


# Proteomika

**Złożoność proteomów**

# Źródła złożoności

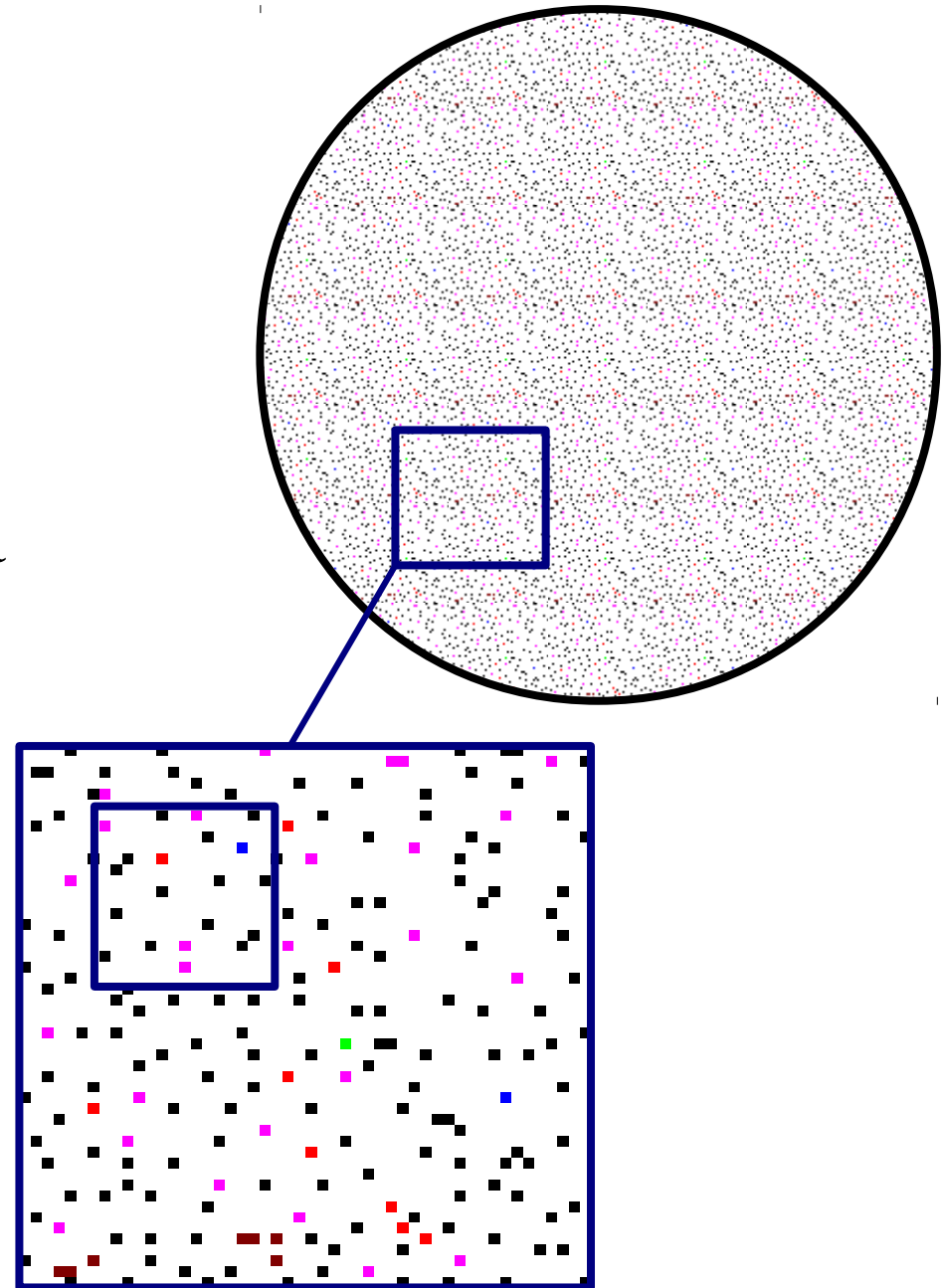
- Złożoność jakościowa pojedynczych białek
    - geny
    - alternatywnie złożone transkrypty,
    - modyfikacje potranslacyjne
    - przycinanie, itp.
    - struktura
  - Oddziaływania
    - z białkami lub innymi cząsteczkami
    - trwałe kompleksy
    - przejściowe łączenie cząsteczek
      - modyfikowanie, cięcie, degradacja
      - składanie białek (chaperoniny)
- 

# Zmienność stężenia białek

- „Złożoność ilościowa”
  - Kilka cząsteczek w komórce — setki milionów
  - Zakres dynamiczny stężeń białek w osoczu  $\sim 10^9$
  - mechanizmy regulacji
    - ekspresji genów
    - składania transkryptów
    - translacji
    - szybkość składania i transport
    - modyfikacji
    - degradacji

# Problemy badawcze

- „Głębokość analizy”  
w genomice i transkryptomice
- Identyfikacja
  - peptydy i białka, bark amplifikacji
  - ograniczona „głębokość analizy”
  - spektrometr mas jest w stanie fragmentować ograniczoną liczbę peptydów w przebiegu
  - ograniczona czułość i zakres dynamiczny



# Czułość

- Minimalna ilość cząsteczek pozwalająca na
  - pomiar masy
  - identyfikację peptydu
- Złożona mieszanina
  - Większe prawdopodobieństwo pomiaru MS/MS cząsteczek o dużym stężeniu
  - Zakres dynamiczny urządzenia
  - Z góry określona maksymalna ilość białka poddawanego analizie np. w układzie LC-MS
    - niewystarczająca liczba cząsteczek białek o małym stężeniu w określonym preparacie

# Radzenie sobie ze złożonością

- Postęp w spektrometrii mas
  - Szybsze i bardziej czułe spektrometry
    - Q-TOF → do 150 białek/przebieg LC-MS
    - Orbitrap Velos → do 2000 białek/przebieg LC-MS
      - Poziom proteomu bakterii
- Frakcjonowanie

# Etapy analiz proteomicznych

## **Materiał**

↓  
**frakcjonowanie komórek**

↓  
**izolacja białek**

↓  
**rozdział białek**

↓  
**trawienie proteazą**

↓  
**rozdział peptydów**

↓  
**analiza w MS**

**Dane**

Wirowanie w gradiencie itp.

Wytrącanie TCA/Aceton

Elektroforeza 1D i 2D, LC, IEF

Trypsyna

nanoHPLC, 2D HPLC (MudPIT)  
elektroforeza kapilarna

MALDI TOF, Q-TOF, LTQ-FTICR

# Strategie

- Nacisk na rozdział białek
  - typowo elektroforeza 2D → trawienie → MALDI
- Metody typu 'Shotgun'
  - MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)
- Metody mieszane
  - Rozdział białek i rozdział peptydów



# Selekcja i frakcjonowanie komórek

- Badania organów, tkanek itp.
- Mikrodysekcja laserowa

## Metody do selekcji lub frakcjonowania komórek:

- Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)
- Elektroforeza przepływowa (Free-Flow Electrophoresis)
- Wirowanie w gradientach gęstości
- Izolacja konkretnych organelli komórkowych

# Izolacja białek

- Liza/homogenizacja komórek
- Konieczne rozpuszczenie białek
  - utrudniają to różne właściwości chemiczne
  - bufony „łagodne” pozwolą na badania białek rozpuszczalnych w wodzie
  - detergenty np. SDS, mocznik, chlorowodorek guanidyny
    - inaktywują enzymy, mogą uniemożliwiać elektroforezę itp.
      - np. SDS (inaktywuje trypsynę, nie pozwala na IEF), chlorowodorek guanidyny (inaktywuje trypsynę, strąca SDS).
- Usunięcie innych substancji pochodzący z badanego materiału i dodanych podczas preparatyki
  - zależne od metod dalszej analizy
  - strącanie, dializa, ultrafiltracja, itp.
  - duże straty materiału

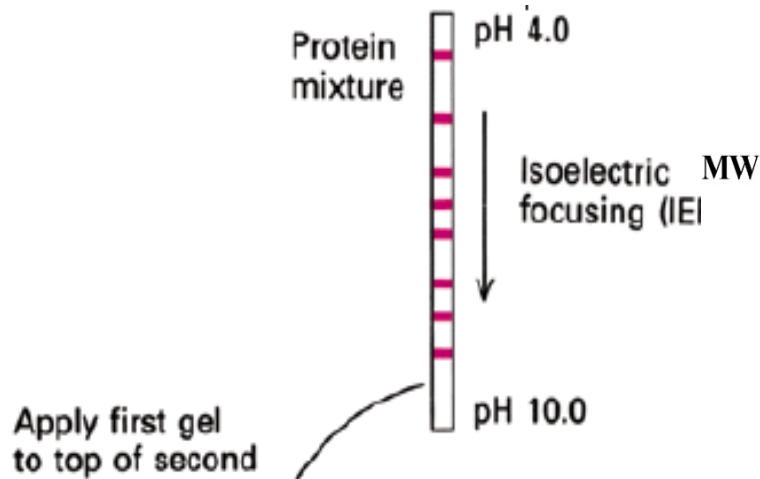
# Rozdział białek

- Wytrącanie różnicowe, itp.
- Elektroforeza 1D i 2D
  - 1D: SDS-PAGE, ogniskowanie izoelektryczne (IEF), natywna, AU-PAGE (acid urea), itp.
  - 2D: ogniskowanie izoelektryczne — SDS-PAGE
  - można wyciąć prążki lub plamki, białka strawić w żelu i poddać analizie LC-MS
- Chromatografia
  - sączenie molekularne, jonowymienna, oddziaływań hydrofobowych, odwróconej fazy (np. RP-HPLC)

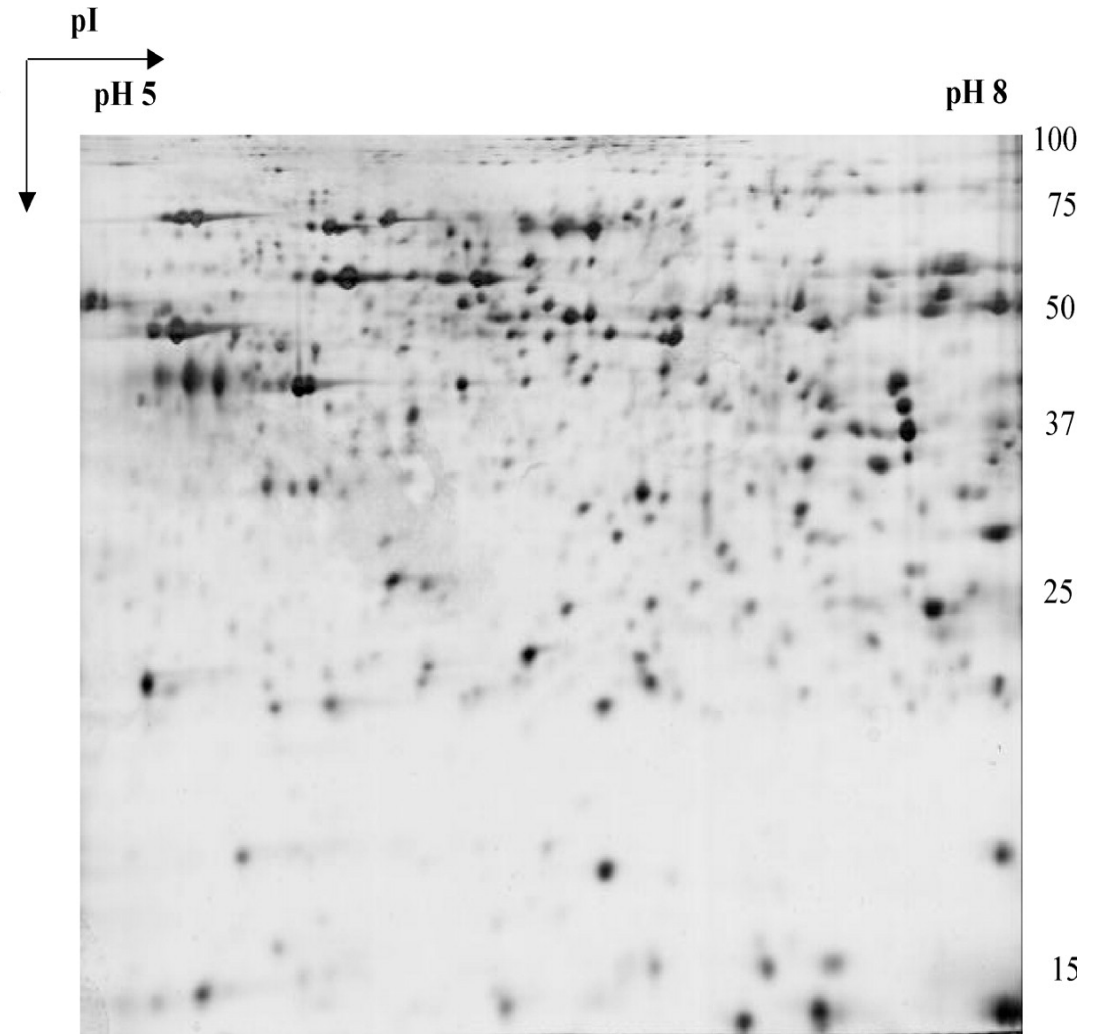
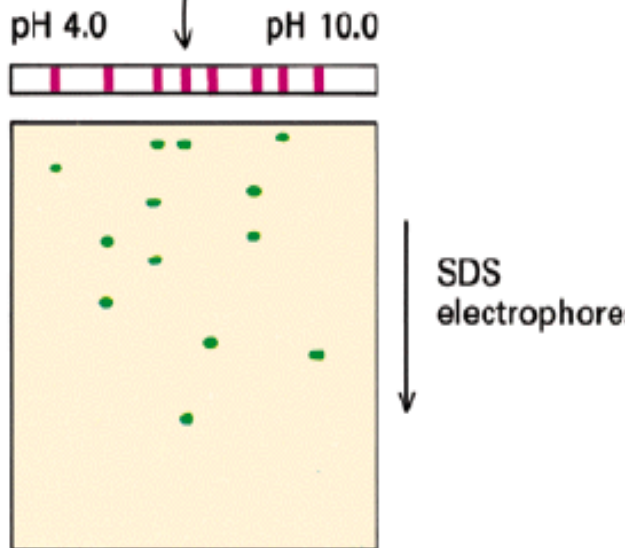
# Elektroforeza dwukierunkowa

(a)

**Separation in first dimension (by charge)**



**Separation in second dimension (by size)**



# Podział ze względu na ciśnienie

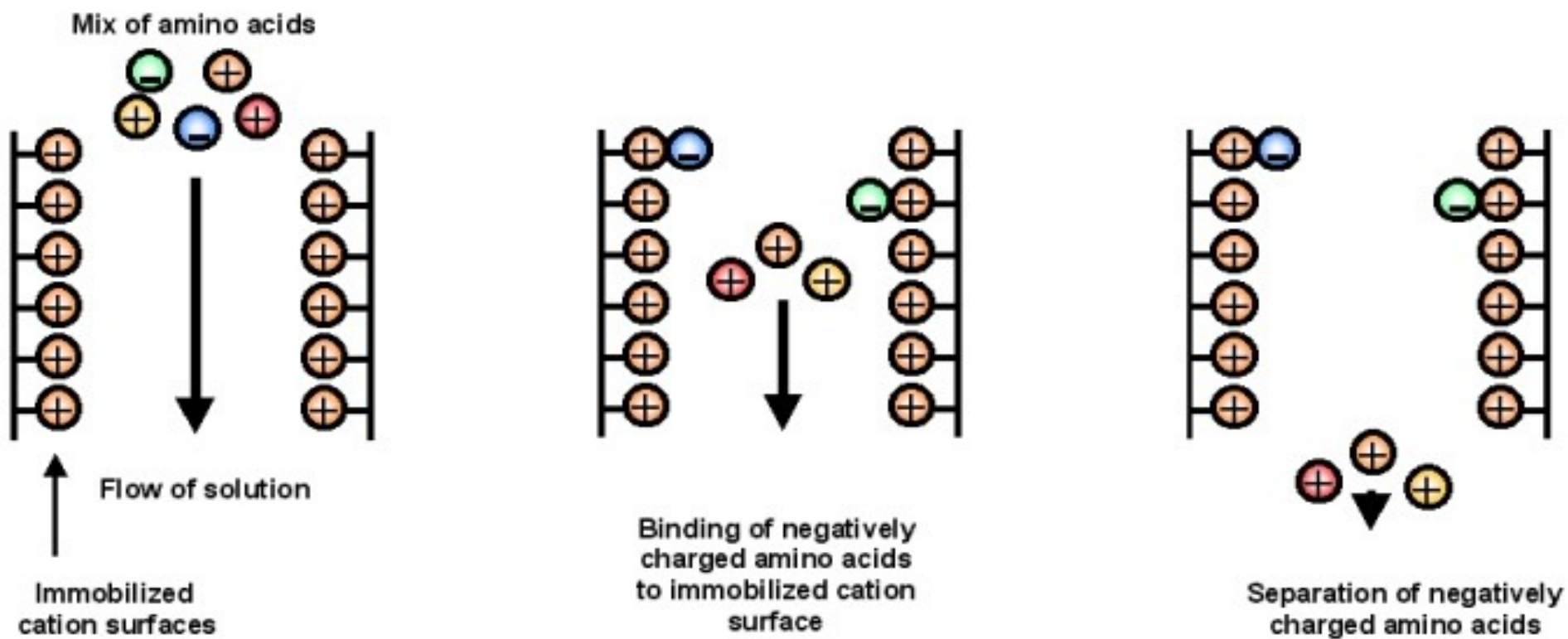
- Chromatografia kolumnowa (Liquid Chromatography – LC)
  - Standardowa niskociśnieniowa
    - przepływ eluenta: grawitacja lub pompa
- FPLC (Fast Protein/Performance LC)
- HPLC (High Performance/Pressure LC)
  - nanoHPLC
- UPLC (Ultra Performance LC)
  - nanoUPLC
  - możliwe bardzo krótkie przebiegi w skali analitycznej

# Chromatografia odwróconej fazy

- Najczęściej stosowana w systemach HPLC
- typowe złoże: C-4 do **C-18**
  - łańcuchy węglowodorowe
  - drobniejsze ziarna złoże → większa rozdzielczość i ciśnienie
  - współczynnik kształtu kolumny
- Duża rozdzielczość
- Uniwersalna

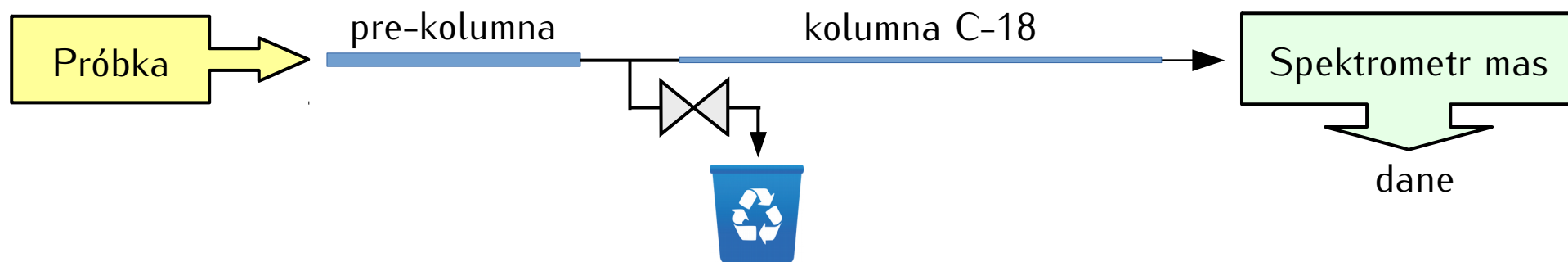
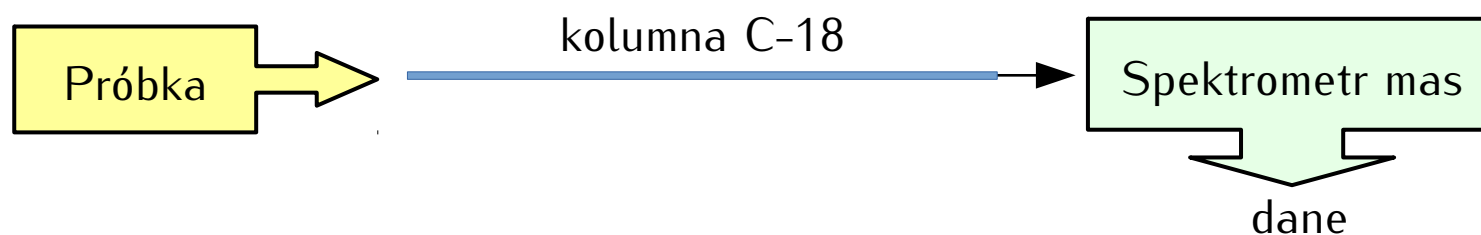
# Chromatografia jonowymienna

- Rozdział ze względu na ładunek
  - zależna od pH
  - kationit/anionit
  - sól w buforze — nie działa w połączeniu z ESI



# Rozdział peptydów

- Standardowy układ: nanoHPLC (złóże C18) połączony ze źródłem jonów spektrometru mas
  - przepływ np. 250 nl/min





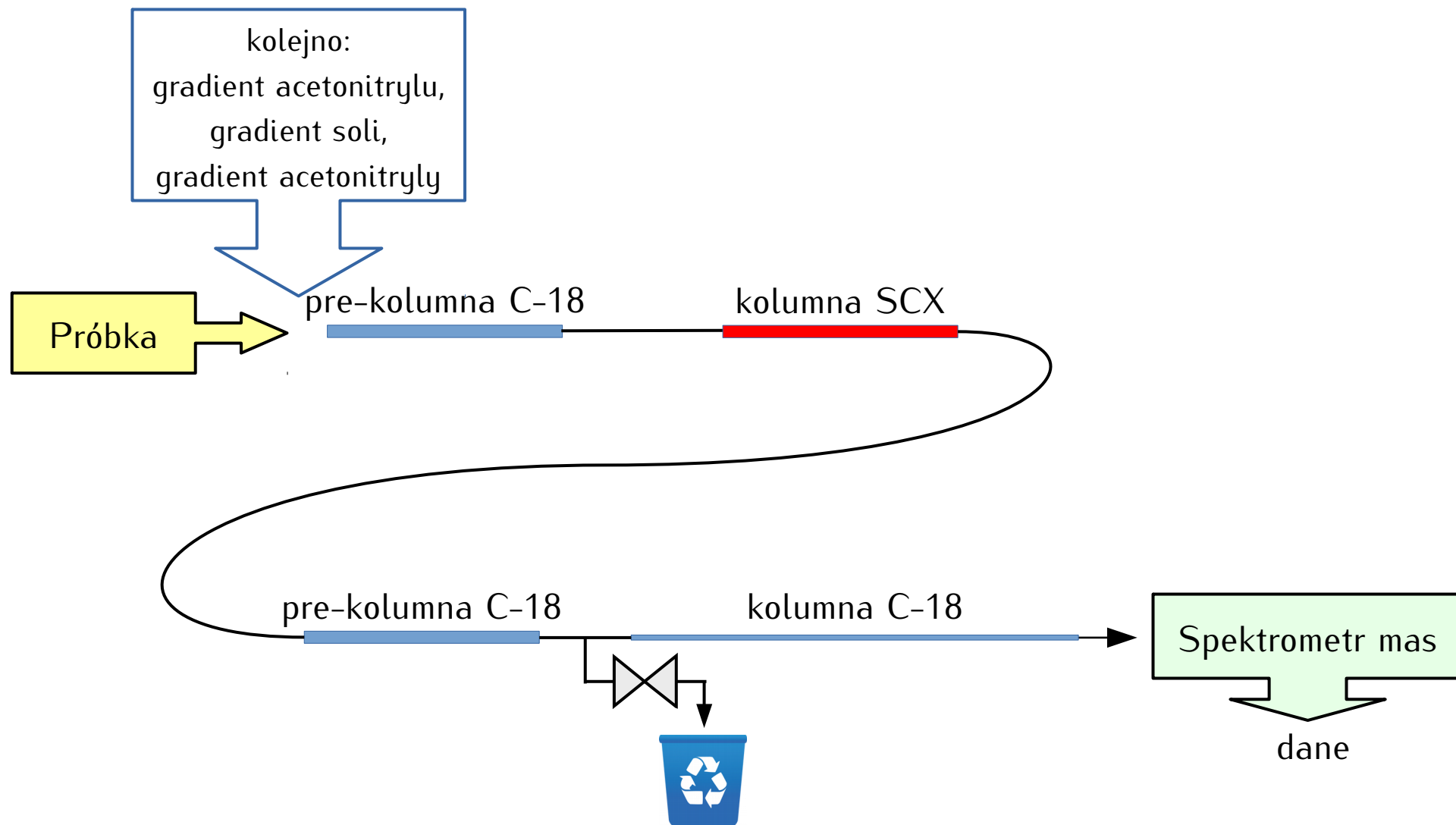
# nanoHPLC-MS

- Ważna rozdzielczość
  - Rozdział peptydów + zagęszczenie próby
- Typowe parametry kolumn
  - Złóże C-18
    - średnica ziaren 1,7 – 5  $\mu\text{m}$
    - średnica kolumny 50 – 150  $\mu\text{m}$
    - długość kolumny 7 – 50 cm
- Dobór czasu przebiegu
- Ekstremalne HPLC (np. wielometrowe kolumny)

# Chromatografia dwuwymiarowa

- Multidimensional Protein Identification Technique (MudPIT)
- Najczęściej stosowana chromatografia jonowymienna przed chromatografią odwróconej fazy
  - każdą z frakcji po chromatografii jonowymiennej można analizować w standardowym systemie LC-MS
  - można zbudować układ robiący takie analizy „on-line”

# Zautomatyzowany system



# Wszystko w jednej kolumnie



Kolumna ze złożem SCX i C-18



Kolumna ze złożem C-18, SCX, C-18

- Kolumna może być zintegrowana z igłą źródła jonów
- Zintegrowane kolumny są często stosowane w standardowych systemach LC-MS

# Ogniskowanie izoelektryczne

- Peptydy można rozdzielić w immobilizowanych gradientach pH
  - Działa tak samo dla całych białek i peptydów
- Żel można pociąć na fragmenty, wyeluować peptydy i poddać analizie w układzie LC-MS
  - można uzyskać dużo frakcji peptydów

# Elektroforeza kapilarna

- Można połączyć ze spektrometrem mas
  - sprawia problemy (napięcia, kierunek migracji, itp.)
- Bardzo rzadko stosowana
- Dobra rozdzielczość

# Optymalny wybór metod

- Charakterystyka białek
  - białka hydrofobowe, o skrajnym pI
  - białka bardzo trudno rozpuszczalne
- Zanieczyszczenia preparatu
  - substancje natywne DNA/RNA, lipidy, polisacharydy
- Złożoność proteomu i liczba białek, które chcemy badać
- Koszty

# Liczba badanych białek

- Elektroforeza 2D

*kilkaset analiz spektrometrycznych (trawienie+pomiar) ~ 1000 białek*

– niska czułość i mały zakres dynamiczny, nie nadaje się do białek hydrofobowych i o skrajnym pI

- preparat → trawienie → LC-MS (nanoHPLC-MS)

*jeden przebieg systemu HPLC-MS np. 4 godziny spektrometru ~ 1000 białek*

- preparat → SDS-PAGE → trawienie → LC-MS

*np. 10 przebiegów LC-MS, np. 24 godziny, kilka tysięcy białek*

- preparat → trawienie → 2D-LC-MS

*kilka do kilkanaście przebiegów LC-MS, kilkanaście tysięcy białek*

- preparat → trawienie → IEF → LC-MS

*kilka do kilkanaście przebiegów LC-MS, kilkanaście tysięcy białek*



# Podsumowanie

- Dobór strategii bardzo istotny
- Większa liczba kroków frakcjonowania zwiększa liczbę identyfikowanych/badanych białek
  - może powodować utratę białek
- Koszty analizy zależą przede wszystkim od czasu użycie drogiego sprzętu (spektrometr mas)