

Genom Sonrası Dönem
**Proteom
Analizi**

On beş yıl önce ilk kez sözü edilen proteom analizi, protein araştırmalarında yeni bir dönemin başlangıcı oldu. Tıpkı 400 yıl önce Galileo'nun ilk kez teleskopu kullanarak yüzlerce yıldızı incelemesinin ardından yeni bir dönemin başlaması gibi. Proteom analiziyle aynı anda birbirlerinden farklı yüzlerce protein incelenebiliyor.

Bilimde bilgi birikiminin belli bir düzeye ulaşması aynı zamanda yeni bir çağın kapılarını da aralıyor. Örneğin 1900'lü yıllarda fizik alanındaki bilgi birikimi belli bir anlayışın olgunlaştığını gösteriyordu. O dönemde çok sayıda bilim insanı fizikte yeni gelişmelerin çok zor olacağını düşünüyordu. Oysa tam da o sıralarda yeni bir çağın başlangıç sinyalleri alınıyordu. Albert Einstein'ın kütle ve enerji ilişkisini ortaya koyan ünlü $E=mc^2$ denklemi, Özel Görelilik ve ardından Genel Görelilik kuramları fizikte yeni bir çağın kapısını açtı ve böylece uzay, zaman ve madde hakkında bilim insanları çok farklı düşünmeye başladı. Benzer gelişmeler tıp ve biyolojide de yaşanıyor. 1950'li yıllara kadar süren çalışmalarla DNA'nın yapısının aydınlatılması yeni bir dönemin başlangıcı oldu ve bilim insanlarının canlılık konusundaki düşünceleri yeni bir boyut kazandı. 1990'a kadar süren çalışmalar genetik malzemenin moleküler yapısını ayrıntılarıyla ortaya koydu ve insan genom (canlıdaki genetik bilgilerin tümü) projesi için gerekli bilgi birikimi ve teknolojik alt yapıyı sağladı. Genom projesiyle sanılan aksine insanda 100.000 değil 25.000 civarında gen olduğu anlaşıldı. Ancak protein sayısının bundan çok daha fazla olduğu biliniyordu. Çok sayıda bilim insanı genetik şifrelerin çözülmesiyle birçok sorunun ortadan kalkacağı ve belki de moleküler biyoloji ve tıp alanında sona yaklaşılacağını düşünüyordu. Ancak genom projesiyle daha işin başında olduğumuzu, karşımızda devasa bir protein dünyası olduğunu fark ettik.

Proteinler canlı organizmalarda en çok bulunan biyomoleküller olup temel olarak aminoasitlerden oluşuyor. Her proteinin hangi aminoasitlerden oluşacağı bilgisi hücrenin bilgi bankası olan ve hücre çekirdeğinde bulunan genlerde saklı. Protein sentezine ihtiyaç duyulduğu zaman, genlerdeki bilgi mesaj taşıyan özel büyük-moleküllere (mesajcı ribonükleik asitler, mRNA) aktarılıyor. Genlerdeki bilgiyi taşıyan mRNA'lar daha sonra hücre çekirdeğinden sitoplazmaya geçerek ribozom denen özel protein fabrikalarına geliyor. Burada mesajı getiren mRNA'daki bilgilere göre aminoasitler uç uca eklenerek zincir

şeklinde istenilen protein sentezleniyor. Buraya kadar her şey yolunda. Ancak bundan sonra proteinler değişime uğrayarak farklılık kazanabiliyor. Proteinler adeta ham malzeme olarak sentezleniyor. Sentezden sonra organizmanın ihtiyacına göre 150'den fazla değişik işlemde geçtiği biliniyor. Sentez sırasında veya sonrasında zincir şeklindeki proteinler katlanarak kendine has üç boyutlu bir yapı kazanıyorlar ve ayrıca lipitler (yağlar), şekerler, metaller veya başka moleküller de proteinlere eklenebiliyor. Böylece yapı ve işlevleri farklı çok sayıda proteinle karşılaşabiliyoruz. Tıpkı, aynı ahşap malzemeden çok sayıda farklı mobilyanın yapılabilmesi gibi. Bu yüzden bir gen bir protein değil çok sayıda protein sentezleyebiliyor. Kuşkusuz tüm bunlara ilaveten protein sentezleyecek genlerin kendi içinde bazı karmaşık düzenlemeleri de söz konusu. Böylece 25.000 genin yüz binlerce farklı proteini sentezlemesi mümkün olabiliyor.

Canlı organizmalar genlerindeki tüm bilgileri her zaman kullanmıyor. Hangi genlerdeki bilgilerin kullanılacağı ortama ve zamana göre değişiyor. Organizmanın yaşamını sürdürmesi için gerekli olan proteinler ve diğer moleküller farklı koşullara göre sentezleniyor. Çok sayıda benzer örnekleri günlük yaşamdan verebiliriz. Örneğin gardrobumuzda çok sayıda kıyafetimiz olabiliyor ancak hepsini her zaman giymiyoruz. Hangi kıyafetleri giyeceğimizi ortam ve zaman belirliyor. Soğuk kış günlerinde ince elbiseler yerine bizi soğuktan koruyabilenleri tercih ediyoruz. Bunun gibi, organizmanın bulunduğu ortam ve yaşı da o an hangi proteinleri kullanması gerektiğini belirliyor.

Canlının genomu yani sahip olduğu genetik bilgi sabittir ancak kullanılan kısımlar koşullara ve zamana göre değişim gösteriyor. Organizmanın ihtiyacına ve zamana göre değişen yüzbinlerce proteinle karşı karşıyayız. Farklı zamanlarda ve durumlarda canlının sahip olduğu proteinlerin yapı ve işlevlerini aydınlatmak yaşamsal önem taşıyor. Ancak farklı bir bakış açısı şart. Tıpkı 1900'lü yıllarda fizikte ve 1950'li yıllarda biyoloji ve tıpta yaşanan değişimlere neden olan farklı bakış açıları gibi. Aksi halde yüz binlerce proteinin yapı ve işlevlerini aydınlatmak epey zaman alacak. Bu farklı bakış açısını bize proteom analizi sunuyor.

1994'te İtalya'nın Siena kentinde yapılan iki yönlü elektroforez toplantısında (elektroforez, proteinlerin elektriksel alanda hareket ettirilerek ayrışmasını sağlayan yöntem) Avustralyalı araştırmacı Marc Wilkins ilk kez "proteom" sözcüğünü önerdi ve bu sözcük 1995'te literatürde yer almaya başladı. Proteom, belirli bir zaman ve ortamda organizmanın sa-

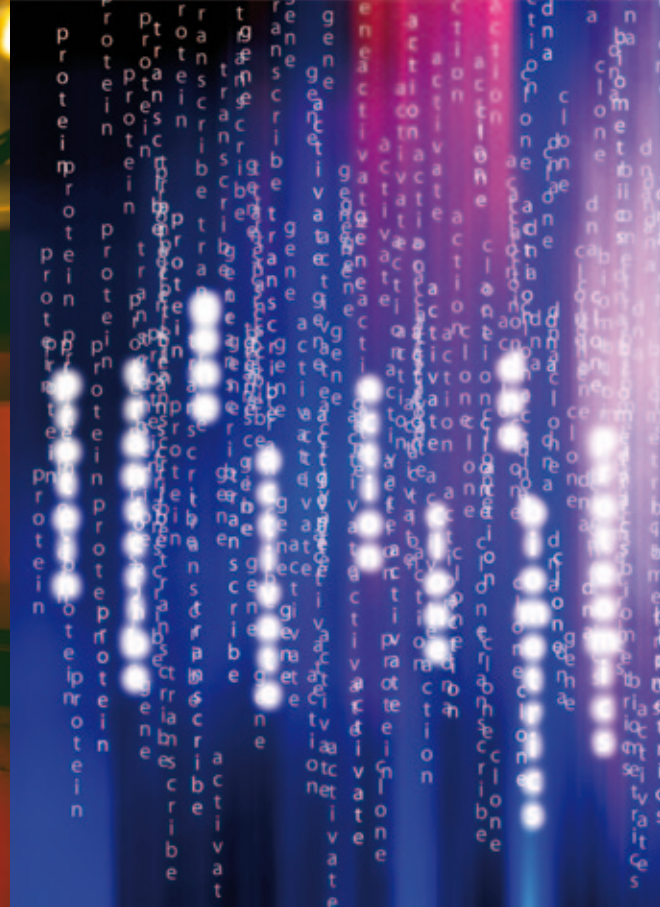
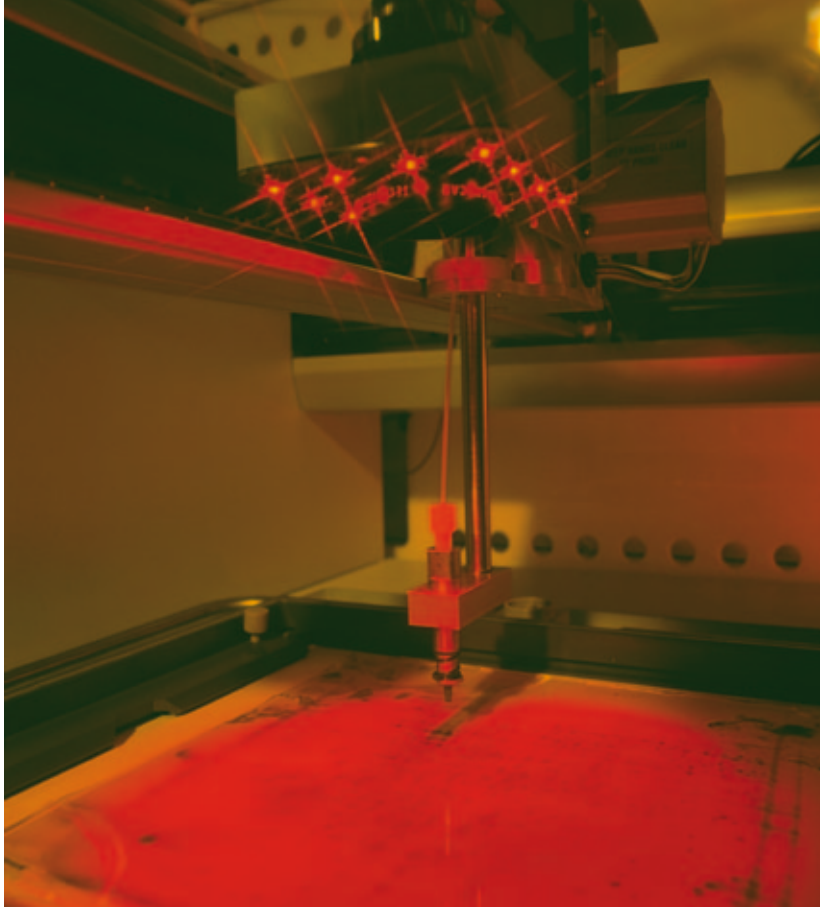


Abdurrahman Coşkun, 1994 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldu. 2000 yılında biyokimya ve klinik biyokimya uzmanı, 2003 yılında yardımcı doçent ve 2009'da doçent oldu. Uluslararası hakemli dergilerde (*SCI ve SCI expanded*) yayımlanmış 32 makalesi var. Özel olarak laboratuvarında kalite kontrol, standardizasyon ve protein biyokimyası konularında araştırmalar yapıyor. Halen Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarları'nda klinik biyokimya uzmanı ve Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olarak çalışıyor.

hip olduğu ve ifade ettiği farklı proteinlerin tümüdür. Buradaki farklılık, sadece proteinlerin aminoasit dizilimi değil, sentez sonrası değişimleri de kapsıyor. Proteomla birlikte yeni bin yılda moleküler biyolojide yeni bir adlandırma sisteminin kullanılması da benimsendi. Bu adlandırma sisteminde tüm bileşenlerin kapsama alındığını belirtmek için sözcüklerin sonuna -om (İngilizce -ome) takısı eklendi. Örneğin proteom ifadesiyle organizmanın veya hücrenin belirli bir zaman ve durumda sahip olduğu tüm proteinler; benzer şekilde glikom ifadesiyle de tüm şekerler ifade edildi. O zamana kadar tek tek veya küçük gruplar halinde incelenen biyomoleküllerin artık topluca incelenmesini sağlayan yeni bir dönem başladı. Topluca yapılan incelemeyi belirtmek için

Organizmanın yaşı, bulunduğu çevre koşulları, farklı hastalıklar gibi etkenler sentezlenen proteinlerin tipi ve miktarının değişmesine neden olabiliyor. Hücrelerin protein bileşimi durağan olmadığından her hangi bir anda hücrede bulunan proteinlerin izlenebilmesi büyük önem taşıyor. Hatta protein normal sentezlendiği halde yanlış katlanmış da olabilir. Bu durumda genom normal iken proteom normal olmayabiliyor. Kuşkusuz proteomun inceleme alanına sadece proteinlerin yapıları girmez; proteinlerin diğer protein ve moleküllerle olan etkileşimi de giriyor. Proteom araştırmalarının kapsamı, yalnızca proteinlerin tanımlanmaları ve miktarlarının ölçülmesiyle sınırlı değil; buldukları yerleri, geçirdikleri değişimleri, etkileşimleri, etkinlikleri, kısaca işlevlerinin tanımlanması da kapsama dâhil.

Robotik spot (proteinlerin bulunduğu leke şeklindeki bölgeler) kesici. İki boyutlu elektroforez sonucunda farklı proteinlerin bulunduğu spotlar kesilerek alınır. Çıkarılan spotlarda bulunan proteinlerin kütlesi ve amino asit dizilimi belirlenebilir. (Alttaki resim)



de -omik takısı kullanıldı. Bu yeni dönem “-omik” dönemiydi. Proteinleri (proteomik), genleri (genomik), şekerleri (glikomik), yağları (lipidomik) ve diğer molekülleri ayrıntılı olarak ve topluca inceleme imkânı doğdu. Yeni bin yılın doğuşu, tıp ve biyolojide aynı zamanda “-omik” döneminin doğuşuna eşlik ediyordu. Bu dönemde biyolojik süreçlerin, daha önce sanılanın aksine, sadece genom çalışmalarıyla yeterince çözülemeyeceği de anlaşılıyordu.

Proteom çalışmaları için organizmanın tüm proteinlerini kısa zamanda araştırmak çok zor. Bunu evrendeki tüm gökadalardan incelenmesine benzetebiliriz. Tümünü kısa zamanda araştırmak kolay olmasa gerek. Öncelikle bir gökada kümesinin belirlenmesi ve bu kümede belli bir gökadanın seçilmesi incelemeyi kolaylaştırır. Seçilen gökadada istenilen yıldız veya yıldız kümeleri incelenirse daha net bilgiler elde edilebilir. Proteomik çalışmalarda da benzer şekilde

Protein mikroarray. Proteinler arasındaki etkileşimi belirlemek için kullanılıyor. Her bir nokta bir proteini gösteriyor. (Sağdaki resim)

öncelikle organizmanın, daha sonra doku veya hücrelerin ve son olarak istenilen hücre bölgesinin seçilmesi incelemeyi kolaylaştırıyor. Örneğin insanda kanserli karaciğer hücrelerinin zar proteomu araştırılabilir. Bu durumda hücre yüzeyinde bulunan proteinler belirlenerek hastalık mekanizması ve tedavi stratejileri daha kolay anlaşılabilir. Proteomik çalışmalarla organizmanın bulunduğu durum ve zaman temel alınarak araştırma yapıldığından, hastalıkların tanısı için uygun belirteçlerin bulunması, tedavi amacıyla hedeflerin iyi belirlenmesi ve hedeflenen yapılarla en uygun etkileşime girecek ilaçların geliştirilmesi gibi alanlarda eşsiz bilgiler elde ediliyor. Günümüzde kullanılan ilaçların hedefi de çoğunlukla proteinlerden oluşuyor.

rak hücredeki yerlerini değiştirebiliyor ve farklı organellerde (zarla çevrilmiş hücre içi bölümler) bulunabiliyor. Bir protein, birden fazla işleve sahip olabiliyor ya da tersine, birkaç farklı protein benzer işlevleri gerçekleştirebiliyor. DNA'daki bilgi sadece 4 yapı taşı ile (adenin, guanin, sitozin ve timin) kodlanıyor. Oysa proteinlerde 22 farklı aminoasit kullanılıyor. Üstelik ortamın değişmesiyle proteinler işlevlerini de kaybedebiliyor. Örneğin hücre zarında bulunan bir protein ancak zar içindeyken işlev görebiliyor. Zarın parçalanmasıyla proteinin bulunduğu ortam da değişeceğinden artık işlevini yerine getirmesi kolay olmayacak. Tüm bu bilgiler protein çözümlerinin daha zor olacağını ve daha çok zaman alacağını gösteriyor.



-om sözlüğü

Genom: Canlının sahip olduğu genetik bilgilerin tümü. DNA'nın protein kodlamaya katılan ve katılmayan tüm kısmını kapsar.

Glikom: Organizmanın sahip olduğu tüm şekerler. Bu şekerler serbest olabilir ya da proteinler ve yağlar gibi başka moleküllere bağlanmış olabilir.

İnteraktom: Hücredeki tüm moleküllerin etkileşimi.

Lipidom: Hücre, doku veya organizmanın sahip olduğu tüm lipid profili.

Metabolom: Organizmada bulunan tüm küçük moleküllü metabolitler.

Metalom: Belli bir doku ya da hücrede bulunan farklı metallerin tümü.

Proteom: Genom tarafından ifade edilen tüm proteinler

Sekretom: Genomun hücre tarafından salgılanan tüm ürünleri

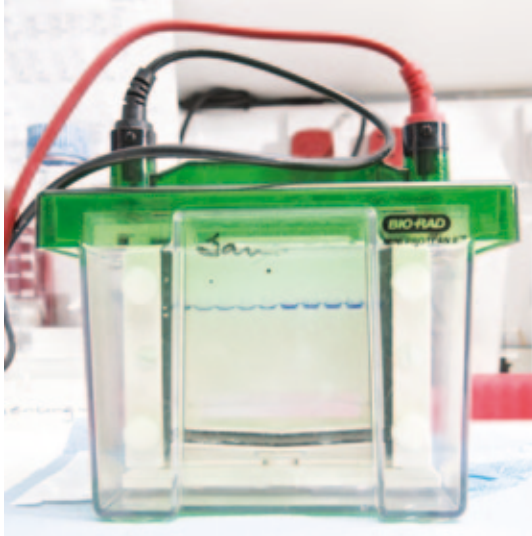
Transkriptom: Hücrede bulunan, protein sentezine katılan ve katılmayan RNA'ların tümü.

Proteom araştırmaları genom araştırmalarından daha karmaşık ve zaman alıcı. Genom çalışmalarında, geni oluşturan DNA'nın baz dizilişi ön plana çıkıyor. Oysa proteinler metaller, lipitler ve karbonhidratlar gibi farklı moleküllerle bir araya gelme özelliği nedeniyle daha karmaşık ve çeşitlidir. Proteinlerin farklı moleküllere bağlanması veya ayrılması ortama ve zamana göre değişkenlik gösteriyor. Ayrıca proteinler, ortam koşullarının değişmesine bağlı ola-

Proteomik çalışmalarda doku ve hücrelerle birlikte vücut sıvıları da sıklıkla kullanılıyor. Örneğin beyin omurilik sıvısı, plazma (veya serum), idrar gibi sıvıların farklı zaman ve durumlarda içerdiği proteinler bu çalışmalarla aydınlatılabilir. Proteinlerin yapı ve işlevlerinin aydınlatılması için buldukları ortamdan yapıları bozulmadan çıkartılmaları gerekiyor. Proteinleri ayırmak için çok farklı yöntemler kullanılıyor. Kuşkusuz elektroforez içlerinde en önemlilerinden biri.

Protein Elektrofrez

Dokularda, hücrelerde veya kanda bulunan proteinlerin özelliklerini, yapılarını ve işlevlerini öğrenmek için öncelikle onları birbirlerinden ayırmamız gerekiyor. Proteinleri birbirlerinden ayırdıktan sonra istediğimiz proteini ayrıntılı olarak inceleyebiliriz. İncelemek istediğimiz proteinleri birbirlerinden ayırmak için başvurduğumuz yöntemlerden biri de elektrofrez. Elektrofrez, bir çözeltide bulunan proteinlerin elektriksel alanda hareket ettirilerek birbirlerinden ayrılmasını sağlayan bir yöntem. Bu çözelti plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı veya özel işlemlerden geçirilen doku örneği olabilir. Söz konusu elektriksel alan olunca, proteinlerin sahip oldukları elektriksel yük önem taşır. Küçük ve yüklü proteinler daha hızlı, diğerleri daha yavaş hareket eder. Proteinleri tek tek ayırmak için bu yöntem tek başına yeterli olmaz. Çünkü benzer yük ve büyüklüklere sahip olan proteinler aynı hızda hareket ettikleri için ayrılmaz. Eğer kısmen ayrılmış proteinleri, farklı bir ortamda tekrar hareket ettirebilirsek, tüm proteinleri birbirinden ayırma imkânımız olabilir. İşte bu dü-



İki boyutlu jel elektrofrez için kullanılan tank. Tankın ortasında jel üzerinde protein bantları görülüyor.

şünceden hareketle geliştirilen iki boyutlu elektrofrez yöntemi, günümüzde proteom çalışmalarının en önemli basamağını oluşturuyor. Bu ayırım işlemlerini öğrencilere uygulanan bir sınava benzetebiliriz. Eğer öğrencilere örneğin sadece matematik soruları sorulursa, bazı öğrenciler aynı sayıda soruya doğru cevap verebilir ve bu durumda tüm öğrencileri sıralamak mümkün olmaz. Ayırımı daha iyi yapmak için farklı ikinci bir sınav yapılabilir. Matematik dışı sorular sorulursa daha önce aynı sayıda matematik sorusuna cevap veren öğrencileri ve dolayısıyla tüm öğrencileri ayırmak daha kolay olabilir.

Elektrofrez işleminden sonra proteinleri görünür hale getirmek için sadece proteinlere bağlanabilen özel boyalar kullanılıyor. Proteinler boyandıktan sonra karşımıza tıpkı gökadalara haritası gibi bir görüntü çıkıyor. Bu haritadaki her bir nokta veya bölge ayrı bir proteini gösteriyor. İnanılmaz derecede güçlü olan bu yöntemle sağlıklı ve hastalıklı bireylerde karşılaştırma çalışmaları yapma olanağına kavuşuyoruz. Örneğin karaciğer kanseri olan hastaların kanında ne gibi değişiklikler olduğunu araştırabiliriz. Bunun için sağlıklı bireylerin kan örnekleri alınarak iki boyutlu elektrofrez yapılır. Benzer çalışma ayrıca karaciğer kanseri olan hastalarda da yapılır. Her iki grubun elektrofrez görüntüleri karşılaştırılır. Eğer hastalıklı bireylerin elektrofrez görüntülerinde farklı bir protein tespit edilirse bunun hastalıktan kaynaklanabileceği düşünülür. Bu durumda ilgili proteinin yapı ve işlevinin aydınlatılması gerekmektedir. Bunun için proteinin bulunduğu bölge kesilerek çıkarılır ve bu bölgedeki proteinin öncelikle kütle spektrometresi ile kütlesi ölçülür. Daha sonra aminoasit dizilimi belirlenerek proteinin yapısı aydınlatılır.

Proteinlerde Kütle Analizi

Proteinlerin kütle analizi çok sayıda farklı yöntemle yapılabilir. Ancak hiçbir yöntem kütle spektrometresi kadar kolay ve güçlü değil. Proteom analizinde, iki boyutlu elektrofrezle birbirinden ayrılan proteinlerin kütleleri, kütle spektrometresi kullanılarak kolaylıkla ve kısa zamanda ölçülebilir. Kütle spektrometresi, proteinlerin kütlesini doğrudan ölçemiyor, ancak kütle/elektriksel yük (m/z) oranını ölçebiliyor. Kütle spektrometresi ile ölçüm yapılabilmesi için incelenecek proteinlerin yüklü olması şart. Bu amaçla öncelikle incelenecek maddelerin değişik yöntemlerle iyonlaştırılarak yüklü hale getirilmesi gerekiyor. Bu yöntemle bir çözeltide bulunan çok sayıda farklı proteinin kütle analizi kolaylıkla yapılabilir. Kütle analizi için vazgeçilmez olan kütle spektrometresindeki gelişmeler, kuşkusuz proteom çalışmalarının ivme kazanmasında en önemli etken oldu. 2002'de biyolojik makromoleküllerin kütle spektrofotometrik analizindeki çalışmalarından ötürü John Bennett Fenn ve Koichi Tanaka Nobel ödülüne layık görüldüler.

Kütle spektrometresi ile kütlesi ölçülen proteinlerin içerdikleri aminoasitler belirlenebilir. Dizi analiziyle örneğin 80 aminoasit içeren bir proteinin tüm aminoasitleri sırayla tek tek belirlenebilir.

Proteinlerde Dizi Analizi

Proteom analizi çalışmaları 1990'lı yıllarda yeni bir boyut kazandıysa da konuyla ilgili ilk çalışmalar çok öncelere dayanıyor. 1945 yılında Frederic Sanger (1918 -) protein dizi analizi için ilk büyük çalışmayı gerçekleştirdi. Reaktif olarak da bilinen dinitroflorobenzen'i kullanan Sanger, insülin hormonunun aminoasit dizilimini aydınlatmayı başardı. Sanger bu başarısıyla 1958'de Nobel tıp ve fizyoloji ödülünü aldı. 1980'de ise nükleik asitlerin dizi analizi konusundaki çalışmalarından ötürü ikinci kez Nobel Kimya Ödülü aldı ve iki kez Nobel alan ve şu an hayatta olan tek bilim insanı. Sanger'den sonra Pehr Victor Edman (1916-1977) tarafından geliştirilen yöntemle proteinlerin dizi analizi daha kolay yapılmaya başlandı. Yüzlerce aminoasit içeren ve karmaşık üç boyutlu yapıları olan proteinlerin aminoasit diziliminin artık tek tek gerçekleştirilebilmesinin önü açıldı.

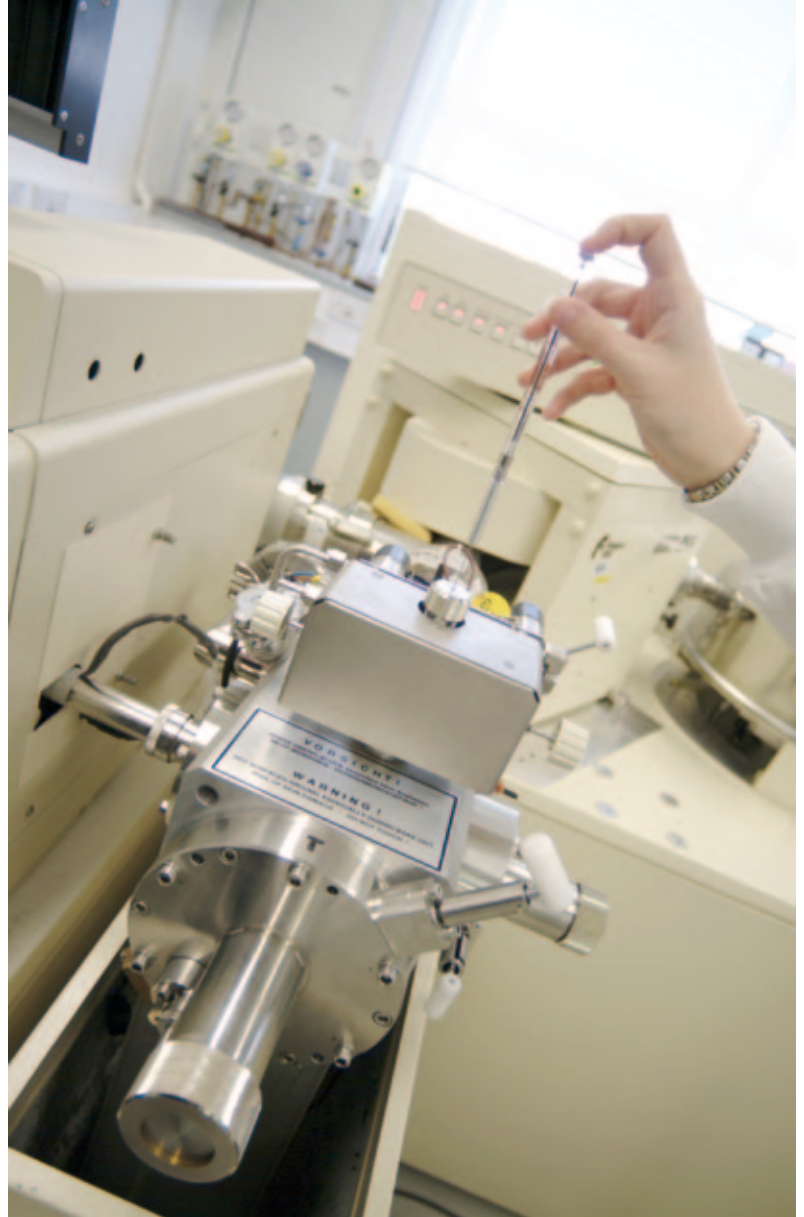
Edman yöntemiyle, proteinlerde aminoasitlerin dizilim sırasını belirlemek için öncelikle incelenecek proteinin bulunduğu ortama Fenilizotiyosiyanat (Edman Reaktif olarak da bilinir) adlı bileşik ekleniyor. Bu bileşik protein zincirinin ilk aminoasidine bağlanarak (amino grubuna bağlanır) onun proteinden ayrılmasını kolaylaştırıyor. Ayrılan aminoasidin kimliğini kolaylıkla belirleyebiliyoruz. Bu işlem defalarca tekrarlanarak proteindeki tüm aminoasitleri sırayla belirlemek mümkün.

Kütlesi ve aminoasit dizilimi belirlenen protein daha sonra protein veri bankalarındaki diğer proteinlerle karşılaştırılır. Eğer protein veri bankasında aynı dizilime ve özelliklere sahip başka bir protein bulunuyorsa elde edilen proteinin yeni olmadığı daha önce çalışıldığı anlaşılır, değilse yeni bir protein olduğuna karar verilir. Sonraki aşamalarda bu proteinin teşhis veya tedavi amacıyla kullanılıp kullanılmayacağı araştırılır. Bu işlemler tüm doku ve hücrelere uygulanabilir. Karşılaşabildiğimiz tüm hastalıklar için bu tekniği kullanabiliyoruz. Bu amaçladır ki son yıllarda proteomikle ilgili çalışmalarda adeta bir patlama yaşanıyor.

Sonuç

Proteom analizinin getirdiği yenilikçi bakış açısı sadece proteinlerle sınırlı kalmadı, diğer tüm moleküller için de adeta bir dönüm noktası oldu. Proteom analiziyle başta kanser olmak üzere çok sayıda hastalığın ayrıntılı olarak incelenebilmesinin yolu açıldı. Artık hastalığa ve kişiye özel tedavi stratejileri geliştiriliyor. Tüm bu çalışmaların so-

nucunda, yirmi birinci yüzyılda biyoloji ve tıp artık mikroskobik dönemi geride bırakarak nanoskobik döneme geçiyor.



Kütle spektrometresi.

İnsan proteom haritası çıkarıldığı gün çok sayıda hastalık da belki tarihin sayfaları arasında yerini alacak. Ancak genomun aksine insan proteom haritasının çıkarılması kolay değil ve çok zaman alacak gibi görünüyor. İçinde bulunduğumuz yüzyılda, tıp ve biyolojide belki de en çok duyacağımız sözcük proteom olacak.

Kaynaklar

Wasinger, V. C., Cordwell, S. J. ve diğerleri. "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*," *Electrophoresis* 16 (1995): 1090-94.
Aebersold, R., "Constellations in a cellular universe," *Nature* 422 (2003): 115-116.

<http://www.hprd.org/>
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
<http://www.hupo.org/>