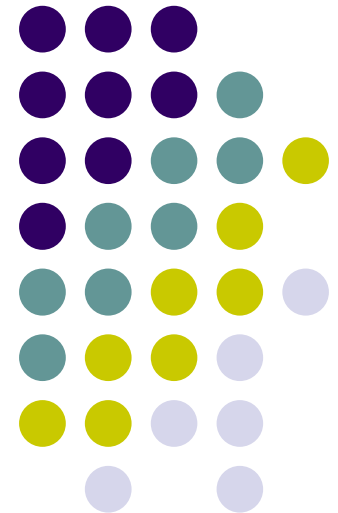


# Resolución multivariante aplicada a problemas (bio)analíticos

Raimundo Gargallo, Anna de Juan, Joaquim Jaumot  
Grupo de equilibrios en solución y Quimiometría  
Universidad de Barcelona

[raimon\\_gargallo@ub.edu](mailto:raimon_gargallo@ub.edu)

[www.ub.es/gesq/](http://www.ub.es/gesq/)



## Índice



- El grupo de equilibrios en solución y Quimiometría
- Estudio de los equilibrios en solución del ADN
- Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas
- Análisis de micromatrices de ADN

# El grupo de equilibrios en solución y Quimiometría

## Ubicación



http://www.ub.es/gesq/esp/espindex.html

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

Benvinguts al Grup d'Equilibris en solució i Quimiometria

Departamento de Química Analítica

Català | English | Inici ESQ | Inicio Departamento | Inicio UB



### Grupo de equilibrios en solución y Quimiometría

- Grupo ESQ
  - Presentación
  - Localización
  - Miembros
- Investigación
  - Actividad investigadora
  - Oferta de postgrado
  - Proyectos
  - Recursos
- Servicios
  - Asesoría, cursos y seminarios
  - Multivariate Curve Resolution homepage
  - Enlaces

Para más información:

Universitat de Barcelona  
Departament de Química Analítica, Facultat de Química

Martí i Franquès 1-11, 08028-Barcelona  
Tel.: +34-934021276  
Fax: +34-934021233

Bienvenidos a la página web del grupo ESQ



Intranet

Identificador

Contraseña

validar

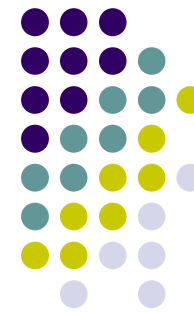
© Universitat de Barcelona

Edición: Grupo ESQ  
Última actualización o validación: 31.10.2007

www.ub.es/gesq/esp/espindex.html

## El grupo de equilibrios en solución y Quimiometría

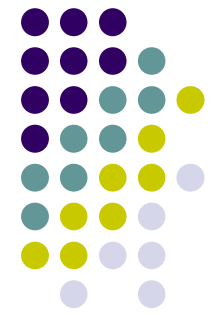
### Líneas de investigación



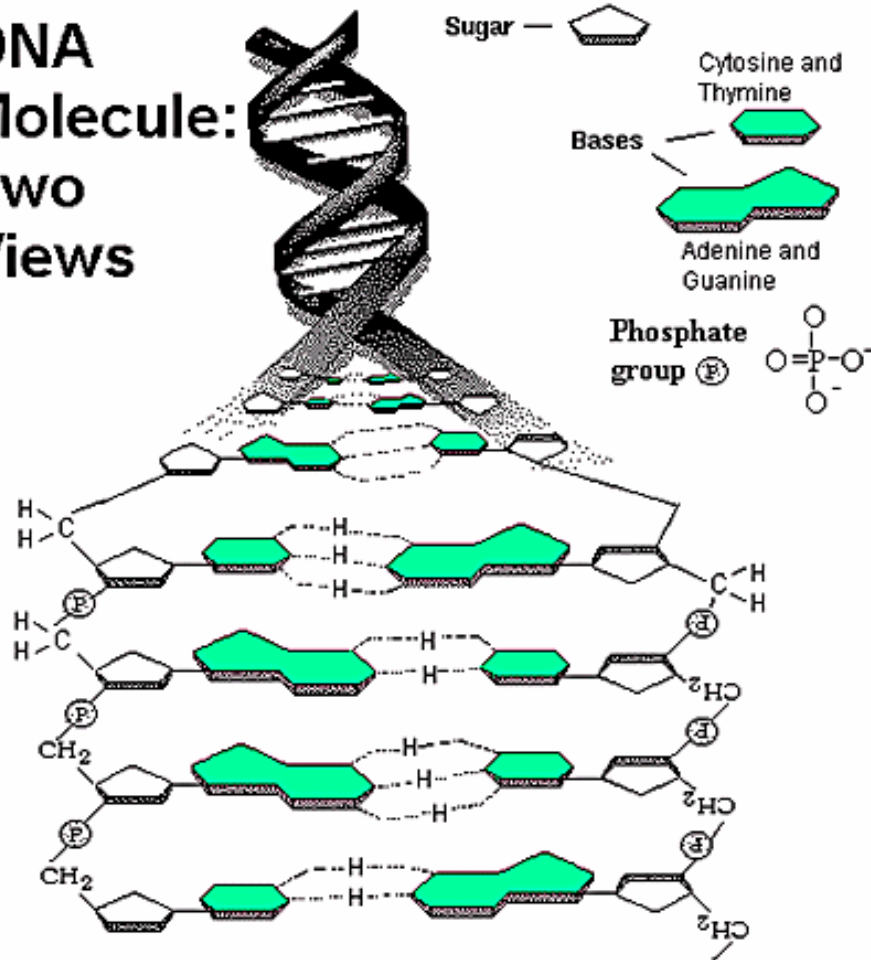
- Desarrollo y validación de métodos de análisis quimiométricos
- Desarrollo de herramientas quimiométricas para el análisis de imágenes espectroscópicas
- Química Analítica del DNA cuádruple
- Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas
  
- Establecimiento de metodologías analíticas para la determinación de polifenoles en alimentos (Dra. Gemma Fonrodona)
- Caracterización y determinación de fármacos antirretrovirales utilizados en el tratamiento del SIDA mediante sistemas en flujo continuo y técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas acopladas a espectrometría de masas (Dr. Santiago Hernández y Dr. Javier Saurina)

# Química Analítica del DNA cuádruple

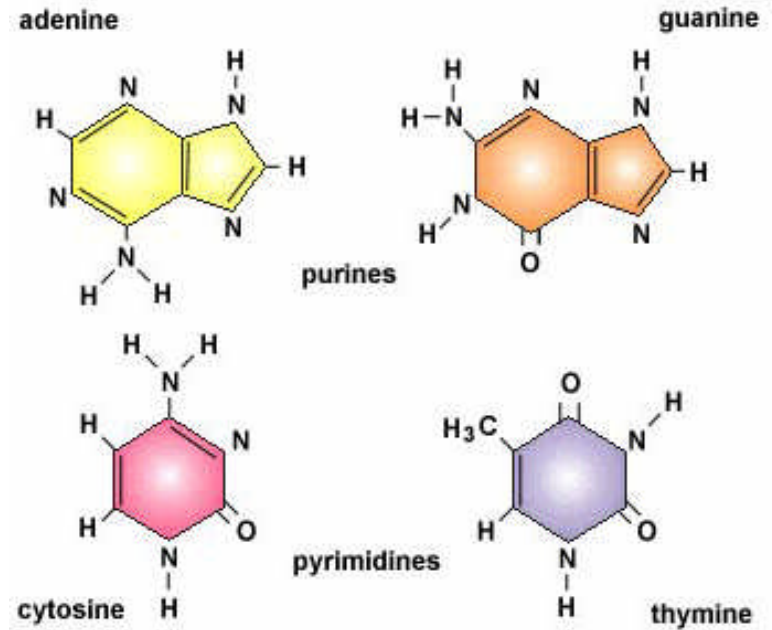
## Las bases del DNA



### DNA Molecule: Two Views

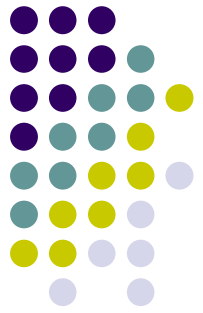


[www.accessexcellence.org](http://www.accessexcellence.org)

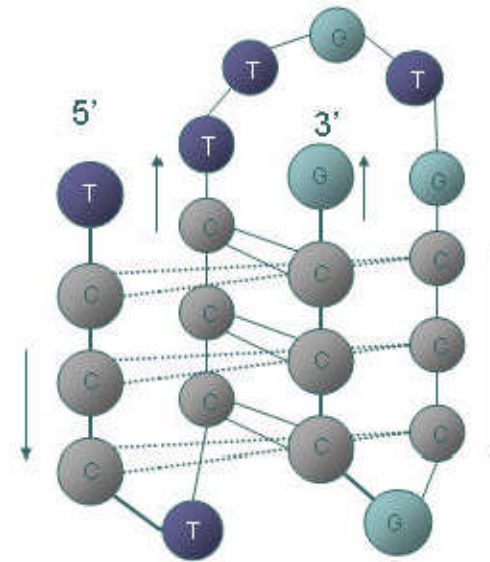
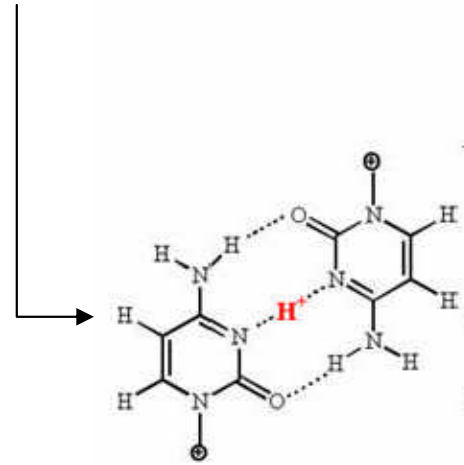


# Química Analítica del DNA cuádruple

## La estructura *i-motif*



pH < 7

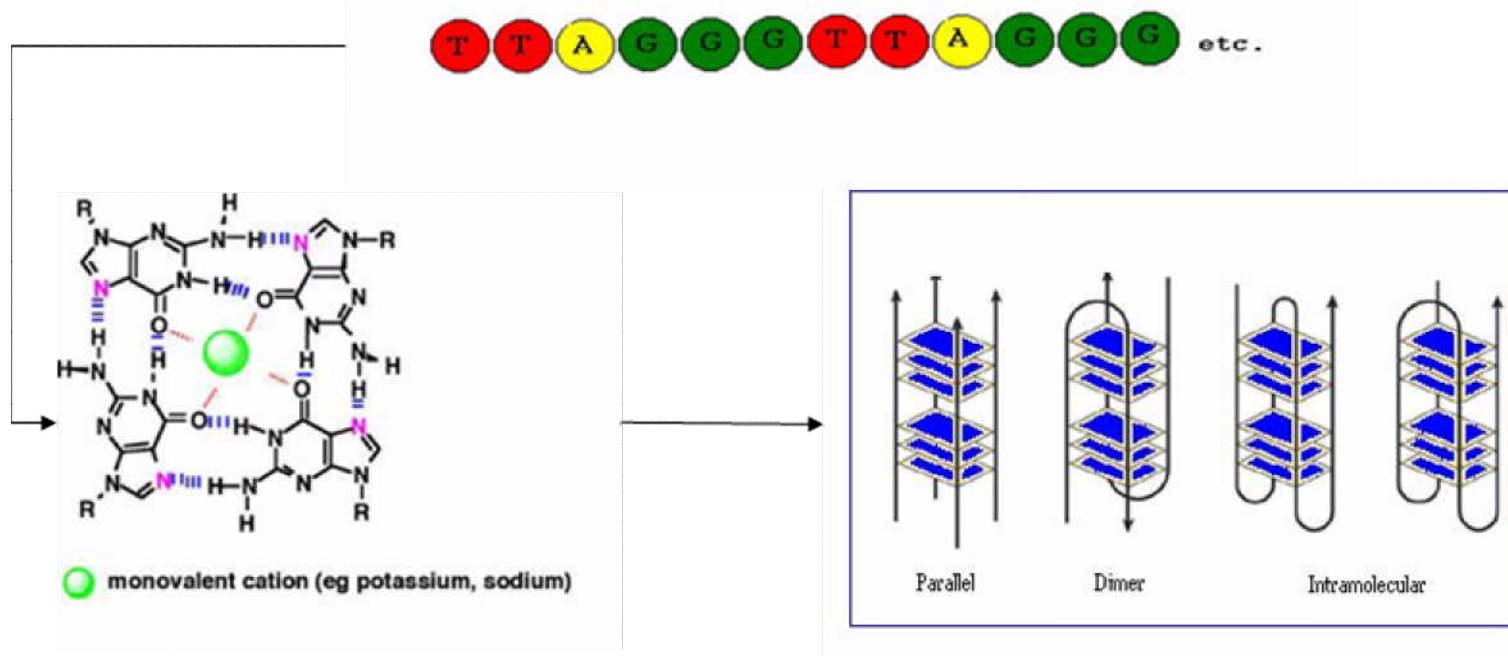


- Esta estructura se forma en cadenas de DNA ricas en bases citosina
- Se necesita la protonación de una base citosina y sólo ocurre a pH moderadamente ácidos (el  $pK_a$  de la citosina es, aproximadamente, 4,5).
  - ¿Cómo modular la estabilidad del *i-motif*?
    - Interaccionando con ligandos apropiados
    - Introduciendo modificaciones en su estructura



# Química Analítica del DNA cuádruple

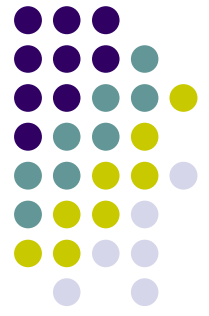
## La estructura *G-quadruplex*



- Presencia "in vivo" de secuencias de ADN potencialmente formadoras en:
  - Extremos de los cromosomas (telómeros)
  - Promotores de algunos oncogenes: *bcl-2*, *c-kit*, *c-myc*
- Interés científico como posibles objetivos de terapias genéticas
  - Formación y estabilidad
  - Desarrollo de ligandos capaces de modular selectivamente la estabilidad de éstos frente a la hélice doble de ADN

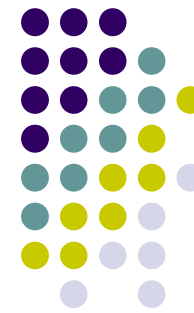
# Química Analítica del DNA cuádruple

## Técnicas instrumentales y procedimientos experimentales



- ¿Qué secuencias estudiamos?
  - telómero humano
  - regiones próximas a promotores en los oncogenes *bcl-2* y *c-kit*
- ¿Qué hacemos?
  - Estudiar la estabilidad (en función del pH, de la temperatura, de la fuerza iónica, de la presencia de ligandos, etc.)
  - Desarrollar metodología analítica para su estudio
- ¿Cómo?
  - Procedimientos experimentales: valoraciones, razones molares, fusiones, etc.
  - Técnicas espectroscópicas: absorción molecular, fluorescencia molecular, FRET, almenaras moleculares (*molecular beacons*), dicroísmo circular, NMR
  - Técnicas de interacción molecular: *Surface Plasmon Resonance*
  - Técnicas de separación : HPLC, CE.
  - Quimiometría: *hard-* y *soft-modeling*





# Química Analítica del DNA cuádruple

## Estudio de la estabilidad de un *i-motif* en función de la temperatura

### Análisis individual

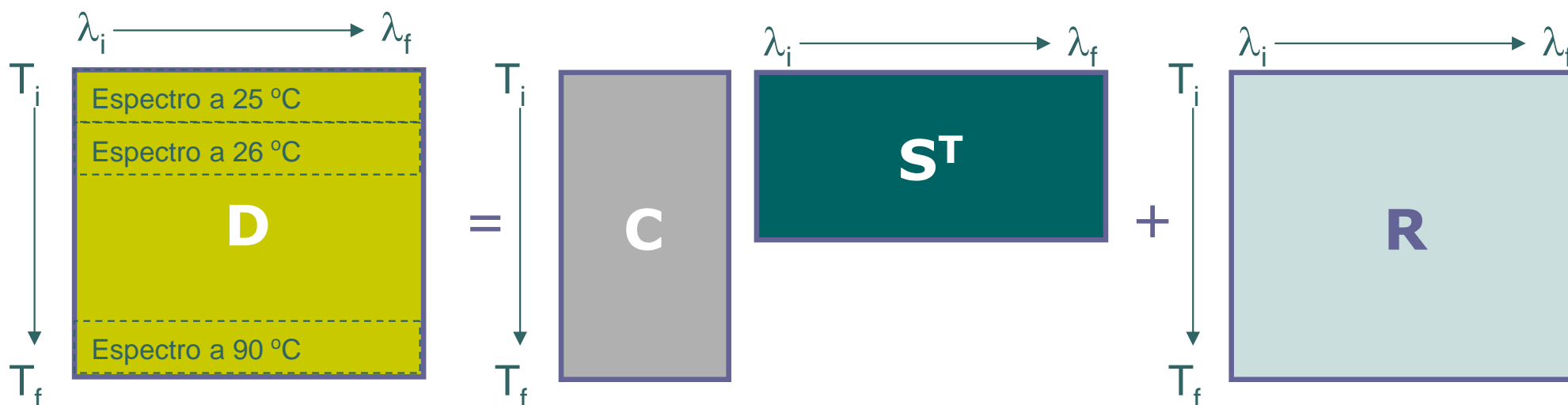
La bien conocida ley de Lambert-Beer-Bouer para una única longitud de onda...

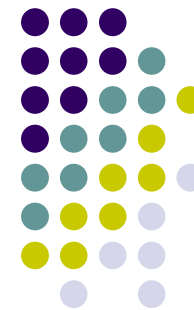
$$A_{\lambda} = c \varepsilon_{\lambda}$$

... se aplica a todo el espectro:

$$D = CS^T + R$$

En forma gráfica:



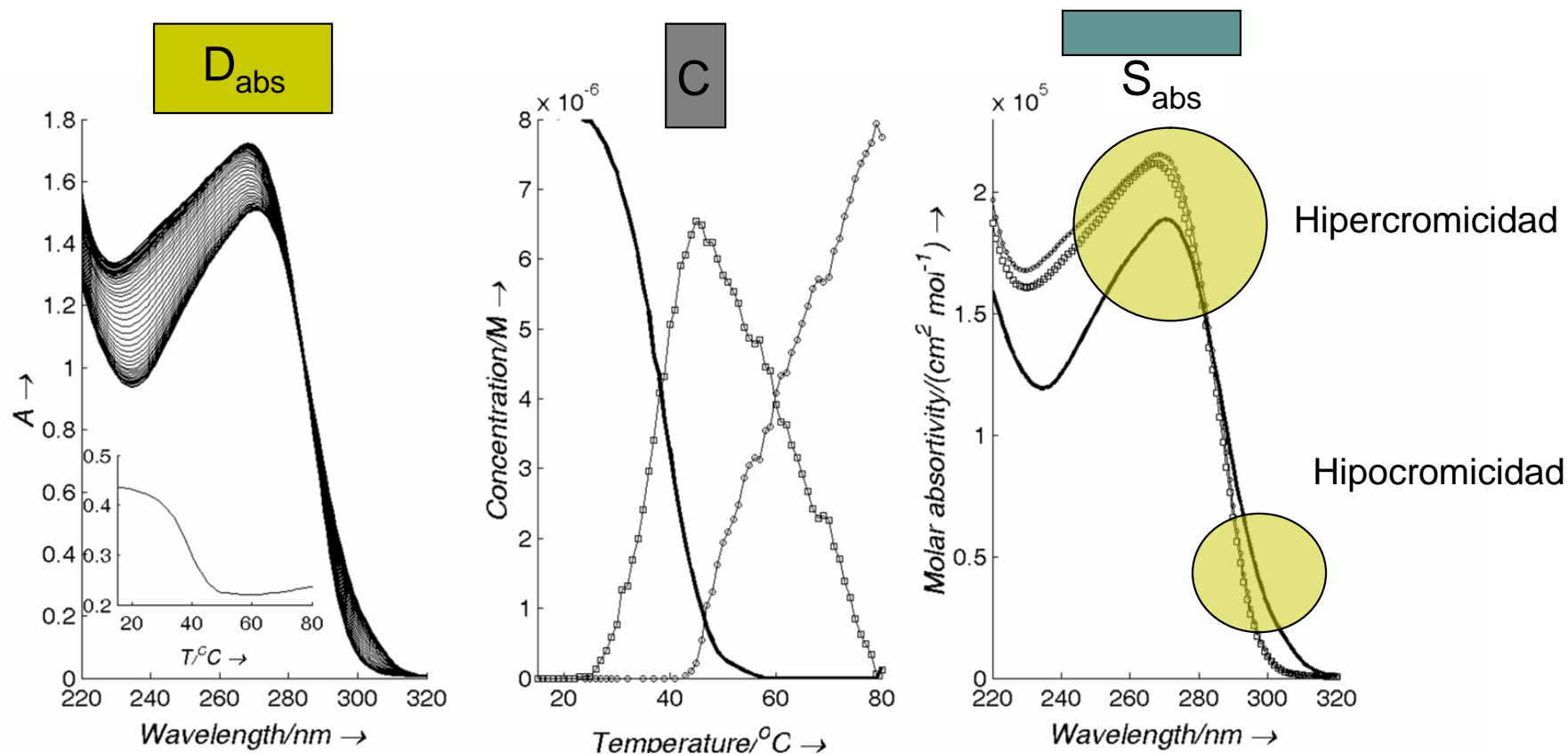


# Química Analítica del DNA cuádruple

## Estudio de la estabilidad de un *i-motif* en función de la temperatura

### Análisis individual

Desnaturalización térmica de un *i-motif* a pH 6,1





# Química Analítica del DNA cuádruple

## Estudio de la estabilidad de un *i*-motif en función del pH

### Análisis simultáneo

Analizamos dos matrices de datos: dicromismo circular y absorción molecular

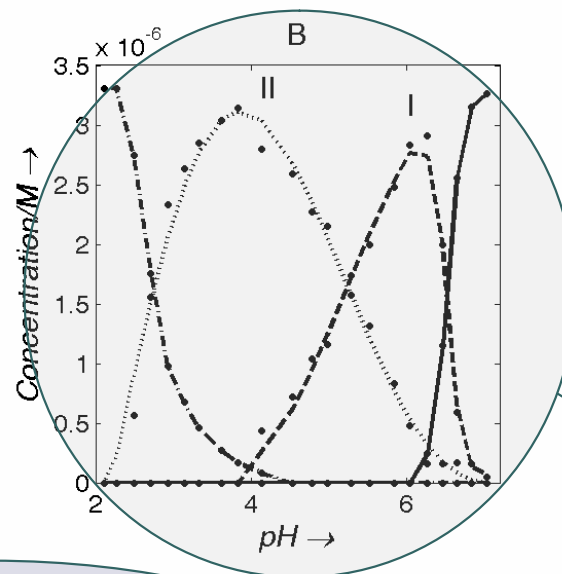
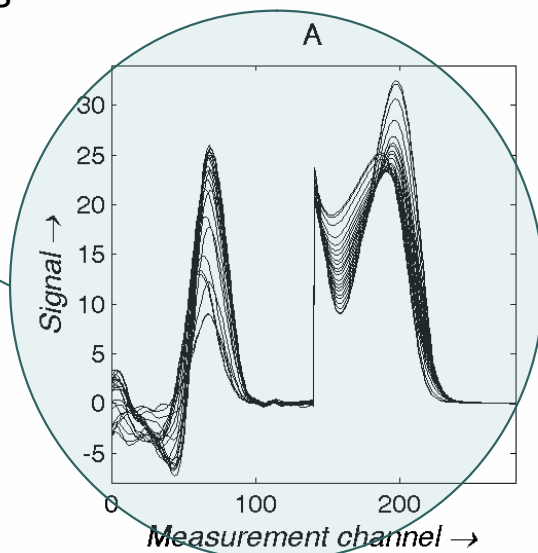
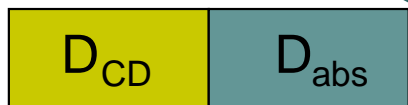
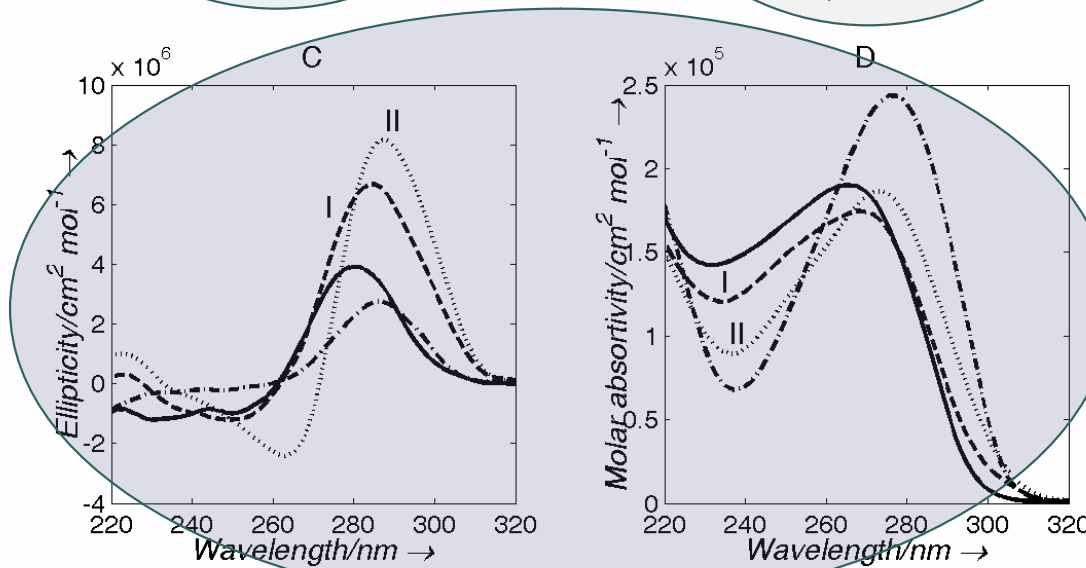
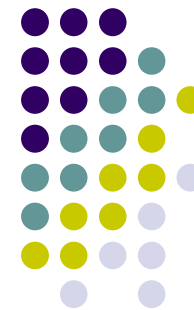


Diagrama de distribución



Espectros resueltos

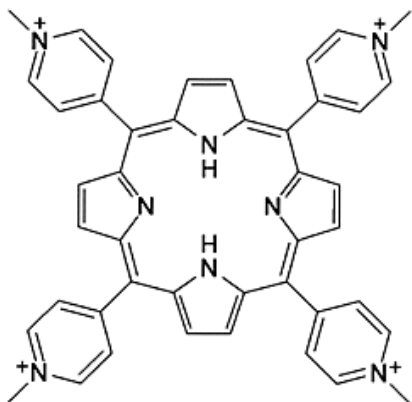




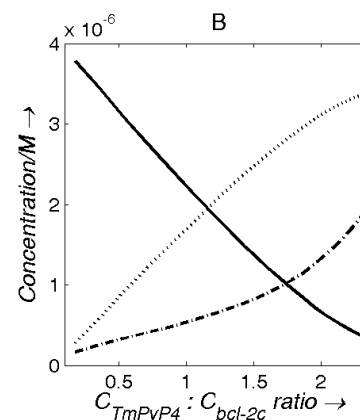
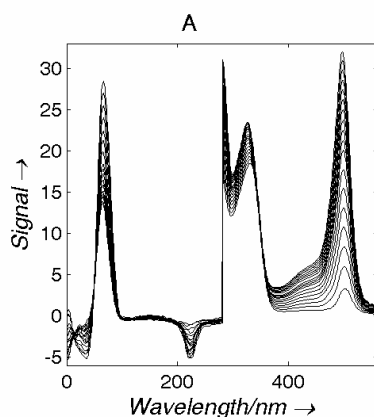
# Química Analítica del DNA cuádruple

## Estudio de la interacción de un *i-motif* con la porfirina TMPyP4

### Modelado rígido (*hard-modeling*)

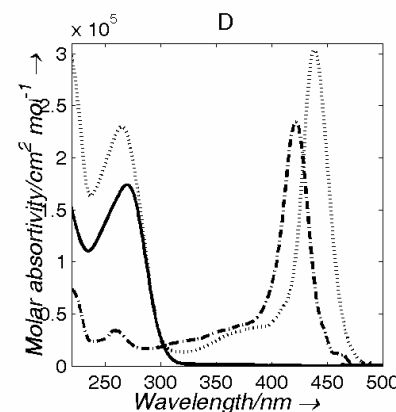
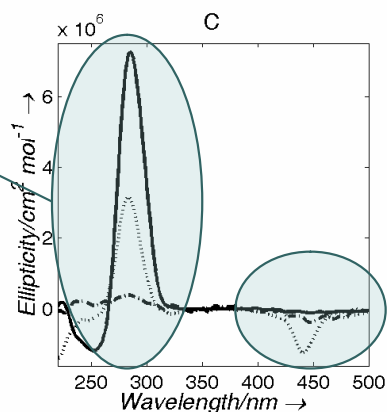


TMPyP4: porfirina tomada como 'modelo' en estudios de interacción



Clara disminución de la señal de dicroísmo ¿desorden?

Dicroísmo inducido: ¿intercalación?

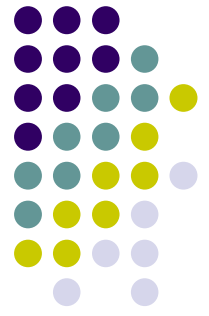


Se propone un complejo con estequiometría 1:2 (DNA:ligando) y  $\log K_{eq} = 12.4 \pm 0.2$

# Química Analítica del DNA cuádruple

## Competición dúplex / *G-quadruplex* en el telómero humano

### Análisis simultáneo



- Si tenemos una cadena rica en citosinas y, a la vez, una cadena rica en guaninas...



- ... podremos tener una competición dúplex Watson-Crick vs. G-cuádruple

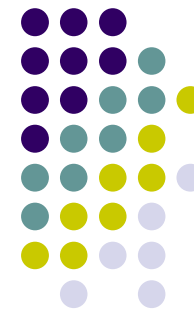


- Objetivo: resolver la competición cuádruple / dúplex W-C a lo largo de la fusión de una mezcla de cadenas ricas en guanina y citosina
  - Presencia de cadena rica en G → G- cuádruple
  - Presencia de cadena rica en C → dúplex
- En definitiva:
  - “¿cuánto hay de cada una de estas estructuras?”

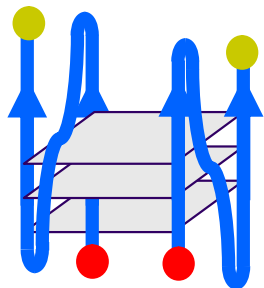
# Química Analítica del DNA cuádruple

## Competición dúplex / *G-quadruplex* en el telómero humano

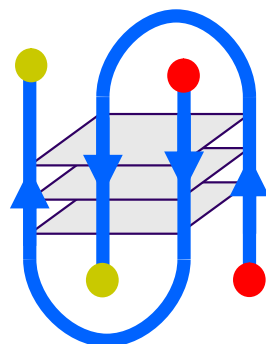
### Análisis simultáneo



Estructuras presentes en el sistema:



SG cuádruple paralelo



SG cuádruple antiparalelo

SG ovillo aleatorio



SC  
cadena  
sencilla

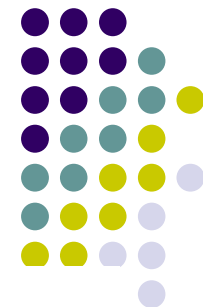


SG-SC dúplex

Temperatura baja: mezcla de estructuras ordenadas

Temperatura alta: **mezcla de estructuras desordenadas de SG y SC**

Temperaturas intermedias: ¡habrá de todo!

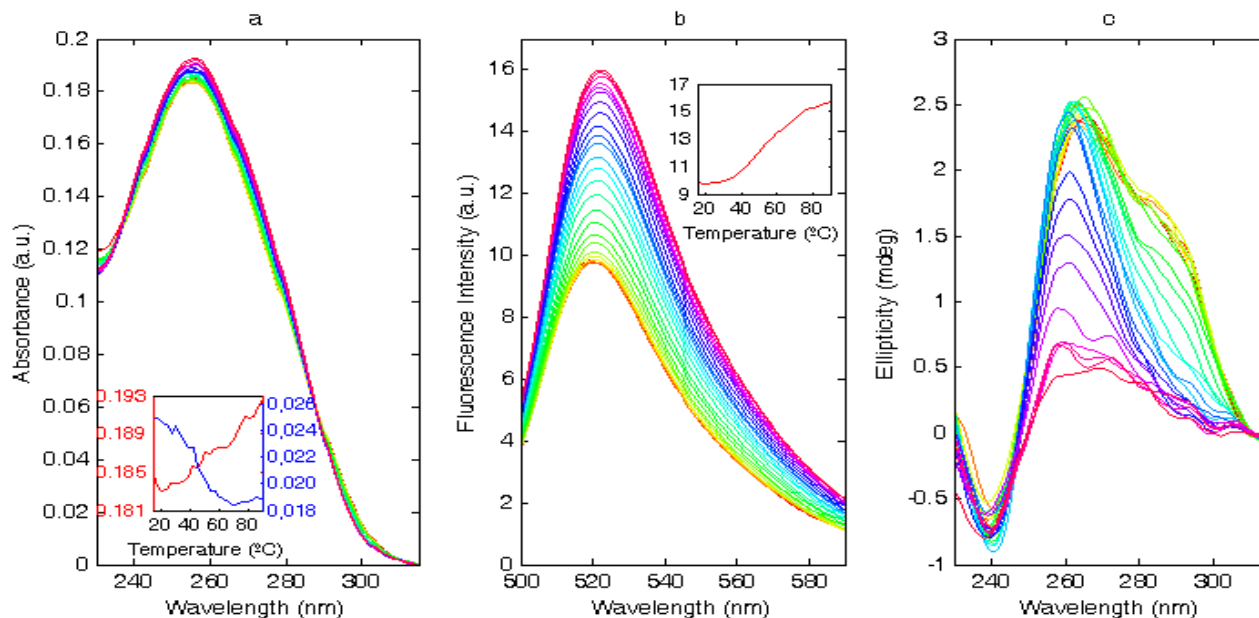


# Química Analítica del DNA cuádruple

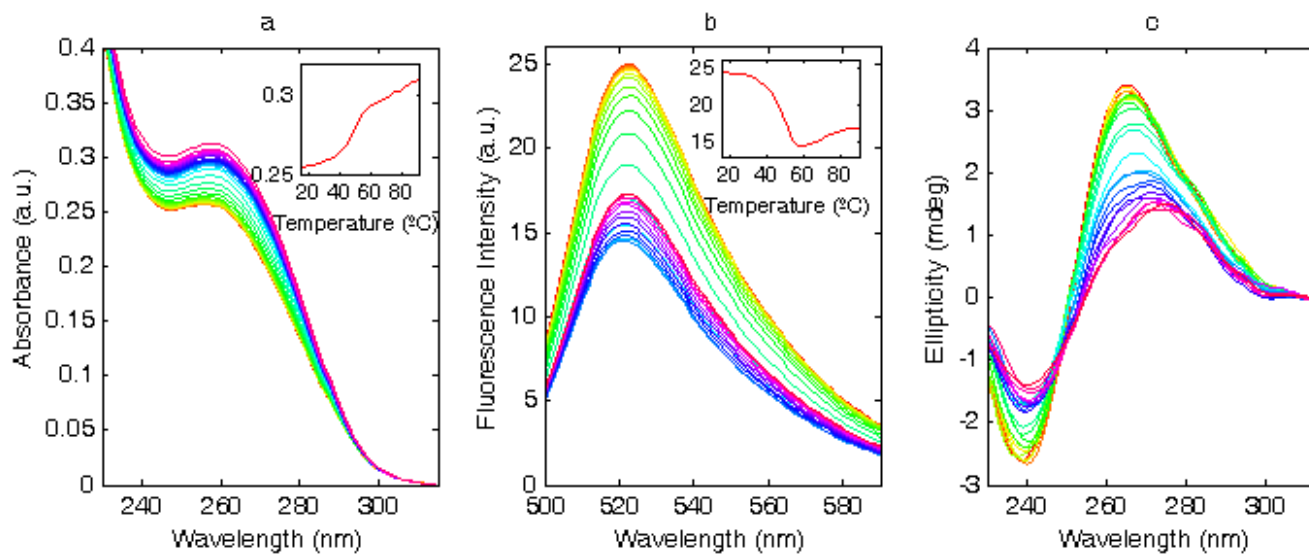
## Competición dúplex / *G-quadruplex* en el telómero humano

### Análisis simultáneo

Fusión de SG



Fusión de la mezcla  
SG:SC 1:1



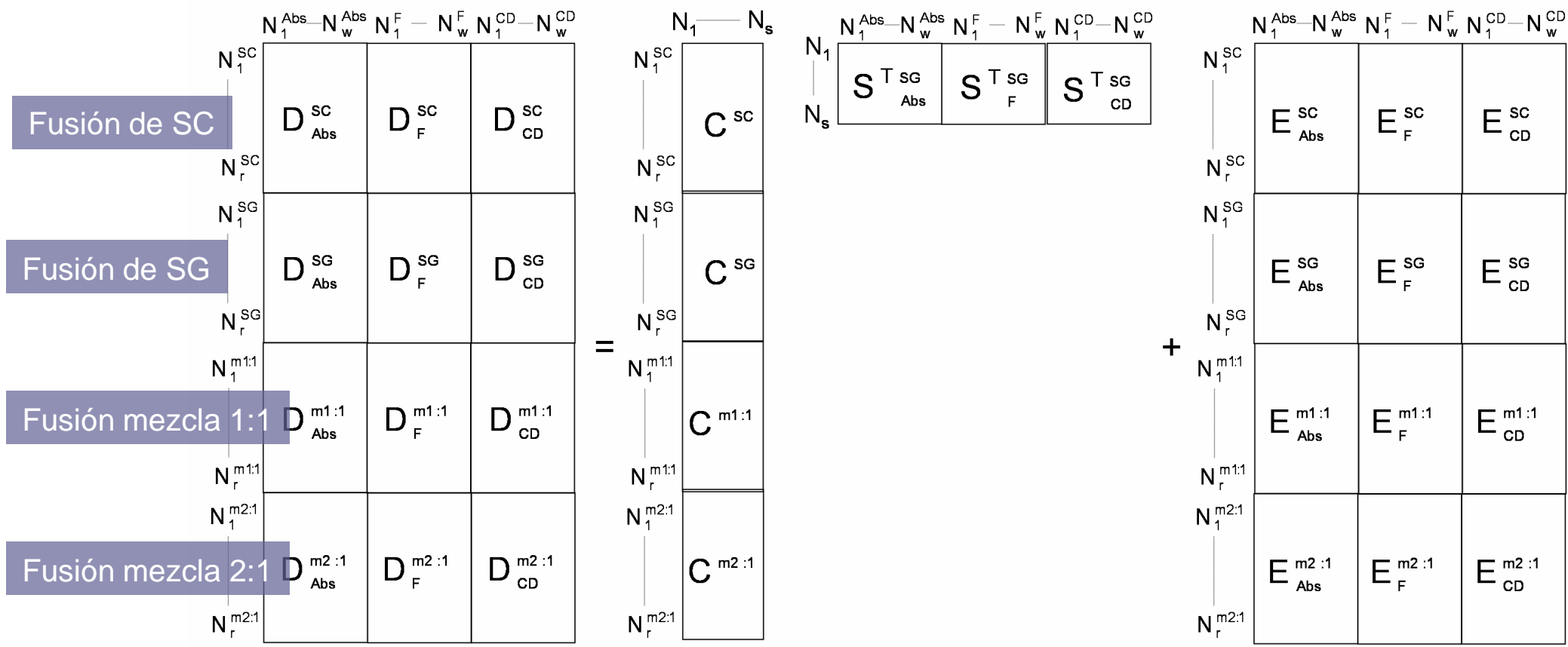


# Química Analítica del DNA cuádruple

## Competición dúplex / *G-quadruplex* en el telómero humano

### Análisis simultáneo

Abs.    Fl.    DC



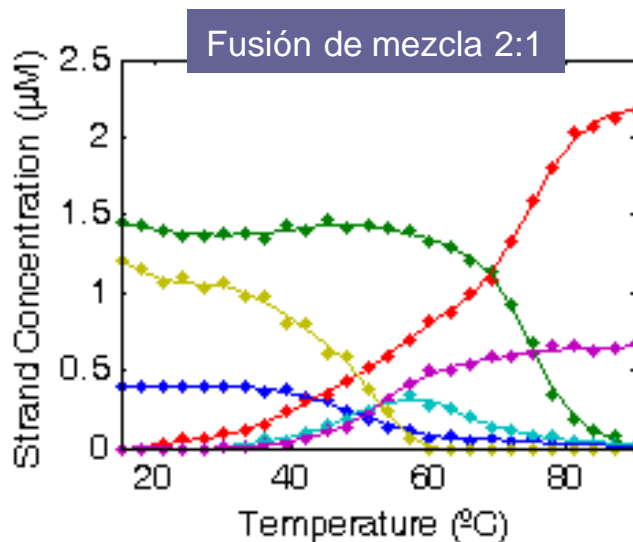
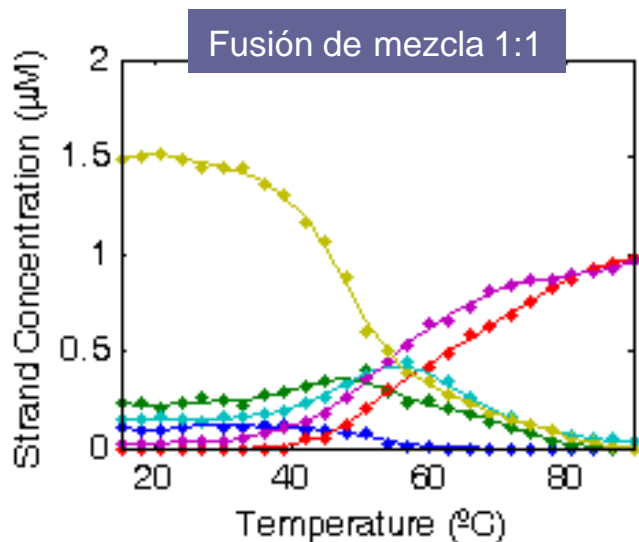
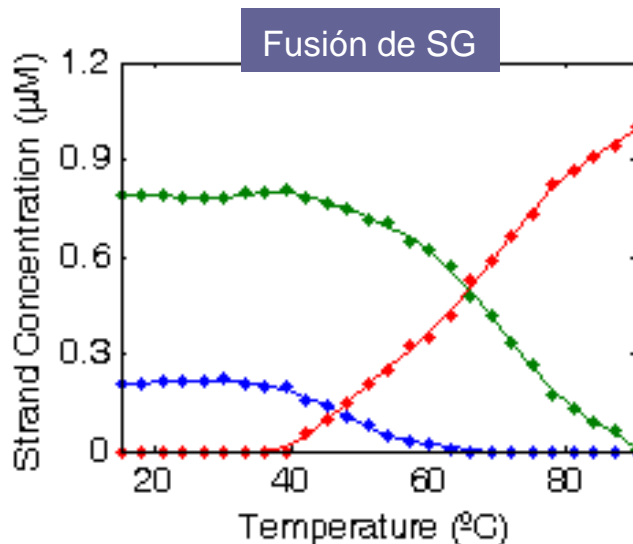
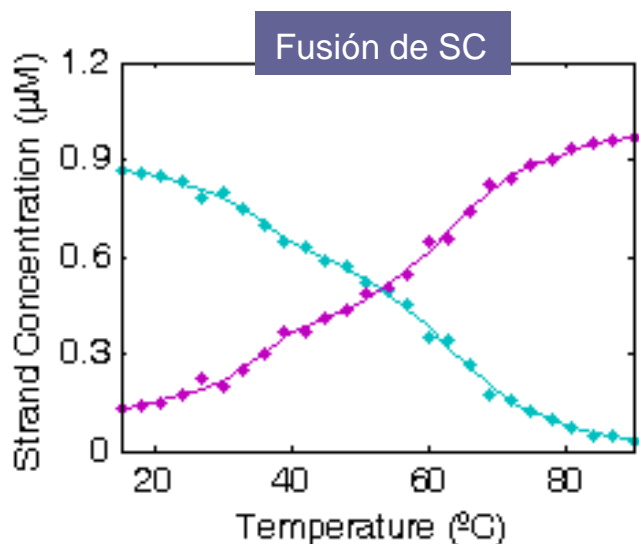




# Química Analítica del DNA cuádruple

## Competición dúplex / *G-quadruplex* en el telómero humano

### Análisis simultáneo



**Identificación:**

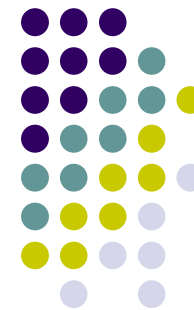
SC “ordenada”  
SC desordenada

SG cuádruple  
paralelo

SG cuádruple  
antiparalelo

SG desordenada

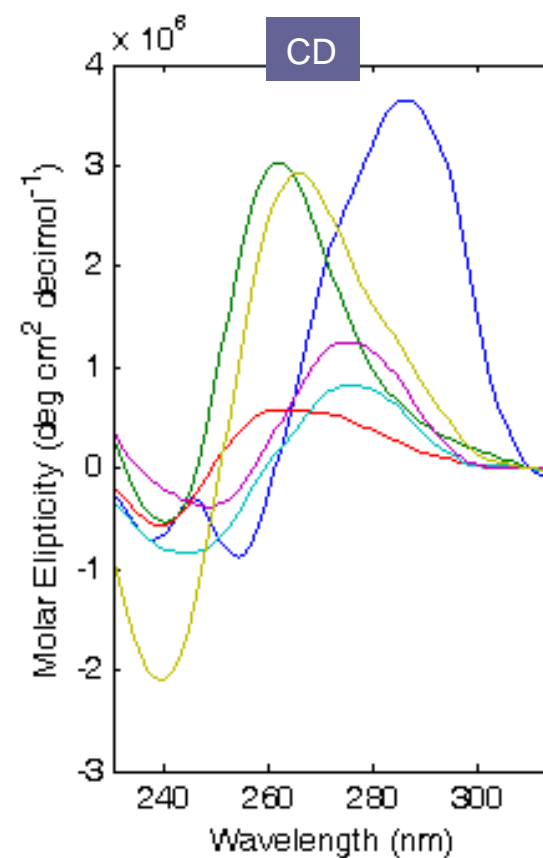
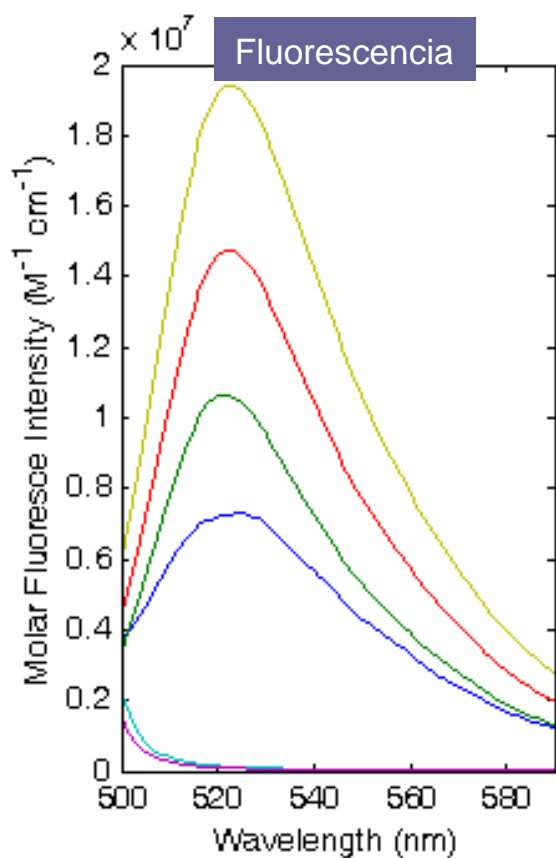
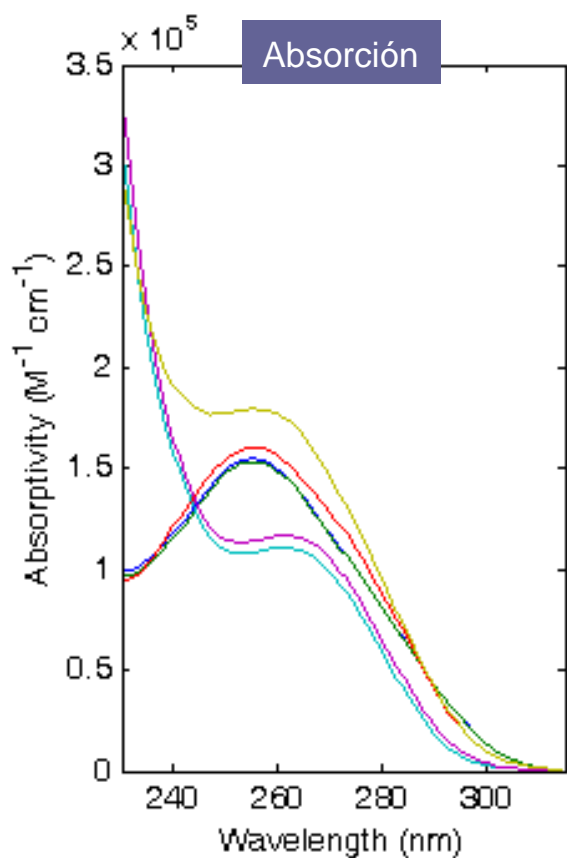
SG-SC dúplex



# Química Analítica del DNA cuádruple

## Competición dúplex / *G-quadruplex* en el telómero humano

### Análisis simultáneo



SC “ordenada” SC desordenada

SG cuádruple paralelo

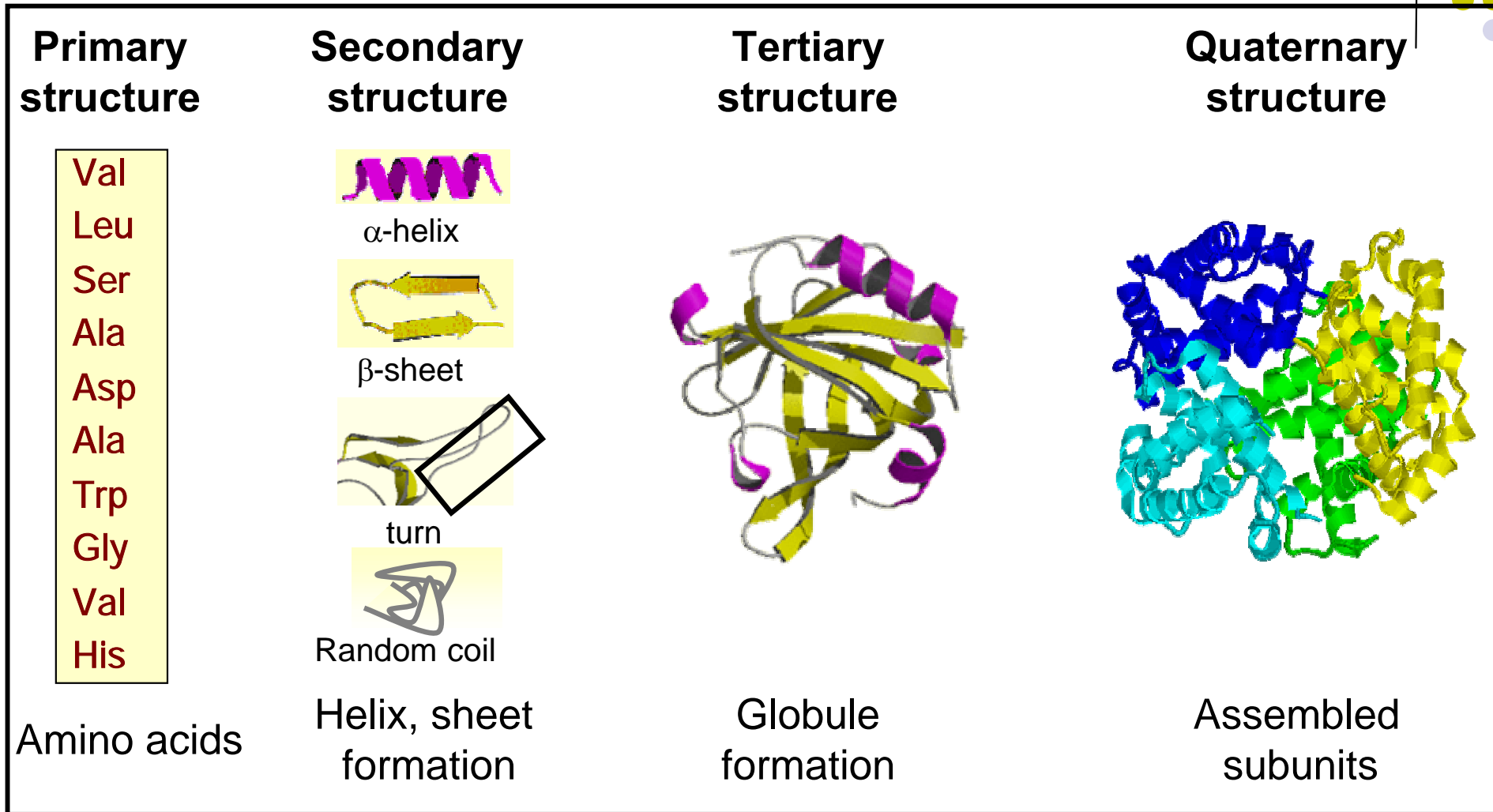
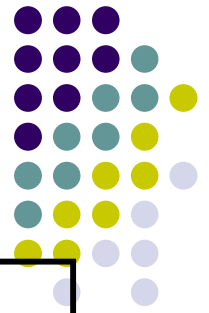
SG cuádruple antiparalelo

SG desordenada

SG-SC dúplex

# Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas

## Estructuras de las proteínas

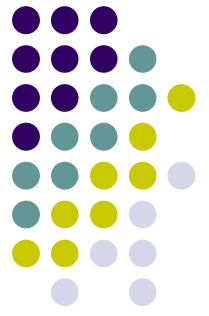


**Native protein** (secondary and tertiary structures formed).

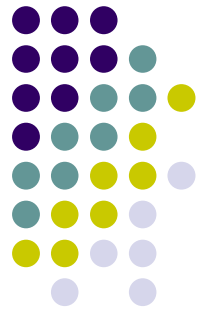
**Biologically active!!!**

# Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas

## Estructuras de las proteínas



- **Protein conformational transitions**
  - Induced by pH, temperature, time, salt effects,...
  - Within a structural level.
  - Involving variations in several structural levels (protein folding).
- **Protein binding interactions**
  - Prosthetic groups within the protein (heme proteins).
  - Other ligands (drugs, pollutants,...).



## Secondary structure

- Far-UV circular dichroism (200-250 nm)
- Infrared (mid- and near-)
- UV

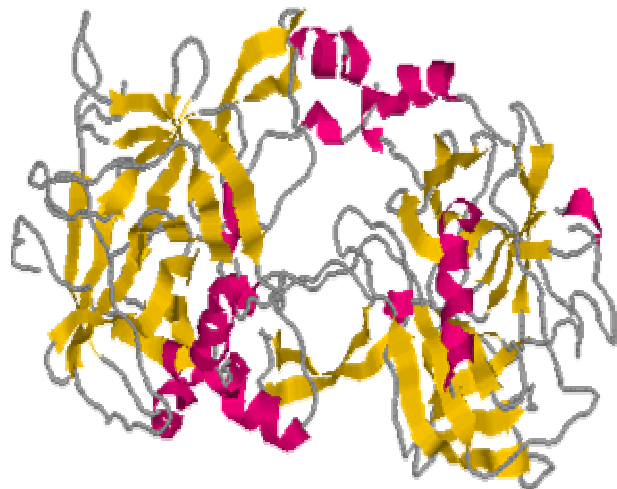
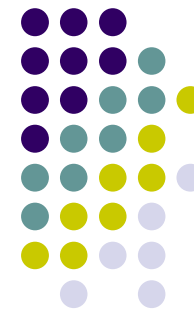
## Binding of heme groups

- Soret CD (380–430 nm)
- UV

## Tertiary structure

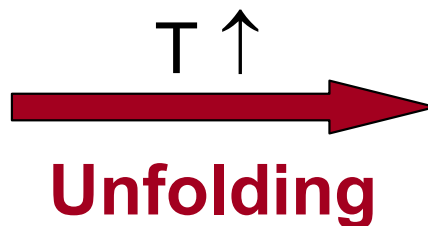
- Near-UV circular dichroism (250-350 nm)
- Fluorescence
- UV
- Mass spectrometry (MS)

Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas  
*T-induced unfolding of  $\alpha$ -chymotrypsin*



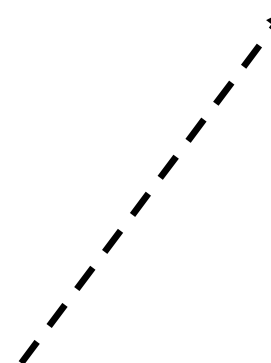
**Native protein**

(2<sup>ary</sup> and 3<sup>ary</sup> structures ordered)



**Unfolded conformation**

(2<sup>ary</sup> and 3<sup>ary</sup> structures lost)



**Intermediate conformations**

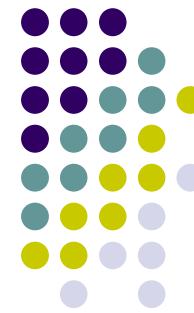
(non-simultaneous evolution of 2<sup>ary</sup> and 3<sup>ary</sup> structures)

**Other examples of protein folding processes**

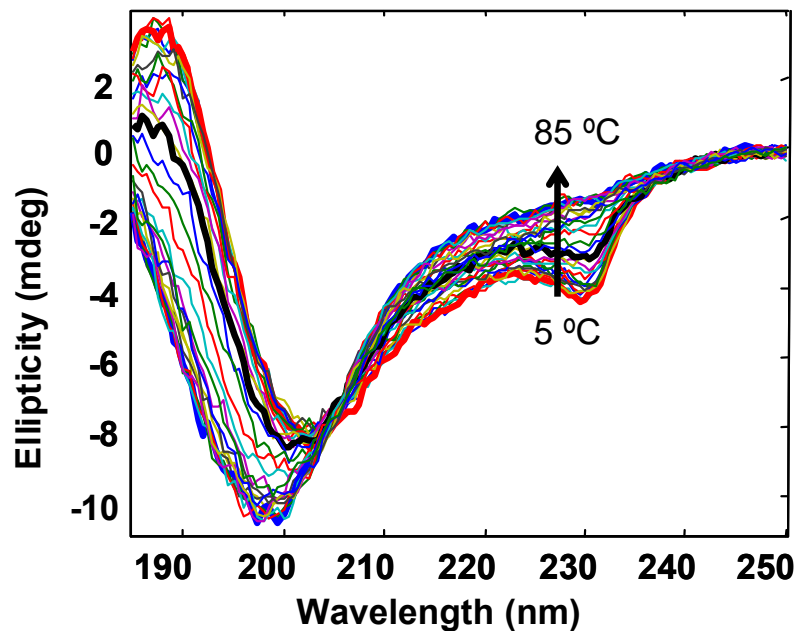
S. Navea, A. de Juan.; R. Tauler. *Analytica Chimica Acta*, 446 (2001) 187-197.

S. Navea, A. de Juan; R. Tauler. *Analytical Chemistry*, 64 (2002) 6031-6039.

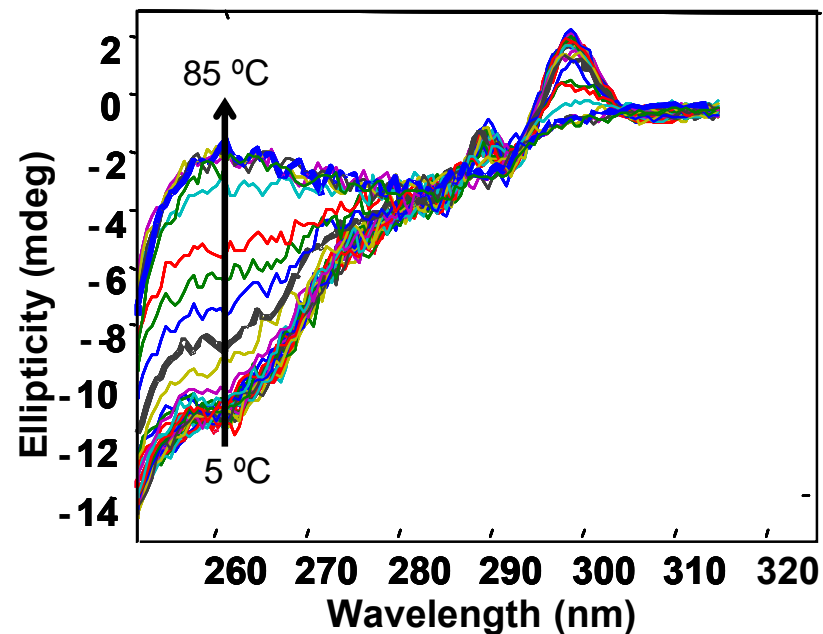
Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas  
*T-induced unfolding of  $\alpha$ -chymotrypsin*



Changes in secondary structure  
(Far-UV CD)

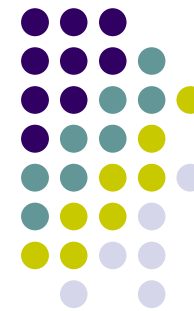


Changes in tertiary structure  
(near-UV CD)

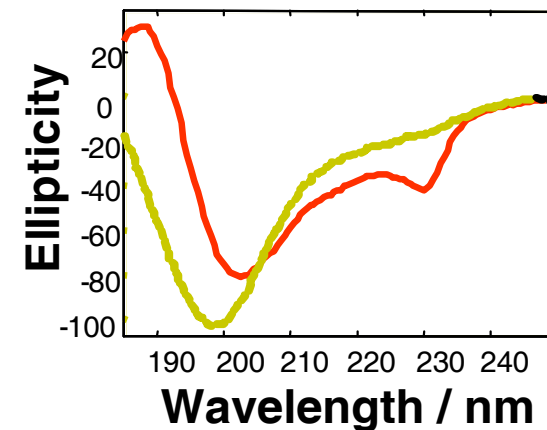
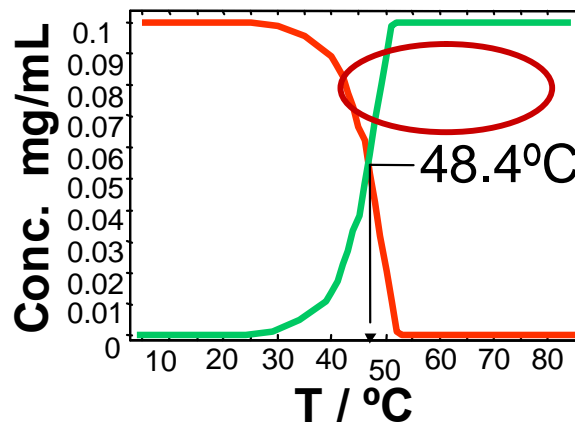
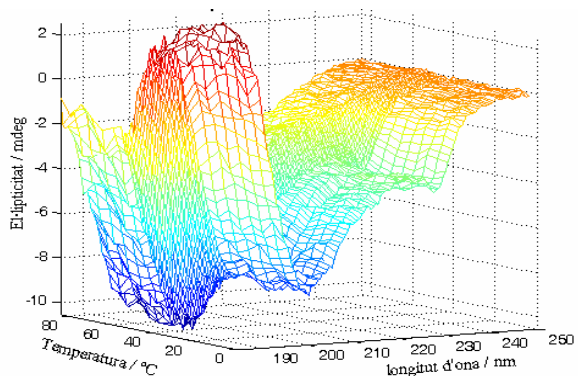


# Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas

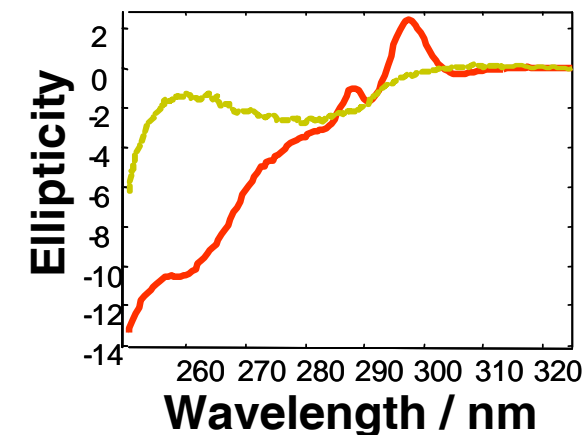
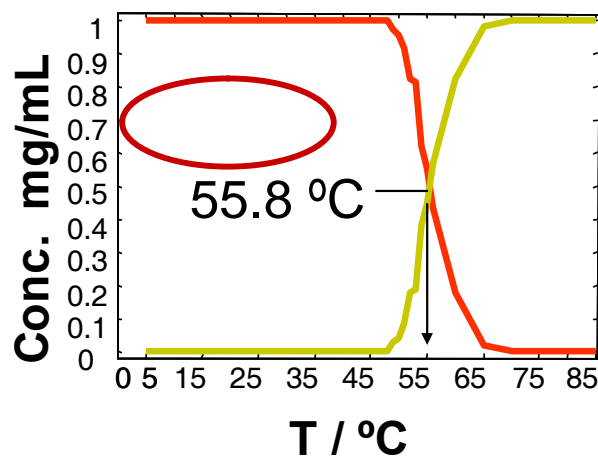
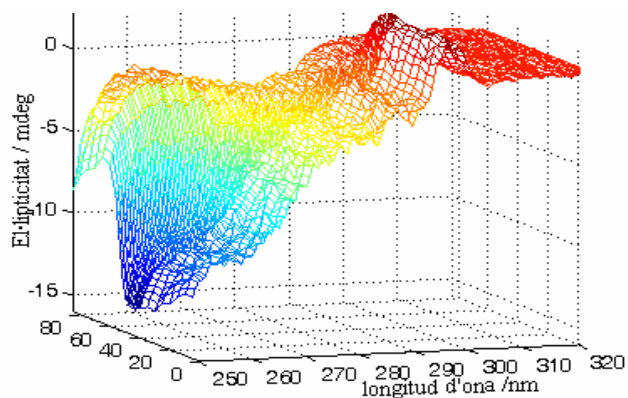
## *T-induced unfolding of $\alpha$ -chymotrypsin*



### Changes in secondary structure (far-UV CD resolution)



### Changes in tertiary structure (near-UV CD resolution)



**Intermediate??**

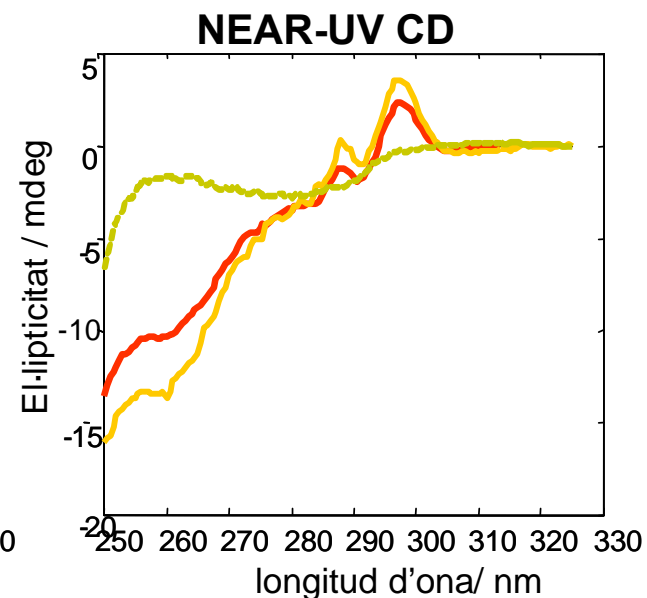
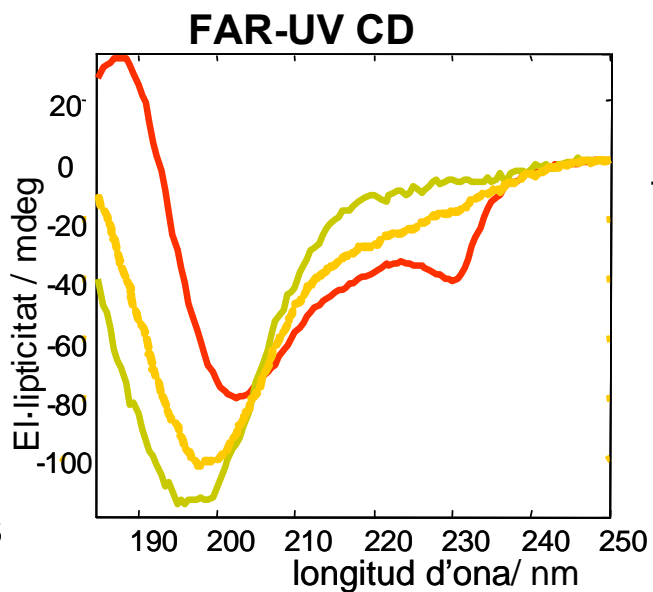
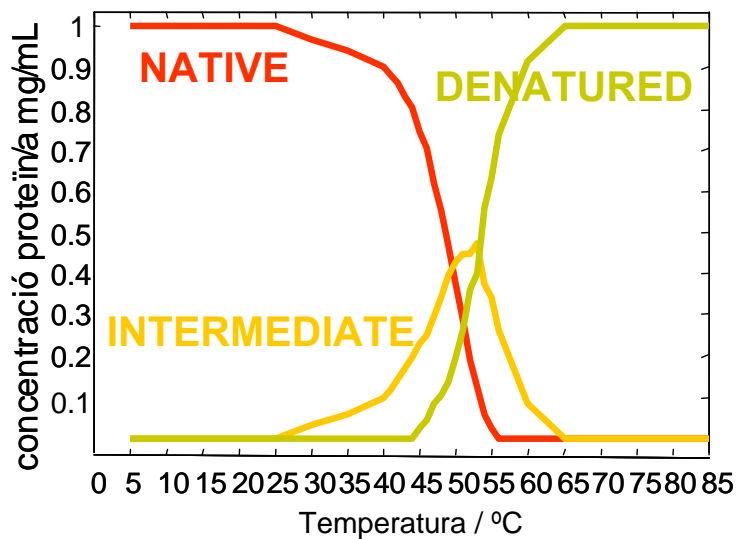
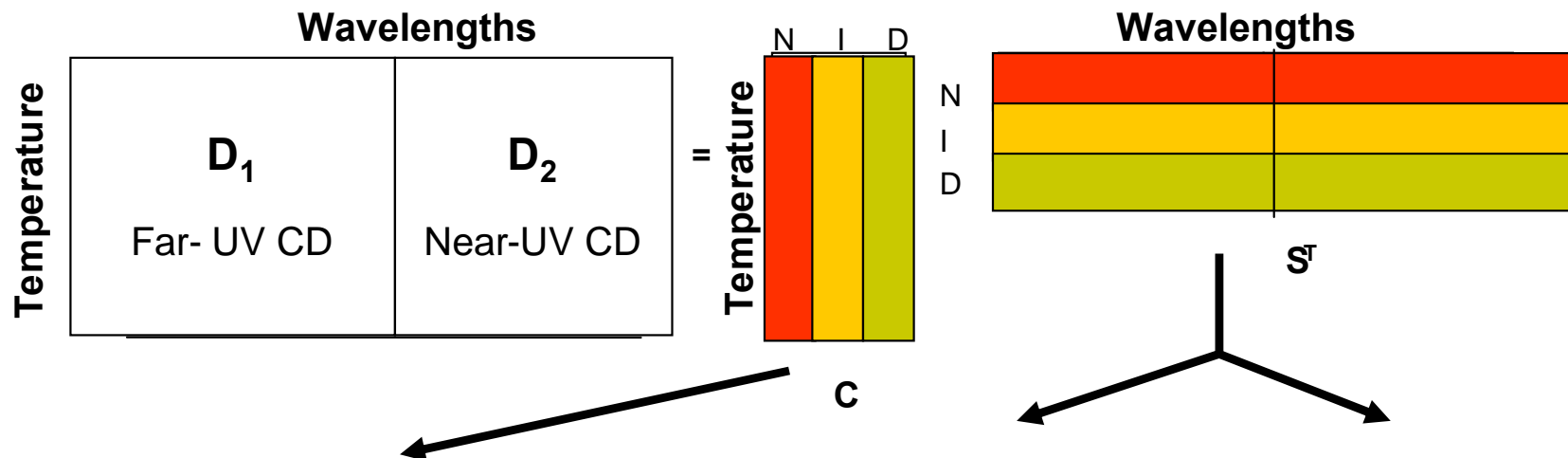


# Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas

## *T-induced unfolding of $\alpha$ -chymotrypsin*

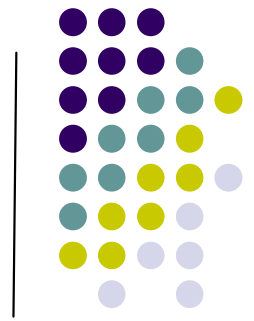


### Global protein unfolding description (far-UV and near-UV CD)



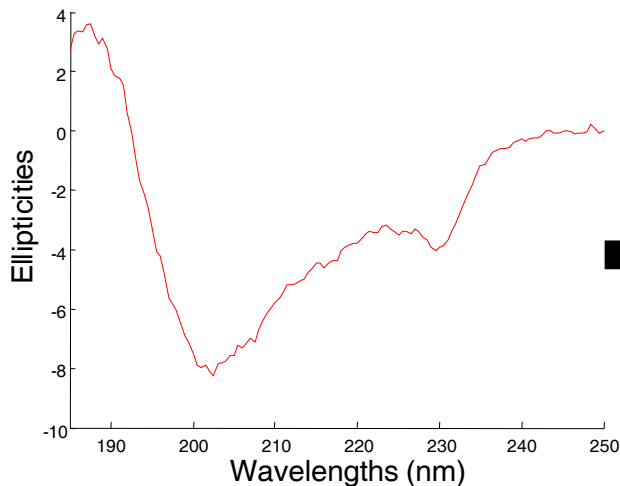
# Estudio y modelado de procesos en que intervienen proteínas

## *Elucidation of protein secondary structure*

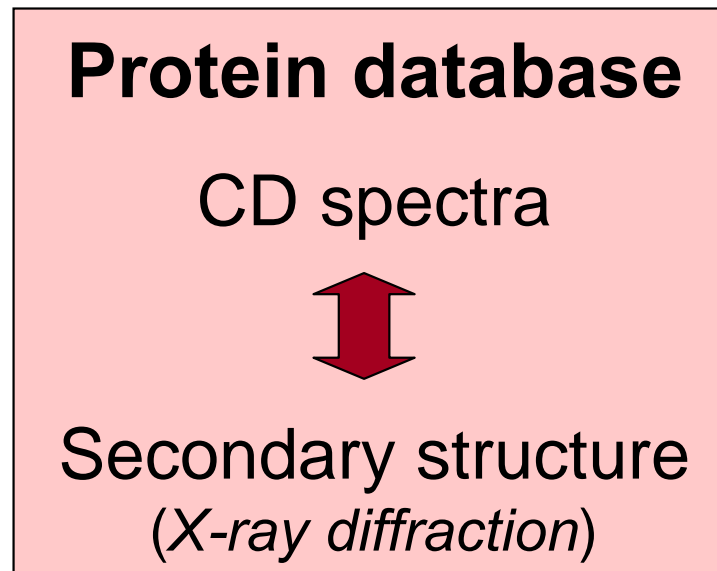


## Resolved far-UV circular dichroism spectra

$$\text{CD spectrum} = \sum (\text{frac. } 2^{\text{ary}} \text{ motif}) (\text{pure sp } 2^{\text{ary}} \text{ motif})$$

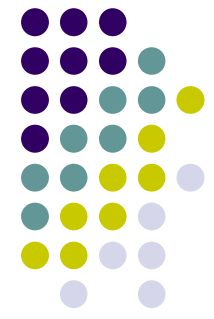


**CD spectrum**



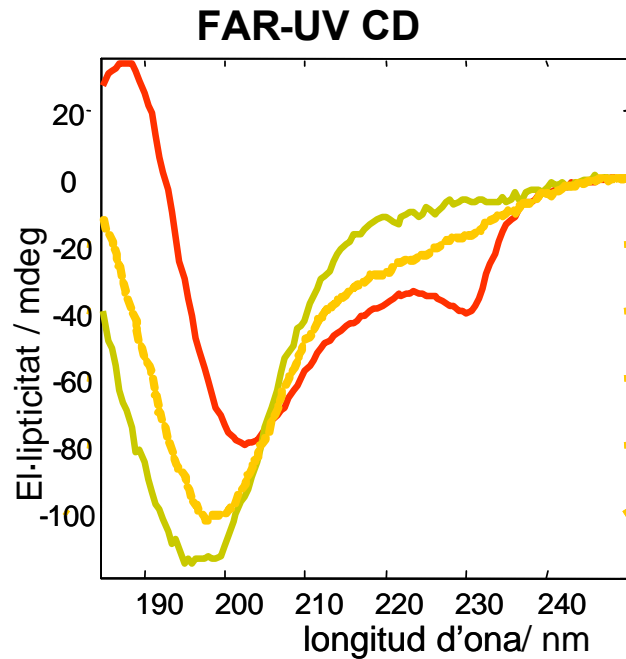
- 
- ✓ F.  $\alpha$ -helix
  - ✓ F.  $\beta$ -sheet
  - ✓ F. random coil
  - ✓ F. turns

**Fraction  $2^{\text{ary}}$   
structure motifs**



● **Resolved pure far-UV CD spectra**

- Structural description of the pure protein conformations.

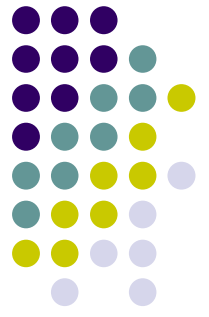


	$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	Turns	Random coil
<b>Native</b>	$12 \pm 4$	$30 \pm 7$	$24 \pm 6$	$34 \pm 5$
<b>Intermediate</b>	$5 \pm 4$	$36 \pm 8$	$24 \pm 6$	$33 \pm 6$
<b>Unfolded</b>	$6 \pm 4$	$35 \pm 7$	$24 \pm 4$	$34 \pm 5$

Conversion  $\alpha$  helix  $\rightarrow$   $\beta$  sheet

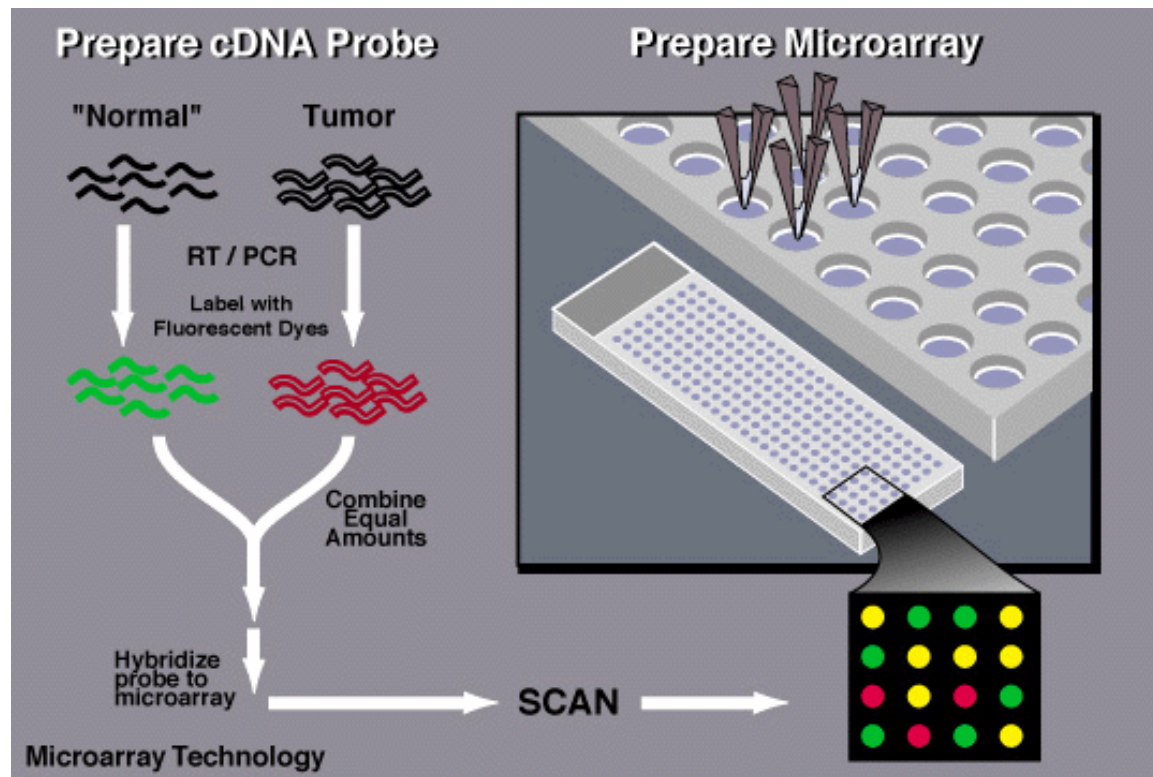
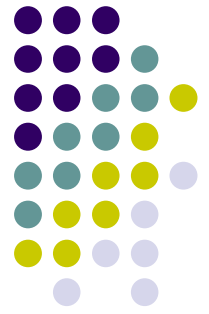
**Structure of chemically non-isolable conformations can be elucidated!!**

## Análisis de micromatrices de ADN



- Se visualizan los niveles de expresión genética de miles de genes en un único experimento
- Se obtiene información sobre la existencia de pautas y relaciones entre muestras (líneas celulares) y variables (genes)
- PCA y métodos de clasificación se han utilizado ampliamente, permitiendo la clasificación de muestras y la identificación de genes sobre- o infra-expresados

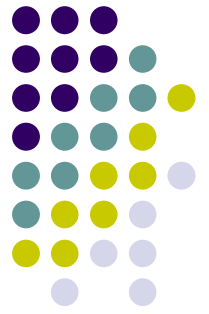
# Análisis de micromatrices de ADN Instrumentación



- When a gene is activated, cellular machinery begins to copy certain segments of that gene. The resulting product is known as messenger RNA (mRNA), which is the body's template for creating proteins. The mRNA produced by the cell is complementary, and therefore will bind to the original portion of the DNA strand from which it was copied.
- To determine which genes are turned on and which are turned off in a given cell, a researcher must first collect the messenger RNA molecules present in that cell. The researcher then labels each mRNA molecule by attaching a fluorescent dye. Next, the researcher places the labeled mRNA onto a DNA microarray slide. The messenger RNA that was present in the cell will then hybridize - or bind - to its complementary DNA on the microarray, leaving its fluorescent tag. A researcher must then use a special scanner to measure the fluorescent areas on the microarray.
- If a particular gene is very active, it produces many molecules of messenger RNA, which hybridize to the DNA on the microarray and generate a very bright fluorescent area. Genes that are somewhat active produce fewer mRNAs, which results in dimmer fluorescent spots. If there is no fluorescence, none of the messenger molecules have hybridized to the DNA, indicating that the gene is inactive. Researchers frequently use this technique to examine the activity of various genes at different times.

## Análisis de micromatrices de ADN

### Datos analizados (*Anal. Biochem.* 2006, 538, 76)

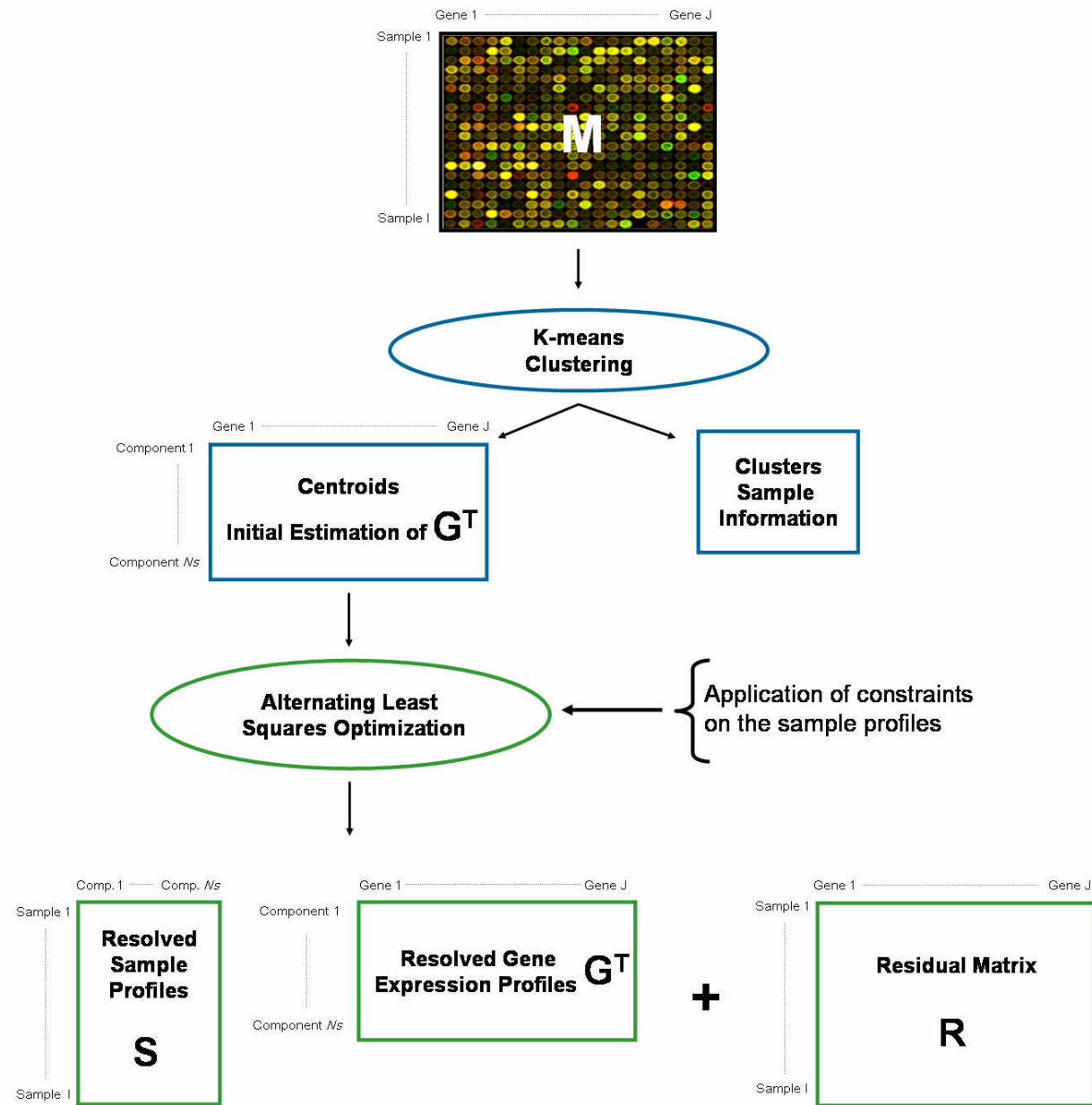


- NCI60 data set (Ross *et al.* Nat. Gen. 2000, 24, 227)
- 60 samples:
  - breast carcinoma (BR)
  - central nervous system tumor (CNS)
  - colon carcinoma (CO)
  - non-small lung cancer (NSLC)
  - leukemia (LE)
  - melanoma (ME)
  - ovarian carcinoma (OV)
  - prostate cancer (PR)
  - renal carcinoma (RE)
- mRNA was extracted and hybridized to cDNA microarrays including 9703 human cDNA clones that represented approximately 8000 different genes.
- The analyzed data set contains 60 samples and 1416 variables



# Análisis de micromatrices de ADN

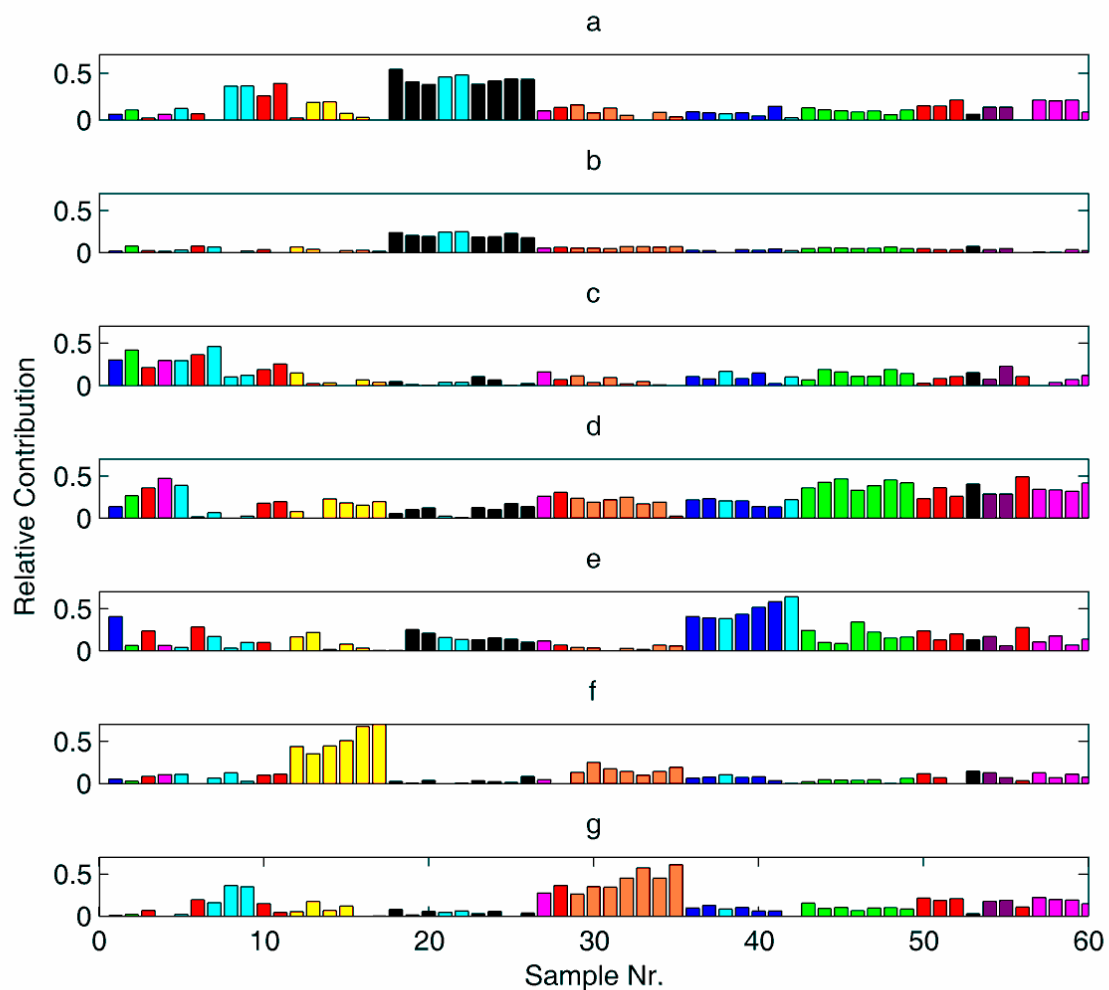
## Esquema del análisis con MCR-ALS





# Análisis de micromatrices de ADN

## Interpretación de los perfiles de muestras resueltas



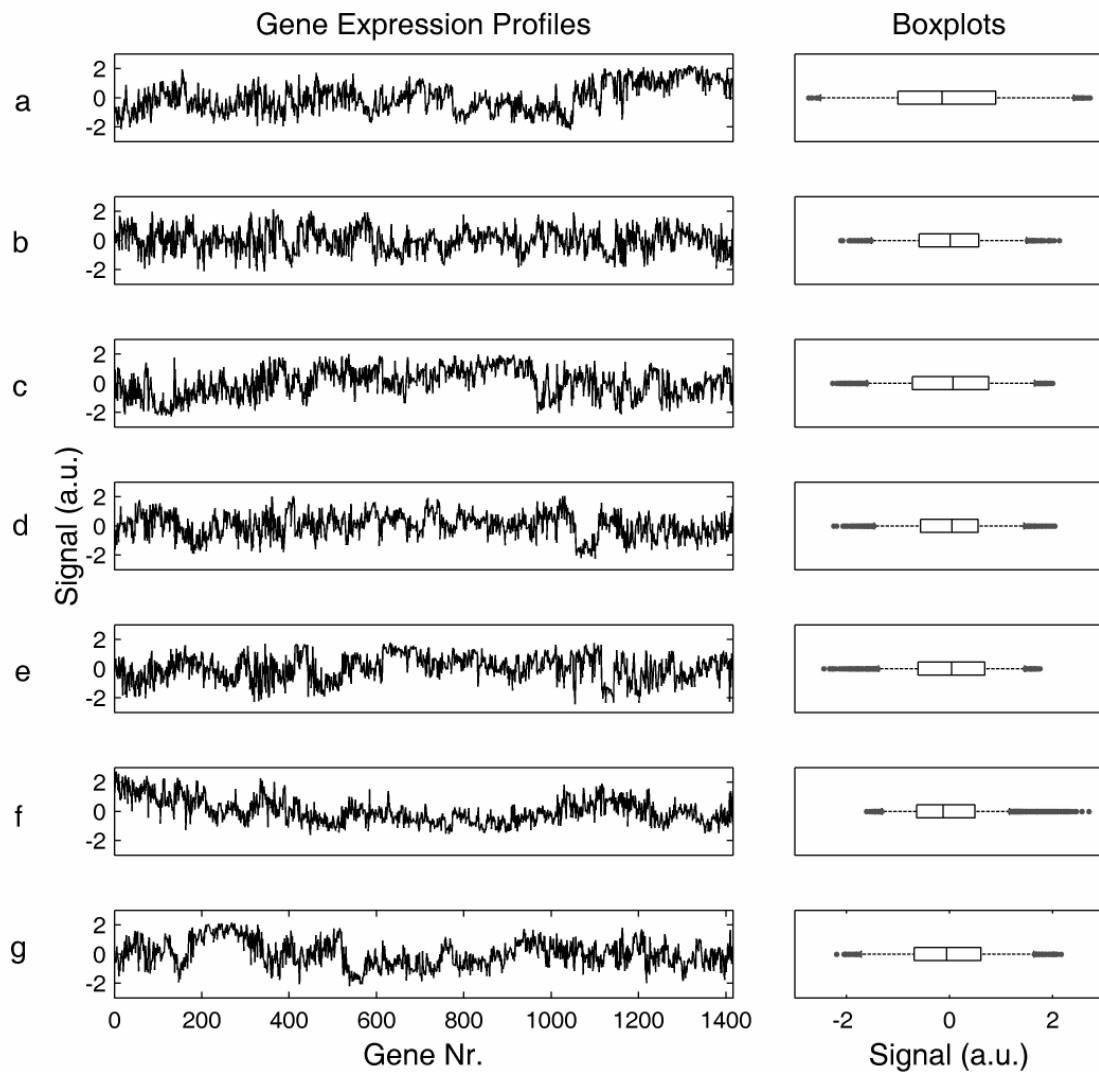
Componente	Tipo de cáncer
a	melanoma, <b>cancer de mama</b>
b	melanoma, <b>cancer de mama</b>
c	No es posible una asignación inequívoca
d	
e	<b>sistema nervioso central</b>
f	<b>leucemia</b>
g	<b>carcinoma de colon</b>





# Análisis de micromatrices de ADN

## Interpretación de los perfiles de expresión genética resueltos



La identificación de las variables extremas (*~ outliers*) mediante diagramas de caja (*boxplot*) en los perfiles de expresión genética resueltos con MCR-ALS permite una identificación de los genes sobre- e infra- expresados

## Más información en...



Estudio de los equilibrios en solución de un i-motif	Biochimie 2007, 89, 1562
Estudio de la competición dúplex / G-cuádruple en el telómero humano	Nucleic Acids. Res. 2006, 34, 206
Application of multivariate curve resolution to the temperature-induced unfolding of $\alpha$ -chymotrypsin	Anal Chimica Acta, 2005, 544, 159
T-induced transitions of $\beta$ -lactoglobulin	Anal. Chem. 2003, 75, 5592
Análisis de datos de micromatrices de ADN	Anal. Biochem. 2006, 358, 76
Página web del grupo de equilibrios en solución y Quimiometría	<a href="http://www.ub.es/gesq">www.ub.es/gesq</a>
Página web de la línea de investigación sobre equilibrios en solución de ácidos nucleicos ( <i>esta presentación está disponible en esta web</i> )	<a href="http://www.ub.es/gesq/dna">www.ub.es/gesq/dna</a>
Página web de MCR-ALS	<a href="http://www.ub.es/mcr">www.ub.es/mcr</a>