

# Studium přítomnosti proteinů v buňkách (analýza proteomu)

Metody pro stanovení fyzické přítomnosti proteinů:

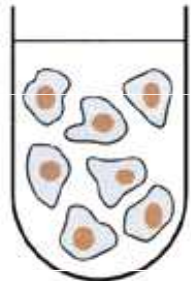
- polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
- westernový přenos
- imunoprecipitace
- imunohistochemie
- izoelektrická fokusace
- dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- chromatografie
- fluorescenční a elektronová mikroskopie
- průtoková cytometrie

## ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

Použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plasmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané čtyři metody jsou tu ukázány schematicky.

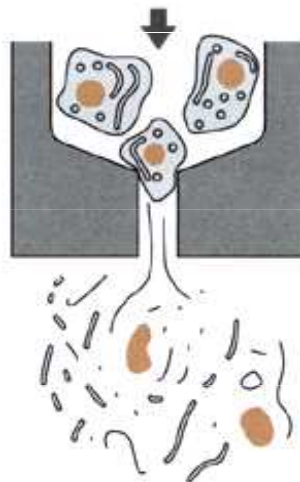
Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.



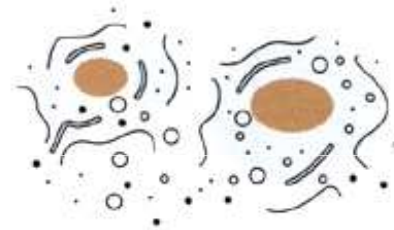
suspenze buněk nebo tkáň



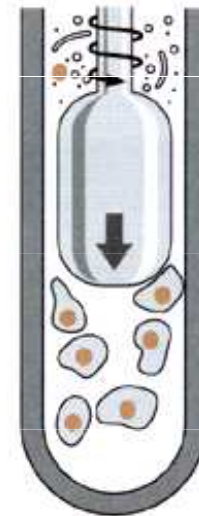
① rozbití buněk ultrazvukem



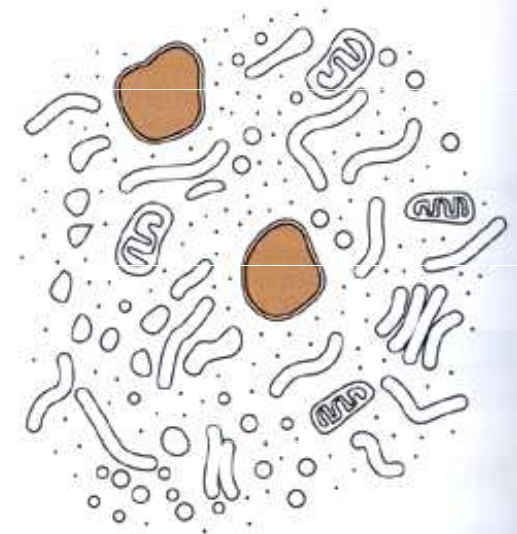
③ protlačení buněk malým otvorem



② použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



④ rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce



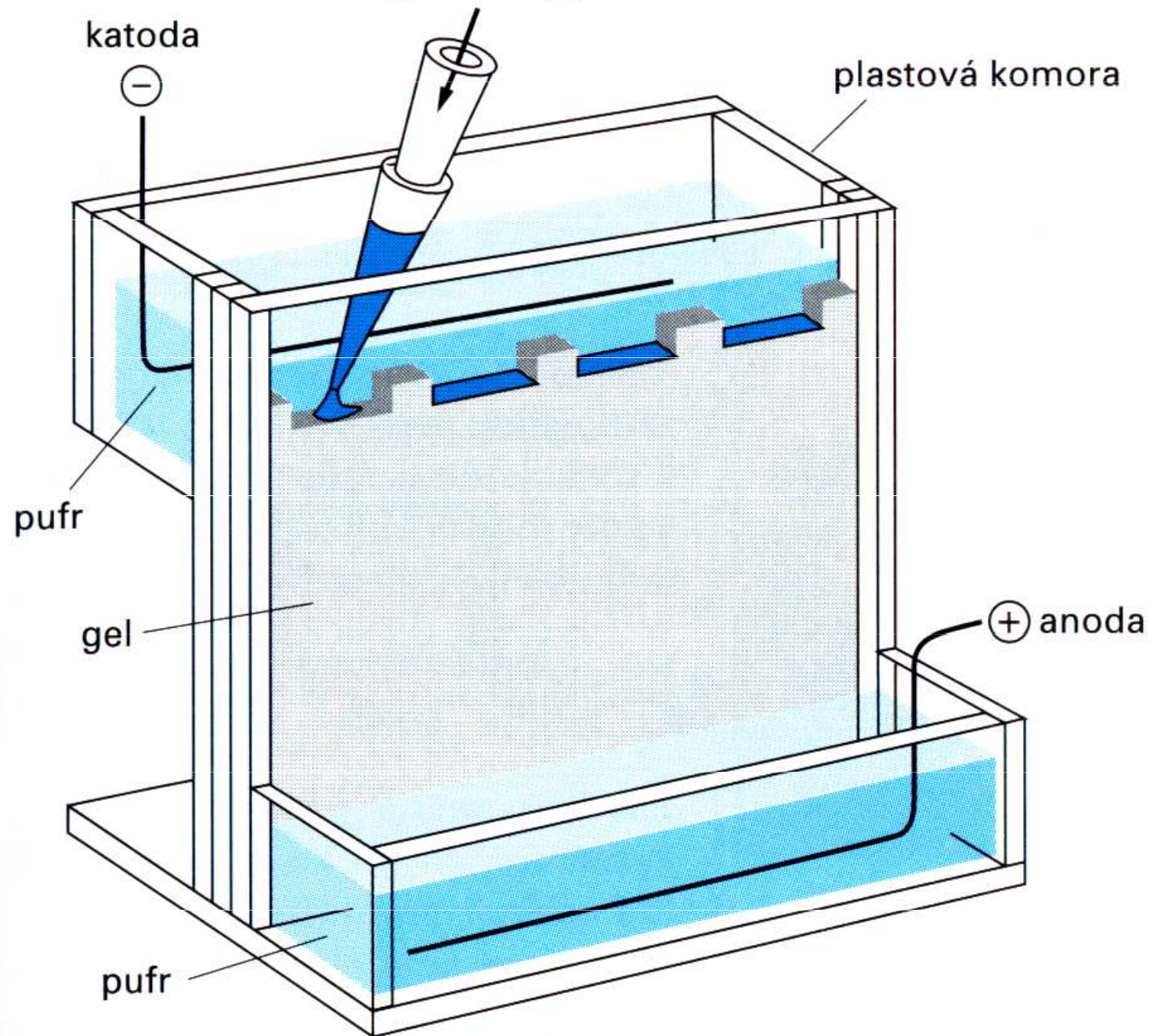
Při opatrné práci lze získat téměř všechny organely v neporušeném stavu.

# Elektroforetické techniky

- založeny na schopnosti pohybu nabitých molekul v elektrickém poli
- proteiny se obvykle rozdělují polyakrylamidovou gelovou elektroforézou
- polymerovaný gel se vloží mezi dvě nádoby naplněné pufrem, do kterých se ponoří elektrody
- u deskové varianty se vzorky nanesou do jamek na horní straně gelu
- používají se alkalické pufry, které proteinům udělí **negativní náboj** - v elektrickém poli pohyb směrem k anodě

# GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

vzorek se nanáší na gel  
speciální pipetou



# Faktory ovlivňující pohyblivost proteinů v gelu

- **velikost:** se vzrůstající velikostí molekuly se snižuje pohyblivost proteinů v gelu (efekt molekulárního síta)
- **tvar:** globulární proteiny se pohybují rychleji než vláknité
- **hustota náboje** (náboj/jednotka hmoty): čím vyšší hustota náboje tím vyšší pohyblivost v gelu
- **koncentrace akrylamidu:** se vzrůstající koncentrací pohyblivost klesá

# SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

- proteiny zaujímají různé tvary a disponují různými náboji (na rozdíl od molekul DNA, které jsou uniformní z hlediska tvaru a rozdělení náboje):
- pro separaci proteinů se běžně používá denaturační varianta PAGE zvaná **SDS-PAGE**
- proteiny se rozpouští ve roztoku obsahujícím negativně nabitou molekulu SDS
- disulfidové vazby se eliminují redukčním činidlem ( $\beta$ -merkaptoetanolem)
- denaturace proteinů je dokončena varem

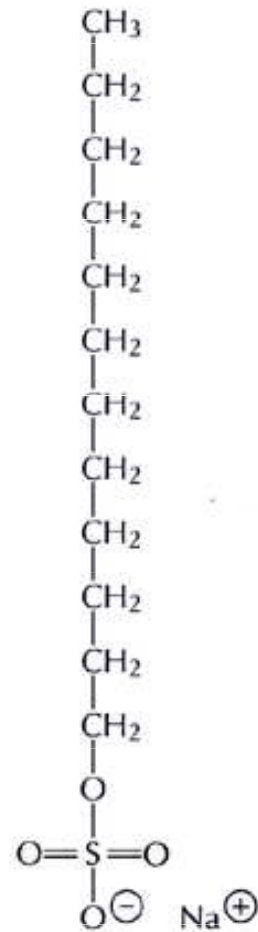
# SDS -polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Negativní náboj SDS a jeho vazba do hydrofobních oblastí proteinů způsobí:

- zamaskování vlastního náboje proteinu
- elektrostatické odpuzování molekul SDS vede k natažení proteinu (denaturaci) a eliminuje se tak vliv tvaru proteinu na pohyblivost
- počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti. Proto má každý protein, bez ohledu na svou velikost, ekvivalentní hustotu náboje.
- větším proteinům bude kladen v gelu větší odpor a jejich pohyb bude pomalejší (efekt molekulárního síta).

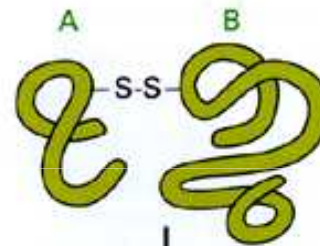
**Proteiny se při SDS-PAGE separují pouze podle jediné vlastnosti: molekulové hmotnosti.**

detergent  
dodecylsulfát sodný  
(SDS) se používá  
pro solubilizaci  
proteinů, které  
se pak dělí v SDS-  
polyakrylamidové  
gelové  
elektroforéze



SDS

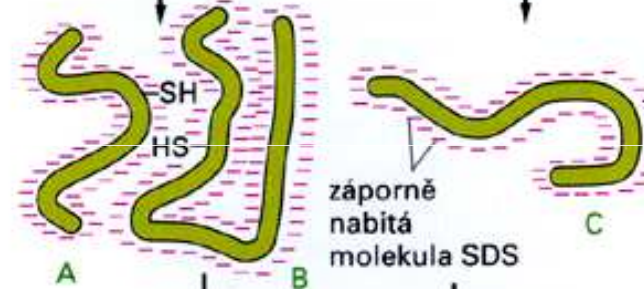
protein s dvěma  
podjednotkami A a B  
spojenými disulfidovou  
vazbou



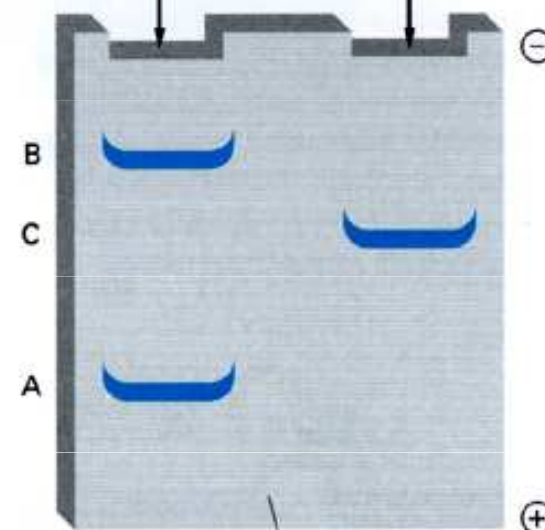
samostatná  
podjednotka



zahřátí s SDS a merkaptoethanolem



polyakrylamidová gelová elektroforéza



destička polyakrylamidového gelu



# Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

- **nespecificky**: obarvení všech proteinů ve vzorku proteinovými barvivy
- **specificky**: westernový přenos (detekce specifických proteinů protilátkami)

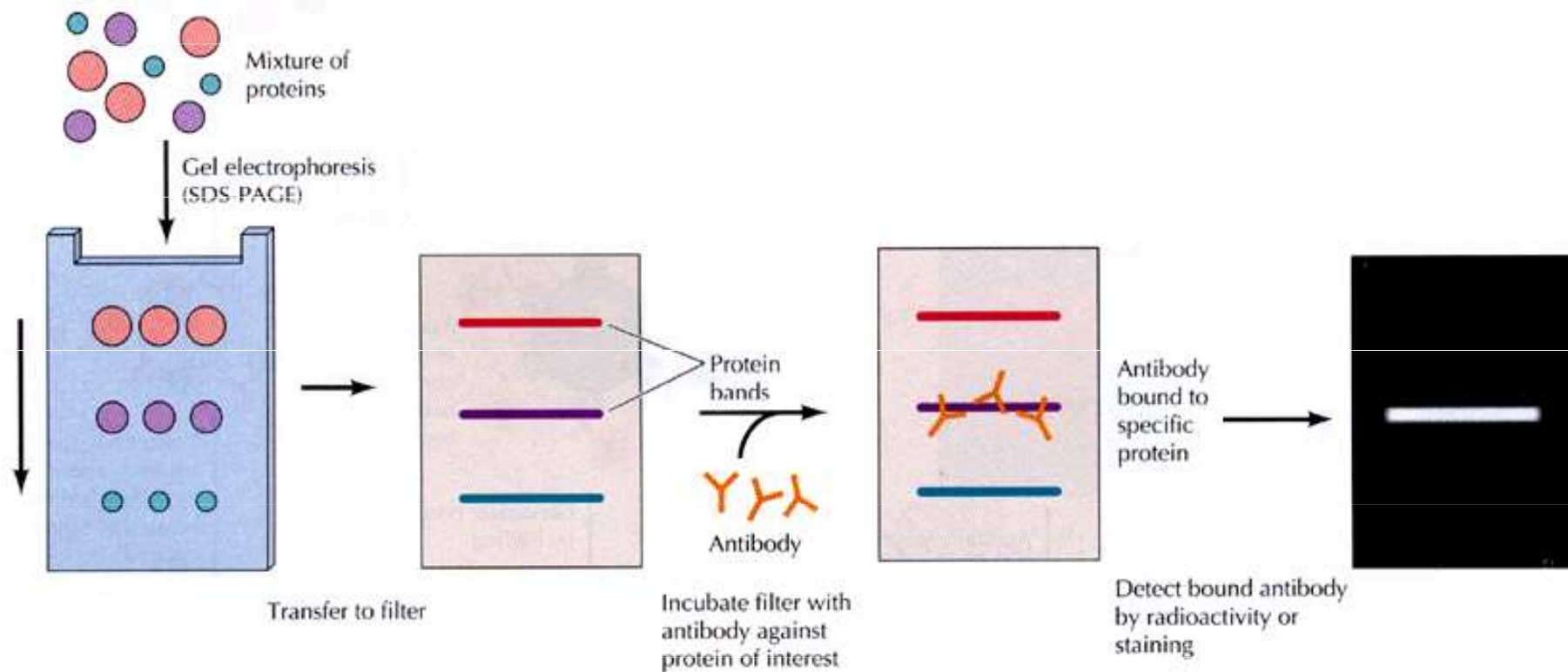
## Nespecifické barvení proteinů v gelech:

- stříbro, „coomassie brilliant blue“

## Specifické barvení proteinů při westernovém přenosu:

- přenos rozdělených proteinů z gelu na pevný filtr (**elektroblotting**)
- navázání protilátky na příslušný antigen při promývání filtru v roztoku specifické primární protilátky (protilátka musí rozeznat lineární epitop - protein je denaturován)
- zviditelnění protilátky na filtru např. **radioaktivní sondou** nebo **sekundární protilátkou konjugovanou s určitým enzymem**

# Zviditelnění proteinů westernovým přenosem

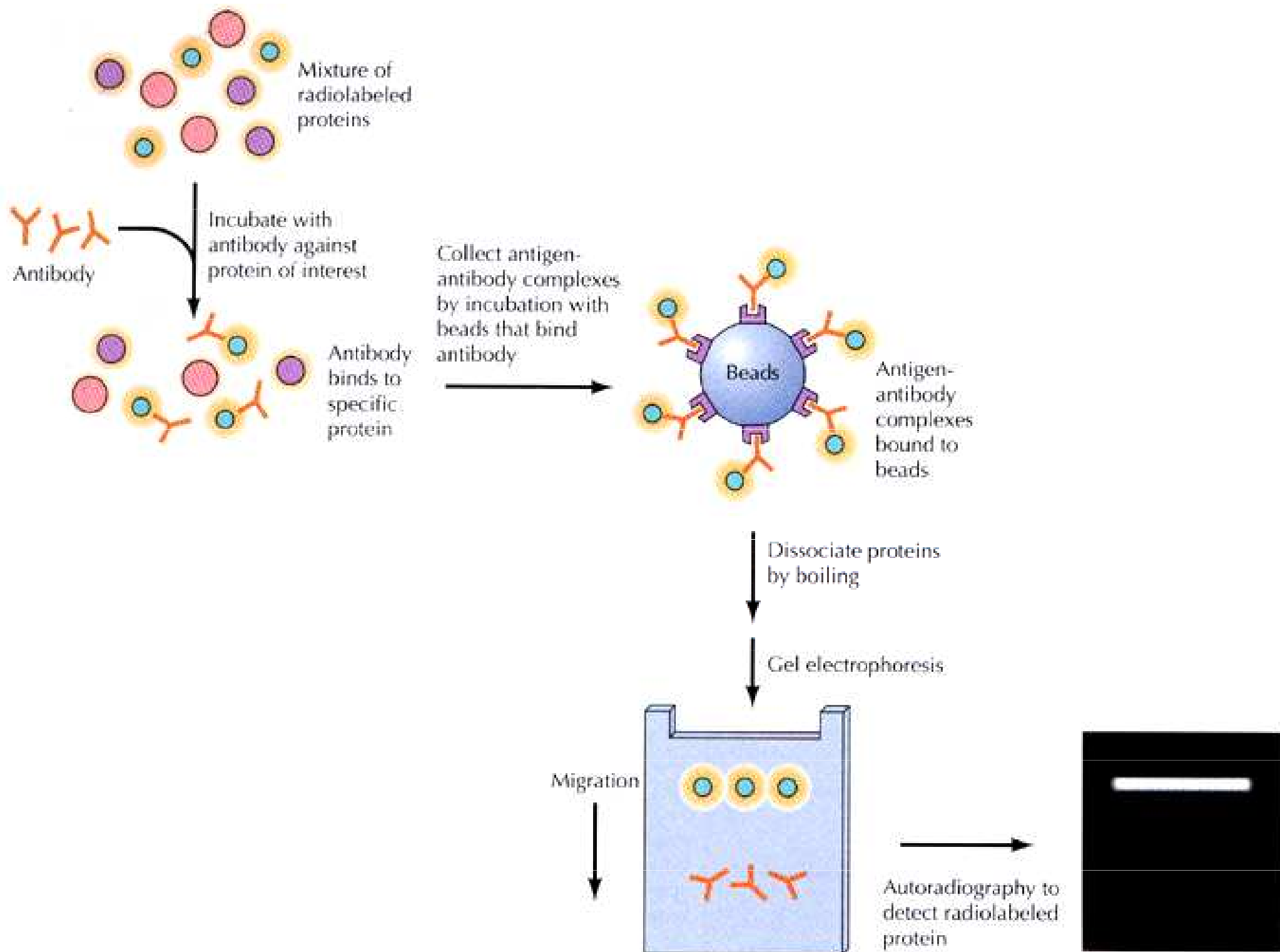


# Imunoprecipitace

- technika izolace specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek

## Obvyklý postup:

- označení buněčných proteinů inkubací buněk za přítomnosti radioaktivně značených aminokyselin (není nutné, pokud jsou k dispozici jiné metody pro detekci vysrážených a od protilátek oddělených proteinů)
- lýze buněk
- inkubace buněčných extraktů, které obsahují značené proteiny s protilátkou specifickou pro cílový protein
- vytvořené komplexy se oddělí od zbytku extraktů prostřednictvím kuliček vážoucích imunoglobuliny
- varem se cílové proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček
- elektroforéza, autoradiografie (westernový přenos)



# Použití imunoprecipitace pro studium meziproteinových interakcí

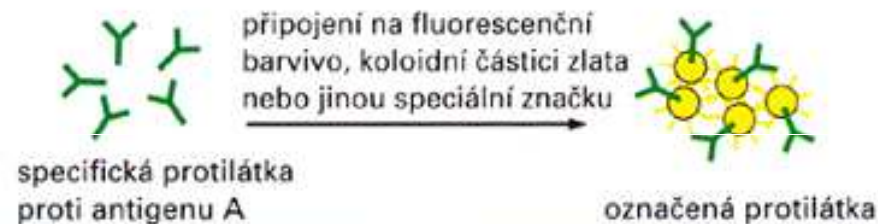
- technika kombinující imunoprecipitaci za nativních podmínek a westernový přenos

## Obvyklý postup:

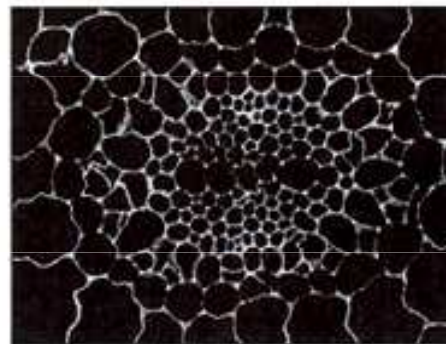
- precipitace cílového proteinu z buněčných extraktů protilátkou za takových podmínek, které neničí vazby mezi proteiny
- cílový protein bude precipitován v komplexu se svými přirozenými partnery
- purifikované komplexy se denaturují a podrobí SDS-PAGE
- přítomnost současně precipitovaných partnerských proteinů se stanoví westernovým přenosem

# Imunohistochemie

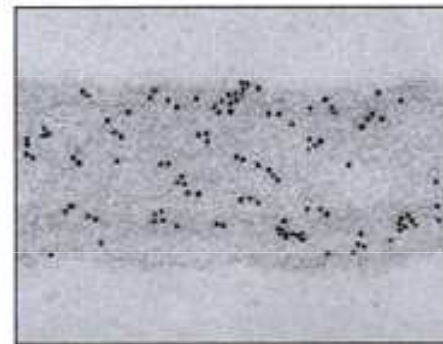
- určení, ve kterých buňkách je daný protein přítomen (obdoba hybridizace nukleových kyselin *in situ*)
- určení, v které části buňky je daný protein přítomen (membránový, cytoplazmatický, jaderný) - lokalizace naznačuje funkci



Mikroskopická detekce



Fluoreskující protilátka váže antigen A ve tkáni a lze ji detegovat ve světelném mikroskopu. Antigenem je tu pektin v rostlinných buňkách.



Zlatem označená protilátka se váže na antigen A ve tkáni a lze ji odhalit v elektronovém mikroskopu. Antigenem je opět pektin ve stěně rostlinné buňky.

# Izoelektrická fokusace

- varianta elektroforézy, kde podpůrným médiem je polyakrylamidový gel obsahující směs **amfolytů**

## Amfolyty:

- polymery o nízké molekulové hmotnosti, které mají různé poměry pozitivně nabitých aminoskupin a negativně nabitých karboxylových skupin
- při elektroforéze se amfolyty rovnoměrně rozdělují v gelu podle náboje a tak v něm vytvářejí gradient pH

## Princip:

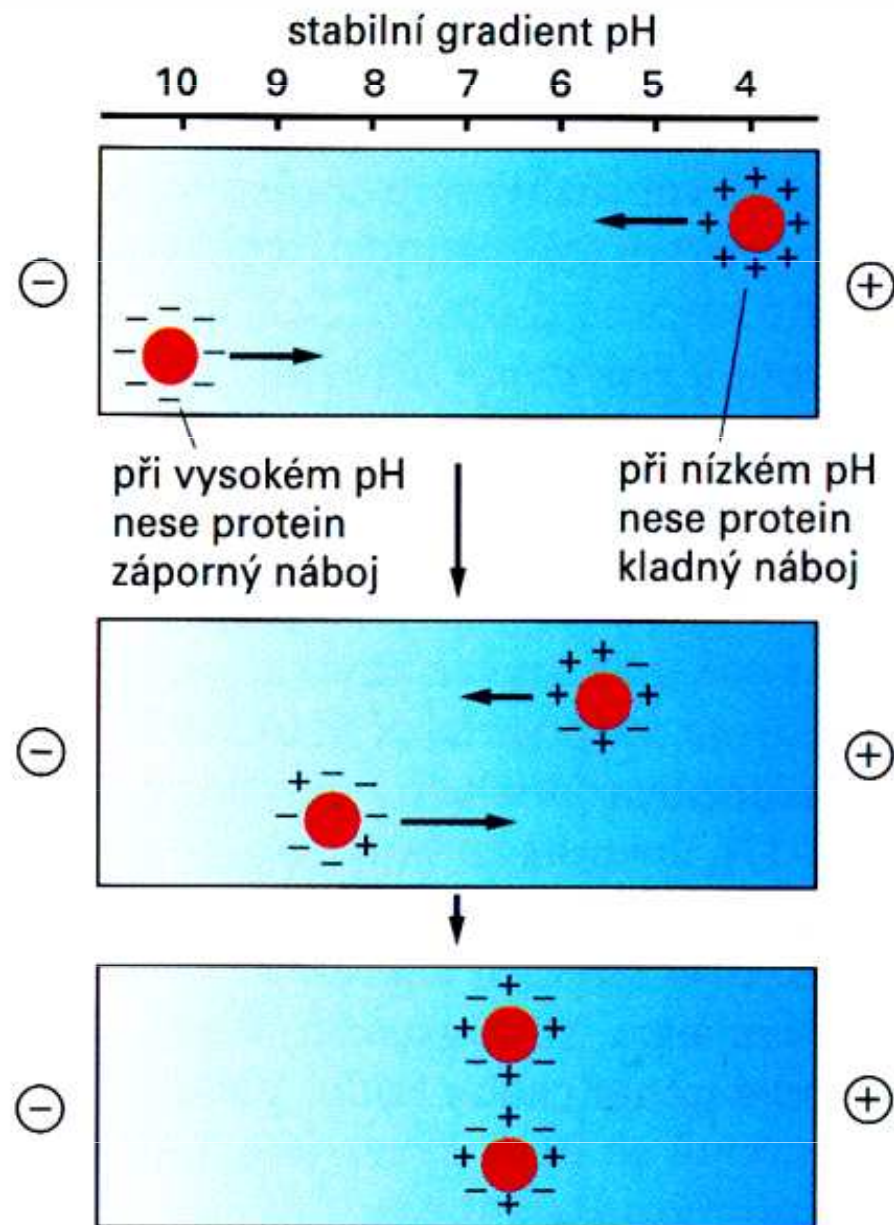
- proteiny se pohybují gelem a jsou vystaveny gradientu pH
- změnou pH se mění iontový náboj, který proteiny nesou
- protein se dostane do oblasti takového pH, při kterém nemá žádný náboj (**je v izoelektrickém bodu**) a jeho pohyb se zastaví

## Výhoda:

- protein je soustředěn do velmi ostrého proužku

# IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

Každý protein je charakterizován svým **izoelektrickým bodem**, což je pH, při kterém protein nenes žádný výsledný elektrický náboj. V tomto bodě se nebude pohybovat v elektrickém poli. Při **izoelektrické fokusaci** se proteiny dělí elektroforézou v tenké trubičce s polyakrylamidovým gelem, v níž je vytvořen gradient pH ze směsi speciálních pufrů. Každý protein se pohybuje až do vzdálenosti, která odpovídá jeho izoelektrickému bodu, a tam setrvá.



Protein v naší ukázce má izoelektrický bod při pH 6,5



# Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

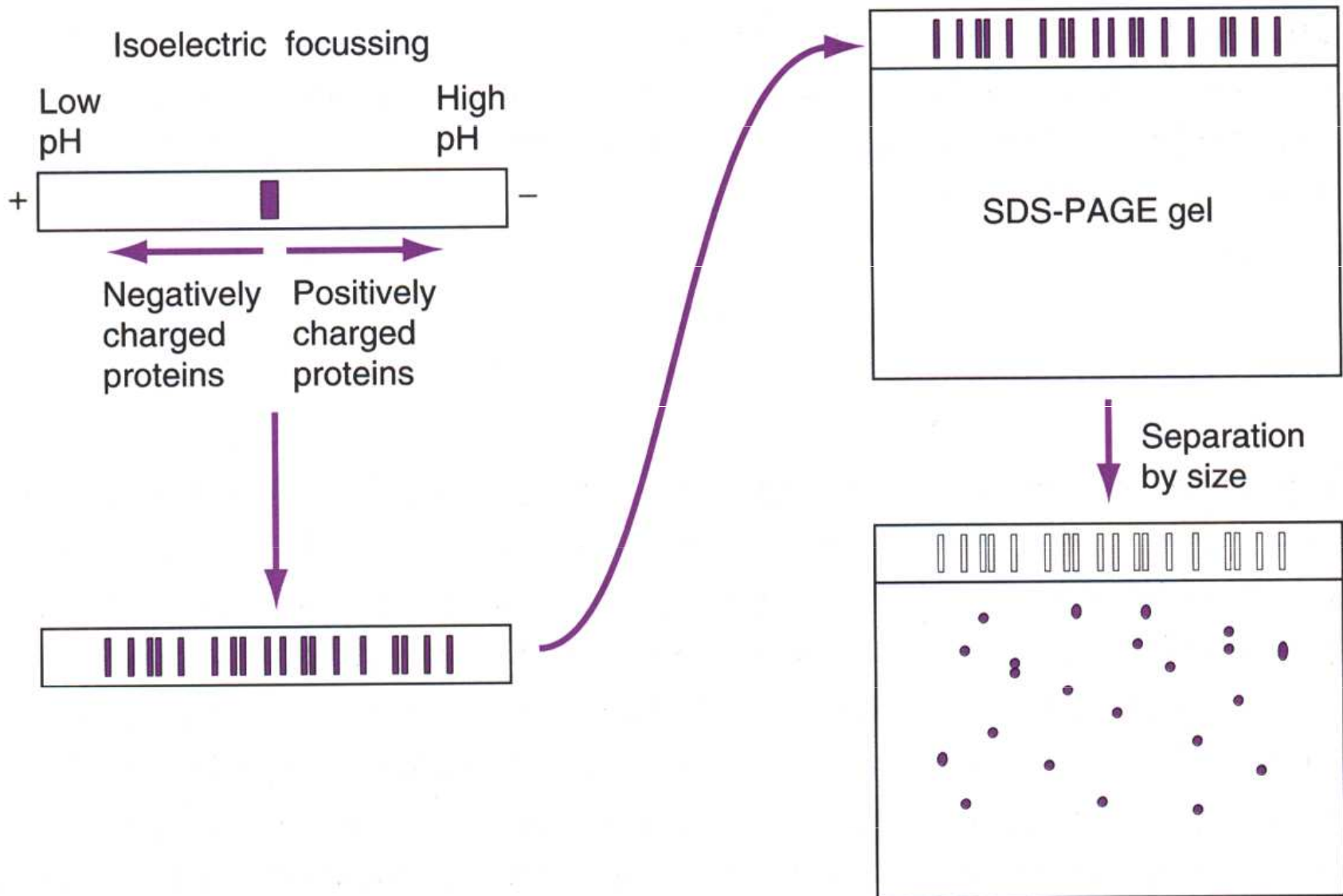
- pro dělení komplexních směsí proteinů, které nelze řádně rozdělit jednorozměrnou elektroforézou
- možno srovnat úplný proteom v buňkách vystavených různým podmínkám, v buňkách zdravých a nemocných, zjistit změny proteomu v průběhu diferenciaci, apod.

## Obvyklý postup:

- nativní proteiny se dělí v úzkém pásu gelu podle elektrického náboje izoelektrickou fokusací
- pruh gelu s proteiny se umístí na desku gelu a zapojí se elektrické pole jako u SDS-PAGE ve směru kolmém ke směru fokusace
- každý protein má na ploše gelu jedinečné místo

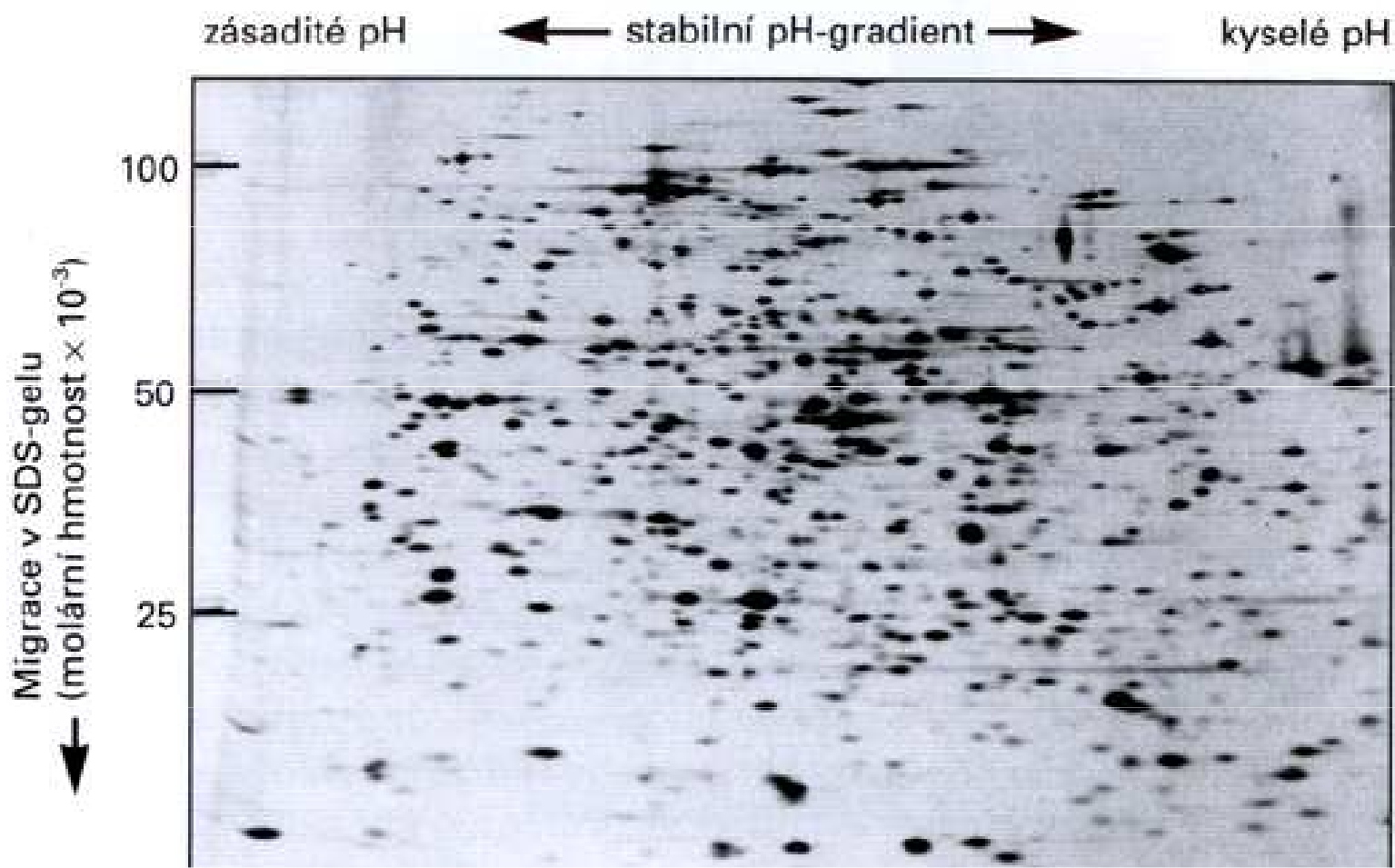
Výhoda: vysoká rozlišovací schopnost - více než 1000 proteinů/gel

# Dvourozměrná elektroforéza proteinů



## DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Všechny proteiny  
buňky bakterie  
*Escherichia coli* jsou  
rozděleny na tomto  
dvourozměrném  
gelu, na němž každá  
skvrna odpovídá  
jinému polypeptidu.  
Nejdříve byl vzorek  
rozdělen  
izoelektrickou  
fokusací zleva  
doprava a pak  
elektroforézou podle  
své hmotnosti shora  
dolů.



# Sloupcová chromatografie

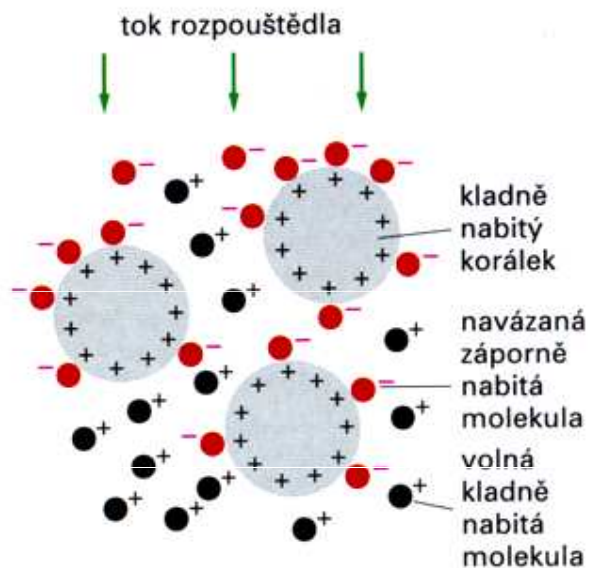
## Obvyklý postup:

- směs proteinů v roztoku se pomalu nalévá na válcovou kolonu naplněnou propustnou pevnou matricí ponořenou do rozpouštědla
- kolona se promývá
- různé proteiny mají různou míru afinity s náplní kolony a proto je lze odděleně sbírat při výtoku z kolony
- podle typu náplně můžeme proteiny dělit např. podle velikosti nebo podle schopnosti vázat se na určité chemické skupiny náplně

# Tři druhy sloupcové chromatografie

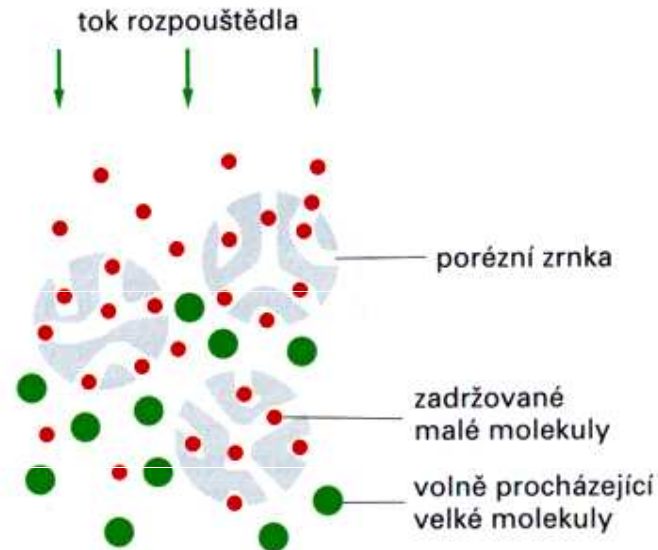
- **iontoměničová:** podle náboje, vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku
- **gelová:** podle velikosti
- **afinitní:** náplň je opatřena molekulami, které specificky interagují s cílovým proteinem (např. protilátka/antigen, enzym/substrát)

# Tři druhy sloupcové chromatografie



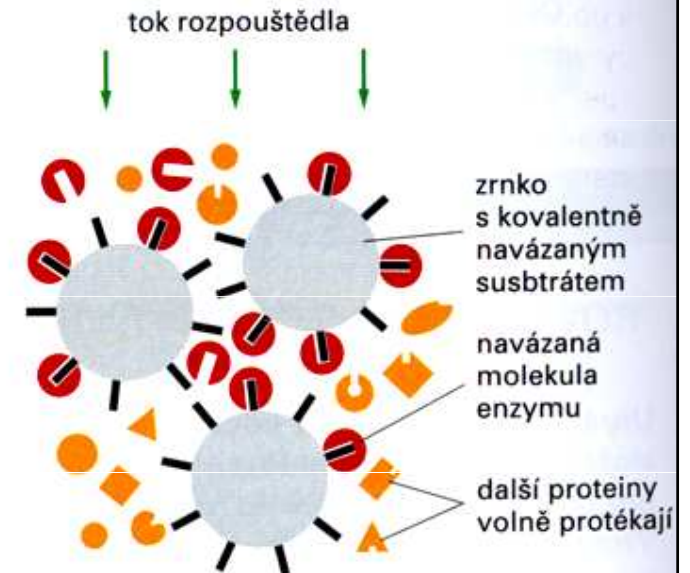
(A) IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kolony jsou naplněny iontoměničem s navázanými kladnými nebo zápornými náboji tak, aby zadržovaly proteiny s opačnou polaritou. Vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku, který kolonou protéká. Ty lze regulovat tak, aby se dosáhlo účinné separace.



(B) GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Při gelové filtraci se dělí proteiny podle velikosti. Náplň se tady skládá z porézních zrnok, kdy malé molekuly proteinů mohou vstupovat do pórů, a jsou tak zadržovány v postupu kolonou. Proteiny, které jsou větší a nemohou pronikat do porézních zrnok, procházejí kolonou rychleji.



(C) AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Kolony pro afinitní chromatografii obsahují náplň, která je kovalentně vázána k molekulám, jež specificky reagují se studovaným proteinem (např. protilátkou nebo substrátem enzymu). Proteiny specificky navázané v koloně lze pak uvolnit změnou pH nebo koncentrace solného roztoku, kterým se kolona promývá. Proteiny pak získáme zcela čisté.

# Proteomika

- určuje úplný profil všech proteinů, které daný organismus (buňka) vytváří za definovaných podmínek
- na rozdíl od genomu, který se neliší v buňkách téhož organismu, je proteom proměnlivý podle vnějších a vnitřních faktorů

# Proteomické přístupy

- dvourozměrná elektroforéza
- definování proteinů rozdělených na gelu (určení sekvence aminokyselin, westernový přenos)

nebo

- štěpení eluovaných proteinů proteolytickým enzymem a stanovení molekulové hmotnosti vzniklých peptidů hmotnostní spektrometrií, srovnání hmotnostních spekter s databázemi - identifikace proteinu



# Průtoková cytometrie

## Co dokáže?

- spočítat buňky v suspenzi
- rozlišit živé buňky od mrtvých
- vyhodnotit více než 100 buněk za 1 minutu
- zhodnotit míru emitované fluorescence
- frakcionovat buňky podle určitých vlastností, které korelují s mírou fluorescence

# Průtoková cytometrie

Účel: Studium vlastností individuálních buněk v buněčné populaci

- míra přítomnosti určitých antigenů (diferenciace)
- míra přítomnosti DNA (buněčný cyklus, apoptóza)
- velikost buněk, přítomnost granulí v cytoplazmě (determinace buněčných typů ve směsích buněk)
- možno využít k frakcionaci buněk dle určitých vlastností (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorter)

# Průtoková cytometrie

Princip: Počítačové zpracování míry fluorescence jednotlivých buněk

Předpoklad: Míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru (antigen, DNA...)

Pojmy:

„Flow cytometry“ - měření určité vlastnosti buněk v průběhu jejich toku přístrojem

„Flow sorting“ (Fluorescence-activated cell sorting FACS) oddělování buněk podle jejich vlastností zjištěných v průběhu průtokové cytometrie

FACS není totéž jako průtoková cytometrie (termín označuje jen separaci buněk, ne analýzu)

# Průtoková cytometrie

## Postup:

- koncentrovaná suspenze buněk je opatřena fluorescenční značkou specifickou pro cílovou molekulu (pro DNA - propidium jodid, pro protein - fluoreskující protilátka)
- buněčná suspenze je rozdělena na malé kapičky (každá z nich obsahuje jednu buňku) ultrazvukem
- jednotlivé kapičky jsou ozářeny laserovým paprskem - dojde k excitaci fluorescenční značky a emisi fluorescence
- měření míry fluorescence pro každou buňku (určuje míru přítomnosti cílové molekuly)
- měření míry rozptylu světla pro každou buňku (určuje míru granulace cytoplazmy, velikost a tvar buňky)

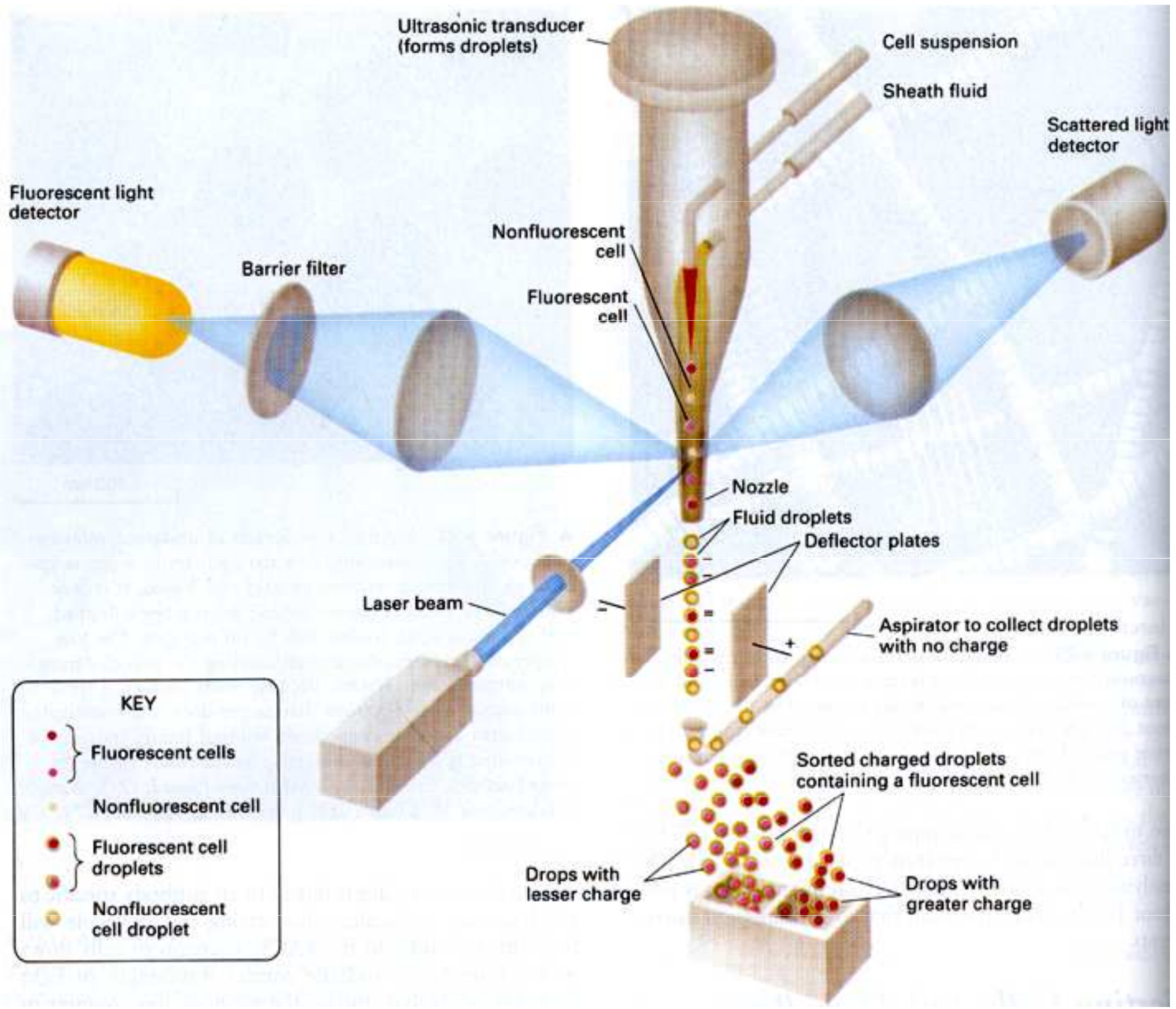
# Frakcionace buněk - FACS

## Princip:

- podle míry fluorescence je každé kapičce s jednotlivou buňkou udělen proporcionální elektrický náboj
- kapičky procházejí prostorem mezi dvěma elektrodami a dochází k jejich frakcionaci podle náboje

## Výhoda:

- buňky nejsou průtokovou cytometrií poškozeny - udržují si životaschopnost
- buňky nejsou kontaminovány - lze je dále kultivovat



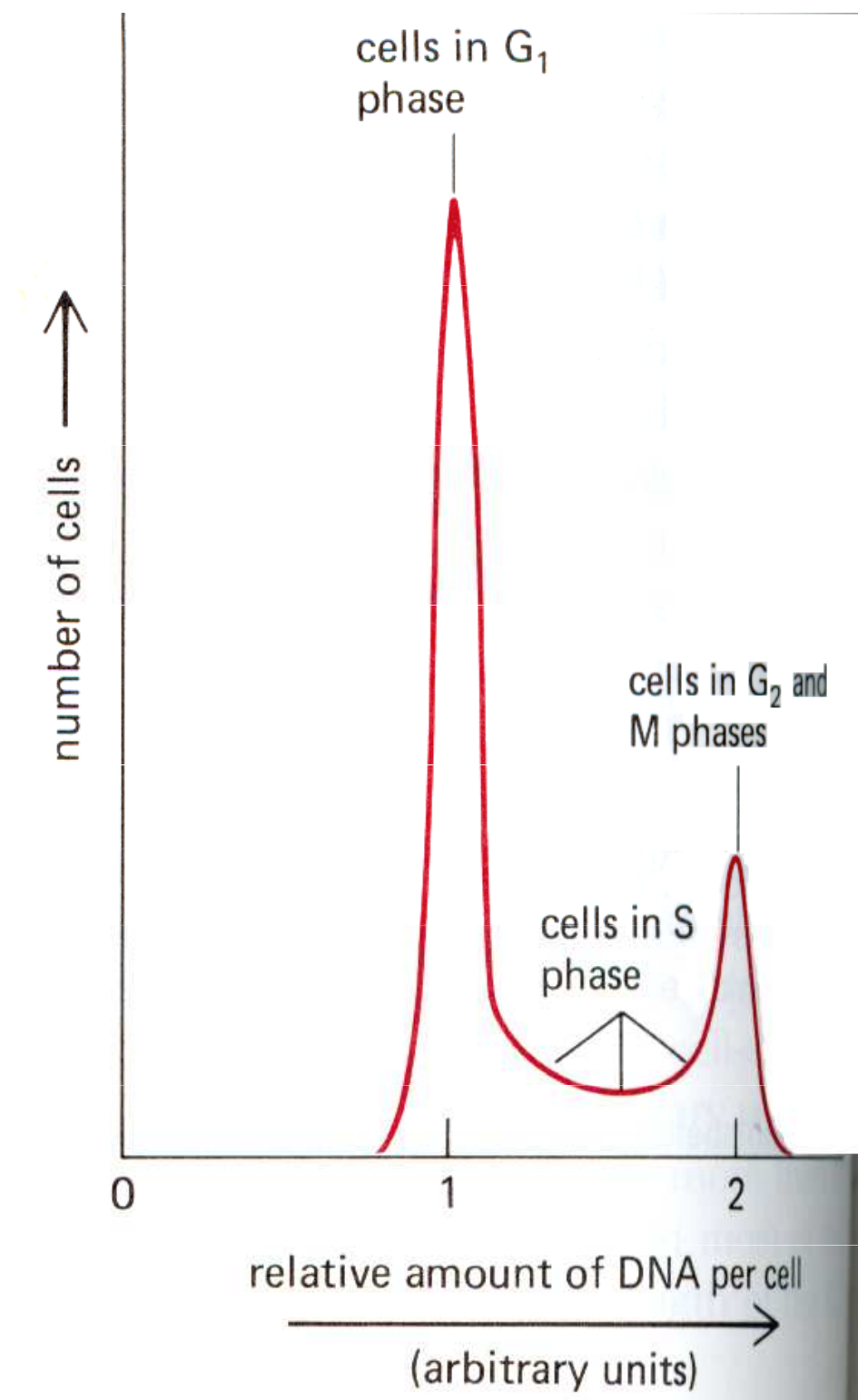
# Využití průtokové cytometrie pro analýzu buněčného cyklu

## Princip:

- měření obsahu DNA jednotlivých buněk, který se v průběhu cyklu periodicky mění

## Postup:

- obarvení DNA fluorescenčním barvivem - propidium jodidem
- měření míry fluorescence emitované jednotlivými buňkami
- počítačové zpracování dat a grafické vyhodnocení



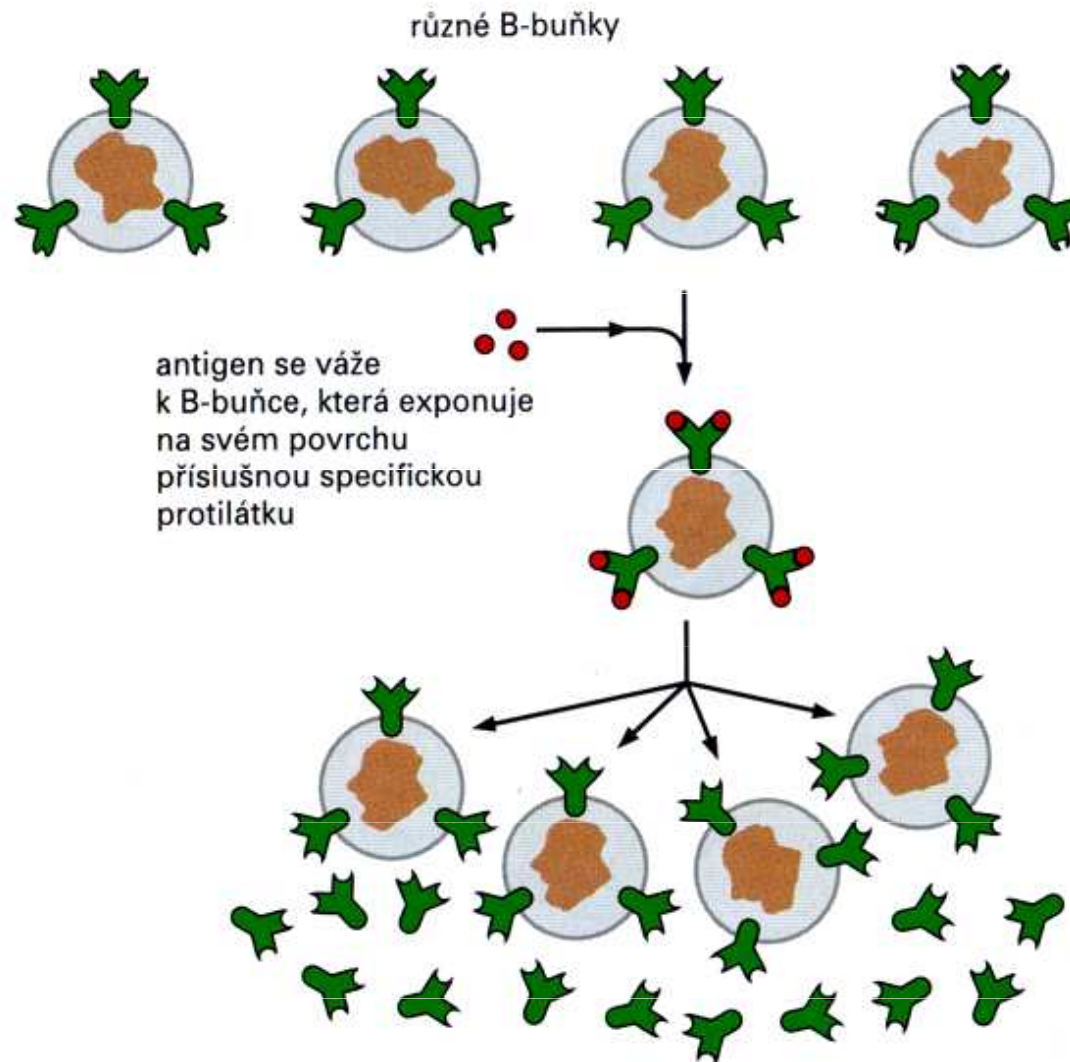


# Protilátky

- proteiny tvořené lymfoidní tkání jako reakce na přítomnost cizorodého materiálu - antigenů
- vysoká specificita
- jedna protilátka může rozlišit polypeptidy lišící se jedinou aminokyselinou nebo dokonce jedinou modifikací dané aminokyseliny (např. fosforylaci)

## B-BUŇKY

Protilátky jsou v těle vyráběny zvláštní třídou bílých krvinek, tzv. B-lymfocyty. Každý klidový B-lymfocyt má na povrchu určitý typ v membráně vázané protilátky, která slouží jako receptor pro rozeznání specifického antigenu. Jakmile se antigen naváže na tento receptor, B-buňka je stimulována k dělení a tvorbě a sekreci téže protilátky, která zachytila na povrchu antigen.



B-buňka je stimulována k tvorbě dalších molekul identické protilátky, které jsou pak vylučovány

# Příprava polyklonálních protilátek

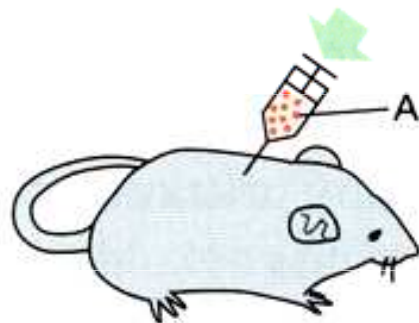
- opakovaná injekce antigenu lab. zvířeti (králík, koza)
- po několika týdnech se zvíře utratí a odebere se mu krev
- z krve se odstraní buňky a srážlivé faktory - *antisérum*
- test titru a čistoty imunoglobulinů

## Nevýhody:

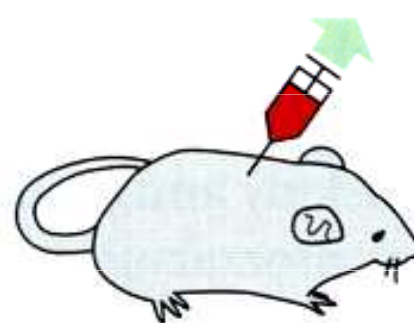
- tvorba různých Ig proti danému antigenu (polyvalence)
- Ig se chemicky navzájem podobají, nelze získat čistou frakci daného Ig
- množství získané protilátky je omezené (celý postup nutno opakovat)

## PRODUKCE PROTILÁTEK V LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH

Protilátky lze vyrábět v laboratoři tak, že se zvířeti vstříkne antigen A (používá se myši, králíků, ovcí a koz).

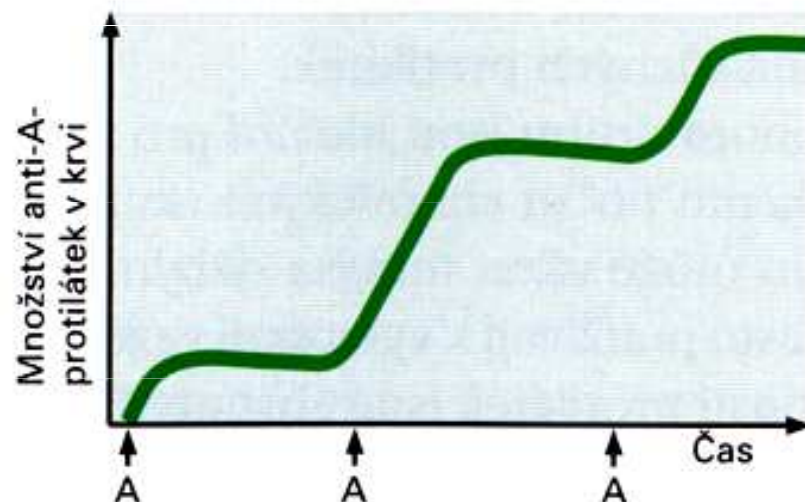


vstříknutí antigenu A



pozdější odebrání krve

Opakované injekce téhož antigenu v intervalech několika týdnů stimulují specifické B-buňky k tvorbě a sekreci velkého množství anti-A-protilátek do krevního oběhu.



Protože se injekcí antigenu A stimuluje mnoho různých B-buněk, bude v krvi přítomna řada protilátek proti A, každá z nichž bude vázat antigen A poněkud odlišně.

# Monoklonální protilátky

- produkt jednoho klonu B lymfocytů, který je chemicky a funkčně homogenní
- B lymfocyty izolované z laboratorních živočichů nelze kultivovat *in vitro*

## Myelomové buňky:

- maligní buňky
- možnost kultivace *in vitro*
- vysoká schopnost tvorby protilátek
- protilátky nejsou specifické pro určitý antigen
- vznikají maligní transformací normálního lymfocytu

# Příprava monoklonálních protilátek

Milstein a Köhler 1975:

- provedli fúzi normálních lymfocytů produkujících protilátky s maligní myelomovou buňkou
- získali hybridní buňky (**hybridomy**):
  - možnost kultivace *in vitro*
  - vysoká schopnost tvorby jediné (monoklonální) protilátky
  - protilátka svou specifitou odpovídá produktu normálního lymfocytu použitého k fúzi

# Příprava monoklonálních protilátek

## Postup:

- antigen je injekcí přenesen do laboratorní myši a vyvolá proliferaci specifických protilátkotvorných buněk
- z utraceného zvířete je vyjmuta slezina
- získané lymfocyty se použijí k fúzi s maligními myelomovými buňkami
- hybridní buňky získávají nesmrtelnost z myelomové buňky a schopnost tvorby specifické protilátky z lymfocytu
- hybridní buňky se selektují od nefúzovaných buněk na základě schopnosti růst v selekčním médiu HAT
- skrínink hybridů podle schopnosti tvorby specifické protilátky
- kultivace žádaných hybridů v kultuře nebo jako nádor v lab. zvířeti
- získání neomezeného množství čisté protilátky

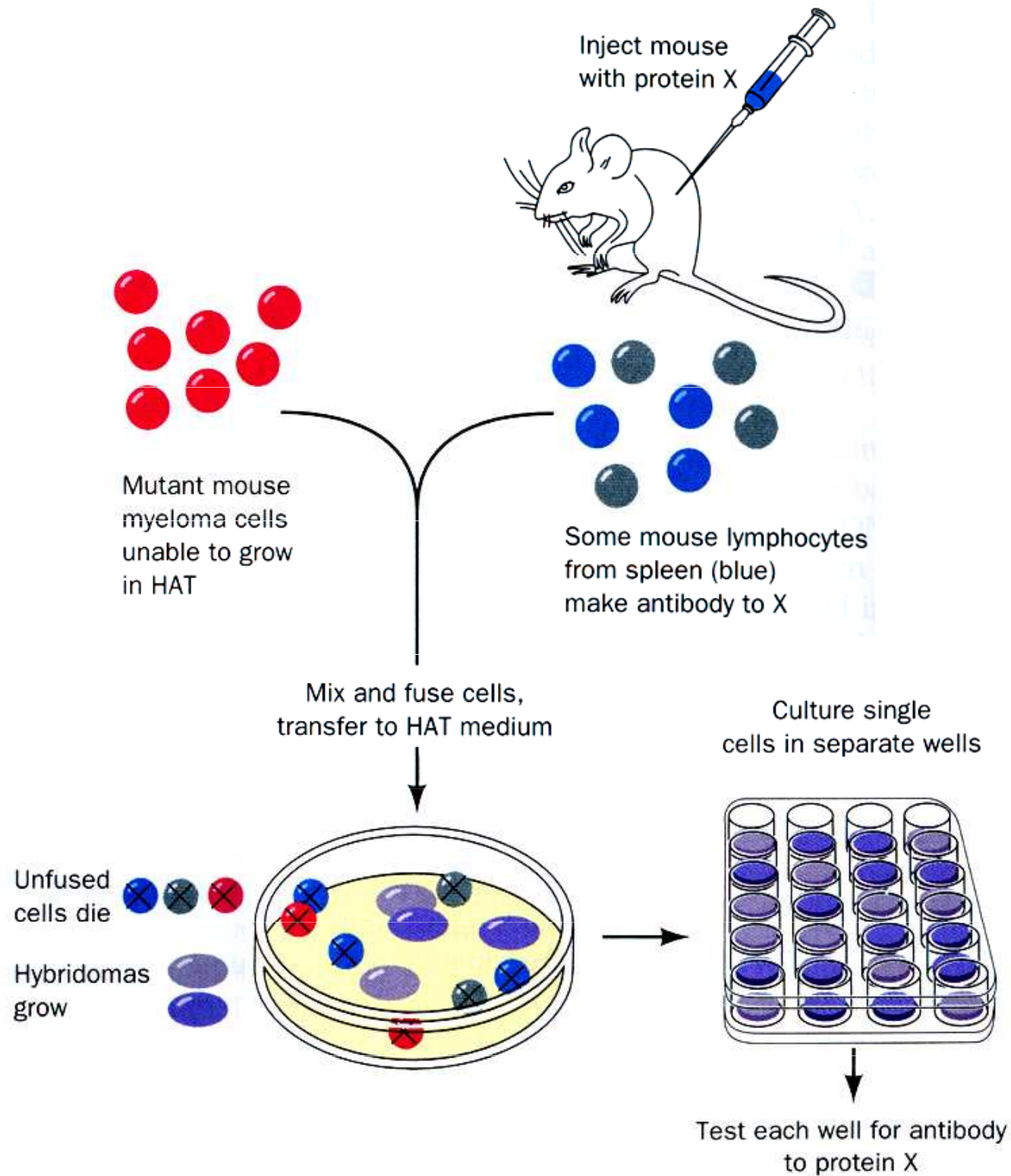
# Příprava monoklonálních protilátek

Princip selekce hybridů:

## Médium HAT

- obsahuje hypoxantin, aminopterin, tymidin
- umožňuje růst jen buňkám s funkční hypoxantin-guanin fosforibozyl transferázou (HGPRT)
- linie myelomových buněk používaných k fúzi je HGPRT-





# Studium interakcí protein-protein

- Dvouhybridní systém
- Ko-imunoprecipitace
- Knihovna „Phage display“
- Proteinová „microarray“

# Interaktom

- soubor všech meziproteinových interakcí v dané buňce nebo organismu
- celkový skrínink interaktomu umožňuje dvouhybridní systém nebo proteinová „microarray“

# Dvouhybridní systém

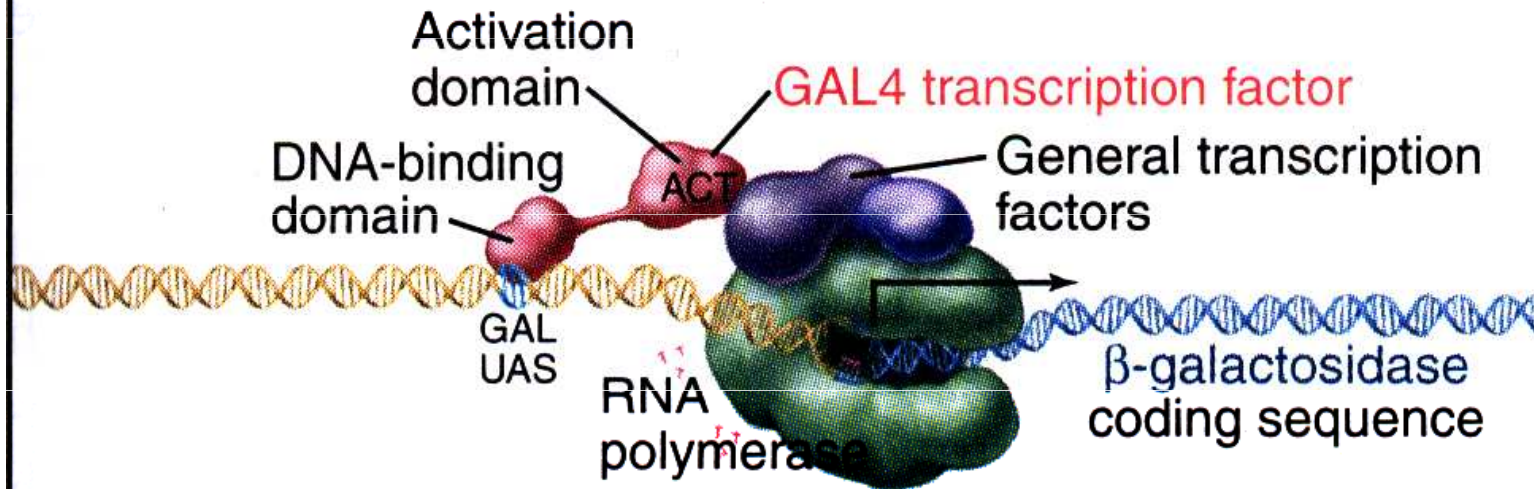
- využívá fúze testovaných proteinů s dvěma oddělenými doménami transkripčního aktivátoru
- transkripční faktory mají často modulární strukturu: doménu pro vazbu na DNA (DBD) a aktivační doménu (AD)
- interakce obou domén vede k aktivaci transkripce (kovalentní propojení domén není nutné)

# Dvouhybridní systém - princip

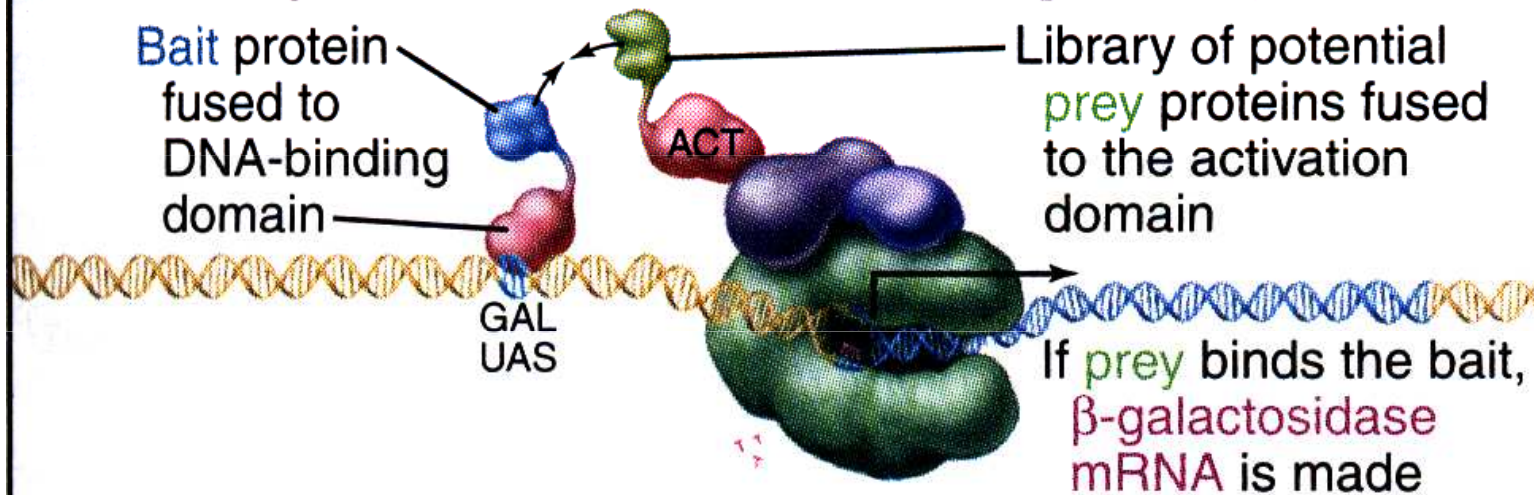
- DBD doména je spojena fúzí s proteinem X a AD doména s proteinem Y
- „návnada“ („*bait*“): proteinová chiméra obsahující doménu pro specifickou vazbu na DNA spojenou se studovaným proteinem (DBD-X)
- „dravec“ („*prey*“): proteinová chiméra spojující partnerský protein s aktivační doménou (AD-Y)
- v kvasinkových buňkách se interakce testovaných proteinů projeví aktivací reportérského genu, který je stabilně začleněn do genomu

Význam metody: stanovení interakcí mezi dvěma proteiny

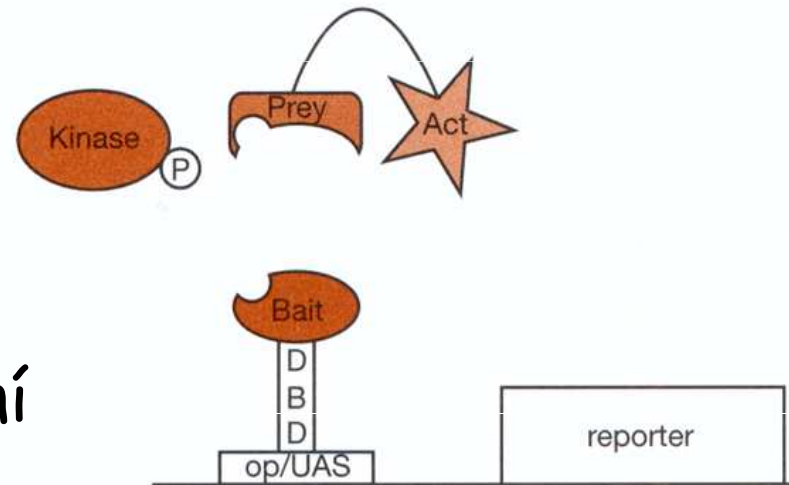
## A. Normal regulation of gene expression



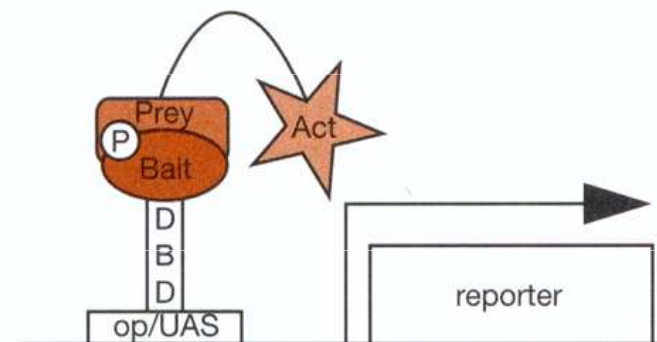
## B. Two-hybrid interaction activates gene expression



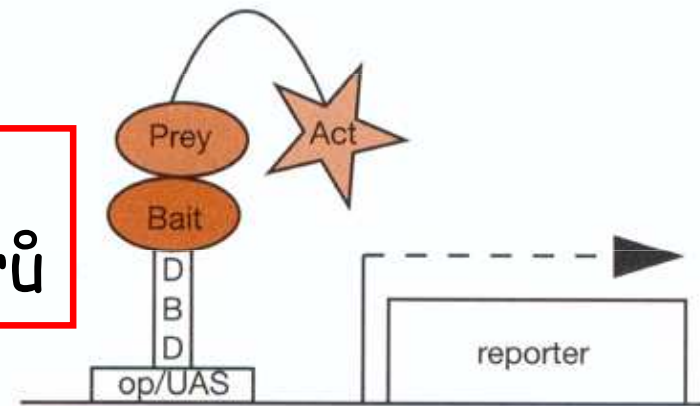
# Interakce mezi proteiny někdy podstatně závisí na posttranslačních modifikacích, které v kvasinkových buňkách nenastávají



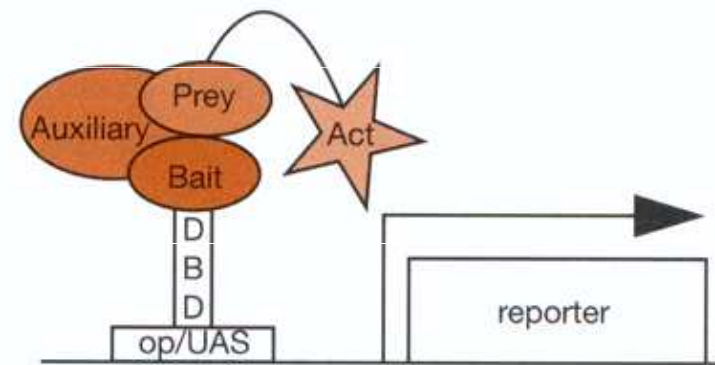
V roce 1995 připraven speciální kvasinkový kmen, který exprimuje savčí tyrosinovou kinázu Lck



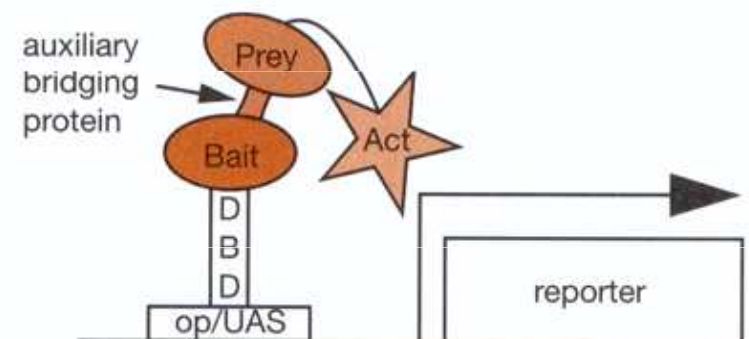
Meziproteinové interakce někdy závisí na přítomnosti dalších faktorů



weak interaction: minimal reporter activation



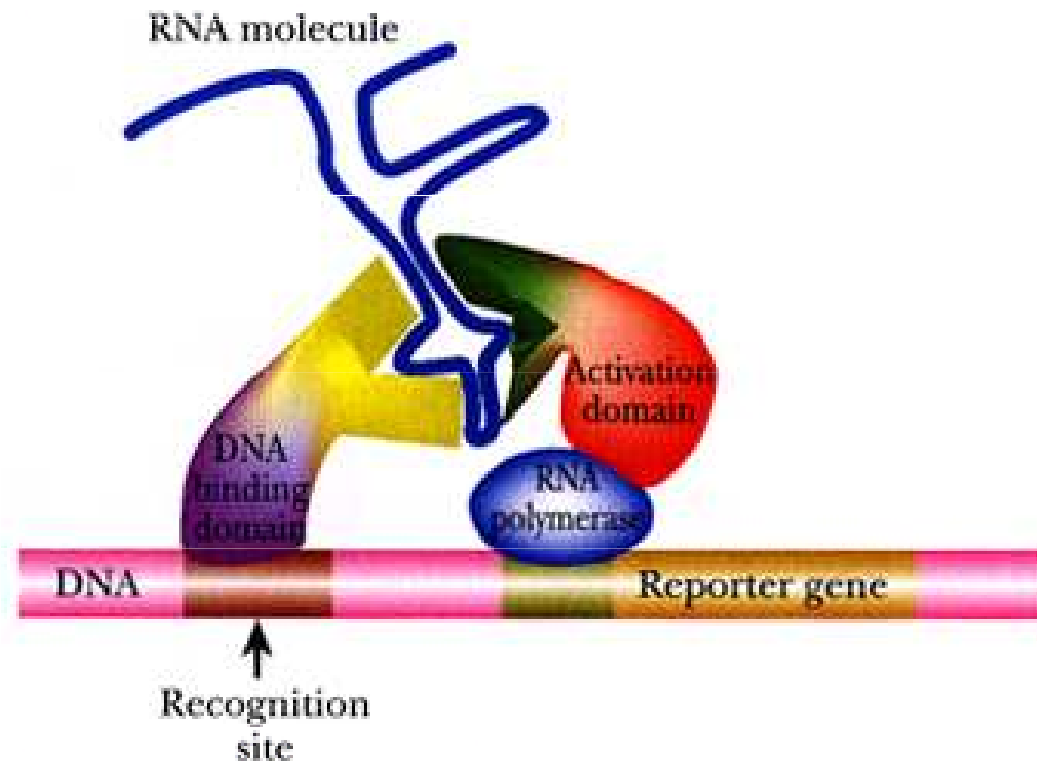
strong ternary interaction: strong reporter activation





# Trojhybridní systém

Slouží k identifikaci proteinů, jejichž interakci zprostředkovává RNA

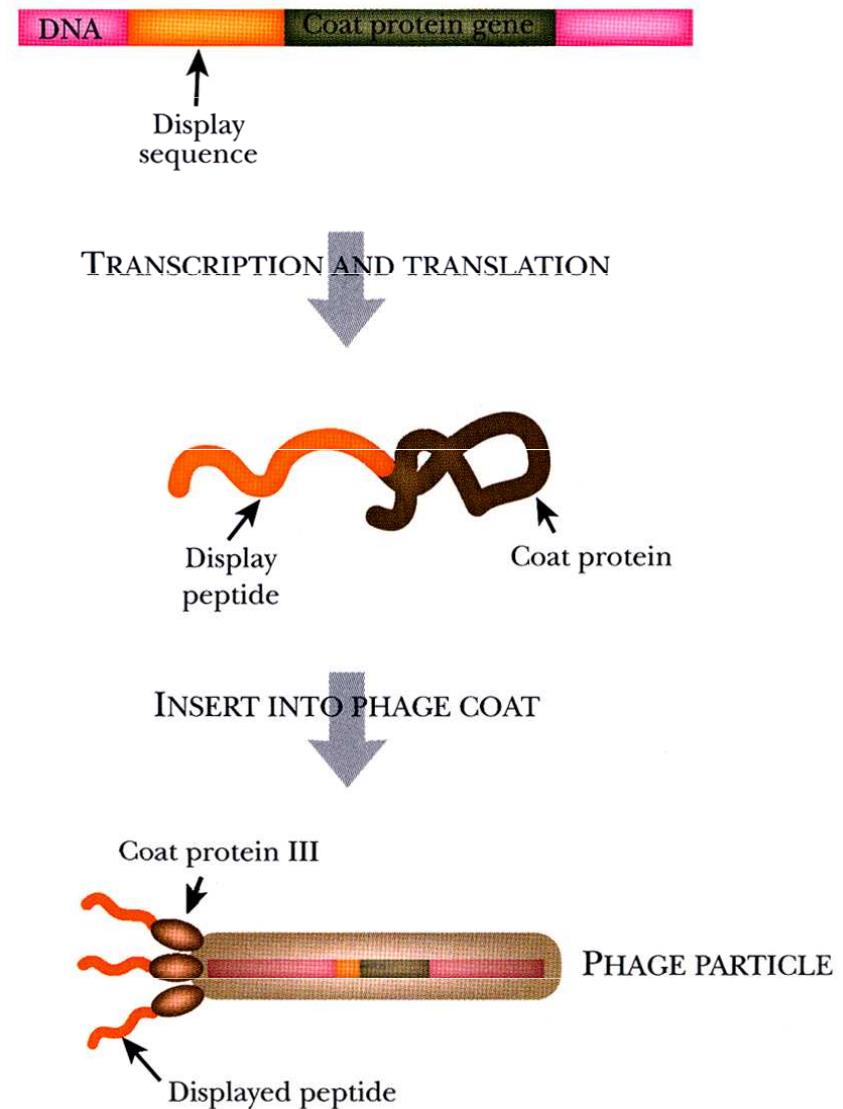


# Knihovna „Phage display“

- fragmenty DNA se začlení do klonovacího místa uvnitř genu, který kóduje jeden z povrchových proteinů vláknitého fága M13
- fúzovaný gen kóduje proteinovou chiméru, která bude včleněna do fágové hlavy a to takovým způsobem, že cizí protein bude vystaven na povrchu fágové částice
- přenesení knihovny „phage display“ do zkumavky nebo mikrotitrační destičky potažené ligandem, protilátkou, receptorem nebo jiným testovaným proteinem
- odmytí nenavázaného fága
- lze testovat velmi vysoké počty fágových částic a hledat interagující klony

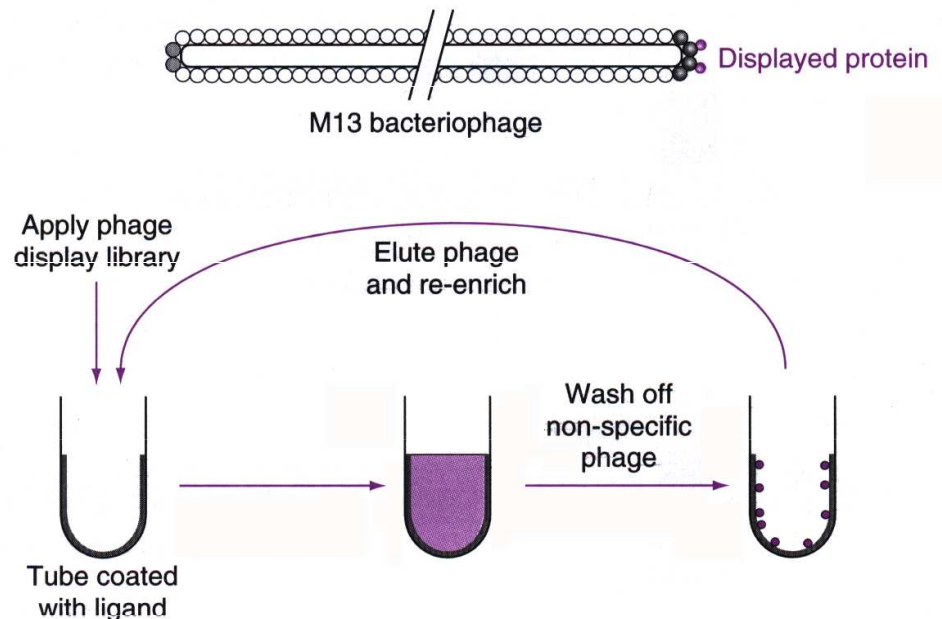
# Knihovna „Phage display“

- fragmenty DNA se začlení do klonovacího místa uvnitř genu, který kóduje jeden z povrchových proteinů vláknitého fága M13
- fúzovaný gen kóduje proteinovou chiméru, která bude včleněna do fágové hlavy a to takovým způsobem, že cizí protein bude vystaven na povrchu fágové částice

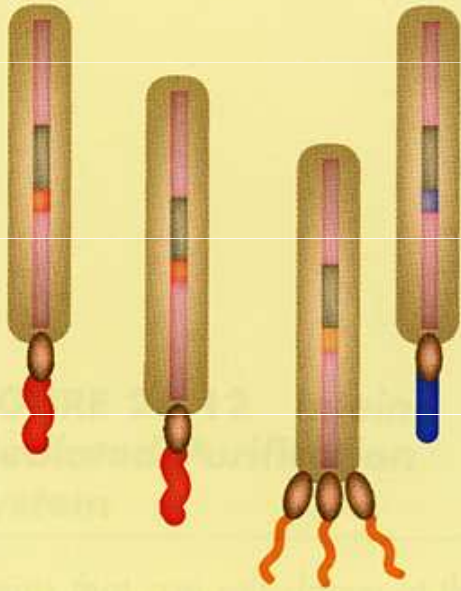


# Knihovna „Phage display“

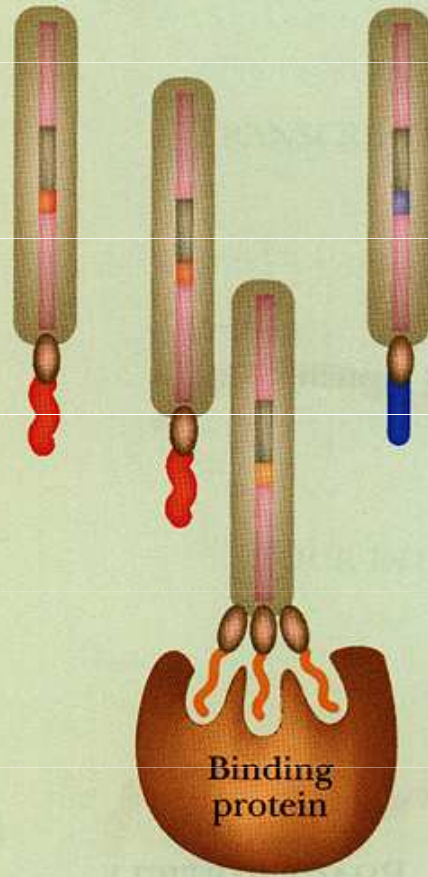
- přenesení knihovny „phage display“ do zkumavky nebo mikrotitrační destičky potažené ligandem, protilátkou, receptorem nebo jiným testovaným proteinem
- odmytí nenavázaného fága
- lze testovat velmi vysoké počty fágových částic a hledat interagující klony



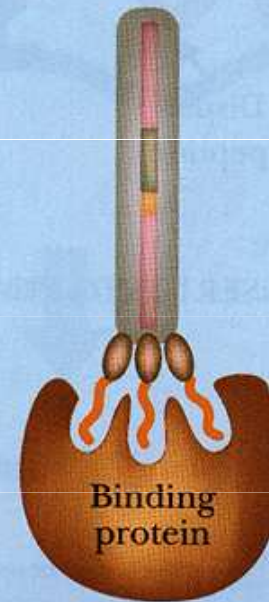
A. LIBRARY OF PHAGE WITH DISPLAYED PEPTIDES



B. BIND PHAGE TO BINDING PROTEIN



C. WASH AWAY UNBOUND PHAGE



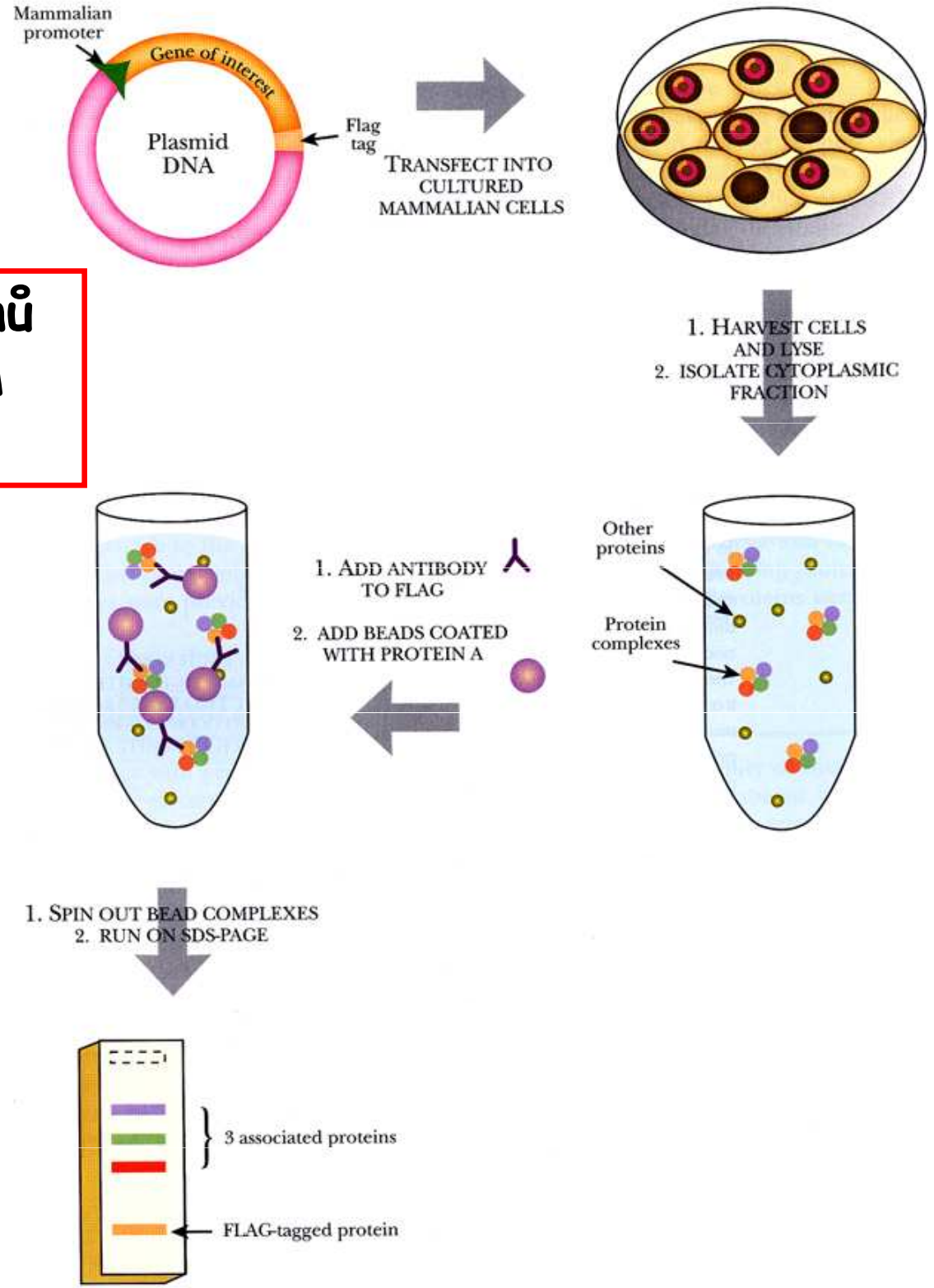
D. RELEASE SELECTED PHAGE



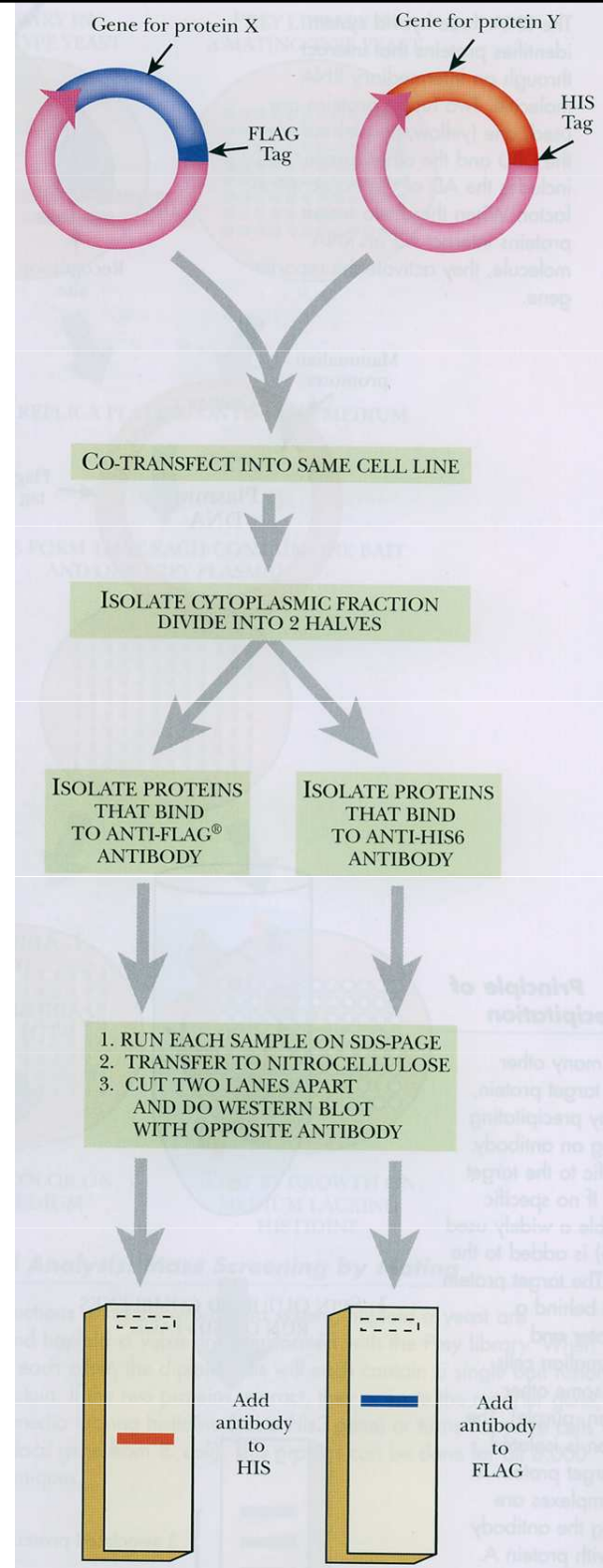
# Ko-imunoprecipitace

- vhodná metoda pro ověření meziproteinových interakcí stanovených dvojhybridním systémem v kvasinkách
- savčí buňky se transfekují genem kódujícím testovaný protein
- vytvořený protein se z buněk izoluje prostřednictvím protilátek
- pokud není k dispozici vhodná protilátka může být protein označen pomocným peptidem FLAG, pak lze k precipitaci použít anti-FLAG protilátku
- protein se z buněk precipituje za takových podmínek, že není narušeno jeho případné spojení s jinými proteiny
- protein A izolovaný z buněk *S. aureus* pevně váže protilátky: imobilizovaný protein A je vhodným nástrojem pro izolaci protilátek s připojenými proteiny
- proteinové komplexy se rozdělí elektroforézou SDS-PAGE
- identifikace asociovaných proteinů je možná protilátkami, hmotnostní spektrometrií nebo sekvenováním proteinů

# Hledání neznámých proteinů asociujících se studovaným proteinem



# Ověření interakcí mezi dvěma proteiny ko-immunoprecipitací



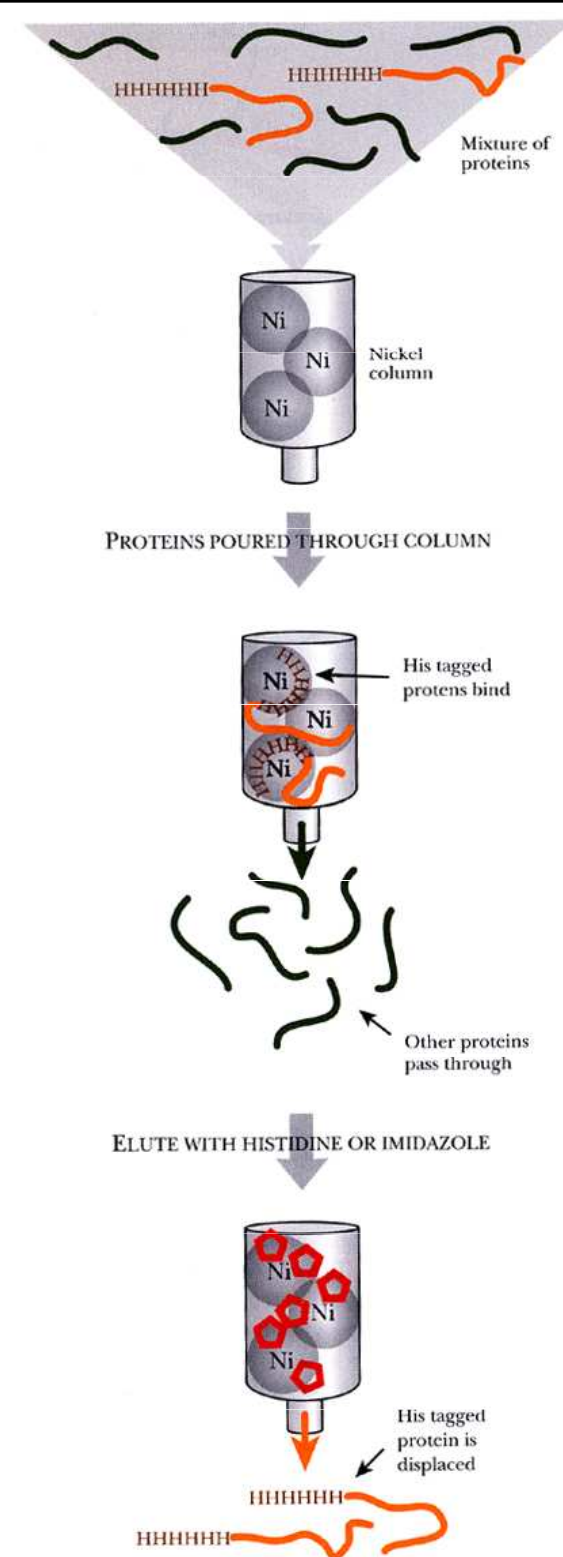


# „Protein tagging“

- „tag“ = visačka
- „Protein tagging“ znamená označení proteinu připojením zřetelné značky
- obvykle se provádí geneticky - sekvence DNA je opatřena segmentem kódujícím „tag“
- sekvence musí být klonována ve vhodném vektoru a přenesena do vhodné hostitelské buňky, která bude syntetizovat označený protein
- značku lze využít např. pro účinnou purifikaci proteinu nebo imunoprecipitační experimenty

# Typy peptidových značek

- „His tag“ = polyhistidinový tag
- složen ze šesti tandemově uspořádaných zbytků histidinu
- přidává se k cílovému proteinu na N- nebo C-konec
- „His tag“ se velmi účinně váže k iontům niklu
- proteiny označené „His tag“ lze snadno purifikovat chromatograficky na kolonách, kde je nosič opatřen niklovými ionty



## „FLAG tag“

Krátký peptid (AspTyrLysAspAspAspAspLys), který je rozeznáván specifickou protilátkou, která je komerčně dostupná (Immunex Corp)

Tato protilátka může být imobilizována na koloně pro chromatografickou purifikaci příslušného proteinu.

## „Strep tag“

Peptid o velikosti 10 aminokyselin, který napodobuje trojrozměrnou strukturu biotinu

Má afinitu k avidinu nebo streptavidinu

# Funkci značky mohou mít nejen krátké peptidy, ale i celé proteiny

**Protein A** - afinita k protilátkám

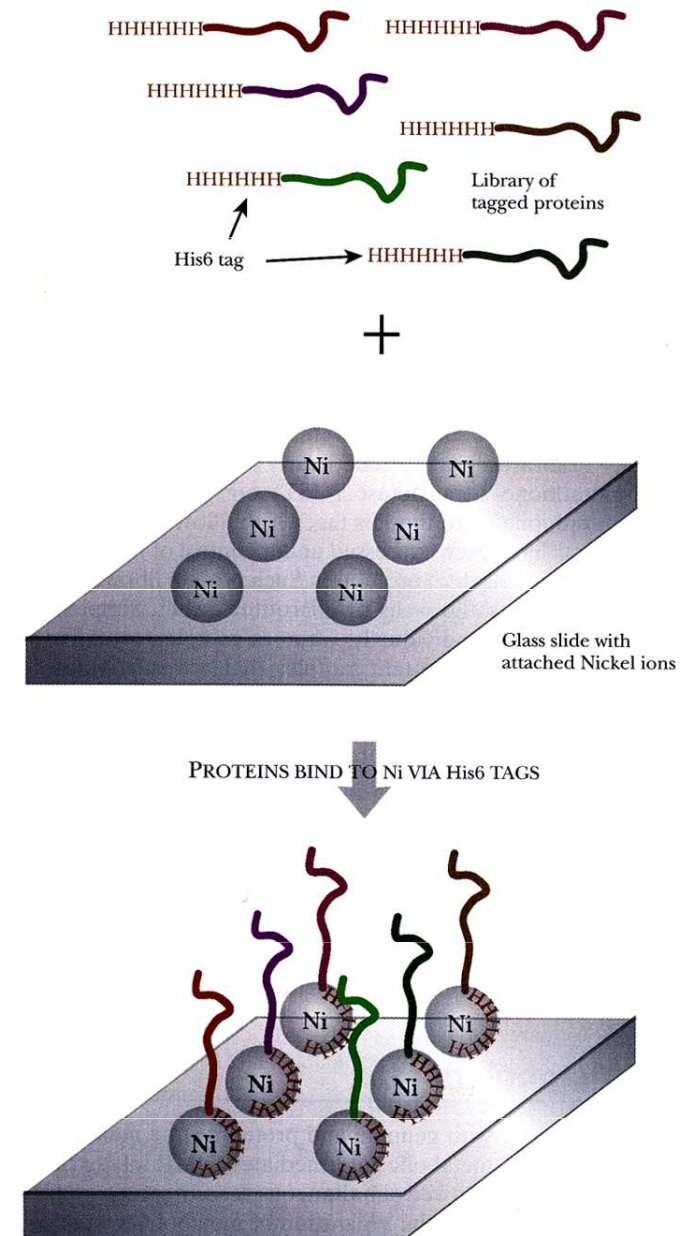
**Glutathion S transferáza (GST)** - afinita k tripeptidu glutathionu

**Protein vážoucí maltózu (MBP)** - afinita k maltóze a polymeru maltózy (amylóze)

Sekvence kódující značící protein se obvykle umísťuje 5' od studovaného genu

# Protein arrays

- umožňují simultánní monitorování interakcí mnoha proteinů
- používají se pro biochemické a enzymatické analýzy proteinů a pro studium meziproteinových interakcí
- sestaveny z proteinů označených tagy, které umožňují jejich připojení k pevnému podkladu buď ELISA destiček nebo podložním sklíčkům



# Skrínink interakcí proteinů obvykle využívá fluorescence, méně často radioaktivity

Příklad: hledání proteinů, které vážou fosfolipidy

- proteinová array se inkubuje s fosfolipidy konjugovanými s biotinem
- navázaný fosfolipid je zviditelněn přidáním avidinu konjugovaného s fluorescenční značkou
- fluoreskující „spot“ reprezentuje protein, který váže fosfolipidy

