

PROFILIRANJE PROTEINOV NA OSNOVI AKTIVNOSTI

ABPP za odkrivanje encimov v raku

Obsežne metode profiliranja so razkrile številne genske in protein izrazne spremembe, ki korelirajo s tumorigenezo. Celice s temeljnimi metabolnimi spremembami pogosto nastajajo med tumorigenezo in prav te spremembe nam omogočijo osnovati biokemijske temelje napredovanja bolezni in malignomov. Prvi primer tega je bil odkrit v 1920 ko je Otto Warburg ugotovil, da rakaste celice porabijo višji nivo glukoze in raje sekrecirajo večina glukoznega ogljika kot laktat, kot pa da ga popolnoma oksidirajo. Od takrat je bilo narejenih veliko študij preko katerih so odkrili raznolike metabolne spremembe pri raku, vključno s spremembami v glikolitičnih poteh, citratnem ciklusu, lipogenezi, lipolizi in proteolizi. ABPP uporabi aktivno mesto-usmerjeno kemično sondo, da direktno oceni funkcionalno stanje velikega števila encimov v nativnih bioloških vzorcih. Sestojijo iz vsaj dveh ključnih elementov: reaktivne skupine za vezavo in kovalentno označevanje aktivnih mest mnogih encimskih razredov in poročevalni označevalec(reporter tag) za detekcijo, olementitev in identifikacijo s sondo označenih encimov v proteomih. Te sonde so lahko prilagojene za in situ ali in vivo označevanje preko zamenjave poročevalnega označevalca(reporter tag) z bio-ortogonalno kemično ročico kot je alkin. S sondo označeni encimi so nato zaznani preko poznejše "click chemistry" konjugacije v različne azid modificirane poročevalne označevalce. ABPP se lahko uporabi za katerokoli celico ali tkivo(predpostavka da je genom parentalnega genoma sekvencioniran) in je lahko v kombinaciji z nizom analitičnih metod za pridobivanje podatkov; z gelskimi in masno spektrometričnimi(MS) metodami. ABPP se pa prav tako lahko uporablja za slikovno upodobitev encimske aktivnosti. Znale so t.i. quenched near-infrared fluorescent activity based probes(qNIRF-AbPs) za slikovno upodobitev cisteinske proteazne aktivnosti v tumorskih ksenograftih(xenografts) in vivo in ex vivo.

ABPP v onkoloških raziskavah

Na osnovi ABPP pridobljenih sond lahko označimo aktivna mesta encimov, kar je osnova za študijo encimskih inhibitorjev. Ta kompetitivni način profiliranja encimov ima nekaj prednosti v primerjavi s klasičnimi metodami, saj lahko hkrati obravnavamo več encimov z večimi različnimi inhibitorji in tako vzporedno primerjamo njihovo selektivnost in afiniteto. Tako lahko razvijemo inhibitorje tudi za neznane encime za katere še niti substratov ne poznamo. Z ABPP principi lahko v pred-kliničnih in kliničnih študijah raka razjasnimo mehanizem delovanja določenega inhibitorja in določimo morebitno toksičnost neke spojine, ki je lahko toksična zaradi svojega preširokega spektra delovanja. Znanstveniki so s pomočjo ABPP odkrili organsko spojino, ki izredno specifično inhibira monoacilglicerol lipazo (MAGL). MAGL katalizira nastanek prekursorja lizofosfatidilne kisline (LPA), ki je ključna pri signalizaciji proliferacije v tumorskih celicah. Tako je ob inhibiciji encima MAGL zavrta rast tumorskih celic.

ABPP in proteaze

Ko so tehnologije kot ABPP koristne za identificiranje deregulirane proteinske aktivnosti, dodatne metode so potrebne za identifikacijo protezskih substratov.

Wells i kolegi so razvili poseben encim (subtiligazo) za označevanje i obogatitev novonastalih N-koncev, ki so posledica proteolitskih cepitev v kompleksni proteinski mešanici. Uporaba slednje tehnike za preučevanje apoptoze je privedla do odkritja 292 novih kaspaznih substratov.

Za pridobivanje bolj kompletne in detajlne mape proteolitskih dogodkov, razvita je posebna metoda, imenovana PROTOMAP, ki vključuje nekaj klasičnih analitskih ter bioinformatičnih pristopov. Združeni skupaj, zagotavljajo dragocen vpogled v topološko mapo proteinov, ter tudi kvantitativno informacijo.

Zaključek

ABPP predstavlja eno izmed najbolj prodornih kemo-proteomskih tehnologij, ki nam je omogočila detajlan pregled obnašanja dereguliranih encimov v razvoju številnih patoloških stanj, kot tudi v razvoju raka. Združena z ostalimi metodi profiliranja, lahko nam odkrije nove biokemijske poti encimov, ki aktivno pomagajo k tumorogenezi. Ti encimi so lahko tarča naslednje generacije terapevtskih zdravil.