



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»

Περιγραφή του μαθήματος και στόχος

Το μάθημα αποσκοπεί στην περιγραφή βασικών βιοχημικών μεθόδων ανάλυσης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο στη βασική όσο και στην εφαρμοσμένη έρευνα. Σε ερευνητικό επίπεδο ο χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με μία πρωτεΐνη παρέχει πληροφορίες σε σχέση με τη βιολογική της δράση, δεδομένου ότι σε κυτταρικό επίπεδο οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με μόρια που εμπλέκονται στο ίδιο βιοχημικό μονοπάτι με αυτές. Κατά συνέπεια ο χαρακτηρισμός των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά μια πρωτεΐνη, παρέχει πληροφορίες σε σχέση τόσο με την εύρεση νέων δράσεών της, όσο και με τη διερεύνηση των μηχανισμών ήδη γνωστών δράσεων της πρωτεΐνης. Βιοχημικές μέθοδοι ανάλυσης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών, που περιγράφονται στη συνέχεια, δίνουν τη δυνατότητα πέραν της ταυτοποίησης των αλληλεπιδρώντων με την υπό μελέτη πρωτεΐνη μορίων και του χαρακτηρισμού της κινητικής αυτών των αλληλεπιδράσεων. Δηλαδή του χαρακτηρισμού του κατά πόσο η σύνδεση είναι ισχυρή ή ασθενής, του προσδιορισμού των σταθερών σύνδεσης και αποσύνδεσης, και του χαρακτηρισμού των τμημάτων των μορίων απαραίτητων για την επίτευξη αυτής της αλληλεπίδρασης. Οι πληροφορίες αυτές είναι πολύ σημαντικές στη εφαρμοσμένη έρευνα, δεδομένου ότι αξιοποιούνται σε βιοϊατρικές επιστήμες όπως ιατρική και φαρμακευτική. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών είναι η χρήση αντισωμάτων για φαρμακευτικούς σκοπούς, ο προσδιορισμός των σταθερών σύνδεσης και αποσύνδεσης ενός φαρμάκου με το μόριο στόχο του, η τροποποίηση της δομής μορίων στόχων για την ενίσχυση ή περιορισμό της δράσης τους για φαρμακευτικούς, θεραπευτικούς σκοπούς. Οι μέθοδοι ανάλυσης που περιγράφονται στη συνέχεια είναι ή μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης, οι Pull down δοκιμασίες, η μέθοδος FRET

(Fluorescence Resonance Energy Transfer) και η μέθοδος SPR (Surface Plasmon Resonance). Μέθοδος προσδιορισμού αλληλεπιδράσεων βιομορίων είναι επίσης και η μέθοδος διπλού υβριδισμού ζυμομύκητα, η οποία έχει το μειονέκτημα της εξαγωγής πιθανώς ψευδώς αποτελεσμάτων.

Λέξεις κλειδιά

Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-DNA, αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-RNA, ανοσοκατακρήμιση, συν-ανοσοκατακρήμιση, Pull down, FRET ανάλυση, Surface plasmon resonance (SRP) ανάλυση.



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»

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Άννα-Μαρία Ψαρρά

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας

Τμήμα Βιοχημεία & Βιοτεχνολογίας

Παν/μιο Θεσσαλίας



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο-Τίτλος	Σελίδα
Περιγραφή του μαθήματος και στόχος-Λέξεις κλειδιά	3
1. Ανοσοκατακρήμνιση	5
1 ^A . Συν-Ανοσοκατακρήμνιση	9
1 ^B . Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης	10
1 ^T . Ανοσοκατακρήμνιση RNA (RIP)	12
2. Pull- Down Δοκιμασίες	12
3. Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR)	16
4. FRET Ανάλυση	19
5. Βιβλιογραφία	22

Περιγραφή του μαθήματος και στόχος

Το μάθημα αποσκοπεί στην περιγραφή βασικών βιοχημικών μεθόδων ανάλυσης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο στη βασική όσο και στην εφαρμοσμένη έρευνα. Σε ερευνητικό επίπεδο ο χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με μία πρωτεΐνη παρέχει πληροφορίες σε σχέση με τη βιολογική της δράση, δεδομένου ότι σε κυτταρικό επίπεδο οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με μόρια που εμπλέκονται στο ίδιο βιοχημικό μονοπάτι με αυτές. Κατά συνέπεια ο χαρακτηρισμός των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά μια πρωτεΐνη, παρέχει πληροφορίες σε σχέση τόσο με την εύρεση νέων δράσεών της, όσο και με τη διερεύνηση των μηχανισμών ήδη γνωστών δράσεων της πρωτεΐνης. Βιοχημικές μέθοδοι ανάλυσης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών, που περιγράφονται στη συνέχεια, δίνουν τη δυνατότητα πέραν της ταυτοποίησης των αλληλεπιδρώντων με την υπό μελέτη πρωτεΐνη μορίων και του χαρακτηρισμού της κινητικής αυτών των αλληλεπιδράσεων. Δηλαδή του χαρακτηρισμού του κατά πόσο η σύνδεση είναι ισχυρή ή ασθενής, του προσδιορισμού των σταθερών σύνδεσης και αποσύνδεσης, και του χαρακτηρισμού των τμημάτων των μορίων απαραίτητων για την επίτευξη αυτής της αλληλεπίδρασης. Οι πληροφορίες αυτές είναι πολύ σημαντικές στη εφαρμοσμένη έρευνα, δεδομένου ότι αξιοποιούνται σε βιοϊατρικές επιστήμες όπως ιατρική και φαρμακευτική. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών είναι η χρήση αντισωμάτων για φαρμακευτικούς σκοπούς, ο προσδιορισμός των σταθερών σύνδεσης και αποσύνδεσης ενός φαρμάκου με το μόριο στόχο του, η τροποποίηση της δομής μορίων στόχων για την ενίσχυση ή περιορισμό της δράσης τους για φαρμακευτικούς, θεραπευτικούς σκοπούς. Οι μέθοδοι ανάλυσης που περιγράφονται στη συνέχεια είναι η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης, οι Pull down δοκιμασίες, η μέθοδος FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) και η μέθοδος SPR (Surface Plasmon Resonance). Μέθοδος προσδιορισμού αλληλεπιδράσεων βιομορίων είναι

επίσης και η μέθοδος διπλού υβριδισμού ζυμομύκητα, η οποία έχει το μειονέκτημα της εξαγωγής πιθανώς ψευδώς αποτελεσμάτων.

Λέξεις κλειδιά

Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-DNA, αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-RNA, ανοσοκατακρήμιση, συν-ανοσοκατακρήμιση, Pull down, FRET ανάλυση, Surface plasmon resonance (SRP) ανάλυση.

1. Ανοσοκατακρήμνιση

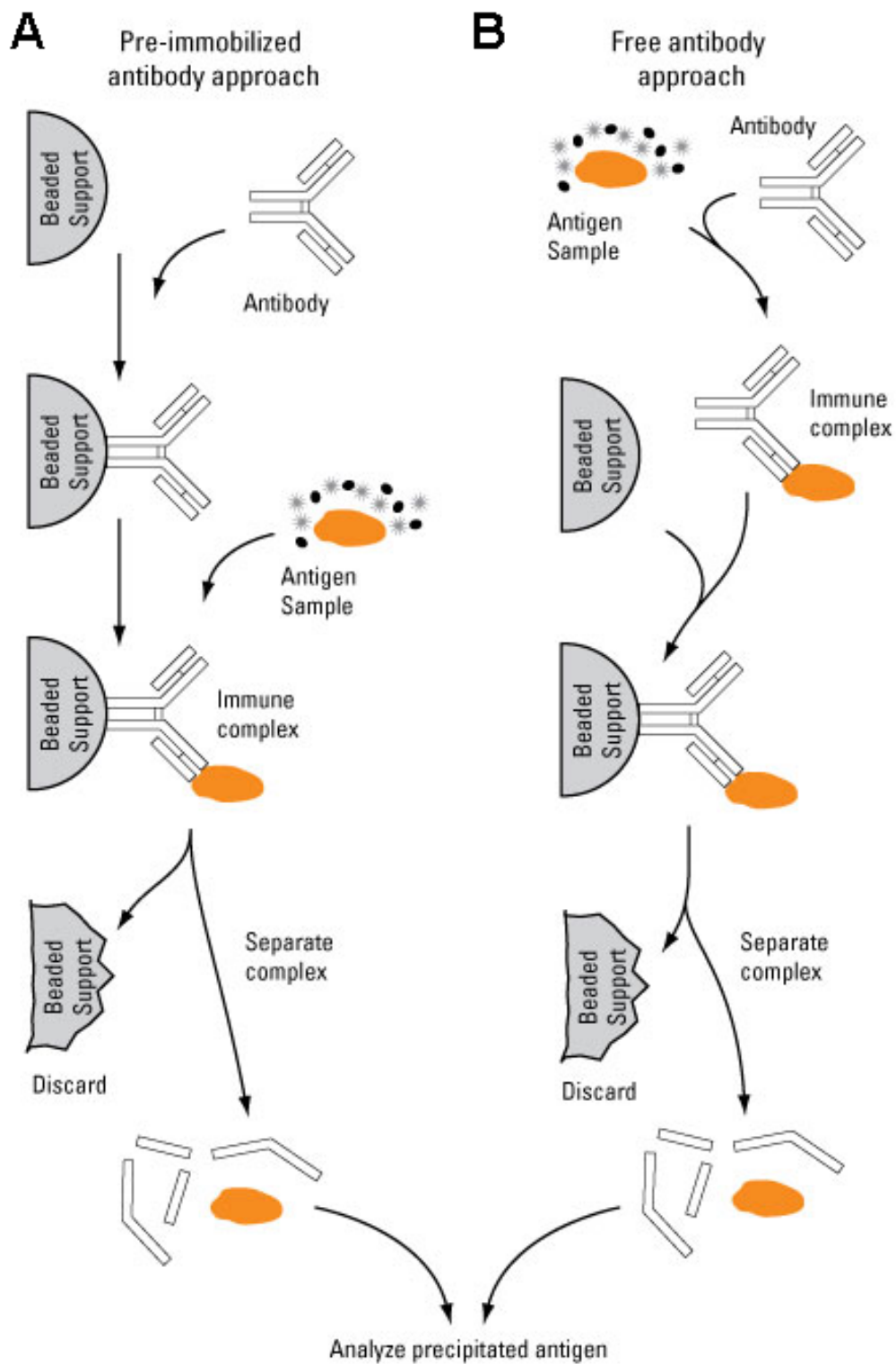
Η ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) είναι μία χρωματογραφική μέθοδος καθαρισμού, μικρής κλίμακας. Συγκεκριμένα είναι μια χρωματογραφία συγγένειας, ευρέως χρησιμοποιούμενη. Στηρίζεται στην ειδική χημική συγγένεια αντιγόνου – αντισώματος και αποσκοπεί στον καθαρισμό αντιγόνων χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα έναντι αυτών των αντιγόνων. Στην περίπτωση που το αντιγόνο είναι πρωτεϊνικής φύσεως μόριο, με την ανοσοκατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί ο χαρακτηρισμός της ταυτότητας, της δομής, των επιπέδων έκφρασης, αλλά και της ύπαρξης μεταφραστικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών. Παραλλαγές στη βασική μέθοδο IP παρέχουν την ευελιξία να εκτελέσει κανείς ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως ο χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης-στόχου με άλλες πρωτεΐνες ή νουκλεϊνικά οξέα.

Τα αντιγόνα-πρωτεϊνικοί στόχοι, συνήθως ανοσοκατακρημνίζονται από εκχυλίσματα κυττάρων ιστών, αίματος, κυττάρων σε καλλιέργεια ή οποιαδήποτε άλλου βιολογικού δείγματος.

Η βασική αρχή της IP διαγραμματικά απεικονίζεται παρακάτω (Σχήμα 1). Ένα αντίσωμα (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό) έναντι μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι προ-ακίνητοποιημένο (Σχήμα 1Α) επάνω σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα, όπως ρητίνη (π.χ. αραρόζη) ή μαγνητικά σφαιρίδια, και στη συνέχεια επωάζεται με το προϊόν λύσης κυττάρων που περιέχουν την πρωτεΐνη-αντιγόνο στόχο. Κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης, ήπια ανάδευση του προσδεμένου αντισώματος και του εκχυλίσματος επιτρέπει στο αντιγόνο - στόχο να συνδεθεί με το ακίνητοποιημένο αντίσωμα. Τα ακίνητοποιημένα ανοσοσύμπλοκα στη συνέχεια συλλέγονται είτε με ήπια φυγοκέντρηση είτε με χρήση μαγνητών.

Εναλλακτικά, το ειδικό αντίσωμα αφήνεται να σχηματίσει ανοσοσύμπλεγμα με συστατικά του εκχυλίσματος κυττάρων (Σχήμα 1Β) και στη συνέχεια τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος συλλέγονται με χρήση σφαιριδίων αραρόζης ή μαγνητικών σφαιριδίων κατάλληλα τροποποιημένων, (βλέπε παρακάτω) αφού επωαστούν και κατά συνέπεια συνδεθούν με τα ανοσοσύμπλοκα.

Μετά την έκπλυση της στήλης με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν προσδέονται ειδικά στη στήλη.



Σχήμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης

A. Σύνδεση αντισώματος στα σφαιρίδια-στήλη και στη συνέχεια επώαση αυτών με το εκχύλισμα που περιέχει το αντιγόνο. B. Σύνδεση αντισώματος με εκχύλισμα που περιέχει το

αντιγόνο και στη συνέχεια επώαση αυτών με τα σφαιρίδια-στήλη. Τροποποίηση σχήματος από <http://www.piercenet.com/method/immunoprecipitation>.

Ως στήλη χρωματογραφίας, σφαιρίδια, χρησιμοποιούνται συνήθως σφαιρίδια σεφαρόζης είτε αγαρόζης, ή εναλλακτικά μαγνητικά σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια αγαρόζης και σεφαρόζης έχουν το πλεονέκτημα δημιουργίας ενός πορώδους κέντρου, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα σύνδεσης. Τα μαγνητικά σωματίδια, σε αντίθεση με τα σφαιρίδια αγαρόζης, είναι στερεά και σφαιρικά, και η δέσμευση του αντισώματος περιορίζεται στην επιφάνεια κάθε σφαιριδίου. Ενώ τα σφαιρίδια αυτά δεν έχουν το πλεονέκτημα ενός πορώδους κέντρου, τα μαγνητικά σφαιρίδια είναι σημαντικά μικρότερα από τα σφαιρίδια αγαρόζης (1 έως 4 μm), προσδίδοντας έτσι συνολικά επαρκή περιοχή επιφάνειας - προς-όγκο για βέλτιστη πρόσδεση αντισώματος.

Η δέσμευση του αντισώματος πάνω στα σφαιρίδια μπορεί να γίνει είτε απευθείας με χημικό δεσμό είτε χρησιμοποιώντας ενδιάμεσες πρωτεΐνες, οι οποίες προσδέονται χημικά στη στήλη (σφαιρίδια). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι πρωτεΐνη A, πρωτεΐνη G, μίγμα πρωτεΐνη A/G και πρωτεΐνη L. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να συνδέονται με ανοσοσφαιρίνες (Ig, αντισώματα) και χρησιμοποιούνται ως συνδέτες συγγένειας, αποτελώντας τις πιο δημοφιλείς πλατφόρμες πρόσδεσης αντισώματος για εφαρμογές IP. Τόσο οι πρωτεΐνες A όσο και οι πρωτεΐνες G δείχνουν εξειδίκευση για τις βαριές αλυσίδες με την περιοχή Fc των αντισωμάτων (Σχήμα 2), τα οποία προσανατολίζει αποτελεσματικά, ώστε τα ακινητοποιημένα αντισώματα να έχουν τις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου προς τα έξω. Η G πρωτεΐνη δείχνει επίσης κάποια συγγένεια για θραύσματα Fab. Η L πρωτεΐνη δεσμεύεται με ελαφρές αλυσίδες, αλλά λόγω των ειδικών χαρακτηριστικών δεσμεύσεως, η πρωτεΐνη L χρησιμοποιείται μόνο για περιορισμένες εφαρμογές.

ανοσοκατακρήμνιση με χρήση πολύ μικρών όγκων σφαιριδίων. Ενδεικτικά είναι δυνατή η σύνδεση 30 έως και 50mg Ig (αντισώματος) ανά ml ρητίνης με πολύ χαμηλή μη ειδική δέσμευση σε αυτές τις ρητίνες συγγένειας.

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος απομόνωσης και χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών δεδομένου ότι για αρκετές πρωτεΐνες υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα. Ακόμα και για τις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα στο εμπόριο, το πρόβλημα αυτό μπορεί να παρακαμφθεί, με το να σημειθούν οι πρωτεΐνες με έναν επίτοπο (ετικέτα) για τον οποίον είναι εμπορικά διαθέσιμο ένα αντίσωμα υψηλής συγγένειας-αποτελεσματικότητας. Αυτή η προσέγγιση είναι πολύ διαδεδομένη για ανοσοκαθιζήσεις στην έρευνα της μοριακής βιολογίας. Αυτές οι ετικέτες μπορεί να είναι είτε βραχείες αλληλουχίες πεπτιδίου ή φθορίζουσες πρωτεΐνες, όπως π.χ. οι εξής :

σημαία DYKDDDDK πεπτιδική αλληλουχία

c- Myc seqence πεπτίδιο EQKLISEEDL

Αιμοσυγκολλητίνης (HA), YPYDVPDYA πεπτιδική αλληλουχία

Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)

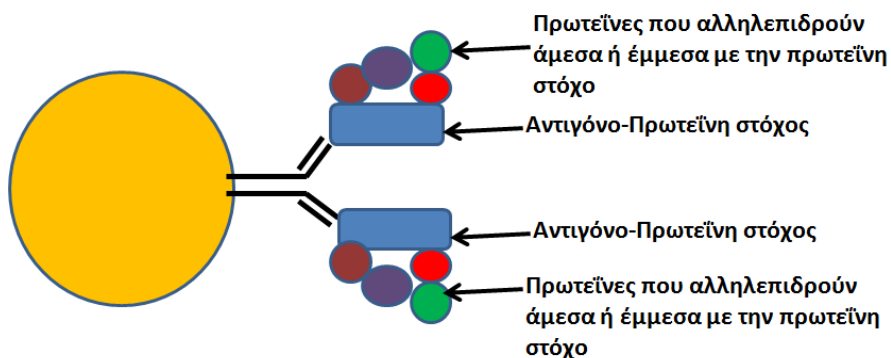
Η σήμανση των υπό μελέτη πρωτεϊνών στόχων επιτυγχάνεται με εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας δημιουργώντας πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι φέρουν αλληλουχίες DNA, οι οποίες κωδικοποιούν την έκφραση χημικών πρωτεϊνών (ετικέτας+πρωτεΐνης στόχος). Μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με τους συγκεκριμένους πλασμιδιακούς φορείς, επιτυγχάνεται η κυτταρική έκφραση της επιθυμητής χημικής πρωτεΐνης.

1Α. Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co - IP)

Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη έναντι της οποίας διαθέτουμε αντίσωμα με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης

Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co - IP) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την εύρεση και χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Το Co - IP διεξάγεται ουσιαστικά με τον ίδιο τρόπο όπως ένα IP. Στηρίζεται στο ότι το αντιγόνο στόχος κατακρημνίζεται μεν με το αντίσωμα, που ονομάζεται επίσης ως «δόλωμα», συμπαρασύροντας επίσης πρωτεΐνες, κυτταρικούς παράγοντες, που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη στόχο, εφόσον το αντιγόνο 'ψαρεύεται' μέσα από ένα κυτταρικό εκχύλισμα. Έτσι

πρωτεΐνη στόχος και μόρια που αλληλεπιδρούν μαζί της συν-καθιζάνουν ως ένα σύμπλοκο αλληλεπιδρούσας πρωτεΐνης ή « θήραμα », - πρωτεΐνη στόχος, από ένα κυτταρικό εκχύλισμα (Σχήμα 3). Δηλαδή, η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη στόχο δεσμεύεται στο αντιγόνο-πρωτεΐνη στόχο, το οποίο δεσμεύεται από το αντίσωμα που είναι ακινητοποιημένο πάνω στη στήλη χρωματογραφίας-σφαιρίδια. Οι πρωτεΐνες που ανοσοκαταβυθίζονται και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μαζί τους συνήθως ανιχνεύονται με SDS-PAGE και ανάλυση με Western blot ή φασματοσκοπία μάζας (Mass spec). Η υπόθεση που γίνεται συνήθως είναι ότι οι πρωτεΐνες που συν-καθιζάνουν είναι αυτές οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη λειτουργία του αντιγόνου-στόχου σε κυτταρικό επίπεδο. Αυτή είναι μόνο μια υπόθεση, και αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω επαλήθευσης και χαρακτηρισμού άμεσων ή έμμεσων αλληλεπιδράσεων.

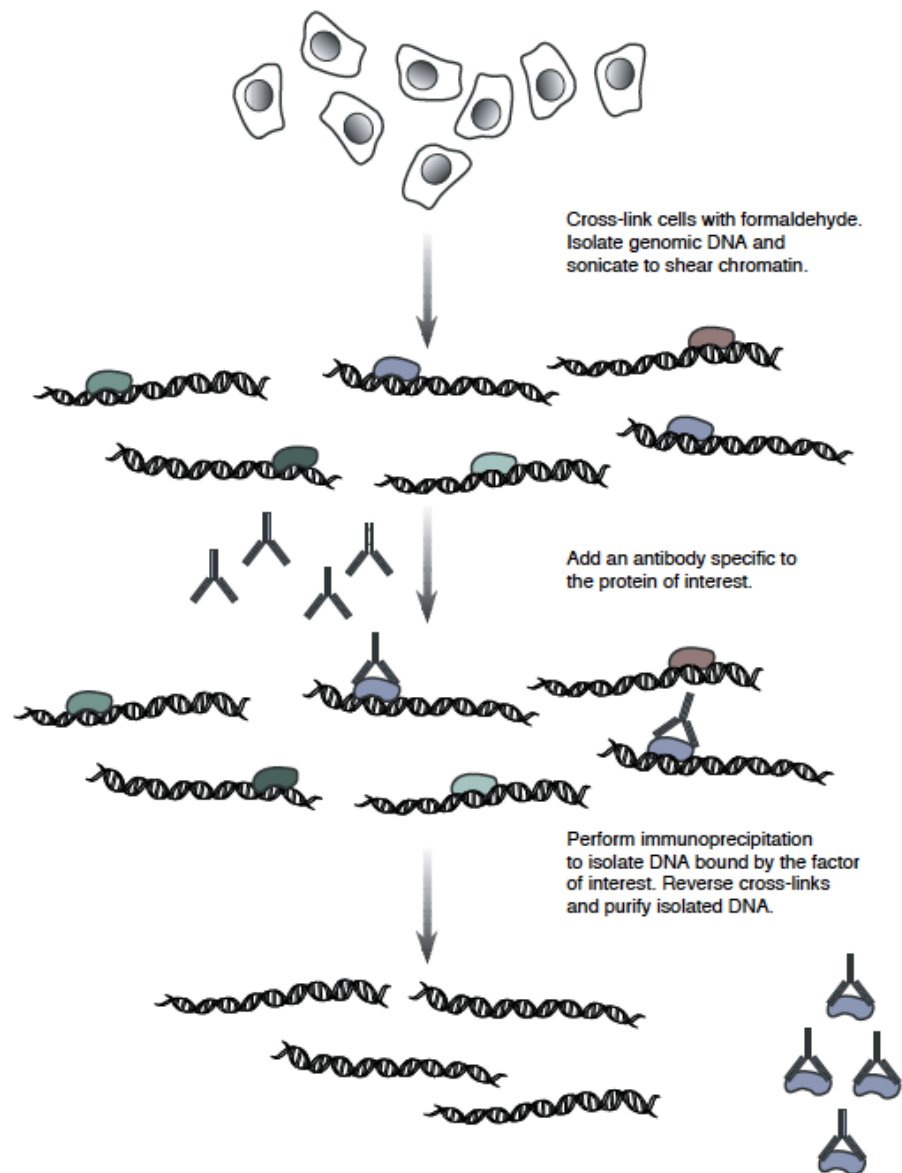


Σχήμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών. Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με την πρωτεΐνη στόχο.

1B. Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

Οι δοκιμασίες ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) εκτελούνται για τον προσδιορισμό περιοχών του γονιδιώματος με τις οποίες αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη στόχος. Ταυτοποιούνται επίσης δεσμεύουσες με το DNA πρωτεΐνες, όπως παράγοντες μεταγραφής, ιστόνες, ρυθμιστικοί παράγοντες. Σε προσδιορισμούς ChIP, οι πρωτεϊνικές συνδέσεις με το DNA σταθεροποιούνται προσωρινά με σταυροειδείς δεσμούς (μονιμοποίηση των κυττάρων με φορμαλεϋδη πριν από την λύση των κυττάρων). Στη συνέχεια το DNA υφίσταται διάτμηση σε κομμάτια 300-700bp, με χρήση υπερήχων. Οι πρωτεΐνες-στόχοι

ανοσοκαταβυθίζονται μαζί με τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (λόγω της προσωρινής σταθεροποίησης της αλληλεπίδρασής τους με σταυροειδείς δεσμούς) και το DNA στη συνέχεια απομονώνεται και ταυτοποιείται η αλληλουχία του με PCR ή με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο, Real Time PCR. (Σχήμα 4). Το σύμπλοκο αντισώματος πρωτεϊνών μπορεί επίσης να απομονωθεί και να ακολουθήσει χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με άλλες τεχνικές όπως πρωτεομική ανάλυση.

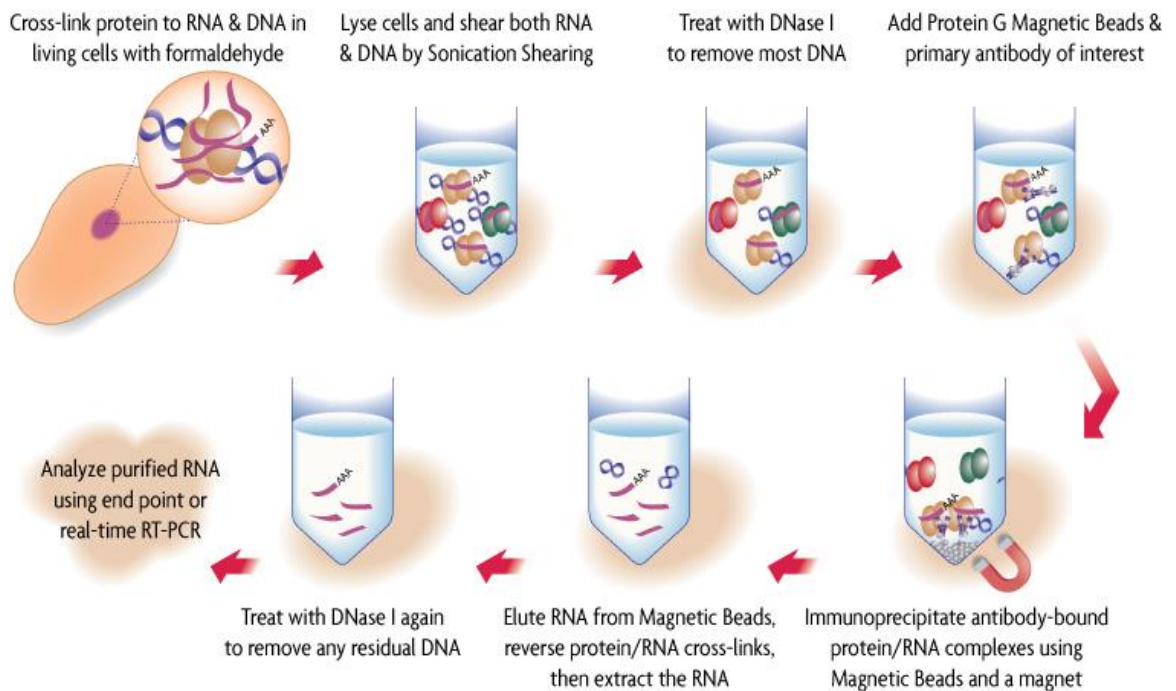


Σχήμα 4. Διαγραμματική απεικόνιση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης

Από: http://mmg-233-2013-genetics-genomics.wikia.com/wiki/Chromatin_Immunoprecipitation

1Γ. Ανοσοκατακρήμνιση (Ανοσοκαθίζηση) RNA (RIP)

Αυτή η προσέγγιση είναι παρόμοια με ChIP, με εξαίρεση τα ότι το σύμπλοκο RNA - πρωτεΐνες που συνδέονται-αλληλεπιδρούν με αυτό, ανοσοκαταβυθίζονται αντί των πρωτεϊνών - DNA. Τα RNAs που ανοσοκαταβυθίζονται μπορούν στη συνέχεια να ταυτοποιηθούν με RT-PCR και αλληλούχιση του cDNA (Σχήμα 5).



Flow chart of the RNA ChIP-IT™ process.

Live cells are fixed using formaldehyde, which cross-links and preserves protein/RNA interactions (as well as protein/DNA interactions). The RNA/DNA is then sheared into small, uniform fragments using sonication and, after a DNase treatment to remove residual DNA, specific protein/RNA complexes are immunoprecipitated using an antibody directed against the RNA-binding protein of interest. Following immunoprecipitation, cross-linking is reversed, the RNA is extracted then DNase I treated again (to remove residual DNA). The RNA is then analyzed by end point or real-time RT-PCR to determine which RNA fragments were bound by the protein of interest.

Από ιστοσελίδα Active motif

Σχήμα 5. Διαγραμματική απεικόνιση ανοσοκατακρήμνισης RNA.

2. Pull-Down Δοκιμασίες

Η δοκιμασία pull-down χρησιμοποιείται για να καθορίσει μια φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών και αποτελεί μία *in vitro* μέθοδο. Οι Pull-down δοκιμασίες είναι χρήσιμες τόσο για την επιβεβαίωση της ύπαρξης μιας αλληλεπίδρασης

πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, η οποία έχει προβλεφθεί εφαρμόζοντας άλλες τεχνικές (π.χ. ανοσοκαταβύθιση) όσο και ως τεχνική αρχικής ανίχνευσης άγνωστων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Οι Pull-down δοκιμασίες είναι μια μορφή καθαρισμού πρωτεϊνών, με εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας και είναι παρόμοια με την ανοσοκατακρήμνιση. Διαφέρει στο ότι ως «δόλωμα» χρησιμοποιείται μία πρωτεΐνη αντί ενός αντισώματος.

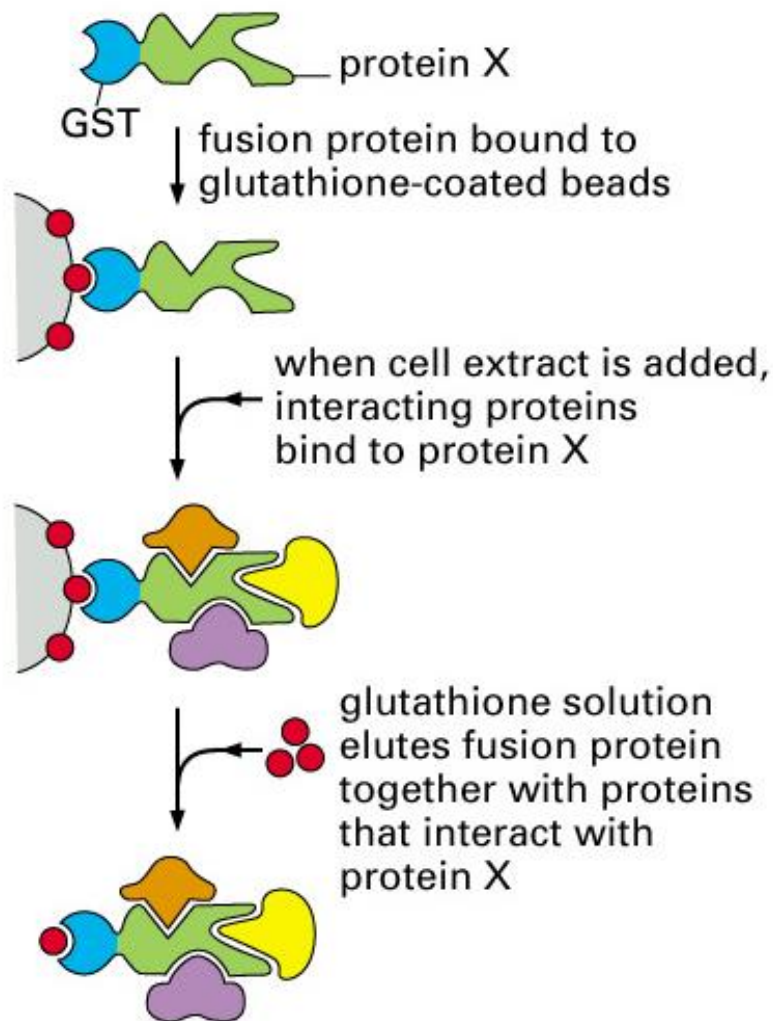
Στην περίπτωση αυτή, το σύστημα (στήλη συγγένειας – υπό μελέτη πρωτεΐνη) αποτελείται από τη στήλη και από την υπό μελέτη πρωτεΐνη, χημική είτε με α) S-τρανσφεράση γλουταθειόνη (GST), β) είτε από μία πεπτιδική αλληλουχία με έξι Ιστιδίνες, γ) είτε ετικέτα στρεπταβιδίνης, οι οποίες χημικές πρωτεΐνες δεσμεύονται πάνω στη στήλη αντίστοιχα, είτε με δεσμευτικό παράγοντα που συνδέεται με γλουταθειόνη, είτε χηλικό μέταλλο (π.χ. κοβάλτιο ή νικέλιο), είτε με βιοτίνη προσκολλημένα πάνω στη στήλη (σφαιρίδια σεφαρόζης ή αγαρόζης). Η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη – ετικέτα δρα ως "δόλωμα" για να συλλάβει ένα υποθετικό μόριο αλληλεπίδρασης (δηλαδή, το "θήραμα"). Στη συνέχεια το σύστημα μπορεί:

A) είτε να επωαστεί με το επιθυμητό εκχύλισμα κυττάρων. Στο οποίο περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες οι οποίες πιθανόν να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη στόχο (Σχήμα 6). Μετά τα προβλεπόμενα στάδια εκπλύσεως, τα προκύπτοντα σύμπλοκα εκλύονται εκλεκτικά χρησιμοποιώντας ανταγωνιστικούς αναλύτες ή χαμηλό pH ή κατάλληλο ρυθμιστικό για την in-gel ή Western blot ανάλυση.

B) είτε να επωαστεί με ένα εκχύλισμα κυττάρων στο οποίο με κατάλληλες τεχνικές (έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών) έχει επιτευχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης στόχου σε μεγάλες ποσότητες. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει στον ερευνητή να εργαστεί με μια μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης από ότι είναι τυπικά διαθέσιμα υπό ενδογενείς συνθήκες έκφρασης.

Γ) είτε να επωαστεί με in vitro εκφρασμένη, ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη, η οποία ελέγχεται ως προς την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη στόχο. Η in vitro εκφρασμένη, ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη, εκφράζεται με χρήση ειδικά σχεδιασμένων Kit, διαθέσιμα στο εμπόριο, τα οποία περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα ένζυμα και ρυθμιστικούς παράγοντες για την in vitro επίτευξης αντιγραφής, μεταγραφής, μετάφρασης και κατά συνέπεια έκφρασης της πρωτεΐνης, η οποία είναι σημασμένη

ραδιενεργά μία και στο όλο σύστημα περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων και αμινοξέα ένα εκ των οποίων σε μικρή ποσότητα είναι σημασμένο ραδιενεργά (π.χ. ραδιενεργή κυστεΐνη), οπότε κατά την ενσωμάτωσή του στην συντιθέμενη πρωτεΐνη προκύπτει ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη. **Η προσέγγιση αυτή εξαλείφει σύγχυση αποτελεσμάτων μία και απαντάει στο ερώτημα της απευθείας (άμεσης) και όχι έμμεσης αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών**, που θα μπορούσε να προκύψει από την αλληλεπίδραση των προσδενουσών πρωτεϊνών μεταξύ τους και όχι απευθείας με το δόλωμα.



Σχήμα 6. Διαγραμματική απεικόνιση Pull down δοκιμασίας

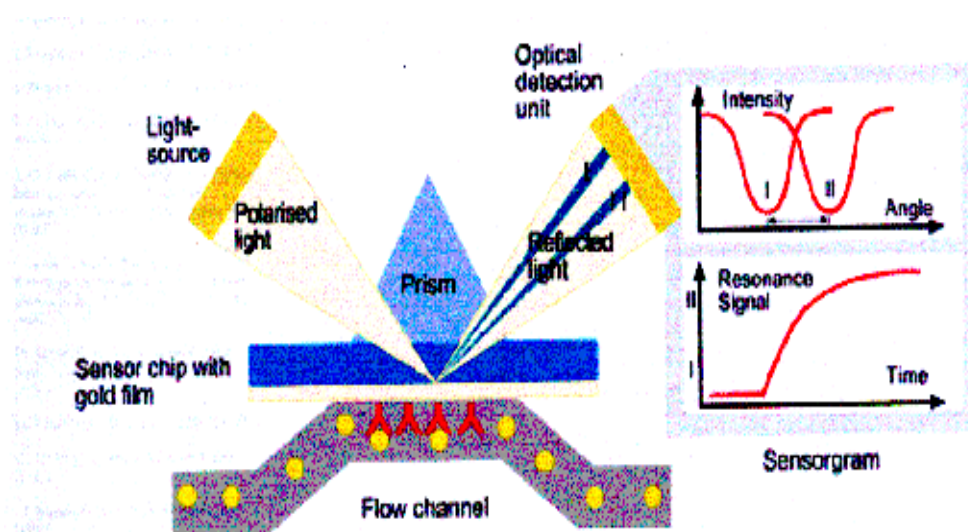
Από: <http://www.baike.com/ipadwiki/GST+pull-down+assay>

Εκτός από τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών, οι pull-down δοκιμασίες είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση της κατάστασης ενεργοποίησης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες που

ενεργοποιούνται ως απόκριση σε ενεργοποίηση φωσφορυλιώσεων τυροσίνης μπορεί να καταβυθιστούν (Pull - down) χρησιμοποιώντας μία ακινητοποιημένο SH2 περιοχή που στοχεύει την φωσφορυλιωμένη τυροσίνη σε μία δεδομένη πρωτεΐνη. Επιπλέον, GTPases, οι οποίες δρουν ως μοριακοί διακόπτες, που ρυθμίζουν την κυτταρική σηματοδότηση με την εναλλαγή μεταξύ μιας συνδεδεμένης με GTP (ενεργής) και συνδεδεμένης με GDP (ανενεργής) κατάστασης, μπορεί να καταβυθιστούν (Pull -down), χρησιμοποιώντας μία ακινητοποιημένη GTPase περιοχή δέσμησης. Σε αμφοτέρους τους τύπους προσδιορισμών pull-down, επειδή η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης εξαρτάται από την αλληλουχία της περιοχής συνδέσεως, αυτές οι προσεγγίσεις είναι πολύ ειδικές στην ανίχνευση της ενεργοποίησης διακριτών πρωτεϊνών.

3. Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (surface plasmon resonance, SPR)

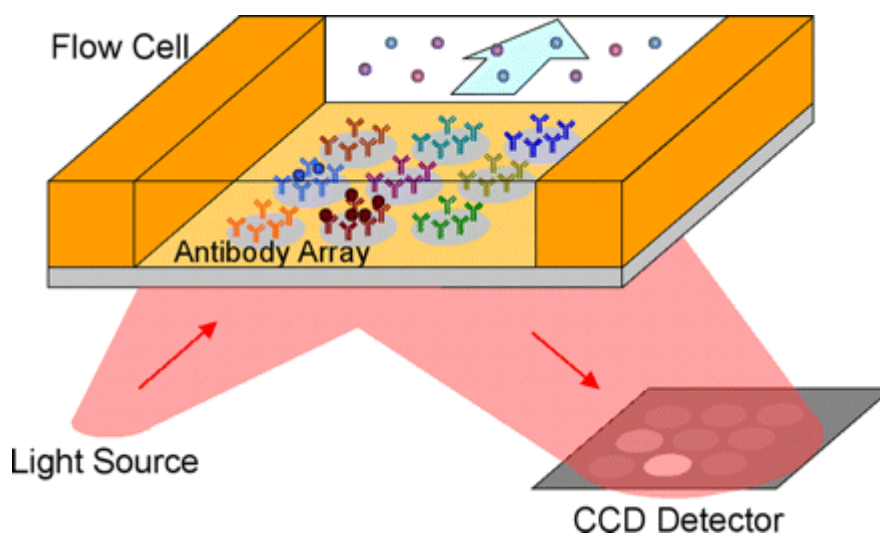
Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει σε μεταλλικές επιφάνειες (συνήθως χρυσού και αργύρου) όταν μια προσπίπτουσα δέσμη φωτός χτυπά την επιφάνεια υπό μία συγκεκριμένη γωνία. Ανάλογα με το πάχος της μοριακής στιβάδας, και άρα της ποσότητας της πρωτεΐνης, στην επιφάνεια του μετάλλου, τα SPR φαινόμενο καταλήγει σε μία διαβαθμισμένη μείωση της έντασης του ανακλώμενου φωτός, άρα και του δείκτη διάθλασης του μέσου σε γεινίαση με την επιφάνεια του μετάλλου (Σχήμα 7). Η μέθοδος καθιστά δυνατή την ακριβή μέτρηση της προσρόφησης μορίων επί της μεταλλικής επιφανείας και κατά συνέπεια των αλληλεπιδράσεων τους με ειδικούς προσδέτες. Η μέθοδος λόγω της υψηλής ευαισθησίας της έχει πολλές εφαρμογές στις Βιοϊατρικές επιστήμες. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται όχι μόνο για τη μέτρηση σε πραγματικό χρόνο της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών αλλά και την διαλογή των ενώσεων μολύβδου στη φαρμακευτική βιομηχανία, όπως επίσης και στη μέτρηση του υβριδισμού του DNA, στο χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος, στο χαρακτηρισμό πολυκλωνικών αντισωμάτων, την χαρτογράφηση επιτόπων, σε μελέτες διαμόρφωσης πρωτεΐνης και ετικέτας χωρίς ανοσολογικές δοκιμασίες. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιούνται ειδικές μικροσυστοιχίες-αισθητήρες με ικανότητα επαναχρησιμοποίησης, στις οποίες με αξιοποίηση των χημικών ιδιοτήτων των υπό μελέτη πρωτεϊνών επιτυγχάνεται η σύνδεση- ακινητοποίηση τους στις ειδικές επιφάνειες των μικροσυστοιχιών. Η χρήση σωματίδιων κολλοειδούς χρυσού ως συστατικά της επιφάνειας των μικροσυστοιχιών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στην SPR.



Σχήμα 7. Διαγραμματική απεικόνιση φαινομένου συντονισμού επιφανειακών πλάσμων. Από <http://microgen.ouhsc.edu/biacore.htm>

Ο αισθητήρας κολλοειδούς χρυσού αποτελείται από μια γυάλινη επιφάνεια, επικαλυμμένη με ένα λεπτό στρώμα χρυσού. Αυτό αποτελεί τη βάση για μια σειρά από εξειδικευμένες επιφάνειες που έχουν σχεδιαστεί για τη βελτιστοποίηση της πρόσδεση μίας ποικιλίας μορίων.

Οι μικροσυστοιχίες με φύλα χρυσού έχουν συνήθως τέσσερις διακριτές θέσεις (κελιά) σύνδεσης, όπου μπορούν να ακινητοποιηθούν π.χ. τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες (μία εξ αυτών αποτελεί την πρωτεΐνη αναφοράς, τυφλό) (Σχήμα 8). Από τα κελιά αυτά μπορεί να διέρχονται διαλύματα μέσω ενός συστήματος μικροροών. Τα διαλύματα αυτά μπορεί να είναι διαλύματα ενεργοποίησης των θέσεων δέμευσης, διαλύματα μπλοκαρίσματος μη κατειλημμένων θέσεων, διαλύματα των μορίων που ελέγχονται για τη δυνατότητα σύνδεσής τους με τα ακινητοποιημένα μόρια, διαλύματα έκπλυσης και αποσύνδεσης της προσδεμένης πρωτεΐνης με το ακινητοποιημένο μόριο. Με την SPR μπορούν να μελετηθούν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, πρωτεϊνών - DNA, μεμβρανών με λιπιδικής φύσεως μόρια, μέταλλα νικελίου με άλλα μόρια με ετικέτες ιστιδίνης κ.α. Για κάθε μία από τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται ειδική μικροσυστοιχία. Οι οποίες ανακτώνται και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν. Το σύστημα είναι αυτοματοποιημένο και συνοδεύεται από κατάλληλο λογισμικό για τον χαρακτηρισμό της κινητικής σύνδεσης και αποσύνδεσης των υπό μελέτη μορίων.



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση διακριτών θέσεων αισθητήρων (μικροσυστοιχιών) SRP από Molecular & Cellular Proteomics December 2008 vol. 7 no. 12 2464-2474

Έτσι η μεθοδολογία SRP επιτρέπει όχι μόνο την **ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο της αλληλεπίδρασης δύο μορίων. Αλλά δίνει και ποσοτικές πληροφορίες. Όπως πόσο ειδική είναι η αλληλεπίδραση, πόσο ισχυρή είναι η σύνδεση και ποια είναι οι σταθερές σύνδεσης και αποσύνδεσης των μορίων που αλληλεπιδρούν.**

4. Μέθοδος FRET

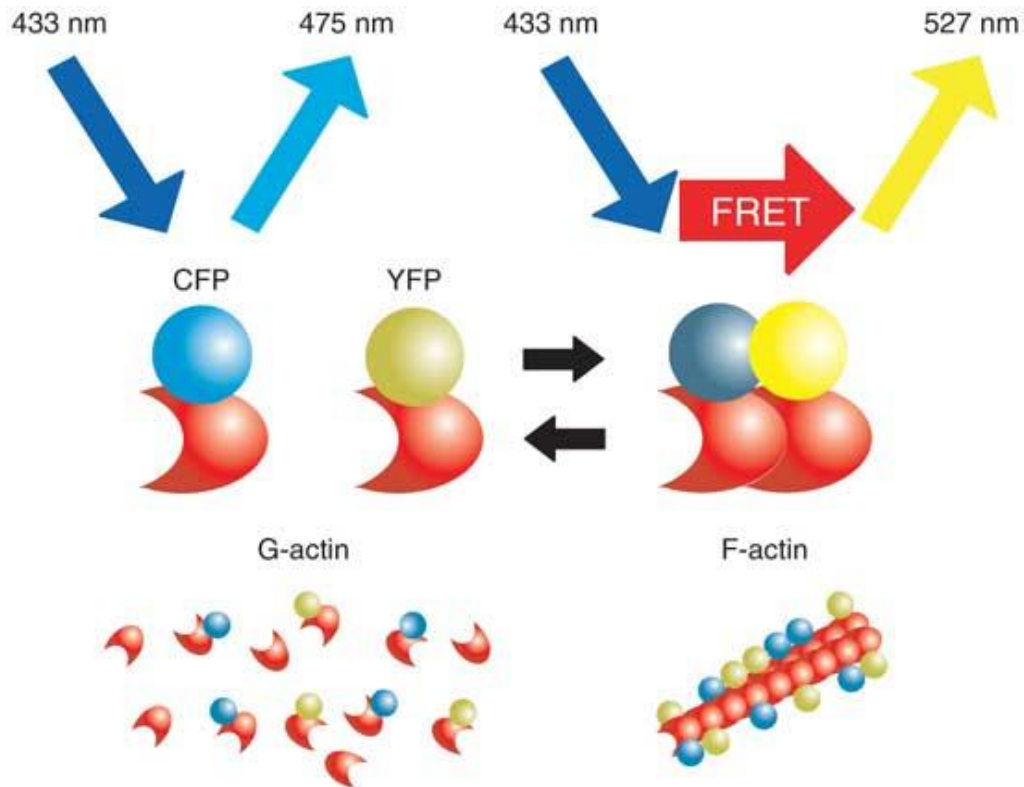
Το φαινόμενο FRET αναφέρεται στη μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET), ή μεταφορά ενέργειας από μη ραδιενεργή διεγερμένη κατάσταση από ένα σε άλλο φθοροφόρο. Πρόσφατα, με την ανάπτυξη της ψηφιακής μικροσκοπίας, η μεθοδολογία FRET έχει εφαρμοστεί στην **ανάλυση των μοριακών αλληλεπιδράσεων μεμονωμένων μορίων, ενδογενώς, σε ζωντανά συστήματα μεμονωμένων κυττάρων, οργανιδίων κυττάρων, σε πραγματικό χρόνο**. Η FRET μικροσκοπία είναι πλέον ένα τυποποιημένο εργαλείο για τη διερεύνηση των δια-και ενδομοριακών αποστάσεων στην κλίμακα νανομέτρων.

Η μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού φθορισμού είναι μια φυσική διεργασία. Εξαρτάται από την απόσταση μεταφοράς ενέργειας από μη ραδιενεργό μοριακό φθοροφόρο (δότη) σε ένα άλλο φθοροφόρο (δέκτης) μέσω διαμοριακής μεγάλης εμβέλειας σύζευξης διπόλου-διπόλου. Η FRET μπορεί να είναι μια ακριβή μέτρηση της μοριακής εγγύτητας σε Angstrom αποστάσεις (0-100 Å) και άκρως αποτελεσματική, αν ο δότης και ο δέκτης είναι τοποθετημένες εντός της ακτίνας Forster (η απόσταση κατά την οποία το ήμισυ της ενέργειας διέγερσης του δότη μεταφέρεται στο δέκτη, τυπικά 3-6 nm). Επιπλέον, το φάσμα εκπομπής του φθοροφόρου δότη πρέπει να επικαλύπτει σημαντικά (> 30 %) το φάσμα απορρόφησης διέγερσης του δέκτη. Η ταχύτητα μεταφοράς της ενέργειας εξαρτάται από την απόσταση των δύο χρωμοφόρων, το βαθμό επικάλυψης μεταξύ φάσματος εκπομπής του δότη και διέγερσης του δέκτη, το σχετικό προσανατολισμό μεταξύ δότη και δέκτη, την απόδοση κβάντουμ του δότη και το χρόνο ζωής φθορισμού του δότη.

Οι μοριακές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στη δοκιμασία FRET απεικονίζονται στο Σχήμα 9. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την απορρόφηση της ενέργειας από το μόριο δότη, με αποτέλεσμα τη διέγερση από την αρχική κατάσταση, S0D, σε μία διεγερμένη μονή κατάσταση, S1D. Εάν ένας κατάλληλος δέκτης φθοροφόρου είναι κοντά, τότε μεταφορά μη-ραδιενεργής ενέργειας μεταξύ του δότη και του δέκτη μπορεί να συμβεί. Αυτή η μεταφορά συνεπάγεται συντονισμό μεταξύ των singlet - μονό ηλεκτρονικών μεταπτώσεων των δύο φθοροφόρων, που δημιουργούνται από τη σύζευξη της μετάβασης εκπομπής διπολικής ροπής του δότη και της μετάβασης απορρόφησης διπολικής ροπής του δέκτη. Έτσι, η αποτελεσματικότητα της FRET και το φάσμα των αποστάσεων στις οποίες μπορεί να παρατηρηθεί καθορίζονται από τις φασματικές ιδιότητες ενός δεδομένου ζεύγους δότη δέκτη.

Οι κατάλληλοι δότης και δέκτης ανιχνευτές επιλέγονται βάσει τα φασματικά χαρακτηριστικά απορρόφησης και εκπομπής τους. Για τη βέλτιστη μεταφορά ενέργειας

συντονισμού το φάσμα εκπομπής του δότη πρέπει να αλληλεπικαλύπτεται σημαντικά με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη. Επίσης η πηγή διέγερσης του δότη δεν πρέπει να διεγείρει απευθείας τον δέκτη.



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση φαινομένου FRET, ως μέθοδος προσδιορισμού αλληλεπίδρασης δύο μορίων. Από : Nature Protocols 1, 911 - 919 (2006)

Το πρώτο μέλος του ζεύγους FRET λειτουργεί ως δότης ενέργειας και το δεύτερο μέλος της συνάρτησης ζεύγους FRET ως δέκτη ενέργειας. Όταν ένα σύστημα περιέχει δύο φοριζόντα είδη έτσι ώστε το φάσμα εκπομπής του πρώτου (δότης) να επικαλύπτει το φάσμα απορρόφησης του δεύτερου (δέκτης), η ενέργεια που απορροφάται από τον δότη μπορεί να μεταφερθεί στον δέκτη. Η ενέργεια μεταφέρεται στον δέκτη μόνο εάν τα δύο μόρια είναι πολύ κοντά, άρα και αλληλεπιδρούν. Τότε και μόνο τότε εκπέμπεται ακτινοβολία από τον δέκτη, ή οποία ανιχνεύεται, προσδιορίζεται ποσοτικά, και πιστοποιεί την αλληλεπίδραση δύο μορίων σε ζωντανά κύτταρα σε πραγματικό χρόνο. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια ποικιλία τρόπων για να χαρακτηρίσει την απόσταση μεταξύ των δύο χρωμοφώρων. Πρακτικά για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών σε ζωντανό σύστημα κυττάρων, τα κύτταρα διαμολύνονται με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν γονίδια

τα οποία κωδικοποιούν την έκφραση χημικών πρωτεϊνών των υπό μελέτη πρωτεϊνών με τις δύο φθορίζουσες κατάλληλα επιλεγμένες ώστε να πληρούν τα κριτήρια τα οποία προαναφέρθηκαν.

5. Βιβλιογραφία

1. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int J Proteomics*. 2014;2014:147648. Epub 2014 Feb 17.
2. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*. 1995 Mar;59(1):94-123. Review. PubMed PMID: 7708014; PubMed Central PMCID: PMC239356.
3. Patrick Englebienne, Anne Van Hoonacker and Michel Verhas Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences *Spectroscopy* 17 (2003) 255–273 255.
4. Lausted C, Hu Z, Hood L. Quantitative serum proteomics from surface plasmon resonance imaging. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Dec;7(12):2464-74. doi: 10.1074/mcp.M800121-MCP200. Epub 2008 Aug 3. PubMed PMID: 18678562.