

## **Separación y Análisis de Biomoléculas (SABI)**

### ***Breve descripción de la asignatura***

Este curso contempla dar una formación avanzada a los alumnos en métodos de purificación y caracterización de biomoléculas, con especial interés en péptidos, proteínas y metabolitos de baja masa molecular. El curso también es una introducción a la Proteómica y Metabolómica, con énfasis en la metodología instrumental más avanzada y actual aplicada a la biotecnología.

Los principales objetivos del curso son:

- Adquirir un conocimiento adecuado acerca de la relación estructura/función de proteínas y sus modificaciones postraduccionales.
- Conocer los fundamentos de las principales técnicas cromatográficas y electroforéticas de purificación de biomoléculas.
- Aprendizaje de metodologías avanzadas de análisis y caracterización de metabolitos orgánicos.
- Conocer el fundamento básico de las tecnologías metabolómicas haciendo incidencia en la aplicabilidad de dichos métodos.
- Conocer los fundamentos y las variantes de la espectrometría de masas útiles para el análisis de proteínas y su empleo en Proteómica.
- Planear un esquema funcional de purificación de proteínas. Aprender a diseñar un protocolo y tabla de purificación de proteínas.
- Efectuar una práctica de laboratorio de purificación y análisis estructural de una proteína utilizando algunos de los métodos descritos en la parte teórica.

Este curso posee una marcada orientación práctica, por lo que 2 de los 4 créditos de la asignatura son prácticos. La práctica de laboratorio "Purificación y análisis de la proteína humana recombinante: la proteína PDZ GIP ("Glutaminase-Interacting Protein") se extiende durante 1 semana completa de trabajo experimental en el laboratorio. El protocolo experimental fue desarrollado originalmente en el laboratorio del prof. Márquez y publicado en la revista *Protein Expression and Purification*. La proteína GIP humana (Fig. 1) fue obtenida por clonación tras rastreo de una genoteca de cerebro. Es una proteína de la familia PDZ que interviene en la formación de agregados funcionales en diversos tejidos, pero con mayor relevancia en cerebro. Fue aislada a través de un rastreo de doble-híbrido en levaduras, utilizando como cebo el extremo C-terminal de la isoenzima GAB de la glutaminasa humana



Fig. 1: Modelo estructural 3D de la proteína GIP humana deducido por homología. Se indican los elementos de estructura secundaria. La cadena lateral del residuo de Trp83 e His90 se muestran marcados y en azul (Banerjee et al. (2008) *Biochemistry* 47:9208-19).

La proteína GIP humana recombinante, modificada con una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en su extremo NH<sub>2</sub>-terminal, se expresa en un sistema heterólogo de células bacterianas (*E. coli*). Esta etiqueta permite su purificación por cromatografía de afinidad en columna de níquel (Ni<sup>2+</sup>)-Sefarosa. La proteína es purificada adicionalmente mediante una cromatografía de intercambio catiónico. El grado de purificación y su masa molecular se caracterizan por electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencia Western, empleando anticuerpos policlonales generados en conejo y específicos para la proteína GIP humana (Fig. 2).

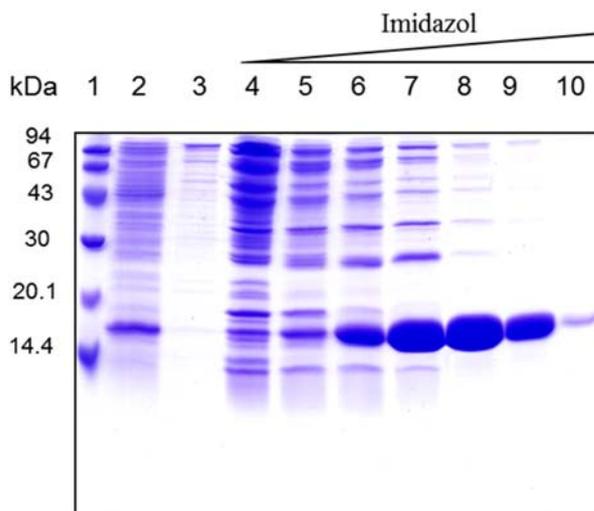


Fig. 2: Análisis por electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la proteína GIP humana por cromatografía de afinidad en columna de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa. Calle 1: marcadores de masa

molecular. Calle 2, extracto total proteico introducido en la columna. Calle 3, lavado. Calles 4-10, fracciones eluidas con un gradiente creciente de imidazol. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

### **Conocimiento previo necesario**

Resulta recomendable haber superado asignaturas relacionadas con aspectos estructurales y funcionales de aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para alumnos procedentes de titulaciones con una menor formación en estos tópicos, será necesario profundizar en algunos aspectos que se repasan en el Tema 1 del temario.

### **Programa de la asignatura**

Para ver un programa detallado, véase la página web de la asignatura en el Campus Virtual de la asignatura

(<https://mop.cv.uma.es/course/view.php?id=10319>)

TEMA 1. Estructura y función de proteínas.

TEMA 2. Métodos cromatográficos de purificación de proteínas.

TEMA 3. Cromatografía de afinidad.

TEMA 4: Procesos analíticos en metabolómica.

TEMA 5: Aplicaciones de la metabolómica.

TEMA 6: Métodos electroforéticos de purificación y análisis de proteínas.

TEMA 7: Espectrometría de masas (MS) y su aplicación a biomoléculas. Fundamentos de la técnica.

TEMA 8: Parámetros globales en metabolómica. Biomarcadores.

TEMA 9: Modelos *in vitro* para estudios metabolómicos.

### **Profesorado**

Dr. Javier Márquez Gómez (Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga)



El profesor Márquez es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Málaga desde 2002. Posee una amplia experiencia docente e investigadora. Ha sido profesor visitante en la Universidades de Brandeis (Boston, USA), Harvard (Cambridge, USA) y Medical University of Vienna (Viena, Austria). Ha publicado más de 100 artículos científicos (índice h=30) en dos áreas: cancerómica (genómica y proteómica del cáncer) y bases celulares y moleculares de la síntesis de glutamato en cerebro. Realiza colaboraciones internacionales con prestigiosos grupos científicos de ambas áreas, una de las últimas en cáncer con el grupo del Dr. Adolfo Ferrando (Columbia University, New York) publicada en Nature Medicine (2015) (<http://uciencia.uma.es/Noticias/Salud/Investigadores-de-la-UMA-identifican-una-estrategia-antitumoral>). En la actualidad lidera un grupo de investigación de excelencia: Canceromics (referencia BIO-179 en el registro de grupos de Andalucía) con más de 30 años de experiencia investigadora en Biomedicina (<http://www.glutaminase.org/>) y que pertenece al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA, [http://www.ibima.eu/en/grupo\\_investigacion/canceromica/](http://www.ibima.eu/en/grupo_investigacion/canceromica/)).

Dr. José Manuel Matés Sánchez (Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga)



El profesor Matés es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Málaga desde 2016. Lleva 26 años en investigación biomédica (cáncer fundamentalmente), siempre participando en uno o varios proyectos de investigación financiados por el Ministerio y/o la Junta de Andalucía. Fue

becario del Human Capital and Mobility Program. Trabajó dos años (1993-1995) en Londres en The Royal Postgraduate Medical School (Hammersmith Hospital), University of London. Posteriormente, obtuvo otra beca Human Capital and Mobility Program de un año, para la reinserción en el Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica. Su interés investigador se centra en la regulación transcripcional de las isoenzimas glutaminasa, así como en las funciones de la glutamina, el glutatión, y las ROS como moléculas señal y reguladores de apoptosis. Ha publicado 71 artículos (54 como primer o último autor) y posee un h index = 29. Es miembro del grupo Canceromics y del IBIMA.

Dr. José Ángel Campos Sandoval (Unidad de Proteómica, SCAI, Universidad de Málaga)



El Dr. José A. Campos posee actualmente un contrato de Técnico Superior del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, desarrollando su trabajo en la Unidad de Proteómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la UMA. Completó su licenciatura en Biología con un excelente expediente académico y realizó su Tesis de Licenciatura y Tesis Doctoral en el Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección de los Dres. I. Núñez de Castro y Javier Márquez. Posteriormente, efectuó dos etapas postdoctorales: en el Medical College de Virginia (USA) trabajando en metabolismo del colesterol (IP Dr. Gregorio Gil) y, posteriormente, en el laboratorio del profesor John B.C. Findlay (National University of Ireland, Dublin) implicado en estudios proteómicos y diseño de nuevas moléculas para la diabetes tipo 2. El Dr. Campos posee publicaciones en revistas de alto impacto como Journal of Medicinal Chemistry, Journal of Biological Chemistry, GLIA y Biochemical Journal; es miembro del grupo Canceromics y del IBIMA. Es un experto en química de proteínas y proteómica, con amplia experiencia en la expresión heteróloga de proteínas, su purificación y caracterización.