

Metode de separare folosite pentru studiul proteomului

Separation methods used for the study of proteome

Ileana Funduc*

Rezumat

Termenul “proteom” definește setul total de proteine exprimate de către genom într-o celulă, țesut sau lichid biologic, la un moment dat. Scopul studierii proteomului este identificarea și cuantificarea proteinelor dintr-un material biologic, analiza modificărilor expresiei proteice a celulelor normale față de cele patologice, caracterizarea modificărilor post-tranlaționale, studiul interacțiilor proteină-proteină, cât și alte aplicații. Analiza proteomică se poate clasifica în trei categorii principale: expresia proteomului, analiza bioinformatică și funcționalitatea proteomului. Studiul proteomului utilizează pentru analiza de imagine, electroforeza, cromatografia și, pentru identificarea secvențelor proteice, în special spectrometria de masă. Se descriu diferite metode electroforetice și de vizualizare a spoturilor de proteine în geluri. Când nivelul sensibilității și specificității modelelor proteomice vor avea valori maxime, metodele diagnostice care se sprijină pe acestea vor revoluționa medicina.

Cuvinte-cheie: electroforeză, cromatografie, spectrometrie de masă.

Abstract

The term “proteome” defines the total set of proteins expressed by its genome in a given cell, tissue or biological fluid, at a given time. The purpose of proteomics is the identification and quantification of proteins from the given biological material, analysis of the changes in protein expression in normal versus diseased cells, characterization of post-translational modifications, the study of protein – protein interactions as well as other applications. Proteomic analyses can be classified as three main categories: expression proteomics, bioinformatics analysis and functional proteomics. The study of proteome uses for the image analyses electrophoresis, chromatography and for the identification of protein sequences, especially mass spectroscopy. The different methods of electrophoresis and visualization of protein spots in gels are hereby described. If the level of the sensitivity and specificity of the proteomic patterns will have maximum values, the disease diagnosis using them will revolutionize medicine.

Keywords: electrophoresis, chromatography, mass spectrometry

*Adresa de corespondență: Ileana Funduc, Barajul Uzului 2, bl.Y16, sc.A, apt.18, Sector 3, 032796 București
Tel. 0724210670, Tel/fax: 0213407668

Introducere

Denumirea de “PROTEOM” a fost introdusă prima dată în 1994 de către Marc Wilkins¹⁴, provenind de la „PROTEine exprimate de genOM” - adică setul total de proteine al unei celule date, exprimat de genomul său. Analiza proteomică constituie un domeniu de studiu separat, dar complementar cu genomul.

Unii cercetători afirmă că denumirea de “proteom” ar proveni și de la PROTEUS – o divinitate primordială în mitologia grecilor antici, care cunoștea trecutul, prezentul și viitorul, dar îi dis plăcea să împărtășească informațiile. El trebuia să fie legat în timpul somnului de după amiază, căci altfel scăpa și se transforma în diverse forme materiale. Strâns legat, dădea răspunsul dorit și apoi se arunca în mare. Datorită puterii sale de a lua diverse forme, Proteus a fost socotit un simbol al materiei de origine din care toți suntem creați.

Definiții ale proteomului

- 1998 Anderson N.L. și Anderson N.G.¹: „folosirea măsurării cantitative a nivelului proteic din expresia genei, pentru a caracteriza procesele biologice și a descifra mecanismele controlului expresiei genetice”.
- 2000 Gygi și Raebersold¹⁰: ... abilitatea identificării sistematice a fiecărei proteine exprimate într-o celulă sau țesut, cât și determinarea proprietăților caracteristice ale fiecărei proteine ca stare de modificare, concentrație, implicare în complexe multiproteice.
- 2001 Yates¹⁵: „... disciplina caracterizării și analizării proteinelor, a interacțiilor proteice și a modificărilor proteice ale unui organism”.
- 2003 Huber⁹: „... o colecție dinamică de proteine ce diferă de la individ la individ și chiar de la celulă la celulă”.
- 2003 Beranova-Giorgianni³: „... proteine exprimate într-un compartiment biologic (celule, țesut, organ) într-un anumit moment, sub un set particular de condiții”.

De ce a apărut necesitatea studierii proteomului?

Analiza genomică este limitată, ea neputând să ofere informații complete referitoare la funcțiile celulare, subcelulare și supracelulare în care proteinele și nu genele guvernează.

Un exemplu îl prezintă diversele stadii ale ciclului de viață al unei insecte: aceeași genă determină diverse morfologii datorită variației proteomului și nu genomului (*Figura 1*).

Genomul este constant ani de zile; proteomul variază cu tipul celulei (deși toate celulele au același genom), răspunde la stimulii mediului înconjurător, la tratamente chimice și depinde chiar și de istoricul celulei. Numărul de gene din genomul uman atinge 10000. Celula umană are aproximativ 20000 proteine cu o greutate medie de 50 kD⁸ care, când sunt supuse digestiei, produc un număr mare de peptide. După Regnier¹⁰, digestia triptică a celulelor eliberează cel puțin 1 milion de peptide, deoarece celulele conțin mii de proteine, fiecare generând o mulțime de fragmente triptice. Proteinele suferă transformări după ce sunt exprimate (activitate enzimatică, abilitate de legare etc.), transformări ce pot determina creșterea numărului de peptide dintr-un singur țesut la 10-20 milioane.



Figura 1. Stadii diferite ale ciclului de viață a unei insecte cu același genom și morfologii diferite determinate de variații ale proteomului¹¹.

Scopul studierii proteomului³:

- identificarea și cuantificarea proteinelor din celule, țesuturi și lichide biologice;
- analiza modificărilor expresiei proteinelor în celulele normale în raport cu cele patologice;
- studierea interacțiunilor proteină-proteină;
- caracterizarea modificărilor post-tranlaționale.

Prin atingerea acestor obiective sunt posibile:

- clarificarea mecanismelor moleculare ce guvernează procesele moleculare;
- caracterizarea rețelelor complexe de proteine și a perturbațiilor lor;
- descoperirea proteinelor-biomarkeri pentru detectarea și diagnosticul bolilor;
- identificarea țintelor pentru proiectarea terapiei medicamentoase.

Etapile analizei proteomice¹¹ (Figura 2)

1. Obținerea unei expresii proteomice:

- 1.1. Prepararea probei pentru analiză (solubilizare, extracție, izolare din celulă sau țesut).
- 1.2. Separarea componentelor probei.
- 1.3. Detectare (evaluare și identificare).

Această fază permite compararea expresiei proteice între două sau mai multe condiții experimentale sau stadii de boală, ceea ce contribuie la înțelegerea mecanismelor fiziologice și patologice și la determinarea comparativă a abundenței proteice în diversele condiții.

2. Analiza bioinformatică - extinde informațiile anterioare la posibilitatea obținerii de structuri primare, secundare și terțiare, secvențieri, domenii, interacțiuni proteice și rețele, localizări subcelulare etc.

3. Funcționalitatea proteomului, prin care sunt analizate interacțiunile proteină - proteină, complexe proteice și modificările post-tranlaționale, în scopul înțelegerii rolului proteinelor țintă asupra funcțiilor celulare.

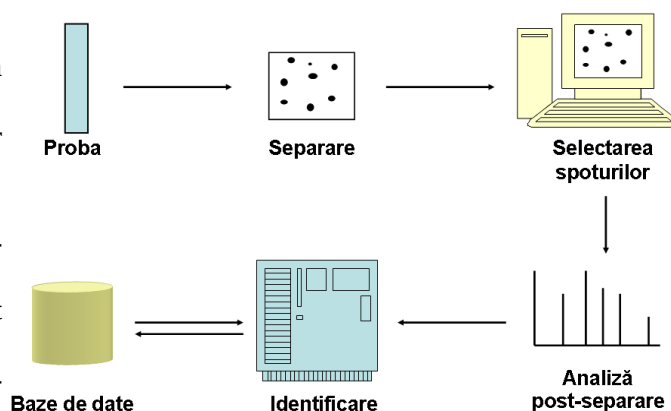


Figura 2. Schema generală a etapelor analizei proteomice (după [2]).

1. Obținerea unei expresii proteomice

1.1. Prepararea probei pentru analiză

– implică solubilizare, extracție, izolare din celulă sau țesut.

Datorită proprietăților fizice și chimice diverse ale proteinelor, se aplică diferite protocoale de extracție care să favorizeze anumite compartimente ale întregului proteom. Dintre substanțele folosite pentru solubilizarea probei fac parte uree de mare concentrație, tiouree, DTT (dithiothreitol), DTE (dithioeritritol), fosfine, detergenți (triton) etc⁷. Cele mai multe protocoale de extracție pentru electroforeză bi-dimensională prezintă o limitare pentru solubilizarea proteinelor de membrană.

1.2. Separarea componentelor probei.

Definirea metodologiei de separare a proteinelor dintr-un mediu biologic se face în funcție de ceea ce vrem să studiem¹⁰: o anumită proteină, un grup de proteine, toate proteinele.

a. O anumită proteină

Separarea selectivă se face folosind electroforeza capilară (CE) și HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de afinitate (Figura 3).

Principiul de afinitate se bazează pe abilitatea substanței biologice active să lege specific și reversibil substanța de interes. Locurile de legare a substanței imobilizate trebuie să fie accesibile steric, chiar și după cuplare și nu tre-

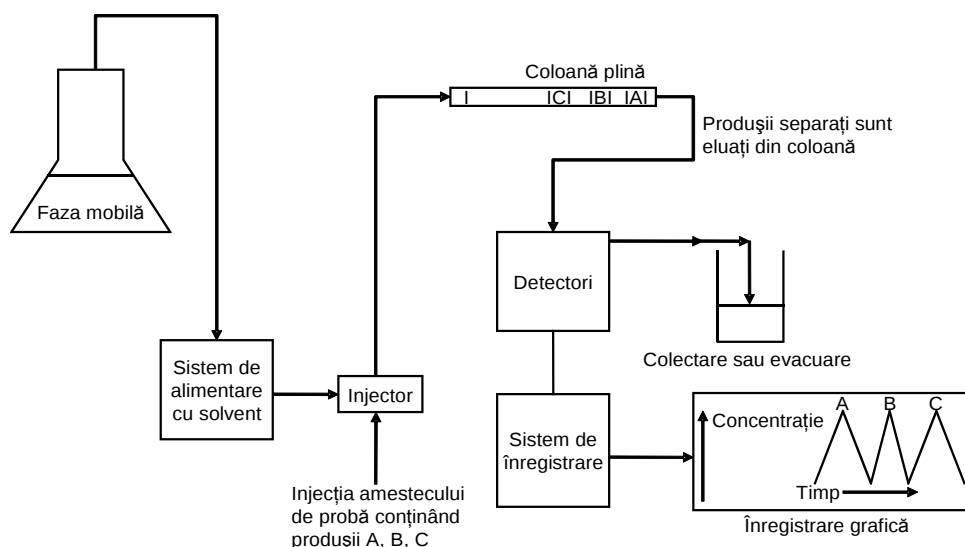


Figura 3. Schema unei instalații de cromatografie lichidă de înaltă performanță¹⁷.

buie să se deformeze prin imobilizare. În cazul HPLC, substanța de interes se atașează de suprafața activă a materialului care umple coloana, iar în cazul CE, de suprafața coloanei. Amestecul se injectează pe coloană și proteina este captată de substanța biologic activă prin afinitate, iar restul compușilor trec prin coloană. Proteina captată se eluează modificând proprietățile tamponului (pH, pI, t^0 etc) (Figura 4).

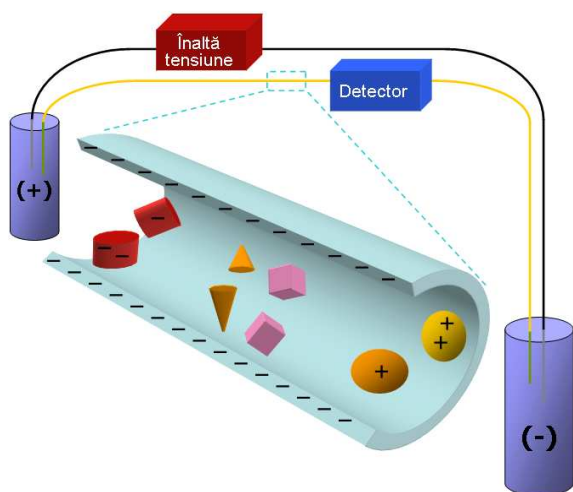


Figura 4. Schema unei instalații de electroforeză capilară (după [16]).

b. Un grup de proteine

Separarea implică folosirea aceluiași metode ca în cazul precedent sau modificarea în trepte a condițiilor experimentale, în funcție de proprietățile grupului de proteine ce se separă (hidrofobicitate, încărcătură electrică, polaritate). Aceasta se obține modificând proprietățile fazei mobile (pH-ul tamponului, concentrația sărurilor etc.) sau tipul coloanei (afinitate, schimb ionic, filtrare în gel).

c. Toate proteinele

Separarea în acest caz se realizează cu o metodă multidimensională (bi- sau tridimensională) care să folosească două sau mai multe metode (SDS PAGE -electroforeză în gel de poliacrilamidă și sodiu dodecil sulfat, HPLC, CE) sau una singură, dar cu mecanisme diferite (partiție, adsorbție, schimb ionic, afinitate, filtrare în gel etc.).

Electroforeza bidimensională în gel a rămas, totuși, tehnica esențială de separare utilizată în studiul proteomului. Prima dimensiune implică focalizarea izoelectrică, prin care proteinele se separă pe baza sarcinii electrice, folosind geluri cu gradient de pH imobilizat, iar a doua dimensiune - separare SDS-PAGE, prin care proteinele se separă pe baza greutateii lor

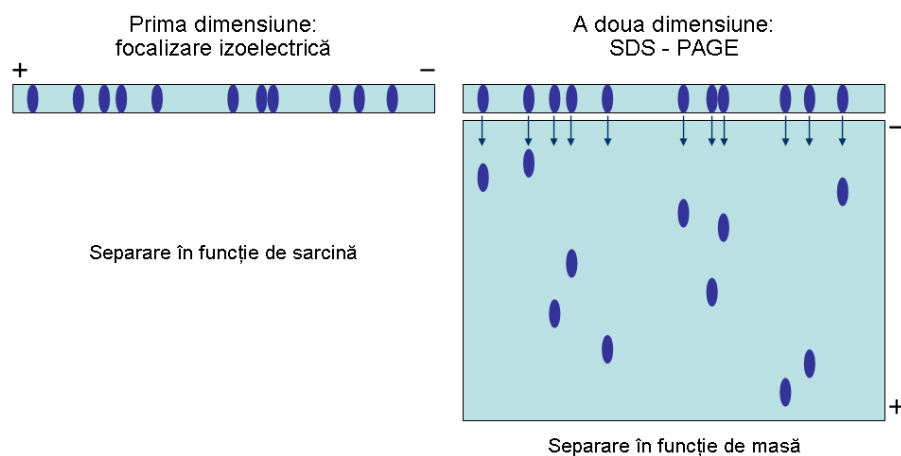


Figura 5. Electroforeză bidimensională: focalizare izoelectrică în prima dimensiune, electroforeză în gel de poliacrilamidă cu sodiu dodecil sulfat în a doua dimensiune (după [4]).

moleculare (Figura 5).

Mii de proteine separate în gel se pot păstra luni și chiar ani la temperatura camerei, într-un spațiu egal cu o pagină de bloc-notes.

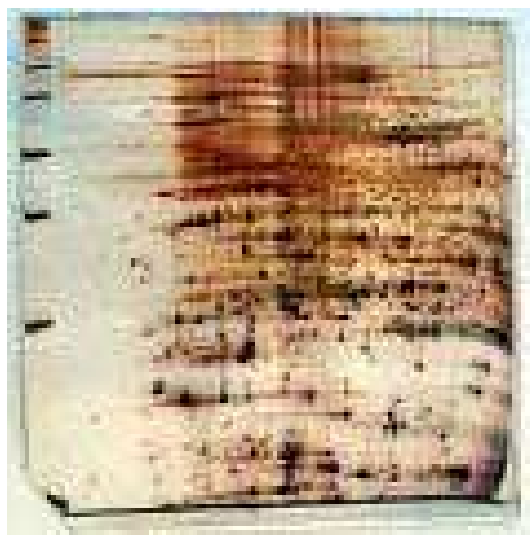
Colorarea se face cu Coomassie Blue sau cu Ag (limită de detecție 1ng), Figura 6.

Spoturile de proteine colorate se eliberează din gel, se clivează cu tripsină la carbonul terminal al lizinei și argininei și apoi se caracterizează fragmentele peptidice.

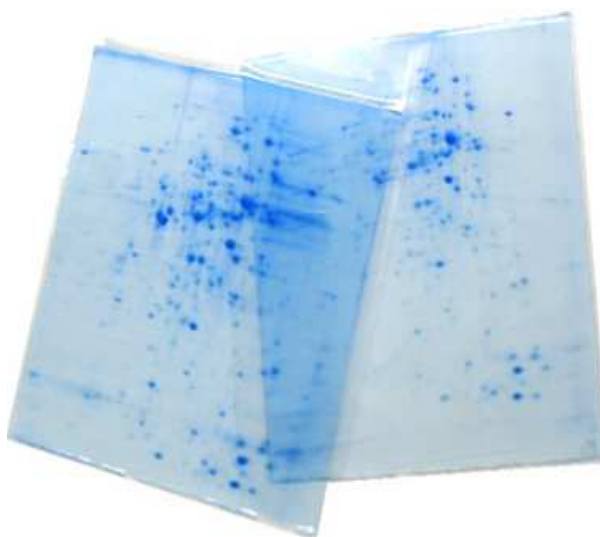
Electroforeza bidimensională are anu-

mite limite:

- Este manuală, laborioasă.
- Nu există o matriță de gel standardizată pentru a reproduce modelele proteice⁹.
- Capacitatea de rezoluție este limitată, fapt pentru care vizualizarea se reduce la 3000-10000 proteine, în funcție de detecție. Celula mamară, de exemplu, prezintă 50000 spoturi/celulă, dintre care doar 7-24% din proteine se pot separa prin electroforeză bidimensională,



a.



b.

Figura 6. Colorarea traseelor de electroforeză cu argint (a) și cu Coomassie Blue (b) ¹².

restul de 76% fiind sub limita de detecție. Domeniul dinamic este, deci, limitat; sunt observate proteinele cele mai abundente și unele clase sunt excluse sau subreprezentate (proteinele foarte acide sau bazice, foarte mari sau foarte mici și proteinele de membrană)¹³.

- Sensibilitatea este redusă: coloranții convenționali nu detectează proteine cu rol cheie în procesele celulare (receptori, proteine reglatoare etc.), proteine alcaline, hidrofobe și proteinele membranare, datorită solubilității lor reduse. Colorantul cu argint sau combinat cu glutaraldehidă, nu obține ușor reproductibilitatea intensității spotului. Soluția coloidă Coomassie Blue ar fi mai potrivită în acest sens, dar sensibilitatea sa este mai mică⁹. Se mai utilizează Sypro Ruby, un colorant fluorescent sau marcarea cu fluorofori Cy3 și Cy5⁷.

Pentru înlăturarea acestor limite s-au propus unele îmbunătățiri:

- alchilarea și marcarea ulterioară cu tritiu, iodacetamidă sau cu ¹²⁵I;
- prefracționarea proteinelor înainte de electroforeză pentru reducerea complexității lor și/sau izolarea specifică a subseturilor lor;
- sisteme SDS-PAGE verticale;
- coloranți fluorescenți;
- roboți pentru extirparea spoturilor de pe gel și module pentru digestia automată a proteinelor³;
- geluri cu domeniu de pH îngust¹³;
- dispozitive microchip integrate pentru dife-

rite trepte ale separării (electroforeză, digestie, marcarea, fluorescență)¹⁰.

Toate aceste încercări au ameliorat impedimentele, dar nu le-au eliminat.

HPLC și CE multidimensionale implică întâi digerarea proteinelor și apoi separarea lor, deoarece peptidele sunt mai solubile și mai ușor de separat comparativ cu proteinele din care provin, cum ar fi proteinele hidrofobe sau cele de membrană. Față de electroforeza în gel, preconcentrarea soluțiilor diluate este realizată în HPLC în vârful coloanei prin manipularea fazei mobile înainte de separare, iar în EC cu ajutorul anticorpilor, a dopului de C-18, prin focalizare izoelectrică sau izotacoforeză. Numărul de peptide separate prin varianta HPLC-CE multidimensionale este mai mare față de varianta anterioară, dar proteinele cu abundența scăzută scapă detectării.

1.3. Detectare (identificare și cuantificare).

Identificarea

Identificarea cu ajutorul electroforezei bidimensionale în gel, prin colorare sau alt procedeu, a rămas în urmă față de HPLC, fluorescență, fluorescență indusă cu laser (LIF) și CE (care permit detectarea on-line folosind absorbția în ultraviolet) și, nu în ultimul rând, spectroscopia de masă².

Spectroscopia de masă (*Figura 7*) a rămas tehnica ideală de detectare a peptidelor și proteinelor, datorită universalității, selectivității și sensibilității sale (măsoară cu extremă sensi-

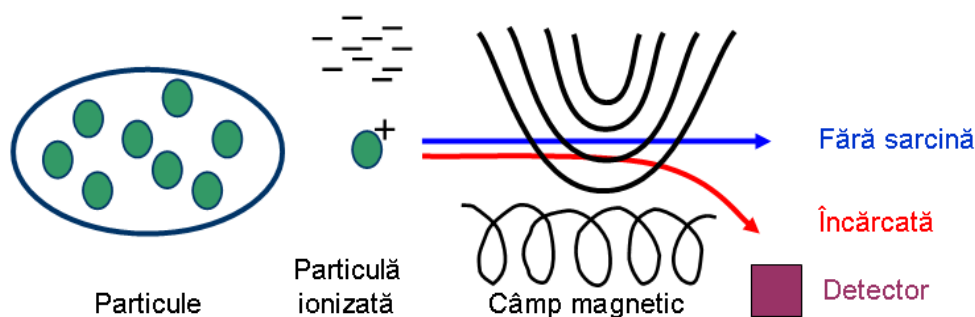


Figura 7. Schema etapelor detectării prin spectroscopie de masă (după [18]).

bilitate raportul masă/sarcină electrică a ionilor în fază gazoasă cu mase moleculare de 500-50000 Da)⁷. În special cuplată cu HPLC sau CE, este cea mai importantă tehnică pentru cercetarea proteomului, realizarea hărții peptidice, confirmarea secvențelor proteice și investigarea modificărilor post-tranlaționale.

Spectrometria de masă folosește 3 metode ce permit introducerea în spectrometrul de masă a compușilor polari, nevolatili, precum peptidele și proteinele¹⁰:

- bombardament atomic rapid în flux continuu (FAB);
- ionizare prin pulverizare electrică (ESI), prin care se produc ioni în gaz la presiune atmosferică pentru secvențierea parțială de peptide;
- spectrometrie de masă prin desorbție/ionizare cu laser pe matriță asistată (MALDI-MS) cu analizor de masă.

A mai fost introdusă ulterior ionizarea prin pulverizare electrică cu analizor cu timp de descărcare de tip quadrupole (ESI-Q-IT-MS), care implică inițial o etapă de cromatografie lichidă, iar analiza durează o oră³. Un analizor cu timp de descărcare quadrupole se poate cupla cu ESI sau cu MALDI cu sensibilitate crescută, apărând generații ulterioare din ce în ce mai perfecționate. Astfel, a apărut varianta în care proteinele sunt capturate după separarea pe o fază staționară și imobilizate pe un chip. Acesta se pune pe o matriță, după care urmează ionizarea și, în final, se măsoară raportul dintre masă și sarcină⁵. Alte variante utilizează anterior analizei spectrometrice, HPLC capilară, cu rezoluție ultra înaltă, sau cromatografie de interacțiune hidrofobă¹⁰.

Identificarea proteinelor a folosit spectrometria de masă prin 2 modalități¹³:

- Clasic: electroforeză bidimensională, digestie, *fingerprinting* prin spectrometrie de masă; metoda este rapidă (3-5 minute/analiză), sensibilă (măsoară cantități peptidice de până la 50 ppm). În final, identificarea se face comparând lista cu masele peptidelor observate cu o listă

calculată a tuturor maselor peptidice. Spoturile de proteină separate prin electroforeză bidimensională se pot cuantifica în raport cu intensitatea culorii. În acest caz, însă, ne lovim de limitele acestei metode. Un sistem superior folosește LC (Liquid Chromatography) care elimină etapa de electroforeză bidimensională.

- Unele variante folosesc și izotopi și au posibilitatea de a detecta modificări ale profilului proteic, de exemplu, între țesutul normal și patologic.

Evaluarea cantitativă presupune obținerea unor date cel puțin semicantitative. Cantitatea proteinelor din probă se poate calcula cu ajutorul unor standarde marcate cu izotopi care se introduc chimic, metabolic sau prin încorporare enzimatică în timpul proteolizei¹³. Marcarea se face folosind un reactiv ce conține un marcator de afinitate – biotina, un ligand ce încorporează izotopii și un grup specific pentru tiol. Proba se denaturează, se reduce, se marchează, suferă digestia cu tripsină și se separă prin HPLC on-line cuplată cu spectrometria de masă.

2. Analiza bioinformatică

Odată cu imaginile gelurilor de electroforeză cu proteinele identificate pe ele și unele date experimentale ca punctul izoelectric și masă moleculară, se mai obțin și informații din cursul separării gelurilor, a microsecvențializării, a analizei compoziției aminoacidice și din spectrometria de masă a fingerprinturilor⁷.

3. Funcționalitatea proteomului

Interacțiunile proteice și complexe se analizează prin tehnici de co-imunoprecipitare urmate de electroforeză bidimensională sau de cromatografie de afinitate, chipuri de proteine, analiza interacției biomoleculare cu purificare prin spectrometrie de masă etc. Toate aplicațiile se bazează pe folosirea unui anticorp specific sau a unui receptor specific și a unor proteine de interacție, analiza ulterioară realizându-se prin spectrometrie de masă.

Aplicații

În ciuda limitelor sale, electroforeza bi-dimensională este încă folosită pentru analiza proteomului celular și tisular, pentru compararea hărților bidimensionale a stărilor diferiteleor boli¹⁰. Astfel, în 2000 s-au folosit gelurile bidimensionale pentru analiza plasmei la bolnavii cu Alzheimer. Tot în același an, s-a efectuat analiza proteomică a liniei celulare de carcinom de colon uman și proteomul liniei celulare de carcinom hepatocelular uman.

La Conferința anuală a Societății Americane de Electroforeză din 2004⁶ s-au prezentat rezultatele unui studiu proteomic asupra mușchiului scheletic lezat prin arsură, acestea fiind utile în terapia acestor cazuri. Tot cu această ocazie a fost prezentat studiul proteomic al lichidului cefalo-rahidian al bolnavilor cu Alzheimer comparativ cu cel provenind de la indivizi sănătoși și de la bolnavi cu alte tulburări neuro-degenerative.

Cum numărul de proteine variază între 1×10^6 și 5×10^6 , inventarul tuturor proteinelor, unul din scopurile majore ale analizei proteomice, este aproape imposibil de realizat. Mai mult, aceste proteine sunt diferite structural și au caracteristici fizico-chimice diverse, iar caracterizarea acestora constituie o enormă angajare^{3,7}.

Electroforeza bi-dimensională va mai fi pentru un timp principala tehnologie utilizată în studiul proteomului, dar abordarea cromatografică va înlocui această tehnică în viitor⁹.

Unul din scopurile analizei proteomice este găsirea de biomarkeri specifici unei boli care să poată fi utilizați pentru detectarea, monitorizarea evoluției bolii și a răspunsului terapeutic⁵. Un "biomarker ideal" indicat exclusiv pentru o boală nu există. Conceptul folosirii modelului proteomic ca instrument diagnostic este încă în fașă, datorită dificultăților privind folosirea bioinformaticii, descoperirea bazelor biologice din spatele soluțiilor matematice etc. La Conferința Internațională asupra proteomului din 2006 s-a arătat că elucidarea secvenței

aminoacidice a unei proteine nu este suficientă pentru a înțelege funcția sau interacțiunile sale cu alte proteine și macromolecule; este nevoie să fie luate în considerare modificările post-translaționale pentru a înțelege dinamica proteomului. Dacă sensibilitatea și specificitatea metodologiei vor fi perfecționate, diagnosticul bolilor bazat pe modelele proteomice va revoluționa medicina.

Așa cum se spune „aceste ghetete sunt făcute pentru a merge”, acum se pare că „ghetele” proteomului se potrivesc și avem chiar o idee asupra „direcției corecte” spre care să mergem⁹.

Se anticipează să se ajungă în viitor la dezlegarea misterelelor unor procese biologice și informațiile modelelor proteomice să constituie un instrument cu un rol mai mult decât complementar în mâna medicului clinician.

Bibliografie

1. Anderson N.L., Anderson N.G. - Proteome and proteomics : New technologies, new concepts, and new words. – Electrophoresis, 1998;19:1853-1861.
2. Baecher R. – 2005, Information Systems in Biology, Proteome Analysis <http://lsirwww.epfl.ch/courses/isb/2004ws/Proteome%20analysis.pdf>.
3. Beranova-Giorganni S. – Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. – Trends in Analytical Chemistry, 2003; 22;5:273-280.
4. Binz A. P. 2001, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland - Proteomics day: step by step EMBO course, Uppsala, Alain Binz <http://www.lcb.uu.se/course/embo2001/binz/presentation-PAB-tutorial/ppframe.htm>
5. Conrads T.P., Zhou M., Petricoin III E.F. et al. – Cancer diagnosis using proteomic patterns. – Expert Mol.Rev.Diagn. 2003; 3;4:411-419.
6. Garfin D.E., Rodkey I.S. – Electrophoresis in 2004: The Annual Meeting of the American Electrophoresis Society - Expert Rev. Proteomics 2005; 2;2:157-164.
7. Govorun V.M., Archakov A.I. - Proteomic Te-

- chnologies in Modern Biomedical Science - Biochemistry (Moscow), 2002;67;10:1109-1123.
8. Hardiman G. – Introduction to proteomics: tools for the new biology. – Expert Rev.Proteomics 2004;1;1:1-10.
9. Huber L.A. – Is proteomics heading in the wrong direction? - Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2003;4:74-80.
10. Issaq H.J. – The role of separation science in proteomics research. - Electrophoresis, 2001; 22:3629-3638.
11. Klein J.B. - Overview of Proteomics, Thongboonkerd V., Klein J.B., (eds) – Proteomics in Nephrology – Contrib.Nephrol.Basel, Karger, 2004;144:1-10.
12. Kossida S., Pitkänen E, Rousu J. 2007, Proteomics & Bioinformatics”, MBI, Master's Degree Program, Helsinki, Finland
www.cs.helsinki.fi/bioinformatiikka/mbi/courses/06-07/proteomics/slides/lecture1.ppt.
13. Lane C.S. – Mass spectrometry – based proteomics in the life sciences. – CMLS, Cell.Mol.Life Sci., 2005;62:848-869.
14. Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A. et al. – Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. – Biotechnol. Genet. Eng.Rev. 1996; 13:19-50.
15. Yates J. – Proteomics Workshop at HPCE 2001, Boston, MA, 2001.
16. --- Protein separation and fractionation GMS6181-2007
<http://bioinformatics.ufl.edu/courses/GMS6181/Week10-Proteomics-2.pdf>.
17. --- High Performance Liquid Chromatography (HPLC), www.protein.iastate.edu/hplc.html
18. --- CMSC 838T – Lecture 12 Proteomics, Study of the proteome: Methods, 2D electrophoresis, Mass spectrometry, Protein arrays & microarrays.
<http://amber.cs.umd.edu/class/838-s04/lec12.pdf>