

Proteomické prístupy k analýze klinických vzoriek

Bielkoviny sú objektom systematického vedeckého skúmania viac ako storočie.

Pokroky v sekvenovaní genómov, ich databázového spracovania a vývoj principiálne nových prístrojov v oblasti hmotnostnej spektrometrie výrazne zmenili a urýchli biochemický výskum. Proteomika, ktorá vďaka týmto faktorom vznikla v 90. rokoch

20. storočia, vychádza z proteínovej chémie, ktoréj metódy a techniky vo veľkej mieri nadálej používa. Má však ambíciu na širšiu a kompletnejšiu charakterizáciu veľkého množstva rôznych proteínov v jednom experimente.

Výraz proteóm, ktorý v roku 1994 vytvoril Marc Wilkins, bol prvýkrát použitý pri charakterizácii bielkovín patogénnej baktérie *Mycoplasma genitalium* (1). Pod týmto pojmom autori rozumeli proteínový komplement genómu. Proteomika sa snaží určiť identitu, množstvo, štruktúru, biochemické a funkcie všetkých bielkovín v organizme, orgáne alebo organele a skúmať, ako sa tieto vlastnosti menia napríklad v čase alebo v závislosti od fyziologického stavu organizmu.

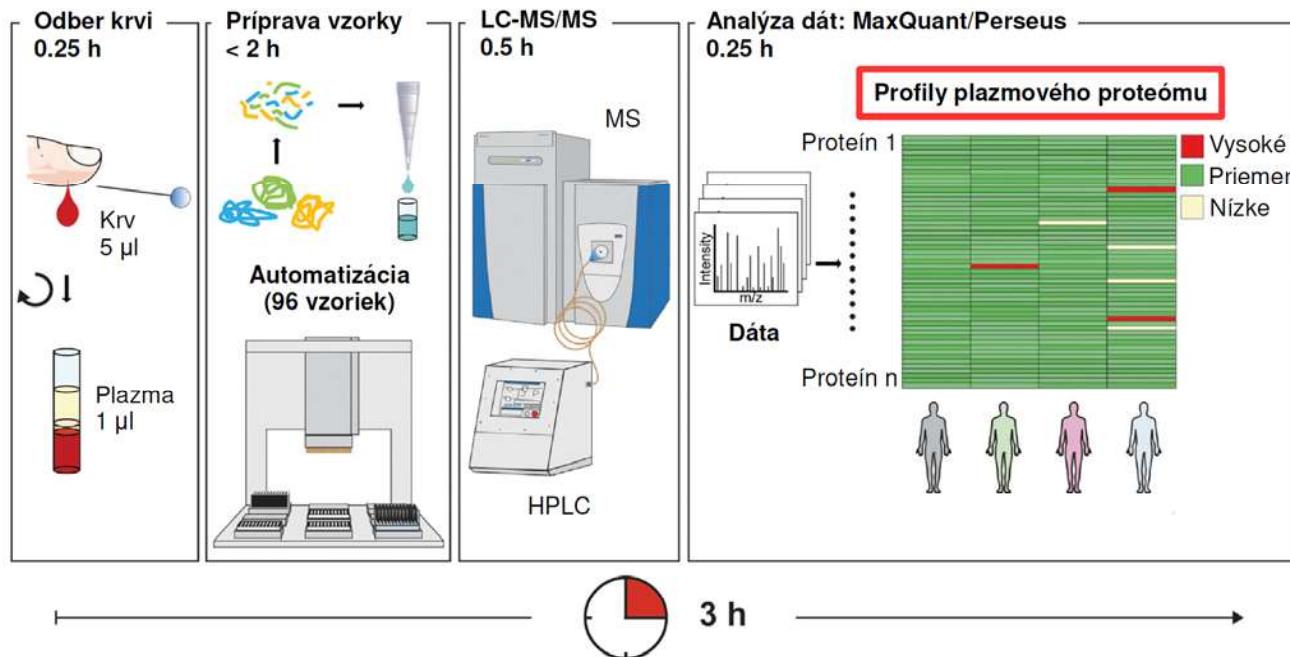
Z charakteru bielkovín vyplýva, že proteóm organizmu je variabilný a mimoriadne dynamický. Jedným z aspektov, ktorý robí štúdium proteómov zložitým, je rôzne zastúpenie jednotlivých bielkovín. Proteíny nie je možné amplifikovať ako nukleové kyseliny, a preto je štúdium bielkovín s nízkou koncentráciou podmienené ich obohatením rôznymi separačnými technikami. Príkladom proteómu so širokým dynamickým rozsahom môže byť ľudská krvná plazma. Obsahuje asi 3000 bielkovín, z ktorých 10 hlavných tvorí celkovo 90 % bielkovínovej masy, a 22 proteínov s najvyšším zastúpením tvorí až 99 % bielkovín. Rozdiel medzi bielkovinami s najvyššou (albumín) a najnižšou koncentráciou (interleukín-6) je až 10 rádov (40 mg/ml oproti 5 pg/ml) (2).

Kvantitatívna analýza jednotlivých sérových bielkovín pomocou imunodetekcie (ELISA) je každodennou praxou klinických

diagnostických zariadení. Imunodetekcia má však obmedzenia vyplývajúce z podstaty metódy, a to najmä problém s detekciou viacerých analytov súčasne (tzv. multiplexing), identifikácia bielkovinových izoforiem a získané údaje sú cielené, t. j. nezískavame informácie o ostatných bielkovinách, ktorých hladiny môžu byť pozmenené. Proteomika založená na hmotnostnej spektrometrii sa dokáže vysporiadať s týmito obmedzeniami a má vysoký potenciál na identifikáciu a detekciu biomarkerov v telesných tekutinách, či už v experimentálnom, alebo klinickom prostredí. Hlavným problémom tohto prístupu zostáva spomínany široký dynamický rozsah koncentrácií jednotlivých bielkovín.

V snahe priblížiť k pacientovi proteomické analýzy, založené na hmotnostnej spektrometrii, vedecký tím pod vedením profesora Matthiasa Manna optimalizoval proces prípravy vzorky z krvnej plazmy, analýzu pomocou kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) a následné bioinformatické vyhodnotenie získaných dát (obr. 1). Tento komplexný proces, ktorý pred pár rokmi trval niekoľko dní, boli schopní úspešne zavŕšiť v priebehu troch hodín. Vychádzajúc iba z 1 µl krvnej plazmy a pri použíti krátkeho 20-minútového chromatografického gradientu identifikovali a kvantifikovali približne 300 bielkovín s vysokou reprodukovateľnosťou (3).

VYPRACOVAL
Mgr. Peter Baráth, PhD.
vedecký pracovník v MEDIREX
GROUP ACADEMY n. o.



Obr. 1: Celkové schéma spracovania krvnej vzorky na rýchle profilovanie plazmového proteómu. Po odobratí krvnej vzorky je v mikrocentrifugačnom zariadení pripravená krvná plazma. Bielkoviny sú enzymaticky natrávené trypsínom a vzniknuté peptidy sú následne odsolené na mikrokolóne. Peptidová vzorka je separovaná pomocou nano-HPLC s priamym nástrekom do iónového zdroja hmotnostného spektrometra. Zaznamenané ďátove sady sú bioinformaticky spracované pomocou voľne súčasným softvéru, ktorý identifikuje zmeny v hladinách jednotlivých bielkovín. Upravené podľa Geyer a kol. (3).

Medzi detegovanými proteínmi bolo aj viac ako 40 bielkovín, ktoré sú schválené ako biomarkery Americkým úradom pre kontrolu potravín a liečív (FDA). Z proteómových profilov boli vďaka detekcii zvýšených hladín markerov (napr. CRP) ľahko identifikovaní jedinci s prebiehajúcimi zápalovými procesmi. V proteóme organizmu sa odzrkadluje aj genetický stav jednotlivca. Niektoré genetické varianty vedú k tvorbe modifikovaných bielkovín, ktoré sú proteomicky detegovateľné. Príkladom môže byť variant apolipoproteínu E (ApoE4), ktorý je spájaný s vyšším rizikom vzniku Alzheimerovej choroby. Autori spomínanej

štúdie spoľahlivo detegovali variantný peptid ApoE4 bielkoviny v dvoch z desiatich jedincov. Peptid nerizikového ApoE2/3 bol prítomný u všetkých z nich, čo reflekтуje heterozygotný (ApoE4 / ApoE2/3), resp. homozygotný (ApoE2/3) genetický stav.

Technologický pokrok pri vývoji hmotnostných spektrometrov spolu s rozvojom analytických prístupov a bioinformatických nástrojov umožňuje vidieť reálne použitie klinickej proteomiky nielen v špecializovanom výskume, ale aj pri rutinnej starostlivosti o pacienta. Aj keď je ešte potrebné prejsť dlhú cestu, základy na tento typ modernej

diagnostiky boli položené a je iba otázkou času, kedy jej výhody budeme môcť naplnu využívať.

Poděkování

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt „Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDGRES“, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Wasinger V.C. a kol. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis 16: 1090–1094
- Anderson N.L., Anderson N.G. (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol. Cell Proteomics 1: 845–867
- Geyer P.E. a kol. (2016), Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. Cell Systems 2: 185–195