

# *Detekce protein-proteinových interakcí*

Tereza Stará, Polina Shpet, Barbora Habánová, Klára Hánělová, Tereza Brůžová

Masarykova univerzita

# Úvod

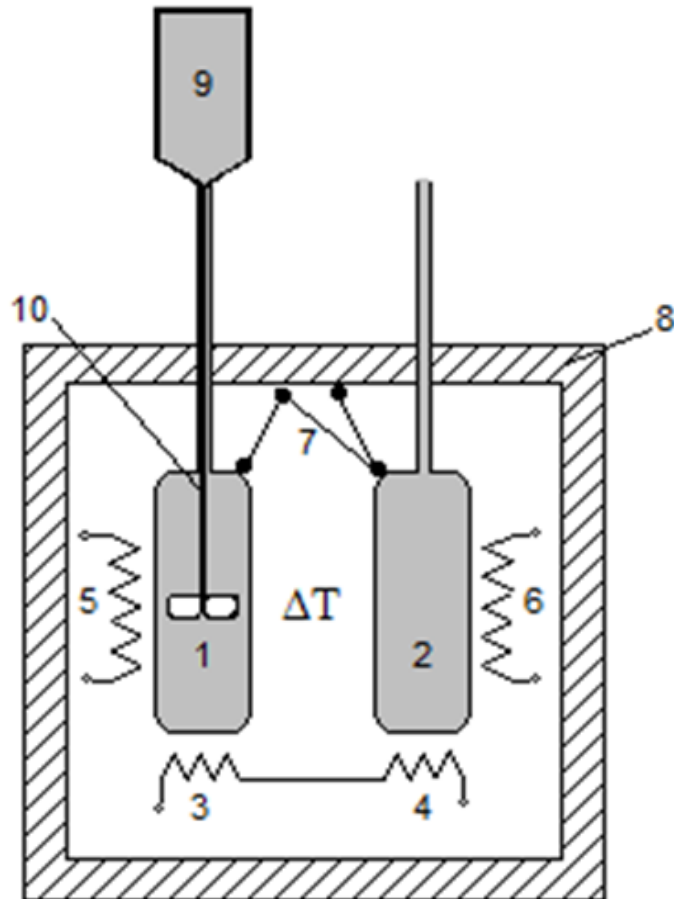
- ◇ •Tvorba komplexů
- ◇ •Klíčová role ve většině buněčných procesech
- ◇ •Proteinová síť - interaktom
- ◇ •Studium buněčné fyziologie, enzymové kinetiky, identifikace funkcí neznámých proteinů
- ◇ •Specifické interakce – specifická funkce
- ◇ •Klasifikace:
  - Slabé přechodné
  - Silné trvalé

# Izotermální titrační kalorimetrie ITC

- ◇ • Studium biologické aktivity, enzymové kinetiky, strukturální změny
- ◇ • Měření termodynamických parametrů interakce:
  - vazebná konstanta  $K_D$
  - stechiometrie interakce  $n$
  - entalpie  $\Delta H$
  - entalpický přírůstek  $-T\Delta S$
- ◇ • Typy vzorků:
  - Pevné vzorky rozpuštěné v pufru
  - Kapalné vzorky a roztoky látek
  - Organické, anorganické a biologické materiály
  - Farmaceutika

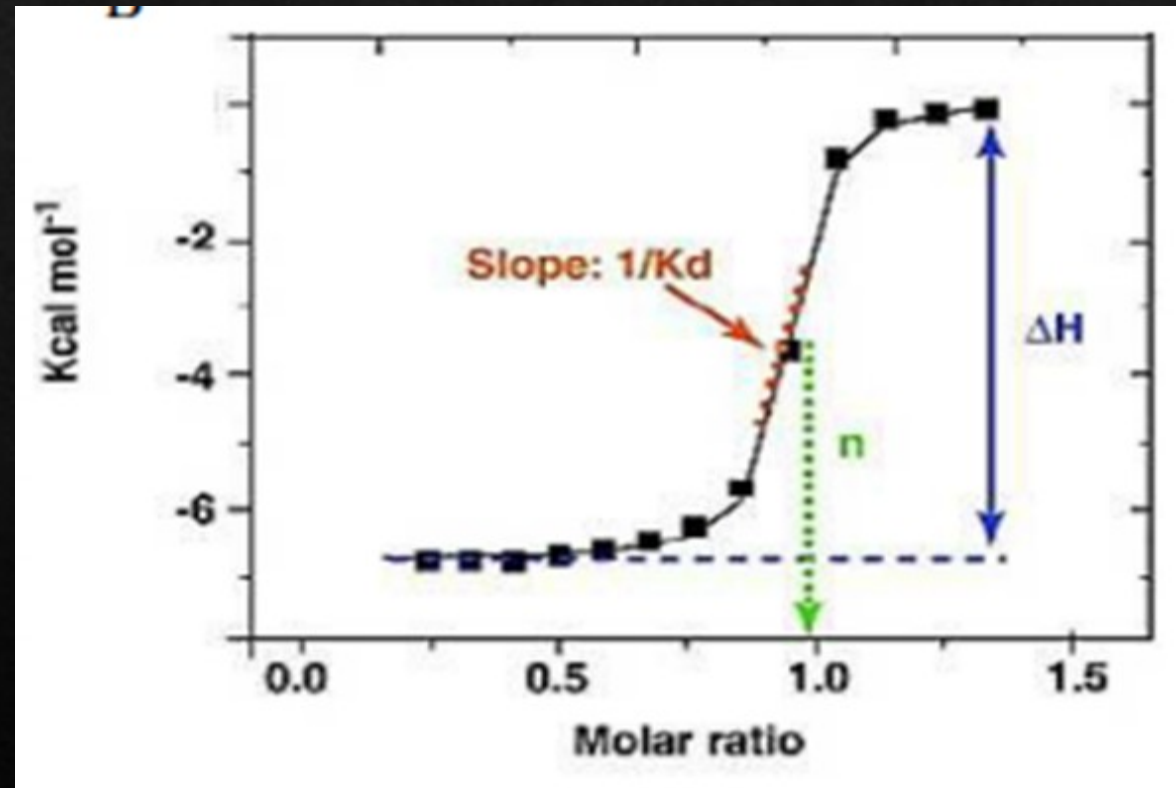
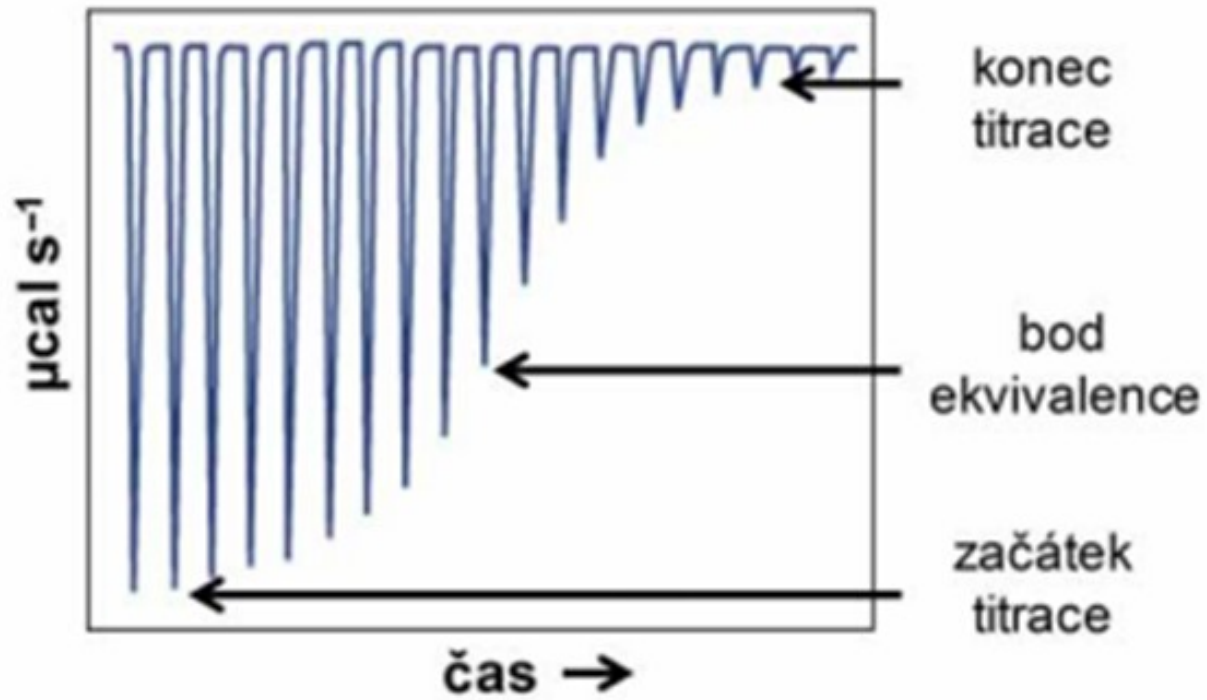
Výhody	Nevýhody
- Všechny vazebné parametry po 1 měření - Žádné značení	-Větší objemy -Pomalé měření

# Izotermální titrační kalorimetrie ITC



- 1 – vzorková cela
- 2 – referentní cela
- 3, 4, 5, 6 – elektická topná tělesa
- 7 – čidlo zaznamenávající rozdíl teploty mezi celami
- 8 – adiabatický plášť
- 9 – injektor
- 10 - míchadlo

# Izotermální titrační kalorimetrie ITC

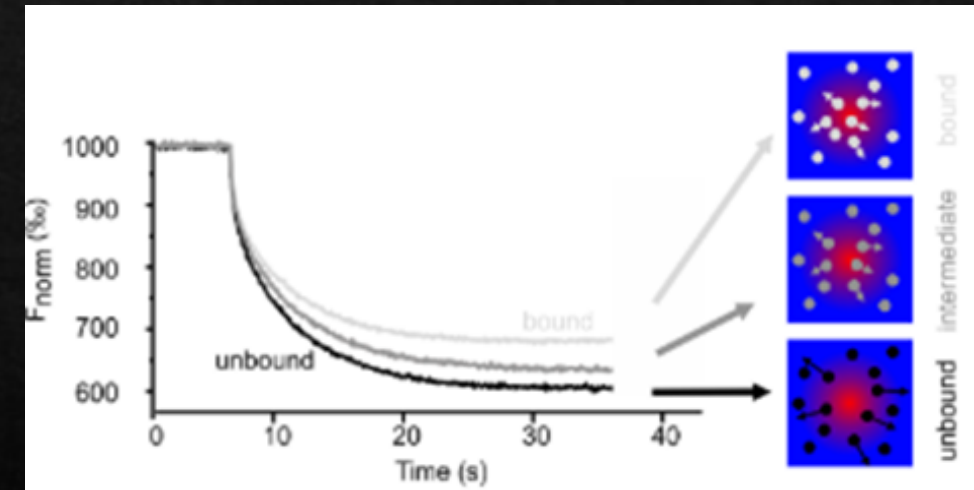
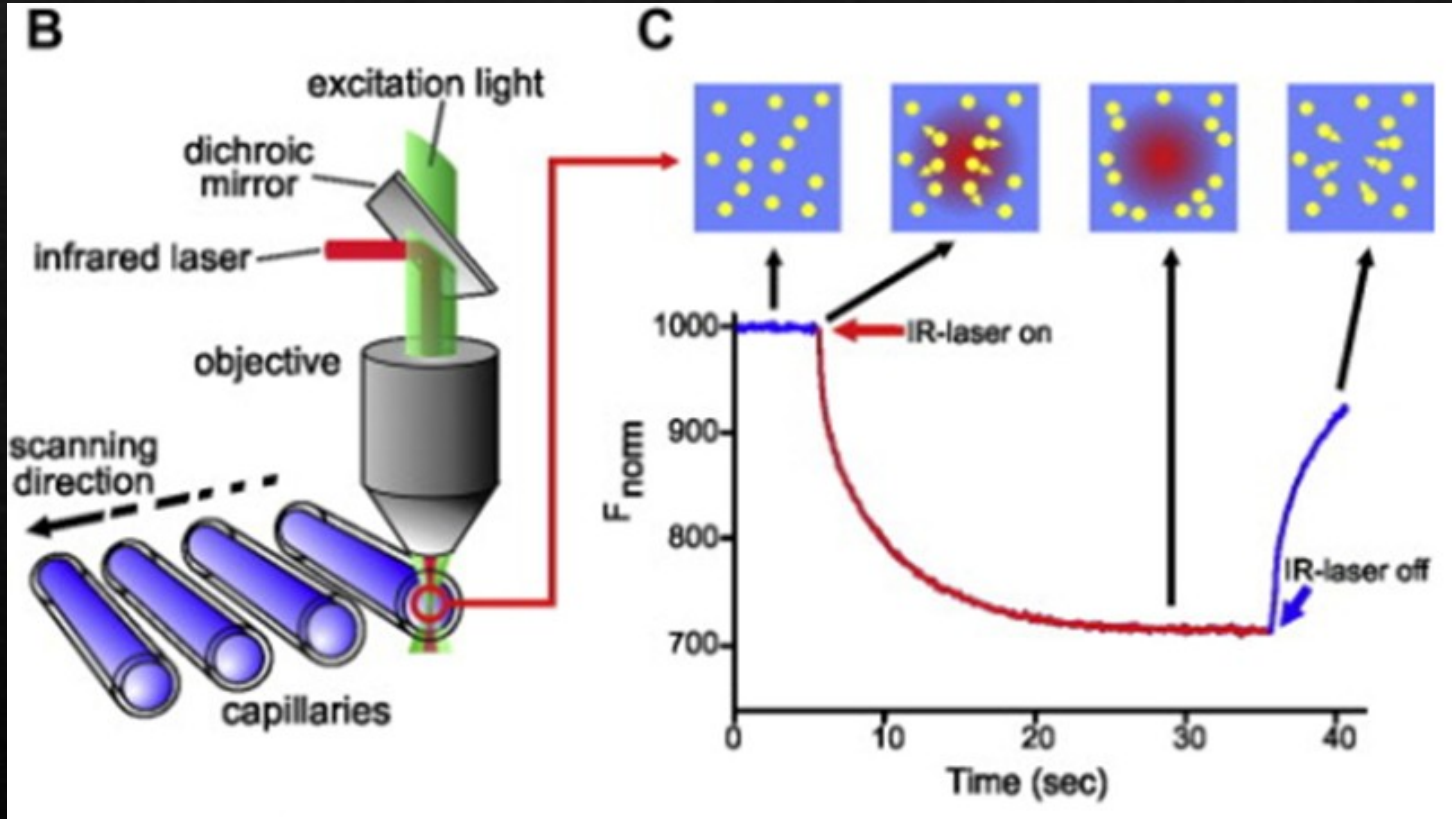


# Mikroskopická termoforéza MST

- ◇ Informace o velikosti molekuly, náboji
- ◇ Studium:
  - enzymová kinetika
  - termodynamika interakce
  - mechanismus vysoce afinitních interakcí proteinů
- ◇ Řízený pohyb molekul v teplotním gradientu
- ◇ Optická metoda
- ◇ Biologické tekutiny (krev, lyzáty)
- ◇ Fluorescence:
  - Vnější
  - Vnitřní (aromatické AMK)

Výhody	Nevýhoda
<ul style="list-style-type: none"><li>- Malé množství vzorku</li><li>- Velikost molekul není limitována</li><li>- Bez imobilizace</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fluorescenční značení</li></ul>

# Mikroskopická termoforéza MST



# *Metody založené na hmotnostní spektrometrii*

- ◇ Cross-linking
- ◇ Protein painting
- ◇ Hydrogen/Deuterium Exchange

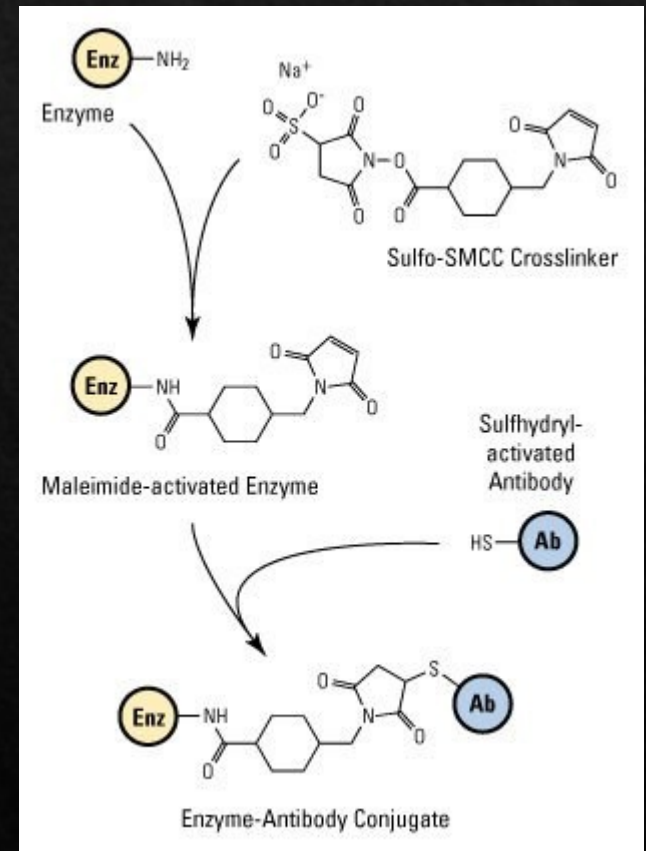
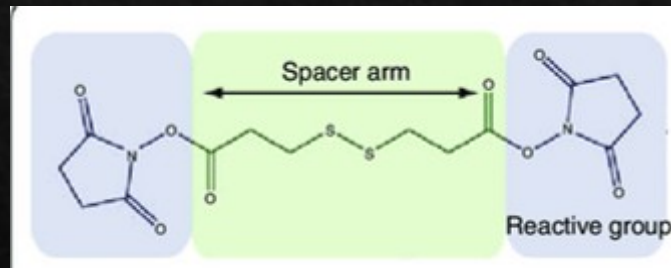


# Cross-linking

Zachycení přechodných nebo slabých PPI, stabilizace interakcí

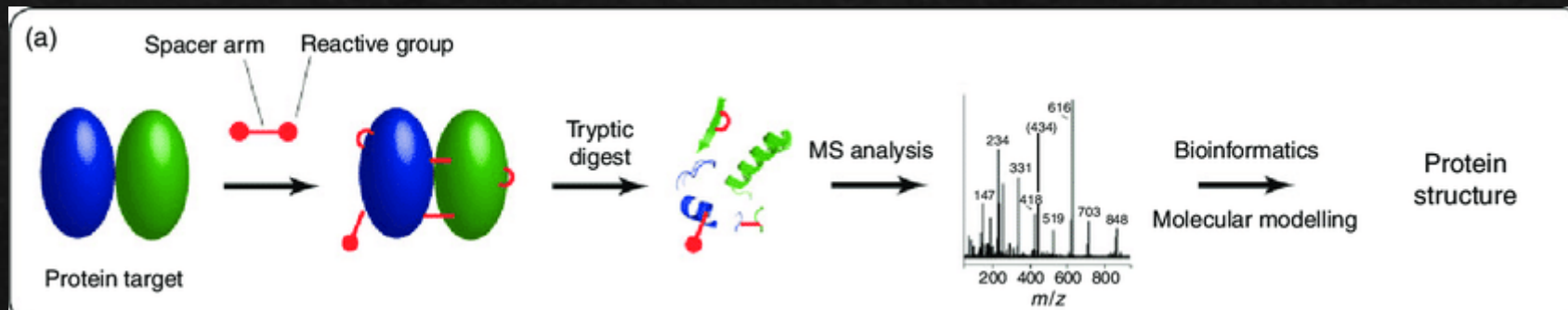
Zesíťovací činidla obsahují na koncích dvě reaktivní skupiny, které se kovalentně vážou na funkční skupiny proteinů:

- primární aminy -NH<sub>2</sub>
- karboxyly -COOH
- thioly -SH
- karbonyly -CHO



# Cross-linking

Cross-linking se provádí jak *in vivo*, tak *in vitro*



Pro **vyhodnocení** pomocí MS jsou proteiny denaturovány a štěpeny proteázou. **Identifikace** na základě změny hmotnosti vyplývá z připojení buď deuterované nebo nedeuterované molekuly zesítovacího činidla.

**Nevýhoda:** někdy je pro zesítovací molekuly obtížné se dostat k místu interakce proteinů, proto se mohou vyskytovat falešně negativní výsledky

# Protein painting

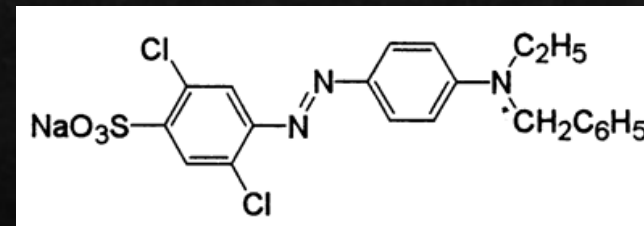
Poměrně nová metoda využívající molekulové „barvy“, které se vážou na povrch proteinového komplexu, **nikoli** na místo interakce proteinů

Rychlá metoda, nevyžaduje žádný speciální software

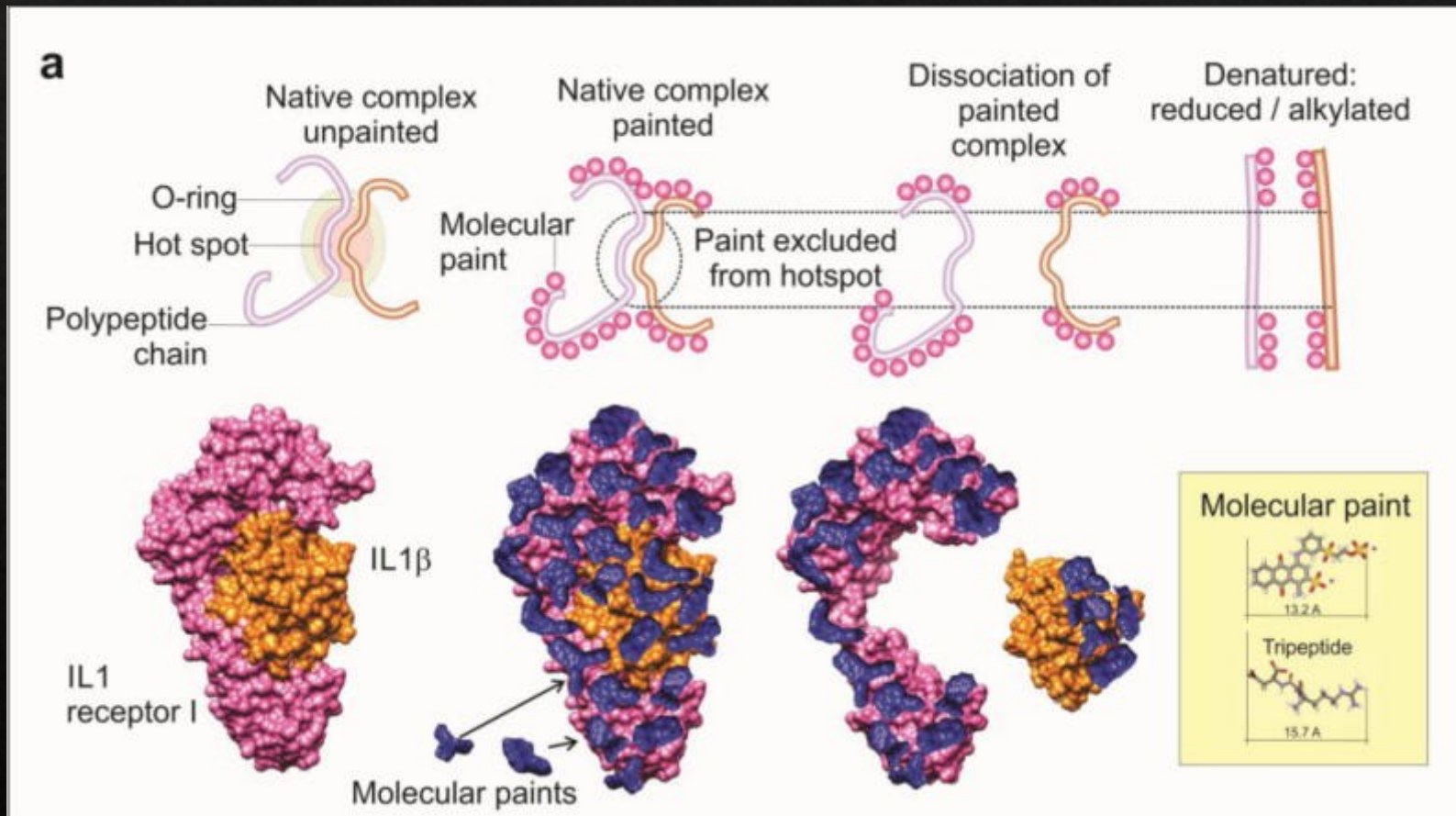
Ve výsledku jsou spektra jen vazebných míst, protože „obarvené“ oblasti nejsou viditelné pro MS

## Molekulové „barvy“

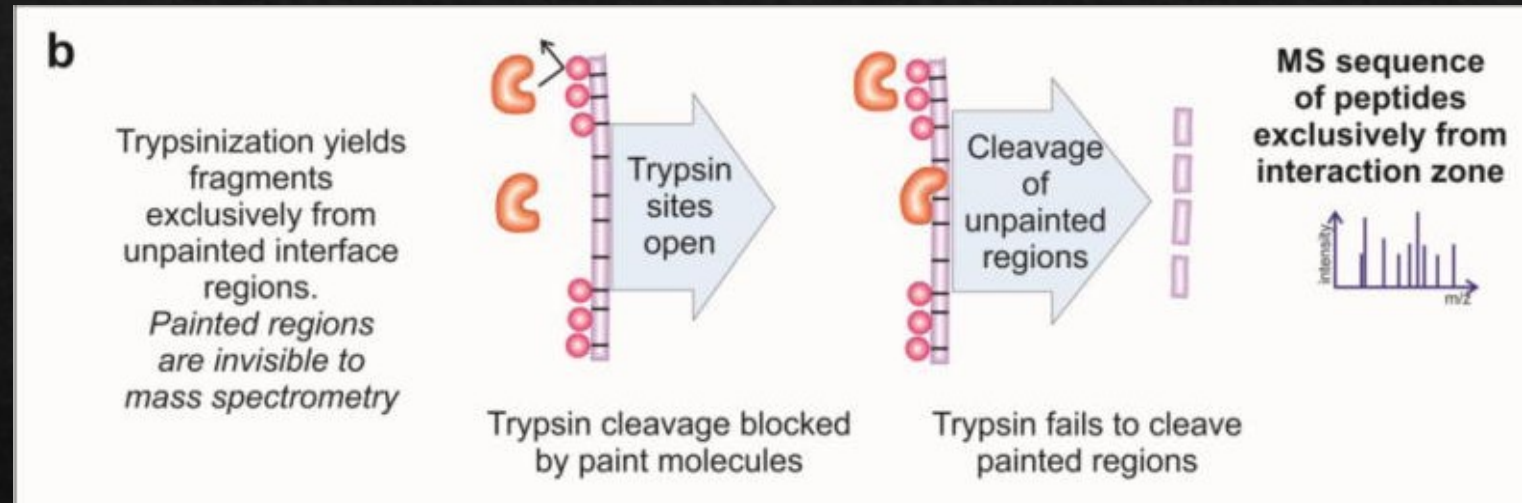
- ◇ Acid Orange 50
- ◇ R495034



# Protein painting



# Protein painting

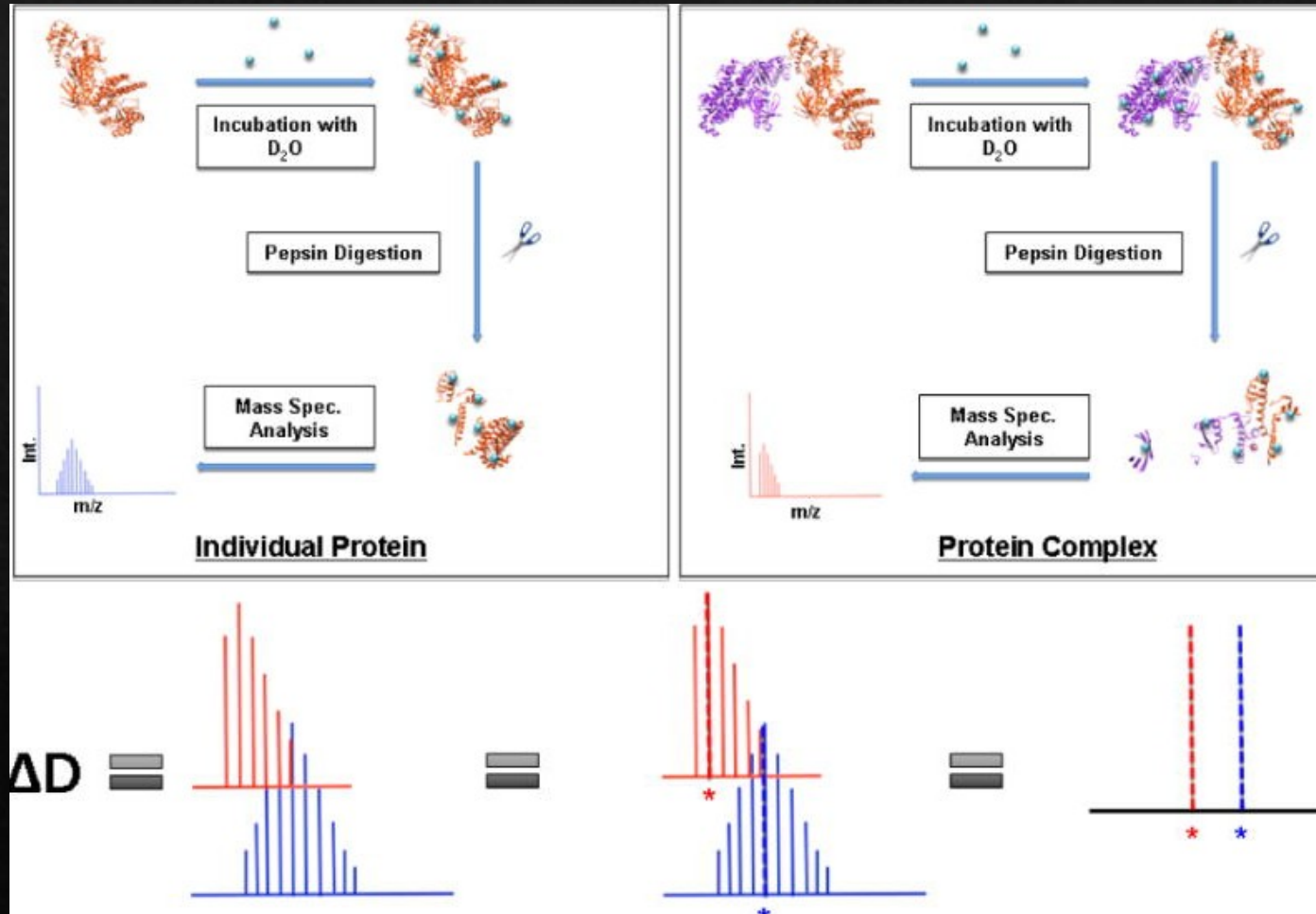


**Nevýhoda:** pokud je ve vazebném místě málo oblastí pro štěpení trypsinem, vede to ke snížení rozlišení měřených peptidů

# *Hydrogen/Deuterium Exchange*

- ◇ Deuterium se používá k přechodnému značení amidů v proteinové kostře
- ◇ Rychlost výměny vodíku za deuterium poskytuje informace o přístupnosti amidů pro rozpouštědlo  $D_2O$  → amidy v lineárním peptidu mají *vyšší* poměr rychlosti výměny H/D než amidy na rozhraní PPI, protože jsou lépe přístupné

# Hydrogen/Deuterium Exchange



# Hydrogen/Deuterium Exchange

- ◇ Deuterium se používá k přechodnému značení amidů v proteinové kostře
- ◇ Rychlost výměny vodíku za deuterium poskytuje informace o přístupnosti amidů pro rozpouštědlo  $D_2O$  → amidy v lineárním peptidu mají *vyšší* poměr rychlosti výměny H/D než amidy na rozhraní PPI, protože jsou lépe přístupné
- ◇ K **identifikaci** se využívá software, který srovnává hmotnostní spektrum deuterovaných a nedeuterovaných peptidových fragmentů. Peptidy, které mají *menší* obsah D mohou být součástí místa, ve kterém dochází k PPI
- ◇ **Nevýhody:** je obtížné stanovit přesnou sekvenci v místě interakce, není možné stanovit konformační změnu proteinu nebo zaznamenat slabé interakce

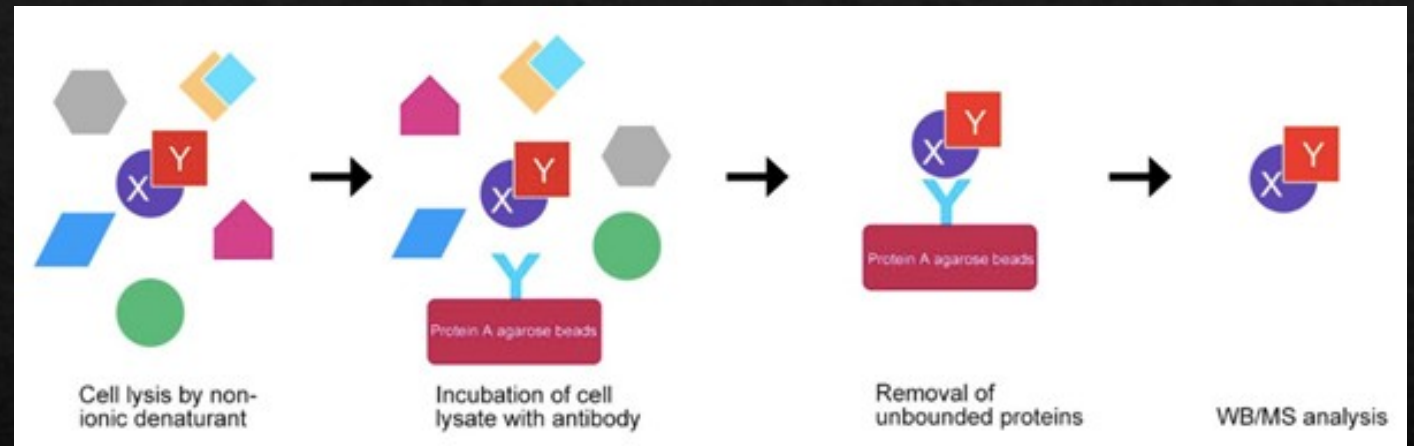


# *Koimmunoprecipitace*

- ◇ *in vivo* metoda pro studium proteinů a jejich interakčních partnerů v buňkách nebo ve vzorcích tkání
- ◇ princip je založen jako u ostatních imunoprecipitačních technik na interakci **antigen-protilátka**
- ◇ specifická protilátka – protein vázaný v komplexu s jinými proteiny (často i neznámými)
- ◇ alternativa k afinitní chromatografii

# Průběh koimunoprecipitace

- ◇ příprava lyzátu (nedenačující činidla)
- ◇ tvorba imunokomplexu
- ◇ precipitace
- ◇ promytí nespecificky se vázajících proteinů
- ◇ eluce
- ◇ analýza komplexů s protilátkou



# Shrnutí

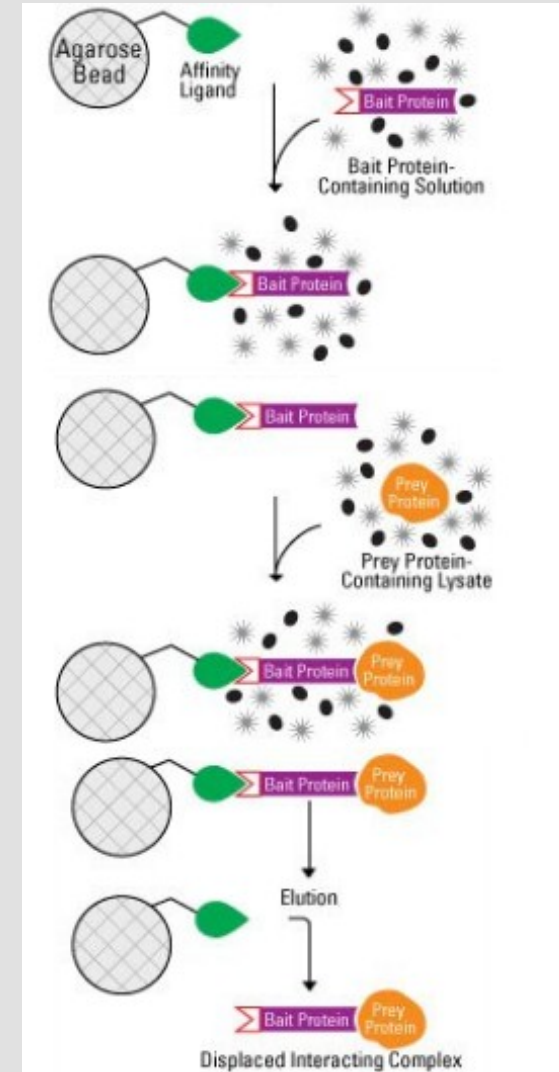
- ◇ Výhody:
  - ◇ vysoce specifická a velmi jednoduchá metoda
  - ◇ proteiny interagují během této metody téměř ve fyziologickém stavu
  - ◇ získaný komplex je možné analyzovat dalšími metodami (western blot, MS)
  - ◇ dají se takto identifikovat proteiny, které se v buňce vyskytují i ve velmi malém množství
- ◇ Nevýhody:
  - ◇ slabší interakce z nízkoafinitních proteinů nemusí být detekovány
  - ◇ náročná izolace protilátek s vysokou afinitou
  - ◇ není vhodná pro interakce, ke kterým dochází v krátkém časovém období

# *Pull down assay*

- ◇ *in vitro* purifikační metoda používaná ke studiu interakcí mezi dvěma nebo více proteiny
- ◇ podobná koimunoprecipitaci s tím rozdílem, že pro záchyt proteinových komplexů na povrch nosiče není používána protilátka, ale využívá se vazby **afinitní značky se specifickým imobilizovaným ligandem**
- ◇ klonování a přenos cizorodé rekombinantní molekuly DNA do buněk → exprese fúzaného proteinu se značkou

# Průběh

- ◆ afinitní ligand je imobilizován na pevném nosiči
- ◆ „návnada“ je označena značkou (tag) a zachycena na imobilizovaném afinitním ligandu specifickým pro tuto značku
- ◆ inkubace se zdrojem interakčních partnerů
- ◆ promytí
- ◆ eluce
- ◆ analýza (např. western blot)



# Shrnutí

- ◇ Výhody
    - ◇ možnost identifikovat i interakční partnery různých nízkomolekulárních ligandů (např. kofaktorů) po jejich kovalentní modifikaci afinitní značkou
  - ◇ Nevýhody
    - ◇ vyžaduje klonování a přenos cizorodé rekombinantní molekuly DNA do buňky
- ◇ Příklady afinitních značek a jejich ligandů

afinitní značka	afinitní ligand
<b>(GST) glutathion-S-transferasa</b>	glutathion
<b>poly-histidin</b>	chelát kobaltu nebo niklu
<b>biotin</b>	strepravidin

# *Povrchová plazmonová rezonance*

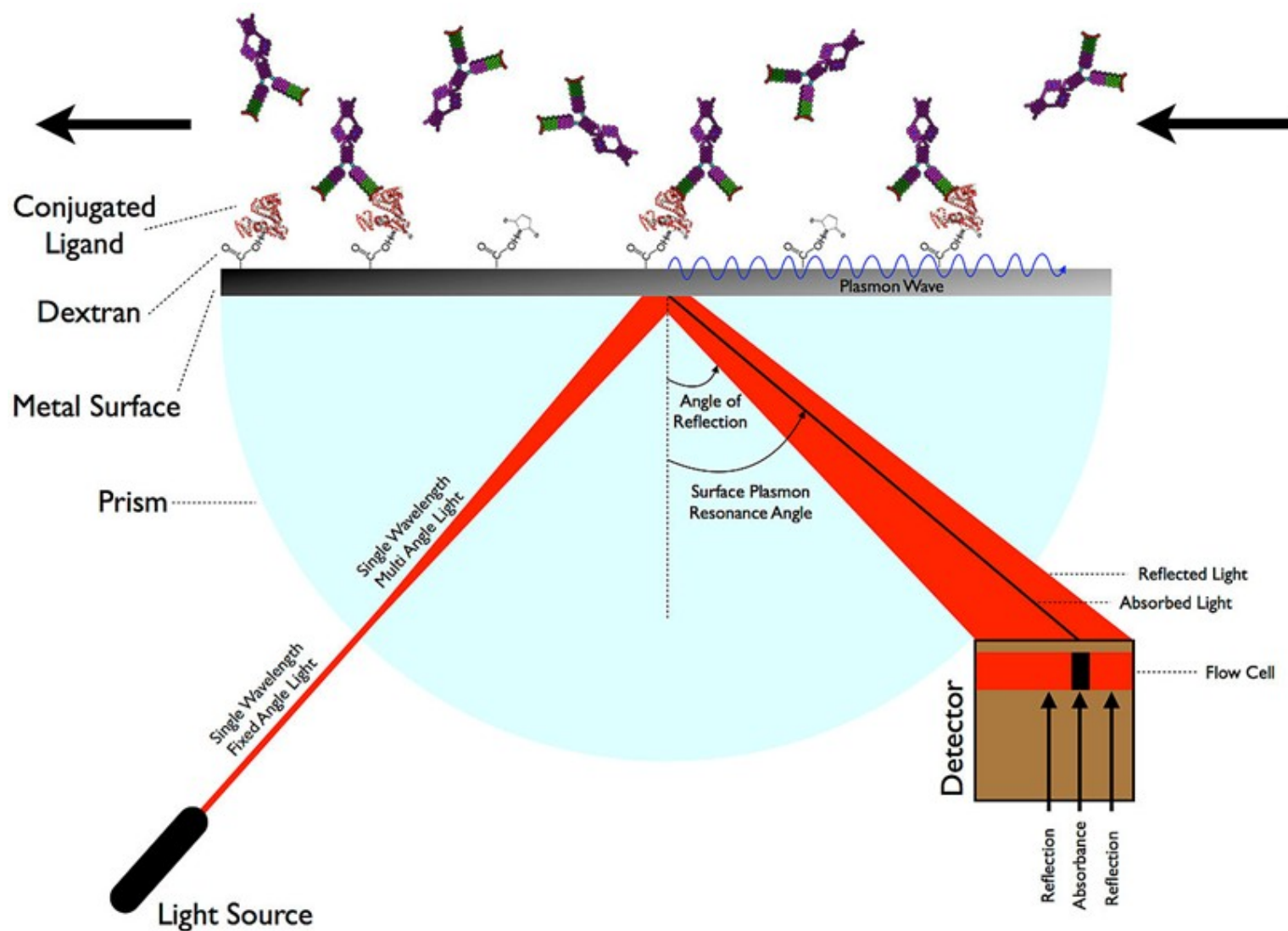
- ◇ **SPR**, Surface Plasmon Resonance
- ◇ založena na oscilaci elektronů na rozhraní dvou materiálů o různé optické hustotě
- ◇ ozáření monochromatickým světlem způsobuje rezonanci plazmonů na povrchu a vznik plazmonové vlny
- ◇ rezonance závislá na indexu lomu světla
- ◇ imobilizace jednoho interakčního partnera na povrch kovu (kovalentní, pomocí protilátky, pomocí značky)
- ◇ kolem imobilizované molekuly proudí roztok s interagující látkou

# SPR

◇ vazbou druhé molekuly se změjí index lomu, dojde k posunu rezonančního úhlu

◇ využití: určení asociačních a disociačních konstant a přítomnosti vlastní interakce

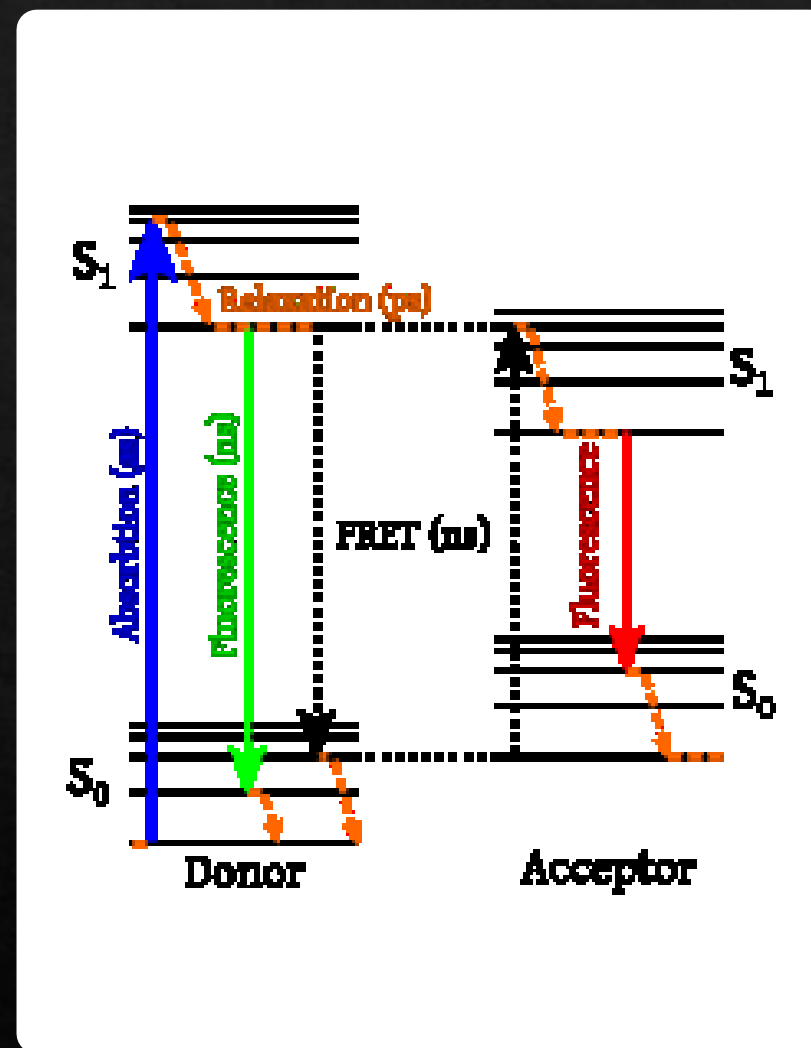
[http://old.vscht.cz/nmr/mol\\_model\\_bioinfo/lekce/SPR.pdf](http://old.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/SPR.pdf)





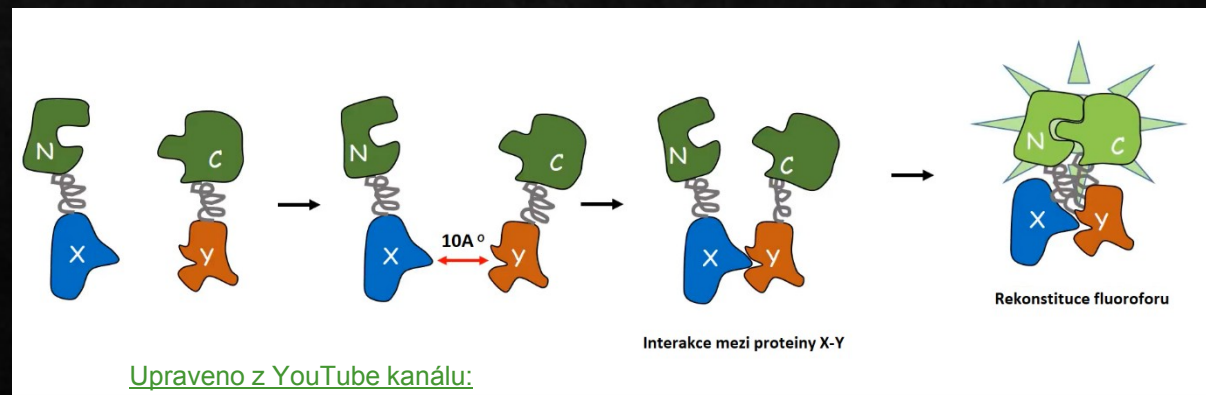
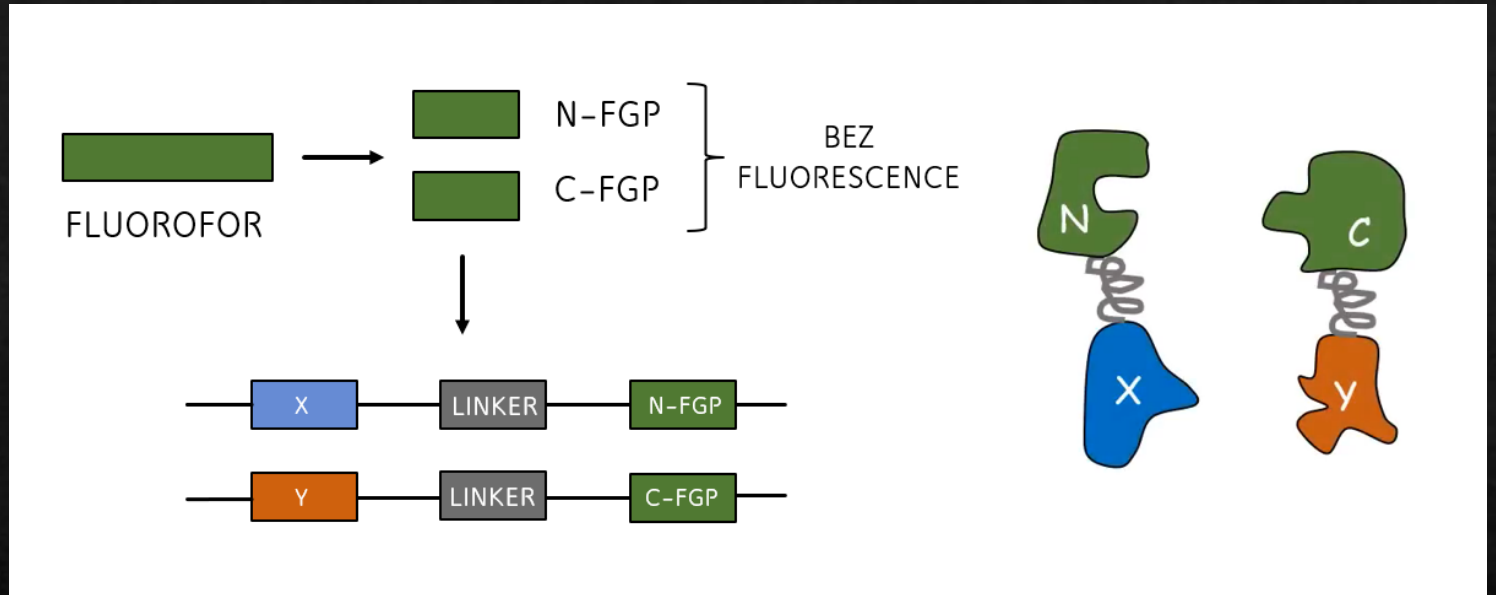
# Försterův rezonanční přenos energie

- ◇ FRET
- ◇ přenos energie mezi dvěma chromofory (molekulami citlivými na světlo)
- ◇ donorová molekula v excitovaném stavu
- ◇ přenos energie na akceptor přes dipól-dipólovou interakci
- ◇ extrémně citlivá metoda na vzdálenost molekul
- ◇ studium interakce mezi proteiny a proteinovými doménami



# Bimolekulární fluorescenční komplementace

- ◇ BiFC
- ◇ *In vivo* metoda
- ◇ Vznik fluorescenčního komplexu (např. YFP – yellow fluorescent protein) asociací 2 fragmentů fluoroforu (N a C fragment)
- ◇ Každý z fragmentů navázán na jeden protein zájmu
- ◇ Detekujeme sílu i lokalizaci interakce



Upraveno z YouTube kanálu:

<https://www.youtube.com/watch?v=g6XeVH08xzY&t=12s>

[https://www.news-medical.net/life-sciences/Bimolecular-Fluorescence-Complementation-\(BiFC\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Bimolecular-Fluorescence-Complementation-(BiFC).aspx)

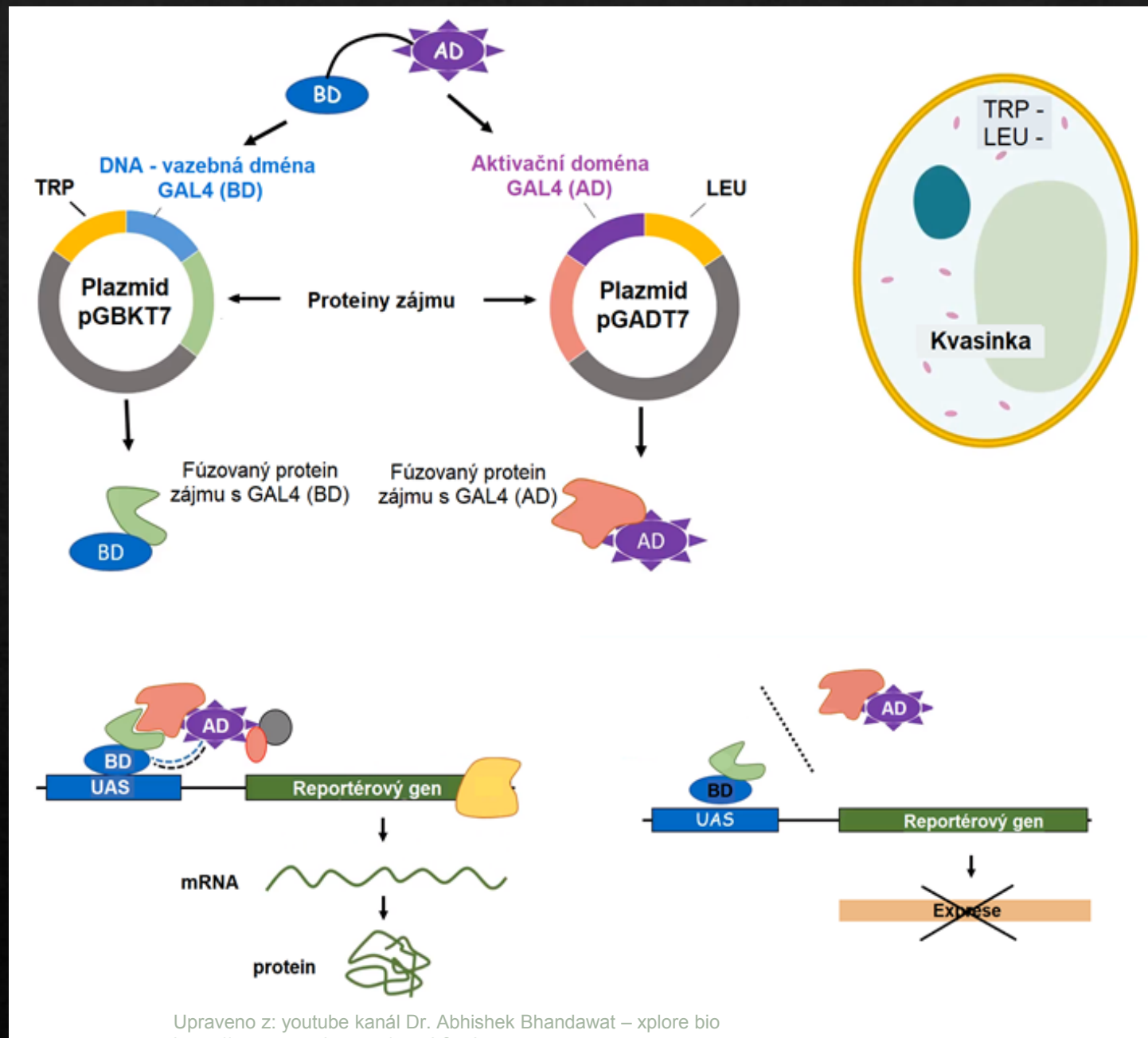
# *Bimolekulární fluorescenční komplementace*



- ◇ zobrazit lokalizaci vznikající interakce v závislosti na čase
- ◇ Vysoká citlivost – detekce i při nízkých hladinách interagujících proteinů
- ◇ Není zapotřebí dalších chemických reagentů
- ◇ MULTICOLOR IMAGING: umožňuje vizualizovat několik P-P komplexů v rámci jedné buňky
- ◇ Pomalá maturace fluoroforu – může ovlivnit vizualizaci krátce trvajících či proměnlivých interakcí
- ◇ Nevhodné pro anaerobní organismy (poslední krok maturace fluoroforu vyžaduje kyslík)

# Yeast two hybrid (Y2H)

- ◇ Kvasinkový dvouhybridní systém
- ◇ Rekonstituce domén transkripčního faktoru GAL4 – spuštění transkripce reportérového genu
- ◇ Aktivační doména (AD) GAL4 je fúzována s jedním a DNA vazebná (BD) doména s druhým proteinem zájmu
- ◇ Různé expresní vektory s HIS-tagy na C i N konci pro expresi v *E. coli*
- ◇ Selekcční markery (Trp, Leu)
- ◇ Reportérové markery (His, Ade)



# *Yeast two hybrid (Y2H)*



- ◇ Velmi citlivá metoda – vhodná pro širší screening
- ◇ Metodicky snadná
- ◇ Ekonomicky nenáročná



- ◇ Vyšší míra falešně pozitivních i negativních výsledků – nutno ověřit použitím jiné metody

*Děkujeme za pozornost*