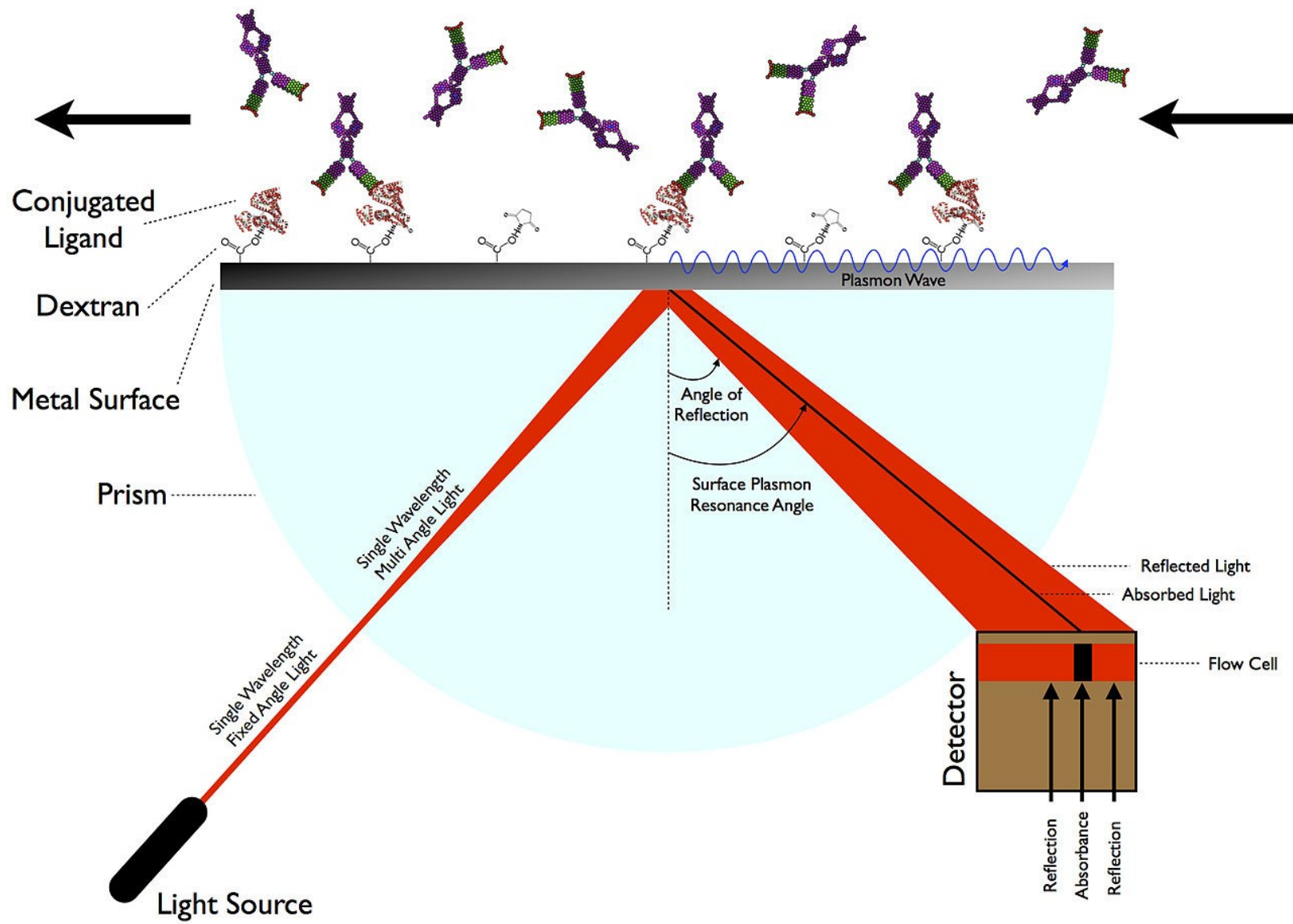


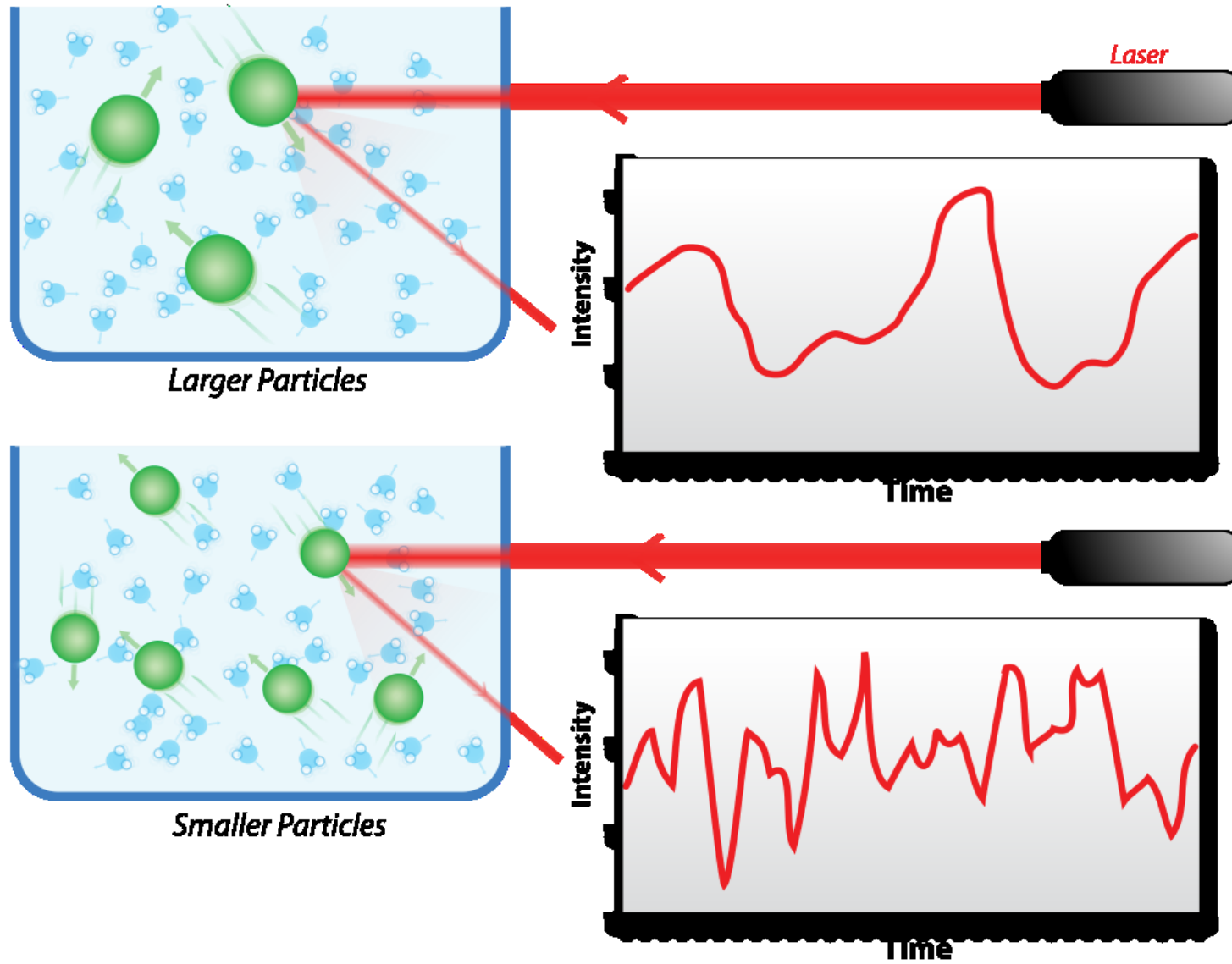
# Povrchová plazmonová rezonancia (SPR)

- Rezonančná oscilácia elektrónov na rozhraní materiálov s rozdielnou optickou hustotou
- Imobilizácia makromolekuly na povrchovú vrstvu kovu
- Druhá interagujúca molekula privádzaná úzkou kapilárou
- Ožiarenie monochromatickou vlnou, spĺňajúcou podmienky rezonancie
- „Úplný odraz“, prostredie s vyšším indexom lomu — nižší index lomu
- Vznik plazmonovej vlny (oscilácia elektrónov) a jej meranie
- Naviazanie a zmena tvaru makromolekuly mení index lomu → zmena signálu
- Možnosť zistiť nielen disociačnú konštantu ale aj kinetické konšt. vzniku a rozpadu komplexu

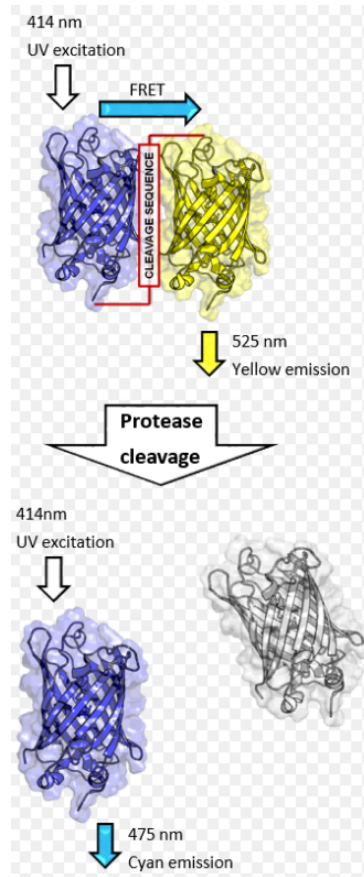


# Dynamický rozptyl svetla (DLS)

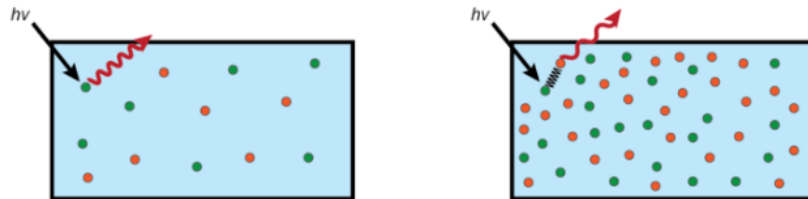
- Charakteristika veľkosti a tvaru makromolekúl
- Ožiarenie vzorky monochromatickým svetlom
- Po dopade na malé častice sa svetlo rozptyľuje do všetkých smerov (Rayleigho rozptyl) pričom pri kontinuálnom snímaní je možné stanoviť Brownov pohyb danej molekuly, ktorý definuje jej veľkosť
- Malé častice, rýchly pohyb                      Veľké častice, pomalý pohyb
- Difúzny koeficient častíc
- Monodisperzia/polydisperzia
- Hydrodynamický polomer



# Försterov rezonančný prenos energie (FRET)



- Výmena energie medzi dvomi svetlo-citlivými molekulami
- Donorová molekula v exc. stave odovzdá energiu akceptorovej cez dipól-dipól interakciu, dôležitá je vzdialenosť
- Detekcie rôznych interakcií, medzi proteínmi, medzi doménami proteínov
- Možnosť aplikácie *in vivo*

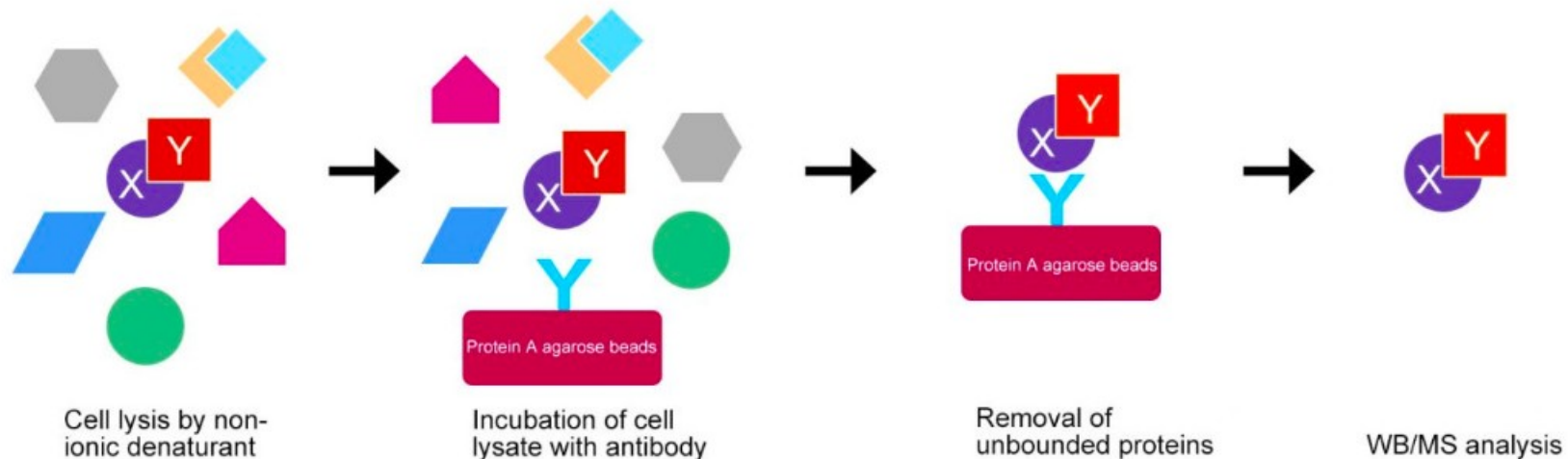


# Koimunoprecipitácia (Co-IP)

- častá technika na štúdium špecifických proteínov a ich interakčných partnerov vo vzorkách buniek alebo tkanív
  - najmä na identifikáciu nových protein-proteínových interakcií a ich validáciu
- fyziologicky relevantná metóda nepriamej identifikácie protein-proteínových interakcií
- využíva proteín-špecifické protilátky na vychytávanie proteínov viazaných v komplexe s inými proteínmi (často neznámymi)
  - Bait <-> prey protein

# Priebeh koimunoprecipitácie

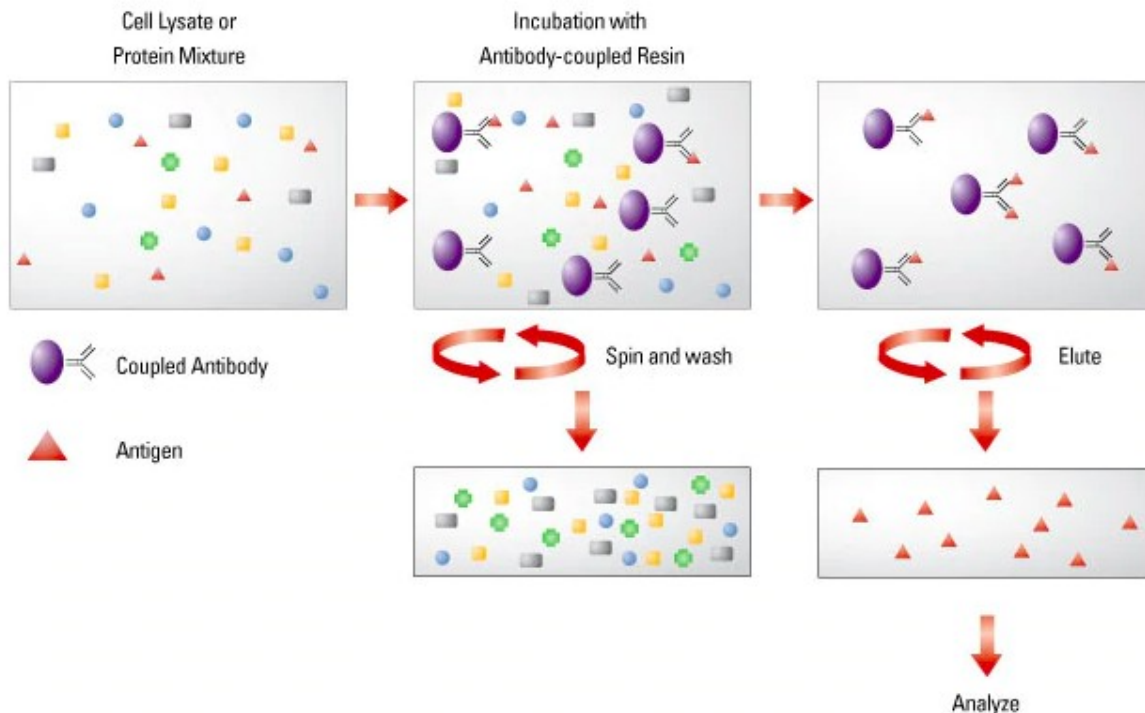
- tvorba bunkových lyzátov pomocou nenedenuračných činidel
- použitie špecifickej protilátky
- naviazanie antigénu zo vzorky na protilátku
- precipitácia a premytie antigénu a na ňom naviazaných proteínov
  - precipitácia pomocou agarózových/ magnetických guľčiek
- vymytie a analýza proteínov naviazaných na antigén



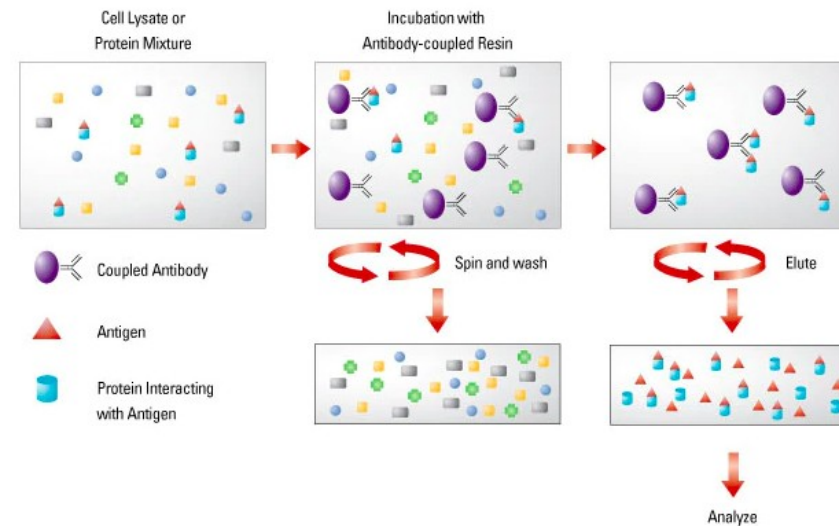


# Imunoprecipitácia vs. Koimunoprecipitácia

Imunoprecipitácia – cieľom metódy je získať primárny cieľ => antigén



Koimunoprecipitácia – cieľom metódy je získať sekundárny cieľ => proteíny interagujúce s antigénom



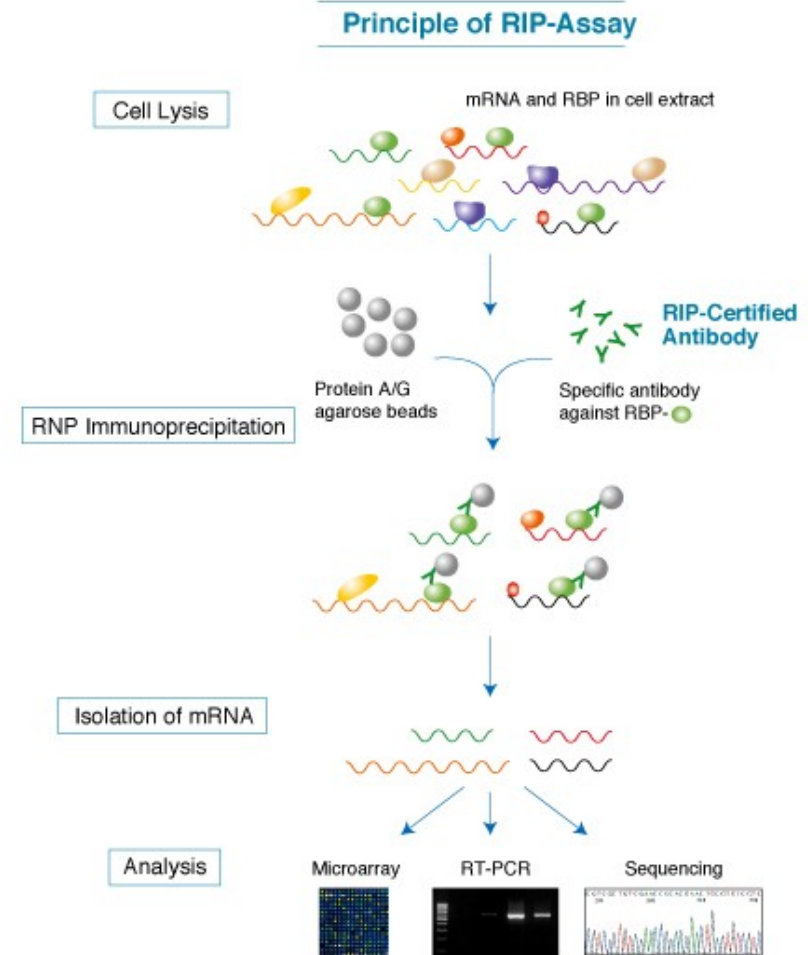
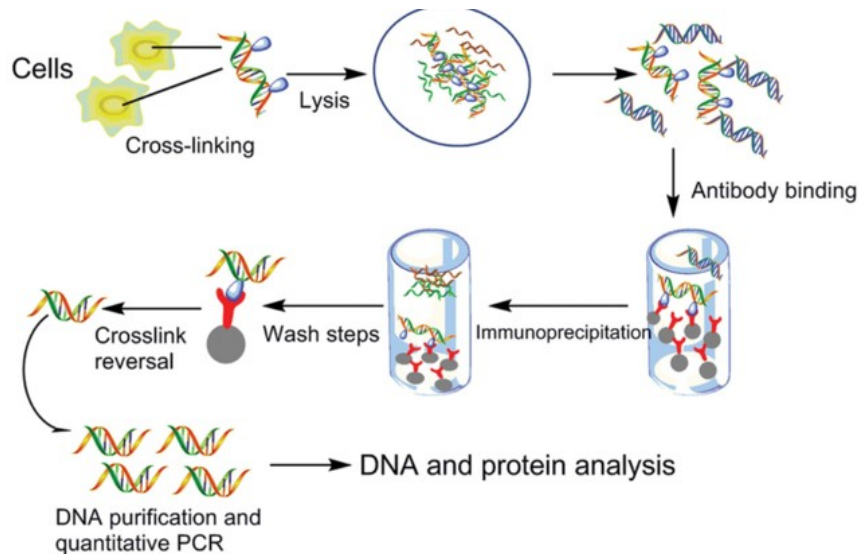
# Výhody Nevýhody

vs.

- vysoko špecifická a veľmi jednoduchá metóda
  - podmienky podobné fyziologickým
    - prevedenie metódy, konformácia získaného proteínového komplexu
  - identifikácia proteínov vyskytujúcich sa v bunke vo veľmi malom množstve
  - získaný komplex je pripravený na analýzu ďalšími metódami
    - WB, MS
- slabé signály z nízko-afinitných proteínov
  - nevhodné pre rýchle proteínové reakcie
  - náročná izolácia veľmi afinitných protilátok
  - nutnosť výberu správnej vysoko-špecifickej protilátky

# Iné typy imunoprecipitácie

- RNP imunoprecipitácia
  - izolácia miRNA z RNP komplexov
- Chromatínová imunoprecipitácia (CHIP)
  - identifikácie interakcie proteínu a DNA v bunke
    - asociácia génového regiónu s určitým proteínom
    - určovanie väzby transkripčných faktorov

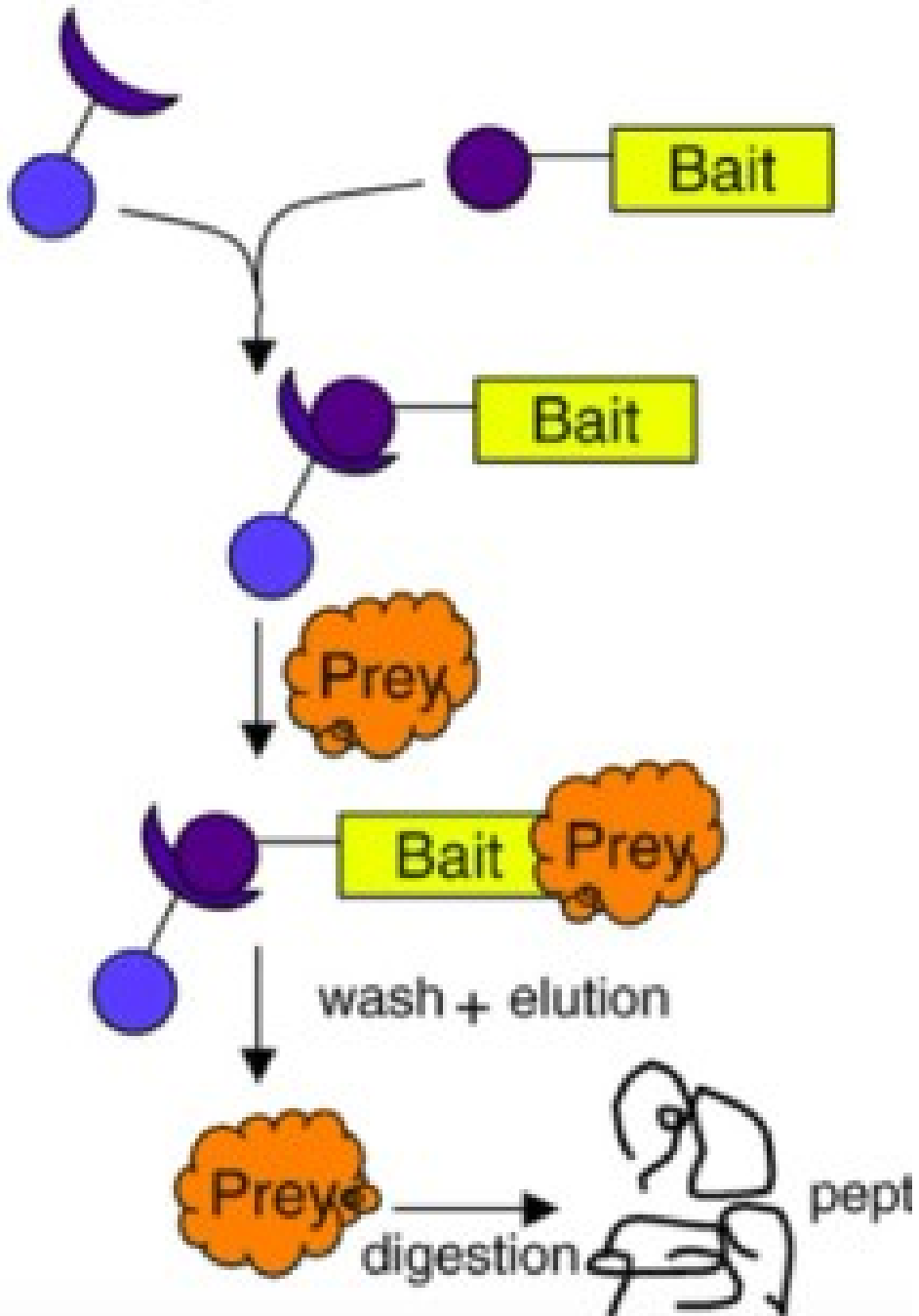


<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/chromatin-immunoprecipitation-chip.html>

# Pull-down assay

- In vitro afinitní purifikační metoda
- Podobná koimunoprecipitaci
- Záchyt proteinových komplexů na povrch matrice prostřednictvím interakce krátké fúzované sekvence nebo vazbou **(tzv. afinitní značky, se specifickým ligandem imobilizovaným na povrchu matrice)**
- Pro studium proteinových interakcí je vyžadováno klonování a přenos cizorodé rekombinantní molekuly DNA do buněk za účelem exprese proteinu fúzovaného s afinitní značkou
- Výhodou je možnost identifikovat i interakční partnery různých nízkomolekulárních ligandů (např. kofaktorů)

Affinity ligand



# Průběh

- Imobilizace afinitního systému (ligand) specifického pro afinitní značku (tag) na pevný nosič
- Exprese rekombinantních fúzně značených proteinů nebo vazba afinitní značky na protein (tzv. návnada) → imobilizace na afinitní systém
- Inkubace se zdrojem interakčních partnerů (tzv. kořist)
- Promývání a eluce
- Analýza

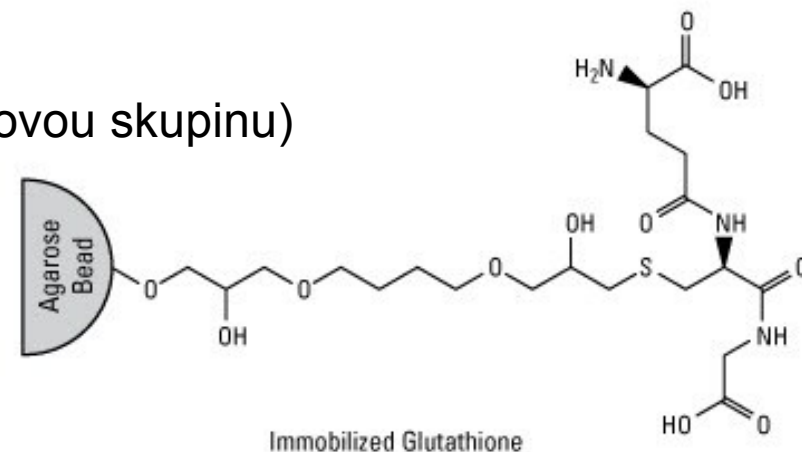
# Systemy afinitních značek a jejich partnerů

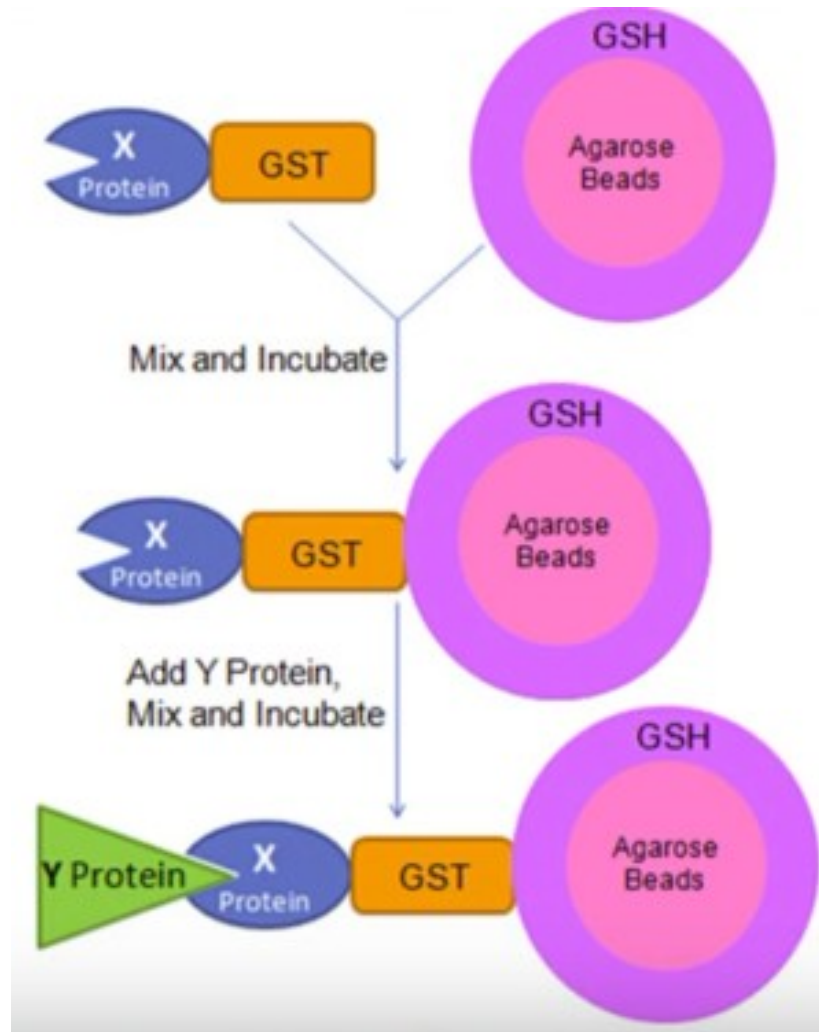
	afinitní značka	sekvence afinitní značky	imobilizovaný interakční partner
Peptidové značky	FLAG	DYKDDDDK	protilátka anti-FLAG
	HA	YPYDVPDYA	protilátka anti-HA
	oligoHis (6-10mer)	HHHHHH(HHHH)	chelát niklu nebo kobaltu
	Myc	EQKLISEEDL	protilátka anti-Myc
	SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLR ARLEHHPQGQREP	streptavidin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

<https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/395/4488.pdf>

# GST systém

- **Glutathion S-transferáza** (211 aminokyselin, 26kDa)
- DNA sekvence integrovaná do expresních vektorů pro produkci rekombinantního proteinu
- GST protein fúzován k N-konci rekombinantního proteinu
- Výsledek: GST- značený fúzní protein
- Vazba enzymu se substrátem **glutathionem** (GSH)
- Redukovaný GSH na pevném nosiči (skrz sulfhydrylovou skupinu)

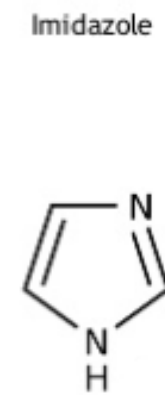
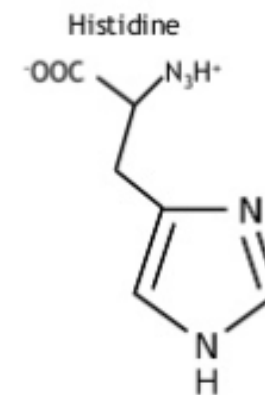


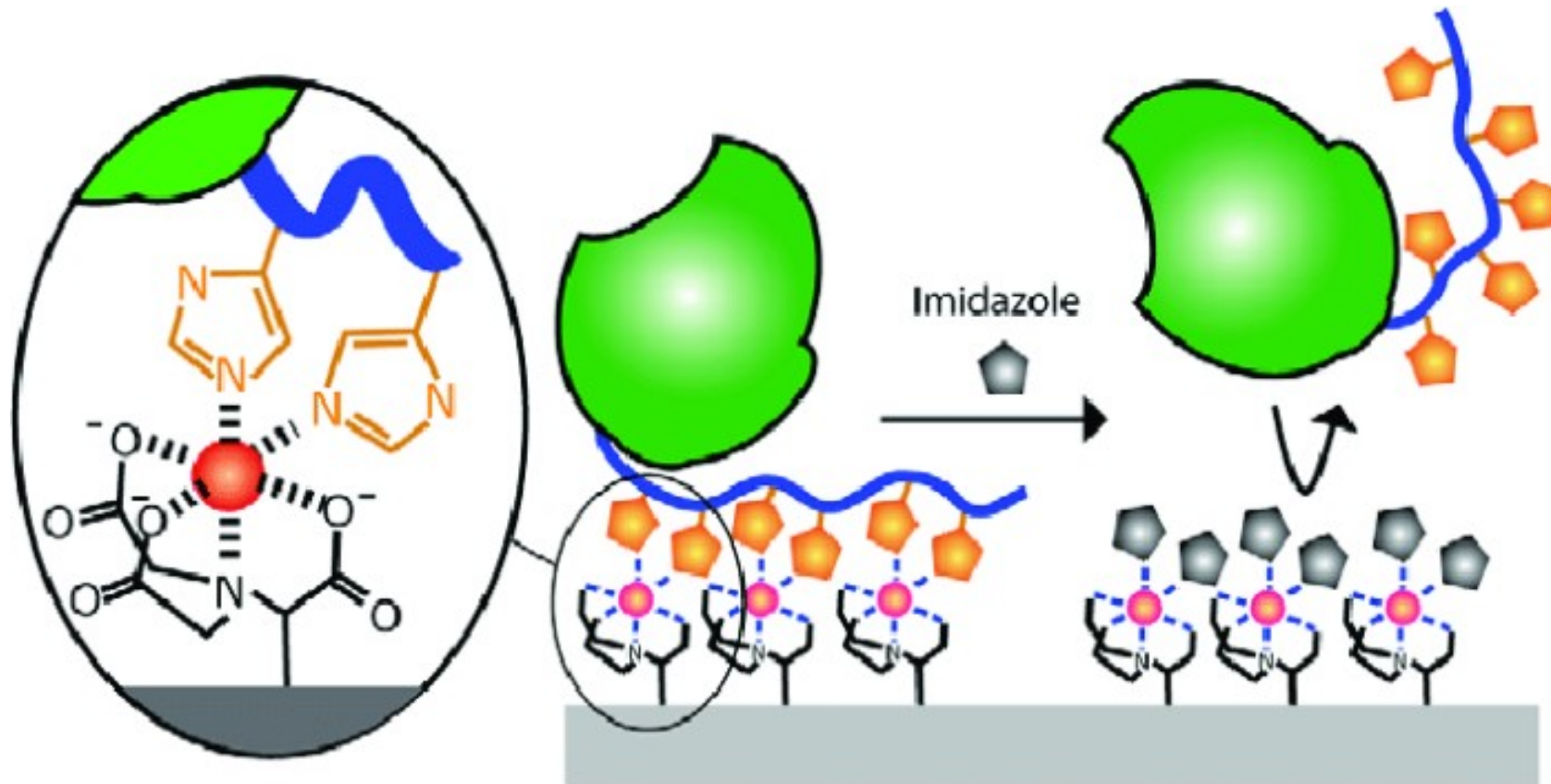




# His-tag systém

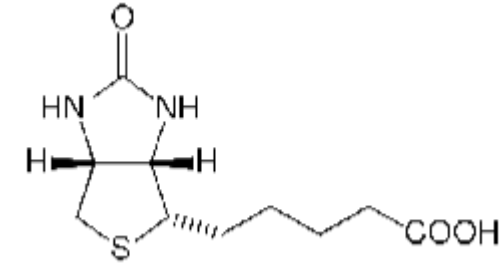
- **6-10 histidinových zbytků**
- DNA sekvence integrovaná do expresních vektorů pro produkci rekombinantního proteinu
- Fúzováno k N- nebo C- konci rekombinantního proteinu
- Výsledek: fúzovaný protein s 6xHis nebo poly-His-tagem
- Vazba His-řetězce k imobilizovaným **kovovým iontům** ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ )
- Imobilizace iontů chelatačním činidlem (NTA, IDA)





[https://www.researchgate.net/figure/Immobilization-of-His-tagged-protein-on-Ni-2-NTA-surface-A-linear-sequence-of-6-12\\_fig1\\_44626558v](https://www.researchgate.net/figure/Immobilization-of-His-tagged-protein-on-Ni-2-NTA-surface-A-linear-sequence-of-6-12_fig1_44626558v)

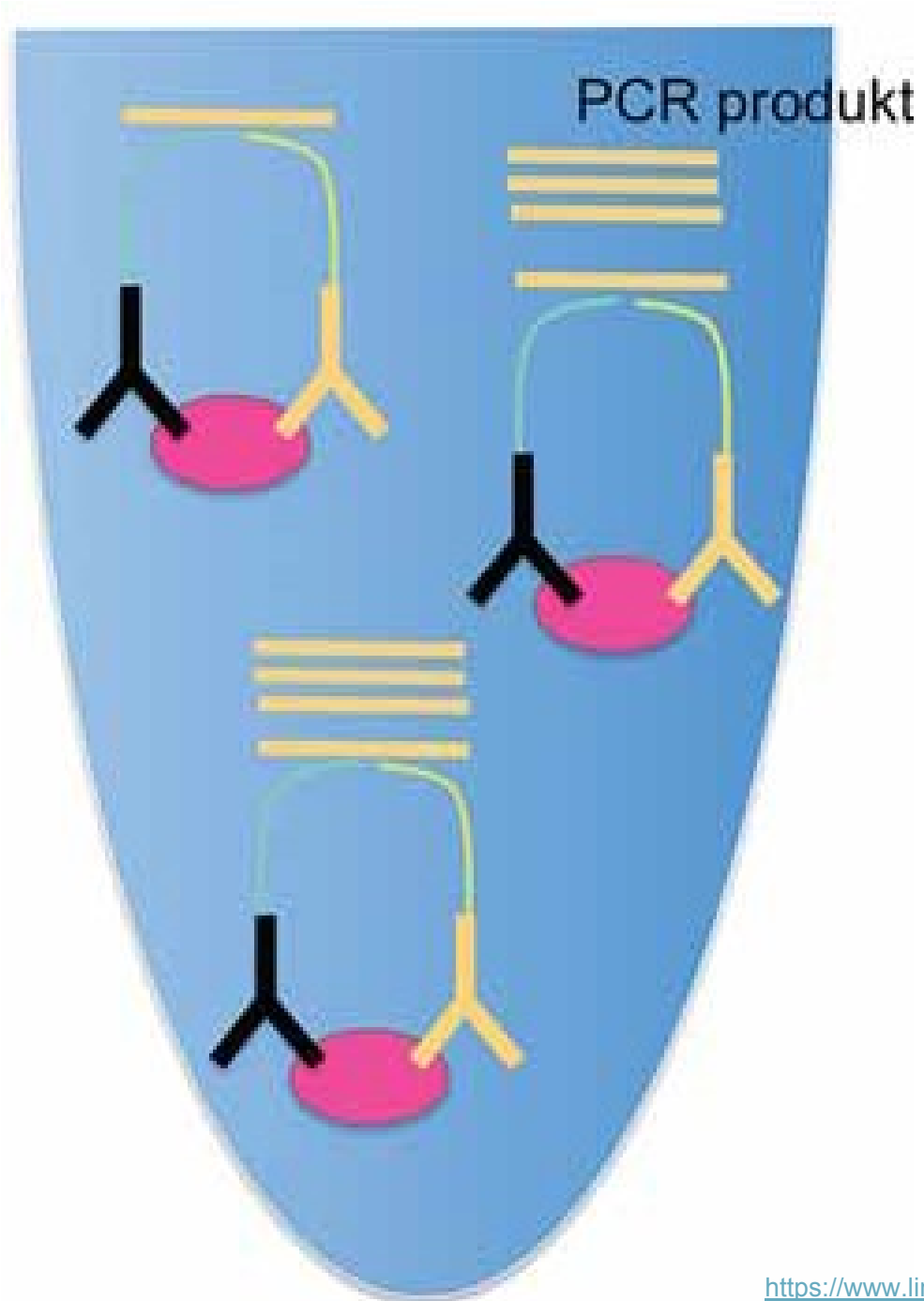
# Biotinový systém



- **Biotin** (vitamín H) je malá molekula v bočním řetězci s kys. valerovou
- Její karboxylová skupina může být chemicky modifikovaná
- Různé reaktivní skupiny cílí proteinové části (-NH<sub>2</sub>, -SH)
- Imobilizace na **avidin**
- Vzniká extrémně silná interakce biotin-avidin
- Pro eluci jsou nutné drsné podmínky způsobující denaturaci
- Komerční dostupnost alternativních činidel pro značení biotinem, modifikované avidinové pevné nosiče

# Proximity ligation assay (PLA)

- Detekcia proteínov, proteínových interakcii, translačných modifikácii proteínov
- Väzba dvojice sond – špecifické protilátky s naviazanými oligonukleotidmi na proteín/komplex proteínov
- *In vitro* – Solution phase PLA, Solid phase PLA
- *In situ* – skúmanie endogénnych proteínov v tkanivách, bunčných kultúr

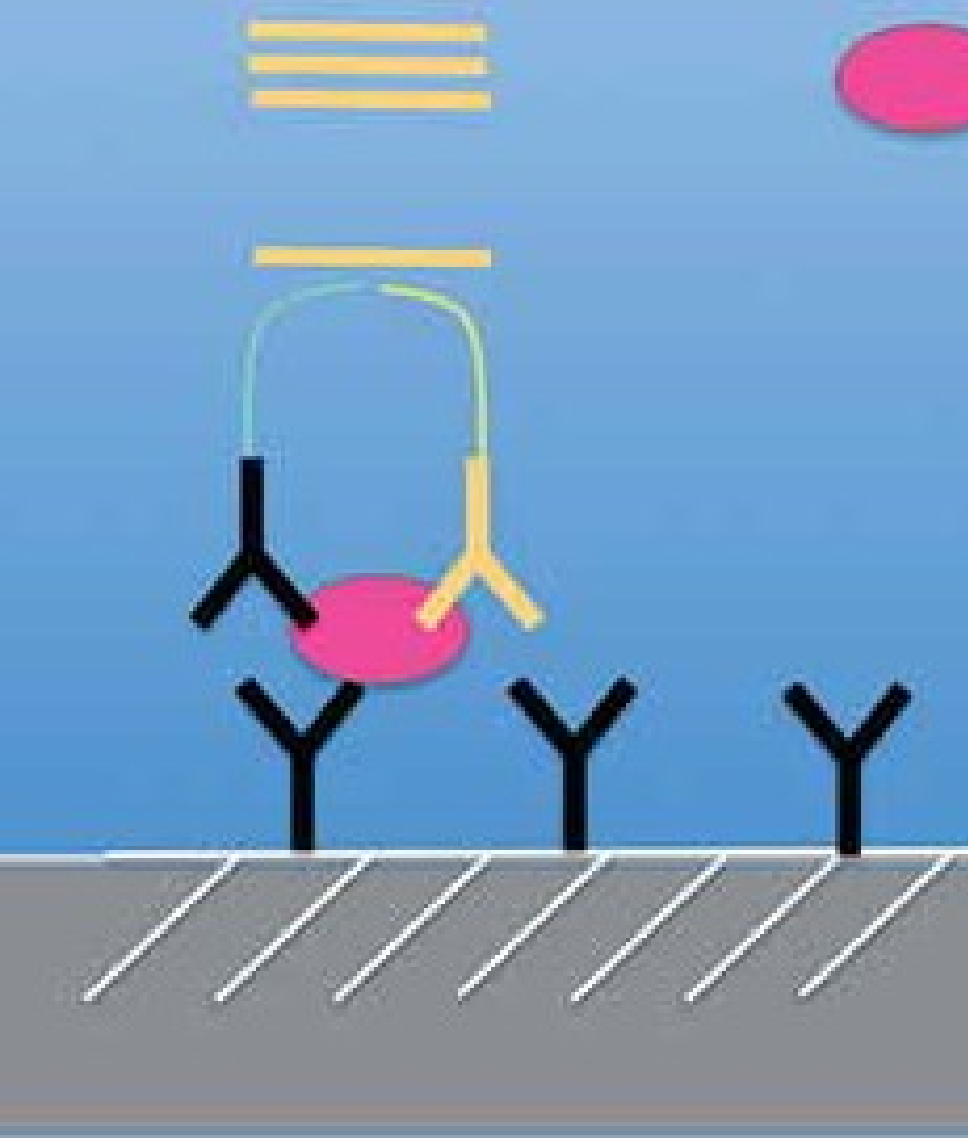


## Solution phase - v kvapalnej fáze

1. Pridanie sond ku vzorku
2. Pridanie spájacieho oligonukleotidu a DNA ligázy
3. Amplifikácia a detekcia – qPCR

- Nenáročná metóda – veľký počet vzoriek
- Vysoká citlivosť - femtomóly

PCR produkt

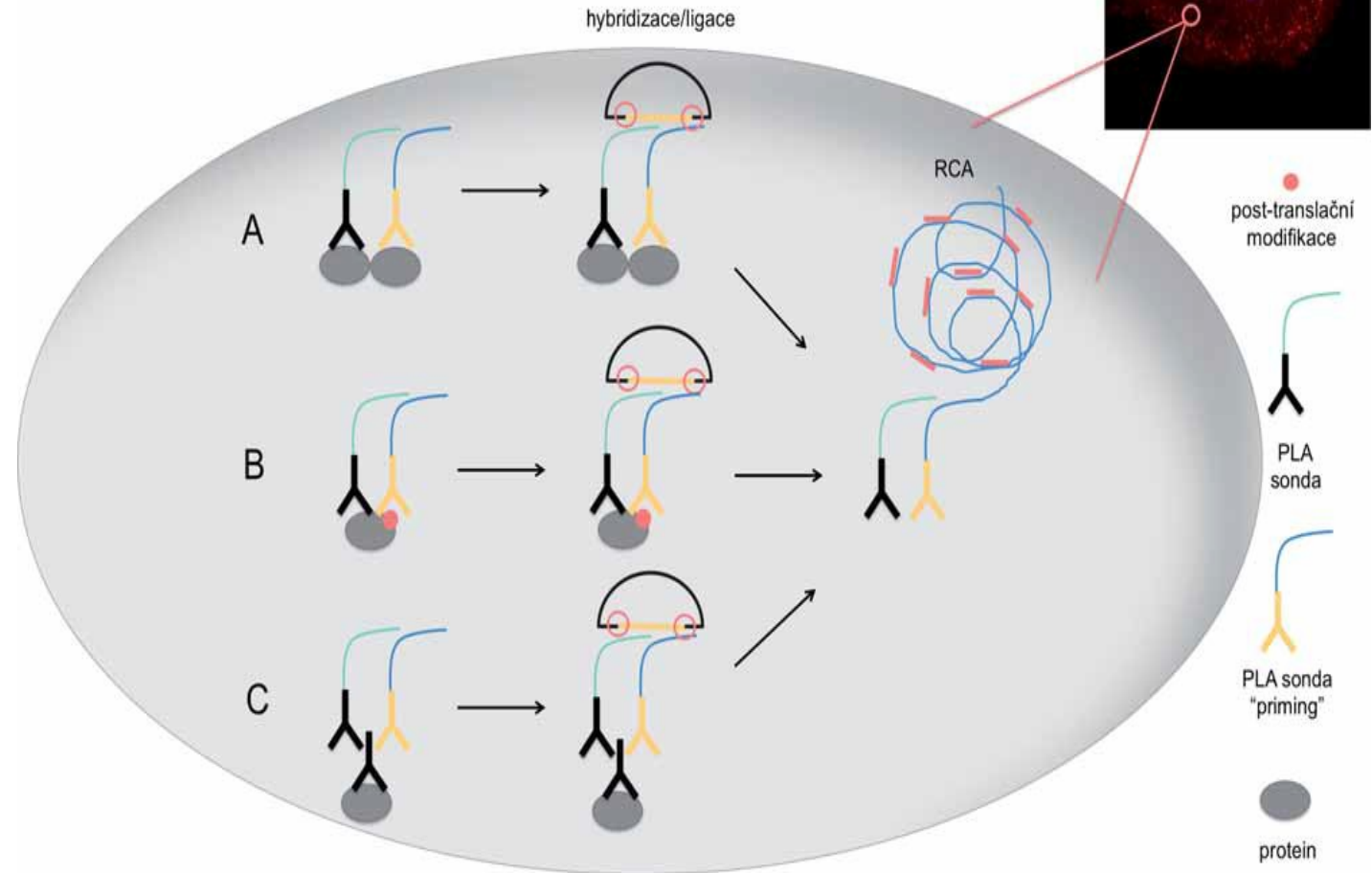


## Solid phase – na pevnej fáze

- Podobnosť ELISA
- Naviazanie proteínu na protilátku uchytenú na pevnej vrstve
- Nasledovné pridanie sond, amplifikácia & detekcia ako v kvapalnej fáze

# *In situ*

- Interakcia proteín-proteín
- Interakcia proteín-modifikovaný proteín
- Využitie sekundárnych sond
- Rolling circle amplification (RCA) – syntéza cDNA
- Phi29 DNA polymeráza
- Produkt amplifikácie zostáva naviazaný na cieľový proteín
- Detekcia pomocou hybridizácie s fluorescenčne značnými oligonukleotidmi



- Pokročilá analýza, možnosti sledovania viacerých analytov
- Citlivá – schopnosť sledovania jednotlivých molekúl
- Prirodzené prostredie, špecifický signál ľahko rozlíšiteľný od nešpecifického
- Molekulárna onkológia, diagnostika, farmakológia

- ❖ Nedá sa využiť in vivo
- ❖ Nie je možné identifikovať nové proteíny

<https://bitesizebio.com/22920/proximity-ligation-assay-pla-for-dummies/>

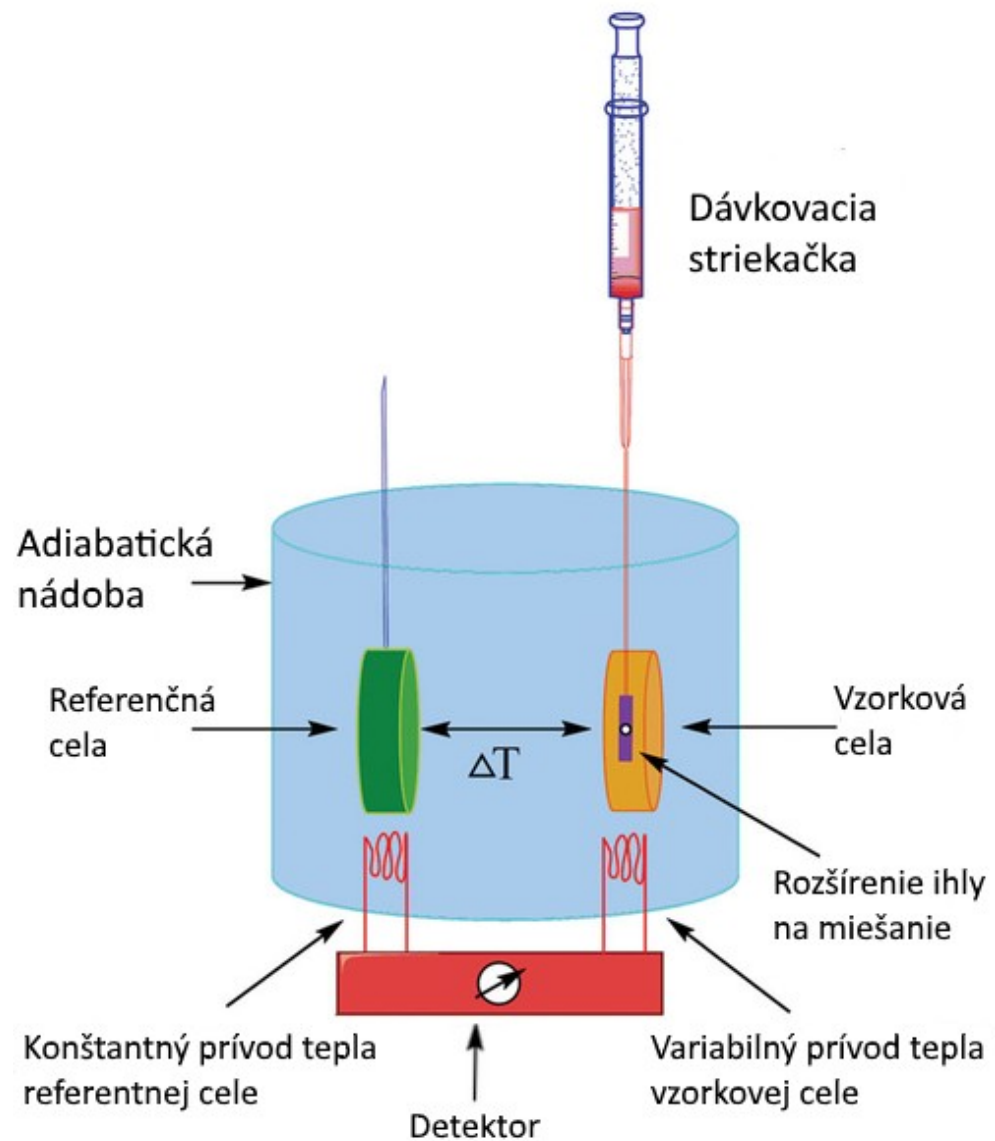
<https://www.youtube.com/watch?v=RFTbb5xd6iQ>

<https://bitesizebio.com/22920/proximity-ligation-assay-pla-for-dummies/>



# Izotermálna titračná kalorimetria (ITC)

- Kvantitatívna analýza proteínových interakcií
- Bez značkovania
- Zistenie všetkých parametrov interakcie
- V natívnom stave
- Zistenie väzobnej afinity ( $K_D$ ), reakčnej stechiometrie ( $n$ ), reakčnej entalpie ( $\Delta H$ )



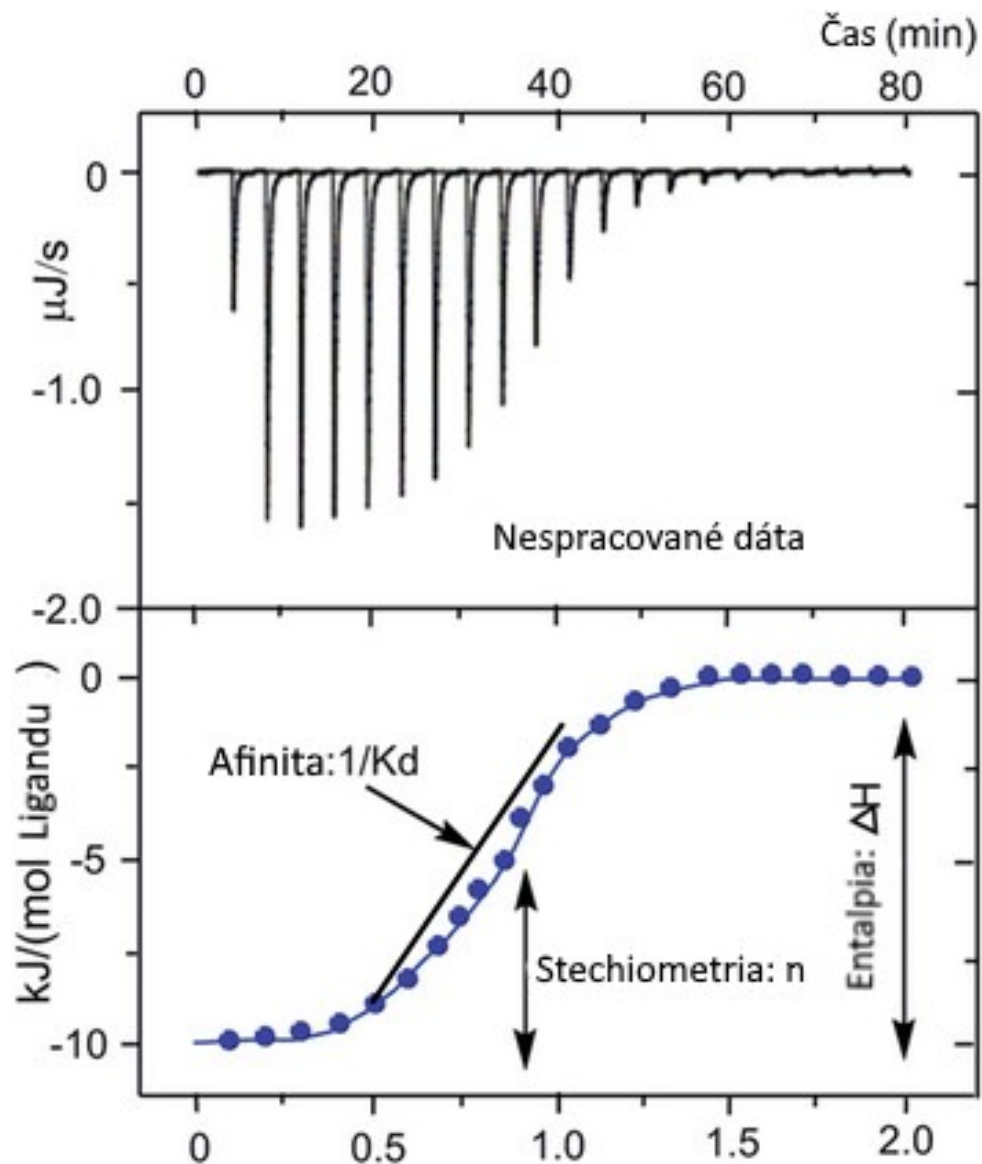
[https://www.researchgate.net/figure/Basic-principle-of-isothermal-titration-calorimetry-Schematic-representation-of-the\\_fig4\\_282834104](https://www.researchgate.net/figure/Basic-principle-of-isothermal-titration-calorimetry-Schematic-representation-of-the_fig4_282834104)

- Referenčná cela – voda (pufor)
- Vzorková cela – proteín

1. Pridanie ligandu striekačkou
2. Zaznamenanie zmeny teploty (exotermická x endotermická reakcia)
3. Reakcia detektoru - mikrokalorimetru (zníženie x zvýšenie prívodu tepla)

<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry/>

- Afinita merateľná v rozmedzí  $K_A$   $10^3$  až  $10^9$ . ( $K_A = 1/K_D$ ), smernica vyznačeného úseku
- Stechiometria – kolmica na osu X z bodu inflexie
- Entalpia – rozdiel počiatočného a konečného energetického stavu
- Následné dopočítanie  $\Delta G$ ,  $\Delta S$
- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
- $\Delta G_0 = -RT \ln K_a$

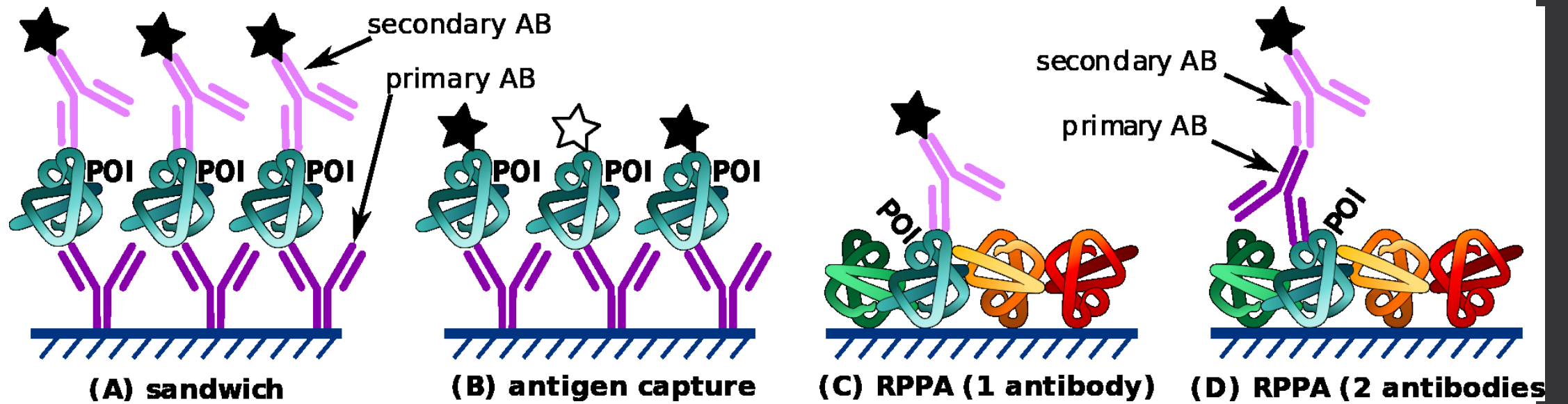


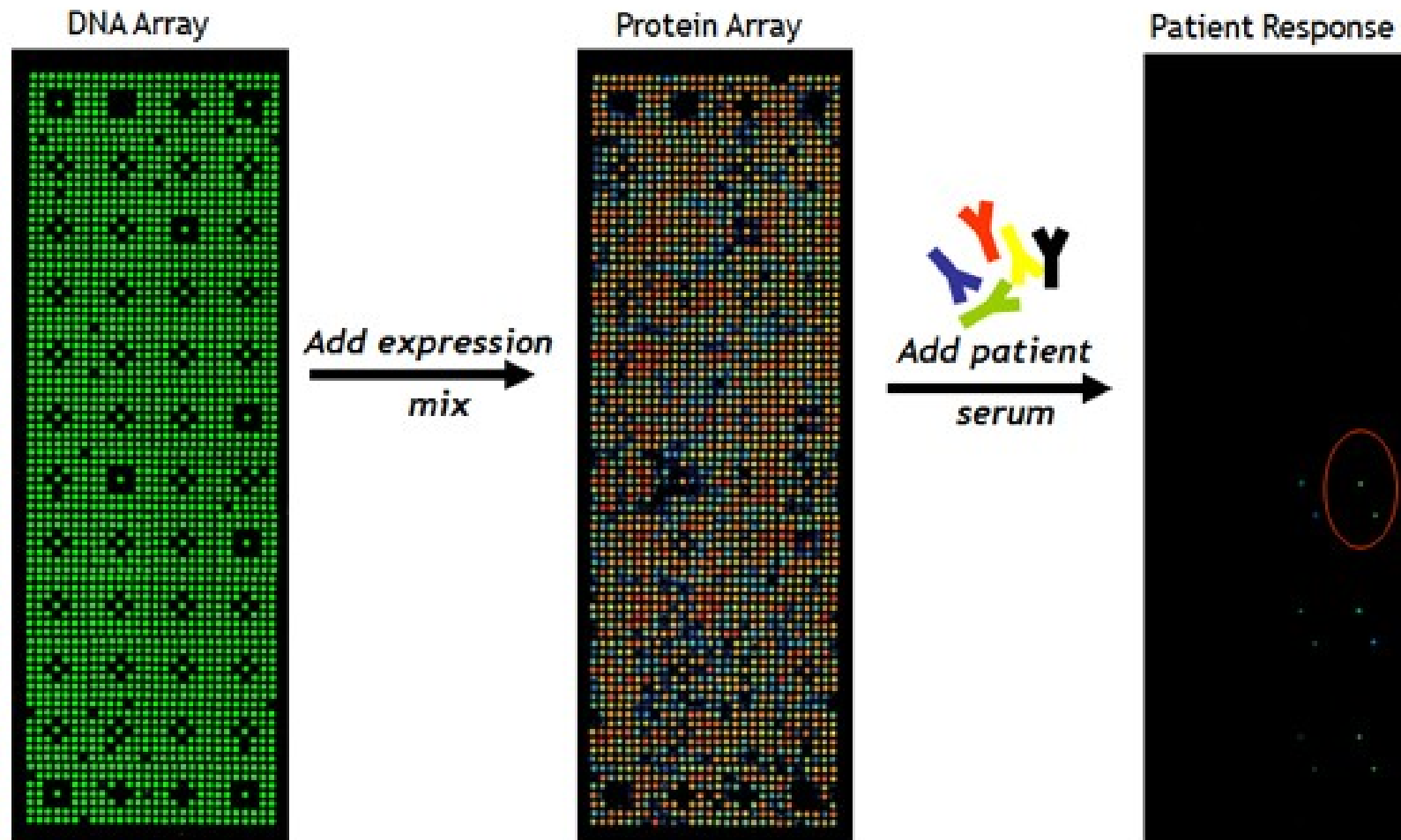
[https://www.researchgate.net/figure/Basic-principle-of-isothermal-titration-calorimetry-Schematic-representation-of-the\\_fig4\\_282834104](https://www.researchgate.net/figure/Basic-principle-of-isothermal-titration-calorimetry-Schematic-representation-of-the_fig4_282834104)

- Metóda merania termodynamických vlastností proteín-proteínovej interakcie
  - Zisťovanie stechiometrie, enzýmovej kinetiky, špecificity
  - Popisovanie mechanizmu interakcie
  - Bez nutnosti značenia
- 
- ❖ Vysoká spotreba vzorku
  - ❖ Citlivosť na bubliny, agregáciu

# Proteinové čipy

- Vysoce výkonná in-vitro metoda
- Mnoho způsobů detekce, značené i neznačené metody
- Detekce proteinu, posttranslační modifikace, identifikace interakcí a ligandových receptorů
- Podobná DNA čipům





[http://nappaproteinarray.org/image/NAPPA\\_slides.jpg](http://nappaproteinarray.org/image/NAPPA_slides.jpg)



- Ohromné množství kombinací testováno zároveň
- Teoreticky i celý proteom buňky testovaný zároveň
  
- Nutnost navázat proteiny na matrici
- Velmi složité
- Velmi drahé