

# Metabolomika i proteomika - nauka i diagnostyka kliniczna

dr n.med. Katarzyna Kuśmierska  
Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej  
Instytut Matki i Dziecka



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita  
Polska**



**Instytut  
Matki i Dziecka**

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny





# Biochemia i medycyna

- Biochemia ma istotne znaczenie w rozwój wiedzy dotyczącej nie tylko metabolizmu komórek, ale również immunologii, farmakologii, toksykologii czy procesów zapalnych.
- Ścisła zależność pomiędzy biochemią i medycyną pokazuje jak życie, które znamy zależy od reakcji i procesów biochemicznych zachodzących w pojedynczej komórce.
- Wyzwania przed, którymi stają dzisiaj biochemicy:
  - zrozumienie czym jest zdrowie, czyli zrozumienie mechanizmów i procesów zachodzących w zdrowej komórce
  - zrozumienie czym jest choroba, czyli zrozumienie patomechanizmów odpowiedzialnych za wystąpienie określonych objawów klinicznych.

# Biochemia i medycyna

Badania biochemiczne z jednej strony przyczyniają się do wyjaśnienia wielu aspektów choroby, z drugiej odsłaniają nowe dziedziny jeszcze nie do końca poznane lub zrozumiałe, co stanowi duże wyzwanie zarówno dla biochemików jak i klinicystów.

**WSPÓŁPRACA MIĘDZY BIOCHEMIKAMI A KLINICYSTAMI MA OGROMNE  
ZNACZENIE W POSZERZANIU WIEDZY NA TEMAT METABOLIZMU KOMÓRKI W  
RÓŻNYCH ZDROWYCH I PATOLOGICZNYCH WARUNKACH**

# Rozwój diagnostyki biochemicznej zaburzeń metabolizmu

Choroba to dynamiczny proces modyfikujący ekspresję określonych genów tym samym przyczyniając się do zmian zarówno w powstałych białkach jak i zsintetyzowanych metabolitach.

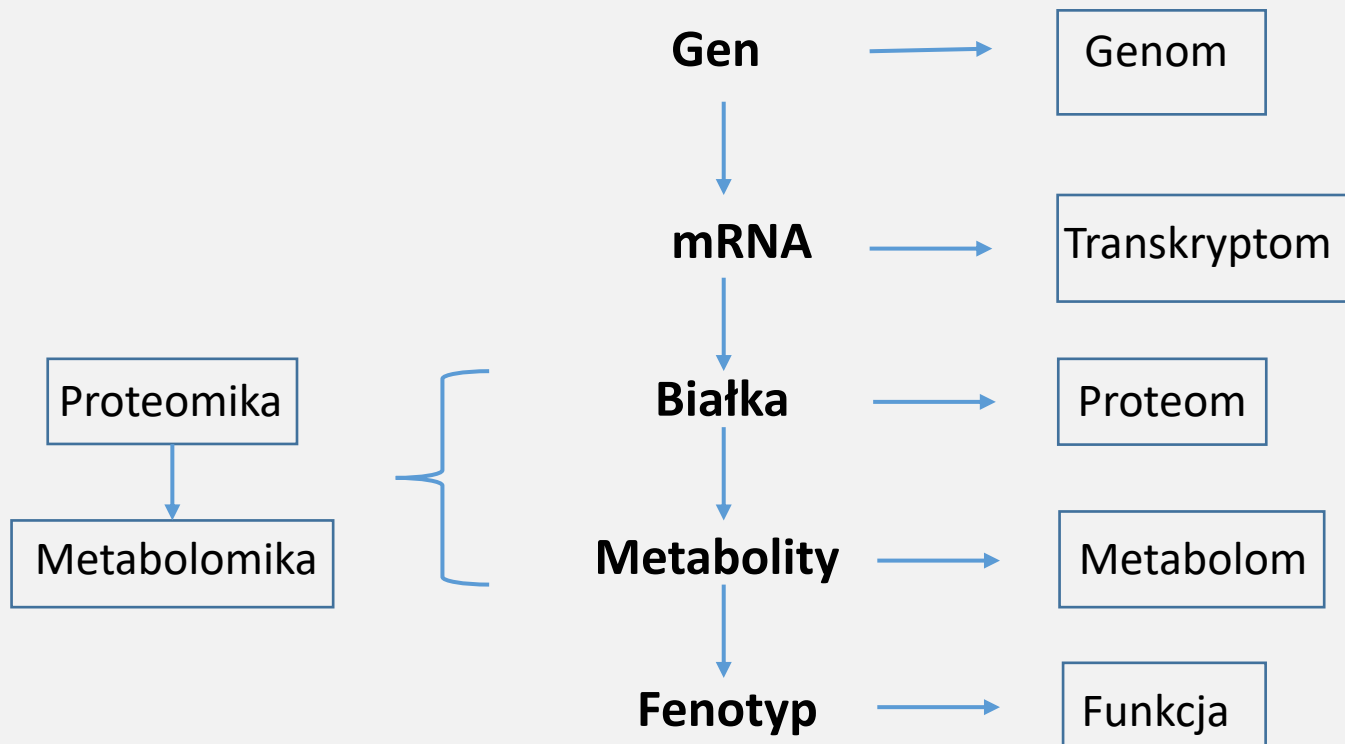
Pojedyncze markery charakteryzują się niską czułością i specyficznością a ich wartość diagnostyczna stanowi jedynie pewne zawężone kryterium rozpoznania.

Intensywny rozwój nowych technologii, spektrometrii mas i biochemii otwiera przed medycyną nowe możliwości diagnostyczne, umożliwia analizę wielu związków w tym samym czasie.

Nowa dziedzina „omika” w tym metabolomika i proteomika jest jedną z najbardziej pręźnie rozwijających się dziedzin nauki.

***Staje się użytecznym narzędziem w badaniu różnych patofizjologicznych procesów zachodzących w organizmie.***

# „Omika” w układach biologicznych



Fundusze Europejskie  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska



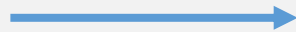
Instytut  
Matki i Dziecka

Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny

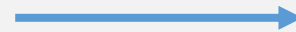


# Diagnostyka

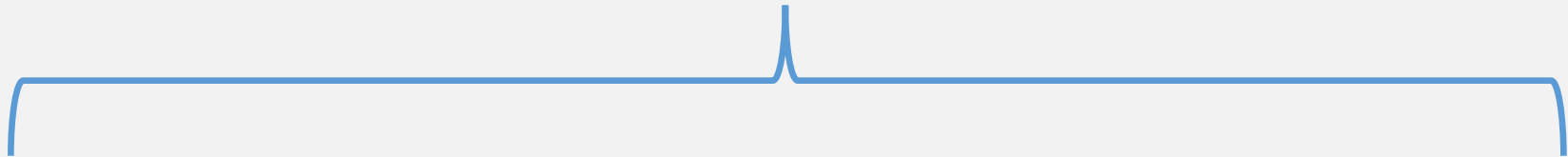
Badania



Biomarkery



Diagnostyka



**Proteomics**

**Glycomics**

**Metabolomics**



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita  
Polska**



**Instytut  
Matki i Dziecka**

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny

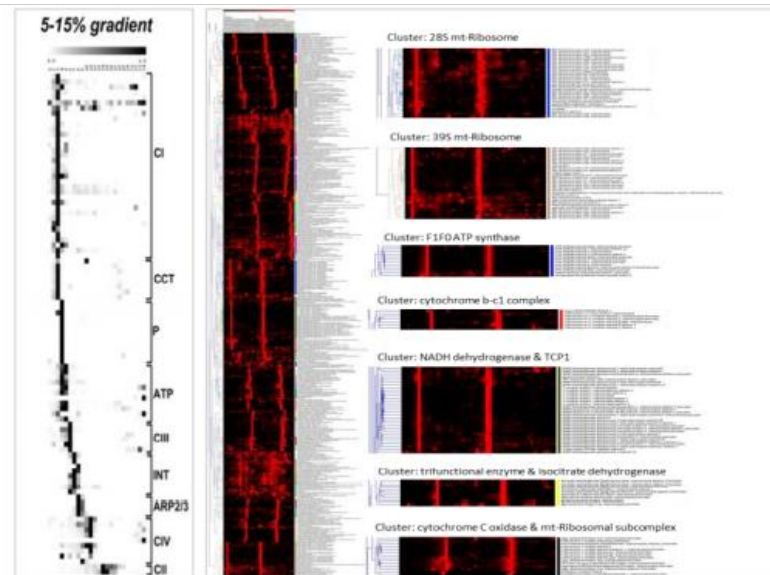
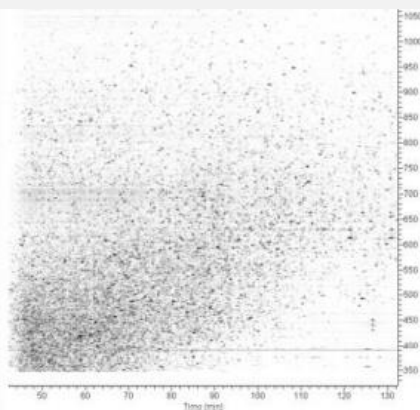


# Techniki proteomiczne

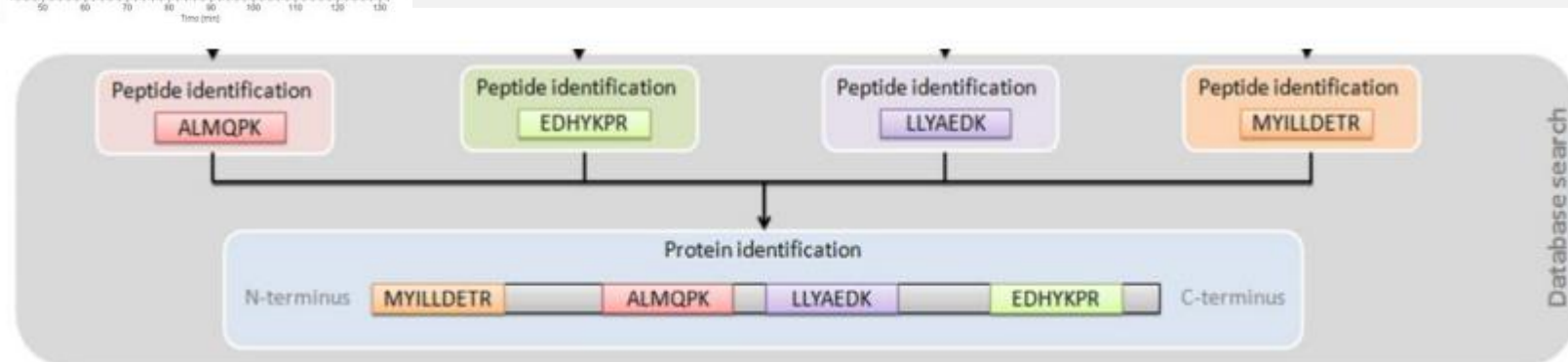
Identyfikacja białek na podstawie wybranych fragmentów łańcuchów peptydowych

Profilowanie różnicowe ekspresji białek

Nadaje się do bardzo złożonych próbek



Protein complex isolation and characterization



Fundusze Europejskie  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska



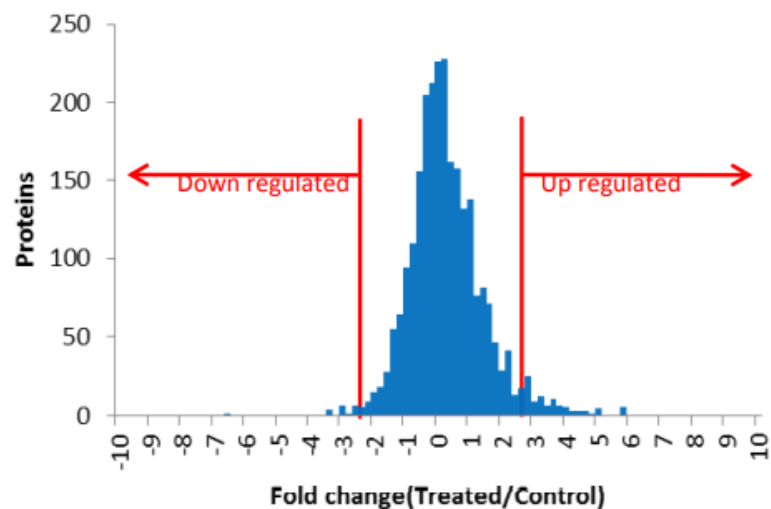
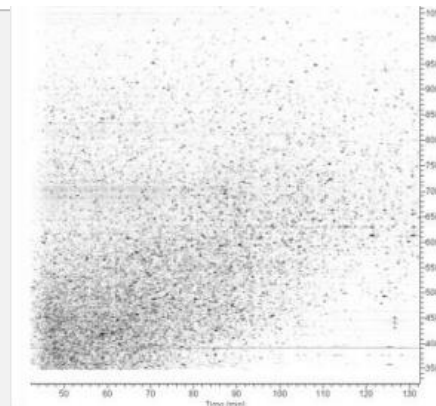
Instytut  
Matki i Dziecka

Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



# Techniki proteomiczne

- Różnicowanie ekspresji białek w zdrowiu i chorobie
- Czas
- Interakcje białko-białko
- Kompleksy białkowe
- korelacja białek



## Instruments:



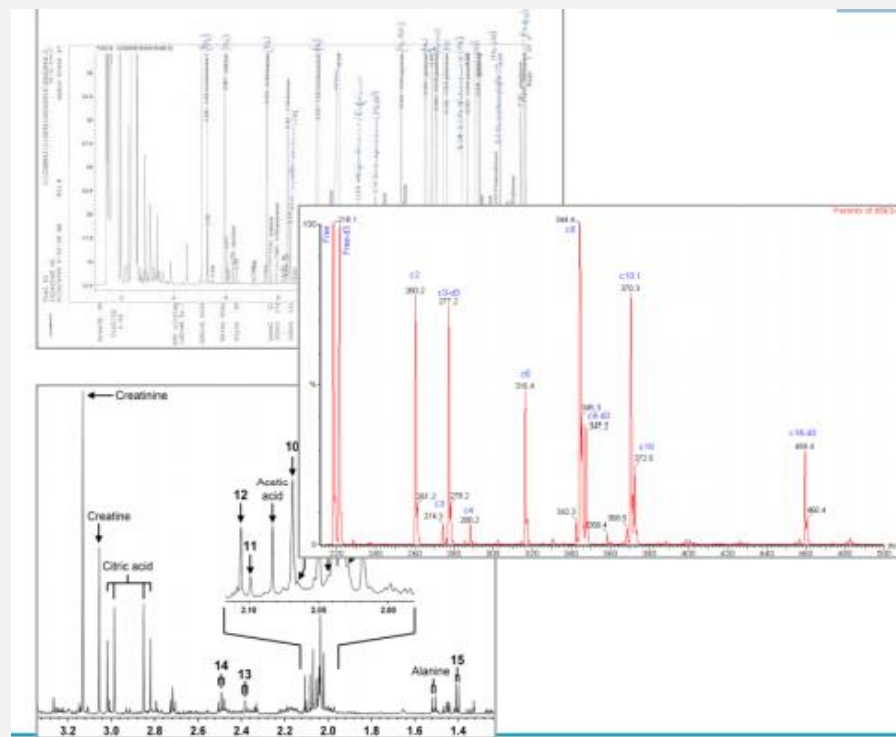
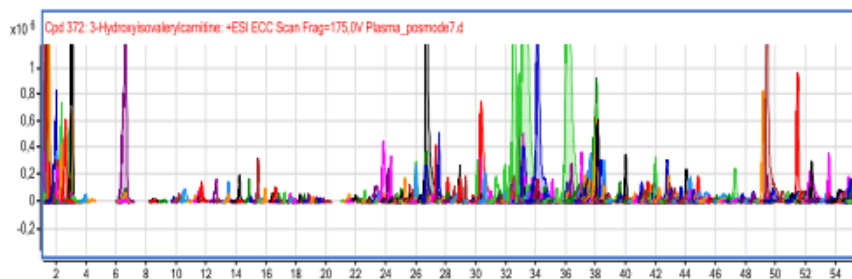
# Podejście metabolomiczne

## Badania:

- Wdrażanie nowych procedur pod kątem specyficznych metabolitów lub grupy związków drobnocząsteczkowych
- Profilowanie nieznanymi metabolitów
- Identyfikacja metabolitów jako biomarkerów

## Diagnostyka:

- Kwasy organiczne
- Aminokwasy
- Puryny i pirymidyny
- Monosacharydy / poliole
- Karnityna (-estry)
- Sterole



Fundusze Europejskie  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska



Instytut  
Matki i Dziecka

Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



# METABOLIZM

zespół przemian chemicznych i biochemicznych zachodzących w organizmie, dzięki którym możliwe jest przeżycie każdej komórki

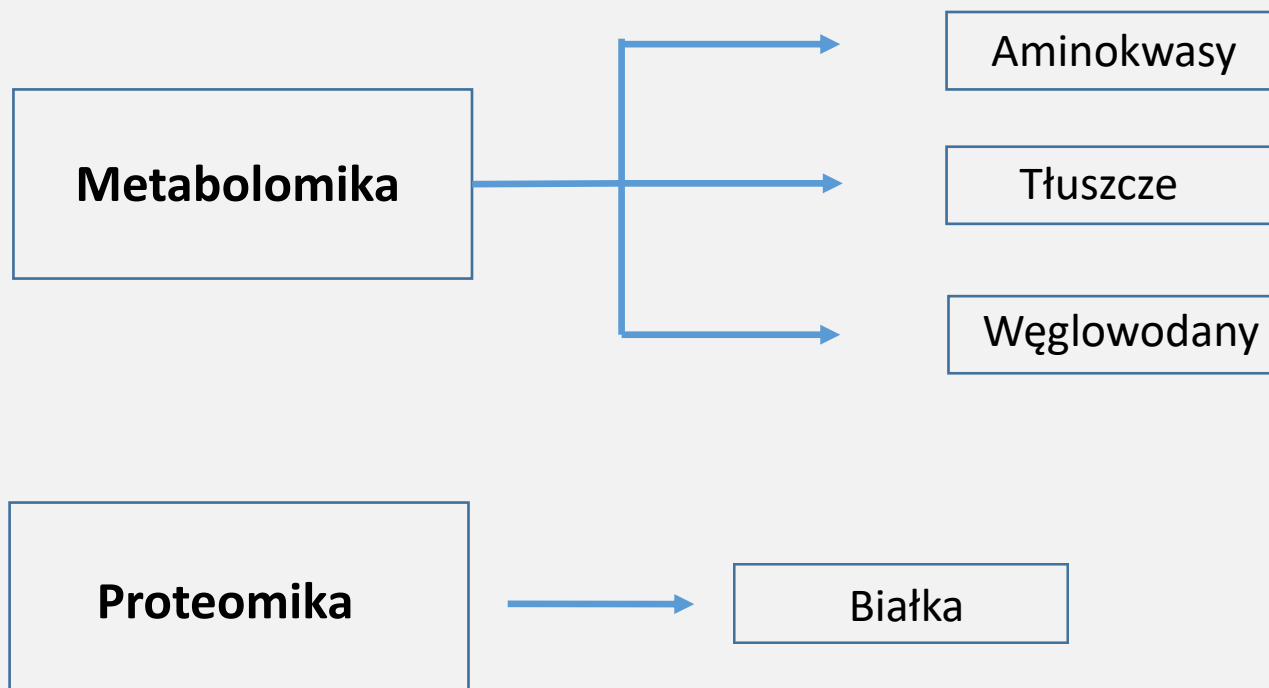
większość reakcji chemicznych zachodzi dzięki energii dostarczanej z pożywieniem  
czyli

zachodzące w komórce przemiany węglowodanów , tłuszczu i białek prowadzą do wytwarzania ogromnych ilości energii

Energia ta jest potrzebna do utrzymania temperatury organizmu, aktywności mięśni, wchłaniania i przemian energetycznych, wydzielania gruczołowego oraz potencjałów elektrycznych włókien nerwowych i mięśniowych



# Nowe narzędzia diagnostyczne



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska



**Instytut  
Matki i Dziecka**

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



# Analiza związków drobnocząsteczkowych

- Aminokwasy oznaczane są w osoczu/surowicy, moczu, płynie m-rdzeniowym oraz w suchej kropli krwi.

## Analiza aminokwasów

Sucha kropla krwi

Badania  
przesiewowe  
noworodków

- PKU
- MSUD
- Cykl mocznikowy
- homocystynuria

Osocze/surowica

Podejrzenie  
zaburzeń  
metabolizmu aa

mocz

Podejrzenie  
zaburzeń  
metabolizmu aa

- Cystynuria
- LPI
- Kofaktor MoCo

Płyn  
m-rdzeniowy

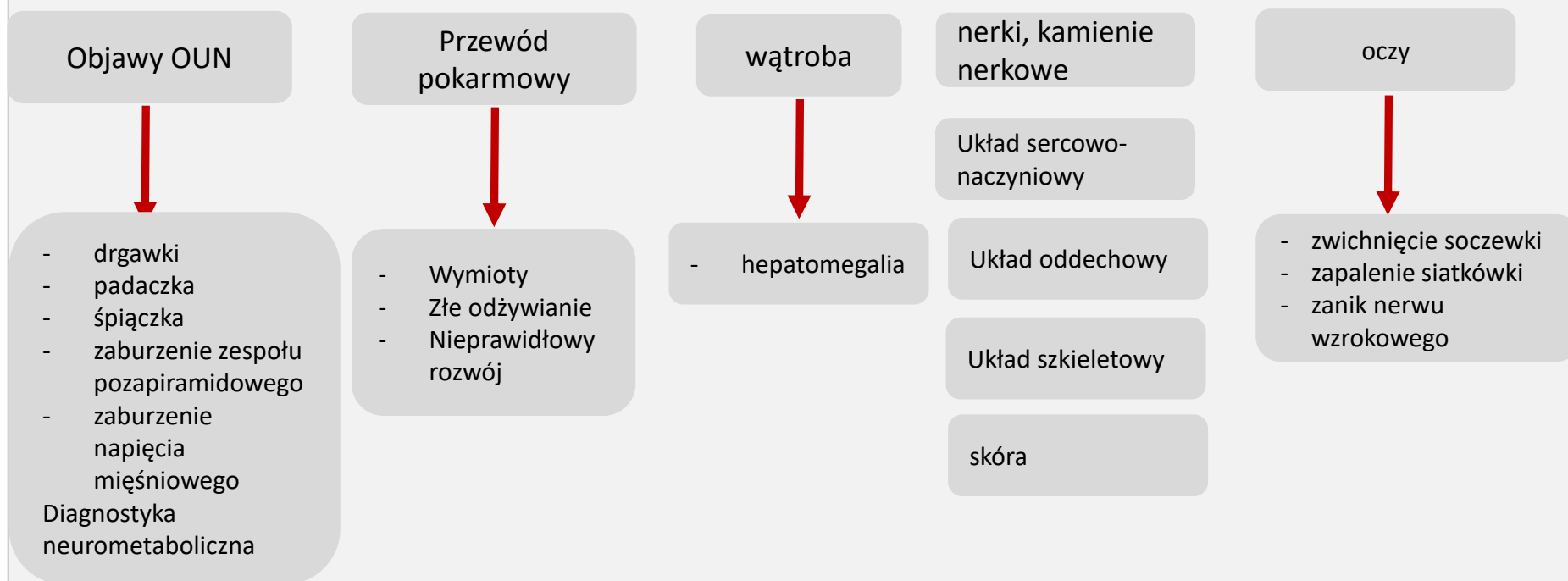
Podejrzenie  
zaburzeń  
neurometabolizmu

- NKH
- Metabolizm seryny
- Metabolizm glutaminianu

# Fenotyp kliniczny w interpretacji zaburzeń metabolizmu

Informacja kliniczna jest niezbędna do prawidłowej interpretacji profilu aminokwasów:

## ➤ Fenotyp kliniczny podpowiada kierunek diagnostyki metabolicznej



## ➤ Pozytywny wywiad rodzinny i pozytywny wynik badania przesiewowego noworodków

# Czynniki wpływające na interpretację wyniku profilu metabolitów

**czas pobrania materiału**

**wiek pacjenta**

**hemoliza**

**sposób przechowywania i transportu  
materiału**

**dieta**

**leki**

**Wtórne zaburzenia metabolizmu  
aminokwasów:**

1/ galaktozemia

2/ kwasice organiczne

3/ zaburzenia metabolizmu  
pirogronianu

4/ dysfunkcja wątroby

5/ niedotlenienie



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita  
Polska**



**Instytut  
Matki i Dziecka**

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



Pojedyncze analizy nie zawsze dają jednoznaczną odpowiedź na pytanie  
„Co się dzieje z pacjentem i dlaczego?”

Nie pomagają w zrozumieniu patomechanizmów odpowiedzialnych za wystąpienie  
objawów klinicznych

Znacznie wydłużają proces diagnostyczny

DLATEGO

tak ważne jest wykorzystanie najnowszych technik do jednoczasowych oznaczeń  
wielu metabolitów w danej grupie związków.

# Metabolomika

- jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki, której głównym celem jest identyfikacja oraz ilościowa analiza związków niskocząsteczkowych - metabolitów pierwotnych i wtórnych, które tworzą metabolom w organizmach żywych.
- połączenie informacji uzyskiwanych na poziomie metabolomu z danymi otrzymywanymi w ramach nowych technologii tj: genomika, transkryptomika i proteomika i obrazem klinicznym.
- jest narzędziem w genomice funkcjonalnej i biologii systemów subkomórkowych, w tym transportu, co umożliwi zrozumienie mechanizmów i określenie przebiegu procesów życiowych w pojedynczych komórkach jak i na poziomie całego organizmu

- Celem metabolomiki w badaniach systemów biologicznych jest katalogowanie i oznaczanie ilościowe maksymalnie wielu związków chemicznych w analizowanych próbkach materiału biologicznego.

Natomiast w zakres metabonomiki wchodzi:

- badania dotyczące profilowania zmian ilościowych i jakościowych metabolitów w organizmie człowieka.

# Zalety metabolomiki

- Wzrost zrozumienia patomechanizmów choroby na poziomie molekularnym i tworzenie nowej hipotezy dotyczącej mechanizmów choroby
- Identyfikacja biomarkerów charakterystycznych dla danej choroby
- Ocena postępu choroby
- Interpretacja wpływu środowiska i stylu życia na rozwój choroby
- Ocena skuteczności terapii

# Neurometabolizm

W chwili obecnej dokładny patomechanizm stojący za większością zaburzeń neurometabolicznych

pozostaje nadal niejasny, a bez jego dokładnego zrozumienia rozwój/zastosowanie terapii celowanej stanowi nadal poważne wyzwanie;

Równowaga między różnymi NTs – glutaminianem, acetylocholiną, dopaminą, serotoniną, w wybranych regionach mózgu odpowiada za prawidłowy rozwój psychoruchowy, stan emocjonalny;

Zaburzenie, nawet nieznaczne, na dowolnym szlaku, może prowadzić do wystąpienia objawów klinicznych.

# PROTEOMIKA

Uzupełnieniem dla metabolomiki w diagnostyce klinicznej jest badanie białek w różnych płynach ustrojowych.

Proteomika - nauka

wywodząca się z genomiki, ale znacznie szersza i bardziej złożona;

zajmująca się badaniem proteomu, czyli zbiorem wszystkich białek kodowanych przez genom i produkowanych przez jedną komórkę, tkankę lub organ;

gromadząca informacje na temat struktury białkowej oraz rozpoznawania sekwencji białek

i

badająca ich funkcje

# PROTEOMIKA

W ostatnich latach, ponad 300 białek po post-translacyjnych modyfikacjach, między innymi takich jak:

- acetylacji,
- metylacji,
- glikozylacji
- fosforylacji
- karboksylacji

było szeroko badanych pod kątem ich istotnej roli w regulacji procesów komórkowych.



## WYRÓŻNIAMY:

**proteomikę ekspresyjną**, która za pomocą badania ekspresji białek ułatwia dokładniejsze zrozumienie mechanizmów fizjologicznych i patologicznych zachodzących w komórce;

**proteomikę strukturalną**, która umożliwia poznanie struktury przestrzennej białek;

**proteomikę funkcjonalną**, która umożliwia ocenę stanu aktywacji i wzajemnych interakcji między białkami

# Białka ulegają między innymi:

**Glikozylacji** (polega na przyłączeniu wiązaniem glikozylowym reszt cukrowych do reszt aminokwasowych polipeptydów);

**Fosforylacji** (polega na przeniesieniu końcowej grupy fosforanowej z ATP na atom tlenu grupy hydroksylowej, specyficznej reszty aminokwasowej: Ser, Thr, Tyr; zmiana strukturalna białka może istotnie zmienić jego aktywność, aktywność katalityczną, wiązanie substratu, jeśli fosforylowanym białkiem jest enzym);

**Karboksylacji** (karboksylacja reszt glutaminianu i  $\gamma$ -karboksylglutaminianu w białkach uczestniczących w krzepnięciu krwi dostarcza miejsc wiążących jony  $\text{Ca}^{2+}$  przekształcając je ze słabych chelatorów w silne);

**Acetylacji** (acetylazy przenoszą resztę acetylową z acetylo-CoA na grupę  $\epsilon$ -aminową łańcucha bocznego lizyny);

**Metylacji** (reakcje katalizowane przez metylotransferazy, które przenoszą grupę metylową z aktywnego donora (S-Adenozylometioniny lub betainy) na akceptor);

**Nitrowaniu** (aminokwasy aromatyczne ulegają nitrowaniu tworząc nitrowe pochodne);

**Acylacji** (chemicznej modyfikacji białek, w wyniku której rozpuszczone cytoplazmatyczne białko uzyskuje właściwości hydrofobowe, z grupą  $-\text{acyl}$ , która umożliwi zaczepienia białka w błonie; przykładem acylacji są reakcje mirytsylacji i palmitylacji);

**Hydroksylacji** (dioksygenazy wbudowują jeden atom aktywnego tlenu cząsteczkowego w substrat, czyli lizynę lub prolinę z wytworzeniem grupy  $-\text{OH}$ , tworząc odpowiednio 5-OH-lizynę i 4-OH-prolinę).



# Metody stosowane do analizy białek:

**„Blotting białek” – metoda umożliwiająca analizę białek przy użyciu odpowiednich, znakowanych przeciwciał, które są specyficzne i nie zawsze dostępne;**

**Elektroforeza – rozdział białek w zależności od ich masy na żelu poliakrylamidowym;**

**Spektrometria (spektrometr typu potrójny kwadrupol) – ZŁOTY STANDARD W PROTEOMICĘ – białko w postaci zjonizowanej przenoszone jest do części spektrometru znajdującej się pod wysoką próżnią, w której znajdują się analizatory masy; służą one do rozdzielania jonów na podstawie ich stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ).**

# Oznaczanie i identyfikacja białek obejmuje:

- przygotowanie próbki i hydrolizę białek;
- rozdział białek na elektroforezie;
- identyfikację białek za pomocą tandemowej spektrometrii mas MS/MS, która umożliwia: a/ oznaczanie wybranych sekwencji aminokwasowych białka lub peptydu, b/ bezpośrednią identyfikację błędnej sekwencji aminokwasowej, c/ modyfikacje białek
- ilościowe oznaczanie białek z wykorzystaniem stabilnego izotopu

Na podstawie porównania dużej grupy związków białkowych w jednej analizie u zdrowych i chorych pacjentów można określić „odcisk palca” choroby, co oznacza specyficzne zastosowanie konkretnych markerów białkowych dla danej choroby

Taki wzór ekspresji, któremu towarzyszy odpowiedni fenotyp kliniczny stanowi alternatywę dla dotychczasowych metod polegających na oznaczaniu pojedynczych markerów

Rozwój diagnostyki proteomicznej i metabolomicznej umożliwia przewidywanie, prognozowanie, zapobieganie i zastosowanie odpowiedniego leczenia celowanego???

Proteomika i metabolomika dostarczają ważnych klinicznie biomarkerów, które umożliwiają poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za nieprawidłowy fenotyp kliniczny i biochemiczny;

Zarówno badanie metabolomu jak i proteomu w różnym materiale biologicznym jest obiecującym narzędziem w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób, monitorowaniu i prognozowaniu przebiegu leczenia oraz indywidualnego podejścia do pacjenta charakterystycznego dla medycyny spersonalizowanej





**DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ**

