

Doble Fraccionamiento por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida para el estudio de mezclas complejas de proteínas.

Unidad ejecutora principal del resultado: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Autor Principal: Yassel Ramos¹, Vladimir Besada¹

Otros Autores: Luis J. González¹, Yairet García¹, Yiliam Cruz¹, Elain Gutierrez¹, Yoan Machado¹, Alejandro Leyva¹, Annia González¹, Aniel Sánchez¹, Yasset Pérez-Riverol¹, Arielis Rodríguez-Ulloa¹, Dayana García¹, Lila Castellanos-Serra¹.

Colaboradores: 9

Filiación: ¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Resumen:

La identificación de proteínas de baja abundancia es uno de los retos actuales de la proteómica debido al amplio rango dinámico de expresión de proteínas en un sistema biológico. Para aumentar las posibilidades de detección de proteínas poco abundantes es esencial utilizar métodos de separación de proteínas o péptidos que reducen la complejidad de la muestra biológica. Los métodos de separación de proteínas se han basado fundamentalmente en técnicas electroforéticas como la focalización isoelectrica y la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La focalización isoelectrica también ha sido aplicada para la separación de mezclas de péptidos. Sin embargo, no se ha investigado con anterioridad la utilidad de la electroforesis para el fraccionamiento de mezclas complejas de péptidos.

En el presente trabajo se establece un nuevo método para estudios de proteómica denominado Doble Fraccionamiento por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (DF-PAGE). El método combina el fraccionamiento de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, la hidrólisis enzimática en el gel y la separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida en ausencia de dodecil sulfato de sodio. Como aspecto novedoso se desarrolla, por primera vez, la técnica PAGE en ausencia de SDS para el fraccionamiento y la simplificación de mezclas complejas de péptidos. Además, se presenta, para esta técnica, un nuevo sistema discontinuo de soluciones tampón para la selección de péptidos ácidos ($pI \leq 5.5$) y se desarrolla un dispositivo para la colección en solución de los péptidos fraccionados. El método DF-PAGE permite identificar mayor número de proteínas que la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y la focalización isoelectrica en solución. La aplicación del método DF-PAGE a la caracterización del principio activo de la vacuna VA-MENGOC-BC permitió identificar 67 proteínas que no se habían detectado previamente en este preparado vacunal. El método DF-PAGE también se aplicó a la identificación de las proteínas moduladas diferencialmente por el péptido antitumoral CIGB-552 sobre la línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon. Los resultados arrojaron nuevas evidencias experimentales para la caracterización de las bases moleculares de la acción de este péptido.

Los resultados de este trabajo están avalados por cuatro publicaciones científicas en las revistas *Journal of Proteome Research*, *Electrophoresis*, *Journal of Proteomics* y un capítulo solicitado por invitación de los editores en el libro *Methods in Molecular Biology* en la serie *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*. Estos resultados también han sido presentados en siete congresos internacionales.

Colaboradores científicos: Jorge Fernández-de-Cossio¹, Lázaro Betancourt¹, Jeovanis Gil¹, Gabriel Padrón¹, Teresa Núñez de Villavicencio-Díaz¹, Brizaida Oliva¹, Julio R. Fernández¹, Osmany Guirola-Cruz¹, Maribel Guerra Vallespi¹.

"

Autor para la correspondencia:

Yassel Ramos Gómez: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, ave 31 e/158 y 190, Playa, Ciudad Habana
yassel.ramos@cigb.edu.cu

Comunicación corta de descripción del resultado

Introducción

La heterogeneidad estructural y funcional de las proteínas y el descubrimiento sistemático de nuevas modificaciones post-traduccionales que varían sus propiedades físicas, químicas y biológicas demandan un desarrollo constante de los métodos analíticos de proteómica. El fraccionamiento y la simplificación de la muestra biológica, aumentan la posibilidad de identificar proteínas poco abundantes. Las proteínas poco abundantes generalmente regulan la respuesta del sistema biológico y por tanto han demostrado ser de interés terapéutico para el desarrollo de nuevos medicamentos o la identificación de marcadores de diagnóstico.

La combinación de la focalización isoelectrica y la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) dio lugar al surgimiento de la electroforesis bidimensional (2DE). La 2DE se convirtió en la plataforma metodológica de base para la separación de mezclas complejas de proteínas. No obstante, la 2DE tiene limitaciones en cuanto a la separación de proteínas con valores extremos de pI y masa. En tal sentido han surgido nuevas técnicas analíticas para identificar las proteínas sin previa separación por métodos electroforéticos y utilizando la mezcla de péptidos generados por digestión enzimática. Estas técnicas analíticas se basan en la combinación de métodos de aislamiento selectivo de péptidos y métodos cromatográficos basados en principios ortogonales.

A pesar del amplio espectro de herramientas metodológicas con que cuenta la proteómica, ninguno de los métodos analíticos actuales ha demostrado ser el ideal para la identificación de todas las proteínas presentes en una muestra biológica. Solo la aplicación de varias estrategias metodológicas ofrece una visión más completa del problema biológico en estudio. Por tanto el desarrollo de métodos analíticos sigue siendo una demanda en el campo de la proteómica y un área de activa investigación.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, se definió como **objetivo** del presente trabajo: Desarrollar un nuevo método para estudios de proteómica que combine el fraccionamiento de proteínas por SDS-PAGE, la digestión de proteínas en el gel y el fraccionamiento de péptidos por PAGE en ausencia de SDS, previo al análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

El método establecido denominado Doble Fraccionamiento por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (DF-PAGE) combina tres principios de separación ortogonales: el fraccionamiento de las proteínas de acuerdo a su talla molecular, el fraccionamiento de los péptidos en función de su carga eléctrica y talla molecular y la separación de los péptidos de acuerdo a sus propiedades hidrofóbicas. En comparación con otros métodos de proteómica que emplean técnicas electroforéticas de fraccionamiento como la SDS-PAGE y la focalización isoelectrica en solución (OGE), el método DF-PAGE permite identificar mayor número de proteínas a partir de mezclas complejas. Este novedoso método fue aplicado a la caracterización del principio activo de la vacuna VA-MENGOC-BC y al estudio del mecanismo de acción del péptido antitumoral CIGB552. Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de insertar el método DF-PAGE a la plataforma metodológica de la proteómica.

Resultados

1. Diseño y evaluación del método DF-PAGE para estudios de proteómica.

El método DF-PAGE contiene tres etapas fundamentales: 1- el fraccionamiento de las proteínas por SDS-PAGE, 2- la digestión de proteínas en el gel, 3- el fraccionamiento de los

péptidos por PAGE en ausencia de SDS. Las fracciones de péptidos así obtenidas se analizan por LC-MS/MS y se realiza la identificación de las proteínas en las bases de datos a partir de los espectros de fragmentación de los péptidos. El uso de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en ausencia de SDS para el fraccionamiento de mezclas complejas de péptidos en estudios de proteómica constituye un elemento novedoso dentro del desarrollo del método DF-PAGE.

La técnica PAGE en ausencia de SDS, combinando un sistema discontinuo de soluciones tampón (Tris/Glicina) con un gel separador de poliacrilamida al 15%, permite la separación de los péptidos en función de sus velocidades de migración con una selectividad de fraccionamiento (porcentaje de péptidos que se resuelven en una de las fracciones respecto al total de péptidos detectados) superior al 80%. El principio de separación de la técnica PAGE en ausencia de SDS está basado en dos propiedades ortogonales de los péptidos: carga eléctrica y talla molecular. En particular la carga eléctrica es un factor esencial de la separación. Esta técnica logra separar péptidos que se diferencian en solo 1 unidad de carga eléctrica como son los péptidos desamidados y sus precursores. Adicionalmente, la técnica PAGE en ausencia de SDS logra un efecto de simplificación de la mezcla de péptidos ya que solo los péptidos cargados negativamente migran hacia el gel y se separan en diferentes fracciones. Las estrategias de simplificación de las muestras en los métodos de proteómica tienen la ventaja de aumentar las posibilidades de detección de proteínas minoritarias.

La técnica PAGE en ausencia de SDS se comparó con la técnica OGE, un método para el fraccionamiento de péptidos que ha sido establecido exitosamente en la plataforma metodológica de la proteómica. Para esta comparación se utilizó la digestión trípica de una fracción enriquecida en proteínas citosólicas de *E. coli*. El análisis por LC-MS/MS de la muestra sin previo procesamiento por PAGE en ausencia de SDS u OGE permitió la identificación de 126 proteínas. El efecto del fraccionamiento de péptidos por ambos métodos (PAGE en ausencia de SDS u OGE) permitió multiplicar de 3-4 veces la capacidad de identificación de proteínas. La calidad del fraccionamiento (evaluada a partir del número de péptidos detectados en fracciones individuales respecto al total de péptidos identificados) fue superior en la técnica PAGE en ausencia de SDS (86%) en comparación con OGE (76%). Sin embargo, el número de proteínas identificadas y de péptidos asignados fue mayor para la técnica OGE (524 proteínas y 1397 péptidos) en comparación con PAGE en ausencia de SDS (408 proteínas y 1101 péptidos).

Las pérdidas atribuibles a la elución pasiva de los péptidos a partir de los fragmentos de gel justifican el menor número de proteínas identificadas en la aplicación de la técnica PAGE en ausencia de SDS. Como parte del presente trabajo se diseñó un sistema de electroforesis para la técnica PAGE en ausencia de SDS que permite la colección de las fracciones directamente en solución. El sistema electroforético en tubo se evaluó utilizando la mezcla de péptidos trípticos de la muestra enriquecida en proteínas citosólicas de *E. coli*. En este nuevo sistema la calidad del fraccionamiento (84%) es similar al obtenido para la técnica PAGE en ausencia de SDS en la variante de geles planos (86%). Sin embargo, el número de proteínas identificadas (543 proteínas) es superior al obtenido por dicha técnica (408 proteínas) y similar al obtenido por la técnica OGE (524 proteínas).

El método GeLC (electroforesis en gel combinada a cromatografía líquida) se basa en el fraccionamiento de proteínas por SDS-PAGE combinado con el análisis de las mezclas de péptidos por LC-MS/MS. El método DF-PAGE surge al insertar el paso de fraccionamiento de péptidos por PAGE en ausencia de SDS en el método GeLC. Como resultado de la inclusión

del paso de fraccionamiento de péptidos, el método DF-PAGE en comparación con el método GeLC aumenta el número de péptidos identificados a partir una fracción enriquecida en proteínas citosólicas de *E. coli*. Todas las proteínas identificadas por el método GeLC también se identificaron al aplicar el método DF-PAGE. Con este último, adicionalmente se identificaron 89 proteínas que no se identificaron por el método GeLC. Este resultado demuestra las ventajas del método DF-PAGE en comparación con GeLC, el cual forma parte de la plataforma metodológica actual de los estudios de proteómica.

2. Selección de péptidos por PAGE en ausencia de SDS.

En el presente trabajo, como parte del desarrollo del método DF-PAGE, se evaluó un nuevo sistema discontinuo de soluciones tampón histidina/MOPS para la selección y fraccionamiento de péptidos ácidos ($pI \leq 5,5$). En comparación con el sistema clásico Tris/glicina, el cual selecciona y fracciona los péptidos en diferente rango de pI ($pI \leq 6,8$), el sistema histidina/MOPS logra un mayor grado de simplificación de la muestra sin afectar la cobertura del proteoma. Adicionalmente el nuevo sistema histidina/MOPS aumenta la capacidad resolutive en la zona del gel de mayor migración para resolver péptidos con modificaciones químicas que desplazan la distribución del pI de los péptidos hacia valores más ácidos.

3. Aplicación del método DF-PAGE a estudios de proteómica descriptiva.

El método DF-PAGE se empleó para determinar la composición de proteínas del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna contra *N. meningitidis* VA-MENGO-BC. El análisis permitió la identificación de 138 proteínas a partir de 602 péptidos. Previo a este estudio, se utilizaron las metodologías 2DE y SCAPE (captura selectiva de péptidos) para la caracterización de este preparado. El estudio por 2DE reveló la presencia de 31 proteínas, mientras que mediante la metodología SCAPE se identificaron 121 proteínas. Después del estudio utilizando DF-PAGE el catálogo de proteínas que describe el preparado vacunal aumentó de 129 a 196. En total, 67 proteínas se detectaron por primera vez en la muestra con el empleo del método DF-PAGE, de ellas 9 proteínas de membranas. Algunas de las proteínas de membrana identificadas mediante DF-PAGE han sido evaluadas por otros autores como candidatos vacunales contra infecciones de *N. meningitidis* tipo B.

4. Aplicación del método DF-PAGE a estudios de proteómica cuantitativa.

El método DF-PAGE se empleó para estudiar el perfil de proteínas modulado en la línea celular HT-29 en respuesta al tratamiento con el péptido antitumoral CIGB-552. El fraccionamiento de péptidos por PAGE en ausencia de SDS se realizó con el sistema discontinuo de solución tampón histidina/MOPS. El estudio de proteómica comparativa se realizó utilizando dos réplicas biológicas. Como resultado se identificaron 3372 péptidos correspondientes a 868 proteínas. Se consideraron como proteínas moduladas diferencialmente aquellas identificadas en ambas réplicas biológicas con un factor de cambio mayor que 1,8, según el análisis estadístico de los datos. Un total de 68 proteínas cambiaron sus niveles de expresión por la acción del péptido CIGB-552. Estas proteínas participan en la modulación de la apoptosis, la respuesta al daño oxidativo, la activación de la ruta NF- κ B y la respuesta anti-inflamatoria. Estos datos constituyen una valiosa información para la comprensión del mecanismo de acción del péptido CIGB552.

Impacto científico y social.

El impacto científico del presente trabajo radica en el establecimiento de un nuevo método para estudios de proteómica denominado DF-PAGE que incrementa el número de proteínas

identificadas respecto a otros métodos establecidos como la 2DE y el método GeLC. En el contexto del método se desarrolla la técnica PAGE en ausencia de SDS para el fraccionamiento y la simplificación de mezclas complejas de péptidos. Como elemento novedoso se presenta, para esta técnica, un nuevo sistema discontinuo de soluciones tampón para la selección de péptidos ácidos y se desarrolla un dispositivo para la colección en solución de los péptidos fraccionados.

La importancia práctica del presente trabajo consiste en la aplicación del método DF-PAGE al estudio de problemas biotecnológicos específicos como la caracterización del principio activo de la vacuna VA-MENGOC-BC. El método DF-PAGE permitió la identificación de 67 proteínas que no se habían detectado previamente en este preparado vacunal. El método se aplicó también a la identificación de las proteínas moduladas diferencialmente por la acción del péptido de actividad antitumoral CIGB-552 sobre una línea celular HT-29. Los resultados arrojaron nuevas evidencias experimentales para la caracterización de las bases moleculares de la acción de este péptido.

El método DF-PAGE se inserta en un campo de investigación de la proteómica que se encuentra en continuo desarrollo. Este método propone una alternativa para resolver problemas aun existentes en las metodologías establecidas. Por tanto es una opción para acelerar y complementar los proyectos de proteómica del país; específicamente en el trabajo de identificación de proteínas minoritarias que sirven de base para proponer nuevos candidatos vacunales y terapéuticos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que la electroforesis en geles de poliacrilamida en ausencia de SDS fracciona y simplifica mezclas complejas de péptidos con una calidad de fraccionamiento superior a técnicas establecidas. Adicionalmente, el sistema discontinuo de soluciones tampón histidina/MOPS diseñado para la técnica PAGE en ausencia de SDS selecciona y fracciona péptidos con pI menores de 5,5. En su conjunto el método DF-PAGE incrementa el número de proteínas identificadas; su aplicación a diferentes problemas biotecnológicos avala su inserción a la plataforma metodológica de la proteómica.

Publicaciones

1. Y. Ramos, E. Gutiérrez, Y. Machado, A. Sánchez, L. Castellanos-Serra, L. J. González, J. Fernández-de-Cossio, Y. Pérez-Riverol, L. Betancourt, J. Gil, G. Padrón, V. Besada. Proteomics Based on Peptide Fractionation by SDS-Free PAGE. *J. Proteome Res.* 7(6):2427-34, 2008.
2. Y. Ramos, Y. Garcia, Y. Pérez-Riverol, A. Leyva, G. Padrón, A. Sánchez, L. Castellanos-Serra, L. J. González, V. Besada. Peptide fractionation by acid pH SDS-free electrophoresis. *Electrophoresis* 32(11): 1323-6, 2011.
3. Y. Ramos, V. Besada, L. Castellanos-Serra. Peptide fractionation by SDS-free polyacrylamide gel electrophoresis for proteomic analysis via DF-PAGE. *Biji T. Kurien and R. Hal Scofield (eds.), Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 869: 197-204, 2012.
4. T. Núñez de Villavicencio-Díaz, Y. Ramos, B. Oliva, J. Fernández Masso, A. Rodríguez-Ulloa, Y. Cruz, O. Guirola-Cruz, Y. Perez-Riverol, L. J. González, I. Tiscornia, S. Victoria, M. Bollati-Fogolín, V. Besada, M. Guerra. Comparative proteomics analysis of the antitumor effect of CIGB-552 peptide in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Journal of Proteomics* 126: 163–171, 2015.