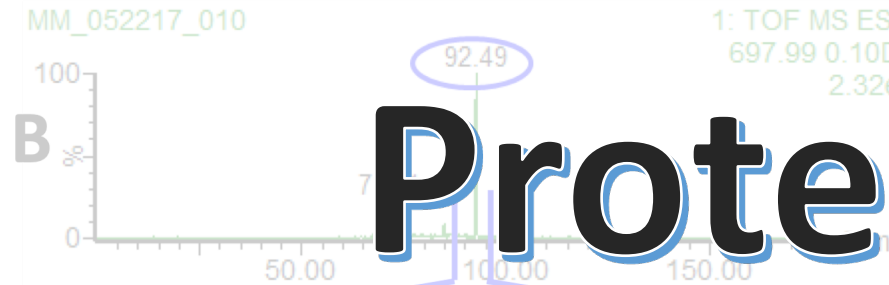
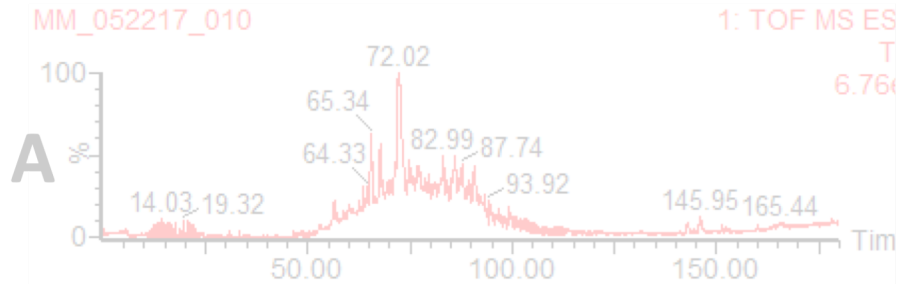


Nicotine

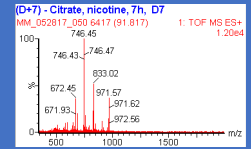


Proteomică

12.03.26 – 10-14

Curs III – Digestia și separarea peptidelor

I. 3. Digestia proteinelor pentru generarea de peptide

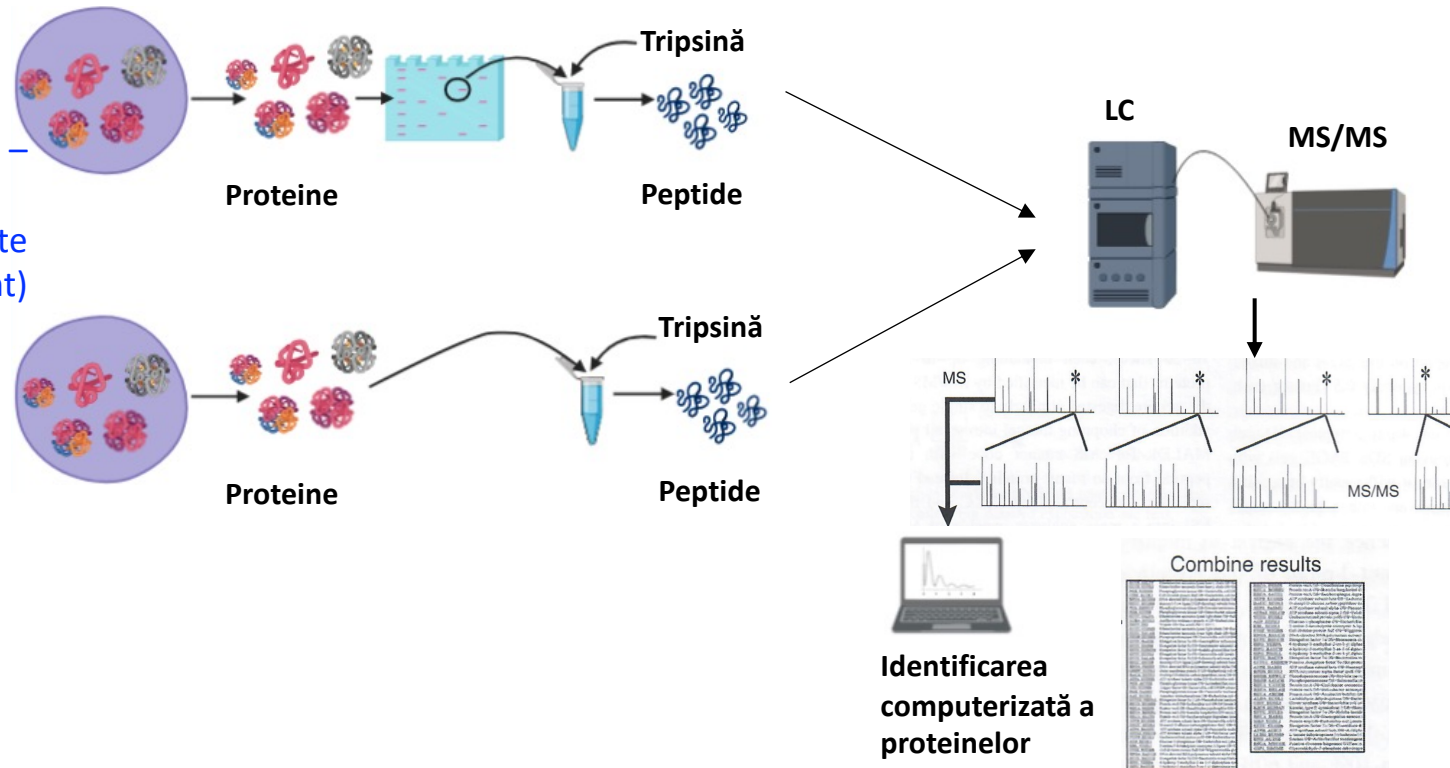


Funcție de prezența sau absența etapei de fracționare a proteinelor, metodele proteomice pot fi grupate în două tipuri majore de abordări:

A. Metode ce utilizează fracționarea proteinelor

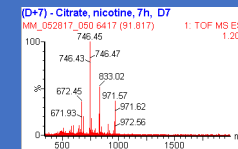
1. Fractionarea se realizează în geluri – gel based proteomics
2. Fraționarea se realizează prin alte metode (cromatografice cel mai frecvent) – gel-free proteomics

B. Metodele tip shot-gun



Indiferent de abordarea majoră utilizată, una dintre etapele obligatorii ale unui studiu de proteomică în reprezintă fragmentarea proteinelor în peptide.

I. 3. Digestia proteinelor pentru generarea de peptide



De ce este necesară digestia și generarea de peptide?

Instrumentele de spectrometrie de masă sunt în prezent capabile să măsoare masele moleculare ale moleculelor proteice. Deși acest **parametru este unic pentru fiecare proteină și ar trebui deci să fie suficient pentru a o identifica dintr-un amestec**, în realitate acest lucru nu este posibil deoarece:

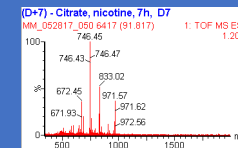
1. cu toată precizia foarte mare a instrumentelor de spectrometrie de masă, au încă un oarecare grad de eroare. În intervalul de masă moleculară al proteinelor, acuratețea instrumentelor nu permite încă identificarea cu precizie a proteinelor cu mase foarte asemănătoare;
2. nu toate proteinele pot fi măsurate prin spectrometrie de masă – proteinele membrane sau cele de dimensiuni foarte mari nu ionizează corespunzător;
3. sensibilitatea măsurătorilor este redusă când se utilizează proteine de dimensiuni mari.

Peptidele pe de altă parte sunt semnificativ de ușor de analizat pentru că:

- a. Spectrometrele de masă au precizia maximă în domeniul de masă al peptidelor;
- b. **Pot fi relativ ușor secvențiat.**

În majoritatea metodelor de proteomică, proteinele extrase sunt așadar clivate complet în peptide, iar mai apoi peptidele sunt secvențiate. Pe baza secvenței de aminoacizi a peptidelor se identifică mai apoi proteina inițială din care acestea provin. Deoarece identificarea pleacă de la peptide spre proteine, aceste metode sunt reunite sub denumirea de **metode de jos în sus (bottom-up)**.

I. 3. Digestia proteinelor pentru generarea de peptide



Proteinele pot fi convertite în peptide printr-un proces de **hidroliză** a unui număr limitat de legături peptice.

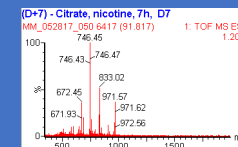
Hidroliza legăturii peptidice se poate realiza:

- A. **Chimic** – prin expunerea la acizi tari (Ex. HCl). Cel mai frecvent hidroliza are loc complet și se eliberează aminoacizi, din acest motiv nu are aplicații în proteomică.
- B. **Enzimatic** – prin utilizarea proteazelor – metoda de care depind studiile de proteomică.

Proteazele, numite și peptidaze sau proteinaze **sunt enzime ce catalizează clivarea legăturilor peptidice cu implicarea unei molecule de H_2O** . Funcție de natura moleculei implicată în mecanismul de reacție, proteazele se clasifică în:

1. **Serin-proteazele** sau **serin-endorpeptidazele** - conțin în situs-ul o trei aminoacizi implicați în cataliză – triadă catalitică – un aminoacid bazic (His), unul dicarboxilic (Asp sau Glu) și un aminoacid puternic nucleofil – serina. Acesta ce inițiază atacul nucleofilic asupra legăturii peptidice; Ex: chimotripsina, tripsina, subtilizina;
2. **Cistein-proteazele** sau **tiol-proteazele** – au triada catalitică, dar serina este înlocuită de cisteină. Ex: papaina.
3. **Treonin-proteazele** - au triada catalitică, dar serina este înlocuită de treonină. Ex: proteazele din interiorul proteasomului;
4. **Aspartat-proteazele** – cataliza este realizată de un rest de acid aspartic, nu conțin triada catalitică. Ex. pepsina.
5. **Glutamat-proteazele** – cataliza este realizată de un rest de acid glutamic, nu conțin triada catalitică.
6. **Metaloproteaze** – în situsul catalitic este un ion metalic, cel mai frecvent Zn^{2+} , ce realizează cataliza.
7. **Asparagin-peptid liazele** – sunt o grupă de enzime ce conțin în situsul activ un rest e Asp implicat în cataliză, dar mecanismul propriu-zis de reacție nu implică molecule de apă.

I. 3. Digestia proteinelor pentru generarea de peptide



Proteazele sunt enzimele caracterizate în general printr-un **nivel ridicat de promiscuitate** – pot **hidroliza un număr foarte mare molecule proteice diferite**, indiferent de secvența de aminoacizi. **Clivarea propriu-zisă este însă specifică** – proteazele recunosc un aminoacid specific de pe secvența de aminoacizi și hidrolizează legătura peptidică înainte sau după acesta. Aceste proprietăți sunt extrem de utile în studiile de proteomică în care toate proteinele din probă trebuie hidrolizate pentru a genera peptide, într-o manieră independentă de secvența lor de aminoacizi.

Trypsin	/K-, /R-, \P
Chymotrypsin	/W-, /Y-, /F-, \P
Glu C (V8 protease)	/E-, /D ^e -, \P
Lys C	/K-, \P
Asp N	/D-

Cel mai frecvent utilizate proteaze sunt:

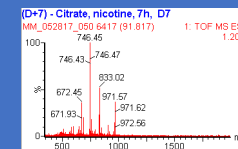
A. Tripsina – este de departe cea mai frecvent utilizată enzimă în proteomică deoarece poate fi obținută în cantități mari relativ ieftin din pancreasul de porc sau vită;

- **clivează legătura peptidică înainte de un rest de Lys(K) sau Arg(R) dacă acestea nu sunt urmate de un rest de Pro(P)**. Datorită acestui fapt, prin acțiunea tripsinei, dintr-o moleculă proteică se generează un număr mare de peptide. Frecvența mare a aminoacizilor K și P face ca în general, o proteină de 50 kDa să genereze 30 peptide prin acțiunea tripsinei.

B. Glu-C (proteaza V8) – este o endoproteinază a cărei specificitate de substrat se modifică funcție de condițiile de reacție:

- În soluții tampon pe bază de ioni amoniu, enzima hidrolizează înainte de un rest de glutamat;
- În soluții tampon pe bază de fosfat, enzima hidrolizează înainte de Glu și Asp.

I. 3. Digestia proteinelor pentru generarea de peptide



Digestia proteinelor fracționate se poate realiza în soluție sau, în cazul în care fracționarea s-a realizat prin electroforeză, direct în geluri. Cel mai frecvent gelul este tăiat în fragmente și tratat cu tripsină. Prin hidrolizarea proteinelor din fragmentul de gel se generează peptide care au suplimentar avantajul că **pot fi foarte ușor extrase sau eluate din gel** (sunt semnificativ mai mici decât proteinele și se nu mai sunt reținute prin porii gelului).

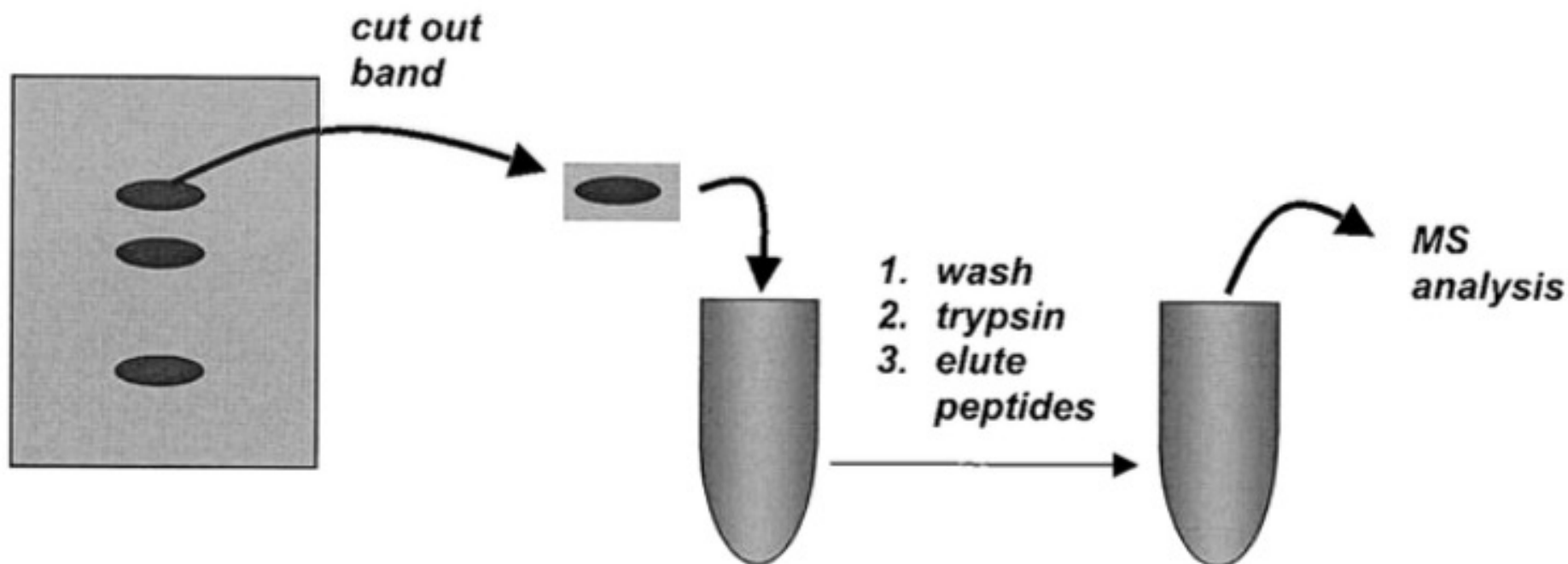


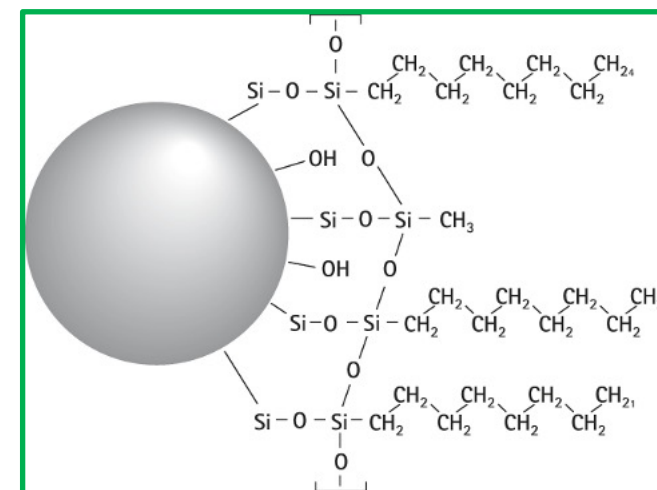
Fig. 1. Schematic representation of in-gel digestion.

(D+7) - Citrate, nicotine, 7h, D7
 MM_052817_050 6417 (91.817) 1: TOF MS ES- 1.20e

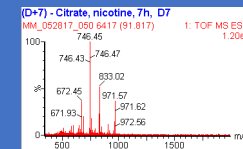
m/z	Relative Intensity (%)
671.93	~10
672.45	~15
746.43	~85
746.47	100
833.02	~25
971.57	~15
971.62	~10
972.56	~10

În mod tradițional, **peptidele sunt separate prin cromatografia de fază inversată** folosind coloane cromatografice în care faza staționară este atașată de bile inerte din silica cu dimensiuni de 1.8–5 μm. **Faza mobilă este pompată prin coloana cromatografică cu un debit de 0.1-10 ml/minut și lichidul este forțat să treacă prin spațiile strâmte dintre bile, ceea ce creează presiune în interiorul sistemului cromatografic. Din acest motiv tehnica de separare se numește HPLC – high pressure liquid chromatography.** Deși termenul a devenit aproape sinonim cu separarea peptidelor, HPLC se referă la absolut toate separările cromatografice ce folosesc fază mobilă lichidă (**LC-liquid chromatography, spre deosebire de GC – gaz chromatography**) în care presiunea de lucru este mare.

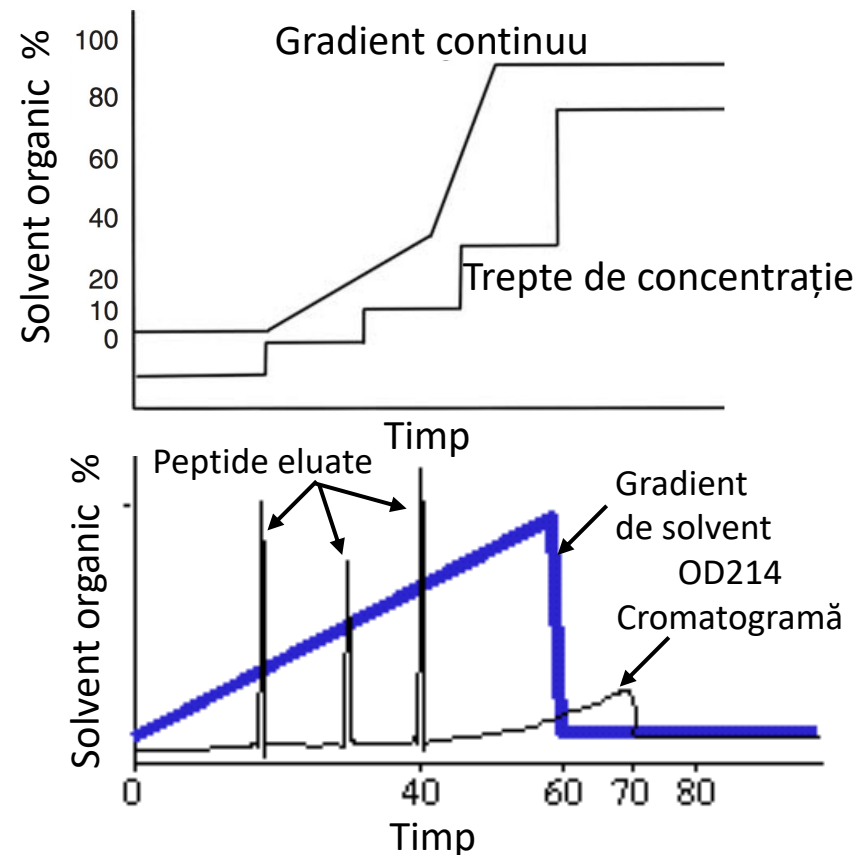
- **Faza staționară** este reprezentată din **molecule hidrofobe – catene alchil** ($-\text{CH}_2-$, **alcani sau hidrocarburi cu diverse grade de nesaturare**) cu lungimea cuprinsă între 2 și 18 atomi de C. Cel mai frecvent sunt notate C2-C18;
- **Faza mobilă** este reprezentată dintr-un **amestec variabil dintr-un solvent polar precum apa (solvent apos) și unul nepolar, organic (acetonitril, ACN sau metanol, MetOH – solvent organic)**. La începutul separării raportul este favorabil apei, faza mobilă fiind preponderent polară, la finalul separării raportul este favorabil solventului nepolar. Modificarea raportului între cei doi solvenți se realizează automatizat de către sistemul cromatografic în două modalități diferite:



I. 4. Fraționarea peptidelor

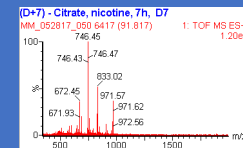


- A. Sub forma unui **gradient de concentrație continuu**;
- B. Sub forma unor modificări **în trepte a concentrației**;
- Amestecul peptidic este injectat în coloană în prezența fazei mobile polare, apoase, ceea ce va face ca aminoacizii hidrofobi din structura peptidelor să interacționeze cu catenele C18 hidrofoabe și să fie reținute de către faza staționară;
- La creșterea concentrației de solvent organic, interacțiunile hidrofoabe dintre peptide și catenele hidrofoabe ale fazei staționare scad, iar peptidele se desprind fracționat din coloana cromatografică funcție de secvență: peptidele cu un număr mic de aminoacizi nepolari la concentrații mici de solvent polar, cele cu număr mare de aminoacizi nepolari spre final, la concentrații mari de solvent polar. **Procesul de antrenare a peptidelor de pe coloana cromatografică prin modificarea unui parametru fizico-chimic (în cazul de față polaritatea solventului) poartă numele de eluție.**
- Peptidele eluate din coloana cromatografică sunt înregistrate prin intermediul detectorului sub forma unor semnale sau *peak*-uri.



- Cel mai frecvent, în RP-HPLC detectorul este un spectrometru UV-VIS, peptidele fiind detectate la 214nm;
- Timpul scurt de la injecția probei în coloana cromatografică până la eluția unei peptide este înregistrat și se numește **timp de retenție**. Intensitatea semnalului de la detector reprezentat de înălțimea peak-ului este strict proporțională cu concentrația peptidei eluate.

I. 4. Fraționarea peptidelor



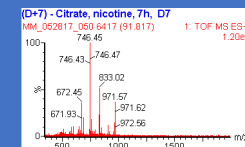
Sistemele HPLC tradiționale funcționează la un debit de 0.1-10 ml/minut și datorită acestui fapt nu pot fi conectate direct la spectrometre de masă – cantitatea de solvent este prea mare, nu poate fi evaporat suficient de repede pentru ca peptidele să ionizeze. De asemenea, coloanele în HPLC tradiționale au diametru mare (**4,6 mm cel mai frecvent**) ceea ce face ca în urma separării proba să fie diluată, devenind nedetectabilă de către instrumentele MS.

Fraționarea peptidelor în experimentele de proteomică se realizează în sisteme nano-HPLC, ce funcționează după același principii ca sistemele HPLC clasice dar:

- Debitul utilizat este de ordinul **nano-litrilor, cel mai frecvent 200-350 nanoL/min;**
- Coloanele cromatografice au diametrul de **50 – 75 micrometri;**
- Eluția peak-urilor peptidice are loc într-un volum de aproximativ **100 nL**, volum ce poate fi ușor evaporat pentru a ioniza peptidele conținute;



I. 4. Fraționarea peptidelor



Separare LC bidimensională

