



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

Centro de Biología Molecular “SEVERO OCHOA”

# DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS EN PROTEÓMICA DE SEGUNDA GENERACIÓN Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE CAMBIOS DINÁMICOS RELACIONADOS CON LA DISFUNCIÓN CARDIOVASCULAR

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias por

**Horacio Serrano Rivera**

Director de tesis

Dr. Jesús Vázquez Cobos

Co-directores

Dra. Inmaculada Jorge Cerrudo

Dra. Elena Bonzón-Kulichenko

Madrid, 2008

## INFORME DE LOS DIRECTORES

El trabajo presentado por el licenciado Horacio Serrano Rivera es un estudio del comportamiento del proteoma mitocondrial de cardiomiocitos de rata en un modelo de preconditionamiento isquémico. Este es un tema de muy alto interés biomédico, debido a la conocida prevalencia de las enfermedades cardiovasculares relacionadas con procesos de isquemia. El preconditionamiento isquémico es un proceso por el cual el miocardio se protege y resiste mejor procesos posteriores de isquemia, pero que tiene un mecanismo molecular todavía no determinado. El esclarecimiento del mecanismo molecular de este proceso constituye un reto de altísimo interés científico y biomédico, porque podría servir para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas que ayudarían a paliar el enorme impacto que esta patología tiene en la sociedad actual.

En este trabajo se presentan una serie de desarrollos tecnológicos bastante novedosos que han abierto el camino no sólo al estudio pormenorizado y altamente específico de proteínas individuales en mezclas complejas, sino también al estudio masivo de proteomas y subproteomas de forma robusta, reproducible y desatendida. Durante este trabajo se han esclarecido, además, cuestiones científicas de mucho interés en este tema, como la distribución de la conexina 43 entre la membrana plasmática y la mitocondrial, que ayudan a entender la implicación de esta proteína en este proceso. Por otra parte, en este trabajo se ha llevado a cabo el estudio proteómico más completo efectuado hasta la fecha en este modelo que ha permitido determinar qué proteínas cambian de expresión en respuesta al preconditionamiento isquémico. Consideradas conjuntamente, estos cambios permiten adelantar una interesante hipótesis de trabajo sobre el posible mecanismo molecular de este proceso.

Por todas estas razones consideramos que este trabajo reúne todos los requisitos para ser defendido por el candidato con vistas a la obtención de su título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid en Biología Molecular.

Los directores de la tesis

Jesús Vázquez

Inmaculada Jorge

Elena Bonzón

## AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que durante este proceso de formación doctoral me han dado su respaldo y apoyo. Todos de una forma particular a nivel personal y profesional han permitido que esta jornada culminara con la lectura y obtención de este grado académico. Intentaré dejar de manifiesto mi más sincero agradecimiento con este escrito que recopila en gran medida sus intervenciones, tratando de no olvidar a nadie.

Ante todo las gracias al Dr. Jesús Vázquez Cobos, Director de Tesis, por la confianza y la responsabilidad delegada. Pero más que nada, por la ayuda en el proceso de formación y por lo que aquí, a grandes rasgos podemos apreciar y dar fe en cuanto a mi evolución como investigador científico en el campo de la Proteómica de segunda generación. Jesús, por tu mano amiga y por las guías que en momentos oportunos permitieron el logro de este objetivo.

A la Dra. Inma Jorge, Co-directora de esta Tesis. Inma, por muchas razones... y por dar paso al desarrollo de lo que en el futuro será una colaboradora científica de excelencia, pero más que nada, por los nexos de gran amistad que fomentas entre nosotros.

A la Dra. Elena Bonzón-Kulichenko, Co-directora de esta Tesis. Elena, agradezco tus muchas horas de apoyo a este trabajo, tus pertinentes y muy prudentes consejos, tus recomendaciones y por ser como eres, simple y llanamente excelente. Elena, porque con tu llegada al equipo has aportado buenos consejos a este tu amigo y hermano caribeño.

A la Dra. Predestinación García (Predes) por que siempre has vertido luz para encontrar las posibilidades de mi futuro como investigador, Dr. Fernando Valdivieso, Dra. Marisol Ruiz Meana, Dr. Benito Cañas, Dra. Ángela Moreno, Dra. Esther Blanco y al Dr. Gustavo del Real. A todos ellos, miembros del Tribunal de Tesis, por dar parte de su valioso tiempo a la evaluación de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Cardiología Experimental del Instituto de Recerca Hospital Valle de Hebrón, en particular al Dr. David García Dorado y a la Dra. Marisol Ruíz Meana por su colaboración.

A la Dra. María Pajares y a Rocio Vargas por permitirme colaborar en su trabajo de investigación.

A los compañeros de la línea de investigación a los que cito en el orden que la vida me ha permitido conocer: Pedro Navarro, Pablo Martínez, Estefanía Nuñez y Daniel Pérez. A Pedro, por su valiosa aportación en los aspectos bioinformáticos y de bioestadísticas. Pablo, por sus aportaciones, su cooperación y solidaridad. Estefanía, por el compartir y las muchas horas de trabajo dedicadas a este estudio. Dani, por ser como eres, especial. Al personal del servicio de Proteómica y de Síntesis de Péptidos del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Dra. Anabel Marina, Fernando Barahona, Dra. Esperanza Morato, Dra. Mercedes Del Valle, Yolanda Nuñez, Alberto Jorge y muy especialmente a mi amiga África Gil, por sus detalles y siempre ayudarme a buscar las mejores ofertas de viajes para visitar a mi familia en Puerto Rico. Con mucho afecto a Mari José e Iluminada quienes con su cariño siempre me hicieron sentir como en casa. A todos por su acogida y saber bien estar. Les deseo el mejor de los éxitos en su vida personal y profesional.

A la Dra. Beatriz Pardo, por ser como es, tan maravillosa y especial.

A María Ramírez Boo, de la Universidad de Córdoba por permitirme validar parte del método con su modelo biológico de estudio. ¡Éxito María!.

A los que con su estancia temporera en el labo dejaron su aportación y su cariño, Mónica Carrera (Vigo, España), Marcos, Rocio, Azar Radfar (Irán) y Marta Mendes (Portugal).

A Madelena Sanz (Super Mada) Secretaria del Departamento de Biología Molecular por sus consejos, detalles y orientaciones.

Indiscutiblemente a los compañeros del Programa de Doctorado en la UAM/CBM: Mis amigos y colegas. Gracias Dr. Juan Francisco Aranda, amigo “Juan Fra”, Dra. Elena Merino (Elenita), Juan José (Juanjo “el Pibe”) Cragnolini, Noel García, Dra. Begoña Galocha, Carla “Bambina”, Salvador Martínez (Salva), mi querida Olga Antón, Dr. Jaime Millán, Dr. Fernando Martín Belmonte, Anita Ruiz, a la Dra. Laura Contreras y al Dr. Álvaro Ortega. Por que todos, de una forma u otra, durante los días difíciles siempre dieron ánimo para seguir adelante, porque remamos juntos y nos ayudamos para ver otros horizontes..., por su tiempo y consejos, por darme el respaldo para seguir adelante. Muy en especial a Elena Merino por sus horas dedicadas a los asuntos oficiales y dar de su tiempo para hacer las encuadernaciones finales de este documento.

A los que me brindaron su amistad incondicional, tanto en la primera fase del Diploma de Estudios Avanzados (DEA) como en la investigación de Tesis. Mis amigos: Rodolfo, Miguel Rodríguez, María Ángeles, Alicia Llorente, Horacio Almanza, Nicolás Molina y Oscar Nuero, todos del Centro de Investigaciones en Sanidad Animal (CISA/INIA) y a Milena Mintcheva por su cariño y bonita amistad.

Al Dr. Francisco Sobrino Castelló y al Dr. Estebán Domingo por permitirme realizar la primera fase de mis estudios (DEA) y los compañeros Dra. Belén Borrego, Paloma Fernández, Manuel (Manu) Navarro, Dra. Jillian Ganges, Dr. José (Pepe) Nuñez de la Línea de Investigación en AFTOSA, del Centro de Investigaciones en Sanidad Animal CISA-INIA.

Muy en especial a la Dra. Esther Blanco, por sus excelentes cartas de recomendación para mi segunda fase de estudios. A Ivonne Ávalos, por ser una magnífica compañera del quehacer científico durante mi primera estancia en el laboratorio de alta seguridad biológica, CISA en Valdeolmos, en Madrid.

A mis amigos y mi familia de Madrid: Charles Baize, Nathalie Ravoire, Claudia Mesa, Steve Mazoyer, Olga De la Rosa, Ramón, Javy Aliaga, Elena, Javy, Adela, Pilar Buitrón, José Luis Félix y José Luis Raimond. Gracias por estar siempre prestos a mí auxilio.

A mi prima Ángeles Sanz, quien me recibe en la Biblioteca del CBM, a mi amiga Carmen Navarro, a Jaime García y José Ignacio Belio López por el arte gráfico de la portada de esta Tesis. A M<sup>a</sup> Carmen Rico, Marga Corral, M<sup>a</sup> José Fernández, y Remedios Madrid, todas de la oficina de compras en la Administración de CBM, por sus detalles para conmigo y por endulzarme la vida siempre con chocolates.

Al Sr. Ramón Darío Molinary, Presidente de la Casa de Puerto Rico en España y a su esposa Mariza Malo por su hospitalidad y detalles durante mi estancia en Madrid.

No menos importante y de forma muy especial a mi familia de Murcia: Javier Giménez Arnau y Paquita Arnau a quienes siempre recordaré con mucho amor y cariño.

En la dimensión ultramar caribeña: PUERTO RICO

Son muchos los que de una forma u otra han puesto su granito de arena. A los que fomentaron y fueron mis cartas de recomendación para inicial esta gestión: Dra. Ivonne Jiménez, Dra. Carmen Cadilla, Dra. Anamaría Díaz, Dr. Heriberto Torres y Dra. Loyda Meléndez. Todos del Recinto de Ciencias Medicas de la Universidad de Puerto Rico. A la Sra. Anna I. Álvarez Castro, Secretaria del Programa de Beca Presidencial de la UPR.

Ivonne, para gracias no basta. ¡Tu sabes bien porque!

De forma muy especial a la Dra. Martha Quiñones y su esposo Iván Elías, por allanar el camino y ser luz a la hora de emprender una nueva vida en Madrid. Por su lealtad y su amistad.

Significativamente, a la Dra. Raquel Vargas quién, aunque a la distancia, siempre estuvo muy de cerca en todo el proceso y siempre ha sido una amiga incondicional, compañera profesional y consejera. Para mí, es madre del quehacer universitario y científico en la experiencia con la Universidad. Raquel esto lo celebraremos ¡con un “Champancito”!

A los que día a día a través de los medios del correo electrónico y sus llamadas me dieron el apoyo para seguir adelante. Mis amigos y compañeros de vida profesional en Puerto Rico. Los que dieron el máximo para que se lograra este objetivo luchando en todos los foros universitarios y presentando los logros del proceso. Indiscutiblemente son ellos: la Prof. Sonia I. Reyes Medina, Prof. Annie Gómez, Prof. Servy Serrano, a los próximamente doctores Prof. Migdalia López Forty, Licdo. Roberto Delgado y Prof José A. Fonseca. Y a todos los compañeros de la Facultad de la Universidad de Puerto Rico en Arecibo que aunaron esfuerzos en pro de mi última fase de estudios en el extranjero. Gracias.

A la Prof. Edda Ilena Fresse, Iris Ríos, Milena Velázquez, las palabras sobran...

A el Prof. José Juan Rivera, Presidente de la Asociación de Profesores Universitarios de Arecibo, y al Comité de Personal del Departamento de Biología de la UPR-Arecibo.

Particularmente, a la Administración y el personal de apoyo de la Universidad de Puerto Rico en Arecibo, por permitirme gozar del privilegio de Licencia con Sueldo durante el periodo de junio 2003 a diciembre 2007. A la Administración Central de la UPR por acoger mi propuesta de estudios como una de tipo prioritario en el Plan de Desarrollo para la Universidad de Puerto Rico, en lo que a Biotecnología se refiere y al permitirme ser becado por el Programa de Becas de la Presidencia de la Universidad de Puerto Rico a nivel Central.

Finalmente y no menos importante, a mi familia en especial a mis padres.

¡A todos, Muchísimas GRACIAS!

DEDICATORIA

*A mi familia, a cada uno de ellos en forma especial y particular,*

*¡A Eva y Horacio, mis padres.  
Porque entre muchas cosas,  
siempre han patrocinado todos mis proyectos, científicos y artísticos.  
Por ser modelos de perseverancia,  
sobre todo por su amor y por su generosidad.  
Por su sabiduría al enseñarme que la mayor riqueza es el conocimiento y que el  
mismo se debe impartir con respeto a los demás. Por haberme enseñado que  
“de nada sirve poseer si no sabemos apreciar.  
Y que una de las mayores riqueza de esta corta y efímera vida  
es saber cultivar buenos amigos.  
“Que mientras más se ha recibido más debemos dar en agradecimiento”.  
Por enseñarme que lo importante es llegar,  
independientemente de ser o no el rimero.*

*¡A Eva Ileana e Ida Liz (Lizzie), mis queridísimas hermanas,  
por su amor, cariño, por ser fruto de la misma cosecha de amor,  
y sobre todo por ser como son...excelentemente maravillosas!.*

*¡A mis cuatro hijos (sobrinos)!  
Xavier Omar, Nelson Gadiel, Gustavo Alexis y Krystel Marie,  
por privarme de ellos durante estos últimos cinco años.  
Por mi ausencia física justo quizás cuando más me necesitaban.  
Por haber seguido mis pasos como estudiantes de siempre  
y por su pasión por la Universidad.*

*¡Por ustedes es que siempre he actuado teniendo claro y presente que:  
“los deberes son intransferibles”!*

*Horacio Serrano Rivera  
Octubre, 2008*

ÍNDICE

<b>1. SUMMARY .....</b>	<b>8</b>
<b>2. ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Precondicionamiento isquémico y disfunción cardiovascular.....</b>	<b>11</b>
3.1.1. La isquemia cardiaca y el daño por reperfusión .....	11
3.1.2. Precondicionamiento del miocardio .....	11
3.1.3. La Conexina 43 (Cx43).....	12
<b>3.2. La proteómica actual .....</b>	<b>13</b>
3.2.1. Proteómica clásica: Escuela Europea .....	13
3.2.2. Proteómica de Segunda Generación.....	14
3.2.3. Identificación masiva de proteínas .....	15
3.2.4. Indicador estadístico no paramétrico: Probability Ratio (pRatio) .....	16
<b>3.3. La proteómica de expresión diferencial .....</b>	<b>17</b>
3.3.1. Marcajes Químicos: .....	17
3.3.1.1. “Isotope-Coded Affinity Tags” (ICAT) .....	17
3.3.1.2. Isotope Tangging Reagents for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ).....	18
3.3.2. Marcaje Metabólico: “Stable Isotope Labeling with amino acid in Cell culture”(SILAC) .....	19
3.3.3. Marcaje enzimático con <sup>18</sup> O.....	19
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. Reactivos.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Modelos de precondicionamiento isquémico del miocardio .....</b>	<b>22</b>
<b>5.3. Aislamiento de mitocondrias.....</b>	<b>22</b>
<b>5.4. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....</b>	<b>23</b>
<b>5.5. Digestión en gel y marcaje isotópico.....</b>	<b>23</b>
5.5.1. Cortes de gel .....	23
5.5.2. Digestión trípica en gel .....	23
5.5.3. Marcaje enzimático con <sup>16</sup> O/ <sup>18</sup> O.....	24
<b>5.6. Configuración y acoplamiento de un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con un inyector de muestras automático y una trampa iónica lineal MS/MS..</b>	<b>25</b>
<b>5.7. Análisis por espectrometría de masas .....</b>	<b>28</b>
5.7.1. Identificación y cuantificación relativa de péptidos de conexina 43 y conexina 32 mediante la técnica SMIM .....	28
5.7.2. Identificación y cuantificación masiva de proteínas .....	29
5.7.3. Modelo Estadístico.....	30
5.7.4. Cuantificación de péptidos y análisis estadístico .....	30
5.7.5. Cálculo del peso estadístico del ajuste .....	31
5.7.6. Cálculo de la media ponderada y las varianzas a nivel de scan, péptido y proteína.....	31

<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
6.1. Puesta a punto de un sistema para el análisis masivo de proteomas por espectrometría de masas.....	34
6.2. Estudio de la distribución mitocondrial de las conexinas 43 y 32.....	36
6.2.1. Identificación específica de la conexina 43 en membrana mitocondrial en cardiomiocitos de rata.....	36
6.2.2. Estudio de la distribución mitocondrial de la conexina 32 en un modelo animal de ratones Cx43KI32.....	40
6.3. Identificación masiva de proteínas de membrana mitocondrial utilizando SDS-PAGE y digestión en gel.....	42
6.4. Cuantificación masiva de proteínas de membrana mitocondrial utilizando SDS-PAGE, digestión en gel y marcaje isotópico con <sup>18</sup> O: experimento de prueba.....	44
6.5. Estudio diferencial del proteoma de membrana mitocondrial de rata en respuesta a un modelo de preconditionamiento isquémico.....	47
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
7.1. Innovaciones tecnológicas para el estudio del proteoma de membrana mitocondrial....	61
7.2. Implicaciones de los resultados con Cx43 y Cx32 en el preconditionamiento isquémico.....	64
7.3. Implicaciones fisiológicas de los cambios en los niveles de proteínas detectados en el preconditionamiento isquémico.....	64
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>



## 1. SUMMARY

In spite of recent developments, the global analysis of membrane subproteomes is still a common obstacle. Also, in some situations, the precise characterization of a particular peptide species present in low amounts in a very complex peptide mixture is needed. In this work we have developed novel proteomic approaches for high sensitivity analysis of specific peptides of membrane proteins in complex samples, as well as for high-throughput membrane protein identification and quantification. Also, we show some applications of these techniques in the context of biological studies on cardiovascular dysfunction.

Ischemic preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury by still unknown molecular mechanisms. Mitochondria have been proposed to be involved in cardioprotection exerted by ischemic preconditioning. In this study, differential protein expression in myocardial mitochondria was assessed during rat ischemic preconditioning by high-throughput proteomics. 300  $\mu$ g of SDS-solubilized mitochondria from the hearts of normoxic and preconditioned rats were separated on SDS-PAGE. The gel was cut into several fractions, which were subjected to trypsin digestion, followed by stable isotope labeling with  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  and RP-HPLC-LIT analysis. In-house developed programs pRatio and QuiXoT were used for high-throughput peptide identification and quantification, respectively. This analysis resulted in confident identification of more than 400 mitochondrial proteins, from which a large proportion could be quantified. The abundance of several mitochondrial membrane proteins was statistically increased or decreased, being most of them involved in energy metabolism and mitochondrial dysfunction. The set of differentially expressed proteins is consistent with a protective role in myocardium of preconditioned rats.

Connexin 43 plays an important role in cardiac preconditioning. However, the presence of this protein in mitochondria has never been described in a proteomic study. Here we verified the presence of Cx43 in purified mitochondrial preparations from mouse myocardium by a mass-spectrometry-based proteomic approach. Also, we demonstrate the absence of Cx32 in cardiac mitochondria and its presence in hepatic mitochondria in preconditioning-resistant Cx43KICx32 mice.

Our results may help understanding the molecular mechanisms involved in ischemia preconditioning.

## 2. ABREVIATURAS

<b>1-DE:</b>	<b>Electroforesis monodimensional</b>
<b>2-DE:</b>	<b>Electroforesis bidimensional</b>
<b>Aa:</b>	<b>Aminoácido</b>
<b>Ac:</b>	<b>Anticuerpo</b>
<b>AMP</b>	<b>Desaminasa (adenilato aminohidrolasa)</b>
<b>APS:</b>	<b>Persulfato amónico</b>
<b>BLAST:</b>	<b>Programa bioinformático de alineamiento de secuencias de tipo local</b>
<b>BSA:</b>	<b>Albúmina de suero bovino</b>
<b>CBB:</b>	<b>Azul brillante de Coomassie</b>
<b>CID:</b>	<b>Disociación inducida por colisión</b>
<b>CRM:</b>	<b>Reacción de vigilancia consecutiva</b>
<b>CTEM:</b>	<b>Cadena de transporte electrónico mitocondrial</b>
<b>CYMAL:</b>	<b>5-cyclohexylpentyl-<math>\beta</math>-D-maltoside</b>
<b>Da:</b>	<b>Dalton (unidad de masa atómica)</b>
<b>DE:</b>	<b>Exclusión dinámica</b>
<b>DE</b>	<b>delay extraction</b>
<b>DESI:</b>	<b>Desorción/ionización por electrospray</b>
<b>DTT:</b>	<b>Ditiotreitol</b>
<b>ECD:</b>	<b>Disociación por captura de electrones</b>
<b>ETD:</b>	<b>Disociación por transferencia de electrones</b>
<b>ESI:</b>	<b>Electrospray o electronebulización</b>
<b>ExPASy:</b>	<b>Sistema experto de análisis de proteínas</b>
<b>FASTA:</b>	<b>Programa para alineamiento de secuencias de ADN y de proteínas</b>
<b>FAB</b>	<b>Ionización por bombardeo con átomos rápidos</b>
<b>FDR:</b>	<b>Tasa de error o porcentaje de asignaciones falsas</b>
<b>FD</b>	<b>Desorción por campo eléctrico (FD)</b>
<b>FWHM:</b>	<b>Anchura de pico a media altura</b>
<b>FT:</b>	<b>Transformada de Fourier</b>
<b>FTICR:</b>	<b>Espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones por Transformada de Fourier</b>
<b>HIFU:</b>	<b>Ultrasonidos de alta intensidad focalizados</b>
<b>HPLC:</b>	<b>Cromatografía líquida de alta eficacia</b>
<b>ICAT:</b>	<b>Marcaje isotópico diferencial</b>
<b>ICR:</b>	<b>Resonancia ciclotrónica de iones</b>
<b>IEF:</b>	<b>Isoelectroenfoque o enfoque isoeléctrico</b>
<b>IT:</b>	<b>Trampa iónica</b>
<b>iTRAQ:</b>	<b>Marcaje isotópico diferencial para la cuantificación absoluta y relativa</b>
<b>K+:</b>	<b>Ión de Potasio</b>
<b>LC:</b>	<b>Cromatografía líquida</b>
<b>LC-MS:</b>	<b>Cromatografía líquida acoplada a un equipo de espectrometría de masas</b>
<b>LIT:</b>	<b>Trampa iónica lineal</b>
<b>M:</b>	<b>Molar</b>
<b>MALDI:</b>	<b>Ionización/desorción por láser asistida por matriz</b>
<b>MeOH:</b>	<b>Metanol</b>

<b>MPTP:</b>	<b>Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial</b>
<b>MS:</b>	<b>Espectrometría de masas</b>
<b>MS/MS:</b>	<b>Espectrometría de masas en tándem</b>
<b>MSn:</b>	<b>Espectrometría de masas en tándem múltiple</b>
<b>m/z:</b>	<b>Relación masa/carga</b>
<b>mKATP:</b>	<b>Canal de K dependiente de ATP</b>
<b>NAD(P):</b>	<b>Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato</b>
<b>nESI:</b>	<b>Nanoelectrospray o nanospray</b>
<b>PAGE:</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida</b>
<b>PCV2:</b>	<b>Circovirus porcino tipo 2</b>
<b>PD</b>	<b>Desorción por plasma</b>
<b>PMF:</b>	<b>Huella o mapeo de masas peptídicas</b>
<b>ppm:</b>	<b>Partes por millón</b>
<b>PTM:</b>	<b>Modificación postraduccional</b>
<b>PSA:</b>	<b>Albúmina de suero porcino</b>
<b>Q:</b>	<b>Cuadrupolo</b>
<b>RP:</b>	<b>Fase reversa</b>
<b>ROS:</b>	<b>Radicales de Oxígeno</b>
<b>reTOF:</b>	<b>Sistema de reflectrón (reTOF)</b>
<b>SDS:</b>	<b>Dodecil sulfato sódico</b>
<b>SDS-PAGE:</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS</b>
<b>SELDI:</b>	<b>Ionización/desorción por láser en superficie</b>
<b>SILAC:</b>	<b>Marcaje de cultivos celulares con aminoácidos marcados con isótopos estables</b>
<b>SIM:</b>	<b>Monitorización de un ión seleccionado</b>
<b>SIMS</b>	<b>Masas de iones secundarios</b>
<b>SIRM:</b>	<b>Monitorización de la reacción de un ión seleccionado</b>
<b>SMIM:</b>	<b>Monitorización de la fragmentación de un ión seleccionado</b>
<b>SORI-CID:</b>	<b>Irradiación sostenida sin resonancia con disociación inducida por colisión</b>
<b>SWISS-PROT:</b>	<b>Base de datos proteica del Instituto Suizo de Bioinformática</b>
<b>TEMED:</b>	<b>N'N'N'N'-tetra-metil-etilendiamina</b>
<b>TFA:</b>	<b>Trifluoroacético</b>
<b>Th:</b>	<b>Thomson, unidad de m/z</b>
<b>TOF:</b>	<b>Tiempo de vuelo</b>
<b>Tricina:</b>	<b>N-tris(hidroximetil)metilglicina</b>
<b>Tris:</b>	<b>N-tris(hidroximetil)aminometano</b>
<b>TrEMBL:</b>	<b>Base de datos de proteínas traducidas del EMBL</b>
<b>Tris:</b>	<b>Trizma base (Hidroximetil aminometano)</b>
<b>UCPs:</b>	<b>Proteínas de desacoplamiento mitocondrial</b>
<b>UV:</b>	<b>Ultravioleta</b>

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. *Precondicionamiento isquémico y disfunción cardiovascular*

##### 3.1.1. **La isquemia cardiaca y el daño por reperfusión**

Las enfermedades isquémicas del corazón son la primera causa de muerte en los países industrializados (Mathers and Loncar, 2006). La muerte de los cardiomiocitos causada por isquemia, es el único mecanismo fisiopatológico responsable de la mayor parte de este problema médicos, sociales, y económicos que incide en la enfermedad isquémica del corazón. Su muerte, reduce el rendimiento contráctil del corazón, y como consecuencia ocasiona el fallo contráctil del miocardio superviviente (remodelación), favoreciendo la aparición de arritmias cardíacas letales (Ross et al., 2004) y (Ehlert and Goldberger, 1997).

La isquemia cardíaca puede producirse como consecuencia de episodios trombóticos, o por la oclusión de la arteria coronaria debido a placas de ateroma (síndrome coronario agudo), entre otras causas. El resultado fundamental de la isquemia es que se reduce el suministro de sangre al miocardio. Consecuentemente, el suministro de oxígeno se vuelve insuficiente para mantener la fosforilación oxidativa y por tanto, la producción de ATP mitocondrial.

Actualmente, el único tratamiento capaz de limitar el alcance de la muerte los cardiomiocitos consiste en la repermeabilización de la arteria lo antes posible con trombolíticos o intervenciones mecánicas (reperfusión), que se traducen en la re-admisión del oxígeno y de los substratos metabólicos. Sin embargo, la reperfusión también provoca daño celular mediante mecanismos que están aún por dilucidar, que resultan en apoptosis (Kajstura y col, 1996) o necrosis de los cardiomiocitos (Halestrap y col., 2004). En principio la eficacia de la reperfusión depende de manera crítica en la forma en que se aplican, y los pacientes que han recibido el mismo, tan pronto como 90 minutos después de la oclusión coronaria, experimentan pérdida de una parte importante de las células cardíacas (Dirksen et al., 2007). Se prevé que incluso con una óptima aplicación de los métodos para la recanalización de la arteria coronaria, la mayoría de los pacientes que sufren síndromes coronarios agudos terminan con una importante pérdida de cardiomiocitos (Dirksen et al., 2007).

##### 3.1.2. **Precondicionamiento del miocardio**

Afortunadamente, se ha demostrado que la tolerancia de las células del miocardio a la isquemia y reperfusión transitoria puede ser modificada mediante diferentes intervenciones. Estas incluyen tratamientos farmacológicos que interfieren en los mecanismos de muerte celular, o que activan cascadas de señales de protección endógena. Dichos tratamientos pueden ser aplicados antes de la aparición de la isquemia (precondicionamiento), o en el momento de la reperfusión (post-acondicionamiento).

El precondicionamiento isquémico (breves episodios de isquemia-reperfusión) ocasiona la protección más sólida en contra de la muerte celular secundaria como consecuencia de un posterior período de isquemia prolongada (Murry et al., 1986). Sin embargo, actualmente se reconoce que su aplicación clínica es muy limitada debido a la dificultad de producir una isquemia controlada.

Por otra parte, el preconditionamiento puede ser imitado por drogas que sean capaces de desencadenar la respuesta endógena de protección (Schulz et al., 2001. o por la isquemia en lugares distintos al corazón (como un brazo) [Schmidt, 2007 #40]. Diferentes factores desencadenantes de cardioprotección han sido identificados, y muchas vías de señalización se han caracterizado en detalle [Schulz, 2001 #39] (Zhu et al., 2006). Sin embargo, algunos pasos críticos de la traducción de señales no se han aclarado, incluyendo el lugar exacto y el mecanismo de generación de radicales de oxígeno (ROS) (Becker, 2004). Tampoco se conoce la composición molecular de las dos estructuras más ampliamente aceptadas como esenciales en la señalización y protección del mitocondria como son el canal de K<sup>+</sup> dependiente de ATP (MKATP), y el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP).

Aun cuando se requiere más conocimiento para comprender estos mecanismos moleculares subyacentes a la protección miocárdica del preconditionamiento, este tratamiento se está empleando en la práctica clínica, ya que su eficacia está más que demostrada (Mahaffey et al., 1999), (Kitakaze et al., 2007), (Hausenloy et al., 2007).

### **3.1.3. La Conexina 43 (Cx43)**

Las conexinas son una familia de proteínas de gran importancia biológica, cuyo papel principal es formar canales transmembrana tipo “gap junctions”. Estas proteínas están involucradas en la transmisión del impulso eléctrico en el miocardio así como en la comunicación entre otros tipos celulares y tejidos. En el corazón, los cardiomiocitos ventriculares expresan una isoforma de 43 kDa (conexina 43 o Cx43). Muchos estudios han demostrado que esta isoforma participa en importantes procesos celulares con mecanismos distintos a su papel como “gap junction”. Un estudio reciente ha demostrado que la conexina 43 se encuentra localizada, además de en la membrana nuclear, en la membrana interna mitocondrial. Es por ello que la investigación se ha centrado en el estudio de los mecanismos de regulación e interacción molecular de la translocación y función de esta isoforma, utilizando técnicas basadas en la detección mediante anticuerpos (Ac) como la inmunoelectroforesis, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

La Cx43 es una proteína que se ha visto implicada en la cardioprotección endógena, según se ha demostrado en animales deficientes de Cx43 (Schwanke, 2002). Las Conexinas son una familia de proteínas transmembrana expresadas en todos los animales cordados (Sohl and Willecke, 2004). Su función principal es la de formar los canales, que permiten la comunicación directa entre el citoplasma de las células adyacentes. Estos canales están formados por el acoplamiento de dos hemicanales, uno de cada célula, que a su vez se componen de seis unidades de Conexinas. En adultos, los cardiomiocitos ventriculares expresan casi exclusivamente la isoforma de conexina Cx43 (van Veen et al., 2001). La mayor parte de la Cx43 ventricular se encuentra en los discos intercalados, donde es esencial para la rápida propagación del potencial de acción (Jalife et al., 1999). La apertura de los hemicanales se regula por fosforilación mediada por diferentes kinasas (Schulz y Heusch, 2004). La Cx43 puede tener otras funciones celulares independiente de su función en la formación de los canales de cruces [Rodríguez-Sinovas, 2007 #44] (Goodenough and Paul, 2003), como son la interacción con otras proteínas y la participación en diferentes cascadas de transducción de señales (Plotkin et al., 2002).

La comunicación intercelular mediada por los canales de Cx43 es un elemento importante en la fisiopatología de la isquemia-reperusión miocárdica. Los experimentos realizados por Ruíz-Meana y colaboradores han demostrado que los canales permiten la sincronización del agotamiento de ATP y del inicio de contractura de rigor durante la isquemia (Ruiz-Meana et al., 2001). (Rodríguez-Sinovas et al., 2006), y que el paso de Na<sup>+</sup>

de células adyacentes a los individuos heridos durante la reperfusión, y la posterior activación de cambio  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  pueden dar lugar, de célula a célula, hypercontracturas y la propagación de la muerte de las células durante la reperfusión (García-Dorado et al., 1997), (Rodríguez-Sinovas et al., 2004).

Por otra parte, experimentos en cultivos celulares no confluentes han demostrado que la expresión de la Cx43 puede modular la muerte celular por mecanismos independientes de la comunicación célula a célula (Rodríguez-Sinovas et al., 2007). En este sentido, mediante pruebas de anticuerpos (Ac), se ha detectado la presencia de Cx43 en la membrana mitocondrial interna de cardiomiocitos (Rodríguez-Sinovas et al., 2007). Además, la reducción del contenido de la Cx43 a nivel mitocondrial se ha asociado con la abolición de la cardioprotección inducida por dióxido [Rodríguez-Sinovas, 2007 #44]. Por todo esto, se cree que la Cx43 podría participar en el precondicionamiento a través de la modulación de la función mitocondrial.

Aunque el mecanismo cardioprotector aun se desconoce, actualmente se están desarrollando y ensayando en pacientes distintos reguladores de la apertura de Cx43 con resultados prometedores en cardioprotección (Herve, 2006; Axelsen, 2007).

## **3.2. La proteómica actual**

### **3.2.1. Proteómica clásica: Escuela Europea**

La Proteómica es una de las áreas tecnológicas de mayor relevancia científica de la era post-genómica. La ingente cantidad de información generada durante los proyectos de secuenciación de genomas, y la necesidad de descifrar esta información han desplazado el foco de atención hacia el estudio directo de las proteínas, su estructura, su función, sus interacciones y sus modificaciones. De forma paralela, el desarrollo espectacular en los últimos años de la espectrometría de masas está permitiendo la identificación o secuenciación de proteínas con unos niveles de rapidez, sensibilidad y versatilidad sin precedentes. Por primera vez en la historia de la biomedicina, se dispone de una herramienta para el análisis sistemático de las proteínas, que, a fin de cuentas, son los agentes fundamentales de la vida. La Proteómica se revela, pues, como una de las tecnologías clave de la ciencia del siglo XXI, y constituye un campo emergente cuyo desarrollo reviste una importancia estratégica de primer orden en lo que a Biotecnología se refiere.

La aproximación “clásica” de la Proteómica: o también conocida como la Escuela Europea es la estrategia experimental en la que se ha basado esta disciplina desde sus comienzos y se basa en la separación previa de las proteínas mediante electroforesis mono (1-DE) o bidimensional (2-DE) en geles de poliacrilamida. La identificación de las proteínas se lleva a cabo por digestión directa en el mismo gel donde se han separado usando proteasas altamente específicas y analizando los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas. El análisis mediante MALDI-TOF y la identificación de las proteínas en la base de datos a partir del mapa o “huella peptídica” (peptide mass fingerprinting) (Pandey and Mann, 2000) permite una identificación rápida y directa de las proteínas en la mayoría de los casos. La espectrometría de masas mediante nanospray o nanoHPLC-electrospray combinados con el análisis cuadrupolar, por trampa iónica (IT) o utilizando híbridos como el doble cuadrupolo-TOF (QToF), permite la fragmentación de los péptidos, la cual se puede correlacionar con su secuencia. Ello permite una identificación muy fiable de los péptidos en las bases de datos (un único péptido es suficiente para identificar una proteína) (Yates et al., 1995). La combinación sinérgica de estas dos aproximaciones permite obtener el máximo rendimiento, obteniéndose notables resultados en términos de rapidez y precisión (véanse por ejemplo (Shevchenko et al., 1996); (Garrels et al., 1997). Más recientemente se han comenzado a

utilizar equipos que aúnan la rapidez de análisis de la técnica MALDI con capacidades de fragmentación de péptidos, utilizando analizadores como el TOF-TOF (véase por ejemplo (Friedman et al., 2004). En los últimos años estas aproximaciones han sido utilizada de forma sistemática para llevar a cabo análisis de expresión diferencial de proteomas (por ejemplo, (Shevchenko et al., 1996); (Garrels et al., 1997) , para la caracterización a gran escala de redes de interacción entre proteínas (Gavin et al., 2002) y para la caracterización de los componentes de complejos macromoleculares (Link et al., 1999). En la figura 1. se resume a grandes rasgos la aproximación proteómica “clásica”.

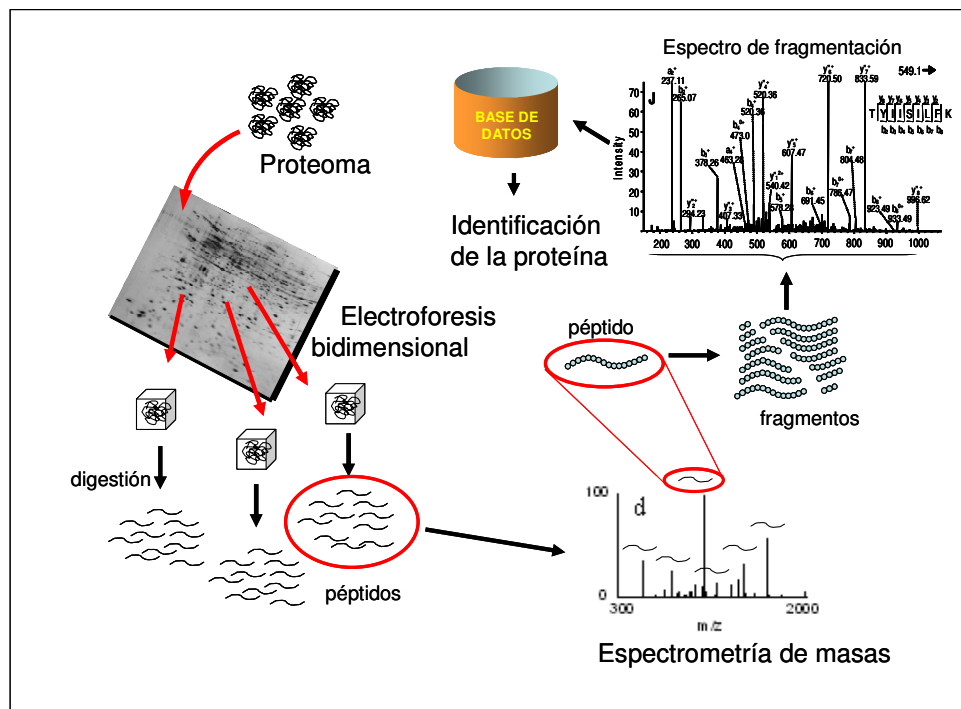


Figura 1. Esquema de aproximación proteómica “clásica”.

### 3.2.2. Proteómica de Segunda Generación

La Proteómica de Segunda Generación o también conocida como la Escuela Americana, reconoce la limitación más importante de la Proteómica “clásica” con la necesidad de separar los componentes del proteoma mediante electroforesis, y los problemas asociados a la digestión de las proteínas en la matriz de poliacrilamida. Incluso después de más de una década de esfuerzos, las técnicas electroforéticas no permiten todavía la separación ni detección de todos los componentes del proteoma, y son todavía poco reproducibles y difíciles de estandarizar (Gygi et al., 1999a). La digestión “en gel” suele producir una falta de cobertura de secuencia, debido a que muchos péptidos no pueden ser extraídos de la matriz, o poseen sitios de corte que no quedan expuestos a la acción de la proteasa. Esta técnica, además, posee un rango dinámico limitado, no siendo posible identificar proteínas en baja concentración en presencia de cantidades altas de otras proteínas (Gygi et al., 1999a), (Gygi and Aebersold, 2000).

Una serie de avances recientes han cambiado el panorama hasta el punto de que hoy en día se habla de una “Proteómica de Segunda Generación” (Griffin et al., 2001). Estas técnicas se basan en la digestión directa de proteomas en disolución y la identificación a escala masiva de péptidos mediante fragmentación. Por una parte, la cromatografía líquida







tanto a las asignaciones directas como las que se adjudican de forma aleatoria. Sin embargo, este tipo de motor de búsqueda no permite establecer las diferencias entre las asignaciones correctas e incorrectas. Las aproximaciones más comunes para interpretar los resultados de dichas identificaciones a gran escala se basan en análisis estadísticos de las distribuciones promedio de las puntuaciones, las cuales se construyen a partir de las mejores puntuaciones obtenidas por el motor de búsqueda. Este es el planteamiento seguido en un trabajo previo (Lopez-Ferrer et al., 2004); este método consiste en la construcción de las distribuciones estadísticas de las puntuaciones aleatorias o correspondientes a las asignaciones falsas utilizando el mismo conjunto de datos y construyéndolas a partir de las búsquedas de las bases de datos de secuencias aleatorias. A partir de una apropiada modificación matemática de las puntuaciones, la distribución global de las puntuaciones del SEQUEST se puede modelar como una distribución normal dependiente de dos variables y en cuya fórmula se puede deducir el cálculo de la probabilidad de que la identificación de un péptido no sea debido al azar. Además de la simplicidad del modelo, se demuestra que éste ofrece una precisa estimación de la tasa de error del experimento, inclusive mejor que la de otros métodos o modelos publicados. De igual forma, se logra estimar el comportamiento de la distribución global en función de la calidad de secuencias candidatas a las que se puede enfrentar cada espectro MS/MS, influenciado especialmente por parámetros como el tamaño de la base de datos y la ventana de tolerancia para recepción del ión precursor, (Lopez-Ferrer et al., 2004).

#### **3.2.4. Indicador estadístico no paramétrico: Probability Ratio (pRatio)**

Otras aproximaciones al mismo problema calculan las probabilidades individuales de cada péptido identificado en base a modelos teóricos o a partir de las distribuciones de las puntuaciones individuales de cada péptido, como es el caso de MASCOT (Perkins et al., 1999). En un trabajo llevado a cabo recientemente en el laboratorio de Jesús Vázquez (Martínez-Bartolomé, 2007) se estudian las propiedades matemáticas de las distribuciones promedio de las puntuaciones obtenidas por SEQUEST introduciendo el concepto de “calidad de espectro” y expresando dichas distribuciones como distribuciones compuestas por las distribuciones de espectros simples. En este trabajo se predice y demuestra en la práctica que las distribuciones promedio de puntuaciones están dominadas por la distribución de calidad de la colección de espectros, excepto en la región de baja probabilidad, en la cual se puede predecir la dependencia del tamaño de la base de datos que tiene la probabilidad promedio. Este análisis matemático conduce al desarrollo de un nuevo indicador, la razón de probabilidad “probability ratio” (pRatio), que toma en cuenta de forma óptima la información estadística proporcionada por la primera y la segunda mejor puntuación obtenida en la identificación de cada péptido. La razón de probabilidad es un indicador estadístico no paramétrico y robusto que hace innecesaria la clasificación de espectros de acuerdo a parámetros como el estado de carga y permite un rendimiento de identificación, basándose en las tasas de error “false discovery rates” (FDR), al menos mejor que el obtenido por otras aproximaciones estadísticas empíricas. Lo robusto, simple del concepto y la facilidad de automatización de este algoritmo lo hacen ser una alternativa muy atractiva para determinar el grado de certidumbre y las tasas de error de las identificaciones en experimentos a gran escala (Martínez-Bartolomé et al., 2008). El programa “pRatio”, desarrollado por Pedro Navarro, permite aplicar de forma automática el método de la razón de probabilidades, de forma conjunta y desatendida, en experimentos de análisis masivo (cientos de carreras de HPLC). Este es el programa utilizado en este trabajo para la identificación de proteínas de forma masiva y con alta confianza.

### **3.3. La proteómica de expresión diferencial**

El análisis de la expresión diferencial en proteínas es fundamental para entender los procesos biológicos y cada vez más juegan un rol importante en la biología y la investigación médica (Li et al., 2003). Actualmente el análisis masivo de proteínas de membranas representa un reto con muchos obstáculos (Hynek et al., 2006). La proteómica de expresión diferencial estudia de forma comparativa los cambios dinámicos que tienen lugar en la composición proteica de muestras diferentes pero con denominadores comunes. La muestra a comparar puede proceder de organismos sanos y en estado mórbido, de diferentes tratamientos a un sistema biológico, de células o tejidos que han sido sometidos a diferentes tratamientos o condiciones tales como terapias farmacológicas, ambientales, toxicológica etc... y de un número variado de sistemas en los que se necesite conocer los cambios que pueden ocurrir en las poblaciones de proteínas como consecuencia de fases estables o transitorias. Esta metodología permite el análisis de los mecanismos celulares en respuesta a distintos factores e identificar aquellas proteínas cuya expresión se ha visto afectada por estos factores. La caracterización de las proteínas expresadas permite inquirir en el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes o como posibles candidatos de marcadores en investigaciones biomédicas, asumiendo una importancia en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades (Banks et al., 2000). Generalmente este tipo de análisis ha venido haciéndose utilizando la tecnología 2D-PAGE, seguida de un estudio de imagen en el cual se compara la intensidad de las manchas de las proteínas en el gel. Las manchas de proteínas que por las circunstancias del experimento han variado en intensidad de una muestra a otra, son cortadas y analizadas por espectrometría de masas, con el objetivo de diseñar futuros experimentos y general hipótesis de los resultados obtenidos. Como una alternativa a esta aproximación el grupo de Aebersold diseñó una aproximación diferente para estudiar cuantitativamente la expresión de proteínas (Gygi et al., 1999b), basada en el uso de isótopos estables. Existen diferentes tipos de marcaje isotópico y previo a comentar y exponer el método que hemos seleccionado para este trabajo es pertinente citar y exponer algunas de las ventajas y desventajas relevantes de cada una de ellas, tales como las que se conocen como: “Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture” (SILAC), “Isotope-coded affinity tags” (ICAT), “Quantitation by Amine-Reactive Isobaric Tagging Reagents” (ITRAQ) y el que utilizamos en este trabajo, O18. El desarrollo de técnicas para el marcaje isotópico de péptidos y la purificación selectiva de los péptidos modificados, han permitido aplicar esta tecnología al análisis de expresión diferencial de proteomas (Gygi et al., 1999b) y al análisis sistemático de modificaciones postraduccionales (Oda et al., 2001).

#### **3.3.1. Marcajes Químicos:**

##### **3.3.1.1. “Isotope-Coded Affinity Tags” (ICAT)**

Utilizando los desarrollos en la proteómica de expresión y enfocando la metodología de análisis basada en la cromatografía multidimensional se desarrolló el método llamado ICAT. Este método sirve para ver los niveles relativos de proteínas en dos preparaciones distintas que han sido digeridas por separado. Cada uno de los digeridos se somete a una biotinylación de las cisteínas utilizando diferentes etiquetas biotinylladas. En una primera instancia una de las etiquetas tiene ocho átomos H1, mientras en la segunda se sustituyen los H1 por deuterios. Las dos muestras, una vez marcadas, se mezclan y los péptidos que contienen las cisteínas se purifican por afinidad en una columna de avidina. Posteriormente, el eluido se analiza por espectrometría de masas y para la cuantificación se integran, a lo largo del cromatograma, las señales de pares de picos con una diferencia de masa de 8 uma,

coincidentes con los ocho hidrógenos intercambiables del reactivo. Aunque este método se utilizó durante algún tiempo, se observó que al llevar a cabo los análisis de la mezcla purificada con avidina utilizando LC-MS/MS, las diferencias en la elución de los péptidos en la cromatografía líquida eran significativamente diferentes para cada uno de los isotómeros, este hecho hace que la cuantificación sea difícil. Para subsanar el problema, se sintetizó un reactivo de segunda generación en el que la expresión diferencial se basaba en la sustitución de  $^{12}\text{C}$  por  $^{13}\text{C}$ , ya que estos isótopos no presentan problemas diferenciales de elución en fase reversa (Yi, EC. Et.al.). La diferencia de  $n$  Da (donde  $n$  es el número de átomos de  $^{13}\text{C}$  del análogo isotópico) permite la distinción de los dos péptidos iguales isotópicamente marcados diferencialmente y que provienen de orígenes distintos. La cuantificación relativa se obtiene de la misma manera que previamente se explica, integrando las señales iónicas correspondientes a los péptidos, mientras que la identificación de las proteínas se hace a partir de la fragmentación de los péptidos. Este método permite por tanto la cuantificación de la concentración relativa de la misma proteína en dos muestras diferentes y la identificación de las mismas. La diferencia en la concentración puede ser mayor a dos órdenes de magnitud lo que posibilita utilizar esta tecnología para muchas aplicaciones.

La aproximación ICAT tiene una serie de ventajas por sus características: simplificación de la muestra, robustez, estandarización, etc., aunque al mismo tiempo éstas pueden tornarse en inconvenientes; por ejemplo, la purificación de los péptidos que contienen cisteínas permiten simplificar enormemente la complejidad de la muestra y al mismo tiempo se evita saturar la capacidad de las columnas capilares, sin embargo, esto se hace a expensas de perder el resto de los péptidos y la información acerca de las proteínas que no contengan cisteínas. Los pasos de purificación son críticos cuando se requiere alta sensibilidad debido a la escasez de muestra y por supuesto al ser un reactivo comercial su precio es, en muchos casos, un factor limitante.

Con el objetivo de salvar estos problemas otros método de marcaje isotópico fue puesto a punto por Münchbach; este método consiste en el marcaje de los péptidos en el N-terminal con distintos isotómeros del ácido nicotínico después de la digestión de las muestras. Esta aproximación tiene la ventaja de ser más universal que la basada en la purificación de cisteínas, pero no resuelve el problema del rango dinámico. Por el contrario, Oda marcaba todos los aminoácidos (Aa) haciendo los cultivos con un medio marcado con  $^{15}\text{N}$ , pero en este caso ocurre lo contrario, no se simplifica la muestra, aunque se marcaran todos los péptidos, y además sólo servía para muestras que proviene de extractos de un cultivo, pero no para un cultivo primario o para ver diferencias en tejidos.

### **3.3.1.2. Isotope Tagging Reagents for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ)**

Otra opción muy utilizada actualmente es la metodología iTRAQ que se basa en la utilización de cuatro reactivos con diferentes estructuras isotópicas pero todos ellos con la misma masa y que reaccionan con el grupo amino terminal de los péptidos [Ross, 2004 #96]. En esta estrategia se marcan todos los péptidos de las muestras a comparar, pero utilizando reactivos diferentes para cada una de ellas. Una vez que la reacción química ha terminado se juntan las distintas muestras y se procede a un análisis masivo MS/MS. Los perfiles de fragmentación van a ser iguales para todas las muestras, pues el mismo péptido en todas ellas tiene la misma masa y se fragmenta al mismo tiempo, sin embargo la marca introducida fragmenta de forma diferente según el reactivo, obteniéndose picos significativos para cada una de ellas, 114, 115, 116, 117 m/z. La cuantificación se hace en función de la intensidad de estos fragmentos. Las ventajas de este método son por un lado el incremento de la confianza y de la calidad de los datos al estar marcados todos los péptidos y la adición de la

marca en el N-terminal mejora la fragmentación. Además se pueden realizar hasta cuatro experimentos de expresión diferencial en un sólo análisis. Sin embargo esta metodología tiene una serie de inconvenientes tales como la acumulación en el mismo ión reportero de las trazas de diferentes péptidos que coeluyen y tienen masas parecidas, además del factor costo.

### 3.3.2. Marcaje Metabólico: “Stable Isotope Labeling with amino acid in Cell culture”(SILAC)

Otros métodos se basan en la comparación isotópica de proteínas procedentes de cultivos celulares distintos, que han sido crecidos en medio de cultivo celulares diferentes por presentar un determinado isótopo diferencial. Puede tratarse de una fuente de nitrógeno en el caso de microorganismos, para los cuales un cultivo es suplementado con  $^{14}\text{N}$  y el otro con  $^{15}\text{N}$ . Una de las metodologías mas utilizadas para el marcaje metabólico es la conocida como SILAC “Stable Isotope Labeling with amino acid in Cell culture”, donde se adicionan aminoácidos marcados con isótopos estables ligeros ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$  o  $^{14}\text{N}$ ) o pesados ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ ), durante el cultivo de líneas celulares (Ong et al., 2002). Este método puede ir unido a una posterior separación de proteínas por 2-DE o mediante separación e identificación de péptidos por LC-MS.

### 3.3.3. Marcaje enzimático con $^{18}\text{O}$

El marcaje enzimático utilizando agua  $^{18}\text{O}$ , durante o después de la digestión triptica, permite subsanar de una forma asequible algunas de las limitaciones de los métodos descritos anteriormente, aunque se trata de una técnica laboriosa y difícil de poner a punto. Consiste en incubar en presencia de tripsina cada una de las muestras que han sido digeridas previamente de forma triptica ya sea con  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  o con  $\text{H}_2\text{O}^{16}$ . La tripsina introduce uno o dos átomos de  $^{18}\text{O}$ , en el C-terminal de cada péptido. Aunque originalmente el marcaje enzimático se llevaba a cabo durante la etapa de digestión triptica, hoy en día se prefiere primero llevar a cabo la digestión y posteriormente el marcaje; ello permite optimizar las condiciones de estas etapas por separado, lo que redundaría en una mejor eficiencia del método. Después de la etapa de marcaje, las muestras marcadas con  $^{16}\text{O}$  y con  $^{18}\text{O}$  se mezclan y se analizan conjuntamente por LC-MS. La ventaja de esta aproximación es que es altamente sensible, al tratarse de una reacción enzimática no da lugar a reacciones químicas secundarias y su aplicación es prácticamente universal, ya que se basa en una de las etapas genéricas del proceso, la digestión triptica [Yao, 2003 #16; Yao, 2003 #16; Yao, 2003 #3444; Yao, 2003 #16; Yao, 2003 #16; Yao, 2003 #16; Yao, 2003 #16; Yao, 2003 #16], (Lopez-Ferrer et al., 2006).

Uno de los problemas asociados a este tipo de marcaje isotópico es que la eficiencia de incorporación de  $^{18}\text{O}$  no es siempre completa en todos los péptidos y por tanto se pueden producir cambios de expresión artificiales. En un trabajo reciente llevado a cabo en el laboratorio de Jesús Vázquez (Ramos-Fernandez et al., 2007) se demuestra que este tipo de marcaje isotópico estable usado conjuntamente con algoritmos matemáticos adecuados es una alternativa robusta para el estudio dinámico del proteomas. El método se basa en un avanzado algoritmo de cuantificación desarrollado específicamente para este tipo de marcaje y que se basa en el análisis del proceso cinético de intercambio de oxígenos. Con este procedimiento se logra al mismo tiempo un cálculo exacto de la proporción relativa de los péptidos en las muestras originales y un cálculo preciso de la eficiencia del marcaje de cada uno de los péptidos. Con esta aproximación se ha demostrado que se eliminan los artefactos producidos por intercambio incompleto de oxígeno en subgrupos de péptidos que tienen una eficiencia de marcaje relativamente baja, y que puede considerarse indicativo de

desviaciones al momento de referirnos a un cambio de expresión en una proteína resultando ser un falso positivo. Con la aplicación de este modelo, al permitir un control completo sobre los posibles artefactos, se logra contribuir en mejoras a la automatización de los procedimientos de cuantificación relativa de proteínas donde se utiliza el marcaje isotópico para entender mejor los posibles cambios de expresión en un proteoma en particular. Este algoritmo ha sido incorporado en el programa de cuantificación QuiXot, desarrollado por Pedro J. Navarro, y debido a sus excelentes prestaciones ha sido el método de marcaje isotópico usado en este estudio.

## 4. OBJETIVOS

Partiendo de la falta de conocimiento sobre los mecanismos moleculares de cardioprotección y de la importancia del preconditionamiento isquémico además de otros aspectos críticos que siguen siendo desconocidos, y teniendo en cuenta el estado actual de las tecnologías proteómicas, los objetivos que nos proponemos abordar en este trabajo son los que se indican a continuación:

1.- Desarrollar una metodología que permita un análisis de alta sensibilidad de péptidos específicos en muestras complejas, validándolo en un modelo biológico de disfunción cardiovascular.

2.- Desarrollar un método eficiente para la identificación masiva de proteínas aplicable a preparaciones de membrana mitocondrial provenientes de tejido de corazón de ratas sometidas a preconditionamiento isquémico.

3.- Desarrollar un método eficiente para la cuantificación a gran escala de proteínas de membrana mitocondrial mediante marcaje isotópico con  $^{18}\text{O}$ .

4.- Determinar, empleando las técnicas desarrolladas, cuáles son las proteínas mitocondriales que cambian de expresión en el proteoma de la membrana mitocondrial de corazón de rata en respuesta a un proceso de preconditionamiento isquémico.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos

Todos los reactivos y productos son de grado analítico y han sido suministrados por distintas casa comerciales: Sigma, Merck, Fluka, Thermo-Fisher. Se han utilizado además una serie de productos más específicos cuya procedencia se indica en el texto.

### 5.2. Modelos de preconditionamiento isquémico del miocardio

El preconditionamiento isquémico del miocardio de las ratas fue llevado a cabo por el grupo del prof. David García-Dorado, en el Hospital Vall d'Hebron (Barcelona). Se emplearon ratas macho de 3 meses de edad de la raza Sprague-Dawley. Los animales se sacrificaron con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital (150 mg/Kg). Los corazones se extrajeron rápidamente y se sometieron a perfusión retrógrada con solución oxigenada de Krebs (NaCl 118 mM, HCO<sub>3</sub> 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, glucosa 11 mM, pH 7.4) en un aparato de Languendorff (Rodríguez-Sinovas et al., 2007). Tres corazones fueron sometidos a 20 min de perfusión normóxica mientras que otros tres corazones fueron sometidos a 2 ciclos de preconditionamiento de isquemia de 5 minutos seguido de 5 minutos de reperfusión (ciclos de preconditionamiento isquémico) (Boengler et al., 2005).

En otros experimentos de preconditionamiento isquémico del miocardio se han usado muestras provenientes de ratones knock-in homocigóticos para Conexina 32 (Cx43KI32/32) y ratones de fenotipo salvaje (wild type) homocigóticos para Conexina 43 (Cx43KI43/43).

Para los otros ensayos citados donde el objetivo era validar los procesos y métodos de análisis estadístico utilizando los algoritmos diseñados en el laboratorio se utilizaron muestras de naturaleza animal (extractos de proteínas de ganglios linfáticos porcinos) pero no relacionada con el modelo biológico bajo estudio aquí presentado.

### 5.3. Aislamiento de mitocondrias

La preparación de mitocondrias y la extracción de proteínas se llevaron a cabo por el grupo del prof. David García-Dorado. Las mitocondrias cardíacas se aislaron del tejido de corazón de rata tal y como se describe en (Ruiz-Meana et al., 1999), con algunas modificaciones según el protocolo descrito en (Holmuhamedov et al., 1998). El tejido de corazón se troceó en tampón de aislamiento (manitol 200 mM, sacarosa 50 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5mM, HEPES 5.9 mM, pH 7.15) en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas (Ulrich et al., 1998) BSA al 0.1 % y EGTA al 0.038 %, homogeneizándolo en frío con un Politrón (3 ciclos de 20 minutos). El extracto homogenado se centrifugó a 750 g durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 7000 g durante 20 min. El pellet de mitocondrias se resuspendió en tampón de aislamiento con BSA al 0.1 % y se centrifugó a 3000 g durante 20 min. De nuevo el pellet se resuspendió en tampón de aislamiento con BSA al 0.1 % y Percoll al 19 % y se centrifugó a 12500 g durante 10 min. El pellet de membrana mitocondrial se lavó en tampón de aislamiento (sin BSA ni EGTA) por centrifugaciones a 10000 g durante 5 minutos, se cuantificó la concentración de proteínas en los extractos mediante el método de (Bradford, 1976) y se guardó a -80 °C hasta su uso.



#### **5.4. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las muestras se hirvieron 5 min en tampón Laemmli (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0.01 %). Las proteínas se separaron en gel 1-DE desnaturizante al 10-12 % de poliacrilamida; estas condiciones se escogieron para conseguir la mejor resolución de las bandas de proteínas. Se aplicaron 100 µg de proteínas en geles pequeños (7 x 10 cm, 1.5 mm de grosor), usando el sistema Mini-Protean®3 (BioRad, Hercules, USA), aplicando un voltaje de 130 V durante 1h. Para 300 µg de proteínas se utilizaron geles grandes (16 x 18 cm, 1.5 mm de grosor), usando el sistema SE600 (Hoefer Scientific Instrument, California, USA), a 50 V overnight. La tinción de los geles se realizó con Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad).

#### **5.5. Digestión en gel y marcaje isotópico**

##### **5.5.1. Cortes de gel**

Para cada ensayo se generaron cantidades diferentes de fracciones dependiendo del tamaño del gel y de la cantidad de muestra. Los geles pequeños (7 x 10 cm) se cortaron en 5 porciones, conteniendo cada una de ellas aproximadamente 20 µg de proteínas. Los geles grandes (16 x 18 cm) se cortaron en 10 ó 11 porciones, en función de la separación de las proteínas. Para obtener las porciones de gel utilizamos una plataforma de cristal con un patrón milimetrado de fondo que facilitó la precisión de los cortes. Cortamos en forma vertical el carril o patrón de bandas procurando hacer cortes de 0.5 cm x 0.5 cm. Los cortes se realizaron en los extremos laterales pero en zonas o área limpias del gel. Para definir los cortes dentro del patrón de bandas, se tomó como referencia las zonas mas claras y se definieron como lugar de corte en el diagrama esquemático digitalizado. Se definió cada porción del carril como una fracción diferente. Cada trozo de gel se lavó y se hidrató por separado en un tubo de 2 ml con 500 µl de agua (grado HPLC) durante 10 minutos en agitación, procurando que todo el gel esté en contacto con el agua. Tras la hidratación se eliminó el agua y los geles se deshidrataron con 160 µl de ACN (grado HPLC) al 100 %, durante 10 minutos en agitación, al cabo de los cuales se eliminó el sobrenadante.

##### **5.5.2. Digestión triptica en gel**

Las proteínas se sometieron a un tratamiento de reducción de los puentes disulfuro de los residuos de cisteína y alquilación de los grupos tioles generados, para facilitar la digestión con tripsina. La reducción se realizó en 500 µl de DTT 6.5 mM en tampón bicarbonato amónico 25 mM (pH 8.8) (BA) durante 1 hora a 56 oC, en agitación. Finalizada la incubación se retiró el sobrante. Para la alquilación se utilizaron 500 µl de iodoacetamida (IAA) 54 mM en 500 µl de BA 25 mM (pH 8.8) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad. Tras la incubación se retiró el sobrenadante y se rehidrató el gel con 200 µl de BA 25 mM (pH 8.8) durante 5 minutos en agitación. Pasados los 5 minutos, añadimos la misma cantidad de ACN al 100 % e incubamos durante 15 minutos en agitación. Retiramos el sobrenadante y secamos el gel en un evaporador centrífugo (SPD121P, Savant Speed Vac, Milford, Na, USA) durante una 1 hora aproximadamente hasta lograr que el gel esté completamente seco. Posteriormente, mezclamos los fragmentos secos procedentes de la misma porción de gel e incubamos con tripsina porcina (Promega, Madison, WI, USA) resuspendida en tampón de digestión (BA 25 mM pH 8.8, ACN 10%, CYMAL 0.01% (Fluka)) en una proporción enzima:sustrato de 1:20



(p/p), de donde se obtuvieron los péptidos trípticos (Shevchenko et al., 2006). Procurando siempre verificar que el pH del tampón es el correcto, resuspendimos 6 µg de tripsina por fracción. Para garantizar una absorción completa de la tripsina en el gel, antes de la digestión se incubó la mezcla de reacción a 4 °C durante una hora. Tras esta incubación, el gel absorbe todo el volumen de reacción y se añade el mismo volumen de tampón BA 25 mM (pH 8.8). El volumen final de reacción equivale a 600 µl por tubo, lo que en términos de concentración es igual a 0.01µg tripsina/µl de reacción. Incubamos la mezcla de reacción durante 12 horas a 37°C en agitación. Tras la digestión, recuperamos el sobrenadante con los péptidos trípticos. Añadimos el mínimo volumen de tampón BA 12 mM (pH 8.8) a los cortes de gel con el propósito de hacer dos lavados posteriores a la digestión y recuperar más péptidos trípticos e incubamos durante 1 hora, en agitación y a 37 °C. Se mezclan los volúmenes recuperados de los dos lavados con el correspondiente a la reacción de digestión original. La muestra se acidificó con TFA al 1.0 % para detener la reacción. Tomamos una alícuota (1/10 de muestra) para confirmar que la digestión tríptica ha sido completa analizándola en la trampa iónica MS desalándola previamente mediante Zip-Tip C18 (Billerica, MA, USA). Una vez confirmada la digestión total con la alícuota de prueba se desaló la muestra completa mediante cartuchos de desalado C18 (OASIS, Waters, Massachusetts, USA). El cartucho de desalado se lavó previamente con 1 ml ACN al 50 %, seguido de 1 ml de ACN al 100 % y se equilibró con 1 ml TFA al 0.1 %. Se introdujo la muestra por la parte superior del cartucho y se lavó con 5 ml de TFA al 0.1 %, eluyendo finalmente los péptidos con 400 µl TFA 0.1 %/ACN 50 %.

### **5.5.3. Marcaje enzimático con <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O**

Al conjunto de péptidos desalados se le añadieron 120 µl de acetato amónico 1 M (pH 6.0) y los secamos en evaporador centrífugo durante 2 horas. Por otra parte, acondicionamos la tripsina a ser utilizada para el marcaje con <sup>18</sup>O: usamos tripsina inmovilizada (Pierce, Rockford, IL, USA) en una proporción de 200: 1 (µl enzima: mg proteína). Lavamos la tripsina con acetato amónico 500 mM (pH 6.0), centrifugando a 12.000 g durante 5 minutos (3x) y la secamos durante 1 hora. A continuación, resuspendemos la tripsina seca en 30 µl del agua correspondiente para cada caso H<sub>2</sub><sup>16</sup>O/H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (Isotech, Sigma-Aldrich, Miamisburg, OH, USA). Resuspendemos los péptidos secos en 7.8 µl de ACN al 100% (20 % concentración final) y los sonicamos durante 5 minutos. Añadimos la tripsina con el agua H<sub>2</sub><sup>16</sup>O/ H<sub>2</sub><sup>18</sup>O al tubo de los péptidos e incubamos la mezcla de reacción en agitación fuerte a 37 °C durante 12 horas (Serrano, 2007). Tras el marcaje tomamos una alícuota (1/10 de muestra) para confirmar la incorporación del <sup>18</sup>O, desalando previamente con puntas Zip-Tip C18 equilibradas con formato amónico 5 mM (pH 3.0).

Una vez comprobado un marcaje eficiente (Ramos-Fernandez et al., 2007), paramos la reacción enzimática reduciendo la tripsina utilizada en el marcaje con 10 mM de DTT en ACN y alquilando con 30 mM de IAA . Mezclamos la muestra marcada con <sup>16</sup>O con la marcada con <sup>18</sup>O (1:1, v/v) y diluimos la mezcla para bajar la concentración de ACN del 20 al 1.5 % con 1 ml de formato amónico 5 mM (pH 3.0). Desalamos los péptidos marcados con cartuchos de C18 (Oasis) eluyendo con 400 µL de formato amónico 5 mM (pH 3.0), dividimos cada muestra en 6 alícuotas, las secamos y las guardamos a -20 °C hasta su posterior análisis mediante espectrometría de masas.

### **5.6. Configuración y acoplamiento de un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con un inyector de muestras automático y una trampa iónica lineal MS/MS**

Se emplearon dos equipos de espectrometría de masas de trampa iónica lineal LTQ (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) acoplados a un HPLC (LC) con un diseño distinto de conexión externa. Estos diseños se muestran en la figura 3, junto a otras configuraciones comúnmente utilizadas en el acoplamiento líquido-masas de este tipo de equipos. Cada LTQ se acopló a un inyector automático de muestras de la misma casa comercial (AS). A escala micro se utilizaron tubos (Peek Polymer Tubing, (Supelco, Pennsylvania, USA) con diferentes diámetros internos para obtener un flujo de 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  hasta el tramo de la entrada a la trampa iónica. Para ambos sistemas de unión se emplearon dos tipos de columnas de cromatografía de fase reversa. Una de ellas, en disposición de pre-columna desaladora, (BioBasic-18, 30 x 0.32 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, Thermo-Electron), y la otra en disposición de columna analítica (BioBasic-18, 150 x 0.18 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, Thermo-Electron). Los solventes utilizados fueron: A (ácido fórmico 0.1 %) y B (ácido fórmico 0.1 % / acetonitrilo 80 %).

En este trabajo hemos usado varios sistemas de acoplamiento líquido masas, que comentaremos aquí brevemente en relación a otros descritos en la bibliografía. Cuando se dispone de dos bombas el acoplamiento convencional, como el que se esquematiza en la figura 3 (modelo C), permite controlar por separado el flujo necesario para inyectar la muestra y el flujo que se requiere para el gradiente de la columna analítica. La ventaja de este sistema es que la inyección de la muestra en el cartucho o precolumna se lleva a cabo con una bomba diferente a la que se utilizar para generar el gradiente a través de la columna analítica. Cuando sólo se dispone de una bomba, una configuración muy usada para acoplar el inyector automático es la que se presenta en la figura 3 (modelo D). En el momento de llevar a cabo esta tesis en nuestro laboratorio hemos usado dos configuraciones diferentes, que llamaremos A y B y que pueden considerarse variantes de la configuración D. El modelo A (figura 3) se caracteriza por presentar una bifurcación o “Split” ubicada después del inyector de muestras automático (AS), siendo la válvula la que determina cuando pasa la muestra por el sistema a un flujo de 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  o de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , con la asistencia controlada de la programación a nivel del ordenador (figura 3, arriba a la izquierda). Esto se refiere a la configuración en modo cargar “LOAD” o configuración en modo inyectar “INJECT”. El modo “LOAD” es cuando se favorece el movimiento de la muestra desde el AS hasta la Pre-Columna a un flujo más bajo (10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) durante 10 min, permitiendo que la válvula de paso a una salida donde se descartan las sales no deseadas y que entorpecen e interfieren en el proceso de ionización. Cuando la válvula esté en modo INJECT el sistema permite el paso de la muestra de la Pre-columna (Pre-C) a la Columna (C) y es entonces cuando la muestra llegua hasta la entrada de la trampa (MS) a un flujo de 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Esto, acoplado al control que ejerce un ordenador que determina el paso del gradiente de tampón acuoso a tampón orgánico antes descrito, entre otros parámetros. De esta forma los péptidos tripticos paulatinamente y de acuerdo a su hidrofobicidad se van eluyendo de la columna para ser ionizados y analizados en el MS. Otro detalle que caracteriza este modelo es el uso de una columna de fase reversa C8 (Vydac 208TP52) como sistema generador de presión (identificada en la figura 1 con la letra C).

La configuración correspondiente al modelo B (figura 3) consta de un LC donde la bifurcación o “Split” esta ubicado antes del inyector automático (AS) y al igual que en la configuración del Modelo A, la válvula determina cuando pasa la muestra por el sistema a 2

$\mu\text{l}/\text{min}$  o a  $10 \mu\text{l}/\text{min}$ . En este sistema también utilizamos la Columna de fase reversa C8 como sistema generador de presión.

La configuración E, desarrollada durante el curso de este trabajo, se esquematiza y discute en más detalle en la sección de Resultados.

Con las configuraciones seleccionadas y aquí descritas como las letras A, B y E se realizaron distintas pruebas utilizando como muestra estándar 150 fmoles de péptidos trípticos de albúmina de suero porcino comercial (Michrom Bioresources Inc, Auburn, California, USA). Los péptidos se eluyeron en un gradiente de 35 minutos de 5 a 40 % de tampón B (ácido fórmico 0.1 % / acetonitrilo 80 %) y se analizaron en la trampa iónica mediante una combinación de modos de barrido FullScan-ZoomScan-MS/MS, comúnmente llamado “TriplePlay”, en un rango de  $m/z$  de 400 a 1600 (Jorge et al., 2007). Se determinó 20 segundos de tiempo de exclusión dinámica (DE), permitiendo la fragmentación una sola vez del ión parental. Los parámetros del ZoomScan, el número de microscans y la energía de colisión aplicada utilizados se describen en (Lopez-Ferrer et al., 2006).

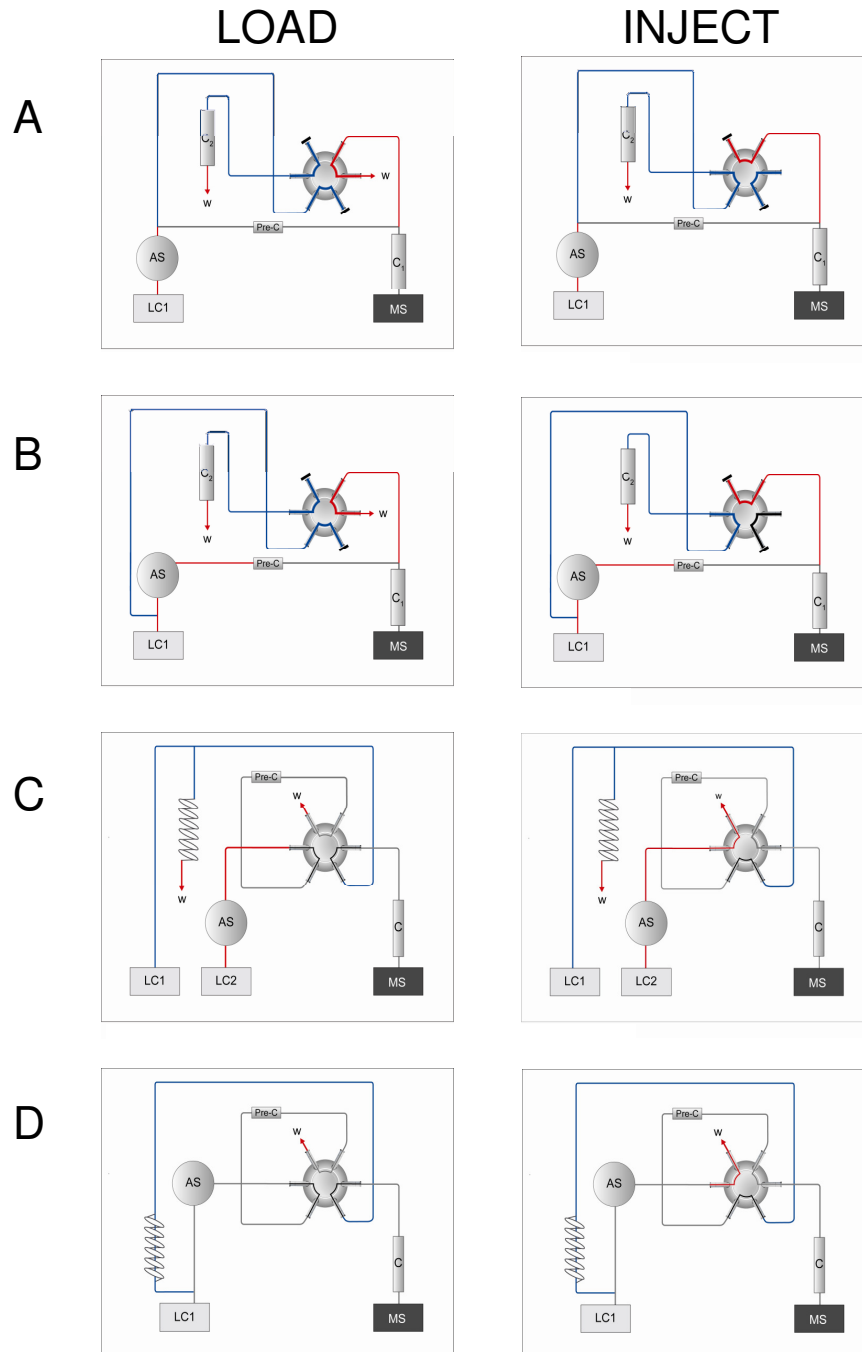


Figura 3. Modelos de sistemas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con un inyector de muestras automático (AS) y una trampa iónica lineal MS/MS esquematizados y contrastados. C: Columnas fase reversa, W: residuos, LC: HPLC, V: Válvula.

## 5.7. Análisis por espectrometría de masas

El análisis de péptidos mediante espectrometría de masas se realiza, en parte, con la utilización de uno de los sistemas propuestos (Modelos E), compuesto por un sistema HPLC Surveyor (LC) acoplado a un espectrómetro de masas modelo LTQ (MS) (Thermo electron). Los péptidos se desalaron en una columna BioBasic C18 de 0.32 x 30 mm (Thermo Electron) y se separaron en una columna BioBasic C18 de 0.18 x 150 mm (Thermo Electron), eluidos a un flujo de 2  $\mu$ l/min y utilizando un gradiente de 5 a 40 % tampón B, (tampón A: ácido fórmico al 0.1 % (v/v), tampón B: ácido fórmico al 0.1 % (v/v), ACN al 80 % (v/v)) durante 225 minutos. La trampa iónica es programada con 6 modos de barrido ZoomScan y MS/MS alternados por cada FullScan, permitiendo la cuantificación y la identificación de los péptidos simultáneamente (los 6 primeros iones más intensos detectados en cada FullScan) (Jorge et al., 2007). Se aplicó una energía de colisión del 35 %, una rendija de apertura de 3 Da para fragmentar el ión parental y una exclusión dinámica de 180 min, permitiendo fragmentar el mismo ión dos veces (Lopez-Ferrer et al., 2006). Cada alícuota perteneciente a una porción de gel se analizó en un rango de m/z diferente: Una alícuota se analizó con el rango de m/z total, de 400 a 1600, para tener un perfil completo de la muestra. Las 5 alícuotas restantes se analizaron en otros rangos de m/z más estrechos, definidos como: R1 (400-599 m/z), R2 (600-699 m/z), R3 (700-799 m/z), R4 (800-899 m/z), y R5 (900-1200 m/z).

### 5.7.1. Identificación y cuantificación relativa de péptidos de conexina 43 y conexina 32 mediante la técnica SMIM

Mediante SDS-PAGE se separaron las proteínas de un extracto proveniente de membranas aisladas de discos intercalares de rata. Se recortó las bandas del gel correspondientes a conexina 43 y conexina 32 y se digirieron con tripsina. Los péptidos tripticos resultantes se analizaron mediante espectrometría de masas. Los espectros MS/MS obtenidos se enfrentaron a una base de datos de rata.fasta y mediante SEQUEST se identificaron varios péptidos de cada una de las proteínas, conexina 43 y conexina 32 (metodología descrita previamente). Utilizando una muestra de membranas mitocondriales de cardiomiocitos y de hígado de rata, se realizó una SDS-PAGE en las mismas condiciones y se digirieron las proteínas de la misma fracción del gel anterior. Los péptidos tripticos obtenidos se analizaron mediante espectrometría de masas programando la trampa iónica con el método SMIN, que permite programar la fragmentación MS/MS y MS3 (Ver Figura 4.) de iones pertenecientes a péptidos específicos en una trampa iónica lineal, tal y como se describe previamente (Jorge et al., 2007). Mediante las trazas obtenidas en el cromatograma de los iones precursores de los péptidos y de los fragmentos de los espectros MS/MS y MS3 se pudo determinar la presencia y la abundancia relativa de estos iones en comparación con otros utilizados como control, en distintas muestras analizadas.

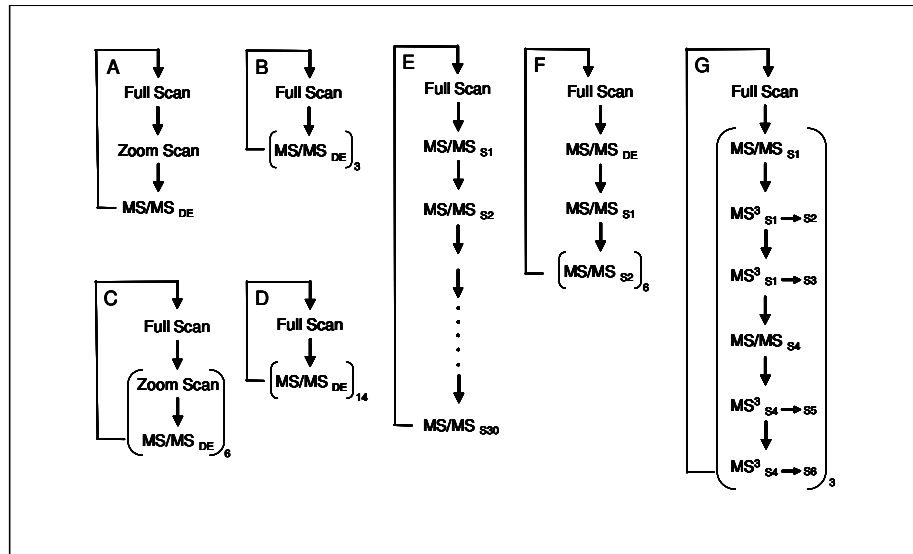


Figura 4. Esquema de posibles configuraciones en LTQ

### 5.7.2. Identificación y cuantificación masiva de proteínas

La identificación de las proteínas se realizó tal y como describimos anteriormente (Lopez-Ferrer et al., 2004). Los espectros de fragmentación MS/MS de los archivos .raw obtenidos del espectrómetro de masas se enfrentaron a una base de datos de mamífero.fasta usando como motor de búsqueda SEQUEST (Bioworks 3.1 package, Thermo Finnigan). La misma colección de espectros de fragmentación MS/MS se enfrentó a una base de datos aleatoria (invirtiendo las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la base de datos real). Los parámetros de búsqueda utilizados incluían una tolerancia de la masa del ión precursor de 2 Da y en los fragmentos de 1.2 Da. Además se utilizó la carbamidometilación de residuos de Cys como modificación fija (+57 Da) y la oxidación de residuos de Met (+16 Da) y la posible incorporación de 2 átomos de <sup>18</sup>O en residuos de Lys y Arg (+4 Da) como modificaciones variables. La significancia de la identificación de péptidos se determinó calculando la tasa de error (FDR), definida como el número de falsas identificaciones encontradas al azar en una población total de péptidos identificados. Este parámetro se calculó mediante el método estadístico Probability Ratio (Martínez-Bartolomé, 2007) utilizando el programa pRatio desarrollado por Pedro Navarro.

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo a partir de la distribución de los ratios de abundancias <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O a escala logarítmica. Las medidas de los ratios de abundancia isotópica se llevaron a cabo de forma automática a partir de los espectros ZoomScan obtenidos en la trampa iónica, utilizando una aplicación desarrollada por Pedro Navarro en nuestro laboratorio (QuiXoT) (Navarro, 2007). La principal ventaja de este método es la facultad de estimar la eficiencia de marcaje durante el proceso de cuantificación, lo que permite obtener medidas muy robustas incluso cuando la incorporación de átomos de <sup>18</sup>O tiene un rendimiento bajo. Sólo se cuantificaron los espectros ZoomScan correspondientes a péptidos identificados con una tasa de error del 5 %. La veracidad de los cambios de expresión se determinó mediante el cálculo de la tasa de error (FDR), definida en este contexto como la proporción de proteínas que se espera que muestren un cambio de expresión al azar entre la población de proteínas que muestran un cambio de expresión significativo (Ramos-Fernandez et al., 2007).

### 5.7.3. Modelo Estadístico

El modelo estadístico para este trabajo ha sido desarrollado por Pedro Navarro y está descrito en I. Jorge et al (2008) próximo a ser publicado como “Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  labeling and linear ion trap mass spectrometry: Application to the study of VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells” y a continuación se citan los parámetros y se ilustran las formulas utilizadas.

En principio el modelo se ha desarrollado y enfocado inicialmente para el análisis aplicado a muestras procedente de un proteoma digerido en solución y marcado con  $^{18}\text{O}$ . En el caso particular del estudio del proteoma de membrana de mitocondria, son muestras con la peculiaridad de ser procesadas por SDS-PAGE y con un patrón de digestión y marcaje de forma fragmentada haciendo que resulte interesante el comparar las similitudes y diferencias en el análisis.

### 5.7.4. Cuantificación de péptidos y análisis estadístico

La cuantificación de péptidos a través de espectros de ZoomScan se describe en [14, 16], y se efectua utilizando el programa desarrollado en nuestro laboratorio por Pedro Navarro llamado QuiXoT, Este programa, al incorporar los archivos RAW generados en el espectrómetro de masas (LTQ) facilita la cuantificación de péptidos resultantes [42]. La cuantificación a través del programa QuiXoT se realiza usando un algoritmo descrito anteriormente [14]. Se usaron los espectros ZoomScan correspondientes al ajuste de los péptidos con una tasa de error de identificación inferior al 5% (FDR) para la cuantificación. Los espectros de ZoomScan se ajustaron a una curva teórica, de forma que el mejor ajuste de parámetros permite una determinación simultánea de la concentración de péptido en las dos muestras (A y B, respectivamente, expresados en unidades de área), y determinar la eficiencia del marcaje ( $f$ ) [14]. La proporción de los péptidos no marcados, y mono o di-marcados en la muestra (B0, B1 y B2, respectivamente) puede calcularse a partir de estos parámetros, tal como se describe en [14]. La curva teórica utilizada para el ajuste de los espectros es una mezcla de distribuciones Gaussiana y doble exponencial [14], y no se impusieron limitaciones numéricas a los parámetros durante el proceso de ajuste. Para eliminar las malas cuantificaciones se utiliza el parámetro para el valor optimo del ajuste es  $\sigma$  (parámetro de escala que determina la mitad de ancho del pico),  $\beta$  (proporción relativa de doble componente exponencial) y la eficiencia de marcaje  $f$ . El valor típico de  $\sigma$  para el LTQ, bajo las condiciones de escaneo utilizadas en este trabajo, que se describen en [16], es alrededor de 0,085 Da; el aumento de este valor indica que las curvas ajustadas no tienen sentido físico y no pueden describir la envoltura isotópica de un pico. De forma similar, los valores de  $f$  o  $\beta$  superiores a uno son indicativos de que, tanto la curva obtenida como la curva teórica no solapan adecuadamente, o la envoltura isotópica de los picos observados no puede ser explicada por la superposición de los tres componentes peptídicos (sin marcar, mono y di-marcado), respectivamente. Por lo tanto, el primer paso para efectuar un filtrado automático de los ZoomScan se efectuó utilizando las siguientes parametos:  $\sigma > 0.12$ ,  $\beta > 1.1$  y  $f > 1.2$ .

### 5.7.5. Cálculo del peso estadístico del ajuste

Como se ha descrito anteriormente, los espectros de ZoomScan se ajustaron a una función teórica que depende de la concentración de péptidos en las dos muestras. Expresando en relación a las concentraciones de los péptidos en escala logarítmica en base 2, si  $A$  y  $B$  son la cantidades de péptidos expresados en unidades de superficie en la muestra control y la muestra tratada, respectivamente, el resultado de una cuantificación del scan ( $s$ ), proveniente del péptido ( $p$ ) derivado de la proteína ( $q$ ) puede expresarse como  $x_{qps} = \log_2(A/B)$ . El peso del ajuste a nivel de scan se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$v_{qps} = \frac{T^2}{MSDc + MSDl} \quad (1)$$

Donde  $T$  es la medida de la concentración de péptidos en unidades de área,  $MSDc$  es la desviación cuadrática media entre el espectro de ZoomScan teórico y el ZoomScan experimental en torno a una ventana central que abarca el conjunto de picos isotópicos y  $MSDl$  es la desviación cuadrática media en torno a una ventana lateral a la izquierda o la derecha del clúster isotópico. Entonces, si  $A + B_0 > B_1 + B_2$  la ventana lateral se toma a la izquierda y entonces  $T = A$ , y de otra manera la ventana lateral se considera a la derecha y entonces  $T = B$ . Este procedimiento garantiza que el peso del ajuste es proporcional al valor cuadrado de la concentración del péptido e inversamente proporcional a la varianza de la función teórica, además, esto garantiza que el peso no sufra una brusca disminución cuando hay grandes cambios de expresión y también tiene en cuenta la presencia de señales adyacentes cuando artefactos puedan interferir con la cuantificación. La varianza en los valores  $\log_2$  ratio se calcula a partir del peso del ajuste aplicando la siguiente fórmula  $\sigma_{LR}^2 = k/v_{qps}$ , donde  $k$  es una constante que para el equipo LTQ y las condiciones del escaneo utilizadas en este trabajo toma el valor de 0,17.

### 5.7.6. Cálculo de la media ponderada y las varianzas a nivel de scan, péptido y proteína.

El modelo estadístico utilizado para analizar los datos de este trabajo fue desarrollado por Pedro Navarro en el laboratorio de J. Vázquez y ha sido validado durante el análisis de otros proteomas anteriores. Cuando la cantidad de proteína en las dos muestras es idéntica  $x_{qps} = 0$ . La desviación experimental de este valor se supone que procede de un error sistemático  $\mu$ ; proveniente de la desviación de la concentración de proteínas, el efecto de variabilidad biológica, errores cometidos durante el proceso de preparación de los extractos de proteínas,  $\rho_q$ ; de las desviaciones en concentración de péptido debidas a la obtención de los mismos mediante la digestión de las proteínas  $\beta_{qp}$ , y de los errores cometidos durante la cuantificación de pares de péptidos a partir de sus scans,  $\xi_{qps}$ , de forma que

$$x_{qps} = \mu + \rho_q + \beta_{qp} + \xi_{qps} \quad (2)$$



Asumiendo que  $\beta_{qp}$  y  $\rho_q$  se distribuyen normalmente, es decir,  $\beta_{qp} \sim N(0, \sigma_p^2)$  y,  $\rho_q \sim N(0, \sigma_Q^2)$  y las varianzas de los péptidos y las proteínas,  $\sigma_p^2$  y  $\sigma_Q^2$ , respectivamente, son constantes. También se supone que  $\xi_{qps}$  se distribuye normalmente, es decir  $\xi_{qps} \sim N(0, \sigma_s^2 + k/v_{qps})$ , donde  $\sigma_s^2$  es la varianza del scan, y  $v_{qps}$ , es el peso del ajuste y  $k$  es la constante descrita en la sección anterior.

El valor del  $\log_2$ -ratio asociado a cada péptido es calculado como un promedio ponderado de los scans utilizados para cuantificar el péptido, y el valor asociado a cada proteína es igualmente calculado por el promedio ponderado de sus péptidos. Además, un “gran promedio” se calcula como media ponderada de los valores de las proteínas. El peso estadístico asociado a cada scan, péptido y proteína es la inversa de sus varianzas locales, mientras que el inverso de las varianzas de los valores promedio es la suma de las inversas de las diferencias de los valores utilizados para calcular la media. Por lo tanto, el peso estadístico está dado por

$$w_{qps} = \frac{1}{\frac{k}{v_{qps}} + \sigma_s^2} \quad (3); w_{qp} = \frac{1}{\sum_s w_{qps} + \sigma_p^2} \quad (4); w_q = \frac{1}{\sum_p w_{qp} + \sigma_Q^2} \quad (5)$$

Y el promedio de los péptidos y las proteínas y la gran media se obtienen por:

$$x_{qp} = \frac{\sum_s w_{qps} x_{qps}}{\sum_s w_{qps}} \quad (6); x_q = \frac{\sum_p w_{qp} x_{pq}}{\sum_p w_{qp}} \quad (7); x = \frac{\sum_q w_q x_q}{\sum_q w_q} \quad (8)$$

El algoritmo utilizado para calcular los valores de  $\sigma_s^2$ ,  $\sigma_p^2$  y  $\sigma_Q^2$  así como sus correspondientes intervalos de confianza se describe en la información complementaria en un artículo que está en proceso de revisión editorial (Jorge I, 2008).

Como se ha comentado, las varianzas locales a nivel de scan y los promedios por péptidos y por proteínas son la inversa de los pesos de los scans y se describen en las ecuaciones 3-5, respectivamente. Estas varianzas pueden ser utilizadas para determinar si un valor particular se desvía significativamente de su media más de lo esperado de acuerdo con el supuesto de distribución normal. Definiendo  $P(\mu, \sigma^2, x_t)$  como las probabilidades de dos colas de que los valores  $x_t$  producidos por la muestra  $t$  se desvíen de la distribución normal con media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$ , las probabilidades de que una determinada medida de scan, péptido o proteína sea un outlier con respecto a la correspondiente media puede estimarse, respectivamente, por

$$p_{qps} = P(x_{qp}, w_{qps}^{-1}, x_{qps}) \quad (9); p_{qp} = P(x_q, w_{qp}^{-1}, x_{qp}) \quad (10);$$

$$p_q = P(x, w_q^{-1}, x_q) \quad (11)$$

La detección de la presencia de valores anómalos (outliers) se realiza controlando la tasa de falsas identificaciones (FDR) [43-46], definida como la proporción de los valores que se espera que se desvíen por pura casualidad dentro de la población de los valores observados. Dado que el número de cambios aleatorios es el producto de la probabilidad, tal

como se define en la ecuación 9-11, por el número total de determinaciones en cada nivel, el FDR en cada uno de los tres niveles se calcula

$$FDR_{aps} = \frac{p_{aps} \cdot NS}{O(p_{aps})} \quad (12); \quad FDR_{qp} = \frac{p_{qp} \cdot NP}{O(p_{qp})} \quad (13); \quad FDR_q = \frac{p_q \cdot NQ}{O(p_q)} \quad (14)$$

siendo  $NS$ ,  $NP$  y  $NQ$  los números totales de scans, péptidos y proteínas, respectivamente, y  $O(p)$  es el número observado de valores detectados en cada población con una probabilidad igual o inferior a la  $p$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Puesta a punto de un sistema para el análisis masivo de proteomas por espectrometría de masas

A la hora de abordar el análisis de un proteoma entero o el monitoreo de los péptidos de una proteína en particular es necesario una aproximación adecuada que permita un análisis masivo de péptidos, con el mayor rendimiento posible y la mejor resolución de los espectros MS/MS para una identificación significativa de los péptidos. Los sistemas de microHPLC convencionales utilizan normalmente un sistema de bifurcación de flujo. Este sistema sirve para conseguir flujos del orden de 1 ul/min en columnas de diámetro interno de alrededor de 150 micras con una bomba capaz de suministrar flujos del orden de centenares de ul/min. Para ello se sitúa un restrictor de presión que mantiene la presión del sistema a los flujos adecuados para la bomba (normalmente un trozo de tubería de diámetro interno muy pequeño o una columna de HPLC convencional). Esta presión genera un flujo mucho más pequeño en el ramal donde está la columna analítica. Hay varias formas de acoplar un inyector automático (AS) a un sistema de microHPLC con bifurcación de flujo.

Cuando sólo se dispone de una bomba, una configuración muy usada para acoplar el inyector automático es la que se presenta en la figura 6 (modelo D en la figura 3, sección de Material y Métodos). En nuestro laboratorio nosotros usamos una configuración parecida, pero no idéntica Figura 3 (modelo A). El uso del modelo A o del modelo D es una cuestión de preferencias personales. La configuración A tiene la desventaja de que el inyector automático está situado antes del restrictor y por ello el restrictor puede contaminarse con trazas de la muestra; sin embargo, en nuestra experiencia este problema no tiene lugar prácticamente nunca. Por otra parte, esta configuración tiene la ventaja de que cerrando la salida W en posición LOAD y operando a un flujo del orden de microlitros por minuto, es posible determinar cuál es la presión de trabajo requerida por la microcolumna, lo que resulta en la práctica muy útil para poner a punto el sistema de bifurcación de forma rápida y directa. Esto no puede hacerse con el modelo D, y además en este modelo la muestra a analizar atraviesa la válvula de inyección, lo que puede producir contaminación cruzada o problemas de flujo. El modelo A permite un lavado exhaustivo del loop de inyección cuando el sistema está en posición inject, lo que minimiza los problemas de contaminación cruzada. Sin embargo para usar este modelo es necesario que la muestra se retenga primero en la precolumna antes de ser dirigida hacia la microcolumna analítica. Esta configuración es apropiada para análisis masivo de muestras complejas. Sin embargo, en algunos casos existen péptidos con baja capacidad de retención a la precolumna que se pierden durante el proceso de lavado previo de la muestra (por ejemplo péptidos de pequeño tamaño, baja hidrofobicidad, o incluso fosfopéptidos), para los que esta configuración no es apropiada.

Por ello, existe otra configuración alternativa, el de la figura 3 (modelo B), que se diferencia del anterior en el que el loop del inyector automático está situado después del bifurcador de flujo. Esta configuración tiene el inconveniente de que el flujo que pasa por este loop es siempre del orden de microlitros por minuto y por tanto el inyector no se limpia de forma tan exhaustiva durante la carrera como en el modelo A. A cambio, esta configuración tiene la ventaja de que se puede pinchar toda la muestra y dirigirla directamente hacia la columna analítica sin lavado previo, evitando la pérdida de los péptidos que no se retengan en la precolumna. Esta configuración es apropiada para análisis pormenorizado de proteínas individuales, identificación de modificaciones postraduccionales o para la búsqueda de péptidos concretos.

Puesto que estos dos modelos son incompatibles, en este trabajo se ha desarrollado un modo de acoplamiento que con solo la incorporación de una válvula adicional podemos

dotar al sistema de las prestaciones que ofrece el modelo A y el modelo B las que podemos apreciar en la figura 5 (configuraciones E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>). Comparando los resultados obtenidos después de pinchar una alicuota de digerido de PSA (150 fmol) usando las configuraciones E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> logramos ver lo relacionado a ventajas de retención y limpieza con una misma cantidad de muestra. En la figura 6 se demuestra que, en cuanto a la resolución de los picos de péptidos de PSA no hay grandes diferencias entre ellas pero encontramos que se pierden los primeros picos (figura 6-A) usando la configuración del modelo E<sub>1</sub>, por el contrario en la figura 6-C se puede apreciar que se detecta un mayor número de picos usando el modelo E<sub>2</sub>. Sin embargo, en cuanto a la limpieza de la columna y el loop del AS se detectaron algunos picos de trazas de péptidos figura 6-D en el modelo E<sub>2</sub> en la carrera correspondiente a un blanco inmediatamente consecutivo a la carrera anterior, mientras que en la figura 6-B se observa que usando el modelo E<sub>1</sub> la limpieza fue total, no detectándose péptidos de PSA en la carrera consecutiva. Este problema de contaminación es mucho más acusado cuando en vez de usar cantidades pequeñas de PSA se inyectan fracciones muy complejas de proteomas conteniendo altas concentraciones de péptido (no se muestra). Estos resultados demuestran que con un mismo modelo es posible utilizar dos configuraciones diferentes que pueden ser usadas dependiendo de los requerimientos (limpieza, reproducibilidad, retención) de la muestra a analizar.

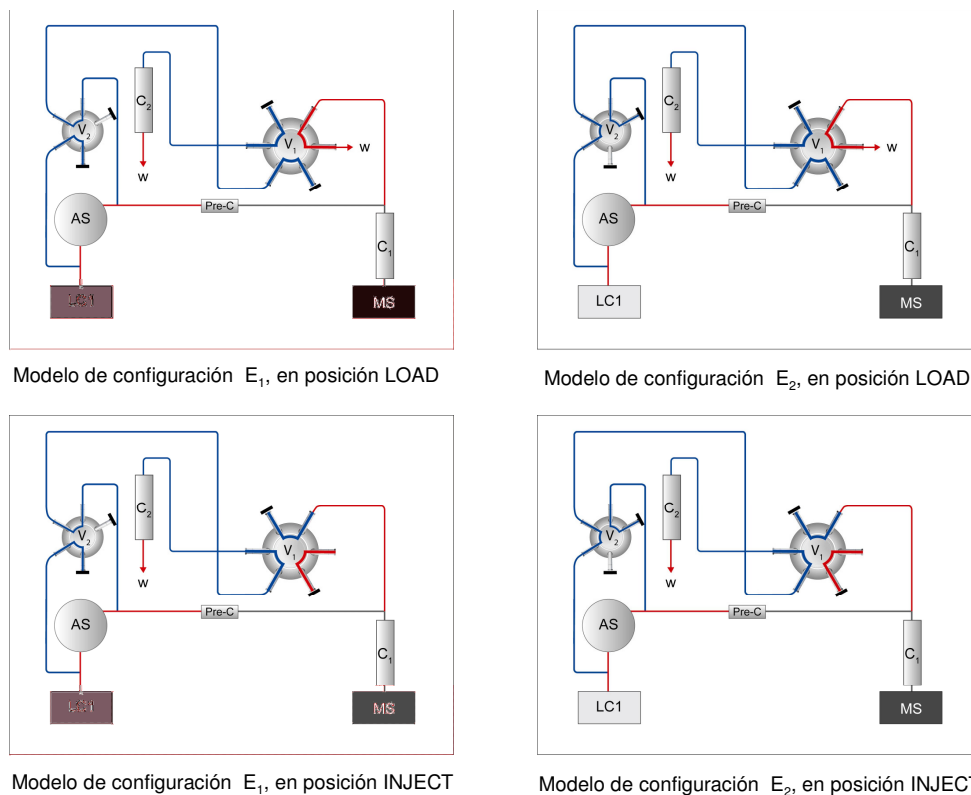


Figura 5. Modelo E1 y E2, acoplamiento HPLC-MS/MS. E1 con bifurcación posterior al inyector automático (AS) la que favorece la limpieza del loop a un mayor flujo. E2 con bifurcación anterior al AS la que favorece el trabajo con muestras especiales pero donde la limpieza del loop es a un flujo menor.

En este trabajo hemos aprovechado esta configuración doble para llevar a cabo dos tipos de aproximaciones al estudio del proteoma de la membrana mitocondrial. En un mismo equipo, hemos utilizado una de ellas (configuración E<sub>2</sub>) para el análisis pormenorizado de péptidos específicos provenientes de proteínas diana (apartado 6.2 de Resultados), mientras

que hemos usado la configuración E<sub>1</sub> para el análisis masivo y la cuantificación de los componentes del proteoma mitocondrial, en respuesta al proceso de preconditionamiento isquémico (apartados 6.3-6.5 de Resultados).

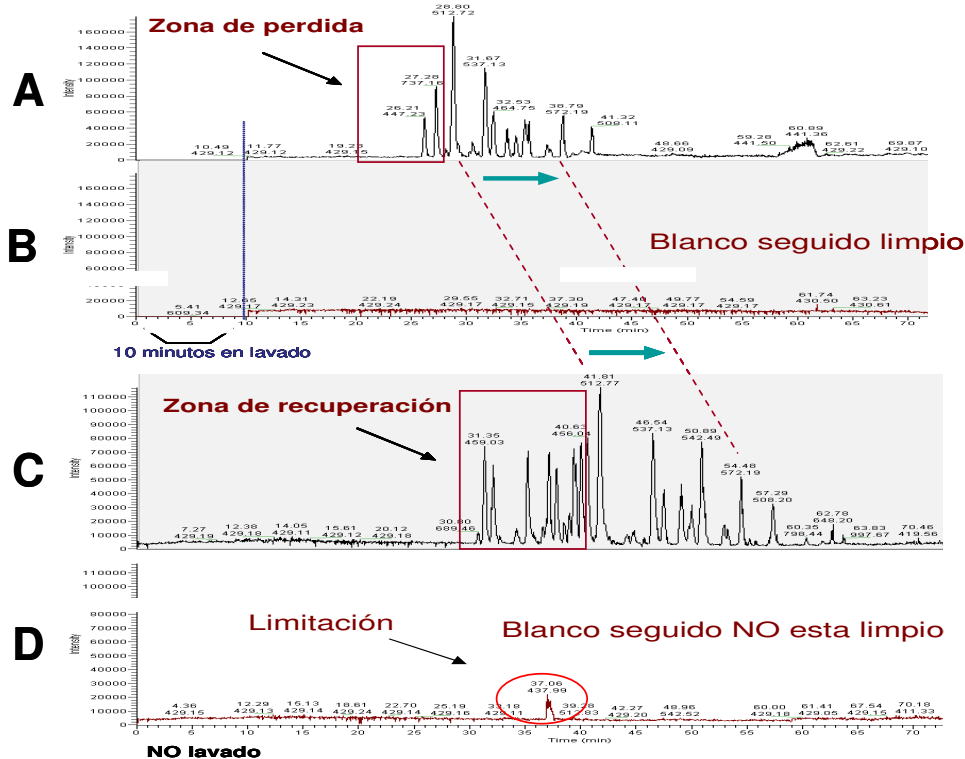


Figura 6. Resultados de los modelos E1 y E2. Se analizaron 150 fmol de péptidos trípticos de PSA seguido de una carrera en blanco para detectar la limpieza del sistema. A: FullScan de PSA observando la zona de pérdida de péptidos isocráticos y blanco posterior correspondiente completamente limpio de péptidos, usando la configuración del modelo E1. B: FullScan de PSA remarcando en un recuadro la recuperación de péptidos isocráticos y blanco posterior correspondiente con trazas de péptidos, usando la configuración del modelo E2.

## 6.2. Estudio de la distribución mitocondrial de las conexinas 43 y 32

### 6.2.1. Identificación específica de la conexina 43 en membrana mitocondrial en cardiomiocitos de rata

Como se ha comentado en la introducción, la Cx43 es una proteína que juega un papel importante en el proceso de acondicionamiento isquémico. Estudios recientes sugieren que la acción cardioprotectora de la Cx43 se debe a la traslocación de esta proteína desde la membrana plasmática hacia la membrana mitocondrial interna. Sin embargo, la investigación de este posible papel se ha realizado utilizando técnicas de detección mediante anticuerpos como la inmunoelectroforesis, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica y microscopía electrónica, que no son del todo concluyentes. Por esta razón, en este trabajo desarrollamos una metodología de espectrometría de masas para detectar de forma directa y específica la Cx43 en una mezcla compleja de proteínas provenientes de fracciones purificadas de membrana mitocondrial de corazón de rata.

En una primera aproximación se analizó la composición proteica de un extracto de proteínas de membrana de rata mediante SDS-PAGE, cortando el gel en fracciones y digiriendo con tripsina las proteínas de cada fracción. Los péptidos trípticos resultantes se identificaron mediante HPLC-MS/MS usando una trampa iónica lineal. Los espectros MS/MS obtenidos se enfrentaron a una base de datos de rata. En este experimento, el péptido TYIISILFK de la Cx43 se encontró en primera posición de uno de los espectros MS/MS de un ión precursor de 549.1 m/z. Sin embargo, la puntuación del motor de búsqueda SEQUEST ( $Xcorr = 1.913$ ,  $DCn = 0.42$ ) no consideró el resultado estadísticamente significativo a un 5 % de FDR. Una inspección manual del espectro MS/MS tampoco fue concluyente, originando dudas sobre la identificación del péptido. Otro péptido de Cx43 de un espectro MS/MS con ión precursor de 514.3 obtuvo incluso peor puntuación en la identificación, ( $Xcorr = 1.927$ ,  $DCn = 0.087$ ). No se detectaron mas péptidos de Cx43 en este extracto, por lo que no se pudo confirmar la presencia de Cx43 en la muestra.

En un intento de confirmar de manera inequívoca la presencia de Cx43 en la preparación de proteínas de membrana mitocondrial de rata, una fracción idéntica del mismo gel se analizó mediante la técnica SMIM programada en la trampa iónica lineal. En primer lugar se realizó un modo de barrido FullScan entre 400-1600 m/z para detectar la presencia de péptidos trípticos y verificar la correcta separación de los mismos a lo largo del gradiente. A continuación se programó la monitorización de un espectro MS/MS a partir de un ión precursor de carga 2 y m/z 549.1 y dos espectros MS<sup>3</sup> de iones de m/z 720.5 y 833.6, seleccionados por ser los fragmentos más intensos del espectro MS/MS obtenido en el primer análisis. También se programó un grupo de iones de la misma estructura a partir del ión de m/z 514.3, y se repitieron los dos grupos de scans 3 veces en el mismo ciclo.

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 7. El cromatograma mostró la presencia de un gran número de especies iónicas así como una buena resolución de la separación de los mismos (Figura 7A), indicando un buen rendimiento en la digestión tríptica. La traza del cromatograma del ión de 549.1 m/z también mostró la presencia de varias especies iónicas con la misma m/z (Figura 7B), sin embargo los espectros MS/MS mas intensos de estos precursores eran completamente diferentes al espectro detectado en el primer experimento, indicando que ninguna de estas especies abundantes correspondía al péptido de Cx43. Después de una exhaustiva inspección de todos los espectros MS/MS encontrados a lo largo de todo el gradiente se detectó un espectro MS/MS correspondiente al péptido de Cx43 a 42 min de tiempo de retención (Figura 7F). En este espectro MS/MS se detectó la presencia de un fragmento intenso de 833.6 m/z. La traza del cromatograma se obtiene representando la intensidad de este fragmento frente al tiempo de retención (Figura 7C). Esta traza es completamente diferente a la obtenida para el ión precursor (comparar con Figura 7B), lo que indica la presencia de especies iónicas únicas e intensas a este tiempo de retención. Este ión corresponde al fragmento  $y_7^{*+}$  del péptido TYIISILFK, por lo que podemos asumir que el pico de la Figura 7C es indicativo de la elución del péptido a este tiempo de retención. Realizando un promedio de todos los espectros MS/MS del ión precursor de 549.1 m/z dentro de ese pico se consiguió mejorar el espectro MS/MS con mayor señal/ruido (Figura 7G). La mayoría de los fragmentos detectados en el espectro se asignaron como iones de la serie  $y^{*-}$  o de la serie  $b^-$ , sin embargo algunos fragmentos no se consiguieron interpretar como pertenecientes al péptido (indicados con flechas en la Figura 7G). El espectro se filtró para eliminar los espectros MS/MS adyacentes del mismo precursor (Figuras 7H y I). De este modo se consiguió minimizar el ruido de fondo inespecífico. El resultado obtenido fue un espectro MS/MS consistente con la secuencia del péptido, pudiéndose asignar todos los picos significativos del espectro (Figura 7J).

Inspeccionado los dos espectros MS<sup>3</sup>, que fueron también promediados en sus picos (Figura 7C), se confirmó la identidad inequívoca del péptido de Cx43. Tal y como muestran

las Figuras 7K y L, se consiguió una buena fragmentación de los dos iones  $y''$  seleccionados, que permitió confirmar sus sub-secuencias. Sorprendentemente, algunos de los fragmentos más intensos correspondían a pérdidas internas de aminoácidos en la serie *b*. Este tipo de fragmentos se ha observado con relativa frecuencia en otros péptidos y su formación es debida a la ciclación de los iones *b*, demostrada previamente en nuestro laboratorio ((Yague et al., 2003)). Suelen ser fragmentos muy intensos, debido a la gran estabilidad inducida en los iones por la ciclación.

La interpretación de los resultados obtenidos para el ión  $m/z$  514.0 no fueron concluyentes para demostrar que el ión correspondía a la secuencia VAQTDGVNVEMHLK de la Cx43, lo que indica que este tipo metodologías también puede ser útil para detectar falsas identificaciones de péptidos.

Finalmente, tal y como muestran las Figuras 1D y E, se pueden obtener trazas muy limpias de la presencia del péptido de Cx43, representando la intensidad de uno de los fragmentos más intensos detectados en el espectro  $MS^3$ . Las tres trazas (Figuras 1C, D y E) pueden usarse como señal característica de la presencia inequívoca de este péptido y, por consiguiente, de la Cx43 en la muestra.

Estos resultados permiten afirmar la presencia inequívoca de esta proteína en la membrana mitocondrial y el método desarrollado constituye un método que puede usarse de forma rutinaria para analizar la presencia y/o proporción de esta proteína en este tipo de preparaciones.

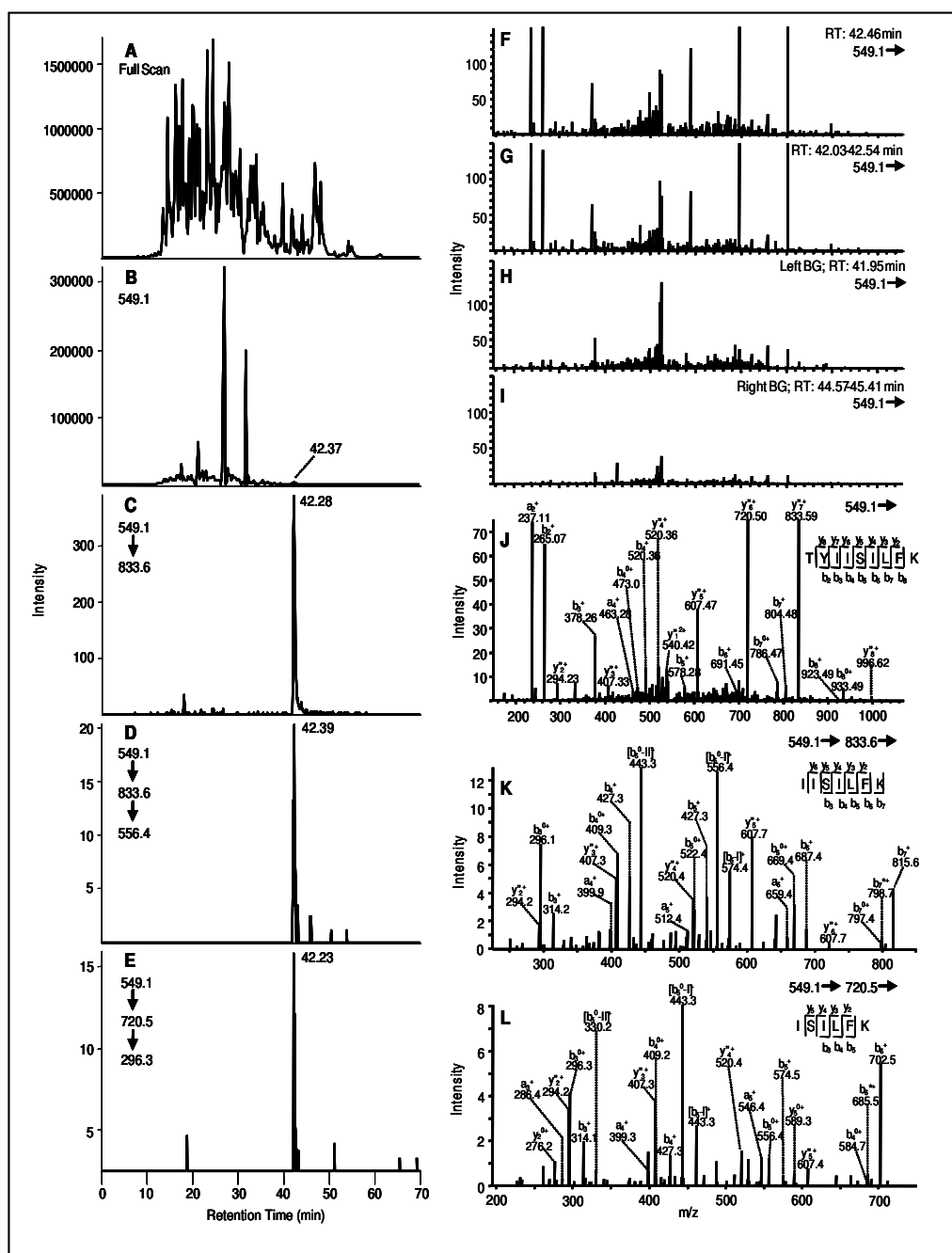


Figura 7. Identificación del péptido TYIISILFK de la conexina 43 en un extracto de proteínas de membrana mediante SMIM. A partir de un extracto crudo de proteínas de membrana separadas mediante SDS-PAGE, se recortó la zona del gel de 43 kDa y se digirió con tripsina. Los péptidos resultantes se analizaron mediante LC-MS/MS. Las figuras de la izquierda muestran los cromatogramas correspondientes a los iones precursores más intensos (A) y los iones hijos originados en la fragmentación del ión precursor de carga dos de 549.1 m/z (B) así como las trazas MS/MS y MS3 de los fragmentos del péptido seleccionado (C, E). Las figuras (F - J) muestran el espectro MS/MS del mismo ión en el pico más alto del cromatograma (F), el espectro promedio de los scans alrededor del pico (G), el espectro MS/MS de ruido justo antes (H) y después del pico (I), y un espectro MS/MS promedio con la corrección del ruido definitivo (J). Dos espectros MS3 promediados y no corregidos del mismo ión se muestran en las figuras (K) y (L).



## 6.2.2. Estudio de la distribución mitocondrial de la conexina 32 en un modelo animal de ratones Cx43KI32

Como ya se ha comentado en introducción, la Cx43 es la isoforma de Cx específica de corazón, localizada principalmente a nivel de los discos intercalados (DI) del miocardio ventricular. Para estudiar la relevancia biológica de la Cx43 en la función cardiovascular, en el laboratorio de David G. Dorado se preparó una línea de ratones transgénicos KO de Cx43. Sin embargo, dicha delección producía letalidad neonatal. Por tanto, para lograr estudiar la función cardiovascular de Cx43 en animales adultos, esta proteína se sustituyó por la Cx32 (Cx43KI32, homocigoto para Cx32). En los ratones transgénicos Cx43KI32 se observó que desaparecía el efecto protector del preconditionamiento isquémico, sugiriendo la implicación de la Cx43 en este proceso (García-Dorado et al., 1997). Por otro lado, se ha descrito que la localización de la Cx43 en la membrana mitocondrial interna de corazón juega un papel importante en el preconditionamiento. Por tanto, en este trabajo, aprovechando la potencia del método basado en la monitorización SMIM puesto a punto en el apartado anterior, estudiamos la distribución mitocondrial de la Cx32 en los animales Cx43KI32.

La Cx32 es la isoforma predominante en hígado (Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* (2002) 383:725–737). Experimentos del laboratorio de David G. Dorado han demostrado por western blot la presencia de Cx32 en mitocondrias hepáticas (artículo en preparación). Por esta razón, en el presente trabajo hemos empleado mitocondrias de hígado como control positivo en la identificación y detección de Cx32.

En experimentos previos se separaron mediante SDS-PAGE extractos de proteínas de tejido hepático y se recortó la zona del gel donde presumiblemente debía estar la banda de Cx32, según su peso molecular (32 kDa). Se procedió a una digestión con tripsina de las proteínas en gel y los péptidos trípticos resultantes se analizaron por HPLC-MS/MS con una trampa iónica lineal intentando identificar el mayor número de péptidos posibles. En estas preparaciones donde la Cx32 es relativamente abundante fue posible la identificación directa de dos péptidos específicos de esta proteínas (resultados no mostrados), cuyos iones precursores y sus espectros de fragmentación se utilizaron como referencia para los experimentos posteriores usando la técnica SMIM descrita en el apartado anterior.

Una vez identificados los péptidos más adecuados para llevar a cabo una monitorización específica de la Cx32, las proteínas de extractos de mitocondria de hígado y de corazón de ratones Cx43KI32 se separaron electroforéticamente y de nuevo se procedió a cortar la zona del gel en la zona de 32 kDa. De la misma manera en que se procedió con el experimento de Cx43, se programó en primer lugar un modo de barrido FullScan entre 400-1600 m/z para detectar la presencia de péptidos trípticos y una buena separación de los mismos a lo largo del gradiente. A continuación, monitorizamos la fragmentación de dos iones precursores de la Cx32: uno correspondiente al ión de carga 3 con m/z 576.9 del péptido LEGDHGDPLHLEEVKR (Figura 8K) y otro correspondiente al ión de carga 2 con m/z 793.9 del péptido LLSEQDGSLKDILR (Figura 8L). Para confirmar que ambos péptidos pertenecen a la Cx32, por MS<sup>3</sup> se monitorizaron iones hijos del espectro MS/MS de cada péptido: uno con m/z 561.0 (Figura 8K) y otro con m/z 901.6 (Figura 8L), respectivamente. Se monitorizó como control interno un péptido DFLAGGVAAISK correspondiente al ión de carga 2 con m/z 610.33 de la proteína ADP/ATP translocasa 2 mitocondrial (datos no mostrados), con objeto de comprobar que la cantidad de proteínas presentes en las dos muestras era comparable.

El cromatograma mostró la presencia de un gran cantidad de especies iónicas así como una buena resolución de la separación de los mismos, tanto en el extracto de



Figura 8. Identificación de la conexina 32 en un extracto de proteínas de membrana de hígado y confirmación de su ausencia en mitocondria de corazón de ratón Cx32K132 mediante SMIM Cromatogramas de la intensidad base de los iones precursores más intensos en mitocondria de hígado (A) y mitocondria de corazón (F). La conexina 32 se identificó por la monitorización de la fragmentación de dos iones precursores: uno correspondiente al ión de carga 3 con  $m/z$  576.9 del péptido LEGDHGDPLHLEEVKR (datos no mostrados) y otro correspondiente al ión de carga 2 con  $m/z$  793.9 del péptido LLSEQDGSLKDILR (D,I). Para confirmar que ambos péptidos pertenecen a la Cx32 se monitorizaron dos iones hijos del espectro MS/MS: uno con  $m/z$  561.0 (C,H) y otro con  $m/z$  901.6 (D,I). La Cx32 sólo se identificó en la mitocondria de hígado y no en la de corazón de los ratones Cx43KI32. Se utilizó un péptido control DFLAGGVAAISK de la proteína ADP/ATP translocasa 2 mitocondrial para cuantificar la abundancia relativa de la Cx32 (B,G). (K,L) Espectros MS3 y MS/MS de los fragmentos PLHLEEEVKR y LLSEQDGSLKDILR, respectivamente.

### **6.3. Identificación masiva de proteínas de membrana mitocondrial utilizando SDS-PAGE y digestión en gel**

El interés de este trabajo se centra en el análisis del proteoma de membrana mitocondrial utilizando las técnicas de cromatografía multidimensional. Esta metodología requiere una digestión en solución del proteoma seguido de un fraccionamiento de los péptidos trípticos resultantes mediante intercambio iónico y el consiguiente análisis por RP-HPLC-MS/MS, tal y como se ha descrito en otros trabajos ((Lopez-Ferrer et al., 2004)). Después de algunos intentos de digerir en solución el proteoma de membrana mitocondrial en los que la cantidad de péptidos trípticos obtenidos fue muy baja, debido a la dificultad de solubilizar las proteína de membrana para favorecer la reacción enzimática, nos planteamos si el análisis multidimensional de las proteínas de membrana podría realizarse usando SDS-PAGE como un primer paso de separación de las proteínas, seguido de un digestión tríptica del gel cortado en varias fracciones y finalmente el análisis por RP-HPLC-MS/MS de los péptidos resultantes.

Se utilizaron muestras de extractos de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de ratas normóxicas y de ratas sometidas a un proceso de preconditionamiento isquémico, para un posterior análisis comparativo de los proteomas (Figura 9).

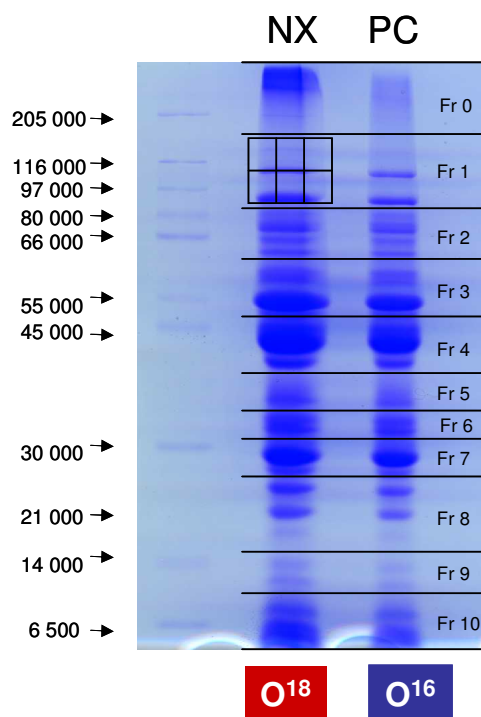


Figure 9. Separación de proteínas de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata mediante SDS-PAGE. 300  $\mu$ g de proteínas se separaron en un gel de 16 x 18 cm al 11 % de poliacrilamida, que se cortó en 10 porciones para la posterior digestión triptica. Tras la digestión, los péptidos tripticos recuperados se sometieron a un marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$ . Los extractos de proteínas correspondían a a tejido de miocardio de una rata normóxica (NX), que se marcó con  $O^{16}$  y una rata sometida a pre-condicionamiento isquémico (PC), que se marcó con  $O^{18}$ .

En una primera aproximación se separaron 100  $\mu$ g de las proteínas de membrana mediante SDS-PAGE. Esta técnica permite separar proteínas muy hidrofóbicas como las de membranas, pudiendo después realizar una digestión en gel de dichas proteínas. En ningún caso se hubiera podido plantear una digestión triptica en solución, ya que estas proteínas son muy difíciles de solubilizar. Los carriles de cada muestra se cortaron en 10 fracciones y cada fracción se digirió con tripsina por separado. Los péptidos tripticos resultantes se sometieron a una segunda separación por cromatografía de fase reversa en el sistema HPLC acoplado a la trampa iónica lineal, permitiendo la obtención *on line* de los espectros de MS/MS para su posterior identificación. Estos espectros MS/MS se enfrentaron a una base de datos de rata, logrando identificar 524 péptidos únicos que favorecieron la identificación de 128 proteínas con una tasa de error del 5 %. Un análisis de localización celular de estas proteínas mostró que un 69 % del proteoma total eran proteínas de membrana, donde un 60 % del total correspondían a proteínas de membrana mitocondrial lo que indicaba el uso de un buen método de purificación previa de proteínas de mitocondrias (Figura 10). En cuanto al tipo de proteínas mitocondriales identificadas, la mayoría fueron proteínas de la membrana interna de la mitocondria (39 %) y en menor medida de la membrana externa (10 %).

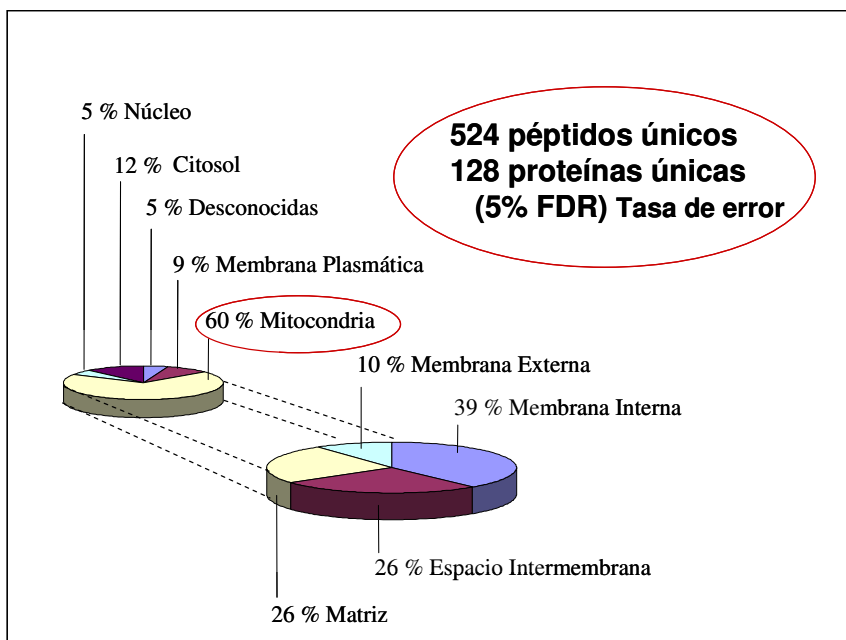


Figura 10. Distribución de proteínas de membrana mitocondrial. A partir de 100 µg de un extracto crudo de proteínas de membrana de mitocondria de corazón de rata separadas mediante SDS-PAGE se analizó su distribución de acuerdo a las categorías que establece el Gene Ontology en cuanto a la localización subcelular.

Estos resultados demuestran que el SDS-PAGE es una técnica muy adecuada para la separación de proteínas de membrana, ya que la presencia de SDS en el gel permite una buena separación de las mismas y su posterior digestión en solución. Además, esta metodología presenta otra serie de ventajas con respecto a la digestión en solución, como que permite el análisis de muestras que contienen detergentes; componentes claves en la mayoría de los protocolos de extracción de proteínas, sobre todo en la extracción de proteínas de membrana. Otra ventaja es que el SDS-PAGE se usa como una primera dimensión en la separación de las proteínas, eliminando un paso posterior de separación de los péptidos trípticos mediante cromatografía líquida de intercambio catiónico. Por otro lado, todos los péptidos de cada una de las proteínas se analizan juntos en la misma fracción de HPLC, lo que permite una identificación más robusta de las proteínas.

#### **6.4. Cuantificación masiva de proteínas de membrana mitocondrial utilizando SDS-PAGE, digestión en gel y marcaje isotópico con $^{18}\text{O}$ : experimento de prueba**

Según se ha planteado, el solo hecho de identificar cualitativamente la presencia o ausencia de una proteína en particular nos puede ayudar a entender un proceso fisiológico o metabólico. Cuando esto se puede lograr de forma cuantitativa nos permite obtener un panorama más claro de los procesos biológicos de interés. En este trabajo nos planteamos si la separación de proteínas mediante SDS-PAGE, utilizada en el apartado anterior para el análisis masivo de proteínas de membrana mitocondrial, era compatible con los métodos de marcaje isotópico estable. El marcaje enzimático de péptidos con  $^{18}\text{O}$  se realiza normalmente durante la digestión de las proteínas con tripsina en presencia de  $^{18}\text{O}$ -agua; este proceso incorpora 2 átomos de  $^{18}\text{O}$  en el extremo C-terminal de los péptidos. En este trabajo se realiza el marcaje enzimático en un paso posterior a la digestión tríptica. Este procedimiento

tiene la ventaja de que se usa un volumen mínimo de  $^{18}\text{O}$ -agua para el marcaje y, además, se pueden optimizar por separado las condiciones de digestión y marcaje.

Para demostrar que el método propuesto es válido, se separó un extracto de proteínas de membrana mediante SDS-PAGE. Una porción del gel se cortó verticalmente en dos fracciones exactamente iguales y se digirieron con tripsina por separado. Los péptidos resultantes de las dos fracciones se marcaron con  $^{16}\text{O}$  y  $^{18}\text{O}$ , respectivamente, y se mezclaron. La mezcla de péptidos se analizó mediante C18-HPLC-MS/MS, programado de forma consecutiva tres ciclos de un espectro ZoomScan para cuantificación, y de un espectro MS/MS para identificación. Se obtuvieron 216 espectros MS/MS, que correspondían a 130 péptidos únicos y 60 proteínas diferentes, con una tasa de error del 5 %. Un estudio de la secuencia de los péptidos indicó un buen rendimiento en la digestión triptica, ya que sólo un 4 % de los péptidos presentaban residuos de lisina y arginina internos, que no estaban flanqueados por residuos de prolina. La eficiencia de la digestión es un requisito muy importante para el posterior marcaje de los péptidos, ya que asegurará una cuantificación correcta de la proteína a nivel de péptido.

Para la cuantificación relativa de los pares de péptidos se usó el modo de barrido ZoomScan, programado en la trampa iónica lineal. Sólo se cuantificaron los ZoomScans correspondientes a los péptidos identificados a partir de los espectros MS/MS. Este análisis se realizó automáticamente mediante QuiXoT, como se describe en la sección de material y métodos.

Este programa permite calcular con precisión la eficiencia del marcaje de cada uno de los péptidos cuantificados, así como determinar la proporción de péptido que procede de las dos muestras, marcada y no marcada con  $^{18}\text{O}$ . La eficiencia del marcaje es un parámetro muy importante a tener en cuenta, sobre todo en experimentos a gran escala, ya que permite detectar falsos cambios de expresión de proteínas debidos a una incompleta incorporación del  $^{18}\text{O}$  en uno de los pares de péptidos. Para analizar este parámetro se representa frente al valor del ratio de la intensidad de cada péptido en las dos muestras en escala logarítmica (Figura 11 A). Esta representación es muy útil a la hora de comprobar la extensión del marcaje y su influencia en la cuantificación relativa de los péptidos. En este experimento, todos los péptidos presentaron una eficiencia de marcaje superior a 0,6 por lo que podrían usarse para su cuantificación ya que a partir de este valor de eficiencia de marcaje el algoritmo permite corregir eficazmente las pequeñas variaciones que pudieran aparecer por un posible marcaje incompleto.

El programa QuiXoT permite además calcular el peso estadístico que mide la exactitud de cada cuantificación individual; un peso estadístico alto corresponde a una menor desviación del ratio sobre el valor esperado (Figura 11 B). Los péptidos con baja calidad en su cuantificación se eliminaron automáticamente, usando un corte en el peso estadístico menor de 50. Al aplicar este filtro se eliminó un 5 % del total de los péptidos cuantificados.

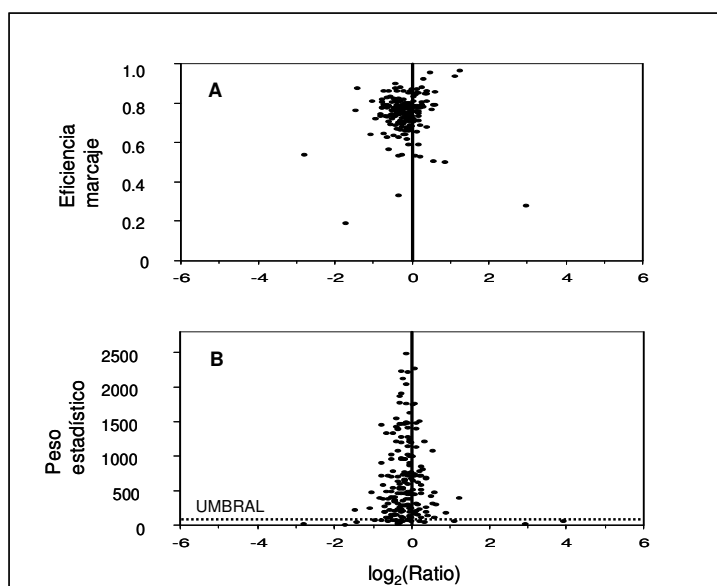


Figura 11. Análisis estadístico de la cuantificación de péptidos resultantes del análisis de un extracto crudo de proteínas de membrana de mitocondrias contra si mismo. A: Análisis de la eficiencia de marcaje (f) con  $O^{18}$  en función del  $\log_2(\text{Ratio})$  de los péptidos cuantificados. B: Análisis de la calidad de la cuantificación mediante el peso estadístico en función del  $\log_2(\text{Ratio})$  de los péptidos.

En la Figura 12 se observa que los  $\log_2$ -ratios calculados muestran valores muy cercanos al cero (ratio 1:1) y su distribución se ajustó perfectamente a una distribución normal, tal y como se espera de una hipótesis nula para un experimento donde no se observan cambios de expresión. La distribución Gaussiana se ajustó con un valor medio de -0,16 y una desviación estándar de 0,31.

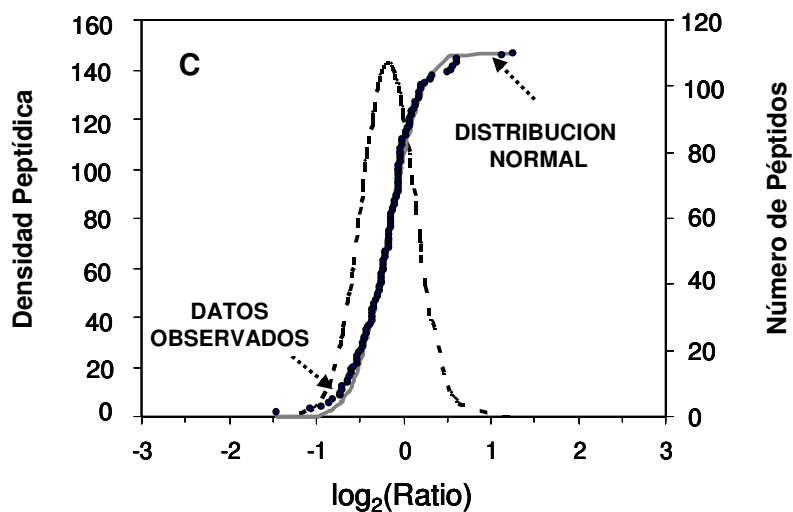


Figura 12. Distribución del  $\log_2$  (Ratio) a nivel de péptido. La línea gris representa la distribución normal, donde se observa el ajuste de los datos experimentales. La densidad de la distribución de los péptidos se representa en líneas discontinuas.



La distribución de los  $\log_2$ -ratios de estos datos demuestra que es posible realizar estudios de proteómica de expresión diferencial en proteínas de membrana mediante una separación en SDS-PAGE, digestión en gel y posterior marcaje peptídico con  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  y análisis en trampa iónica lineal. El análisis comparativo entre dos muestras mediante SDS-PAGE no permite detectar los cambios de expresión en mezclas complejas de proteínas debido a la baja resolución de esta técnica y a la interferencia de las proteínas más abundantes. Sin embargo, estos resultados sugieren que usando esta metodología como una primera dimensión y el posterior marcaje enzimático con  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  se obtienen resultados similares a los que se producirían usando una separación por cromatografía multidimensional. Además, aunque este trabajo se ha centrado en las proteínas de membrana mitocondrial, esta metodología es totalmente aplicable a todo tipo de proteínas de membrana. Un detalle importante es que a la hora de confirmar los resultados de los cambios de expresión de las proteínas obtenidos en el análisis no sería necesario volver a repetir el experimento completo, sólo se analizaría la fracción del gel donde se espera que migre cada una de las proteínas a analizar.

### **6.5. Estudio diferencial del proteoma de membrana mitocondrial de rata en respuesta a un modelo de preconditionamiento isquémico**

Una vez demostrado que es posible analizar los cambios de expresión de proteínas de membrana mediante la metodología descrita previamente, procedimos al análisis comparativo de extractos de proteínas de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de ratas sometidas a un proceso de pre-condicionamiento isquémico (PC), en comparación con ratas normóxicas (NX), con objeto de determinar qué proteínas cambian de expresión en respuesta al pre-condicionamiento isquémico. Los extractos de proteínas de cada una de las muestras se separaron por SDS-PAGE. Estableciendo nuevamente, un patrón de bandas con las muestras, se definieron los cortes del gel para generar 10 fracciones que se digirieron por separado (Figura 13). Para digerir cada fracción se realizaron cortes más pequeños dentro de cada una de ellas consiguiendo 6 porciones en cada una de las muestras ya definida. Estos cortes se efectuaron para mejorar los lavados del gel y la incorporación de tampones que favorecen la reacción de digestión y la incorporación de la tripsina al gel. Antes de añadir la enzima se mezclaron los 6 trozos de gel pertenecientes a la misma fracción, Para cada muestra digerida analizamos por MS una pequeña alícuota para confirmar las eficiencia de la digestión

Tras haber confirmado una completa digestión trípica de las proteínas se procedió al marcaje con  $\text{O}^{16}/\text{O}^{18}$  (NX con  $\text{O}^{18}$  y PC con  $\text{O}^{16}$ ) y a un acondicionamiento de la muestra posterior para no perder el marcaje enzimático antes de mezclar las muestras y analizarlas por MS. Para lograr una mayor profundidad del análisis se prepararon 6 alícuotas de los extractos marcados, de cada una de las fracciones del gel, y una sexta parte se analizó por MS en un rango amplio de ionización (400-1600 m/z) y las otras 5 alícuotas restantes en rangos más estrechos (400-599 m/z, 600-699 m/z, 700-799 m/z, 800-899 m/z y 900-1200 m/z) favoreciendo la obtención de una mayor cantidad de datos para una misma fracción. Una vez analizadas las muestras mediante RP-HPLC-MS/MS, se procesaron los datos para obtener la identificación, mediante el método Probability Ratio, y la cuantificación del proteoma, mediante el programa QuiXoT.

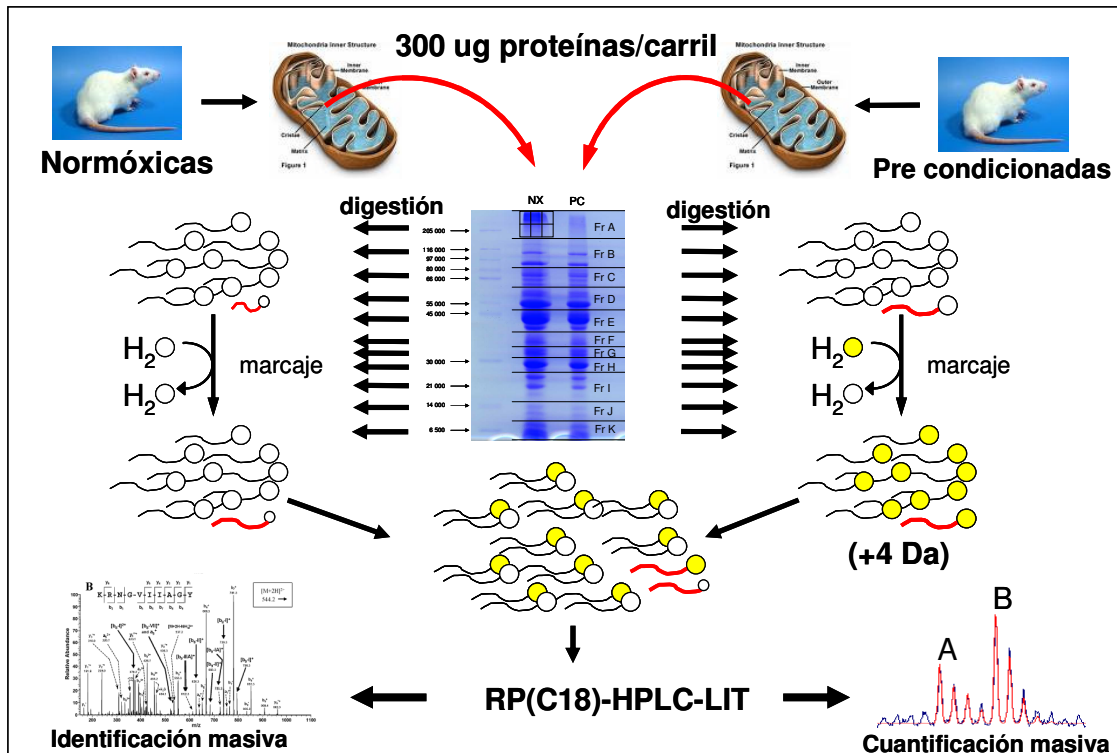


Figura 13. Diagrama de flujo del análisis de expresión diferencial en el proteoma de membrana mitocondrial en respuesta al pre-condicionamiento isquémico. El tejido de miocardio de ratas normóxicas y sometidas a pre-condicionamiento isquémico se sometió a una purificación de mitocondrias y extracción de proteínas de membrana. Los extractos crudos de proteínas se separaron por SDS-PAGE y tras una digestión triptica del gel dividido en 10 porciones, los péptidos resultantes se marcaron con  $O^{16}/O^{18}$ . Tras el marcaje se mezclaron las dos muestras y se analizaron en LC-MS/MS usando una trampa iónica lineal. Los espectros de fragmentación sirvieron para la identificación de los péptidos que se cuantificaron utilizando el modo de barrido ZoomScan.

Con esta aproximación en gel SDS-PAGE a nivel preparativo, realizando cortes estratégicos para analizar en la trampa iónica lineal de forma fragmentada el proteoma de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata conseguimos identificar 1410 péptidos únicos, a partir de 4047 MS/MS, que correspondían a 428 proteínas únicas, con una tasa de error del 5 % (ver anejo). En la Figura 14 se representa el número total de péptidos y proteínas únicas identificadas en cada fracción del gel, observándose que, en general, se cuantifican entre 20 y 50 proteínas en cada fracción. En las fracciones intermedias del gel (fracciones 4-8) se identificaron un mayor número de péptidos que en el resto de las fracciones, debido probablemente a que en esa zona del gel migran las proteínas más abundantes de todo el proteoma.

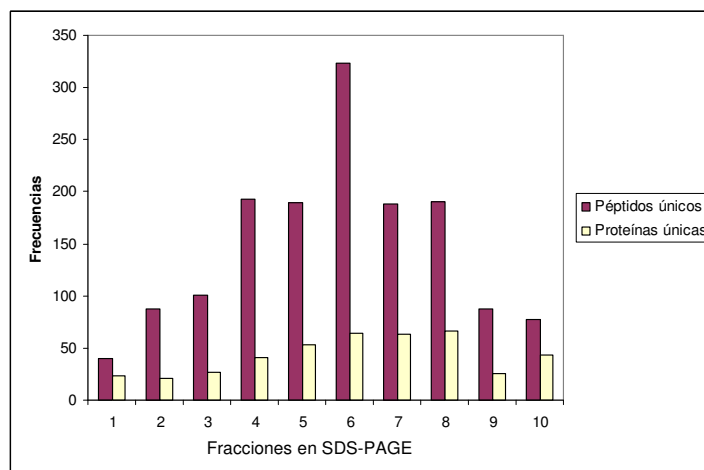


Figura 14. Cantidad de péptidos y proteínas por fracción de gel SDS-PAGE identificadas en el estudio del pre-condicionamiento isquémico en corazón de rata.

Sólo los ZoomScans correspondientes a los espectros de fragmentación que dieron una identificación significativa de péptidos se usaron para el análisis de la cuantificación, mediante un método de análisis descrito por (Ramos-Fernandez et al., 2007) que permite controlar la eficiencia del marcaje de cada uno de los péptidos. En este método el espectro ZoomScan se ajusta a una curva teórica y, tanto la concentración del péptido (en unidades de área) como la eficiencia de marcaje, se calculan automáticamente. Tal y como se explica en Materiales y Métodos se usan unos parámetros del valor óptimo del ajuste:  $\sigma$  (parámetro de escala, lo que determina la mitad de ancho del pico),  $\beta$  (proporción de doble componente exponencial) y la eficiencia de marcaje  $f$ , como criterio inicial para eliminar falsas cuantificaciones. En total, un 20 % de los scans se eliminaron del análisis debido al mal ajuste con la curva teórica, según estos parámetros. Además, los scans correspondientes a péptidos del extremo C-terminal de las proteínas también se rechazaron para el análisis puesto que no son péptidos trípticos y no incorporan el  $O^{18}$  en el extremo carboxilo del aminoácido en la reacción enzimática con tripsina.

Para lograr una cuantificación correcta en experimentos a gran escala es necesario controlar la eficiencia de marcaje de cada péptido. Algunos autores describen que existe la posibilidad de que la reacción enzimática de incorporación de  $^{18}O$  mediante tripsina revierta a lo largo del tiempo. Esta reacción reversible no se suele observar en experimentos a pequeña escala, puesto que las muestras tratadas con  $^{16}O/^{18}O$  se suelen analizar rápidamente. Pero en un experimento a gran escala, como en este trabajo donde hay 10 fracciones que analizar, es conveniente seguir un protocolo especial para mantener estable el marcaje durante meses. Es crítico inactivar la tripsina después del marcaje, ya que es la mayor responsable de que revierta la reacción. En este trabajo se usó tripsina inmovilizada en bolitas de agarosa, lo cual permitía eliminarla por filtración. Pero además, las muestras se sometieron a una reducción y una alquilación para desnaturalizar residuos que quedaran de tripsina. Además, existe la posibilidad de que los péptidos se desmarquen debido a una hidrólisis química, por lo que es necesario mantener el pH de la muestra por encima de 3. Controlando estas condiciones, en este experimento se consiguió una eficiencia de marcaje muy alta, superior a 0,6, tal y como se observa en la Figura 15 A. Este método se ha empleado al mismo tiempo con muestras de otro modelo biológico como parte de una colaboración con la Universidad de Córdoba, aplicando la misma metodología y análisis

estadístico, y consiguiendo una eficiencia del marcaje de todos los péptidos cuantificados superior también a 0,6 (Figura 15 B).

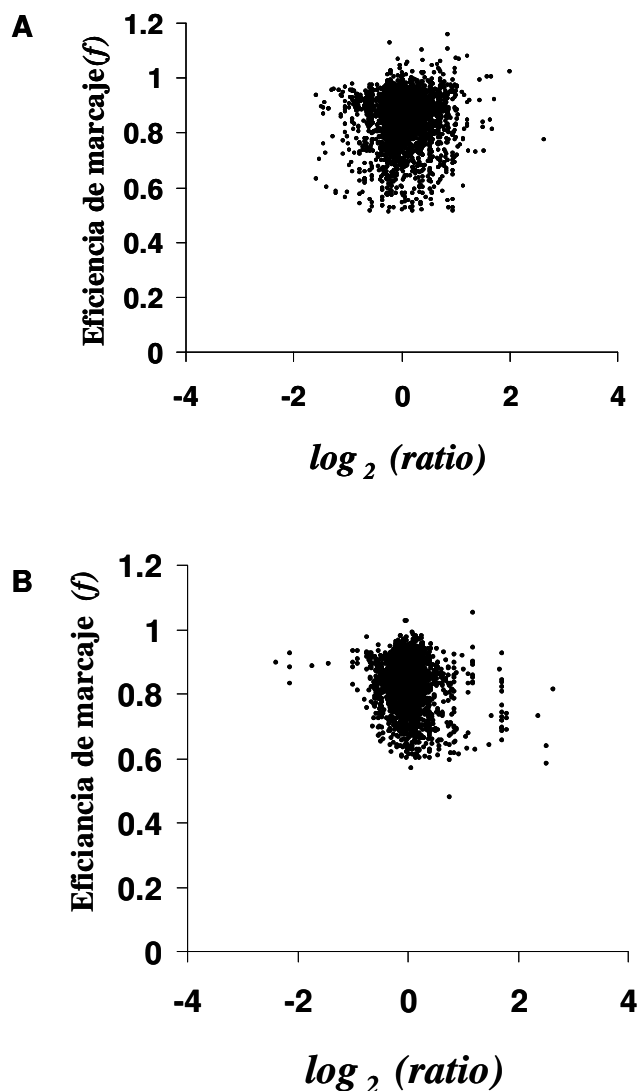


Figura 15. Distribución de la eficiencia de marcaje ( $f$ ) en la cuantificación de proteínas con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$ , en el experimento de análisis comparativo de extractos de proteínas de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de ratas sometidas a un proceso de pre-condicionamiento isquémico (PC), en comparación con ratas normóxicas (NX) (A) y en el experimento de análisis de expresión diferencial en el proteoma de ganglios linfáticos de cerdo post infección viral, realizado en colaboración con la Universidad de Córdoba (B).

Analizando la distribución de los  $\log_2$ -ratios a nivel de péptido observamos que una digestión pobre de la muestra o la presencia de metioninas oxidadas son factores que introducen una considerable desviación de los ratios. La oxidación de metioninas ocurre de manera espontánea y puede dar lugar a una cuantificación errónea de los péptidos, ya que la proporción de metioninas oxidadas y no oxidadas en cada muestra puede ser distinta y afectaría al ratio real del péptido. Para comprobar si se produjo oxidación de metioninas en las muestras se comparó la dispersión de las proteínas en los valores de  $\log_2$ -ratios promedios correspondientes a los péptidos que contenían residuos de metioninas no oxidadas

con aquellos que contenían residuos de metioninas oxidadas (Figura 16). Inspeccionando visualmente esta figura claramente se puede observar que los péptidos que contienen metioninas oxidadas y no oxidadas en su secuencia tienden a desviarse del ratio promedio de su proteína correspondiente (Figura 16A). Del mismo modo se realizó el estudio para el modelo experimental de cerdo post-infección viral, de la Universidad de Córdoba, observándose también una desviación del promedio de los  $\log_2$ -ratios de proteínas que tenían péptidos con metioninas oxidadas (Figura 16B).

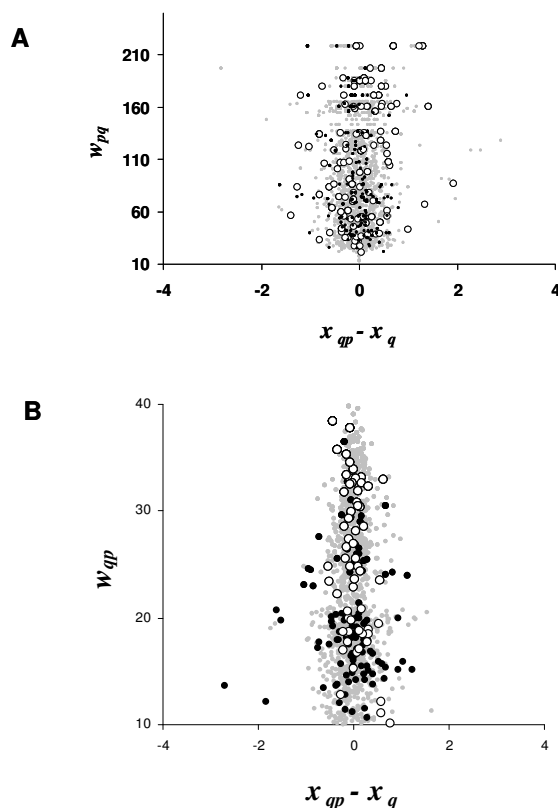


Figura 16. Efecto de la metionina oxidada y no oxidada en la cuantificación de proteínas con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$ . (A) Experimento de pre-condicionamiento isquémico en miocardio de rata. (B) Experimento de cerdo post infección viral, Universidad de Córdoba. Puntos negros: péptido con metionina no oxidada; Puntos blancos: péptidos con metionina oxidada; Puntos grises: péptidos sin metionina.

Una digestión parcial poco eficiente es también una fuente de error en la cuantificación de las proteínas, ya que los péptidos parcialmente digeridos (que presentan un residuo de lisina o de arginina internos en la secuencia) no reflejan la concentración real de las proteínas en cada muestra. Para estudiar si la digestión parcial afectaba al experimento de pre-condicionamiento isquémico de rata, se comparó la dispersión de las proteínas representando los  $\log_2$ -ratios correspondientes a los péptidos parcialmente digeridos superpuestos con los  $\log_2$ -ratios de los péptidos totalmente digeridos, además de los  $\log_2$ -ratios de los subpéptidos detectados cuya secuencia se localiza en un péptido largo mal digerido en la misma muestra (Figura 17A). La nube de puntos de los péptidos parcialmente digeridos se desplaza claramente de los valores esperados, mientras que los subpéptidos generados por una correcta digestión tienden a desplazarse al lado contrario. Se analizó de la misma manera el experimento de cerdo post-infección viral de la Universidad de Córdoba, observándose el mismo efecto debido a la digestión parcial de los péptidos (Figura 17B). En los dos estudios

consideramos que los datos obtenidos donde afectaban tanto las metioninas oxidadas como la digestión parcial de los péptidos no eran reales y decidimos eliminarlos del análisis.

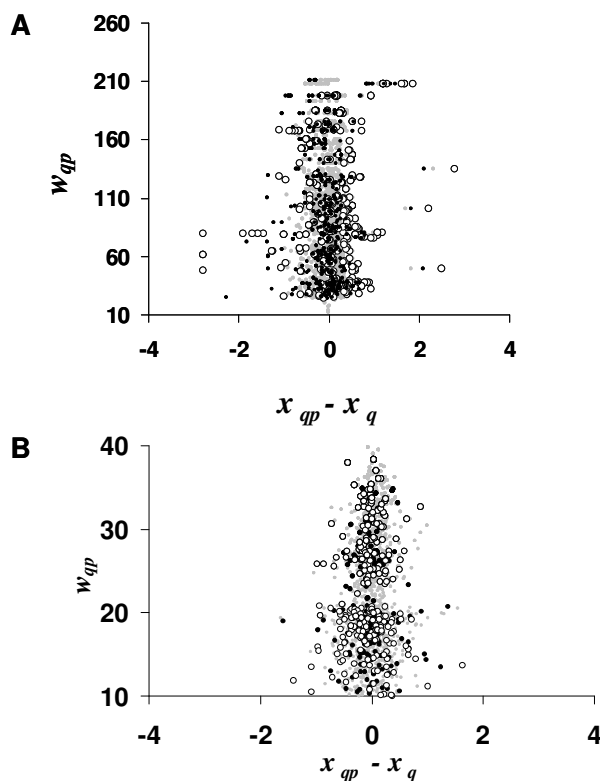


Figura 17. Efecto de la digestiones parciales y subpéptidos en la cuantificación de proteínas con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$ . (A) Experimento de pre-condicionamiento isquémico en miocardio de rata. (B) Experimento de cerdo post infección viral, Universidad de Córdoba. Puntos negros: digestiones parciales; Puntos blancos: Sub-péptidos; Puntos grises: péptidos bien digeridos del total de la muestra.

Tal y como se explica en Materiales y Métodos, suponemos que una población de scans que tiene el mismo peso estadístico se comporta siguiendo una distribución normal. Esta hipótesis se puede comprobar analizando la presencia de “outliers”. Para ello, las varianzas locales estimadas a nivel de scan, péptido y proteínas se usaron para calcular los  $\log_2$ -ratios promedios de péptidos y proteínas, y la gran media, usando las ecuaciones 3-5 descritas en el apartado de Material y Métodos. La presencia de outliers a nivel de scan se detectó analizando la presencia de scans que presentaban una desviación excesiva en su  $\log_2$ -ratio con respecto al promedio del péptido correspondiente. La probabilidad de que un scan se desvíe del promedio del péptido se calculó usando la ecuación 9, y su correspondiente tasa de error ( $FDR_{qps}$ ) con la ecuación 12. Visualmente se inspeccionaron las determinaciones con una  $FDR_{qps}$  más bajas que el 10 %. La ausencia de outliers a nivel de scan indica que todos los scans que cuantifican un mismo péptido muestran las desviaciones esperadas en torno a la media del péptido, es decir, que se comportan como si pertenecieran a una misma distribución normal con varianza homogénea y constante y, por tanto, todos ellos se pueden usar para un correcto análisis estadístico. En nuestro caso, el experimento de pre-condicionamiento isquémico no presentó ningún outlier a nivel de scan (Figura 18A), sin embargo, en el experimento de cerdo post-infección viral de la Universidad de Córdoba si

que se detectaron 30 outliers, aunque pueden considerarse muy pocos en comparación con los miles de scans analizados del total del experimento (Figura 18B).

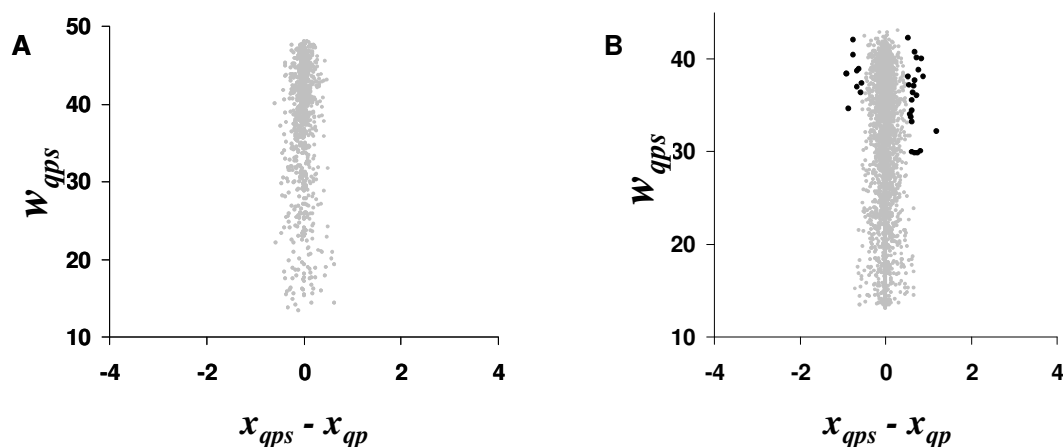


Figura 18. Análisis de “outlier” a nivel de scan, con una tasa de error 10% (FDR<sub>qps</sub>). (A) Experimento de cuantificación con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$ , en muestra de - pre-condicionamiento isquémico en miocardio de rata. (B) Experimento del proteoma de ganglio linfático de cerdo post infección viral. Puntos negros: “outliers”.

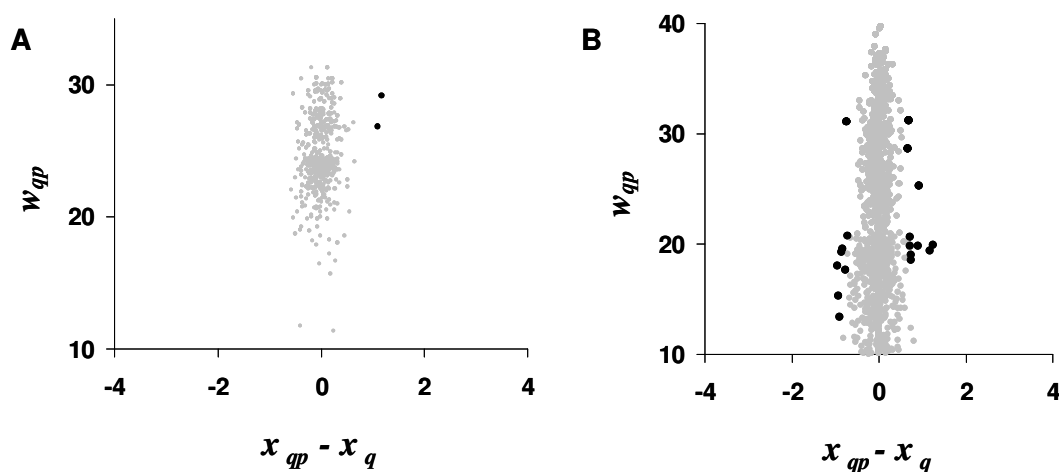


Figura 19. Análisis de “outlier” a nivel de péptido, con una tasa de error 10 % (FDR<sub>qp</sub>). (A) Experimento de cuantificación con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$ , en muestra de pre-condicionamiento isquémico en miocardio de rata. (B) Experimento del proteoma de ganglio linfático de cerdo post infección viral. Puntos negros: “outliers”.

Del mismo modo se realizó un análisis de los outliers a nivel de péptido, es decir, las cuantificaciones de los péptidos que se desviaban significativamente del promedio de sus proteínas correspondientes. Para ello, se calculó la tasa de error a nivel de péptido, FDR<sub>qp</sub>, con las ecuaciones 10 y 13. En el experimento de pre-condicionamiento isquémico sólo se detectaron dos outliers, por lo que, de la misma manera que ocurría a nivel de scan, se puede asumir que todos los péptidos tienen un mismo error constante y que se distribuye normalmente (Figura 19A). Por el contrario, en el experimento de comparación del proteoma



de ganglio linfático tras una infección viral se detectaron 18 outliers, aunque viene siendo un número muy bajo en comparación con el total de péptidos cuantificados (Figura 19B).

Desde el punto de vista estadístico, un outlier a nivel de proteína significa un cambio de expresión y se detectaría usando la misma estrategia seguida a nivel de péptido y scan. Sin embargo, un análisis más exhaustivo a nivel de proteínas nos llevó a detectar cambios falsos de expresión debido a la metodología usada basada en los cortes del gel para digerir las proteínas. En algunas fracciones detectamos la misma proteína, ya que al cortar el gel algunas bandas de proteínas se dividían en fracciones consecutivas. Este fenómeno llevó a que la cuantificación de algunas proteínas fue diferente dependiendo de la fracción en que se encontraban. Para analizar a qué proteínas afectaba el efecto de corte del gel, se estudió la distribución de los  $\log_2$ -ratios de las proteínas de acuerdo con la varianza estimada para cada una de ellas. El  $\log_2$ -ratio a nivel de proteína ( $x_q$ ) se transformó en valores de desviación estándar ( $z_q$ ) restando la gran media y dividiendo por la desviación estándar, por ejemplo,  $z_q = (x_q - \bar{x}) / (w_q)^{1/2}$ . Estos valores normalizados a nivel de proteína se espera que tengan la misma desviación estándar, independientemente del peso estadístico asociado al  $\log_2$ -ratio. Se analizaron las proteínas que se repetían en distintas fracciones del gel, eligiendo las tres que presentaban un mayor valor de peso estadístico ( $w_q$ ); puesto que el peso estadístico depende de la intensidad de la señal y del número de péptidos, es razonable esperara que las fracciones con mayor peso estadístico sean las que tengan mayor cantidad de proteína. En el experimento de pre-condicionamiento isquémico se observó que claramente había proteínas que se desviaban de su valor real de la cuantificación, según en la fracción en que se encontraran (Figura 20). Estas proteínas tendrían que ser tratadas de manera especial en el análisis global, y estudiarlas por separado analizando más en profundidad cual sería su valor real de  $\log_2$ -ratio observando su comportamiento en cada fracción. También se analizó el experimento del perfil de expresión diferencial de la infección porcina con PCV2, observándose que, en este caso, el efecto de corte del gel era mucho menos acusado (Figura 21). Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias en la naturaleza de la muestra, así como a la posible degradación proteolítica de la muestra durante su manipulación.

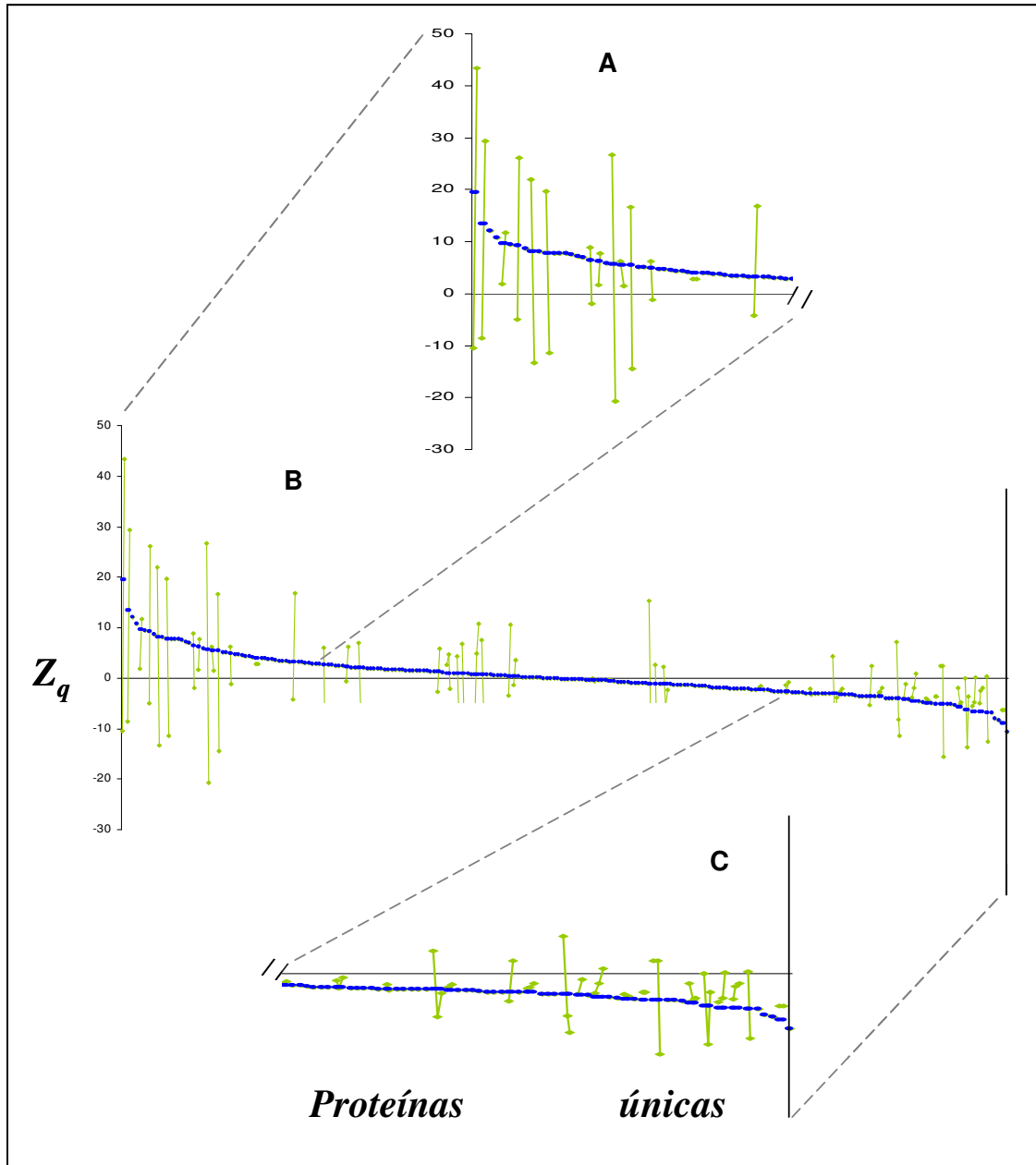


Figura 20. Efecto de cortes en gel SDS-PAGE en la cuantificación de las proteínas con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$  en pre-condicionamiento isquémico en miocardio de rata. Los puntos unidos por líneas representan las tres medidas de peso estadístico para una misma proteína. Las líneas que interceptan o se acercan a la línea 0 en alguno de los puntos que las une se interpretan como cambios que con esta medida no se pueden afirmar. (A) proteínas que disminuyen su expresión; (B) el total de la muestra; (C) proteínas que aumentan su expresión.

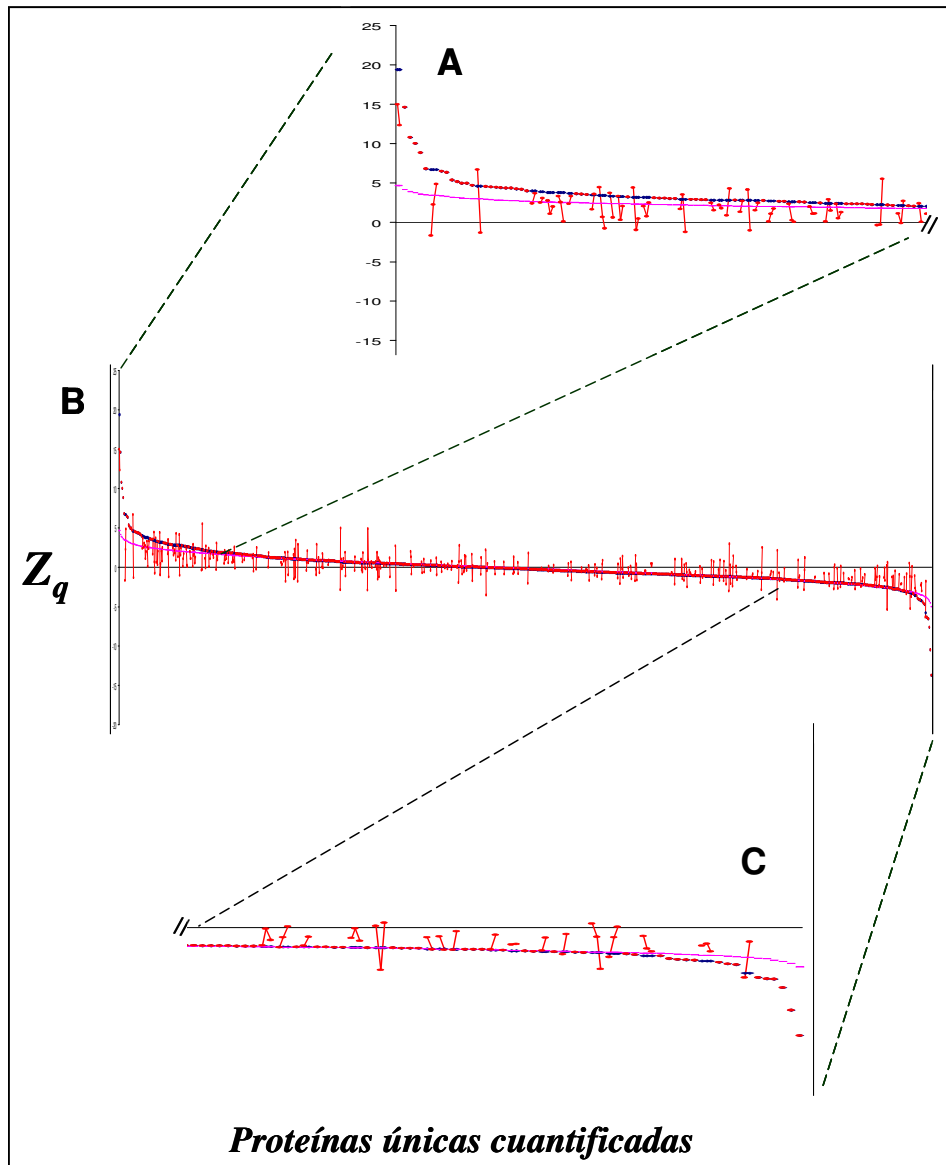


Figura 21. Efecto de cortes en gel SDS-PAGE en la cuantificación con marcaje isotópico con  $O^{16}/O^{18}$  en el proteoma de ganglio linfático porcino infectado con infección vírica con PCV2. Las líneas que interceptan o se acercan a la línea 0 en alguno de los puntos que las une, se interpretan como cambios que con esta medida no se pueden afirmar. . (A) proteínas que disminuyen su expresión; (B) el total de la muestra; (C) proteínas que aumentan su expresión.

Finalmente, una vez comprobadas todas las fuentes de error posibles que afectaban al estudio global del experimento, se analizaron los cambios de expresión en el proteoma de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata sometidas a un pre-condicionamiento isquémico, en comparación con ratas normóxicas. En total, se cuantificaron 3195 MS/MS,

que correspondían a 592 péptidos únicos y a 202 proteínas únicas (Figura 22). El análisis estadístico reveló un aumento significativo de expresión en 34 proteínas de membrana y una disminución de expresión en 31 proteínas de membrana, la mayoría relacionadas con el metabolismo energético.

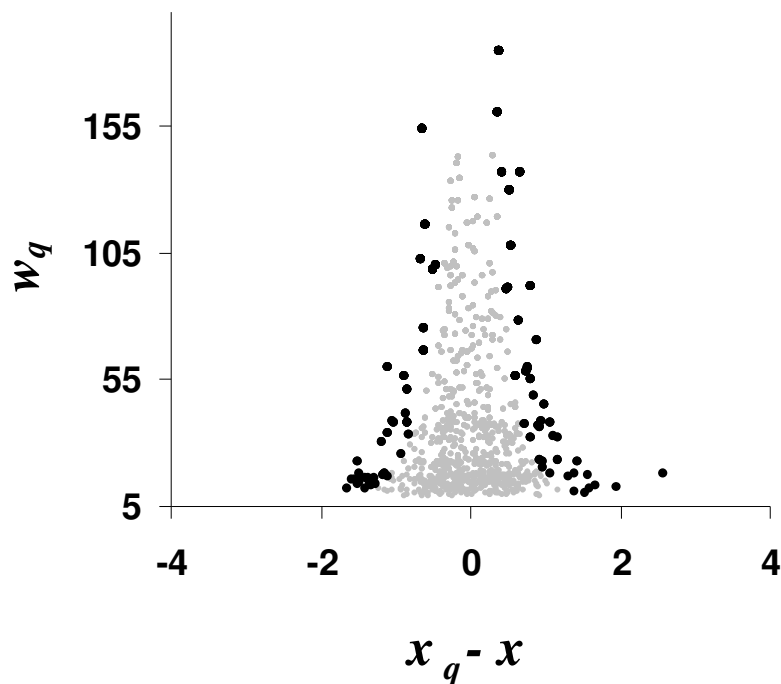


Figura 22. Análisis de los cambio de expresión significativos en el estudio de pre-condicionamiento isquémico en miocardio de rata. Los puntos negros representan las proteínas que cambian de expresión con una tasa de error 1%.

La mayoría de las proteínas que cambian de expresión pertenecen a los complejos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones. Dentro de las proteínas que aumentan su expresión debido al tratamiento de pre-condicionamiento isquémico, aparecen las proteínas 4, 7 y 8 NADH-deshidrogenasa de Fe-S, la subunidad de 75 kDa de la ubiquinona oxidoreductasa y la NADH-deshidrogenasa 1 del subcomplejo B, que pertenecen al complejo I. Otras proteínas que aumentan su expresión intervienen en el proceso de *B*-oxidación de los ácidos grasos, como la cadena larga de la acetyl-CoA deshidrogenasa, la 3,2-trans-enoyl-CoA isomerasa y la 2, 4-dienoyl-CoA reductasa. Y aumentan también subunidades proteicas (O, G, D y B) de la ATP sintasa mitocondrial, tres proteínas del catabolismo de los aminoácidos, dos proteínas de respuesta a estrés oxidativo y cuatro proteínas del ciclo de Krebs, entre otras (Tabla 1). En cuanto al grupo de proteínas que bajan su expresión al tratamiento de pre-condicionamiento isquémico de los cardiomiocitos, 11 proteínas pertenecen a los complejos de la cadena respiratoria, incluyendo NADH-deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa, entre otras; y proteínas muy comunes del ciclo de Krebs, incluyendo isocitrato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa; las subunidades alfa y beta de la ATP sintasa mitocondrial, etc (Tabla 2). El hecho de que la mayoría de los cambios de expresión están relacionados con el metabolismo energético apoya la idea de que estos cambios de expresión son específicos y reflejan cambios debidos al acondicionamiento isquémico. La relevancia biológica de los cambios observados se comenta en la Discusión.

**Tabla 1. Proteínas en las que se encontró un aumento de expresión a causa de precondicionamiento isquémico en miocardio de Rata.**

FASTA Protein Description up-regulated	Xq-X	SD	Xq	fold	péptidos	FUNCTION
sw Q99NB1 ACS2L_MOUSE Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial precu	2.41	0.20	5.31	1	1	Krebs cycle
sw Q9Z2I8 SUCB2_MOUSE Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, mitochondri	2.29	0.20	4.90	1	1	probably both part of the Krebs cycle
sw P14408 FUMH_RAT Fumarate hydratase,	0.50	0.10	1.41	3	3	Krebs cycle
sw Q5X78 ODO1_RAT 2-oxoglutarate dehy	0.22	0.07	1.17	9	9	Reguladora Krebs cycle (produce NADH)
sw P35738 ODBB_RAT 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial p	2.25	0.21	4.76	1	1	amino acid catabolism
sw Q5X19 MCCC2_RAT Methylocrotonyl-Co	1.32	0.14	2.50	2	2	amino acid catabolism
sw Q9GK13 MUTA_BOVIN Methyalmalonyl-CoA mutase, mitochondrial precursor (EC 5.4.	0.98	0.22	1.98	1	1	degradation several amino acids,
sw P07895 SODM_RAT Superoxide dismutas	1.03	0.12	2.04	2	2	ROS protection
sw Q9Z0V6 PRDX3_RAT Thioredoxin-depend	0.58	0.10	1.50	3	3	ROS protection
sw Q02369 NDUB9_BOVIN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subuni	1.72	0.22	3.29	1	1	complex I
sw Q66HF1 INDU1_RAT NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondri	0.33	0.06	1.26	13	13	complex I
sw Q0M0I2 INDUS8_GORGO NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mi	0.78	0.16	1.71	1	1	complex I
sw Q5X1F3 INDUS4_RAT NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mito	0.89	0.19	1.86	1	1	complex I
sw P42028 INDUS8_BOVIN NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, m	0.71	0.21	1.64	1	1	complex I (core protein)
sw P42026 INDUS7_BOVIN NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mi	0.52	0.16	1.44	1	1	complex I (core protein)
sw Q0M0F2 INDUBA_GORGO NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit	0.50	0.16	1.41	1	1	complex I (not involved in catalysis)
sw P35435 ATPG_RAT ATP synthase gamma	0.75	0.10	1.69	3	3	F0(ATP synthesis)
sw Q06647 ATPO_RAT ATP synthase subuni	0.48	0.08	1.39	5	5	F0(ATP synthesis)
sw P31399 ATP5H_RAT ATP synthase D cha	0.59	0.12	1.51	2	2	F0(ATP synthesis)
sw P19511 AT5F1_RAT ATP synthase B cha	0.69	0.18	1.61	1	1	F0(ATP synthesis)
sw P49748 ACADV_HUMAN Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochon	0.95	0.18	1.93	1	1	FA beta oxidation
sw P23965 D3D2_RAT 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor (EC 5	0.37	0.07	1.29	7	7	FA beta oxidation
sw Q64591 DECR_RAT 2,4-dienoyl-CoA red	0.52	0.12	1.44	3	3	FA beta oxidation
sw P97576 GRPE1_RAT GpE protein homol	1.14	0.14	2.21	2	2	Probable component of the PAM complex
sw P48721 GRP75_RAT Stress-70 protein,	0.26	0.07	1.20	9	9	glucose-regulated protein.
sw Q9D880 TIM50_MOUSE Import inner membrane translocase subunit TIM50, mitochon	0.48	0.14	1.39	2	2	Essential component of the TIM23 complex,
sw O77814 KCRS_RABIT Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial precursor (EC 2.	0.70	0.20	1.63	1	1	Reversibly catalyzes the transfer phosphate between ATP various phosphogens
sw Q64536 PK2_RAT [Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 2	0.60	0.18	1.52	1	1	inhibits the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation E1
sw Q9WU50 KAD4_RAT Adenylate kinase is	0.50	0.16	1.41	2	2	
sw Q91VM9 PYR2_MOUSE Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial precursor (EC	1.64	0.21	3.11	1	1	organizer mitochondrial cristae morphology, indispensable for normal mito function.
sw Q8CAQ8 IMMT_MOUSE Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin).	1.29	0.14	2.45	2	2	Regulatory light chain of myosin
sw P16409 MYL3_RAT Myosin light polype	1.83	0.21	3.55	1	1	
sw P12847 MYH3_RAT Myosin-3 (Myosin he	1.66	0.22	3.16	1	1	
sw P24329 THTR_RAT Thiosulfate sulfurtransferase	0.38	0.12	1.30	3	3	Involved in the formation of iron-sulfur complexes,

**Tabla 2. Proteínas en las que se encontró disminución de expresión a causa de preconditionamiento isquémico en miocardio de Rata.**

Accession	Description	Xq-X	SD_Xq	fold	péptidos	FUNCTION
sw Q99NA5 IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-0.33	0.09	1.26	5	Reguladora Krebs cycle (produce NADH)
sw P56574 IDHP_RAT	Isocitrate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-0.30	0.08	1.23	7	Reguladora Krebs cycle (produce NADH)
sw P26284 ODPA_RAT	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-0.45	0.11	1.36	3	Reguladora Krebs cycle (produce NADH)
sw Q8BKZ9 ODPX_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	-0.70	0.20	1.63	1	Reguladora Krebs cycle (produce NADH)
sw P11661 NIJ5M_RAT	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (EC 1.6.5.3) (NADH dehydrogenase [ubiquinone])	-0.53	0.18	1.44	1	complex I (core protein)
sw Q01321 INDUA4_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit	-0.73	0.23	1.66	1	complex I (not involved in catalysis)
sw P49821 INDUV1_HUMAN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	-0.66	0.19	1.58	1	complex I (core protein)
sw P05508 NIJ4M_RAT	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (EC 1.6.5.3) (NADH dehydrogenase [ubiquinone])	-0.73	0.18	1.66	1	complex I (core protein)
sw P17694 INDUS2_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	-0.33	0.08	1.26	6	complex I (core protein)
sw P25708 INDUV1_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	-0.32	0.07	1.25	8	complex I (core protein)
sw Q97725 INDUAC_BOVIN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit	-1.27	0.25	2.41	1	complex I (not involved in catalysis)
sw Q920L2 DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase	-0.35	0.07	1.28	9	complex II respiratory chain
sw P62898 CYC_RAT	Cytochrome c, somatic	-0.58	0.14	1.50	2	complex III respiratory chain
sw Q9D0M3 CY1_MOUSE	Cytochrome c1 heme protein, mitochondrial precursor (Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1)	-1.31	0.26	2.48	1	complex III respiratory chain
sw P10888 COX41_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	-1.29	0.12	2.44	3	complex IV respiratory chain
sw P00507 AATM_RAT	Aspartate aminotransferase	-0.24	0.07	1.18	8	Facilitates cellular uptake of long-chain free fatty acids
sw P18886 CPT2_RAT	Carnitine O-palmitoyltransferase 2	-0.24	0.08	1.18	6	mitochondrial FA uptake for beta-oxidation
sw Q63704 CPT1B_RAT	Carnitine O-palmitoyltransferase 1	-0.59	0.15	1.50	2	mitochondrial FA uptake for beta-oxidation
sw P15650 ACADL_RAT	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase	-0.48	0.08	1.40	5	FA beta-oxidation
sw P45953 ACADV_RAT	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	-0.24	0.06	1.19	14	FA beta-oxidation
sw P10719 ATPB_RAT	ATP synthase subunit b	-0.27	0.06	1.21	8	F1(ATP synthase)
sw P15999 ATPA_RAT	ATP synthase subunit a	-0.32	0.06	1.25	11	F1(ATP synthase)
sw P11024 INNTM_BOVIN	transhydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.6.1.1)	-0.17	0.06	1.13	14	proton pump
sw P52873 PYC_RAT	Pyruvate carboxylase	-0.48	0.15	1.40	2	gluconeogenesis
sw Q02253 IMMSA_RAT	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-0.28	0.09	1.22	5	amino acid catabolism
sw Q9R063 PRDX5_RAT	Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor (EC 1.11.1.15) (Prdx5)	-0.49	0.13	1.40	3	ROS signaling
sw Q5SGE0 LPPRC_RAT	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial precursor	-0.38	0.06	1.30	17	protein folding
sw Q8CIZ7 DLDH_CRIGR	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.6.1.1)	-1.59	0.23	3.00	1	glycine cleavage system
sw P05708 HXK1_RAT	Hexokinase-1 (EC 2.7.1.1)	-0.90	0.09	1.87	7	hexose phosphorylation
sw Q5I0K3 CLYBL_RAT	Citrate lyase subunit beta	-0.99	0.20	1.99	1	
sw P97532 IHTM_RAT	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	-0.69	0.14	1.62	3	

## 7. DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial y se prevé que van a seguir siéndolo en el futuro próximo. Se estima que unos 17.5 millones de personas murieron de enfermedades cardiovasculares en 2005 (Figura 23), lo que representa el 30% de todas las defunciones mundiales. Esto hace más que pertinente el realizar diferentes tipos de abordajes y aunar esfuerzos en todas direcciones.

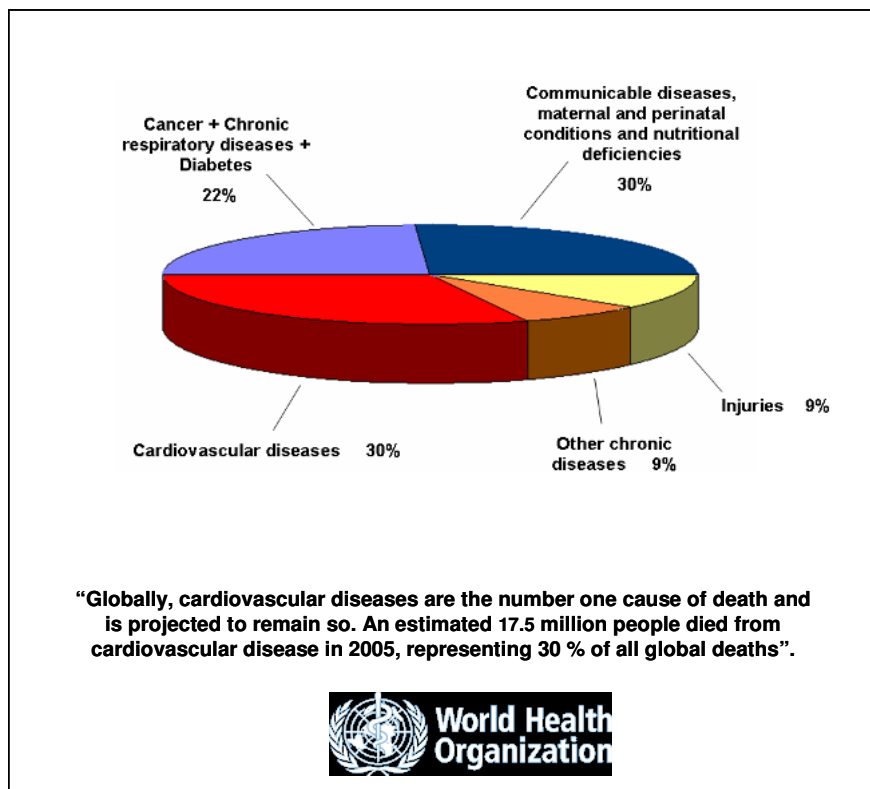


Figura 23. Distribución porcentual de las enfermedades cardiovasculares a nivel mundial según la OMS en 2005. Mundialmente, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y se prevé que va a seguir siéndolo. Se estima que unos 17,5 millones de personas murieron de las enfermedades cardiovasculares para el 2005, lo que representa el 30% de todas las defunciones mundiales.

En ánimos de contribuir al entendimiento de esta afección las nuevas técnicas en Proteómica, las que actualmente y de forma dinámica continúan en desarrollo, demuestran ser herramientas muy útiles. Esto en contrastes con la información que se obtiene de otros tipos de abordajes a nivel molecular, por dar un ejemplo las demás ómicas como la genómica. Actualmente continua siendo un reto el desarrollo de la proteómica a nivel de identificación de proteínas de forma fiable y esto se torna aun más difícil si nos referimos a una Proteómica cuantitativa.

Las carencias de la Proteómica a nivel de las identificaciones hacen necesario el replantearse nuevas estrategias para garantizar mayor fiabilidad en la identificación de proteínas. Los métodos aquí empleados y desarrollados en nuestro laboratorio son en la práctica más robustos en comparación a los que se emplean actualmente. Esto, en cuanto al rigor en el proceso de identificación de proteínas a la luz de las exigencias de la proteómica actual. Al respecto, existen una serie de detalles e innovaciones técnicas en este trabajo que se comentarán brevemente en el siguiente apartado.



### **7.1. Innovaciones tecnológicas para el estudio del proteoma de membrana mitocondrial**

Resulta que, al momento de hacer el análisis a través de MS/MS surgen otros retos de instrumentación con lo que tenemos que trabajar. Es por ello que es importante desarrollar diferentes estrategias en cuanto al acoplamiento de HPLC y MS/MS. En este trabajo se demuestra el rendimiento y la utilidad de una configuración doble que permite utilizar el sistema siguiendo dos modelos diferentes de acoplamiento. Cada modelo tiene sus ventajas y desventajas. Esto depende del trabajo a realizar y la necesidad particulares del análisis. Partiendo que cada muestra tiene sus características particulares y dependiendo de su procedencia, es importante saber que modelo de acoplamiento facilita el trabajo para que el complejo de acoplamiento HPLC y MS/MS este dando servicio de forma interrumpida.

Las características que favorecen la obtención de una serie de espectros de fragmentación y que en otros modelos no se logran se deben a la disposición de cada una de las partes que lo componen y su estricto orden de acoplamiento. Es decir que debido a la forma en que se han dispuesto las conexiones y los aditamentos que la componen son un factor determinante para lograr el objetivo de análisis en este tipo de aproximación proteómico. En nuestro caso particular, el disponer de dos plataformas de equipos similares en cuanto a modelo y procedentes de la misma casa comercial (Termo Fisher) permitió hacer comparaciones en las dos configuraciones usadas. Uno de los problemas a resolver antes de hacer la espectrometría de masas es la limpieza de la muestra previa a la ionización. Para garantizar el que la muestra este en condiciones de limpieza óptima, antes de ser ionizadas, fue necesario el diseñar y establecer un arreglo o composición particular que nos permitiera al cargar la muestra (LOAD) un estadio de lavado durante la primera intervención de fase reversa con un tiempo de duración de 10 minutos. Esto fue posible gracias al acoplamiento de dos columnas, seguidas, una de la otra, pero controladas por una válvula. Esto, en los modelos retados favoreció el que algunas pudieran ser lavadas por espacio de 10 minutos a través de un proceso previo al inicio del gradiente y a la ionización.

Como se ha comentado en Resultados, utilizando una válvula adicional hemos diseñado una configuración que permite el tener las prestaciones de los dos modelos anteriores identificados como A y B que caracterizaba a cada uno de los acoplamientos por separado. Esta dualidad amplía las posibilidades de analizar muestras y a su vez, permite hacer el procesamiento de las muestras a través del HPLC-MS de forma no interrumpida 24 horas al día los siete días a la semana y por periodo prolongado de tiempo. Uno de los modelos, el que favorece el de lavado previo a la ionización, garantiza el tener el equipo funcionando por más tiempo de forma consecutiva. Esto porque favorece un flujo de volumen más alto por todas las vías del trayecto de la muestra. Esta peculiaridad permite el pinchar o cargar las muestras con mucha concentración de péptidos de forma consecutiva y es particularmente útil para el análisis masivo desatendido de proteomas.

Si el objetivo es identificar una proteína en baja concentración o caracterizar de forma inequívoca la presencia o ausencia de un determinado péptido o proteína, es conveniente utilizar la configuración alternativa. En esta configuración el sistema de inyección de la muestra está en línea con el sistema de análisis, de manera que no tiene lugar ninguna pérdida de material inyectado al suprimirse la etapa de lavado previo. Sin embargo, esta configuración no permite un lavado exhaustivo, siendo necesario por tanto, realizar muchos blancos entre muestras para evitar problemas de contaminación cruzada. Esta configuración es adecuada para el análisis específico de determinadas proteínas (como las conexinas analizadas en este trabajo) o para la caracterización de modificaciones postraduccionales.

A la versatilidad de estas configuraciones hay que añadir la versatilidad que permite la trampa iónica lineal como analizador. Este equipo permite hacer barridos muy rápidos, y

ello permite mucha flexibilidad a la hora de programar los modos de barrido dependiendo del tipo de análisis que se quiera realizar. En este trabajo hemos puesto a punto un método de barrido que hemos denominado SMIM (monitorización selectiva de iones en modo fragmentación), que consiste en llevar a cabo un espectro de fragmentación continuo y “a ciegas” sobre un ión precursor seleccionado a priori correspondiente a un determinado péptido que se quiere monitorizar. Debido a la rapidez de la trampa, cuando el péptido en cuestión eluye de la columna de HPLC durante el gradiente, es monitorizado por la trampa durante varios ciclos. Ello permite obtener varios espectros de fragmentación consecutivos de ese mismo péptido, que al promediarse permiten un aumento considerable de la razón señal/ruido, incrementándose así notablemente la sensibilidad. Por otra parte los espectros de fragmentación MS/MS o incluso de fragmentación múltiple permiten identificar inequívocamente la presencia (o ausencia) del péptido que se quiere analizar. Si la secuencia del péptido seleccionado es única (como es el caso de los péptidos que se han elegido en este trabajo para monitorizar la presencia de Cx43 y Cx32) entonces el método permite la identificación inequívoca y altamente específica (especificidad muy superior a la obtenida con anticuerpos) de proteínas determinadas en mezclas muy complejas como el proteoma mitocondrial.

En este trabajo se propone un método alternativo para llevar a cabo análisis de identificación y cuantificación de proteínas a escala masiva utilizando cromatografía multidimensional. La salvedad del método que proponemos es que en vez de digerir las proteínas conjuntamente y separar los péptidos mediante cromatografía multidimensional, en nuestro método las proteínas son primero fraccionadas por SDS-PAGE y los péptidos de cada fracción son analizados en una única carrera cromatográfica en tándem con espectrometría de masas. La técnica es de aplicabilidad universal, pero es particularmente idónea para analizar proteínas de membrana, ya que el uso de SDS como agente solubilizante no es incompatible con el proceso posterior de la muestra. Las proteínas se separan eficazmente en el gel en presencia de SDS, que es eliminado posteriormente del mismo, y los péptidos de las zonas accesibles de las proteínas de membrana son digeridos por la tripsina y liberados fuera del gel, pudiendo ser sometidos a análisis.

Otra de las ventajas de la técnica es que todos los péptidos de la misma proteína salen en la misma fracción, simplificándose así considerablemente el proceso de identificación y cuantificación de las proteínas a partir de los péptidos. Por otra parte la digestión en gel es un proceso que permite obtener los péptidos en un medio 100% compatible con su análisis directo por espectrometría de masas. Por otro lado, la técnica permite ir analizando el proteoma por partes, de forma que se pueden ir identificando cambios de expresión a medida que se va analizando el proteoma sin necesidad de esperar a tenerlo analizado completamente. Por último, la técnica permite repetir o confirmar cambios de expresión sobre proteínas concretas, sin necesidad de repetir el análisis del proteoma completo.

En este trabajo demostramos que es posible llevar a cabo experimentos de análisis masivo después de la separación de proteínas por SDS-PAGE y la digestión en gel. De hecho la eficiencia de digestión (calculada como fracción de péptidos no conteniendo cortes tripticos internos) es comparable a la obtenida mediante digestión en solución en otros trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio.

Uno de los problemas de esta técnica es que el proceso de corte de las diferentes fracciones del gel puede dar lugar a cambios de expresión artificiales, ya que puede quedar algo más de proteína en una fracción que en otra. Afortunadamente, y como mostramos en este trabajo, este factor se puede controlar analizando los cambios de expresión de la misma proteína cuando aparece en diferentes fracciones consecutivas. Las proteínas que muestran “efecto de corte” se pueden confirmar fácilmente analizando de nuevo la muestra después de haber cortado el gel siguiendo una pauta de cortes diferentes.

Otro factor que hemos controlado en este trabajo es la eficiencia de marcaje de los péptidos. Como se ha comentado en Material y Métodos, este parámetro se controla mediante un algoritmo que se lleva a cabo de forma automática mediante el programa QuiXoT. El control de la eficiencia de marcaje permite detectar inmediatamente cualquier variación durante el proceso de marcaje enzimático, y ha sido el que ha permitido poner a punto la técnica para poder cuantificar de forma fiable proteínas de membrana. Uno de los parámetros críticos es el control del pH durante la etapa del marcaje y también durante toda la manipulación posterior de la muestra. El control de la eficiencia de marcaje en cada uno de los péptidos cuantificados fue un parámetro crítico a controlar en cada pareja de péptidos analizados para obtener un protocolo de marcaje apropiado y para obtener resultados cuantitativos consistentes. En otras técnicas de marcaje, como por ejemplo por SILAC (Trauman y col., 2008) o el iTRAQ (D'ascenzo y col., 2008), también se ha descrito la importancia de controlar la eficiencia de marcaje. En esos casos la eficiencia de marcaje se calcula de forma global, mientras que la ventaja de nuestra metodología consiste en el control de la eficiencia de marcaje de cada péptido de manera individual.

La fiabilidad de la cuantificación en un experimento de proteómica de alto rendimiento depende en gran medida del modelo estadístico empleado, el cual permite decidir si un cambio es verdadero o artefactual. En la actualidad dichos modelos están muy poco desarrollados y la mayoría carecen de experimentos a gran escala que validen la hipótesis nula, dando lugar a cambios de expresión falsos. En el laboratorio se desarrolló un modelo estadístico novedoso (Pedro Navarro, Tesis Doctoral en curso). Dicho modelo es de tipo jerárquico, es decir, las medidas a nivel de scan repercuten a nivel de la cuantificación de los péptidos y estos a su vez en la cuantificación de las proteínas. Asimismo, se tienen en cuenta las fuentes de varianza a cada nivel de cuantificación, como son el ajuste del espectro, y varianzas a nivel de scan, péptido y proteína. A diferencia de otros trabajos descritos en la literatura dedicados a proteómica cuantitativa, en nuestro modelo se identifican dos fuentes principales de artefactos a nivel de péptido, como son la oxidación de metioninas y las digestiones parciales, las cuales se producen en un grado variable en las muestras control y tratada, afectando la fiabilidad de la cuantificación. Además, se considera que las varianzas asociadas a las 3 fuentes de error en cada uno de los niveles de cuantificación son constantes y homogéneas para toda la población de scans, péptidos y proteínas dentro de un mismo experimento. De esta forma, no hay “outliers” a nivel de scan, y el número de “outliers” a nivel de péptido es despreciable. En este sentido, es importante destacar que dicho modelo estadístico se desarrolló para digestiones en solución, mientras que en el presente trabajo se ha aplicado a muestras separadas en gel, el cual se dividió en fracciones, digiriendo y marcando cada fracción por separado. En este caso el efecto corte constituye una fuente adicional de error y estamos desarrollando un método para detectarlo eficazmente.

Aplicando dicho modelo a un experimento control de marcaje de la muestra contra sí misma, sólo se identifica un cambio de expresión falso entre más de un millar de proteínas cuantificadas (Pedro Navarro, Tesis Doctoral en curso). Sin embargo, en nuestro caso, al aplicar el modelo a las muestras con preconditionamiento isquémico, hemos sido capaces de identificar 40 cambios de expresión estadísticamente significativos. Hay diversas razones que nos llevan a pensar que estos cambios de expresión reflejan acertadamente alteraciones en la concentración de esas proteínas durante el proceso de preconditionamiento. Por un lado, en un experimento de prueba a pequeña escala de un proteoma contra sí mismo no detectamos ningún cambio de expresión significativo. Por otro lado, no se detecta ningún outlier a nivel de péptido, lo que indica que todos los péptidos están cuantificando su proteína respectiva de la misma manera y no hay artefactos en este sentido. Finalmente, hay algunas proteínas que son cuantificadas por varias subunidades diferentes, y en todas ellas se

detecta el mismo cambio de expresión. Todos estos detalles apoyan la robustez del método de cuantificación desarrollado en este trabajo.

## **7.2. Implicaciones de los resultados con Cx43 y Cx32 en el preconditionamiento isquémico**

Se ha demostrado que la Cx43 se expresa en los cardiomiocitos (Schulz et al., 2004) y está implicada en la cardioprotección por mecanismos aún desconocidos. La Cx43 se ha localizado principalmente en la membrana plasmática, a nivel de los discos intercalados (DI) del miocardio ventricular. Sin embargo, se ha demostrado que la participación de Cx43 en cardioprotección es independiente a la función más conocida de esta proteína de establecer comunicaciones intercelulares (Padilla y col., 2003).

Las mitocondrias juegan un papel clave en los mecanismos de cardioprotección por preconditionamiento isquémico o farmacológico. Diversas aproximaciones usando inmunodetección han sugerido la presencia de Cx43 en mitocondrias. Sin embargo, hasta ahora, ningún estudio de proteómica mitocondrial ha detectado Cx43 (Sickmann y col., 2003; Forner F, y col., 2006). Con el objetivo de demostrar la presencia de Cx43 en mitocondrias de corazón por métodos independientes del uso de anticuerpos, en el presente trabajo separamos el proteoma mitocondrial por SDS-PAGE, se recortó la zona correspondiente a la Cx43, se digirió el gel, y los péptidos se pincharon en la trampa iónica, la cual se programó en modo SMIM para detectar péptidos específicos de la Cx43 a lo largo de todo el gradiente cromatográfico. De esta forma, al concentrar toda la potencia del equipo en iones específicos, logramos una mayor sensibilidad en el análisis, siendo capaces de obtener espectros de fragmentación que demuestran de forma inequívoca y concluyente la presencia de esta proteína en mitocondrias.

Por otro lado, experimentos con ratones transgénicos Cx43KI32 han demostrado que es la Cx43 y no otra la responsable de la cardioprotección, ya que el preconditionamiento isquémico no tiene lugar en estos animales donde se ha sustituido la Cx43 por la Cx32 (García-Dorado y col., 1997). Sin embargo, no se sabe si al igual que la Cx43, la Cx32 se trasloca a la mitocondria cardíaca. Por tanto, el objetivo del trabajo fue intentar detectar Cx32 en mitocondria de corazón mediante espectrometría de masas. En el presente trabajo, utilizando la misma aproximación que para confirmar la presencia de Cx43, se demuestra inequívocamente la presencia de Cx32 en la membrana mitocondrial de hígado de ratones Cx43KI32 (empleado como control positivo), mientras que no se detecta en la membrana mitocondrial de corazón de ratones Cx43KI32.

Este resultado apoya el papel específico de la Cx43 en la génesis de los procesos de preconditionamiento isquémico del corazón. En este sentido, cabría la posibilidad de que la Cx43 estuviera relacionada con la generación de ROS mitocondriales, los cuales son considerados como desencadenantes de la cardioprotección inducida por preconditionamiento, y también con la apertura del poro de transición mitocondrial se ha sugerido como efector final del preconditionamiento.

## **7.3. Implicaciones fisiológicas de los cambios en los niveles de proteínas detectados en el preconditionamiento isquémico**

El primer trabajo donde se describe el efecto protector del preconditionamiento isquémico (PC) frente a la muerte de cardiomiocitos inducida por reperfusión data de 1986 (Murry y col., 1986). Sin embargo, hasta ahora, y a pesar de la gran importancia clínica del

PC, el proteoma del miocardio preconditionado no ha sido caracterizado de manera exhaustiva. Por esta razón, las herramientas desarrolladas por el grupo para proteómica cuantitativa a gran escala se aplicaron en el presente trabajo al estudio de los mecanismos moleculares responsables del efecto protector del preconditionamiento isquémico frente a episodios de isquemia-reperusión.

En los estudios previos más extensos de proteómica que conocemos hasta la fecha sobre preconditionamiento este proceso se induce de forma farmacológica con adenosina o diazóxido en miocardio de conejo. Las proteínas del tejido se fraccionaron en dos subproteomas: extracto citosólico y extracto enriquecido en miofilamentos; los perfiles proteicos se obtuvieron mediante electroforesis bidimensional y por espectrometría de masas se identificaron alrededor de 130 proteínas únicas, de las cuales cambiaban de forma significativa unas 20. La mayoría de esas proteínas estaban involucradas en procesos de energética mitocondrial (Arrel y col., 2006).

Con el objetivo de reducir el rango dinámico de la muestra, permitiendo así un análisis más profundo del proteoma, en el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio del proteoma de mitocondrias aisladas, ya que se ha demostrado que este organelo subcelular juega un papel central en los mecanismos de cardioprotección. La complejidad de la muestra se redujo más aún al fraccionar el extracto mitocondrial por SDS-PAGE, lo cual también contribuyó a una mayor limpieza de la muestras previo al análisis por MS. De esta forma, en el presente trabajo logramos identificar unas 400 proteínas mitocondriales únicas, lo cual, teniendo en cuenta que en la actualidad se conocen alrededor de 600-700 proteínas mitocondriales (Westerman y Neupert, 2003), habla a favor de nuestras aproximaciones proteómicas en cuanto a la profundidad del análisis en comparación con otros autores. Adicionalmente, el trabajo de (Arrel y col., 2006) se basa en el uso de electroforesis bidimensional, la cual es conocida por su poca reproducibilidad y por no ser apta para el análisis de proteínas de membrana, que tienden a precipitar durante la separación en la primera dimensión por isoelectroenfoque (IEF). En este trabajo, gracias al uso del SDS-PAGE, alrededor del 45% de las proteínas identificadas son proteínas de membrana mitocondrial. Aunque nuestro estudio constituye el análisis proteómico más completo de todos los existentes hasta la fecha sobre preconditionamiento, el abordaje es todavía limitado y la mayoría de las proteínas detectadas son proteínas abundantes. Aunque las estrategias tipo SMIM, utilizadas para la identificación altamente específica de proteínas concretas, podrían aumentar la sensibilidad de análisis, estas estrategias sólo pueden llevarse a cabo sobre un número limitado de proteínas en un mismo análisis y no son por tanto útiles para el estudio masivo de proteomas. Para profundizar más en el estudio del proteoma mitocondrial será necesario desarrollar nuevos métodos que permitan una cobertura de identificación mayor del proteoma y también una mejora en la calidad de las identificaciones.

Por otro lado, con nuestra aproximación hemos sido capaces de cuantificar unas 200 proteínas mitocondriales y hemos detectado cambios de expresión significativos en alrededor de 75 proteínas, la mayoría de las cuales están implicadas principalmente en fosforilación oxidativa y disfunción mitocondrial (Figura 24).



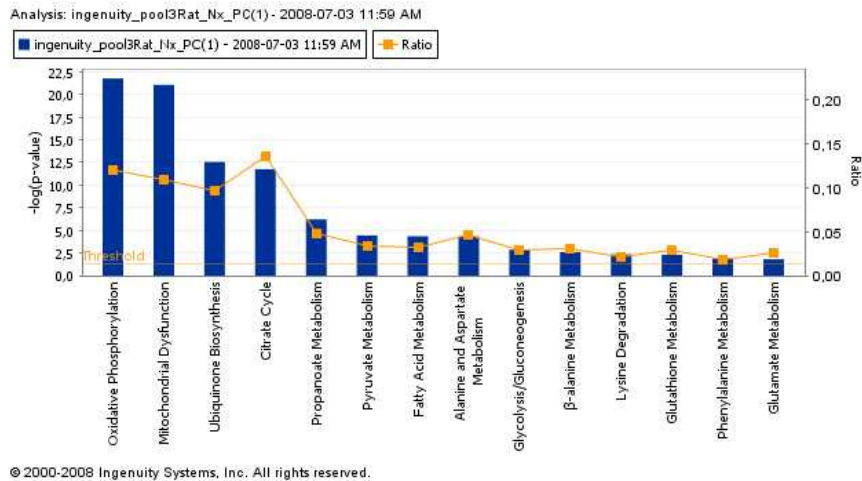


Figura 24. Histograma de análisis por el Programa Ingenuity (Canonical Pathways-b)

Según nuestros resultados, el preconditionamiento isquémico reduce los niveles de dos componentes del ciclo de Krebs como la isocitrato deshidrogenasa (sw|Q99NA5|IDH3A\_Isocitrate dehydrogenase) y dos enzimas del complejo de la piruvato deshidrogenasa (sw|P26284|ODPA Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha; sw|Q8BKZ9|ODPX\_Pyruvate dehydrogenase protein X component). Ambas enzimas además de ser reguladoras del ciclo, son las encargadas de la generación de NADH que alimenta la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM). Asimismo, se detectó un incremento de la piruvato deshidrogenasa cinasa 2 (sw|Q64536|PDK2\_[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 2), encargada de inhibir el complejo de la piruvato deshidrogenasa a través de la fosforilación de la subunidad E1 de dicho complejo. En conjunto, estos datos sugieren una disminución en la velocidad del ciclo de Krebs y un menor flujo de equivalentes de reducción hacia la CTEM en el corazón de las ratas preconditionadas.

Adicionalmente, nuestros datos indican una disminución en los niveles de las proteínas componentes de los complejos de la CTEM, sugiriendo una inhibición en la respiración mitocondrial en el corazón de ratas preconditionadas. La mayor disminución se observó a nivel del complejo IV (sw|P10888|COX41 Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1), que es el último componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y es el que proporciona la mayor fuerza que impulsa la transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular (Raw, 1989) (Figura 25). Es llamativo el hecho de que, aunque otras enzimas del complejo I de la CTEM, así como del ciclo de Krebs, también fueron detectadas, estas proteínas o bien no presentaron cambios o bien mostraron un aumento de expresión, indicando que los componentes de un mismo complejo no se modulan de la misma forma, lo cual concuerda con resultados descritos por otros autores (Arrel y col., 2006).

Por otro lado, según nuestros datos, el preconditionamiento isquémico reduce los niveles de los dos componentes fundamentales de la subunidad catalítica (F1) de la ATP sintasa (sw|P15999|ATPA\_ATP synthase subunit A; sw|P10719|ATPB\_ATP synthase subunit B). En el corazón la ATP-sintasa sintetiza ATP en condiciones normales, pero

paradójicamente, en condiciones de isquemia causa hidrólisis de ATP (Jennings RB, y col. 1991), lo cual agrava el funcionamiento del corazón isquémico. Por tanto, nuestros resultados sugieren que, a través de la disminución de los niveles de la subunidad catalítica de la ATP-sintasa, el PC reduce la hidrólisis innecesaria de ATP en los periodos de isquemia, protegiendo de esta forma al miocardio. A esto se une un incremento en los niveles de creatin quinasa, la enzima que cataliza la transferencia reversible de fosfato entre el ATP y el fosfógeno creatina, el cual actúa de reserva energética en casos de escasez de ATP.

La ventana de tiempo empleada para producir el acondicionamiento isquémico en el presente trabajo no es suficiente para detectar cambios en la expresión de genes. Con lo cual, las diferencias observadas en los niveles de las proteínas podrían deberse más bien a procesos de proteólisis, a cambios en la localización subcelular o a modificaciones post-traduccionales de las proteínas analizadas. De todos modos, es un hecho comprobado, que estos tiempos cortos son suficientes para producir protección miocárdica. Aunque los mecanismos subyacentes a este tipo de protección “temprana” no se conocen, se ha demostrado que los ROS mitocondriales están involucrados en este proceso (Pain y col., 2000; Heinzel y col., 2005), al igual que la apertura de canales de K<sup>+</sup> mitocondriales dependientes de ATP (mKATP). Incluso existen evidencias que apuntan a una inter-relación entre ambos efectores (Lebuffe y col., 2003; Pain y col., 2000).

Nuestros datos son consistentes con resultados de otros autores que logran mimetizar el acondicionamiento con compuestos que inhiben la CTEM (Riepe y col., 1996; Park y col., 1997; Rakhit y col., 2001). Como consecuencia, se podría producir un modesto incremento en la producción de ROS, los cuales a su vez podrían provocar desacoplamiento mitocondrial actuando sobre proteínas desacopladoras UCPs (Brand y Esteves, 2005) o sobre mKATP (Lebuffe y col., 2003; Pain y col., 2000). Además, el incremento de la adenilato kinasa observado en nuestro trabajo en los animales acondicionados podría aumentar la formación de AMP, lo cual a su vez provocaría una apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM) (Halestrap y col., 2004). En línea con esta hipótesis obtenemos una ligera disminución de citocromo C en las mitocondrias de los animales acondicionados, sugiriendo una liberación de citocromo C por la mitocondria en estos animales. Aunque la apertura total del PTPM ha estado ligado al daño por reperfusión (Crompton, 1999), evidencias recientes apuntan que una apertura moderada del PTPM subyace a la cardioprotección por acondicionamiento (Hausenloy y col., 2004).

Teniendo en cuenta todos estos datos, sugerimos que en el momento de la reperfusión, al estar las mitocondrias moderadamente desacopladas por los mecanismos discutidos anteriormente, se atenuaría el drástico aumento en la generación de ROS que es conocido por provocar muerte celular (Lefer y Granger, 2000), logrando de esta forma cardioprotección. Finalmente, el aumento de los niveles de las proteínas encargadas de la protección contra ROS (sw|P07895| Superoxide dismutase; sw|Q9Z0V6|PRDX3\_ Thioredoxin-dependent peroxide reductase) en las ratas acondicionadas, muy probablemente contribuiría a la supervivencia de los cardiomiocitos ante una reperfusión.

Los resultados obtenidos en esta tesis abren el camino a estudios más profundos sobre el proteoma de mitocondria de cardiomiocitos que permitan alcanzar un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes al proceso de acondicionamiento isquémico y también de la posible implicación de la Cx43 en este importante proceso. Además de conseguir una mayor profundidad de análisis proteómico, resultaría muy interesante analizar los cambios en los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales en respuesta a otros tipos de acondicionamiento, como el producido farmacológicamente. También resultaría muy interesante analizar los cambios en la composición de proteínas

producidos en este proteoma cuando se sustituye la Cx43 por la Cx32. Estos estudios ya han comenzado y están llevándose a cabo en nuestro laboratorio.

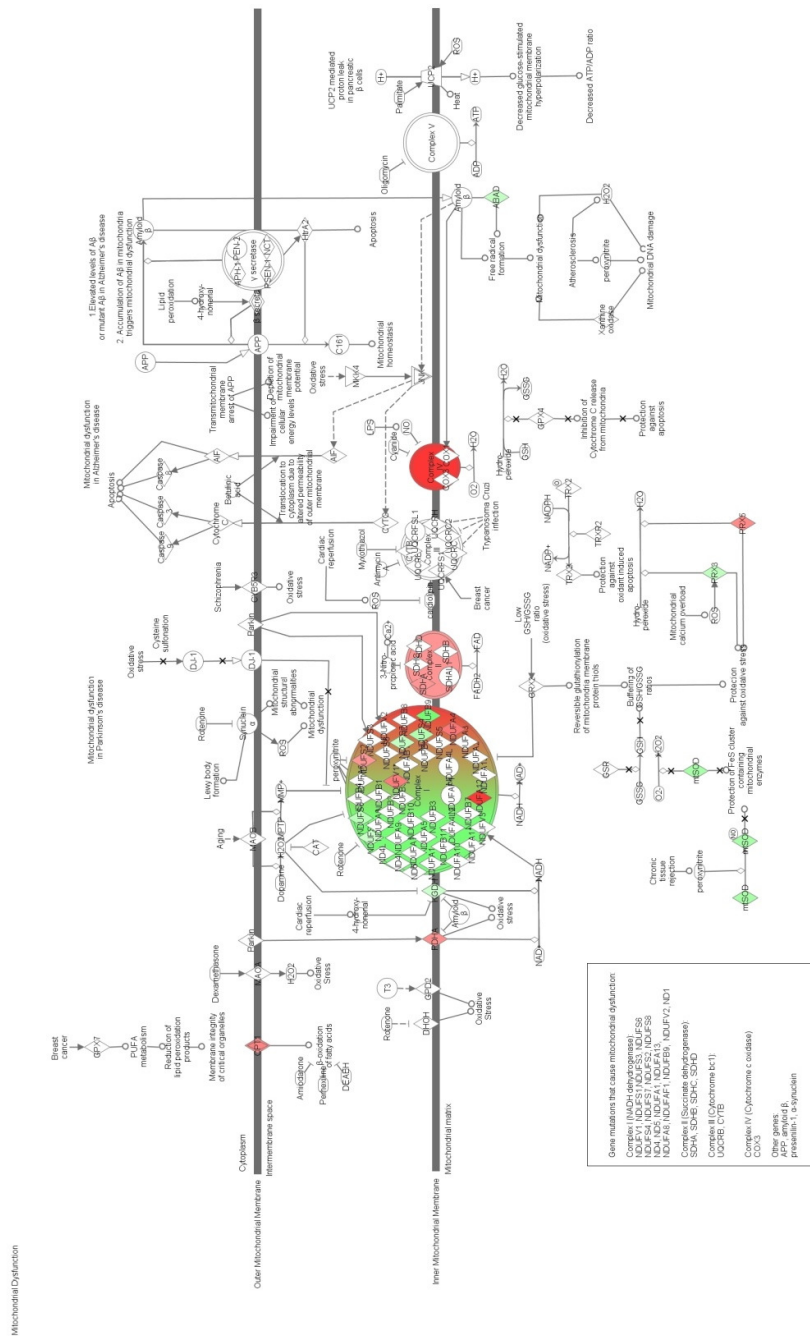


Figura 25. Esquema de disfunción mitocondrial analizado con el Programa Ingenuity. <http://www.ingenuity.com/index.html>. Color verde: indica aumentos de expresión, Rojo: disminución de expresión



## 8. CONCLUSIONES

- 1) Las nuevas tecnologías que se han desarrollado permiten la detección de proteínas individuales en mezclas muy complejas de forma altamente específica y la identificación y cuantificación diferencial a escala masiva de los componentes del proteoma de la membrana mitocondrial de cardiomiocitos.
- 2) La conexina 43 está presente en la membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata. Cuando la conexina 43 es sustituida por la conexina 32 en un modelo animal del tipo knock in/out, la conexina 32 no está presente en la membrana mitocondrial de cardiomiocitos, mientras que sí está presente en la membrana mitocondrial de hepatocitos. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la conexina 43 está implicada en el acondicionamiento cardiaco.
- 3) Se han identificado más de 400 proteínas mitocondriales en cardiomiocitos de rata, siendo la mayoría de ellas proteínas integrales de membrana. Cerca de 70 proteínas de la membrana mitocondrial de cardiomiocitos, entre más de 200, muestran cambios de expresión significativos en respuesta a un tratamiento de acondicionamiento isquémico. La mayoría de dichas proteínas están implicadas en fosforilación oxidativa y procesos de disfunción mitocondrial. Este es el estudio proteómico sobre el acondicionamiento de miocardio más completo hasta la fecha.
- 4) El acondicionamiento isquémico del miocardio reduce los niveles de la isocitrato deshidrogenasa y de la piruvato deshidrogenasa, dos de las tres enzimas reguladoras del ciclo de Krebs, y aumenta los niveles de la piruvato deshidrogenasa quinasa 2, una enzima inhibidora del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Estos datos sugieren que en las ratas acondicionadas disminuyen la velocidad del ciclo de Krebs y el flujo de equivalentes de reducción hacia la cadena de transporte electrónico mitocondrial.
- 5) El acondicionamiento isquémico del miocardio reduce los niveles de proteínas componentes del complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, sugiriendo una disminución en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular.
- 6) El acondicionamiento isquémico disminuye los niveles de las subunidades A y B, componentes fundamentales de la subunidad catalítica F<sub>1</sub> de la ATP sintasa, e incrementa los niveles de creatina quinasa. Estos cambios podrían tener un efecto protector en el miocardio acondicionado, evitando una hidrólisis innecesaria de ATP y aportando una reserva energética durante los periodos de isquemia.
- 7) En los animales acondicionados aumenta el nivel de adenilato quinasa, enzima implicada en la síntesis de AMP, y disminuye ligeramente los niveles de citocromo C mitocondrial. Estos datos sugieren una posible apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y un desacoplamiento moderado de la mitocondria.
- 8) El acondicionamiento isquémico aumenta los niveles de la superóxido dismutasa y la reductasa de peróxido dependiente de tiorredoxina, dos

proteínas que contribuyen a la protección contra el daño producido por especies reactivas de oxígeno.

CONCLUSIÓN FINAL: El efecto cardioprotector del preconditionamiento isquémico podría deberse a un desacoplamiento moderado de la mitocondria cardiaca que atenuaría la muerte celular provocada por la generación drástica de especies reactivas de oxígeno durante la reperfusión.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature* 422(6928): 198-207.
- Andersen, J. S. and M. Mann (2006). "Organellar proteomics: turning inventories into insights." *EMBO Rep* 7(9): 874-9.
- Arrell, D. K., S. T. Elliott, et al. (2006). "Proteomic analysis of pharmacological preconditioning: novel protein targets converge to mitochondrial metabolism pathways." *Circ Res* 99(7): 706-14.
- Banks, R. E., M. J. Dunn, et al. (2000). "Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities." *Lancet* 356(9243): 1749-56.
- Barber, M., R. S. Bordoli, et al. (1981). "Fast atom bombardment mass spectrometry of bleomycin A2 and B2 and their metal complexes." *Biochem Biophys Res Commun* 101(2): 632-8.
- Becker, L. B. (2004). "New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology." *Cardiovasc Res* 61(3): 461-70.
- Boengler, K., G. Dodoni, et al. (2005). "Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning." *Cardiovasc Res* 67(2): 234-44.
- Boyle, J. G. and C. M. Whitehouse (1992). "Time-of-flight mass spectrometry with an electrospray ion beam." *Anal Chem* 64(18): 2084-9.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brenner, S., M. Johnson, et al. (2000). "Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays." *Nat Biotechnol* 18(6): 630-4.
- Carroll, J., I. M. Fearnley, et al. (2006). "Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16170-5.
- Clauser, K. R., P. Baker, et al. (1999). "Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching." *Anal Chem* 71(14): 2871-82.
- Cleveland, D. W., S. G. Fischer, et al. (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis." *J Biol Chem* 252(3): 1102-6.
- Costa, A. D., K. D. Garlid, et al. (2005). "Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria." *Circ Res* 97(4): 329-36.
- Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." *Biochem J* 341 (Pt 2): 233-49.
- Cusato, K., A. Bosco, et al. (2003). "Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina." *J Neurosci* 23(16): 6413-22.
- D'Ascenzo, M., L. Choe, et al. (2008). "iTRAQPak: an R based analysis and visualization package for 8-plex isobaric protein expression data." *Brief Funct Genomic Proteomic* 7(2): 127-35.
- Damodaran, S., T. D. Wood, et al. (2007). "Evaluating peptide mass fingerprinting-based protein identification." *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5(3-4): 152-7.
- De Hoog, C. L. and M. Mann (2004). "Proteomics." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 267-93.
- Di Lisa, F. and P. Bernardi (2006). "Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole." *Cardiovasc Res* 70(2): 191-9.

- Dirksen, M. T., G. J. Laarman, et al. (2007). "Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies." *Cardiovasc Res* 74(3): 343-55.
- Ehlert, F. A. and J. J. Goldberger (1997). "Cellular and pathophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias in acute ischemia and infarction." *Pacing Clin Electrophysiol* 20(4 Pt 1): 966-75.
- Forner, F., L. J. Foster, et al. (2006). "Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver." *Mol Cell Proteomics* 5(4): 608-19.
- Friedman, D. B., S. Hill, et al. (2004). "Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics* 4(3): 793-811.
- Garcia-Dorado, D., J. Insete, et al. (1997). "Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion." *Circulation* 96(10): 3579-86.
- Garrels, J. I., C. S. McLaughlin, et al. (1997). "Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins." *Electrophoresis* 18(8): 1347-60.
- Gavin, A. C., M. Bosche, et al. (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." *Nature* 415(6868): 141-7.
- Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4): 285-94.
- Griffin, T. J., D. R. Goodlett, et al. (2001). "Advances in proteome analysis by mass spectrometry." *Curr Opin Biotechnol* 12(6): 607-12.
- Gygi, S. P. and R. Aebersold (2000). "Mass spectrometry and proteomics." *Curr Opin Chem Biol* 4(5): 489-94.
- Gygi, S. P., D. K. Han, et al. (1999). "Protein analysis by mass spectrometry and sequence database searching: tools for cancer research in the post-genomic era." *Electrophoresis* 20(2): 310-9.
- Gygi, S. P., B. Rist, et al. (1999). "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." *Nat Biotechnol* 17(10): 994-9.
- Halestrap, A. P. (2004). "Does the mitochondrial permeability transition have a role in preconditioning?" *Circulation* 110(11): e303; author reply e303.
- Hanke, S., H. Besir, et al. (2008). "Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level." *J Proteome Res* 7(3): 1118-30.
- Hausenloy, D. J., P. K. Mwamure, et al. (2007). "Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial." *Lancet* 370(9587): 575-9.
- Hausenloy, D. J., A. Tsang, et al. (2005). "Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(2): H971-6.
- Heinzel, F. R., Y. Luo, et al. (2005). "Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice." *Circ Res* 97(6): 583-6.
- Heller, M., H. Mattou, et al. (2003). "Trypsin catalyzed 16O-to-18O exchange for comparative proteomics: tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-ion trap mass spectrometers." *J Am Soc Mass Spectrom* 14(7): 704-18.
- Henry, K. D., E. R. Williams, et al. (1989). "Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23): 9075-8.

- Henzel, W. J., C. Watanabe, et al. (2003). "Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting." *J Am Soc Mass Spectrom* 14(9): 931-42.
- Holmuhamedov, E. L., S. Jovanovic, et al. (1998). "Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function." *Am J Physiol* 275(5 Pt 2): H1567-76.
- Horsley, V. and G. K. Pavlath (2002). "NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation." *J Cell Biol* 156(5): 771-4.
- Hu, Q., R. J. Noll, et al. (2005). "The Orbitrap: a new mass spectrometer." *J Mass Spectrom* 40(4): 430-43.
- Hynek, R., B. Svensson, et al. (2006). "Enrichment and identification of integral membrane proteins from barley aleurone layers by reversed-phase chromatography, SDS-PAGE, and LC-MS/MS." *J Proteome Res* 5(11): 3105-13.
- Jalife, J., G. E. Morley, et al. (1999). "Connexins and impulse propagation in the mouse heart." *J Cardiovasc Electrophysiol* 10(12): 1649-63.
- Jennings, R. B., C. E. Murry, et al. (1991). "Preconditioning myocardium with ischemia." *Cardiovasc Drugs Ther* 5(5): 933-8.
- Jorge, I., E. M. Casas, et al. (2007). "High-sensitivity analysis of specific peptides in complex samples by selected MS/MS ion monitoring and linear ion trap mass spectrometry: application to biological studies." *J Mass Spectrom* 42(11): 1391-403.
- Kaasik, A., D. Safiulina, et al. (2007). "Regulation of mitochondrial matrix volume." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C157-63.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem* 60(20): 2299-301.
- Kitakaze, M., M. Asakura, et al. (2007). "Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials." *Lancet* 370(9597): 1483-93.
- Korbel, S., M. Schumann, et al. (2005). "Relative quantification of erythropoietin receptor-dependent phosphoproteins using in-gel 18O-labeling and tandem mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(16): 2259-71.
- Lampe, P. D. and A. F. Lau (2000). "Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins." *Arch Biochem Biophys* 384(2): 205-15.
- Lane, C. S. (2005). "Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences." *Cell Mol Life Sci* 62(7-8): 848-69.
- Lebuffe, G., P. T. Schumacker, et al. (2003). "ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(1): H299-308.
- Li, X. J., H. Zhang, et al. (2003). "Automated statistical analysis of protein abundance ratios from data generated by stable-isotope dilution and tandem mass spectrometry." *Anal Chem* 75(23): 6648-57.
- Lin, J. H., H. Weigel, et al. (1998). "Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury." *Nat Neurosci* 1(6): 494-500.
- Lin, J. H., J. Yang, et al. (2003). "Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury." *J Neurosci* 23(2): 430-41.
- Link, A. J., J. Eng, et al. (1999). "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry." *Nat Biotechnol* 17(7): 676-82.
- Lockhart, D. J. and E. A. Winzeler (2000). "Genomics, gene expression and DNA arrays." *Nature* 405(6788): 827-36.
- Loo, J. A., C. G. Edmonds, et al. (1990). "Primary sequence information from intact proteins by electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Science* 248(4952): 201-4.

- Lopez-Ferrer, D., S. Martinez-Bartolome, et al. (2004). "Statistical model for large-scale peptide identification in databases from tandem mass spectra using SEQUEST." *Anal Chem* 76(23): 6853-60.
- Lopez-Ferrer, D., A. Ramos-Fernandez, et al. (2006). "Quantitative proteomics using (16)O/(18)O labeling and linear ion trap mass spectrometry." *Proteomics* 6 Suppl 1: S4-S11.
- Mahaffey, K. W., J. A. Puma, et al. (1999). "Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial." *J Am Coll Cardiol* 34(6): 1711-20.
- Makarov, A. (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." *Anal Chem* 72(6): 1156-62.
- Mann, M., R. C. Hendrickson, et al. (2001). "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry." *Annu Rev Biochem* 70: 437-73.
- Martinez-Bartolome, S., P. Navarro, et al. (2008). "Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method." *Mol Cell Proteomics* 7(6): 1135-45.
- Martínez-Bartolomé, S., Navarro, P. J., Martín-Maroto, F., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Villar, m., García-ruiz, J. P., Vázquez, J. (2007). "Properties of average score distributions of SEQUEST: the Probability Ratio method." *Molecular and Cell Proteomics* in press.
- Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." *PLoS Med* 3(11): e442.
- Mortz, E., P. B. O'Connor, et al. (1996). "Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8264-7.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74(5): 1124-36.
- Navarro, P. J., Martínez-Acedo, P., Serrano, H., jorge, I., Vázquez, J. (2007). A full automated and integrated bioinformatic toolset for large-scale peptide identification and quantification by 18O stable isotope labeling. 2nd Congress of the SEProt and 1st Meeting of EUPA, Valencia, Spain.
- Nelson, C. J., A. D. Hegeman, et al. (2006). "A quantitative analysis of Arabidopsis plasma membrane using trypsin-catalyzed (18)O labeling." *Mol Cell Proteomics* 5(8): 1382-95.
- Neubauer, G., A. Gottschalk, et al. (1997). "Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 385-90.
- Oda, Y., T. Nagasu, et al. (2001). "Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome." *Nat Biotechnol* 19(4): 379-82.
- Ong, S. E., B. Blagoev, et al. (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." *Mol Cell Proteomics* 1(5): 376-86.
- Padilla, F., D. Garcia-Dorado, et al. (2003). "Protection afforded by ischemic preconditioning is not mediated by effects on cell-to-cell electrical coupling during myocardial ischemia-reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(5): H1909-16.
- Pandey, A. and M. Mann (2000). "Proteomics to study genes and genomes." *Nature* 405(6788): 837-46.
- Pappin, D. J., P. Hojrup, et al. (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol* 3(6): 327-32.



- Paul, W. a. s., H.S. (1953). "Mass spectrometer without magnetic fiel." *Z Naturforsch*(8a): 448-450.
- Peracchia, C. (2004). "Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin." *Biochim Biophys Acta* 1662(1-2): 61-80.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, et al. (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." *Electrophoresis* 20(18): 3551-67.
- Piper, H. M., D. Garcia-Dorado, et al. (1998). "A fresh look at reperfusion injury." *Cardiovasc Res* 38(2): 291-300.
- Plotkin, L. I., S. C. Manolagas, et al. (2002). "Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels." *J Biol Chem* 277(10): 8648-57.
- Pradet-Balade, B., F. Boulme, et al. (2001). "Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?" *Trends Biochem Sci* 26(4): 225-9.
- Rachlin, J., D. D. Cohen, et al. (2006). "Biological context networks: a mosaic view of the interactome." *Mol Syst Biol* 2: 66.
- Ramos-Fernandez, A., D. Lopez-Ferrer, et al. (2007). "Improved method for differential expression proteomics using trypsin-catalyzed 18O labeling with a correction for labeling efficiency." *Mol Cell Proteomics* 6(7): 1274-86.
- Ratmann, O., O. Jorgensen, et al. (2007). "Using likelihood-free inference to compare evolutionary dynamics of the protein networks of *H. pylori* and *P. falciparum*." *PLoS Comput Biol* 3(11): e230.
- Reinders, J., U. Lewandrowski, et al. (2004). "Challenges in mass spectrometry-based proteomics." *Proteomics* 4(12): 3686-703.
- Riepe, M. W., W. N. Niemi, et al. (1996). "Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase." *Exp Neurol* 138(1): 15-21.
- Rodriguez-Sinovas, A., A. Cabestrero, et al. (2007). "The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling." *Prog Biophys Mol Biol* 94(1-2): 219-32.
- Rodriguez-Sinovas, A., D. Garcia-Dorado, et al. (2003). "Pre-treatment with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia." *Cardiovasc Res* 58(1): 109-17.
- Rodriguez-Sinovas, A., D. Garcia-Dorado, et al. (2004). "Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium." *J Physiol* 559(Pt 1): 245-57.
- Rodriguez-Sinovas, A., D. Garcia-Dorado, et al. (2006). "Protective effect of gap junction uncouplers given during hypoxia against reoxygenation injury in isolated rat hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(2): H648-56.
- Roepstorff, P. (1992). "Characterization of proteins by mass spectrometry. Invited lecture." *Analyst* 117(3): 299-303.
- Rosenfeld, J., J. Capdevielle, et al. (1992). "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." *Anal Biochem* 203(1): 173-9.
- Ross, P. L., Y. N. Huang, et al. (2004). "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents." *Mol Cell Proteomics* 3(12): 1154-69.
- Ruiz-Meana, M., A. Abellan, et al. (2007). "Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca<sup>2+</sup> overloaded cardiac myocytes." *Basic Res Cardiol* 102(6): 542-52.

- Ruiz-Meana, M., D. Garcia-Dorado, et al. (1999). "Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions." *Circ Res* 85(3): 280-7.
- Ruiz-Meana, M., D. Garcia-Dorado, et al. (2001). "Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(6): H2563-71.
- Scigelova, M. and A. Makarov (2006). "Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics." *Proteomics* 6 Suppl 2: 16-21.
- Schmidt, M. R., M. Smerup, et al. (2007). "Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4): H1883-90.
- Schulz, R., M. V. Cohen, et al. (2001). "Signal transduction of ischemic preconditioning." *Cardiovasc Res* 52(2): 181-98.
- Schwartz, J. C., M. W. Senko, et al. (2002). "A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer." *J Am Soc Mass Spectrom* 13(6): 659-69.
- Senko, M. W., J. P. Speir, et al. (1994). "Collisional activation of large multiply charged ions using Fourier transform mass spectrometry." *Anal Chem* 66(18): 2801-8.
- Serrano, H., Jorge, I., Martínez-Acedo, P., Navarro, P. J., Pérez-Hernández, D., Miró Casas, E., García-Dorado, D., Vázquez, J. (2007). "Quantitative proteomics of mitochondrial membrane proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, 16O/18O stable isotope labeling and linear ion trap mass spectrometry." *Proteómica* 0: 29-34.
- Shevchenko, A., H. Tomas, et al. (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." *Nat Protoc* 1(6): 2856-60.
- Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone." *Biochem Soc Trans* 24(3): 893-6.
- Sickmann, A., J. Reinders, et al. (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13207-12.
- Sohl, G. and K. Willecke (2004). "Gap junctions and the connexin protein family." *Cardiovasc Res* 62(2): 228-32.
- Staes, A., H. Demol, et al. (2004). "Global differential non-gel proteomics by quantitative and stable labeling of tryptic peptides with oxygen-18." *J Proteome Res* 3(4): 786-91.
- Taylor, S. W., E. Fahy, et al. (2003). "Characterization of the human heart mitochondrial proteome." *Nat Biotechnol* 21(3): 281-6.
- Torgerson, D. F., R. P. Skowronski, et al. (1974). "New approach to the mass spectroscopy of non-volatile compounds." *Biochem Biophys Res Commun* 60(2): 616-21.
- Tyers, M. and M. Mann (2003). "From genomics to proteomics." *Nature* 422(6928): 193-7.
- Ulrich, R. G., J. A. Bacon, et al. (1998). "Disruption of mitochondrial activities in rabbit and human hepatocytes by a quinoxalinone anxiolytic and its carboxylic acid metabolite." *Toxicology* 131(1): 33-47.
- Van Veen, A. A., H. V. van Rijen, et al. (2001). "Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties." *Cardiovasc Res* 51(2): 217-29.
- Velculescu, V. E., L. Zhang, et al. (1995). "Serial analysis of gene expression." *Science* 270(5235): 484-7.
- Washburn, M. P., D. Wolters, et al. (2001). "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." *Nat Biotechnol* 19(3): 242-7.
- Westermann, B. and W. Neupert (2003). "'Omics' of the mitochondrion." *Nat Biotechnol* 21(3): 239-40.
- Whitehouse, C. M., R. N. Dreyer, et al. (1985). "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers." *Anal Chem* 57(3): 675-9.



- Yague, J., A. Paradela, et al. (2003). "Peptide rearrangement during quadrupole ion trap fragmentation: added complexity to MS/MS spectra." *Anal Chem* 75(6): 1524-35.
- Yao, X., C. Afonso, et al. (2003). "Dissection of proteolytic 18O labeling: endoprotease-catalyzed 16O-to-18O exchange of truncated peptide substrates." *J Proteome Res* 2(2): 147-52.
- Yates, J. R., 3rd, J. K. Eng, et al. (1995). "Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database." *Anal Chem* 67(8): 1426-36.
- Zhu, M., J. Feng, et al. (2006). "Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway." *Cardiovasc Res* 72(1): 152-62.