

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

APLIKACE MODERNÍCH SEPARAČNÍCH METOD
V PROTEOMICE

Diplomová práce
studijního oboru Analytická chemie

Praha 2008

Tomáš Křížek

Prohlášení o důvěrnosti dat

Všechna experimentální data uvedená v této diplomové práci byla získána na přístroji zapůjčeném firmou Agilent Technologies ve Waldbronnu a jsou důvěrná.

Confidentiality statement

All experimental data presented in this Diploma Thesis were measured on apparatus provided by Agilent Technologies in Waldbronn and are Agilent restricted.

1. Úvod

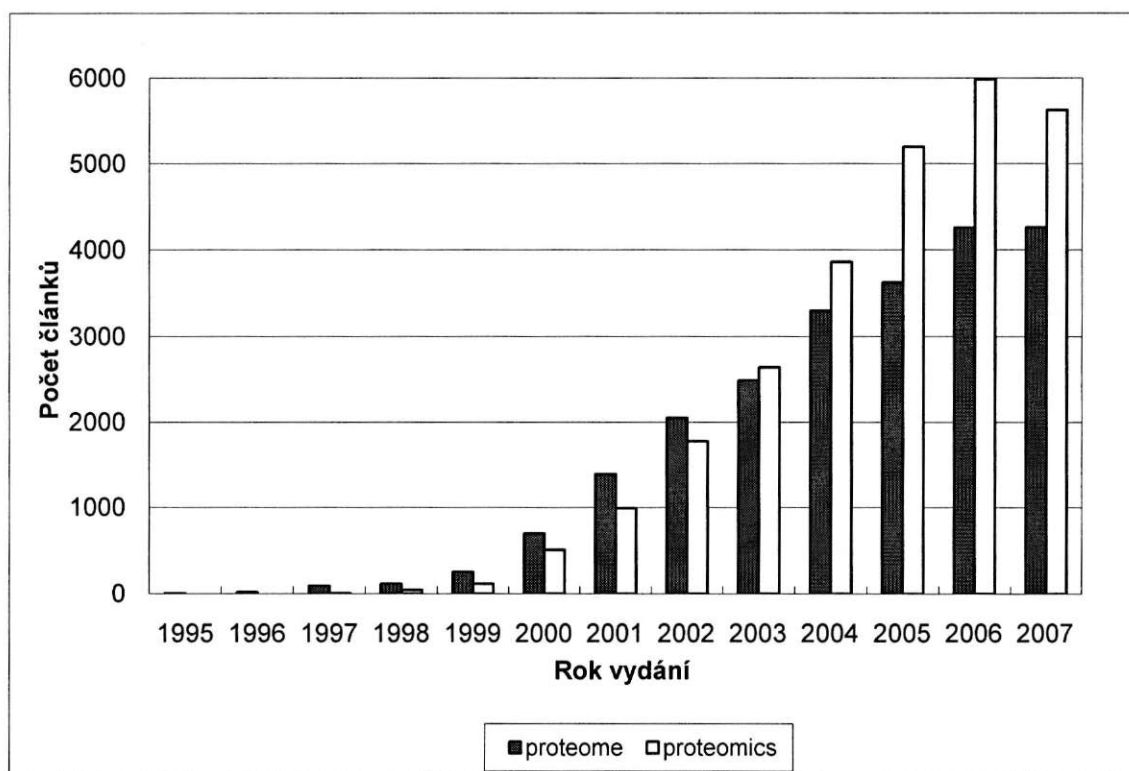
1.1. Proteomika

Proteomika je perspektivní a rychle se rozvíjející vědní obor, který se obecně zabývá studiem proteomu. Výraz „proteom“ byl v literatuře zřejmě poprvé použit Markem Wilkinsem v roce 1995 [1]. O tom, jak dobře a rychle se termín ujal, svědčí výsledek vyhledávání výrazu „proteome“ v databázi Chemical Abstracts pomocí programu SciFinder. Při omezení vyhledávání na články publikované v roce 1996 nabízí SciFinder osmnáct odkazů, zatímco pro rok následující je jich již devadesát tři. Článků obsahujících heslo „proteome“ publikovaných v roce 2007 bylo nalezeno 4264. Graf na **obr. 1** ilustruje prudký nárůst počtu článků zabývajících se proteomem a proteomikou publikovaných během posledních třinácti let. Termín proteom je jakýmsi proteinovým ekvivalentem výrazu „genome“, který vytvořil Hans Winkler již v roce 1920 spojením slov „gene“ a „chromosome“. Původně byl proteom definován jako úplná sada bílkovin vyjádřená genomem organismu nebo také jako celkový bílkovinný obsah tkáně či buňky [2].

V roce 2003 byl po třinácti letech dokončen projekt sekvenace lidského genomu, stejně tak byly již sekvenovány genomy řady dalších organismů. V současnosti je na základě znalosti nukleotidové sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA) možné predikovat aminokyselinové sekvence bílkovin, které daný genom kóduje. Díky studiu tzv. signálních sekvencí je často možné rovněž určit lokalizaci bílkoviny v organismu. Ze sekvence DNA však stále nelze předpovídat posttranslační modifikace bílkovin, jejich vzájemné interakce nebo biologické funkce. Tím vším se kromě identifikace a kvantifikace bílkovin současná proteomika také zabývá. Jedná se o interdisciplinární obor využívající poznatky a techniky biologie, biochemie, molekulární biologie, medicíny a v nemalé míře také analytické chemie. Výsledky proteomiky zpětně přispívají k rozvoji všech zmíněných oborů.

Mezi odvětví, pro něž má studium bílkovin velký význam, patří medicína, neboť proteom závisí, na rozdíl od genomu, na vnějších podmínkách vývoje organismu a odráží jeho aktuální zdravotní stav. Určité změny v proteomu mohou být charakteristické pro danou chorobu a jejich identifikace může do značné míry usnadnit

diagnostiku. Příkladem takové aplikace je využití proteomiky při studiu a léčbě rakoviny. Předpokládá se, že rakovinné buňky produkují určité bílkoviny v nadměrném množství a uvolňují je do krevního oběhu. Ačkoli je takovýchto látek v celkovém objemu krevní plazmy málo, mohou být detekovány a použity jako biomarkery při diagnóze raných stádií choroby díky nízkým detekčním limitům některých proteomických technik. Proteomiku je možné využít i v průběhu léčby onemocnění pro předvídání reakce pacienta na způsob léčení. Pro vývoj nových léků je pak velmi perspektivní studium vzájemných interakcí bílkovin spojených s rakovinnými procesy [3]. Jinou oblastí, kde hraje proteomika významnou roli, je vývoj a testování geneticky modifikovaných rostlin. Zde se prostřednictvím sledování změn v proteomu kontroluje vliv genetických manipulací na organismus a hledají se případné nežádoucí efekty. Rostlinnou proteomiku lze navíc využít i při sledování reakcí rostlin na změny v jejich životním prostředí [4].



Obr. 1 Počet článků obsahujících hesla „proteome“ a „proteomics“ publikovaných v posledních 13 letech podle Chemical Abstracts.

Literatura

- [1] Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpapoljak A. Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L., Humpherysmith I., Electrophoresis, 16 (1995) 1090-1094
- [2] Yan J. X., Wilkins M. R., Ou K., Gooley A. A., Williams K. L., Sanchez J. C., Golaz O., Pasquali C., Hochstrasser D. F., J. Chromatogr. A, 736 (1996) 291-302
- [3] Chuthapisith S., Layfield R., Kerr I. D., Eremit O., Surgeon – Journal of The Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland, 5 (2007) 14-22
- [4] Chen S., Harmon A. C., Proteomics, 6 (2006) 5504-5516
- [5] Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F., Int. J. Mass Spectrom. Ion. Processes, 78 (1987) 53-68
- [6] Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M., Science, 246 (1989) 64-71
- [7] Kellersberger K. A., Tan P. V., Laiko V. L., Doroshenko V. M., Fabris D., Anal. Chem., 76 (2004) 3930-3934
- [8] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>; 21. 3. 2007, 9:50
- [9] Simpson R. J.: *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003, s. 348-352
- [10] Simpson R. J.: *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003, s. 352-355
- [11] Walker J. M. (Ed.): *The Protein Protocols Handbook*, 2nd Edition, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2002
- [12] Liebler D. C.: *Introduction to Proteomic Tools for the New Biology*, Humanna Press, Totowa, New Jersey, 2002, kap. 7
- [13] <http://prowl.rockefeller.edu/>, 17. 2. 2008, 10:30
- [14] <http://www.matrixscience.com>, 23. 3. 2006, 9:00
- [15] Liebler D. C.: *Introduction to Proteomic Tools for the New Biology*, Humanna Press, Totowa, New Jersey, 2002, kap. 8
- [16] <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>, 16. 2. 2008
- [17] <http://prospector.ucsf.edu/>, 16. 2. 2008

- [18] Mermet J. M., Otto M., Kellner R. A., Widmer M. M.: *Analytical Chemistry – A Modern Approach to Analytical Science, Second Edition*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2004, Německo, s. 1023-1034
- [19] Yu C., Davey M. H., Švec F., Fréchet J. M. J., *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5088-5096
- [20] Yin N. F., Killeen K., Brennen R., Sobek D., Werlich M., van de Goor T. V., *Anal. Chem.*, 77 (2005) 527-533
- [21] Yang Y., Li C., Kameoka J., Lee K. H., Craighead H. G., *Lab Chip*, 5 (2005) 869-876
- [22] Foote R. S., Khandurina J., Jacobson S. C., Ramsey J. M., *Anal. Chem.*, 77 (2005) 57-63
- [23] Zhang Y., Timperman A. T., *Analyst*, 128 (2003) 537-542
- [24] Ramsey J. D., Collins G. E., *Anal. Chem.*, 77 (2005) 6664-6670
- [25] Felton M. J., *Anal. Chem.*, 75 (2003) 302A – 306A
- [26] Sassolas A., Leca-Bouvier B. D., Blum L. J., *Chem. Rev.*, 108 (2008) 109-139
- [27] Kan C. W., Fredlake C. P., Doherty E. A. S., Barron A. S., *Electrophoresis*, 25 (2004) 3564-3588
- [28] Tegenfeldt J. O. et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1678-1692
- [29] Lion N. et al., *Electrophoresis*, 24 (2003) 3533 – 3562
- [30] Ibanez A. J., Muck A., Halim V., Svatoš A., *J. Prot. Res.*, 6 (2007) 1183-1189
- [31] Al-Lawati H., Watts P., Welham J., *Analyst*, 131 (2006) 656-663
- [32] Lim L. W., Tomatsu M., Takeuchi T., *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 614-620
- [33] Freire S. L. S., Wheeler A. R., *Lab Chip*, 6 (2006) 1415-1423
- [34] Jung B., Bharadwaj R., Santiago J. G., *Electrophoresis*, 24 (2003) 3476-3483
- [35] Li Y., Buch J. S., Rosenberger F., DeVoe D. L., Lee C. S., *Lab Chip*, 4 (2004) 18-23
- [36] Gottschlich N., Jacobson S. J., Culbertson C. T., Ramsey M., *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2669-2674
- [37] Xue Q. F., Foret F., Dunayevskiy Y. M., Zavracky P. M., McGruer N. E., Karger B. L., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 426-430
- [38] Lion N., Gellon J. O., Jensen H., Girault H. H., *J. Chromatogr. A*, 1003 (2003) 11-19
- [39] Wang Y. X., Cooper J. W., Lee C. S., DeVoe D. L., *Lab Chip*, 4 (2004) 363-367

- [40] Wachs T., Henion J., *Anal. Chem.*, 73 (2001) 632-638
- [41] Zhang B., Foret F., Karger B. L., *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1015-1022
- [42] Wallman L., Ekstrom S., Magnusson M., Bolmsjo G., Olsson M., Nilsson J., Marko-Varga G., Laurell T., *Meas. Sci. Technol.*, 17 (2006) 3147-3153
- [43] Wang Y. X., Zhou Y., Bagley B. M., Cooper J. W., Lee C. S., DeVoe D. L., *Electrophoresis*, 26 (2005) 3631-3640
- [44] He B., Tait N., Regnier F., *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3790-3797
- [45] Eijkel J. C. T., van den Berg A., *Electrophoresis*, 27 (2006) 677-685
- [46] Kettner C., Reimann P., Hänggi P., Müller F., *Phys. Rev. E*, 61 (2000), 312-323
- [47] Siwy Z., Fulinsky A., *Phys. Rev. Lett.*, 89 (2002) Article No.198103
- [48] Bader J. S., Deem M. W., Hammond R. W., Henck S. A., Simpson J. W., Rothberg J. M., *Appl. Phys. A*, 75 (2002) 275-278
- [49] <http://www.expasy.org>, 23. 3. 2006, 9:00
- [50] Aronin N., DiFiglia M., Liotta A. S., Martin J. B., *J. Neurosci.*, 1 (1981) 561-577
- [51] Kumar R., *American Laboratory*, 31 (1999) 32-35