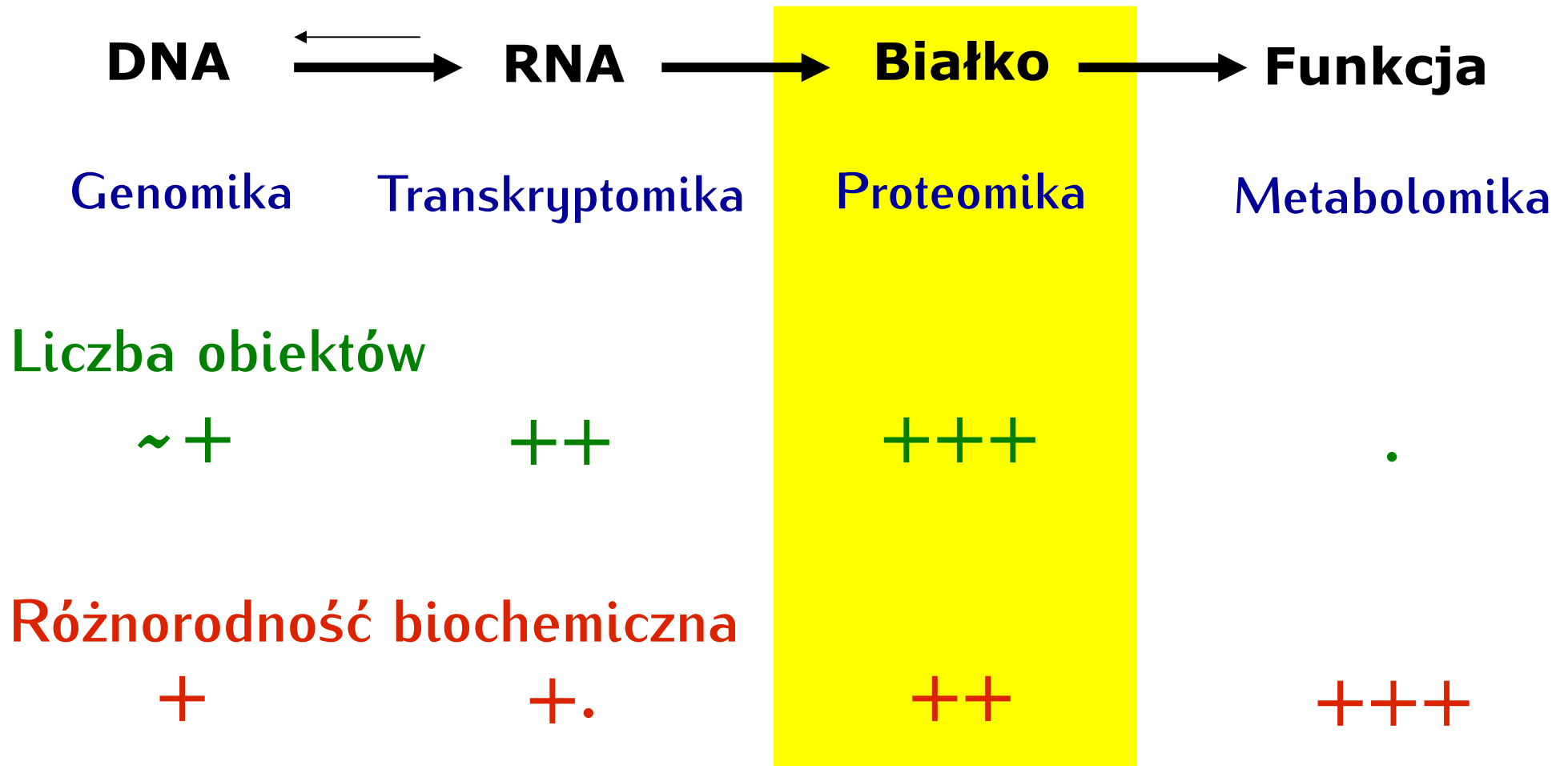


# Proteomika

1. Definicja proteomiki i techniki stosowane w proteomice

# Przeptyw informacji, złożoność, \*mika



# Podejście do badań

- Redukcjonizm klasycznym podejściem do badań w biologii molekularnej
  - zjawiska emergentne niedostępne
- Holizm — podejście całościowe
  - próby zastosowania
  - biologia systemów
  - + geno-, transkrypto-, proteo-, metabolo-mika

# Definicja

- **Proteom** — zestaw wszystkich białek organizmu / tkanki / **komórki** / organellum (+modyfikacje)
  - Ewentualnie zestaw wszystkich białek ulegających ekspresji z określonego genomu (bez modyfikacji)
- **Proteomika** — badanie proteomów
  - Skala badań odróżnia ją od klasycznych badań nad białkami
- **Metody proteomiczne** często utożsamiane z proteomiką

# Działy proteomiki

- **Jakościowa** → identyfikacja białek
  - modyfikacje potranslacyjne
- **Ilościowa**
  - bezwzględna
  - różnicowa (porównawcza)
- **Interaktomika** → oddziaływania
- **Strukturalna?**

# Historia proteomiki

- Elektroforeza 2D i pierwsze mapy proteomów

*O'Farella, Klosea i Scheele, 1975*

- Sekwencjonowanie Edmana

*1950, automatyzacja w 1967*

- Spektrometria mas w badaniach proteomicznych

*lata 90-te XX wieku*

- Termin 'proteomika'

*Wilkins, 1995*

# Metody stosowane w proteomice

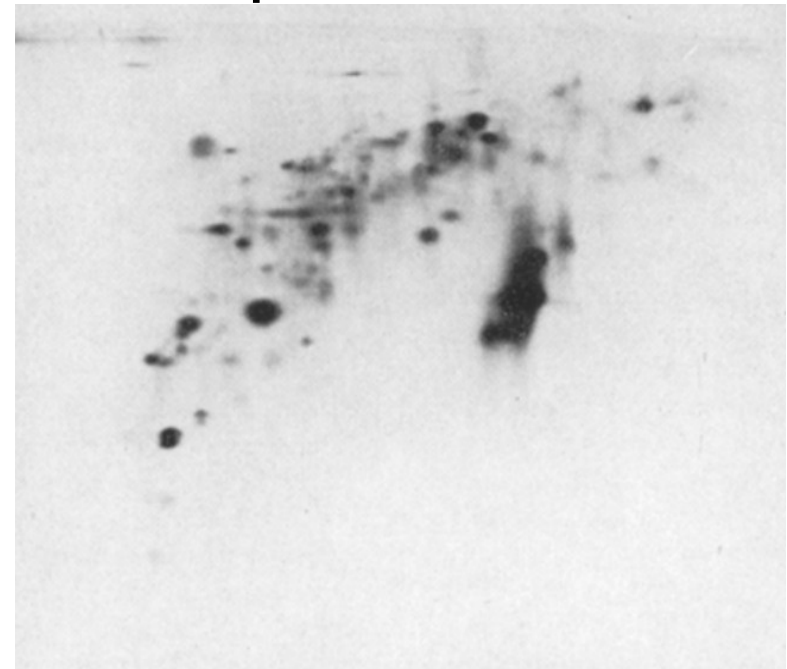
- Standardowe: ekstrakcja/strącanie itp.
- Elektroforeza 1D / 2D
- Chromatografia cieczowa (HPLC w tym wielowymiarowa, powinowactwa, itp.)
- Spektrometria mas
- Przetwarzanie danych

## Wymagania dla metod:

- Czułość brak amplifikacji
- wydajność/szybkość dużo białek
- zakres dynamiczny wielkie różnice stężeń

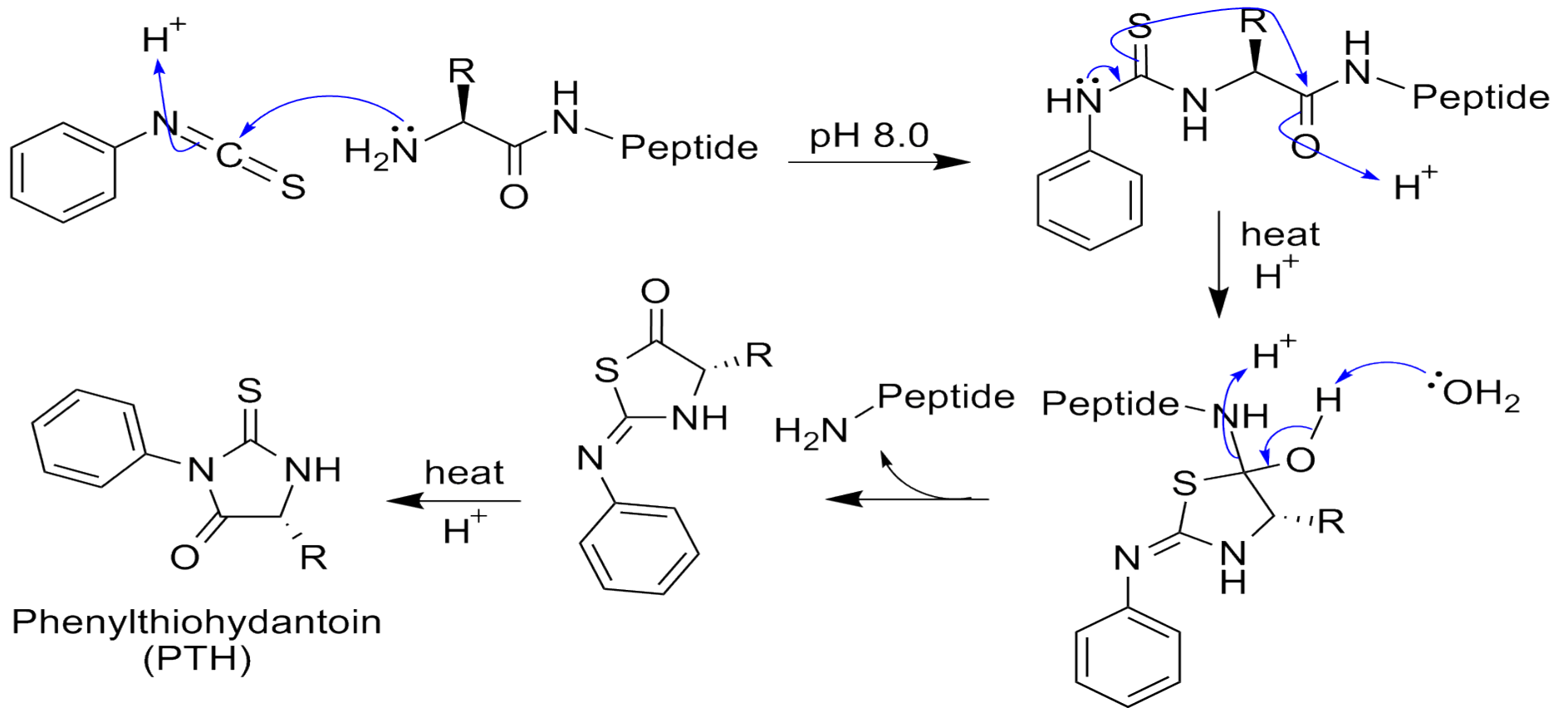
# Elektroforeza dwukierunkowa

- Rozdział pod względem 2 cech, najczęściej punkt izoelektryczny i masa
- Układ Laemliego (SDS-PAGE)
- Użycie immobilizowanych gradientów pH
- Bazy danych





# Metoda Edmana



- 10 – 100 pmol peptydu
- ~30 aminokwasów, można trawić dłuższe peptydy
- Membrana PVDF do kilku aminokwasów
- Homogenna próba

# Spektrometria mas

- Metoda pozwalająca na pomiar stosunku masy do ładunku cząsteczek
  - Można wyliczyć masę
- Spektrometr mas pracuje na jonach w fazie gazowej
  - Cząsteczki niezjonizowane niewidoczne
- Tradycyjne metody jonizacji zwykle powodują degradację większych cząsteczek (np. peptydów)
  - Łagodne metody jonizacji
    - Elektrozpylanie (ESI)
    - MALDI

# Jonizacja polipeptydów

- Grupy ulegające łatwo jonizacji
  - Przyłączenie protonu
    - Grupy aminowe na N-końcu oraz aminokwasy zasadowe
    - Metoda działająca najlepiej używana w większości analiz
  - Jonizacja ujemna
    - Grupa karboksylowa na C-końcu i aminokwasy kwaśne
    - Fosforylacja
    - Używana bardzo rzadko w bardzo specyficznych zastosowaniach

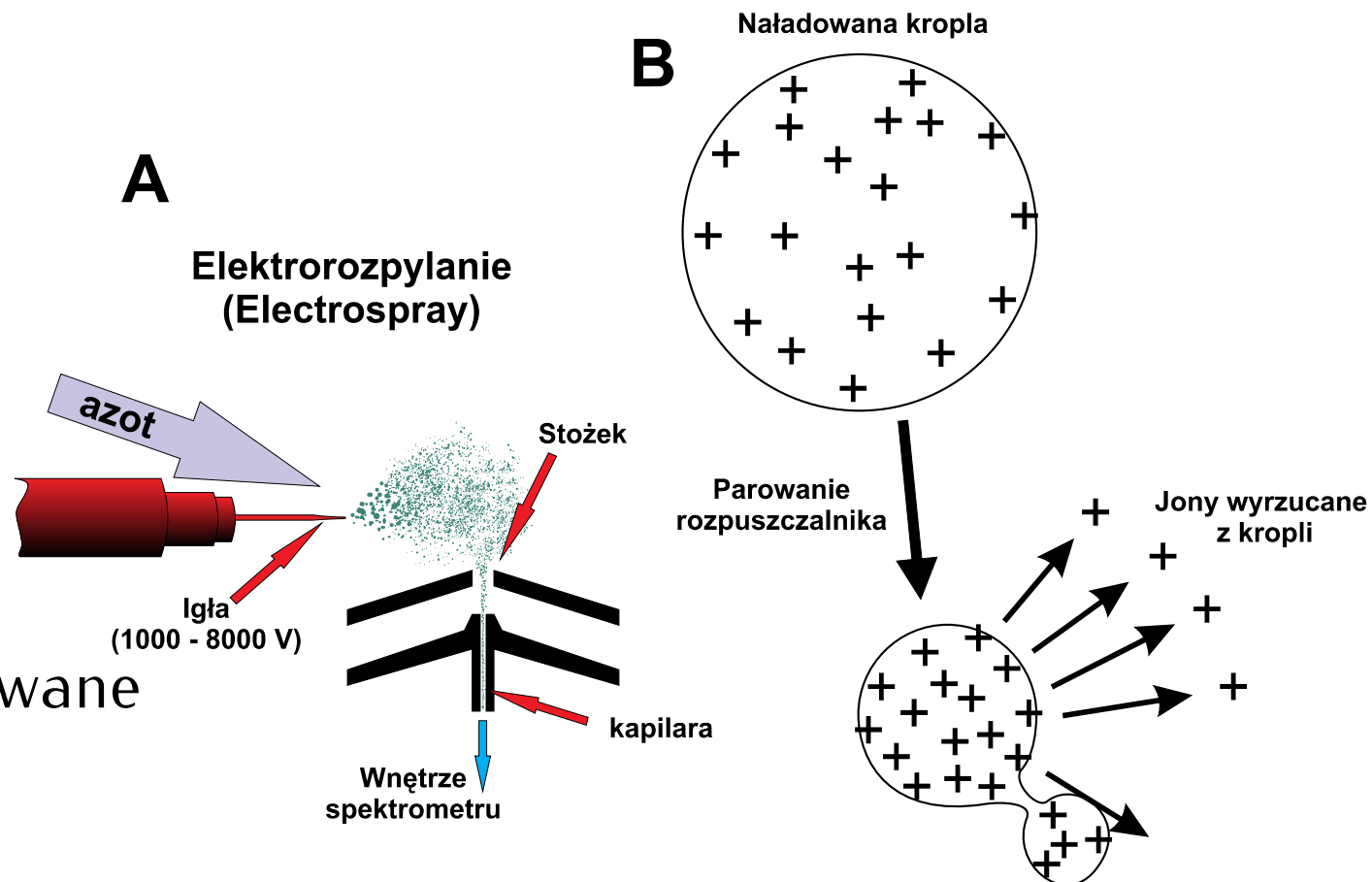
# Elektrozpylanie

## *ang. Electrospray (ESI)*

- Jonizacja z roztworu
- Ciśnienie atmosferyczne
- Praca ciągła
- Wrażliwe na nietłotne sole

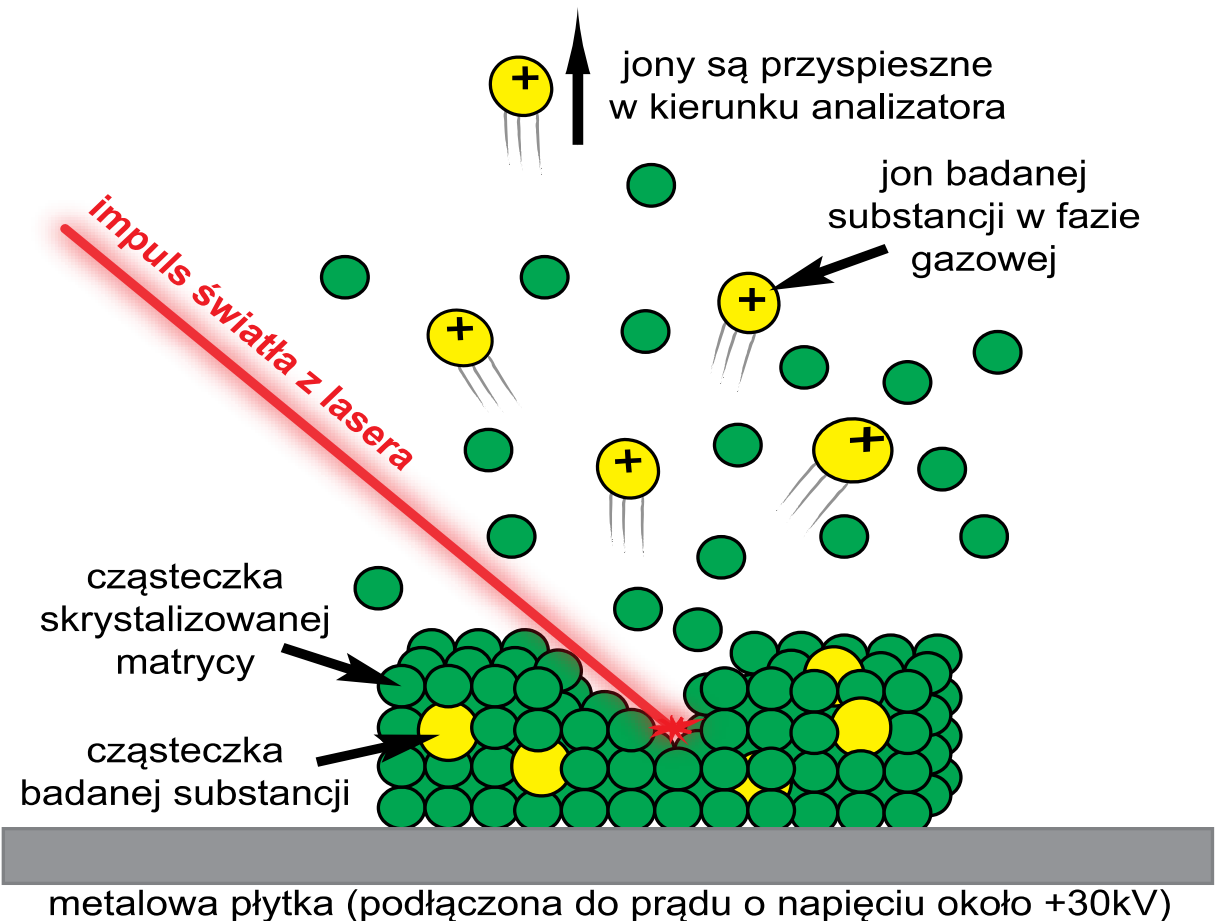
- Łatwość połączenia z HPLC

- Wielokrotnie naładowane cząsteczki



# Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

- Jonizacja z matrycy
- W próżni
- Praca impulsowa
- Odporniejsza na sole
- Trudna do połączenia z chromatografią
- Jednokrotnie naładowane cząsteczki



# Pomiar masy białka

- Nie wystarczy do wiarygodnej identyfikacji
- Różnorodność właściwości
  - Wielkość
  - Problemy z rozpuszczalnością
  - Problemy z jonizacją
- Możliwość pomiaru masy tylko niektórych białek
- Trawienie endoproteazą
  - Krótsze peptydy mają bardziej „przewidywalne” właściwości
    - Lepsza rozpuszczalność, łatwiejsza jonizacja, itp.
  - Rozróżnienie znaczenia słów: peptyd, białko, fragment w żargonie proteomicznym

# Identyfikacja białka 'mass fingerprinting'

- Trawienie specyficzną endoproteazą
  - Można przewidzieć wzór trawienia polipeptydów o znanej sekwencji
- Pomiar masy peptydów powstałych w wyniku trawienia
- Porównanie mas peptydów zmierzonych i wyliczonych teoretycznie

# Mass fingerprinting

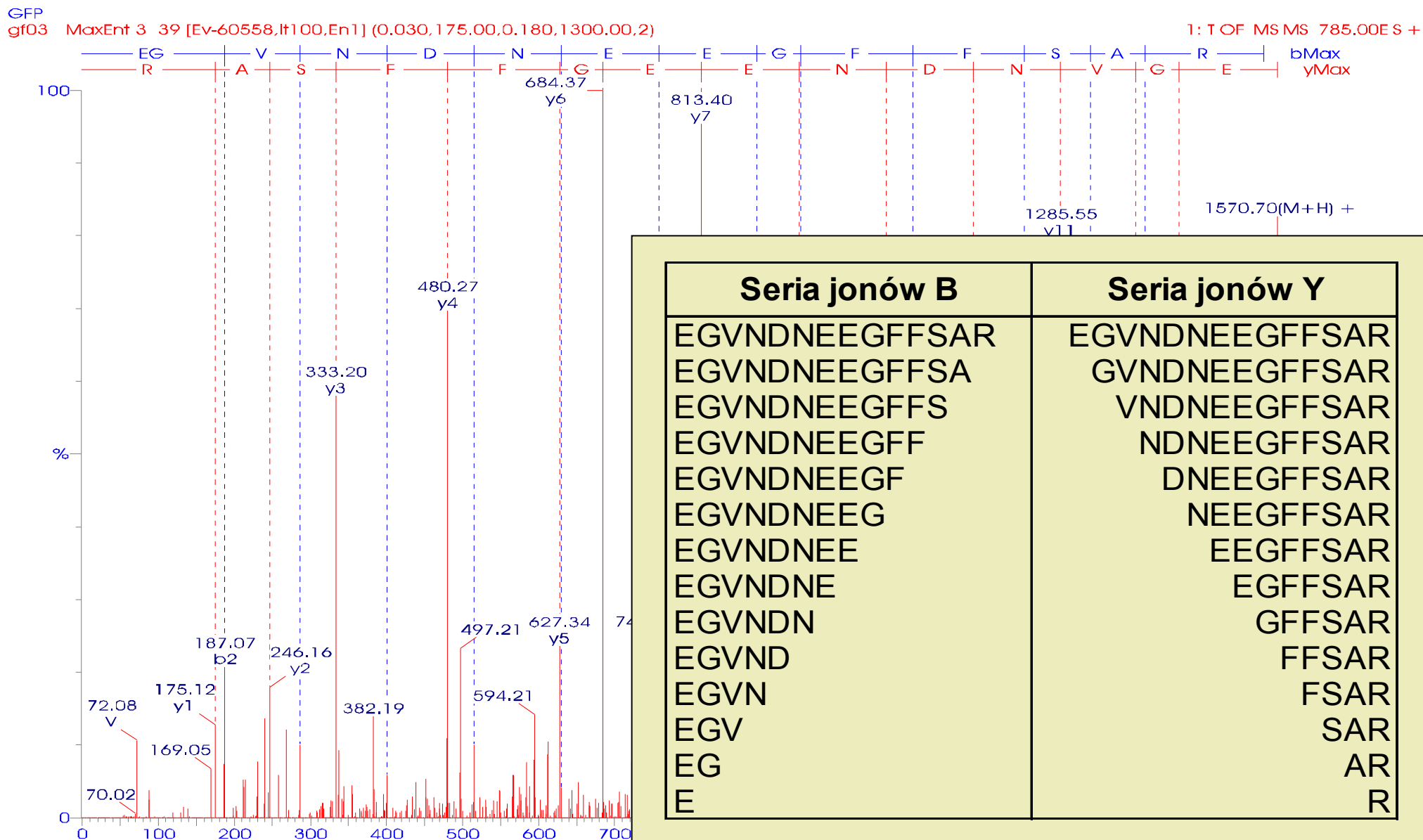
- Identyfikacja białek o znanej sekwencji
- Tylko proste preparaty
  - max. kilka białek
- Niska wiarygodność identyfikacji
  - Zależna od liczby białek w preparacie, wielkości bazy danych i dokładności spektrometru



# Fragmentacja peptydów i sekwencjonowanie

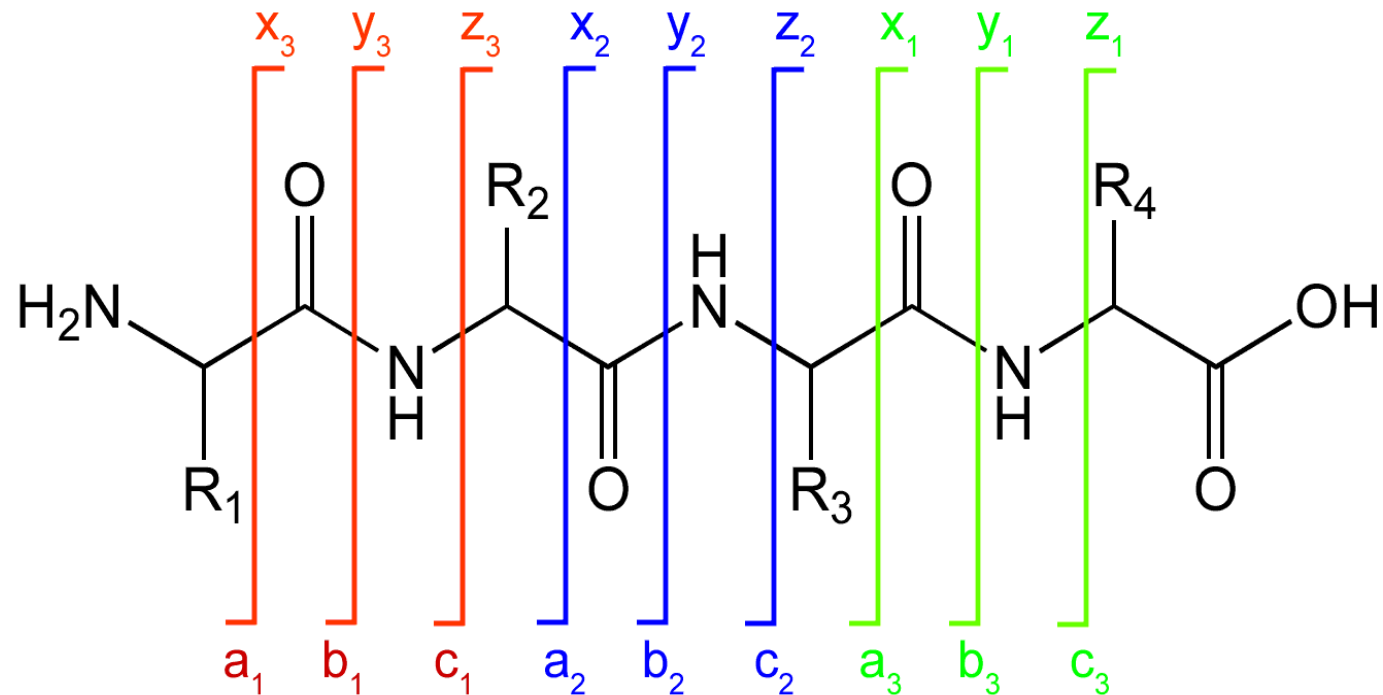
- Spektrometry tandemowe
  - pomiar masy peptydu (MS)
  - selekcję
  - fragmentację
  - pomiar masy fragmentów  
(MS/MS = MS<sup>2</sup>)

# Widmo MS/MS



# Metody fragmentacji i powstające jony potomne

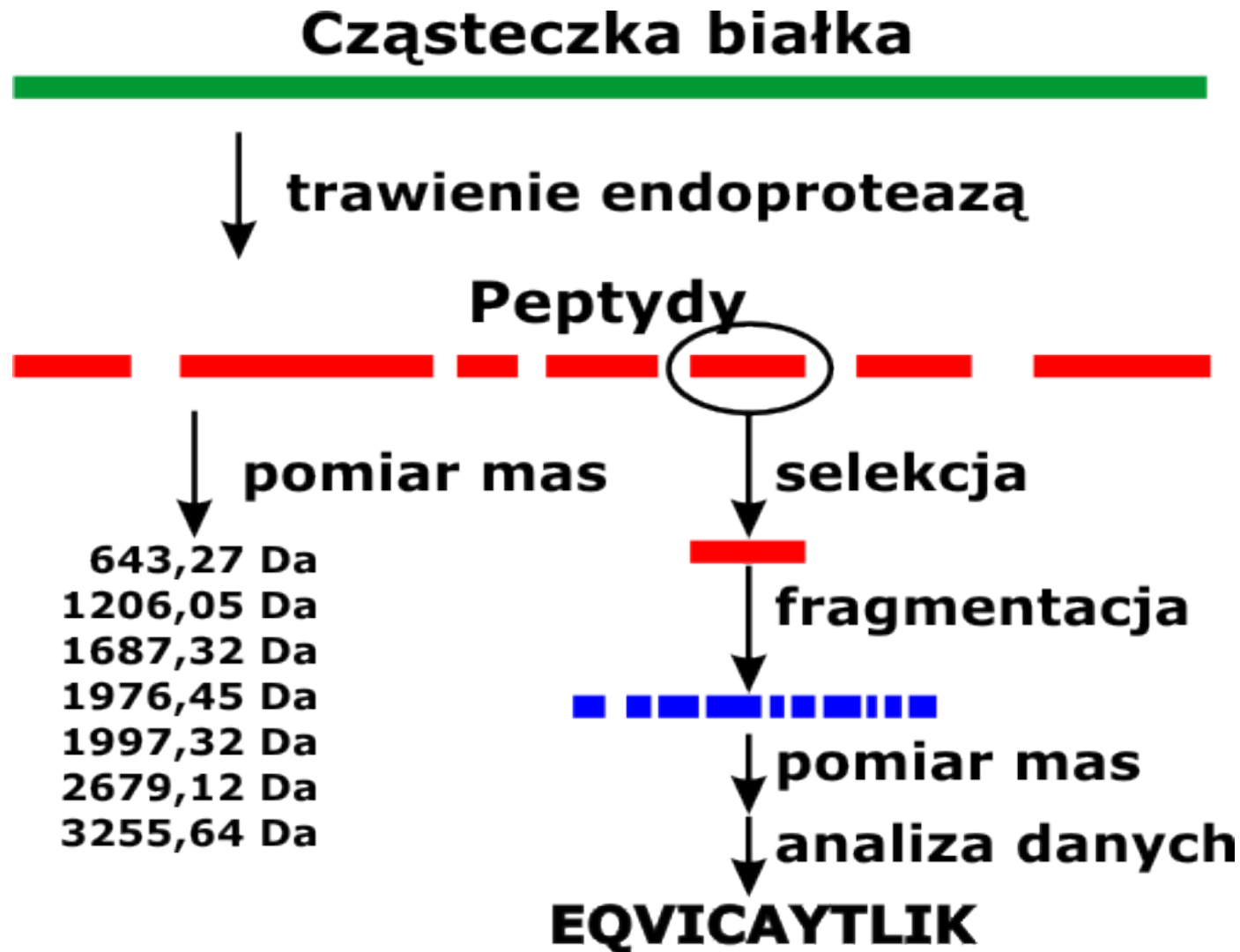
- CID – Collisionally Induced Dissociation
- ECD – Electron Capture
- ETD – Electron Transfer
- Podczerwień



# Identyfikacja na podstawie widma MS/MS

- Znając sekwencję peptydu można wyliczyć masy jonów poszczególnych serii
- Porównanie mas zmierzonych do mas wyliczonych pozwala na identyfikację
  - Nie potrzeba kompletnego widma fragmentacji

# Mas fingerprinting + MS/MS



# Gdzie robić MS?

Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas  
IBB

Prof. Michał Dadlez