

Osnove proteomike

Šimić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:729020>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J.J. Strossmayera

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marko Šimić

Osnove proteomike

Principles of proteomics

Završni rad

Mentor : doc. dr. sc. Martina Šrajer-Gajdošik

Osijek, 2021.

SAŽETAK	1
UVOD	2
2. PRINCIPI, POVIJEST I ETIMOLOGIJA PROTEOMIKE.....	3
2.1. EDMANOVA OGRADNJA	4
3. VRSTE PROTEOMIKA.....	5
3.1. PROTEOMIKA EKSPRESIJE PROTEINA.....	5
3.2. STRUKTURALNA PROTEOMIKA	6
3.3. FUNKCIONALNA PROTEOMIKA	6
4. ORUĐE PROTEOMIKE.....	7
4.1. ANALITIČKA SEPARACIJA PROTEINA.....	7
4.1.1. METODE RAZDVAJANJA PROTEINA	8
4.2. METODE RAZGRADNJE PROTEINA.....	12
4.2.1. TRIPSIN	13
4.2.2. V8-PROTEAZA	13
4.2.3. OSTALE PROTEAZE	14
4.3. ANALIZA PROTEINA MASENOM SPEKTROSKOPIJOM.....	14
4.3.1. MALDI-TOF MASENA SPEKTROMETRIJA	15
4.4. METODA PREPOZNAVANJA REZULTATA SPEKTARA	17
4.5. IDENTIFIKACIJA PROTEINA PEPTIDNIM MASENIM OTISCIMA	20
4.5.1. PREGLED DJELOVANJA PROTEINSKE IDENTIFIKACIJE PEPTIDNIM MASENIM OTISCIMA	21
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24

SAŽETAK

Proteomika je brza i efikasna znanstvena disciplina primarno orijentirana na izučavanje proteoma ili sume proteina, tkiva, stanica i staničnih fluida. Izučavanjem ovih komponenti, dolazi se do širokog spektra podataka o ekspresiji i modifikaciji određenih željenih proteina. Proteini su sastavni infrastrukturni i funkcionalni dijelovi stanica koji su građeni od raznolikog poretka aminokiselina po uzorcima na kalupe DNA i RNA. Proteomika je bazirana na opsežnom polju istraživanja proteina u koje spadaju strukturalne i fiziološke značajke proteina, tj. uloge proteina u organizmima. Ponajveći broj otkrića u području proteomike pronalazi upotrebu u medicinskim svrhama, ponajviše liječenju protiv karcinoma kao i u efektivnom i ciljnom djelovanju lijekova na određene stanične mehanizme koje su uzrok raznih upala i bolesti organizama. Uz proteomiku bitan je i pojam proteoma koji označava sveobuhvatni skup proteina koje producira organizam. U užu kontekst proteoma ulaze i prepravke te promjene koje se mogu zbiti na osnovnom, nativnom proteinu ukoliko se organizam izloži dugotrajnom i raznolikom broju faktora koji će utjecati na promjenu funkcionalnosti i strukture proteina.

KLJUČNE RIJEČI : proteomika, proteom, protein, masena spektrometrija

ABSTRACT : Proteomics is a fast and efficient scientific discipline primarily focused on the study of proteomes or the sum of proteins, tissues, cells and cellular fluids. By studying these components, a wide range of data is obtained based on the expression and modification of certain desired proteins. Proteins are integral infrastructural and functional parts of cells that are built from a diverse order of amino acids by patterns on DNA and RNA molds. Most of the discoveries in the field of proteomics are used for medical purposes, especially in the actions against cancer as well as in the effective and targeted action of drugs on certain cellular mechanisms that cause various inflammations and diseases of organisms. In addition to proteomics, the notion of genome is closely related. Within proteomics important term is also a proteome which denotes a comprehensive set of proteins produced by an organism. The narrower context of the proteome also includes modifications and changes that can occur in the basic, native protein if the organism is exposed to a long-lasting and diverse number of factors that will affect the change in the functionality and structure of the protein.

KEYWORDS: proteomics, proteome, protein, mass spectrometry

UVOD

Proteomika je znanstvena disciplina koja obuhvaća kemiju, biologiju i računarstvo, a temelji se na sveobuhvatnom istraživanju proteina. Proteini su sastavni infrastrukturni i funkcionalni dijelovi stanica koji su građeni od raznolikog poretka aminokiselina po uzorcima na kalupe DNA i RNA^[1,2]. Utemeljenja je na istraživanju strukturalnih i fizioloških karakteristika proteina. Proteomika se najčešće dijeli po principu određenog odgovora proteina na određeni faktor koji djeluje na njega, stoga razlikujemo tri ključne podvrste proteomike^[3,8,9] : proteomika ekspresije proteina, strukturalna i funkcionalna proteomika. Pojam „protein“ (dolazi od grčke riječi *proteios* = „prvog ranga“) prvi je u znanosti iznio švedski znanstvenik Jöns Jakob Berzelius^[3,6] nastojeći karakterizirati jedinstvenu skupinu makromolekula koje se sastoje od pravocrtnih lanaca građenih od aminokiselina koja je do tada bila nepoznata. Prva bitnija istraživanja u analizi proteina započinju 1975. godine u Sydneyju^[5]. U proteomskim istraživanjima znanstvenici pretežito upotrebljavaju analitičke i bio-računalne metode uz pomoć kojih dolaze do željenih informacija o proteinima. Od analitičkih metoda koristi se elektroforeza i spektrometrija masa potpomognuta ionizacijom/desorpcijom laserskog zračenja (MALDI-MS)^[10] dok se u bioinformatici koriste razni računalni programi za analizu i pohranu dobivenih podataka^[2]. U poznatije proteomičke metode ubrajaju se proteinska analitička separacija, metode probave proteina, proteinska identifikacija peptidnim masenim otiscima, masena spektroskopsku analizu proteina i peptida te metoda prepoznavanja rezultata spektara pojedinih proteina^[2,11].

2. PRINCIPI, POVIJEST I ETIMOLOGIJA PROTEOMIKE

Proteomika je znanstvena disciplina koja obuhvaća sistematsku i opsežnu analizu proteina. Temeljena je na konceptu proteoma koji predstavlja cjelokupni set proteina stanice, tkiva ili organizma pod strogo reguliranim uvjetima. U organizmima, proteini izravno sudjeluju u gotovo svim biološkim mehanizmima i procesima, stoga sveobuhvatno istraživanje proteina omogućuje razumijevanje o tome kako proteini samostalno ili kooperativno djeluju na održavanje i unaprjeđivanje složenih bioloških sustava. Djelovanje specifičnih unutarnjih ili vanjskih čimbenika na stanicu rezultira promjenom aktivnosti i razine pojedinih proteina. Takve kvantitativne i/ili kvalitativne promjene proteoma daju uvid u aktivnosti stanice^[1]. Koncentracije proteina unutar stanice se razlikuju od organela do organela, stoga je kontrola količine pojedinih proteina na pojedinom mjestu regulirana na razne načine^[3].

Proteom je kompleksan i dinamičan te se može definirati pojmovima poput slijeda, strukture, modifikacije te biokemijskih međudjelovanja i funkcija pojedinih njegovih komponenti dajući široki spektar iznimno korisnih znanstvenih podataka. Zbog nemogućnosti objašnjenja različitih upalnih mehanizama ili utjecaja okoliša na organizam iz informacija koje pružaju geni, razvijena je znanstvena disciplina koja se temelji na istraživanju proteina iz koje se dobiva velika količina informacija koja daje odgovor na princip djelovanja specifičnih mehanizama i vanjskih utjecaja. Uz znanstveno korisnu upotrebu proteoma i proteomike pojavljuje se i pitanje etičke zabrinutosti. Naime, postavlja se pitanje je li etički prihvatljivo koristiti ljudsko tkivo; skladištiti ga i upotrebljavati u znanstvene svrhe što u konačnici mora dovesti do prvotnog pristajanja donatora tkiva što može dovesti do potencijalnih pravnih problema koje sprječava daljnje napredovanje proteomike kao znanstvene discipline^[1,2,3].

Glavne zadaće proteomike podrazumijevaju otkrivanje proteina koji su eksprimirani pri različitim uvjetima kao što su razna zdravstvena stanja organizma te opisivanje interakcija, njihove strukturne građe i modifikacije. Kombinacijom rezultata ova dva smjera dolazi se do lepeze informacija uz pomoć kojih se stvara temelj za shvaćanje funkcija gena, genetskih modifikacija te bioloških mehanizama koji svojim daljnjim razvojem omogućuju lakše uspostavljanje dijagnoza, liječenje te stvaranje bioloških zaštita protiv bolesti^[4]. Uz autentifikaciju proteina i opisa proteinskih aktivnosti ključan je podatak količine gena u genomu pojedine žive vrste, stoga se uz bioinformatiku, genomske podatci spajaju sa

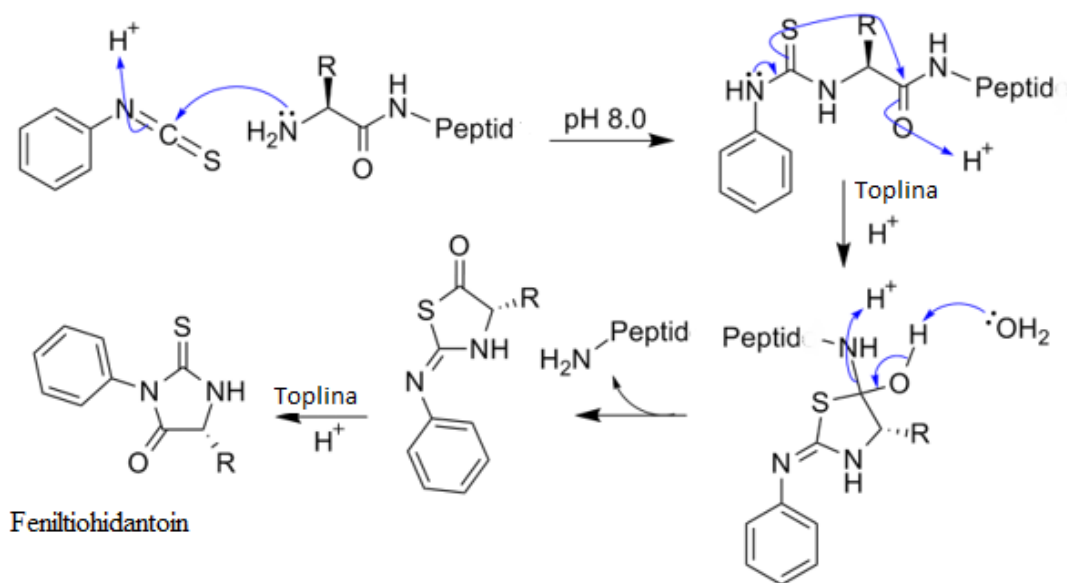
širokim spektrom podataka dobivenih iz izučavanja proteina kako bi se ustanovilo prisustvo određenog gena u genomu.

Pojam „protein“ prvi je u znanosti postavio švedski znanstvenik Jöns Jakob Berzelius, 1938. nastojeći karakterizirati jedinstvenu skupinu makromolekula koje se sastoje od pravocrtnih lanaca građenih od aminokiselina, a koja je do tada bila nepoznata. Prva, ozbiljna istraživanja pod naslovom proteomike započela su 1975. u Sydneyju nakon patentiranja 2D-gel elektroforeze i proteinskog mapiranja rađena su na bakteriji *Escherichia coli*, bijelim miševima i domaćim zamorcima. Naziv proteoma potječe iz sume termina „protein“ i „genom“, a predložio ga je 1994. australski doktorand Marc Wilkins na Macquarie Sveučilištu na kojemu je 1995. ustrojen prvi laboratorij koji se bavio opsežnim istraživanjem proteina^[5]. Razvojem proteomike otkrivene su metode vizualnog razdvajanja proteina bez mogućnosti njihove identifikacije. Nedugo zatim, nastaje ideja za opsežnim istraživanje ljudskih proteina uz korištenje 2D-elektroforeze i proteinskog mapiranja koja se ubrzo zanemaruje zbog prevelikih financijskih troškova. Prva revolucionarna metoda za identifikaciju proteina, točnije za određivanje slijeda aminokiselina u njihovom sastavu, naziva se „Edmanova ogradnja“^[7]. Nedugo nakon Edmanove ogradnje dolazi do razvitka mikrosekvencijske tehnologije za elektroblotirane proteine koja je omogućila identifikaciju i stvaranje baze podataka proteina izdvojenih s 2D elektroforezom. Uz mikrosekvencijsku tehnologiju i Edmanovu ogradnju bitno je istaknuti i razvoj masene spektrometrije koja je u sadašnjem stadiju proteomike zamijenila Edmanovu ogradnju zbog visokog stupnja osjetljivosti^[6].

2.1. Edmanova ogradnja

Edmanova ogradnja jedna je od prvih metoda za pročišćavanje i identifikaciju proteina. Proces identificiranja proteina započinje pojedinačnim odcjepljivanjem aminokiselinskih ostataka s ostatka peptida zagrijavanjem peptida u 6M otopini HCl na 100 °C tijekom 24 sata. Za označavanje amino-terminalnog ostatka kao i njegovog odcjepljivanja od peptida, švedski biokemičar Pehr Victor Edman uvodi novi način odcjepljivanja bez kidanja peptidnih veza među ostalim aminokiselinskim ostacima. Ideja

iza ovakvog načina obilježavanja i kidanja peptida bazira se na dodatku fenil-izotiocijanata koji u reakciji s aminokiselinskim ostatkom stvara fenil-tiokarbamoilni ostatak s N-terminalnom skupinom^[21]. Dovođenjem topline u reakcijsku smjesu uz blagu kiselost, N-terminalna skupina se cijepa te nastaje ciklički spoj, feniltiohidantoin (Slika 1). Ovakav mehanizam ne utječe na oštećenje cjelokupnog proteina te se može višestruko upotrijebiti na ostatak aminokiselina istraživanog peptida/proteina^[22].



Slika 1 Mehanizam Edmanove razgradnje na primjernu fenil izotiocijanata s nenabijenom N-terminalnom aminoskupinom u slabo bazičnim uvjetima

3. VRSTE PROTEOMIKA

Proteomika se najčešće dijeli po principu određenog odgovora proteina na određeni faktor koji djeluje na njega. Stoga razlikujemo proteomiku ekspresije proteina, funkcionalnu te strukturalnu proteomiku.

3.1. PROTEOMIKA EKSPRESIJE PROTEINA

Proteomika ekspresije proteina upotrebljava se za proučavanje kvalitativne i kvantitativne ekspresije proteina normalne stanice i stanice koja je podvrgnuta određenoj vrsti stresa, kao što je bolest ili djelovanje lijekova. Istraživanja sličnosti uzoraka ekspresije gena u abnormalnim stanicama često se potpomažu ovom proteomičkom metodom^[3,8].

Primjer primjene proteomike ekspresije kod abnormalnih stanica jest istraživanje stanica tumora. Uspoređuju se uzorci tkiva tumora donora s uzorcima normalnog, zdravog tkiva, a od metoda se najčešće koriste 2D gel elektroforeza i masenu spektrometrija. Analizom proteinske ekspresije pojedinih proteina unutar stanice moguće je razlikovati zdrave i abnormalne stanice. Ekspresijom proteina stanice omogućava se raspoznavanje i interpretiranje aktivnosti pojedinog proteina kao i proteinskog kompleksa unutar stanica. Identifikacija željenih proteina daje uvid u iznimno korisne informacije koje se mogu koristiti u molekularnoj biologiji za umjetno stvaranje tkiva tumora te proučavanje jedinstvenih karakteristika ovakvih vrsta bolesti što rezultira produktivnim istraživanjima u svrhu terapijskog liječenja i identificiranja proteina koji su karakteristični za bolesti u ranim stadijima oboljenja^[8,9].

3.2. STRUKTURALNA PROTEOMIKA

Strukturalna proteomika se bavi karakterizacijom trodimenzionalnih struktura specifičnih proteinskih kompleksa ili pojedinačnih proteina prisutnih u određenoj staničnoj komponenti. Osim toga, strukturalna proteomika bavi se i detekcijom svih mogućih proteina u kompleksu, utvrđivanjem njihovih lokacija i objašnjavanjem protein-protein interakcija. Homolognim modeliranjem moguće je pretpostaviti strukturni izgled ciljanog proteina. Identificiranje strukturalne građe proteina u stanicama najčešće se provodi rendgenskom kristalografijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom^[9,10].

Primjer korištenja strukturalne proteomike jest istraživanje proteinskih kompleksa u jezgrinoj ovojnici^[10]. Zbog zahtjevnosti samih istraživanja proteinskih kompleksa, znanstvenici prvo izoliraju ključne podstanične frakcije uz pomoć metoda pročišćavanja. Izolacija kompleksa olakšava analizu proteina i njegovu podjelu na više manjih dijelova. Razdvojeni dijelovi proteina se po završetku spajaju u širu sliku strukturalne građe željenog proteinskog kompleksa. Osim olakšavanja određivanja ukupne strukturalne građe, „razdvajanje“ proteinskog kompleksa olakšava i razumijevanje kako ekspresija pojedinih proteina daje stanici specifična svojstva^[9].

3.3. FUNKCIONALNA PROTEOMIKA

Funkcionalna proteomika se temelji na otkrivanju i opisivanju uloga proteina, objašnjenju pojedinih mehanizama stanice koji ovise o identificiranim staničnim proteinima

te karakterizaciju protein-protein interakcija. Funkcionalna proteomika se ne može točno definirati već se koristi kao termin za široki spektar proteomskih metoda. Uz glavne zadaće funkcionalne proteomike, javlja se i identifikacija nepoznatih proteina unutar određenog proteinskog kompleksa zbog kojeg se određeni stanični mehanizam odvija i zbog kojeg on djeluje pozitivno ili negativno na organizam^[7,9,10].

4. ORUĐE PROTEOMIKE

Ključni dio svake znanosti je vremenski period potreban za razvoj tehnologije, koja će olakšati pristup novim informacijama te omogućiti lakša i efikasnija istraživanja koja će donijeti točnije i preciznije podatke. U proteomskim istraživanjima znanstvenici pretežito upotrebljavaju analitičke i bio-računalne metode uz pomoć kojih dolaze do željenih informacija o proteinima. U analitičke metode se ubrajaju 2D gel elektroforeza i masena spektrometrija s matricom potpomognutom ionizacijom/desorpcijom laserkog zračenja^[10] kao spektroskopska metoda (*engl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, MALDI-MS*) dok se u području bio-informatike koristi razni broj računalnih programa za analizu i svrstavanje podataka dobivenih istraživanjima. Devedesetih godina znanstvenici su razvili 2D-elektroforezu, a od tada se tehnologije za razdvajanje i identificiranje proteina kontinuirano razvijaju, dok se starije metode pokušavaju prilagoditi današnjim standardima i očekivanjima^[8,10].

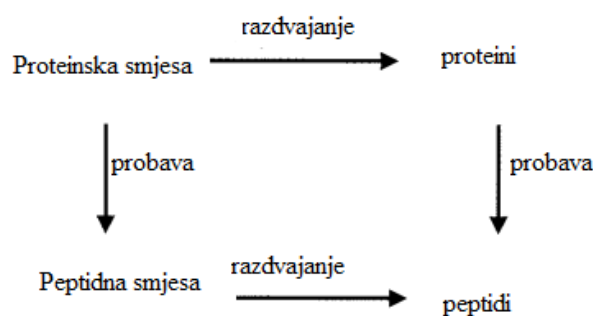
U poznatije proteomske metode ubrajamo proteinsku analitičku separaciju, metode probave proteina, proteinsku identifikaciju peptidnim masenim otiscima, masenu spektroskopsku analizu proteina i peptida te metodu prepoznavanja rezultata spektara pojedinih proteina (*eng. scoring algorithm for spectral analysis, SALSA*)^[2].

4.1. ANALITIČKA SEPARACIJA PROTEINA

Analitička separacija proteina je skup postupaka koji su zaduženi za pripremu uzoraka kako bi se željeni protein mogli analizirati masenom spektroskopijom. Za sam postupak separacije proteina potrebno je prevesti proteine u peptide, uglavnom, upotrebom određenih proteaza. Razdvajanjem proteina (Slika 2.) na manje kompleksnu otopinu peptida omogućeno je brže, jednostavnije i kvalitetnije snimanje uzoraka masenim spektrometrom^[2].

Za proteomsku analizu ključno je ekstrahirati što više proteina od interesa uz prisutnost što manje drugih proteina i nečistoća. Za ekstrakciju proteina iz staničnih frakcija ponajveću upotrebu pronalaze :

- Detergenti – koji doprinose rastapanju membrana i izdvajanju proteina od lipidne membrane
- Reducensi (pr. merkaptoetanol, ditiotreitol (DTT)) čija je uloga redukcija disulfidnih veza te sprječavanje moguće oksidacije proteina
- Reagensi za denaturaciju (pr. Urea ili kiseline) pomoću kojih se narušavaju interakcije između proteina te koji promjenom ionske snage i pH otopine utječu na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina
- Enzimi (pr. DNaza I, DNaza II) koji su zaslužni za razgradnju lipida, ugljikohidrata i nečistih nukleinskih kiselina



Slika 2 Proces razgradnje i razdvajanja proteinske smjese na osnovne komponente

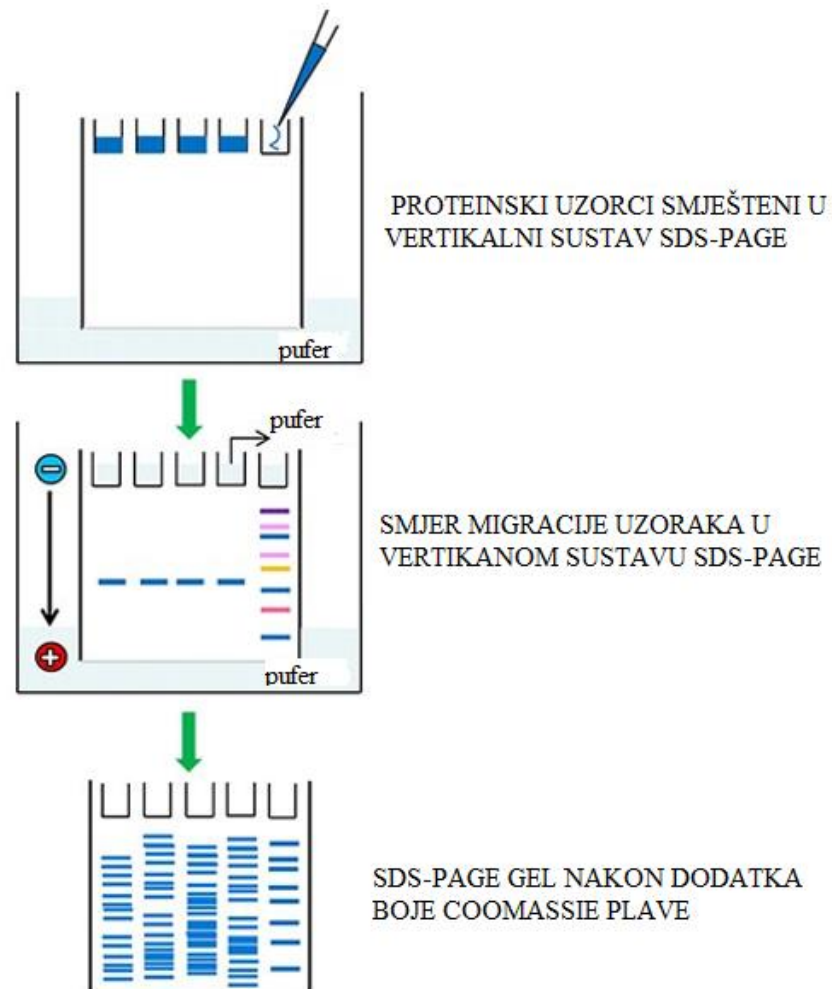
4.1.1. Metode razdvajanja proteina

Za odvajanja proteina na temelju njihovih naboja i molekulske mase koriste se tri glavne proteomske metode: jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecilsulfata (*engl. sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) te metoda izolektričnog fokusiranja (*eng. preparative isoelectric focusing, IEF*) koja prethodi SDS-PAGE-u. Ovisno o kompleksnosti proteinske smjese i broju frakcija koje se mogu izdvojiti iz nje, u procesu

razdvajanja proteina može se koristiti i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)^[2,5].

- Jednodimenzionalna SDS-PAGE – Pri primjeni 1D-SDS-PAGE ključno je učinkovito otapanje uzorka proteina u puferu s tiolnim reducensom (pr. DTT ili merkaptetoetanol) i natrijevim dodecilsulfatom. Metoda se temelji na vezanju SDS-a na denaturirani protein (1 anion se veže na 2 aminokiseline), što mu daje veliki neto negativni naboj koji je direktno proporcionalan molekulskoj masi proteina. Uspostavom električnog polja (Slika 3.), SDS-proteinski kompleksi se, ovisno o njihovoj učinkovitosti probijanja kroz pore poliakrilamidnog gela, gibaju kroz sustav^[5,8]. Gelovi koji se primjenjuju u 1D-SDS-PAGE su poliakrilamidni gelovi, tj. polimeri akrilamida i bisakrilamida. Pore gelova se mogu kontrolirati prilagođavanjem umreživača (*engl. crosslinker*), tj. prilagođavanjem koncentracije aktiviranog akrilamidnog monomera i poprečno vezanog metilenbisakrilamida. Polimerizaciju kataliziraju amonijev persulfat i *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED). Merkaptetoetanol i DTT se koriste za redukciju disulfidnih mostova u proteinima. Ponajveću znanstvenu uporabu SDS-PAGE ima u analizi protein-protein interakcija posebno u uzorcima s

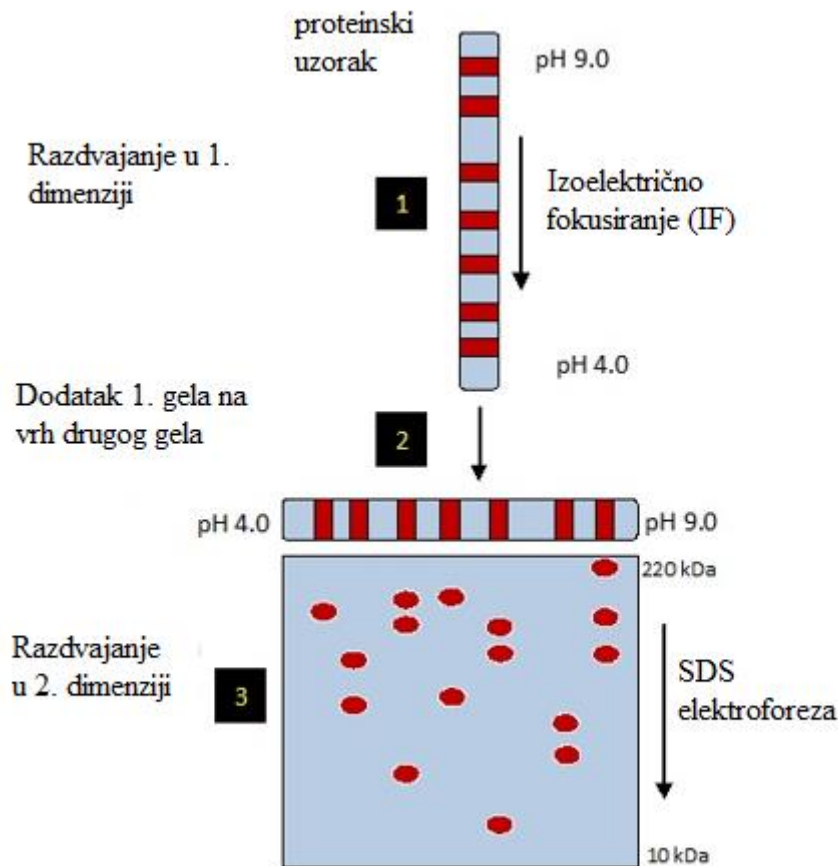
manjim sadržajem različitih proteina, tj. u manje kompleksnim uzorcima.



Slika 3 Shematski prikaz 1D-SDS-PAGE

- Dvodimenzionalna SDS-PAGE – Ova varijanta elektroforeze predstavlja kombinaciju dvije različite metode razdvajanja proteina. Proteini se prvo razdvajaju prema razlici u izoelektričnim točkama (pI) procesom izoelektričnog fokusiranja (prema Slika 4.), a potom razdvajaju u električnom polju standardnom elektroforezom^[11]. Metoda dvodimenzionalne SDS-PAGE osmišljena je sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća, međutim manje je zastupljena zbog poteškoća koje se javljaju pri provođenju izoelektričnog fokusiranja te kasnijem prijenosu fokusiranih proteina na poliakrilamidni gel s SDS-om. Poteškoće pri izoelektričnom fokusiranju nastaju zato što je

izoelektrično fokusiranje predviđeno za gelove u cjevčicama te je pH gradijent koji se kreira u cijevi vrlo teško precizno reproducirati u kontinuiranim gelovima.



Slika 4 Shematski prikaz provođenja 2D elektroforeze koja se sastoji od izoelektričnog fokusiranja nakon čega se uzorak provlači kroz električno polje

- Izoelektrično fokusiranje - Metoda koja se koristi kao početni korak u dvodimenzionalnoj SDS-PAGE je izoelektrično fokusiranje koje se odvija na fiksiranom gradijentu pH u cijevi. Stvaranje konstantnog pH gradijenta omogućeno je s topljivim spojevima polikarboksilne kiseline koji stvaraju gradijent kada se na cjevčicu primjeni visok napon. Dodatkom uzorka i uključivanjem električnog polja, proteini se razdvajaju prema njihovim izoelektričnim točkama. Jedna od dobrih karakteristika izoelektričnog fokusiranja je mogućnost analize većih uzoraka. Nasuprot izoelektričnog fokusiranja u gelu, izoelektrično fokusiranje u otopinama predstavlja lakšu varijantu fokusiranja uzorka. Kod tekućeg izoelektričnog fokusiranja, nakon fokusiranja, odvajanje proteina uspješno je oko 90 %, dok je kod gel izoelektričnog fokusiranja taj postotak oko 75 % [2,11].

4.2. METODE RAZGRADNJE PROTEINA

Sadašnje metode spektrometrije masa imaju sposobnost vrlo preciznog određivanja molekulskih masa proteina u njihovom nativnom, netaknutom stanju. No, zašto se ove metode ne koriste primarno u proteomici za određivanje mase cjelovitog proteina? Razlozi tomu su da su spektrometri samo uređaji koji će u određenoj mjeri ipak pogriješiti u analizi (veća netaknuta masa proteina označava veću potencijalnu grešku u mjerenju), zatim, nije moguće sve proteine održati u nativnom obliku (primarno zbog njihove veličine i hidrofobnosti) te u konačnici osjetljivost metode u usporedbi s metodom peptidnih masenih otisaka je znatno lošija. Iz ovih razloga, primjena masene spektrometrije u određivanju molekulskih masa nativnih proteina nije najpogodnija, stoga se upotrebljava puno djelotvornija analiza peptida. Masenom spektrometrijom peptida znanstvenicima je omogućen pristup podacima iz kojih se točne peptidne sekvence mogu ekstrahirati te se ti podaci mogu direktno uspoređivati s proteinskim sekvencama iz softverskih baza. Bitna stavka uspoređivanja peptidnih i proteinskih podataka je algoritam prepoznavanja identiteta proteina s bazom podataka uz informacije softvera o točno specifičnim proteolitičkim enzimima koji cijepaju proteine specifičnim mjestima^[2,8,10].

Digestijom proteina želi se postići slijed od 6-20 aminokiselinskih ostataka što ga čini idealnim uzorkom za masenu spektroskopiju i softversku analizu. Digestiju proteina obavljaju enzimi sa zajedničkim nazivom „protease“. U ljudskom organizmu pronalazimo nekoliko tisuća proteaza s raznolikim funkcijama. Proteaze su sveprisutni enzimi u organizmima gdje posjeduju različite biokemijske, fiziološke i regulatorne uloge. Temelj djelovanja proteaza je cijepanje peptidnih veza u proteinima. Proteaze predstavljaju najveći postotak industrijske upotrebe enzima gdje se pretežito upotrebljavaju u preradi hrane i tekstilnih materijala kao što je koža. Prema pravilnicima Međunarodne Unije Biokemije (*engl. International Union of Biochemistry, IUBMB*) proteaze se prema principima njihovih mehanizama dijele u 6 obitelji proteaza^[23]: serinske proteaze, serin-karboksi proteaze, cisteinske proteaze, aspartatske proteaze, metalo-proteaze te proteaze glutaminske kiseline. Nasuprot podjeli proteaza po IUBMB-u, proteaze se općenito dijele na kisele, lužnate i neutralne proteaze. Proteaze se prije istraživanja izoliraju te višestruko pročišćavaju kako bi imale što bolji utjecaj na protein. Poželjno je da korištene proteaze nisu podložne učestalim promjenama aktivnosti pri izmjenama uvjeta kojima se izlože. Prema *tablici 1.* neke od najvažnijih proteaza koje zadovoljavaju dovoljnu čistoću i otpornost na promjenu uvjeta su

Tripsin, Kimotripsin, V8 proteaza, Lys-C proteaza i Asp-N proteaza koje pokazuju različitu proteolitičku aktivnost^[2,11].

Tablica 1 Proteaze sa njihovom proteolitičkom aktivnošću

ENZIM	CIJEPAJE NA OSTATKU
Tripsin	Lizin , Arginin, Prolin
Kimotripsin	Fenilalanin, Tirozin, Triptofan, Prolin
V8 proteaza	Aspartat ,Glutamat, Prolin
Lys-C proteaza	Lizin, Prolin
Asp-N proteaza	Aspartat

4.2.1. Tripsin

Tripsin je serinska proteaza najšire primjenjivana u znanstvene svrhe. Uspješno se izolira i pročišćava iz goveđe ili svinjske gušterače. Glavna uloga tripsina je cijepanje proteina na lizinskom i argininskom ostatku osim ako iza njih dolazi prolinski ostatak u C-terminalnom smjeru polipeptida. Tripsin je najpogodnija proteaza za proteomička istraživanja zbog efektivnog cijepanja nakon lizina i arginina koje u 95 % slučajeva rezultira „savršenim peptidnim fragmentom“ (6-20 aminokiselinskih ostataka) za analizu masenom spektrometrijom te zbog održive aktivnosti pri istraživanjima u otopinama i gelovima^[2,4].

4.2.2. V8-proteaza

Glu-C proteaza ili V8-proteaza je vrsta endopeptidaze koja kida vezu na karboksilnom kraju glutamatnog aminokiselinskog ostatka u amonij acetatnom ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) ili amonij bikarbonatnom puferu (imaju stabilni pH u rasponu 4.75 ± 1 i 9.25 ± 1). Ukoliko se enzim nalazi u otopini kao što je natrijev fosfatni pufer, pufer će djelovati na enzim kao katalizator kidanja veza kod aspartatnih i glutamatnih aminokiselinskih ostataka. V8-proteaza pokazuje drugačiju specifičnost cijepanja u odnosu na tripsin koja omogućuje otkrivanje komplementarnih peptidnih fragmenata proteina^[2,8,9].

4.2.3. Ostale proteaze

Među ostale važnije proteaze ubrajaju se Lys-C proteaza, kimotripsin, Asp-N proteaza te nekoliko nespecifičnih proteaza. Navedene proteaze imaju značaj u znanstvenim istraživanjima no zbog svojih specifičnih mjesta cijepanja nisu najpogodnija za analizu proteina. Ovi enzimi, uglavnom, cijepaju peptidne veze na kraju jedne vrste aminokiselinskih ostatka što rezultira stvaranjem većih polipeptidnih lanaca koji nisu najpogodniji za analizu masenom spektrometrijom. Kimotripsin, pak cijepa veze na krajevima tirozina, triptofana, fenilalanina, leucina ili metionina što rezultira nastankom većeg broja premalih peptidnih fragmenata koji nisu pogodni za analizu masenom spektrometrijom. Ove proteaze nisu najpogodnije za analizu masenom spektrometrijom, ali pronalaze uporabu u istraživanjima u kojima je potrebno dobiti točno određeni fragment^[2,10].

4.3. ANALIZA PROTEINA MASENOM SPEKTROSKOPIJOM

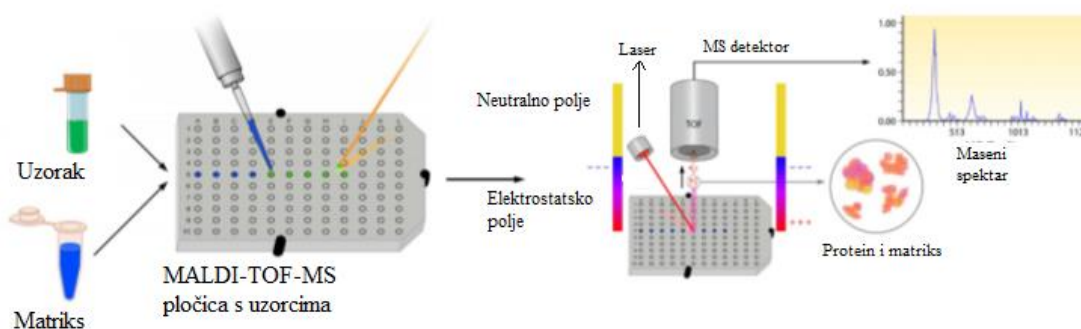
Analiza peptida i proteina masenom spektroskopijom iskazala se kao jedna od ključnih metoda u proteomici. Za analizu primarno se koriste dva tipa masene spektrometrije: MALDI-TOF spektrometrija koristi matricom potpomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem i analizator vremena leta (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*)^[10] i masena spektrometrija s ionizacijom elektroraspršenjem^[12] (eng. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry, ESI-MS*).

Maseni spektrometri se sastoje od tri ključna dijela: izvor svjetlosti, analizator te detektor. Dobiveni rezultati direktno se bilježe i pohranjuju u baze podataka dostupne znanstvenicima^[10,11].

- Izvor svjetlosti – monokromatski ili polikromatski izvor bijele svjetlosti koji ionizira molekule uzorka po prilagođenom mehanizmu ionizacije koji ovisi o faznom stanju istraživanog uzorka
- Analizator – svoje djelovanje bazira na odvajanju iona prema omjeru mase i naboja koji prolaze kroz magnetno polje sve do detektora
- Detektor – komponenta koja detektira razdvojene ione te računskim operacijama iskazuje željene podatke

4.3.1. MALDI-TOF masena spektrometrija

MALDI-TOF masena spektroskopija jest spektroskopska metoda koja upotrebljava lasersku zraku koja pogađa smjesu matrice i uzorka koja je smještena na tzv. „ciljnoj ploči“ uslijed čega uzorak prelazi u plinovito stanje bez da se pri tome razgradi ili fragmentira^[17]. Kada laserska zraka pogodi ciljnu pločicu (slika 5.), dolazi do ubrzanog porasta temperature što uzrokuje snažnu vibracijsku aktivnost molekula. Porastom vibracijske energije, molekule matrice odvajaju se od ciljne ploče noseći sa sobom i molekule istraživanog analita u plinovitu fazu. Ionizacija molekula analita odvija se pro toniranjem ili deprotoniranjem uz pomoć molekula matriksa koje se nalaze u okruženju molekula analita. Za izbijanje molekula matriksa i analita kao izvor laserske svjetlosti najčešće se upotrebljavaju laseri ultraljubičastih i infracrvenih valnih duljina. Uz navedene, u MALDI-TOF spektrometriji koriste se i dušikovi te Nd:Yag laseri^[18]. Kod ove vrste spektrometrije, topljivost samog analita u otapalu trebala bi iznositi ~0.1 mg/ml, a omjer smjese ciljnog analita i matrice treba biti u rasponu od 1:1000 do 1:100,000.



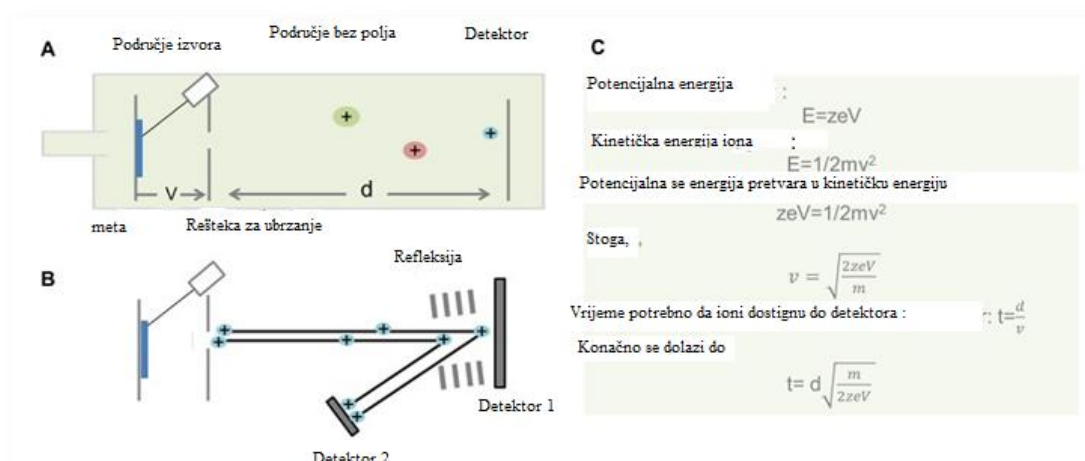
Slika 5 Proces odvijanja MALDI-TOF masene spektroskopije koji uključuje pripravu uzoraka, implementiranje uzoraka u spektrometar koji obavlja istraživanje te grafički prikaz dobivenih podataka

Za početak spektroskopskog istraživanja bitno je odabrati odgovarajuću komponentu matrice. Pri odabiru željene matrice bitno je naglasiti da će polarne matrice biti u boljoj sinergiji s polarnim uzorcima analita i obrnuto. Razvojem proteomike i MALDI-TOF spektrometrije znanstvenici su ustanovili povećati broj kemijskih spojeva (vidi *tablica 2.*) koji mogu služiti kao sinergisti u istraživanju željenih uzoraka. U novijim proteomičkim istraživanjima, najčešće korištene matrice sadržavaju 2,5-dihidroksibenzojevu kiselinu i α -cijano-4-hidroksicimetnu kiselinu^[17,18].

Tablica 2 Kemijski spojevi prigodni za MALDI-TOF spektroskopiju

KEMIJSKI SPOJ	AKRONIM KEMIJSKOG SPOJA	UPORABA
Nikotinska kiselina	NA	Peptidi, proteini
3-aminokinolin	3-AQ	oligosaharidi
2-merkaptobenzotiazol	MBT	Peptidi, proteini, sintetički polimeri
Pikolinska kiselina	PA	oligonukleotidi, DNA

Komponenta MALDI spektroskopa koja služi u analizi ioniziranih molekula naziva se analizator vremena leta (*eng. Time of flight analyser, TOF*). TOF analizator shematski se sastoji od 3 regije (vidi *slika 6*). Primarna regija analizatora sastoji se od praznine bez utjecaja polja kroz koju se kreću ioni raznih vrijednosti m/z omjera sve do prvog detektora gdje se odvija refleksija na drugi detektor na kojemu se odvija proces deriviranja vremena potrebnog da ioni prelete prazninu bez utjecaja polja. Paralelno odvijanju procesa deriviranja, dobiveni podatci šalju se do pretvornika podataka u signale koji se iskazuju kao rezultat u masenom spektru ^[19].



Slika 6 Shematski prikaz glavnih komponenta TOF analizatora

4.4. METODA PREPOZNAVANJA REZULTATA SPEKTARA

Uporabom programa poput programa *Sequest* znanstvenicima je omogućena analiza masenih spektara kojima se uglavnom identificiraju različiti proteini i peptidi. Osim identifikacije proteina, znanstvenicima je važna i detaljna analiza uzorka iz kojeg se pokušavaju izolirati specifični proteini s karakterističnim modifikacijama ili peptidi koji u svojoj građi posjeduju specifičnu zajedničku sekvencu.

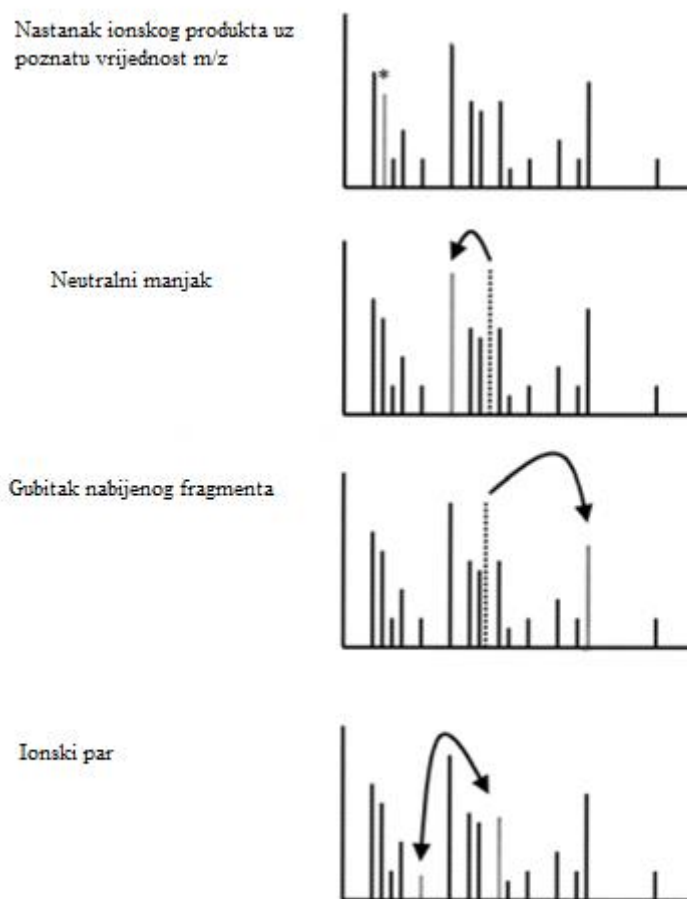
Zbog velike količine dobivenih podataka iz masenih spektara, znanstvenici moraju izdvojiti one spektre koji sadržavaju područje interesa istraživanja. Proces pronalaska željenih spektara odvija se u tri etape^[2,3]. Prva etapa uključuje ispitivanje spektara koji sadrže traženu ključnu funkcionalnu skupinu kao što je fosforilirana aminokiselina, dok se u preostale dvije etape odvija analiza spektara koji sadrže b- ili y-ionske serije koje upućuju na motiv sekvence specifične aminokiseline. Kako bi se znanstvena istraživanja olakšala, znanstvenici su razvili algoritam bodovanja spektralne analize (*eng. Scoring Algorithm for Spectral Analysis, SALSA*)^[2].

SALSA algoritam funkcionira na principu bodovanja masenih spektara po broju karakterističnih obilježja i intenzitetu samog spektra, a odlika programa je mogućnost razlikovanja četiri vrste obilježja masenih spektara (Slika 7.)^[2,13]:

- Nastanak ionskog produkta uz poznatu vrijednost m/z omjera – pr. uskraćivanje kemijske modifikacije peptida uslijed odvajanja karakterističnog ionskog produkta koji se pojavljuje u spektru s specifičnom vrijednošću m/z omjera od promatranog peptida
- Neutralni manjak – pr. gubitak neutralnog dijela od iona preteče; područje istraživanja neutralnog manjka fokusira se na m/z omjer preteče umanjeno za specifično odabranu vrijednost omjera neutralne mase/naboja preteče dok se mora uzeti u obzir činjenica da je objektivna vrijednost omjera m/z neutralnog manjka za dvostruko nabijenu preteču upola manja negoli pri gubitku mase kod pojedinačnih komponenata nabijenih preteča^[13]. Iz neutralnog manjka proističe proizvodni ion koji je istog naboja kao i njegova preteče.
- Gubitak nabijenog fragmenta – višestruko nabijenoj ionskoj preteči se odvaja nabijeni djelić; pr. dvostruko nabijena ionska preteča gubi jednostruko

nabijeni fragment^[3]. Princip ovog načela temelji se na oduzimanju traženog specifičnog omjera m/z od omjera m/z pretpostavljene, jednostruko nabijene preteče umjesto stvarne vrijednosti prave preteče. Osim specifičnog gubitka omjera m/z , u algoritam se istovremeno unose i naboji preteče te odvojenog nabijenog fragmenta^[13].

- Ionski par – načelo koje djeluje na način da označava bilo koja dva signala u spektru koja bivaju razdvojena s traženom specifičnom vrijednošću m/z omjera bilo gdje u masenom spektru. Otkriće ionskog para u spektru upućuje na postojanje specifične postavke unutar peptidne sekvence. Uporaba značajke ionskog para najbolje se očitava na primjeru peptidne sekvence čiji je y-ionski par signala odvojen za 103 vrijednosti omjera m/z što označava prisutnost cisteinske komponente u peptidu^[2].

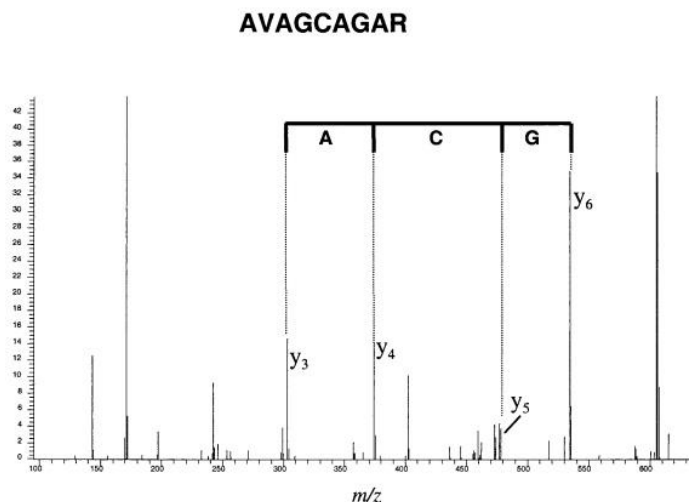


Slika 7 Četiri glavne spektralne značajke koje SALSA algoritam prepoznaje

Uparivanjem ovih karakteristika u različitim kombinacijama znanstvenici mogu odgonetnuti posebne strukturne karakteristike u uzorcima peptida preteča. Osim pronalaženja i identificiranja karakterističnih fragmenata unutar peptida, SALSA algoritam sposoban je procesuirati stotine masenih spektara koje nakon analize rangira po broju bodova koje je pojedinačni spektar ostvario za određene značajke^[2]. Znanstvenicima je omogućeno korištenje svake od navedenih četiri značajke zasebno no zbog velike količine spektralnih podataka, primorani su koristiti najčešće sve četiri značajke.

Glavno svojstvo SALSA algoritma jest svojstvo agilnosti što omogućava detaljno sparivanje informacija traženih specifikacija u peptida uz pomoć točnog razlučivanja određenih karakteristika proučavanog peptida^[4,13]. Spektar SALSA algoritma najbolju primjenu pronalazi u analizi značajki neutralnog gubitka i ionskog para. Stupanj identifikacije pojedine značajke ovisi o vrsti modifikacije značajke. Kod neutralnog gubitka, algoritam upućuje na visoku sigurnost o identifikaciji uslijed post-translacijskih modifikacija kao što je fosforilacija, dok se kod ionskog para sigurnost identifikacije temelji na stabilnim modifikacijama aminokiselina^[4]. Osim identifikacije, SALSA algoritam služi kao bodovni sistem otkrivenih svojstava promatranog peptida. Prema karakterističnom rangui za specifični peptid, algoritam će razlikovat karakteristike kao primarne i sekundarne. Algoritam će prilikom bilo koje nove detekcije tražene karakteristike tu karakteristiku zabilježiti kao primarnu karakteristiku, dok se sekundarna karakteristika registrira na principu otkrivanja primarne karakteristike s kojom je ona povezana^[2,3,4].

Algoritam sadrži značajku koja mu omogućuje prepoznavanje aminokiselina po specifičnom razmaku m/z omjera unutar novonastalog spektra. Kod AVAGCAGAR peptida^[2], masenom spektrometrijom najčešće se uočavaju b- i y- ionske serije. Pojavom ionskih parova na vrijednostima od 477 i 374 m/z omjera (Slika 8.), ustanovljen je razmak od 103 jedinice na skali vrijednosti m/z omjera. Razmak od 103 jedinice upućuje da se u karakterističnom peptidu nalazi cisteinski ostatak^[2,13].



Slika 8 Odgovarajuće 4 specifikacije za GCA sekvenciju AVAGCAGAR peptid masenom spektroskopijom

4.5. IDENTIFIKACIJA PROTEINA PEPTIDNIM MASENIM OTISCIMA

Identifikacija proteina peptidnim masenim otiscima je metoda otkrivanja i identificiranja proteina koja koristi masenu spektrometriju za očitavanje masa peptida nastalih cijepanjem pomoću proteolitičkih enzima. Nakon očitavanja masa, protein biva identificiran uparivanjem podataka izmjerenih masa fragmenata s adekvatnim masama peptida iz proteinskih ili nukleotidnih sekvencijskih baza podataka.

Metoda identifikacije proteina peptidnim masenim otiscima započinje razdvajanjem proteina provođenjem dvodimenzionalne elektroforeze ili tekućinskom kromatografijom. Nakon razdvajanja proteina, ciljni protein biva razgrađen određenim proteolitičkim enzimom. Najčešće korišteni proteolitički enzim u metodi identifikacije peptidnim masenim otiscima je Tripsin. Nakon cijepanja na karakteristične peptide, analizom masenom spektrometrijom dobivaju se eksperimentalni podatci. Istovremeno s masenom spektrometrijom, računalni program provodi *in silico* razgradnju proteina s istim enzimom te stvara teorijsku listu podataka. Najčešće upotrebljavani programi za *in silico* istraživanja su „Mascot“, „MS-Fit“ i „Profound“. Po završetku analize, rezultati se statistički uspoređuju kako bi se dobilo najtočnije poklapanje za određeni fragment^[24].

Načela koja kontroliraju metriku interpretacije s peptidnim masenim otiscima su proučavana i ustrojena kroz nekoliko tisuća istraživanja baza podataka o proteinima koji nemaju toliko bitnu ulogu u organizmima. Upravo su ta načela skladno kreirana po analiziranju djelotvornosti svakog pojedinog unosa tražene specifikacije u podatkovnu bazu.

Primjer ustroja uspostave načela identifikacije o djelovanju kod pseudo-endoproteinaza koristi podatke dobivene *in silico*¹ istraživanjem uz pomoć niza od 20 pseudo-endoproteinaza koje kidaju veze na karboksi-terminalnoj strani aminokiselina i 3 proteaze (tripsin, kimotripsin i Glu-C). Nakon istraživanja, preraspodjela masa peptidnih fragmenta nastalih djelovanjem pseudo-endoproteinaza dala su uvid u efikasnije kreiranje osnovnih načela identifikacije proteina uz navedene endoproteinaze^[15].

Kada bi znanstvenici pocijepali cijeli proteom jednog organizma u veliki niz peptida uz pomoć tripsina dobili bi karakterističan broj peptidnih fragmenata određene duljine sekvencija te karakterističnih masa. Računalnim postupcima moguće je povezivanje dobivenih informacija kako bi se dobio identitet proteina i njegova sekvenca.

4.5.1. Pregled djelovanja proteinske identifikacije peptidnim masenim otiscima

Cijepanjem proteina na fragmente, istovremeno se dobivaju i mase nastalih fragmenata. Eksperimentalno dobivena masa jednog izabranog fragmenta uspoređuje se s generiranom listom svih peptidnih masa kako bi se pronašlo pozitivno poklapanje. Program će prepoznati odgovarajuću masu na popisu masa peptidnih fragmenata (vidi *slika 9*). Analizom i usporedbom višestrukog broja fragmenata nastalih cijepanjem nepoznatog proteina na peptidne fragmente odgovarajućih masa dolazimo do identifikacije nepoznatog proteina. Prilikom ispitivanja novonastalog peptida s nepoznatog proteina, usporedbom s generiranom listom masa peptidnih fragmenata, traži se s nekim od poznatih peptida, koji je dio proteina već poznatog aminokiselinskog slijeda, što će u konačnici rezultirati identifikacijom istraživanih nepoznatog proteina.

¹ Izraz koji označava „istraživanje koje sprovodi računalo“

Lista peptidnih masa

.
.
.
1528.7685
1528.7989
1529.0002
1529.2001
1529.2454
1529.5006
1529.6997
1529.7348 ← **1529.7348**
1529.9978
1530.2332
1530.4567
1531.0003
1531.0107
1531.3004
1531.5656
.
.
.

Izmjerena masa

Slika 9 Primjer algoritmičke usporedbe peptidnih vrijednosti omjera m/z s izmjerenim podacima generirane liste peptidnih masa

U praktičnoj izvedbi proteinske identifikacije peptidnim masenim otiscima znanstvenicima je ponekad teško doći do točne identifikacije peptidnih fragmenata uz pomoć usporedbe s generiranom listom jer se dobivene mase vrlo rijetko točno poklapaju s listom uz odstupanja vrijednosti od 0.01 Da ili više. Osim odstupanja na bazi peptidnih masa, posao identifikacije proteina znanstvenicima otežavaju stvarni podatci dobiveni masenom spektroskopijom kao i vjerojatnost slučajnog poklapanja podataka bez utvrđivanja stvarnog identiteta. Današnji maseni spektrometri sposobni su visoko kvalitetnoj analizi peptidnih fragmenata u kojoj vrijednosti m/z omjera peptidnih iona odstupaju ± 0.005 . Usprkos visokoj točnosti, sistematske pogreške su sveprisutne, ponajčešće zbog loše baždarenosti samoga uređaja. Uz sistematske pogreške pri mjerenju, ograničenje za precizno i točno mjerenje jest velik broj spektralnih podataka od kojih višestruk broj dolazi od samo jedne skupine promatranih proteina. Svaki višestruki signal od pojedinog proteina sadržava, u prosjeku, od 25 do 40 peptidnih fragmenata uz sveopće prisustvo tvari koje onečišćuju fragment, a istovjetno i signal u spektru. Naposljetku, sistematske greške su zaslužne i za lažno pozitivna poklapanja unutar sistematskih baza, a veličina postotka lažno pozitivnih poklapanja raste

proporcionalno s veličinom proteina. Dosljedno tomu, veći broj lažnih poklapanja će se pojaviti kod većeg proteina zbog količine novonastalih peptidnih fragmenata ^[2,4,15,18] .

5. ZAKLJUČAK

Proteomika je znanstvena disciplina čija se istraživanja sve više i više izučavaju. Bazira se na shematskom, visoko preciznom i osjetljivom istraživanju ekspresije proteina, njihovoj identifikaciji i ulozi u pojedinačnim organizmima. Klasični ishodi proteomskih istraživanja uključuju opsežne baze podataka koje sadrže mase peptidnih fragmenata proteina, raznolike spektralne karakteristike peptidnih sekvencija te identifikaciju proteina pojedinih organizama. Dinamikom aktivnosti i koncentracije određenih staničnih proteina nastaje odgovarajući odgovor stanice na specifične promjene izvan ili unutar nje. Proteomika se, kao znanstvena disciplina proučavanja proteina, može podijeliti u tri vrste : proteomika ekspresije proteina, strukturalna proteomika te funkcionalna proteomika. Od pojave prvoga termina za ovu vrstu specifičnih makromolekula izgrađenih od pravocrtnih lanaca aminokiselina do danas tehnologija koja se razvila omogućila je ogroman napredak u proteomici. Ponajveću zaslugu u analizi proteina ima 2D gel elektroforeza te razvitak masene spektroskopije kao što je MALDI-TOF masena spektroskopija. Neke od glavnih metoda analize proteoma nekog organizma su proteinska identifikacija masenim otiscima, metoda prepoznavanja rezultata spektara, analiza proteina masenom spektrometrijom, metoda digestije proteina te analitička separacija proteina. Proteomika je znanstvena disciplina sa ogromnim potencijalom razvijanja koji će se u budućnosti i iskoristiti u razvitak tehnologije za analizu proteina, što će rezultirati otkrivanjem važnih, znanstvenicima trenutno neobjašnjivih informacija.

6. LITERATURA

- [1] R.M. Twyman , *Encyclopedia of Applied Ethics* , Elsevier Inc., 2012., Coventry UK
- [2] D.C. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press Inc., 2002., Totowa SAD
- [3] K.-H. Liang, *Bioinformatics for Biomedical Science and Clinical Applications*, Woodhead Publishing Limited, 2013., Tajvan
- [4] K.K. Hixon, D. Lopez-Ferrer, E. Robinson, L. Paša-Tolić, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier Ltd., 2017., Richland SAD
- [5] 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, *Electrophoresis* **16** (1995.), 1090-1094.
- [6] Gavin A.C., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., *Nature* **415** (2002) 141-147.
- [7] P.A. Edman, *Arch Biochem.* , **22** (1949.), 475-483.
- [8] A.M. Hinsby, J.V. Olsen, K.L. Bennett, M. Mann, *Molecular and Cellular Proteomics* **2**, 2003.
- [9] R.R. Graves, T.A.J. Haystead, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66** (2020.), 39-63.
- [10] K. Chandrasekhar, A. Dileep, D. Ester Lebonah, J. Pramoda Kumari, *International Letters of Natural Sciences* , **17** (2014.), 77-84.
- [11] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija, Školska knjiga*, 2013., Zagreb, 70-74.; 205-241.;
- [12] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K Cheung, *Clin. Biochem. Rev.*, **24** (2003.), 3-12.
- [13] B.T. Hansen, J.A. Jones, D.E. Mason, D.C. Lieber, *Anal. Chem.*, **73** (2001.), 1676.-1683.
- [14] S. Dey, T. Roy, S. Sarkar, *Advances in mathematics of communications*, **13** (2019.), 689-704.
- [15] J.S. Cottrell, *Protein identification by peptide mass fingerprinting, Pept res.*, **3** (1994.), 24-115
- [16] M.J. Wise, I.G. Littlejohn, I. Humphery-Smith, *Electrophoresis*, **18** (1997.), 1399-1409.

- [17] B. Fuchs, J. Schiller, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **1** (2009.), 83-98.
- [18] U. Boesl, *Mass spectrometry reviews*, **1** (2017.), 86-109.
- [19] D.J. Kenny, J.M. Brown, M.E. Palmer, et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1** (2006.), 60-66.
- [20] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(McMurry\)/26%3A_Biomolecules-Amino_Acids_Peptides_and_Proteins/26.07%3A_The_Edman_Degradation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(McMurry)/26%3A_Biomolecules-Amino_Acids_Peptides_and_Proteins/26.07%3A_The_Edman_Degradation) , 27.8.2020.
- [21] P. Edman, E. Högfeldt, L.G. Sillén, P.-O. Kinell, *Acta Chem.*, **4** (1950.), 283-293.
- [22] P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.*, **1** (1967.), 80-91.
- [23] O.S. Ramos, F.X. Malcata, *Comprehensive Biotechnology*, **3** (2011.), 555-569.
- [24] <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/protein-identification-peptide-mass-fingerprinting-pmf/> , 25.9.2021.

IZVORI SLIKA

1. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(McMurry\)/26%3A_Biomolecules-A](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(McMurry)/26%3A_Biomolecules-A) 29.8.2020.
2. D.C. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press Inc., 2002., Totowa SAD
3. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page> , 27.8.2020.
4. <https://kendricklabs.com/2d-overview/> , 27.8.2020.
5. B. Fuchs, J. Schiller, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **1** (2009.), 83-98.
6. D.J. Kenny, J.M. Brown, M.E. Palmer, et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1** (2006.), 60-66.
7. D.C. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press Inc., 2002., Totowa SAD
8. D.C. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press Inc., 2002., Totowa SAD
9. D.C. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press Inc., 2002., Totowa SAD