
LA PROTEOMICA EN LA ERA POSTGENÓMICA

The Proteomics In The Postgenomic Era

MARÍA CLAUDIA SANDOVAL-USME¹, Química; ADRIANA UMAÑA-PÉREZ¹, M.Sc. Ph. D.; ANDRÉS FELIPE VALLEJO-PULIDO¹, Químico; CATALINA ARÉVALO-FERRO^{2*}, M.Sc., Ph. D.; MYRIAM SÁNCHEZ-GÓMEZ¹, M.Sc.

¹Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

²Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

*Autor correspondiente: Catalina Arévalo-Ferro, Dr. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. carevalof@unal.edu.co

Presentado 12 de febrero de 2009, aceptado 30 de junio de 2009, correcciones 9 de septiembre de 2009.

RESUMEN

El principal desafío de la biología moderna es entender la expresión, función y regulación del conjunto completo de proteínas codificadas por un organismo, lo cual describe el objetivo del nuevo campo de la proteómica. Las proteínas son las efectoras del trabajo celular, por ello el estudio de sus perfiles globales de expresión y de sus cambios bajo determinadas condiciones fisiológicas o patológicas, permite entender la red compleja de interacciones en que se basa el funcionamiento de una célula. La electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) es la técnica central de la proteómica. En la actualidad no existe otro método con la capacidad para resolver simultáneamente miles de proteínas en un solo procedimiento y para detectar modificaciones post y co-traduccionales imposibles de predecir a partir de la secuencia genómica. Sus aplicaciones incluyen el análisis de proteomas, señalización, detección de marcadores de enfermedades y cáncer.

Palabras clave: proteómica, electroforesis 2D, proteomas, identificación de proteínas, espectrometría de masas.

ABSTRACT

The main challenge of modern biology is to understand the expression, function and regulation of the whole set of proteins codified by an organism, which is the objective of the new field of proteomics. Proteins are the effectors of cellular work and the knowledge of their global expression profiles and changes under physiological and pathological conditions can help us to understand the complex network of interactions involved in cellular function. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) is the central technology in proteomics. At present no other technique has the throughput and high resolution of 2-DE for the separation of thousands of proteins in one procedure and for the analysis of post- and co-translation modifications, not predictable from the genome

sequence. The scope of applications extends from proteome analysis, to cell signaling, disease markers and cancer.

Key words: proteomics, 2D electrophoresis, proteome, protein identification, mass spectrometry .

INTRODUCCIÓN

El proyecto del Genoma Humano es uno de los pocos ejemplos en biología que refleja un intento por coordinar y enfocar hacia objetivos definidos un gran proyecto multinacional de investigación. Concluído en 2003, dos años antes de lo planeado, el proyecto del Genoma Humano ha impactado la investigación biológica tanto a nivel científico como político. Científicamente, le ha dado una nueva dimensión conceptual a la biología humana, al hacer posible estudiar el comportamiento de todos nuestros genes, una idea inconcebible antes de que se contara con la secuencia del genoma humano. Políticamente, el proyecto del Genoma Humano ha planteado una nueva forma de organización de la investigación, lo cual ya se está manifestando en la creación de una segunda generación de proyectos dirigidos como el proyecto HapMap (*Human Haplotype*) basado en la identificación de variaciones en el ADN de 270 grupos étnicos (*The International HapMap Consortium 2003; http://www.hapmap.org*) y el proyecto ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements), que busca identificar todos los elementos funcionales en la secuencia del genoma humano (*ENCODE Project Consortium 2004; http://www.genome.gov/10005107; Little, 2005*).

El progreso realizado en el conocimiento de la secuencia del genoma humano, así como de cientos de otros genomas de eucariotes y procariotes ha arrojado una gran cantidad de información, que requiere ser complementada con datos sobre transcritos o ARN mensajeros y de sus productos, las proteínas, con el apoyo de la bioinformática. El principal desafío de la biología moderna es entender la expresión, función y regulación del conjunto completo de proteínas codificadas por un organismo, lo cual describe el objetivo del nuevo campo de la proteómica. Esta información será invaluable para comprender muchos procesos complejos a nivel molecular, sus diferencias de acuerdo al tipo celular y sus alteraciones en estados de enfermedad (Zhu *et ál.*, 2003).

Las proteínas son las efectoras del trabajo celular, por ello el estudio de sus perfiles globales de expresión y de sus cambios bajo determinadas condiciones fisiológicas o patológicas, permite entender la red compleja de interacciones en que se basa el funcionamiento de una célula. Tradicionalmente las investigaciones alrededor de los procesos bioquímicos se han dirigido a moléculas individuales, genes o proteínas, que en muchos casos conducen a puntos ciegos por las innumerables interacciones que afectan un fenómeno particular (Williams, 1999). Actualmente existen formas para estudiar un conjunto de proteínas a la vez, esto es, el proteoma, el cual refleja el estado de una célula en un momento determinado y ha sido usado con éxito en la búsqueda de diversos factores que alteran los patrones normales de proteínas, algunas imposibles de predecir mediante estudios genómicos (Williams, 1999).

En 1995 se llamó proteómica al estudio de las proteínas expresadas por el genoma, esto incluye estudios de interacción entre proteínas, modificaciones post-traduccionales,

funciones y localización (Wilkins *et ál.*, 1996), y desde entonces grandes avances se han dado debido a la nueva instrumentación y estrategias experimentales recientemente desarrolladas, así como a los métodos bioinformáticos. Así mismo, se ha hecho posible empezar a integrar datos a gran escala de varias de las disciplinas “ómicas” en investigaciones dirigidas en búsqueda de un marco conceptual general para los sistemas biológicos (de Hoog y Mann, 2004). Con el fin de organizar la información que se está generando a partir de los estudios proteómicos, se creó en 2001 un consorcio internacional denominado HUPO (*Human Proteome Organization*) con sede en Canadá. Sus objetivos son fundamentalmente propiciar la colaboración e intercambio entre investigadores en esta disciplina, la conformación de bases de datos y el apoyo a iniciativas, tales como los proteomas humanos de hígado, plasma, cerebro, entre otros.

Diferentes áreas, entre ellas, la bioquímica, la bioinformática, la microbiología, la medicina y nuevos desarrollos en biología molecular se han beneficiado del desarrollo de las diferentes técnicas de la proteómica que han sido útiles para la comparación de proteomas y subproteomas (secretoma, proteínas de superficie, etc.) en microorganismos con el objetivo de encontrar proteínas altamente inmunogénicas, factores de virulencia, proteínas responsables de la producción de solventes o de la degradación de celulosa, así como proteínas responsables de la interacción hospedero patógeno. También para la caracterización de especies y la comparación de diferentes cepas y líneas clonales. Así mismo se ha utilizado para el estudio de los mecanismos de acción de diferentes fármacos y la comparación de proteínas involucradas en diferentes rutas metabólicas (Sali *et ál.*, 2003).

Esta revisión está enfocada hacia la discusión de la técnica de la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE del inglés *Two-dimensional gel electrophoresis*), ampliamente empleada en estudios de proteómica de expresión, proteómica estructural y funcional. Se discuten algunas características de la técnica con base en aplicaciones en las investigaciones y actividades académicas de extensión por parte de los autores.

ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES

En 1975 O'Farrell y otros investigadores demostraron que las proteínas podían separarse utilizando dos dimensiones, la primera, por isoelectrofoque (IEE) de acuerdo con el punto isoeléctrico (PI) y la segunda según su masa molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (O'Farrell, 1975). Esta metodología tiene un poder de resolución superior al de muchas otras utilizadas para el análisis de mezclas de proteínas extraídas de muestras complejas (tejidos, sangre, cultivos de microorganismos, cultivos de línea celular, etc.) y permite la visualización de miles de proteínas al mismo tiempo. El mayor problema de esta metodología era la reproducibilidad, debida principalmente a los gradientes de anfolitos utilizados para el IEE. En la metodología tradicional, se utilizaban “anfolitos acarreadores” (CA del inglés *carrier ampholyte*), con los que resultaba difícil alcanzar el equilibrio durante el IEE presentándose un corrimiento del gradiente de pH hacia el cátodo (*cathodic drift*) y un fenómeno de meseta en el centro del gel (*plateau phenomenon*), dando una baja reproducibilidad en los patrones de proteínas de un gel a otro. Estos inconvenientes se solucionaron con la aparición de los gradientes de pH inmovilizados en poliacrilamida (IPG del inglés *immobilized pH gradients*; Bjellqvist *et ál.*, 1982). Estos gradientes se hacen con derivados de acrilamida que tienen un ácido

carboxílico libre o grupos de aminas terciarias que co-polimerizan con la acrilamida y la bis-acrilamida. Estas moléculas conocidas comercialmente como immobilines permiten preparar gradientes de pH desde 2,5 hasta 12, así se pueden tener rangos amplios (3-10) en los que se corre una muestra dada y paralelamente se puede correr la misma muestra en un rango de 4 - 7, esto hace un efecto de zoom en el que se amplía el rango de análisis de una fracción de la muestra (Gorg *et ál.*, 1999).

Además de la reproducibilidad entre las mismas muestras, los gradientes inmovilizados permitieron la comparación entre muestras diferentes como plasma, fluido cerebroespinal, tejidos normales, biopsias etc., en las que se podían encontrar las mismas proteínas en las mismas posiciones en diferentes geles, surgiendo los mapas de proteomas en dos dimensiones. La reproducibilidad, la facilidad de hacer comparaciones entre muestras y la posibilidad de separar proteínas punto por punto en un gel micropreparativo (que permite la extracción del polipéptido y la identificación posterior por cualquier técnica basada en microsecuencia por composición de aminoácidos o espectrometría de masas entre otras), ha situado la metodología de separación de proteínas en geles de dos dimensiones (2D-PAGE) entre una de las más usadas e importantes técnicas para estudios en proteómica, enfocados a resolver preguntas biológicas (Rabilloud, 2002). Existen diferentes aproximaciones para obtener geles de proteínas de dos dimensiones. En resumen, la técnica consiste en utilizar tiras de geles equilibrados con gradientes inmovilizados de pH en el rango deseado para hacer el IEE, las cuales se rehidratan e impregnán con la muestra, ésta última disuelta en un *buffer* contenido en urea, un detergente no iónico, un agente reductor y anfolitos (O'Farrell, 1975; Rabilloud, 1996; Gorg *et ál.*, 2000). El IEE debe realizarse comenzando con un voltaje bajo e incrementándolo hasta 8000V para alcanzar un estado estacionario en el que la separación y localización de las proteínas sea constante. Despues del IEE las tiras con la muestra deben equilibrarse en un *buffer* que contenga SDS, un agente reductor y un agente alquilante, urea y glicerol para que la transferencia al segundo gel (SDS-PAGE) sea completa y el corrido sea homogéneo. La electroforesis vertical de la segunda dimensión debe realizarse con un voltaje constante que permita la transferencia de las proteínas, generalmente 100 a 300 voltios. Las proteínas pueden ser visualizadas con diferentes métodos de tinción (Coomassie, Coomassie coloidal, tinción de plata) o realizando detección por fluorescencia (DIGE) o autoradiografía. La identificación de las proteínas de interés puede realizarse extrayendo la banda directamente del gel y siguiendo los protocolos indicados para los diferentes métodos como degradación de Edman o espectrofotometría de masas (Gorg *et ál.*, 2000).

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. De manera similar al avance técnico de la electroforesis en dos dimensiones, los adelantos en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas han contribuido al desarrollo vertiginoso que ha tenido la proteómica en los últimos años. El método de Edman fue la técnica principal de identificación de proteínas y fue usado con un éxito considerable, no obstante por ser un método es lento (un péptido al día) y poco sensible (Pappin, 1996). En estos aspectos, sensibilidad y velocidad, y haciendo uso de las amplias bases de datos existentes en el momento la espectrometría de masas ha evolucionado permitiendo el análisis rutinario de muestras complejas en muy poco tiempo lo que la ha convertido en una herramienta muy exitosa en proteómica.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que mide la relación carga-masa (m/z) de iones basándose en su comportamiento en un campo magnético. La muestra es convertida en iones y vaporizada haciendo uso de técnicas como MALDI (desorción ionización asistida por láser) o ESI (ionización por electrospray). MALDI es una técnica de ionización por pulsos que puede ionizar biomoléculas de gran tamaño al utilizar la energía de un láser para desorber y ionizar la muestra en presencia de una matriz capaz de absorber luz. En la técnica ESI, las muestras son ionizadas a presión atmosférica al hacer fluir la muestra por un capilar en presencia de una corriente eléctrica.

Originalmente la técnica de identificación de proteínas comprende la digestión de la proteína, análisis por MALDI y búsqueda en bases de datos. Cada proteína en la base de datos es digerida teóricamente, generando miles de péptidos teóricos. Los datos experimentales de masas de péptidos, la huella digital de masas de péptidos, son comparados con las masas teóricas, con lo que se calcula y se asigna una calificación (Waestermeier Reiner, 2008). Esta calificación refleja la similaridad entre las masas teóricas y experimentales, la proteína más probable será entonces la que presente la mayor correspondencia entre los péptidos experimentales y teóricos. Adicionalmente este análisis puede realizarse en *tandem*, para esto el equipo debe ser capaz de seleccionar un determinado fragmento y someterlo a una nueva fragmentación y análisis.

APLICACIONES DE PROTEÓMICA MEDIANTE GELES DE DOS DIMENSIONES

El análisis de expresión de proteomas, conocido como *expression proteomics* permite identificar proteínas involucradas en la transducción de señales y proteínas relacionadas con una enfermedad entre otras. Estos estudios están divididos en dos aspectos, los experimentos en los que el investigador expone al objeto de estudio (cultivos (Fig. 1A y D), tejidos (Fig. 1C) o pacientes) a determinado tratamiento y se comparan los perfiles de expresión de proteínas entre los casos tratados y los no tratados. Y los experimentos en los que se comparan los perfiles de expresión de proteínas entre pacientes, cultivos o tejidos que presenten una alteración o comportamiento diferente al de los estados normales. El primer tipo de experimento ha sido ampliamente usado por las industrias farmacéuticas para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, en clínica para observar el desarrollo de terapias o el mecanismo de resistencia a diferentes antibióticos. El segundo, se ha utilizado para encontrar proteínas involucradas en el desarrollo de procesos como el alcoholismo, cáncer, problemas cardíacos y Alzheimer. En todos estos estudios, debe resaltarse, que la ausencia de una proteína o un cambio en su modificación, puede ser tan crucial como la presencia de una nueva proteína.

Otro tipo de estudios se hacen para localizar proteínas en determinados compartimentos celulares o en organelos específicos, de esta forma se construye un mapa celular. Estas estrategias se conocen con el nombre de proteómica estructural. La localización de proteínas permite buscar interacciones entre ellas y de esta forma encontrar diferentes complejos proteicos relacionados con actividades específicas como poros en las membranas nucleares entre otros. La búsqueda de interacciones entre proteínas señalizadoras o receptores en membranas, así como blancos farmacológicos, se conocen con el nombre de proteómica funcional. Estos estudios se realizan sobre subproteomas celulares separados por diferentes estrategias, y se combinan la mayoría de técnicas relacionadas con el estudio de proteínas (cromatografía, inmunoprecipitación, reacciones antígeno anticuerpo etc.; Graves y Haystead, 2002).

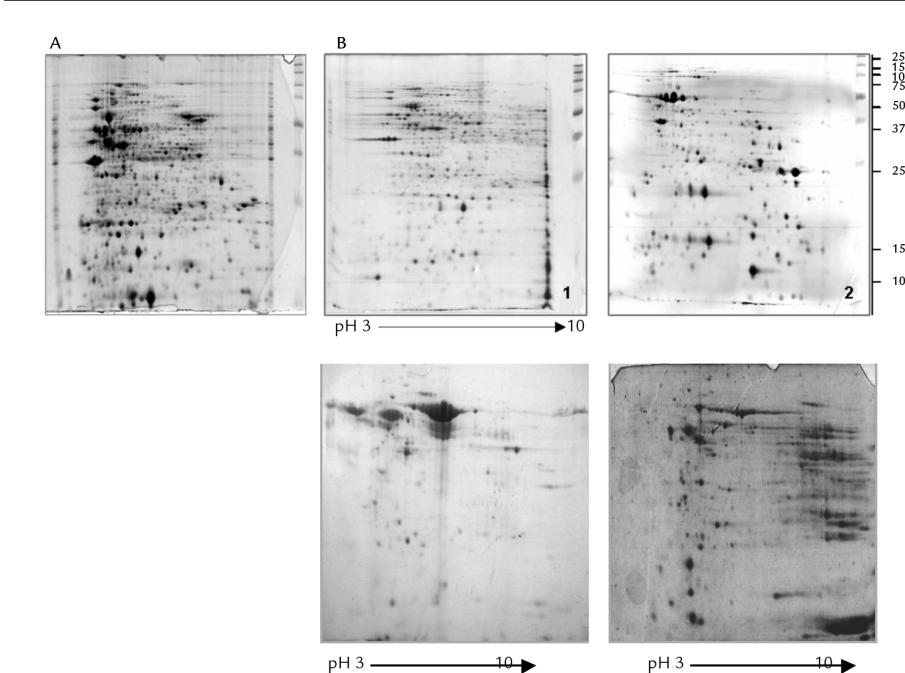


Figura 1. Proteomas y subproteomas. Geles bidimensionales de proteínas de cultivos celulares (*Pseudomonas aeruginosa*, (A), cáncer de cérvix C33a (D)) y tejidos (hígado de rata (C)). Extractos obtenidos con diferentes técnicas a partir del mismo cultivo: extracto total por sonicación y precipitación con fenol de proteínas (A) y separando contenido intracelular (B,1) de las membranas (B,2).

En todas las aproximaciones que existen para caracterizar el proteoma de una célula, se deben manejar las variables bajo las cuales se encuentra la célula en estudio, ya que la expresión de proteínas cambia drásticamente con cualquier factor que se encuentre modificado en el medio ambiente del organismo que se estudia. Existe un proteoma diferente para cada estado celular que refleja condiciones específicas: “un genoma dado puede producir un número de proteomas infinito” (Graves y Haystead, 2002). Adicionalmente, según la técnica de extracción utilizada también se pueden obtener diferentes subproteomas para el mismo estado celular separando las proteínas de diferentes partes de la célula. En la figura 1 se observan los patrones de proteínas obtenidos usando diferentes métodos de extracción, el patrón correspondiente a la extracción “total” de proteínas celulares (Fig. 1A) se compara con los subproteomas intracelular y de proteínas asociadas a la superficie celular de una bacteria (Fig. 1B 1 y 2 respectivamente). El fraccionamiento del proteoma total no solamente permite mayor resolución en la separación de las proteínas evitando sobreapamientos sino que permite detectar proteínas diferencialmente expresadas con mayor claridad asociando su función a la estructura celular a la que corresponden.

El estudio de proteomas ha tenido su mayor impacto en el área clínica en la búsqueda de marcadores de diagnóstico para enfermedades o en el desarrollo de medicamentos. A continuación mencionamos algunos ejemplos de estos estudios, que utilizando 2D-PAGE, han permitido identificar proteínas que juegan papeles fundamentales en diferentes

sistemas biológicos relacionados con patologías. Entre ellos, el análisis de blancos farmacéuticos potenciales que permite saber cuáles de las proteínas diferencialmente expresadas que, se asume, intervienen en una disfunción, se ven directamente afectadas por el fármaco. En la figura 2A y 2B se puede apreciar un mapa de expresión diferencial de proteínas realizado con software para análisis de geles, el ImageMaster Elite® 2-D versión 4.0 (Amersham Biosciences). En este mapa las proteínas coloreadas de rosado son blancos de una molécula que puede bloquear la comunicación bacteriana (Manefield *et al.*, 2002; Arevalo-Ferro *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la comparación de proteínas diferencialmente expresadas entre clones (Fig. 2C). Arévalo-Ferro *et al.*, 2004, reportaron proteínas diferencialmente expresadas en dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes potenciales de virulencia pero pertenecientes al mismo linaje clonal, estas cepas fueron previamente caracterizadas con otras técnicas que no permitieron encontrar diferencias significativas. Las proteínas reportadas en el estudio mencionado están relacionadas con mecanismos de patogenicidad (Arevalo-Ferro *et al.*, 2004). Vale la pena mencionar estudios enfocados en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico en cáncer (Srinivas *et al.*, 2002) y la caracterización de patrones de expresión de proteínas en enfermedades cardíacas (van Eyk, 2001) entre muchos otros (Hanash, 2003; Veenstra *et al.*, 2005).

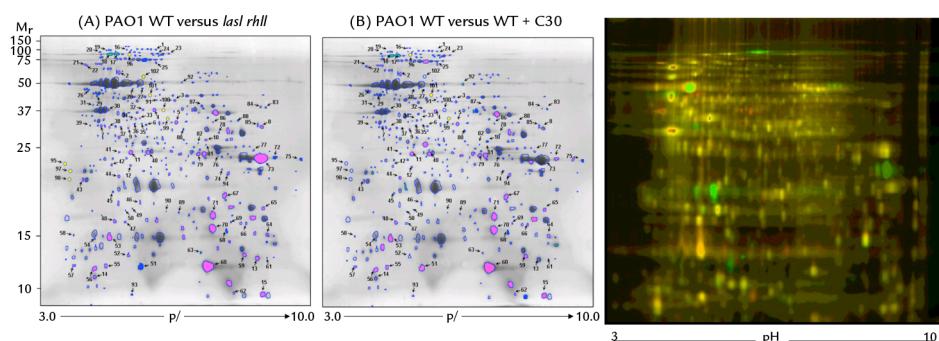


Figura 2. Blancos farmacéuticos. A. Mapa de proteínas diferencialmente expresadas entre: *Pseudomonas aeruginosa* y su mutante no patogénica. B. Mapa de proteínas diferencialmente expresadas entre: *Pseudomonas aeruginosa* sin fármaco inhibidor de proteínas relacionadas con patogenicidad y con fármaco. Las proteínas marcadas en rosado son proteínas cuya expresión se ve reducida en la mutante y en la cepa silvestre cuando esta bajo la influencia del fármaco. C. Electroforesis diferencial en gel (DIGE). Extracto total de proteínas de dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de pacientes con Fibrosis Cística. Los extractos fueron marcados diferencialmente con fluorocromos (Cy3 y Cy5). En el mismo gel se observan las proteínas diferencialmente expresadas de cada una de las cepas en rojo y en verde respectivamente. Estos estudios se realizaron en el grupo del Prof Dr. Leo Eberl bajo la supervisión de Dr. Katrin Riedel, en el Departamento de Microbiología de la Technischen Universität Manchen.

En el caso del estudio de tejidos enfermos es especialmente útil estudiar los proteomas, como se mencionó anteriormente, la expresión de un gen puede ser la misma en dos situaciones y no refleja necesariamente la actividad de una proteína, dado que esta se encuentra regulada por infinidad de mecanismos y modificaciones post-traduccionales,

entre las cuales la fosforilación es la más relevante. Este proceso reversible se ajusta al plegamiento y función de las proteínas, ya sea en actividades enzimáticas, regulando localización de proteínas, formación de complejos o degradación. Por ello, tiene influencia en una gran variedad de funciones esenciales para la célula como lo son la transducción de señales, mantenimiento metabólico, división celular, etc.

En el laboratorio de los autores se implementan actualmente técnicas de análisis fosfoproteómico basadas en el uso del radioisótopo ^{32}P así como tinciones fosfoespecíficas, que permiten analizar las proteínas fosforiladas claves en la transducción de señales. El empleo de isótopos radioactivos de fósforo permite seleccionar solo las proteínas que sufren fosforilación, aumentando en gran medida la sensibilidad y disminuyendo considerablemente la complejidad de los datos a analizar.

Modificaciones post-traduccionales. El estado de fosforilación o de glicosilación de una proteína puede señalar la activación de una proteína en unas condiciones y la inactivación otras (Williams, 1999; Hanash, 2003; Lim, 2005). Es claro que las vías de transducción de señales, el ciclo celular y otras vías de señalización cruciales en el desarrollo eucariótico son dependientes en ciclos de fosforilación/desfosforilación. Un residuo de serina o treonina dado puede tener uno de tres estados de actividad: sin modificar, glicosilado, o fosforilado. Solo estudios a nivel del proteoma clarifican tal diversidad. En otros casos proteínas pueden ser diferencialmente procesadas para ejercer su actividad biológica. Para tener una aproximación correcta de esas actividades, la escogencia de los proteomas a extraer y el tipo de proteínas que se quieren evaluar es fundamental. Con este objetivo se han desarrollado diferentes procesos de fraccionamiento subcelular que permitan obtener diferencialmente proteínas representativas de diferentes estructuras celulares, así mismo se han desarrollado diferentes tipos de tinción o detección que permitan diferenciar proteínas dentro de los perfiles ya separados, entre estas tinciones están las específicas para glicosilaciones o proteínas fosforiladas. El estudio de este tipo de proteínas es necesario para entender procesos biológicos fundamentales y redes de señalización (Zhu *et ál.*, 2003).

OTRAS TÉCNICAS

Aunque la electroforesis bidimensional es la herramienta más tradicional y hasta el momento una de las más empleadas en proteómica, es una técnica que requiere una gran cantidad de muestra y una minuciosa ejecución (Rabilloud, 2002). Por tal razón se han diseñado estrategias para facilitar su desarrollo, un ejemplo es la electroforesis diferencial en gel (DIGE), la cual facilita el análisis de expresión de proteínas al marcar poblaciones de proteínas de diferentes orígenes con tintes fluorescentes (Fig. 2C). De esta manera se pueden identificar las proteínas diferencialmente expresadas en el mismo gel de electroforesis bidimensional (Tonge *et ál.*, 2001).

El desarrollo de otras técnicas, que acoplan a la separación la espectrometría de masas, ha logrado además de facilitar el análisis, mejorar la resolución, la sensibilidad, han permitido disminuir la cantidad de muestra y el tiempo empleado. Entre ellas se encuentran la desorción/ionización asistida en matriz con láser (MALDI-TOF), la ionización con electrospray (ESI), desorción/ionización asistida con láser en superficie (SELDI-TOF), así como otros métodos que incluyen los arreglos de proteínas en fase reversa, microarreglos de anticuerpos y marcación de afinidad codificada por isótopos (ICAT), que surgen

como una alternativa para la electroforesis bidimensional. Este último (ICAT) permite la identificación y análisis cuantitativo y comparativo de proteínas presentes en fluidos biológicos por cromatografía microcapilar de acoplamiento con espectrometría de masas, ionización de electrospray en *tandem*. Como ventaja sobre otras técnicas de proteómica, el ICAT permite analizar proteínas de menor abundancia, lo cual hasta ahora sigue siendo un problema para la electroforesis bidimensional (Reymond y Schlegel, 2007). El acoplamiento de la cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS ha tenido un gran impacto para el análisis de moléculas pequeñas. (Sali *et al.*, 2003). El sistema de LC-MS/MS puede ser automatizado, lo que permite que haya una mejoría notable en la reproducibilidad, la resolución, facilidad del manejo de las muestras y un rango dinámico para la cuantificación, y en el caso de muestras complejas, como las empleadas en el análisis de proteínas, la identificación por espectrometría de masas puede hacerse de forma completamente automática (Fig. 3).

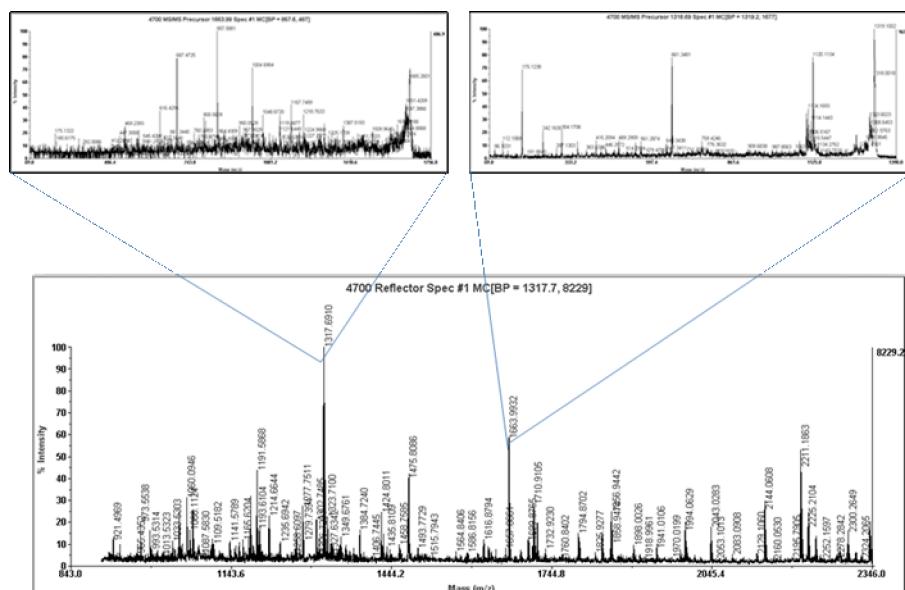


Figura 3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas en *tandem*. La espectrometría de masas en *tandem* MSn involucra la selección, separación y segunda fragmentación de un producto de la fragmentación inicial.

El sistema de LC-MS/MS, ya sea uni o multidimensional, después de la digestión de proteínas se denomina *shotgun proteomics*, y representa una aproximación en la que no se emplea electroforesis ni en una o dos dimensiones para la separación e identificación de proteínas. A partir de los péptidos generados con la digestión, se puede realizar el análisis directamente sin necesidad de otra separación adicional, y un programa de búsqueda en una base de datos se emplea para determinar las proteínas originales de las muestras. Para simplificar el análisis también es posible realizar un fraccionamiento de las muestras previo a la cromatografía, ya sea por fracciones celulares, o en metodologías como el ICAT, los

cuales aumentan el número de proteínas identificadas. El análisis por *shotgun* puede llegar a ser de hasta 100.000 espectros de MS/MS en mezclas muy complejas de péptidos.

CONCLUSIONES

La electoforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) es la técnica central de la proteómica. En la actualidad no existe otro método de elevada reproducibilidad con la capacidad para resolver simultáneamente miles de proteínas en un solo procedimiento. Es también única en su capacidad para detectar modificaciones post y co-traduccionales que no es posible predecir a partir de la secuencia genómica. Sus aplicaciones incluyen el análisis de proteomas, señalización, detección de marcadores de enfermedades y cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- AREVALO-FERRO C, HENTZER M, REIL G, GORG A, KJELLEBERG S, GIVSKOV M, et ál. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ Microbiol*. 2003;5(12):1350-1369.
- AREVALO-FERRO C, BUSCHMANN J, REIL G, GORG A, WIEHLMANN L, TUMMLER B, et ál. Proteome analysis of intraclonal diversity of two *Pseudomonas aeruginosa* TB clone isolates. *Proteomics*. 2004;4(5):1241-1246.
- BJELLQVIST B, EK K, RIGHETTI PG, GIANAZZA E, GORG A, WESTERMEIER R, et ál. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 1982;6(4):317-339.
- DE HOOG CL, MANN M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:267-293.
- GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, WEISS W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*. 1999;20(4-5):712-717.
- GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, HARDER A, SCHEIBE B, WILDGRUBER R, et ál. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;21(6):1037-1053.
- GRAVES PR, HAYSTEAD TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(1):39-63; table of contents.
- HANASH S. Disease proteomics. *Nature*. 2003;13;422(6928):226-232.
- LIM YP. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin Cancer Res*. 2005;11(9):3163-3169.
- LITTLE PF. Structure and function of the human genome. *Genome Res*. 2005;15(12):1759-1766.
- MANEFIELD M, RASMUSSEN TB, HENZTER M, ANDERSEN JB, STEINBERG P, et ál. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*. 2002;148(Pt 4):1119-1127.
- O'FARRELL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250(10):4007-4021.
- PAPPIN DJC RD, HANSEN HF. Mass Spectrometry in the biological Sciences. 1996.

- RABILLOUD T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*. 1996;17(5):813-829.
- RABILLOUD T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*. 2002;2(1):3-10.
- REYMOND MA, SCHLEGEL W. Proteomics in cancer. *Adv Clin Chem*. 2007;44:103-142.
- SALI A, GLAESER R, EARNEST T, BAUMEISTER W. From words to literature in structural proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):216-225.
- SRINIVAS PR, VERMA M, ZHAO Y, SRIVASTAVA S. Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clin Chem*. 2002;48(8):1160-1169.
- TONGE R, SHAW J, MIDDLETON B, ROWLINSON R, RAYNER S, YOUNG J, *et al.* Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*. 2001;1(3):377-396.
- VAN EYK JE. Proteomics: unraveling the complexity of heart disease and striving to change cardiology. *Curr Opin Mol Ther*. 2001;3(6):546-553.
- VEENSTRA TD, CONRADS TP, HOOD BL, AVELLINO AM, ELLENBOGEN RG, MORRISON RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(4):409-418.
- WAESTERMEIER REINER NT. *Proteomics in Practice*. Second ed. 2008.
- WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA, APPEL RD, HUMPHERY-SMITH I, HOCHSTRASSER DF, *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19-50.
- WILLIAMS KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis*. 1999;20(4-5):678-688.
- ZHU H, BILGIN M, SNYDER M. Proteomics. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:783-812.