

# PROTEOMIKA MEMBRANSKIH PROTEINOV

## UVOD

Membranski proteini v/nna celici opravljajo pomembne celične funkcije, ki so ključne za obstoj in delovanje celic. Komunikacija med celicami, imunski odziv, uravnavanje polariziranosti celice in odgovor na zdravila so naloge, na katere prvi naletijo membranski proteini (plazmalema in intracelularne membrane). V seminarski nalogi se bomo osredotočile na membranske proteine plazmaleme, ki zaradi okolja tvorijo posebno obliko molekule – so amfipatske molekule. Pri analizi le-teh največji problem predstavljajo  $\alpha$ -vijačnice.

## OBOGATITEV IN IZOLACIJA

Da lahko uspešno opravimo analizo membranskih proteinov, jih moramo predhodno obogatiti oz. izolirati. Pri tem uporabljamo metode obogatitve in izolacije, sklopljene z metodami separacije. Najlažji način za izolacijo membranskih proteinov je odstranitev ostalih citosolnih proteinov in proteinov, ki interagirajo z membranskimi proteini. Z visoko vsebnostjo soli in visokim pH-jem prekinemo elektrostatske interakcije med proteini. Hidrofobnost membranskih proteinov preprečuje prekinitev interakcij zgolj z detergenti ali organskimi topili zaradi tvorjenja micelov. V grobem se metode za obogatitev proteinov delijo v tri skupine tehnik. Pred vsako izmed tehnik moramo celice lizirati.

- **FRAKCIONACIJA** - Metoda je najbolj primerna za frakcionacijo plazmaleme in organelov. Ko celice liziramo, jih damo centrifugirati. Za membranske proteine uporabljamo centrifugiranje v gostotnem gradientu, z uporabo saharoze ali sorbitola. Organeli se v gradientu posedajo do ravni z enako gostoto. Slabost te tehnike je, da se membranski proteini v plazmalemah lahko kontaminirajo z membranskimi proteini organelov.
- **DELIPIDACIJA** - Metoda, kjer odstranimo lipidni dvosloj. Poteka v dveh korakih in je lahko sklopljena s frakcionacijo. Najprej plazmalemo tretiramo z detergentom, da postane bolj topna, nato pa uporabimo mešanico kloroforma in metanola, ki odstrani lipidni del membrane.
- **AFINITETNO ČIŠČENJE** - Z afinitetno kromatografijo dobimo koncentriran in očiščen protein. Metoda temelji na specifičnih interakcijah z ligandi. Obogatimo lahko glikoproteine, za katere je značilna N-glikozilacija. Biotinilacija pa je metoda za izolacijo integralnih membranskih proteinov. Biotinski reagenti so usmerjeni na primarne amino skupine, ki jih vsebujejo nekateri peptidni ostanki (lizin). Najbolj razširjen reagent je Sulfo-NHS-SS-Biotin, ki je vodotopna molekula in se specifično veže na membranske proteine. Ko je membrana biotinilirana, lahko proteine obogatimo s pomočjo avidinske smole. Pri tem postopku se izločijo izolirani integralni membranski proteini. Slabost tehnike je v tem da je specifična, saj deluje le pri proteinih z lizinskim ostankom.

## SEPARACIJSKE TEHNIKE

V osnovi delimo separacijske metode na tiste, ki so osnovane na gelu in druge, ki temeljijo na topnosti. Zanje gela ne potrebujemo.

- **GELSKE SEPARACIJE**

Včasih je bil ena izmed poglavitnih tehnik ločevanja membranskih proteinov SDS PAGE, kjer fragmenti proteinov potujejo proti anodi. Proteini se na gel porazdelijo po velikosti. Po končani elektroforezi je potrebno gel razrezati na manjše dele in vsakega posebej tretirati s tripsinom. Iz posameznih gelov se izločijo peptidi, ki so poslani v nadaljnjo analizo tandemске masne spektrometrije. Danes poznamo izpopolnjeno verzijo tehnike pod imenom GeLC-MS/MS.

Veliko bolj priročni sta tehniki nativne PAGE, in sicer BRE in CRE. Z njima lahko določamo oz. ločimo nativne proteine in cele proteinske komplekse. Pri BRE potrebujemo pufersko raztopino, zwitterjev ion, ki poveča topnost membrane in molekulo CBB. Po izolaciji membranskih proteinov dodamo molekulo CBB. Molekula CBB se veže na proteine in na njihovi površini ustvari negativen naboj, zaradi katerega nato protein potuje proti anodi. CNE deluje na podoben princip kot BNE, le da ne vsebuje molekule CBB. Tu se proteini ločijo po izoelektrični točki. BNE je zelo dobra metoda za ločbo membranskih proteinov, klub temu pa moramo vedeti, da do popolne separacije ne pride. Tehniki, ki združuje dobre lastnosti obeh tako CNE in BNE tehnike, pravimo hrCNE.

- **NE GELSKE SEPARACIJE**

Med ne gelske separacije lahko uvrstimo tehniko MudPIT. Le ta pristopa na 2D kromatografski način. V prvi stopnji se protein razgradi na peptide. Tej stopnji nato sledi močna izmenjava kationov in reverzna faza kromatografije. Dvig temperature med delom prav tako poveča selektivnost in resolucijo. Omeniti velja tudi OFFGEL frakcionacijo, ki vključuje delovanje IPG-IEF.

## SHOTGUN

Metoda shotgun v proteomiki deluje na isti princip kot pri analizi DNA. Vzorec mešanice proteinov obdelamo s proteazo, ki ga razbije na peptide. Le-ti so nato naloženi na 2D kromatografijo in naprej obdelani v tandemskem masnem spektrometru. Namesto 2D kromatografije lahko kot separacijsko tehniko uporabimo MudPIT, ki bolje analizira neizolirane membranske proteine. V tabeli so našteje in na kratko opisane 2D separacijske tehnike pri shotgun metodi.

	OPIS
<b>SCX/RP/MS/MS</b>	Prepoznamo tudi pod imenom MudPIT. Peptide ločimo z 2D kromatografijo, ki je sklopljena z masnim spektrometrom za MS/MS analizo.
<b>IEF-RP/MS/MS</b>	Po izoelektričnem fokusiranju se izolirani fragmenti razgradijo, temu sledi reverzna faza kromatografije.
<b>RP-RP/MS/MS</b>	Kombinacija dveh sklopljenih reverzних faz. Pri obeh se uporabi drugačen pH.
<b>GeLC-RP/MS/MS</b>	Proteine ločimo s pomočjo SDS PAGE, ti se nadalje odstranijo iz gela. Zatem pa jih razgradimo na peptide. Le te nato ločimo z reverzno fazo kromatografije.
<b>AC-RP/MS/MS</b>	Uporabimo pri preučevanju post translacijskih modifikacijah. Tu kombiniramo afinitetno kromatografijo in reverzno fazo kromatografije.
<b>CE-RP/MS/MS</b>	Sklopljena kapilarna elektroforeza in reverzna faza kromatografije.
<b>AE-RP/MS/MS</b>	Anionsko izmenjalna kromatografija, ki ji kasneje po razgradnji proteina sledi reverzna faza kromatografije.

## RAZGRADNJA PROTEINOV

Pogosto uporabljen encim pri razgradnji proteinov v MS je tripsin (lys, arg), vendar imajo membranski proteini zanj malo cepitvenih mest. Posledica tega je, da pri razgradnji dobimo velike peptide, ki ohranijo hidrofobnost in so zato slabo zaznavni za masno spektrometrijo. Zato se za razgradnjo membranskih proteinov uporabljajo drugi manj specifični encimi, to so proteinaza K, elastaza in pepsin.

Proteinaza K je nespecifična in proteine razgradi na več optimalno dolgih peptidov. Inkubacija traja dalj časa, pri visoki koncentraciji encima in v prisotnosti kalcija. Praktična je tudi zaradi delovanja v širšem pH spektru (4-12pH)

Elastaza cepi mesta za hidrofobnimi aminokislinami alaninom, valinom, levcinom, serinom, tirozinom... Zelo učinkovita je v kombinaciji z metanolom.

Tudi pepsin cepi med hidrofobnimi aminokislinami. Raziskave so pokazale, da je spekter boljši, če so membrane predhodno raztopljene v trifluoroocetni kislini in metanolu.

Število peptidov, ki bo nastalo z nespecifičnimi proteazami, je težko predvidljivo. Po razgradnji je lokacija pozitivnih nabojev naključna, kar pa vpliva na fragmentacijo v naboje (b, y).

Na usmerjanje nabojev pa lahko predhodno vplivamo z dodatki reagentov, ki modificirajo N-del peptidov ali specifično stransko skupino. S tem želimo povečati število b in y ionov. -dodatek bazicne skupine na N-konec (vec b iona)

Učinek modifikacije so preverili s programom Mascot, ki iz aminokislinskih sekvenc masnega spektra identificira protein.

## VIRI

Gilmore, J.M. and Washburn, M.P. (2010): Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. J. Proteomics 73, 2078-2091., 10.11.2012

<http://bio.ijs.si/~krizaj/group/Predavanja%202012/BM%20-%20Cisenje%20celic%20in%20njihovih%20delov.pdf>, 10.11.2012

[http://sl.wikipedia.org/wiki/Afinitetna\\_kromatografija](http://sl.wikipedia.org/wiki/Afinitetna_kromatografija), 10.11.2012

[http://abra.fkkt.uni-lj.si/pihlar/AA2011\\_12/AAsem2012\\_SJambrovic.pdf](http://abra.fkkt.uni-lj.si/pihlar/AA2011_12/AAsem2012_SJambrovic.pdf), 11.11.2012