

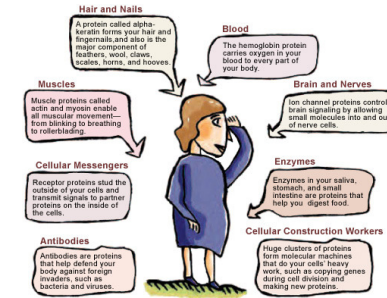
Proteini (proizvodnja, analiza, struktura, funkcija)

Celična biologija z genetiko
1. letnik UŠ LBM, Kozmetologija
šol. leto 2012/13



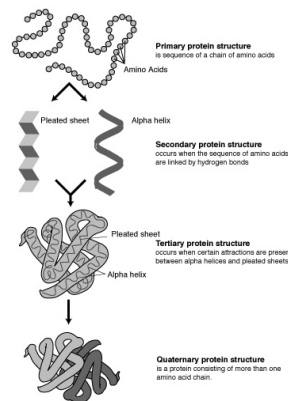
Proteini

- Proteios (Gr.) = prvega reda
- Makromolekule – polimeri aminokislin, ki so povezane s peptidno vezjo
- Tipična sesalčja celica vsebuje do 10 000 različnih proteinov, ki sodelujejo praktično v vseh procesih znotraj celice



Struktura proteinov

- Ima več stopenj:
- **Primarna** (polipeptidna veriga)
- **Sekundarna** (osnovne strukturne enote)
- **Terciarna** (3D struktura polipeptida)
- **Kvarterni** (struktura multimernega proteina, sestavljenega iz posameznih podenot)

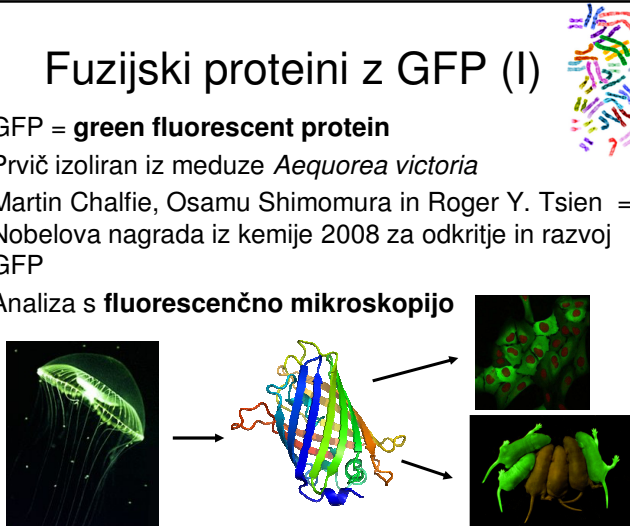


Analiza proteinov

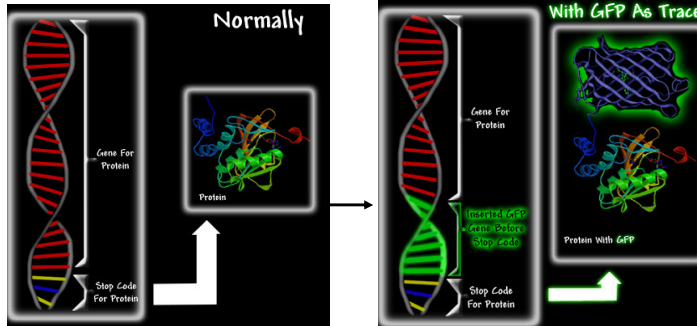
- **Tarčne proteine** lahko opazujemo v **intaktnih celičnih kulturah/tkivih/živalih**
 - Že predhodno vključimo v rekombinantno DNA, ki kodira za tarčni protein, zaporedje za sintezo označevalnega proteina (nastane **fuzijski protein**: naš tarčni protein + označevalni protein)
 - Celice označimo naknadno s **specifičnimi protitelesi**, ki imajo vezane fluorofore
- **Tarčne proteine** lahko analiziramo po **lizi celic in izolaciji proteinov** (celokupni, membranski, jedrni, citoplazemski)

Fuzijski proteini z GFP (I)

- GFP = **green fluorescent protein**
- Prvič izoliran iz meduze *Aequorea victoria*
- Martin Chalfie, Osamu Shimomura in Roger Y. Tsien = Nobelova nagrada iz kemije 2008 za odkritje in razvoj GFP
- Analiza s **fluorescenčno mikroskopijo**



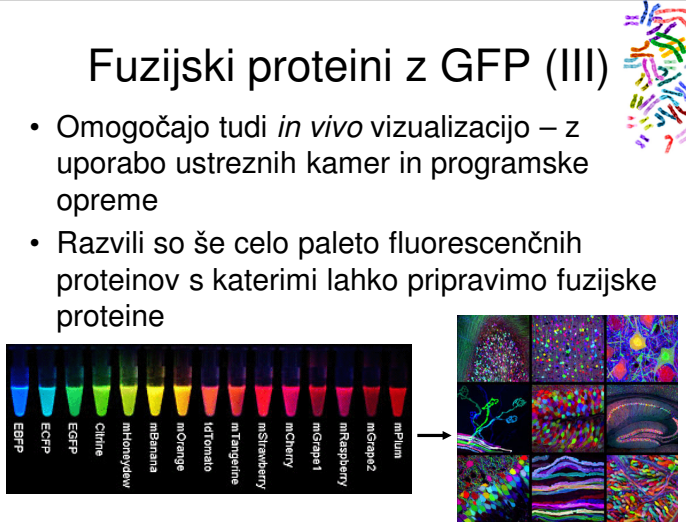
Fuzijski proteini z GFP (II)



Skupaj z želenim proteinom se izraža še fluorescenčni protein GFP = fuzijski protein

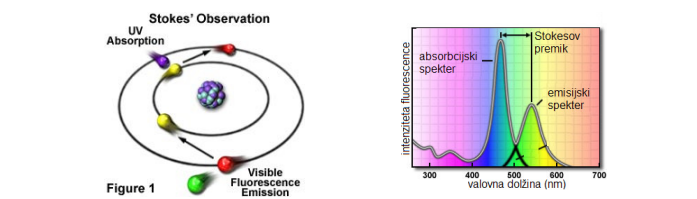
Fuzijski proteini z GFP (III)

- Omogočajo tudi *in vivo* vizualizacijo – z uporabo ustreznih kamer in programske opreme
- Razvili so še celo paleto fluorescenčnih proteinov s katerimi lahko pripravimo fuzijske proteine



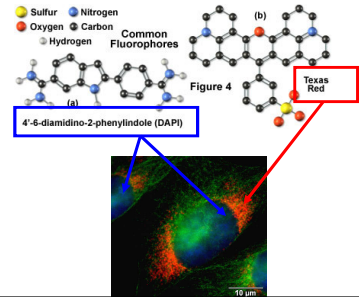
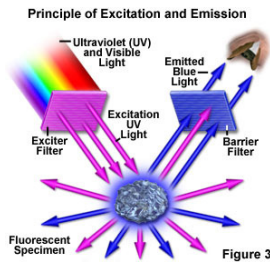
Fluorescenčna mikroskopija (I)

- **Fluorescenca** = pojav, pri katerem molekula absorbira svetlobo določene valovne dolžine in pri prehodu v osnovno stanje emitira svetlobo druge, višje valovne dolžine
- **Fluorofor** = del molekule, ki je odgovoren za fluorescenca

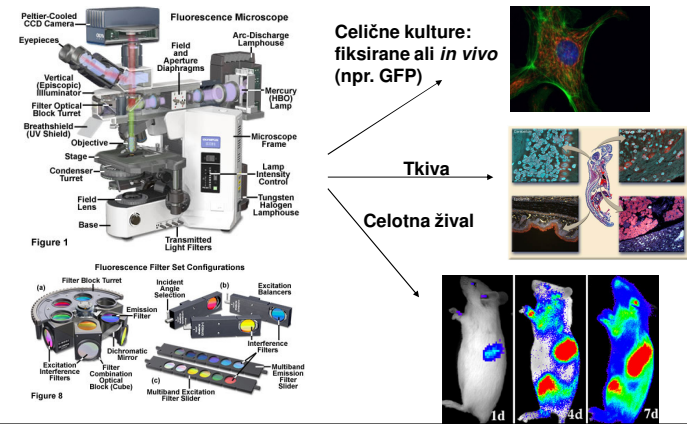


Fluorescenčna mikroskopija (II)

- Fluorescenčni mikroskop preko sistema **filtrov** omogoča obsevanje in opazovanje preparata s **svetlobo določene valovne dolžine**

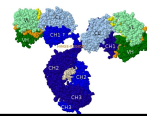
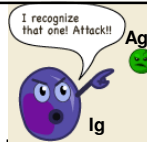


Fluorescenčna mikroskopija (III)

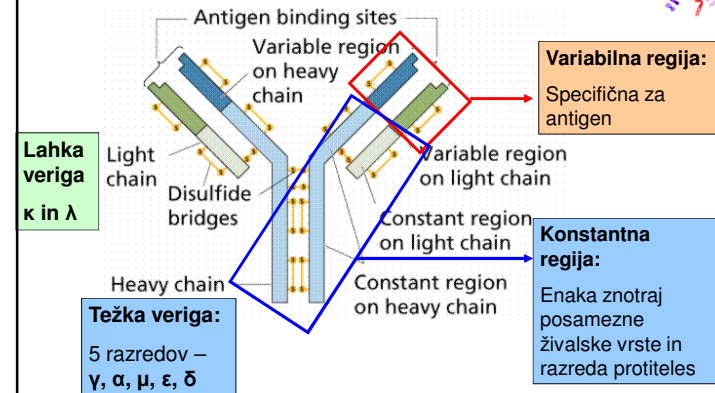


Protitelesa (imunoglobulini) (Ig)

- Del humoralnega (prodobljenega) imunskega sistema sesalcev, izločajo jih **aktivirani limfociti B**
- Glikozilirani globularni proteini
- Namenjena **prepoznavi tujih molekul** (virusnih, bakterijskih, itd.) = **antigeni (Ag)**
- Prisotna so v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih (sluz, solze, slina, urin, mleko doječe matere)

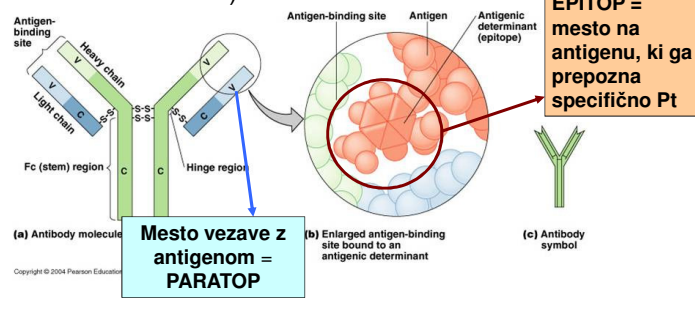


Struktura protiteles

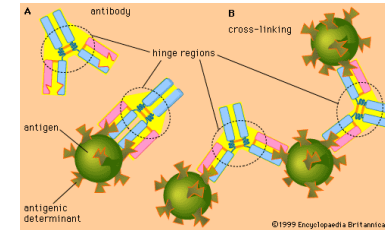


Funkcija protiteles

- Protitelesa specifično prepoznajo in se vežejo na določen del proteina (**epitop ali antigenska determinanta**)

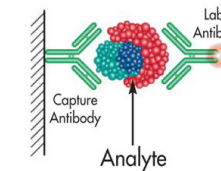


Reakcija antigen - protitelo



Reakcija antigen - protitelo

Če želimo to reakcijo uporabiti v diagnostične ali raziskovalne namene, moramo detektirati nastanek kompleksa antigen-protitelo.



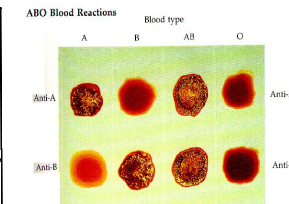
Eden izmed načinov detekcije je označevanje protiteles z različnimi signalnimi molekulami.

Uporaba protiteles

- **Raziskovalni nameni** (imunokemijske metode: RIA, ELISA, prenos Western, točkovni prenos proteinov, fluorescenčna mikroskopija, itd.) → **poliklonska protitelesa ter monoklonska protitelesa**
- **Diagnostika:** v diagnostiki raka, diagnostika avtoimunih obolenj, infekcijskih bolezni, endokrinološke preiskave, tipizacija tkiv in krvi, nosečnostni testi, itd. → **monoklonska protitelesa**
- **Za zdravljenje** → **monoklonska protitelesa**

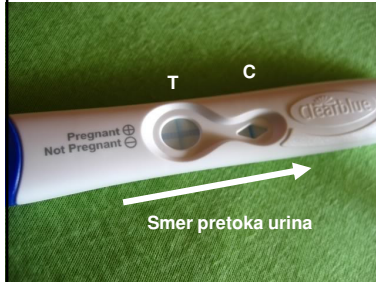
Primer uporabe protiteles: določanje krvne skupine

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type	A	B	AB	O
Antibodies present	Anti-B	Anti-A	None	Anti-A and Anti-B
Antigens present	A antigen	B antigen	A and B antigens	No antigens



http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter33/animation_quiz_5.html

Primer uporabe protiteles: Test nosečnosti



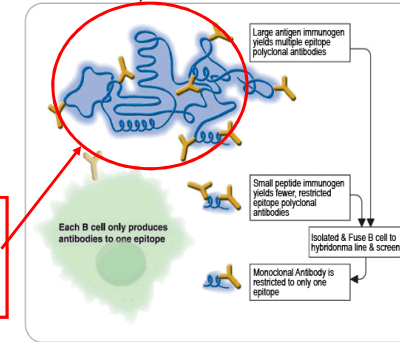
- Kontrolno polje (C) vsebuje na podlago pritrjena anti-mišja protitelesa.
- Testno polje (T) vsebuje na podlago pritrjena anti-hCG protitelesa.
- Pred T in C poljem so nanešena nepritrjena mišja anti-hCG protitelesa, ki do označena s signalno molekulo (encim).

Pridobivanje poliklonalnih protiteles



- Pridobljena so z **imunizacijo** živali (miš, zajec, koza, ovca, osel, itd.)
- živali vbrizgamo želeni antigen in iz seruma izoliramo **protitelesa proti mnogim antigenim determinantom** (epitopom)

Monoclonal/Polyclonal Antibodies

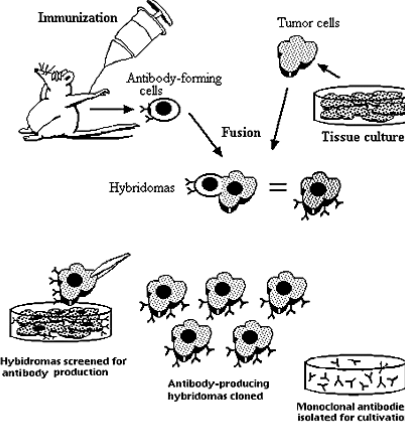
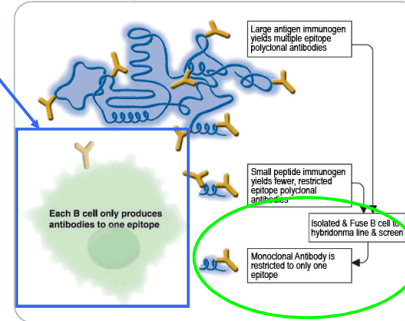


Pridobivanje monoklonalnih protiteles



- **Vsak B limfocit proizvaja le eno vrsto protiteles** – proti točno določenemu epitopu
- Limfociti B, ki se namnožijo iz enega kлона proizvajajo **monoklonska Pt**
- *In vitro* jih pridobivamo v **hibridomih** (fuzija enega kлона limfocita B z nesmrtnimi celičnimi linijami)

Monoclonal/Polyclonal Antibodies



Pridobivanje monoklonalnih protiteles

Monoclonal Antibody Production

http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter32/animation_quiz_3.html

Detekcija proteinov s protitelesi (I)

Direktna vezava
označenega
protitelesa na
antigen

Indirektna vezava:
najprej se veže
neoznačeno
"primarno" protitelo,
sledi vezava
označenega
"sekundarnega"
protitelesa

Fluorescent staining tag

Cell

Fluorescent staining tag

Cell

Detekcija proteinov s protitelesi (II)

- Načini označevanja protiteles:
 - **direktno** (neposredno) s fluorescenčnimi barvili
 - **indirektno** (posredno) z drugimi molekulami (biotin, hrenova peroksidaza, alkalna fosfataza) → šele po dodatku druge molekule (substrata) poteče reakcija, ki jo lahko kvantificiramo

Direktno:

Protitelo, konjugirano s fluorescenčnim barvilom FITC

Indirektno:

Protitelo, konjugirano s HRP – hrenovo peroksidazo

Kemiluminiscenca

- Kot reagent se največkrat uporablja **LUMINOL**
- Reagira s **hrenovo peroksidazo (HRP; horseradish peroxidase)**, pri čemer se sprošča svetloba
- Reagira tudi z drugimi peroksidazami: npr. hemoglobin iz krvi

H_2O_2 Alkaline conditions

luminol → Unstable Intermediate → Chemiluminescence

Haem ali hrenova peroksidaza

Fluorescenca vs. kemiluminiscenca

Principle of Excitation and Emission

Figure 3

Fluorescenca: fluorofor **vzbudimo** (ekscitiramo) s svetlobo določene valovne dolžine – ko se vrne v osnovno energetska stanje, odda svetlobo druge valovne dolžine

Kemiluminiscenca: oddajanje svetlobe pri kemijski reakciji

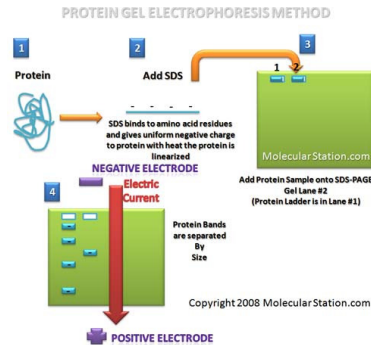
3-Aminophthalate* (3-APA*)

Prenos western (western blot) (I)

Proteine ločimo po velikosti in s protitelesi detektiramo želeni protein.

Potek:

1. Izolacija proteinov iz vzorca (kri, serum, tkivo, celična kultura, itd.)
2. Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu v denaturirajočih pogojih (**proteini se ločijo po velikosti**)



Prenos western (western blot) (II)

3. Proteine iz gela prenesemo na membrano (npr. nitrocelulozno) s pomočjo električnega toka
4. Tarčne proteine označimo z ustreznimi protitelesi (običajno indirektno: primarna Pt + označena sekundarna Pt)
5. Običajno detektiramo z dodatkom kemiluminiscenčnega substrata (izpostavimo filmu ali posnamemo s kamero)

