

Sumário

Transcriptômica e Proteômica

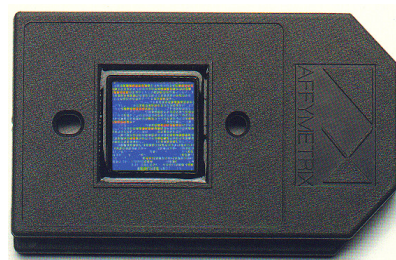
- O que são *arrays* de DNA? *Microarrays*: padrões globais de expressão de genes
- Exemplo: uma experiência de hibridação comparativa. *Clustering* de genes.
- *Arrays*: aplicações. Novas tecnologias de *chips*.
- Proteômica: uma nova ferramenta para 'pescar proteínas'. Proteoma vs. Proteômica .
- Proteômica: geis a duas dimensões (2D). Análise de mapas 2D.
- Identificação de proteínas: espectrometria de massa.
- Proteômica: aplicações.

Bibliografia

- Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter (2004) *Essential Cell Biology* 2^a ed. Garland Science Publishing. Cap.4.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson J (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th ed, Garland, New York. Cap. 8.

O Que São Arrays de DNA?

- Arrays de DNA consistem em 'arranjos' de **elevado número** de moléculas de DNA, alinhadas **de forma ordenada** num suporte sólido.
- Dependendo do tamanho de cada 'spot' de DNA, os arrays podem ser classificados como:
 - ❖ **Microarrays** ($\varnothing < 250 \mu\text{m}$) ou
 - ❖ **Macroarrays** ($\varnothing > 300 \mu\text{m}$)
- Quando o transportador ('carrier') ou substrato sólido usado é pequeno, os arrays também são designados por **'chips' de DNA**.

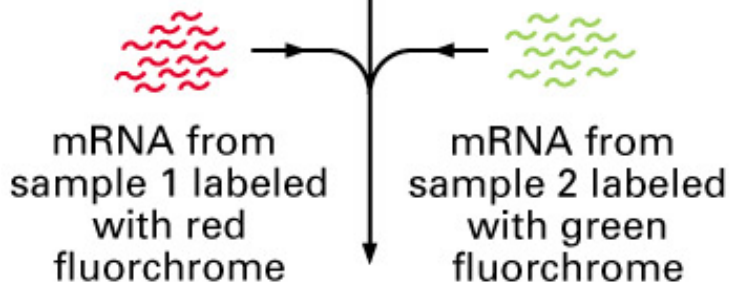
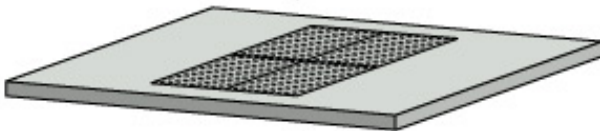


Microarrays: Padrões Globais de Expressão de Genes

collection of gene-specific DNA molecules

↓
PCR amplification

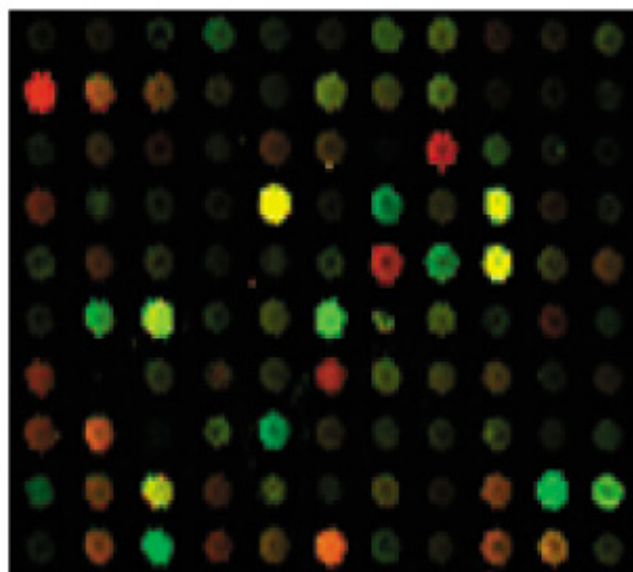
↓
robotic 'printing' onto glass slide



↓
HYBRIDIZE

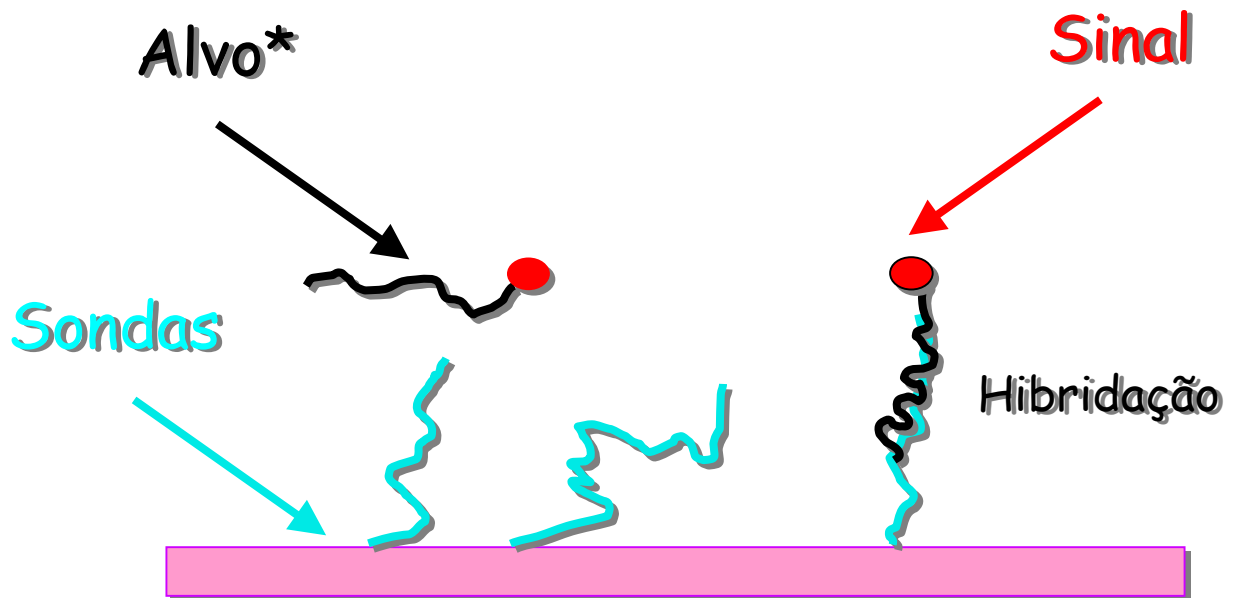
↓
WASH

↓
SCAN RED AND GREEN SIGNALS AND COMBINE IMAGES



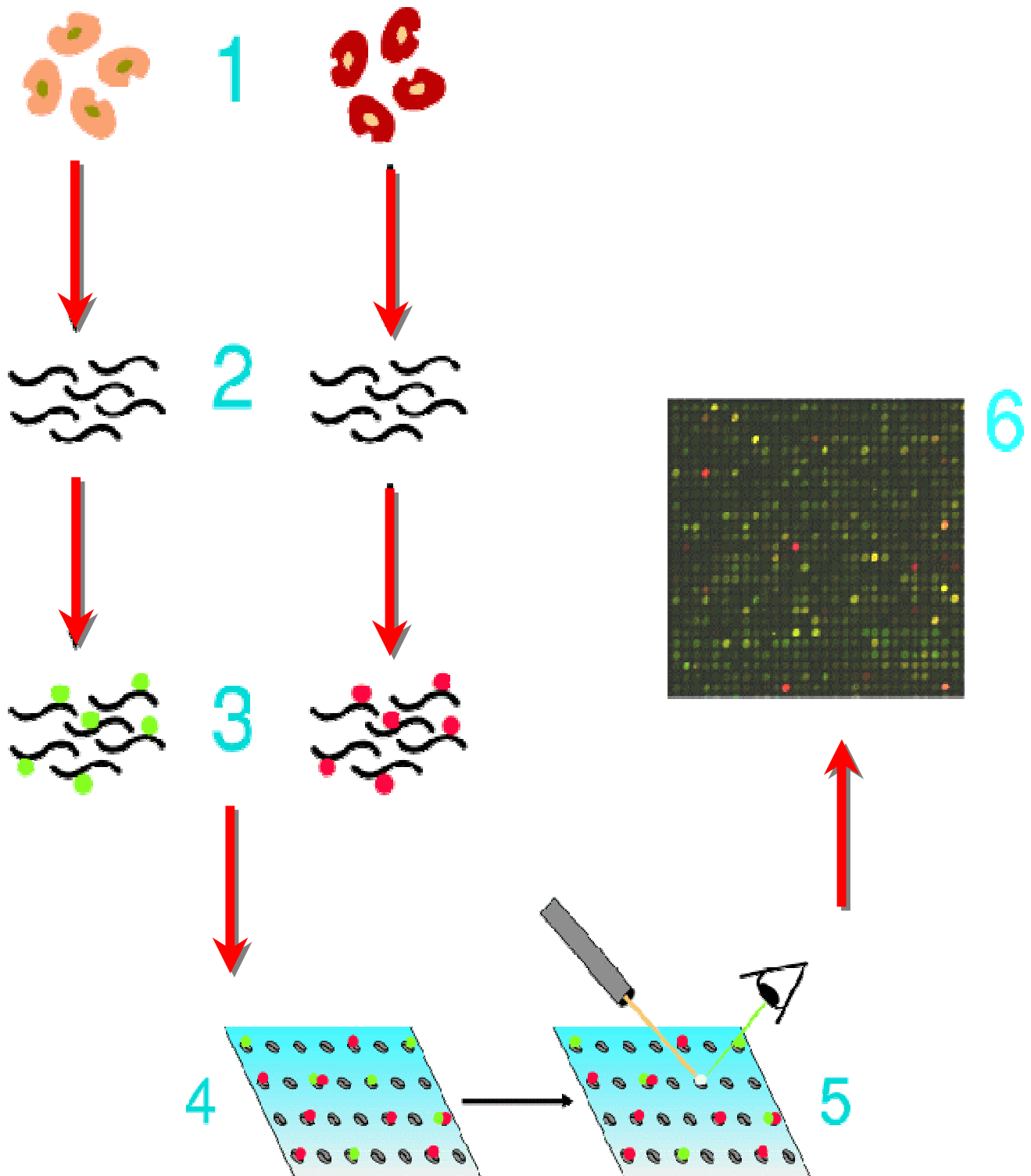
small region of microarray representing expression of 110 genes from yeast

Ensaio

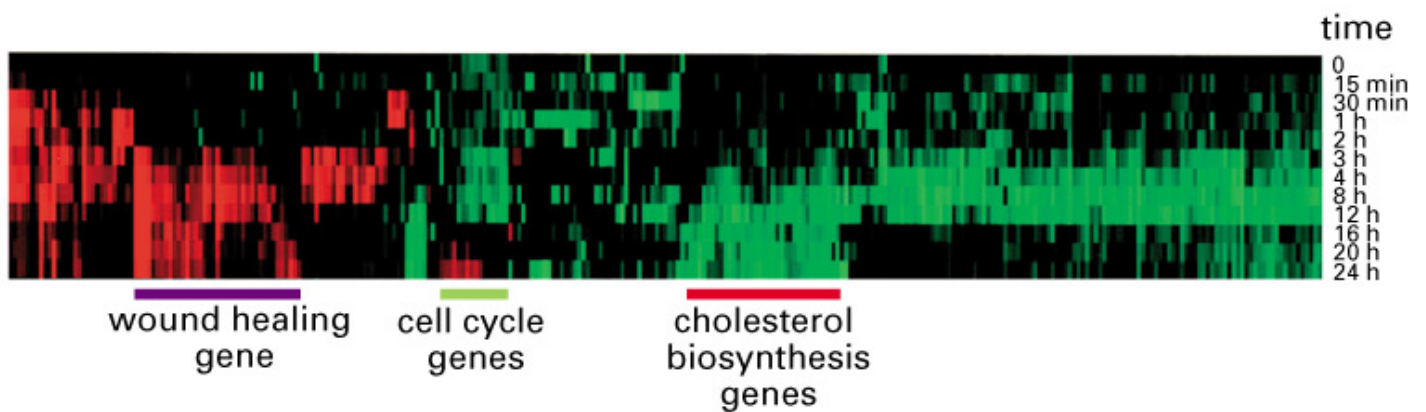


- Uma **"sonda"** é o ácido nucleico imobilizado, de sequência conhecida.
- Um **"alvo"** é o ácido nucleico livre (na amostra) cuja presença / abundância está a ser testada.

Uma Experiência de Hibridação Comparativa



'Clustering' de Genes

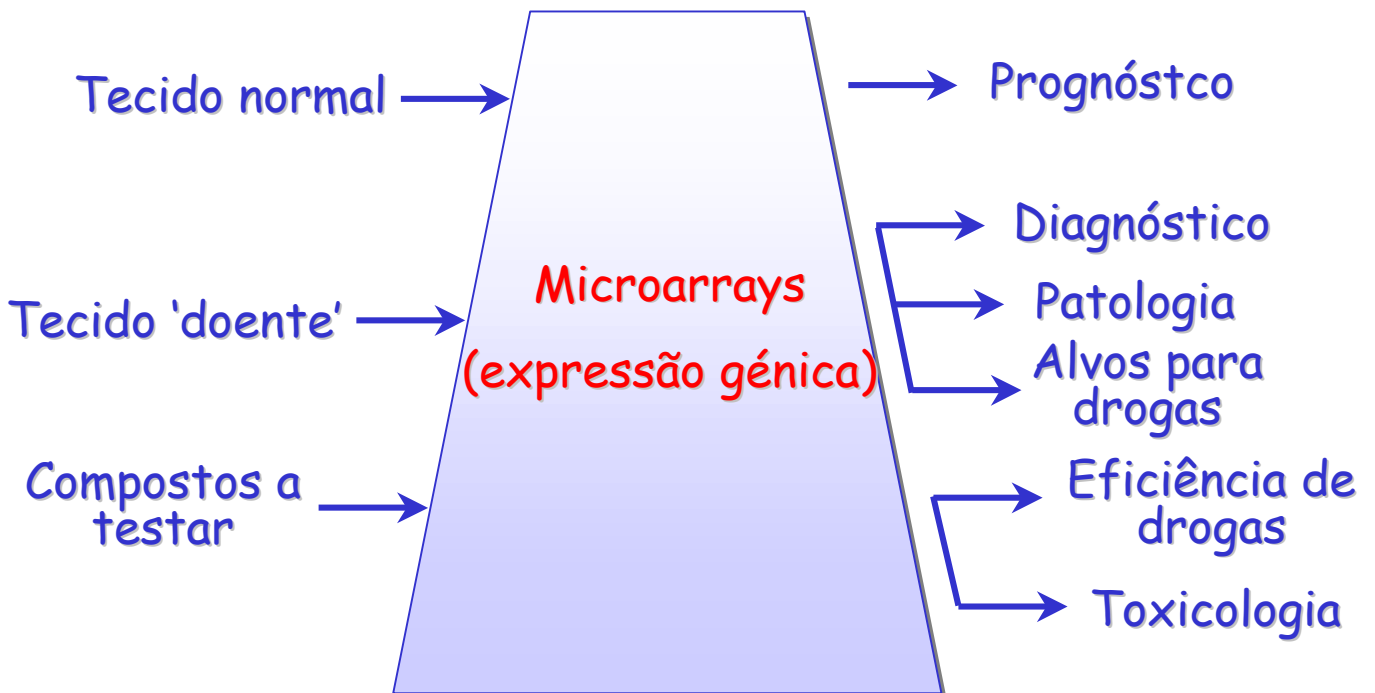


São utilizadas metodologias de Bioinformática para *clustering* de genes, ou seja, identificação de genes que são regulados coordenadamente

Arrays: Aplicações

Inputs

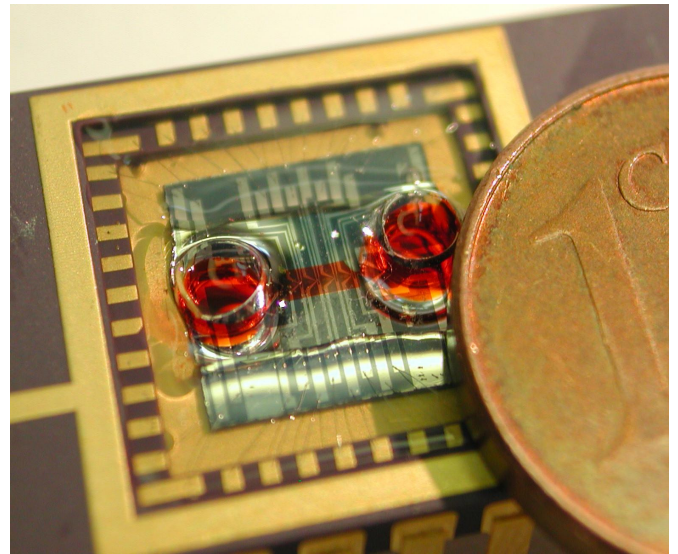
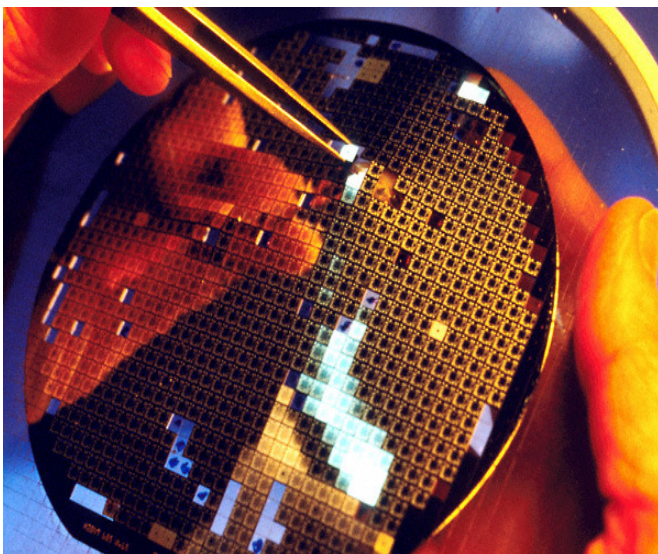
Outputs



Novas Tecnologias de *Chips*

Smaller is beautiful...

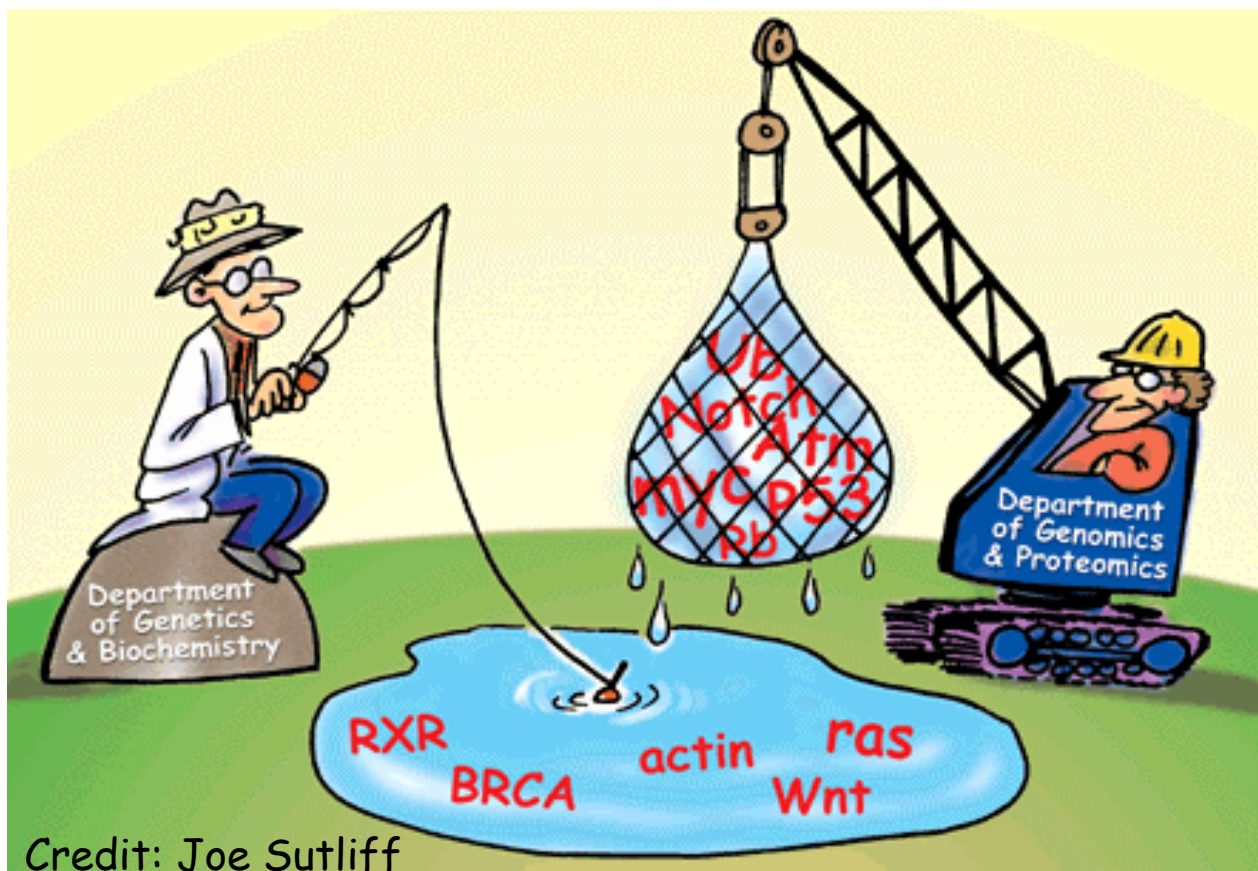
'Chip' de Sensores Magnéticos



Nanochip



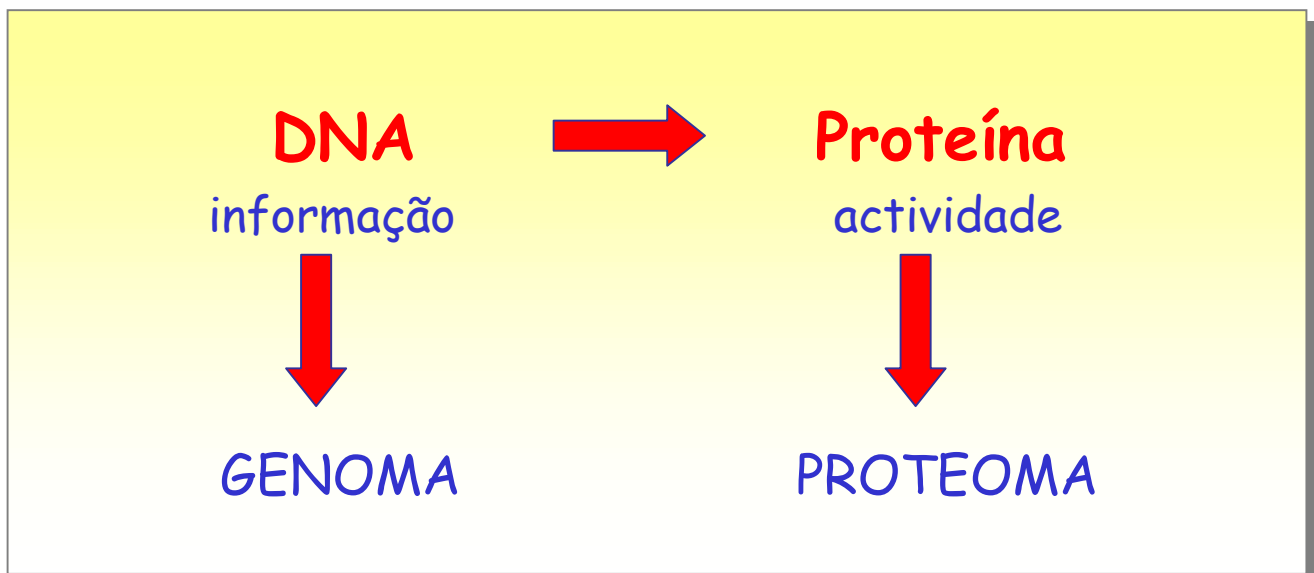
Proteómica: Uma Nova Ferramenta para 'Pescar Proteínas'



O Que é um Proteoma?

É o conjunto de todas as **PROTEÍNAS** expressas por um tecido ou organismo num dado momento, sob determinadas condições por um **genOMA**.

Marc R. Wikins, 1994



Proteoma vs. Proteômica

Proteoma

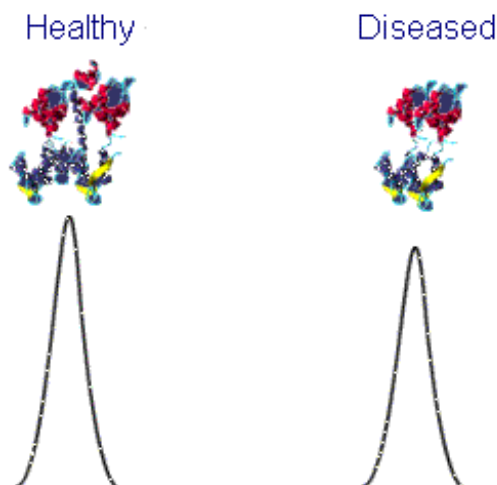
- ✓ Padrão de expressão proteica quantitativo dum genoma sob condições definidas.

Proteômica

- ✓ Metodologias usadas para determinar proteomas.

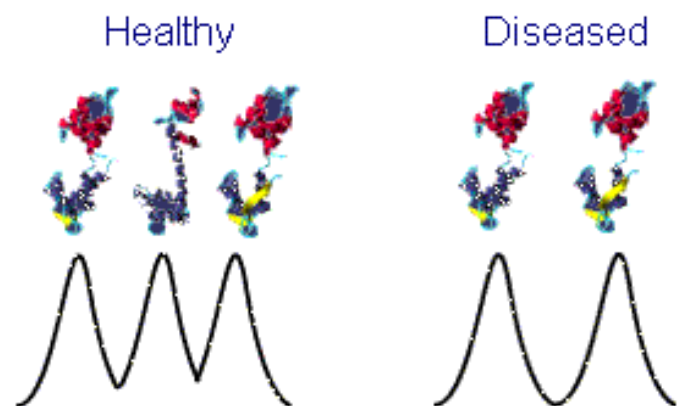
Vantagens duma Abordagem Global de Elevada Resolução

Baixa Resolução



Difference in peak height is not significant. Important protein could be overlooked due to low difference in apparent abundance

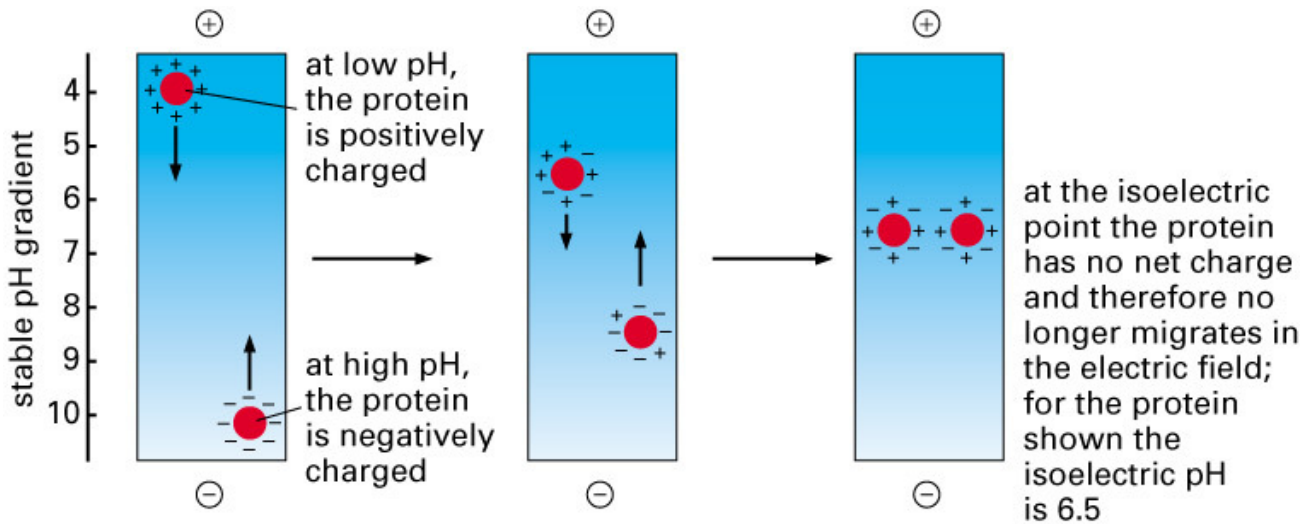
Elevada Resolução



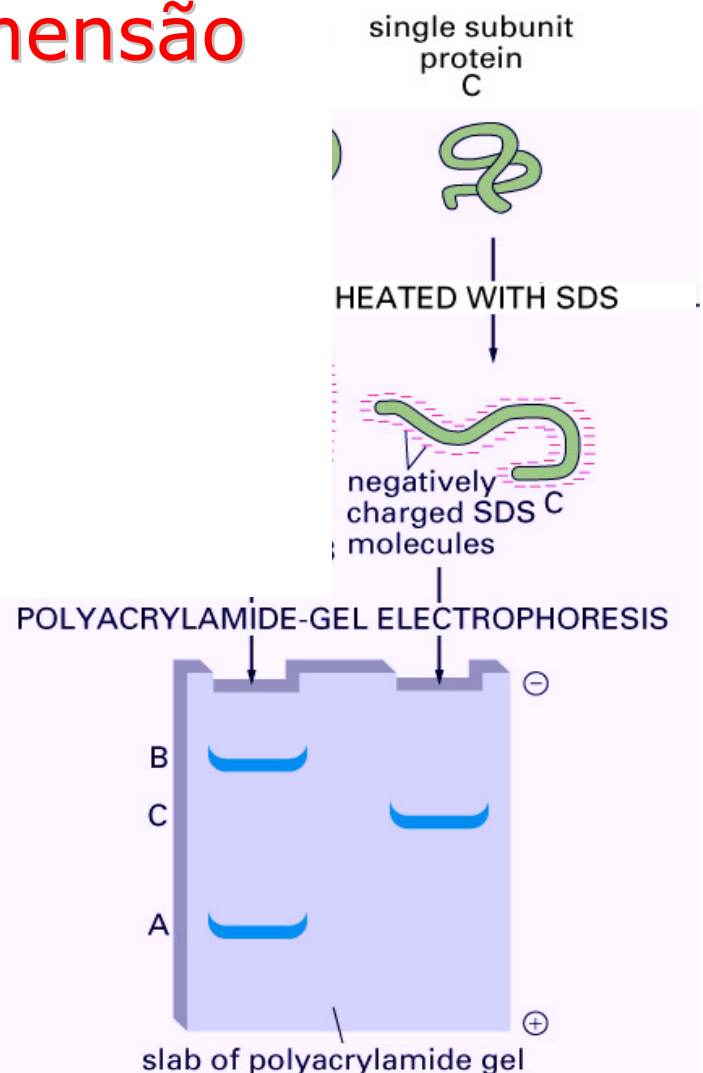
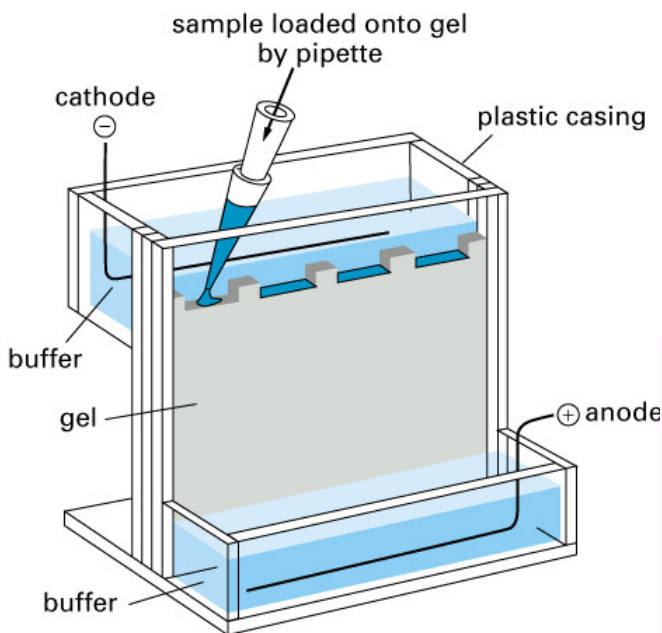
Disappearance of peak is easily detected and protein can be investigated

Proteómica - Geis 2D

1ª Dimensão

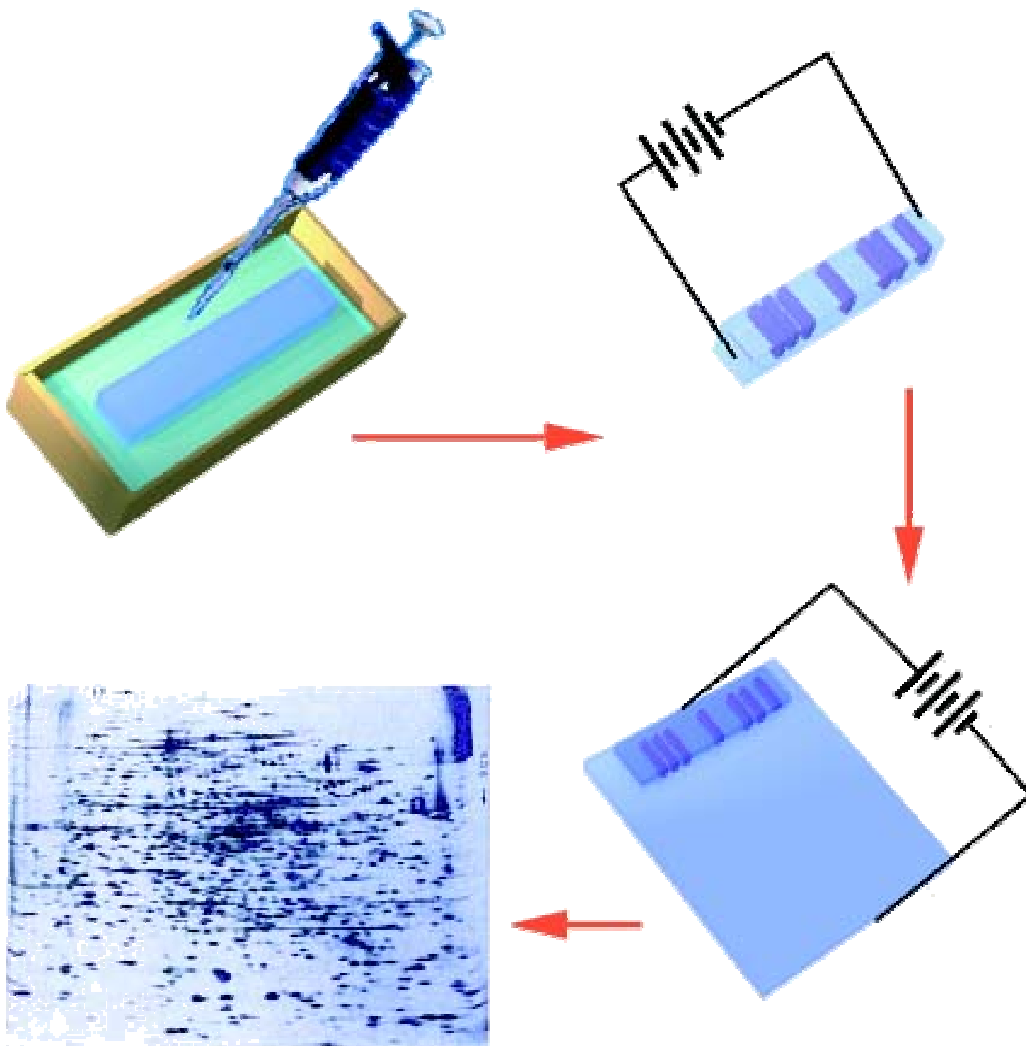


2ª Dimensão

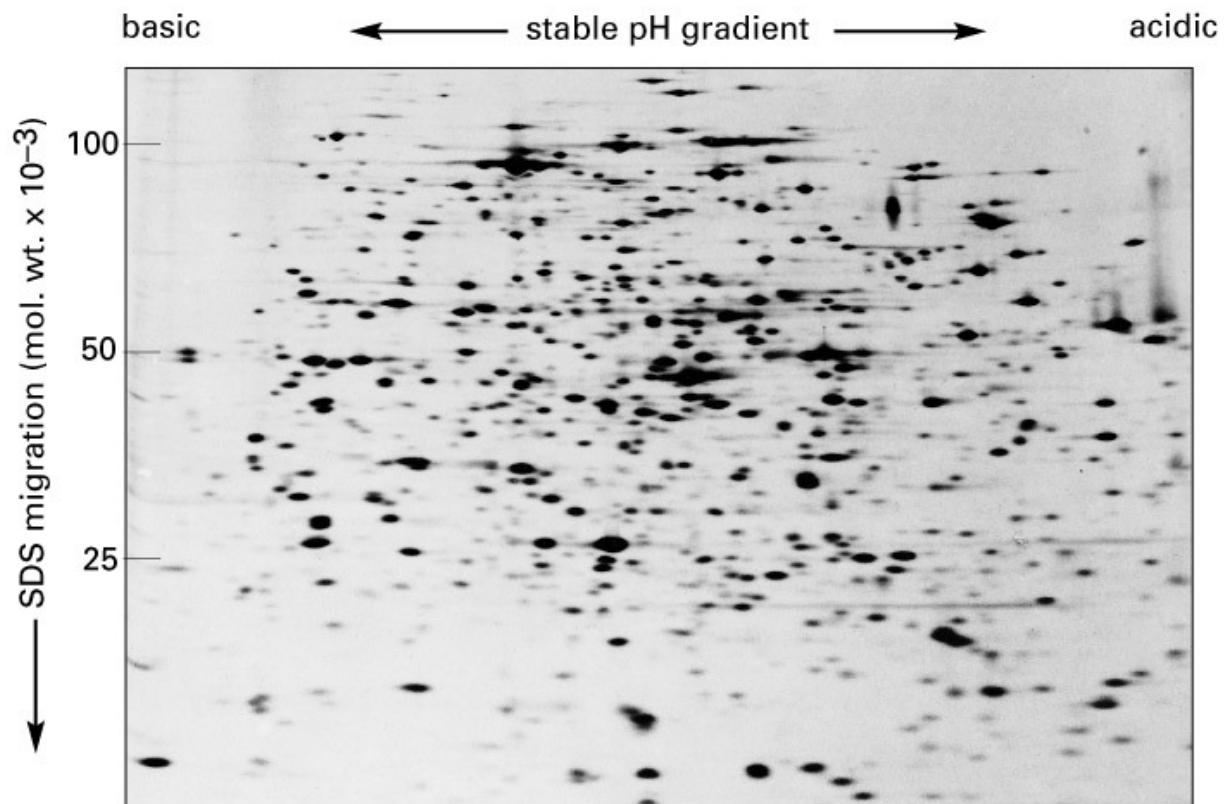


Electroforese em Gel-2D

1. Preparação da amostra.
2. Separação electroforética pela carga (IEF).
3. Separação electroforética pela massa (SDS-PAGE).
4. Coloração / visualização.

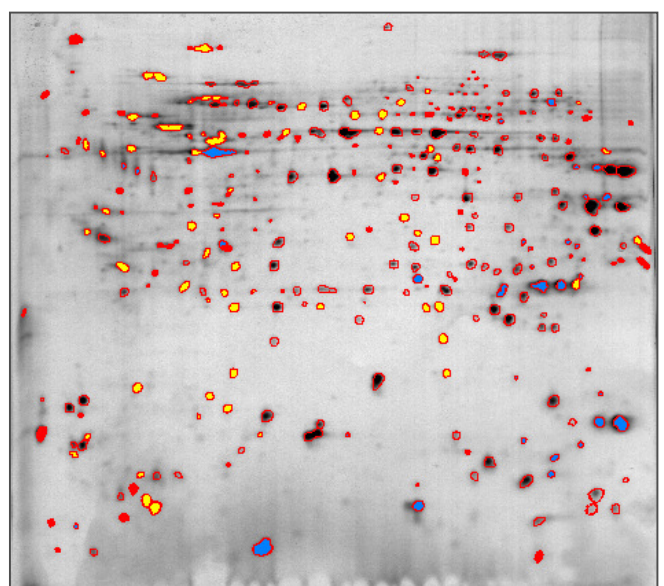
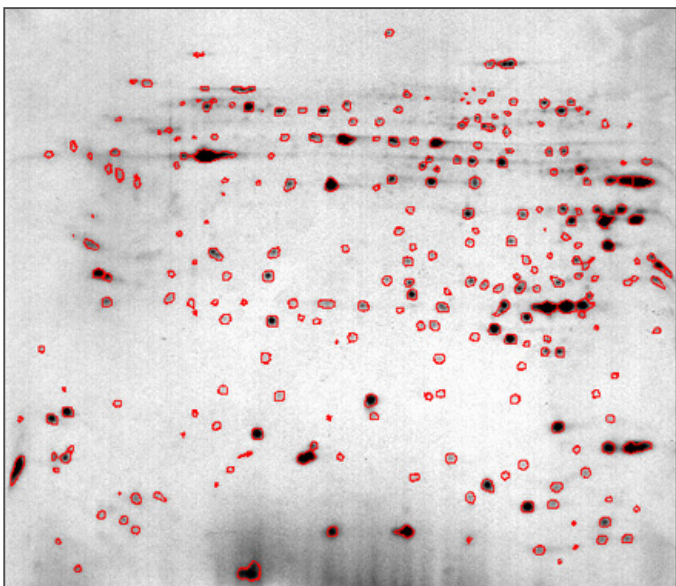


Análise de Mapas 2D

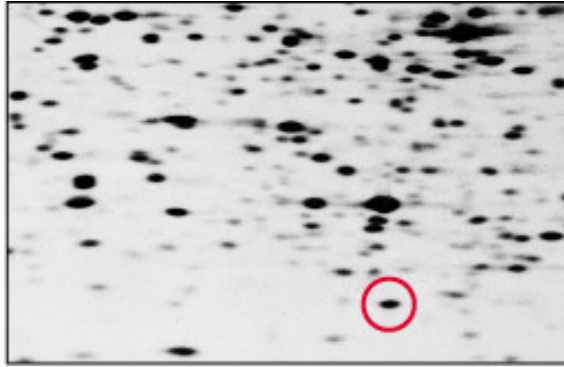


Alberts et al (2002) *Mol Cell Biol* 4/e

Comparação de Mapas 2D



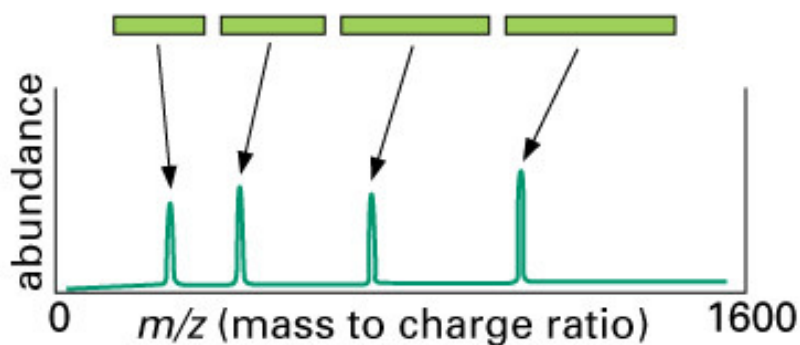
Identificação de Proteínas: Espectrometria de Massa



single protein spot excised from gel

N  C

↓ PEPTIDES RELEASED BY TRYPTIC DIGESTION AND THEIR MASSES MEASURED USING MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

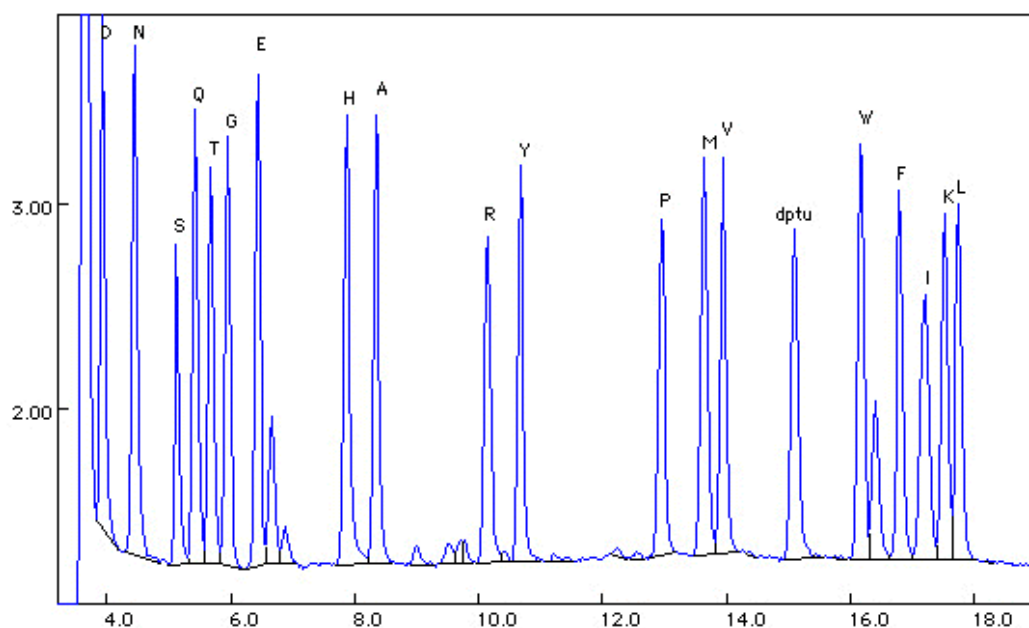


↓ PROTEIN SEQUENCE DATABASES SEARCHED FOR MATCHES WITH THEORETICAL MASSES CALCULATED FOR ALL TRYPSIN-RELEASED PEPTIDES

↓ IDENTIFICATION AND ISOLATION OF CORRESPONDING GENE

Identificação de Proteínas

Degradação de Edman Automática



Proteómica - Aplicações

- ✓ Identificação de marcadores de doenças (diagnóstico).
- ✓ Identificação de proteínas para uso em vacinas (prevenção de doenças).
- ✓ Identificação de alvos moleculares para terapia de doenças (terapêutica).
- ✓ Validação de alvos encontrados por via genómica, a nível proteico.
- ✓ Avaliação de eficácia de drogas.
- ✓ Avaliação de toxicidade de drogas específica de tecido.
- ✓ Validação de modelos animais.
- ✓ Fármaco-proteómica - encontrar a droga certa para o doente certo.
Etc, etc...

Trabalho para Casa...

Veja as Diferenças!



Controlo



Experiência