



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Pull-down -määrittäminen

Mette Kärppä

Kemia (Detektioteknologian tutkimusryhmä)

Kandidatutkielma

Laajuus: 6 op

22.4.2025

Turku

Turun yliopiston laatuvarmistuksen mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Kandidatutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Mette Kärppä

Otsikko: Pull-down -määritys

Ohjaaja(t): Harri Härmä, Kari Kopra

Sivumäärä: 20 sivua

Päivämäärä: 22.4.2025

Biologisten prosessien ymmärtämiseen, uusien lääkkeiden suunnitteluun ja aineiden fysikaalisten ominaisuuksien selittämiseen tarvitaan molekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimista. Vuorovaikutusten tutkimiseen on kehitetty monia erilaisia menetelmiä ja yksi yleisimmistä on pull-down -määritys. Määritys on käytössä tutkimustyökaluna vuorovaikutusten identifioinnissa, sekä esimerkiksi proteiinkohteiden puhdistamisessa.

Pull-down -määritys on yleisimmin käytössä proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimisessa, mutta sitä voidaan käyttää myös esimerkiksi vasta-aineiden, peptidien, nukleiinihappojen ja pienten molekyylien vuorovaikutusten tutkimisessa. Määrityksessä käytettävät menetelmät vaihtelevat tutkimuskohteen mukaan, mutta pääpiirteittäin se koostuu kiinteälle alustalle kiinnitetystä sitojamolekyylistä, kohdemolekyylistä, pesuvaiheita, sekä analyttisestä mittaussuunnitelmasta. Määrityksessä sitojamolekyyli (esimerkiksi vasta-aine tai nukleiinihappo) immobilisoidaan kiinteälle alustalle (palleille tai kuoppalevyille). Immobilisoitu sitojamolekyyli inkuboidaan näytteen kanssa. Sitoutumattomat ja ei-halutut komponentit pestään pois pesuvaiheilla, jolloin jäljelle jäävät vain sitojamolekyyli ja siihen sitoutuneet kohdemolekyylit. Molekyylit eluoidaan kiinteästä alustasta ja analysoidaan esimerkiksi luminesenssillä tai massaspektrometrillä.

Proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimusala on monitieteinen ja se kattaa kemian lisäksi biologian ja fysiikan näkökulmat. Vaikka pull-down -määritys on yksi käytetyimmistä menetelmistä proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimisessa, se ei kuitenkaan yksin riitä niiden yksityiskohtaiseen tarkasteluun, vaan vaatii monien eri menetelmien ja tieteenalojen yhdistämisen.

Avainsanat: Kohdemolekyyli, proteiinien väliset vuorovaikutukset, pull-down -määritys, sitojamolekyyli

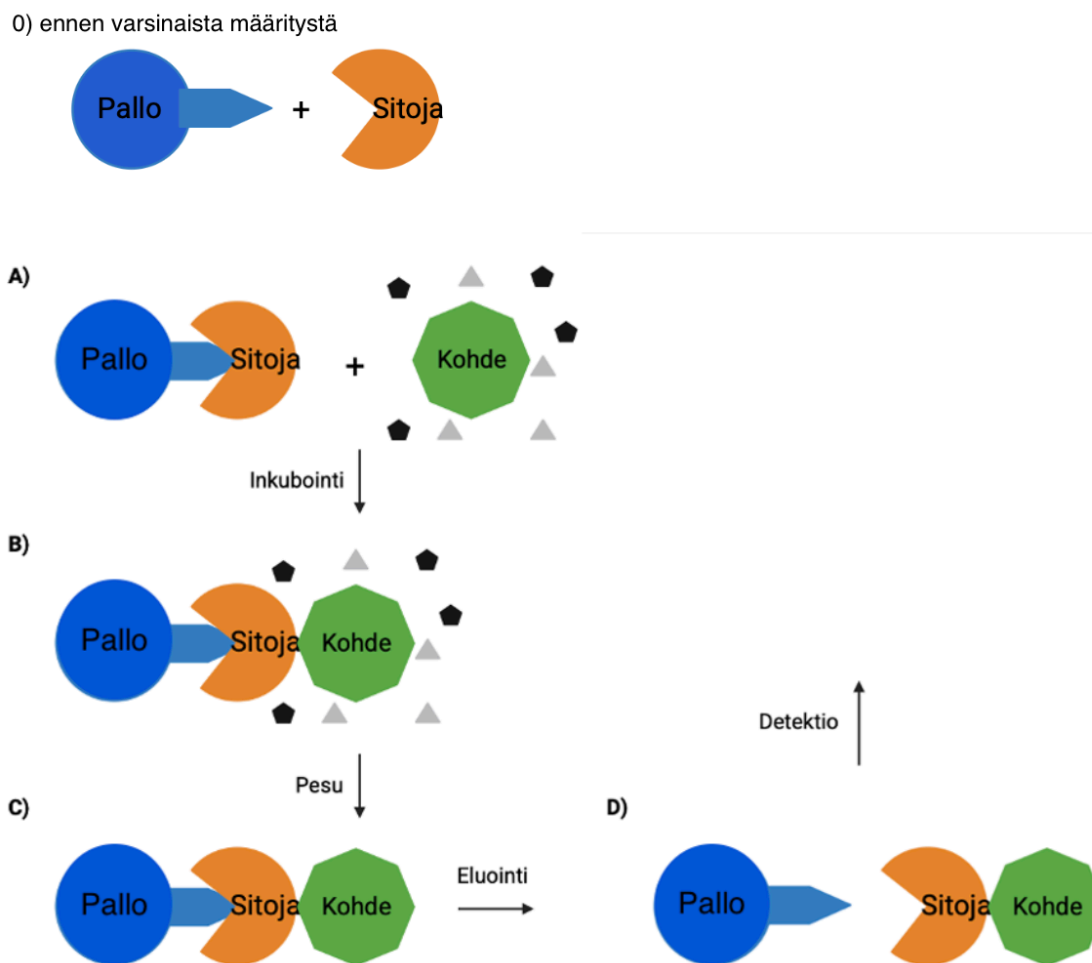
Sisällysluettelo

1	<i>Johdanto</i>	4
2	<i>Pull-down -menetelmät</i>	7
2.1	Sitojamolekyylit	7
2.1.1	Kiinteät alustat: Agaroosi -ja magneettipallot	8
2.1.2	Sitojaproteiini – Vasta-aine	9
2.1.3	Peptidin käyttö sitojana	10
2.2	Pesumenetelmät	12
2.3	Kohdemolekyylit	12
2.3.1	Kohdeproteiinit	12
2.3.2	Nukleiinihapot kohteena.....	13
2.4	Analyttiset mittausmenetelmät	15
2.4.1	Luminesenssipohjaiset analysointimenetelmät.....	15
2.4.2	Mikrotiitterilevymääritys	17
3	<i>Pull-down -määritys tutkimuksessa ja lääkekehityksessä</i>	18
4	<i>Johtopäätökset</i>	19
5	<i>Lähteet</i>	20

1 Johdanto

Pull-down -määritys on *in vitro* -menetelmä, jota käytetään kahden tai useamman molekyylin välisen fyysisen vuorovaikutuksen määrittämiseen. Usein vuorovaikutuksia tutkitaan proteiinien välillä, mutta määrittystä voidaan käyttää myös esimerkiksi ligandien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Pull-down -määritykset ovat hyödyllisiä sekä muiden tutkimustekniikoiden, esimerkiksi ko-immunisaation, ennustaman vuorovaikutuksen läsnäolon varmistamiseen, että alustavana seulontamäärityksenä aiemmin tuntemattomien molekyylien välisten vuorovaikutusten tunnistamiseen.¹⁴ Pull-down -määritystekniikka on laajalti käytetty kokeellinen menetelmä ja se auttaa tutkijoita esimerkiksi proteiinien vuorovaikutusverkoston tulkitsemisen lisäksi selvittämään solujen signalointireittien molekyylimekanismeja, selvittämään sairauksien esiintymistä ja etenemisen molekyyliä pohjaa, sekä tunnistamaan uusia lääkekohteita.¹⁵

Pull-down -määrityksen peruseriaatteena on sitojamolekyylin immobilisointi kiinteälle alustalle, esimerkiksi palloille, jota seuraa inkubointi lyaatin tai puhdistetun näytteen kanssa, joka sisältää vuorovaikutuksessa olevia molekyyliä. Vuorovaikutuksessa olevat molekyylit kalastetaan sitten yhdessä sitojamolekyylin kanssa käyttämällä spesifisiä affiniteettivuorovaikutuksia, kuten antigeeni-vasta-aine -vuorovaikutuksia. Tämän jälkeen pull-down -molekyylit havaitaan ja analysoidaan käyttämällä erilaisia menetelmiä, kuten Western-blot:tausta tai massaspektrometriä¹⁵ (kuva 1).



Kuva 1. Pull-down -määrittelyn peruseriaate. 0) Ennen varsinaista pull-down -määrittystä sitojamolekyylille immobilisoidaan kiinteään alustaan, tässä tapauksena palloon (esimerkiksi agarosii- tai magneettipalloon). A) Immobilisoitu sitojamolekyylillä viedään kohdemolekyylejä sisältävään näytteeseen. B) Sitojamolekyylillä inkuboidaan kohdemolekyylin kanssa, jolloin kohdemolekyylit sitoutuvat sitojaan. C) Sitoutumattomat ja ei-halutut komponentit pestään pois, jonka jälkeen jäljelle jää vain immobilisoitu sitoja ja siihen sidottu kohde. D) Kiinteä alusta eluoidaan pois, jolloin sitojamolekyylit ja kohdemolekyylit saadaan detektoidua analysointimenetelmällä.

Sitojamolekyyliksi valitaan molekyylit, jotka tiedetään vuorovaikuttavan näytteen kanssa. Sitojamolekyylin voidaan konjugoida esimerkiksi biotiini helppoa havaitsemista ja immobilisointia varten, mutta tämä ei ole pakollista. Sitojamolekyylit immobilisoidaan kiinteälle alustalle, kuten agarosii- tai magneettipalloille, tai suoraan mikrotiitterilevyille. Tämä voidaan suorittaa kovalenttisilla, ei-kovalenttisilla tai affiniteettivuorovaikutuksilla sitojasta ja kiinteästä alustasta riippuen. Immobilisoitua sitojamolekyylillä inkuboidaan valmistetun näytteen, kuten solulyysaatin kanssa. Tässä vaiheessa näytteessä olevat vuorovaikutuksessa olevat molekyylit sitoutuvat sitojaan spesifisesti.¹⁵ Yksi pull-down -määrittelyn tärkeistä vaiheista ovat pesut, sillä niillä epäspesifisesti sitoutuvat

molekyylit ja komponentit saadaan poistettua näytteestä. Inkuboinnin jälkeen kiinteä alusta pestään huolellisesti ylimääräisten komponenttien poistamiseksi säilyttäen samalla sitojanmolekyylin ja sen vuorovaikutuskumppanien väliset spesifiset vuorovaikutukset. Vuorovaikutuksessa olevat molekyylit eluoidaan kiinteästä alustasta. Tämä vaihe vapauttaa vuorovaikutuksessa olevat molekyylit säilyttäen samalla niiden alkuperäisen rakenteen ja aktiivisuuden.¹⁵ Koko kompleksi voidaan eluoida alustasta käyttämällä esimerkiksi puskuria.¹⁴ Irrotetut molekyylit havaitaan ja analysoidaan erilaisilla menetelmillä, kuten Western blot:illa tai luminesenssikuvantamisella. Näin vuorovaikutuksessa olevat molekyylit tunnistetaan ja karakterisoidaan, sekä mahdollistetaan niiden sitoutumisaffiniteetin ja spesifisyyden kvalitatiivinen analyysi.¹⁵

Vaikka pull-down -määritys on yleisimmin käytössä proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimisessa, voidaan menetelmää käyttää myös nukleiinihappojen ja pienmolekyylien tutkimiseen. Sitojamolekyylit voi olla proteiinien lisäksi esimerkiksi peptidejä tai pieniä molekyyliä, jotka on suunniteltu sitoutumaan spesifisesti kohdemolekyyliin tai sen kanssa vuorovaikutuksessa oleviin proteiineihin.¹⁵

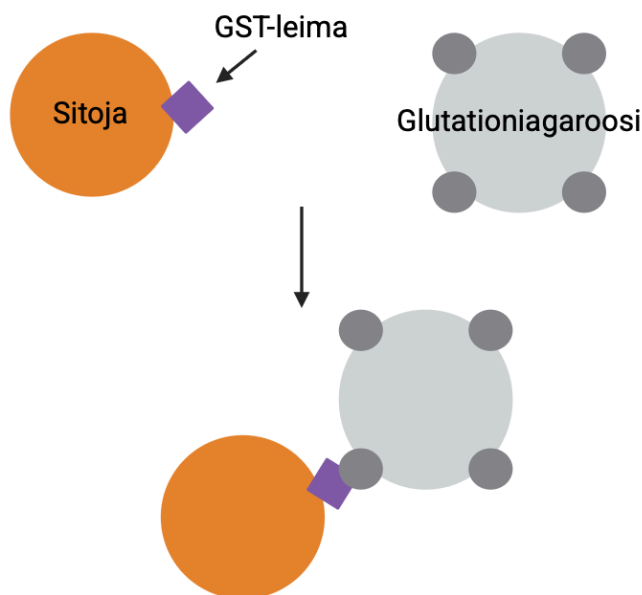
2 Pull-down -menetelmät

Pull-down -määritys koostuu osista, jotka vaihtelevat sitä käyttävien tutkimusten mukaan. Esimerkiksi pull-down -määritys on olennaisesti käytössä pienimuotoisena affiniteettipuhdistuksena,⁴ mutta myös tutkittavien kohteiden välisten vuorovaikutusten ymmärtämisessä. Se ei ole määrityksestä toiseen samanlainen, vaan menetelmät valitaan määrityksen käyttökohteiden mukaan.

Vaikka pull-down -määrityksestä on eri versioita, koostuvat ne silti samoista osasista. Pull-down -määritys koostuu sitojamolekyylistä, kohdemolekyylistä, pesuista ja analyttisistä mittaumenetelmistä, oli tavoitteena sitten kohteen puhdistus tai molekyylien välisten vuorovaikutusten havaitseminen. Tässä osiossa käydään läpi erilaisia menetelmävaihtoehtoja määrityksen eri osille, sekä niiden käyttökohteita.

2.1 Sitojamolekyylit

Sitojamolekyyli on tärkeä osa pull-down -määritystä ja sitä käytetään kohdemolekyylin ja sen sitoutumiskumppanien kalastamiseen näytteestä. Sitojan valinta on tärkeää, sillä sen on muodostettava spesifisiä vuorovaikutuksia kohteen kanssa. Sitoja voi olla proteiini, peptidi, pieni molekyyli tai aptameeri, joka immobilisoidaan kiinteälle alustalle. Sitojaan voidaan lisätä konjugaatti, jos sen immobilisointi ei muuten onnistu. Yleisiä konjugaatteja ovat GST (glutathioni-S-transferaasi), His (polyhistidiini) ja biotiini (kuva 2). Biotinikonjugaatin ansiosta sitoja saadaan immobilisoitua avidiini- tai streptavidinipalloihin, GST-konjugaatti glutatiooniin ja His-konjugaatti nikkelikelaattiin. Sitojan konjugoiminen ei kuitenkaan ole pakollista ja monissa tapauksissa sitojamolekyyli ei sisällä konjugaattia.



Kuva 2. GST-konjugoitu sitojamolekyylä ja kiinteänä alustana toimiva agaroosipallo, johon on kovalenttisesti sidottu glutationimolekyylejä. GST-konjugaatti sitoutuu suurella affiniteetillä agaroosipallon glutationiin, jolloin sitoja kiinnittyy kiinteään alustaan.

Agaroosi- ja magneettipallot ovat usein käytettyjä kiinteitä alustoja sitojamolekyyleille. Agaroosipalloilla on yleensä suurempi sitoutumiskyky huokoisen pintansa vuoksi. Magneettipallot ovat helppokäyttöisempiä, mutta sitoutuvat vähemmän spesifisesti.⁸ Kohdemolekyylin immobilisointi kiinteälle alustalle on välttämätöntä kohdemolekyylikompleksin saostamisessa. Pallojen lisäksi kiinteänä alustana voidaan käyttää myös mikroitiitterilevyä.

2.1.1 Kiinteät alustat: Agaroosi -ja magneettipallot

Ennen varsinaista pull-down -määritystä sitojamolekyylä immobilisoidaan kiinteälle alustalle. Tämä mahdollistaa sitoutuneiden komponenttien eristämisen muusta näytteestä, sillä sitojan ja kohteen ollessa kiinni fyysisellä alustalla ne eivät huuhtoudu pois pesuvaiheissa. Näin molekyylikompleksi pysyy kasassa koko määrityksen ajan.

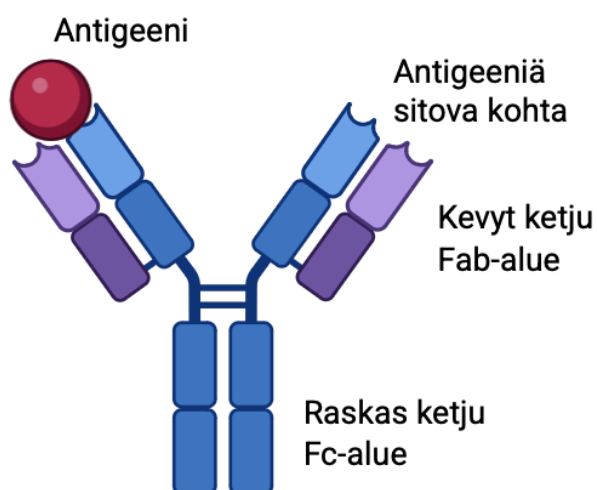
Pallojen käyttö kiinteänä alustana on usein käytetty menetelmä pull-down -määrityksessä. Pallojen käyttö on helppoa ja nopeaa, sillä pesut voidaan suorittaa nopeasti esimerkiksi sentrifugoimalla tai magneetilla. Toistettavat pesut onnistuvat pallojen liukenemattomuuden ja kestävyuden ansiosta, mikä mahdollistaa ei-haluttujen komponenttien tehokkaan poistamisen.

Yleisimmin käytetyt pallot ovat agaroosi- ja magneettipallot. Agaroosipallot ovat huokoisia polysakkarideistä muodostuvia geelihiukkasia ja niiden koko vaihtelee 50-150 μm .⁸ Magneettiset pallot ovat huomattavasti agaroosipalloja pienempiä (halkaisija 1-4 μm) ja sisältävät rautaytimen.⁸ Huokoisen rakenteensa ansiosta agaroosipalloilla on suurempi sitoutumispinta-ala magneettipalloihin

verrattuna ja ne ovat edullisempia. Heikkojen vuorovaikutusten havaitsemisessa suositaan kuitenkin magneettipalloja, sillä pesuvaiheisiin käytetään sentrifugin sijaan magneettia. Sentrifugointi voi rikkoa heikot vuorovaikutussidokset ja aiheuttaa kohdemolekyylin irtoamisen sitojusta.⁸

2.1.2 Sitojaproteiini – Vasta-aine

Vasta-aineet ovat hyvin yleisesti käytettyjä proteiineja pull-down -määrityksessä. Vasta-aine, immunoglobuliini, on suuri glykoproteiini, jota immuunijärjestelmä tuottaa tunnistakseen ja neutraloidakseen antigeenejä, kuten bakteereita ja viruksia. Vasta-aine koostuu kahdesta kevyestä ketjusta ja kahdesta raskaasta ketjusta, sekä disulfididoksista.² Vasta-aineet jaetaan isotyyppisiin niiden raskasketjujen mukaan ja ihmisessä erilaisia vasta-ainetyyppejä löytyy IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Jokaisessa vasta-ainetyypissä on kaksi Fab-aluetta, jotka sisältävät antigeeniä sitovat alueet, sekä yksi Fc-alue, joka säätelee biologisia toimintoja (kuva 3).

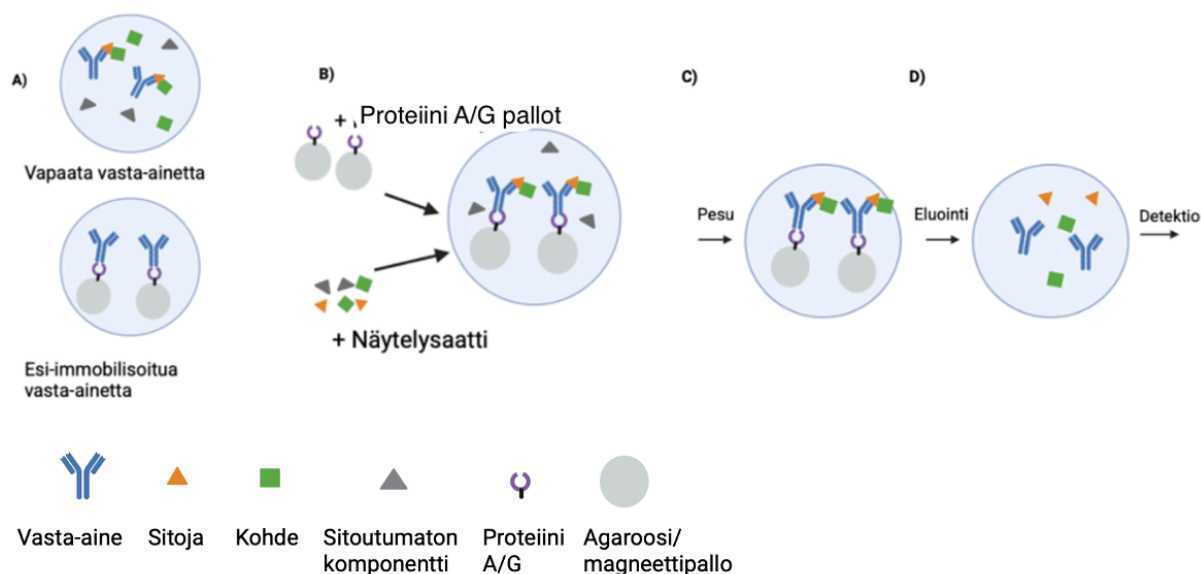


Kuva 3. Vasta-aineen rakenne. Rakenteessa on kaksi kevyttä ketjua, jotka sisältävät antigeeniä sitovat Fab-alueet ja kaksi raskasta ketjua, joissa sijaitsee biologisia toimintoja säätelevä Fc-alue.

Vasta-aine pull-down -määritys perustuu antigeenin ja vasta-aineen väliseen sitoutumisaffiniteettiin.⁶ Valitaan tutkittavalle proteiinille spesifi vasta-aine ja sidotaan se joko proteiini A:lla tai proteiini G:llä päällystettyihin palloihin.⁷ Proteiinit A ja G ovat peräisin bakteereista ja sitoutuvat vasta-aineiden Fc-alueen raskaisiin ketjuihin. Näin Fab-alue jää tyhjäksi ja suuntautuu pois päin palloista.⁸ Proteiini A ja proteiini G sitoutuvat eri vasta-aineisiin; proteiini A sitoutuu pääosin ihmisen ja kaninin vasta-aineisiin ja proteiini G hiiren vasta-aineisiin. Jos vasta-ainelajista ollaan epävarmoja, voidaan käyttää proteiini A/G -seosta.

Ko-immunisaustus on suosittu vasta-aine pull-down -menetelmä.⁶ Siinä tavoitteena on saostaa proteiineja, jotka ovat sitoutuneet vasta-aineen kohdeantigeeniin. Nämä proteiinit voivat

sisältää esimerkiksi aktivaattoreita, inhibiittoreita ja kinaaseja.⁸ Ko-immunisaostukseen on kaksi standardimenetelmää; esi-immobilisoitua vasta-ainetta sisältävä menetelmä ja vapaata vasta-ainetta sisältävä menetelmä. Esi-immobilisoidussa menetelmässä kohdeantigeenille spesifi vasta-aine immobilisoidaan ensin pallopohjaiselle alustalle, jonka jälkeen se lisätään näytteeseen antigeenin sitomiseksi. Vapaata vasta-ainetta sisältävässä menetelmässä vasta-aine lisätään ensin näytteeseen, jolloin antigeeni-vasta-ainekompleksi muodostuu. Tämän jälkeen pallot lisätään immuunikompleksin sitomiseksi⁸ (kuva 4).



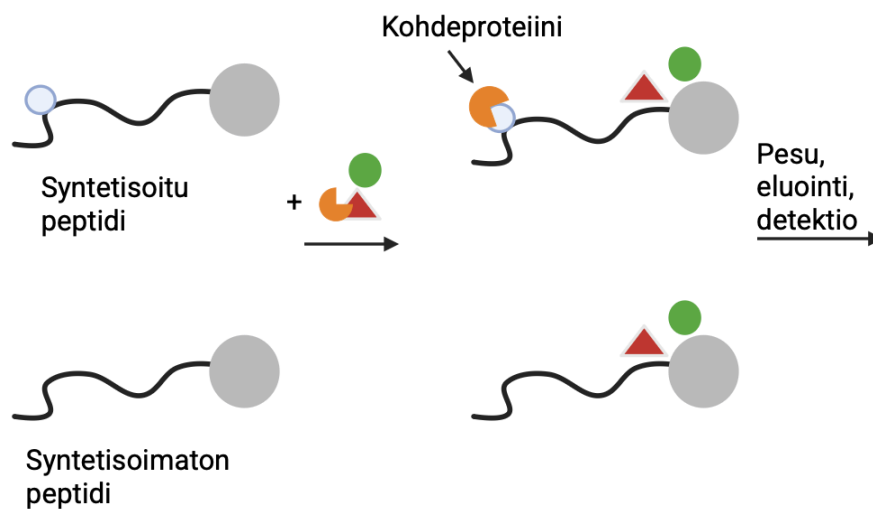
Kuva 4. Ko-immunisaostus vapaata vasta-ainetta sisältävällä menetelmällä ja esi-immobilisoidulla menetelmällä. A) Vapaata vasta-ainetta sisältävässä menetelmässä vasta-aine lisätään ensin näytelysaattiin, jolloin antigeeni-vasta-aine -kompleksi muodostuu. Esi-immobilisoidussa menetelmässä vasta-aine immobilisoidaan ensin proteiini A:lla tai G:llä päällystetyille palloille. Proteiinit A ja G ovat bakteereista peräisin ja ne sitoutuvat vasta-aineiden Fc-alueen raskaisiin ketjuihin. B) Vapaaseen vasta-aineeseen lisätään pallot immuunikompleksin luomiseksi. Esi-immobilisoituun vasta-aineeseen lisätään näytelysaatti, jolloin antigeeni-vasta-aine -kompleksi muodostuu. C) Sitoutumattomat komponentit pestään pois. D) Antigeeni-vasta-aine -kompleksi eluoidaan irti palloista ja näyte detektoidaan.

2.1.3 Peptidin käyttö sitojana

Peptidien käyttö sitojana pull-down -määrityksessä toimii samalla perusidealla kuin sitojaproteiinit. Peptidit immobilisoidaan kiinteälle alustalle, jonka jälkeen ne lisätään näytteeseen. Näytteessä mahdolliset peptidiin sitoutuvat proteiinit kiinnittyvät siihen ja epäspesifisesti sitoutuneet proteiinit poistetaan pesuvaiheiden sarjalla.²⁵ Etuna niiden käytössä on kuitenkin mahdollisuus syntetisoida

peptidit kemiallisesti ja näin sisällyttää esimerkiksi translaation jälkeisiä modifikaatioita (PTM) pull-down -reaktioon.⁹

Peptidit ovat biomolekyylejä, jotka koostuvat aminohappojen monomeereistä ja peptidisidoksista. Näiden biomolekyylien aminohappokoostumus määrää niiden kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet.¹¹ Peptidit vuorovaikuttavat erilaisten proteiinien kanssa ja osallistuvat moniin soluprosesseihin, kuten ohjelmoituun solukuolemaan, geenien ilmentymisen säätelyyn ja signaalinsiirtoon.¹² Peptidien sitoutumiskumppanien tunnistamiseksi peptidejä käytetään sitojana affiniteettipohjaisessa pull-down -määrityksessä, jolloin peptidin sitoutumiskumppani saadaan havaittua suoraan. Proteiinien välisten vuorovaikutusten havaitsemiseen ja varmentamiseen käytetään kemiallisesti syntetisoituja peptidejä. Peptidejä, jotka vastaavat tiettyjä alueita proteiinien välisissä vuorovaikutuksissa syntetisoida, jolloin analysoitavien näytteiden proteiinit sitoutuvat sitojapeptidiin¹⁰ (kuva 5).



Kuva 5. Pull-down -määritys syntetisoidulla ja syntetisoimattomalla peptidillä. Syntetisoitu peptidi sisältää kohdeproteiinia sitovan alueen, jolloin proteiini kiinnittyy siihen.

Yksi yleisin tapa syntetisoida peptidi on kovalentisesti konjugoida se biotiinilla. Biotiini sitoutuu suurella affiniteetillä ($K_d \sim 10^{-15}$ M) avidiniin tai streptavidiniin.³⁴ Vahva ja spesifinen biotiini-streptavidiniin -vuorovaikutus mahdollistaa peptidien immobilisoinnin ja kiinnittymisen kiinteille alustoille.¹³ Peptidiketjuissa on N- ja C-terminaalit, ja biotiini voidaan liittää kumpaan vain.¹⁰ Biotinyloidut peptidit immobilisoidaan avidiini-konjukoituihin palleihin ja näyte inkuboidaan niiden kanssa. Sitoutumattomien proteiinien pesun jälkeen peptideihin sitoutuneet proteiinit eluoidaan ja analysoidaan esimerkiksi SDS-PAGE:lla.¹⁰

2.2 Pesumenetelmät

Pull-down -määritykseen kuuluvat pesut ovat tärkeässä roolissa määrityksen eri komponenttien valmistelussa ja varsinkin lopullisen kohdemolekyylikompleksin eristyksessä. Pesujen avulla määrityksen näytteet pyritään puhdistamaan niin, että sitoutumattomat ja ei-halutut komponentit saadaan poistettua näytteestä.¹ Oikean pesupuskurin käyttäminen on tärkeää, sillä epäspesifisesti sitoutuneet komponentit on saatava poistettua säilyttäen silti kohdemolekyylin vuorovaikutukset, erityisesti jos ne ovat suhteellisen heikkoja.⁸

Pesupuskuriyhdistelmä voi olla esimerkiksi peruspuskuri, suola ja detergentti. Peruspuskuri on esimerkiksi PBS tai HEPES-pohjainen, tyypillisesti pH 7.4-8.0 ja sen tarkoituksena on säilyttää fysiologinen pH ja ionivahvuus. Suolalla taas tarkoitetaan NaCl tai KCl, joiden pitoisuus on yleensä välillä 150-500 mM. Suolalla pyritään lisäämään ionivahvuutta, jolloin epäspesifiset sidokset vähenevät. Pesupuskuri voi olla myös detergentti, kuten Titon X-100. Niiden pitoisuus on tyypillisesti 0,05-1%, ja niillä pyritään poistamaan hydrofobisia ei-spesifisiä sidoksia.³⁰

Pesujen määrää ja suolapitoisuutta voidaan säätää vuorovaikutusten vahvuuksien mukaan. Esimerkiksi heikoille ja todennäköisille vuorovaikutuksille riittävät miedot pesut ja vahvoille tai epäspesifisille vuorovaikutuksille voimakkaat pesut. Myös pesujen määrä vaihtelee käytettävän määrityksen mukaan, mutta tyypillisesti 3-5 pesua on riittävä.³⁰

2.3 Kohdemolekyylit

Riippuen siitä mitä tutkitaan, kohdemolekyylit voivat olla proteiineja, nukleiinihappoja tai jopa pieniä molekyyliä, kuten lääkkeitä. Kohdemolekyylit sitoutuu immobilisoituun sitojamolekyyliin, kun sitoja inkuboidaan kohdemolekyylejä sisältävässä näytteessä. Kohdemolekyylit on usein tutkimuksen kohteena ja tavoitteena on yleensä tutkia kohdeproteiinin vuorovaikutuksia sitojamolekyylin ja muiden näytteessä olevien molekyylien kanssa. Kohdemolekyylin lähde riippuu siitä, halutaanko vahvistaa jo valmiiksi epäiltyjä vuorovaikutuksia vai tunnistetaanko tuntematonta vuorovaikutusta.²⁹ Yleisimmän kohde on kuitenkin peräisin solulyysaatista, kudoksenäytteestä tai *in vitro* -ilmennetyistä proteiineista.

Tässä osiossa käydään läpi kohdeproteiinit, mitkä ovat yleisimmän käytetty ryhmä pull-down -määrityksessä. Lisäksi tarkastellaan nukleiinihappoja kohteena. Nukleiinihappojen tapauksessa käytetään usein DNA tai RNA pull-down -määritystä, joissa DNA tai RNA toimii sitojana ja kohteena ovat niihin sitoutuvat proteiinit, jotka tunnistavat jonkin tietyn sekvenssin.

2.3.1 Kohdeproteiinit

Proteiinit ovat yleisin kohdemolekyyliryhmä pull-down -määrityksessä, sillä tavoitteena on usein proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen. Proteiinia käytetään kohteena usein vahvistamaan epäiltyjä proteiini-proteiini -vuorovaikutuksia. Sitä voidaan käyttää myös tuntemattomien

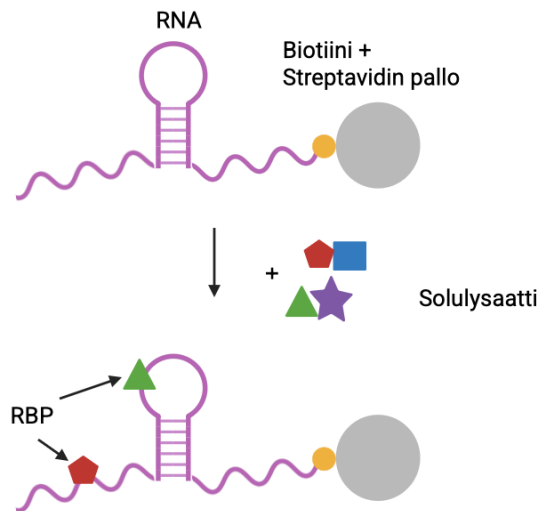
vuorovaikutusten varmentamiseen, jotka on tunnistettu jo muilla menetelmillä.²⁸ Kohdeproteiinit voivat olla esimerkiksi transkriptiotekijöiden säätelyproteiineja, signaalintiproteiineja, rakenneproteiineja tai entsyymien säätelijöitä.

Proteiinit ovat orgaanisia molekyyliä, joita esiintyy runsaasti elävissä organismeissa, ja ne osallistuvat moniin toimintoihin solussa, kuten kuljetukseen, varastointiin, membraanin koostumukseen ja enstymaattiseen toimintaan.⁵ Ne kontrolloivat kaikkia solun biologisia järjestelmiä, ja vaikka monet proteiinit toimivat itsenäisesti, valtaosa proteiineista on vuorovaikutuksessa muiden proteiinien kanssa biologisen aktiivisuuden saavuttamiseksi.²⁹

Proteiinien rakenteen ja toiminnan ymmärtämiseksi on määritettävä, mitkä proteiinit ovat vuorovaikutuksessa keskenään ja pull-down -määrityksestä on tullut yksi tärkeistä työkaluista näiden vuorovaikutusten tunnistamiseen.¹⁴ Pull-down -määrityksessä sitojamolekyyliä käytetään puhdistamaan kaikki lysaatissa olevat proteiinit, jotka sitoutuvat sitojaan.²⁹ Määrityksessä immobilisoitu sitoja inkuboidaan potentiaalisia vuorovaikuttavia proteiineja sisältävässä lysaatissa ja pesuvaiheiden jälkeen näyte eluoidaan ja analysoidaan mahdollisten vuorovaikutusten havaitsemiseksi.¹⁵

2.3.2 Nukleiinihapot kohteena

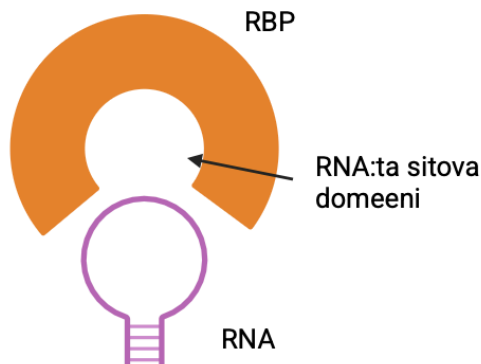
Transkriptio, DNA:n rekombinaatio, DNA:n replikaatio ja modifikaatio ovat kaikki prosesseja, jotka vaativat proteiinien vuorovaikutusta nukleiinihappojen kanssa.²⁵ Nukleiinihappojen vuorovaikutuksia tutkiessa käytetään usein DNA tai RNA pull-down -määritystä. DNA:n pull-down -määrityksessä kohteena on yleensä proteiini tai proteiini-kompleksi, jonka sitoutumista tiettyyn DNA-sekvenssiin tutkitaan. Määrityksessä DNA toimii sitojana ja sitoo vuorovaikutuksessa olevat proteiinit esimerkiksi solu- tai tumalysaatista.²⁶ RNA:n pull-down -määritys toimii samaan tapaan kuin DNA:n. RNA toimii määrityksessä sitojana ja kohteena ovat yleensä RNA:ta sitovat proteiinit (kuva 6).



Kuva 6. Biotiinilla Streptavidin palloon immobilisoitu RNA lisätään solulysaattiin, jolloin solulysaatissa olevat RNA:ta sitovat proteiinit (RBP) sitoutuvat tiettyihin RNA sekvensseihin.

Bakteerit ja muut organismit käyttävät spesifisiä DNA:han sitoutuvia proteiineja moniin eri tarkoituksiin, esimerkiksi geenien transkription säätelyssä, DNA:n replikaatiossa ja kromatiinin konformaation ylläpidossa.²⁵ DNA:n pull-down -määrityksessä sitojana toimiva DNA-sekvenssi immobilisoidaan palloihin, ja se inkuboidaan kohdeproteiineja sisältävään näytteen kanssa, esimerkiksi solulysaatissa.²⁵ Pallot pestään epäspesifisesti sitoutuneiden proteiinien poistamiseksi, jolloin jäljelle jäävät vain spesifisesti DNA-sekvenssiin sitoutuneet proteiinit. Sitoutuneet proteiinit eluoidaan ja analysoidaan.²⁶

RNA on biomolekyyli, jolla on laaja valikoima erilaisia biologisia toimintoja. Esimerkiksi lähetti-RNA (mRNA) sisältää proteiinisynteesin ohjeet, ribosomaalinen RNA (rRNA) tarjoaa ribosomin rakenteellisen ja enstymaattisen rungon ja siirtäjä-RNA (tRNA) sisältää tiettyjen mRNA-kodonien antikodonin ja toimittaa kodonia vastaavat aminohapot translaation aikana. RNA:t toimivat myös keskeisinä säätelijöinä tietyille proteiineille, jotka osallistuvat monenlaisiin biologisiin prosesseihin, esimerkiksi geenien ilmentymisen kasvun, kehityksen ja solustressin aikana. Nämä RNA:ta sitovat proteiinit (RBP:t) sisältävät yhden tai useamman RNA:ta sitovan domeenin, jotka tunnistavat ja sitoutuvat tiettyihin sekvensseihin RNA:ssa²⁷ (kuva 7). RNA:n pull-down -määrityksessä RNA-sitoja immobilisoidaan palloihin ja inkuboidaan sitoutumiskumppaneja sisältävän näytteen, esimerkiksi solulysaatin kanssa. Pesuvaiheiden jälkeen RNA:t ja niihin sitoutuneet proteiinit eluoidaan ja analysoidaan.²⁶



Kuva 7. RNA:ta sitova proteiini (RBP) sisältää RNA:ta sitovan domeenin, joka sitoutuu tiettyihin RNA-sekvensseihin.

2.4 Analyttiset mittausmenetelmät

Kun kohdemolekyylit ja siihen mahdollisesti sitoutuneet vuorovaikutuskumppanit on saatu kalastettua ja puhdistettua näytteestä sitojamolekyylin avulla, kompleksi eluoidaan kiinteästä alustasta ja analysoidaan mahdollisten vuorovaikutusten havaitsemiseksi. Analyysissä voidaan käyttää monia menetelmiä, kuten SDS-PAGE ja Western-blot, mutta yleisimmin käytetyt menetelmät ovat luminesenssipohjaiset analyysit ja mikrotiiterilevymääritykset.

Tässä osiossa käydäänkin läpi luminesenssipohjaisia analysointimenetelmiä, kuten kemiluminesenssi ja bioluminesenssi, sekä mikrotiiterilevymääritys. Nämä ovat yleisesti käytössä olevia menetelmiä pull-down -kompleksien analysoimisessa, ja mikrotiiterilevymääritystä voidaan analysoinnin lisäksi käyttää myös suoraan kiinteänä pohjana immobilisoitavalle sitojamolekyylille. Tällöin sitojamolekyylit ei tarvitse immobilisoida esimerkiksi agarosi- tai magneettipalloille, vaan se kiinnitetään mikrotiiterilevyn pohjaan.

2.4.1 Luminesenssipohjaiset analysointimenetelmät

Luminesenssimenetelmät, erityisesti kemiluminesenssi ja bioluminesenssi, tuottavat voimakkaan signaalin pienestä määrästä analysoitavaa proteiinia. Tämän tekee pienistä proteiinimääristä ja heikoista vuorovaikutuksista helpommin havaittavia. Tietyt luminesenssin muodot, kuten kemi- ja bioluminesenssi, eivät vaadi ulkoista valonlähdettä, mikä voi vähentää taustakohinaa.¹⁶

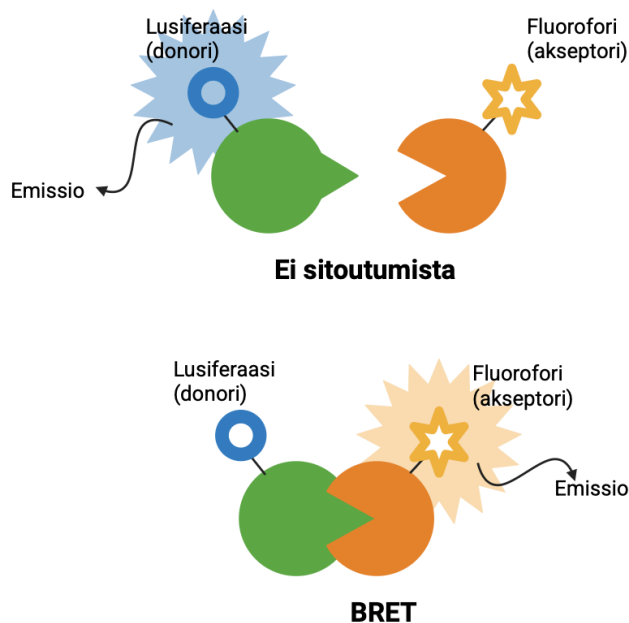
Kemiluminesenssi on ilmiö, jossa kemiallisen reaktion energia muuttuu valon emissioksi.²⁴ Pull-down -määrityksessä kemiluminesenssia käytetään molekyylien välisten vuorovaikutusten havaitsemiseen ja kvantifiointiin lisäämällä kemiluminesenssisubstraatti, joka emittoi valoa kemiallisen reaktion jälkeen. Tämä tapahtuu sitomalla entsyymi, usein piparjuuriperoksidaasi (HRP), sitoja- tai kohdemolekyyliin. Näytteeseen lisätään sitten kemiluminesoiva substraatti, esimerkiksi

luminolipohjainen substraatti. Entsyymi katalysoi kemiallisen reaktion substraatin kanssa, mikä tuottaa valoa.²³ Valon voimakkuus on suoraan verrannollinen vuorovaikuttavien kohdemolekyylien määrään ja se voidaan mitata esimerkiksi luminometrillä.

Bioluminesenssi on kemiluminesenssin erikoistapaus. Bioluminesenssi syntyy kemiallisesta reaktiosta, jossa lusiferiinisubstraatti hapettuu lusiferaasientsyymien katalysoimassa reaktiossa. Pull-down -määrityksessä bioluminesenssia käytetään fuusioimalla bioluminesoivia proteiineja, kuten lusiferaasia, kohdemolekyyliin.²²

Bioluminesenssiresonanssienergiansiirto (BRET) on biofysikaalinen ilmiö, joka kuvaa etäisyydestä riippuvaa ei-säteilevää energiansiirtoa lusiferaasi-lusiferiinin ja akseptorikromoforin välillä. BRET tapahtuu yleensä luminoforin ja fluoroforin lähennä, alle 10 nm etäisyydeltä, ja sitä hyödynnetään esimerkiksi proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimuksessa.¹⁷ Proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimisessa toinen proteiini fuusioidaan donorilla ja toinen akseptorilla. Jos kaksi fuusioproteiinia ei ole vuorovaikutuksessa, voidaan seurata vain energiadonorin substraattimuutoksen emittoimaa valoa. Jos donorin ja akseptorin välinen etäisyys on alle 10 nm, resonanssienergiansiirto voi tapahtua ja akseptorin emissiota vastaava valosignaali voidaan havaita²² (kuva 8).

Lusiferaasifuusion käyttö BRET-menetelmässä toimii niin, että donorina on lusiferaasi ja akseptorina fluorofori-fluoresoiva proteiini.²²



Kuva 8. BRET-ilmiö. Kun lusiferaasi-donorilla fuusioitu proteiini ei ole sitoutunut fluorofori-akseptorilla fuusioituun proteiiniin, donori emittoi valoa. Kun proteiinit sitoutuvat, resonanssienergiansiirto voi tapahtua, jolloin akseptori emittoi valoa.

2.4.2 Mikroitiitterilevymääritys

Mikroitiitterilevymääritys on laboratoriotekniikka, jossa mikroitiitterikuoppalevyjä käytetään samanaikasten kokeiden suorittamiseen useille näytteille.¹⁸ Levyt voivat olla materiaaliltaan polystyreeniä tai polypropeenia, ja niitä on saatavilla eri kokoisia, kuten 24-, 48-, 384-, 864- ja 1536-kuoppaisina levyinä. Yleisimmin käytetty on kuitenkin 96-kuoppainen mikroitiitterilevy.¹⁹

Määrityksen periaate perustuu biokemiallisten reaktioiden tai biologisten vuorovaikutusten suorittamiseen levyn kuopissa käyttämällä hyvin pieniä reagenssimääriä, tyypillisesti 50-200 µl kuoppaa kohden. Näytteen reaktiossa syntyvä signaali, kuten kemiluminesenssi, fluoresenssi tai absorbanssi, voidaan mitata levynlukijalla tai spektrofotometrillä, jotka havaitsevat signaalin joko suodattimien tai spektrin avulla.²⁰ Mikroitiitterilevymäärityksen vaiheet vaihtelevat käyttötarkoituksen mukaan, mutta yleinen määritys sisältää levyn valmistelun, näytteen lisäämisen, inkuboinnin, reaktion kehittymisen, mittauksen ja data-analyysin.²⁰ Levyn valmistelussa valitaan sopiva levytyyppi, esimerkiksi tasa- tai pyöreäpohjaiset kuopat. Näytteen lisäämisessä pieni määrä testinäytettä ja reagenssia lisätään jokaiseen kuoppaan pipettien tai automaattisten annostelulaitteiden avulla. Levyjen inkubointi tapahtuu tietyissä olosuhteissa, joissa otetaan huomioon lämpötila, kosteus tai CO₂-pitoisuudet soluviljelyssä. Reaktion kehityksessä tapahtuu biokemiallisia ja biologisia reaktioita, jotka johtavat havaittaviin signaaleihin. Levynlukijat mittaavat absorbanssia, fluoresenssia tai luminesenssia ja kustakin kuopasta saadut tiedot analysoidaan.²⁰

Pull-down -määrityksessä mikroitiitterilevyä voidaan soveltaa immobilisoimalla sitojamolekyylit mikroitiitterilevyn pinnalle sen sijaan, että käyttäisi agarosii- tai magneettisia palloja kiinteänä alustana. Sitojan immobilisoinnin jälkeen levyn kuoppiin lisätään mahdollisia sitoutumiskumppaneita sisältävä liuos. Kuopat pestään sitoutumattomien komponenttien poistamiseksi, ja sitoutuneet komponentit havaitaan ja kvantifioidaan.²¹

Mikroitiitterilevymäärityksen etuina ovat usean näytteen määritys yhtäaikaaisesti, mikä vähentää aikaa ja työvoimaa, ja alhainen reagenssin kulutus tekee siitä kustannustehokkaan. Haittoina määrityksessä ovat levyn reunojen lähellä olevien kuoppien haihtuminen, mikä voi aiheuttaa vaihtelua tuloksissa. Määrityksessä on myös kontaminaatoriski, sillä pienet reagenssitilavuudet lisäävät ristikominaation todennäköisyyttä.²¹

3 Pull-down -määritys tutkimuksessa ja lääkekehityksessä

Pull-down -määritys on yleinen työkalu tutkimuksessa molekyylien välisten vuorovaikutusten tunnistamisessa. Usein tutkimuksen kohteena ovat proteiinien väliset vuorovaikutukset, mutta myös peptidien, DNA-sekvenssien, RNA-molekyylien ja pienten molekyylien vuorovaikutuksia esimerkiksi proteiinien kanssa tutkitaan. Esimerkiksi tutkimukset proteiinien sitoutumisesta tiettyyn DNA- tai RNA-sekvenssiin auttaa ymmärtämään transkription säätelyä ja RNA:n toimintaa.²⁵ Vuorovaikutusten lisäksi tutkitaan proteiinien spesifisyyttä, esimerkiksi sitoutuvatko proteiinit vain tiettyyn sekvenssiin ja mitkä osat proteiineista tai nukleiinihapoista ovat tärkeitä vuorovaikutuksessa.

Lääkekehityksessä määritys on käytössä lääkeaineen kohdemolekyylin tunnistamisessa, sekä kohdemolekyylin toiminnan ja biologinen merkityksen tarkastelussa. Lisäksi pull-down -määrityksen avulla voidaan selvittää lääkeaineiden vaikutusmekanismeja, esimerkiksi muuttaako lääkeaine proteiinien välisiä vuorovaikutuksia, kompleksien muodostumista ja sitoutumiskumppanien profiilia. Kun kohdemolekyylin vuorovaikutusverkosto tunnetaan paremmin, voidaan tunnistaa molekyyliä, joiden muutokset kertovat lääkevasteesta. Myös mahdollisia haittavaikutuksia voidaan vähentää tunnistamalla lääkeaineen ei-toivotusti sitoutuvia sidosmolekyyliä.³

Reseptori-ligandi -vuorovaikutukset ovat tärkeä proteiini-proteiini -vuorovaikutusten luokka. Ligandin ja reseptorin väliset vuorovaikutukset ovat olennaisia solun kommunikoinnille muiden solujen, ja koko organismin kanssa. Ne käynnistävät paitsi dynaamisia prosesseja, kuten proliferaation ja apoptoosin, myös ylläpitävät solujen homeostasiaa ja kaikkien solujärjestelmien tasapainoista toimintaa.³¹ Lääkekehityksessä reseptori-ligandi -vuorovaikutukset ovat perustana sille, miten lääkkeet sitoutuvat kohteisiinsa ja tuottavat terapeuttisen vaikutuksen. Ligandi, esimerkiksi lääke tai luonnollinen molekyyli, sitoutuu reseptoriin, tyypillisesti proteiiniin, aktivoidakseen tai estääkseen soluvasteen. Lääkekehityksessä hyödynnetään tätä periaatetta suunnittelemalla lääkkeitä, jotka voivat tunnistaa tarkasti nämä vuorovaikutukset. Tämä johtaa tehokkaampiin hoitoihin vähemmällä sivuvaikutuksilla.³²

Ligandin ja reseptorin fyysikaalinen vuorovaikutus voidaan osoittaa pull-down -määrityksellä. Sen avulla voidaan myös määrittää mikä osa ligandista tai reseptorista on tärkeä sitoutumiselle ja tapahtuuko sitoutuminen suoraan vai vaiheittain. Määrityksessä ligandi toimii sitojana ja se immobilisoidaan kiinteään alustaan. Immobilisoitu ligandi lisätään reseptoria sisältävään näytteeseen, esimerkiksi solulysaattiin tai kudoksenäytteeseen. Epäspesifisti sitoutuneet komponentit poistetaan pesuilla, jolloin jäljelle jäävät vain ligandi ja siihen sitoutuneet reseptorit. Lopuksi kompleksi analysoidaan esimerkiksi SDS-PAGE:lla.³³

4 Johtopäätökset

Molekyylien välisten vuorovaikutuksia tutkitaan, kun halutaan tunnistaa esimerkiksi proteiinien sitoutumista ja spesifisyyttä. Vuorovaikutuksia käytetään hyväksi myös tutkimuksissa solujen signalointireittien molekyylimekanismeista, sairauksien esiintymisestä ja etenemisestä, sekä uusien lääkekohteiden tunnistamisessa.¹⁵ Tutkimuksien kohteena ovat usein proteiinien väliset vuorovaikutukset, mutta myös nukleiinihappoja, vasta-aineita, peptideitä ja pieniä molekyyliä käytetään tutkimuksissa. Lääkekehityksessä erityisesti reseptorin ja ligandin välisten vuorovaikutusten tutkiminen on tärkeää uusien lääkkeiden ja hoitomuotojen kehittämisessä, sekä mahdollisten haittavaikutusten vähentämisessä.

Pull-down -määrityksen yleisin käyttötarkoitus on proteiinien välinen vuorovaikutus. Ne ovat tärkeässä osassa monissa biologisissa prosesseissa. Ne voivat vuorovaikuttaa yksin tai muiden proteiinien kanssa muodostaen funktionaalisia yhdisteitä. Muodostuneet yhdisteet lisäävät käytettävien toiminnallisten yksiköiden muotoja ja johtavat siten suurempaan proteiinimonimuotoisuuteen.⁴ Proteiinien väliset vuorovaikutukset ovat tärkeässä osassa esimerkiksi solun aineenvaihduntasyklissä, signaalinsiirrossa, DNA transkriptiossa ja replikaatiossa, katalyysissä sekä immuunivasteessa.⁵ Poikkeavuudet proteiinien välisiin vuorovaikutuksiin vaikuttavat solun aktiivisuuteen ja toimintaan, jotka voivat johtaa moniin sairauksiin, kuten syöpään ja kroonisiin rappeuttaviin sairauksiin.⁵

Proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen on monitieteinen ja erikoistunut ala, joka kattaa biologian, fysiikan ja kemian näkökulmat. Tutkimuskohteena ovat proteiinit, jotka muodostavat organismeja. Tämä koskettaa biologiaa. Fysiikkaa ja kemiaa koskettavat taas vuorovaikutusten tapahtuminen yksittäisten proteiinien fysikaalisten ominaisuuksien pohjalta. Tämän vuoksi on välttämätöntä integroida, yhdistää ja validoida useampia menetelmiä eri tieteenaloilta vuorovaikutusten yksityiskohtaiseen tarkasteluun.⁴ Pull-down -määritys on siis hyvä työkalu vuorovaikutusten tutkimiseen, mutta se ei riitä yksin. Hyvä puoli määrityksessä on kuitenkin sen kyky detektoida proteiinien sitoutumista, seuloa vuorovaikutteisia proteiineja ja puhdistaa proteiiniyhdisteitä.⁴

5 Lähteet

1. Jain A et al. *Nature Protocols* **2012**, 7(3), 445-452.
2. Hu D et al. *Cellular and Molecular Immunology* **2011**, 8(6), 479-485.
3. Tabana Y et al. *BioMed Central Ltd* **2023**, 23(1).
4. Miura K. *Protein & Peptide Letters* **2018**, 25(8), 728-733.
5. Soleyman F et al. *Elsevier B.V.* **2022**, 20, 5316-5341.
6. Dong Q et al. *Methods in Molecular Biology* **2018**, 1721, 117.
7. Burckhardt C et al. *STAR Protocols* **2021**, 2(3), 100644.
8. Maccarrone G et al. *Methods in Molecular Biology* **2017**, 1546, 223-234.
9. Hernandez D et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2021**, 413(22), 5561.
10. Flynn G et al. *Nature* **1991**, 353(6346), 726-730.
11. Meems L et al. *Elsevier B.V.* **2016**, 1(7), 557-567.
12. Lei Y et al. *Nature Communications* **2021**, 12(1), 5465.
13. Arnese T. *PLoS Biology* **2011**, 9(5).
14. Chaparian R et al. *Methods in Molecular Biology* **2020**, 2346, 155-172.
15. Müller G et al. *Methods in Molecular Biology* **2021**, 2267, 81-90.
16. Jaque D et al. *Nanoscale* **2012**, 4(15), 4301-4326.
17. Weihs F et al. *Analytical Chimica Acta* **2020**, 6, 100059.
18. Barrett C. *ScienceDirect* **1994**, 71-102.
19. Pitts B et al. *Journal of Microbiological Methods* **2003**, 54(2), 269-276.
20. Casey J et al. *Journal of Microbiological Methods* **2004**, 58(3), 327-334.
21. Aggarwal V et al. *BioEssay* **2014**, 36(11), 1109-1119.
22. Smirnova D et al. *Photochemistry and Photobiology* **2017**, 93(2), 436-477.
23. Kricka L. *Analytical Chimica Acta* **2003**, 500(1-2), 279-286.
24. Selvolini G et al. *ScienceDirect* **2023**, 17-43.
25. Jutras B et al. *Current protocols in microbiology* **2012**.
26. Solimani F et al. *Achives of Dermatological Research* **2022**, 314(9), 921-928.
27. Uppala J et al. *Bio-protocol* **2022**, 12(4).
28. Lin J et al. *Methods in Molecular Biology* **2017**, 1615, 211-219.
29. Rao V et al. *International Journal of Proteomics* **2014**, 2014(1), 147648.
30. Louche A et al. *Methods in Molecular Biology* **2017**, 1615, 247-255.
31. Guryanov I et al. *ScienceDirect* **2016**, 68, 890-903.
32. Fang Y. *Expert opinion on drug discovery* **2012**, 7(10), 969-988.
33. Kool J et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 401(4), 1109-1125.
34. Jain A et al. *Journal of controlled release* **2016**, 245, 27.