

Profesorowi Zbigniewowi Galusowi poświęcamy

ROLA I MOŻLIWOŚCI BADAŃ PROTEOMICZNYCH

THE ROLE AND POTENTIAL OF PROTEOMIC RESEARCH

Andrzej Gawor, Ewa Bulska*

¹*Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski, Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa, Polska
e-mail: ebulska@chem.uw.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Metody instrumentalne w identyfikacji białek

1.1. Identyfikacja białek z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas

1.2. Analiza porównawcza i ilościowa w proteomicie

2. Znaczenie biologiczne danych proteomicznych: narzędzia bioinformatyczne

3. Badania proteomiczne tkanek po podaniu leków zawierających fluor

3.1. Materiał biologiczny do badań

3.2. Materiały i metody

3.3. Interpretacja otrzymanych wyników

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

prof. dr hab. Ewa Bulska - pracownik Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Kieruje Centrum Metrologii Chemicznej przy Uniwersytecie Warszawskim oraz Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Członek Komitetu Chemii Analitycznej PAN oraz przewodnicząca Zespołu Spektrometrii Atomowej KChA PAN, członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego, członek zarządu Klubu Polskich Laboratoriów Badawczych POLLAB, członek zarządu międzynarodowej organizacji EuroLab. Przewodnicząca pierwszej kadencji Rady Metrologii przy Prezecie Głównego Urzędu Miar. Prof. E. Bulska posiada w swoim dorobku ponad 210 publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych, około 40 publikacji w czasopismach polskich, poza tym 4 rozdziały w monografiach w języku angielskim oraz 7 rozdziałów w monografiach polskich. Jest również autorką podręcznika „Metrologia Chemiczna”, wydanego przez wydawnictwo MALAMUT oraz powstałej na tej podstawie monografii „Metrology in Chemistry” (Springer, 2018 r.). Jest laureatka wielu nagród, w tym nagrody im. Bunsena-Kirchhoffa przyznanej przez Niemieckie Towarzystwo Chemiczne (2004 r.); nagrody Uniwersytetu Warszawskiego im W. Świątosławskiego (2006 r.); medalu im. Wiktora Kemuli przyznanej przez Polskie Towarzystwo Chemiczne (2012 r.); tytułu IUPAC’2015 Distinguished Women in Chemistry, przyznanej przez organizację IUPAC (2015 r.); nagrody im. Jerzego Fijałkowskiego przyznanej przez Komitet Chemii Analitycznej PAN (2016 r.). Otrzymała nagrody „Excellence Award 2006” / „Excellence Award 2007”, przyznane przez Komitet Naukowy IRMM JRC EU. W 2009 r. uzyskała Złoty Medal za długoletnią służbę, w 2015 r. otrzymała Złoty Krzyż Zasługi, a w 2019 r. Krzyż Kawalerski Orderu Odrodzenia Polski. W 2015 r. uzyskała Dyplom Ministra Gospodarki za aktywne propagowanie idei i ducha przedsiębiorczości. Prof. Ewa Bulska była stypendystką Towarzystwa Maxa Plancka (MPG), przebywała na stażu po-doktorskim w Instytucie Maxa Plancka w Dortmundzie (Niemcy); była również stypendystką Fundacji Aleksandra von Humboldta, realizowana staż na Politechnice w Darmstadt (Niemcy). Była również profesorem wizytującym na kilku uniwersytetach w Brazylii, Chinach, Japonii, Niemczech, Słowenii, Szwecji i USA.



<https://orcid.org/0000-0003-4872-5521>

dr Andrzej Gawor – pracownik Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, zajmuje się wykorzystaniem technik wysokorozdzielczej spektrometrii mas w badaniach proteomicznych. Współautor prac naukowych związanych z wykorzystaniem badań proteomicznych i metabolomicznych oraz poświęconych potwierdzeniem ważności wyników zgodnie z normą ISO/IEC 17025 oraz ISO 15189. Od 2018 roku pełnomocnik ds. jakości Kampusu Ochota Uniwersytetu Warszawskiego, odpowiedzialny za realizację procesów akredytacji i certyfikacji laboratoriów Kampusu Ochota UW. Odbił staż naukowy w specjalistycznym laboratorium spektrometrii mas we wspólnej jednostce badawczej University of Pau and Pays de l’Adour oraz Joint Research Unit w Pau, we Francji.



<https://orcid.org/0000-0001-9578-4968>

ABSTRACT

Proteomic research plays a crucial role in unraveling the mysteries of cellular function. This paper explores the historical background and contemporary significance of proteomics, emphasizing its importance in understanding protein interactions within biological systems. We discuss key advancements in technology, particularly in mass spectrometry and ionization techniques, which have greatly enhanced our ability to analyze the proteome comprehensively. Moreover, we examine the potential applications of proteomic research in fields such as diagnostics, drug development, and personalized medicine, highlighting its transformative impact on biomedical sciences. By addressing current challenges and future prospects, this review aims to provide a clear overview of the role and potential of proteomic research in advancing our understanding of complex biological processes.

Keywords: proteomics; mass spectrometry; protein-protein interaction

Słowa kluczowe: proteomika; spektrometria mas; oddziaływania białko-białko

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BioGRID	– akronim bazy danych Biological General Repository for Interaction Datasets
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
ESI	– jonizacja przez elektrorozpylanie, ang. <i>electrospray ionization</i>
FWMH	– jednostka zdolności rozdzielczej, ang. <i>full width at half maximum</i>
GO	– ontologia genów, ang. <i>gene ontology</i>
i-TRAQ	– akronim znacznika izobarycznego Isobaric Tags For Relative And Absolute Quantitation
KEGG	– akronim bazy ścieżek metabolicznych Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS/MS	– chromatografia cieczowa połączoną z tandemową spektrometrią mas, ang. <i>Liquid Chromatography MS/MS</i>
LFQ	– metoda proteomiki ilościowej bez użycia znaczników izotopowych, ang. <i>label-free quantification</i>
MALDI	– laserowa jonizacja wspomagana matrycą, ang. <i>matrix-assisted laser desorption</i>
mRNA	– informacyjny kwas rybonukleinowy
MS	– spektrometria mas, ang. <i>Mass Spectrometry</i>
PPI	– oddziaływania białko-białko, ang. <i>protein-protein interaction</i>
STRING	– akronim bazy danych Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TMT	– akronim znacznika izobarycznego Tandem Mass Tag

WPROWADZENIE

Dynamiczny rozwój biologii molekularnej jest możliwy dzięki badaniom złożonych mechanizmów biologicznych, w których wykorzystuje się zaawansowane techniki proteomiczne. Istotne przy tym są możliwości prowadzenia kompleksowych badań struktury, funkcji i wzajemnych oddziaływań białek, które stanowią kluczowy element regulacji procesów życiowych. Wraz z postępem technologii pomiarowych pozwalających na zrozumienie struktury oraz funkcji białek, proteomika stała się niezwykle ważnym narzędziem w biologii molekularnej, biotechnologii, medycynie i wielu innych dziedzinach naukowych.

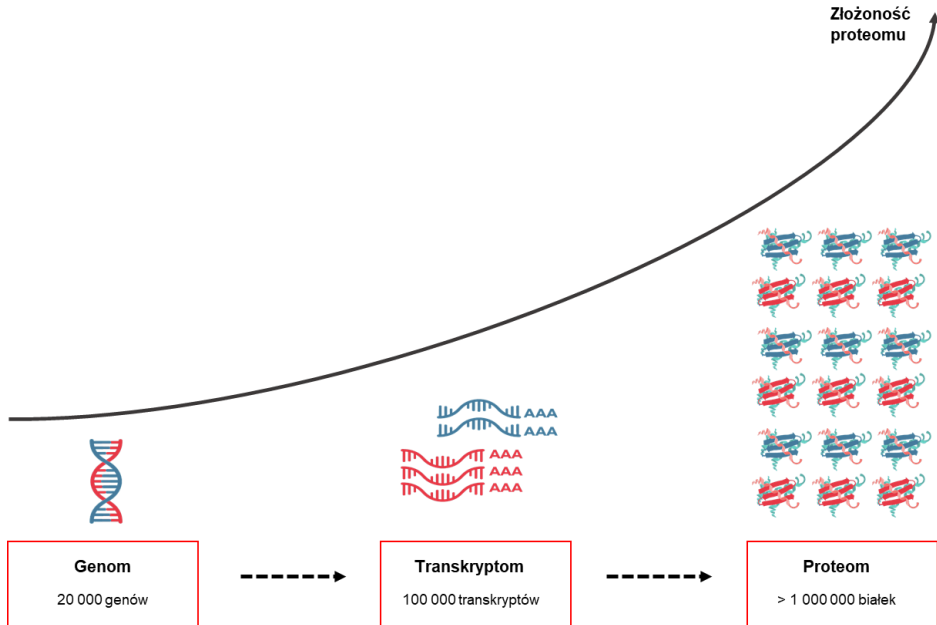
Niniejszy artykuł poświęcony jest omówieniu roli oraz możliwości badań proteomicznych złożonych układów biologicznych. Omawiamy rolę proteomiki w zrozumieniu różnorodnych procesów biologicznych, między innymi ekspresji genów, regulacji metabolicznych, oddziaływań białko-białko czy mechanizmów patogenezы chorób. Ponadto, omawiamy najnowsze osiągnięcia w technologii badań proteomicznych oraz nowych narzędzi bioinformatycznych wykorzystywanych do analizy i interpretacji danych proteomicznych. Biorąc pod uwagę rolę i potencjał takich badań, zwracamy uwagę na niekwestionowane znaczenie proteomiki dla postępu naukowego oraz jej wpływu na rozwój terapii i diagnostyki chorób. Zrozumienie złożonych sieci oddziaływań białek oraz identyfikacja biomarkerów i terapeutycznych celów molekularnych są kluczowymi elementami prowadzenia skutecznych badań nad chorobami oraz opracowywania nowych strategii terapeutycznych. Badania proteomiczne są również pomocne w ocenie wpływu cząsteczek aktywnych w lekach na procesy zachodzące na poziomie komórkowym, po ich podawaniu pacjentom w trakcie leczenia. Takie zastosowanie proteomiki wybraliśmy w celu ilustracji sposobu postępowania i możliwości jej wykorzystania w praktyce medycznej.

1. METODY INSTRUMENTALNE W IDENTYFIKACJI BIAŁEK

Istota badań biologicznych dotyczy fundamentalnej roli białek dla funkcji życiowych, co zostało docenione już we wczesnych etapach rozwoju nauki. Określenie "białko", wywodzące się od greckiego terminu *proteios* oznaczającego "pierwszorzędny", po raz pierwszy zostało użyte przez Berzeliusa w 1838 roku [1], podkreślając znaczenie tej grupy związków. Białka stanowią istotny składnik wszystkich tkanek, między innymi skóry, mięśni, nerwów i tkanki łącznej. Są składnikami enzymów, hormonów czy przeciwciał. Bogactwo białek obecnych w komórkach powoduje, że poznanie ich wzajemnych oddziaływań i modyfikacji jest kluczowe dla zrozumienia mechanizmów działania systemów biologicznych.

Proteomika to dziedzina zajmująca się analizą proteomu, czyli całościową i kompleksową analizą wszystkich białek znajdujących się w obrębie danej komórki,

tkanki czy organu. Termin ten wprowadził Marc Wilkins w 1994 roku [2,3], łącząc słowa "białko" i "genom". Proteom jest dynamiczny i charakteryzuje się znaczną złożonością, przewyższającą złożoność genomu, co przedstawiono poglądowo na Rysunku 1.



Rysunek 1. Graficzna prezentacja złożoności proteomu.

Figure 1. Graphical presentation of the complexity of the proteome.

Warto podkreślić, że ludzki genom zawiera około 20 000 genów zdolnych do kodowania białek, a przy tym każdy gen może kodować różne formy białka, które mogą ulegać różnym modyfikacjom potranslacyjnym lub łączyć się z innymi związkami. Badania transkryptomyczne, możliwe dzięki rozwojowi technologii mikromacierzy DNA, dostarczają informacji o ekspresji genów na poziomie mRNA. Wprawdzie wskazują na cele genomu w syntezie białek, to jednak nie dostarczają pełnych informacji o ich funkcjach. Proteomika przenosi informacje genetyczne na poziom funkcjonalny, co umożliwi lepsze zrozumienie fizjologicznych i patologicznych procesów zachodzących w organizmie. Bez wątpienia wyniki badań proteomicznych odgrywają kluczową rolę w procesie rozwoju leków jako białkowych cząsteczek docelowych. Dzięki analizie wyników badań proteomicznych uzupełnionych wynikami badań genomicznych, transkryptomycznych czy metabolomicznych, możliwe jest pogłębienie wiedzy i lepsze zrozumienie procesów biologicznych na poziomie molekularnym.

Konieczność identyfikacji sekwencji aminokwasowych białek jest niezwykle istotna w naukowych badaniach. Dzięki pionierskiej metodzie opracowanej przez Frederica Sangera, pierwszym zsekwencjonowanym materiałem biologicznym było białko – insulina, za co naukowiec otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 1958 roku [4], Sangera ponownie uhonorowano Noblem w 1980 roku [5] za opracowanie metody sekwencjonowania DNA. Pomimo postępów i ulepszeń, takich jak metoda enzymatycznego sekwencjonowania DNA opracowana przez Pepera Edmana z Uniwersytetu w Lund [6], oraz automatyzacja procesu przez Stanforda Moore'a i Williama Steina [7], metody te nadal miały liczne ograniczenia. Proces ten był stosunkowo powolny, wymagając blisko godziny na cykl i nieskuteczny dla peptydów powyżej 30 reszt aminokwasowych. Dodatkowo, możliwe było zastosowanie tej metody jedynie dla pojedynczych, oczyszczonych próbek białkowych, wymagając stosunkowo dużej ilości materiału (około 100 pmol), nie była również możliwa identyfikacja białek bez wolnej grupy aminowej na N-końcu [8].

Warto również wspomnieć, że w latach 70-tych XX wieku, w badaniach proteomicznych wykorzystywano dwuwymiarową elektroforezę żelową [9], jednak ta technologia miała również wiele ograniczeń. Rozdzielczość nie była zbyt wysoka, co utrudniało rozdzielenie wielu białkowych składników obecnych w próbce, a konieczność posiadania wzorca białek uniemożliwiała analizę tych białek, których tożsamość nie była znana. Jednakże, wraz z rozwojem biologii molekularnej, wzrosła potrzeba identyfikacji białek na szeroką skalę, aby poznać różnice między stanami funkcjonalnymi organizmów.

Spektrometria mas (MS), której początki sięgają przełomu XIX i XX wieku, kiedy to Joseph John Thomson skonstruował pierwszy spektrometr mas [10], odegrała kluczową rolę w rozwoju chemii analitycznej w latach osiemdziesiątych XX wieku. Pojawienie się komercyjnie dostępnych analizatorów mas umożliwiło ich wykorzystanie w analizie pierwiastkowej oraz w analizie związków małowcząsteczkowych. Wcześniejsze ograniczenia związane z badaniem złożonych układów biologicznych wynikały głównie z trudności w efektywnej jonizacji białek, kwasów nukleinowych i złożonych węglowodanów. Początkowo, techniki jonizacji powodowały znaczną fragmentację cząsteczek już w źródle jonów, a przy tym wymagana była duża ilość badanej substancji. Przełom nastąpił w 1988 roku, kiedy opisano dwie nowe techniki jonizacji: MALDI (ang. *matrix-assisted laser desorption*; laserowa jonizacja wspomagana matrycą) oraz ESI (ang. *electrospray ionization*; jonizacja przez elektrorozpylanie). Dzięki temu zakończyły się problemy z jonizacją związków wielkocząsteczkowych, a to zrewolucjonizowało wykorzystanie spektrometrii mas w analityce. Nastąpił dynamiczny rozwój nowych analizatorów mas, pojawiły się nowe układy tandemowych spektrometrów mas, nie

wspominając o znaczącym postępie w technikach rozdzielania złożonych mieszanin. W 2002 roku za te znaczące osiągnięcia John Fenn, Koichi Tanaka i Kurt Wüthrich otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [11], a techniki MALDI i ESI do dziś pozostają kluczowymi metodami jonizacji związków wielkocząsteczkowych. Kolejnym kamieniem milowym było opracowanie w 1999 roku przez Alexandra Makarova nowego analizatora mas typu Orbitrap [12], co miało istotny wpływ na poszarzenie obszaru zastosowań spektrometrii mas, zwłaszcza w proteomice. Analizator typu Orbitrap charakteryzuje się wysoką zdolnością rozdzielczą (do 500 000 FWHM) oraz zapewnia jedną z najwyższych dokładności pomiaru m/z sięgającą 1 ppm [13]. Obecnie spektrometria mas jest powszechnie stosowana do identyfikacji białek na dużą skalę. Niemniej jednak, nie jest uniwersalnym narzędziem do osiągnięcia wszystkich celów analizy proteomicznej, a wybór odpowiednich technik, strategii pomiarów i narzędzi bioinformatycznych jest kluczowy dla uzyskania pożądanych informacji w każdym eksperymencie proteomicznym.

1.1. IDENTYFIKACJA BIAŁEK Z WYKORZYSTANIEM WYSOKOROZDZIELCZEJ SPEKTROMETRII MAS

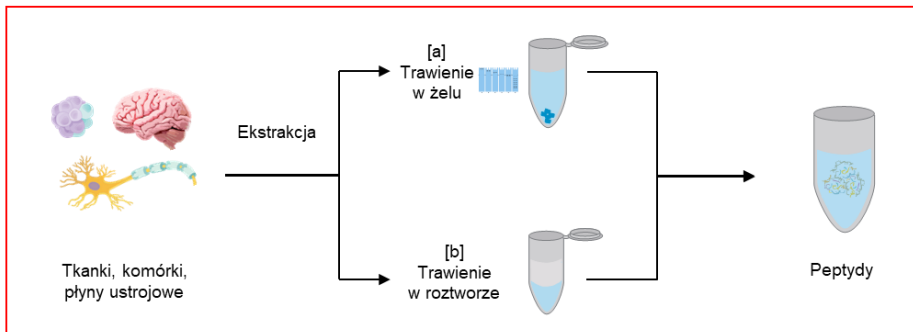
Analiza proteomiczna, wykorzystująca wysokorozdzielczą spektrometrię mas, obejmuje kilka etapów: (i) przygotowanie próbek, (ii) rozdzielenie chromatograficzne mieszaniny białek lub peptydów, a następnie (iii) analizę poszczególnych składników próbki za pomocą odpowiedniego analizatora MS, a także interpretację wyników z wykorzystaniem baz danych i narzędzi bioinformatycznych. Obecnie w analizie proteomicznej stosuje się dwa główne podejścia: *top-down* i *bottom-up* [14].

W podejściu *top-down* analizuje się nienaruszone białka (lub ich duże fragmenty) o pełnej sekwencji aminokwasowej, bez ich uprzedniej proteolizy. Ta strategia umożliwia identyfikację nieznanymi wcześniej białek oraz pełną charakterystykę proteoform, czyli wszystkich form, w których może występować kodowane przez dany gen białko. Istotnym problemem analitycznym jest ograniczony zakres wartości m/z stosowanych analizatorów mas oraz ograniczona efektywność stosowanych metod rozdzielania złożonych mieszanin białkowych, przez co w praktyce możliwa jest analiza pojedynczych białek lub ich mało złożonych mieszanin.

W przeciwieństwie do tego, w strategii *bottom-up* analizowane są peptydy uzyskane w wyniku proteolizy białek enzymem proteolitycznym. Do identyfikacji danego białka wystarczy zidentyfikować charakterystyczny peptyd, który występuje jedynie w tym białku. W przeciwieństwie jednak do strategii *top-down*, proces przygotowania próbki do analizy proteomicznej w strategii *bottom-up* jest bardziej złożony i obejmuje kilka etapów (Rysunek 2): (i) izolację i oczyszczenie materiału białkowego; (ii) redukcję mostków dwusiarczkowych i zabezpieczenie powstałych

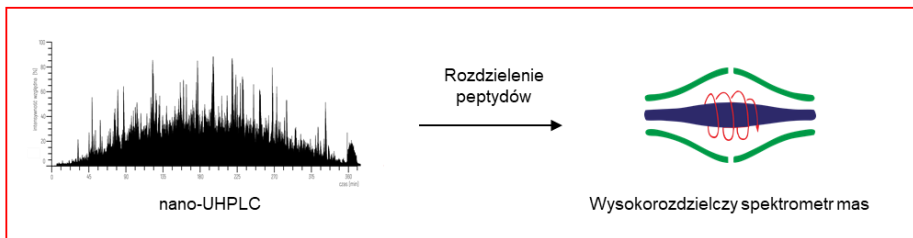
grup sulfhydrylowych; (iii) proteolityczne trawienie białek [14–18]. Aby uzyskać rozpuszczalność materiału białkowego, stosuje się czynniki chaotropowe, które zapobiegają tworzeniu się agregatów poprzez zrywanie wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofilowych, a liza tkanek lub komórek prowadzona jest w buforach zawierających silne środki redukujące.

Przygotowanie próbek

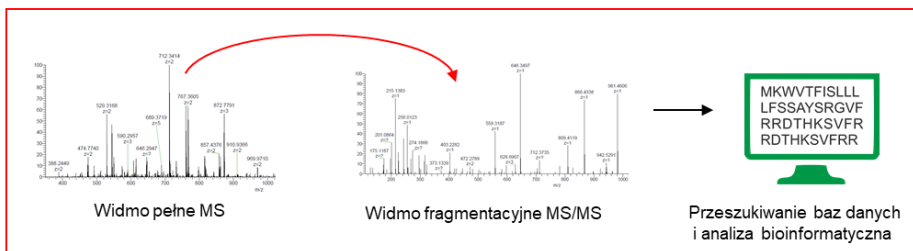


Rozdzielenie chromatograficzne

Spektrometria mas



Identyfikacja białek



Rysunek 2. Etapy przygotowania próbki do analizy proteomicznej w strategii *bottom-up*.
 Figure 2. Sample preparation steps for proteomic analysis in the bottom-up approach.

Podczas lizy komórek dochodzi do uwolnienia endogennych proteaz, co może prowadzić do naruszenia struktur komórkowych i niespecyficznego trawienia białek. Aby temu zapobiec, stosuje się inhibitory proteaz, takie jak fluorek

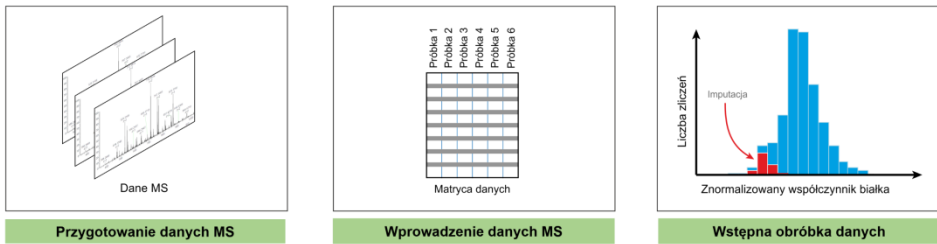
fenyloetylosulfonowy lub jego mieszaninę z kwasem etylenodiaminotetraoctowym. Do redukcji wiązań dwusiarczkowych najczęściej używa się ditiotreitolu, β -merkaptotolanu oraz tris(2-karboksyetylo)fosfiny. Powstałe grupy sulfhydrylowe zabezpiecza się zwykle za pomocą 2-jodoacetamidu. Biorąc pod uwagę potencjalne reakcje uboczne związane z jego stosowaniem, coraz częściej stosowane są akrylamid lub kwas jodooctowy. Proces trawienia enzymatycznego białek najczęściej przeprowadza się przy użyciu modyfikowanej trypsyny, chronionej przed autolizą. Trawienie to może odbywać się w żelu poliakrylamidowym (ang. *in-gel digestion*) lub w roztworze (ang. *in-solution digestion*; *shotgun*). Następnie oczyszczone peptydy ekstrahuje się do fazy stałej. Analizę peptydów prowadzi się zazwyczaj za pomocą chromatografii cieczowej z nano-przepływem połączonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas, np. nano-UHPLC-ESI-(Orbitrap)MS/MS. Do identyfikacji białek wykorzystuje się zarejestrowane widma fragmentacyjne MS/MS peptydów, które porównuje się z teoretycznymi widmami wygenerowanymi dla sekwencji peptydowych zgromadzonych w bazach danych białkowych [17–19]. Do tego celu służą oprogramowania typu *open-source*, takie jak MaxQuant, Open MS, czy Viper, a także rozwiązania komercyjne, np. Mascot czy PEAKS. Wiele wiodących producentów spektrometrów mas oferuje również własne oprogramowanie do analizy danych proteomicznych, takie jak Progenesis QI for Proteomics firmy Waters czy Proteome Discoverer należący do Thermo Fisher Scientific. Wprawdzie korzystanie z baz danych jest powszechną praktyką w analizie proteomicznej, ma wiele ograniczeń, zwłaszcza gdy w próbce obecne są nieznanne białka. W takich przypadkach stosuje się alternatywne podejście zwane sekwencjonowaniem *de novo*, które polega na analizie widm fragmentacyjnych w celu przypisania zarejestrowanym sygnałom odpowiednich sekwencji aminokwasowych.

1.2. ANALIZA PORÓWNAWCZA I ILOŚCIOWA W PROTEOMICIE

W biologii molekularnej wiele kluczowych odkryć dokonano poprzez identyfikację różnic między różnymi stanami funkcjonalnymi systemu biologicznego. Przykładem może być odkrycie procesu ubikwitynacji, na podstawie porównania statusu komórek poddanych stresowi z komórkami w warunkach normalnych [20,21]. W takich badaniach nie informacje ilościowe (stężenie białek) nie są kluczowe, istotne jest oszacowanie jak zmienia się zawartość danego białka w wyniku działania określonego czynnika.

Wykorzystanie spektrometrii mas do analizy ilościowej w proteomicie wymaga zastosowania przemyślanej strategii, biorącej pod uwagę techniczne ograniczenia układów pomiarowych oraz ekonomiczne aspekty pomiaru [22]. Na efektywność jonizacji w typowych źródłach jonów wpływa otoczenie chemiczne, a w przypadku

źródła ESI czynniki takie jak zasolenie próbki, lotność czy napięcie powierzchniowe rozpuszczalnika. Można temu zapobiec stosując wstępne frakcjonowanie [23] i/lub oczyszczanie próbki [24], które zmniejsza obecność potencjalnie przeszkadzających składników. Metody ilościowej proteomiki różnicowej można podzielić na dwie kategorie: te wykorzystujące znakowanie białka stabilnymi izotopami (ang. *stable isotope labeling*) oraz te bez stosowania znaczników izotopowych (ang. *label-free quantification, LFQ*) [25]. Stosowanie trwałych izotopów w analizie proteomicznej polega na wprowadzeniu specjalnego znacznika, który zmienia skład izotopowy próbki, co umożliwia odróżnienie sygnałów pochodzących od poszczególnych składników próbki, w analizatorze mas. Największą zaletą techniki znakowania izotopowego jest to, że sygnały pochodzące od analitów bez znacznika oraz znakowane izotopowo mierzone są jednocześnie, co pozwala na eliminację efektów związanych z efektywnością jonizacji, zmianą składu roztworów, czy stabilnością układu pomiarowego. Metody proteomiki ilościowej z wykorzystaniem znaczników izotopowych, mimo swojej popularności i rozwiniętych protokołów analitycznych, mają jednak kilka istotnych ograniczeń. To przede wszystkim: (i) konieczność dodatkowych etapów przetwarzania próbek w trakcie eksperymentu, (ii) wysokie koszty stosowanych odczynników do znakowania, (iii) zmienność wydajności znakowania zależna od powtarzalności przygotowania próbek do analizy oraz (iv) ograniczenia w liczbie próbek, które można jednocześnie analizować w jednym eksperymencie [26–28]. Ze względu na te ograniczenia, ale również dzięki rozwojowi układów pomiarowych i algorytmów obliczeniowych, wprowadzane są alternatywne metody analizy ilościowej białek/peptydów bez konieczności stosowania znaczników izotopowych. W trakcie elucji składników próbki z kolumny chromatograficznej, układ pomiarowy rejestruje widma mas dla kolejnych peptydów, co umożliwia pełną charakterystykę każdego z nich, w tym informacje o czasie retencji, intensywności sygnału i wartości m/z . Następnie wybrane jony pseudomolekularne mogą być poddane dalszej fragmentacji, co może być źródłem szczegółowych informacji o intensywnościach sygnałów i wartościach m/z dla wszystkich jonów fragmentacyjnych. Analiza tych danych za pomocą narzędzi bioinformatycznych pozwala uzyskać pełną charakterystykę ilościową peptydu w danej próbce, uwzględniając pole powierzchni i intensywność sygnału oraz wartości m/z peptydu, w tym jego fragmentów widocznych na widmie fragmentacyjnym. Obecnie, w większości dostępnych narzędzi bioinformatycznych wykorzystywanych w proteomicznej analizie ilościowej stosuje się metodologię przedstawioną Rysunku 3.

(A) Przygotowanie danych MS**(B) Analiza statystyczna i interpretacja biologiczna wyników**

Rysunek 3. Metodologia analizy bioinformatycznej w proteomice ilościowej na przykładzie oprogramowania MaxQuant oraz Perseus obejmująca: A) przygotowanie danych MS oraz B) analizę statystyczną i interpretację biologiczną otrzymanych wyników.

Figure 3. Methodology of bioinformatic analysis in quantitative proteomics using MaxQuant and Perseus software, comprising: A) preparation of MS data, and B) statistical analysis and biological interpretation of the obtained results.

W eksperymentach prowadzonych zgodnie ze strategią *label-free*, duża liczba próbek jest analizowana niezależnie od siebie, za pomocą układu LC-MS/MS, co generuje surowe dane. Następnie, dane te są przetwarzane za pomocą specjalnych protokołów i algorytmów, które korzystając z baz białkowych wyodrębiają informacje dotyczące liczby i tożsamości białek. Wyniki otrzymane dla różnych próbek są porównywane, co pozwala uzyskać macierz danych ilościowych dla wielu białek. Te, których ekspresja uległa zmianie, mogą zostać zidentyfikowane za pomocą analizy statystycznej i walidacyjnej. Obecnie, dzięki postępowi technologicznemu, naukowcy mają dostęp do ogromnych zbiorów danych proteomicznych, które wymagają zaawansowanych algorytmów pozwalających na wydobyciu istotnych informacji. Jednym z ciekawych rozwiązań jest algorytm MaxLFQ, zaproponowany przez Matthiasa Manna w 2014 roku, będący częścią oprogramowania MaxQuant [29]. Algorytm ten przetwarza dane LC-MS/MS, identyfikując cechy reprezentujące poszczególne peptydy, a następnie porównuje je, tworząc macierz intensywności sygnałów, które można przypisać do konkretnych peptydów. Wartości te są sumowane, co pozwala na pozyskanie informacji o zawartości poszczególnych białek w próbkach. Algorytm MaxLFQ wykorzystuje

różne narzędzia statystyczne, między innymi opóźnioną normalizację i maksymalny współczynnik ekstrakcji peptydów, co pozwala na dokładniejsze określenie względnej zawartości białek w badanych próbkach. Jakość analizy proteomicznej zależy w dużej mierze od wykorzystywanego oprogramowania. W dostępnej literaturze [30–32] znajduje się wiele przeglądowych prac dotyczących narzędzi bioinformatycznych w proteomice ilościowej, jednakże brakuje obiektywnych porównań działania tych narzędzi. Obecnie popularnymi narzędziami są MaxQuant (z algorytmem MaxLFQ), Perseus oraz Proteome Discoverer, które są ciągle rozwijane i aktualizowane przez międzynarodowe zespoły ekspertów.

2. ZNACZENIE BIOLOGICZNE DANYCH PROTEOMICZNYCH: NARZĘDZIA BIOINFORMATYCZNE

Proteomika stanowi kluczowe narzędzie w badaniach nad systemami biologicznymi, szczególnie w obszarze genomiki funkcjonalnej, gdzie pozwala na zgłębianie ekspresji, modyfikacji i oddziaływań białek. Jak wspomniano wcześniej, w badaniach proteomicznych kluczową rolę odgrywają narzędzia bioinformatyczne, umożliwiające interpretację dużych, bardzo licznych zbiorów danych. Przetwarzanie, analiza statystyczna i walidacja tych danych, różnorodnych ze względu na stosowane różne strategie eksperymentalne, takie jak przygotowanie próbek czy parametry pracy spektrometrów mas, są kluczowe dla zrozumienia molekularnych mechanizmów procesów biologicznych. Bioinformatyka odgrywa fundamentalną rolę w projektowaniu eksperymentów, przechowywaniu i przetwarzaniu danych, kontroli jakości, a także analizie statystycznej i walidacji wyników eksperymentalnych [33,34].

Warto też podkreślić, że większość białek nie działa samodzielnie, lecz współdziała z innymi, co sprawia, że zrozumienie ich funkcji wymaga ich wspólnej charakterystyki. Poznanie oddziaływań białko-białko (ang. *protein-protein interaction*, PPI) jest niezwykle ważne dla zgłębiania procesów komórkowych, umożliwiając lepsze zrozumienie relacji między białkami oraz ich aktywnością w różnych kompleksach [35]. Sieci oddziaływań białek obejmują wszystkie geny kodujące białka w danym genomie, definiując ich funkcjonalne powiązania. Analiza tych powiązań może być prowadzona na różnych poziomach złożoności, począwszy od pojedynczych białek po całe proteomy. Aby przeprowadzić skuteczną analizę oddziaływań białek, kluczowe jest odpowiednie przygotowanie danych wejściowych oraz odniesienie do eksperymentalnych danych bazowych. Istnieje kilka baz danych oddziaływań białko-białko, udostępnianych na zasadach *open-source*, które mogą posłużyć do określenia funkcji białka na podstawie jego bezpośrednich lub pośrednich oddziaływań. Do najpopularniejszych należą: STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, string-db.org) [36]

oraz BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets, thebiogrid.org) [37]. Baza danych STRING integruje informacje pochodzące z różnych źródeł, takich jak bazy danych i literatura naukowa, a następnie umożliwia grupowanie białek o podobnych sekwencjach. Algorytm STRING posiada funkcję oceny oddziaływań, które mogą być prezentowane w postaci grafów, co ułatwia zrozumienie złożonych relacji między nimi. Dodatkowo, STRING umożliwia przewidywanie nowych oddziaływań między białkami na podstawie analizy sekwencji białkowych oraz danych z sekwencjonowania genomu. Należy jednak pamiętać, że funkcjonalność bazy STRING jest możliwa dzięki pozyskiwaniu informacji pochodzących z różnych źródeł, co może wpłynąć na analizę danych lub prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników, dlatego ważne jest uwzględnienie tego podczas interpretacji danych.

Inną znaną bazą oddziaływań białkowych jest BioGRID [37]. Jest to baza danych podobna do STRING pod względem narzędzi wizualizacyjnych i modeli oddziaływań białkowych. Główną różnicą między BioGRID a STRING jest to, że BioGRID obejmuje przede wszystkim, poza nielicznymi danymi dla innych organizmów, informacje o oddziaływaniach między białkami ludzkimi, podczas gdy w bazie STRING zgromadzone są dane odnośnie szerokiej gamy organizmów: ludzi, zwierząt, roślin, grzybów i bakterii. Warto również zauważyć, że BioGRID i STRING używają innych protokołów do interpretacji wyników, co może prowadzić do pewnych różnic w uzyskiwanych odpowiedziach. Dlatego ważne jest, aby badacze porównywali wyniki uzyskane z obu baz danych, uwzględniając we wnioskowaniu, te ewentualne różnice. Baza STRING, ze względu na duży zbiór danych, uproszczony dostęp oraz bardzo przyjazny interfejs, jest najczęściej stosowaną bazą do opisu oddziaływań białko-białko. Ponadto, otrzymane dane wyjściowe są uporządkowane według odpowiednich oddziaływań i prezentowane w bardzo spójny sposób, poparte dowodami z innych baz danych i publikacji naukowych. Warto podkreślić, że baza STRING integruje również informacje z innych istotnych źródeł, takich jak ontologia genów (ang. *gene ontology*, GO) [38] oraz baza ścieżek metabolicznych KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [39], co czyni ją uniwersalnym narzędziem w analizie funkcjonalnej białek.

3. BADANIA PROTEOMICZNE TKANEK PO PODANIU LEKÓW ZAWIERAJĄCYCH FLUOR

Wprowadzanie leków, w których cząsteczka aktywna jest stabilizowana podstawnikami zawierającymi fluor odgrywają istotną rolę w współczesnych terapiach, to coraz częściej pojawiają się doniesienia o niepokojących, długoterminowych skutkach ubocznych [40], których mechanizmy działania są jeszcze słabo poznane. W szczególności, niejasne są konsekwencje obecności atomów fluoru w strukturze chemicznej cząsteczek aktywnych

biologicznie dla organizmu ludzkiego, zwłaszcza w kontekście ich oddziaływań na białka i inne biocząsteczki.

Badania proteomiczne, pozwalające na kompleksową analizę zmian zachodzących na poziomie białkowym w organizmie, stanowią obiecujące narzędzie w zrozumieniu skutków przyjmowania leków fluorowanych. Analiza proteomiczna pozwala identyfikować zmiany w ekspresji białek, ich modyfikacje oraz interakcje z innymi cząsteczkami, co może rzucić światło na mechanizmy działania tych leków oraz ewentualne skutki uboczne. W niniejszym rozdziale omówiony jest przykład badań proteomicznych, dotyczących wpływu podawania leku zawierającego fluor ze szczególnym uwzględnieniem możliwych zmian proteomicznych oraz ich implikacji klinicznych.

3.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY DO BADAŃ

W badaniach wykorzystano próbki tkanek szczurów z gatunku Wistar (*Rattus Norvegicus*), które zostały uzyskane w efekcie współpracy naukowej z Zakładem Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z Katedrą Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego. W badaniu uczestniczyło osiemnaście dorosłych osobników w wieku od 10 do 16 tygodni o zbliżonej masie ciała. Zwierzęta miały stały dostęp do pokarmu i wody *ad libitum*, były utrzymywane w cyklu dnia i nocy oraz w kontrolowanych warunkach temperatury ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) i wilgotności ($55\% \pm 5\%$). Zwierzęta zostały losowo podzielone na trzy grupy: grupę kontrolną ($n = 6$) oraz dwie grupy ($n = 6$), którym podawano lek zawierający fluor w postaci (1R)-N-(1-(naftalen-1-yl)etylo)-3-(3-(trifluorometylo)fenylo)propano-1-aminy (Cynacalcet, łac. *Cinacalcetum*) przez 7 i 21 dni. Substancja aktywna jest związkiem aminowym, w którym jeden z atomów wodoru przyłączonych do atomu azotu jest podstawiony grupą 3-[3-(trifluorometylo)fenylo]-propylową. Pozyskanie tkanek wątroby i mózgu zostało przeprowadzone zgodnie z odpowiednimi wytycznymi i przepisami Unii Europejskiej dotyczącymi opieki i wykorzystania zwierząt laboratoryjnych, a protokół eksperymentalny został zatwierdzony przez właściwą komisję etyczną (numer zezwolenia: WAW2/055/2018, Warszawa, Polska).

3.2. MATERIAŁY I METODY

Badane tkanki (około 50 mg masy mokrej tkanki) zostały zhomogenizowane z użyciem 1 mL buforu (1% SDS i inhibitora proteaz cOmplete™ EDTA-free; Merck, Niemcy) w 100 mmol/L węglanu amonu (Merck, Niemcy) w temperaturze pokojowej przez 15 minut przy użyciu mechanicznie napędzanego homogenizatora. Supernatant

oddzielono poprzez wirowanie przez 30 minut przy obrotach 20 000 ×g. Stężenie białka zostało wyznaczone za pomocą zestawu do oznaczania białka Pierce™ BCA (Thermo Scientific, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Objętości ekstraktów białkowych odpowiadające 100 µg białka zostały wytrącone z użyciem acetonu (-20°C, 800 µL, 24 h; Merck, Niemcy). Następnie próbki zostały odwirowane (20 000×g) przy 4°C, a supernatant został usunięty. Suchy osad białkowy został następnie rozpuszczony w 50 µL 0,1% RapiGest (Waters, USA) w 50 mmol/L węglanu amonu (Merck, Niemcy). Następnie białka zostały zredukowane z 75 µL 5 mmol/L 1,4-ditiotiotretolem (Merck, Niemcy) przez 45 minut w 56°C i alkilowane z 75 µL 30 mmol/L akryloamidem (Merck, Niemcy) przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Reakcję alkilowania zatrzymano przez dodanie równomolowej ilości 1,4-ditiotiotretolu i inkubację w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Próbki zostały poddane trawieniu enzymatycznemu przez 18 godzin w 37°C z 75 µL 20 ng/L trypsyny Promega (USA) i 100 µL 50 mmol/L węglanu amonu (stosunek masy białka: enzym - 100:1). Reakcję zatrzymano przez dodanie 150 µL 5% wodnego roztworu kwasu mrówkowego (Merck, Niemcy). Do oczyszczania próbek użyto kolumn do oczyszczania peptydów Pierce™ Peptide Desalting (Thermo Scientific, USA).

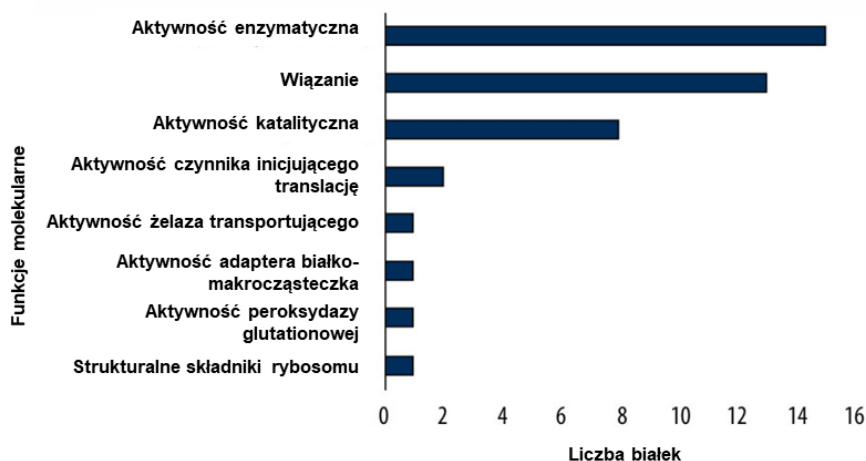
Wydzielona frakcja peptydów została rozpuszczona w 100 µL 5% acetonitrylu (Merck, Niemcy), 0,1% kwasu mrówkowego i poddana analizie LC-MS/MS. Mieszaniny peptydów (1 µg) były rozdzielane w odwróconym układzie faz z użyciem kolumny krzemionkowej o długości 50 cm, wypełnionej złożem C18 (średnica wewnętrzna 75 µm, ReproSil Gold 120 C18, 1,9 µm ziarno, Dr. Maisch, Niemcy) za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej UHPLC (Ultimate 3000 nano-UHPLC, Thermo Fisher Scientific, USA) połączonej z spektrometrem mas Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Elucję peptydów przeprowadzono przez 90 minut przy prędkości przepływu fazy ruchomej 300 nL/min z użyciem gradientowej elucji składającej się z 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (roztwór A) oraz 0,1% kwasu mrówkowego w 80% acetonitrylu/20% wody (roztwór B).

3.3. INTERPRETACJA OTRZYMANYCH WYNIKÓW

Badanie zmian ekspresji białek w tkance wątroby i mózgu szczurów przeprowadzono za pomocą analizy bioinformatycznej danych LC-MS/MS przy użyciu oprogramowania MaxQuant w wersji 1.6.1.0. (Instytut Biochemii Max Plancka, Niemcy). Baza sekwencji (*Rattus norvegicus*), wykorzystywana w analizie, została pobrana z bazy danych UniProt (n=29 928 izoform białkowych). Podczas analizy wyników, stała modyfikacja peptydów polegała na propionamidacji cysteiny (C), która jest wynikiem użycia akryloamidu jako środka alkilującego podczas przygotowywania

próbek. Modyfikacje zmienne obejmowały: fluorowanie alaniny (A), fenyloalaniny (F), tryptofanu (W) i tyrozyny (Y); utlenianie metioniny (M); oraz acetylację końca N białka. Ustawienia programu MaxQuant zostały ustalone zgodnie z protokołem zaproponowanym przez Tyanova i współpracowników [41] w trybie *label-free*. Do przeprowadzenia analizy statystycznej i wizualizacji danych wykorzystano oprogramowanie Perseus (wersja 1.6.14.0, Instytut Biochemii Max Plancka, Niemcy), korzystając z pliku wyjściowego z programu MaxQuant. Analiza danych umożliwiła identyfikację około 2200 białek w próbkach tkanki mózgu oraz około 2500 białek w próbkach tkanki wątroby. Wykorzystując te dane, przeprowadzono analizę głównych składowych w celu poznania ogólnego obrazu zmienności proteomu pomiędzy badanymi grupami. Analiza PCA wykazała istotne różnice między grupą kontrolną a badanymi grupami eksperymentalnymi. W analizie statystycznej oprogramowania Perseus zdecydowano się na rygorystyczne kryteria, eliminując fałszywie pozytywne wyniki i skupiając się tylko na zmianach, które są najbardziej istotne statystycznie.

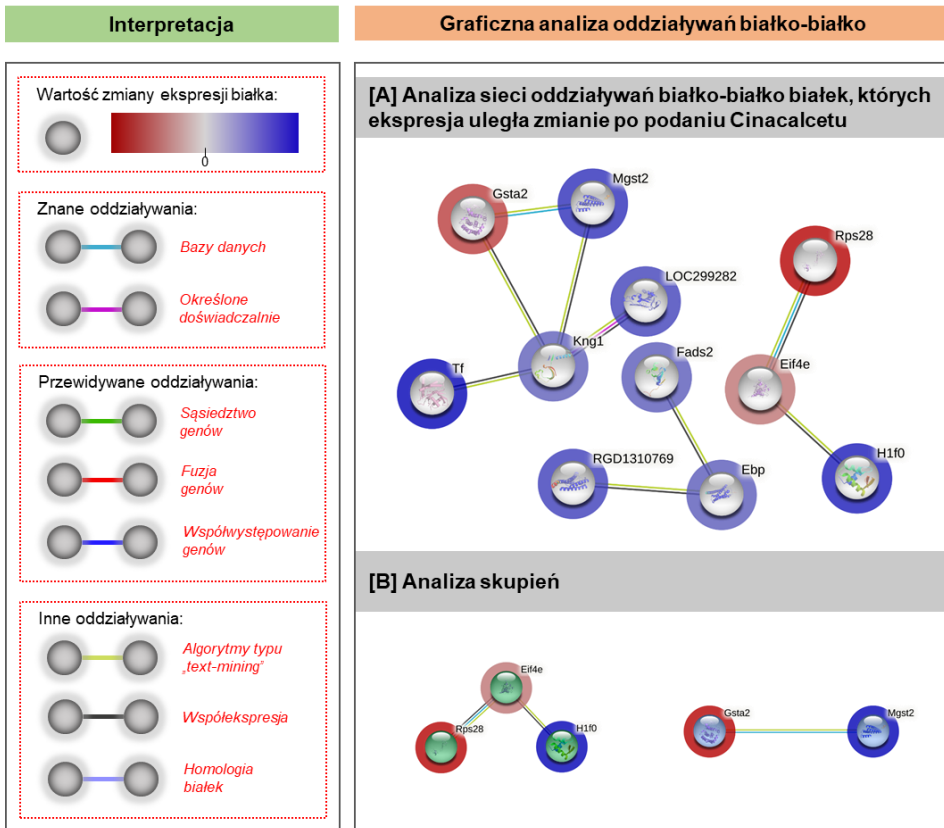
Po 21 dniach podawania (1R)-N-(1-(naftalen-1-ylo)etylo)-3-(3-(trifluorometylo)fenylo)propano-1-aminy zauważono zmienione poziomy ekspresji 13 białek w próbkach tkanek wątroby oraz jednego białka w próbkach tkanki mózgu. Wszystkie zidentyfikowane białka o zmienionej ekspresji zostały przypisane do symbolu genu przy użyciu bazy danych UniProt i przeprowadzono ich klasyfikację na podstawie adnotacji funkcjonalnych przy użyciu ontologii genów dla funkcji molekularnych za pomocą bazy STRING. Zidentyfikowane białka przede wszystkim były zaangażowane w regulację aktywności enzymatycznej (36%), wiązanie cząsteczek biologicznie aktywnych (31%) oraz aktywność katalityczną (19%) (Rysunek 4).



Rysunek 4. Klasyfikacja ontologia genów (GO) dla funkcji molekularnych dla białek, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem leku zawierającego fluor.

Figure 4. Gene ontology (GO) classification indicated molecular function of differentially expressed proteins exposed to fluorinated drug.

Do badania oddziaływań białko-białko dla wszystkich zidentyfikowanych białek, których ekspresja uległa zmianie, wykorzystano to samo narzędzie bioinformatyczne. Analiza oddziaływań miała na celu poznanie reakcji biologicznej organizmu na obecność (1R)-N-(1-(naftalen-1-ylo)etylo)-3-(3-(trifluorometylo)fenylo)propano-1-aminy, w tym przede wszystkim oddziaływanie między białkami oraz na potencjalne konsekwencje biologiczne tego procesu. Wyniki analizy pozwoliły na identyfikację istotnych połączeń między białkami oraz na zrozumienie złożonych sieci interakcji, które odgrywają rolę w biologicznych odpowiedziach w danych warunkach. Wykorzystany algorytm [36], umożliwił wizualizację zależności oraz przypisanie konkretnych interakcji między białkami o zmienionych stężeniach (Rysunek 5). Dodatkowo, w celu wspomaganie interpretacji wyników, zastosowano analizę skupień przy użyciu algorytmu Markova [42], co pozwoliło wyodrębnić dwa istotne klastry białek.



Rysunek 5. Graficzna interpretacja oddziaływań białko-białko dla białek, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem leku zawierającego fluor. Dane zostały wygenerowane z wykorzystaniem bazy STRING, wersja 11.5.

Figure 5. Graphic interpretation of protein-protein interactions for proteins whose expression changed after exposed to fluorinated drug. The data were generated using the STRING database, version 11.5.

Analiza została przeprowadzona przy wykorzystaniu bazy danych STRING oraz oprogramowania Perseus. W wyniku tej analizy uzyskuje się interaktywny graf sieci oddziaływań białkowych (Rysunek 5), gdzie każde białko reprezentowane jest przez „węzeł”, a oddziaływania między nimi przez „krawędzie”. Różne kolory oznaczają różne rodzaje oddziaływań, co ułatwia interpretację wyników analizy funkcjonalnej danych wejściowych. Badanie wykazało istotną zmianę ekspresji białek w badanych tkankach, w tym warto zwrócić uwagę na białko N-końcowo przetworzone histonu H1.0 w mózgu, które może mieć negatywny wpływ na regulację chromatyny, rekombinację DNA i transkrypcję RNA. Wyniki sugerują, że zwiększone stężenie tego białka może przyspieszać lub nasilać objawy otępienia u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Ponadto, istotne zmiany ekspresji białek w wątrobie wskazują na ich kluczowe funkcje w transporcie jonów metalu, metabolizmie lipidów oraz reakcjach zapalnych, co może być istotne dla pacjentów. Uzyskane wyniki sugerują, że stymulacja receptora CaSR w komórkach wątroby może mieć istotny wpływ na procesy metaboliczne i stan zapalny w tej tkance. Dodatkowo, zmiany stężenia glutationowej S-transferazy w tkance wątroby mogą mieć wpływ na metabolizm innych leków stosowanych jednocześnie, co może mieć znaczenie kliniczne dla pacjentów. W związku z tym, istnieje potrzeba dalszych badań, aby lepiej zrozumieć mechanizmy działania leku zawierającego fluor oraz jego długoterminowe konsekwencje kliniczne, zwłaszcza w kontekście terapii łączonej oraz występowania działań niepożądanych. Warto również podkreślić, że interpretacja wyników uzyskanych po zastosowaniu analizy bioinformatycznej została przeprowadzona we współpracy z lekarzami i biochemikami, co jest niezmiernie istotne dla pełnego zrozumienia wpływu (1R)-N-(1-(naftalen-1-yl)etylo)-3-(3-(trifluorometylo)fenylo)propano-1-aminy.

UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując, białka odgrywają kluczową rolę we wszystkich procesach biologicznych, stanowiąc końcowy etap informacji biologicznej pochodzącej z genomu. Proteom, czyli zbiór wszystkich białek w organizmie, jest niezwykle dynamiczny i złożony, ze względu na ciągłą odpowiedź na bodźce zewnętrzne, zmiany w diecie oraz przyjmowane leki. Systematyczna analiza proteomiczna na dużą skalę staje się więc niezastąpionym narzędziem do kompleksowej charakterystyki aktywności biologicznej. Opisany przypadek przyjmowania leków zawierających w aktywnej cząsteczce atomy fluoru pokazuje w jaki sposób wyniki badań nad zmianami ekspresji białek otwierają możliwości badania oddziaływań molekularnych, ścieżek sygnalizacyjnych i identyfikacji nowych biomarkerów. Aby zinterpretować dane proteomiczne uzyskane przy użyciu wysokorozdzielczej spektrometrii mas, konieczne jest połączenie podejścia eksperymentalnego z bioinformatycznym. Analiza złożonych interakcji na różnych

poziomach informacji biologicznej może przyczynić się do lepszego zrozumienia ścieżek biochemicznych, sieci regulacyjnych oraz leczenia i monitorowania chorób. Narzędzia bioinformatyczne umożliwiają skuteczne przetwarzanie, analizę i interpretację danych proteomicznych, co pozwala badaczom uzyskać bardziej szczegółowe i kompleksowe informacje na temat białek i ich funkcji biologicznych. Bioinformatyka pozwala na integrację danych z różnych źródeł, takich jak dane genomowe, transkryptomyczne i proteomiczne, co przyczynia się do bardziej holistycznej analizy systemów biologicznych.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pragną podziękować prof. dr. hab. Leszkowi Pączkowi z Zakładu Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz prof. dr. hab. Zbigniewowi Gajewskiemu z Katedry Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego za możliwość wykorzystania tkanek do przeprowadzenia badań proteomicznych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] I.M. Cristea, S.J. Gaskell, A.D. Whetton, *Proteomics Techniques and Their Application to Hematology*, *Blood* 2004, 103, s. 3624.
- [2] V.C. Wasinger, S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M.R. Wilkins, M.W. Duncan, R. Harris, K.L. Williams, I. Humphery-Smith, *Progress with Gene-Product Mapping of the Mollicutes: Mycoplasma Genitalium*, *Electrophoresis* 1995, 16, s. 1090.
- [3] I. Humphery-Smith, *The 20th Anniversary of Proteomics and Some of Its Origins*, *Proteomics* 2015, 15, s. 1773.
- [4] NobelPrize.org, *The Nobel Prize in Chemistry 1958*, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/summary/>, dostęp: 16 sierpnia 2022.
- [5] NobelPrize.org, *The Nobel Prize in Chemistry 1980*, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/summary/>, dostęp: 16 sierpnia 2022
- [6] P. Edman, E. Högfeldt, L.G. Sillén, P.-O. Kinell, *Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides*, *Acta Chemica Scandinavica* 1950, 4, s. 283.
- [7] S. Moore, W.H. Stein, *Chromatographic Determination of Amino Acids by the Use of Automatic Recording Equipment*, *Analytical Chemistry* 1963, s. 819.
- [8] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *New Method of Peptide Cleavage Based on Edman Degradation*, *Molecular Diversity* 2013, 17, s. 605.
- [9] U.K. Laemmli, *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*, *Nature* 1970, 227, s. 680.
- [10] G. Münzenberg, *Development of Mass Spectrometers from Thomson and Aston to Present*, *International Journal of Mass Spectrometry* 2013, 349–350, s. 9.
- [11] Nobel Prize Outreach, *The Nobel Prize in Chemistry 2002*, NobelPrize.Org, dostęp: 16 sierpnia 2022. Available online: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/summary/>
- [12] A. Makarov, *Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis*, *Analytical Chemistry* 2000, 72, s. 1156.
- [13] V. Cunsolo, V. Muccilli, R. Saletti, S. Foti, *Mass Spectrometry in Food Proteomics: A Tutorial*, *Journal of Mass Spectrometry* 2014, 49, s. 768.
- [14] E. Bulska, M. Bicka, A. Gawor, A. Karpiński, A. Konopka, *Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis in Neurodegenerative Disorders' Research*, w: *Handbook of Bioanalytics*, Springer International Publishing, Cham, 2022, s. 1.

- [15] A. Gawor, A. Ruszczynska, A. Konopka, G. Wryk, M. Czauderna, E. Bulska, Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis in Lamb Tissues after Fish Oil, Carnosic Acid, and Inorganic Selenium Supplementation, *Animals* 2022, 12, s. 1428.
- [16] A. Gawor, A. Konopka, J.C. Torres Elguera, A. Ruszczynska, M. Czauderna, E. Bulska, Label-Free Proteomic Approach to Identification and Quantification of Proteins in Animal Tissue Samples, w: *Proceedings of the 14th ISC "Modern Analytical Chemistry"*, K. Nesměrāk (red.), Charles University, Faculty of Science, Prague, 2018, s. 25.
- [17] E. Bulska, A. Gawor, A. Konopka, G. Wryk, B. Czarkowska-Pączek, Z. Gajewski, Ł. Pączek, Label-Free Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics to Evaluate the Effects of the Calcium-Sensing Receptor Agonist Cinacalcet on Protein Expression in Rat Brains and Livers, *Medical Science Monitor* 2022, 28, s. 937338.
- [18] A. Gawor, Z. Gajewski, Ł. Pączek, B. Czarkowska-Pączek, A. Konopka, G. Wryk, E. Bulska, Fluorine-Containing Drug Administration in Rats Results in Fluorination of Selected Proteins in Liver and Brain Tissue, *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, s. 4202.
- [19] Gawor, A. Ruszczynska, A. Konopka, G. Wryk, M. Czauderna, E. Bulska, Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis in Lamb Tissues after Fish Oil, Carnosic Acid, and Inorganic Selenium Supplementation, *Animals* 2022, 12, s. 1428.
- [20] J. Cox, M. Mann, Is Proteomics the New Genomics? *Cell* 2007, 130, s. 395.
- [21] G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, D.H. Schlesinger, H.D. Niall, E.A. Boyse, Isolation of a Polypeptide That Has Lymphocyte-Differentiating Properties and Is Probably Represented Universally in Living Cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975, 72, s. 11.
- [22] A. Gawor, E. Bulska, A Standardized Protocol for Assuring the Validity of Proteomics Results from Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, s. 6129.
- [23] A. Manadas, V.M. Mendes, J. English, M.J. Dunn, Peptide Fractionation in Proteomics Approaches, *Expert Rev Proteomics* 2010, 7, s. 655.
- [24] N. Jehmlich, C. Golatowski, A. Murr, G. Salazar, V.M. Dhople, E. Hammer, U. Völker, Comparative Evaluation of Peptide Desalting Methods for Salivary Proteome Analysis, *Clinica Chimica Acta* 2014, 434, s. 16.
- [25] M. Bantscheff, S. Lemeer, M.M. Savitski, B. Kuster, Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics: Critical Review Update from 2007 to the Present, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 404, s. 939.
- [26] Z. Li, R.M. Adams, K. Chourey, G.B. Hurst, R.L. Hettich, C. Pan, Systematic Comparison of Label-Free, Metabolic Labeling, and Isobaric Chemical Labeling for Quantitative Proteomics on LTQ Orbitrap Velos, *Journal of Proteome Research* 2012, 11, s. 1582.
- [27] O. Chahrour, D. Cobice, J. Malone, Stable Isotope Labelling Methods in Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015, 113, s. 2.
- [28] X. Tian, H.P. Permentier, R. Bischoff, Chemical Isotope Labeling for Quantitative Proteomics, *Mass Spectrometry Reviews* 2021, s. 21709.
- [29] J. Cox, M.Y. Hein, C.A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, Accurate Proteome-Wide Label-Free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ, *Molecular and Cellular Proteomics* 2014, 13, s. 2513.
- [30] P. Navarro, J. Kuharev, L.C. Gillet, O.M. Bernhardt, B. MacLean, H.L. Röst, S.A. Tate, C.-C. Tsou, L. Reiter, U. Distler, et al., A Multicenter Study Benchmarks Software Tools for Label-Free Proteome Quantification, *Nature Biotechnology* 2016, 34, s. 1130.
- [31] A. Chawade, M. Sandin, J. Teleman, J. Malmström, F. Levander, Data Processing Has Major Impact on the Outcome of Quantitative Label-Free LC-MS Analysis, *Journal of Proteome Research* 2015, 14, s. 676.
- [32] M. Sandin, J. Teleman, J. Malmström, F. Levander, Data Processing Methods and Quality Control Strategies for Label-Free LC-MS Protein Quantification, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2014, 1844, s. 29.
- [33] R.R. Lereim, E. Oveland, F.S. Berven, M. Vaudel, H. Barsnes, Visualization, Inspection and Interpretation of Shotgun Proteomics Identification Results. w *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*, Springer 2016, s. 227.
- [34] C. Christin, R. Bischoff, P. Horvatovich, Data Processing Pipelines for Comprehensive Profiling of Proteomics Samples by Label-Free LC-MS for Biomarker Discovery, *Talanta* 2011, 83, s. 1209.
- [35] D. Guala, C. Ogris, N. Müller, E.L.L. Sonnhammer, Genome-Wide Functional Association Networks: Background, Data & State-of-the-Art Resources. *Briefings in Bioinformatics* 2020, 21, s. 1224.
- [36] D. Szklarczyk, A.L. Gable, K.C. Nastou, D. Lyon R., Kirsch, S. Pyysalo, N.T. Doncheva, M. Legeay, T. Fang, P. Bork, et al. The STRING Database in 2021: Customizable Protein-Protein Networks,
- [37]

- nd Functional Characterization of User-Uploaded Gene/Measurement Sets. *Nucleic Acids Research* 2021, 49, s. D605.
- [38] R. Oughtred, J. Rust, C. Chang, B. Breitkreutz, C. Stark, A. Willems, L. Boucher, G. Leung, N. Kolas, F. Zhang, et al. The BioGRID Database: A Comprehensive Biomedical Resource of Curated Protein, Genetic, and Chemical Interactions. *Protein Science* 2021, 30, s. 187.
- [39] M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. *Nature Genetics* 2000, 25, s. 25.
- [40] M. Kanehisa, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 2000, 28, s. 27.
- [41] FDA Drug Safety Communication FDA Warns about Increased Risk of Ruptures or Tears in the Aorta Blood Vessel with Fluoroquinolone Antibiotics in Certain Patients. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-warns-about-increased-risk-ruptures-or-tears-aorta-blood-vessel-fluoroquinolone-antibiotics>
- [42] S. Tyanova, T. Temu, J. Cox, The MaxQuant Computational Platform for Mass Spectrometry-Based Shotgun Proteomics. *Nature Protocols* 2016, 11, s. 2301.
- [43] S. Brohée, J. van Helden, Evaluation of Clustering Algorithms for Protein-Protein Interaction Networks. *BMC Bioinformatics* 2006, 7, s. 488.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 maja 2024 r.