Derleme

Proteomik

Sevil KURBAN, İdris MEHMETOĞLU

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Genomik çalışmalardan elde edilen bilgiler sınırlı olduğundan, genomiğin devamı olan proteomik biyolojik olayların açıklanmasında önem kazanmıştır. Proteomik belli şartlar altında ve belli bir dokuda genom tarafından kodlanan tüm proteinlerin, yani proteomun analiz edilmesi işlemidir.

Proteomik çalışmalarının esas amacı bütün hücre, doku ve vücut sıvılarındaki proteinleri, özellikleri ve seviyelerini de içerecek şekilde belirleyerek tanımlamaktır. Proteomik çalışmaları proteinlerin ayrılması, miktarlarının belirlenmesi ve bu proteinlerin tanımlanması teknolojilerine ihtiyaç duyar.

Bu makalede biz iki yönlü jel elektroforezi (2-DE), iki yönlü differential jel elektroforezi (2D-DIGE), tek ve iki yönlü sıvı kromatografisi (1D-LC ve 2D-LC), kütle spektrofotometresi (MS) ve protein mikroarray teknolojileri olan son proteomik teknolojileri üzerinde durduk. Aynı zamanda biyomarker keşfi, özellikle erken kanser tanısı olmak üzere bazı diğer hastalıkların tanı ve tedavisi ile toplumsal proteomik çalışmalarında proteomik teknolojisinin yerini belirlemeye çalıştık.

Anahtar Kelimleler: Proteomik, 2-DE ve 2D-DIGE, kütle spektrometresi, kanser biyomarker, toplumsal proteomik

ABSTRACT

Proteomics

Since information obtained from genomic studies is limited, proteomics, which is an advance of genomics, become more important in the evaluation of the biological events. Proteomics is to analyse proteins expressed by genom under certain conditions and in a spesific tissue, that is proteomics is to identify proteom.

The main goal of proteomics studies is the understanding of proteins including their identification, characterization, and quantification of proteins in whole cells, tissues, or body fluids. Proteomics methodologies require techniques to separate and quantify individual proteins and identify those proteins.

In this article, we review the current proteomics technologies which include two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE), one-and two-dimensional liquid chromatography (1D-LC and 2D-LC), mass spectrometry (MS) and protein microarray technology. We will also review proteomics technology in biomarker discovery, especially early detection of cancer and diagnosis and treatment of some other diseases and population proteomics.

Key Words: Proteomics, 2-DE and 2D-DIGE, mass spectrometry, cancer biomarker, population proteomics

GİRİŞ

Genom, DNA'nın taşıdığı genetik bilgiyi ifade eder. Bu bilginin ortaya çıkarılması ile ilgili tüm çalışmalar ise genomik olarak adlandırılmaktadır.

Genomik çalışmalarda hastalık ya da fizyolojik süreçlerle ilgili genler tanımlanmaya çalışılır[1,2].

Fakat genomik çalışmalar, organizmanın tanımlanan bu genleri hangi oranda kullandığı hakkında bilgi vermez. Ayrıca, bir gen, birçok biyolojik işleve sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler sentez sonrası değişimlere uğramaktadır. Çoğu durumda, sentez sonrası değişimler de gen işlevinden bağımsızdır. Bu nedenlerden dolayı, çok fazla miktarda bilimsel veri olmasına karşın genomik çalışmalara dayanan teşhis yaklaşımları klinik kullanım için yeterli değildir[1-3]. Gen ürünü mRNA'ların ifade düzeyleriyle bu mRNA'lardan kodlanan proteinlerin miktarları arasında da zayıf bir doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir[4]. Gen ürünlerinin sentez sonrası değişimleri, hücrede bulundukları yerler ve göreceli miktarlarının anlaşılması için genomik sonrası bilgilere ihtiyaç vardır. Bu noktada proteom ve proteomik teknolojisi karşımıza çıkmaktadır.

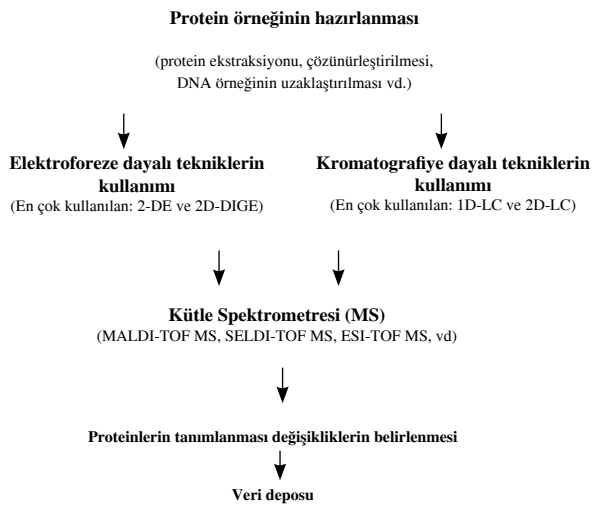
Proteom kelimesi ilk kez 1994 yılında, Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve kabul görmüştür. Proteom genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlar. Bir hücrenin, organın veya organizmanın belirli bir zaman ve mekanda sahip olduğu (izoformlar, polimorfizimler ve sentez sonrası değişimler de dahil olmak üzere) tüm proteinlerin bir toplamıdır. Bir organizma vücudunun farklı bölgelerinde, hücre döngüsünün farklı evrelerinde ve farklı çevre koşullarında farklı protein ekspresyonlarına sahiptir[1-3]. Sabit bir yapı olan ve bir organizma için çok iyi tanımlanabilen genomun aksine, proteom, hücreden hücreye farklılık gösterir ve iç ve dış uyaranlara yanıt olarak biyokimyasal etkileşimler aracılığı ile sürekli bir değişim halindedir[2].

Proteomik ise belli şartlar altında belli bir dokuda genom tarafından sentezlenen tüm proteinlerin analiz edilmesi, yani proteomun tanımlanması işlemidir. Proteomik, spesifik hastalıklar, toksik ajanlar veya enfeksiyonlar gibi pekçok dış faktör uyarısı sonucu oluşan proteinlerin seviyeleri ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi, işlevlerinin aydınlatılması ve interaksiyonları üzerinde çalışan

ve multidisipliner, teknoloji gerektiren bir bilimdir. Hücrelerin fonksiyonları genler ve mRNA'lardan ziyade direk olarak proteinler ile düzenlenir[3]. Proteinlerin fonksiyonlarında ise hücredeki lokalizasyonları, fizyolojik uyaran sonucu lokalizasyonlarında meydana gelen değişiklikler ve posttranslasyonal modifikasyonları önemlidir. Bu da ancak proteomik çalışmaları ile belirlenebilir[1-3,5].

PROTEOMİK TEKNOLOJİSİ

Proteomik teknolojisi, önce örnekteki proteinlerin ayırımı ve sonra bu proteinlerin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. İlk aşamada örnekte bulunan proteinler aşağıda belirtilen ayırma metotlarına tatbik edilebilir hale getirilir. Sonra proteinlerin bu ayırma metodlarına tatbik edilmesinden elde edilen veriler gerekli yazılımlar kullanılarak değerlendirilir ve proteinler belirlenir. Son aşamada ise kütle spektrometresi (MS) yöntemi ile bu proteinlerin kütleleri saptanır ve kesin ve doğru olarak proteinlerin tek tek tanımlanması sağlanır[1-5] (Şekil 1).



Şekil 1. Proteomikin genel çalışma akışının şeması

Örnek Hazırlığı

Serum, diğer vücut sıvıları, hücre ve doku ekstraktlarından proteinlerin hazırlanması için analizlenecek örneğe ve hedefe göre örnek hazırlığı yapılması iyi bir ayırma ve doğru bir protein tanımlaması için gereklidir[2,3,5-7].

Vücutta yer alan proteinlerin pekçoğu serumda bulunduğundan, serum çok sayıda protein içerir. Bu yüzden hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi için serum iyi bir kaynaktır. Fakat albumin ve immünglobulinler serumda bulunan proteinlerinin yaklaşık %80-90'ını oluşturduğundan serumda az miktarda bulunan diğer proteinlerin sağlıklı bir biçimde belirlenebilmesi için önce bu proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir[2].

Hücre ve doku örnekleri ise farklı tekniklerle parçalandıktan sonra proteinleri çözünür hale getirilir. Membran proteinlerinin veya diğer hidrofobik proteinlerin hazırlanmasında farklı deterjanlar ve indirgeme ajanlarının kullanılması gerekmektedir. Ayrıca nükleik asitlerin örnek preparatlarında bulunması, izoelektrik odaklama (IEF) elektroforezinde proteinlerin ayrılmasında problemlere neden olabileceğinden ortamdan uzaklaştırılmaları önerilmektedir. Bunun için nükleik asitler ya taşıyıcı amfolitlere bağlandıktan sonra ultrasantrifüj yolu ile veya endonükleazlarla enzimatik olarak parçalandıktan sonra uzaklaştırılır[7].

Protein Ayırma Metotları

Çok çeşitli protein ayırma metodları bulunmaktadır. Burada en çok kullanılan yöntemlerden iki yönlü jel elektroforezi (2-DE), iki yönlü differential jel elektroforezi (2D-DIGE) ve tek ve iki yönlü sıvı kromatografisi (1D-LC ve 2D-LC) üzerinde durulacaktır[1,5,6,8].

İki Yönlü Jel ve İki Yönlü Differential Jel Elektroforezi (2-DE ve 2D-DIGE)

Elektroforez; proteinlerin elektriksel bir alan içerisinde büyüklüklerine, molekül ağırlıklarına, şekillerine, yüklerine bağlı olarak elektrik akımının tesiri ile hareket etmeleri esasına dayanır. Proteomik analizi ve protein ayrıştırmasında ise 2-DE metodunun gelişmesi bir dönüm noktası olmuştur. 2-DE, kompleks protein karışımlarının ayrılmasında kullanılan en önemli tekniklerden birisidir. 2-DE'de iki ayırma tekniği kullanılarak binlerce proteinin tek adımda ayrılması sağlanır. Birinci yönde IEF elektroforezi ile pH gradientinde yük bağımlı ayırma ve ikinci yönde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığına bağımlı ayırma metodları uygulanır. Herbir teknik kendi başına 100 proteini ayırma kapasitesine sahipken, birleştiklerinde 1000-3000 polipeptidi ayırabilirler. Ayrıca, uygun bir boyama ile örnekteki 1 ng kadar küçük proteinler saptanabilmektedir[3,5,6].

Jellerin Değerlendirilmesi

Proteinlein doğru olarak belirlenebilmesi için iki yönlü elektroforez jellerinin görüntü analizinde çok fazla sayıda protein jelinin karşılaştırılması gerekmektedir. Fakat, jellerin görüntüsü tam olarak örtüşmediğinden jeller arasındaki farklılıklar görüntü karşılaştırmasının değerlendirmesini güçleştirmektedir. Ayrıca, bir jelde çok fazla sayıda protein bulunduğundan protein belirlenmesinin doğru olarak yapılabilmesi için gelişmiş bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulur. İki yönlü elektroforez

jellerinden proteinlerin tanımlanması ile elde edilen büyük miktardaki veri protein 2-DE veri tabanlarında depolanmaktadır. Aynı proteinler jelde aynı pozisyona sahip olduğundan, iki yönlü elektroforez jellerinin görüntüleri veri tabanlarında karakterize edilmiş görüntüler ile karşılaştırılarak proteinler tanımlanır[3,5,6].

2-DE teknolojisi protein ayırımında standart olmakla birlikte proteinlerin kütle ve çözünürlüğü ile sınırlıdır. 2D-DIGE ise 2-DE teknolojisinden geliştirilmiş ve kısa süre önce kullanılmaya başlanmış bir teknolojidir. 2D-DIGE metodunda jel elektroforezinden önce değişik hastalık veya çalışmalara ait proteinler farklı iki floresan boyası ile işaretlenir. Farklı kütle ve dalga boyuna sahip boyalar ile işaretli bu proteinler daha sonra 2-DE yapılarak elde edilen jelin farklı dalga boylarında taranarak kontroller ile karşılaştırılması ile tanımlanır[8,9].

Tek ve İki Yönlü Sıvı Kromatografisi (1D-LC ve 2D-LC)

Kromatografi, herhangi bir karışımdaki maddelerin biri hareketli ve diğeri sabit olan iki faz yardımıyla birbirinden ayrılması işlemidir. Bileşenlerine ayrılacak karışım, sabit fazın başlangıç bölgesine konur ve hareketli fazın ileriye doğru ilerletilmesi sırasında çözdüğü karışımdaki maddeleri de sabit faz üzerinde değişik hızlarda ilerletir. Bileşenler, fizikokimyasal özelliklerine göre sabit fazın farklı bölgelerinde tutularak birbirlerinden ayrılırlar. Kromatografinin dayandığı fizikokimyasal olaya göre veya sabit ve hareketli fazların yapılarına göre çeşitli kromatografi teknikleri vardır.

1D-LC proteinleri izoelektrik noktaları, kütleleri veya hidrofobikliklerine göre ayırır. En çok kullanılan 1D-LC, proteinleri hidrofobikliklerine göre ayıran ters faz sıvı kromatografisidir. 2D-LC'de proteinler önce izoelektrik noktalarına, ikinci olarak hidrofobikliklerine göre ayrılır. Standart strateji 2D-LC fraksiyonlarında çok fazla sayıda protein olduğundan örnekteki proteinlerin tanımlanması ve örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için gelişmiş bilgisayar programlarının kullanımıdır. Fakat hala 2-DE'de kullanılanlara benzer gelişmiş programların yapılanmasına ihtiyaç vardır[3,5,10,11].

Kütle Spektrometresi (MS)

Proteomikteki gelişmeler ve proteomike dayalı biyomarkerların keşfi MS'deki gelişmelerle 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. MS ile proteinlerin ve peptidlerin tanımlanması, moleküler kütle ve özellikle post translasyonel modifikasyonların belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan sistemler Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF), Elektro Spray Ionization Time of Fligh (ESI-TOF) ve Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI-TOF) olarak sıralanabilirler[1,3,5,6,12].

Ayırma metodları ile tanımlanan proteinlerin MS ile doğrulanması gerekmektedir. Proteinlerin MS ile tanımlanması için iki temel yaklaşım vardır: Birinci yaklaşımda 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. Bu yaklaşım, başlangıçtaki örnekten çok fazla sayıda peptid türediğinden proteomikin karmaşıklığını artırmaktadır. İkinci yaklaşımda ise önce protein MS ile belirlenir ve sonra eğer gerekli ise peptidler tanımlanır[3,5,6,13]. Yeni kanser biyomarkerlarının çoğu ikinci yaklaşımın modifikasyonu ile geliştirilen SELDİ-TOF teknolojisi kullanılarak yapılmıştır[14]. MALDI-TOF ise düşük konsantrasyon ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yüksek özgüllük ve duyarlılıkta ayırımını ve tayinini mümkün kılmaktadır[15].

Protein Mikroarray (mikroçip) Teknolojisi

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 mikroarraylar 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[6,16].

Protein çip üzerindeki reaktif proteinler floresan, fotokimyasal veya radyoizotop yöntemlerle işaretlendikten sonra belirlenirler. En çok floresan

işaretleme kullanılmaktadır[3]. Protein mikroarray teknolojisi ile MS'in birlikte çalıştığı sistemlerde çiplere bağlı proteinler MS ile belirlenmektedir. SELDİ-TOF MS dayalı protein mikroarraylar MALDI-TOF MS'in varyantı olmakla birlikte aynı anda fazla sayıda örneğin ve özellikle küçük moleküler ağırlıklı proteinlerin analizini sağlamaları açısından avantajlıdırlar[6].

Proteomik Teknolojisinin Sınırlılıkları

Günümüzde kullanılan protein ekstraksiyon protokolleri tüm biyolojik örneklerin hepsine uygulanamamaktadır. Hidrofobik proteinler kolaylıkla ekstrakte edilemez ve iki yönlü elektroforez jelleri üzerinde gösterilemez. Bir proteomdan beklenen proteinlerin çoğunun hidrofobik olması ise bu sorunun artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, ekstrakte edilmiş olan proteomdaki proteinlerin gösterilebilmesi anlamında da sınırlılıkları vardır. Proteomik analizi için kullanılan küçük hacimlerde (~10-300 µl) bulunan proteinler tanımlanabilmeleri için yeterli miktarda olmayabilir veya düşük konsantrasyondaki bu proteinler total proteinlerin analizi süresince belirlenmeyebilirler[3,5-7].

TIPTA PROTEOMİKİN KULLANIM ALANLARI

Proteomik fenotip belirlemenin en doğru ve güvenilir yolu olarak ortaya çıkmıştır. Tıpta, hastalıkların tanı ve takibinde, terapötik uygulamaların etkilerinin izlenmesi ve patojenik mikroorganizmalara karşı etkin ilaç ve aşı geliştirmede kullanılabilecek hastalığa özgün proteinlerin yani yeni markerların belirlenmesi gibi çok önemli uygulamalara sahiptir. Örnek içerisinde az miktarda bulunan ama marker olabilecek proteinlerin ayrımı için çok hassas bir çalışma ve iyi bir gözlem gerekmektedir. Bu proteinlerin tanımlanması, hastalığın gelişimi ile ilgisi ve bu verilerin bilgi bankalarında toplanarak değerlendirilmesi ile normal biyolojik süreçlerin ve hastalıkların altında yatan mekanizmaların tanımlanması amaçlanmaktadır. Normal-hastalık veya yaşlı-genç vb. iki farklı durum arasındaki ekspresyon farklılıklarının tanımlanması başlıca onkolojide olmak üzere nöroloji, kardiyoloji, nefroloji ve enfeksiyon hastalıkları gibi pek çok dalda tanı ve tedavide önemli gelişmeler sağlamaktadır[6,13,17-37].

Multiple skleroz hastalarının üç farklı, majör tip lezyonunun yapılan karşılaştırmalı proteomik analizinde kronik aktif plakta doku faktörü ile protein C inhibitörü belirlenmiş ve bu hastalarda hirudin ile rekombinant aktif protein C tedavisinin deneysel otoimmün ensefalopatide hastalığın ciddiyetini azalttığı gösterilmiştir. Multiple sklerozda farklı lezyonların karşılaştırmalı proteomik analizi bu hastalıkta patolojik duruma uygun olarak hedefe yönelik seçici tedavi imkanı sağlamıştır[17].

Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalarının beyin omurilik sıvı (BOS)'larının proteomik analizi üç protein türünün sağlıklı kontrollerden daha düşük olduğunu göstermiş ve bu proteinler ile ALS hastaları %91 sensitivite, %97 spesifite ve %95 doğruluk ile sağlıklı kontrollerden ayrılabilmişlerdir[18].

Nöbet geçiren ratların BOS'larının proteomik analizinden elde edilen mitokondrial sitokrom bc1 kompleksinin bir komponenti olan Rieske demir-sülfür proteinin nöronlarda epileptik aktiviteden sorumlu olabileceği ve epilepsinin moleküler patogenezine yeni ve önemli bir bakış açısı sunacağı belirtilmiştir[19].

Pek çok kalp hastalığında kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan moleküler sebepler tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde proteomik teknolojisi bize hasta kalpteki protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri göstermekte ve kalpte fonksiyon bozukluğuna sebep olan hücre içi mekanizmalara yeni bir bakış açısı sağlamaktadır[20]. Benzer şekilde böbrek hastalıklarının tanı ve tedavisinde proteomik analizi ile hastalıkla ilgili biyomarkerlar belirlenebilmektedir[21]. Bu örnekler çok artırılabilir. Çünkü, hastalıkların tanı ve hedefe yönelik tedavisi amacı ile proteomik çalışmalarına her geçen gün yenileri eklenmektedir.

Erken Kanser Tanısında Proteomik Teknolojisinin Kullanımı

Proteom teknolojisi ile kanser tanısı için yeni biyomarkerların tanımlanması ve bu biyomarker moleküllerin analizi ile erken kanser tanısında önemli adımlar atılmıştır[13,22,23].

Günümüzde tek biyomarker analizleri ile yapılan kanser tanısının özgüllük ve hassasiyeti yeterli değildir. Proteomik teknolojisi kullanılarak tek biyomarker analizinde karşılaşılan bu problem çoklu biyomarker analizi ile ortadan kaldırılmakta, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta erken dönemde kanser tanısı mümkün olmaktadır. Çünkü proteomik teknolojisi ile birden fazla biyomarker molekülün ekspresyon değişimleri oldukça yüksek bir özgüllük ve duyarlılıkla değerlendirilebilmektedir. Bu amaçla kanser ve normal doku proteinleri karşılaştırılarak farklı olan proteinler belirlendikten sonra bu proteinlerden marker olarak prediktif değeri en iyi olanları bulunur ve saflaştırması yapılır[22-25].

Bu konudaki ilk çalışma over kanserleri ile ilgilidir ve bunu pek çok araştırma çalışması izlemiştir. Over kanserlerini belirlemek için sık kullanılan bir marker olan Ca 125 ileri evre over kanserlerinde %80 pozitif olmasına rağmen evre I over kanser-

lerinde %50-60 pozitiftir. Ca 125'in tek marker olarak pozitif prediktif değeri (PPV) %30-35 civarındadır. SELDI-TOF MS teknolojisi kullanılarak evre I over kanserleri bile %100 sensitivite, %95 spesifite ve %94 PPV ile saptanabilmektedir[26].

Hepatosellüler kanserleri belirlemede alfa feto protein (AFP)'nin sensitivitesi %73 ve spesifitesi %71'dir. SELDI-TOF MS ile %79 sensitivite ve %86 spesifite ile hepatosellüler kanserler belirlenebilmektedir. Ayrıca, SELDI-TOF MS'in küçük tümörleri belirlemede geleneksel markerlardan daha iyi sonuç verdiği görülmüştür[27]. SELDI-TOF MS ile %97,2 sensitivite ve %94,4 spesifite ile pankreas kanseri[28] ve %93,3 sensitivite ve %96,7 spesifite ile akciğer kanseri[29] tanısı konulabilmektedir.

Haptoglobulin[30], apolipoprotein A-I, transtiretin ve inter-α-tiripsin inhibitör[31] over kanseri**:** serum amiloid A[32], D vitamini bağlayıcı protein[33], apolipoprotein A-II[34], stem cell antijen[35], alfa-metil koenzim-A rasemas[35], insan kallikrein-2[35] ve hepsin[35] prostat kanseri: komlement komponent C3a meme kanseri[36] ve proteasome subunit beta tip 7, peroxiredoxin-1 ve signal recognition particle 9 kDa protein ise kolon kanseri[37] için proteomik teknolojisi ile belirlenen potansiyel biyomarkerlara örnek olarak gösterilebilir.

TOPLUMSAL PROTEOMİK

Toplumsal proteomik toplumun kendi içinde ve toplumlar arasında insan proteinlerinin belirlenmesi, farklılıklarının tanımlanması ve hastalığa spesifik proteinlerin keşfi için yapılan geniş ölçekli çalışmaların tümünü kapsar. Standart immünoassay ölçümler ile yüzlerce proteinin konsantrasyonu belirlenebilmekle beraber yapısal değişimleri ve sağlıklı ve hasta grubunda dağılımı ile ilgili çok az bilgi sağlanır. Toplumsal proteomikin amacı ilk olarak proteinlerin genel popülasyondaki frekansını ve yapısal farklılıklarını belirlemek ve sonra bu farklılıklarla spesifik hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır[13,38].

Bu konudaki ilk çalışma 96 sağlıklı erişkinin plazmasında orta veya fazla miktarda bulunan 25 plazma proteininin araştırıldığı çalışmadır[39].

Araştırılan 25 proteinden en çok nokta mutasyonu belirlenen apolipoprotein-E ve transtiretin genomik çalışmalarda da polimorfizmin yüksek olduğu moleküllerdir[40,41]. Bu küçük ölçekli pilot çalışmayı Amerikanın 4 coğrafi bölgesinden 1000 bireyi içeren daha geniş kapsamlı bir çalışma izlemiştir[42]. Bu çalışmada ise 5 plazma proteininin: beta-2 mikroglobulin, sistatin C, retinol bağlayıcı protein, transferrin ve transtretinin modifikasyonları çalışılmış ve 20 posttranslasyonal modifikasyon ile 7 nokta mutasyonu belirlenmiştir. Yüksek sıklıktaki 6 modifikasyon toplumun %80'ninden fazlasında, orta sıklıktaki 5 modifikasyon %20-50'sinde ve düşük sıklıktaki 16 modifikasyon ise toplumun %7'sinden azında bulunduğu gözlenmiştir. Düşük sıklıktaki 5 modifikasyon 96 örnekli çalışmada görülmemiştir. Çalışma popülasyonunun büyüklüğü arttırıldığı zaman bu düşük frekanslı modifikasyonlar görünür hale gelmiştir. Proteomik teknolojisi ile yapılan bu iki çalışma konularında ilktirler ve Amerika toplumu için bu modifikasyonların normal dağılımını göstermektedirler.

İnsan proteomunun karmaşıklığından dolayı henüz toplumsal proteomik alanında yeterli ilerleme sağlanamamıştır ve bu konuda yapılacak geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak hastalıklar, toksik ajanlar veya enfeksiyonlar gibi faktörler sonucu oluşan proteinlerin seviyeleri ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve işlevlerinin aydınlatılmasını amaçlayan proteomik çalışmalarında başarıya ulaşıldığı takdirde, özellikle erken kanser tanısı olmak üzere pek çok hastalığın tanı ve tam hedefe yönelik tedavisi sağlanabilecektir. Proteomik teknolojisi özellikle kanser tanısı için doğru ve güvenilir markerların belirlenmesinde önemli avantajlar sağlamakla birlikte günümüzde yaygın olarak araştırma laboratuvarlarında kullanılmasına rağmen henüz klinik laboratuvarlarda yaygın kullanılır hale gelmemiştir. Proteomik teknolojisinin yaygın olarak kullanılmasında metotların standardizasyonu ve ölçüm sistemlerindeki teknolojik ilerlemeler önemli rol oynayacak ve proteomik teknolojileri ve biyomarkerlar klinik laboratuvarlarda yakın zamanda yerini alacaktır. Toplumsal proteomik çalışmaları ile toplumların protein haritalarının çıkarılması ve böylece proteinlerin genel popülasyondaki dağılımı yapısal farklılıkların belirlenmesi ve sonra bu farklılıklarla spesifik hastalıklar arasındaki ilişkinin ortaya konması planlanmaktadır.

REFERANSLAR

1. Del Boccio P, Urbani A. Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. Ann Ist Super Sanita 2005;41: 479-82.
2. Denizli A. Protein Analizi. BİLİM ve TEKNİK 2007;476: 66-9.
3. Arthur JM. Proteomics. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003;12: 423-30.
4. Anderson L, Seilhamer J. A comparision of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis 1997;18: 533-7.
5. Graham DR, Elliott ST, Van Eyk JE. Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. J Physiol 2005;563: 1–9.
6. Guo Y, Fu Z, Van Eyk JE. A proteomic primer for the clinician. Proc Am Thorac Soc 2007;4: 9-17.
7. Chen Y, Guo Z, Wang X, Qiu C. Sample preparation. J Chromatogr A 2008;1184: 191-219.
8. Von Eggeling F, Gawriljuk A, Fiedler W, Ernst G, Blaussen U, Klose J, et al. Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid

detection of differences in protein patter with standard image analysis software. Int J Mol Med 2001;8: 373–7.

9. Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics techonology. Proteomics 2001;1: 377-96.

10. Neverova I, Van Eyk JE. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005; 815: 51–63.

11. Sheng S, Chen D, Van Eyk JE. Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome: optimization and protein database. Mol Cell Proteomics 2006;5: 26-34.

12. Hilario M, Kalousis A, Pellegrini C, Müller M. Processing and classification of protein mass spectra. Mass Spectrom Rev 2006;25: 409-49.

13. Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofler EE, Tubbs KA, Nelson RW. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. Mol Cell Proteomics 2006;5: 1811-18.

14. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. Mass Spectrom Rev 2004;23: 34–44.

15. Kallweit U, Börnsen OK, Kresbach GM, Widmer HM. Matrix compatible buffers for analysis of proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1996;10: 845-9.

16. Hall DA, Ptacek J, Snyder M. Protein microarray technology. Mech Ageing Dev 2007;128: 161-7.

17. Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, et al. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. Nature 2008;451: 1076-81.

18. Pasinetti GM, Ungar LH, Lange DJ, Yemul S, Deng H, Yuan X, et al. Identification of potential CSF biomarkers in ALS. Neurology 2006;66: 1218-22.

19. Junker H, Späte K, Suofu Y, Walther R, Schwarz G, Kammer W, et al. Proteomic identification of the involvement of the mitochondrial rieske protein in epilepsy. Epilepsia 2005;46: 339-43.

20. McGregor E, Dunn MJ. Proteomics of the Heart Unraveling Disease. Circ Res 2006;98: 309-21.

21. Vidal BC, Bonventre JV, I-Hong Hsu S. Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis. Clin Sci (Lond) 2005;109: 421-30.

22. Johann DJ Jr, McGuigan MD, Patel AR, Tomov S, Ross S, Conrads TP, et al. Clinical proteomics and biomarker discovery Ann N Y Acad Sci 2004;1022: 295–305.

23. Wulfkuhle JD, Liotta L A, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. Nat Rev Cancer 2003;3: 267–75.

24. Chuthapisith S, Layfield R, Kerr ID, Eremin O. Principles of proteomics and its applications in cancer. Surgeon 2007;5: 14–22.

25. Kuramitsu Y, Nakamura K, Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. Proteomics 2006;6: 5650–61.

26. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet 2002;359: 572–7.

27. Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, Otu HH, Spentzos D, Kalmowitz B, et al. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. Clin Cancer Res 2008;14: 470-7.

28. Okusaka T, Yamada T, Maekawa M, Okusaka T, Yamada T, Maekawa M. Serum tumor markers for pancreatic cancer: the dawn of new era? JOP 2006;7: 332–6.

29. Xiao X, Liu D, Tang Y, Guo F, Xia L, Liu J, et al. Development of proteomic patterns for detecting lung cancer. Dis Markers 2003-2004;19: 33-9.

30. Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. Clin Cancer Res 2003;9: 2904–11.

31. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. Cancer Res 2004;64: 5882-90.

32. Le L, Chi K, Tyldesley S, Flibotte S, Diamond DL, Kuzyk MA, et al. Identification of serum amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions. Clin Chem 2005; 51: 695-707.

33. Hlavaty JJ, Partin AW, Shue MJ, Mangold LA, Derby J, Javier T, et al. Identification and preliminary clinical evaluation of a 50.8-kDa serum marker for prostate cancer. Urology 2003;61: 1261-5.

34. Malik G, Ward MD, Gupta SK, Trosset MW, Grizzle WE, Adam BL, et al. Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer. Clin Cancer Res 2005;11: 1073-85.

35. Parekh DJ, Ankerst DP, Troyer D, Srivastava S, Thompson IM. Biomarkers for prostate cancer detection. J Urol 2007;178: 2252-9.

36. Li J, Orlandi R, White CN, Rosenzweig J, Zhao J, Seregni E, et al. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. Clin Chem 2006;52: 771-2.

37. Rho JH, Qin S, Wang JY, Roehrl MH. Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up-regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. J Proteome Res 2008;7: 2959-72.

38. Nedelkov D. Population proteomics: investigation of protein diversity in human populations. Proteomics 2008;8: 779-86.

39. Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofler EE, Tubbs KA, Nelson RW. Investigating human plasma proteins diversity. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102: 10852–7.

40. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA, Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants. Amyloid 2003;10: 160–84.

41. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. Curr Opin Lipidol 1999;10: 207–17.

42. Nedelkov D, Phillips DA, Tubbs KA, Nelson RW. Investigation of human protein variants and their frequency in the general population. Mol Cell Proteomics 2007;6: 1183-7.

Yazışma adresi:

Dr. Sevil KURBAN
Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya
e-mail: svkrbn@yahoo.com
Yazının geldiği tarih : 25.08.2009
Yayına kabul tarihi : 11.12.2009