

HER2

*Un paradigma
en evolución*

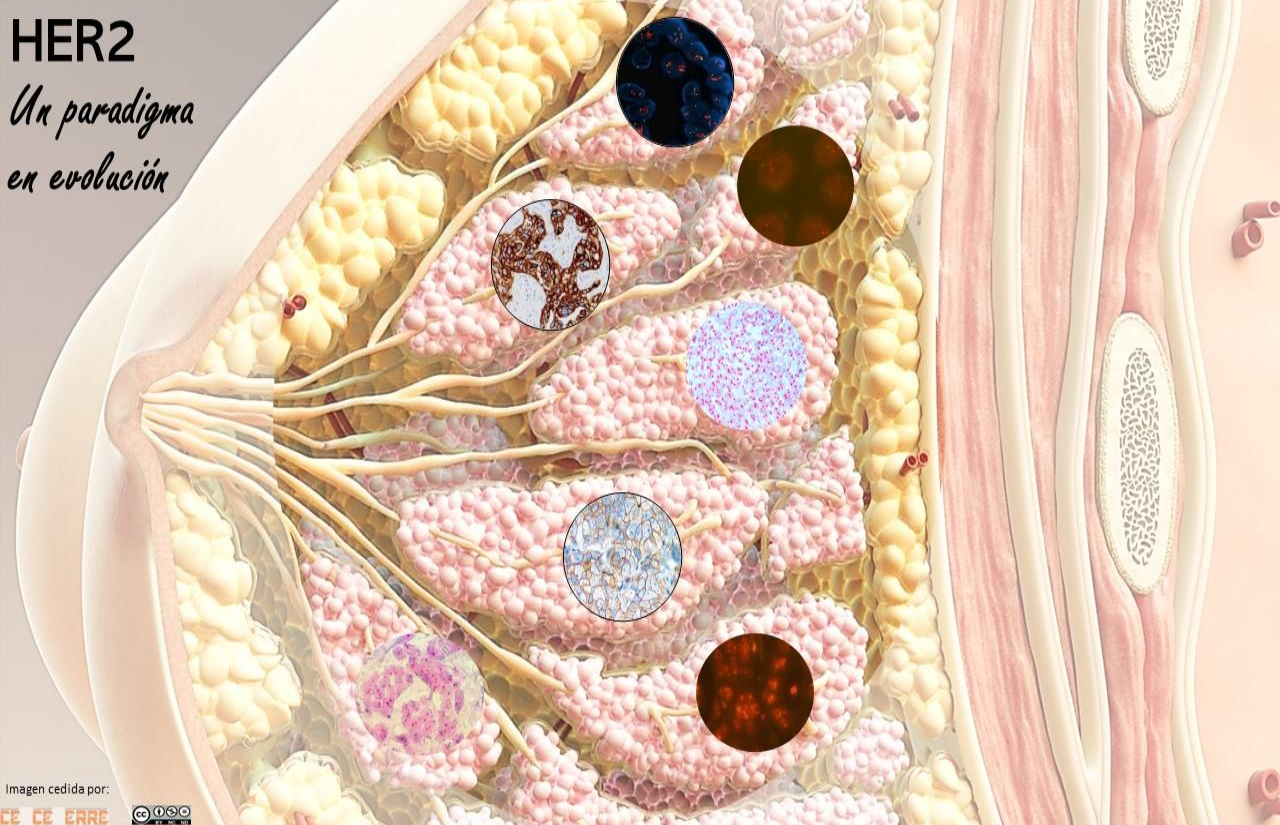


Imagen cedida por:

CE CE ERRE

Sociedad Española
de Senología y Patología Mamaria

¿ES LA PROTEÓMICA UNA OPCIÓN?

Manuel M. Sánchez del Pino
Universidad de Valencia
Proteómica

HER2 en cáncer de mama: un paradigma en evolución

¿Es la proteómica una opción?

Manuel M. Sánchez del Pino

Universidad de Valencia

Proteómica

¿Qué define a un sistema biológico?

¿Genes o proteínas?

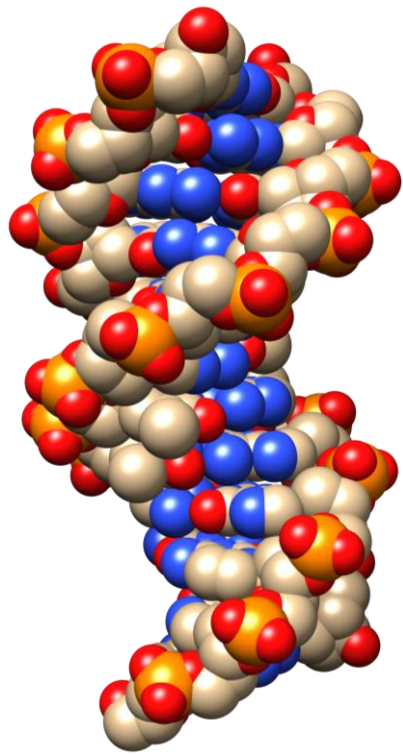


Claramente, un mismo genoma puede dar lugar a organismos completamente distintos. Si bien la oruga y la mariposa podría considerarse un ejemplo extremo, pensemos en la diversidad de tipos celulares de nuestro organismo que comparten el mismo genoma.

Fenotipo y proteoma

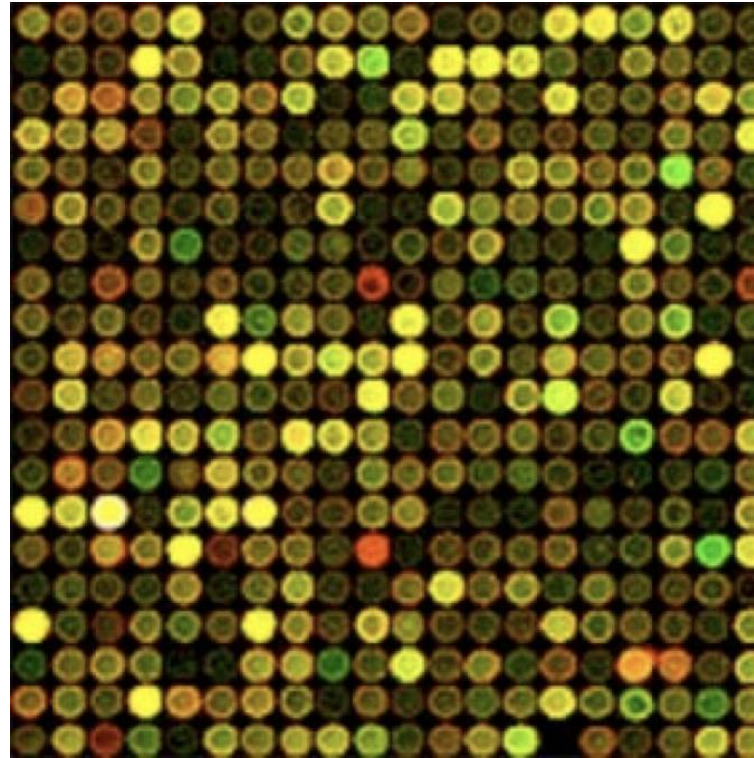
Genoma:

“lo que podría pasar”



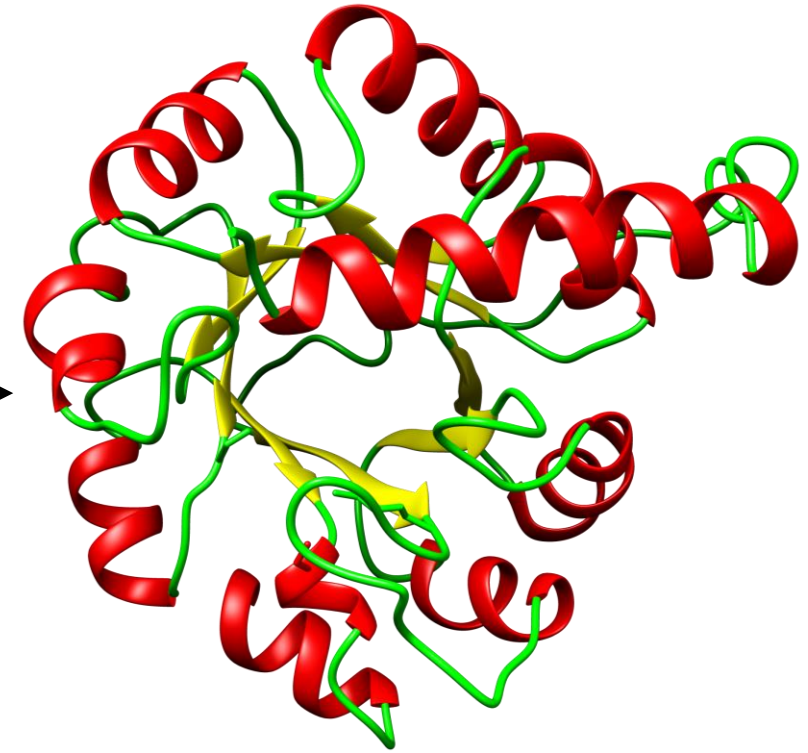
Transcriptoma:

“lo que puede estar pasando”



Proteoma:

“lo que está pasando”

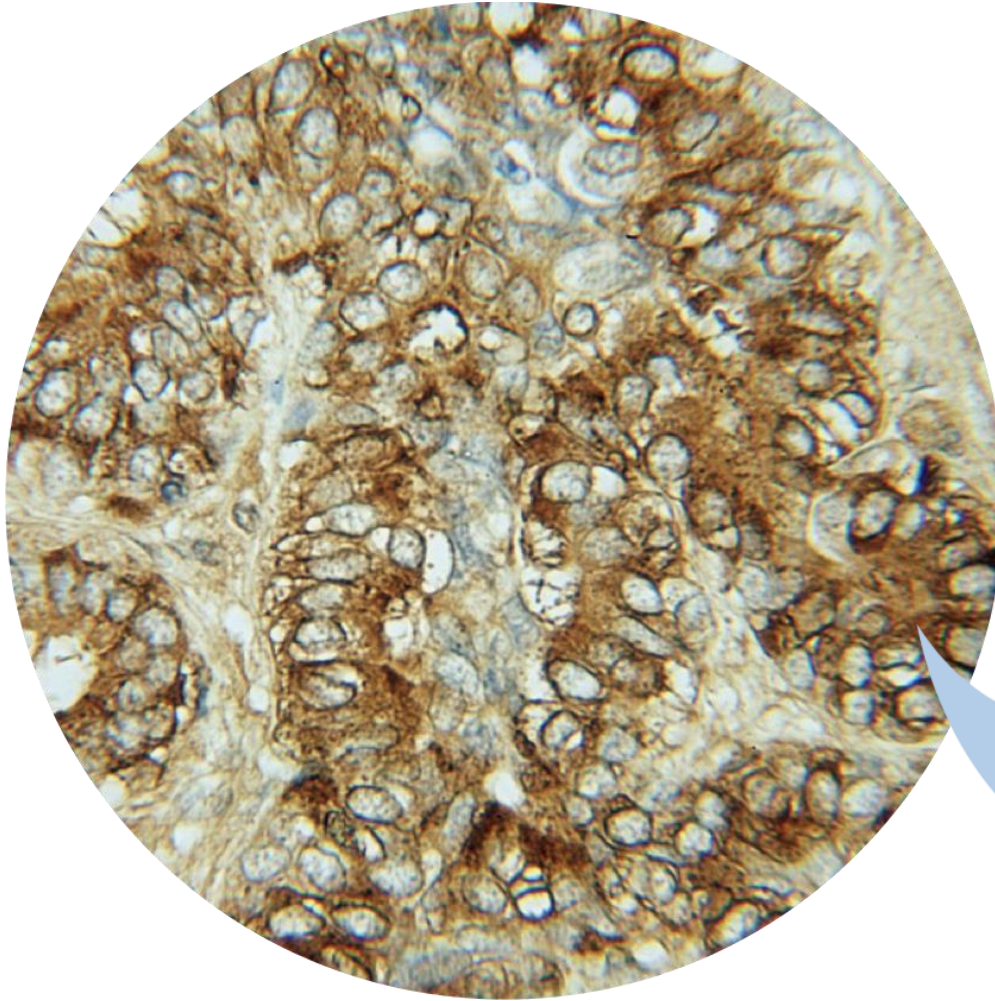


Los ácidos nucleicos (DNA y RNA), en general, son biomoléculas cuya función es la transmisión de información. Por el contrario, las proteínas desempeñan multitud de funciones químicas, estructurales y de señalización. Por tanto, el fenotipo está determinado por el conjunto de proteínas presentes en un momento dado.

Diagnóstico molecular y biomarcadores

- El diagnóstico molecular pretende asociar la abundancia de determinadas biomoléculas con enfermedades concretas
- El análisis molecular tiene utilidad no solo en el diagnóstico sino que puede utilizarse para la clasificación de los pacientes, para inferir el pronóstico o para predecir la respuesta al tratamiento
- Todo ello es parte de la medicina de precisión y el análisis molecular es la base para poder alcanzarla
- Dado que la función de las proteínas contribuye decisivamente en el fenotipo asociado a cada uno de los aspectos relacionados con la medicina de precisión, el análisis de las proteínas es clave

Las proteínas como biomarcadores



Inmunocitoquímica

La detección de proteínas es la base de gran parte de las pruebas diagnósticas

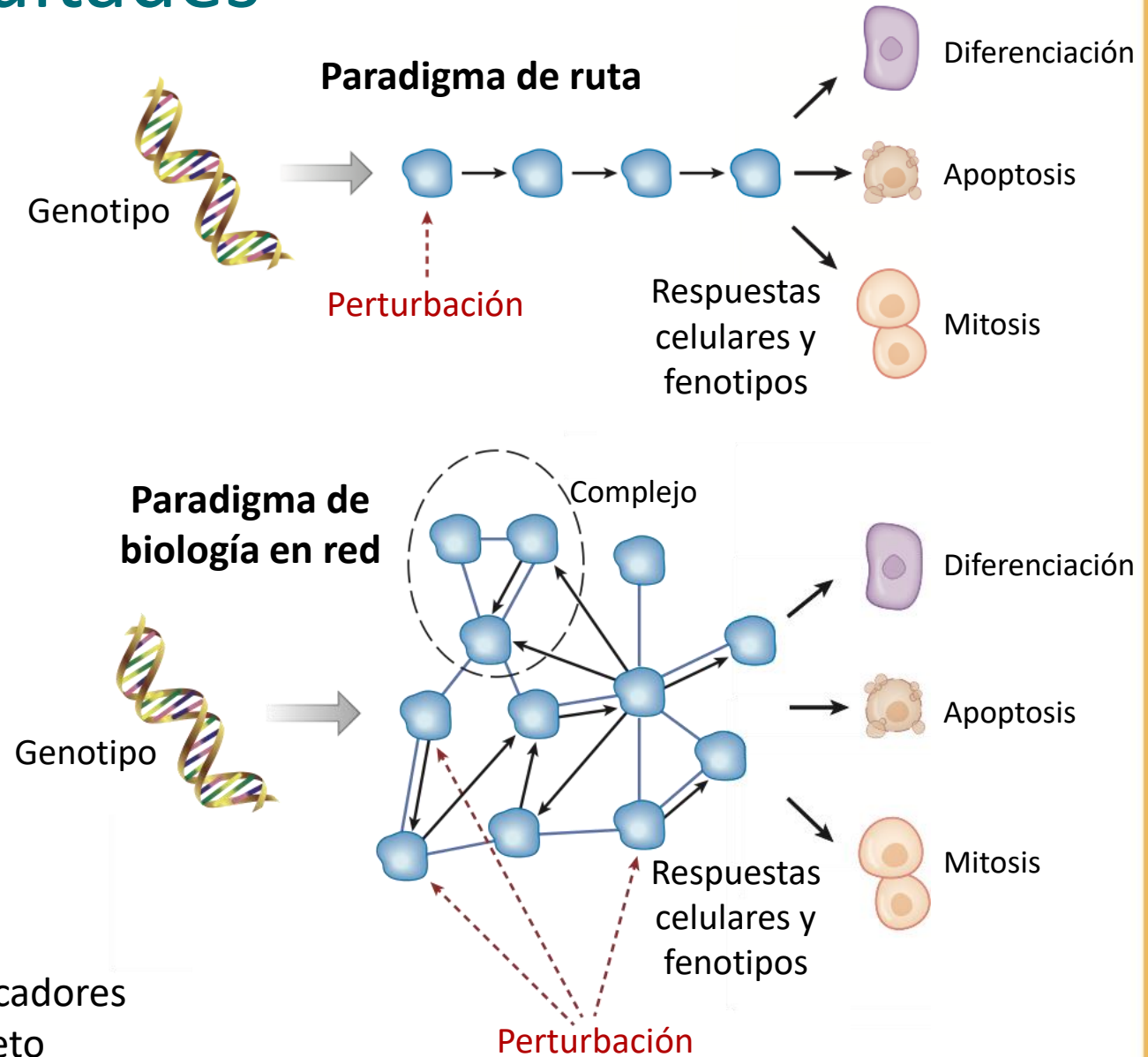


Dificultades

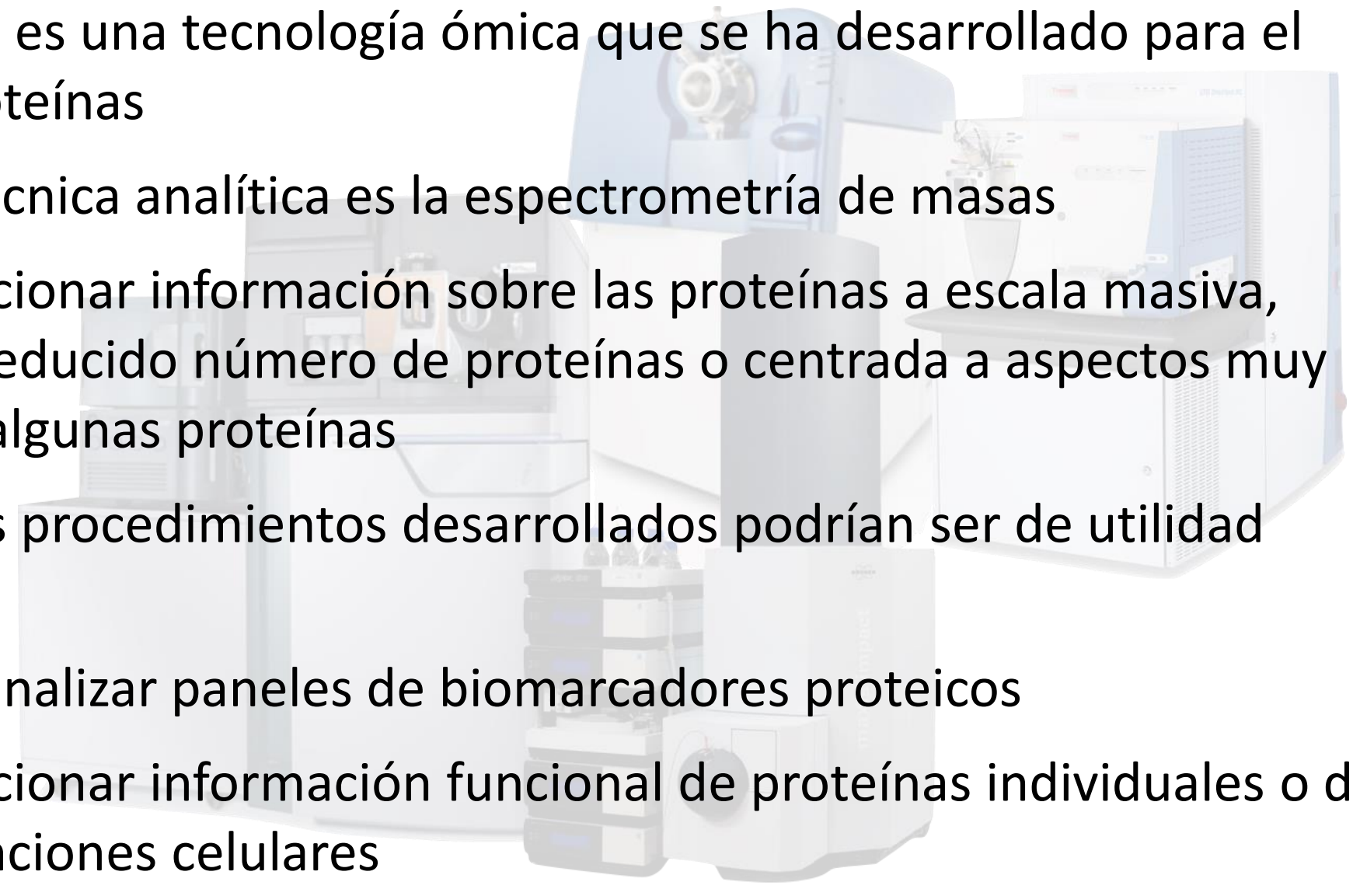
La experiencia muestra que encontrar una única biomolécula como biomarcador de una enfermedad es difícil. En parte, ello se debe a que el modelo de organización celular lineal en el que las perturbaciones producen un efecto al final de la ruta no parece ajustarse a la realidad en la mayor parte de los casos.

Por el contrario, las evidencias indican que la organización celular es una red con un alto grado de interconectividad, interacciones y solapamientos de funciones. Las alteraciones en cualquier punto de la red puede tener múltiples consecuencias o ser atenuada.

Por tanto, en muchas ocasiones un panel de varios biomarcadores puede ser más apropiado para describir un fenotipo concreto



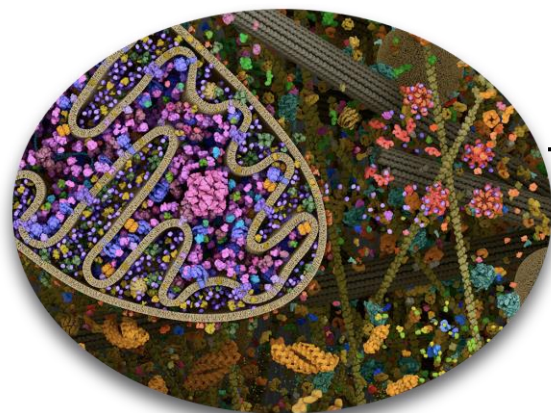
Proteómica

- La proteómica es una tecnología ómica que se ha desarrollado para el análisis de proteínas
 - Su principal técnica analítica es la espectrometría de masas.
 - Puede proporcionar información sobre las proteínas a escala masiva, dirigida a un reducido número de proteínas o centrada a aspectos muy concretos de algunas proteínas
 - Algunos de los procedimientos desarrollados podrían ser de utilidad clínica
 - Es ideal para analizar paneles de biomarcadores proteicos
 - Puede proporcionar información funcional de proteínas individuales o de procesos y funciones celulares
- 
- A background image showing a mass spectrometer and other laboratory equipment, including a computer monitor displaying data, all in a light blue and white color scheme.

Búsqueda e identificación de biomarcadores

Análisis diferencial de proteínas:

Proteómica *bottom-up* con una estrategia *shotgun* de identificación masiva de proteínas combinada con distintas técnicas cuantitativas

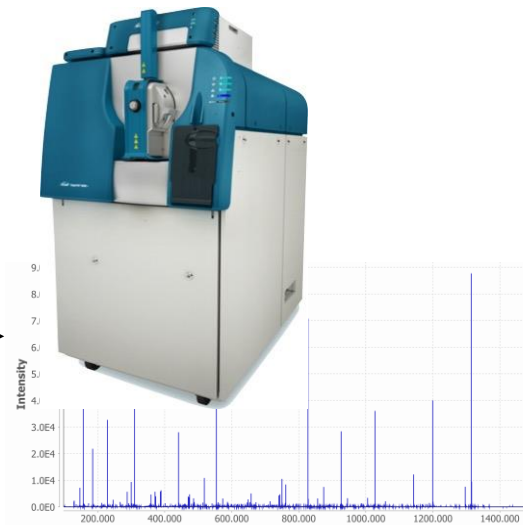


Péptidos



HPLC

Espectrometría de masas



Análisis diferencial:

- Sin marcaje
- SILAC
- iTRAQ/TMT
- Otras

Muestra:

- Biopsia
- Suero
- Otros

Búsqueda e identificación de biomarcadores

Annals of Internal Medicine

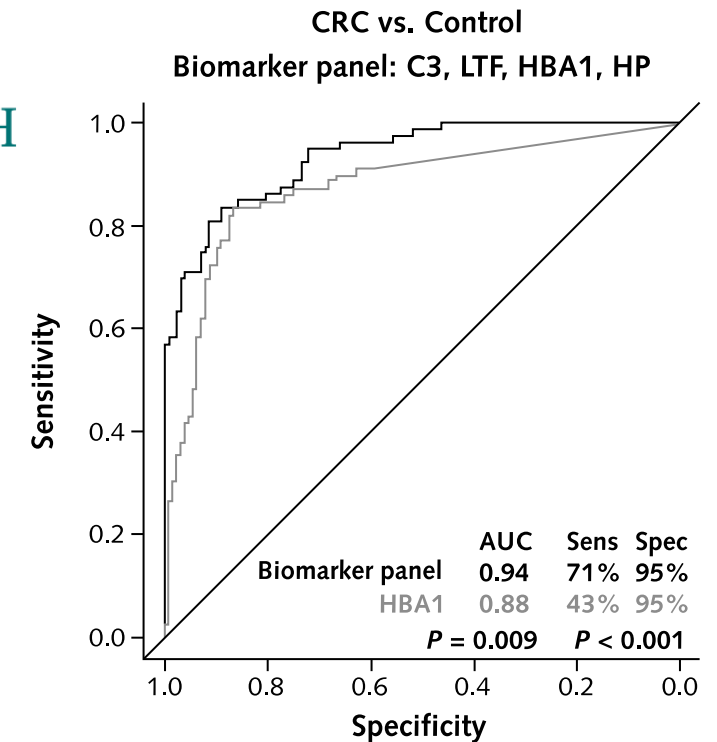
ORIGINAL RESEARCH

Novel Stool-Based Protein Biomarkers for Improved Colorectal Cancer Screening

A Case-Control Study

Linda J.W. Bosch, PhD*; Meike de Wit, PhD*; Thang V. Pham, PhD; Veerle M.H. Coupé, PhD; Annemieke C. Hiemstra, MSc; Sander R. Piersma, PhD; Gideon Oudgenoeg, PhD; George L. Scheffer, PhD; Sandra Mongera, MSc; Jochim Terhaar Sive Droste, MD, PhD; Frank A. Oort, MD, PhD; Sietze T. van Turenhout, MD, PhD; Ilhame Ben Larbi, MD; Joost Louwagie, PhD; Wim van Criekinge, PhD; Rene W.M. van der Hulst, MD, PhD; Chris J.J. Mulder, MD, PhD; Beatriz Carvalho, PhD; Remond J.A. Fijneman, PhD; Connie R. Jimenez, PhD*; and Gerrit A. Meijer, MD, PhD*

Ann Intern Med. 2017;167:855-866. doi:10.7326/M17-1068



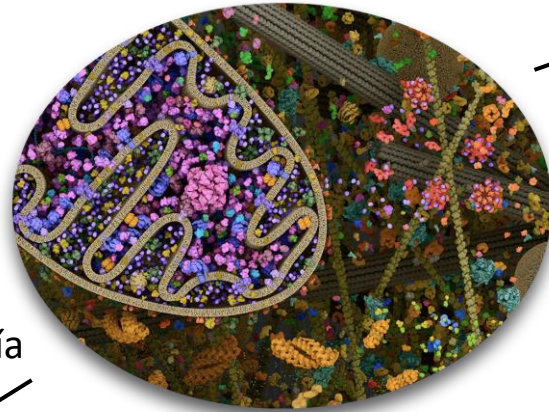
El análisis de cientos o miles de proteínas permite identificar las proteínas diferenciales con mayor potencial biomarcador a partir de las cuales se pueden definir paneles de proteínas con mayor capacidad para clasificar muestras patológicas.

Proteoma digital

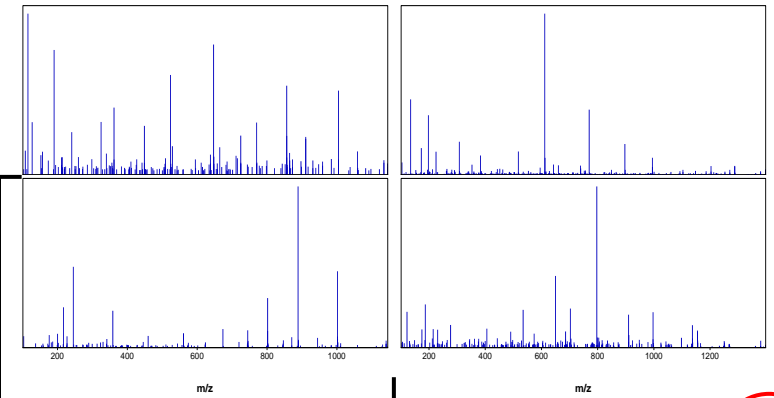
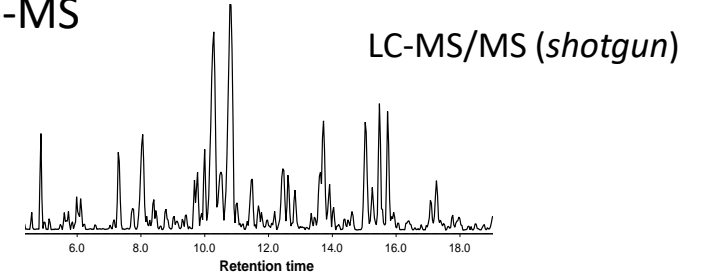
Análisis cuantitativo masivo de proteínas:

Proteómica *bottom-up* con una estrategia de adquisición independiente de datos-SWATH-MS

1. Análisis LC-MS/MS mediante adquisición *shotgun*
2. Identificación de proteínas y generación de la librería de espectros MS2
3. Análisis LC-MS/MS mediante adquisición Independiente de datos SWATH
4. Cuantificación de las proteínas de la librería



1



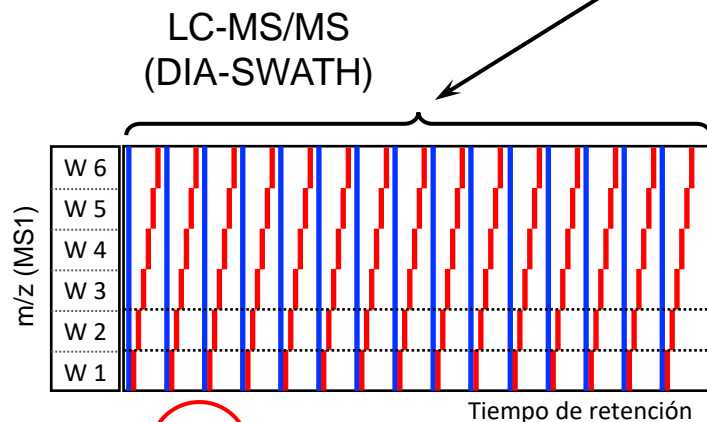
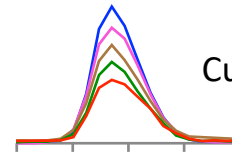
2

Librería MS2

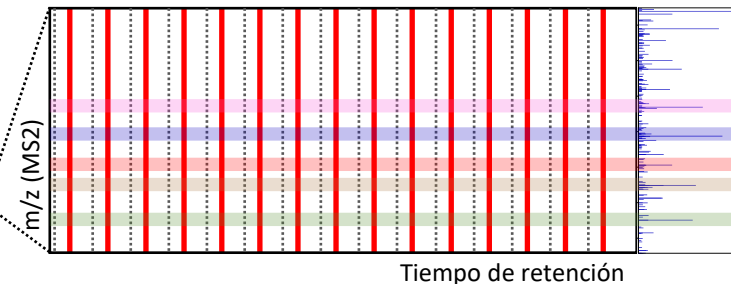
Protein	Peptide	Prec MZ	Prec z	RT	Frag MZ	Frag z	Ion Type	Residue
sp P04114 APOB_HUMAN	TGISPLALIK	506,824	2	49.68	741,487	1	y	7
sp P04114 APOB_HUMAN	TGISPLALIK	506,824	2	49.68	654,455	1	y	6
sp P04114 APOB_HUMAN	TGISPLALIK	506,824	2	49.68	854,571	1	y	8
sp P04114 APOB_HUMAN	TGISPLALIK	506,824	2	49.68	911,592	1	y	9
sp P04114 APOB_HUMAN	TGISPLALIK	506,824	2	49.68	557,402	1	y	5
sp P04114 APOB_HUMAN	ILGEEIGFASLHDQLLQGG	685,049	3	62.53	913,986	2	y	17
sp P04114 APOB_HUMAN	ILGEEIGFASLHDQLLQGG	685,049	3	62.53	970,528	2	y	18
sp P04114 APOB_HUMAN	ILGEEIGFASLHDQLLQGG	685,049	3	62.53	923,531	1	y	8
sp P04114 APOB_HUMAN	ILGEEIGFASLHDQLLQGG	685,049	3	62.53	1194,684	1	y	11
sp P04114 APOB_HUMAN	ILGEEIGFASLHDQLLQGG	685,049	3	62.53	1398,774	1	y	13
sp P04114 APOB_HUMAN	VPSYTLUPSLELPVHVPR	748,444	3	65.03	817,504	1	y	7
sp P04114 APOB_HUMAN	VPSYTLUPSLELPVHVPR	748,444	3	65.03	1356,800	1	y	12
sp P04114 APOB_HUMAN	VPSYTLUPSLELPVHVPR	748,444	3	65.03	930,588	1	y	8
sp P04114 APOB_HUMAN	VPSYTLUPSLELPVHVPR	748,444	3	65.03	887,524	1	b	8
sp P04114 APOB_HUMAN	VPSYTLUPSLELPVHVPR	748,444	3	65.03	774,440	1	b	7
sp P04114 APOB_HUMAN	LLSGGNTLHVSTTK	514,295	3	35.09	657,854	2	y	13

Cuantificación

4



3



Proteoma digital

Rapid mass spectrometric conversion of tissue biopsy samples into permanent quantitative digital proteome maps

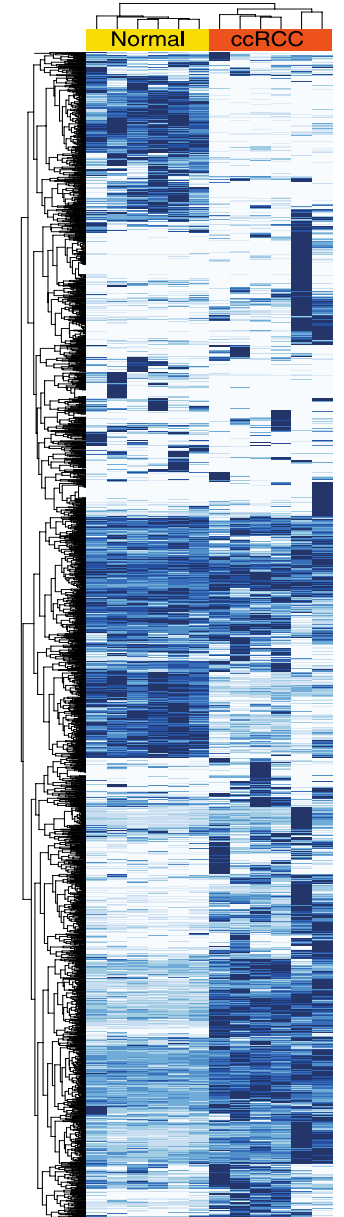
Tiannan Guo¹, Petri Kouvonen^{1,2}, Ching Chiek Koh^{1,3}, Ludovic C Gillet¹, Witold E Wolski^{1,4}, Hannes L Röst^{1,5}, George Rosenberger^{1,5}, Ben C Collins¹, Lorenz C Blum^{4,6}, Silke Gillessen⁷, Markus Joerger⁷, Wolfram Jochum⁸ & Ruedi Aebersold^{1,9}

NATURE MEDICINE | VOLUME 21 | NUMBER 4 | APRIL 2015

407

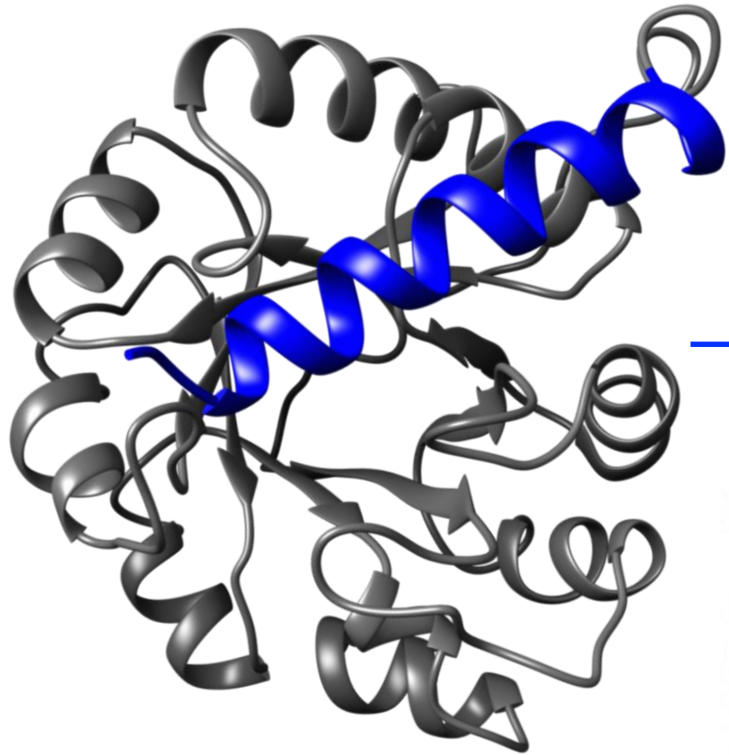
Una de las aplicaciones es su capacidad para realizar perfiles de proteínas que después pueden asociarse a distintos fenotipos, grupos de pacientes, diagnóstico, pronóstico, etc.

Clasificación basada en la cuantificación de ~2300 proteínas



ccRCC: carcinoma de células renales de tipo células claras

Proteómica dirigida: cuantificación de biomarcadores

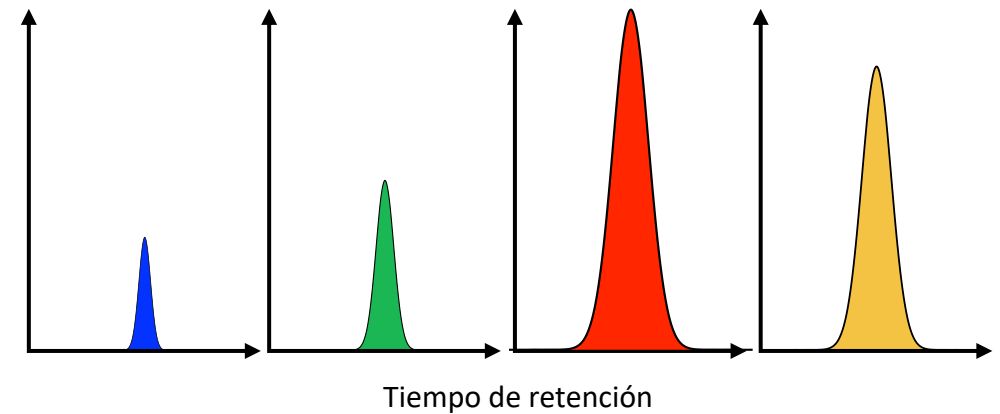


Péptido proteotípico
(específico de la proteína de interés)

LC-MS/MS SRM/MRM



Abundancia del péptido en las muestras



La proteómica dirigida (SRM/MRM) permite cuantificar una o varias proteínas de interés en cualquier tipo de muestra con gran exactitud y sensibilidad

Proteómica dirigida: cuantificación de biomarcadores

MOLECULAR ONCOLOGY 10 (2016) 138–147



available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/molonc



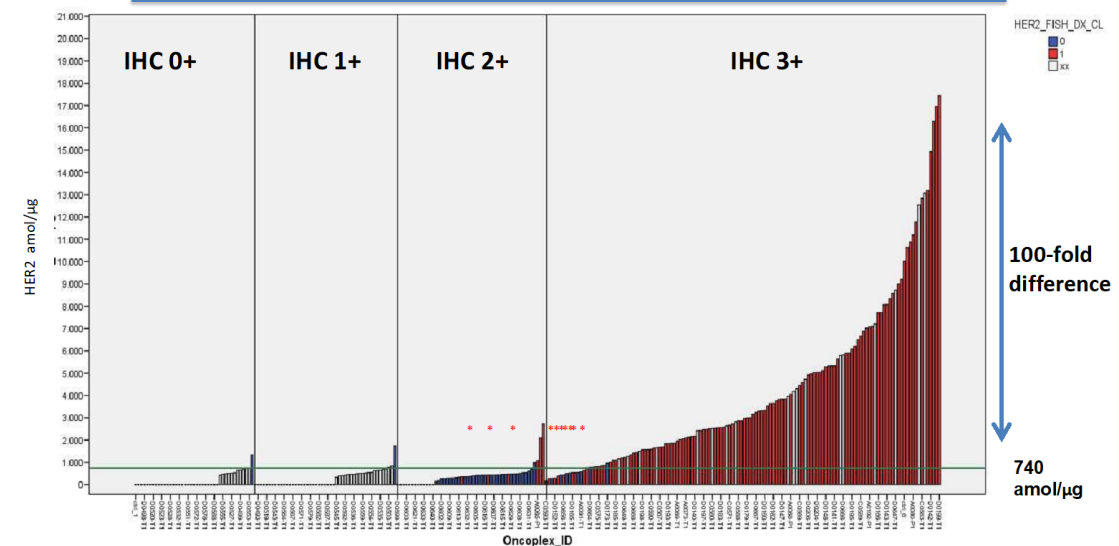
High HER2 protein levels correlate with increased survival in breast cancer patients treated with anti-HER2 therapy



Paolo Nuciforo^{a,b,**,1}, Sheeno Thyparambil^{c,1}, Claudia Aura^a, Ana Garrido-Castro^d, Marta Vilaro^a, Vicente Peg^e, José Jimenez^a, Rocio Vicario^f, Fabiola Cecchi^c, William Hoos^c, Jon Burrows^c, Todd Hembrough^c, Juan Carles Ferreres^e, José Perez-Garcia^d, Joaquin Arribas^{f,g}, Javier Cortes^d, Maurizio Scaltriti^{h,*}

El análisis de HER2 mediante proteómicadirigida proporciona una mejor cuantificación que la inmunohistoquímica y pone de manifiesto diagnósticos erróneos

Result SRM-MS versus standard HER2 testing



A wide dynamic range of HER2 levels was observed by SRM-MS

*Ten cases (9% of amplified BC) showed low HER2 levels (below 740 amol/μg)

Proteómica dirigida: cuantificación de biomarcadores

RESEARCH ARTICLE

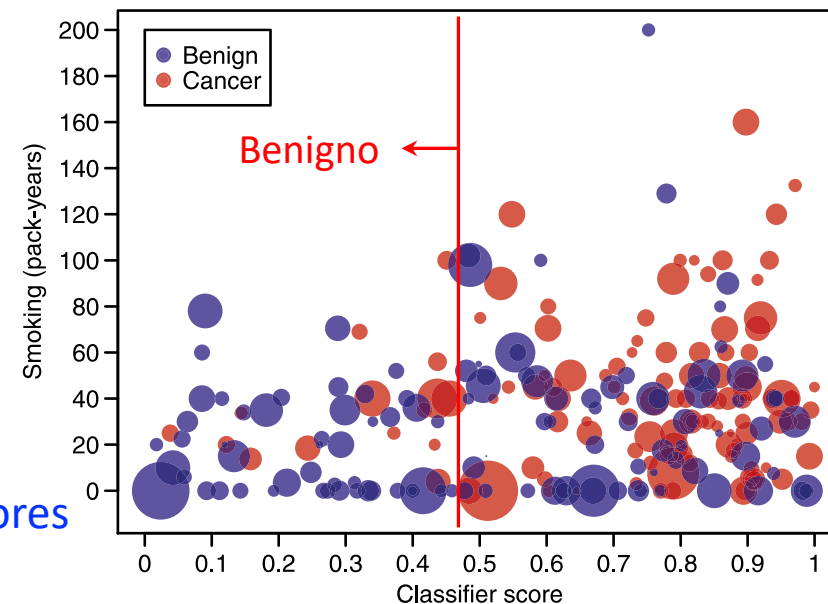
LUNG DISEASE

A Blood-Based Proteomic Classifier for the Molecular Characterization of Pulmonary Nodules

Xiao-jun Li,^{1*} Clive Hayward,¹ Pui-Yee Fong,¹ Michel Dominguez,^{1†} Stephen W. Hunsucker,¹ Lik Wee Lee,¹ Matthew McLean,^{1‡} Scott Law,¹ Heather Butler,^{1§} Michael Schirm,² Olivier Gingras,² Julie Lamontagne,² Rene Allard,² Daniel Chelsky,² Nathan D. Price,³ Stephen Lam,⁴ Pierre P. Massion,^{5,6} Harvey Pass,⁷ William N. Rom,⁸ Anil Vachani,⁹ Kenneth C. Fang,¹ Leroy Hood,³ Paul Kearney^{1*}

www.ScienceTranslationalMedicine.org 16 October 2013 Vol 5 Issue 207 207ra142

Medida simultánea de un panel de 13 biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de pulmón



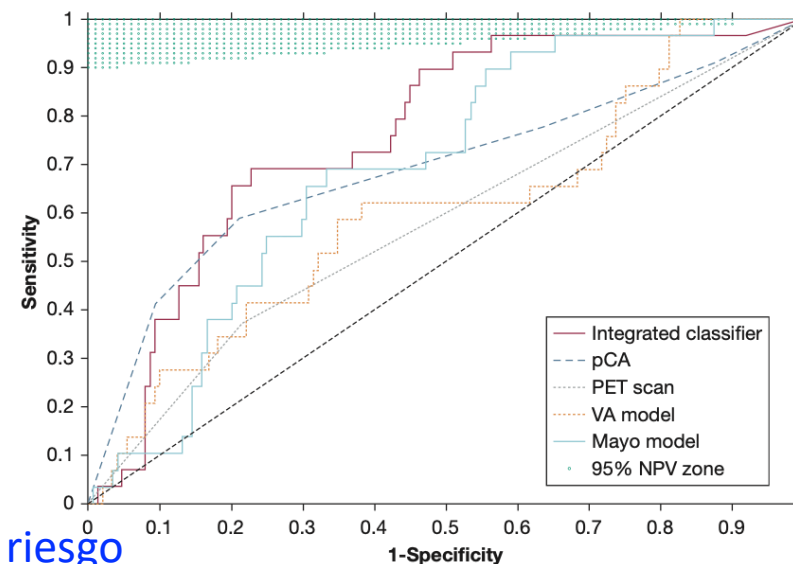
Assessment of Plasma Proteomics Biomarker's Ability to Distinguish Benign From Malignant Lung Nodules

Results of the PANOPTIC (Pulmonary Nodule Plasma Proteomic Classifier) Trial

Gerard A. Silvestri, MD; Nichole T. Tanner, MD; Paul Kearney, PhD; Anil Vachani, MD; Pierre P. Massion, MD; Alexander Porter, MD; Steven C. Springmeyer, MD; Kenneth C. Fang, MD; David Midthun, MD; Peter J. Mazzone, MD, MPH; for the PANOPTIC Trial Team*

CHEST 2018; 154(3):491-500

Posteriormente se creó un clasificador integrando la cuantificación de 2 proteínas (LG3BP y C163A) con 5 factores de riesgo



Check for updates

Monitorización funcional

La proteómica permite evaluar funciones y procesos complejos de interés que no están codificados en la secuencia genómica.

En este caso, mediante proteómica dirigida, se ha evaluado la activación de la ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Para ello se pueden cuantificar los residuos fosforilados claves de las proteínas de la ruta.

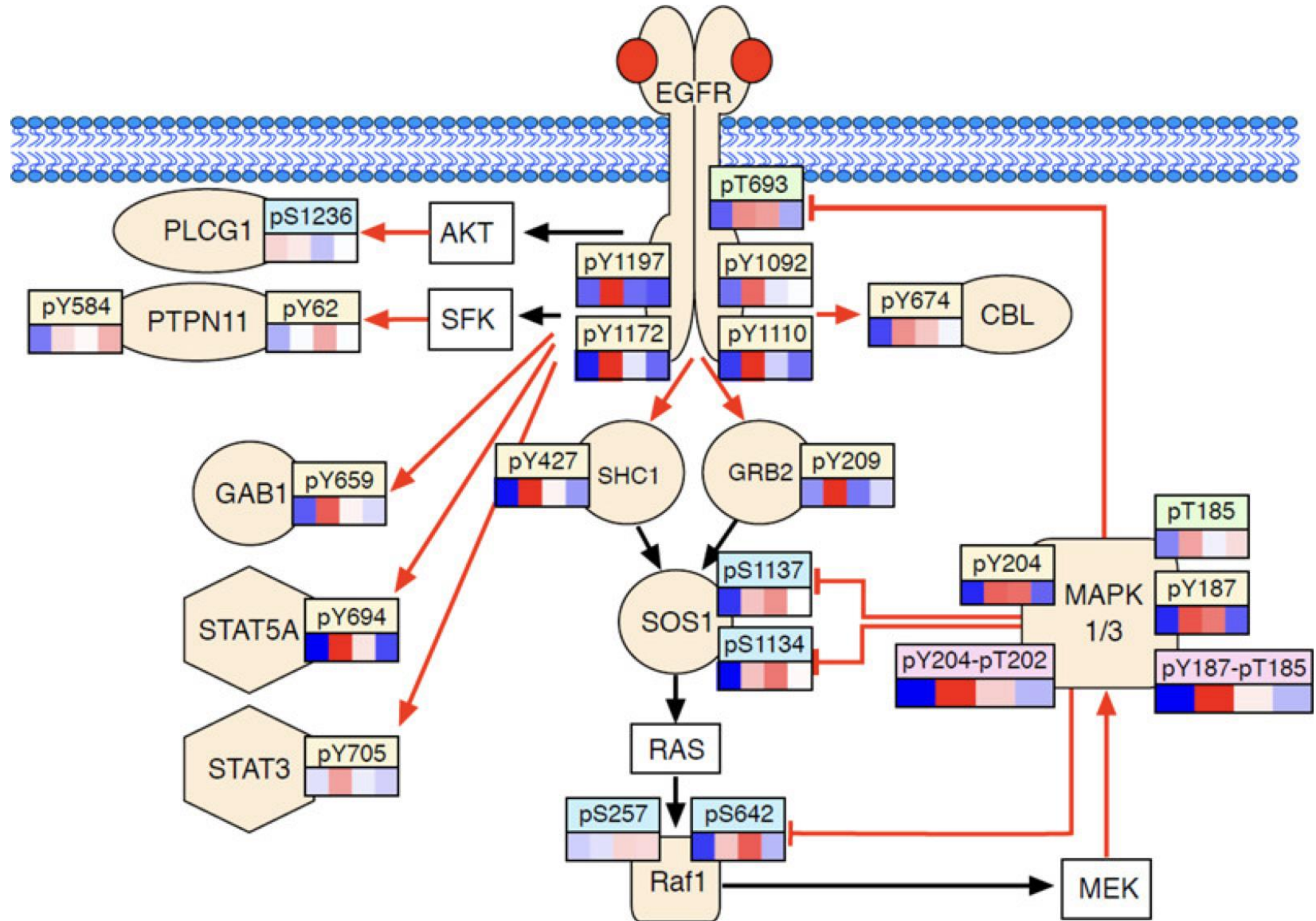


Imagen de espectrometría de masas (MSI)

El análisis de preparaciones histológicas mediante espectrometría de masas permite estudiar la distribución de las moléculas en los tejidos

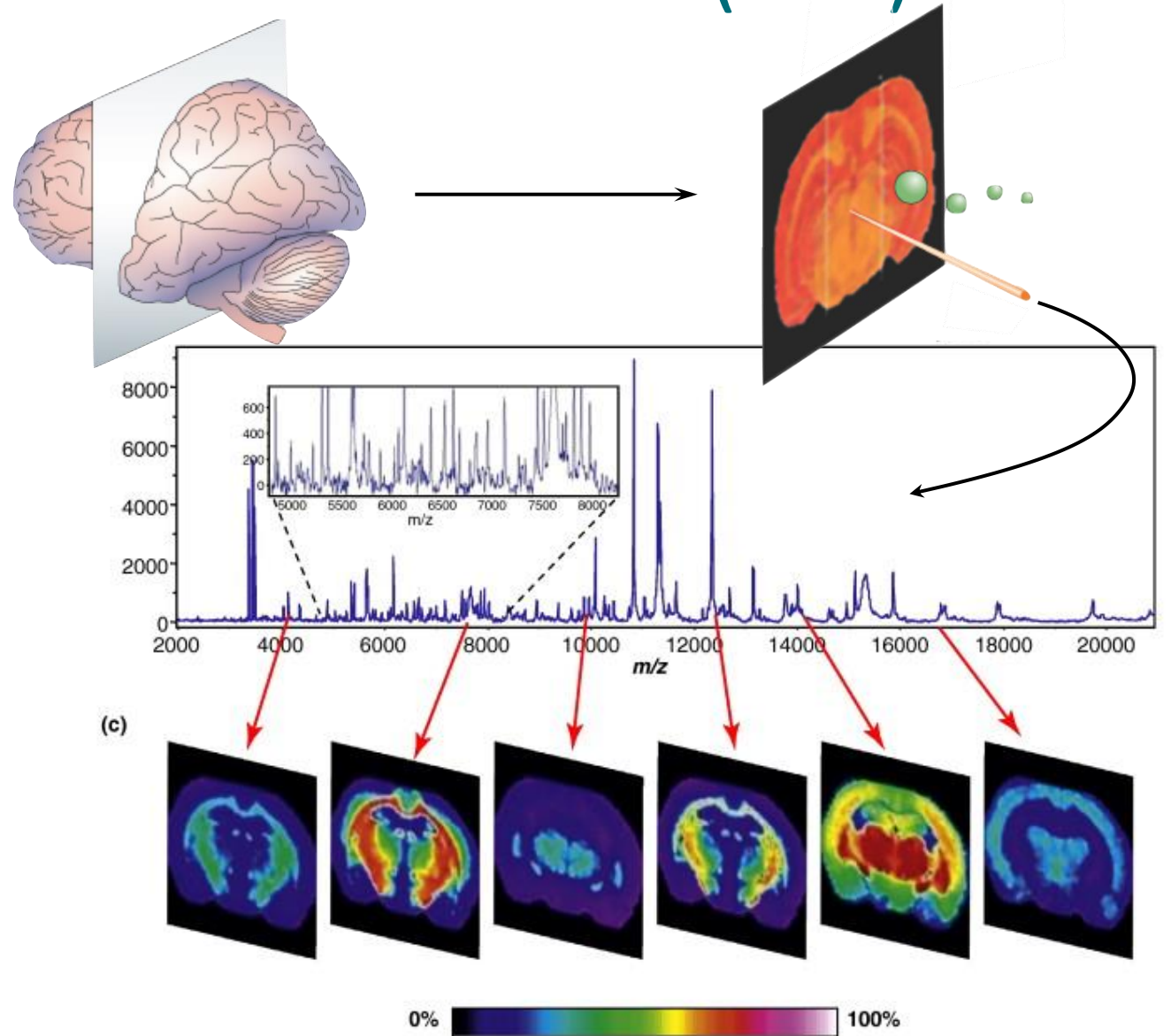
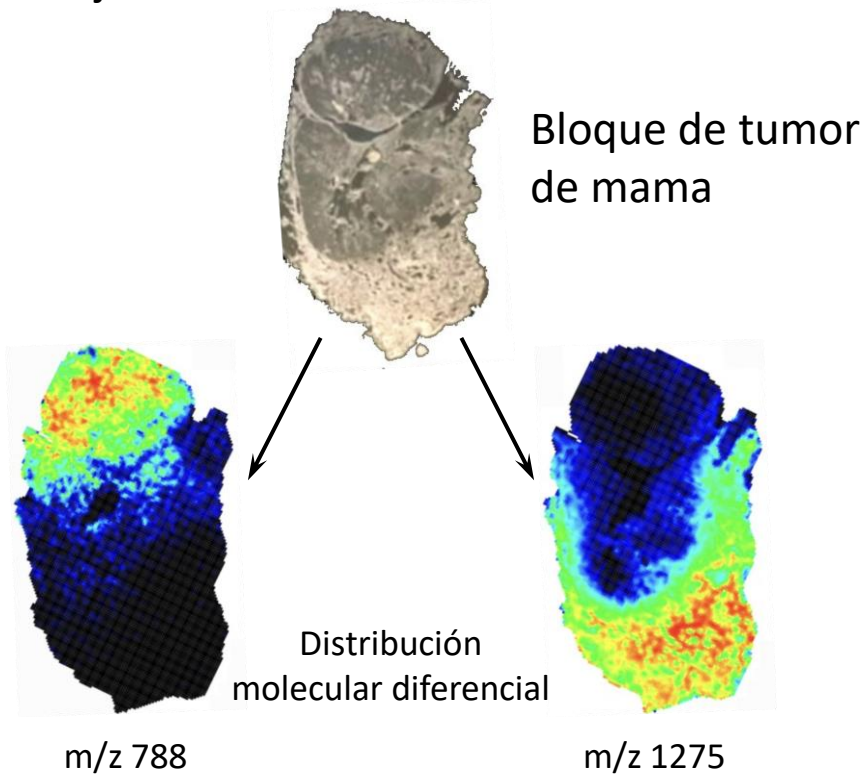


Imagen de espectrometría de masas (MSI)

Clinical Biochemistry 46 (2013) 539–545



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Clinical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem



Review

MALDI imaging mass spectrometry in cancer research: Combining proteomic profiling and histological evaluation

Cédrik Schöne^a, Heinz Höfler^{a,b}, Axel Walch^{a,*}

La imagen molecular permite identificar marcadores que, en este caso, agrupa a los pacientes con distinto pronóstico y supervivencia

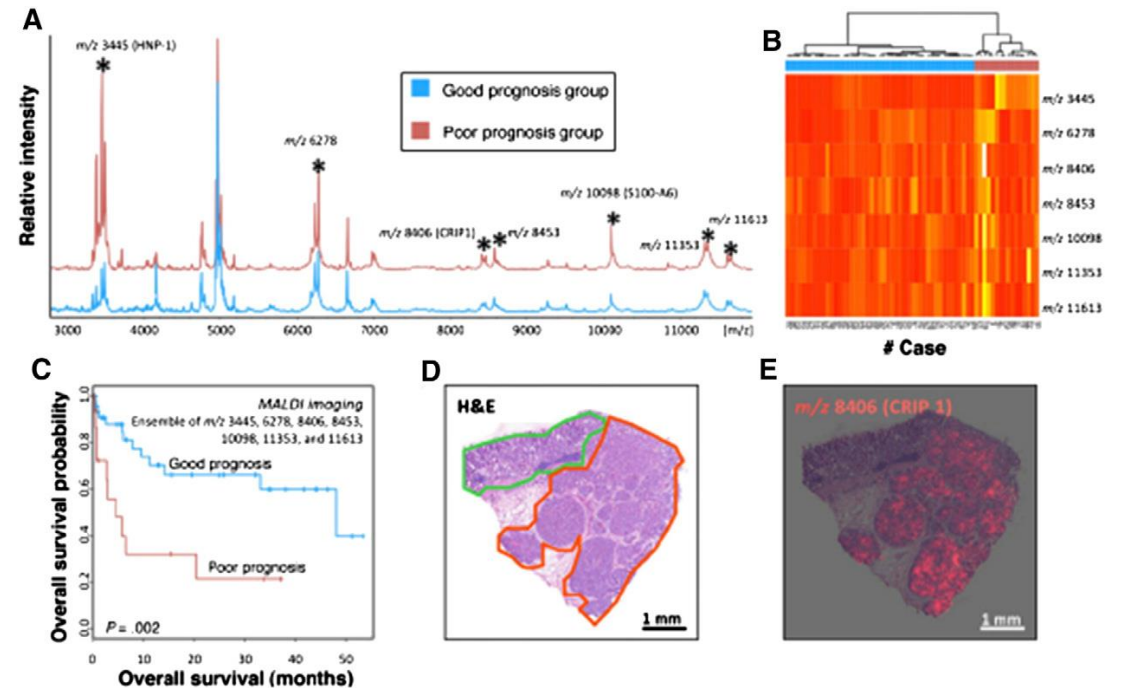


Imagen de espectrometría de masas (MSI)



ELSEVIER



CrossMark

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 32 (2014) 1225–1233

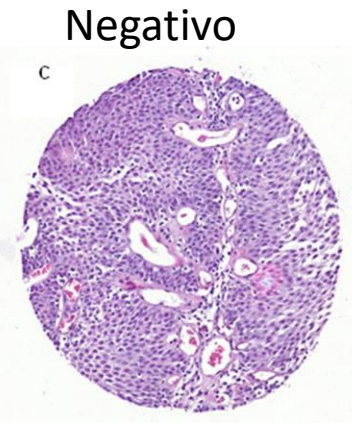
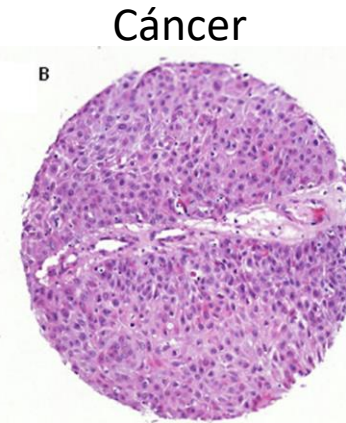
UROLOGIC
ONCOLOGY

Original article

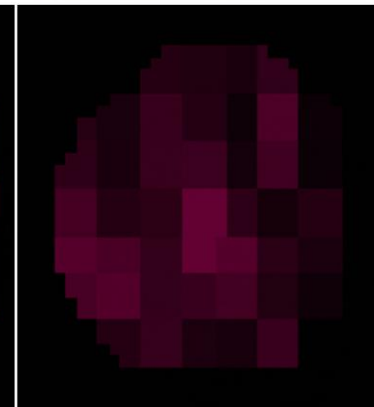
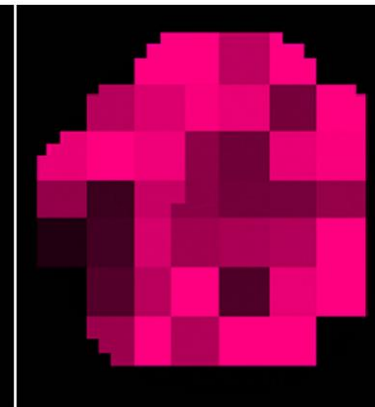
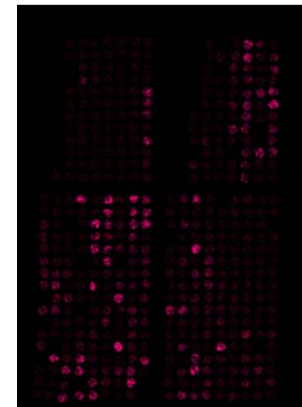
MALDI imaging–based identification of prognostically relevant signals in bladder cancer using large-scale tissue microarrays

La combinación con las matrices de tejidos permiten el diagnóstico de los pacientes

Histología

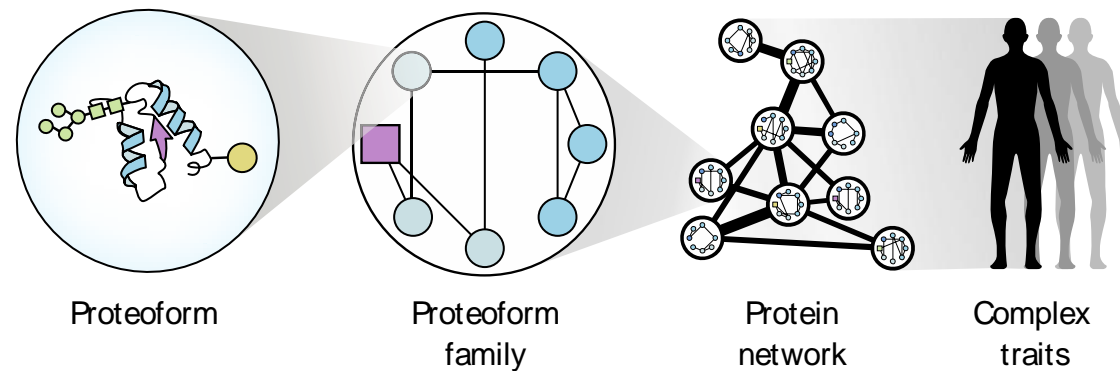


MSI
($m/z = 1,406.9$)



Proteómica *Top-down*: el análisis de las proteoformas

De cada proteína suelen existir variantes tanto debidas a causas genéticas como consecuencia del procesamiento celular. Estas variantes se denominan proteoformas y tienen una gran importancia en la función de las proteínas y pueden participar en procesos patológicos. Las modificaciones post-traduccionales son un ejemplo de la variabilidad proteica que modula la función de las proteínas.



R. Aebersold et al. (2018) Nature Chemical Biology 14, 206-214

La proteómica *Top-down* analiza las proteínas intactas y permite identificar y diferenciar las distintas proteoformas

Proteómica *Top-down*: el análisis de las proteoformas

Precise characterization of KRAS4b proteoforms in human colorectal cells and tumors reveals mutation/modification cross-talk

Ioanna Ntai^{a,b,1,2}, Luca Fornelli^{a,b,2}, Caroline J. DeHart^{a,b,2}, Josiah E. Hutton^{a,b}, Peter F. Doubleday^{a,b}, Richard D. LeDuc^{a,b}, Alexandra J. van Nispen^{a,b}, Ryan T. Fellers^{a,b}, Gordon Whiteley^c, Emily S. Boja^d, Henry Rodriguez^d, and Neil L. Kelleher^{a,b,3}

4140–4145 | PNAS | April 17, 2018 | vol. 115 | no. 16

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1716122115

El análisis de las proteoformas de KRAS4B muestra que la presencia de mutaciones impide la nitrosilación de la proteína y su correcto funcionamiento y explica el efecto dominante de la mutación

