

IDENTIFIKACIJSKA TEHNOLOGIJA VEČDIMENZIONALNIH PROTEINOV: STATUS IN PRIHODNOST

Pregled obsega pripomočke in praktične nasvete identifikacije večdimenzionalnih proteinov kot osnovo za obsežno profiliranje kompleksnih bioloških vzorcev. Proteini so zelo dinamične molekule in v nasprotju z genom je proteom zelo dinamičen in se spreminja v skladu z celičnimi in okoljskimi spremembami; proteinska masna spektrometrija (MS) je ena od glavnih metod za identifikacijo proteoma.

Pred kratkim so začeli MS uporabljati tudi za identifikacijo proteinov z uvedbo mehke ionizacijske tehnike v 1980-ih. Razvoj ionizacije v matriksu z desorpcijo z laserjem (MALDI) in elektrosprejne ionizacije (ESI) sta odprla vrata sistematični uporabi MS v proteomskih raziskavah, ker je mehka ionizacija omogočile rutinsko analizo proteinov oz. peptidov brez občutnih napak v procesu.

ESI-MS: pri metodi elektrosprejne ionizacije masne spektrometrije so proteini v kisli raztopini (prebitek H^+) in so ionizirani z razprševanjem v prisotnosti močnega električnega polja. Hitro uparevanje nabitih kapljic omogoča tvorjenje disperznih pozitivnih ionov.

V študijah so uporabljeni tandemski masni spektrometri (**MS/MS**), saj so zmožni hitrega izoliranja in fragmentacije posameznih peptidnih ionov z trčenjem z inertnimi plinskimi molekulami v procesu, ki ga imenujemo »s trkom povzročena disociacija« oz. COLLISION-INDUCED DISSOCIATION (= CID).

Kritična je predvsem interpretacija rezultatov MS/MS spektrov, ki jih dobimo z CID metodo. Pred iznajdbo računalniških algoritmov je bila interpretacija prepuščena *de novo* sekvencioniranju. Naloga je bila časovno prezahtevna za interpretacijo vseh sto do tisoč spektrov na eksperiment. Zahteva po avtomizaciji je povzročila iznajdbo algoritma SEQUEST. Drugi statistični algoritem za hitro identifikacijo proteinov je algoritem STATQUEST, ki ima strožje ocene natančnosti kot SEQUEST.

MudPIT: l.1990 odkrili visoko-resolucijsko frakcioniranje peptidov z večdimenzionalno kapilarno-lestvično kromatografijo. Ta postopek izboljša limite detekcije in pokritost zaporedja v proteinskih kompleksih. Osnovni MudPIT postopek; močna kationska izmenjevalna smola (SCX) –prva faza; v povezavi z RP-18 smolo (reverzno fazna); peptidi so eluirani po korakih iz SCX do RP-18 in ločeni s pomočjo konvecionalnega acetonitrilnega gradienta; eluirani peptidi so potem ionizirani z elektrosprejno ionizacijo in direktno razpršeni v masni spektrometer.

Metoda MudPIT je zelo uporabna analiziranju posttranslacijskih modifikacij. Ugotovili so, da je najučinkovitejša ob hkratni uporabi različnih proteoliz. Vedno bolj se je poslužujejo tudi v funkcijski proteomiki, saj lahko dobro analiziramo velike proteinske komplekse in posledično ugotovimo kakšni so mehanizmi bioloških poti v organizmih. Opazujemo lahko razlike v delovanju različnih modelnih organizmov in odkrivamo razlike med enakimi proteini v različnih tkivih/organizmih. Določimo lahko tkivno in jedrno specifične proteine in na ta način ugotovimo kakšna je vloga določenega tkiva. S to metodo se nam odpirajo nove možnosti pri soočanju s paraziti, ki povzročajo različne bolezni (npr. malarijo), saj lahko podrobno preučimo njihov življenjski cikel in morebitne podedovane mutacije ter tako hitreje razvijamo učinkovitejša zdravila. Pri višjih organizmih je nujna predhodna poenostavitev

vzorca, ki ga izoliramo v različne subcelularne frakcije. Tako dobimo manj kompleksne vzorce in boljšo zaznavo. Odlično nam pripomore k identificiranju transmembranskih proteinov, kjer lahko razlikujemo tudi med integralnimi in perifernimi. Z vsako raziskavo, ki jo naredijo s to metodo pridejo do odkritja novih, še nekategoriziranih proteinov.

Tehnike identificiranja proteinov kot je MudPIT danes še ne dosegajo zadostne kompleksnosti, ki je potrebna za večino bioloških sistemov. Za izboljšanje te so razvili že nekatere tehnične izboljšave kot so linearne ionske tarče. V veliko pomoč pa so nam tudi računalniški programi ter orodja.

Najpreprostejši nam pomagajo filtrirati podatke ter jih povezati z znano literaturo ter predhodnimi napovedmi (ExPASy). Drugi nam podatke sortirajo v skupine, ki jih obogatijo z njihovo funkcijo, lokacijo ter biološko vlogo (GO). Tako dobljene skupine orodja, kot je GOMiner med sabo primerjajo in jih s tem identifikacijsko obogatijo. Pri interpretaciji podatkov je pomembno tudi znanje o domenah. Le-te so pomembne saj sodelujejo pri interakcijah proteinov z drugimi proteini, ligandi ter DNA ali RNA. Z njimi se ukvarjata programa Pfam in InterPro. Bolj zapleteni programi pa združujejo različne podatke. Tako pridejo na plano različne pomembne informacije, ki bi drugače ostale zakrite.