



INTRODUCCIÓN

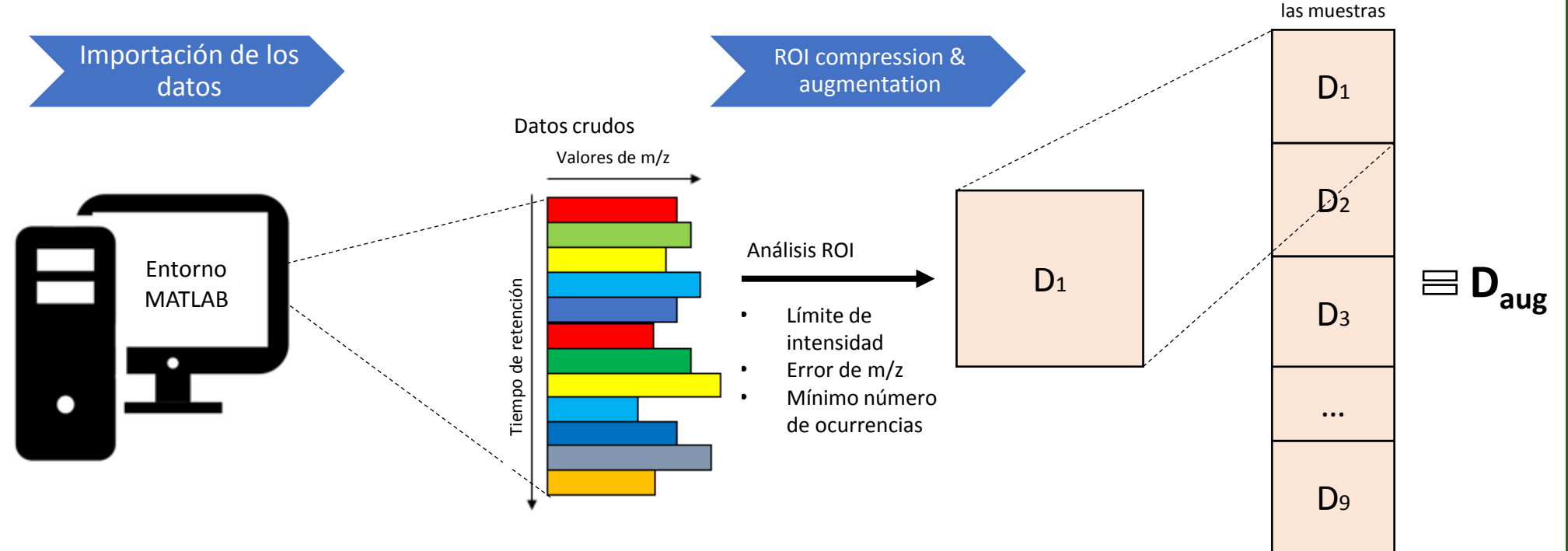
Las aguas residuales proporcionan una gran cantidad de información sobre la población de un área geográfica. Aunque las muestras de aguas residuales han sido ampliamente utilizadas en el estudio de moléculas pequeñas como productos farmacéuticos o drogas ilegales, recientemente se han empleado como fuente de muestreo representativo en el estudio de biomarcadores¹. La gran cantidad de información obtenida en este tipo de estudios proteómicos supone una dificultad para la caracterización y cuantificación de biomarcadores proteicos en muestras de aguas residuales. En este trabajo, la metodología "Regions of Interest-Multivariate Curve Resolution" (ROIMCR), una herramienta recientemente propuesta en proteómica³, combinada con "Partial Least Squares-Discriminant Analysis" (PLS-DA)⁴ es propuesta para el análisis de muestras ambientales en estudios proteómicos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se colocaron dispositivos poliméricos en el agua de entrada de la depuradora de Gavà-Viladecans (Barcelona, España) en 3 tiempos diferentes (3 dispositivos en cada uno de los tiempos) entre Abril y Mayo de 2020

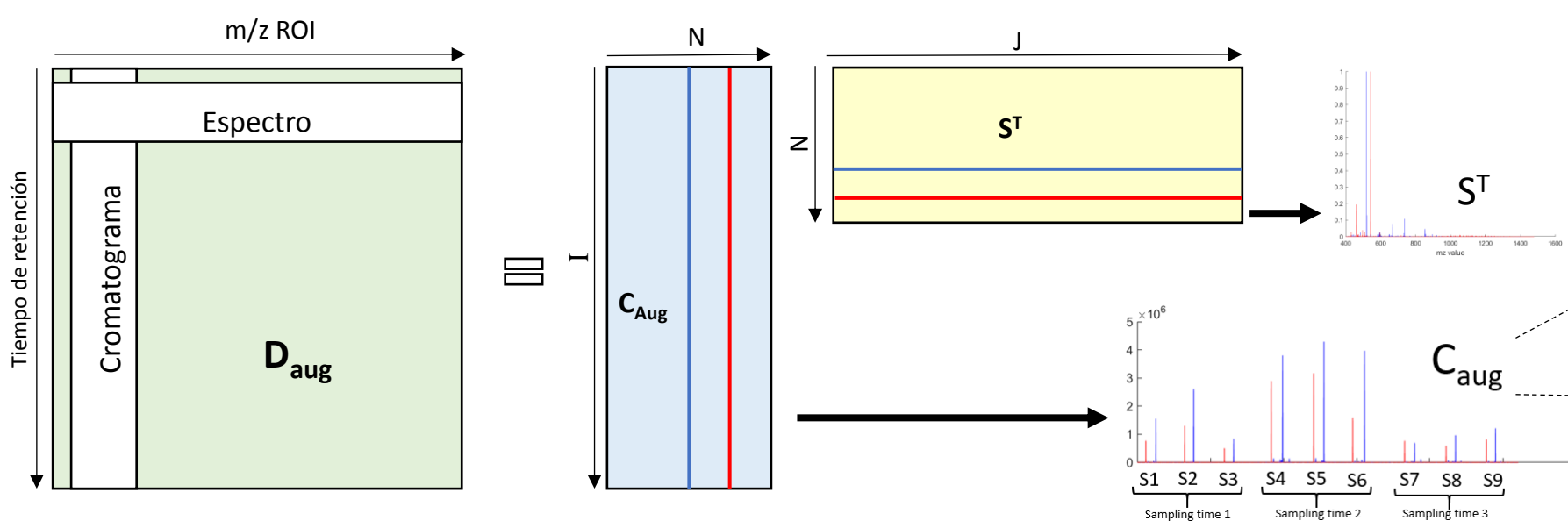


LIMPIEZA DE DATOS



ESTADÍSTICA

MCR-ALS



PLS-DA

Las alturas de los perfiles de elución de las componentes MCR (matriz C_{aug}) fueron empleadas como variables en el análisis PLS-DA

X11	X12	X13	X1	X1j

Componentes MCR seleccionadas como las máximas responsables de las diferencias observadas entre muestras de distintos tiempos de muestreo

IDENTIFICACIÓN PEPTIDICA

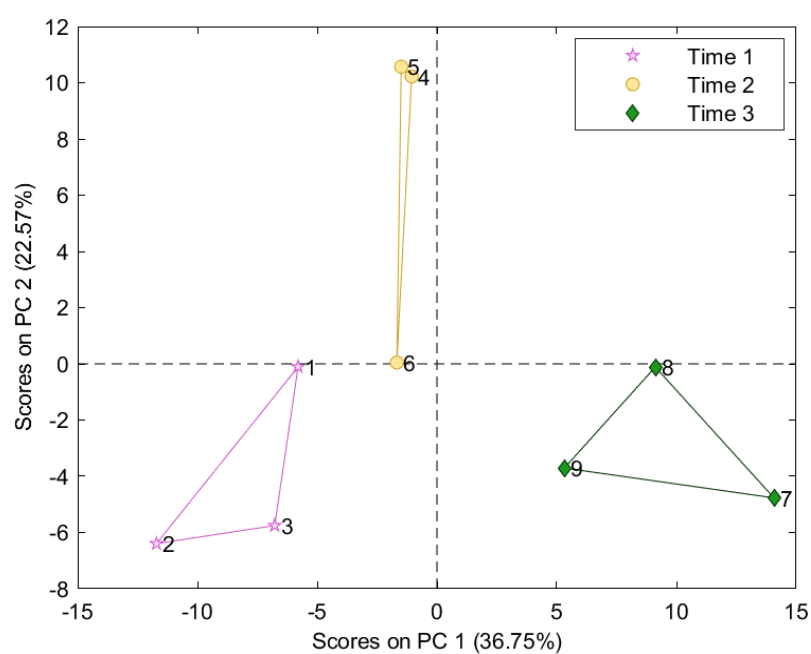
La identificación se centra en aquellas señales resultado del análisis PLS-DA, siendo las máximas responsables de las diferencias observadas entre muestras de distintos tiempos de muestreo. Las características del proceso de identificación son:

- **Software:** Proteome Discoverer
- **Metodología de identificación:** Bottom-up
- **Limitaciones:** Solo las señales previamente fragmentadas tienen señales MS2 y pueden ser identificadas
- **Procedimiento:** Solo las señales coincidentes entre los resultados de la metodología ROIMCR-PLSDA y la fragmentación previa serán considerados en el proceso de identificación
- **Problemática:** Existen señales resultado del ROIMCR-PLSDA que no pueden ser identificadas por falta de señales MS2.

RESULTADOS

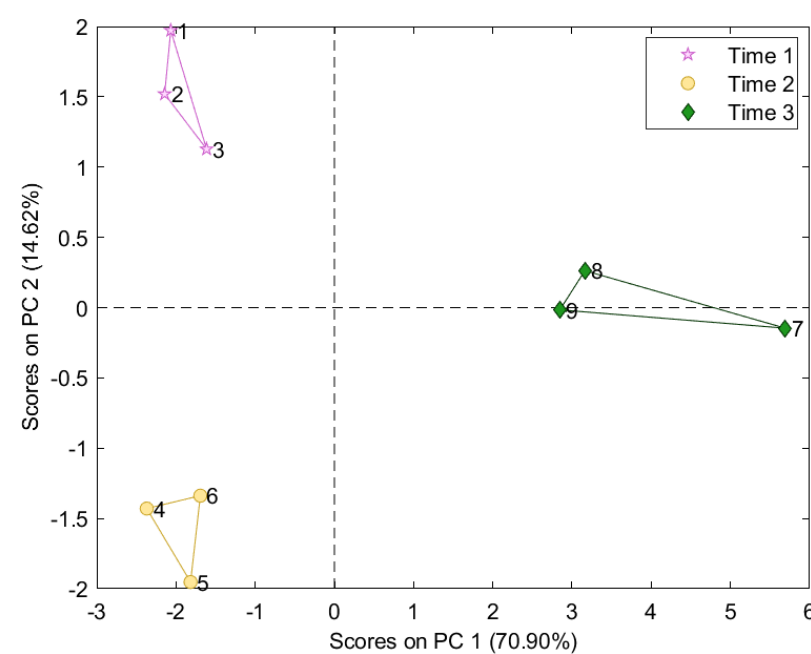
ROIMCR

Como resultado del análisis ROIMCR, se obtuvieron 181 componentes 'puras', logrando un 96.86% de la explicación de la varianza de los datos. La mayor parte de estas componentes se pueden asociar con señales peptídicas. Para evaluar la calidad de los resultados, se analizaron las alturas de los perfiles de elución de las componentes.



PLS-DA

Las 181 componentes 'puras' resultado del análisis ROIMCR fueron estudiadas empleando un PLS-DA, para evaluar cualer eran las componentes responsables de la diferenciación entre muestreos. Finalmente, se seleccionaron 41 componentes.



Esta tabla presenta las diferentes proteínas representadas por los péptidos identificados como los principales responsables de la diferenciación entre muestras recogidas a distintos tiempos. Las últimas 3 columnas representan el número de péptidos en cada uno de los tiempos de muestreo. Estas proteínas representan una gran variedad de especies como humano, ratón o distintas bacterias.

Proteins	Protein name	Organism name	Time 1	Time 2	Time 5
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	Homo sapiens	7	10	5
Q6IFZ6	Keratin, type II cytoskeletal 1b	Mus musculus	7	9	5
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	Homo sapiens	12	17	6
Q98119	60 kDa chaperonin	Mesorhizobium japonicum	1	1	1
B5YIN3	60 kDa chaperonin	Thermodesulfobium yellowstonii	1	1	1
A1K436	60 kDa chaperonin 1	Azoarcus sp.	1	1	1
Q5P7G2	60 kDa chaperonin	Aromatoleum aromaticum	1	1	1
A4G837	60 kDa chaperonin	Hermiimonas arsenicoxydans	1	1	1
Q1H4F2	60 kDa chaperonin	Methylobacillus flagellatus	1	1	1
A4SZV4	60 kDa chaperonin	Polynucleobacter asymbioticus	1	1	1
Q3A0V2	60 kDa chaperonin	Pelobacter carbinolicus	1	1	1
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	Homo sapiens	1	9	2
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	Homo sapiens	2	4	0
A8EV70	ATP synthase subunit beta	Acetobacter butzleri	0	1	0
Q99895	Chymotrypsin-C	Homo sapiens	0	6	0
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Homo sapiens	0	7	2
Q6FF97	Elongation factor Tu	Acinetobacter baylyi	0	4	0
A3M1F6	Elongation factor Tu	Acinetobacter baumannii	0	4	0
P09093	Chymotrypsin-like elastase family member 3A	Homo sapiens	0	14	0
A5FLS1	ATP synthase subunit beta	Flavobacterium johnsoniae	0	1	0
A1AL17	ATP synthase subunit beta 1	Pelobacter propionicus	0	1	0
Q82XP8	ATP synthase subunit beta	Nitrosomonas europaea	0	1	0
Q9Y6R7	IgGfC-binding protein	Homo sapiens	0	1	0
Q14533	Keratin, type II cuticular Hb1	Homo sapiens	0	0	1
P78385	Keratin, type II cuticular Hb3	Homo sapiens	0	0	1
P78386	Keratin, type II cuticular Hb5	Homo sapiens	0	0	1
O43790	Keratin, type II cuticular Hb6	Homo sapiens	0	0	1
O76009	Keratin, type I cuticular Ha3-I	Homo sapiens	0	0	1

CONCLUSIONES

- ✓ La compresión de los datos y el análisis llevado a cabo por ROIMCR permite la reducción de la cantidad de datos, sin perder las señales proteómicas de las muestras.
- ✓ El análisis PLS-DA permite la selección de las componentes puras que representan los péptidos responsables de la variación entre diferentes tiempos de muestreo.
- ✓ El siguiente paso en este trabajo sería analizar las señales seleccionadas mediante la combinación del ROIMCR y PLS-DA empleando LC-HRMS/MS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado económicamente por la Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group "2017 SGR 1404 - Water and Soil Quality Unit") y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CEX2018-000794-S, PID2019-105732GB and PID2020-114065RB-C22)

REFERENCIAS

- 1- M. Carrascal et al. (2020) Discovery of large molecules as new biomarkers in wastewater using environmental proteomics and suitable polymer probes. Sci. Total Environ., 747 Article 141145.
- 2- C. Perez-Lopez et al. (2021) Non-target protein analysis of samples from wastewater treatment plants using the regions of interest-multivariate curve resolution (ROIMCR) chemometrics method. J. Environ. Chem. Eng. Volume 9, Issue 4, August, 105752.
- 3- E. Gorrochategui et al. (2019) ROIMCR: a powerful analysis strategy for LC-MS metabolomic datasets, BMC Bioinforma., 20 (1), pp. 1-17.
- 4- S. Wold et al. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemom. Intell. Lab Syst., 58 (2) (2001), pp. 109-130