

Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΣΤΑ ΟΠΩΡΟΦΟΡΑ ΔΕΝΔΡΑ

A. Μολασιώτης & Γ. Διαμαντίδης

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γεωπονική Σχολή, Πανεπιστημιούπολη, 54124 Θεσσαλονίκη

Λέξεις κλειδιά: πρωτέομα, πρωτεομική τεχνολογία, φασματοσκοπία μάζας, βιοπληροφορική

Εισαγωγή

Στη μετα-γενωματική εποχή (post-genomic area) οι ερευνητικές προσπάθειες συγκλίνουν στη μελέτη και στην ανάλυση της λειτουργίας του γονιδιώματος σε ποικίλες συνθήκες. Το νέο αυτό ερευνητικό πεδίο αναφέρεται ως λειτουργική γονιδιωματική (functional genomics). Πρόκειται για την ολιστική προσέγγιση της λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων που στηρίζεται στη γνώση της ταυτότητας του γονιδιώματος (genomics) σε συνδυασμό με την ανάλυση και ταυτοποίηση των mRNAs μορίων (transcriptomics) και των μεταβολιτών (metabolomics) αλλά και την ανάλυση και ταυτοποίηση των πρωτεΐνων (proteomics). Άλλωστε δεν πρέπει να λησμονείται το γεγονός ότι οι πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία ενός οργανισμού «εδρεύουν» στο γονιδιώματος, αλλά ο οργανισμός «ζει» και «λειτουργεί» με εργαλεία τις πρωτεΐνες του, δηλαδή με το πρωτέομά του. Ο όρος πρωτέομα (proteome) προτάθηκε για πρώτη φορά το 1994 και αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεΐνων που καταγράφονται σε μια δεδομένη χρονική στιγμή ως αποτέλεσμα έκφρασης του γονιδιώματος (PROTEins expressed by the genOME) (James, 1997). Επομένως η ανάλυση του πρωτεόματος, ως ένα διακριτό πεδίο ερευνητικής στρατηγικής, με τη βοήθεια εξειδικευμένων τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, ευρείας κλίμακας και υψηλής αξιοπιστίας, στοχεύει στη συστηματική και λεπτομερή ανάλυση του συνόλου των πρωτεΐνων που απαντούν σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή και με δεδομένη μια συνθήκη σε ένα κύτταρο, σε ένα υποκυτταρικό οργανίδιο, σε έναν ιστό ή ακόμη και σε έναν ολόκληρο οργανισμό (Jobet et al., 2011).

Σε σύγκριση με το γονιδιώμα, το πρωτέομα είναι πολυπλοκότερο καθώς αυτό μεταβάλλεται χρονικά (π.χ. βλαστικό στάδιο) και τοπικά (π.χ. ρίζα ή φύλλα) αλλά και σε απάντηση ποικίλων περιβαλλοντικών συνθηκών. Η πολυπλοκότητα του πρωτεόματος αυξάνεται ακόμη περισσότερο εξαιτίας του εναλλακτικού ματίσματος αλλά και των ποικίλων μετα-μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ., φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακετυλίωση, οξειδοαναγωγική κατάσταση, κ.ά.), γεγονός που καθιστά ιδιαιτέρως κοπιώδη και δυσχερή την ανάλυσή του (Gupta et al., 2007, Muller et al., 2007, Qinet et al., 2009; Ytterberg & Jensen, 2010). Παρόλα αυτά με τη βελτιστοποίηση της χρησιμοποιούμενης τεχνολογίας, τη δημιουργία εξειδικευμένων βάσεων δεδομένων και λογισμικών προγραμμάτων (bioinformatics) καθώς και την πλήρη ταυτοποίηση του γονιδιώματος πολλών φυτικών ειδών, μεταξύ των οπίων των τριών πρότυπων φυτών, της *Arabidopsis thaliana*, της *Oryza sativa* και του *Medicago truncatula*, τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης αποκτούν αξιοπιστία και ποιότητα καθώς και

ανεπανάληπτη χρηστικότητα για την κατανόηση της σύνδεσης μεταξύ του γονιδιώματος και του φαινότυπου (Agrawal et al., 2011).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται βαθμαία όλο και πιο κατανοητό ότι είναι απαραίτητη η χρήση της πρωτεομικής ανάλυσης και ειδικότερα της συγκριτικής πρωτεομικής¹ στην προσπάθεια κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών που διέπουν τη λειτουργία των πολυετών φυτών, όπως για παράδειγμα τα οπωροφόρα δένδρα (Crowhurst et al., 2008). Μέχρι σήμερα, αν και ο αριθμός των σχετικών πρωτεομικών εργασιών είναι περιορισμένος σε σύγκριση με αντίστοιχες τρανσκριπτομικές μελέτες, έχει προσδιοριστεί το πρωτέομα διαφόρων ιστών οπωροφόρων δένδρων κυρίως ως απόκριση σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων καθώς και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Rose & Saladié, 2005, Wisniewski et al., 2009, Palma et al., 2011). Μεταξύ των οπωροφόρων δένδρων η πρωτεομική ανάλυση εστιάζεται κυρίως στη μηλιά (Caoet et al., 2011), στην αχλαδιά (Pedreschi et al., 2008), στη ροδακινιά (Qinet et al., 2009, Niloet et al., 2011), στη φράουλα (Biancoet et al., 2009) και στα εσπεριδοειδή (Muccilliet et al., 2009, Tanou et al., 2009). Με βάση αυτή την ερευνητική προσπάθεια έχει δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων στην οποία περιέχονται πληροφορίες που σχετίζονται με το όνομα των πρωτεϊνών των παραπάνω δενδροκομικών ειδών, οι λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες αυτές ανήκουν και ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλονται ως απόκριση στην αλατότητα (Zhang, 2012). Για παράδειγμα στην περίπτωση της νεραντζιάς (*Citrus aurantium* L.) οι μεταβολές του πρωτεόματος της σε συνθήκες αιχμημένης αλατότητας μπορεί να περιγράψει μεταβολές της έκφρασης του γονιδιώματος και έτσι να οδηγήσει στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών που συνδέονται άμεσα με την ικανότητα και το βαθμό εγκλιματισμού του συγκεκριμένου γονιδιώματος σε συνθήκες καταπόνησης (Tanou et al., 2009). Ένας λοιπόν από τους κύριους στόχους της πρωτεομικής ανάλυσης είναι η ταυτοποίηση πρωτεΐνης-βιοδείκτη εγκλιματισμού (και άρα τη ταυτοποίηση του αντίστοιχου αλληλόμορφου γονιδίου) στην καταπόνηση που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί π.χ. από τους γενετιστές στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις ερευνητικές ομάδες που ασχολούνται με τη χρήση της πρωτεομικής ανάλυσης στην επιστήμη της Δενδροκομίας αποτελεί επίσης η μελέτη της ωρίμανσης των καρπών αλλά και η μετασυλλεκτική ζωή τους, καθώς εκτιμάται ότι η κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν το γηρασμό των καρπών και εν τέλει την ποιότητά τους συνδέονται άμεσα με την παραγωγική διαδικασία και την ανθρώπινη υγεία (Hertoget et al., 2011). Προς την κατεύθυνση αυτή είναι σημαντική η προσπέλαση των τεχνικών δυσκολιών και η εφαρμογή της

¹Η συγκριτική πρωτεομική ανάλυση (differential-expression proteomics) στηρίζεται στη σύγκριση διαφορετικών πρωτεομάτων, για παράδειγμα στη σύγκριση του πρωτεόματος ενός μάρτυρα και του αντίστοιχου πρωτεόματος που προέκυψε ως απόκριση σε μια καταπόνηση. Σε άλλες περιπτώσεις αφορά στη σύγκριση του πρωτεόματος δύο διαφορετικών φαινοτύπων του ίδιου είδους ή δύο διαφορετικών ειδών με τελείως διαφορετική συμπεριφορά σε σχέση με μια δεδομένη συνθήκη καταπόνησης

πρωτεομικής ανάλυσης σε όσο το δυνατόν περισσότερα είδη καρπών και ιδιαίτερα αυτών που χαρακτηρίζονται από υψηλή οικονομική και διατροφική αξία (Palma et al., 2011). Για παράδειγμα ο πρωτεϊνικός χάρτης του καρπού της ακτινιδιάς (*Actinidia deliciosa* ποικ. 'Hayward'), ταυτοποιήθηκε πρόσφατα παρά την περιορισμένη γενομική υποστήριξη (μόνο το 19% των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών προήλθε από το γένος *Actinidia*) συμβάλλοντας αφενός στη κατανόηση της φυσιολογίας του καρπού ακτινιδιάς και αφετέρου στον εμπλουτισμό της σχετικής βάσης δεδομένων Uniprot/Swiss-prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=kiwi&sort=score>) (Minas et al., 2011).

Με δεδομένο ότι, όπως ήδη αναφέρθηκε, η δράση της κάθε πρωτεΐνης εξαρτάται από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της (κυρίως φωσφορυλώσεις και μεταβολές της σειριδοαναγωγικής κατάστασης), είναι αναγκαίο η πρωτεομική ανάλυση να προσανατολιστεί στη

λεπτομερέστερη ταυτοποίηση αυτών των τροποποιήσεων (phosphoproteomics και redoxproteomics) (Gupta, et al., 2007, Muller et al., 2007, Qinet et al., 2009, Ytterberg & Jensen, 2010). Επειδή η δράση κάθε πρωτεΐνης εξαρτάται και από την ταυτότητα των άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται γεγονός που εξαρτάται και από τη θέση της στο κύτταρο (πυρήνας, μιτοχόνδριο, χλωροπλάστης, κυτταρικό τοίχωμα, μεμβράνες) είναι αναγκαίο η πρωτεομική ανάλυση να στοχεύει επιπρόσθετα στο πρωτέομα των υποκυτταρικών οργανιδίων (organelle proteome) (Blackstock & Weir, 1999, Hossain et al., 2012). Σε κάθε περίπτωση και προκειμένου η πρωτεομική ανάλυση να συνεισφέρει στην ολιστική κατανόηση της λειτουργίας ενός βιολογικού συστήματος σε μια δεδομένη συνθήκη, θα πρέπει να επιδιώκεται ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων της με μεταβολές της ποιότητας και ποσότητας των mRNAs μορίων καθώς και με μεταβολές στη σύσταση των μεταβολιτών (Rogerset et al., 2008).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1. Προετοιμασία δείγματος

Η καλή προετοιμασία του δείγματος αποτελεί το καθοριστικό βήμα για ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα πρωτεομικής ανάλυσης. Στόχος είναι η παραλαβή σε καθαρή κατάσταση του μέγιστου αριθμού των πρωτεϊνών από ένα φυτικό ιστό στο μικρότερο δυνατό χρόνο και με το μικρότερο δυνατό αριθμό παρεμβάσεων. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται η λειτουργία μέσα σε υγρό άζωτο του φυτικού ιστού και η μετατροπή του σε μια εξαιρετικά λεπτόκοκκη ξηρή σκόνη. Αν και έχουν προταθεί αρκετά πρωτόκολλα εκχύλισης τα περισσότερα δημοφιλή είναι αυτά που χρησιμοποιούν το τριχλωροξικό οξύ (TCA) και την ακετόνη για την άμεση καταβύθιση/ιζηματοποίηση των πρωτεϊνών από ένα δεδομένο φυτικό υλικό. Με τη χρήση αυτών των δύο αντιδραστηρίων ταυτοχρόνως επιτυγχάνεται η αδρανοποίηση π.χ. των πρωτεασών που υδρολύουν τις πρωτεΐνες και η απομάκρυνση ποικίλων άλλων ουσιών που μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στα επόμενα βήματα της ανάλυσης (π.χ., άλατα, πολυφαινόλες, χρωστικές). Ωστόσο διαπιστώνονται προβλήματα στην επανάδιαλυτοποίηση των πρωτεϊνών γεγονός που οδηγεί σε σημαντικές απώλειες. Για να ξεπεραστεί αυτό σύμφωνα με ένα άλλο δημοφιλές πρωτόκολλο οι πρωτεΐνες διαλυτοποιούνταις ενα πρώτο στάδιο σε φαινόλη και στη συνέχεια καταβυθίζονται με τη χρήση οξικού αμμωνίου και μεθανόλης. Στην περίπτωση δύσχρηστων ιστών, όπως π.χ., τα φύλλα της ελιάς, ο συνδυασμός των δύο παραπάνω πρωτόκολλων, χρήση TCA/ακετόνης και φαινόλης, βελτιστοποιεί την εκχύλιση και επιτυγχάνεται η παραλαβή ικανοποιητικών ποσοτήτων πρωτεϊνών (Rose & Saladii, 2005).

1. Ηλεκτροφόρηση (IEF και 2DE)

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων σε 1^η και 2^η διάσταση με στόχο την κλασμάτωση και διαχωρισμό των πρωτεϊνών αποτελεί τη βάση της πρωτεομικής ανάλυσης και ένα από τους κύριους πυλώνες της συγκεκριμένης τεχνολογίας. Σε πρώτο στάδιο οι πρωτεΐνες του παρασκευάσματος διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (Isoelectric Focusing, IEF) και ακολουθεί ο διαχωρισμός τους με βάση τη μοριακή τους μάζα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS (SDS-PAGE). Η εμπορική διάθεση ταινιών με σταθερή διαβάθμιση τιμών pH (Immobilized pH gradient strips) συνετέλεσε σημαντικά στην εξάπλωση της πρωτεομικής τεχνολογίας.

Μετά την ηλεκτροφόρηση 2^{ης} διάστασης (2DE), για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών με μορφή κηλίδων στην πηκτή πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται το Coomassie brilliant blue (CBB) (Εικ. 1) ή ο νιτρικός άργυρος. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο αυτές οι κλασικές βαφές ανήνευσης των πρωτεϊνών στην πηκτή αντικαθίστανται με φθορίζουσες βαφές διότι με τη χρήση τους αυξάνεται σημαντικά η ευαισθησία της οπτικοποίησης, η ποσοτικοποίηση είναι ευχερής για μια μεγάλη σχετικώς ζώνη συγκέντρωσης, ενώ η χρήση τους είναι συμβατή και δεν δημιουργεί προβλήματα στα στάδια της ανάλυσης που έπονται. Η ανήνευση και οπτικοποίηση των πρωτεϊνών στην πηκτή είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση αντισωμάτων (τεχνική ELISA) στο βαθμό που διατίθενται στο εμπόριο τα αντίστοιχα αντιδραστήρια και ο ερευνητικός στόχος δεν είναι η διερεύνηση του συνολικού πρωτεόματος αλλά μιας εξειδικευμένης υποομάδας του, π.χ. οι καρβονυλιωμένες/οξειδωμένες πρωτεΐνες (oxyproteome ή redox proteome). Στη συνέχεια τα ηλεκτροφορήματα της 2^{ης} διάστασης επεξεργάζονται με κατάλληλα προγράμματα ηλεκτρονικού υπολογιστή, γεγονός που επιτρέπει τη σχετική ποσοτικοποίηση των κηλίδων και τη λήψη απόφασης για την επιλογή εκείνων των κηλίδων πρωτεϊνών που εκτιμάται ότι θα πρέπει να προσδιοριστεί η ταυτότητά τους (Blackstock & Weir, 1999). Η παραλαβή των κηλίδων πραγματοποιείται είτε χειρωνακτικά ή με τη βοήθεια αυτόματων δειγματοληπτών (robots) (Ytterberg, & Jensen, 2010).

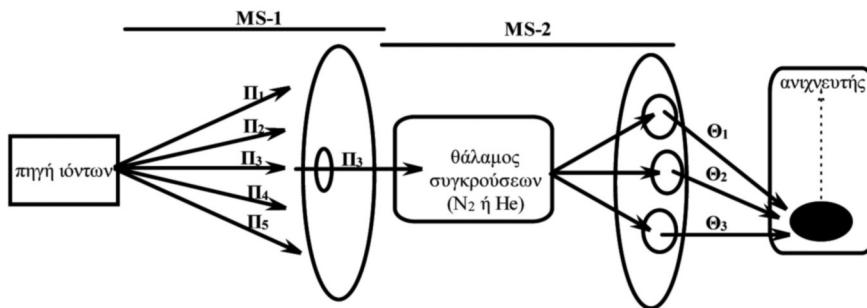


Εικ. 1 Οπτικοποίηση των πρωτεϊνών των φυλλών νεραντζιάς στην πηκτή πολυακρυλαμίδης μετά από δισδιάσταση ηλεκτροφόρηση και χρώση με CBB. Κάθε κηλίδα με μεγάλη πιθανότητα αντιπροσωπεύει μια και μοναδική πολυπεπτιδική αλυσίδα (Tapanou et al., 2007).

2. Φασματοσκοπία μάζας (Mass spectrometry, MS)

Ο δεύτερος πυλώνας της πρωτεομικής ανάλυσης είναι η φασματοσκοπία μάζας (MS). Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική με την οποία ίόντα μιας αέριας φάσης διαχωρίζονται/κλασματώνονται με βάση την τιμή του λόγου μάζα προς ηλεκτρικό φορτίο (m/z). Επομένως ο απαραίτητος τεχνολογικός εξοπλισμός αποτελείται από μια συσκευή παραγωγής ιόντων, μια συσκευή ανάλυσης που με τη βοήθεια μεταβαλλόμενων ηλεκτρομαγνητικών πεδίων διαχωρίζει τα ίόντα με βάση την τιμή m/z (αναλυτής μάζών) και έναν ανιχνευτή που καταγράφει και παρέχει τα αναγκαία δεδομένα για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κάθε ιόντος (π.χ. η συσκευή Time of Flight, TOF) και την αποτύπωση του φάσματος μάζών (mass spectrum). Στην περίπτωση της ανάλυσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται δύο τεχνικές ιοντισμού: ο ιοντισμός ηλεκτροδιαστοράς (ESI) και η τεχνική MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Με τις τεχνικές αυτές είναι δυνατόν να ιοντιστούν ολόκληρα πρωτεϊνικά μόρια ή ολιγοπεπτίδια (6 έως και 25 αμινοξέων), τα οποία στη συνέχεια εισέρχονται στον αναλυτή μάζας. Σε μια από τις εναλλακτικές στρατηγικές ταυτοποίησης μιας άγνωστης πρωτεΐνης με χρήση της MS, η πρωτεΐνη που παραλαμβάνεται από την πηκτή της 2DE υπόκειται σε πρωτεόλυση με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων (π.χ.

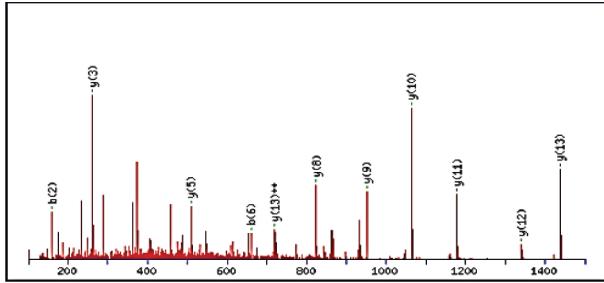
την τρυψίνη ή την πεψίνη) ή χημικών αντιδραστηρίων (π.χ., CNBr). Στο επόμενο βήμα ανάλυσης τα πεπτίδια που προκύπτουν, κλασματώνονται με την τεχνική HPLC (High Performance Liquid Chromatography) και ακολουθεί ο ιοντισμός τους με την τεχνική της ηλεκτροδιαστοράς (ESI) κατά την οποία ο διαλύτης έκλουσης της στήλης HPLC ψεκάζεται διαμέσου ενός τριχοειδούς σωλήνα σε ένα θάλαμο όπου το ηλεκτρικό πεδίο διατηρείται σε υψηλές τιμές (περίπου 4000 V) και όπου εξαερώνεται ο διαλύτης έκλουσης εγκαταλείποντας στο θάλαμο θετικώς φορτισμένα πεπτίδια σε αέρια μορφή. Στη συνέχεια τα πεπτίδια εισέρχονται στον αναλυτή μάζας (1^o φασματοσκόπιο, MS-1), όπου με τη ρύθμιση των συνθηκών λειτουργίας του (ελεγχόμενη μεταβολή του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου) επιτυγχάνεται η επιλογή ενός μόνου είδους πεπτίδου που οδηγείται σε ένα δεύτερο αναλυτή μάζας (MS-2). Στο 2^o MS το πεπτίδιο συγκρούεται με τα άτομα ενός αδρανούς αερίου (He ή N_2) και διασπάται κάθε φορά ένας μόνον πεπτιδικός δεσμός, αλλά κάθε φορά σε διαφορετική θέση, ώστε από το αρχικό πεπτίδιο να προκύπτουν πάντοτε μόνον δύο θραύσματα, ένα μόνον από τα οποία φέρει θετικό ηλεκτρικό φορτίο, ενώ το άλλο παραμένει ηλεκτρικώς ουδέτερο. Έτσι στο τέλος αυτής της διαδικασίας παράγονται πεπτίδια που διαφέρουν μεταξύ τους μόνον κατά ένα αμινοξέον και άρα με διαφορετικές τιμές του λόγου m/z .



Εικ. 2 Μετά την υδρόλυση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (της πρωτεΐνης), τα πεπτίδια με τη βοήθεια μιας πηγής ιόντων, για παράδειγμα της συσκευής ηλεκτροδιαστοράς και ιοντισμού (ESI), εξαερώνονται και ταυτόχρονα ιοντίζονται (Π_1, Π_2, \dots), και στη συνέχεια εισέρχονται στον πρώτο αναλυτή μάζας (MS-1). Εκεί διαχωρίζονται με βάση την τιμή του λόγου τους m/z . Ένα από αυτά (στην εικόνα το Π_3) επιλέγεται και εισέρχεται στο δεύτερο αναλυτή (MS-2) όπου διασπάται κάθε φορά ένας μόνον πεπτιδικός δεσμός και σε διαφορετική θέσηση δύο θραύσματα ($\Theta_1, \Theta_2, \dots$), καθώς αυτό συγκρούεται με τα άτομα ενός αδρανούς αερίου που απαντούν στη συσκευή. Τα θραύσματα διαχωρίζονται με βάση την τιμή του λόγου τους m/z και κάθε φορά επιτρέπεται να διαφύγουν από τη συσκευή μόνον θραύσματα με συγκεκριμένη τιμή του λόγου m/z και να εισέλθουν στον ανιχνευτή (κατά κανόνα στη συσκευή TOF, για λεπτομέρειες, βλέπε κείμενο).

Οι συνθήκες του MS-2 ρυθμίζονται ώστε να επιλεγούν μόνον εκείνα τα θραύσματα που προέρχονται από τη διαδοχική διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο (ή μόνον θραύσματα του καρβοξυλικού άκρου). Στη συνέχεια τα ιοντισμένα θραύσματα εξέρχονται από τη συσκευή και εισέρχονται στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής καταγράφει το χρόνο που απαιτείται για να διανύσει ένα θραύσμα μια συγκεκριμένη απόσταση (Time Of Flight, TOF) καθώς αυτό προσπίπτει και στη συνέχεια ανακλάται από μια επιφάνεια με ισχυρό θετικό ηλεκτρικό φορτίο. Εξαιτίας της διαφορετικής μάζας του κάθε θραύσματος, σε μια τέτοια διάταξη ροής ο χρόνος «πετάγματος» από τον ανακλαστήρα ως τον ανιχνευτή είναι ανάλογος της μάζας του πεπτίδου: το θραύσμα με την μικρότερη μοριακή μάζα (π.χ., ένα αμινοξέον) θα διανύσει την απόσταση στο μικρότερο δυνατό χρόνο, ενώ το θραύσμα (π.χ. ολόκληρο το πεπτίδιο) θα απαιτήσει πολύ περισσό-

τερο χρόνο για να διανύσει την ίδια απόσταση και άρα θα καταγραφεί τελευταίο. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα αποτυπώνονται σε σύστημα ορθογωνίων αξόνων και συνιστούν το φάσμα μάζας (mass spectrum, ποσότητα θραύσματος vs τιμή μάζας). Συγκρίνοντας τις μοριακές μάζες δύο διαδοχικών θραύσμάτων είναι ευχερής η ταυτοποίηση του αμινοξέος στο οποίο άλλωστε οφείλεται η διαφορά μάζας μεταξύ των δύο θραύσμάτων (κατά συνέπεια συγκρίνοντας αλληλοδιάδοχες κορυφές του φάσματος μάζων όχι μόνον ταυτοποιούνται τα αμινοξέα, αλλά καθορίζεται και η αλληλουχία τους στο πεπτίδιο). Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι οι μοριακές μάζες των πρωτεΐνικών αμινοξέων είναι διαφορετικές (με εξαίρεση τα δύο ισομερή αμινοξέα, λευκίνη και ισολευκίνη με ταυτόσημη μοριακή μάζα). Για παράδειγμα εάν η διαφορά μοριακής μάζας μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών του φάσματος μάζας ισούται με 101, τότε πρόκειται για το αμινοξέον θρεονίνη.



Εικ. 3 Φάσμα μάζας. Κάθε κορυφή περιγράφει μια μοριακή οντότητα (ένα πεπτίδιο) και ορίζεται από τη σχετική πυκνότητα (κατακόρυφος άξονας) και την τιμή της μάζας (οριζόντιος άξονας).

Στις παραπάνω γραμμές στην πραγματικότητα έχει περιγραφεί μια μεθοδολογία ανάλυσης ενός ολιγοπεπτίδου που συνοπτικά αναφέρεται ως 2DE-LC-ESI-MS/MS-TOF. Ταυτόχρονα με τη μεθοδολογία αυτή η φασματοσκοπία μάζας και στο βαθμό που αναλύεται το σύνολο των πεπτίδων που προκύπτουν από την πρωτεόλυση μιας πρωτεΐνης, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην *de novo* αλληλούχιση των αμινοξέων των πρωτεΐνων.

3. Βιοπληροφορική (Bioinformatics)

Το επόμενο βήμα της πρωτεομικής ανάλυσης είναι η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της άγνωστης πρωτεΐνης, της οποίας έχει ταυτοποιηθεί ένα πεπτίδιο (ή μικρός αριθμός πεπτίδων). Αυτό επιτυγχάνεται με την αναζήτηση ταυτόσημων αλληλουχιών αμινοξέων σε εξειδικευμένη βάση δεδομένων πρωτεΐνικών αλληλουχιών (UniProtKB/Swiss-Prot) με τη βοήθεια κατάλληλων

λογισμικών προγραμμάτων (π.χ. MASCOT, ProteinProspector)² (Ishihama et al., 2005). Η πρόσβαση στα δεδομένα της βάσης UniProtKB/Swiss-Prot είναι ελεύθερη διαμέσου του διαδικτύου και σε αυτήν αποθηκεύονται πρωτεϊνικές αλληλουχίες που κατά ένα πολύ μεγάλο ποσοστό προέρχονται από τη μετάφραση ταυτοποιημένων γονιδίων ή τμημάτων τους (EST) και κατά το υπόλοιπο ποσοστό αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν άμεσα με τη μέθοδο Edman (EDMAN degradation) ή με φασματοσκοπία μάζας. Πολλές φορές η αλληλουχία ενός μόνου πεπτίδου είναι αρκετή για να ταυτοποιηθεί η γονική πρωτεΐνη του πεπτίδου ή η ομόλογός της πρωτεΐνη ενός άλλου είδους οργανισμού. Για την αξιοπιστία και την αποδοχή του αποτελέσματος κατά κανόνα απαιτείται η διερεύνηση της βάσης αλληλουχιών ως προς την αλληλουχία τουλάχιστον τεσσάρων πεπτίδων προερχόμενων από την ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα (Εικ. 4).

```

1 MASRLLLASL LRQSAQRGGG LISRSLGNISI PKSASRASSR ASPKGFLINR
51 AVQYATSAAA PASQPSTPPK SGSEPSGKIT DEFTGAGSIG KVCQVIGAVV
101 DVRFDeglpp ILTALEVLQN QIRIVLEVQAQ HLGENMVRTI AMDGTEGLVR
151 GQRVINTGSP ITVPVGRATL GRIINVIGEA IDERGPIITD HFLPIHREAP
201 AFVEQATEQQ ILVTGIKVVD LLAPYQORGK ICGLPGGAGVG KTVLIMELIN
251 NVAKAHGGFS VFAGVGERTR EGNDLYREMI ESGVKLGEK QSESKCALVY
301 GQMNEPPGAR ARVGLTGLTV AEHFRDAEGQ DVLLFIDNIF RFTQANSEVS
351 ALLGRIPSAV GYQPTLATDL GGLQERITT KKGSITSVQA IYVPADDLTD
401 PAPATFAHL DATTVLSRQI SELGIYPAVD PLDSTSRLMS PHILGEDHYN
451 TARGVQKVQLQ NYKNLQDIIIA ILGMDELS EDKMTVARARK IQRFLSQPFH
501 VAEVFTGAPK KYVDILKESIN SFQGVLDGKY DLLSEQSFYM VGGIDEVIAK
551 AEKIAKESAA

```

Εικ. 4 Το αποτέλεσμα με το λογισμικό Mascot της διερεύνησης της βάσης δεδομένων ως προς την ταυτότητα τεσσάρων πεπτίδων της άγνωστης πρωτεΐνης που αναλύθηκαν με MS/MS. Σε πλαίσιο οι τέσσερις αλληλουχίες αμινοξέων (οριζόμενα με ένα γράμμα) της γνωστής πρωτεΐνης της βάσης που είναι ταυτόσημες με την αλληλουχία αμινοξέων τεσσάρων πρωτεολυτικών πεπτίδων της άγνωστης πρωτεΐνης.

Μια άλλη τεχνική ταυτοποίησης μιας πρωτεΐνης είναι η αποκαλούμενη τεχνική αποτυπώματος μάζας πεπτίδων (Peptide mass fingerprint). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται μόνον ένας αναλυτής μάζας των πεπτίδων που προκύπτουν από την πρωτεόλυση μιας άγνωστης πρωτεΐνης και τα δεδομένα μετά από την καταγραφή της μάζας τους, το φάσμα μάζας τους χρη-

σιμοποιείται στη διερεύνηση εξειδικευμένων βάσεων δεδομένων που περιέχουν φάσματα μάζας πεπτίδων που προέκυψαν από την πρωτεόλυση γνωστών πρωτεΐνων και αναλύθηκαν με την ίδια τεχνική. Η άγνωστη πρωτεΐνη ταυτίζεται με τη γνωστή στην περίπτωση της ταυτότητας των δύο φασμάτων μάζας (Pappin et al., 1993).

²Στον ιστότοπο www.expasy.org/proteomics έχουν συγκεντρωθεί οι διαδικτυακές διευθύνσεις των διαθέσιμων και απαραίτητων βάσεων δεδομένων για την πρωτεομική ανάλυση και στον ιστότοπο www.expasy.org/tools διατίθενται τα λογισμικά προγράμματα με τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν τα αποτελέσματα της MS/MS ανάλυσης διερευνώντας τις βάσεις δεδομένων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrawal, G.K., Job, D., Zivy, M., Agrawal, V.P., Bradshaw, R.A., Dunn, M.J., Haynes, P.A., van Wijk, K.J., Kikuchi, S., Renaut, J., Weckwerth, W. and Rakwal, R. 2011. Time to articulate a vision for the future of plant proteomics-A global perspective: An initiative for establishing the international plant proteomics organization (INPPO). *Proteomics* 11:1559-1568.
- Bianco, L., Lopez, L., Scalone, A.G., Di Carli, M., Desiderio, A., Benvenutom E. and Perrotta, G. 2009. Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. *J. Proteomics* 72:586-607.
- Blackstock, W.P. and Weir, M.P. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17: 121-7
- Cao, X., Gao, Y., Wang, Y., Li, C.M., Zhao, Y.B., Han, Z.H., Zhang, X.Z. 2011. Differential expression and modification of proteins during ontogenesis in *Malus domestica*. *Proteomics* 11:4688-4701.
- Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., MacRae, E.A., Ampomah-Dwamena, C., Atkinson, R.G., Beuning, L.L., Bulley, S.M., Chagne, D., Marsh, K.B., Matich, A.J., et al. 2008. Analysis of expressed sequence tags from *Actinidia*: applications of a cross species EST database for gene discovery in the areas of flavor, health, color and ripening. *BMC Genomics* 9:351
- Gupta, N., Tanner, S., Jaitly, N., Adkins, J.N., Lipton, M., Edwards, R., Romine, M., Osterman, A., Bafna V., Smith R.D., et al. 2007. Whole proteome analysis of post-translational modifications: Applications of mass-spectrometry for proteogenomic annotation. *Genome Res.* 17:1362-1377.
- Hertog, M., Rudell, D.R., Pedreschi, R., Schaffer, R.J., Geeraerd, A.H., Nicolao, B.M. and Ferguson, I. 2011. Where systems biology meets postharvest. *Postharvest Biol. Tech.* doi:10.1016/j.postharvbio.2011.05.007
- Hossain, Z., Nouri, M.-Z. and Komatsu, S. 2012. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. *J. Proteome Res.* 11:37-48.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappaport, J. and Mann, M. 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell Proteomics* 4:1265-1272.
- James, P. 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quart Rev. Biophys.* 30:279-331.
- Job, D., Haynes, P.A. and Zivy, M. 2011. Plant proteomics. *Proteomics* 11:1557-1558.
- Minas, I.S., Tanou, G., Belghazi, M., Job, D., Manganaris, G.A., Molassiotis, A. and Vasilakakis, M. 2012. Physiological and proteomic approaches to address the active role of ozone in kiwifruit post-harvest ripening. *J. Exp. Bot.* 63:2449-2464.
- Muller, I.M., Jensen, P.E. and Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459-481.
- Muccilli, V., Licciardello, C., Fontanini, D., Russo, M.P., Cunsolo, V., Saletti, R., Reforgiato, R.G. and Foti, S. 2009. Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *J. Proteomics* 73:134-152.
- Nilo, R., Saffie, C., Lilley, K., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., Gonzalez, M., Meisel, L.A., Retaimales, J., Silva, H., et al. 2010. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics* 11:43
- Palma, J.M., Corpas, F.J. and del Rvo, L.A. 2011. Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *J. Proteomics* 74: 1230-1243.
- Pappin, D.J., Hojrup, P. and Bleasby, A.J. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3:327-332.
- Pedreschi, R., Hertog, M., Robben, J., Noben, J-P. and Nicolao, B. 2008. Physiological implications of controlled atmosphere storage of 'Conference' pears (*Pyrus communis* L.): A proteomic approach. *Postharvest Biol. Technol.* 50:110-111.
- Qin, G., Wang, Q., Liu, J., Li, B. and Tian, S. 2009. Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during fruit senescence. *Proteomics* 9:4241-4253.
- Rogers, S., Girolami, M., Kolch, W., Waters, K.M., Liu, T., Thrall, B. and Wiley, H.S. 2008. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics* 24:2894-2900.
- Rose, J.K.C. and Saladié, M. 2005. Proteomic analysis and fruit ripening. Proc .5th Int. Postharvest Symp. 211 Eds. F. Mencarelli and P. Tonutti Acta Hort. 682.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A. and Job, D. 2009. Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J.* 60:795-780.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Macarisin, D., Norelli, J., Artlip, T. and Korban, T.S. 2009. Transcriptomic and proteomic response of fruit trees to abiotic stress. Proc. 1st IS on Biotechnol. of Fruit Species Eds.: M.-V. Hanke et al. *Acta Hort.* 83
- Ytterberg, A.J. and Jensen, O.N. 2010. Modification-specific proteomics in plant biology. *J. Proteomics* 73:2249-2266.
- Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y. and Dai, S. 2012. Mechanisms of plant salt response: Insights from proteomics. *J. Proteome Res.* 11:49-67.