

2. PROTEOMİK'S'E GİRİŞ

Biyolojik alanlarda yapılan çalışmalar hızla tekli analiz metodlarından global sistem yaklaşımlarına doğru değişim göstermektedir ve bu çalışmaların tümünde, bileşenlerin tanımlanması sistemin anlaşılması için temel adımı oluşturmaktadır. Bugüne kadar genom bilimi bu doğrultuda önemli bir zemin hazırlamış ve pek çok organizmanın tam genom sekansları çıkarılarak değerli veriler elde edilmiştir. Ekspresyon profili analizleri sayesinde ise bağıl transkript seviyeleri hakkında bilgi edinilmiştir. Ancak araştırmalar göstermiştir ki, organizmada bulunan mRNA seviyeleri ile protein seviyeleri arasında korelasyon oldukça zayıftır. Bu sayede, protein mekanizmalarının bağımsız olarak incelenmesinin, protein miktar analizlerinin ve profilendirilmesinin önemi anlaşılmıştır

İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasının ardından, genlerin fonksiyonel ürünü olan proteinlere ait bilgi birikimi artmadığı sürece genetik bilginin tek başına yeterli olamayacağı görülmüş ve proteinlerle ilgili çalışmalara ağırlık verilerek "proteomik" ("proteomics") alanı doğmuştur. Bunun nedeni, proteinler hücrenin, dokunun ya da organizmanın dinamik durumu hakkında daha kesin bilgi vermesidir. Genom projesinin ardından insan genomundaki gen sayısı 25000 ± 5000 olarak hesaplanırken bu genler tarafından üretilen proteinlerin nispeten az bir kısmı bilinmektedir ve sayısının 1,5 milyon civarında olabileceği tahmin edilmektedir.

Genombilim DNA'dan protein oluşumuna kadar devam eden süreci incelerken, proteombilim translasyon basamağını ve sonrasında sentezlenen proteinlerin kimyasal modifikasyonlarını incelemektedir. Translasyon sonrasında proteinin yapısında meydana gelen değişimlere "post-translasyonel modifikasyonlar" adı verilmektedir. Bu modifikasyonlar protein ömrünü, lokalizasyonunu, protein etkileşimlerini ve aktivitesini etkileyen çok önemli görevlere sahiptirler. Canlılarda, gelişimin, fizyolojinin, metabolizmanın ve hastalık oluşumunun sırları bu modifikasyonlarda gizlidir. Günümüzde ayırma teknolojileri ve kütle spektrometreleri beraber kullanılarak, post-translasyonel modifikasyonların tespit edilmesi mümkündür, ancak tespit edilen modifikasyonlar ile protein fonksiyonunu doğrudan tahmin edebilmek için yeterli veri birikimi oluşmamıştır.

Proteom kelimesi, ilk defa 1994'te Siena iki boyutlu elektroforez toplantısında Marc Wilkins tarafından önerilmiştir. Bu terimin ilk baştaki tanımı basit olarak "bir organizma veya doku tarafından sentezlenen bütün proteinlerin tanımlanması ve karakterizasyonu" şeklinde yapılmıştır. Daha sonra alanda çalışan kişiler tarafından tanım geliştirilmiştir. Örneğin "karakterizasyon" terimi protein fonksiyonlarının belirlenmesi, konumlanmaları, translasyon sonrası modifikasyonları da kapsamıştır. Daha sonraki çalışmalar bu tanımın bile yetersiz olduğunu göstermiştir ve konu kapsamındaki proteinleri etkileyen çevresel, farmakolojik, genetik ve patolojik etmenlerin araştırılması da dâhil edilmiştir.

Proteomik alanında yapılan çalışmaların aşamaları dört ana başlıkta toplanabilir: (1) Protein izolasyonu, (2) proteinlerin ayırımı (elektroforetik, kromatografik vs.) ve ifade analizleri, (3) protein tanımlaması (kütle spektrometreleri, Edman), (4) protein etkileşimleri ve yapısal analizler. Günümüzde proteomik çalışmaların temelini iki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometrelerinin oluşturduğu görülmektedir. Proteomik yöntemlerin kullanım alanının büyük kısmını klinik proteomik olarak da adlandırılan tıpta kullanım oluşturmaktadır ve klinik proteomik alanındaki çalışmaların da çoğu hastalıklara özgü yeni biyo-belirteç tanımlanmasıyla

ilgili çalışmalardır. Bunun haricinde ilaç geliştirmeden toksikolojiye kadar birçok farklı alanda da proteomik yöntemler kullanılmaktadır.

Her yöntemin ve yaklaşımın olduğu gibi proteomik alanının da kendine özgü zorlukları ve kısıtlamaları vardır. Ancak günümüzde hızlı bir şekilde gelişen bu alan gelecekte birçok farklı konuda önemli bilgiler sağlayacaktır. Özellikle protein tanımlanmasında ve dizilenmesindeki gelişmeler bu işlemleri hızlı ve güvenilir hale getirebilecek ve gerçek yapı fonksiyonu ortaya koyan proteinlere dair bilgi birikimimiz hızla artacaktır.

Proteombilimindeki gelişmeler ve proteomik metotlara dayalı geliştirilen biyobelirteçlerin keşfi kütle spektrometresi (MS) gelişimi ile yakından ilişkilidir. MS manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan sistemler Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF), Elektro Spray Ionization Time of Flight (ESI-TOF) ve Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI-TOF) olarak sıralanabilirler. Günümüzde farklı algılayıcı sistemlerin kombinasyonları ile (ör: quadrupole-time of flight) daha hassas analizler yapılabilmektedir. Örnekteki proteinler enzimatik olarak parçalandıktan sonra proteini oluşturan peptid parçalarının (bir ayırma metodu ile belirlendikten sonra) kütleleri MS ile belirlenir. Daha sonra karışımdaki bireysel peptidlerin ölçülen kütleleri, bir proteinde bulunduğu düşünülen teorikçe türetilmiş peptid kütleleri ile kıyaslanarak protein tanımlanır.

Protein mikroarray (mikroçip) teknolojisi proteinlerin küçük bir alanda yakalanarak sabitlenmesi ve sonra bu proteinlerin analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır. Temel olarak analitik ve fonksiyonel olmak üzere iki tip protein mikroarray vardır: Analitik mikroarrayde proteinlere bağlanabilme özelliğine sahip olan spesifik moleküller küçük bir cam yüzey üzerine yerleştirilmiştir. Bu özel cam yüzey seçilirken amaç proteinlerin yüzey üzerinde sabitlenmesi ve maksimum bağlanmanın gerçekleştirilmesidir. Solüsyonundaki proteinler bu moleküllere bağlanır ve yıkamadan sonra belirlenirler. Antikor mikroarray en çok kullanılan analitik mikroarraydir. Bu tip mikroarrayler genellikle klinik tanıda, sağlıklı ve hastalıklı dokudaki protein farklılıklarını ve hastalık durumunda proteinlerde meydana gelen değişiklikleri tanımlamak için kullanılmaktadırlar. Fonksiyonel protein mikroarray ise analitik mikroarrayden tüm fonksiyonel proteinlerin tanımlanması ile ayrılır. Bu ölçümde protein çipler protein-protein, protein-DNA, protein-RNA ve protein-fosfolipid gibi pek çok protein interaksiyonlarını çalışmak için kullanılırlar. Protein çip üzerindeki reaktif proteinler floresan, fotokimyasal veya radyoizotop yöntemlerle işaretlendikten sonra belirlenirler. Protein mikroarray teknolojisi ile MS'in birlikte çalıştığı sistemlerde çiplere bağlı proteinler MS ile belirlenmektedir. SELDI-TOF MS dayalı protein mikroarrayler MALDI-TOF MS'in varyantı olmakla birlikte aynı anda fazla sayıda örneğin ve özellikle küçük moleküler ağırlıklı proteinlerin analizini sağlamaları açısından avantajlıdırlar.

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.