

Análisis de expresión/modificación diferencial de proteínas mediante electroforesis bidimensional



PRINCEPE FELIPE

Objetivo

- Contar “mi experiencia” como usuario de electroforesis bidimensional.
- Que sea de utilidad.
- Aspectos generales.
- Caso particular: cardiopatía hipertensiva.



PRINCEPE FELIPE

Expresión diferencial

- Problema fundamental en biología.
- Desarrollo de importantes metodologías en torno a este problema:
 - Genómica
 - proteómica



PRINCEPE FELIPE

Estrategia proteómica

- Separar:
 - La más utilizada: electroforesis bidimensional.
 - Alternativas: cromatografía bidimensional (lo más común a nivel de péptidos (MudPIT), pérdida de información PTM).
- Identificar:
 - Espectrometría de masas.



PRINCEPE FELIPE

Electroforesis bidimensional

Inconvenientes:

- No “high throughput”
- Proteínas básicas
- *Proteínas de membrana*
- *Proteínas poco abundantes*
- *Falta de reproducibilidad*
- *Análisis laborioso*

Ventajas:

- Resolución
- Nivel de proteína
- Información PTM
- Cuantitativo

Cambio de filosofía:

Antes: “no manipular para tener todas las proteínas de la muestra y no perder nada”

Ahora: “manipular porque no es posible ver todo”



PRINCEPE FELIPE

Mejora tecnológica

Reproducibilidad:

- La mayoría de las veces los problemas están en la parte “no proteica” de la muestra.
- Una vez se “limpia” los resultados suelen ser reproducibles, de buena calidad y “aplicabilidad general”. ¿Es posible que se pierda “la proteína” clave del universo? Si, pero...

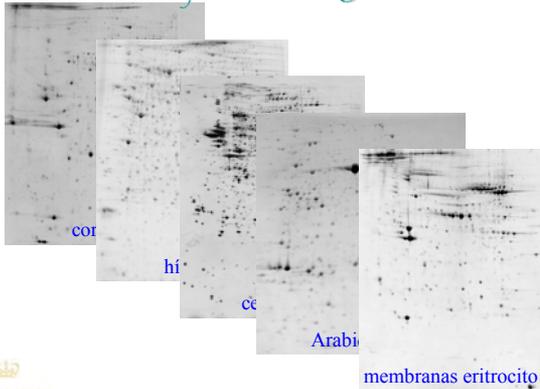
Análisis laborioso:

- Metodología DIGE (Amersham/GE).



PRINCEPE FELIPE

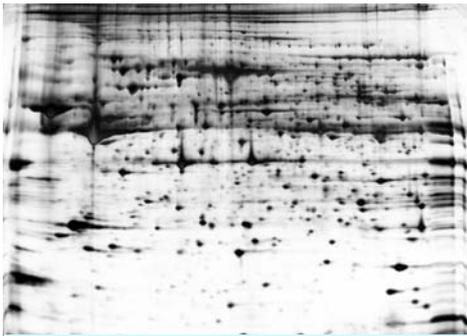
Mejora tecnológica



Cardiopatía hipertensiva

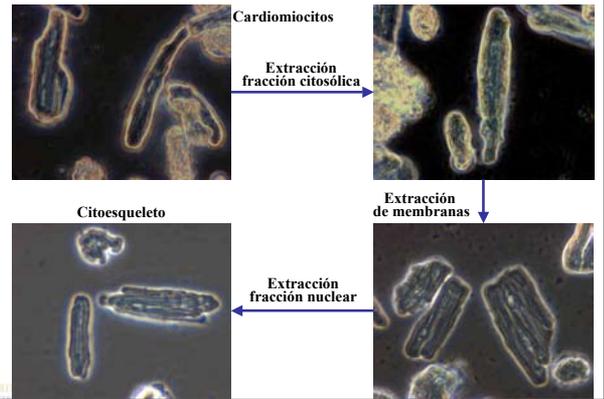
- Modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR).
- Control rata Wistar-Kyoto (WKY).
- Objetivo: identificar diferencias en el miocardio hipertrofiado.

Miocardio

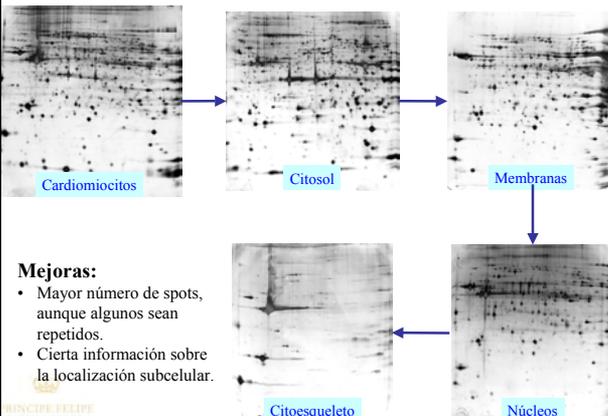


Problemas: sensibilidad, proteínas muy abundantes, no demasiado reproducible.
Nos llevó a la tinción con plata y al fraccionamiento.

Cardiomiocitos



Cardiomiocitos



Mejoras:

- Mayor número de spots, aunque algunos sean repetidos.
- Cierta información sobre la localización subcelular.

Análisis

Problemas:

- Muy laborioso
- Muy subjetivo (variabilidad incluso con uno mismo)
- Estadísticamente no muy sólido

Resultados

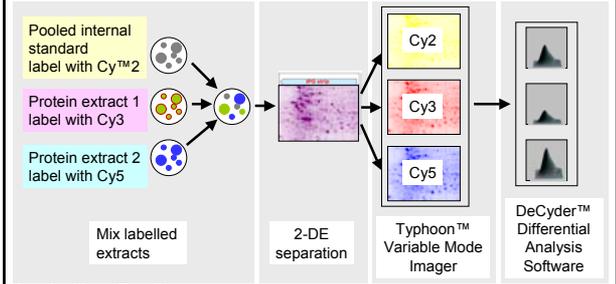
	SHR>WKY	SHR<WKY
Citosol	5	12
Membranas	18	3
Núcleos	2	27
Citosqueletos	4	7
Totales	29	48

Metodología DIGE

¿Qué aporta esta metodología?

- Mejora tecnológica: fluoróforos
 - Marcaje por separado
 - dos muestras en un mismo gel
 - estándar interno.
- Mejora en cuanto al concepto:
 - Se requiere una planificación (esto se debería hacer siempre, pero...).
- Práctico: emplear el menor tiempo posible con el máximo de proteínas.

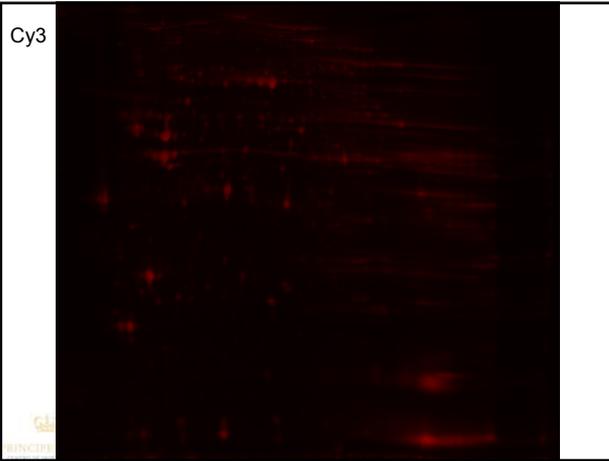
Ettan™ DIGE system



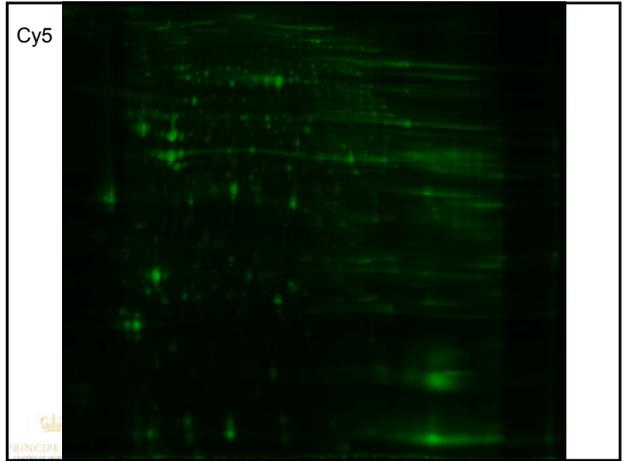
Ventajas "inmediatas":

- Las dos muestras se analizan en el mismo gel: el match es automático.
- Co-detección: se cuantifica sobre un área del gel idéntica: mejor comparación.
- Estándar interno: se usa en todos los geles, idéntica referencia en todos los casos.

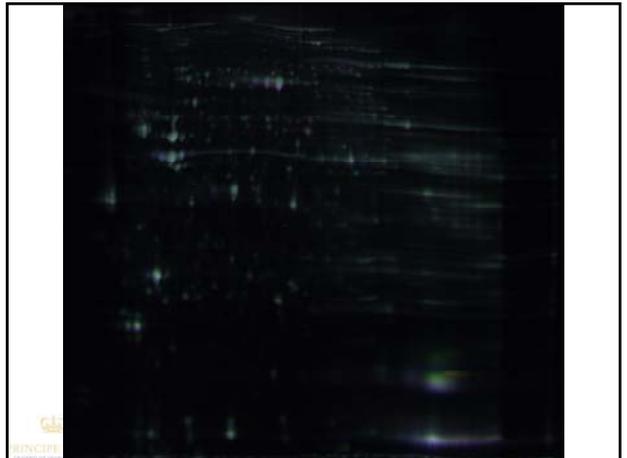
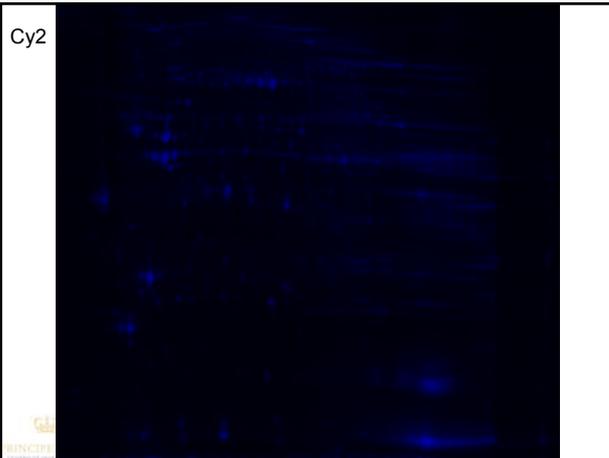
Cy3



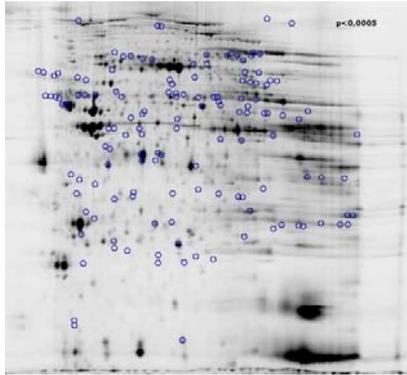
Cy5



Cy2

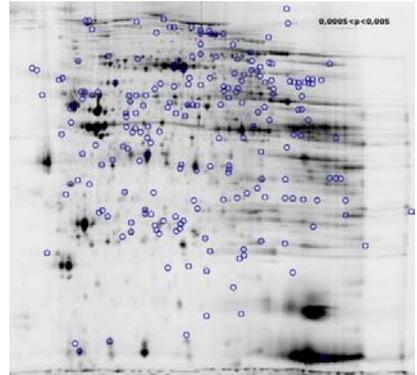


Resultados



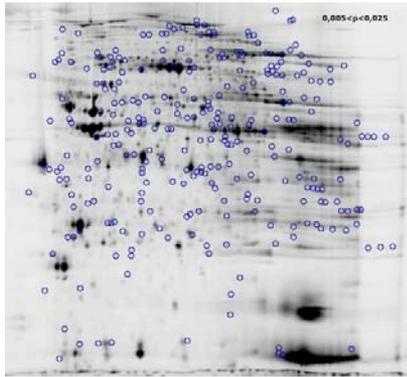
n=136

Resultados



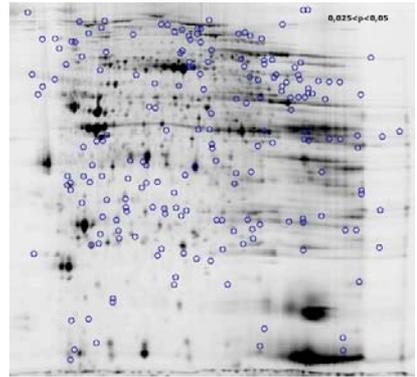
n=204

Resultados



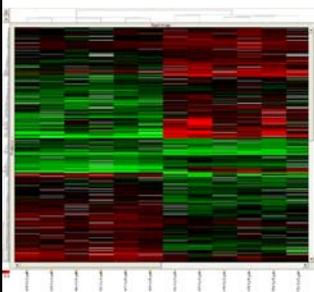
n=276

Resultados



n=188

DeCyderTMEDA Analysis Hierarchical Cluster analysis (HCA)

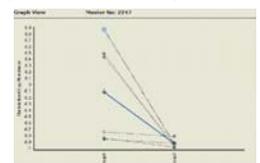
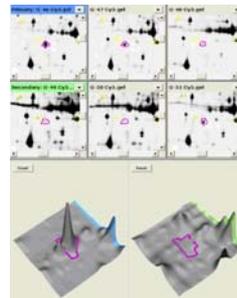


Creación de un set de datos para analizar:

HCA indica que hay 715* proteínas que se pueden separar en 2 clusters distintos. 206 proteínas están aumentadas y 506 disminuidas.

*Sólo proteínas con un t-test de $p < 0.05$

DeCyderTMEDA Analysis ¿Existen subgrupos en el grupo 1?

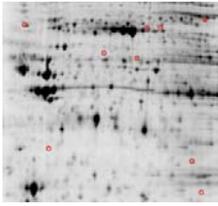


Ejemplo: aparición del spot 2247.

DeCyder™ EDA Analysis

Selección de marcadores

Marcadores potenciales que podrían ser utilizados para predecir el grupo al que pertenece una muestra.



Protein Name	Spot	Abundance	Ratio	Log Ratio
Actin	10 (10)	0.0010	1.00	0.00
Albumin	10 (10)	0.0010	1.00	0.00
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10
LDH	10 (10)	2.7e-005	12.70	1.10

DeCyder™ Differential Analysis Software

