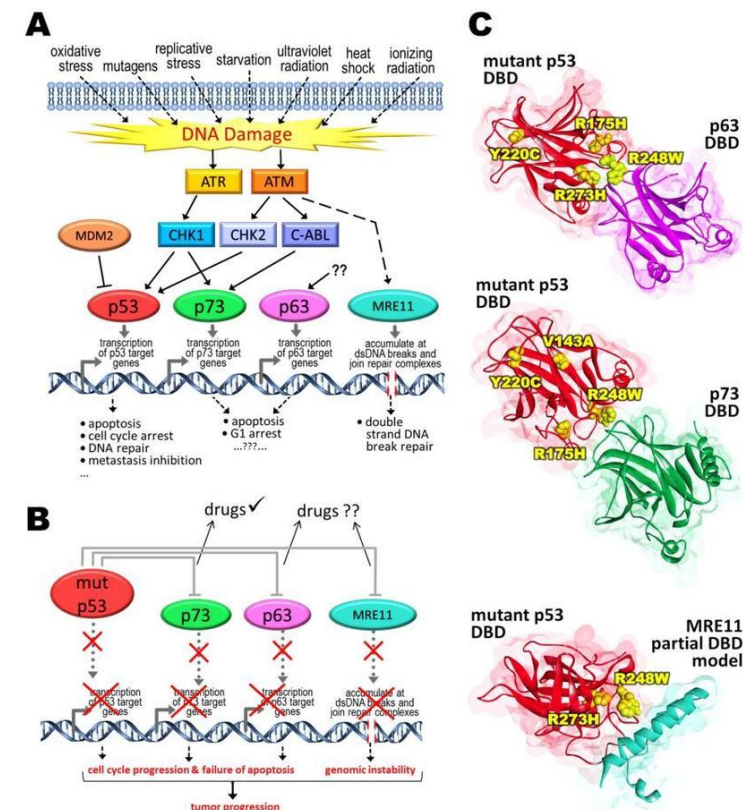
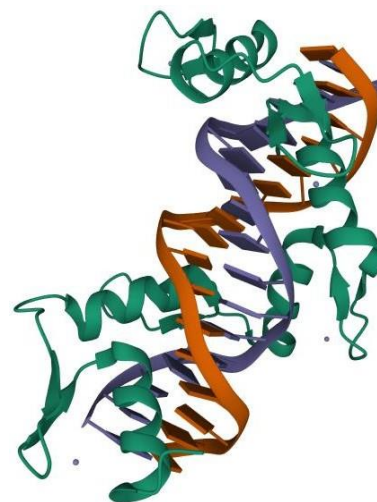


Protein-DNA interakce

F1MG1_Metody molekulární biologie

Mgr. Denis Šubert
Mgr. Marie Brázdová, Ph.D.

PDB id: 5KKQ, Hashimoto



https://www.researchgate.net/figure/Mutant-p53-proteins-carry-out-novel-oncogenic-interactions-A-Signaling-in-the-p53_fig2_277087873

Protein-DNA interakce

- Screening interakčních partnerů
 - Lokalizace interakce v rámci chromatinu
 - Sekvenční strukturní preference
 - Funkce proteinů (TRF, Helikázy, Chromatinové, DNA-repair)
- K studiu interakcí mezi proteiny a nukleovými kyselinami použita široká škála metod biofyzikální chemie.
 - zvláště dobré pro stanovení síly (afinity) interakcí
 - Vysoká afinita, μM - nM : mají tendenci zahrnovat sekvenční interakce,
 - Nízká afinita, mM - μM : proteiny mají tendenci rozpoznávat aspekty "celkové" struktury, tj.

Vazba DNA-protein motivy

Vodíkové můstky:

- Adenin - Gln/ Asn
- Guanin - Arg

Solné můstky:

- Fosfátový zbytek – Arg/ Lys

Prostřednictvím koordinovaně vázaných kovů

- Motiv Zinkového prstu – Zn^{2+}

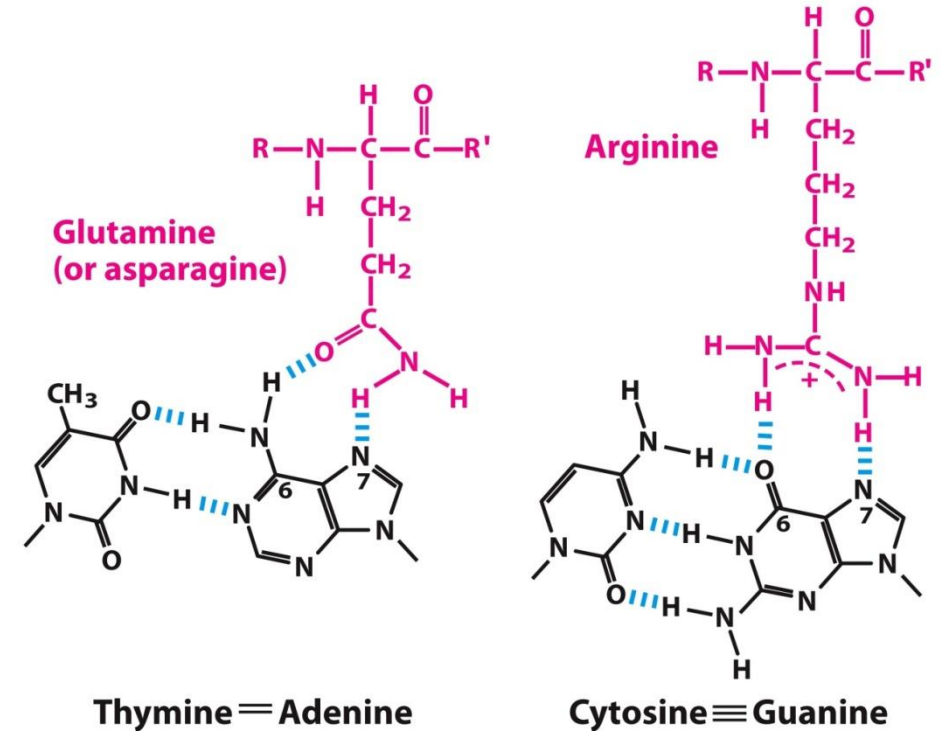


Figure 28-10
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

Gln/Asn tvoří specifické vazby H-bond s N-6 H-7 H Adeninu

Arg tvoří specifické vazby s párem Cytosin-Guanin

Nejčastější DNA-vazebné motivy

HTH

Zinc-Finger

Leucinový zip

Vazba

Velký žlábek

Velký žlábek

Velký žlábek

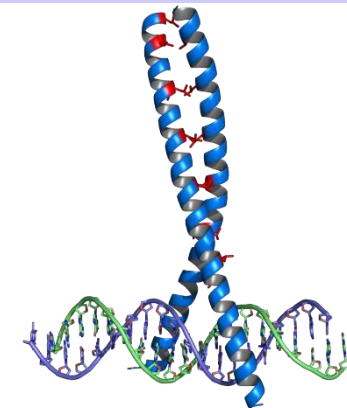
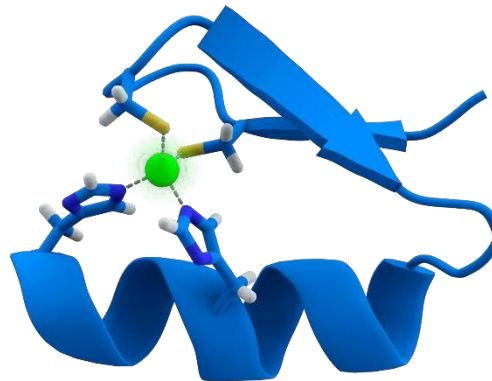
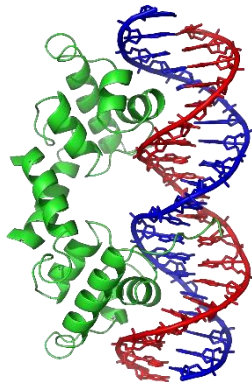
Složení

Helix-otáčka-Helix

β -sheet- β -sheet-Helix

Helix-Helix

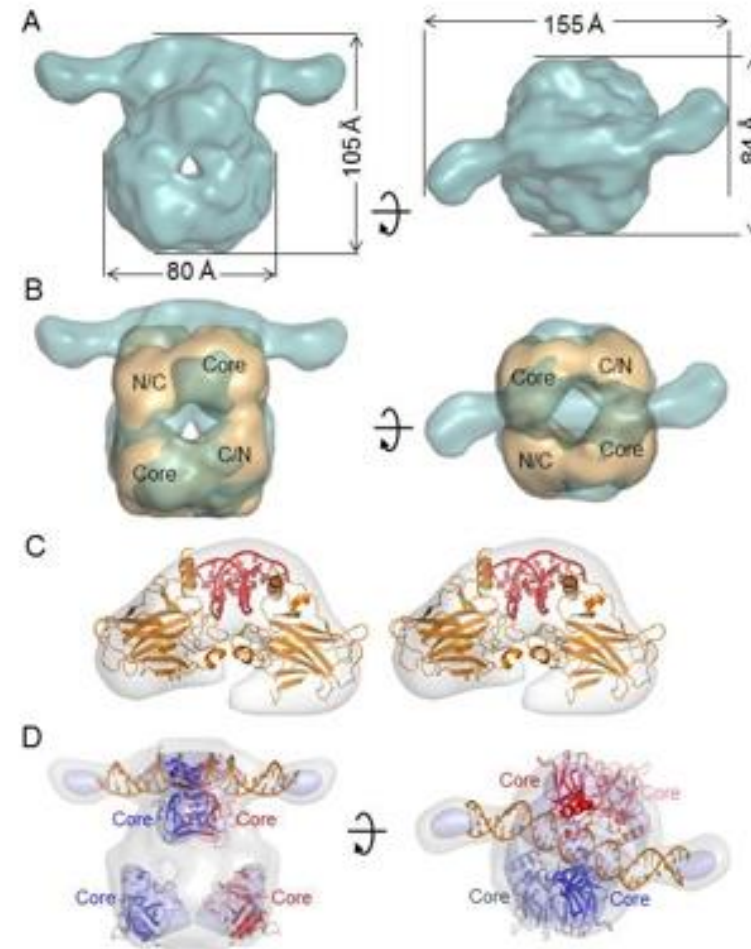
Struktura



Metody pro studium DNA-proteinových interakcí

- Chip seq
- Pull down assay
- EMSA
- FRET
- ITC
- Ko-krystalizace
- NMR
- Kvasinkový dvouhybridní systém
- Genová exprese

- SELEX
- databáze (interaktomy a komplexy ...)
- genetické metody



DNA-protein interakce

<i>In vitro</i> methods	Description
Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	The EMSA has been used extensively for studying protein:DNA interactions. The assay is based on the slower migration of protein:DNA complexes through a native polyacrylamide or agarose gel than unbound DNA. The individual protein:DNA complexes form discrete bands within the gel. Now, protein:RNA interactions can be detected with the first RNA-EMSA assay.
Supershift Assay	A variation of the EMSA that uses antibodies to identify proteins involved in the protein:DNA complex. The formation of an antibody:protein:DNA complex further reduces the mobility of the complex within the gel resulting in a "supershift."
Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)	Captures protein DNA interactions via <i>in vivo</i> crosslinking. Antibodies are used to selectively precipitate a protein of interest, and the quantity of DNA bound to that protein is measured via Quantitative PCR.
Protein:DNA Crosslinking	Method for trapping protein:DNA interactions covalently under controlled conditions by labeling the protein bait and capturing the interacting DNA via coupling with a photo-reactive reagent. Excellent for capturing weak or transient interactions.
Affinity-based Methods	Uses labeled DNA or RNA fragments bound to an affinity support to capture or purify specific binding proteins from crude extracts.
DNA Footprinting	Method identifies the recognition site of a protein for a specific nucleic acid sequence. Binding of a protein to a specific DNA sequence protects that region of DNA from subsequent attack by DNase.
Reporter Assays	Identify gene promoter activity with reporter genes that are easily visualized. Provides real-time data in cell systems.

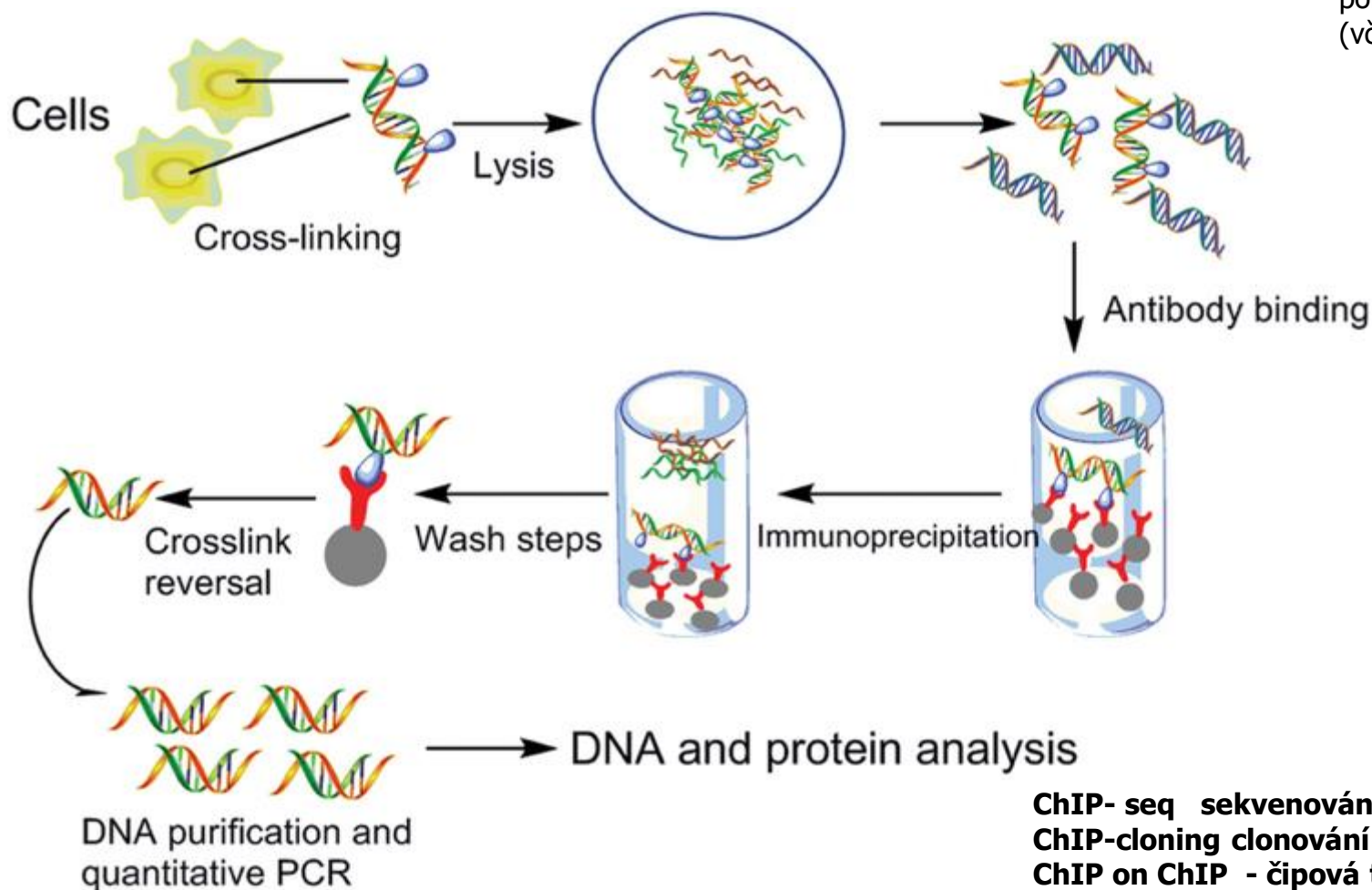
***In Vivo* Methods for Protein Interaction Analysis**

***In vivo* methods for protein interaction analysis.**

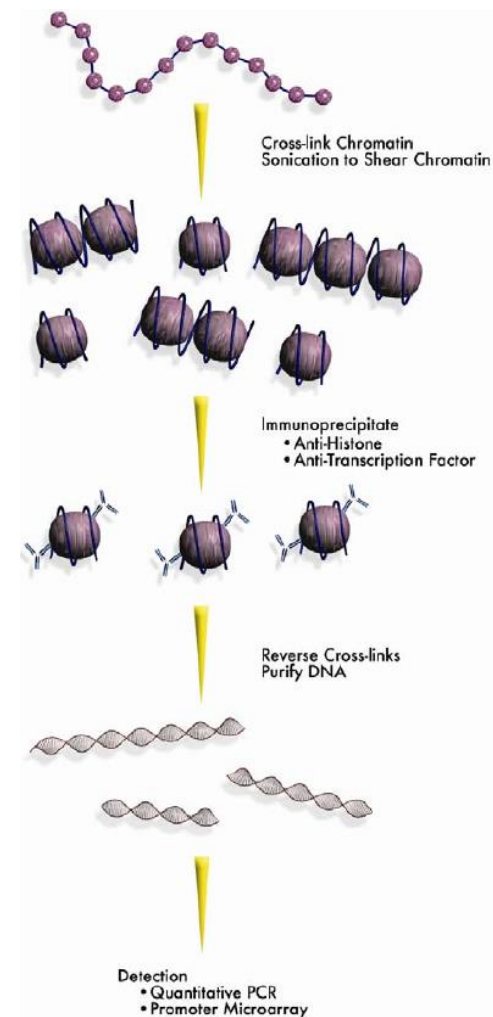
<i>In Vivo</i> Methods	Description
Yeast Two-Hybrid System	Monitor complex formation through transcriptional activation of reporter genes.
Crosslinking Reagents	Incorporating functional groups into proteins which can react, trapping a protein complex.
Immunofluorescence/FRET	Detect co-localized signal from two different proteins or monitor complex formation through fluorescent resonance energy transfer.

Detekce DNA/RNA vazebných míst

ChIP (chromatinová imunoprecipitace)



Chromatin imunoprecipitace (ChIP) je technika, která určuje, zda protein zájmu interaguje s konkrétní sekvencí DNA. Tato technika se často používá ke studiu repertoáru míst na DNA, které jsou vázány konkrétními transkripčními faktory nebo histonovými proteiny, a k pohledu na přesná genomická umístění různých modifikací histonu (včetně acetylace, fosforylace nebo methylace).



ChIP- seq sekvenování fragmentů
ChIP-cloning clonování
ChIP on ChIP - čipová technologie

Image credit: Song, C., Zhang, S., and Huang, H. (2015). Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front. Microbiol.*

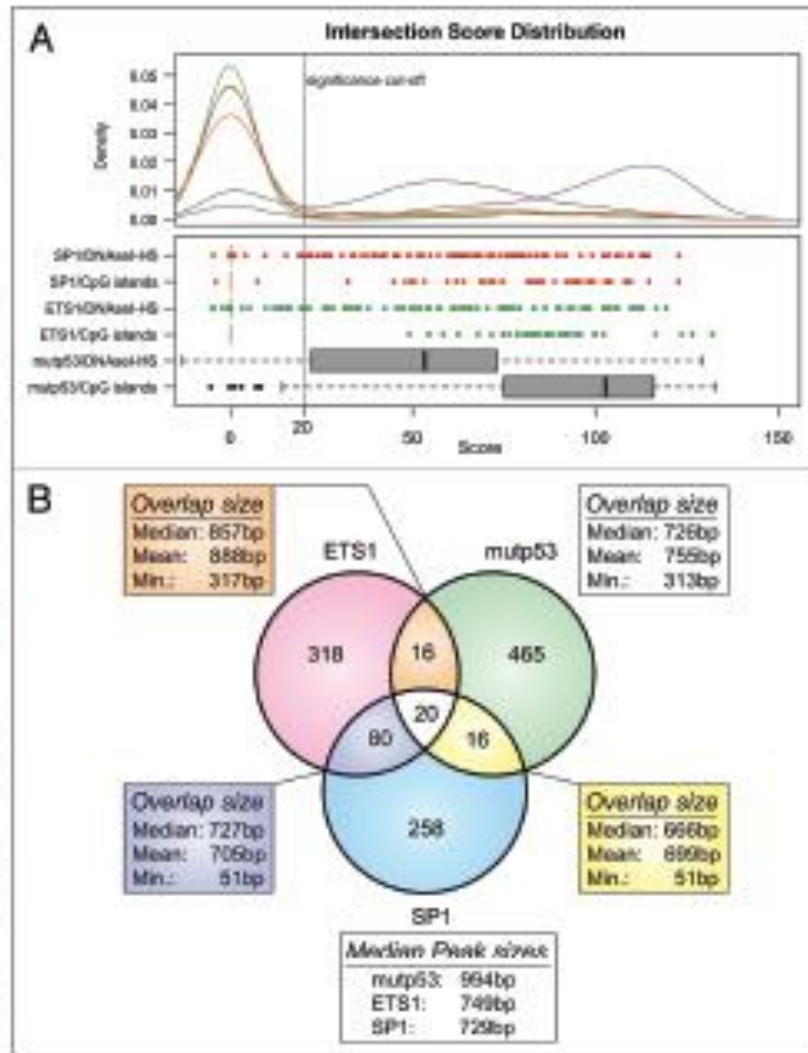
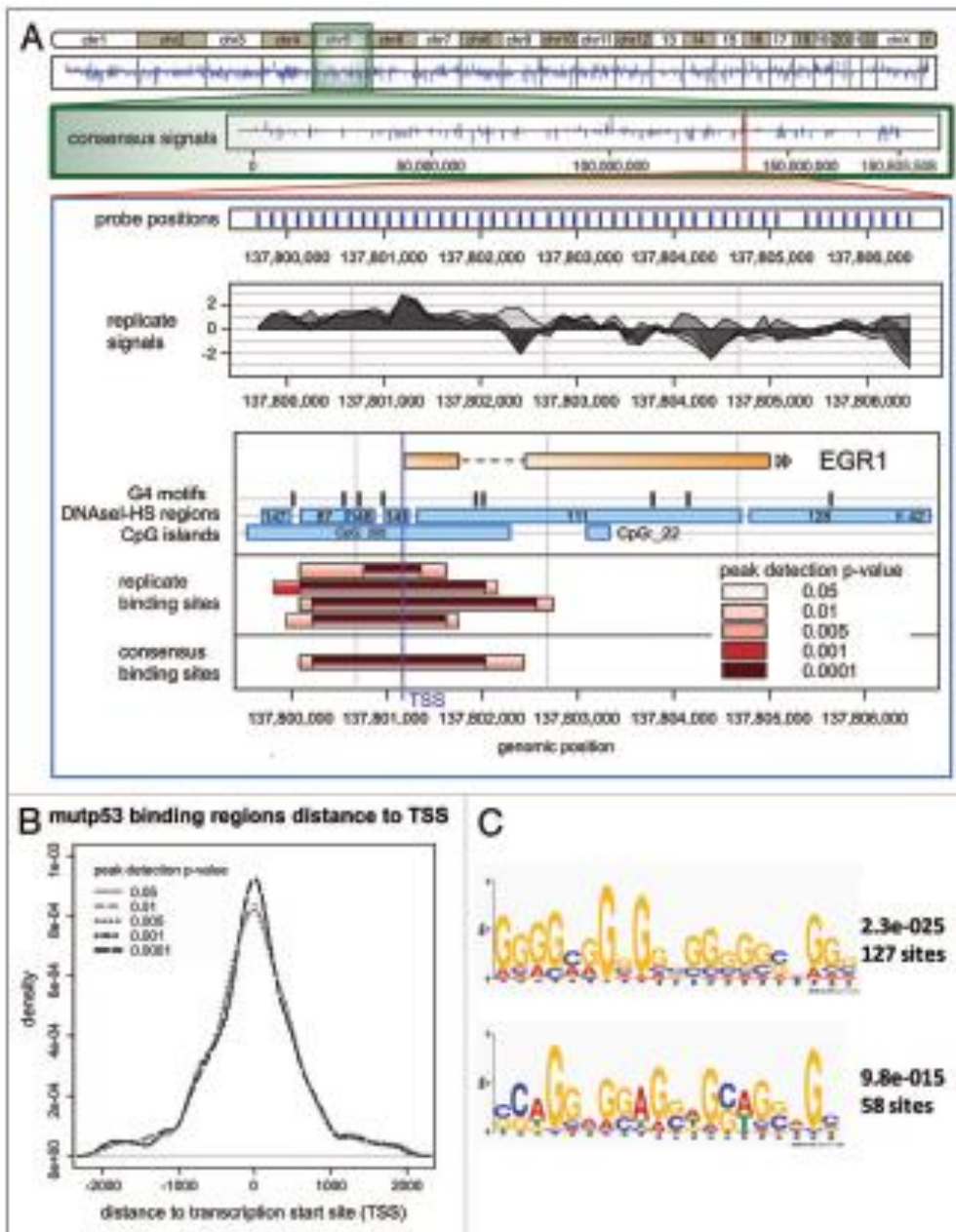
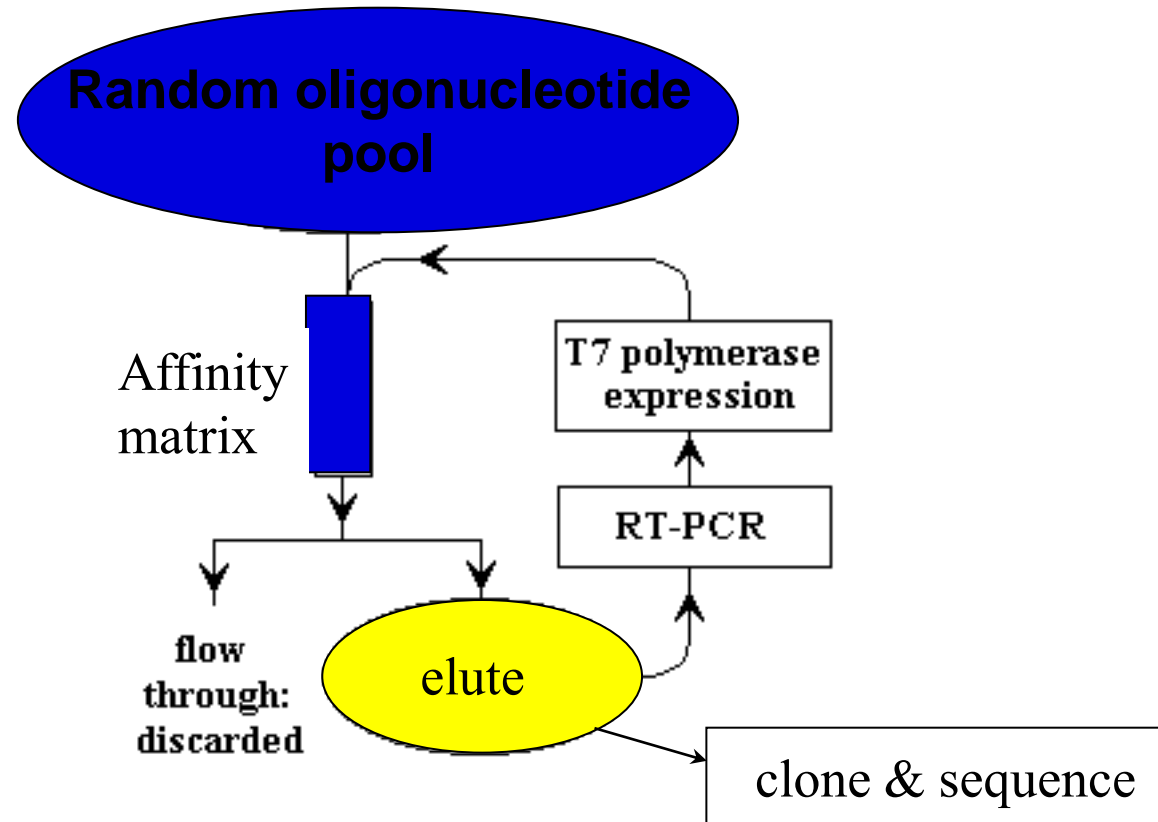


Figure 3. Array-wide analysis of mutp53, SP1 and ETS1 binding sites. (A) Distribution of the scores calculated for the overlap of mutp53, ETS1 and SP1 binding regions with CpG islands and DNaseI-HS regions. The distribution was used to identify a significance threshold, where peaks with a score ≥ 20 are assumed to overlap significantly. (B) Venn-diagram displaying the number of overlapping mutp53, ETS1 and SP1 binding regions.

Figure 1. Array-wide analysis of mutp53 binding sites. (A) Consensus signals for the whole genome and for chromosome 5 are shown. The EGR1 gene is shown as an example of a known mutp53 target gene. The lower panel displays the detected peaks in the EGR1 gene dependent on the selected p-value threshold during peak calling. CpG islands, DNaseI-HS regions and G4 motif locations extracted from the public databases are plotted. (B)

SELEX

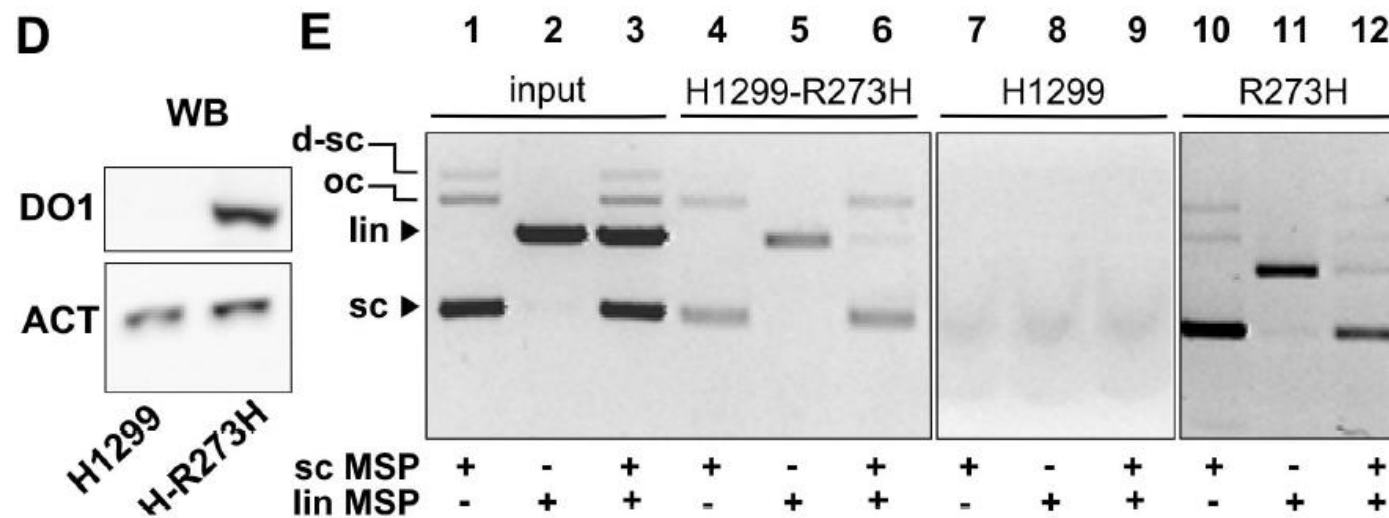
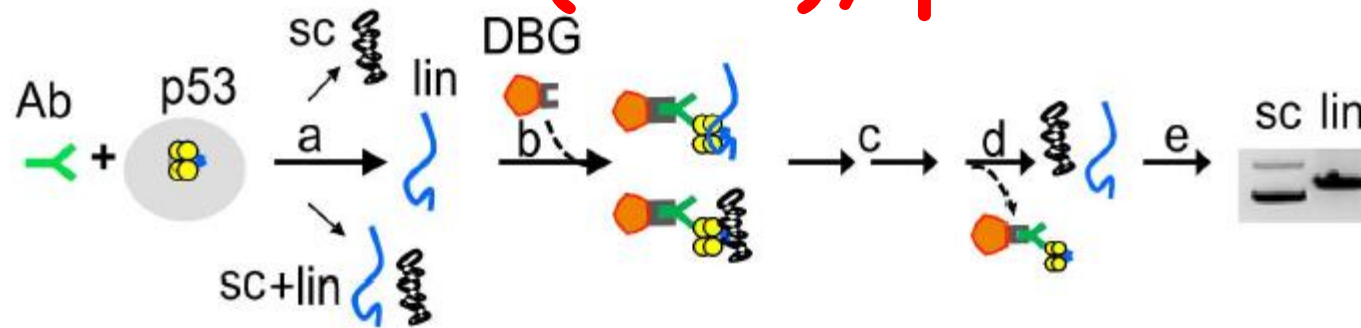
Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), also referred to as *in vitro selection* or *in vitro evolution*, is a combinatorial chemistry technique in molecular biology for producing oligonucleotides of either single-stranded DNA or RNA that specifically bind to a target ligand or ligands. These single-stranded DNA or RNA are commonly referred to as aptamers.^{[1][2][3]} Although SELEX has emerged as the most commonly used name for the procedure, some researchers have referred to it as **SAAB** (selected and amplified binding site) and **CASTing** (cyclic amplification and selection of targets)^{[4][5]} SELEX was first introduced in 1990. In 2015 a special issue was published in the Journal of Molecular Evolution in the honor of quarter century of the SELEX discovery.^[6]



C.Tuerk, L. Gold Systematic evolution of high-affinity RNA ligands of bacteriophage T4 DNA polymerase in vitro. Science 249:505-510 (1990).

Imunoprecipitace - protein -DNA (DNA), pull down

- metoda izolace specifických proteinů z směsí (lyzátů, purifikovaných...) prostřednictvím protilátek
- protilátky jsou v komplexu se svými antigeny odděleny od ostatních molekul pomocí proteinů **A** nebo **G** (zdroj bakterie), které vážou imunoglobuliny a současně jsou imobilizovány na pevném podkladu (KULIČKY, „beads“)
- proteiny **A** a **G** se vážou na oblast **Fc těžkých řetězců**
- oblast **Fab** je stále k dispozici pro vazbu antigenu
- **precipitace DNA**



OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Preferential Binding of Hot Spot Mutant p53 Proteins to Supercoiled DNA *In Vitro* and in Cells

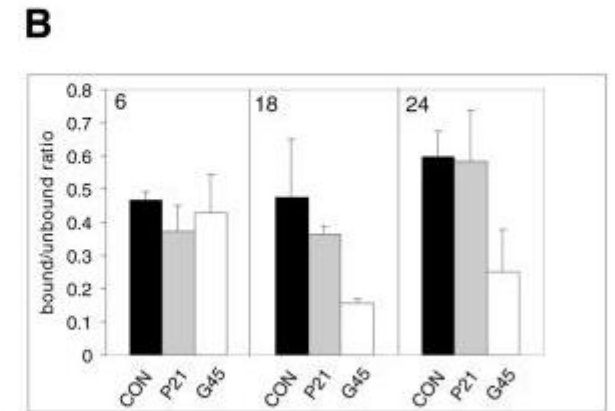
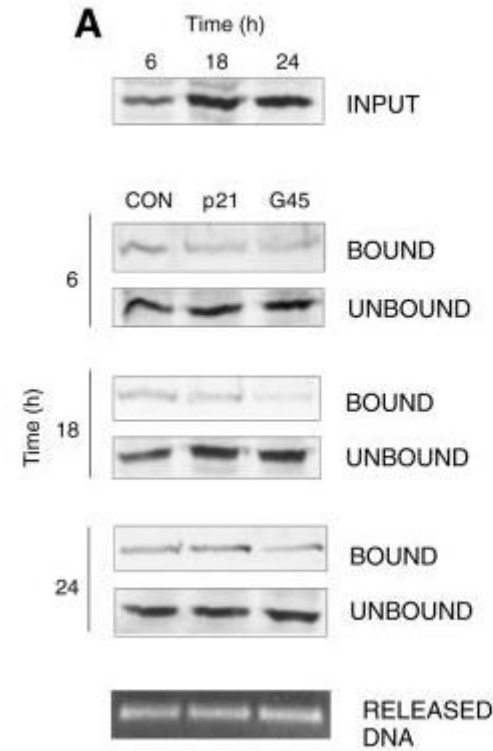
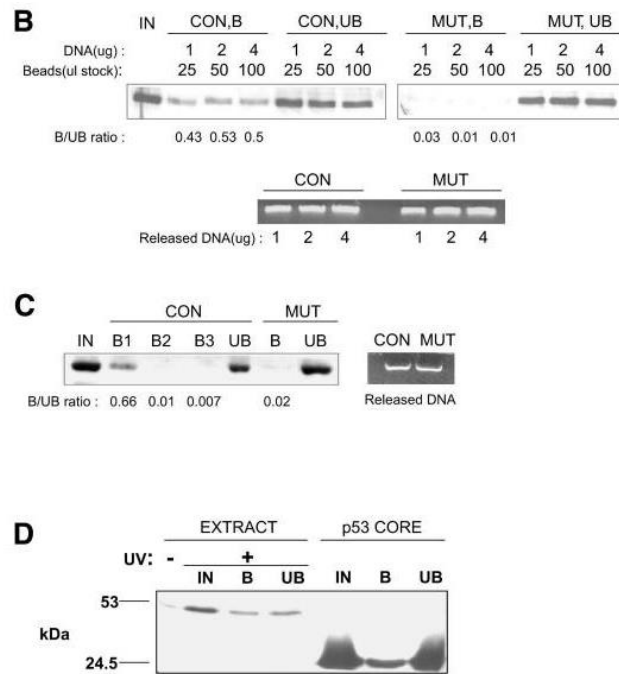
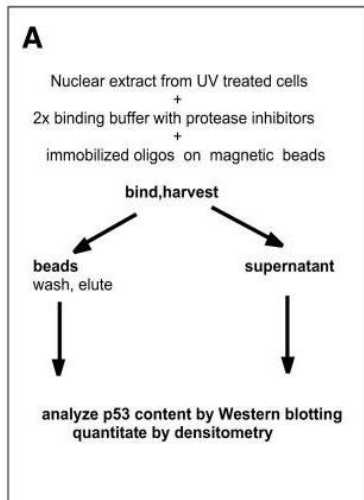
Marie Brázdová^{1*}, Lucie Navrátilová¹, Vlastimil Tichý¹, Kateřina Němcová¹, Matej Lexa⁴, Roman Hrstka³, Petr Pečinka^{1,5}, Matej Adámik¹, Borivoj Vojtesek³, Emil Paleček¹, Wolfgang Deppert², Miroslav Fojta^{1,6}

¹Department of Biophysical Chemistry and Molecular Oncology, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic, ²Department of Tumor Virology, Heinrich-Pette-Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany, ³Regional Center for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic, ⁴Faculty of Informatics, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ⁵Environmental Center, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic, ⁶Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

MUNI
PHARM

Imunoprecipitace proteinu -na DNA - imobilizace

- metoda izolace specifických proteinů z směsí (lyzátů, purifikovaných...) prostřednictvím DNA-navázána na kuličky
- precipitace proteinu
- Detekce WB



Různé systémy afinitních značek a jejich interakčních partnerů využívané pro purifikaci proteinů

Tab. 1. Různé systémy afinitních značek a jejich interakčních partnerů využívané pro purifikaci proteinů nebo studium protein-proteinových interakcí (afinitní koprecipitaci).

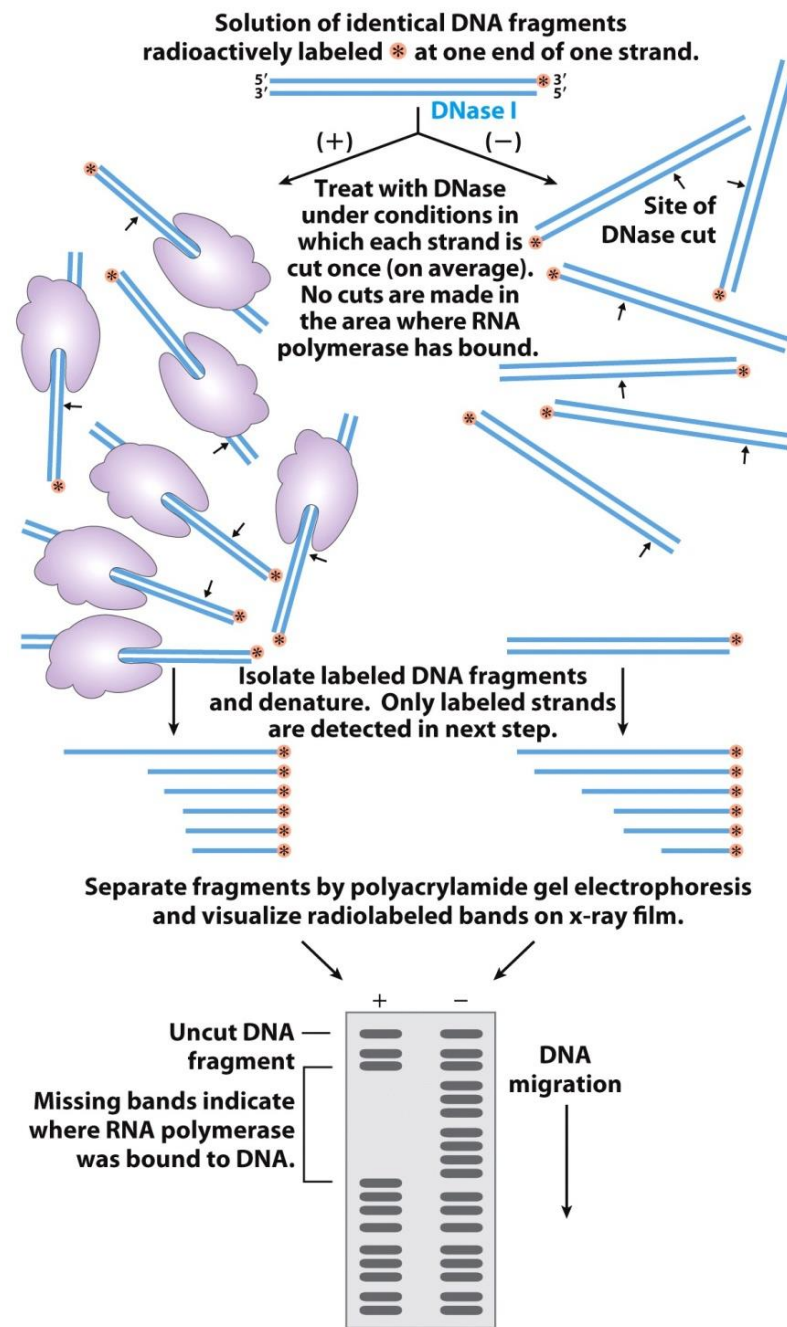
	afinitní značka	sekvence afinitní značky	imobilizovaný interakční partner
Peptidové značky	FLAG	DYKDDDDK	protilátka anti-FLAG
	HA	YPYDVPDYA	protilátka anti-HA
	oligoHis (6-10mer)	HHHHHH(HHHH)	chelát niklu nebo kobaltu
	Myc	EQKLISEEDL	protilátka anti-Myc
	SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLR ARLEHHPQGQREP	streptavidin
	Avi	GLNDIFEAQKIEWHE	streptavidin
	Strep	WSHPQFEK	streptavidin
	V5	GKPIPPLLGLDST	protilátka anti-V5
Proteinové značky	GST (glutathione S-transferase)		glutathion
	MBP (manose-binding protein)		amylóza

Protein-DNA Footprinting

"Footprinting" je technika k identifikaci DNA-vazebného místa

- Slouží k identifikaci cílové oblasti interakce v rámci DNA sekvence
- Je nutné značení jednoho řetězce DNA (Radioaktivně/ fluorescenčně)
- Využívá enzym DNasu I nebo chemické štěpení (piperidin)
- Oblasti kde dochází k interakci jsou chráněny před štěpením
- chybějící proužky (bandy)

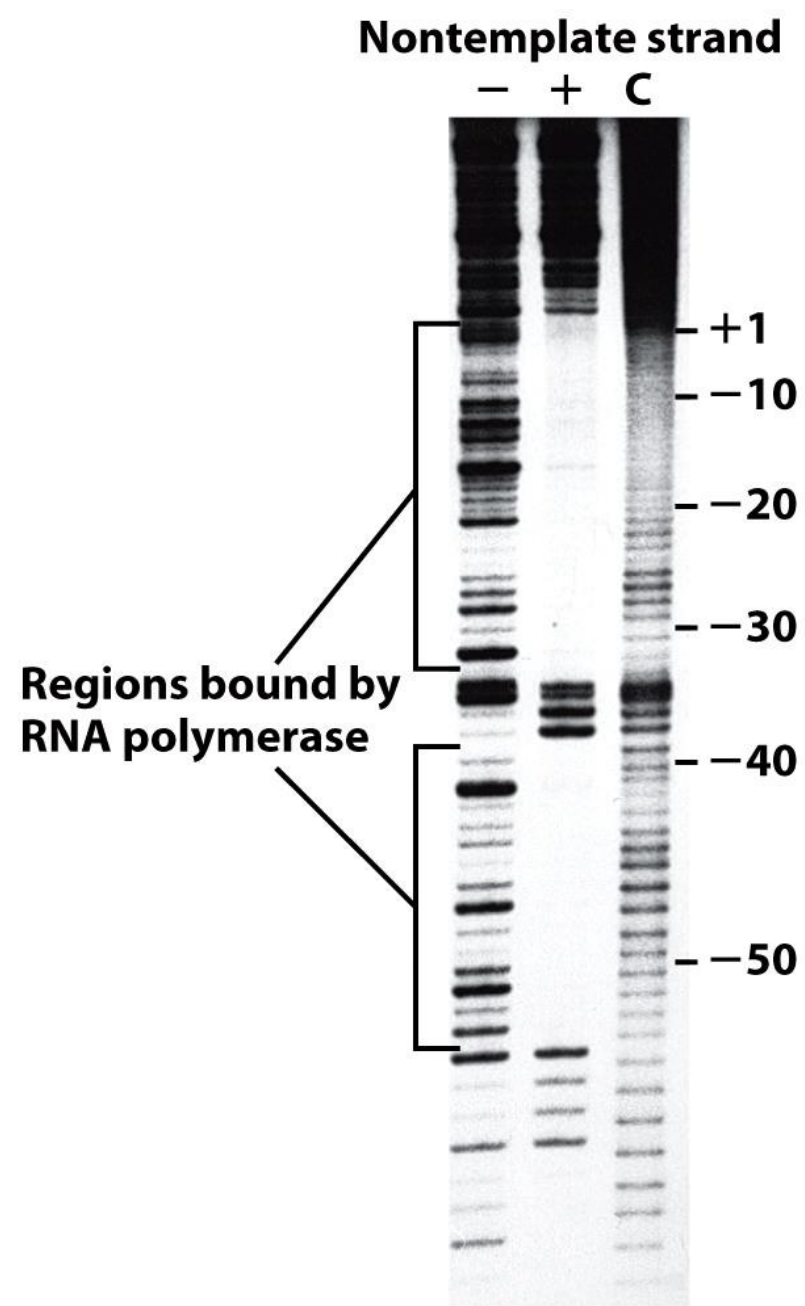
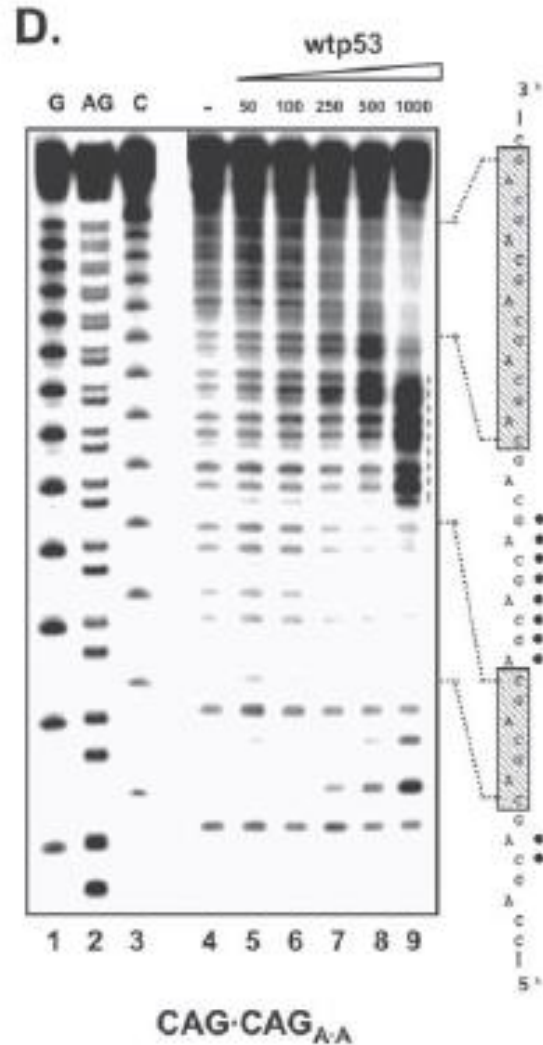
předpoklad: DNA vázaná bílkovinou bude chráněna před chemickým štěpením v místě vazby.
Izolujte fragment DNA, který obsahuje vazebné místo, a "označte"..
Vázat protein na DNA v jedné zkumavce; udržet další jako "nahé DNA" kontrolu
Oba vzorky ošetřete chemickým nebo enzymatickým činidlem.
Oddělte fragmenty gelovou elektroforézou a vizualizovat pásy na rentgenovém filmu nebo obrazové desce



Box 26-1 Figure 1
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

DNA/RNA footprinting

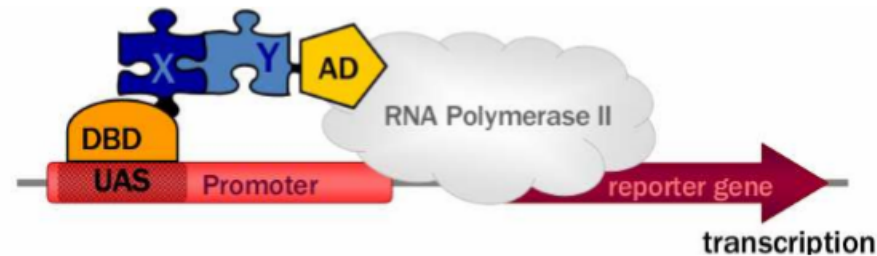
Chemické štěpení:
 AG:Kyselina
 mravenčí
 CT:Hydrazin
 C:Hydrazin+NaCl
 G:Dimethylsulfát
 Následné působení
 piperidinu



Kvasinkové dvouhybridní systémy Y2H

- metoda molekulární biologie běžně používaná pro **studium interakcí mezi proteiny**.
- Fungování Y2H je umožněno tím, že transkripční faktory mají modulární strukturu a tyto moduly-domény mohou fungovat odděleně, případně ve fúzi s jiným proteinem.
- V nejběžnější podobě Y2H je takto rozdělen kvasinkový **transkripční faktor Gal4**. Jeho DNA vazebná doména je fúzována s **jedním proteinem (bait - „návnada“)**, obvykle známým, jehož vazebné partnery bude Y2H vyhledávat, zatímco **aktivační doména Gal4 je fúzována s proteinem (prey - „kořist“)**, který je potenciální vazebný partner zkoumaného proteinu.
- Interakce mezi „návnadou“ a „kořistí“ obnoví původní funkci Gal4, který následně transaktivuje příslušné reportérové geny. Vzhledem ke své univerzalitě a jednoduchosti může být Y2H použit k rychlé analýze rozsáhlých cDNA knihoven kódujících proteiny ve fúzi s Gal4 DNA vazebnou doménou. Výsledky Y2H ovšem musí být ověřovány dalšími metodami, protože jsou obvykle zatíženy značnou chybou, ať už falešně negativními, nebo falešně pozitivními výsledky.
- Kvasinkový dvouhybridový systém, jeho možná použití, variace a omezení byly nedávno velmi podrobně popsány (Brückner et al. 2009).

Reporterový gen:
lacZ (B-galaktosidasa)
Luciferaza
GFP



Obrázek 2:
Kvasinkový dvouhybridní systém

studovaný protein (X), je fúzován s DNA vazebnou doménou, (DBD) pocházející nejčastěji z Gal4, která se váže do aktivační oblasti v blízkosti promotoru reportéru (UAS, *upstream activating sequence*), zatímco potenciální vazebný partner (Y) je fúzován s aktivační doménou (AD), obvykle z Gal4. Pokud spolu oba hybridní proteiny interagují, funkce původně rozděleného transkripčního faktoru se obnoví, což vyvolá transkripci reportérového genu RNA polymerázou II. Převzato z (Brückner et al. 2009).

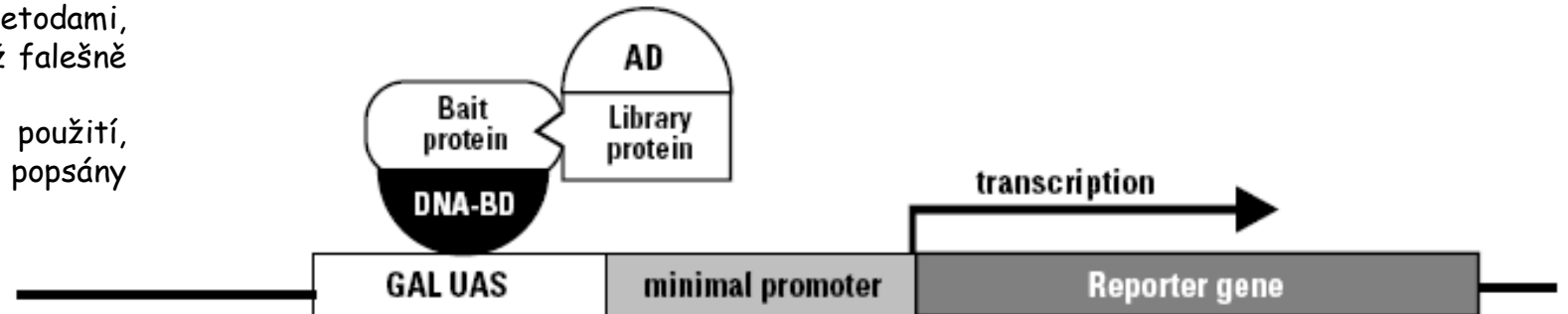
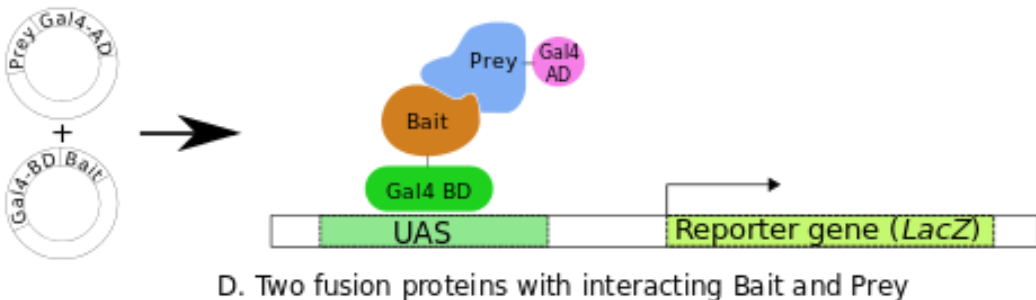
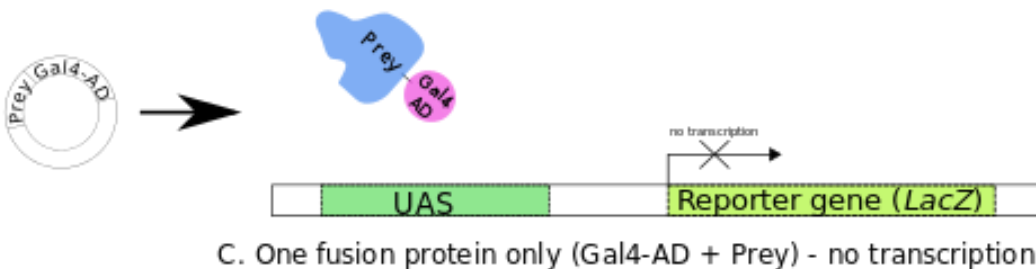
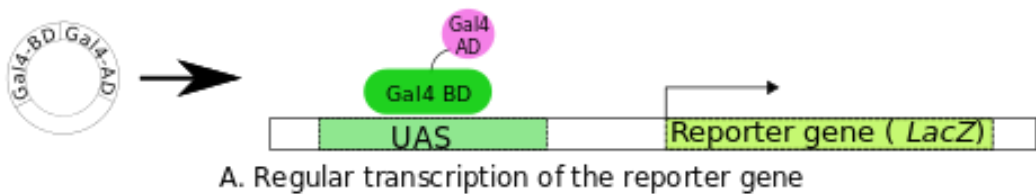


Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.



V nejběžnější podobě Y2H je takto rozdělen kvasinkový **transkripční faktor Gal4**. Jeho **DNA vazebná doména (BD)** je fúzována s **jedním proteinem (bait - „návnada“)**, obvykle známým, jehož vazebné partnery bude Y2H vyhledávat, zatímco **aktivační doména (AD) Gal4 je fúzována s proteinem (prey - „kořist“)**, který je potenciální vazebný partner zkoumaného proteinu.

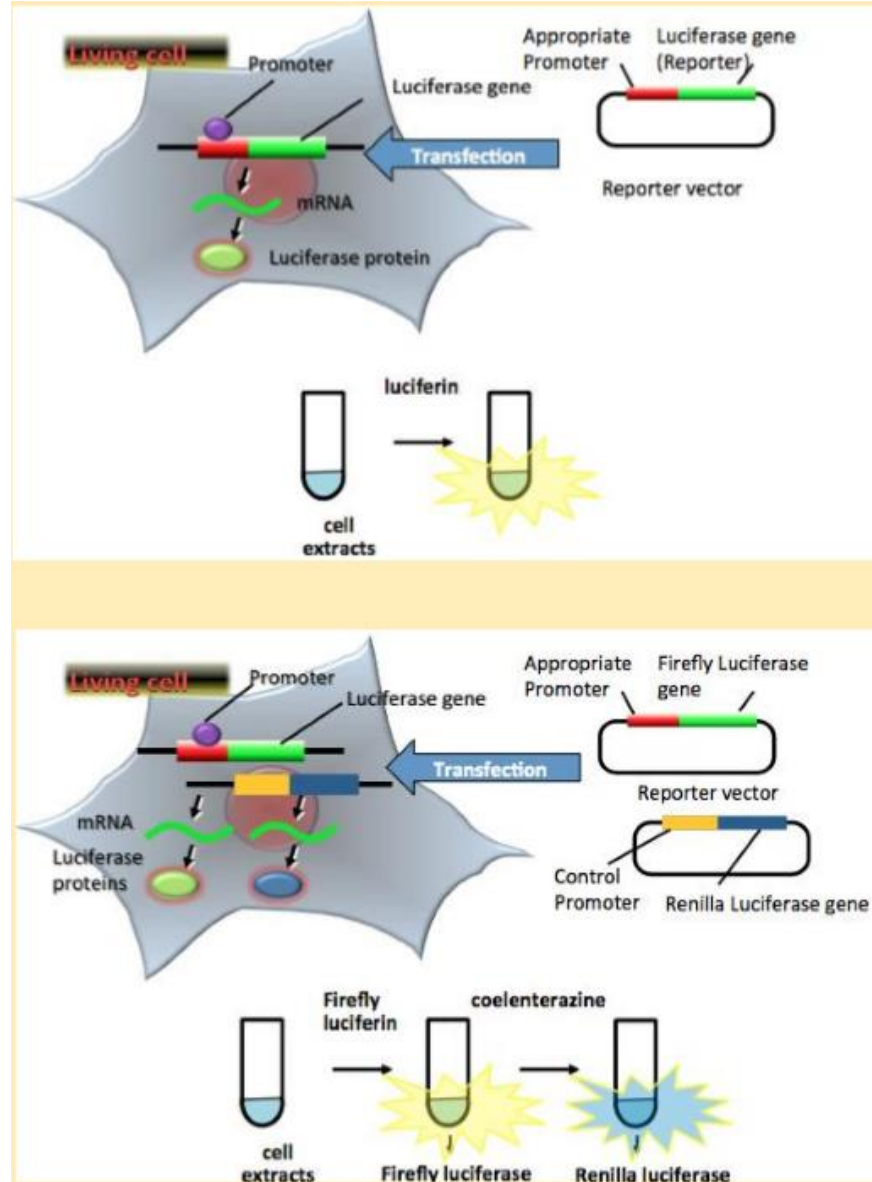
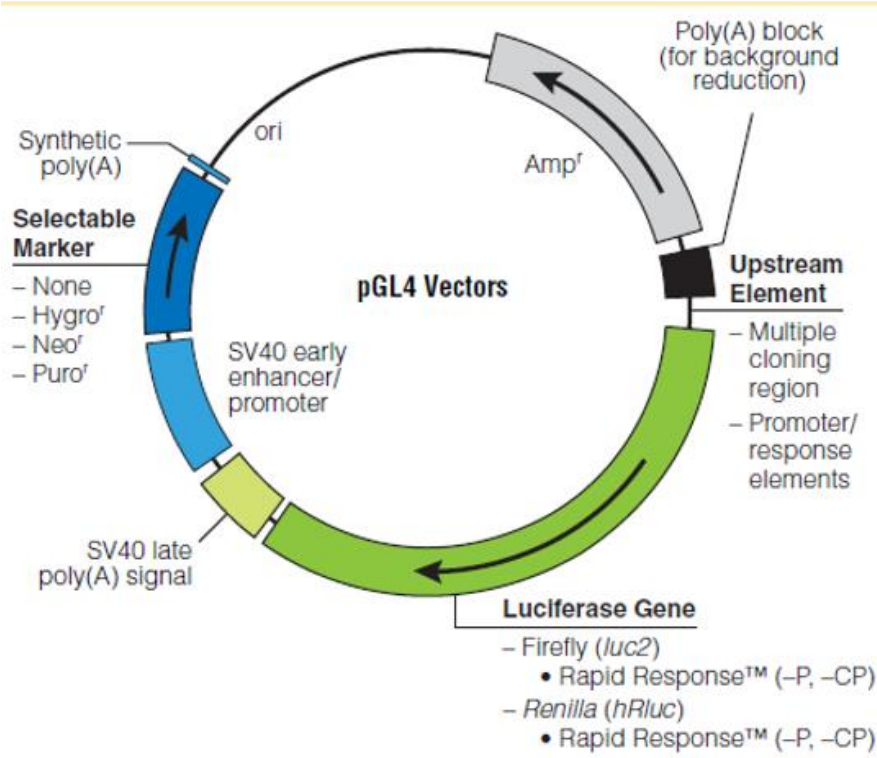
Aplikace/Využití:

- protein-protein interakce
- DNA-protein interakce
- Analýza genové exprese- regulace
- reporterový test (DNA vazebné elementy, DNA regulační elementy)

Geny nebo markery reportéra poskytují vhodný prostředek identifikovat a analyzovat regulační prvky genů.

System reportérů měří transkripční činnost (interakce cis-prvků na předkladatele s předkladatelem trans-působící faktory).

Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay



The Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System(a-c) provides an efficient means of performing dual-reporter assays. In the DLR™ Assay, the activities of **firefly (*Photinus pyralis*)** and **Renilla (*Renilla reniformis*, also known as sea pansy)** luciferases are measured sequentially from a single sample. The firefly luciferase reporter is measured first by adding Luciferase Assay Reagent II (LAR II) to generate a stabilized luminescent signal. After quantifying the firefly luminescence, this reaction is quenched, and the Renilla luciferase reaction is simultaneously initiated by adding Stop & Glo® Reagent to the same tube.

Luciferase Reporter Assay

- The Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System(a–c) provides an efficient means of performing dual-reporter assays. In the DLR™ Assay, the activities of **firefly (*Photinus pyralis*)** and **Renilla (*Renilla reniformis*, also known as sea pansy)** luciferases are measured sequentially from a single sample. The firefly luciferase reporter is measured first by adding Luciferase Assay Reagent II (LAR II) to generate a stabilized luminescent signal. After quantifying the firefly luminescence, this reaction is quenched, and the Renilla luciferase reaction is simultaneously initiated by adding Stop & Glo® Reagent to the same tube.

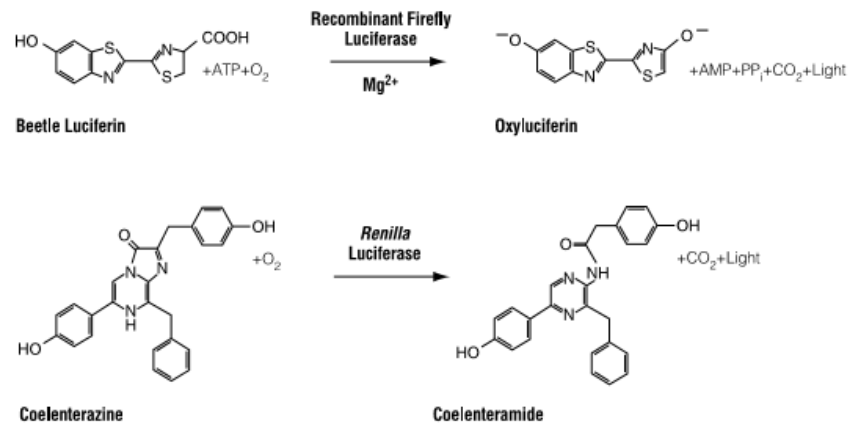


Figure 1. Bioluminescent reactions catalyzed by firefly and *Renilla* luciferases.

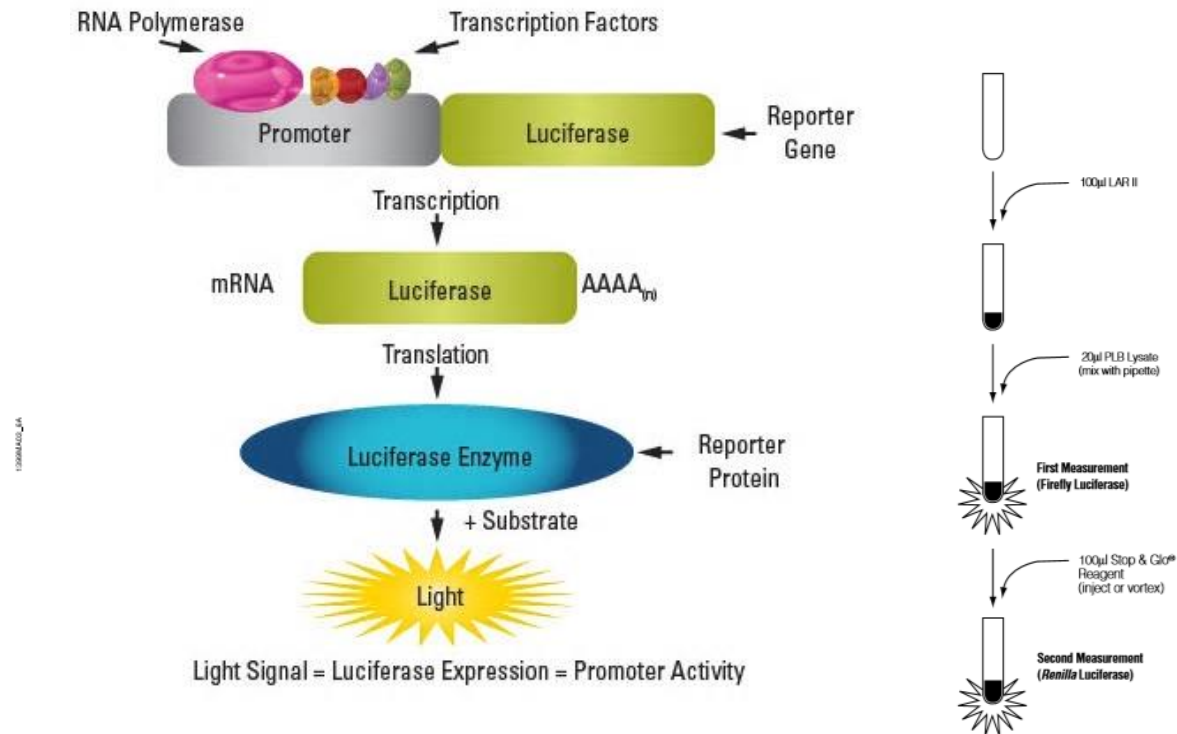


Figure 6. Format of the DLR™ Assay using a manual luminometer or a luminometer equipped with one reagent injector. If the instrument is equipped with two injectors, it may be preferable to predispense the lysate into luminometer tubes, followed by sequential auto-injection of the LAR II and Stop & Glo® Reagents.

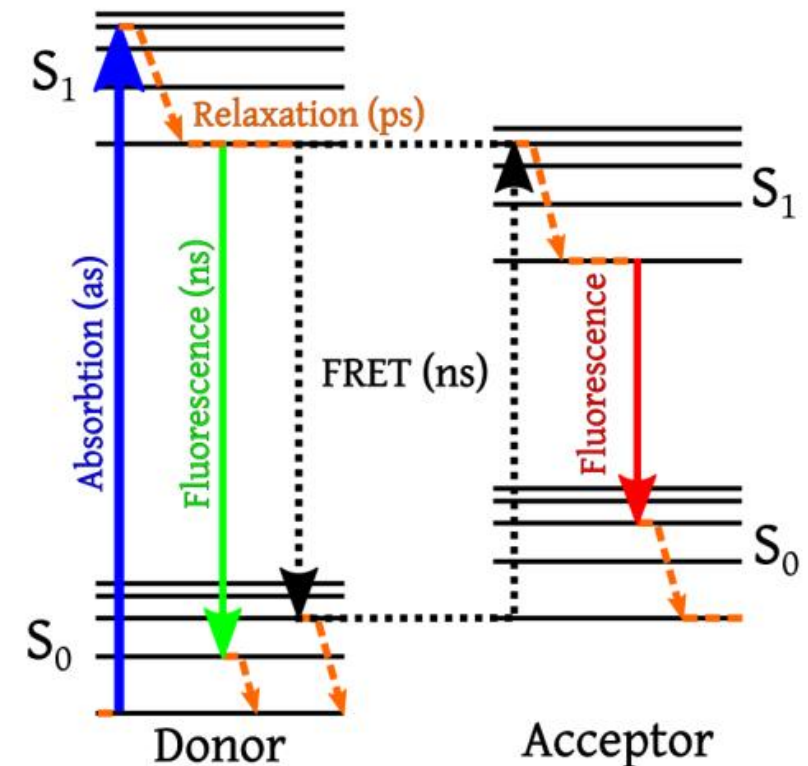
FRET Förster/fluorescence resonance energy transfer

Fluorescence / Förster resonance energy transfer

- Využíváme přenosu excitační energie mezi donorovým a akceptorovým fluoroforem
- Emisní spektrum donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptoru

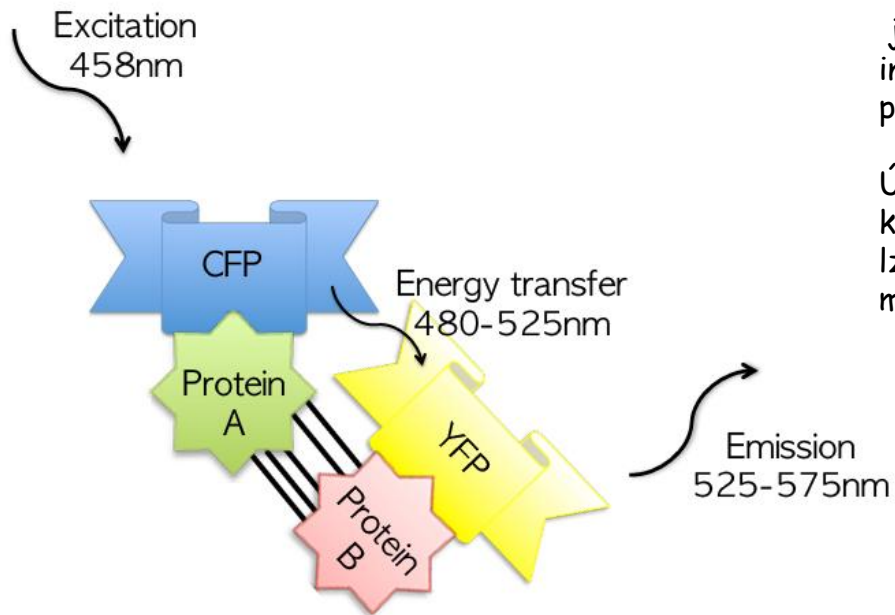
FRET Pair Fluorescent Proteins

Laser	Donor	Acceptor	Donor Ex Acceptor Em
Violet	CFP	YFP	405/526
Violet	Cerulean FP	YFP	405/526
Argon	GFP	YFP	488/526
Argon	GFP	mRFP	488/579



FRET

Förster/fluorescence resonance energy transfer



je mechanismus nezářivého přenosu energie mezi dvěma molekulami prostřednictvím dipól-dipólové interakce. Molekula, z níž se energie přenáší, se nazývá donor (dárce), kdežto molekula, která energii přijímá, se nazývá akceptor (příjemce).

Účinnost tohoto mechanismu je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, k čemu tedy prakticky dochází jen tehdy, jsou-li obě molekuly v těsné blízkosti. Z intenzity FRET (kterou lze určit různými metodami analýzy fluorescence vzorku) lze proto získat informaci o míře interakce mezi donorem a akceptorem. To je velmi cenné především při studiu živých buněk

Primary Conditions for FRET

- Donor and acceptor molecules must be in close proximity (typically 10–100 Å).
- The absorption spectrum of the acceptor must overlap the fluorescence emission spectrum of the donor (**Figure 1**).
- Donor and acceptor transition dipole orientations must be approximately parallel.

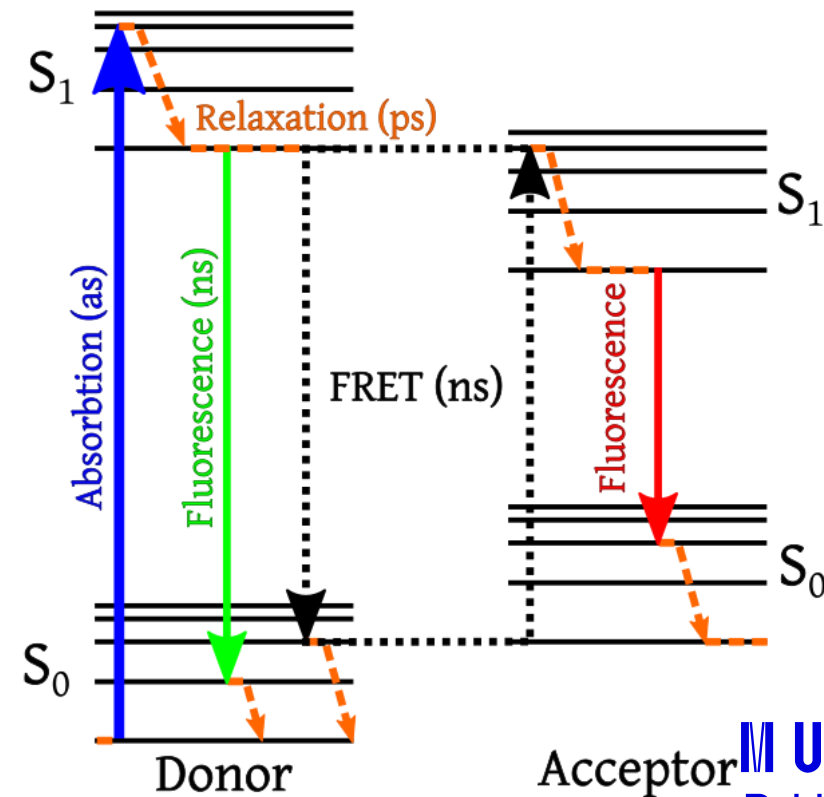
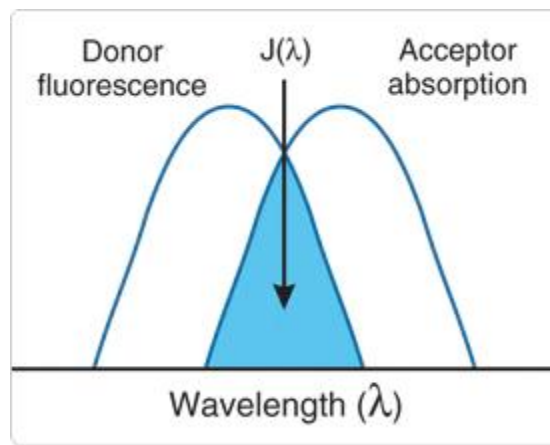


Table 1. Typical Values of R_0

Donor	Acceptor	R_0 (Å)
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	55
IAEDANS	Fluorescein	46
EDANS	Dabcyl	33
Fluorescein	Fluorescein	44
BODIPY FL	BODIPY FL	57
Fluorescein	QSY 7 and QSY 9 dyes	61

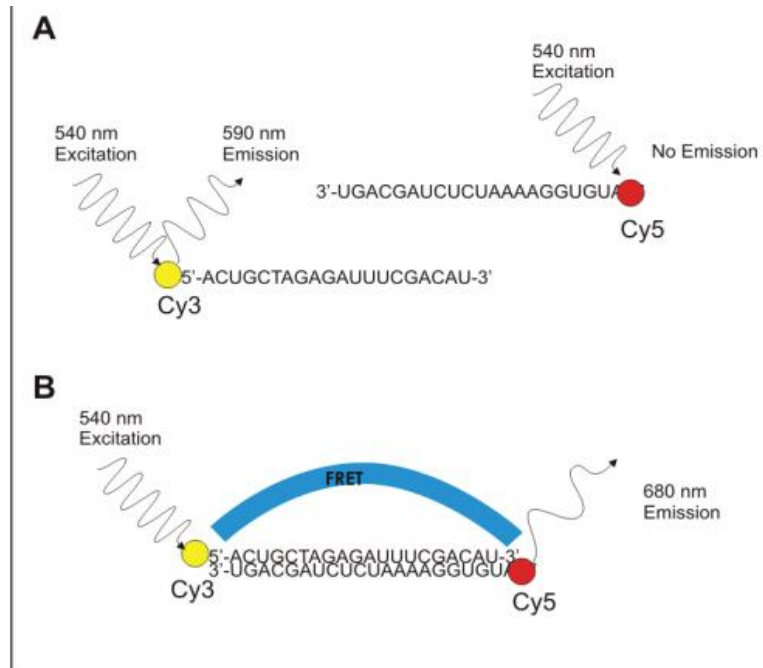


Figure 4. Schematic representation of FRET occurring between Cy3 and Cy5 fluorescent moieties when labeled oligonucleotides are annealed.

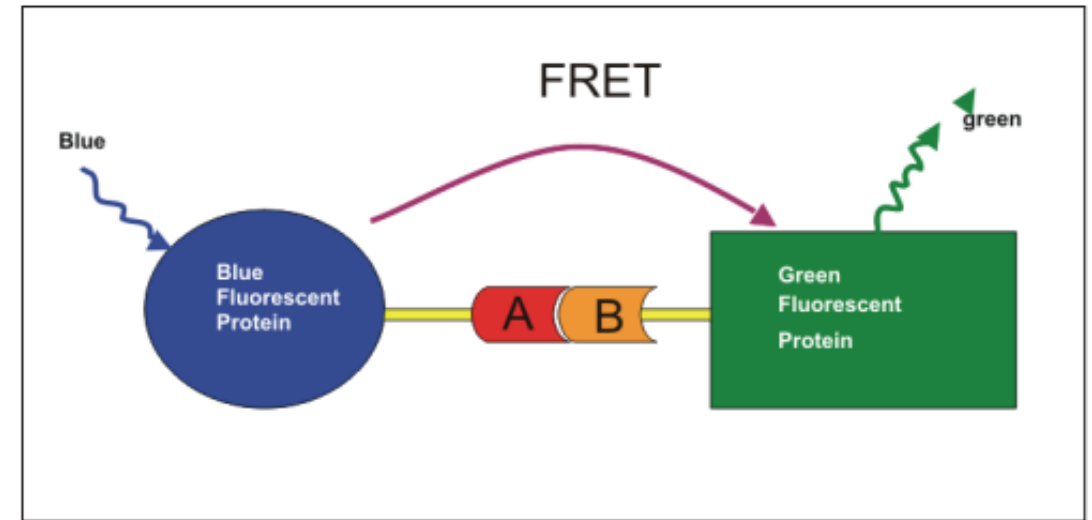
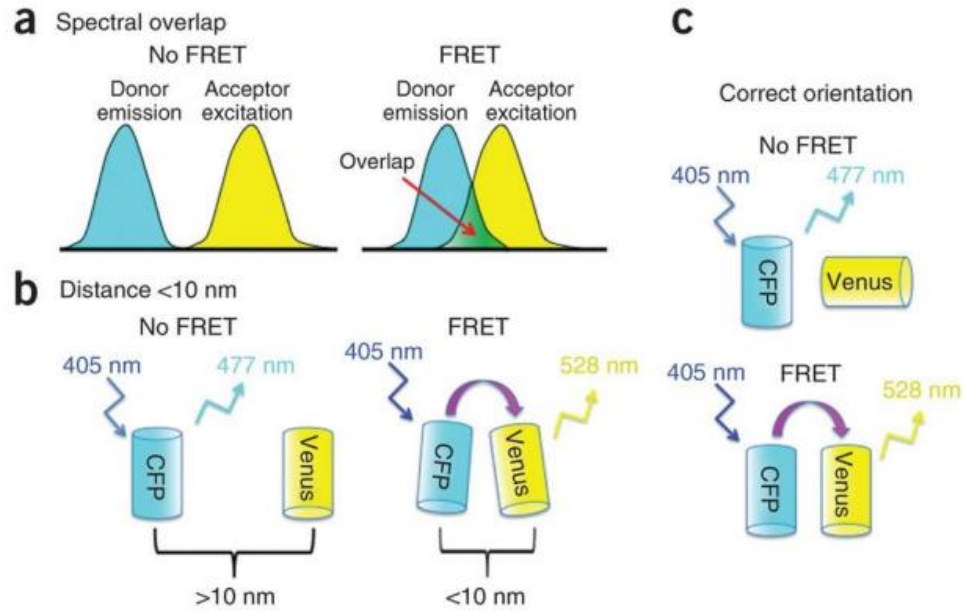


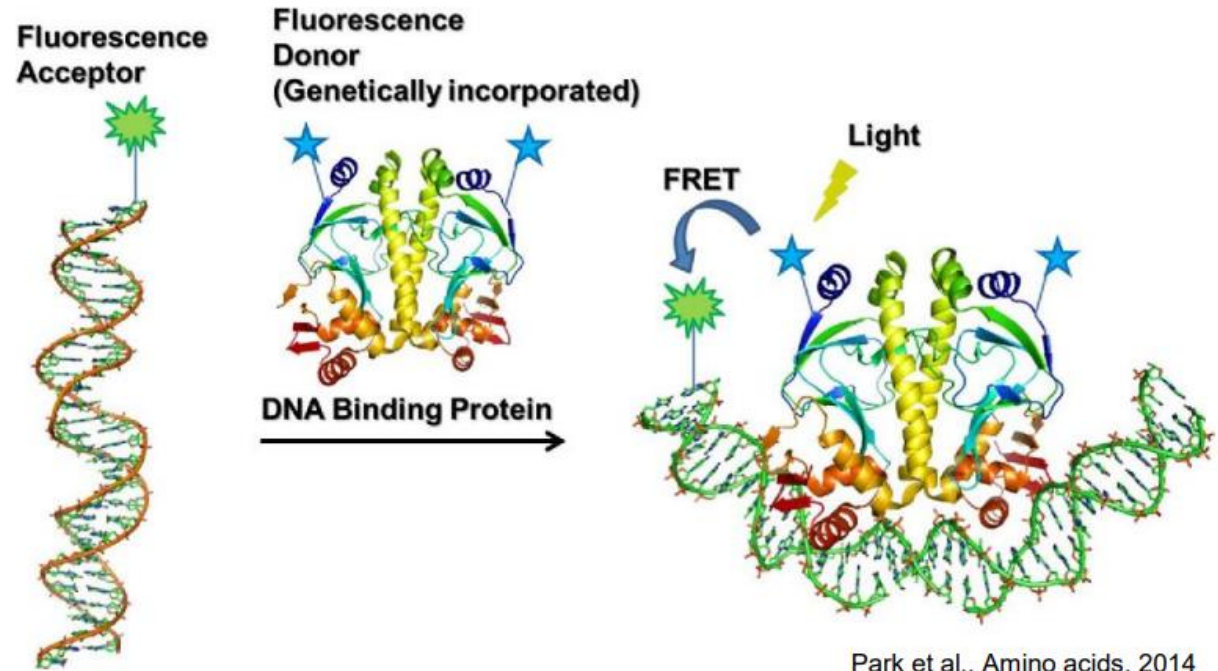
Figure 3. Schematic representation of the interaction of two different fluorescent protein chimeras. Protein-protein interactions between proteins labeled A and B bring Blue fluorescent protein and Green fluorescent proteins in close enough proximity to allow for FRET to occur. In this example, excitation of blue fluorescent protein results in the emission of fluorescence by Green fluorescent protein.

FRET

Fluorescence / Förster resonance energy transfer

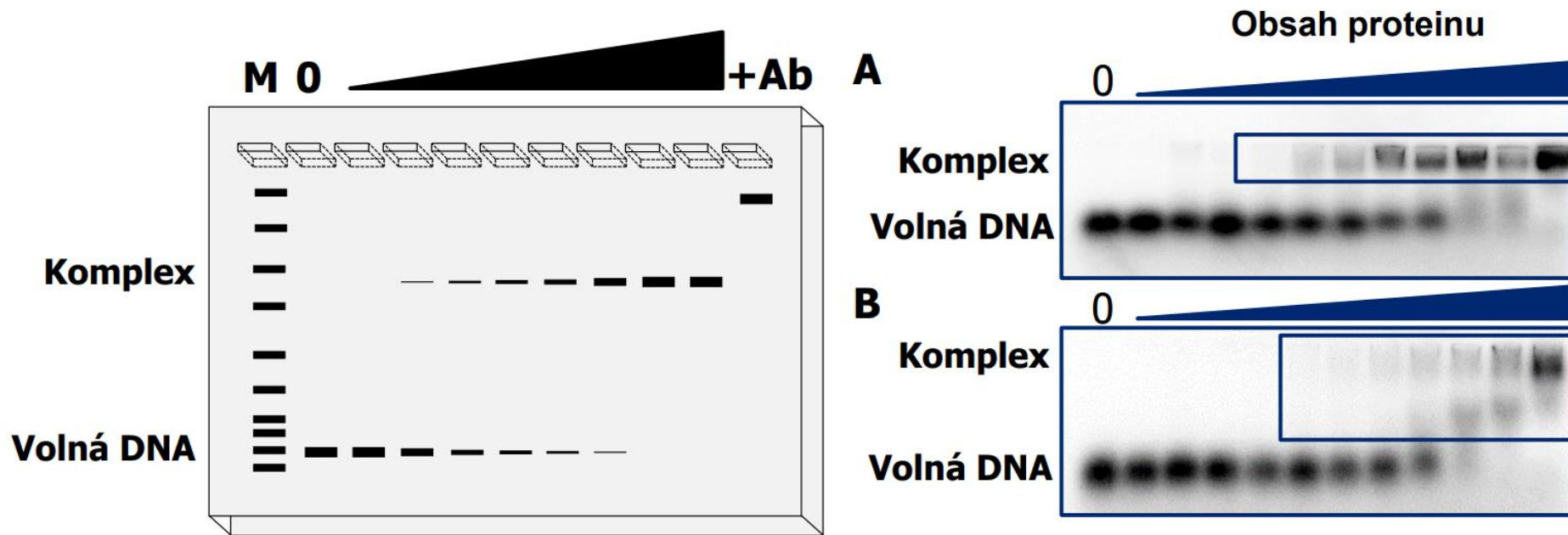


<https://www.photometrics.com/learn/physics-and-biophysics/fret>



Park et al., Amino acids, 2014

Electro-Mobility Shift Assay (EMSA)

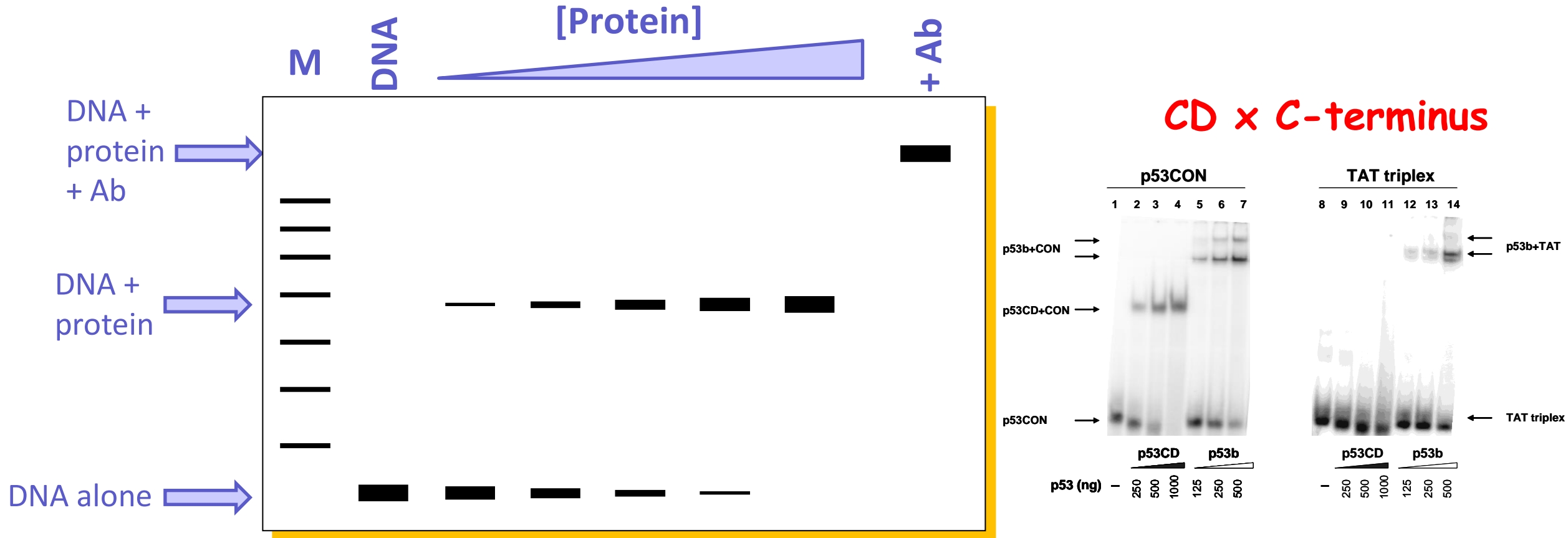


- Stanovení afinity interakce protein- DNA
- Interakce probíhá in vitro
- Nutnost značení DNA (Radioaktivita/ fluorescence)
- Separace gelovou elektroforézou (PA, Agarose)
- Sledujeme zbrzdění (shift) migrace komplexu DNA-protein v elektrickém poli
- Migrace molekuly (komplexu) v elektrickém poli je závislá na její velikosti a náboji

TEST

EMSA ("Gel Shift" Assay)

- Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) or "gel shift" can provide information about protein-NA interactions



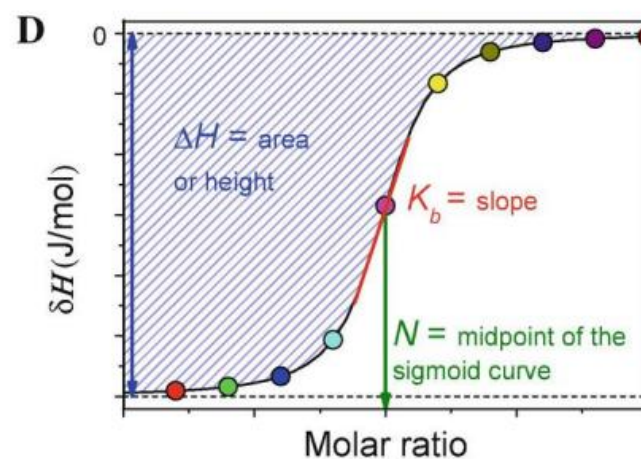
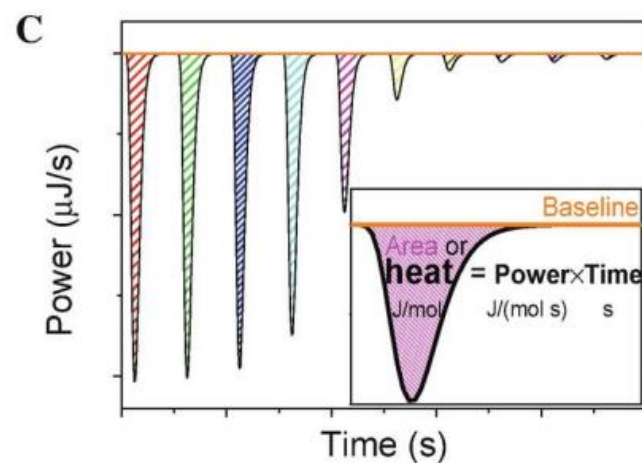
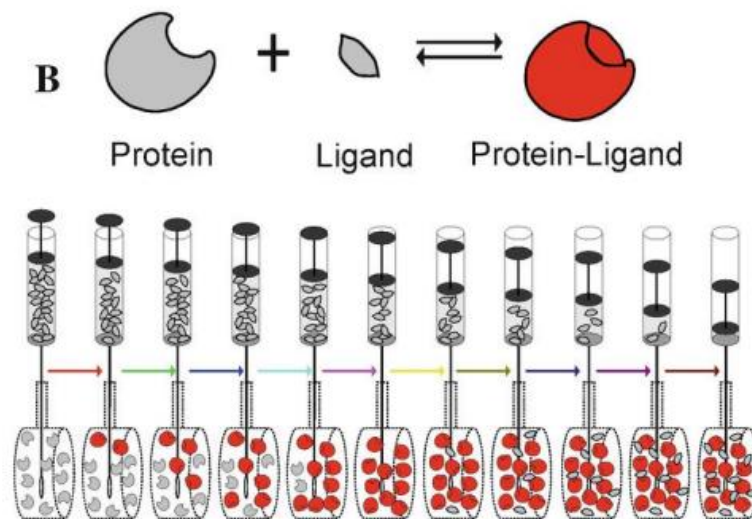
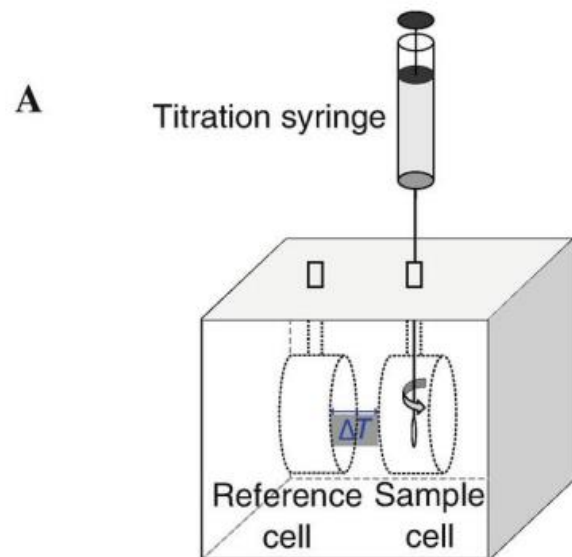
Poměrně přímočará technika, ale poskytuje pouze přesvědčivá data pro interakce s vysokou afinitou (typicky $< \mu\text{M}$)

ITC – izotermální titrační kalorimetrie

- Stanovení stechiometrie interakce
- Protein (v cele) je titrován ligandem (DNA)
- Náročné na čistotu a koncentraci proteinu
- Vysoká spotřeba purifikovaného proteinu
- Nutná optimalizace podmínek interakce
- Získáme veškeré termodynamické informace o interakci



ITC – izotermální titrační kalorimetrie



$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = RT \ln K_d$$

ΔG - Gibbs Free Energy, or "available energy"

ΔH - Enthalpy change

T- Temperature in Kelvin

ΔS - Entropy change

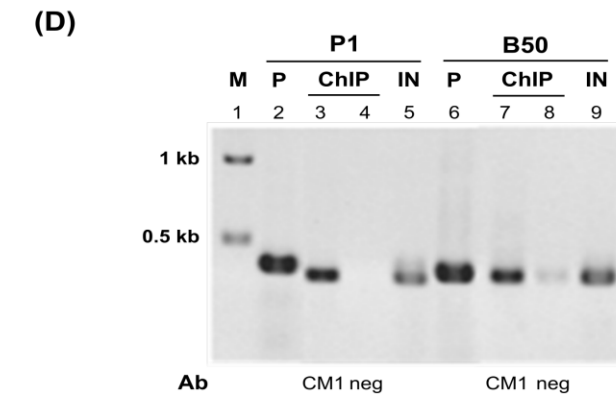
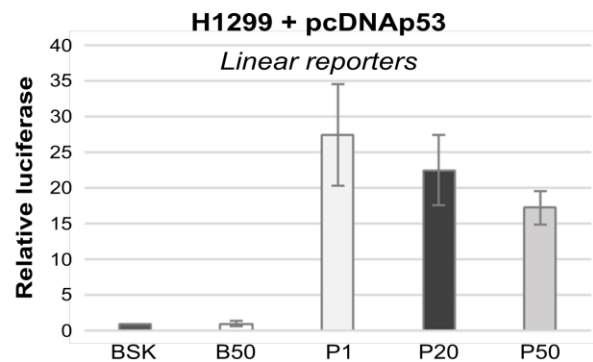
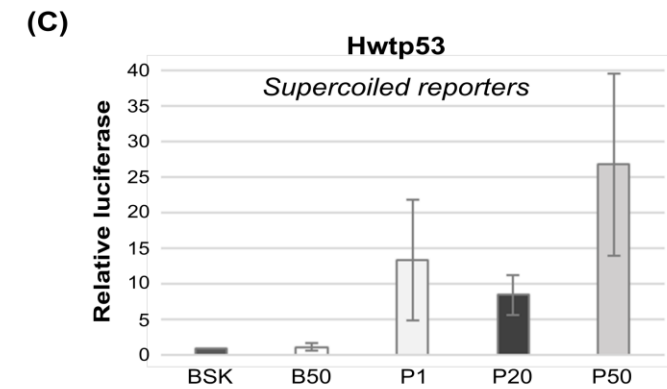
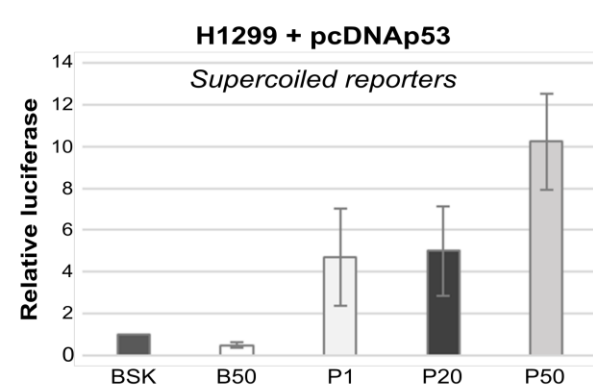
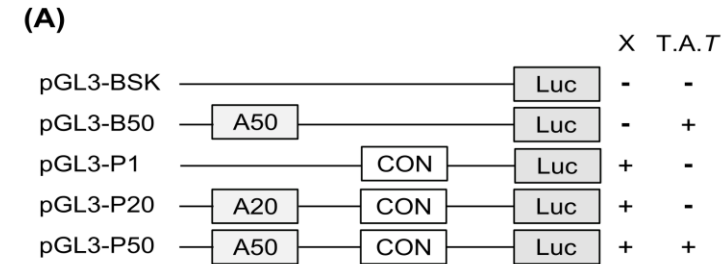
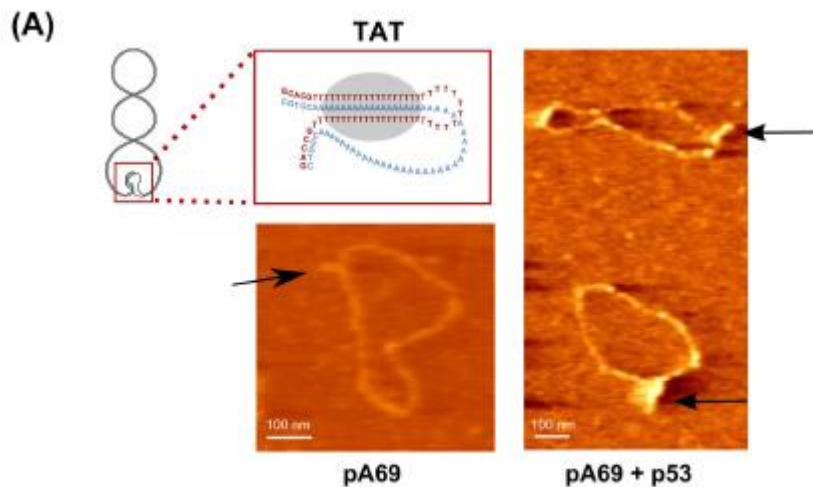
R- Gas constant, $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

K_d - Dissociation rate

p53 Specifically Binds Triplex DNA *In Vitro* and in Cells

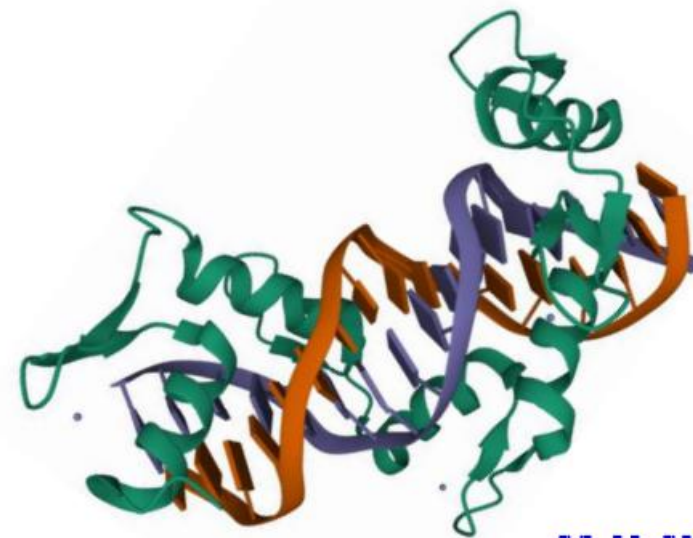
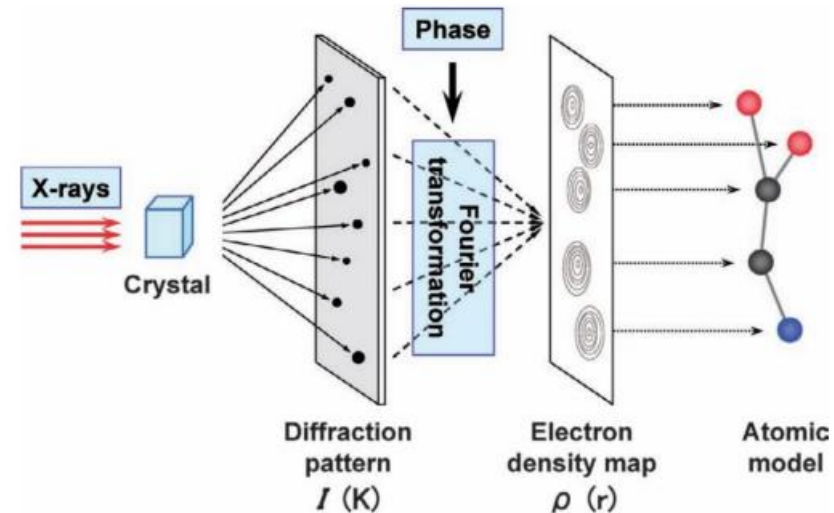
Marie Brázdová^{1*}, Vlastimil Tichý¹, Robert Helma¹, Pavla Bažantová¹, Alena Polá Aneta Krejčí², Marek Petr¹, Lucie Navrátilová¹, Olga Tichá¹, Karel Nejedlý¹, Martin L. Bennink³, Vinod Subramaniam³, Zuzana Bábková², Tomáš Martínek⁴, Matej Le: Matej Adámik¹

1 Department of Biophysical Chemistry and Molecular Oncology, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Brno, Czech Republic, **2** Department of Molecular Biology and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Brno, Brno, Czech Republic, **3** Biophysical Engineering Group, Faculty of Science and Technology, University of Twente, Enschede, The Netherlands, **4** Department of Computer Systems, Faculty of Information Technology, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic, **5** Department of Information Technologies, Faculty of Informatics, Masaryk University, Brno, Czech Republic



Ko-krytalizace a NMR

- Strukturní analýza
- Náročná na přípravu vzorků
- Finančně a časově nákladná
- NMR – speciální živná média obohacená o uhlík ^{13}C
- Přesná strukturní data



Shrnutí :

analýza genové exprese

- studium transkripce (mRNA-northern přenos, RT-PCR, hybridizace IN SITU, primer extension)
- srovnání transkriptomů (RT-PCR, siRNA, DNA microarrays, ..)
- Analýza promotorů a interakcí protein-DNA (reporterové geny, lokalizace promotoru, identifikace promotorových regulačních oblastí-elementů, footprinting, EMSA..)
- Analýza translace (proteiny-WB, chip, IP)