

3. Fehérjék vizsgálatának bioanalitikai módszerei

KILÁR FERENC

A fehérjék analitikai elemzésére alkalmas módszerek elsősorban tisztított fehérjék vizsgálatát jelentik, de növekszik az olyan módszereknek a száma, amelyek a keverékekben, mátrixokban jelen lévő fehérjék vizsgálatára alkalmasak.

A fehérjék vizsgálatának célja tisztítás, elválasztás, a kölcsönhatások vizsgálata, a jellemző paraméterek meghatározása, biológiai funkciók elemzése, a szerkezet meghatározása, konformációs, denaturációs tulajdonságok jellemzése. Mindez a bioanalitika tárgykörébe tartozik. A bioanalitikai módszerek felölelik az elválasztástechnikák, a szerkezetanalízis, a bioinformatika, a biológiai fizikai kémia majdnem teljes eszköztárát.

E fejezet – amellet, hogy érinti a fehérjék vizsgálatára alkalmas módszerek céljait és főbb kérdéseit, valamint előjelzi a további fejezetek tartalmát – néhány bioanalitikai területet tárgyal részletesebben.

Fehérjék extrakciója

A fehérjék extrakciójának még ma is a legszélesebb körben alkalmazott módja az oldószeres kinyerés és az ezt követő, csapadékképzésen alapuló, esetenként lépcsőzetes kicsapással végrehajtott frakcionálás.

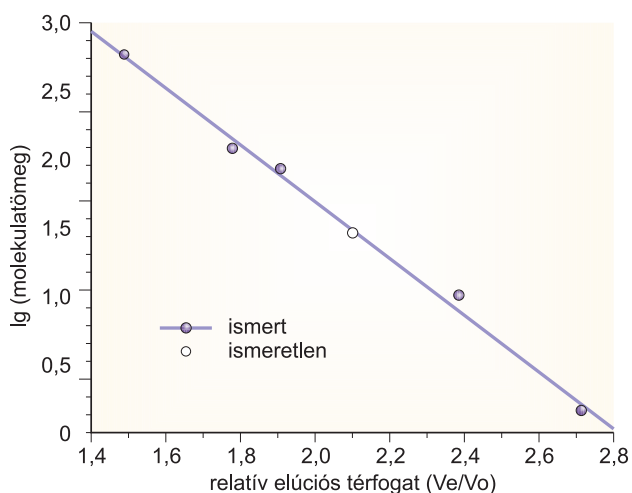
Fehérjék kromatográfiája

A fehérjetisztítás másik legfontosabb területe annak elválasztástechnikai alkalmazása, azok közül is a kromatográfia. A kromatográfiás eljárások széles felhasználási köréből a fehérjék kinyerésére alkalmas *géliszűrés* (méretkizárásos kromatográfia, gélkromatográfia) a legfontosabb módszer, amellyel preparatív módon, nagy mennyiségben lehet tisztított preparátumot előállítani. A géliszűrés során különböző pórusméretű gélmátrixon megfelelően lehet a fehérjéket

akár a 100 000 Da molekulatömeg értékig egymástól elválasztani és frakcionálni. A módszer preparatív felhasználása mellett fehérjék molekulatömegének analitikai megbecsülésére is alkalmas (3-1. ábra). A géliszűrés hátrányai közé tartozik az, hogy két fehérje elkülönítésének feltétele molekulatömegükben legalább 10%-os különbség megléte, valamint az, hogy a frakciók gyűjtése során az oldat hígul, ezért töményítési eljárásokat (pl. szelektív membránokon való „ultraszűrés”) vagy pl. liofilizálást kell alkalmazni a megfelelő fehérjepreparátum elkészítéséhez.

A fehérjék különböző tulajdonságain alapuló kromatográfiás elválasztások közül az *ioncserés kromatográfiával* egy adott pH-n a töltéskülönbség alapján lehet fehérjéket elválasztani. Ennek hátrányai közül meg kell említeni, hogy az elúcióhoz alkalmazott esetlegesen nagy ionerősségű oldószer a molekulák denaturációját okozhatja.

Az *affinitáskromatográfia* alkalmazásával lehet a legtisztább preparátumokat előállítani. Ennek formája a fehérjékkel specifikusan kölcsönhatás kialakítására alkalmas oszlopok használata. Glikoproteinek tiszt-



3-1. ábra. Ismeretlen fehérje molekulatömegének becslésére alkalmazható kalibrációs egyenes géliszűréssel való elemzésben

títására alkalmazható a lektinkromatográfia, fémkötő fehérjék elválasztására immobilizált fémionokat tartalmazó oszlopok, de a legszélesebb körben használható módszer az immobilizált, specifikus ellenanyagokat alkalmazó „immunaflatás-kromatográfia”.

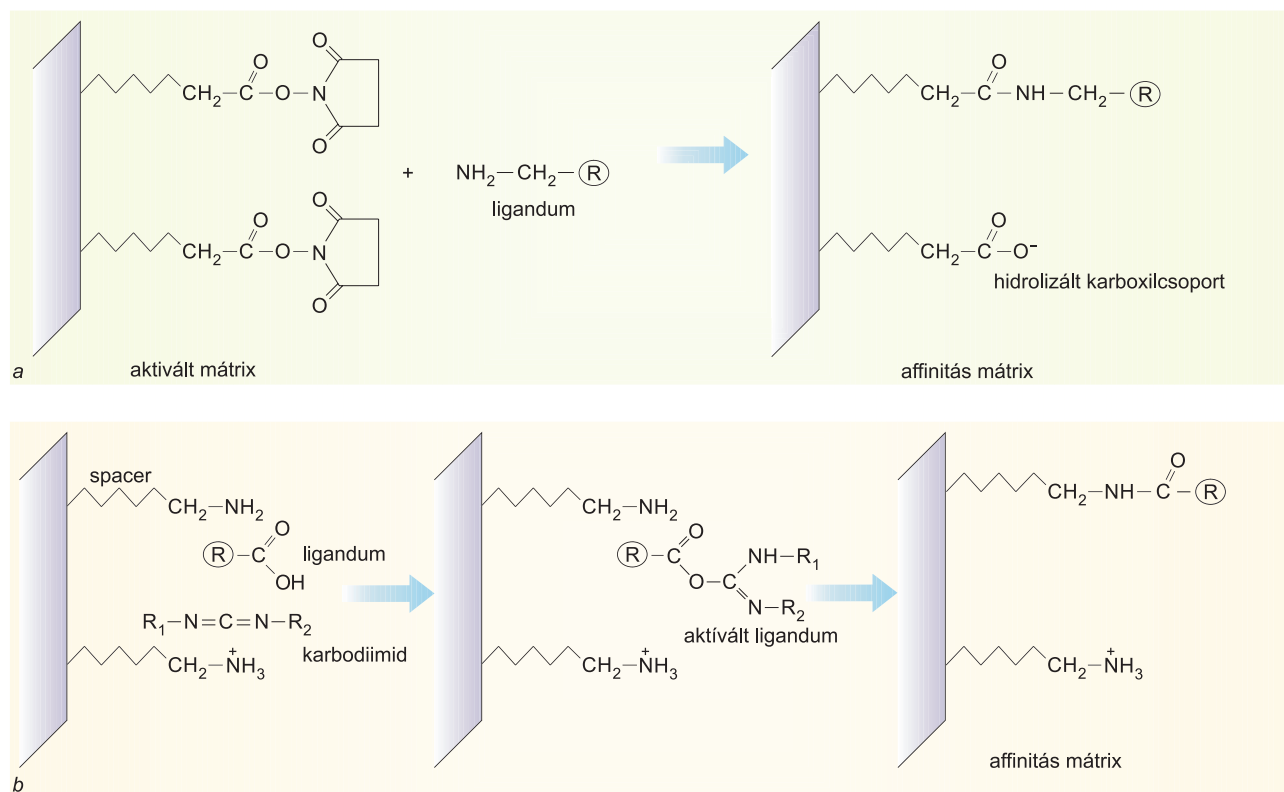
A különböző kötött ligandumokat alkalmazó *ligandumreceptor-kromatográfia* akár 1000-szeres fehérjetisztítási hatékonyságot képes elérni 10–50%-os visszanyeréssel. A specifikus ligandumok egy „spacer”-en keresztül kapcsolódnak az agaróz- vagy poliakrilamidmátrixhoz (3-2. ábra). Amennyiben a ligandum reaktív, a fehérjék szelektíven kötődnek az oszlophoz. A kötött fehérjék eltávolítása az eluensben oldott azonos vagy attól különböző, más ligandummal végrehajtott extenzív mosással érhető el.

Specifikus fehérjetisztítás lehetséges ún. *affinitás-címkék*, „tag”-ek segítségével. Egy adott fehérjéhez kovalensen kötött pl. hisztidin-„tag” („His-tag”), „címke” nagy affinitással rendelkezik nikkel- és kobaltionokkal szemben, vagyis az ilyen immobilizált fémionokat tartalmazó oszlopon azokat a fehérjéket, amelyek ilyen címkékkel rendelkeznek, nagy speci-

ficitással lehet elválasztani. A His-tag-et elsősorban rekombináns technikák alkalmazásakor használják, az így előállított fehérjéről a „címkét” proteolitikus hasítással el lehet távolítani.

Fehérjék frakcionálása ultracentrifugával

A fehérjéket ultracentrifugálással is el lehet választani a vizsgálatokhoz. Az analitikai és a preparatív ultracentrifugálási technikák közül ma már elsősorban a *gradienscentrifugálást* alkalmazzák, amelyhez szacharóz- vagy glicerín-koncentrációgradienst, ill. kolloid szilikagél-részecskéket tartalmazó ún. Percoll-gradienst használnak. Megfelelően hosszú centrifugálást követően a különböző molekulatömegű fehérjék (kolloidrészecskék) a sűrűségüknek megfelelő zónában helyezkednek el, és a centrifugálás után frakciókba gyűjthetők. Bár a felbontás (molekulatömeg szerinti elválasztás) nem nagy, alkalmazása bizonyos esetekben hasznos.



3-2. ábra. Ligandum kötése mátrixokhoz

a) A ligandum az aminos csoportján keresztül kötődik az N-hidroxisukcinimid-észterrel aktivált mátrixhoz

b) Karboxilcsoporttal rendelkező ligandum kötése karbodiimid-aktiválás után a mátrix aminos csoportjához

Fehérjék vizsgálata elektroforézissel

A pH-tól függő töltéssel rendelkező, amfoter tulajdonságú fehérjék analizisére leggyakrabban alkalmazott elválasztástechnika az elektroforézis. Az elektroforézis – bár korlátozott mértékben alkalmas preparatív elválasztásra – elsősorban analitikai módszer, amellyel ugyanakkor számos vizsgálatot el lehet végezni. A fehérje-összetétel meghatározása mellett egyértelműen alkalmazható tisztaságvizsgálatra, de más molekulákkal (kis molekulák és makromolekulák) történő kölcsönhatások vizsgálatára, az amfoter tulajdonságaikat jellemző paraméterek (izoelektromos pont) meghatározására, konformációs stabilitásuk (denaturációs tulajdonságuk) jellemzésére.

Az elektroforézis technikának az ARNE TISELIUS által a harmincas években leírt módszere az elektromos térben vándorló ionokat oldatban, hordozó nélkül írta le, amelynek során fehérjéket és fehérjekeverékeket (pl. szérum) választott el elektroforézissel. A vándorló komponensek határfelületét (a zóna vándorlását) törésmutató-detektorral követte nyomon (*moving boundary electrophoresis*). Az azóta eltelt időszak alatt az elektroforetikus technikák két lényeges formában jelentek meg. Az eredeti Tiselius-készülék „szabad oldat”-ban nem volt alkalmas nagyszámú minta elemzésére, a detektálás módja is gondot jelentett. Ezért a technika akkor kezdett teret hódítani, amikor gélmátrixokat (HJERTÉN – agaróz, 1955, ORNSTEIN és DAVIS, valamint RAYMOND és WEINTRAUB – poliakrilamid, 1959) kezdtek alkalmazni.

A csak makromolekulák (fehérjék és nukleinsavak) vizsgálatára alkalmas gélelektroforetikus módszerek a mai napig fontos szerepet játszanak. Elsősorban fehérjék molekulatömegének meghatározására használatosak, ugyanakkor a proteomikai kutatások előtérbe kerülésével, a tömegspektrometriával kapcsolva egyértelműen helyük van a mai elemzésekben is.

A hatvanas-hetvenes évek során azonban egy „új” elektroforetikus módszer hódította vissza TISELIUS eredeti módszerének érdemeit. Az oldatban, de most már vékony (üveg)csövekben, kapillárisokban, érzékeny detektálási technikákkal kombinált módszerek egy új, nagyon sok lehetőséget kínáló elektroforetikus elemzőrendszert alkotnak, a kapilláris-elektroforetikus technikákat.

Az egyes elemző-detektáló technikák részletesebb tárgyalása előtt azonban fontos az elektromos térben

végrehajtható elemzések összefoglalása. A 3-1. táblázat az elválasztási módok fajtáit, a végrehajtás körülményeit, az elválasztási elveket és a vizsgált komponenseket összegzi.

A 3.1. táblázaton leírt módszerek többsége tehát gél- és oldatrendszerekben is végrehajtható. A táblázat elektroforetikus technikái ugyanakkor egymással vagy más technikákkal kapcsolhatók. Többek között így jött létre a 2D-PAGE, vagyis a „kétdimenziós poliakrilamid-gélelektroforézis”.

A gélmátrixban végrehajtott, fehérjék analizisére alkalmazható egy- és kétdimenziós elektroforetikus elválasztások elméleti és gyakorlati leírása a 4. fejezetben található. E fejezetben a fehérjék kapilláris-elektroforetikus elemzésére használatos legfontosabb technikák leírását adjuk meg.

FEHÉRJÉK KAPILLÁRIS-ELEKTROFORETIKUS ELEMZÉSE. CHIP-ELEKTROFORÉZIS

A kapillárisméretben végzett, elektromigráción alapuló elválasztás egyike a leggyorsabban fejlődő elválasztási módszereknek. Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak. A kapilláris-elektroforézisnél (capillary electrophoresis, CE) az elektroforézis egy vékony, általában 25–75 µm belső átmérőjű, pufferoldattal töltött kapillárisban történik. A kapilláris alkalmazásának számos előnye van, így pl. az, hogy a kapilláris nagy elektromos ellenállásánál fogva a rendkívül nagy térerő (100–500 V/cm) alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé. A fejlődött hő (joule-hő) a kapilláris nagy felület/térfogat aránya miatt jól eloszlik. A nagy elektromos térerő használata rövid mérési időt, valamint nagy elválasztási hatékonyságot és felbontást biztosít. A kapilláris-elektroforézis minimális mintamennyiséget (1–10 nl) igényel, könnyen automatizálható. A módszer egyik legnagyobb előnye a lehetséges alkalmazások rendkívül széles köre. Míg a kapilláris-elektroforézist eleinte csak biológiai makromolekulák vizsgálatához használták, ma már aminosavak, királis vegyületek, vitaminok, peszticidek, szerves ionok, szerves savak, peptidek és fehérjék, szénhidrátok, oligonukleotidok és DNS-részek, de még egész sejtek és vírusok elválasztásához és meghatározásához is alkalmazzák. A kapilláris-elektroforetikus módszerek gyorsaságuk-

nak, automatizálhatóságuknak, jó felbontásuknak (10^6 elméleti tányérszám/m) és kis anyagigényüknek köszönhetően nagyon gyorsan elterjedtek.

A kapilláris-elektroforézis ma már a mikrofluidika, azaz a miniaturizált, folyadékban végrehajtott elemzések területén fejlődik a legnagyobb mértékben. A genomika, a proteomika és a metabolomika rohamosan növekvő igényeinek és a technikában megfigyelhető általános fejlődési tendenciáknak megfelelően a miniaturizálás az elválasztástechnikák körében is egyre inkább tért hódít, mivel egyre kisebb térfoga-

tú, ugyanakkor nagyszámú minta kis helyen végzett gyors analízisét teszi lehetővé. E módszereknek meg kell felelniük korunk és természetesen a vizsgált biológiai rendszer kívánalmainak, úgymint kis mennyiségű minták (mikro- és nanoliter térfogat) gyors analízise (másodperces elválasztási idő), nagy felbontóképesség és olyan enyhe elválasztási körülmények, amelyek lehetővé teszik a szeparált komponensek további azonosítását, többnyire tömegspektrometriával vagy mikroszekvenálással. A detektálási érzékenységnek bizonyos esetekben el kell érnie az egy mo-

3-1. táblázat. Elektroforetikus technikák jellemzése

<i>Elnevezés</i>	<i>Kísérleti körülmények</i>	<i>Az elválasztás elve (az elektroforetikus vándorlást befolyásoló körülmény vagy tulajdonság)</i>	<i>Vizsgált komponensek</i>
(natív) zóna-elektroforézis	pufferelt elektrolitoldat (háttélektrolit) oldatban vagy gélmátrixban	a vándorlás a komponens töltés/tömeg arányától függ	oldatban vagy gélben: egyszerű szervesen ionok, kismolekulák, makromolekulák csak oldatban: kolloid részecskék, sejtalkotórészek, sejtek
(denaturáló) zóna-gélelektroforézis	gél mátrix (vagy agaróz, vagy poliakrilamid, vagy lineáris poliakrilamidláncok kolloid oldata)	molekulaméret (molekulatömeg) szerinti vándorlás	fehérjék (magas pH-n SDS jelenlétében) és nukleinsavak
izoelektromos fókuszálás	oldatban vagy gélmátrixban, a rendszerben az anolit és katólit között amfolitok segítségével létrehozott pH-gradiens	amfoter vegyületek izoelektromos pontja alapján való fókuszálódás	oldatban vagy gélben: amfoter tulajdonságú kis- és makromolekulák csak oldatban: kolloid részecskék, sejtek
micelláris elektrokinetikus kromatográfia	oldatban vagy gélmátrixban, egy nagy és egy kis elektroforetikus mobilitású anionokat vagy kationokat tartalmazó rendszer	elektroforetikus mobilitás	egyszerű szervesen ionok, kismolekulák, makromolekulák
elektrokromatográfia	kromatográfiás állófázist vagy ún. „monolit”-ot tartalmazó kapillárisban pufferelt vagy nem pufferelt háttélektrolit jelenlétében	elektrooszmózis jelenlétében vándorló komponensek, amelyek a kromatográfiás állófázissal tulajdonságaiknak megfelelően kölcsönhatásba lépnek	kis- és makromolekulák
affinitás- (immun-)elektroforézis	oldatban vagy gélmátrixban, specifikus kölcsönhatásra képes komponens jelenlétében vándorló vizsgált anyagok	a szabad és a kölcsönhatással komplexbe került komponensek vándorlási sebességeinek különbözősége	kis- és makromolekulák

lekula kimutathatósági határt. E modern elválasztási módszereket főleg a rendszer biológia részterületein használhatják, de ezen túl természetesen alkalmazást találnak biomarkerek felfedezésekor, metabolizmus-utak analízisében és gyógyszer-céltermékek validálási eljárása során is.

A kémiai chippek előállítása a számítógépchipek gyártása során alkalmazott technikákat (fotolitográfia, kémiai maratás stb.) alkalmazza. A miniatürizálás számos előnnyel jár különösen azon alkalmazások esetében, ahol nagyszámú minta gyors elemzése szükséges, ami a rendszer biológia korszakában alapvető fontosságú. Az analízist kisméretű üveg- vagy műanyag lapba maratott csatornában végzik (3-3. ábra), és a néhány cm hosszúságú kapillárisokban a nanoliternyi mennyiségű minták elemzése csupán másodperceket, esetleg perceket vesz igénybe.

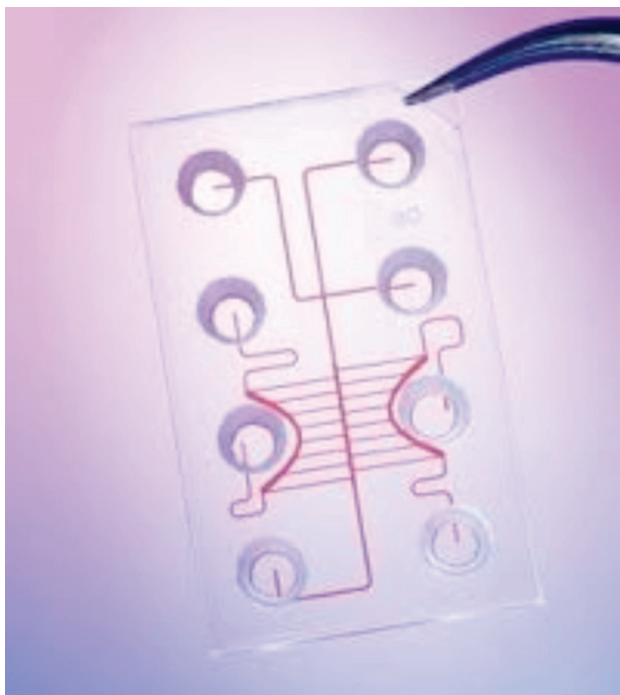
A miniatürizálás előnyei közé tartozik a kis reagensigény, a csökkentett oldószer-felhasználás és akár egymást követő kémiai és biokémiai reakciók, valamint elválasztási lépések integrálása egyetlen mikrochipben (*lab-on-a-chip*). A módszer magában hordozza a multiplex, integrált rendszerek kialakításának lehetőségét is. Sokcsatornás chippek alkalmaz-

zásával akár több száz minta párhuzamos vizsgálata válik lehetővé (96, 384 stb.), és mivel ez az új módszer könnyen automatizálható, mindez jelentős munka-, idő-, anyag- és költségmegtakarítást jelent.

Az elektroforézis-mikrochip elkészítésének első lépése a csatornahálózat és a reagenstartó edények elrendezésének megtervezése annak tudatában, hogy mit várunk el a kémiai chiptől. A következő lépés a terv megfelelő chipalapanyagra való átvitele felhasználva a számítógépes mikrochipek gyártásánál bevezetett és ma már nagyiparilag is alkalmazott módszereket. Ezzel a technikával akár több ezres nagyságrendben is előállíthatók elektroforézis-chipek. Megfelelő detektorok alkalmazásával femto- és attomol mennyiségű minta detektálása lehetséges, és az így kialakított mikrochipek 10-, sőt 100-szoros analízissebességet biztosítanak a konvencionális elválasztási módszerekhez képest. Különösen előnyös, hogy a már beállított folyadékkromatográfiás vagy kapilláris-elektroforézis módszerek egyszerűen átültethetők mikrochip formátumra.

Elektroforézis-mikrochipeket mikromegmunkálással készíthetünk üvegből, kvarcból és különböző műanyagokból, úgymint polimetil-metakrilát, teflon, polikarbonát stb. A kémiai chip alapanyag kiválasztásánál megfontolandó, hogy miniatürizált körülmények között e nagy felület anyagi minősége fontos szerepet játszhat. Ez különösen lényeges lehet fehérjék elektroforézise, ill. kémiai reakciók (polimeráz-láncreakció, restrikciós emésztés) során, amikor a negatív töltésű üvegfelszín esetleg gátló tényezőként szerepelhet (pl. nem specifikus kötődés). Műanyagokat alkalmazva a kedvezőtlen hatásokkal kevésbé kell számolni, emellett a műanyagból készült kémiai chippek olcsók, nem törékenyek és könnyen megmunkálhatók.

A chippekben kialakított munkacsatornában egyszerű pufferoldatoktól a bonyolult géleken keresztül a monolitikus elektrochromatográfiás állófázisokig bármilyen elválasztórendszert alkalmazhatunk. A csatornák a mikrochip felszínén lévő nyílásokban végződnek, amelyek az oldatok (minta, puffer, szeparáló mátrix) betöltésére szolgálnak (lásd 3-3. ábra). Az ide csatlakozó elektródok segítségével az egyes csatornában különböző nagyságú és polaritású elektromos mezők alakíthatók ki, amelyek alkalmasak a mikrochipben lévő anyagok mozgására és a mintakomponensek elektroforetikus elválasztására.



3-3. ábra. Egy kapilláris-elektroforézishez használható mikrochip, amelyen az elválasztó csatornákon kívül reagenstartályok, elektródok és pufferek elhelyezésére szolgáló nyílások, kialakított lyukak (*well*) találhatók

A detektálás a mikrochipeken főképpen lézer indukálta fluoreszcencia (LIF) segítségével biztosítható, de emellett más, hagyományos fotometriai (pl. ultraibolya fényelnyelés) vagy elektrokémiai (vezetőképesség-mérés, amperometria), valamint tömegspektrometriai technikák is alkalmazhatók.

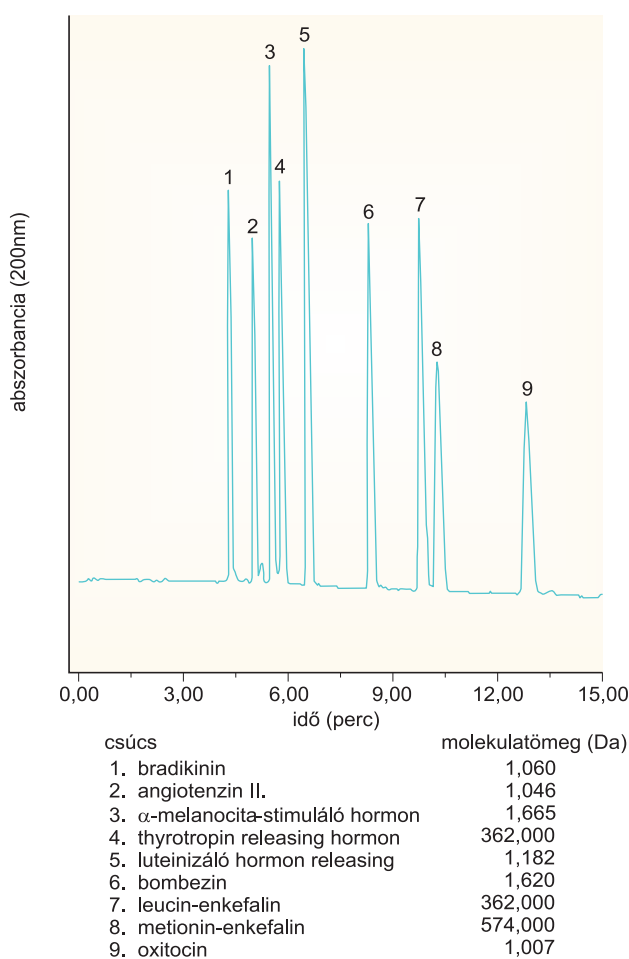
A leggyakrabban használt egyszerű mikrochip-alkalmazások mellett (DNS-fragmentum-analízis, fehérjék SDS-gélelektroforézise, komplex szénhidrátok elválasztása stb.) olyan integrált rendszereket is kidolgozhatunk, melyek korábban a konvencionális módszerek alkalmazásával elképzelhetetlenek voltak.

A kapilláris-elektroforetikus eljárások lefedik az összes elektroforetikus elválasztási módszert, azaz zónaelektroforézis, izoelektromos fókuszálás, izotachoforézis, gélelektroforézis, micelláris elektrokinetikus

kromatográfia és elektrochromatográfia. Mindegyik módszer alkalmas fehérjék analízisére és elválasztására, mégis a fehérjeanalízisekben elsősorban zónaelektroforézist, izoelektromos fókuszálást, gélelektroforézist és micelláris elektrokinetikus kromatográfiát használnak.

Zónaelektroforézis kapillárisban. A legegyszerűbb zónaelektroforézis a leggyakrabban alkalmazott fehérjeanalitikai módszer a kapilláris-elektroforézis technikák közül. A natív körülmények között, a puffertelt közeg pH-ját erősen figyelembe vevő elektroforézis aminosavak, peptidok, de akár komplex fehérjekeverékek nagy felbontású elválasztására képes. Az üvegkapillárisban 2,5-ös pH-jú foszfátpufferben végrehajtott peptidanalízis a kapilláris-elektroforetikus elválasztások fontos standard módszere (3-4. ábra). A „szabad” oldatban végzett elektroforézis nem a molekulatömeg alapján választ el.

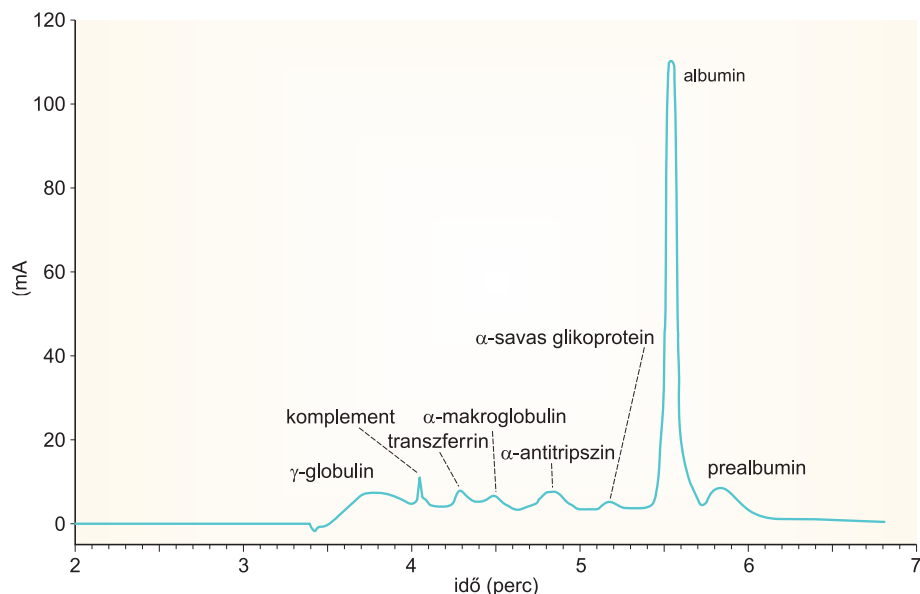
A szérumelektroforézist natív körülmények között végrehajtva a klinikai-kémiai diagnosztikában alkalmazható eredményeket kapunk (3-5. ábra).



3-4. ábra. Peptidok zónaelektroforézise. (Kísérleti körülmények: kapilláris 50 $\mu\text{m} \times 24\text{ cm}$, feszültség 10 kV, hőmérséklet 25 $^{\circ}\text{C}$, háttérelktrolit: 50 mM foszfátpuffer, pH 2,5, detektálás: 200 nm.) A peptidok a negatív pólus felé vándoroltak

Gélelektroforézis molekulatömeg-meghatározásra mikrochipanalízisekben. Az SDS-PAGE (dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis) kapilláris formában is megvalósítható, és ez a technika a legjobban elterjedt miniatürizált kapilláris-elektroforézis technikák egyike. A kapillárisban (mikrochip-kapillárisban) végzett gélelektroforézishez lineáris (nem térhálós) gél használunk, mert a térhálós (kereszt kötött) poliakrilamid gél a kapilláris-elektroforézis körülményei között csak néhány fehérjeminta analízisére alkalmas és az elkészítés módja alapján a kapillárisból nem távolítható el (nem cserélhető), s így csak korlátozott mértékben automatizálható. A dinamikus molekulaszűrésnek (*dynamic molecular sieving*) megfelelő körülményeket dextrán, polietilén-oxid vagy lineáris poliakrilamidláncok biztosítják. A fehérjékhez tapadó dodecil-szulfát-láncok minden saját töltést elfedő, nagy negatív töltése miatt a fehérje-dodecil-szulfát komplexek szabad oldatban azonos töltés/tömeg arányuk miatt azonos sebességgel vándorolnának, de a lineáris polimer-láncok jelenlétében – amelyek úgy viselkednek a gyakorlatban, mint egy térhálós polimer – a komplexek molekulatömegüknek (méretüknek) megfelelően vándorolnak az elektromos térben.

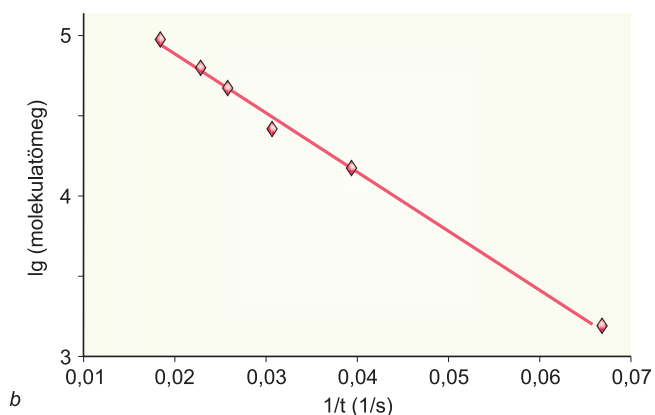
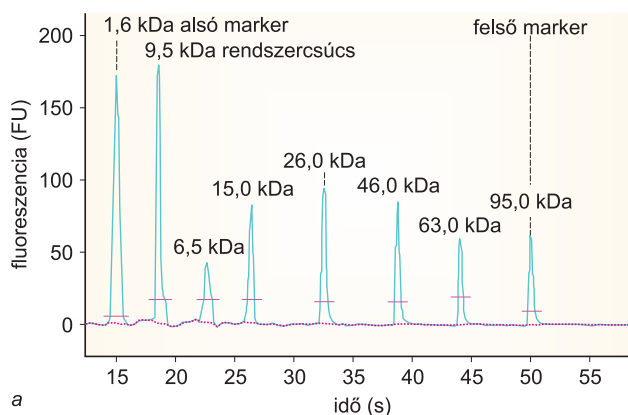
3-5. ábra. Szérumelektroforézis natív körülmények között. (Kísérleti körülmények: kapillaris 50 $\mu\text{m} \times 44\text{ cm}$, feszültség 15 kV, hőmérséklet 25 °C, háttélektrolit: 30 mM borátpuffer, pH 10, detektálás: 215 nm)



A molekulatömeg a kalibrációs molekulatömeg-meghatározás segítségével (3-6. ábra a, b) meghatározható.

A fehérjék mennyiségének a biológiai folyamatok függvényében történő változása nagyon érzékenyen követhető nyomon a mikrochipanalízisekkel. A csökkentett vasmentességet tartalmazó táptalajon tenyésztett baktériumok külső membránfehérjéinek mennyiségi változása az elektroforetikus fehérjeprofilban érzékenyen tükröződik. A 3-7. ábra mutatja a *Pseudomonas aeruginosa* NIH Hungary 170 000 baktérium-törzs külső membránfehérjéinek profilját teljes táptalajon, ill. vasat nem tartalmazó táptalajon való tenyésztés során. A vasmentes körülmény legalább egy fehérje (92 kDa, 31 s) nagymértékű termelődését idézte elő.

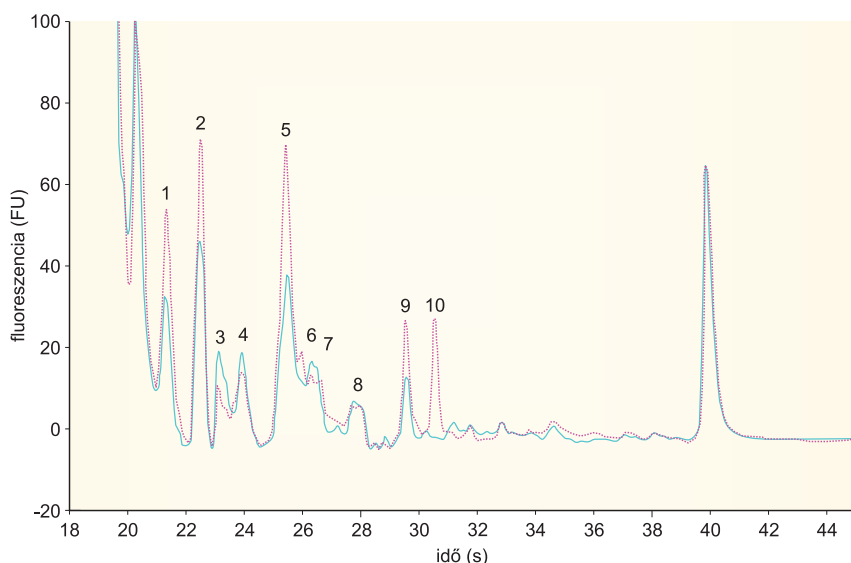
Izoelektromos fókuszálás fehérjék jellemzésére. Az izoelektromos fókuszálás az elektroforetikus technikák közül az egyik legnagyobb felbontással képes amfoter jellegű komponenseket, esetünkben fehérjéket jellemezni. Az akár egy aminosav különbség következtében előforduló izoformák elválasztása az izoelektromos pont alapján nagy érzékenységgel lehetséges. Az izoelektromos fókuszálást önállóan vagy egy másik technikával kapcsolatban is fel lehet használni. A technika speciálisan igényli olyan nagy elektroforetikus mozgékonyaságú, amfoter komponensek, amfolitok alkalmazását, amellyel az elválasztás során (előtt) egy alkalmas pH-gradiens alakítható ki. Az amfolitok poliamino-polikarboxi-savak, amelyek egy alacsony és egy magas pH-jú elektrolitoldat között, elektromos tér



3-6. ábra. Elektroforézis (kísérleti körülmények: készülék: Bioanalyzer 2100, Agilent, Germany; Protein 80 mikrochip)

a) Standard fehérjekeverék mikrochipen végrehajtott elektroforézise

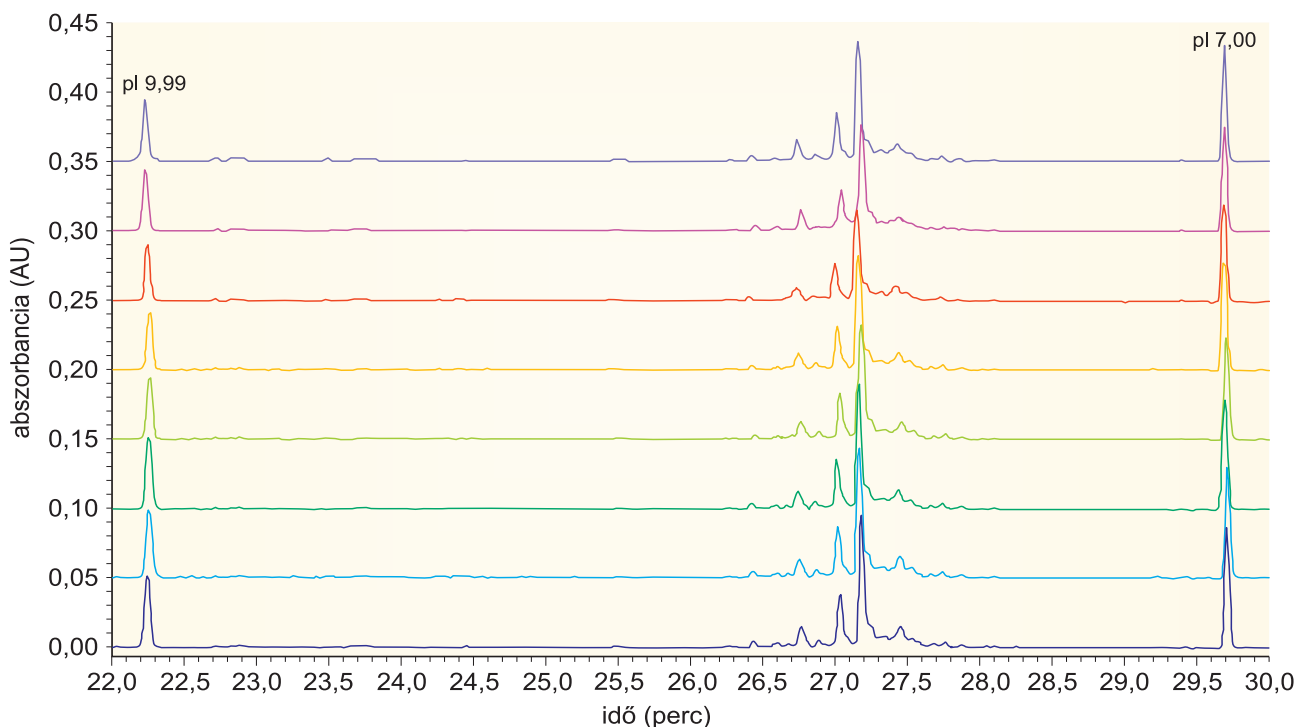
b) A „markerek” és az ismert molekulatömegű fehérjék segítségével a vándorlási idő meghatározásával az ismeretlen fehérjék molekulatömege meghatározható



3-7. ábra. Baktérium külső membránfehérje-profiljában bekövetkező változások nyomon követése gélelektroforézissel microchipen. A *Pseudomonas aeruginosa* NIH Hungary 170 000 törzs normális táptalajon való tenyésztése során (folytonos vonal) kilenc fő komponens látható, míg a vasat nem tartalmazó táptalajon (szaggatott vonal) egy fehérje (10-es) fokozott termelődése volt észlelhető. [A kísérletek a Bioanalyzer 2000 (Agilent) készüléken, a Protein 200 Labchip Kit felhasználásával készültek. A fluoreszcens festékkel megjelölt fehérjék vándorlását lineáris polimer jelenlétében LIF (lézerindukált fluoreszcencia) detektorral követték.]

hatására mobilitásuknak (izoelektromos pontjuknak) megfelelően sorba állnak, és nagy puffercapacitásuknak megfelelően a kialakuló pH-gradiensben az amfoter fehérjék fókuszálódását idézik elő. A fókuszálási lépés során 1000–3000-szeresre tömnyedő fehérjezónák detektálása vagy az egész pH-gradiens „lefényképezésével”, vagy egy stationáris detektor irányában végzett megfelelő mobilizálási lépés segítségével lehetséges.

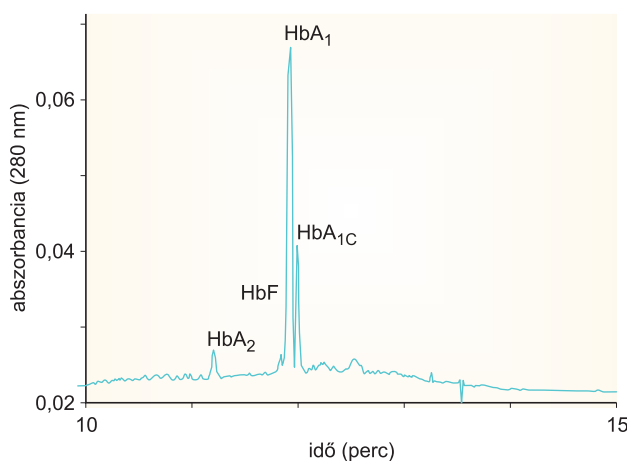
Az izoelektromos fókuszálás gélben az egész pH-gradiens egyidejű megfestésével zajlik, de a kapilláris- vagy chipformátumban, oldatban végrehajtott izoelektromos fókuszálás során általában stationárius detektorokat (akár tömegspektrométert) alkalmaznak.



3-8. ábra. Monoklonális ellenanyag minták izoelektromos fókuszálása standardizált körülmények között (az ábra a fókuszált zónáknak csak a mobilizálási lépés során történő vándorlási profilját mutatja) (Kísérleti körülmények: 1,8 v% Pharmalyte pI 3–10 amfolitkeverék által kialakított pH-gradiens, kétlépéses izoelektromos fókuszálás, feszültség a fókuszálás során 15 kV, mobilizálás 350 mM ecetsavval 30 kV feszültségen, peptidmarkerek koncentrációja: 10 mM, fehérjekoncentráció: 210 mg/ml, detektálás 280 nm-en, mintafelvétel az egész kapilláris hosszában)

Az amfoter komponensek izoelektromos pontját a vándorlás során csak standardok (marker peptidok vagy fehérjék) segítségével, kalibráció után lehet meghatározni. Bár a technika gél formátumban már hosszú idő óta elsősorban a 2D-PAGE technika alkotórésze, a standardizálás problémái miatt csak az utóbbi időben sikerült megfelelő, reprodukálható körülményeket kialakítani kapilláris-elektroforézis készülékekben. A 3-8. ábra egy standardizált, reprodukált körülmények között végrehajtott fehérjeanalízist mutat. A monoklonális ellenanyagok előállítása során keletkező izoformák kapilláris izoelektromos fókuszálásával sikeresen lehet a főkomponensek mellett a kis mennyiségben jelen lévő bázikus és savas izoformák izoelektromos pontjait reprodukálhatóan meghatározni.

Az izoelektromos fókuszálás fókuszálási és mobilizálási lépéseit egy lépésben is meg lehet valósítani a kapilláris-elektroforetikus eljárások során, az elsősorban üvegkapillárisokban fellépő *elektroendozmózis* jelenségének felhasználásával. A mintát ez esetben csak a kapilláris egy rövidebb szakaszában viszik fel, és lehetséges az amfolitok és az elválasztandó komponensek egymás utáni injektálása is. A nagy felbontású elválasztás során a komponensek egy időben vándorolnak a detektor irányába, amely vándorlás során a



3-9. ábra. Hemoglobinváriánsok és -komponensek detektálása kapilláris izoelektromos fókuszálással egy diabeteses betegből származó mintában (Az egy lépésben végrehajtott izoelektromos fókuszálás kísérleti körülményei: feszültség 20 kV, kapilláris 50 $\mu\text{m} \times 60\text{ cm}$, katolit: 20 mM NaOH, anolit: 10 mM foszforsav, injektálási paraméterek: 1. 2% Pharmalyte 6,7–7,7 – 3000 mbar·s; 2. 1 mg/ml hemoglobinminta – 500 mbar·s; 3. 2% Pharmalyte 3–10 – 1500 mbar·s.) A magas glikált HbA_{1c}-szint a diabetesre jellemző.

fókuszálódás is lezajlik. A 3-9. ábra hemoglobinváriánsok izoelektromos fókuszálással való minőségi és mennyiségi meghatározását mutatja egy diabeteses betegből származó mintában.

Fehérjék azonosítása és meghatározása a proteomikában

A genomika célja egy élő szervezet teljes genomjának a feltérképezése. A genetikai állományban rejlő információ megismerésének célja az adott gén által expresszált polipeptidok meghatározása. A génexpresszió tanulmányozható mRNS- vagy fehérjeszinten, de tekintettel arra, hogy az mRNS mennyisége nincs összefüggésben a megfelelő fehérje mennyiségével, ezért a génexpresszió vizsgálatának pontosabb módja az expresszált fehérje meghatározása.

A *proteomika* kifejezést először 1995-ben használták egy sejt, szövet vagy szerv összes fehérjéjének kvalitatív és kvantitatív meghatározására. A *proteom* a genom által kifejezett teljes fehérjeállomány (PROTEINS expressed by the genome).

A megfelelő felbontású elválasztástechnika kialakulásával, a kétdimenziós gélelektroforézis segítségével lehetővé vált (először radioaktívan jelzett) fehérjék tanulmányozása. A technika nagy felbontóképessége néhány ezer fehérje elválasztását is lehetővé teszi egyetlen gélben. A gélen elválasztott kis mennyiség megfelelő érzékenységgű fehérjeazonosítási technikáknak, úgymint pl. elektropray ionizációs (ESI) és mátrixszal segített lézer deszorpció-ionizációs (MALDI) tömegspektrometriának az alkalmazását igényli.

A **proteomikai módszereknek** ma már több csoportját különböztetjük meg: expressziós proteomika, funkcionális proteomika, fehérje-fehérje kölcsönhatás, strukturális (szerkezeti) proteomika, fehérje poszttranszlációs módosítások vizsgálata. Az *expressziós proteomika* egy adott minta különböző körülmények között expresszáldott fehérjéinek mennyiségi összehasonlítására szolgál. Az eljárás során lehetőség nyílik up- vagy down-regulált fehérjék meghatározására. A *funkcionális proteomika* a fehérjék szerepének meghatározását vizsgálja különböző életfolyamatokban és változó környezeti körülmények között. A *szerkezeti (strukturális) proteomika* célja egy fehérje-

komplex vagy egy adott sejt szerv összes fehérjéjének azonosítása és szerkezetének meghatározása. A fehérjék poszttranszlációs módosításainak tanulmányozása során többek között a fehérjék közötti jelátvitelben kiemelkedő fontosságú foszforilációnak vagy pl. a fehérjék egymás közötti kölcsönhatásaiban, ill. az enzimatis aktivitást meghatározó glikolizációnak a szerepét vizsgálják.

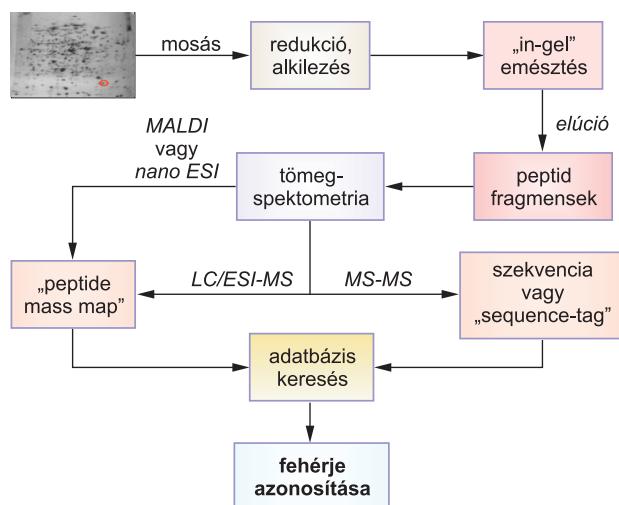
A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatának fontos szerepe van pl. az anyagcsere-folyamatok megismerésében. A metabolizmusban részt vevő enzimek specificitásukat nemegyszer fehérjekomplexek formájában érik el, más enzimekkel vagy alegységekkel összekapcsolódva. E fehérjekomplexek összetételének, szerkezetének tanulmányozása az anyagcsere-utak mélyebb megértését eredményezheti.

A fehérjék szeparálása és azonosítása alapján a *proteomikai vizsgálatok* a következő csoportokba sorolhatók:

- A natív, tisztított vagy elválasztástechnikával (pl. kapilláris-elektroforézissel) elválasztott fehérjék tömegspektrometriás analízise.
- A kétdimenziós gélelektroforézissel elválasztott fehérjék azonosítása enzimatis emésztés után tömegspektrometriával.
- A fehérjékből enzimatis emésztéssel előállított peptidkeverék elemzése és feldolgozása folyadékkromatográfiával (LC) vagy kapilláris-elektroforézissel (CE), amelyet aztán tömegspektrometriás azonosítás követ.
- Mikroarray-technikák.

A tömegspektrometriának (a módszer részletes tárgyalása a 7. fejezetben található) számos alkalmazási lehetősége ismert a fehérjekémiában, úgymint: peptidok és fehérjék tömegmeghatározása; izolált fehérjék (HPLC, PAGE) primer szerkezetének felderítése; poszttranszlációs módosítások (acilezés, formilezés, amidálás, foszforilezés, szulfatálás, glikozilezés) detektálása, azonosítása és lokalizálása; fehérjebontási termékek, metabolitok azonosítása; fehérje-ligandum kötődések vizsgálata; enzimek aktív helyeinek felderítése; diszulfidhidak helyeinek feltérképezése.

A proteomikai vizsgálatokban az elválasztott fehérjék azonosítására, szekvenciájuk meghatározására az elektropray-tömegspektrometria (ESI-MS) és mátrixszal segített lézer deszorpciós-ionizációs repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF) technikát



3-10. ábra. A 2D-PAGE segítségével, elektroforetikus elválasztott fehérjék azonosításának lehetséges módjai

alkalmazzák, kapcsolva esetleg más, tandem tömegspektrometriás (MS/MS) szekvenálási módszerekkel. Az egyik lehetőség a „peptide mass mapping”, amelynek lényege, hogy a meghatározni kívánt fehérjét specifikus enzimmel (általában tripszinnel) vagy kémiai reagenssel fragmentálják, redukálják, alkilálják, majd közvetlenül (nano-ESI vagy MALDI) vagy HPLC-vel való elválasztás után (LC-MS) tömegspektrométerrel meghatározzák az egyes peptidok tömegét. Ezek a peptidtömegek szolgálnak bemeneti adatként a számítógépes adatbázis-kiértékelő programban, amely az adatbázisban lévő fehérjék összes lehetséges fragmentálási reakciónak megfelelően összeveti a lehetséges fragmentadatokat a kísérletekkel meghatározott tömegadatokkal. Már 3-4 peptidtömeg elég lehet egy fehérje azonosítására, és lehetőség szerint a szekvenciafedettség minimum 15% legyen. A tandem tömegspektrometriás eljárások segítségével tovább pontosíthatjuk az azonosítást.

A tömegspektrometriás „peptide mass mapping” gyorsasága és nagy érzékenysége miatt ma már nagyon elterjedt módszer fehérjék 2D gélből való azonosítására (3-10. ábra).

Fehérjék bioinformatikája

Korunkban a komplex biológiai minták vizsgálatánál elengedhetetlen az olyan modern bioanalitikai módszerek alkalmazása, mint a genomterképezés és szekvenálás, proteomanalízis és -szekvenálás, va-

lamint metabolomanalízis és azonosítás. A kapott adatokat bioinformatikai módszerek segítségével hasonlítjuk össze a már meglévő adatbázisokkal. Korábban a kémiai szintézissel előállított molekulákat egyszerűen próba szerencse alapon vizsgálták. Ma a nagy mennyiségben rendelkezésre álló kombinatorikus kémiai könyvtárak lehetővé teszik, hogy milliószámra vizsgáljunk újabb és újabb vegyületeket. Így a génszekvenciák és géntermékek ismeretében egyre inkább áttérünk a biológiai fekete doboz vizsgálatáról a rendszerbiológiai megközelítésre. A modern orvostudományi kutatások ennek kapcsán genomikai adatbázisokból kiindulva a transzkriptom, a proteom és a metabolom feltérképezésén keresztül érnek el újabb és újabb eredményeket.

A biológiai feladatokkal rendelkező, nagyszámú alkotóelemből álló rendszerek elemzésére számítógépes módszerek kidolgozása és alkalmazása vált szükségessé. A *bioinformatika* tágabb értelemben a

számítógép segítségével folytatott és a biológiához kapcsolódó elemző folyamatokat, szűkebb értelemben a biológiai szekvenciaadatok, ill. a 3D szerkezeti információk kezelését és elemzését takarja. A bioinformatika olyan információmenedzselési rendszer a molekuláris biológia számára, amelynek sok gyakorlati alkalmazása van. A bioinformatikai ismeretek terjedésével csökkenhet a tényleges kísérletek elvégzésének lehetősége, mert a folyamatokat különböző módokon szimulálhatjuk.

A bioinformatikai ismeretekhez adatbázisokra van szükség. A feladat többcélú:

- *Adatbázisok* létrehozása és karbantartása, az adatok megszervezése, rendezése és az információhoz való hozzáférésnek, valamint a kiegészítés lehetőségének biztosítása.
- *Eszközök, módszerek kifejlesztése az adatok elemzésére.*

3-2. táblázat. A bioinformatikai adathalmaz jellemzése

Adatforrás	Az adathalmaz nagysága	Bioinformatikai célok
DNS-szekvenciák	12 millió szekvencia, 13 milliárd bázis	a kódoló és nem kódoló régiók elkülönítése az intronok és az exonok azonosítása a géntermékek predikciója igazságügyi elemzések
fehérjeszekvenciák	400 000 szekvencia (egyenként kb. 300 aminosav)	szekvencia-összehasonlítási algoritmusok többszörös szekvenciaillesztő algoritmusok konzerválódott szekvenciamotívumok azonosítása
makromolekuláris szerkezetek	15 000 szerkezet (egyenként kb. 1000 atom koordinátái)	másodlagos és harmadlagos szerkezet jóslása 3D szerkezeteket illesztő algoritmusok fehérjegeometriai mérések felszín, térfogat és alak számítása intermolekuláris kölcsönhatások molekulaszimulációk (energiafüggvény, molekuláris mozgások, dokkolás)
genomok	300 teljes genom (egyenként 1,6 millió–3 milliárd bázis)	az ismétlődések jellemzése szerkezetek hozzárendelése génekhez filogenetikai analízis genomi méretű felmérések (fehérjetartalom jellemzése, anyagcsere-útvonalak), kapcsoltság elemzése egyes betegségek és gének összefüggésének vizsgálatához
génexpressziós adatok	legnagyobb: kb. 20 időpont az élesztő kb. 6000 génjénél	az expressziós mintázatok korrelációjának vizsgálata az expressziós adatok összekapcsolása a szekvencia-, szerkezeti és biokémiai adatokkal
egyéb: anyagcsere-útvonalak		reakcióútvonal-szimulációk

- Az eszközök és módszerek *alkalmazása* az adatok elemzésére, és az *eredmények értelmezése* a biológia szempontjából.

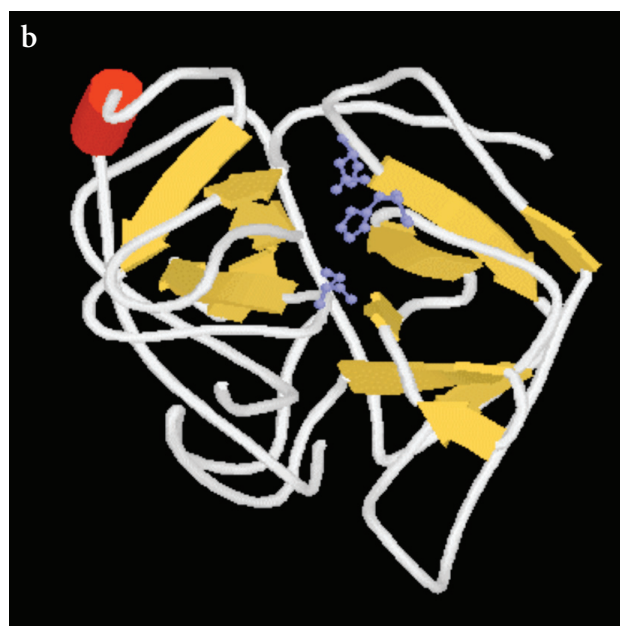
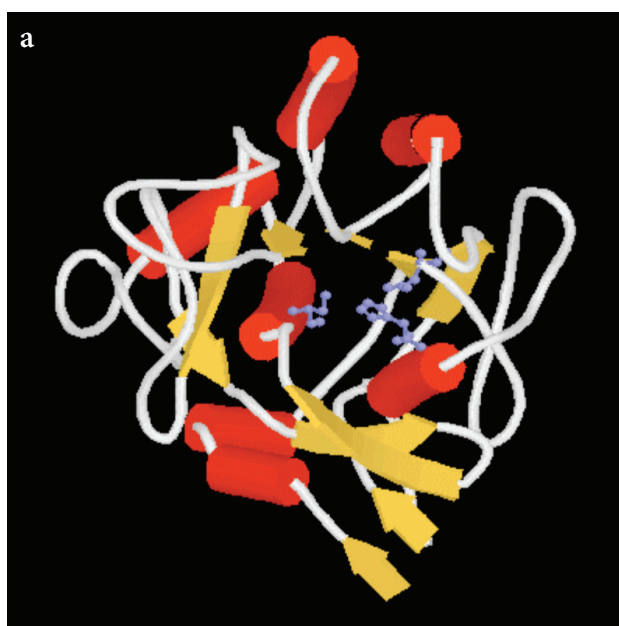
A biológiai információ méretét, forrását és elemzési módszereit a 3-2. táblázat összegzi. Amint az a táblázatból is látható, a bioinformatikai módszerek a genetikai kód és a fehérjeszekvenciák óriási tömegű adatának kezelését végzik, egymással való összefüggéseit keresik. Ennek célja a szekvenciákban kódolt információ megfejtése a térszerkezetek, a funkciók és az evolúciós összefüggések leírásához. Ehhez páronkénti szekvencia-összerendezés, többszörös szekvencia-összerendezés, filogenetikai analízis, nukleotid-szekvenciák analízise, fehérjeszekvenciák analízise, fehérjeszerkezetek elemzése, fehérjék térszerkezetének jóslása útján lehet eljutni.

Az adatok kezelésére elsősorban a *biológiai hasonlóságok alapján való csoportosítás* alkalmas; pl. a genomban található ismétlődő szekvenciareszletek, a funkció (pl. enzimhatás) vagy az anyagcsere-útvonalak szerint csoportosítható gének, a hasonló a szekvenciájú különböző fehérjék vagy a véges számú alapvető fehérjeszerkezet (becslések 1000 és 10 000 közé teszik) összehasonlítása lehetséges.

Mindezek alapján a feladat a mintázatfelismerés és a predikció megfelelő alkalmazása. A *mintázatfelismerés célja* a hasonlóságok megtalálása, a funk-

cióra/szerkezetre jellemző, konzerválódott sajátosságok felismerése a hasonló funkciójú/szerkezetű fehérjék vizsgálata alapján, amelyet aztán felhasználhatunk új szekvenciák funkciójának/szerkezetének azonosítására. A *predikció* a funkció vagy a térszerkezet megjóslása (hasonlóság alapján vagy másképpen). A bioinformatika egyik fő célja a szekvenciából megjósolni a térszerkezetet. Tudjuk, hogy az aminosavsorrend meghatározza a térszerkezetet, de még ma sem értjük, hogyan. Jelenleg csak a másodlagos szerkezet jóslása lehetséges, korlátozott megbízhatósággal.

A bioinformatikai eljárásokban alkalmazott néhány fogalom a következőképpen írható le. A fehérjék homológiájának és analógiájának kérdése evolúciós eredetük szempontjából tárgyalható. Elfogadott állítás, hogy a szekvenciák esetében megjelenő *homológia* megfelel a közös *evolúciós eredetnek*. Két szekvencia vagy homológ, vagy nem, amit nem lehet százalékosan kifejezni (a homológiának nincs mértéke). A két fehérje közötti *analógia* azt jelenti, hogy szerkezetük hasonló, de nincs közöttük szekvenciális hasonlóság, vagy azonosak a katalitikus csoportjaik, de térszerkezetük különböző. Az analógia olyan hasonlóság, amelynek nincs közös evolúciós eredete, valószínűleg az ún. *konvergens evolúció* állhat a háttérben; pl. a szubtilizin és a kimotripszin mindegyike szerin-pro-



3-11. ábra. Vegyületek térszerkezete

a) Szubtilizin, b) Kimotripszin

teáz, azonos His/Asp/Ser katalitikus triáddal, de térszerkezetük teljesen eltérő (3-11. ábra a, b).

A *homológia* két típusa az *ortológia* és a *paralógia*. Két gén *ortológ*, ha két különböző fajban található, és egy közös ősgénből származnak, amely a két faj közös ősében volt jelen. A gének ugyanazt a funkciót szolgálják a két fajban (pl.: a tejsav-dehidrogenáz az emberben és az egérben). Két gén *paralóg*, ha ugyanabban az organizmusban található, és egy közös ősgénből génduplikáció és azt követő divergens evolúció útján alakultak ki. Többnyire különböző, de egymással összefüggésben lévő funkciójuk van (pl. a hisztidinbioszintézis enzimeinek génjei emberben, amelyek nagyon hasonló szerkezetűek, de más-más reakciót katalizálnak).

A bioinformatikai módszerek egyik dimenziója a *fizikai megközelítés*, amely szerint veszünk egy fehérjét, és azt igyekszünk minél mélyebben megérteni (gén-szekvencia–fehérjeszekvencia–térszerkezet–geometria–kötőhelyek–gyógyszertervezés). A másik dimenzióban az informatika segítségével összehasonlításra kerül sor (páronkénti, majd többszörös szekvenciaillesztés, szekvenciamintázatok azonosítása, filogenetikai elemzés, teljes genom elemzése stb).

Az ismert fehérjeszekvenciák és az ismert térszerkezetek számának növekedése nagymértékű, a szekvenciaadatok száma az utóbbi években évente folya-

matosan megduplázódik, emiatt a nagy *információs deficit* miatt nagy szerepe van a bioinformatikának.

A genomprojektek következtében óriási mennyiségű genetikai információ áll rendelkezésre, amelyet a fehérjék vizsgálatára fel lehet használni.

A legfontosabb eljárás a bioinformatikában a *szekvenciaanalízis*, amelynek során egy új (ismeretlen szerkezetű/funkciójú fehérjéhez tartozó) szekvenciahoz próbálunk hasonlót találni a már ismert szerkezetű/funkciójú fehérjék szekvenciái között. Ebben a szekvenciák összerendezése (vagy -illesztése) (alignment) segít. A szekvenciaazonosságot ebben az összerendezésben az azonos aminosavpárok százalékos arányával fejezzük ki. A szekvenciaazonosság csökkenésével a funkció/szerkezet átvihetősége csökken.

A szekvenciaanalízis során számos probléma merülhet fel. Az ortológia és a paralógia bonyolult viszonyai új szekvenciák vizsgálatánál megnehezítik annak eldöntését, hogy a *funkcionális információ mennyire vihető át* az új fehérjére (a talált hasonló szekvencia lehet az ortológ paralógja egy másik organizmusban). Emiatt az automatikus funkció-hozzárendelés sok esetben hibás lehet. A szekvenciahasonlóság sokszor csak a szekvencia egy részére vonatkozik, pl. *moduláris fehérjék* esetében. A moduláris fehérjékben modulok, olyan fehérjedomének található, amelyek cserélhető építőköként szerepelnek. Ezek nem csak génduplikációval, hanem *shuffling* révén is terjednek,

3-3. táblázat. A szekvenciaazonosság mértékének jellemzése

Szekvenciaazonosság (%)	Zóna	Megjegyzés
50–100		biztosra vehető a homológia és a nagyfokú szerkezeti hasonlóság erősen valószínűsíthető az azonos vagy rokon funkció
20–50		biztosra vehető a homológia és a jelentős szerkezeti hasonlóság a funkció feltételezhetően azonos vagy rokon
20 körül	<i>alkonyzóna</i> (<i>twilight zone</i>)	kétségesse válik a homológia és a szerkezeti hasonlóság ekkora hasonlóság véletlenül is kialakulhat, egymással nem rokon fehérjék között is kifinomult módszerek szükségesek a homológia detektálásához a szekvencia sokszor nem elég, térszerkezeti információ is szükségessé válik a rokonság mértékének eldöntéséhez
0–10	<i>éjfélzóna</i> (<i>midnight zone</i>)	esetleg fennállhat funkcionális és szerkezeti hasonlóság a két fehérje között, de ezt a szekvencia alapján nem lehet eldönteni az esetleges rokonságot csak más információk alapján (elsősorban térszerkezet) lehet megállapítani



3-12. ábra. Vegyületek térszerkezete
a) α -laktalbumin, b) Lizozim

funkciójuk változhat attól függően, milyen fehérje részét képezik. Sajnos az evolúció nagyon változatosan használja fel a modulokat, ezért az új szekvenciák kb. egyharmadának egyáltalán nem lehet a funkciójára következtetni az ismert funkciójú fehérjék szekvenciái alapján. S végül a *nagy szekvencia- és szerkezeti hasonlóság* sem jelent mindig funkcionális azonosságot vagy rokonságot. A 3-12. a, b ábra az 50% szekvenciaazonosságú, lényegében azonos térszerkezettel rendelkező α -laktalbumint és lizozimot mutatja, ugyanakkor a két fehérjének teljesen más a funkciója. A lizozim a baktériumok sejtfalát emészt, míg az α -laktalbumin a laktóz-szintáz szabályozófehérjéje.

Összefoglalva a bioinformatikai programok, eljárások, algoritmusok nem végleges, biztos válaszokat adnak, csak segítenek leszűkíteni a lehetőségek körét és kísérleteket tervezni a kérdések eldöntésére. A valódi válaszokat a biológiai háttérismeretek fényében találhatjuk meg.

IRODALOM

- GÁSPÁR A.: Kapilláris zónaelektroforézis. (Jegyzet) Debreceni Egyetem, Debrecen, 2000.
- RIGHETTI, P. G. (ed.): Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology. CRC, Boca Raton, 1996.
- KILÁR, F., VÉGVÁRI, A., MÓD, A.: New setup for capillary isoelectric focusing in uncoated capillaries. *J. Chromatogr.* 813:349–360, 1998.
- KUSTOS, I., ANDRASZALVY, M., KUSTOS I. et al.: Effect of iron restriction on outer membrane protein composition of *Pseudomonas strains* studied by conventional and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 26:3789–3795, 2005.
- SCOTT MACK, CRUZADO-PARK, INGRID, CHAPMAN, J. et al.: A systematic study in CIEF: Defining and optimizing experimental parameters critical to method reproducibility and robustness, *Electrophoresis* 30:4049–4058, 2009.
- ZVELEBIL, MARKETA, BAUM, J. O.: Understanding bioinformatics. Garland Science, New York, 2008.
- Bioinformatikai webhelyek, EMBL, SRS, NCBI (Medline, Genbank, stb.), Expasy, Swissprot, Amos, CCP11 projekt