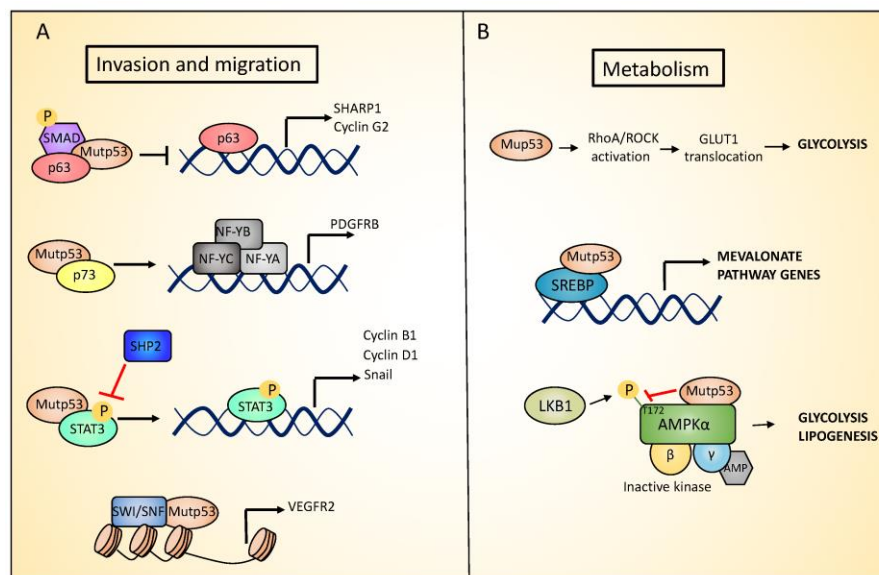
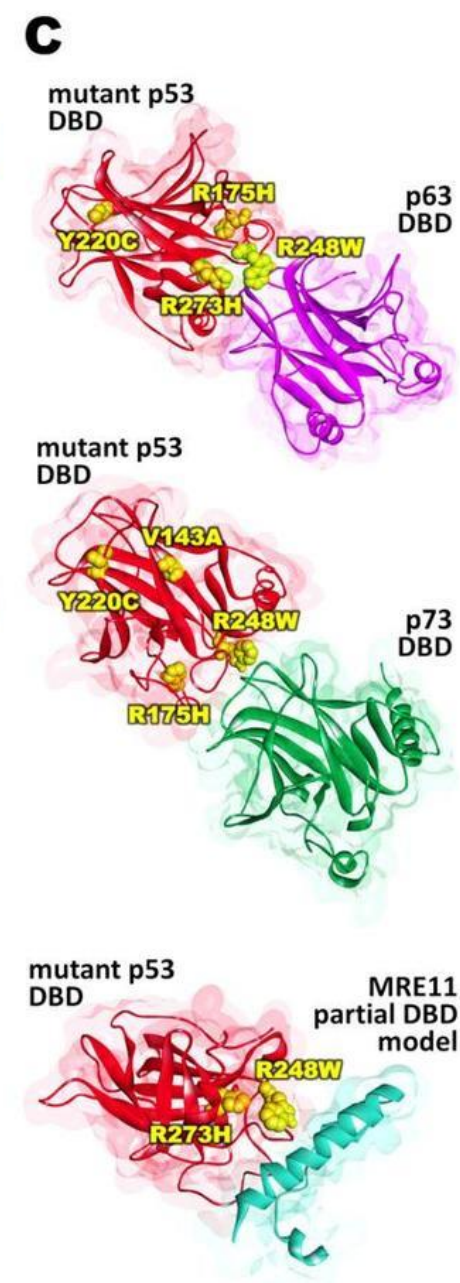
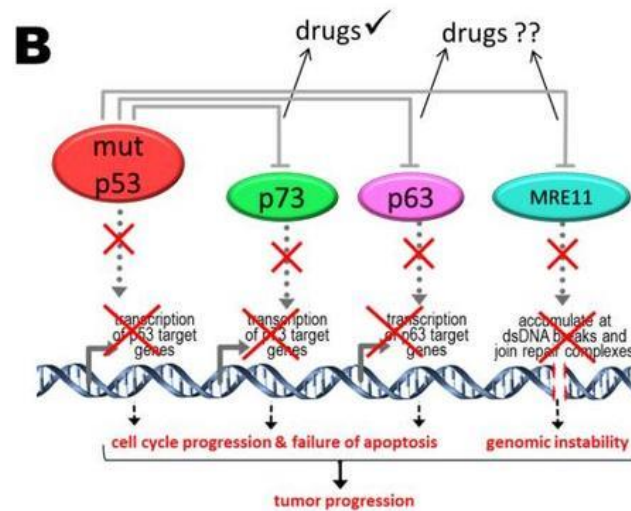
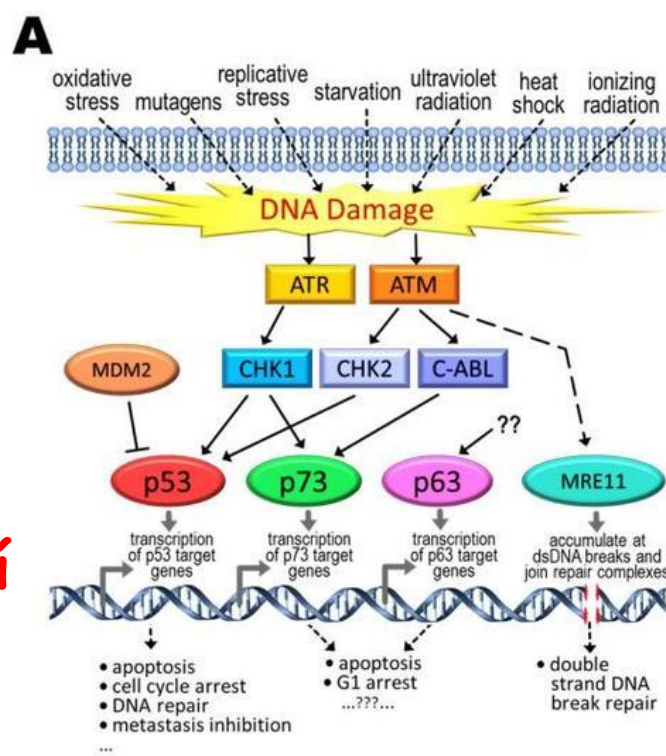


10. Metody pro studium: a) protein-proteinových, b) protein-ligandových a c) protein-DNA interakcí



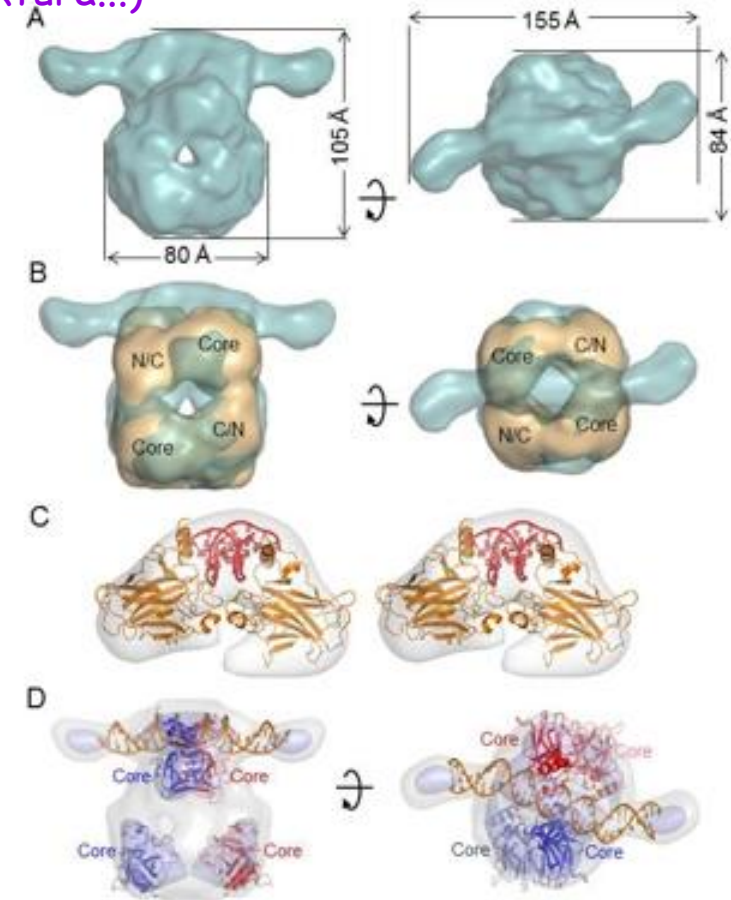
- a) protein-proteinových,
- b) protein-DNA interakcí
- c) protein-ligandových a

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



Metody pro studium protein-proteinových a dalších interakcí

- metody pro detekci interakcí
- charakterizace interakcí protein-protein (např. Kd, kvantifikace, stechiometrie, struktura...)
- imunoprecipitace, ko-immunoprecipitace, pull-down,
- fluorescenční anisotropie-polarizace,
- SPR, ITC ...
- afinitní purifikace, ko-purifikace, gelová filtrace, ultracentrifugace
- TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
- kvasinkový dvou-hybridní systém
- FRET, ko-lokalizace, ko-exprese
- ko-krytalizace, cryoEM ...
- databáze (interactom a komplexy ...)
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)



Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na interakci antigen-protilátka.

Pomocí těchto metod stanovujeme přítomnost patogenů nebo

prokazujeme, zda vzorek obsahuje specifické protilátky vůči danému

antigenu či nikoliv. **Antigen** je makromolekulární látka přirozeného nebo

umělého původu, kterou organismus rozpoznává jako cizí. **Protilátka** je

tedy molekula, které je schopna navázat se na antigen a tím spustit

obrannou reakci organismu. Rozlišujeme **polyklonální protilátky**

(namířeny proti více epitopům určitého antigenu), **monoklonální**

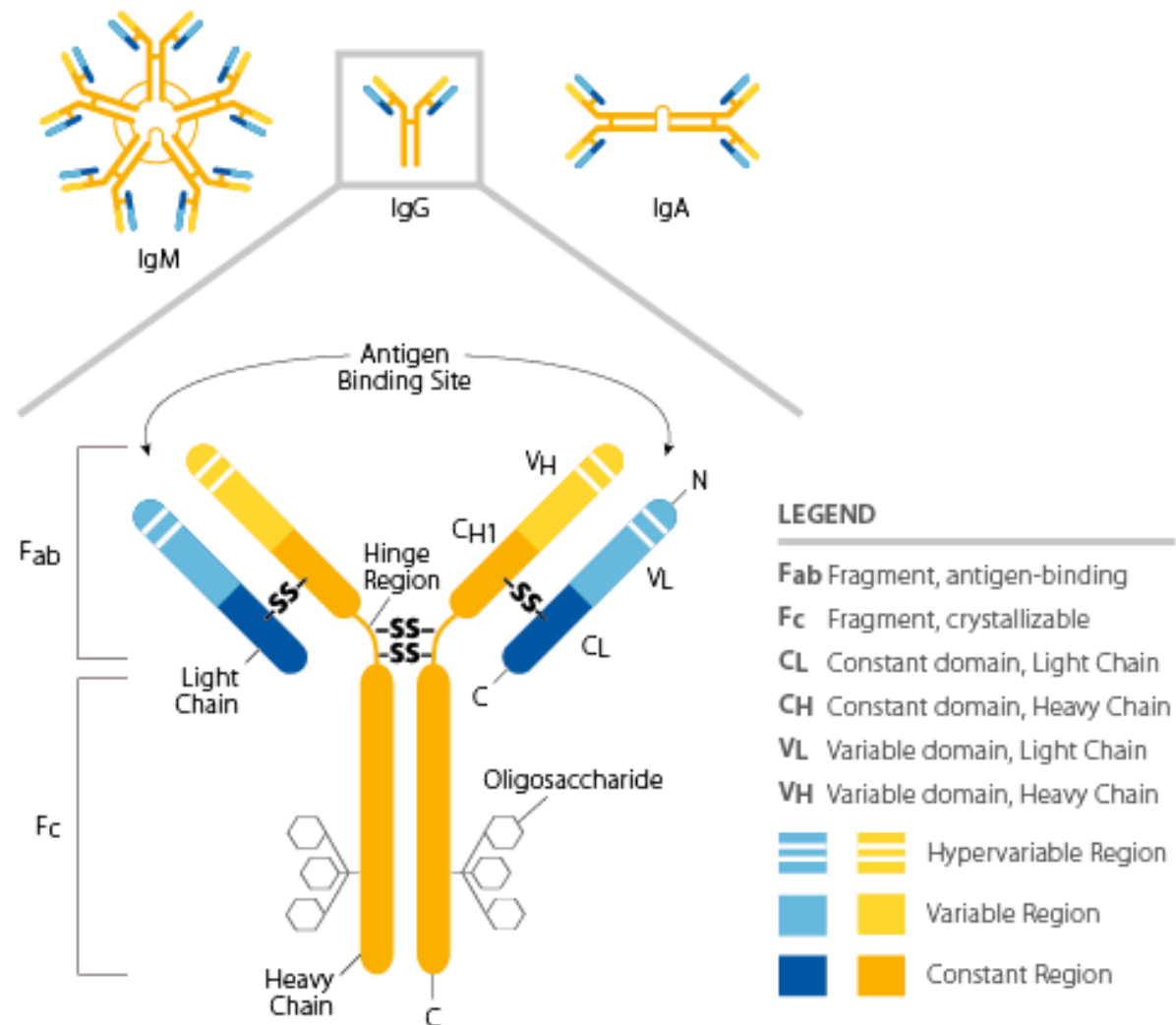
protilátky (namířeny proti jednomu epitopu antigenu) a **rekombinantní**

protilátky (kombinace obou předchozích).

Vybrané metody: - **Imunoprecipitace, Pull-down assay, WB-**

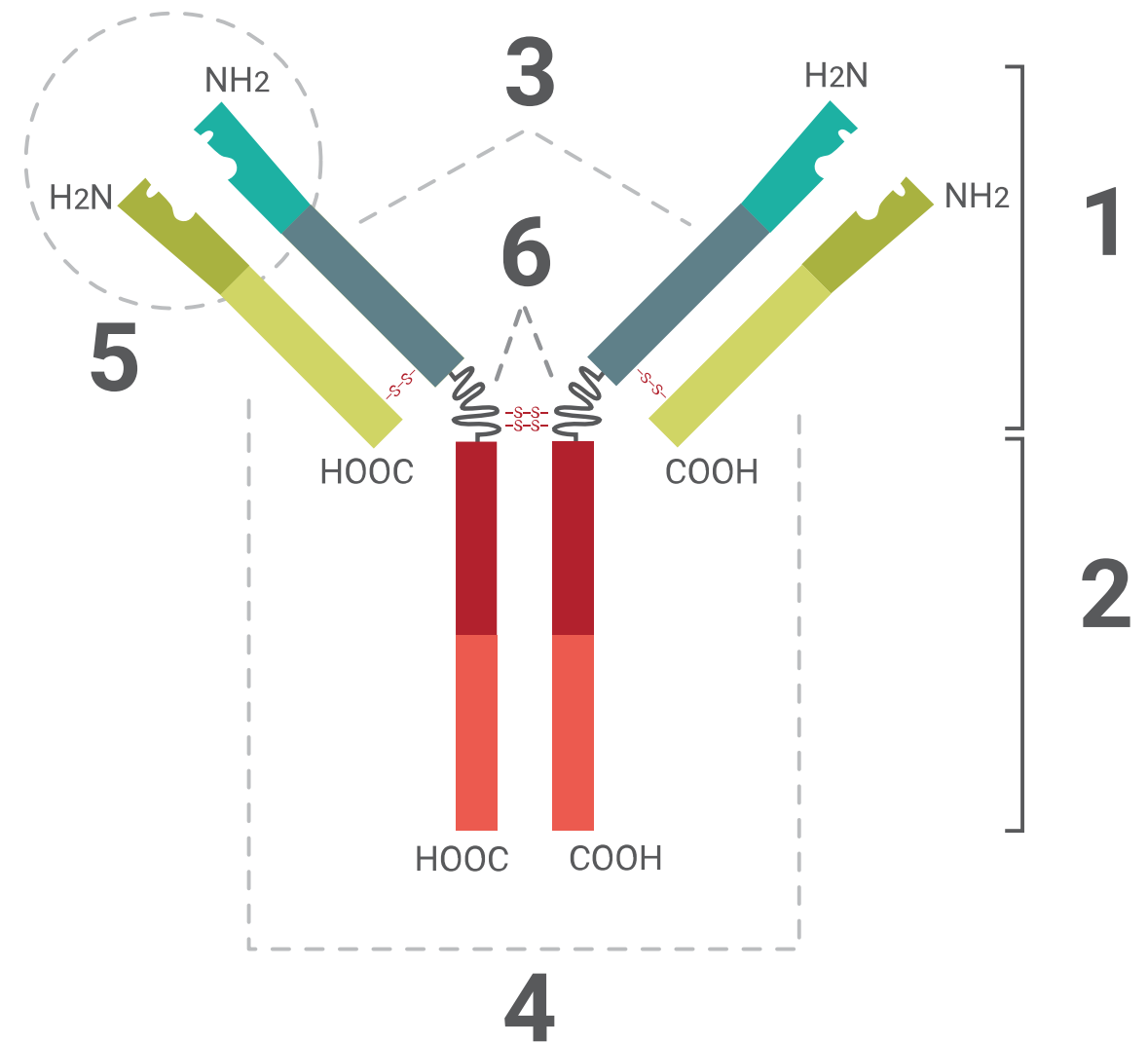
imunodetekce, ELISA, SPR, ITC, FP,

4 10. Interakce protein-protein IP



Imunoprecipitace

- metoda izolace specifických proteinů z proteinových 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



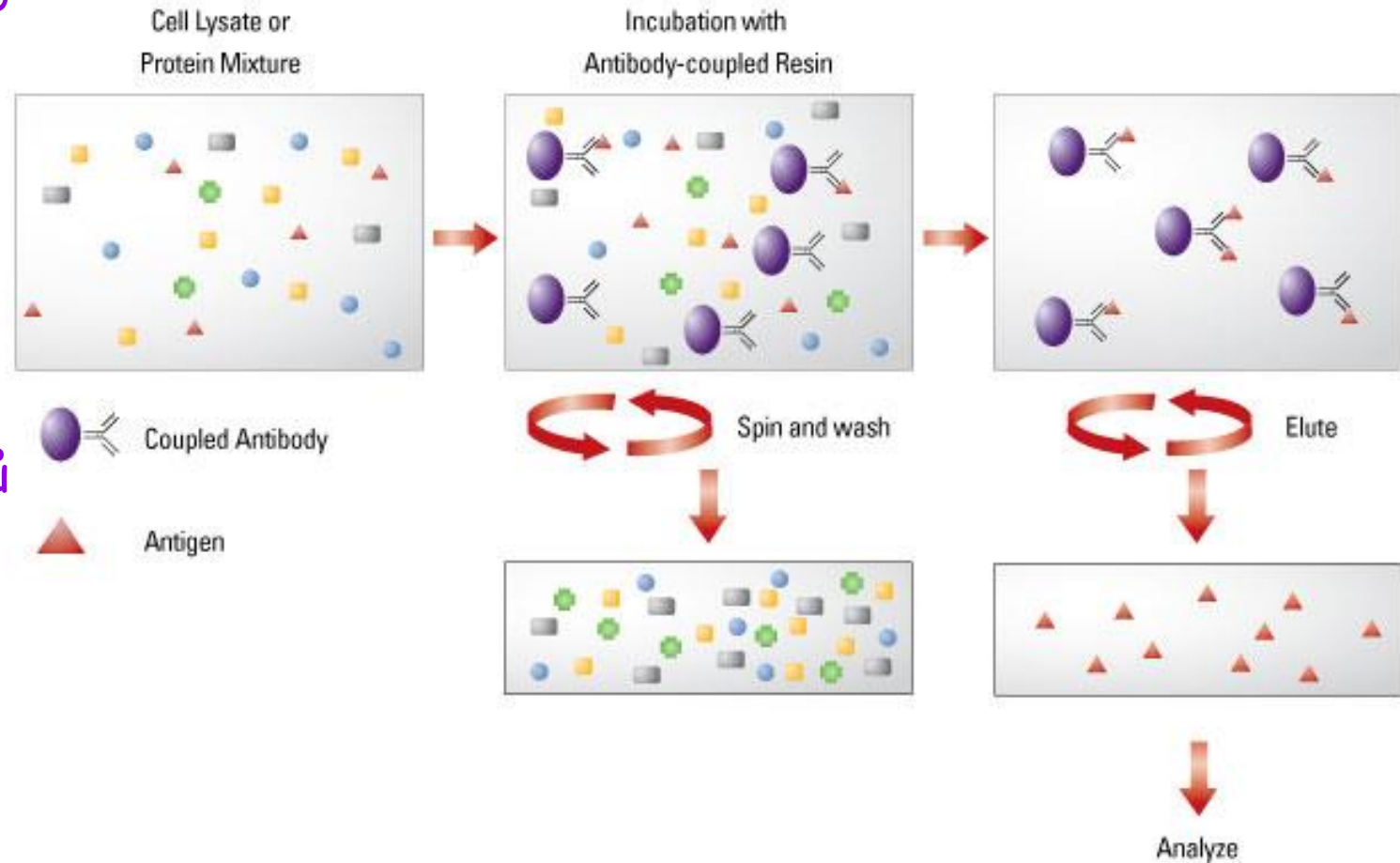
1. Fab region
2. Fc region
3. Heavy chain with one variable (V_H) domain followed by a constant domain (C_H1), a hinge region, and two more constant (C_H2 and C_H3) domains.
4. Light chain with one variable (V_L) and one constant (C_L) domain
5. Antigen binding site (paratope)
6. Hinge regions

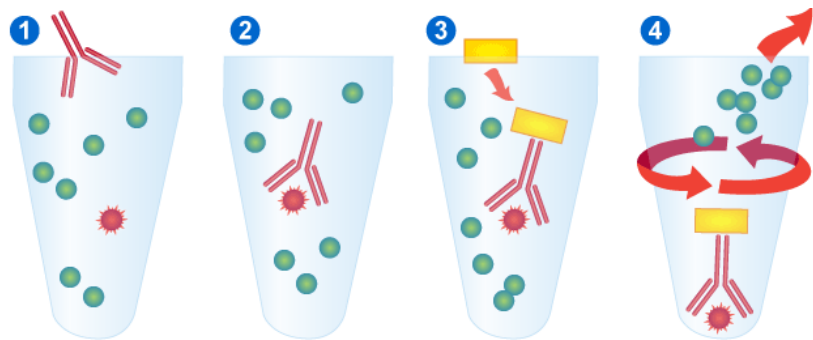
Imunoprecipitace

- protilátka je imobilizována na pevném podkladu (např. paramagnetických nebo agarózových/nemagnetických kuličkách), váže antigen -protein a vyváže jej ze směsi (získáme nativní či denaturovaný protein)

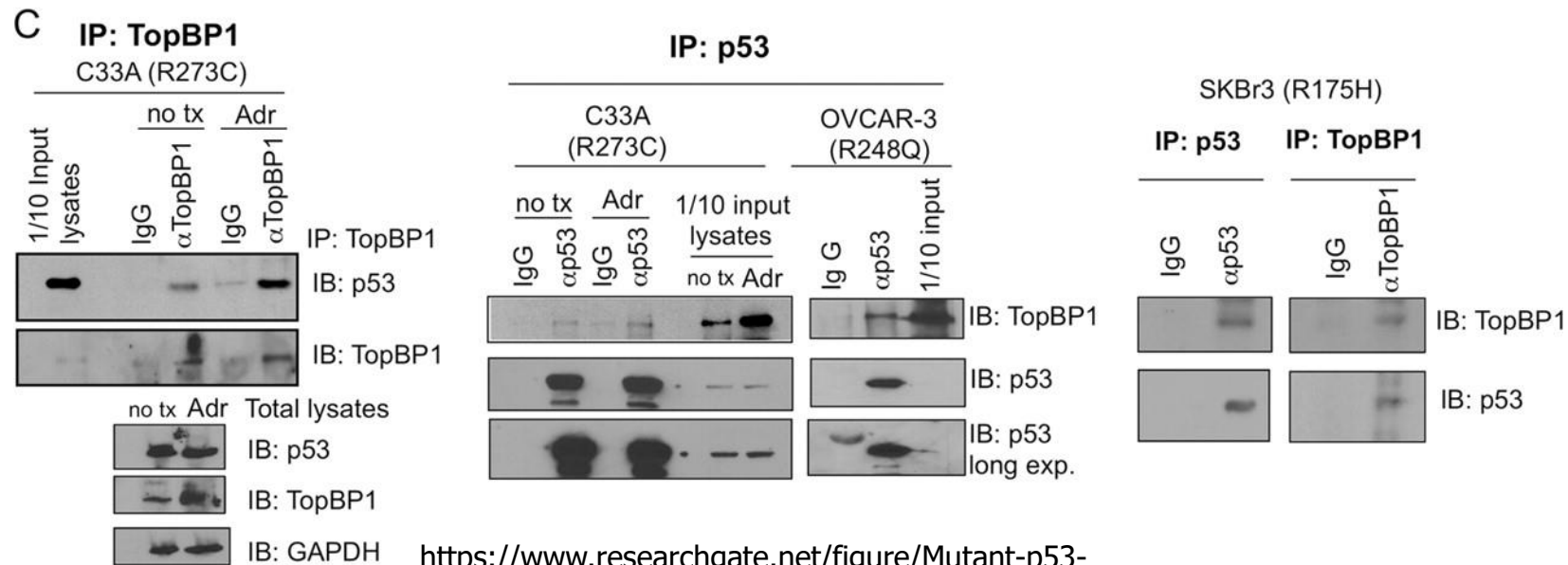
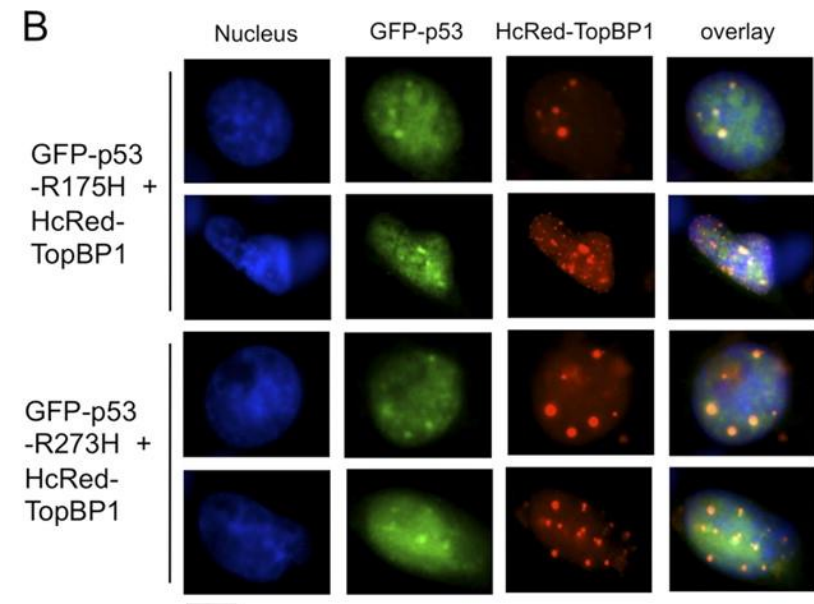
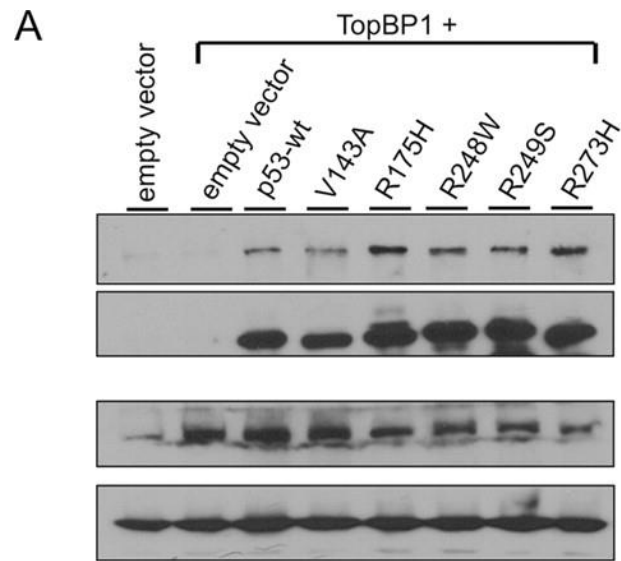
Postup:

- lýze buněk, in vitro translace, směs proteinů
- inkubace vzorku (buněčných extraktů ...) s protilátkou
- precipitace kuličkami s proteiny A/G
- promytí
- oddělení proteinu od kuliček a detekce (WB, využití další)
- detekce protein (nejčastěji se proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček denaturačně elektroforéza, WB)





- 1 Suitable antibody is added.
- 2 Antibody binds to protein of interest.
- 3 Protein A or G added to make antibody-protein complexes insoluble.
- 4 Centrifugation of solution pellets antibody-protein complex. Removal of supernatant and washing.



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

10. Interakce protein-protein IP

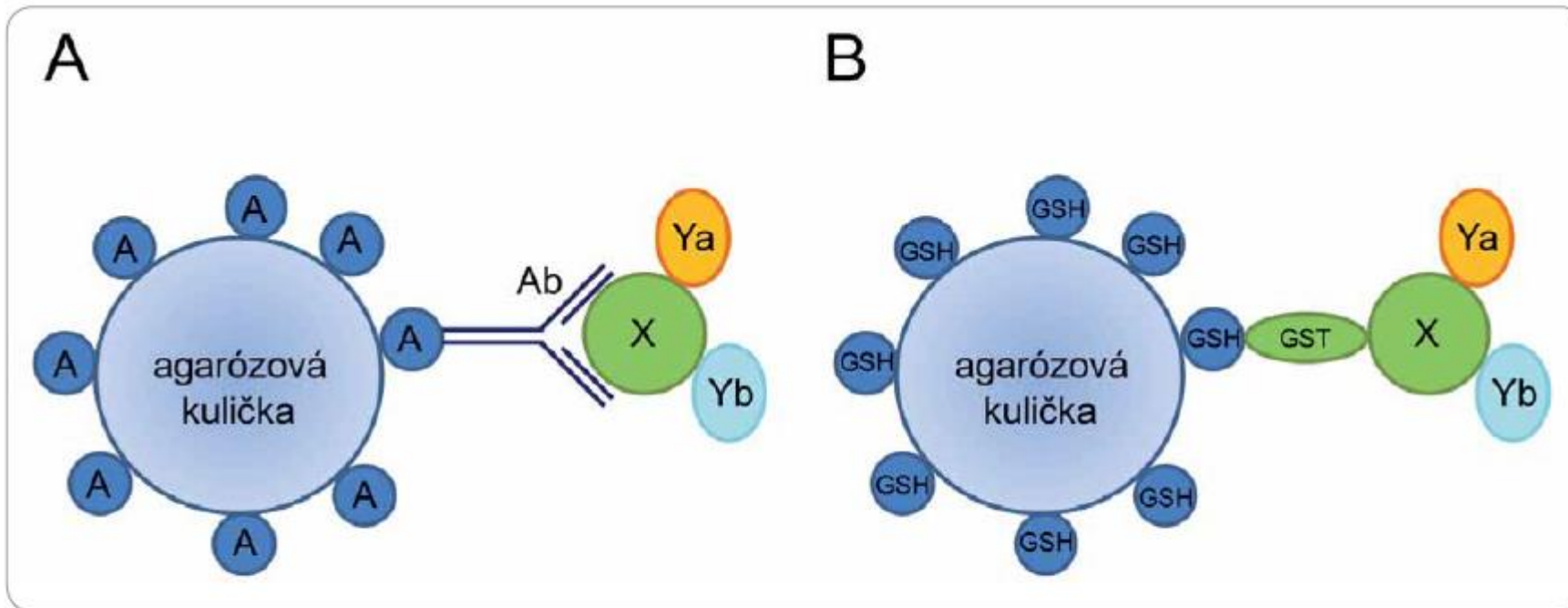
<https://www.youtube.com/watch?v=QRgTpCEY2nU>

Různé systémy afinitních značek a jejich interakčních partnerů využívané pro purifikaci proteinů nebo studium protein-protein interakcí

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

TAG	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	MDEKTTGWRGGHVVVEGLAGELEQLR 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

Koimmunoprecipitace (Co- IP) a afinitní koprecipitace, (pull- down analýzy)

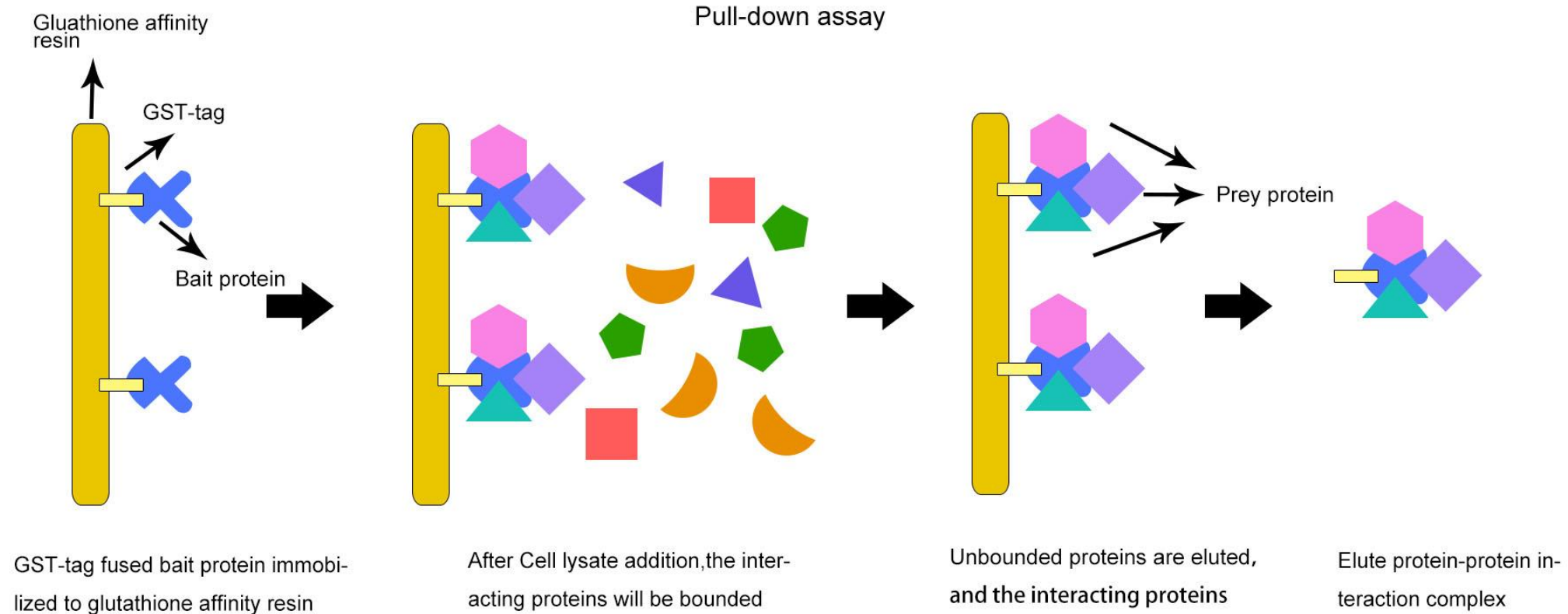


Obr. 1. Princip koimmunoprecipitace (A) a afinitní koprecipitace (B).

A. Protein X spolu s jeho interakčními partnery (proteiny Ya a Yb) je navázán na specifickou protilátku (Ab). Vzniklý imunokomplex je ze směsi vychytán pomocí agarózových kuliček s imobilizovaným proteinem A, který rozeznává Fc fragment protilátek. B. Komplex tří proteinů (X, Ya, Yb) je vychytán ze směsi pomocí silné interakce proteinu GST (fúzaného s proteinem X) a glutationu (GSH) imobilizovaného na agarózových kuličkách.

Řurech M., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P., [Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí](#)

Izolace specifických proteinů (tzv. pull-down assay)



Cíle:

Kvalitativní parametry - proteiny, interakční partnery,
porozumění interakcím

WB, IP

Kvantitativní definování

- afinita (K_d ...)

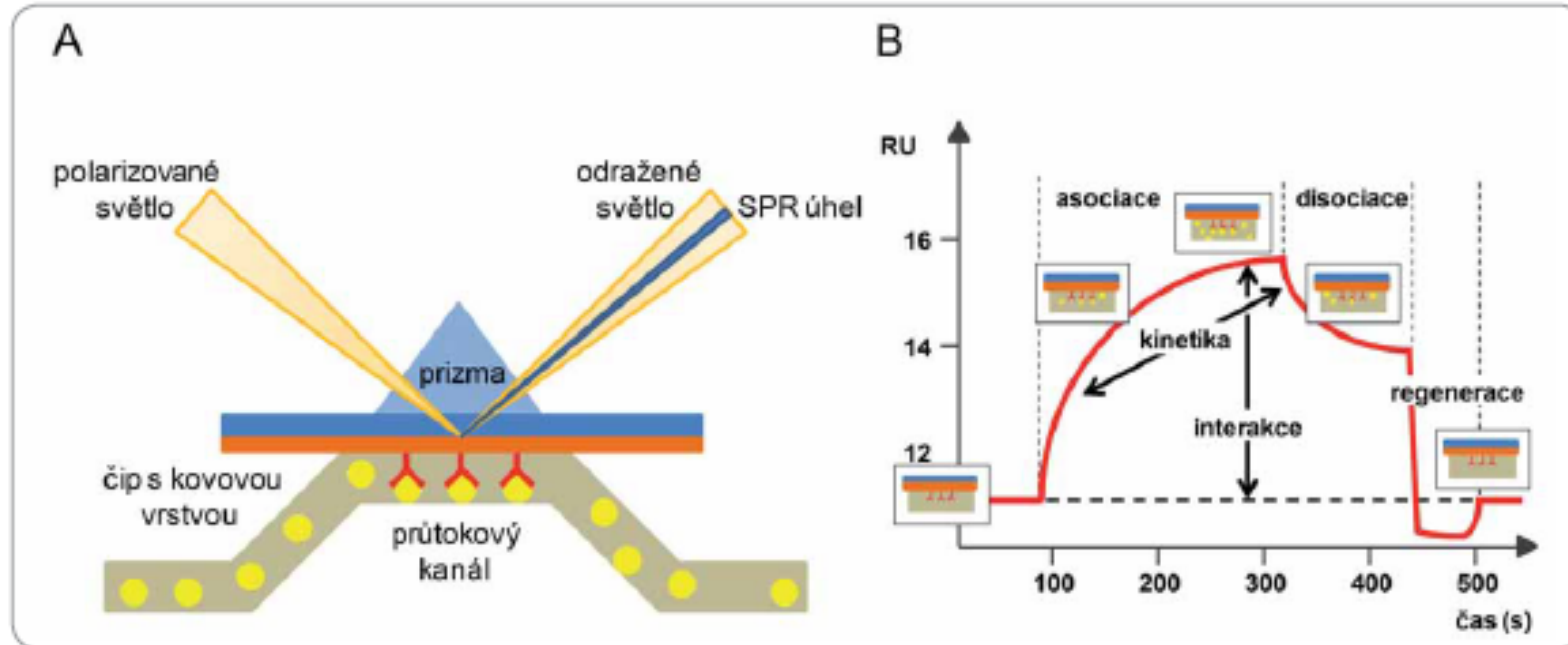
ELISA

SPR

FP, fluorescenční anizotropie

- afinita, kinetické a termodynamické parametry (ΔG ,
 ΔH , ΔS)- ITC

Rezonance povrchového plazmonu (SPR)



Obr. 2. Princip metody rezonance povrchového plazmonu (A) a grafický výstup SPR experimentu, sensorgram (B).

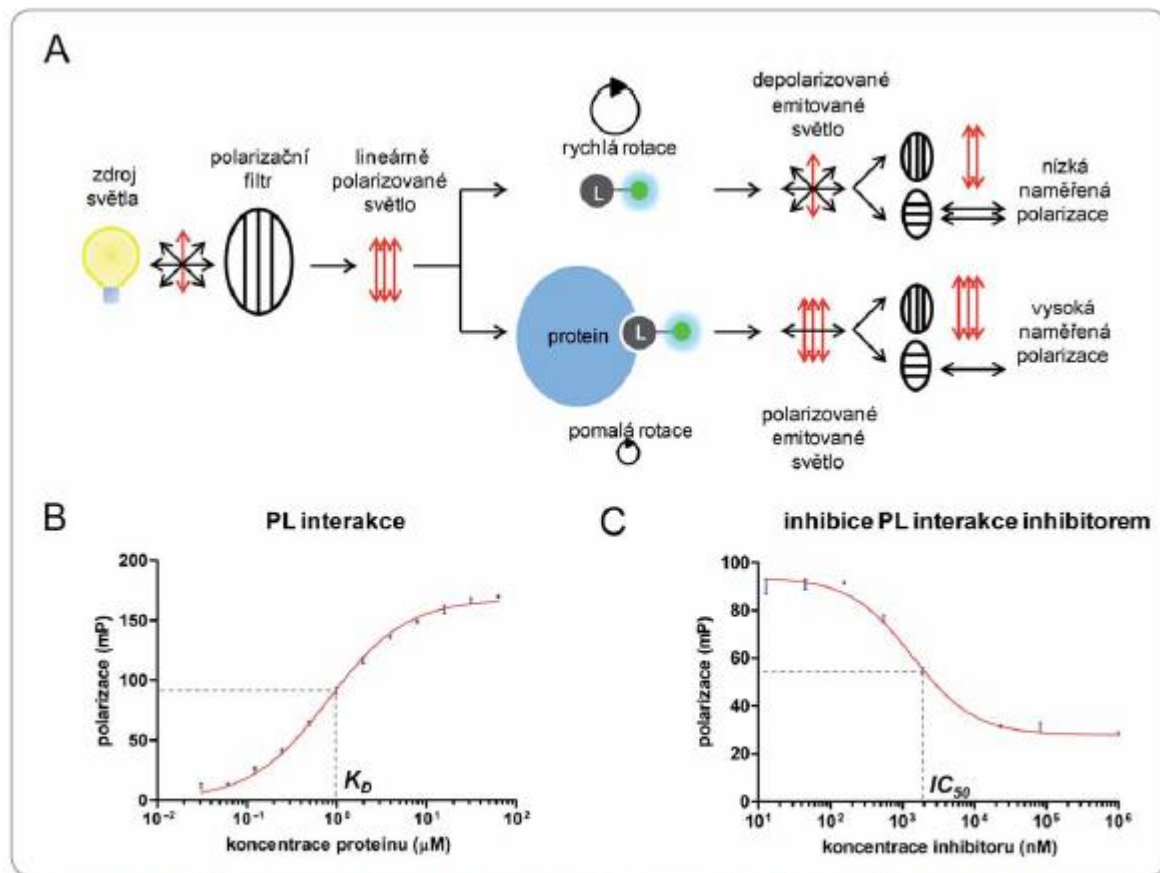
A. Jeden z interakčních partnerů je imobilizován na povrchu čipu a v roztoku proudícím kolem imobilizované molekuly je přítomen druhý interakční partner. Změna indexu lomu na povrchu čipu způsobená jejich vzájemnou interakcí je zaznamenána jako posun SPR úhlu.

B. Výstup SPR experimentu zobrazuje vazbu interakčních partnerů na povrchu čipu. V prvním kroku (asociace) dochází k vazbě interakčního partnera přítomného v roztoku na partnera imobilizovaného na povrchu čipu až do stavu saturace. Následná disociace je způsobená použitím reakčního pufru. Dochází k ustálení dynamické rovnováhy interakce závislé na afinitě interakčních partnerů. Užitím regeneračního pufru ve třetím kroku je čip regenerován a připraven k dalšímu použití. Převzato ze semináře BIAcore® [10].

Vysoce citlivý a teplotně stabilizovaný SPR biosensorový systém pro monitorování biomolekulárních interakcí v reálném čase bez nutnosti značení biomolekul. Pomocí SPR systému T200 lze získat informace o kinetice, afinitě, koncentraci, specifitě, selektivitě a termodynamice biomolekulárních interakcí a tato metoda tak může být použita v různých oblastech od základního výzkumu po výzkum bioterapeutik a léčiv. V principu, jeden z vazebných partnerů je imobilizován na povrchu biosenzoru a druhý je přítomen volně v nánášecím pufru.



Princip metody fluorescenční polarizace (A), měření interakce proteinu s ligandem (B) a inhibice interakce proteinu s ligandem (C) metodou FP.



Obr. 3. Princip metody fluorescenční polarizace (A), měření interakce proteinu s ligandem (B) a inhibice interakce proteinu s ligandem (C) metodou FP.

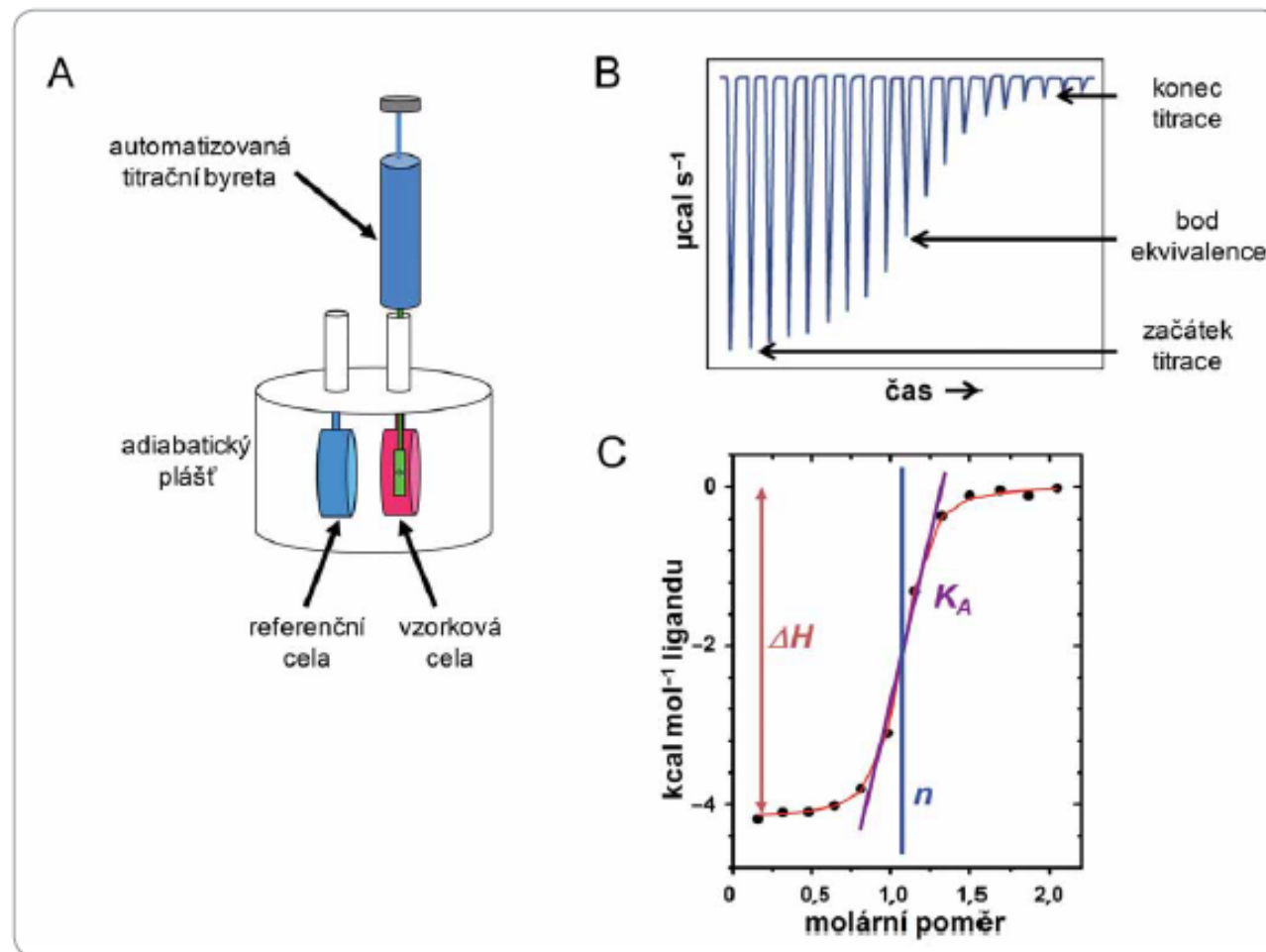
A. Fluoroforem značený ligand (L) je ozářen lineárně polarizovaným světlem. V důsledku jeho vysoké rotace dochází k emisi depolarizovaného světla a k naměření nízké hodnoty fluorescenční polarizace. Interakce ligandu s větší molekulou (proteinem) způsobí zpomalení jeho rotace a emisi polarizovaného světla. Převzato z [13]. B. Titrace fluoroforem značeného ligandu o konstantní koncentraci vzrůstající koncentrací proteinu. C. Měření IC_{50} inhibitoru protein-ligandové interakce. Směs proteinu a fluoroforem značeného ligandu byla titrována vzrůstající koncentrací inhibitoru.

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC)

Izotermální titrační kalorimetrie se používá pro charakterizaci biomolekulárních interakcí malých molekul, proteinů, protilátek, nukleových kyselin, lipidů a ostatních. Během jednoho experimentu je možné získat kompletní termodynamický profil (stechiometrie, K_A , ΔH and ΔS).



Řurech M., Trčka F.,
Vojtěšek B., Müller P.,
**Metody pro studium protein-
proteinových
a protein-ligandových interakcí**



Obr. 4. Schematické znázornění přístroje MicroCal* (A).

Teplo uvolněné při interakci dvou interakčních partnerů je zaznamenáno jako funkce času (B) a po integraci jako závislost entalpie na molárním poměru interakčních partnerů (C). Z výsledního grafu je možné přímo definovat hodnoty změny entalpie, asociační konstantu i stechiometrii interakce. Převzato z manuálu GE Healthcare [23].