



IQB-706 – FUNDAMENTOS DA ANÁLISE PROTEÔMICA

Professores

Fábio César Sousa Nogueira (IQ / UFRJ) - fabiocsn@gmail.com, fabiocsn@iq.ufrj.br
Magno Junqueira (IQ / UFRJ) - magnojunqueira@gmail.com
Gilberto B. Domont (Instituto de Química / UFRJ) - gilberto@iq.ufrj.br
Paulo Costa Carvalho (Fiocruz - Paraná) - paulo@pcarvalho.com

Carga horária: 45 horas

Disciplina teórico-experimental

Créditos: 3

Vagas: 20

Objetivo

A disciplina tem por objetivo principal fornecer ao aluno de Pós-graduação os conceitos e as aplicações mais atuais na área de análise de proteomas. O conteúdo da disciplina permitirá ao aluno a familiarização com etapas essenciais para uma análise proteômica quantitativa completa de amostras biológicas.

Ementa

Os principais tópicos do curso são: (i) conceitos e princípios da proteômica; (ii) métodos de ionização suave (ESI e MALDI); (iii) analisadores de massa; (iv) modelos de aquisição; (v) identificação de proteínas; (vi) sequenciamento de peptídeos e proteínas; (vii) algoritmos de interpretação de dados; (viii) estratégias proteômicas quantitativas *label-free* e *label-dependent* e relativas e absolutas; (ix) análise de modificações pós-traducionais; (x) proteômica estrutural; (xi) *softwares* para interpretação dos dados.

Programa Analítico

1. Introdução
 - 1.1. Histórico
 - 1.2. Proteoma e Proteômica
 - 1.3. Análise proteômica
 - 1.4. Ciência dirigida por hipótese versus ciência dirigida pela descoberta
 - 1.5. Introdução à espectrometria de massa
 - 1.5.1. Revisão de conceitos
 - 1.5.2. Princípios da espectrometria de massa
 - 1.5.3. Métodos de ionização (ESI e MALDI)
 - 1.5.4. Analisadores de massa
 - 1.5.5. Proteômica bottom up e top-down



- 1.5.6. Modos de operação
 - 1.5.7. Fragmentação em baixa energia
 - 1.5.8. Espectro de massa
 - 1.5.9. Espectrometria de massa nativa e desnaturada
 - 1.5.10. Aplicações
2. Preparação de amostras
 - 2.1. Introdução.
 - 2.2. Diversidade, complexidade e desafios das amostras.
 - 2.3. Métodos de homogeneização. Tampões, agentes caotrópicos e detergentes.
 - 2.4. Interferentes e contaminantes.
 - 2.5. Desnaturação, redução, alquilação.
 - 2.6. Digestão de proteínas. Enzimas, sítios de clivagem. Digestão in-gel e in-solution.
 - 2.7. Extração, limpeza e concentração de peptídeos. Extração em fase sólida.
 - 2.8. Exemplos de estratégias de preparação de amostras aplicadas à análise proteômica.
 3. Espectrometria de Massas
 - 3.1. Introdução. Histórico.
 - 3.2. Conceitos e aplicações.
 - 3.3. Espectrômetro de massa e seus componentes.
 - 3.4. Fontes de ionização
 - 3.4.1. MALDI. Matrizes. Modelos (Lucky Survivor e Gas Phase Protonation). Imagiamento.
 - 3.4.2. ESI. Nano-ESI. Cone de Taylor. Modelos (Ion Evaporation e Charge Residue).
 - 3.5. Analisadores.
 - 3.5.1. Tempo de voo (TOF).
 - 3.5.2. Quadrupolo.
 - 3.5.3. Armadilha de íons (Ion Trap).
 - 3.5.4. Orbitrap.
 - 3.5.5. Mobilidade iônica.
 - 3.6. Detectores.
 - 3.7. Espectrômetros de massa híbridos usados na proteômica
 - 3.8. Modos de aquisição
 4. Identificação de proteínas por espectrometria de massas
 - 4.1. Métodos convencionas baseados no PSM (Peptide Spectrum Match)
 - 4.2. De novo sequencing de peptídeos
 - i. Identificação de proteínas de organismos com o genoma não sequenciado por similaridade em sequência
 - 4.2. Identificação por "Sequence tag"
 - ii. Buscas erro tolerante
 5. Proteômica quantitativa
 - 5.1. Quantificação baseada na marcação isotópica e quantificação livre de marcação (label-free).
 - 5.2. Quantificação por "tags" isobaricas e multiplexização de amostras



- 5.3. Quantificação Absoluta e relativa
- 5.4. Quantificação em proteômica shotgun
- 5.5. Quantificação em proteômica alvo direcionada
 - i. Selected Reaction Monitoring
 - ii. Parallel Reaction Monitoring

6. Análise de modificações pós-traducionais (PTMs)
 - 6.1. Introdução. Diversidade do proteoma.
 - 6.2. Tipos gerais de PTMs. Clivagem proteolítica e adição de grupos funcionais covalentemente.
 - 6.3. Funções das PTMs
 - 6.4. Estratégias para análise das PTMs. Variação de massa, íons diagnóstico e perda neutra.
 - 6.5. Estratégias de quantificação e estequiometria das PTMs.
 - 6.6. Workflow de uma análise proteômica para identificação e quantificação de PTMs.
 - 6.7. Fosfoproteômica. Funções e estratégias proteômicas.
 - 6.8. Glicoproteômica. Funções e estratégias proteômicas.
 - 6.9. Análise sequencial de PTMs.

7. Top-Down proteomics.
 - 7.1. Espectrometria massas nativa
 - 7.2. Espectrometria de massas de íons individuais (Individual Ion Mass Spectrometry)

8. Análise bioinformática
 - 8.1 Funcionamento de ferramenta de busca para proteômica shotgun
 - 8.2 False Discovery Rate
 - 8.3 Obtendo lista de proteínas de acordo com o critério de máxima parsimonia.
 - 8.4 Análise de dados com PatternLab for Proteomics

Literatura recomendada

- Yaoyang Zhang, Bryan R. Fonslow, Bing Shan, Moon-Chang Baek, and John R. Yates III. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics Chemical reviews. 2013, 113, 2343-2394.
- Aebersold R, Mann M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422:198-207. Biol. 215:403-410. Annan, R.S.; Huddleston, M.,J.; Verna, R.; Deshaies, R.J.; Carr, S.A. (2001)- A multidimensional electrospray MS-based approach to phosphopeptide mapping. Anal. Chem. 73: 393- 404.
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G et al., (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. Anal. Bioanal. Chem. 389:1017-1031.
- Hunt, D.F.; Yates, J.R. III; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C.R. (1986)- Protein sequencing by mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6233 – 6237.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 2003 Mar 13;422(6928):198-207. Review. PubMed PMID: 12634793.
- Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. Nat Chem Biol. 2005 Oct;1(5):252-62. Review



- Kinter, Michael; Sherman, Nicholas E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. New York, Wiley-Interscience, 2000.
- Zhou, Ming; Veenstra, Timothy. Proteomics for Biomarker Discovery. Vol. 1002, 1st Edition. New York: Humana Press, Springer, 2013.
- Kim et al. A draft map of the human proteome. Nature. 2014 May 29;509(7502):575-81. doi: 10.1038/nature13302
- Nogueira FC, Domont GB. Survey of shotgun proteomics. Methods Mol Biol. 2014;1156:3-23. doi: 10.1007/978-1-4939-0685-7_1.
- Magno Junqueira, Paulo Costa Carvalho. Tools and challenges for diversity-driven proteomics in Brazil. J Proteomics 2013; <https://doi.org/10.1002/pmic.201200058>
- Andrej Shevchenko, Cristina-Maria Valcu, Magno Junqueira. Tools for exploring the proteomosphere. J Proteomics. 2009 Mar 6;72(2): 137-44. doi:10.1016/j.jprot.2009.01.012.