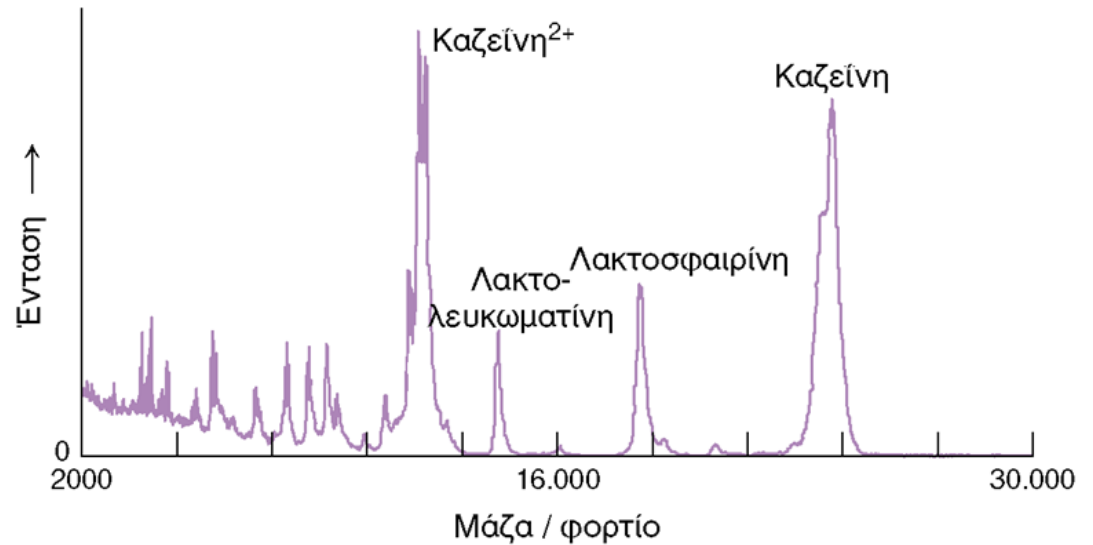
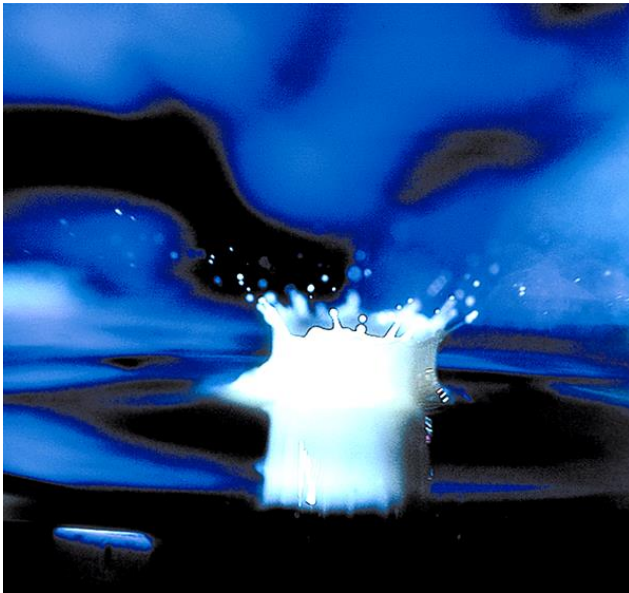


ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ



ΣΤΟΧΟΙ:

■ **ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ αα**

■ **ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ**

■ **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ**

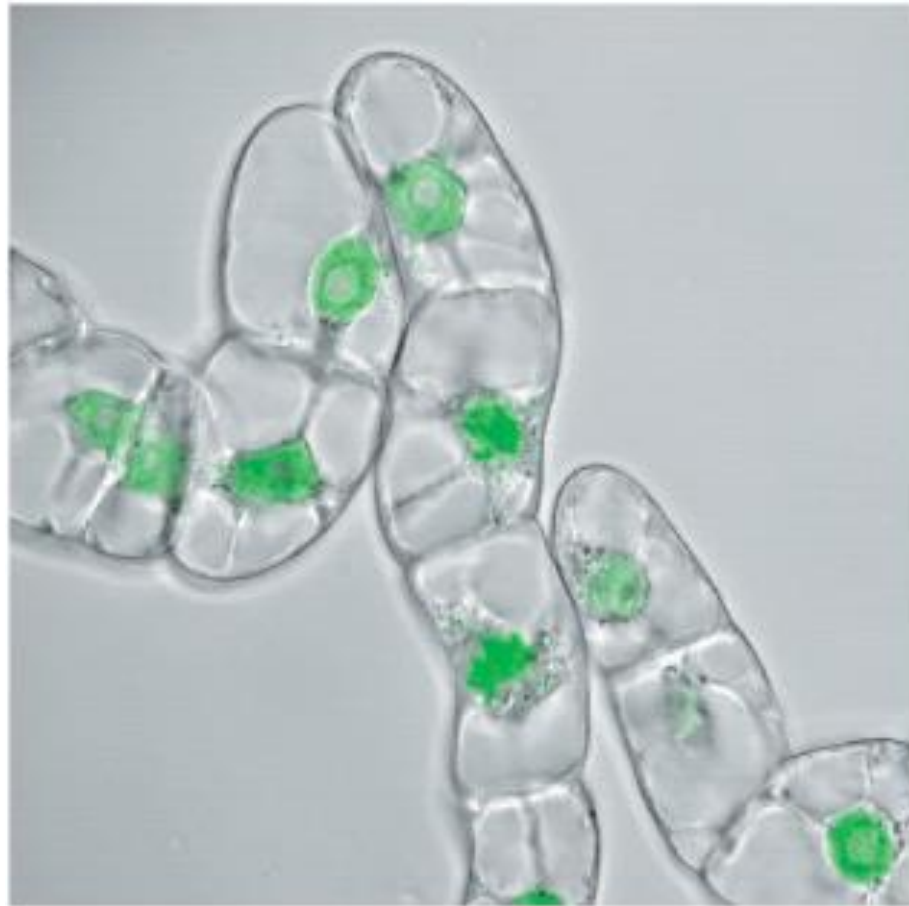
■ ΣΤΑΔΙΑ

1. Απομόνωση (με βάση διαλυτότητα, μέγεθος, φορτίο, ικανότητα σύνδεσης)
2. Προσδιορισμός αλληλουχίας αα (ανασυνδυασμένο DNA, peptide sequence)
→ λειτουργία
3. Φυσιολογία πρωτεΐνης (θέση, συγκέντρωση) μονοκλωνικά αντισώματα
4. Επίλυση τρισδιάστατης δομής (περίθλαση ακτίνων Χ, NMR, CD κλπ)

Ο όρος **πρωτέωμα** προέρχεται από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο γονιδίωμα

γενομική → πλήθος πληροφοριών που *μπορούν* να εκφραστούν
πρωτεομική → πλήθος πληροφοριών που είναι λειτουργικά *παρούσες*

Απομόνωση κυττάρων και ανάπτυξη τους σε καλλιέργεια

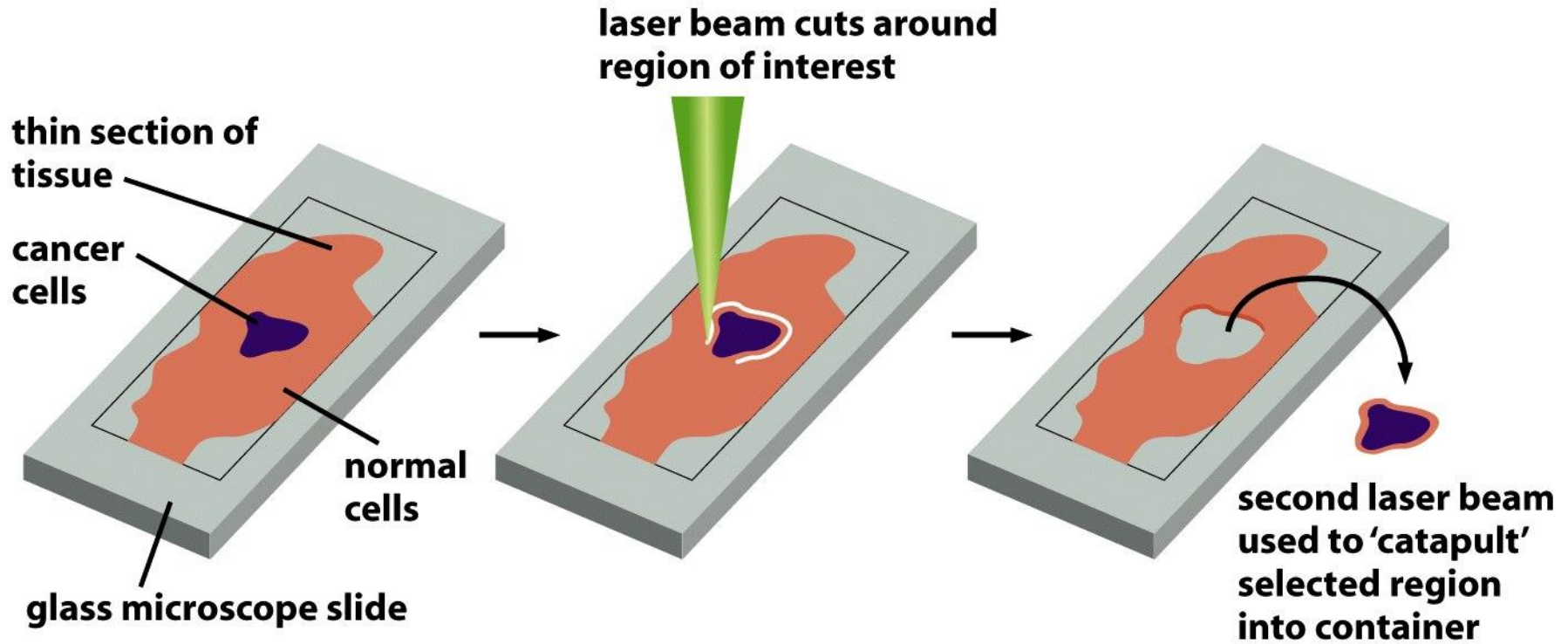


Τα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από έναν ιστό και να διαχωριστούν ανάλογα με τον τύπο τους

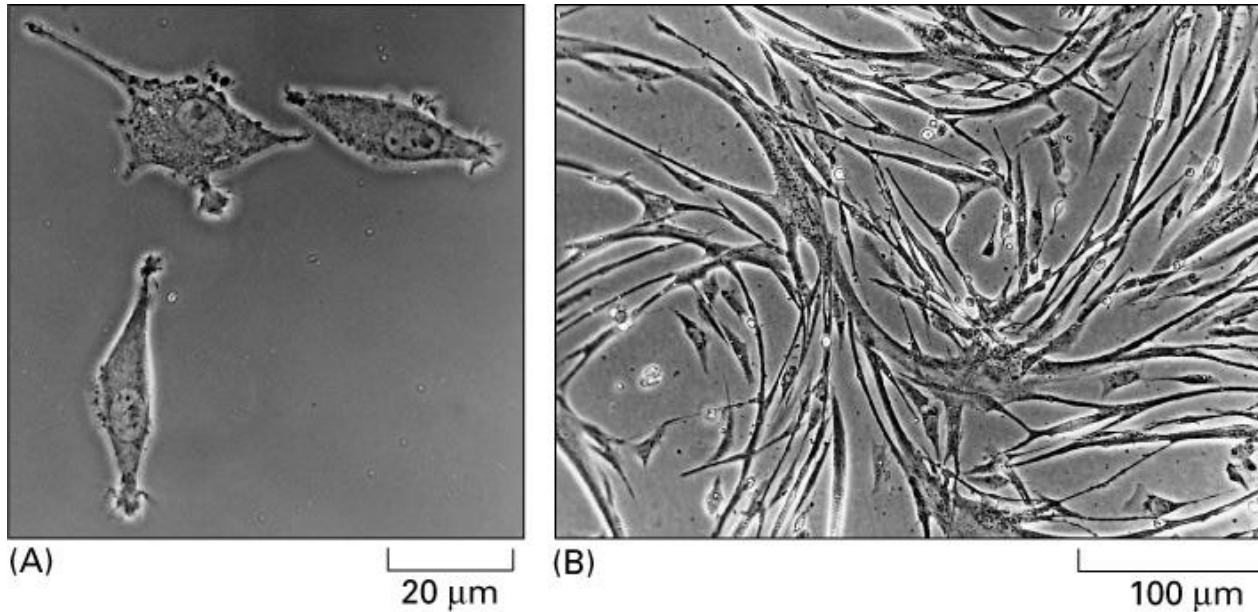
Ζωικοί ιστοί: Animal tissues – αγωγή με πρωτεολυτικά ένζυμα (όπως η τρυψίνη και η κολλαγενάση) και χηλικούς παράγοντες (όπως το EDTA)

Φυτικοί ιστοί: αγωγή με πεκτινάση

Τεχνική μικροτομής για την απομόνωση επιλεγμένων κυττάρων από μικρά τεμάχια ιστού

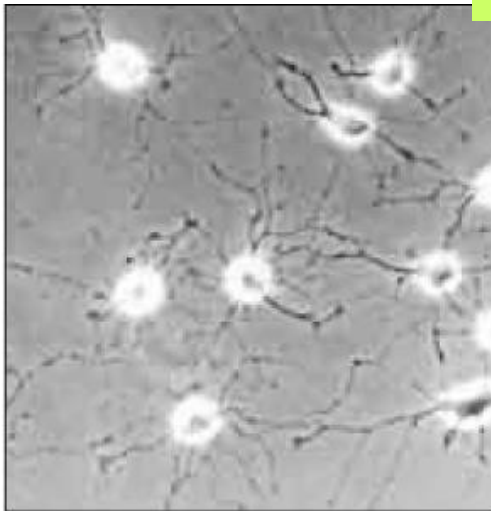


Τα κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν



- (A)** Phase-contrast μικρογραφία ινοβλαστών σε καλλιέργεια.
- (B)** Μυοβλάστες σε καλλιέργεια με μερικά κύτταρα να συντήκονται για να σχηματίσουν μυοκύτταρα.

Τα κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν

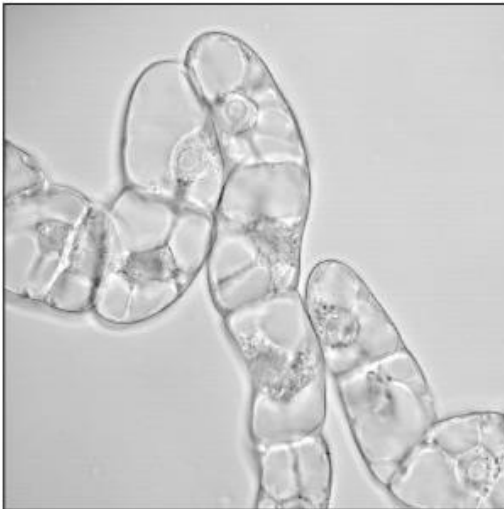


(C)

50 μm

(C) Ολιγοδενδριτικά πρόδρομα κύτταρα σε καλλιέργεια.

(D) Κύτταρα καπνού από την κυτταρική σειρά BY2 ανεπτυγμένα σε υγρή καλλιέργεια.



(D)

50 μm

Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται ευρέως ως πηγές ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Table 8–1 Some Commonly Used Cell Lines

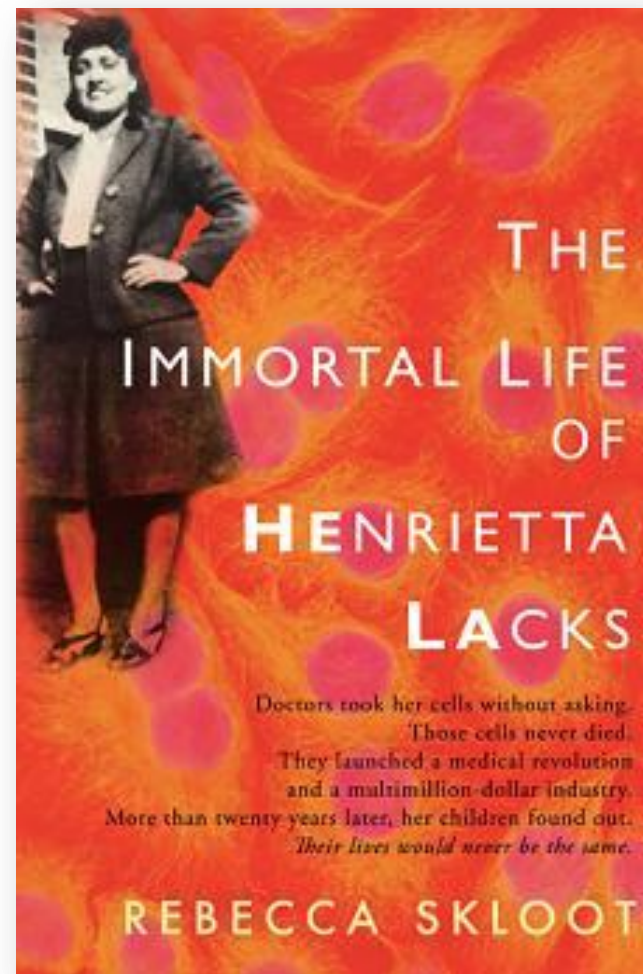
CELL LINE*	CELL TYPE AND ORIGIN
3T3	fibroblast (mouse)
BHK21	fibroblast (Syrian hamster)
MDCK	epithelial cell (dog)
HeLa	epithelial cell (human)
PtK1	epithelial cell (rat kangaroo)
L6	myoblast (rat)
PC12	chromaffin cell (rat)
SP2	plasma cell (mouse)
COS	kidney (monkey)
293	kidney (human); transformed with adenovirus
CHO	ovary (Chinese hamster)
DT40	lymphoma cell for efficient targeted recombination (chick)
R1	embryonic stem cell (mouse)
E14.1	embryonic stem cell (mouse)
H1, H9	embryonic stem cell (human)
S2	macrophage-like cell (<i>Drosophila</i>)
BY2	undifferentiated meristematic cell (tobacco)

***Many of these cell lines were derived from tumors. All of them are capable of indefinite replication in culture and express at least some of the special characteristics of their cell's of origin.**

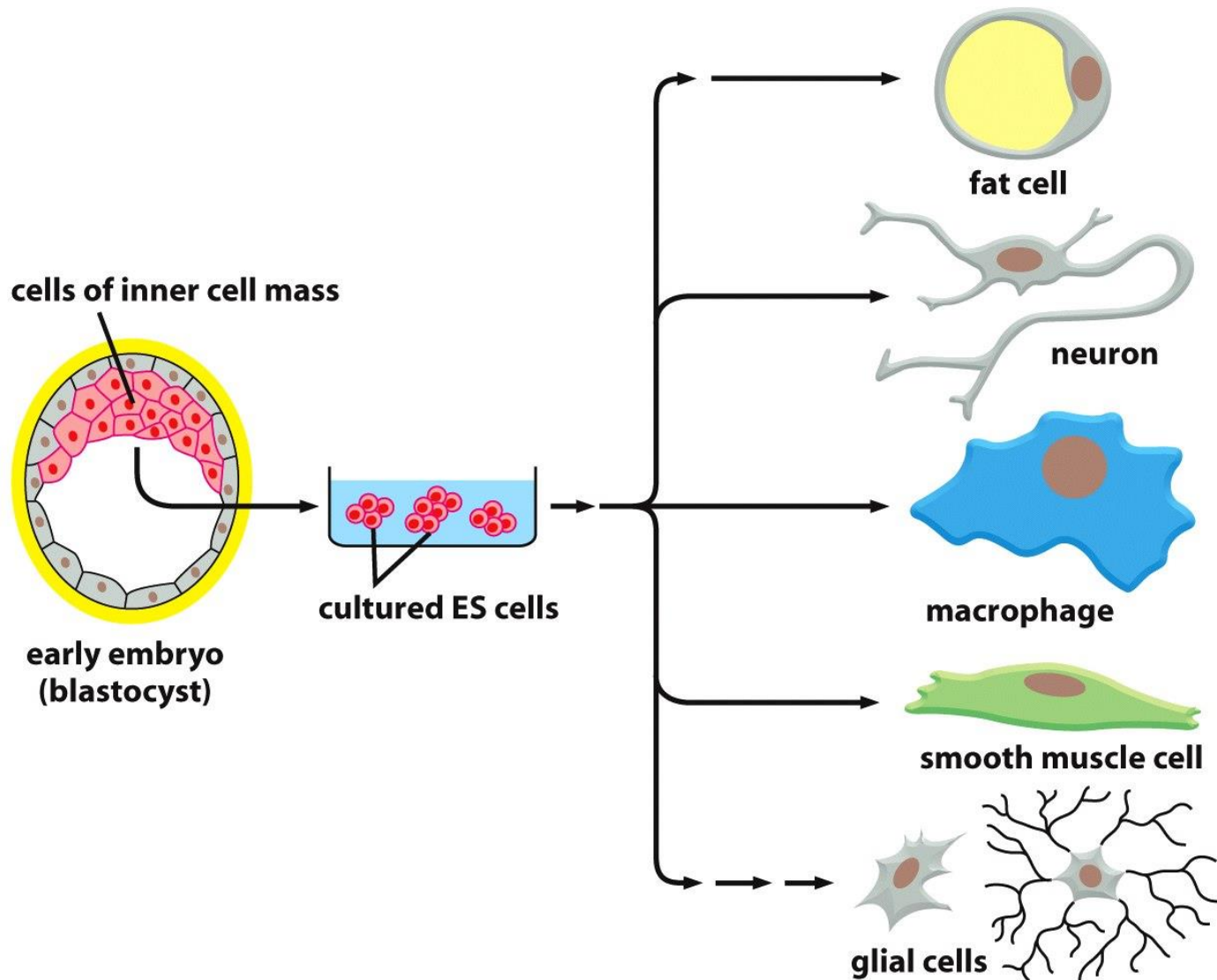
Το όνομά της ήταν Henrietta Lacks, αλλά οι επιστήμονες την ξέρουν ως HeLa. Ήταν μια φτωχή αγρότης καπνού στον Αμερικάνικο νότο που εργάστηκε στην ίδια γη που οι πρόγονοι της ήταν σκλάβοι, εντούτοις τα κύτταρα της (που λήφθηκαν χωρίς να το ξέρει) έγινα ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία στην ιατρική. Τα πρώτα «αθάνατα» ανθρώπινα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια, εξακολουθούν να είναι ζωντανά και σήμερα, αν και αυτή έχει πεθάνει εδώ και εξήντα χρόνια. Αν θα μπορούσαμε να συσσωρεύσουμε όλα τα κύτταρα HeLa που έχουν καλλιεργηθεί μέχρι σήμερα, αυτά θα ζύγιζαν πάνω από 50 εκατομμύρια τόνους. Τα κύτταρα HeLa ήταν ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του εμβολίου κατά της πολιομυελίτιδας, αποκάλυψαν μυστικά του καρκίνου, των ιών, καθώς και τις επιπτώσεις της ατομικής βόμβας, η χρήση τους οδήγησε σε σημαντικά επιτεύγματα, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση, η κλωνοποίηση, και η γονιδιακή χαρτογράφηση, και έχουν αγοραστεί και πωληθεί δισεκατομμύρια.

15/10/2015

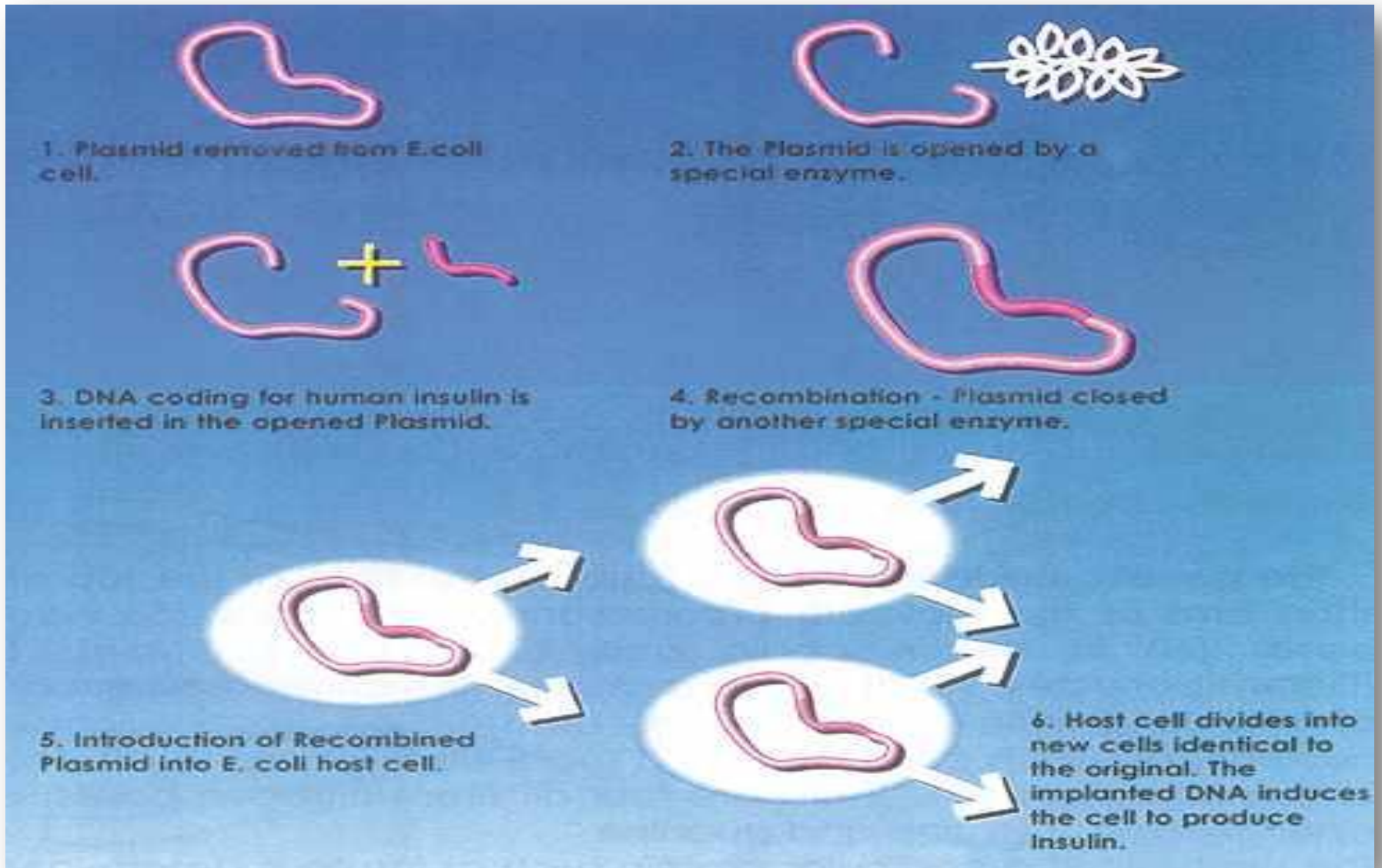
Δ.Δ. Λεωνίδας



Βλαστικά κύτταρα (ES) μπορούν να τροποποιηθούν



Παράγοντας πρωτεΐνες στην *Escherichia Coli*



15/10/2015

Δ.Δ. Λεωνίδας

ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

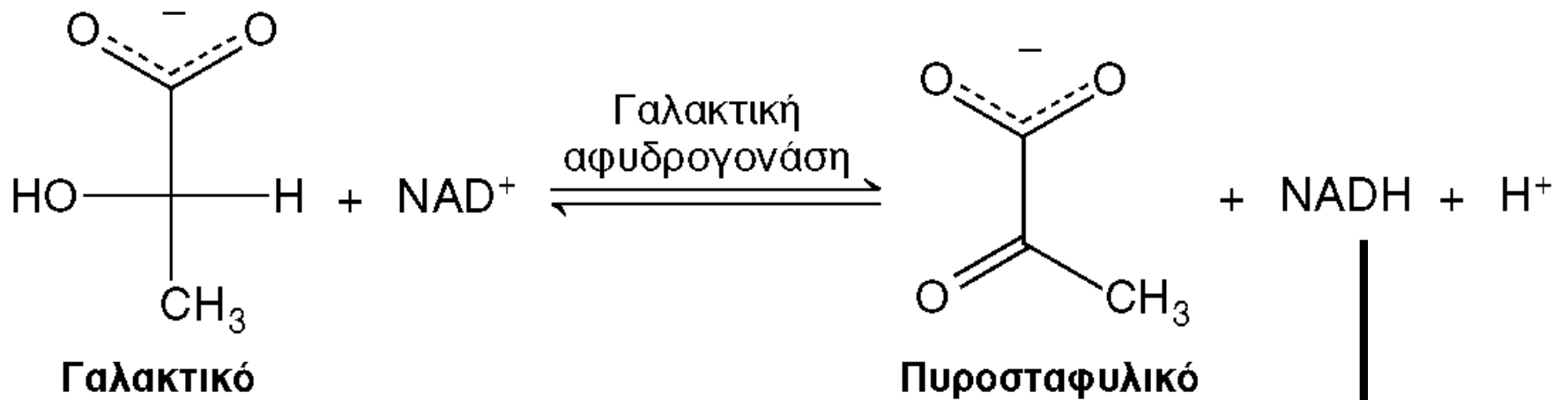
Για τον καθαρισμό μιας πρωτεΐνης απαιτούνται:

1. Δοκιμασία ελέγχου για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (αν η πρωτεΐνη είναι ένζυμο η καταλυτική της δράση χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της)
2. Δοκιμασία ελέγχου για τη μέτρηση της συνολικής πρωτεΐνης
3. Μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού που να είναι προσαρμοσμένη στη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει
4. Δοκιμασίες ελέγχου καθαρότητας (συνήθως ηλεκτροφόρηση)

Στο σχεδιασμό του καθαρισμού χρειαζόμαστε δύο πληροφορίες:

1. Τρόπος αναγνώρισης της πρωτεΐνης
2. Τρόπος ανίχνευσης της ποσότητας της πρωτεΐνης

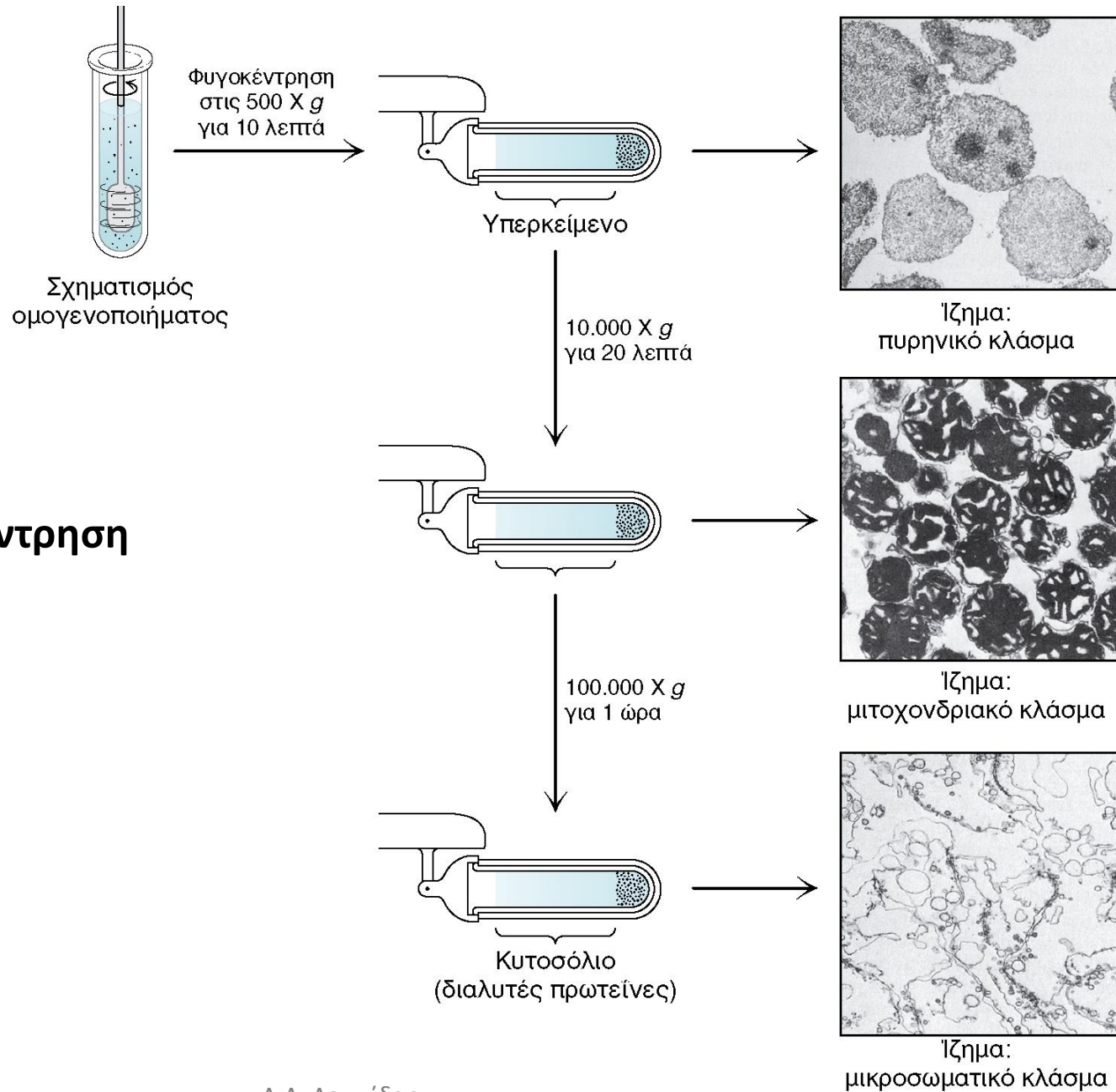
- Ενζυμική δραστικότητα / ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης = ειδική δραστικότητα (specific activity)
- Στόχος = μεγιστοποίηση ειδικής δραστικότητας



Απορρόφηση σε $\lambda=340\text{nm}$

Για να καθαρίσουμε μία πρωτεΐνη
πρέπει να την απομονώσουμε από το
κύτταρο

Διαφορική φυγοκέντρηση



Για την απομόνωση μιας πρωτεΐνης μπορούμε να βασιστούμε στις διαφορές που έχουν οι πρωτεΐνες στο/στην:

1. Διαλυτότητα της πρωτεΐνης
2. Φορτίο της πρωτεΐνης
3. Μοριακό μέγεθος της πρωτεΐνης
4. Βιολογική δράση που οφείλεται στη εκλεκτική δέσμευση υποστρωμάτων η αναστολέων