



Proteômica - Fosfoproteômica e Proteoma Subcelular

Discentes

Agnes de Oliveira Maciel

Bruna Letícia S. Gonçalves

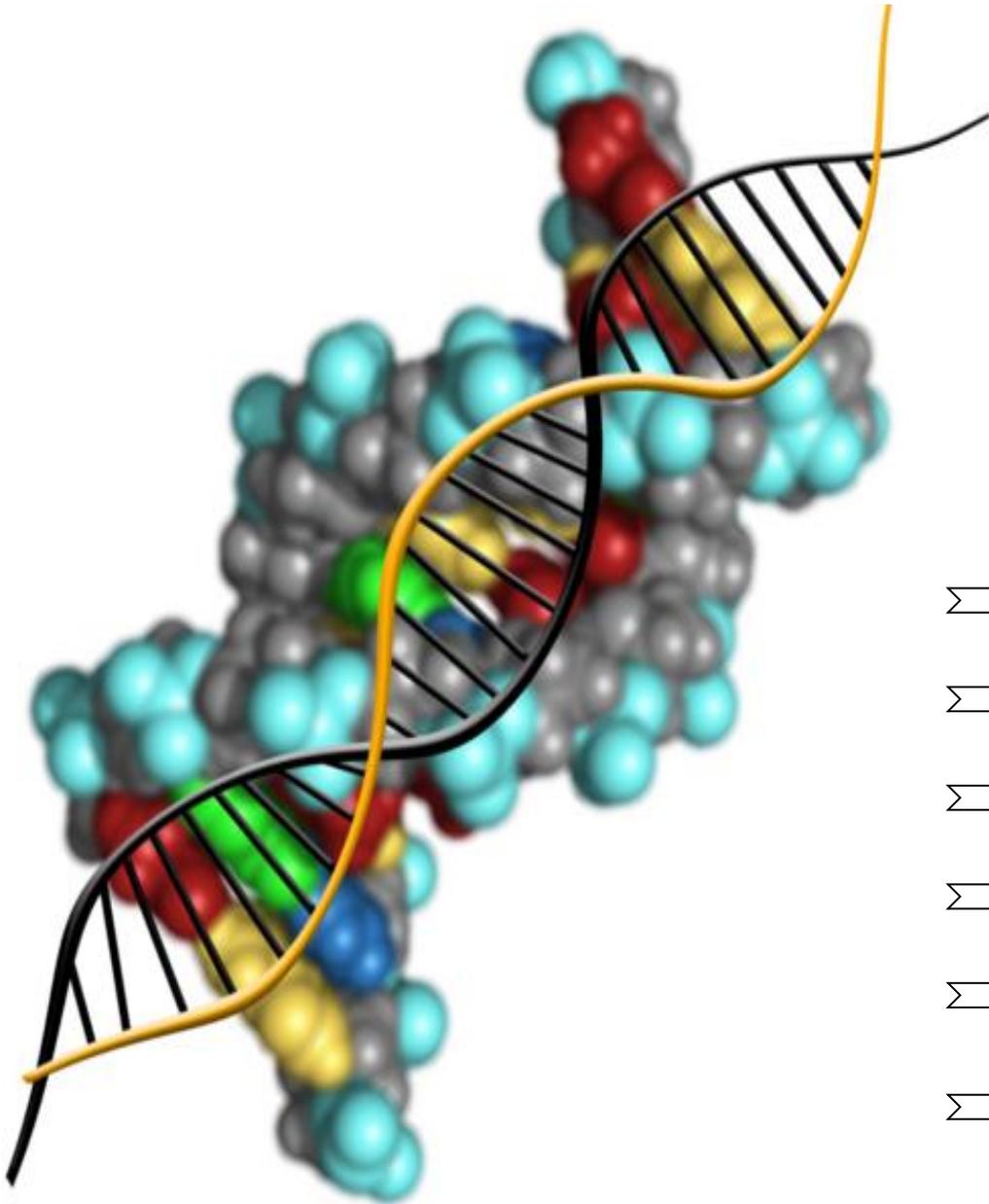
Luis de Queiroz

Prof^ª Dr. Maria Carolina Quecine
LGN5809 - Genética Molecular



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo



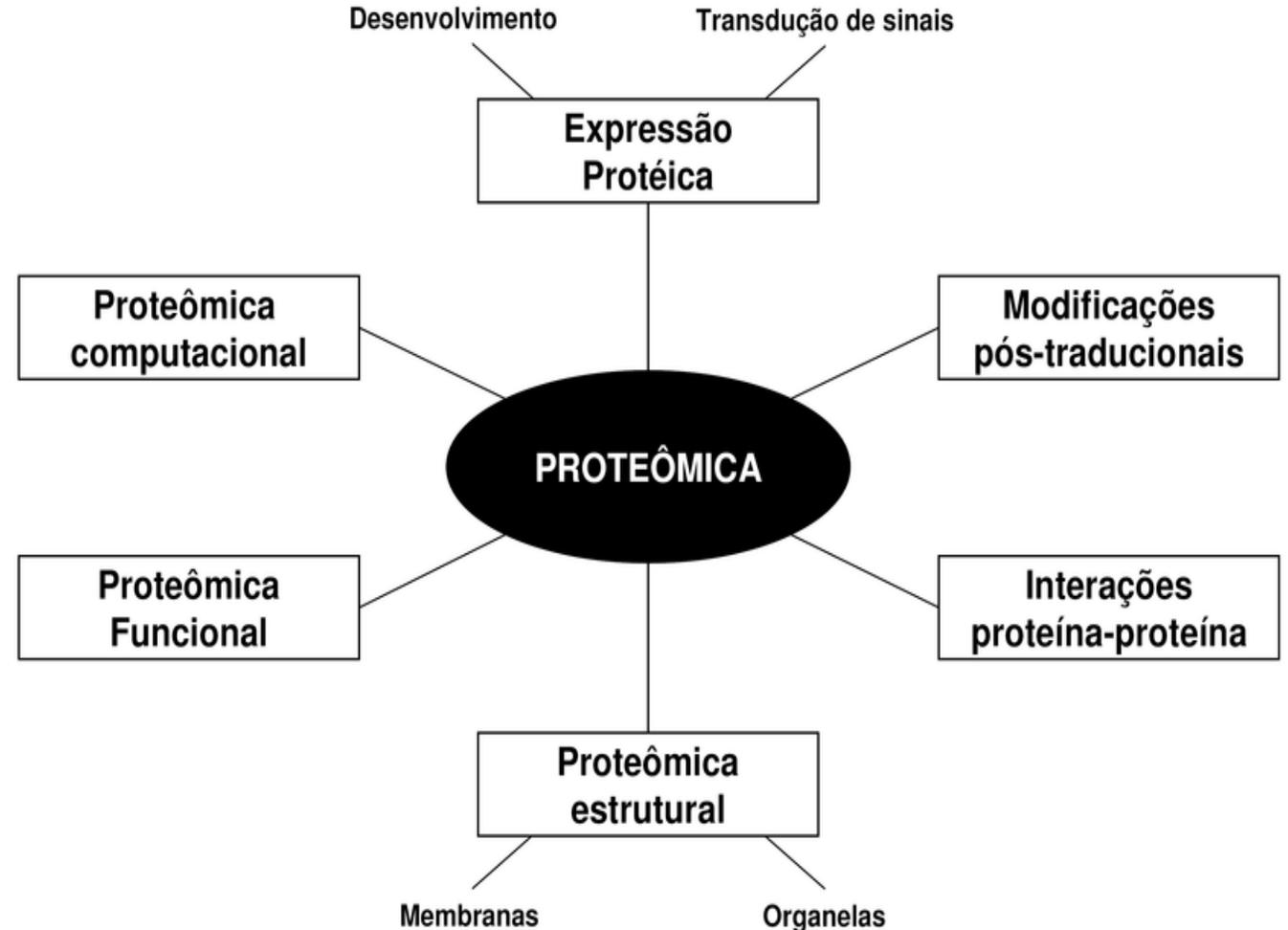
Proteínas

Macromoléculas que possuem como unidade básica aminoácidos. São estruturas dinâmicas, altamente moldáveis, responsáveis por inúmeras funções celulares.

- ⇒ **Estrutural** - colágeno
- ⇒ **Hormonal** - Insulina
- ⇒ **Transporte** - Hemoglobina
- ⇒ **Defesa** - Imunoglobulina
- ⇒ **Contráteis** - Miosina e actina
- ⇒ **Nutricional** - Caseína

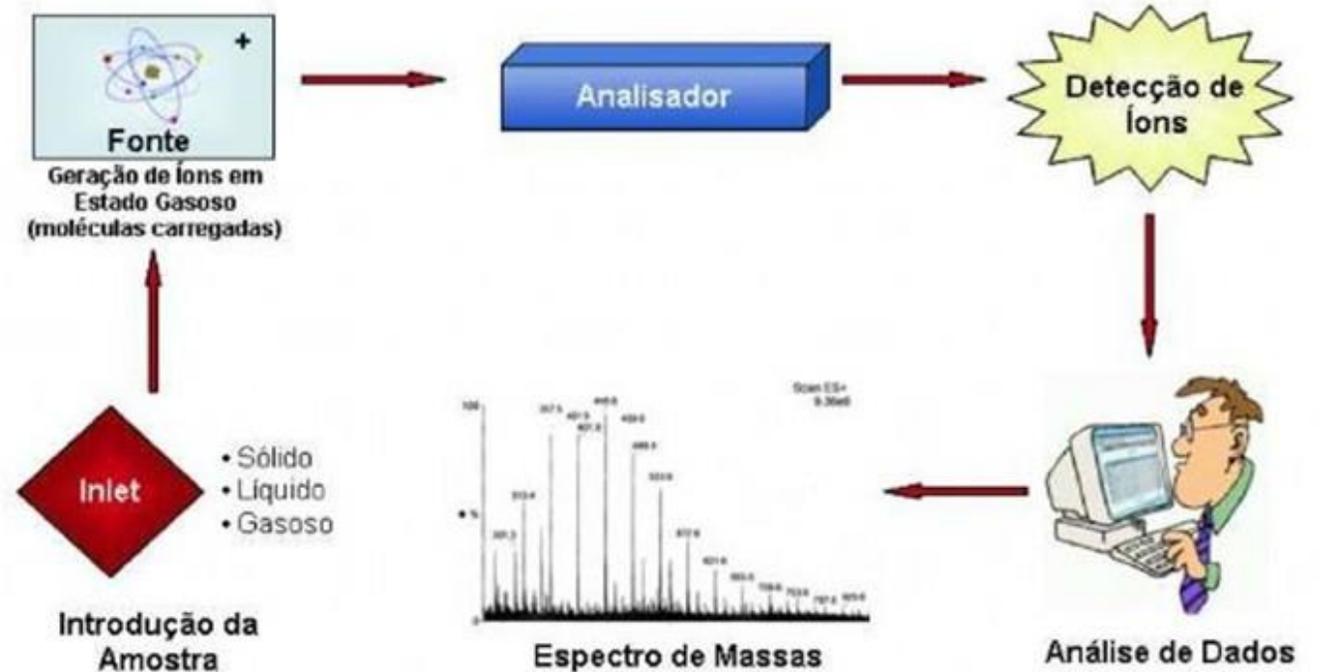
Proteômica X Proteoma

- A proteômica é a metodologia, utilizada para se estudar o Proteoma
- O proteoma pode ser definido como o conjunto de todas as proteínas expressas em um tecido, célula ou sistema biológico em dado momento celular.
- Importante na era pós genômica
- Não é estático, podendo se modificar dependendo das condições e estímulos a qual está sendo exposto.

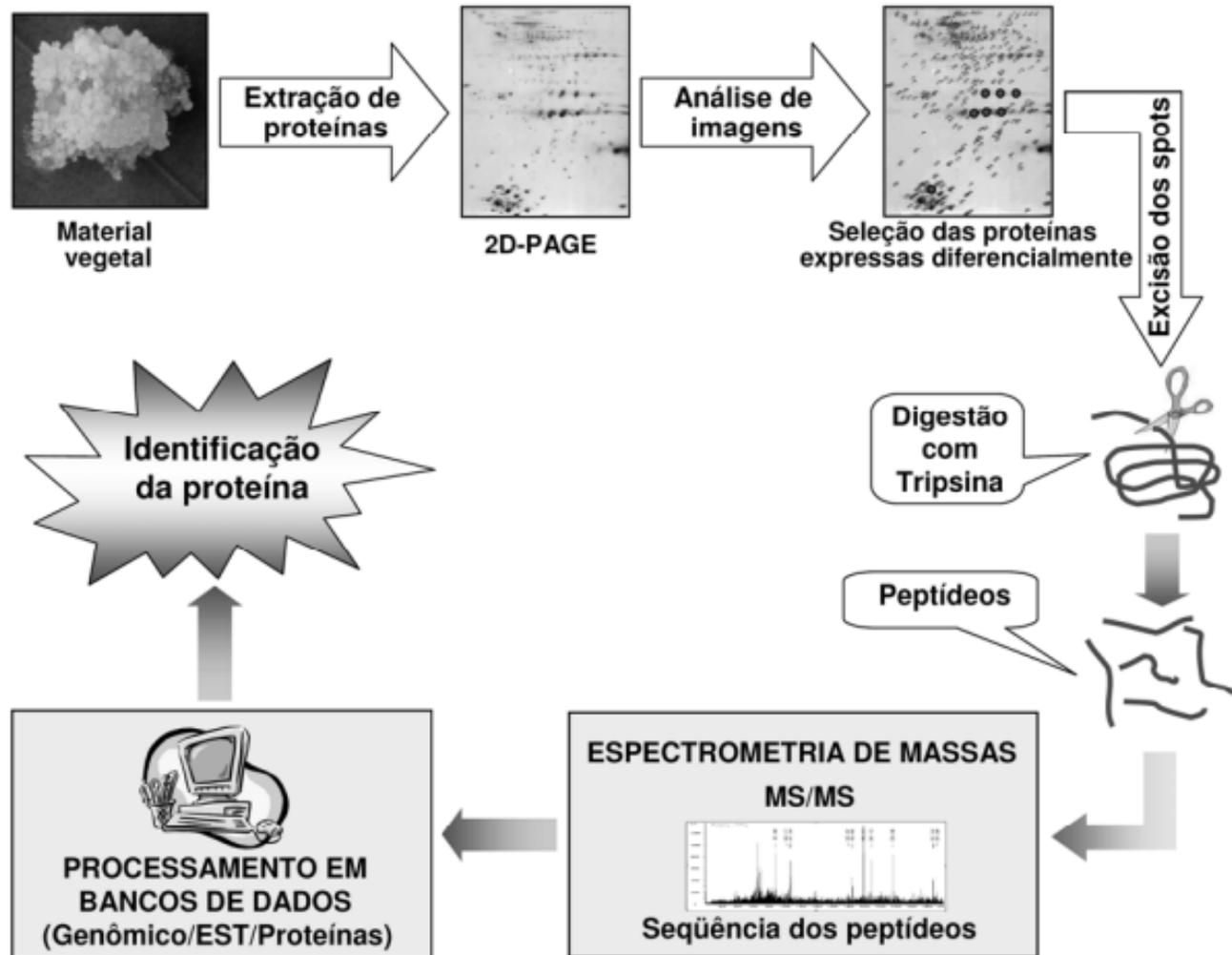


Espectrometria de massa

- Eletroforese bidimensional, limitada para análise do proteoma
- Espectrometria adaptada
- Ocorre por movimento dos íons em campos eletromagnéticos, e faz a classificação de acordo com a sua massa
- Possibilitou o estudo em larga escala



Proteômica em plantas



- A proteômica em plantas utilizam a interface que consiste principalmente na separação das proteínas através de eletroforese bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) com posterior identificação da proteína por espectrometria de massas (MS/MS)
- Elaboração de mapas proteômicos de referência
- Análise proteômica comparativa de diferentes proteomas
 - avaliação entre diferentes genótipos
 - avaliação da influência da aplicação de sinais no metabolismo vegetal, como por exemplo a adição ou supressão de reguladores de crescimento.
- complementar aos estudos de genômica

Proteoma Subcelular

- Usada para identificar e quantificar as proteínas presentes em cada parte da célula, permitindo uma compreensão mais detalhada das funções celulares e das interações entre as proteínas.
- Os proteomas subcelulares são obtidos por purificação seletiva ou enriquecimento específico de organelas ou frações celulares



Fosfoproteômica

- Ramo da proteômica que identifica e caracteriza proteínas com modificações em um grupo fosfato pós-traducional.



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27398-y>

OPEN

Spatial-proteomics reveals phospho-signaling dynamics at subcellular resolution

- Traçar o perfil da dinâmica global de proteoma e fosfoproteoma em frações subcelulares distintas
- Análise de LC-MS/MS de disparo único, aquisição independente de dados (DIA) e MS
- O fluxo de trabalho analítico otimizado minimiza o tempo necessário para obter mapas abrangentes da dinâmica do proteoma subcelular e fosfoproteoma
- Observaram diferenças relevantes nos perfis dos compartimentos celulares obtidos do fígado ou rim quando comparados às células HeLa.



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27398-y>

OPEN

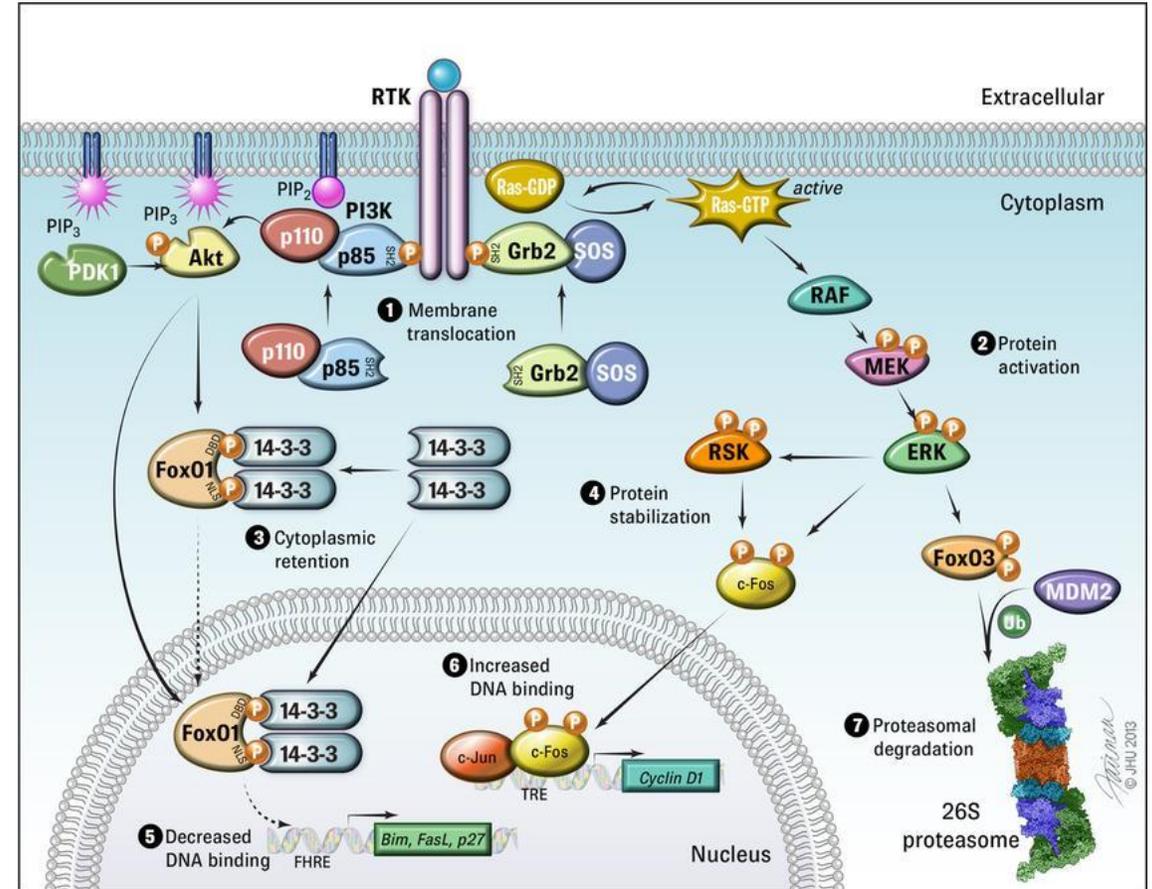
Spatial-proteomics reveals phospho-signaling dynamics at subcellular resolution

- Isso sugere que as diferenças na natureza da amostra têm um impacto significativo em suas propriedades de separação com este fluxo de trabalho
- O protocolo utilizado foi eficiente em análises de fosfoproteômica e ainda pode ser melhorado para ser mais eficiente em análises de proteômica subcelular
- Os conjuntos de dados in vivo e in vitro representam um grande recurso da dinâmica proteômica subcelular e fosfoproteômica
- Para disponibilizá-lo para outros pesquisadores em um formato de fácil acesso, foi criado o site **SpatialProteoDynamics.github.io**



Fosforilação de Proteínas

- Pode modificar transitoriamente as propriedades da proteína
- Em plantas a sinalização em resposta a estímulos ambientais por meio da transdução de sinais receptores de quinases
- Estudos de fosforilação em plantas são desafiadores



Fosfoproteômica em plantas

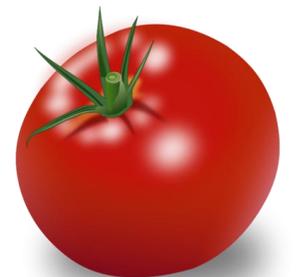


Technological Innovation and Resources

- Transdução de sinalização mediada pela fosforilação
- Preparação de amostra universal
- Aplicação do fluxo de trabalho para identificar eventos de fosforilação associados à tolerância ao frio
- Fosfoproteomas e quinases estão relacionadas na regulação molecular

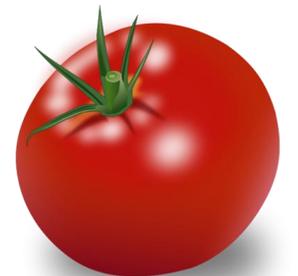
Universal Plant Phosphoproteomics Workflow and Its Application to Tomato Signaling in Response to Cold Stress*[§]

Chuan-Chih Hsu^{‡§§}, Yingfang Zhu^{§¶||§§}, Justine V. Arrington^{**}, Juan Sebastian Paez[‡], Pengcheng Wang^{||¶}, Peipei Zhu^{**}, I-Hsuan Chen[‡], Jian-Kang Zhu^{‡||¶}, and  W. Andy Tao^{‡**‡‡}



Fosfoproteômica em plantas

- Tomates: N135 Green Gage (Tolerante) e Atacames (Suscetível)
- LC MS/MS
- Protocolo universal de preparação de amostras, aumentou significativamente a cobertura e a profundidade do fosfoproteoma da planta
- Procedimentos otimizados na extração de proteínas, três protocolos de lise: Tris HCl, SDC-SLS e GdnHCl

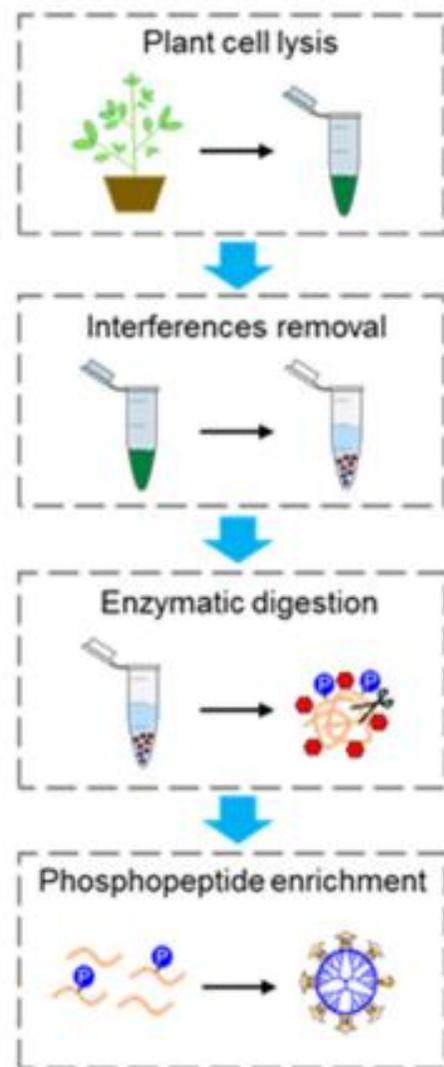


Fosfoproteômica em plantas

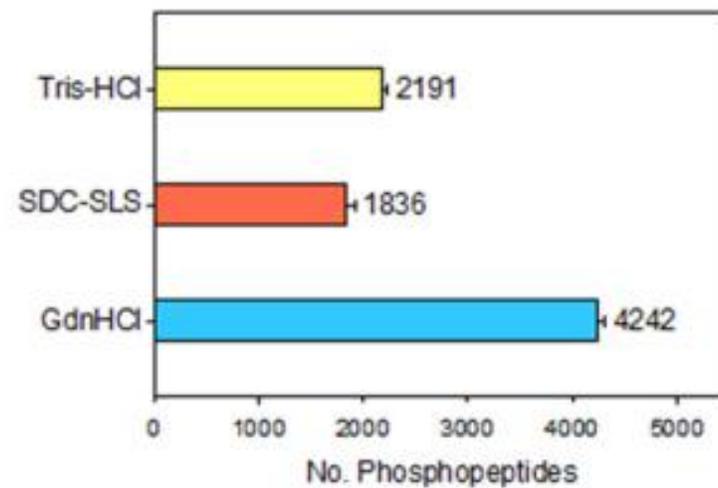
- O gene CBF3 é mais expresso em N135 Green Gage do que em Atacames após tratamentos frios
- Sítios de fosforilação em substratos diretos de SnRK2s foram identificados apenas em N135 Green Gage
- MAPKs são ativados em Atacames em resposta a um ambiente frio e em N135 Green Gage dois SnRK2 quinases são ativados



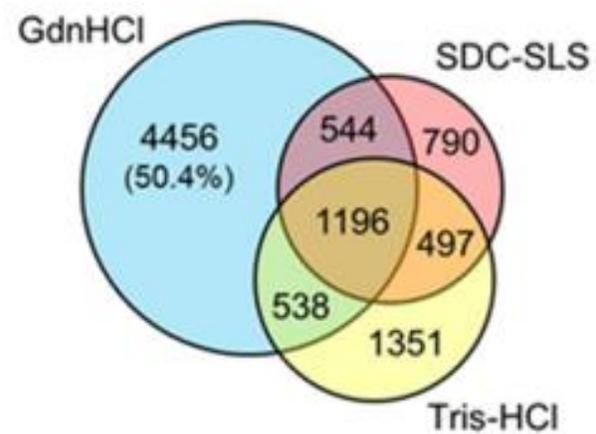
A

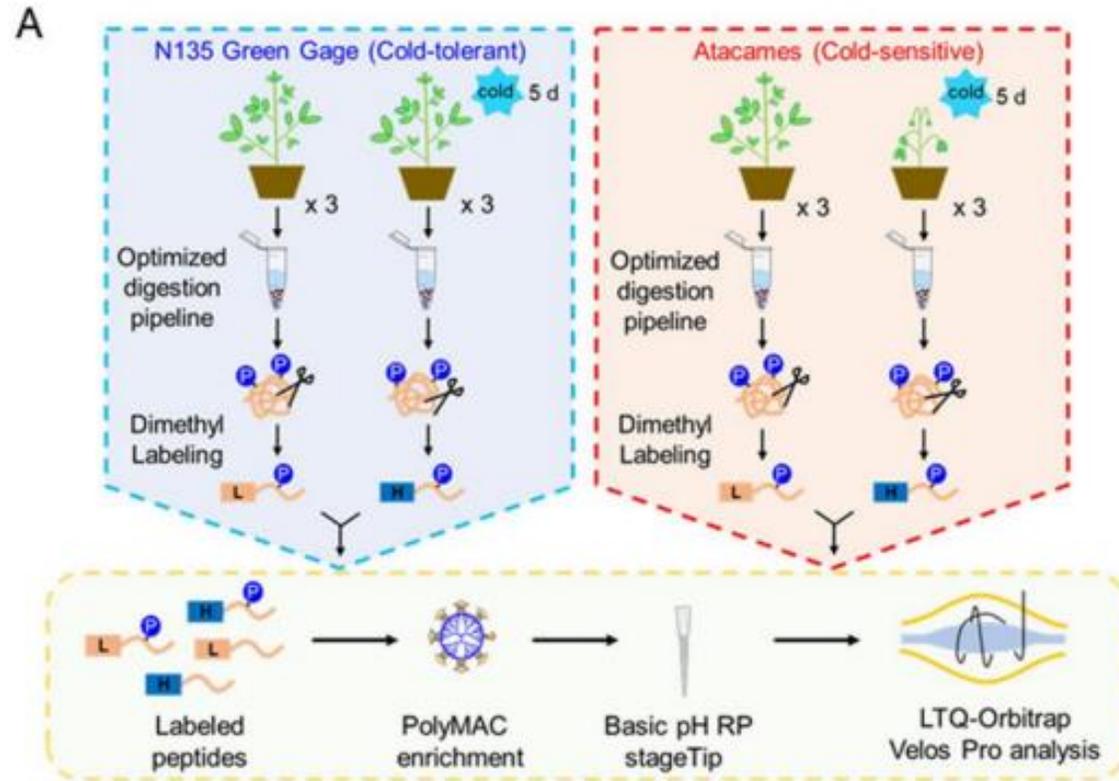


B



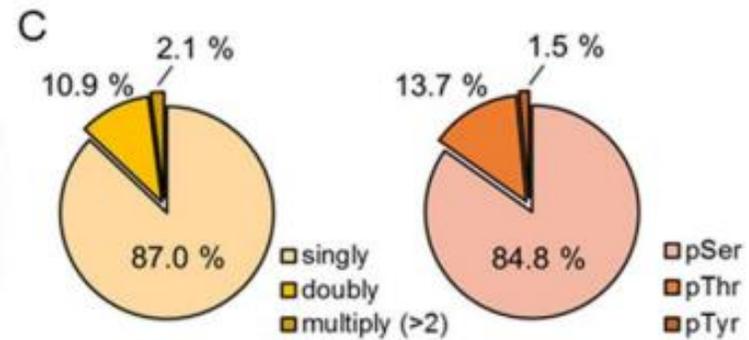
C





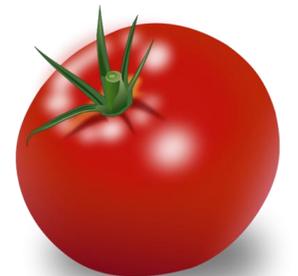
B

Phosphoproteins	5,471
Phosphopeptides	30,593
Phosphosites (All)	23,444
Phosphosites (Class I)	14,343



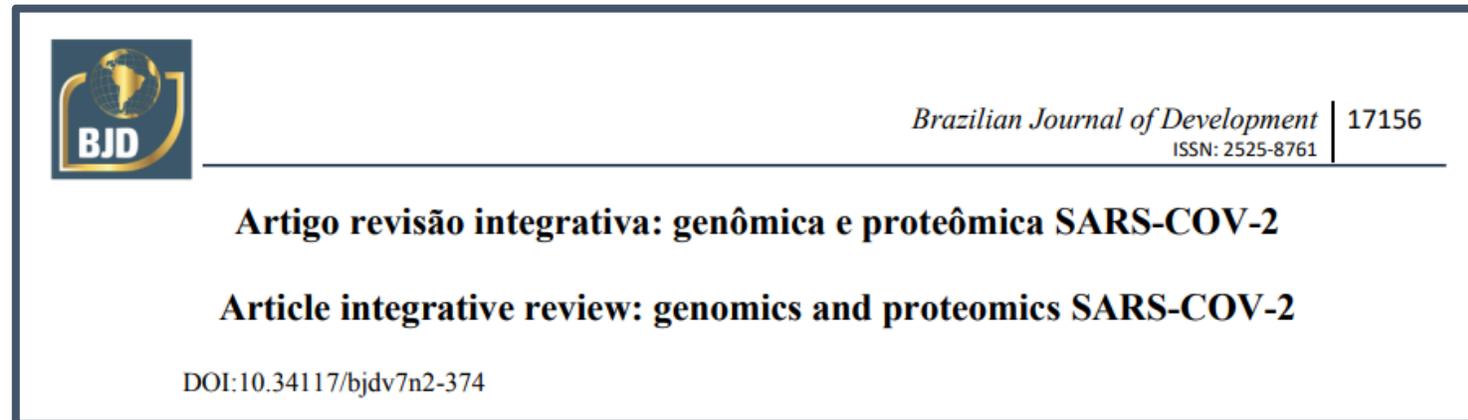
Fosfoproteômica em plantas

- Muitos locais de fosforilação foram significativamente regulados em resposta ao estresse ao frio
- Implicando que as atividades de quinases e fosfatases foram significativamente alteradas
- Foi alcançada uma cobertura eficiente do fosfoproteoma da planta aumentando a eficiência de lise e otimizando os protocolos de digestão
- Traçaram o perfil fosfoproteômico, caracterizaram a indução das quinases e identificaram cascatas de sinalização



Fosfoproteômica e proteômica subcelular em outros organismos

- Aplicação na medicina humana
- Uso indireto na indústria alimentícia
- Estudos em animais
- Estudos em fungos
- Etc...



Fosfoproteômica em outros organismos

Análise de Fosfoproteoma Usando Eletroforese Bidimensional Acoplada à Desfosforilação Química

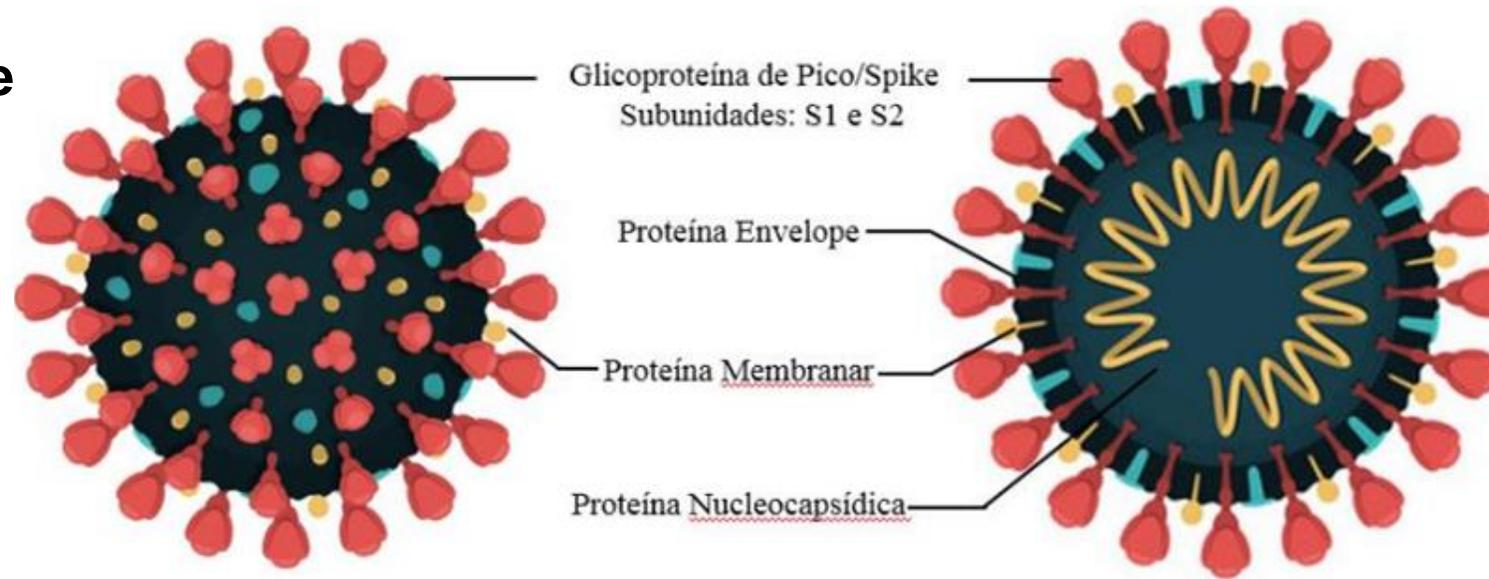
- Objetivo: comparar o fosfoproteoma global da carne usando diferentes abordagens e avaliar qual técnica é mais eficiente.
- Músculo *longissimus thoracis* (LT) da raça bovina Rubia Gallega (*Bos taurus*).
- A desfosforilação química com FH-P é a técnica mais eficiente.
- Grande potencial como biomarcador de qualidade de carne.



Fosfoproteômica em outros organismos

Artigo revisão integrativa: genômica e proteômica SARS-COV-2

- Revisão sobre genômica, proteômica, evolução do genoma do vírus causador da COVID-19.
- A conformação das proteínas afeta a virulência do SARS-COV-2.
- Fosforilação em sua estrutura proteica pode induzir mutações e, conseqüentemente, aumentar ou diminuir a agressividade da doença.



Fosfoproteômica em outros organismos

Subproteômica de *Trypanosoma cruzi*: proteínas básicas e fosfoproteoma

- Objetivo: melhorar o conhecimento sobre as proteínas do protozoário causador da Doença de Chagas.
- Parasito tem várias formas: tripomastigota, amastigota e epimastigota.
- Foi analisada fosfoproteômica no início da forma amastigota.
- Conclusão: a cascata de sinalização celular por fosfatases tem grande importância na fisiologia do *T. cruzi*, incluindo: mobilidade, infectividade, metabolismo, etc.



Fosfoproteômica em outros organismos

Perfilagem Fosfoproteômica das Glândulas Produtoras de Seda da Aranha *Trichonephila clavipes*

- Estudos anteriores não incluíram PTMs.
- Identificação de 1316 proteínas fosforiladas.
- Sete tipos de proteínas: estruturais; transporte de íons e oxigênio; modificadoras de espidroínas; preservação anit-oxidativa das espidroínas; preservação fibrilar das espidroínas; proteínas *housekeeping*; captura e pré-digestão de presas.



Fosfoproteômica em outros organismos

Perfilagem Fosfoproteômica das Glândulas Produtoras de Seda da Aranha *Trichonephila clavipes*

- Estudos anteriores não incluíram PTMs.
- Identificação de 1316 proteínas fosforiladas.
- Sete tipos de proteínas: estruturais; transporte de íons e oxigênio; modificadoras de espidroínas; preservação anit-oxidativa das espidroínas; preservação fibrilar das espidroínas; proteínas *housekeeping*; captura e pré-digestão de presas.



Obrigado!

Dúvidas?

