



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

# ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ

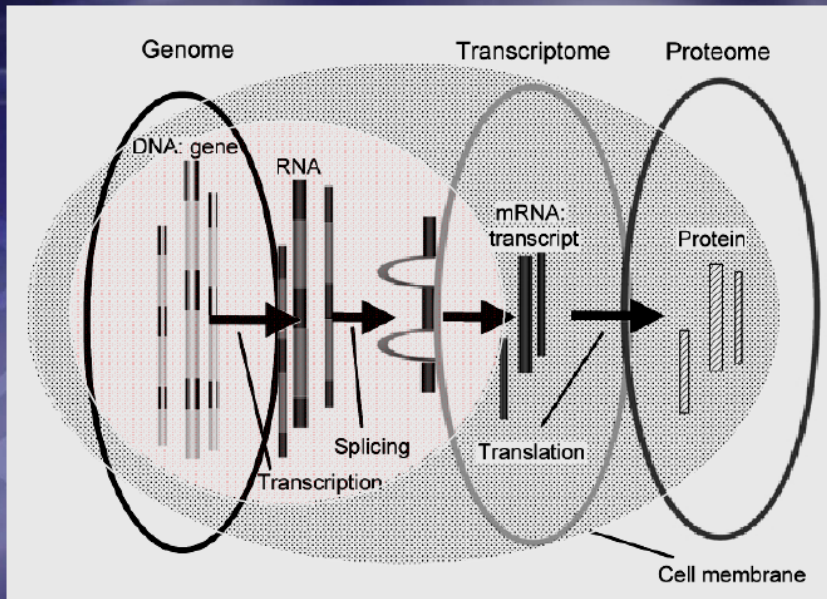
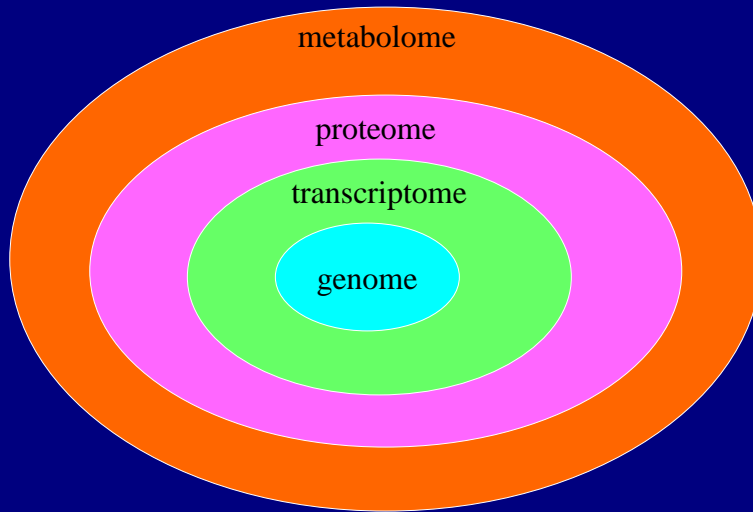
## Ορισμός Πρωτεωμικής

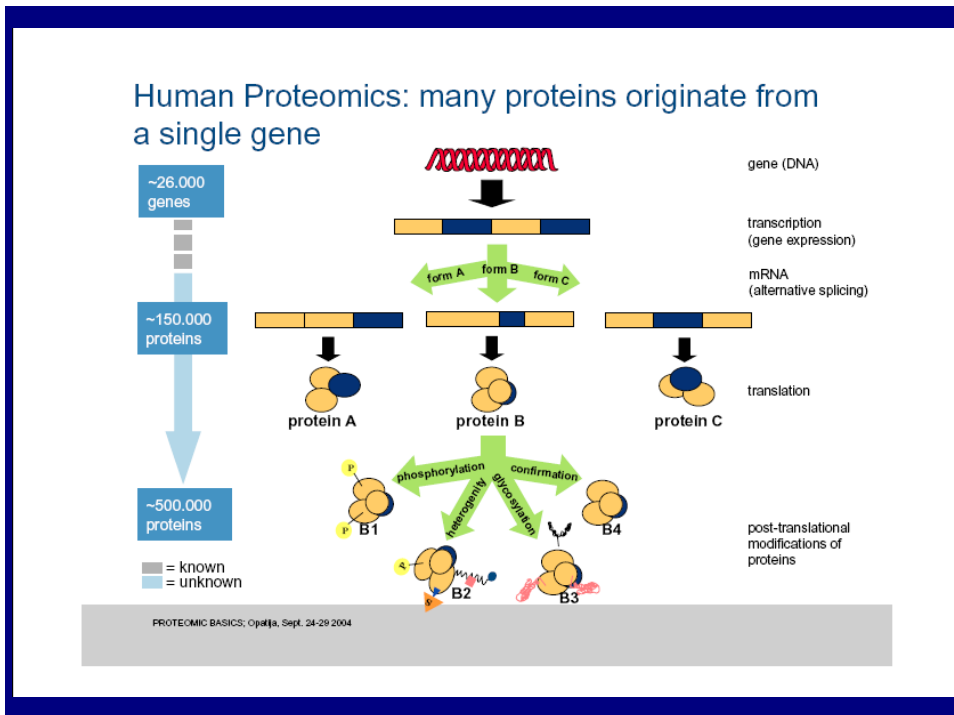
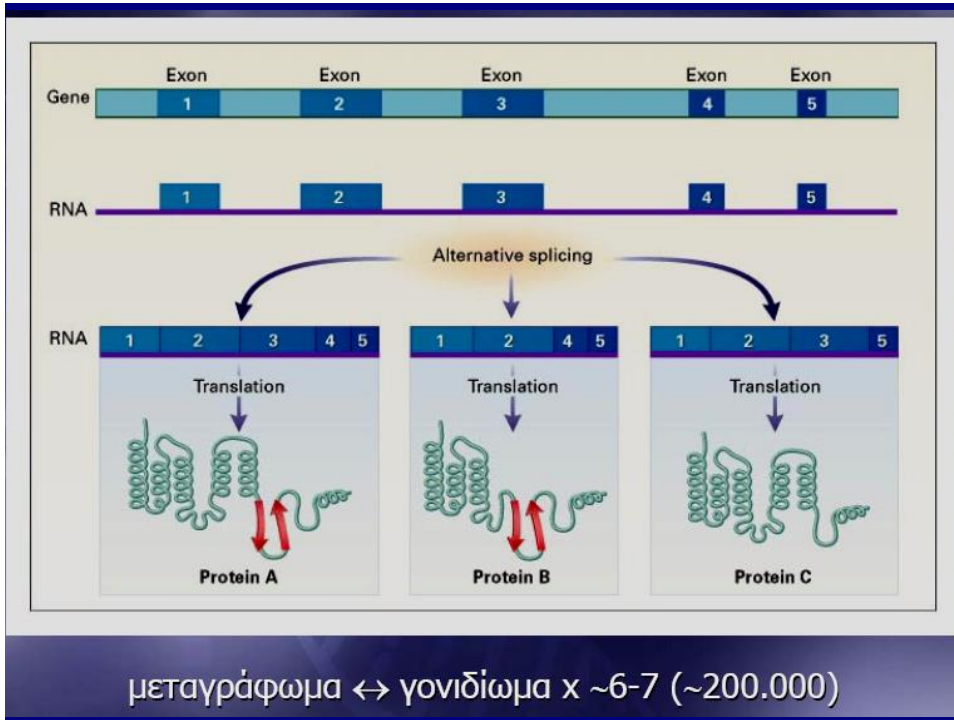
Ανάλυση του συνόλου (ή υποσυνόλων) των εκφραζομένων πρωτεϊνών ενός οργανισμού (μονοκύτταρος) ή ενός κυτταρικού τύπου ή ιστού

σε ποιοτικό αλλά και ποσοτικό επίπεδο

Ο όρος εισάγεται το 1994 από τον Marc Wilkins που την όρισε ως "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."

# Πρωτέομα





## 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.)

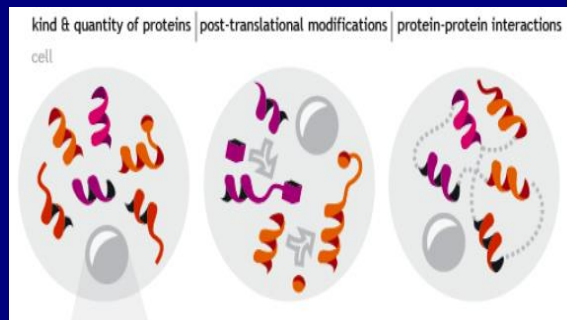
Περιβαλλοντικές επιδράσεις  
(π.χ. οξειδωση)

- ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ (proteomics)
- Λειτουργική πληροφορία (είδος, λειτουργία & αλληλεπίδρασεις πρωτεϊνών 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

κάθε γένωμα εκφράζει  
διάφορες μορφές πρωτεϊνών,  
σε διαφορετικές ποσότητες,  
κάτω από διαφορετικές συνθήκες

## Δυναμική της Πρωτεωμικής

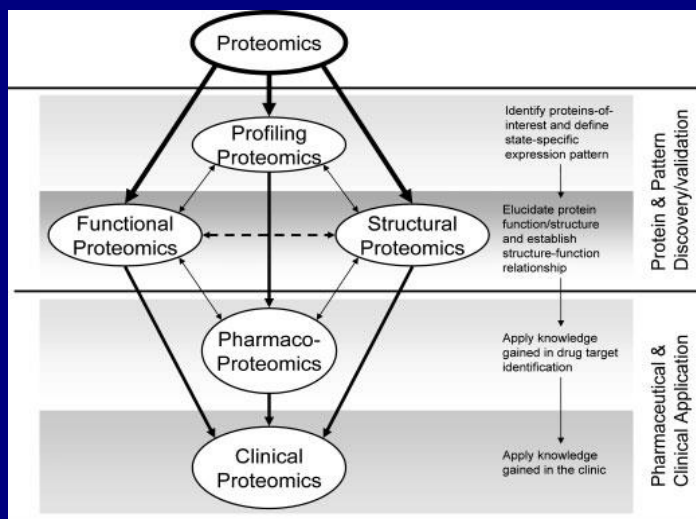
- Επίπεδα έκφρασης
- Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
- Δημιουργία συμπλόκων
- Δομή



# Είδη πρωτεομικής

- Πρωτεομική έκφρασης (Expression or Analytical Proteomics)
  - 2 dimensional electrophoresis gels
  - Mass Spectrometry, Microsequencing
- Πρωτεομική αλληλεπίδρασης (Functional or Interaction Proteomics)
  - HT Functional Assays, Ligand Chips
  - Yeast 2-hybrid, Deletion Analysis, Motif Analysis
- Δομική πρωτεομική (Structural Proteomics)
  - High throughput X-ray Crystallography/Modeling
  - High throughput NMR Spectroscopy/Modeling

# Κατηγορίες Πρωτεωμικής

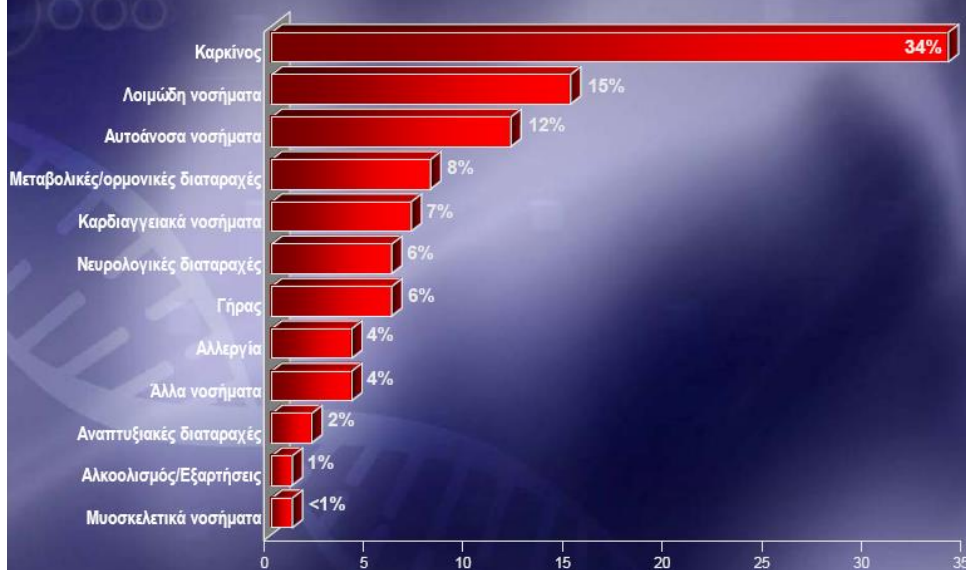




# Βιοϊατρικές Εφαρμογές Πρωτεωμικής

- 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





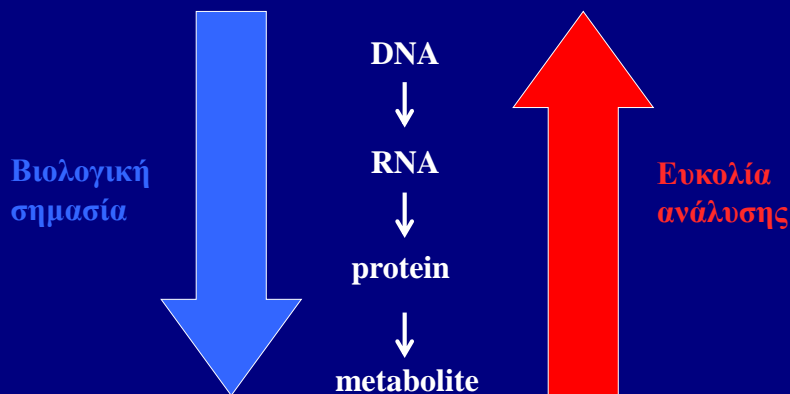
## US Food and Drug Administration-Approved Cancer Biomarkers

Medscape®		www.medscape.com		
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

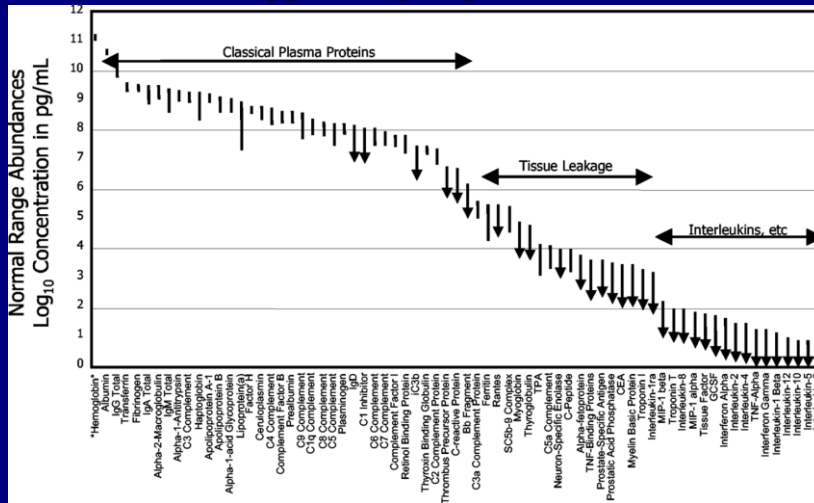
BTA, bladder tumour-associated antigen; CA, cancer antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; FDP, fibrin degradation product; FISH, fluorescent in-situ hybridization; GIST, gastrointestinal stromal tumour; IHC, immunohistochemistry; NMP22, nuclear matrix protein 22; PSA, prostate-specific antigen.

Source: Nat Rev Cancer © 2005 Nature Publishing Group

## Προβλήματα και δυνατότητες για high-throughput analysis

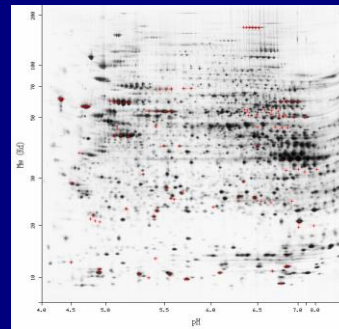


## Το πρωτέωμα ανθρώπινου πλάσματος >10 τάξεις μεγέθους διαφορά σε σχετική αφθονία



## Πρωτεομική έκφρασης

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



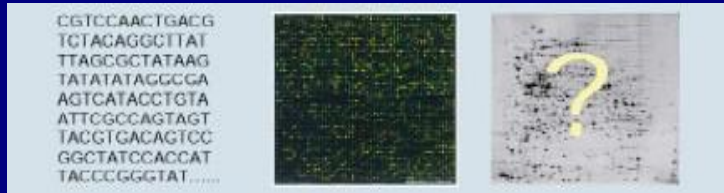
- Διέγερση με κυτοκίνες / αυξητικούς παράγοντες
- Κυτταρική διαφοροποίηση
- Απόπτωση
- Καρκινική μεταβολή

# Εργαλεία

DNA  
Genome

RNA  
Transcriptome

Protein  
Proteome

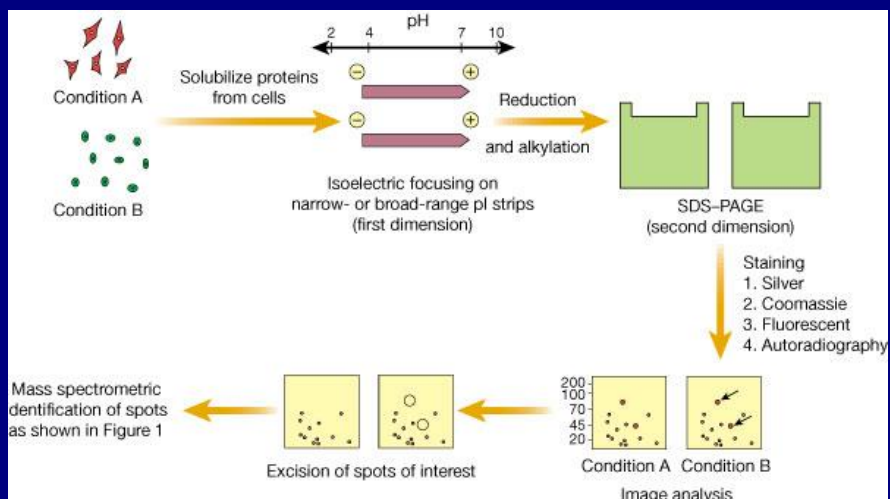


DNA Sequencing

cDNA arrays

2D PAGE / MS

# Ηλεκτροφόρηση και πρωτεομική

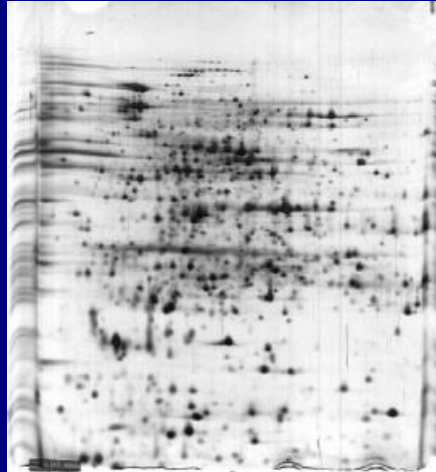
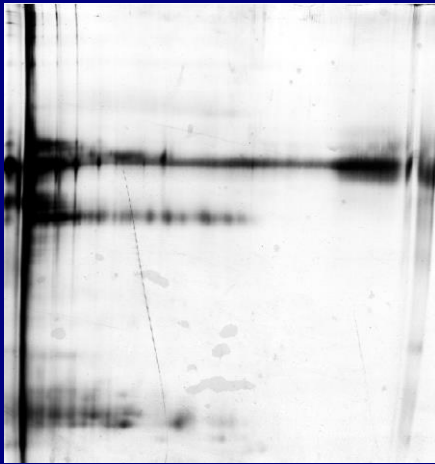


## Δείγμα

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

## Προετοιμασία δείγματος (sample preparation)

- Λύση κυττάρων
- Διαλυτοποίηση πρωτεϊνών
- Προστασία έναντι πρωτεασών
- Απομάκρυνση:
  - Νουκλειικών οξέων
  - Πολυσακχαριτών
  - Λιπιδίων
  - Αλάτων και ιοντικών μορίων χαμηλού MB
  - Αδιάλυτου υλικού
- Προ-κλασμάτωση



## Μέθοδοι Λύσης των κυττάρων

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

## 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; Opaf@a, 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(?).  
Inhibits metalloproteases,  
but interferes with nucleases

EDTA

May show up in 2-D pattern

Peptide protease inhibitors  
(leupeptin aprotinin etc.)

High pH

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

PROTEOMIC BASICS; Opaf@a, Sept. 24-29 2004

Προσμίξεις	Προβλήματα που προκαλούν
Άλατα- άλλα φορτισμένα μικρού μοριακού βάρους μόρια	Εμποδίζουν τη διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης και πρέπει να απομακρύνονται ή να παραμένουν σε όσο το δυνατόν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Άλατα στο IPG strip έχουν ως αποτέλεσμα την υψηλή αγωγιμότητα του. Η εστίαση των πρωτεϊνών δεν είναι δυνατή μέχρι τα ιόντα να μετακινηθούν στο τέλος του strip, αυξάνοντας έτσι τον απαιτούμενο χρόνο της IEF. Η παρουσία των αλάτων γίνεται εμφανής στα πηκτώματα με τη μορφή οριζόντιων ραβδώσεων στο φόντο(horizontal streaking).
Νουκλεοτίδια- μεταβολίτες- φωσφολιπίδια	Είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα μόρια και μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα τη δυσκολία εστίασης των πρωτεϊνών προς την άνοδο.
Πολυσακχαρίτες	Μπορούν να φράξουν τους πόρους του πηκτώματος προκαλώντας κατακρήμνιση των πρωτεϊνών ή αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για την ισοηλεκτρική εστίαση. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες είναι αρνητικά φορτισμένοι και σχηματίζουν συμπλέγματα με πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα τη δυσκολία εστίασης των πρωτεϊνών προς την άνοδο. Στα 2D πηκτώματα εμφανίζονται με οριζόντιες ραβδώσεις στο φόντο(horizontal streaking).

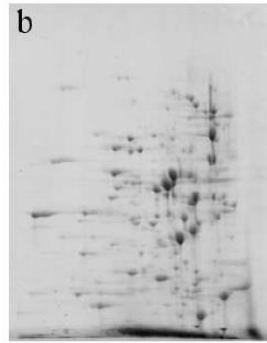
Προσμίξεις	Προβλήματα που προκαλούν
Λιπίδια	Συμπλέγματα πρωτεϊνών-λιπιδίων μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών επηρεάζοντας το pI και το μοριακό τους βάρος.
Φαινολικές ενώσεις	Τροποποιούν τις πρωτεΐνες μέσω μιας ενζυμικά καταλυόμενης οξειδωτικής αντίδρασης.
DNA-RNA	Υψηλού μοριακού βάρους νουκλεϊκά οξέα μπορούν να φράξουν τους πόρους του πηκτώματος. Επίσης δεσμεύονται στις πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων εμποδίζοντας την εστίαση τους. Τέλος αυξάνουν το ιξώδες του δείγματος και εμφανίζονται στα πηκτώματα ως ραβδώσεις στο φόντο(streaking).
Ιοντικά απορρυπαντικά	Το πιο συνηθισμένο είναι το SDS που σχηματίζει συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες φορτίζοντας έτσι όλο το σύμπλεγμα αρνητικά, με αποτέλεσμα να μην εστιάζονται οι πρωτεΐνες σύμφωνα με το pI τους.



## Sample Preparation

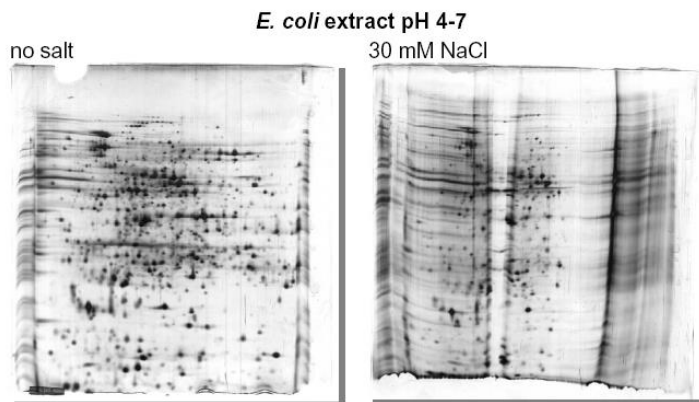


crude sample



same sample processed  
through the 2D cleanup kit

## Effect of salt



## De-salting techniques

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

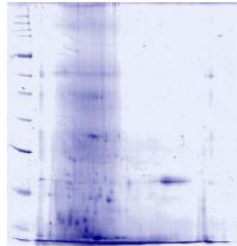
PROTEOMIC BASICS; Opalja, Sept. 24-29 2004

## Protein precipitation procedures

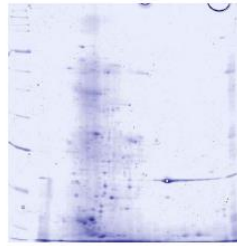
Ammonium sulfate (salting out)	Not efficient, de-salting necessary
TCA precipitation	Can be hard to re-solubilize
Acetone and/or ethanol	Leaves SDS behind, but many proteins not precipitated
TCA plus acetone (Damerval et al. 1986)	More effective than either alone, good for basic proteins
Chloroform and methanol (Wessels and Flügge, 1984)	Time consuming, large volumes necessary

PROTEOMIC BASICS; Opalja, Sept. 24-29 2004

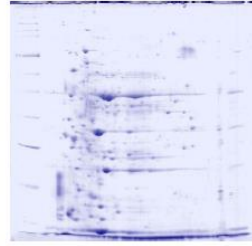
## Extraction of plant proteins:



solubilization w/o precipitation



solubilization followed by precipitation with methanol

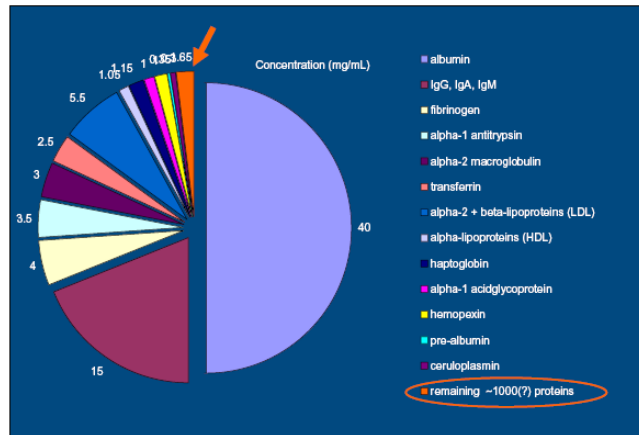


TCA-acetone extraction

## 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.

## The problem

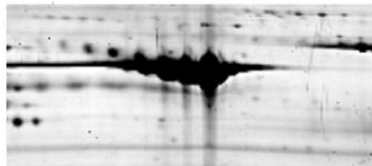


53 PROTEOMIC BASICS: Opatka, Sept. 24-29 2004

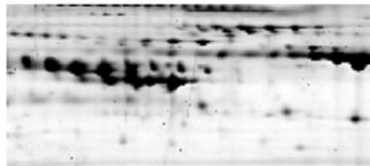
## Albumin and IgG Removal Kit

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 15µl human serum samples.

Untreated Human Serum



“Albumin and IgG Removal Kit”  
 treated Human Serum



55 PROTEOMIC BASICS: Opatka, Sept. 24-29 2004

## Pre-fractionation possibilities

### By solubility

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

### By chromatography

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

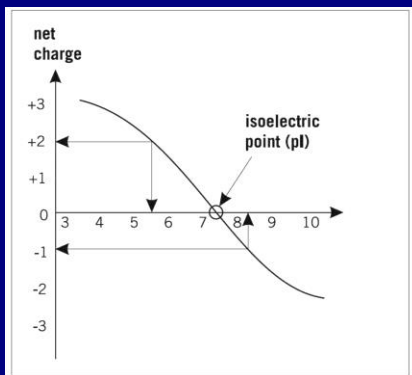
### By centrifugal separation of subcellular components

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

### By affinity

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

## Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)



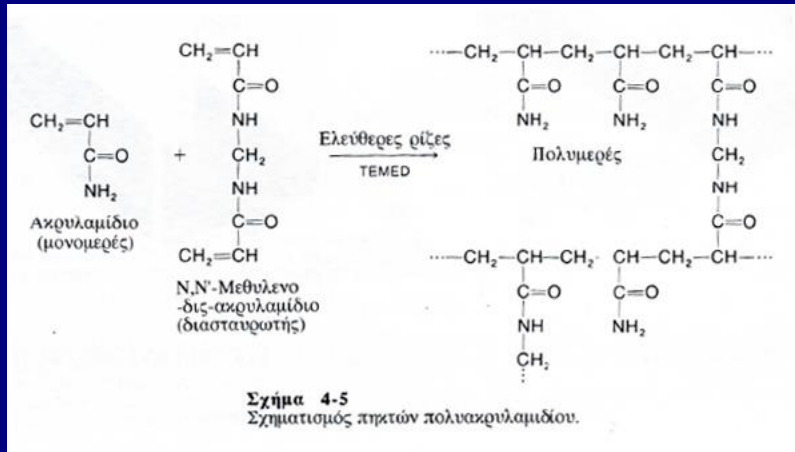
Διαχωρίζει τις πρωτεΐνες ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο

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)

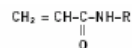
## Σχηματισμός πηκτής πολυακρυλαμίδιου



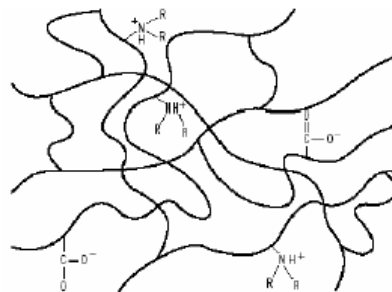
## 1<sup>η</sup> Διάσταση

### ◆ 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.



*R = weakly acidic or basic buffering group*

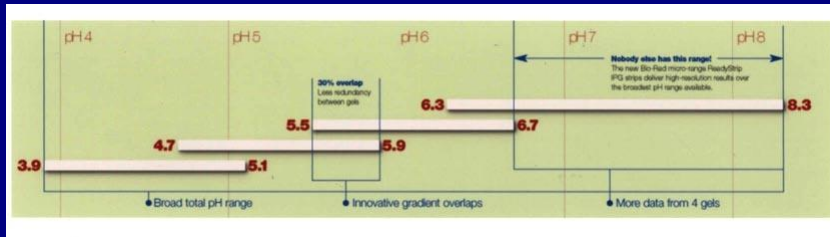


Immobiline matrix

## 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)

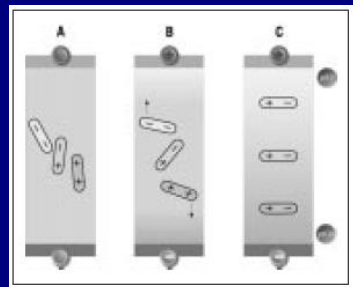


## Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)



Το σύστημα ενώνεται με ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται ένα δυναμικό

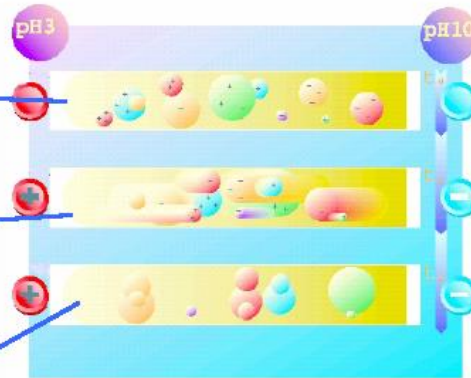
Οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της βαθμίδωσης pH, μέχρι να φθάσουν το ισοηλεκτρικό τους σημείο



## 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



- Video:
- 2D Gel Electrophoresis 1st Electrophoresis.wmv

## Ισοηλεκτρική Εστίαση – Σύνοψη

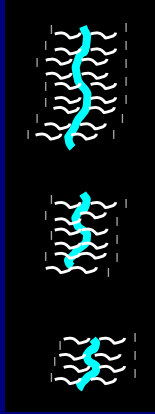
- Απαιτείται πλήρης απομάκρυνση μη πρωτεϊνικών μορίων
- Διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το φορτίο
- Χρησιμοποιούνται αμφολύτες για την δημιουργία της βαθμίδωσης pH
- Εφαρμόζεται πολύ υψηλή τάση (10000V)
- Χρονοβόρα διαδικασία (>10h)
- Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την καθαρότητα του δείγματος, το εύρος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

## Αναγωγή και αλκυλίωση

- <https://www.youtube.com/watch?v=SaU1qX37nPM>

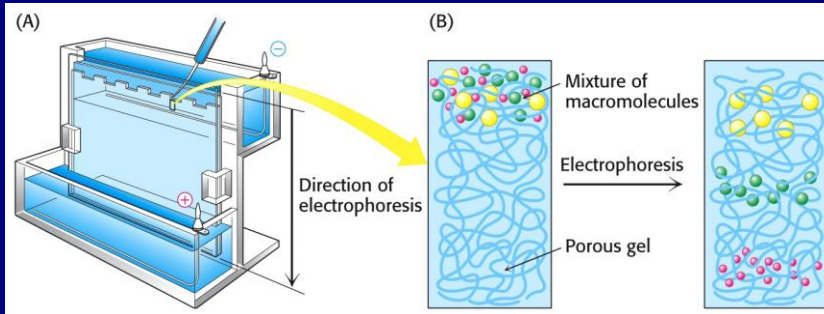
Κ Α Θ Ο Ο Σ Μ

## 2<sup>η</sup> Διάσταση: SDS PAGE Βασικές Αρχές



Μ Ο Δ Ο Σ Α

## SDS-PAGE

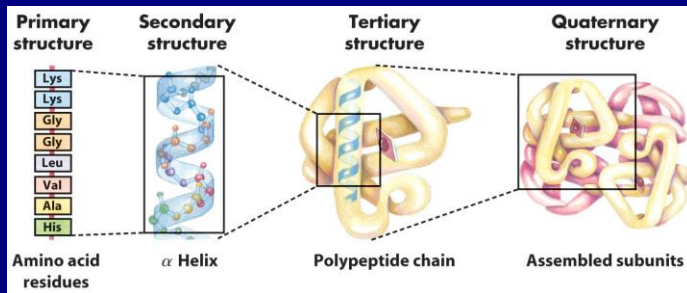


## SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Βασικό συστατικό ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (Sample Buffer):

Αναγωγικός παράγοντας διθειοθρεϊτόλη DTT, β-μερκαπτο-αιθανόλη

Διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς, καταργεί την 3D δομή



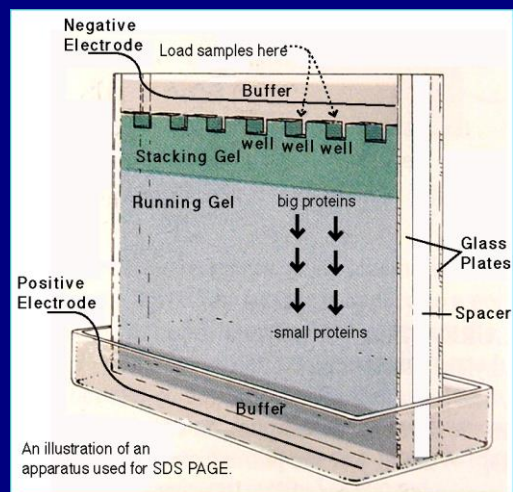
## SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Δύο πηκτές:

Πηκτή Συσσώρευσης

Πηκτή Διαχωρισμού

Εφαρμογή ηλεκτροδίων,  
διαφοράς δυναμικού



## SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Σχέση συγκέντρωσης ακρυλαμίδιου 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 ακρυλαμίδιου

## SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

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

Πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα συνήθως αγοράζονται έτοιμα

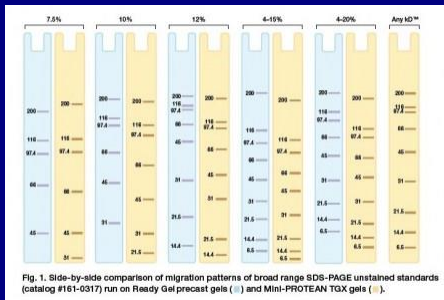


Fig. 1. Side-by-side comparison of migration patterns of broad range SDS-PAGE unstained standards (catalog #161-0317) run on Ready Gel precast gels ( ) and Mini-PROTEAN TOX gels ( ).



Video:  
2D Gel Electrophoresis (7) 2nd  
Dimension

## 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 ακρυλαμιδίου και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου



## Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

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



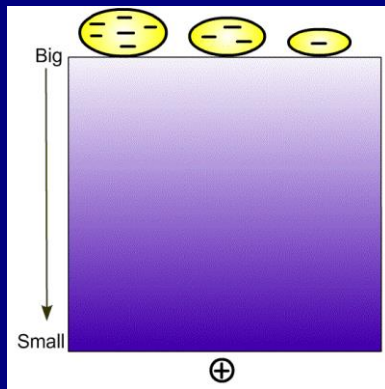
Ο διαχωρισμός βασίζεται στο μέγεθος, φορτίο, σχήμα των πρωτεϊνών

Εφαρμογές:

Διερεύνηση πιθανόν αλληλεπιδράσεων:  
πρωτεϊνών με πρωτεΐνες,  
πρωτεϊνών με προσδέτες

Ανίχνευση ύπαρξης ισομορφών/διμερών (πολυμερών)

## Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες



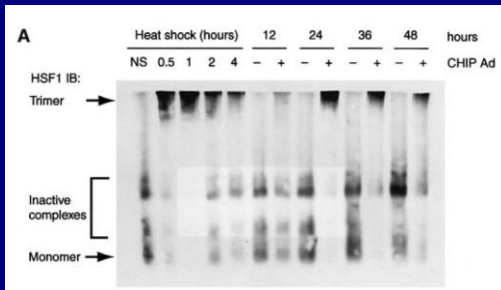
Διαχωρίζει τις πρωτεΐνες στη φυσική τους διαμόρφωση. Οι πρωτεΐνες σταματούν να κινούνται όταν φθάσουν σε μία συγκεκριμένη πυκνότητα πηκτής

Αυτό μπορεί να απαιτεί πολύ χρόνο

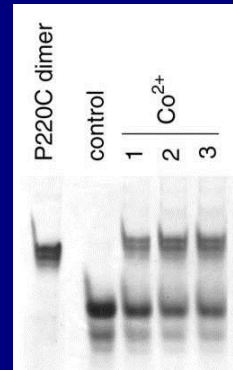
Ιδανική μέθοδος για ανίχνευση ύπαρξης ολιγομερών



## Παραδείγματα ηλεκτροφόρησης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες



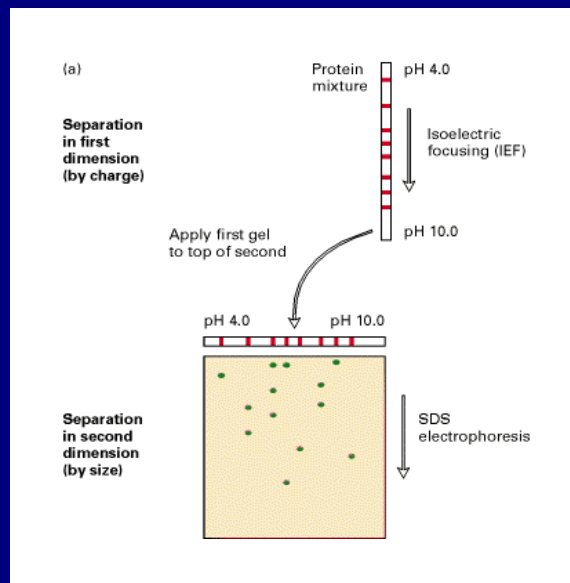
*Dai et al EMBO J (2003) 22, 5446-5458*



Διμερισμός KIR2DL1 παρουσία Co<sup>2+</sup>

*Qing R. Fan et al. JBC 2000*

## Σύνοψη 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> διάστασης



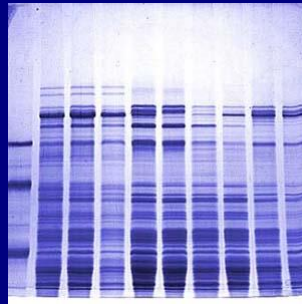
## Ανίχνευση πρωτεϊνών

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

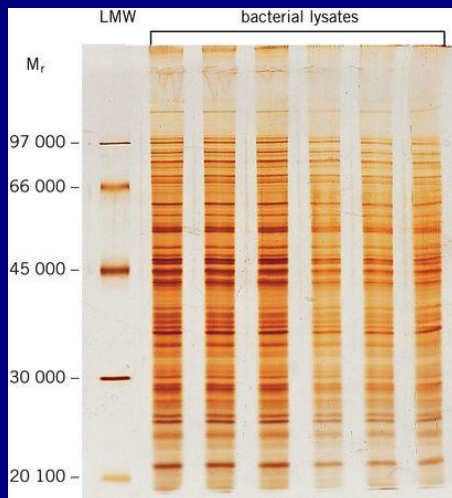
Οι πρωτεΐνες επίσης μπορούν να ανιχνευτούν με χρωστικές όπως η Coomassie Blue ή με κατεργασία με  $\text{AgNO}_3$  (silver staining)

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

Χρώση με coomassie blue



## Ανίχνευση πρωτεϊνών



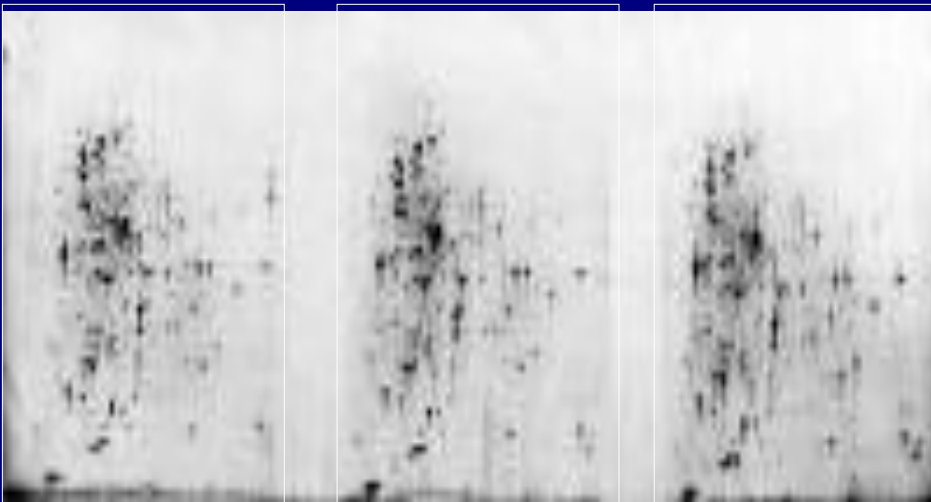
Η χρώση με άργυρο είναι 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από αυτήν με Coomassie Blue

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

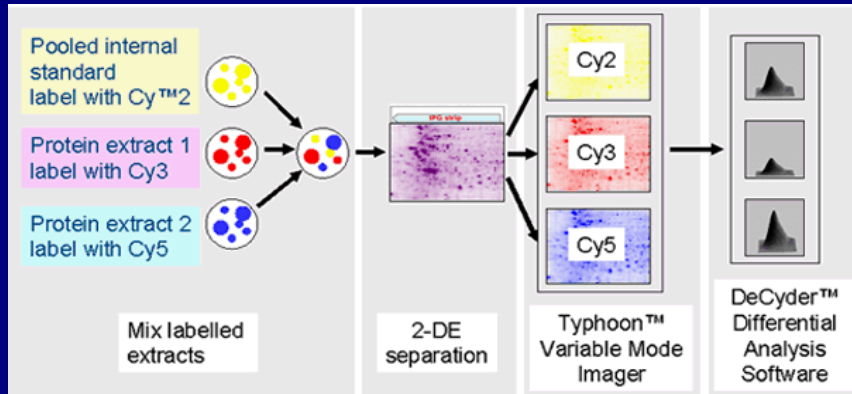
Είναι πιο πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία

- Video:
- 2D Gel Electrophoresis (10) Visible Stain

## 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

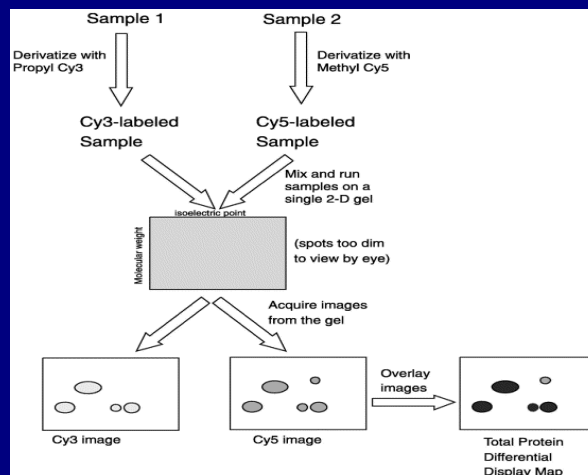
Ανάμειξη των δειγμάτων

2D Ηλεκτροφόρηση

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

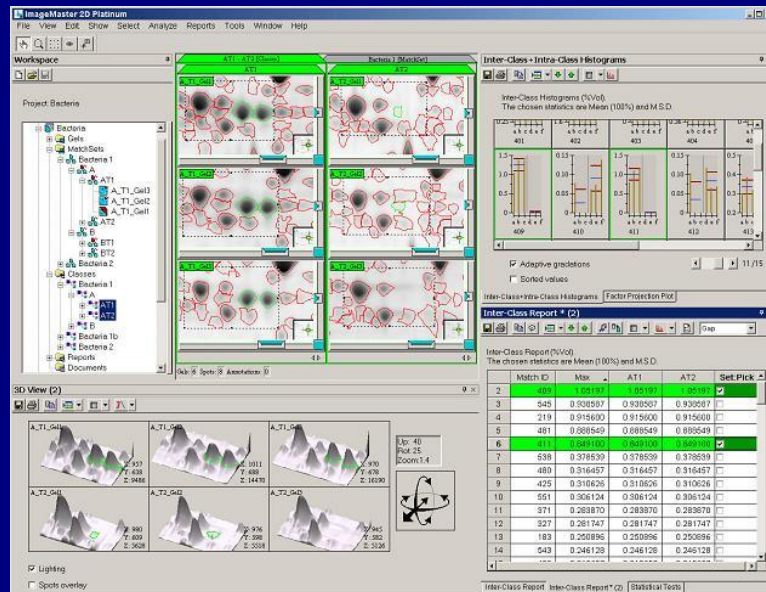
Πρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο στη μία περίπτωση δίνει μόνο τη μία φθορίζουσα κ.τ.λ.

Έλεγχος ποιοτικών και ποσοτικών διαφορών

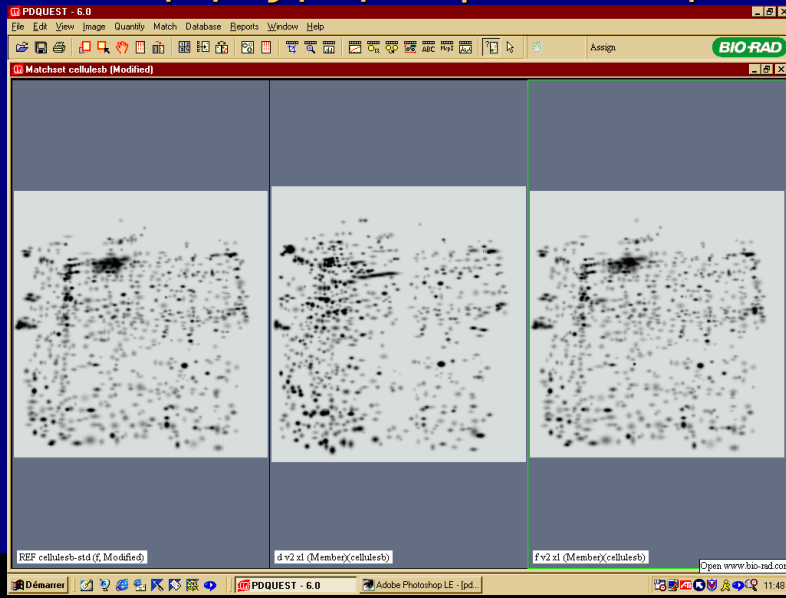


- Video:
- 2D Gel Electrophoresis (9) Image Capture-UV Light Box

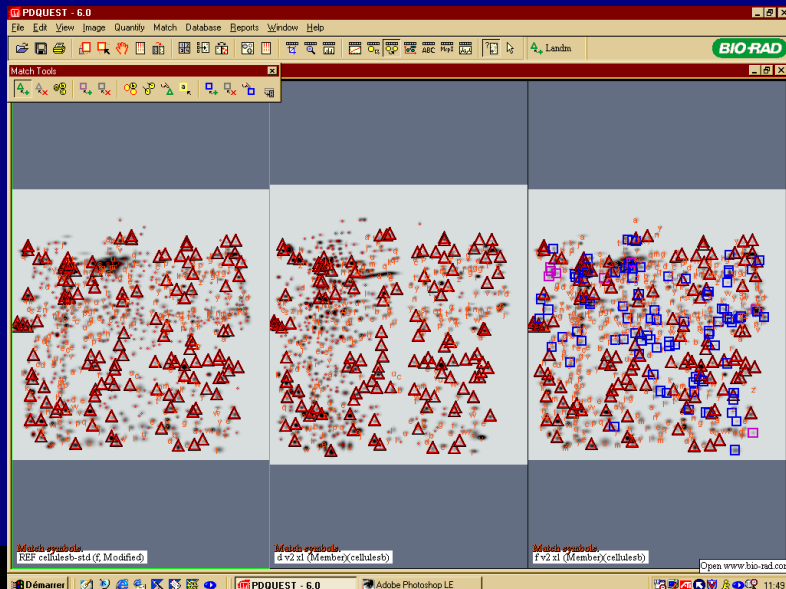
## Λογισμικό ανάλυσης 2D-Ηλεκτροφόρησης



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

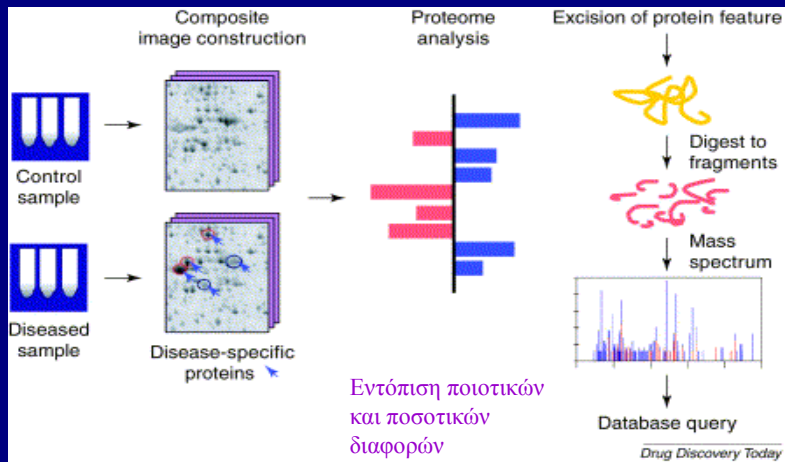


# Το λογισμικό μπορεί να ταυτοποιήσει διαφορές με βάση το MW & pI

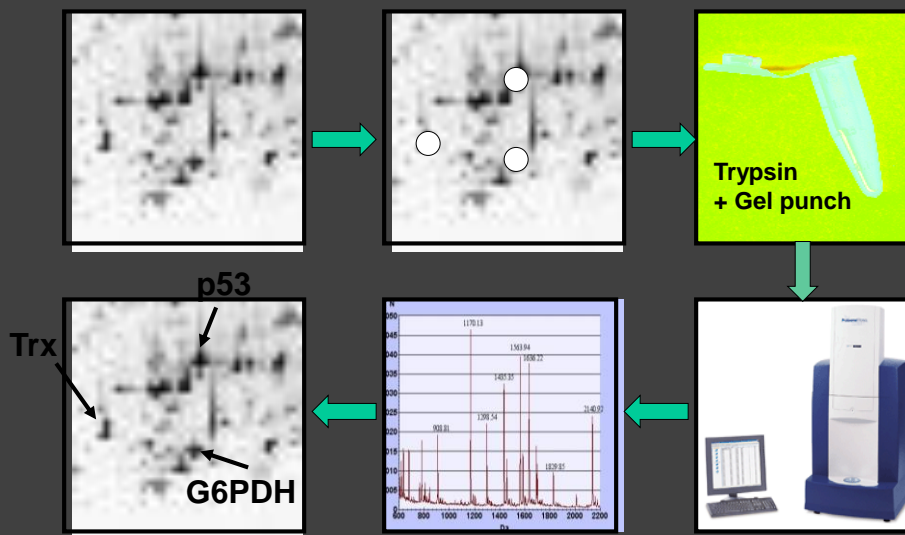


# Πρωτεομική ανάλυση

Σύνοψη σύγκρισης πρωτεϊνικού προφίλ δύο καταστάσεων



# Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών





# Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών

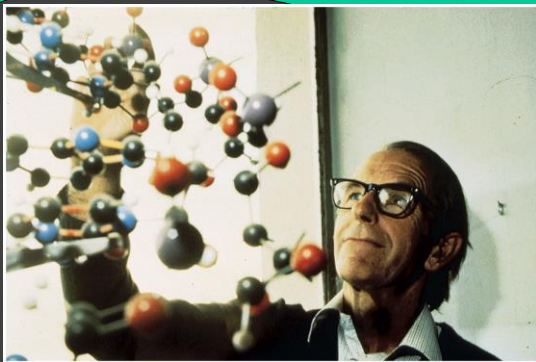
- Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται:
- Αποικοδόμηση κατά Edman
- Φασματοσκοπία μάζας (Mass Spectrometry)

## Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας

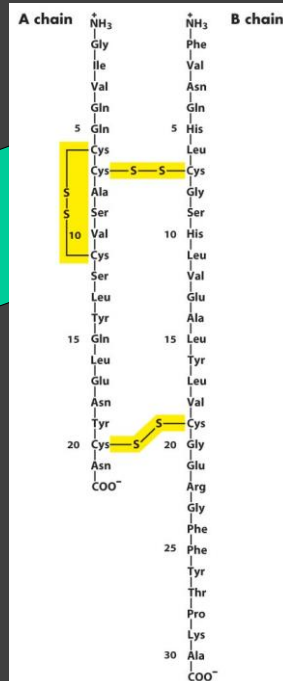
1953, ο Frederick Sanger βρήκε την αλληλουχία της ινσουλίνης



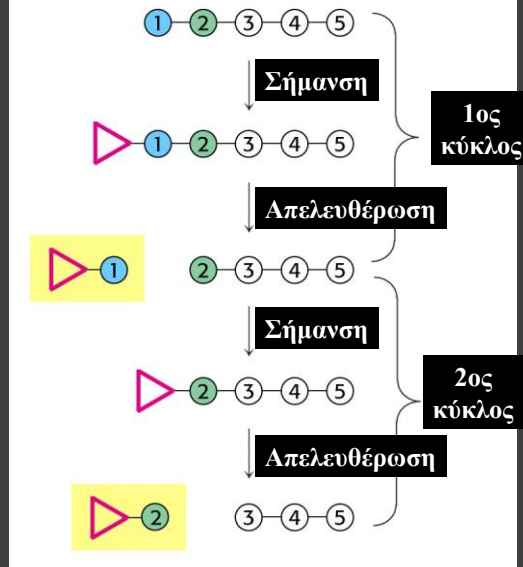
1958 Nobel Prize in Chemistry  
1980 Nobel Prize in Chemistry:  
DNA sequencing



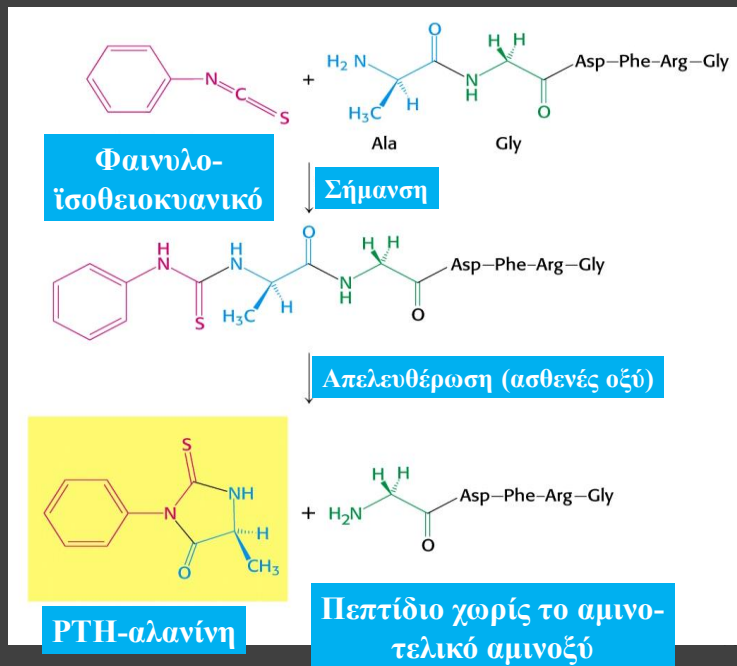
b. 1918

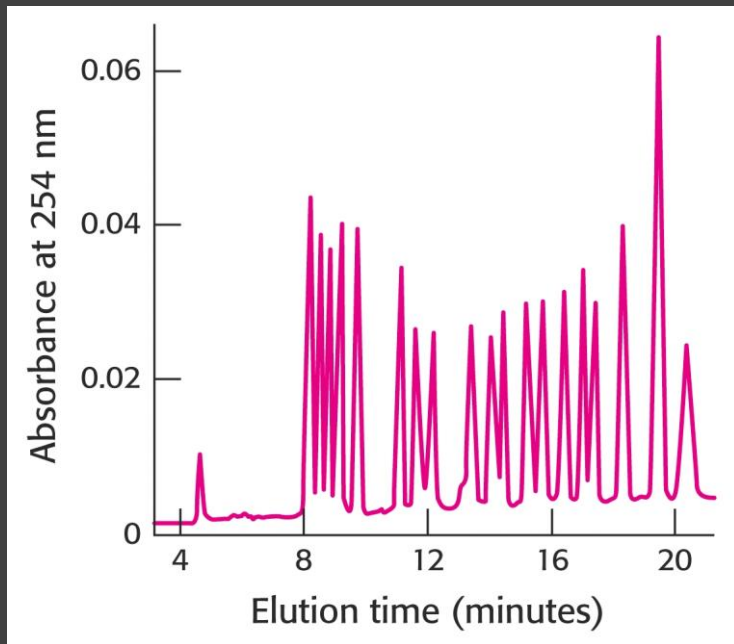


EDMAN DEGRADATION



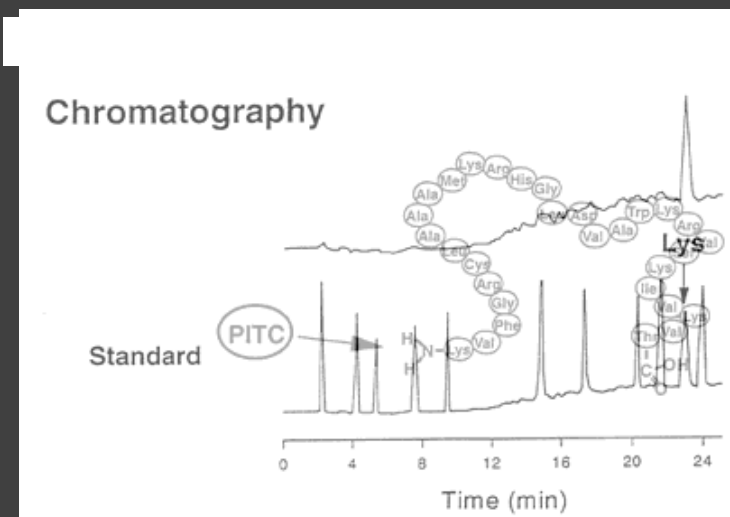
75





77

## Edman Microsequencing



- Ανάπτυξη αυτοματοποιημένων οργάνων για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (sequenators)
- Ένας κύκλος αποικοδόμησης κατά Edman διαρκεί λιγότερο από 1h
- Ευαισθησία pmoI πρωτεΐνης
- Προσδιορισμός αλληλουχίας δείγματος πρωτεΐνης που εκλούεται από μια ζώνη ηλεκτροφόρησης SDS-πολυακρυλαμιδίου
- Πρωτεΐνη έως 50 αμινοξέα (απόδοση της φάσης απελευθέρωσης < 100%) 79

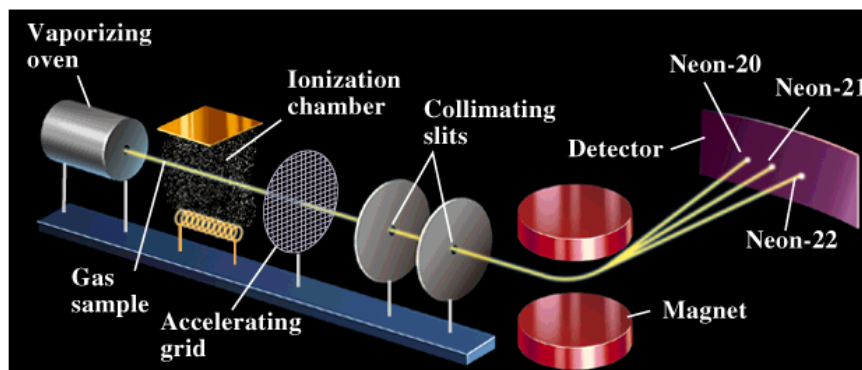
## Φασματομετρία Μάζας στην Πρωτεωμική

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

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

Πρόβλημα: Τεχνικές εξαέρωσης και ιοντισμού

## Mass spectrometer and spectrum



1/2

## 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

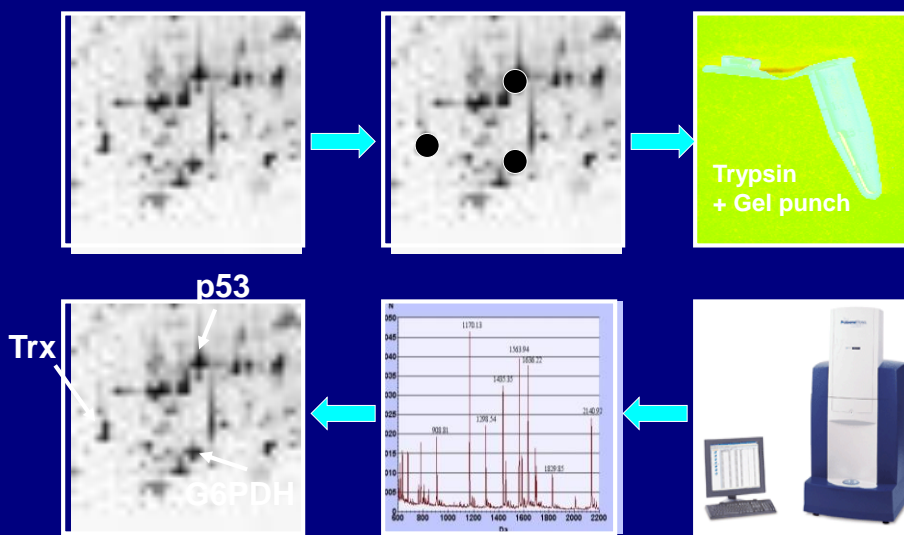
*"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution".*

# Φασματοσκοπία μάζας: Φυσικά οι πρωτεΐνες μπορούν να πετάξουν!



- Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την μελέτη ουσιών μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους. Η ταυτοποίηση γίνεται μέσω του ακριβούς προσδιορισμού της μάζας τους
- Οι John B. Fenn and Koichi Tanaka έδειξαν, με διαφορετικούς τρόπους, ότι τα μακρομόρια μπορούν επίσης να αναλυθούν με αυτή την τεχνική. Το «τρικ» ήταν να εξαερωθούν οι πρωτεΐνες, ή όπως είπε ο John Fenn «να δώσουμε φτερά στους μοριακούς ελέφαντες».

## Ταυτοποίηση πρωτεϊνών



## Θέσεις πέψης πρωτεασών



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

## Θρυψίνη

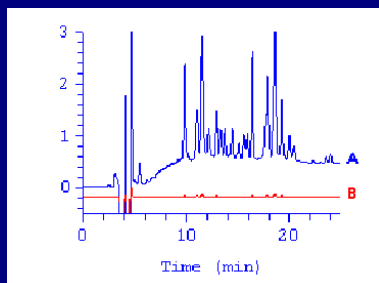
- Σταθερό ένζυμο
- Φθηνό, εύκολο στην παρασκευή
- Λειτουργικό σε μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασίας
- Εξειδικευμένη πέψη
  
- Video:
- 2D Gel Electrophoresis (11) Mass Sample Preparation

## «Δακτυλικό αποτύπωμα» πεπτιδίων (Peptide mass 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

## Nano - HPLC

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης  
με τριχοειδείς στήλες (75  $\mu\text{m}$  x 15 cm)  
και ροές κάτω των 200 nl/min

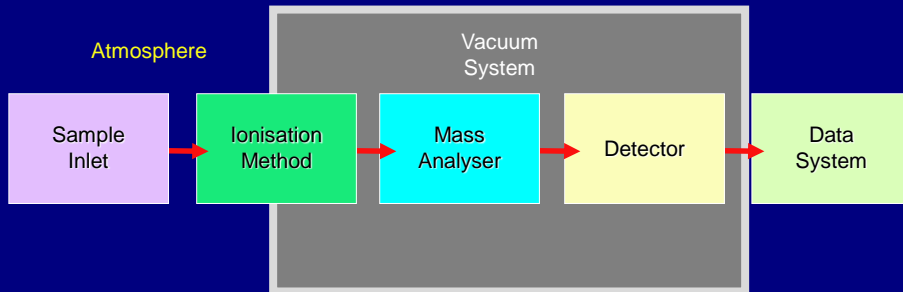


Σύστημα nano-LC με αυτόματο δειγματολήπτη

Μεγάλη βελτίωση στην ευαισθησία  
ανίχνευσης πεπτιδίων σε σύγκριση  
με απλή HPLC



## Συνιστώσα Μέρη Φασματογράφου Μάζας



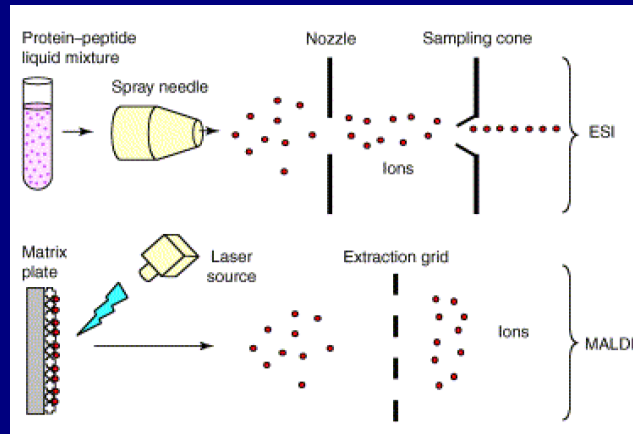
## Τεχνικές ιοντισμού

Για βιολογικά δείγματα ήπιες τεχνικές που δεν προκαλούν θραύση πεπτιδικών δεσμών:

**Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)**

**Electrospray ionization (ESI)**

# Ιονισμός ESI / MALDI



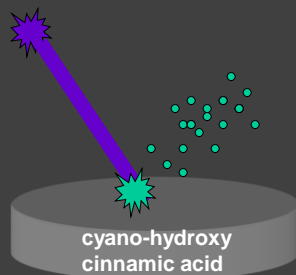
## Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix-assisted laser desorption-ionization MALDI)

Τεχνική στερεάς φάσης, στην οποία το μίγμα των πεπτιδίων αναμιγνύεται με περίσσεια του υλικού μήτρας (συνήθως  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid), το οποίο στην συνέχεια εναποτίθεται σε μικροτροβλίο

Υπό κενό, το υλικό της μήτρας απορροφά ενέργεια στο μήκος κύματος του laser, με αποτέλεσμα είναι τα μακρομόρια να ιοντισθούν και στην συνέχεια να εκροφηθούν (μέσα σε κενό) χωρίς να επέλθει σημαντική αποικοδόμησή τους

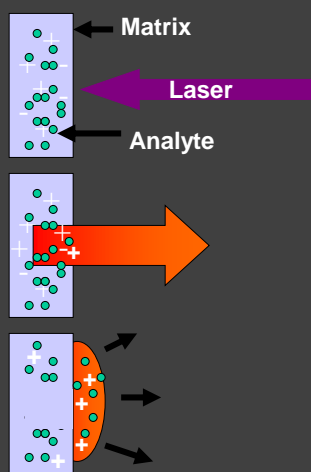
# Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

337 nm UV laser



**MALDI**

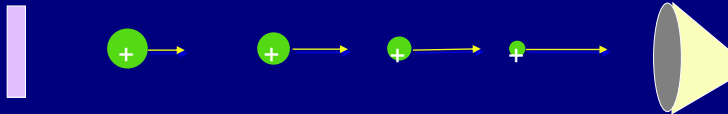
## Ιοντισμός MALDI



- Απορρόφηση της ακτινοβολίας από το χρωμοφόρο υλικό και ιοντισμός της μήτρας
- Διάσπαση του υλικού μήτρας, αλλαγή φάσης σε υπερσυμπιεσμένο αέριο και μεταφορά φορτίου στα υποανάλυση μόρια
- Εκρόφιση του υλικού μήτρας με πολύ μεγάλη ταχύτητα και εξάτμιση των υποανάλυση μορίων που είναι παγιδευμένα μέσα στο υλικό μήτρας (explosion/“popping”)

- Video:
- 2D Gel Electrophoresis (12) Mass Analysis

## Time-of-Flight Analyser



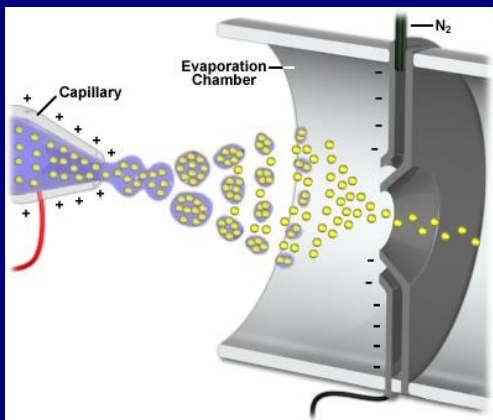
- Τα ιόντα επιταχύνονται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο προσδίδει σε κάθε ιόν κινητική ενέργεια
- Στην συνέχεια τα ιόντα εισέρχονται στην άνευ πεδίου περιοχή ελεύθερης πτήσης. Την στιγμή που εισέρχονται, όλα τα ιόντα συγκεκριμένου φορτίου θα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους.
- Αυτή η κινητική ενέργεια θα καθορίσει την ταχύτητα με την οποία θα κινηθούν στην συνέχεια κατά μήκος της περιοχής ελεύθερης πτήσης προς τον ανιχνευτή, σύμφωνα με την σχέση
- $K = mv^2/2$ , όπου  $m$  η μάζα του ιόντος και  $v$  η ταχύτητά του.
- Άρα, τα πιο βαριά ιόντα, εφόσον έχουν την ίδια κινητική ενέργεια με τα πιο ελαφριά, θα κινηθούν με μικρότερη ταχύτητα.



## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI)

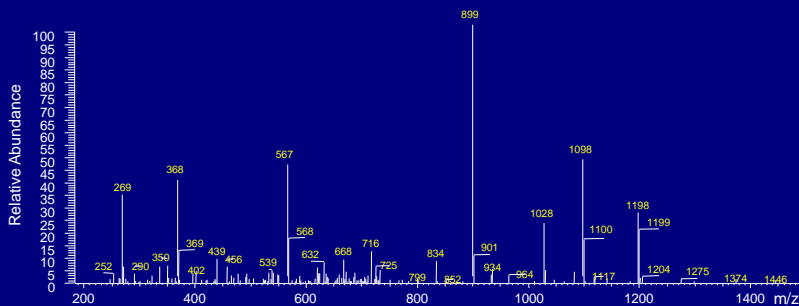
•Γενικά τεχνική υγρής φάσης που συνδυάζεται με HPLC

**Video:**  
**Mass spectrometry proteomic**



- Τα μικροσταγονίδια, τα οποία περιέχουν τα μελετούμενα μακρομόρια, ψεκάζονται στον φασματογράφο μάζας μέσω ενός φορτισμένου ακροφυσίου.
- Με τον τρόπο αυτό τα σταγονίδια ιοντίζονται κατά την έξοδό τους από το ακροφύσιο.
- Στην συνέχεια τα σταγονίδια αυτά επιταχύνονται, αλλά κατά την κίνησή τους αυτή ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρις ότου κάποια στιγμή η πυκνότητα φορτίου γίνεται τόσο υψηλή, που οι ηλεκτροστατικές απώσεις υπερνικούν την επιφανειακή τάση της σταγόνας, με αποτέλεσμα η αρχική σταγόνα να διασπάται σε μικρότερα σταγονίδια.
- Τα σταγονίδια συνεχίζουν να εξατμίζονται και διασπώνται με την σειρά τους σε ακόμα μικρότερα σταγονίδια, μέχρι τελικά να εξατμισθεί όλος ο διαλύτης, αφήνοντας μόνο τα μακρομόρια για ανάλυση

## 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.

## Δακτυλικά αποτυπώματα

Αλληλουχία	Μάζα(M+H)	Πεπτίδια μετά από πέψη με θρυψίνη
>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

# Δακτυλικά αποτυπώματα

## Αλληλουχία

## Μάζα (M+H)

## Φάσμα Μάζας

>Protein 1  
acedfhsakdfqasdf  
pkivtmeewendadnf  
ekqwfe

4842.05



>Protein 2  
acekdfhsadfqasdf  
pkivtmeewenkdadn  
feqwfe

4842.05

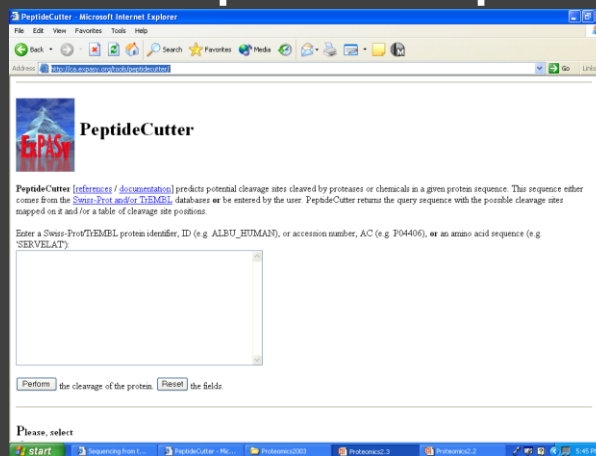


>Protein 3  
acedfhsadfqekasdf  
pkivtmeewendakdn  
feqwfe

4842.05



# Πρόβλεψη θέσεων πέψης και πεπτιδίων γνωστών πρωτεϊνών



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

## Βάση δεδομένων δακτυλικών αποτυπωμάτων (Peptide Mass Fingerprint, **PMF**)

- Για οποιαδήποτε πρωτεΐνη από βάση δεδομένων πρωτεϊνών ή γονιδίων (Swiss-Prot or nr-GenBank)
- Με βάση την πρωτοταγή δομή προβλέπονται οι θέσεις πέψης →
- Υπολογίζεται η θεωρητική μάζα κάθε πεπτιδίου
- Λίστα μαζών από την χαμηλότερη προς την υψηλότερη και σήμανση στην βάση δεδομένων

## Κατασκευή βάσης δεδομένων PMF

### Αλληλουχία DB

>P12345

acedfhsakdfqea  
sdfpkivtmeewe  
ndadnfekqwfe

>P21234

acekdfhsadfqea  
sdfpkivtmeewe  
nkdadnfekqwfe

>P89212

acedfhsadfgeka  
sdfpkivtmeewe  
ndakdnfegwfe

### Πεπτικά θραύσματα

acedfhsak  
dfgeasdfpk  
ivtmeewendadnfek  
gwfe

acek  
dfhsadfgeasdfpk  
ivtmeewenk  
dadnfekqwfe

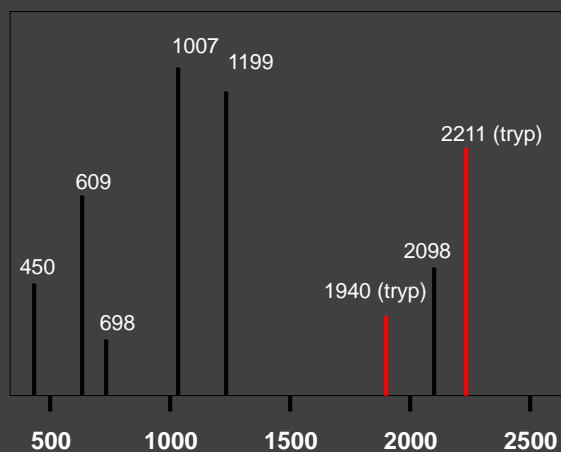
acedfhsadfgek  
asdfpk  
ivtmeewendak  
dnfegwfe

### Μάζα

450.2017 (P21234)  
609.2667 (P12345)  
664.3300 (P89212)  
1007.4251 (P12345)  
1114.4416 (P89212)  
1183.5266 (P12345)  
1300.5116 (P21234)  
1407.6462 (P21234)  
1526.6211 (P89212)  
1593.7101 (P89212)  
1740.7501 (P21234)  
2098.8909 (P12345)



## Φάσμα (MALDI) της άγνωστης πρωτεΐνης



## Παραβολή με βάση δεδομένων

<u>Query Masses</u>	<u>Database Mass List</u>	<u>Results</u>
450.2201	450.2017 (P21234)	2 Unknown masses 1 hit on P21234 3 hits on P12345
609.3667	609.2667 (P12345)	
698.3100	664.3300 (P89212)	
1007.5391	1007.4251 (P12345)	Conclude the query protein is P12345
1199.4916	1114.4416 (P89212)	
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=.:\\DataBase\\sprot.fasta, accession=AOP2_MOUSE
peptide(s)=VVDSLQLTGTK KGESVMVPTLSEEEK VVFIFGPKK VVDSLQLTGTRPVATPVDWK LPFPIIDDK
PGLLLLGDEAPNFEANTTIGR LIALSIDSVEDHLAWSK FHDFLGDSWGILFSHR DLAILLGMLDPVEK

Analyzing ...

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

PGLLLLGDEA FNFEANTTIG RIRFHDFLGD SWGILFSHR DFTFVCTTEL GRAAKLAPEF AKRNVK LIAL SIDSVEDHLA
WSKDINAYNG ETPTEKLPFP IIDDKGRDLA ILLGMLDPVE KDDNNMPVTA RVVFIFGPKK KKLKLSILYPA TTGRNFEIL
R\\VVDSLQLTG TKPVATPVDW KKGESVMVPE TLSEEEKQC FPKGVFTKEL PSGKKYLRYT PQP

>average mass = 24721

position  sequence (NCBI BLAST link)
-----  -----
162- 172  VVDSLQLTGTK
182- 198  KGESVMVPTLSEEEK
132- 141  VVFIFGPKK
162- 181  VVDSLQLTGTRPVATPVDWK
 97- 105  LPFPIIDDK
  1-  21  PGLLLLGDEAPNFEANTTIGR
 67-  83  LIALSIDSVEDHLAWSK
 24-  40  FHDFLGDSWGILFSHR
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.
```

## Ταυτοποίηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Post-translational Modifications PTMs)

- Η φωσφορυλίωση είναι η πιο συνηθισμένη και δυναμική μορφή πρωτεϊνικής ρύθμισης στα κύτταρα
- >30% των πρωτεϊνών είναι φωσφορυλιωμένες σε κάποιο στάδιο της ζωής τους μέσα στο κύτταρο
- Σύγκριση του PMF πριν και μετά από επώαση με φωσφατάση (διαφορά μάζας 80 amu)
- Χρήση ειδικών χρωματογραφικών τεχνικών για απομόνωση των τροποποιημένων πεπτιδίων (πχ immobilized metal affinity chromatography (IMAC), και στην συνέχεια ανάλυση με MALDI-TOF