

## OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE PROTEOMAS CELULARES

Francielle Aguiar Gomes

Mariana P. Massafera, Graziella Eliza Ronsein

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

ellegomes06@usp.br

### Objetivos

A espectrometria de massas de alta resolução para análises proteômicas permite investigar com elevada eficiência a composição de proteomas celulares. Mas, para que as potencialidades da técnica sejam plenamente atingidas, é necessário que os protocolos de preparo das amostras estejam bem estabelecidos, sejam reprodutíveis, e que minimizem a quantidade de potenciais contaminantes e interferentes. Além disso, é necessário que os métodos de aquisição dos espectros de massas também sejam otimizados, visando à identificação da maior quantidade possível de proteínas por amostra.

Nesse sentido, os dois principais objetivos deste trabalho são otimizar: (a) os protocolos de preparo de amostras para proteômica (incluindo desde a lise celular até a digestão e *clean-up*), e (b) os métodos de aquisição de espectros de massas.

### Métodos e Procedimentos

Células humanas THP-1 foram cultivadas, diferenciadas em macrófagos com phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), e lisadas. As proteínas obtidas a partir deste processo foram quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) e posteriormente digeridas em triplicatas técnicas seguindo-se três protocolos distintos (*em Gel* [1], *Filter-Aided Sample Preparation* – FASP [2], *Em Solução* [3]). Para os protocolos *em Gel* e *em Solução* foram comparados os resultados de diferentes quantidades de proteínas digeridas (1, 5, 10, e 25 µg). Para o protocolo FASP empregou-se as

seguintes quantidades de proteínas digeridas: 1; 2,5; 5; 10; 25; 100 e 200 µg. Os métodos de aquisição avaliados e comparados foram: *Shotgun* [4] e *BoxCar* [5]. Visando também uma maior identificação de proteínas, estudou-se o efeito do fracionamento das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para construção de uma biblioteca de peptídeos. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro modelo Orbitrap Fusion Lumos acoplado a um sistema de cromatografia líquida EASY-nLC 1200, ambos fabricados pela ThermoFisher Scientific. Os dados foram analisados utilizando-se os softwares MaxQuant e Perseus [6].

### Resultados

Nos experimentos em que foram comparados diferentes protocolos de digestão (*em Solução*, *em Gel*, FASP), foram identificadas entre 1346 e 2642 proteínas do proteoma humano. A Figura 1 ilustra a comparação entre os três métodos em função da massa de proteínas digeridas (1-25 µg). Observa-se que o método FASP resulta em um maior número de identificações em todos os casos. Além disso, verifica-se que com uma massa de proteínas tão baixa quanto 1 µg, identifica-se no mínimo 1346 proteínas. Esse resultado é bastante promissor especialmente no caso de amostras nas quais há uma quantidade reduzida de proteínas disponível (frações específicas de fluidos biológicos como o sangue, por exemplo).

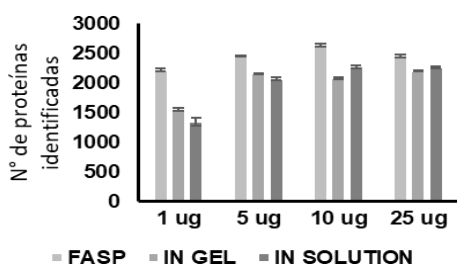


Figura 1. Número de proteínas identificadas em cada método de digestão estudado.

Tendo sido observado que o protocolo FASP promove uma melhor performance em termos do número de proteínas identificadas, passou-se ao estudo dos efeitos da variação da massa de proteínas digeridas (1, 5, 10, 25, 100 e 200 µg) por este método. A Figura 2 apresenta os resultados assim obtidos, a partir dos quais conclui-se que o número de proteínas identificadas é praticamente independente da massa de proteínas de partida, uma vez que há pouca variação no número de proteínas identificadas (2398-2789) nessas condições.

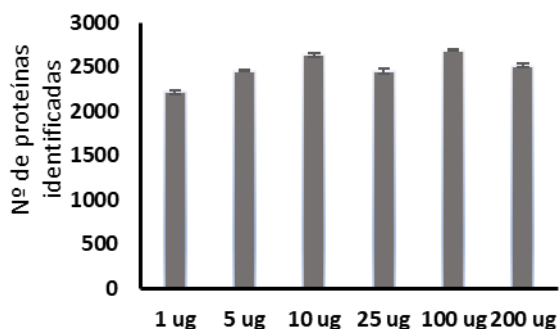


Figura 2. Variação no número de proteínas identificadas em função do aumento da massa de proteínas digeridas seguindo-se protocolo FASP.

Os dados apresentados até aqui são resultado de análises por espectrometria de massas em modo de aquisição conhecido como *Shotgun* [4]. Avaliou-se comparativamente um segundo método, denominado *BoxCar* [5], em que se variou o tempo de ciclo (intervalo de tempo entre aquisição de espectros MS1 e MS2). Os resultados estão descritos na Tabela 1, e demonstram que, nas condições estudadas, o número de proteínas identificadas é sempre maior com aquisição *Shotgun* do que com

*BoxCar*. Também, o emprego de uma biblioteca de peptídeos no momento da busca por proteínas a partir de um banco de dados de espectros teóricos promove um grande aumento das identificações em todos os casos.

Tabela 2. Número de proteínas identificadas e dados de *sequence coverage* de cada análise (triplicatas).

Método de aquisição	Nº de proteínas identificadas	Sequence Coverage
<i>Shotgun</i>	2306	38%
<i>BoxCar 1s</i>	1087	14%
<i>BoxCar 3s</i>	2052	37%
<i>Shotgun – com biblioteca</i>	4344	38%
<i>BoxCar 1s – com biblioteca</i>	4241	57%
<i>BoxCar 3s – com biblioteca</i>	4284	37%

## Conclusões

A digestão assistida por filtro (FASP) apresentou um melhor desempenho dentre os três métodos de digestão analisados, em termos do número de proteínas identificadas.

Nas condições analisadas, o método de aquisição *Shotgun* convencional apresentou um melhor desempenho em comparação com o método *BoxCar*.

## Referências Bibliográficas

1. Shevchenko, A., *et al.*, Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2856-60.
2. Wiśniewski, J.R., *et al.*, Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 359-62.
3. Gundry, R.L., *et al.*, Protoc Mol Biol, 2009. **Chapter 10**: p. Unit10.25.
4. Meissner, F. and M. Mann, Nat Immunol, 2014. **15**(2): p. 112-7.
5. Meier, F., *et al.*, Nat Methods, 2018. **15**(6): p. 440-448.
6. Cox, J. and M. Mann, Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.