

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

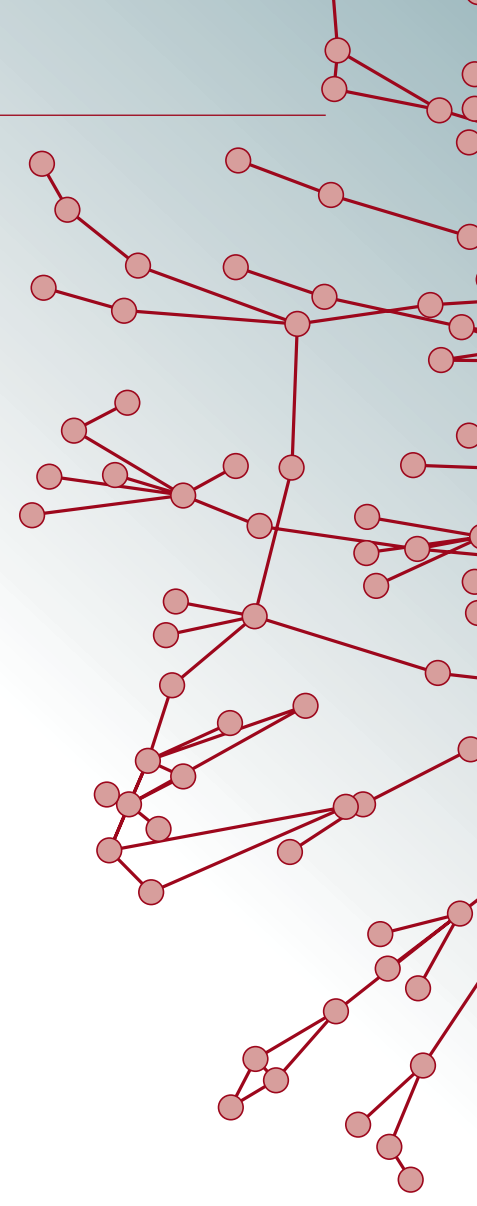
# Στρατηγικές διαχωρισμού πρωτεϊνών

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάλυση πρωτεϊνών είτε σε μικρή είτε σε μεγάλη κλίμακα, απαιτεί μεθόδους για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μιγμάτων στα ανεξάρτητα συστατικά τους. Οι μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών μπορούν να τοποθετηθούν σε μία κλίμακα από πλήρως επιλεκτικές έως πλήρως μη επιλεκτικές. Οι επιλεκτικές μέθοδοι στοχεύουν στην απομόνωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα μίγμα, συνήθως εκμεταλλευόμενες συγκεκριμένες ιδιότητες όπως την ειδικότητα πρόσδεσης σε άλλα μόρια. Οι μέθοδοι που στηρίζονται στη συγγένεια αναλύονται με περισσότερη λεπτομέρεια στο **Κεφάλαιο 7**. Σε αυτό το Κεφάλαιο εστιάζουμε στις μεθόδους μη ειδικού διαχωρισμού οι οποίες στοχεύουν στο να πάρουν ένα σύνθετο μίγμα πρωτεϊνών και να το διαχωρίσουν με αμερόληπτο τρόπο ώστε όλες οι μεμονωμένες πρωτεΐνες ή τουλάχιστον ένα σημαντικό μέρος τους να είναι διαθέσιμες για περαιτέρω ανάλυση. Οι μέθοδοι αυτές αποτελούν την καρδιά της πρωτεωμικής και εκμεταλλεύονται τις γενικές ιδιότητες των πρωτεϊνών όπως η μάζα και το φορτίο τους.

Στην πρωτεωμική, η τεχνολογία διαχωρισμού πρωτεϊνών ωθείται στα όρια της. Ο απόλυτος στόχος είναι να απομονωθούν οι ανεξάρτητες πρωτεΐνες ενός κύτταρου ή άλλου βιολογικού δείγματος. Όπως αναφέρεται στο **Κεφάλαιο 1**, σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο ο αριθμός των διαφορετικών πρωτεϊνών που μπορούν να απομονωθούν αντιστοιχεί σε δεκάδες ή εκατοντάδες χιλιάδες όταν λαμβάνονται υπ' όψιν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτές οι πρωτεΐνες ποικίλουν στις χημικές τους ιδιότητες, καθιστώντας δύσκολη τη δημιουργία μίας μεθόδου διαχωρισμού που θα αντιπροσωπεύει ισοδύναμα όλες τις πρωτεΐνες. Ακόμη και μετά από χρόνια ανάπτυξης των μεθόδων διαχωρισμού πρωτεϊνών, οι πιο έξυπνες μέθοδοι πρωτεωμικού διαχωρισμού, έχουν ως αποτέλεσμα την υπο-εκπροσώπηση συγκεκριμένων οικογενειών πρωτεϊνών και είναι επομένως μερικώς επιλεκτικές.

Ανεξάρτητα εάν μία μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών είναι επιλεκτική, ή είναι μερικώς επιλεκτική, ή δεν είναι επιλεκτική, είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι η βασική αρχή είναι πάντα η εκμετάλλευση των φυσικών και χημικών διαφορών μεταξύ των πρωτεϊνών που τις κάνουν να συμπεριφέρονται διαφορετικά σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Αυτές οι φυσικές και χημικές διαφορές καθορίζονται από τον αριθμό, τον τύπο και τη αλληλουχία των αμινοξέων σε μία πρωτεΐνη κι από την παρουσία και τον τύπο πιθανών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

- 
- 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ
  - 2.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ
  - 2.3 ΑΡΧΕΣ ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ
  - 2.4 Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ 2DGE ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ
  - 2.5 ΑΡΧΕΣ ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

## 2.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

Πολλές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωρίσουν σύνθετα μίγματα πρωτεϊνών σε κάτι που τουλάχιστον προσεγγίζει μία μη επιλεκτική μέθοδο, αλλά δεν είναι όλες αυτές οι τεχνικές κατάλληλες για την πρωτεωμική. Μία απαραίτητη

προϋπόθεση είναι η υψηλή διαχωριστική ικανότητα (*high resolution*). Η τεχνική διαχωρισμού πρέπει να παράγει κλάσματα που αποτελούν απλά μίγματα πρωτεϊνών ή πεπτιδίων (**Πλαίσιο 2.1**), που είναι η βασική αρχή των μονο-διάστατων τεχνικών διαχωρισμού (όσων δηλαδή αξιοποιούν μία μόνο χημική ή φυσική ιδιότητα σαν βάση διαχωρισμού), επειδή δεν προσφέρουν επαρκή διαχωριστική ικα-

### ΠΛΑΙΣΙΟ 2.1 ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

#### Η ανάγκη για πεπτίδια στην πρωτεωμική

Η τυπική ροή ενός πειράματος πρωτεωμικής περιλαμβάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και/ή των πεπτιδίων ακολουθούμενη από την ταυτοποίηση είτε επιλεγμένων πρωτεϊνών ή με την έννοια της πρωτεωμικής, όλων των πρωτεϊνών στο αρχικό δείγμα με φασματομετρία μάζας. Αναλύουμε και τη χρήση της φασματομετρίας μάζας στην πρωτεωμική με περισσότερες λεπτομέρειες στο **Κεφάλαιο 3**, αλλά είναι ξεκάθαρο από τις τεχνικές που θα αναλυθούν σε αυτό το Κεφάλαιο ότι πολλές από τις τεχνικές για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών εφαρμόζονται στην πραγματικότητα σε **πεπτίδια** (*peptides*) που προέρχονται από πρωτεΐνες μετά από **πέψη με πρωτεολυτικά ένζυμα** (*digestion with proteolytic enzymes*) και όχι στις ίδιες τις πρωτεΐνες. Ο λόγος για αυτό είναι απλός: η φασματομετρία μάζας έχει ένα ανώτατο όριο στην ταυτοποίηση της μάζας που σημαίνει ότι οι περισσότερες πλήρεις πρωτεΐνες δε μπορούν να ανιχνευτούν. Το όριο είναι περίπου 50 kDa για τις συνηθισμένες μεθόδους, και αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες με λιγότερα από 500 αμινοξέα, ενώ οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου μεγέθους αποκλείονται από την ανάλυση. Κάποιες πρόσφατες εξειδικευμένες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για να ωθήσουν τα όρια της ανίχνευσης αναλύονται στο **Κεφάλαιο 3**.

Στις περισσότερες περιπτώσεις για να μειωθεί το μέγεθος των μορίων προς ανάλυση, είναι απαραίτητος ο κατακερματισμός διατηρώντας όμως ταυτόχρονα τη δυνατότητα ταυτοποίησης του αρχικού μορίου. Οι πρωτεΐνες επομένως πέπτονται με θρυψίνη ή άλλα ένζυμα που κατακερματίζουν κάθε πρωτεϊνικό μόριο σε τμήματα των οποίων τα μεγέθη μπορούν να προβλεφθούν από δεδομένα αλληλουχιών (βασισμένα σε καλά χαρακτηρισμένες **θέσεις διάσπασης-cleavage sites**), επιτρέποντάς τους να αντιστοιχηθούν με τις πρωτεΐνες που τα έδωσαν, χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους αλγόριθμους αναζήτησης βάσεων δεδομένων (**Κεφάλαιο 3**). Στην 2DGE οι πρωτεΐνες πέπτονται μετά το διαχωρισμό τους, έτσι ώστε κάθε πρωτεϊνική κηλίδα να μετατρέπεται σε μία ομάδα από πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν την πρωτεΐνη(ες) της κηλίδας. Στις μεθόδους πολυπαραμετρικής χρωματογραφίας, είναι πολύ πιο συχνό να πέπτονται οι πρωτεΐνες σε πεπτίδια στο αρχικό τους δείγμα και έπειτα να διαχωρίζονται τα πεπτίδια, καθώς τα κλάσματα μπορούν να τροφοδοτηθούν αυτόματα στον φασματογράφο μάζας, μία προσέγγιση γνωστή ως **προσέγγιση από κάτω προς τα πάνω** (*bottom up proteomics*). Η κύρια πρόκληση σε αυτή την προσέγγιση είναι ότι το μίγμα των πρωτεϊνών έχει ήδη υψηλή πολυπλοκότητα, και γίνεται ακόμη πιο πολύπλοκο όταν κατακερματιστεί σε πεπτίδια, διότι κάθε πρωτεΐνη παράγει 20-50 πεπτίδια ανάλογα με το μέγεθός της. Η υψηλή διακριτική ικανότητα των τεχνικών της τεχνολογίας πολυδιάστατης χρωματογραφικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προλάβει την φόρτιση του φασματογράφου μάζας με ένα μεγάλο αριθμό πεπτιδίων ανά κλάσμα. Παρόλα αυτά, μόνο ένας μικρός αριθμός πεπτιδίων πρέπει να ταυτοποιηθούν για να προσδιορισθεί η ταυτότητα της αρχικής πρωτεΐνης. Επομένως ένας άλλος τρόπος για να προσεγγίσουμε το πρόβλημα της πολυπλοκότητας είναι να μειώσουμε τον αριθμό των πεπτιδίων στο δείγμα με μεθόδους εμπλουτισμού μέσω συγγένειας διατηρώντας όσο είναι δυνατόν την εκπροσώπηση των πρωτεϊνών (σελ. 54). Άλλη εναλλακτική μέθοδος, ανάλογη της μεθοδολογίας 2DGE, είναι να επιλεχθούν ολόκληρες πρωτεΐνες για ανάλυση και να παραχθούν κλάσματα μετά από σύγκρουσή τους (*collision*) αντί για πέψη, γνωστή ως πρωτεωμική **προσέγγιση από πάνω προς τα κάτω** (*top down proteomics*). Τα σχετικά ωφέλη αυτών των διαφορετικών μεθόδων για ταυτοποίηση πρωτεϊνών συζητώνται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στο **Κεφάλαιο 3**.

νότητα. Όλες οι τεχνικές που αναλύονται σε αυτό το Κεφάλαιο είναι επομένως πολυδιάστατες, χρησιμοποιούν δηλαδή διαδοχικά δύο ή περισσότερες αρχές διαχωρισμού. Ο βαθμός τον οποίο οι πολλαπλές τεχνικές πετυχαίνουν διαχωρισμό βασίζονται σε διαφορετικές αρχές περιγράφεται ως **ορθογωνικότητα** (*orthogonality*). Η άλλη πολύ σημαντική προϋπόθεση στην πρωτεωμική είναι η **υψηλή αποδοτικότητα** (*high throughput*). Η τεχνική διαχωρισμού πρέπει να διαχωρίζει όλες τις πρωτεΐνες με ένα πείραμα και ιδανικά να μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Οι πλέον κατάλληλες μέθοδοι για αυτοματοποίηση είναι αυτές που βασίζονται σε διαφορετικά επίπεδα μετανάστευσης πρωτεϊνών για να παράγουν κλάσματα που μπορούν εύκολα να απεικονιστούν ή να συλλεγούν, μία διαδικασία που γενικά περιγράφεται ως **διαχωριστική μεταφορά** (*separative transport*). Μία τελευταία προϋπόθεση είναι ότι η διαδικασία διαχωρισμού πρέπει να είναι συμβατή με επακόλουθη ανάλυση από φασματομετρία μάζας, καθώς αυτή είναι η κύρια τεχνολογική πλατφόρμα για υψηλής αποδοτικότητας ταυτοποίηση πρωτεϊνών (**Κεφάλαιο 3**). Οι δύο ομάδες τεχνικών που επικράτησαν στην πρωτεωμική είναι η **δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτώματος** (*two-dimensional gel electrophoresis, 2DGE*) και η **πολυδιάστατη υγρή χρωματογραφία** (*multidimensional liquid chromatography, MDLC*), με την τελευταία να συνδυάζεται κατά περίπτωση με περαιτέρω τεχνικές διαχωρισμού, όπως η **μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτώματος**, η **τριχοειδής ηλεκτροφόρηση** (*capillary electrophoresis*) ή η **χρωματογραφία ισοηλεκτρικής εστίασης** (*chromatofocusing*).

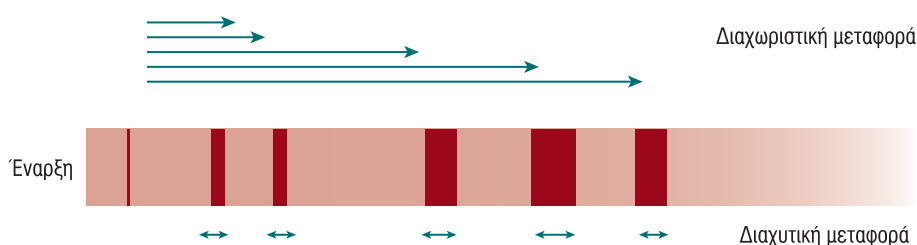
## 2.3 ΑΡΧΕΣ ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

### Η ηλεκτροφόρηση διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει μάζας και φορτίου

Κάθε φορτισμένο μόριο σε ένα διάλυμα μετακινείται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ένα φαινόμενο γνωστό ως **ηλεκτροφόρηση** (*electrophoresis*). Ο

ρυθμός της μετακίνησης εξαρτάται από την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου και την **πυκνότητα του φορτίου** (*charged density*) του μορίου, που είναι, το πηλίκο του φορτίου προς τη μάζα. Επειδή οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες φέρουν ένα καθαρό φορτίο, ένα πρωτεϊνικό μίγμα σε ένα διάλυμα μπορεί θεωρητικά να κλασματωθεί με ηλεκτροφόρηση, αφού οι διαφορετικές πρωτεΐνες, με διαφορετικές πυκνότητες φορτίων, μεταναστεύουν προς τα κατάλληλα ηλεκτρόδια με διαφορετικό ρυθμό. Στην πράξη, ωστόσο, ο αποτελεσματικός διαχωρισμός δε μπορεί ποτέ να επιτευχθεί επειδή όλες οι πρωτεΐνες είναι αρχικά διασκορπισμένες σε όλο τον όγκο του διαλύματος.

Η απάντηση σε αυτό το πρόβλημα είναι να φορτώσουμε ένα πρωτεϊνικό μίγμα σε ένα σημείο μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, επιτρέποντας στις πρωτεΐνες με διαφορετικές πυκνότητες φορτίων να μεταναστεύσουν σε διακριτές ζώνες. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλοί πρακτικοί λόγοι γιατί η κοινή ηλεκτροφόρηση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα ελεύθερο διάλυμα. Ένας λόγος είναι ότι κάθε διαταραχή στο διάλυμα θα διαταράξει τις ζώνες ηλεκτροφόρησης. Ακόμη κι αν ληφθούν εξαιρετικές προφυλάξεις ώστε να αποφευχθούν τα σοκ και οι δονήσεις από το εξωτερικό περιβάλλον, η ηλεκτροφόρηση παράγει θερμότητα και το ρεύμα μεταγωγής στο ρυθμιστικό διάλυμα θα διασπείρει τις ζώνες σε μεγάλο βαθμό. Άλλος ένας λόγος είναι ότι οι στενές ζώνες πρωτεϊνών που παράγονται από την ηλεκτροφόρηση, διευρύνονται με διάχυση, προκαλώντας τη γρήγορη ομογενοποίηση του πρωτεϊνικού μίγματος μόλις το ηλεκτρικό πεδίο απενεργοποιηθεί (**Εικόνα 2.1**). Αυτά τα ανεπιθύμητα φαινόμενα ελαττώνονται αν η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιηθεί σε πολύ λεπτούς, τριχοειδείς, σωλήνες (**τριχοειδής ηλεκτροφόρηση**, *capillary electrophoresis*, **Πλαίσιο 2.2**) και μέσα σε ένα σταθεροποιητικό πλέγμα όπως χαρτί ή πήκτωμα, μιας και το τελευταίο επιτρέπει επίσης στις διαχωρισμένες πρωτεΐνες να σταθεροποιηθούν σε ένα σημείο μόλις η διαδικασία ολοκληρωθεί. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης προτιμώνται διότι διευκολύνουν το διαχωρισμό των πρωτεϊνών μέσω διήθησης, και



**ΕΙΚΟΝΑ 2.1**  
Διαχωριστική και διαχυτική μεταφορά κατά την ηλεκτροφόρηση ζώνης.

## ΠΛΑΙΣΙΟ 2.2 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση στην πρωτεωμική

Η **τριχοειδής ηλεκτροφόρηση** (*Capillary electrophoresis, CE*) είναι όμοια στη βάση της με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αλλά πραγματοποιείται σε γυάλινους σωλήνες διαμέτρου περίπου 50 μm και μήκους μέχρι 1 m. Οι σωλήνες μπορούν να είναι ή να μην είναι γεμάτοι με πήκτωμα, αλλά η παρουσία πηκτώματος διευκολύνει τη διήθηση των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων και εμπλουτίζει τον εξαρτώμενο από το μέγεθος διαχωρισμό, μια παραλλαγή γνωστή ως **ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτώματος** (*Capillary gel electrophoresis, CGE*). Οι λεπτοί σωλήνες είναι αποτελεσματικοί στη διάχυση της θερμότητας, επιτρέποντας τη χρήση δυνατών ηλεκτρικών πεδίων. Αυτό σημαίνει ότι οι διαχωρισμοί είναι γρήγοροι και μπορούν να παρατηρούνται σε πραγματικό χρόνο παρά στο τελικό πειραματικό στάδιο. Το κύριο κέρδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης στην πρωτεωμική είναι ότι επιτρέπει στις διαχωριστικές αρχές της ηλεκτροφόρησης (όπως είναι, η καταλληλότητα να διαχωριστούν φορτισμένα και πολικά μόρια αποτελεσματικά) να συνδυαστούν με τη μέθοδο της ορθογωνικής χρωματογραφίας (τυπικά RP-HPLC) και να παράγουν πολύ γρήγορα κλάσματα υψηλής διακριτικότητας που μπορούν να τροφοδοτήσουν αυτόματα ένα φασματογράφο μάζας. Η μικρή διάμετρος των σωλήνων απαιτεί μικρούς όγκους δειγμάτων. Επομένως, άλλη μία εφαρμογή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης στην πρωτεωμική είναι ο διαχωρισμός πεπτιδίων σε σχετικά απλά μίγματα, όπως στα προϊόντα πέψης με θρυψίνη των απομονωμένων πρωτεϊνών ή κηλίδων που εκτέμνονται από το πήκτωμα των δύο διαστάσεων. Η μικροσκοπικότητα της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης μπορεί να εξελιχθεί περαιτέρω με την ανάπτυξη τεχνικών διαχωρισμού με συστοιχίες (*chips*) που βασίζονται σε τεχνολογία μικροροών, τεχνολογία με την οποία θα ασχοληθούμε συνοπτικά στο **Κεφάλαιο 9**.

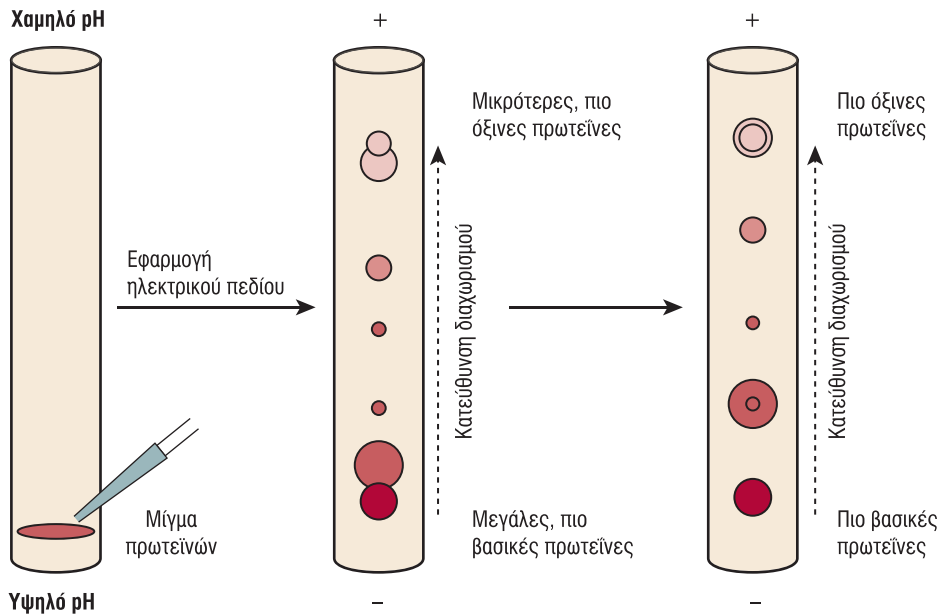
πηκτώματα με διαφορετικό μέγεθος πόρων μπορούν να παραχθούν εύκολα και επαναλήψιμα μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο μίγμα πολυμερισμού, επιτρέποντας έτσι τον επιλεκτικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ένα συγκεκριμένο εύρος μοριακών μαζών (σελ. 46). Η **ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης** (*polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE*) είναι επομένως μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών στη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία.

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, όλες οι τεχνικές κλασμάτωσης πρωτεϊνών υψηλής ανάλυσης χρησιμοποιούν πολυδιάστατες μεθόδους διαχωρισμού που εκμεταλλεύονται διαφορετικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, προκειμένου να πετύχουν το διαχωρισμό σε κάθε διάσταση. Παρόλο που η PAGE διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το φορτίο και τη μάζα τους, εκμεταλλευόμενη και τις δύο αυτές αρχές στην ίδια διάσταση, εξακολουθεί να καταλήγει σε χαμηλής ανάλυσης διαχωρισμό επειδή οι ζώνες διαχωρισμού επικαλύπτονται εκτεταμένα. Είχε εκτιμηθεί ήδη από το 1970, ότι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για να κλασματωθεί ένα πρωτεϊνικό μίγμα θα ήταν να εφαρμοσθούν αυτές οι αρχές η μία μετά την άλλη σε ορθογώνια διάσταση. Ήταν επομένως απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μετατροπές στην ηλεκτροφόρηση πηκτώματος προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός με

βάση μόνο το φορτίο ή με βάση μόνο τη μάζα. Αυτές οι τροποποιημένες τεχνικές εφαρμόζονται διαδοχικά στη 2DGE.

### Ισοηλεκτρική εστίαση διαχωρίζει πρωτεΐνες με βάση το φορτίο ανεξάρτητα από τη μάζα

Ο διαχωρισμός της πρώτης-διάστασης στη 2DGE είναι συνήθως η **ισοηλεκτρική εστίαση** (*isoelectric focusing, IEF*), στην οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του καθαρού φορτίου τους ανεξάρτητα από τη μάζα τους. Η βασική αρχή είναι ότι η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα διαβαθμισμένο pH, επιτρέποντας σε κάθε πρωτεΐνη να μετακινηθεί στο **ισοηλεκτρικό της σημείο** (*isoelectric point, pI*), δηλαδή στην **τιμή pH** στο οποίο η πρωτεΐνη έχει μηδενικό συνολικό φορτίο (**Εικόνα 2.2**). Στη συνηθισμένη ηλεκτροφόρηση δεν υπάρχει διαβάθμιση pH επειδή το ηλεκτροφορητικό ρυθμιστικό διάλυμα έχει ομοιόμορφο pH. Επομένως, η πυκνότητα του φορτίου κάθε πρωτεΐνης παραμένει η ίδια κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και με τον χρόνο, κάθε πρωτεΐνη φτάνει είτε στην άνοδο είτε στην κάθοδο. Στην περίπτωση της IEF, η πυκνότητα του φορτίου κάθε πρωτεΐνης μειώνεται καθώς αυτή κινείται κατά μήκος των βαθμίδων pH με κατεύθυνση το ισοηλεκτρικό της σημείο. Όταν φτάσει στο ισοηλεκτρικό σημείο, η πυκνότητα του φορτίου της πρωτεΐνης στο σημείο

**ΕΙΚΟΝΑ 2.2**

**Η αρχή της ισοηλεκτρικής εστίασης.** Ένα μίγμα πρωτεϊνών φορτώνεται στο βασικό άκρο ενός πηκτώματος με κλίση pH. Ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους, με κάθε μία να εστιάζεται σε μία θέση όπου η τιμή pH του περιβάλλοντος να είναι τέτοια ώστε η πρωτεΐνη να έχει μηδενικό συνολικό φορτίο, δηλαδή να βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες θα κινηθούν πιο αργά μέσα στο πήκτωμα αλλά μετά

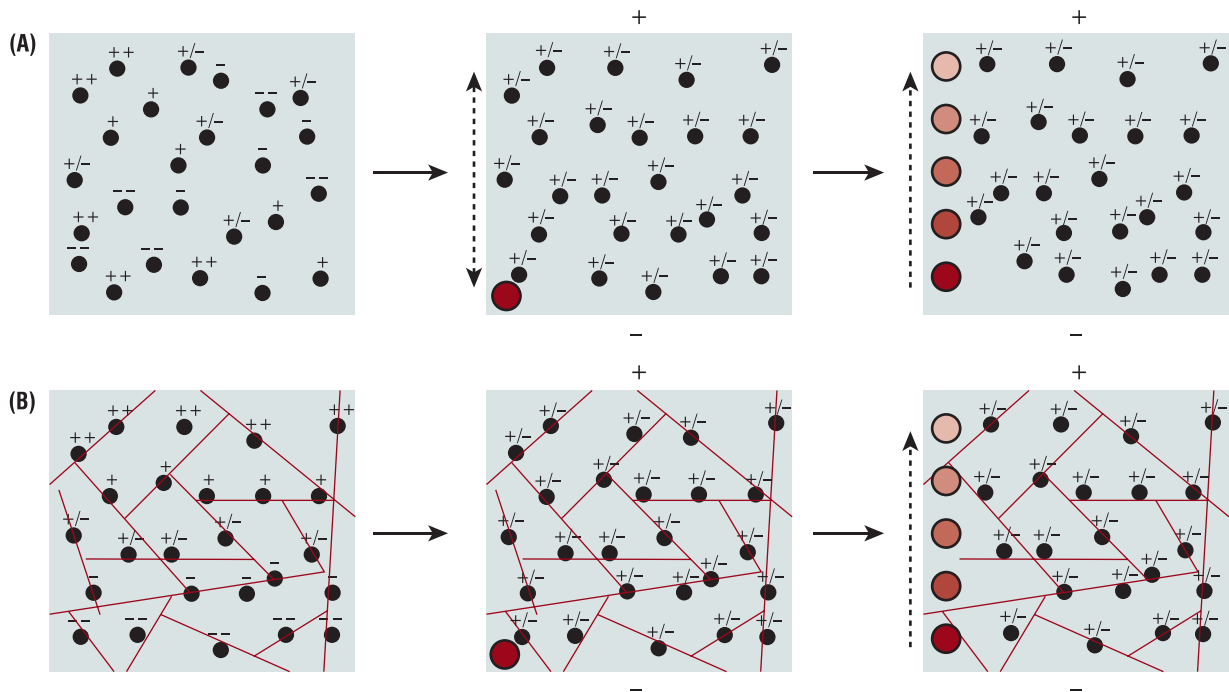
από αρκετό χρόνο θα φτάσουν τις μικρές πρωτεΐνες ίσου φορτίου. Οι κύκλοι αναπαριστούν τις πρωτεΐνες, με τη σκίαση να συμβολίζει τις τιμές pI και τη διάμετρο να αντικατοπτρίζει τη μοριακή μάζα.

αυτό είναι μηδέν και δεν μπορεί πλέον να κινηθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο. Η διάχυση λειτουργεί ενάντια σε αυτή την τάση εστίασης σε μία συγκεκριμένη θέση στο πήκτωμα, αλλά όταν η πρωτεΐνη διαχέεται μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο επαναφορτίζεται κι επομένως κινείται ξανά πίσω προς το σημείο εστίασης. Πρωτεΐνες με διαφορετικές τιμές pI, όπως προσδιορίζεται από τον αριθμό και τον είδος των όξινων και βασικών αμινοξικών καταλοίπων που περιέχουν, εστιάζουν ως εκ τούτου σε διαφορετικές θέσεις μέσα στην βαθμίδωση pH. Παρόλο που μπορεί παράλληλα να λειτουργεί και το φαινόμενο μοριακού φίλτρου (*seiving*) που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει του μεγέθους τους, αν αφήσουμε το πήκτωμα να τρέξει τον αναγκαίο μακρύ χρόνο, εξασφαλίζει τελικά ότι όλες οι πρωτεΐνες θα μπορέσουν να φτάσουν τα ισοηλεκτρικά σημεία τους και να επιτύχουν διαχωρισμό ανεξάρτητο από το μέγεθος.

Η κλίση pH σε ένα πήκτωμα IEF μπορεί να εξασφαλισθεί με δύο τρόπους. Η αρχική μέθοδος ήταν να χρησιμοποιηθούν **συνθετικοί αμφολύτες** (*synthetic carrier ampholytes*), οι οποίοι είναι μια ομάδα από μικρά αμφοτερικά μόρια με τιμές pI που αντιστοιχούν σε ένα δεδομένο εύρος pH (**Εικόνα 2.3A**). Αρχικά, δεν υπάρχει βαθμίδωση του pH στο πήκτωμα, επειδή όλοι οι αμφολύτες είναι ομοιόμορφα καταναμημένοι, το δε pH στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι ο μέσος όρος του pH των αμφολυτών. Όταν εφαρμοσθεί

ένα ηλεκτρικό πεδίο, ωστόσο, οι ίδιοι οι αμφολύτες υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση. Οι πιο όξινοι αμφολύτες κινούνται προς την άνοδο, και οι πιο βασικοί αμφολύτες κινούνται προς την κάθοδο και όλοι οι άλλοι αμφολύτες δημιουργούν ενδιάμεσες ζώνες σύμφωνα με τις τιμές του pI τους. Μόλις αυτή η διαδικασία ολοκληρωθεί, το σύστημα φτάνει σε μία ισορροπία η οποία χαρακτηρίζεται από μία ομαλή διαβάθμιση pH. Οι πρωτεΐνες οι οποίες μεταναστεύουν πολύ πιο αργά από τα μόρια των αμφολυτών, ξεκινούν τότε να κινούνται προς τα ισοηλεκτρικά τους σημεία στο πήκτωμα. Οι πρωτεΐνες μπορούν να προστεθούν στο πήκτωμα πριν εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο ή έπειτα από μία **περίοδο προ-εστίασης** (*pre-focusing*).

Υπάρχουν διάφορα προβλήματα στη χρήση των αμφολυτών που οδηγούν σε κακή επαναληψιμότητα στα 2DGE πειράματα. Ένας από τους πιο σοβαρούς περιοριστικούς παράγοντες είναι η **καθοδική τάση** (*cathodic drift*), όπου οι ίδιοι οι αμφολύτες μεταναστεύουν προς την κάθοδο χάρη σε ένα φαινόμενο το οποίο καλείται **ηλεκτροοσμωτική ροή** (*electroosmotic flow*). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αστάθεια της διαβάθμισης του pH καθώς οι βασικοί αμφολύτες σταδιακά χάνονται από το σύστημα. Με πρακτικούς όρους, είναι δύσκολο να διατηρήσουμε μία κλίση pH η οποία να εκτείνεται πέρα από το 7-8 σε παρατεταμένες διαδρομές πηκτωμάτων, έχοντας ως αποτέλεσμα την απώλεια πολλών βασικών πρωτεϊνών εκτός



### ΕΙΚΟΝΑ 2.3

**Διαφορετικοί τρόποι σχηματισμού μίας κλίσης pH για ισοηλεκτρική εστίαση. (Α)** Με αμφολύτες, τα μόρια του ρυθμιστικού διαλύματος είναι ελεύθερα να διαχυθούν και αρχικά διαχύνονται με ίσο τρόπο ώστε να μην υπάρχει κλίση pH. Όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμοσθεί, οι αμφολύτες δημιουργούν μία κλίση pH και γίνονται ουδέτερα φορτισμένα. Αυτό οδηγεί σε ένα διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με τις τιμές pI. **(Β)** Στην περίπτωση της ακινητοποιημένης κλίσης pH, τα μόρια του ρυθμιστικού διαλύματος είναι συνδεδεμένα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Τα μόρια του ρυθμιστικού διαλύματος δεν κινούνται όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, αλλά οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται. Τα βέλη με τελείες δείχνουν την κατεύθυνση διαχωρισμού. Η σκίαση στους κύκλους υποδηλώνει τιμές πρωτεΐνης pI.

εαν τόσο η μετακίνηση των μορίων όσο και ο χρονικός συγχρονισμός ελεγχθούν με μεγάλη προσοχή. Ένας τρόπος με τον οποίο το πρόβλημα της καθοδικής τάσης έχει αντιμετωπιστεί είναι μία διαδικασία γνωστή ως **ηλεκτροφόρηση μη ισορροπημένης κλίσης pH** (*non-equilibrium pH gradient electrophoresis, NEpHGE*). Με αυτή τη μέθοδο, το πρωτεϊνικό δείγμα εφαρμόζεται στο όξινο άκρο του πηκτώματος (αντί για το βασικό άκρο, που είναι γενικά η περίπτωση της συνηθισμένης ισοηλεκτρικής εστίασης) ώστε όλες οι πρωτεΐνες να είναι θετικά φορτισμένες όταν αρχίζει να τρέχει το πήκτωμα. Όταν ολοκληρωθεί το τρέξιμο, οι βασικοί αμφολύτες και οι βασικές πρωτεΐνες θα συνεχίσουν να τρέχουν εκτός πηκτώματος, αλλά η βασική αρχή του NEpHGE είναι ότι το πήκτωμα δεν πρέπει να τρέξει αρκετά ώστε το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε μία γρήγορα σχηματιζόμενη διαβάθμιση pH που ποτέ δεν σταθεροποιείται. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι συνθήκες του διαχωρισμού είναι δύσκολο να επαναληφθούν.

Και τα δύο αυτά προβλήματα - η καθοδική τάση και τη κακή επαναληψιμότητα - έχουν αντιμετωπισθεί με την ανάπτυξη των **πηκτωμάτων ακινητοποιημένης κλίσης pH** (*immobilized pH gradient, IPG*), στα οποία οι ρυθμιστικές ομάδες συνδέονται με το δίκτυο της πολυακρυλαμίδης του πηκτώματος (**Εικόνα 2.3B**). Αυτή είναι σήμερα η συνηθισμένη προσέγγιση στην πρωτεωμική, όπου η επαναληψιμότητα είναι κομβικής σημασίας. Το IPG σχηματίζεται χρησιμοποιώντας μία ομάδα από μη αμφοτερικά μόρια που ονομάζονται **ακινητοποιητές** (*Immobilines*) τα οποία περιέχουν μία ασθενή όξινη ή βασική ρυθμιστική ομάδα στο ένα άκρο κι ένα ακρυλικό διπλό δεσμό στο άλλο άκρο για να διευκολύνει την αντίδραση ακινητοποίησης στο πήκτωμα. Το πήκτωμα τρέχει με το συνηθισμένο τρόπο, αλλά η κλίση του pH υπάρχει πριν την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, και παραμένει σταθερή ακόμη κι αν τρέξουμε το πήκτωμα για πολλή ώρα. Όταν φορτωθεί το δείγμα, οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν στα ισοηλεκτρικά τους σημεία όπως στη συνηθισμένη ισοηλεκτρική εστίαση. Μεταφορείς αμφολύτες μπορούν επίσης να προστε-

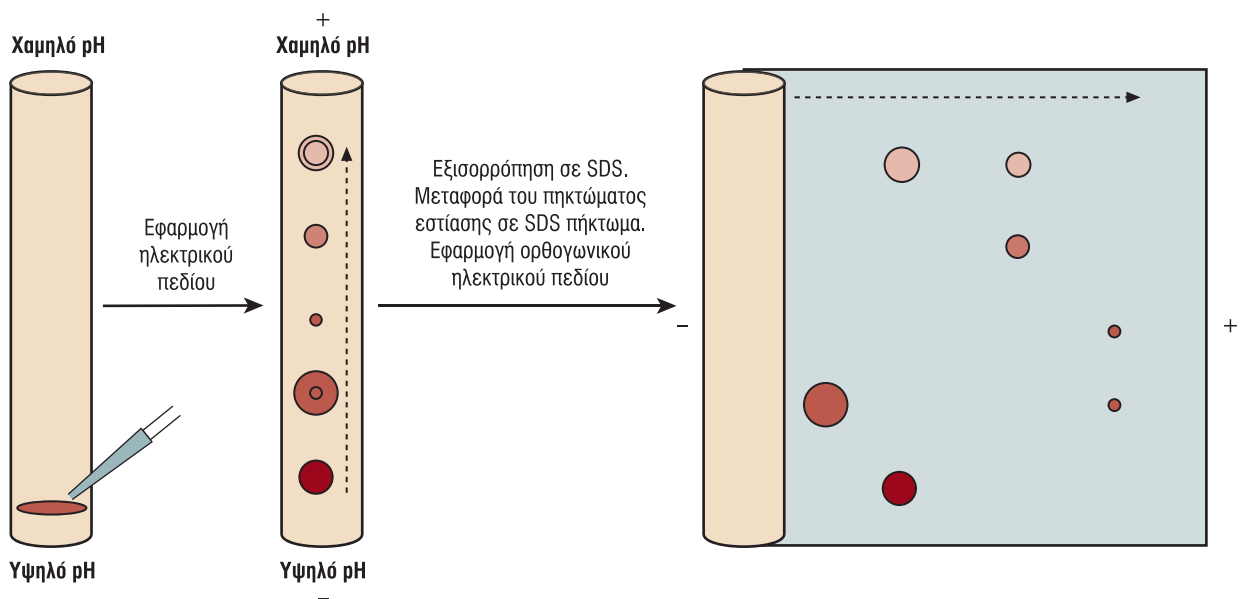
θούν στο ρυθμιστικό διάλυμα IPG του πηκτώματος καθώς θεωρείται ότι αυξάνουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών και προλαμβάνουν τις μη παραγωγικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες και των αντιδραστηρίων των ακινητοποιητών που μπορούν να οδηγήσουν σε καταβύθιση των πρωτεϊνών και λάθος αποτελέσματα, ειδικά στη βασική περιοχή του πηκτώματος.

### Η SDS-PAGE διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση τη μάζα ανεξάρτητα από το φορτίο

Ο διαχωρισμός στη δεύτερη διάσταση σε 2DGE γενικώς πραγματοποιείται με την γνωστή διαδικασία **SDS-PAGE** (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση τη μοριακή τους μάζα ανεξάρτητα από το φορτίο (**Εικόνα 2.4**). Η βάση της τεχνικής είναι η έκθεση των πρωτεϊνών στο ανιοντικό απορρυπαντικό **δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο** (*sodium dodecylsulfate, SDS*), το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και συνδέεται στοιχειομετρικά στην πολυπεπτιδική αλυσίδα (1.4 g SDS ανά g πολυπεπτιδίου), προσδίδοντας έτσι ένα ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο. Η παρουσία δεκάδων ή εκατοντάδων μορίων SDS σε κάθε πολυπεπτιδίο επισκιάζει οποιοδήποτε εγγενές φορτίο που φέρουν οι ίδιες οι πρωτεΐνες, και η στοιχειομετρική σύνδεση, υποδηλώνουν ότι μεγαλύτερες πρωτεΐνες προσδένουν

περισσότερο SDS από τις μικρότερες πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό έχει δύο σημαντικά αποτελέσματα που εξασφαλίζουν το διαχωρισμό με βάση αποκλειστικά τη μάζα. Αρχικά, όλα τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS έχουν βασικά την ίδια πυκνότητα φορτίου, και δεύτερον, οι σχετικές διαφορές στη μάζα μεταξύ πρωτεϊνών διατηρούνται στα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS.

Το πήκτωμα ενισχύει την εξαρτώμενη από το μέγεθος διαχωρισμό με μοριακό φιλτράρισμα-διήθηση των πρωτεϊνών καθώς μεταναστεύουν. Το αποτέλεσμα της διήθησης εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, το οποίο με τη σειρά του εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πηκτώματος (ολική συγκέντρωση μονομερούς ως ποσοστό του όγκου του πηκτώματος πριν τοποθετηθεί στη συσκευή, αναφερόμενο ως %T). Στην περίπτωση των πηκτωμάτων ακρυλαμίδης, το μονομερές φτιάχνεται από τον παράγοντα πήξης ακρυλαμίδη και τον παράγοντα διασύνδεσης δικακρυλαμίδη. Το μέγεθος των πόρων επίσης εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από το ποσοστό του μονομερούς, κατά μάζα, που αντιπροσωπεύεται από την δικακρυλαμίδη (αναφερόμενο ως %C). Γενικά, καθώς το %T αυξάνεται, το μέγεθος των πόρων μειώνεται διότι στο πήκτωμα περιέχεται περισσότερος παράγοντας πήξης ανά μονάδα όγκου. Στα κανονικά πηκτώματα (όπου %T ≤ 15%), το ελάχιστο μέγεθος των πόρων επιτυγχάνεται όταν



#### ΕΙΚΟΝΑ 2.4

**Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων χρησιμοποιώντας πήκτωμα σε σωλήνα για ισοηλεκτρική εστίαση και επίπεδο πήκτωμα για SDS-PAGE.** Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στην πρώτη διάσταση με βάση το φορτίο και σε δεύτερη διάσταση με βάση τη μοριακή τους μάζα. Οι διάφοροι κύκλοι αναπαριστούν τις πρωτεΐνες και η σκίαση υποδηλώνει τις τιμές pI και οι διάμετροι αναπαριστούν τη μοριακή μάζα. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει την κατεύθυνση του διαχωρισμού.

%C είναι περίπου 5%. Κάτω από αυτή την τιμή υπάρχουν λιγότερες διασυνδέσεις και το ελάχιστο μέγεθος των πόρων γίνεται μεγαλύτερο. Πάνω από αυτή την τιμή, τα μόρια της ακρυλαμίδης υπερ-διασυνδέονται και σχηματίζουν πυκνές δέσμες διάσπαρτες με μεγάλες κοιλότητες και το ελάχιστο μέγεθος πόρων γίνεται ξανά μεγαλύτερο. Επομένως, κρατώντας το ποσοστό της δι-ακρυλαμίδης στο 5%, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος μπορεί εύκολα να ελεγχθεί μεταβάλλοντας την ολική συγκέντρωση του μονομερούς. Η βέλτιστη τιμή για τον %C που είναι η τιμή που απαιτείται για να επιτευχθεί το ελάχιστο μέγεθος πόρων - αυξάνεται πάνω από 5% όταν  $\%T > 15\%$ . Τα πηκτώματα μπορούν να κατασκευαστούν με τιμές %T που να κυμαίνονται από 1% έως περισσότερο από 30%. Πήκτωμα με συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 3% απαιτούνται για τη διήθηση πολύ μεγάλων πρωτεϊνών ( $M_r \geq 10^6$ ,  $M_r$ , σχετική μοριακή μάζα) αλλά είναι εύθραυστα, και γενικά σταθεροποιούνται από την ενσωμάτωση αγαρόζης (που δεν είναι ηθμός για τις πρωτεΐνες αλλά προσφέρει στήριξη στο πλέγμα). Πηκτώματα με συγκεντρώσεις πάνω από 30% μπορούν να διηθήσουν πολύ μικρές πρωτεΐνες ( $M_r = 10^3$ ). Η μάζα των πρωτεϊνών στο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί περιλαμβάνοντας σε μία από τις διαδρομές του πηκτώματος, μίγμα από πρωτεϊνικούς δείκτες των οποίων οι μάζες είναι γνωστές.

## 2.4 Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ 2DGE ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

**Τα τέσσερα βασικά πλεονεκτήματα της 2DGE είναι η ανθεκτικότητα, η επαναληψιμότητα, η οπτικοποίηση, και η συμβατότητα με μεταγενέστερη μικροανάλυση**

Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος δύο διαστάσεων είναι η παλαιότερη από τις μεθόδους διαχωρισμού πρωτεωμικής, που σημαίνει ότι έχει διερευνηθεί εκτενώς σε πολλά εργαστήρια, δίνοντας μία μοναδική δυνατότητα ανάλυσης των δυνατών και αδύνατων σημείων της. Η επίδραση διαφορετικών παραμέτρων στην πειραματική μεταβλητότητα, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια, και καθιερωμένες λειτουργικές διαδικασίες μπορούν να περιορίσουν τις περισσότερες λειτουργικές διαφορές, αφήνοντας την προετοιμασία του δείγματος και την ανάλυση της εικόνας ως τις μεγαλύτερες πηγές σφάλματος, εν αντιθέσει με την διαδικασία διαχωρισμού. Ενώ οι διαχωρισμοί με βάση τη χρωματογραφία που αναλύονται αργότερα στο Κεφάλαιο, γίνονται

συνήθως αποδεκτοί δίχως την ανάγκη επανάληψης, η μικρή επαναληψιμότητα των πρώτων πειραμάτων 2DGE προέτρεπαν τους ερευνητές να τρέξουν παράλληλα πηκτώματα, που περιελάμβαναν τέσσερα ή περισσότερα βιολογικά αντίγραφα ανά πείραμα για να ελέγξουν τις πηγές μεταβλητότητας, κι αυτό έχει υιοθετηθεί από πολλά περιοδικά ως προϋπόθεση για δημοσίευση. Παραδόξως, τα 2DGE πειράματα έχουν συνεπώς υψηλή επαναληψιμότητα παρόλη της φήμης τους ότι είναι δύσκολο να επαναληφθούν.

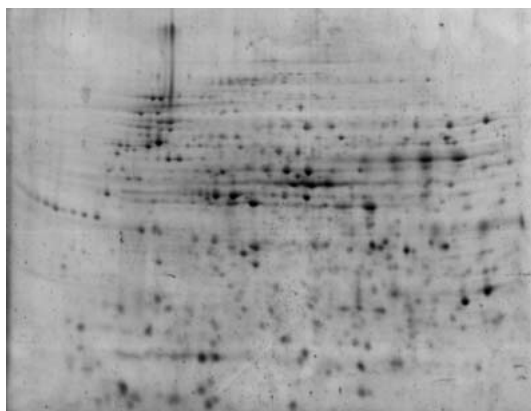
Η απεικονιστική πλευρά του 2DGE και η συμβατότητα με τις τεχνικές μικροανάλυσης όπως η ανοσοσύτωση (*Western blot*) που ακολουθούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα, είναι επίσης σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς μπορούν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών όταν άλλες τεχνικές αποτυγχάνουν. Αυτό αφορά ιδιαίτερα την περίπτωση πρωτεϊνών που φέρουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, που συχνά μεταβάλλουν το pI μιας πρωτεΐνης και παράγουν γραμμικά ίχνη (γραμμές) σε πήκτωμα δύο διαστάσεων υποδηλώνοντας ότι οι διαφορετικές κουκίδες ανήκουν σε ένα κοινό αρχικό μόριο. Όπως συζητήτε στο **Κεφάλαιο 8**, η χρήση ειδικών αντισωμάτων για τροποποιήσεις μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση των τροποποιημένων παραλλαγών μια πρωτεΐνης, ειδικά όταν τα δείγματα διαφέρουν ως προς την έκταση της τροποποίησης, σε σχέση με τη συνολική ποσότητα μιας πρωτεΐνης. Η ταυτοποίηση των αποικοδομημένων πρωτεϊνών είναι ακόμη ένα θέμα στο οποίο η απεικονιστική δυνατότητα του 2DGE είναι χρησιμότερη από την αντικειμενική δειγματοληψία που επιτυγχάνεται από τις μεθόδους που βασίζονται σε χρωματογραφία.

**Οι τέσσερις σημαντικότεροι περιορισμοί του 2DGE είναι η διακριτική ικανότητα, η ευαισθησία, η αντιπροσώπευση και η συμβατότητα με αυτοματοποιημένη πρωτεϊνική ανάλυση**

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών με μεθόδους πολυδιάστατης ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται από το 1950, αλλά οι βασικές αρχές της μεθόδου 2DGE που χρησιμοποιούνται τώρα στην πρωτεωμική είναι πιο πρόσφατες. Τα πειραματικά πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν διαδοχική ισοηλεκτρική εστίαση και SDS-PAGE αναπτύχθηκαν τα μέσα της δεκαετίας του 1970, αλλά η πρώτη πρωτεωμική ανάλυση που χρησιμοποιεί την σημερινή καθιερωμένη προσέγγιση της εφαρμογής του δείγματος στο ένα άκρο ενός λεπτού IEF πηκτώματος πριν μεταφέρουμε τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες σε ένα επίπεδο πήκτωμα για τον δεύτερο διαχωρισμό δημο-

σιεύτηκε σε ένα άρθρο ορόσημο το 1975 από τον Πάτρικ Ό Φάρρελλ (βλέπε Περαιτέρω Βιβλιογραφία). Σε αυτή τη μελέτη, οι πρωτεΐνες από το βακτήριο *Escherichia coli* διαχωρίστηκαν με ισοηλεκτρική εστίαση σε ένα πήκτωμα το οποίο είχε πολυμεριστεί σε λεπτό σωλήνα. Όταν το τρέξιμο της IEF ολοκληρώθηκε, έσπασαν τον σωλήνα για να πάρουν το πήκτωμα άθικτο και οι πρωτεΐνες που είχαν εστιαστεί στο πήκτωμα κατεργάστηκαν περαιτέρω εμποτίζοντας το πήκτωμα σε διάλυμα SDS, για να προσλάβουν τα πρωτεϊνικά μόρια το απορρυπαντικό. Το πήκτωμα του σωλήνα της πρώτης διάστασης τοποθετήθηκε στην κορυφή ενός επιπέδου πηκτώματος SDS-PAGE, δηλαδή ενός επιπέδου πηκτώματος ανάμεσα σε δύο υάλινες πλάκες - και οι εστιασμένες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν στην ορθογώνια διάσταση με κριτήριο το μέγεθος. Έπειτα από μη ειδική χρώση, το αποτέλεσμα ήταν ένα δισδιάστατο πρωτεϊνικό προφίλ στο οποίο σχεδόν 1.000 ανεξάρτητα πρωτεϊνικά μόρια διασκορπίστηκαν στο πήκτωμα σαν κηλίδες, οι οποίες αναπαριστούν σχεδόν το 20% του πρωτεώματος της *E. coli* (**Εικόνα 2.5**).

Η βασική διαδικασία για το 2DGE έχει αλλάξει λίγο από τότε, παρόλο που τα σχετικά δυσκίνητα σωληνοειδή πηκτώματα (τα οποία ήταν εύθραυστα και υπόκειντο σε μη γραμμική παραμόρφωση) έχουν αντικατασταθεί ευρέως από **ταινίες πηκτωμάτων (IPG strip gels)**, τα οποία είναι ευκολότερα να τα χειριστεί κανείς και δίνουν πιο επαναλήψιμους διαχωρισμούς. Παρόλα αυτά, η πρωτεωμική εκμεταλλεύεται τις δυνατότητες του 2DGE στο έπακρο καθώς ένας αριθμός λειτουργικών προβλημάτων έχουν εντοπιστεί όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, την ευαισθησία, την αντιπροσω-



**ΕΙΚΟΝΑ 2.5**

**Διαχωρισμός 240 μg πρωτεϊνών *E. coli* με 2DGE, εύρος pH 4-7 και εύρος μάζας 10-120 kDa.** Το πήκτωμα εμφανίστηκε με χρώση ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) και σαρώθηκε με μπλε SHGlaser στο σαρωτή FujiFLA-3000. (Χορηγία του Michael Lieber, raytest GmbH, βλέπε <http://www.raytest.com>).

πυση και τη συμβατότητα με την επακόλουθη συνδυασμένη χρήση της φασματομετρίας μάζας. Αυτοί οι περιορισμοί συζητούνται με περισσότερη λεπτομέρεια παρακάτω μαζί με στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστούν.

### **Η διακριτική ικανότητα του 2DGE μπορεί να βελτιωθεί σε μεγάλα πηκτώματα, μεγενθυμένα πηκτώματα, και τροποποιημένη βαθμίδωση pH, ή με προκλασματοποίηση του δείγματος**

Τα συνηθισμένα σύγχρονα συστήματα 2DGE, τα οποία βασίζονται σε μία ισοηλεκτρική εστίαση πρώτης διάστασης χρησιμοποιώντας ταινίες IPG και μετέπειτα από τη δεύτερη διάσταση SDS-PAGE, είναι ικανά να αναλύσουν 2.500 πρωτεϊνικές κηλίδες σε επίπεδο ρουτίνας. Παρόλα αυτά, το πρωτέωμα ενός σύνθετου ευκαρυωτικού κυττάρου μπορεί να είναι περισσότερο από μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερο από αυτό. Ακόμη και σε ένα απλό ευκαρυωτικό σύστημα, όπως οι ζύμες, όπου το εναλλακτικό μάτισμα και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών είναι μάλλον εξαιρεση παρά κανόνας, οι ανεξάρτητες πρωτεϊνικές κηλίδες στα συνηθισμένα πηκτώματα δύο διαστάσεων μπορεί να περιλαμβάνουν έναν αριθμό διαφορετικών συν-μεταναστευμένων πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να κάνουν συγκεκριμένους τύπους ακολουθούμενης ανάλυσης πιο πολύπλοκη λόγω της παρουσίας των πολλαπλών πρωτεϊνών στην ίδια κηλίδα. Έχει γίνει δεκτό ότι η 2DGE έχει καλύτερα αποτελέσματα με τα συστήματα χαμηλής πολυπλοκότητας, παρόλο που διάφορες καινοτομίες έχουν εμφανιστεί για να απλοποιήσουν την ανάλυση των σύνθετων πρωτεωμάτων.

Η διακριτική ικανότητα της 2DGE εξαρτάται από το μήκος του διαχωρισμού και στις δύο διαστάσεις, και μπορεί έτσι να αυξηθεί αν χρησιμοποιηθούν πηκτώματα μεγάλου μεγέθους. Για παράδειγμα, τα πηκτώματα IEF σε σωλήνες και ταινίες IPG μήκους >30 cm έχουν χρησιμοποιηθεί για να πετύχουν το μέγιστο διαχωρισμό στην πρώτη διάσταση σε συνδυασμό με πολύ μεγάλα επίπεδα SDS πηκτώματα με απόσταση διαχωρισμού >30 cm. Παρά το γεγονός ότι τέτοιους είδους πηκτώματα είναι πολύ δύσκολο να τα διαχειριστεί κανείς, μπορούν να αναλύσουν έως και 10.000 πρωτεϊνικές κηλίδες. Άλλος ένας τρόπος για να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα των 2DGE είναι να χρησιμοποιηθούν πολλαπλά πηκτώματα IEF, με στενή διαβάθμιση pH. Αυτά είναι γνωστά ως **μεγεθυντικά πηκτώματα (zoom gels)**. Ακολουθώντας την δεύτερη διάσταση SDS-PAGE και την ανάλυση εικόνας, τα προφίλ των αλληπάλληλων μεγεθυντικών πη-

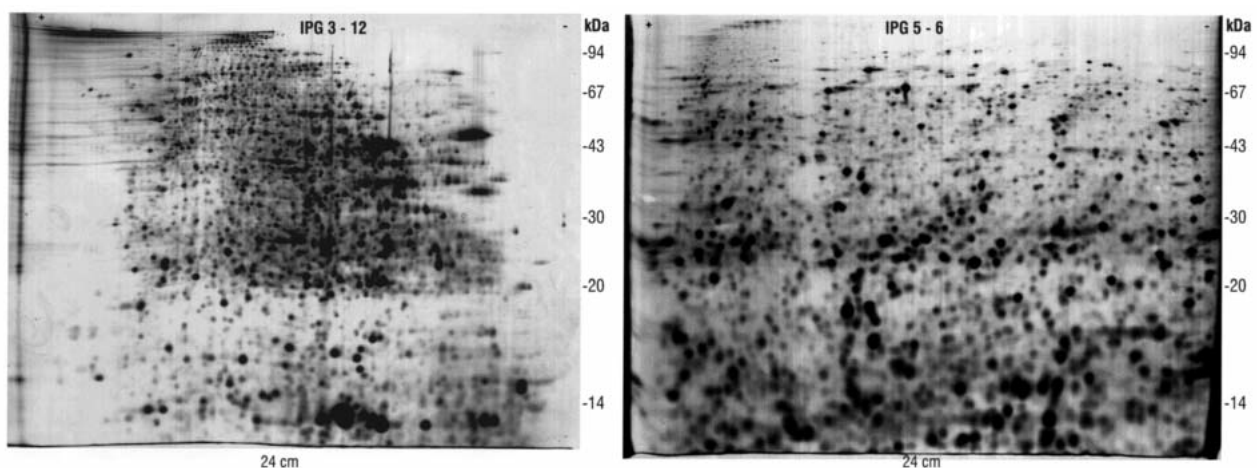
κτωμάτων μπορούν να συνενωθούν από έναν υπολογιστή και να παράγουν τη σύνθεση ολόκληρου του πρωτεώματος (**Εικόνα 2.6**). Σε ένα πείραμα επίδειξης, η χρήση έξι μεγεθυντικών πηκτωμάτων επέτρεψε το διαχωρισμό περισσότερων από 3.000 πρωτεϊνών της *E. coli* που αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% του πρωτεώματος. Ο συνδυασμός των μεγάλων διαστάσεων διαχωρισμού και των στενών διαβαθμίσεων pH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μεγιστοποιήσει τη διακριτικότητα τέτοιων πηκτωμάτων. Εναλλακτικά, για να αυξηθεί ο διαχωρισμός και η ανάλυση των πρωτεϊνών μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος pH, μπορούν να παραχθούν πηκτώματα με **μη γραμμική κλίση pH**. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί απλά αυξάνοντας την απόσταση μεταξύ των κατάλληλων αντιδραστηρίων ακινητοποίησης, που χρησιμοποιείται συχνά για να «επιπεδοποιήσουν» τη διαβάθμιση του pH μεταξύ pH 4 και 7, που αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των πρωτεϊνών στο πρωτέωμα (**Εικόνα 2.7**).

Τελικά, η διακριτική ικανότητα μπορεί να αυξηθεί από διάφορες μορφές προ-κλασμάτωσης πριν την ηλεκτροφόρηση, για να απλοποιήσουν το πρωτεϊνικό μίγμα που θα αναλυθεί. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, για παράδειγμα, εστιάζοντας σε ένα συγκεκριμένο υπο-πρωτέωμα (για παράδειγμα, απομονώνοντας συγκεκριμένα οργανίδια), ή με εκχύλιση με διαλύτη, φυγοκέντρηση σε διαφορικής πυκνότητας διαλύματος σουκρόζης, ή τον βασισμένο σε συγγένεια εμπλουτισμό ή την απομάκρυνση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Η προ-κλασμάτωση είναι απαραίτητη για την επιτυχημένη χρήση

μεγεθυντικών πηκτωμάτων γιατί οι πρωτεΐνες που αντιστοιχούν στις τιμές pI έξω από το καθορισμένο εύρος pH τείνουν να καθιζάνουν σε συμπυκνωμένες ζώνες στα ηλεκτρόδια καταστρέφοντας την εστίαση των υπολοίπων πρωτεϊνών λόγω οσμωτικών φαινομένων.

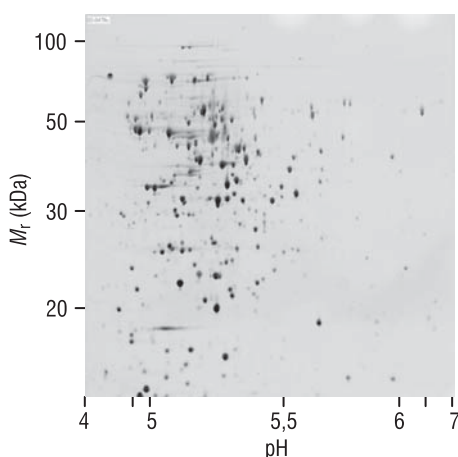
### Η ευαισθησία του 2DGE εξαρτάται από την απεικόνιση των μη άφθονων πρωτεϊνικών κηλίδων, που μπορούν να καλυφθούν από τις μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες σε ένα κύτταρο διαφέρουν ως προς την αφθονία τους πάνω από τέσσερις με έξι τάξεις μεγέθους, με το μεγαλύτερο μέρος από το σύνολο του πρωτεϊνικού περιεχομένου να αντιπροσωπεύεται από ένα σχετικά μικρό αριθμό άφθονων ή υπεράφθονων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, είναι πιθανό να ανιχνευθούν περίπου 4.000 από τα 5.000 επιβεβαιωμένα γονιδιακά προϊόντα στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, αλλά 50% του πρωτεώματος αντιπροσωπεύει την παραγωγή μόλις 130 γονιδίων, και το 75% του πρωτεώματος αντιπροσωπεύει την παραγωγή 400 γονιδίων με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Παραδόξως, οι μικρότερης αφθονίας πρωτεΐνες (κι επομένως πιο δύσκολο να εντοπιστούν) είναι συχνά αυτές με τις πιο ενδιαφέρουσες λειτουργίες, για παράδειγμα μεταγραφικοί παράγοντες, πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Στα υγρά του ανθρώπινου σώματος, το δυναμικό εύρος των τιμών συγκέντρωσης πρωτεϊνών μπορεί να είναι ακόμη



#### ΕΙΚΟΝΑ 2.6

Και οι δύο εικόνες αναπαριστούν πρωτεΐνες από ήπαρ ποντικού που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος δύο διαστάσεων και η χρώση αργύρου αναδεικνύει τις ανεξάρτητες πρωτεϊνικές κηλίδες. Η αριστερή εικόνα είναι ένα πήκτωμα μεγάλου εύρους pH (pH 3-12) ενώ η δεξιά εικόνα είναι ένα πήκτωμα χαμηλού εύρους pH που εστιάζει πρωτεΐνες στο εύρος pH 5-6. Να σημειώσουμε ότι σε ένα πήκτωμα με μεγαλύτερο εύρος pH, οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι συγκεντρωμένες στο μέσο αντανάκλωντας το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν τιμές pI με εύρος 4-7. (Χορηγία του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής, Γενεύη, Ελβετία).

**ΕΙΚΟΝΑ 2.7**

**Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε υψηλή ανάλυση μπορεί να επιτευχθεί με την ομαλοποίηση της κλίσης pH μεταξύ 4-7 που αντιστοιχεί στην πλειοψηφία των πρωτεϊνών.** (Χορηγία του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής, Γενεύη, Ελβετία).

πιο υψηλό (εννέα τάξεις μεγέθους) και ένα ακραίο παράδειγμα είναι ο ανθρώπινος ορός, όπου οι δώδεκα πιο άφθονες πρωτεΐνες συνιστούν το 95% του πρωτεώματος.

Τα προβλήματα ευαισθησίας που επηρεάζουν την 2DGE ανήκουν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη είναι η δυσκολία του απεικονιστικού εντοπισμού των σπανιότερων πρωτεϊνών. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης πρωτεϊνών που στηρίζονται στη φασματομετρία μάζας είναι αρκετά ευαίσθητες για να έχουν αποτέλεσμα με μερικά *picomole* πρωτεΐνης, αλλά αυτό προϋποθέτει ότι οι αντίστοιχες κηλίδες της πρωτεΐνης έχουν απομονωθεί και έχουν αναλυθεί. Παρόλα αυτά η 2DGE είναι μοναδική ανάμεσα στις μεθόδους πρωτεωμικής στο γεγονός ότι τα στοιχεία που υποβάλλονται σε ανάλυση με φασματομετρία μάζας έχουν συλλεχθεί οπτικά, και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών κηλίδων εξαρτάται από τη ευαισθησία της χρώσης, που περιορίζεται στην περιοχή των νανογραμμαρίων (**Κεφάλαιο 4**). Εάν ολόκληρο το πήκτωμα χωριζόταν με ένα πλέγμα και κάθε τμήμα υποβαλλόταν σε αντικειμενική MS ανάλυση, ίσως θα ήταν εφικτό να ανιχνευθούν κάποιες από τις ελάχιστα εμφανιζόμενες πρωτεΐνες, αλλά τα τυπικά πειράματα περιλαμβάνουν την επιλογή των κηλίδων «ενδιαφέροντος», που είναι συνήθως αυτές που δείχνουν κάποια μορφή διαφορικής έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων. Δεν υπάρχει μέθοδος χρώσης πηκτώματος που να μπορεί να καλύψει επαρκώς ολόκληρο το εύρος του πρωτεϊνικού περιεχομένου ακόμη και στο πιο απλό προκαρυωτικό κύτταρο.

Το δεύτερο πρόβλημα προκαλείται από την επι-

κράτηση των υψηλής συγκέντρωσης (άφθονων) πρωτεϊνών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πιο άφθονες πρωτεΐνες ενός κυττάρου τείνουν να αποτελούν τη μεγάλη πλειοψηφία του πρωτεώματος, κι αυτές στη συνέχεια τείνουν να παράγουν τεράστιες κηλίδες που καλύπτουν τις μικρότερες και ασθενέστερες. Κατ' αρχήν, η ανίχνευση των σπάνιων πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί αναλύοντας μεγαλύτερες ποσότητες από τις ολικές πρωτεΐνες σε ένα πήκτωμα, αλλά στην πράξη, αυτό προκαλεί τη δημιουργία μεγαλύτερων κουκίδων που εκπροσωπούν τις άφθονες πρωτεΐνες, οι οποίες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής του πηκτώματος. Κάποια προβλήματα ευαισθησίας μπορούν επομένως να προσεγγιστούν αυξάνοντας τη διακριτικότητα των πηκτωμάτων δύο διαστάσεων (βλέπε παραπάνω) αφού αυτό διευκολύνει τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με παρόμοιες ηλεκτροφορητικές ιδιότητες. Αυτή η χρήση πηκτωμάτων στενού εύρους IPG σε συνδυασμό με προ-κλασμάτωση, ή απομάκρυνση μέσω συγγένειας των πολύ άφθονων πρωτεϊνών, μπορεί επίσης να λύσει τα προβλήματα που προκαλούνται με την επικάλυψη, ιδιαίτερα επειδή περισσότερη ποσότητα δείγματος μπορεί να φορτωθεί για ανάλυση, αλλά αυτό εναπόκειται στην ανάπτυξη των εξατομικευμένων μεθόδων προετοιμασίας κάθε δείγματος για συγκεκριμένες άφθονες πρωτεΐνες. Περισσότερη πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί σε επίπεδο γενικών μεθόδων προετοιμασίας του δείγματος μειώνοντας την εξάρτηση της οπτικής επιλογής με βάση τις κηλίδες πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας εναλλακτικά πρωτόκολλα ηλεκτροφόρησης (**Πλαίσιο 2.3**).

### **Η ταυτοποίηση των υδρόφοβων πρωτεϊνών είναι ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα που αφορά τα διαλύματα που απαιτούνται για την ισοηλεκτρική εστίαση**

Οι πρωτεΐνες ποικίλουν όσον αφορά τις χημικές και φυσικές τους ιδιοτήτων, οπότε είναι αδύνατο να σχεδιαστεί μία μέθοδος που να οδηγεί στην αντικειμενική ταυτοποίηση όλων των πρωτεϊνών σε πηκτώματα ακρυλαμίδης. Ο πιο σημαντικός καθοριστικός παράγοντας είναι το βήμα της διαλυτοποίησης στην IEF, και για τις γενικές εφαρμογές η διαδικασία δεν έχει αλλάξει πολύ από τότε που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1975. Το συνηθισμένο ρυθμιστικό διάλυμα διαλυτοποίησης – λύσης του δείγματος, περιλαμβάνει ένα χαστροπικό παράγοντα για να σπάσει τους υδρόφοβους δεσμούς (ουρία ή ο συνδυασμός ουρίας και θειουρίας), ένα μη ιοντικό απορρυπαντικό όπως το NP-40 (οπωσδήποτε όχι SDS διότι είναι υψηλά φορτισμένο), έναν αναγωγικό παράγοντα (συνήθως δι-

## ΠΛΑΙΣΙΟ 2.3 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### Εναλλακτικές προσεγγίσεις στην 2DGE

#### IEF-MS

Σε αυτή την προσέγγιση, το βήμα διαχωρισμού με SDS-PAGE αντικαθίσταται από το MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*) φασματομετρία μάζας. Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται πρωταρχικώς για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών, όπως θα συζητηθεί με λεπτομέρεια στο **Κεφάλαιο 3**. Σε αυτή τη παραλλαγμένη εφαρμογή, παρόλα αυτά, η τεχνική χρησιμοποιείται απλά για να μας δώσει μια λίστα με τις μάζες των διαφορετικών πρωτεϊνών που βρίσκονται σε κάθε περιοχή του πηκτώματος IEF, προσφέροντας ένα εικονικό διαχωρισμό δύο διαστάσεων. Η διαδικασία περιλαμβάνει ενσωμάτωση του πηκτώματος IEF σε μια μήτρα συστατικών (*matrix compound*) κατάλληλη για ανάλυση MALDI (**Κεφάλαιο 3**) και σάρωση του αφυδατωμένου πηκτώματος σε μικρά χρονικά διαστήματα για να ιονιστούν οι πρωτεΐνες και να καθοριστούν οι μάζες τους. Παρόλο που είναι γρήγορη και εύκολο να αυτοματοποιηθεί, οι πρωτεΐνες με >50 kDa τείνουν να μην ανιχνεύονται, διότι είναι πολύ δύσκολο να ιονιστούν. Επίσης δε φαίνεται να υπάρχει εύκολος τρόπος για να ολοκληρωθεί αυτή τη μορφή πρωτεϊνικού διαχωρισμού με τη συνηθισμένη μεταγενέστερη MS ανάλυση για ταυτοποίηση πρωτεϊνών.

#### SDS-PAGE-MS/MS

Αυτή η παραλλαγή της κλασσικής στρατηγικής πρωτεωμικής παραλείπει το βήμα της ισοηλεκτρικής εστίασης και αποτελεί μία λύση στην υποεκπροσώπηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών στο συμβατικό 2DGE (που προκαλείται γενικά από την ασυμβατότητα των ρυθμιστικών διαλυμάτων με την IEF). Σε μία δεύτερη εφαρμογή, το SDS-PAGE-MS/MS χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί μία λίστα πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο δείγμα, αλλά δεν είναι δυνατό να βγάλουμε οποιαδήποτε ποσοτικά δεδομένα από τέτοια πειράματα. Η διαθεσιμότητα πιο κατάλληλων LC-MS και CE-MS πλατφόρμων για «τυχαία» (*shot-gun*) πρωτεωμική (βλέπε **Κεφάλαιο 3**) σημαίνει ότι ο συνδυασμός SDS-PAGE-MS/MS χρησιμοποιείται τώρα πολύ σπάνια για αυτό το σκοπό. Πιο συχνά, η τεχνική χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύ απλών πρωτεϊνικών μιγμάτων, όπως καθαρισμένα σύμπλοκα πρωτεϊνών από χρωματογραφία συγγενείας για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών (βλέπε **Κεφάλαιο 7**). Όταν το πρωτεϊνικό μίγμα είναι απλό, μπορεί να θεωρηθεί ότι κάθε SDS-PAGE ζώνη περιλαμβάνει μόνο μία πρωτεΐνη, οπότε αυτό είναι γενικώς ισοδύναμο με την διακριτικότητα πιο σύνθετων μιγμάτων χρησιμοποιώντας ορθογωνικούς διαχωρισμούς. Το πιο άμεσο παράδειγμα είναι η επί-του-πηκτώματος **LC-MS (In-gel, GeLC-MS)** στην οποία τα δείγματα διαχωρίζονται με SDS-PAGE μίας διάστασης, η λωρίδα του πηκτώματος χωρίζεται σε λωρίδες, και κάθε λωρίδα ξεχωριστά ανάγεται, αλκυλιώνεται, και πέπτεται με θρυψίνη πριν από την ανάλυση LC-MS ή το LC-MS/MS για να καθοριστούν τα πεπτίδια που είναι παρόντα σε κάθε περιοχή του πηκτώματος.

#### Μη αποδιατακτική PAGE (native PAGE)

Η **μη αποδιατακτική PAGE (native PAGE)** περιλαμβάνει τις ίδιες αρχές όπως η συμβατική PAGE με εξαίρεση ότι οι πρωτεΐνες δε μετουσιώνονται κατά την εκχύλιση, διατηρώντας έτσι τις φυσικές τους δομές. Η μη αποδιατακτική PAGE είναι επομένως χρήσιμη για το διαχωρισμό άθικτων πολυμερικών πρωτεϊνών (για παράδειγμα αντισώματα, τα οποία έχουν τέσσερις διαφορετικές αλυσίδες ενωμένες με δι-σουλφιδικούς δεσμούς) και επίσης για πρωτεϊνικά σύμπλοκα, μια θεματική ενότητα που θα ερευνήσουμε πάλι στο **Κεφάλαιο 7**. Ενώ η μη αποδιατακτική PAGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση τη μάζα, μία ειδική παραλλαγή γνωστή ως **QPNC-PAGE (quantitative preparative native continuous polyacrylamide gel electrophoresis)** μπορεί να ταυτοποιήσει φυσικές πρωτεΐνες με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την απομόνωση μη αποδιατεταγμένων μεταλλοπρωτεϊνών.

θειοθρεϊτόλη ή β-μερκαπτοαιθανόλη, παρόλο που και αυτά είναι φορτισμένα μόρια και μετακινούνται έξω από το πηκτώμα κατά την IEF, οπότε μη φορ-

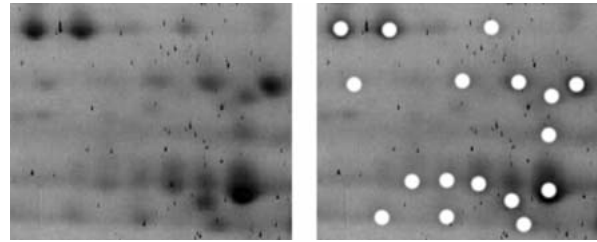
τισμένα εναλλακτικά μόρια όπως η τριβουτυλοφωσφίνη μπορεί να είναι πιο κατάλληλα), και αν είναι επιθυμητό, αμφολύτες για το επιθυμητό εύρος pH.

Αυτές οι προϋποθέσεις δεν είναι κατάλληλες για τη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, κι αυτός είναι ο λόγος που οι μεμβρανικές πρωτεΐνες υποεκπροσωπούνται στα συνηθισμένα πηκτώματα. Η ανάκτηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να αυξηθεί επιλέγοντας δυνατότερα απορρυπαντικά, όπως το CHAPS, και εμπλουτίζοντας επιλεκτικά το αρχικό δείγμα για μεμβρανικές πρωτεΐνες, για παράδειγμα, προετοιμάζοντας μεμβρανικά κλάσματα, αλλά αυτό δεν έχει οδηγήσει σε μια γενικά εφαρμόσιμη λύση. Οι μόνες μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς στις περιπτώσεις μειωμένης ταυτοποίησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι αυτές που παρακάμπτουν εντελώς το βήμα IEF, όπως η συνδυασμένη PAGE μίας διάστασης και η υγρή χρωματογραφία (GeLC-MS, βλέπε **Πλαίσιο 2.3**), ή διαχωριστικές μέθοδοι που βασίζονται αποκλειστικά στη χρωματογραφία (βλέπε παρακάτω).

Άλλες οικογένειες πρωτεϊνών που είναι παραδοσιακά πολύ δύσκολο να διαχωριστούν από τη συνηθισμένη 2DGE περιλαμβάνουν τις πολύ βασικές ιστόνες, άλλες πρωτεΐνες της χρωματίνης, και ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Για αυτές τις περιπτώσεις έχουν αναπτυχθεί ειδικές μέθοδοι διαχωρισμού. Για παράδειγμα, μία προσέγγιση 2DGE που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για το διαχωρισμό των ιστονών περιλαμβάνει ένα πρώτο διαχωρισμό που πραγματοποιείται από ένα πήκτωμα οξέος-ουρίας (το οποίο διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει του μεγέθους τους) και ένα διαχωρισμό δεύτερης διάστασης που πραγματοποιείται σε ένα πήκτωμα οξέος-ουρίας-Triton. Το Triton είναι ένα απορρυπαντικό που προσδένεται στις ιστόνες ανάλογα με την υδροφοβικότητά τους, έτσι οι πιο υδρόφοβες ιστόνες έχουν μειωμένη κινητικότητα. Ένα ιδιαίτερο πρόβλημα με τις πυρηνικές πρωτεΐνες είναι η τάση τους να συσσωματώνονται κάτω από τις συνηθισμένες συνθήκες ηλεκτροφόρησης, και για να αποτραπεί αυτό απαιτούνται τροποποιημένα ρυθμιστικά διαλύματα. Είναι ενδιαφέρον ότι η 2DGE έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ πιο ικανοποιητική μέθοδος για το διαχωρισμό πυρηνικών πρωτεϊνών από την υγρή χρωματογραφία, πιθανότατα επειδή οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιο διαλυτές και διαχωρίσιμες κάτω από τις συνηθισμένες συνθήκες IEF.

### Η ακολουθούμενη φασματομετρία μάζας απαιτεί ανάλυση και συλλογή των κηλίδων

Τα δεδομένα που παράγονται από τα πειράματα 2DGE είναι οπτικοποιημένα σε εικόνες, οπότε το επόμενο βήμα της ανάλυσης περιλαμβάνει τη χρήση αυτών των εικόνων από δισδιάστατο πήκτωμα που έχει υποστεί χρώση και στη συνέχεια την απο-



**ΕΙΚΟΝΑ 2.8**

Τμήμα πηκτώματος δύο-διαστάσεων εμφανισμένου με χρώση αργύρου πριν και μετά την επεξεργασία με ρομποτική εκτομή των πρωτεϊνικών κουκίδων χρησιμοποιώντας ένα πλαστικό δειγματολήπτη διαμέτρου 2 mm.

μόνωση συγκεκριμένων κηλίδων για περαιτέρω ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Αυτή η διαδικασία είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί και αποτέλεσε μία από τις πιο σημαντικές δυσκολίες στην πρωτεωμική που βασίζεται στη 2DGE κατά τη δεκαετία του 1990, όταν η χειροκίνητη ανάλυση και η συλλογή των κηλίδων από πηκτώματα ήταν συνηθισμένες πρακτικές. Παρόλα αυτά τώρα υπάρχουν διαθέσιμα διάφορα πακέτα λογισμικού που παράγουν υψηλής ποιότητας ψηφιακές εικόνες πηκτωμάτων και ενσωματώνουν μεθόδους για να εκτιμήσουν ποσοτικές διαφορές μεταξύ των κηλίδων διαφορετικών πηκτωμάτων (**Κεφάλαιο 4**). Αυτά μπορούν να ενσωματωθούν με **ρομποτική εκτομή των κηλίδων** (*spot excision robots*) που χρησιμοποιούν πλαστικά ή ασάλινα εργαλεία για να μεταφέρουν τα τεμάχια του πηκτώματος σε πλακίδια μικροτιλοδότσης για αυτόματη πέψη, καθαρισμό, συγκέντρωση και μεταφορά στο φασματογράφο μάζας. Μερικά εμπορικά διαθέσιμα συστήματα, μπορούν να αυτοματοποιήσουν πλήρως την ανάλυση και την επεξεργασία των πηκτωμάτων δύο διαστάσεων, και μπορούν να χειριστούν 200-300 πρωτεϊνικές κηλίδες την ώρα. Τμήματα ενός πηκτώματος μετά από χρώση με άργυρο πριν και μετά την επεξεργασία με FSI Flexys ρομποτ αυτόματης εκτομής κουκίδων παρουσιάζονται ως παράδειγμα, στην **Εικόνα 2.8**.

## 2.5 ΑΡΧΕΣ ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

### Διαχωρισμός πρωτεϊνών και πεπτιδίων με χρωματογραφία που βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια για σταθερές και κινητές φάσεις

Κάθε τεχνική διαχωρισμού που κατανέμει τα συστατικά ενός μίγματος ανάμεσα σε δύο φάσεις, μία **ακίνητη σταθερή φάση** (*stationary phase*) και

μία **ελεύθερα κινούμενη κινητή φάση** (*mobile phase*) είναι γνωστή ως **χρωματογραφία** (*chromatography*). Υπάρχουν πολλές μορφές χρωματογραφίας, συμπεριλαμβανόμενης της χρωματογραφίας χάρτου, της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, της υγρής χρωματογραφίας, και της αέριας χρωματογραφίας, αλλά όλες βασίζονται στην ίδια βασική αρχή. Ένα μίγμα μορίων διαλυτοποιείται σε ένα διαλύτη και τροφοδοτεί τη διαδικασία της χρωματογραφίας. Καθώς η κινητή φάση κινείται πάνω στη σταθερή φάση, τα συστατικά του μίγματος μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια τόσο της διαλυτής - κινητής όσο και της σταθερής φάσης. Τα διαφορετικά συστατικά στο μίγμα κινούνται με διαφορετικούς ρυθμούς λόγω της διαφορετικής τους συγγένειας για κάθε φάση. Τα μόρια με τη χαμηλότερη συγγένεια για τη σταθερή φάση θα κινηθούν γρηγορότερα γιατί τείνουν να μείνουν στο διαλύτη, ενώ τα μόρια με την υψηλότερη συγγένεια για τη σταθερή φάση κινούνται αργά γιατί τείνουν να είναι συνδεδεμένα με τη σταθερή φάση και καθυστερούν στην έκλουσή τους από την χρωματογραφική στήλη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μίγμα να διαμερίζεται σε μία σειρά από κλάσματα που μπορούν να εκκλύονται και να συλλέγονται ανεξάρτητα.

Στην πρωτεωμική η **υγρή χρωματογραφία** (*liquid chromatography, LC*) χρησιμοποιείται πιο συχνά από τις άλλες μορφές χρωματογραφίας εξαιτίας της ευελιξίας και της συμβατότητάς της με τη φασματομετρία μάζας (**Κεφάλαιο 3**). Σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος, η υγρή χρωματογραφία είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό τόσο πρωτεϊνών όσο και πεπτιδίων, και μπορεί επομένως να εφαρμοστεί προγενέστερα της 2DGE για να προ-κλασματώσει το δείγμα, και μετά την 2DGE για να διαχωρίσει τα πεπτιδικά μίγματα από απλές αποκομμένες κηλίδες, ή αντίστοιχα με την 2DGE σαν την κυρίαρχη τεχνολογία διαχωρισμού πρωτεϊνών/πεπτιδίων (**Εικόνα 2.9**). Οι φασματογράφοι μάζας έχουν ένα ανώτατο όριο ανίχνευσης μάζας, οπότε οι πρωτεΐνες συνήθως μετατρέπονται σε πεπτίδια πριν το διαχωρισμό τους ώστε τα κλάσματα να μπορούν να εισέλθουν κατευθείαν στο φασματογράφο μάζας, παρόλο που αυτό παράγει μεγάλο αριθμό **πεπτιδικών τμημάτων** (*fragments*). Επομένως όπως στην 2DGE, οι πολυδιάστατοι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί που βασίζονται σε διαφορετικές αρχές χρησιμοποιούνται ώστε να διαχωρίζουν πεπτιδικά μίγματα. Εναλλακτικά οι LC μέθοδοι μπορούν να εκμεταλλευτούν διαφορετικές αρχές διαχωρισμού, όπως το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα, και τη συγγένεια για **συγκεκριμένους υποκαταστάτες** (*ligands*).

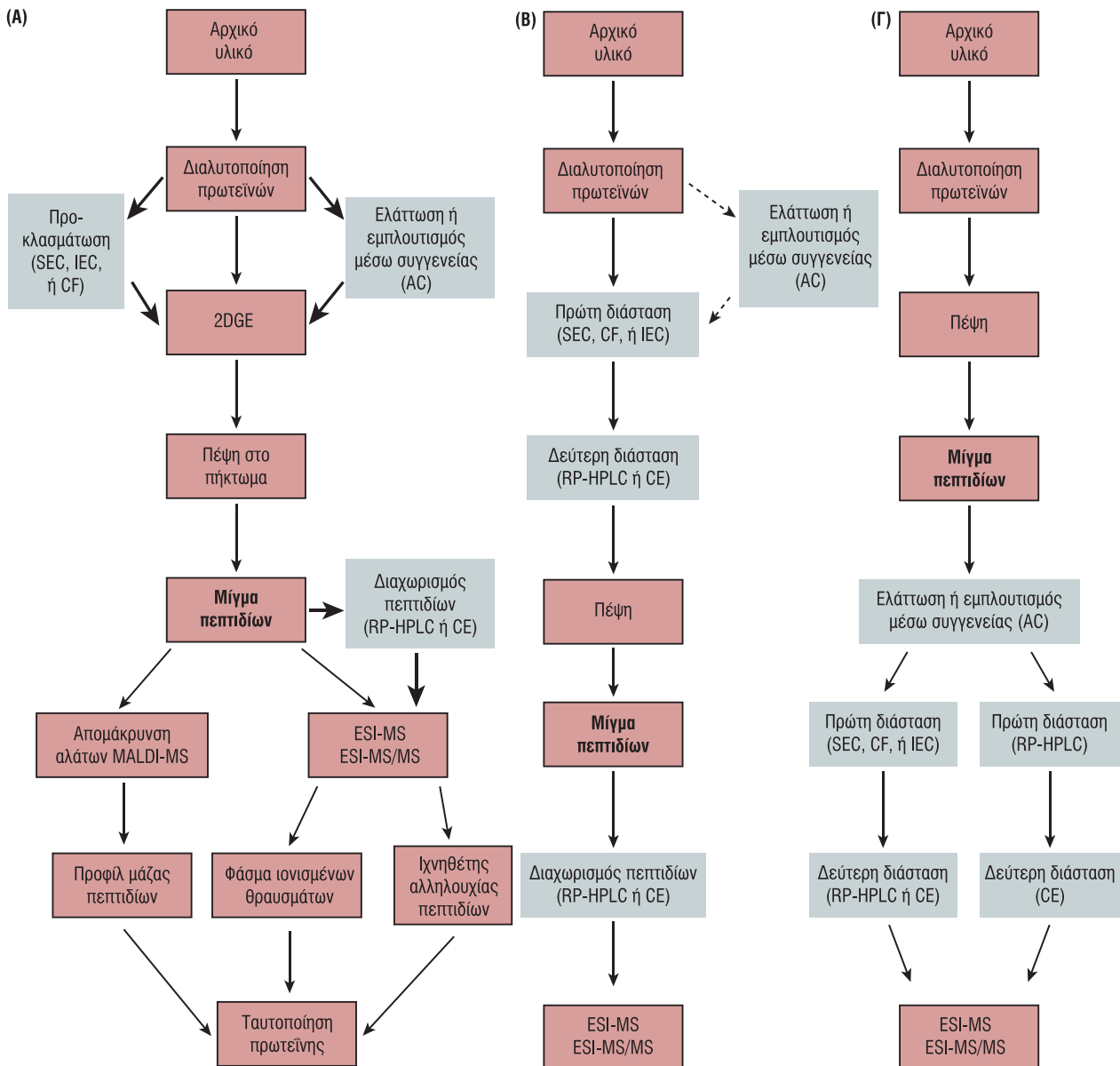
Στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας που

χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική, η σταθερή φάση είναι ένα πορώδες υλικό, συνήθως με τη μορφή πακεταρισμένων σφαιριδίων που γεμίζουν κάποιας μορφής στήλης. Η κινητή φάση, ένα διάλυμα που περιλαμβάνει τις διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια, ρέει μέσα από τη στήλη είτε με τη βαρύτητα είτε ωθείται να διέλθει υπό υψηλή πίεση. Η ευαισθησία του διαχωρισμού εξαρτάται σε ένα βαθμό από την εσωτερική διάμετρο της στήλης γιατί τα διαλύματα μπορούν να εισαχθούν με υψηλότερη συγκέντρωση σε μικρότερο όγκο. Οι MDLC διαχωρισμοί στην πρωτεωμική επιτυγχάνονται επομένως συχνά με *nanoflow-LC* με τριχοειδείς νανοσωλήνες (εσωτερική διάμετρος στήλης <0.1 mm, επίπεδο ροής <1μL/min). Μολονότι αυτό ορίζει την ταχύτητα ροής της μάζας, η ταχύτητα με την οποία κάθε συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή πεπτίδιο ρέει μέσα από τη στήλη εξαρτάται από τη συγγένειά τους με τη υλικό της στήλης, και έτσι υλικά με διαφορετικές χημικές και φυσικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωρίσουν πρωτεΐνες ή πεπτίδια σύμφωνα με διαφορετικές αρχές επιλογής. Αυτές οι αρχές, τα κριτήρια, και ο τρόπος με τον οποίο εφαρμόζονται, θα συζητηθούν στις επόμενες ενότητες.

### **Η χρωματογραφία συγγένειας εκμεταλλεύεται τα ειδικά χαρακτηριστικά σύνδεσης των πρωτεϊνών και/ή των πεπτιδίων**

Η **χρωματογραφία συγγένειας** (*affinity chromatography*) διαχωρίζει πρωτεΐνες ή πεπτίδια με βάση την εξειδικευμένη τους συγγένεια - αλληλεπίδραση σε υποκαταστάτες. Το υλικό σε μία στήλη συγγένειας περιλαμβάνει υποκαταστάτες που είναι ιδιαίτερα επιλεκτικοί για συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή ομάδες πρωτεϊνών. Σφαιρίδια συνδεδεμένα με αντισώματα, για παράδειγμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απομονώσουν μια και μόνο πρωτεΐνη ή ένα πεπτίδιο από ένα πολύπλοκο μίγμα, ενώ σφαιρίδια καλυμμένα με γλουταθειόνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συγκρατήσουν πρωτεΐνες που περιέχουν «ιχνηθέτες συνάφειας» (*affinity tags*) για την γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (*glutathione-S-transferase, GST*). Ομοίως, η **χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένο μέταλλο** (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) είναι μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας όπου η στερεά φάση περιλαμβάνει θετικά φορτισμένα μεταλλικά ιόντα. Αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομονωθούν επιλεκτικά φωσφοπρωτεΐνες/πεπτίδια, πρωτεΐνες με ιχνηθέτες ολιγοιστιδίνης όπως His<sub>6</sub>, και άλλες αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες.

Οι μέθοδοι χρωματογραφίας συγγένειας τυπι-

**ΕΙΚΟΝΑ 2.9****Στρατηγικές διαχωρισμού πρωτεϊνών/πεπτιδίων.**

**(Α)** Υγρή χρωματογραφία που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με 2DGE σε συνηθισμένες πρωτεωμικές αναλύσεις. Πριν το 2DGE το πρωτεϊνικό δείγμα μπορεί να επεξεργαστεί με χρωματογραφία συγγενείας (AC) για την μείωση των πρωτεϊνών που είναι σε μεγάλες ποσότητες ή τον εμπλουτισμό σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η προ-κλασμάτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC), ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (IEC), ή χρωματογραφία ισοηλεκτρικής εστίασης (CF) για να επιλεγθούν πρωτεΐνες που καλύπτουν ένα συγκεκριμένο εύρος ισοηλεκτρικών σημείων ή μοριακών μαζών για διαχωρισμό με 2DGE. Μετά τη 2DGE, οι κηλίδες πέπτονται στο πηκτώμα με θρυψίνη. Τα παραγόμενα πεπτιδία μπορούν να αφαλατωθούν και να μεταφερθούν σε ένα φασματογράφο μάζας MALDI, ή να διαχωριστούν με μικροτριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) ή με αντίστροφης φάσης HPLC (RP-HPLC) πριν την ανάλυση στο φασματογράφο μάζας ESI. Η πολυδιάστατη υγρή χρωματογραφία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί αντικαθιστώντας το 2DGE για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων. **(Β)** Τα βήματα της χρωματογραφίας με διαφορετικές αρχές διαχωρισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν άμεση αντικατάσταση της 2DGE για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, με ή χωρίς την μείωση των πρωτεϊνών που είναι σε μερικές ποσότητες ή τον εμπλουτισμό σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η πέψη με θρυψίνη στη στήλη ακολουθείται από ένα επιπλέον κύκλο RP-HPLC για να εισαχθούν επιπλέον πεπτιδικά κλάσματα στο φασματογράφο μάζας. **(Γ)** Πολυδιάστατοι διαχωρισμοί υγρής φάσης μπορούν επίσης να εφαρμοστούν απευθείας σε περίπλοκα πρωτεϊνικά μίγματα. Αυτή η στρατηγική συνήθως περιλαμβάνει τη μείωση των πρωτεϊνών που είναι σε μεγάλες ποσότητες ή τον εμπλουτισμό σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες, εξαιτίας της πολύ πολύπλοκης φύσης του πρωτεϊνικού μίγματος. Οι πλέον χρήσιμες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν AC-SEC-RPHPLC-MS, AC-IEC-RPHPLC-MS, και AC-RPHPLC-CEMS. Η ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων με φασματοφωτομετρία μάζας αναλύεται στο Κεφάλαιο 3.

κά περιλαμβάνουν μία διαδικασία **έκλουσης δύο βημάτων** (*two-step elution*) στην οποία το πρώτο κλάσμα που εκλύεται από τη στήλη περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια που απέτυχαν να αλληλεπιδράσουν με το υλικό συγγένειας, και το δεύτερο κλάσμα, όλες τις πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια που κατακρατήθηκαν στη στήλη. Αυτό επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενο πλύσιμο με δύο διαλύματα, το πρώτο από τα οποία ξεπλένει και απομακρύνει όλες τις πρωτεΐνες που δεν είναι προσδεμένες, και το δεύτερο το οποίο αποσυνδέει τις προσδεμένες πρωτεΐνες από το **υλικό συγγένειας** (*affinity matrix*). Σε ορισμένες περιπτώσεις, το πρώτο κλάσμα είναι απαραίτητο [για παράδειγμα, όταν ο στόχος είναι να απομακρυνθεί μια άφθονη πρωτεΐνη από ένα δείγμα για να απλοποιηθεί η ανάλυση των υπολοίπων πρωτεϊνών, μια διαδικασία γνωστή ως **μείωση προσμίξεων μέσω συγγένειας** (*affinity depletion*)]. Σε άλλες περιπτώσεις, ο στόχος είναι να απομονωθεί ένα δεύτερο κλάσμα, το οποίο περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που προσδένονται επιλεκτικά σε ένα υλικό συγγένειας γνωστό ως **καθαρισμός μέσω συγγένειας** (*affinity purification*). Σκοπός είναι να απομονωθεί μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή μία ομάδα πρωτεϊνών, να απομονωθούν πρωτεΐνες που φέρουν έναν συγκεκριμένο ιχνηθέτη συγγένειας, ή να απομονωθούν πρωτεΐνες ή πεπτίδια με κοινά χαρακτηριστικά. Η εφαρμογή της χρωματογραφίας συγγένειας στη μελέτη φωσφοπρωτεϊνών και άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αναλύεται στο **Κεφάλαιο 8**. Μία άλλη σημαντική εφαρμογή της χρωματογραφίας συγγένειας είναι η απομόνωση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη μορφή ενός συμπλόκου, ένα αντικείμενο που αναλύεται με περισσότερη λεπτομέρεια στο **Κεφάλαιο 7**. Στους συμβατικούς διαχωρισμούς της πρωτεωμικής, η πιο κοινή εφαρμογή της χρωματογραφίας συγγένειας είναι να απλοποιηθούν τα εξαιρετικά πολύπλοκα μίγματα πεπτιδίων ενώ παράλληλα διασφαλίζεται ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες εκπροσωπούνται ακόμη, επιλέγοντας αυτές με κατάλοιπα ιστιδίνης και/ή κυστεΐνης (βλέπε παρακάτω και **Κεφάλαιο 4**).

### Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους διηθεί τα μόρια βάσει του μεγέθους τους

Η **χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους** (γνωστή επίσης ως **χρωματογραφία πηκτώματος μοριακής διήθησης** - *gel filtration chromatography*) είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει πρωτεΐνες σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η στήλη γεμίζει (πακετάρεται) με σφαιρίδια που κατασκευάζονται από ένα πορώδες υλικό όπως η αγαρόζη. Μικρές πρωτεΐνες μπορούν να

εισέλθουν στους πόρους των σφαιριδίων του υλικού της στήλης οπότε απαιτούν περισσότερο χρόνο για να βρουν το δρόμο τους προς την έξοδο της στήλης, σε σύγκριση με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες, οι οποίες δε χωρούν στους πόρους και βρίσκουν ένα συντομότερο μονοπάτι για να κινηθούν ανάμεσα στα κενά των σφαιριδίων. Αυτή η διαχωριστική αρχή είναι γνωστή ως **μοριακός αποκλεισμός** (*molecular exclusion*) και δεν απαιτεί καμία χημική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαλυτών και της σταθερής φάσης. Εμπορικά σκευάσματα σφαιριδίων χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους, για παράδειγμα Sepharose, έχουν διαφορετικού μεγέθους πόρους κατάλληλους για βέλτιστο διαχωρισμό πρωτεϊνικών και πεπτιδικών μιγμάτων σε ένα εύρος μεγεθών.

### Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία εκμεταλλεύεται τις διαφορές στο καθαρό φορτίο

Σε αντίθεση με τη χρωματογραφία συγγένειας, οι άλλες μορφές χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική δεν είναι εξειδικευμένες, αυτό σημαίνει ότι χρησιμοποιούνται για να χαρακτηρίσουν το δείγμα και να διαχωρίσουν τις πρωτεΐνες ανάλογα με τις γενικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Η **ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία** (*IEX, ion exchange chromatography*) διαχωρίζει πρωτεΐνες ή πεπτίδια ανάλογα με το φορτίο τους. Βασίζεται στη αναστρέψιμη προσρόφηση διαλυτών μορίων από μια στερεά φάση που περιέχει φορτισμένες χημικές ομάδες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατιοντικές και ανιοντικές ρητίνες (**Πίνακας 2.1**) που προσελκύουν μόρια αντίθετου φορτίου του διαλύματος. Παραλλαγές των **ιοντοανταλλακτικών χρωματογραφιών** (*IEX*) επομένως περιλαμβάνουν **κατιοντοανταλλακτική** (*CAX, cation exchange*), **ανιοντοανταλλακτική** (*AEX, anion exchange*), **ισχυρή κατιοντοανταλλακτική** (*SCX, strong cation exchange*), **ισχυρή ανιοντοανταλλακτική** (*SAX, strong anion exchange*), οι δύο τελευταίες με πιο ισχυρά φορτισμένες ρητίνες. Αντί για τη διαδικασία έκλουσης δύο βημάτων, σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται η διαδικασία πολλών βημάτων ή **βαθμιδωτή έκλυση** (*gradient elution*) που επιτυγχάνεται με πλύσιμο της στήλης με διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης ιοντικής ισχύος ή pH (**Εικόνα 2.10**). Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας διαδικασίας είναι ένα **χρωματογράφημα** (*chromatogram*), όπου ο άξονας x αναπαριστά το **χρόνο κατακράτησης** (*retention time*) και ο άξονας y τις **κορυφές απορρόφησης** (*absorption peaks*) ενός δεδομένου μήκους κύματος από τα ανεξάρτητα συστατικά κάθε κλάσματος - δείγματος (**Εικόνα**

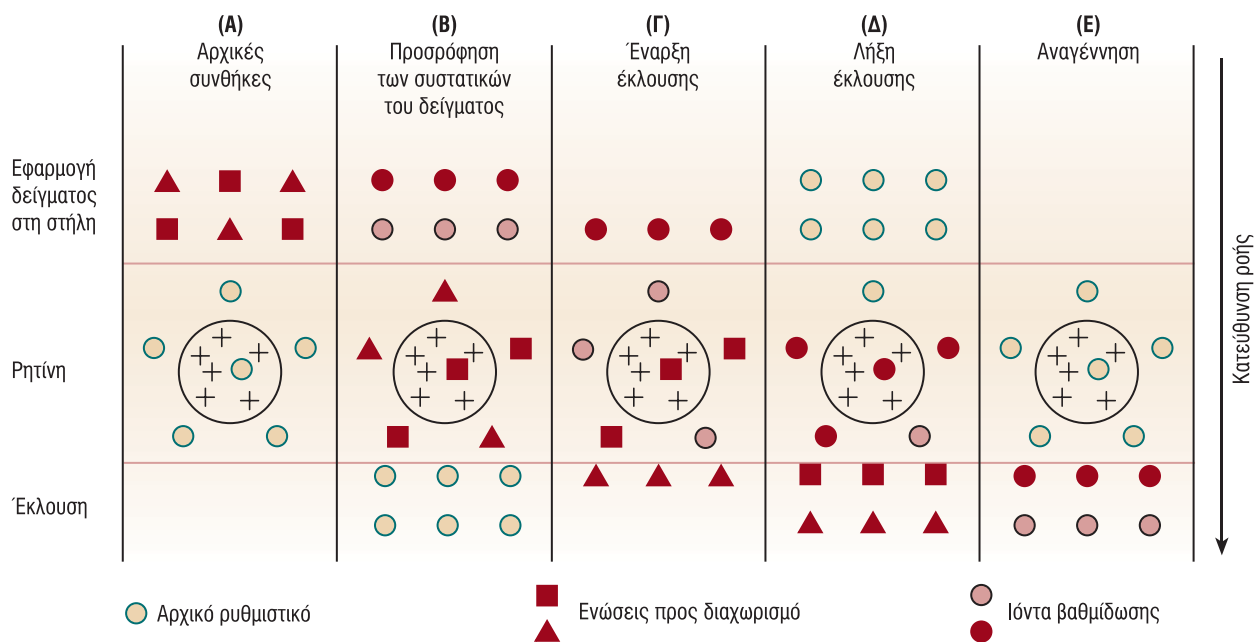
**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1** Ενεργές ομάδες που χρησιμοποιούνται σε ιονοανταλλάκτες

Ανιονοανταλλάκτες	Ενεργές ομάδες
Διαιθυλαμινοαιθύλιο (DEAE)	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> H(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Τεταρτοταγές αμινοαιθύλιο (QAE)	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CHOH-CH <sub>3</sub>
Τεταρτοταγές αμμώνιο (Q)	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Κατιονοανταλλάκτες	Ενεργές ομάδες
Καρβοξυμεθύλιο (CM)	-O-CH <sub>2</sub> -COO
Σουλφοπροπύλιο (SP)	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Μεθυλοσουλφονικό (S)	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

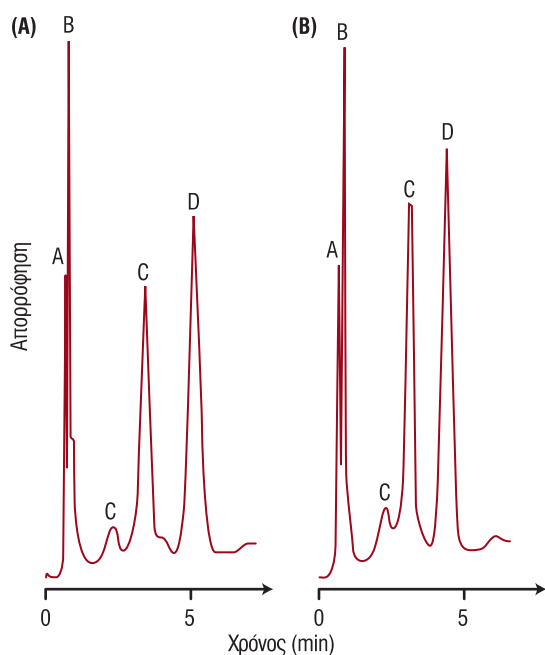
**2.11).** Η διακριτική ικανότητα ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού εκφράζεται ως **χωρητικότητα κορυφών** (*peak capacity*), που εκφράζει τον αριθμό των κορυφών που εκτείνονται πάνω από την βασική γραμμή του πλήρους φάσματος έκλυσης. Ο αριθμός των κορυφών στο χρωματογράμμα αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα του δείγματος, ενώ τα ποσοτικά δεδομένα μπορούν να εξαχθούν συγκρίνοντας το εμβαδόν των κορυφών.

Μία παρόμοια τεχνική, η **χρωματογραφία**

**εστίασης** (*chromatophocusing, CF*), περιλαμβάνει τη χρήση μιας ιοντοανταλλακτικής στήλης εξισορροπημένης σε ένα pH και ενός δευτέρου ρυθμιστικού διαλύματος σε άλλο pH. Αυτό παράγει μία βαθμίδωση pH κατά μήκος της στήλης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκλούσει πρωτεΐνες βάσει των ισοηλεκτρικών τους σημείων. Φαινόμενα εστίασης που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία αυτή παράγουν λεπτές κορυφές που βοηθούν να συγκεντρωθούν μεμονωμένα κλάσματα.

**ΕΙΚΟΝΑ 2.10****Η αρχή της ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.**

**(A)** Αρχικά, η ρητίνη ανταλλαγής ιόντων περιορίζεται σε απλά αντίθετα ιόντα (ιόντα με αντίθετο φορτίο στη ρητίνη) που είναι παρόντα στο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης. **(B)** Όταν το δείγμα προστεθεί στη στήλη, τα μόρια του δείγματος με αντίθετο φορτίο με τη ρητίνη αντικαθιστούν τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης και προσροφούνται στη στήλη. **(Γ)** Το πρώτο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης υποκαθιστά τα συστατικά εκείνα του δείγματος που είναι πιο ασθενώς δεμένα. **(Δ)** Καθώς η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης αυξάνεται (ή αλλάζει το pH), τα πιο σταθερά συνδεδεμένα διαλυτά ιόντα εκτοπίζονται. **(Ε)** Αφού έχουν εκτοπιστεί όλα τα ιόντα της διαλελυμένης ουσίας, η στήλη αναγεννιάται με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης.

**ΕΙΚΟΝΑ 2.11**

**Χρωματογραφήματα που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα από διαχωρισμούς μιγμάτων πρωτεϊνών με ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.** Οι κορυφές που φέρουν γράμματα αντιστοιχούν σε διαφορετικές πρωτεΐνες (A=οβαλβουμίνη, B= κοναλβουμίνη, C=κυτόχρωμα c, D=λυσσοζύμη). Ο πρώτος διαχωρισμός (a) πραγματοποιήθηκε σε pH 5.85, ενώ ο δεύτερος (b) πραγματοποιήθηκε σε pH 6.50. Οι συνθήκες όπως το pH και η θερμοκρασία έχουν σημαντικό αποτέλεσμα στην απόδοση. (Χορηγία της Rebecca Cartier και Julie Bordonaro, Rensselaer Polytechnic Institute).

### Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και χρωματογραφία υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων εκμεταλλεύονται τη συγγένεια μεταξύ πεπτιδίων και υδροφοβικών ρητίνων

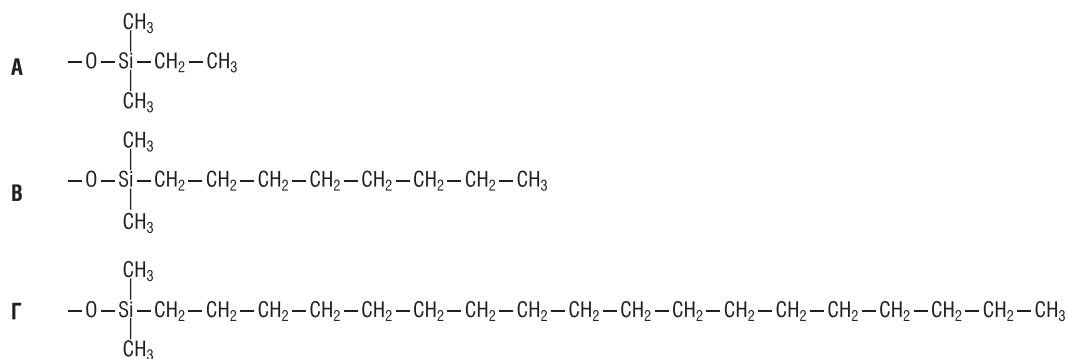
Όπως στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία, η **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης** (*reverse-phase chromatography, RP*) περιλαμβάνει την αντίστροφη προσρόφηση πρωτεϊνών ή πεπτιδίων στο υλικό της σταθερής φάσης, παράγοντας πολλαπλά κλάσματα μέσω βαθμιδωτής έκλουσης. Σε αυτή την περίπτωση, ωστόσο, οι πρωτεΐνες και τα πεπτιδία διαχωρίζονται βάσει της υδροφοβικότητάς τους και η ρητίνη αντίστροφης φάσης αποτελείται από υδρόφοβους προσδέτες όπως οι αλκυλικές ομάδες C<sub>4</sub> έως C<sub>18</sub> (**Εικόνα 2.12**). Στην πρωτεωμική, οι διαχωρισμοί αντίστροφης φάσης συνήθως πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας **υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης** (*reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC*), στην οποία η κινητή φάση ωθείται μέσα στη στήλη από υψηλή πίεση. Παρόλο που η αρχή διαχωρι-

σμού είναι η υδροφοβικότητα, η RP-HPLC έχει ως αποτέλεσμα ένα σχεδόν εξαρτώμενο από τη μάζα διαχωρισμό, γιατί η κατακράτηση στη στήλη τείνει να αυξάνεται αυξανόμενης της μοριακής μάζας. Η βαθμιδωτή έκλουση επιτυγχάνεται με τη σταδιακή αύξηση του ποσοστού ενός οργανικού τροποποιητή στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, ο οποίος πρώτα διαταράσσει τις ασθενέστερες υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (**Εικόνα 2.13**). Από όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική, η RP-HPLC είναι η πιο σημαντική μέθοδος και έχει την υψηλότερη διακριτικότητα (μέγιστη ικανότητα κορυφών έως 100 συστατικά στην πράξη) και επειδή διαφορετικές ρητίνες εμφανίζουν διακριτά προφίλ κατακράτησης βιομορίων σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί RP-HPLC με διαφορετικές ρητίνες στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, ή οι ίδιες ρητίνες και διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, για να πραγματοποιήσουμε πολυδιάστατους διαχωρισμούς. Η RP-HPLC χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό πεπτιδίων μετά την πέψη τους με θρυψίνη και οι στήλες HPLC συχνά συνδέονται απευθείας με **φασματογράφο μάζας τύπου ιονισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού** (*electrospray ionization mass spectrometer*) για να διευκολύνουν τον πλήρως αυτοματοποιημένο διαχωρισμό πεπτιδίων και την ανάλυσή τους μέσω LC-MS ή LC-MS/MS (**υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας, liquid chromatography-mass spectrometry** ή **υγρή χρωματογραφία - διαδοχική φασματομετρία μάζας, liquid chromatography-tandem mass spectrometry**) (**Κεφάλαιο 3**). Η **χρωματογραφία υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων** (*hydrophobic interaction chromatography*) είναι μία παρόμοια τεχνική που επίσης διαχωρίζει πρωτεΐνες βάσει των υδροφοβικών τους ιδιοτήτων, μολονότι χρησιμοποιεί διαφορετικές ρητίνες ως προς τη σύσταση (αλκυλικές ομάδες C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, ή αρυλικούς υποκαταστάτες) και περισσότερο πολικά διαλύματα έκλουσης. Παρομοίως, η **χρωματογραφία υδροφιλικής αλληλεπίδρασης** (*hydrophilic interaction chromatography*) χρησιμοποιεί μία πολική στερεά φάση για να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες με βάση τις υδροφιλικές τους ιδιότητες.

## 2.6 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

**Η πολυδιάστατη υγρή χρωματογραφία είναι πιο πολύπλευρη και πιο εύκολα αυτοματοποιήσιμη από την 2DGE αλλά στερείται απεικονιστικής διάστασης**

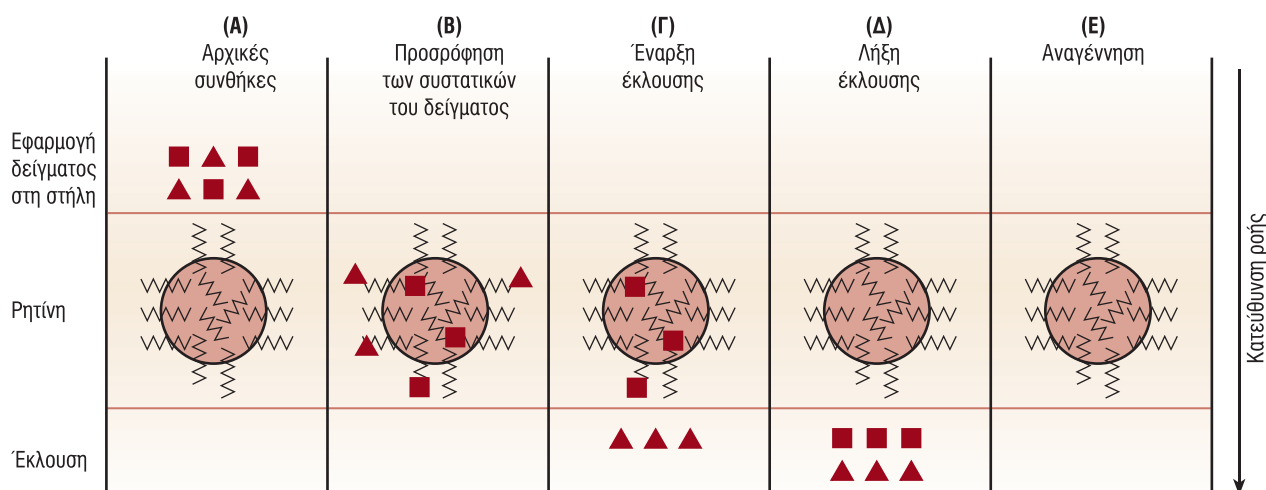
Όπως συζητήθηκε παραπάνω, η υγρή χρωματο-

**ΕΙΚΟΝΑ 2.12**

**Μερικοί και οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι συνδέτες n-αλκυλ-υδρογονάνθρακες σε ρητίνες αντίστροφης φάσης. (Α)** προσδέτης δυο ανθρακικών ομάδων, **(Β)** προσδέτης οκτώ ανθρακικών αλυσίδων (*octyl*, C<sub>8</sub>), **(Γ)** προσδέτης δεκαοκτώ ανθρακικών αλυσίδων (*octadecyl*, C<sub>18</sub>).

γραφία χρησιμοποιείται συχνά είτε πριν είτε μετά από την 2DGE για την προ-κλασμάτωση δειγμάτων και για να διαχωρίσει τα πεπτιδία της θρυψίνης από τις ανεξάρτητες κηλίδες του πηκτώματος. Παρόλα αυτά η ευελιξία των LC μεθόδων, όσον αφορά τον συνδυασμό διαφορετικών διαχωριστικών αρχών, και η ικανότητα να συνδέονται οι LC μέθοδοι για διαχωρισμό πεπτιδίων απευθείας στο φασματογράφο μάζας χωρίς την ανάγκη ανθρώπινης παρέμβασης στη μεταφορά δείγματος, κάνει την πολυδιάστατη υγρή χρωματογραφία μία ελκυστική λύση ενάντια στα πολλά μειονεκτήματα της 2DGE που συζητήθηκαν παραπάνω. Οι HPLC στήλες επιτρέπουν να χρησιμοποιηθούν μεγάλοι όγκοι δειγμάτων και να συμπυκνωθούν στη στήλη, βοηθώντας τις χαμηλής αφθονίας πρωτεΐνες να ταυτοποιηθούν πιο εύκολα. Τα πεπτιδία από πολλές πρωτεΐνες που είναι δύσκολο να αναλυθούν με 2DGE (για παράδειγμα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες και οι πολύ βασικές πρωτεΐνες) μπορούν να διαχωριστούν εύκολα χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες ρητίνες. Πρωτεΐνες και πεπτιδία που έχουν διαχω-

στική λύση ενάντια στα πολλά μειονεκτήματα της 2DGE που συζητήθηκαν παραπάνω. Οι HPLC στήλες επιτρέπουν να χρησιμοποιηθούν μεγάλοι όγκοι δειγμάτων και να συμπυκνωθούν στη στήλη, βοηθώντας τις χαμηλής αφθονίας πρωτεΐνες να ταυτοποιηθούν πιο εύκολα. Τα πεπτιδία από πολλές πρωτεΐνες που είναι δύσκολο να αναλυθούν με 2DGE (για παράδειγμα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες και οι πολύ βασικές πρωτεΐνες) μπορούν να διαχωριστούν εύκολα χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες ρητίνες. Πρωτεΐνες και πεπτιδία που έχουν διαχω-

**ΕΙΚΟΝΑ 2.13**

**Η αρχή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. (Α)** Αρχικά, η υδρόφοβη ρητίνη ή ρητίνη αντίστροφη φάσης είναι ελεύθερη. **(Β)** Όταν το δείγμα προστεθεί στη στήλη, τα περισσότερα μόρια του δείγματος προσδένονται στη ρητίνη εξαιτίας της φύσης του ρυθμιστικού διαλύματος του δείγματος που φορτώθηκε. **(Γ)** Το πρώτο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης εκτοπίζει αυτά τα συστατικά του δείγματος που είναι συνδεδεμένα πιο χαλαρά στην υδρόφοβη ρητίνη. **(Δ)** Καθώς το επίπεδο του οργανικού διαλύτη (για παράδειγμα, ακετονιτρίλιο) στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης αυξάνεται, περισσότερα ισχυρά συνδεδεμένα μόρια εκτοπίζονται. **(Ε)** Αφού όλα τα μόρια του δείγματος έχουν εκτοπιστεί πλήρως, η στήλη αναγεννιάται.

ριστεί στην υγρή φάση δε χρειάζονται χρώση για να ανιχνευθούν. Ίσως το πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι LC μέθοδοι μπορούν να διαχωρίσουν πεπτιδία το ίδιο καλά όπως και πρωτεΐνες και η δυνατότητα να συνδεθούν οι LC στήλες απευθείας στον φασματογράφο μάζας, σημαίνει ότι ολοκληρωμένη η αναλυτική διαδικασία από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι το προφίλ της μάζας του πεπτιδίου μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Τα μειονεκτήματα των LC μεθόδων είναι ότι η απεικονιστική πλευρά του πρωτεϊνικού διαχωρισμού σε σχέση με την 2DGE, χάνεται, περιλαμβάνοντας το RI και τα δεδομένα της μοριακής μάζας που μπορούν να προσδιοριστούν από τις θέσεις των κηλίδων στο πήκτωμα και ότι LC είναι μία σειριακή τεχνική ανάλυσης, οπότε είναι δύσκολο να τρέξουν παράλληλα πειράματα χωρίς πρόσβαση σε παράλληλα συστήματα πανομοιότυπων συσκευών (περιλαμβάνοντας το φασματογράφο μάζας). Παρόλα αυτά, η ακρίβεια των σύγχρονων LC-MS οργάνων σημαίνει ότι, όπως στην 2DGE, ο διαχωρισμός ελέγχεται πολύ καλά και τα περισσότερα σφάλματα προκύπτουν στη φάση της προετοιμασίας του δείγματος παρά μεταγενέστερα στην ανάλυση και την ερμηνεία των δεδομένων.

### Τα πιο χρήσιμα MDLC συστήματα επιτυγχάνουν βέλτιστη χωρητικότητα κορυφών εκμεταλλευόμενα ορθογώνιους διαχωρισμούς που έχουν εσωτερικά συμβατά ρυθμιστικά διαλύματα

Η διαχωριστική ισχύς μίας χρωματογραφικής διαδικασίας είχε προσδιοριστεί από τον Eli Grushka το 1970 με τον όρο **χωρητικότητα κορυφών** (*peak capacity*) ακολουθώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$p = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_n}{t_A}$$

Όπου το  $p$  είναι η χωρητικότητα της κορυφής, το  $N$  είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, και τα  $t_n$ ,  $t_A$  είναι ο τελικός και ο κενός χρόνος των κορυφών, αντίστοιχα.

Βασικά, η MDLC πρέπει να είναι σε θέση να πολλαπλασιάζει την χωρητικότητα κορυφών σε διαδοχικούς διαχωρισμούς, αλλά αυτό είναι δυνατόν μόνο αν οι ιδιότητες που επηρεάζουν τον πεπτιδικό διαχωρισμό σε μία διάσταση δεν επηρεάζουν το διαχωρισμό σε άλλη διάσταση, μία κατάσταση που μπορεί να περιγραφεί ως **απόλυτη ορθογωνικότητα** (*complete orthogonality*). Στην πράξη, υπάρχει πάντα κάποια συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών κατακράτησης των διαλυμένων

πρωτεϊνών/πεπτιδίων σε διάφορες ρητίνες και οι MDLC μέθοδοι δεν ανταποκρίνονται στη θεωρητική διαχωριστική ισχύ. Για να το αποτυπώσουν, ο Gilar και οι συνεργάτες έφτιαξαν μία συνάρτηση γνωστή ως **πρακτική ικανότητα δημιουργίας κορυφών** (*practical peak capacity*) που παίρνει υπ' όψιν τις συσχετισμένες λειτουργίες:

$$N_p = P_1 P_2 \frac{\sum \text{bins}}{P_{\max}}$$

Όπου το  $N_p$  είναι η πρακτική ικανότητα δημιουργίας κορυφών, οι  $P_1$  και  $P_2$  είναι οι ικανότητες κορυφών που επιτυγχάνονται σε κάθε διαχωρισμό, το  $\sum \text{bins}$  αναφέρεται στον αριθμό των bins που περιέχουν δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιήσουν την υπολογισμένη ορθογωνικότητα σε ένα ανομοιόμορφο διάστημα διαχωρισμού, και το  $P_{\max}$  είναι η θεωρητική ικανότητα κορυφών που υπολογίζεται από το άθροισμα των δεδομένων από όλα τα bins.

Τέτοιες μελέτες έχουν προσδιορίσει τρεις τύπους χρωματογραφίας δύο-διαστάσεων που παρέχουν την καλύτερη διακριτική ισχύ για την πρωτεωμική: συγκεκριμένα, την ορθογωνική HPLC αντίστροφης - φάσης χρησιμοποιώντας διαφορετικά pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων σε κάθε διαχωρισμό (RP-RPLC), την ιοντική ανταλλαγή ακολουθούμενη από χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (ιδιαίτερα SCX-RPLC), και την υδρόφοβη αλληλεπίδραση ακολουθούμενη από χρωματογραφία αντίστροφης - φάσης (HILIC-RPLC). Παρόλα αυτά, αυτές οι μελέτες δε λαμβάνουν υπ' όψιν το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί ο μέγιστος διαχωρισμός, δηλαδή, μία μέθοδος που επιτυγχάνει υψηλή ορθογωνική διακριτικότητα αλλά απαιτούνται αρκετές μέρες για να ολοκληρωθεί δεν θα είναι πιο χρήσιμη από τη μέθοδο με ελάχιστη χαμηλότερη διακριτικότητα που ολοκληρώνεται σε μία ώρα. Ένας συμβιβασμός μπορεί να επιτευχθεί από την κατασκευή διαγράμματος της ικανότητα κορυφών σε σχέση με την ταχύτητα του διαχωρισμού που είναι γνωστή ως **Porpe διάγραμμα** (*Porpe plot*).

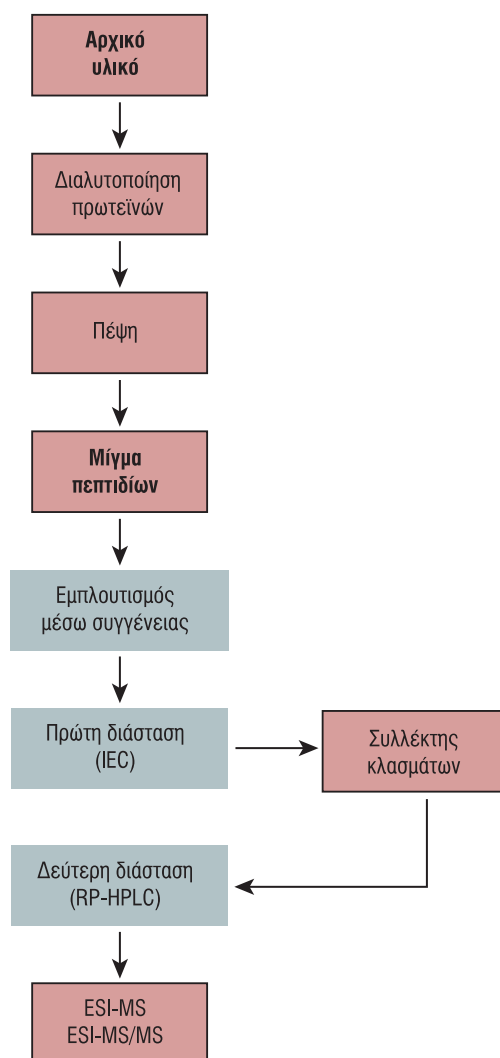
Πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί διαχωριστικών μεθόδων έχουν αναφερθεί, μερικοί από τους οποίους περιλαμβάνουν δύο βήματα ορθογωνικής χρωματογραφίας και άλλα που συνδυάζουν χρωματογραφία με μία διαφορετική διαχωριστική μέθοδο όπως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (**Πλαίσιο 2.2**). Οι βασικές προϋποθέσεις για το συνδυασμό διαφορετικών τεχνικών διαχωρισμού είναι ότι ο πρώτος διαχωρισμός πρέπει να έχει την υψηλότερη χωρητικότητα δείγματος, κι ότι οι δύο τεχνικές πρέπει να είναι διαμορφώσιμες (αυτό σημαίνει, ότι πρέπει να είναι δυνατό να τις συνδέσουμε για να

επιτρέψουμε κλάσματα από τον πρώτο διαχωρισμό να διαχωριστούν περαιτέρω στη δεύτερη διάσταση), και ότι τα ρυθμιστικά διαλύματα πρέπει να είναι μεταξύ τους συμβατά. Για παράδειγμα η διαδοχική χρήση ιοντοανταλλαγής και χρωματογραφίας αντίστροφης - φάσης σε μία τεχνική όπως η SCX-RPLC είναι δημοφιλής, γιατί το διάλυμα έκλουσης από την κατιοντοανταλλαγή είναι κατάλληλο ως διάλυμα φόρτωσης για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, διαφορετικά κάθε κλάσμα θα πρέπει να εξισορροπηθεί σε άλλο ρυθμιστικό διάλυμα πριν από το δεύτερο διαχωρισμό. Η RP-HPLC προτιμάται ως ο δεύτερος διαχωρισμός, επειδή το διάλυμα έκλουσης είναι συμβατό με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται τόσο στη MALDI-MS όσο και στη ESI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry* και *electrospray ionization mass spectrometry*, **Κεφάλαιο 3**).

### Η MudPIT δείχνει πως το MDLC έχει εξελιχθεί από μία επίπονη τεχνική ουσιαστικά σε μία σχεδόν αυτόματη λειτουργία

Αρχικά, η MDLC επιτεύχθηκε από μία ασυνεχή διαδικασία στην οποία τα κλάσματα συλλέχθηκαν από τη στήλη ιοντοανταλλαγής ή τη στήλη μοριακής διήθησης και στη συνέχεια εισήχθησαν χειροκίνητα στη στήλη HPLC (**Εικόνα 2.14**). Παρόλο που απαιτεί εντατική εργασία, τα **ασυνεχή συστήματα** (*discontinuous systems*) δεν επηρεάζονται από χρονικούς περιορισμούς. Τα κλάσματα που εκκλύονται από την πρώτη στήλη μπορούν να αποθηκευτούν εκτός διαδικασίας απεριόριστα, και να φορτωθούν ένα προς ένα στην στήλη HPLC, η οποία είναι ήδη συνδεδεμένη με ένα φασματογράφο μάζας. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι οι μεγάλοι όγκοι δειγμάτων που μπορούν να εισαχθούν στην πρώτη στήλη ώστε να αποκτηθεί επαρκής ποσότητα πρωτεϊνών μικρής αφθονίας για ανάλυση στη δεύτερη διάσταση.

Παρόλα αυτά, η ανάγκη για χειροκίνητη εφαρμογή του δείγματος μπορεί να παρακαμφθεί εξοπλίζοντας την πρώτη στήλη με ένα αυτόματο σύστημα συλλογής κλασμάτων και μία βαλβίδα ροής στη στήλη. Τα κλάσματα συλλέγονται στη συνέχεια από την πρώτη στήλη σε όλο το εύρος της έκλουσης, και η βαλβίδα ροής μπορεί να συνδέσει την στήλη RP-HPLC διαδοχικά έτσι ώστε να παραλαμβάνει συνεχώς τα κλάσματα της πρώτης στήλης. Εναλλακτικά, κάποιοι ερευνητές ανέπτυξαν συσκευή που αποτελείται από μια απλή ιοντοανταλλακτική στήλη συνδεδεμένη, μέσω ενός κατάλληλου συστήματος βαλβίδων, σε πολλαπλές στή-

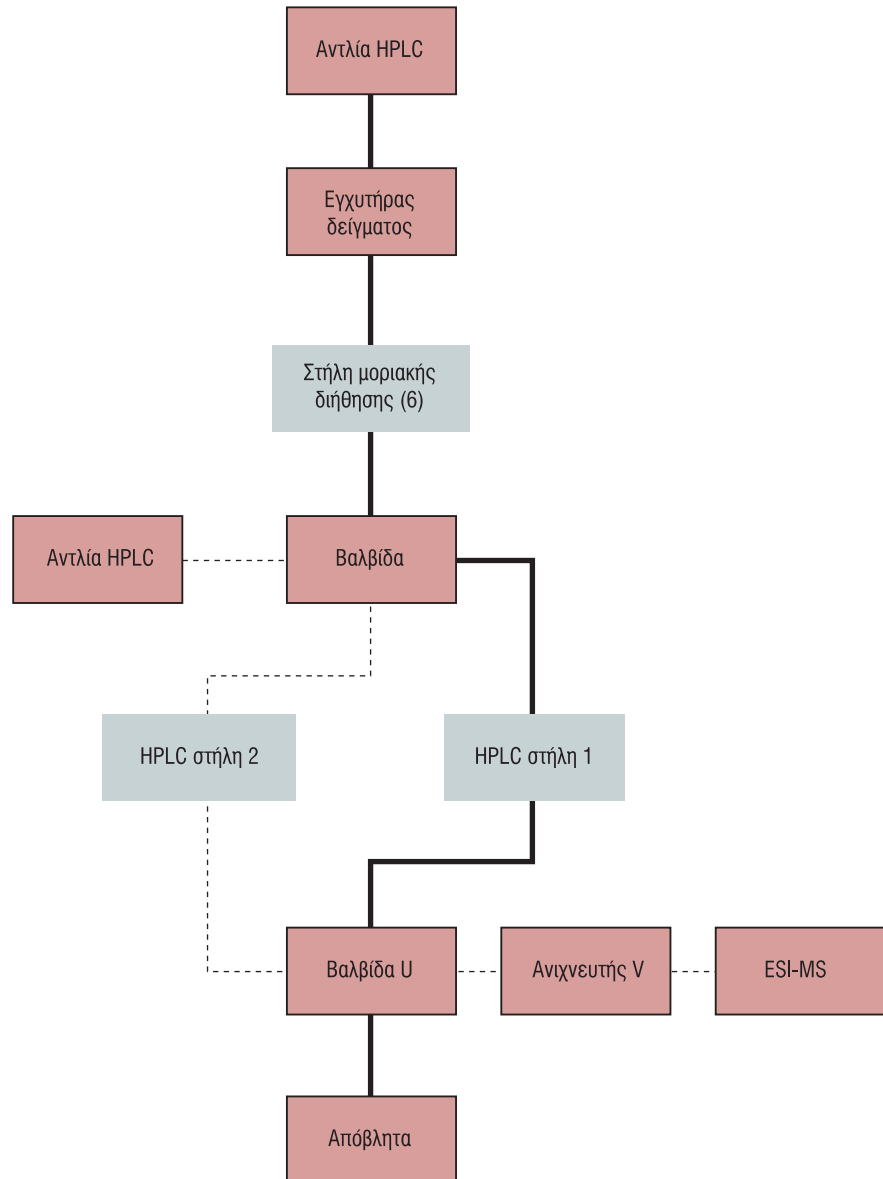


**ΕΙΚΟΝΑ 2.14**

**Ασυνεχής πολυδιάστατη χρωματογραφία για τον διαχωρισμό πεπτιδίων.** Σε αυτό το πείραμα ακολουθώντας το παράδειγμα των Gygi και συνεργατών (βλέπε Περαιτέρω Βιβλιογραφία), πρωτεΐνες από δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά δείγματα ζύμης σημάθηκαν με ιχνηθέτες συγγένειας βιοτίνης σημασμένης μάζας που αντιδρούσαν ειδικά με κατάλοιπα κυστεΐνης (αυτή η στρατηγική σήμανσης δεν αναφέρεται με λεπτομέρεια, χρησιμοποιείται για συγκριτική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μεταξύ δειγμάτων και περαιτέρω λεπτομέρειες στο **Κεφάλαιο 4**, σελ 101). Οι πρωτεΐνες από κάθε δείγμα πέπτονταν με θρυψίνη και αναμιγνύονταν ώστε να παράγουν ένα κοινό πεπτιδικό δείγμα. Η χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να επιλεγθούν τα πεπτιδία που φέρουν τον ιχνηθέτη συγγένειας, μειώνοντας την πολυπλοκότητα του μίγματος περίπου δέκα φορές. Παρόλα αυτά, εφόσον οι περισσότερες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, ο εναπομείναν πληθυσμός των πεπτιδίων παρείχε ακόμη κάλυψη περίπου 90% του πρωτεώματος της ζύμης. Τα πεπτιδία που ανακτήθηκαν διαχωρίστηκαν με ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιώντας μία ισχυρή ιοντοανταλλακτική ρητίνη. Τριάντα ανεξάρτητα δείγματα συλλέχθηκαν, και τέσσερα από αυτά αναλύθηκαν σε δισδιάστατο διαχωρισμό με RP-HPLC.

**ΕΙΚΟΝΑ 2.15****Συνεχόμενη πολυδιάστατη χρωματογραφία με αλλαγή στήλης.**

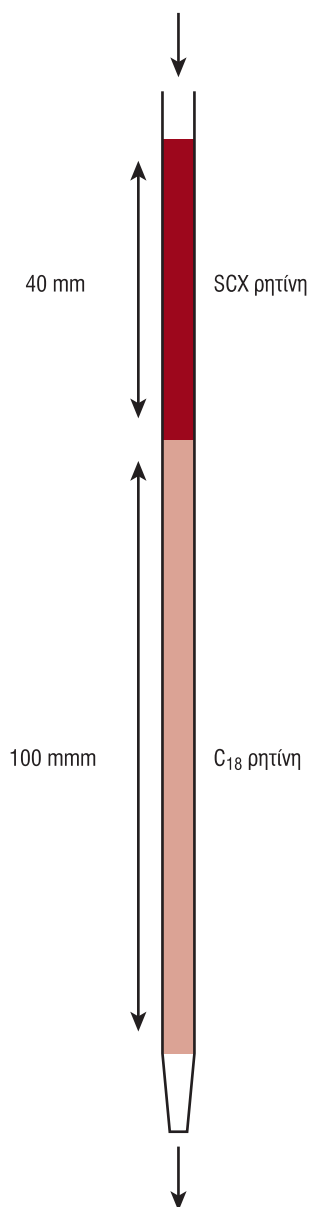
Σε αυτό το παράδειγμα, δύο HPLC στήλες που δουλεύουν παράλληλα προσλαμβάνουν εναλλακτικά εκλούσματα από μία συστοιχία έξι στήλων μοριακής διήθησης. Μετά την εφαρμογή του δείγματος και το διαχωρισμό με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, κλάσματα από τη στήλη μοριακής διήθησης κατευθύνονται στη HPLC στήλη 1 χρησιμοποιώντας μία βαλβίδα τεσσάρων διαδρομών (παχειά γραμμή). Ενώ τα πεπτιδικά παγιδεύονται σε αυτή τη στήλη, η HPLC στήλη 2 εκλούεται και το δείγμα κατευθύνεται στον ανιχνευτή και το συλλέκτη κλασμάτων (διακεκομμένη γραμμή). Αφού ξεπλυθεί και εξισορροπηθεί η στήλη 2, οι βαλβίδες αναστρέφονται επιτρέποντας στη στήλη 2 να φορτωθεί με το επόμενο κλάσμα από διαχωρισμό μοριακής διήθησης ενώ η στήλη 1 εκλούεται. Αυτός ο κύκλος συνεχίζεται μέχρι τα κλάσματα από τη μοριακή διήθηση εξαντηθούν. (Adapted from Oriteck GJ, Ramirez SM, Jorgenson JW & Moseley MA 3rd (1998) Anal. Biochem. 258, 349. (Κατόπιν αδειας από Elsevier).



λες HPLC τοποθετημένες παράλληλα (**Εικόνα 2.15**). Σε αυτό το σύστημα, κλάσματα που εκλούνται από την πρώτη στήλη κατευθύνονται διαδοχικά στις πολλαπλές HPLC στήλες, και αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται όταν η πρώτη στήλη τελειώσει και αναγεννηθεί.

Η έμφαση σε υψηλότερη απόδοση μέσω της αυξημένης αυτοματοποίησης και της μείωσης του απαιτούμενου χρόνου οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας της **πολυδιάστατης πρωτεϊνικής ταυτοποίησης** (*multidimensional protein identification technology, MudPIT*) χρησιμοποιώντας μία **διφασική στήλη** στην οποία η κορυφή της στήλης περιλαμβάνει ρητίνη SCX και το τελικό της τμήμα περιλαμβάνει ρητίνη ανεστραμμένης – φάσης. Επειδή οι διαλύτες είναι συμβατοί (βλέπε παραπάνω), αυτό επιτρέπει την σταδιακή έκλυση των κλασμάτων από την πρώτη ρητίνη και τη βαθμιδωτή

έκλυση των κλασμάτων της δεύτερης διάστασης από τη δεύτερη στήλη. Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε πρωτοποριακά ως κατευθείαν ανάλυση **μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων** (*direct analysis of large protein complexes, DALPC*) και τροποποιήθηκε αργότερα στην πλατφόρμα MudPIT (βλέπε Washburn et al., Περαιτέρω Βιβλιογραφία). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.16**, τα πεπτιδικά μίγματα που φορτώνονται στη ρητίνη SCX εκλούνται χρησιμοποιώντας βαθμίδωση άλατος κατά βήματα (*stepwise*) και τα εκλούόμενα κλάσματα της πρώτης-διάστασης εισάγονται στη ρητίνη της αντίστροφης φάσης. Τα κλάσματα της δεύτερης διάστασης εκλούνται στη συνέχεια από τη ρητίνη της αντίστροφης φάσης χρησιμοποιώντας μια διαβάθμιση ακετονιτριλίου και εισάγονται στο φασματογράφο μάζας. Αυτή η διαδικασία και το ακόλουθο βήμα αναγέννησης, δεν εμποδίζουν το SCX βή-



### ΕΙΚΟΝΑ 2.16

**Συνεχής πολυδιάστατη χρωματογραφία χρησιμοποιώντας μία διφασική στήλη.** Σε αυτό το παράδειγμα, από τη μέθοδο MudPIT που αναπτύχθηκε από τον Yates και τους συνεργάτες (βλέπε Washburn και συνεργάτες, βλέπε Περαιτέρω Βιβλιογραφία), μια τριχοειδής στήλη κατασκευασμένη από πυρίτιο με διαστάσεις 140 mm x 0,1 mm γεμίζεται στο ένα άκρο με σφαιρίδια μορίων C<sub>18</sub> διαμέτρου 5 μm (ανάστροφη φάση) και στο άνω άκρο με σφαιρίδια διαμέτρου 5 μm από ισχυρό κατιοντοανταλλάκτη. Έπειτα από την τοποθέτηση του δείγματος (πάνω βέλος), τα κλάσματα εκλύονται από την ρητίνη SCX με διάλυμα άλατος σε βήματα (*stepwise*). Έπειτα από τη σταδιακή έκλυση, τα κλάσματα του ιοντοαντάλλακτη ρέουν μέσα σε ένα υλικό αντίστροφης φάσης και εκλύονται με την χρήση μιας διαβάθμισης ακετονιτριλίου (κάτω βέλος). Η έκλυση αντίστροφης φάσης και επανεξισορρόπηση δεν επηρεάζει την ρητίνη SCX. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται έως η ρητίνη SCX να εξαντληθεί.

μα χρωματογραφίας, και έπειτα από τη αναγέννηση ακόμα ένα κλάσμα μπορεί να εκλουθεί από την ρητίνη SCX αυξάνοντας τη συγκέντρωση του άλατος. Όταν αναπτύχθηκε αυτή η μέθοδος το 2001, επετεύχθη η υψηλότερη διακριτικότητα ανάλυσης για το πρωτέωμα της ζύμης εκείνη την εποχή, διαχωρίζοντας και ταυτοποιώντας 1.484 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων αυτών που φυσιολογικά υποεκπροσωπούνταν στα πειράματα πρωτεωμικής (Πλαίσιο 2.4). Η ορθογωνικότητα της αυθεντικής MudPIT μεθόδου έχει βελτιωθεί έκτοτε μέσω διαφορετικών προσαρμογών, όπως η χρήση ενός μικτού στρώματος χρωματογραφίας AEX/CAX για το πρώτο βήμα διαχωρισμού, τη χρήση μιας ημι-συνεχούς κλίσης άλατος για έκλυση και τη συνδυαστική χρήση βαθμιδωτής έκλυσης με άλας και pH. Το τελευταίο πρόσφατα επέτρεψε το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση 14.105 μοναδικών πρωτεϊνών από δείγμα ήπατος ποντικού.

Παρόλο που είναι υπό αμφισβήτηση το κατά πόσον η πολυδιάστατη χρωματογραφία θα αντικαταστήσει ποτέ την 2DGE σαν τεχνολογική πλατφόρμα στην πρωτεωμική, είναι εμφανές ότι είναι μία χρήσιμη τεχνική τόσο από μόνη της όσο και σε συνδυασμό με την ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Τα συνδυασμένα προτερήματα της ευαισθησίας, της ταυτοποίησης, της ευκρίνειας (διαχωριστικής ικανότητας) και πιθανώς πιο σημαντικό, της δυνατότητας αυτοματοποίησης των διαδικασιών της LC-MS και της LC-MS/MS μπορεί να απαλείψει τα μειονεκτήματα της μη οπτικοποίησης των δεδομένων που παρέχεται από τη 2DGE. Η χρήση του φασματογράφου μάζας για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί από 2DGE και/ή LC μεθόδους συζητιέται στο **Κεφάλαιο 3**.

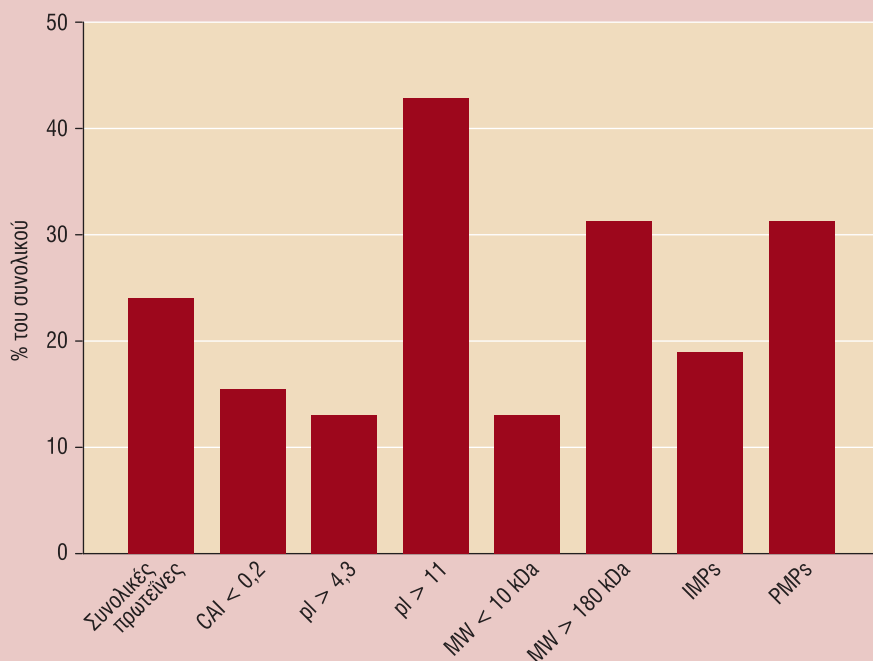
### Τα RP-RPLC και τα HILIC-RP συστήματα προσφέρουν πλεονεκτήματα για το διαχωρισμό συγκεκριμένων τύπων πεπτιδικών μιγμάτων

Τα συστήματα RP-RPLC έχουν γίνει δημοφιλή επειδή επιτυγχάνουν υψηλή ικανότητα κορυφών στον πρώτο διαχωρισμό, εξασφαλίζοντας ελάχιστη επικάλυψη ανάμεσα στα κλάσματα και η ορθογωνικότητα μπορεί να προσαρμοστεί ρυθμίζοντας τις συνθήκες του ρυθμιστικού διαλύματος ενώ χρησιμοποιείται η ίδια ρητίνη και στις δύο στήλες (για παράδειγμα, υψηλής ανάλυσης διαχωρισμοί με C<sub>18</sub> ρητίνες έχουν επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 10 στη μία στήλη κι ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 2,6 στην άλλη). Η ολική ορθογωνικότητα των συστημάτων RP-RPLC

## ΠΛΑΙΣΙΟ 2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

### Ανάλυση πρωτεώματος ζύμης με MudPIT

Το πρώτο πείραμα MudPIT περιγράφηκε από τον Michael Washburn, Dirk Wolters, και τον John Yates το 2001. Εκείνη την περίοδο, τα πιο πετυχημένα πολυδιάστατα πειράματα υγρής χρωματογραφίας μπορούσαν να αναλύσουν και να ταυτοποιήσουν περίπου 200 πρωτεΐνες ζύμης, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνών ζύμης που ταυτοποιήθηκαν από 2DGE ήταν 279 (με την τυπική υποεκπροσώπηση σπάνιων και υδροφοβικών πρωτεϊνών). Το MudPIT ήταν η πρώτη πλήρως αυτοματοποιημένη μέθοδος υψηλής απόδοσης για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών, αυτό σημαίνει ότι όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν συνεχόμενα και στη σειρά χωρίς να είναι απαραίτητη η ανθρώπινη παρέμβαση μετά το φόρτωμα το δείγματος. Οι πρωτεΐνες από κύτταρα ζύμης σε μεσαία λογαριθμική φάση πέπτονται και τα πεπτίδια διαχωρίζονται σε μία διφασική στήλη SCX/RP που τροφοδοτεί απευθείας το φασματογράφο μάζας για MS/MS ανάλυση ακολουθούμενη από ερμηνεία χρησιμοποιώντας το SEQUEST αλγόριθμο (βλέπε **Κεφάλαιο 3**). Αυτή η ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 5.540 πεπτιδίων στο φασματογράφο μάζας, που οδήγησε στην ταυτοποίηση 1.484 πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι ότι εντοπίστηκαν 131 πρωτεΐνες με τρεις ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, όπως επίσης και άλλες τυπικά υποεκπροσωπημένες πρωτεΐνες όπως χαμηλής αφθονίας μεταγραφικούς παράγοντες και κινάσες, πρωτεΐνες με ακραίες τιμές pI, ή μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 180 kDa (**Εικόνα 1**). Την εποχή εκείνη, ο -σε μεγάλο βαθμό- αντικειμενικός χαρακτήρας αυτής της πρωτεϊνικής δειγματοληπτικής μεθόδου ήταν μια πραγματική επανάσταση.



#### ΕΙΚΟΝΑ 1

**Η ευαισθησία της αυθεντικής μεθόδου MudPIT σε διάφορες ομάδες πρωτεϊνών.** Ο αριθμός των πρωτεϊνών σε κάθε ομάδα που ταυτοποιήθηκε στο πείραμα συγκρίνεται με τον συνολικό αριθμό τους στις βάσεις δεδομένων πρόβλεψης πρωτεϊνών του ζυμομυκήτα. CAI= Προσαρμοσμένος κατάλογος κωδικονίων, MW= Μοριακό βάρος, IMP= Πλήρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες με τρεις ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, PMP= Περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες.

είναι λίγο χαμηλότερη από αυτή του SCX-RPLC, αλλά ο διαχωρισμός είναι πιο αποτελεσματικός όπως επίσης και εύκολος στη διαχείριση.

Η HILIC-RPLC είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για το διαχωρισμό πολύπλοκων δειγμάτων που είναι πλούσια σε πολικά συστατικά. Ο συνδυασμός υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης είναι ιδιαίτερα συμβατές, όσον αφορά τις ανάγκες για ρυθμιστικά διαλύματα κι επίσης παρέχει μία πολύ μεγάλη πρακτική ικανότητα δημιουργίας κορυφών, όπως φαίνεται στη αμφοτεριονική διαδικασία HILIC-RPLC, η οποία προσομοιάζει της SCX-RPLC σε χαμηλό pH αλλά επιτυγχάνει καλύτερο διαχωρισμό φορτισμένων πεπτιδίων σε pH 7-8. Έχει επίσης αναπτυχθεί ένα σύστημα HILIC-RPLC βασισμένο σε πήκτωμα καρβαμυλίου του πυριτίου για τον επιλεκτικό διαχωρισμό και τον καθαρισμό φωσφοπρωτεϊνών (βλέπε **Κεφάλαιο 8**).

### Η χρωματογραφία συγγένειας συνδυάζεται με MDLC για να επιτύχει την απλοποίηση των πεπτιδικών μιγμάτων

Όπως σημειώθηκε στο **Πλαίσιο 2.1**, η πέψη πρωτεϊνών σε πεπτίδια είναι απαραίτητη για τη φασματομετρία μάζας, αλλά αυτό αυξάνει την πολυπλοκότητα ενός ήδη πολύπλοκου μίγματος πρωτεϊνών κατά 20-50-φορές. Θα συζητήσουμε στο **Κεφάλαιο 3** πως χρειάζεται να ανιχνευθούν πολλαπλά πεπτίδια ανά πρωτεΐνη για να παρέχουν σίγουρη ταυτοποίηση πρωτεϊνών, αλλά για το σκοπό αυτού του Κεφαλαίου είναι μόνο απαραίτητο να ξέρουμε ότι 3-5 πεπτίδια είναι γενικά αρκετά για να επιβεβαιώσουν ότι μία γνωστή πρωτεΐνη περιέχεται σε ένα δείγμα. Αυτό σημαίνει ότι μόνο ένα κλάσμα από τα πεπτίδια σε ένα πολύπλοκο μίγμα είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί σίγουρη ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Ένας τρόπος για να απλοποιηθεί ένα πρωτεϊνικό μίγμα χωρίς να χάσει την αντιπροσώπευση είναι να απομονωθούν αυτά τα πεπτίδια που περιέχουν σχετικά σπάνια αμινοξέα. Για παράδειγμα μόνο 10% πεπτιδίων τρυψίνης περιέχουν κατάλοιπα κυστεΐνης και μόνο 17% περιέχουν κατάλοιπα ιστιδίνης. Σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν τουλάχιστον ένα από αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα, οπότε η επιλογή πεπτιδίων που περιέχουν αυτά τα κατάλοιπα μπορούν να μειώσουν την πολυπλοκότητα κατά μια τάξη μεγέθους, χωρίς να επηρεάσουν την εκπροσώπηση στο πρωτέωμα. Η χρωματογραφία συγγένειας, ιδιαίτερα η IMAC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομονώσει πε-

πτίδια που περιέχουν ιστιδίνη, και έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες μέθοδοι επισήμανσης για να επισημάνουν τα κατάλοιπα κυστεΐνης και ταυτόχρονα να επιτρέπουν τον εμπλουτισμό της συγγένειας και επίσης τον ποσοτικό καθορισμό. Αυτές τις μεθόδους θα τις συζητήσουμε με περισσότερη λεπτομέρεια στο **Κεφάλαιο 4**.

## ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Di Palma S, Hennrich ML, Heck AJ & Mohammed S (2012) Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *J. Proteomics* 75, 3791-3813.
2. Hames BD & Rickwood D (1990) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. IRC Press.
3. Krenkova J & Foret F (2012) On-line CE/ESI/MS interfacing: recent developments and applications in proteomics. *Proteomics* 12, 2978-2990.
4. Gao M, Qi D, Zhang Petal. (2010) Development of multi-dimensional liquid chromatography and application in proteomic analysis. *Expert Rev. Proteomics* 7, 665-678.
5. Gygi SP, Rist B, Gerber SA et al. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994-999.
6. O'Farrell PH (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
7. Opiteck GJ, Ramirez SM, Jorgenson JW & Moseley MA (1998) Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Anal. Biochem.* 258, 349-361.
8. Rabilloud T (2002) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still it climbs up the mountains. *Proteomics* 2, 3-10.
9. Rabilloud T (2009) Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis* 30 (Suppl. 1), S174- S180.
10. Rabilloud T (2010) Variations on a theme: changes to electrophoretic separations that can make a difference. *J. Proteomics* 73, 1562-1572.
11. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S & Lelong C (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J. Proteomics* 73, 2064-2077.
12. Rabilloud T, Vaezzadeh AR, Potier N et al. (2009) Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 816-843.
13. Ramautar R, Heemskerk AA, Hensbergen PJ et al.

- (2012) CE-MS for proteomics: advances in interface development and application.]. *Proteomics* 75, 3814-3828.
14. Wang H & Hanash S (2003) Multi-dimensional liquid phase-based separations in proteomics.]. *Chromatogr. B* 787, 11-18.
  15. Washburn M, Wolters D & Yates J (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19,242-247.
  16. Wu Q, Yuan H, Zhang L & Zhang Y (2012) Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: from qualitative to quantitative analysis-a review. *Anal. Chim. Acta* 731, 1-10.
  17. Zhang X, Fang A, Riley CP et al. (2010) Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics- a review. *Anal. Chim. Acta* 664, 101-113.
  18. Zhao SS, Zhong X, Tie C & Chen DD (2012) Capillary electrophoresis-mass spectrometry for analysis of complex samples. *Proteomics* 12, 2991-3012.