

## Seminarska naloga pri predmetu Struktura proteinov

### Dešifriranje proteoma raka z analitičnimi metodami (The grand challenge to decipher the cancer proteome)

Prizadevanja dešifrirati proteinske različice raka so prisotna že veliko desetletij. Težave so predvsem velik dinamični obseg proteinov (nekaterih je zelo veliko, spet drugih zelo malo), njihove mnoge izooblike in heterogenost bolezni. Napredek v bioloških znanostih v zadnjih 20 letih je pokazal, da študije proteinov, ki se izražajo v celičnih sistemih, vsebujejo veliko ključnih informacij za boljše razumevanje zelo kompleksnih mehanizmov, ki se odvijajo pri nastanku raka, njegovem napredovanju in metastazi ter tudi pri odkrivanju učinkovitih metod za njegovo zdravljenje. Napredek je viden predvsem v analitičnih tehnikah in pri implementaciji različnih strategij, s katerimi se proteom razdeli v obvladljive koščke in je tako manj kompleksen. To nam omogoča odkrivanje novih biomarkerjev, tj. značilnih proteinov, ki služijo kot indikatorji za določeno vrsto raka.

Začetki proteinskega profiliranja za odkritje različic v raku so bili narejeni z uvedbo gelskih elektroforez. Najprej so uporabljali enodimenzionalne, nato pa se je pojavila 2D PAGE, ki je bila dolga leta edina uspešna in uporabna tehnika. Z njo so profilirali na tisoče proteinov v skoraj vseh vrstah raka.

Zanimanje za uporabo masne spektrometrije (MS) v analizi proteinov traja že dolga leta. Masni spektrometri imajo tri bistvene dele: vir ionov, masni analizator in detektor. Masni spektrometri pretvorijo komponente v vzorcu v ione in jih nato analizirajo na podlagi njihovega  $m/z$ . Napredek je odvisen predvsem od razvoja instrumentov. Na začetku se je MS uporabljala za identifikacijo proteinov v 2D gelskih ekstraktih celic – zagotovila je učinkovito sredstvo za pridobitev peptidnih prstnih odtisov mase za proteine, ločene v 2-DE gelu. Razvoj z matriko podprte laserske desorpcijske ionizacije (MALDI) je dopolnil proteomiko, temelječo na gelih, saj so lahko proteinske lise ali črte izrezali iz gelov in proteine prenesli na MALDI MS za identifikacijo. Kot rezultat so bili razviti 2D zemljevidi za različne vrste raka. Proteinom, ločenim z 2D PAGE in opredeljenim z MS lahko določimo tudi raven ekspresije na podlagi DIGE kvantifikacije (Difference gel electrophoresis). To je oblika gelske elektroforeze, kjer lahko označimo do tri vzorce s fluorescentnimi barvili. Nato jih zmešamo skupaj, naredimo 2D PAGE in analiziramo z osvetljevanjem pri različnih valovnih dolžinah. S pomočjo te tehnike so opredelili proteine, ki se lahko uporabljajo za razvrstitev 42 celičnih linij, glede na stopnjo diferenciacije. Vzoredni razvoj elektrosprej ionizacije (ESI) MS za identifikacijo proteinov ter uporaba različnih prefrakcijskih in ločevalnih metod ter označevanja proteinov je omogočil kvantitativno analizo vse večih proteinov iz celic, tkiv in bioloških tekočin. Masni spektrometri, ki so trenutno na voljo, imajo močno izboljšano občutljivost ter hitrost skeniranja. Kot rezultat je identifikacija skoraj vseh proteinov, prevedenih iz izraženih genov v rakavih celicah, postala dosegljiva. Prav tako je sedaj uresničljiva tudi izčrpna identifikacija proteinov, povezanih z določenimi predeli celice (npr. proteini, izraženi na celični površini, za sekrecijo).

Za ugotavljanje izražanja proteinov, ki je pravzaprav ključen biomarker rakastih obolenj, lahko uporabimo več metod. Proteinske mikromreže, nam poleg napovedi izražanja proteinov služijo še za determinacijo interakcij proteinov in peptidov z zdravili, majhnimi ligandi in drugimi biomolekulami, npr. z drugimi proteini in avtoproteiteli za tumorske antigene. Zgovorne so tudi PTM, predvsem glikozilacija. Z uporabo afinitetne kromatografije lahko primerjamo glikoproteine zdravih in bolnih oseb in jih analiziramo z MS. Nekateri glikoproteini se razlikujejo. Pomembne so tudi študije signalnih poti. Zanje uporabljamo kvantitativno MS, ki dovoljuje velik obseg analiz signalnih dogodkov in metabolni SILAC, ki priskrbi sredstva za kvantitativno proteomsko analizo. Mutirani proteini in tisti divjega tipa se razlikujejo tudi v fosforilacijitirozinov. Prek analize celotne celice ali lizatov tkiva lahko z LC-MS/MS identificiramo ali gre za iniciacijo tumorjev, invazijo ali metastazo. Podobne ugotovitve lahko dobimo tudi, če se osredotočamo na sekretome celic ali pa na sam medij, v katerem so celice rasle in vanj izločale proteine. Ti naj bi bili v večji meri povezani s procesom adhezije celic.

Mnoge proteomske študije so skušale identificirati biomarkerje raka z izrabo imunskega odziva, ki se pojavijo z razvojem tumorjev. Avtoproteitelesa proti avtolognim antigenom, ki jih povezujemo s tumorji, so odkrili pred začetkom simptomov in tako bi ta lahko bila biomarkerji za zgodnje odkrivanje raka. Čeprav je napredek ogromen, vseeno obstajajo možnosti izboljšave, npr. bolj specifične in natančne aparature, primerjava velikih števil vzorcev, vzpostavitev baz podatkov ...