Instituto de Biomedicina de Valencia
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
IBV
CSIC

HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI

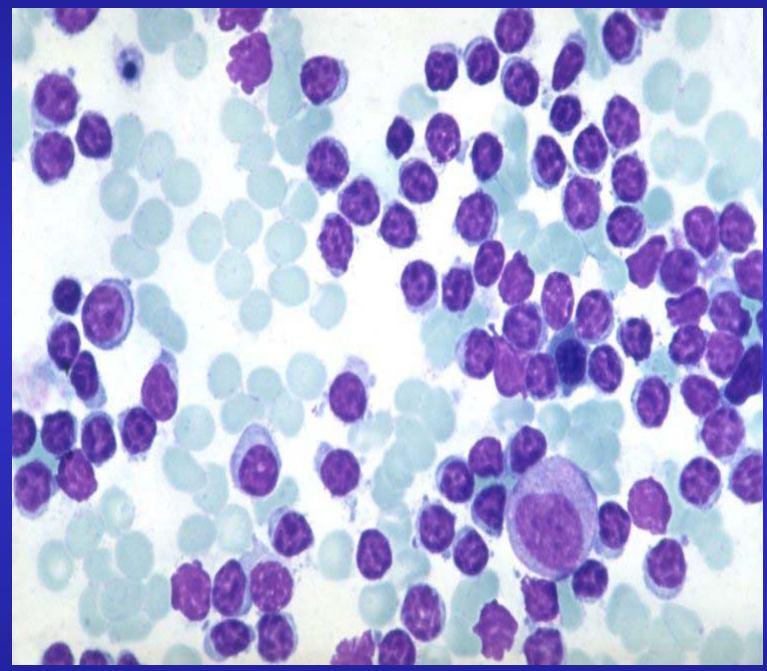
PERFILES PROTÉICOS CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PACIENTES DE LLC-B CON LOS GENES IGVH Y BCL6 MUTADOS O NO MUTADOS

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B

- **Síndrome linfoproliferativo crónico más frecuente en Occidente**

- **El 75-80 % de los pacientes se diagnostican en estadio incipiente (A de Binet).**

- **Curso heterogéneo**

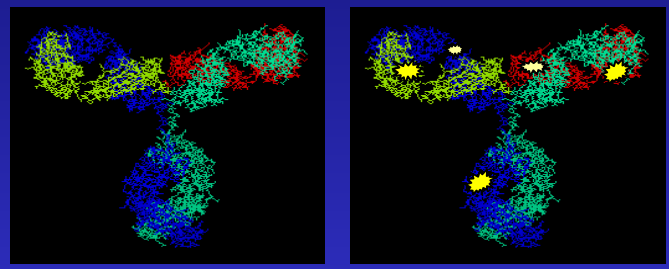


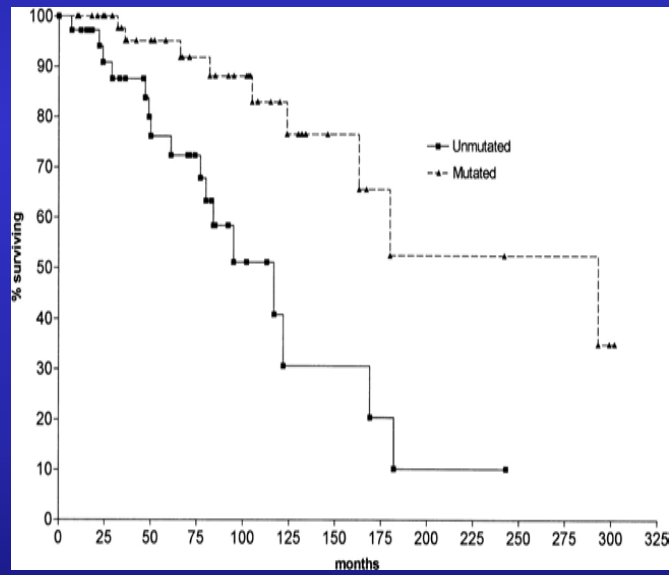
MUTACIONES DE IgVH

- En función del estado mutacional de la región variable del gen de la inmunoglobulina (IgVH), en la LLC se distinguen dos grandes grupos.

- Un 50-60% de las LLC-B presentan mutaciones de IgVH, la enfermedad tiene un curso clínico indolente y una mediana de supervivencia de 293 meses.

- El 40-50% restante presenta ausencia de mutaciones en IgVH, con curso clínico mas agresivo y una mediana de supervivencia de 117 meses.

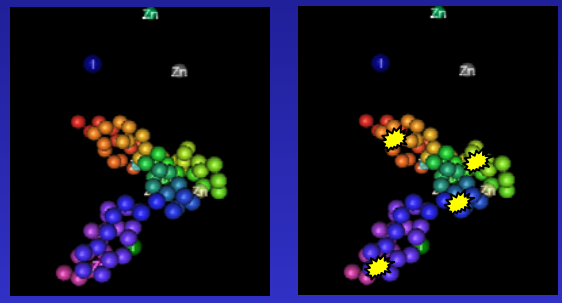


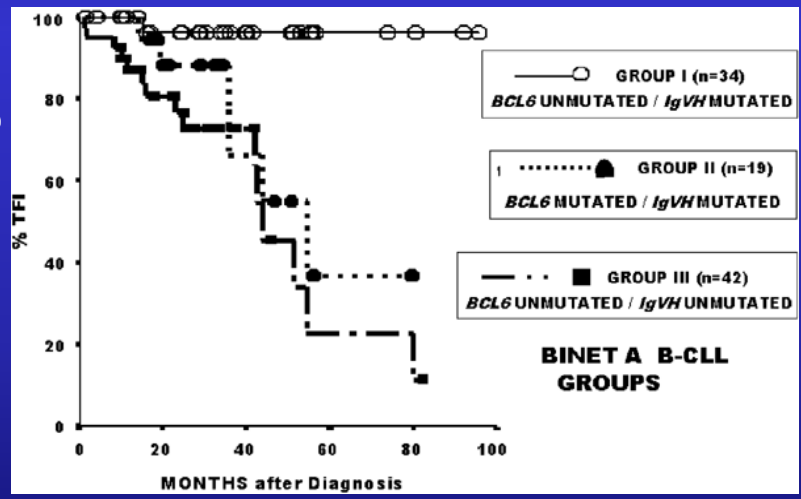


Hamblin TJ et al. Blood. 1999; 94: 1848-1856

MUTACIONES SOMATICAS DEL GEN *BCL6*

- Se han descrito mutaciones somáticas del gen BCL6, aunque su significado clínico es incierto.
- En nuestra experiencia, la presencia de mutaciones somáticas del gen BCL6 aparece en el 20% de los casos de LLC-B en el estadio A.
- Se restringe a pacientes con mutaciones de IgVH e identifica un subgrupo que presenta menor intervalo libre de tratamiento.





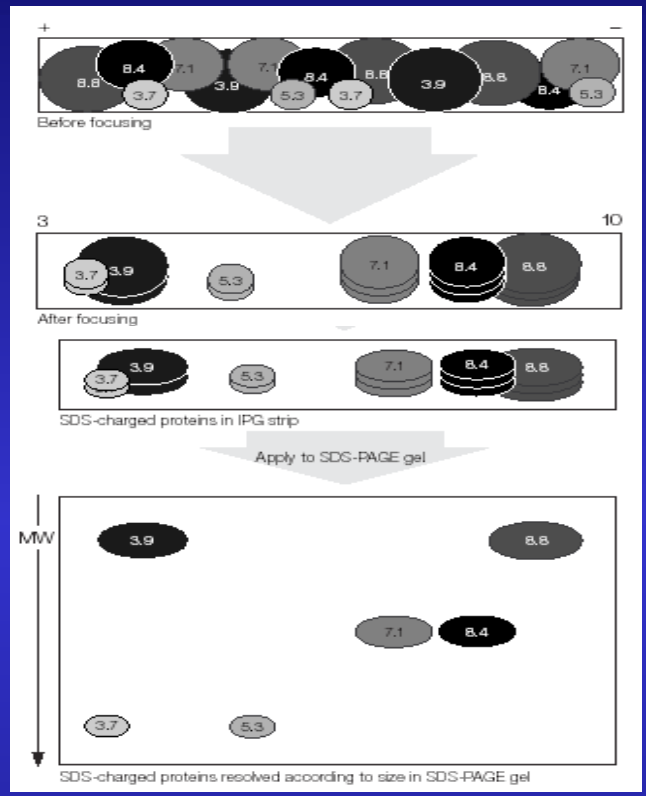
Sarsotti E et al. Leukemia. 2004; 18: 743-746

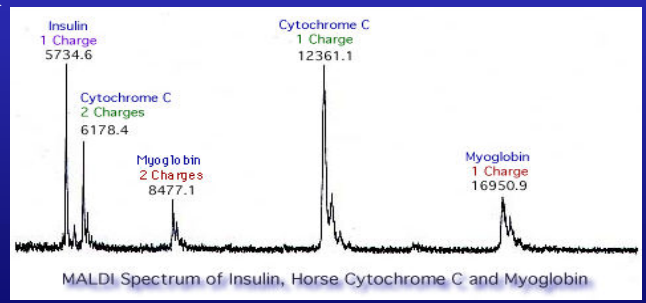
PROTEÓMICA

• La secuenciación completa del genoma humano ha favorecido la utilización de la proteómica en investigación clínica en humanos.

•El grado de éxito en la identificación de la huella peptídica de una proteína depende de que ésta esté representada en las bases de datos.

•La proteómica generalmente combina la resolución de la electroforésis/cromatografía bidimensional con la determinación de la huella peptídica por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF.





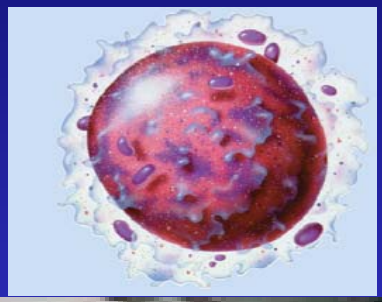
OBJETIVO

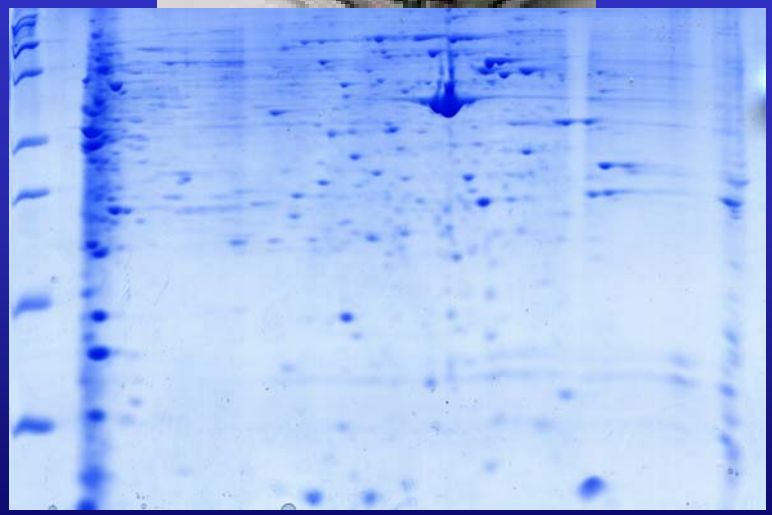
CARACTERIZAR EL PERFIL PROTEÓMICO DE LINFOCITOS B DE PACIENTES DE DIVERSOS GRUPOS CLÍNICOS A FIN DE IDENTIFICAR MARCADORES MOLECULARES QUE LOS DISCRIMINEN.

SUJETOS DE ESTUDIO

	Gen IgVH mutado	Gen IgVH no mutado
Gen BCL6 mutado	5	-
Gen BCL6 no mutado	5	5

METODOLOGIA





Extracción y cuantificación de la proteína total

100 μg Proteina total

IEF

Tiras de 13 cm

Rango pI 3-10, 4-7, 6-11

SDS-PAGE

15% Acrilamida

Tinción con Coomasie, Plata..

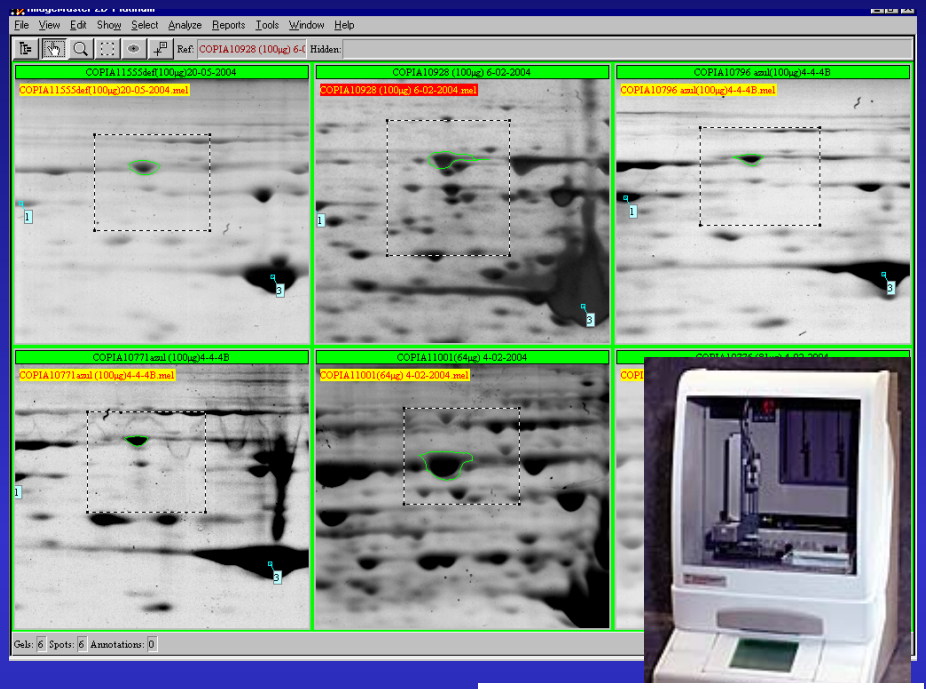
METODOLOGIA

Análisis de imagen con software especializado

Cortar del gel las manchas de interés

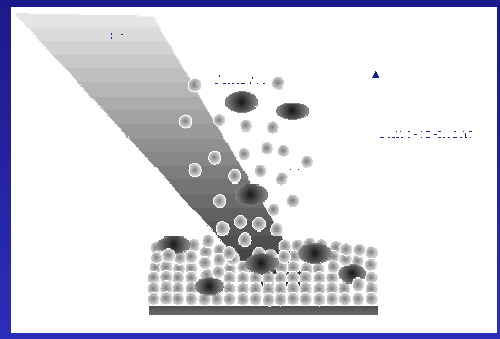
Digestión automatizada (tripsina) de la muestra reducida y carbamidometilada.

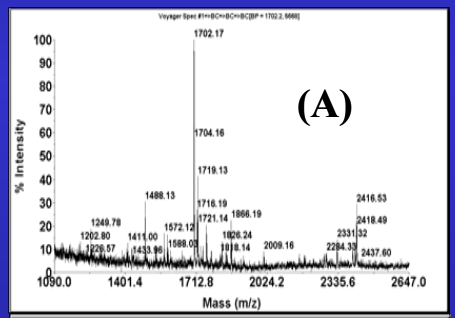
Limpieza de la muestra (ZipTip) y mezcla con la matriz sólida (ácido α-hidroxicinámico)

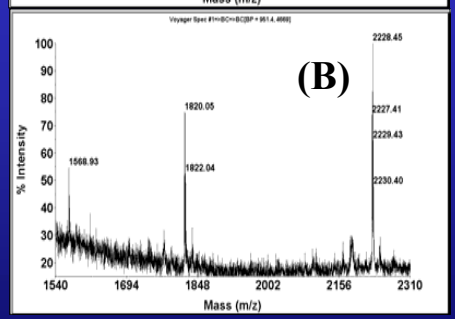


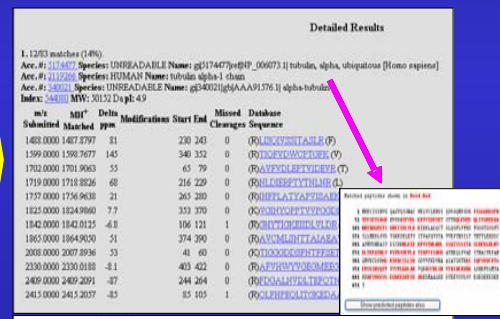
METODOLOGIA

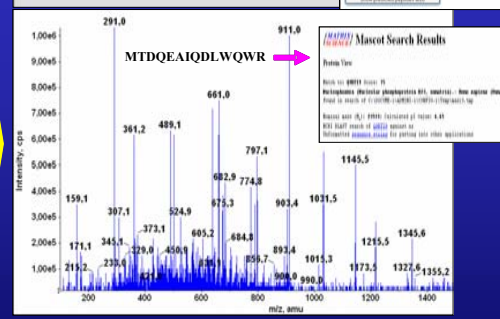
- El láser incide en la matriz e ioniza los péptidos.
- Medimos el tiempo de vuelo de estos peptidos que es función de su masa.
- Cada péptido genera un espectro característico que depende del lugar en el que ha sido cortado por la tripsina.
- En general, un espectro rico en iones permite identificar de manera no ambigua la proteína problema.
- Un espectro con pocos iones no contiene suficiente información y necesita de una secuenciación peptídica utilizando la espectrometría de masas en tandem (ESI-MS/MS).





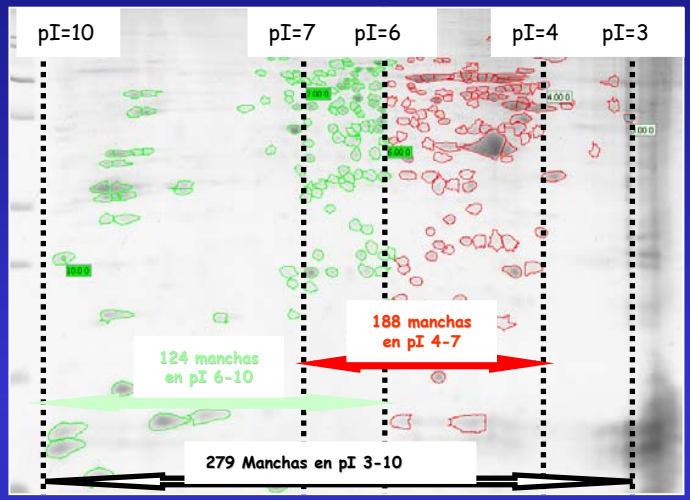


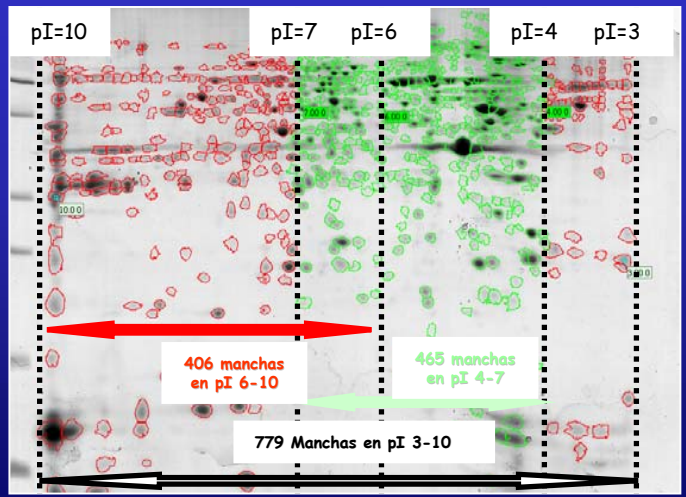




RESULTADOS

Determinación del rango idóneo de punto isoeléctrico (pI).





- 1 muestra de cada grupo de pacientes por duplicado.
- Contaje del número de manchas en cada rango de pI.
- El rango idóneo de pI fue el comprendido entre 4-7, ya que se obtiene un porcentaje mayor de manchas (+15%).

RESULTADOS

Determinación del numero de manchas y el solapamiento entre geles.

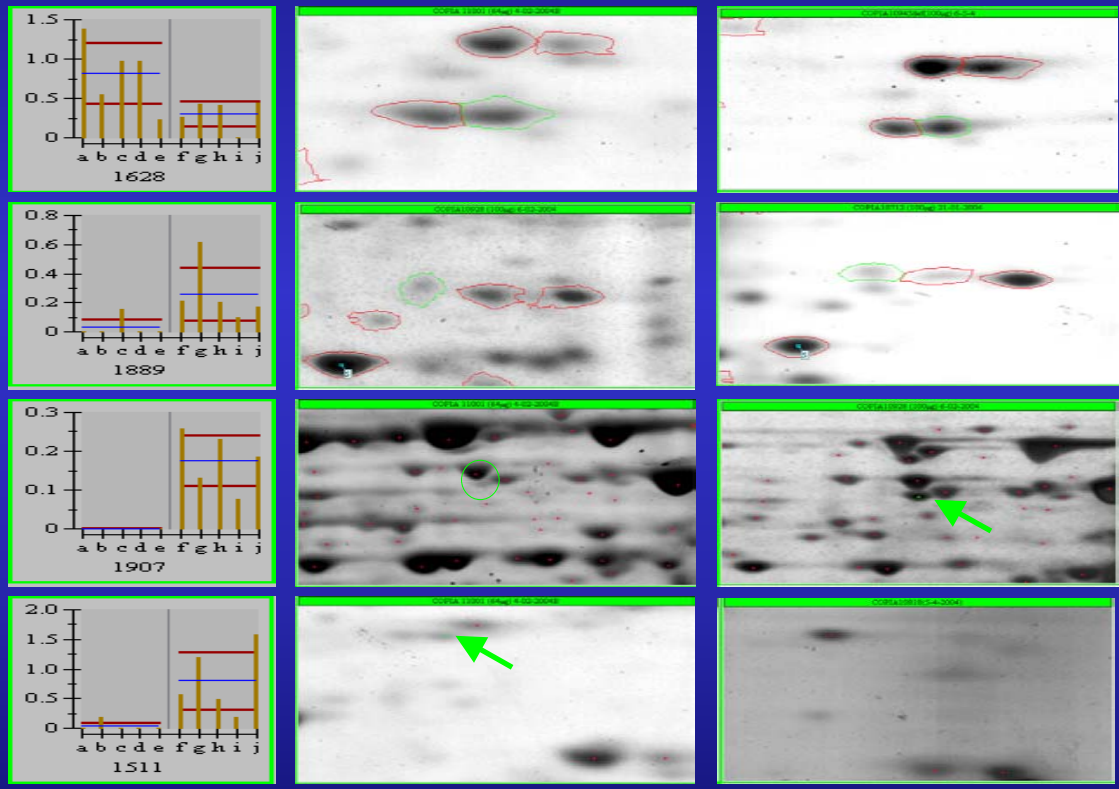
Nombre	Clase	Número de manchas
10776	IgVH, BCL6 (M)	249
10817	IgVH, BCL6 (M)	240
11001	IgVH, BCL6 (M)	276
11246	IgVH, BCL6 (M)	236
10294	IgVH, BCL6 (M)	139
10771	IgVH(M), BCL6 (no M)	102
10796	IgVH(M), BCL6 (no M)	155
10928	IgVH(M), BCL6 (no M)	337
11555	IgVH(M), BCL6 (no M)	127
11516	IgVH(M), BCL6 (no M)	179
10668	IgVH, BCL6 (no M)	281
10712	IgVH, BCL6 (no M)	301
10818	IgVH, BCL6 (no M)	257
10945	IgVH, BCL6 (no M)	152
11321	IgVH, BCL6 (no M)	182
Número medio manchas por gel		214

Grupos	Solapamiento medio
IgVH, BCL6 (M)	68.6%
IgVH (M), BCL6 (no M)	78.5%
IgVH, BCL6 (no M)	73.7%
Intergrupos	76.8%

- El número medio de manchas por gel fue de 214.
- El solapamiento medio de los grupos fue del 76,8%

RESULTADOS

Manchas estadísticamente significativas.



Mancha: 1628
IgVH, BCL6 (M) vs. IgVH, BCL6 (no M)
14-3-3 Proteína Z
p= 0.0202

Mancha: 1889
IgVH(M), BCL6 (no M) vs. IgVH, BCL6 (no M)
Proteína 1 asociada a citoesqueleto
p= 0.0211

Mancha: 1907
IgVH, BCL6 (M) vs.. IgVH(M), BCL6 (no M)
Chaperonina TCP-1
p= 0.0174

Mancha: 1511
IgVH, BCL6 (M) vs. IgVH, BCL6 (no M)
Nucleofosmina
p= 0.0073

De 15 a 8 manchas discriminan el comportamiento de cada grupo estudiado

RESULTADOS

Comparación entre pacientes IgVH y BCL6 mutados y pacientes mutados en IgVH pero no en BCL6, (++ vs. +-).

Manchas estadísticamente significativas	Manchas identificadas mediante MALDI-TOF o ESI Q-TRAP MS
15	10

PROTEÍNA	PROCESO BIOLOGICO	IgVH y BCL6 (M)	IgVH(M) y BCL6 (no M)
Tubulina α	Forma microtúbulos de citoesqueleto Migración celular Segregación cromosómica mitosis / meiosis	0.54	1.28
Similar a β tubulina	Componente de tubulina Une GTP (actividad GTPasa) Polimerización de microtúbulos	0.40	1.85
Vimentina	Forma filamentos intermedios de clase III, en células no epiteliales	0.27	0.98
NADH Ubiquinona reductasa	Transfiere electrones de NADH a cadena respiratoria, forma parte del complejo I de mamíferos	0.12	0.02
Heterochromatin-specific nonhistone protein (CBX1)	Unión a cromatina Enrrollamiento / desenrrollamiento de ésta	0.29	0.20
14-3-3 Proteína Z	Regulación ciclo celular Exocitosis Activador del inhibidor de Protein Kinasa C (PKIC)	0.82	0.30

RESULTADOS

Comparación entre pacientes mutados en IgVH y BCL6 y pacientes no mutados en IgVH y BCL6. (++ vs. --)

Manchas estadísticamente significativas	Manchas identificadas mediante MALDI-TOF o ESI Q-TRAP MS
10	7

PROTEÍNA	PROCESO BIOLOGICO	IgVH y BCL6 (M)	IgVH y BCL6 (no M)
Heterogeneus nuclear ribonucleoprotein F	Forma complejos para el procesamiento del pre mRNA antes de que se convierta en funcional. Se trastoca a citoplasma unido a estos mRNA Se une a mRNAs ricos en G	0.24	0.09
F-actina capping subunidad α	Se une a filamentos de actina en sus extremos, bloqueando el crecimiento. Relacionado con la motilidad celular	1.17	0.75
Transformation upregulated nuclear protein o Heterogeneus nuclear ribonucleoprotein K	Proteína de unión a pre mRNA ricos en poli C, juega un papel en el metabolismo nuclear de estos pre mRNA. También se une a DNAsc con poli C	0.09	0.34

RESULTADOS

Comparación entre pacientes mutados en IgVH pero no en BCL6 y pacientes no mutados en IgVH y BCL6. (+- vs. --)

Manchas estadísticamente significativas	Manchas identificadas mediante MALDI-TOF o ESI Q-TRAP MS
8	5

PROTEÍNA	**PROCESO BIOLOGICO**	**IgVH (M) y BCL6 (no M)**	**IgVH y BCL6 (no M)**
Cytoskeleton associated protein 1 (CKAP1)	Forma parte de microtúbulos de citoesqueleto Plegado de proteínas, se une a intermediarios que pliegan tubulina α	0.030	0.257

RESULTADOS

Proteínas que discriminan entre los 3 grupos clínicos estudiados.

PROTEÍNA	PROCESO BIOLOGICO	IgVH y BCL6 (M)	IgVH(M) y BCL6 (no M)	IgVH y BCL6 (no M)
F-actina capping subunidad β	Se une a filamentos de actina en sus extremos, bloqueando el crecimiento. Relacionado con la motilidad celular	0.062	0.120	0.013
Pre mRNA splicing factor SF2, subunit 33	Previene el que un exon sea saltado por la maquinaria de transcripción, ajustando el splicing y regulando el splicing alternativo. Interacciona con otros componentes del spliceosoma. Procesa RNA Selecciona el lugar del splicing del DNA	0.136	0.013	0.247
Nucleophosmin	Asociado a ribonucleoproteínas nucleolares. Une cadenas sencillas de ácidos nucleicos Función en el transporte o ensamblaje del ribosoma	0.034	0.798	0.660
Chaperonin TCP1	Plegado de proteínas Chaperona Organización y biogénesis de citoesqueleto Necesaria para el ensamblaje de actina y tubulina	0.005	0.047	0.176

CONCLUSIONES

- La caracterización de los perfiles proteómicos ha permitido la identificación de al menos 15 proteínas que discriminan entre los diferentes grupos de pacientes.

- Hemos hallado 6 proteínas que discriminan entre los pacientes con mutaciones y sin mutaciones en el gen Bcl6.

- 3 proteínas discriminan entre los pacientes con mutaciones y sin mutaciones en el gen IgVH.

- 1 proteína diferencia pacientes con mutaciones en IgVH y BCL6 y sin mutaciones en los genes IgVH y Bcl6.

- La expresión de 4 proteínas fue diferente en cada uno de los 3 grupos de pacientes tomados de 2 en 2.

- Las diferentes proteínas marcadoras identificadas abren puertas a futuros estudios sobre los mecanismos moleculares de la patogenia de la LLC-B.

IBV

Dr. Juan J. Calvete

Dra. Libia Sanz

Alicia Pérez

Francisca Gallego

Paula Juárez

Celso Nagano

Rebeca Hilario

Miguel Marín

HCUV

Dr. Javier García-Conde

Dra. Isana Benet

Elena Sarsotti

Dra. MªJose Terol

Agradecimientos

Clínica Universitaria de Navarra

Dr. Felipe Prosper

Dr. Enrique Andréu

Proyecto financiado por la red de grupos temáticos de la Fundación de Investigaciones Sanitarias Carlos III (expediente G03/179)