

DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V PROTEOMICE: PRINCIPY A APLIKACE

PAVEL BOUCHAL a IGOR KUČERA

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: bouchal@chemi.muni.cz*

Došlo dne 8.II.2002

Klíčová slova: proteom, proteomika, dvourozměrná elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, analýza obrazu, databáze

Obsah

1. Úvod: genom, genomika, proteom a proteomika
2. Dvourozměrná elektroforéza
 - 2.1. Příprava vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu
 - 2.2. První rozměr: isoelektrická fokusace
 - 2.3. Druhý rozměr: elektroforéza v přítomnosti SDS
 - 2.4. Vizualizace: barvení 2-DE gelů
3. Alternativa a jiné varianty dvourozměrné elektroforézy
4. Metody analýzy obrazu a obrazové databáze 2-DE gelů
5. Charakterizace a identifikace proteinů
 - 5.1. Edmanovo odbourávání
 - 5.2. Hmotnostní spektrometrie
 - 5.3. Další metody
 - 5.4. Databáze
6. Aplikace
7. Zdroje proteomických informací
8. Závěr

1. Úvod: genom, genomika, proteom a proteomika

Znalost úplné genetické informace daného organismu (genomu), získaná sekvenováním deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a určením funkce jednotlivých genů, je nepochybně velkým pokrokem, který umožní hlouběji proniknout do molekulární podstaty funkce živých systémů, což zřejmě povede i k léčbě dosud těžko překonatelných chorob. Genomika, odvětví orientující se na „přečtení“ genomu, je však pouze jedním z prostředků k naplnění těchto cílů. Genetická informace totiž hovoří především o dědičně převzatých schopnostech organismu. Proteiny, které jsou skutečnými činiteli buněčných procesů, však musí být z úrovně DNA nejprve přepsány a přeloženy, přičemž jejich syntéza a degradace (a následně jejich reálná funkce) závisí na mnoha podstatných regulačních faktorech.

Pro soubor všech buněčných proteinů se v roce 1995 ujal pojem proteom jako komplementární soubor proteinů k souboru genů (genomu). Název vznikl z anglické definice „PROTEin complement able to be encoded by a given genOME“ nebo „PROTEin equivalent of a genOME“¹. Zatímco genom

je pojmem statickým, v podstatě konstantním, proteom je pojmem dynamickým; koncentrace jednotlivých druhů proteinů se (na rozdíl od jejich genů) mění podle aktuálních potřeb organismu.

Studiem proteomu se zabývá nové vědní odvětví na rozhraní chemických a biologických věd, proteomika. Je to komplexní analýza proteinů buňky, tkáně, organely či biologické tekutiny². Jedním z hlavních cílů proteomického výzkumu je získání proteinové mapy – dvourozměrného obrazu znázorňujícího (v metodicky ideálním případě všechny) buněčné proteiny jako skvrny (spoty), jejichž integrální absorbance je mírou jejich koncentrace za daných podmínek. Vytvoření proteinové mapy pomocí dvourozměrné elektroforézy (2-DE), charakterizace jednotlivých proteinů, jejich identifikace v databázích a obrazová analýza 2-DE gelů umožňují provádět experimenty, při nichž je srovnáváno komplexní proteinové složení vzorku za různých podmínek.

Náš článek si neklade za cíl vytvořit vyčerpávající přehled o všech variantách a aplikacích proteomických metod popsaných v literatuře – vzhledem k intenzivnímu rozvoji odvětví tento úkol už ani není splnitelný. Snažili jsme se spíše vytvořit obraz oboru pro čtenáře, kteří s proteomikou dosud nepřišli do kontaktu, případně poskytnout vodítko začínajícím uživatelům proteomických technik. Pro zájemce o hlubší informace jsou citovány specializované přehledné referáty a významné původní práce.

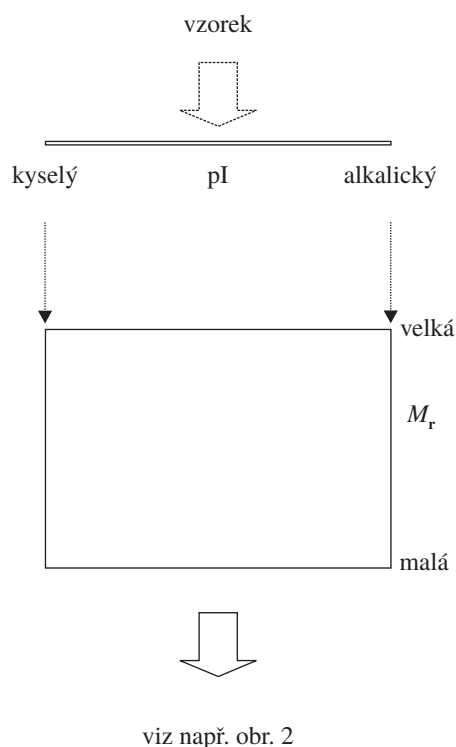
2. Dvourozměrná elektroforéza

Klíčovou technikou proteomiky je vysokorozlišovací dvourozměrná elektroforéza (2-DE), jedinečná metoda schopná účinně separovat komplexní směsi bílkovin. Ačkoliv byla poprvé popsána O'Farrellem³ a Klosem⁴ již roku 1975, opravdu širokého rozšíření dosáhla až s rozvojem proteomiky v posledních letech. Jde o instrumentálně náročnou techniku, která i při použití špičkových komerčních aparátů vyžaduje úzkostlivou laboratorní práci a zvláště čisté chemikálie. Celý proces sestává ze speciálního postupu přípravy vzorku, isoelektrické fokusace (IEF), polyakrylamidové elektroforézy v přítomnosti dodecyl-sulfátu sodného (SDS-PAGE) a vizualizace obrazu separovaných bílkovin (proteinové mapy) – viz obr. 1.

2.1. Příprava vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu

Tento krok je kvůli svému zásadnímu vlivu na obraz proteinové mapy jednou z nejdůležitějších, ale i nejproblematičtějších částí proteomiky a může se velmi lišit podle typu vzorku. Strategie je dána snahou o solubilizaci (převedení do rozpustného stavu) a disagregaci (omezení vzájemných interakcí) co největšího množství proteinů ve vzorku⁵. Rovněž je nutné minimalizovat případné interference činidel, která zůstala ve vzorku z předchozích kroků (soli, SDS, inhibitory proteas ap.).

Vzorek buněk či tkáně by měl být centrifugačně promyt



První rozměr: isoelektrická fokusace
Trubičkový gel (CA-IEF, NEpHGE)
nebo komerční proužek gelu (IPG-IEF)
Separace na základě pI

Po skončení isoelektrické fokusace
a ekvilibraci je IEF gel nanesen na
vrch deskového SDS-PAGE gelu

Druhý rozměr: SDS-PAGE
Separace na základě M_r

Vizualizace dvourozměrné separace
komplexní směsi proteinů
Fixace proteinů v gelu; vizualizace stříbrem,
viditelnými nebo fluorescenčními barvivy,
případně metodami detegujícími
radioaktivitu

viz např. obr. 2

Obr. 1. Schematické znázornění principu dvourozměrné elektroforézy

Tabulka I

Typické kombinace chaotropních činidel a detergentů ve vzorkových pufrch

Č.	Popis účinku vzorkového pufru	Použité chaotropy a detergenty	Lit.
1	Standardní solubilizační podmínky	8 M-močovina, 4% CHAPS	7,8
2	Zlepšené solubilizační podmínky (pro proteiny vyžadující zvýšený účinek chaotropů) ^a	7 M-močovina, 2 M-thiomočovina, 4% CHAPS	10
3	Zlepšené solubilizační podmínky (pro proteiny vyžadující zvýšený účinek detergentů) ^a	5 M-močovina, 2 M-thiomočovina, 2% CHAPS, 2% SB 3-10	10,11
4	T.č. „optimální“ solubilizační podmínky ^a	7 M-močovina, 2 M-thiomočovina, 1% ASB14	12,13

^a Kombinace s 2 M-thiomočovinou nelze uplatnit u CA-IEF při použití chemicky katalyzované polymerace¹⁴; zpracováno podle cit.¹⁵

v pufru s nepříliš velkou iontovou silou a poté fyzikálně nebo chemicky rozbit (rozštěpen). V závislosti na druhu vzorku lze zvolit „french press“, sonikaci, osmotickou či enzymatickou lýzi, mechanickou homogenizaci, případně další metody^{6,7}. Současně je nutné enzymově odstranit zbytky DNA a RNA. Při rozbíjení a v následných krocích je třeba eliminovat účinky proteolytických enzymů, jejichž působení může mít značný vliv na obraz proteinové mapy. Nabízí se aplikace inhibitorů proteas (PMSF, Pefabloc[®], EDTA), volba alkalického prostředí, krátkodobě také práce při zvýšené teplotě. V každém případě se doporučuje proces co možná nejvíce zkrátit. Pro studium pouze určité skupiny proteinů (membránové, ribosomální, cytosolární) se provádí prefrakcionace, obvykle za použití ultracentrifugace. Není-li vzorek dostatečně koncentrován, je možné zahustit jej lyofilizací^{8,9} nebo precipitací acetonem či trichloroctovou kyselinou.

Účinkem vzorkového pufru, s nímž je vzorek smíchán před nanesením na IEF gel, by měly být proteiny solubilizovány a desagregovány. Přítomnost vysoké koncentrace chaotropních činidel (močovina, thiomočovina¹⁰) brání asociaci proteinů vodíkovými můstky. Zwitterionové či neiontové detergenty (CHAPS, NONIDET NP-40, TRITON X-100, Tween 20, oktylglykosid, SB 3-10, C8Ø, ASB 14) zajišťují rozpustnost hydrofobních částí bílkovin. Redukční činidla, dithiothreitol, dithioerythritol, tributylfosfin, popř. 2-hydroxyethanthiol (2-merkptoethanol), zamezují vzniku disulfidových můstků; amfolyty či TRIS pufrují pH. Typické kombinace detergentů a chaotropů jsou v tabulce I.

Pro proteomiku je dosud ve značné míře nevyřešeným problémem analýza funkčně důležitých membránových proteinů^{13,16} a analýza proteinů vyskytujících se v buňce v malém počtu kopií. Kvůli své hydrofobnosti se totiž membránové

proteiny špatně rozpouštějí (solubilizují) a omezeně vstupují do IEF gelu. V důsledku toho jsou pak jejich skvrny na proteinové mapě pod limitem detekce 2-DE často i v případě, že jejich množství v buňce je značné, a proto je třeba volit co neúčinnější solubilizační postupy a detergenty. Nejlepších výsledků bylo zatím dosaženo pomocí amidosulfobetainu 14 (ASB 14), č. 4 v tab. I, cit.^{12,17}. Dlouho užívaným postupem je vložení presolubilizačního kroku s použitím aniontového detergentu SDS. Tento detergent se vyznačuje značnou solubilizační silou, ale interferuje při IEF. Tento fakt lze ale obejít zředěním vzorku vzorkovým pufrům obsahujícím neiontový či zwitteriontový detergent^{18,19}. Rozpustnost proteinů v průběhu 2-DE analýzy zlepšují také dvoukroková ekvilibrace IEF gelu (viz dále) s použitím jodacetamidu²⁰, uplatnění redukčního činidla tributylfosfinu²¹ a aplikace vzorku před rehydratací IPG proužku²².

Za zmínku stojí rovněž elegantní metoda diferenciální frakcionace⁹. Zde jsou proteiny postupně extrahovány ze vzorku několika činidly se vzrůstající solubilizační silou. Jednotlivé frakce jsou poté podrobeny 2-DE analýze. Proteinová mapa se pak skládá z několika dílčích gelů, obsahujících proteiny s podobnou rozpustností.

2.2. První rozměr: isoelektrická fokusace

Solubilizovaný vzorek – bílkoviny ve vzorkovém pufru – je separován isoelektrickou fokusací, během níž se bílkoviny rozdělí v elektrickém poli na základě svých isoelektrických bodů (pI). Jako prvních se pro tento účel začalo užívat trubičkových gelů o průměru 1–2 mm obsahujících amfolyty – látky vytvářející gradient pH (CA-IEF) (cit.³). Vzhledem k obtížné manipulaci s trubičkovými gely a často špatné reprodukovatelnosti se však stále více prosazují komerční proužky gelu s imobilizovanými pH gradienty (IPG-IEF) (cit.^{23,24}). Jejich dalšími výhodami jsou možnost aplikovat mnohonásobně větší objemy vzorků a větší množství proteinu (až 5 mg oproti 100 µg u CA-IEF), což pomáhá zachytit hydrofobní a slabě zastoupené proteiny a rozšiřuje možnosti následné identifikace. Byly však popsány i ztráty některých hydrofobních proteinů při použití metody IPG-IEF (cit.^{10,14}). Na trh byly uvedeny také IPG proužky se sigmoidním pH gradientem²⁵, který na 2-D gelu rozšiřuje oblast pI 5–7 s největším množstvím proteinů. Zvláštní přístup vyžaduje analýza bazických proteinů, které vlivem katodického driftu špatně vstupují do CA-IEF gelu. Zpočátku se uplatňovala nerovnovážná isoelektrická fokusace (NEpHGE) (cit.²⁶), nyní se část problematických případů daří vyřešit pomocí IPG-IEF s úzkým rozsahem pH v alkalické oblasti²⁷.

2.3. Druhý rozměr: elektroforéza v přítomnosti SDS

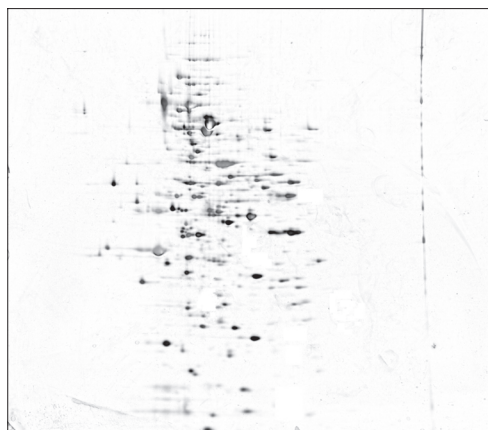
Trubičkový gel (CA-IEF, NEpHGE) nebo komerční proužek (IPG-IEF) obsahující proteiny rozdělené podle isoelektrických bodů (pI) je po ekvilibraci v ekvilibračním pufru umístěn na vrch deskového gelu, případně zalit agarosou s nízkým bodem tuhnutí. Deskový gel obsahuje dodecyl-sulfát sodný, dávající proteinům uniformní specifický náboj (tj. náboj vztažený na jednotku relativní molekulové hmotnosti), takže ty jsou separovány pouze na základě svých velikostí (relativních

molekulových hmotností). Používá se obvykle gelů o koncentraci cca 10–13 % (m/V) akrylamidu. Ve snaze o lepší rozlišení je někdy užíváno gelů s hustotním (porozitním) gradientem (v rozmezí 7–20 % (m/V) akrylamidu) anebo diskontinuálních gelů, složených z koncentrační a separační části. Tyto postupy ale znamenají vnesení dalšího kroku, který může být příčinou zhoršení reprodukovatelnosti celé metody. Doporučuje se proto používat buď gelů bez gradientu nebo počítačově řízeného nalévání gradientových gelů², popřípadě komerčních hotových gelů.

2.4. Vizualizace: barvení 2-DE gelů

Po proběhnutí SDS-PAGE je třeba proteiny v gelu zafixovat proti difuzi a vizualizovat (obarvit), přičemž fixační krok již bývá zařazen do barvicího postupu. Nejjednodušší možností vizualizace proteinů na dvourozměrném gelu je použití barviva Coomassie Brilliant Blue, nejlépe v koloidní variantě. Toto barvení je navíc kvantitativní a gel je poté možné použít pro analýzu hmotnostní spektrometrie (MS) (cit.²⁹).

10–100× citlivější je barvení stříbrem. Stříbrné ionty se však váží jen na některé aminokyselinové zbytky (Asp, Glu, His, Cys, Met, Lys), metodu proto nelze považovat za plně kvantitativní, přesto jde o způsob nejpoužívanější³⁰. Tohoto barvení bylo publikováno mnoho variant s různým složením



Obr. 2. Ukázka záznamu 2-DE analýzy komplexní směsi periplazmatických proteinů bakterie *Paracoccus denitrificans*. Anaerobně rostlá kultura bakterie *Paracoccus denitrificans* byla sklizena do 50 mM-TRIS/HCl pH 7,3. Buňky byly rozbity kombinací enzymatické a osmotické lýze (DNA byla odstraněna pomocí deoxyribonukleasy I), centrifugačně byly odstraněny zbytky celých buněk a ultracentrifugací byla separována membránová frakce. Periplazma (supernatant po ultracentrifugaci) byla zakonzentrována na zahušťovací cele Amicon (membrána YM 3). Vzorek byl presolubilizován převedením do 2% SDS, 0,5 mM-MgCl₂ a 50 mM-TRIS/HCl pH 6,8 sonikací 4 min na ultrazvukové lázni a zahříváním při 100 °C po dobu 3 min; poté byl ochlazen na 4 °C a centrifugován při 33 000 g a 4 °C po dobu 60 min. Konečná solubilizace byla provedena zředěním v poměru 1:2 vzorkovým pufrům o složení 9 M-močovina, 4% (m/V) CHAPS, 65 mM-DTT a 1,6% (m/V) Bio-Lyte 3/10. Dvourozměrná elektroforéza byla provedena na zařízení PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad) podle návodu výrobce systému; při isoelektrické fokusaci s nosnými amfolyty bylo dosaženo celkem 9050 V.h; pro SDS-PAGE byl použit 12% homogenní gel. Gel byl barven stříbrem podle Rabillouda²⁸. Pozadí bylo odečteno pomocí software PDQUEST, cit.⁵⁷

činidel a s různou délkou jednotlivých kroků; v zásadě je lze rozdělit na tzv. kyselé metody na bázi vodného roztoku AgNO_3 a tzv. alkalické metody na bázi diamminkomplexů Ag^+ v alkalickém prostředí. Při barvení stříbrem je vhodné uplatnit některý z možných senzitivizačních kroků s cílem zlepšit tvorbu tzv. latentního obrazu³¹. Byly vyvinuty rovněž modifikace kompatibilní s další MS charakterizací^{32,33}. Přehled kompatibility barvení s MS analýzou je uveden v cit.³⁴

Při funkčních studiích, kdy má být zjištěna indukce proteinů v určitém definovaném časovém okamžiku (např. po předávkou určitého faktoru či při změně podmínek), se někdy používá inkorporace radioaktivně značeného methioninu $\text{L-}[^{35}\text{S}]\text{Met}$ do polypeptidového řetězce syntetizovaného za sledovaných podmínek. Buňky jsou poté podrobeny 2-DE analýze, přičemž výhradně indukované proteiny jsou detegovány na rentgenovém filmu autoradiografií³⁵ či s použitím fosfoimageru.

V poslední době se vkládají naděje do nových fluorescenčních metod barvení typu SYPRO (cit.^{36,37}) (SYPRO Ruby, Orange). Tyto metody jsou podobně jednoduché a kvantitativní jako barvení Coomassie, avšak citlivostí srovnatelné s barvením stříbrem a navíc kompatibilní s MS charakterizací. Vzhledem k vysoké ceně však doposud nedoznaly masového rozšíření. Slibná se zdá být také metodika tzv. 2-D Fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE) (cit.³⁸). Zde probíhá celá 2-D analýza se směsí dvou fluorescenčně předznačených vzorků, jejichž proteinové složení se má srovnat. Po skončení celého procesu jsou srovnány fluorescenční obrazce 2-D gelu při různých vlnových délkách. Díky tomuto postupu je omezen vliv odchylek 2-DE analýzy, protože separace obou vzorků probíhá za identických podmínek.

3. Alternativy a jiné varianty dvourozměrné elektroforézy

Nedostatky dvourozměrné elektroforézy, mezi něž patří vedle problémů s analýzou hydrofobních proteinů také časová a manuální náročnost, vedou k hledání alternativních metod. Zkrácení proteomického postupu bylo dosaženo analýzou proteinů přímo na IPG proužcích pomocí MALDI-TOF MS a tvorbou „virtuálních“ 2-D gelů³⁹. Zcela odlišný alternativní přístup představuje komplexní analýza proteinů založená na skupině nových chemických reagentů ICAT (isotope-coded affinity tags), afinitní chromatografii a tandemové hmotnostní spektrometrii⁴⁰. Přesto však 2-DE zůstává nejrozšířenější a nejvhodnější metodou ke svému účelu⁴¹.

Vedle dvourozměrné elektroforézy definované v tomto článku jako spojení denaturační IEF a SDS-PAGE bývají někdy užívány i jiné kombinace základních elektroforetických metod, například kombinace nativní gradientové „modré“ elektroforézy s denaturační SDS-PAGE (cit.⁴³) nebo nativní IEF s denaturační SDS-PAGE (cit.⁴³).

4. Metody analýzy obrazu a obrazové databáze 2-DE gelů

Jak bylo řečeno již v úvodu, jednou z hlavních náplní proteomiky je po metodické stránce tvorba proteinových map, vycházející ze srovnávání obrazů 2-DE gelů. V první fázi je

obraz nasnímán, přičemž se využívá CCD (charge coupled device) kamer, densitometrů a skenerů pro snímání obrazu ve viditelném světle, fluoroimagerů pro detekci fluorescence a fosfoimagerů citlivých na radioaktivní záření^{2,44}. Speciální software umožňuje detegovat skvrny na 2-DE gelu, odečítat pozadí, navzájem přiřazovat skvrny na různých 2-DE gelech (matching), vzájemně standardizovat a kvantitativně vyhodnocovat gely, čímž jsou částečně eliminovány nepřesnosti vzniklé během komplikované 2-DE analýzy a při barvení gelů. Dále lze konstruovat proteinové mapy a obrazové databáze. Software bylo během let vyvinuto více typů. K nejpoužívanějším dnes patří PC programy s unixovým jádrem PDQUEST a MELANIE II, III a vzájemně blízké produkty založené na PC platformě AIDA, Phoretix 2-D a ImageMaster. Praktické rozdíly mezi jednotlivými druhy komerčního software lze najít zejména v počtu současně srovnávaných gelů a ve způsobu přiřazování skvrn (matchingu).

Jelikož integrální absorpenci každé skvrny lze považovat za kvantitativní ukazatel exprese proteinu, je možné pomocí 2-D software srovnávat parametry skvrn na různých 2-DE gelech a vyvozovat závěry o expresi proteinů za různých podmínek. Získané gely mohou být ukládány do obrazových databází podle typu vzorku, přičemž mnoho databází je dostupných na internetu (pro přehled viz cit.⁴⁵). Některé typy komerčních programů pro analýzu 2-DE gelů umějí s těmito databázemi komunikovat a vytvářet vlastní internetové stránky.

5. Charakterizace a identifikace proteinů

Vyhodnocovací software umožňuje přiřadit každé skvrně na 2-DE gelu určitou hodnotu isoelektrického bodu a relativní molekulové hmotnosti na základě kalibrace. Získané hodnoty jsou však pouze přibližné a k jednoznačné charakterizaci bílkoviny v žádném případě nepostačují. Využívá se proto určování částečné primární struktury bílkoviny dále uvedenými metodami:

5.1. Edmanovo odbourávání

Zjištění N-terminální sekvence aminokyselin analyzovaného proteinu postupem zahrnujícím Edmanovo odbourávání⁴⁶ je metoda, která před více než 30 lety umožnila vznik strukturální chemie proteinů. Bílkoviny jsou nejprve pomocí blotingu^{47,48} přeneseny z gelu na blotovací membránu z poly(vinylidendifluoridu) (PVDF) nebo skelných vláken. Membrána je poté obarvena a je z ní vyříznuto místo se skvrnou analyzovaného proteinu. Tento výřez je podroben Edmanovu odbourávání, kdy je postupným odštěpováním aminokyselin z polypeptidového řetězce a následnou HPLC analýzou vznikajících PTH (fenylothiohydantoinových) derivátů aminokyselin stanovena N-terminální sekvence proteinu. V souvislosti s uplatněním Edmanova odbourávání v rámci proteomických metod je třeba vzít v úvahu následující faktory: *i*) doba analýzy je cca 40 minut na 1 aminokyselinový zbytek, *ii*) cena se pohybuje mezi 3–4 USD na aminokyselinu a *iii*) analýza může být komplikována modifikacemi (blokováním) N-konce proteinu (např. acetylací) (cit.²). Tyto faktory odsouvají Edmanovo odbourávání z popředí proteomického zájmu, neboť úspěšná charakterizace desítek či stovek proteinů tímto způsobem není příliš reálná.

Tabulka II
Strukturální databáze použitelné k identifikaci proteinů v 2-D gelech

Název databáze ^a	URL	Popis databáze
Swiss-Prot	http://www.expasy.ch	proteinová databáze
TrEMBL	http://www.expasy.ch	proteinová databáze
PIR	http://pir.georgetown.edu/pirwww/pirhome.html	proteinová databáze
OWL	http://www.leeds.ac.uk/bmb/owl/owl.html	proteinová databáze
GDB	http://gdb.org	genomová databáze
Washington University	http://genome.wustl.edu/est/esthmpg.html	„sequence tags“ databáze
PDB	http://www.rcsb.org/pdb	3-D struktury proteinů
DDBJ	http://www.ddbj.nig.ac.jp	nukleotidová databáze
EMBL	http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html	nukleotidová databáze
NCBI	http://ncbi.nlm.nih.gov	nukleotidová databáze
EcoCyc	http://ecocyc.pangeasystems.com/ecocyc/ecocyc.html	geny a metabolismus <i>Escherichia coli</i>

^a DDBJ – DNA Data Bank of Japan, EMBL – European Molecular-Biology Laboratory, GDB – Genome Database, NCBI – National Center for Biotechnology Information, PDB – Protein Data Bank, URL – universal-resource locator; zpracováno podle cit.⁴⁵

5.2. Hmotnostní spektrometrie

Pro analýzu bílkovin a peptidů se nejčastěji používají dva typy hmotnostní spektrometrie (MS): *i*) „Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight“ MS (MALDI-TOF MS) (cit.⁵⁰) a *ii*) „Electrospray-ionisation“ MS (ESI-MS) (cit.⁵¹). Kromě získání relativních molekulových hmotností peptidů lze pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) určit částečnou, případně i úplnou primární strukturu peptidů a proteinů. Pro bližší přehled principů viz cit.⁵². Proteiny mohou být hmotnostní spektrometrií charakterizovány v zásadě dvěma metodickými přístupy, a to tzv. „peptide mass fingerprinting“ (PMF) a „peptide fragment sequencing“ (PFS).

Peptide mass fingerprinting

Principem je štěpení proteinů separovaných 2-D elektroforézou obvykle přímo v gelu pomocí enzymu nebo látky, která definovaně štěpí polypeptidový řetězec. Nejpoužívanější je přítom trypsin, štěpící amidovou (peptidovou) vazbu na C-straně argininu a lysinu. Směs peptidů je poté analyzována hmotnostní spektrometrií, a to buď užitím MALDI-TOF MS nebo ESI-MS. Přesnost obou metod je lepší než 0,1 jednotky relativní molekulové hmotnosti. Výstupem je soubor relativních molekulových hmotností peptidů. Tento soubor je pak porovnán se soubory molekulových hmotností peptidů, vytvořenými počítačem z proteinů v proteinové databázi. Užívá se přitom např. programů MS-FIT (<http://www.prospector.ucsf.edu>) nebo MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Peptide fragment sequencing

Při nedostatku informací získaných z PMF je možno protein identifikovat pomocí fragmentace jednotlivých peptidů. Peptidy mohou být fragmentovány přímo ve hmotnostním spektrometru, a to *i*) buď pomocí „collision-induced dissociation“ (CID) v případě ESI-MS, nebo *ii*) pomocí MALDI-TOF pracujícím v režimu MALDI-PSD (post-source decay). Ve srovnání s MALDI-PSD fragmentací, která může být neúplná, je

metoda CID považována za stabilní a robustní metodu. Krátké sekvence peptidů, nazývané „peptide sequence tags“, společně s relativní hmotností peptidu a vzdáleností konců sekvence k N- a C-konci peptidu v jednotkách relativní molekulové hmotnosti, jsou obvykle dostatečnou informací k identifikaci proteinu.

5.3. Další metody

Uplatnění při identifikaci proteinů nalézají také imunochemické metody, konkrétně Western-blotting: proteiny z 2-DE gelu jsou přeneseny na blotovací membránu (podobně jako u Edmanova odbourávání). Ta je inkubována s protilátkou A proti hledanému proteinu. Následně proběhne inkubace s protilátkou B proti protilátce A. Jelikož protilátka B má navázanu chromogenní značku, místo s hledaným proteinem je na membráně barevně označeno.

Pomocné uplatnění při identifikaci proteinů někdy nachází také analýza aminokyselinového složení. Požadovaný protein je z 2-DE gelu blotován na membránu, odkud je vyříznut a hydrolyzován (1 h při 155 °C). Uvolněné aminokyseliny jsou derivatizovány a podrobeny analýze HPLC. Na základě poměrného zastoupení jednotlivých aminokyselin zjištěného z chromatogramu je protein srovnáván s proteiny v databázi, například pomocí programů AACompIdent, ASA, FINDER, AAC-PI, PROP-SEARCH aj.²

5.4. Databáze

Částečná informace o primární struktuře proteinu, získaná s pomocí Edmanova odbourávání nebo hmotnostní spektrometrie, je využita k identifikaci proteinu v databázi. Vedle již zmíněných obrazových databází 2-DE gelů, které jsou vytvářeny vždy pro určitý druh vzorku, existují proteinové databáze (obsahující sekvence všech popsanych proteinů) a databáze se sekvencí DNA. Oba typy strukturálních databází jsou obvykle propojené a využitelné pro identifikaci proteinů – viz tabulka II. Při určení míry homologie se uplatňují algoritmy BLAST a FASTA.

6. Aplikace

Za hlavní přínos proteomických metod lze považovat možnost srovnání komplexního proteinového složení vzorků vzniklých za různých podmínek. V úvahu připadá sledování rozdílů způsobených změnami teploty, pH prostředí, omezení substrátem, anaerobiosou, genovými manipulacemi, vývoje- vým stavem či chemickými faktory, jako jsou hormony, anti- biotika, cytostatika a další. Kromě sestavování proteinových map a srovnávacích studií jsou také prováděna srovnání prote- inového složení vzorků různých, zejména bakteriálních dru- hů. Hmotnostní spektrometrie umožňuje sledovat posttransla- lační modifikace proteinů.

Je třeba si uvědomit, že identifikace proteinů vychází ze zjištění homologie identifikovaného proteinu s proteinem v proteinové databázi nebo s přeloženou sekvencí genomu. Znalost genomu daného organismu je tedy jedinou jistou pomůckou při identifikaci proteinu v případě, že jeho vlastní struktura nebyla dosud popsána. Ne náhodou je tedy mnoho proteomických studií zaměřeno na mikroorganismy^{53,54}; z ge- nomů, které byly kompletně sekvenovány, jsou totiž cca 3/4 bakteriálních (aktuální přehled viz <http://www.tigr.org/tdb/ mdb/mdbcomplete.html> nebo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Entrez/Genome/org.html>). Velmi přínosný se zdá být proteo- mický výzkum v medicíně, a to jednak ve farmakologii při studiu účinku léků na proteosyntézu, jednak v medicínském výzkumu ke studiu komplexních změn proteosyntézy u růz- ných onemocnění, například u onkologií^{55,56}. Rozvíjí se také studium rostlinných a živočišných proteomů.

7. Zdroje proteomických informací

Zájemcům o proteomickou problematiku lze doporučit odborná periodika – zvláště specializovaná čísla časopisu Electrophoresis věnující se střídavě metodickým otázkám, bakteriálním proteomům, bioinformatice, farmaceutické pro- teomice, aj. Od roku 2001 vychází čistě proteomické periodik- um, časopis Proteomics. Komplexní informace je možné nalézt také na serveru <http://www.expasy.org>, provozovaném renomovanou ženevskou skupinou prof. Denise F. Hochstras- sera. Proteomice jsou věnovány mezinárodní konference za účasti světových špiček oboru, v současné době například Proteomic Forum (Mnichov 2001, 2003), kongresy švýcarské proteomické společnosti (Ženeva 2001, Lausanne 2002) nebo prestižní setkání konaná jednou za dva roky v italské Sieně (Siena 2002, viz <http://www.unisi.it/eventi/proteome/>).

8. Závěr

Proteomika se zdá být velmi perspektivním nástrojem výzkumu v „postgenomovém“ období věd označovaných jako vědy o životě (Life Science). V posledních několika letech byly učiněny velké pokroky v oblasti analýzy obrazu a iden- tifikace proteinů hmotnostní spektrometrií, umožňující pod- statně zrychlení, zpřesnění a automatizaci procesu identifikace proteinů. Velkou výhodou je také případná znalost genomu studovaného organismu. Limitující fází proteomiky je tak i přes značnou komercializaci metoda dvourozměrné elektro- forézy. Otazník visí zejména nad její vhodností k analýze

hydrofobních proteinů a proteinů vyskytujících se v malém počtu kopií. Zdá se proto, že do okamžiku, kdy proteinová mapa bude znamenat pohled na skutečně všechny buněčné proteiny, zbývá udělat ještě mnoho usilovné práce. Přes tyto skutečnosti proteomika nepochybně velmi přispěje k odhalení nových souvislostí mezi koncentrací a fyziologickou funkcí proteinů.

Seznam zkratk a symbolů

2-D	two-dimensional – dvourozměrný
2-DE	two-dimensional electrophoresis – dvourozměrná elektroforéza
ASB 14	3-[dimethyl(3-tetradekanamidopropyl)amonio]-propan-1-sulfonát
C8Ø	3-{dimethyl[3-(4-oktylbenzamido)propyl]amo- nio}propan-1-sulfonát
CA	carrier ampholyte – nosný amfolyt
CCD	charge coupled device (český název se dosud nevíl)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-pro- pan-1-sulfonát
CID	collision induced dissociation (český název se dosud nevíl)
DIGE	difference gel electrophoresis – diferenční ge- lová elektroforéza
DNA	deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylen diamintetraoctová kyselina
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s ionizační elektro- sprayem
HPLC	high performance liquid chromatography – vy- sokoúčinná kapalinná chromatografie
ICAT	isotope-coded affinity tags
IEF	isoelectric focusing – isoelektrická fokusace
IPG	immobilised pH gradient – imobilizovaný pH gradient
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization ti- me-of-flight (český název se dosud nevíl)
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
NEpHGE	non-equilibrium pH gradient electrophoresis – nerovnovážná elektroforéza při gradientu pH
PC	personal computer – osobní počítač
PFS	peptide fragment sequencing – sekvenování peptidových fragmentů
pI	isoelectric point – isoelektrický bod
PMF	peptide mass fingerprinting (český název se dosud nevíl)
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
PVDF	poly(vinylidendifluorid)
RNA	ribonucleic acid – ribonukleová kyselina
SB 3-10	3-(decyldimethylamonio)propan-1-sulfonát
SDS	dodecyl-sulfát sodný
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elec- trophoresis – polyakrylamidová gelová elek- troforéza v přítomnosti dodecyl-sulfátu sodného
TBP	tributylfosfin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Autoři děkují RNDr. Zbyňku Zdráhalovi, DrSc., za informace a diskuzi ohledně metod hmotnostní spektrometrie. Práce vznikla s podporou grantových projektů Fondu rozvoje vysokých škol (569/2001) a Grantové agentury České republiky (203/01/1589).

LITERATURA

1. Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L., Humphery-Smith I.: *Electrophoresis* 16, 1090 (1995).
2. Humphery-Smith I., Cordwell S. J., Blackstock W. P.: *Electrophoresis* 18, 1217 (1997).
3. O'Farrell P. H.: *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
4. Klose J.: *Humangenetik* 26, 231 (1975).
5. Rabilloud T.: *Electrophoresis* 17, 813 (1996).
6. Link A. J. (ed.): *2-D Proteome Analysis Protocols. Series: Methods in Molecular Biology*, sv.112. Humana Press, Totowa 1999.
7. Berkelman T., Stenstedt T.: *2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients. Principles & Methods*. Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala 1998.
8. Rabilloud T. (ed.): *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*. Springer, Berlin 2000.
9. Molloy M. P., Herbert B. R., Walsh B. J., Tyler M. I., Traini M., Sanchez J. C., Hochstrasser D. F., Williams K. L., Gooley A. A.: *Electrophoresis* 19, 837 (1998).
10. Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J.: *Electrophoresis* 18, 307 (1997).
11. Garfin D., Heerdt L. (ed.): *2-D Electrophoresis for Proteomics. A Methods and Product Manual*. Bio-Rad, Hercules 2001.
12. Chevallet M., Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S., Rossignol M., Lunardi J., Garin J., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 19, 1901 (1998).
13. Molloy M. P.: *Anal. Biochem.* 280, 1 (2000).
14. Rabilloud T.: *Electrophoresis* 19, 758 (1998).
15. Herbert B.: *Electrophoresis* 20, 660 (1999).
16. Santoni V., Molloy M., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 21, 1054 (2000).
17. Molloy M. P., Herbert B. R., Slade M. B., Rabilloud T., Nouwens A. S., Williams K. L., Gooley A. A.: *Eur. J. Biochem.* 267, 2871 (2000).
18. Ames G. F. L., Nikaido K.: *Biochemistry* 15, 616 (1976).
19. Harder A., Wildgruber R., Nawrocki A., Fey S. J., Larsen P. M., Görg A.: *Electrophoresis* 20, 826 (1999).
20. Görg A., Postel W., Weser J., Gunther S., Strahler J. R., Hanash S. M., Somerlot L.: *Electrophoresis* 8, 122 (1987).
21. Herbert B. R., Molloy M. P., Gooley A. A., Walsh B. J., Bryson W. G., Williams K. L.: *Electrophoresis* 19, 845 (1998).
22. Rabilloud T., Valette C., Lawrence J. J.: *Electrophoresis* 15, 1552 (1994).
23. Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317 (1982).
24. Görg A., Obermaier C., Boguth G., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W.: *Electrophoresis* 21, 1037 (2000).
25. Bjellqvist B., Sanchez J. C., Pasquali C., Ravier F., Paquet N., Frutiger S., Hughes G. J., Hochstrasser D.: *Electrophoresis* 14, 1375 (1993).
26. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H.: *Cell* 12, 1133 (1977).
27. Görg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W.: *Electrophoresis* 20, 712 (1999).
28. Rabilloud T., Brodard V., Peltre G., Righetti P.G., Ettori C.: *Electrophoresis* 13, 264 (1992).
29. Matsui N. M., Smith-Beckerman D. M., Epstein L. B., v knize: *2-D Proteome Analysis Protocols, Series: Methods in Molecular Biology* (Link A. J., ed.), sv. 112, kap. 34. Humana Press, Totowa 1999.
30. Rabilloud T., Vuillrd L., Gilly C., Lawrence J. J.: *Cell. Mol. Biol.* 40, 57 (1994).
31. Rabilloud T.: *Electrophoresis* 11, 785 (1990).
32. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: *Anal. Chem.* 68, 850 (1996).
33. Yan J. X., Wait R., Berkelman T., Harry R. A., Westbrook J. A., Wheeler C. H., Dunn M. J.: *Electrophoresis* 21, 3666 (2000).
34. Lauber W. M., Carroll J. A., Dufield D.R., Kiesel J. R., Radabaugh M. R., Malone J. P.: *Electrophoresis* 22, 906 (2001).
35. Link A. J., v knize: *2-D Proteome Analysis Protocols, Series: Methods in Molecular Biology* (Link A. J., ed.), sv. 112, kap. 31. Humana Press, Totowa 1999.
36. Berggren K., Steiberg T., Lauber W., Carroll J., Lopez M., Chernokalskaya E., Zieske L., Diwu Z., Haugland R., Patton W.: *Anal. Biochem.* 276, 129 (1999).
37. Patton W. F.: *Electrophoresis* 21, 1123 (2000).
38. Unlu M., Morgan M. E., Minden J. S.: *Electrophoresis* 18, 2071 (1997).
39. Wakler A. K., Rymar G., Andrews P. C.: *Electrophoresis* 22, 933 (2001).
40. Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebershold R.: *Nat. Biotechnol.* 17, 994 (1999).
41. Rabilloud T.: *Proteomics* 2, 3 (2002).
42. Schägger H., von Jagow G.: *Anal. Biochem.* 199, 223 (1991).
43. Bass W. T., Bricker T. M.: *Anal. Biochem.* 171, 330 (1988).
44. Miura K.: *Electrophoresis* 22, 801 (2001).
45. Langen H., Berndt P., v knize: *Proteome Research: Mass Spectrometry* (James P., ed.). Springer, Berlin 2001.
46. Edman P.: *Acta Chem. Scand.* 4, 283 (1950).
47. Dunn M. J., v knize: *2-D Proteome Analysis Protocols, Series: Methods in Molecular Biology* (Link A. J., ed.), sv. 112, kap. 35. Humana Press, Totowa, N.J., 1999.
48. Glatz Z.: *Chem. Listy* 89, 437 (1995).
49. Kamo M., Tsugita A., v knize: *2-D Proteome Analysis Protocols, Series: Methods in Molecular Biology* (Link A. J., ed.), sv. 112, kap. 48. Humana Press, Totowa, N.J., 1999.
50. Karas M., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 60, 2299 (1988).
51. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: *Science (Washington, D.C.)* 246, 64 (1989).
52. James P. (ed.): *Proteome Research: Mass Spectrometry*. Springer, Berlin 2001.
53. O'Connor C. C., Adams P., Alefounder P., Farris M., Kinsella N., Li Y., Payot S., Skipp P.: *Electrophoresis* 21, 1178 (2000).
54. Van Bogelen R. A., Schiller E. E., Thomas J. D., Neidhardt F. C.: *Electrophoresis* 20, 2149 (1999).

55. Alaiya A. A., Franzén B., Auer G., Linder S.: *Electrophoresis* 21, 1210 (2000).
56. Myers T. G., Anderson N. L., Waltham M., Li G., Buolamwini J. K., Scudiero D. A., Paull K. D., Sausville E. A., Weinstein J. N.: *Electrophoresis* 18, 647 (1997).
57. Bouchal P.: nepublikované výsledky.

P. Bouchal and I. Kučera (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Two-Dimensional Electrophoresis in Proteomics: Principles and Applications**

Proteomics, a new branch of science related to genomics, involves complex analysis of proteins of cells, tissues or bio-

logical fluids. Proteomics is today based on two-dimensional electrophoresis, the crucial technology in making protein maps. It consists of a special procedure for preparation of a sample, isoelectric focustion, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and gel visualization. Two-dimensional separations of complex protein mixtures in gels are compared, evaluated by image analysis and protein maps are constructed. Individual proteins on the maps can be characterized by various methods, most frequently by mass spectrometry, and identified in databases using the information on their structure. Proteomic methods find useful applications in comparing complex protein composition in biology, especially in microbiology and medicine, where they can contribute to revealing new relations between concentrations of proteins and their physiological functions.

Česká sklářská společnost
Ústav skla a keramiky VŠCHT Praha
Ústav chemie pevných látek VŠCHT Praha

Silikátová společnost ČR
Ústav anorganické chemie VŠCHT Praha
Ústav anorganické chemie AV ČR

ANORGANICKÉ NEKOVOVÉ MATERIÁLY

PROCESY – TECHNOLOGIE – VLASTNOSTI

Odborný seminář o výsledcích dizertačních prací v postgraduálním studiu se koná

5. února 2003 v 9 hodin

v budově „A“ VŠCHT Praha, posluchárna A 02, Technická 5, Praha 6

Na programu semináře jsou přednášky doktorandů ústavů, spolupořadatelů semináře. Po každé přednášce bude v rámci vymezeného času následovat krátká diskuse. K účasti na semináři jsou zváni všichni zájemci o nové poznatky z výzkumu chemie a technologie anorganických nekovových materiálů.