امین رحمانی مجد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه سلولی مولکولی
طاهره ناجی،استاد راهنما و مدیر گروه علوم سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی

پروتئومیکس؛ مبحثی نوین در زیست شناسی

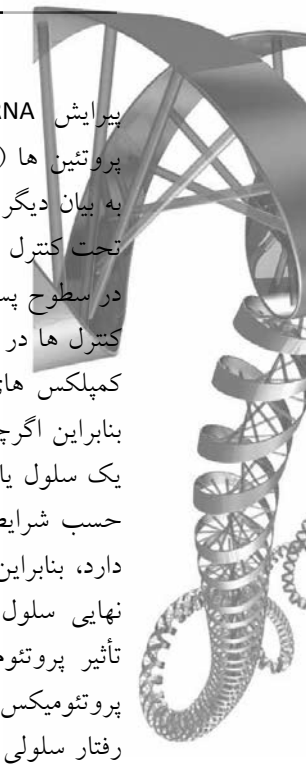
پروتئومیکس

مطالعه‌ی پروتئوم و تغییرات آن در محیط و در فرآیند تکوین را پروتئومیکس می‌نامند. با شناخته شدن توالی ژن های میکروارگانیسم های متعدد و نیز توالی یابی کامل ژنوم انسانی، مرز دانش انسان گسترش بی سابقه ای یافته است. نیاز روز افزون در شناخت ماهیت، چگونگی و روش عملکرد محصول ژن ها، منجر به ظهور پروتئومیکس شده است. اصطلاح پروتئومیکس نخستین بار در سال ۱۹۹۷ یک آنالوگ با ژنومیکس، مطالعه ژن ها، ثبت شده است. پروتئومیکس به بررسی محتوای پروتئینی یا پروتئوم یک سلول یا بافت و یا مایع فیزیولوژیک در شرایط تکاملی محیطی و یا آسیب شناسی مشخص می‌پردازد. جداسازی، نمایان ساختن و تعیین هویت و ویژگی مخلوط های پیچیده حاوی هزاران پروتئین، اقداماتی است که در بررسی پروتئوم صورت می‌پذیرد. فنون متفاوتی که در پروتئومیکس مورد استفاده قرار می‌گیرد بر پایه بیولوژی مولکولی، دانش رایانه ای و فیزیک کوانتوم شکل گرفته است.

مطالعه پروتئوم ها موضوع علم پروتئومیکس است. با این توصیف اگر پروتئوم به مفهوم بررسی هم زمان تعداد زیادی پروتئین در نظر گرفته شود، می توان تاریخ آن را تا اواخر دهه ۱۹۷۰ به عقب برد. یعنی زمانی که محققان شروع به طراحی و ساختن پایگاه های اطلاعاتی پروتئین ها با استفاده از روش هایی مانند ژل الکتروفورز دوبعدی کرده بودند (۵). در آن زمان اگرچه این تکنیک در آزمایش های مختلف در یک آزمایشگاه تکرارپذیر بود و از انجام یک آزمایش خاص در آزمایشگاه های مختلف نیز نتیجه یکسانی حاصل می شد که بازتابی از دقت این روش بود. با این حال تعیین ماهیت پروتئین های جداسازی شده کاری مشکل و طاقت فرسا بود که علت آن فقدان روش های سریع و در عین حال حساس آنالیتیکی برای شناسایی پروتئین ها بود. این مشکل به قوت خود باقی بود تا این که در اوائل دهه ۹۰، طیف سنجی جرمی ۳ به عنوان یک ابزار شناسایی قدرتمند در زیست شناسی به کار گرفته شد(٦). این پیشرفت در بهینه سازی دستگاهی روش طیف سنجی جرمی زمانی میسر شد که کل توالی ژنوم انسان در حال وارد شدن به پایگاه های اطلاعاتی بیوانفورماتیکی بود. در ادامه این روند، این عوامل همگی دست به دست هم داد تا عصر جدیدی از مطالعات زیستی در قالب پروتئومیکس شروع شود(۷).

همزمان با افزایش روز افزون توالی DNA در پایگاه های اطلاعات بیوانفورماتیکی، محققان به تدریج به این نکته پی بردند که فقط داشتن توالی کامل ژنوم برای مشخص کردن رفتار زیستی ناشی از محصولات این ژن ها کافی نیست و حالت یک سلول در یک لحظه خاص که ناشی از عملکرد این محصولات است وابسته به تعداد زیادی از مسیرهای متابولیکی و تنظیمی است. به عبارت دیگر یک میان کنش خطی بین ژن ها و پروتئین های حاصل از آن ها وجود ندارد، در عوض این ژن ها و پروتئین ها، همراه با انواع متابولیت ها در یک سری میان کنش های شبکه ای درگیر بوده و تغییر در تعداد یا غلظت هر کدام از این عوامل می تواند باعث تغییر در این شبکه شده و سلول را از یک حالت به حالت دیگر سوق دهد. این مفهوم دیدگاه جدیدی در زیست شناسی معروف به زیست شناسی شبکه وار است که که در آن اجزای مختلف یک سلول یا موجود زنده در سطوح مختلف (بافت، اندام و کل ماهیت زنده) به صورت نظام مند و در ارتباط با یکدیگر بررسی می شود (۸).

از طرف دیگر هر ژن به طور بالقوه می تواند چندین پروتئین مختلف با عملکردهای متفاوت را ارائه دهد. علت این تنوع در محصولات ژنی انجام فرآیندهای پس از نسخه برداری و ترجمه، مانند پردازش و



پیرایش hnRNA و تغییرات شیمیایی انجام شده روی پروتئین ها (مانند گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون) است. به بیان دیگر چنانچه یک ژن نسخه برداری شود (که خود تحت کنترل پروتئین یا پروتئین های ویژه ای است) بیان آن در سطوح پس از نسخه برداری نیز تحت کنترل بوده و این کنترل ها در نیمه عمر، میان کنش ها، جاگیری پروتئین در کمپلکس های ویژه ماکروملکولی و غیره تأثیرگذارند(۹). بنابراین اگرچه ژنوم یعنی سری کامل توالی های DNA در یک سلول یا ارگانیسم ماهیت ثابتی دارد، لیکن پروتئوم بر حسب شرایط حاکم بر سلول یا ارگانیسم ماهیت متغیری دارد، بنابراین ماهیت میان کنش های شبکه ای که حالت نهایی سلول را در هر لحظه مشخص می کنند، تحت تأثیر پروتئوم تغییر پذیر است. بنابراین می توان گفت پروتئومیکس حوزه ای است که شکاف بین توالی ژنوم و رفتار سلولی ناشی از محصولات این ژنوم را (که از روی توالی قابل پیش بینی نیست) پر می کند؛ همچنین هدف پروتئومیکس مطالعه محصولات پروتئینی حاصل از ژنوم و بررسی میان کنش های آن هاست که به طور پویا تحت تأثیر شرایط حاکم بر سلول یا ارگانیسم متغیرند. بر این اساس امروزه با دیدگاه جدیدی می توان به مطالعه بیماری هایی همچون سرطان پرداخت (۱۰-۱۱). موضوع دیگر این است که وجود یک قالب باز نسخه برداری ژنی در داده های ژنومی به طور لزوم بیانگر وجود یک ژن عملکردی نیست. با وجود پیشرفت های صورت گرفته در بیوانفورماتیک، پیش بینی وجود یک ژن عملکردی از روی داده های ژنومی مشکل است؛ اگرچه تعیین توالی ژنوم ارگانیسم های مشابه همزمان با توسعه الگوریتم های کامپیوتری مناسب امکان مطالعه به روش ژنومیکس مقایسه ای برای رفع این مشکل را تا حدی فراهم کرده است (۱۲). در عین حال باید در نظر داشت که میزان موفقیت در پیش بینی این ساختار اولیه کماکان پایین است. به خصوص در مورد ژن های کوچک و یا ژن هایی که با ژن های عملکردی شناخته شده همسانی چندانی ندارند. بنابراین تشخیص یک محصول ژنی از طریق روش های پروتئومیکس یک گام مهم در تفسیر ژنوم است.

پروتئوم و ژنوم

هر یک از سلول های ما شامل همه اطلاعات ضروری برای ساخت یک موجود کامل است اما همه ژن ها در همه سلول ها بیان نمی‌شوند. ژن هایی که آنزیم های ضروری برای اعمال بنیادی سلول ها را رمز می‌کنند، مثل کاتابولیسم گلوکز، تولید DNA در همه سلول ها بیان می‌شوند، ولی آنهایی که نقش بسیار اختصاصی دارند فقط در انواع خاصی از سلول ها بیان می‌شود. مثل ردوپسین در اپیتلیوم دندانه ای رتینال، بنابراین همه سلول ها این ژن ها را بیان نمی‌کنند.

بنابراین هر موجود زنده یک ژنوم ثابت ولی پروتئوم های بسیاری دارد. پروتئوم در هر سلول شامل برخی از همه پروتئین ها است اما بدین معنا نیست که پروتئوم ساده تر از ژنوم است، در حقیقت عکس این مطلب صحیح است. یک پروتئین که محصول یک ژن است به صورت اشکال چند گانه وجود دارد که در یک سلول خاصی و یا سلول های متفاوت فرق می‌کند. در حقیقت بیشتر پروتئین ها در چندین شکل تغییر یافته وجود دارد. این تغییرات روی ساختار جایگاه عمل و واژگشت پروتئین اثر می‌گذارد. پروتئوم، بسیار پیچیده تر از ژنوم است. DNA از ٤ باز آلی متفاوت ساخته شده است حال آنکه پروتئین ها از ۲۰ نوع از اسید آمینه تشکیل می‌شود. هر چند نحوه قرار گرفتن اسید آمینه های سازنده پروتئین را ژن ها تعیین می‌کند اما با دانستن اسید آمینه یک پروتئین نمی‌توان به طور دقیق حدس زد که این پروتئین با چه پروتئین یا پروتئین ها ویا با چه مولکول های دیگر ی می‌تواند بر همکنش داشته باشد. ساختمان سه بعدی پروتیئن ها نیز از روی توالی اسید های آمینه همشه قابل پیش بینی نیست. بر خلاف DNA که همیشه خطی است ساختار پروتئین ها گاه چنان تا خوردگی پیدا می‌کند که تعیین ساختار سه بعدی غیر ممکن است. به علاوه سلول با اضافه کردن مولکول های دیگری مانند قند و چربی به پروتئین ها، این مولکول ها را به گونه ای تغییر می دهد که ساختمان و عمل آنها تحت تاثیر قرار می‌گیرد که پیش بینی این تغییرات تنها با دانستن توالی اسید های آمینه امکان پذیر نیست و دانشمندان مجبورند هنگام مطالعه پروتئین ها به این تغییرات توجه کنند. موضوع دیگری که محققان باید در نظر داشته باشند نحوه رفتار پروتئین ها در محیط های مختلف است، زیرا بعضی از پروتئین ها در آب محلولند. حال آنکه بعضی تنها زمانی به طور عادی عمل می‌کنند که در یک محیط چرب قرار گیرند.

تازه این پایان کار نیست، چراکه اکثر دانشمندان در این که ژنوم انسان حاوی ۲۲۰۰۰ هزار ژن است توافق دارند. اما دست کم صد ها هزار پروتئین می‌سازد و دانشمندان برای درک پروتئوم باید ویژگی های تمام این پروتئین ها را بدانند و بر همکنش های آن ها را با یکدیگر بشناسند. با وجود تمام این پیچیدگی ها، محققان پروتئومیک تلاش می‌کنند با توسعه روش ها و ابزار های تحقیقاتی جدید بر این مشکلات غلبه کنند(۱۳).

در مقابل ژنوم که ثابت و بی تغییر است، پروتئومیکس دینامیک و متغیر است. بنابراین می توان پروتئومیکس را علم پس از ژنوم نامید. چرا که پروتئومیکس نقش قابل توجهی در عبور از ژنومیکس به کاربرد های سودمند بالینی به ویژه در عرصه های تشخیص و پیشگیری دارد.

محدودیت های مطالعه ژنومیک و استفاده ازپروتئومیکس

تعیین پروفایل mRNA (مجموعه کل mRNA) به عنوان مقیاس غیر مستقیمی از میزان بیان پروتئین، دقت و اعتماد نامطلوبی دارد. در حالی که پروتئومیکس به طور مستقیم صحیح و موثق است.

تغییرات بعد از ترجمه که به طور موثر بر روی فعالیت پروتئین ها تاثیر می‌گذارد. این تغییرات را نمی‌توان با تعیین پروفایل mRNA بررسی کرد و فقط با پروتئومیکس ممکن است.

اکثر رونوشت ها از طریق اسپلایسینگ یا تغییرات پس از ترجمه متفاوت منجر به تولید بیش از یک پروتئین می‌شود.

اکثر پروتئین ها با دیگر پروتئین ها یا مولکول های RNA تشکیل کمپلکس می‌دهد وتنها زمانی قادر به عملکرد است که با این مولکول ها به صورت کمپلکس باشد. سرانجام سرعت تجزیه پروتئین نقش مهمی در محتوای پروتئین، بازی می‌کند.

هدف پروتئومیکس

دامنه بررسی ها در علم پروتئومیکس وسعت زیادی دارد که از مهم ترین آن ها شناخت پروتئین ها، بررسی کمی آنها در سلول ها، بافت ها و مایعات زیست شناختی، سنجش تغییرات در بیان پروتئین ها در سلول های بیمار در مقابل سلول های طبیعی، توصیف تغییرات پس از ترجمه، مطالعه بر همکنش های پروتئین-پروتئین، تعیین موقعیت، شناسایی عملکرد سلولی در سطح پروتئن ها، شناسایی ژن های ناشناخته به کمک پروتئین ها و بسیاری از کاربردها وجوانب دیگر است. ۱۴-۱۵. از مهم ترین اهداف تحقیقات پروتئومیکس نیز شرح و توصیف مکانیسم های مولکولی دخیل در فرایند های سلولی، ویژگی شبکه های پیچیده پروتئینی و اختلال در آن ها، کشف بیومارکرهای پروتئینی برای آشکارسازی و تشخیص بیماری ها و شناخت اهدافی برای طراحی درمان های دارویی است(۱۶).

روش های مورد استفاده در شناسایی پروتئین ها

به طور کلی، یک بررسی پروتئومیکس دارای سه مرحله اصلی جدا سازی و تفکیک پروتئین ها از یک سلول، بافت یا ارگانیسم، به دست آوردن اطلاعات راجع به پروتئین ها برای دسترسی به اهداف و توصیف پروتئین ها و در نهایت استفاده از بانک های اطلاعاتی است(۱۷). ژل الکتروفورز دو بعدی (DE-۲)، طیف سنجی جرمی (ms) و بیوانفورماتیک اجزای کلیدی تکنولوژی پروتئومیکس است. در پروتئومیکسی که بر اساس DE-۲ انجام می شود، اولین مرحله محلول کردن پروتئین های به دست آمده از نمونه ها است. موفقیت در انجام پروتئومیکس به دقت و کیفیت بالای نمونه ها در این مرحله بستگی دارد (۱۸). DE-۲ الکتروفورز دو بعدی یکی از رایج ترین و قدرتمند ترین روش های جداسازی پروتئین ها است. این روش در حدود ۳۰ سال پیش با بهره گیری از تفاوت موجود در دو خصوصیت ذاتی پروتئین ها، یعنی بار الکتریکی و وزن مولکولی، ابداع شده است. در بعد اول با استفاده از تفاوت بار الکتریکی آن ها بر اساس IEF و در بعد دوم بر اساس جرم یا وزن مولکولی، که به طور معمول از SDS-PAGE استفاده می شود۱۹، جداسازی صورت می گیرد همچنین، از آنجا که تغییرات پس از ترجمه در پروتئین ها(مانند فسفوریلاسیون)، در بار و جرم مولکولی آن ها تغییر ایجاد می کند، جداسازی انواع دارای این تغییرات از بقیه نیز امکان پذیر می شود. بنابر این در DE-۲، پروتئین ها هم از لحاظ الگوهای کمی و هم کیفی با هم مقایسه می شود(۱۷). آشکارسازی پروتئین های تفکیک شده بر روی ژل با رنگ آمیزی هایی همچون نقره و غیره صورت می پذیرد. هر چند DE-۲ اساس بسیاری از تکنیک های پروتئومیکسی در حال حاضر است، انواعی از تکنیک های جداسازی پروتئین ها که تفکیک را بدون کمک ژل انجام می دهد مانند کروماتوگرافی

مایع چند بعدی و MudpIT جایگزین آن می کنند.“ قابلیت خودکار شدن “ از فواید قابل ملاحظه این تکنیک ها محسوب می شود(۱۹). گاهی هم جایگزینی روش های دیگر به خاطر اتلاف وقت کمترآن ها است. قبل از ورود به مرحله بعدی یعنی MS لازم است هر یک از پروتئین های جدا شده از هم، با استفاده از عوامل شیمیایی یا پروتئازها که معمولا تریپسین است، به پپتید شکسته شود. سپس این پپتیدها، به کمک طیف سنجی جرمی پروتئین ها مورد مطالعه قرار گرفته و اطلاعات با ارزشی راجع به آن ها به دست می آید. قسمت های اصلی یک طیف سنج جرمی، منبع یونیزاسیون، سنجشگر جرم و آشکارساز است. در منبع یونیزاسیون از مولکول های مورد بررسی چه در فاز جامد و چه مایع، گازهای یونی تولید می شود. قسمت دوم دستگاه، نسبت جرم به بار این مولکول های یون دار شده را اندازه گیری می کند. در این قسمت، از تکنیک های مختلفی برای به دست آوردن این نسبت جرم به بار استفاده می شود که در آنها امکان اندازه گیری زمان مورد نیاز برای طی کردن یک میدان دارای بار وجود دارد. در آشکار ساز، طیف های حاصل از نسبت های مختلف جرم به بار مشاهده می شود. با مقایسه طیف های حاصل از یک نمونه واقعی با طیف های فرضی که بر اساس توالی های پپتیدی موجود در بانک های اطلاعاتی پروتئینی، محاسبه شده اند، پروتئین مورد بررسی، شناسایی می شود. در حقیقت، قطعه کامل پروتئینی که شامل این توالی های جزیی باشد، از مقایسه آن ها با توالی های پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک شناخته شده و موجود در بانک های اطلاعاتی، تعیین توالی می شود و در نهایت پروتئین شناخته می شود. جمع آوری این توالی های پروتئینی در بانک های اطلاعاتی از سال ۱۹۶۰ آغاز شده است(۱۸). به کمک روش های MS پیشرفته، با تفاوت های به دست آمده از مقایسه طیف های حاصل از نمونه هایی که حدس زده می شود دارای تغییرات پس از ترجمه هستند. حتی می توان محل تغییر پس از ترجمه را نیز به دست آورد. کاربردهای وسیع روش های افشاندن الکترونی و MALDI که توانایی یونیزه کردن بیو مولکول های بزرگ را دارد، پیشرفت های قابل توجهی در علم پروتئومیکس ایجاد کرده است. ادغام این روش ها با MS نیز MS متناوب (که شامل دو سنجشگر جرم است و باعث افزایش قدرت سیستم های طیف سنجی می شود) در نهایت، می توان یک پروتئین را در مخلوطی از ده ها بلکه صدها پروتئین، دقیقا شناسایی کرد. طیف های جرمی به دست آمده از نمونه های بافت های طبیعی و بیمار، مثلا بافت های سرطانی شده برای آشکار شدن تغییرات در بیان پروتئین ها با هم مقایسه می شود. این سنجش ها برای انواع مختلف تومورها می تواند اختصاصی باشد. علاوه بر روش های پروتئومیکسی بر پایه DE –۲ MS، مطالعه جوانب مختلف پروتئین ها، روش های متنوع دیگری را می طلبد(۱۷).

منابع:

1. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol 1999; 17:121-127.
2. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. Electrophoresis 1996 17:443-453;.
3. Celis JE, Gromov P, Ostergaard M et al. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: http://biobase.dk/cgi-bin/celis. FEBS Lett 1996; 398:129-134.
4. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD et al. From proteins to proteomes :large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Biotechnology (N Y) 1996; 14:61-65.
5. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975; 250:4007-4021.
6. Benesch JL ,Ruotolo BT. Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology. Curr Opin Struct Biol 2011; 21:641-649.
7. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. Nature 2000; 405:837-846.
8. Chuang HY, Hofree M, Ideker T. A decade of systems biology. Annu Rev Cell Dev Biol 2010; 26:721-744.
9. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. Lancet 2000; 356:1749-1756.
10. Bensmail H, Haoudi A. Postgenomics: Proteomics and Bioinformatics in Cancer Research. J Biomed Biotechnol 2003; 2003:217-230.
11. Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S et al. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. Cancer Res 2001; 61:7585-7593.
12. Chain P, Kurtz S, Ohlebusch E, Slezak T. An applications-focused review of comparative genomics tools: capabilities, limitations and future challenges. Brief Bioinform 2003; 4:105-123.
13. Liebler DC. Proteomic approaches to characterize protein modifications: new tools to study the effects of environmental exposures. Environ Health Perspect 2002; 110 Suppl 1:3-9.
14. Schulenborg T, Schmidt O, van Hall A, Meyer HE, Hamacher M, Marcus K. Proteomics in neurodegeneration--disease driven approaches. J Neural Transm (Vienna2006(; 113:1055-1073)
15. Wang LY, Chakraborty A, Comaniciu D. Molecular Diagnosis and Biomarker Identification on SELDI proteomics data by ADTBoost method. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2005; 5:4771-4774.
16. Vidal BC, Bonventre JV, S IHH. Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis. Clin Sci (Lond) 2005; 109:421-430.
17. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66:39-63; table of contents.