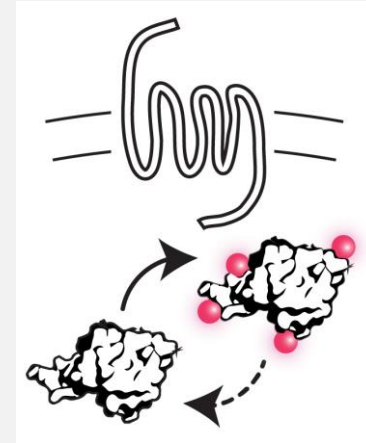


Experimentální embryologie

Bi1130

Metody analýzy **proteinů** využívané ve Vývojové biologii 2

Osnova



Made by James Harnos

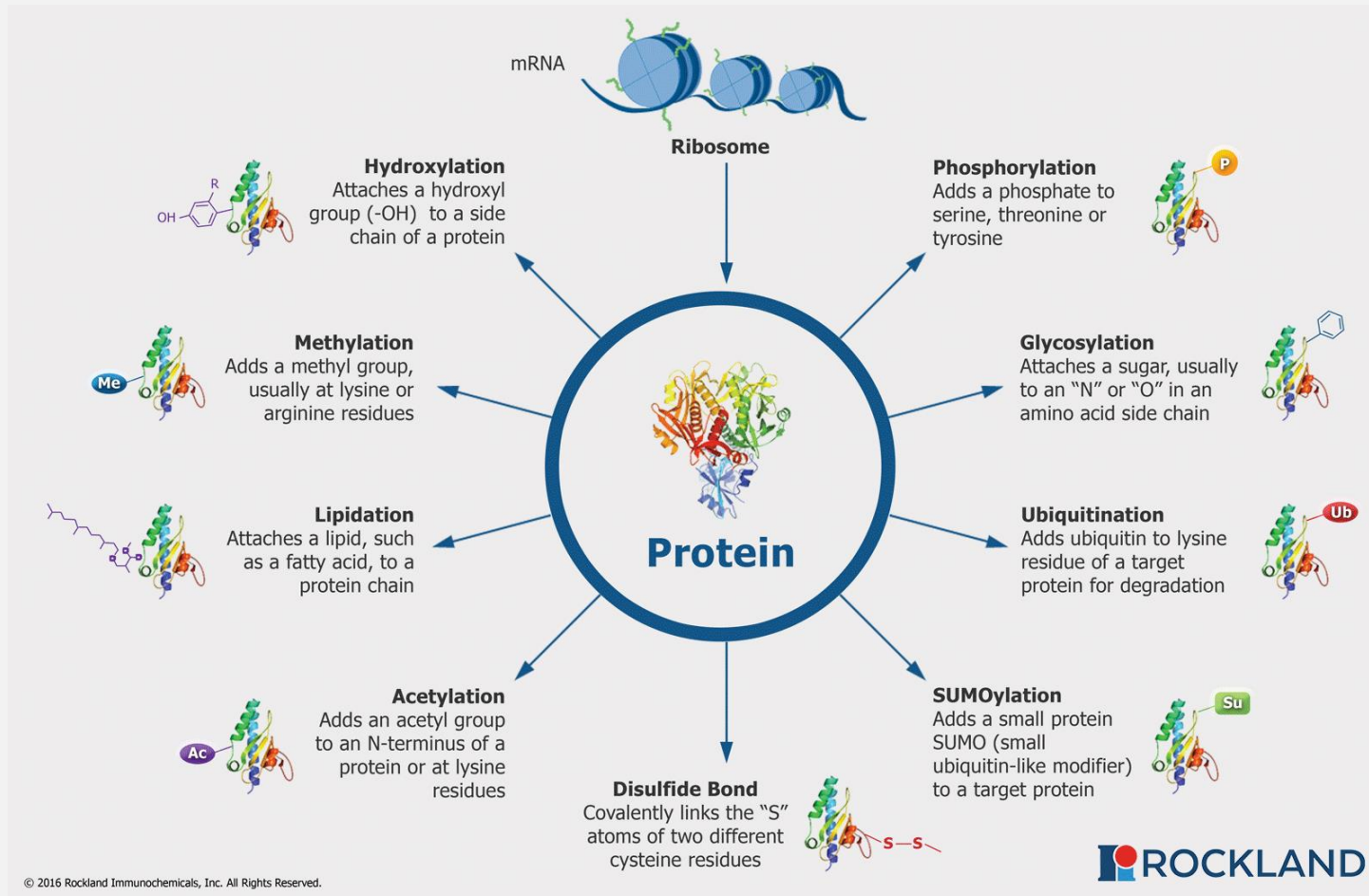
– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– **Post-translační modifikace (PTM)** – (Meziproteinové) interakce (PPI)

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

Posttranslační modifikace proteinů

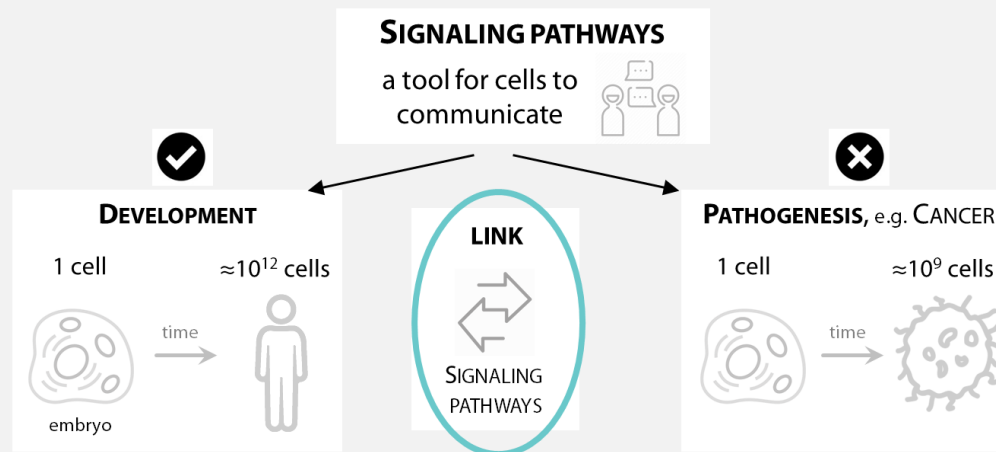


<https://www.rockland.com/>

Posttranslační modifikace proteinů

Co jsou PTM a jaká je jejich funkce při embryogenezi?

- Modifikace postranních řetězců aminokyselin v proteinech (pomocí enzymů)
- Velká diverzita proteomu
- Význam mj. pro diagnostiku chorob:



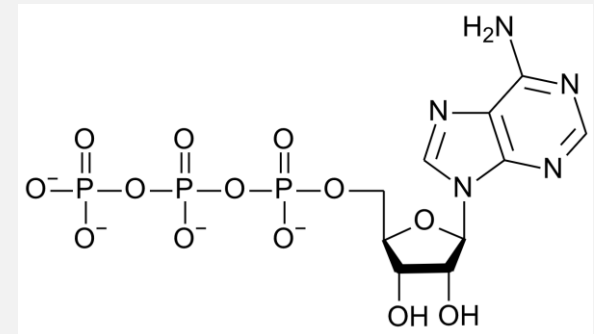
Posttranslační modifikace proteinů

a) Fosforylace

- První popsaná PTM proteinů (Eugene P. Kennedy, 1954)
- Reverzibilní (enzymy: fosfatázy)
- Připojení malé anorganické skupiny PO_4^{3-}
- Aminokyseliny: Ser, Thr, Tyr
- Enzymy: Kinázy + ATP (subs. a zároveň zdroj E)
- Funkce: regulace + signalizace (sign. dráhy)



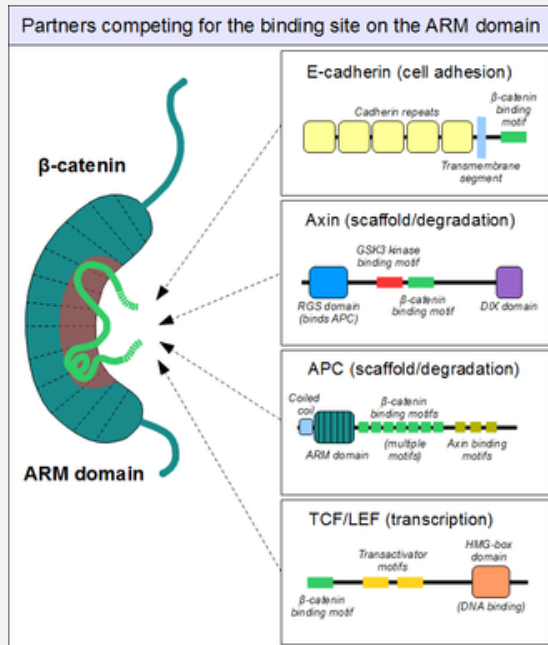
Molekula ATP



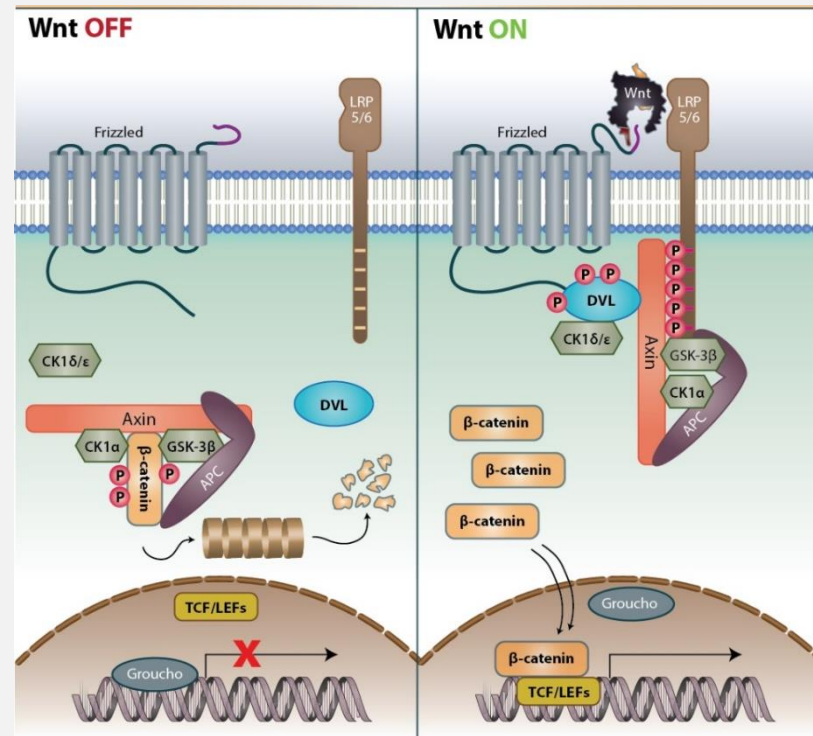
Posttranslační modifikace proteinů

a) Fosforylace

- Př. DVL + CK1 (viz minule)
- Př. beta-katenin (fosforylace mění konformaci)



www.wikipedia.org

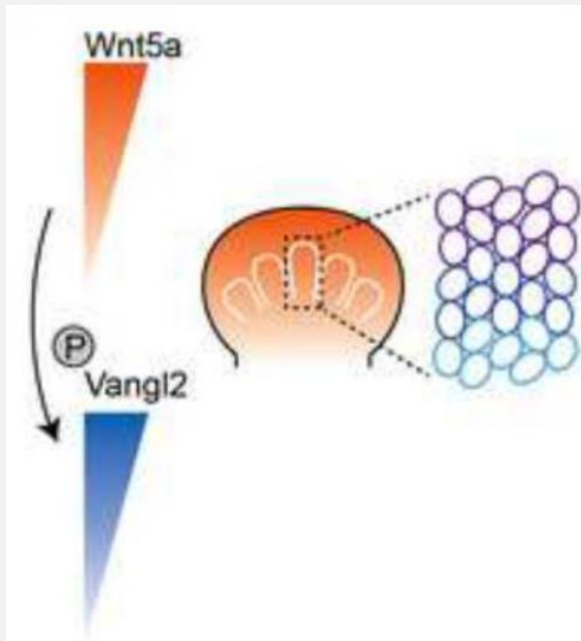


Made by James Harnos

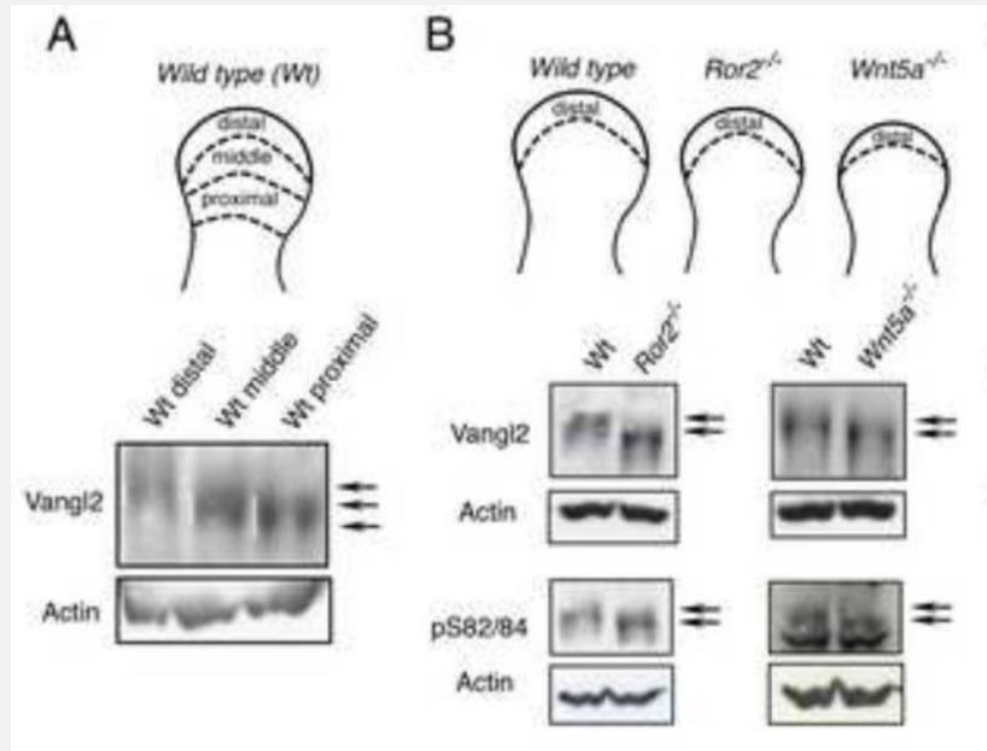
Posttranslační modifikace proteinů

a) Fosforylace

- Př. z *Vývoj. biologie*: fosforylace při růstu končetin



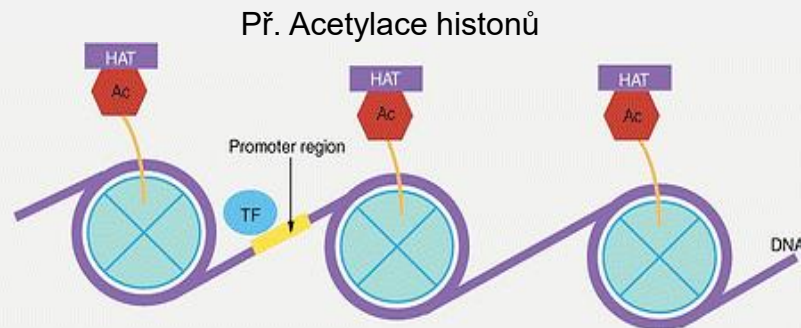
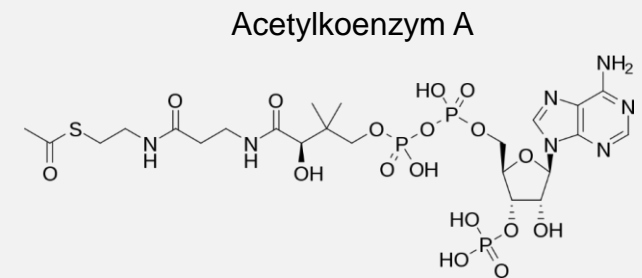
Gao *et al.*, 2011.
Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing **Vangl2 phosphorylation** through Ror2.
Dev Cell.



Posttranslační modifikace proteinů

b) Acetylace

- 3 typy
- Reverzibilní/ireverzibilní (enzymy: deacetylázy)
- Připojení zbytku kyseliny octové (CH_3COO^-)
- Aminokyseliny: Lys
- Enzymy: Acetyltransferázy + acetylkoenzym A (subs.) + ATP
- Funkce: regulace buněčného cyklu, stabilita chromatinu, meziproteinové interakce

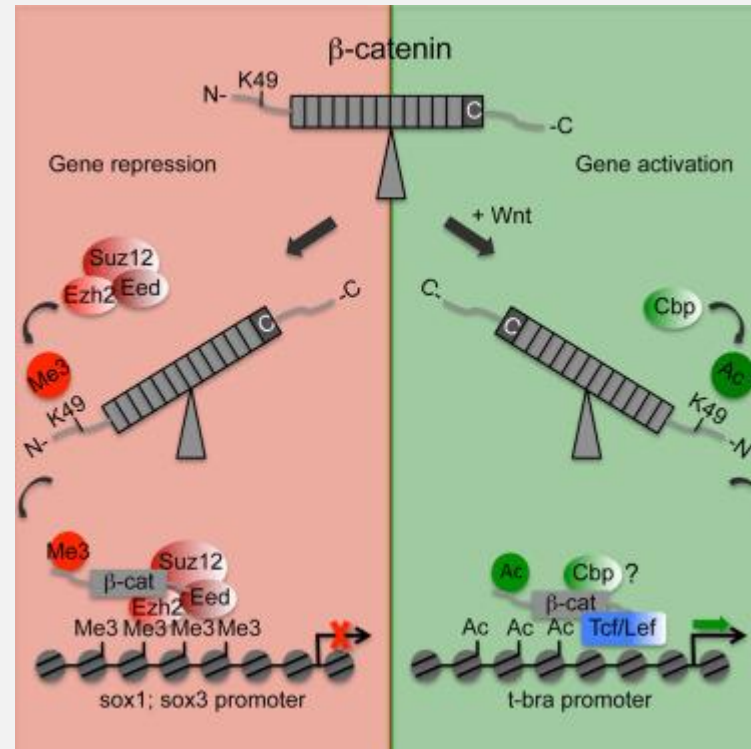


Posttranslační modifikace proteinů



b) Acetylace

- Příklad: obecně histony (potom snadná vazba TF například z rodiny TCF/LEF, na uvolněnou DNA)
- Příklad: samotný beta-kenin

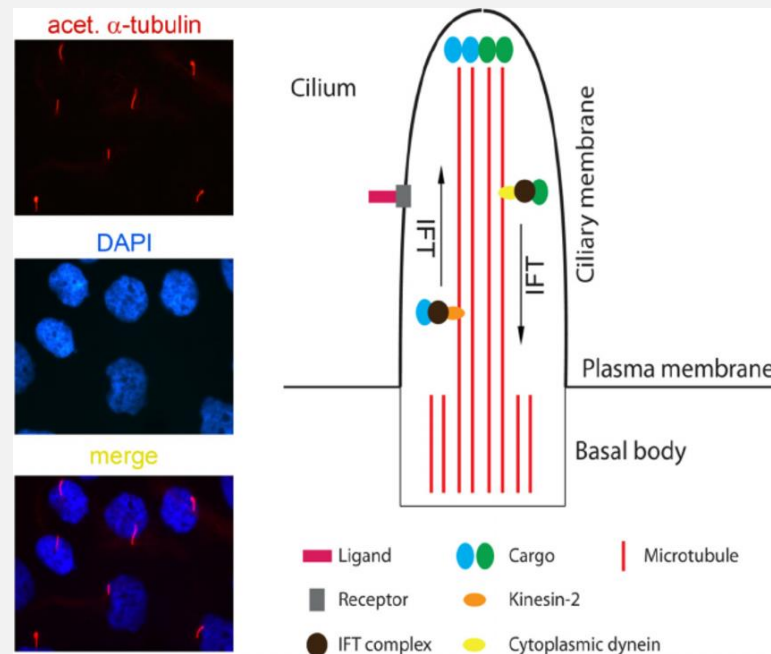


Hoffmeier *et al.*, 2017.
Trimethylation and Acetylation of β -Catenin at Lysine 49
Represent Key Elements in ESC Pluripotency.
Cell Rep.

Posttranslační modifikace proteinů

b) Acetylace

- Př. z *Vývoj. biologie*: acetylace primárních cilií



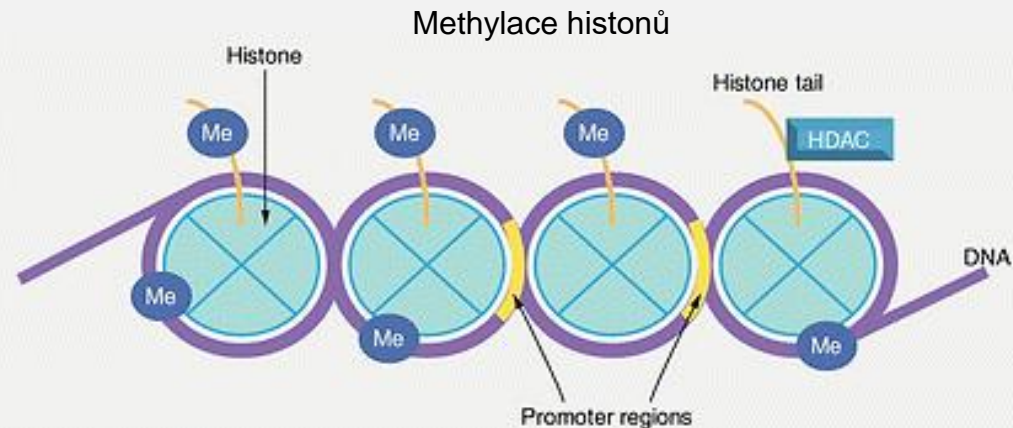
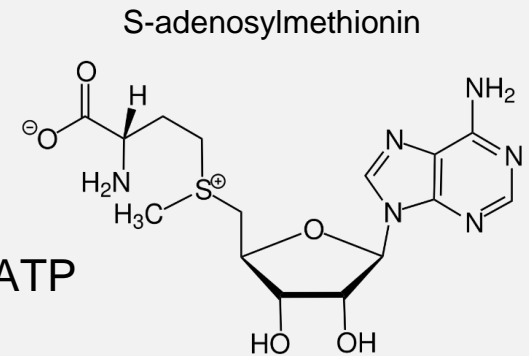
Nakakura T *et al.* 2015

The **elongation of primary cilia via the acetylation of α -tubulin** by the treatment with lithium chloride in human fibroblast KD cells. *Med Mol Morphol.*

Posttranslační modifikace proteinů

c) Methylace

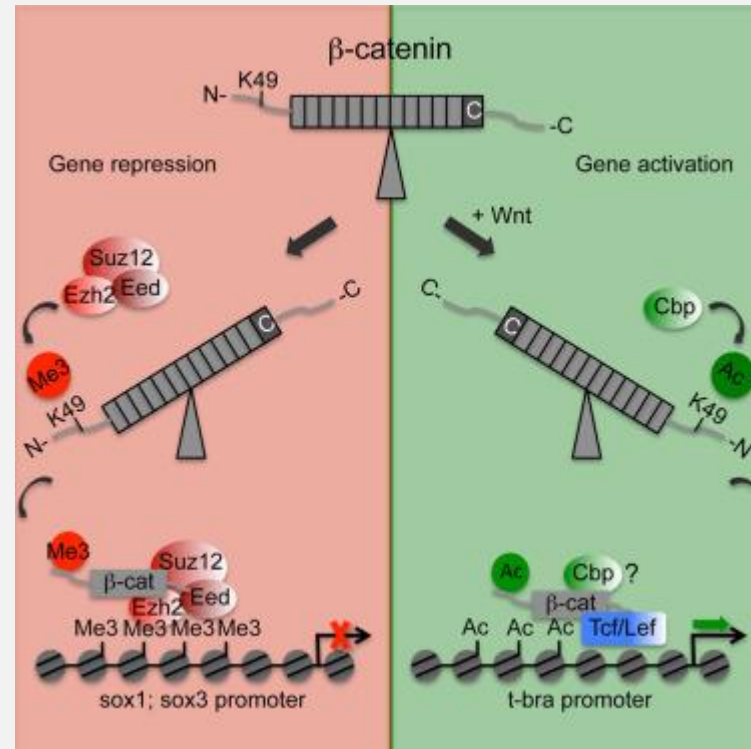
- Reverzibilní (enzymy: demethylázy)
- Enzymy: Methyltransferázy + S-adenosylmethionin (subs.) + ATP
- Připojení CH₃ skupiny (hydrofobní)
- Aminokyseliny: Arg, Lys
- Funkce: epigenetické regulace u jaderných proteinů



Posttranslační modifikace proteinů

c) Methylace

- Příklad: obecně histony (= zastavení transkripce například WNT genů)
- Příklad: samotný beta-kenin

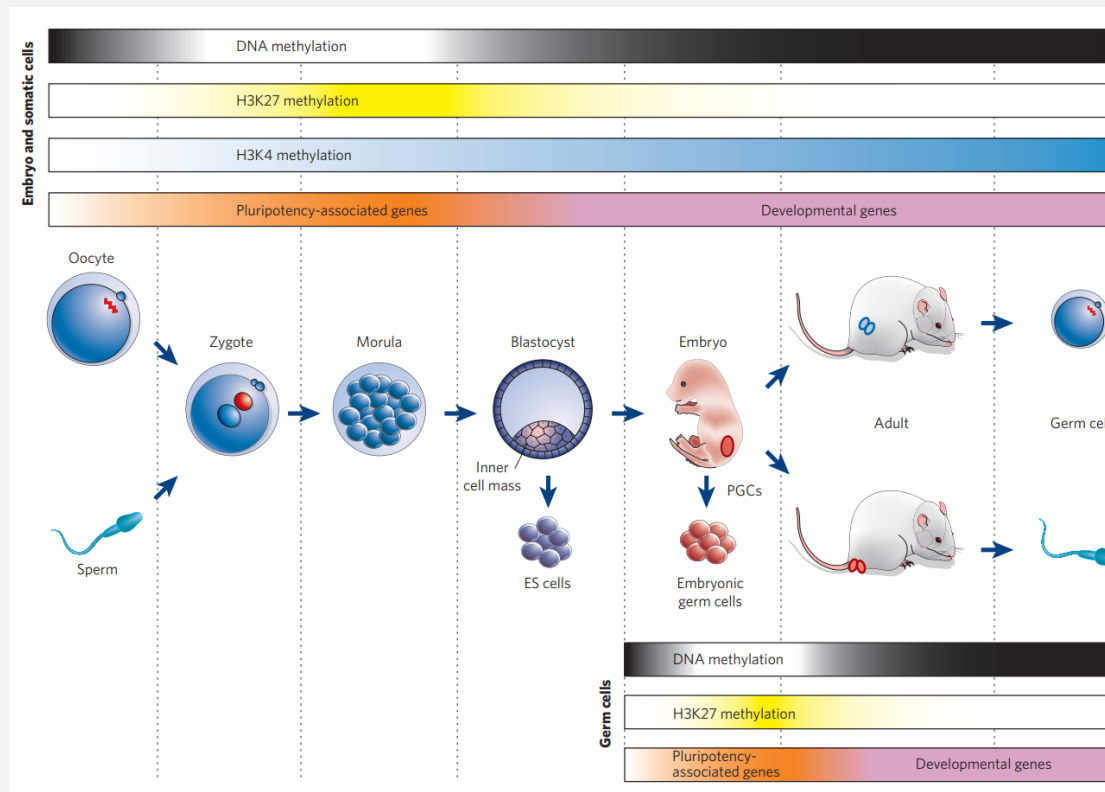


Hoffmeier *et al.*, 2017.
Trimethylation and Acetylation of β -Catenin at Lysine 49
Represent Key Elements in ESC Pluripotency.
Cell Rep.

Posttranslační modifikace proteinů

c) Methylace

- Př. z *Vývoj. biologie*: methylace histonů během embryogeneze



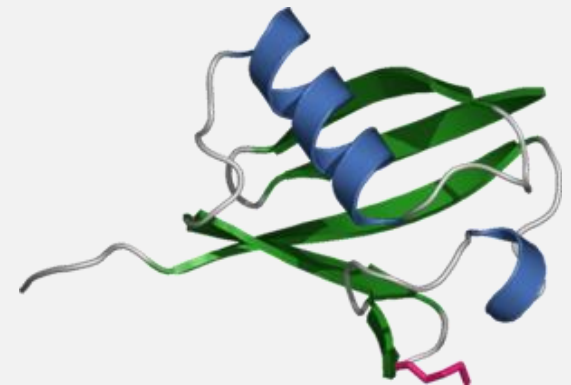
Reik, W. 2007
Stability and flexibility
of epigenetic gene
regulation in
mammalian
development.
Nature

Posttranslační modifikace proteinů

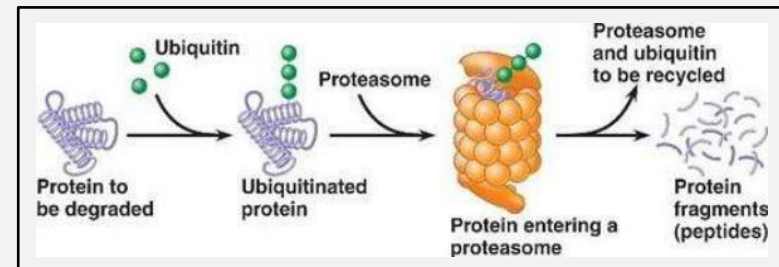
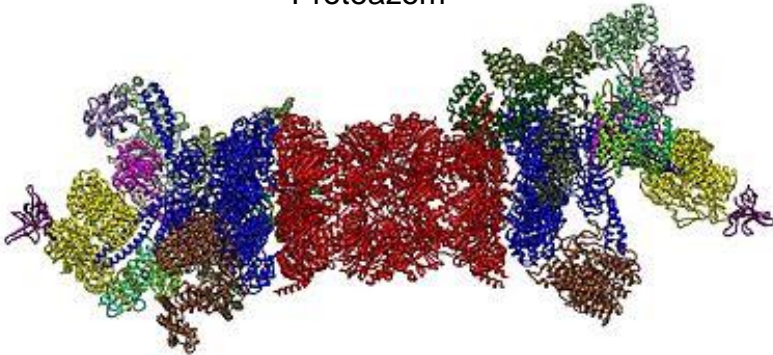
d) Ubikvitinace

- Reverzibilní (enzymy: deubikvitinázy – DUB)
- Připojení ubiquitinu (malý protein, ≈ 80 aa, 8 kDa)
- Komplex enzymů (E1-E3) + ubiquitin (subs.) + ATP
- Aminokyseliny: Lys
- Funkce: označení proteinů pro degradaci v proteazomu

Ubikvitin



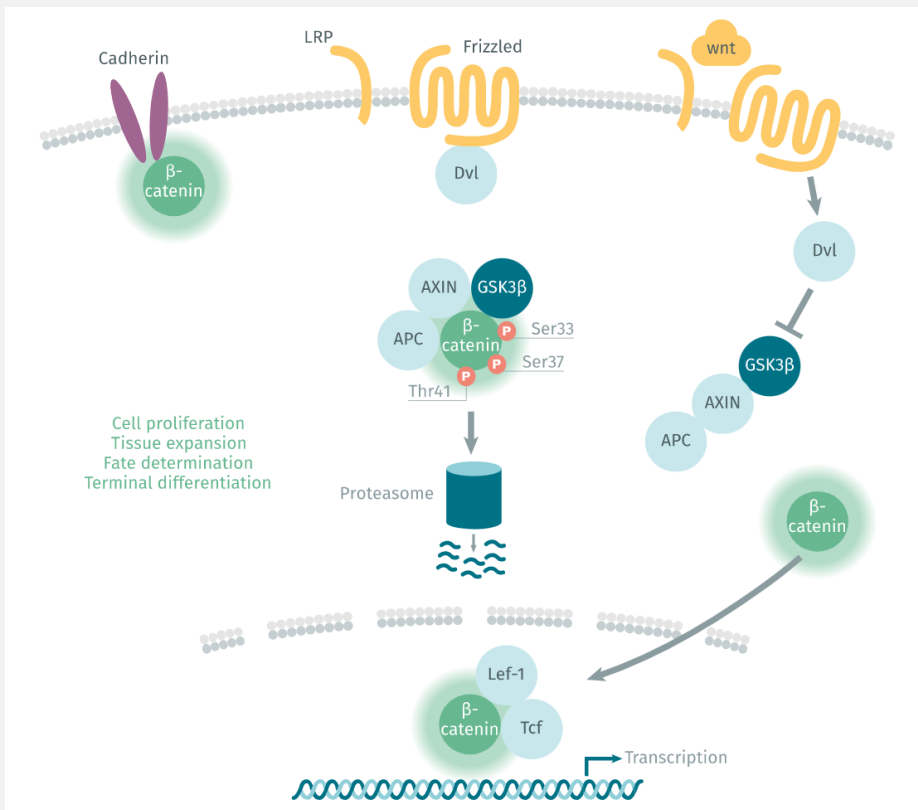
Proteazom



Posttranslační modifikace proteinů

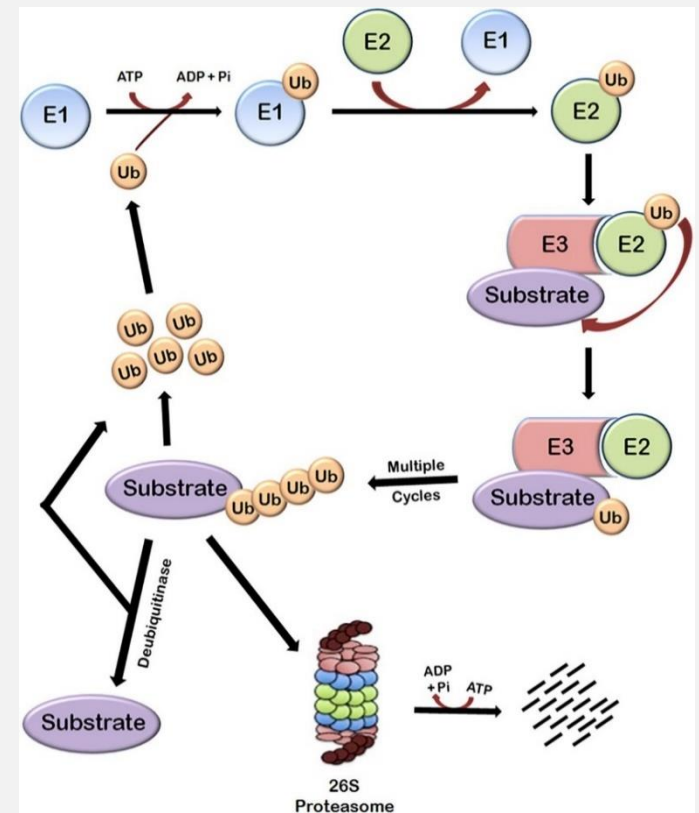
d) Ubikvitinace

– Př. beta-katenin



www.cisbio.eu

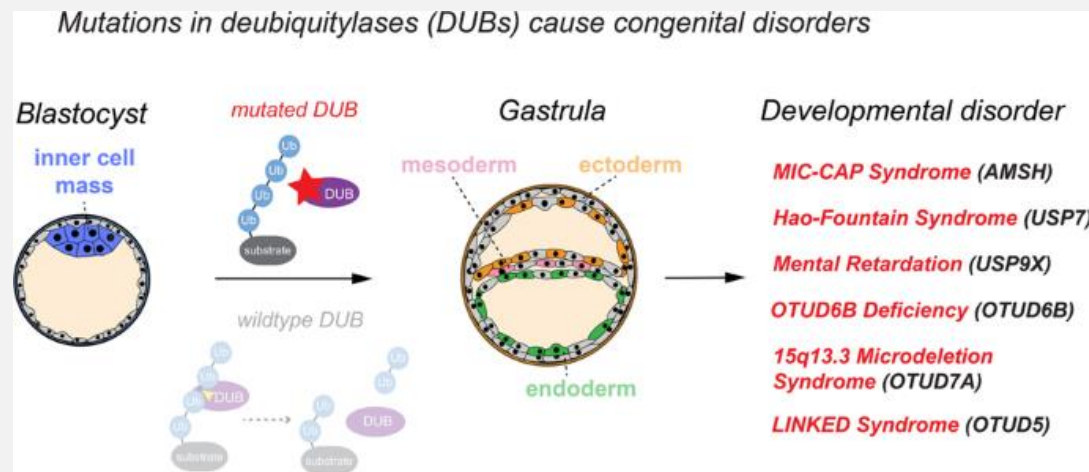
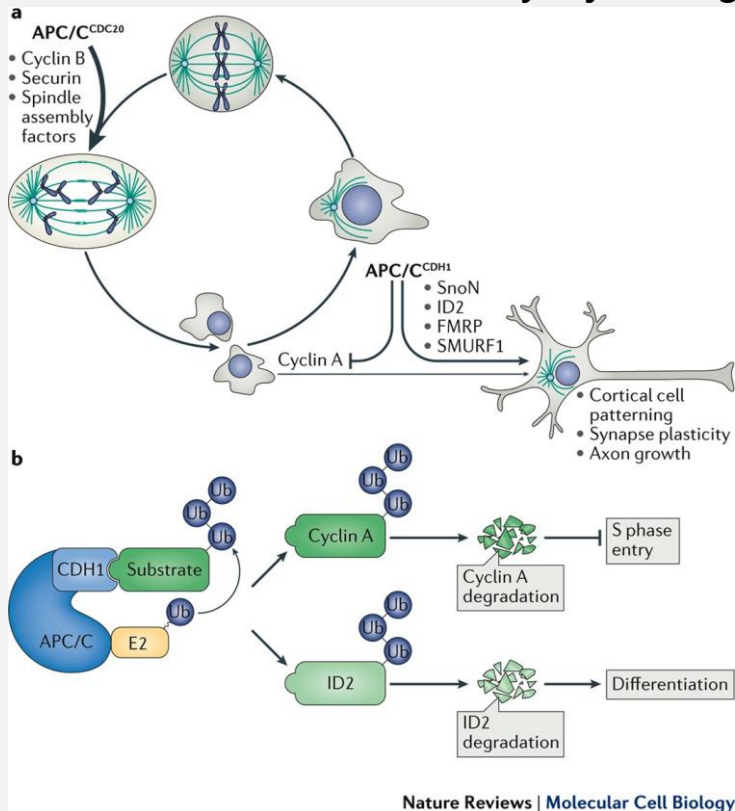
Kaskáda enzymů E1-E3



Posttranslační modifikace proteinů

d) Ubikvitinace

– Př. z *Vývoj. biologie*: buněčný cyklus (a chyby v něm)



Rape M. 2018
Ubiquitylation at the
crossroads of development
and disease.
Nat Rev Mol Cell Biol.

Posttranslační modifikace proteinů

e) SUMOylace

- Reverzibilní (desumoylační enzymy)
- Připojení molekuly SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier protein, ≈100aa, 12 kDa)
- Enzymy: kaskáda E1-E3 (podobně jak u ubikvitinace)
+ SUMO (subs.) + ATP
- Aminokyseliny: Lys
- Funkce: zvyšuje stabilitu proteinu (ovlivňuje buň. signalizaci, expresi genů, buněčný cyklus)

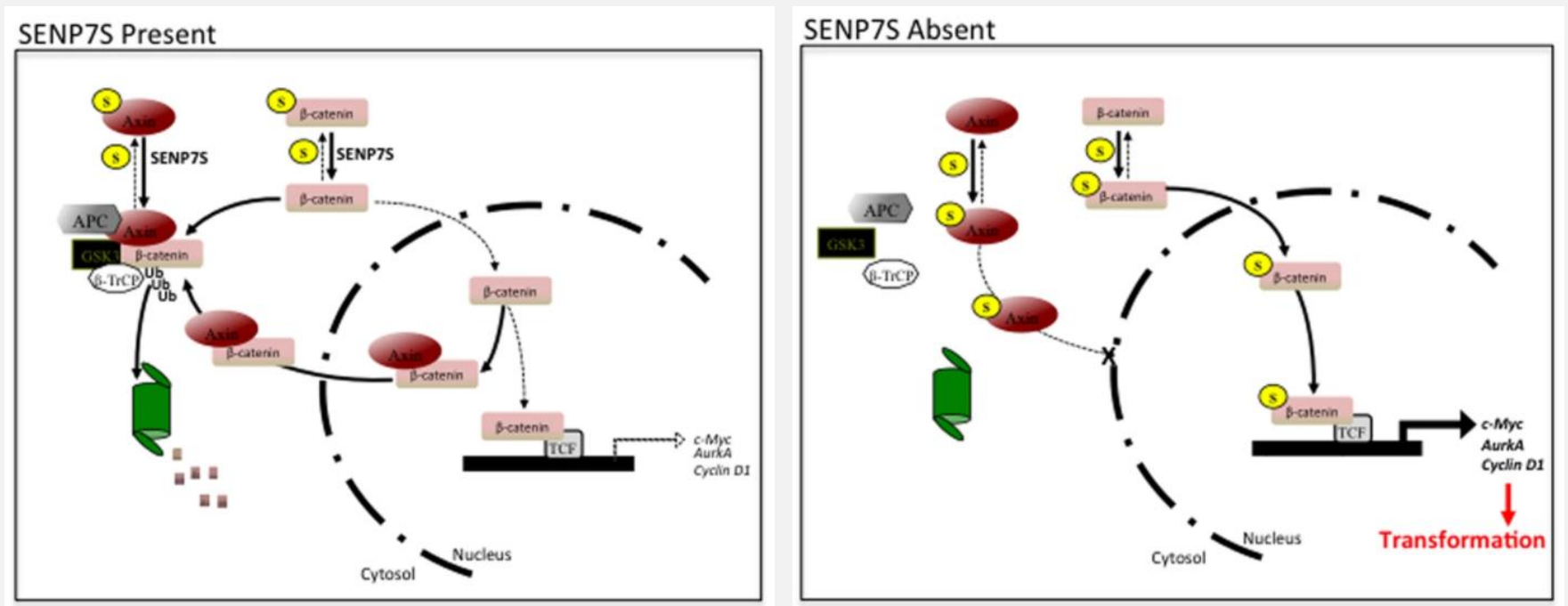
SUMO (z angl. Small Ubiquitin-like Modifier)



Posttranslační modifikace proteinů

e) SUMOylace

– Př. beta-katenin (nebo Axin)



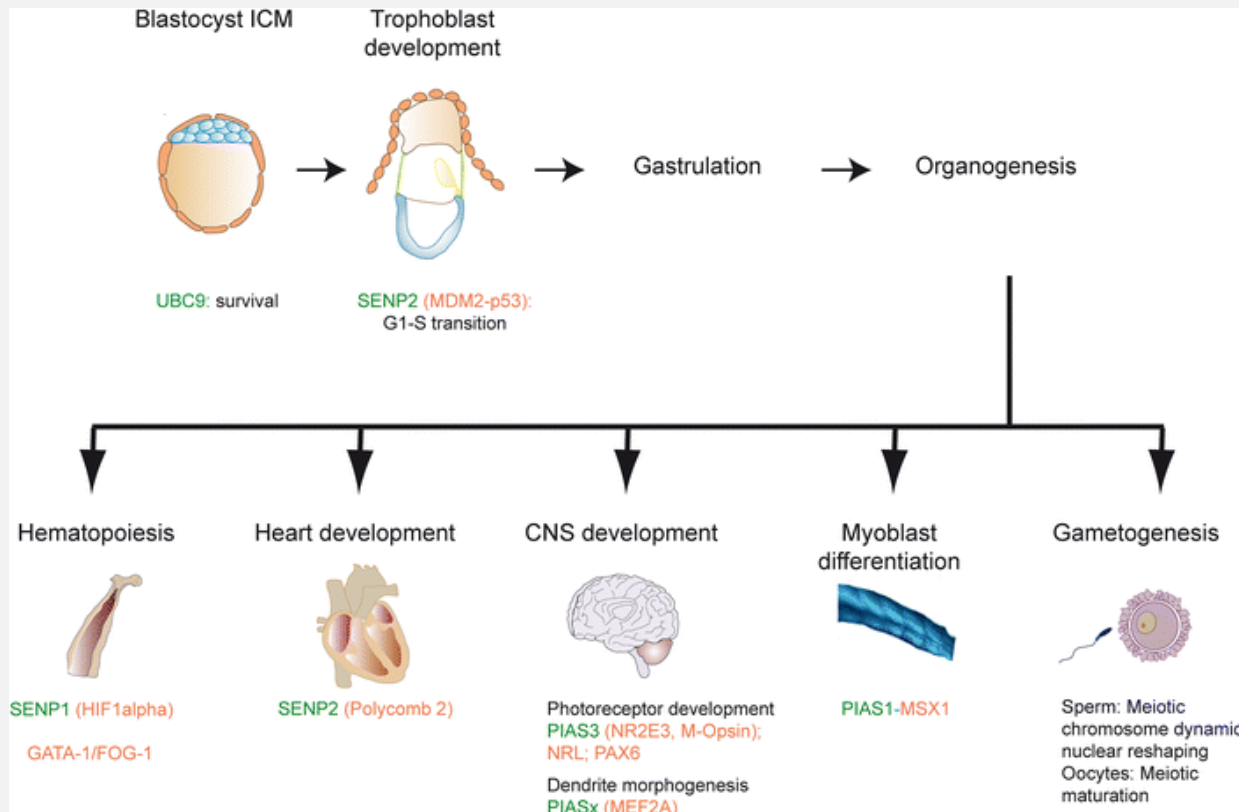
Karami *et al.*, 2017.

Novel SUMO-Protease SENP7S Regulates β -catenin Signaling and Mammary Epithelial Cell Transformation.
Sci Rep.

Posttranslační modifikace proteinů

e) SUMOylace

– Př. z *Vývoj. biologie*:

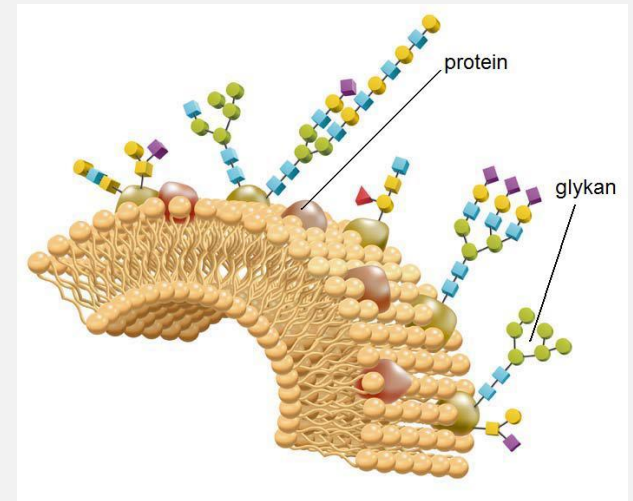


Lomelí H, Vázquez M. 2011
Emerging roles of the SUMO
pathway in development.
Cell Mol Life Sci.

Posttranslační modifikace proteinů

f) Glykosylace

- 6 typů (N-, O-, C-,)
- Reverzibilní (glykosidázy)
- Navázání molekuly sacharidu
- Enzymy: Glykosyltransferázy + monosacharidy/polysacharidy (subs.) + ATP
- Aminokyseliny: N-gly... (Asp, Arg), O-gly... (Ser, Thr, Tyr), C-gly... (Try)
- Funkce: buněčný transport, komponenty buněčného povrchu, sekretované proteiny



Posttranslační modifikace proteinů

f) Glykosylace

– Příklad: WNT ligand

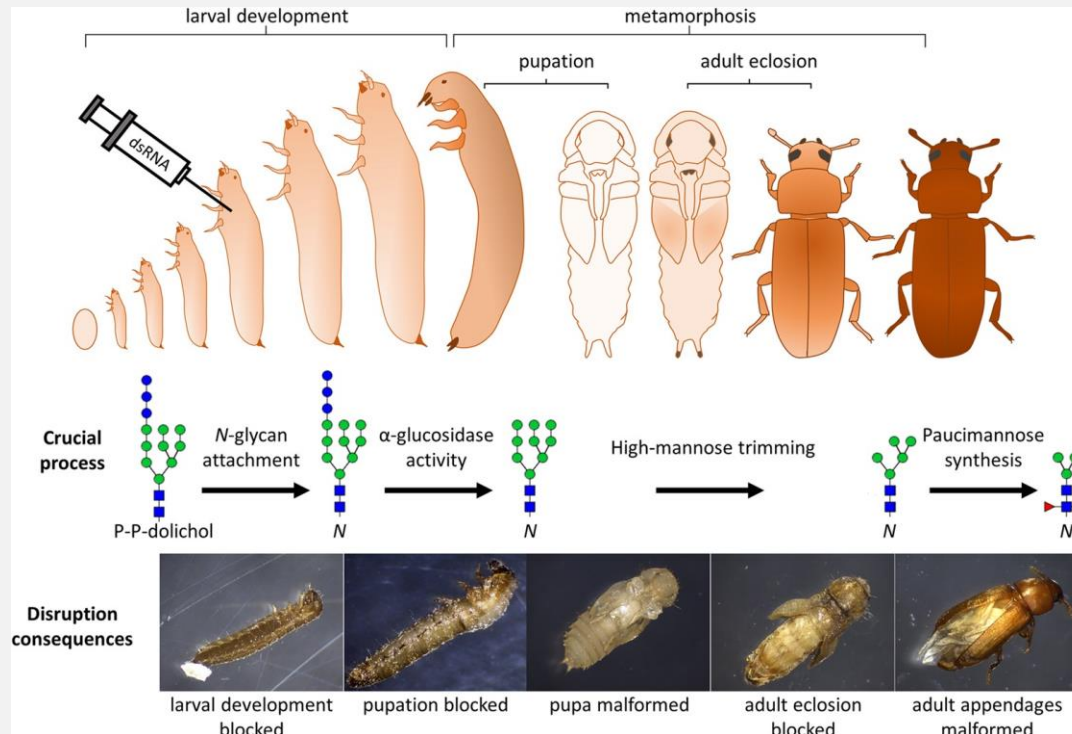


Více info – viz lipidace dále

Posttranslační modifikace proteinů

f) Glykosylace

- Př. z *Vývoj. biologie*: embryonální vývoj u *Tribolium castaneum*

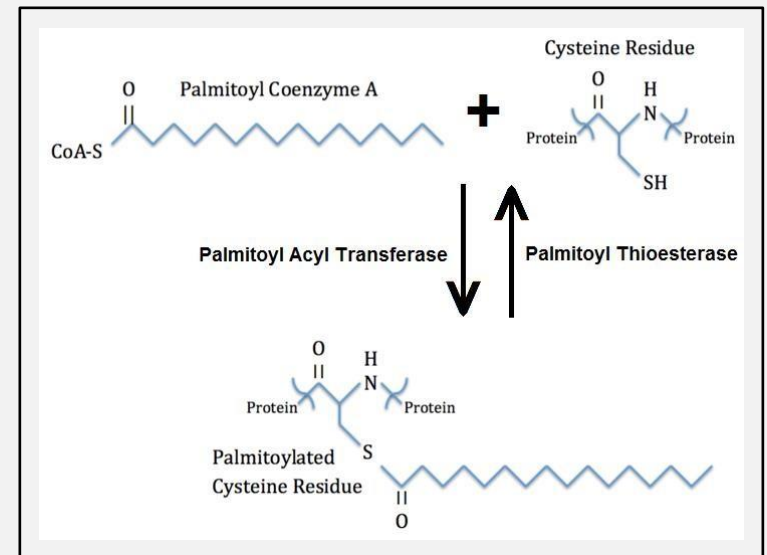


Walski T, *et al.* 2016
Protein N-glycosylation and N-glycan trimming are required for postembryonic development of the pest beetle *Tribolium castaneum*.
Sci Rep.

Posttranslační modifikace proteinů

g) Lipidace

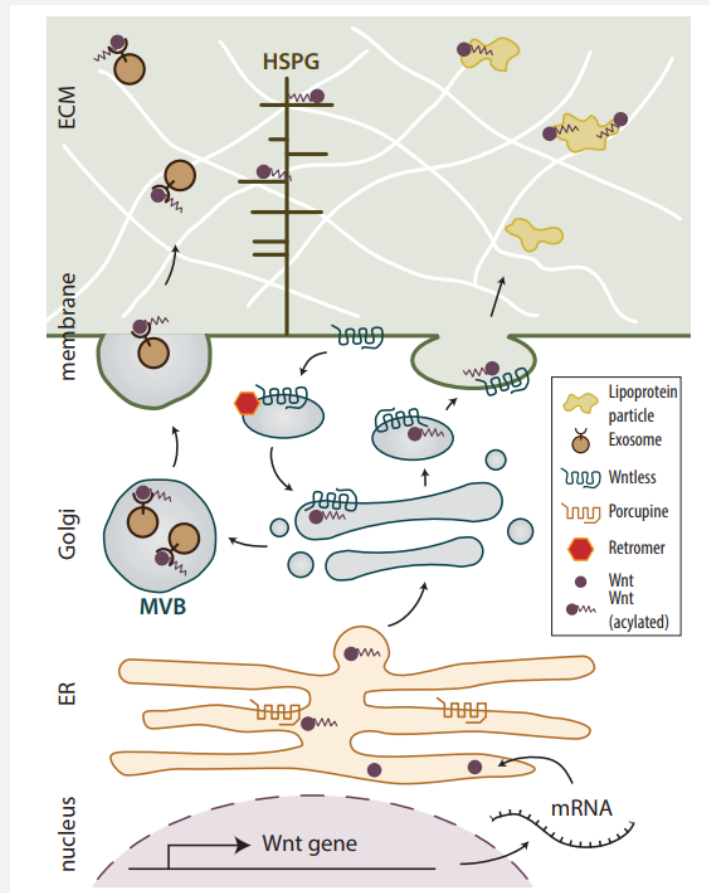
- Reverzibilní (glykosidázy)
- Připojení vyšší mastné kyseliny (amfifilní charakter)
- Aminokyseliny: Cys, nebo **Cys-Alif-Alif-X**
- Enzymy: lipázy/acyl transferázy + acyl (subs.) + ATP
- Funkce: buněčný transport, součást buněčných membrán



Posttranslační modifikace proteinů

g) Lipidace

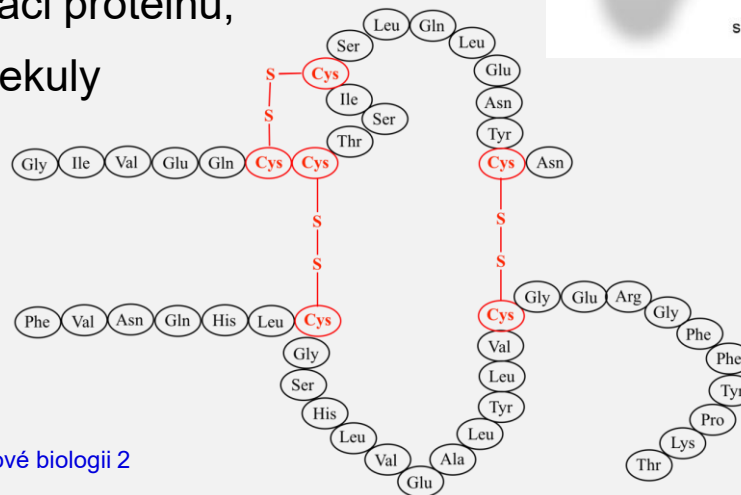
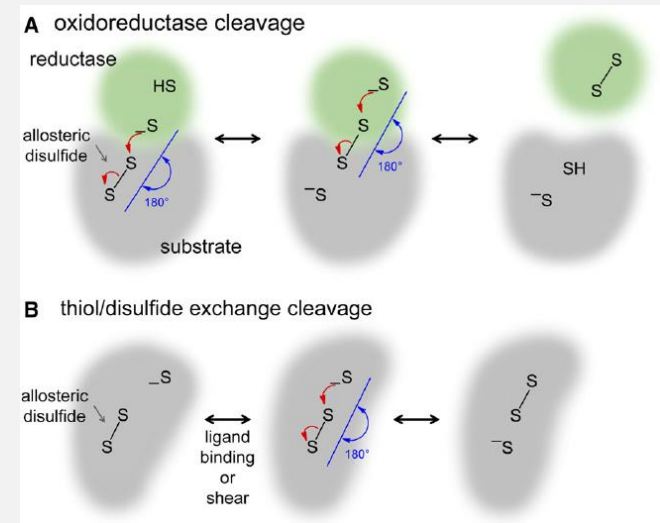
– Příklad WNT ligand



Posttranslační modifikace proteinů

h) Disulfidická vazba

- Z angl. *cysteine bridges*
- Reverzibilní (viz vpravo)
- Vazba mezi dvěma atomy síry
- Enzymy: Dsb + ATP (žádný substrát: oxidace)
- Aminokyseliny: 2x Cys
- Funkce: vliv na 3D konformaci proteinů, obecně zvyšují stabilitu molekuly



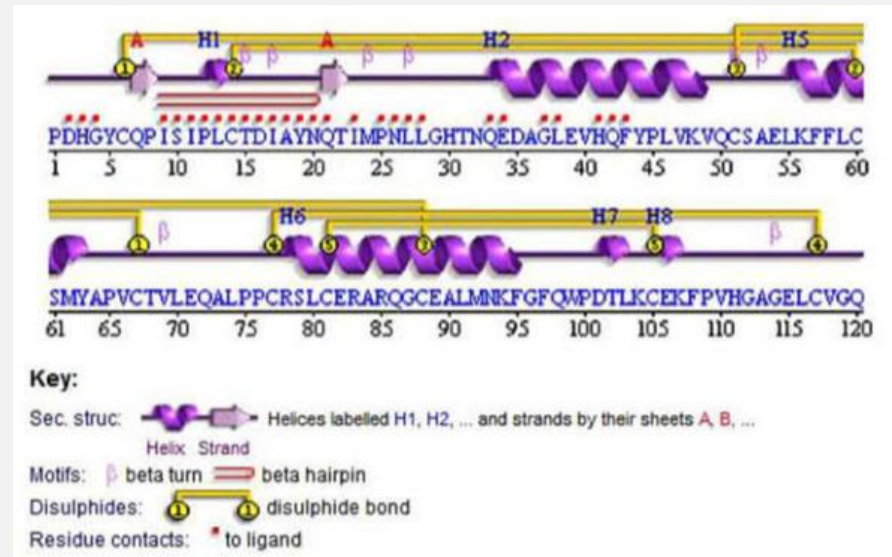
Posttranslační modifikace proteinů

h) Disulfidická vazba

– Př. WNT ligand



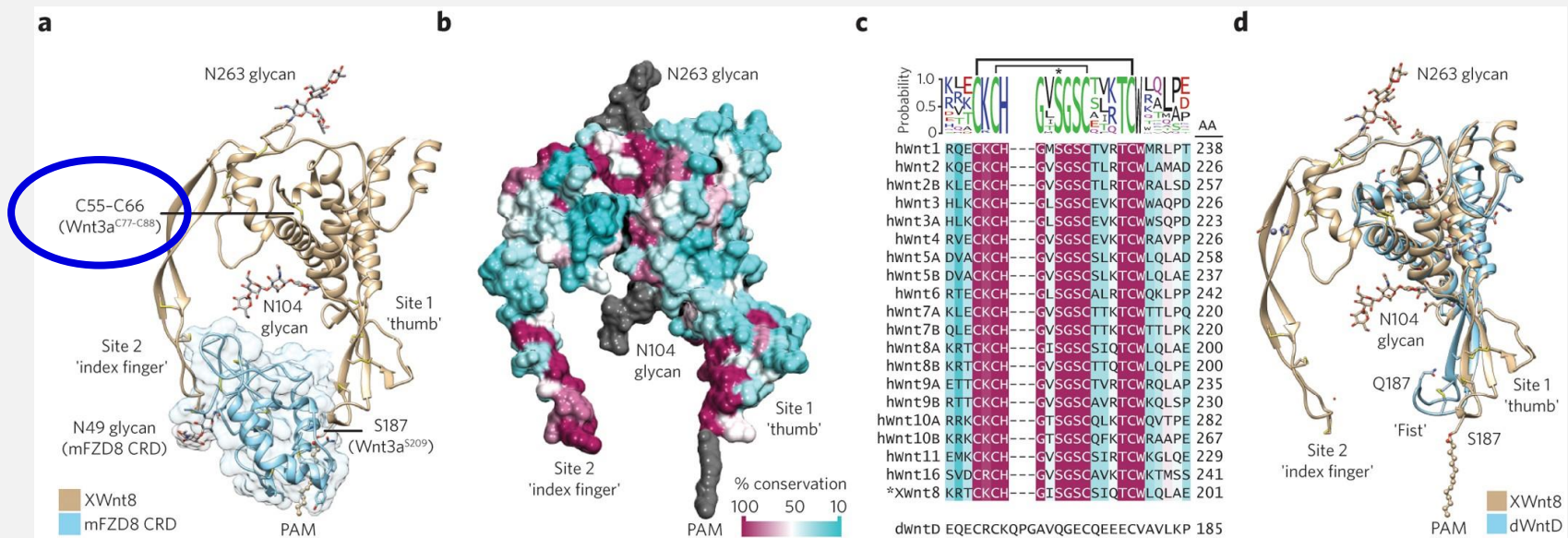
MacDonald et al., 2014
Disulfide Bond Requirements for Active Wnt Ligands
JBC



Posttranslační modifikace proteinů

h) Disulfidická vazba

– Př. WNT ligand (+ glykosylace + lipidace)



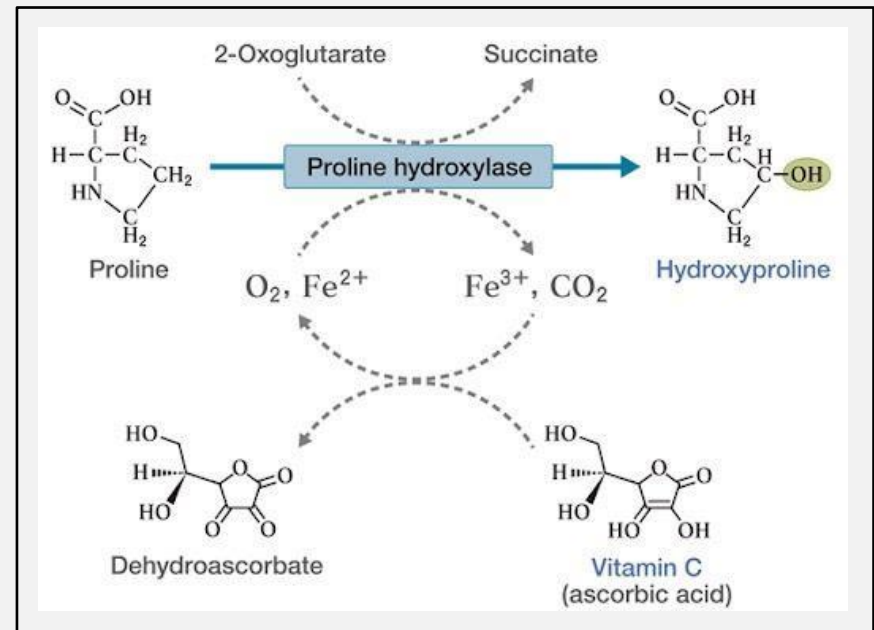
MacDonald et al., 2014

Disulfide Bond Requirements for Active Wnt Ligands
JBC

Posttranslační modifikace proteinů

i) Hydroxylace

- Reverzibilní
- Připojení OH skupiny (možnost tvorby H-můstků)
- Enzymy: hydroxalázy + 2-oxoglutarát (subs.) + ATP
- Aminokyseliny: Pro
- Funkce: vliv na strukturu, umožňuje vyšší rozpustnost ve vodě



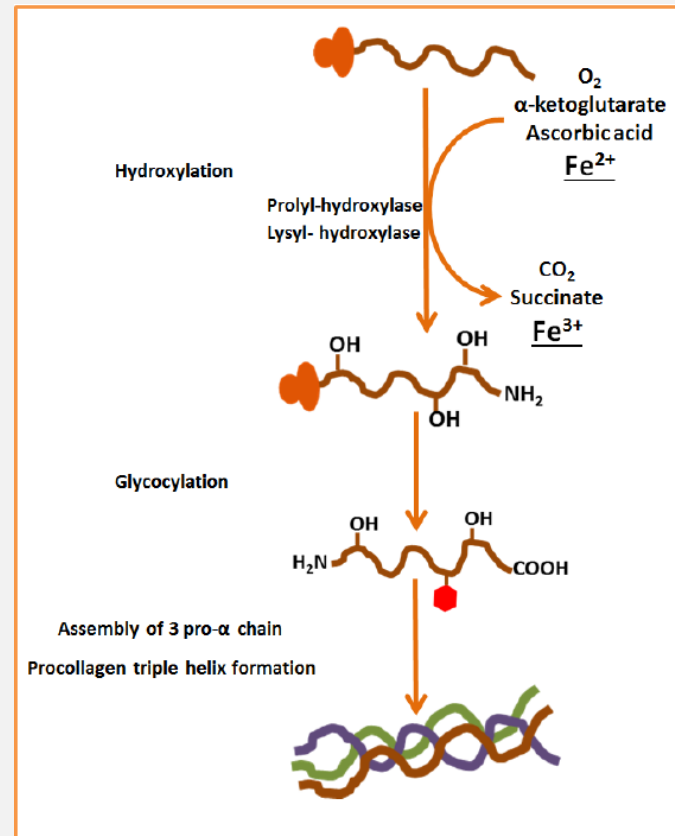
Posttranslační modifikace proteinů

i) Hydroxylace

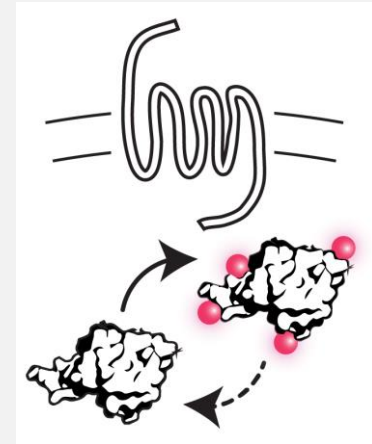
– Př. tentokrát mimo buň. signalizaci

Kolagen:

Vliv PTM (hydroxylace) na strukturu proteinu – vznik H-můstků: elasticita



Osnova



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

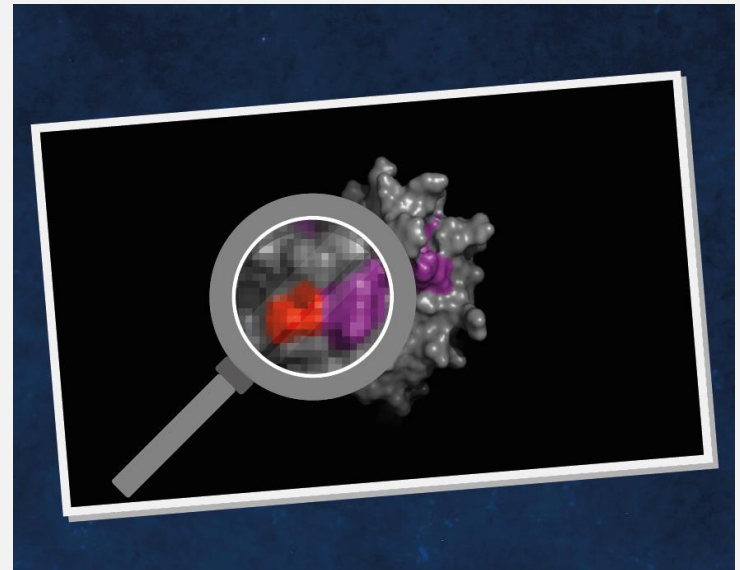
– Post-translační modifikace (PTM) – **(Meziproteinové) interakce (PPI)**

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

Proteinové interakce

- Interakce dvou nebo více proteinů
- Biologický význam interakcí
- Chemická podstata interakcí
- Reverzibilita a specifita interakce

- Poznání funkce daného proteinu
(Studium fyziologických procesů)

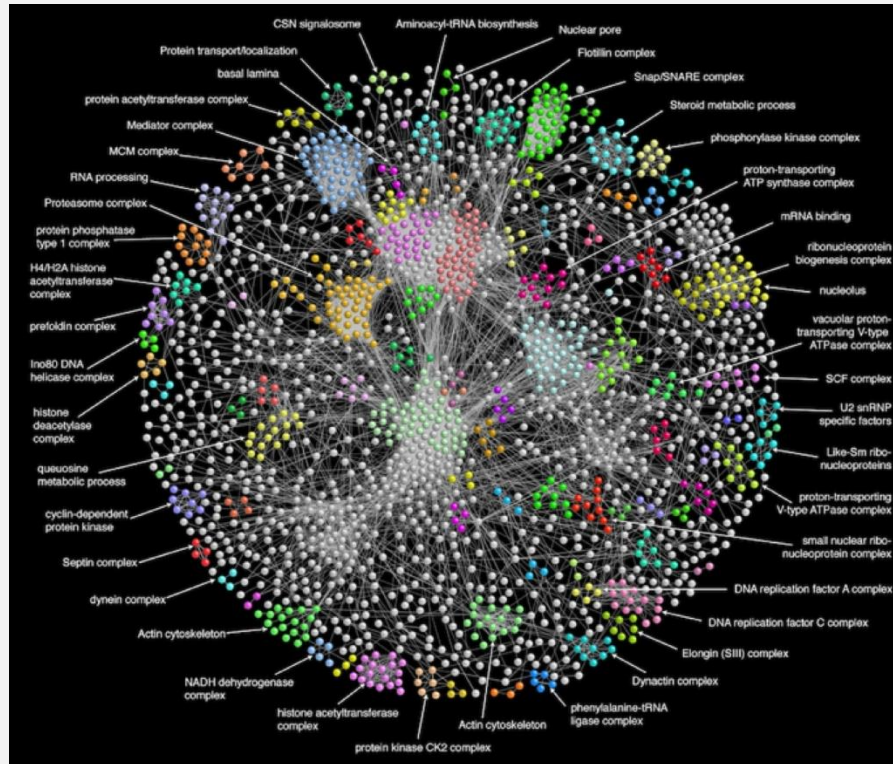


Made by James Harnos

Proteinové interakce

- Role v embryogenezi

Elucidation of the Protein Interactome of *Drosophila melanogaster*

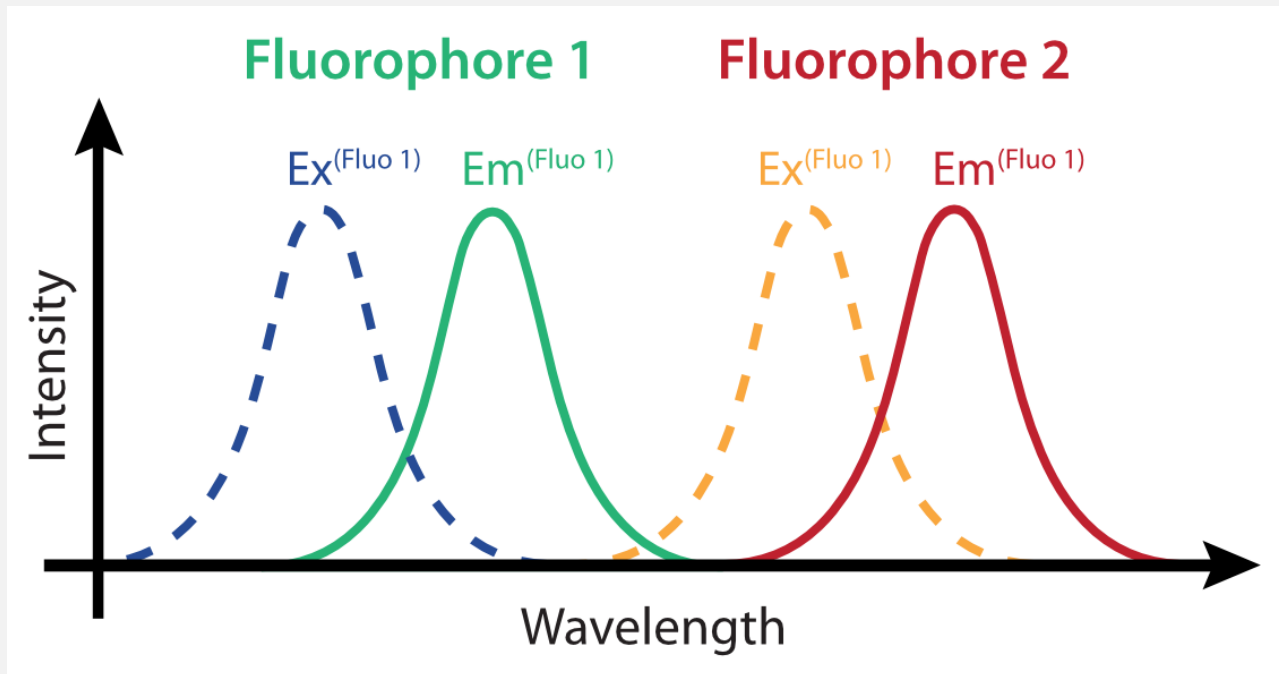


Guruharsha, *et al.* 2011.

A protein complex network of *Drosophila melanogaster*.
Cell

Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

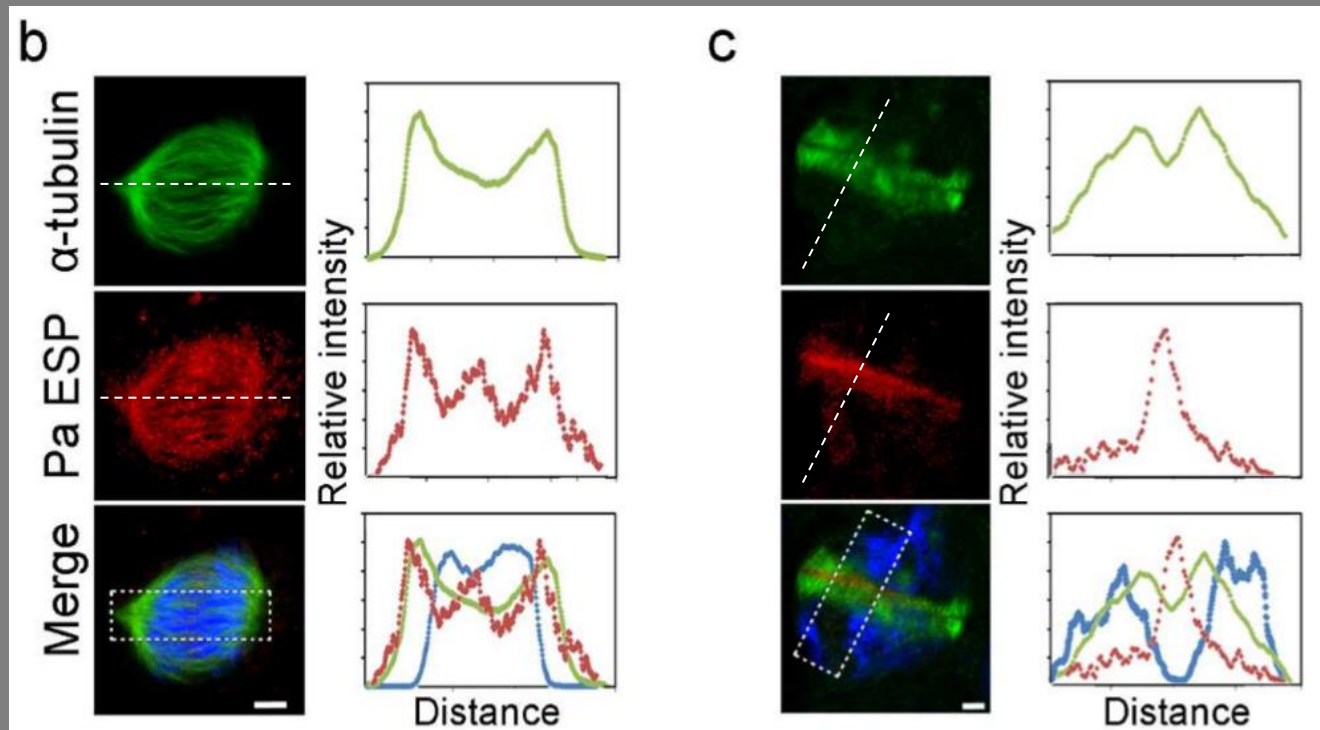
– Fluorescence: podmínka 1



<https://www.creative-proteomics.com/>

Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

– Fluorescence:

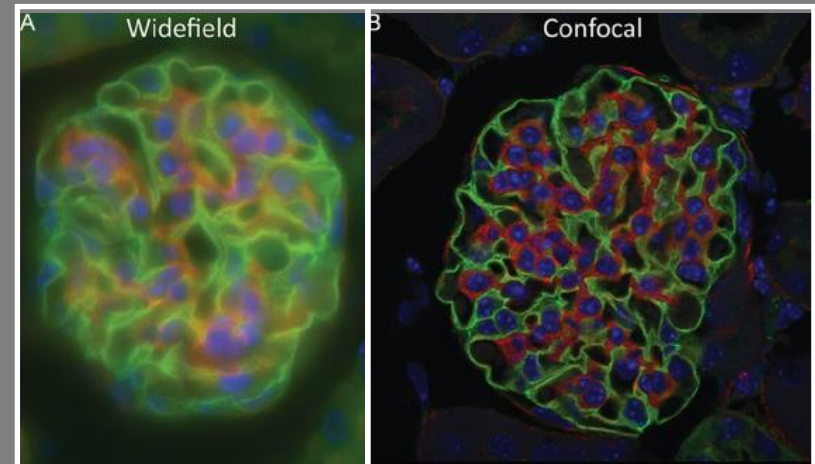
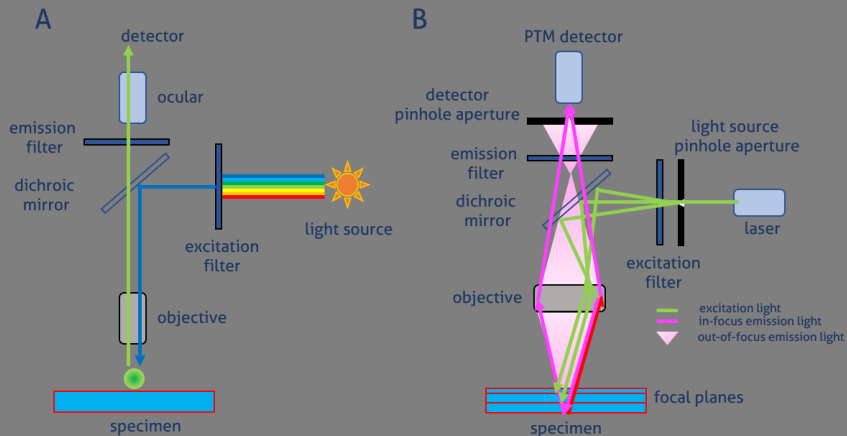


University of Uppsala

Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

– Fluorescence: podmínka 2

- A) Světelná mikroskopie se širokým zorným polem („wide-field“)
vs. **B) konfokální mikroskopie**



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

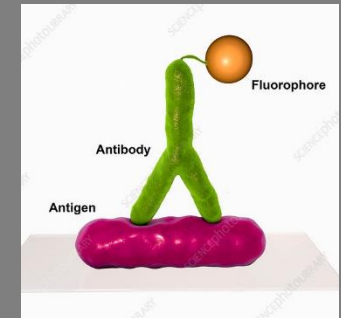
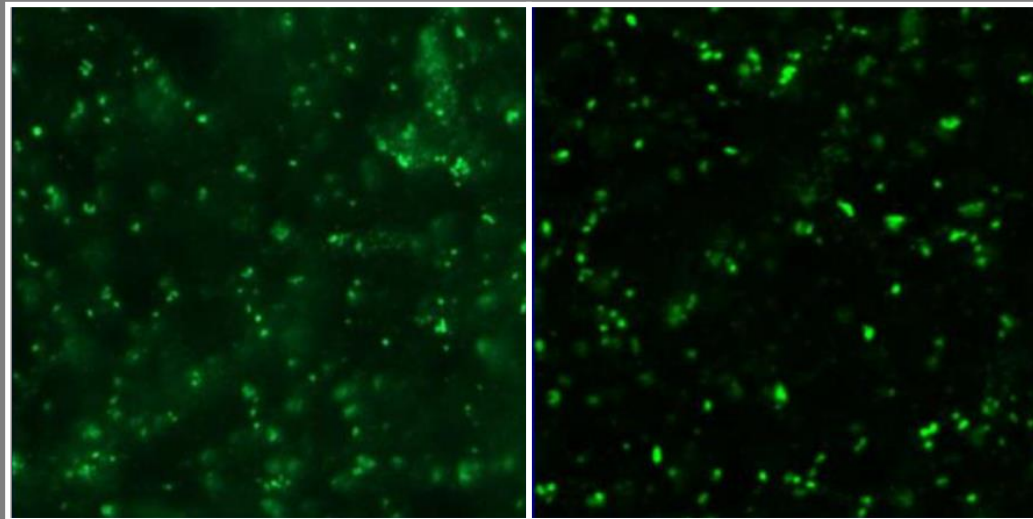
Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

– Fluorescence: druhy

– **epi-fluorescence** VS. **imuno-fluorescence**

Princip: GFP a deriváty: [přednáška 12](#)

(značení **protilátkami**: [dnes](#))



Proteinové interakce: detekce

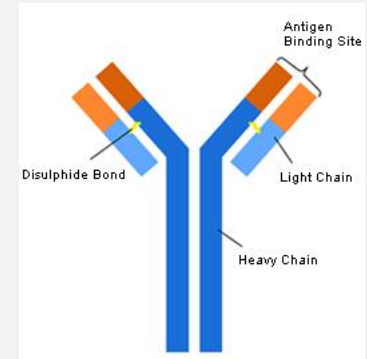
(ko-) lokalizace

– Immunofluorescence:

Protilátky:

- Adaptivní imunita
- Rozpoznání antigenů
- Proteinová povaha
- Vazba na protein našeho zájmu

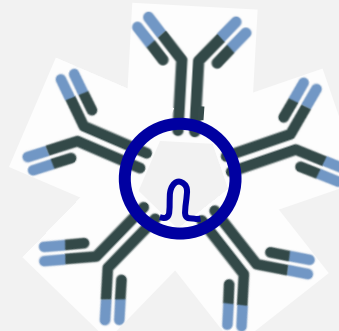
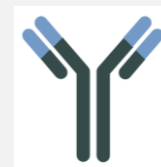
- Struktura – tvar Y
- Řetězce – těžký (H), lehký (L)
- Domény – variabilní, konstantní



POLYKLONÁLNÍ

MONOKLONÁLNÍ

– Třídy:

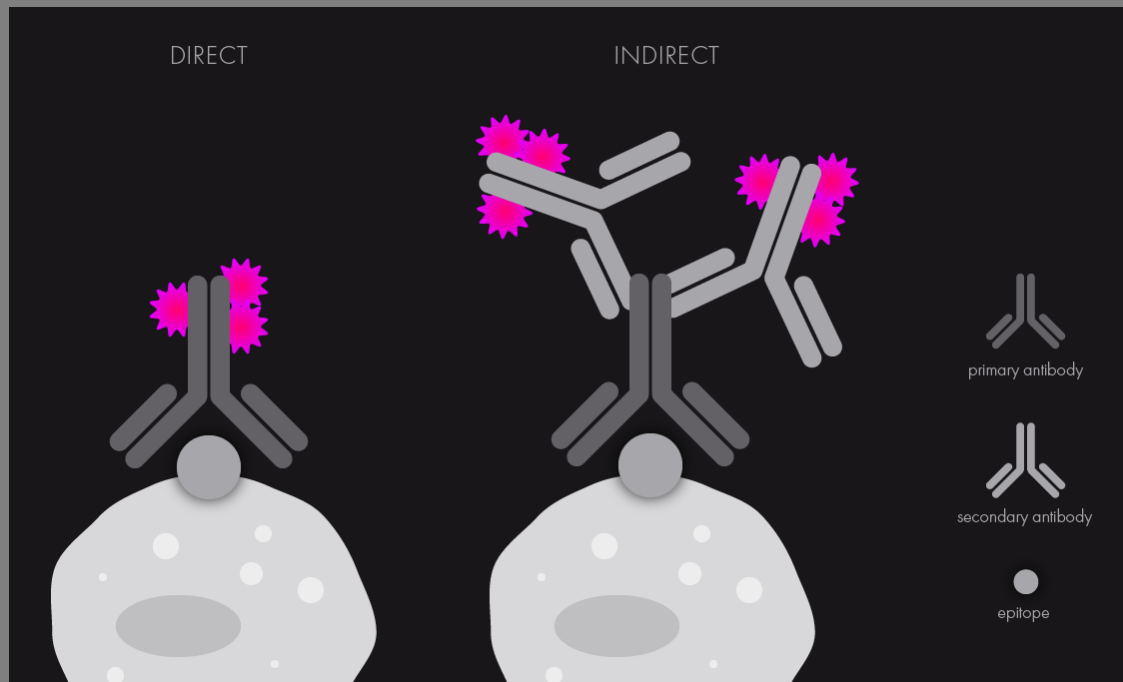


MUNI
SCI

Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

– **Imunofluorescence:**

Protilátky:



<https://www.oni.bio/>

Proteinové interakce: detekce

(ko-) lokalizace

– **Imunofluorescence:**

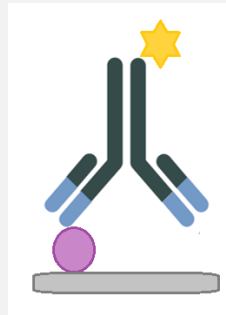
Protilátky:

Přímá detekce:

- Značená primární protilátka
- Původní metoda

+ rychlá

- méně univerzální, nižší intenzita signálu

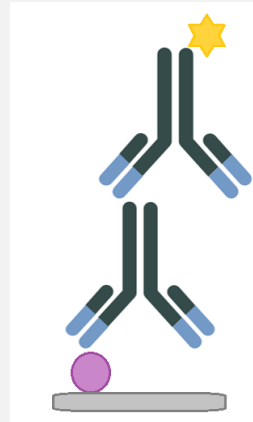


Nepřímá detekce:

- Značená sekundární protilátka
- Vazba na primární protilátku

+ univerzální, vyšší citlivost

- pomalejší

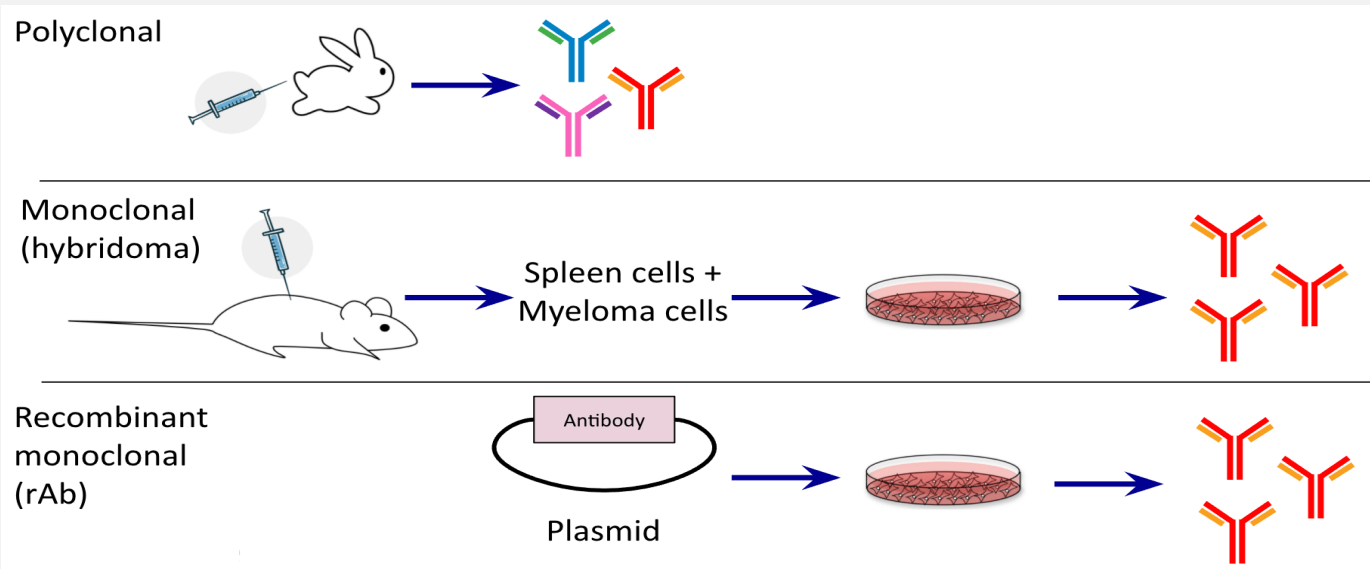


Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

– Immunofluorescence:

Protilátky:

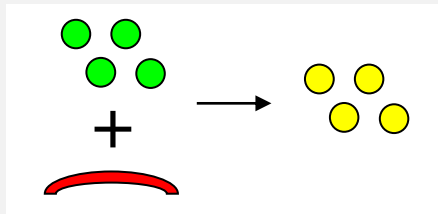
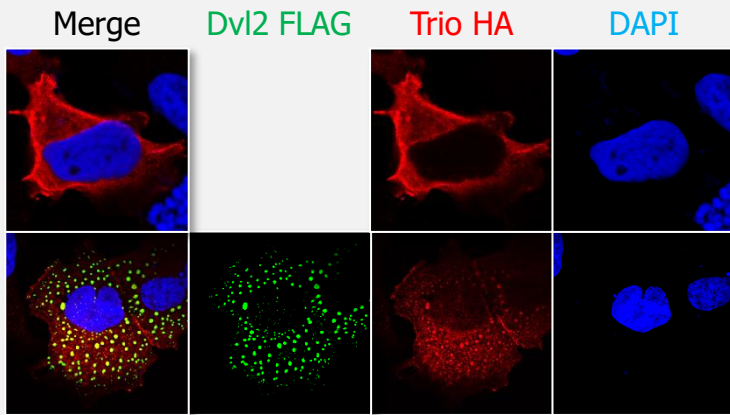
- Polyklonální: různé B lymfocyty, různé epitopy na antigenu
- Monoklonální: jeden klon B lymfocytů, jeden epitop antigenu
- Rekombinantní: rekombinantní DNA, bez využívání živočichů



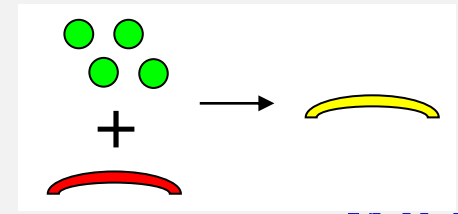
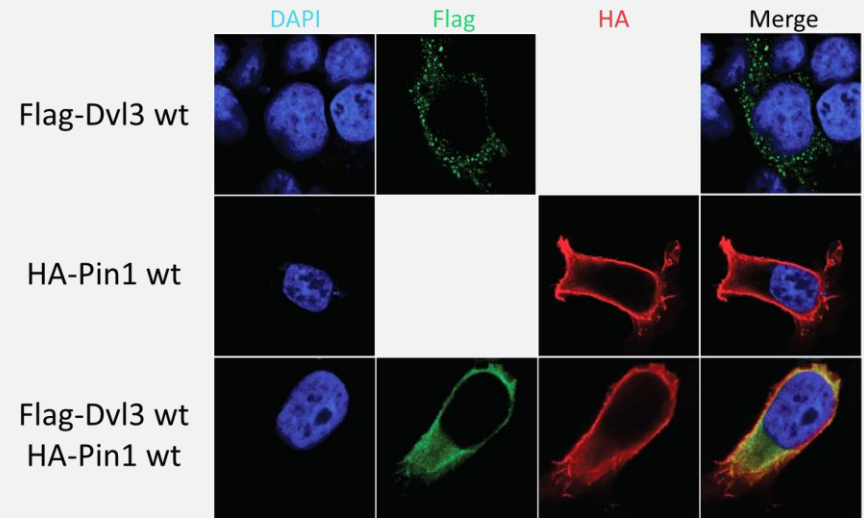
Proteinové interakce: detekce (ko-) lokalizace

– Imunofluorescence: změna lokalizace čeho?

A)



B)

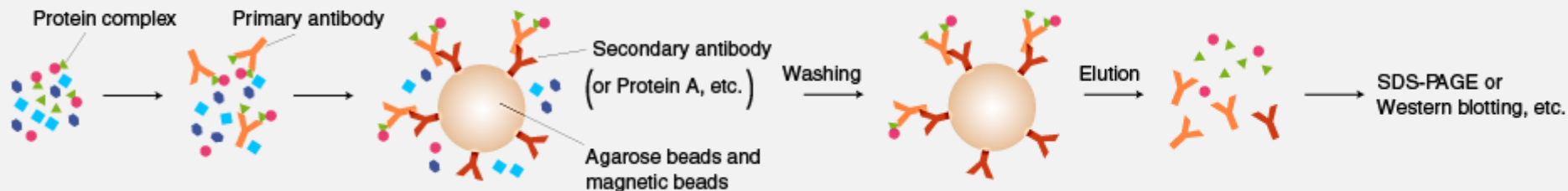


Proteinové interakce: detekce

Co-IP + SDS-PAGE/WB

co-IP = studium fyzické interakce proteinů

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



Separační techniky:

SDS-PAGE

Základní informace

- Dodecyl síranu sodného – polyakrylamidová gelová elektroforéza
- Biochemická metoda pro separaci proteinů
- Rozdělení podle hmotnosti a velikosti řetězce

Pohyb proteinů

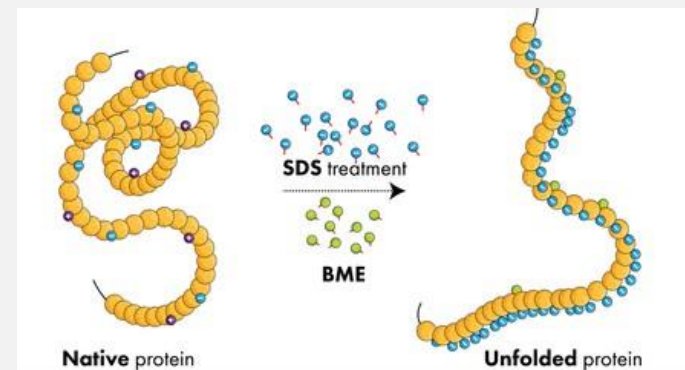
- Záporně nabitě proteiny putují ke kladné anodě
- Molekulová hmotnost
- Menší molekula = vyšší rychlost = delší vzdálenost
- Větší molekula = nižší rychlost = kratší vzdálenost

Separační techniky:

SDS-PAGE

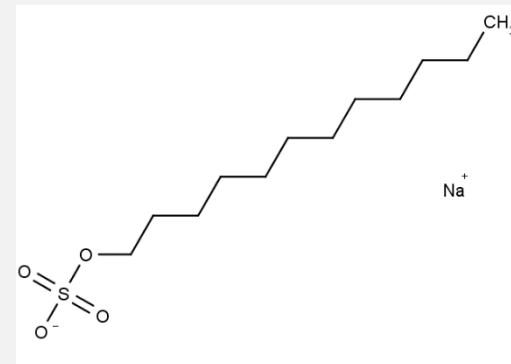
Příprava vzorku – denaturace

- Narušení terciární struktury proteinů
- Vysoká teplota
- Přítomnost SDS
- Přítomnost β -merkaptoethanolu



Molekula SDS

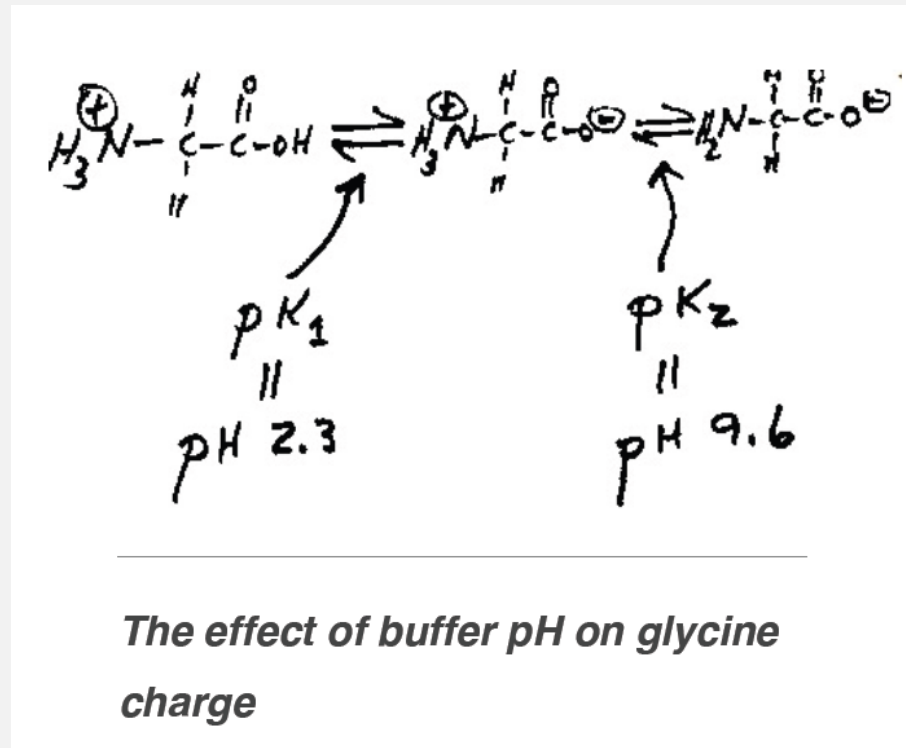
- Dodecyl síranu sodného
- Detergent – amfifilní vlastnosti
- Rozbívá terciární strukturu proteinů
- Dává proteinům záporný náboj



Separační techniky:

SDS-PAGE

System pufrů (diskontinuální)



aa: glycine

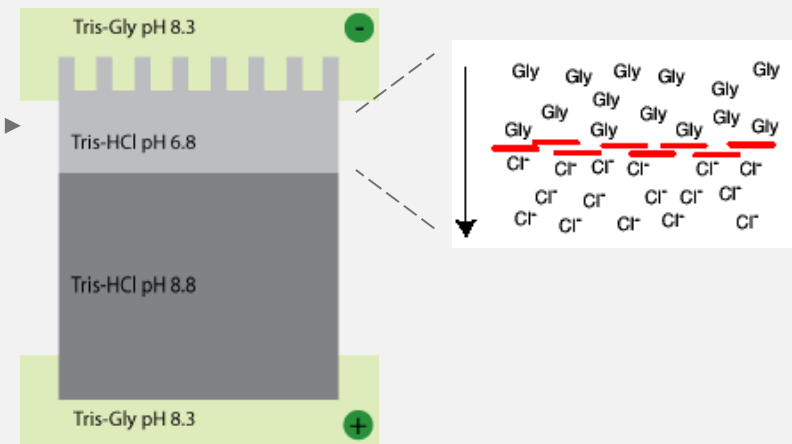
Separační techniky:

SDS-PAGE

System pufrů (diskontinuální)

a) Koncentrační gel

- pH 6,8
- Cl⁻: nejrychlejší pohyb
- Glycin: nejpomalejší
- Koncentrace vzorku do úzkého proužku



Separační techniky:

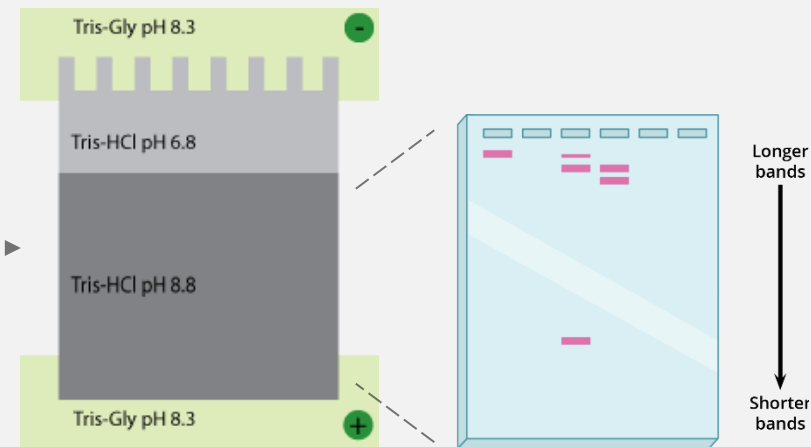
SDS-PAGE

System pufrů (diskontinuální)

a) Koncentrační gel

b) Rozdělovací gel

- pH 8,8
- Glycin získává záporný náboj
- Proteiny migrují na základě molekulové hmotnosti



Separační techniky:

SDS-PAGE

Další analýza proteinů

- Hmotnostní spektrometrie
- Barvení stříbrem
- Barvení „brilliant blue“ barvivem
- **Western blotting**

Separační techniky:

Western-blotting

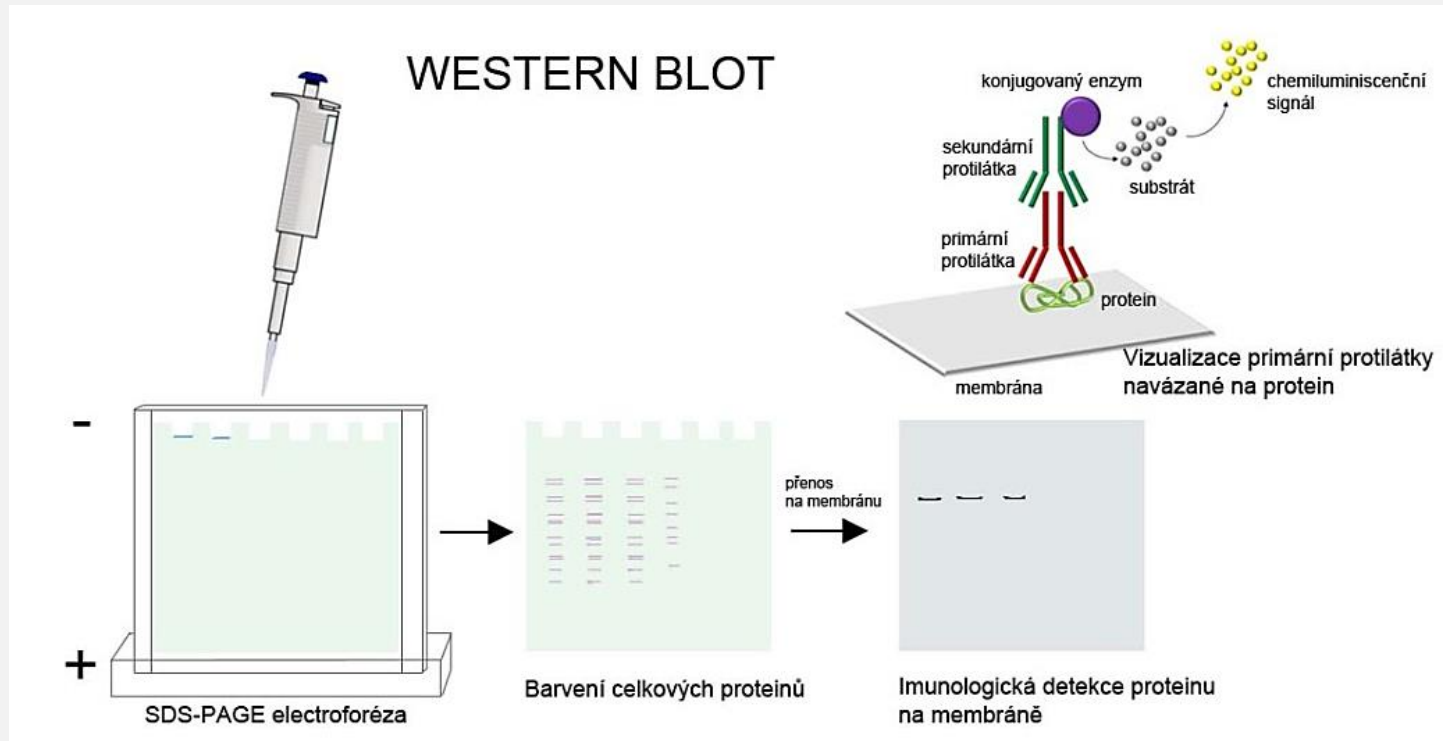
- Analýza, detekce a *kvantifikace* (??) proteinů
- Southern blot (1975) – přenos **DNA** z gelu na membránu
- ‘*Northern*’ blot (1977) – **RNA**
- ‘*Western*’ blot (1979) – ... **proteinů**
 - George Stark, Harry Towbin, Neal Burnette

Separační techniky:

Western-blotting

- Postup:

SDS-PAGE Transfer na membránu Blokování Značení protilátkami Detekce



Separační techniky:

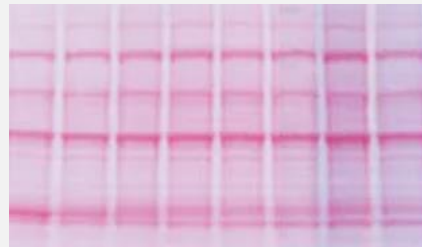
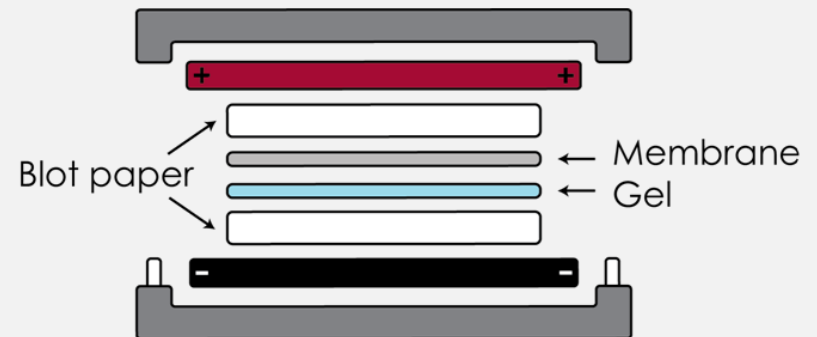
Western-blotting

- Postup:

SDS-PAGE **Transfer na membránu** Blokování Značení protilátkami Detekce

- Elektroforetický transfer
- Membrány – polyvinylové (PVDF), nitroceluloseové
- Podmínky dle výrobce

- Vizualizace proteinů: př. Ponceau S red



Separační techniky:

Western-blotting

- Postup:

SDS-PAGE Transfer na membránu **Blokování** Značení protilátkami Detekce

- Proti nespecifickým vazbám
- Blokovací roztoky
- BSA, sušené mléko

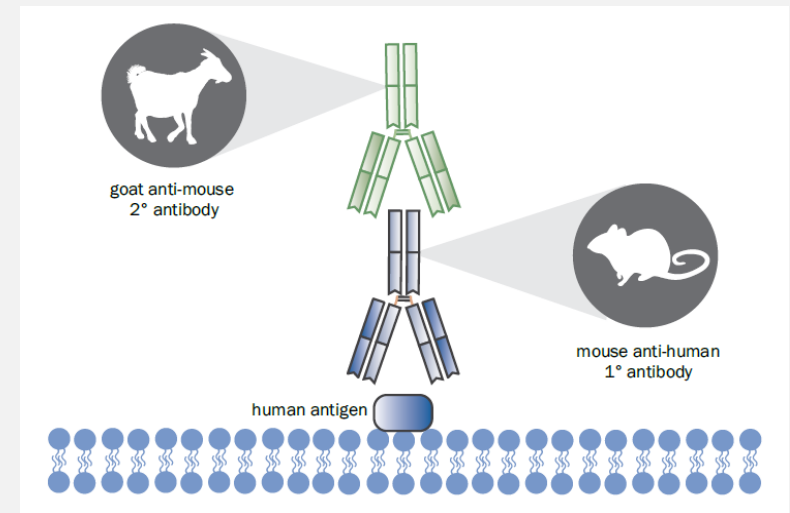
Separační techniky:

Western-blotting

- Postup:

SDS-PAGE Transfer na membránu Blokování **Značení protilátkami** Detekce

- Promývání – PBS, TBS
- Primární **protilátka**
- Sekundární **protilátka**



Separační techniky:

Western-blotting

- Postup:

SDS-PAGE Transfer na membránu Blokování Značení protilátkami **Detekce**

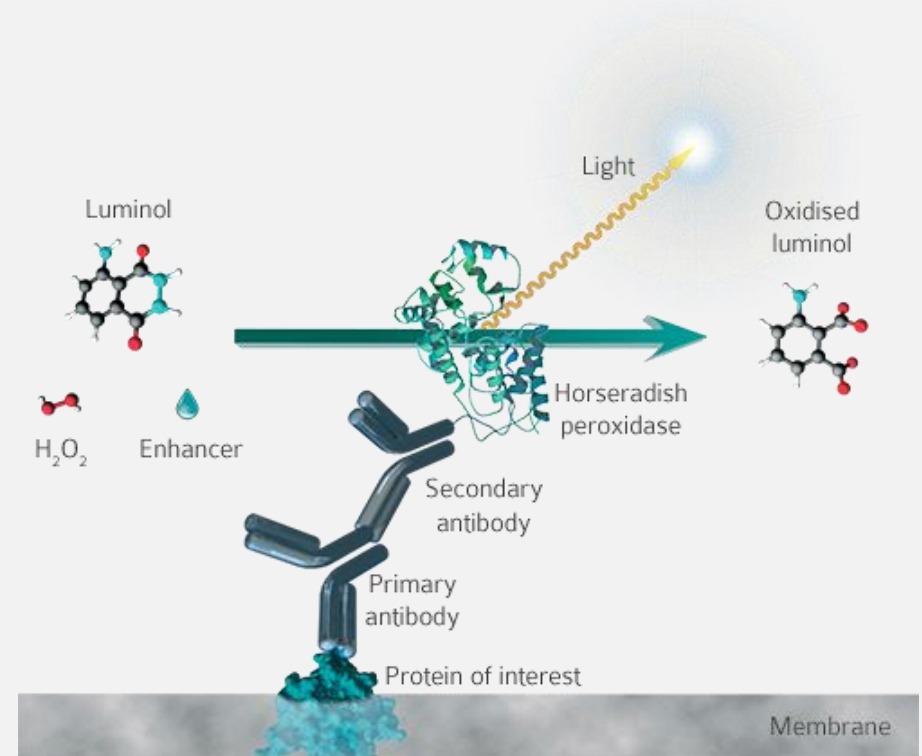
- Radioizotopy
- Enzymatické reakce – alkalické fosfatázy, křenové peroxidázy
- Chemiluminiscence
- CCD kamera

Křenová peroxidáza

- „Horseradish peroxidase“
- Metaloenzym
- Substrát: H_2O_2
- 1,2-diaminobenzen
- Žlutooranžový produkt
- Detekce: pomocí CCD kamera



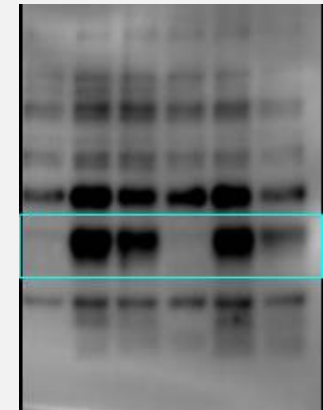
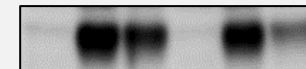
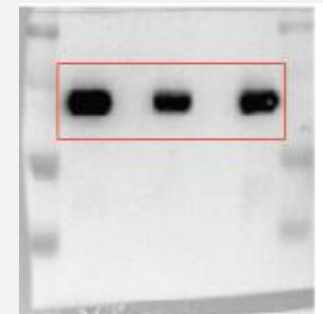
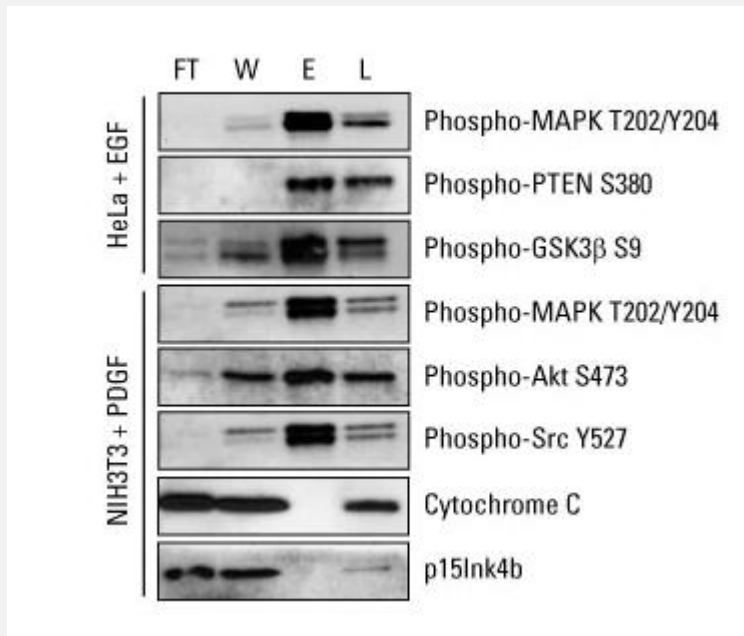
HRP



Separační techniky:

Western-blotting

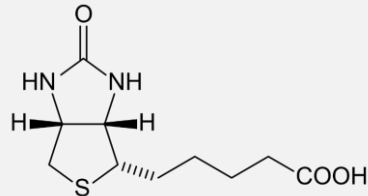
- Výsledek – jak vlastně vypadá výstup?



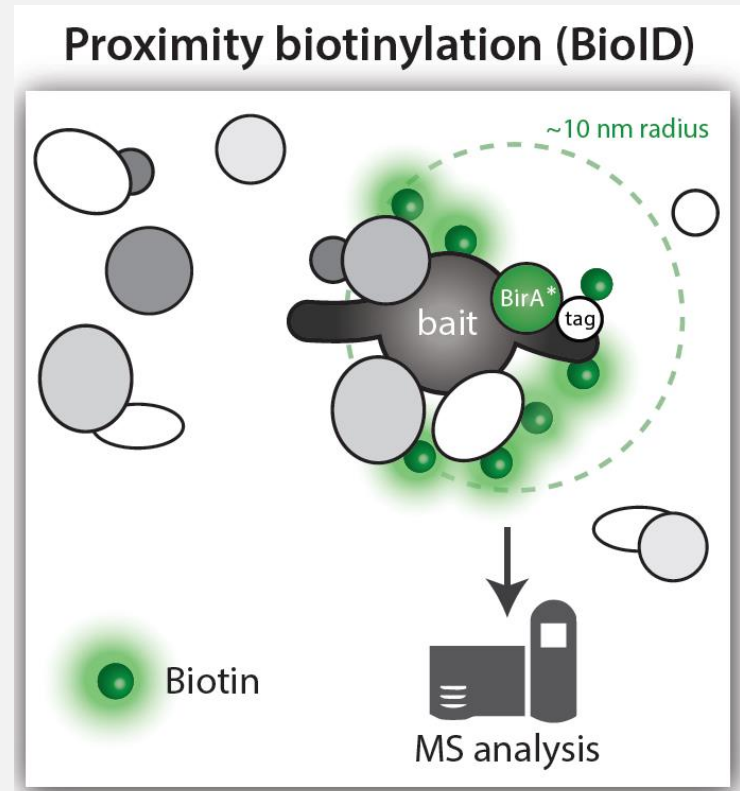
Proteinové interakce: detekce – další metody

Blízkostí indukované značení

- *In vivo* metoda
- Fúze proteinu s enzymem BL
- Značení okolních proteinů
- Př. Značka: biotin



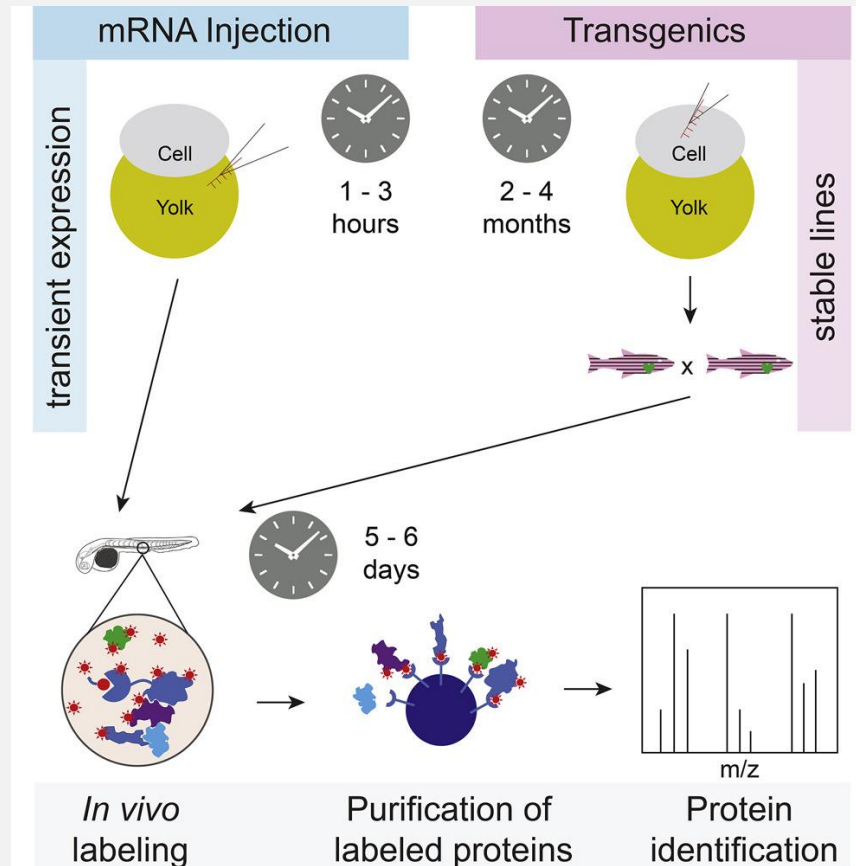
- Detekce: (WB) + MS



Proteinové interakce: detekce – další metody

Blízkostí indukované značení

– Př.



Rosenthal SM, et al. 2021
A Toolbox for Efficient **Proximity-Dependent Biotinylation** in **Zebrafish Embryos**.
Mol Cell Proteomics.

Proteinové interakce: detekce – další metody

Blízkostí indukovaná ligace (PLA – Proximity ligation assay)

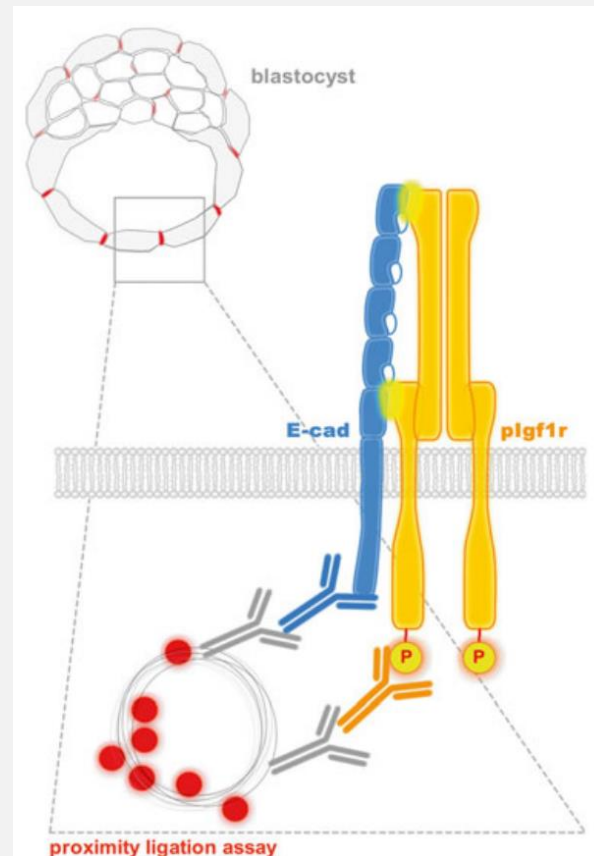
- *In vivo* metoda
- Kovalentní provázání komplexu – bifunkční činidla
- Komplex se při izolaci nerozpadá
- Nebezpečí vazby náhodných proteinů



Proteinové interakce: detekce – další metody

Blízkostí indukovaná ligace (PLA – Proximity ligation assay)

– Příklad.



Bedzhov I, Stemmler MP. 2015

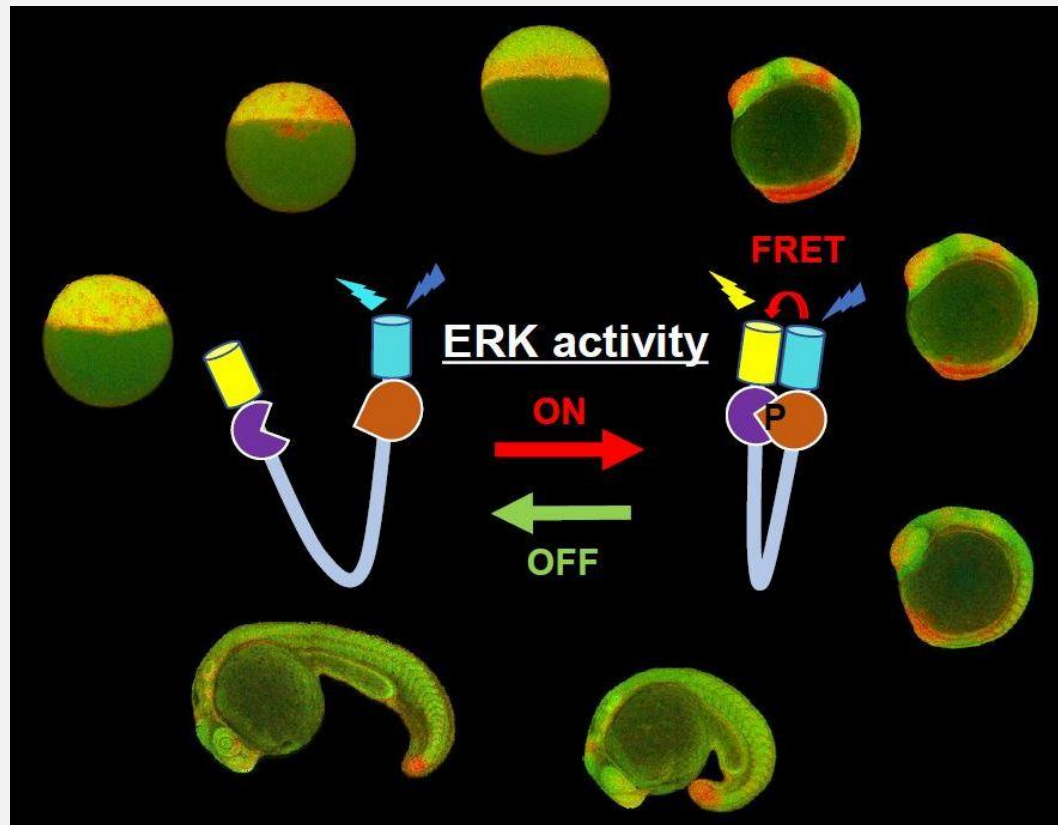
Applying the proximity ligation assay (PLA) to mouse preimplantation embryos for identifying protein-protein interactions in situ.

Methods Mol Biol.

Proteinové interakce: detekce – další metody

FRET: intermolekulární

– Př.

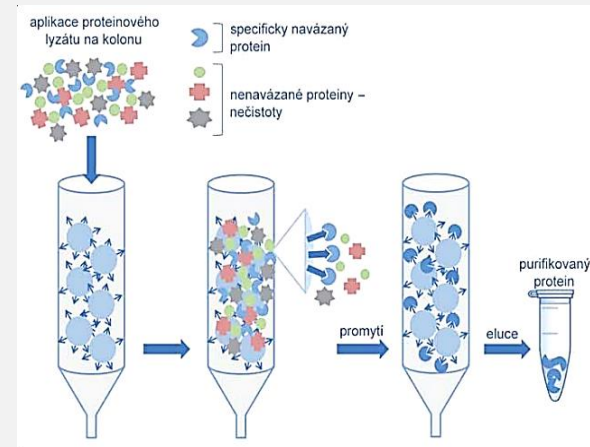


Wong KL, et al..2018
ERK Activity Dynamics during
Zebrafish Embryonic
Development. *Int J Mol Sci.*

Proteinové interakce: detekce – další metody

Afinitní purifikace (AP)

- Afinita proteinu zájmu k ligandu
- Levná a jednoduchá metoda
- Malá specifita a senzitivita



In vitro AP

- Připojení proteinu na pevnou matici
- Aplikace buněčných proteinů na matici
- Zachycení proteinů interagujících s proteinem na matici
- Analýza zachycených proteinů (hmotnostní spektrometrie)

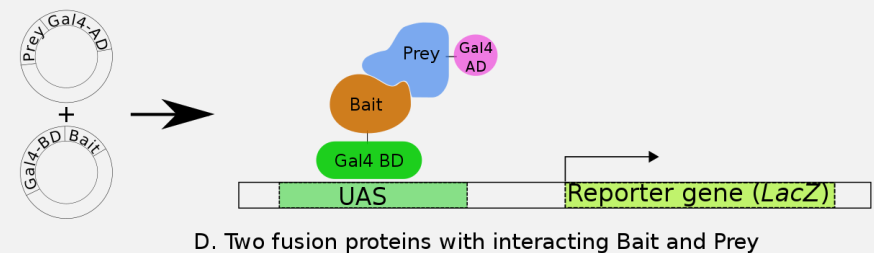
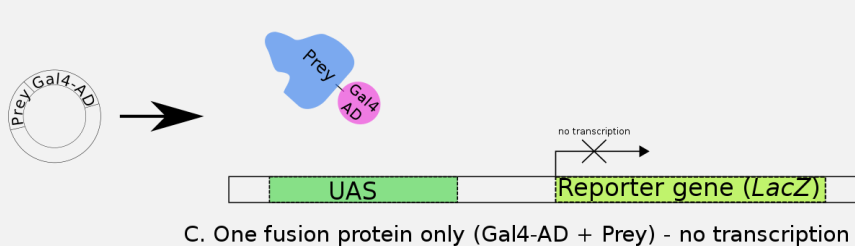
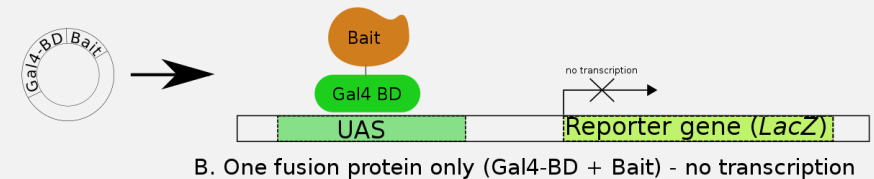
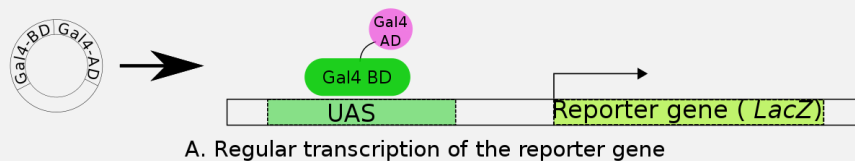
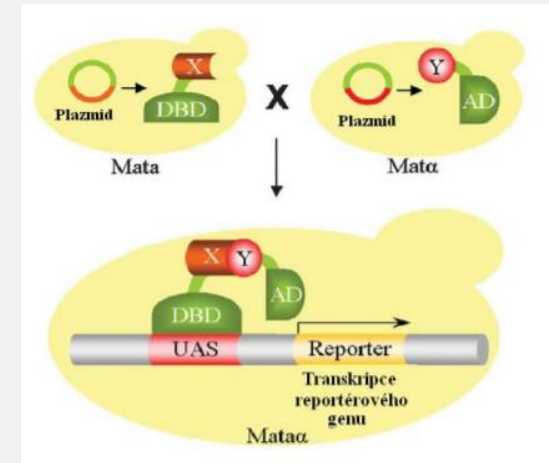
In vivo AP

- Značení proteinu – protilátky, genetická modifikace (FLAG, HA, GFP)
- Matrice s afinními molekulami
- Aplikace buněčného lyzátu
- Eluce a analýza

Proteinové interakce: detekce – další metody

Kvasinkový dvouhybridový systém

- Umělé genové konstrukty – fúzní proteiny:
 - DNA-vazebná doména + „bait“
 - Aktivační doména + „prey“
- Interakce → transkripce určitého genu (*lacZ*)



Proteinové interakce: detekce – další metody

Kvasinkový dvouhybridový systém

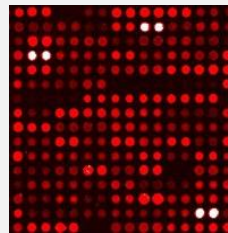
- Proteinová interakce
- Navázání vazebné domény poblíž reportérového genu
- Aktivační doména způsobí aktivaci jeho transkripce
- Exprese reportérového genu (změna barvy kvasinkové kolonie)



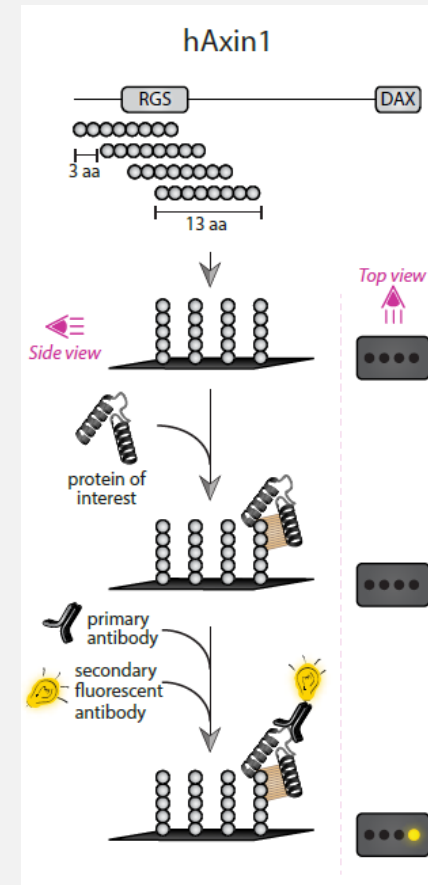
Proteinové interakce: detekce – další metody

Proteinové čipy

- Matrice s mnoha navázanými proteiny
- Detekce – fluorescence/HRP



- + Analýza velkého množství interakcí zároveň
- Ovlivnění struktury a vlastností připojením na matici, Náročná tvorba čipů (finance+čas)



Manipulace funkce proteinů

Optogenetika

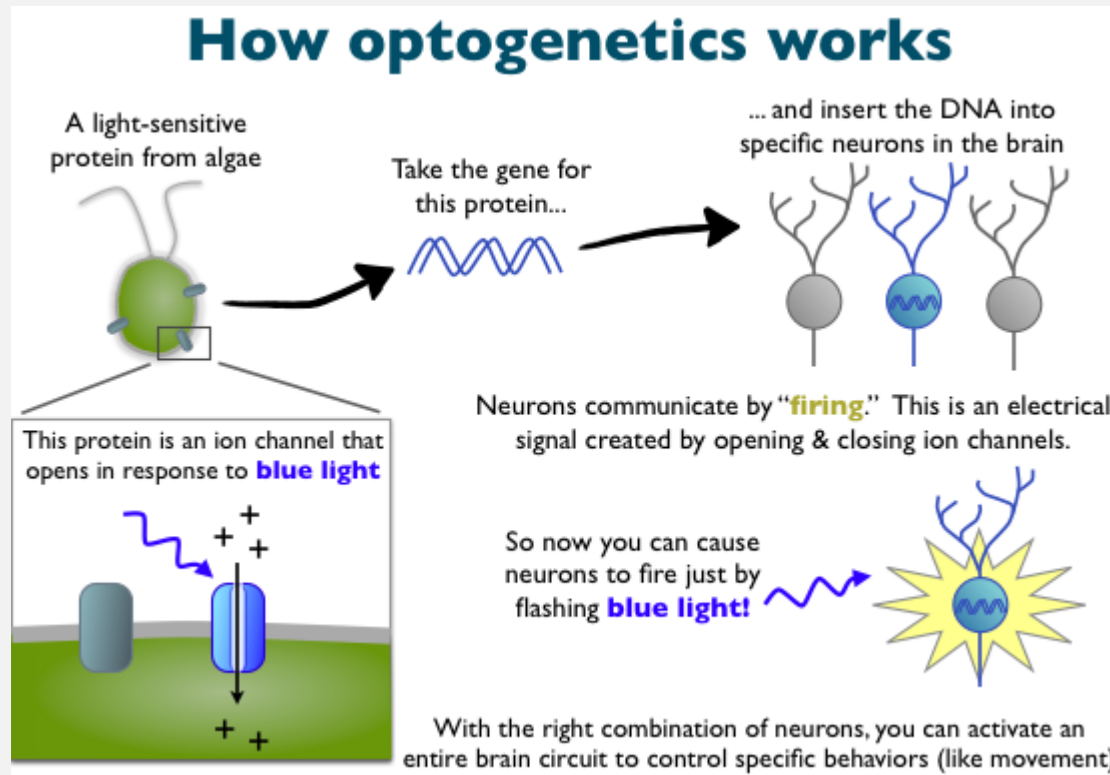
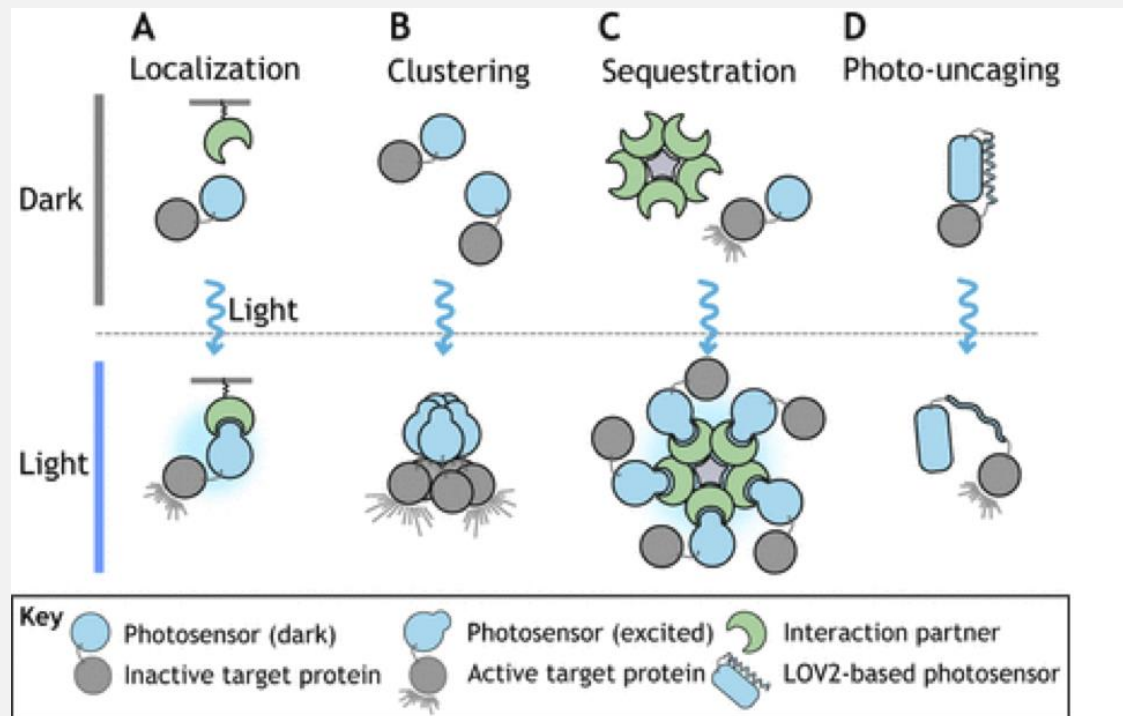


Photo courtesy of Neurobyn.

Manipulace funkce proteinů

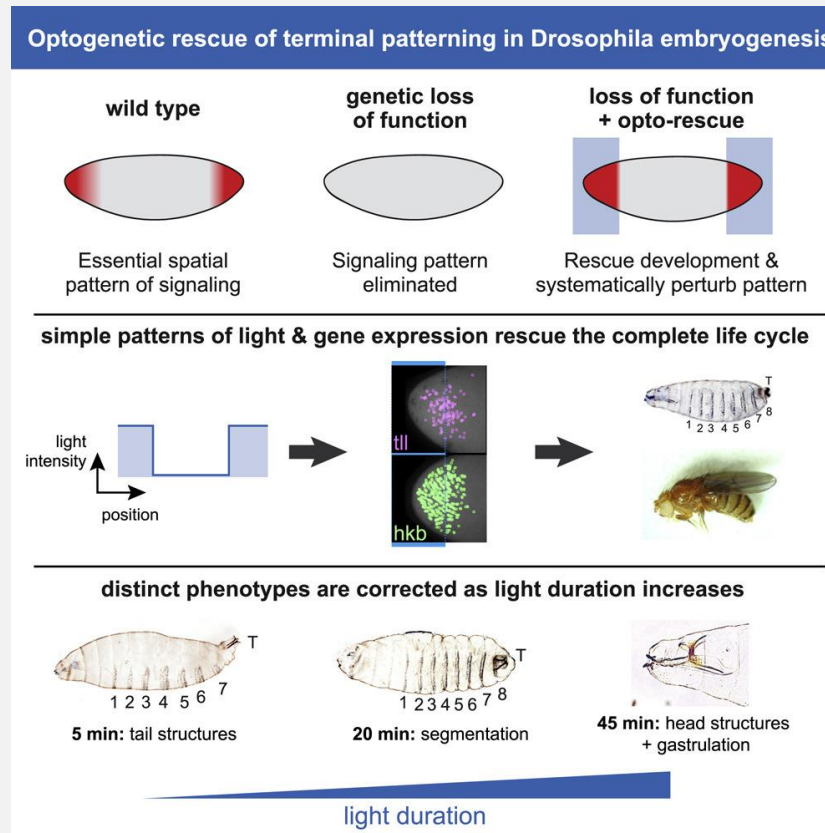
Optogenetika: nejenom neurony



Manipulace funkce proteinů

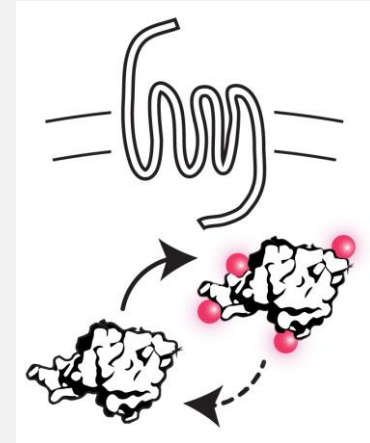
Optogenetika: nejenom neurony

– Př.



Johnson HE et al., 2020.
Optogenetic Rescue of a Patterning Mutant.
Curr Biol.

Shrnutí



Made by James Harnos

– Proteiny

– Analýza proteinů
(lokalizace, konformace, aktivita)

– Post-translační modifikace (PTM)

– (Meziproteinové) interakce (PPI)

Dnes: 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