 scores obtained after negative ion MALDI-MSI measurements. DF1 negative scores are specific to micromasses collected at day 14 and positive scores to day 2 samples. In addition to unsaturated fatty acids ( $m/z$  303.2,  $m/z$  327.2), many phosphatidylethanolamines (PEs) and phosphatidylinositols (PIs) are very abundant in MSC pellets from day 14.

(10  $\mu$ M) and 5.9  $\mu$ L of water. The PCR program consisted of initial preincubation for activation of FastStart Taq DNA Polymerase and denaturation of DNA at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of at 95°C for 10 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 s. Primers for SMPD1, ASAH1, SPHK1, and RPL13A (housekeeping gene) were designed using the Universal Probe Library tool available at the Roche website (<http://www.roche-applied-science.com>). Calculation of the normalized relative expression levels at the two time points of chondrogenesis (14 days versus 2 days) was done using the qbasePLUS software version 1.5 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium). Normalization was carried out with the stably expressed ribosomal reference gene RPL13A validated using the genomPLUS module in qbasePLUS.

### 3 Results

#### 3.1 Positive MALDI-MSI analysis of the lipid composition of hBMSCs at days 2 and 14 of chondrogenesis

The experimental workflow followed in this work for the characterization of lipids in hBMSCs micromasses at different time points of chondrogenesis is described in Supporting Information Fig. 1.

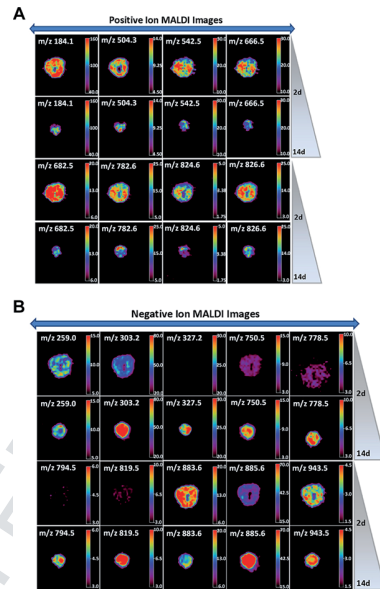
As indicated, we first analyzed the lipid composition of hBMSCs using MALDI-MSI in the positive ion mode. Thin micromass sections obtained from three patients were studied in duplicate. All 683 spectra acquired in the mass range



100–1000 Da were analyzed by PCA and DA. As illustrated in the frequency plot of Fig. 1A, the first discriminant function (DF1) separated the data into two groups corresponding to day 2 and day 14 of chondrogenesis. The discriminant loading spectra for Fig. 1A displayed-specific masses at each time point (Fig. 1B). The positive fraction of masses indicated the specific molecular profile expressed at day 14 of chondrogenesis, whereas the peaks of the negative fraction were specific for the micromasses collected at day 2. The negative part of the graph was mainly dominated by many peaks with a high loading in the mass range of 600–900, such as  $m/z$  682.5,  $m/z$  739.5, and  $m/z$  798.5, at which the phospholipids (PLs) and sphingolipids are typically visualized by MALDI-MSI. In the low mass range we observed some other specific peaks as major discriminating masses from the negative fraction, such as choline at  $m/z$  104.1, phosphate-related ions at  $m/z$  146.9 and 162.9, phosphocholine at  $m/z$  184.1, and a phosphocholine-related ion at  $m/z$  198.1. On the other hand, positive loading spectra revealed a low lipid signal. In fact, only the masses  $m/z$  729.5,  $m/z$  790.5, and  $m/z$  832.5 were specific of day 14 samples. Statistical analyses were performed on the three biological replicates independently and achieved highly reproducible results among donors (Supporting Information Fig. 2).

### 3.2 Negative MALDI-MSI analysis of the lipid composition of hBMSCs at days 2 and 14 of chondrogenesis

Ion suppression in MALDI-MSI is a well-known process demonstrated among lipid classes. In fact, phosphatidylcholines (PCs) and sphingomyelins (SMs) can prevent the detection of other phospholipids present in the sample when using the positive ion mode. Aside from that, many lipids, including some classes of phospholipids and acidic sphingolipids (sulfatides), preferentially ionize in the negative ion mode [24]. For this reason, micromass sections were also assessed in the negative ion mode by MALDI-MSI. A total of 745 spectra were analyzed by the statistical methods mentioned above. After DA, two groups corresponding to the undifferentiated and differentiated stage were clearly distinguishable in the negative ion mode. Moreover, DF1 scores had a different distribution in day 2 and day 14 samples; this indicates a characteristic lipid profile for each chondrogenic time point (Fig. 1C). The DF1 spectrum revealed specific masses from day 2 (positive loadings) and day 14 micromasses (negative loadings) (Fig. 1D). Some examples of 14 day-specific peaks were unsaturated fatty acids (FA) such as  $m/z$  303.2 corresponding to arachidonic acid (AA) (C20:4) and  $m/z$  327.2 linked to  $\omega$ -3 docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6). Other masses detected in the mass range of phospholipids (600–900),  $m/z$  750.5,  $m/z$  819.5, and  $m/z$  885.6, also increased in the micromasses collected at day 14 according to the DA. On the other hand, several peaks specifically increasing at day 2 of chondrogenesis,  $m/z$  323.0,  $m/z$  403.0, and  $m/z$  606.1, represent new markers of the undifferentiated stage.



**Figure 2.** Spatial mapping of lipid-positive (A) and negative (B) ions in micromass sections. (A) Distribution in ascending mass range of lipids ions: phosphocholine at  $m/z$  184.1; a fragment from phosphatidylcholine (PC) (16:0/18:1) at  $m/z$  504.3; fragments from sphingomyelin (SM) (d18:1/16:0) at  $m/z$  542.5 and  $m/z$  666.5; SM (d18:1/16:0- $N(CH_3)_3$ ) at  $m/z$  682.5; and several PCs, PC (16:0/18:1) at  $m/z$  782.6, PC (36:2) at  $m/z$  824.5 and PC (18:0/18:1) at  $m/z$  826.6, obtained after positive ion MALDI-MSI analysis and detected by TOF secondary ion MS (TOF-SIMS). (B) Distribution in ascending mass range of lipids ions: inositol monophosphate [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  259.0; arachidonic acid [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  303.2; docosahexaenoic acid [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  327.2; phosphatidylethanolamine (PE) (18:0/20:4) [M-H]<sup>-</sup> at 750.5; sulfatide (ST) (d18:1/16:0) [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  778.5; PE (18:0/22:4) [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  794.5; phosphatidylglycerol (PG) (18:1/22:6) at  $m/z$  819.5; phosphatidylinositol (PI) (18:1/20:4) [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  883.6; PI (18:0/20:4) [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  885.6 and PI (42:3) [M-H]<sup>-</sup> at  $m/z$  943.5. Scale bar show normalized intensities. Scale size 900  $\mu$ m. ■  $m/z$  = mass/charge.

### 3.3 Visualization of lipid distribution in hBMSCs at days 2 and 14 of chondrogenesis

The intensity and the spatial distribution of the lipid species recorded by MALDI-MSI in the micromasses collected at days 2 and 14 of chondrogenesis were examined using Biomap software (Fig. 2). First, we imaged some of the positive ion peaks obtained after doing the DA in days 2 and 14 samples

(Fig. 2A) and observed a difference in the normalized intensity of these peaks. For example, we observed higher intensities of phosphocholine ( $m/z$  184.1) and some SM fragments, such as  $m/z$  542.5 and  $m/z$  666.5, in the micromasses collected on day 2. The PC signals at  $m/z$  782.6,  $m/z$  824.6, and  $m/z$  826.6 showed the same pattern of differences when days 2 and 14 samples were compared. The distribution and intensities of all the identified lipid species in the positive ion mode are summarized in Supporting Information Fig. 3. In addition, ten negative lipid species were also visualized in the two conditions (Fig. 2B). In these cases, the intensity of  $m/z$  values corresponding to AA ( $m/z$  303.2) and DHA ( $m/z$  327.2) was higher in the micromasses collected at day 14 than in the day 2 samples. This analysis also confirmed the predominant expression of the PLs,  $m/z$  750.5,  $m/z$  794.5,  $m/z$  883.6, and 943.5, at day 14 of chondrogenesis.

However, the different distributions of positive lipid species and negative lipid species did not allow us to characterize specific inner areas within the micromass sections.

### 3.4 Structural characterization of lipid ions by tandem mass spectrometry revealed a differential lipid profile in hBMSCs during chondrogenesis

After statistical analysis, the  $m/z$  values with the highest loadings were selected for identification of the lipid structure. MALDI-MS/MS profiling experiments were performed directly on the micromass sections under the experimental conditions described in Materials and methods. The lipid assignment for each selected peak and the chondrogenic time point at which it was mainly expressed are summarized in Table 1. The  $m/z$  values in Table 1 are listed in order of their mass range. The assignment of  $m/z$  values was based on the bibliography and the Lipidmaps.org database. Contrary to the positive ion mode, where lipids can be protonated ( $[M+H]^+$ ) or cationized by sodium ( $[M+Na]^+$ ) or potassium ( $[M+K]^+$ ), the negative mode mainly leads to the detection of deprotonated  $[M-H]^-$  ion species, allowing easier attribution of lipids.

In total, 37 ion peaks were identified in positive and negative ion modes. Most of the ion peaks detected in the positive ion mode were attributable to PC and SM lipid classes. Six different PC species were identified. With the exception of  $m/z$  790.5 [related to PC (C18:0/C18:0)] and  $m/z$  832.5 [corresponding to PC (C18:0/C20:4)] that were increased at day 14 of chondrogenesis, all PC masses were more abundant in day 2 samples. Among the five different identified SMs, only SM (d18:1/18:1), detected at  $m/z$  729.5, was 14 day-specific. In addition to the intact lipid species, four fragments of PC (C16:0/C18:1) and two fragments of SM (d18:1/C16:0) were identified. Other peaks, like phosphocholine ( $m/z$  184.1) and a phosphocholine-related ion ( $m/z$  198.1), were also increased in the micromasses collected at day 2, as mentioned above. Supporting Information Fig. 4A presents the MS/MS spectrum of  $m/z$  725.5, already assigned

to SM d18:1/C16:0 [25], obtained after the positive-profiling experiments. The CID spectrum of this precursor showed three characteristic fragment ion signals at  $m/z$  264.3,  $m/z$  542.5, and  $m/z$  666.5. The  $m/z$  264.3 fragment ion corresponds to sphingosine base, whereas the  $m/z$  542.5 and  $m/z$  666.5 correspond to the loss of phosphocholine (184 Da) and trimethylamine (59 Da) from the SM precursor. The product ion spectrum of the precursor ion  $m/z$  739.5 (Supporting Information Fig. 4B) was also recorded on the micromass sections. In the negative ion mode, 11 different ion peaks were identified by the MALDI-MS/MS measurements. Almost all were predominantly expressed in the micromasses collected at day 14 and were mainly attributed to the PI and phosphatidylethanolamine (PE) lipid classes. The ions  $m/z$  750.5 and  $m/z$  794.5 belong to PEs, whereas the signals at  $m/z$  883.6,  $m/z$  885.6, and  $m/z$  943.5 correspond to PIs. The ion peak  $m/z$  778.5 is attributable to a sulfatide while that of  $m/z$  819.5 is a phosphatidylglycerol (PG) (Table 1). Supporting Information Fig. 4C shows the fragment ion spectrum of  $m/z$  819.5 (PG C18:1/C22:6) obtained after profiling in the negative ion experiments. The assignment of the FA chain lengths was confirmed by the signals at  $m/z$  281.2, which corresponds to oleic acid (C18:1), and  $m/z$  327.2 attributable to DHA (C22:6). Finally, dehydrated phosphoglycerol ( $m/z$  153), a fragment ion commonly found in PLs, was detected. The identification of the  $m/z$  885.6 precursor ion is shown in Supporting Information Fig. 4D. The mass peaks of  $m/z$  241 and  $m/z$  223 confirm the presence of the phosphoinositol head group, whereas the  $m/z$  283 and  $m/z$  303 fragment ions correspond to the stearic FA (C18:0) and arachidonic FA (C20:4), respectively. The assignment of the FA chain lengths was confirmed by the ion peaks  $m/z$  581 and  $m/z$  601. Finally, the fragment ion at  $m/z$  419 is related to the loss of the inositol head group (162 Da) plus the FA C20:4 chain.

### 3.5 Differential lipid profiles by TOF-SIMS analysis of hBMSCs at days 2 and 14 of chondrogenesis

Traditional TOF-SIMS instruments have limited mass resolution, lack of sensitivity to detect compounds (or metabolites) within the mass range over 1000 Da and they are incompatible with MS/MS analyses. However, recent progress in TOF-SIMS instrumentation has developed modern TOF-SIMS with MS/MS capabilities [26, 27]. SIMS is a unique tool for high spatial resolution MSI of elements and small organic molecules on biological tissues [28]. For this reason and because of the differences in ionization could give extra information on the molecular profiles, we decided to analyze the micromass sections by using this technology. After TOF-SIMS measurements in the positive ion mode, PCA and DA were applied to ascertain the specific masses differentially expressed between the two time points analyzed. The lipid profile of hBMSCs obtained by statistical analysis is shown in Table 2. Notably, we were able to validate a group of lipids, also found by MALDI-MSI, mostly increased at day 2:

**Table 1.** Lipid profiles of hBMSCs undergoing chondrogenesis after MALDI-MSI analysis

<i>m/z</i> value <sup>a)</sup>	Lipid assignment <sup>b)</sup>	Designation <sup>c)</sup>	Condition <sup>d)</sup>
104.1	Choline	[M+H] <sup>+</sup>	Day 2
146.9	Sodiated headgroup of PC	[M+Na] <sup>+</sup>	Day 2
153.0	Dehydrated phosphoglycerol	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
162.9	Potassiated headgroup of PC	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
184.1	Phosphocholine	[M+H] <sup>+</sup>	Day 2
198.1	Phosphocholine-related ion	[M+H] <sup>+</sup>	Day 2
259.0	Inositol monophosphate	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
303.2	Arachidonic acid (C20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
327.2	Docosahexaenoic acid (C22:6)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
478.3	Fragment from <i>m/z</i> PC (16:0/18:1)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
504.3	Fragment from <i>m/z</i> PC (16:0/18:1)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
542.5	Fragment from <i>m/z</i> SM (d18:1/16:0)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
577.5	Fragment from <i>m/z</i> PC (16:0/18:1)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
599.5	Fragment from <i>m/z</i> PC (16:0/18:1)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
666.5	Fragment from <i>m/z</i> SM (d18:1/16:0)	[M+Na] <sup>+</sup>	Day 2
682.5	SM (d18:1/16:0-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
723.5	SM (d18:1/16:1)	[M+Na] <sup>+</sup>	Day 2
725.5	SM (d18:1/16:0)	[M+Na] <sup>+</sup>	Day 2
729.5	SM (d18:1/18:1)	[M+H] <sup>-</sup>	Day 14
739.5	PC (16:0/18:1-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
741.5	SM (d18:1/16:0)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
750.5	PE (18:0/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
767.5	SM (d18:1/19:0) or SM(d18:1/18:1)	[M+Na] <sup>+</sup> or [M+K] <sup>+</sup>	Day 2
778.5	ST (d18:1/16:0)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
782.6	PC (16:0/18:1)	[M+Na] <sup>+</sup>	Day 2
790.5	PC (18:0/18:0)	[M+H] <sup>-</sup>	Day 14
794.5	PE (18:0/22:4)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
798.5	PC (16:0/18:1)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
800.5	PC (34:0)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
819.5	PG (18:1/22:6)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
824.5	PC (36:2)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
826.6	PC (18:0/18:1)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
832.5	PC (18:4/20:0)	[M+Na] <sup>+</sup>	Day 14
853.6	SM (d18:1/24:0)	[M+K] <sup>+</sup>	Day 2
883.6	PI (18:1/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 2
885.6	PI (18:0/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14
943.5	PI (42:3)	[M-H] <sup>-</sup>	Day 14

The specific positive and negative *m/z* values, with the highest discriminant function loadings at days 2 and 14 of chondrogenic differentiation are summarized.

hBMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; MALDI-MSI, matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging; PC, phosphatidylcholine, SM, sphingomyelin, PE, phosphatidylethanolamine, ST, sulfatide, PG, phosphatidylglycerol, and PI, phosphatidylinositol.

a) *m/z* values identified after tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis.

b) Assignments of *m/z* values according to MS/MS analysis, bibliography and Lipmaps.org database.

c) Adduct ions observed in the collision-induced dissociation (CID) mass spectrum.

d) Chondrogenic time point at which the lipid species are mainly expressed.

including phosphocholine, some lipid fragments (*m/z* 504.3, *m/z* 542.5, and *m/z* 666.5) and some PC and SM species (*m/z* 682.5, *m/z* 782.6, *m/z* 824.5, and *m/z* 826.6) previously detected by MALDI-MSI. In addition, we found an important number of *m/z* values in the mass range of 300–600. All of these were predominantly expressed in the differentiation stage and were mainly attributable to monoacylglycerols (*m/z* 313.4, *m/z* 339.4, and *m/z* 341.4), diacylglycerols (DAGs) (*m/z* 551.6, *m/z* 575.7, *m/z* 579.7, *m/z* 603.7, *m/z* 605.7, and *m/z* 607.8) and ceramide lipid classes (*m/z* 576.7 and *m/z* 604.8).

### 3.6 Different localization of phosphocholine-related ions

Several attempts have been made to improve the spatial resolution of MALDI imaging, including oversampling [29], laser modulation [30] and solvent-free sublimation matrix application techniques [31]. In fact, MALDI-MSI instrumentation can usually achieve a spatial resolution of 10  $\mu\text{m}$  [32]. In addition, detailed information on lipids in different anatomical areas of tissues can be obtained by MALDI-MSI, although single cell or intracellular assessments can not be performed. In

**Table 2.** Lipid profiles of hBMSCs undergoing chondrogenesis after TOF-SIMS analysis

<i>m/z</i> value <sup>a)</sup>	Lipid assignment <sup>b)</sup>	Condition
184.1	Phosphocholine	Day 2
313.4	MAG (16:0)	Day 14
339.4	MAG (18:1)	Day 14
341.4	MAG (18:0)	Day 14
504.3	Fragment from <i>m/z</i> PC (16:0/18:1)	Day 2
542.5	Fragment from <i>m/z</i> SM (d18:1/16:0)	Day 2
551.6	DAG (32:0)	Day 14
575.7	DAG (34:2)	Day 14
576.7	Cer (d18:1/20:0)	Day 14
579.7	DAG (34:0)	Day 14
603.7	DAG (36:2)	Day 14
604.8	Cer (d18:1/22:0)	Day 14
605.7	DAG (36:1)	Day 14
607.8	DAG (36:0)	Day 14
666.5	Fragment from <i>m/z</i> SM (d18:1/16:0)	Day 2
682.5	SM (d18:1/16:0-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	Day 2
782.6	PC (16:0/18:1)	Day 2
824.5	PC (36:2)	Day 2
826.6	PC (18:0/18:1)	Day 2

hBMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; TOF-SIMS, time-of-flight secondary ion mass spectrometry; PC, phosphatidylcholine, SM, sphingomyelin, MAG, monoacylglycerol, DAG, diacylglycerol, Cer, Ceramide.  
 a) *m/z* values with the highest discriminant function loadings selected after discriminant analysis (DA).  
 b) Tentative assignments according to the Lipidmaps.org database and lipid literature.

our study, the localization of the lipid ions after MALDI-MSI measurements was similar in micromasses collected at days 2 and 14 of chondrogenesis; we were unable to detect lipid ions with a different distribution profile between the samples, primarily because of the small size of the micromasses (1–2 mm).

SIMS is utilized for very high spatial resolution MSI, as mentioned above. In fact, the lateral resolution of TOF-SIMS can be less than 1 μm [33]. Therefore, the application of TOF-SIMS could reveal some variations in the lipid localization between the two time points of chondrogenesis. The choline signal (*m/z* 104.1) and the phosphocholine (*m/z* 184.1) signals, measured in the positive ion mode, were homogeneously distributed in the membrane of the cells throughout the micromass sections at day 2 (Fig. 3). However, in the micromasses collected at day 14, phosphocholine-related ions were more abundant in the peripheral cells, suggesting a more advanced differentiation of the cells situated in the micromass core. This analysis showed the intrasample heterogeneity in the 14 days samples.

### 3.7 SPHK1 expression is increased at day 14 of chondrogenesis

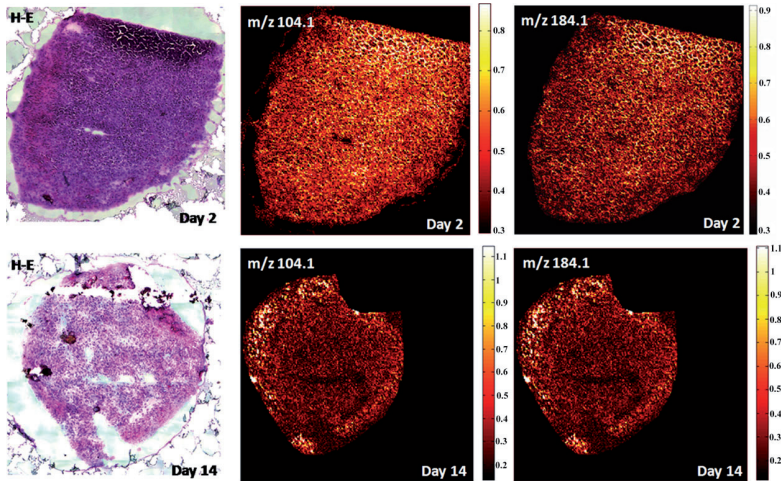
To further investigate the low detection of SMs intact species in the micromasses of hBMSCs undergoing chondrogenesis,

we performed real-time PCR analyses on samples from six independent differentiation experiments using hBMSCs of additional donors, at days 2 and 14. The analyses included the quantitative assessment of gene expression of three enzymes involved in the SM metabolism (Fig. 4), such as sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1, responsible for cleaving SM into phosphocholine and ceramide), N-acylsphingosine amidohydrolase, or acid ceramidase 1 (ASAH1, involved in the generation of sphingosine from ceramide), and sphingosine kinase 1 [SPHK1, which phosphorylates sphingosine to sphingosine-1-phosphate (S1P)]. As shown in Fig. 4, a clear upregulation (4.74-fold) was found for SPHK1 ( $p < 0.05$ ) at day 14 when compared to day 2. Upregulations of ASAH1 and SMPD1 were also detected, although in these cases the results showed a tendency, but were not significant ( $p < 0.1$ ). Taken together, these data suggest an increased activity of this pathway, which might enhance SM degradation during chondrogenesis.

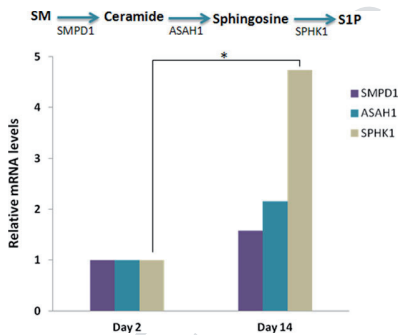
## 4 Discussion

Among the different mass spectrometry imaging techniques, MALDI-MSI is the highest performing MSI tool currently available in terms of sensitivity for intact biomolecules and mass range. It has rapidly developed in the biomedical field, particularly in the investigation of tissues from colon [34], breast [35], and prostate [36] cancers. Investigating rheumatology disorders, MALDI-MSI has been recently employed for the study of osteoarthritic (OA) cartilage [37, 38]. An alternative technique, TOF-SIMS, provides better spatial resolution than MALDI and its application in the biomedical field has also been capitalized upon [39]. As with MALDI, healthy, and OA cartilages have been also subjected to TOF-SIMS analysis, the results of which has specifically localized cholesterol and FAs in the superficial area of OA tissue [40]. In the present study, we combined these two MSI technologies to analyze the lipid distribution of MSCs during chondrogenic differentiation.

The distribution of lipids has previously been examined in adipose [41], bone [42] and cartilage [40] tissues using MSI technologies. Given the potential of these tools for gaining a better understanding of basic biology, MSI has also been increasingly applied in stem cell research. For example, multi-isotope imaging MS and TOF-SIMS have been employed to quantify stem cell division and metabolism in mice [43], and to characterize the distribution of strontium during the osteogenic differentiation of MSCs [44], respectively. However, to date, no MSI studies have specifically focused on those lipid modulations occurring during differentiation of MSCs toward chondrocytes, which have been reported to alter the chondrogenic phenotype [11], and to be essential for proper cartilage formation [9, 10]. This lack emphasizes the importance of studies on lipid modulations to better our understanding of the molecular processes that drive chondrogenesis.



**Figure 3.** High spatial resolution TOF-SIMS imaging of choline and phosphocholine in day 2 and 14 micromass sections. Choline and phosphocholine are more abundant in the cells situated in the peripheral zone of the micromasses collected at day 14. The corresponding H&E staining images are also shown.



**Figure 4.** Enzymes involved in the sphingomyelin metabolism pathway are increased at day 14 of chondrogenesis. Expression of sphingomyelin phosphodiesterase (SMPD1), N-acylsphingosine amidohydrolase (ASAH1), and sphingosine kinase 1 (SPHK1) was quantified by RT-PCR. The results were normalized to the expression of the housekeeping gene RPL13 and are presented as the mean of six independent experiments in duplicate (\* $p < 0.05$  relative to day 2). The SM pathway is illustrated at the top of the graphic. SM, sphingomyelin; S1P, sphingosine-1-phosphate.

Therefore, for the first time, we applied MSI technologies to characterize the lipid profile of hBMSCs during the early stages of chondrogenic differentiation. Among the lipid classes identified by MALDI-MSI, PCs, and SMs levels decreased during chondrogenic differentiation. Apart from their role as structural components of plasma membranes, the products of SM metabolism, such as ceramides, sphingosine, S1P, and DAGs, function as cellular signaling molecules, participating in cell growth, cell differentiation, and programmed cell death [45]. Thus, our data indicate that, during chondrogenesis, hBMSCs mobilize the SMs to produce the secondary metabolites necessary for differentiation toward chondrocytes. In addition, we found a significantly higher expression of the enzyme SPHK1 at day 14 compared with day 2 of chondrogenesis, this explains the low level of identification of intact SM species at day 14. The use of TOF-SIMS also enabled the detection of the presence of some PC ( $m/z$  782.6,  $m/z$  824.5, and  $m/z$  826.6) and SM fragments ( $m/z$  542.5 and  $m/z$  666.5) characteristic of the early stages of chondrogenesis. Moreover, TOF-SIMS analysis revealed the presence of some ceramide lipid species ( $m/z$  576.7 and  $m/z$  604.8) in the micromasses collected at day 14. The effect of ceramide on mesenchymal stem cell differentiation, such as adipogenesis [46] and chondrogenesis [11] has been already studied. The detection of ceramide correlates with the drop of SM levels at day 14 of chondrogenesis. For these reasons,



the loss of SMs during chondrogenesis may be used as a novel chondrogenic marker.

In addition, phosphocholine was preferentially identified at day 2 by both MSI techniques. Phosphocholine represents choline storage *in vivo* and is related to the size of the cell membrane [47]. We hypothesize that, after 14 days of chondrogenesis, the resulting chondrocyte-differentiating hBMSCs are smaller in size than noninduced hBMSCs because, during chondrogenesis, hBMSCs stop proliferating to begin differentiation into chondrocytes. Therefore, the decreased levels of phosphocholine during chondrogenesis could induce the synthesis of inositol- and ethanolamine-derived PLs that were detected by MALDI-MSI at day 14 of chondrogenic differentiation. Moreover, TOF-SIMS measurements indicate that phosphocholine-related ions are specifically localized in the peripheral cells of the micromasses collected at day 14. These analyses showed the intrasample heterogeneity in the 2 and 14 days samples. In addition, some of the masses increased at day 14 detected by TOF-SIMS, such as  $m/z$  551.6 (DAG) and  $m/z$  578.7 (not identified) were localized in the core of the 14 days micromasses (data not shown). These facts points to a higher level of chondrogenic differentiation in the core of the 3D structures where there is a lower availability of oxygen. This observation demonstrates the capability of TOF-SIMS to discriminate with high spatial resolution the different stages of chondrogenesis. Following the same principle that we used for MALDI-MSI, samples were also grouped by donor after TOF-SIMS experiments, observing that DF3 showed the differences between the two time points being able to discriminate between different donors attending to the DF scores (data not shown). Therefore by looking at the different DFs we could obtain information about the state of chondrogenesis, lipid profiles, and link this data with the respective donor. This methodology could provide valuable information to select the best conditions/donors for cell therapy strategies in the future.

Overall, we have described for the first time the lipid changes from hBMSCs in their early stages of chondrogenic differentiation. Accumulation of sphingomyelin was detected in the undifferentiated stage using MALDI-MSI. Moreover, TOF-SIMS revealed a higher abundance of phosphocholine-related ions in the peripheral cells of day 2-related micromasses. These results demonstrate that MSI is a useful tool to discriminate different areas of the micromasses and to understand the molecular processes that occur during the differentiation of hBMSCs toward chondrocytes and/or cartilage-like tissues. Furthermore, these molecules may have key functional roles in chondrogenesis and could be candidate chondrogenic differentiation markers. Therefore, these lipids could have potential value in cartilage repair strategies.

*The authors express appreciation to the Pathology Service from the Orthopaedics Department of the CHU A Coruña for providing bone marrow samples, to Tamara Hermida and Maria José Sánchez for hBMSCs isolation and characterization, and to Purificación Filgueira and Noa Goyanes for*

*obtaining the micromass sections. B. Rocha and C. Ruiz-Romero are recipients of grants from ISCIII-Spain (PFIS and Miguel Servet, respectively). This work was supported in part through funding from EU COST Action BM1104 (Mass Spectrometry Imaging: new tools for healthcare research), and also from Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER-CB06/01/0040; PI12/00329; PI11/02397, RETIC-RIER-RD12/0009/0018; Proteo-Red/ISCIII); FEDER (European Community) and Xunta de Galicia (Red Gallega REDICENT).*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Koga, H., Engebretsen, L., Brinchmann, J. E., Muneta, T., Sekiya, I., Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2009, 17, 1289–1297.
- [2] Pittenger, M. F., Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol. Biol.* 2008, 449, 27–44.
- [3] Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K., The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.* 2006, 97, 33–44.
- [4] Gupta, P. K., Das, A. K., Chullikana, A., Majumdar, A. S., Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* 2012, 3, 25.
- [5] Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. L., Goldberg, V. M., Yoo, J. U., *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 1998, 238, 265–272.
- [6] Spagnoli, A., O'Rear, L., Chandler, R. L., Granero-Molto, F. et al., TGF-beta signaling is essential for joint morphogenesis. *J. Cell Biol.* 2007, 177, 1105–1117.
- [7] Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X. et al., Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling crosstalk. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 41227–41236.
- [8] Huey, D. J., Hu, J. C., Athanasiou, K. A., Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 2012, 338, 917–921.
- [9] Wu, S., De Luca, E., Role of cholesterol in the regulation of growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 4642–4647.
- [10] Schmidt, K., Hughes, C., Chudek, J. A., Goodyear, S. R. et al., Cholesterol metabolism: the main pathway acting downstream of cytochrome P450 oxidoreductase in skeletal development of the limb. *Mol. Cell Biol.* 2009, 29, 2716–2729.
- [11] Simonaro, C. M., Sachot, S., Ge, Y., He, X. et al., Acid ceramidase maintains the chondrogenic phenotype of expanded primary chondrocytes and improves the chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013, 8, e62715.
- [12] Masuko, K., Murata, M., Suematsu, N., Okamoto, K. et al., A metabolic aspect of osteoarthritis: lipid as a possible contributor to the pathogenesis of cartilage degradation. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2009, 27, 347–353.

- [13] Mishra, R., Singh, A., Chandra, V., Negi, M. P. et al., A comparative analysis of serological parameters and oxidative stress in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2012, 32, 2377–2382.
- [14] Kosinska, M. K., Liebisch, G., Lochnit, G., Wilhelm, J. et al., A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 2323–2333.
- [15] Zhou, X., Mao, J., Ai, J., Deng, Y. et al., Identification of plasma lipid biomarkers for prostate cancer by lipidomics and bioinformatics. *PLoS One* 2012, 7, e48889.
- [16] Han, X., Rozen, S., Boyle, S. H., Hellegers, C. et al., Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS One* 2011, 6, e21643.
- [17] Eriksson, C., Masaki, N., Yao, I., Hayasaka, T., Setou, M., MALDI imaging mass spectrometry—a mini review of methods and recent developments. *Mass Spectrom.* 2013, 2, S0022.
- [18] Cicione, C., Diaz-Prado, S., Muinos-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Blanco, F. J., Molecular profile and cellular characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells: donor influence on chondrogenesis. *Differentiation* 2010, 80, 155–165.
- [19] Hermida-Gomez, T., Fuentes-Boquete, I., Gimeno-Longas, M. J., Muinos-Lopez, E. et al., Bone marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen promote in vitro the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng. Part A* 2011, 17, 1169–1179.
- [20] Rocha, B., Calamia, V., Mateos, J., Fernández-Puente, P. et al., Metabolic labeling of human bone marrow mesenchymal stem cells for the quantitative analysis of their chondrogenic differentiation. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 5350–5361.
- [21] Rocha, B., Calamia, V., Casas, V., Carrascal, M. et al., Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 1045–1054.
- [22] Eijkel, G. B., Kaletas, B., Van der Wiel, I. M., Kros, J. M. et al., Correlating MALDI and SIMS imaging mass spectrometric datasets of biological tissue surfaces. *Surf. Interface* 2009, 41, 675–685.
- [23] Hoogerbrugge, R., Willig, S. J., Kistemaker, P. G., Discriminant analysis by double stage principal component analysis. *Anal. Chem.* 1983, 55, 1710–1712.
- [24] Petkovic, M., Schiller, J., Müller, M., Benard, S. et al., Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Anal. Biochem.* 2001, 289, 202–216.
- [25] Chughtai, K., Jiang, L., Greenwood, T. R., Glunde, K., Heeren, R. M., Mass spectrometry images acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelin in MDA-MB-231 breast tumor models. *J. Lipid Res.* 2013, 54, 333–344.
- [26] Fletcher, J. S., Rabbani, S., Henderson, A., Blenkinsopp, P. et al., A new dynamic in mass spectral imaging of single biological cells. *Anal. Chem.* 2008, 80, 9058–9064.
- [27] Carado, A., Passarelli, M. K., Kozole, J., Wingate, J. E. et al., C60 secondary ion mass spectrometry with a hybrid-quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* 2008, 80, 7921–7929.
- [28] Lanni, E. J., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., Mass spectrometry imaging and profiling of single cells. *J. Proteomics* 2012, 75, 5036–5051.
- [29] Jurchen, J. C., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, 16, 1654–1659.
- [30] Holle, A., Haase, A., Käyser, M., Höhdorf, J., Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *J. Mass Spectrom.* 2006, 41, 705–716.
- [31] Hankin, J. A., Barkley, R. M., Murphy, R. C., Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, 1646–1652.
- [32] Schwamborn, K., Caprioli, R. M., MALDI imaging mass spectrometry—painting molecular pictures. *Mol. Oncol.* 2010, 4, 529–538.
- [33] Passarelli, M. K., Winograd, N., Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1811, 976–990.
- [34] Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y. et al., MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, 855, 98–103.
- [35] Ide, Y., Waki, M., Hayasaka, T., Nishio, T. et al., Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine(36:1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS One* 2013, 8, e61204.
- [36] Goto, T., Terada, N., Inoue, T., Nakayama, K. et al., The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One* 2014, 9, e90242.
- [37] Cillero-Pastor, B., Eijkel, G. B., Kiss, A., Blanco, F. J., Heeren, R. M., Matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry: a new methodology to study human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 710–720.
- [38] Peffers, M. J., Cillero-Pastor, B., Eijkel, G. B., Clegg, P. D., Heeren, R. M., Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging identifies markers of ageing and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res. Ther.* 2014, 16, R110.
- [39] Malmberg, P., Jennische, E., Nilsson, D., Nygren, H., High-resolution, imaging TOF-SIMS: novel applications in medical research. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399, 2711–2718.
- [40] Cillero-Pastor, B., Eijkel, G., Kiss, A., Blanco, F. J., Heeren, R. M., Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal. Chem.* 2012, 84, 8909–8916.
- [41] Malmberg, P., Nygren, H., Richter, K., Chen, Y. et al., Imaging of lipids in human adipose tissue by cluster ion TOF-SIMS. *Microsc. Res. Tech.* 2007, 70, 828–835.
- [42] Malmberg, P., Nygren, H., Methods for the analysis of the composition of bone tissue, with a focus on imaging mass spectrometry (TOF-SIMS). *Proteomics* 2008, 8, 3755–3762.

- [43] Steinhäuser, M. L., Bailey, A. P., Senyo, S. E., Guillermier, C. et al., Multi-isotope imaging mass spectrometry quantifies stem cell division and metabolism. *Nature* 2012, *481*, 516–519.
- [44] Kokesch-Himmelreich, J., Schumacher, M., Rohnke, M., Gelinsky, M., Janek, J., TOF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements. *Biointerphases* 2013, *8*, 17.
- [45] Merrill, A. H., Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Spiegel, S. et al., Sphingolipids—the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, *142*, 208–225.
- [46] Xu, F., Yang, C. C., Gomillion, C., Burg, K. J., Effect of ceramide on mesenchymal stem cell differentiation toward adipocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, *160*, 197–212.
- [47] Jang, M. Y., Chun, S. I., Mun, C. W., Hong, K. S., Shin, J. W., Evaluation of metabolomic changes as a biomarker of chondrogenic differentiation in 3D-cultured human mesenchymal stem cells using proton (<sup>1</sup>H) nuclear magnetic resonance spectroscopy. *PLoS One* 2013, *8*, e78325.



## **DISCUSIÓN**



## Discusión artículo I

El cartílago articular hialino tiene una baja capacidad de regeneración, lo que se debe parcialmente a su naturaleza avascular y a la ausencia de inervación [225]. Esta falta de suministro sanguíneo origina que los mecanismos de reparación basados en el reclutamiento de células madre en la zona de la lesión no se produzcan correctamente [226, 227]. Otros factores que explican la escasa capacidad de reparación del cartílago son la incapacidad de los condrocitos de migrar al lugar de la lesión, debido a su baja actividad metabólica y también a la presencia de una densa ECM en este tejido [228, 229]. Para resolver este problema, en los últimos años se ha sugerido la utilidad de células madre mesenquimales (MSCs) como alternativa terapéutica para el tratamiento de las lesiones del cartílago. Las MSCs son células multipotentes, capaces de renovarse por sí mismas, y que también poseen la capacidad de diferenciarse hacia la mayoría de los tejidos esqueléticos (incluido el cartílago) cuando se cultivan *in vitro* en condiciones apropiadas. Las MSCs pueden aislarse a partir de una gran variedad de tejidos, como la médula ósea [230] o el tejido adiposo [52]. En la actualidad, existen multitud de modelos de diferenciación *in vitro* diferentes, lo que dificulta la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en los procesos de diferenciación.

En este sentido, la proteómica se ha utilizado durante los últimos años para profundizar en la caracterización de las MSCs, principalmente para la identificación de proteínas involucradas en la función inmunomoduladora de estas células [103, 108]. Asimismo, diversas aproximaciones proteómicas se han aplicado para el estudio de los procesos de diferenciación de las MSCs, especialmente en adipogénesis [231, 232] y osteogénesis [115, 233, 234]. Sin embargo, hay muy pocos análisis proteómicos centrados en el estudio del proceso de condrogénesis. Hasta la fecha, se han publicado dos estudios en los que se describen las alteraciones del proteoma durante la diferenciación condrogénica de las MSCs: En el primero de ellos se comparó el perfil proteico de una línea de

células madre mesenquimales embrionarias de ratón (C3H10T1/2) mediante el marcaje iTRAQ acoplado a 2D LC-MS/MS [235], mientras que en el segundo trabajo los autores aplicaron la estrategia DIGE para caracterizar el proceso de condrogénesis en un modelo *in vitro* con MSCs de cordón umbilical [236]. En nuestro trabajo hemos utilizado el marcaje metabólico SILAC, basado en isótopos estables, para la cuantificación relativa de los cambios de expresión proteica que ocurren durante la diferenciación condrogénica de las MSCs aisladas de médula ósea. El marcaje SILAC permite estudiar la tasa de recambio de las proteínas y los cambios que se producen en el proteoma de las células [237].

Como paso previo a nuestro análisis proteómico estandarizamos el marcaje SILAC de las MSCs en nuestras condiciones de cultivo. En primer lugar, esta estandarización consistió en evaluar la viabilidad y el crecimiento celular de las MSCs en dos medios de cultivo diferentes (un medio de expansión comercial y un medio DMEM, ambos específicos para SILAC) suplementados con las formas isotópicas de los aminoácidos arginina y lisina, con el fin de seleccionar el mejor medio de expansión para los experimentos de marcaje. El ensayo de proliferación reveló que las MSCs crecían mejor en el medio de expansión comercial que en el medio DMEM, manifestando un incremento medio de crecimiento del  $24.40 \pm 3.61\%$  ( $p < 0.001$ ), independientemente de los aminoácidos utilizados (Figura Suplementaria 1). Las concentraciones de los aminoácidos lisina y arginina utilizadas para la expansión fueron de 146 mg/L y 28 mg/L respectivamente, ya que en estudios previos con condrocitos observamos que en estas condiciones se evita una posible conversión de arginina a prolina que introduciría errores en la cuantificación de las proteínas [238]. A continuación, evaluamos la eficiencia de incorporación de los aminoácidos pesados, así como la mencionada conversión de arginina a prolina, mediante análisis por LC-MS/MS de los extractos celulares. Con este fin, las células se crecieron en el medio de expansión comercial suplementado con las versiones pesadas de arginina y lisina. Seguidamente, las células se recogieron a diferentes pases (llegando hasta pase 6), se lisaron en tampón de urea, se digirieron en solución con tripisina y finalmente se analizaron

mediante LC-MALDI-TOF-TOF. Siguiendo esta estrategia, comprobamos que en las MSCs no se producía interconversión de arginina a prolina con la concentración de arginina utilizada (Figura Suplementaria 2). Por otro lado, obtuvimos un marcaje medio del 98% para ambos aminoácidos después de 5 pases celulares (Figura 1). En cualquier experimento SILAC se necesita al menos un 95% de marcaje para que los datos de cuantificación puedan considerarse reales. Aún así, para nuestro trabajo decidimos expandir las células hasta un pase 6 para asegurar valores cercanos al 100 % de marcaje, y así proporcionar una mayor robustez a nuestros resultados de cuantificación.

Al igual que en estudios previos [51], la diferenciación condrogénica de las MSCs fue validada por la expresión de proteoglicanos, como el agregcano, y del colágeno tipo II. Los análisis por PCR a tiempo real mostraron un aumento en los niveles de ARN mensajero de ambos marcadores a los 14 días de la condrogénesis en comparación con el día 2 (Figura 2). Además, los estudios histoquímicos realizados en este estudio permitieron observar la síntesis de proteoglicanos durante el proceso de diferenciación (Figura 3A). Por último, la ausencia de expresión del colágeno tipo X indicaba que la diferenciación condrogénica no alcanza el estadio de hipertrofia (Figura 3B).

Tras demostrar que el proceso de condrogénesis se estaba produciendo correctamente, se realizó el estudio proteómico diferencial entre los dos tiempos de condrogénesis seleccionados. El análisis proteómico de las MSCs basado en la combinación del marcaje SILAC con el análisis por LC-MS/MS nos permitió identificar 622 proteínas diferentes (Tabla Suplementaria 1). La mayoría de las proteínas identificadas son proteínas intracelulares, lo que nos indica que esta aproximación es útil para evaluar las alteraciones que se producen en el interior de las células, más que analizar la formación de un tejido cartilaginoso. Por lo tanto, es lógico que no se identificaran proteínas típicas de la ECM del cartílago como el colágeno tipo II o el agregcano, a pesar de haber confirmado su expresión mediante los análisis de ARNm. De hecho, estos datos concuerdan con un estudio

previo de nuestro grupo en el que caracterizamos el proteoma de los condrocitos y en el que tampoco fuimos capaces de identificar el colágeno tipo II o el agregano [239]. En general, las proteínas identificadas en nuestro trabajo se relacionaron con el metabolismo celular, la reorganización del citoesqueleto, los procesos de señalización, la síntesis de proteínas y la adhesión celular (Figura 4). También se identificaron un gran número de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, diferentes anexinas y proteínas involucradas en el metabolismo celular en el proteoma de los condrocitos. El perfil proteico identificado en estos análisis es muy similar al obtenido en un estudio reciente en el que se analizan los perfiles intra y extracelulares de los condrocitos después del tratamiento con interleuquina [238]. En este último trabajo, la fibronectina, los colágenos tipo I y VI, y la tenascina fueron las proteínas más abundantes secretadas por los condrocitos. En nuestro estudio pudimos detectar todas ellas con un elevado número de péptidos, especialmente el colágeno tipo VI y la fibronectina.

Al analizar los datos de cuantificación relativa, 64 de las proteínas identificadas se encontraron significativamente alteradas (cambio en los ratios de expresión menores de 0.8 o mayores a 1.2) al comparar ambos estadios celulares (indiferenciado o día 2, frente a más diferenciado o día 14). La modulación de algunas de estas proteínas se había descrito recientemente en un estudio en el que se caracteriza el proceso de condrogénesis de MSCs procedentes de cordón umbilical mediante la técnica DIGE [236]. Entre estas proteínas comunes se incluyen algunas relacionadas con el metabolismo celular, como la alfa enolasa (ENOA), la nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT), la fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1) o la triosasulfato isomerasa (TPIS); algunas chaperonas como la peroxiredoxina 6 (PRDX6), la superóxido dismutasa mitocondrial (SODM) o la proteína reguladora de glucosa 78 kDa (GRP78); diferentes anexinas como la anexina 2 (ANXA2) y la anexina 6 (ANXA6), y una proteína asociada al citoesqueleto, la vimentina (VIME). La identificación de un panel común de proteínas moduladas en ambos estudios sugiere que el perfil de proteínas intracelulares involucrado en el proceso de condrogénesis es único y global,

independiente del origen de las MSCs y del modelo de condrogénesis *in vitro* utilizado. Para soportar esta hipótesis, los niveles de expresión de varias anexinas (ANXA2, ANXA5 y ANXA6) también se encontraron alterados durante la diferenciación condrogénica de una línea de MSCs embrionarias obtenidas de ratón [235].

Los resultados del análisis diferencial se verificaron mediante el análisis inmunohistoquímico de una serie de proteínas pertenecientes a distintas categorías funcionales. Para dicho análisis elegimos un panel de 6 proteínas que aumentan a los 14 días de diferenciación en comparación con el día 2 (Tabla 2), ya que es más probable que estas proteínas estén involucradas en el proceso condrogénico. De hecho, entre las proteínas identificadas y específicas de la ECM del cartílago, detectamos fibronectina (FINC) y dos cadenas del colágeno tipo VI aumentadas a día 14. El incremento en la expresión del colágeno tipo VI se ha descrito en los estadios iniciales del proceso condrogénico de las MSCs cultivadas en geles de alginato [240], lo que apoya los datos obtenidos en nuestro estudio. Por su parte, los análisis inmunohistoquímicos realizados en nuestro trabajo demostraron el incremento en la síntesis de FINC en la ECM de las micromasas, mientras que a día 2, la localización de la FINC es básicamente intracelular (Figura 5). La FINC es una glicoproteína de la ECM de alto peso molecular que tiene la capacidad de unirse a las integrinas y a otros componentes de la matriz como el colágeno, la fibrina y los proteoglicanos sulfatados, y además es esencial para la formación de la ECM del cartílago [241]. Nuestros datos coinciden también con resultados previos en los que se sugiere que la fibronectina interviene en la producción de dos de los principales proteoglicanos del cartílago, agregano y versicano, durante la diferenciación condrogénica [242]. En otro estudio previo también se demuestra que determinados fragmentos de la FINC regulan el proceso de condrogénesis de MSC aisladas de médula ósea en hidrogeles tridimensionales [243]. Por lo tanto, la modulación de la FINC en el proceso de diferenciación parece ser un mecanismo clave para promover la formación de la ECM y por consiguiente, la maduración de los condrocitos.

Seis de las proteínas aumentadas a día 14 se agruparon en la categoría funcional de organización del citoesqueleto, lo que indica que intervienen en una gran variedad de procesos celulares como proliferación, adhesión celular y diferenciación. En nuestro trabajo, decidimos validar la expresión de dos de ellas, la gelsolina (GELS) y la vimentina (VIME), dado que estas dos proteínas se habían relacionado recientemente con el proceso de condrogénesis. De hecho, estudios previos habían descrito que la expresión génica de la GELS aumenta durante la condrogénesis inducida por BMP-2 de MSCs aisladas de médula ósea [244], mientras que otro estudio reciente basado en ARN de interferencia demostró que la proteína VIME actúa como un regulador positivo del proceso de diferenciación [245]. Al igual que la FINC, tanto GELS como VIME mostraron mediante técnicas inmunohistoquímicas un incremento en su abundancia en las micromasas recogidas a día 14 en comparación con las micromasas a día 2 (Figura 5).

La mayor parte de las proteínas cuya modulación cuantitativa en la condrogénesis fue detectada en este trabajo se asignaron a la categoría funcional de metabolismo y todas ellas, incluyendo la ATPA (validada también por inmunohistoquímica) están aumentadas a día 14. Además, la mayoría de estas proteínas participan en la ruta glucolítica. Estos datos sugieren que las MSCs incrementan la actividad de la vía glucolítica durante la diferenciación, lo que concuerda con los resultados obtenidos en un estudio en el que evalúan el metabolismo de las MSCs durante su proliferación y diferenciación. En este último, los autores demuestran que las MSCs reducen significativamente el consumo de oxígeno durante la condrogénesis, por lo que obtienen el ATP principalmente a partir de la vía glucolítica y no de la fosforilación oxidativa [246]. De hecho, el metabolismo de las MSCs es flexible ya que estas células pueden diferenciarse hacia condrocitos incluso en ausencia de oxígeno [247]. En conjunto, estos resultados apoyan el papel de los cambios metabólicos en la regulación del proceso de diferenciación de las MSCs.



Finalmente, también validamos mediante inmunohistoquímica el aumento de dos proteínas relacionadas con la respuesta al estrés: la superóxido dismutasa mitocondrial (SODM) y la peptidil-prolil cis/trans isomerasa A (PPIA). SODM es la principal proteína intracelular con función antioxidante, y por tanto su incremento durante el proceso de diferenciación podría ser indicativo de un aumento del estrés oxidativo en las micromasas. Este incremento de SODM se ha descrito en otros estudios que analizan el proceso de condrogénesis [236, 248]. Por su parte, El aumento en la abundancia de PPIA detectado a los 14 días de la condrogénesis también podría ser un indicador más de este estrés oxidativo. PPIA es una chaperona ubicua que se secreta en respuesta a las especies reactivas de oxígeno (ROS) [249]. En condrocitos, esta proteína se produce también en respuesta a la activación de rutas de estrés [250] o condiciones patológicas [251]. El aumento en la producción de estas dos proteínas podría deberse al incremento en los niveles celulares de ROS, que podría regular los estadios iniciales del proceso de diferenciación. De hecho, un estudio reciente señala que los niveles de ROS aumentan durante la diferenciación de las células ATDC5 y de condrocitos primarios derivados de embriones de ratón, y demuestra que el ROS generado por los enzimas NADPH oxidasas 2 y 4 es necesario para la supervivencia y diferenciación en los estadios iniciales de la condrogénesis [252].

En resumen, en este trabajo se describe el análisis proteómico de un modelo *in vitro* de condrogénesis, con el fin de realizar estudios cuantitativos de las proteínas intracelulares que participan en el proceso de diferenciación. Las proteínas identificadas en este trabajo, realizado mediante una estrategia proteómica basada en marcaje SILAC acoplado a LC-MS/MS, pueden considerarse marcadores potenciales del proceso de diferenciación. Su identificación permite profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en este proceso, y puede ser muy útil para la monitorización molecular de la condrogénesis en estrategias de reparación del cartílago basadas en terapia celular. Además, el protocolo optimizado en este trabajo puede ser aplicado en

otros estudios proteómicos tales como el análisis del secretoma de las MSCs, objetivo del segundo artículo que constituye esta tesis doctoral.

## Discusión artículo II

El análisis del secretoma procedente de las MSCs sometidas a diferenciación condrogénica permite evaluar la composición y calidad de la matriz extracelular (ECM) que se está formando. En el cartílago articular, la formación de la ECM depende de la síntesis e interacción de un gran número de moléculas, principalmente proteínas, que son secretadas por los condrocitos o transportadas por el torrente sanguíneo a la articulación. Sin embargo, cuando se produce una lesión en el cartílago ésta no puede repararse debido a la limitada capacidad regenerativa de este tejido. Este reducido potencial de regeneración se debe principalmente a las escasas facultades de migración y reparación de la lesión de los condrocitos, a la avascularidad del cartílago y también a las características específicas de su ECM, compuesta principalmente de moléculas de gran tamaño como colágenos y proteoglicanos [227].

Por su parte, las MSCs son células multipotentes, capaces de diferenciarse a condrocitos, por lo que potencialmente tienen un papel fisiológico en la reparación del cartílago articular. De hecho, se ha propuesto el uso de MSCs autólogas o alogénicas como un procedimiento terapéutico alternativo para el tratamiento de los defectos del cartílago [253].

La posible aplicación de las MSCs en terapias celulares para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas ha permitido conocer mejor la biología básica de estas células. Durante los últimos años se han realizado algunos estudios proteómicos en los que se analizan las modulaciones que experimentan las proteínas durante el proceso de diferenciación de las MSCs hacia condrocitos [235, 236]. Sin embargo, no se han realizado estudios proteómicos cuantitativos en los que se analicen las proteínas secretadas por estas células durante el proceso de diferenciación condrogénica. Recientemente, se han publicado dos estudios en los que se analiza el secretoma de las MSCs durante su diferenciación a osteoblastos. En el primero de ellos los autores comparan el medio condicionado (CM) procedente de MSCs indiferenciadas y diferenciadas (después

de 6 días de osteogénesis), utilizando una aproximación basada en MS sin marcaje o *label-free* [117]. En el segundo artículo, los autores emplean una versión del marcaje SILAC, llamado SILAC pulsado, para cuantificar el secretoma en condiciones *ex vivo* de las MSCs durante la diferenciación osteogénica [128].

En nuestro trabajo decidimos aplicar el marcaje metabólico SILAC, para caracterizar y cuantificar por primera vez las proteínas secretadas por las MSCs procedentes de médula ósea durante el proceso condrogénico. En nuestro grupo, el marcaje SILAC se había estandarizado previamente en condrocitos articulares humanos [238], y su empleo en el estudio de secretomas de estas células permitió demostrar la utilidad de este tipo de análisis para la caracterización de las proteínas de la ECM del cartílago. Esta utilidad ha sido también recientemente mostrada en un estudio comparativo en el que se analizan las proteínas secretadas por los condrocitos obtenidos de los cóndilos medial y lateral del fémur [254]. Como interesante ventaja para nuestro trabajo, el marcaje SILAC permite discriminar fácilmente las proteínas sintetizadas por las células en cultivo de aquellas que proceden del FBS, lo que potencia su aplicación para el análisis de las proteínas secretadas. Además, en el estudio que habíamos realizado con anterioridad sobre extractos proteicos de las micromasas obtenidos hasta el día 14 de la condrogénesis (Artículo I de esta Tesis), no habíamos sido capaces de detectar proteínas con una localización extracelular conocida, salvo algunas muy abundantes como la fibronectina o el colágeno tipo VI [255]. Esto puede ser debido a que a día 14 el principal componente de las micromasas son las células, ya que la ECM no está completamente formada. Sin embargo, el análisis del secretoma recogido a los días 2 y 14 de condrogénesis realizado en el presente trabajo permitió identificar al menos 221 proteínas extracelulares (Tabla Suplementaria 3), muchas de las cuales habían sido previamente identificadas en el secretoma de los condrocitos articulares humanos [238] y se sabe que están involucradas en la formación de la ECM del cartílago. Por último, de todas las proteínas identificadas en este estudio, únicamente 23 son comunes al primer

trabajo [255], lo que pone de manifiesto la complementariedad de los estudios de proteoma completo y secretoma.

En este trabajo, al realizar el análisis proteómico del secretoma de las micromasas pudimos identificar también un gran número de proteínas intracelulares. La contaminación con proteínas intracelulares es un problema inherente a los estudios del secretoma, ya que el medio condicionado contiene no sólo las proteínas secretadas por las células, sino también las proteínas que se desprenden de la superficie celular, las que se liberan al medio en exosomas, y las que se liberan debido a los procesos de lisis celular, apoptosis o necrosis [256]. En nuestro trabajo es muy difícil restringir los procesos de lisis celular debido a las características específicas del cultivo en micromasa, que pueden ser la principal causa de la alta proporción de proteínas intracelulares que encontramos en el perfil de proteínas secretadas descrito. Con el fin de evitar la identificación de proteínas intracelulares, en el año 2012 se desarrolló una nueva aproximación basada en el uso de dos métodos de marcaje (un marcaje químico con fluorocromos y el marcaje SILAC pulsado), para enriquecer específicamente las muestras de secretoma con proteínas recién sintetizadas [257]. Esta aproximación no sólo disminuye la detección de proteínas procedentes de la lisis celular, sino que también permite analizar el secretoma sin necesidad de cultivar las células sin FBS y sin pasos de lavado. Sin embargo, en nuestro flujo de trabajo decidimos limitar el uso de FBS para incrementar la detección de las proteínas secretadas en bajas cantidades. Para ello, cultivamos las micromasas sin FBS 24 horas antes de la recolección de las muestras de secretoma. La eliminación del FBS del medio de cultivo disminuye la complejidad de la muestra e incrementa la reproducibilidad [258]. Considerando el gran número de proteínas identificadas en este trabajo, para llevar a cabo el resto de los estudios decidimos en primer lugar clasificarlas de acuerdo a su localización según la base de datos Uniprot y la herramienta bioinformática DAVID (del inglés, *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). Una vez clasificadas por localización, únicamente nos

centramos en aquellas proteínas extracelulares expresadas diferencialmente entre los días 2 y 14.

El uso del doble marcaje SILAC, en el que se marcan las dos condiciones que se van a comparar nos permitió cuantificar las proteínas de forma precisa y robusta, evitando los posibles errores de cuantificación que se pueden producir debido al uso del FBS durante el cultivo celular [257]. Entre las 221 proteínas extracelulares identificadas, los niveles de expresión de 34 se mostraron significativamente alterados entre los dos tiempos de condrogénesis analizados (Tabla 1). La mayor parte de estas proteínas están aumentadas a día 14 con respecto a día 2 y fueron asignadas a la categoría funcional de componentes estructurales de la matriz extracelular, por lo que podrían utilizarse potencialmente como marcadores de la formación temprana de la ECM del tejido. Una de las proteínas estructurales moduladas en el secretoma procedente de las MSCs en diferenciación condrogénica fue el proteoglicano 4 (PRG4), también llamado lubricina o proteoglicano de la zona superficial (SZP). Esta proteína es producida por los condrocitos situados en la zona superficial del cartílago articular [259]. Interviene en el metabolismo del cartílago, debido a que potencialmente promueve el crecimiento, se trata de una proteína citoprotectora, y además actúa como lubricante [260]. En algunos estudios se describe que el PRG4 participa en la fisiología de la articulación [261], y también que la pérdida de ésta proteína en el cartílago podría relacionarse con la patología de la artrosis [262]. Además, este proteoglicano se ha descrito como un marcador esencial en los procedimientos de ingeniería tisular para la reparación del cartílago [263], al tratarse de una proteína característica de la capa superficial de este tejido. Por último, se ha demostrado que la expresión de PRG4 aumenta en los condrocitos articulares después del tratamiento con factores de las familias TGF- $\beta$  y BMP [264]. Estudios previos describen además que durante la condrogénesis de MSCs aisladas de grasa infrapatelar inducida por TGF- $\beta$ 1 se estimula la expresión de PRG4 [265]. Este último resultado también se observa en nuestro trabajo, ya que durante la condrogénesis de las MSCs obtenidas de pacientes con artrosis se sintetiza y

acumula PRG4 en la ECM recién formada (Figura 4A). Este hecho es especialmente relevante teniendo en cuenta el reciente efecto condroprotector que se ha descrito para el PRG4, al observar que la expresión de esta proteína en el cartílago protege contra el desarrollo de la artrosis en un modelo *in vivo* de ratón [266].

Otra de las proteínas cuya alteración validamos en este estudio es el inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP1). Esta proteína también está aumentada en el secretoma de las MSCs recogido a día 14 del proceso de condrogénesis, y previamente se había descrito como un marcador de artrosis [267]. En un estudio reciente se describe que los condrocitos del cóndilo medial de la rodilla (normalmente más afectado en la OA) secretan más TIMP1 que los condrocitos del cóndilo lateral [254]. Este hecho sugiere que los condrocitos secretan altos niveles de TIMP1 como un mecanismo de respuesta a la fase inicial de la OA. Además, el desequilibrio entre la producción de metaloproteasas (particularmente de MMP-3 y MMP-13) y de sus inhibidores se ha relacionado con la patogénesis de la artrosis y la artritis reumatoide [268]. Esta última hipótesis se apoya en el hecho de que la expresión de TIMP1 es baja en el cartílago artrósico. En nuestro trabajo, demostramos que las MSCs de pacientes artrósicos en condrogénesis sintetizan y secretan TIMP1 (Figura 4B). Sin embargo, sería necesario comparar los niveles de expresión de TIMP1 obtenidos con los niveles de expresión de esta proteína en las MSCs procedentes de donantes normales para poder conocer si entre ambos tipos de células existen diferencias en la síntesis y secreción de esta proteína.

En nuestro estudio también se describe el aumento de otras proteínas en los estadios iniciales de la condrogénesis, que pueden ser posibles marcadores de diferenciación. Entre ellas destaca la proteína ácida del cartílago 1 (CRAC1/CEP-68). Previamente a nuestro estudio se había descrito que el gen de CRAC1 aumenta durante la condrogénesis de las MSCs, por lo que esta proteína se ha sugerido como un marcador de diferenciación para las terapias celulares basadas en MSCs encaminadas a la reparación del cartílago [269]. Otra proteína

estructural de interés es el proteoglicano versicano (CSPG2), cuya función consiste en regular la formación de la matriz y el inicio de la condrogénesis a través de la agregación de las cadenas de condroitín sulfato [270]. Esta proteína se expresa transitoriamente en los nódulos de condensación condrogénicos durante la morfogénesis del esqueleto, lo que facilita la condrogénesis y la morfogénesis de la articulación mediante la localización del TGF $\beta$  en la matriz extracelular y la regulación de su ruta de señalización [271]. Otra proteína característica de la ECM del cartílago cuyos niveles están aumentados en el secretoma procedente de las micromasas recogidas a día 14 es la MGP (del inglés, *matrix Gla protein*). Esta proteína actúa como un inhibidor de la formación de hueso y la calcificación del cartílago [272]. Por último, la proteína oligomérica del cartílago (COMP/TSP5) también es otra de las proteínas que detectamos diferencialmente expresadas entre los días 2 y 14 del proceso condrogénico. La COMP es una proteína extracelular perteneciente a la familia de las trombospondinas que interacciona con un gran número de proteínas de la ECM que incluyen la fibronectina, el agregano, las matrilinas y diferentes tipos de colágenos [67, 68]. A través de estas interacciones, la COMP se encarga del ensamblaje de la ECM manteniendo la integridad estructural del cartílago. Además, esta proteína interacciona con las integrinas presentes en la superficie de los condrocitos permitiendo la interacción y el anclaje de los mismos a la ECM del cartílago [273], y se ha asociado con varias patologías. De hecho, se ha descrito que los niveles de COMP son diferentes en el cartílago procedente de pacientes con artrosis y artritis reumatoide en comparación al cartílago normal [274]. Además, la COMP se ha detectado en suero y líquido sinovial de pacientes con dichas enfermedades por lo que es uno de los biomarcadores de las enfermedades reumáticas más estudiado en la actualidad [275]. Por último, parece que esta proteína está involucrada en el proceso de condrogénesis *in vitro*, ya que se ha descrito que interactúa con miembros de la familia TGF- $\beta$  y BMPs [276], incrementando la síntesis de proteoglicanos sulfatados durante el proceso de diferenciación [277].



Finalmente, únicamente los niveles de expresión de cuatro proteínas resultaron significativamente disminuidos tras 14 días de condrogénesis. Estas proteínas podrían ser posibles candidatos de la indiferenciación o autorrenovación de las MSCs, y además, ser útiles para resolver los mecanismos moleculares que participan en el proceso de diferenciación. De hecho, nuestro análisis funcional apoya esta propuesta ya que dos de las proteínas disminuidas a día 14 son marcadores de indiferenciación: la glicoproteína de membrana Thy-1 (THY1/CD90), que es un marcador de la superficie celular de células mesenquimales progenitoras [278], y el proteoglicano condroitín sulfato 4 (CSPG4/MCSP) que se expresa en distintos tipos de melanomas y es un valioso marcador de distintas células precursoras incompletamente diferenciadas [279].

En resumen, este trabajo demuestra la utilidad del análisis del secretoma procedente de las MSCs para la caracterización de los mecanismos responsables de la formación de la ECM del cartílago, esclareciendo aquellas rutas o vías moleculares involucradas en los estadios tempranos del desarrollo del cartílago. Además, el panel de proteínas extracelulares descrito en este estudio, principalmente el proteoglicano 4 y la TIMP1, podrían utilizarse en el seguimiento de la formación de la ECM en técnicas de terapia celular para la reparación del cartílago. Finalmente, los resultados de este trabajo demuestran que el doble marcaje SILAC acoplado a LC-MS/MS es una tecnología fiable y robusta para la realización de estudios proteómicos cuantitativos en fracciones de proteínas secretadas.



### Discusión artículo III

Las técnicas de imagen mediante espectrometría de masas, o MS Imaging (MSI), han experimentado un espectacular avance en los últimos años y están siendo empleadas para estudiar la distribución espacial de las diferentes biomoléculas en muestras de tejidos, con el objetivo de determinar los cambios bioquímicos asociados a diversas enfermedades. Entre las técnicas de imagen basadas en MS, la tecnología de MALDI-MSI es la herramienta más utilizada debido a la alta sensibilidad y al amplio rango de masas que permite analizar. Así, esta técnica está siendo aplicada en el campo de la biomedicina para la búsqueda de biomarcadores en diferentes tipos de cáncer [280-282] y en enfermedades reumáticas como la artrosis [283, 284]. Por su parte, TOF-SIMS es otra técnica de imagen basada en MS que proporciona una mayor resolución espacial en comparación con MALDI-MSI y que también se está empleando actualmente en el campo de la investigación biomédica [285]. De hecho, recientemente se ha publicado un estudio comparativo en el que se describe mediante TOF-SIMS la diferente distribución espacial de los lípidos en muestras de cartílago sano y artrósico [210].

Las técnicas de MS Imaging se han empleado no sólo para caracterizar la distribución de proteínas, sino también de lípidos en tejidos como el tejido adiposo [190], el hueso [286] y el cartílago [210]. Dado el potencial de esta tecnología para el estudio de la biología básica de estos tejidos, las técnicas MSI se están aplicando cada vez más en el estudio de la biología de las células madre. Un ejemplo de ello es un estudio reciente en el que se caracteriza, mediante la técnica TOF-SIMS, la distribución del elemento químico estroncio durante la diferenciación osteogénica de las MSCs [287]. Sin embargo, a fecha de hoy no se han realizado estudios basados en MSI en los que se analicen las modulaciones que experimentan los lípidos durante la diferenciación de las MSCs hacia condrocitos, a pesar de que hay trabajos que apoyan el papel clave de los lípidos en la regulación de la condrogénesis [288, 289] y en la correcta formación del

cartílago [290]. Por lo tanto, el estudio de la distribución y modulación de los lípidos durante la condrogénesis podría ser muy útil para describir nuevos mecanismos moleculares que participen en este proceso de diferenciación. Con este objetivo, en este trabajo decidimos combinar dos de las técnicas MSI más empleadas, MALDI-MSI y TOF-SIMS, para caracterizar las modulaciones lipídicas que se producen en las MSCs durante su diferenciación hacia condrocitos.

El análisis mediante MALDI-MSI de las micromasas recogidas a los días 2 y 14 del proceso condrogénico nos permitió identificar un total de 20 lípidos diferentes, pertenecientes principalmente a los grupos de fosfolípidos y esfingolípidos. Entre los lípidos identificados, encontramos que los niveles de fosfatidilcolinas (PCs) y esfingomielinas (SMs) disminuyen durante la condrogénesis. Ambos lípidos son componentes estructurales de la membrana celular. Además, los productos resultantes del metabolismo de las SMs, tales como la ceramida, la esfingosina, la esfingosina-1-fosfato (S1P) o los diacilgliceroles (DAGs) actúan como moléculas de señalización, participando en procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación o la muerte celular programada [153]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las MSCs movilizan lípidos como las SMs para producir aquellos metabolitos secundarios necesarios para su diferenciación hacia condrocitos. De hecho, hemos detectado que los niveles de expresión del enzima SPHK1 (que cataliza la conversión de esfingosina a esfingosina-1-fosfato, o S1P) significativamente aumentados a los 14 días de la diferenciación en comparación con el día 2 (Figura 4), lo que explicaría la escasa identificación de SMs intactas a los 14 días. Además, el análisis empleando TOF-SIMS nos ha permitido validar el perfil lipídico descrito por MALDI-MSI, mediante la identificación de varias PCs ( $m/z$  782.6,  $m/z$  824.5, y  $m/z$  826.6) y fragmentos de SMs ( $m/z$  542.5 y  $m/z$  666.5) característicos de las micromasas recogidas a día 2. En este último análisis también pudimos detectar varias ceramidas ( $m/z$  576.7 and  $m/z$  604.8) a los 14 días de la diferenciación condrogénica. El efecto de esta clase de lípidos en la diferenciación adipogénica [291] y condrogénica de las MSCs [290] se ha descrito recientemente. Además, la detección de ceramidas se correlaciona con la caída de

los niveles de SM a los 14 días de diferenciación, por lo que la pérdida de SM durante el proceso de diferenciación podría utilizarse como un nuevo marcador de condrogénesis.

Por otro lado, ambos análisis nos han permitido identificar moléculas de fosfocolina (necesarias para la síntesis de PCs) de manera preferente en las micromasas recogidas a día 2. La fosfocolina constituye el almacén de la colina *in vivo* y está relacionada con el tamaño de la membrana celular [292]. El hecho de identificar la fosfocolina mayoritariamente al inicio del proceso de diferenciación sugiere que las MSCs diferenciadas son de menor tamaño que las no diferenciadas, ya que durante la condrogénesis, las MSCs dejan de crecer y empiezan a diferenciarse. Por lo tanto, el descenso en los niveles de fosfocolina durante la condrogénesis podría inducir la síntesis de otros fosfolípidos derivados del inositol o la etanolamina, que también fueron identificados mediante MALDI-MSI a los 14 días de la diferenciación. Además, los experimentos TOF-SIMS mostraron diferencias en la distribución espacial de la fosfocolina y de iones relacionados con la misma. En las imágenes de alta resolución espacial obtenidas con TOF-SIMS (Figura 3), se observa que la fosfocolina se localiza específicamente en las células situadas en la periferia de las micromasas recogidas a día 14, mientras que en las muestras recogidas a día 2 la fosfocolina se distribuye de forma homogénea por toda la micromasa. Esta diferencia en la distribución de la fosfocolina sugiere la presencia de una heterogeneidad intramuestral entre las micromasas obtenidas a los 2 y 14 días del proceso de diferenciación. Además, también se observaron diferencias en la localización de algunas otras masas incrementadas a día 14, como  $m/z$  551.6 (DAG) y  $m/z$  578.7 (pico no identificado). Ambos picos fueron detectados mediante TOF-SIMS en el centro de las micromasas recogidas a día 14. Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a que en el núcleo de las micromasas, donde la disponibilidad de oxígeno es menor, las células alcanzan un estadio de diferenciación más avanzado que las células situadas en la periferia. Y este hecho concuerda a su vez con los resultados de las inmunohistoquímicas que se han realizado a lo largo de esta tesis para el colágeno

tipo I. Previamente se ha mencionado que el colágeno tipo I es un marcador de indiferenciación de MSCs, y que éste se expresa en el estadio más temprano de la condrogénesis. En nuestro caso, en la mayor parte de las inmunohistoquímicas realizadas para el colágeno tipo I observamos que este tipo de colágeno es más abundante en las MSCs situadas en la periferia de las micromasas. En conjunto, estos datos demuestran la capacidad de la tecnología TOF-SIMS para discriminar con una alta resolución espacial entre los estadios iniciales y los más avanzados del proceso de condrogénesis.

Finalmente, para evaluar la reproducibilidad de los resultados, las muestras analizadas por TOF-SIMS se agruparon en función del donante mediante análisis de funciones discriminante (DF). Los resultados de este análisis muestran que la DF3 separa los perfiles lipídicos correspondientes a los dos tiempos analizados, y es capaz de discriminar entre los diferentes donantes. Por lo tanto, evaluando cada una de las diferentes funciones discriminantes podríamos obtener información sobre el estadio de diferenciación y el perfil de lípidos, así como relacionar estos datos con sus respectivos donantes. De esta forma, esta metodología de análisis podría utilizarse para seleccionar los mejores donantes de MSCs para la aplicación de estas células en futuras terapias celulares encaminadas a la reparación del cartílago.

En resumen, este estudio representa la primera aproximación basada en MSI para la identificación de los lípidos involucrados en las primeras etapas de diferenciación de las MSCs hacia condrocitos. Entre los lípidos identificados, la esfingomielina y varias fosfatidilcolinas disminuyen durante el proceso de diferenciación. Éstos y otros lípidos identificados en este trabajo podrían considerarse marcadores potenciales de la condrogénesis y ser utilizados en la monitorización de las estrategias encaminadas a la reparación del cartílago articular.

## Consideraciones finales

Las lesiones o defectos del cartílago articular siguen siendo un reto para la medicina moderna debido a la escasa capacidad de regeneración espontánea de este tejido. Estas lesiones son altamente incapacitantes y predisponen para la aparición de enfermedades como la artrosis (OA). Existen numerosos procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de las lesiones focales del cartílago articular basados en el uso de condrocitos autólogos. Sin embargo, los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios, y además no previenen la aparición de la OA. Las limitaciones atribuidas a este tipo de técnicas han motivado la búsqueda de procedimientos alternativos, como las técnicas de terapia celular basadas en el uso de células madre mesenquimales (MSCs). Las MSCs poseen un gran potencial terapéutico para la reparación de los defectos del cartílago debido principalmente a dos propiedades: la capacidad de secretar múltiples moléculas con propiedades inmunomoduladoras y la capacidad de diferenciarse a condrocitos, en un proceso conocido como condrogénesis [78]. La condrogénesis es el proceso por el cual se forma el cartílago, y constituye un factor limitante a la hora de utilizar las MSCs en ingeniería de tejidos, debido a la escasa disponibilidad de información sobre los mecanismos moleculares que regulan este proceso.

El trabajo de esta tesis consistió principalmente en estudiar el proceso de diferenciación condrogénica de las MSCs mediante técnicas proteómicas, con el objetivo principal de obtener paneles de biomoléculas que pudieran utilizarse como nuevos marcadores condrogénicos para su posible aplicación en las terapias de reparación basadas en MSCs.

En el primer trabajo, se estandarizó el marcaje de tipo SILAC en las MSCs aisladas de médula ósea para la cuantificación relativa de los cambios de expresión proteica que ocurren durante la diferenciación condrogénica de las MSCs. Previamente al análisis proteómico, se comprobó la efectividad de nuestro modelo de condrogénesis *in vitro*, basado en la formación de agregados celulares

o micromasas, mediante la expresión de moléculas características de la ECM del cartílago como diferentes proteoglicanos, el colágeno tipo II y el factor de transcripción Sox9. La efectividad de este modelo *in vitro* permitió su utilización en los siguientes estudios proteómicos de las MSCs. La aplicación del marcaje SILAC, en combinación con un análisis mediante nanoLC-MS/MS, permitió definir y posteriormente validar un panel de 6 posibles marcadores proteicos de diferenciación condrogénica (FINC, GELS, ATPA, VIME, SODM y PPIA). Además, estos resultados proporcionaron mucha información sobre los mecanismos moleculares que tienen lugar en las MSCs a lo largo del proceso condrogénico.

Sin embargo, esta estrategia proteómica no favoreció la identificación de proteínas típicas de matriz extracelular, que serían potencialmente muy interesantes a la hora de evaluar las características del nuevo tejido en incipiente formación. Por esta razón, se realizó un segundo estudio en el que utilizamos el doble marcaje SILAC para analizar el conjunto de las proteínas secretadas por las MSCs durante los primeros estadios de la condrogénesis. Esta versión del marcaje SILAC consiste en eliminar la condición ligera y marcar con aminoácidos pesados las dos condiciones a comparar. De esta manera, conseguimos una cuantificación más precisa de las proteínas, evitando cuantificar péptidos “contaminantes” que proceden del FBS. La utilidad de esta técnica se demostró con la cuantificación de casi 800 proteínas, de las cuales 34 proteínas con una localización extracelular conocida presentaron cambios de abundancia significativos entre los dos tiempos de condrogénesis analizados. La mayor parte de estas proteínas estaban incrementadas a día 14, y por tanto proporcionan información sobre la formación de la ECM durante las primeras etapas del proceso de diferenciación. En este trabajo se validó mediante otras técnicas el aumento de la expresión del proteoglicano 4 (PRG4) y del inhibidor tisular de metaloproteasa 1 (TIMP-1) a día 14 de la condrogénesis. Estudios recientes muestran que estas dos proteínas extracelulares se pueden identificar en el líquido sinovial de pacientes con OA, lo que sugiere su utilidad como biomarcadores de los mecanismos que tienen lugar en la articulación.



Por último, y con el fin de obtener información adicional (en este caso no sólo cuantitativa, sino también espacial) sobre las modulaciones moleculares que tienen lugar durante la condrogénesis, se caracterizaron los lípidos involucrados en este proceso de diferenciación de las MSC utilizando dos técnicas de MSI. En este último trabajo se analizaron mediante MALDI-MSI y TOF-SIMS diferentes secciones de micromasas recogidas a los días 2 y 14 de la condrogénesis. El análisis MALDI-MSI permitió identificar un total de 20 lípidos diferentes que se clasificaron principalmente en dos grupos, fosfolípidos y esfingolípidos. Entre los lípidos identificados se observó que los niveles de varias esfingomielinas disminuyen durante la diferenciación condrogénica. Este hallazgo se confirmó evaluando el aumento de expresión del enzima SPHK1 a los 14 días de la diferenciación. Finalmente, los resultados obtenidos por TOF-SIMS validaron el perfil lipídico descrito previamente por MALDI-MSI, y además revelaron diferencias en la distribución espacial de la fosfocolina entre los dos días de condrogénesis evaluados.

Todo el trabajo realizado en esta tesis ha servido, por tanto, para identificar una serie de proteínas y lípidos cuya abundancia o localización se modula en las primeras etapas del proceso condrogénico de MSCs procedentes de médula ósea. La información obtenida resulta muy valiosa para el diseño de métodos que posibiliten la monitorización molecular de esta diferenciación, y que por tanto permitan avanzar en el desarrollo de estrategias eficientes encaminadas a la reparación del cartílago articular.



## **CONCLUSIONES**



Basándonos en los capítulos presentados y discutidos a lo largo de esta tesis podemos establecer una serie de conclusiones que a continuación pasamos a enumerar:

1. La estandarización y optimización del marcaje metabólico SILAC en las células madre mesenquimales procedentes de pacientes con artrosis y controles sanos, permite la cuantificación relativa de las proteínas intracelulares y extracelulares entre los dos tiempos de condrogénesis analizados (2-14 días).
2. La aplicación de la combinación del marcaje SILAC seguido del análisis LC-MS/MS para el análisis del proteoma de células madre en diferenciación condrogénica proporciona un panel de 64 proteínas moduladas entre los dos tiempos de condrogénesis evaluados.
3. Identificamos alteraciones en la expresión de proteínas intracelulares relacionadas con el metabolismo, la reorganización del citoesqueleto y la respuesta a estrés. En particular, demostramos el incremento de 5 proteínas (GELS, ATPA, VIME, SODM, PPIA) a los 14 días de diferenciación condrogénica. Estas proteínas alteradas pueden considerarse potenciales biomarcadores de la condrogénesis.
4. La estrategia descrita en el punto 2, aplicada al estudio del secretoma de las células madre mesenquimales en condrogénesis, permite identificar 34 proteínas diferencialmente secretadas al comparar los dos tiempos de diferenciación.
5. Identificamos modulaciones en la secreción de proteínas extracelulares principalmente relacionadas con la matriz extracelular del cartílago. En particular, validamos el incremento del proteoglicano 4 y del inhibidor de proteasas TIMP-1 como posibles biomarcadores de la condrogénesis.
6. La aplicación de la técnica MALDI-MSI para la caracterización de los lípidos implicados en las fases iniciales del proceso condrogénico de las células madre

mesenquimales, permite identificar 20 especies lipídicas, principalmente fosfolípidos y esfingolípidos.

7. Los lípidos relacionados con la fosfocolina, como la fosfatidilcolina, pueden utilizarse como biomarcadores de indiferenciación mientras que la pérdida de esfingomiélinina puede considerarse como un potencial biomarcador de la condrogénesis.

8. La diferente distribución espacial observada para la fosfocolina e iones relacionados, demuestra que la técnica TOF-SIMS es una herramienta útil para discriminar áreas de células con distinta capacidad condrogénica en las micromasas.

## **CONCLUSIONS**





According to the chapters presented and discussed throughout this thesis, we can establish the following conclusions:

1. The standardization and optimization of the SILAC labeling procedure in the mesenchymal stem cells obtained from OA patients and control donors, enable the relative quantification of the intracellular and extracellular proteins between the two time points of chondrogenesis (2-14 days).
2. The application of SILAC labeling coupled with LC-MS/MS analysis for the proteomic analysis of mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis provides a panel of 64 altered proteins between the two time points of chondrogenesis.
3. We identify alterations in the expression of intracellular proteins related to metabolism, cytoskeletal reorganization and stress response. Specifically, we demonstrate the increase of 5 proteins (GELS, ATPA, VIME, SODM, PPIA) at 14 days of chondrogenesis. These differentially expressed proteins can be considered potential biomarkers of chondrogenesis.
4. The strategy explained in section 2, applied to study the secretome of mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis, allows the identification of 34 proteins that were differentially secreted when we compared the two time points of differentiation.
5. We identify modulations in the secretion of extracellular proteins mainly related with the extracellular matrix of cartilage. Specifically, we validate the increase of proteoglycan 4 and the metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1) as potential biomarkers of chondrogenesis.
6. The application of the MALDI-MSI technique to characterize the lipids involved in the early stages of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, enables the identification of 20 lipid species, mainly phospholipids and sphingolipids.

7. Lipids related to phosphocholine, such as phosphatidylcholine, can be used as undifferentiation biomarkers, while the loss of sphingomyelins can be considered as a potential biomarker of chondrogenesis.

8. The different spatial distribution observed for phosphocholine and related ions demonstrate that TOF-SIMS technique is a useful tool to discriminate cellular areas with different chondrogenic capacity in the micromasses.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- [1] Carmona, L., Ballina, J., Gabriel, R., Laffon, A., Group, E. S., The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis* 2001, *60*, 1040-1045.
- [2] Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., Goldring, M. B., Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012, *64*, 1697-1707.
- [3] Felson, D. T., Lawrence, R. C., Dieppe, P. A., Hirsch, R., *et al.*, Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 2000, *133*, 635-646.
- [4] Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., Jordan, K. P., Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, *18*, 24-33.
- [5] Lawrence, R. C., Felson, D. T., Helmick, C. G., Arnold, L. M., *et al.*, Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 2008, *58*, 26-35.
- [6] Srikanth, V. K., Fryer, J. L., Zhai, G., Winzenberg, T. M., *et al.*, A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, *13*, 769-781.
- [7] Spector, T. D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., Hart, D., Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 1996, *312*, 940-943.
- [8] Evangelou, E., Valdes, A. M., Kerkhof, H. J., Styrkarsdottir, U., *et al.*, Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis* 2011, *70*, 349-355.
- [9] Valdes, A. M., Evangelou, E., Kerkhof, H. J., Tamm, A., *et al.*, The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis* 2011, *70*, 873-875.
- [10] Day-Williams, A. G., Southam, L., Panoutsopoulou, K., Rayner, N. W., *et al.*, A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2011, *89*, 446-450.
- [11] Zeggini, E., Panoutsopoulou, K., Southam, L., Rayner, N. W., *et al.*, Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet* 2012, *380*, 815-823.
- [12] Nevitt, M. C., Zhang, Y., Javaid, M. K., Neogi, T., *et al.*, High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study. *Ann Rheum Dis* 2010, *69*, 163-168.
- [13] Felson, D. T., Anderson, J. J., Naimark, A., Walker, A. M., Meenan, R. F., Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1988, *109*, 18-24.
- [14] Niu, J., Zhang, Y. Q., Torner, J., Nevitt, M., *et al.*, Is obesity a risk factor for progressive radiographic knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum* 2009, *61*, 329-335.
- [15] Felson, D. T., Zhang, Y., Anthony, J. M., Naimark, A., Anderson, J. J., Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1992, *116*, 535-539.

- [16] Christensen, R., Bartels, E. M., Astrup, A., Bliddal, H., Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2007, *66*, 433-439.
- [17] Sandell, L. J., Obesity and osteoarthritis: is leptin the link? *Arthritis Rheum* 2009, *60*, 2858-2860.
- [18] Sowers, M. R., Karvonen-Gutierrez, C. A., The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010, *22*, 533-537.
- [19] Carman, W. J., Sowers, M., Hawthorne, V. M., Weissfeld, L. A., Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol* 1994, *139*, 119-129.
- [20] Grotle, M., Hagen, K. B., Natvig, B., Dahl, F. A., Kvien, T. K., Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord* 2008, *9*, 132.
- [21] Karlson, E. W., Mandl, L. A., Aweh, G. N., Sangha, O., *et al.*, Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors. *Am J Med* 2003, *114*, 93-98.
- [22] Wang, Y., Simpson, J. A., Wluka, A. E., Teichtahl, A. J., *et al.*, Is physical activity a risk factor for primary knee or hip replacement due to osteoarthritis? A prospective cohort study. *J Rheumatol* 2011, *38*, 350-357.
- [23] Englund, M., Guermazi, A., Roemer, F. W., Aliabadi, P., *et al.*, Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 2009, *60*, 831-839.
- [24] Hadler, N. M., Gillings, D. B., Imbus, H. R., Levitin, P. M., *et al.*, Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis Rheum* 1978, *21*, 210-220.
- [25] Gelber, A. C., Hochberg, M. C., Mead, L. A., Wang, N. Y., *et al.*, Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2000, *133*, 321-328.
- [26] Benito-Ruiz, P., *Estructura y función del cartílago. Manual SER de la ARTROSIS*, Madrid 2002.
- [27] Mankin, H., *The water of articular cartilage. The human joint in health and disease.*, 1978.
- [28] Knudson, W., Loeser, R. F., CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2002, *59*, 36-44.
- [29] Jenniskens, Y. M., Koevoet, W., de Bart, A. C., Weinans, H., *et al.*, Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, *14*, 1136-1146.
- [30] Studer, R. K., Decker, K., Melhem, S., Georgescu, H., Nitric oxide inhibition of IGF-1 stimulated proteoglycan synthesis: role of cGMP. *J Orthop Res* 2003, *21*, 914-921.
- [31] Vincent, T., Hermansson, M., Bolton, M., Wait, R., Saklatvala, J., Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, *99*, 8259-8264.

- [32] Monfort, J., Tardif, G., Reboul, P., Mineau, F., *et al.*, Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Res Ther* 2006, *8*, R26.
- [33] Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., Fahmi, H., Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011, *7*, 33-42.
- [34] Goldring, M. B., Berenbaum, F., The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res* 2004, S37-46.
- [35] Hunziker, E. B., Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, *10*, 432-463.
- [36] Dhinsa, B. S., Adesida, A. B., Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012, *7*, 143-148.
- [37] Vijayan, S., Bentley, G., Briggs, T., Skinner, J., *et al.*, Cartilage repair: A review of Stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques. *Indian J Orthop* 2010, *44*, 238-245.
- [38] Henson, F., Getgood, A., The use of scaffolds in musculoskeletal tissue engineering. *Open Orthop J* 2011, *5 Suppl 2*, 261-266.
- [39] Álvarez, E., Ripoll, P. L., Restrepo, A., Forniol, F., Trauma 2010, pp. 117-134.
- [40] Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Rodrigo, J. J., Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* 2001, S362-369.
- [41] Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., *et al.*, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994, *331*, 889-895.
- [42] Brittberg, M., Peterson, L., Sjögren-Jansson, E., Tallheden, T., Lindahl, A., Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 2003, *85-A Suppl 3*, 109-115.
- [43] Brittberg, M., Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med* 2010, *38*, 1259-1271.
- [44] Zheng, M. H., Willers, C., Kirilak, L., Yates, P., *et al.*, Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Eng* 2007, *13*, 737-746.
- [45] Dehne, T., Schenk, R., Perka, C., Morawietz, L., *et al.*, Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene* 2010, *462*, 8-17.
- [46] Caplan, A. I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991, *9*, 641-650.
- [47] Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., *et al.*, Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003, *116*, 1827-1835.

- [48] D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Menei, P., *et al.*, Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004, *117*, 2971-2981.
- [49] Belema-Bedada, F., Uchida, S., Martire, A., Kostin, S., Braun, T., Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell* 2008, *2*, 566-575.
- [50] Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., *et al.*, Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005, *7*, 393-395.
- [51] Cicione, C., Díaz-Prado, S., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Blanco, F. J., Molecular profile and cellular characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells: donor influence on chondrogenesis. *Differentiation* 2010, *80*, 155-165.
- [52] Pires de Carvalho, P., Hamel, K. M., Duarte, R., King, A. G., *et al.*, Comparison of infrapatellar and subcutaneous adipose tissue stromal vascular fraction and stromal/stem cells in osteoarthritic subjects. *J Tissue Eng Regen Med* 2014, *8*, 757-762.
- [53] Wickham, M. Q., Erickson, G. R., Gimble, J. M., Vail, T. P., Guilak, F., Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2003, 196-212.
- [54] Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Wang, M. L., *et al.*, Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells* 2003, *21*, 681-693.
- [55] Jankowski, R. J., Deasy, B. M., Huard, J., Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002, *9*, 642-647.
- [56] Raggi, C., Berardi, A. C., Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine. *Muscles Ligaments Tendons J* 2012, *2*, 239-242.
- [57] Keyser, K. A., Beagles, K. E., Kiem, H. P., Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant* 2007, *16*, 555-562.
- [58] Melief, S. M., Zwaginga, J. J., Fibbe, W. E., Roelofs, H., Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2013, *2*, 455-463.
- [59] Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K., The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006, *97*, 33-44.
- [60] Wagner, E. F., Karsenty, G., Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 2001, *11*, 527-532.
- [61] Michigami, T., Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2013, *70*, 4213-4221.
- [62] Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., de Crombrughe, B., The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 2002, *16*, 2813-2828.



- [63] Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., *et al.*, Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 2004, *18*, 952-963.
- [64] Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., *et al.*, Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 2003, *162*, 833-842.
- [65] Dy, P., Wang, W., Bhattaram, P., Wang, Q., *et al.*, Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 2012, *22*, 597-609.
- [66] Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., Mirams, M., Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008, *40*, 46-62.
- [67] Budde, B., Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., *et al.*, Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol Cell Biol* 2005, *25*, 10465-10478.
- [68] Chen, F. H., Herndon, M. E., Patel, N., Hecht, J. T., *et al.*, Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. *J Biol Chem* 2007, *282*, 24591-24598.
- [69] Hong, S., Derfoul, A., Pereira-Mouries, L., Hall, D. J., A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *FASEB J* 2009, *23*, 3539-3552.
- [70] Djouad, F., Bony, C., Canovas, F., Fromigué, O., *et al.*, Transcriptomic analysis identifies Foxo3A as a novel transcription factor regulating mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Cloning Stem Cells* 2009, *11*, 407-416.
- [71] Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Yoo, J. U., In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998, *238*, 265-272.
- [72] Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E., Richter, W., Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2010, *223*, 84-93.
- [73] Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Reger, R. L., Prockop, D. J., Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005, *320*, 269-276.
- [74] Huang, J. I., Kazmi, N., Durbhakula, M. M., Hering, T. M., *et al.*, Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res* 2005, *23*, 1383-1389.
- [75] Choi, K. M., Seo, Y. K., Yoon, H. H., Song, K. Y., *et al.*, Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng* 2008, *105*, 586-594.
- [76] Zhou, S., Eid, K., Glowacki, J., Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2004, *19*, 463-470.
- [77] Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., *et al.*, Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998, *4*, 415-428.

- [78] Meirelles, L. a. S., Fontes, A. M., Covas, D. T., Caplan, A. I., Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009, *20*, 419-427.
- [79] Le Blanc, K., Rasmusson, I., Götherström, C., Seidel, C., *et al.*, Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004, *60*, 307-315.
- [80] Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W., Dazzi, F., Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005, *105*, 2821-2827.
- [81] Bouffi, C., Djouad, F., Mathieu, M., Noël, D., Jorgensen, C., Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? *Rheumatology (Oxford)* 2009, *48*, 1185-1189.
- [82] Gieseke, F., Böhringer, J., Bussolari, R., Dominici, M., *et al.*, Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* 2010, *116*, 3770-3779.
- [83] Caplan, A. I., Dennis, J. E., Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006, *98*, 1076-1084.
- [84] Fields, S., Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science* 2001, *291*, 1221-1224.
- [85] Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., *et al.*, Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995, *16*, 1090-1094.
- [86] Dziembowski, A., Séraphin, B., Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett* 2004, *556*, 1-6.
- [87] Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., van Dijk, J. M., Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, *64*, 515-547.
- [88] Pavlou, M. P., Diamandis, E. P., The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? *J Proteomics* 2010, *73*, 1896-1906.
- [89] Mustafa, S. A., Hoheisel, J. D., Alhamdani, M. S., Secretome profiling with antibody microarrays. *Mol Biosyst* 2011, *7*, 1795-1801.
- [90] Wang, D., Park, J. S., Chu, J. S., Krakowski, A., *et al.*, Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation. *J Biol Chem* 2004, *279*, 43725-43734.
- [91] Feldmann, R. E., Bieback, K., Maurer, M. H., Kalenka, A., *et al.*, Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis* 2005, *26*, 2749-2758.
- [92] Foster, L. J., Zeemann, P. A., Li, C., Mann, M., *et al.*, Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells* 2005, *23*, 1367-1377.
- [93] Salaszyk, R. M., Westcott, A. M., Klees, R. F., Ward, D. F., *et al.*, Comparing the protein expression profiles of human mesenchymal stem cells and human osteoblasts using gene ontologies. *Stem Cells Dev* 2005, *14*, 354-366.

- [94] Potian, J. A., Aviv, H., Ponzio, N. M., Harrison, J. S., Rameshwar, P., Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003, *171*, 3426-3434.
- [95] Roche, S., D'Ippolito, G., Gomez, L. A., Bouckenooghe, T., *et al.*, Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system in vivo. *Int J Pharm* 2013, *440*, 72-82.
- [96] Nakanishi, C., Nagaya, N., Ohnishi, S., Yamahara, K., *et al.*, Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J* 2011, *75*, 2260-2268.
- [97] Li, H., Zuo, S., He, Z., Yang, Y., *et al.*, Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, *299*, H1772-1781.
- [98] Qu, X., Liu, X., Cheng, K., Yang, R., Zhao, R. C., Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol* 2012, *40*, 761-770.
- [99] Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., *et al.*, Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007, *212*, 702-709.
- [100] Wang, M., Crisostomo, P. R., Herring, C., Meldrum, K. K., Meldrum, D. R., Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006, *291*, R880-884.
- [101] Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., *et al.*, Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004, *109*, 1292-1298.
- [102] Campeau, P. M., Rafei, M., Boivin, M. N., Sun, Y., *et al.*, Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood* 2009, *114*, 3181-3190.
- [103] Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., *et al.*, Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008, *2*, 141-150.
- [104] Ribeiro, C. A., Fraga, J. S., Grãos, M., Neves, N. M., *et al.*, The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem Cell Res Ther* 2012, *3*, 18.
- [105] Hoch, A. I., Binder, B. Y., Genetos, D. C., Leach, J. K., Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2012, *7*, e35579.
- [106] Oskowitz, A., McFerrin, H., Gutschow, M., Carter, M. L., Pochampally, R., Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res* 2011, *6*, 215-225.
- [107] Grässel, S., Ahmed, N., Göttl, C., Grifka, J., Gene and protein expression profile of naive and osteo-chondrogenically differentiated rat bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Int J Mol Med* 2009, *23*, 745-755.
- [108] Rafei, M., Hsieh, J., Fortier, S., Li, M., *et al.*, Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 2008, *112*, 4991-4998.

- [109] Zhang, H., Yang, R., Wang, Z., Lin, G., *et al.*, Adipose tissue-derived stem cells secrete CXCL5 cytokine with neurotrophic effects on cavernous nerve regeneration. *J Sex Med* 2011, *8*, 437-446.
- [110] Maury, E., Ehala-Aleksejev, K., Guiot, Y., Detry, R., *et al.*, Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, *293*, E656-665.
- [111] Sze, S. K., de Kleijn, D. P., Lai, R. C., Khia Way Tan, E., *et al.*, Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 2007, *6*, 1680-1689.
- [112] Liu, C. H., Hwang, S. M., Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine* 2005, *32*, 270-279.
- [113] Sarojini, H., Estrada, R., Lu, H., Dekova, S., *et al.*, PEDF from mouse mesenchymal stem cell secretome attracts fibroblasts. *J Cell Biochem* 2008, *104*, 1793-1802.
- [114] Estrada, R., Li, N., Sarojini, H., An, J., *et al.*, Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol* 2009, *219*, 563-571.
- [115] Choi, Y. A., Lim, J., Kim, K. M., Acharya, B., *et al.*, Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation. *J Proteome Res* 2010, *9*, 2946-2956.
- [116] Kim, H. S., Choi, D. Y., Yun, S. J., Choi, S. M., *et al.*, Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res* 2012, *11*, 839-849.
- [117] Kim, J. M., Kim, J., Kim, Y. H., Kim, K. T., *et al.*, Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. *J Cell Physiol* 2013, *228*, 216-224.
- [118] Lee, M. J., Kim, J., Kim, M. Y., Bae, Y. S., *et al.*, Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Proteome Res* 2010, *9*, 1754-1762.
- [119] Akram, K. M., Samad, S., Spiteri, M. A., Forsyth, N. R., Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir Res* 2013, *14*, 9.
- [120] Bara, J. J., McCarthy, H. E., Humphrey, E., Johnson, W. E., Roberts, S., Bone marrow-derived mesenchymal stem cells become antiangiogenic when chondrogenically or osteogenically differentiated: implications for bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014, *20*, 147-159.
- [121] Chiellini, C., Cochet, O., Negroni, L., Samson, M., *et al.*, Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* 2008, *9*, 26.
- [122] Arufe, M. C., De la Fuente, A., Mateos, J., Fuentes, I., *et al.*, Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev* 2011, *20*, 1199-1212.
- [123] Purmessur, D., Schek, R. M., Abbott, R. D., Ballif, B. A., *et al.*, Notochordal conditioned media from tissue increases proteoglycan accumulation and promotes a healthy nucleus pulposus phenotype in human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 2011, *13*, R81.

- [124] Chen, X., Cushman, S. W., Pannell, L. K., Hess, S., Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. *J Proteome Res* 2005, 4, 570-577.
- [125] Coutu, D. L., Wu, J. H., Monette, A., Rivard, G. E., *et al.*, Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 2008, 283, 17991-18001.
- [126] Zvonic, S., Lefevre, M., Kilroy, G., Floyd, Z. E., *et al.*, Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 18-28.
- [127] Tasso, R., Gaetani, M., Molino, E., Cattaneo, A., *et al.*, The role of bFGF on the ability of MSC to activate endogenous regenerative mechanisms in an ectopic bone formation model. *Biomaterials* 2012, 33, 2086-2096.
- [128] Kristensen, L. P., Chen, L., Nielsen, M. O., Qanie, D. W., *et al.*, Temporal profiling and pulsed SILAC labeling identify novel secreted proteins during ex vivo osteoblast differentiation of human stromal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 2012, 11, 989-1007.
- [129] Rocha, B., Calamia, V., Casas, V., Carrascal, M., *et al.*, Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. *J Proteome Res* 2014, 13, 1045-1054.
- [130] Alvarez-Llamas, G., Szalowska, E., de Vries, M. P., Weening, D., *et al.*, Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 589-600.
- [131] Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J. W., *et al.*, Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J Proteome Res* 2009, 8, 48-58.
- [132] Ruiz-Romero, C., González, A., *Manual de la SER: Artosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.*, 2010.
- [133] Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4, 3665-3685.
- [134] Herbert, B., Galvani, M., Hamdan, M., Olivieri, E., *et al.*, Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? *Electrophoresis* 2001, 22, 2046-2057.
- [135] Olsen, J. V., Ong, S. E., Mann, M., Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 2004, 3, 608-614.
- [136] Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., Shevchenko, A., Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 2003, 75, 1300-1306.
- [137] Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975, 26, 231-243.
- [138] Scheele, G. A., Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J Biol Chem* 1975, 250, 5375-5385.
- [139] Valcu, C. M., Valcu, M., Reproducibility of two-dimensional gel electrophoresis at different replication levels. *J Proteome Res* 2007, 6, 4677-4683.

- [140] Unlü, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997, *18*, 2071-2077.
- [141] Fernández-Puente, P., Mateos, J., Fernández-Costa, C., Oreiro, N., *et al.*, Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. *J Proteome Res* 2011, *10*, 5095-5101.
- [142] Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R., Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001, *19*, 242-247.
- [143] Delcorte, A., *TOF-SIMS: Surface Analysis by Mass Spectrometry*, Manchester 2001.
- [144] Colliver, T. L., Brummel, C. L., Pacholski, M. L., Swaneck, F. D., *et al.*, Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS. *Anal Chem* 1997, *69*, 2225-2231.
- [145] Eijkel, G. B., Kaletas, B., Van der Wiel, I. M., Kros, J. M., *et al.*, Correlating MALDI and SIMS imaging mass spectrometric datasets of biological tissue surfaces. *Surf Interface* 2009, *41*, 675-685.
- [146] Chandra, S., Smith, D. R., Morrison, G. H., Subcellular imaging by dynamic SIMS ion microscopy. *Anal Chem* 2000, *72*, 104A-114A.
- [147] Takáts, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G., Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 2004, *306*, 471-473.
- [148] Cooks, R. G., Ouyang, Z., Takats, Z., Wiseman, J. M., Detection Technologies. Ambient mass spectrometry. *Science* 2006, *311*, 1566-1570.
- [149] Wiseman, J. M., Ifa, D. R., Venter, A., Cooks, R. G., Ambient molecular imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Protoc* 2008, *3*, 517-524.
- [150] Yates, J. R., Ruse, C. I., Nakorchevsky, A., Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2009, *11*, 49-79.
- [151] Di Girolamo, F., Lante, I., Muraca, M., Putignani, L., The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Curr Org Chem* 2013, *17*, 2891-2905.
- [152] Fazekas de St Groth, S., Webster, R. G., Datyner, A., Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 1963, *71*, 377-391.
- [153] Merrill, A. H., Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., *et al.*, Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, *142*, 208-225.
- [154] Oakley, B. R., Kirsch, D. R., Morris, N. R., A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1980, *105*, 361-363.
- [155] Switzer, R. C., Merril, C. R., Shifrin, S., A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1979, *98*, 231-237.
- [156] Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T. H., Kemper, C., *et al.*, Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional

- sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 2000, 21, 2509-2521.
- [157] Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E., Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006, 6, 5385-5408.
- [158] Diezel, W., Kopperschläger, G., Hofmann, E., An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem* 1972, 48, 617-620.
- [159] Rabilloud, T., Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 1990, 11, 785-794.
- [160] Lopez, M. F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., et al., A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 2000, 21, 3673-3683.
- [161] Ong, S. E., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005, 1, 252-262.
- [162] Goshe, M. B., Smith, R. D., Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2003, 14, 101-109.
- [163] Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., et al., Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 2139-2149.
- [164] Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., Gygi, S. P., Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 6940-6945.
- [165] Nahnsen, S., Bielow, C., Reinert, K., Kohlbacher, O., Tools for label-free peptide quantification. *Mol Cell Proteomics* 2013, 12, 549-556.
- [166] Leitner, A., Lindner, W., Current chemical tagging strategies for proteome analysis by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004, 813, 1-26.
- [167] Leitner, A., Lindner, W., Chemistry meets proteomics: the use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics. *Proteomics* 2006, 6, 5418-5434.
- [168] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., et al., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999, 17, 994-999.
- [169] Yi, E. C., Li, X. J., Cooke, K., Lee, H., et al., Increased quantitative proteome coverage with (13)C/(12)C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme. *Proteomics* 2005, 5, 380-387.
- [170] Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., et al., Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004, 3, 1154-1169.
- [171] Pierce, A., Unwin, R. D., Evans, C. A., Griffiths, S., et al., Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7, 853-863.
- [172] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 376-386.



- [173] Bendall, S. C., Hughes, C., Stewart, M. H., Doble, B., *et al.*, Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics* 2008, *7*, 1587-1597.
- [174] Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A., Fenselau, C., Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal Chem* 2001, *73*, 2836-2842.
- [175] Altelaar, A. F., Klinkert, I., Jalink, K., de Lange, R. P., *et al.*, Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 2006, *78*, 734-742.
- [176] Schwamborn, K., Caprioli, R. M., MALDI imaging mass spectrometry--painting molecular pictures. *Mol Oncol* 2010, *4*, 529-538.
- [177] Passarelli, M. K., Winograd, N., Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochim Biophys Acta* 2011, *1811*, 976-990.
- [178] Mas, S., Perez, R., Martinez-Pinna, R., Egido, J., Vivanco, F., Cluster TOF-SIMS imaging: a new light for in situ metabolomics? *Proteomics* 2008, *8*, 3735-3745.
- [179] Schwamborn, K., Caprioli, R. M., Molecular imaging by mass spectrometry--looking beyond classical histology. *Nat Rev Cancer* 2010, *10*, 639-646.
- [180] Chaurand, P., Schwartz, S. A., Billheimer, D., Xu, B. J., *et al.*, Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2004, *76*, 1145-1155.
- [181] Stoeckli, M., Staab, D., Staufenbiel, M., Wiederhold, K. H., Signor, L., Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry. *Anal Biochem* 2002, *311*, 33-39.
- [182] MacAleese, L., Stauber, J., Heeren, R. M., Perspectives for imaging mass spectrometry in the proteomics landscape. *Proteomics* 2009, *9*, 819-834.
- [183] Aerni, H. R., Cornett, D. S., Caprioli, R. M., Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Anal Chem* 2006, *78*, 827-834.
- [184] Lee, S. H., Williams, M. V., DuBois, R. N., Blair, I. A., Targeted lipidomics using electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, *17*, 2168-2176.
- [185] Jones, J. J., Borgmann, S., Wilkins, C. L., O'Brien, R. M., Characterizing the phospholipid profiles in mammalian tissues by MALDI FTMS. *Anal Chem* 2006, *78*, 3062-3071.
- [186] Nakanishi, H., Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., *et al.*, Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J Biol Chem* 2006, *281*, 20140-20147.
- [187] O'Brien, J. S., Sampson, E. L., Stern, M. B., Lipid composition of myelin from the peripheral nervous system. Intradural spinal roots. *J Neurochem* 1967, *14*, 357-365.
- [188] Mikawa, S., Suzuki, M., Fujimoto, C., Sato, K., Imaging of phosphatidylcholines in the adult rat brain using MALDI-TOF MS. *Neurosci Lett* 2009, *451*, 45-49.
- [189] Dill, A. L., Ifa, D. R., Manicke, N. E., Ouyang, Z., Cooks, R. G., Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009, *877*, 2883-2889.



- [190] Malmberg, P., Nygren, H., Richter, K., Chen, Y., *et al.*, Imaging of lipids in human adipose tissue by cluster ion TOF-SIMS. *Microsc Res Tech* 2007, 70, 828-835.
- [191] Woods, A. S., Jackson, S. N., Brain tissue lipidomics: direct probing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *AAPS J* 2006, 8, E391-395.
- [192] Caldwell, R. L., Caprioli, R. M., Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4, 394-401.
- [193] Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., Battifora, H., Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000, 24, 1016-1019.
- [194] Metz, B., Kersten, G. F., Baart, G. J., de Jong, A., *et al.*, Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjug Chem* 2006, 17, 815-822.
- [195] Casadonte, R., Caprioli, R. M., Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc* 2011, 6, 1695-1709.
- [196] Svensson, M., Sköld, K., Svenningsson, P., Andren, P. E., Peptidomics-based discovery of novel neuropeptides. *J Proteome Res* 2003, 2, 213-219.
- [197] Svensson, M., Boren, M., Sköld, K., Fälth, M., *et al.*, Heat stabilization of the tissue proteome: a new technology for improved proteomics. *J Proteome Res* 2009, 8, 974-981.
- [198] Schwartz, S. A., Reyzer, M. L., Caprioli, R. M., Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom* 2003, 38, 699-708.
- [199] Chen, R., Ma, M., Hui, L., Zhang, J., Li, L., Measurement of neuropeptides in crustacean hemolymph via MALDI mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, 20, 708-718.
- [200] Strohalm, M., Strohalm, J., Kaftan, F., Krásný, L., *et al.*, Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-based tissue-embedding medium compatible with MALDI mass spectrometry imaging experiments. *Anal Chem* 2011, 83, 5458-5462.
- [201] Eberlin, L. S., Ifa, D. R., Wu, C., Cooks, R. G., Three-dimensional visualization of mouse brain by lipid analysis using ambient ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010, 49, 873-876.
- [202] Kaletaş, B. K., van der Wiel, I. M., Stauber, J., Güzel, C., *et al.*, Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics* 2009, 9, 2622-2633.
- [203] Herring, K. D., Oppenheimer, S. R., Caprioli, R. M., Direct tissue analysis by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: application to kidney biology. *Semin Nephrol* 2007, 27, 597-608.
- [204] Pan, C., Xu, S., Zhou, H., Fu, Y., *et al.*, Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 2007, 387, 193-204.

- [205] Tholey, A., Heinzle, E., Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives. *Anal Bioanal Chem* 2006, *386*, 24-37.
- [206] Armstrong, D. W., Zhang, L. K., He, L., Gross, M. L., Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2001, *73*, 3679-3686.
- [207] Astigarraga, E., Barreda-Gómez, G., Lombardero, L., Fresnedo, O., *et al.*, Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix. *Anal Chem* 2008, *80*, 9105-9114.
- [208] McLean, J. A., Stumpo, K. A., Russell, D. H., Size-selected (2-10 nm) gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides. *J Am Chem Soc* 2005, *127*, 5304-5305.
- [209] Cerruti, C. D., Benabdellah, F., Laprèvote, O., Touboul, D., Brunelle, A., MALDI imaging and structural analysis of rat brain lipid negative ions with 9-aminoacridine matrix. *Anal Chem* 2012, *84*, 2164-2171.
- [210] Cillero-Pastor, B., Eijkel, G., Kiss, A., Blanco, F. J., Heeren, R. M., Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal Chem* 2012, *84*, 8909-8916.
- [211] Lemaire, R., Tabet, J. C., Ducoroy, P., Hendra, J. B., *et al.*, Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 2006, *78*, 809-819.
- [212] Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Mi, D., Chaurand, P., Caprioli, R. M., Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008, *19*, 1069-1077.
- [213] Groseclose, M. R., Andersson, M., Hardesty, W. M., Caprioli, R. M., Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007, *42*, 254-262.
- [214] Stoyanovsky, D. A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., He, R. R., *et al.*, Improved spatial resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of lipids in the brain by alkylated derivatives of 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2014, *28*, 403-412.
- [215] Shrivastava, K., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., *et al.*, Ionic matrix for enhanced MALDI imaging mass spectrometry for identification of phospholipids in mouse liver and cerebellum tissue sections. *Anal Chem* 2010, *82*, 8800-8806.
- [216] Stübiger, G., Belgacem, O., Analysis of lipids using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a matrix for MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007, *79*, 3206-3213.
- [217] Steven, R. T., Race, A. M., Bunch, J., para-Nitroaniline is a promising matrix for MALDI-MS imaging on intermediate pressure MS systems. *J Am Soc Mass Spectrom* 2013, *24*, 801-804.
- [218] Nakanishi, T., Ohtsu, I., Furuta, M., Ando, E., Nishimura, O., Direct MS/MS analysis of proteins blotted on membranes by a matrix-assisted laser

- desorption/ionization-quadrupole ion trap-time-of-flight tandem mass spectrometer. *J Proteome Res* 2005, 4, 743-747.
- [219] Ferguson, L. S., Creasey, S., Wolstenholme, R., Clench, M. R., Francese, S., Efficiency of the dry-wet method for the MALDI-MSI analysis of latent fingerprints. *J Mass Spectrom* 2013, 48, 677-684.
- [220] Schürenberg, M., Luebbert, C., Deininger, S.-O., Ketterlinus, R., Suckau, D., MALDI tissue imaging: mass spectrometric localization of biomarkers in tissue slices. *Nature Methods* 2007, 4, iii-iv.
- [221] Yamada, Y., Hidefumi, K., Shion, H., Oshikata, M., Haramaki, Y., Distribution of chloroquine in ocular tissue of pigmented rat using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011, 25, 1600-1608.
- [222] Hankin, J. A., Barkley, R. M., Murphy, R. C., Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007, 18, 1646-1652.
- [223] Puolitaival, S. M., Burnum, K. E., Cornett, D. S., Caprioli, R. M., Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008, 19, 882-886.
- [224] Deininger, S. O., Ebert, M. P., Fütterer, A., Gerhard, M., Röcken, C., MALDI imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers. *J Proteome Res* 2008, 7, 5230-5236.
- [225] Zhang, L., Hu, J., Athanasiou, K. A., The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng* 2009, 37, 1-57.
- [226] Steinert, A. F., Ghivizzani, S. C., Rethwilm, A., Tuan, R. S., *et al.*, Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 2007, 9, 213.
- [227] Hardingham, T., Tew, S., Murdoch, A., Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002, 4 Suppl 3, S63-68.
- [228] Hiraki, Y., Shukunami, C., Iyama, K., Mizuta, H., Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9 Suppl A, S102-108.
- [229] Xian, C. J., Foster, B. K., Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006, 1, 213-229.
- [230] Pittenger, M. F., Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 2008, 449, 27-44.
- [231] Lee, H. K., Lee, B. H., Park, S. A., Kim, C. W., The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2006, 6, 1223-1229.
- [232] Jeong, J. A., Ko, K. M., Park, H. S., Lee, J., *et al.*, Membrane proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells during adipogenesis. *Proteomics* 2007, 7, 4181-4191.
- [233] Kim, S., Min, W. K., Chun, S., Lee, W., *et al.*, Protein expression profiles during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Tohoku J Exp Med* 2010, 221, 141-150.

- [234] Granéli, C., Thorfve, A., Ruetschi, U., Brisby, H., *et al.*, Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res* 2014, *12*, 153-165.
- [235] Ji, Y. H., Ji, J. L., Sun, F. Y., Zeng, Y. Y., *et al.*, Quantitative proteomics analysis of chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by iTRAQ labeling coupled with on-line two-dimensional LC/MS/MS. *Mol Cell Proteomics* 2010, *9*, 550-564.
- [236] De la Fuente, A., Mateos, J., Lesende-Rodríguez, I., Calamia, V., *et al.*, Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 2012, *11*, M111.010496.
- [237] Schilling, O., Overall, C. M., Proteomic discovery of protease substrates. *Curr Opin Chem Biol* 2007, *11*, 36-45.
- [238] Calamia, V., Rocha, B., Mateos, J., Fernández-Puente, P., *et al.*, Metabolic labeling of chondrocytes for the quantitative analysis of the interleukin-1-beta-mediated modulation of their intracellular and extracellular proteomes. *J Proteome Res* 2011, *10*, 3701-3711.
- [239] Ruiz-Romero, C., López-Armada, M. J., Blanco, F. J., Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005, *5*, 3048-3059.
- [240] Xu, J., Wang, W., Ludeman, M., Cheng, K., *et al.*, Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Eng Part A* 2008, *14*, 667-680.
- [241] Kadler, K. E., Hill, A., Canty-Laird, E. G., Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008, *20*, 495-501.
- [242] Kutsuna, T., Inoue, H., Takeda, H., Takahashi, T., *et al.*, Fibronectin regulates proteoglycan production balance in transforming growth factor- $\beta$ 1-induced chondrogenesis. *Int J Mol Med* 2011, *28*, 829-834.
- [243] Connelly, J. T., Petrie, T. A., García, A. J., Levenston, M. E., Fibronectin- and collagen-mimetic ligands regulate bone marrow stromal cell chondrogenesis in three-dimensional hydrogels. *Eur Cell Mater* 2011, *22*, 168-176; discussion 176-167.
- [244] Djouad, F., Delorme, B., Maurice, M., Bony, C., *et al.*, Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2007, *9*, R33.
- [245] Bobick, B. E., Tuan, R. S., Chen, F. H., The intermediate filament vimentin regulates chondrogenesis of adult human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *J Cell Biochem* 2010, *109*, 265-276.
- [246] Pattappa, G., Heywood, H. K., de Bruijn, J. D., Lee, D. A., The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol* 2011, *226*, 2562-2570.

- [247] Mylotte, L. A., Duffy, A. M., Murphy, M., O'Brien, T., *et al.*, Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells* 2008, *26*, 1325-1336.
- [248] Schedel, J., Lowin, T., Kujat, R., Judex, M., *et al.*, RAP-PCR fingerprinting reveals time-dependent expression of matrix-related molecules following stem-cell based TGF $\beta$ 1-induced chondrocyte development. *Int J Mol Med* 2011, *27*, 519-523.
- [249] Satoh, K., Nigro, P., Matoba, T., O'Dell, M. R., *et al.*, Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med* 2009, *15*, 649-656.
- [250] Catterall, J. B., Rowan, A. D., Sarsfield, S., Saklatvala, J., *et al.*, Development of a novel 2D proteomics approach for the identification of proteins secreted by primary chondrocytes after stimulation by IL-1 and oncostatin M. *Rheumatology (Oxford)* 2006, *45*, 1101-1109.
- [251] Ruiz-Romero, C., Carreira, V., Rego, I., Remeseiro, S., *et al.*, Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* 2008, *8*, 495-507.
- [252] Kim, K. S., Choi, H. W., Yoon, H. E., Kim, I. Y., Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* 2010, *285*, 40294-40302.
- [253] Jorgensen, C., Noël, D., Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases. *Regen Med* 2011, *6*, 44-51.
- [254] Stenberg, J., Rüetschi, U., Skiöldebrand, E., Kärrholm, J., Lindahl, A., Quantitative proteomics reveals regulatory differences in the chondrocyte secretome from human medial and lateral femoral condyles in osteoarthritic patients. *Proteome Sci* 2013, *11*, 43.
- [255] Rocha, B., Calamia, V., Mateos, J., Fernández-Puente, P., *et al.*, Metabolic labeling of human bone marrow mesenchymal stem cells for the quantitative analysis of their chondrogenic differentiation. *J Proteome Res* 2012, *11*, 5350-5361.
- [256] Piersma, S. R., Fiedler, U., Span, S., Lingnau, A., *et al.*, Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. *J Proteome Res* 2010, *9*, 1913-1922.
- [257] Eichelbaum, K., Winter, M., Berriel Diaz, M., Herzig, S., Krijgsveld, J., Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat Biotechnol* 2012, *30*, 984-990.
- [258] Planque, C., Kulasingam, V., Smith, C. R., Reckamp, K., *et al.*, Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines. *Mol Cell Proteomics* 2009, *8*, 2746-2758.
- [259] Schumacher, B. L., Block, J. A., Schmid, T. M., Aydelotte, M. B., Kuettner, K. E., A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1994, *311*, 144-152.
- [260] Flannery, C. R., Hughes, C. E., Schumacher, B. L., Tudor, D., *et al.*, Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte

- stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 254, 535-541.
- [261] Rhee, D. K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., *et al.*, The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* 2005, 115, 622-631.
- [262] Elsaid, K. A., Jay, G. D., Warman, M. L., Rhee, D. K., Chichester, C. O., Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2005, 52, 1746-1755.
- [263] Klein, T. J., Schumacher, B. L., Blewis, M. E., Schmidt, T. A., *et al.*, Tailoring secretion of proteoglycan 4 (PRG4) in tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2006, 12, 1429-1439.
- [264] Niikura, T., Reddi, A. H., Differential regulation of lubricin/superficial zone protein by transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein superfamily members in articular chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2007, 56, 2312-2321.
- [265] Lee, S. Y., Nakagawa, T., Reddi, A. H., Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF-beta1 and BMP-7. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 376, 148-153.
- [266] Ruan, M. Z., Erez, A., Guse, K., Dawson, B., *et al.*, Proteoglycan 4 expression protects against the development of osteoarthritis. *Sci Transl Med* 2013, 5, 176ra134.
- [267] Lohmander, L. S., Hoerrner, L. A., Dahlberg, L., Roos, H., *et al.*, Stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury. *J Rheumatol* 1993, 20, 1362-1368.
- [268] Martel-Pelletier, J., McCollum, R., Fujimoto, N., Obata, K., *et al.*, Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994, 70, 807-815.
- [269] Steck, E., Benz, K., Lorenz, H., Loew, M., *et al.*, Chondrocyte expressed protein-68 (CEP-68), a novel human marker gene for cultured chondrocytes. *Biochem J* 2001, 353, 169-174.
- [270] Kamiya, N., Watanabe, H., Habuchi, H., Takagi, H., *et al.*, Versican/PG-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. *J Biol Chem* 2006, 281, 2390-2400.
- [271] Choocheep, K., Hatano, S., Takagi, H., Watanabe, H., *et al.*, Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *J Biol Chem* 2010, 285, 21114-21125.
- [272] Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., *et al.*, Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997, 386, 78-81.

- [273] Chen, F. H., Thomas, A. O., Hecht, J. T., Goldring, M. B., Lawler, J., Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem* 2005, *280*, 32655-32661.
- [274] Di Cesare, P. E., Carlson, C. S., Stoleran, E. S., Hauser, N., *et al.*, Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res* 1996, *14*, 946-955.
- [275] Morozzi, G., Fabbroni, M., Bellisai, F., Pucci, G., Galeazzi, M., Cartilage oligomeric matrix protein level in rheumatic diseases: potential use as a marker for measuring articular cartilage damage and/or the therapeutic efficacy of treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2007, *1108*, 398-407.
- [276] Haudenschild, D. R., Hong, E., Yik, J. H., Chromy, B., *et al.*, Enhanced activity of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) bound to cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem* 2011, *286*, 43250-43258.
- [277] Acharya, C., Yik, J. H., Kishore, A., Van Dinh, V., *et al.*, Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol* 2014, *37*, 102-111.
- [278] Fickert, S., Fiedler, J., Brenner, R. E., Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther* 2004, *6*, R422-432.
- [279] Legg, J., Jensen, U. B., Broad, S., Leigh, I., Watt, F. M., Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development* 2003, *130*, 6049-6063.
- [280] Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y., *et al.*, MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, *855*, 98-103.
- [281] Ide, Y., Waki, M., Hayasaka, T., Nishio, T., *et al.*, Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine(36:1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS One* 2013, *8*, e61204.
- [282] Goto, T., Terada, N., Inoue, T., Nakayama, K., *et al.*, The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One* 2014, *9*, e90242.
- [283] Cillero-Pastor, B., Eijkel, G. B., Kiss, A., Blanco, F. J., Heeren, R. M., Matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry: a new methodology to study human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2013, *65*, 710-720.
- [284] Peffers, M. J., Cillero-Pastor, B., Eijkel, G. B., Clegg, P. D., Heeren, R. M., Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging identifies markers of ageing and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* 2014, *16*, R110.
- [285] Malmberg, P., Jennische, E., Nilsson, D., Nygren, H., High-resolution, imaging TOF-SIMS: novel applications in medical research. *Anal Bioanal Chem* 2011, *399*, 2711-2718.



- [286] Malmberg, P., Nygren, H., Methods for the analysis of the composition of bone tissue, with a focus on imaging mass spectrometry (TOF-SIMS). *Proteomics* 2008, 8, 3755-3762.
- [287] Kokesch-Himmelreich, J., Schumacher, M., Rohnke, M., Gelinsky, M., Janek, J., ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements. *Biointerphases* 2013, 8, 17.
- [288] Wu, S., De Luca, F., Role of cholesterol in the regulation of growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth. *J Biol Chem* 2004, 279, 4642-4647.
- [289] Schmidt, K., Hughes, C., Chudek, J. A., Goodyear, S. R., *et al.*, Cholesterol metabolism: the main pathway acting downstream of cytochrome P450 oxidoreductase in skeletal development of the limb. *Mol Cell Biol* 2009, 29, 2716-2729.
- [290] Simonaro, C. M., Sachot, S., Ge, Y., He, X., *et al.*, Acid ceramidase maintains the chondrogenic phenotype of expanded primary chondrocytes and improves the chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013, 8, e62715.
- [291] Xu, F., Yang, C. C., Gomillion, C., Burg, K. J., Effect of ceramide on mesenchymal stem cell differentiation toward adipocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 2010, 160, 197-212.
- [292] Jang, M. Y., Chun, S. I., Mun, C. W., Hong, K. S., Shin, J. W., Evaluation of metabolomic changes as a biomarker of chondrogenic differentiation in 3D-cultured human mesenchymal stem cells using proton (1H) nuclear magnetic resonance spectroscopy. *PLoS One* 2013, 8, e78325.

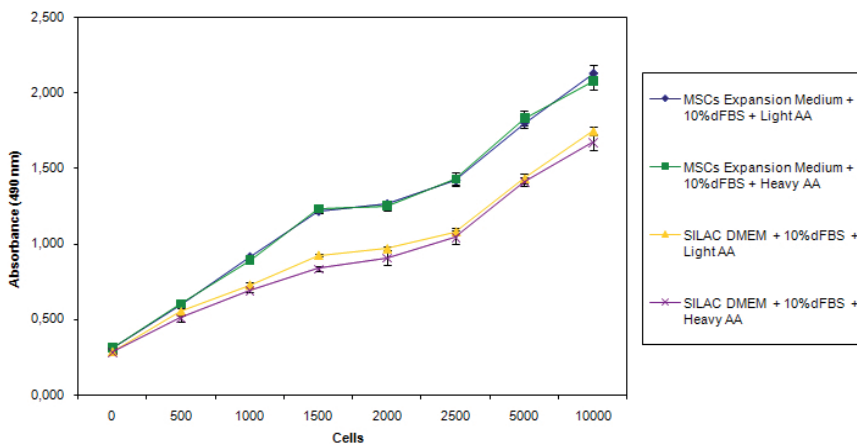


**ANEXOS**

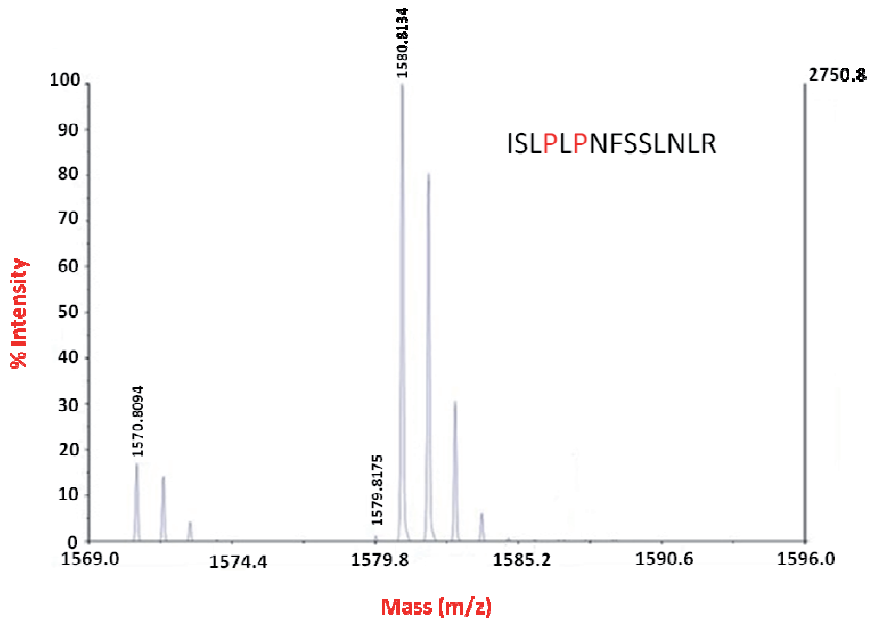


## Anexo I: Material suplementario del artículo I

**Figura Suplementaria 1. Tasa de crecimiento de las MSCs determinada mediante el ensayo de proliferación basado en MTS.** El gráfico muestra la comparación de cuatro condiciones distintas: MSCs en un medio de expansión suplementado con las versiones ligeras de la arginina y la lisina (puntos azules), MSCs en un medio de expansión con las versiones pesadas de ambos aminoácidos (cuadros verdes), MSCs en DMEM para SILAC con las versiones ligeras de los aminoácidos (triángulos amarillos) y MSCs en DMEM para SILAC con los aminoácidos pesados de arginina y lisina (cruces rosas).



**Figura Suplementaria 2. Espectro de masas representativo de un péptido que contiene prolina.** El gráfico muestra el espectro de masas del péptido ISLPLPNFSSLNLR ( $m/z=1580.81$ ) de la proteína vimentina. No se observan picos con una diferencia de masa de + 6 Da o múltiplos de 6 (derivados de los péptidos que contienen una o más prolinas marcadas) lo que demuestra la ausencia de conversión de arginina a prolina en nuestras condiciones de cultivo.



**Tabla Suplementaria 1.** Lista de las 622 proteínas identificadas en este trabajo.

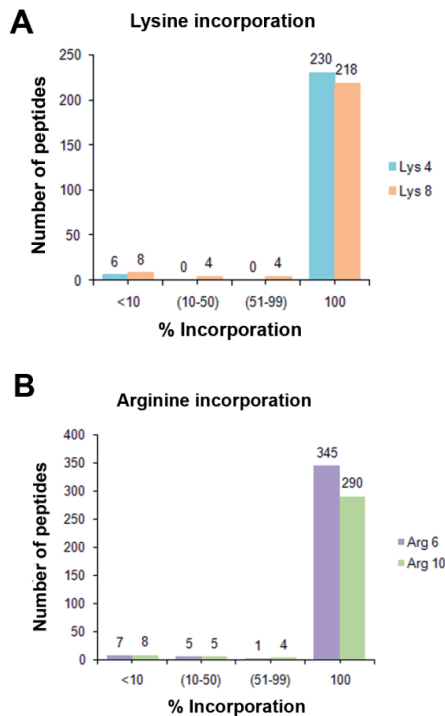
Incluida en el DVD adjunto a esta Tesis.

**Tabla Suplementaria 2.** Lista de péptidos únicos utilizados por el programa

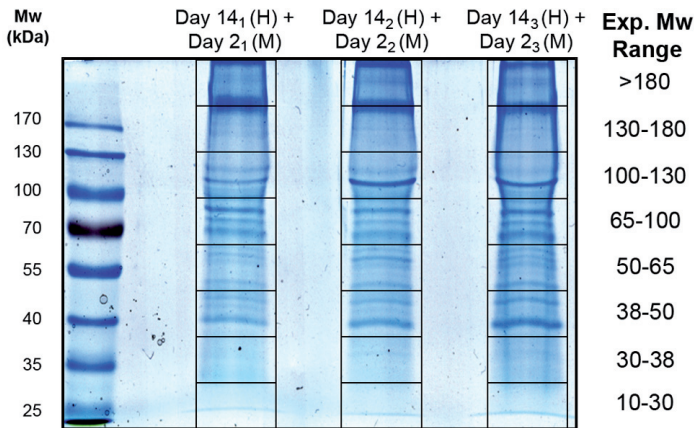
ProteinPilot para la cuantificación de las proteínas moduladas. Incluida en el DVD adjunto a esta Tesis.

## Anexo II: Material suplementario del artículo II

**Figura Suplementaria 1. Evaluación de la eficacia del marcaje SILAC en las BMSCs.** Dos poblaciones de MSCs fueron expandidas durante 6 pases con diferentes variantes isotópicas de los aminoácidos lisina y arginina (Lys4/Arg6 o Lys8/Arg10), lisadas en tampón urea, digeridas en solución y analizadas mediante nanoLC-MS. A, eficacia de incorporación de la lisina (azul: péptidos que contienen Lys4, naranja: péptidos que contienen Lys8). B, eficacia de incorporación de la arginina (violeta: péptidos que contienen Arg6, verde: péptidos que contienen Arg10).



**Figura Suplementaria 2.** Gel monodimensional SDS-PAGE empleado en este trabajo para la separación de las proteínas. El gel de acrilamida al 8 % fue teñido con azul de Coomassie coloidal. Cada carril contiene 8  $\mu$ g de la mezcla de proteínas marcadas (H+M). Una vez separadas, los carriles se cortaron en 8 bandas y cada una se analizó mediante nanoLC-ESI-MS/MS. Exp. MW, rango de peso molecular experimental de las proteínas contenidas en cada banda del gel; H, pesado; M, medio.



**Tabla Suplementaria 1.** Lista de las 1043 proteínas identificadas en este trabajo.

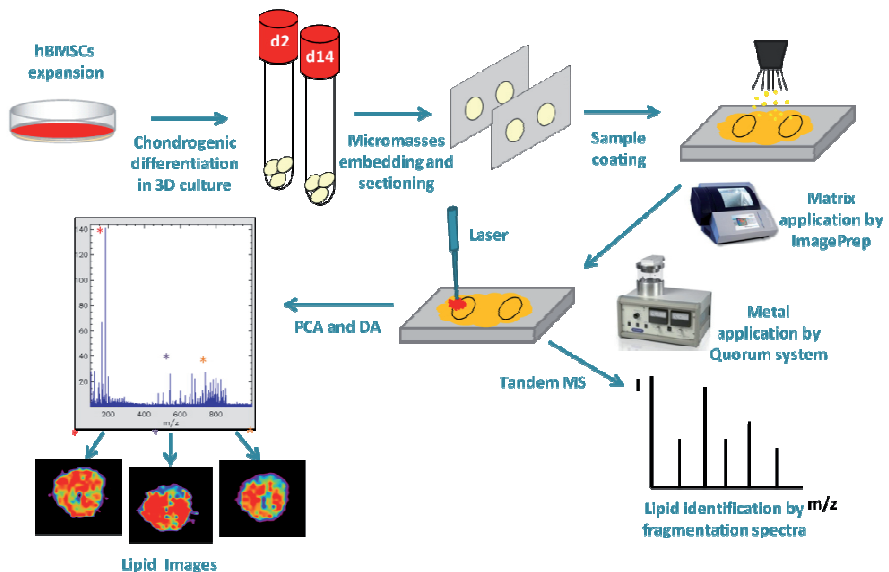
Incluida en el DVD adjunto a esta Tesis.

**Tabla Suplementaria 2.** Análisis de enriquecimiento funcional (Gene Ontology) de las proteínas identificadas en este trabajo. Incluido en el DVD adjunto a esta Tesis.

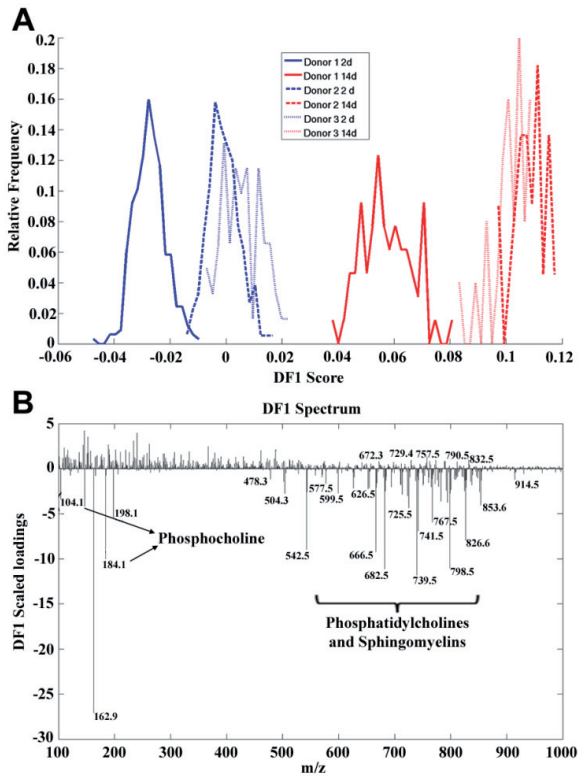
**Tabla Suplementaria 3.** Lista de proteínas con localización extracelular previamente descrita identificadas en el secretoma procedente de las MSCs sometidas a condrogénesis. Incluida en el DVD adjunto a esta Tesis.

### Anexo III: Material suplementario del artículo III


**Figura Suplementaria 1.** Flujo de trabajo experimental utilizado para la caracterización de los lípidos en las micromasas mediante MALDI-MSI y TOF-SIMS. Las micromasas recogidas a los días 2 y 14 del proceso condrogénico se embebieron en gelatina y se obtuvieron secciones de 10  $\mu\text{m}$  para MSI. Para los experimentos MALDI-MSI en los modos ión positivo y negativo, las muestras se cubrieron con matriz utilizando el ImagePrep y se analizaron para obtener los perfiles lipídicos. Los experimentos de TOF-SIMS se realizaron sobre secciones cubiertas con oro para obtener imágenes de las muestras a una alta resolución espacial. El análisis de los datos se realizó mediante métodos estadísticos como el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante (DA). Las imágenes de los lípidos se generaron con el software Biomap 3.7.5.5. Los lípidos se identificaron mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) realizada directamente sobre los cortes de micromasas.

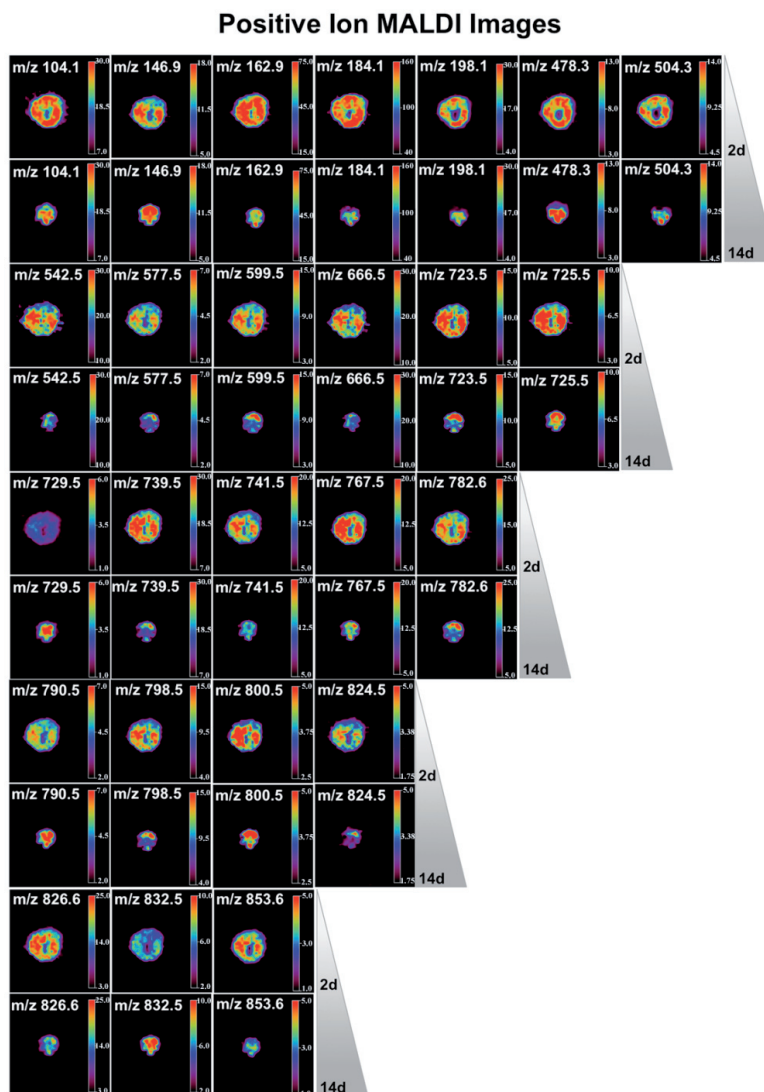


**Figura Suplementaria 2.** El análisis discriminante (DA) confirma la reproducibilidad del perfil lipídico entre las MSCs obtenidas de la médula ósea de tres donantes después de los experimentos de MALDI-MSI realizados en el modo ión positivo. (A) Histograma de distribución de las puntuaciones de la primera función discriminante (DF1). (B) Espectro de las puntuaciones de la DF1. La parte negativa del espectro se corresponde con las micromasas recogidas a día 2 de la condrogénesis y muestra un alto contenido de fosfatidilcolinas (PCs) y esfingomielinas (SMs) comparado con las muestras procedentes del día 14.

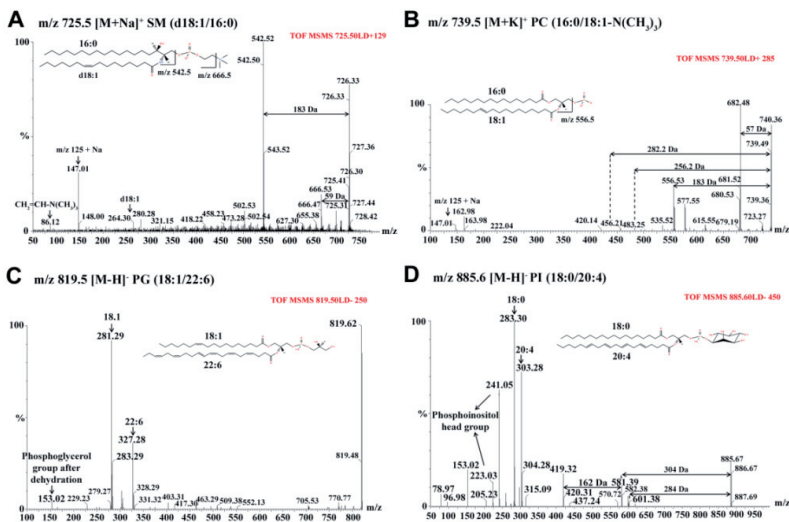




**Figura Suplementaria 3. Distribución e intensidades de los iones positivos en las secciones de micromasas asignados a lípidos después de los experimentos de MALDI-MSI y las identificaciones realizadas mediante MS/MS. La escala muestra las intensidades normalizadas. Tamaño de la escala: 900  $\mu\text{m}$ : **



**Figura Suplementaria 4. Espectros de fragmentación representativos de algunos fosfolípidos y esfingolípidos detectados en las micromasas en los análisis MSI en modo positivo y negativo. (A)** Espectro de MS/MS y estructura de la esfingomiolina (SM) (d18:1/16:0). El ión  $m/z$  86 es un fragmento específico del grupo principal de la colina. La pérdida neutral del grupo principal de la fosfocolina a partir del precursor sodiado de la SM conduce a la formación de un fragmento  $[M+H-183]^+$  a una  $m/z$  de 542.5, mientras que la pérdida de la trimetilamina a partir del grupo principal de la fosfocolina generó el fragmento  $[M+H-59]^+$  a una  $m/z$  de 666.5. **(B)** Espectro de MS/MS y estructura de la fosfatidilcolina (PC) (16:0/18:1-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Los fragmentos  $m/z$  483.2 y  $m/z$  456.2 se corresponden con la pérdida de la cadena de ácidos grasos C16:0 y C18:1 a partir del precursor potasiado de la PC. **(C)** Espectro de MS/MS y estructura del fosfatidilglicerol (PG) (18:1/22:6). **(D)** Espectro de MS/MS del fosfatidilinositol (PI) (18:0/20:4). Las masas  $m/z$  241 (inositolfosfato-H<sub>2</sub>O) y  $m/z$  223 (inositolfosfato-2H<sub>2</sub>O) confirman la presencia del grupo inositol. La asignación de las cadenas de los ácidos grasos se confirmó por la presencia de los picos  $m/z$  581 y  $m/z$  601, característicos de la pérdida del ácido araquidónico y esteárico, respectivamente. El fragmento  $m/z$  419 está relacionado con la pérdida del grupo inositol (162 Da) más la cadena del ácido graso C18:0.



## Anexo IV: Artículo IV, en el que desarrollamos por primera vez la metodología SILAC en nuestro laboratorio y que constituyó el punto de partida de esta Tesis Doctoral.

### Metabolic Labeling of Chondrocytes for the Quantitative Analysis of the Interleukin-1-beta-mediated Modulation of Their Intracellular and Extracellular Proteomes

Valentina Calamia,<sup>†</sup> Beatriz Rocha,<sup>†</sup> Jesús Mateos,<sup>†</sup> Patricia Fernández-Puente,<sup>†</sup> Cristina Ruiz-Romero,<sup>\*,†</sup> and Francisco J. Blanco<sup>\*,†,‡</sup>

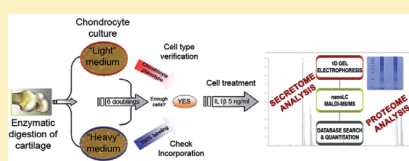
<sup>†</sup>Unidad de Investigación del Envejecimiento Osteoarticular INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

<sup>‡</sup>CIBER-BBN Instituto Salud Carlos III, A Coruña, Spain

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** Chondrocytes are widely used as an *in vitro* model of cartilage diseases such as osteoarthritis (OA). As the unique residents of mature cartilage, they are responsible of the synthesis and release of proteins essential for a proper tissue turnover. In this work, the stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) technique has been standardized in primary human articular chondrocytes (HACs) for quantitative proteomic analyses. Then, it has been employed to study those protein modifications caused by the proinflammatory cytokine Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), a well-known OA mediator, in these cells. Quantitative analysis of the IL-1 $\beta$ -treated HACs proteome revealed a global increase in cellular chaperones concurrent with a down-regulation of the actin cytoskeleton. HACs secretome analysis led to the identification and quantification of 115 proteins and unveiled the effects of the cytokine on the cartilage extracellular matrix metabolism. Among those modulated proteins, three protein clusters were found to be remarkably increased by IL-1 $\beta$ : proinflammatory mediators and proteases, type VI collagen and proteins known to bind this molecule, and proteins related with the TGF-beta pathway. On the other hand, secretion of aggrecan, two vitamin K-dependent proteins, and thrombospondin, among others, was strongly reduced. Altogether, these data demonstrate the usefulness of metabolic labeling for quantitative proteomics studies in HACs, show the complementarity of intracellular proteome and secretome analyses, and provide a comprehensive study of the IL-1 $\beta$ -mediated effects on these cells. Proteins identified in the secretome approach have a potential use as biomarkers or therapeutic targets for OA.

**KEYWORDS:** chondrocyte, proteomics, Interleukin-1-beta, secretome, SILAC



#### INTRODUCTION

The formation and organization of the cartilage extracellular matrix (ECM) network depend on interactions of a number of molecules, mainly proteins, secreted by the resident cells (chondrocytes and synoviocytes) or carried by the bloodstream to the synovial joint. ECM is not only the scaffold for the anchorage of cartilage cells, the chondrocytes, but also confers articular cartilage some of its unique characteristics like load-bearing capability and compressive resistance. ECM is primarily composed of collagens and proteoglycans. It is invariably associated with other components, especially growth factors, cytokines, proteases, and protease inhibitors. Together they comprise the cartilage extracellular environment and are pivotal for various disease processes, such as osteoarthritis (OA). Cartilage degeneration and ECM breakdown are primary features of OA.<sup>1</sup> Although OA is a disease of the entire joint, chondrocytes are thought to play a primary role in mediating cartilage destruction.<sup>2</sup> These cells are essential in the control of matrix turnover through the production of structural proteins (like type II collagen and aggrecan) and enzymes (like metalloproteinases and aggrecanases),

which are strictly necessary for the metabolism of the cartilage tissue. Therefore, human articular chondrocytes (HACs) primary culture is the technique most often used by researchers working on the pathogenesis of cartilage disorders, including OA.

Although proteomics has been previously applied to joint tissues (cartilage, synovial membrane, chondrocytes),<sup>3,4</sup> only a few studies have specifically targeted the extracellular environment.<sup>5</sup> Moreover, most proteomics studies use whole cellular lysates, which are rich in cellular proteins that inevitably mask the identification of the less abundant proteins of the ECM. Thus, the composition of the cartilage ECM and its associated proteins remains poorly defined.

In this work, we used HACs to develop a method for the quantitative study of proteins by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). The objective in SILAC experiments is to distinguish two proteomes by the molecular weight of the light or heavy amino acids that are used during the

Received: April 9, 2011

Published: June 21, 2011

growth of the two cell populations.<sup>6</sup> To ensure that cells incorporate the labeled amino acids into their proteome, essential amino acids are chosen.<sup>7</sup> Incorporation of the heavy amino acid into a peptide led to a known mass shift (easily detectable by mass spectrometry) compared with the peptide that contains the light version of the amino acid, but to no other chemical changes. Anyway, experiments to assess cell viability and phenotype are recommended in standardization steps.

Cell secretome (cell-conditioned medium) is composed of proteins that are found in the extracellular growth medium. It consists of proteins that are secreted, proteins shed from the cell surface, and intracellular proteins released into the supernatant in exosomes or due to cell lysis, apoptosis, and necrosis.<sup>8</sup> Although HACs supernatants lack the complexity of the intact cartilage ECM, chondrocyte secretome may represent an attractive sub-proteome for understanding those mechanisms responsible of matrix remodelling, elucidating those pathophysiological pathways underlying cartilage degeneration during the OA process and also for the discovery of candidate OA biomarkers. In the present study, we had two specific aims: first, to standardize the SILAC technique in primary HACs, by preserving chondrocyte phenotype in the specific culture conditions required for SILAC while achieving complete labeling even for secreted proteins with no significant turnover. This step is essential for accurate quantification. Once the strategy was optimized, we carried out the first quantitative study by SILAC technique of the intracellular proteome and secretome of primary HACs, using an *in vitro* model of inflammation by stimulation with IL-1 $\beta$ .<sup>9</sup> This approach would generate a quantitative profile of chondrocyte extracellular and intracellular protein changes driven by the inflammatory response. We had previously described the effect of both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  on the intracellular chondrocyte proteome using a strategy based on two-dimensional gel electrophoresis and image analysis.<sup>10</sup> With the present work, we would expand the number of known intracellular proteins modulated by IL-1 $\beta$  while testing the effectiveness of a novel technique, and we would also complete this information with the subset of chondrocyte extracellular proteins, which are essential for cartilage ECM synthesis and turnover processes.

## MATERIALS AND METHODS

### Cartilage Procurement

Osteoarthritic cartilage from patients undergoing total joint replacement was provided by the Rheumatology Service at Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. Informed consent was obtained from the patients before surgery. Patients of both genders older than 40 years were included in the study according to American College of Rheumatology (ACR) criteria for OA classification. Age and gender of donors were 57–80 years old and 3 females and 2 males. The study was approved by the local Ethics Committee (Galicia, Spain).

### Cell Culture

Human articular chondrocytes (HACs) were isolated as described previously.<sup>11,12</sup> Briefly, cartilage surfaces were rinsed with saline buffer; scalpels were used to cut parallel vertical sections 5 mm apart from the cartilage surface to the subchondral bone. These cartilage strips were dissected from the bone, and the tissue was incubated with trypsin at 37 °C for 10 min and then digested with type IV clostridial collagenase. The release of chondrocytes from cartilage was achieved after 16 h of digestion in an incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

### Chondrocyte Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)

The isolated chondrocytes were recovered and plated at low density in SILAC DMEM-Flex (Invitrogen) lacking Arginine (R) and Lysine (K), and supplemented with 10% dialyzed Fetal Bovine Serum (dFBS) (Gibco, Invitrogen), 4.5 g/L glucose (Sigma), 2 mM L-Glutamine (Sigma), 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. In the case of light media, standard L-lysine and L-arginine were used, while in the heavy media isotope-labeled L-lysine (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>), and isotope-labeled L-arginine (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>) were used. Titration assays were performed to minimize the problematic conversion of heavy Arg to Pro in chondrocyte cell culture. We tested five different R concentrations: 84 mg/L (standard DMEM concentration), 42 mg/L, 28 mg/L, 21 mg/L, and 0 mg/L. Finally, amino acids concentration was 146 mg/L for K and 28 mg/L for R. For the initial cell expansion, 5  $\times$  10<sup>5</sup> chondrocytes from each donor were seeded in two T-25 cell culture flasks (one grown in light medium and one in heavy medium). We pursued to minimize the number of cell passages that enable a complete incorporation of the labeled amino acids. At confluence, cells were recovered from each culture flask by trypsinization and seeded onto two 6-multiwell plates (15  $\times$  10<sup>4</sup> for well) for further analysis (cell type verification, labeling efficiency evaluation, cell stimulation). Cell proliferation and cell viability were tested by cell count and Trypan Blue dye exclusion.

### Evaluation of Labeling Efficiency

When 80% of confluence was reached onto 6-well plates (P<sub>1</sub>), the FBS-containing medium was removed and adherent cells were washed 4  $\times$  in serum-free medium and incubated for another 24 h in FBS-free, phenol red free medium for labeling efficiency evaluation. Different aliquots of chondrocytes grown in heavy medium were harvested at the same growth time. Cells were centrifuged 5 min at 1200 rpm and cellular pellets were washed 2  $\times$  in phosphate buffer solution. Cells were lysed by adding a mix of 6 M urea, 2 M thiourea and 25 mM ammonium bicarbonate. Cellular debris was eliminated by centrifugation (10 min at 13 000 rpm) and protein concentration was estimated using a standard assay (Bradford). We used about 4  $\mu$ g of protein for the in-solution digestion. Peptide mixture obtained by tryptic digestion was analyzed by nanoscale LC-MS to determine the degree of incorporation by looking for the presence of light peptides. The parameters for successful labeling were recorded and applied to subsequent SILAC experiments.

### Cell Type Verification (RNA Purification, cDNA Synthesis, and Real-Time Quantitative-PCR)

Real-time PCR analyses were carried out to verify the expression of type II collagen, a cartilage specific differentiation marker, under the conditions of study. Total RNA was purified using Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reversed transcribed using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) according to protocol given by supplier. Quantitative PCR analysis was performed using the SYBR Green Master Mix (Roche) and run on the LightCycler 480 instrument using 96-well plates. Primers for COL2A1 and the housekeeping genes, HPRT1 and RPLP0, were designed using the Universal Probe Library tool from the Roche Web site. Primer sequences were as follows: COL2A1 forward, 5'-gtgtcaggccaggatgt-3'; COL2A1 reverse, 5'-tcccagtgctcacagacagat-3'; HPRT1 forward, 5'-tgacctgtattttttcatacc-3'; HPRT1 reverse, 5'-cgagcaagcgttcagctct-3'; RPLP0 forward, 5'-tctaacctgaagtcctgat-3'; and

PRPL0 reverse 5'-caatctgcagacagactgg-3'. The specificity and quality of primers were evaluated including a dissociation curve analysis at the end of each PCR run. The results were analyzed using the LightCycler 480 software release 1.5.0 (Roche).

#### Differential Treatment of SILAC Cell Populations

Chondrocytes were used at week 3 in primary culture (P1) when 100% of labeling was reached. Cells were washed thoroughly to remove abundant serum proteins and incubated in serum-free medium with IL-1 $\beta$  (Sigma) at 5 ng/mL for 48 h.

#### One-Dimensional Gel Electrophoresis and In-Gel Digestion of Proteins

About 50  $\mu$ g of the whole intracellular protein extract from each condition were mixed 1:1 prior to be separated on a 10% SDS-PAGE gel. Gels were stained with Coomassie blue and the resulting lanes were cut into 16 slices and subjected to in-gel digestion according to previous protocol with minor modifications. In-gel reduction was done for 45 min at 56 °C using 10 mM DTT in 25 mM ammonium bicarbonate followed by in-gel alkylation using 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate for 30 min in the dark. Digestion was performed overnight with 12.5 ng/L Sequencing grade Modified Trypsin (Promega) at 37 °C. Extracted peptide mixtures were desalted and concentrated via NuTips essentially as above-described. Samples from each analyzed biological condition were run in biological and technical replicates.

#### Collection and Preparation of Conditioned Media for Analysis by LC-MS

Conditioned media (CM) obtained from 3 different donors were analyzed independently. In addition, measurements were performed in duplicate to assess the technical reproducibility of the LC-MS setup.

CM were collected, centrifuged and filtered using a 0.2  $\mu$ m filter to ensure removal of any dead cells. Proteins in the individual medium were precipitated with 0.02% sodium deoxycholate for 10 min and then with 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) o/n at 4 °C. Precipitates were harvested by centrifugation at 13 000 rpm for 15 min at 4 °C and then washed twice with ice-cold acetone. The protein pellets were dried in air and then resuspended in 6 M urea, 2 M thiourea and 25 mM ammonium bicarbonate. The protein content of the concentrated media was measured using the Bradford reagent from Sigma. Then heavy and light samples were mixed 1:1, and 4  $\mu$ g of each mixed sample were in-solution reduced, alkylated and digested with trypsin. The mixtures were acidified with TFA (1% final concentration) to stop the enzymatic reaction. The resulted peptides were desalted and filtered through a C18 microcolumn (NuTip, Glycen) and finally eluted from the C18 bed using 70% ACN/0.1% TFA. The organic component was removed by evaporating in a vacuum centrifuge and the peptides were resuspended in 2% ACN/0.1% TFA. Five microliters were injected into a reversed-phase column (Integrat C18, ProteoepTM II, New Objective) for nanoflow liquid chromatography (LC) analysis, using a Tempo nanoLC (Eksigent) equipped with a Sun Collect MALDI Spotter/Micro-Fraction Collector (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH).

#### MALDI Mass Spectrometry Analysis

LC eluate was deposited onto an Opti-TOF LC MALDI target plate (1534-spot format, ABSciex) with a speed of one spot per 15 s. Before spotting the LC microfractions were mixed with MALDI matrix (3 mg/mL  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 70% ACN and 0.1% TFA containing 10 fmol/ $\mu$ L angiotensin as

an internal standard). Peptide-containing LC spots were analyzed in a 4800 MALDI-TOF/TOF instrument (ABSciex) with a 200 Hz repetition rate (Nd:YAG laser). MS full scan spectra were acquired from 800 to 4000  $m/z$ . A total of 1500 laser shots were accumulated for each TOF-MS spectrum at an optimized fixed laser setting. Tandem MS mode was operated with 1 kV collision energy with CID gas (air) over a range of 60  $m/z$  to  $-20 m/z$  of the precursor mass value. Precursor mass window was 300 ppm (fwhm) in relative mode. A minimum of 800 and a maximum of 1500 laser shots were accumulated with laser stop conditions set at ten product ion peaks of S/N (signal-to-noise, ratio) > 100 at an optimized, fixed laser setting with metastable suppressor option on. Data dependent tandem MS settings included acquisition of up to 20 most intense ion signals per spot. If two or more consecutive spots in an LC run with precursor  $m/z$  were within 200 ppm tolerance, the spot with the maximum S/N was subjected to tandem MS analysis.

#### Data Analysis

Identification of peptides and proteins and relative quantification of their abundance were performed using the Protein Pilot software vs 3.0 (Applied Biosystems) with Paragon Algorithm. MS/MS data was searched against the UniProt/Swiss-Prot database of protein sequences (Swiss-Prot, August 2010), using following parameters: sample type set as SILAC (Lis+6, Arg+10), cysteine alkylation with IAA, urea denaturation, 1 missed cleavage allowed in trypsin digestion and focus in biological modifications. Only proteins with a threshold >95% confidence (>1.3 Unused Score) were considered for protein identification. Data was normalized for mixing errors by bias corrections.

#### Western Blot Analysis

One-dimensional Western blot analyses were performed utilizing standard procedures. Briefly, 20  $\mu$ g of cellular proteins and secreted proteins were loaded and resolved using standard 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The separated proteins were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon P, Millipore Co., Bedford, MA, USA) by electro-blotting and probed with specific antibodies against TGF $\beta$ 1 (1:100), POSN (1:100), TSP-1 (1:30) and FN1 (1:200) (Santa Cruz). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents (GE Healthcare), then digitized using the LAS 3000 image analyzer. Quantitative changes in band intensities were evaluated using ImageQuant 5.2 software (GE Healthcare).

#### Statistical Analysis

Each experiment was repeated at least three times. The statistical significance of the differences between mean values was determined using a two-tailed *t*-test, considering significant *p* values  $\leq 0.05$ . In the proteomic analysis, normalization tools and statistical package from Protein Pilot software were employed. We considered statistically significant only those changes with a *p* value  $\leq 0.05$  and a ratio  $\geq 1.2$  (or  $\leq 0.83$ ). Where appropriate, results are expressed as the mean  $\pm$  standard error.

## RESULTS

#### Standardization of Metabolic Labeling in Primary HACs

In this work, we first aimed to standardize the protocol for complete metabolic labeling of HACs in primary culture, to allow

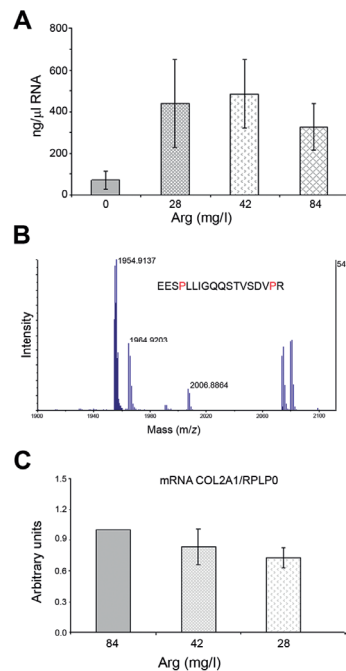
quantitative analyses. This standardization implies: (1) the analysis of cellular growth in SILAC media; (2) the performance of titration assays to determine the minimal amount of arginine that allows normal cell growth while preventing its metabolic conversion to proline; (3) the verification of the maintenance of chondrocyte phenotype under the conditions of study, and finally (4) the certification of complete incorporation of the labeled amino acids (100% efficiency) in the previously defined conditions of culture.

Although there is no indication that incorporation of a heavy amino acid has any effect on cells, the SILAC procedure requires the use of dialyzed serum to remove the natural amino acids already present in the serum. In this process, low molecular weight growth factors can also be removed, potentially interfering with growth of susceptible cell types.<sup>13</sup> We first tested cell viability and growth rate of freshly isolated HACs in SILAC DMEM with dialyzed FBS and standard Lys and Arg quantities (data not shown). After the confirmation of normal growth, we performed a titration assay with dropping amounts of arginine. As revealed by RNA content (Figure 1A), this amino acid is essential for HACs viability,<sup>7</sup> but cells are able to grow at normal rates with only 1/3 of the Arg contained in the classical DMEM formulation. The final Arg concentration employed in this study (28 mg/mL) allowed us to avoid quantitation errors potentially introduced by the arginine to proline conversion. As indicated by MS spectra, there was no arginine to proline conversion in our cell culture (Figure 1B). Then, as chondrocytes in monolayer culture are known to easily dedifferentiate into fibroblasts,<sup>14</sup> we pursued to verify the chondrocytic phenotype under the specific conditions of our quantitative proteomics study. To assess preservation of cell phenotype, we evaluated the expression of the most typical chondrocyte marker, type II collagen (COL2A1), by real-time PCR. As shown in Figure 1C, HACs grown under these conditions express high levels of COL2A1 mRNA. Finally, we evaluated the incorporation of the heavy isotopes in the cells. Aliquots of cells after different culture periods in SILAC heavy medium were taken, and the relative enrichment of labeled peptides by LC-MS of in-solution digested whole cell extracts was assessed. As shown in Supplementary Table 1 (Supporting Information), a 3 weeks expansion time (corresponding to 6 cell doublings) was needed to remove from the spectra those signals corresponding to light peptides, and obtain a clean peak from the fully labeled molecules. The average labeling efficiency after six passages was 100%, demonstrating that primary HACs can be efficiently and completely SILAC-labeled. This was essential for high quantification accuracy and data reproducibility in the next phases of this work.

#### Modulation of Chondrocyte Proteome by IL-1 $\beta$

A previous work by our group described the effect of both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  on the intracellular chondrocyte proteome, using a strategy based on two-dimensional gel electrophoresis and image analysis.<sup>10</sup> Once we had standardized the SILAC protocol in HACs, we pursued to apply this method to analyze the effect of IL-1 $\beta$  on the whole HACs proteome, in order to confirm those results obtained previously (this will serve us to validate the present technique), but also to study more extensively the intracellular modulation caused by the cytokine and to complement those data that would be further obtained in the secretome analysis.

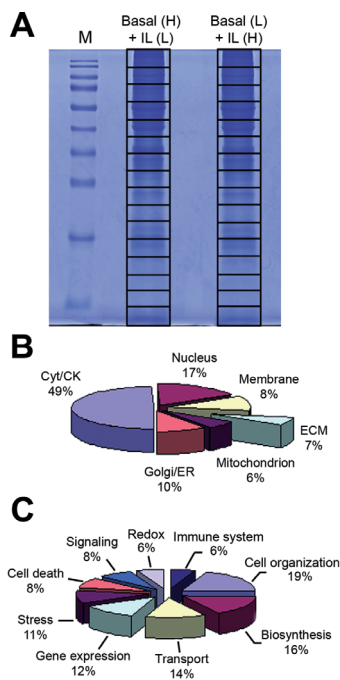
Due to the high complexity of these samples, we carried out a two-dimensional approach: we first combined proteins from the



**Figure 1.** Standardization of metabolic labeling in primary human articular chondrocytes. (A) Evaluation of the minimal arginine concentration essential for normal cell growth. RNA content (ng/ $\mu$ L) was measured as cell viability indicator. (B) Representative MS spectra of a proline-containing peptide, showing no peaks with a mass shift of +6 Da or multiples of 6 (derived from peptides containing one or more labeled prolines), thus demonstrating the absence of arginine to proline conversion in our cell culture conditions. (C) Real-time-PCR analysis indicates no significant variation in type II collagen gene expression (a typical marker of chondrocytic phenotype) in our cell culture conditions. RPLP0 was used as housekeeping gene for quantification.

experimental conditions to be compared (untreated and treated with cytokine), and resolved the mixture by SDS-PAGE, followed by in-gel tryptic digestion. In order to enhance the protein coverage, the gel was processed by shotgun technology<sup>15</sup> (Figure 2A). The whole gel column was sliced into 16 sections regardless banding pattern and collected for reverse phase nanoLC-MS/MS analysis. With this approach, we were able to identify 368 proteins, and 357 could be relatively quantified (Supplementary Table 2, Supporting Information). The most abundant protein identified (highest scored by Protein Pilot) was the intermediate filament protein vimentin (VIM). Only few contaminant proteins derived from dialyzed serum (four) or sample handling (two keratins) were found. Figure 2B shows the





**Figure 2.** HACs proteome analysis. (A) First dimension separation of HACs intracellular proteins was performed by 1DGE. In each lane, 100  $\mu$ g of mixed sample (H+L) were resolved. Then, the whole gel column was sliced into 16 sections and each lane was subjected to nanoLC-MS/MS analysis; (B) predicted localization of those proteins identified in the HACs cell lysates; and (C) predicted biological process in which they are involved. M, molecular weight marker; H, heavy; L, light; IL, Interleukin-1 $\beta$ ; ECM, extracellular matrix; CK, cytoskeleton; Cyt, cytoplasm; ER, Endoplasmic reticulum.

biological function as well as the cellular localization of these identified proteins, according to GO annotation. As expected, most of them have a predicted intracellular localization (345/368), while only 7% are known to be mainly present in the extracellular region. The identified proteins play a wide range of biological processes like cellular organization, transport, gene expression, stress response, biosynthetic processes, cell death, signal transduction, redox processes and immune system (Figure 2C). Thirty-eight of the quantified chondrocytic proteins were significantly ( $p < 0.05$ ) altered by cytokine stimulation and are shown in Table 1.

Four catabolic- or stress-related proteins were only identified in IL1 $\beta$ -treated cells (ratio of 9999 in our quantitative analysis). Furthermore, most of those proteins whose expression resulted modulated by cytokine stimulation were involved in the actin

cytoskeleton structure (VINC, TPM4, FLNA, MYH9, CALD1, CAPG and ZYX), and all of them were decreased by the cytokine (see Table 1). On the other hand, the largest protein cluster increased by IL1 $\beta$  corresponds to protein chaperones, such as GRP78, HSP71 or various protein disulfide-isomerases.

#### Primary HACs Secretome Profiling

Given the key role of chondrocytes in ECM synthesis and turnover, and also the importance of these mechanisms for tissue maintenance (which are disturbed in OA and other joint diseases), we pursued to examine the effect of the proinflammatory cytokine in the subset of proteins secreted by chondrocytes (secretome). For this purpose, supernatants from unstimulated and IL1 $\beta$ -stimulated chondrocytes were collected after 48 h of incubation. An aliquot of these samples was resolved by SDS-PAGE along with HAC whole cell extracts (Figure 3A). Protein profiles show marked differences mainly in the secretome composition of control and IL-1 $\beta$ -treated samples, pointing out how IL-1 $\beta$ , as expected, affects chondrocyte secretory pathways.

To achieve the identification and quantification of these proteins, they were digested in solution with trypsin, and the correspondent tryptic peptides were separated by liquid chromatography. The peptides were then eluted and subjected to MALDI-MS/MS analysis. This procedure resulted in the identification and quantification of 115 proteins present in the culture media with statistical confidence (Protein Pilot score  $\geq 2$ ,  $p < 0.05$ ). A complete list of the identified proteins is shown in Supplementary Table 2 (Supporting Information).

The majority of secreted proteins identified using LC-MS/MS were cartilage ECM proteins, or proteins with well-established matrix functions (see Supplementary Table 3, Supporting Information). The localization and molecular function of the identified proteins were categorized by GeneOntology (GO) and are shown in Figure 3B. Most abundant proteins (top 10 in terms of Protein Pilot hits) identified in the samples included well-known cartilage-related proteins, namely fibronectin (FN1), collagen alpha-2(I) chain (COL1A2), chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1), collagen alpha-1(XII) chain (COL12A1), tenascin (TNC), collagen alpha-3(VI) chain (COL6A3), decorin (DCN), collagen alpha-1(VI) chain (COL6A1), collagen alpha-1(I) chain (COL1A1), and lumican (LUM).

To validate our findings and exclude the possibility of any quantification differences arising from SILAC labeling,<sup>16</sup> we replicated the whole experiment with treatment conditions crossed-over (swapping the labeled state of the perturbed cells). By these means, we were able to quantify all the identified proteins with statistical significance. Among them, 35 presented a significant modulation of their levels due to cytokine stimulation and are listed in Table 2.

#### Cytokine-Mediated Changes in the Chondrocyte Secretome

We could identify some proteins only in the IL-1 $\beta$ -treated samples compared to untreated controls. All these proteins presented a ratio of 9999 (see Table 2), thus indicating a very strong increment of their release due to cytokine stimulation. Among them, we found proteins involved in inflammatory response (like IL6, IL8 or TSG6) and proteins involved in matrix remodelling and degradation (MMP3 and MMP1). Inversely, we could only detect thrombospondin (TSP1) in the secretome of untreated cells. TSP1, an angiogenesis inhibitor, is a multifunctional adhesive glycoprotein present in articular cartilage and synthesized by articular chondrocytes,<sup>17</sup> whose gene transfer suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis.<sup>18</sup>

Table 1. IL-1 $\beta$ -Altered Proteins in the HACs Proteome<sup>a</sup>

accession <sup>b</sup>	symbol <sup>b</sup>	name	IL: BASAL <sup>c</sup>	p value <sup>d</sup>
P20591	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	9999	0
P04179	SODM	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	9999	0
P08254	MMP3	Stromelysin-1	9999	0
Q03169	TNAP2	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2	9999	0
Q04828	AK1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1	3.6382	0.012
P52895	AK1C2	Aldo-keto reductase family 1 member C2	2.7788	0.05
P23381	SYWC	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2.3032	0.05
P16070	CD44	CD44 antigen	2.2727	0.0467
P42224	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	2.2434	0.0001
Q10471	GALT2	Polypeptide N-acetylgalactaminyltransferase 2	2.0458	0.0411
Q16851	UGPA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	1.9184	0.0403
Q15582	BGH3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	1.5856	0.0039
P24821	TENA	Tenascin	1.4876	0.0215
P13639	EF2	Elongation factor 2	1.4802	0.0002
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	1.3715	0.0068
P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	1.3713	0.028
Q15084	PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	1.3419	0.0434
P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	1.2933	0.0008
P36222	CH3L1	Chitinase-3-like protein 1	1.2897	0.0003
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	1.2834	0.0005
P11940	PABP1	Polyadenylate-binding protein 1	1.2647	0.0089
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	1.2188	0.036
P63261	ACTG	Actin, cytoplasmic 2	0.7955	0.0151
P07858	CATB	Cathepsin B	0.79	0.0003
P08133	ANXA6	Annexin A6	0.7791	0.0236
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	0.7732	0.0062
P21333	FLNA	Filamin-A	0.7659	0.0019
P35579	MYH9	Myosin-9	0.7383	0.0176
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	0.7344	0.0231
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	0.7288	0.0004
P40121	CAPG	Macrophage-capping protein	0.7216	0.0376
P13797	PLST	Plastin-3	0.6466	0.023
P67936	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	0.6217	0.0002
Q05682	CALD1	Caldesmon	0.5895	0
P18206	VINC	Vinculin	0.566	0.0172
Q15942	ZYX	Zyxin	0.5602	0.0477
Q99715	COC1	Collagen alpha-1(XII) chain	0.481	0.0207
Q9UHB6	LIMA1	LIM domain and actin-binding protein 1	0.3513	0.047

<sup>a</sup> Number of unique peptides detected by Protein Pilot, total score and sequence coverage for each protein identified are detailed in Supplementary Table 2 (Supporting Information). <sup>b</sup> Swiss-Prot accession number and abbreviation. <sup>c</sup> Average ratio, quantified by ProteinPilot 3.0 software. The SILAC ratios (IL/BASAL) are quantified relative to the protein abundance of the treated versus untreated cells at the same time point (48 h). <sup>d</sup> As determined by ProteinPilot 3.0 software.

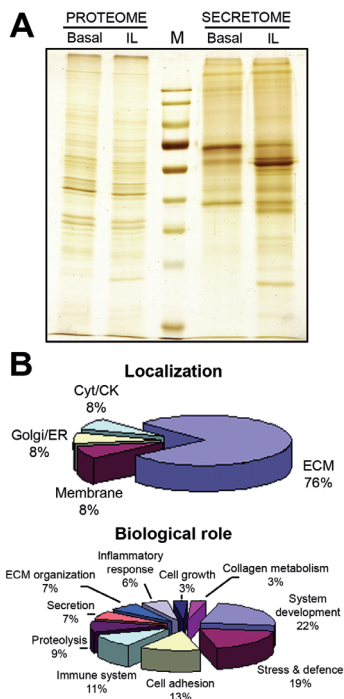
Due to its pivotal role, we decided to verify TSP1 protein levels in HACs conditioned media by Western blot analysis. As shown in Figure 4, TSP1 was detected only in those secretomes from basal conditions, thus confirming the result revealed by the proteomics approach.

Proteins whose abundance was altered in the HACs secretome by the presence of IL-1 $\beta$  are also shown in Table 2. The modulation of proteins involved in several processes was observed, such as cartilage ECM structure (7 proteins, including collagens and aggrecan), ECM remodelling (5 proteins, including proteases and their inhibitors) and the immune response (4 proteins). Interestingly, we found a global increase of immune

response proteins, proteases (such as cathepsin D and MMP2) and some ECM structural proteins (such as lumican or chitinase-3-like protein 1), whereas a remarkable decrease of the aggrecan core protein or biglycan was detected.

Among those secreted proteins found to be increased by IL-1 $\beta$ , the protein identified with the highest number of peptides was fibronectin (FINC), a component of normal cartilage matrix. Elevated levels of this protein are found in OA cartilage<sup>19,20</sup> and in OA synovial fluid,<sup>20</sup> whereas FINC degradation products have been implicated in the induction of proinflammatory responses in cartilage and synovial membrane.<sup>21</sup> Western blotting using an antibody raised against full-length human FINC confirmed





**Figure 3.** Modulation of the chondrocyte secretome by IL-1 $\beta$ . (A) Silver staining of a monodimensional gel showed the differences in the proteome (lanes 1–2) and secretome profiles (lanes 3–4) of treated and untreated HACs. (B) Pie charts indicate the cellular localization of those proteins identified in the HACs secretome and their biological role, according to Gene Ontology annotation. Abbreviations, as in Figure 2.

extensive laddering of the glycoprotein in our IL1 $\beta$  extracts (Figure 4). We could verify as well in this work the cytokine-mediated increase in the secretion of a member of the TGF- $\beta$  pathway, beta ig-h3 (BGH3) (Figure 4). As shown in the Figure, this increase is specific of the extracellular fraction, whereas no modulation is observed in cellular extracts. Finally, we also confirmed by Western blotting analysis the decrease of periostin (POSTN), a vitamin K-dependent Gla-containing protein<sup>22</sup> whose role in ECM mineralization is still little known (Figure 4).

## DISCUSSION

In this work, we have standardized the isotopic labeling of chondrocytes in cell culture. To our knowledge, this is the first study applying a quantitative SILAC approach on HACs. There are two recent works in which SILAC technique is used to

characterize proteins secreted by chondrocytes,<sup>23,24</sup> but both papers describe only qualitative information and none of them report quantitative results. Our work demonstrates the possibility of performing quantitative analyses by metabolic labeling in primary HACs, being this novel approach useful for further differential proteomic studies, including pharmacoproteomic analyses.

The SILAC methodology comprises two steps: an adaptation phase before the experiment and the biological experiment with the differential treatment between control (unstimulated chondrocytes) and experimental cell populations (IL1 $\beta$ -stimulated chondrocytes). Regarding the first point, human articular chondrocytes have a number of limitations in primary cultures, mainly due to their slow growth rate and also their tendency to easily dedifferentiate into fibroblasts. Therefore, the first objective in our work was to achieve a complete labeling of the whole proteome (intracellular and extracellular proteins) while maintaining the chondrocyte phenotype. We show how HACs proteome is fully labeled after an expansion time of 3 weeks and demonstrate the chondrocyte-like phenotype (COL2 expression) of the cells in these conditions.

With this strategy, we have been able to identify 368 proteins as constituents of the HACs proteome by LC-MALDI-TOF/TOF analysis. Among those modulations caused by the cytokine, we have found a remarkable decrease of actin and actin-related proteins (which control cell shape, dynamics and architecture). It is well documented that chondrocytes respond to IL1 $\beta$  treatment with a dramatic morphologic change.<sup>25</sup> Untreated chondrocytes display the characteristic cobblestone morphology, whereas they alter their polygonal morphology to a rounded one in the presence of IL1 $\beta$ . Our data depict the key role of actin and its related proteins in mediating these changes. On the other hand, we detected a number of protein chaperones increased by the cytokine, highlighting the role of these proteins in mediating cellular responses under stress conditions. Accordingly to this, a increase of chaperones was previously described by our group as a characteristic of OA chondrocytes<sup>26</sup> when compared to healthy cells. We also demonstrate the increase of a transcription activator (STAT) and a translation regulator (EF2), thus indicating a sustained biosynthetic activity of stimulated chondrocytes. Finally, despite having previously employed a different proteomic strategy, based on two-dimensional gel electrophoresis,<sup>10</sup> the modulation by IL-1 $\beta$  of a number of proteins identified in that work, such as SOD2, PDIA3 or SWYC, has been confirmed by the present approach.

Moreover, the present study exhibits the advantages of this approach for the relative quantification of HACs secreted proteins. This is especially useful to focus on ECM proteins, which have particular importance not only because of their role in proper tissue maintenance, but also because of their putative biomarker value. These considerations are supported by the fact that only 28 of the 368 proteins identified in the HACs proteome analysis were also detected in the secretome (Figure 5A). Only 7% of the proteins identified in the proteome analysis may have a direct role in cartilage ECM synthesis/turnover (Figure 2B), whereas this percentage rises up to the 76% in the secretome study (Figure 3B). On the other hand, among those proteins identified as modulated in the proteome analysis, only five (BGH3, CH13L1, CATB, MMP3 and TENA) were also detected as altered in the secretome, thus demonstrating the complementarity of both studies. In addition, Figure 5B illustrates the differences of the biological roles played by those proteins that were found to be

Table 2. IL-1 $\beta$ -Altered Proteins in the HACs Secretome<sup>a</sup>

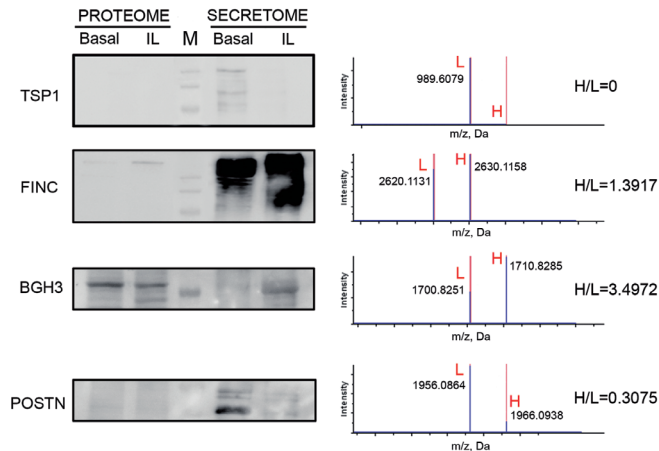
accession <sup>b</sup>	symbol <sup>b</sup>	name	IL/BASAL <sup>c</sup>	p value <sup>d</sup>
P08254	MMP3	Stromelysin-1	9999	0
P03956	MMP1	Interstitial collagenase	9999	0
P98066	TSG6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein	9999	0
P26022	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	9999	0
P05231	IL6	Interleukin-6	9999	0
P01009	AIAT	Alpha-1-antitrypsin	9999	0
P19320	VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1	9999	0
P09341	GROA	Growth-regulated alpha protein	9999	0
P10145	IL8	Interleukin-8	9999	0
P07093	GDN	Glia-derived nexin	15.351	0
P61769	B2MG	Beta-2-microglobulin	5.0804	0.0136
P24821	TENA	Tenascin	4.5818	0
QJ5582	BGH3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	3.4972	0.0002
P10909	CLUS	Clusterin	2.9998	0.0012
P02461	CO3A1	Collagen alpha-1(III) chain	2.4911	0.0076
P07339	CATD	Cathepsin D	2.3459	0.0319
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	2.1567	0.0037
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent	2.0691	0
P51884	LUM	Lumican	1.7211	0.0018
P09871	C1S	Complement C1s subcomponent	1.705	0.0035
P12111	CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	1.6791	0.0026
P01033	TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	1.6265	0.05
P36222	CH3L1	Chitinase-3-like protein 1	1.4606	0.0078
P02751	FN1	Fibronectin	1.3917	0
P07858	CATB	Cathepsin B	0.7155	0.0204
P16035	TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	0.647	0.0217
P08123	CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	0.5965	0
P21810	PGS1	Biglycan	0.5044	0.0294
P17936	IBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3	0.4714	0.0023
P16112	PGCA	Aggrecan core protein	0.3189	0.002
P09486	SPRC	SPARC	0.3161	0.008
QJ5063	POSTN	Periostin	0.3075	0.0028
QJ4767	LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	0.3005	0.0483
P08493	MGP	Matrix Gla protein	0.2061	0.05
P07996	TSP1	Thrombospondin-1	0	0

<sup>a</sup> Number of unique peptides detected by Protein Pilot, total score and sequence coverage for each protein identified are detailed in Supplementary Table 3, Supporting Information. <sup>b</sup> Swiss-Prot accession number and abbreviation. <sup>c</sup> Average ratio, quantified by ProteinPilot 3.0 software. The SILAC ratios (IL/BASAL) are quantified relative to the protein abundance of the treated versus untreated cells at the same time point (48 h). <sup>d</sup> As determined by ProteinPilot 3.0 software.

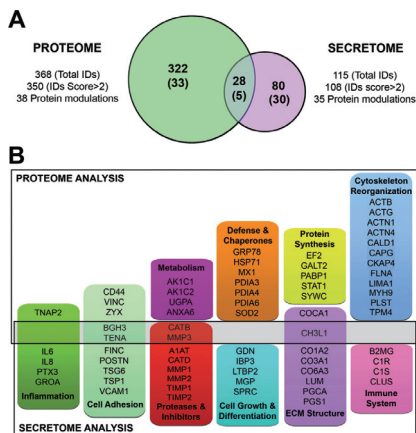
altered by IL-1 $\beta$  in any of the two complementary analyses. As shown in the Figure, the intracellular proteome study allowed the detection of four main functional clusters affected by the cytokine: cytoskeleton organization, chaperones, protein synthesis and metabolism-related proteins, whereas the secretome analysis exhibit its usefulness not only for evaluating the modulation of signaling molecules involved in tissue turnover (such as proteases and inhibitors and cell growth or differentiation-related proteins) but also for the study of typical ECM structural proteins and outputs of both inflammatory and immune responses.

In this sense, we have been able to identify and quantify more than a hundred different specimens in a single experiment on secretome samples, including a number of low molecular weight proteins (IL8, MGP), which are generally lost in a gel-based approach. In addition, LC-MS/MS analysis overlaps the

problem presented by the special features of HACs, which synthesize and secrete a variety of highly anionic compounds (glycosaminoglycans) and a few abundant proteins (mainly collagens and proteoglycans) that discourage from performing 2-DE-based approaches. On the other hand, very few proteins derived from dialyzed serum (contaminants) were encountered in the supernatants due to the extensive washing and careful handling of cell cultures. These proteins could be easily eliminated from the analysis, considering its heavy/light ratio (always zero) and modifying database searching parameters (in this case no species restriction is recommended). As a proof of the absence of serum-derived proteins in the secretomes, bovine serum albumin was not identified in any sample. Moreover, cellular viability analyses and careful sample handling ensure minimal cell lysis.



**Figure 4.** Verification of IL-1 $\beta$ -mediated protein changes. Western Blotting analysis was performed to validate some interesting Protein Pilot results. (Left) Representative blot images of the analyzed proteins. (Right) Representative spectra from each of them obtained with Protein Pilot software, along with their calculated heavy/light ratio. TSP1, thrombospondin-1; FINC, fibronectin; BGH3, beta ig-h3; and POSTN, periostin. Other abbreviations, as in Figure 2.



**Figure 5.** Complementarity of HACs secretome (cell conditioned medium) and proteome (total cell lysate) analyses. (A) Venn diagram of the identified proteins in the proteome and secretome studies. Numbers in parentheses correspond to the subset of proteins significantly modulated by IL-1 $\beta$ . (B) Functional distribution of those proteins that were identified as altered by the cytokine either in the proteome analysis, the secretome analysis, or in both approaches (depicted with a gray area). Protein abbreviations, as in Tables 1 and 2.

Our data underline the effect of IL-1 $\beta$  on diverse inflammatory pathways, and its catabolic role on cartilage ECM. We have detected a number of proinflammatory cytokines, such as IL6, uniformly up-regulated in inflammatory conditions. These proinflammatory cytokines are involved in autoimmune processes and, while controlling each other, they also up-regulate a large number of other genes.<sup>27</sup> Among the up-regulated genes and corresponding proteins, various metalloproteinases (MMPs) degrade cartilage and bone, while TSG6 appears to have a suppressive effect on matrix MMP activation in arthritis processes.<sup>28</sup> Inversely, thrombospondin-1 (TSP1) presented a ratio = 0, indicating a cytokine-dependent dramatic decrease of its release from the cells that was confirmed by Western blotting. In OA, angiogenesis (which occurs in the osteochondral junction and synovium) may accelerate inflammation and contribute to the severity of the disease. IL1 $\beta$  is a well recognized angiogenic factor, so the possibility that an increased concentration of IL1 in OA synovial fluid may reduce the TSP1 expression in severe OA stages cannot be excluded, as described for cultured rabbit chondrocytes.<sup>29,30</sup>

Among those other proteins whose secretion was found to be increased by the cytokine, we found a chain from the heterotrimer type VI collagen (COL6) and two proteins that are known to bind this molecule, fibronectin (FINC) and beta ig-h3 (BGH3). Type VI collagen plays a major role in the mechanical properties of the termed "pericellular matrix" (PCM, which encapsulates the chondrocytes in the tissue), and in the mechanical environment of chondrocytes.<sup>31</sup> Hallmarks of osteoarthritic cartilage are the degradation of ECM components and the destruction of this pericellular microenvironment.<sup>32</sup> Previous studies have shown increased amounts of COL6 in osteoarthritic cartilage,<sup>33,34</sup> depicting those modifications in the collagenous

network that occur in degenerated cartilage. Our group has previously described an intracellular increase of this protein in OA chondrocytes.<sup>26</sup> The present detection of increased secretion of COL6 and related proteins bridges the gap between the modulation of intracellular metabolism and those tissue changes that are consequently triggered, thus providing a trace of the role of IL-1 $\beta$  in the remodelling of pericellular matrix during the OA progress.

We also quantified the decrease of two proteins belonging to vitamin K-dependent Gla-containing proteins<sup>22</sup> whose secretion by chondrocytes was markedly reduced in the presence of IL-1 $\beta$ : matrix gla protein (MGP) and periostin (POSTN). Interestingly, it is now well established that vitamin K is essential in prevention of soft tissue mineralization.<sup>35</sup> In addition, recent epidemiologic studies have revealed a correlation between low plasma level of vitamin K and the presence of osteophytes on knee radiographs.<sup>36,37</sup> Additional studies are needed to determine if altered biosynthesis of these proteins could explain the pathological transformation of normal chondrocytes into OA chondrocytes, characterized by cell hypertrophy and matrix mineralization, observed in older adults affected by this pathology.

Finally, we have identified in this study a number of other novel proteins that are regulated by IL-1 $\beta$  in HACs. Some of them were already described in transcriptomic analyses,<sup>38</sup> such as the intracellular GRP78 (increased) or the extracellular biglycan (decreased), being their modulation verified at the protein level in this work. Nevertheless, most of the identified proteins provide new traces of IL-1 $\beta$  effects. This is the case of those several cytoskeleton components identified (filamin A, actinins, plastrin 3, vinculin or zyxin), and also extracellular proteins such as lumican.

## CONCLUSIONS

The present study demonstrates the usefulness of metabolic labeling for quantitative proteomics studies in HACs and enables the identification and quantification of several proteins, many of which had not been previously reported to be secreted by chondrocytes. Identification of novel secreted molecules will allow further detailed experiments to dissect the roles of such proteins involved in ECM metabolism in normal and pathological conditions. Moreover, despite the inherent limitations of an *in vitro* study, our work provides a comprehensive quantitative analysis of the effects of IL-1 $\beta$  in these cells, highlighting the modulation of a number of extracellular and intracellular pathways that is valuable to understand OA pathogenesis. Those proteins increased by the cytokine that have been identified in this work are potential novel molecular targets for OA treatment. In addition, the subset of extracellular proteins might also be evaluated as noninvasive OA biomarkers for early diagnosis of the disease.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Supplementary Table 1. Verification of complete labeling of HAC secreted proteins by MS analysis on samples obtained after 3 weeks of culture. MS spectra presented a clean peak from the fully labeled peptides, as indicated by a ratio value (H/L) of 9999 (calculated with Protein Pilot software 3.0) for each peptide (FINC example is shown) or corresponding identified protein. Supplementary Table 2. HACs proteome proteins confidently

identified in this work. Supplementary Table 3. HACs secretome proteins confidently identified in this work. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Unidad de Investigación del Envejecimiento Osteoarticular INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña C./Xubias, 84, 15006-A Coruña, Spain. Tel: 34-981-178272. Fax: 34-981-178273. E-mail: Cristina.Ruiz.Romero@sergas.es or Francisco.Blanco.Garcia@sergas.es.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank J. Barallobre and N. Domenech for kindly providing the antibodies employed in this work, P. Cal Purrinos for her expert secretarial assistance, and also express appreciation to the Pathology Service and to Mrs. Lourdes Sanjurjo and Mrs. Dolores Velo from the Orthopaedics Department of the CHU A Coruña for providing cartilage samples. This study was supported by grants from Fondo Investigación Sanitaria-Spain ((CIBER-CB06/01/0040); PI-08/2028); and Secretaria I+D+I Xunta de Galicia: PGIDIT06PXIC916175PN; PXIB916357PR and PGIDIT06PXIB916358PR. B.R., P.F.-P., J.M. and C.R.-R. were supported by Fondo Investigación Sanitaria-Spain.

## REFERENCES

- (1) Aigner, T.; McKenna, L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59* (1), 5–18.
- (2) Goldring, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43* (9), 1916–26.
- (3) Ruiz-Romero, C.; Blanco, F. J. Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2010**, *18* (4), 500–9.
- (4) Ruiz-Romero, C.; Calamia, V.; Carreira, V.; Mateos, J.; Fernández, P.; Blanco, F. J. Strategies to optimize two-dimensional gel electrophoresis analysis of the human joint proteome. *Talanta* **2010**, *80* (4), 1552–60.
- (5) Catterall, J. B.; Rowan, A. D.; Sarsfield, S.; Saklatvala, J.; Wait, R.; Cawston, T. E. Development of a novel 2D proteomics approach for the identification of proteins secreted by primary chondrocytes after stimulation by IL-1 and oncostatin M. *Rheumatology (Oxford)* **2006**, *45* (9), 1101–9.
- (6) Mann, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (12), 952–8.
- (7) Eagle, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **1959**, *130* (3373), 432–7.
- (8) Piersma, S. R.; Fiedler, U.; Span, S.; Lingnau, A.; Pham, T. V.; Hoffmann, S.; Kubbutat, M. H.; Jimenez, C. R. Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (4), 1913–22.
- (9) Goldring, M. B. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2000**, *2* (6), 459–65.
- (10) Cillero-Pastor, B.; Ruiz-Romero, C.; Carames, B.; Lopez-Armada, M. J.; Blanco, F. J. Proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis to identify the normal human chondrocyte proteome stimulated by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62* (3), 802–14.
- (11) Calamia, V.; Ruiz-Romero, C.; Rocha, B.; Fernandez-Puente, P.; Mateos, J.; Montell, E.; Verges, J.; Blanco, F. J. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*, R138.

- (12) Ruiz-Romero, C.; López-Armada, M. J.; Blanco, F. J. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* **2005**, *5* (12), 3048–59.
- (13) Graumann, J.; Hubner, N. C.; Kim, J. B.; Ko, K.; Moser, M.; Kumar, C.; Cox, J.; Scholer, H.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5,111 proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 672–83.
- (14) von der Mark, K.; Gauss, V.; von der Mark, H.; Muller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* **1977**, *267* (5611), 531–2.
- (15) Hathout, Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev. Proteomics* **2007**, *4* (2), 239–48.
- (16) Ong, S. E.; Mann, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2650–60.
- (17) Miller, R. R.; McDevitt, C. A. Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 708–14.
- (18) Hsieh, J. L.; Shen, P. C.; Shiau, A. L.; Jou, I. M.; Lee, C. H.; Wang, C. R.; Teo, M. L.; Wu, C. L. Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **2010**, *28* (10), 1300–6.
- (19) Jones, K. L.; Brown, M.; Ali, S. Y.; Brown, R. A. An immunohistochemical study of fibronectin in human osteoarthritic and disease free articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **1987**, *46* (11), 809–15.
- (20) Homandberg, G. A.; Wen, C.; Hui, F. Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage* **1998**, *6*, 231–44.
- (21) Yasuda, T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod. Rheumatol.* **2006**, *16* (4), 197–205.
- (22) Couto, D. L.; Wu, J. H.; Monette, A.; Rivard, G. E.; Blostein, M. D.; Galipeau, J. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17991–8001.
- (23) Polacek, M.; Bruun, J. A.; Johansen, O.; Martinez, I. Differences in the secretome of cartilage explants and cultured chondrocytes unveiled by SILAC technology. *J. Orthop. Res.* **2010**, *28* (8), 1040–9.
- (24) Polacek, M.; Bruun, J. A.; Elvenes, J.; Figenschau, Y.; Martinez, I. The secretory profiles of cultured human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells: implications for autologous cell transplantation strategies. *Cell Transplant* **2011**, DOI: 10.3727/096368910X550215.
- (25) Firestein, G. S.; Budd, R. C.; Harris, E. D.; McInnes, I. B.; Ruddy, S.; Sergent, J. S. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 8th ed.; Saunders Elsevier: Philadelphia, 2009; Vol. 1, pp 1–1034.
- (26) Ruiz-Romero, C.; Carreira, V.; Rego, I.; Remeseiro, S.; López-Armada, M. J.; Blanco, F. J. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* **2008**, *8* (3), 495–507.
- (27) Glant, T. T.; Kamath, R. V.; Bardos, T.; Gal, I.; Szanto, S.; Murad, Y. M.; Sandy, J. D.; Mort, J. S.; Roughley, P. J.; Mikecz, K. Cartilage-specific constitutive expression of TSG-6 protein (product of tumor necrosis factor alpha-stimulated gene 6) provides a chondroprotective, but not antiinflammatory, effect in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46* (8), 2207–18.
- (28) Maier, R.; Wisniewski, H. G.; Vilcek, J.; Lotz, M. TSG-6 expression in human articular chondrocytes. Possible implications in joint inflammation and cartilage degradation. *Arthritis Rheum.* **1996**, *39* (4), 552–9.
- (29) Pfander, D.; Cramer, T.; Deuerling, D.; Weseloh, G.; Swoboda, B. Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **2000**, *59* (6), 448–54.
- (30) Lyons-Giordano, B.; Kefalides, N. A.; Brinker, J. M.; Pratta, M. A.; Arner, E. C. The effects of interleukin-1 on the expression of thrombospondin and fibronectin by rabbit articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* **1991**, *195* (2), 462–7.
- (31) Alexopoulos, L. G.; Youn, I.; Bonaldo, P.; Guilak, F. Developmental and osteoarthritic changes in Col6a1-knockout mice: biomechanics of type VI collagen in the cartilage pericellular matrix. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60* (3), 771–9.
- (32) Soder, S.; Hambach, L.; Lissner, R.; Kirchner, T.; Aigner, T. Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, *10*, 464–70.
- (33) Ronziere, M. C.; Ricard-Blum, S.; Tiollier, J.; Hartmann, D. J.; Garrone, R.; Herbage, D. Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1038*, 222–30.
- (34) Nugent, A. E.; Speicher, D. M.; Gradisar, I.; McBurney, D. L.; Baraga, A.; Doane, K. J.; Horton, W. E., Jr. Advanced osteoarthritis in humans is associated with altered collagen VI expression and upregulation of ER-stress markers Grp78 and bag-1. *J. Histochem. Cytochem.* **2009**, *57*, 923–31.
- (35) Luo, G.; Ducey, P.; McKee, M. D.; Pinero, G. J.; Loyer, E.; Behringer, R. R.; Karsenty, G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **1997**, *386* (6620), 78–81.
- (36) Neogi, T.; Booth, S. L.; Zhang, Y. Q.; Jacques, P. F.; Terkeltaub, R.; Aliabadi, P.; Felson, D. T. Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54* (4), 1255–61.
- (37) Neogi, T.; Felson, D. T.; Sarno, R.; Booth, S. L. Vitamin K in hand osteoarthritis: results from a randomised clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 1570–3.
- (38) Aigner, T.; McKenna, L.; Zien, A.; Fan, Z.; Gebhard, P. M.; Zimmer, R. Gene expression profiling of serum- and interleukin-1 beta-stimulated primary human adult articular chondrocytes—a molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor. *Cytokine* **2005**, *31*, 227–40.

**Anexo V: Relación de artículos no directamente relacionados con el objetivo de esta Tesis en los que he participado en mi etapa predoctoral.**

1. Calamia V, Mateos J, Fernández-Puente P, Lourido L, **Rocha B**, Fernández-Costa C, Montell E, Vergés J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. A pharmacoproteomic study confirms the synergistic effect of chondroitin sulfate and glucosamine. *Sci Rep.* 2014 Jun 10; 4: 5069.

2. Calamia V, Lourido L, Fernández-Puente P, Mateos M, **Rocha B**, Montell E, Vergés J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Secretome analysis of chondroitin sulfate – treated chondrocytes reveals anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-catabolic properties. *Arthritis Res Ther.* 2012 Oct 2:14(5):R202.

3. Calamia V, Fernández-Puente P, Mateos M, Lourido L, **Rocha B**, Montell E, Vergés J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Pharmacoproteomic study of the effect of three different chondroitin sulfate compounds on chondrocyte intracellular and extracellular proteomes. *Molecular and Cellular Proteomics* 2012 Jun;11(6):M111.013417.

4. Calamia V, Ruiz-Romero C, **Rocha B**, Fernández-Puente P, Mateos J, Montell E, Verges J, Blanco FJ. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy* 2010; 12 (4), R138.

5. Ruiz-Romero C, Calamia V, **Rocha B**, Mateos J, Fernández-Puente P, Blanco FJ. Hypoxia conditions differentially modulate normal and osteoarthritic chondrocyte proteomes. *Journal of Proteome Research* 2010; 9 (6): 3035-3045

