

QB 2005
21

Bases para el estudio de la genómica funcional a través de espectrometría de masa

(Curso teórico)



Objetivo:

Los avances alcanzados en la tecnología del ADN han permitido y están permitiendo la secuenciación sistemática de genomas de organismos muy diversos que incluye al genoma humano. Hoy contamos con una gran cantidad de información de secuencias que resulta muy valiosa. Sin embargo aún se desconoce la función biológica de la mayoría de los productos codificados por las secuencias génicas detectadas. En este período que ya podría considerarse post genómico, debemos abordar el estudio funcional de los genes. En este sentido la ciencias proteómicas pueden contribuir cuali y cuantitativamente al desafío del descifrado de las funciones biológicas asociadas a la información genética.

El curso cuyo programa se adjunta ha sido diseñado para mostrar inicialmente aquellos aspectos básicos de la metodología que se emplea en proteómica haciendo especial énfasis en comprender el fundamento de metodologías de separación de macromoléculas (electroforesis bidimensional, cromatografías, etc), de los métodos analíticos y detección (espectrometría de masas) y de herramientas de bioinformática. Desde allí, y con la participación de especialistas en áreas escogidas, se analizarán diferentes sistemas modelo con los que se discutirán diferentes tipos de estudios proteómicos con enfoques centrados tanto en cuestiones estructurales como funcionales. En todos ellos se hará referencia a las potencialidades de la metodologías en identificación y secuenciamiento de proteínas. Sobre la base de ejemplos concretos y trabajos escogidos se buscará introducir al estudiante a la búsqueda de estrategias adecuadas para el estudio funcional de sus sistemas de trabajo. Los tópicos que se dictarán en el curso serán abordados siempre desde la experiencia personal de cada investigador invitado, destacando el enfoque interdisciplinario de los estudios y el uso actual de las nuevas metodologías de genómica funcional por parte de los disertantes. Las clases teóricas serán acompañados por actividades experimentales. Se detalla a continuación el programa de clases teóricas y seminarios indicando su duración, docente-investigador a cargo, e impacto esperado en el contexto temático del curso.

PROGRAMA.

Primera semana: *Bases teóricas*

Departamento de Química Biológicas, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Introducción a las aproximaciones experimentales "ómicas": Proteómica - Glicómica.

Significado y aplicaciones.

Dra. Andrea Llera (FIL)

Fundamentos de las técnicas de espectrometría de masa aplicada al estudio de biomacromoléculas.

Espectrometría de masa I. Métodos de ionización basados en desorción (FD, FAB, SIMS, LD, MALDI, UV-MALDI) y en nebulización (ES, TESI, ESI), campo de aplicación de cada uno,

ventajas y limitaciones. La problemática de preparación de las muestras para UV-MALDI-MS y ESI-MS.

Dra. Rosa Erra Balsells (Depto Q.O. -FCEN-UBA)



Espectrometría de masa II. Fundamento de los analizadores de iones gaseosos de uso actual (TOF, Q, IT, FTICR), campo de aplicación, ventajas y limitaciones.

Dra. Rosa Erra Balsells

Espectrometría de masa III. La fragmentación como herramienta analítica en espectrometría de masa. Formas de evitarla y formas de inducirla. Accesorios o celdas CAD, CID, ECD, IRMPD, EI. Espectrometría de masa en tandem (MSⁿ). Modo de operación PSD en el analizador de "tiempo de vuelo" (TOF).

Dra. Rosa Erra Balsells

Espectrometría de masa IV. Protocolos actuales de trabajo en proteómica y glicómica. Combinación de datos experimentales con bancos de datos y programas de simulación ("de novo"). Protocolos de trabajo "bottom-up" y protocolos "top-down". Conclusiones. UV-MALDI vs ESI, competencia o complementariedad?

Dra. Rosa Erra Balsells

Proteómica – Glicómica estructural.

Proteómica estructural: Identificación de proteínas celulares. Estrategias convencionales y estrategias de alta penetración para la caracterización de proteomas. Aproximaciones de tipo "shot gun".

Dra. Julieta Fernández (IBBM-UNLP)

Glicómica estructural I: Introducción a la glicobiología. Azúcares componentes de glicoconjugados. Importancia de la glicosilación. Glicolípidos, Glicoproteínas. Métodos generales de purificación de glicoconjugados. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Dra. Alicia Couto. (Depto Q.O.-FCEN-UBA)

Glicómica Estructural II: Cromatografía líquida de intercambio aniónico (HPAEC-PAD). Cromatografía de afinidad. Lectinas.

Dra. Alicia Couto.

Glicómica Estructural III: Ejemplos de UV-MALDI-TOF MS y ESI-MS aplicado a hidratos de carbono y glicoproteínas y glicoconjugados. Conclusiones. ¿UV-MALDI o ESI en glicómica?

Dra. Alicia Couto.

Proteómica de expresión diferencial aplicada a la caracterización de interacciones entre organismos. Diálogos simbióticos y patogénicos.

¿Simbiosis versus patogénesis?

Dr. Federico Sisti (IBBM- UNLP)

Dinámica de proteomas microbianos como consecuencia de la interacción con el entorno. Estrés ambiental.

Dr. A. Lodeiro (IBBM-UNLP)



El proteoma de simbiosis y patógenos como expresión molecular de la visión del otro.

Estudio de caso 1: Una simbiosis modelo como visión de la evolución coordinada de dos proteomas interactuantes.

Dr. A. Lagares (IBBM-UNLP)

Estudio de caso 2: Interacción patógeno hospedador como reflejo de cambios proteómicos con "intereses" divergentes.

Dra. D. Hozbor (IBBM-UNLP)

La proteómica diferencial y funcional aplicada al diagnóstico y seguimiento de enfermedades

Cáncer: sistemas de detección diferencial de proteínas asociadas a la progresión tumoral. Arrays para proteínas. El caso del SELDI-TOF (OvaCheck).

Proteómica en enfermedades neurodegenerativas

Iniciativas internacionales para la caracterización de fluidos y tejidos humanos. The Human Plasma Project. The Human Brain Project

Dra. Andrea Llera (FIL)

La proteómica funcional aplicada a la transducción de señales

Caracterización de complejos proteicos.

Abordajes para el aislamiento de los complejos: inmunoprecipitación, etiquetado, fusiones con GST, TAP (tandem affinity purification). Ejemplos

Modificación postraduccional de proteínas- fosforilación.

Fosfoproteoma: ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae*.

Análisis por radiomarcación de proteínas;

Estrategias de enriquecimiento en fosfoproteínas: IMAC (Immobilized metal affinity chromatography), derivatización química de aminoácidos fosforilados, anticuerpos específicos

Identificación del sitio de fosforilación.

Dra. Silvia Moreno

Metodos de proteómica y proteómica comparada de complejos ribonucleoproteicos.

Validación de resultados por la técnica de interferencia de ARN.

Dr Rolando Rivera Pomar

Trabajo práctico seco: clase teórico-práctica sobre iniciación al uso del programa MASCOT de análisis de resultados de espectrometría de masa de proteínas.

Bibliografía:

- Trabajos de revisión recientes en revistas de publicación periódica.

- Introduction to Proteomics
D.Liebler and J. Yates III
2002- Humana Press



- Proteomics en Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis
R. Westermeier, T.Naven.
2002- 3rd edition- Wiley.VCH