

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ

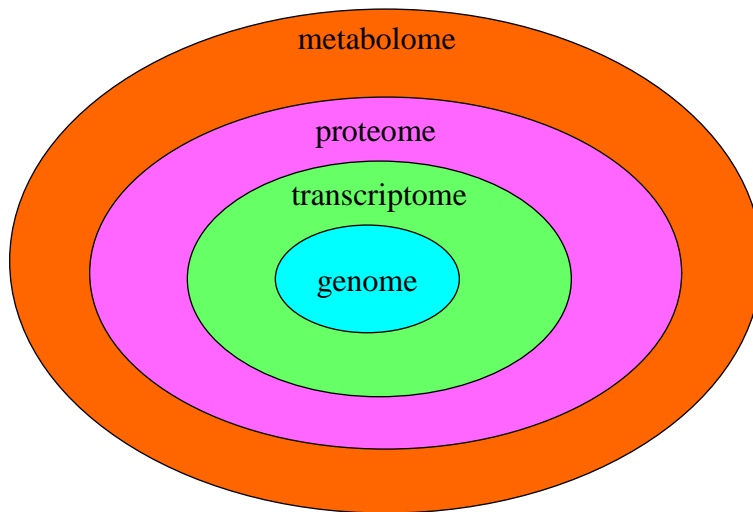
Ορισμός Πρωτεωμικής

Ανάλυση του συνόλου (ή υποσυνόλων) των εκφραζομένων πρωτεϊνών ενός οργανισμού (μονοκύτταρος) ή ενός κυτταρικού τύπου ή ιστού

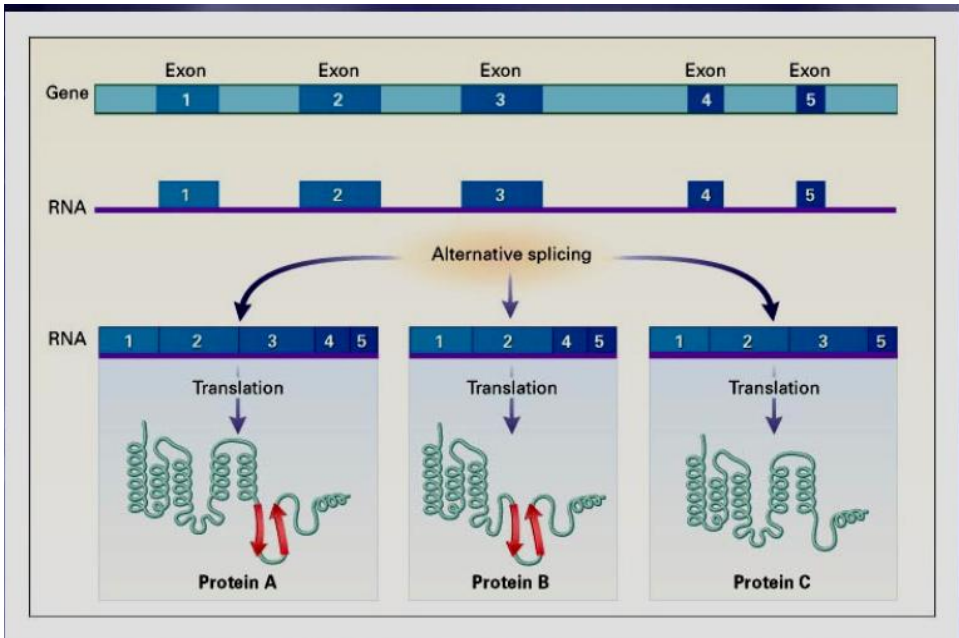
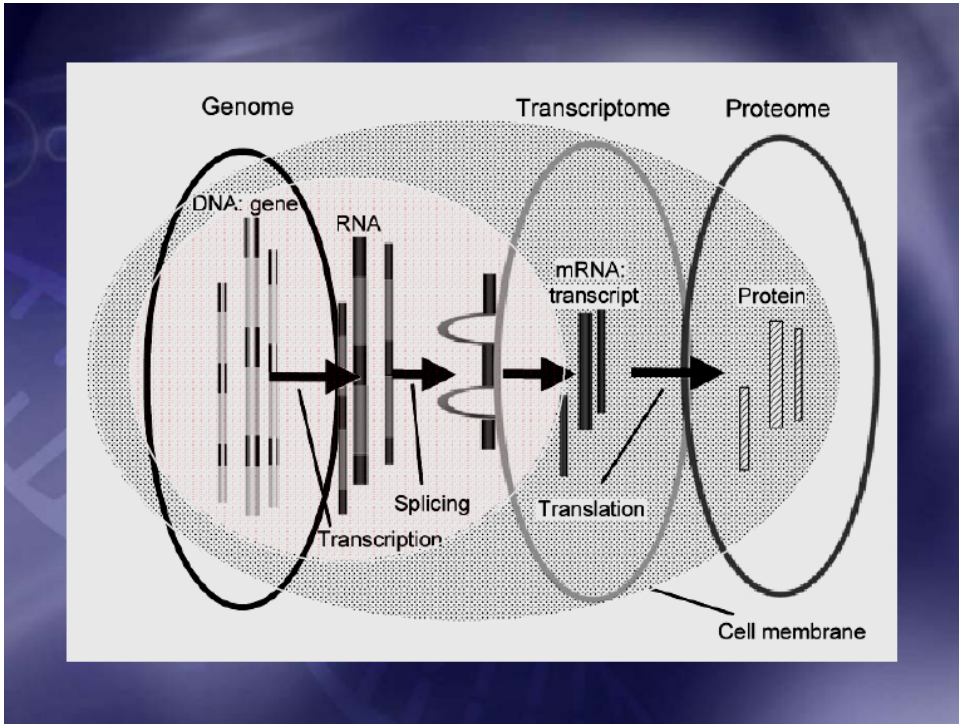
σε ποιοτικό αλλά και ποσοτικό επίπεδο

The term proteomics was coined in 1994 by Marc Wilkins who defined it as "the study of proteins, how they're modified, when and where they're expressed, how they're involved in metabolic pathways and how they interact with one another."

Πρωτέωμα

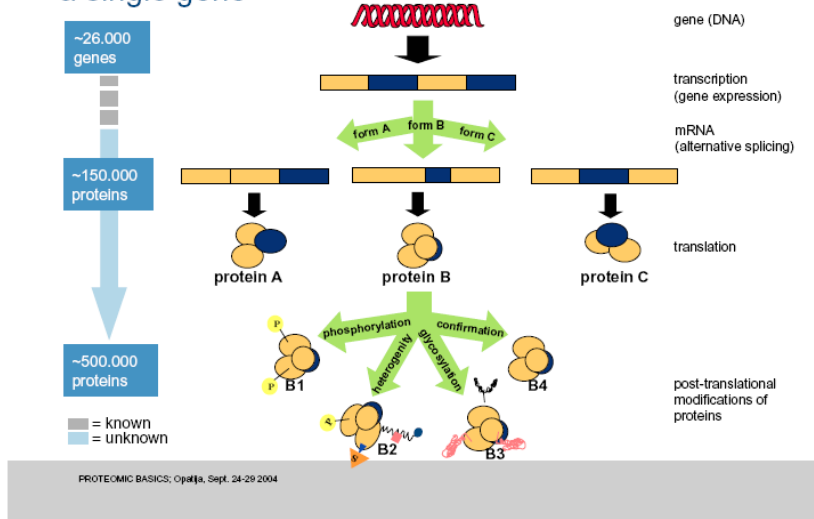


- ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ (proteomics)
- Λειτουργική πληροφορία (είδος, λειτουργία & αλληλεπίδρασεις πρωτεϊνων που αποτελούν μια μονάδα) → Πρωτέωμα
- γενομική → πιθανόν
- πρωτεομική → λειτουργικό
- Μη στατική → διαφέρει ανάλογα με το είδος του κυττάρου, στάδιο ανάπτυξης και διαφοροποίησης, περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. παρουσία ορμονών)
- Εναλλακτικό μάτισμα RNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, χρονική ρύθμιση πρωτεϊνοσύνθεσης, αλληλεπίδραση ενδοκυττάρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος κá



μεταγράψωμα ↔ γονιδίωμα x ~6-7 (~200.000)

Human Proteomics: many proteins originate from a single gene



Protein Post-Translational Modification

Proteolytic Cleavage N-term Met of all proteins removed by aminopeptidases

- N-terminal Acylation formyl, acetyl, myristyl, etc. by acyltransferases

- Glycosylation Asn, Ser, and Thr

Sulfation Tyr

- Phosphorylation Ser, Thr, and Tyr

Carboxyl Terminal Amidation

Hydroxylation Pro, Lys, Asp

N-Methylation Lys, Arg, His, Gln

Carboxylation Glu, Asp

- Modifications introduced by us Met [O], Cys-acrylamide

<http://abrf.org/ABRF/ResearchCommittees/deltamass/deltamass.html>
Exhaustive list maintained by Ken Mitchell

Μετα-μεταφραστικές αλλαγές των πρωτεϊνών

>300 είδη μόνιμων ή αναστρέψιμων χημικών αλλαγών
(π.χ. φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακυλίωση κ.ο.κ.)

Σχηματισμός συμπλεγμάτων με άλλες πρωτεΐνες

Σύνδεση με μη αμινοξικά συστατικά
(π.χ. βιταμίνες, μέταλλα, λιπίδια κ.ά.)

Περιβαλλοντικές επιδράσεις
(π.χ. οξειδωση)

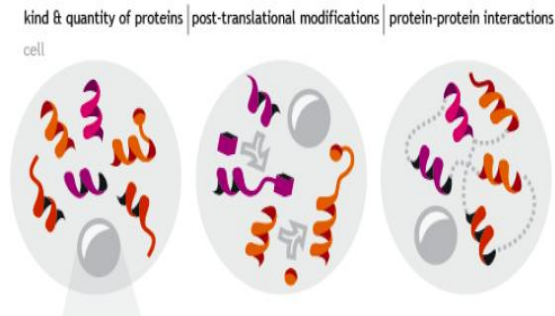
22 810 Ανθρώπινα Γονίδια

Βιολογικά Μετα-γενωμικά Πρωτεϊνικά Ερωτήματα

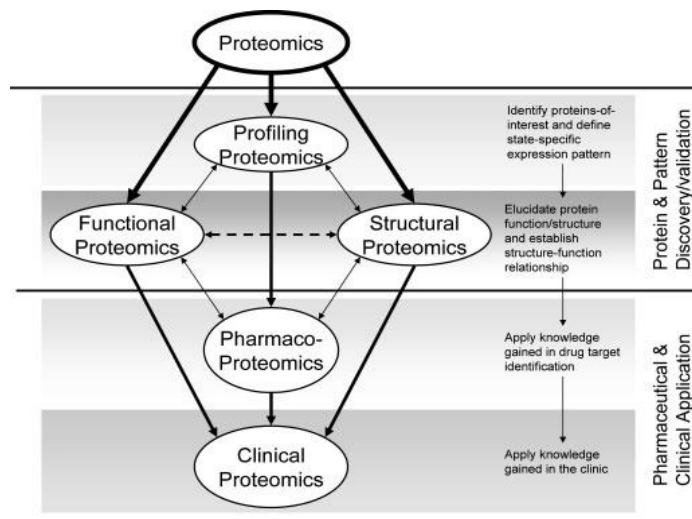
- Πού
- Πότε
- Πόσο
- Με ποιές άλλες αλληλεπιδρά

Δυναμική της Πρωτεωμικής

- Επίπεδα έκφρασης
- Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
- Δημιουργία συμπλόκων
- Δομή



Κατηγορίες Πρωτεωμικής



The Human Plasma Proteome >10 Orders of Magnitude in Abundance

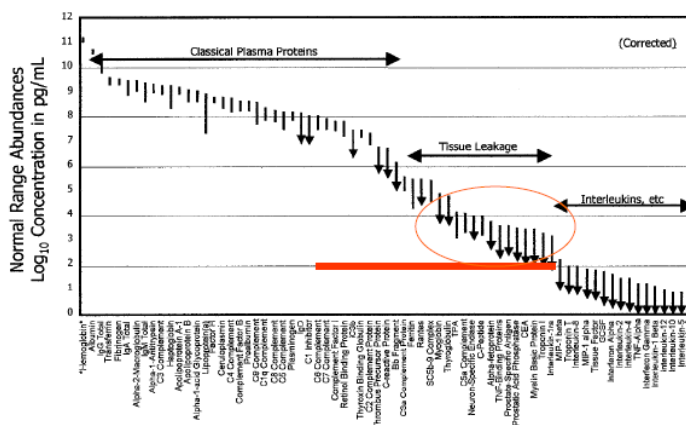
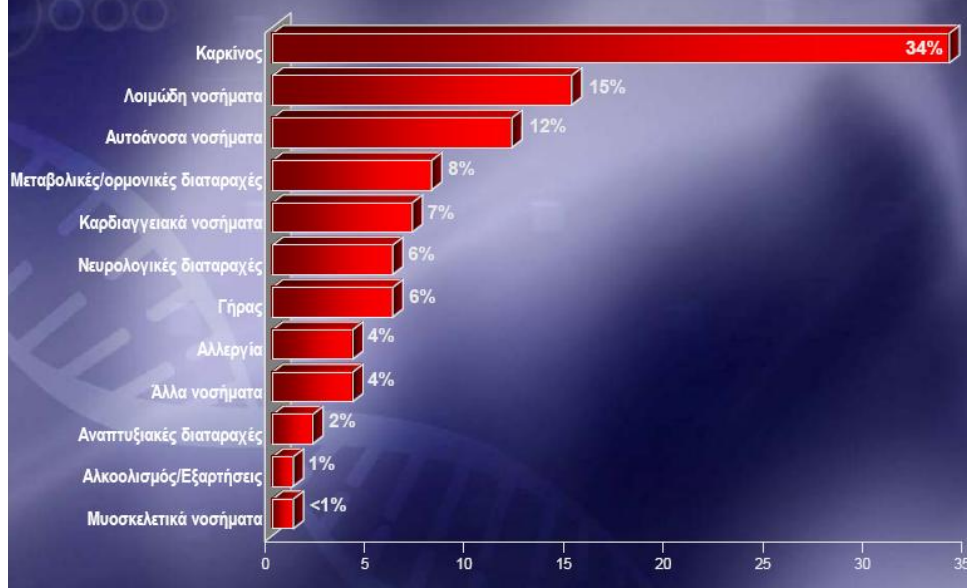


Figure from Anderson & Anderson (2002) Molecular & Cellular Proteomics 1.11, 845. <http://www.mcponline.org>

Βιοϊατρικές Εφαρμογές Πρωτεωμικής

- Στην Διάγνωση, στην Πρόγνωση και στην φαρμακευτική Αντιμετώπιση-εξατομικευμένη θεραπεία
- Ανακάλυψη νέων ειδικών δεικτών ή πρωτεϊνικών προφίλ
- Διαγνωστική ιστολογική απεικόνιση πρωτεϊνών
- Στην βασική έρευνα-κατανόηση μηχανισμών συσχετισμένες με ασθένεια
- Νέοι στόχοι για νέα φάρμακα

Τα πιθανότερα πεδία εφαρμογής προγνωστικών ή και διαγνωστικών πρωτεϊνωμικών δοκιμασιών



US Food and Drug Administration-Approved Cancer Biomarkers

Biomarker	Type	Source	Cancer type	Clinical use
α-Fetoprotein	Glycoprotein	Serum	Nonseminomatous testicular	Staging
Human chorionic gonadotropin-β	Glycoprotein	Serum	Testicular	Staging
CA19-9	Carbohydrate	Serum	Pancreatic	Monitoring
CA125	Glycoprotein	Serum	Ovarian	Monitoring
Pap smear	Cervical smear	Cervix	Cervical	Screening
CEA	Protein	Serum	Colon	Monitoring
Epidermal growth factor receptor	Protein	Colon	Colon	Selection of therapy
KIT	Protein (IHC)	Gastrointestinal tumour	GIST	Diagnosis and selection of therapy
Thyroglobulin	Protein	Serum	Thyroid	Monitoring
PSA (total)	Protein	Serum	Prostate	Screening and monitoring
PSA (complex)	Protein	Serum	Prostate	Screening and monitoring
PSA (free PSA %)	Protein	Serum	Prostate	Benign prostatic hyperplasia versus cancer diagnosis
CA15-3	Glycoprotein	Serum	Breast	Monitoring
CA27-29	Glycoprotein	Serum	Breast	Monitoring
Cytokeratins	Protein (IHC)	Breast tumour	Breast	Prognosis
Estrogen receptor and progesterone receptor	Protein (IHC)	Breast tumour	Breast	Selection for hormonal therapy
HER2/NEU	Protein (IHC)	Breast tumour	Breast	Prognosis and selection of therapy
HER2/NEU	Protein	Serum	Breast	Monitoring
HER2/NEU	DNA (FISH)	Breast tumour	Breast	Prognosis and selection of therapy
Chromosomes 3, 7, 9 and 17	DNA (FISH)	Urine	Bladder	Screening and monitoring
NMP22	Protein	Urine	Bladder	Screening and monitoring
Fibrin/FDP	Protein	Urine	Bladder	Monitoring
BTA	Protein	Urine	Bladder	Monitoring
High molecular weight CEA and mucin	Protein (Immunofluorescence)	Urine	Bladder	Monitoring

BTA, bladder tumour-associated antigen; CA, cancer antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; FDP, fibrin degradation product; FISH, fluorescent *in-situ* hybridization; GIST, gastrointestinal stromal tumour; IHC, immunohistochemistry; NMP22, nuclear matrix protein 22; PSA, prostate-specific antigen.

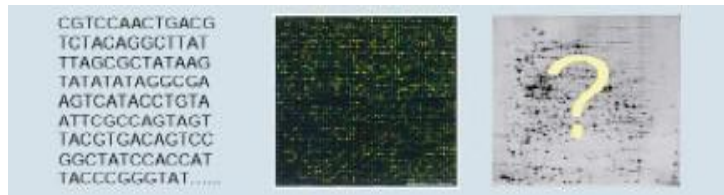
Source: Nat Rev Cancer © 2005 Nature Publishing Group

Εργαλεία

DNA
Genome

RNA
Transcriptome

Protein
Proteome



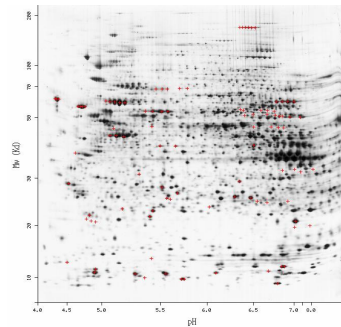
DNA Sequencing

cDNA arrays

2D PAGE?

Expression proteomics

Ανάλυση των διαφορών στην έκφραση πρωτεϊνών όταν ένα κύτταρο μεταβαίνει από μία κατάσταση σε άλλη:



- Διέγερση με κυτοκίνες / αυξητικούς παράγοντες
- Κυτταρική διαφοροποίηση
- Απόπτωση
- Καρκινική μεταβολή

Δείγμα (κυτταρικό εκχύλισμα, κλπ)

Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων Χρωματογραφία πολλαπλών διαστάσεων

Σύγκριση

Ενζυματική πέψη (θρυψίνη)

Διαχωρισμός πεπτιδίων με HPLC

MALDI-TOF

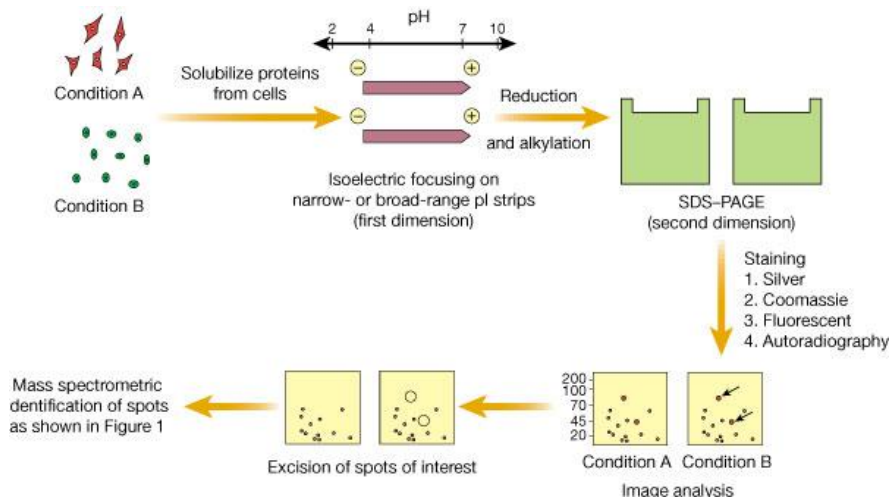
Nanospray LC-MS (triple-quad, Q-TOF, ion-trap, etc)

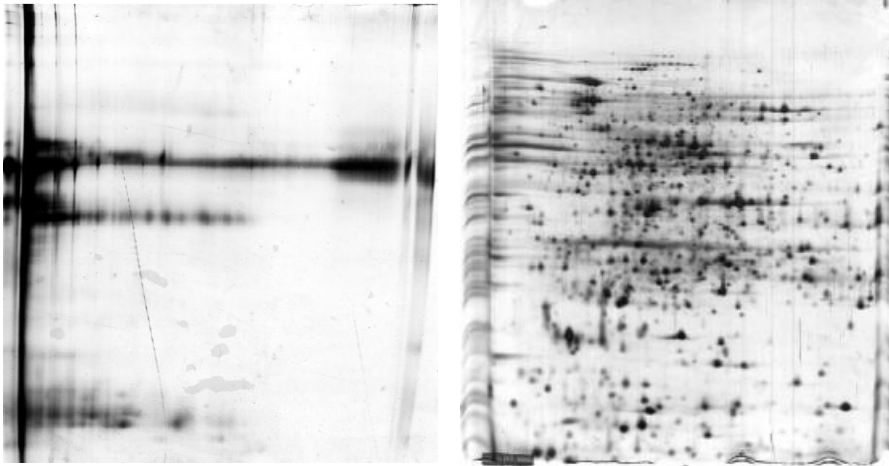
Διάσπαση πεπτιδίων με MS/MS

Σύγκριση αποτελεσμάτων με βάσεις δεδομένων

Ταυτοποίηση πρωτεΐνης

Ηλεκτροφόρηση και πρωτεομική





Sample preparation

Cell disruption

Solubilization

Protection against protease activities

Prefractionation

Removal of

- > nucleic acids
- > polysaccharides
- > lipids
- > salts, buffers, ionic small molecules
- > insoluble material

Υλικό

- **Κυτταρικές σειρές**
- **Βιοψίες (Laser Capture Microdissection)**
- **Ιστοί**
- **Βιολογικά Υγρά**
- **Μακρομοριακά σύμπλοκα**

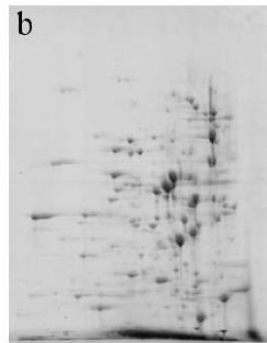
Μέθοδοι Λύσης των κυττάρων

- **Μηχανικοί**
 - Υπέρηχοι (sonication)
 - Πίεση (ομογενοποιητής)
 - Τριβή (ball mill)
- **Μη-μηχανικοί**
 - Φυσικοχημικοί (Οσμωτικά, freeze/thaw)
 - Χημικοί (απορρυπαντικό, χαστρόπα)
 - Ενζυμικοί (Λυσοζύμη)

Sample Preparation



crude sample



same sample processed
through the 2D cleanup kit

Special cases

Bacteria	High nucleic acid/protein ratio. Nucleic acid removal techniques are often employed.
Yeast (and other fungi)	Tough cell walls require vigorous disruption techniques. Protease activity is high. SDS is usually used.
Cultured cells	Salt carry-over from growth medium or wash solution can be significant. Salt-free buffer/osmoticum should be used for washing (10 mM Tris / 250 mM sucrose pH 7.0).
Plant tissue	Dilute source of protein. Precipitation is usually employed. Protease activity is high. Reductants and inhibitors are used to prevent phenolic modification.

Protein solubilization

Urea (8-9.5 M) , or 7 M urea / 2 M thiourea

Detergent (CHAPS,...)

Reductant (DTT, 2-mercaptoethanol)

Carrier ampholytes (0.8 % IPG buffer)

Sonication can help solubilization

Sample can be heated only prior to addition of urea

PROTEOMIC BASICS; Opalja, Sept. 24-29 2004

Protease inhibitors

PMSF
(phenylmethyl sulfonyl fluoride)

Most commonly used
Inactivates serine and cysteine proteases
Is inactivated by DTT and 2-mercaptoethanol

AEBSF (Pefabloc)

More soluble, less toxic than PMSF,
but can cause charge modifications(?).

EDTA

Inhibits metalloproteases,
but interferes with nucleases

Peptide protease inhibitors
(leupeptin aprotinin etc.)

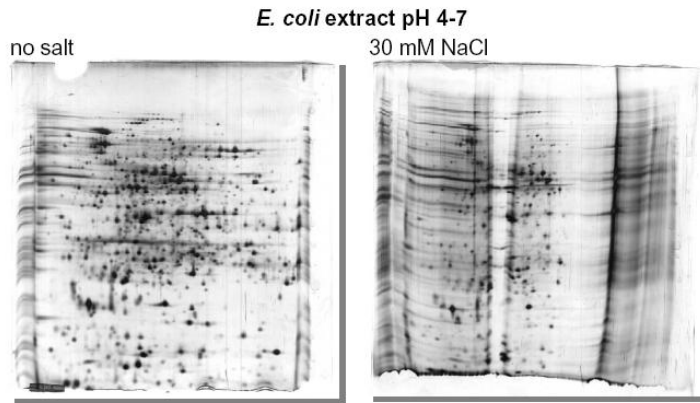
May show up in 2-D pattern

High pH

Inhibits most proteases,
but avoid > 30 mM Tris base,
better: 25 mM spermine base

PROTEOMIC BASICS; Opalja, Sept. 24-29 2004

Effect of salt



20 PROTEOMIC BASICS: Opai@a, Sept. 24-29 2004

De-salting techniques

Dialysis	Slow
Spin dialysis	Detergents can concentrate with protein
Gel filtration	Protein losses
Precipitation/resuspension	Complicated, can cause losses

PROTEOMIC BASICS: Opai@a, Sept. 24-29 2004

Protein precipitation

Clean-up from lipids, nucleic acids, salts

Concentration of proteins

Irreversible inhibition of proteases

Prevention and dissolution of complexes

26 PROTEOMIC BASICS; Opalija, Sept. 24-29 2004

Protein precipitation procedures

Ammonium sulfate
(salting out)

Not efficient, de-salting necessary

TCA precipitation

Can be hard to re-solubilize

Acetone and/or ethanol

Leaves SDS behind, but many proteins not precipitated

TCA plus acetone
(Damerval et al. 1986)

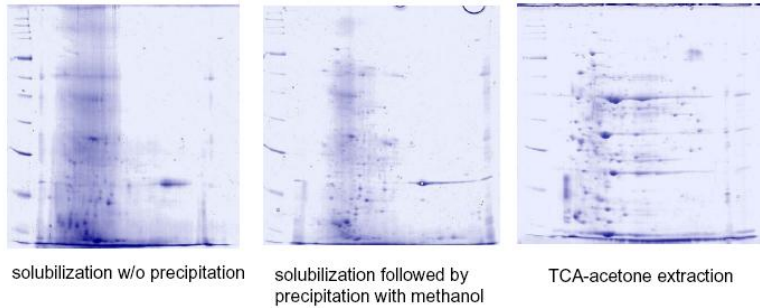
More effective than either alone, good for basic proteins

Chloroform and methanol
(Wessels and Flügge, 1984)

Time consuming, large volumes necessary

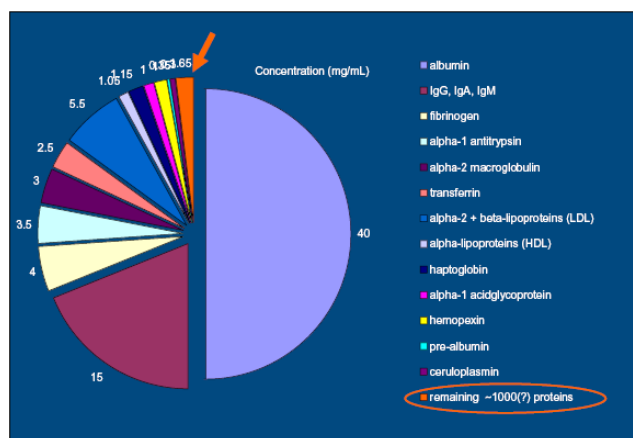
PROTEOMIC BASICS; Opalija, Sept. 24-29 2004

Extraction of plant proteins:



27 PROTEOMIC BASICS: Oppl(a, Sept. 24-29 2004

The problem

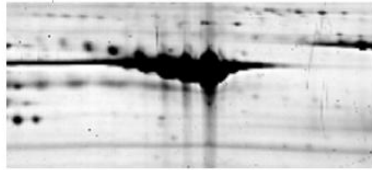


53 PROTEOMIC BASICS: Oppl(a, Sept. 24-29 2004

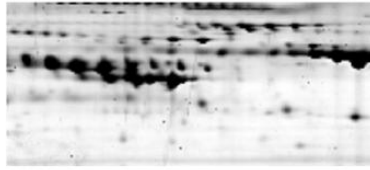
Albumin and IgG Removal Kit

Each kit contains 8.5 ml of affinity gel
– provided as 50/50 (v/v) slurry – which binds human serum albumin and IgG
Selective removal of >95% albumin and IgG from 10 x 15 μ l human serum samples.

Untreated Human Serum



“Albumin and IgG Removal Kit”
treated Human Serum



55 PROTEOMIC BASICS; Opitz et al., Sept. 24-29 2004

Pre-fractionation possibilities

By solubility

- > sequential extraction with increasingly strong solubilizing agents (???)

By chromatography

- > e.g. IEX, GF, HIC, RPC;

By centrifugal separation of subcellular components

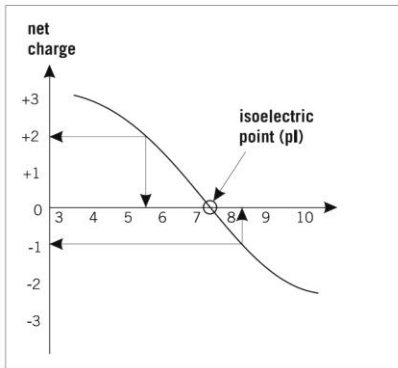
- > e.g. mitochondria, nuclei, cytosol (\Rightarrow information on location of proteins!)

By affinity

- > Immunoprecipitation or affinity chromatography of complexes or selective removal of abundant proteins

51 PROTEOMIC BASICS; Opitz et al., Sept. 24-29 2004

Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)



Διαχωρίζει τις πρωτεΐνες ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο

Κάθε πρωτεΐνη έχει το δικό της ισοηλεκτρικό σημείο

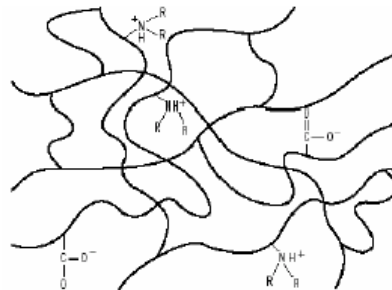
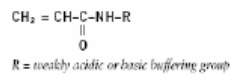
Ισοηλεκτρικό σημείο ορίζεται το pH στο οποίο η πρωτεΐνη είναι ηλεκτρικά ουδέτερη

(ίσος αριθμός θετικά και αρνητικά φορτισμένων ομάδων)

1^η Διάσταση

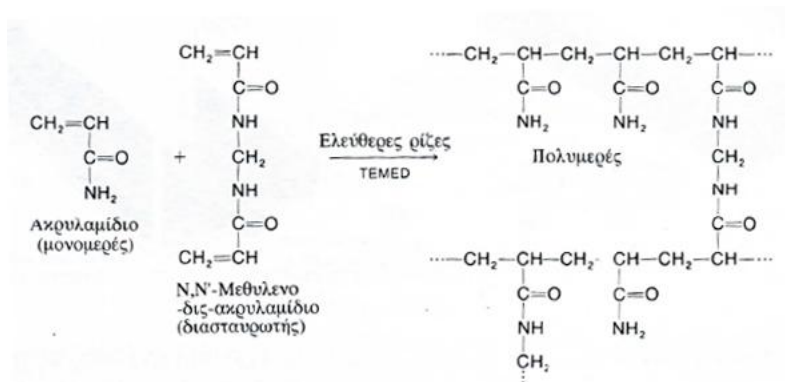
◆ Isoelectric Focussing (IEF)

- ◆ Immobilized Gradient:
- ◆ An immobilized pH gradient is formed along a slab of polyacrylamide gel by polymerizing a gradient mixture of acidic and basic acrylamido buffers with acrylamide and bisacrylamide.
- ◆ The gradient is stable over time.



Immobiline matrix

Σχηματισμός πηκτής πολυακρυλαμίδιου

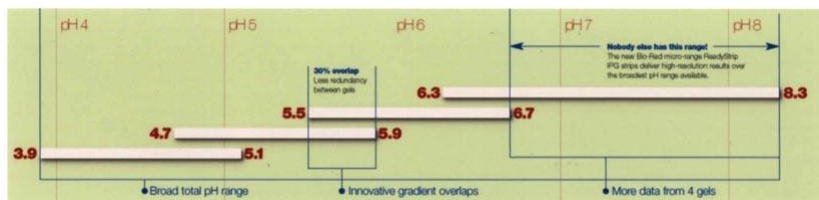


Σχήμα 4-5
Σχηματισμός πηκτών πολυακρυλαμίδιου.

Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)

Το σύστημα περιέχει μακρομόρια και ένα εμπορικά διαθέσιμο παρασκεύασμα **αμφολυτών**, το οποίο συνπολυμερίζεται με το ακρυλαμίδιο

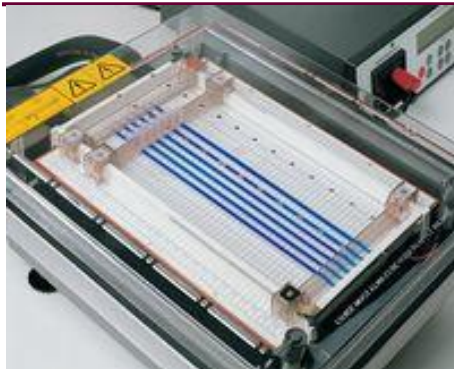
Οι αμφολύτες είναι μικρού μοριακού βάρους πολυμερή που περιέχουν τυχαίες κατανομές ασθενών οξέων και βάσεων, και έχουν μεγάλη ρυθμιστική ικανότητα κοντά στο pI τους. Έτσι δημιουργείται μία βαθμίδωση pH.



Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)

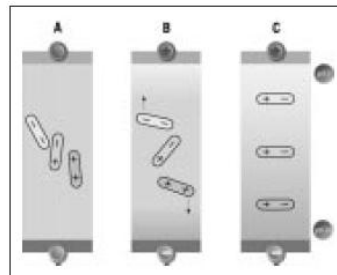


Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)



Το σύστημα ενώνεται με ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται ένα δυναμικό

Οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της βαθμίδωσης pH, μέχρι να φθάσουν το ισοηλεκτρικό τους σημείο



Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)

♦ Theory

- ♦ A protein mixture is absorbed into the gel.
- ♦ An electric field is then applied across the gel.
- ♦ Proteins in regions below or above their pI migrate to the cathode or anode respectively.
- ♦ Migration rate slows as the proteins approach the region where $\text{pH} = \text{pI}$
- ♦ Protein migration ceases when $\text{pH} = \text{pI}$.
- ♦ Note: proteins remain in the native state throughout the process

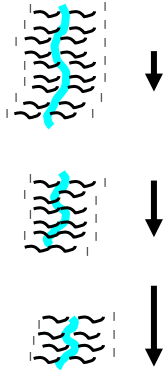


Ισοηλεκτρική Εστίαση – Σύνοψη

- Απαιτείται πλήρης απομάκρυνση μη πρωτεϊνικών μορίων
- Διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το φορτίο
- Χρησιμοποιούνται αμφολύτες για την δημιουργία της βαθμίδωσης pH
- Εφαρμόζεται πολύ υψηλή τάση (10000V)
- Χρονοβόρα διαδικασία (>10h)
- Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την καθαρότητα του δείγματος, το εύρος της βαθμίδωσης pH και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

Μ Ο Δ Ο Θ Α Κ
| | | | | | | |

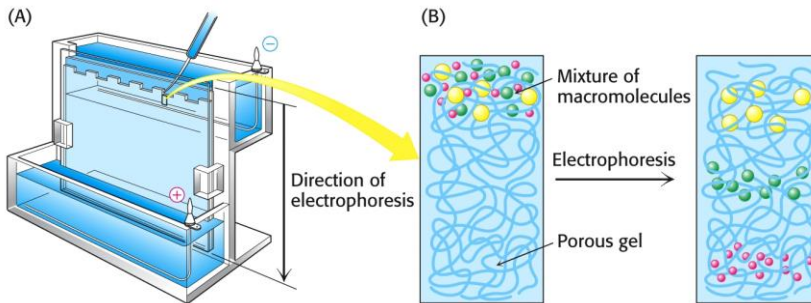
2^η Διάσταση: SDS PAGE Βασικές Αρχές



+ + + + + + +
Μ Ο Δ Ο Θ Α Κ



SDS-PAGE

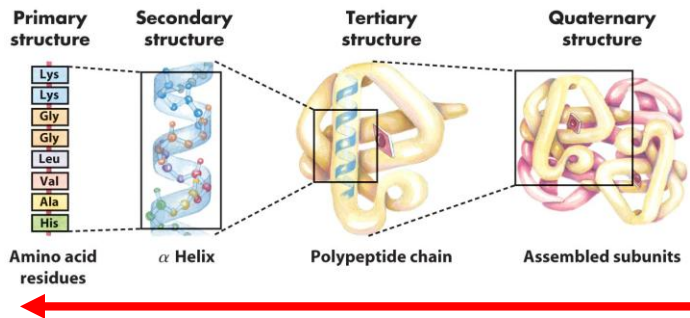


SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Βασικό συστατικό ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (Sample Buffer):

Αναγωγικός παράγοντας: διθειοθρεϊτόλη DTT, β-μερκαπτο-αιθανόλη

Διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς, καταργεί την 3D δομή



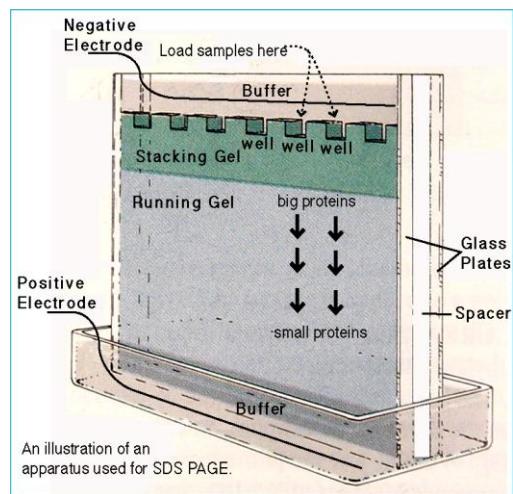
SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Δύο πηκτές:

Πηκτή Συσσώρευσης

Πηκτή Διαχωρισμού

Εφαρμογή ηλεκτροδίων,
διαφοράς δυναμικού



SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Πηκτή συσσώρευσης

Τα ανιόντα γλυκίνης (pH:8.3-8.8) κινούνται μέσα στο δείγμα και στην πηκτή συσσώρευσης

Συναντούν το ρυθμιστικό Tris-HCl pH: 6.8 και τιτλοδοτούνται σε pH: 6.9
Με αποτέλεσμα να μειώνεται το φορτίο και η κινητικότητά τους

Οι πρωτεΐνες σε pH: 6.8 έχουν μεγάλο αρνητικό φορτίο, υπερπηδούν τις δυνάμεις τριβής και κινούνται πιο γρήγορα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης.

Πηκτή Διαχωρισμού

Καθώς οι πρωτεΐνες περνάνε στην πηκτή διαχωρισμού τιτλοδοτούνται σε pH:8.8 και καθυστερούν λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου

SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Σχέση συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου με επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος

% Acrylamide	Best Resolution Range (kDa)
5	25-200
10	15-70
15	12-45

Μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες διαχωρίζονται καλά σε μεγάλης συγκέντρωσης πηκτή ακρυλαμιδίου

SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Πηκτές ακρυλαμίδιου με βαθμίδωση συγκέντρωσης ακρυλαμίδιου
Π.χ. 4-15%

Πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα συνήθως αγοράζονται έτοιμα

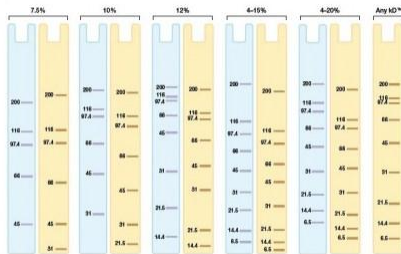


Fig. 1. Side-by-side comparison of migration patterns of broad range SDS-PAGE unstained standards (catalog #161-0317) run on Ready Gel precast gels () and Mini-PROTEAN TGX gels ().



SDS-PAGE - Σύνοψη

- Διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος
- Δεν εφαρμόζεται πολύ υψηλή τάση (200V)
- Απαιτεί μικρό χρονικό διάστημα (2h)
- Η παρουσία του SDS είναι απαραίτητη για την αποδιάταξη της πρωτεΐνης και η κινητικότητα του μορίου να είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους μόνο
- Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την % περιεκτικότητα του ακρυλαμίδιου και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Διαχωρίζει αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, σύμπλοκα πρωτεϊνών, σύμπλοκα πρωτεϊνών με τους αντίστοιχους προσδέτες τους



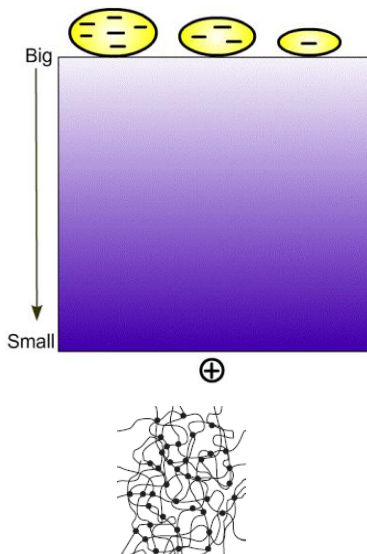
Ο διαχωρισμός βασίζεται στο μέγεθος, φορτίο, σχήμα των πρωτεϊνών

Εφαρμογές:

Διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων:
πρωτεϊνών με πρωτεΐνες,
πρωτεϊνών με προσδέτες

Ανίχνευση ύπαρξης ισομορφών/διμερών (πολυμερών)

Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

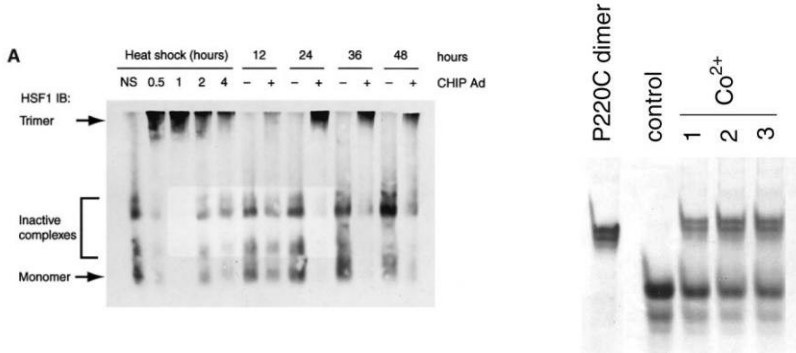


Διαχωρίζει τις πρωτεΐνες στη φυσική τους διαμόρφωση. Οι πρωτεΐνες σταματούν να κινούνται όταν φθάσουν σε μία συγκεκριμένη πυκνότητα τηκτής

Αυτό μπορεί να απαιτεί πολύ χρόνο

Ιδανική μέθοδος για ανίχνευση ύπαρξης ολιγομερών

Παραδείγματα ηλεκτροφόρησης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

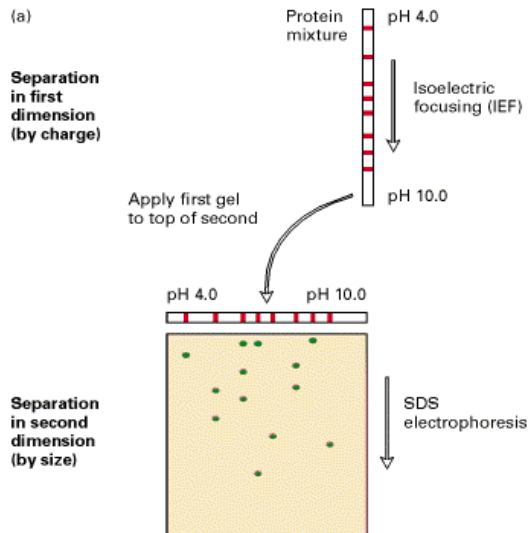


Dai et al EMBO J (2003) 22, 5446-5458

Διμερισμός KIR2DL1 παρουσία Co²⁺

Qing R. Fan et al. JBC 2000

Σύνοψη 1^{ης} και 2^{ης} διάστασης



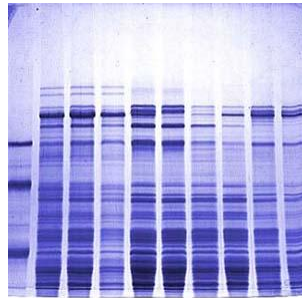
Ανίχνευση πρωτεϊνών

Αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μπορούν να κατακρημνιστούν με προσθήκη αλκοόλης είτε ισχυρού οξέος (π.χ. TCA).

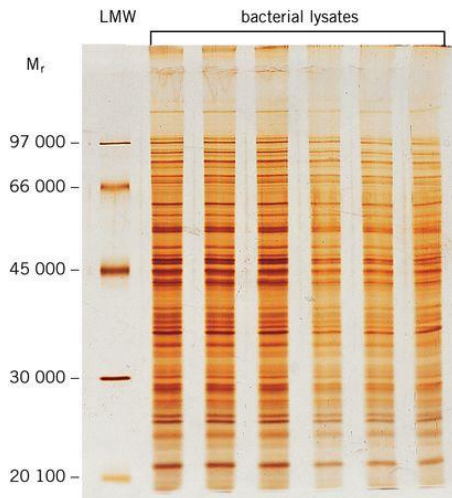
Οι πρωτεΐνες επίσης μπορούν να ανιχνευτούν με χρωστικές όπως η Coomassie Blue ή με καταργασία με AgNO_3 (silver staining)

Είναι δυνατή η χρώση και με άλλους ιχνηθέτες όπως ιχνηθέτες που φοριάζουν

Χρώση με coomassie blue



Ανίχνευση πρωτεϊνών

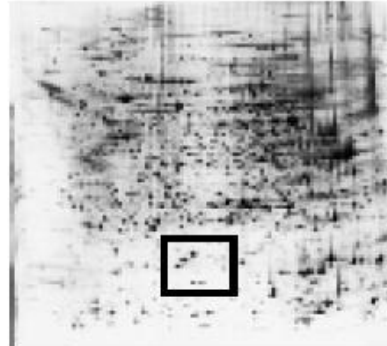
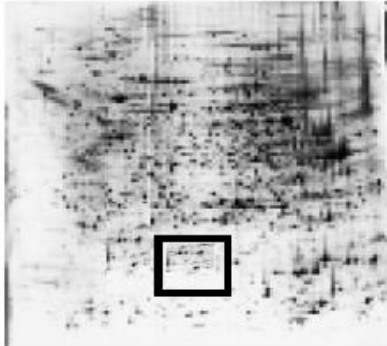


Η χρώση με άργυρο είναι 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από αυτήν με Coomassie Blue

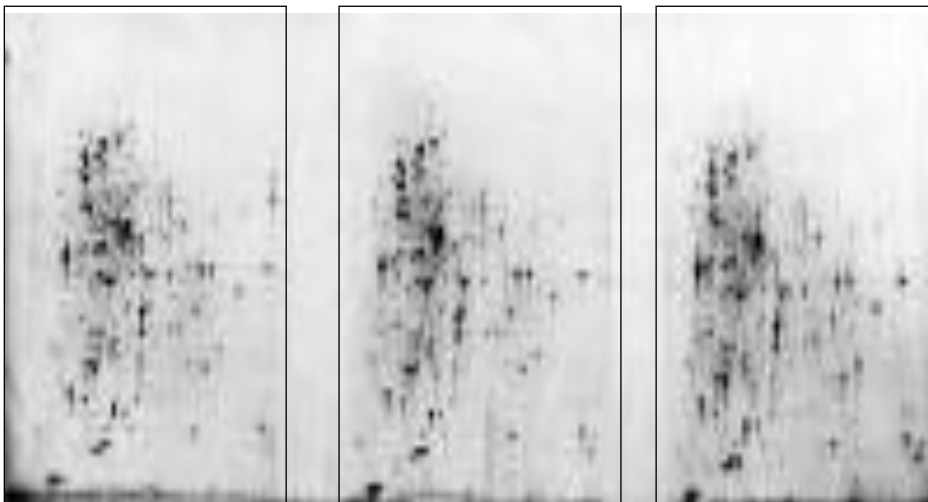
Ανιχνεύει πρωτεϊνικές ζώνες της τάξης των ng (π.χ. 0.5 ng)

Είναι πιο πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία

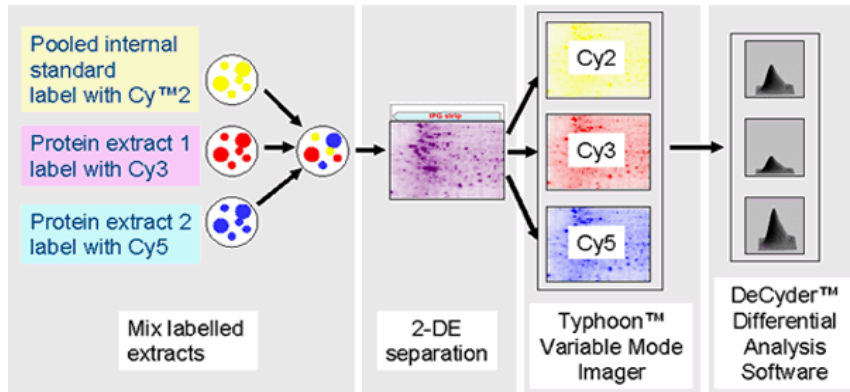
Expressional Proteomics



Επαναληψιμότητα 2D-ηλεκτροφόρησης



Differential In-Gel Electrophoresis (DIGE) ή “Ποσοτική Πρωτεομική”



Τεχνικές ανίχνευσης ποιοτικών και ποσοτικών διαφορών

Differential in-gel electrophoresis (DIGE).

Σήμανση πρωτεϊνών κάθε δείγματος προς ανάλυση με διαφορετική φθορίζουσα

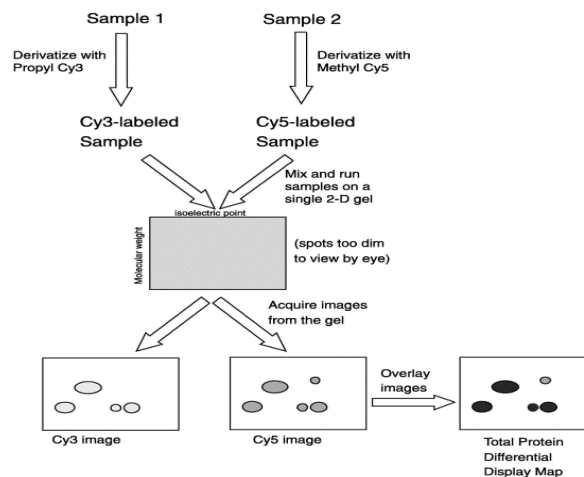
Ανάμειξη των δειγμάτων

2D Ηλεκτροφόρηση

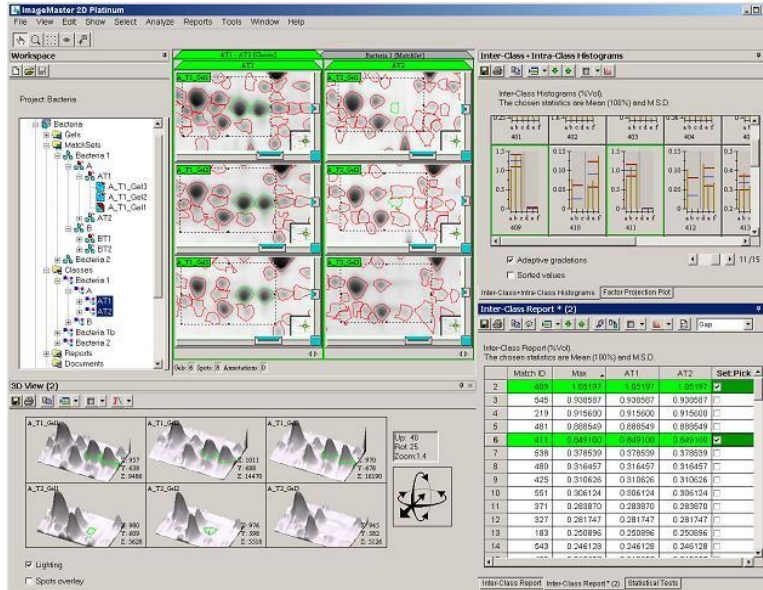
Έλεγχος σήμανσης από τις φθορίζουσες. Π.χ. Ίδια πρωτεΐνη, με ίδιο επίπεδο έκφρασης δίνει χρώμα από την ίση ανάμειξη των δύο ιχνηθετών.

Πρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο στη μία περίπτωση δίνει μόνο τη μία φθορίζουσα κ.τ.λ.

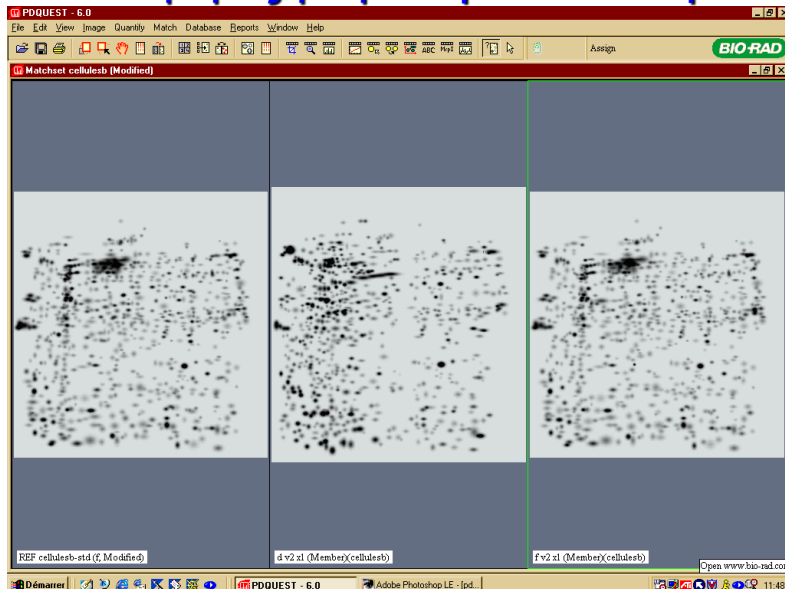
Έλεγχος ποιοτικών και ποσοτικών διαφορών



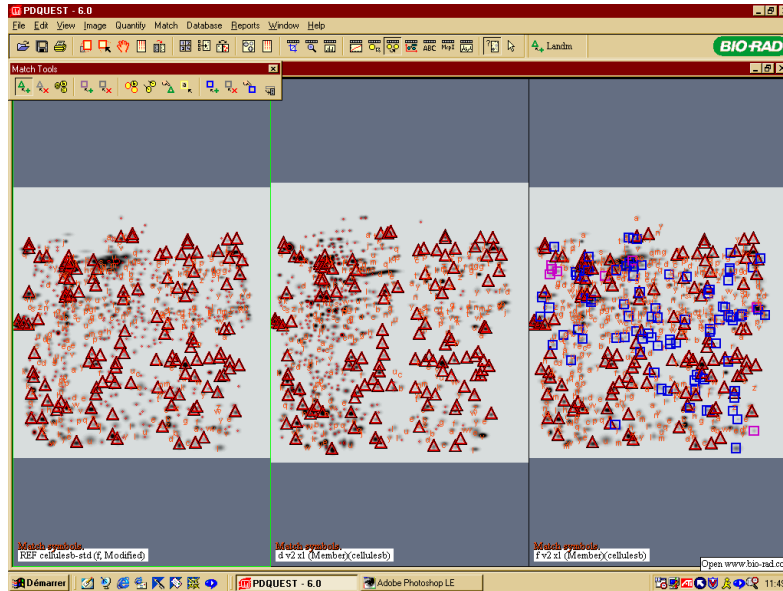
Λογισμικό ανάλυσης 2D-Ηλεκτροφόρησης



Το λογισμικό μπορεί να ταυτοποιήσει διαφορές με βάση το MW & pI

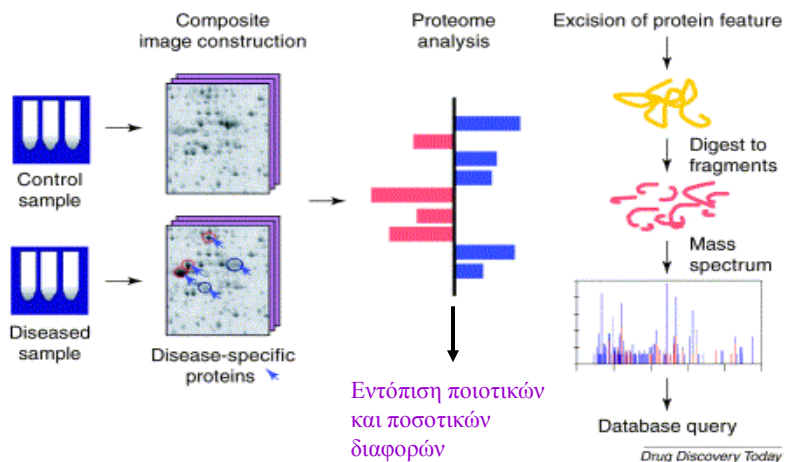


Το λογισμικό μπορεί να ταυτοποιήσει διαφορές με βάση το MW & pI

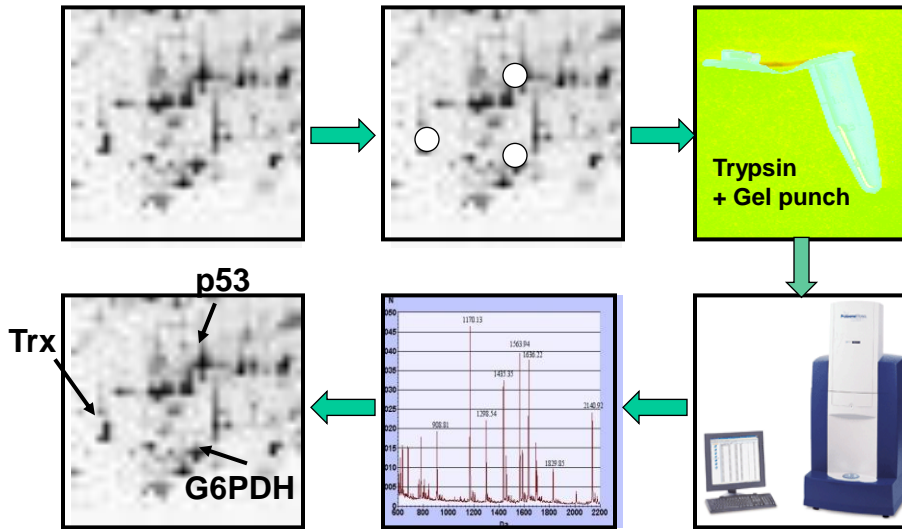


Πρωτεομική ανάλυση

Σύνοψη σύγκρισης πρωτεϊνικού προφίλ δύο καταστάσεων




Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών

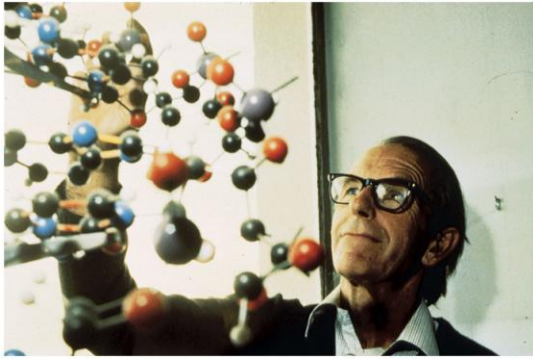


Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών

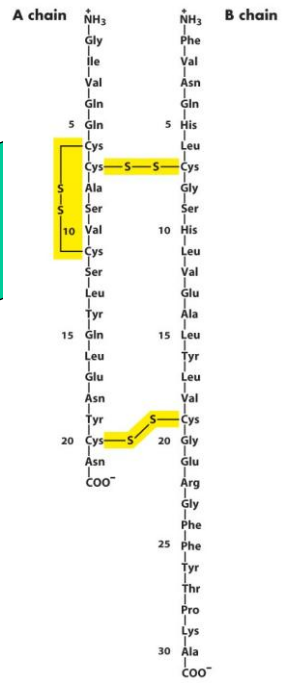
- Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται:
- Αποικοδόμηση κατά Edman
- Φασματοσκοπία μάζας (Mass Spectrometry)

Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας
 1953, ο Frederick Sanger βρήκε την
 αλληλουχία της ινσουλίνης

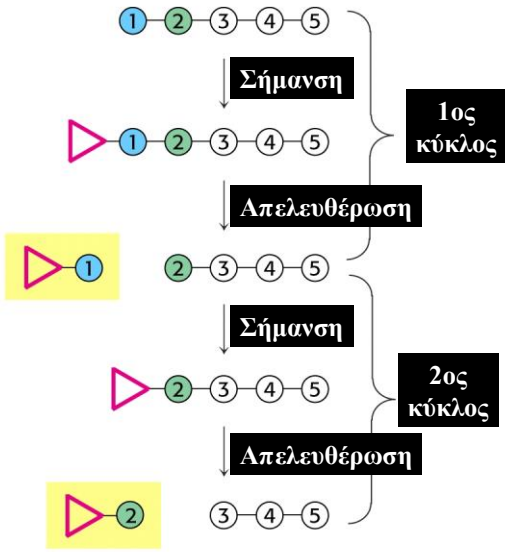
 1958 Nobel Prize in Chemistry
 1980 Nobel Prize in Chemistry:
 DNA sequencing

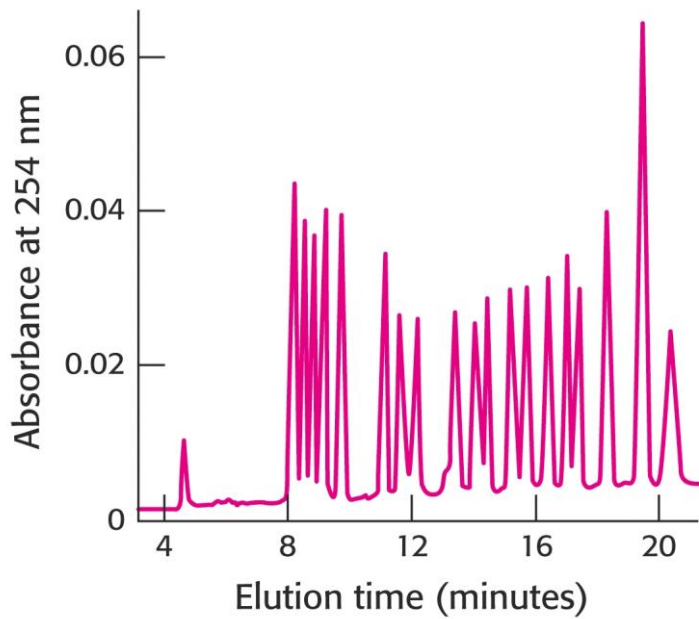
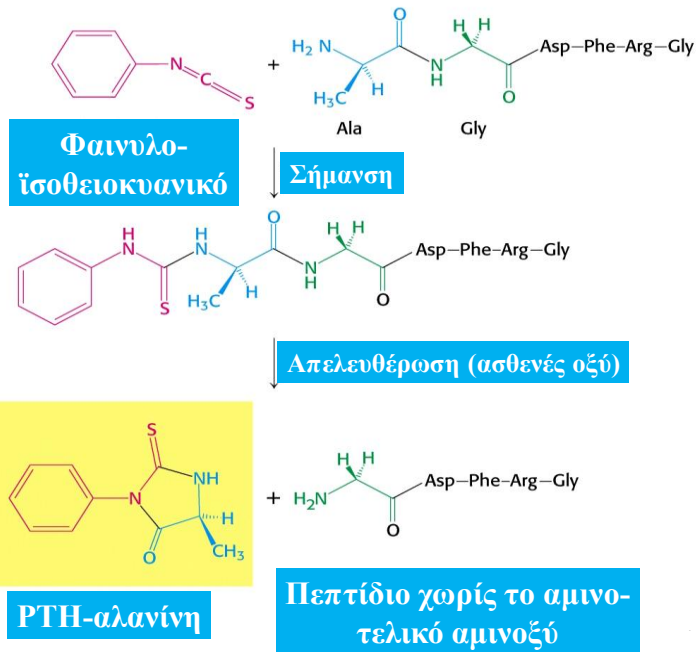


b. 1918

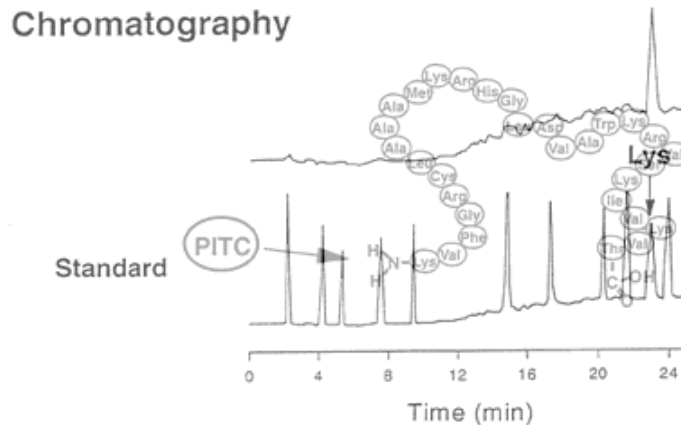


EDMAN DEGRADATION





Edman Microsequencing



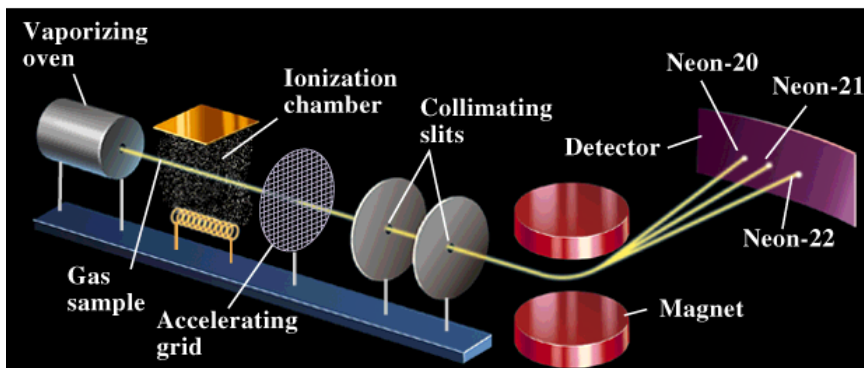
- Ανάπτυξη αυτοματοποιημένων οργάνων για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (sequenators)
- Ένας κύκλος αποικοδόμησης κατά Edman διαρκεί λιγότερο από 1h
- Ευαισθησία pmol πρωτεΐνης
- Προσδιορισμός αλληλουχίας δείγματος πρωτεΐνης που εκλούεται από μια ζώνη ηλεκτροφόρησης SDS-πολυακρυλαμιδίου
- Πρωτεΐνη έως 50 αμινοξέα (απόδοση της φάσης απελευθέρωσης < 100%)

Φασματομετρία Μάζας στην Πρωτεωμική

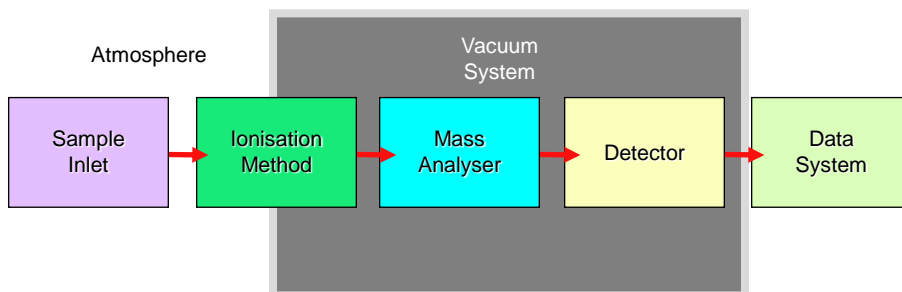
Απίστευτη ισχυρή τεχνολογία- (εργαλείο των χημικών και τώρα και των βιολόγων).

Τεχνολογία που συνδυάζει την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με τον ταυτόχρονο ποσοτικό τους προσδιορισμό

Mass spectrometer and spectrum



Συνιστώντα Μέρη Φασματογράφου Μάζας



Nobel Prize in Chemistry for 2002

- **The Royal Swedish Academy of Sciences** has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2002

"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

with one half jointly to

- **John B. Fenn**
Virginia Commonwealth University, Richmond, USA, and

Koichi Tanaka
Shimadzu Corp., Kyoto, Japan

- *"for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"*

and the other half to

Kurt Wüthrich
Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland and The Scripps Research Institute, La Jolla, USA

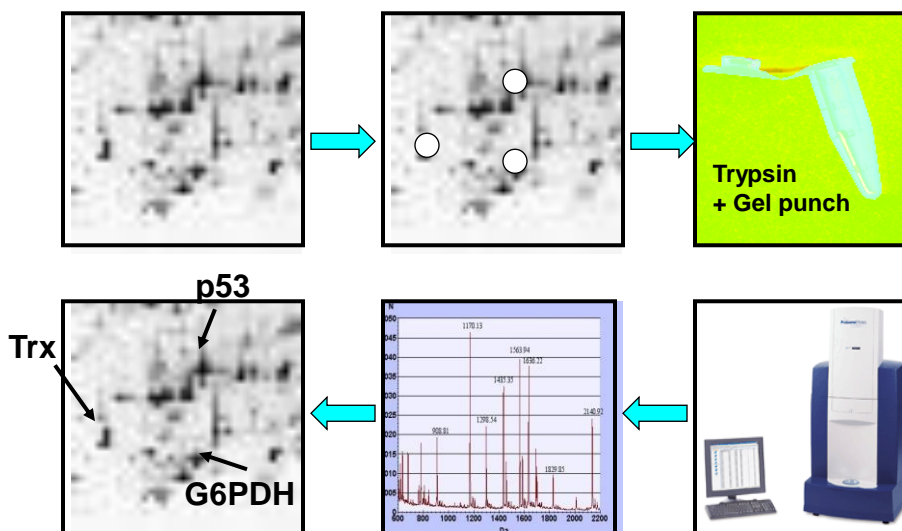
"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution".

Mass spectrometry: Of course proteins can fly!



- With mass spectrometry we can now quickly identify a substance in a sample by accurately determining its molecular mass. Mass spectrometry is a very widely used method for small and medium-sized molecules. John B. Fenn and Koichi Tanaka showed, in different ways, that macromolecules could also be studied. The trick was to get the proteins to fly, or as John Fenn himself said, to give "wings to molecular elephants".

Ταυτοποίηση πρωτεϊνών



Protease Cleavage Rules



Trypsin	XXX[KR]--[!P]XXX
Chymotrypsin	XX[FYW]--[!P]XXX
Lys C	XXXXXK-- XXXXX
Asp N endo	XXXXXD-- XXXXX
CNBr	XXXXXM--XXXXX

Trypsin

- Robust, stable enzyme
- Inexpensive, easily available/purified
- Works over a range of pH & temperature
- Specific and consistent in cleavage
- Cuts frequently to produce “ideal” MW peptides

Chemical Methods for Protein Characterization: In-Gel Proteolysis
--

Why In-Gel Digestion Works:

1. The gel piece behaves like a sponge. It shrinks and swells in response to addition of aqueous or organic solvent. A gel piece shrunk with organic solvent will suck in an aqueous buffer containing reagents, thus bringing them “inside” the matrix to access the protein.
2. The intact protein is trapped in the gel, so many chemical steps can be performed without significant loss.
3. Many of the peptides resulting from proteolysis within the gel freely diffuse out of the matrix.

Ionization Techniques

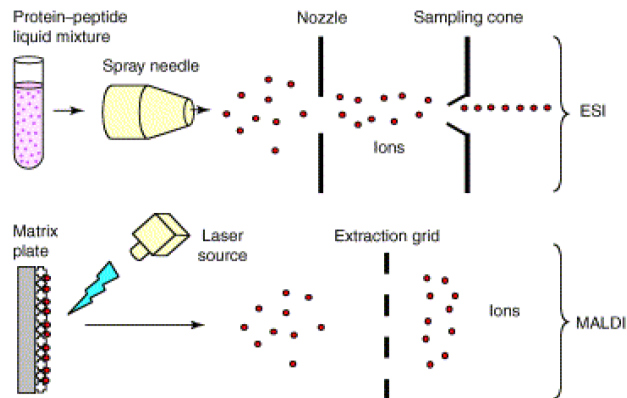
Most common for biological samples

(“soft” ionization methods which induce very little fragmentation):

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)

Electrospray ionization (ESI)

Ιονισμός ESI / MALDI



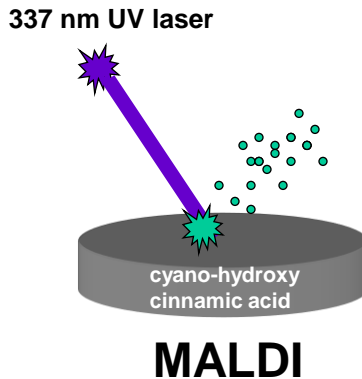
MALDI

Solid phase technique where the peptide sample is mixed with a large excess of matrix material (usually *α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid), which is then precipitated on a plate

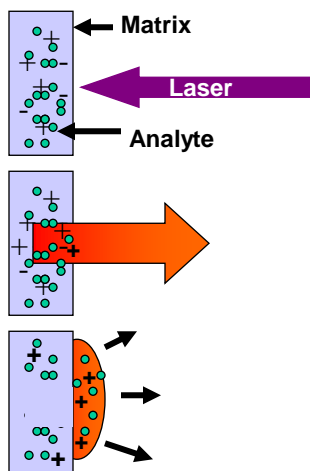
Under vacuum, the matrix material absorbs energy at the wavelength of the laser, resulting in emission of heat, which vaporizes and ionizes the sample, generally by protonation to give a $(M+1)^+$ ion

Can be applied to analysis of gel "plugs" from 2D gel

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization



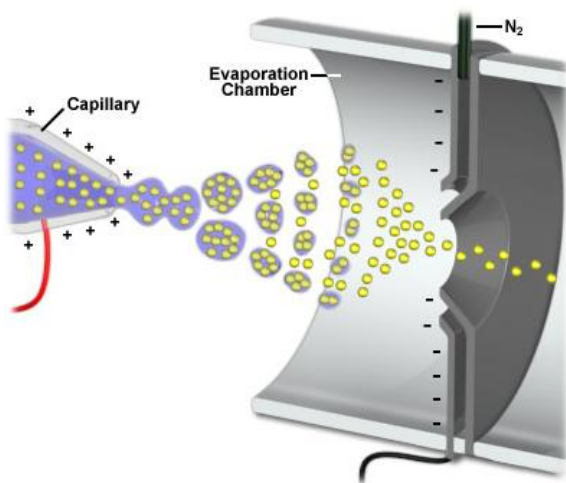
MALDI Ionization



- Absorption of UV radiation by chromophoric matrix and ionization of matrix
- Dissociation of matrix, phase change to super-compressed gas, charge transfer to analyte molecule
- Expansion of matrix at supersonic velocity, analyte trapped in expanding matrix plume (explosion/“popping”)

ESI

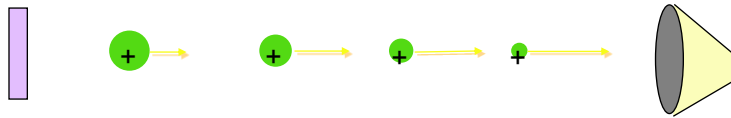
- Generally liquid-phase technique coupled with HPLC



Ionization occurs by spray of sample through a highly charged narrow-bore capillary tip with rapid aerosol formation into a vacuum

As the charged droplets in the mist are desolvated, electrostatic repulsion forces the droplets apart, producing a cloud of ionized peptides with multiple charges

Time-of-Flight Analyser

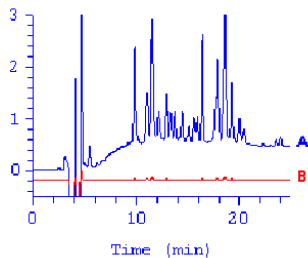


- ◆ All ions start together
- ◆ Smaller ions move faster
- ◆ Measure velocity over known distance (time of flight)



Nano - HPLC

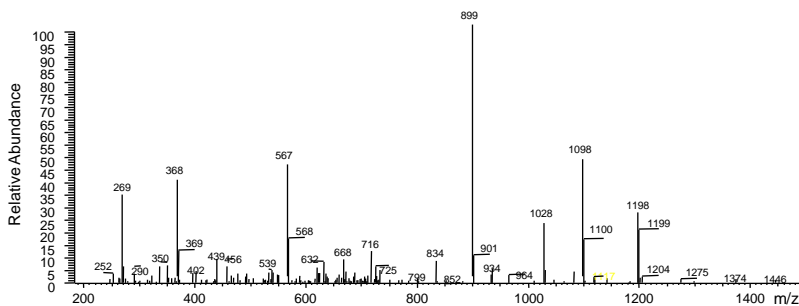
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσεως
με τριχοειδείς στήλες (75 μm x 15 cm)
και ροές κάτω των 200 nl/min



Σύστημα nano-LC με αυτόματο δειγματολήπτη

Μεγάλη βελτίωση στην ευαισθησία
ανίχνευσης πεπτιδίων σε σύγκριση
με απλή HPLC

Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

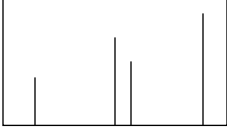
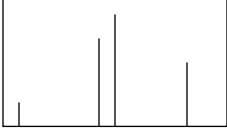
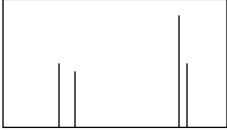


- Τα μοριακά βάρη των πεπτιδίων που προέρχονται από την ενζυμική διάσπαση μιας πρωτεΐνης αποτελούν το «δακτυλικό αποτύπωμα» της.
- Κάθε μία από τις κορυφές αυτές μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω με διαδοχικό MS/MS για την ανάγνωση της αλληλουχίας των αμινοξέων.
- Η ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης γίνεται αναλύοντας τα στοιχεία αυτά σε τράπεζες δεδομένων.

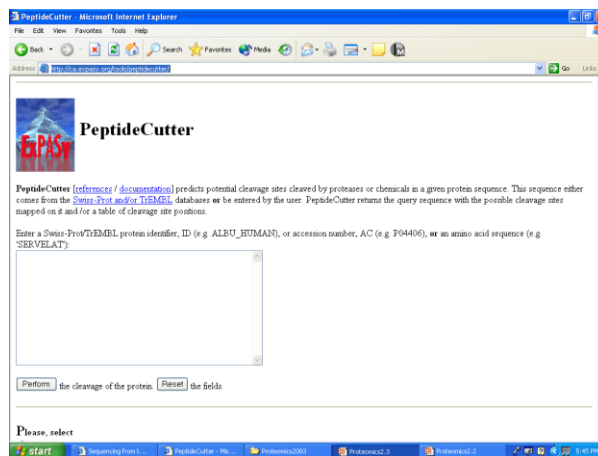
Principles of Fingerprinting

<u>Sequence</u>	<u>Mass (M+H)</u>	<u>Tryptic Fragments</u>
>Protein 1 acedfhsakdfgeasdfp kivtmeewendadnfek qwfe	4842.05	acedfhsak dfgeasdfpk ivtmeewendadnfek qwfe
>Protein 2 acekdfhsadfgasdfp kivtmeewenkdadnfe qwfe	4842.05	acek dfhsadfgasdfpk ivtmeewenk dadnfeqwfe
>Protein 3 acedfhsadfgkasdfp kivtmeewendakdnfe qwfe	4842.05	acedfhsadfgk asdfpk ivtmeewendak dnfeqwfe

Principles of Fingerprinting

<u>Sequence</u>	<u>Mass (M+H)</u>	<u>Mass Spectrum</u>
>Protein 1 acedfhsa k dfqeadsf p k ivtmeewendadnf e k qwfe	4842.05	
>Protein 2 ace k dfhsadfqeadsf p k ivtmeewen k dadn feqwfe	4842.05	
>Protein 3 acedfhsadfqe k asdf p k ivtmeewenda k dn feqwfe	4842.05	

Predicting Peptide Cleavages



<http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>

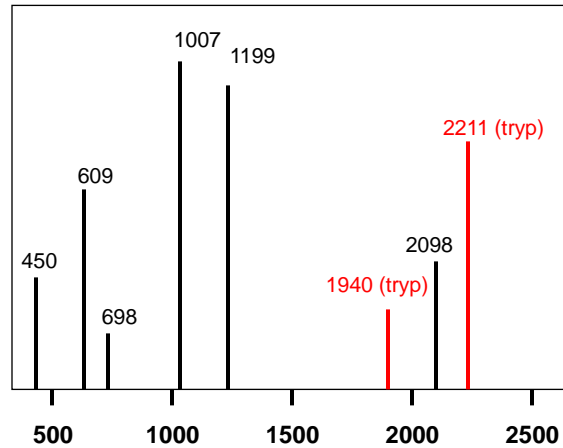
Preparing a Peptide Mass Fingerprint Database

- Take a protein sequence database (Swiss-Prot or nr-GenBank)
- Determine cleavage sites and identify resulting peptides for each protein entry
- Calculate the mass for each peptide
- Sort the masses from lowest to highest
- Have a pointer for each calculated mass to each protein accession number in databank

Building A PMF Database

<u>Sequence DB</u>	<u>Calc. Tryptic Frags</u>	<u>Mass List</u>
>P12345	acedfhsak	450.2017 (P21234)
acedfhsakdfqea	dfgeasdfpk	609.2667 (P12345)
sdfpkivtmeewe	ivtmeewendadnfek	664.3300 (P89212)
ndadnfekqwfe	gwfe	1007.4251 (P12345)
		1114.4416 (P89212)
>P21234	acek	1183.5266 (P12345)
acekdfhsadfqea	dfhsadfgeasdfpk	1300.5116 (P21234)
sdfpkivtmeewe	ivtmeewenk	1407.6462 (P21234)
nkdadnfekqwfe	dadnfekqwfe	1526.6211 (P89212)
		1593.7101 (P89212)
>P89212	acedfhsadfgek	1740.7501 (P21234)
acedfhsadfqeka	asdfpk	2098.8909 (P12345)
sdfpkivtmeewe	ivtmeewendak	
nda.kdnfekqwfe	dnfegwfe	

Query (MALDI) Spectrum



Query vs. Database

<u>Query Masses</u>	<u>Database Mass List</u>	<u>Results</u>
450.2201	450.2017 (P21234)	2 Unknown masses 1 hit on P21234
609.3667	609.2667 (P12345)	
698.3100	664.3300 (P89212)	
1007.5391	1007.4251 (P12345)	3 hits on P12345
1199.4916	1114.4416 (P89212)	Conclude the query protein is P12345
2098.9909	1183.5266 (P12345)	
	1300.5116 (P21234)	
	1407.6462 (P21234)	
	1526.6211 (P89212)	
	1593.7101 (P89212)	
	1740.7501 (P21234)	
	2098.8909 (P12345)	

Ταυτοποίηση πρωτεΐνης σε βάση δεδομένων

```
database=D:\DataBase\sprot.fasta, accession=AOP2_MOUSE

peptide(s)=VVDSLQLTGTK KGESVMVPTLSEEEK VVFIFGPKK VVDSLQLTGTKPVATPVDWK LFPFIIDDK
PGGLLLGDEAPNFEANTTIGR LIALSIDSVEDHLAWSK FHDFLGDSWGILFSHPR DLAILLGMLDPVEK

Analyzing ...

>AOP2_MOUSE (O08709) ANTIOXIDANT PROTEIN 2 (1-CYS PEROXIREDOXIN)

PGGLLLGDEA PNFEANTTIG RIRFHDFLGD SWGILFSHPR DFTFVCTTEL GRAAKLAPEF AKRNVKLIAL SIDSVEDHLA
WSKDINAYNG ETPEKLPFP IIDDKRDLA ILLGMLDPVE KDDNNMPVTA RVVFIFGPK KKLKLSILYPA TTGRNFEIL
RVVDSLQLTG TKPVATPVDW KGESVMVVE TLSEEEKQC FPKGVFTKEL PSGKYLRYT PQP

>average mass = 24721

position sequence (NCBI BLAST link)
-----
162- 172 VVDSLQLTGK
182- 198 KGESVMVPTLSEEEK
132- 141 VVFIFGPKK
162- 181 VVDSLQLTGTKPVATPVDWK
97- 105 LFPFIIDDK
1- 21 PGGLLLGDEAPNFEANTTIGR
67- 83 LIALSIDSVEDHLAWSK
24- 40 FHDFLGDSWGILFSHPR
108- 121 DLAILLGMLDPVEK
Protein Coverage: 125/223 = 56.1% by amino acid count, 13647/24721 = 55.2% by mass

Search SWISS-PROT with AOP2_MOUSE via accession, descr./ID, or full text field.
```

Identification of Post-translational Modifications (PTMs)

- Phosphorylation, methylation, demethylation, deamidation, glycosylation
- Phosphorylation is the most prevalent and dynamic form of protein regulation in cells
- >30% of all proteins are phosphorylated during their functional life cycle
- Aberrant phosphorylation is a hallmark of human disease
- Specific kinases (and in some cases phosphatases) are major drug targets

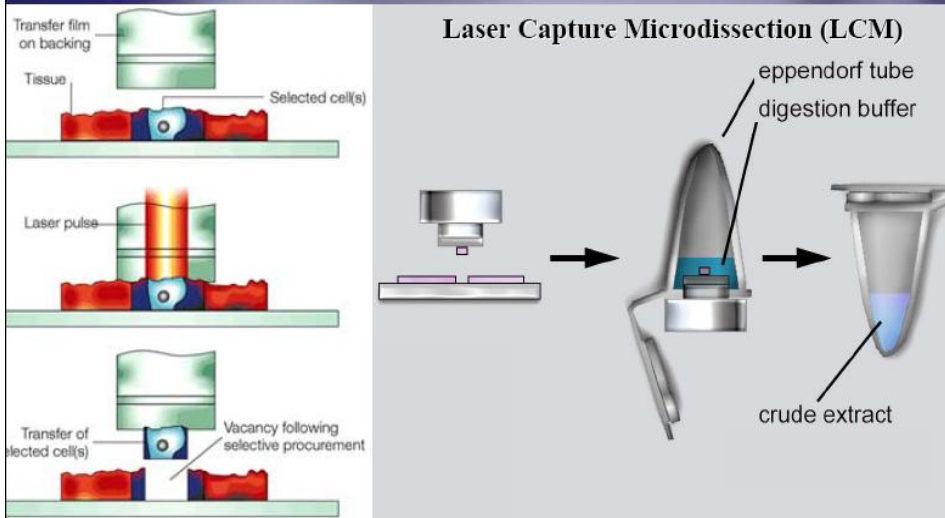
How to find PTMs, e.g., phosphorylations?

- Compare peptide mixture with and without phosphatase treatment by MALDI-TOF (mass difference of 80 amu)
- Also most phosphopeptides show a characteristic loss of phosphate in the reflectron mode of TOF
- Once the phosphorylated peptide is identified, MS/MS sequencing localizes the site
- Important question: to what extent is any one site phosphorylated
- If identification of phosphopeptides is the task, these can be selectively concentrated by the use of immobilized metal affinity chromatography (IMAC), and subsequent analysis of phosphopeptides by MALDI-TOF

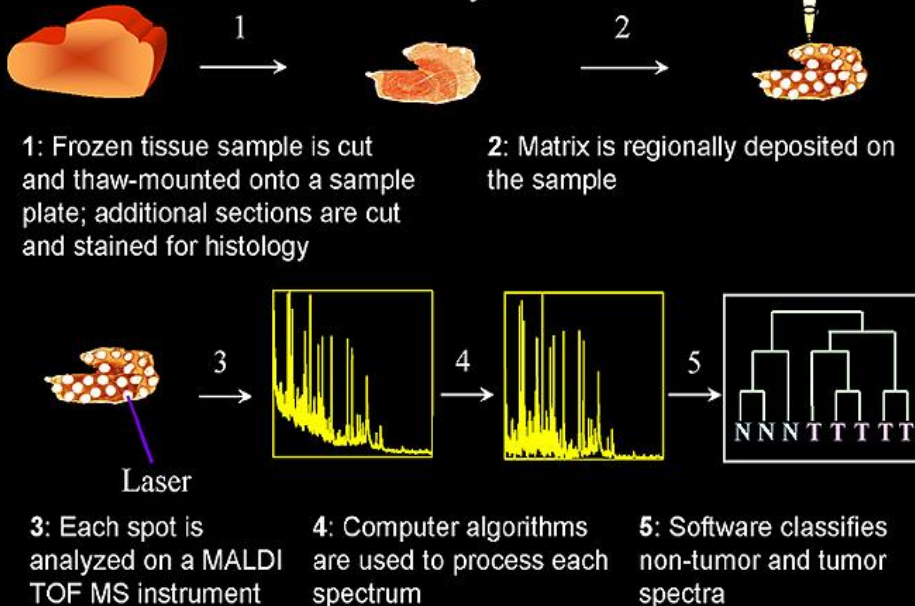
Imaging

- MALDI Imaging Mass Spectrometry is a technology that allows one to simultaneously map hundreds of molecular components that are present in thin tissue sections with a lateral resolution as high as 30-50 μm .
- An extension of the protein profiling technique, imaging allows one to visualize the localized distribution of peptides, proteins, lipides, drugs, etc. within the tissue. The preparation of a sample for imaging is illustrated below:

Λήψη του δείγματος (acquisition)



Sample Preparation for Direct-Tissue MALDI MS Analysis



Μελλοντικές κατευθύνσεις

Αυτοματισμός, διεκπεραίωση πολλών δειγμάτων

Καλύτερες μέθοδοι διαχωρισμού και ανίχνευσης πρωτεϊνών

Καλύτερη ποσοτικοποίηση διαφορικής έκφρασης

Καλύτερα εργαλεία βιοπληροφορικής

- Συνδυασμός:
- μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών (high-throughput, αυτοματισμός)
 - βιοαισθητήρων (ανίχνευση χωρίς σήμανση)
 - φασματογράφων μάζας (ευαισθησία)

Μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

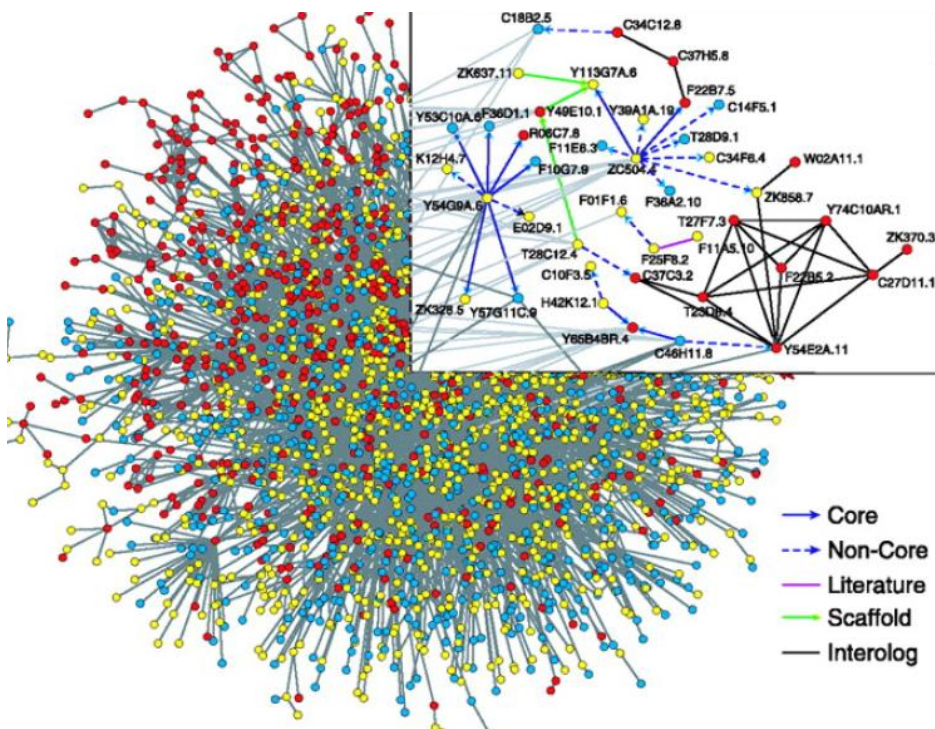
-Η μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων είναι σημαντική για την κατανόηση πολλών βιολογικών λειτουργιών (στη μεταγωγή σήματος, όπου σήματα από το εξωτερικό του κυττάρου μεταφέρονται στο εσωτερικό του μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνικών μορίων).

-Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι στιγμιαία (π.χ. οι κινάσες έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμά τους, το φωσφορυλιώνουν και αποδεσμεύονται από αυτό), ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες δεσμεύονται μεταξύ τους για εκτενέστερα χρονικά διαστήματα μέχρι να ολοκληρώσουν τη βιολογική τους δράση (π.χ. οι ιμφορτίνες που μεταφέρουν πρωτεΐνες από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ:

- Σύστημα διπλού υβριδίου ζύμης (Yeast Two-Hybrid system)
- Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-IP, Co-ImmunoPrecipitation)
- Συγκατακρήμνιση (Pull-down assay)
- Καθαρισμός Διαδοχικής Συγγένειας (TAP, Tandem Affinity Purification)
- Φθορισμό-Μεταφερόμενη Ενέργεια Συντονισμού (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Μικροθερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC, Isothermal Titration Calorimetry)
- Συντονισμός Επιφανειακών Πλάσμονίων (SPR, Surface Plasmon Resonance)

Οι πρωτεΐνες
εκφράζουν τη δράση τους
μόνο μέσα στο πλαίσιο
ολοκληρωμένων
λειτουργικών δικτύων



Drosophila Protein Interaction Map

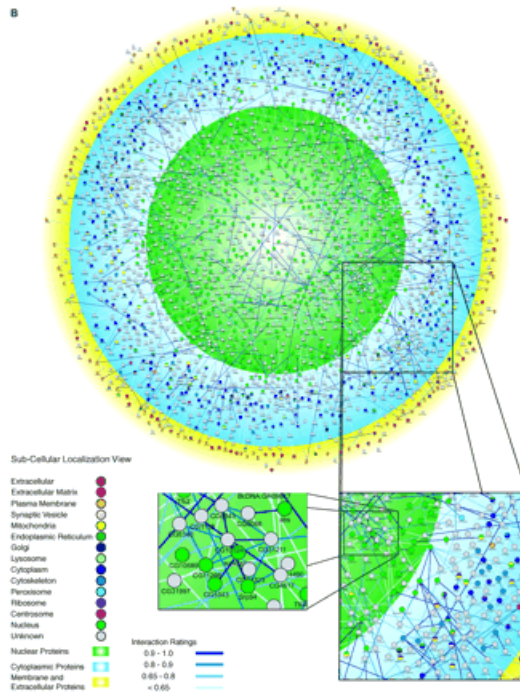
7048 proteins – 20405 interactions

Refinement
with software



4679 proteins – 4780 interactions

From Giot et al., Science
302: 1727-36, 2003

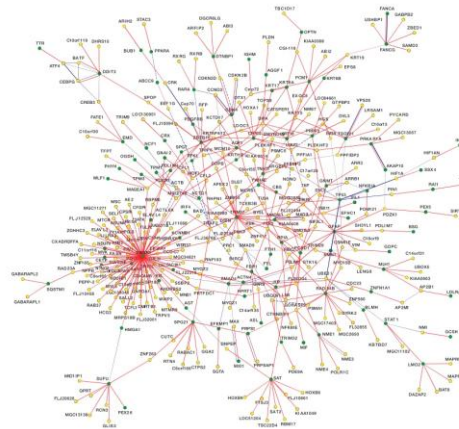


Preliminary Human Protein Interaction Map

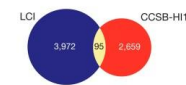
Yeast two-hybrid:

8100 proteins – 2800 interactions

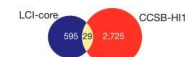
Verification with co-precipitation assay: 78%



300 new connections to over 100
disease-associated proteins



Overlap = 2.3% of LCI



Overlap = 4.6% of LCI-core



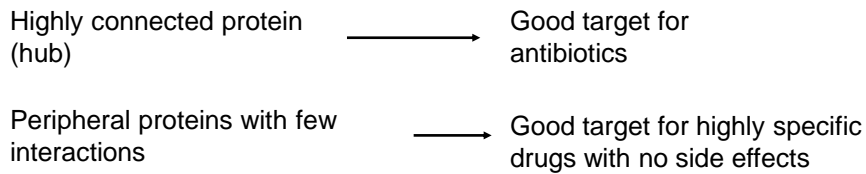
Overlap = 8.4% of LCI-hypercore

Overlap with
published interactions

From Rual et al., Nature 437, 1173-1178
(2005)

Protein Interaction Maps and Drug Discovery

- Identify proteins, complexes or pathways involved in a specific disease
- Predict and avoid side-effects

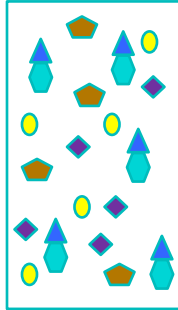


ΣΥΝ-ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

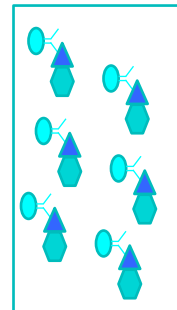
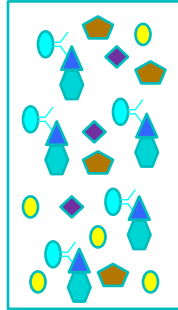
- Η τεχνική βασίζεται στην επιλογή του κατάλληλου αντισώματος που θα αναγνωρίσει επιλεκτικά την πρωτεΐνη-στόχο (αντιγόνο), μέσα σε ένα ετεροδιμερές ή ένα μεγαλύτερο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο.
- Το αντίσωμα επωάζεται πάνω στα ακινητοποιημένα μόρια πρωτεΐνης Α ή G που είναι τοποθετημένα σε μια επιφάνεια (gel αγαρόζης).
- Το κυτταρικό εκχύλισμα επωάζεται πάνω στο αντίσωμα και η πρωτεΐνη-αντιγόνο μαζί με τις πρωτεΐνες που είναι ενωμένες με αυτή δεσμεύονται σε αυτό.
- Η επιφάνεια ξεπλένεται και όλες οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν από το αντίσωμα φεύγουν.
- Το σύμπλοκο αντιγόνου-ΑΝΤΪΣΩΜΑΤΟΣ εκλούεται με αποδιατακτικό διάλυμα χαμηλού pH.
- Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-αντιγόνο αναλύονται με ηλεκτροφόρηση, αποτύπωση κατά Western, φασματοσκοπία μάζας.

ΣΥΝ-ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Cell Lysate or
Protein Mixture

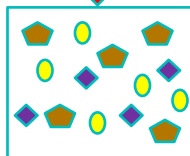


Incubation with
antibody coupled resin

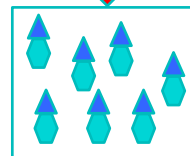


- Coupled antibody
- Antigen
- Protein Interacting with Antigen

↓ Wash



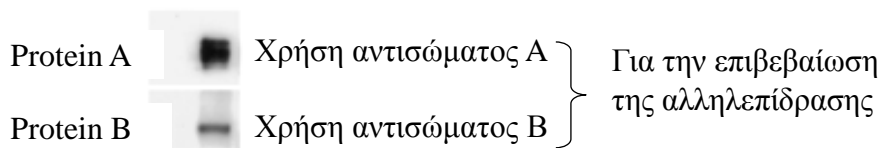
↓ Elute



Analyze

ΣΥΝ-ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Αποτύπωση κατά Western



ΣΥΝ-ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

-Η χρήση κυτταρικού εκχύλισματος έχει τα εξής δύο πλεονεκτήματα:

1. Τόσο η πρωτεΐνη αντιγόνο, όσο και οι αλληλεπιδρούσες με αυτήν πρωτεΐνες βρίσκονται στην αναλογία όπου βρίσκονται και στα ζωντανά κύτταρα.
2. Οι πρωτεΐνες έχουν υποστεί όλες τις απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις,

...με αποτέλεσμα η αλληλεπίδραση που παρατηρείται, να μην οφείλεται σε κενά της τεχνικής (πολύ λιγότερα false positive).

-Η χρήση του αντισώματος προσδίδει στην τεχνική την εξειδίκευση που απαιτείται, αλλά η παραγωγή του μπορεί να είναι επίπονη.

-Εξάλλου, η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να αναστέλλει τη σύνδεση του αντιγόνου με τις αλληλεπιδρούσες με αυτό πρωτεΐνες.

-Όταν ακόμα και η αρχή στην οποία βασίζεται η τεχνική αμφισβητείται, δηλαδή όταν το αντίσωμα δεν είναι αρκετά ειδικό, τότε βρίσκουν εφαρμογή οι πρωτεΐνες 'σύντηξης' με GST, MBP, ...ετικέτες εναντίον των οποίων έχουν παραχθεί μονοκλωνικά αντισώματα.

ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

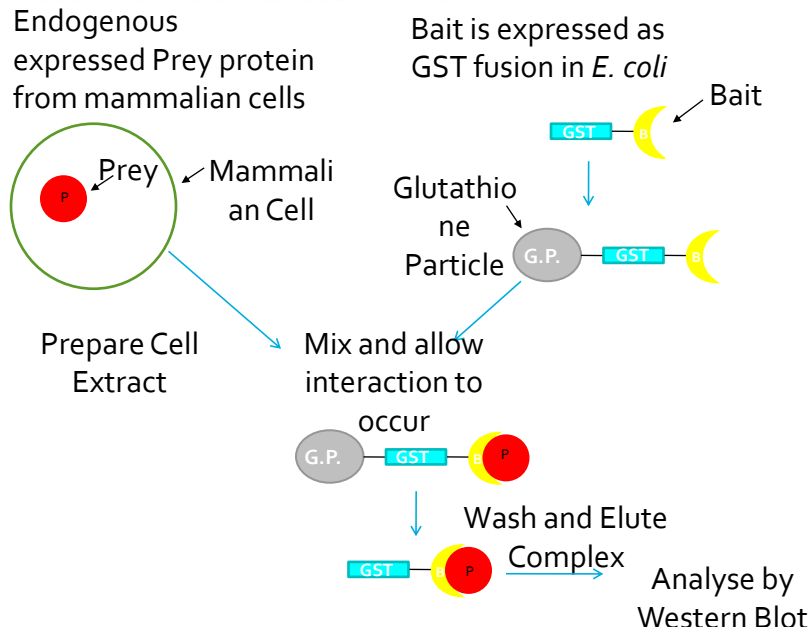
-Η τεχνική είναι παρόμοια με εκείνη της συν-ανοσοκατακρήμνισης με τη διαφορά ότι τη θέση του αντισώματος παίρνει μια πρωτεΐνη B (bait).

-Η πρωτεΐνη B εκφράζεται ως fusion πρωτεΐνη με GST ετικέτα από ανασυνδυασμένα βακτηριακά κύτταρα.

-Η πρωτεΐνη P εκφράζεται είτε από κύτταρα θηλαστικών είτε από ανασυνδυασμένα βακτηριακά κύτταρα και λαμβάνεται ως κυτταρικό εκχύλισμα.

-Τα δυο εναιωρήματα επωάζονται μαζί για να αλληλεπιδράσει η πρωτεΐνη B με την πρωτεΐνη P, απομακρύνονται με έκπλυση οι πρωτεΐνες που δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη B και τελικά εκλύεται η GST fusion πρωτεΐνη B συζευγμένη με την πρωτεΐνη P και ταυτοποιείται με αποτύπωση κατά Western.

ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ



ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

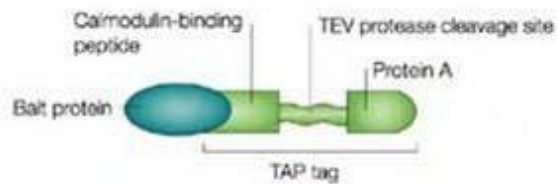
-Η συγκατακρήμνιση χρησιμοποιείται κυρίως ως μέθοδος επιβεβαίωσης της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών.

-Αποφεύγεται η χρήση αντισώματος, που θα μπορούσε να παρεμβληθεί στη σύνδεση του αντιγόνου με τις αλληλεπιδρούσες με αυτό πρωτεΐνες.

-Η συγκατακρήμνιση, όμως απαιτεί μεγάλη ποσότητα καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

TAP

Και η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που έχει συντηχθεί στο καρβοξυτελικό της άκρο, με μια ετικέτα που περιλαμβάνει, ένα πεπτίδιο που δεσμεύει ασβεστιοτροποποιητίνη (calmodulin binding peptide, CBP), μια θέση κοπής από TEV πρωτεάση και την πρωτεΐνη A.



TAP

-Η fusion πρωτεΐνη B εισάγεται στα κύτταρα του ξενιστή και αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες τους.

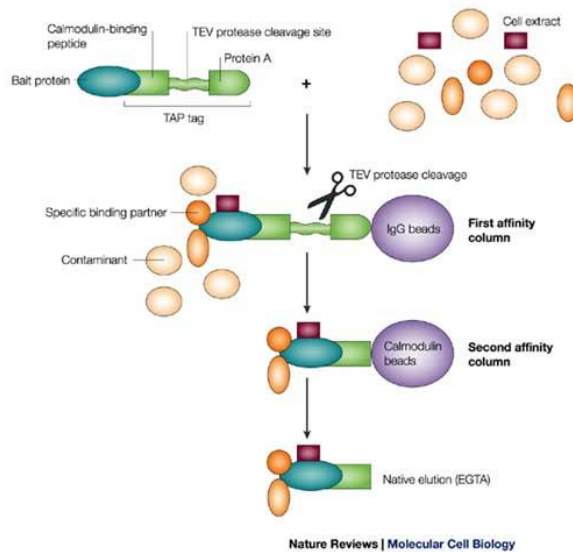
-Τα κύτταρα λύνονται και το εναίωρημα διέρχεται από στήλη συγγένειας με IgG σφαιρίδια όπου δεσμεύεται η πρωτεΐνη A

-Στις δεσμευμένες πρωτεΐνες προστίθεται TEV πρωτεάση με αποτέλεσμα η ετικέτα της fusion πρωτεΐνης B να κόβεται στη θέση κοπής από TEV πρωτεάση.

-Η εναπομείνουσα fusion πρωτεΐνη B διέρχεται από δεύτερη στήλη συγγένειας με σφαιρίδια καλμοδουλίνης, όπου συνδέεται μέσω του CBP.

-Τελικά, οι αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες εκλύονται με EGTA και αναλύονται με αποτύπωση κατά Western. (Γιατί EGTA??)

TAP



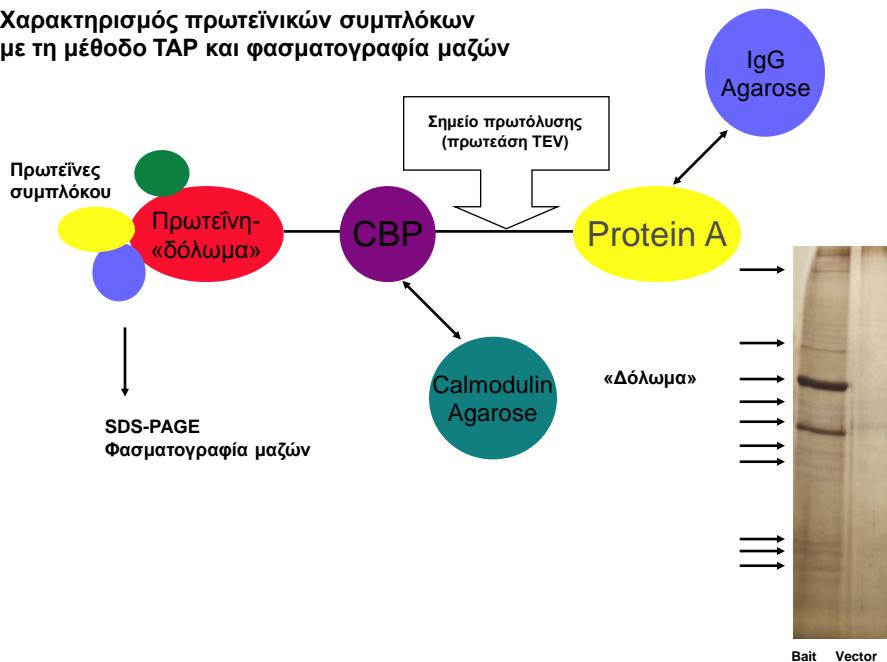
TAP

-Η καινοτομία της τεχνικής έγκειται στην εισαγωγή της πρωτεΐνης στα κύτταρα του ξενιστή (επιμόλυνση). Με τον τρόπο αυτό η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες στο φυσικό περιβάλλον του κυττάρου καθιστώντας την τεχνική αυτή ιδιαίτερα αξιόπιστη.

-Ωστόσο, η χρήση μιας τόσο μεγάλης ετικέτας, παρόλο που είναι απαραίτητη για την εφαρμογή της τεχνικής μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα τόσο στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Β, όσο και στην αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες (αν και υπάρχουν περιπτώσεις που η ανεπαρκής έκθεση της στα σφαιρίδια συγγένειας δυσχεραίνει την εφαρμογή).

-Πρόβλημα μπορεί να δημιουργηθεί και με την ανεξέλεγκτη δράση της TEV πρωτεάσης, όταν αυτή δεν εντοπίζεται μόνο στη θέση κοπής από TEV πρωτεάση.

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων με τη μέθοδο TAP και φασματογραφία μαζών



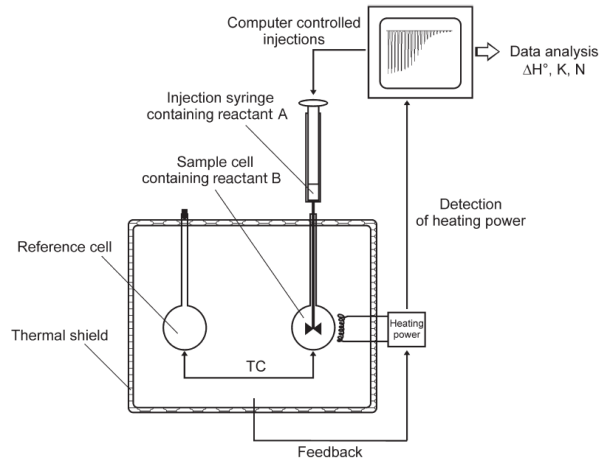
ΜΙΚΡΟΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

-Η μικροθερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC) χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση αντιδράσεων μεταξύ βιομορίων, όπως πρωτεϊνών με πεπτίδια ή άλλες πρωτεΐνες και βασίζεται στην αρχή ότι όλες οι χημικές και βιολογικές διαδικασίες συνοδεύονται από έκλυση (εξώθερμες) ή απορρόφηση (ενδόθερμες) θερμότητας.

-Το θερμιδόμετρο αποτελείται από το κελί του δείγματος και το κελί αναφοράς (με μηδενική διαφορά θερμοκρασίας ανάμεσα τους), τη σύριγγα αυτοματοποιημένης έγχυσης, το σύστημα επανατροφοδότησης θερμότητας και το σύστημα μέτρησης θερμότητας.

-Η τιτλοδότηση αραιού πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται στο κελί του δείγματος με διάλυμα ($10^{-5}M$) πρωτεΐνης πραγματοποιείται με σειρά εγχύσεων της πρωτεΐνης μέσω της σύριγγας στο κελί σε αδιαβατικές συνθήκες.

ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΟ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ



ΜΙΚΡΟΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

-Αν η αντίδραση της πρωτεΐνης που εγχέεται από τη σύριγγα με εκείνη που υπάρχει στο κελί είναι εξώθερμη, τότε το θερμιδόμετρο θα χρησιμοποιήσει λιγότερη ενέργεια για να διατηρήσει σταθερή την θερμοκρασία, ενώ αν η αντίδρασή είναι ενδόθερμη, το θερμιδόμετρο θα χρησιμοποιήσει περισσότερη ενέργεια.

-Η ακριβής μέτρηση της ενέργειας που απαιτείται για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του κελιού καθ' όλη τη διάρκεια των αλληπάλληλων εγχύσεων οδηγεί στον υπολογισμό θερμοδυναμικών παραμέτρων όπως η ελεύθερη ενέργεια, η ενθαλπία, η εντροπία, η σταθερά σύνδεσης καθώς και η στοιχειομετρία της σύνδεσης.

binding



stability

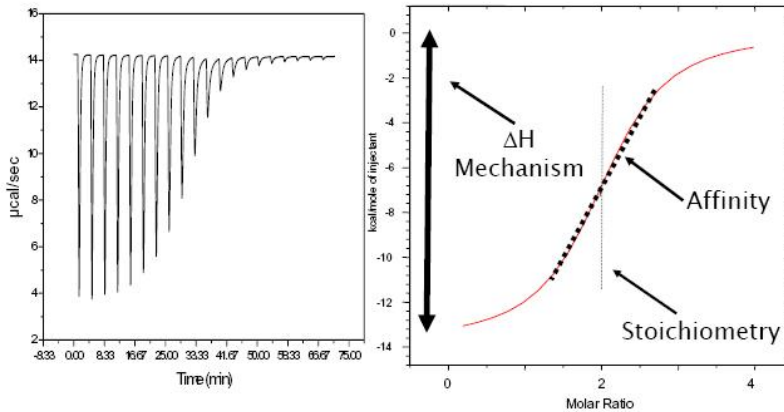


kinetics



Isothermal Titration Calorimetry

Typical ITC Data



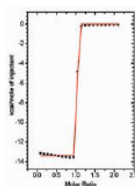
Ultrasensitive Calorimetry for the Life Sciences™



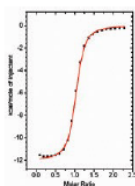
Limitations

Window of binding strength typically 10^3 - 10^9 M^{-1}

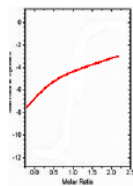
Examples of variable binding constants. $\Delta H=13\text{kJ/mol}$, $n=1$



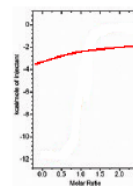
Too strong



Perfect

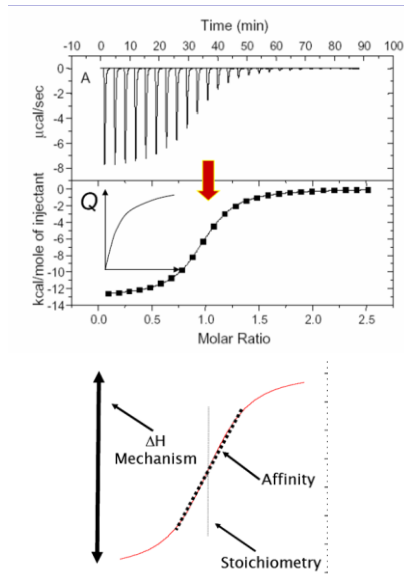


Hard



Too weak

ΜΙΚΡΟΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ



Ένα και μόνο πείραμα
μπορεί να υπολογίσει τα
ακόλουθα θερμοδυναμικά
μεγέθη:

- Ενθαλπία σύνδεσης (ΔH)
- Στοιχειομετρία σύνδεσης (N)
- Σταθερά σύνδεσης (K_b)



- Ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης (ΔG)
- Εντροπία σύνδεσης (ΔS)

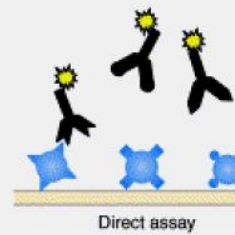
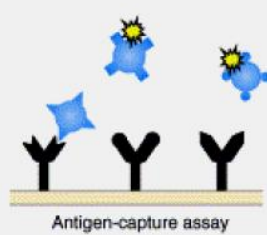
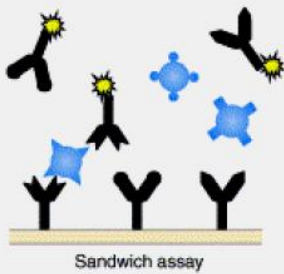
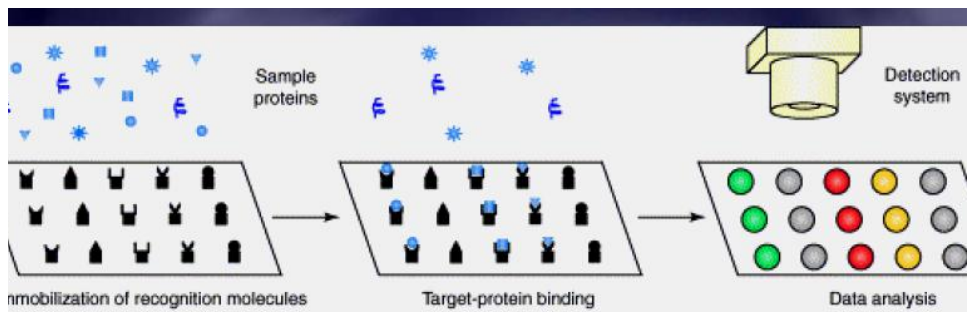
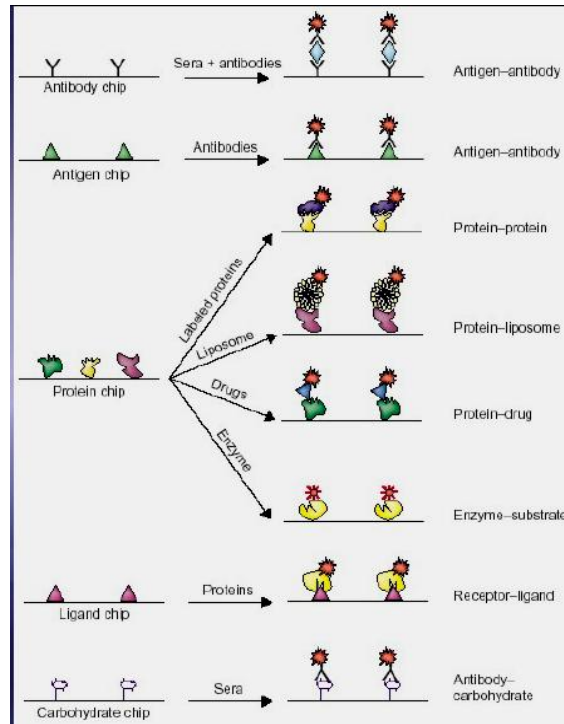
Μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών / πεπτιδίων

Συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των μικροσυστοιχιών
(μεγάλη ταχύτητα και όγκος αναλύσεων, ευαισθησία, κλπ)
με την ικανότητα ανάλυσης πρωτεϊνών

Συνολική ανάλυση σε κυτταρικά εκχυλίσματα του
σχηματισμού συμπλόκων
ή της ενζυμικής δραστηριότητας

Παραδείγματα:

- Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών
- Ανάλυση υποστρωμάτων κινασών και άλλων ενζύμων
- Αναγνώριση πρωτεϊνικών στόχων φαρμακευτικών ουσιών

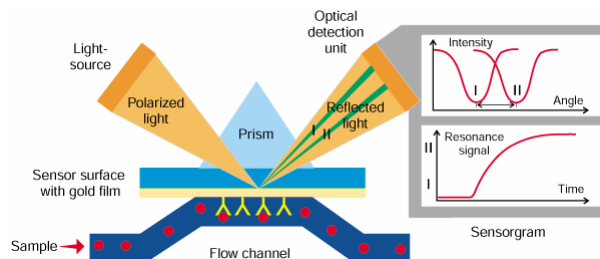


ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ

- Διάθλαση χαρακτηρίζεται η εκτροπή της διεύθυνσης του φωτός όταν αυτό περάσει από τη διεπιφάνεια που χωρίζει δυο υλικά διαφορετικής οπτικής πυκνότητας.
- Ολική εσωτερική ανάκλαση συμβαίνει όταν το φως, που διαδίδεται μέσω ενός οπτικά πυκνότερου υλικού προσπίπτει στη διεπιφάνεια με ένα υλικό μικρότερης οπτικής πυκνότητας, με γωνία πρόσπτωσης θ μεγαλύτερη της κρίσιμης γωνίας θ_c . (Ως θ_c ορίζεται η γωνία πρόσπτωσης για την οποία η διαθλώμενη ακτινοβολία φωτός εξέρχεται εφραπτομενικά προς την επιφάνεια).
- Όταν μια λεπτή στρώση χρυσού (50 nm) τοποθετηθεί στη διεπιφάνεια των δυο υλικών, τότε η ενέργεια από το φως διεγείρει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια του χρυσού, τα οποία καλούνται επιφανειακά πλασμόνια (surface plasmons).
- Συντονισμός συμβαίνει όταν η ορμή των πλασμονίων γίνει ίση με την ορμή των εισερχόμενων φωτονίων (μέγιστη απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας) και γωνία συντονισμού είναι εκείνη όπου ελαχιστοποιείται η ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας.

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ

- Ο βιοαισθητήρας SPR είναι ένα σύστημα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων, όπου μια πρωτεΐνη προσδέτης έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του χρυσού.
- Ο βιοαισθητήρας SPR μετράει αλλαγές στη γωνία συντονισμού σε πραγματικό χρόνο.
- Η αλλαγή της γωνίας συντονισμού σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα πρωτεΐνης που αντέδρασε με την πρωτεΐνη προσδέτη.





...ευχαριστώ για την προσοχή σας