

¿CÓMO FUNCIONA?

De la prometeómica a la proteómica: ya una realidad

Carlos E. Rodríguez

Licenciado en Química. carrodri@uma.es

34 años han pasado desde que Patrick H. O'Farrell describiera la realización del primer gel bidimensional donde había conseguido resolver más de 1100 proteínas diferentes de *E. coli* y comenzase una prometedora carrera por desentrañar el estudio del proteoma (Fig.1). Este término aún no había sido acuñado, pues hasta 1995 no apareció por primera vez para definir el conjunto de PROTeínas expresado por un genOMA; posteriormente el término *proteómica* denominó al estudio del proteoma. Pero, en estos años de transición y desarrollo, quizás habría sido mejor emplear el término *prometeómica*, debido a que se necesitaron varios factores adicionales para que la recién nacida técnica tuviera la gran utilidad que disfruta en estos momentos.

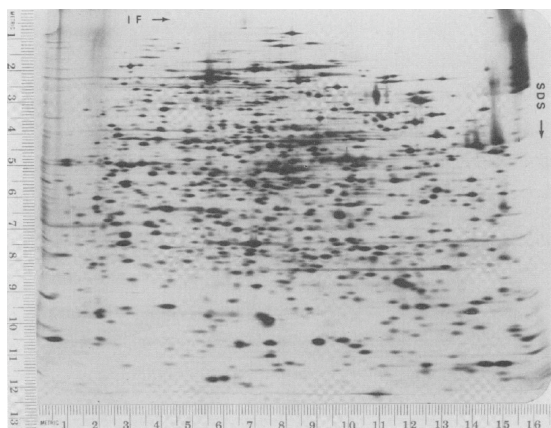


Fig. 1 Primer gel bidimensional de alta resolución publicado por O'Farrell (J Biol Chem 250: 4007-21, 1975)

Solamente dos años después de la publicación de O'Farrell, Leigh Anderson junto a varios colaboradores demostró la potencialidad de la técnica para el estudio del plasma humano y fue capaz de identificar 30 proteínas plasmáticas en un gel 2-D por inmunoprecipitación. Este método es muy adecuado para confirmar la presencia de proteínas conocidas, aunque se necesitan anticuerpos contra las mismas. Pero ¿cómo se puede abordar la identificación de las proteínas desconocidas a priori? Fue un problema insalvable hasta que en la década de los 80 se desarrolló el análisis de proteínas por espectrometría de masas, que acabó siendo el método de referencia para el análisis de polipéptidos, en sustitución de la laboriosa degradación de Edman usada hasta la fecha. Fue este el primero de los factores necesarios para que la técnica tuviera la expansión que le correspondía dentro de las ahora llamadas ciencias ómicas.

El segundo factor corrió a cargo de la empresa sueca *Pharmacia*, que posteriormente se fusionó con la británica *Amersham*, al apostar por los investigadores que desarrollaron el isoelectroenfoque en gradientes de pH inmovilizado (Bjellqvist y colaboradores). Este paso fue fundamental para conseguir que las imágenes de los geles bidimensionales fuera muy reproducible incluso entre distintos laboratorios. El desarrollo de la técnica por la citada empresa fue notable, con una descripción de los procedimientos y las condiciones electroforésicas muy precisas y didácticas. En la

actualidad, adquirida la empresa por la multinacional americana *General Eléctric* en su división sanitaria (*GE Healthcare*), siguen siendo la referencia en la electroforesis bidimensional de proteínas. No deja de ser curioso que esta técnica electroforésica haya acabado en la empresa que fundó Thomas Alva Edison, que tanto hizo por la transmisión de la corriente eléctrica continua.

Un tercer aldabonazo fue la secuenciación del genoma humano y de otras especies, que permitió identificar las proteínas mediante búsquedas en las bases de datos de proteínas deducidas de los genomas. Tras la obtención de un listado de masas correspondientes a los péptidos obtenidos por digestión en el propio gel mediante proteasas y posterior análisis por *espectrometría de masas MALDI-TOF*, se realiza la comparación de las masas obtenidas experimentalmente con la de los péptidos deducidos por la digestión teórica de las proteínas deducidas del genoma. Los datos genómicos ahora se han complementado con las bases de datos de proteínas y, además, disponemos de herramientas de todo tipo que nos ayudan a caracterizar o a predecir masas, puntos isoelectrónicos, propiedades físico-químicas, posiciones de corte por proteasas, distribuciones isotópicas, modificaciones postraduccionales, topológicas o estructurales, a alinear secuencias y realizar análisis filogenéticos.

En la actualidad, la proteómica ha dejado de ser una ciencia prometedora para pasar a ser una realidad que ha alcanzado plena madurez. Aunque su principal utilidad es el estudio de los cambios cuantitativos de la expresión de las proteínas con aplicación diagnóstica y terapéutica basada en la búsqueda de biomarcadores de enfermedad y de respuesta a tratamiento farmacológico, también ha venido a ser una herramienta muy útil en la investigación básica: en las plantas, en los microorganismos, en la detección de dianas terapéuticas en estudios de toxicidad, en el proteotipado de los individuos para predecir la respuesta al tratamiento o en la búsqueda de modificaciones postraduccionales que ayuden a descubrir u orientar el estudio de la etiología de los distintos procesos celulares o de las enfermedades; e incluso se utiliza como herramienta de imagen para localizar tejidos específicos, con múltiples aplicaciones, de las que cabe destacar la que tiene en anatomía patológica para visualizar distribuciones neoplásicas en cortes de tejidos realizados con un microtomo.

A pesar de que el futuro siempre es impredecible, probablemente los pasos de la proteómica se encaminen irremisiblemente hacia técnicas multidimensionales basadas en la cromatografía y la espectrometría de masas, abandonando la laboriosa separación en gel. Los equipos de espectrometría de masas mejoran su sensibilidad por órdenes de magnitud en cada nuevo modelo que sale al mercado. Todas las combinaciones posibles de espectrómetros en tándem de tiempos de vuelo, trampas iónicas y cuadrupolos se pueden adquirir en analizadores cada vez más compactos y con precios más reducidos. Recientemente se ha desarrollado el orbitrap (técnica combinación de trampa y cuadrupolo) con una capacidad de resolución desconocida hasta la fecha y una exactitud en el cálculo de masas sólo alcanzada por los equipos de análisis de masas basados en la transformada de Fourier. La precisión cuantitativa, caballo de batalla de la espectrometría de masas, ha mejorado considerablemente con la aparición de métodos de marcajes isotópicos como el *iTRAQ*, o la metodología *SILAC* que realiza el marcaje en el propio cultivo celular con medios a los que se les ha añadido un aminoácido etiquetado con un isótopo estable, habitualmente arginina marcada con ^{13}C . Sin embargo, por el momento, los geles bidimensionales se resisten a abandonarnos gracias a los nuevos métodos de tinción sensibles más reproducibles y con gran intervalo de linealidad, que lo mantienen como el método de referencia (*state of the art*) gracias a la técnica denominada *DIGE* (*Difference Gel Electrophoresis*). El *DIGE* permite correr en el mismo gel hasta tres muestras diferentes, pero marcadas con diferente fluoróforo, lo que redundará en unas excelentes prestaciones respecto a la comparación de los casos frente a los controles intra- e intergel. Recientemente ha aparecido una sencilla pero

57

útil metodología de fraccionamiento previo de la muestra denominada *dPC Fractionator*, basada en el isoelectroenfoque en gel, capaz de resolver en cinco centésimas de unidad de punto isoeléctrico. Con ella, en apenas

58

30 minutos, podemos tener la muestra preparada para realizar la digestión con tripsina que precede al análisis por espectrometría de masas.

Lo que sí sabemos con seguridad es que el futuro está en la capacidad y la ilusión que tienen los investigadores por seguir descubriendo e innovando en el maravilloso mundo de la ciencia. Sin duda, estamos en la edad dorada de la biología, que está viviendo una expansión enorme gracias a los nuevos paradigmas descubiertos en el pasado siglo sobre la estructura de los ácidos nucleicos y las proteínas. La etapa de investigación tras la aparición de un nuevo paradigma que Thomas S. Kuhn denominó de ciencia normal, nos dirige ahora hacia un largo camino por reco-

59

60

Bibliografía citada:

- 1 O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975 May 25;250(10):4007-21.
- 2 Anderson L, Anderson NG. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5421-5.
- 3 Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods.* 1982 Sep;6(4):317-39.

61

62

rrer para discernir los misterios de la vida en el ámbito molecular. ¡Biólogos del mundo, ha llegado vuestra hora! Ya pasaron las penurias y ahora afrontamos un largo reto que comprende un lejano viaje en el que no podemos olvidarnos de llevar las alforjas repletas de conocimientos, no sólo de especies, del funcionamiento celular y de reacciones bioquímicas, sino también de tecnología. Tendremos el apoyo de otras ciencias, pero ya no se concibe a un buen biólogo sin el dominio de sofisticados equipos, procesos y técnicas. La abundancia normalmente se presenta con un alto peaje y no debemos confiar en pagarlo con un golpe de suerte. Ya hace tiempo que Albert Einstein tuvo claro que Dios no realizó su acto creador jugando a los dados... y a ver quién se atreve a contradecir a tan perspicaz pensador.

63

PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2009



64

El Nobel de Química del año 2009 premia el trabajo de tres investigadores por sus estudios sobre la resolución de uno de los problemas más complejos de la Biología: la estructura tridimensional del ribosoma.

65

66

Los ribosomas, presentes en las células de todos los seres vivos, son las estructuras de la célula encargadas de traducir a proteínas el mensaje genético portado por la molécula de RNA mensajero que a su vez procede de la molécula de DNA. Su complejidad es enorme dado que están compuestos por moléculas de RNA y alrededor de 50 proteínas. A su vez, el ribosoma se encuentra estructurado en dos partículas diferentes que en los procariotas constituyen la subunidad mayor o 50S y la subunidad menor o 30S.

67

68

69

La contribución de la investi-

gadora Ada E. Yonath, del Instituto Weizmann en Israel y de los investigadores Thomas A. Steitz, de la Universidad de Yale, en Estados Unidos y Venkatraman Ramakrishnan, del Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigaciones Médicas en Cambridge, Reino Unido, ha sido precisamente la obtención, mediante difracción de rayos X, de la estructura atómica de una de las partículas más complejas de la célula, como son los ribosomas, a partir de cristales de alta calidad.

La función de los ribosomas es clave para la síntesis de proteínas y, por lo tanto, crucial para la vida. La comprensión de su estructura no sólo supone un avance fundamental en la investigación básica, sino que permite comprender la acción de numerosos antibióticos que tienen como diana precisamente los ribosomas bac-

terianos. Su bloqueo como consecuencia de la unión del antibiótico impide que la bacteria fabrique las proteínas y, por lo tanto, acaba con la infección bacteriana.

Estos estudios permitirán en el futuro dilucidar la estructura del ribosoma eucariótico y permiten especular con la idea de diseñar moléculas que bloqueen específicamente el ribosoma de la célula tumoral.

Enrique Viguera Mínguez
eviguera@uma.es
Profesor Titular del Área de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Málaga

70