

İnsan Genom Projesi Tamamlandınc Ne Olacak: Fonksiyonel Genomiks ve Proteomiks

THE NEXT STEP IN HUMAN GENOME PROJECT: FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS

Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

İnsan genomunun haritalanmasının büyük bir bölümü Şubat 2001'de tamamlanmış olup, araştırmalar gen ürünlerinin normal biyolojik fonksiyonlarının ve hastalıkların gelişimindeki fonksiyonel rollerinin belirlenmesine yönelmiştir. Bu nedenle "proteomiks" post-genomik süreçte genlerin fonksiyonlarının anlaşılması için en önemli uygulamalardan birisi haline gelmiştir. Proteomiks kapsamında yapılan çalışmalar üç ana alanda toplanabilir: (1) Proteinlerin identifikasyonu, karakterizasyonu ve post translasyonel modifikasyonlarının belirlenmesi, (2) Çok sayıdaki farklı hücre, doku, organ, organizmada ve farklı hastalıklardaki protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmalı analizleri, (3) Protein-protein ilişkilerinin analizleri. Genomiks sırasında DNA metodlarındaki ilerlemeler ile ulaşılan nokta göz önüne alındığında, çok kısa bir süre içinde proteomiks çalışmalarının hastalıkların biyolojik temellerini anlamada ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde getireceği açılımlar yadsınamaz. Bu makalede insan genom projesi tamamlandıktan sonraki hedefler, proteomiks çalışmalarında kullanılan yöntemler özetlenmiş ve bu gelişmelerin normal biyolojik işlevleri anlamada, hastalıkların tedavi edilmesinde sağlayacağı yararlar tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: İnsan genomu projesi, fonksiyonel genomiks, proteomiks

SUMMARY

Mapping of human genome was mostly completed in February 2001 and efforts are then directed to understand the role of gene products in biological pathways and human diseases. Therefore "proteomics" became to be one of the most important approaches to understand gene function in the post-genomic era. Proteomics includes three main areas: (1) identification, characterization and posttranslational modifications of proteins; (2) comprehensive analysis of protein expression in a wide range of cells, tissues, organs, organisms and diseases; (3) analysis of protein-protein interactions. In consideration with the improvements in DNA methods during genomics, it is not hard to expect that proteomics will add to our understanding of the biological basis of diseases and development of new protein based therapeutics. In this paper, the future goals of human genome projects and current status of technologies that are used in proteomics are summarized and benefits of proteomics for understanding of the normal biological processes and treatments of diseases are discussed.

Key words: Human genome project, functional genomics, proteomics

Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

35340 Inciraltı-İZMİR

e-mail: nesc.atabey@deu.edu.tr

Otomasyon ve biyoinformatikteki teknolojik gelişmeler biyolojide genomiks olarak adlandırılan yeni bir disiplinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Genler ve

genom hakkındaki bilgilerin oluşturulması ve analizini hedefleyen, tek tek genlerin bulunması ve tanımlanması gibi amaçları olan bu proje kapsamında otomas-

yön teknolojisinin gelişimi ile dokuz aylık bir süre içinde 14.8 milyar baz çiftinin sekanslaması gerçekleştirilmiştir (1).

Teknolojideki bu ve benzeri gelişmeler sonucunda proje tahmin edilenden çok daha kısa bir sürede tamamlanmış ve 2000 yılı Şubat ayında yayınlanan verilere göre insan genomunda yaklaşık 32,000 geninin bulunduğu belirlenmiştir. Bu rakam *Caenorhabditis elegans*'ta 19,000 gen veya *Drosophila melanogaster*'de 13,600 gen olduğu düşünüldüğünde daha önceki tahminlerin üçte biri düzeyindedir. Bilim adamlarını önce şaşırtan bu veri, daha sonra yüksek ökaryotlardaki farklılıkların gen sayısındaki artış ile değil, proteinlerin fonksiyonel evrimi ile gerçekleşen çeşitlilik nedeniyle olabileceğini düşündürmüştür. Son yıllarda *S.cerevisiae* ile yapılan protein-protein ilişkilerini saptamaya yönelik çalışmalar, basit ökaryotik organizmalarda sinyal iletimi yollarının çok az sayıda partner ile ve sınırlı sayıda protein ile gerçekleştiğini göstermiştir (1). Bunun yüksek ökaryotlar için de doğru olabileceği, hücrede kilit fonksiyonları olan ve pek çok hücre fonksiyonunun gerçekleşmesinde rol oynayan bu tip proteinlerin (örn p53 gibi) saptanması ve bunları hedefleyen ilaçlar ile bozulan hücre fonksiyonlarının düzeltilebileceği fikri tartışılmaya başlanmıştır (1).

Genomik verilere ek olarak "microarray" gibi yöntemlerle hücre fonksiyon paternlerinin tanınması sonucunda, projeden elde edilen bilgilerin hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanımında yeni uygulamalar ortaya çıkmıştır. Moleküler biyolojik ve robotik tekniklerin bir arada kullanımı sonucunda her 10 mikrometreye, her biri bir spesifik geni temsil eden binlerce farklı DNA parçasının (oligonükleotidler veya cDNA lar) yapılandırılması ile elde edilen "array"ler ile hücrelere, hastalıklara özel gen ekspresyonu paternlerinin belirlenmesi mümkün olmuştur (1-6). Genomik veriler ve transkript profilleri normal işlevlerin ve hastalıkların moleküler temellerinin anlaşılmasına çok önemli açılımlar getirmiş olsalar da tam bir genetik "blueprint" in de bazı sınırlamaları bulunmaktadır.

Hücre fonksiyonlarının DNA veya RNA ile değil proteinler tarafından gerçekleştiriliyor olmasının yanı sıra, "RNA splicing", fosforilasyon ve glikolizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonları da içeren çok sayıda protein modifikasyonu nükleik asit veya amino asit sekansından anlaşılabilir değildir. Ayrıca genomik sekans hangi proteinlerin DNA ile veya birbirleri ile ne zaman, nasıl bir bağlantı yapacaklarını veya onların değişik koşullarda hücrenin neresine yerleşmesi gerektiğine de spesifik değildir. Transkript miktarının fazla olması her zaman protein miktarının fazla olduğu anlamına da gelmemektedir. Şu anda var olan teknoloji ile genomik bir sekansa bakınca o sekansın ürün sentezlenip sentezlenmeyeceği veya sentezlenen ürünün fonksiyonel olup olmadığı, bu proteinin ekspresyonunun nasıl düzenlendiğini, yapısı ve fonksiyonu ile ilgili bilgileri anlaşılması olası değildir.

Bu nedenlerle son yıllardaki genetik ilerlemeler ile paralel olarak protein ve protein sistemleri ile ilgili karşılaştırmalı çalışmalara da ilgi artmıştır. Sonuçta proje "fonksiyonel genomik" olarak adlandırılan yeni bir açılım kazanmıştır. Projenin bu bölümünün amacı kısaca genomik sekansdaki bilgilerin fonksiyonunun ne olduğunun belirlenmesi olarak özetlenebilir. Proje kapsamında genom ekspresyonu ve kontrolünün nasıl gerçekleştiğinin; fare gibi organizmaların genomlarında yaratılan mutasyonlar, kayıp veya değişiklikler ile anlaşılması ve protein analizi için bilgisayar destekli metodların geliştirilmesi hedeflenmiştir (1). Fonksiyonel genomik araştırmaları "*delesyon ve mutageniz*" çalışmalarını, "*fare-insan karşılaştırmalı dizi analizlerini*", hedef proteinlerin identifikasyonu, hedef gen ekspresyonlarının ve regülasyonlarının belirlenmesine yönelik "*proteomik*" çalışmalarını, "*yapısal (structural) genomik*" ya da "*computational genomics*" olarak adlandırılan proteinlerin üç boyutlu ve dört boyutlu analizlerini yapmaya yönelik çalışmalarını içermektedir. Bunu hücre doku ve organlardaki tüm metabolitlerin belirlenmesini hedefleyen çalışmaların izleyeceği düşünülmektedir (1) (Tablo I).

Tablo I. Gen-fonksiyon analiz düzeyleri (Oliver S^oden modifiye ederek hazırlanmıştır)

Analiz Düzeyi	Tanımlama	En sık kullanılan Analiz Yöntemleri
Genom	Bir organizmadaki veya onun organellerindeki genlerin tamamı	DNA baz dizi analizi
Transkriptom	Bir hücre, doku ve organda eksprese olan mRNA moleküllerinin tamamı	Hibridizasyon arrayleri SAGE (serial analysis of gene expression) Northern analizleri
Proteom	Bir hücre, doku ve organda eksprese olan protein moleküllerinin tamamı	İki boyutlu jel elektrofozezi Peptid kütle parmak izi Maya iki hibrit analizleri Faj display
Metabolom	Bir hücre, doku ve organdaki metabolitlerin (ara ürünler dahil) tamamı	İnfr red spektroskopisi Kütle spektrometresi Nükleer magnetik rezonans spektrometre

Delesyon çalışmaları ile farelerde fonksiyonu bilinmeyen genleri içeren bölgelerde büyük gen delesyonları veya mutasyonları yapılmakta, sonuçta ortaya çıkan hastalık veya bozukluktan yararlanarak genin fonksiyonu belirlenmektedir. Örnekleyecek olursak Lawrence Berkeley laboratuvarından Eddy Rubin'in (1) grubu fare 11.kromozomunda 4.5 kb'lık bir delesyon yaratmışlardır. Bu bölge farenin fonksiyonu bilinmeyen dokuz genini içermektedir. Bu delesyon sonrası farede trigliserid düzeyinin kontrol grubuna göre 10 kat yüksek olduğu ve prematür dönemde öldükleri saptanmıştır. Bu bölgedeki genleri içeren farklı YAC klonlarının delete edilen bölgeye insersiyonu ile 120 kb'lık bir bölgenin fareye aktarımı ile yüksek trigliserid düzeyinin kontrol altına alındığı belirlenmiş, aday genin homoloji gösterdiği sekansların taranması ile bu bölgede genlerden birisinin fonksiyonu tanımlanmıştır (5).

Benzer sekanslara sahip genlerin benzer fonksiyonlara sahip olabileceği düşüncesine dayanılarak gerçekleştirilen fare insan karşılaştırmalı sekans analizleri ile amaçlanan, fare genetik ve biyolojisi hakkında bilinenlerden yararlanarak sekansı bilinen insan genlerinin fonksiyonlarının tanımlanmasıdır (5).

Bu saydaki daha önceki bölümlerinde delesyon ve sekans homolojisi çalışmalarının nasıl kullanıldığından söz edildiğinden, bu makalede daha çok proteomiks çalışmaları üzerinde durulacaktır.

"Proteomiks" kavramı genom tarafından eksprese edilen tüm proteinler anlamına gelen "proteom" kelimesinden köken almakta, büyük kapsamlı protein ayrımı ve tanımlanması çalışmalarını içermektedir (1-11). Günümüzde proteomiks araştırmaları iki zıt ancak birbirini tamamlayıcı stratejiyi içermektedir (1). İlk strateji, "*cell-mapping proteomics*" olarak adlandırılmakta, hücreler arası sinyal iletimi yollarını oluşturan kompleks şebekenin bir görünümünü oluşturacak protein-protein ilişkilerinin tanımlanmasını hedeflemektedir. İkinci strateji ise "*protein expression proteomics*" olarak adlandırılmakta, farklı koşullarda, farklı hücre tipleri ve dokular arasında protein ekspresyon paternlerinin tanımlanmasını amaçlamaktadır.

Biyomedikal yaklaşımla bakıldığında, proteomiks alanındaki gelişmeler genlerden çok proteinlerin hedeflendiği tanısal testlerin yada farmakolojik buluşların yapılması için yüksek potansiyel taşımaktadır. Çünkü proteinler biyolojik son ürünlerdir. Bu çalışmalar sonrası post-genomik proteomiks çalışmalarının ulaşmayı planladığı hedefleri listeleyecek olursak:

1. Protein fonksiyonlarının belirlenmesi
2. Post translasyonel modifikasyonların karakterizasyonu
3. Proteinlerin yapısal analizlerinin gerçekleştirilmesi
4. Protein aktivitesinin regülasyonu
5. Protein interaksyonları ve kompleks oluşturma
6. Protein hedeflenmesi ve proteinlerin subselüler

- kompartmentlara dağılımları
7. Protein ekspresyon analizleri
 8. Sinyal iletimi ve metabolik yolların analizi
 9. İlaç geliştirme çalışmaları
 10. Toksikite çalışmaları

Elde edilen verilerin biyoinformatik entegrasyonu yoluyla gen fonksiyonlarının ve regülasyonlarının karşılaştırmalı analizleri tanı, tedavi ve korunmada yeni uygulamaların ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

Ancak şu anda var olan teknoloji ile proteinlerin çalışılmasında, gen ve transkriptlerin çalışılması ile kıyaslandığında pek çok zorluk vardır. Birincisi, proteinlerin davranışlarını-fonksiyonlarını onların tersiyer yapıları belirler. Şu anda kullanılan protein bağlanması temeline dayanan tüm testler proteinin primer yapısı esas alınarak hazırlanmıştır. Bu protein hedeflerin saptanmasında afinite temelli bir sistem kullanılması sonucunu doğurmaktadır. İkincisi, sistemde milyonlarca farklı protein olduğu varsayıldığında, ortamda çok küçük miktarlarda var olan proteinlerin çalışılmasında yaşanan zorluklardır. Henüz nükleik asitlerin amplifikasyonunu sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi bir yöntemin, protein hedefler için geliştirilmemiş olması çalışmaları sınırlamaktadır. Ek olarak proteinlerin davranışları her zaman ortamda bulunan proteinlerin kantitatif olarak miktarına bağlı olmayabilir. Protein regülasyonu sıklıkla proteinlerin sentez ve degradasyonlarını değil modifikasyonlarına (örn fosforilasyon) bağlı olarak gerçekleşmektedir. Zorluklara "RNA splicing" ile elde edilen farklı splice varyantlarının son derece benzer yapıya sahip olup, çok farklı fonksiyonlar yapması eklendiğinde bizi bekleyen güçlüklerin boyutu ortaya çıkmaktadır. Ancak genomiksin başlangıcında nükleik asit çalışmalarındaki zorluklar ve bunların ne kadar hızla çözümlendiği düşünüldüğünde, yakın bir gelecekte bütün bu sorunların üstesinden gelineceği tahmin etmek hiç de zor değildir.

Örnekeleyecek olursak son zamanlara kadar, global protein ekspresyon çalışmalarında iki boyutlu jel elektroforezi (2DE) kullanılmakta idi. Bu teknik binlerce farklı proteinin dikdörtgen şeklinde bir jel üze-

rinde yük birinci, moleküler ağırlık ikinci boyutta olacak şekilde ayrımlanarak, farklı noktalar oluşturması ile sınırlı idi. Günümüze kadar bu teknikle pek çok farklı proteinin çalışılması yapı ve fonksiyonlarının analizi mümkün olsa da, yöntemin zorluğu, zaman alıcı olması, sensitivitesinin düşük olması gibi sorunlar devam etmekteydi. Bu sınırlamalar maya iki-hibrit sistemi (Y2H), faj display (PD) tekniği, modifiye kütle spektrometrisi (MS) ve protein array'leri gibi yeni uygulamaların geliştirilmesini sağlamıştır (Tablo II).

Maya İki-hibrid Analizleri

Maya iki-hibrid (yeast two-hybrid=Y2H) sistemi tüm genom düzeyinde protein-protein bağlantılarının araştırılmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Maya genetiği çalışan araştırmacılar tarafından iki proteinin birbiri ile bağlantı kurup kurmadığını anlamak için geliştirilmiştir (6,1). Yöntem bir transkripsiyonel aktivatörün DNA'ya bağlanan domainin ve aktivasyon domainlerini kodlayan genlerin ayrı vektörlere klonlanması esasına dayanır. Partnerini saptamak istediğimiz protein (*av-yem*) DNA ya bağlanan domain ile füzyona uğratılır. Bu yem ile bağlantı kurması olası proteinleri kodlayan c-DNA kütüphanesi aktivasyon domaini ile füzyona uğratılır (*ava*). Bu iki farklı maya genomu aynı maya içine yerleştirilir, eğer av ve avcı bir araya geliyorsa (kütüphanede partneri aranan protein ile bağlanan proteinler varsa) transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanan domaini ve aktivasyon domaini bir araya gelir. Transkripsiyon faktörü aktive olur ve renk değişimine neden olan "reporter" gen açılarak ürün vermeye başlar (Şekil 1). Bu yöntem çok başarılı olmasına karşın bazı sınırlamaları da vardır: (1) Y2H sistemi transkripsiyon faktörleri gibi "reporter" sistemler tarafından da aktive edilebilen proteinler için uygun değildir; (2) Çalışma sırasında mayaların içinde bulunduğu ortam kofaktörler bazı multiprotein kompleksleri veya fosforilasyon metilasyon ve glikolizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar için gerekli proteinler gibi temel elementler açısından yetersiz olabilir. Bu sınırlamalar nedeniyle hücrede protein haritalaması amacıyla kullanılamaz.

Tablo II. Proteomiks Çalışmaları (10 No'lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır)

Proteomiks (Klasik tanımlama)	Hücre lizatlarından iki boyutlu jellerde proteinlerin tanımlanması İki boyutlu jellerde differential gen ekspresyonlarının tanımlanması	
Proteomiks (genomiks sonrası tanımlama)	Protein identifikasyonları	Tek boyutlu jel elektroforezi(örn.afinite pürifikasyon sonrası analizler) İki boyutlu jeller (örn.afinite pürifikasyon sonrası veya vücut sıvılarından yapılan analizler) Protein çipleri (protein veya antikor ile kaplı çipler ile yapılan analizler) Sölyusyonlardaki protein/protein komplekslerinin analizleri
	Post translasyonel modifikasyonlar	Fosforilasyon Glikozilasyon
	Fonksiyon belirleme çalışmaları	Enzimatik aktivite veya substrat belirlenmesi Biyosensörler (reseptör-ligand bağlama ölçümleri) Hücrede lokalizasyonların belirlenmesi (GFP füzyon) Knockout veya RNA interferens çalışmaları Delesyon suşları ile fenotipik analizler
	Moleküler Tıp	Moleküler ilaç hedeflerinin belirlenmesi İlaçlar kullanılarak protein-protein ilişkilerinin yıkımı Rekombinant proteinler,antikor ve inhibitörler için geniş çaplı hayvan çalışmaları
	İki boyutlu jellerde differential display	
	Protein-Protein ilişkilerinin incelenmesi	Maya iki hibrit Phage display Ribozom display RNA peptid füzyonları
	Protein identifikasyonu	Kütle spektrometresi

Faj Display Analizleri

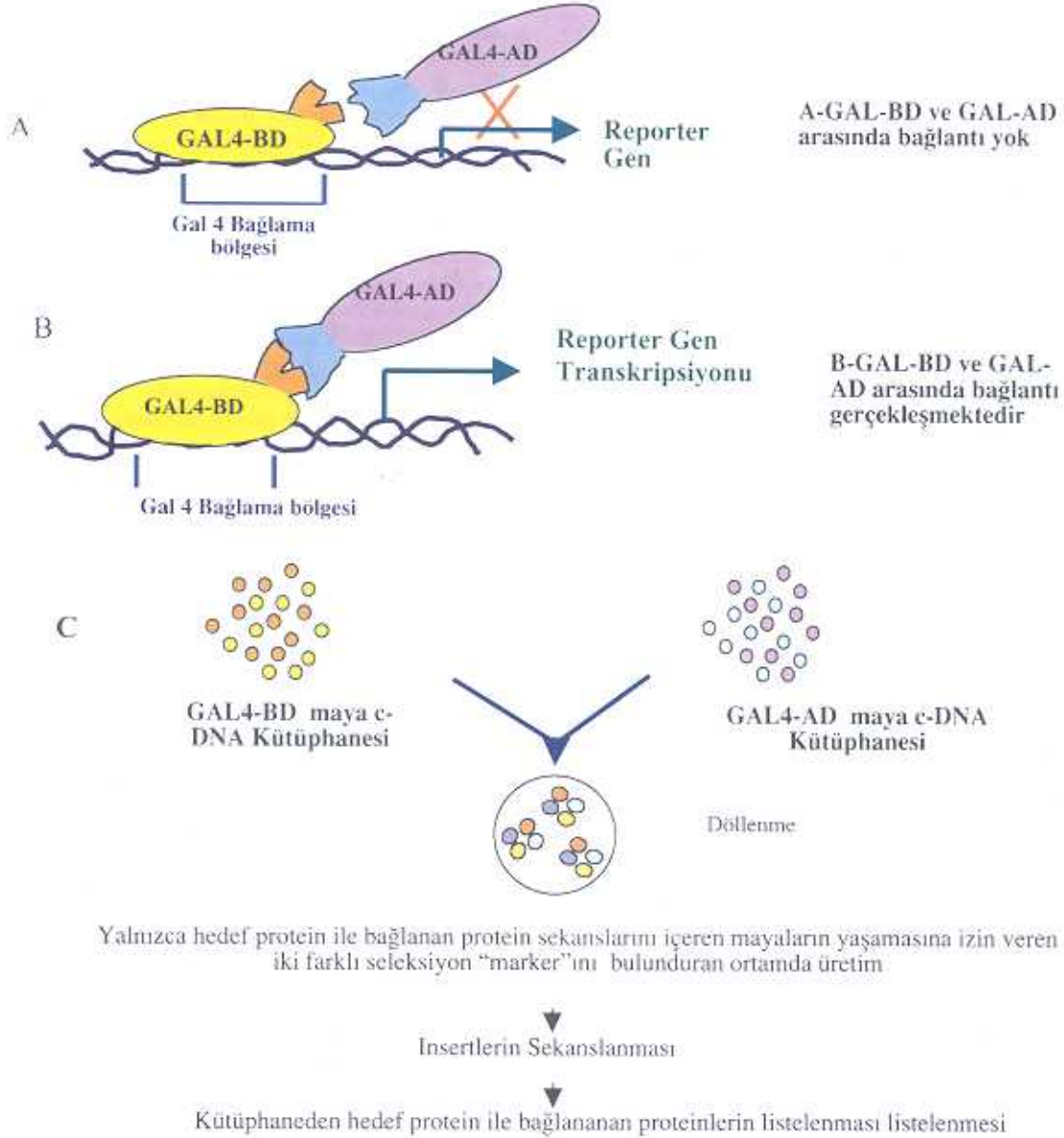
Faj display teknolojisi, 1985'te yabancı proteinlerin filamentöz bakteriofajların yüzeyinde minör kılıf proteinleri ile füzyon yaparak sunulabildiğinin saptanması ile ortaya çıkmış olup, faj genomunun kapsid proteinlerini kodlayan bölümüne yerleştirilen yabancı DNA segmentlerinin kapsid proteinleri ile beraber faj yüzeyinde sunulması sağlanmaktadır. Yöntem hedef protein veya antikor ile ilişkiye giren yeni peptidlerin identifikasyonunda evrimsel seçim prensiplerine göre çalışmaktadır. Faj genomu genetik olarak memeli hücrelerini transfekte edecek şekilde modifiye edilir. Özellikle bakteriofajların reseptöre bağımlı endositoz (RBE) ile bazı hedef genleri hücre içine aktarabildiğinin saptanması teknikte fonksiyonel ligand seleksiyonunu sağlayan bir modifikasyonun yapılmasına yol açmış ve LIVE (*ligand identification via expression*) olarak kısaltılan ekspresyon yoluyla ligand identifikasyonu yöntemi geniş kullanım alanı bulmuştur (2). LIVE seleksiyonunun geleceği son noktanın faj aracılığı ile gen aktarımı ve hedef hücrenin genetik transdüksiyonu olacaktır.

RBE ile internalize edilen faj partikülü bir reporter gen (yeşil floresan protein (GFP), beta galaktosidaz veya lusiferaz gibi) veya ilaç dirençlilik geni (neomisin gibi) ekspresyonu ile identifiye edilir. PCR amplifikasyonu ile ligand DNA amplifiye edilir, bu sekanslar faj vektörlere aktararak yenileyen transfeksiyon ve seleksiyon basamakları ile kütüphane zenginleştirilir (Şekil 2). LIVE modifikasyonu "phage display" teknolojisini protein-protein ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemden, hedefe spesifik ilaç geliştirmede, tedavi için hedef belirlemede, terapötik proteinleri kodlayan sekansların belirlenmesinde, gen tedavisinde kullanılabilen bir yöntem dönüşmesini sağlamıştır. LIVE in gen aktarımı için kullanımında hayvan virusları ve sentetik vektörlere göre pek çok avantajı olduğu bildirilmiştir. Bu avantajların en önemlilerinden birisi de transfer edilen ligandların hedefe spesifik olarak bağlanması ve internalizasyonuna ek olarak hücre içinde istenilen

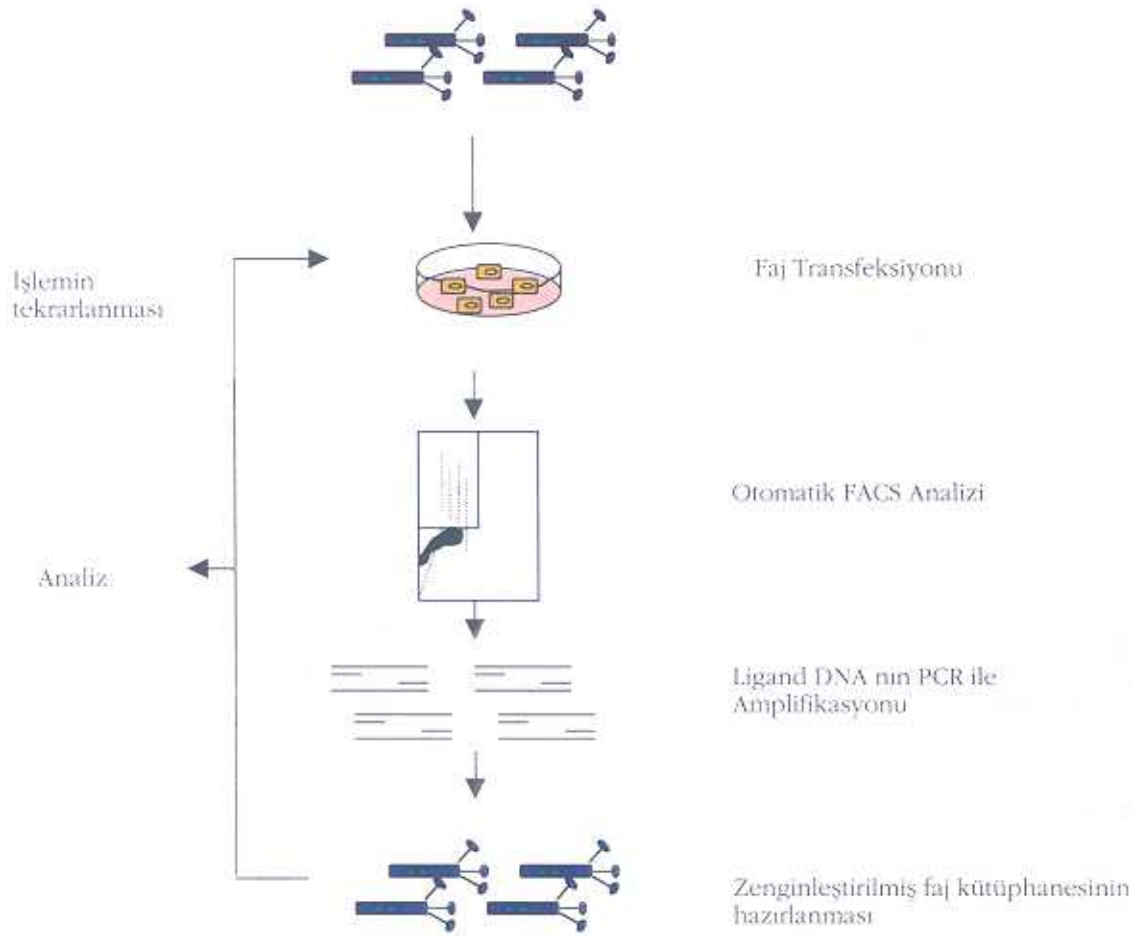
İnsan genom projesi tamamlanmca ne olacak?

bölgeye hedeflenebilmesinin sağlamasıdır (11,3). Örneğin LIVE genetik seleksiyonunun faj partikülü üzerindeki hedefleme sinyali üzerinden yapılması ve

böylece kütüphaneden yalnızca belli bir (öm: nükleer lokalizasyon) sinyali olan partiküllerin seçilimi mümkündür.



Şekil 1. Maya iki hibrid sistemi a. Farklı ORF'ler ya GAL4 DNA bağlayan domaini (GAL4-BD) yada bu proteinin aktivasyon domaini (GAL4-AD) füzyon protein olarak eksprese etmektedir. Eğer iki ORF'den kodlanan protein birbiri ile bağlanmazsa tek tek GAL 4 bağlanma bölgesinin up-stream'inde bulunan reporter gen aktive olamayacak ve transkripsiyon gerçekleşmeyecektir. B. Eğer iki ORF'den kodlanan protein birbiri ile bağlanırsa füzyon protein repoter gendeki GAL4 bağlanma bölgesine bağlanacak ve genin transkripsiyonu aktive olacaktır. c.Kütüphane temelli maya iki hibrid tarama yöntemi: Bu strateji ile iki farklı cDNA kütüphanesi içeren iki farklı maya suşu hazırlanmaktadır. Bir suş GAL4-BD diğeri ise GAL4-AD füzyon proteinini eksprese etmektedir. İki maya suşunun döllenme süreci sonrasında çoğalan mayalarda mayalardan DNA dizi analizi yapılarak hedef proteine bağlanan proteinleri kodlayan genler tanımlanmaktadır (10 no'lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır).



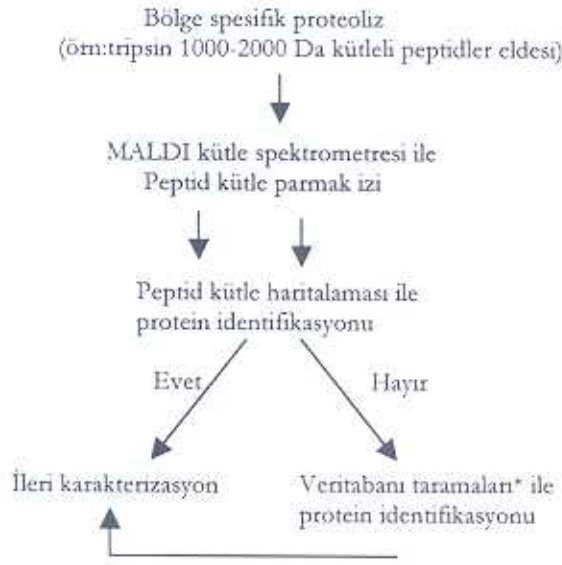
Şekil 2.Ekspresyon yoluyla ligand identifikasyonu (LIVE) seleksiyon yöntemi. Yeşil floresan protein (GFP) gibi bir Reporter geni taşıyan faj display kütüphanesi hedef hücreler ile karşılaşılır. Ligandı eksprese eden faj hücreleri hücrelere girer ve reporter geni aktarır. Otomatik floresan aktive hücre ayırma (FACS) ile GFP pozitif hücreler ayrılır, bu hücrelerdeki internalize olan faj partikülleri PCR amplifikasyonu yeniden yapılandırılır. Yeniden yapılandırılan faj partikülleri kullanılarak aynı işlem tekrarlanır. Bu işleme kütüphanenin kompleksliği azaltılana kadar devam edilir ve elde edilen ligandlar DNA dizi analizi ile karakterize edilir (11 no.lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır).

Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi protein çalışmalarında iki farklı amaçla kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi protein identifikasyonu, ikincisi protein-protein ilişkilerinin belirlenmesidir. Protein identifikasyonunda "peptid-kütle haritalaması", ikincisi ise "peptid-kütle pamakizi" olarak adlandırılan iki farklı uygulama vardır. Temel akış şeması Şekil 3'te verilen yöntem iyonize

bir molekülün-bir protein veya peptid molekülü olabilir-yük-kütle oranının ölçülmesi esasına dayanır. İlgilenilen molekül bölgeye spesifik proteoliz sonrası ya *elektrospray iyonizasyon (ESI)*, veya *lazer iyonizasyon (MALDI)* yöntemler ile iyonize edilir. Yapılan araştırmalar ile lazer iyonizasyonun çok duyarlı olduğu, bu yöntem ile femtomol düzeyindeki proteinlerin bile identifikasyonu ve miktar tayininin mümkün olduğu belirlenmiştir.

İnsan genom projesi tamamlanınca ne olacak?



* <http://prospector.ucsf.edu>
<http://www.matrixscience.com>
<http://prowl.rockefeller.edu>
<http://expasy.ch/tools>

Şekil III. Kütle spektrometresi ile protein identifikasyonundaki çalışma akışı (11'no.lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır)

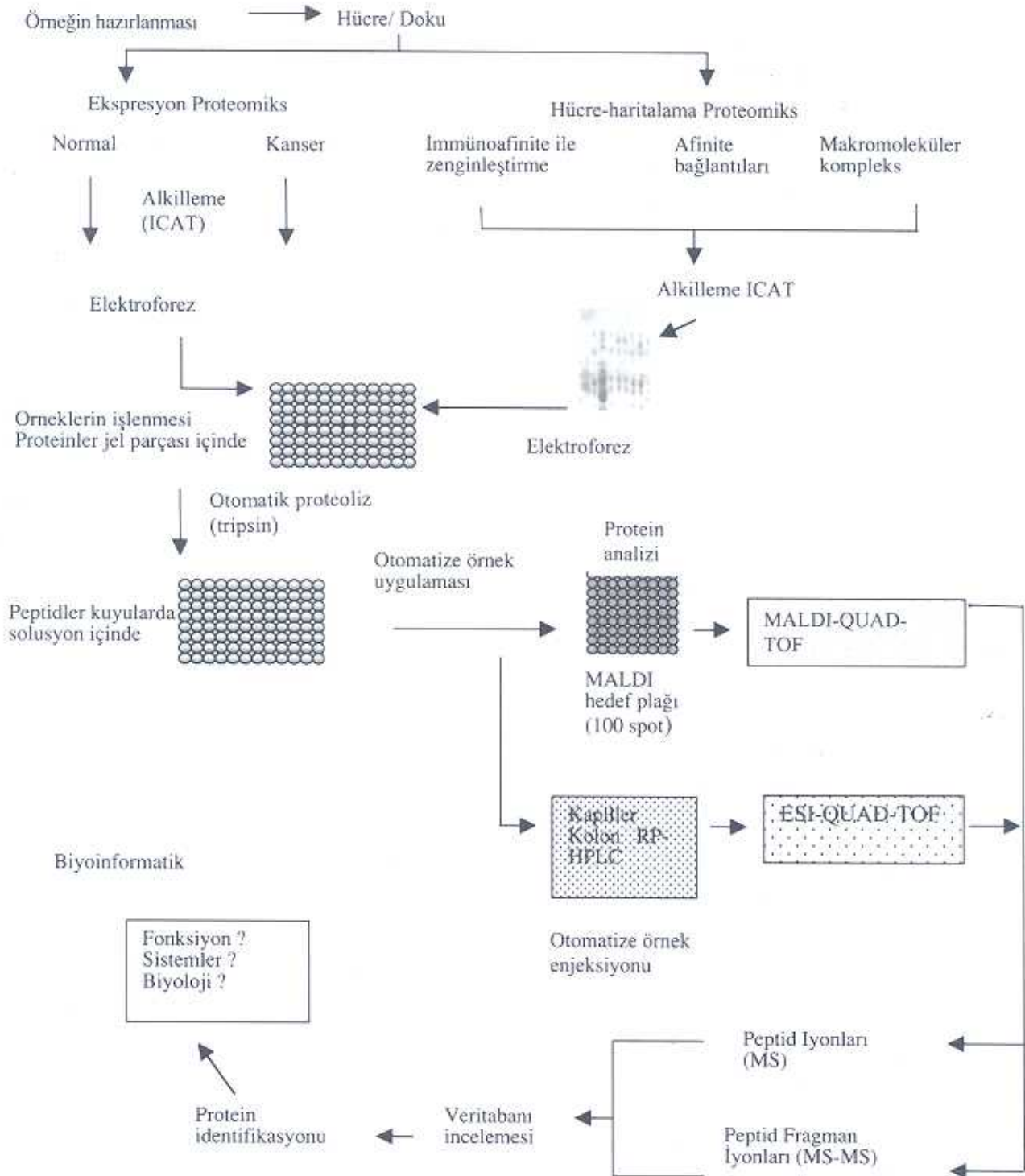
Günümüzde teknik bir protein karışımından peptidlerin identifikasyonunda da kullanılır hale gelmiştir. Bu yöntem izole edilen bir peptidin, enerji uygulayarak her bir peptid bağında random kırıklar oluşturacak ve oluşan fragmanları ölçerek ana peptidin ne olduğunu tanımlayacak şekilde modifiye edilmiştir. Bu ve benzer gelişmeler proteomiks çalışmalarında MS kullanımının gitikçe artacağını düşündürmektedir. Yeni jenerasyon makineler ile bir saat içinde yüzlerce peptidin fragmentasyonunu ve seçilimini sağlayacak hızdadır. Yeni yazılım algoritmelerinin geliştirilmesi ile istenen peptidin binlerce adayın arasından birkaç saniyede seçilimini sağlayacağı ve bilgisayar taraması sonrası çıktının karışımında bulunan tüm peptidlerin listesi şeklinde olacağı düşünülmektedir.

MS'den yararlanılarak kompleks protein karışımlarında yer alan spesifik proteinlerin kalitatif ve kantitatif

karşılaştırılmasını kolaylaştıran yeni teknikler geliştirilmektedir. Bu yöntem "microarray" dekiner benzer bir şekilde, iki hücre durumu (normal hücre-tümör hücresi, tedavi öncesi-tedavi sonrası... gibi) arasındaki gen ekspresyonu farklılıklarının iki farklı izotopik formda (ağır ve hafif) işaret veya kimyasal grup ile ayrılması esasına dayanmaktadır. ICAT (*isotope-coded affinity tag*) olarak adlandırılan bu yöntemde protein karışımındaki bütün sisteinler işaretlenmektedir. İşaretleme sırasında bir örnek (örn kanser hücreleri) ağır, diğer örnek (örneğin normal hücreler) hafif reagen ile işaretlenmekte, örnekler karıştırıldıktan sonra spesifik proteazlar ile muamele edilmekte ve karışım kütle spektrometresi ile analiz edilmektedir (Şekil 4). İzotopik farklılıklar peptidlerin seperasyon sırasındaki davranışlarını değiştirmemektedir. Bu bağlamda hücre veya dokular arasında veya iki farklı evre arasındaki peptidlerin parmak izinin çıkarılması ve karşılaştırılması mümkün olmaktadır.

'Protein array'ler

Diğer yöntemler karşılaştırmalı transkript ekspresyon çalışmalarının proteinlerin saptanması ve ölçümü için uyarlanması sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu metotlar protein-protein ilişkilerini, protein modifikasyonlarını ve dokudaki, ekspresyon profillerini saptamayı hedefleyen heterojen bir grup metodu içermektedir. "Protein array"ler ile ilgilenilen proteinler cam bir yüzeye tutturulmakta spesifik floresan işaretli proteinler ile muamele edilmekte, immobilize olan proteine bağlanma özelliğinde olan proteinler belirlenmekte, sonuçta kompleks bir protein karışımından hedefimize bağlanan proteinlerin seçilimi mümkün olmaktadır. Aynı işlem enzimatik substrat olabilen proteinler için benzer şekilde uygulanmakta ve uygun enzim varlığında spesifik protein-protein bağlantılarının yol açtığı enzimatik olaylar belirlenebilmektedir. Bu yöntemdeki gelişmeler ile spesifik ligandlar ile ilişkiye giren yeni proteinlerin identifiye edilmesi veya bir enzim için substratların hızla saptanması gibi uygulamalar mümkün olacaktır (8,4).



Şekil IV. Kütle spektrometresi ile protein identifikasyonu ve karakterizasyonu (3 no'lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır)

Bir diğer uygulama yüzlerce spesifik antijen ve anti-kor solüsyonunun robotik bir sistem ile mikroskopik slayt üzerine yerleştirilmesi esasına dayanmaktadır (5).

Buna ek olarak protein çip ve kütle spektrofotometrisi karışımı **kimerik bir metot** geliştirilmiştir. Bu metotta geleneksel iyon değişim reçinesi gibi bir solid destek ile kaplı bir "protein çipi" hazırlanmaktadır. Ortama tam vücut sıvıları veya hücre lizatları gibi kompleks protein karışımları eklenerek, çipe bağlı olmayan proteinlerin uzaklaştırılması için yıkanmaktadır. Bağlı proteinler yüksek güçte lazer uygulaması ile çip'ten direkt iyonize edilerek kütle spektroskopisi ile incelenmektedir (5). Bu yöntemle 8-50 kDa aralığındaki proteinlerin saptanabildiği ve tekniğin tekrarlanabilirliği, az miktarda doku varlığında bile kullanılabilirliği avantajları olarak sayılmaktadır. Protein çip teknolojisinin ilk kullanıldığı uygulama transisyonel hücreli mesane kanserlerinde üriner protein profillerinin belirlenmesi amaçlı olmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler bu uygulamanın yeni biyomarkerların belirlenmesinde veya hastanın protein ekspresyon paterninin veya tedaviye yanıtın izlenmesinin bir prognostik marker olabileceğini düşündürmektedir (6).

SONUÇ

İnsan genomu projesinin birinci basamağının tamamlanması yaşamın temellerini anlamaya başlamanın ilk basamağı olmuştur. Bugün insan genom projesi ile elde edilen veriler sonucunda insan DNA'sının, genlerinin yapısının ve fonksiyonlarının anlaşılmasına başlanması ile genetiğin tıptaki yerini hızla değiştirmeye başlamıştır. Genetiğin basit aile öyküleri ve tek gendeki değişiklikler ile ortaya çıkan bazı nadir sendromlarla sınırlı kalmadığı, travma dışında tüm hastalıklar genetik temelli ortaya çıkmıştır (7). Hemen her gün literatürde yeni bir hastalıktan sorumlu olduğu düşünülen gen/genler yayınlanmaktadır. Ancak bazı bilim adamlarına göre bu gün ulaştığımız nokta "Shakespeare'in bir eserini anlamaya çalışan bir kişinin, sadece alfabe-deki harfleri öğrenmesi ile geldiği noktadır" (8). Günümüzde sürmekte olan fonksiyonel genomik çalışmalarını genom alfabesindeki harflerin bir araya gelmesi ile oluşan kelimeleri ve cümleleri anlamaya yöneliktir. Projenin birinci basamağının beklenenden çok daha

erken tamamlanması ve proteomik çalışmalarının ilerleme hızı göz önüne alındığında, gelecek yıllarda tahmin edilenden çok daha büyük ilerlemeler kaydedileceği açıktır.

KAYNAKLAR

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of human genome, Science 2001;291:1304-1351.
2. Jeong H, Mason SP, Barabasi AL, Oltvai ZN. Lethality and centrality in protein networks. Nature 2001;411:41-42.
3. Simpson RJ, Dorow DS. Cancer proteomics: from signaling networks to tumor markers. Trends Biotechnol 2001;19 (Suppl):40-48.
4. Chee M, Yang R, Hubbell, et al. Accessing genetic information with high density DNA arrays. Science, 1996;274:610-614.
5. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary a complementary DNA microarray. Science 1995;270:467-470.
6. Clarke PA, tePoole T, Wooster R, Workman P. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology and drug development: progress and potential, Biochem Pharmacol, 2001;62:1311-1336
7. Human Genome Program, U.S. Department of Energy, Human genome news (v10n3-4) Available from: http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/hgn/v10n3/06f_unc.html
8. Oliver S. Guilt by association goes global. Nature 2000; 403:601-603.
9. Frazer KA, Ueda Y, Zhu Y, et al. Computational and biological analysis of 680 kb of DNA sequence from the human 5q31 cytokine gene cluster region. Genome Res 1997;7:495-512.
10. Martin DB, Nelson PS. From genomics to proteomics techniques and application in cancer research, Trends Cell Biol 2001;11:560-565.
11. Naaby-Haysen S, Waterfield MD, Cramer R. Proteomics-post genomic cartography to understand gene function, Trends in Pharmacol Sci, 2001;22:376-384.
12. Simpson RJ, Dorow DS. Cancer proteomics: from signaling networks to tumor markers, Trends Biotechnol, 2001;19:40-48.
13. Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I, Yeates TO.

- Protein function in the post genomic era. *Nature*, 2000;405:823-826.
14. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-127.
 15. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-846.
 16. Larocca D, Baird A. Receptor mediated gene transfer by phage display vectors: applications in functional genomics and gene therapy, *DDT*, 2001;6:793-801.
 17. Larocca D, Jensen-Pergakes K, Burg MA, et al. Receptor targeted gene delivery using multivalent phagemid particles. *Mol Ther* 2001;3:476-484.
 18. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination, *Science* 2000;289:1760-1763.
 19. Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein Microarrays for highly parallel detection and quantification of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2000;2: Research 0004.
 20. Merchant M, Weinberg SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21: 1164-1177.
 21. Vlahou A, Schellhammer Pf, Mendinos S, et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001;158:1491-1502.
 22. Collins FC, McKusick VA. Implication of human genome project for medical science, *JAMA* 2001;285:540-544.
 23. Borgstein J. The poetry of genetics: or reading a genetic sequence—a literary model for cellular mechanisms. *Lancet* 1998;351:1353-1354.