



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA

BIOTEKNOLOGIA

ClpB proteina: informazio-bilketa eta proteomika ituratuaren bidez aztertze-ko esperimentuaren diseinua

Ikaslea: *Dublang Irazabal, Leire*

Data: 2014ko ekaina

Zuzendaria
Dr. Miren Josu Omaetxebarria Ibarra

Ikasturtea
2013/14

AURKIBIDEA

LABURPENA.....	iii
1. SARRERA	
1.1. ClpB proteina.....	1
1.2. Proteinen gaineko ikerketa proteomikaren eskutik.....	5
1.2.1. Eskala handiko proteomika (<i>Shotgun proteomics</i>).....	6
1.2.2. Proteomika ituratua (<i>Targeted proteomics</i>).....	9
1.2.2.1. Proteomika ituratua bereizmen altuko eta masa-zehaztasun handiko instrumentazioan: PRM.....	12
2. HELBURUAK.....	16
3. MATERIALAK ETA METODOAK.....	17
3.1. Baliabide bioinformatikoak.....	17
3.1.1. Sarekoak.....	17
3.1.2. Programak.....	18
3.2. Peptido proteotipikoak identifikatzea.....	19
3.3. Peptido proteotipikoak hautatzeko irizpideak.....	19
3.4. ClpB proteina purifikatua.....	19
3.5. <i>E. coli</i> MC4100 proteina erauzkina.....	20
3.6. Geleango (<i>in-gel</i>) liseriketa eta peptidoen erauzketa.....	20
3.7. Proteina-erauzkineko proteinen prezipitazioa.....	21

3.8. Soluzioango (<i>in-solution</i>) liseriketa.....	21
3.9. Peptido nahasketaren C18 zeharreko garbiketa.....	22
3.10. Masa espektrometria eta datuen analisia.....	22
3.10.1. Masa espektrometria.....	22
3.10.2. Datuen analisia.....	23
4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	24
4.1. Peptido proteotipikoen hautaketa.....	24
4.1.1. <i>In silico</i> bideratutako hautaketa.....	24
4.1.2. Esperimentalki bideratutako hautaketa.....	29
4.2. PRM esperimentua.....	34
4.3. <i>E. coliren</i> erauzkin osoarekin egindako <i>shotgun</i> esperimentua.....	41
5. ONDORIOAK.....	43
6. BIBLIOGRAFIA.....	44

LABURPENA

Zelulen bizi zikloan zehar zein inguruneko estimulu edo erasoen aurrean, geneek adierazpenean aldaketak pairatzen dituzte; proteinen sintesia beraz, prozesu dinamikoa da. Proteomikak izugarritzko jauzia suposatu du egoera ezberdinetan sintetizatzen diren proteinen inguruko ezagutzan. Hasiera batean esfortzu gehienak identifikaziora bideratzen ziren arren, azken hamarkadetan identifikazioaz gain, kuantifikazioak indar handia hartu du. Hala izanik, gaur egun ikerkuntza arloan lagin biologiko konplexuetako proteinen identifikazio eta kuantifikazioa bereizmen handiz eta era errepikakorrean burutzeko metodoen behar handia dago. Proteomika diziplina sortu zenetik eta berrikuntza teknologikoez lagunduta, geneen adierazpen mailaren, isoformen eta itzulpen ondoko eraldaketen inguruko geroz eta informazio gehiago lortzen den arren, egunera arte erabilitako metodo guztiek zenbait muga edo traba agertzen dituztela ukalezina da. 2D geletako proteinen analisiarekin hasi eta masa espektrometrian oinarritutako eskala handiko proteomikatik igarota, gaur egun masa espektrometrian oinarritzen den eta puri-purian dagoen proteomika ituratura heldu gara. Azken hurbilketa honek lagin konplexuetan bereizmen eta espezifikotasun handiz, interesekoa den proteina jakin bat edo batzuk identifikatu eta kuantifikatzeko aukera eskaintzen du. Proteomika ituratua SRM (*Single Reaction Monitoring*) teknikaren eskutik agertu zen arren, gaur egun PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) teknika ari da aurrekoarekiko gailentzen are bereizmen eta sentikortasun handiagoa eskaintzen baitu. Testuingurua hau izanik, aurkezten den lan honetan, *Escherichia coli*ren (*E. coli*) ClpB proteinaren identifikazioa burutzeko PRM bidezko esperimendu bat diseinatu da. Batetik, proteina honen jarraipena egiteko erabiliko diren peptido proteotipikoen aukeraketa eskala handiko MS/MS esperimenduen bidez zein eskuragarri dauden datu-baseak erabilia burutu daitekeela frogatu da. Bestetik, PRM esperimendua lagin konplexu batekin burutu eta hautatutako peptidoak behatu daitezkeela ikusi da. Are gehiago, lortutako emaitzei erreparatuta, peptidoen aukeraketa esperimenduaren arrakastarako faktore erabakigarria dela ondorioztatu da. Gainera, proiektu honetan aurkezten den lanarekin, orain arteko biokimikako beste teknikek eskatzen duten lan eskerga ekiditen da. Hortaz, PRM teknika lagin konplexuetan inolako frakzionamendu, purifikazio edo aberastasun pausorik gabe intereseko proteina baten kuantifikazioa burutzeko metodo egokia dela frogatu da.

1. SARRERA

1.1. ClpB PROTEINA

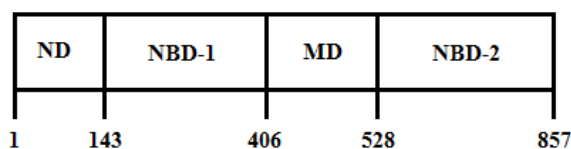
ClpB proteina bakterioen Hsp100 txaperoi molekularren familiako proteina zitoplasmatikoa da (Park *et al.*, 1993; Schirmer *et al.*, 1996). Hsp100 proteina-familia halaber AAA+ ATPasen superfamiliaren baitan kokatzen da (Neuwald *et al.*, 1999; Hanson eta Whiteheart, 2005).

Hsp100 familiako proteinen zeregin nagusia agregatutako proteinak solugarri bihurtu eta jatorrizko egoerara bueltatzea da, euren aktibitatea berreskura dezaten. Agregatuak hiru dimentsiotako egitura partzialki edo guztiz galdu duten proteinen arteko elkarketak dira (Fink, 1998; Horwich, 2002; Dobson, 2004; Rousseau *et al.*, 2006). Proteinen tolesdura edota destolesdura prozesuak itzulgarriak diren bitartean, agregatuen kasuan ez da horrelakorik gertatzen eta behin hauek eratuta ez dago jatorrizko egoerara bueltatzerik, baldintza natiboetan behintzat. Hau honela izanik, agregatuek geroz eta tamaina handiagoa hartzen dute eta geroz eta solugaitzagoak izanik jalkitzeko joera dute. *In vivo*, agregatzeko bidean dauden edota 3. mailako egitura galdu duten proteinak proteasek degradatuko dituzte (Wickner *et al.*, 1999; Ciechanover, 2005). Gehiegizko agregazioaren kasuan berriz, proteasen bidezko makineria desorekatu egin daiteke, honek ondorio latzak eragin ditzakeelarik, tartean zelularen heriotza (Bence *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2005). Honekin lotuta, hainbat zelula-patologia zein giza gaixotasun agregatuen pilaketekin erlazionatuta daudela argitaratu da, besteak beste; Alzheimer, Huntinton eta Parkinson gaixotasunak (Horwich, 2002). Proteina-agregatuek eguneroko ikerkuntzan ere trabak eragin ditzakete; esaterako, proteina birkonbinatuen ekoizpenerako industrian, bioteknologia arloan...

Proteina-agregatuei zein proteinen tolesdura desagoki edo ezari aurre egiteko, zelulek txaperoi molekular izeneko proteinak sintetizatzen dituzte. Hsp 100 familiako proteinek eta tartean ClpB proteinak txaperoi molekular gisa jokatzen dute (Hartl *et al.*, 2001; Bukau *et al.*, 2006). Hsp (*heat shock protein*) 100 txaperoi molekularrak bakterio, legamia, eta landareetan agertzen dira, ez ordea animalietan (Zolkiewski *et al.*, 2012). Euren izenak adierazten duen bezala, bero-estresen aurrean

erantzuten duten proteinak dira; baldintza hauetan zelularen bideragarritasuna mantentzen dutelarik. Zelularen egoera fisiologiko arruntean, ez dira biziraupenerako ezinbestekoak baina bero-estresaren aurrean behar-beharrezko bilakatzen dira (Squires *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1992; Queitsch *et al.*, 2000).

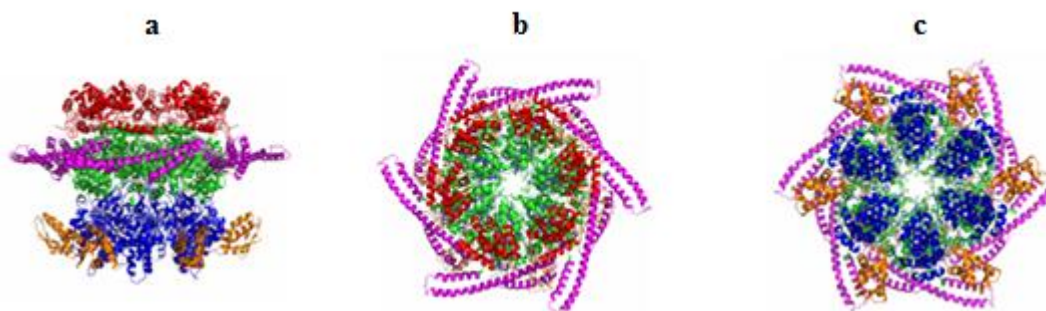
Aurretik aipatu bezala, ClpB kide den Hsp100 proteina-familia AAA+ (*ATPases associated with various cellular activities*) superfamiliako kidea ere bada (Neuwald *et al.*, 1999; Hanson eta Whiteheart, 2005). Superfamilia honetako proteinak organismo eukarioto zein prokariotoetan agertzen dira eta prozesu askotan parte hartzen dute; hala nola, mintzerainoko besikulen garraio eta fusioan, DNAREN erreplikazio eta konponketan, zitoeskeletoaren erregulazioan edota proteinen degradazio, birtolesdura edo agregatuaren ezabapenean. Funtzio hauek guztiak betetzeko beharrezko energia ATParen hidrolisitik lortzen dute, hidrolisian askatutako energia substratutzat dituzten makromolekulen egitura aldaketak eragitera bideratuko delarik (Zolkiewski *et al.*, 2012).



1. irudia. ClpB proteinaren egitura *E. coli*n. Amino muturra (ND), ATPa lotzeko NBD-1 modulua, erdiguneko coiled-coiled domeinua (MD) eta ATPa lotzeko bigarren domeinua (NBD-2).

ClpB proteina 857 aminoazidoz osatuta dago. AAA+ familiakoa izanik eta egiturari (1. irudia) dagokionez, ATPa lotzeko bi modulu ditu, NBD-1 eta NBD-2, bakoitza 250 aminoazido inguruko luzerakoa (Barnett *et al.*, 2000). Bi modulu hauen artean, funtzio ezezaguneko *coiled-coil* domeinu bat dago, beste AAA+ ATPasa batzuetan ez bezala (Kedzierska *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2005). Proteinaren amino muturreko 150en bat aminoazidok, substratuarekiko afinitatea bideratzen dute (Barnett *et al.*, 2005). ClpB proteinaren forma aktiboa homohexamerikoa da non sei monomerok eratzun itxuradun poliproteina egituratzen dute (Akoiev *et al.*, 2004) (2.

irudia). Proteina agregatuak 2. irudiko (b) eta (c)-n ikus daitekeen eraztunaren erdiguneko hutsunetik translokatu ahala desegingo dira (Weibezahn *et al.*, 2004).



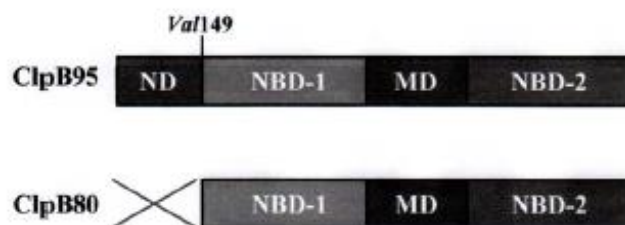
2. irudia. *E. coli*ren ClpB-ren forma hexamerikoa. Poliproteinaren egitura ereduia albo batetik (a), goitik (b) eta behetik ikusita (Zolkiewski *et al.*, 2012) artikulutik hartua).

Agregatuak desegiteko proteina honen akzioak birulentzia-faktore gisa joka dezake (Krajewska eta Kędzińska-Mieszkowska, 2014). Bakterio patogenoek infekzio bat eragiten dutenean estrespean aurkitzen dira ostalariak estres baldintza horiek ezartzen baititu defentsa gisa. Gertaera honen ondorioz patogenoaren baitan proteina-agregatuak sortzen dira. Agregatu hauek desegin eta proteinak berraktibatzeo, bakterioaren ClpB proteina gainadierazi egingo da infekzioa aurrera eramatea ahalbidetuz (Krajewska eta Kędzińska-Mieszkowska, 2014).

ClpB-k bideratutako proteinen berraktibazioa, DnaK/DnaJ/GrpE txaperoi molekularren sistemarekin elkarrekintzan burutzen da (Goloubinoff *et al.*, 1999; Motohashi *et al.*, 1999; Zolkiewski, 1999). Izan ere, proteina agregatuek ClpB-ren eraztunean zehar translokatu ahala euren egitura galduko dute eta eraztunetik pasatakoan destolestuta egongo dira. Desegituratutako proteina hauen egitura aktiboa berreskuratzeko beraz, beste txaperoi molekular batzuen lankidetzaz beharrezkoa izango da (Glover eta Lindquist, 1998; Goloubinoff *et al.*, 1999). Gainera, txaperoi molekular laguntzaile hauen akzioa ez da agregatua ClpB-tik pasa ostera mugatzen, aurretik ere, badute zeregina eta (Acebron *et al.*, 2009).

ClpB proteinak nola edo hala tolestutako proteina aktiboak eta proteina-agregatuak bereizteko gaitasuna izan behar du. Proteina-agregatuek, degradaziora bideratuta dauden proteinek ez bezala, ez daukate inolako markarik euren patuaren erakusle gisa. Ondorioz, ClpB-k egokiro tolestutako proteinetan agertzen ez diren eta proteina-agregatuen gainazalean azaltzen diren motiboak ezagutu beharko ditu. Proteina-agregatuen motibo horien ezaugarri fisiko-kimikoak ez dira ezagunak oraindik. Hala ere, badirudi ClpB proteinak positiboki kargaturiko eta aromatikoak diren aminoazidoetara lotzeko joera duela (Schlieker *et al.*, 2004).

Lan honetan *E. coli*ren ClpB proteina da aztergai. *E. coli*k, ClpB-ren bi isoforma sintetizatzen ditu (Nagy *et al.*, 2010), bata luzera osoko ClpB95 izenekoa (forma kanonikoa) eta bestea amino muturreko 148 aminoazidoak ez dituen ClpB80 forma motza (3. irudia). ClpB95 eta ClpB80 isoformek elkarrekin heterohexameroak eratzen dituzte eta modu sinergikoan elkarrekintzan dihardute, honela proteina-agregatuen berraktibazio jarduera hobetzen delarik (Nagy *et al.*, 2010).



3. irudia. Domeinu ezberdinen banaketa ClpB95 eta ClpB80 isoformetan. ND amino muturreko domeinua, NBD-1 eta NBD-2 ATPa lotzeko domeinua eta MD erdiguneko *coil-coiled* domeinua (Krajewska *et al.*, 2014) artikulatik hartutako irudia). ClpB80 isoforma motzak amino muturrean 148 aminoazido gutxiago ditu.

Bero-estresaren aurrean heterohexameroak osatuz azaltzen diren luzera osoko ClpB zein ClpB motzen proportzioak aldakorrak dira (Chow eta Baneyx, 2005). Interesekoa da beraz, isoforma bien adierazpen-mailaren ideia edukitzea, nolabait kuantifikatzea. Bestalde, aurretik aipatu bezala txaperoi molekular honek DnaK/DnaJ/GrpE txaperoiekin elkarrekintzan dihardu. Gaur egunera arte proteina hauen arteko erlazio sareen osaketa ez dago argi eta esparru honek ere proteina-

agregatuen berraktibazioaren ezagutzan sakontzeko ikerkuntzarako arlo zabala eskaintzen du.

1.2 PROTEINEN GAINKO IKERKETA PROTEOMIKAREN ESKUTIK

Proteoma eta proteomika kontzeptuak sortu zirela hogeitaz hamar urte izango dira (Wilkins *et al.*, 1996). Lehen termino honek, baldintza jakinetan zelula, ehun edo organismo batean adierazten diren proteina guztiak barne hartzen ditu. Bigarrenak berriz, proteoma ikasten duen diziplinari egiten dio erreferentzia. Genoman kodetutako sekuentziak non, zein baldintzatan eta zein kopurutan adierazten diren aztertzen duen jakintzagaia dugu proteomika. Izena hain zuzen ere, genoma hitzarekin analogia ezartzearen aukeratu zen. Hasieran erronka proteinen identifikazioa zen; lagin batean ahalik eta proteina gehien hautematea. Urteak igarota ordea, kuantifikaziorako bidea hartu zen (Ong eta Mann, 2005). Lagin batean dauden proteinak zeintzuk diren jakiteaz gain, zein kopurutan aurkitzen diren determinatzea ere premiazko bihurtu zelarik. Interes horiek guztiek, gure artean jarraitzen dute; alde batetik, egoera konkretu batean sintetizatzen den proteina kopurua ezagutzeak berebiziko garrantzia dauka. Jakina denez, gaixotasun askoren oinarrian proteina baten falta baino, urritasuna edo ugaritasuna egoten da. Bestetik, estimulu zein farmako desberdinen aurrean zelulek euren proteina mailan zein aldaketa jasaten dituzten jakiteak ikerkuntzarako interes handia du. Argi dago beraz, proteinen identifikazioa eta kuantifikazioa burutzeak izugarritzko garrantzia duela gaur egun biomedikuntza arloan.

Proteinen gaineko ikasketak hasi zirenetik gaur egunera, identifikazio eta kuantifikazio metodoek garapen nabaria jasan dute. Urte askotan zehar, Western plapaketa izan da metodorik erabiliena (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981). Afinitatean oinarritutako metodoa dugu hau, zeinetan antigorputzen bidez proteinak detektatu eta kuantifikatzen dira. Dena dela Western plapaketak zenbait muga ditu bereziki antigorputzen erabilerari dagokienez. Izan ere, antigorputzen espezifikotasuna askotan ez da proteina baten isoformak bereizteko bezain zehatza

edota polimorfismo edo mutazioek eragindako sekuentzia aldaketak identifikatzeko gai (Liebler eta Zimmerman, 2013).

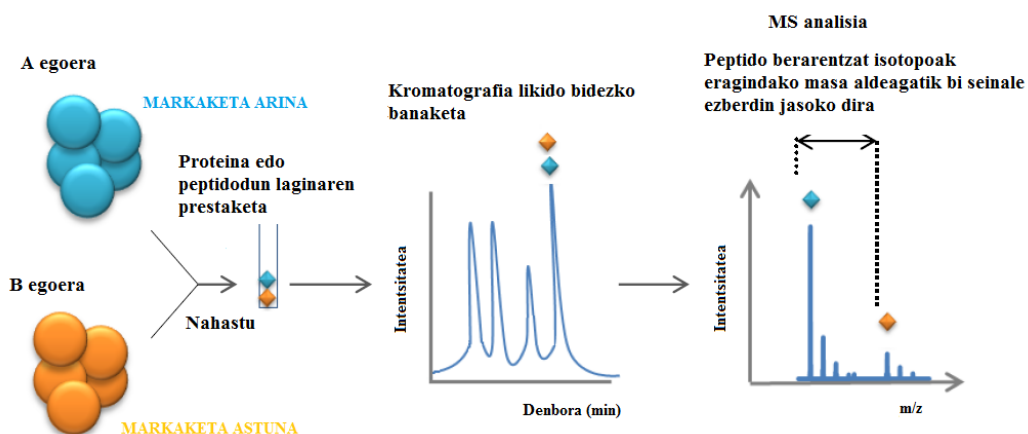
Mende berriarekin batera, 2 dimentsiotako (2D) geletan oinarritutako irudi analisiaren erabilera hasi zen (Wilkins *et al.*, 1996). Bi dimentsiotako gel elektroforesian lagin bateko proteinak euren masa eta puntu isoelektrikoaren arabera banatzen dira. Informazio honetan oinarrituz identifikazioa burutu daiteke eta gelaren tindaketa emanez gero kuantifikazioa egin daiteke bi edo lagin gehiagoren emaitzen intentsitateak alderatuz. Dena dela, geletan oinarritutako teknikak errepikakortasun arazoak ematen dituzte eta proteoma jakin bateko proteina guztiak ondo ikustea ez da batere erraza izaten, bereziki mintzeko eta organuluetao proteinei dagokienez (Anderson *et al.*, 1998; Corthals *et al.*, 2000). Western plapaketa eta 2D geletan oinarritutako metodoak oraindik erabiliak badira ere, masa espektrometrian oinarritutako teknikak agertu zirenetik aurreko biak argi eta garbi gainditu dira (Aebersold eta Mann, 2003). Proteomika eta masa espektrometria bata bestea elikatuz joan dira gaur eguneko garapen mailara helduz. Urtetik urtera ekipoetan emandako berrikuntza teknologiko etengabeek arlo honen bultzada jarraitua ahalbidetu dute. Masa espektrometria proteinen kuantifikaziorako erabiltzean abiadura, bereizmena, espezifikotasuna eta hautakortasuna izugarri areagotzen dira (Bantscheff *et al.*, 2012). Aurrerapen hauek guztiek mesede handia egin diote proteomika kuantitatiboari. Izan ere, ikertzen diren proteoma gehienak oso konplexuak dira eta eskuragarri den lagin biologiko kopurua murrizta da kasu askotan. Masa espektrometrian oinarrituta, gaur egun eskala handian egindako proteomika (*shotgun proteomics*) eta proteomika ituratua (*targeted proteomics*) egin daiteke.

1.2.1. Eskala handiko proteomika (*Shotgun proteomics*)

Eskala handiko proteomikan lagin baten ehunka zein milaka proteinen identifikazioa eta kasuan kasuko zehaztasunez hauen kuantifikazioa burutu ohi da (Aebersold eta Mann, 2003). Lagin bateko proteinen kuantifikazioa burutzeko orduan, estrategia

desberdinak erabili daitezke. Alde batetik, markaketa isotopikoa dago baina baita markarik gabeko hurbilketak ere badira, *label-free* izenekoak hain zuzen ere.

Markaketa isotopikoa erabiltzen deneko hurbilketetan (4. irudia) isotopo egonkorak erabiltzen dira. Isotopoak erabiltzean, aztergai den proteina edo peptidoaren ezaugarri fisiko-kimikoak ia ez dira aldatzen. Ondorioz, masa espektrometroan emandako seinale intentsitatea berdintsua izango da baldin eta markadun eta berdina den markarik gabeko peptidoa kantitate berdinean badaude (Leenheer eta Thienpont, 1992). Aldaketa bakarra, peptidoaren masan emango da (isotopoen arteko aldea, atomoak dauzkan neutroi kopuruan datza).

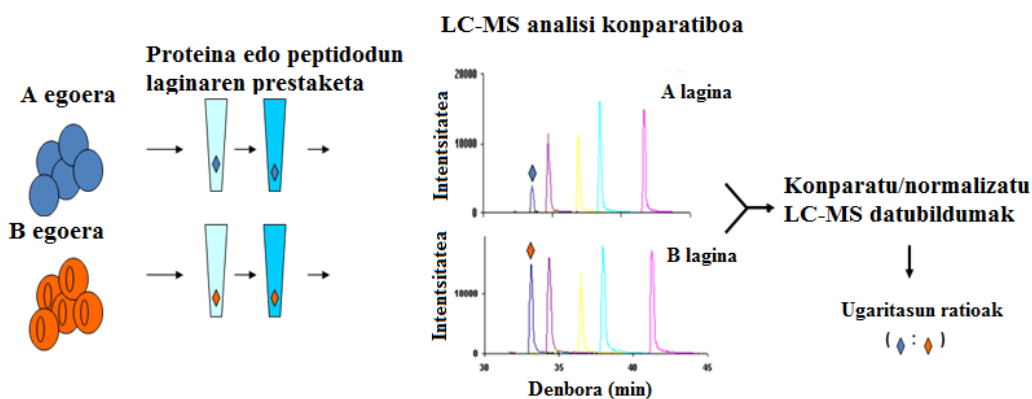


4. irudia. Isotopo egonkorren markaketan oinarritutako kuantifikazioa. Lagin bateko proteinek ez dute inolako aldaketarik pairatzen (markaketa arina, naturala da), beste lagin bateko proteinek berriz isotopo egonkordun erreaktibo edo aminoazido bat dute (markaketa astuna). Behin markaketa burututa, bi laginak nahastu eta elkarrekin analizatuko dira. Kromatografia likidoan elkarrekin eluituko duten arren, masa espektrometrian bakoitzak seinale bat emango du (Jensen, 2006) artikulutik moldatua).

Isotopoen bidezko markaketa, metabolikoa zein kimikoa izan daiteke. Markaketa metabolikoan, orokorrean zelulen hazkuntzei isotopikoki markatutako arginina zein lisina [^{13}C , ^{15}N] aminoazidoak gehitzen zaizkie, teknika honi SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids cell Culture*) deritzo (Ong *et al.*, 2002). Zelulek proteinen sintesia burutu ahala aminoazido hauek gehituko dituzte eta aurrerago proteinen liseriketa triptikoa ematean peptido bakoitzak isotopikoki markaturiko aminoazido

bat behintzat izango duela ziurtatuko da (tripsinak arginina eta lisina osteko lotura peptidikoa moztzen du). Kuantifikazioa burutzeko, isotopikoki markaturiko eta markatu gabeko zelula hazkuntzak eduki behar dira. Bietako proteinak liseritu eta peptidoak kromatografian banatu ondoren masa espektrometroan analizatuko dira. Markaketa kimikoa, *in vitro* egindako markaketa da. Sintetizaturiko proteinen amino muturrean zein lisinen ϵ amino taldean eraldaketak burutzen dira isotopo egonkorrek erantsiz. Markaketa kimikoko metodorik ezagunenetakoa bat iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) da (Ross *et al.*, 2004; Wiese *et al.*, 2007). Markaketarako etiketa isobarikoak erabiltzen dira, hau da, etiketa guztiek masa bera dute baina masa espektrometroan hauen fragmentazioa ematean, masa ezberdineko talde erreportariak askatuko dituzte.

Markarik gabeko eskala handiko kuantifikazioan (*label-free quantification*) ez da isotoporik erabiltzen (5. irudia). Proteina kopurua zuzenean peptidoek masa espektrometroan emandako intentsitateak ondorioztatu daiteke (Bondarenko *et al.*, 2002; Chelius eta Bondarenko, 2002). Horretarako, izaera berdina baina egoera desberdinetan aurkitzen diren laginak masa espektrometroan analizatu eta peptido bakoitzak emandako intentsitateak alderatuko dira.



5. irudia. Markarik gabeko kuantifikazioa (*label-free quantification*). Bi egoera desberdinetako laginak LC-MS bidez analizatuko dira. Aztergai den peptidoak erretentzio denbora bera izango du bi kasuetan beraz A eta B egoeretako espektrora alderatu ahal dira. Jasotako peptidoaren seinalearen intentsitatean oinarrituz, peptidoaren ugaritasun ratioa kalkula daiteke (Jensen, 2006) artikulutik moldatua).

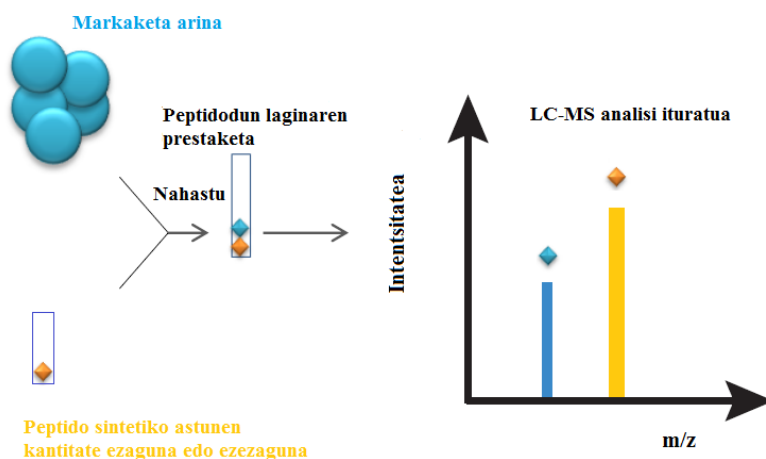
1.2.2. Proteomika ituratua (*Targeted proteomics*)

Eskala handiko hurbilketek aukera ematen dute lagin bateko proteina ia guztien (guztiak ez badira) identifikazioa burutzeko, baina denbora zein baliabide eskerga behar izan ohi da eta askotan emaitzak ez datoz bat ikertzailearen helburuekin (Picotti *et al.*, 2013). Izan ere, kasu ugarian eskala handiko tekniken bidez identifikatutako proteina guztien proportzio txiki bat baino ez da ikertzailearen interesekoa izaten. Gainera, ugariak diren peptidoak erraz kuantifikatu daitezkeen bitartean, kopuru txikiagoan aurkitzen direnak identifikatu eta kuantifikatzea zaildu egiten da. Are gehiago, eskala handiko saioen bidez lagin bat baino gehiago alderatu nahi izanez gero, baliteke kasu batzuetan intereseko peptidoaren emaitzarik ez jasotzea eta ikerkuntza aurrera ezin eramatea (Li *et al.*, 2010). Proteomika ituratuan berriz, proteina jakin baten edo batzuen kuantifikazioa burutuko da modu errepikakor eta zehatz batean, horretarako intereseko proteina edo proteinen peptido proteotipikoak monitorizatuko direlarik (Liebler eta Zimmerman, 2013). Teknika ituratuetan, lagin konplexuak erabiltzen dira eta ez purifikatuak, beraz peptidoen aukeraketa erabaki mugatzailea izango da esperimentera ondo burutu dadin. Peptido proteotipikoak intereseko proteinaren esklusiboak izateaz gain, detektatzeko zailtasun handiegirik aurkezten ez dutenak izango dira, jakina baita euren ezaugarri fisiko-kimikoek zerikusi handia dutela peptidoak detektatzeko orduan (Kuster *et al.*, 2005; Mallick *et al.*, 2007). Horren gaineko informazioa jasotzeko aukera bat, era esperimentalean aztergai den proteina purifikatuarekin MS/MS esperimentu bat burutzea da. Dena dela, hau ez da beti posible izaten eta kasu hauetan alde aurretik beste ikertzaile taldeek burututako esperimentuen emaitzak har daitezke oinarri gisa. Era honetan errepikakorrak eta seinale intentsuak ematen dituzten peptidoak zeintzuk diren jakin ahal izango da.

Teknika ituratuak peptidoen detekzio sentikorra eta kuantifikazio zehatzagoa eskaintzen dute, era honetan proteinatik eratorritako peptidoen kuantifikazioan oinarrituta proteina kuantifikatzea lortuko da (Kuhn *et al.*, 2004; Anderson eta Hunter, 2006; Picotti *et al.*, 2009). Teknika ituratuen abantailetariko bat eskala handiko teknikekin alderatuz gero, peptido zehatzen jarraipena burutu ahal izatea da. Bestetik, saio bakar batean peptido ugariaren jarraipena egin ahal izango da eta

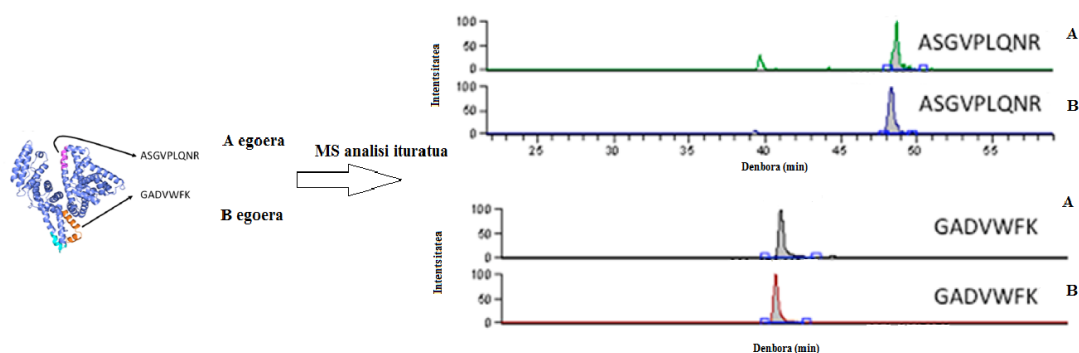
ondorioz proteina bat baino gehiago kuantifikatuko dira aldi berean (Liebler eta Zimmerman, 2013).

Proteomika ituratuan oso baliagarria da isotopikoki markatutako peptidoak erabiltzea. Kuantifikaziorako teknikarik erabiliena, SID (*Stable Isotope Dilution*) (6. irudia) da (Liebler eta Zimmerman, 2013). Isotopo egonkorak erabiliz, aztergai diren peptidoen analogoak diren peptido astunak sintetizatzen dira. Peptido astun hauek orokorrean [$^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$] lisinak edo [$^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$] argininak dituzte. Erreferentziazko peptido hauek aztergai den lagin liserituarekin batera analizatuko dira masa espektrometroan. Monitorizatuko diren peptidoekin batera beraz, isotopikoki markaturikoen emaitzak ere jasoko dira. Izan ere, bi peptido mota hauek kromatografia likidoan elkarrekin eluituko dute, aurretik aipatu bezala euren ezaugarri fisiko-kimikoak oso antzekoak direlako (Leenheer eta Thienpont, 1992). Peptido arinek eta peptido astun homologoek fragmentazio-patroi bera izango dute baina fragmento astunek arinekiko, isotopoak emandako masa aldea azalduko dute. Gertaera honek peptido markatuen eta markatu gabeen artean bereizteko aukera emango du.



6. irudia. Peptido astunen bidezko kuantifikazioa proteomika ituratuan. Aztergai den lagina monitorizatuko den peptido sintetiko analogoaren kantitate ezagun (kuantifikazio absolutua) edo ezezanunarekin (kuantifikazio erlatibo) nahastu eta LC-MS bidez analizatuko da.

Eskala handiko proteomikan bezala, proteinen kuantifikazioa markaketarik gabe (7. irudia) ere burutu ahal izango da (Rinner *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2010). Estrategia honen funtsean zenbait laginetan proteina bati dagokion peptidoa monitorizatzea egongo da. Behin emaitzak jasota lagin bat bestearekiko alderatu eta laginen arteko proteina jakin baten kuantifikazio erlatiboa burutu ahal izango da.



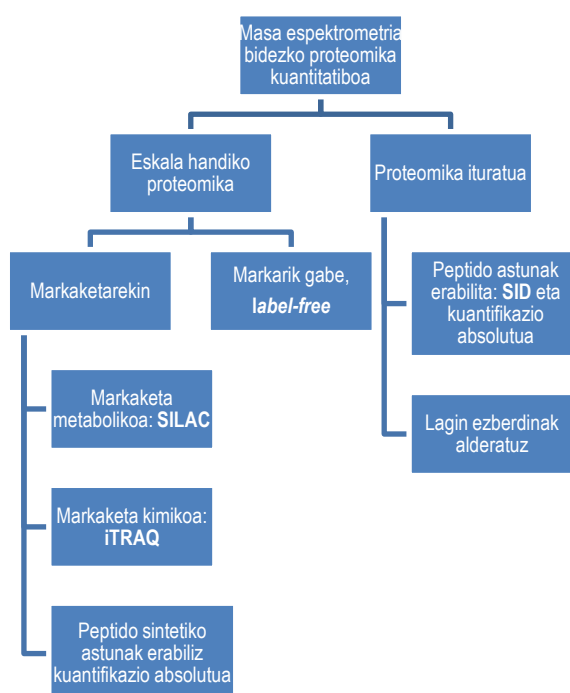
7. irudia. Markarik gabeko kuantifikazioa proteomika ituratuan. Aztegi den proteinaren jarraipena egiteko peptidoak aukeratu eta bi egoera ezberdinetako laginetan jasotako seinalea alderatu daiteke kuantifikazio erlatiboa burutuz (Liebler eta Zimmerman, 2013) artikulutik moldatua).

Bai *shotgun* zein teknika ituratuen bidez kuantifikazio absolutua zein erlatiboa burutu daiteke, beti ere kasuan kasuko interesen arabera. Kuantifikazio erlatiboan, egoera desberdin bi edo gehiagotako intereseko proteina jakin bat edo batzuen kantitateak alderatzen dira. Jasotako emaitzak kualitatiboak dira, egoera zein lagin desberdinetan proteina kopuruan dauden aldean inguruko informazio orokorra jasotzeko egokiak. Hala ere, zenbait kasutan interesekoa izan daiteke proteinen kantitate zehatza ezagutzea eta horretarako, kuantifikazio absolutua ezinbestekoa da (Ong eta Mann, 2005).

Balio absolutuak jaso nahi diren kasuetarako, beste metodo batzuk jarraitu behar dira. Isotopikoki markaturiko peptido jakinen kopuru zehatzak estandar gisa erabil daitezke aztergai diren peptidoen (eta inferentziaz proteinen) kuantifikazio absolutua burutzeko masa espektrometrian ematen duten seinale intentsitateak alderatuz (Gerber *et al.*, 2003; Kirkpatrick *et al.*, 2005). Kuantifikatu nahi diren proteinetatik

eratorritako peptido proteotipikoak identifikatu eta sintetizatu egiten dira aminoazido astunak edo isotopo egonkordun etiketak erantsita. Aztergai den lagin liserituari peptido astunen kantitate zehatz eta ezagun bat gehitu eta masa espektrometroan analizatuko da. Ondoren, peptido endogeno eta astunen seinaleak alderatuko dira eta azken hauen kantitatea ezaguna izanik, peptido endogenoarena ere ondorioztatuko da.

Jarraian, orain arte aipatutako tekniken laburpen eskematikoa ikus daiteke (8. irudia).



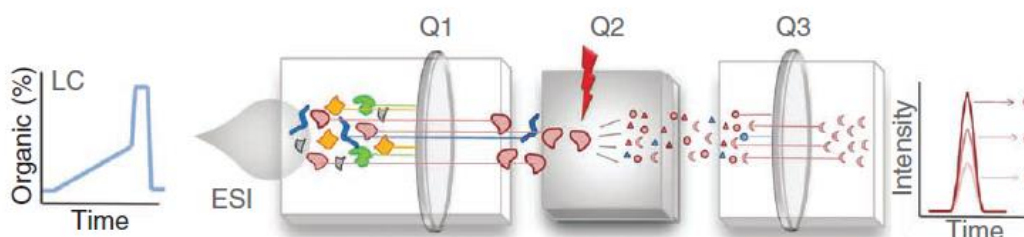
8. irudia. Masa espektrometrian oinarritutako kuantifikazio tekniken eskema.

1.2.2.1. Proteomika ituratua bereizmen altuko eta masa-zehaztasun handiko instrumentazioan: *Parallel Reaction Monitoring* (PRM)

Proteomika ituratuko hurbilketen artean, SRM (*Selected Reaction Monitoring*) teknirik erabiliena da (Anderson eta Hunter, 2006; Picotti eta Aebersold, 2012). SRMa, masa espektrometrian oinarrituta dago eta alde zuzenetik aukeratutako eta fragmentazio ezaugarri ezaguneko analito zehatzak lagin konplexuetan detektatu eta

kuantifikatzeko erabilia da. SRMrako sistema orokorrean kromatografia likidoko eta jarraian masa espektrometriako ekipoez osatuta egoten da. Erabilitako masa espektrometroa *triple quadrupole* (QQQ) delakoa da. Honek aukera ematen dio masa espektrometroari iragazi bezala jokatzeko. Hau da, espresuki hautatutako analitoa monitorizatzeko gai da eta baita analito honen talkaren ondoriozko disoziazioz sortutako fragmentu-ioi bat edo gehiagoren jarraipena egiteko (Kondrat *et al.*, 1978; Yost eta Enke, 1978; Yost eta Enke, 1979). Denboran zehar, masa espektrometroko detektagailuak aukeratutako fragmentu-ioiak neurtuko ditu ioi aitzindariarekin batera (analitoa). Ioi aitzindari eta fragmentu-ioi bikote bakoitzari SRM trantsizio deritza.

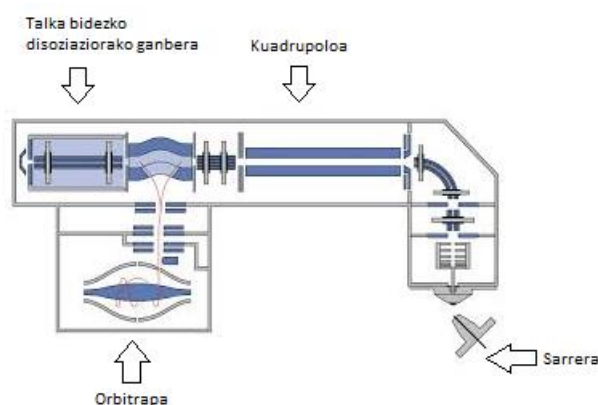
Masa espektrometroan aztergai den laginaren liseriketaren ondorioz sortutako peptidoak analizatzeko dira (9. irudia). Masa espektrometroak daukan lehen analizatzailean zehar, Q1, intereseko proteinaren ordezkotzat hautatu den peptidoaren masa edo antzekoa duten ioiak igaroko dira. Jarraian, ioi hauetatik talka bidezko disoziazioz fragmentu-ioiak sortuko dira Q2an. Bukatzeko, aukeratutako peptidotik eratorritako hiruzpalau fragmentu-ioiek baino ez dute igaroko Q3 analizatzailea (Kuhn, *et al.*, 2004; Lange *et al.*, 2008). Hau da, aurretiaz determinatutako trantsizio jakinen seinaleak baino ez dira jasoko.



9. irudia. *Triple quadrupole* masa espektrometroan egindako SRM esperimentuaren eskema. Lagina osatzen duten peptidoak zutabe kromatografikoan banatu eta masa espektrometroan sartzean ioinizatuko dira. Q1 kuadrupoloan masa jakineko peptidoak aukeratu eta Q2an haien fragmentazioa emango da. Aukeratutako trantsizioek baino ez dute Q3 kuadrupoloa igaroko. Hauen intentsitatea denboran zehar neurtuko da (Picotti eta Aebersold, 2012) artikulutik hartua).

SRMak proteomika arloan aurrerapen izugarria ekarri duen arren baditu gainditu beharreko zenbait muga. Batetik, saio bakoitzean aztertu daitekeen peptido kopurua areagotu beharra dago. Bestetik, beharrezkoa da teknikaren hautakortasun maila handitzea, monitorizatu nahi diren peptidoen eta ez beste interferentziazko espezieren neurketak jasoko direla ziurtatuz (Gallien *et al.*, 2012).

Bereizmen altuko eta masa-zehaztasun handiko instrumentuen erabilerak muga hauek gainditu ditzake (Gallien *et al.*, 2012). Analisi hauek proteomika ituratuan intereseko analitoak gainontzeko espezieetatik bereizteko aukera ematen dute. Mota honetako saioak, *orbitrap*-ean oinarritutako masa espektrometroetan burutu daitezke haien sentikortasun eta masa zehaztasun altua dela eta (Olsen *et al.*, 2009), adibidez, QqOrbi (*Q* *Exactive bench-top quadrupole-orbitrap*) (10. irudia) delakoan. Ekipo hau erabilia burututako hurbilketei PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) deritze (Peterson *et al.*, 2012). Kasu honetan SRMan bezala, aldez aurretik liseritutako proteinak masa espektrometroan analizatuko dira. Instrumentuak kuadropolo bat du zeinak iragazi gisa jokatu du monitorizatu nahi den masa zehazdun peptidoa soilik igarotzen utziz. Ondoren, talkaren ondoriozko disoziazioz, ioia fragmentutan zatituko da eta kasu honetan SRMan ez bezala, ez da fragmentu-ioirik aukeratuko. Sortutako fragmentu guztiak *orbitrap*-era igaroko dira (Michalski *et al.*, 2011; Nagaraj *et al.*, 2012). *Orbitrap*-a, ardatz itxurako elektrodo bat da zeinaren inguruan fragmentu-ioiek birak emango dituzten eta haien masak zehaztuko diren.



10. irudia. Q Exactive masa espektrometroaren atalen irudi eskematikoa.

Aurretik esan bezala, PRM teknikak abantailak dakartza SRMarekiko. Lehenik, jasotako espektroek peptidoen identifikazioa burutzeko askoz ere espezifikotasun handiagoa eskaintzen dute; hiruzpalau trantsizio neurtu beharrez, peptido batetik eratorritako fragmentu guztien seinalea jasotzen baita (Duncan *et al.*, 2009; Sherman *et al.*, 2009). Era honetan, identifikaziorako fidagarritasuna oso altua da. Bigarrenez, fragmentu-ioi kopuru askoren seinalea jasotzen denez, interesekoak ez diren baina kuadруполоа igaro dezaketen interferentziatzeko espezieen seinaleek ez dute emaitzen zehaztasunean horrenbesteko eraginik izango. Intereseko peptidoa identifikatzeko adina fragmenturen seinalea jasoko da eta (Michalski *et al.*, 2011). Hirugarrenez, PRM saioetan ez denez trantsizioen aukeraketa egin behar, SRM esperimentu bat optimizatzeak eskatzen duen trantsizio egokien aukeraketara bideratutako esfortzua ekidin egiten da (Peterson *et al.*, 2012).

2. HELBURUAK

Lan honen helburu orokorra ClpB proteinarako proteomika ituratuko esperimentu baten diseinua burutzea da, etorkizunean ClpB proteina lagin konplexuetan erlatiboki edo absolutuki kuantifikatzeko baliagarria izango dena.

Xede orokor hori erdiesteko ondoko helburu partzialak planteatu dira:

- ClpBren isoforma kanonikoaren peptido proteotipikoak hautatu, horretarako bidea ematen duten baliabide informatiko eta emaitza esperimentalak erabiliz.
- Hautatutako ClpBren peptido proteotipikoak frakzionatu gabeko erauzkin batean PRM proteomika ituratuko estrategiaz detektatzen direnentz aztertu.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1. BALIABIDE BIOINFORMATIKOAK

3.1.1. Sarekoak

1. taula. Proteinaren gaineko informazioa biltzeko eta proteomika ituratuko esperimentuaren diseinurako erabilitako sareko baliabideak

Internet baliabidea	Izena osoa	Sareko helbidea	Deskribapena	Erabilera
GPMDDB	Global Proteome Machine Database	http://gpmdb.thegpm.org/	GPM erabiltzaileek eskuratutako peptidoen MS/MS espektroak eta orokorrean proteomikako esperimentuen emaitzak biltzen dituen datu-basea.	Ikerketa talde desberdinek <i>E. coli</i> ren ClpB proteinarekin masa espektrometriako esperimentuak burutzean behatutako peptidoak zeintzuk izan diren jakiteko erabilia.
BLAST (ncbi)	Basic Local Alignment Search Tool	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	DNA, RNA edo proteina mailako sekuentzien alineamenduak egiteko erreminta informatikoa.	Esperimentua egiteko erabilitako ClpB proteinaren sekuentzia datu-baseetan aurkitutako esperimentuetan erabilitako ClpB proteinen sekuentziekin alderatzeko erabilia.
PIR	Protein Information Resource	http://pir.georgetown.edu/	Genomika zein proteomikako ikerkuntza eta ikasketak bultzatzeko sortutako baliabide bioinformatikoen sareko orrialdea.	Masa espektrometriako esperimentuen ondoren behatutako peptidoetatik eksklusiboak direnak identifikatzeko erabilia, <i>Peptide match</i> baliabidearen bidez.
Uniprot	Universal Protein resource	http://www.uniprot.org/	Proteinen sekuentziak eta euren funtzioari buruzko informazioa eskaintzen duen baliabidea.	Aztergai den proteinaren funtzio biologikoari buruzko informazioa jasotzeko erabili da.

3.1.2. Programak

2. taula. PRM esperimenteria martxan jartzeko doikuntzak zehaztu eta ondorengo datuak analizatzeko erabilgaitako programa informatikoak.

Izena	Programa deskargatzeko helbidea	Deskribapena	Erabilera
Skyline	http://proteome.gs.washington.edu/software/skyline	Doako aplikazioa proteomika ituratuko esperimenteria diseinu eta datuen analisi kuantitatiboa egiteko.	Monitorizatu nahi diren peptidoen masa kalkulatzeko erabilia.
Proteome Discoverer 1.4	https://portal.thermo-brims.com/	Thermo Scientific enpresak sortutako doako programa informatikoa. Proteomikako esperimenteriatik lortutako datuen analisi kualitatibo zein kuantitatiboak egiteko baliagarria.	Masa espektrometriatik jasotako datu gordinak datu-base baten kontra alderatu eta jasotako emaitzak zein ioiei dagokien zehazteko erabilia.
Mascot	http://www.matrixscience.com/	Masa espektrometriako esperimenterian jasotako datuetatik proteinen identifikazio, karakterizazio eta kuantifikaziorako programa. Doako zein ordaindu beharreko programak daude eskuragarri.	Masa espektrometriako esperimenteriatik lortutako datu gordinetatik abiatuz peptidoen identifikazioa burutzeko erabili da.

3.2. PEPTIDO PROTEOTIPIKOAK IDENTIFIKATZEA

PRM esperimentuan ClpB-ren jarraipena egiteko zein peptido aukera zitezkeen determinatzeko bi bide jarraitu ziren. Alde batetik, sareko baliabide informatiko ezberdinetan (1. taula) oinarritutako bilaketa bat egin zen. Bestetik, ClpB proteina purifikatuarekin *shotgun* MS/MS esperimentu bat burutu zen (esperimentuaren baldintzak 3.10 atalean azaldu dira).

3.3. PEPTIDO PROTEOTIPIKOAK HAUTATZEKO IRIZPIDEAK

Orokorrean, peptido labur hidrofiloak eta hidrofobo luzeak ekidin egiten dira. Hauen orde, hamar aminoazido inguruko peptidoak aukeratzera jotzen da zeintzuen sekuentzian itzulpen ondoko eraldaketak zein oxidazioa edo bestelako aldaketak jasan ditzaketen aminoazidoak egotea saihesten da. Adibidez, metionina, zisteina eta triptofanoak oxidazioa jasan dezakete eta bai asparraginak zein glutaminak ere, desamidazioa jasan dezakete. Era berean, lisina-lisina eta arginina-arginina sekuentziadun peptidoak ekidin egiten dira gehienetan tripsinaren liseriketa ez osoagatik ebaketa galduak (*missed cleavages*) dakartzatelako. Gainera, proteinen liseriketa triptikoa %100eko etekinez burutzea ziurtatu ezin daitekeenez, hobe da proteina bakoitzaren ordezkotzat peptido bat baino gehiago aukeratzeko. Sekuentziak pairatu ditzakeen aldaketez gain, beharrezkoa da monitorizatuko diren peptidoak alde aurretik MS/MS esperimentu batean ikusi izana eta seinale intentsuak ematea. Gertaera honek ziurtatu egingo du ondoren proteomika ituratuko esperimentera burutzean peptidoen jarraipena egin ahal izatea.

3.4. ClpB PROTEINA PURIFIKATUA

Arturo Mugaren lantaldearen (UPV/EHU) eskutik, *E. coli* MC4100-ren ClpB proteina kanoniko (ClpB95) purifikatua jaso zen. Purifikazioa (Woo *et al.*, 1992) artikuluan azaldutako prozedurari jarraituz egin zen.

3.5. *E. COLI* MC4100 PROTEINA ERAUZKINA

E. coli MC4100-ren proteina erauzkina Arturo Mugaren lantaldearengandik (UPV/EHU) jaso zen. Erauzkina lortzeko jarraitutako prozedura (Woo *et al.*, 1992) artikuluan aipatzen dena izan zen.

3.6. GELEANGO (*IN-GEL*) LISERIKETA ETA PEPTIDOEN ERAUZKETA

Dimentsio bateko gelean jasotako ClpB proteinarekin geleango liseriketa burutu zen. Akrlamida geleko banda ebaki eta txikitu ondoren, proteinetatik Coomassie urdina ezabatzeko destindaketari ekin zitzaion (%50 azetonitrilo, %50 H₂O soluzioa). Jarraian zenbait zikloko garbiketa burutu zen azetonitrilo eta H₂O txandakapenen bidez. Hurrengo pausoa proteinen erredukzioa egin zen 10mM ditiotreitola (DTT) (50mM amonio bikarbonatoan) gehitu eta 56°C-tan 45 minutuz inkubatzen utziz (Thermomixer 1150rpm). Erreduzitutako proteinak 25mM iodoazetamidaz (50mM amonio bikarbonatoan) alkilatu ziren 30 minutuz giro tenperaturan eta ilunpetan utziz. 50mM amonio bikarbonato eta azetonitrilo gehikuntzan oinarritutako bi zikloren ondoren laginari 1µg/µl tripsina gehitu zitzaion eta 45 minutuz izotzetan inkubatu zen. Jarraian, 25mM amonio bikarbonatoa gehitu eta lagina 16 orduz 37°C-tan inkubatzen utzi zen liseriketa gerta zedin. Liseriketa ondoren, peptidoen erauzketari ekin zitzaion geletik are material gehiago berreskuratuzeko; 25mM amonio bikarbonato, azetonitrilo, %0,1 azido trifluoroazetiko eta berriz ere azetonitriloa gehitu ziren gehikuntza batetik bestera 10 minutuko inkubazio denbora utziz. Lagina lehortu (Speed Vacuum) eta berreskuratutako peptidoak %0,1 azido formikotan berreseki ziren. Bukatzeko, lagina 2-3 minutuz sonikatu eta 4°C-tan mantendu zen masa espektrometria bidez analizatzeko prest utziz.

3.7. PROTEINA-ERAUZKINEKO PROTEINEN PREZIPITAZIOA

2D Clean-Up Kit (General Electric Healthcare) produktua *E. coli*ren proteina-erazkineko proteinen prezipitazioa burutzeko erabili zen. 50 μg -ko erazkinari *precipitant* soluzioa gehitu eta izotzetan 15 minutuz inkubatu zen. Jarraian *co-precipitant* soluzioa gaineratu zitzaion eta lagina zentrifugatu zen (5 minutu, 12000g). Jalkinari berriz ere *co-precipitant* soluzioa gehitu eta 5 minutuz izotzetan inkubatu ondoren aurreko baldintza berdinetan zentrifugazioa burutu zen. Jalkinari ura gehitu zitzaion eta ondoren, *wash buffer* eta *wash additive* soluzioak gaineratu zirela, lagina 20°C-tan inkubatu zen gau osoan zehar. Biharamunean, lagina zentrifugatu (5 minutu, 12000g) eta jalkina airean lehortzen utzi zen.

3.8. SOLUZIOANGO (IN-SOLUTION) LISERIKETA

Proteina prezipitatudun lagina %0,2 *RapiGest SF* (Waters) zuen 50mM amonio bikarbonatoan disolbatu zen %0,1 *RapiGest* kontzentrazioa lortu zelarik (beharrezko kontzentrazioa tripsinak ondo funtzionatu dezan). Lagina 15 minutuz 85°C-tan inkubatu zen (Thermomixer 1150rpm) eta ondoren 50mM amonio bikarbonatoa gehitu zitzaion. Hurrengo pausoak proteinen erredukzioa, alkilazioa eta liseriketa izan ziren. Horretarako lehenik 125mM DTT gehitu eta lagina 25 minutuz 60°C-tan inkubatu zen (Thermomixer 1150rpm). Ondoren 375mM iodoazetamida gaineratu zen eta lagina 30 minutuz giro tenperaturan eta ilunpetan utzi zen. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ tripsina gehitutakoan lagina gau osoan inkubatu zen 37°C-tan liseriketa eman zedin. Erreaktibo bakoitzaren bukaerako kontzentrazioak hurrengoak izan ziren; 5mM DTT, 15mM iodoazetamida eta 1/25 tripsina. %25 HCl-aren gaineratzeak erreakzioa gelditu zuen. Bukatzeko bi errepikapenez, lagina 37°C-tan 45 minutuz inkubatu eta zentrifugatu zen (10 minutu, 12000g).

3.9. PEPTIDO NAHASKETAREN C18 ZEHARREKO GARBIKETA

C18 Stage Tip mikrozutabeari A soluzioa (%50 azetonitrilo, %2,5 azido formiko) gehitu eta zentrifugatu zen (1 minutu, 700g). Prozedura birritan errepikatu zen. Garbiketarekin jarraituz, zutabeari B soluzioa (%3 azetonitrilo, %2,5 azido formiko) gehitu zitzaion eta aurreko baldintzetan zentrifugatu, garbiketari bukaera emanez. Jarraian peptido nahasketa (25 μ g) gaineratu zen eta baita %0,1 azido formikoa ere. Lagina aurreko baldintzetan zentrifugatu eta peptidoak zutabera itsatsi ziren. Zutabea birritan garbitu zen B soluzioa gaineratu eta zutabeak zentrifugatuz (1 minutu, 700g). Ondoren A soluzioa gaineratu eta zutabea zentrifugatzean (aurreko baldintzak) eluitutako peptidoak jaso ziren. Are peptido gehiago eluitzeko aurreko prozedura errepikatu zen baina C soluzioarekin (%90 azetonitrilo, %2,5 azido formiko). Bukatzeko, jasotako peptido nahasketa lehortu eta %0,5 azido formikotan berreseki zen masa espektrometroan analizatzeko prest utziz. Deskribatutako prozedura bi zutabetan egin zen.

3.10. MASA ESPEKTROMETRIA ETA DATUEN ANALISIA

3.10.1. Masa espektrometria

Masa espektrometriako analisi guztiak UPV/EHUko Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretako (SGIker) Proteomika Unitatean burutu ziren.

Proteina purifikatuaren liseriketa triptikotik zein erauzkin osoaren liseriketa triptikotik eratorritako peptido-nahasturak azidifikatu egin ziren eta C18 kromatografian 90 minutuko gradientean, %3-%30 ACN (Easy nLC, TFS-Proxeon) banatu ziren. Peptidook masa espektrometriako bi estrategia jarraituta analizatu ziren: alde batetik *shotgun* moduan eta bestetik modu ituratuan (PRM). Analisi guztiak QqOrbitrap masa espektrometro batean burutu ziren (Q Exactive, TFS, Bremen, Germany). PRMrako 2,0 Da-etako isolaketa-leiho erabili zen eta hala izan zen *shotgun* analisisian ere. 2-7 kargadun 10 peptido intentsuenak fragmentatu ziren, eskusio denbora 30 segundotakoa izan zelarik. Fragmentazioa *High Collision Energy* (HCD) bidez burutu zen.

3.10.2. Datuen analisia

Eskuratutako datu gordinak, bai *shotgun* esperimentukoak bai PRM esperimentukoak ere Proteome Discoverer programarekin prozesatu ziren. *Shotgun*eko identifikazioetarako bilaketak Swissprot-eko 2013.09. bertsioeko *E. coli*ren datu-basearen kontra burutu ziren ondoko parametroak erabilia: ioi aitzindarien masa desbiderapena gehienez jota 10 ppm-takoa ezarri zen eta 0,05 Da MS/MS gertaerentzako. Gehien jota 2 ebaketa galdu baimendu ziren, entzima espezifikotasuna tripsinarako zehaztu zen, zisteinaren karbamidometilazioa eraldaketa finko gisa hartu zen. Hautazko eraldaketa gisa metioninaren oxidazioa, proteinaren N-muturreko azetilazioa eta asparragina eta glutaminaren desamidazioa hartu ziren kontutan.

4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

4.1. PEPTIDO PROTEOTIPIKOEN HAUTAKETA

PRM esperimenterako erabiliko ziren peptido proteotipikoen hautaketarako elkarren osagarri diren bi hurbilketa erabili ziren.

4.1.1. *In silico* bideratutako hautaketa

Peptido proteotipikoak aukeratzeko orduan ohikoa da masa espektrometriako datuez osatuta dauden datu-baseetara jotzea hauen bila. GPMDB datu-basea, mundu mailako ikerketa taldeek egindako masa espektrometriako milaka esperimenteruz dago osatuta.

Datu basean bildutakoetatik hamahiru sarrera *E. coli*ren ClpB proteinari zegozkion. Alabaina sarrera horietatik bakarra ere ez zegokion laborategian landutako *E. coli* anduiari (*E. coli* MC4100).

Hau honela izanik GPMDB datu-basean agertzen ziren *E. coli* andui ezberdinen ClpB proteinaren aminoazido sekuentziak, aztergai zen *E. coli* MC4100 anduiaren ClpB proteinaren sekuentziarekiko alineatu ziren Blast programaren bidez; honela, euren arteko antzekotasuna zenbatekoa zen zehaztu eta aurrerantzean antzekotasun handiena azaldutako anduiaren datuekin lan egitea erabaki zen (3. taula).

Blast programa erabilia burututako alineamenduen emaitzen formatua hurrengo irudian (11. irudia) ikus daiteke; zehazki, laborategian erabilitako *E. coli* MC4100 eta honekin antzekotasun handiena partekatzen duen *E. coli* O157:H7 str.EDL933 anduiaren artekoa erakusten da. Alineamenduaren esperotako balioa (*Expected value*, *E value*) zero da. Honek adierazi egiten du zenbat aldiz espero zitekeen emaitza hori lortzea alineamendua zorizkoa izango balitz. E balioa zerokoa denez, jasotako emaitzen gaineko konfiantza osoa ondoriozta daiteke. Aztertutako bi anduien ClpB-ren aminoazido sekuentzien artean hiru hondarreko desberdintasuna baino ez dago (hauek lauki horiz adierazi dira). Gainera, desberdintasun horietako bakarrak dakar aminoazidoen izaeran aldaketa. Izan ere, balina eta leuzina, biak dira aminoazido hidrofobikoak eta horregatik “positiboak”, hau da berdintsuak, delako kontaktaren

barnean sartu dira. Alineamenduan ikus daitekeen bezala, bi sekuentzien artean ez dago hutsune bakarra ere (0% gap).

Sequence ID: |cl|19655 Length: 861 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 861 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1728 bits(4475)	0.0	Compositional matrix adjust.	854/857(99%)	856/857(99%)	0/857(0%)
Query 1	MRLDRLTNKFLALADAQSLALGHDNQFIEPLHLSALLNQGGSVSPLLTSAGINAGQL				60
Sbjct 5	MRLDRLTNKFLALADAQSLALGHDNQFIEPLHLSALLNQGGSVSPLLTSAGINAGQL				64
Query 61	RTDINQALNRLPQVEGTGGDVQPSQDLVRVNLCDNVAQKRGDNFISSELFVLAALLESRG				120
Sbjct 65	RTDINQALNRLPQVEGTGGDVQPSQDLVRVNLCDNVAQKRGDNFISSELFVLAALLESRG				124
Query 121	TVADILKAAGATTANITQAEIQMRGGESVNDQGAEDQRQALKKYTIDLTERAEQGGKLDPV				180
Sbjct 125	TVADILKAAGATTANITQAEIQMRGGESVNDQGAEDQRQALKKYTIDLTERAEQGGKLDPV				184
Query 181	IGRDEEIRRTIQVLRRTKINPVLIGE PGVGKTAIVEGLAQRI INGEVPEGLKGRRLVLA				240
Sbjct 185	IGRDEEIRRTIQVLRRTKINPVLIGE PGVGKTAIVEGLAQRI INGEVPEGLKGRRLVLA				244
Query 241	DMGALVAGAKYRGEFEERLKGVLNDLAKQEGNVILFIDELHTMVGAGKADGAMDAGNMMLK				300
Sbjct 245	DMGALVAGAKYRGEFEERLKGVLNDLAKQEGNVILFIDELHTMVGAGKADGAMDAGNMMLK				304
Query 301	PALARGELHCVGATTLDYRQYIEKDAALERRFQKVFVAE PAVEDTIAILRGLKERYELH				360
Sbjct 305	PALARGELHCVGATTLDYRQYIEKDAALERRFQKVFVAE PAVEDTIAILRGLKERYELH				364
Query 361	HHVQITDPAIVAAATLSHRYIADRQLPDKAIDLIDEAASSIRMQIDSKPEELDRDRRII				420
Sbjct 365	HHVQITDPAIVAAATLSHRYIADRQLPDKAIDLIDEAASSIRMQIDSKPEELDRDRRII				424
Query 421	QKLEQQALMKESEDEASKRRLDMLNEELSDKERQYSELEEEWKAEKASLSGTQTIKAELE				480
Sbjct 425	QKLEQQALMKESEDEASKRRLDMLNEELSDKERQYSELEEEWKAEKASLSGTQTIKAELE				484
Query 481	QAKIAIEQARRVGD LARMSELQYGKI PELEKQLEAATQLEGKTMRLLRNKVTD AEIAEVL				540
Sbjct 485	QAKIAIEQARRVGD LARMSELQYGKI PELEKQLEAATQLEGKTMRLLRNKVTD AEIAEVL				544
Query 541	ARWTGIPVSRMMESEREKLLRMEQELHHRVIGQNEAVDAVSNAIRR SRAGLADPNRPIGS				600
Sbjct 545	ARWTGIPVSRMMESEREKLLRMEQELHHRVIGQNEAVDAVSNAIRR SRAGLADPNRPIGS				604
Query 601	FLFLGPTGVGKTELCKALANFMFDSDEAMVRIDMSEFMEKHSVSRVLV GAPPYVGYE EGG				660
Sbjct 605	FLFLGPTGVGKTELCKALANFMFDSDEAMVRIDMSEFMEKHSVSRVLV GAPPYVGYE EGG				664
Query 661	YLTEAVRRRFPYSVILLDEVEKAHFDVFNILLQVLDGRLTDGQGRIVDFRNTVWIMTSNL				720
Sbjct 665	YLTEAVRRRFPYSVILLDEVEKAHFDVFNILLQVLDGRLTDGQGRIVDFRNTVWIMTSNL				724
Query 721	GSDLIQERFGELDYAHMKELV LGVSSHFRPEFINRIDEVVVFHPLGEQHIASIAQIQLK				780
Sbjct 725	GSDLIQERFGELDYAHMKELV LGVSSHFRPEFINRIDEVVVFHPLGEQHIASIAQIQLK				784
Query 781	RLYKRLEERGYEIHISDEALKLSENGYDFVYGARPLKRAIQQQIENPLAQQLSGELVP				840
Sbjct 785	RLYKRLEERGYEIHISDEALKLSENGYDFVYGARPLKRAIQQQIENPLAQQLSGELVP				844
Query 841	GKVirLEVNEDRIVAVQ	857			
Sbjct 845	GKVirLEVNEDRIVAVQ	861			

11. irudia. Laborategian erabilitako *E. coli* MC4100 (Query) eta GPMDbko *E. coli* O157:H7 strEDL933 (Subject) anduien ClpB proteinaren sekuentzia aminoazidikoen arteko alineamendua, Blast programaren bidez egina.

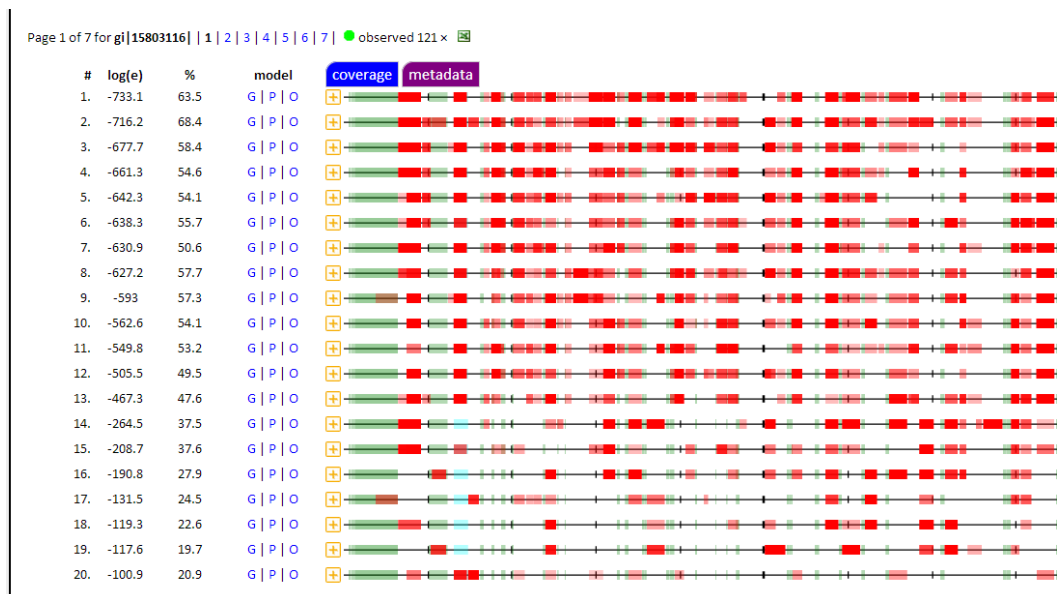
3. **taula.** GPMDB datu-basean eskuragarri ziren *E. coli*ren andui ezberdinen ClpB proteinen sekuentzien eta laborategian erabilitako *E. coli* MC4100-ren ClpB-ren sekuentziarekiko alineamenduen analisiaren emaitzak.

Proteinaren izendapena	<i>E. coli</i> anduia	Alineamendua			
		E balioa	Antzekotasun maila	Positiboak	Hutsune kopurua
ClpB gene product	O157:H7 str.EDL933	0.0	854/857(%99)	856/857(%99)	0/857(%0)
ClpB gene product	O157:H7 str.EC4115	0.0	854/857(%99)	856/857(%99)	0/857(%0)
ClpB protein	Nissle 1917	0.0	854/857(%99)	856/857(%99)	0/857(%0)
Protein disaggregation chaperone ClpB	O111:H-str.11128	0.0	854/857(%99)	856/857(%99)	0/857(%0)
Protein disaggregation chaperone ClpB	O103:H2 str.12009	0.0	854/857(%99)	856/857(%99)	0/857(%0)
ClpB gene product	O127:H6 str.E2348/69	0.0	854/857(%99)	856/857(%99)	0/857(%0)
ClpB gene product	APECO1	0.0	853/857(%99)	855/857(%99)	0/857(%0)
ClpB protein	UTI89	0.0	306/699(%44)	436/699(%62)	38/699(%5)
ClpB protein	CFT073	0.0	308/699(%44)	440/699(%62)	38/699(%5)
ClpA/ClpB family protein	E24377A	0.0	306/699(%44)	436/699(%62)	38/699(%5)
Chaperone ClpB	55989	0.0	298/683(%44)	443/683(%64)	33/683(%4)
ATP-dependent chaperone protein ClpB	SE11	1e-82	134/255(%53) 123/289(%43)	134/255(%53) 184/289(%63)	0/255(%0) 10/289(%3)
ATP-dependent chaperone protein ClpB	E24377A	3e-153	281/685(%41)	406/685(%59)	45/685(%6)

3. taulan ikus daitekeen bezala, lehen sei sarrerek emaitza berdinak ematen dituzte alineamenduan. Beraz, printzipioz seietariko edozein erabil zitekeen eredu gisa GPMDBn bildutako masa espektrometriako esperimentuetan zerrendatutako eta PRM esperimenturako baliogarriak izango ziren peptidoen *in silico* azterketarako.

Hala ere, GPMDB datu-basean sarrera bakoitza fidagarritasunaren arabera ordenatuta dago, sarrera bakoitzaren $\log(e)$ balioan oinarrituta. Balio hau irizpidetzat erabili zen GPMDBko anduiaren aukeraketarako. E balioak (*expected value*) zorizko gertaeraz emaitza jakin bat lortzeko aukera zenbatekoa izan daitekeen adierazten du. Ondorioz, zenbat eta e balio txikiagoa izan (gehienez zerora iritziz), emaitza zorizkoa izateko probabilitatea txikiagoa izango da. GPMDBn $\log(e)$ zenbakia agertzen da. E balio zenbat eta txikiago izatea hobe bada, $\log(e)$ -rentzat balio negatibo eta altuenek fidagarritasun handiena adieraziko dute. Hori horrela izanik, $\log(e)$ balioa eskuragarri zeudenetatik handiena ($\log(e) = -733.1$) zuen anduia aukeratu zen erreferentzia gisa, *E. coli* O157:H7 str.EDL933 anduia hain zuzen ere.

GPMDBn *E. coli* O157:H7 str.EDL933 anduiarekin burututako masa espektrometriako 121 esperimentu zeuden zerrendatuta. Dena dela, ClpB identifikatu zeneko masa espektrometriako esperimentu guztietan lortutako proteinaren estaldura ezberdina zen. Ahalik eta peptido gehienekin jokatzeko aukera izateko, proteinaren estaldura handiena lortu zuen esperimentua aztertu zen. Hala ere, aurreko pausoen bezala, esperimentu bakoitzak $\log(e)$ balio zehatz bat zuen erantsita, zeinak proteinaren peptidoak zenbateko konfiantzarekin identifikatu ziren zehazten zuen. Nahiz eta esperimentu bakoitzean proteinaren estaldura irizpide garrantzitsua izan, hautatutako esperimentuaren fidagarritasunak are garrantzia handiagoa duela ondorioztatu zen. Nahiz eta peptido gutxiago behatu, behatutakoen identifikazioaren konfiantza maila dagoenik altuena izatea garrantzitsua da oso. Hori dela eta, esperimentu guztiak $\log(e)$ -ren balioaren arabera ordenatuz gero, lehen postuan zegoena aukeratu zen, zeinak ClpB-ren %63.5eko estaldura zuen (12. irudia).



12. irudia. *E. coli* O157:H7 str.EDL933 anduiaren ClpB proteina identifikatu deneko masa espektrometriako 121 esperimentu daude bilduta GPMDbN, irudian horren lagin txiki bat ikusgai. Bakoitzarentzat log(e)-ren balio bat eta lortutako proteinaren estaldura ehunekotan adierazten dira. Esperimentu bakoitzarentzat proteinaren irudi eskematiko bat ere agertzen da. Eskemaren elementu bakoitzak hurrengoak adierazten du: marra beltza proteinaren luzera da; laukizuzen gorriek behatutako peptidoei dagokie, zenbat eta ilunagoak izan konfiantza altuagoak direlarik; laukizuzen berdeek proteomikako teknika ohikoen bidez behatzeko zailak izan daitezkeen sekuentzia tarteei egiten die erreferentzia eta laukizuzen urdin argietan N-glikosilazioa eduki dezaketen peptidoak agertzen dira.

Aukeratutako esperimentuan (12. irudian lehen), PIR baliabide informatikoa erabiliz, identifikatutako peptido guztiak ClpB proteinaren eskusiboak zirela ikusi zen, hau da, bakterioaren andui honen beste proteina guztietan aurkituko ez diren peptidoak dira. Beraz edozein izan zitezkeen printzipioz proteotipikoa baldin eta Materialak eta Metodoak (3.3. Peptido proteotipikoak hautatzeko irizpideak) atalean zehaztu den bezala baldintzak beteko balitu. Hala ere, lan honetan ClpB proteinaren isoforma kanonikoaren, ClpB95, eta ez besteren jarraipena egin nahi denez, isoforma honentzako eskusiboak diren peptidoak ziren interesekoak (4. taula). Peptido eskusibo hauek, ClpB95 isoformaren amino muturreko lehen 148 hondarrek osatutako sekuentzian kokatzen dira.

4. taula. GPMDB datu-basean oinarritutako bilaketaren ondoren ClpB 95 isoformaren jarraipena egiteko hautatutako peptidoak.

Peptidoa	Kokapena proteinaren sekuentzian	Eraldaketak jasan ditzaketen aminoazidoak
TDINQALNRLPQVEGTGGDVQPSQDLVR	62-89	Tripsinaren liseriketa ez osoa, galdutako ebaketa (<i>missed cleavage</i>) du. Glutamina (Q) desamidatu daiteke.
LPQVEGTGGDVQPSQDLVR	71-89	Glutamina (Q) desamidatu daiteke.
TGGDVQPSQDLVR	77-89	Glutamina (Q) desamidatu daiteke.
AAGATTANITQAIEQMR	128-144	Metionina (M) oxidatu daiteke Asparragina (N) eta glutaminak (Q) desamidazioa jasan dezakete.

4.1.2. Esperimentalki bideratutako hautaketa

Arturo Mugaren lantaldearen eskutik jasotako ClpB proteina purifikatuaren peptido triptikoen nahastura MS/MS *shotgun* bidez analizatutakoan, behatutako peptidoek zehazten duten proteinaren estaldura 13. irudian ikus daiteke.

MRLDRLTNKF QLALADAQSL ALGHDNQFIE PLHLMSALLN QEGGSVSPIL TSAGINAGQL RFDINQALNR LPQVEGTGGD
 VQPSQDLVRV LNLCDKLAQK RGDNFISSEL FVLAALLESRG TLADILKRAAG ATTANITQAI EQMRGGESVN DQGAEDQRQA
 LKKYTIIDLTE RAEQGLDPV IGRDEEIRRT IQVLRRTKN NPVLIGEPGV GKTAVEGLA QRHINGEVPE GLKGRVLAAL
 DMGALVAGAK YRGEFEERLK GVLNDLAKQE GNVLIFIDEL HTMVGAGKAD GAMDAGNMLK PALARGELHC VGATTIDEYR
 QYIEKDAALE RRFOKVFVAE PSVEDTIAIL RGLKERYELH HHVOITDPAI VAAATLSHRY IADROLDPKA IDLIDEAASS
 IRMQIDSKPE ELDRLDRII QLKLEQQALM KESDEASKR LDMLNEELSD KERQYSELEE EWKAEKASLS GTQTIKAELE
 QAKIAIEQAR RVGDLARMSE LOYGIPELE KQLEAATQLE GKTMRLLRNK VTDAAIEAELV ARWTGIPVSR MMESEREKLL
 RMEQELHHRV IQONEAVDAV SNAIRRSRAG LADPNRPIGS FLFLGPTGVG KTELCKALAN FMFDSDEAMV RIDMSEFMEK
 HVSVRLVGAP PGYVGYEEGG YLTEAVRRRP YSVILLDEVE KAHPDVFNIL LQVLDDGRLT DGQGRTVDFR NTVVIMTSNI
 GSDLIQERFG ELDYAHMKEL VLGVVSHNFR PEFINRIDEV VVFHPLGEQH IASIAQIQLK RLYKRLEERG YEITHISDEAL
 RLLENGYDP VYGARPLKRA IQQQIENPLA QQILSGELVP GKVIRLEVNE DRIVAVQ

13. irudia. ClpB isoforma kanonikoaren aminoazido sekuentzia. Berdez nabarmendutako eskualdeak, MS/MS *shotgun* esperimentuaren bidez behatutako peptidoen estaldura adierazten da. Marroi kolorez azpimarratuta, ClpB85 isoformari dagokion sekuentzia agertzen da. Lauki barnean agertzen den balina, V¹⁴⁹, ClpB isoforman metionina bat da.

Analisi honetako datu gordinak Proteome Discoverer programarekin prozesatu ziren eta peptidoak identifikatzeaz gain, peptidoen masa eta kargaren informazioa lortu zen. Horietatik guztiak ziren ClpB proteinaren eskusiboak (PIR baliabide informatikoarekin zehaztu zen legez) beraz, monitorizaziorako erabiliko ziren peptido proteotipikoen aukeraketa burutu zen. Horretarako Materialak eta Metodoak (3.3. Peptido proteotipikoak hautatzeko irizpideak) atalean aipaturiko peptido proteotipikoen hautaketarako irizpideak oinarritzat hartu ziren. Hala ere, kontuan hartu behar da kasuan kasuko interes eta aukeren arabera hautatzen direla proteomika ituratuan erabiliko diren peptidoak eta aipaturiko irizpide horiek zorroztasun handiagorekin edo txikiagorekin erabili daitezkeela. ClpB proteinaren kasuan bereziki interesagarria zen amino muturreko peptidoak monitorizatzea, hauek baitira bi isoformen artean desberdinu dezaketen peptido bakarrak. Beraz, esperimentera lortutako datuetan oinarrituta hurrengo taulan azaltzen diren peptido proteotipikoen zerrenda osatu zen (5. taula).

5. taula. PRM analisirako hautatutako peptidoen zerrenda eta bakoitzaren ezaugarriak. Ioiaren karga kopurua eta m/z balioaren datuak burututako *shotgun* MS/MS esperimentuan jasotako emaitzetatik lortu ziren. ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ peptidoari dagozkion datuok metionina oxidatudun espezieari dagozkio, hura izan baitzen esperimentera behatu zena. Taulako peptido guztiak konfiantza altuarekin behatu ziren *shotgun* MS/MS esperimentuan.

Peptidoa	Kokapena proteinen sekuentzian	Isoforma	Eraldaketak jasan ditzaketen aminoazidoak	Ioiaren karga kopurua	m/z
TDINQALNR	62-70	ClpB90	Asparagina (N) eta glutaminak (Q) desamidazioa jasan dezakete.	2	522,77655
LPQVEGTGGDVQPSQDLVR	71-89	ClpB90	Glutamina (Q) desamidatu daiteke.	2	998,01093
RGDNFISSELFVLAALLESR	101-119	ClpB90	Tripsinaren liseriketa ez osoa, galdutako ebaketa (<i>missed cleavage</i>) du. Asparaginak (N) desamidazioa jasan dezake	2	1062,56128
GDNFISSELFVLAALLESR	102-119	ClpB90	Asparaginak (N) desamidazioa jasan dezake	2	984,50867
AAGATTANITQAIEQMR	128-144	ClpB90	Metionina (M) oxidatu daiteke Asparagina (N) eta glutaminak (Q) desamidazioa jasan dezakete.	3	588,29541
TAIVEGLAQR	213-222	ClpB85, ClpB90	Glutaminak (Q) desamidazioa jasan dezake.	2	529,30457

4. eta 5. taulak alderatuta ikus daitekeen bezala, *in silico* egindako bilaketaren bidez lortutako peptido proteotipiko kandidatuetatik ⁷¹LPQVEGTGGDVQPSQDLVR⁸⁹ eta ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ peptidoak proteotipikotzat konfirmatu ziren *shotgun* MS/MS esperimentuan ere behatu ziren eta. GPMDB bilaketaren bidez behatutako bi peptido hauei, *shotgun* MS/MS esperimentuan behatutako beste lau peptido gaineratu zitzaizkion monitorizaziorako: ⁶²TDINQALNR⁷⁰, ¹⁰¹RGDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹, ¹⁰²GDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ eta ²¹³TAIVEGLAQR²²² peptidoak hain zuzen ere. *In silico* bilaketan behatutako baina *shotgun* MS/MS esperimentuan ikusi ez ziren peptidoak monitorizaziorako hautagai ziren arren, ez ziren aukeratu. Izan ere, *shotgun* esperimenterako erabilitako ekipo bera PRM esperimenterako erabiliko zenez, fidagarritasunik handiena instrumentu horretan bertan behatutako peptidoei zegokien. Kontuan eduki behar da masa espektrometro motak baduela eragina jasotako emaitzen aldakortasunean eta baita kromatografia likidoan peptidoen banaketarako ezarritako baldintzek (erretxinaren izaera, eluziorako erabilitako gradientea, eluzion-denbora...) ere. Dena dela, *shotgun* MS/MS esperimendu bat burutzeko aukerarik ez dagoen kasuetan, datu-baseetan bilaketak egitea da peptido proteotipikoak hautatzeko bide bakarra, lagin eskasia dagoenean edo bestelako arrazoiak direla eta.

Monitorizaziorako hautatutako peptidoetatik ⁶²TDINQALNR⁷⁰, ⁷¹LPQVEGTGGDVQPSQDLVR⁸⁹, ¹⁰¹RGDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ ¹⁰²GDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ eta ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ ClpB95 isoformaren eskusiboak ziren. Beraz honen jarraipena eginik isoforma bakarraren inguruko informazioa jasoko da. Hori dela eta, peptido proteotipiko hauek ClpB95-ren kuantifikazioa burutzeko kandidatu onak lirateke. Bestetik, ²¹³TAIVEGLAQR²²² peptidoa ClpB proteinaren eskusiboa den arren, ez da baliagarria isoforma konkretu baten informazioa jasotzeko, bieran agertzen baita. Dena dela, peptido hau monitorizatzea interesgarria izan daiteke ClpB proteina bere osotasunean aztertu nahi den kasuetan.

5. taulan adierazi den bezala, proteinaren jarraipenerako hautatutako peptidoek eraldaketak jasan ditzaketen aminoazidoak dituzte kasu guztietan. Peptido proteotipikoen hautaketarako irizpideetan oinarrituz, hauek ez lirateke PRM

esperimenturako ezin hobeak, baina kontutan eduki behar da ClpB isoforma kanonikoaren jarraipena egiteko derrigorrean peptidoak amino muturreko lehen 148 hondarretakoak izan behar direla eta aukeraketa horien artean burutzera mugatuta dagoela. Hori dela eta, hautagai guztietatik egokienak aukeratu ziren. ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ peptidoan metionina oxidatu daiteke eta ¹⁰¹RGDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ peptidoak galdutako ebaketa du; ondorioz hauetatik jasotako emaitzak metionina oxidatzearen edo ez oxidatzearen eta PRM esperimenturako liseriketan tripsinaren jardueraren arabekoak izango dira hurrenez hurren. Gainontzeko eraldaketak ordea, asparraginaren eta glutaminaren desaminazioa, eraldaketa finkoak dira, beti emango dira; hori dela eta, ez da emaitzen aldakortasunik espero hauekin.

In silico burututako bilaketan eta *shotgun* MS/MS esperimentuaren emaitzetan peptido berdinak ikusi ez izana ez da harritzekoa. Era esperimentalean ClpB proteina purifikatuaren *shotgun* esperimentua burutu da baina GPMDB datu-basean erabilitako laginak ez ziren proteina puruarenak, lagin konplexuak baino. Lagin konplexuak *shotgun* esperimentu bidez aztertzerakoan presentzia txikia duten proteinak ikustea zaila izaten da kopuru altuagoetan dauden proteinen seinaleak kantitate txikian daudenekiko gailentzen baitira. Beraz aztergai den proteinaren arabera bai identifikazioa zein kuantifikazioa ere ezinezko gerta daiteke *shotgun* esperimentuak egiten direnean. PRM eta orokorrean proteomika ituratuko esperimentuetan ostera, intereseko proteinaren peptidoei dagokien seinaleak baino ez direnez jasotzen, proteinak zelulan duen presentzia txikia zein handia izan, behatzeko aukera dago; beti ere peptido proteotipikoen aukeraketa egokia denean. Hau da, peptido horren fragmentuak era argi eta intentsuan ikusten badira. Erabiliko den ekipoari monitorizatu behar den peptidoaren jarraipena egiteko baldintzak ezarrita gainera, aukera dago nahi beste lagin analizatu eta ondoren horiek kuantifikatzeko, bai era erlatiboan zein absolutuan peptido astunak erabiliz gero.

Hori dela eta, eta lan honen testuingurura bueltatuz, ClpB95 isoformaren jarraipena egiteko monitorizatu beharreko peptido proteotipikoak zeintzuk izan daitezkeen zehaztu da. Pauso hau PRM esperimentuaren atalik zailen eta kritikoen da. Azken

batean peptidoak ondo aukeratuz gero lagin ezberdinetako (bero-estres egoera desberdinenen pean egon zitezkeenak) ClpB95 isoformaren kantitateak alderatu ahalko dira era erlatiboan edota euren kantitate absolutuak ezagutu peptido astunak erabiliz gero.

4.2. PRM ESPERIMENTUA

Behin ClpB proteinaren isoforma kanonikoaren peptido proteotipikoak hautatuta PRM esperimentua burutu zen. Analizatutako laginak, bai ClpB proteina purifikatutik eratorritako peptido triptikoen nahastura zein *E. coliren* erauzkin osotik eratorritako peptido triptikoen nahastura ere, izan ziren. Monitorizatutako peptidoak aurreko taulan (5. taula) zerrendatutakok izan ziren. Esperimentutik jasotako datu gordinak Proteome Discoverer programaren bidez prozesatu ziren eta behatutako peptidoak zeintzuk ziren zehaztu zen. Datuok Skyline programarekin ireki eta honela peptido bakoitzaren erretentzio denborarekiko intentsitatearen kromatogramak jaso ziren (14-19. irudiak).

Hautatutako peptido proteotipiko guztiak erauzkin osoaren liseriketa triptikoan monitorizatu ziren. Horretarako peptido proteotipiko bakoitzaren masa eta kargaren informazioa erabili zelarik aurretiaz burututako ClpB proteinaren *shotgun* MS/MS esperimentutik jasotako emaitzetan oinarriturik, zeintzuek 5. taulan adierazi dira. Dena dela, PRM esperimentua aurrera eramateko beharrezkoa da monitorizatuko diren peptidoen masa teorikoa ere kalkulatzeko. Balio hauek, Skyline programa informatikoa erabiliz kalkulatu ziren.

Jarraian erakusten diren kromatograma guztietan peptido proteotipiko bakoitzaren monitorizazioaren kromatogramak ikus daitezke (14-19. irudiak). Monitorizazioa bai erauzkin osoan bai purifikatutako proteinarekin burutu zen. Izan ere, baldin eta erauzkin osoan monitorizatutako peptidoaren seinalea ikusteko zailtasunik izanez gero, proteina purifikatuan peptidoak izandako erretentzio denborak gida gisa balio zezakeen intereseko peptidoaren seinalea non bilatu jakiteko (6. taula).

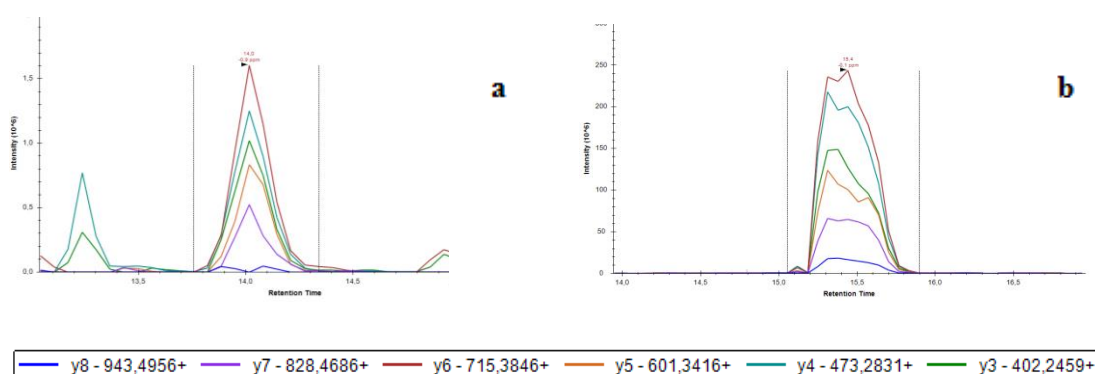
6. taula. PRM esperimentuan monitorizatu diren peptidoen erretentzio denbora erauzkin osoaren laginean eta proteina purifikatuaren laginean. Peptidoa bi kasuetan behatu izan denerako, erretentzio denboren aldea (min) kalkulatu da. ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ eta ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ metionina oxidatu gabea eta oxidatutun espezieak dira hurrenez hurren

Peptidoa	Datuen analisisan peptidoari erantsitako konfiantza maila		Erretentzio denbora (min)		
	Erauzkin osoa	Proteina purifikatua	Erauzkin osoa	Proteina purifikatua	Aldea
⁶² TDINQALNR ⁷⁰	Altua	Altua	14,0	15,4	1,4
⁷¹ LPQVEGTGGDVQPSQDLVR ⁸⁹	Altua	Altua	30,1	30,08	0,02
¹⁰¹ RGDNFISSELFVLAALLESR ¹¹⁹	Tartekoa	Altua	Ez da ikusi	64,4	
¹⁰² GDNFISSELFVLAALLESR ¹¹⁹	Baxua	Altua	Ez da ikusi	72,1	
¹²⁸ AAGATTANITQAIEQMR ¹⁴⁴	Tartekoa	Altua	Ez da ikusi	42,0	
¹²⁸ AAGATTANITQAIEQMR ¹⁴⁴	Altua	Altua	Ez da ikusi	30,4	
²¹³ TAIVEGLAQR ²²²	Tartekoa	Altua	18,8	19,5	0,7

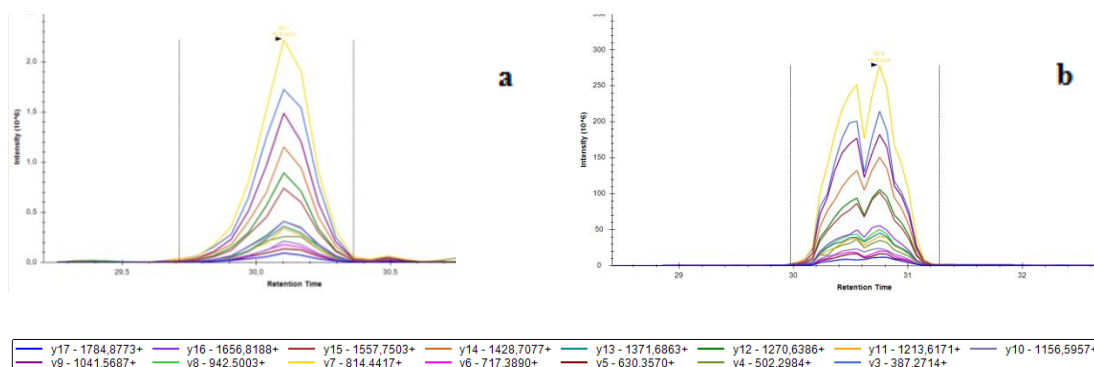
Peptido proteotipikoak banaka aztertzean (14-19. irudiak) ikus daiteke, ClpB95 isoformaren esklusiboak diren ⁶²TDINQALNR⁷⁰ eta ⁷¹LPQVEGTGGDVQPSQDLVR⁸⁹ peptidoak eta ClpB isoforma bietan dagoen ²¹³TAIVEGLAQR²²² peptidoak (14., 15. eta 16. irudietan hurrenez hurren) seinale ona ematen dutela erauzkin osoan. ClpB proteina purifikatuaren eta erauzkin osoaren espektroak alderatuta, hiru kasu hauetan erauzkinean peptidoen askoz ere seinale hobea, piko definituagoa jaso zen. ClpB proteina purifikatua bi tontor zituen pikoak ikusi ziren. Honen arrazoia zein izan zitekeen ezezaguna da, aukera bat peptidoen fragmentaziorako sprayak lagin hori analizatzerakoan peptidoak era arrakastatsuan fragmentatu ez izana da.

Aipatu beharra dago peptidoen monitorizazioa erauzkin osoan edo proteina purifikatuaren liseriketatik eratorritako peptido nahasturan egin, bietan gradiente berdina erabilita, peptido jakin baten erretentzio-denbora apurtxo bat aldatzen dela. PRM esperimentua burutzeko baldintzak berdinak izan ziren bi kasuetan baina kontutan eduki beharra dago laginak ezberdinak izatean kromatografian zeharreko eluzioa ere desberdina izango dela neurriren batean. Hala ere, erretentzio denboren aldeak nabarmenak ez izateak erauzkin osoaren analisia errazten du monitorizatutako

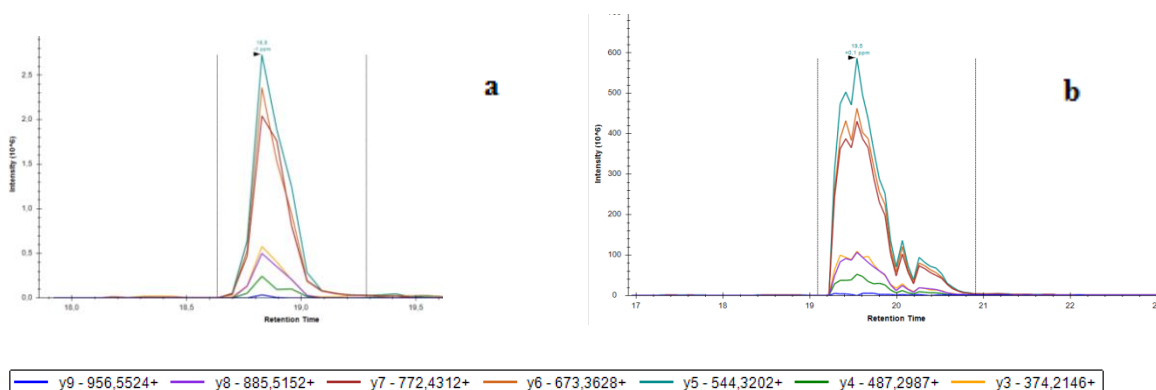
peptidoa ikusteko zailtasunik egonez gero, gutxi gora behera dagokion seinalea non agertu beharko litzatekeen jakin daitekeelako. Bada beste datu bat interesekoa dena: peptido beraren fragmentuen seinalearen intentsitatearen informazioak peptido zuzena monitorizatu dela adierazten du. Hau da, peptido bera izango bada, peptido jakin hori monitorizatzen den aldioro seinalerik handiena aurkeztzen duen fragmentu-ioia bera da eta seinale txikiena aurkeztuko duena ere bera izango da analisia burutzen den kasu guztietan.



14. irudia. $^{62}\text{T DINQALNR}^{70}$ peptidoari dagokion seinalea erauzkin osoan (a) eta ClpB proteina purifikatuari (b) dagokion laginean. Kolore desberdineko gailurrek fragmentu-ioi desberdinen intentsitateei dagokie. Irudiaren azpiko legendan lerro bakoitzak irudikatzen duen fragmentu-ioia zein den adierazten da, intentsitate handienekotik hasi eta txikienekora ordenatuta daudelarik.



15. irudia. $^{71}\text{LPQVEGTGGDVQPSQDLVR}^{89}$ peptidoari dagokion seinalea erauzkin osoan (a) eta ClpB proteina purifikatuari (b) dagokion laginean. Kolore desberdineko gailurrek peptidoaren fragmentu-iei desberdinen intentsitateei dagokie. Irudiaren azpiko legendan lerro bakoitzak irudikatzen duen fragmentu-ioia zein den adierazten da, intentsitate handienetik hasi eta txikienera ordenatuta daudelarik.



16. irudia. $^{213}\text{TAIVEGLAQR}^{222}$ peptidoari dagokion seinalea erauzkin osoan (a) eta ClpB proteina purifikatuari (b) dagokion laginean. Kolore desberdineko gailurrek peptidoaren fragmentu-iei desberdinen intentsitateei dagokie. Irudiaren azpiko legendan lerro bakoitzak irudikatzen duen fragmentu-ioia zein den adierazten da, intentsitate handienetik hasi eta txikienera ordenatuta daudelarik.

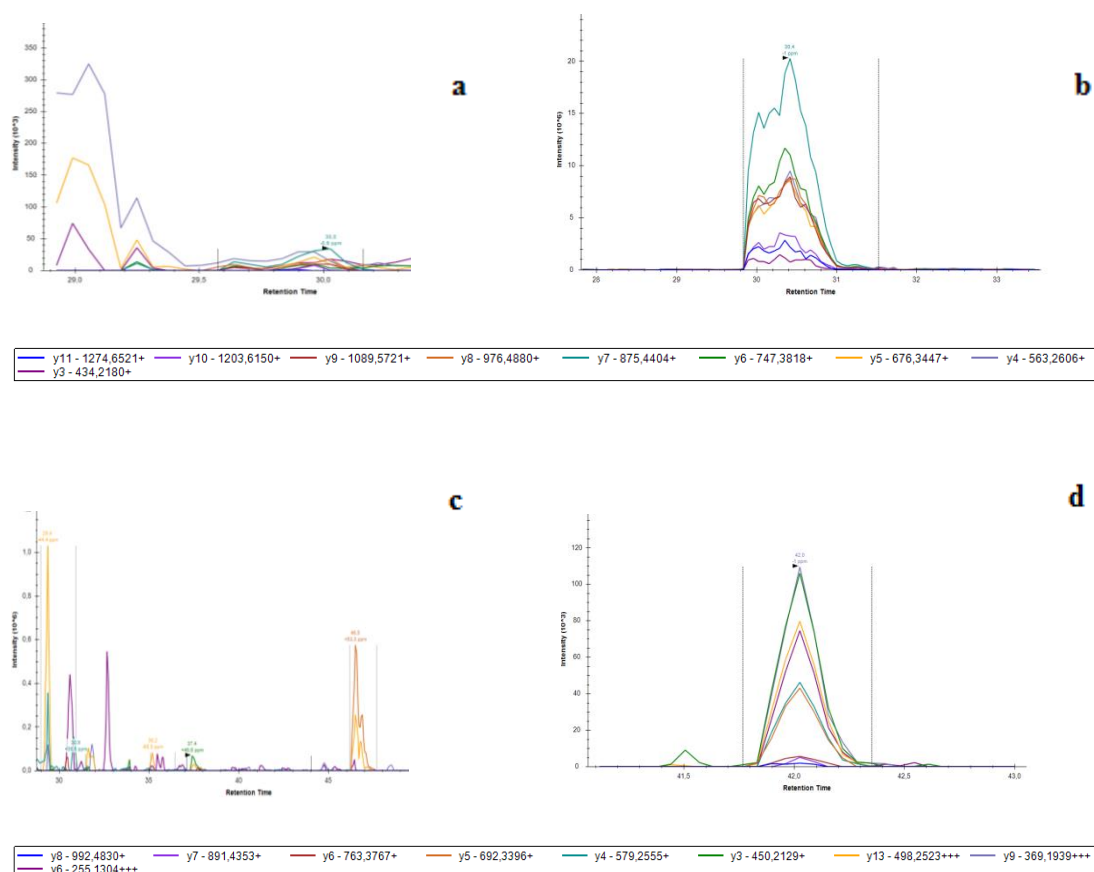
$^{101}\text{RGDNFISSELFVLAALERS}^{119}$, $^{102}\text{GDNFISSELFVLAALERS}^{119}$ eta $^{128}\text{AAGATTANITQAIEQMR}^{144}$ (ez metionina oxidatuduna ez eta oxidatu gabea ere) peptidoak ezin izan ziren erauzkin osoan ikusi (17-19. irudiak).

$^{128}\text{AAGATTANITQAIEQMR}^{144}$ peptidoaren sekuentzian metionina (M) bat dago. Masa espektrometriarako laginen prestakuntzan erabiltzen diren errektiboak direla eta, ohikoa da metionina oxidatzea eta ondorioz, peptido honetarako bi seinale jaso dira; metionina oxidatua ez duena ($^{128}\text{AAGATTANITQAIEQMR}^{144}$) eta 5,3316 Da

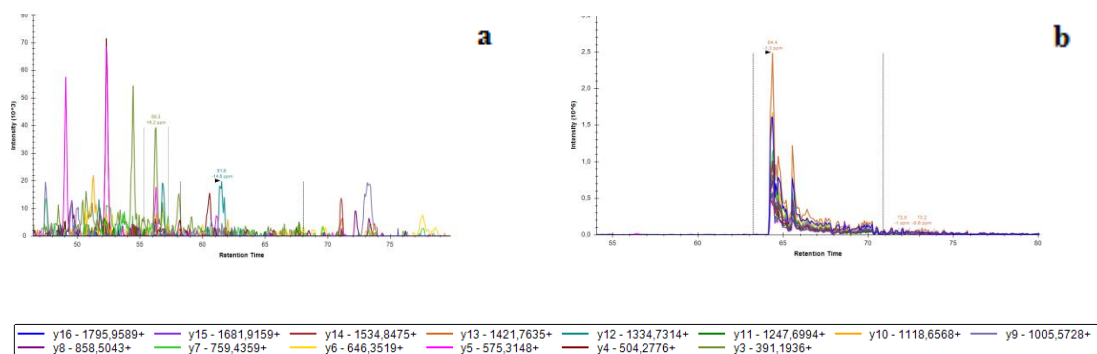
gehiago dituen metionina oxidatutun (¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴) peptidoa (17. irudia). Aurreko kasuan bezala, espezie bi hauek erauzkin osoan ikustea ezinezkoa izan zen. Intentsitate jakineko seinale bat jaso beharrean, horren intentsuak ez diren bi seinale ikusi beharko lirateke eta kasu konkretu honetarako seinaleok ez ziren hautemangarriak izan. ClpB proteina purifikatuaren laginean bi espezie hauek eman zituzten eluzio profilak nahiko ezberdinak izan ziren. Eraldaketarik gabeko peptidoari dagokion seinaleari erreparatuta, bere eluzioa minutu batez luzatu zen eta metionina oxidatutunarentzako berriz, molekula guztiak nahiko jarraian askatu ziren zutabetik maximo bakarreko profila emanez. Beraz, kasu honetan ere peptido honen bi formak baztertu egin daitezke aurrerantzean egingo diren kuantifikazio saioretarako.

¹⁰¹RGDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ peptido proteotipikoak ebaketa galdua du eta beraz proteotipiko zentzu hertsian ezin da kontsideratu. Tripsinak burututako proteinaren liseriketa ez zen guztiz eman eta horregatik argininaren (R) osteko peptido lotura moztu gabe dago. Jakina da izaera honetako peptidoak monitorizatzek ez duela emaitza onik ziurtatzen. Arrazoiatariko bat, ¹⁰²GDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ peptidoa ere liseriketaren ondorioz sortu izana da. Hau aurreko peptidoaren bikia da baina galdutako ebaketarik gabea. Espezie bat eduki beharrean, bi espezie zeuden eta ondorioz, peptido bakarrak eman beharko zukeen intentsitatea bi espezieen artean banatu egiten zen. Nahiz eta erauzkin osoan bi peptido hauek ikustea ezinezkoa izan, ClpB proteina purifikatuaren laginean lortutako emaitzei erreparatuta (18b eta 19b irudiak) aukeraketarako peptidoa egokia ez zen ideia are gehiago indartzen da. Bi peptidoentzako, eluzio profilak ez zuen maximo bakarreko piko baten itxura, seinale on batek eman beharko lukeen legez. Horren orde, hainbat maximo erlatibo zituen zeintzuen agerpena ez zen beherakorra, baizik eta zorizkoa eta gainera denbora nahikoz luzatzen zen. Profil honek, kromatografiak arazoren bat zuela aditzera eman zezakeen baina beste peptido batzuk era argian ikusi izanak hipotesi hau bazterten du. Peptido hauek luzaro eluitzen egotea peptidoaren berezko ezaugarria da, erretxinarekin dituen elkarrekintzen arabera. Beraz, peptido proteotipiko hauek ezin izango dira erabili aurrerantzean lagin konplexuetan ClpB isoforma kanonikoaren kuantifikazioa burutzeko.

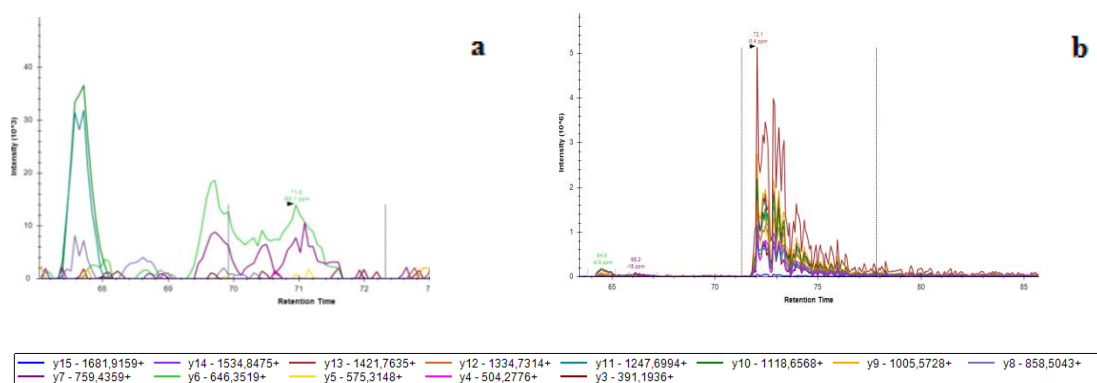
Azken hiru peptido hauek beraz, ez lirateke erabiliko ClpB proteinaren jarraipena ez kuantifikazioa burutzeko. Aldez aurretik peptido proteotipiko egokienak ez izatearen susmoa zegoen baina aipatu bezala beti ezin izaten da peptido proteotipiko ezin hobekin lan egin, kasu honetan bezala non ClpB isoformaren espezifikoak diren peptidoak oso gutxi dira eta beraz daudenekin saiakerak egin behar dira. Aipatu beharra dago, erauzkin osoan behatu ezin izan diren peptido hauentzako Skyline programak nahiz eta oker egin peptido bakoitzari piko bat lehenetsi egiten diola (17a, 17c, 18a eta 19a irudiak). Hori dela eta, esan bezala azken peptido hauen seinaleak jaso ez diren arren, irudietan piko bat nabarmentzen da triangulutxo beltzez. Dena dela, marka hori ez da peptidoaren adierazgarri kasu hauetan.



17. irudia: $^{128}\text{AAGATTANITQAIEQMR}^{144}$ peptidoari dagozkion emaitzak. A eta b irudietan metionina oxidatu gabea duen sekuentziari dagozkion erauzkin osoko (a) eta ClpB proteina purifikatuaren (b) lagineko seinaleak ikus daitezke. C eta d irudietan berriz, metionina oxidatutun peptidoari dagozkion emaitzak erauzkin osoan (c) eta proteina purifikatuan (d). Irudien azpiko legendan lerro bakoitzak irudikatzen duen fragmentu-iaioa zein den adierazten da, intentsitate handienekotik hasi eta txikienera ordenatuta daudelarik.



18. irudia: $^{101}\text{RGDNFISSELFVLAALLESR}^{119}$ peptidoari dagokion seinalea erazkin osoan (a) eta ClpB proteina purifikatuari (b) dagokion laginean. Kolore desberdineko gailurrek peptidoaren fragmentu-ioi desberdinen intentsitateei dagokie. Irudiaren azpiko legendan lerro bakoitzak irudikatzen duen fragmentu-ioia zein den adierazten da, intentsitate handienekotik hasi eta txikienera ordenatuta daudelarik.



19. irudia: $^{102}\text{GDNFISSELFVLAALLESR}^{119}$ peptidoari dagokion seinalea erazkin osoan (a) eta ClpB proteina purifikatuari (b) dagokion laginean. Kolore desberdineko gailurrek peptidoaren fragmentu-ioi desberdinen intentsitateei dagokie. Irudiaren azpiko legendan lerro bakoitzak irudikatzen duen fragmentu-ioia zein den adierazten da, intentsitate handienekotik hasi eta txikienera ordenatuta daudelarik.

4.3. *E. COLIREN* ERAUZKIN OSOAREKIN EGINDAKO *SHOTGUN* ESPERIMENTUA

Behin PRM esperimentua eginda, era ituratuan analizatutako *E. coliren* erauzkin osoaren lagina *shotgun* MS/MS bezala analizatu zen, monitorizatutako peptidoak behatzeko aukera zegoen ala ez aztertzeko. Esperimentua burututakoan behatutako peptidoen zerrendatik abiatuta, teknika ituratuaren bidez monitorizatutako peptidoak *shotgun* MS/MS esperimentuan ere detektatu ziren ala ez determinatzeari ekin zitzaion (7. taula).

7. taula. PRM esperimentuan monitorizatu ziren peptidoetatik *shotgun* MS/MS bidez zeintzuk behatu ziren eta haien konfiantza maila.

Peptidoa	<i>Shotgun</i> MS/MS esperimentuan behatua	Konfiantza maila
⁶² TDINQALNR ⁷⁰	Bai	Baxua
⁷¹ LPQVEGTGGDVQPSQDLVR ⁸⁹	Bai	Altua
¹⁰¹ RGDNFISSELFVLAALSR ¹¹⁹	Ez	
¹⁰² GDNFISSELFVLAALSR ¹¹⁹	Ez	
¹²⁸ AAGATTANITQAIEQMR ¹⁴⁴	Bai	Baxua
¹²⁸ AAGATTANITQAIEQMR ¹⁴⁴	Bai	Tartekoa
²¹³ TAIVEGLAQR ²²²	Bai	Altua

E. coliren erauzkin osoarekin egindako *shotgun* MS/MS esperimentuan identifikatutako peptidoen zerrenda aztertuta, monitorizaziorako aukeratutako sei peptidoetatik lauren (⁶²TDINQALNR⁷⁰, ⁷¹LPQVEGTGGDVQPSQDLVR⁸⁹, ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ -metionina oxidatu eta oxidatu gabearekin- eta ²¹³TAIVEGLAQR²²²) agerpena ikusi zen. Aipatzekoa da nahiz eta lau peptido hauek ikusteko aukera eduki bakoitzak identifikazioari loturiko konfiantza maila zehatza zuela erantsita. ⁶²TDINQALNR⁷⁰ eta ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ (metionina oxidatu gabea) peptidoen identifikazioa burutu zen arren, konfiantza baxuko balioa zuten erantsita (%5ekoa baino errore handiagoa). Errealitatean, sailkapen honetan aurkitzen diren peptidoak ez dira ziurtzat hartzen eta baztertuak izaten dira kasu guztietan. Hori dela eta, lortutako bi emaitza hauek ez dira batere adierazgarriak.

Metionina oxidatudun ¹²⁸AAGATTANITQAIEQMR¹⁴⁴ peptidoari tarteko konfiantza balioa erantsi zitzaion. Honek gauzatutako errorea %5ekoa dela adierazten du. Ikerketaren arabera datu hauek kontutan hartu egiten dira ala ez, dena dela gaur egungo joera zorrotasunerakoa da eta onartzen diren identifikazio bakarrak konfiantza maila altukoak (%1ekoa edo errore baxuagoa) izaten dira. Fidagarritasun maila honekin identifikatutako peptidoak ⁷¹LPQVEGTGGDVQPSQDLVR⁸⁹ eta ²¹³TAIVEGLAQR²²² izan ziren. PRM esperimentuaren bidez ClpB proteinaren jarraipena egiteko aukeratutako ¹⁰¹RGDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ eta ¹⁰²GDNFISSELFVLAALSR¹¹⁹ peptidoen seinalerik ez zen jaso.

Datuok PRM esperimentuaren alde egiten dute. Izan ere, aurretik behin baino gehiagotan aipatu den bezala, *shotgun* esperimentuetan kasu askotan intereseko proteina behatzeko aukerarik ez da izaten, bai zelulan proteina horrek presentzia txikia duelako edo lagina aztertzerakoan aztergai den proteinarekin batera beste espezie asko eta asko ere daudelako eta interferentzia horrek intereseko seinalea jasotzea zailtzen duelako.

5. ONDORIOAK

Lan honetan PRM esperimentu baten bidez ClpB proteinaren jarraipena egiteko monitorizatu beharreko peptido proteotipiko egokiak zeintzuk diren zehaztu da. Hautaketarako irizpideak ezarrita, esperimentalki frogatu da peptido horiek proteomika ituratuaren bidez lagin konplexu batean behatzen direla eta aztergai den proteina monitorizatzeko aukera ematen dutela.

Proteomika ituratuko esperimentu honen diseinuak, ClpB proteinaren kuantifikazio erlatibo zein absolutua burutzeko baldintzak ezarri ditu. Zehazki, *E. colik* sintetizatzen duen ClpBren ClpB95 isoforma espezifikoki kuantifikatu ahal izateko oinarriak ezarri dira. Izan ere, monitorizatutako peptidoak ez dira deskribatutako beste isoforman, ClpB80-an, agertzen.

Aurrerantzean jarraituko den bidea

Bero estresa eragiten duten baldintzetan, *E. colin* ClpB95 zein ClpB80 isoformek zelulen bideragarritasuna ahalbidetzen dute. Bi isoformen artean eratutako hexameroek isoforma bakarreko konplexuek baino eraginkortasun handiagoa erakutsi dute agregatuen berreskurapenean. Estres baldintzapeko egoera batetik bestera isoforma baten edota bestearen adierazpenean aldaketak ematen direnez, interesekoa da etorkizunean hauen adierazpenaren kuantifikazioa burutzea.

E. coliren erauzkin konplexuetan proteomika ituratuaren bidez ClpB95 isoforma identifikatu eta kuantifikatu ahal izateko esperimentua diseinatu da. Beraz, lan honen bidez, baldintza konkretuetan aurkitzen diren zelulengan estres ezberdinak aplikatu eta isoforma baten zein bestearen adierazpenean ematen diren aldaketak ikertzeko bidearen abiapuntua ezarri da.

6. BIBLIOGRAFIA

- Acebron, S.P., Martin, I., del Castillo, U., Moro, F., Muga, A. 2009. DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A chaperone network at the aggregate surface. *FEBS Lett.* 583: 2991–2996.
- Aebersold, R., Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 422: 198–207.
- Akoev, V., Gogol, E.P., Barnett, M.E. and Zolkiewski, M. 2004. Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA+ ATPase ClpB. *Protein Sci.* 13: 567-574.
- Anderson, L., Hunter, C.L. 2006. Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Mol. Cell. Proteomics.* 5: 573–588.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G. 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts and new words. *Electrophoresis.* 19: 1853-1861
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M., Kuster, B. 2012. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal. Bioanal. Chem.* 404: 939-965
- Barnett, M.E., Nagy, M., Kedzierska, S., Zolkiewski, M. 2005. The amino-terminal domain of ClpB supports binding to strongly aggregated proteins. *J. Biol. Chem.* 280: 34940–34945.
- Barnett, M.E., Zolkiewska, A., Zolkiewski, M. 2000. Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 275: 37565-37571
- Bence, N.F., Sampat, R.M., Kopito, R.R. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 292: 1552–1555.
- Bennett, E.J., Bence, N.F., Jayakumar, R., Kopito, R.R. 2005. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol. Cell.* 17:351–365
- Bondarenko, P.V., Chelius, D., Shaler, T.A. 2002. Identification and relative quantification of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 4741–4749
- Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 125: 443–451.
- Burnette, W. N. 1981. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195–203.
- Chelius, D., Bondarenko, P.V. 2002. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *J Proteome Res.* 1: 317–323.

- Choi, S., Kim, J., Yea, K., Suh, P.G., Ryu, S.H. 2010. Targeted label-free quantitative analysis of secretory proteins from adipocytes in response to oxidative stress. *Anal. Biochem.* 401: 196–202.
- Chow, I.T., Baneyx, F. 2005. Coordinated synthesis of the two ClpB isoforms improves the ability of *Escherichia coli* to survive thermal stress. *FEBS Lett.* 579: 4235-4241
- Chow, I.T., Barnett, M.E., Zolkiewski, M., Baneyx, F. 2005. The N-terminal domain of *Escherichia coli* enhances chaperone function. *FEBS Lett.* 579: 4242–4248.
- Ciechanover, A. 2005. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ.* 12:1178–1190.
- Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hotchstrasser, D.F., Sanchez, J.C. 2000. The dynamic range of proteome expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis.* 21: 1104-1115
- de Leenheer, A. P., Thienpont, L. M. 1992. Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology. *Mass Spectrom. Rev.* 11: 249–307.
- Dobson, C.M.2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15:3–16.
- Duncan, M. W., Yergey, A. L., Patterson, S. D. 2009. Quantifying proteins by mass spectrometry: The selectivity of SRM is only part of the problem. *Proteomics* 9: 1124–1127
- Fink, A.L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 3:R9–R23.
- Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T., Domon, B. 2012. Targeted Proteomics Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics.* 11: 1709-1722.
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P. 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1006940–6945.
- Glover, J.R., Lindquist, S.1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell.* 94:73–82.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., Bukau, B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13732–13737
- Hanson, P.I., Whiteheart, S.W. 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 519–529.
- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 475: 324–332.

- Horwich, A. 2002. Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J. Clin. Invest.* 110:1221–1232.
- Jensen, O.N. 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.* 7: 391-403
- Kedzierska, S., Akoev, V., Barnett, M.E., Zolkiewski, M. 2003. Structure and function of the middle domain of ClpB from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 42:14242–14248.
- Kirkpatrick, D.S., Gerber, S.A., Gygi, S.P. 2005. Novel Approach for Quantitative Measurements of Matrix Metalloprotease-1 (MMP1) in Human Breast Cancer Cells Using Mass Spectrometry. *J. Anal. Sci. Methods. Instrum* 35: 265–273.
- Kondrat, R.W., McClusky, G.A., Cooks, R.G. 1978. Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. *Anal. Chem.* 14: 2017–2021.
- Krajewska, J., Kędzierska-Mieszkowska, S. 2014. AAA+ ClpB chaperone as a potential virulence factor of pathogenic microorganisms: Other aspect of its chaperone function. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 5: 31-35
- Kuhn, E., Wu, J., Liao, H., Zolg, W., Giuld, B. 2004. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics.* 4: 1175–1186.
- Kuster, B., Schirle, M., Mallick, P., Aebersold, R. 2005. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 577–583.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R. 2008. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 4: 222
- Li, M., Gray, W., Zhang, H., Chung, C. H., Billheimer, D., Yarbrough, W. G., Liebler, D. C., Shyr, Y., and Slebos, R. J. 2010. Comparative shotgun proteomics using spectral count data and quasilielihood modeling. *J. Proteome Res.* 9: 4295–4305.
- Liebler, D.C., Zimmerman, L.J. 2013. Targeted Quantification of Proteins by Mass Spectrometry. *Biochemistry.* 52: 3797-3806.
- Mallick, P. Schirle, M., Flory, M.R., lee, H., Martin, D., Ranish, J., Raught, B., Schmitt, R., Werner, T., Kuster, B., Aebersold, R. 2007. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* 25: 125–131
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., Horning, S. 2011. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics.* 10: M111.011015.

- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., and Horning, S. 2011. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics*. 10: M111.011015.
- Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., Yoshida, M. 1999. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 7184–7189.
- Nagaraj, N., Alexander Kulak, N., Cox, J., Neuhauser, N., Mayr, K., Hoerning, O., Vorm, O., and Mann, M. 2012. System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top orbitrap. *Mol. Cell. Proteomics*. 11: M111.013722.
- Nagy, M., Guenther, I., Akoyev, V., Barnett, M.E., Za-vodszky, M.I., Kedzierska-Mieszkowska, S. and Zol-kiewski, M. 2010. Synergistic cooperation between two ClpB isoforms in aggregate reactivation. *J. Mol. Biol.* 396: 697-707.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V. 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27–43.
- Olsen, J. V., Schwartz, J. C., Griep-Raming, J., Nielsen, M. L., Damoc, E., Denisov, E., Lange, O., Remes, P., Taylor, D., Splendore, M., Wouters, E. R., Senko, M., Makarov, A., Mann, M., and Horning, S. 2009. A dual pressure linear ion trap orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell. Proteomics*. 8: 2759–2769
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 1: 376–386
- Park, S.K., Kim, K.I., Woo, K.M., Seol, J.H., Tanaka, K., Ichihara, A., Ha, D.B., Chung, C.H. 1993. Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the clpB gene of *Escherichia coli* and characterization of its gene products. *J. Biol. Chem.* 268: 20170-20174
- Peterson, A.C., Russel, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S., Coon, J.J. 2012. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*. 11: 1475-1488.
- Picotti, P., Aebersold, R. 2012. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Methods*. 9: 555–566.
- Picotti, P., Bodenmiller, B., Aebersold, R. 2013. Proteomics meets the scientific method. *Nat. Methods*. 10: 24-27
- Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., Aebersold, R. 2009. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*. 138: 795–806.

- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E., Lindquist, S. 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 12: 479–492.
- Rinner, O., Mueller, L.N., Hubálek, M., Müller, M., Aebersold, R. 2007. An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks. *Nat. Biotechnol.* 25: 345–353.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D.J. 2004. Multiplexed protein quantification in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics*. 3: 1154–1169.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. 2006. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds?. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:118–126.
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A., Lindquist, S. 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* 11:2357–2364.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., Lindquist, S. 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21: 289–296.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J.W., Schultz, P.G., Bukau, B., Mogk, A. 2004. Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 607–615.
- Sherman, J., McKay, M. J., Ashman, K., Molloy, M. P. 2009. How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics*. 9: 1120–1123
- Squires, C.L., Pedersen, S., Ross, B.M., Squires, C. 1991. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* 173: 4254–4262.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350–4354.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E.U., Dougan, D.A., Tsai, F.T., Mogk, A., Bukau, B. 2004. Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell*. 119:653–665.
- Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. 286:1888–1893.
- Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E., Warscheid, B. 2007. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 7: 340–350.

Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphrey-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Gene Eng Rev* 13: 19–50

Woo, K.M., Kim, K.I., Goldberg, A.L., Ha, D.B., Chung, C.H. 1992. The Heat-shock Protein ClpB in *Escherichia coli* Is a Protein-activated ATPase. *J. Biol. Chem.* 267: 20429-20434

Yost, R.A., Enke, C.G. 1978. Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. *J. Am. Chem. Soc.* 100: 2274–2275.

Yost, R.A., Enke, C.G. 1979. Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structural elucidation. *Anal. Chem.* 51: 231–243.

Zolkiewski, M. 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 28083–28086.

Zolkiewski, M., Zhang, T., Nagy, M. 2012. Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones. *Arch. Biochem. Biophys.* 520: 1-6