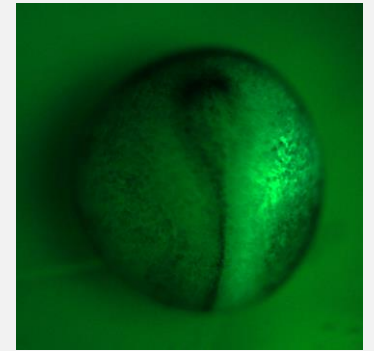


MUNI
SCI


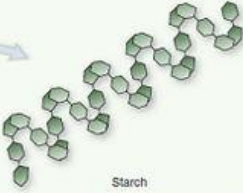
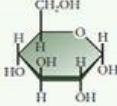

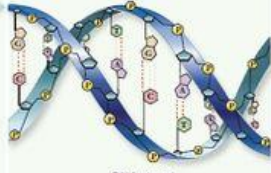
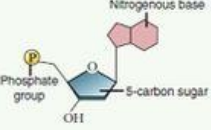




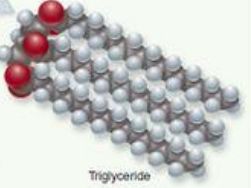



Experimentální embryologie

Bi1130

Metody analýzy **proteinů** využívané ve Vývojové biologii 1

Proteiny

	Cellular Structure	Polymer	Monomer
Carbohydrate	 Starch grains in a chloroplast	 Starch	 Monosaccharide
Nucleic Acid	 Chromosome	 DNA strand	 Nucleotide
Protein	 Intermediate filament	 Polypeptide	 Amino acid
Lipid	 Adipose cell with fat droplets	 Triglyceride	 Fatty acid

<https://www.chegg.com/>

– Jedna ze čtyř skupin biologických makromolekul

– Kromě stavební funkce, proteiny mají jedinečnou a nezastupitelnou roli v intra- a inter-celulární signalizaci

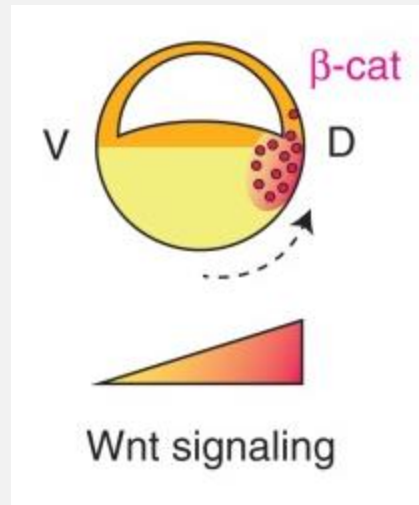
Proteiny

Buněčná **signalizace** ve vývoji: nezastupitelná role proteinů

a) Analýza výstupů proteinových sign. drah



“Velká pětka”



Hikasa *et Sokol*, 2013.
Wnt signaling in vertebrate **axis specification**.
Cold Spring Harb Perspect Biol.



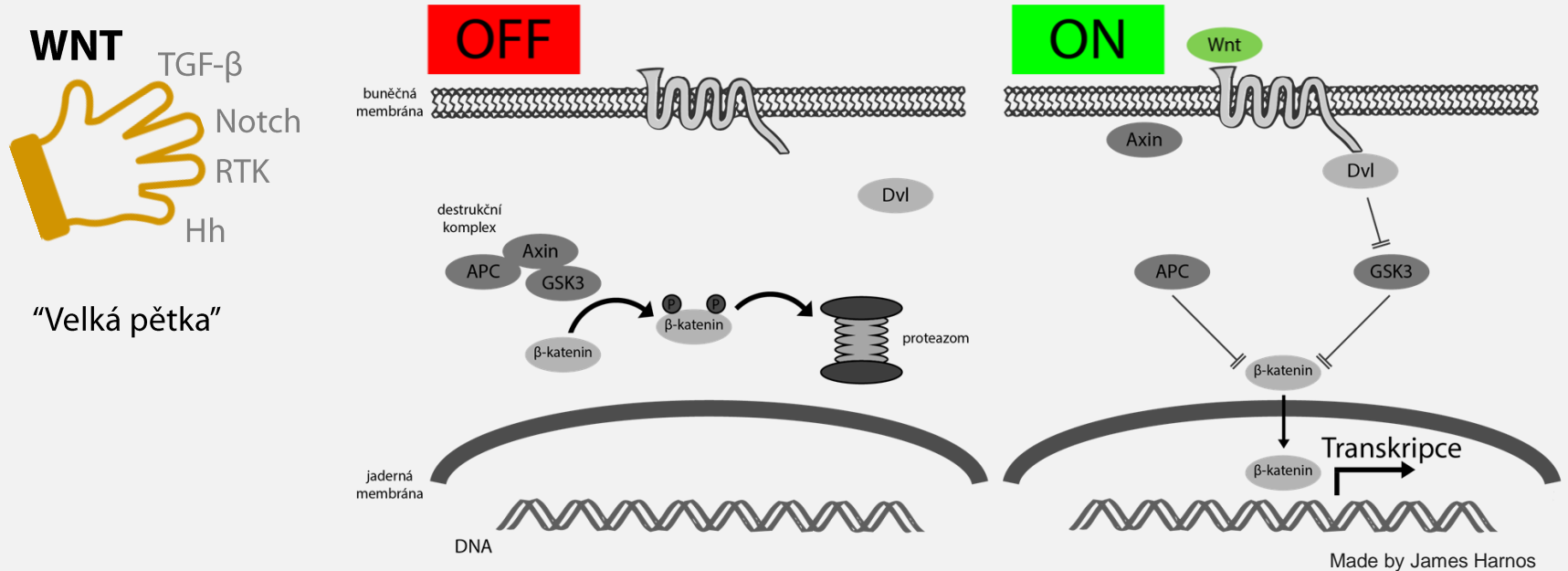
Funyama *et al.*, 1995.
Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling.
JCB

Proteiny

Buněčná **signalizace** ve vývoji: nezastupitelná role proteinů

b) Analýza proteinů v sign. drahách

Kanonická signalizace WNT:



Proteiny

Buněčná **signalizace** ve vývoji: nezastupitelná role proteinů



“Velká pětka”

a) Analýza výstupů proteinových sign. drah:

Pokryto vesměs přednáškami z Vývoj. biologie

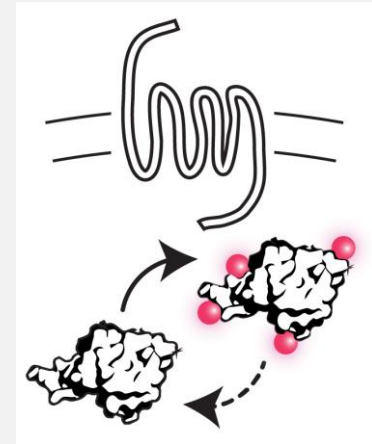
b) Analýza proteinů v sign. drahách:

Náplň této přednášky

Made by James Harnos

MUNI
SCI

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– Meziproteinové interakce (PPI)

– Vytváření pracovní hypotézy

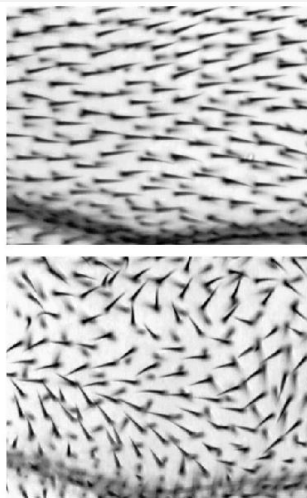
Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

Úvod

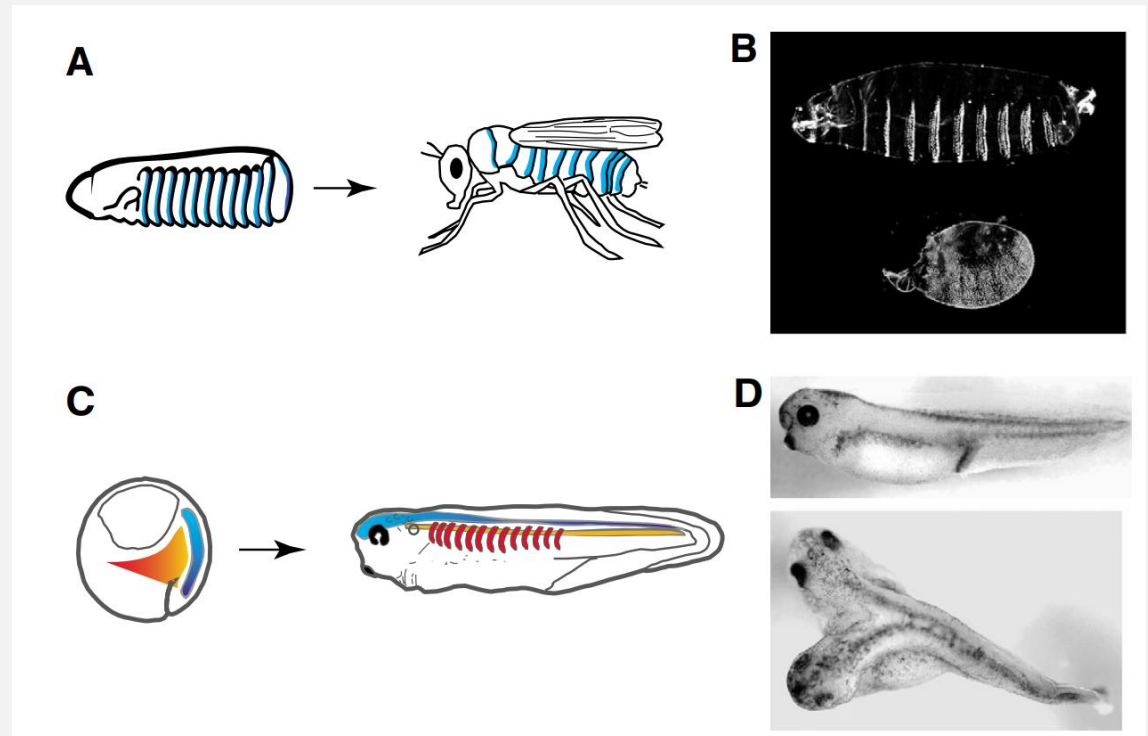
Proč Dishevelled (DVL)?

- Dobrý příklad proteinu fungujícím v buněčné signalizaci (WNT)

dishevelled hair style

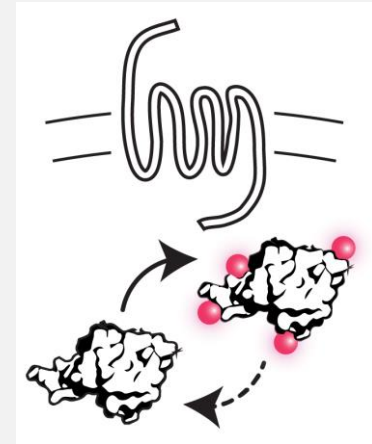


Wallingford JB, Habas R. 2005
The **developmental biology of Dishevelled**: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity.
Development.



- Téma mého studia za posledních 10 let

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– **Analýza proteinů**
(**lokalizace**, konformace, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– Meziproteinové interakce (PPI)

– Vytváření pracovní hypotézy

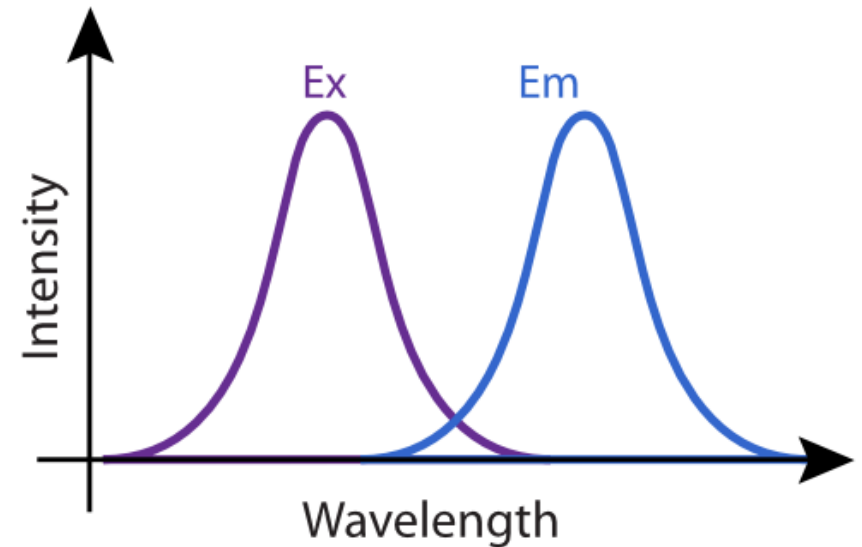
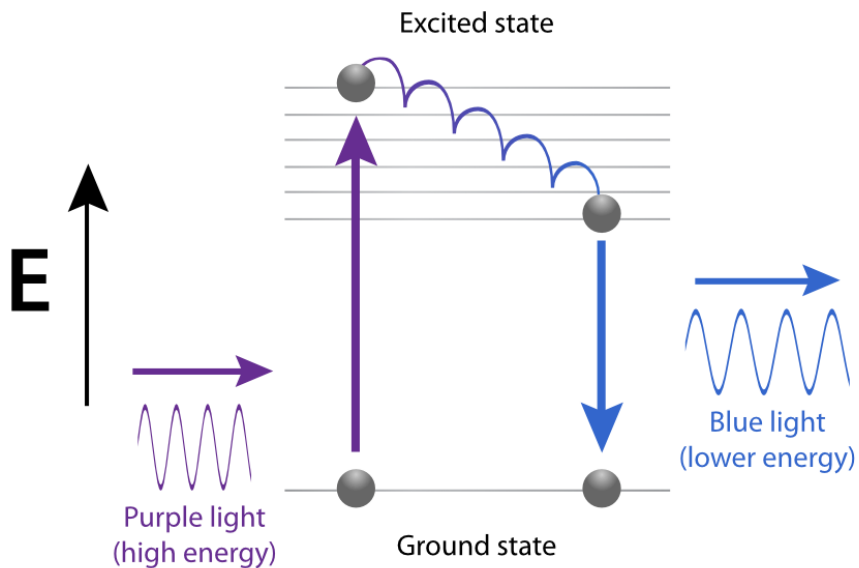
Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

Analýza proteinů: lokalizace

Detekce?

– Fluorescence

jev, kdy molekulární systém absorbuje a poté emituje světlo.



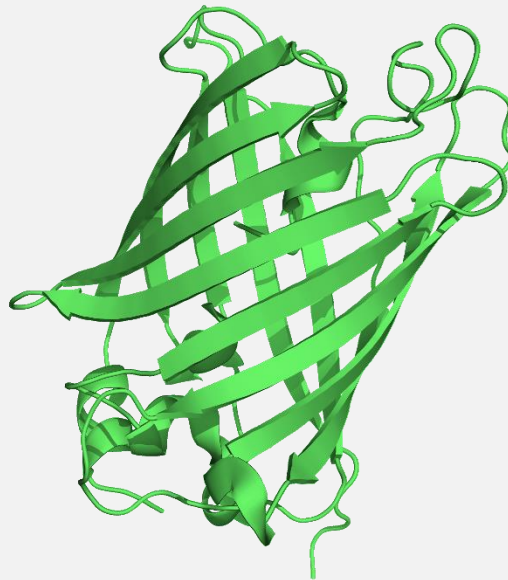
Made by James Harnos

Analýza proteinů: lokalizace

Detekce?

– Fluorescence

jev, kdy molekulární systém absorbuje a poté emituje světlo.



GFP

(přednáška 13)

Analýza proteinů: lokalizace

Detekce?

– Fluorescence: **druhy/typy/pojmy**

– **epi-fluorescence** vs. **imuno-fluorescence**

Princip: GFP a deriváty: [přednáška 13](#) (značení protilátkami: [příště](#))

– proteiny: **endogenní** vs. **exogenní**

Princip: klonovací techniky, př. CRISPR: [přednáška 12](#) (transfekce, injikace DNA/RNA apod.: [přednáška 12](#))

– *mikroskopie živých buněk* („live-imaging“) vs. **fixace vzorku**

Možnosti: pouze epi-fluorescence ([přednáška 13](#)) jak epi-, tak imuno-fluorescence

– Světelná mikroskopie se *širokým zorným polem* („wide-field“) vs. *konfokální* mikroskopie (...více [příště](#))

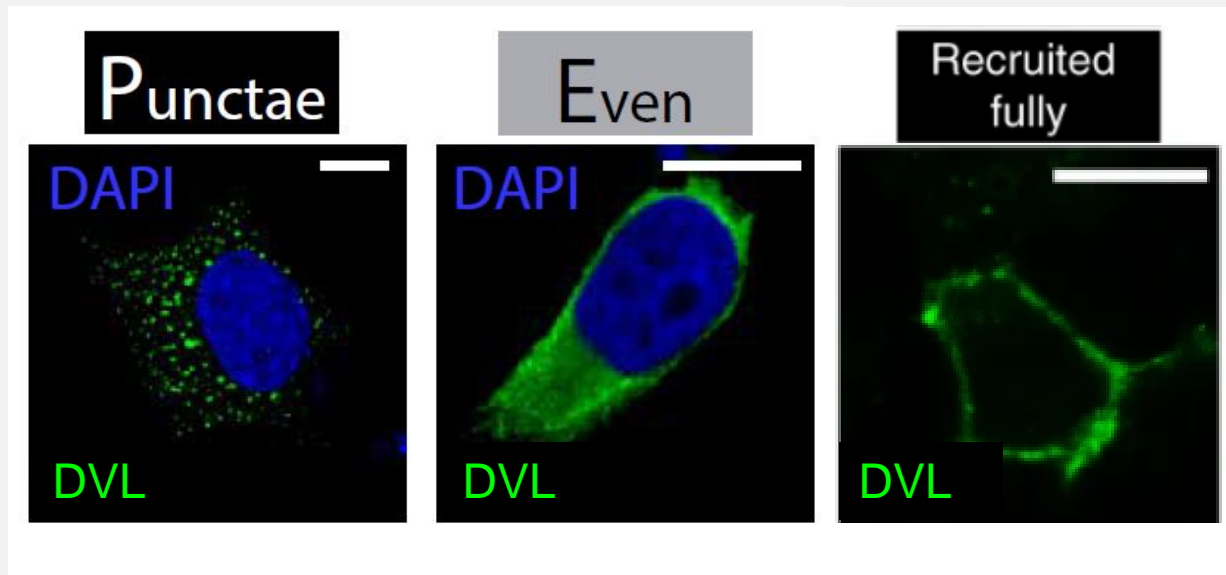
Analýza proteinů: lokalizace

Detekce?

– Fluorescence: příklad

Protein Dishevelled (DVL)

pohled
shora
na buňku



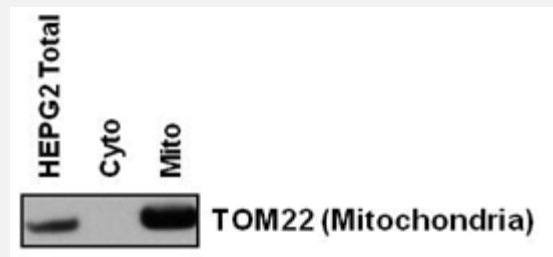
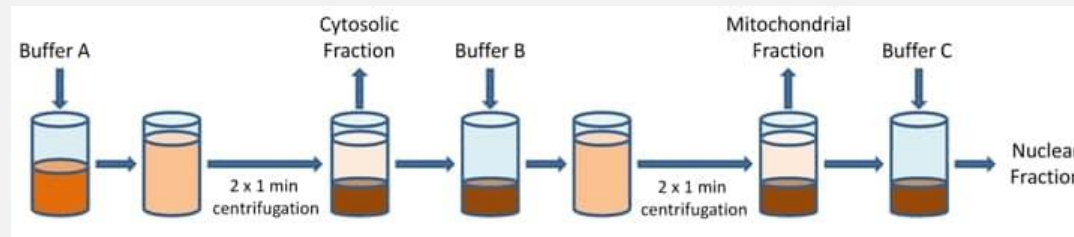
Lokalizace proteinu může mnohdy napovědět o jeho funkci

Analýza proteinů: lokalizace

Detekce 2?

– „Hrubá“ alternativa k fluorescenci: použití **frakcionačních kitů**

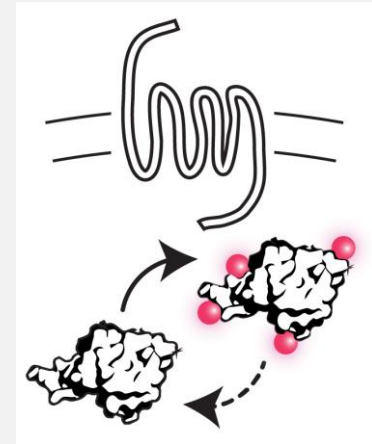
(+ vizualizace frakcí např. pomocí **WB** – **příště**)



<https://www.abcam.com/>

Lokalizace proteinu může mnohdy napovědět o jeho funkci

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– **Analýza proteinů**
(lokalizace, **konformace**, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– Meziproteinové interakce (PPI)

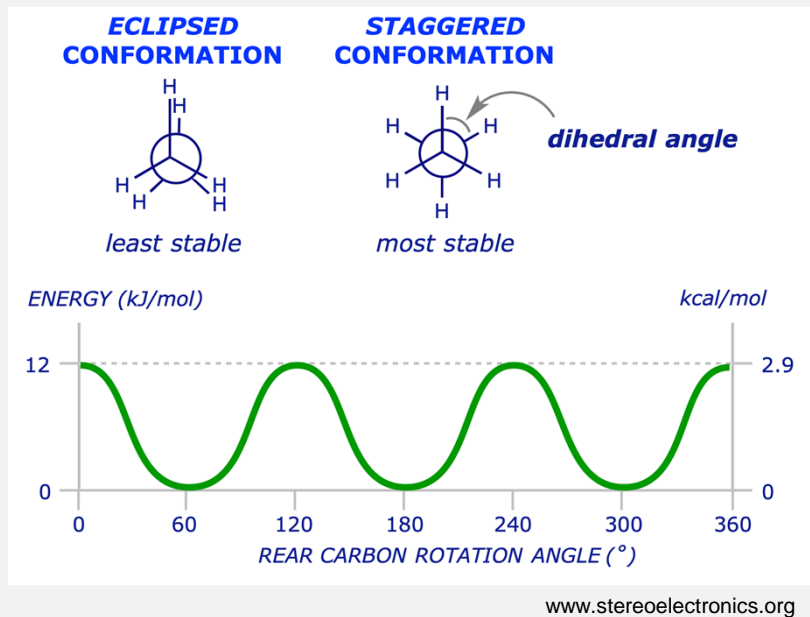
– Vytváření pracovní hypotézy

Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

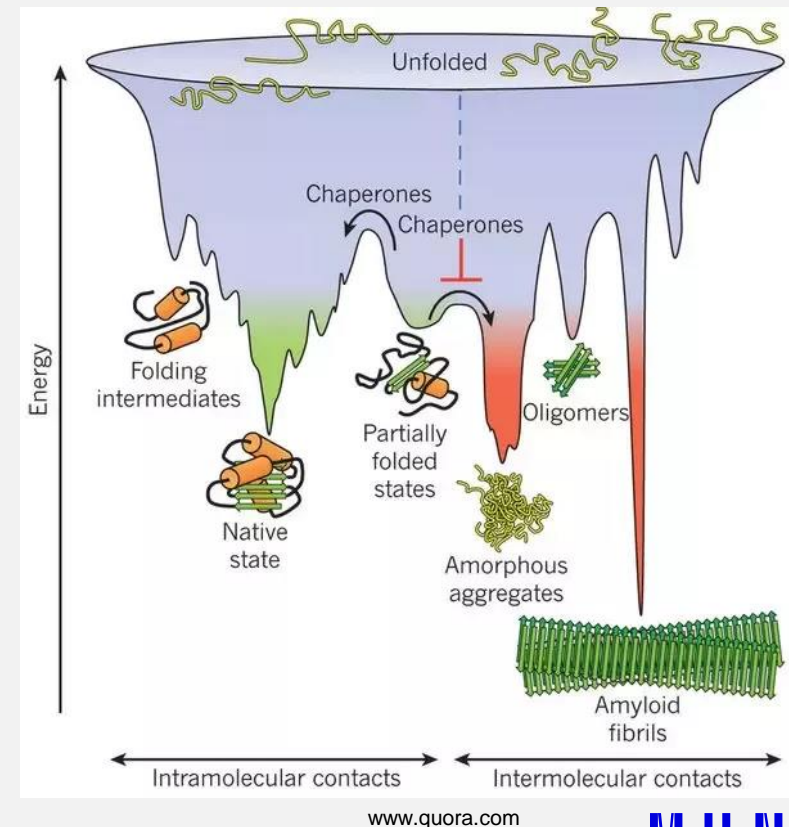
Analýza proteinů: konformace

Proč konformace?

Malé molekuly



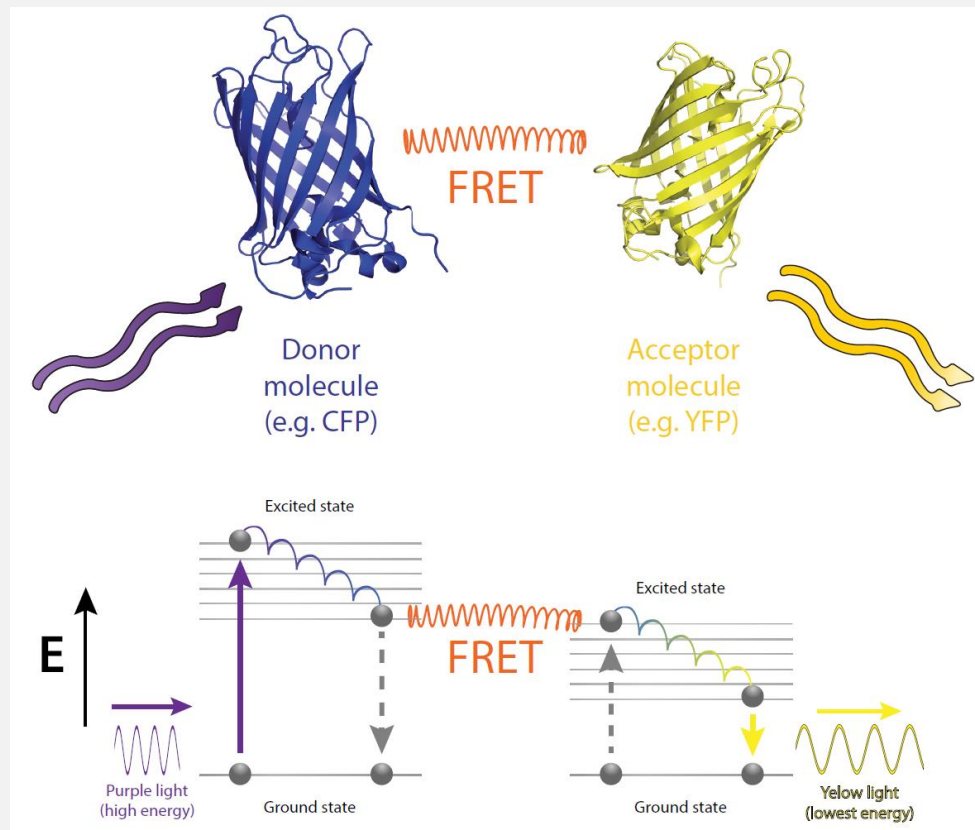
Velké molekuly



Analýza proteinů: konformace

Detekce?

- FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer



Neradiativní
přenos energie
mezi dvěma
blízkými fluorofory

Made by James Harnos

Analýza proteinů: konformace

Detekce?

– FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer

FRET = long range dipole-dipole interaction (QM)

1. Approximation of FRET in macroscopic world



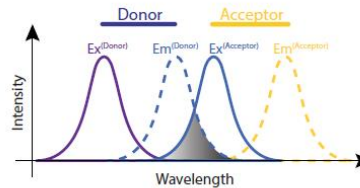
Transfer of: Current



Transfer of: Energy (kinetic)

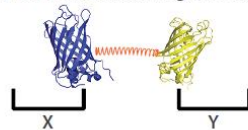
2. Requirements

- 10-100Å distance of fluorophores
- Ex/Em spectra of fluorophores

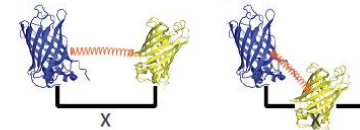


3. FRET experimental setup

a) INTERmolecular (e.g. interaction)



b) INTRA molecular (e.g. conformation)



Terminal tagging

Internal tagging

Meziproteinové interakce (příště)

Konformace (dnes)

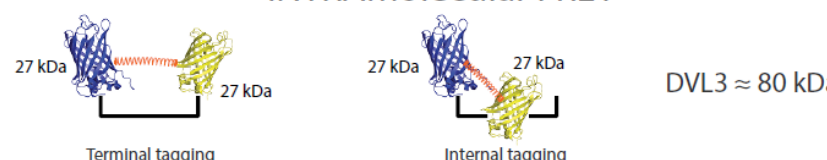
Neradiativní
přenos energie
mezi dvěma
blízkými fluorofory

Analýza proteinů: konformace

Detekce?

– FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer

INTRAmolecular FRET




DVL3 \approx 80 kDa

Terminal tagging Internal tagging

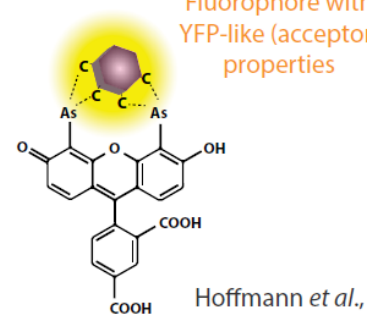
FAsH molecule
(Fluorescence Arsenical
Hairpin Binder)

O=C1C=C(C(=O)O)C(O)=C2C(=O)C=C(C(=O)O)C(O)=C21

+ Tetracystein tag
(CC-PG-CC)





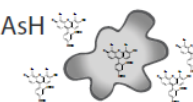
=



Fluorophore with
YFP-like (acceptor)
properties

Hoffmann *et al.*,
Nature. 2005

General procedure:

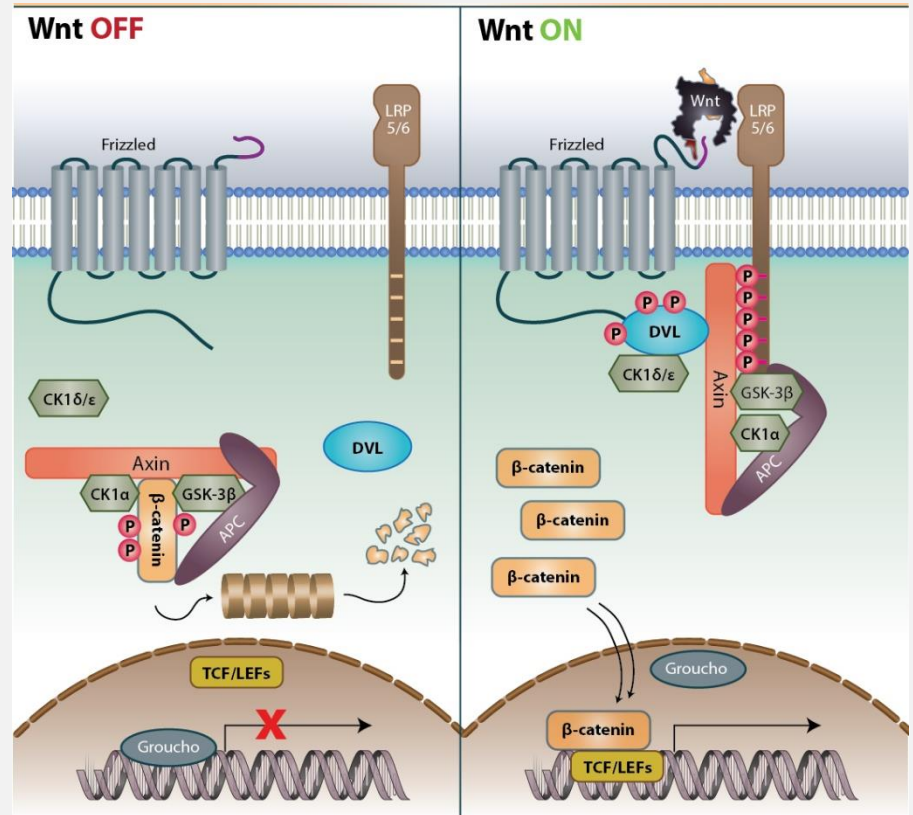
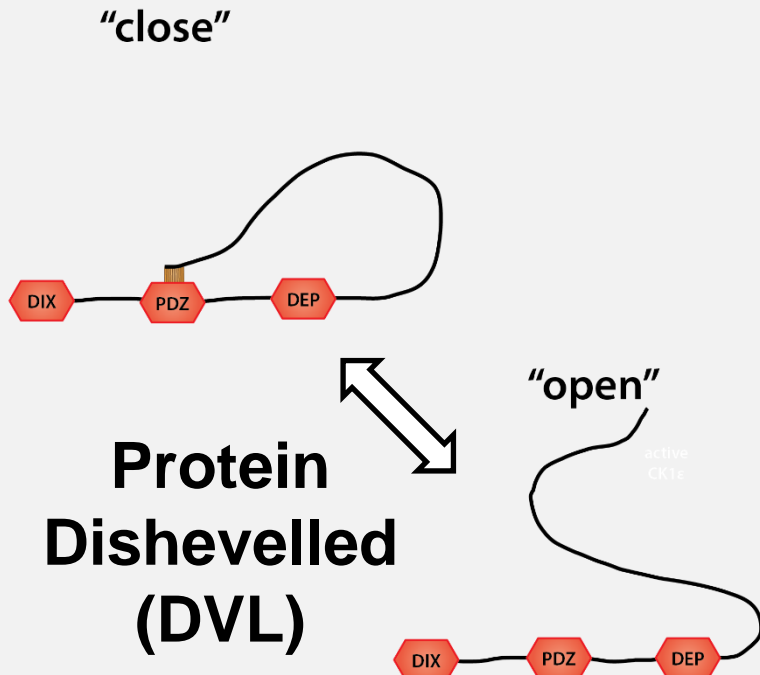
1. Cloning CC-PG-CC tag into POI by single genetic engineering + testing 
2. Expressing tagged POI in cells 
3. Cell labelling by FAsH 

Neradiativní
přenos energie
mezi dvěma
blízkými fluorofory

Analýza proteinů: konformace

Detekce?

– FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer

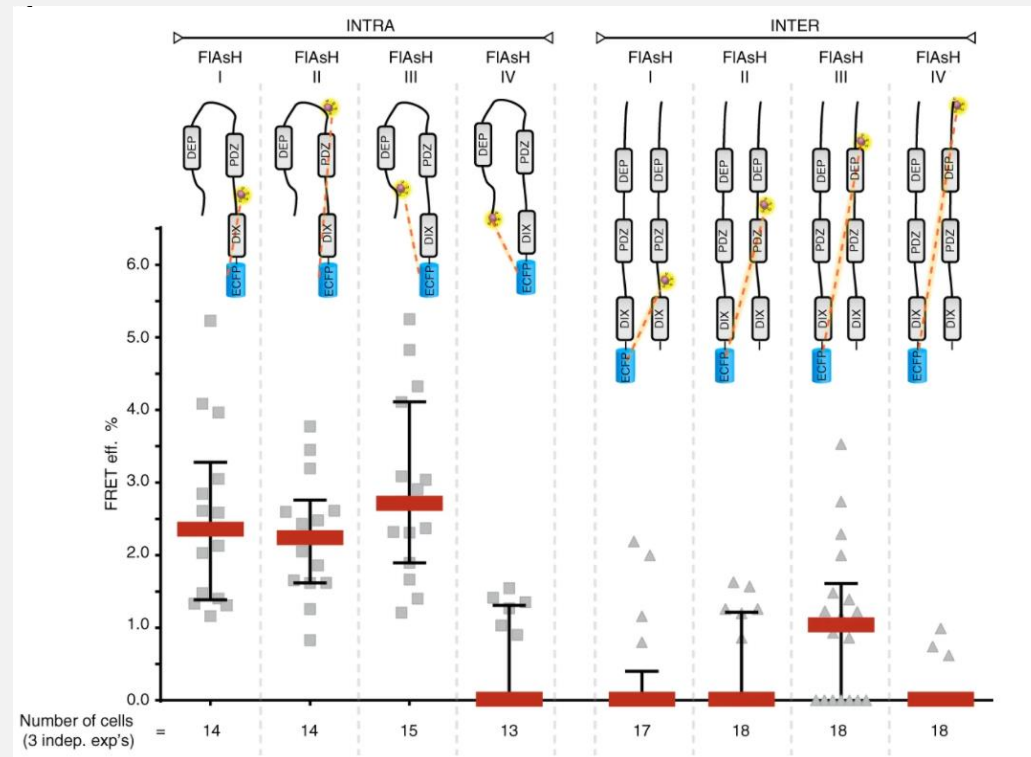
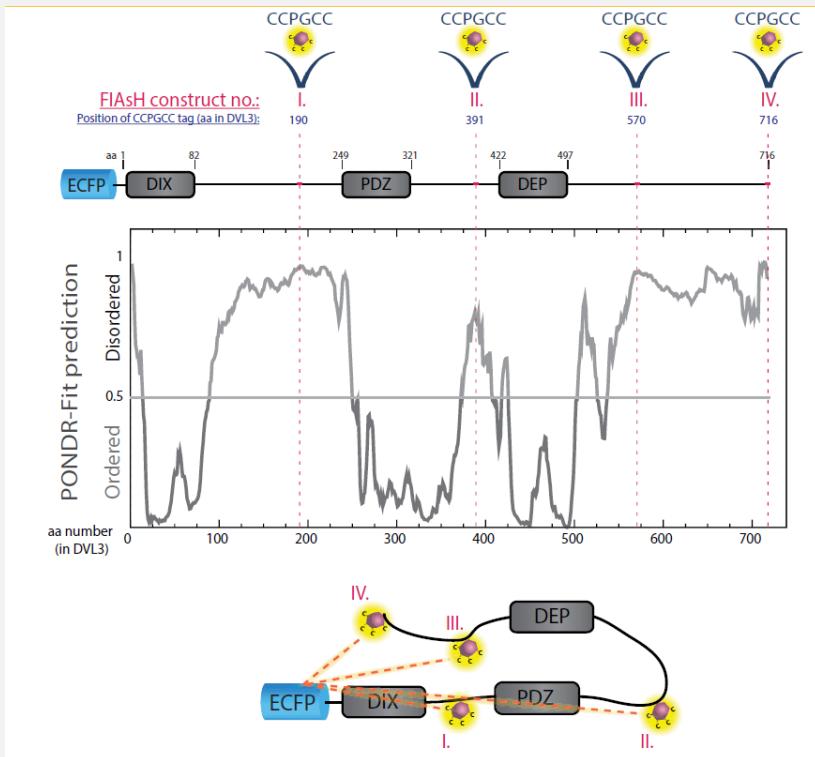


Made by James Harnos

Analýza proteinů: konformace

Detekce?

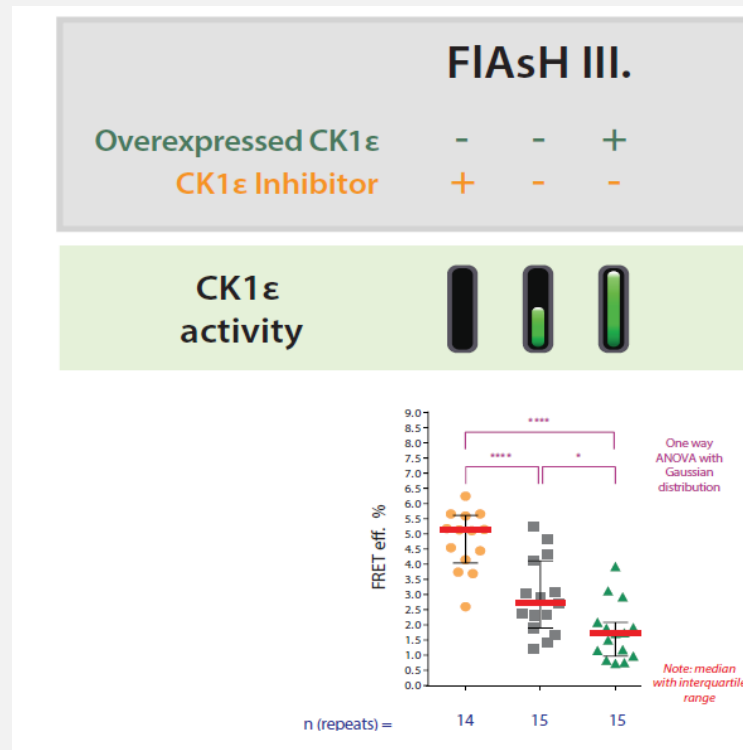
- FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer
Protein Dishevelled (DVL)



Analýza proteinů: konformace

Detekce?

- FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer
Protein Dishevelled (DVL)

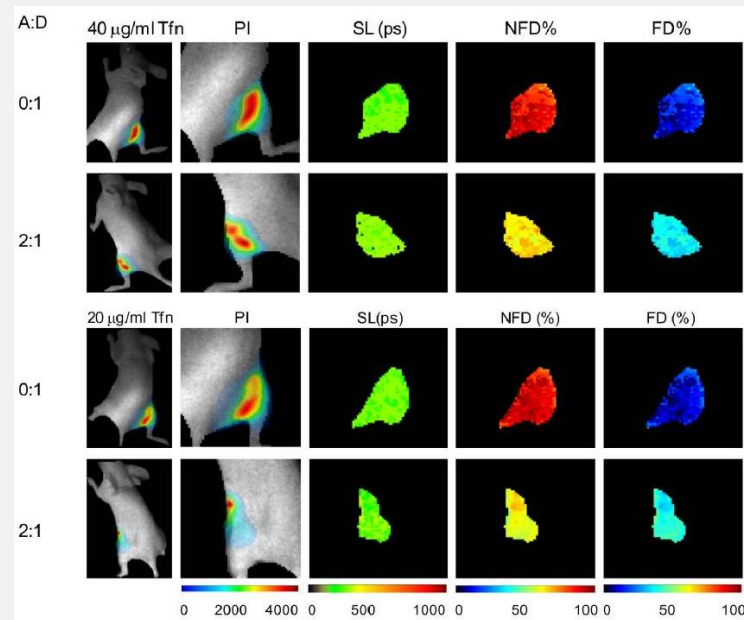


Analýza proteinů: konformace

Jen v buňkách?

– FRET: Förster/ fluorescence resonance energy transfer

In vivo!

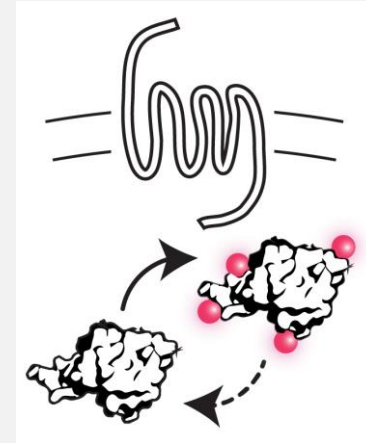


Abe *et al.*, 2013.

Non-Invasive In Vivo Imaging of Near Infrared-labeled Transferrin in Breast Cancer Cells and Tumors Using Fluorescence Lifetime FRET.

Plos One

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– **Analýza proteinů**
(lokalizace, konformace, **aktivita**)

– Post-translační modifikace (PTM)

– Meziproteinové interakce (PPI)

– Vytváření pracovní hypotézy

Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

Analýza proteinů: aktivita

Co je to aktivita?

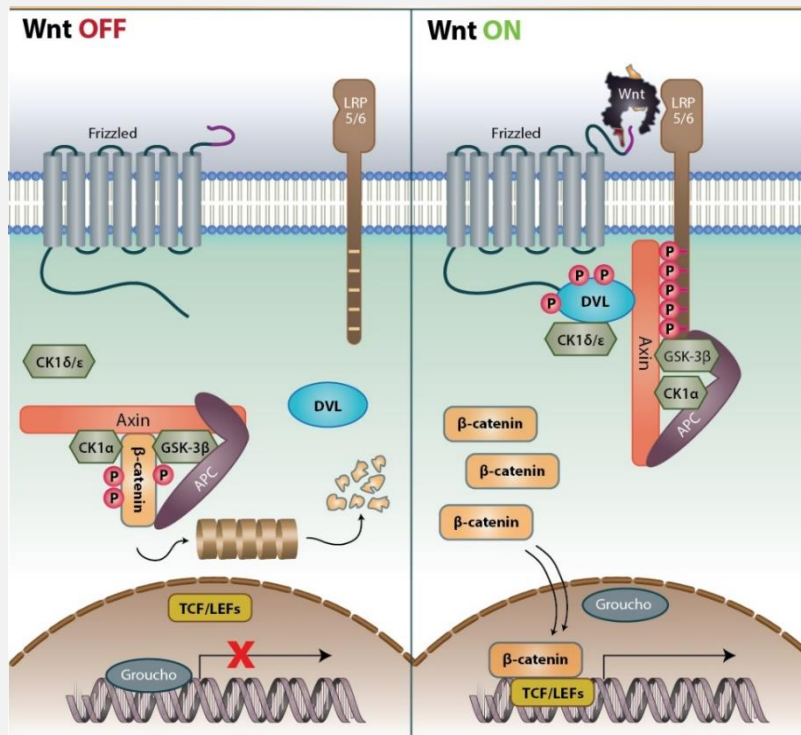
– Vysvětlení pojmů: **aktivita**

vs. **„aktivita“**

Př.: ○ Enzym – enzymatická reakce

Jiné proteiny (několik příkladů):

- Vazba na jiné proteiny (PPI – dnes/příště)
- „Scaffold“ proteiny – platforma pro mnoho PPI
- Vazba na DNA (● TF)



Změny aktivity/„aktivity“?

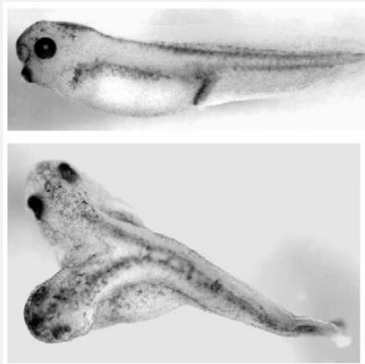
- Úroveň (př. makroskopická, ..., molekulární)
- Kvalitativní vs. Kvantitativní
-

Analýza proteinů: aktivita

Detekce?

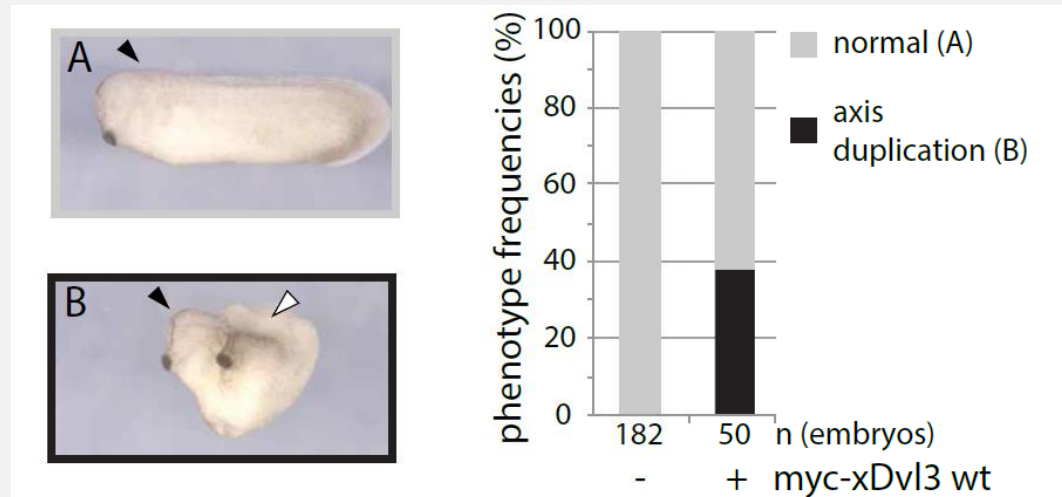
– Příklad 1: duplikace tělní osy (embryo *Xenopus laevis*)

(pozn. unikátní pro každou sign. dráhu)



Wallingford JB, Habas R. 2005
The **developmental biology of Dishevelled**: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity.
Development.

Př. přidání DVL



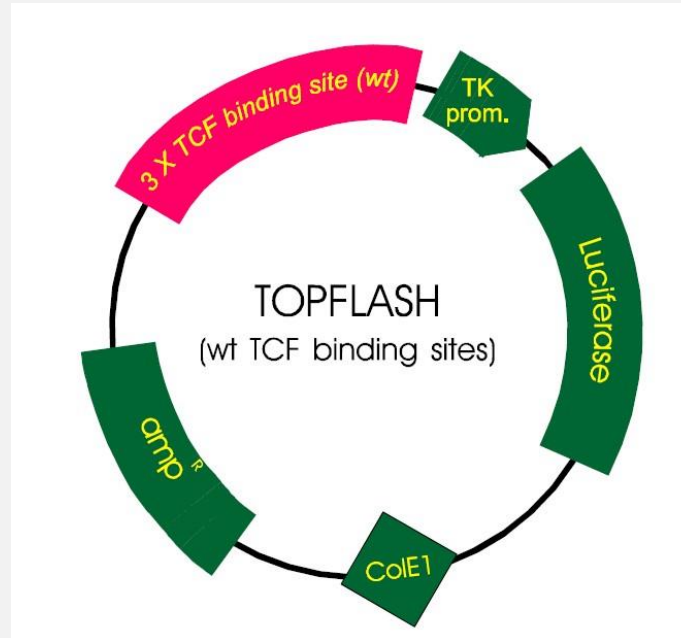
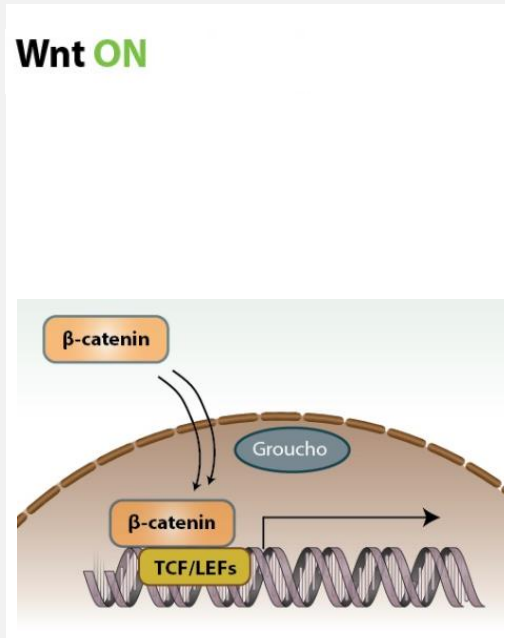
Makroskopická kvalitativní změna: duplikace tělní osy

Analýza proteinů: aktivita

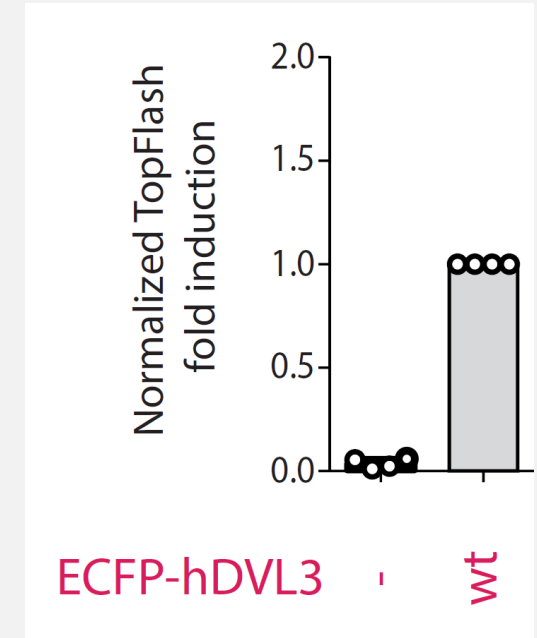
Detekce?

– Příklad 2: reportérová esej (pozn. unikátní pro každou sign. dráhu)

WNT: TopFlash

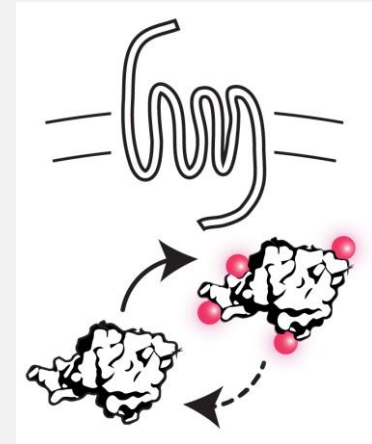


Př. přidání DVL



Molekulární kvantitativní změna: množství β-kateninu

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– **Post-translační modifikace (PTM)**

– (Meziproteinové) interakce (PPI)

– Vytváření pracovní hypotézy

Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

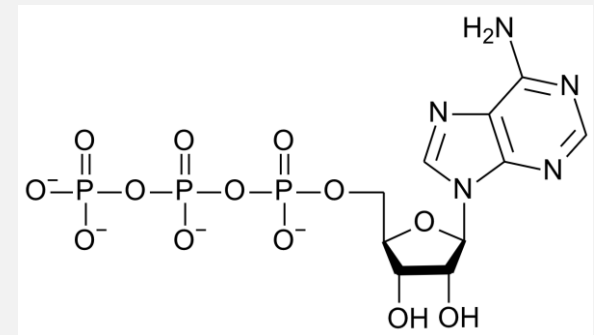
Posttranslační modifikace proteinů

Fosforylace

- První popsaná PTM proteinů (E. P. Kennedy, 1954)
- Reverzibilní (enzymy: fosfatázy)
- Připojení malé anorganické skupiny PO_4^{3-} (**neg.**)
- Aminokyseliny: Ser, Thr, Tyr
- Enzymy: kinázy + ATP (**substrát** i zdroj E)
- Funkce: „rychlá“ regulace + signalizace (sign. dráhy)



Molekula ATP

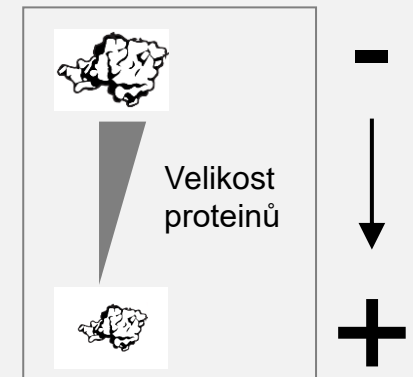
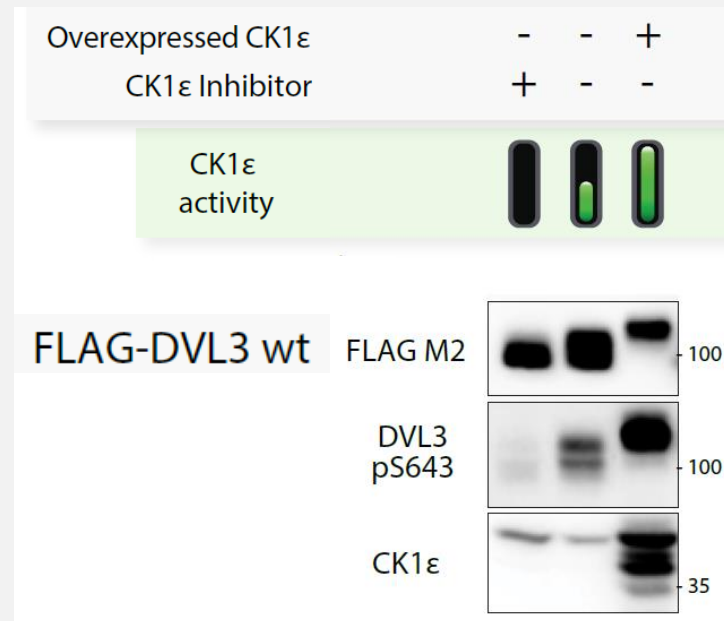


Posttranslační modifikace proteinů

Fosforylace

Detekce?

- Příklad 1: elektroforetický posun (shift) molekuly DVL pomocí WB (příště)

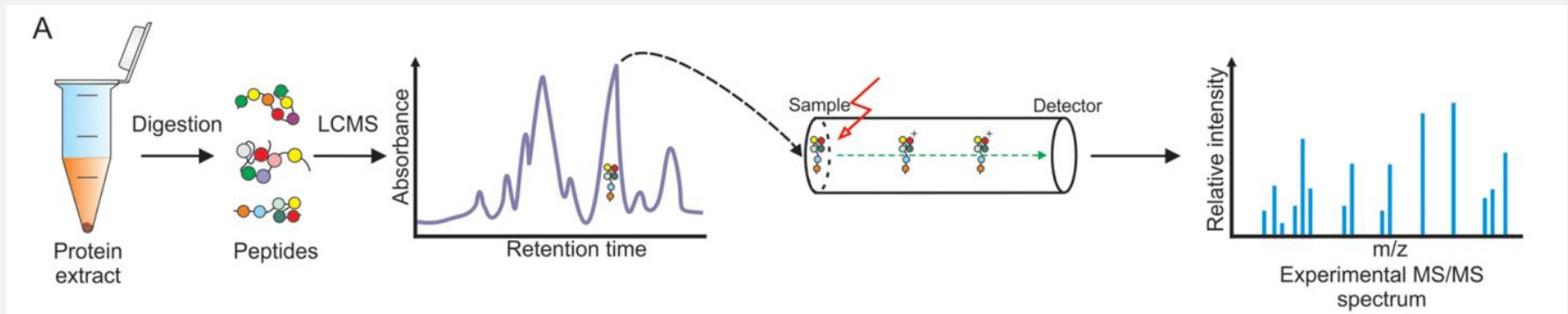


Posttranslační modifikace proteinů

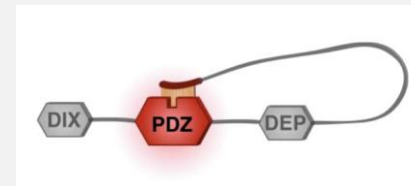
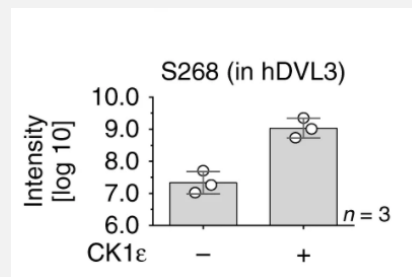
Fosforylace

Detekce?

– Př. 2: analýza PTM pomocí **hmotnostní spektrometrie** (přednáška 7)

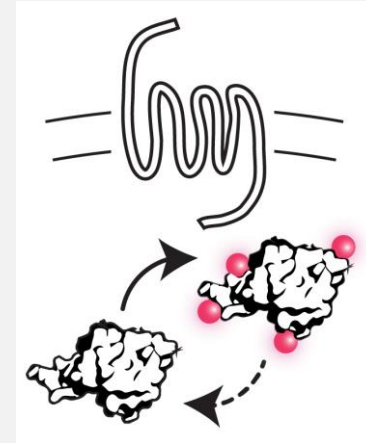


Chugunova *et al.*, 2018.
Mining for Small Translated ORFs.
J Proteome Res



Harnos *et al.*, 2019.

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– **(Meziproteinové) interakce (PPI)**

– Vytváření pracovní hypotézy

Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

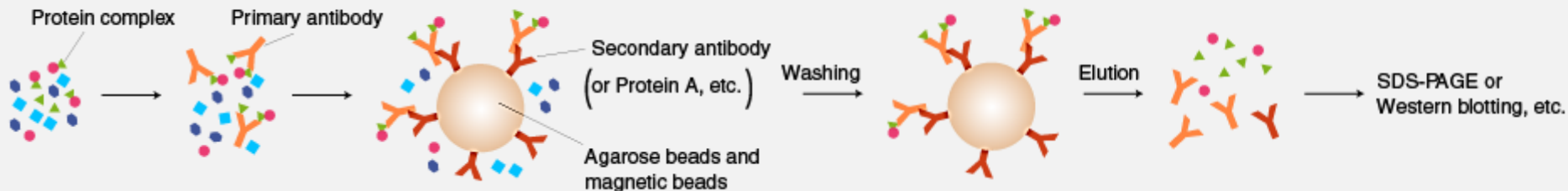
Proteinové interakce

Detekce?

a) Ko-imunoprecipitace (co-IP)

co-IP = studium fyzické interakce proteinů

- Inkubace lyzátu s protilátkou (Ab)
- Imunoprecipitace („vychytání“) částicemi/kuličkami s proteinem A/G
- Separace částic od zbytku lyzátu? Centrifugace vs. magnetismus
- Analýza vzorku: SDS-PAGE + Western blot (příště)

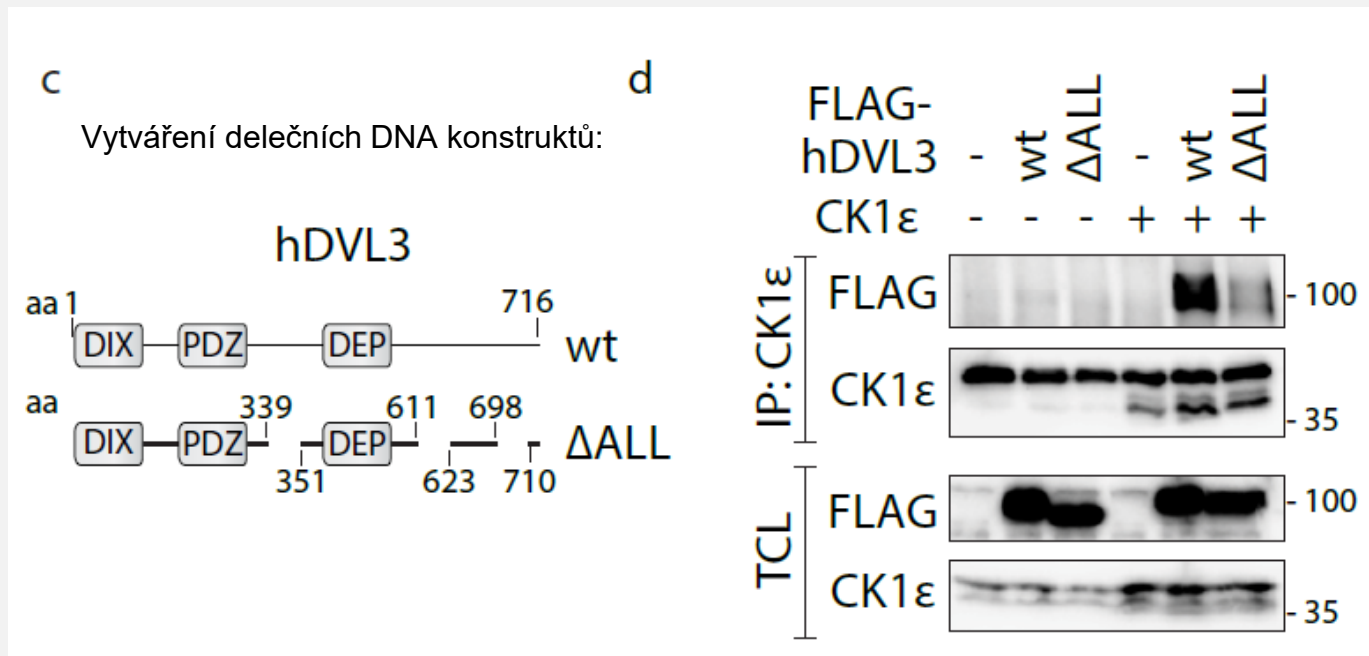


Proteinové interakce

Detekce?

a) Ko-imunoprecipitace (co-IP)

co-IP = studium fyzické interakce proteinů



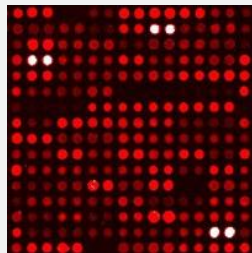
Proteinové interakce

Detekce?

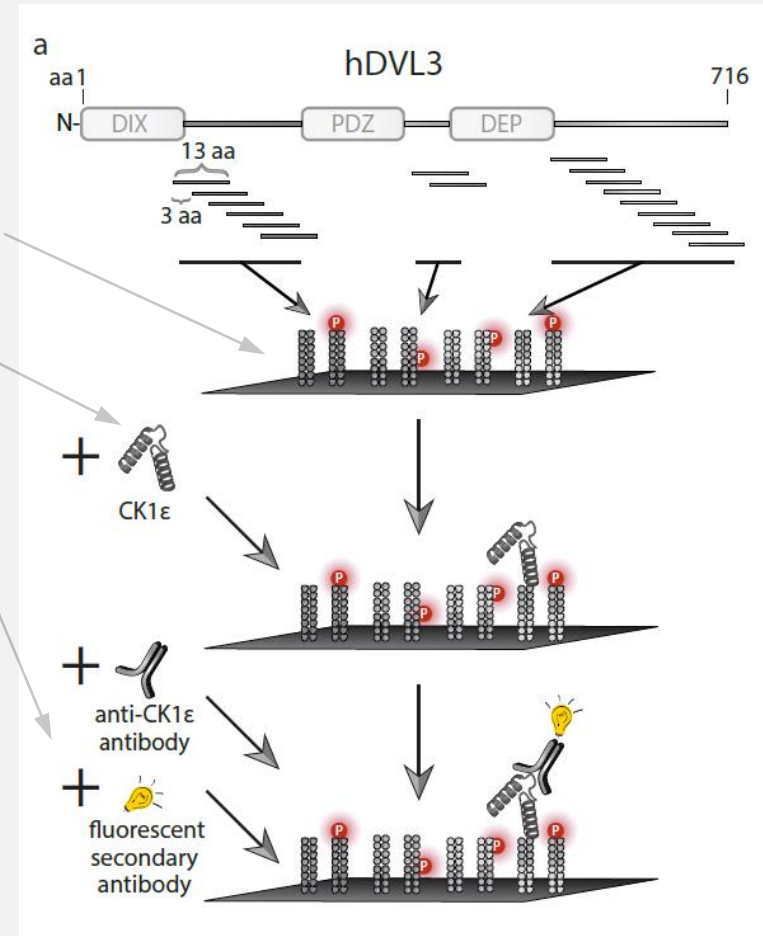
b) Proteinové čipy

- Matrice s peptidy odvozenými od proteinu zájmu
- Přidání vazebného proteinu, tzv. partnera
- Detekce partnera pomocí *protilátek* (příště)

Výstup:



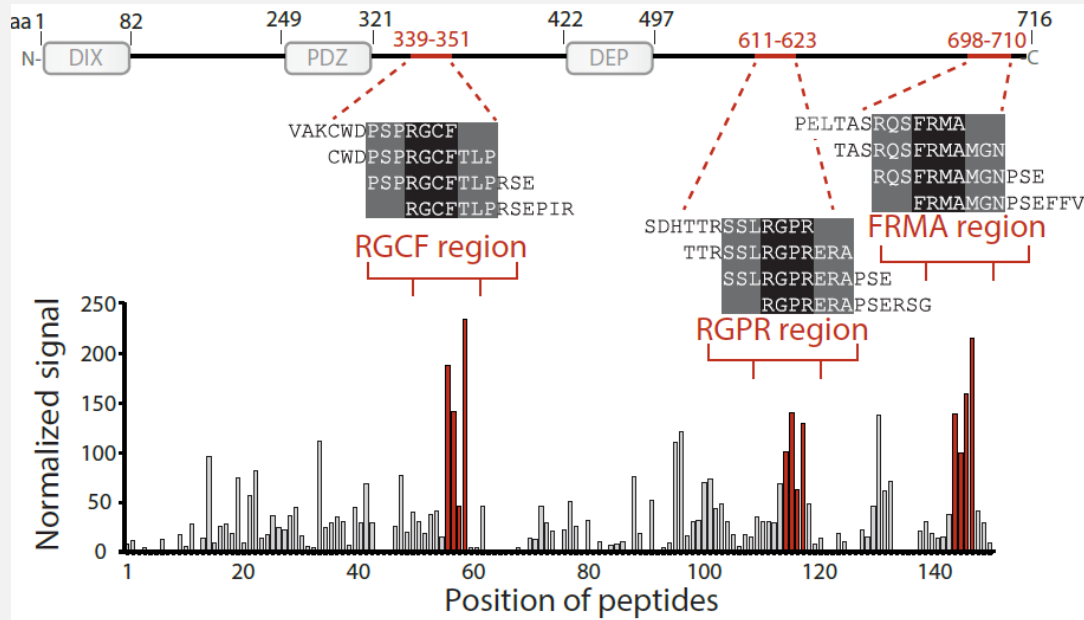
- + Analýza velkého množství interakcí zároveň
- Ovlivnění struktury a vlastností připojením na matrici, spíše *in vitro* metoda, náročná tvorba čipů: finance + čas



Proteinové interakce

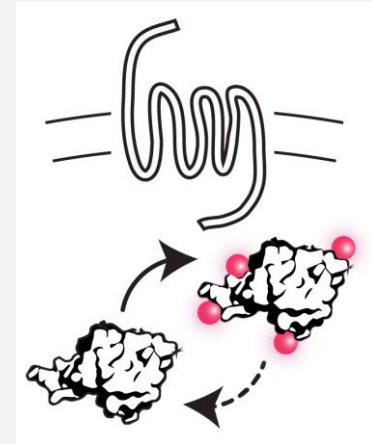
Detekce?

b) Proteinové čipy – DVL3



Příklad kvantifikace signálu:

Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– (Meziproteinové) interakce (PPI)

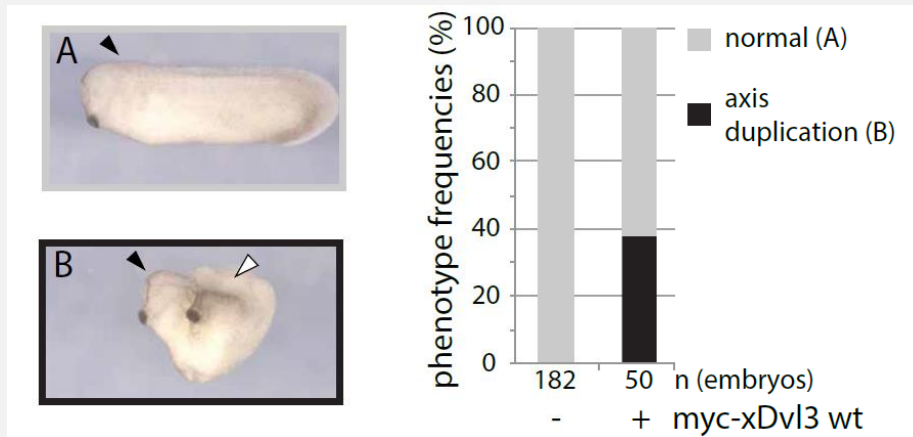
– Vytváření pracovní hypotézy

Dnes: analýza proteinu Dishevelled (DVL) v kanonické signalizace WNT

Vytváření pracovní hypotézy

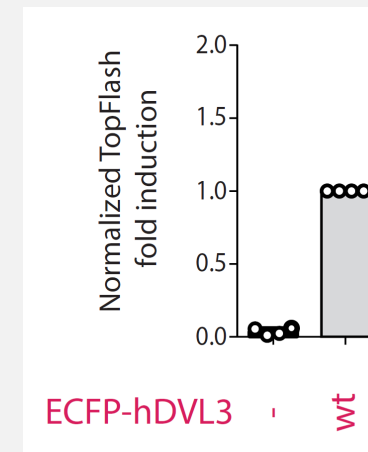
Postup 1: je Váš protein aktivní/“aktivní“ v signalizaci Vašeho zájmu?

a) „aktivita“ DVL
ve WNT:



Kvalitativně: duplikace tělní osy

b) „aktivita“ DVL
ve WNT:

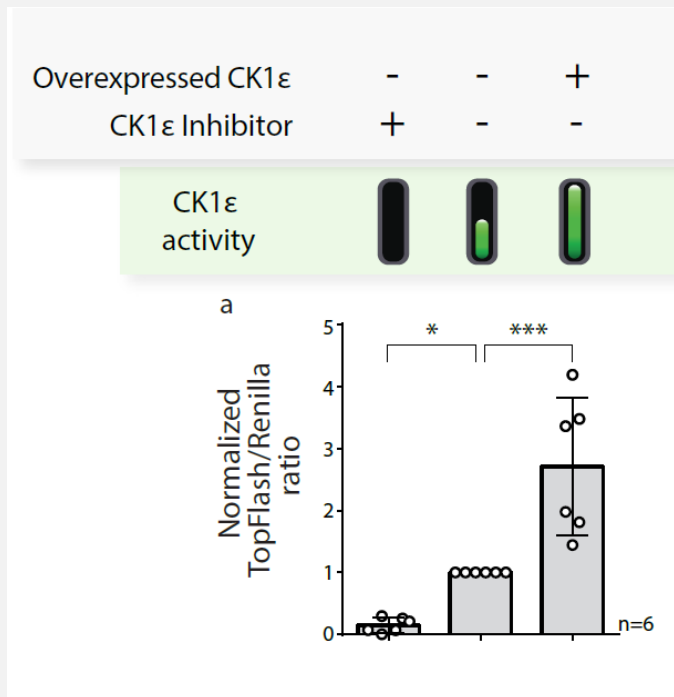


Kvantitativně: množství β -kateninu

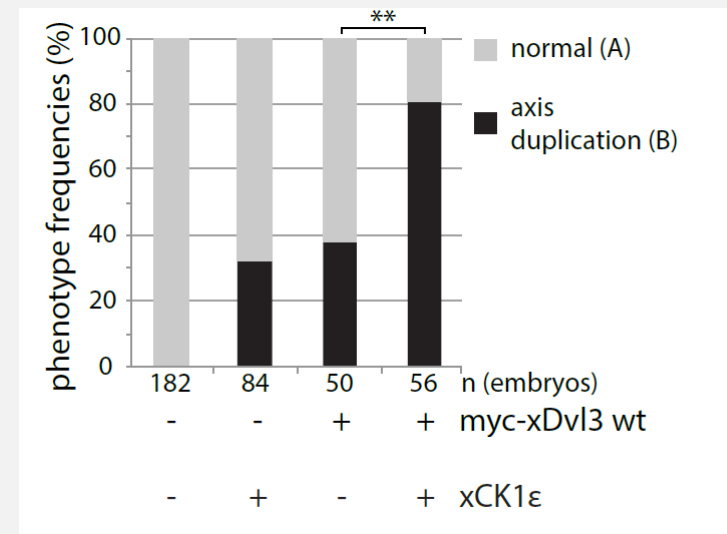
Vytváření pracovní hypotézy

Postup 2: Závisejí na něčem (známém) jeho aktivita/“aktivita“?

a) „aktivita“ DVL ve WNT závislá na aktivitě CK1ε:



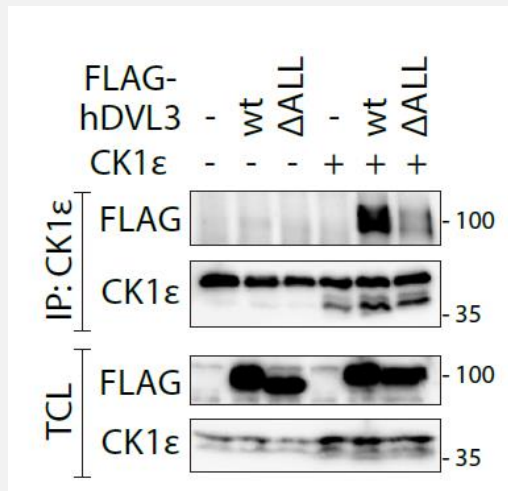
b) „aktivita“ DVL ve WNT závislá na aktivitě CK1ε:



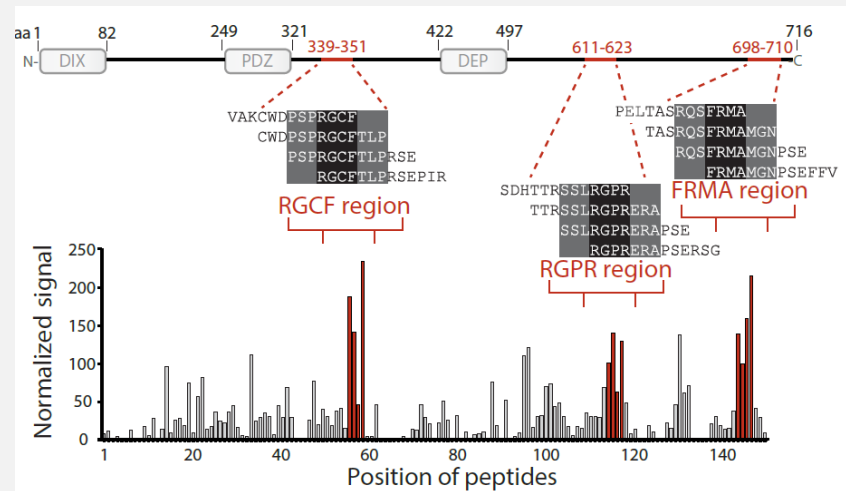
Vytváření pracovní hypotézy

Postup 3: Interaguje fyzicky protein Vašeho zájmu s pozitivní kontrolou (již známý protein)?

a) co-IP:

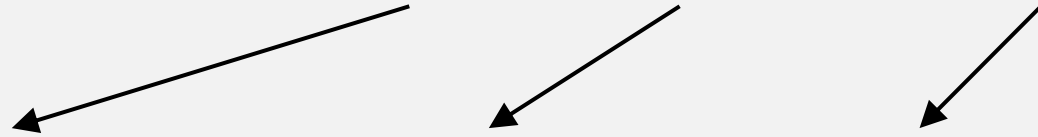


b) peptidové knihovny:



Vytváření pracovní hypotézy

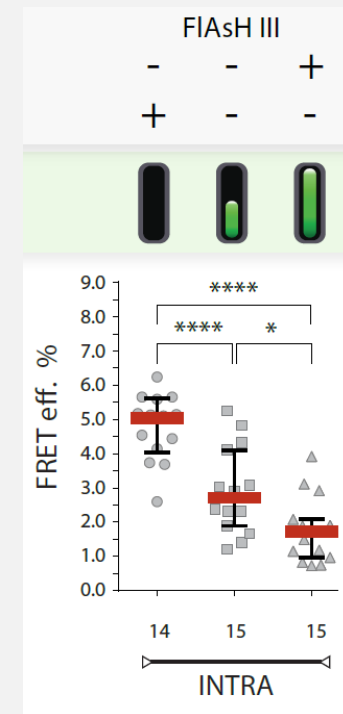
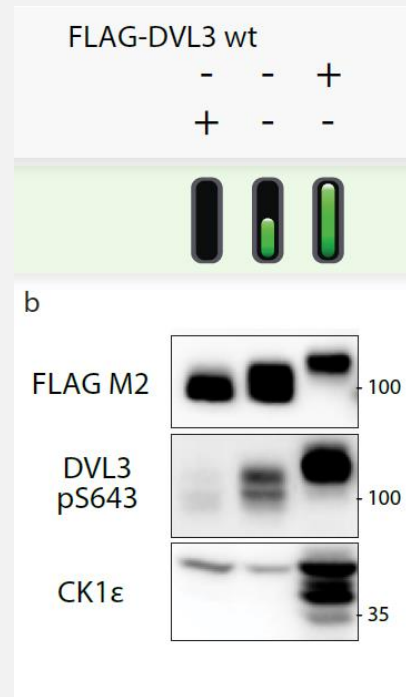
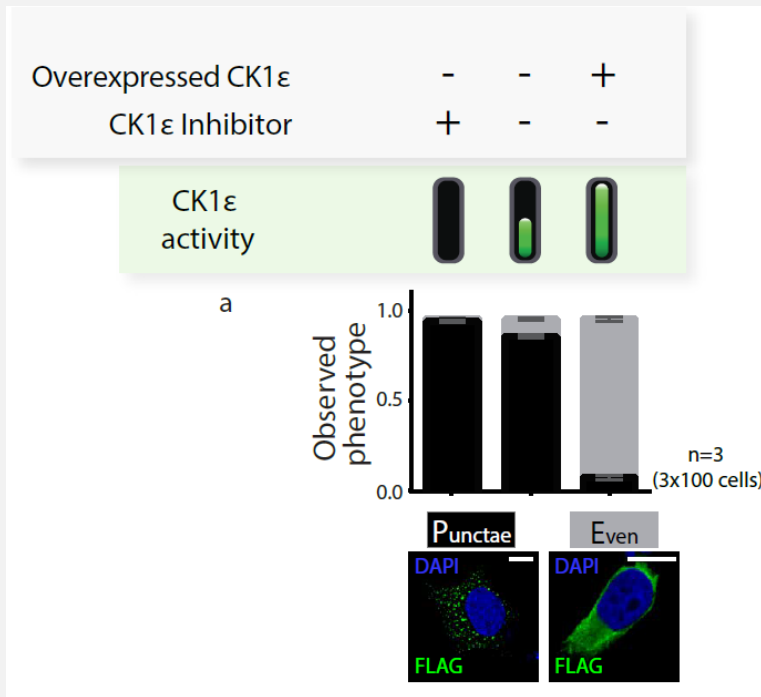
Postup 4: Dochází ke změně lokalizace, PTM, či konformace?



př. fluorescence

př. posun na WB

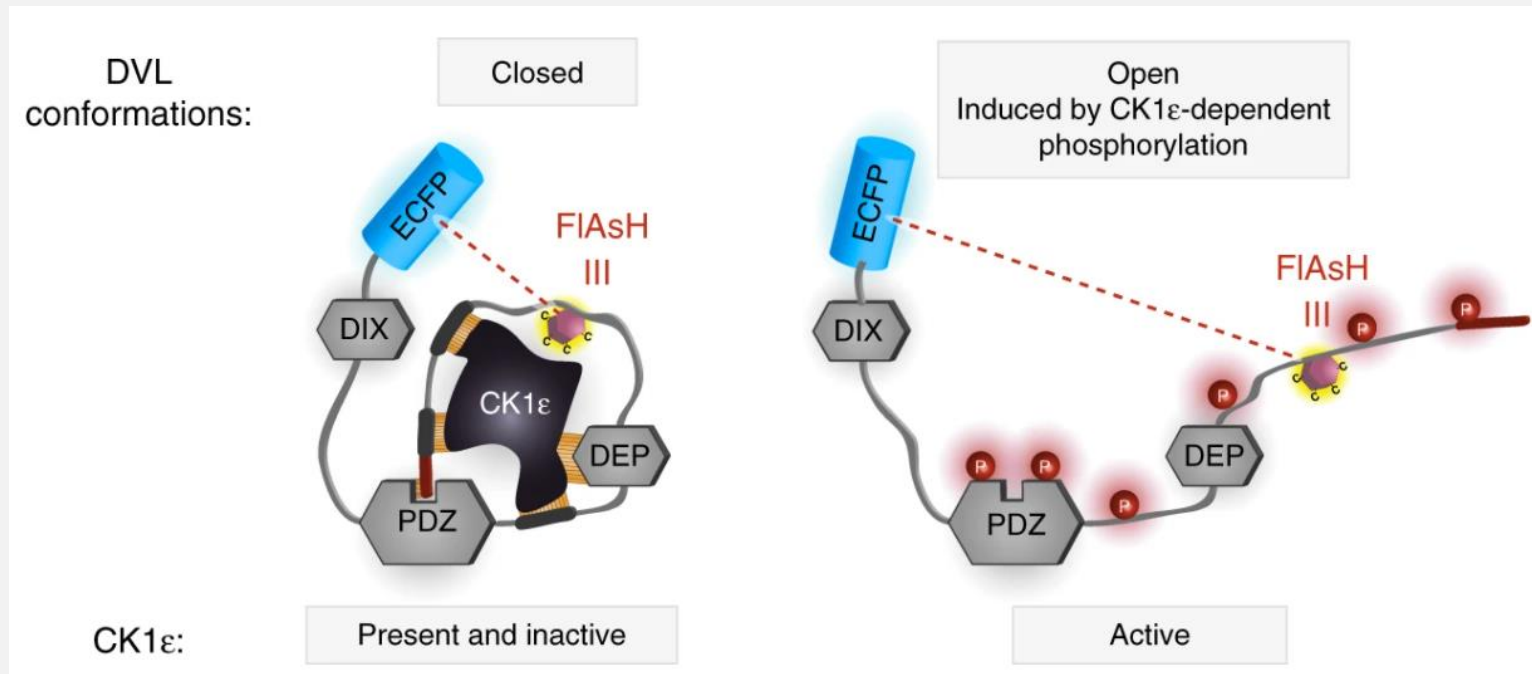
př. FRET



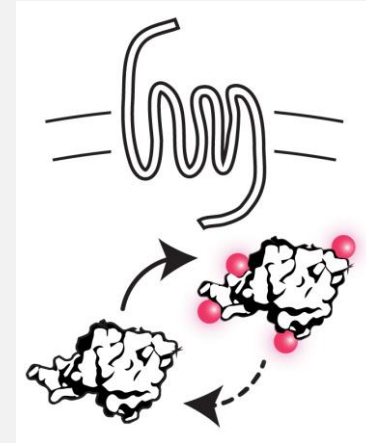
Vytváření pracovní hypotézy

Postup 5: udělejte závěr z Vašich exper. dat:

Příklad:



Shrnutí



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů

(lokalizace – Fluorescence, konformace – FRET, aktivita – funkční eseje)

– Post-translační modifikace (PTM)

fosforylace

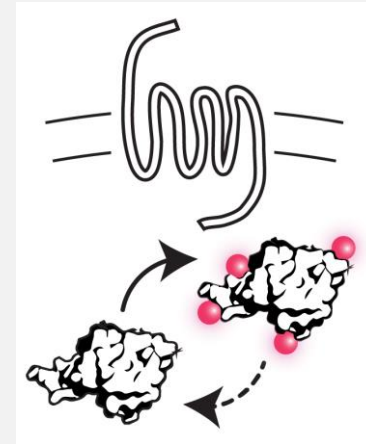
– Meziproteinové interakce (PPI)

co-IP, peptidové čipy

– Vytváření pracovní hypotézy

Dnes: analýza proteinu **Dishevelled (DVL)** v kanonické signalizace WNT

Osnova pro příště



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– (Meziproteinové) interakce (PPI)

Příště: další PTM, techniky studujících PPI a několik příkladů z Vývoj. biologie

Děkuji Vám za pozornost

MUNI
SCI

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE A IMUNOLOGIE
ŽIVOČICHŮ (OFIŽ)



STUDIJNÍ PROGRAM:
EXPERIMENTÁLNÍ A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

SPECIALIZACE:
EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ŽIVOČICHŮ
A IMUNOLOGIE & BUNĚČNÁ BIOLOGIE