

Analiza proteinskih kompleksov z masno spektrometrijo

Andreja Bratovš, Matja Zalar, Tamara Marić

Za analizo proteinskih kompleksov se zadnje čase uveljavlja kombinacija afinitetnega čiščenja in masne spektrometrije (AP-MS). V prvem koraku z afinitetnim čiščenjem izoliramo raziskovan protein (vabo) in proteine, ki se nanj vežejo (plen). Vabo pred čiščenjem afinitetno označimo. Možnih je več načinov, med njimi tudi 'flag tag' in 'TAP tag'. V drugem koraku z masno spektrometrijo identificiramo plen.

Identifikacija kompleksov: AP-MS nam da le seznam proteinov, ki med sabo interagirajo, ne pa tudi sestavo kompleksa. Za identifikacijo kompleksa je potrebno narediti več zaporednih AP-MS, pri katerih kot vabo označimo različne proteine.

Visoko zmogljive raziskave: AP-MS se uporablja tudi v visoko zmogljivih raziskavah za ugotavljanje povezav v velikih interakcijskih mrežah. Možni so različni pristopi.

- algoritem za grupiranje grafov (*graph-clustering algorithm*): končni rezultat so najbolj verjetni kompleksi;
- socio-afinitetni indeks: uvede se indeks, ki nam pove, koliko sta dva proteina nagnjena k medsebojnemu povezovanju.

Za razliko od prejšnjega pristopa so tukaj proteini v kompleksu razdeljeni na 'jedrne' proteine in 'priponke'.

Izboljšave pri čiščenju: Pri določevanju sestave in strukture proteinskega kompleksa je pomembno, da je proteinski vzorec čim bolj čist. V ta namen se poleg prej omenjene AP, uporabljajo kombinacije klasičnih ločevalnih tehnik, kot so ionska izmenjevalna kromatografija, gelska filtracija, selektivno obarjanje... Največja pomankljivost tega pristopa je neuniverzalnost, saj moramo protokol dela prilagajati za vsak kompleks posebej.

Povezovanje (crosslinking): Pri čiščenju in izolaciji kompleksov se ohranijo le tiste povezave med podenotami, ki so odporne na pogoje lize in izolacije. Šibke vezi, ki običajno razpadejo, pa utrdimo s kemičnimi prečnimi povezovalci (crosslinker). Vsi prečni povezovalci imajo vsaj dve reaktivni skupini, med katerima je vmesnik dolžine 5-15 Å. V praksi sta najbolj uporabljena prečna povezovalca formaldehid in DSP. Reaktivni skupini se v idealnem primeru kovalentno vežeta na sosednja peptida. Možne in za analizo moteče pa so intramolekularne vezave prečnih povezovalcev, zato je pomembno da lahko ločimo med pravilno in nepravilno vezanimi prečnimi povezovalci. V ta namen se uporablja več tehnik, ki večinoma temeljijo na inkorporaciji stabilnih izotopov v proteinski kompleks.

Stehiometrija kompleksov: Za določevanje strukturne organizacije proteinskega kompleksa moramo poznati stehiometrijo komponent znotraj njega. Do tega podatka lahko pridemo s pomočjo različnih tehnik masne spektrometrije. Eden izmed načinov je določitev stehiometrije na podlagi znanih mas posameznih komponent in celotnega proteinskega kompleksa. Pri drugem načinu pa informacijo o stehiometriji dobimo s pomočjo izotopnega označevanja in s sintetičnimi peptidi.

Dinamika kompleksov: Večina proteinskih kompleksov je analiziranih v statičnem stanju, vendar se je z razvojem kvantitativne proteomike omogočilo tudi preučevanje sprememb znotraj kompleksa, ki se zgodijo ob določenem biološkem procesu (npr. celična signalizacija). Razvilo se je več metod in izberemo tisto, ki bo dala optimalne rezultate pri pogojih, v katerih poskus izvajamo:

- Metodi SILAC in ICAT sta si po principu delovanja zelo podobni, razlikujeta se po načinu uvajanja izotopnih molekul v vzorec. Pri SILAC metodi celice rastejo na gojišču z izotopno označenimi aminokislinami. Pri ICAT metodi pa ICAT reagente vnesemo v že pripravljen vzorec denaturiranih in reduciranih proteinov.

- iTRAQ metoda je novejša in uporablja posebne iTRAQ reagente, ki omogočajo hkratno analizo štirih različnih vzorcev z željenim proteinom. Čeprav se po prvi analizi z MS v spektru pojavi samo en vrh, se po tandemski MS/MS zaradi dodane reporterske oznake vrhi razdelijo.