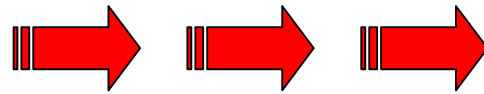


Uso de MS em Análises Proteômicas

**Cortesia Prof. Gilberto Domont -
UFRJ**



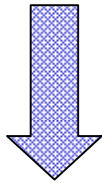
Proteome 1



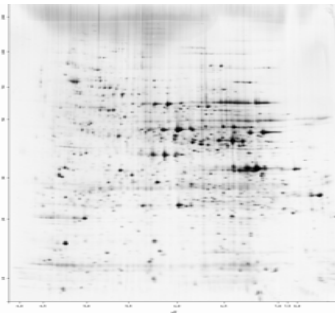
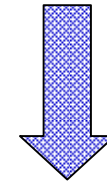
**Biological changes
(morphogenesis)**



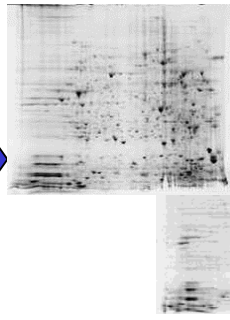
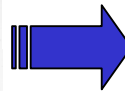
Proteome 'n'



Profiling of proteins



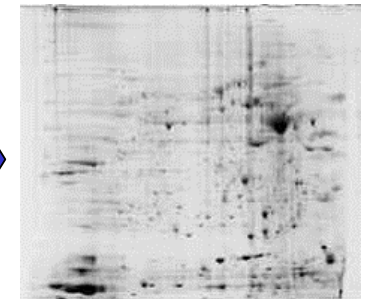
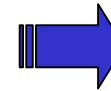
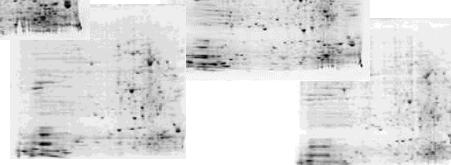
Proteome 1



Proteome 2

Proteome 3

Proteome 4



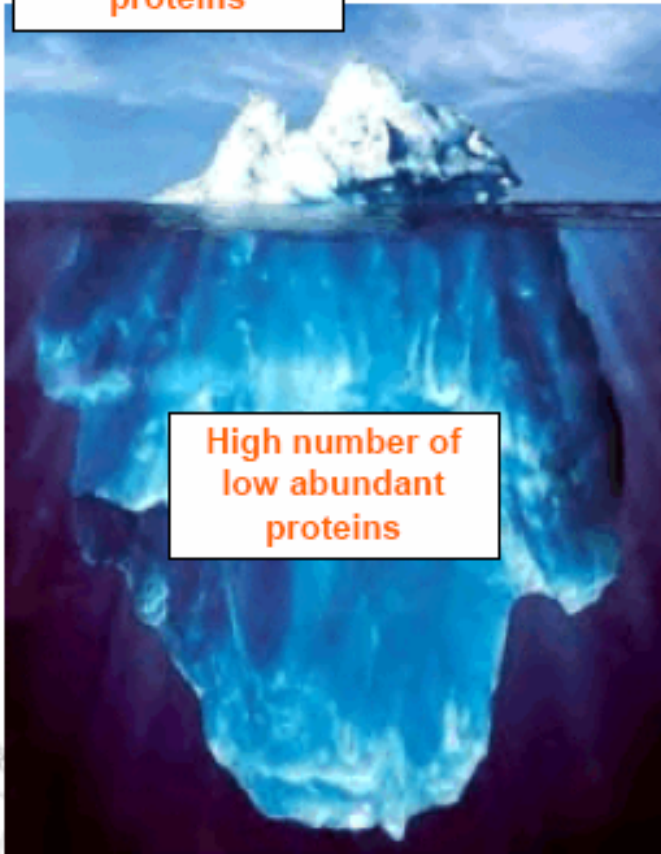
Proteome 'n'

O GENOMA É O MESMO, JÁ O PROTEOMA.....



O ICEBERG PROTÉICO

Low number of highly abundant proteins



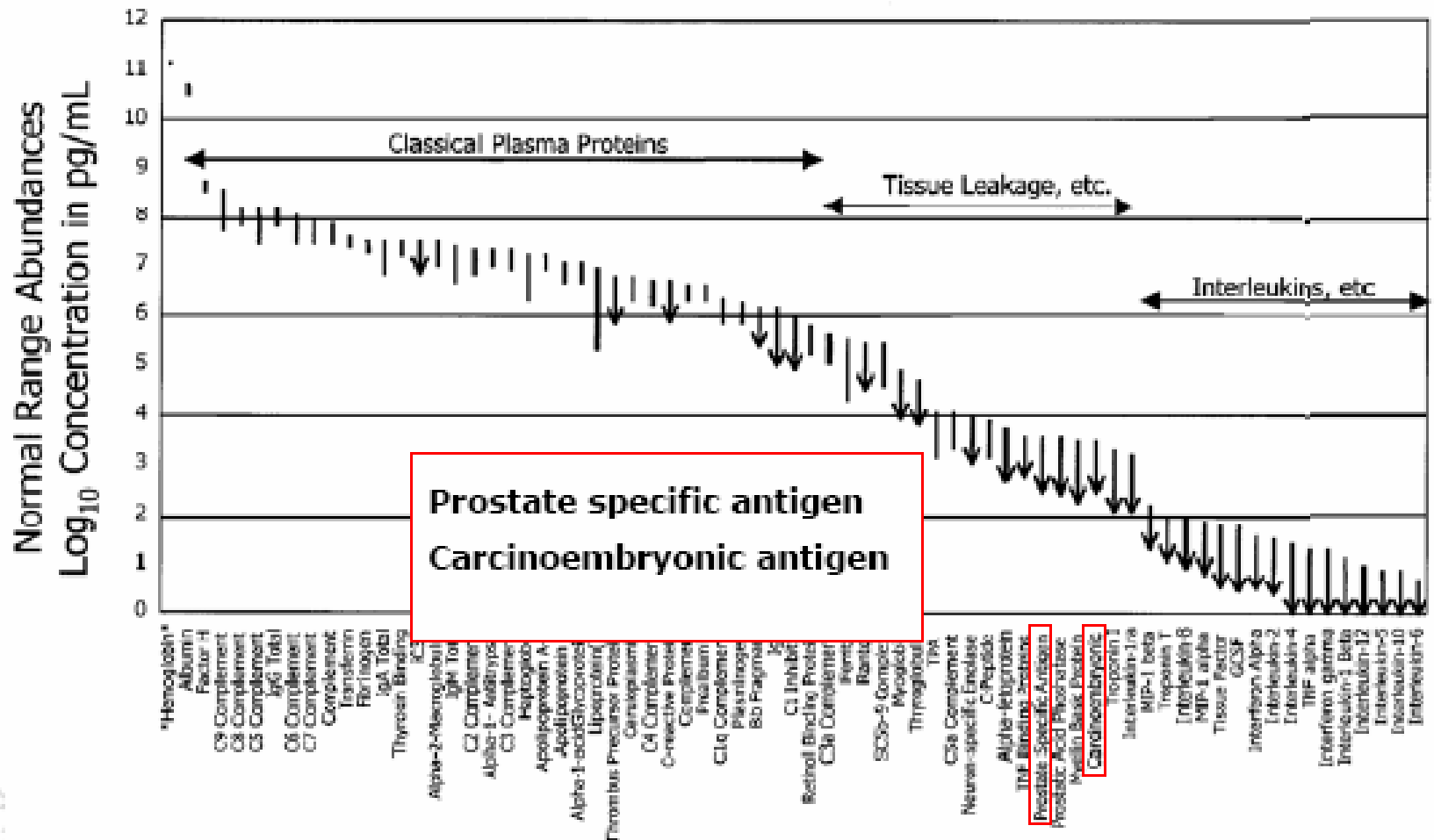
High number of low abundant proteins

Low number of highly abundant proteins, but high protein amount



High number of low abundant proteins, but low protein amount

The Human Plasma Proteome



CONSIDERAÇÕES ESTRATÉGICAS E ESTATÍSTICAS PARA ESTUDAR UM PROTEOMA

- Qual o objetivo do estudo proteômico ?**
- É possível testar a dependência da concentração em função do tempo ?**
- Quais técnicas serão utilizadas ?**
- Quanto tempo posso investir nos experimentos ?**
- Posso repetir meus experimentos pelo menos 5 vezes ?**

CONSIDERAÇÕES ESTRATÉGICAS E ESTATÍSTICAS PARA ESTUDAR UM PROTEOMA

- Quanto tempo será necessário para a avaliação dos dados ?**
- Qual o financiamento necessário ?**
- A quantidade de amostra é suficiente ?**
- Usarei "pool" de amostras ? Quais as conseqüências ?**
- Quão reprodutível é a preparação de amostra ?**

BIOMARCADOR

BIOMARKER: LINKAGE BETWEEN MEASURABLE EVENTS AND DISEASE

Sir Richard Doll

- **Molécula que informa sobre as condições biológicas de indivíduos**
- **Um biomarcador é um teste, é uma medida biométrica que nos informa sobre o estado patológico de um individuo**
- **Esta medida pode ser a determinação quantitativa de um analito específico ou a medida de múltiplos analitos combinada a modelos matemáticos**
- **São moléculas segregantes, ou seja, só têm valor quando possuem a capacidade de diferenciar entre dois ou mais estados biológicos**

BIOMARCADORES



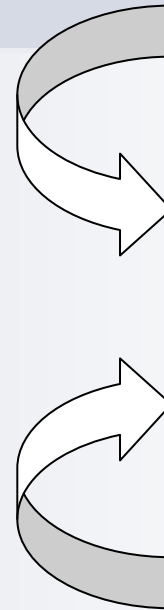
Muito cuidado !!!!!!!!!!!



PARA QUE SERVEM OS BIOMARCADORES ?

- **Deteccção/ caracterização de doenças:**
 - diagnóstico precoce
 - diagnóstico diferencial
 - prognóstico
 - estágio de doenças

- **Criação de ferramentas para:**
 - seleção de pacientes
 - bio-segurança



MEDICINA PERSONALIZADA

- **Guia na seleção do tipo de tratamento e dosagem**
- **Acompanhamento do tratamento**

TENDÊNCIAS:

- 1. Uso de painéis de biomarcadores/ uso de várias proteínas/ necessidade de acompanhar um único processo**
- 2. Co-desenvolvimento de drogas e biomarcadores**

EM RESUMO:

- USO EM DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TERAPIA

- Modificarão a forma pela qual se classificam e diagnosticam as doenças se monitoram os efeitos de terapias, detectam-se toxicidade e se desenvolvem novas drogas

- As proteínas, como consequência do papel central que jogam na etiologia e no tratamento de doenças, são os melhores candidatos ao exercício da função de biomarcadores

BIOMARCADORES

Onde e como a proteômica pode auxiliar na descoberta de biomarcadores ?

O Instituto Nacional de Câncer (EUA) descreve 5 fases distintas para o desenvolvimento e teste de biomarcadores:

Fase I. Estudos exploratórios de identificação de biomarcadores potencialmente úteis

Fase II. Determinação da capacidade de distinguir controle e doença (fase de validação)

Fase III. Avaliação da capacidade de detecção de estagio pré-clínico da doença

Fase IV. Estudos prospectivos de varredura

Fase V. Estudos populacionais para determinar o impacto destes alvos na saúde

**USO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA
POR MALDI-TOF
PARA DIAGNÓSTICO POR IMAGEM**

**Esquema da determinação da
imagem molecular de um tecido
A, região anterior
P, região posterior**

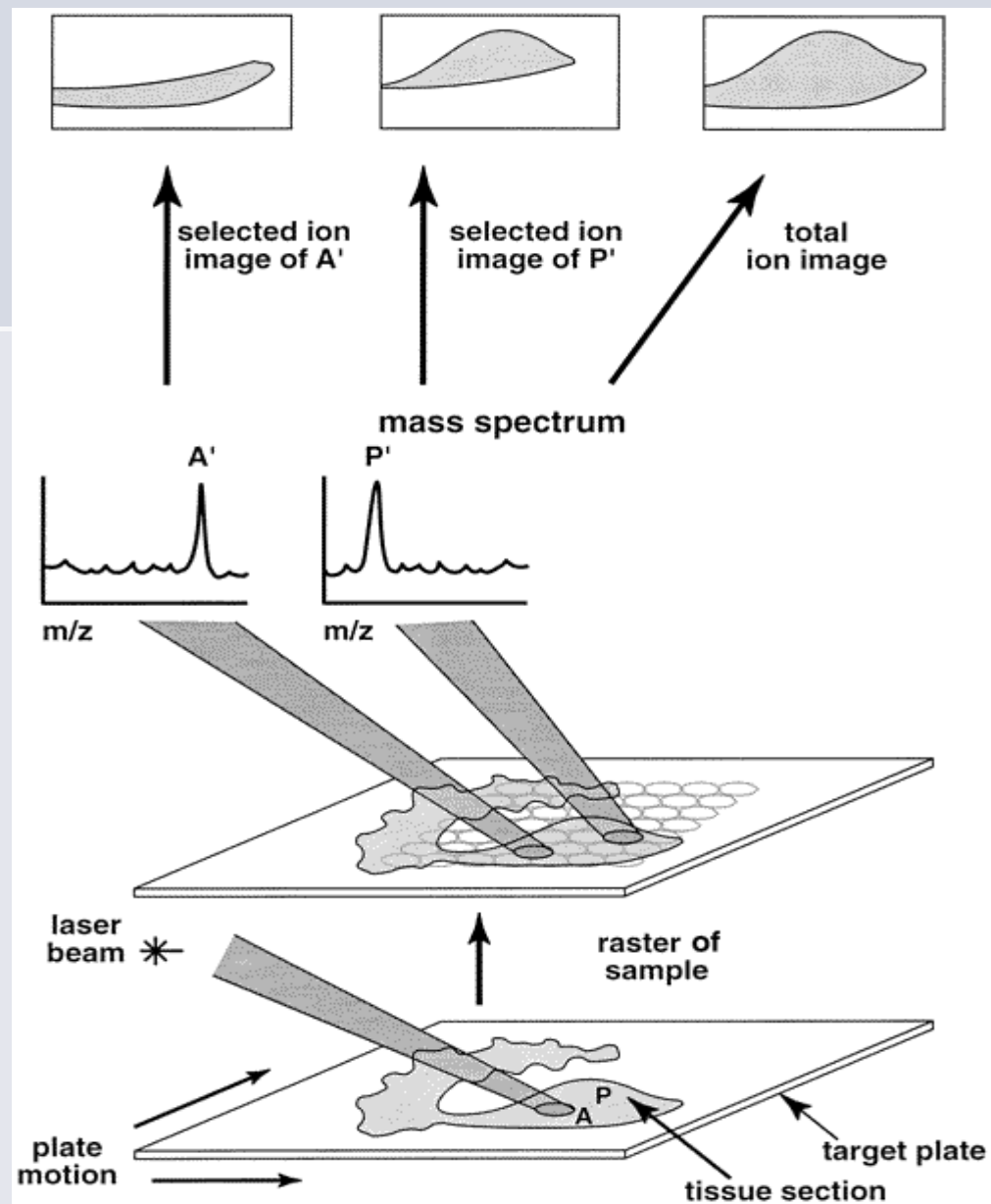
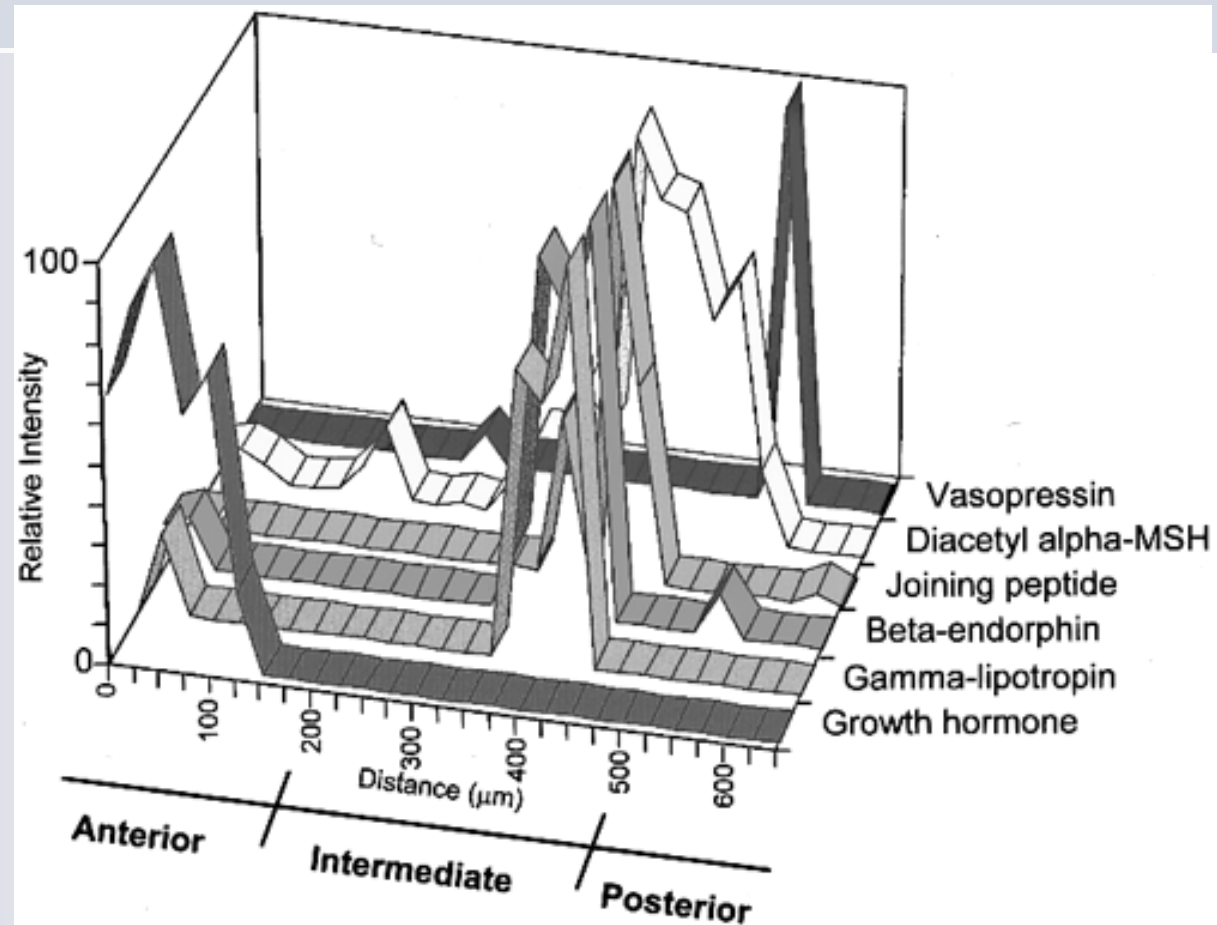
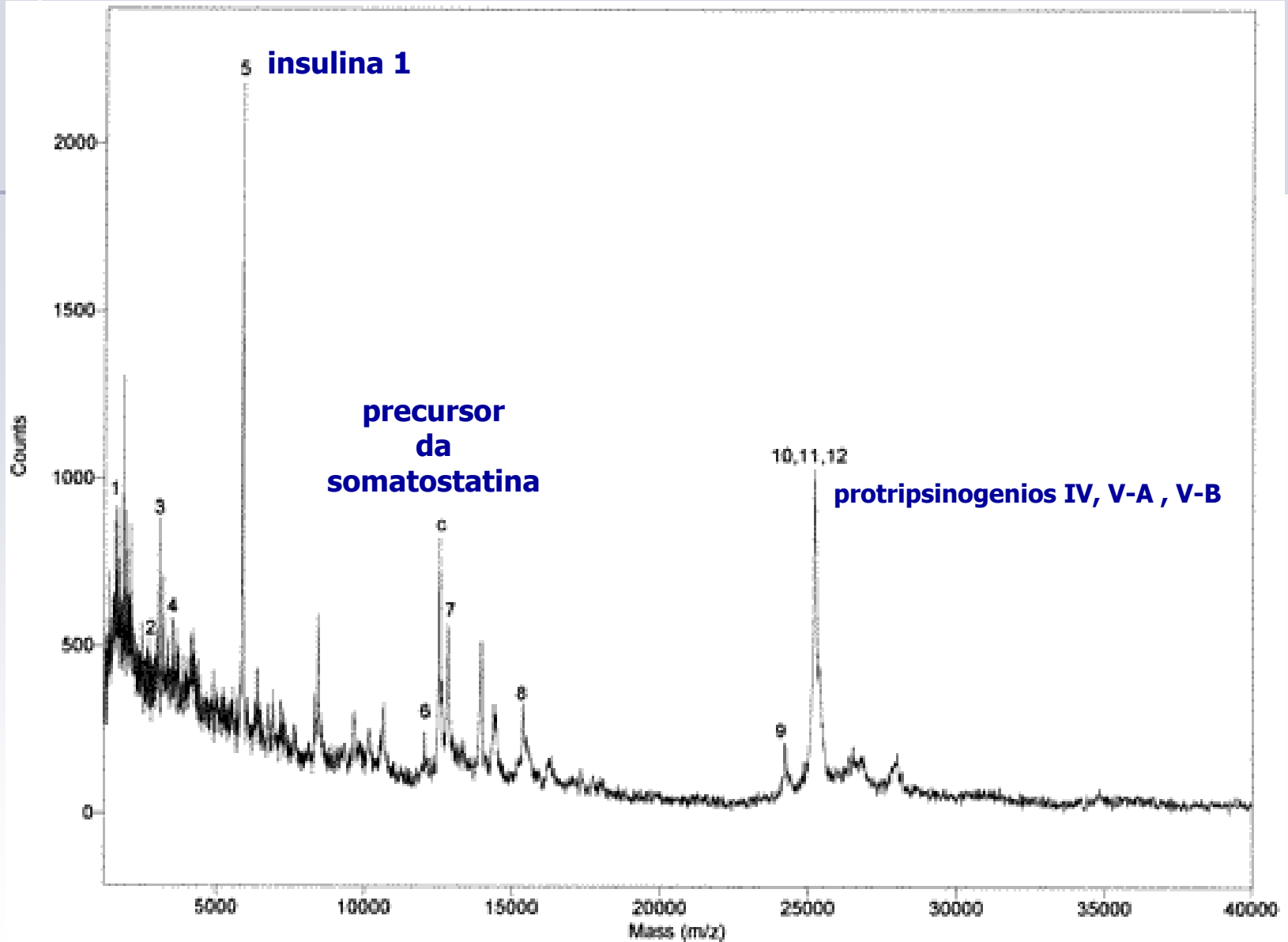


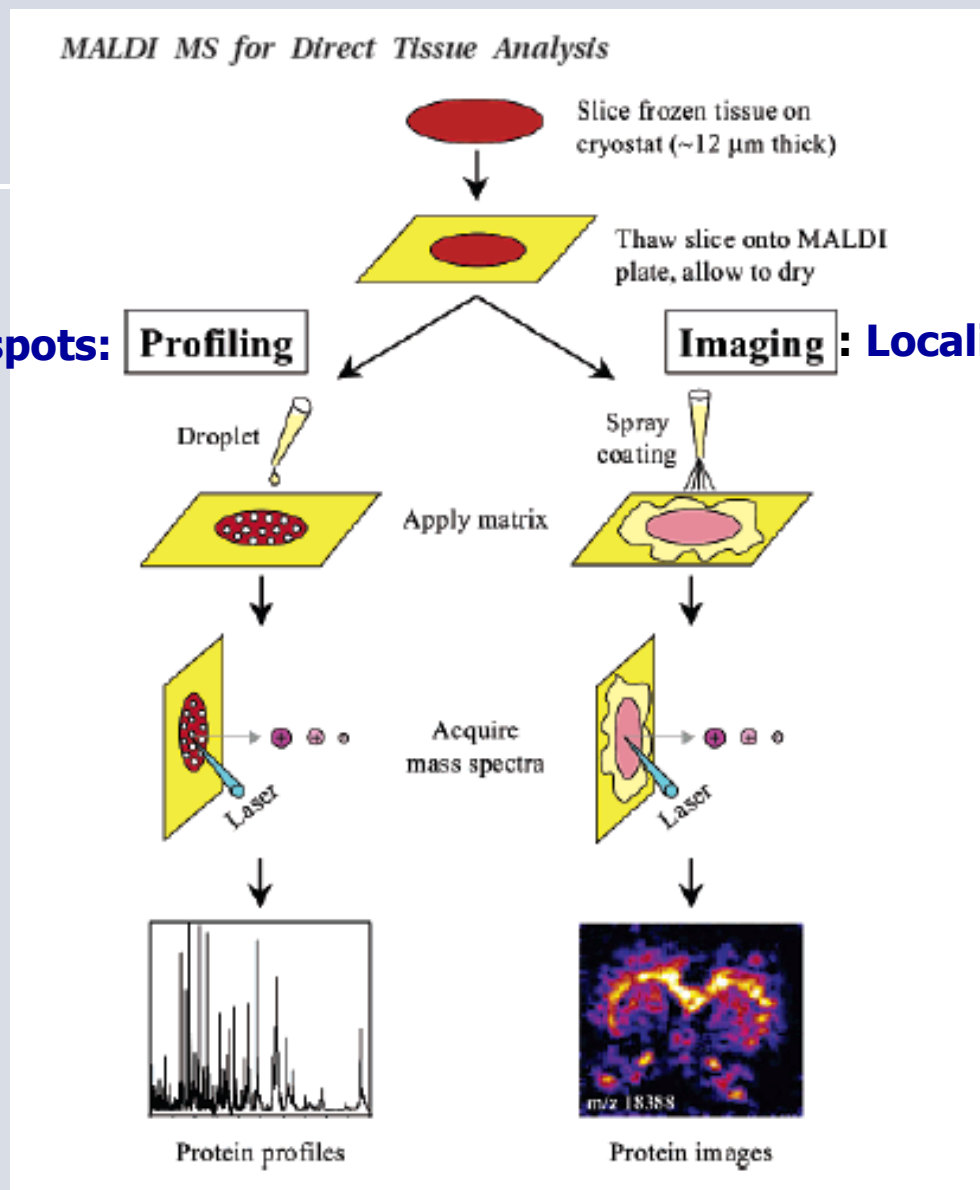
Diagrama da organização espacial de peptídeos e proteínas, identificados nas regiões anterior, intermediária e posterior da pituitária



Espectro de massa de um corte de tecido do pâncreas



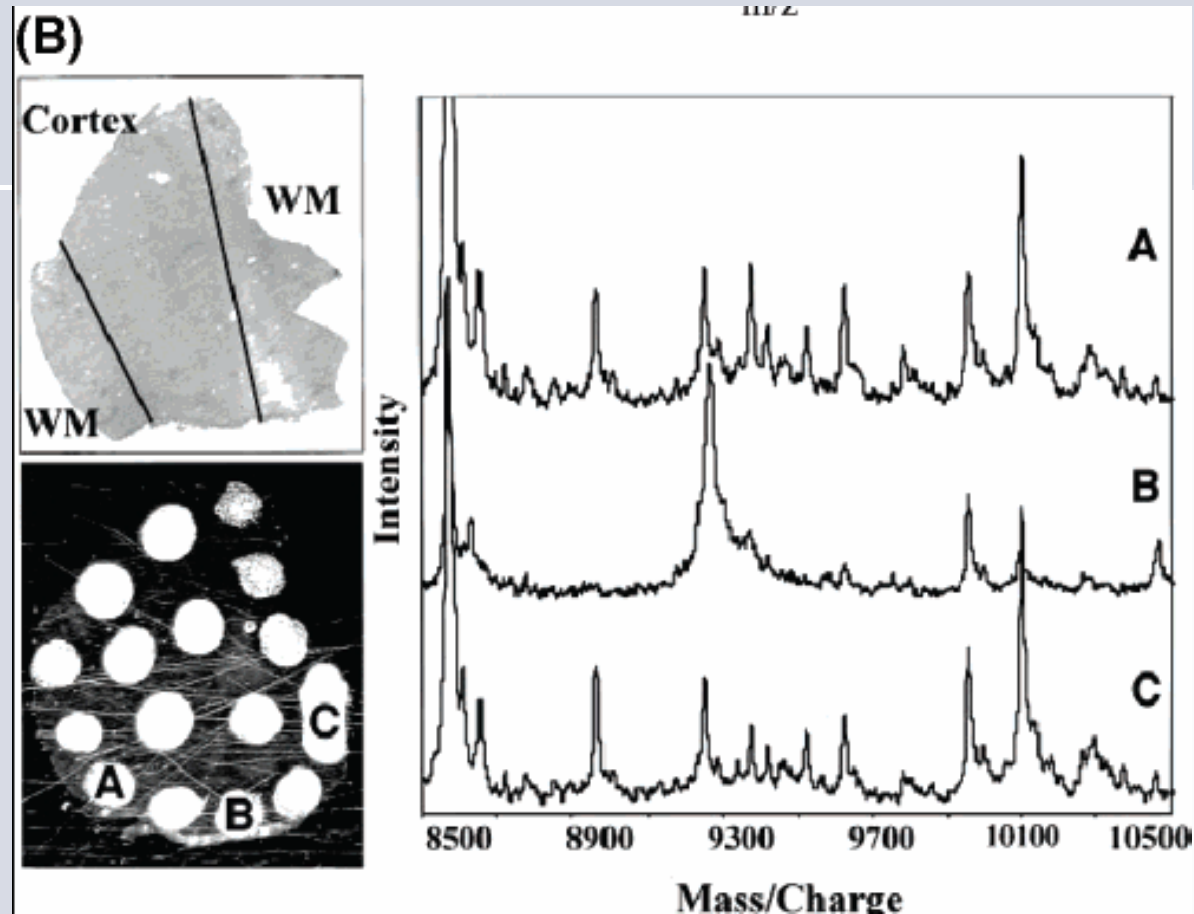
Esquema para obtenção de perfil e imagem de tecidos de mamíferos



Perfil: análise de spots:

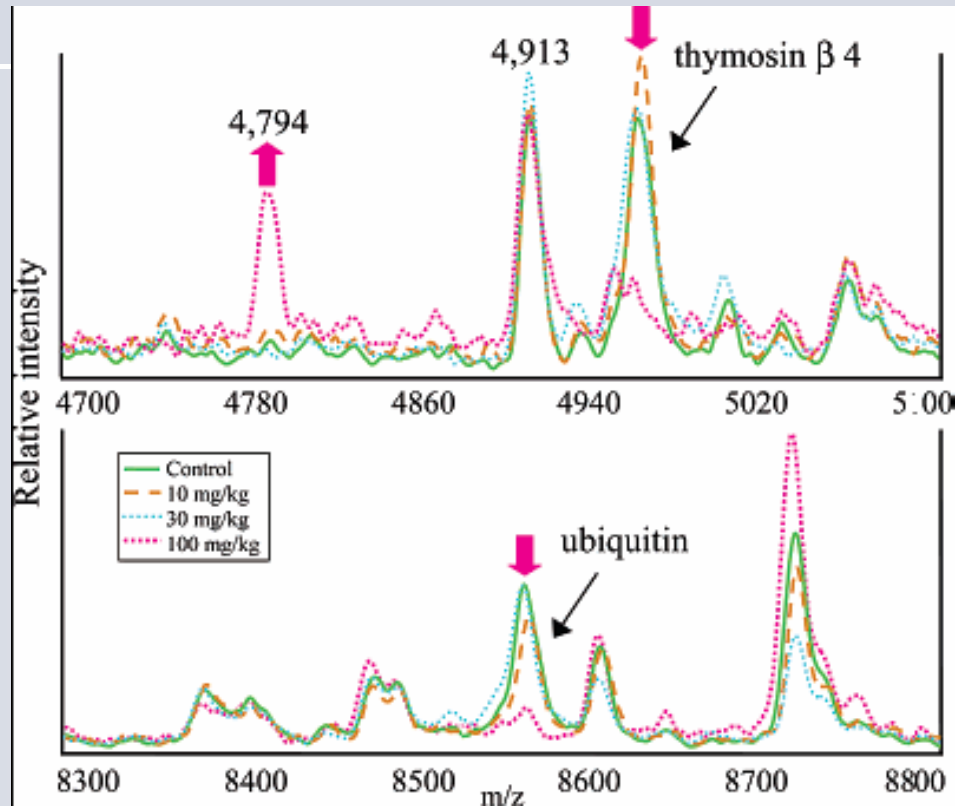
Localizacao de proteínas

MALDI-MS DE CÉLULAS CEREBRAIS



Varredura de uma seção de tecido tumoral cerebral
A – WM, “white matter” homogênea
B - células tumorais (glioblastoma)
C – WM

MALDI-MS de seções tumorais (MMTV- HER2)



MMTV - mouse mammary tumor vírus

HER2 - "Human Epidermal growth factor Receptor-type 2, um proto-oncogen

"down-regulation de timosina β 4 (m/z 4965), ubiquitina (m/z 8565)

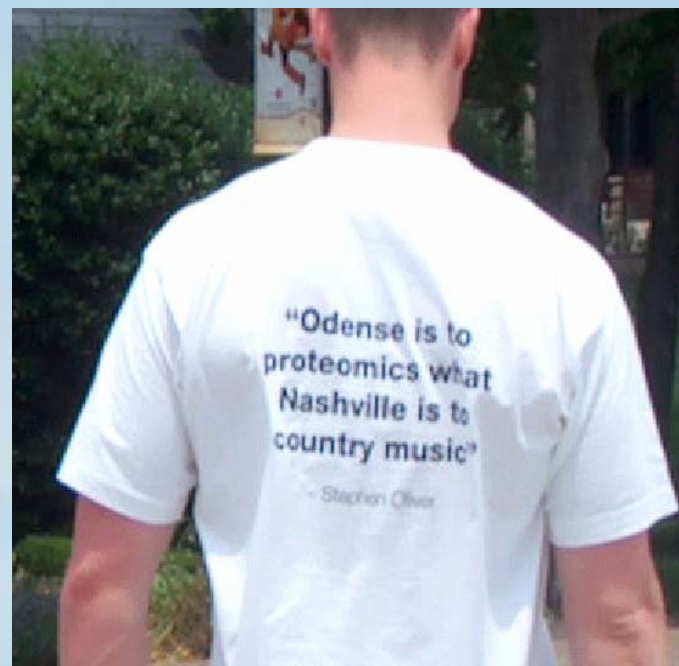
"up-regulation" de m/z 4794

MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Fosfo- e glicoproteômica

Homenagem a Peter Roepstorff Martin R. Larsen

Grupo de Pesquisa em Proteômica
Depto de Bioquímica e Biologia Molecular
University of Southern Denmark



MAIS DE 200 MODIFICACOES PÓS-TRADUCIONAIS SÃO CONHECIDAS

Modificações mais comuns

Acetilação

- N-terminal
- Lisina
- Serina

Modificação de lipídeos

- âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol)
- farnesilação
- miristoilação
- palmitoilação

Fosforilação

- Serina
- Treonina
- Tirosina
- Histidina
- Ácido aspártico
- Lisina

Processamento proteolítico

- específico
- não-específico
- C- e N-terminal

Glicosilação

- O-ligada: Serina, Treonina
- N-ligada: Asparagina

NÍVEIS PROTEÔMICOS DE ESTUDO

Proteômica de expressão ou proteômica descritiva:

- quais produtos gênicos são expressados ?
- como ?
- quanto ?

PTômica ou Modificômica:

- quais isoformas/variantes protéicas estão presentes em qual proteína ?
- quando ?
- quanto ?

Proteômica de mapeamento celular:

- quem interage ?
- quando ?
- onde ?

FUNÇÃO DAS PTMs

- **Peptídeo sinal - localização**
- **“Switches moleculares” - ativar, desativar ou modificar a atividade biológica de uma proteína**
- **Sinalização celular**
- **Estabilidade**
- **Solubilidade**
- **Enovelamento correto de proteínas**
- **Interação proteína-proteína ou proteína-DNA-RNA**
- **Transporte**

PORQUE ESTUDAR AS PTMS EM PROTEINAS ?

- **A função, a atividade biológica e a estrutura de uma dada proteína podem ser determinadas por sua modificação pós-traducional**
- **Um número cada vez maior de proteínas conhecidas é atribuído a diferentes doenças**
- **Isto é provocado não só por mudanças no nível de expressão mas, também, ou EXCLUSIVAMENTE, por modificação pós-traducional**

GLICOSILAÇÃO E FOSFORILAÇÃO DE PROTEINAS

A SITUAÇÃO IDEAL: UMA TÉCNICA PROTEÔMICA !

CARACTERÍSTICAS

- **Separar uma mistura complexa de peptídeos e proteínas:**
 - **visualizar seletivamente, ou isolar, peptídeos e proteínas**
- **Identificar a proteína**
- **Localizar o sítio modificado (e.g. glicosilado/fosforilado)**
- **Quando glicosilado, determinar a estrutura do glicano**

©2001RickLondon/JohannWessels



Carboidratos complexos ou complexo de carboidratos

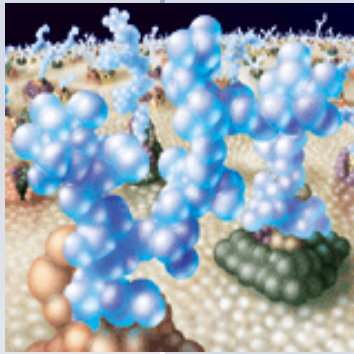
"Almost without exception, whenever two or more living cells interact in a specific way, cell surface carbohydrates will be involved. From first meeting of sperm and egg, through embryogenesis, development and growth, carbohydrate molecules confer exquisite specificity on cell-cell interactions"

Dr. John Hodgson, Ph.D.

"Capitalizing on Carbohydrates", BioTechnology, 1990.

FATOS BÁSICOS SOBRE GLICOPROTEÔMICA

2/3 de aproximadamente 75 000 entradas no SWISS-PROT incluem um sítio consensual potencial de N-glicosilação NXS/T



10.6% estão relacionados como glicoproteínas das quais somente 1% foi caracterizado quanto ao sítio de ligação e ao número de unidades glicosídicas

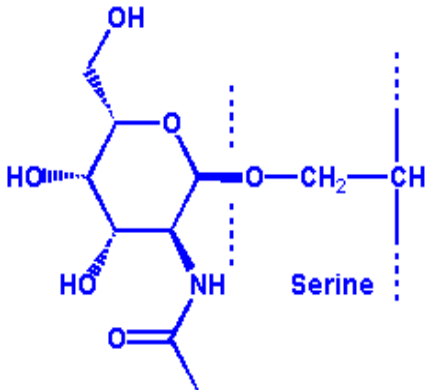
Estima-se que 50% de todas as proteínas são glicosiladas

Apweiler R. et al/Biochim. Biophys. Acta (1999), 1473: 4-8

- **Nem todos os sítios NXS/T consensuais estão ocupados**
- **Há necessidade de identificarmos quais proteínas são glicosiladas e de localizarmos os sítios de glicosilação**
- **Acredita-se que as glicoproteínas são importantes biomarcadores para várias doenças**
- **É necessário o desenvolvimento de novas técnicas proteômicas de análise**

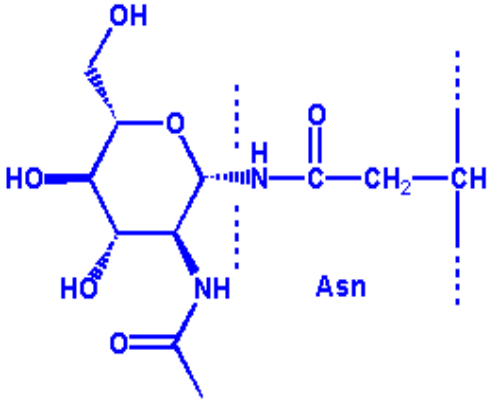
GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS

O-ligada



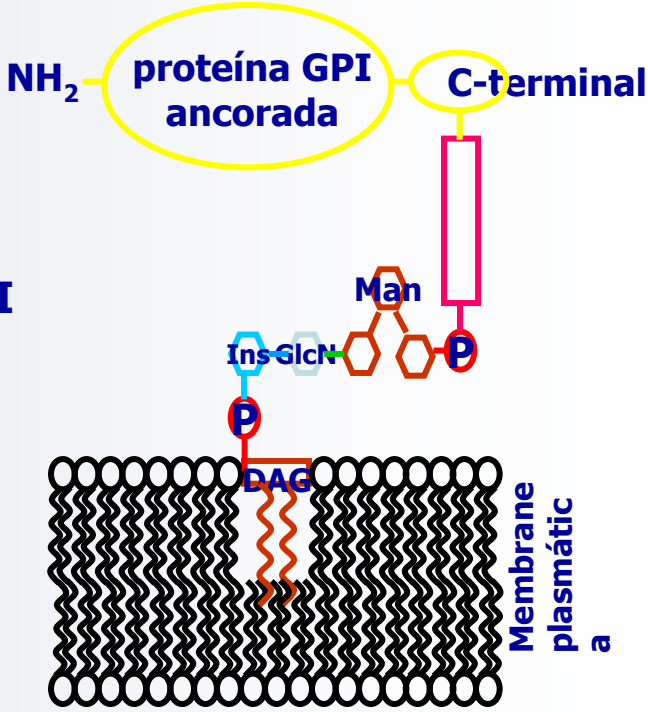
O-linkage to GalNAc

N-ligada

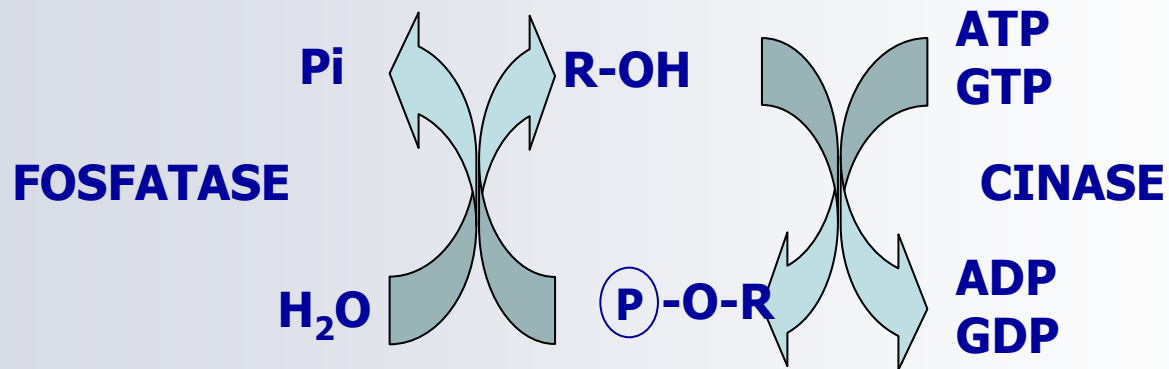


N-linkage to GlcNAc

Âncora GPI



FOSFORILAÇÃO PROTÉICA



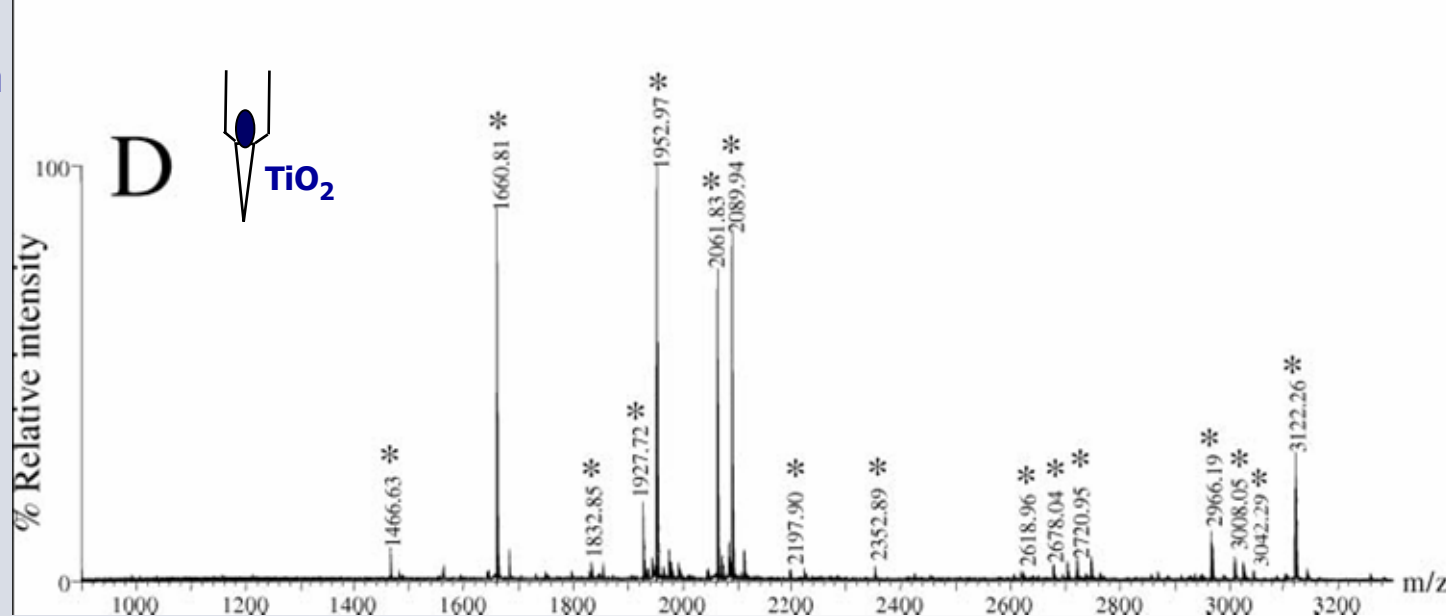
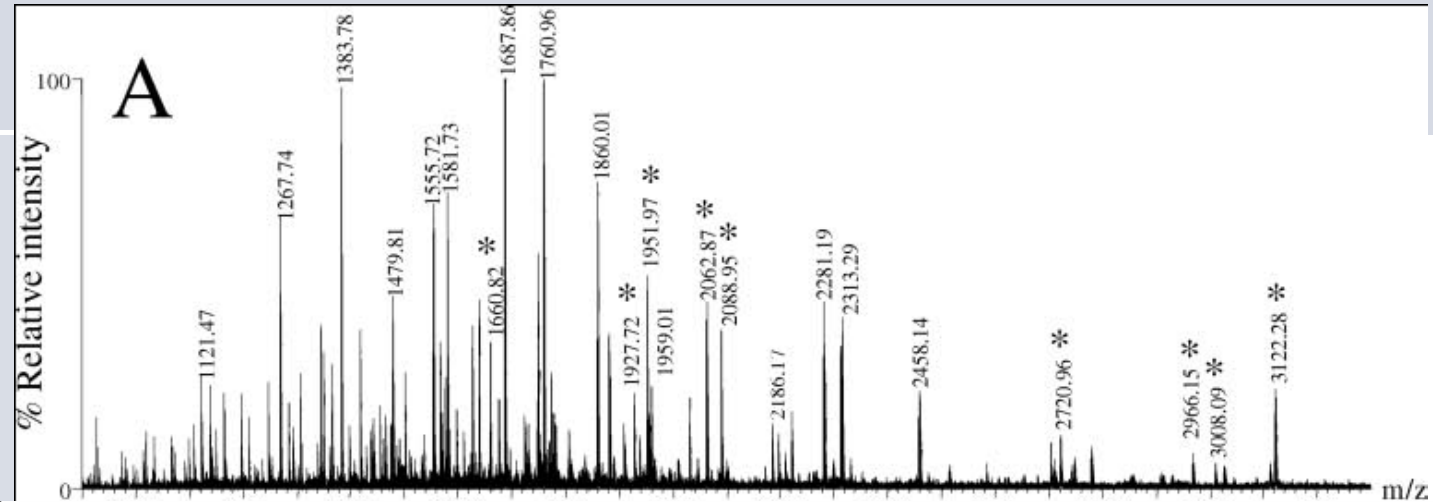
Importante mecanismo regulatório do metabolismo celular, crescimento, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, apoptose

Enriquecimento de peptídeos fosforilados empregando TiO_2

MR Larsen, TE Tingholm, ON Jensen, P Roepstoff, TJD Jørgensen, 2005 Mol Cel Proteomics 4(7): 873-886

Mistura de peptídeos
trípticos de
BSA
OVA,
 β -lactoglobulina,
anidrase carbônica,
 β -caseína, α -caseína

Enriquecimento:
A – sem TiO_2
D – com TiO_2



CONCLUSÕES

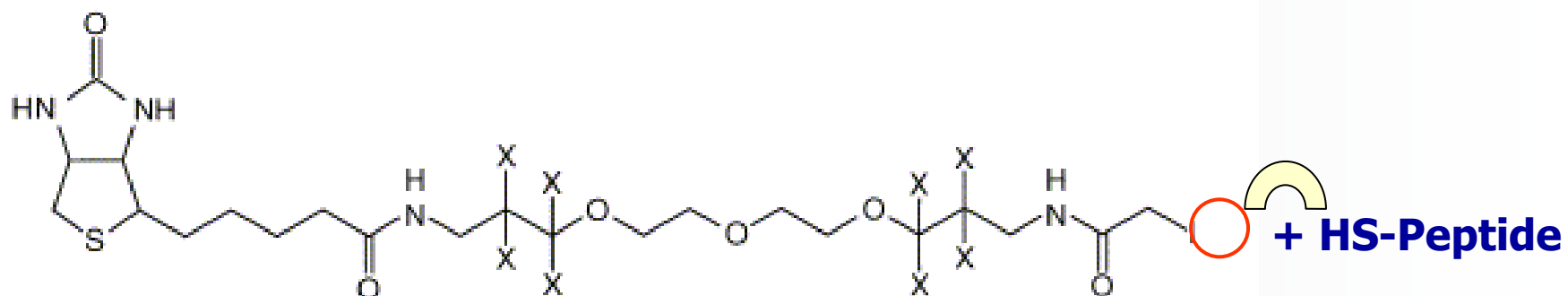
- **Alta seletividade de TiO_2 por peptídeos fosforilados**
- **A presença de DHB no tampão de equilíbrio favorece o enriquecimento**
- **A técnica é muito rápida (5 minutos)**
- **A técnica tolera sal, variações de força iônica, pH etc**

Obs: neste tipo de análise devemos usar várias técnicas para detectar e caracterizar os sitios protéicos de fosforilação

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEINAS
POR
ESPECTROMETRIA DE MASSA

REAGENTE ICAT

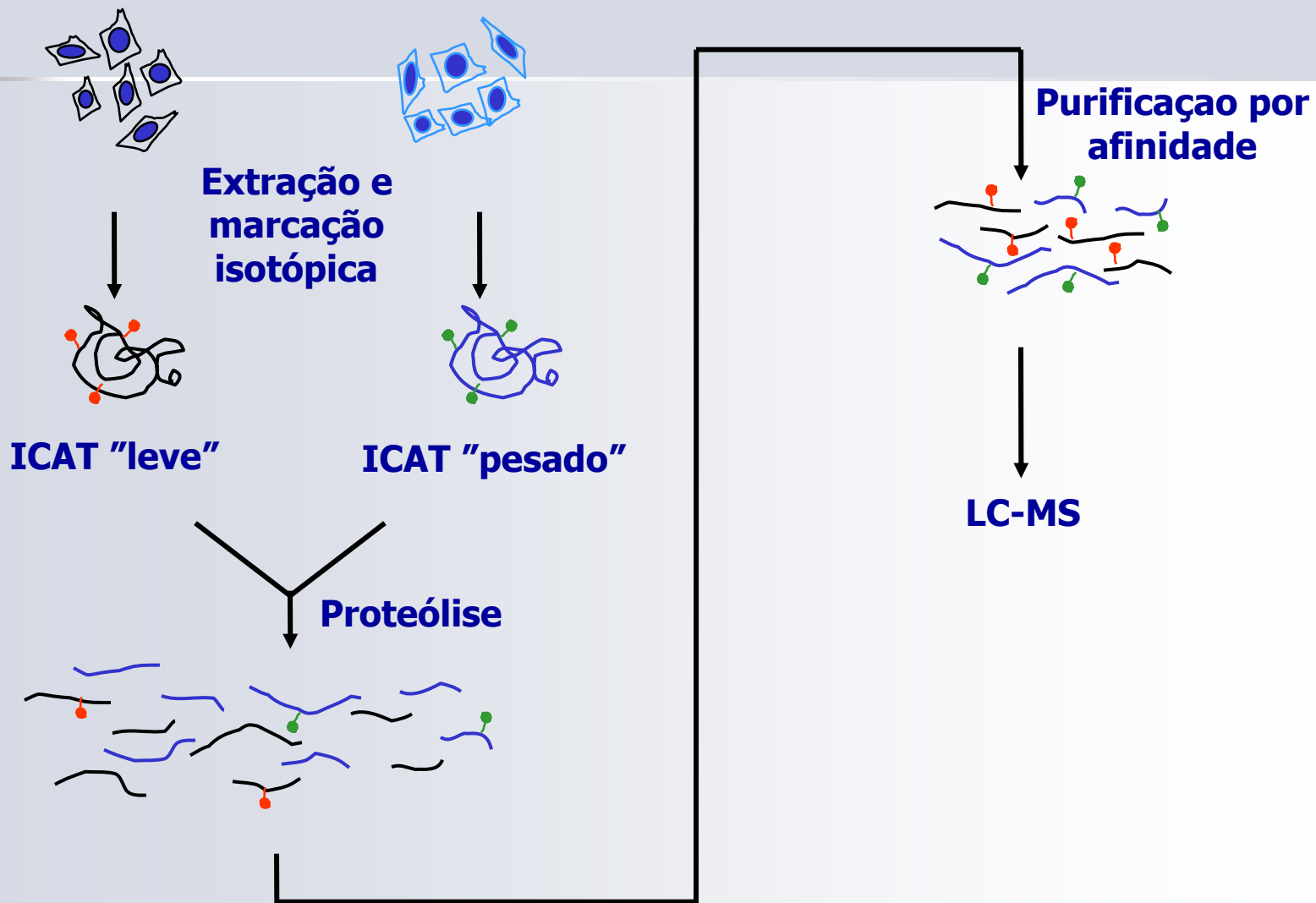
ISOTOPE-CODED AFFINITY TAG



Biotina

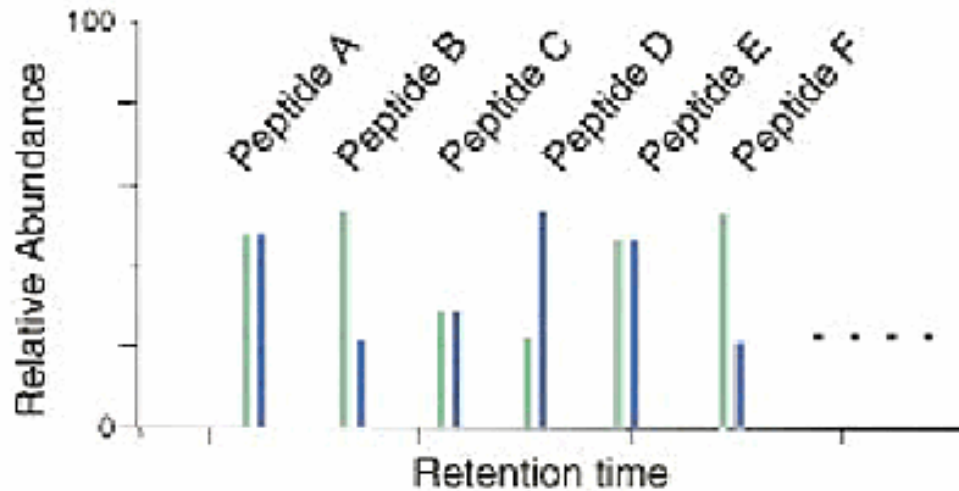
composto pesado **x = deutério**
composto leve **x = hidrogênio**

ICAT - RACIONAL

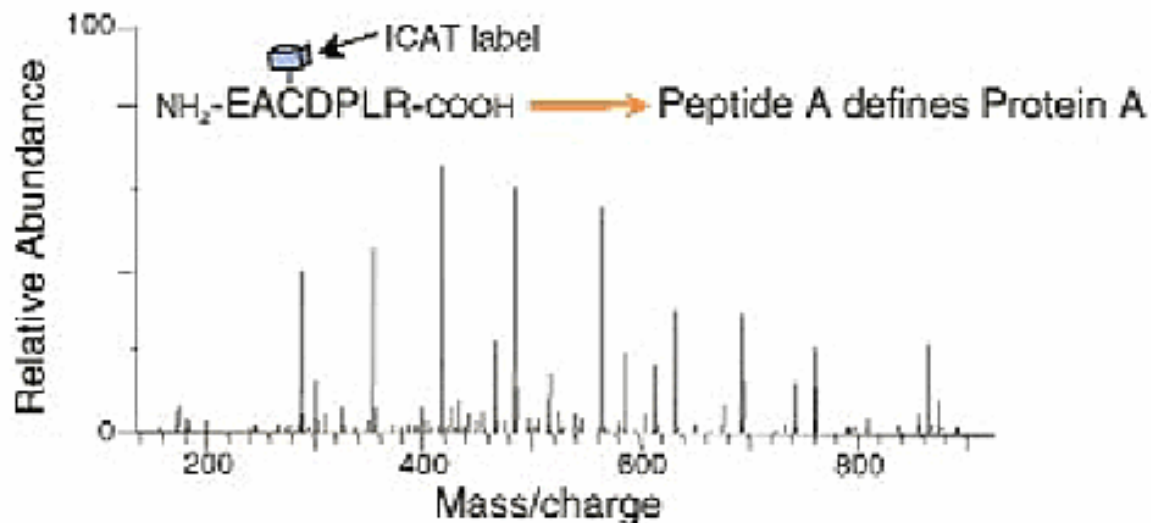


ICAT - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR EM

Quantitate relative protein levels by measuring peak ratios



Identify proteins by sequence information (MS/MS scan)



**IMPORTÂNCIA DOS BIOMARCADORES
E DA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA
A SEPSE, COMO EXEMPLO**

DADOS EPIDEMIOLOGICOS

Porque a sepse é um problema de saúde pública ?

- **Número crescente de casos**
 - e.g., **750.000 casos/ ano (EUA)**
- **Alta taxa de mortalidade**
 - **% das mortes depende do estágio**
 - **225.000 mortes/ ano (EUA)**
- **Alto custo de tratamento**
 - e.g., **custo anual em U\$ de 18 bilhões**

RELEVÂNCIA – Um caso clínico

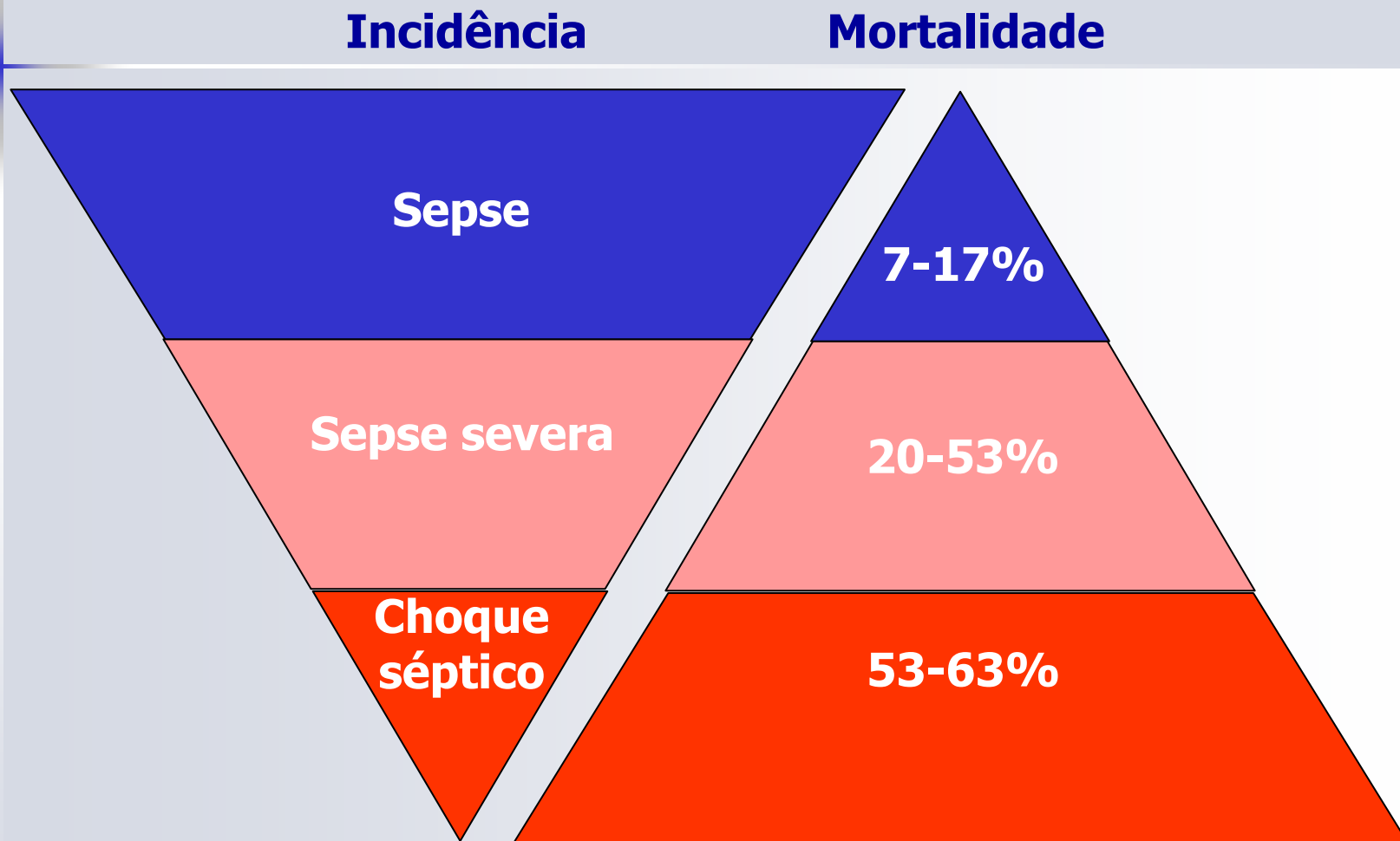
- **ABF, feminino, 37 years, lipoaspiração abdominal & implante de silicone nas nádegas, antibióticos, deixou hospital no dia seguinte;**
- **Tonteiras após dois dias, perspiração, retorno ao médico: hipotensão e hospitalização;**
- **Pronto socorro para observação: hipotensa, baixa diurese; edema no local da cirurgia. Sem febre. Hemograma: 2000 leucocites, anemia, ureia e creatinina elevadas. Hidratação e transfusão de sangue. CT mostrou aumento de volume abdominal e possibilidade de gases. Avaliada por um nefrologista.**
- **Admissão na Unidade de Terapia Intensiva após 48 hs de fraqueza e 96 hs após cirurgia: diagnóstico de choque séptico e insuficiência respiratória. Suporte de ventilação e antibióticos. Morte após algumas horas.**

SEPSE

Definida como suspeição ou comprovação de uma infecção acrescida da síndrome de resposta inflamatória sistêmica

e.g. febre, taquicardia, taquipnéia e leucocitose

ESTÁGIOS DA SEPSE INCIDÊNCIA x MORTALIDADE



O TEMPO DA SEPSE

Infarto do miocárdio: tempo é músculo

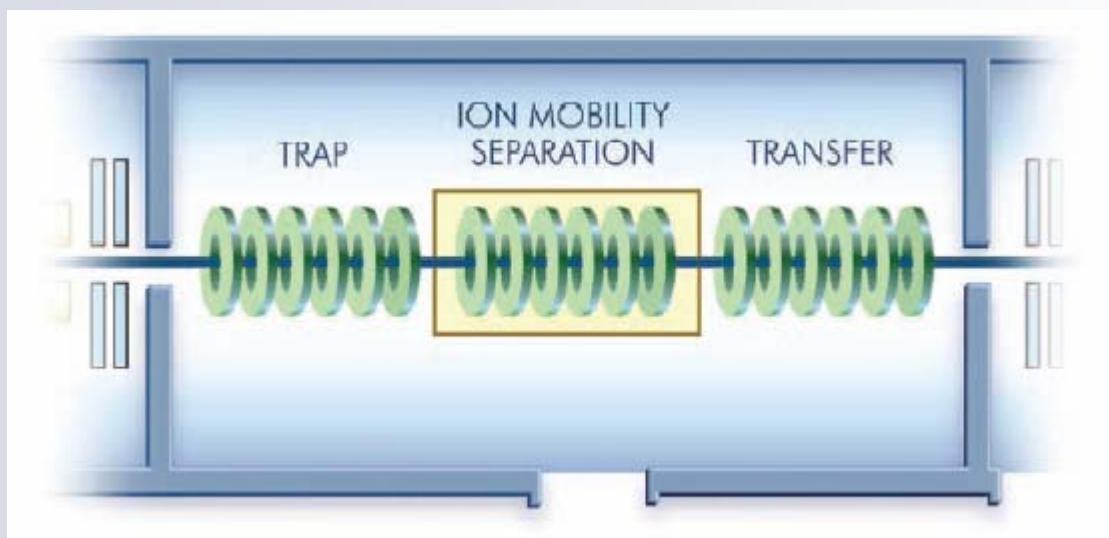
Acidente vascular cerebral: tempo é cérebro

Sepse: tempo é vida

EQUIPAMENTOS

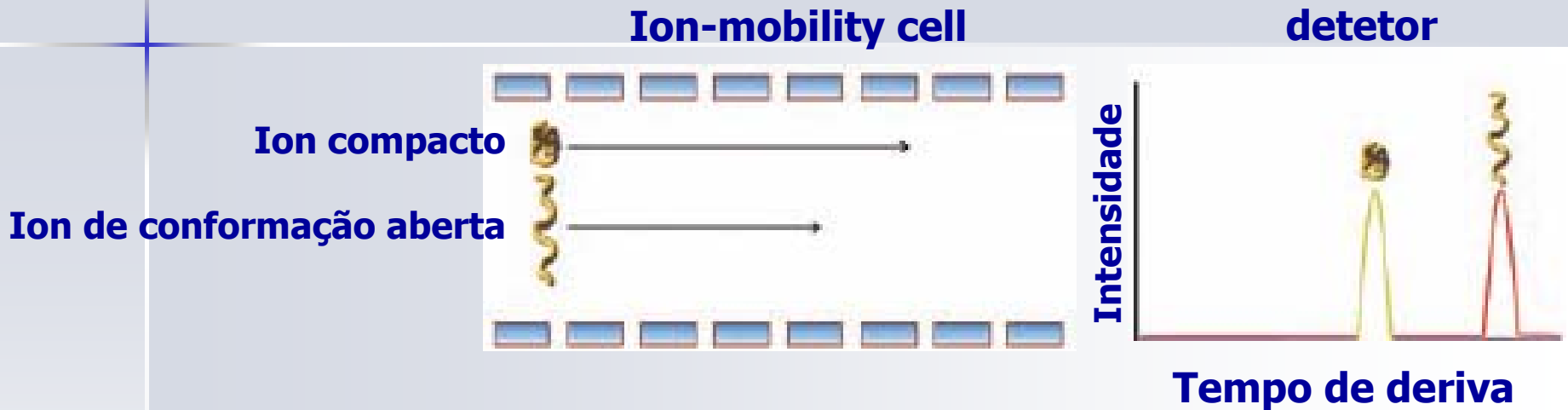
HDMS

“High Definition Mass Spectrometer”



Combinação de mobilidade iônica (“ion mobility”) com espectrometria de massa, em tandem, de alto desempenho

MOBILIDADE IÔNICA

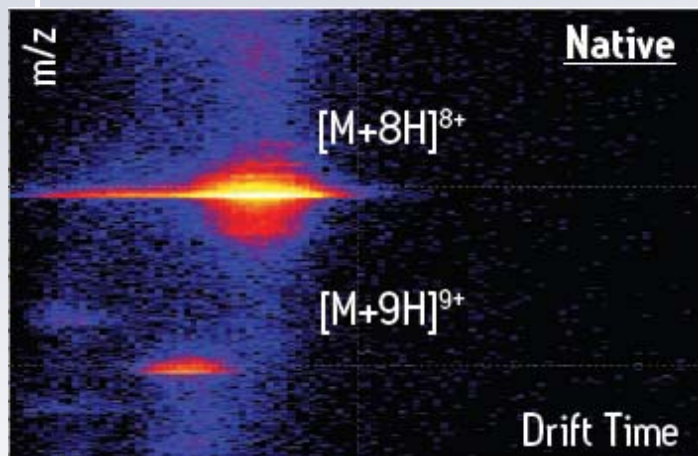


Ions compactos viajam mais rapidamente (maior mobilidade que ions de conformação aberta (volumes moleculares diferentes))

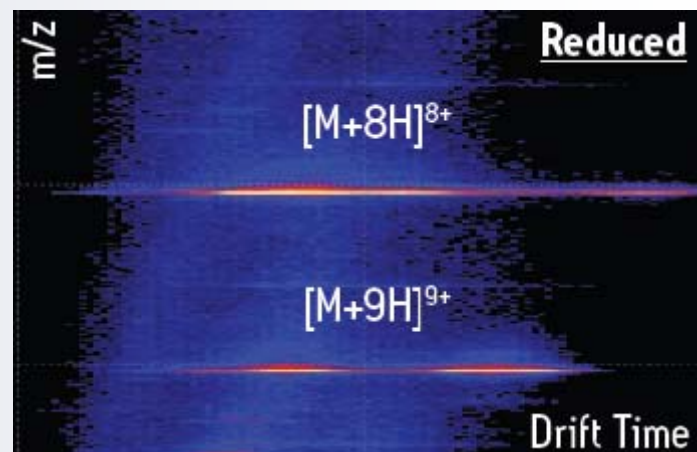
Misturas de proteínas com estruturas compactas/ desenoveladas são separadas em um processo semelhante a uma eletroforese em fase gasosa

ESPECTROS DE MASSA DA LISOZIMA

NO HDMS



Lisozima nativa: Distribuição discreta de tempo de deriva $[M+9H]^{9+}$

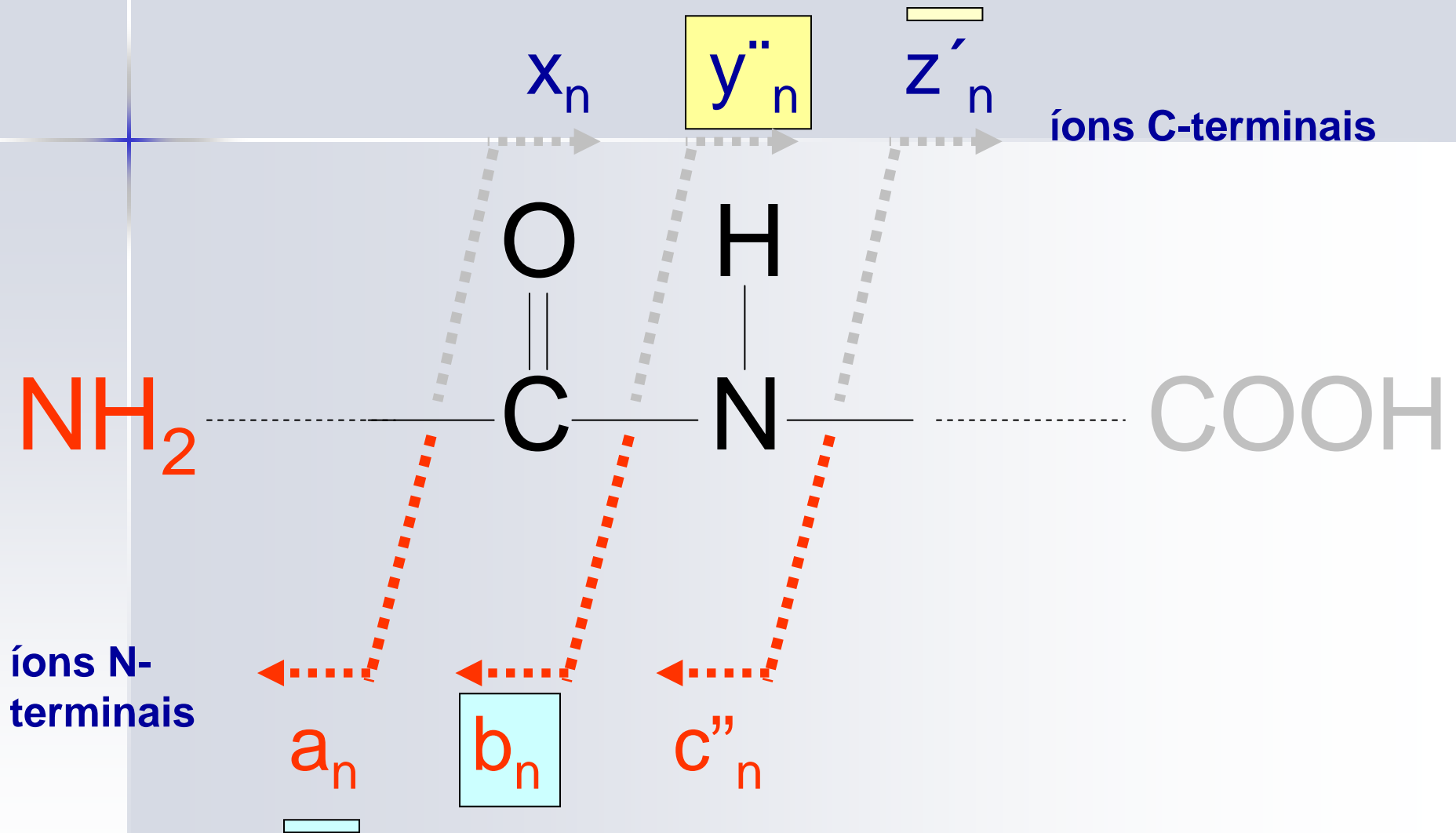


Lisozima reduzida: em meio ácido apresenta, pelo menos, duas conformações $[M+9H]^{9+}$

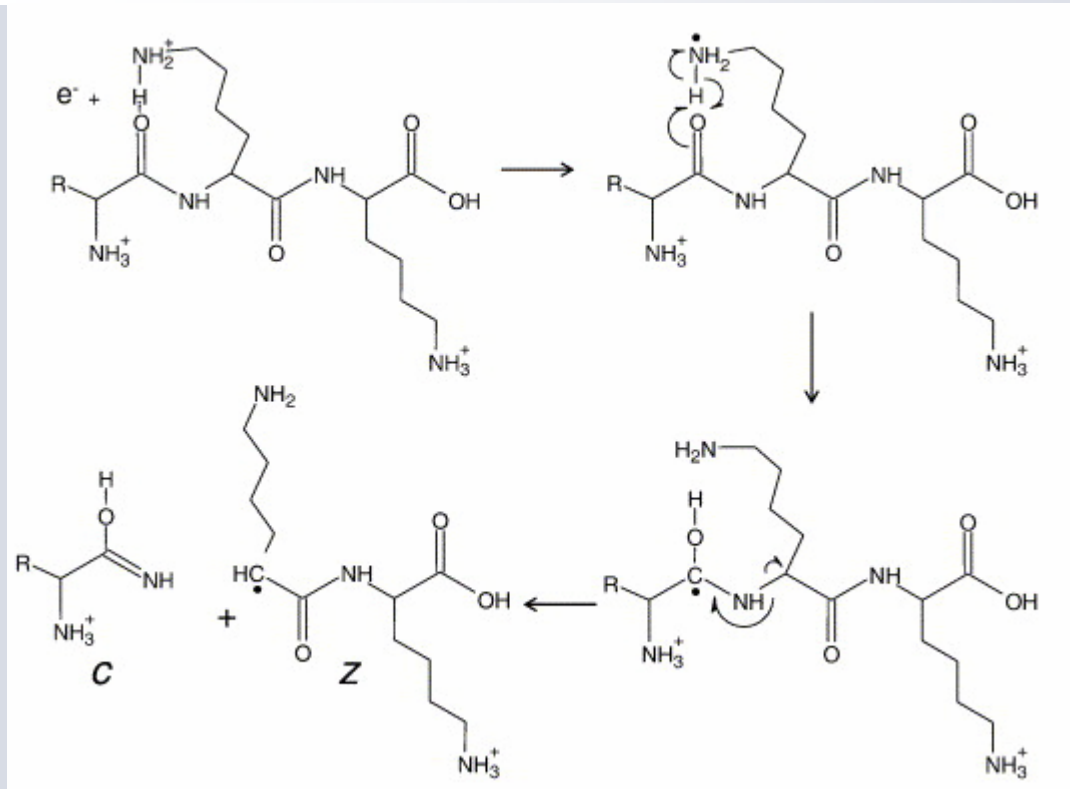
ELECTRON TRANSFER DISSOCIATION

ETD

Nomenclatura Peter Roepstorff



MECANISMO DE DISSOCIAÇÃO POR TRANSFERÊNCIA DE ELECTRON

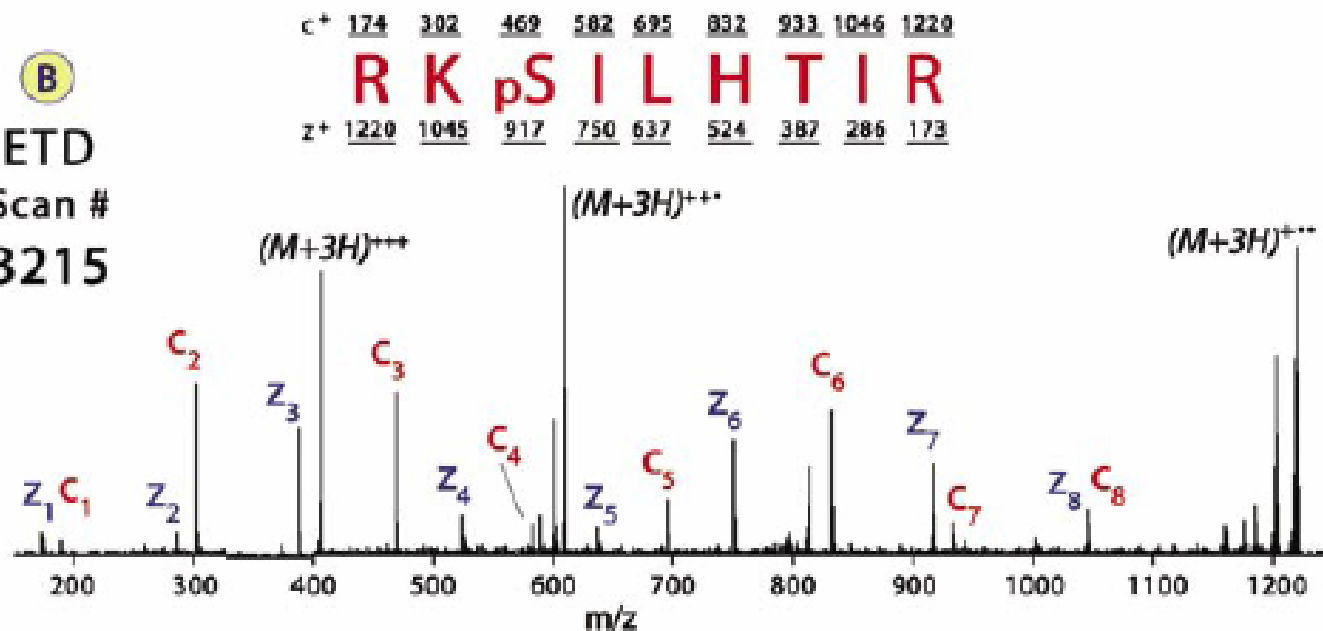


ESPECTRO DE MASSA DE FRAGMENTAÇÃO POR CID E POR ETD

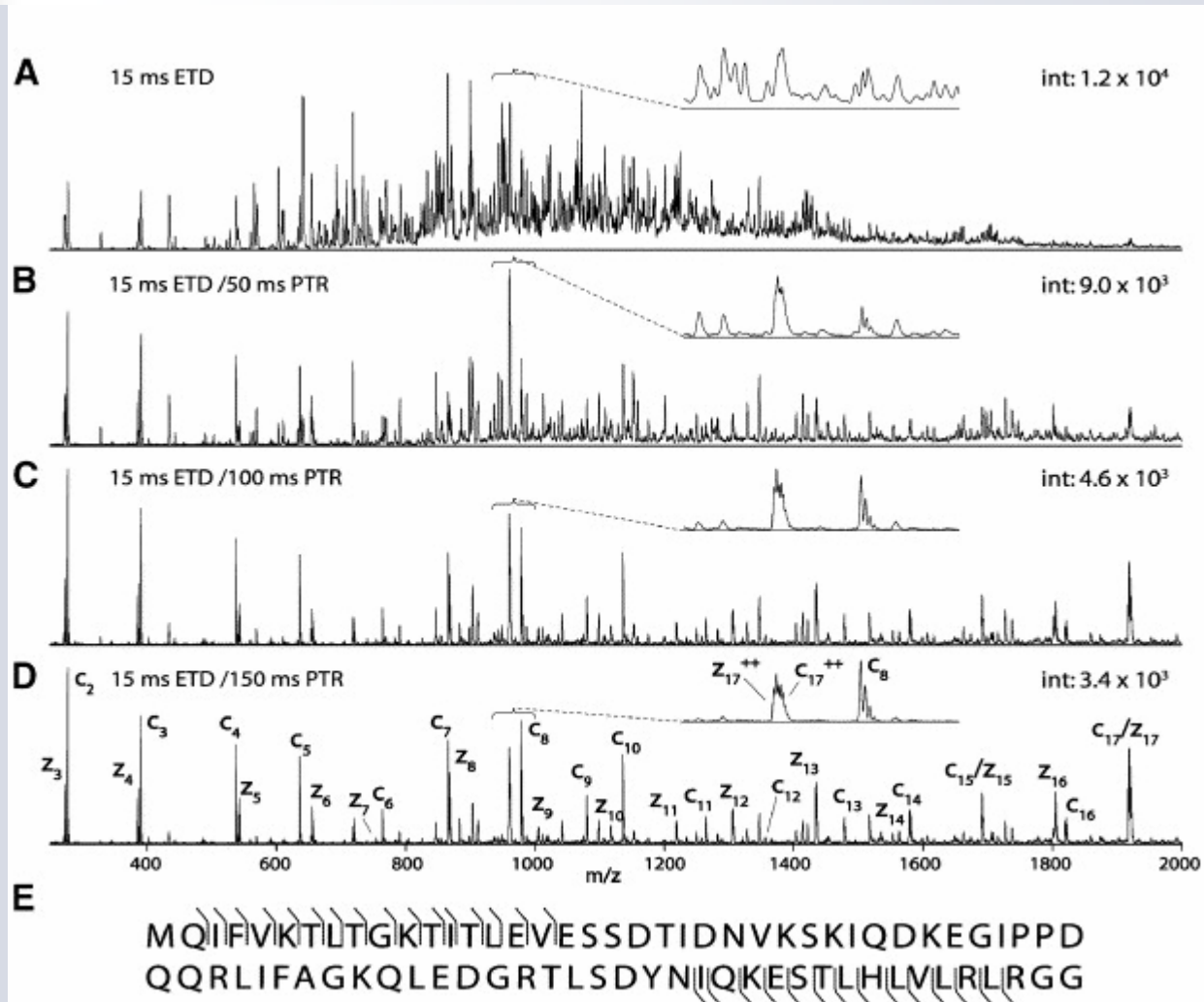
A
CAD
Scan #
3214



B
ETD
Scan #
3215



ETD DE PROTEINAS - UBIQUITINA





INTERATOMA

A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*

L. Giot,^{1*} J. S. Bader,^{1*†} C. Brouwer,^{1*} A. Chaudhuri,^{1*}
B. Kuang,¹ Y. Li,¹ Y. L. Hao,¹ C. E. Ooi,¹ B. Godwin,¹ E. Vitols,¹
G. Vijayadamodar,¹ P. Pochart,¹ H. Machineni,¹ M. Welsh,¹
Y. Kong,¹ B. Zerhusen,¹ R. Malcolm,¹ Z. Varrone,¹ A. Collis,¹
M. Minto,¹ S. Burgess,¹ L. McDaniel,¹ E. Stimpson,¹ F. Spriggs,¹
J. Williams,¹ K. Neurath,¹ N. Ioime,¹ M. Agee,¹ E. Voss,¹
K. Furtak,¹ R. Renzulli,¹ N. Aanensen,¹ S. Carrolla,¹
E. Bickelhaupt,¹ Y. Lazovatsky,¹ A. DaSilva,¹ J. Zhong,²
C. A. Stanyon,² R. L. Finley Jr.,² K. P. White,³ M. Braverman,¹
T. Jarvie,¹ S. Gold,¹ M. Leach,¹ J. Knight,¹ R. A. Shimkets,¹
M. P. McKenna,¹ J. Chant,^{1‡} J. M. Rothberg¹

Drosophila melanogaster is a proven model system for many aspects of human biology. Here we present a two-hybrid-based protein-interaction map of the fly proteome. A total of 10,623 predicted transcripts were isolated and screened against standard and normalized complementary DNA libraries to produce a draft map of 7048 proteins and 20,405 interactions. A computational method of rating two-hybrid interaction confidence was developed to refine this draft map to a higher confidence map of 4679 proteins and 4780 interactions. Statistical modeling of the network showed two levels of organization: a short-range organization, presumably corresponding to multiprotein complexes, and a more global organization, presumably corresponding to intercomplex connections. The network recapitulated known pathways, extended pathways, and uncovered previously unknown pathway components. This map serves as a starting point for a systems biology modeling of multicellular organisms, including humans.

A Map of the Interactome Network of the Metazoan *C. elegans*

Siming Li,^{1*} Christopher M. Armstrong,^{1*} Nicolas Bertin,^{1*}
 Hui Ge,^{1*} Stuart Milstein,^{1*} Mike Boxem,^{1*}
 Pierre-Olivier Vidalain,^{1*} Jing-Dong J. Han,^{1*}
 Alban Chesneau,^{1,2*} Tong Hao,¹ Debra S. Goldberg,³ Ning Li,¹
 Monica Martinez,¹ Jean-François Rual,^{1,4} Philippe Lamesch,^{1,4}
 Lai Xu,^{5†} Muneesh Tewari,¹ Sharyl L. Wong,³ Lan V. Zhang,³
 Gabriel F. Berriz,³ Laurent Jacotot,^{1‡} Philippe Vaglio,^{1‡} Jérôme
 Reboul,^{1§} Tomoko Hirozane-Kishikawa,¹ Qianru Li,¹
 Harrison W. Gabel,¹ Ahmed Elewa,^{1||} Bridget Baumgartner,⁵
 Debra J. Rose,⁶ Haiyuan Yu,⁷ Stephanie Bosak,⁸
 Reynaldo Sequerra,⁸ Andrew Fraser,⁹ Susan E. Mango,¹⁰
 William M. Saxton,⁶ Susan Strome,⁶ Sander van den Heuvel,¹¹
 Fabio Piano,¹² Jean Vandenhaute,⁴ Claude Sardet,²
 Mark Gerstein,⁷ Lynn Doucette-Stamm,⁸ Kristin C. Gunsalus,¹²
 J. Wade Harper,^{5†} Michael E. Cusick,¹ Frederick P. Roth,³
 David E. Hill,^{1¶} Marc Vidal^{1¶#}

To initiate studies on how protein-protein interaction (or “interactome”) networks relate to multicellular functions, we have mapped a large fraction of the *Caenorhabditis elegans* interactome network. Starting with a subset of metazoan-specific proteins, more than 4000 interactions were identified from high-throughput, yeast two-hybrid (HT= Y2H) screens. Independent coaffinity purification assays experimentally validated the overall quality of this Y2H data set. Together with already described Y2H interactions and interologs predicted *in silico*, the current version of the Worm Interactome (WI5) map contains ~5500 interactions. Topological and biological features of this interactome network, as well as its integration with phenome and transcriptome data sets, lead to numerous biological hypotheses.

INTERACTOME

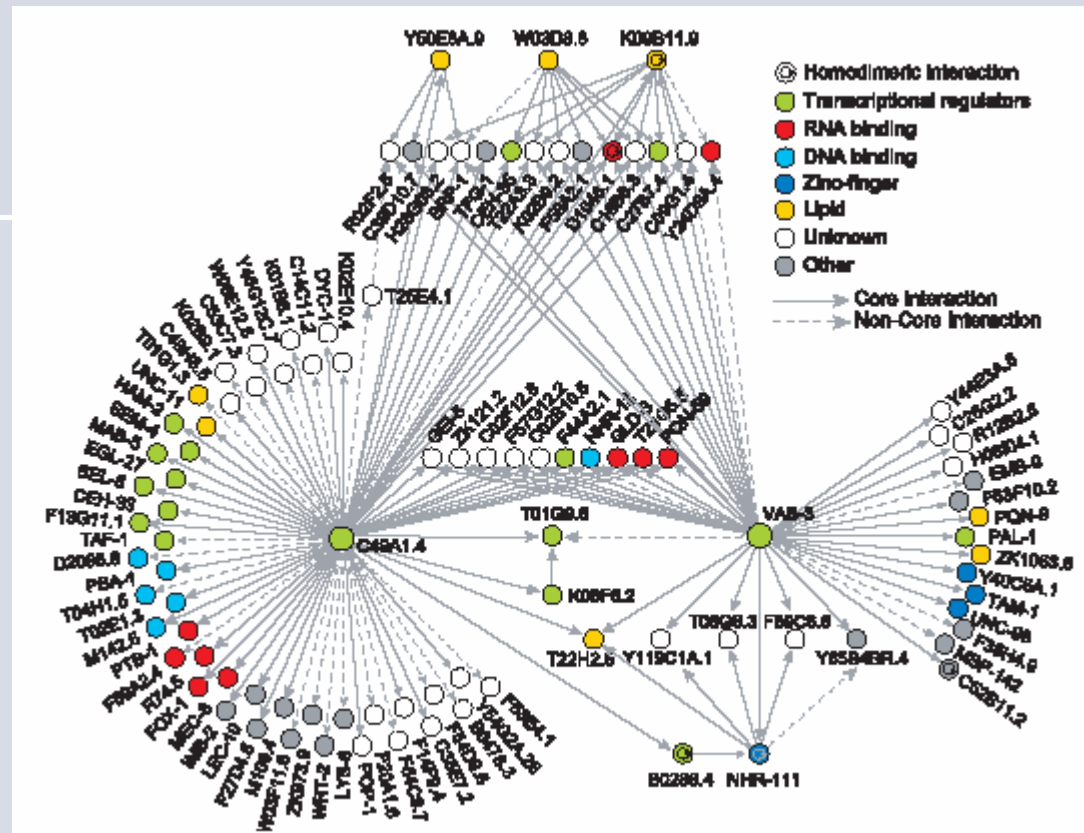


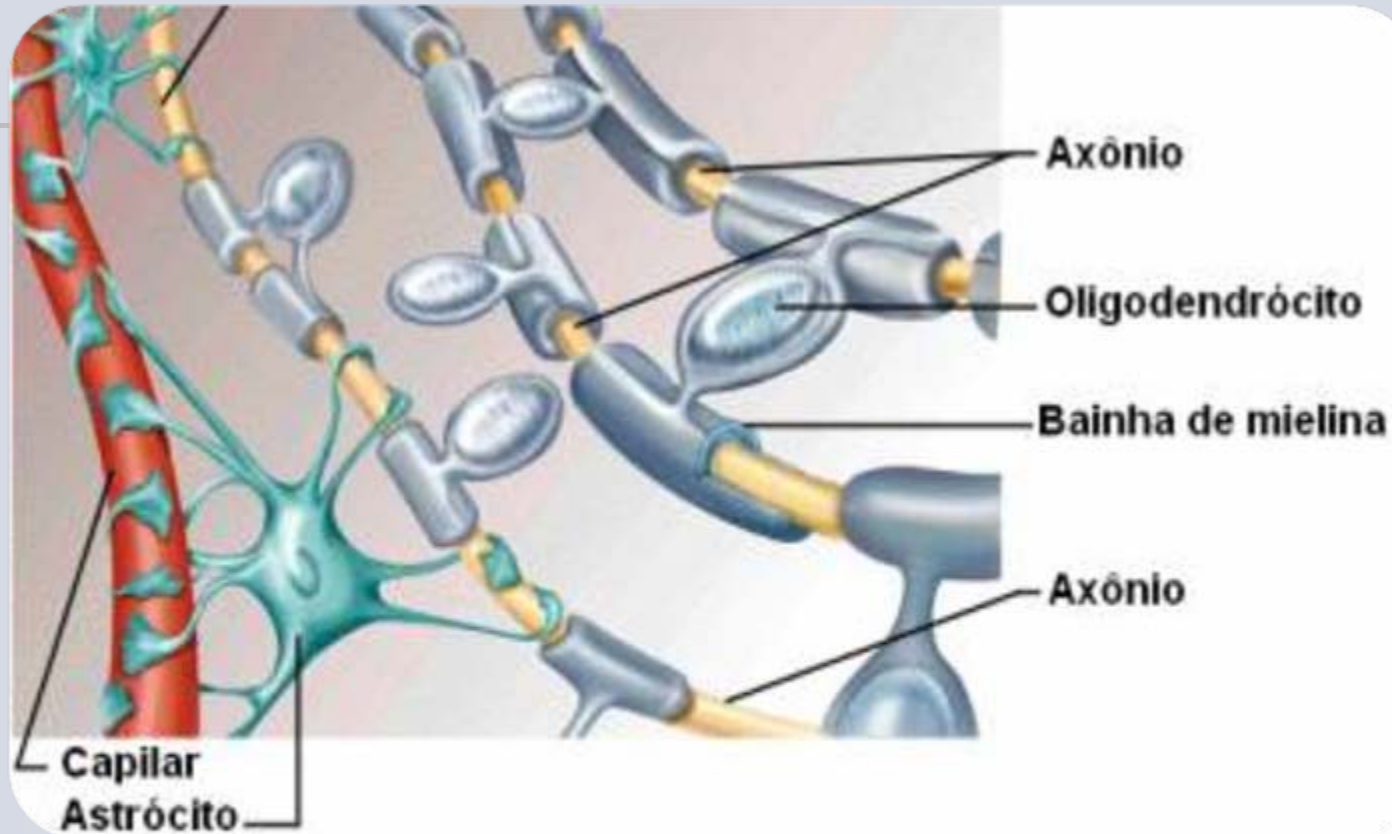
Fig. 3. Graphical representation of a highly interconnected subnetwork around VAB-3 and C49A1.4. Biological functional classes were obtained from WormPD (10).

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

E

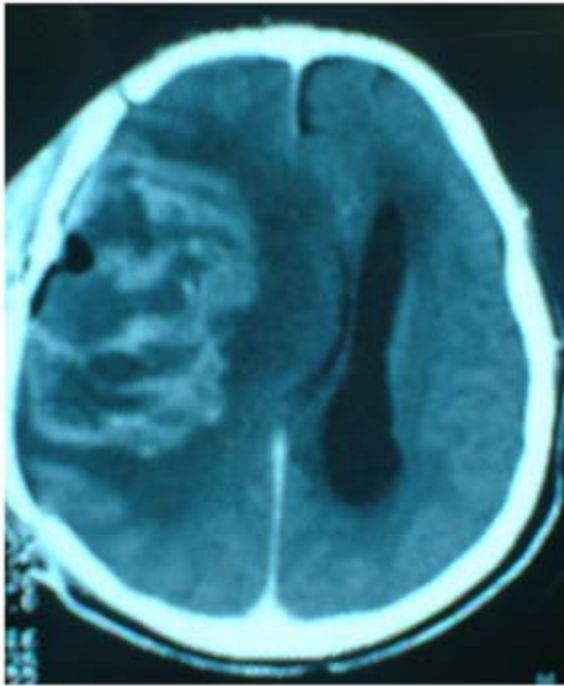
BIOLOGIA DIGITAL

Análise proteômica da resposta de células de glioblastoma ao álcool perílico

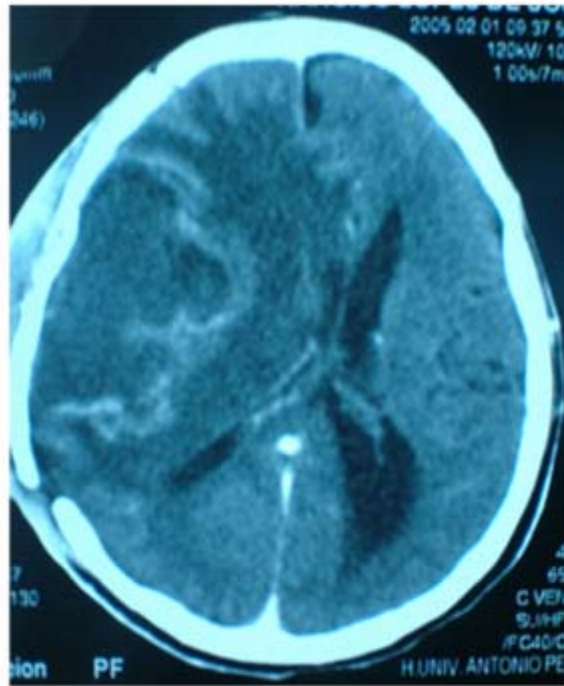


Objetivo: caracterizar vias de ação/resistência do álcool perílico em células de glioblastoma multiforme através de técnicas proteômicas e bioinformática

TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA



A



B



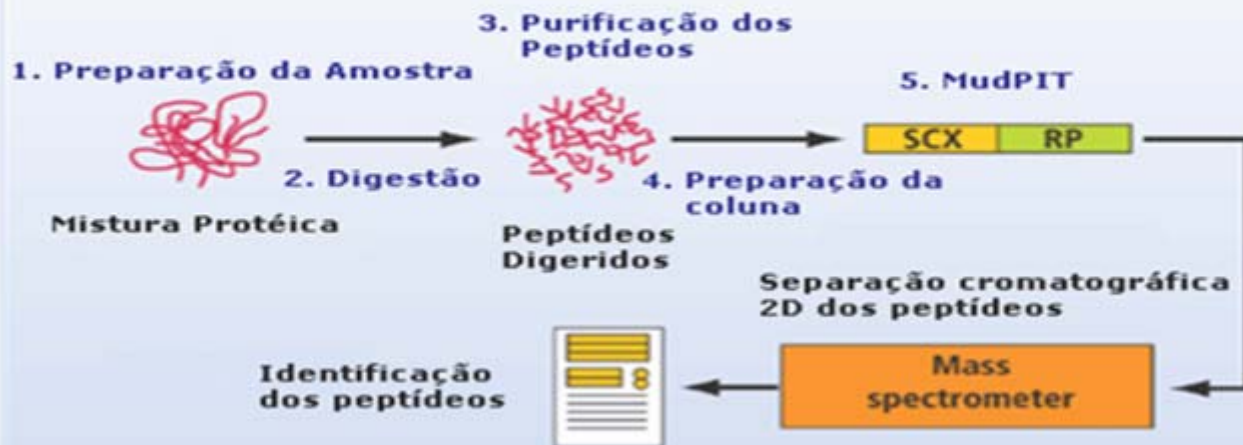
C

A – TC de GBM recidivo após 5 meses de cirurgia

B – TC de paciente após 3 meses de inalação com o AP

C – TC de paciente após 5 meses de inalação com o AP

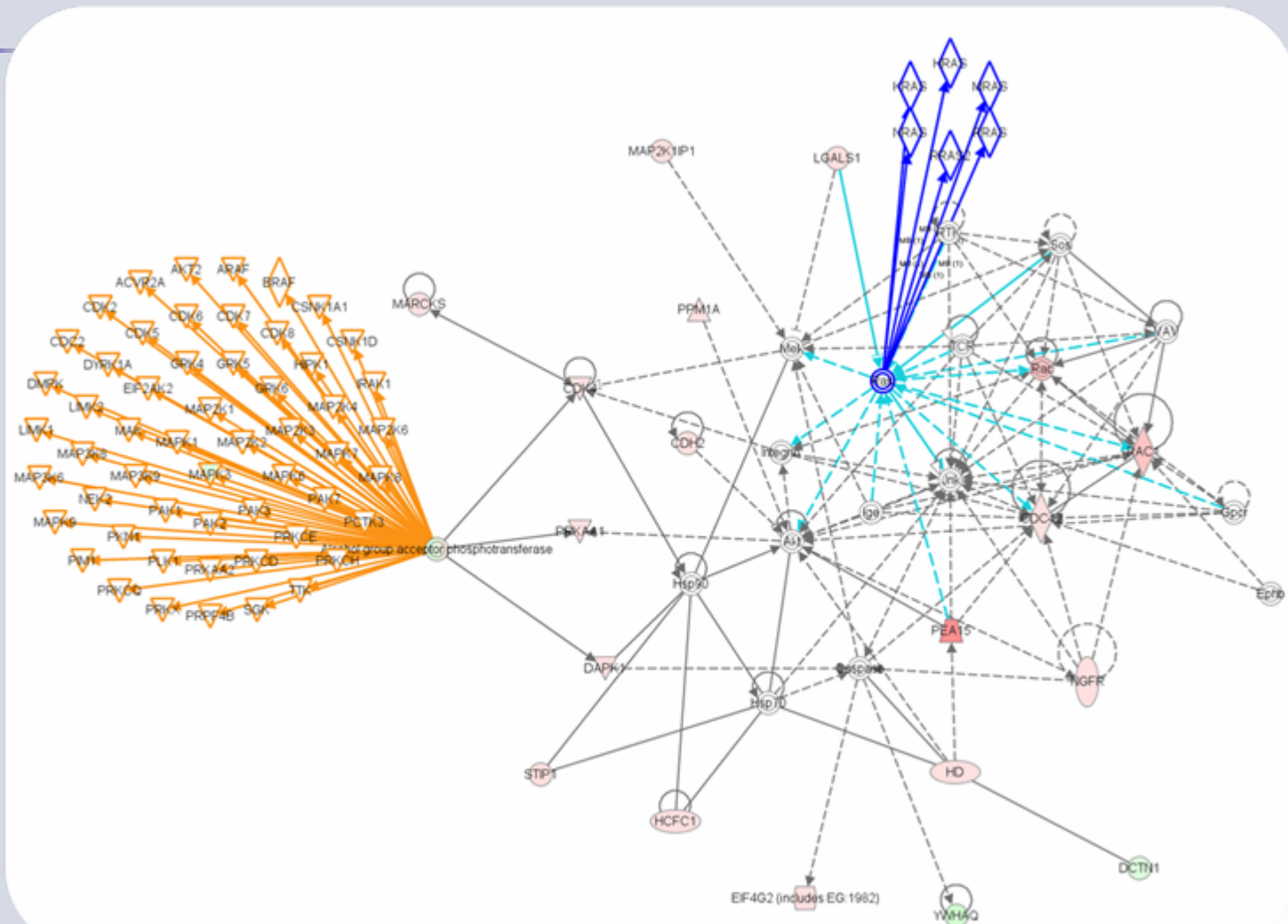
MUDPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)



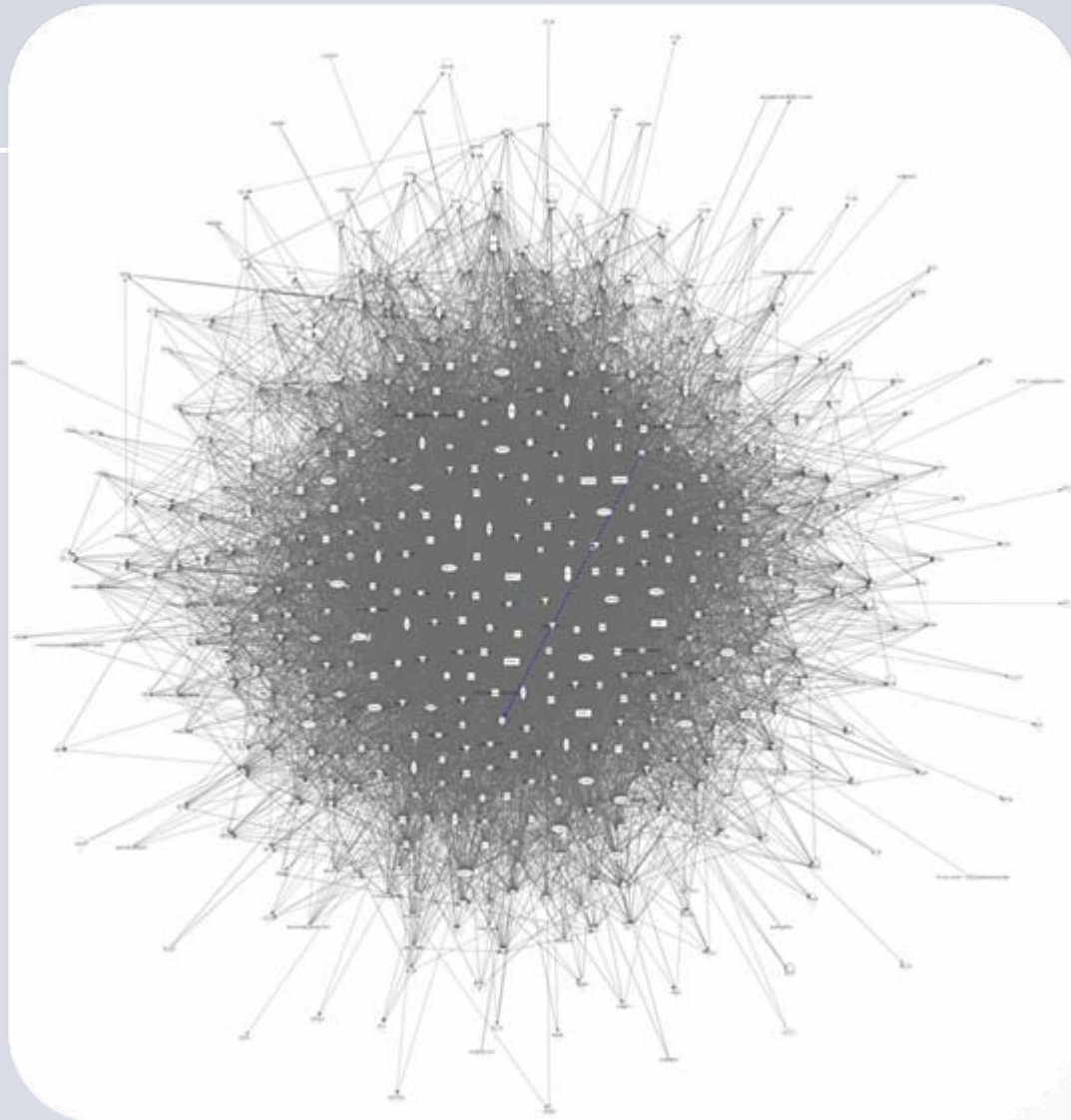
Mais de 1800 proteínas identificadas e quantificadas (algoritmo genético)

LOCUS	Description	1.5h/c on	3h/c	Cellular Component
IPI00646779	TUBB6 protein	3	3.7	cytoskeleton ; microtubule
IPI00011654	Tubulin beta-2 chain	376	371.4	cytoskeleton ; microtubule
IPI00555900	FKSG30	47.9	81.3	cytoskeleton; actin filament
IPI00013683	Tubulin beta-3 chain	148.5	177	cytoskeleton; microtubule
IPI00013475	tubulin, beta 2	295.8	275.7	cytoskeleton; microtubule
IPI00007752	Tubulin beta-2C chain	2.5	2.3	cytoskeleton; microtubule
IPI00396279	CLIP-associating protein 1	8.4	7.3	cytoskeleton; microtubule
IPI00387144	Tubulin alpha-ubiquitous chain	419.1	444	cytoskeleton; microtubule
IPI00180675	Tubulin alpha-3 chain	4.1	4	cytoskeleton; microtubule

Redes relacionadas a vias da Ras e proteínas de choque térmico



Interatoma da A172



HYPOTHESIS - DRIVEN SCIENCE

X

DISCOVERY – DRIVEN SCIENCE

RUPTURA TECNOLÓGICA/ CONCEITUAL

BIOLOGIA TRADICIONAL

-Examina proteínas ou gens isolados

BIOLOGIA DE SISTEMAS

- estuda simultaneamente as interações complexas de vários níveis da informação biológica: DNA genômico, mRNA, proteínas, vias e redes informacionais para compreender como eles funcionam

-procura uma visão contextual para a Biologia

- dados sobre gens, proteínas e metabólitos são combinados para gerar um quadro coerente das conexões entre as diferentes partes