

Eva Borràs^{1,2} i Eduard Sabidó^{1,2}

¹ Unitat de Proteòmica, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra

² Unitat de Proteòmica, Centre de Regulació Genòmica

Correspondència: Eduard Sabidó. Unitat de Proteòmica CRG/UPF. Carrer del doctor Aiguader, 88.

08003 Barcelona. Adreça electrònica: eduard.sabido@crg.cat.

DOI: 10.2436/20.1501.02.152

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 13/11/2014

Acceptat: 23/02/2015

Resum

La proteòmica basada en espectrometria de masses és una tècnica analítica d'identificació i quantificació de proteïnes que, gràcies als avenços de les últimes dècades, es troba actualment en disposició de resoldre problemes complexos de la biologia molecular i de sistemes. Avui dia s'estan posant les bases per a la consolidació d'aquestes aplicacions i per desenvolupar-les de manera que la proteòmica tingui un impacte real en la medicina personalitzada del futur. Els nous desenvolupaments han fet augmentar significativament la sinergia entre la proteòmica i la biologia molecular, especialment en l'anàlisi de les xarxes de proteïnes i en dinàmiques temporals i espacials. Aquests estudis han permès aprofundir en l'elucidació de mecanismes d'acció i les seves disfuncions, la creació de models de resposta a tractaments, la identificació de biomarcadors per a la classificació i estratificació de pacients, i la concreció de l'impacte de la variabilitat genètica sobre els fenotips observats.

Paraules clau: proteòmica, espectrometria de masses, biologia, medicina personalitzada.

Identificació dels components biològics

Durant les últimes dècades la biologia molecular s'ha centrat en la identificació, enumeració i quantificació de les molècules que componen els organismes vius, incloent-hi el DNA, l'RNA, els metabòlits i les proteïnes. Aquest plantejament ha resultat extremadament efectiu i ha permès avançar significativament en el coneixement dels principals mecanismes de comunicació, resposta i regulació gènica de la cèl·lula.

En aquest context, la proteòmica basada en espectrometria de masses ha tingut un paper rellevant en la identificació sistemàtica de les proteïnes cel·lulars i de les seves modificacions i interaccions. Al llarg dels últims anys s'han fet diversos estudis exhaustius de proteòmica per identificar els components proteics de les cèl·lules i establir la topologia de les vies de senyalització i de les xarxes d'interacció proteïna-proteïna, tant en estats de salut com de malaltia. Aquests esforços han conduït a la publicació recent del primer esborrany del proteoma humà, en el qual s'han identificat més de divuit mil proteïnes diferents i se n'han caracteritzat els patrons d'abundància en la majoria de teixits i òrgans de l'organisme (Kim *et al.*, 2014; Wilhelm *et al.*, 2014).

L'estratègia basada en espectrometria de masses més utilitzada per a la identificació dels components proteics que conformen els sistemes biològics ha estat la *proteòmica de cribratge*. En aquesta estratègia analítica les mesclades de proteïnes es digereixen a pèptids mitjançant una proteasa específica. A continuació, els pèptids se separen mitjançant cromatografia en fase líquida, es converteixen a ions en fase gasosa, i s'analitzen mitjançant un espectròmetre de masses (Steen *et al.*, 2004). En l'espectròmetre de masses, els pèptids es detecten en forma

Proteomics of complex systems

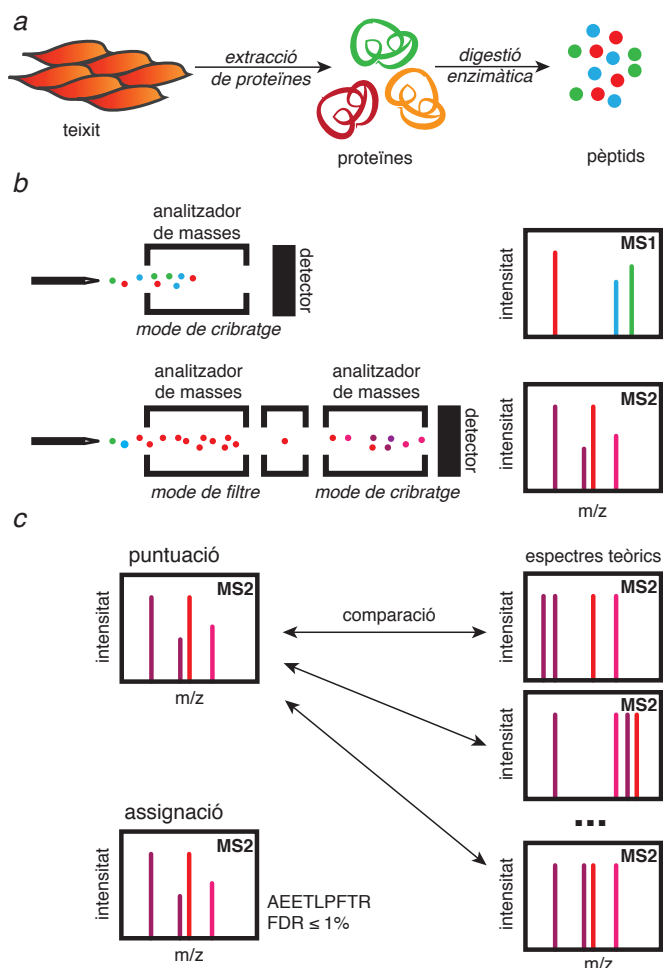
Summary

Mass spectrometry-based proteomics is an analytical technique for the identification and quantification of proteins which, thanks to advances in recent years, is now able to address complex problems in molecular biology and systems biology. Currently, efforts are being conducted to consolidate these applications and to further develop in order for proteomics to have a real impact on the future of personalized medicine. New developments have significantly increased the synergy between proteomics and molecular biology, especially in the analysis of protein networks and their temporal and spatial dynamics. These studies have allowed the elucidation of certain mechanisms of action and their dysfunctions, the creation of models of response to treatment, the identification of biomarkers for patient stratification and classification, and the assessment of the impact of genetic variation on the observed phenotypes.

Keywords: proteomics, mass spectrometry, biology, personalized medicine.

d'ions en una primera exploració, i els ions més abundants se seleccionen automàticament per fragmentar-los i detectar posteriorment els fragments peptídics. Per poder identificar els pèptids presents en una mostra els espectres de fragmentació obtinguts es comparen amb espectres de fragmentació teòrica generats a partir d'una base de dades, i la identificació de les proteïnes s'aconsegueix assignant les seqüències peptídiques a les seves proteïnes corresponents (vegeu la figura 1). Aquesta tècnica té la capacitat d'identificar milers de proteïnes en qualsevol tipus cel·lular o organisme, i per tant, proporciona una àmplia visió sobre la complexitat i la composició de la mostra estudiada, així com una estimació de l'abundància relativa de les proteïnes identificades i de les seves modificacions. La proteòmica de cribratge no requereix cap coneixement previ sobre la composició de la mostra i ha estat durant molt temps el mètode preferit en els estudis biològics que requereixen una elevada cobertura del proteoma.

Una de les aplicacions més rellevants de la proteòmica basada en espectrometria de masses ha estat l'estudi de les modificacions post-traduccionals de proteïnes, com ara la fosforilació, i el seu impacte en les xarxes de senyalització cel·lular, en l'activitat i la localització de les proteïnes, i en la determinació de les interaccions amb altres macromolècules (Christophorou *et al.*, 2014). Tradicionalment, l'estat de fosforilació de les proteïnes s'ha determinat mitjançant mètodes bioquímics basats en anticossos (per exemple, transferència Western), però aquestes tècniques es veuen limitades a uns pocs analits per als quals hi ha anticossos disponibles. En canvi, l'espectrometria de masses ofereix la capacitat d'identificar un gran nombre de proteïnes i els llocs específics de fosforilació, i proporciona així una informació



↑ **Figura 1.** Esquema general de la identificació de components proteòmics de cribratge. *a*) Inicialment s'extreuen les proteïnes de les mostres biològiques, i s'obté una mescla de pèptids mitjançant la digestió de les proteïnes amb una proteasa específica, típicament tripsina. *b*) La mescla peptídica se separa per cromatografia en fase líquida, i els pèptids entren a l'espectròmetre de masses, en el qual es detecten en forma d'ions en una primera exploració (MS1) i, a continuació, els ions més abundants se seleccionen automàticament per fragmentar-los i detectar-los posteriorment (MS2). *c*) Finalment, els espectres de fragmentació obtinguts es puntuen segons la seva similitud amb espectres de fragmentació teòrics generats a partir d'una base de dades, i cada espectre s'assigna a una seqüència peptídica amb una determinada probabilitat. Els errors d'assignació es controlen a escala d'experiment mitjançant el control de falsos positius (FDR).

més precisa, i alhora, una visió global de l'estat de fosforilació de la cèl·lula.

La identificació de fosfopèptids per espectrometria de masses ha estat tradicionalment difícil a causa de la seva naturalesa subestequiomètrica i transitòria, així com de les seves propietats cromatogràfiques i del seu patró de fragmentació. Per fer front a aquestes particularitats, s'han desenvolupat diferents tècniques per detectar pèptids fosforilats amb elevada sensibilitat, com ara *a*) mètodes d'enriquiment de fosfopèptids utilitzant òxids de metall; *b*) estratègies de fraccionament extens de la mostra utilitzant cromatografia líquida, i *c*) l'establiment de nous mètodes d'adquisició d'espectrometria de masses desenvolupats específicament per als pèptids fosforilats. Aquests esforços, juntament

amb el ràpid avenç de la tecnologia en el camp de l'espectrometria de masses, han permès la identificació i quantificació de milers de fosfopèptids en sistemes complexos. Per exemple, un estudi recent ha permès la identificació de més de vint mil llocs de fosforilació en cèl·lules canceroses humanes utilitzant diferents estratègies ortogonals de fraccionament cromatogràfic (cromatografia d'intercanvi catiònic, cromatografia basada en interaccions hidrofòbiques i cromatografia de fase inversa) en combinació amb tècniques d'enriquiment de fosfopèptids (Zhou *et al.*, 2013).

De manera similar, hi ha estudis recents en la caracterització d'interaccions proteïna-proteïna per a la caracterització de complexos proteïcs i xarxes d'interacció. Dos dels exemples més il·lustratius han estat la utilització de l'espectrometria de masses combinada amb tècniques d'entrecreuament químic per a la caracterització estructural del ribosoma mitocondrial de mamífers (Greber *et al.*, 2014a, b), i la identificació dels components i interactors implicats en la via de senyalització *Hippo* que controla el creixement d'òrgans en metazous mitjançant la regulació de la proliferació cel·lular i l'apoptosi (Hauri *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2013).

Assignació funcional dels components biològics

Aquests estudis han evidenciat el potencial de l'espectrometria de masses de cribratge per identificar milers de pèptids i proteïnes, i caracteritzar-ne les modificacions posttraduccionals i les interaccions moleculars. Tanmateix, quan es tracta d'assignar un significat funcional a les proteïnes i a les seves modificacions, o establir mecanismes d'acció que expliquin respostes cel·lulars heterogènies a un determinat tractament, la identificació dels components del sistema no és suficient, i cal estudiar els sistemes biològics de manera dinàmica i quantitativa (vegeu la figura 2).

Amb l'objectiu de caracteritzar funcionalment les xarxes moleculars, diversos estudis d'espectrometria de masses han abordat la dinàmica tant en vies de senyalització com en les interaccions proteïna-proteïna sota diferents tipus de perturbacions. Aquests experiments van més enllà de la identificació dels components biològics en condicions basals i combinen la identificació d'alt rendiment amb tècniques de quantificació per comparar canvis en les modificacions posttraduccionals i en les interaccions entre proteïnes durant els diferents estats. A tall d'exemple, s'han utilitzat diverses tècniques de proteòmica quantitativa, com el marcatge isotòpic a escala cel·lular o la quantificació lliure de marcatge, per discernir els efectes de la insulina sobre l'estat de fosforilació cel·lular (Monetti *et al.*, 2011), per estudiar la progressió del càncer de pell en ratolins (Zanivan *et al.*, 2013), per estudiar la dinàmica del fosfoproteoma en resposta al dany cel·lular (Bensimon *et al.*, 2010), o per establir les diferències en els mecanismes de resposta induïda pel contacte entre cèl·lules (Jørgensen *et al.*, 2009) o per factors de creixement (Kiel *et al.*, 2014, 2013). Així mateix, també s'ha estudiat la dinàmica del proteoma i les seves fosforilacions al llarg del cicle cel·lular en cèl·lules de mamífer (Olsen *et al.*, 2010), i recentment, s'han utilitzat diverses soques mutants de llevat per elucidar el mecanisme d'eliminació de proteïnes mal plegades de la membrana interna nuclear (Foresti *et al.*, 2014).

Altres estudis han abordat la dinàmica de diferents modificacions posttraduccionals més enllà de la fosforilació, com ara l'acetilació i la ubiquitinació. De fet, el progrés en la identificació i quantificació mitjançant espectrometria de masses de les modificacions en lisines ha permès avançar en la comprensió del complex vincle entre l'acetilació

de lisina i el metabolisme celular, i ha refermat el paper actiu del metabolisme en els mecanismes de regulació de processos cel·lulars (Choudhary *et al.*, 2014; Henriksen *et al.*, 2012; Weinert *et al.*, 2014).

Finalment, cal destacar que en l'àmbit de les xarxes d'interacció proteïna-proteïna també s'ha explorat la dinàmica de les interaccions després d'un determinat estímul o pertorbació. En aquest sentit, diversos estudis han caracteritzat la composició de determinats complexos, com per exemple el complex de la ligasa Cullin-Ring (Bennett *et al.*, 2010), la xarxa d'interacció de Grb2 (Bisson *et al.*, 2011), o els components del sistema 14-3-3 (Collins *et al.*, 2013), en resposta al tractament cel·lular amb inhibidors o efectors de diverses vies de senyalització.

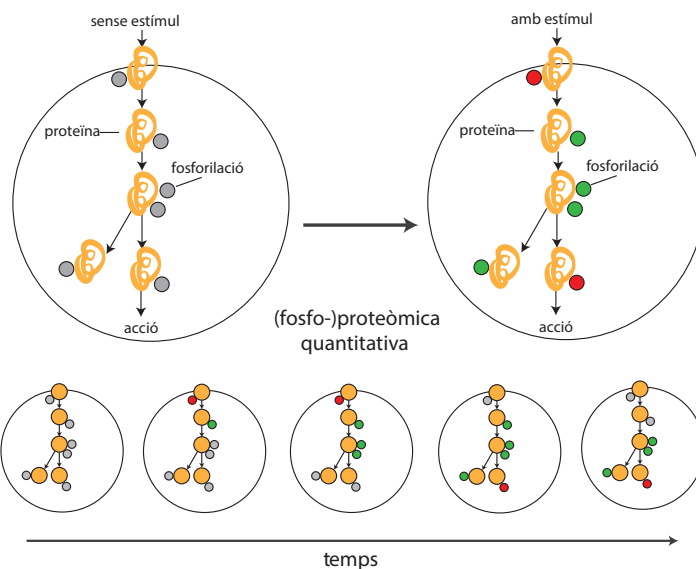
Proteòmica dirigida i xarxes moleculars

L'anàlisi de les molècules biològiques en un context en xarxa —ja sigui en forma de xarxa d'interactors o de vies de senyalització— contrasta amb la visió clàssica de considerar les molècules de manera aïllada, i aborda l'estudi dels sistemes biològics des d'una perspectiva integradora amb l'objectiu de capturar les propietats emergents del sistema. L'estudi de la biologia com a xarxa de molècules que interaccionen físicament i funcionalment entre si es coneix generalment com a biologia de sistemes.

Aquest nou paradigma en el qual els processos biològics complexos s'estudien com a xarxes moleculars dinàmiques permet fer front a la complexitat inherent als sistemes biològics, i juntament amb els estudis de biomarcadors i de l'efecte dels polimorfismes genètics en el fenotip cel·lular, té gran rellevància clínica en l'avenç de la medicina personalitzada. Més enllà de la comparació entre un estat pertorbat i una condició basal, els estudis basats en la consideració del sistema com un tot permeten augmentar significativament la quantitat d'informació recuperada dels conjunts de dades disponibles. D'aquesta manera, permeten la identificació de diferències en la resposta cel·lular i milloren la predicció de la resposta de determinats tumors als fàrmacs, i l'eficàcia de teràpies de combinacions de medicaments, entre d'altres.

Per desxifrar la complexitat biològica, aquests tipus d'estudis solen utilitzar dissenys experimentals del tipus estímul-senyal-resposta que requereixen múltiples pertorbacions i diferents punts temporals. Així, aquests estudis introdueixen limitacions i reptes específics d'anàlisi, entre els quals cal destacar la necessitat *a)* d'identificar i quantificar un nombre elevat d'anàlits en totes les condicions analitzades, i *b)* d'anàlitzar un elevat nombre de mostres atès l'alt nombre de condicions experimentals. Per tant, aquests estudis requereixen mètodes sensibles, específics, i d'alt rendiment d'anàlisi que permetin quantificar les proteïnes, els pèptids, i en especial els pèptids fosforilats (o altrament modificats) en un gran nombre de mostres complexes diferents.

És evident que la proteòmica de cribratge ha contribuït significativament al desenvolupament del paradigma de la biologia de sistemes. Tanmateix, la proteòmica de cribratge presenta algunes limitacions quan es compara un elevat nombre de mostres, principalment per l'existència d'una certa estocasticitat de mostreig durant la selecció dels ions peptídics per a la fragmentació que tendeix a generar conjunts de dades incomplets i inconsistents (Rifai *et al.*, 2006). Aquesta limitació s'ha resolt utilitzant principalment l'anomenada *proteòmica dirigida*, en la qual un nombre reduït d'anàlits es quantifica en múltiples mostres. Aquesta nova estratègia difereix dels mètodes de cribratge pel seu rendiment analític en termes de reproductibilitat, rang dinàmic i límit de detecció, i ha esdevingut el mètode preferit per a la quantificació reproducible de pèptids i proteïnes en un gran conjunt de mostres o con-

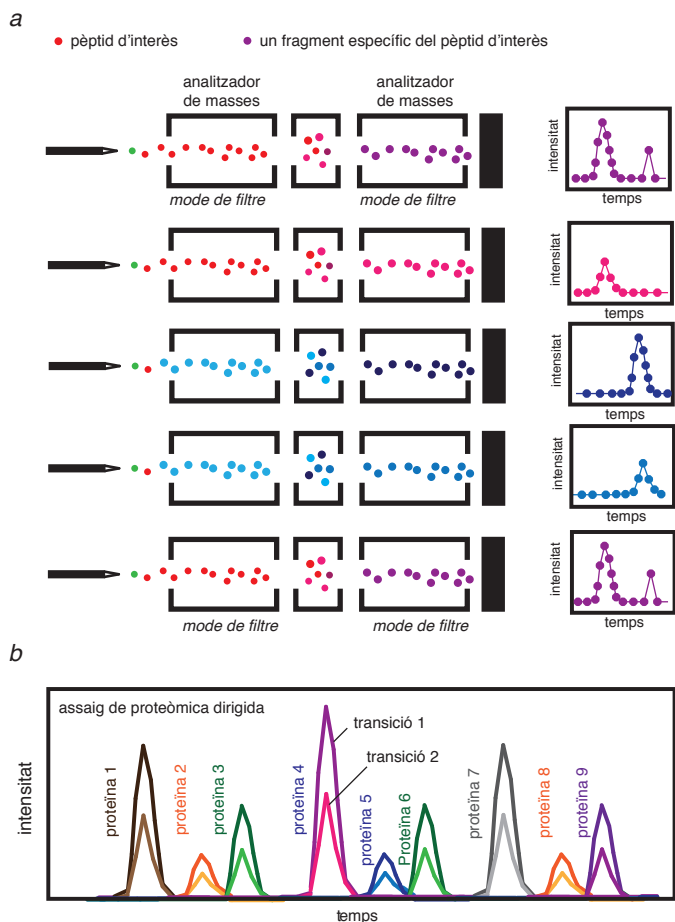


↑ Figura 2. Exemple d'estudi d'un sistema biològic complex de manera dinàmica i quantitativa. Concretament, s'exemplifica la identificació i quantificació dels llocs de fosforilació d'una via de senyalització a diferents temps després de l'aplicació d'un estímul concret. En l'exemple, gris: fosforilació que no canvia respecte a les condicions basals; verd: augment de la fosforilació; vermell: disminució de la fosforilació. Aquests estudis permeten l'assignació funcional de les modificacions posttraduccionals de les proteïnes.

dicions experimentals, tal com requereixen els estudis de biologia de sistemes i de validació de biomarcadors.

Les principals estratègies de la proteòmica dirigida es corresponen amb els mètodes de *supervisió de fragments* (*selected reaction monitoring* o SRM), i els mètodes *d'adquisició independent de dades* (*data independent acquisition* o DIA) com ara els anomenats MSX (Egertson *et al.*, 2013) i SWATH (Gillet *et al.*, 2012). En aquests mètodes l'objectiu és identificar i quantificar en les mostres d'interès un conjunt de proteïnes seleccionades segons una hipòtesi. Per això, cal especificar els pèptids adients ja sigui abans (SRM) o després de l'adquisició de dades —DIA.

El mètode de *supervisió de fragments* (o SRM, vegeu la figura 3) és una tècnica d'espectrometria de masses dirigida en la qual s'analitzen simultàniament un conjunt de pèptids prèviament seleccionats per quantificar-los. Aquesta tècnica es fa generalment en instruments de tipus triple quadrupol en els quals se seleccionen ions peptídics específics en el primer analitzador de masses —primer quadrupol—, que es fragmenten dins la cella de col·lisió —segon quadrupol— i, a continuació, se selecciona un fragment peptídic predeterminat en el tercer quadrupol i el seu senyal és registrat pel detector al llarg del temps. Cada parell d'ió peptídic i fragment s'anomena *transició*, i per identificar i quantificar de manera conclouent un pèptid en una mostra complexa es mesuren múltiples transicions de manera coordinada. Típicament de tres a cinc fragments per pèptid i d'un a cinc pèptids per proteïna constitueixen un assaig per a la quantificació definitiva d'una proteïna en una mostra. El mètode de supervisió de fragments és un mètode atractiu per quantificar de manera consistent un conjunt de proteïnes en diverses condicions experimentals. És per això que s'empra en estudis de proteòmica clínica com a mètode de validació de biomarcadors i en estudis de biologia de sistemes, ja que permet analitzar uns pocs anàlits en un gran volum de mostres biològiques. Tanmateix, aquest mètode requereix el coneix-



.....
 † **Figura 3.** a) Esquema d'un espectròmetre de masses de tipus triple quadrupol operat en mode de supervisió de fragments, en el qual se supervisen dos fragments de cadascun dels dos pèptids seleccionats —vermell i blau— de manera seqüencial. Els ions peptídics se seleccionen en el primer analitzador de masses, mentre que els fragments se seleccionen en l'últim analitzador de masses. b) Esquema d'un assaig de proteòmica dirigida per a la quantificació de nou pèptids corresponents a nou proteïnes preseleccionades en el sèrum d'un pacient.

ment previ de les característiques cromatogràfiques i de fragmentació de cada pèptid que es vol mesurar, incloent-hi valors com la massa de l'ió peptídic i dels seus fragments, la intensitat de senyal relativa de cada fragment en l'espectre i el temps de retenció de cada pèptid (Lange *et al.*, 2008). Per aquest motiu, s'han fet esforços per determinar, en diferents tipus d'espectròmetres de masses, els patrons de fragmentació dels pèptids que representen totes les proteïnes conegudes d'un proteoma. Aquests espectres de referència s'utilitzen per crear assajos dirigits que després es compilen en bases de dades públiques com SRMATlas (Kusebauch *et al.*, 2014). Actualment, s'han generat i posat a disposició de la comunitat científica espectres de referència per a tot el proteoma de llevat (Picotti *et al.*, 2013) i de cèl·lules humanes (Rosenberger *et al.*, 2014). Els assajos de proteòmica dirigida per SRM estan recolzats per un ampli ventall d'eines computacionals que permeten automatitzar la selecció de pèptids, el desenvolupament de l'anàlisi i optimització, i l'avaluació de les dades (Chang *et al.*, 2012, 2014; Reiter *et al.*, 2011; Röst *et al.*, 2012).

El mètode SRM requereix el desenvolupament d'assajos específics

per a cada proteïna d'interès i té una limitació en el nombre de proteïnes que poden ser analitzades en una única injecció. Malgrat que aquestes limitacions no solen restringir els estudis de validació de biomarcadors, sí que poden reduir l'abast d'estudis d'elucidació de mecanismes cel·lulars o de l'impacte dels polimorfismes genètics en el proteoma. Per superar aquestes limitacions, han aparegut noves estratègies de proteòmica dirigida d'alt rendiment que permeten adquirir, potencialment, dades per a totes les proteïnes de la mostra, i posteriorment contrastar hipòtesis concretes mitjançant l'extracció d'informació per a les proteïnes d'interès. Aquests mètodes s'anomenen *mètodes d'adquisició independent de dades* (DIA) i operen a través de l'enregistrament cíclic de finestres d'aïllament peptídic que cobreixen tot el rang de masses. Per tant, en aquesta aproximació no és necessari tenir cap coneixement previ dels pèptids a mesurar sinó que el mètode registra, en una sola injecció, tots els fragments que deriven de qualsevol pèptid present a la mostra, i crea, doncs, un mapa complet d'ions de fragments. L'anàlisi de dades consisteix a extreure la informació quantitativa de tots els fragments d'un conjunt de pèptids d'interès gràcies a la informació relativa a la intensitat de cada fragment, la concurrència cromatogràfica, i altra informació disponible en la biblioteca espectral de referència. El gran atractiu d'aquestes *estratègies d'adquisició independent de dades* és que un mateix conjunt de dades pot ser interrogat il·limitadament per contrastar diferents hipòtesis. Així doncs, és possible reanalitzar les mateixes dades de manera iterativa per interrogar, per exemple, noves vies de senyalització o modificacions posttraduccionals *a posteriori* a partir d'un conjunt de dades adquirides un sol cop i per sempre.

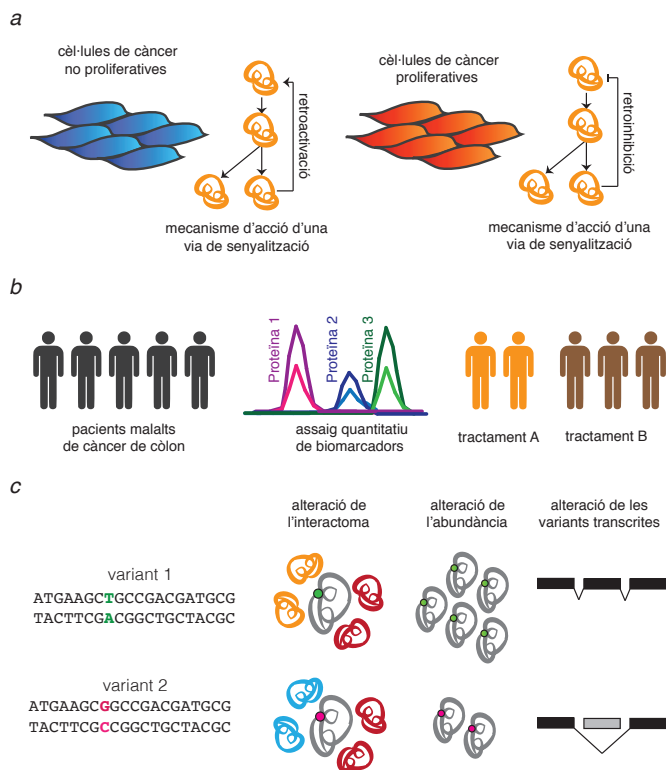
Medicina personalitzada i proteòmica de la malaltia

Les noves estratègies de proteòmica dirigida com ara els mètodes de *supervisió de fragments*, i *d'adquisició independent de dades*, han introduït de ple la proteòmica basada en espectrometria de masses en el camp del diagnòstic clínic i la recerca aplicada, a causa de la capacitat de poder identificar i quantificar un conjunt de proteïnes seleccionades en un elevat nombre de mostres d'interès.

En moltes ocasions la comprensió de la malaltia humana es limita a les principals característiques clíniques i als mecanismes moleculars comuns, mentre que es desconeixen els mecanismes moleculars específics que causen l'heterogeneïtat en el desenvolupament individual d'una certa malaltia o en la resposta al tractament. L'exemple paradigmàtic d'aquesta variabilitat en el desenvolupament i la resposta entre individus és el càncer. En aquest cas, els marcadors genètics es poden utilitzar per determinar la predisposició al desenvolupament de tumors, però en la majoria dels casos no es disposa encara d'estratègies concretes i personalitzades que millorin el pronòstic del pacient. Aquestes estratègies de medicina personalitzada es desenvolupen mitjançant l'aplicació de la investigació bàsica en el tractament clínic per tal d'elucidar els mecanismes moleculars subjacents a respostes heterogènies, identificar nous biomarcadors per al diagnòstic, prognosi i estratificació de pacients, i avaluar l'impacte de la variabilitat genètica individual en la funcionalitat del proteoma (vegeu la figura 4).

Diversos estudis han utilitzat la proteòmica dirigida per determinar canvis específics en el proteoma de models animals en malalties d'etiologia complexa com és el cas de la síndrome metabòlica (Sabidó *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). De manera similar, la proteòmica dirigida també s'ha utilitzat exhaustivament per a la identificació i validació de proteïnes que ajudin en el diagnòstic o pronòstic de malalties així com de proteïnes que permetin la classificació i estratificació de

♦ Figura 4. Exemples de tres de les principals aplicacions de la proteòmica en el camp de la medicina personalitzada i la malaltia. a) Les tècniques actuals de proteòmica permeten elucidar els mecanismes moleculars —retroactivació i retroinhibició— que expliquin respostes heterogènies d'un mateix tipus de cèl·lules —no-proliferació enfront de proliferació. b) Creació i validació d'assajos de biomarcadors que facilitin l'estratificació dels pacients i millorin l'elecció dels tractaments. c) Avaluació de l'impacte de la variabilitat genètica individual en la funcionalitat del proteoma. Certes mutacions o variants genètiques (per exemple, mutació verda/rosa) poden conduir a una alteració en les interaccions proteïna-proteïna, a una alteració de l'abundància de certes proteïnes, o a l'alteració de les variants transcrites i finalment traduïdes a proteïna.



pacients afectats per una determinada malaltia (Drabovich *et al.*, 2013; Niederkofler *et al.*, 2013; Borràs *et al.*, 2016). En aquest aspecte cal destacar els esforços en la identificació de marcadors proteics associats al nivell d'agressivitat del càncer de pròstata per minimitzar l'excés de tractament en pacients amb tumors no agressius. Dos estudis recents han utilitzat un enfocament de proteòmica dirigida (SRM i SWATH) amb l'objectiu de detectar signatures proteiques que permetin predir la progressió futura d'un càncer de pròstata en pacients i així millorar l'elecció de tractament en cadascun dels pacients analitzats (Cima *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

Bibliografia

- BENNETT, E. J. [et al.] (2010). «Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics». *Cell*, 143: 951-965.
- BENSIMON, A. [et al.] (2010). «ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage». *Sci. Signal*, 3: rs3.
- BISSEON, N. [et al.] (2011). «Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor». *Nat. Biotechnol.*, 29: 653-658.
- BORRÀS, E. [et al.] (2016). «Protein based classifier to predict conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis». *Mol. Cell Proteomics*, 15 (1): 318-328.
- CHANG, C.-Y. [et al.] (2012). «Protein significance analysis in selected reaction monitoring (SRM) measurements». *Mol. Cell Proteomics*, 11: M111.014662.

Recentment, el consorci CPTAC (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium) ha dut a terme un estudi en el qual s'han analitzat per proteòmica de cribratge cèl·lules procedents de desenes de tumors col·rectals humans i s'ha determinat l'impacte de les alteracions genètiques en la funció proteica (Zhang *et al.*, 2014). La integració de les dades proteòmiques i genòmiques —o proteogenòmica— ofereix una visió més completa de les característiques biològiques de la mostra, ja que, tal com destaca aquest estudi, l'abundància de RNA missatger no prediu de manera fiable l'abundància de proteïnes, a causa de l'existència de punts de regulació localitzats entre l'RNA sintetitzat i la traducció a proteïna. Així mateix, aquest estudi va identificar dianes potencials per al diagnòstic i la intervenció terapèutica, i va identificar cinc subtipus de càncer de col·lon no obvis a partir de les dades genètiques. Aquest tipus d'estudis permeten entendre millor els mecanismes moleculars subjacents a les malalties i els marcadors proteics que es desenvolupin podran ser utilitzats en un futur per al diagnòstic i la classificació de pacients segons la seva capacitat de resposta a determinats tractaments.

Finalment, l'estudi dels polimorfismes i el seu impacte en el fenotip s'ha ampliat amb alguns treballs mitjançant l'anàlisi de trets quantitius a escala de proteïna (*protein quantitative trait loci* o pQTL) (Picotti *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013, 2014; Engelken *et al.*, 2015), actualment factibles gràcies a la capacitat de la proteòmica dirigida d'analitzar múltiples analits de manera sistemàtica en un nombre elevat de mostres.

Corollari

La proteòmica basada en espectrometria de masses és una tècnica analítica d'identificació i quantificació de proteïnes que, gràcies als avenços de les últimes dècades, es troba actualment en disposició de resoldre problemes complexos de la biologia molecular i de sistemes. Així mateix, avui dia s'estan posant les bases per a la consolidació d'aquestes aplicacions i perquè la proteòmica tingui un impacte real en la medicina personalitzada del futur. Els nous desenvolupaments han fet augmentar significativament la sinergia entre la proteòmica i la biologia molecular, especialment en l'anàlisi de les xarxes pertorbades i en dinàmiques temporals i espacials. Aquests estudis han permès aprofundir en l'elucidació de mecanismes d'acció i les seves disfuncions, la creació de models de resposta a tractaments, la identificació de biomarcadors per a la classificació i estratificació de pacients, i la concreció de l'impacte de la variabilitat genètica sobre els fenotips observats.

Aquests avenços són un pas ferm en la utilització de la proteòmica en la resolució de problemes biològics complexos. Tanmateix, l'aprofundiment en tècniques d'anàlisi que permetin la quantificació sistemàtica, no només de l'abundància de proteïnes, sinó també de les seves modificacions i variants naturals, serà essencial per augmentar la capacitat d'anàlisi del proteoma i, en definitiva, per fer de la proteòmica una tècnica fonamental per a l'avenç en la medicina personalitzada i en la biologia molecular.

- (2014). «Targeted protein quantification using sparse reference labeling». *Nat. Methods*, 11: 301-304.
- CHOUDHARY, C. [et al.] (2014). «The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15: 536-550.
- CHRISTOPHOROU, M. A. [et al.] (2014). «Citruination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin». *Nature*, 507: 104-108.
- CIMA, I. [et al.] (2011). «Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 3342-3347.
- COLLINS, B. C. [et al.] (2013). «Quantifying protein interaction dynamics by SWATH mass spectrometry: application to the 14-3-3 system». *Nat. Methods*, 10: 1246-1253.

- DRABOVICH, A. P. [et al.] (2013). «Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma». *Sci. Transl. Med.*, 5: 212ra160.
- EGERTSON, J. D. [et al.] (2013). «Multiplexed MS/MS for improved data-independent acquisition». *Nat. Methods*, 10: 744-746.
- ENGELKEN, J. [et al.] (2015). «Signatures of evolutionary adaptation in quantitative trait loci influencing trace elements homeostasis in liver». *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/msv267.
- FORESTI, O. [et al.] (2014). «Quality control of inner nuclear membrane proteins by the Asi complex». *Science*, 346: 751-755.
- GILLET, L. C. [et al.] (2012). «Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis». *Mol. Cell Proteomics*, 11: O111.016717.
- GREBER, B. J. [et al.] (2014a). «The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome». *Nature*, doi:10.1038/nature13895.
- (2014b). «Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome». *Nature*, 505: 515-519.
- HAURI, S. [et al.] (2013). «Interaction proteome of human Hippo signaling: modular control of the co-activator YAP1». *Mol. Syst. Biol.*, 9: 713.
- HENRIKSEN, P. [et al.] (2012). «Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol. Cell Proteomics*, 11: 1510-1522.
- JØRGENSEN, C. [et al.] (2009). «Cell-specific information processing in segregating populations of Eph receptor ephrin-expressing cells». *Science*, 326: 1502-1509.
- KIEL, C. [et al.] (2013). «Integration of protein abundance and structure data reveals competition in the ErbB signaling network». *Sci. Signal*, 6: ra109.
- (2014). «Quantification of ErbB network proteins in three cell types using complementary approaches identifies cell-general and cell-type-specific signaling proteins». *J. Proteome Res.*, 13: 300-313.
- KIM, M.-S. [et al.] (2014). «A draft map of the human proteome». *Nature*, 509: 575-581.
- KUSEBAUCH, U. [et al.] (2014). «Using PeptideAtlas, SRMAtlas, and PASSEL: comprehensive resources for discovery and targeted proteomics». *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 46: 13.25.1-13.25.28.
- KWON, Y. [et al.] (2013). «The Hippo signaling pathway interactome». *Science*, 342: 737-740.
- LANGE, V. [et al.] (2008). «Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial». *Mol. Syst. Biol.*, 4: 222.
- LIU, Y. [et al.] (2014). «Glycoproteomic analysis of prostate cancer tissues by SWATH mass spectrometry discovers N-acyl ethanolamine acid amidase and protein tyrosine kinase 7 as signatures for tumor aggressiveness». *Mol. Cell Proteomics*, 13: 1753-1768.
- MONETTI, M. [et al.] (2011). «Large-scale phosphosite quantification in tissues by a spike-in SILAC method». *Nat. Methods*, 8: 655-658.
- NIEDERKOFER, E. [et al.] (2013). «Targeted selected reaction monitoring mass spectrometric immunoassay for insulin-like growth factor 1». *PLoS One*, 8: e81125.
- OLSEN, J. V. [et al.] (2010). «Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis». *Sci. Signal*, 3: ra3.
- PICOTTI, P. [et al.] (2013). «A complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis». *Nature*, 494: 266-270.
- REITER, L. [et al.] (2011). «mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments». *Nat. Methods*, 8: 430-435.
- RIFAI, N. [et al.] (2006). «Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility». *Nat. Biotechnol.*, 24: 971-983.
- ROSENBERGER, G. [et al.] (2014). «A repository of assays to quantify 10,000 human proteins by SWATH-MS». *Scientific Data*, doi:10.1038/sdata.2014.31.
- RÖST, H. [et al.] (2012). «A computational tool to detect and avoid redundancy in selected reaction monitoring». *Mol. Cell Proteomics*, 11: 540-549.
- SABIDÓ, E. [et al.] (2013). «Targeted proteomics reveals strain-specific changes in the mouse insulin and central metabolic pathways after a sustained high-fat diet». *Mol. Syst. Biol.*, 9: 681.
- STEEN, H. [et al.] (2004). «The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 699-711.
- WEINERT, B. T. [et al.] (2014). «Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol. Syst. Biol.*, 10: 716.
- WILHELM, M. [et al.] (2014). «Mass-spectrometry-based draft of the human proteome». *Nature*, 509: 582-587.
- WU, L. [et al.] (2013). «Variation and genetic control of protein abundance in humans». *Nature*, 499: 79-82.
- WU, Y. [et al.] (2014). «Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population». *Cell*, 158: 1415-1430.
- ZANIVAN, S. [et al.] (2013). «In vivo SILAC-based proteomics reveals phosphoproteome changes during mouse skin carcinogenesis». *Cell Rep.*, 3: 552-566.
- ZHANG, B. [et al.] (2014). «Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer». *Nature*, 513: 382-387.
- ZHOU, H. [et al.] (2013). «Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome». *J. Proteome Res.*, 12: 260-271.