



Universidad de  
Oviedo



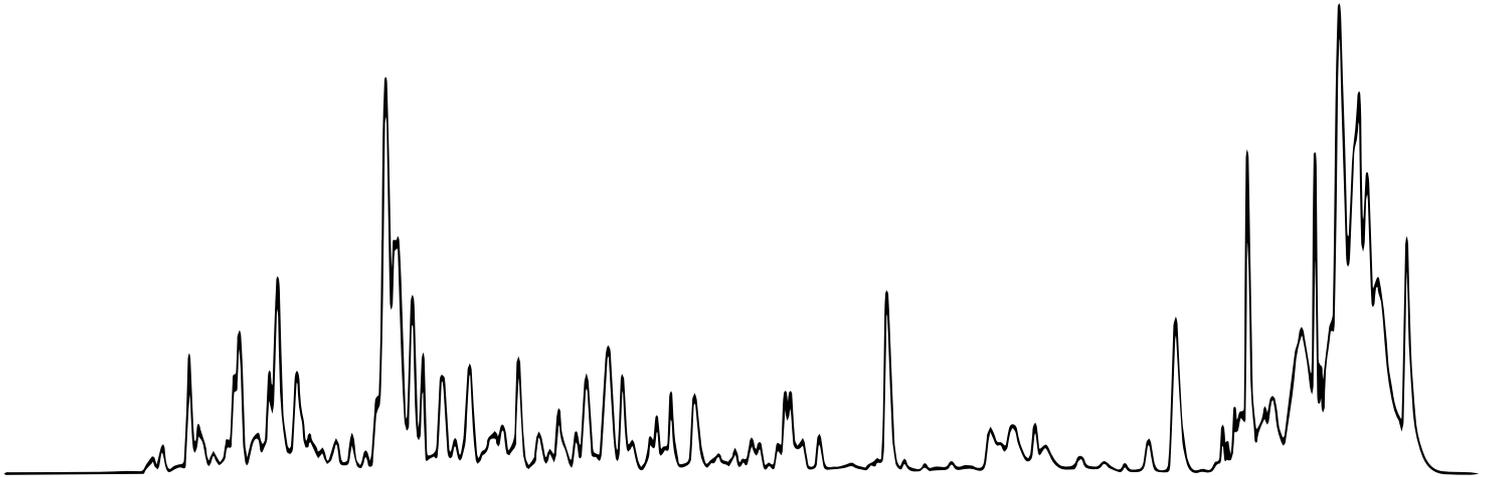
Fundación  
Centro Nacional de  
Investigaciones  
Cardiovasculares  
Carlos III



INSTITUTO  
UNIVERSITARIO  
DE ONCOLOGIA

OBRA SOCIAL CAJASTUR

## Máster Universitario en Biomedicina y Oncología Molecular Universidad de Oviedo



# Aproximaciones proteómicas para el estudio del envejecimiento

Víctor Fanjul Hevia<sup>1,2,3</sup>

Directores: Carlos López Otín<sup>1,2</sup>, Vicente Andrés García<sup>3</sup>

1. Universidad de Oviedo, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
2. Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias
3. Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III

**Trabajo Fin de Máster**

**junio de 2014**





Universidad de  
Oviedo



Fundación  
Centro Nacional de  
Investigaciones  
Cardiovasculares  
Carlos III



**D. Carlos López Otín**, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo y **D. Vicente Andrés García**, Investigador Sénior del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

**CERTIFICAN:**

Que el Licenciado en Biología, **D. Víctor Fanjul Hevia**, ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster titulado: *Aproximaciones proteómicas para el estudio del envejecimiento* que reúne a su juicio las condiciones necesarias de originalidad y calidad para ser admitido como Trabajo Fin de Máster de la Universidad de Oviedo

Y para que así conste, firman la presente certificación.

Vicente Andrés García

Carlos López Otín

Oviedo, a 3 de Junio de 2014

## **Agradecimientos**

Son demasiadas las personas que han hecho posible este trabajo y por ello me gustaría dar las gracias:

A mi familia por su apoyo incondicional.

A los compañeros del laboratorio de Oviedo porque, aunque nos separaban varios cientos de kilómetros, sé que estaban ahí para ayudarme en lo que necesitara.

Al personal del CNIC, en concreto al del departamento de AIE (tanto de administración, como de los laboratorios y del animalario) y a los del Programa Máster, por crear un ambiente de trabajo tan agradable y alentador.

A todo el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular y Genética por acogerme con los brazos abiertos, especialmente a José Rivera por ayudarme a enfocar los experimentos e incluirme en un proyecto de tanto calibre y en el que ha puesto tanto empeño.

A la Unidad de Proteómica del CNIC, principalmente a Jesús Vázquez, Inmaculada Jorge, Aleksandra Binek, Raquel Mesa y sobre todo a Emilio Camafeita por introducirme al apasionante mundo de la proteómica y por devanarse los sesos conmigo tratando de explicar los resultados de los experimentos.

A los tutores, Vicente Andrés y Carlos López Otín, por apostar por mí y por ofrecerme tantas y tan buenas oportunidades. Porque gracias a su apoyo y dedicación tal vez algún día aprenda a hacer ciencia de la más alta calidad, como la que hacen ellos.

## Abreviaturas utilizadas

ACN	Acetonitrilo
BA	Bicarbonato amónico
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
Cys	Cisteína
DTT	Ditiotreitol
AIE	Aterotrombosis, Imagen y Epidemiología
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FASP	Preparación de muestra ayudada por filtro
FDR	Tasa de falsos positivos
GELSILOX	Marcaje de Cys oxidadas con isótopos estables basado en gel
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HGPS	Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAM	Yodoacetamida
iTRAQ	Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
MMTS	Metilmetanotiosulfonato
MS	Espectrometría de masas
PBS	Tampón fosfato salino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TFA	Ácido trifluoroacético

## Tabla de contenido

<b>1. Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>7</b>
2.1. Papel de las laminas tipo A en envejecimiento y ECV .....	7
2.2. Envejecimiento normal y HGPS, similitudes y diferencias .....	8
2.3. Objetivos del proyecto .....	9
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>11</b>
3.1. Modelos animales .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.2. Extracción de proteínas .....	11
3.3. Cuantificación de extractos proteicos .....	11
3.3.1. Método RC DC.....	11
3.3.2. Método Direct Detect .....	12
3.4. Purificación y digestión de proteínas.....	12
3.4.1. Método SDS-PAGE .....	12
3.4.2. Método FASP.....	12
3.5. Desalado de muestras .....	13
3.6. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	13
3.7. Análisis bioinformático .....	13
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>15</b>
4.1. Análisis del rendimiento de extracción de proteínas.....	15
4.2. Optimización del método de preparación de muestra para LC-MS .....	17
4.3. Estimación de la cantidad de tejido mínima para el estudio .....	22
4.4. Estudio de la oxidación basal de las muestras .....	24
<b>5. Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>27</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>28</b>

## 1. Resumen

La población mundial está envejeciendo progresivamente y la edad es el factor principal de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), que a su vez es el principal problema de salud en países desarrollados. Aún no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares que provocan el envejecimiento ni aquéllos que originan la ECV, y su estudio podría conducir hacia el desarrollo de estrategias preventivas o de terapias que alarguen significativamente la vida y mejoren su calidad.

La progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) es un síndrome de envejecimiento acelerado que presenta grandes similitudes con el envejecimiento normal, pues también está relacionada con ECV, estrés oxidativo e inestabilidad genómica. No obstante, y a diferencia de este proceso fisiológico, no está asociada con patologías tan prevalentes como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas o la diabetes. Esto pone de manifiesto la importancia que tiene identificar mecanismos moleculares específicos y comunes del envejecimiento prematuro y del normal.

Con este fin nos planteamos identificar cambios en el proteoma específicos y comunes del envejecimiento prematuro y del normal aplicando nuevas técnicas de proteómica a diferentes órganos de ratones silvestres de distintas edades y a otros afectados por progeria. Posteriormente, validaremos los resultados en muestras de pacientes y realizaremos estudios funcionales para tratar de mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares que provocan ECV en envejecimiento normal y prematuro, un requisito para el desarrollo de nuevas terapias y medidas preventivas encaminadas a lograr un envejecimiento más saludable.

En el presente trabajo se sientan las bases del proyecto mediante la optimización de los procedimientos sobre los que se sustenta el estudio proteómico. Para ello se identifican los métodos de extracción, cuantificación, purificación y digestión de proteínas que ofrecen un alto rendimiento, lo cual permitirá abordar los objetivos propuestos a partir de una cantidad de material limitada preservando al máximo el estado de oxidación de las muestras.

## 2. Introducción

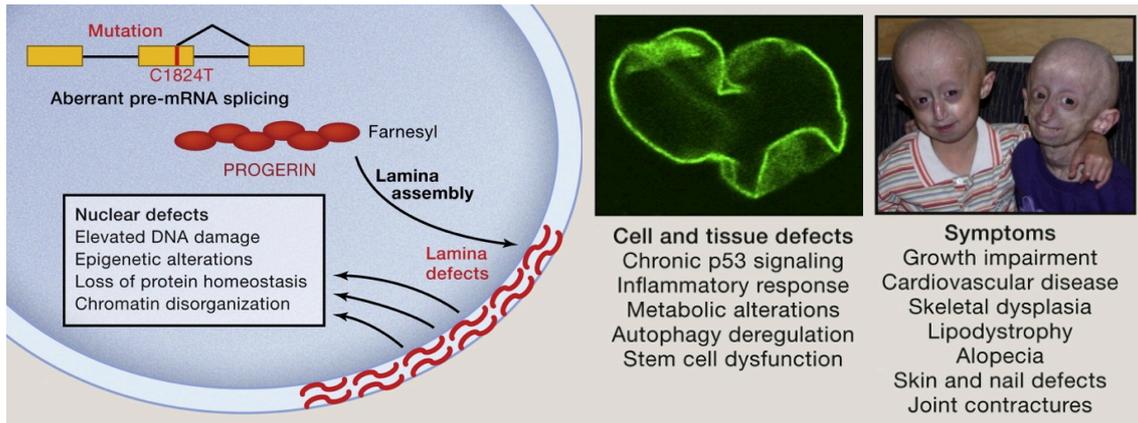
La población mundial está sufriendo un proceso de envejecimiento progresivo, y la edad es el factor más importante de riesgo de ECV. La ECV es el principal problema de salud en países desarrollados (es responsable de una de cada tres muertes) y se espera que pronto lo sea también a nivel mundial, lo cual acarreará importantes consecuencias sanitarias y socioeconómicas. Aún no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares que provocan el envejecimiento ni aquéllos que originan la ECV, y su estudio podría conducir hacia el desarrollo de estrategias preventivas o de terapias que alarguen significativamente la vida y mejoren su calidad. Así pues, este campo posee una gran relevancia social y unas prometedoras perspectivas, por lo que debería considerarse una preocupación prioritaria.

### 2.1. Papel de las laminas tipo A en envejecimiento y ECV

Las laminas de tipo A son filamentos intermedios de tipo V de la envuelta nuclear codificadas por el gen *LMNA* [1]. La prelamina A, el precursor de la lamina A, sufre una serie de modificaciones postraduccionales, incluyendo el procesamiento por la metaloproteasa ZMPSTE24/FACE-1. Estas proteínas juegan importantes papeles estructurales en el núcleo y regulan un amplio rango de funciones celulares [2].

Las mutaciones en *LMNA* o las alteraciones en su procesamiento llevan a la célula a acumular prelamina A o progerina (su forma mutada) y provocan la aparición de enfermedades genéticas denominadas laminopatías [1,3]. El HGPS es una laminopatía detectada en 1 de cada 4-8 millones de nacimientos. Los pacientes que la sufren padecen un síndrome de envejecimiento acelerado caracterizado por aterosclerosis, calcificación vascular, alopecia, osteoporosis y muerte prematura, principalmente por infarto de miocardio o cerebral a una edad media de 13 años [3-5] (**Fig. 1**).

Gracias al empleo de modelos celulares y animales de HGPS se han podido desarrollar terapias paliativas que están siendo evaluadas en ensayos clínicos [6]. Sin embargo, los resultados del primero de estos ensayos han mostrado solo leves mejorías en algunos pacientes [4]. Por tanto, es fundamental progresar en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad para diseñar tratamientos más efectivos.



**Figura 1: Etiología de HGPS.** La progeria está causada por una mutación puntual en el gen *LMNA* (izda.), que provoca una maduración alternativa de su pre-mRNA y en consecuencia la expresión de una proteína aberrante denominada progerina. Esta se acumula interfiriendo con las funciones normales de la lámina nuclear y desencadenando una serie de defectos en el núcleo. A nivel celular (centro), se provocan una serie de alteraciones metabólicas y de señalización, que a su vez contribuyen a la aparición de los síntomas en los pacientes con la enfermedad (dcha.). Adaptado de Gordon *et al.*, 2014.

## 2.2. Envejecimiento normal y HGPS, similitudes y diferencias

El envejecimiento normal y el prematuro comparten ciertas características como la acumulación del daño en el DNA debido a la inestabilidad genómica y al estrés oxidativo, defectos en la maquinaria de reparación del DNA, acortamiento acelerado de los telómeros o alteraciones epigenéticas [7]. Ambos procesos también están asociados con disfunción mitocondrial y alteraciones en calcificación vascular [8,9]. A nivel de organismo, la ECV y la osteoporosis son también comunes a ambos tipos de envejecimiento [3-5]. Por el contrario, el cáncer, la pérdida cognitiva, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes son mucho más prevalentes en pacientes geriátricos. Así, hay tanto mecanismos comunes como específicos que contribuyen al envejecimiento normal y al prematuro.

Los pacientes con HGPS expresan progerina. Notablemente, la progerina también puede contribuir al envejecimiento normal, ya que esta proteína se ha detectado en células y tejidos envejecidos de individuos sin HGPS [3]. En relación a este aspecto, cabe destacar que los ratones mosaico para *Zmpste24*, constituidos por una proporción similar de células deficientes en este enzima (que acumulan prelamina A) como de células que la expresan (las cuales contienen lamina A madura), no muestran fenotipo aparente, lo que sugiere que este tipo de progeria está gobernada por mecanismos sistémicos [10]. Teniendo presente todo lo anterior, el estudio de esta rara enfermedad

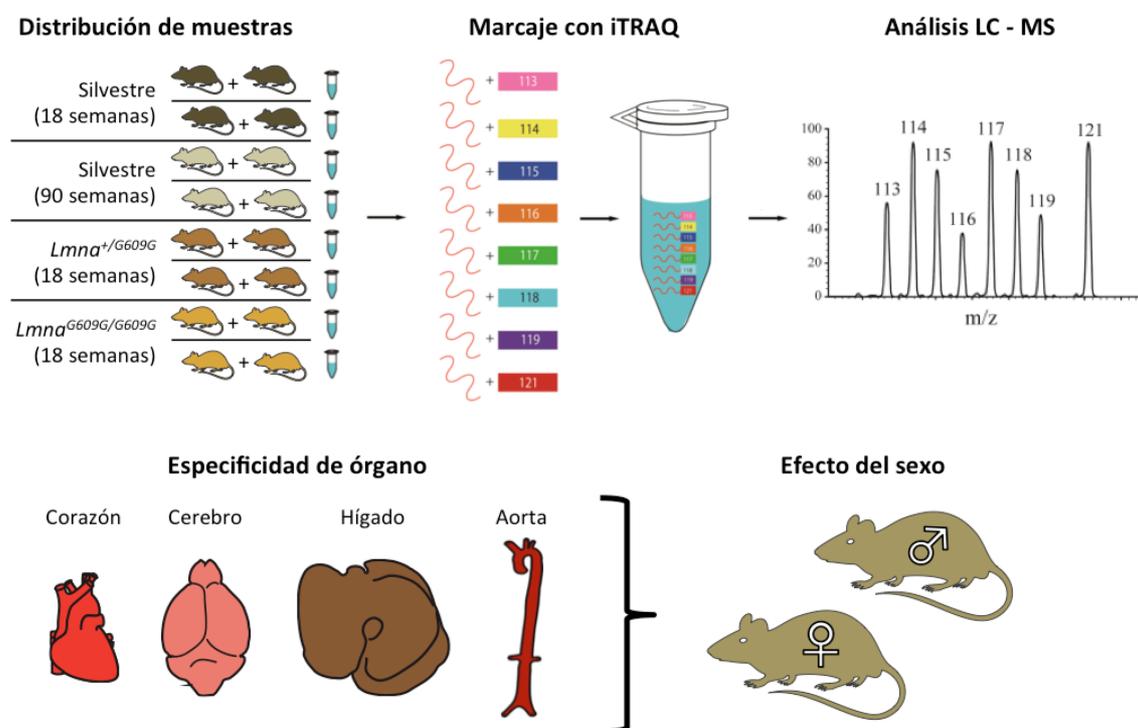
podría contribuir también a desentrañar nuevas claves del envejecimiento y de la ECV en la población general.

### 2.3. Objetivos del proyecto y plan de trabajo

Tanto en progeria como en envejecimiento fisiológico hay presencia de ECV, inestabilidad genómica, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo que sugiere la existencia de mecanismos comunes a ambos procesos. No obstante, solo el envejecimiento normal está asociado con cáncer, diabetes o enfermedades neurodegenerativas, lo cual indica que ambos procesos poseen una etiología sensiblemente diferente. Por ello, **nuestro objetivo general es identificar cambios en el proteoma específicos y comunes del envejecimiento prematuro y del normal.**

En colaboración con la Unidad de Proteómica del CNIC llevaremos a cabo análisis proteómicos profundos basados en GELSILOX (Marcaje de Cys oxidadas con isótopos estables basado en gel) [11] con diferentes órganos afectados sólo en envejecimiento normal (cerebro) y órganos afectados tanto en progeria como en envejecimiento normal (corazón, aorta). Como modelo de progeria utilizaremos el ratón *Lmna*<sup>G609G</sup>, que recapitula múltiples síntomas de progeria, incluyendo ECV y muerte prematura (a las 18-20 semanas) [8,13]. Se estudiará el proteoma de este ratón en comparación con el de ratones silvestres de 18 y 90 semanas (jóvenes y viejos) y el de ratones *Lmna*<sup>G609G</sup> heterocigotos de 18 semanas, atendiendo tanto a la abundancia relativa de proteínas como a su estado de oxidación. También se tendrán en cuenta posibles efectos del sexo. La cuantificación de las especies proteicas se llevará a cabo con gran sensibilidad y precisión mediante LC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) en combinación con la tecnología iTRAQ, un método de marcaje isotópico químico estable que posibilita la cuantificación relativa de hasta ocho muestras simultáneamente [14]. Los datos crudos cuantitativos serán sometidos a un riguroso análisis bioinformático, basado en modelos estadísticos desarrollados en el Laboratorio de Proteómica Cardiovascular del CNIC, a fin de revelar cambios no sólo en la abundancia relativa de proteínas y en su nivel de oxidación, sino también en las funciones celulares implicadas [15-17]. Para aumentar la fiabilidad de los resultados se realizarán cuatro réplicas tanto biológicas como técnicas (**Fig. 2**).

Posteriormente, validaremos los resultados en muestras de pacientes y llevaremos a cabo estudios funcionales para analizar las proteínas cuya abundancia o estado de oxidación varíe tanto en los modelos animales como en la patología humana y profundizar en los mecanismos moleculares que contribuyen al envejecimiento normal, la progeria y las enfermedades cardiovasculares.



**Figura 2: Diseño del experimento proteómico central.** En cada análisis se comparan simultáneamente ocho grupos, cada uno de los cuales comprende la combinación del proteoma de dos individuos pertenecientes a cada uno de los genotipos (o edades) de ratón más duplicados. Se llevarán a cabo múltiples réplicas técnicas y se repetirá el proceso para cada órgano que se desee estudiar y para cada sexo.

Puesto que se trata de un proyecto a gran escala y a largo plazo, el presente trabajo se centra en la puesta a punto del procedimiento para el estudio proteómico. Con este fin abordamos los siguientes objetivos concretos:

1. Optimizar la metodología de extracción de proteínas para la obtención de muestras adecuadas para el estudio que se pretende.
2. Optimizar el método de purificación y digestión de proteínas, de modo que se maximice la recuperación de péptidos.
3. Estimar la cantidad de tejido mínima para el estudio proteómico.
4. Determinar si es viable utilizar la tecnología GELSILOX mediante el análisis de la oxidación basal de las muestras.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Material

Los ratones empleados pertenecen a la cepa C57BL/6, unos con genotipo silvestre y otros con una inserción en heterocigosis u homocigosis en el gen *LMNA* en la posición G609G, que ya se encuentran disponibles y han sido proporcionados por el grupo del Dr. López-Otín. Estos animales se han alimentado *ad libitum* y se han mantenido siguiendo la normativa del Comité de Ética de Experimentación Animal del CNIC. Se utilizaron ratones de 18 semanas de cada genotipo y sexo, así como silvestres de 90 semanas. Los ratones fueron sacrificados mediante eutanasia por CO<sub>2</sub> y se les extirpó el corazón, el hígado, la aorta torácica y el cerebro. Estos órganos se lavaron consecutivamente en PBS, se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización. Las aortas se despojaron previamente de la capa de tejido adiposo que las recubre bajo una lupa binocular en el laboratorio.

#### 3.2. Extracción de proteínas

Los órganos y tejidos congelados se homogenizaron mecánicamente con ayuda de un mortero enfriado con nitrógeno líquido para evitar la descongelación de las muestras, que se pesaron previa y posteriormente al tratamiento con el propósito de comprobar que no se producían pérdidas de material. A continuación se tomaron *ca.* 100 mg de cada tejido y se hirvieron en un tampón de lisis (Tris pH 8,45, 50 mM, SDS 4%, EDTA 1 mM) que contenía IAM 50 mM (cuya función es alquilar las cisteínas reducidas para su posterior detección mediante MS) siguiendo la metodología GELSILOX [11]. A continuación las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 10 min y el sobrenadante se almacenó 4°C tras recogerlo cuidadosamente.

#### 3.3. Cuantificación de extractos proteicos

##### 3.3.1. Método RC DC

Se empleó el kit *RC DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)* para cuantificar los extractos proteicos obtenidos en el apartado anterior a partir de su absorbancia a 750 nm siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se interpoló de

una recta patrón obtenida con seroalbúmina bovina. Con el objetivo de realizar mediciones más precisas se midió cada muestra por triplicado a diferentes diluciones.

### **3.3.2. Método Direct Detect**

La concentración de proteínas de los extractos se midió en un espectrofotómetro *Direct Detect* (EMD Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener medidas más precisas se realizaron réplicas de diferentes diluciones para cada muestra. Este método también se utilizó para cuantificar péptidos tras la digestión.

## **3.4. Purificación y digestión de proteínas**

### **3.4.1. Método SDS-PAGE**

Se hirvieron las muestras en tampón de carga (Tris pH 8,8 0,1 M, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, DTT 10 mM) y se cargaron en un gel concentrador de poliacrilamida 4% con SDS y con 1,5 mm de grosor. La electroforesis se llevó a cabo a 45 V hasta la entrada de las proteínas en el gel concentrador, tras lo cual el gel se tiñó con azul de Coomassie y se lavó con metanol 50% ácido acético 5% para fijar las proteínas. El gel concentrador se recortó y troceó en fragmentos de *ca.* 1 mm<sup>3</sup>. Los fragmentos se deshidrataron con ACN y se sometieron a reducción con DTT 10 mM en BA 25 mM, pH 8,8. Tras una segunda deshidratación se realizó una incubación en oscuridad con MMTS 20 mM (a fin de alquilar las cisteínas originalmente oxidadas) disuelto en HEPES bajo campana extractora de gases. Los fragmentos se deshidrataron de nuevo con ACN, se incubaron con BA 50 mM, pH 8,8, se deshidrataron una vez más y se secaron completamente en una centrifuga de vacío. A continuación, las muestras se incubaron con tampón de digestión (BA 50 mM pH 8,8, ACN 10% y tripsina (*Promega*) 80 ng/μl) a 37°C en agitación horizontal durante toda la noche. Después de la digestión, se extrajeron los péptidos con BA 12 mM, pH 8,8. Alternativamente, se realizó una segunda extracción con TFA 0,1% y ACN 50%. Los extractos se traspasaron a tubos nuevos, se llevaron a sequedad en una centrifuga de vacío y se resuspendieron en TFA 0,1%.

### **3.4.2. Método FASP**

Se utilizó el kit *FASP Protein Digestion (Expedeon)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incorporando un paso de reducción a temperatura ambiente (DTT 50

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO

mM, HEPES 100 mM, EDTA 1 mM) seguido de uno de alquilación (MMTS 500 mM, HEPES 100 mM, EDTA 1 mM) inmediatamente después de cargar las muestras en el filtro.

### 3.5. Desalado de muestras

Se comprobó el pH de las muestras y se rebajó a 3 cuando fue necesario a fin de favorecer la retención de los péptidos en la fase estacionaria. A continuación, las muestras se desalaron en columnas *Oasis HLB C18 (Waters Corporation)* (o, para volúmenes reducidos de muestra, puntas *OMIX C18 de Agilent Technologies*) que habían sido previamente equilibradas con ACN 50%, ACN 100% y TFA 0,1%. El retenido se lavó con metanol 5% TFA 0,1% y se eluyó con TFA 0,1% ACN 50%. Los eluidos se llevaron a sequedad en una centrifuga de vacío.

### 3.6. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Las muestras desaladas se resuspendieron en tampón A (ácido fórmico 0,1%) en un baño con ultrasonidos y se centrifugaron a 13000 g durante 10 min. Una alícuota de 15µg de péptidos (cuantificados por *Direct Detect*) se depositó en una microplaca de 96 pocillos para su análisis automático en un nano-HPLC *Easy nLC 1000 (Thermo Scientific)* acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones lineal *Orbitrap Elite (Thermo Scientific)*. Los péptidos se separaron en una nanocolumna casera de fase inversa C18 (100 µm de diámetro interno, 44 cm de longitud) aplicando un gradiente continuo de 8-31% de tampón B (ACN 90%, ácido fórmico 0,1%) durante 130 min seguido de otro de 31-90% de tampón B durante 2 min con un flujo de 300 nl/min. La ionización de los péptidos se realizó a 4,5 kV en una aguja de electronebulización (*New Objective*). El análisis de masas se llevó a cabo en ciclos repetitivos de barrido completo de masa seguido de la fragmentación inducida de los 20 iones más intensos con una exclusión dinámica de 45s.

### 3.7. Análisis bioinformático

Los péptidos se identificaron a partir de sus espectros de fragmentación utilizando el motor de búsqueda en bases de datos *Sequest* a través del programa *Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific)*. Los resultados se analizaron por el método *Probability Ratio* [16], que calcula la FDR de identificación por comparación con los

resultados obtenidos en la búsqueda en una base de datos señuelo en la que las secuencias de los péptidos trípticos han sido invertidas [17]. Se seleccionaron los espectros con  $FDR < 0,01$ , se determinó a cuántos péptidos únicos y proteínas correspondían y se estudió su abundancia relativa y estado de oxidación (en distintos tejidos y condiciones) empleando las pruebas estadísticas necesarias cuando fuera pertinente (*Microsoft Office Excel, IBM SPSS Statistics*).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Análisis del rendimiento de extracción de proteínas

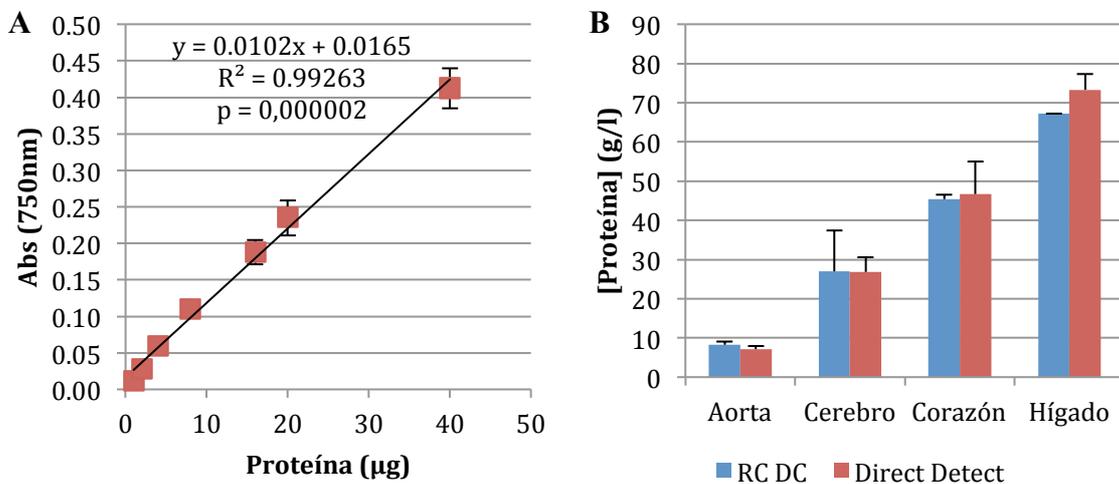
En un experimento de proteómica a gran escala es fundamental cerciorarse de que se posee el material de partida necesario para poder identificar y cuantificar un número suficiente de péptidos con un nivel alto de confianza. Puesto que se desea comparar muestras en múltiples condiciones (ratones con diferentes genotipos, edades y sexos), también es esencial asegurarse de que los análisis comparativos se realicen con cantidades de proteínas equivalentes. La cantidad de proteínas que se puede extraer de cada órgano puede ser diferente dependiendo de su composición, que determina no sólo el contenido proteico sino también la presencia de otros componentes (lípidos, matriz extracelular, etc.) susceptibles de interferir en el procesamiento de las muestras.

En el presente trabajo, se extirpó la aorta, el cerebro, el corazón y el hígado de ratones silvestres y el material se congeló con nitrógeno líquido. Se tomaron muestras de 100 mg de cada órgano (en el caso del tejido de aorta fueron necesarios cinco individuos). Después de la extracción con tampón de lisis, se midió la concentración de proteínas por dos métodos distintos: *RC DC* y *Direct Detect*. El primero es un ensayo colorimétrico que permite cuantificar proteínas en presencia de detergentes y agentes reductores. Está basado en el método de Lowry, el cual combina el test de Biuret (reacción de iones de cobre con los enlaces peptídicos por el reactivo de Folin) con la oxidación de residuos aromáticos para determinar la concentración de proteínas en función de la intensidad de color de la disolución al medirse la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro [18]. El método *Direct Detect* mide la absorción de luz infrarroja de los enlaces amida presentes en la muestra sin necesidad de realizar ningún tipo de reacción previa y empleando tan solo 2 µl de cada muestra.

Debido a su alto contenido proteico, fue necesario diluir dos veces el extracto de cerebro y tres veces los de corazón e hígado. El método *RC DC* requirió la obtención de una recta patrón (**Fig. 3A**), mientras que *Direct Detect* tiene la ventaja de que permite emplear con gran fiabilidad la recta patrón creada para experimentos previos (siempre y cuando haya sido obtenida en el mismo tampón que en el que se encuentran las muestras a cuantificar), lo cual agiliza sensiblemente el proceso.

Asumiendo que se cumplen las hipótesis previas de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad, se realizó un ANOVA bifactorial para comprobar si existían diferencias de concentración de proteínas entre los tejidos o entre los métodos. El resultado fue que no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos, pero sí entre cada tejido (**Fig. 3B**). De esto se deriva que las muestras están cuantificadas con gran exactitud y que *RC DC* y *Direct Detect* parecen ofrecer unos resultados comparables.

Puede explicarse que la cantidad de proteínas extraída de cada órgano (partiendo de una masa equivalente para todos) sea diferente porque cada uno posee un contenido proteico distinto. *A priori* no podría determinarse si además influye el método de procesamiento de las muestras, pues algunos componentes celulares o extracelulares podrían interferir con la acción del tampón de lisis durante la extracción de proteínas. Para comprobar esto podría realizarse una extracción por homogenización mecánica o con el reactivo TRIzol; pero el presente método parece ser el que mejor preserva el estado de oxidación de las muestras, lo cual es fundamental para poder realizar un estudio proteómico utilizando la tecnología GELSILOX [11].



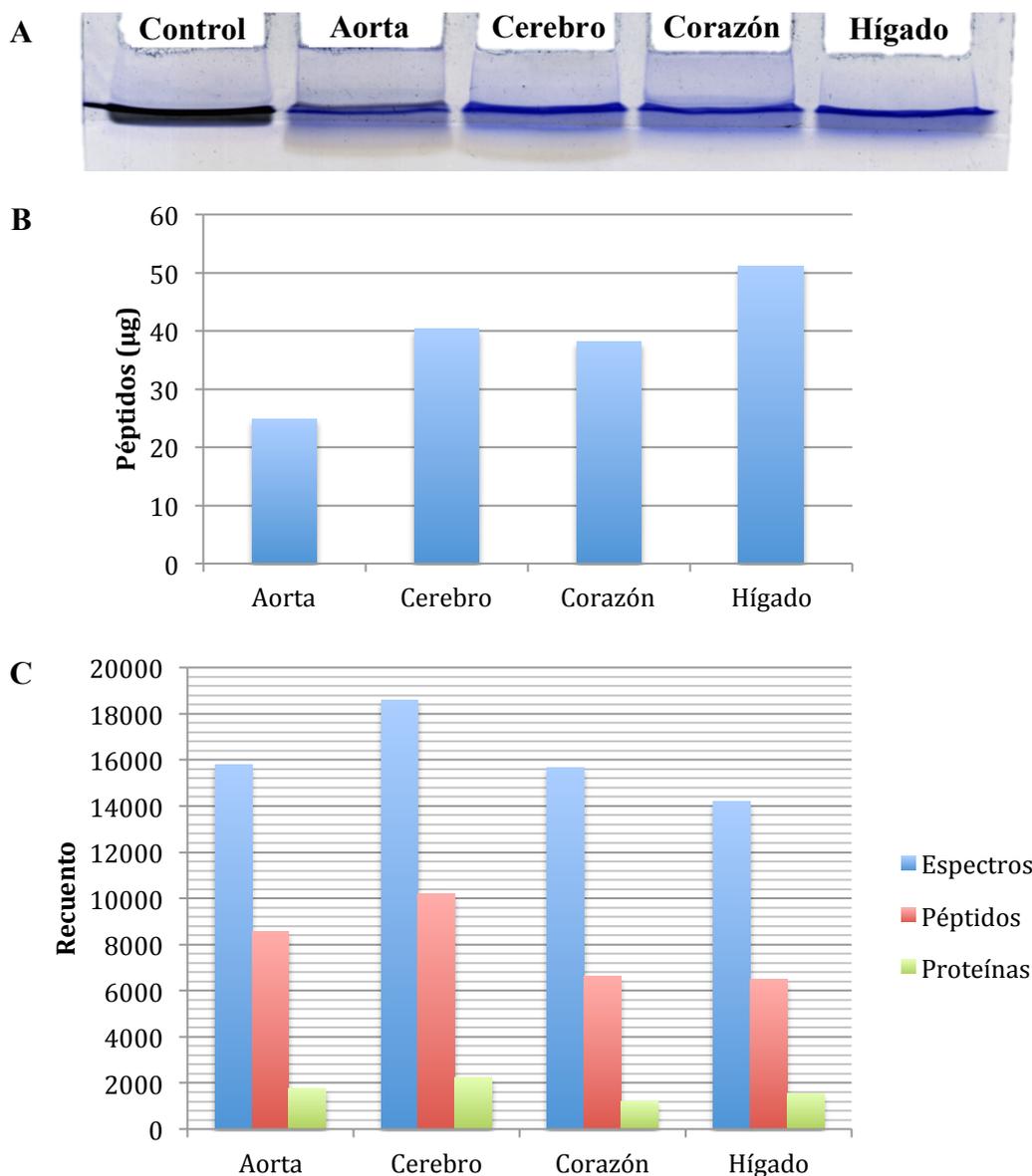
**Figura 3: Cuantificación de extractos proteicos.** A) Recta patrón del método *RC DC*, con un coeficiente de determinación superior a 0,99 y con una pendiente significativamente distinta de 0. B) Comparación entre los métodos *RC DC* y *Direct Detect*. Se representan valores medios y desviaciones estándar de 3 réplicas técnicas para *RC DC* y 6 para *Direct Detect*. Mediante ANOVA bifactorial se encontraron diferencias significativas entre los tejidos ( $p < 0,001$ ), pero no entre cada método.

### 4.2. Optimización del método de preparación de muestra para LC-MS

Uno de los puntos clave en el procesamiento de las muestras para los estudios proteómicos es la purificación y digestión de proteínas. Por un lado, la introducción de contaminantes en los sistemas LC-MS dificulta enormemente la obtención de resultados de calidad; por otro, si los péptidos no están bien digeridos no podrán ser identificados ni cuantificados correctamente. Además, el proceso de digestión de proteínas adolece del inconveniente de que a lo largo del mismo se pierde una gran parte del material, por lo que es importante buscar el método que ofrezca el mayor rendimiento posible.

Se tomaron 200  $\mu\text{g}$  de las muestras extraídas en la sección 4.1 y se les aplicó un procedimiento de purificación optimizado en la Unidad de Proteómica que está basado en la purificación de proteínas por medio de SDS-PAGE en gel concentrador (**Fig. 4A**) y el posterior lavado del gel con ACN y BA [19]. Después, se digirieron las proteínas con tripsina y se recuperaron los péptidos con BA. Tras desalar las muestras con columnas *Oasis* (para no introducir sustancias contaminantes en el sistema LC-MS) se llevó a cabo una cuantificación por *Direct Detect*. Se observa que por este método se obtiene un rendimiento medio del 20% en la cantidad de péptidos recuperados respecto de la cantidad de proteína digerida, siendo algo menor en aorta y mayor en hígado (**Fig. 4B**).

Los péptidos (15  $\mu\text{g}$ ) se analizaron mediante LC-MS (Sección 3.6) y, tras el análisis bioinformático con *Proteome Discoverer* y *Probability Ratio*, se realizó un recuento de espectros (número total de identificaciones), de péptidos únicos (número de péptidos excluyendo los redundantes) y de proteínas (**Fig. 4C**). Se observa que se identifican como promedio 2 espectros por cada péptido y 10 (5 péptidos únicos) por cada proteína. El resultado es comparable entre los distintos órganos, lo cual corrobora las cuantificaciones de péptidos obtenidas por *Direct Detect*.

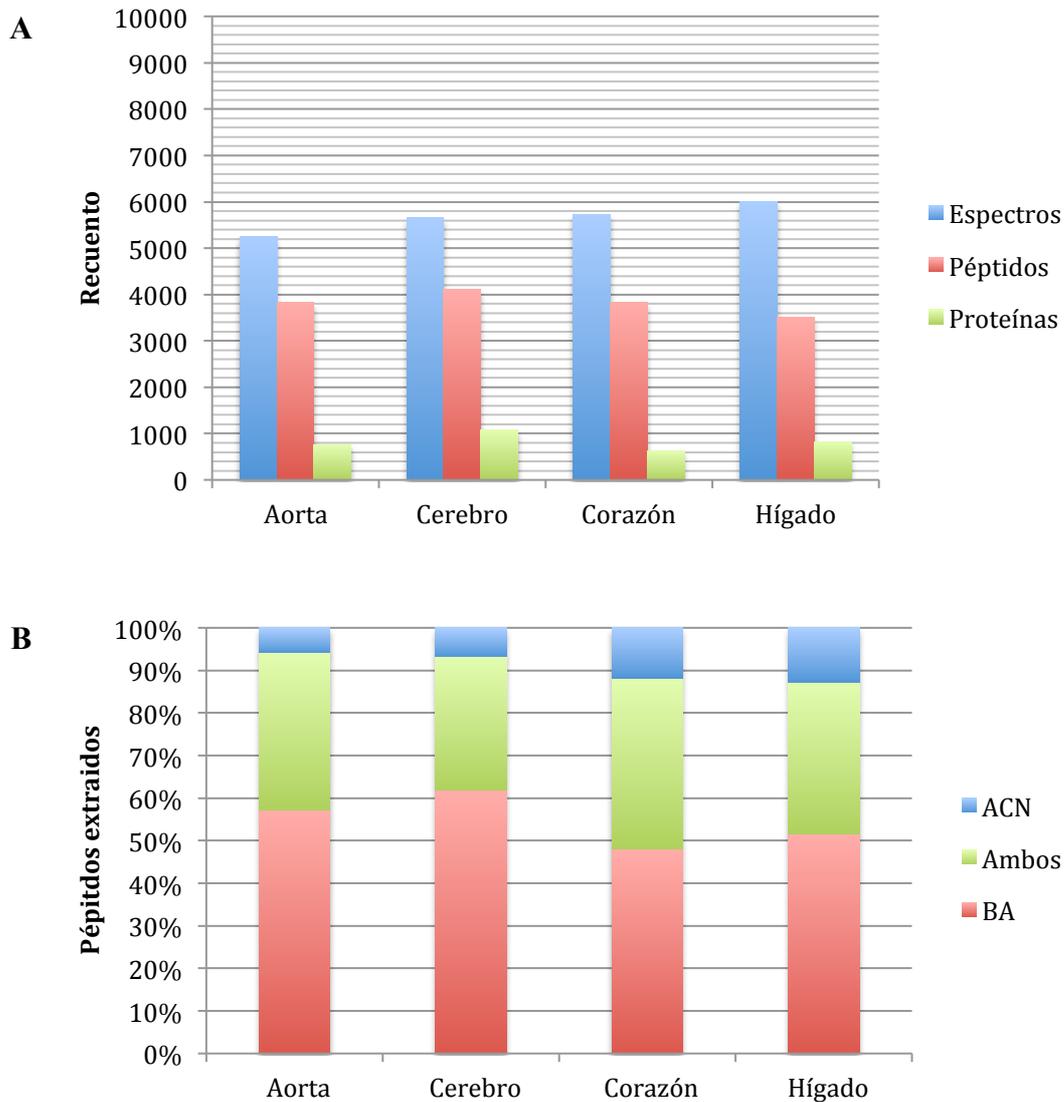


**Figura 4: Método SDS-PAGE.** A) Gel concentrador de electroforesis. El control de carga contiene seroalbúmina bovina. B) Cuantificación de los péptidos recuperados tras la digestión. El rendimiento medio es del 20%. C) Recuento de espectros obtenidos, así como de péptidos únicos y proteínas identificadas en cada órgano.

Con el objetivo de aumentar el rendimiento de la recuperación de péptidos, se tomaron los fragmentos de gel remanentes del experimento anterior y se realizó una segunda extracción con ACN y un desalado con puntas *OMIX* (apto para volúmenes más reducidos de muestra). Este paso adicional, aunque permite aumentar el número de péptidos identificados, puede introducir compuestos contaminantes susceptibles de influir muy negativamente en la calidad de los datos de LC-MS. En este caso, la cuantificación de proteínas mediante *Direct Detect* no fue posible debido a que las concentraciones no superaban el límite de detección del método; no obstante, el análisis

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO

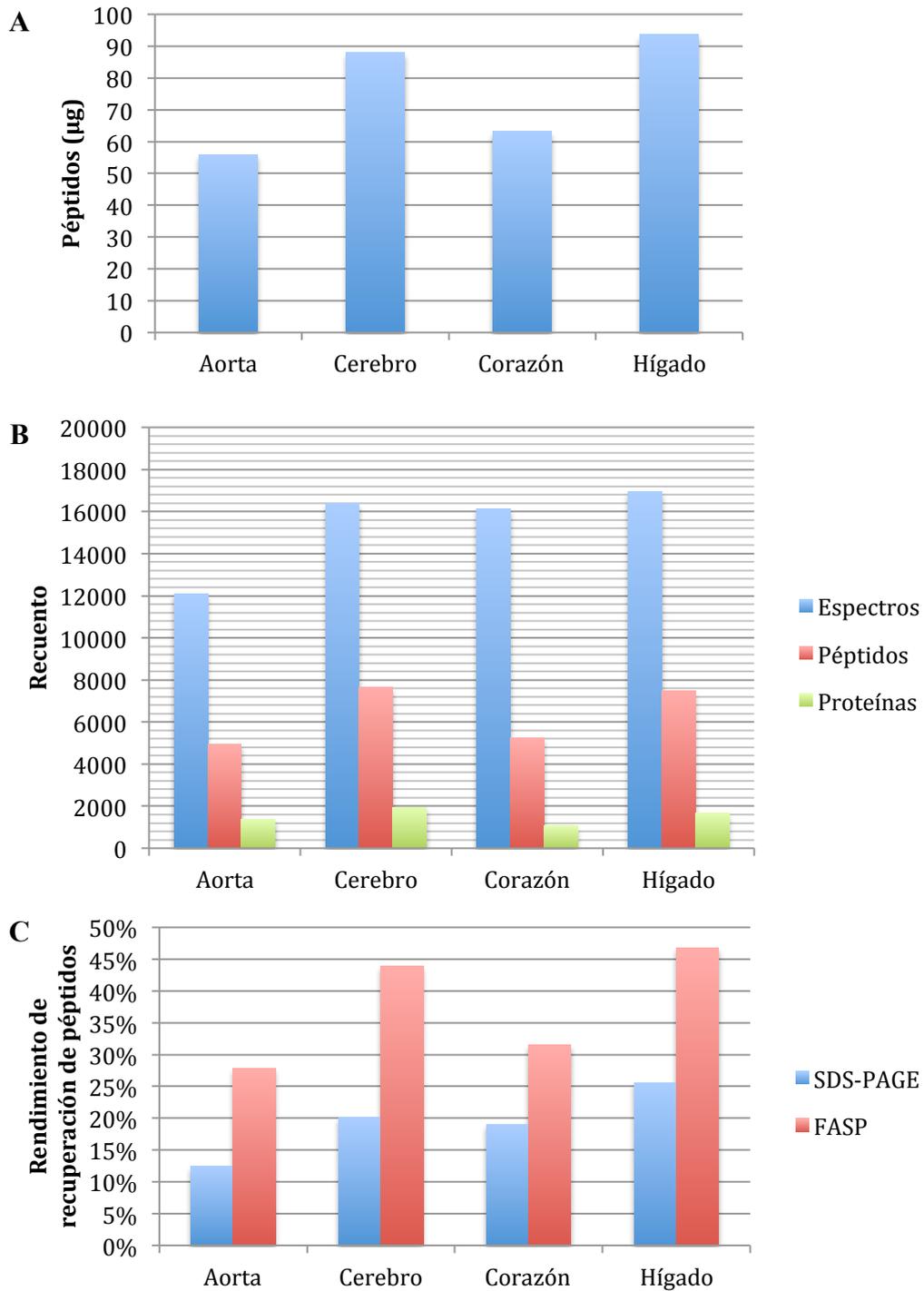
mediante LC-MS (gradiente de 30 min) reveló niveles altos de material (**Fig. 5A**). El siguiente paso fue llevar a cabo un análisis comparativo para determinar la especificidad de cada método de extracción (**Fig. 5B**). Se comprobó que los péptidos únicos extraídos específicamente con ACN no suponen más de un 15% del total, de modo que no parece compensar identificarlos a costa de introducir impurezas en el sistema LC-MS.



**Figura 5: Método SDS-PAGE (extracción con ACN).** A) Recuento de espectros, péptidos únicos y proteínas de cada órgano. B) Comparativa entre péptidos únicos comunes o específicos a cada método de extracción. Los identificados exclusivamente con ACN son menos de un 15% del total.

A continuación, se llevó a cabo un tercer experimento a fin de mejorar el rendimiento en la recuperación de péptidos tras la purificación-digestión. En este caso se optó por el sistema *FASP*, sensiblemente más rápido y sencillo que el basado en gel, ya que consiste esencialmente en una purificación en filtro ayudada por centrifugación seguida de la digestión en el propio filtro. Se trató de reproducir al máximo las mismas condiciones que en el experimento del gel: se partió de la misma cantidad de proteína (200µg), se digirió con las mismas concentraciones de tripsina y con tiempos de incubación equivalentes, se desaló con columnas *Oasis* y se cuantificó el extracto resultante con *Direct Detect* (**Fig. 6A**). En esta ocasión las concentraciones obtenidas fueron cerca del doble de las de los extractos obtenidos tras la digestión en gel concentrador, lo cual sugiere que el método *FASP* es más efectivo. Los digeridos (15 µg) se analizaron mediante LC-MS (gradiente de 130 min) y, tras el análisis bioinformático, se comprobó que los recuentos de espectros, péptidos únicos y proteínas y sus proporciones relativas (**Fig. 6B**) presentan un perfil similar al obtenido siguiendo el protocolo basado en gel. Los datos subrayan de nuevo la precisión que muestra *Direct Detect* en la cuantificación de péptidos. En vista de estos resultados se realizó una comparación del rendimiento de recuperación de péptidos de los métodos SDS-PAGE y *FASP*, que puso de manifiesto que el segundo es considerablemente más efectivo (**Fig. 6C**).

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO



**Figura 6: Método FASP.** A) Cuantificación de péptidos recuperados tras la digestión. El rendimiento medio es del 38%. B) Recuento de espectros, péptidos únicos y proteínas de cada órgano. C) Comparativa del rendimiento de cada método de purificación-digestión de acuerdo a las cuantificaciones de péptidos, la cual pone de manifiesto que el rendimiento del método FASP es prácticamente el doble.

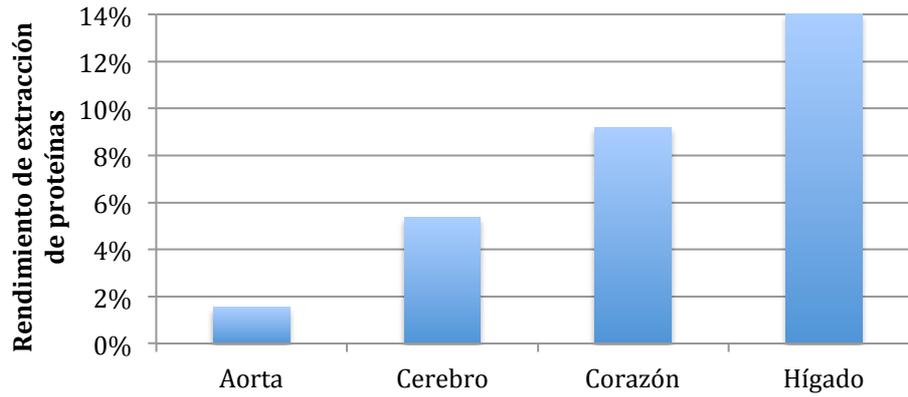
### 4.3. Estimación de la cantidad de tejido mínima para el estudio

Los ratones progénicos presentan problemas de crecimiento y sus órganos internos son de un tamaño sensiblemente menor a los de ratones silvestres de la misma edad [13]. Por otra parte, algunos órganos como la aorta son considerablemente más pequeños que otros como el hígado o el cerebro. Esto supone que el material de partida podría ser limitado para el exhaustivo estudio proteómico que se plantea, de modo que se hace necesario determinar si es suficiente o si sería necesario modificar el diseño del experimento incluyendo un número mayor de animales para la obtención de tejidos.

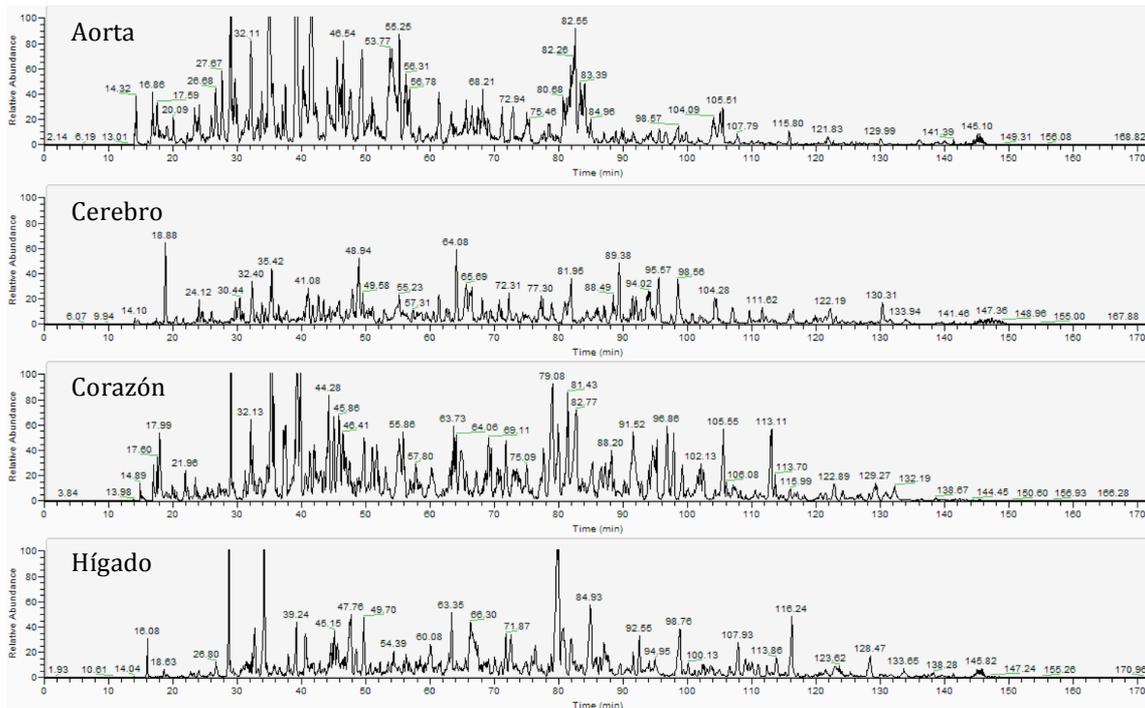
A partir de las cuantificaciones mostradas en la sección 4.1, se puede calcular el porcentaje de masa de proteínas que se puede extraer de cada órgano (**Fig. 7A**). Teniendo en cuenta este resultado, el peso de cada órgano y el porcentaje de péptidos que se recuperan tras la digestión por el método *FASP* (**Fig. 6A**), se puede hacer una estimación orientativa de la cantidad de péptidos que se podrían obtener como máximo a partir de cada órgano (**Fig. 7B**). En los experimentos presentados en el apartado anterior, en los que se analizaron mediante LC-MS 15 µg de muestra en gradientes de 130 min, se identificaron *ca.* 6000 péptidos únicos de media (**Fig. 6C, 7C**), por lo que debería haber material suficiente para varias carreras independientemente del tipo, edad y sexo de ratón, especialmente si se considera que cada muestra estará compuesta por el extracto proteico combinado de dos individuos. El único órgano que podría presentar limitaciones es la aorta, pues incluso combinando las de 5 animales, se recupera una cantidad considerablemente menor de péptidos en relación a los otros órganos analizados.

Nuestro objetivo en este abordaje proteómico profundo es la obtención de datos fiables de cuantificación de varios miles de péptidos en cada muestra analizada mediante LC-MS. Si se carga una cantidad mayor de muestra para alcanzar este objetivo hay que tener la precaución de no superar el umbral de retención de la columna cromatográfica y de no saturar la señal porque se sobrepase el límite de detección del MS. Una opción interesante para estudiar muestras concentradas es fraccionarlas por cromatografía de intercambio iónico y después analizar cada fracción en carreras independientes. Por otro lado, una alternativa que podría suplir el inconveniente de poseer una cantidad limitada de aorta es optimizar la duración de los gradientes cromatográficos.

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO



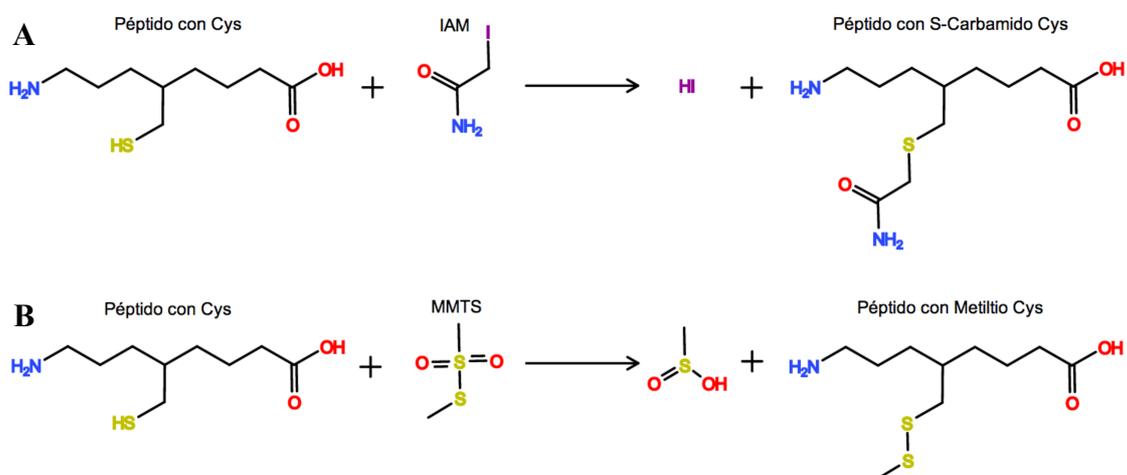
	Aorta	Cerebro	Corazón	Hígado
Material de partida (mg)	100	580	215	1355
Rendimiento de extracción (%)	1,5	5,4	9,2	14
Rendimiento de digestión (%)	27,9	44	31,6	46,8
Máx. péptidos recuperables (mg)	0,43	13,7	6,2	89,2



**Figura 7: Rendimiento global del procesamiento de muestras.** A) Proporción de masa de proteínas que se extraen en cada órgano en relación a 100 µg de material de partida. Téngase en cuenta que para alcanzar esta cantidad de material de partida ha sido preciso combinar las aortas torácicas de 5 ratones. B) Estimación de la máxima cantidad de péptidos recuperables tras la extracción, purificación y digestión de proteínas a partir de un órgano completo de un ratón de 9 semanas con un peso medio de 20 g. Nótese que se presenta el resultado de combinar las aortas torácicas de 5 individuos. C) Perfil cromatográfico de cada órgano en el que se representa la abundancia relativa de péptidos en el transcurso de la carrera.

#### 4.4. Estudio de la oxidación basal de las muestras

En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se comportan como segundos mensajeros necesarios en procesos fisiológicos, pero tienden a acumularse excesivamente en patologías como las enfermedades cardiovasculares o durante el envejecimiento, reaccionando con diferentes componentes celulares (*e.g.* DNA, lípidos y proteínas) y provocando una serie de defectos con consecuencias negativas para la célula y el individuo. Así pues, en el presente proyecto, además de investigar los cambios en abundancia relativa de proteínas en envejecimiento prematuro y fisiológico, también analizaremos las alteraciones en el estado de oxidación de las mismas. Para ello emplearemos la metodología GELSILOX, desarrollada en el laboratorio de Proteómica Cardiovascular del CNIC [11]. Este nuevo método proteómico analiza las alteraciones dinámicas en el estado de oxidación de los residuos de cisteína de las proteínas, las cuales si están reducidas, son marcadas con IAM y si están oxidadas, con MMTS (previa reducción), lo que conlleva un incremento de masa de 57,02 Da o de 45,99 Da respectivamente en los péptidos cisteínicos (**Fig. 8**).



**Figura 8: Reacción de marcaje de péptidos cisteínicos.** A) Oxidación irreversible con IAM para péptidos inicialmente reducidos. B) Oxidación con MMTS para péptidos inicialmente oxidados y que han sido reducidos antes del marcaje.

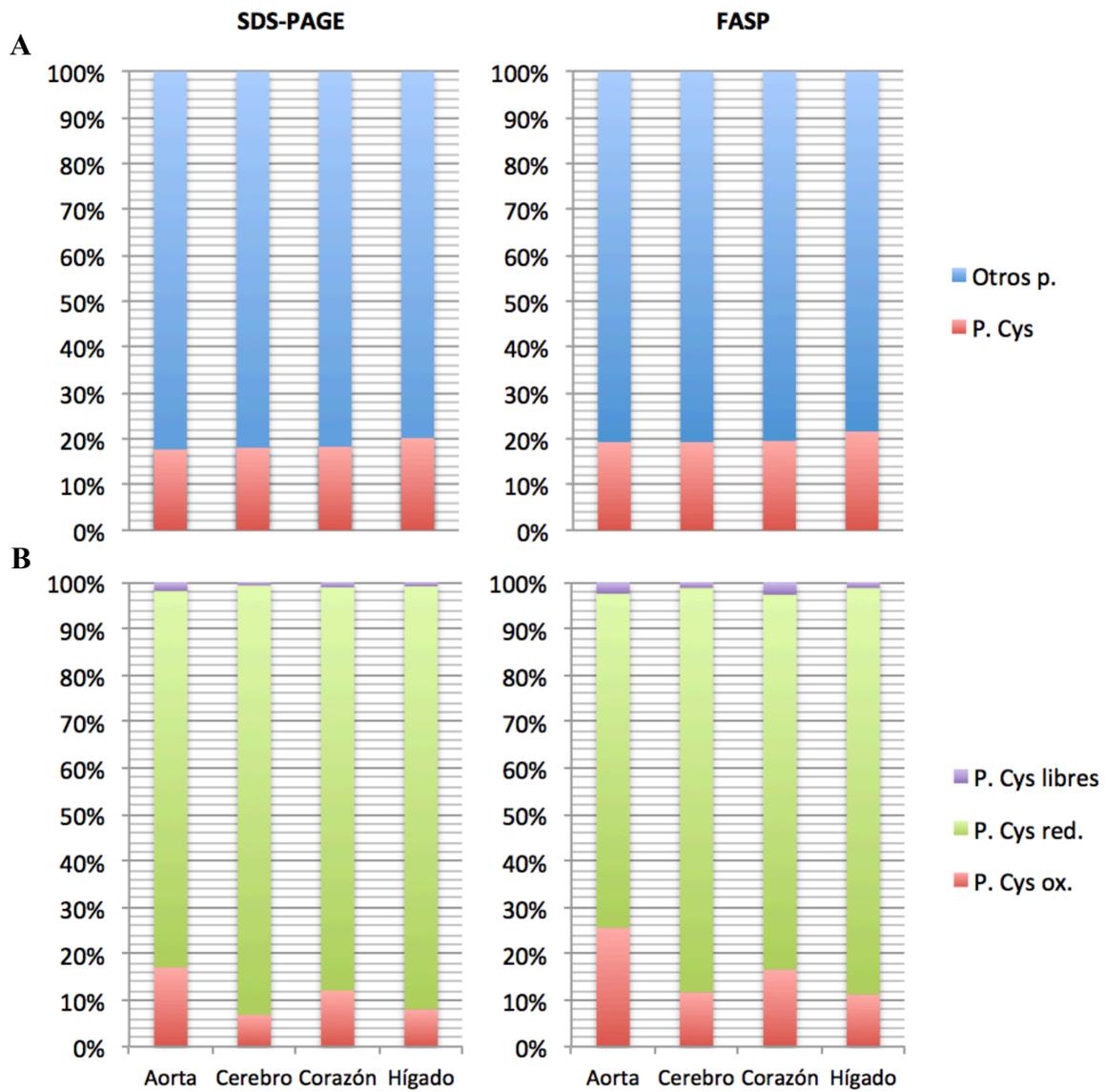
Para que estas variaciones sean cuantificables de manera estadísticamente significativa es indispensable que las muestras tengan una oxidación basal mínima, por lo que es importante tratar de conservar intacto el estado de oxidación de las proteínas desde que se sacrifica el animal hasta que se marcan las cisteínas reducidas con IAM, evitando aumentos de temperatura y ambientes oxidantes. De este modo, para este estudio se utilizaron las muestras empleadas en las secciones 4.1 y 4.2, que habían sido congeladas

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO

a  $-80^{\circ}\text{C}$ , homogeneizadas con mortero y marcadas con IAM en el tampón de lisis durante la extracción de proteínas. Las que se purificaron por el método SDS-PAGE habían sido marcadas con MMTS durante los lavados con ACN y BA tras la electroforesis y antes de la digestión con tripsina, previa reducción de las cisteínas con DTT. Aquéllas que se purificaron siguiendo el protocolo de *FASP* también habían sido reducidas y marcadas inmediatamente después de cargar las muestras sobre el filtro equilibrado.

Después del análisis mediante LC-MS y de que los resultados fueran procesados por *Protein Discoverer* y *Probability Ratio*, se calculó que el 18-21% de los péptidos únicos en cada muestra contienen cisteínas en su secuencia (**Fig. 9A**), lo cual se corresponde con lo esperable [11]. A continuación, se estudió cuántos de esos péptidos estaban oxidados (marcados con MMTS), cuántos estaban reducidos (marcados con IAM) y cuántos habían quedado sin marcar (**Fig. 9B**). Estos últimos representan menos de un 5% del total, por lo que puede concluirse que el método de marcaje de cisteínas resultó efectivo.

Se ha comprobado que para GELSILOX, la oxidación basal en corazón debería ser de un 12% [11], lo que sugiere que las proteínas han conservado su estado de oxidación durante la extracción. En hígado y cerebro, el porcentaje de péptidos oxidados parece algo más bajo que en corazón, lo cual facilitaría la observación de cambios redox al comparar muestras de envejecimiento prematuro y fisiológico. No obstante las muestras de aorta presentan una oxidación basal de más de un 15% (17% en el experimento de SDS-PAGE y 25% en el de *FASP*), pues estos órganos requieren un tratamiento algo diferente al resto: tras la extirpación en el animalario se transportan en PBS al laboratorio, donde bajo una lupa binocular son despojados de la capa de tejido adiposo que los recubre antes de ser congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los resultados sugieren que resulta crítico llevar a cabo esta tarea en el menor tiempo posible para evitar que las proteínas de la aorta se oxiden artefactualmente durante el procesamiento previo a su extracción.



**Figura 9: Oxidación basal de las muestras.** A) Porcentaje de péptidos cisteínicos. Se mantiene en torno al 20% en los cuatro tejidos independientemente del método de purificación-digestión que se emplee. B) Porcentaje de péptidos cisteínicos oxidados, reducidos y libres. Los libres representan menos del 5%, demostrando que el procedimiento de marcaje ha funcionado; los oxidados oscilan entre el 8 y el 25%, siendo más altos en aorta.

## 5. Conclusiones y perspectivas

1. La extracción de proteínas siguiendo el protocolo indicado ofrece un buen rendimiento para los órganos analizados y mantiene su oxidación basal al mínimo, por lo que es viable llevar a cabo un estudio de proteómica con la tecnología GELSILOX. No obstante, conviene reducir el tiempo de procesamiento de las aortas previo a la alquilación de cisteínas reducidas a fin de preservar más fielmente el estado fisiológico de oxidación.
2. *Direct Detect* es un método de cuantificación que resulta idóneo para cuantificar tanto proteínas extraídas de diferentes órganos como péptidos recuperados tras una digestión con tripsina pues, aparte de ser rápido y de precisar un gasto insignificante de muestra, presenta una gran precisión que se demuestra al validar los resultados con *RC DC* o con el recuento de los espectros obtenidos por LC-MS.
3. El sistema de filtros *FASP* para la purificación y digestión de proteínas ofrece un rendimiento considerablemente superior al método basado en separación mediante SDS-PAGE. Si se opta por el segundo, no es recomendable realizar una segunda extracción con ACN, ya que podría introducir contaminantes interferentes y en esencia sólo aporta un incremento en la redundancia de los péptidos.
4. No parece necesario modificar el diseño experimental propuesto para incrementar el material de partida, si bien las aortas de ratones progéricos podrían suponer una limitación. Este inconveniente podría paliarse en alguna medida optimizando la duración de los gradientes cromatográficos, lo cual también favorecerá la posterior identificación y cuantificación de péptidos.

El presente trabajo sienta las bases de un proyecto a gran escala que contribuirá a mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares que provocan ECV (la principal causa de muerte en países desarrollados) en envejecimiento normal y prematuro, un requisito para el desarrollo de nuevas terapias y medidas preventivas encaminadas a lograr un envejecimiento más saludable.

## 6. Bibliografía

1. Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):967-1008.
2. Andrés V, González JM. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol*. 2009 Dec 28;187(7):945-57.
3. Trigueros-Motos L, Gonzalez JM, Rivera J, Andres V. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jun 1;3:1285-97.
4. Pereira S, Bourgeois P, Navarro C, Esteves-Vieira V, Cau P, De Sandre-Giovannoli A, Lévy N. HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech Ageing Dev*. 2008 Jul-Aug;129(7-8):449-59.
5. Gordon LB, Rothman FG, López-Otín C, Misteli T. Progeria: a paradigm for translational medicine. *Cell*. 2014 Jan 30;156(3):400-7.
6. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suárez MF, Cau P, Cadiñanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Lévy N, Freije JM, López-Otín C. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med*. 2008 Jul;14(7):767-72.
7. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217.
8. Villa-Bellosta R, Rivera-Torres J, Osorio FG, Acín-Pérez R, Enriquez JA, López-Otín C, Andrés V. Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation*. 2013 Jun 18;127(24):2442-51.
9. Rivera-Torres J, Acín-Pérez R, Cabezas-Sánchez P, Osorio FG, Gonzalez-Gómez C, Megias D, Cámara C, López-Otín C, Enriquez JA, Luque-García JL, Andrés V. Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford progeria syndrome through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *J Proteomics*. 2013 Oct 8;91:466-77.
10. de la Rosa J, Freije JM, Cabanillas R, Osorio FG, Fraga MF, Fernández-García MS, Rad R, Fanjul V, Ugalde AP, Liang Q, Prosser HM, Bradley A, Cadiñanos J, López-Otín C. Prelamin A causes progeria through cell-extrinsic mechanisms and prevents cancer invasion. *Nat Commun*. 2013;4:2268.
11. Martínez-Acedo P, Núñez E, Gómez FJ, Moreno M, Ramos E, Izquierdo-Álvarez A, Miró-Casas E, Mesa R, Rodríguez P, Martínez-Ruiz A, Dorado DG, Lamas S, Vázquez J. A novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Sep;11(9):800-13.

## APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO

12. Varela I, Cadiñanos J, Pendás AM, Gutiérrez-Fernández A, Folgueras AR, Sánchez LM, Zhou Z, Rodríguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, López-Otín C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*. 2005 Sep 22;437(7058):564-8.
13. Osorio FG, Navarro CL, Cadiñanos J, López-Mejía IC, Quirós PM, Bartoli C, Rivera J, Tazi J, Guzmán G, Varela I, Depetris D, de Carlos F, Cobo J, Andrés V, De Sandre-Giovannoli A, Freije JM, Lévy N, López-Otín C. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med*. 2011 Oct 26;3(106):106ra107.
14. Griffin TJ, Xie H, Bandhakavi S, Popko J, Mohan A, Carlis JV, Higgins L. iTRAQ reagent-based quantitative proteomic analysis on a linear ion trap mass spectrometer. *J Proteome Res*. 2007 Nov;6(11):4200-9.
15. Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Núñez E, Martínez-Acedo P, Pérez-Hernández D, Jorge I, Mesa R, Calvo E, Carrascal M, Hernáez ML, García F, Bárcena JA, Ashman K, Abian J, Gil C, Redondo JM, Vázquez J. General Statistical Framework for Quantitative Proteomics by Stable Isotope Labeling. *J Proteome Res*. 2014 Feb 10.
16. Martínez-Bartolomé S, Navarro P, Martín-Maroto F, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Villar M, García-Ruiz JP, Vázquez J. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Jun;7(6):1135-45.
17. Navarro P, Vázquez J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J Proteome Res*. 2009 Apr;8(4):1792-6.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
19. Bonzon-Kulichenko E, Pérez-Hernández D, Núñez E, Martínez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, Ramos Mdel C, Sierra S, Martínez-Martínez S, Ruiz-Meana M, Miró-Casas E, García-Dorado D, Redondo JM, Burgos JS, Vázquez J. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by <sup>18</sup>O labeling. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jan;10(1):M110.003335.