

MODIFIKACIJE SPECIFIČNE PROTEOMIKE: STRATEGIJE ZA KARAKTERIZACIJO POST-TRANSLACIJSKIH MODIFIKACIJ Z UPORABO OBOGATITVENE TEHNIKE

Do danes je bilo opisano več kot 300 različnih vrst proteinov s post-translacijsko modifikacijo, vendar je le malo raziskanih na ravni proteoma. Za biokemično analizo post-translacijskih modifikacij in določitev vloge le-teh v vzpostavitvi vezi substrat-encim je potrebna identifikacija proteinskih substratov in njihovih post-translacijskih mest. Post-translacijske modifikacije na različnih delih proteina lahko dokažemo z metodo obogatitvene tehnike, pri čemer je vključena tudi MS metoda in računalniška analiza podatkov.

Za detekcijo in identifikacijo proteinskih substratov uporabimo različne tehnike, med katerimi je najuporabnejša tako imenovana MS-proteomika, ki vključuje proteolitično razgradnjo s specifično proteazo, uporabo primernih metod za ločevanje post-translacijsko modificiranih peptidov od ostalih peptidov, obogatitveno metodo, izolacijo post-translacijskih peptidov in analizo z HPLC ali MS- identifikacijo peptida in natančno lokalizacijo post-translacijskih mest, oceno možnih peptidov z ročnimi ali avtomatskimi načini preverjena za zagotovitev natančnosti. Predno so post-translacijsko modificirani proteini obogateni so običajno pripravljene iz celičnih kultur ali tkiv in zatem proteolitično razgrajeni, čemur sledi sama analiza post-translacijskih modifikacij. Za samo analizo je potrebno zmanjšati kompleksnost vzorca, kar vključuje separacijo organelov in frakcionacijo proteinov in proteolitičnih peptidov z elektoroforeznimi tehnikami ali večdimenzionalnimi kromatografijami.

Razgradnji proteinov v peptide sledi postopek »obogatitve« post-translacijsko modificiranih peptidov. Poznamo več načinov obogatitve. Pri obogatitvi s protitelesi se protitelesa, za detekcijo post-translacijskih modifikacij proteinov, uporabljajo v kombinaciji z Western blot analizo. Tarčni proteini ali njihova modifikacija se detektirajo z vezavo specifičnih protiteles, ki ob dodatku substrata emitirajo svetlobo. Rezultati proteomske analize kažejo, da je pristop analize s protitelesi uporaben za večino tistih post-translacijskih modifikacij, pri katerih je sestavni del PTM antigenski in ima ustrezno velikost, ki je večja od metilne in acetilne skupine. Obogatitev s kemijsko derivatizacijo uporabljamo za identifikacijo in kvantifikacijo glikoproteinov, ki so povezani s plazemsko membrano, tkivi in telesnimi tekočinami. Najprej oksidiramo ogljikohidratni del glikoproteina in nato na glikopeptid vežemo označen hidrazid. Proteine, ki niso glikozilirani lahko nato odstranimo, glikoziliranim pa dodamo PNGazo F (peptid-N-glikozidaza F) s čimer se protein odcepi od označene sladkorne enote. Proteine s tarčno post-translacijsko modifikacijo lahko obogatimo z IMAC (=Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography). IMAC je separacijska tehnika, katere osnova je koordinacijska kovalentna vez med proteinom in kovinskim ionom.

Masna spektrometrija je zelo dragoceno orodje za identifikacijo proteinov in njihovih peptidnih fragmentov. Poznamo več vrst MS (MALDI, ESI, MS/MS...), vendar pa se za določanje PTM največkrat uporablja tandemna masna spektrometrija (MS/MS). MS/MS je zelo občutljiva in hitra tehnika za sekveniranje peptidov, s katero lahko identificiramo PTM, hkrati pa ji določimo lokacijo na peptidu (na kateri AK se nahaja) ter kvantitativno vrednost.

Proteomika je ena izmed najbolj perspektivnih ved v biokemiji, saj bo v prihodnosti imela vedno večjo vlogo pri diagnosticiranju bolezni, velik potencial pa ima tudi na področju raziskav novih zdravil. S svojimi metodami nam omogoča preučevanje proteinov, njihovega izražanja v različnih (patoloških) stanjih in pri različnih pogojih. Ker se ukvarja s post-translacijskimi spremembami proteinov, je zato po eni strani koristnejša kot pa genomika, ki le teh ne more »zaznati«. Z razvojem novih tehnik pričakujemo inovacije, ki bodo omogočale, da bo analiza proteinov postala veliko hitrejša in občutljivejša, količina potrebnega vzorca proteinov se bo zmanjšala. Želimo

odkriti tudi metodo, s katero bi lahko določili različne PTMs v tkivih in analizirali vse tipe modifikacij, ki niso značilne le za proteolitične peptide, pač pa tudi za regulatorne.