
PROTEOMSKA ANALIZA STANJA POVEZANIH UZ PATOLOGIJU INTERVERTEBRALNOG DISKA – METODOLOŠKI PRIKAZ

Ruder Novak¹, Lejla Ferhatović-Hamzić¹, Lovorka Grgurević^{1,2}

¹ Centar za translacijska i klinička istraživanja, Odjel za proteomiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

² Zavod za anatomiju "Drago Perović", Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Identifikacija i kvantifikacija proteina u određenom tkivu ili stanici, bitan je korak u razumijevanju fizioloških i patofizioloških promjena organizma. Aminokiselinski slijedovi proteina izravno su povezani s genima koji ih kodiraju te tako predstavljaju vezu između genetike i fiziologije stanice. Proteomskim istraživanjima stoga se dobiva sveobuhvatan uvid u izvršni dio metabolizma stanice i njegove složene metaboličke regulatorne mreže. Ključna tehnika u sveobuhvatnoj analizi staničnog proteoma upravo je spektrometrija masa. Ova metoda razvila se u posljednjih tridesetak godina tijekom kojih je gotovo u potpunosti istisnula iz upotrebe klasično kemijsko ili enzimsko sekvenciranje pojedinačnih proteina. Ovaj trend ubrzan je naglim razvojem genomike koja je širom otvorila vrata tehnologijama visokog probira (engl. high throughput) i opsežnoj analizi bioloških sustava (1). Spektrometrija masa omogućuje istovremeno ispitivanje tisuća izraženih proteina iz jednog uzorka pa zbog toga ima znatne prednosti pred klasičnim molekularno biološkim metodama kojima se ispituju pojedinačni proteini. Iz male količine početnog uzorka, spektrometrijom masa moguće je pouzdano identificirati i kvantificirati proteine, što je značajno u situacijama kada je uzorak teško dostupan, rijedak ili prisutan u malim količinama (2).

Intervertebralna degeneracija diska (IDD) je najčešća bolest povezana sa starenjem, a karakterizira ju postepena degradacija samog diska. Za ovu bolest ne postoje adekvatna terapijska rješenja, dijelom i zbog slabo poznate etiologije bolesti, pa je prijeko potreban razvoj novih dijagnostičkih pristupa. Kako je intervertebralni prostor teško dostupan, tkivo diska je teško prikupiti pa je provedeno svega nekoliko studija koje su povezale gensku sklonost razvoju IDD (3). Međutim, kako se različiti uzroci ove bolesti jednako prezentiraju, postoji velika potreba za identifikacijom proteinskih biomarkera koji bi olakšali njenu kategorizaciju, ispravnu dijagnostiku i terapiju. Babu i sur. su tehnikom spektrometrije masa proteomski profilirali annulus fibrosus

i nucleus pulposus intervertebralnog diska u pacijenata s kroničnom boli donjeg dijela leđa (4). Uzorci intervertebralnog diska prikupljeni su od pacijenata tijekom operacije spinalne fuzije, a tkiva su potom usitnjena te su iz njih izolirani ukupni proteini diska. Proteini su potom elektroforetski razdvojeni po molekulskim masama u frakcije, te su kidani u gelu pomoću peptidaze tripsina. Dobiveni peptidi sekvencirani su spektrometrijom masa te su njihovi aminokiselinski sljedovi uspoređeni in silico s ukupnim humanim proteomom. Konačno, za razlikovne proteine koji se eksprimiraju samo u tkivu annulusa ili nucleusa, napravljena je analiza genske ontologije kako bi se utvrdila njihova povezanost s pojedinim signalnim putovima ili tipovima stanica (5). Upotrebom opisanog eksperimentalnog pristupa, ovim je istraživanjem iz annulus fibrosus detektirano ukupno 759, a iz nucleus pulposus 692 proteina, a njih 118 prisutno je u oba tipa tkiva. Velik broj identificiranih proteina iz teško dostupnog biološkog uzorka jedna je od ključnih prednosti masene spektrometrije kao moderne tehnologije koja omogućava promatranje čitavog sustava u odnosu na analizu pojedinačnih ciljnih molekula.

Literatura

1. Domon B and Aebersold R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. Science. 2006; 312(5771): 212-7.
2. Li S, Plouffe BD, Belov AM, Ray S, Wang X, Murthy SK, et al. An Integrated Platform for Isolation, Processing, and Mass Spectrometry-based Proteomic Profiling of Rare Cells in Whole Blood. Mol Cell Proteomics. 2015;14(6):1672-83.
3. Paasilta P, Lohiniva J, Goring HH, Perala M, Raina SS, Karppinen J, et al. Identification of a novel common genetic risk factor for lumbar disk disease. JAMA. 2001;285(14):1843-9.
4. Sarath Babu N, Krishnan S, Brahmendra Swamy CV, Venkata Subhaiah GP, Gurava Reddy AV, Idris MM. Quantitative proteomic analysis of normal and degenerated human intervertebral disc. Spine J. 2016;16(8):989-1000.
5. The Gene Ontology Consortium, Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. Nucleic Acids Research. 2017;45(D1):D331-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1108>