Resumo Tema 10: A espectrometria de massas aplicada ao estudo de vias de sinalização.

As vias de sinalização regulam essencialmente toda a biologia das células e organismos em condições normais e patológicas. Os sinais representam informações detectadas nas células por receptores específicos e convertidos em resposta celular, que sempre envolve um processo químico. Essa conversão de informação em alteração química é conhecida como transdução de sinais.

Muitas doenças, como o câncer, podem ser definidas como alterações patológicas nas vias de sinalização, por isso estudar a natureza e mecanismos de sinalização é crucial para a pesquisa biológica e médica. Ligantes extracelulares podem ativar receptores ligados à membrana plasmática, e transmitir o sinal através de uma cascata de fosforilações no núcleo da célula, levando finalmente a mudanças na expressão de genes específicos. Vias de sinalização também envolvem redes intrincadas com outros sinais em que a integração de informações reflete o estado da célula.

A propagação do sinal envolve mudanças em três diferentes níveis:

1. Regulação da proteinas por PTMs, processo bioquímico no qual os resíduos de aminoácidos das proteínas são modificados covalentemente, após a biosíntesse da proteína. Algumas PTMS incluem fosforilação, acetilação, ubiquitinação, metilação, sumoilação e glicosilação. Essas diferentes formas moleculares nas quais o produto protéico de um único gene pode ser encontrado, incluindo as formas devidas das PTMs, são conhecidas como proteoformas
2. Interações proteína-proteína
3. Mudanças na expressão proteica induzidas por um sinal

Todos os três níveis são sincronizados em um maneira altamente dinâmica e muitas vezes espacial e podem levar a alterações na atividade proteica, localização e associação com outras moléculas. Assim, o objetivo da pesquisa das vias de sinalização é a medição de PTMs, interações proteicas e dinâmica do proteoma.

Uma das técnicas mais amplamente utilizadas no estudo de proteomas é a espectrometria de massas, técnica analítica utilizada para medir a razão massa-carga (m/z) de uma ou mais moléculas presentes em uma amostra em fase gasosa. O espectrometro de massas detecta a presença e abundância de peptídeos (e outras biomoléculas como metabólitos, lipídios, carboidratos, ácidos nucléicos e proteínas) usando propriedades fundamentais das moléculas, como massa e carga. Quando os peptídeos são ionizados (geralmente através de ganho de prótons), eles são chamados de íons peptídicos.

Todos os espectrômetros de massa têm como mínimo três componentes: uma fonte de íons, um ou mais analisadores de massa e um detector de íons. Na fonte de ionização, as moléculas são convertidas em íons em fase gasosa para que possam ser movidas e manipuladas por campos elétricos e magnéticos externos.Como os espectrômetros de massa só podem analisar em fase gasosa foram desenvolvidos métodos como ionização por electrospray (ESI) a fim de converter peptídeos em fase líquida a íons gasosos. Assim a amostra líquida contendo os peptídeos é bombeada através do orifício de entrada do espectrômetro, mantido em alta tensão. Ao chegar ao emissor da fonte, o fluxo constante do líquido se desintegra em gotículas pequenas, altamente carregadas, das quais a líquido se evapora rapidamente deixando íons peptídicos na fase gasosa. Em proteômica é comum usar sistemas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para separar misturas de peptídeos usando nano fluxo para a injeção da amostra à fonte de íons ESI.

Quanto ao analisador de massa sua principal função é separar íons por suas razões massa-carga (m/z). Fundamentalmente, todos os íons são separados modulando suas trajetórias em campos elétricos. Os analisadores de massa diferem no princípio que usam para

separar íons, e isso define sua aplicação. Analisadores do tipo quadrupolo, analisadores por tempo de voo (TOF) ou analisadores Orbitrap, são os mais comuns em proteômica.

Normalmente o analisador de ións é seguido por uma ‘cela de colisão’ um tipo de analisador onde os íons podem ser fragmentados por colisão com um gás inerte como o N2 usando baixa energia (CID) ou alta energia de colisão (HCD). Duas outras técnicas de fragmentação dependem de um mecanismo físico completamente diferentes: a dissociação por captura de elétrons (ECD) e dissociação por transferência de elétrons (ETD), nas quais os peptídeos obtêm o excesso de energia de um elétron, que neutraliza uma das cargas positivas do peptídeo.

O analisador de massa geralmente funciona em conjunto com o sistema de detecção de íons, registrando a intensidade de cada m/z detectada, gerando um espectro de massa. Os espectros resultantes dos íons precursores são chamados MS1 enquanto os espectros dos fragmentos gerados são chamados de MS2 ou MS/MS.

As técnicas dominantes para identificar PTMs em proteoformas são duas abordagens complementares de espectrometria de massa (MS): proteômica Bottom up e Top-down. Na análise bottom-up, as proteoformas são digeridas proteoliticamente por ação enzimática em peptídeos curtos, que são separados por cromatografia líquida (LC) ou outros métodos de separação e depois analisados por MS. Esta abordagem geralmente fornece alta cobertura de íons de fragmentos de peptídeos identificados, o que aumenta a precisão na determinação de tipos e localizações de PTM em peptídeos. No entanto, a proteômica bottom-up pode identificar apenas vários peptídeos de uma proteína e perder muitos peptídeos com PTMs em análises de todo o proteoma. Além disso, padrões combinatórios de PTMs em proteoformas são perdidos na digestão, tornando a abordagem bottom-up ineficiente para analisar proteoformas complexas com múltiplos PTMs.

Por outro lado, a proteômica top-down analisa proteínas intactas em vez de peptídeos, para poder identificar padrões combinatórios de PTM em proteoformas e caracterizar proteoformas com múltiplos PTMs. No entanto, esta abordagem ainda sofre de sensibilidade e rendimento limitados e muitas vezes não consegue identificar proteoformas de baixa abundância em estudos que abrangem o proteoma inteiro.

Com ajuda do desenvolvimento de métodos computacionais que facilitam a identificação e localização de PTMs a proteômica bottom-up tem tornado a abordagem preferencial no estudo de PTMs em grande escala. Esses métodos identificam PTMs em peptídeos fazendo uma busca contra um banco de dados com PTMs pré-especificadas ou uma pesquisa aberta. Enquanto uma pesquisa em banco de dados com PTMs variáveis relata diretamente os tipos de PTMs identificados, o método de pesquisa aberta primeiro identifica mudanças de massa inesperadas, que são então combinadas com PTMs comuns para identificar os tipos de PTMs na amostra. Esses PTMs são posteriormente localizados para determinar seus locais de modificação. Muitas ferramentas de software, como MaxQuant, determinam o local de uma PTM em um PSM identificada com base nas pontuações de similaridade entre o espectro e todas as formas candidatas do peptídeo com o PTM em sítios diferentes. A forma peptídica modificada com a melhor pontuação de similaridade é relatada como o resultado da localização da PTM.

A PTM mais comum e mais bem estudada é a fosforilação, ligação reversível de um grupo fosforil. Cerca de 30% do proteoma humano é fosforilado e cada fosfoproteína pode existir como múltiplas formas fosforiladas. Existem dois tipos principais de fosforilação: O-fosforilação, que é mais comum e ocorre em resíduos de serina, treonina e tirosina; e N-fosforilação, que ocorre na histidina, arginina e lisina. Outros eventos de fosforilação menos comuns envolvem resíduos de ácido aspártico, cisteína e ácido glutâmico. A fosforilação de proteínas regula a atividade proteica, a estabilidade, a localização celular, a afinidade do substrato e a formação de complexos. Portanto, este PTM desempenha um papel fundamental em eventos essenciais, como sinalização, divisão celular, crescimento, metabolismo, desenvolvimento e envelhecimento. Em particular, a fosforilação do ácido aspártico representa uma PTM abundante em procariontes, com um papel crucial nas vias de sinalização.

A exposição das células a fatores de crescimento específicos proporciona sinais cruciais durante as decisões do destino celular. Por exemplo, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) induzem células-tronco mesenquimais para se diferenciarem em células ósseas ou proliferar. A razão para uma resposta diferente deste sistema está relacionada a sinais que foram descobertos quantificando Tyr fosfoproteínas. Isto revelou que o PDGF, mas não o EGF, ativou a via da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) além da MAPK. Bloqueando quimicamente o PI3K, converteu a via de PDGF em um sinal de diferenciação. Atualmente, a maioria dos dados quantitativos baseados em estudos de sinalização são realizados em linhagens celulares inmortalizadas e outros tipos de células como células-tronco embrionárias.

O fluxo de trabalho da proteômica bottom-up para a identificação e quantificação de PTMs, começa com a extração das proteínas, as quais são digeridas em peptídeos. As PTMs podem ser enriquecidas a nível de proteína (antes da digestão) ou, mais comumente, a nível de peptídeo (após a digestão). Os peptídeos enriquecidos são então separados por cromatografia líquida (LC) e analisados no espectrômetro de massa, permitindo não só a identificação dos PTMs, mas também a sua quantificação.

Algumas das estratégias de enriquecimento de PTMs mais comuns incluem cromatografia de afinidade (IMAC e MOAC), cromatografia de troca iônica (SCX e SAX), cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), imunoprecipitação (IP) e pull-down de proteínas.

No caso específico dos fosfopeptídeos, a cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) explora a afinidade do grupos fosfato por íons metálicos carregados positivamente, como Fe3+, Ga3+, Zr4+, Sn4+ e Ti4. Os íons metálicos são ligados de forma não covalente a uma resina cromatográfica e interagem por meio de quelação de metal e atração eletrônica com fosfopeptídeos carregados negativamente. Uma limitação das resinas IMAC é que elas também podem ligar peptídeos não fosforilados com múltiplos resíduos carregados negativamente. Outra limitação consiste na recuperação relativamente baixa de peptídeos monofosforilados em comparação com os multifosforilados, devido à sua interação mais fraca com cátions metálicos. Outro tipo de cromatografia de afinidade é a cromatografia de afinidade de óxido metálico (MOAC), que explora a afinidade do grupo fosfato com óxidos metálicos. A extração é baseada na interação de Lewis ácido-base , e o grupo fosfato assume um modo de ligação bidentado à superfície do óxido metálico. Os fosfopeptídeos são, portanto, enriquecidos por MOAC com base na afinidade do grupo fosfato carregado negativamente com óxidos metálicos, mais comumente TiO2.

Embora os métodos descritos acima sejam eficientes para isolar peptídeos contendo fosfo-serinas e fosfo-treoninas, eles normalmente não funcionam bem para pTyr, devido à menor abundância de Tyr e ao menor grau de suas fosforilações em geral. Anticorpos anti-pTyr podem ser empregados para enriquecer fosforilações de Tyr no nível de proteína ou peptídeo. Como a imunoprecipitação (IP) de proteínas inteiras gera um elevado número de peptídeos não modificados presentes em quantidades muito maiores em comparação com os peptídeos pTyr, o enriquecimento de peptídeos é atualmente o método de escolha. A sinalização FosfoTyr inicia diferentes cascatas de sinalização e proteínas ou peptídeos Tyr fosforilados podem ser enriquecido por anticorpos específicos Desta forma é possivel monitorar a dinâmica da fosforilação de Tyr em resposta à estimulação da insulina, fornecendo uma visão geral dos eventos de sinalização que acontecem próximos ao receptor e identificando novos substratos regulados pela insulina.

Após o enriquecimento, os peptideos modifcados são injetados ao MS. Existem PTMs estáveis que são retidas pelo precursor após a fragmentação, proporcionando, no espectro MS um deslocamento de massa previsível. Porém muitas PTMs são lábeis e dão origem a um intenso pico de perda neutra após a fragmentação localizada em uma massa inferior à do peptídeo precursor devido à perda de uma espécie neutra relacionada ao PTM. Normalmente, o pico de perda neutra é selecionado para posterior fragmentação (MS/MS/MS) e sequenciamento do peptídeo.

Além da identificação, várias configurações baseadas em MS permitem a quantificação de PTMs por abordagens com e sem marcação. Em particular, os métodos baseados em marcação incluem principalmente o uso de isótopos estáveis em aminoácidos adicionados à cultura celular (SILAC), marcadores isobáricos para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ), marcação de massa em tandem (TMT) e marcação com dimetil.

Às vezes apenas algumas proteínas ou peptídeos modificados são de interesse e assim o sequenciamento e quantificação podem ser restritos a um subconjunto de peptídeos especificados. As técnicas denominadas MRM e SRM usadas há muitos anos na espectrometria de massas para monitorar moléculas pequenas e seus fragmentos, têm sido aplicadas em abordagens direcionadas para monitorar a expressão de proteínas em diferentes modelos.

O mecanismo consiste em configurar o espectrômetro para selecionar a massa do peptídeo de interesse, seguidamente a célula de colisão é usada para fragmentar a peptídeo e um um segundo analisador de massas é definido um valor de massa específico para fragmento característico do peptídeo (SRM). Para aumentar a especificidade deste método, mais de um fragmento pode ser monitorado (MRM) ou como no caso dos equipamentos de alta resolução como os obitrap, todo o espectro MS/MS gerado a partir da massa de interesse pode ser analisado (PRM)