

3. PROTEOMİKLER'DE GENEL STRATEJİLER

Proteomikler alanında yöntemsel olarak iki genel yaklaşım söz konusudur:

- (1) Etiketli (labeled) proteomikler
- (2) Etiketsiz (label-free) proteomikler

Etiketli proteomiklerde, proteinleri oluşturan amino asitler belirli etiket moleküller veya izotop atomlar (genelde ağır izotoplar) kullanılarak işaretlenir ve kütle spektrometreleriyle karşılaştırmalı protein ifade analizi yapılır. Burada yapılan kantitatif analiz oldukça hassas ve güvenilir olarak kabul edilmektedir. Bu yaklaşımda kullanılan tekniklere örnek olarak SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture), iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation), ICAT (Isotope-coded affinity tags) ve ¹⁸O işaretleme verilebilir.

Bu kitap kapsamında ele alınan yöntemler ve uygulama örneklerinin tümü etiketsiz proteomikler başlığı altında değerlendirilmektedir. Etiketsiz proteomikler alanında yapılan çalışmaların aşamaları dört ana başlıkta toplanabilir: (1) Protein izolasyonu, (2) Proteinlerin ayrımı (elektroforetik, kromatografik vs. gibi tekniklerle) ve ifade analizleri (kantitasyon), (3) Protein tanımlaması (kütle spektrometreleri, Edman yıkımı), (4) Protein etkileşimleri ve yapısal analizler. Basamaklar daha detaylı bir şekilde 5. bölümde ele alınmıştır.

Günümüzde proteomik çalışmaların temelini, proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezi veya sıvı kromatografi gibi yöntemlerle ayrılmasını takiben kütle spektrometreleriyle tanımlanması ve karşılaştırmalı ifade analizleri oluşturmaktadır. Ancak son yıllarda farklı teknikler içeren yeni yaklaşımlar da geliştirilmektedir. Proteomik çalışmalarda, çalışılan konuya ve amaca yönelik olarak benimsenen bazı yaklaşımlar şunlardır:

- Peptit kütle parmakizi (peptide mass fingerprinting, PMF) yaklaşımı: İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE: Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ile proteinlerin iki özelliğine göre (moleküller ağırlıkları ve izoelektrik noktaları) ayrıştırılması, proteolitik enzimlerle proteinlerin peptitler halinde parçalanması ve peptit izolasyonunun ardından MALDI-TOF kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) ile elde edilen peptit kütle verileri ışığında biyoinformatik analizlerle protein tanımlanması.
- Peptit fragment parmakizi (peptide fragment fingerprinting, PFF) yaklaşımı: 2D-PAGE veya kromatografik ayırım ya da ikisinin kombinasyonu sonrası izole edilen peptitlerden ardışık kütle spektrometreleri (MS/MS, tandem MS) ile elde edilen veriler ışığında biyoinformatik analizlerle protein tanımlanması.
- Örneklerin direkt olarak LC-MS/MS (Likit kromatografi-MS/MS) sistemine uygulanarak aynı platformda ayırım, tanımlama ve karşılaştırmalı ifade analizi yapılması.
- Etiketli proteomikler ile kütle spektrometreleri kullanılarak nicel (kantitatif) ifade analizi.
- Kütle spektrometreleriyle translasyon sonrası modifikasyonların analizi.
- Two dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) yaklaşımı: 2D-DIGE ile karşılaştırmalı ifade analizinin ardından kütle spektrometreleriyle protein tanımlanması.
- Protein çip teknolojisi.

Yukarıda verilen yaklaşımlara bakıldığında, daha önce de ifade edildiği gibi, kütle spektrometrelerinin proteomiks alanında çok önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Günümüzde kütle spektrometresi verileri kullanılarak yapılan protein tanımlanmasında üç temel yaklaşım vardır:

(1) "Top-down" (yukarıdan aşağıya) proteomiks: Kütleleri ölçülen intakt proteinlerin moleküler ağırlıklarının protein dizi veri tabanlarında eşleştirilerek tanımlama yapılması; intakt protein bilgisinin kullanılarak protein kimliklendirilmesi. Özellikle translasyon sonrası modifikasyonların tanımlanması için tercih edilen bir proteomik stratejidir.

(2) "Bottom-up" (aşağıdan yukarıya) proteomiks: Proteinin çeşitli proteazlarla (tripsin, kimotripsin gibi) kesilmesinin ardından elde edilen peptit ve/veya fragment kütlelerinin protein dizi veri tabanlarında eşleştirilerek tanımlama yapılması; peptit bilgisinin kullanılması ile protein kimliklendirilmesidir.

(3) De novo dizileme: Ardışık kütle spektrometreleriyle elde edilen peptit ve fragment kütlelerinden protein/peptit dizisinin elde edilmesidir.

"Shotgun" proteomiks olarak isimlendirilen bir yaklaşım da proteomik çalışmalarda kullanılabilir. Bu yaklaşımda protein karışımlarının ardışık olarak farklı kromatografik koşullarda ayrılmasının ardından kütle spektrometreleriyle, "bottom-up" stratejisi kullanılarak protein tanımlanması gerçekleştirilir. Bu strateji, çok boyutlu protein tanımlama yaklaşımı (multi dimensional protein identification technology, MudPIT) olarak da adlandırılır.

Bahsi geçen stratejilerinden "bottom-up" yaklaşımı, günümüzde kütle spektrometresi tabanlı protein tanımlaması için en çok tercih edilen metottur. Bu kitap kapsamında uygulama örneği verilen MALDI-TOF ile PMF analizi de bu yaklaşımı temel alır. Tipik olarak proteinin enzimatik kesimini, bazı durumlarda buna ilave olarak kromatografik ayrımını ve takiben MS veya MS/MS analizini içerir (kütle spektrometreleri hakkında daha detaylı bilgi 4. Bölümde verilmiştir). Bu yaklaşımda iki tip strateji kullanılabilir:

- Peptit Kütle Parmakizi (PMF)
- Peptit Fragment Parmakizi (PFF)

Peptit kütle parmakizi genel olarak MALDI-TOF MS ile triptik peptitlerin analiziyle elde edilir. İkinci tip strateji olan peptit fragment parmakizi ise genel olarak ilgili peptidin kütle/yük (m/z) değerinin ardışık kütle spektrometrelerinde fragmentasyonu ile elde edilir. Günümüzde yüksek işlem hacmi ile peptit kütlelerinden protein tanımlaması yapılmasını sağlayan biyoinformatik araçlar bulunmaktadır ve daha iyi tanımlama yapılması için bu araçların kullandığı algoritmaların geliştirilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir.

Her yöntem ve yaklaşımda olduğu gibi proteomik alanının da kendine özgü zorlukları ve kısıtlamaları vardır. Proteomik çalışmalarda en fazla önem verilmesi gereken nokta proteomun dinamik yapısıdır. Proteom, genom gibi stabil değildir ve belli bir hücre/doku/organda ifade olan proteinler birçok koşula bağlı olarak dönemsel veya anlık değişimler gösterebilir. Bu nedenle çalışmalarda standardizasyonun çok iyi yapılması gerekir. Ayrıca özellikle laboratuvarlar arasında uygulanan farklı protokollerden doğan teknik farklılıklar nedeniyle elde edilen sonuçlarda değişkenlik olabilmektedir. Bu da küresel bilimsel birikimin ilerlemesi

açısından istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle son yıllarda HUPO (Human Proteome Organization, <http://www.hupo.org>)'nun da dahil olduğu proteomiks ekipleri özellikle iki boyutlu jel elektroforezi ve sonrasında kütle spektrometresi ile protein tanımlanması stratejileri için belli protokoller oluşturarak dünya genelinde kullanılan doğrulanabilir standartlar oluşturmaya çalışmaktadır (<http://www.fixingproteomics.org>). Ayrıca özellikle iyonlaşma tabanlı sistemler içerisinde aynı koşullarda ve aynı sistemlerle eş zamanlı olarak yapılacak çalışmalarda dahi elde edilecek verilerde farklılıklar oluşabilmektedir. Burada peptidlerin iyonlaşma derecesini etkileyecek her koşul sonuçta PMF ve PFF yöntemleriyle tanımlanacak proteinlere etki edebilmektedir. Dolayısıyla elde edilecek her bir farklı veri birbirinin tamamlayıcısı da olabilmektedir.

Günümüzde hızlı bir şekilde gelişen bu alanın gelecekte birçok farklı konuda önemli bilgiler sağlayacağı açıktır. Özellikle protein tanımlanmasında ve dizilenmesindeki gelişmeler bu işlemleri daha hızlı ve güvenilir hale getirebilecek ve proteinlerin gerçek yapı fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olabilecektir.

Kaynak:

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.