

Streszczenie wykładu: Proteomika wielkoskalowa w badaniach układu pokarmowego

Podstawy proteomiki

W latach dziewięćdziesiątych minionego stulecia analiza białek i peptydów przy użyciu spektrometrów masowych zaczynała nabierać znaczenia w naukach biologicznych. Ze względu na swój potencjał badawczy, umożliwiający jednoczesne badanie dużej ilości białek, została ona, przez analogię do genomiki i transkryptomiki - wielkoprzepustowych metod badań kwasów nukleinowych, nazwana proteomiką. Proteomika, obdarzona umiejętnością szybkiej i jednoznacznej identyfikacji białek, znalazła różnorodne zastosowania, przede wszystkim do badania składu proteomów, czyli kompozycji białek w komórce lub jej funkcjonalnych podjednostek - organelli. Ważnym nurtem proteomiki stało się badanie oddziaływań białek z białkami lub innymi składnikami komórki. Proteomika oferuje również unikalne możliwości badania modyfikacji potranslacyjnych. Analiza pozwalająca na identyfikację i oznaczenie ilościowe kilku tysięcy do ponad dziesięciu tysięcy białek w jednym pomiarze nazywana jest proteomiką wielkoskalową lub globalną.

Spektrometr masowy, który jest motorem proteomiki, pozwala na pomiary masy białek lub peptydów oraz oznaczanie ich sekwencji aminokwasowej. Znajomość sekwencji oraz mas jest podstawą identyfikacji białek. Podczas gdy bezpośrednia analiza białek ma raczej marginalne znaczenie jako narzędzie badawcze, analiza mieszanin peptydów pochodzących z proteolitycznego trawienia białek, tak zwana technika *bottom-up*, stała się dominującą metodą proteomiczną.

W trawieniu białek największe zastosowanie ma trypsyna, która w sposób swoisty hydrolizuje wiązania peptydowe, w które zaangażowane są lizyna lub arginina. Tak przygotowane mieszaniny peptydów poddaje się jonizacji umożliwiającej oznaczenie ich mas. W następnym etapie, w drodze zderzeń z cząsteczkami gazu, zjonizowane peptydy poddawane są dalszej fragmentacji. Pomiary mas fragmentów dają podstawę do wyznaczenia sekwencji peptydów. Ten dwuetapowy proces spektrometryczny nazywa się techniką tandemową. Zdobyta w powyższy sposób informacja o sekwencji peptydów jest podstawą do identyfikacji białek, która jest możliwa przez porównanie z teoretycznymi sekwencjami wszystkich białek przewidywanych przez analizę genomu badanego organizmu.

Ilościowe aspekty analizy proteomicznej

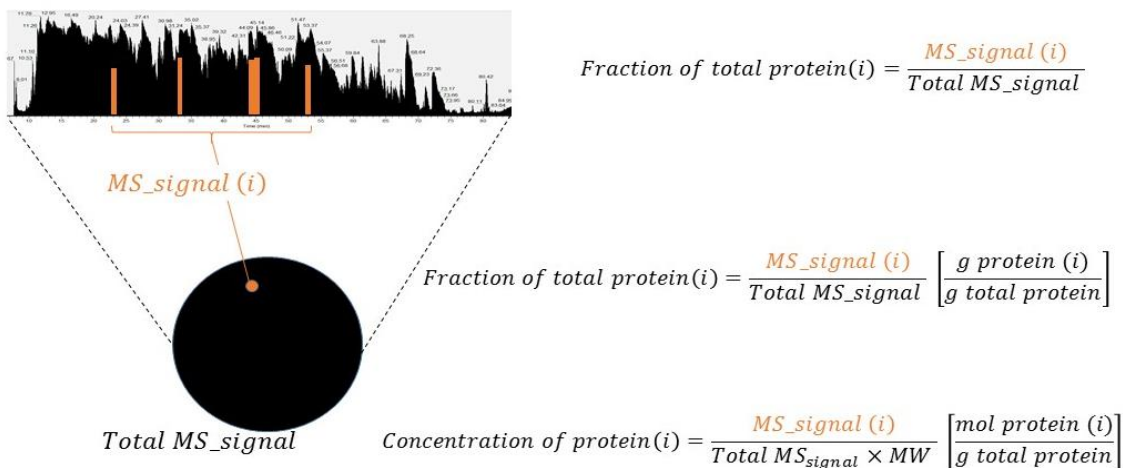
Z technicznego punktu widzenia, największą trudnością w analizie typu *bottom-up* jest zarówno ekstrakcja białek, jak i ich trawienie. Ze względu na funkcję i budowę białka są bardzo różnorodne. Jedne cytosolowe i dobrze rozpuszczalne w wodzie, inne błonowe, w dużej części złożone z hydrofobowych aminokwasów wymagają użycia detergentów lub rozpuszczalników organicznych do ich rozpuszczenia. Użycie detergentów lub rozpuszczalników często uniemożliwia trawienie białek trypsyną lub innymi proteazami.

FASP jest jedną z popularnych metod konwersji białek do peptydów. Umożliwia ona użycie silnych detergentów, takich jak SDS, ich usunięcie i trawienie zdenaturowanych białek w buforach dających proteazom pełną aktywność enzymatyczną. W końcowym etapie FASP-u peptydy izolowane są od niestrawionych substancji przez ultrafiltrację. Niski poziom zanieczyszczeń peptydów otrzymywanych tą metodą umożliwia wydajną identyfikację peptydów pochodzących od białek zarówno rozpuszczalnych, jak i błonowych.

Metoda FASP umożliwiła po raz pierwszy analizę białek błonowych oraz ich modyfikacji potranslacyjnych na dużą skalę. Badania te umożliwiły identyfikację ponad 10000 miejsc fosforylacji w białkach mózgu. Innym przykładem zastosowania FASP-u była analiza N-glikozylacji, modyfikacji występującej jedynie w białkach błonowych na powierzchni komórki lub wewnątrz cystern aparatu Golgiego i kanałów retikularnych.

Do badania i zrozumienia składu proteomu oraz zjawisk z nim związanych, takich jak regulacja ścieżek sygnałowych, czy organizacja organelli komórkowych, potrzebne są pomiary ilościowe. Najczęściej stosowaną metodyką jest względne porównanie obfitości białek pomiędzy dwoma albo większą ilością stanów fizjologicznych. Poważnym mankamentem tej metody jest niemożliwość określenia stężeń białek, co jest szczególnie istotne w zrozumieniu oddziaływań białek z ligandami lub enzymów z ich substratami. Do oznaczania obfitości białek często stosowane są izotopowo znakowane standardy, ale podstawowym ograniczeniem takiego podejścia analitycznego jest niska liczba białek, które mogą być jednocześnie badane.

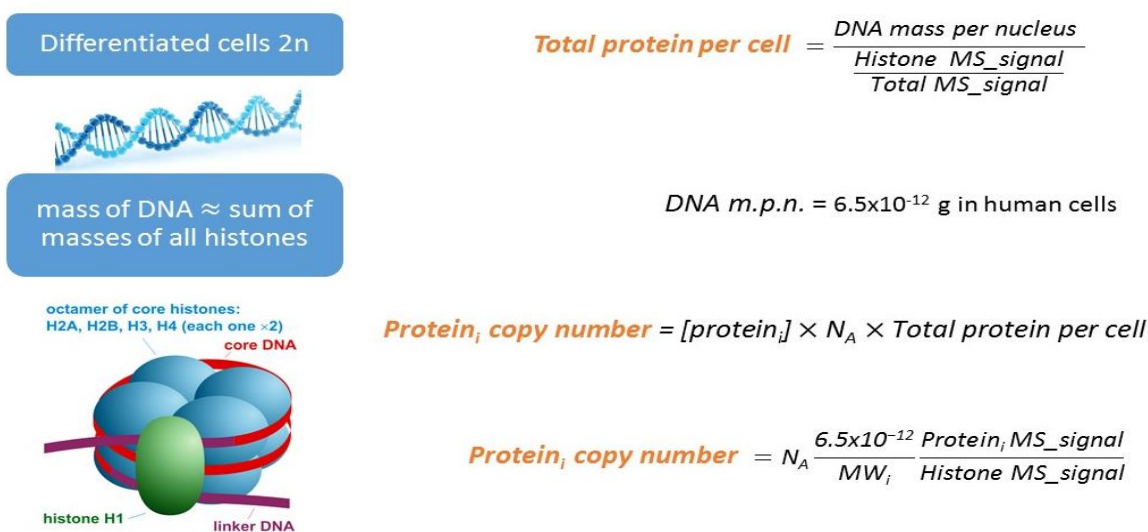
Innym podejściem w badaniu ilościowym proteomu jest metoda *Total Protein Approach*, w której zawartość całkowitego białka w analizowanej próbce definiowana jest przez całkowity sygnał spektrometryczny mierzony w całej analizie (Ryc. 1). Natomiast stężenie każdego białka



Ryc. 1. Podstawy ilościowego oznaczania białek z wielkoskalowych danych proteomicznych metodą *Total Protein Approach*. '*MS_signal (i)*' to suma intensywności widmowych wszystkich peptydów pochodzących z białka (*i*), natomiast '*Total MS_signal*' to całkowity sygnał widmowy pochodzący od wszystkich peptydów.

odpowiada sumie intensywności widm wszystkich jego peptydów. A zatem informacja intensywności widmowych zawarta w dużych zbiorach danych otrzymywanych przez proteomikę wielkoskalową umożliwia jednocześnie obliczenie stężeń tysięcy białek. Należy tu podkreślić, że *Total Protein Approach* pozwala na określanie stężeń białek bez potrzeby stosowania jakichkolwiek standardów, czy też oznaczania zawartości białka w próbce. Nie wymaga ona wstępnego definiowania białek, których stężenia mają być zmierzone.

Niejako pochodną metody *Total Protein Approach* jest *Proteomic Ruler*, która, korzystając z informacji o zawartości histonów w stosunku do pozostałych białek, umożliwia oszacowanie rozmiarów komórki, a co za tym idzie, możliwość obliczenia ilości cząsteczek białek lub ich kompleksów przypadających na jedną komórkę (liczba kopii) (Ryc. 2). Należy tu podkreślić, że obliczenia te także nie wymagają żadnych dodatkowych pomiarów, takich jak liczenie komórek, a zatem dostarczają absolutnej informacji bazującej jedynie na pomiarze spektrometru masowego.



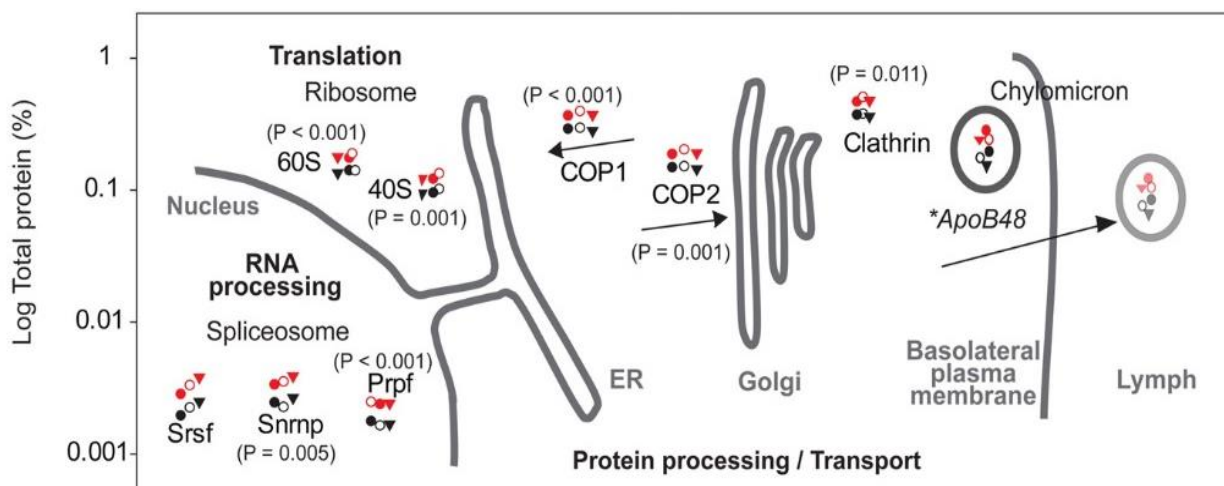
Ryc. 2. *Proteomic Ruler* umożliwia oznaczenie ilości cząsteczek białek przypadających na komórkę. Wykorzystuje ona to, że w komórkach eukariotów masa histonów jest niemal równa masie DNA. Dzięki temu, że masy DNA przypadające na komórkę są znane, możliwe jest obliczenie zawartości całkowitego białka w komórce na podstawie proporcji intensywności sygnałów widmowych pochodzących z histonów i wszystkich pozostałych białek.

Ponieważ liczba kopii białka zależy od wielkości komórki, a stężenie białka nie, obydwie te wartości mogą opisywać innego rodzaju zmiany w komórce. Na przykład, liczby kopii białka trafniej opisują zmiany w obrębie jądra komórkowego, a stężenia lepiej pokazują potencjał metaboliczny enzymów w cytoplazmie.

Opracowane przez nas metody proteomiki wielkoskalowej, stały się dla nas narzędziem wielu analiz komórek, tkanek, czy też organów pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Istotną częścią naszych badań były analizy narządów układu pokarmowego, w tym jelita cienkiego, grubego oraz wątroby.

Zmiany w jelicie cienkim spowodowane dietą wysokotłuszczową

Jelito cienkie jest głównym miejscem absorpcji i przekazywania do organizmu substancji odżywczych: węglowodanów, białek i tłuszczu. Jakkolwiek fizjologia tych procesów była przez dziesięciolecia przedmiotem różnorodnych badań, część jej molekularnych podstaw wciąż jest przedmiotem kontrowersji. Także zmiany adaptacyjne komórek nabłonkowych (enterocytów) zależnie od rodzaju przyjmowanego pokarmu nie mogły być analizowane kompleksowo. Użycie proteomiki wielkoskalowej umożliwiło oznaczenie obfitości tysięcy białek, w tym odpowiedzialnych zarówno za homeostazę enterocytów, jak i za mechanizmy transportowe.



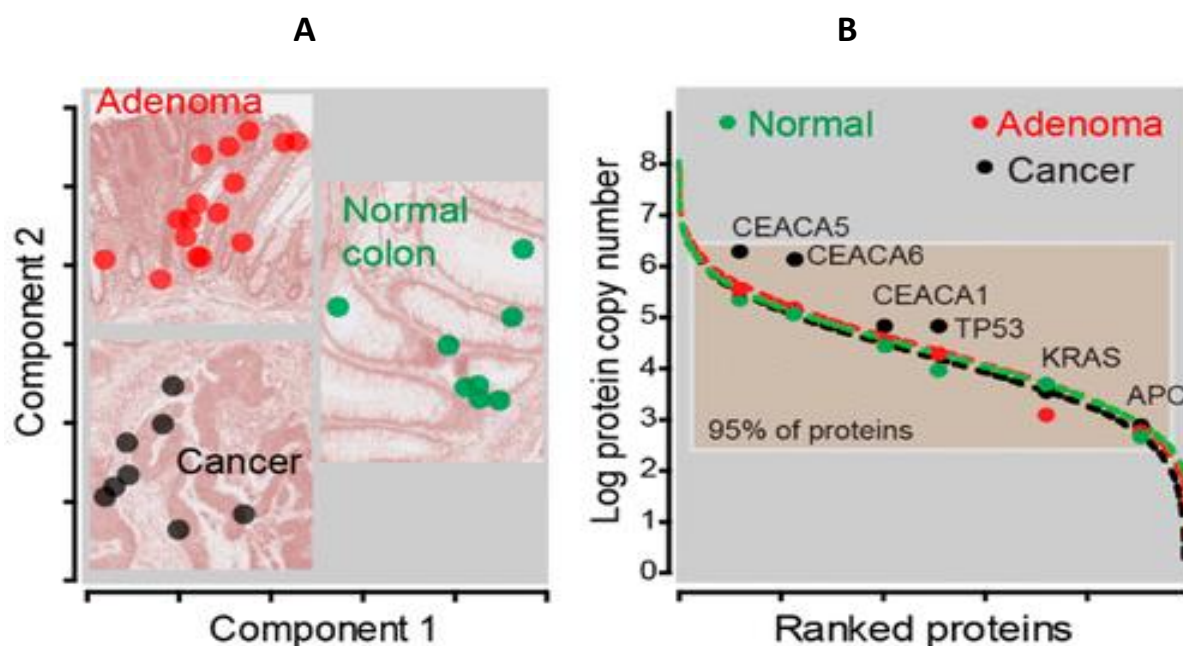
Ryc. 3. Dieta wysokotłuszczowa stymuluje syntezę białek oraz ich aktywne przemieszczanie się wewnątrz komórki. Wyraźnie podniesiony jest mechanizm transportu tłuszczu w postaci chylomikronów. Symbole czarne - normalna dieta, symbole czerwone - wysokotłuszczowa. Obfitość białek lub kompleksów jest wyrażona w procentach całkowitego białka.

Porównanie proteomów nabłonka jelita myszy karmionych dietą normalną i jelita myszy odżywianych pokarmem wysokotłuszczowym wykazało istotne zmiany. Ogólnie, dieta wysokotłuszczowa podnosi aktywność produkcji białek i ich transportu wewnątrzkomórkowego (Ryc. 3). Towarzyszy jej podniesiony metabolizm oksydacyjny w mitochondriach. Ponadto dieta wysokotłuszczowa obniża poziom podjednostek przeciwciał i składników kompleksu

histokompatybilności II, co może odzwierciedlać obniżoną odporność i tolerancję immunologiczną.

Proteom komórek nabłonkowych jelita grubego i jego transformacja w gruczolaku i raku

Celem tego projektu było zbadanie i porównanie proteomów komórek nabłonkowych jelita grubego i wywodzących się od nich gruczolaków i komórek rakowych. Materiałem klinicznym były tkanki utrwalone formaliną i zatopione w parafinie (FFPE; formalin fixed and paraffin embedded). W badaniach tych zastosowane zostały własne protokoły izolacji komórek i ekstrakcji białek. Ponieważ użyte tu metody nie są w żaden oczywisty sposób uzależnione od właściwości fizykochemicznych białek, umożliwiają one analizę wielkoskalową proteomów, w której odzwierciedlony został naturalny rozkład obfitości białek w komórkach.



Ryc. 4. Analiza proteomów nabłonka jelita grubego oraz komórek jego gruczolaka i raka. (A) Analiza głównych składowych pokazuje istotne różnice w proteomach trzech badanych typów komórek. (B) Obfitość białek ropyściera się na 7 rzędów wielkości, podczas gdy liczba kopii około 95% białek, w tym białek związanych z etiologią raka (TP53, APC, KRAS) oraz jego markerów (CEACA), mieści się w przedziale 4 rzędów wielkości.

Kompletna analiza trzech rodzajów komórek umożliwiła identyfikację ponad 10.000 białek, z czego obfitość około 30% różniła się w sposób statystycznie znaczący pomiędzy każdym z trzech badanych proteomów. Potencjalnie każde z tych białek może być rozważane jako biomarker, a

duża część z nich, jako białek docelowych w projektowaniu nowych leków. Otrzymane wyniki stanowią pierwszy, i jak dotąd jedyny bliski kompleksywności, ilościowy opis proteomów prawidłowego nabłonka oraz jego gruczolaka i raka.

Perspektywa

Wykład ten ma na celu przedstawienie aktualnych możliwości proteomiki, jakkolwiek w jego ramach jedynie niektóre metody proteomiki mogą zostać omówione. W centrum uwagi znajduje się proteomika wielkoskalowa, umożliwiającą systemowe spojrzenie na komórkę, które w znacznym stopniu rozszerza możliwości badawcze stworzone przez inne wielkoprzepustowe analizy, takie jak genomika, czy transkryptomika. Podczas gdy macierzowe badania RNA pozwalają jedynie na uchwycenie względnych zmian w komórce, proteomika wielkoskalowa dostarcza informacje o podłożu termodynamicznym, gdyż stężenia białek, czy liczby ich cząsteczek, są wartościami bezpośrednio interpretowalnymi w kategoriach biochemii i fizjologii.

Ze względu na ograniczoną dostępność spektrometrów masowych, jak i względnie długi czas analiz, proteomika wielkoskalowa wciąż pozostaje metodą głównie dostępną specjalistom. Rozpowszechnienie jej jest jednak jedynie kwestią czasu. Coraz szybsze i dostępnejsze urządzenia sprawiają, że globalne analizy proteomów staną się rutynową metodą analityczną, taką jaką są dziś elektroforeza żelowa, czy *western blot*, i je zastąpią.