

# Kvantitativní metody analýzy interakce protein-protein

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních Biomolekul

Funkční genomika a proteomika

Národní centrum pro výzkum biomolekul

# Přehled kvantitativních metod analýzy protein-protein interakcí

1

## Teorie = základ praxe

Vazebná křivka, rovnovážná disociační konstanta, lineární rozsah detektoru.

2

## Fluorescence počtem vede, ale jde to i bez ní

Stanovení vazebné afinity fluorescenčně značných proteinů - fluorescenční anisotropie, microscale thermophoresis, detekce vazby molekul imobilizovaných na povrchu - surface plasmon resonance; studium vazby nemodifikovaných proteinů přímo v roztoku - izotermální titrační kalorimetrie.

3

## Která je nejlepší - srovnání metod

Shrnutí praktických výhod a nevýhod kvantitativních metod analýzy interakce protein-protein.

# Vazebná křivka 1 isoterma

Pro vazbu dvou proteinů A,B  
a vznik komplexu A.B  
při konstantní teplotě



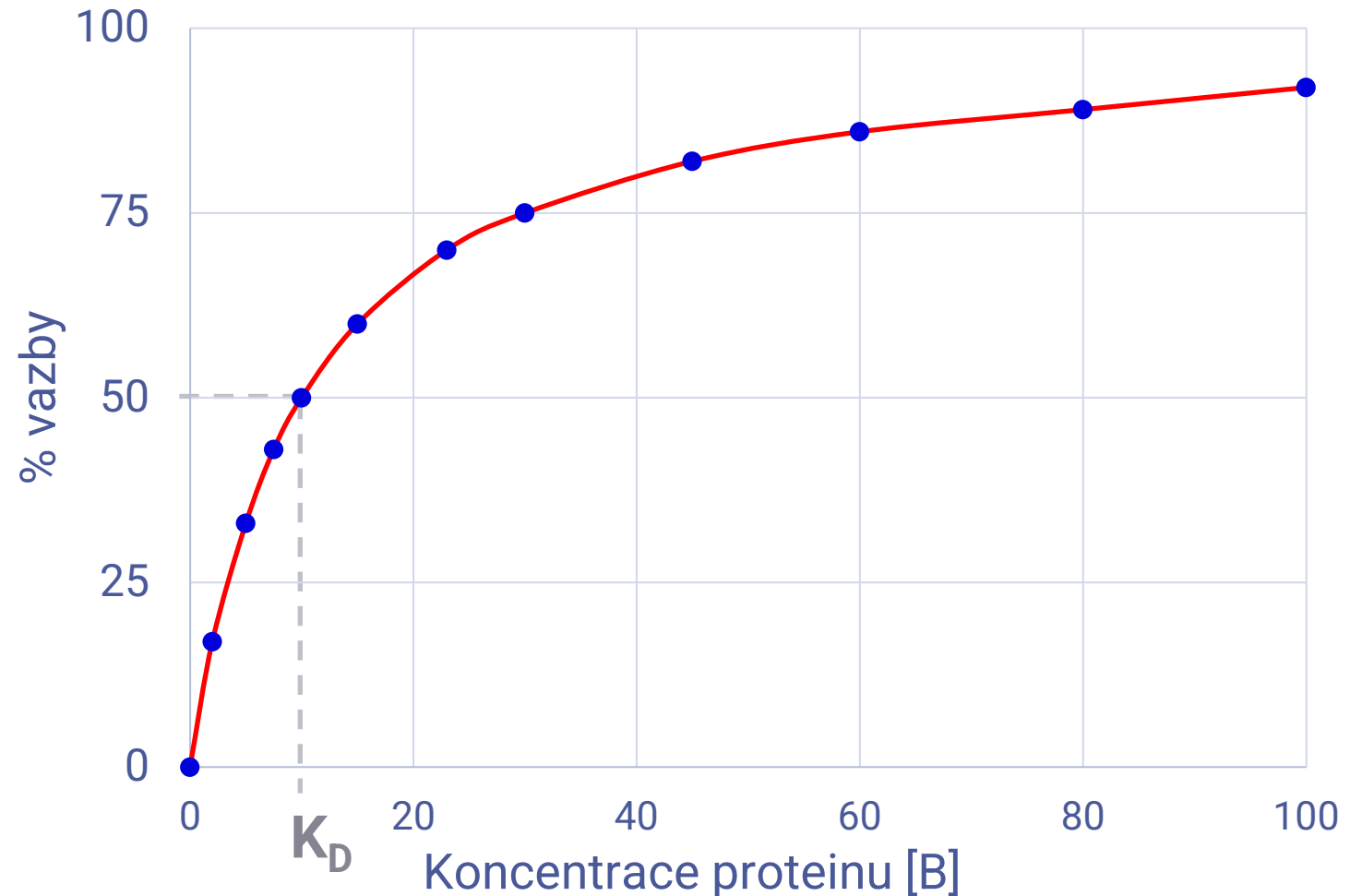
zapišeme **rovnovážné konstanty**  
**asociační  $K_A$**  a **disociační  $K_D$**

$$K_A = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

Jestliže přidáváme postupně  
protein B k proteinu A, vazebnou  
křivku lze vyjádřit rovnicí

$$\% \text{ vazby} = \frac{[B]}{[B] + K_D} \cdot 100\%$$

Závislost míry vazby na celkové koncentraci přidaného proteinu B



$K_D$  disociační konstanta – koncentrace proteinu, při které je právě polovina molekul v komplexu

# Vazebná křivka 2 odvození rovnice funkce - hyperbola

Míru vazby vyjádříme poměrem koncentrace komplexu **A.B** a celkové koncentrace proteinu **A** násobený 100%.

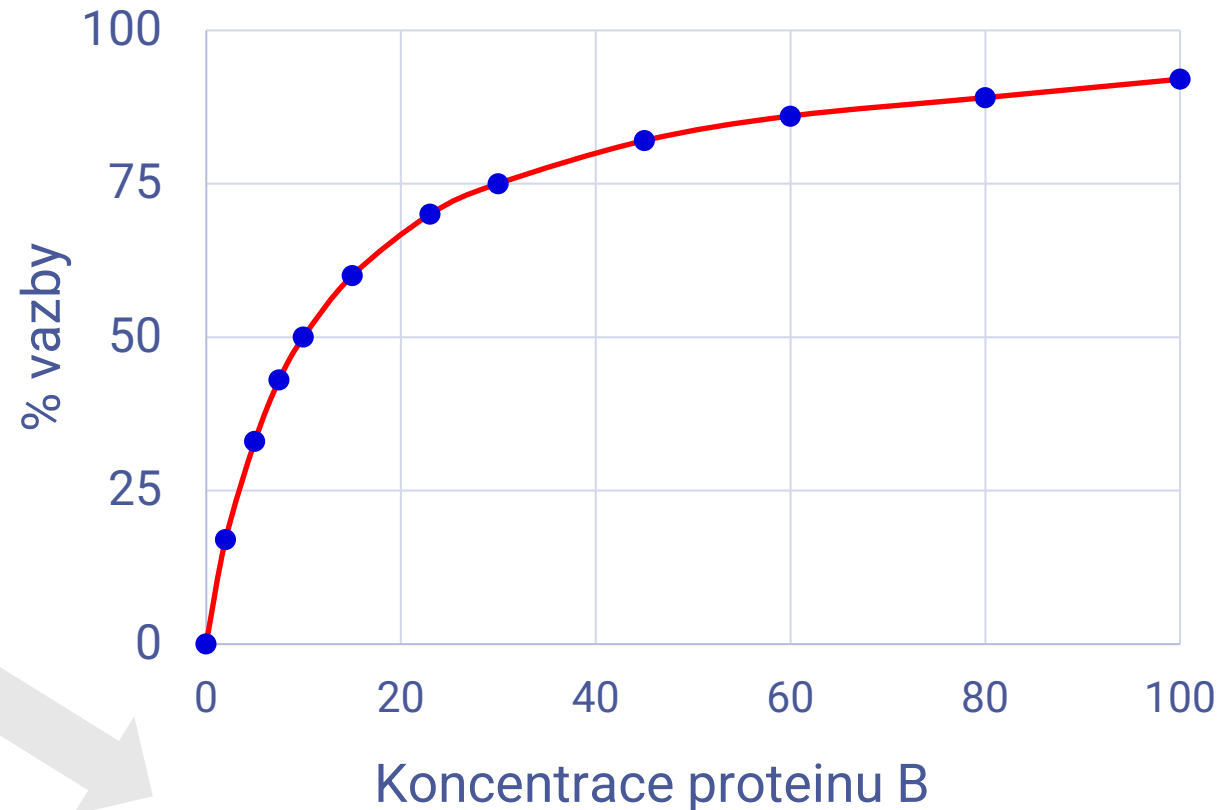
$$Y = \%vazby = \frac{[A \cdot B]}{A_{TOT}} \cdot 100\%$$

Po dosazení za **A.B** a **A<sub>TOT</sub>** získáme rovnici pro vazebnou křivku

$$[A \cdot B] = K_A [A][B] \quad A_{TOT} = [A \cdot B] + [A]$$

$$K_A = \frac{1}{K_D}$$

Závislost míry vazby na celkové koncentraci přidaného proteinu B



$$\% vazby = \frac{[B]}{[B] + K_D} \cdot 100\%$$

# Vazebná křivka 3

## logaritmus koncentrace = sigmoida

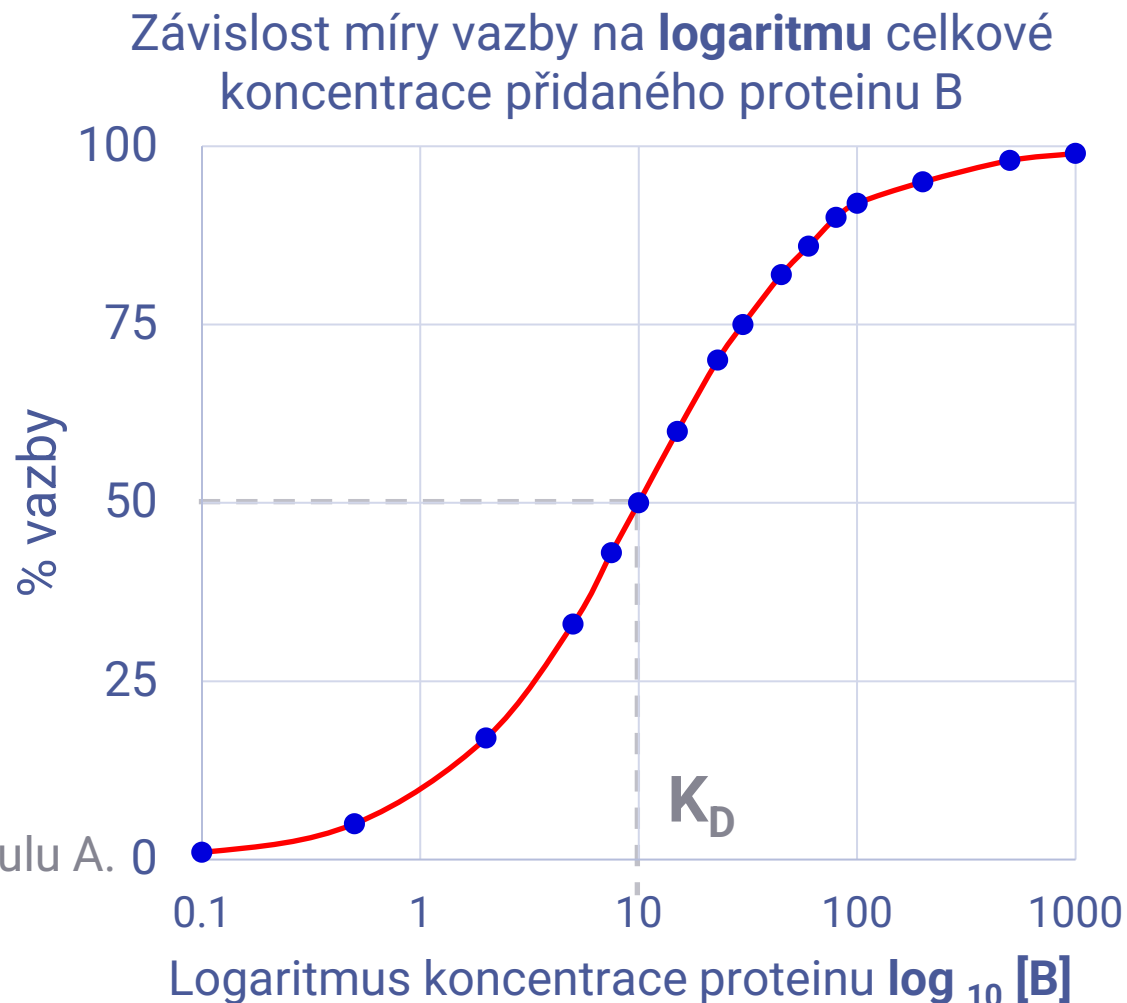
Jestliže přidáme k proteinu A protein B v dostatečně širokém rozsahu koncentrací, vazebnou křivkou závislosti míry vazby na **logaritmu** koncentrace B je **sigmoida**.

$$\% \text{ vazby} = \frac{[B]}{[B] + K_D} \cdot 100\%$$

$K_D$  disociační konstanta – inflexní bod sigmoidy

Sklon sigmoidy – míra kooperativity vazby

v případě, že se váže více molekul B na jednu molekulu A.



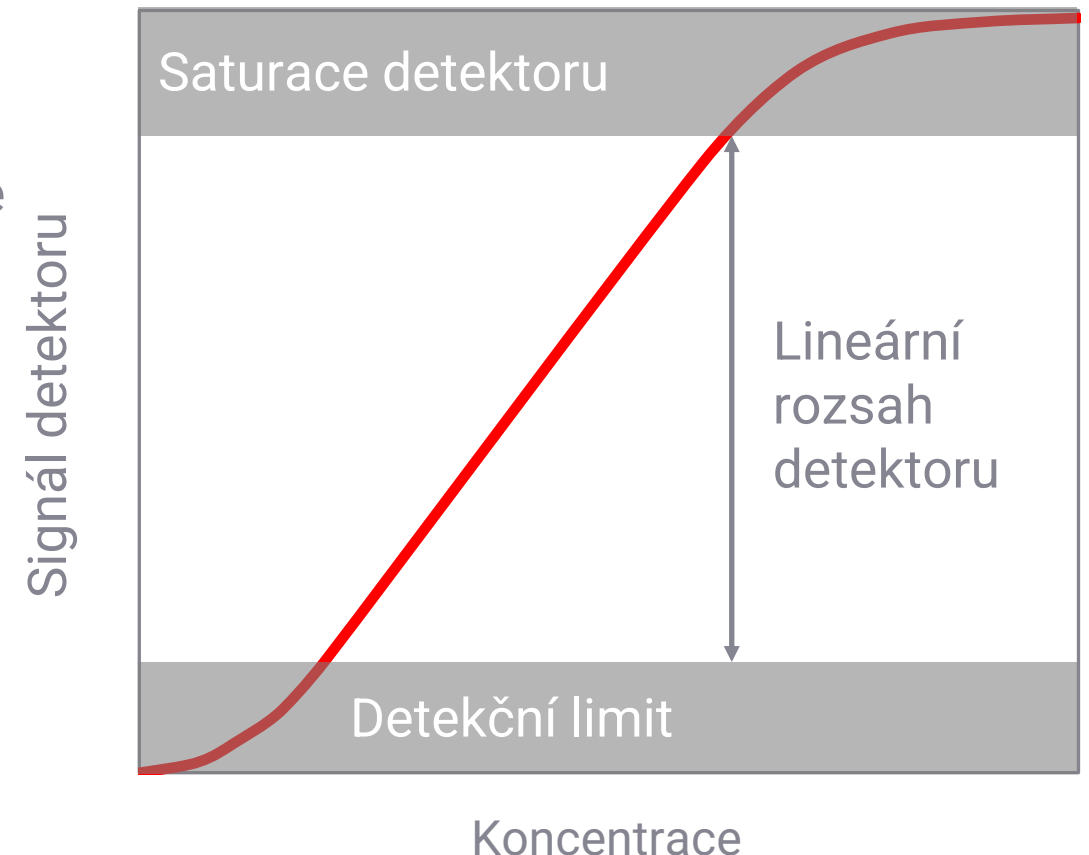
# Poznejte svůj detektor - lineární rozsah detektoru = přesná kvantitativní měření

Celkově má detekční křivka průběh sigmoidy.

Pro přesné kvantitativní měření je nezbytné, aby byl přírůstek signálu přímo úměrný přírůstku koncentrace komplexů protein-protein.

To je splněno pro **lineární rozsah** detektoru – oblast detekce, kde po zvýšení koncentrace např. dvakrát zvýší hodnota signálu také dvakrát.

**Oblast pod** lineárním rozsahem - jsme blízko minimálnímu detekčnímu limitu = nelineární odezva.  
**Oblast nad** lineárním rozsahem – detektor je zahlcen signálem – saturován, velká změna koncentrace způsobí relativně malé a nelineární zvýšení signálu.



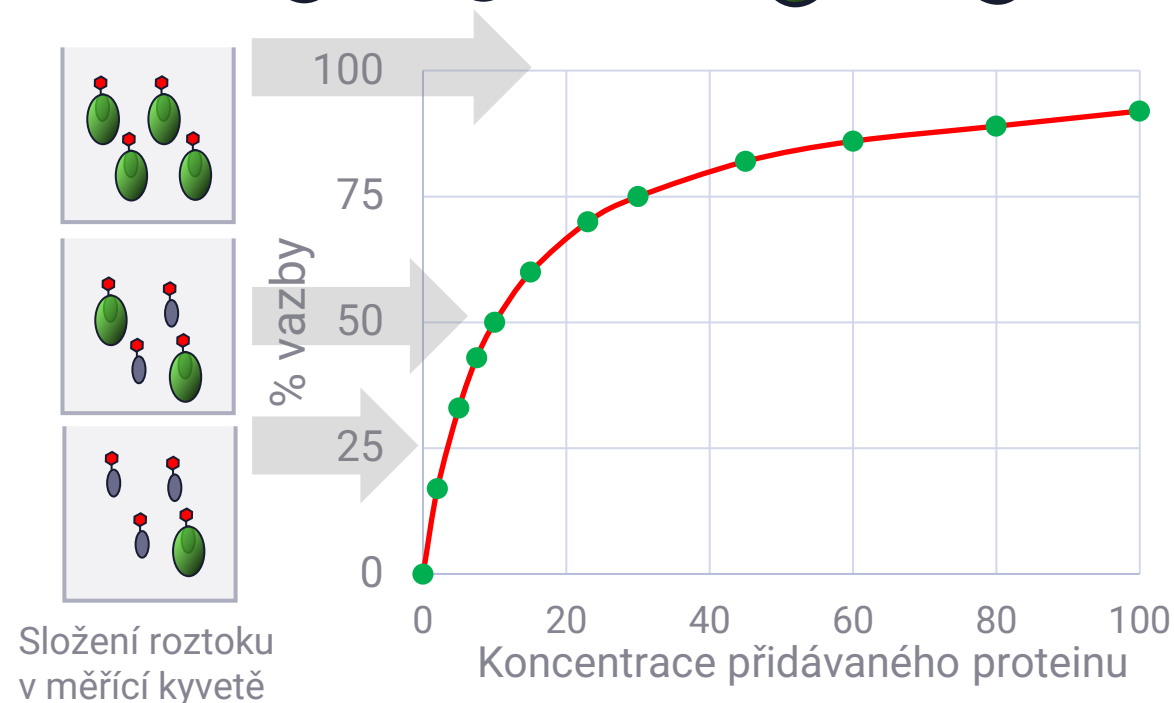
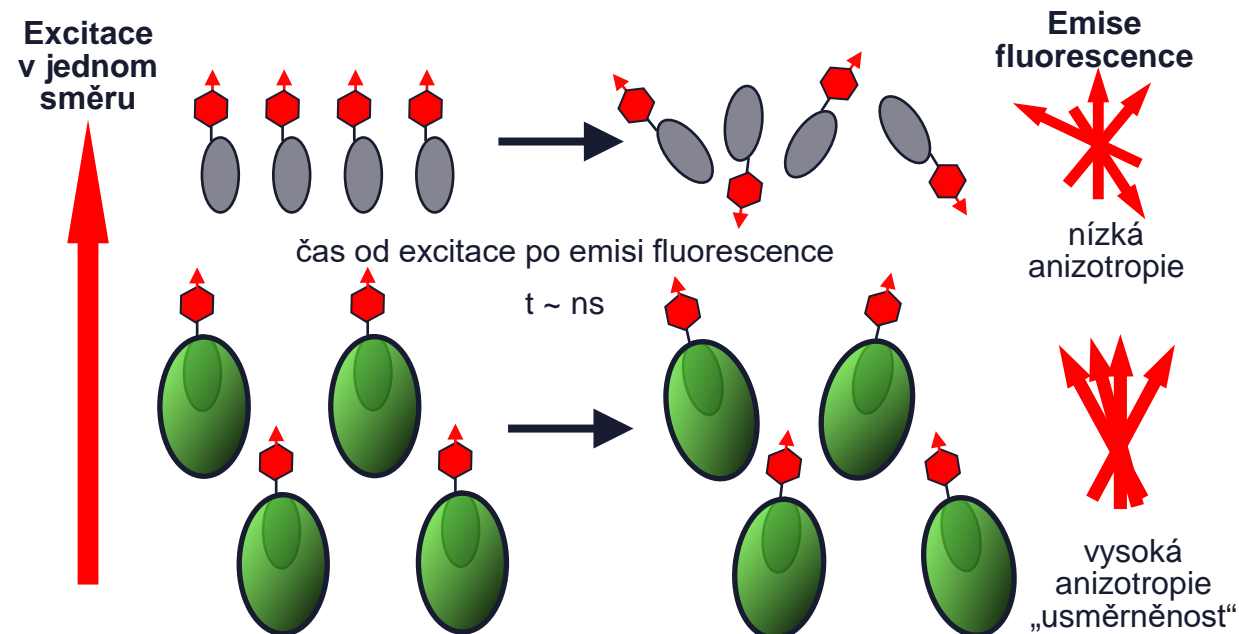
# Fluorescenční stanovení vazebné affinity z anizotropie

## Anisotropie fluorescence - princip

„Usměrňenost“ emitovaného světla se zvýší po vytvoření komplexu protein-protein; po excitaci lineárně polarizovaným zářením dochází k emisi fluorescence značené molekuly převážně v jednom směru.

## Prakticky

- značíme menší z proteinů.
- stačí naznačit 100  $\mu\text{g}$  proteinu v kyvetě.
- přidávaný protein není značený.
- celková koncentrace přidávaného proteinu je minimálně 10x větší než koncentrace značeného proteinu

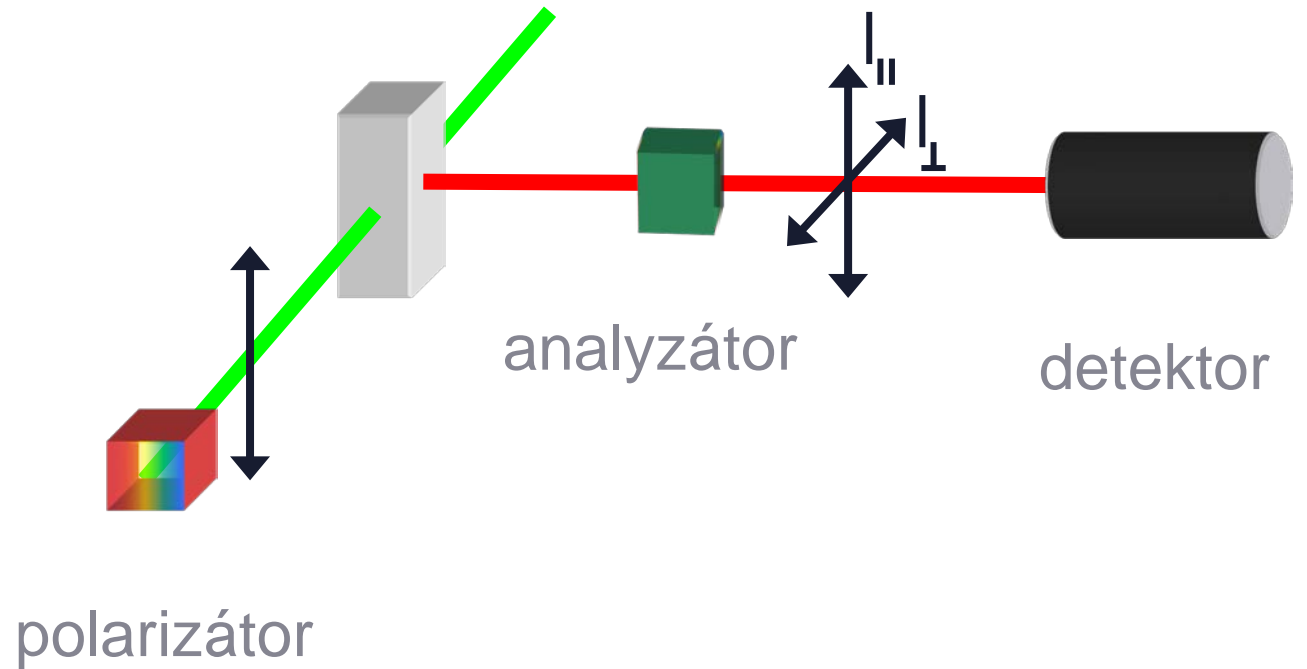


Složení roztoku v měřící kyvetě

# Anisotropie fluorescence měření

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

Hodnota anizotropie  $r$  je **podíl rozdílu**  $I_{VV} - I_{VH}$  intenzity fluorescence při rovnoběžném (vertikálním) a kolmém (horizontálním) natočení analyzátoru vůči excitačnímu polarizátoru a **celkové intenzity fluorescence**  $I_{VV} + 2I_{VH}$  ve 3D všech třech směrech šíření fluorescence.



## Prakticky

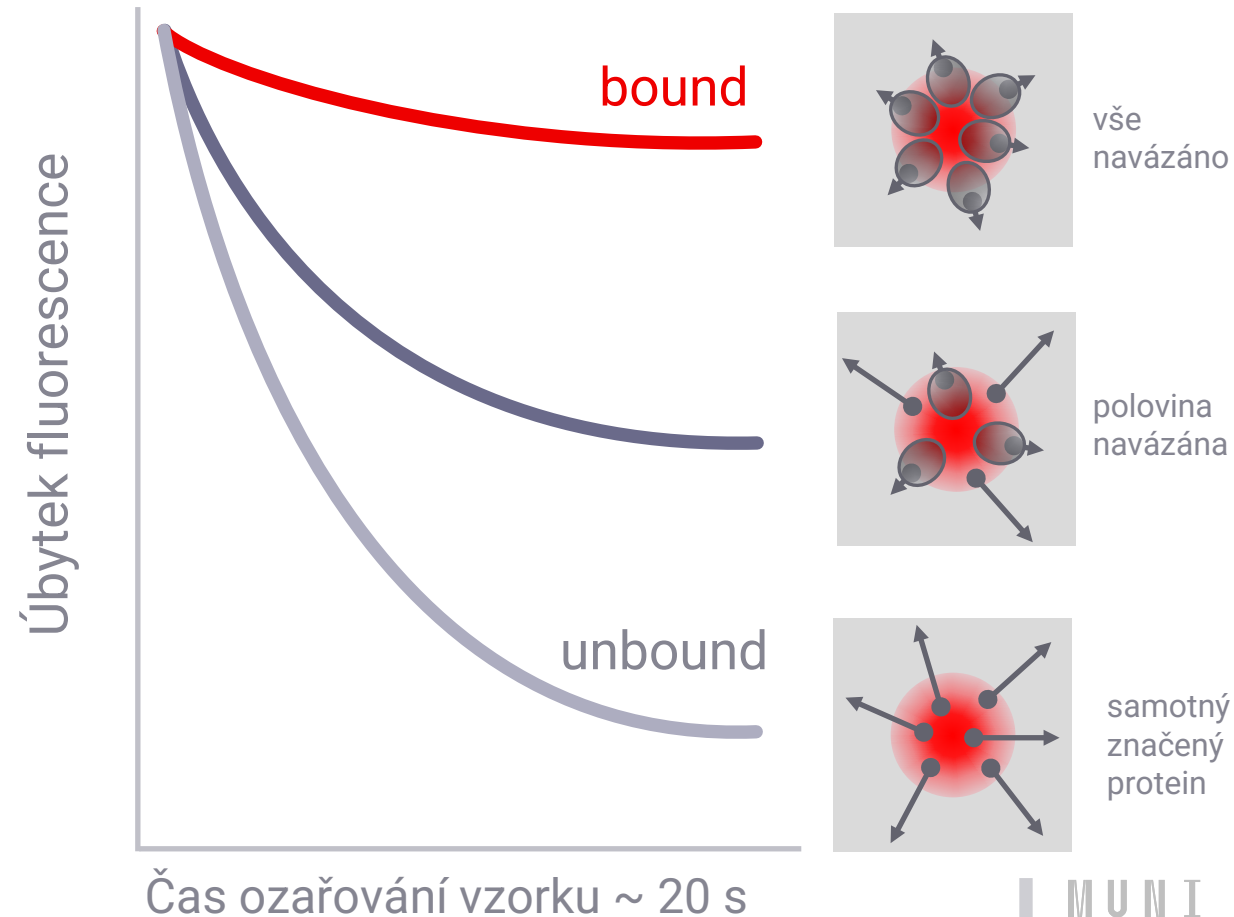
- Příklad - fluorometr s polarizátorem excitačního světla a otočným polarizátorem = analyzátozem vyzařené fluorescence pro zjištění intenzity v různých směrech.
- Potřebujeme ~ 10x vyšší koncentraci než na měření klasické fluorescence – polarizátory propouští 10x méně světla.
- Hodnota anizotropie  $r$  je bezrozměrná veličina (podíl čísel).



# Microscale thermophoresis MST

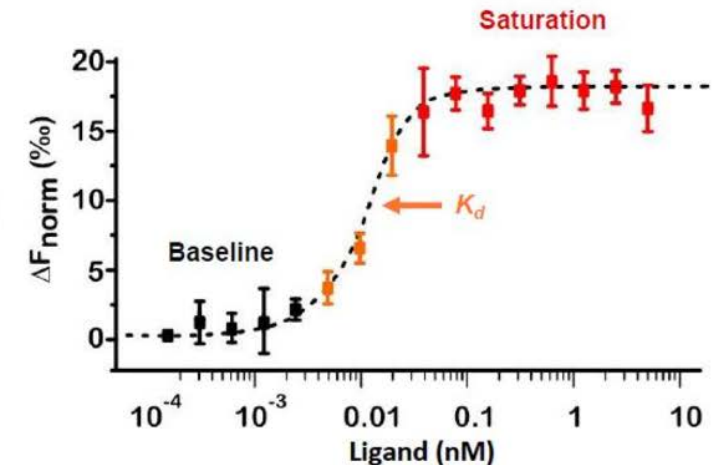
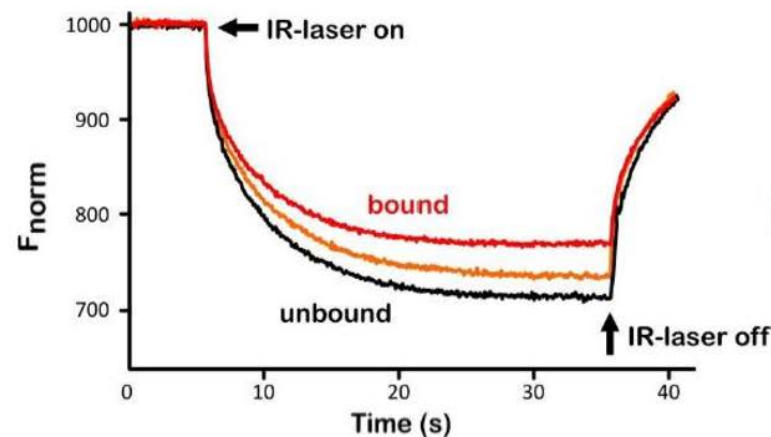
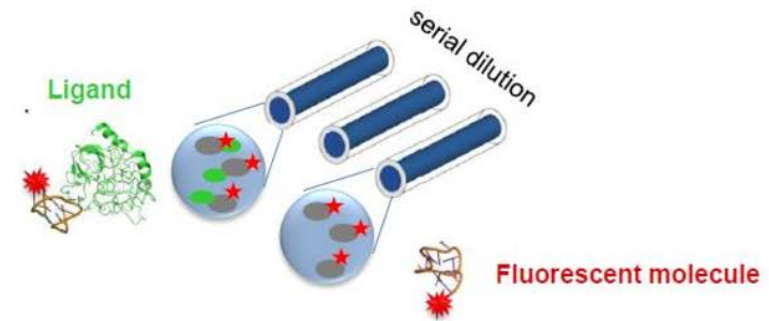
## Princip MST

- Vytvoříme lokální teplotní gradient – ozáříme vzorek v kapiláře infračerveným laserem.
- Vzorek zároveň osvětlujeme excitačním světlem pro fluorofor, kterým je značený menší protein.
- Detekujeme pohyb fluorescenčně značených molekul jako změnu fluorescence v mikrooblasti osvětlené IR laserem.
- Při konstantní koncentraci fluorescenčně značeného proteinu zvyšujeme koncentraci přidávaného neznačeného proteinu = ligandu.
- Sledujeme snížení míry poklesu fluorescence v čase se vzrůstající koncentrací ligandu.



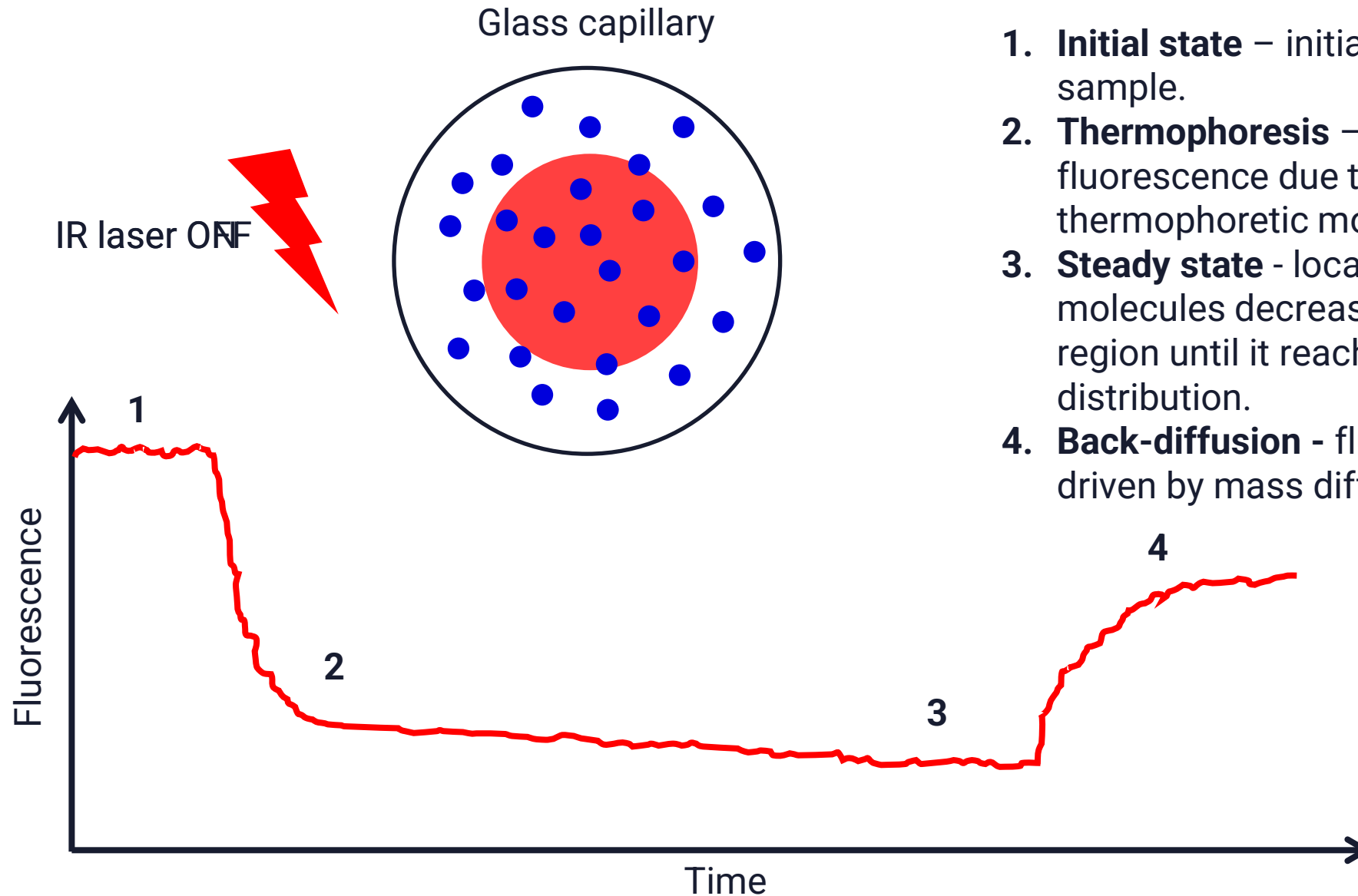
# Prakticky MST měření protein-protein interakce

- Fluorescenčně naznačíme menší protein.
- Vytvoříme ředící řadu druhého proteinu = ligandu jeho postupným ředěním 2x.
- Smícháme roztoky tak, že koncentrace značeného proteinu je stejná, ale koncentrace ligandu se mění v rozsahu 5 řádů.
- Vzorky nasajeme do kapilár (5uL) .
- Měříme změnu fluorescence po zapnutí IR laseru.
- Vyneseme změnu fluorescence v závislosti na logaritmu koncentrace ligandu.
- Z inflexního bodu sigmoidy určíme disociační konstantu vzniku komplexu protein-ligand.



Obrázek laskavě poskytl Dr. Josef Houser,  
CORE FACILITY Biomolecular Interactions and Crystallization  
<http://bic.ceitec.cz/cs>

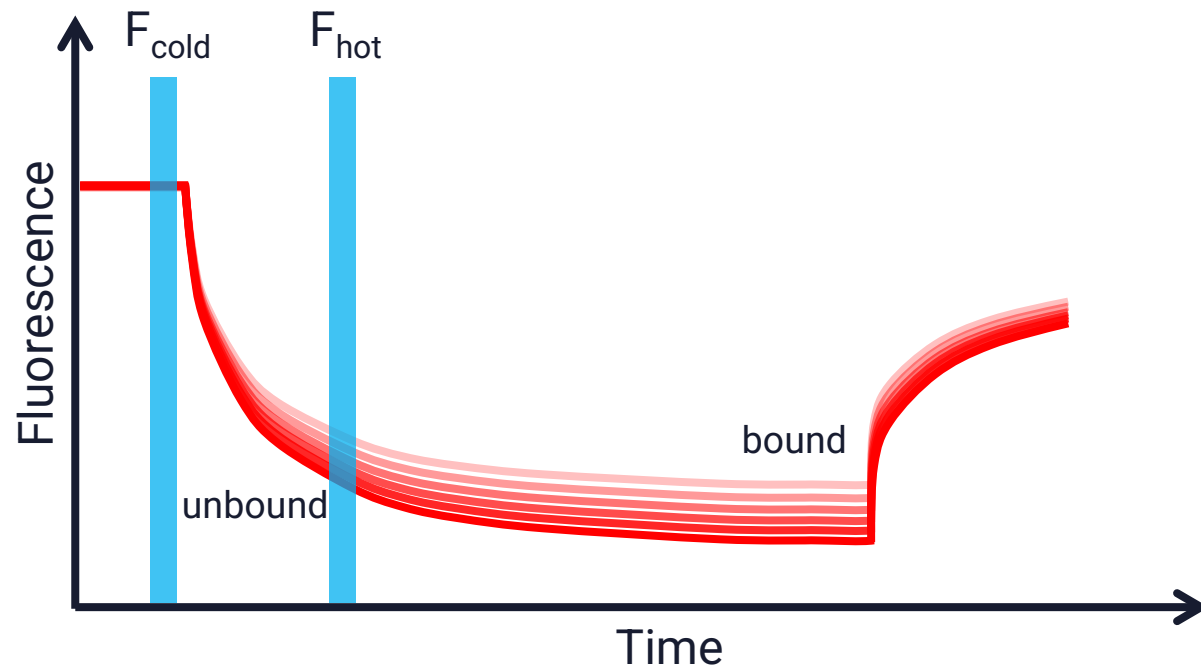
# MST – Microscale Thermophoresis



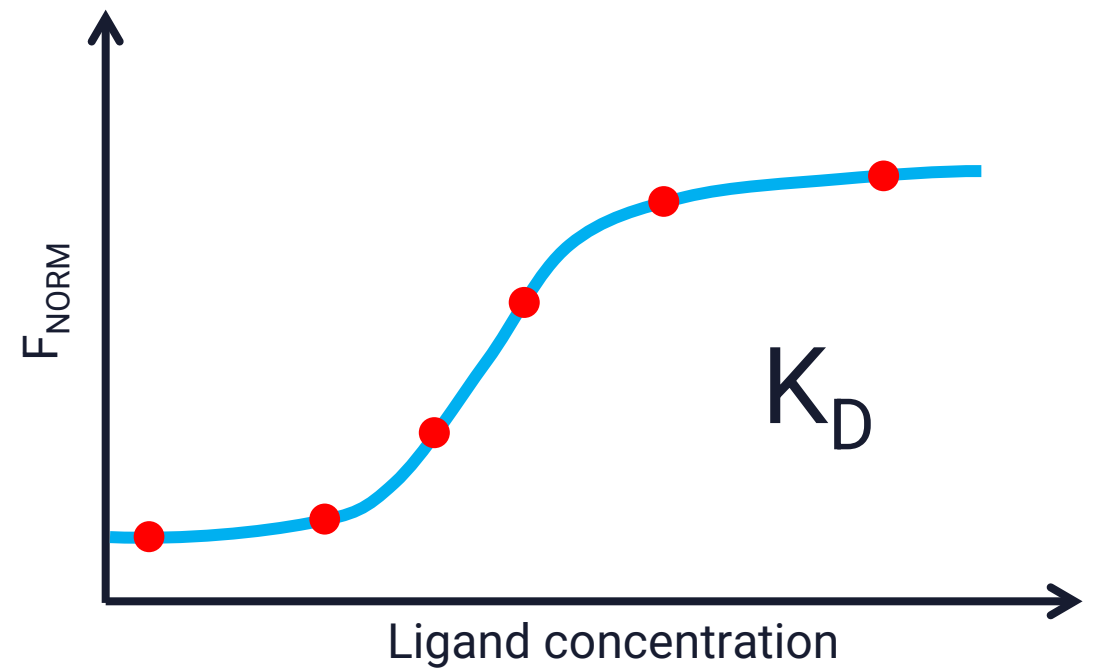
1. **Initial state** – initial fluorescence of sample.
2. **Thermophoresis** – change in fluorescence due to the thermophoretic motion of molecules.
3. **Steady state** - local concentration of molecules decreases in the heated region until it reaches a steady-state distribution.
4. **Back-diffusion** - fluorescence recovery driven by mass diffusion of molecules.

# Analyzing protein-protein interaction with MST

Measuring MST for ligand serial dilution



Evaluating interaction affinity



# Interakce protein-protein na povrchu Surface plasmon resonance - SPR

## Princip

Na přechodu mezi sklem a zlatou vrstvou ideálně o tloušťce 50 nm dochází k odrazu světla - laseru.

Při rezonančním úhlu  $\theta$  dochází ke zvýšené absorpci, která je zaznamenána detektorem.

Vzniká evanescentní (mizející) vlna rezonančních elektronů = plazmonů, která se vzdáleností od povrchu postupně slábne.

Dosah evanescentní vlny je přibližně 100 nm do prostoru roztoku. Plazmony jsou velmi citlivé na změny prostředí, ve kterém se pohybují.

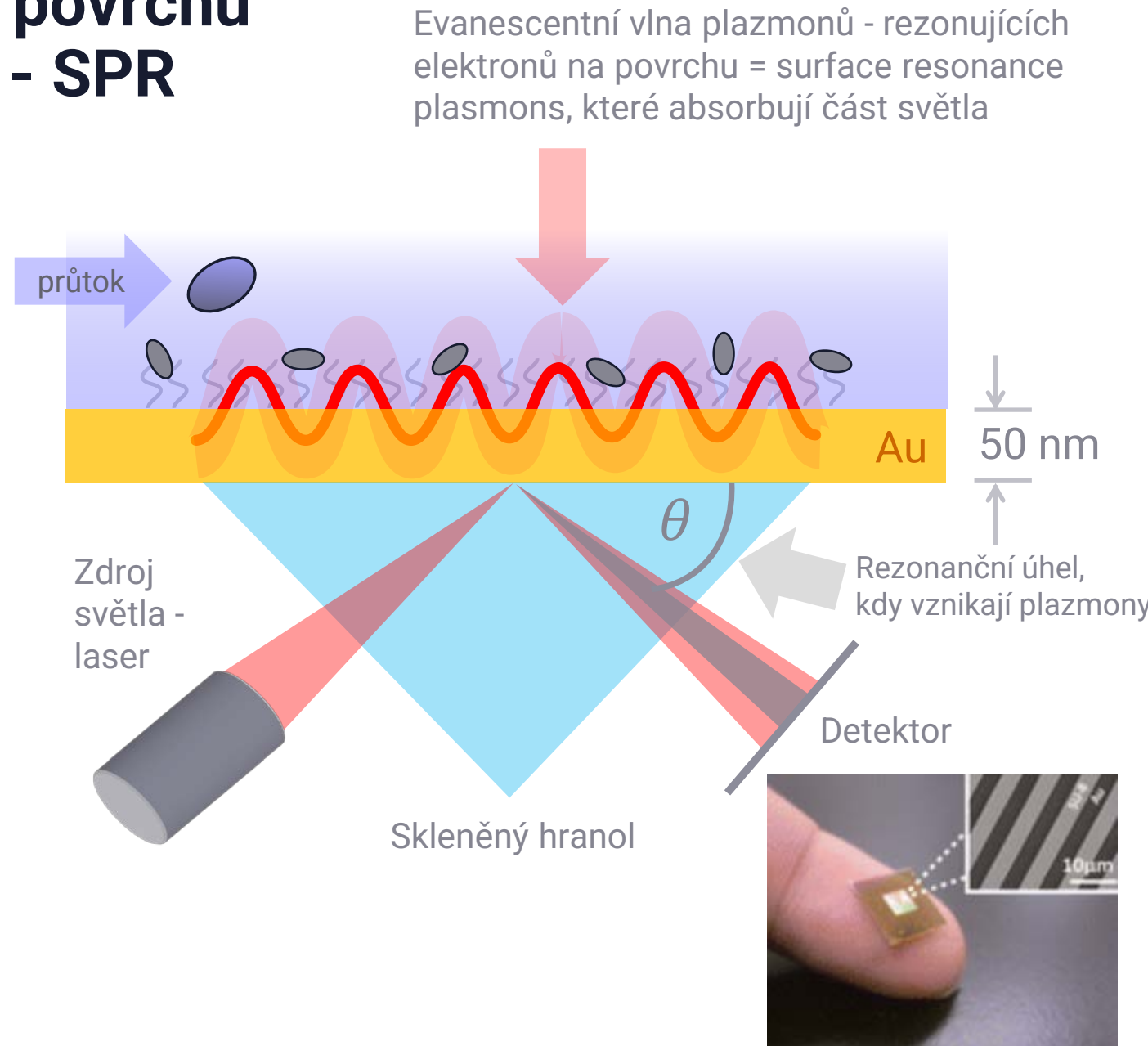
SPR tak umožňuje detekovat změny díky vazbě proteinů na povrchu zlaté vrstvy.

Zlato je pokryto dextranem, na který se imobilizuje jeden interakční protein.

Druhý protein je přidáván do pufru, kterým je promýván povrch s imobilizovaným proteinem.

Po vzniku komplexu protein-protein na povrchu dochází ke změně rezonančního úhlu  $\theta$ , kterou detekujeme.

Sledujeme kinetiku vzniku komplexů v reálném čase.



# SPR prakticky

- Imobilizujeme protein L – ligand na SPR čip.
- Nasytíme vazebná místa na povrchu bez imobilizovaného proteinu L.
- Promyjeme čip puřrem.

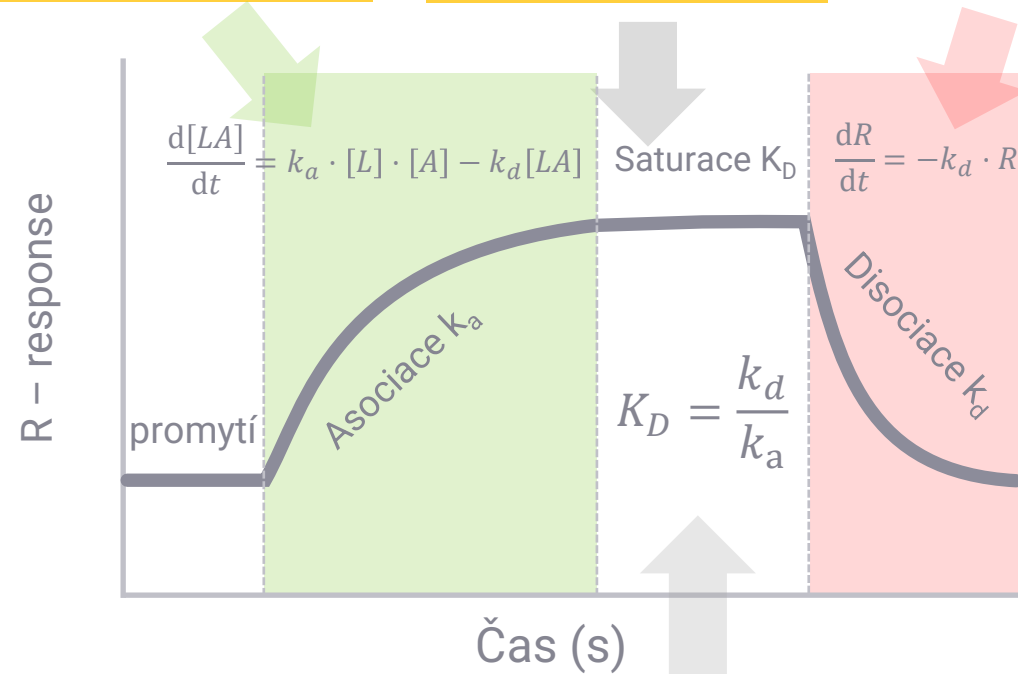
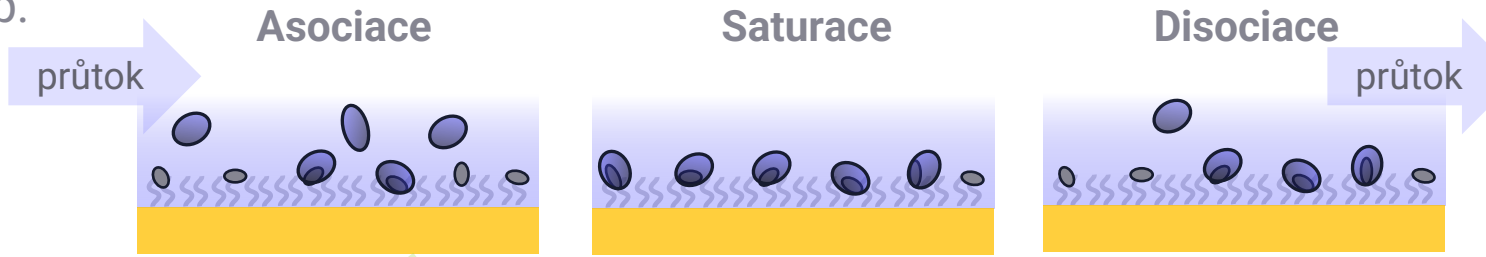
- Promýváme čip druhým proteinem A - analyt.
- Detekujeme změnu signálu.
- Počáteční část křivky ukazuje **kinetiku asociace** obou proteinů.

- Závěrečná část křivky popisuje **kinetiku disociace** obou proteinů.

- Fitováním vazebných modelů určíme hodnoty **rychlostní asociční  $k_a$  a disociační  $k_d$  konstanty**.

**Asociační rychlostní konstanta  $k_a$**  popisuje rychlost tvorby komplexů, tj. počet komplexů LA vytvořených za sekundu v jednomolárním roztoku L a A. Jednotka  $k_a$   $M^{-1}s^{-1}$  v biologických systémech je hodnota  $k_a$  mezi  $1.10^3$  a  $1.10^7$ .

**Disociační rychlostní konstanta  $k_d$**  popisuje stabilitu komplexu, tj. podíl komplexů, které se rozpadnou za sekundu. Jednotka  $k_d$  je  $s^{-1}$  a v biologických systémech se obvykle pohybuje mezi  $1.10^{-1}$  a  $1.10^{-6}$ . Když  $k_d$   $1,10^{-2}s^{-1} = 0,01 s^{-1}$ . To znamená, že 1 % komplexů se rozpadne za sekundu.



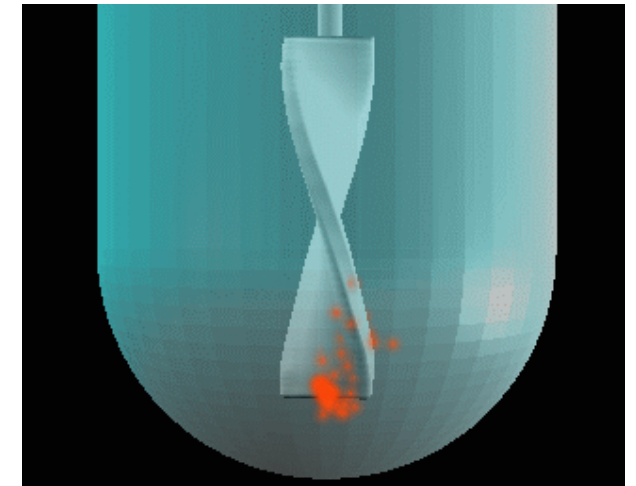
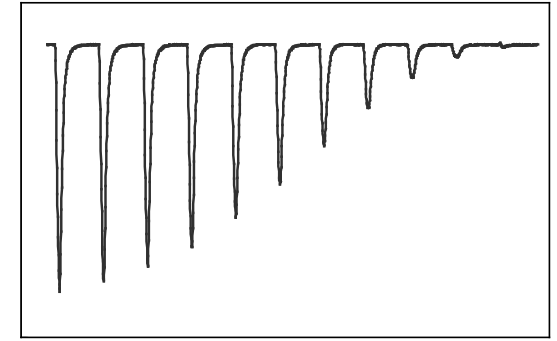
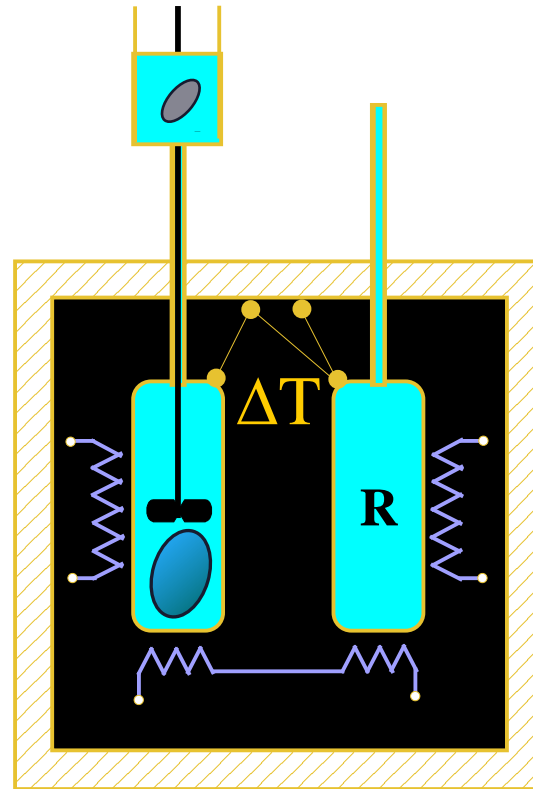
Z poměru  $k_d$  a  $k_a$  určíme

**rovnovážnou disociační konstantu  $K_D$ .**

# ITC – Izotermální titrační kalorimetrie

## popis interakce měřením reakčního tepla

- **Princip**
- Měříme reakční teplo, které se uvolní nebo spotřebuje po přidání proteinu injektorem do roztoku proteinu v měřící cele. Injektor má tvar lodního šroubu, který míchá směs v měřící cele.
- Teplota cely se vzorkem je srovnávána s teplotou referenční cely, která obsahuje pouze pufr.
- Když dojde ke změně teploty mezi celami, dojde k zahřátí nebo ochlazení cely se vzorkem. Teplo, které je vyměněno pro vyrovnání teplot je zapsáno po každém přidavku proteinu z injektoru. Výsledkem je **titrační křivka - sigmoida**.
- Ze známých molárních koncentrací a změny tepla určíme molární vazebnou entalpii - teplo vazby proteinů.

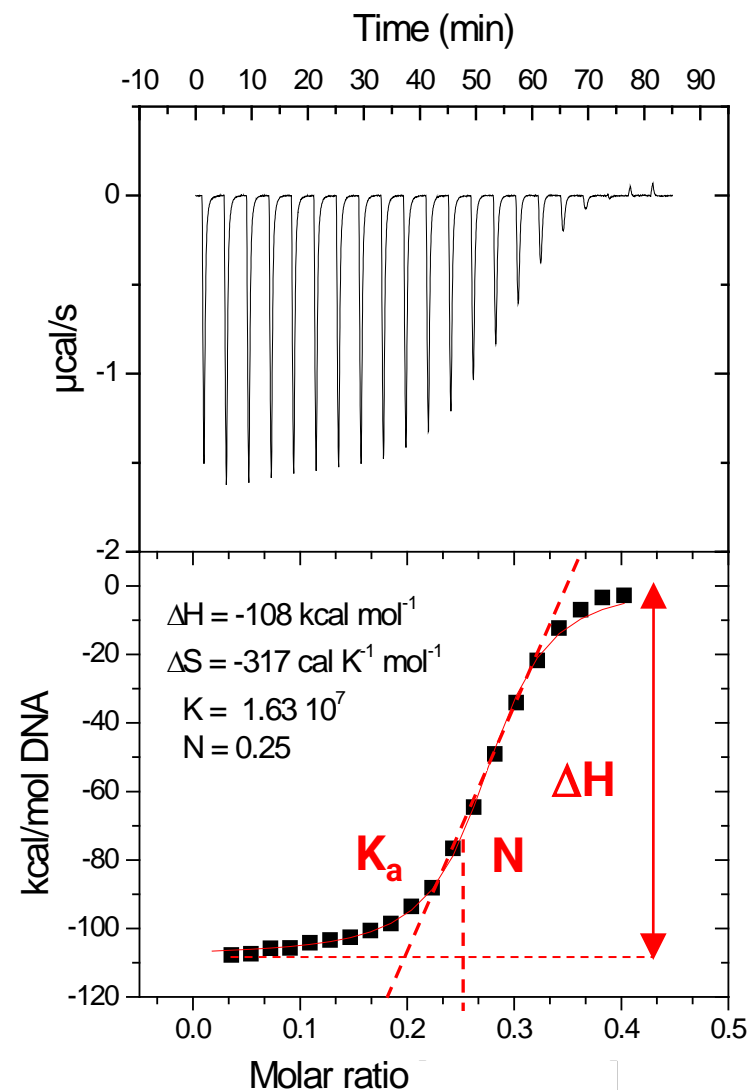


<http://www.youtube.com/watch?v=cYj5IOELaVI>

[https://youtu.be/o\\_lpWcWKNXI?t=44](https://youtu.be/o_lpWcWKNXI?t=44)

# ITC prakticky

- Určíme co nejpřesněji koncentrace proteinů.
- Změříme „blank“ titraci - pufr v injektoru, protein v cele při 25°C.
- Dáme do injektoru druhý protein s desetkrát vyšší koncentrací, než je první protein v cele.
- Změříme titrační křivku.
- Odečteme „blank“ titraci od titrační křivky.
- Normalizujeme na koncentrace proteinů v cele a injektoru.
- Proložíme výslednou sigmoidu vhodným modelem vazby.
- Výška křivky udává vazebnou entalpii, sklon odpovídá rovnovážné asociační konstantě a inflexní bod odpovídá molárnímu poměru vazby proteinů.
- Z jednoho měření lze získat kompletní termodynamický popis vazby  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ,  $K_A$  a stechiometrii vazby  $N$ .



Vazebná entalpie  $\Delta H$

Stechiometrie  $N$

Vazebná konstanta  $K_A$

Volná energie  $\Delta G$

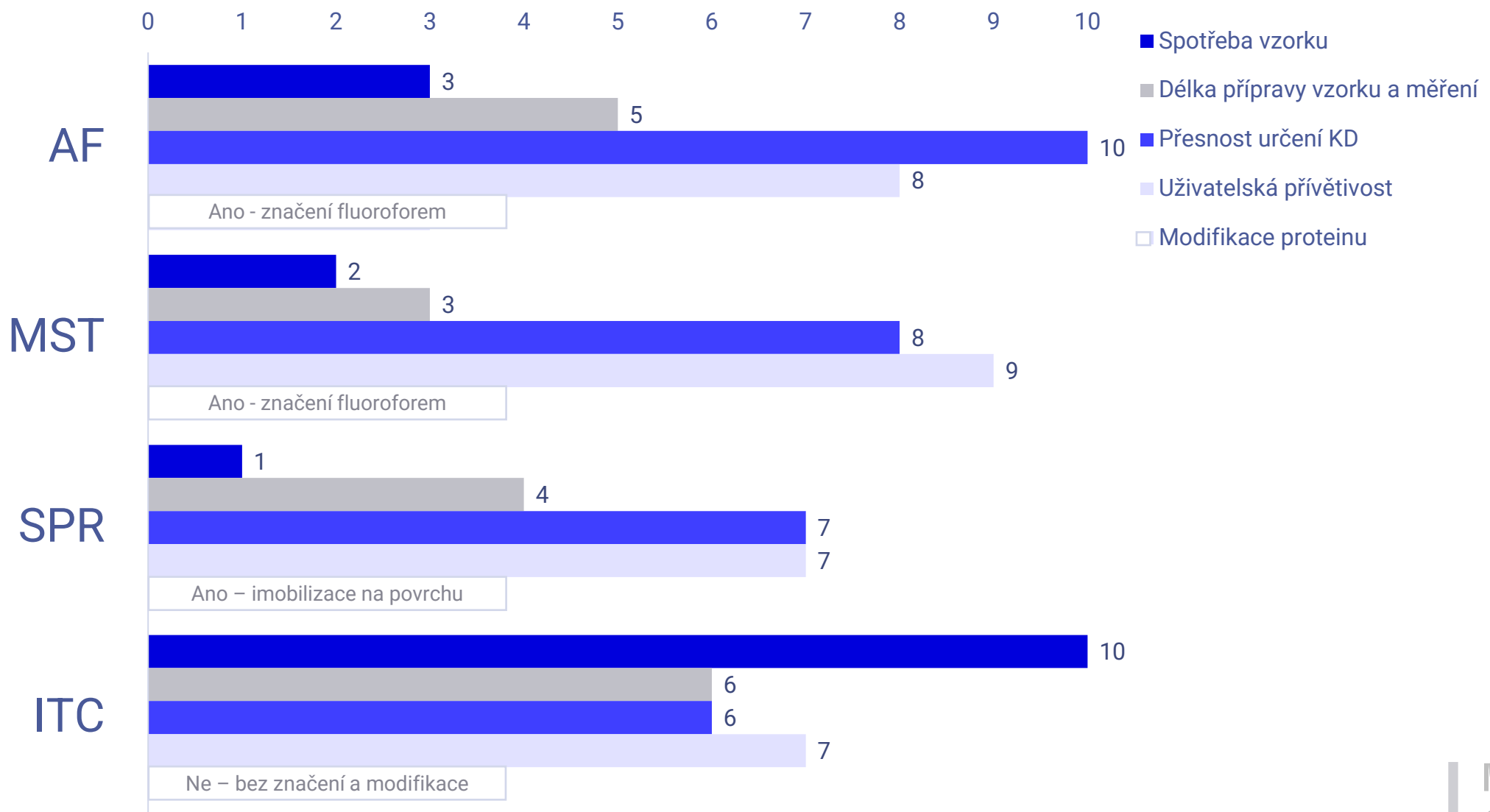
vypočtena z  $\Delta G = -RT \ln K_A$

Změna entropie  $\Delta S$

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



# Srovnání kvantitativních metod



# Kde se můžete dozvědět více?

[C7230](#) Fluorescenční metody ve vědách o životě - cesta od molekuly k buňce

[C7235](#) cvičení

Teoretická vysvětlení principů fluorescence a praktická výuka aplikace fluorescenčních přístupů  
Podzim 2021

[F9070](#) Experimentální metody biofyziky  
Přednášky odborníků a exkurze do výzkumných laboratoří mezinárodně uznávaných společností  
Podzim 2021

- Thermo Fisher 20 November 2018



# Prakticky – fitování vazebné křivky pro chytré hlavy

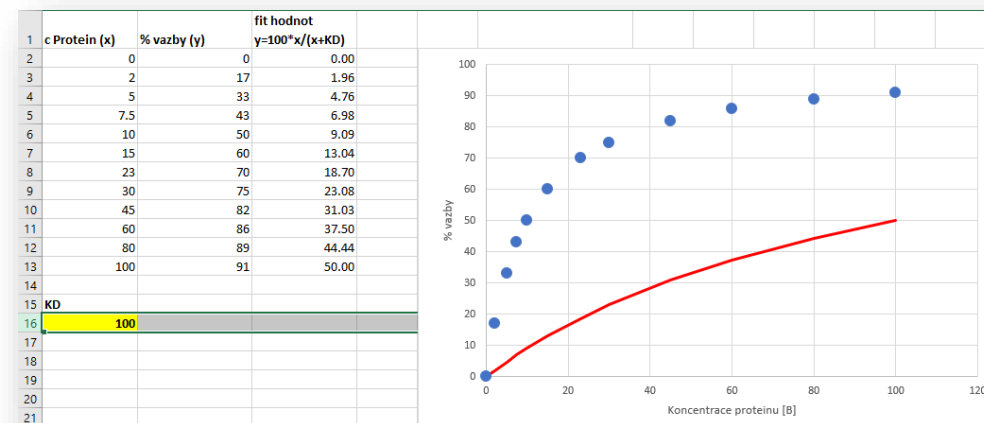
<http://www.lablifeb.org/courses/>



Vyzkoušet, jak se mění tvar vazebné křivky v závislosti na  $K_D$  si můžete v souboru

[KD\\_vliv\\_na\\_tvar\\_krivky.xlsx](#)

když **ručně** změníte hodnotu  $K_D$  na řádku 16.

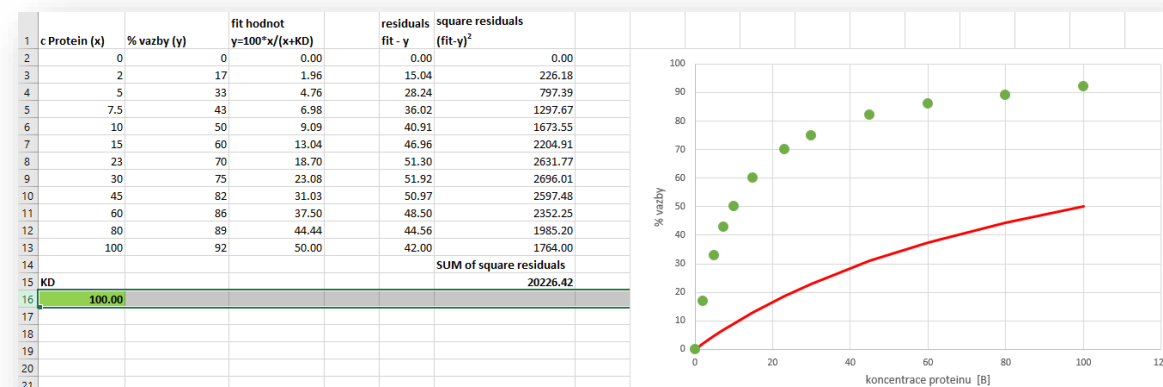


**Automatické** fitování dat v Excel minimalizací součtu druhých mocnin odchylek měřených dat a fitovaných hodnot za použití doplňku Řešitel (Solver) si můžete vyzkoušet v souboru

[Automat\\_KD\\_fit.xlsx](#)

Videonávod, jak aktivovat doplněk Řešitel (Solver) v programu Excel je v souboru

[Resitel\\_Solver\\_ON.mp4](#)



Návod vznikl na základě videa - autor Karl Zuvela

<https://youtu.be/4jpoCGWmfEM>