

Proteomika

Proteomika ilościowa

Oznaczanie ilości białka

- Bezwzględna ocena ilości konkretnego białka
 - oczyszczenie i pomiar ilości
 - trudne do oceny straty podczas oczyszczania
 - metody „pół ilościowe” np. western blot ze standardem dodanym
 - LC-MS ze standardem dodanym
- Bezwzględne oznaczenie ilości setek białek w jednym doświadczeniu?
 - 2DE + densytometria

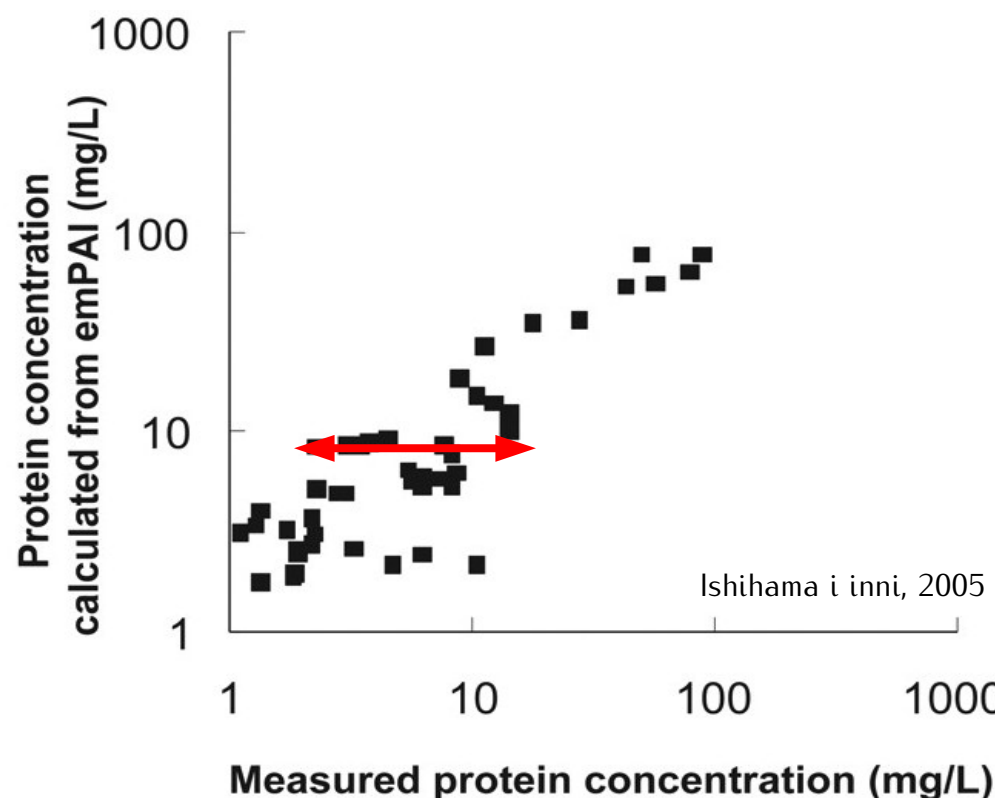
Liczenie widm

(spectral counting)

- Najprostszy sposób oceny ilości białka w badaniach LC-MS
- Liczenie współczynnika biorącego pod uwagę liczbę peptydów zidentyfikowanych i możliwych do zidentyfikowania
 - PAI – Protein Abundance Index
 - emPAI – Exponentially Modified PAI
- Wyniki skrajnie szacunkowe
- Współczynniki używające intensywności
 - iBAQ, TOP3, MeanInt

$$PAI = \frac{N_{obsd}}{N_{obsbl}}$$

$$emPAI = 10^{PAI} - 1$$

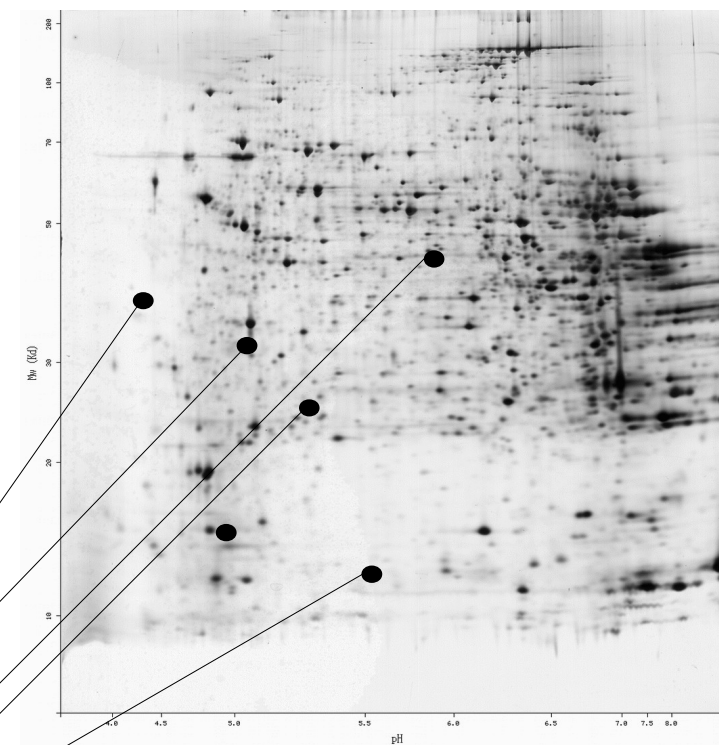
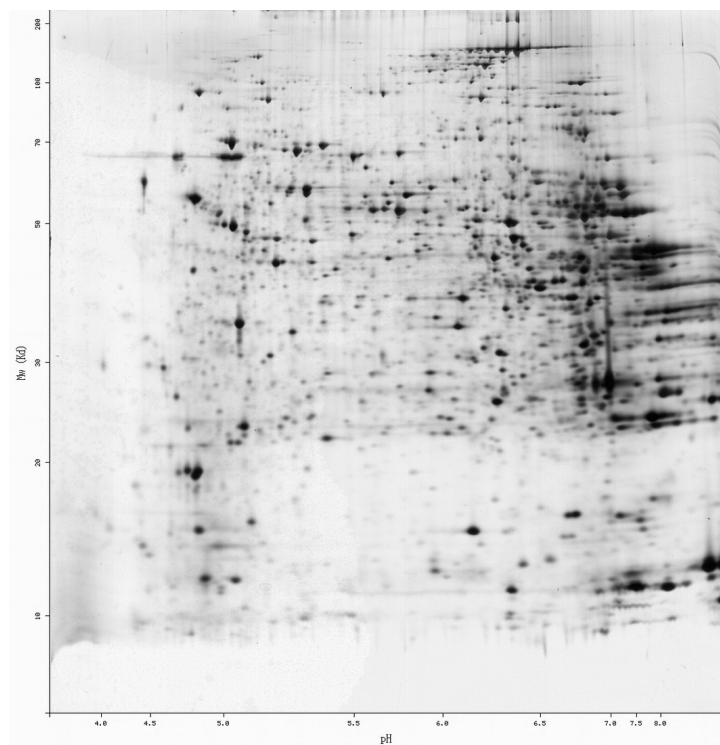


Proteomika różnicowa

- Biologów najbardziej interesują różnice w ilości konkretnych białek pomiędzy próbami
 - mutant – dziki
 - szczep chorobotwórczy – szczep niegroźny
 - reakcja na stres, itp.
 - Różnice odzwierciedlają zmiany zachodzące w komórce
 - Łatwiej badać różnice – kontrola jest „standardem”

Elektroforeza dwukierunkowa

metoda klasyczna



Plamki różnicowe

wycięte

białka strawione w żelu

peptydy poddane analizie spektrometrycznej i zidentyfikowane

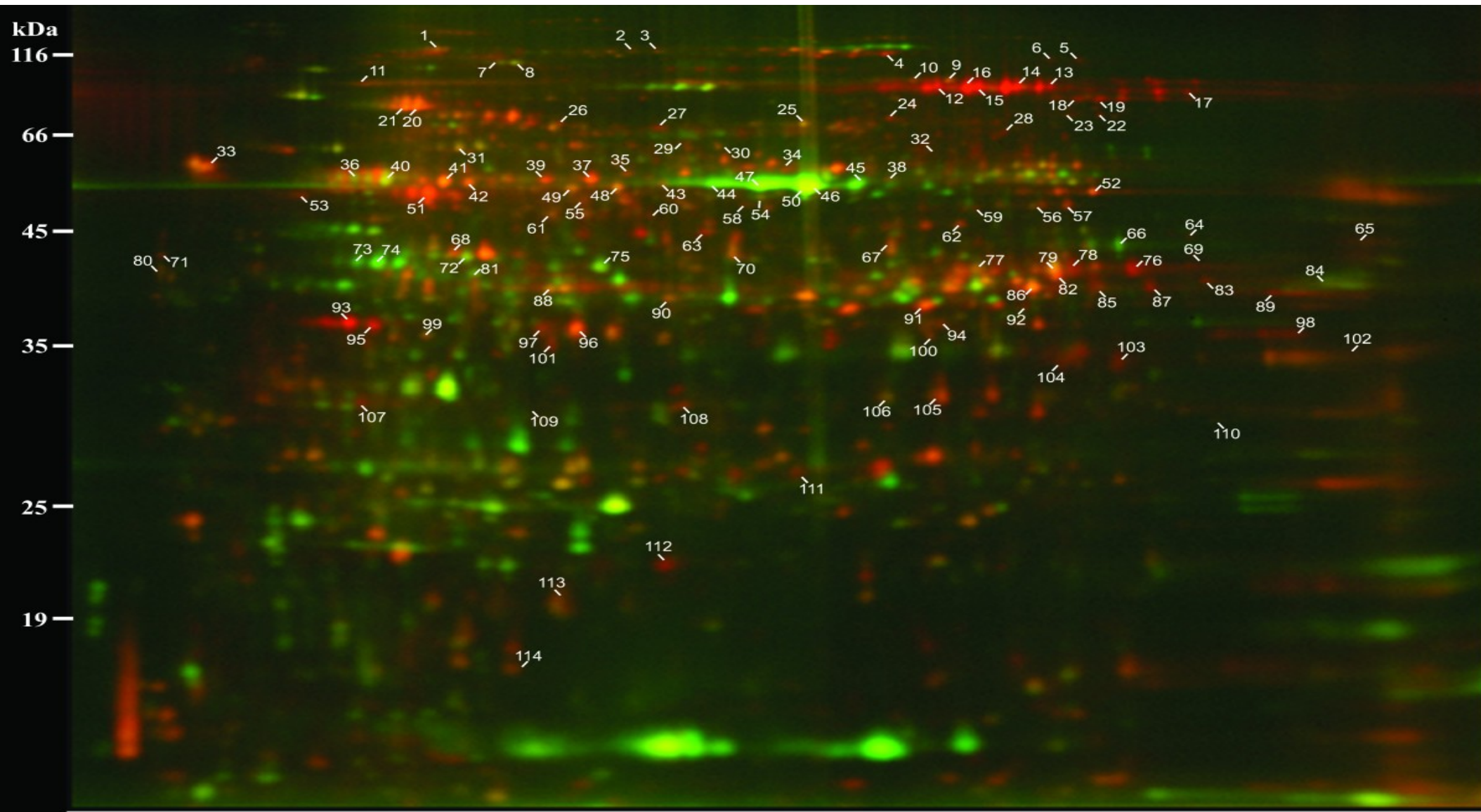
Elektroforeza 2D

- Prosta koncepcyjnie
 - różnice widoczne „na oko”
- Prosty sprzęt
- Łatwo oszacować ilość białka w preparacie
- Pracochłonna i czasochłonna
- Nie nadaje się do białek hydrofobowych i o skrajnym pI
- Mała czułość
 - zasłanianie jednych białek przez inne
- ograniczona liczba białek
- Kiepska powtarzalność
- Wysokie koszty (dodatkowo wiele analiz MS)

DIGE

Difference gel electrophoresis

Znakowanie białek z różnych prób rozróżnialnymi fluorofoforami, wspólny rozdział 2D-PAGE

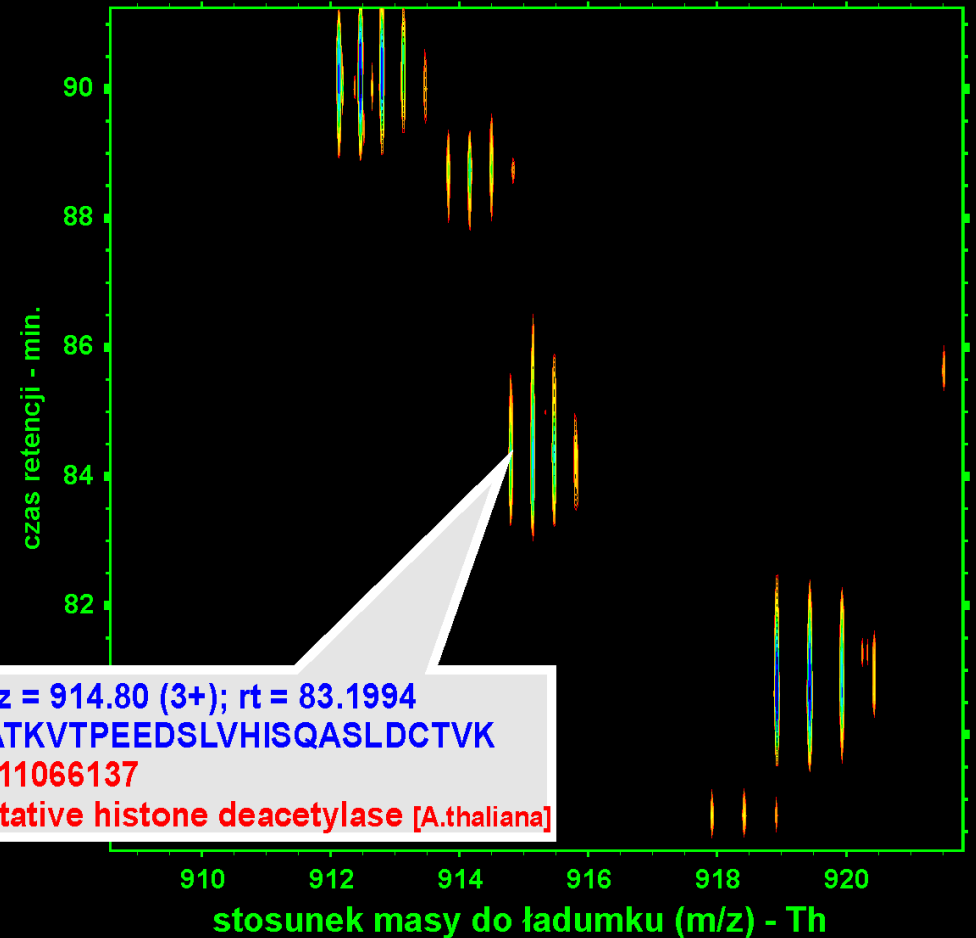
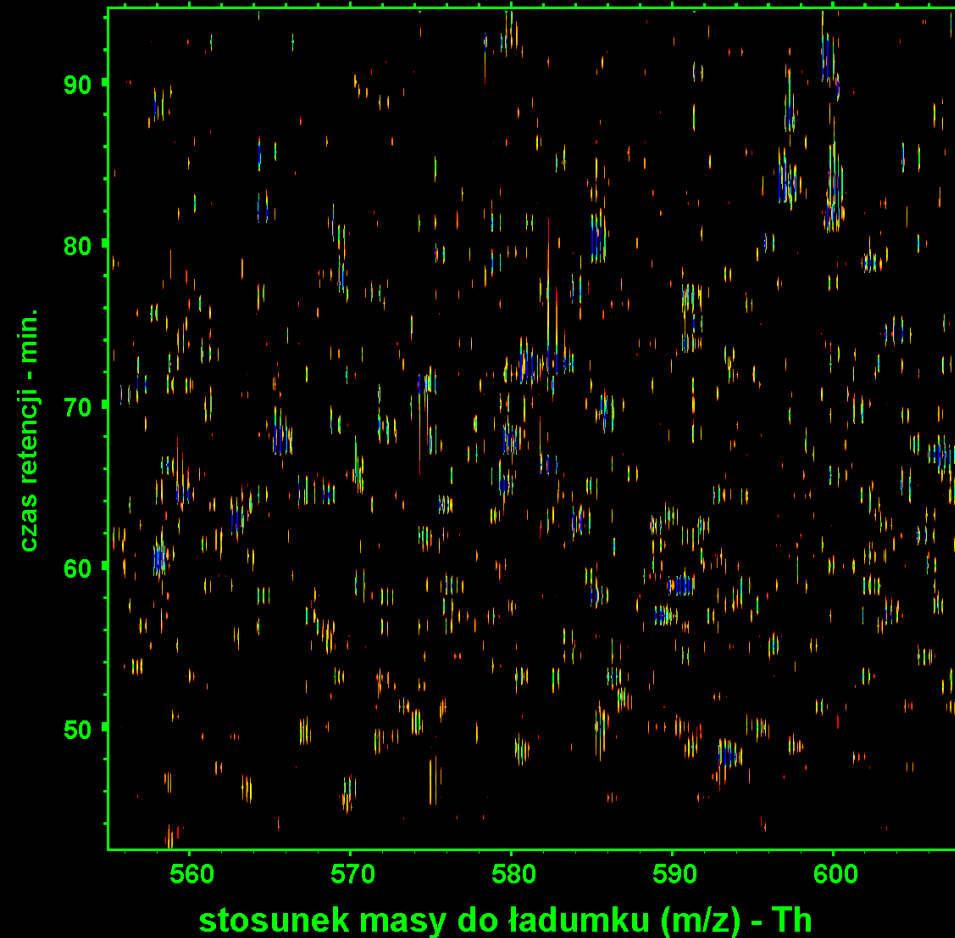
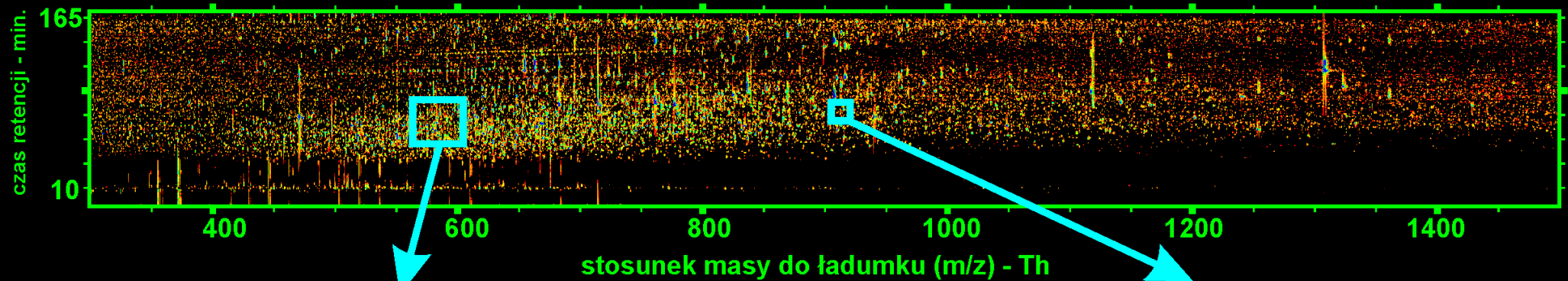


Użycie metod typu 'shotgun'

- Spektrometr mas rejestruje intensywność sygnału
- Intensywność zależy od stężenia peptydu ale
 - wydajność jonizacji ciężka do przewidzenia
 - właściwości peptydu, obecność innych substancji w próbce, parametry źródła jonów
 - można założyć, że w dwóch porównywalnych próbach wydajność jonizacji będzie zbliżona
 - porównanie sygnałów pozwoli na stwierdzenie różnic w stężeniu określonych peptydów (i białek)

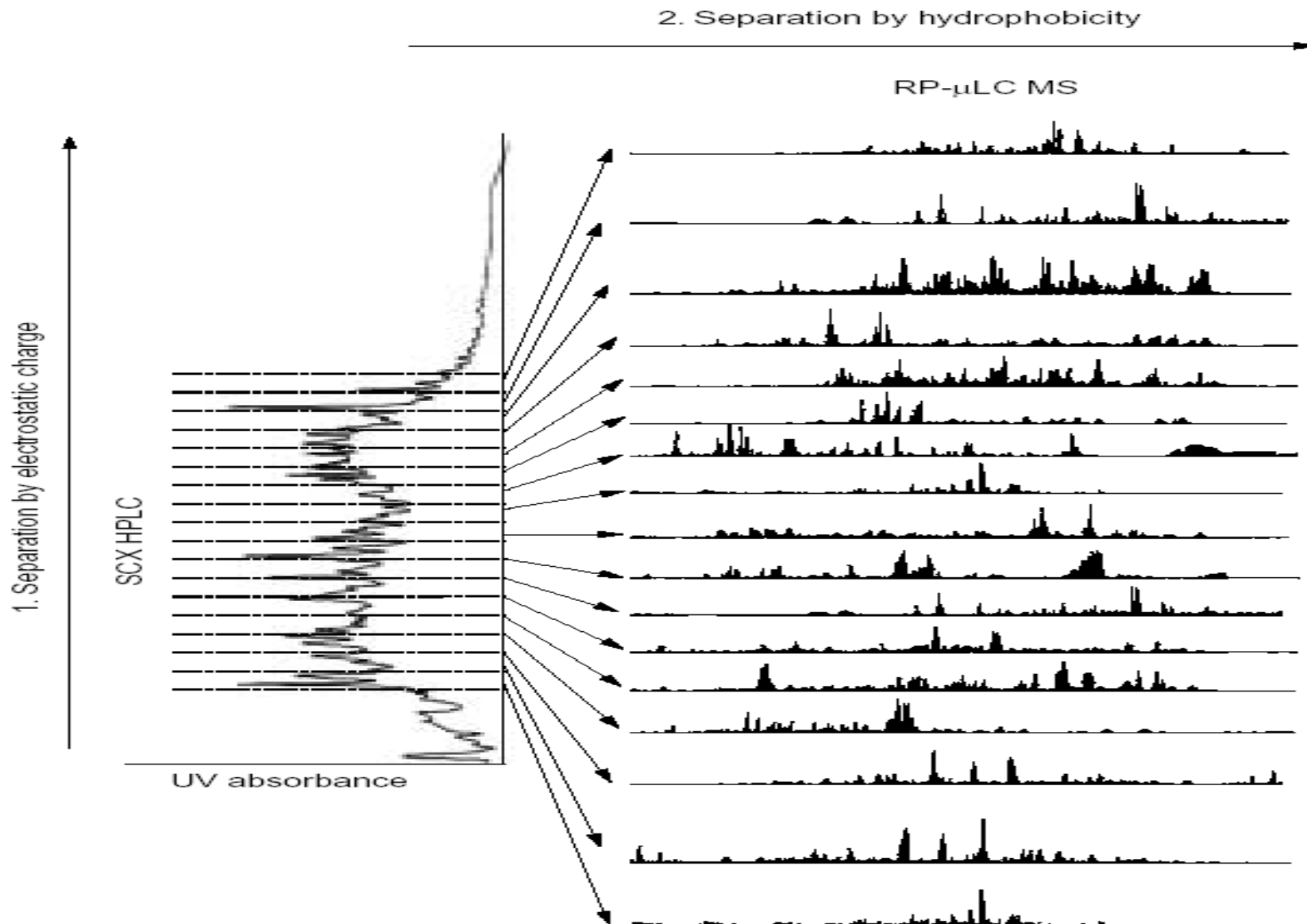
Mapa peptydowa jądra komórkowego *Arabidopsis*

HPLC - ESI - LTQ-FTICR



Rozdział 2D

typowa metoda MudPIT



Analizy bez znakowania peptydów

Label-free

- Kolejne porównywane próby peptydów są poddawane analizie w układzie LC-MS
 - lub 2D-LC-MS, IEF → LC-MS, itp.
- Dane o intensywności z widm MS są używane do porównania ilości peptydów/białek
 - widma MS/MS są używane do identyfikacji

Rozdzielenie rejestracji danych MS i MS/MS

Metody 'Accurate Mass Tags'

- Spektrometr rejestruje widma wielkiej liczby peptydów w czasie jednego przebiegu
 - tylko nieliczne są fragmentowane
- Czas retencji peptydów z kolumny HPLC jest powtarzalny
 - należy zapewnić powtarzalne warunki rozdziatu i skład badanej próby (porównywanie podobnych preparatów)
 - możliwa identyfikacja peptydów na podstawie dokładnego pomiaru masy i czasu retencji
- Jeśli peptyd został zsekwencjonowany tylko w jednym przebiegu, można zidentyfikować jego pik w innym przebiegu
 - porównanie ilości
 - można zwiększyć liczbę identyfikacji i porównań ilości
 - budowa bazy danych pozwalającej przypisać peptydy na podstawie m/z i czasu retencji

Metody 'label free'

- Możliwe badanie wielkiej liczby białek
- Duża czułość
- Białka hydrofobowe i o skrajnym pI
- Łatwa i stosunkowo tania obróbka prób
 - mało etapów – małe straty
 - mało materiału
- Badanie podobnych próbek
 - wpływ mutacji, warunków, choroby, itp.
 - słabiej spisuje się przy badaniu różnych proteomów
- Skomplikowane przetwarzanie danych
- Wrażliwe na zakłócenia rozdziatu i zmiany czułości spektrometru mas

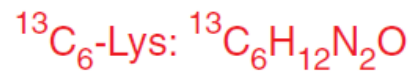
Użycie standardów znakowanych izotopowo

- Możliwe rozróżnienie sygnałów od różnych izotopów przy pomocy spektrometrii mas
 - porównywane próby można wyznakować różnymi izotopami i zmieszać przed analizą
 - różnice w składzie izotopowym nie zmieniają istotnie właściwości peptydów – czas retencji ten sam
- Znakowanie metaboliczne
- Znakowanie *in-vitro*

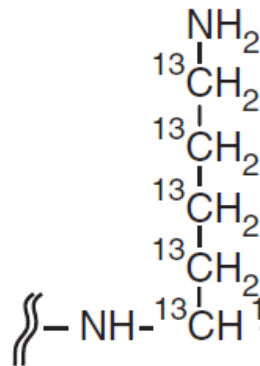
Znakowanie metaboliczne

- Cięższe izotopy dodawane do składników pożywki
- SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in cell Culture)
 - Aminokwasy najczęściej Lizyna i Arginina, rzadziej tyrozyna i metionina
 - Izotopy ^{13}C , ^{15}N rzadziej ^2H
 - Po kilka atomów w aminokwasie zmienionych (+masa kilka Da)
 - Możliwe kombinacje atomów o różnej masie
 - Kultury komórkowe
 - Organizmy modelowe np. Muszka owocowa, Mysz
 - Potrzeba kilku pokoleń

SILAC

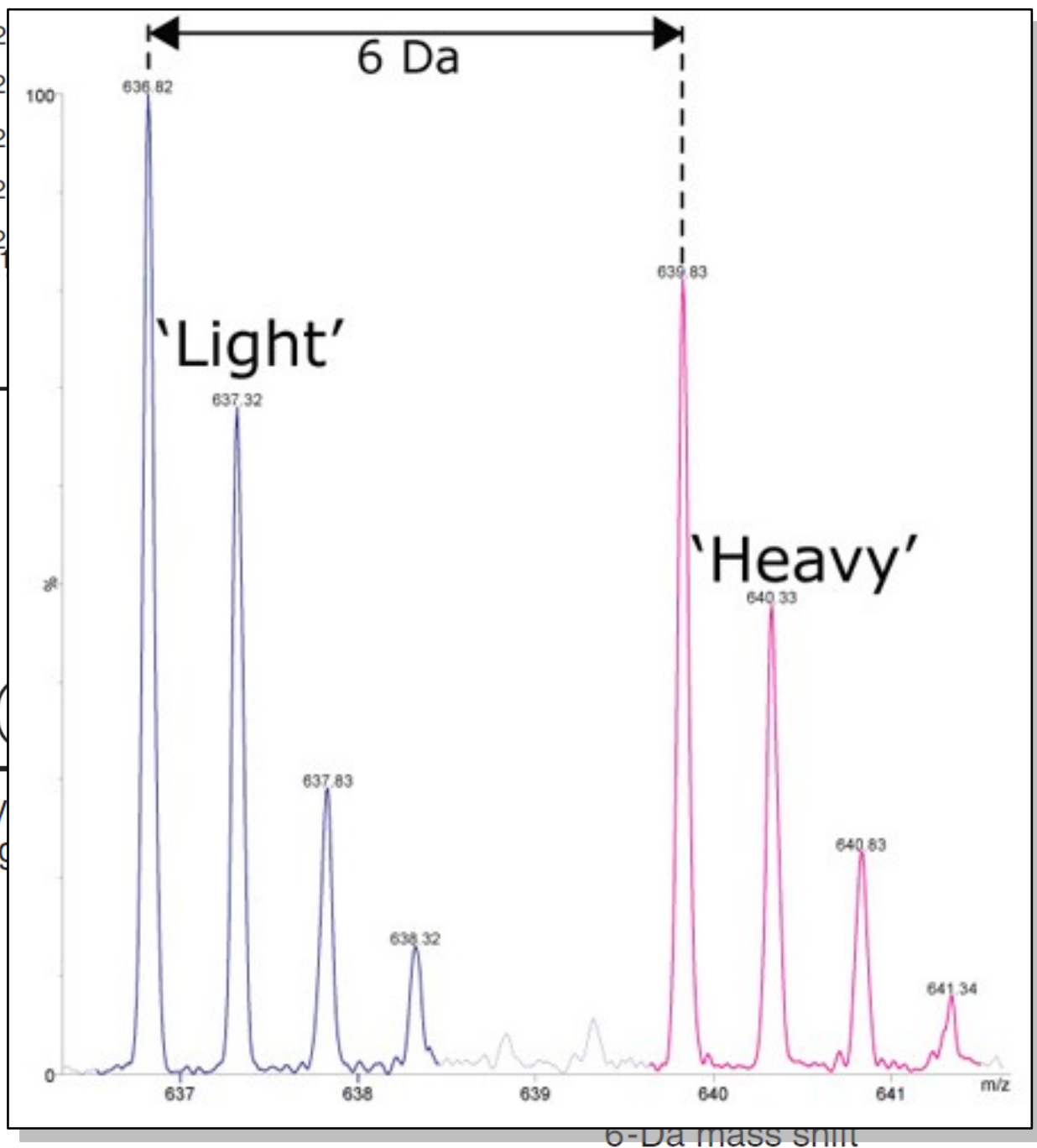


Cells in light,
 $^{12}\text{C}_6\text{-Lys}$ medium



mahspvavqvpqgmqnniadv
eelft^klerig^kgsfgev^k
ginrtqqvvaikⁱidleeae
deiesilacdiqqeivlsq
cdssyvt^khask^kstyleyyg
syl^kgsklw...

Heavy proteins



SILAC

- dobra jakość wyników
- eliminuje błędy na wszystkich etapach izolacji białek
- większość peptydów znakowana
- działa na wszystkich spektrometrach
- ograniczone zastosowanie (zwykle *in-vitro*)
- dość duże zużycie znakowanych aminokwasów
→ koszty

Znakowanie metaboliczne i organizmy samożywne

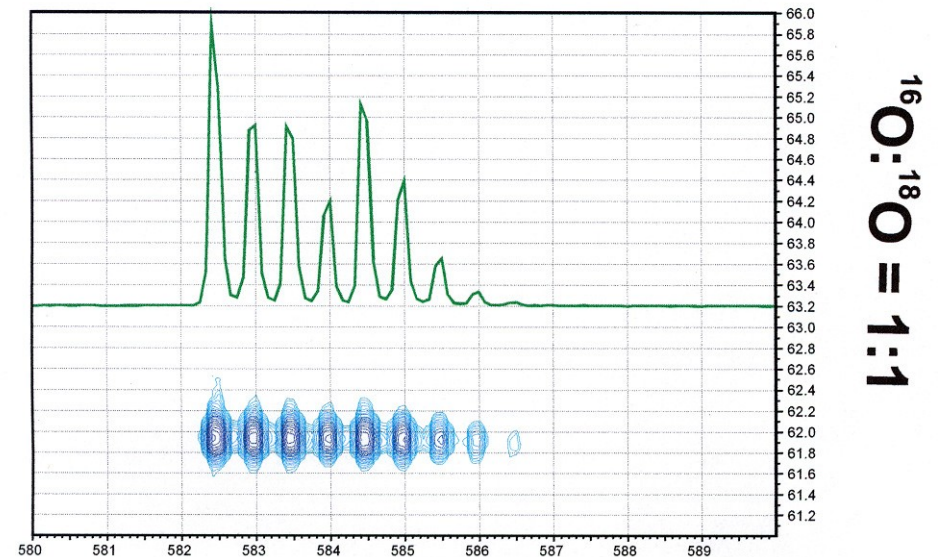
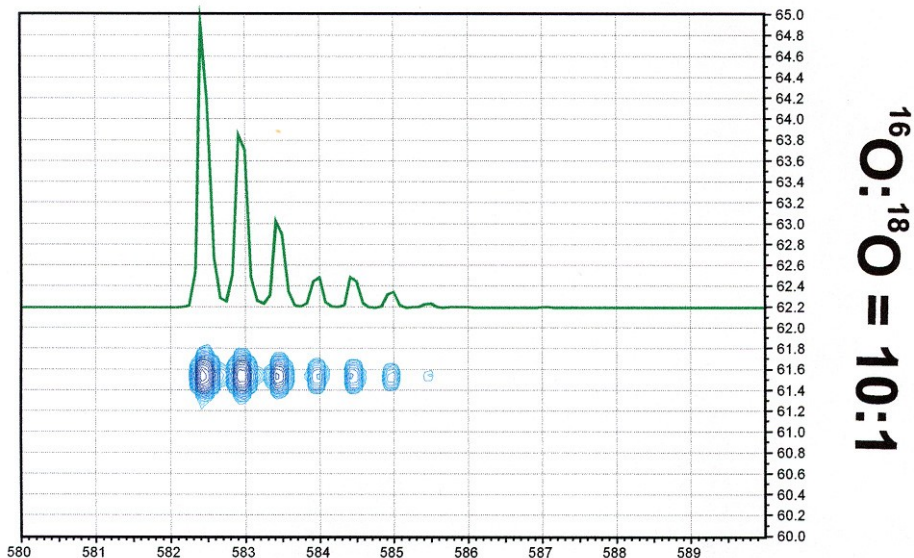
- Rośliny syntetyzują wszystkie aminokwasy
 - można dostarczyć nadmiaru aminokwasów do pożywki
 - mała wydajność inkorporacji (~80%)
- Zastąpienie ^{14}N przez ^{15}N w pożywce
 - możliwe *in-vitro* i np. w szklarni (hydroponika)

Znakowanie *in-vitro*

- Znakowane są wyizolowane białka lub peptydy
- Dodanie ^{18}O podczas trawienia trypsyną
- ICAT (Isotopically coded affinity tags)
- iTRAQ — znaczniki izobaryczne

Znakowanie ^{18}O

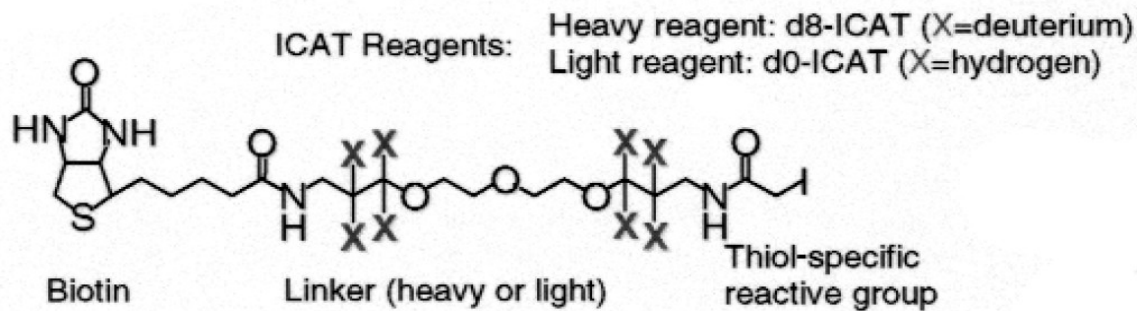
- Trypsyna podczas trawienia przyłącza dwa atomy tlenu do odtwarzanej grupy $-\text{COOH}$
 - Trypsyna wymienia atomy tlenu grup COOH lizyn i arginin na C-końcach peptydów.



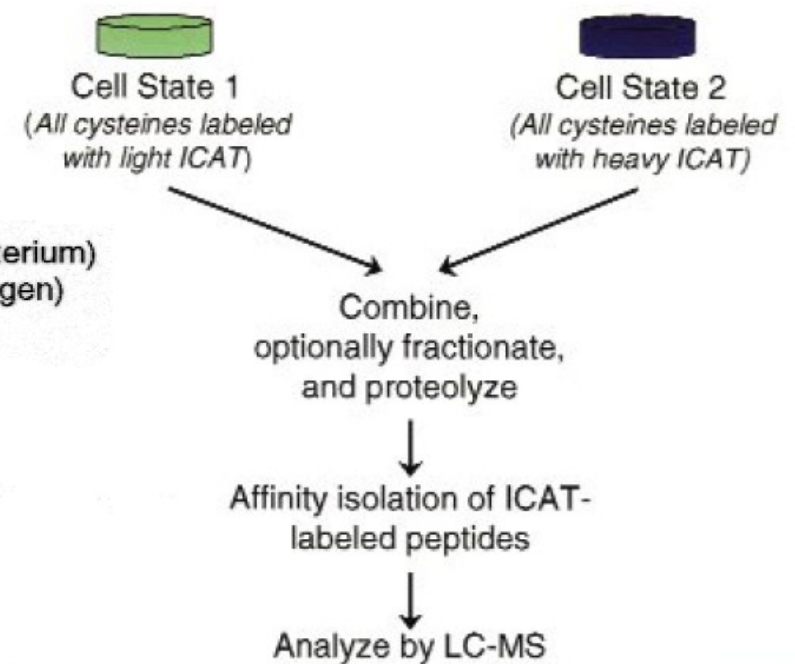
^{18}O

- znakowane prawie wszystkie peptydy
- znakowanie podczas trawienia białek lub znakowanie peptydów po trawieniu
- dobre porównanie ilości
- wymiana ^{18}O na ^{16}O
 - tripsyna w roztworze
- należy wymienić całość wody w próbce przed znakowaniem
 - np. liofilizacja
- H_2^{18}O dość drogie

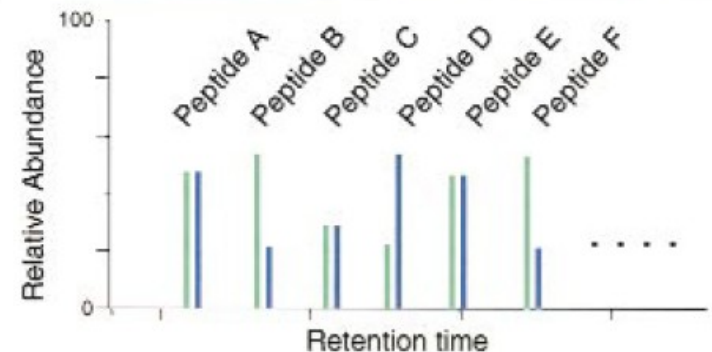
ICAT



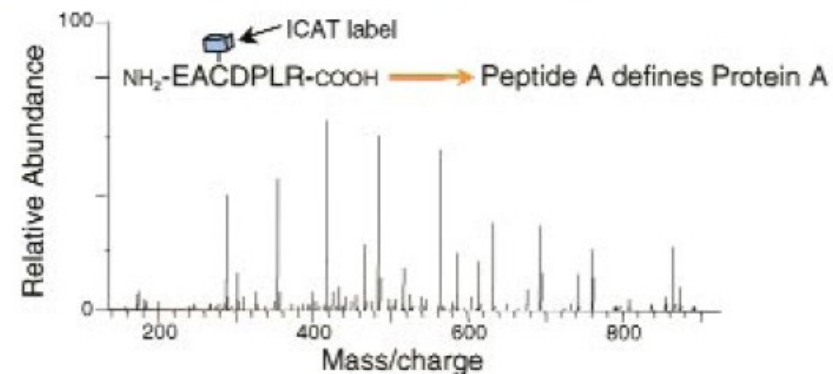
- Isotopically coded affinity tag
- Przyłącza się do zredukowanej cysteiny
 - Oczyszczanie
 - Niewiele peptydów wyznakowanych i wzbogaconych
- Zmienia się m/z i czas retencji



Quantitate relative protein levels by measuring peak ratios



Identify proteins by sequence information (MS/MS scan)

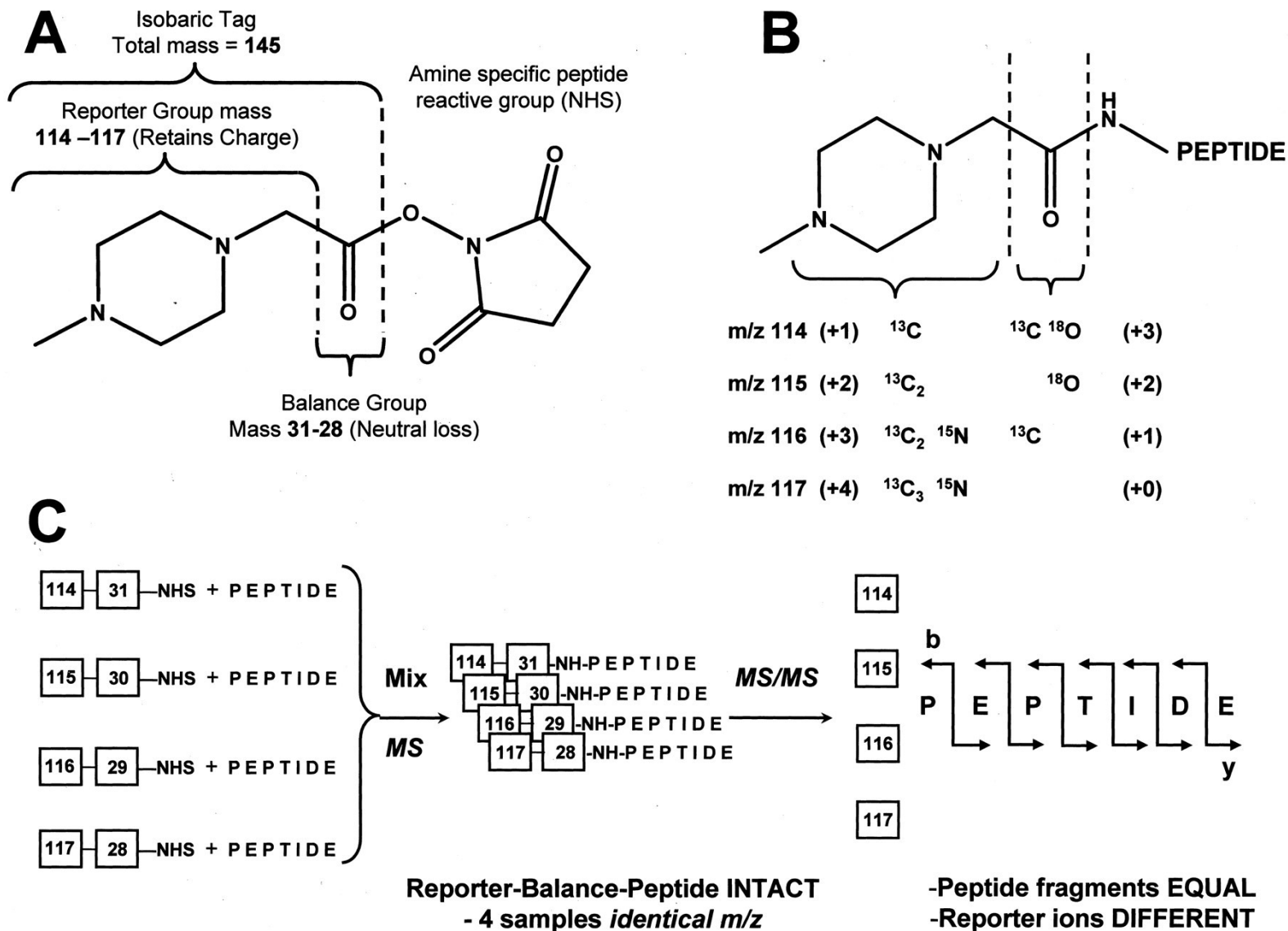


Znaczniki izobaryczne iTRAQ

Isobaric tag for relative and absolute quantitation

- Znacznik przyłącza się do grup aminowych
- Wiele wersji znacznika np. 4 lub 8
- masy poszczególnych wersji **równe!**
- przy fragmentacji powstaje jon reporterowy
 - z każdego znacznika powstaje jon o innej masie
- porównanie intensywności sygnałów jonów reporterowych na widmach MS/MS

A, diagram showing the components of the multiplexed isobaric tagging chemistry.



Ross P L et al. Mol Cell Proteomics 2004;3:1154-1169



iTRAQ

- dobra ocena ilości
- wiele prób na raz
- prostsze przetwarzanie danych niż w ^{18}O i SILAC
- znakowanie dość proste
- nie działa z fragmentacją w pułapce jonowej
- możliwa mniejsza czułość
 - dużo prób na raz
- wysoka cena

Oprogramowanie

- Przy metodach 'label-free' i znakowaniu izotopowym
 - Potrzebna analiza widm MS
 - Znajdowanie pików i ocena objętości
 - Nakładanie i porównywanie map z HPLC-MS w metodach typu AMT (eliminacja zakłóceń rozdziatu HPLC)
 - Większa objętość danych (np. ~1GB na przebieg)
 - przy identyfikacji używane tylko na początku analiz
- iTRAQ – podobnie, jak przy identyfikacji dokładniejsza analiza tylko widm MS/MS

Podsumowanie

- Metody klasyczne
 - 2D–PAGE
- Metody opierające się na LC–MS
 - bez znakowania ('label–free')
 - znakowanie metaboliczne
 - znakowanie wyizolowanych białek lub strawionych peptydów
- Optymalny wybór metody