

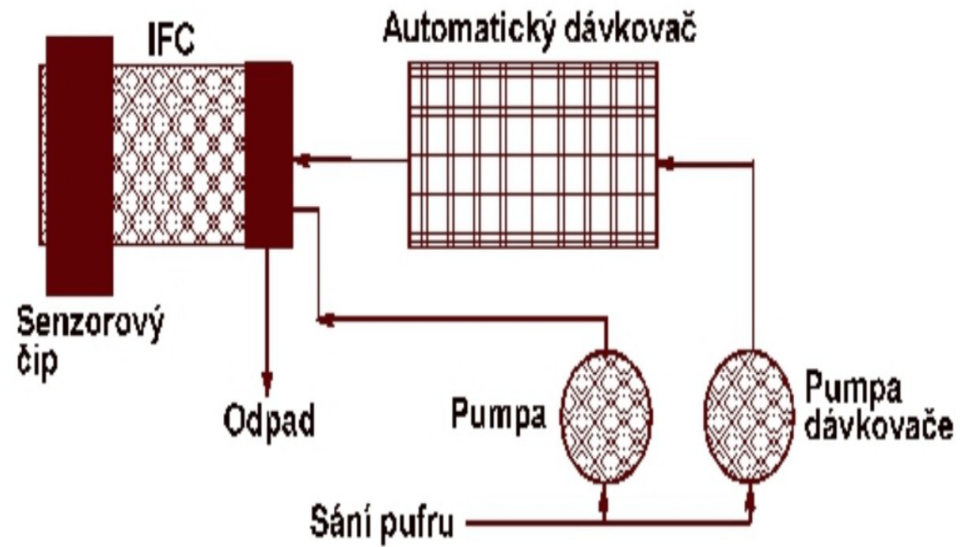
- Dobrovolná, Goišová, Siládiová, Svobodová, Kudláčková

- interakce mezi různými proteiny
- funkci proteinu lze dobře zjistit, pokud se nám podaří odhalit jeho interakční partnery
- Metody
 - metody, které umožňují interakci objevit
 - metody, které umožňují zjištěnou interakci ověřit/potvrdit a lépe charakterizovat
- detekovat nové PPI umožňují zejména metody afinitní purifikace, imunoprecipitace, kvasinkový dvouhybridový systém, proteinové čipy a další

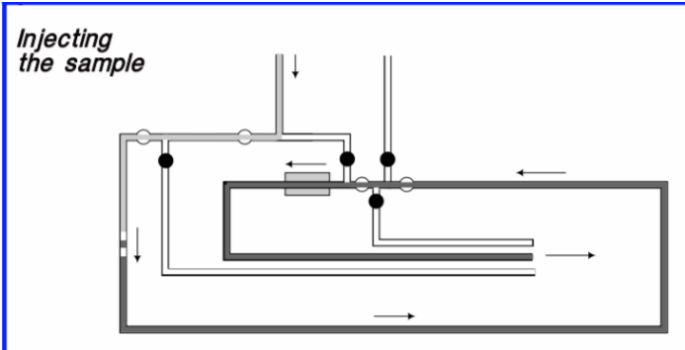
- Zařízení pro sledování biomolekulárních interakcí v reálném čase
- Rezonance povrchových plazmonů umožňuje monitorovat vznik komplexu bez značení interagujících molekul
- Jedna část komplexu imobilizována na povrchu senzoru
- Druhá interagující molekula je volně v roztoku pufru
- Použití: interakce proteinů, proteinových konjugátů, nukleových kyselin i celých buněk

- Průtočný a optický systém
- Ovládací software
- Průtočné cely
- Sensorový čip
- Sada chemikálií navržených pro výzkum biomolekulárních interakcí

Průtočný systém

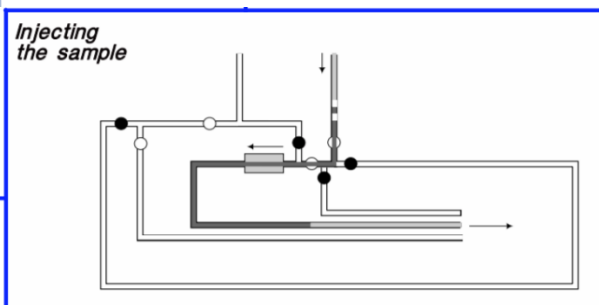
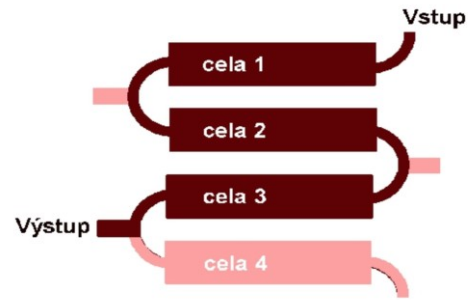


- Dvě pumpy
 - nasávají pufr ze zásobní nádoby a pohánějí kapalinu systémem
- Dvě nádoby
- Automatický dávkovač

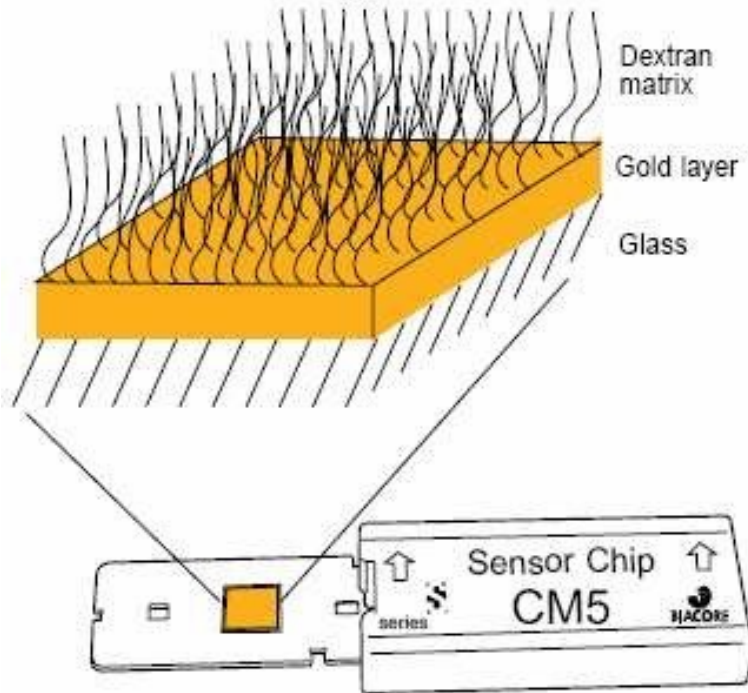


Průtočné cely

- Vzorky jsou ze zásobních nádobek přenášeny do kartidže (dva módy)
- Kartidž
- Důležité nízké rozmytí nanášeného vzorku (snížení mrtvých objemů a použití pneumatických ventilů)
- Měřící cely (přitisknutím čipu na povrch kartidže)
- Čtyři cely (jedna stěna cel je tvořena povrchem senzoru)

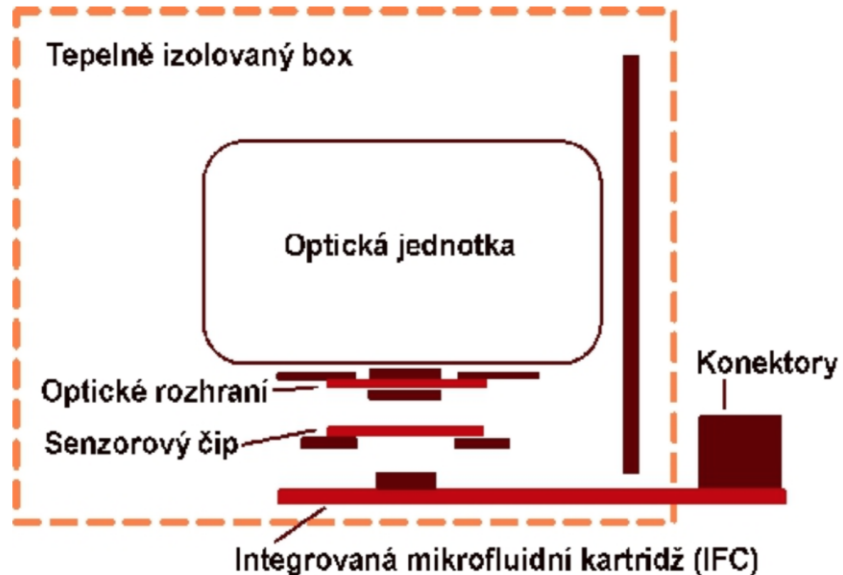


Senzorový čip



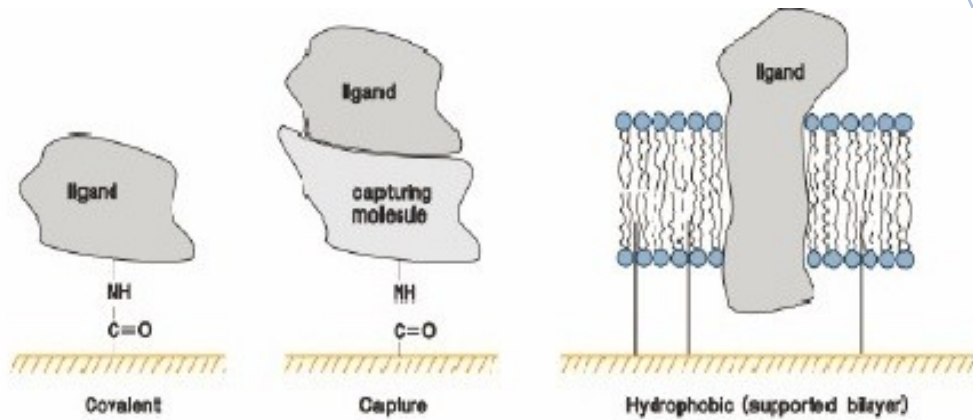
- Čip CM5
- CM4, CM3, C1, SA, NTA, HPA, L1, Au, SIA
- Připevněn na plastovém nosiči
- Plastový nosič je po vložení do přístroje oddělen vnitřním mechanismem a senzor je usazen na svoje místo
- Proces usazení – indikován prostřednictvím zelené LED
- 50-100 opakovaných měření (v přístroji jeden týden)

Optický systém



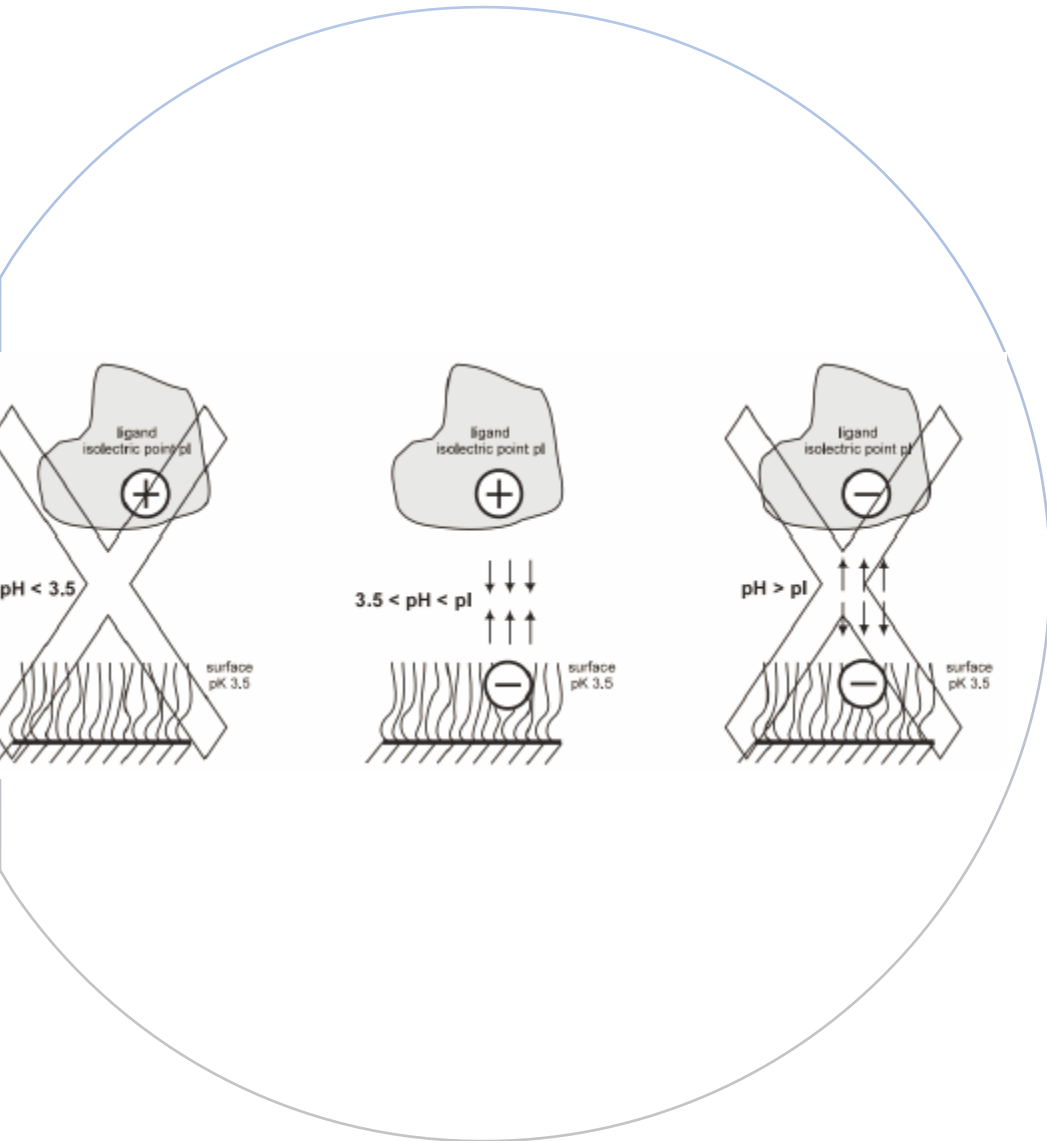
- Skleněná strana čipu je v kontaktu se skleněným hranolem optické jednotky
- Kontakt mezi hranolem a čipem zajišťuje silikonové optické rozhraní
- Přes hranol dopadá na povrch čipu infračervené záření emitované LED
- Odraz záření od povrchu čipu je monitorován pomocí pole fotodiód
- Detekční jednotka – optická jednotka obsahující světelný zdroj, detektor a optické rozhraní s čipem

Imobilizace ligandů



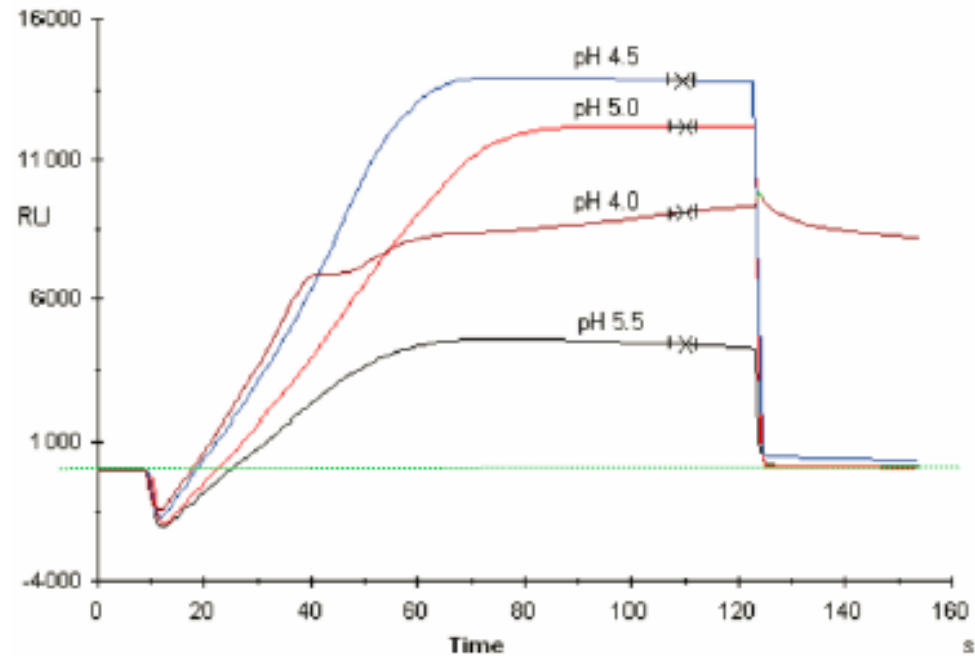
- Kovalentní vazba – nejjednodušší – navážeme protein, NK,.. ligandem může být cokoli
- Afinitní vazba – př. avidin-biotin. Vazba je velmi silná.
- Hydrofobní interakce – můžeme vytvořit lipidovou dvojvrstvu

Dextranová matrice



- díky karboxyskupinám má záporný náboj
- při správném pH do sebe natáhne bílkoviny s opačným nábojem
- jde to použít i u nízkých koncentrací biomolekul

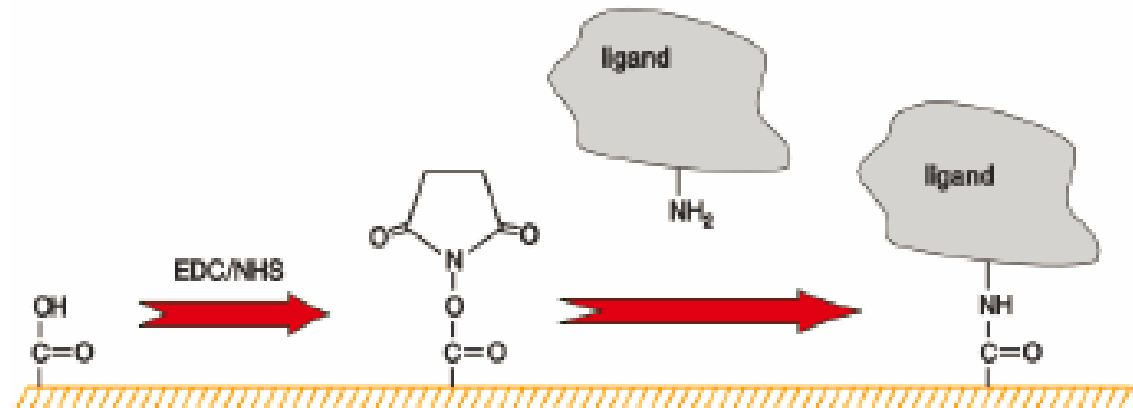
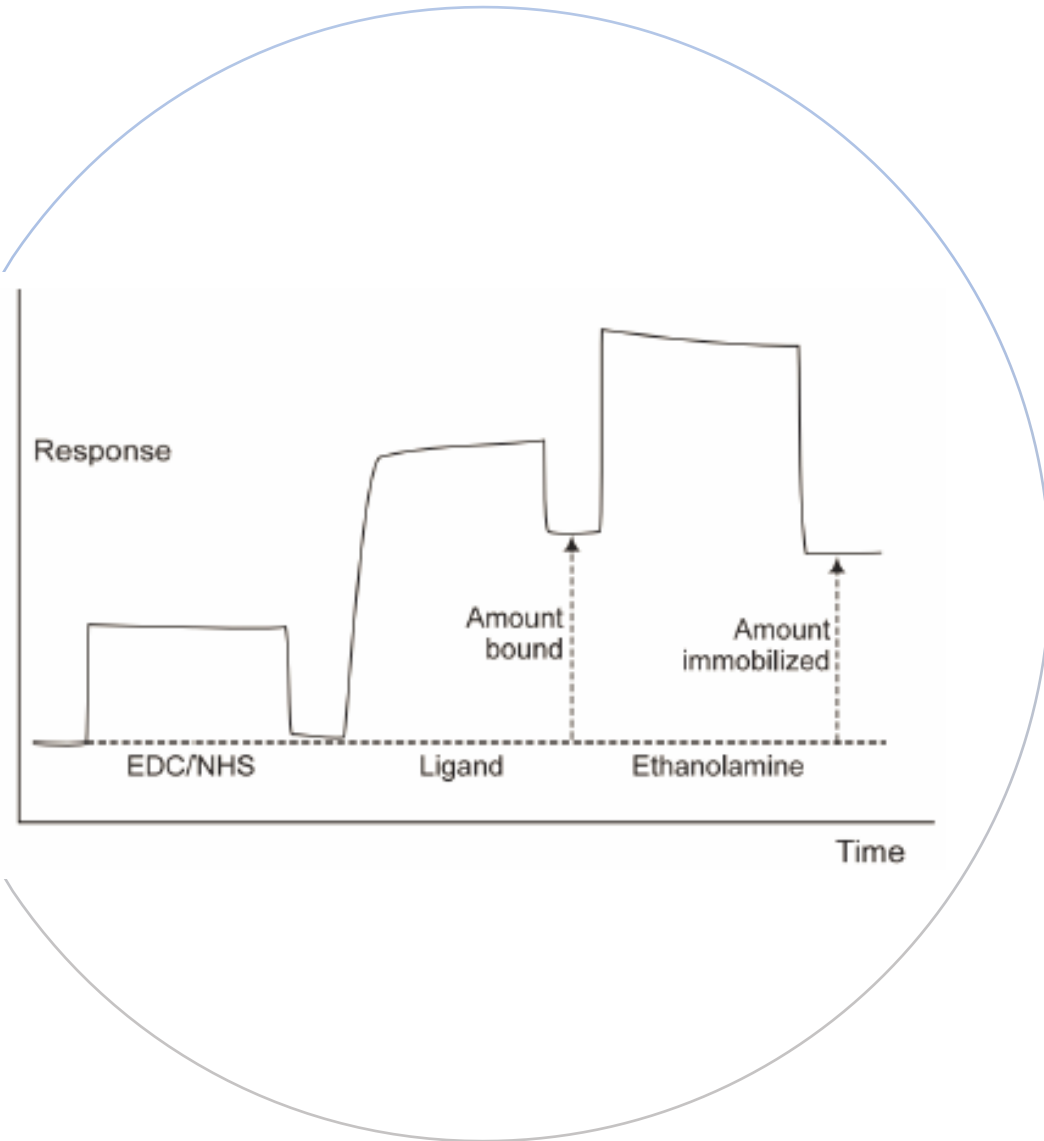
Ph při immobilizaci – NH₂ skupina přes EDC/NHS



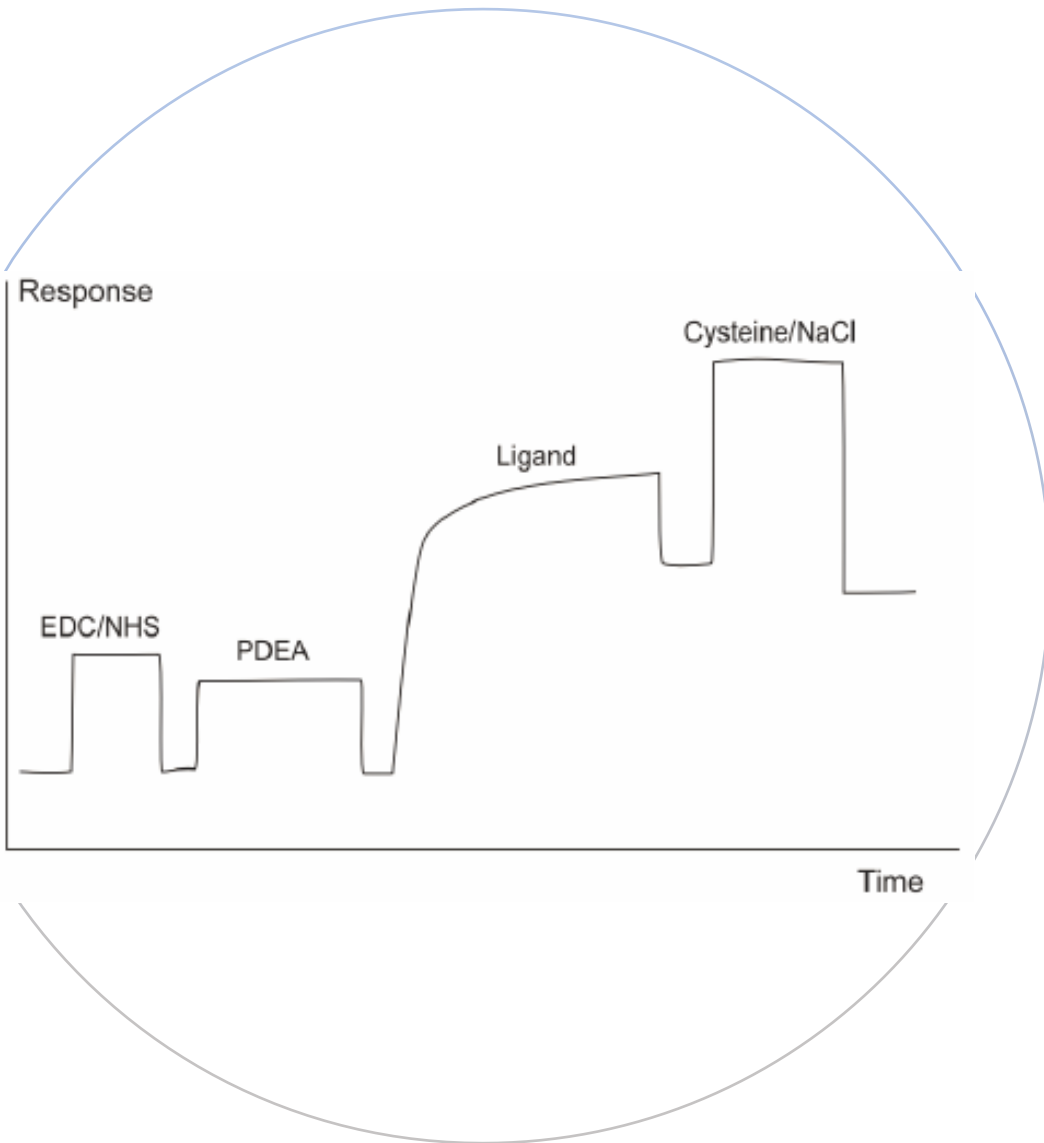
- pro bílkoviny jako ligandy obvykle pH 5 funguje dobře
- používá se 10 mM acetátový pufr, prekoncentrace se vyzkouší 2 min při různých hodnotách pH (5.5, 5.0, 4.5, 4.0)
- prekoncentrace obecně lepší při nižším pH, ale kovalentní vazba probíhá lépe při vyšších pH
- při nízkém pH také může nastat agregace bílkovin

Vazba přes aminoskupinu ligandu

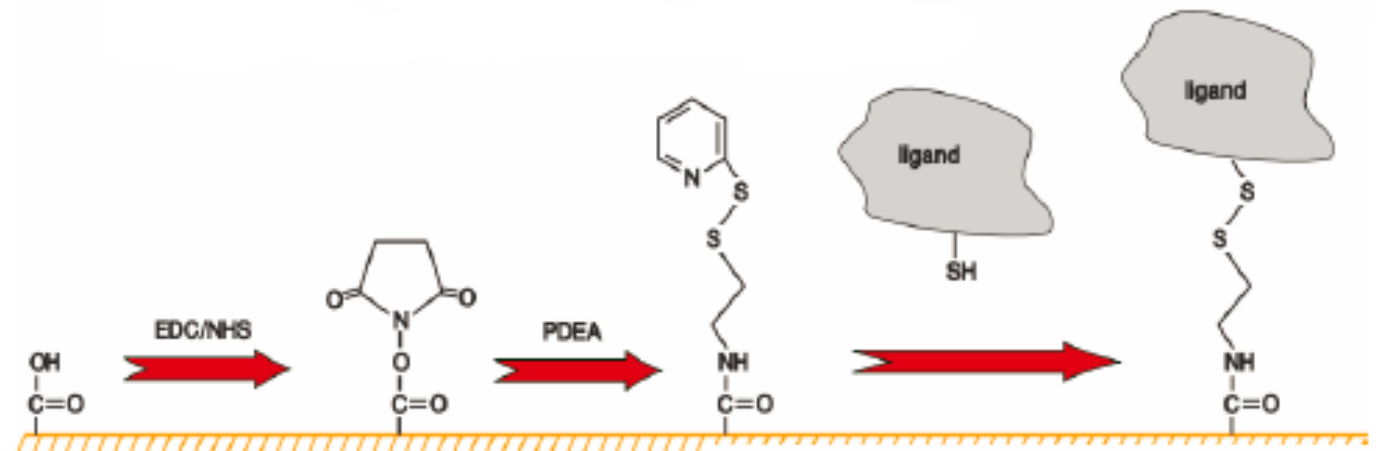
- V 80% se využívá tato metoda
- Na dextranovou matici nanese směs EDC a NHS 1:1
- Po imobilizaci zbyde pár aktivních skupin. Přidáme 1M ethanolamin pH 8,5.
- Ten vysytí zbytek NHS



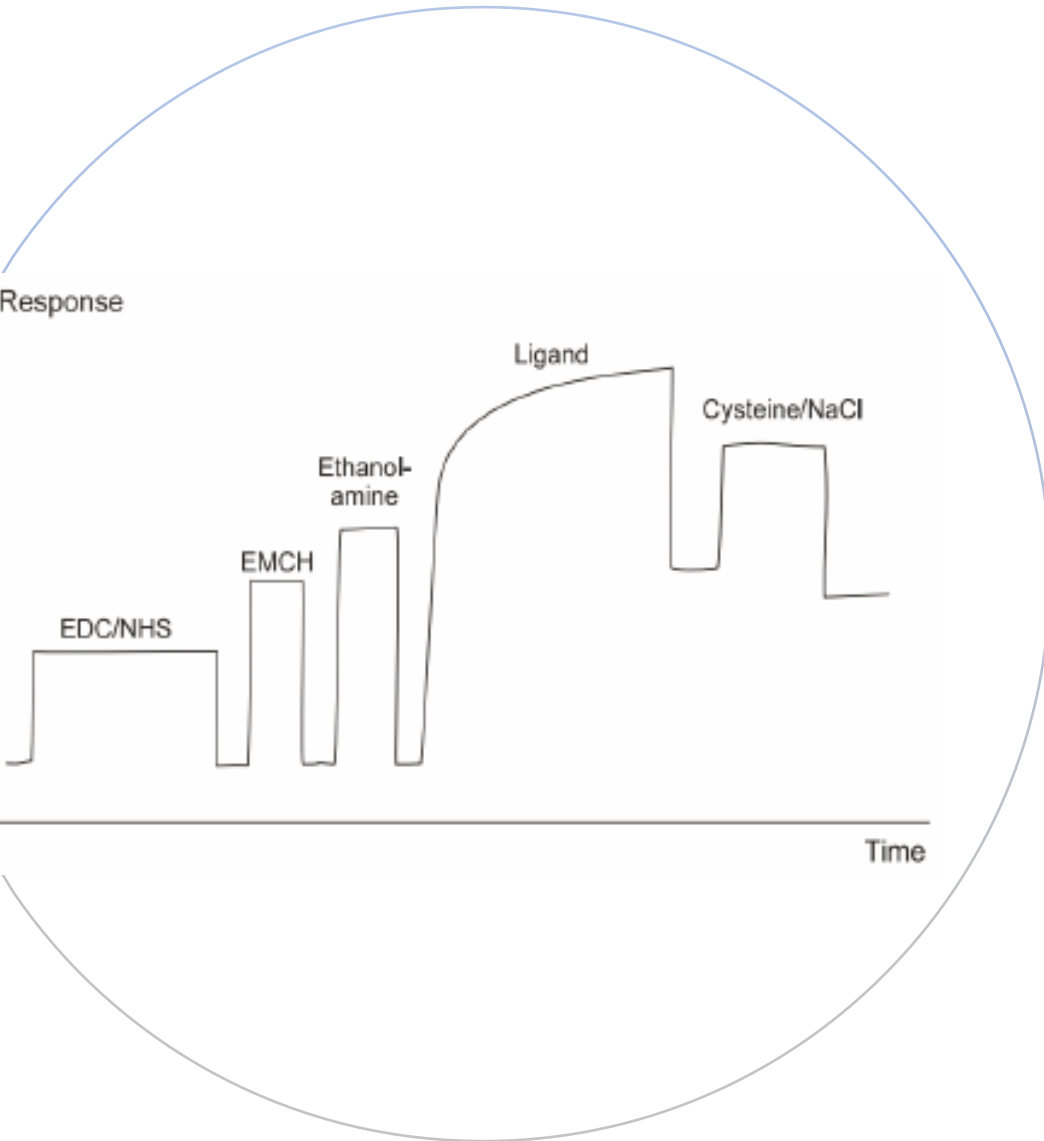
Vazba přes thiol



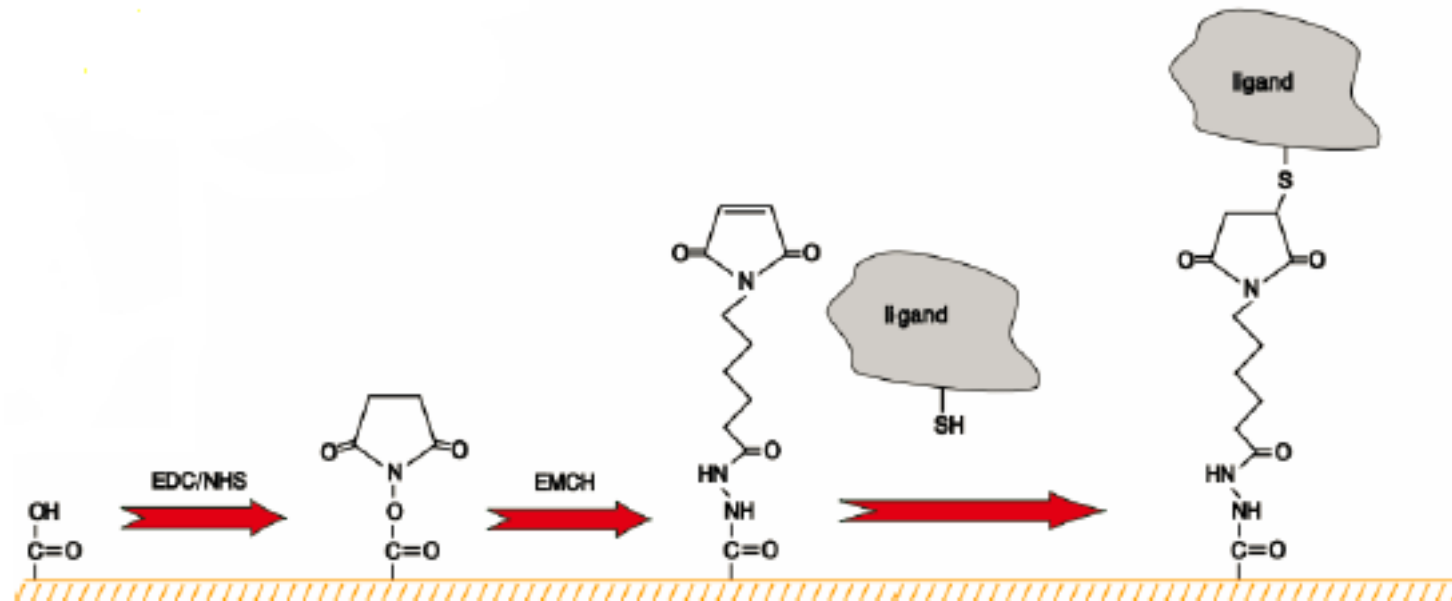
- 2-(2-pyridinyldithio)ethanamin hydrochlorid
- 80 mM ve 100 mM borátu pH 8.5



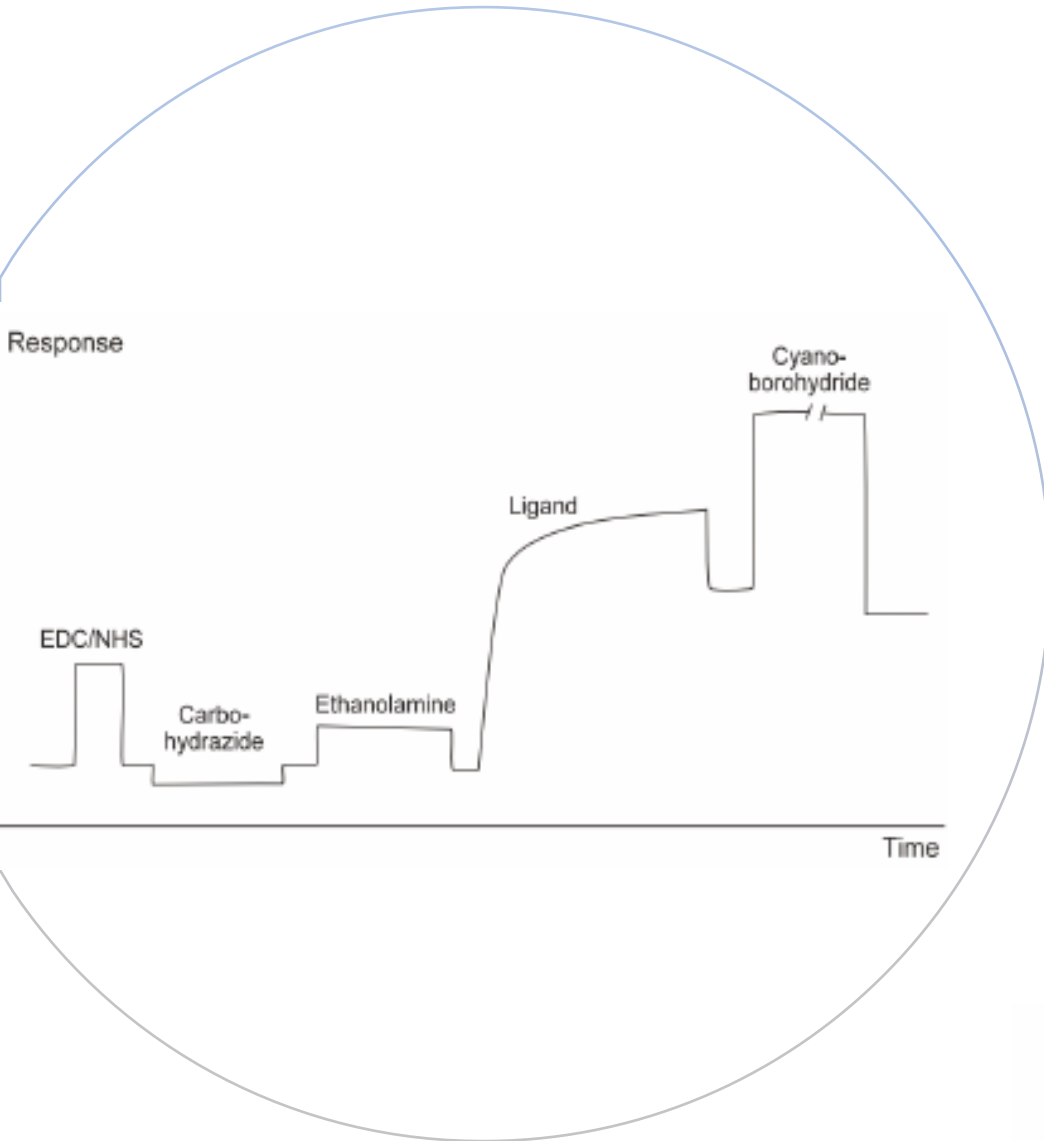
Maleimidová metoda



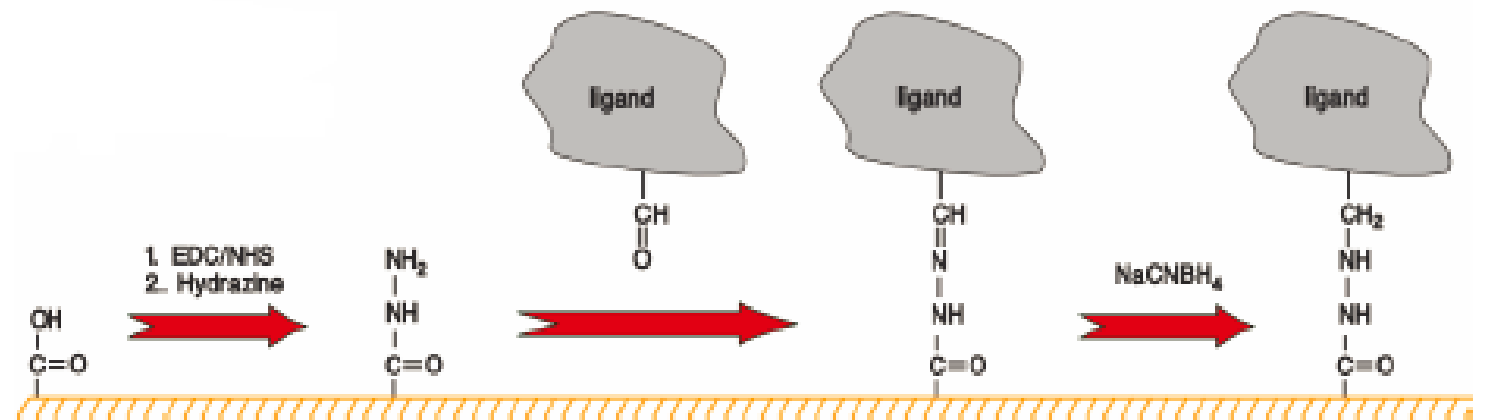
- vzniká stálá thioetherová vazba



Vazba přes aldehyd

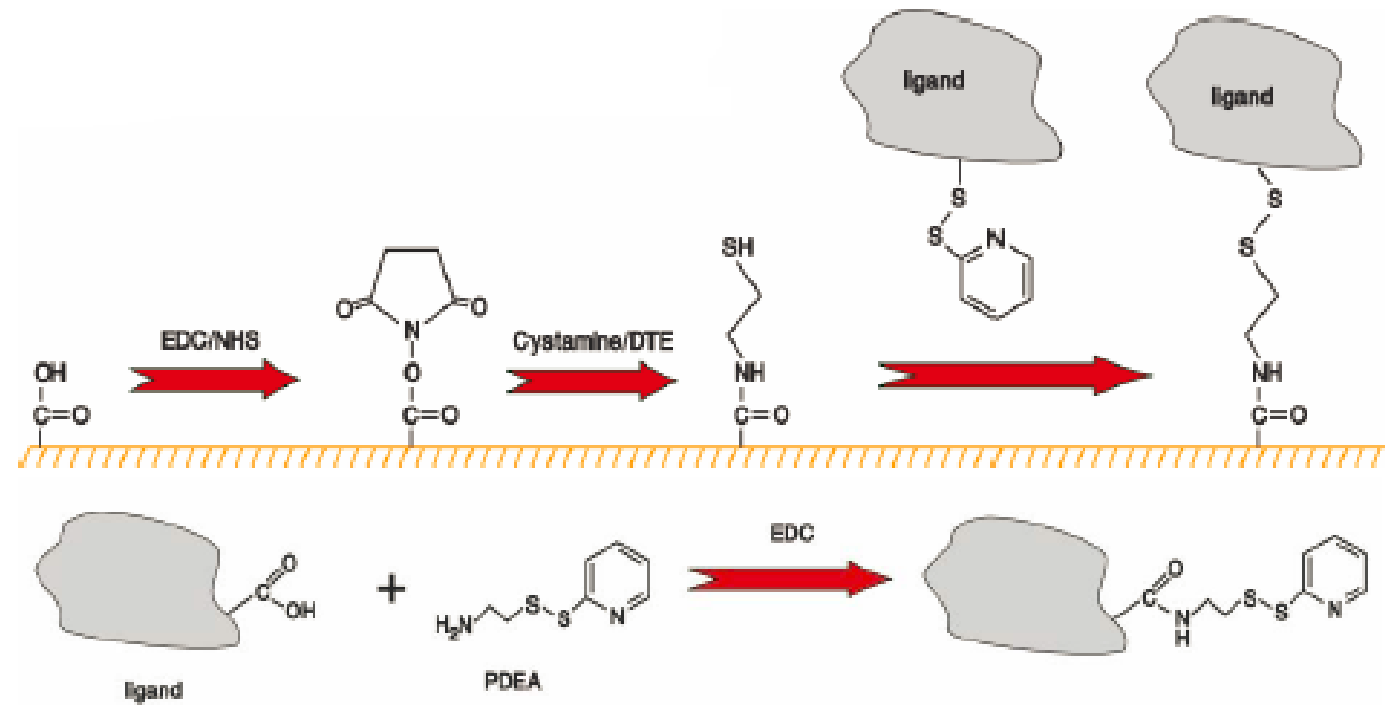
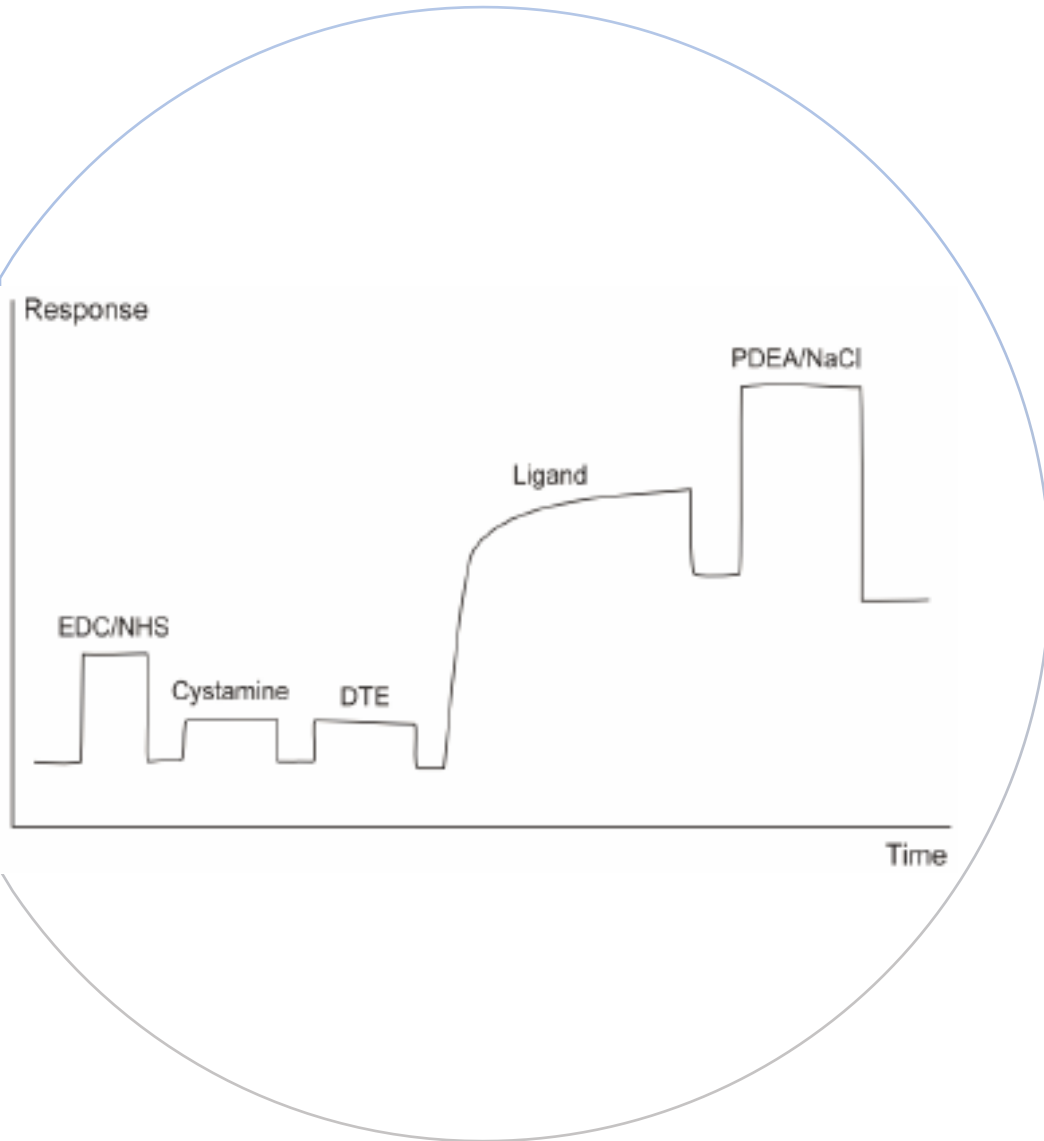


- aldehydová skupina se získá oxidací diolového uskupení pomocí jodistanum (1 mM, mírné podmínky)
- alternativně lze koncový galaktosylový zbytek zkusit oxidovat pomocí galaktosaoxidasy
- pro glykoprotein, oligosacharidy



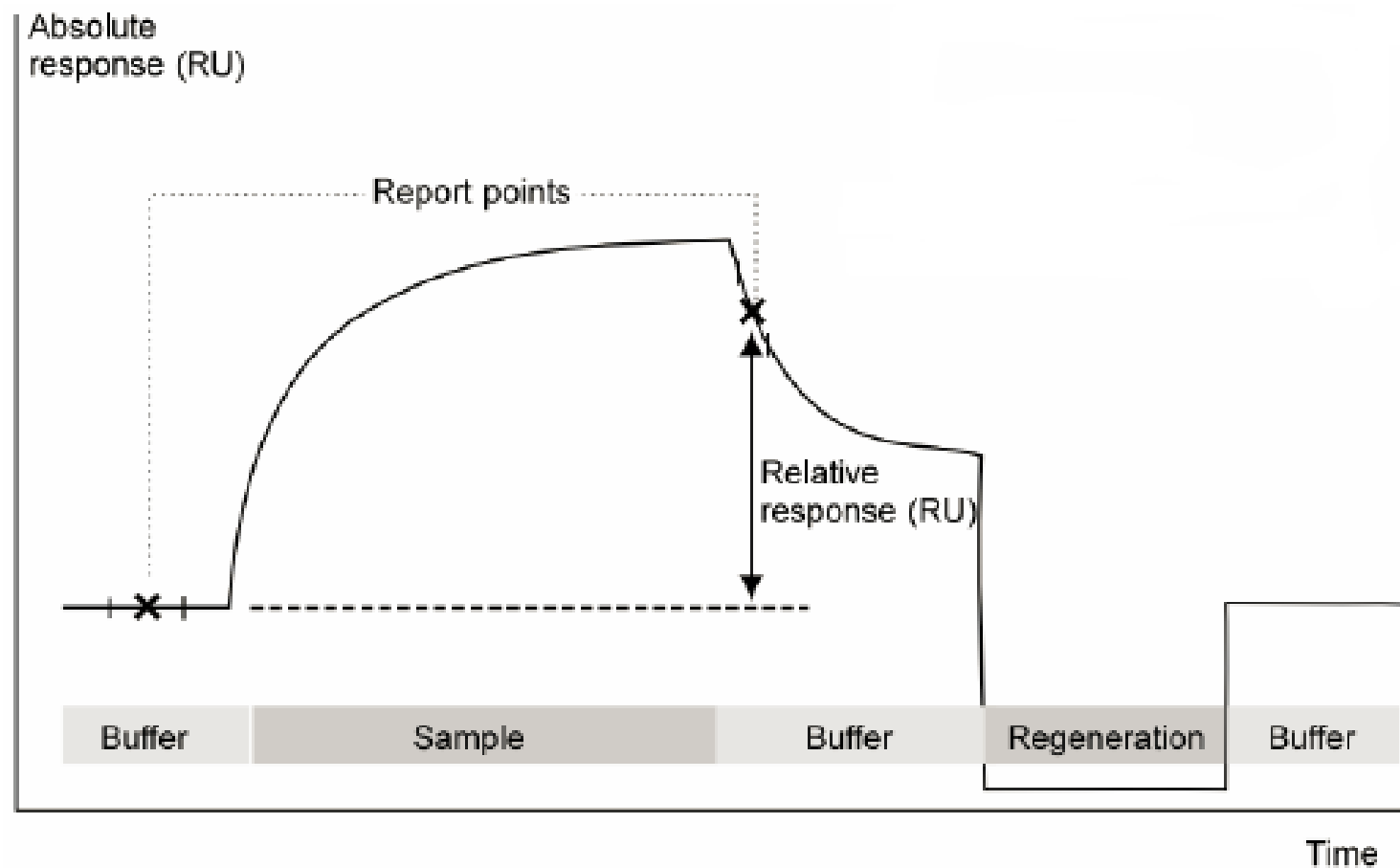
Vazba přes thiol na ligandu

- na povrch se vnese SH skupina
- ligand derivatizován PDEA, vznikne SS vazba (reverz.!)



Sensogram

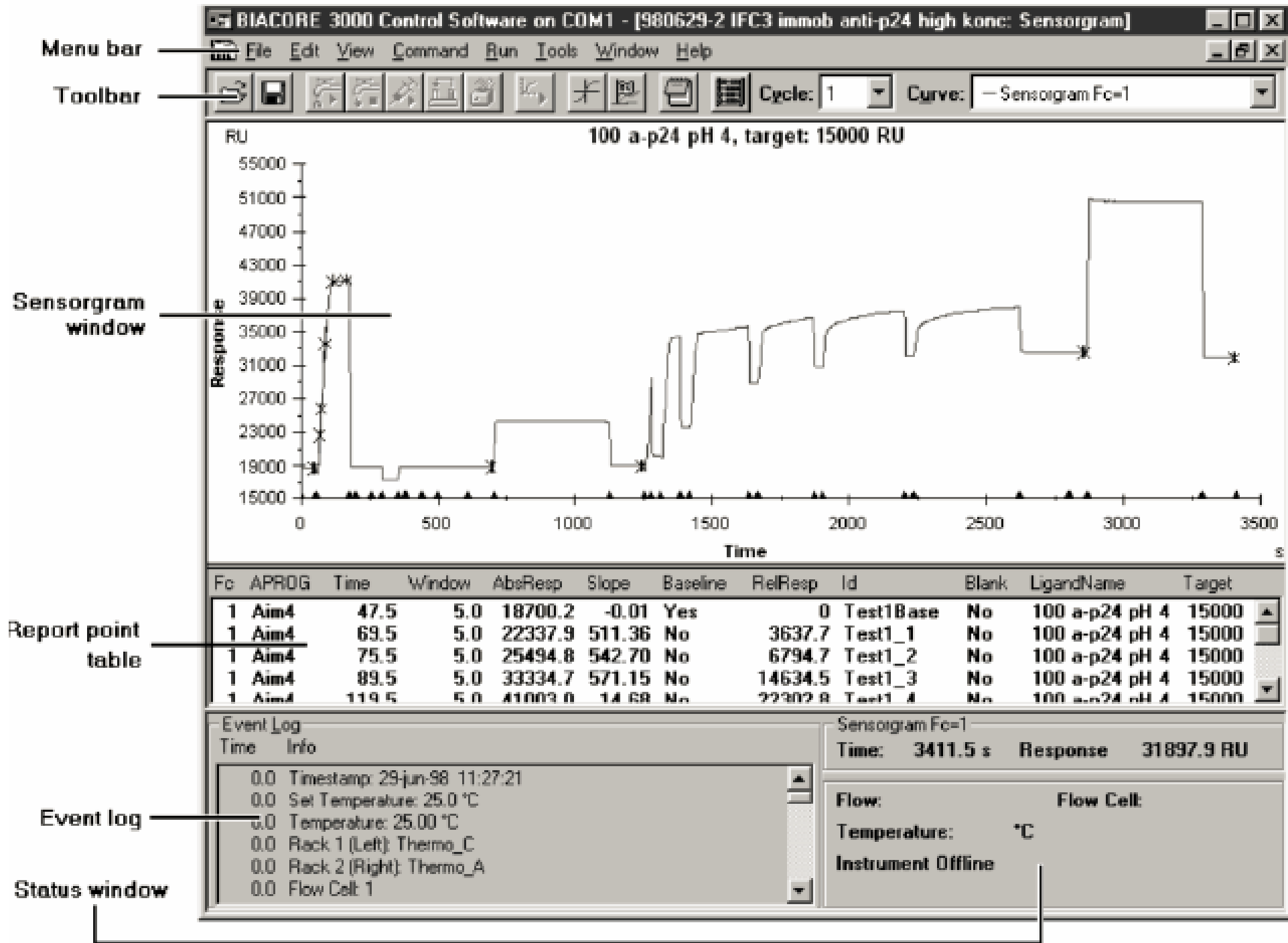
- průběh typického vazebného experimentu
- signál v čase při vazbě biomolekuly na imobilizovaný ligand



- 1) přímé měření se zesílením odezvy
- nejčastější způsob stanovení koncentrace analytu ve vzorku
- vyhodnocovat lze buď rychlost vazby v počátku, nebo změnu signálu po ustálení
- zvolený způsob měření ovlivní analytické parametry stanovení
- rychlost, citlivost, limit detekce
- vícevrstevný (sendvičový) komplex zlepšuje citlivost (např. nanočástice)

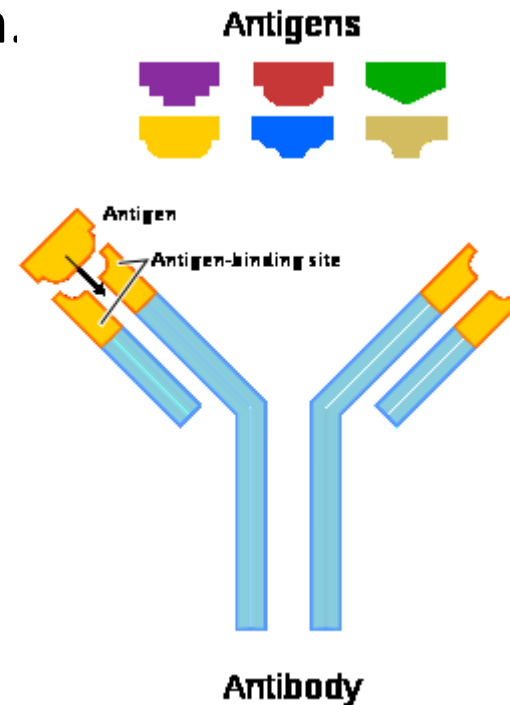
- 2) inhibiční (kompetiční) stanovení
 - pro malé molekuly, jejichž přímá vazba by poskytla nízký signál
 - kalibrační závislosti v log závislosti pro osu x
 - signál vyvolá vazba pomocné detekční molekuly; její afinita a koncentrace ovlivní výrazně průběh stanovení
-
- 3) přímé měření – bez kalibrace
 - pokud není k dispozici standard, lze za podmínek difúzní limitace určit koncentraci analytu z rychlosti vazby (lineární oblast) se znalostí (přibližnou) difúzního koeficientu analytu
 - je potřeba vysoká hustota ligandu, dostatečná velikost analytu (přes 5 kDa) a přiměřená afinita interakce
 - optimální je odezva 0.3–15 RU/s při 5 μ l/min aspoň 30 s, to odpovídá asi 0.05–5 μ g/ml

BiaControl



- Pomocí Biacore systému lze získat:
 - informace o kinetice, affinitě, koncentraci, specifitě, selektivitě a termodynamice biomolekulárních interakcích
 - může být použita v různých oblastech od základního výzkumu po výzkum bioterapeutik a léčiv

- **Antigen** – látka s ktorou špecificky reaguje protilátka a dokáže vyvolať imunitnú odpoveď
- **Protilátka (imunoglobulín)** – proteín, ktorý je súčasťou imunitného systému a je schopný identifikovať a zneškodniť cudzie objekty. Špecificky sa viažu na antigén.



- je technika precipitácie proteínového antigénu z roztoku s použitím protilátky, ktorá sa špecificky viaže na tento konkrétny proteín.
- Zdroje antigénu môžu byť neznačené bunky alebo tkanivá, metabolicky alebo vnútorne označené bunky, translatované proteíny in vitro.

- Cieľové antigény sú zvyčajne imunoprecipitované z komplexných roztokov, ako sú bunkové lyzáty s cieľom izolovať a nakoniec detegovať a merať špecifický proteín

1. Predimobilizácia protilátky proti špecifickému proteínu na nerozpustný nosič (agaróza, magnetické perličky).
2. Inkubácia s bunkovým lyzátom obsahujúcim cieľový proteín. Popri inkubácii sa lyzát mieša a to umožňuje naviazanie antigénu na imobilizovanú látku.
3. Imobilizované imunitné komplexy sa z lyzátu zobierajú, elujú sa z nosiča a analyzujú sa.

1. Voľná neviazaná protilátka sa nechá v lyzáte tvoriť komplexy s proteínom prítomným v lyzáte.
2. Oddelenie pomocou nerozpustného afinitného nosiča

Použitie pri nízkej koncentrácii cieľového proteínu, pri nízkej vazebnej afinite k antigénu, alebo pomalej väzbe protilátky na antigén.

- Identifikácia stavu aktivácie proteínov
- Určenie posttranslačných modifikácií proteínov
- Meranie molekulovej hmotnosti molekúl viažucich sa na proteín pri interakcii proteín-proteín
- Purifikácia a detekcia antigénu

- Imunoprecipitácia a aglutinácia v roztoku
- Imunoprecipitácia v géle
 - Dvojitá imunodifúzia
 - Jednoduchá imunodifúzia

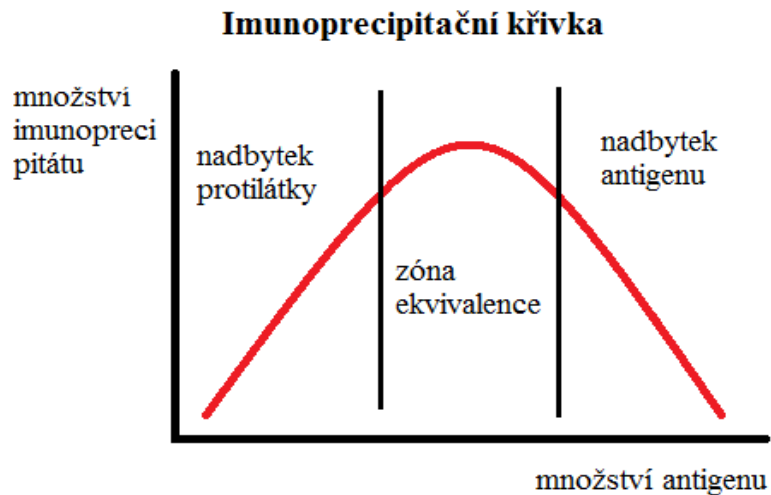
Imunoprecipitační metody

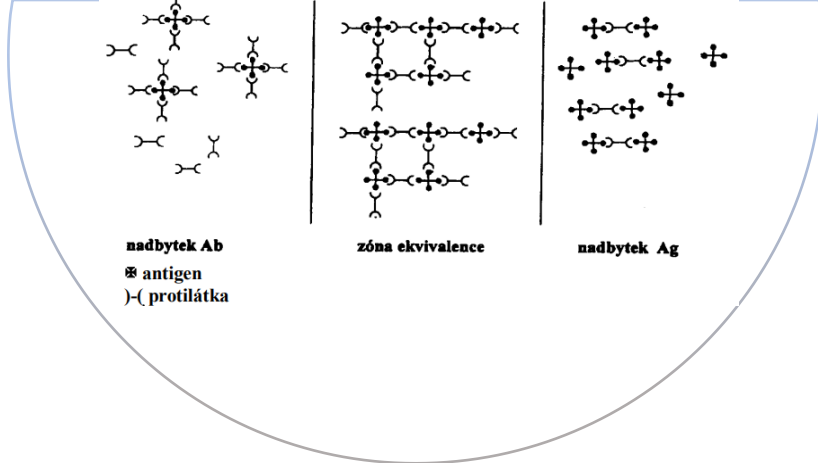
IMUNOPRECIPITAČNÍ KŘIVKA

- základní kvantitativní ukazatel stanovení analytů v tělesných tekutinách
- 1935 Heidelberger a Kendall

1) Oblast nadbytku protilátky

- se zvyšujícím se množstvím Ag vzrůstá precipitát
- na všechna vazebná místa Ag jsou navázány Ab
- malé rozpustné komplexy
- množství komplexu antigen-protilátka úměrné koncentraci přítomného antigenu
- *imunoturbidimetrie a imunonefelometrie*



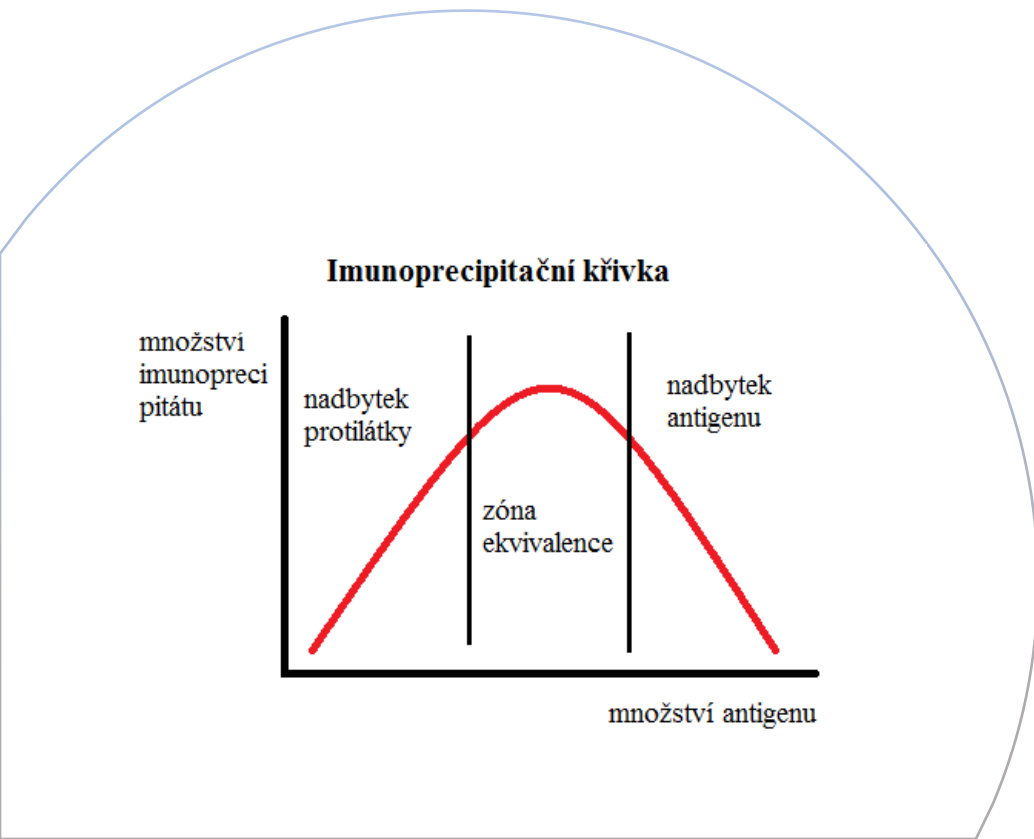


2) Zóna ekvivalence

- propojování molekul Ag a Ab
- velké nerozpustné imunokomplexy s mřížkovitou strukturou, které agregují a vytvářejí imunoprecipitát
- *imunodifúzní metody*

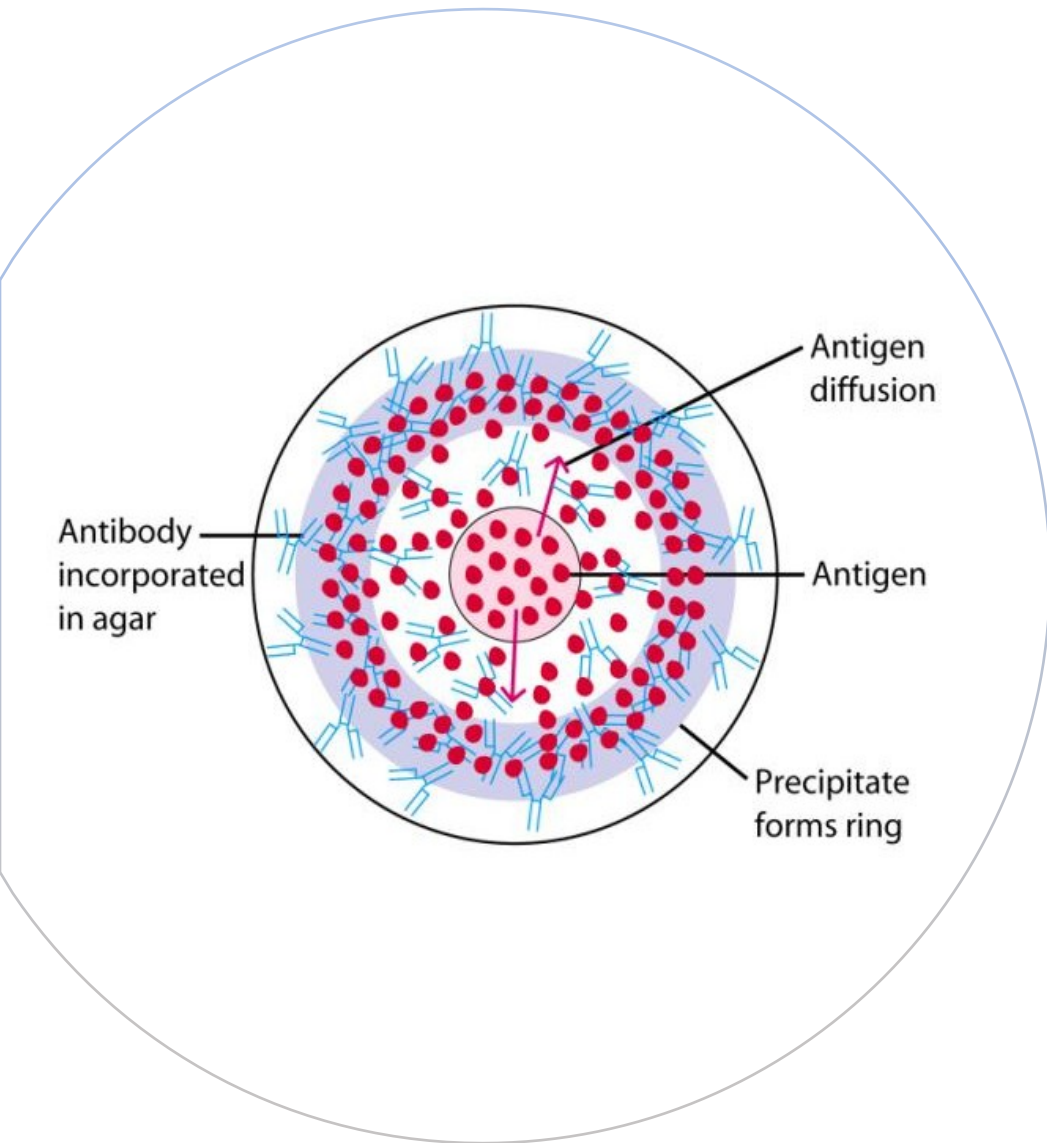
3) Oblast nadbytku Ag

- množství precipitátu klesá v důsledku vysoké koncentrace antigenu
- imunokomplexy se rozpadají
- malé rozpustné imunokomplexy
- *kompetitivní immunoanalýzy*



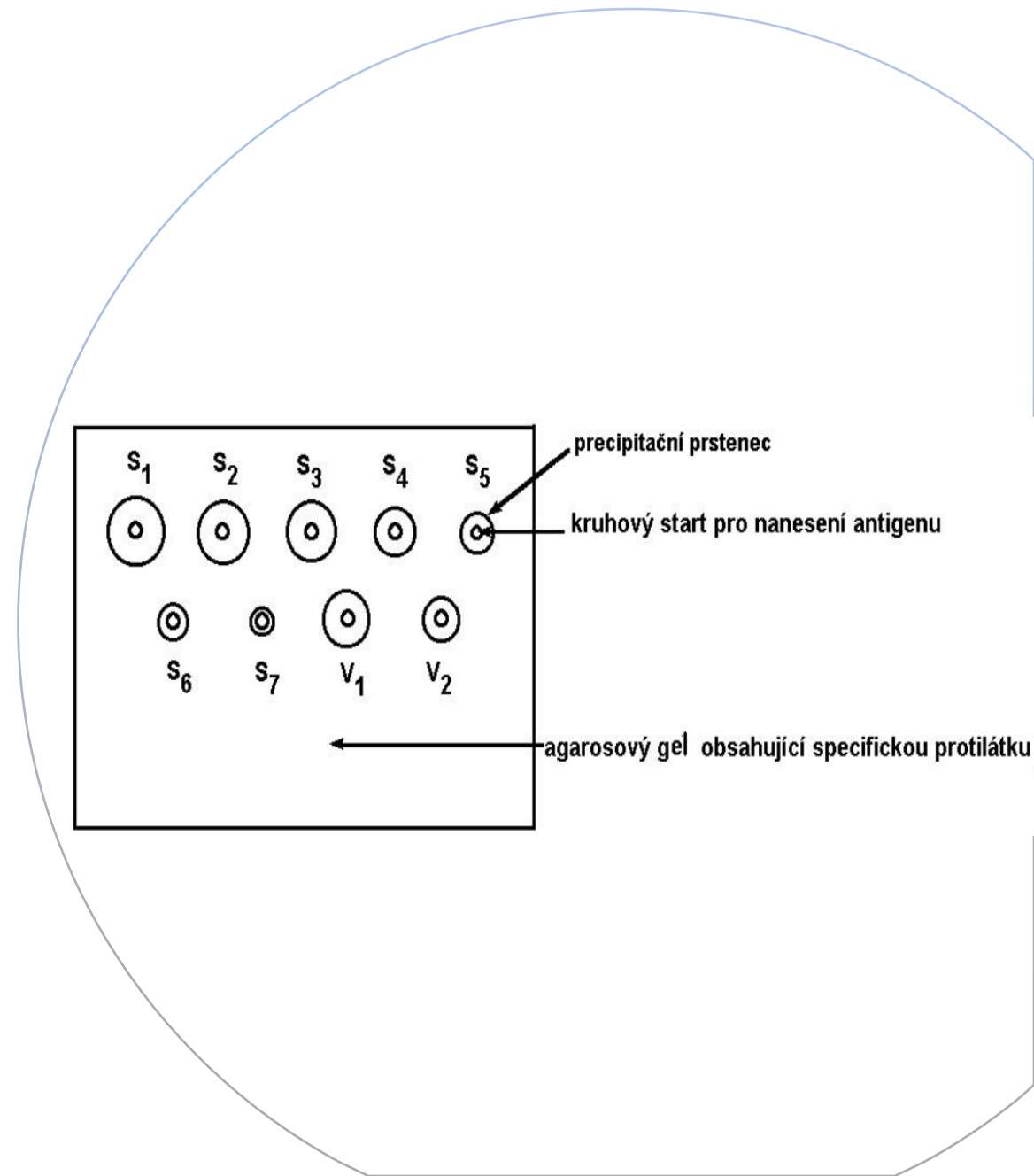
- agar nebo agaróza
- nanášení protilátky a antigenu v různém uspořádání
 - Jednoduchá difúze
 - v agaróze se pohybuje pouze jedna složka (Ab nebo Ag), zatímco druhá je rovnoměrně rozptýlena
 - Dvojitá difúze
 - mohou se pohybovat obě složky volně

Jednoduchá radiální imunodifúze

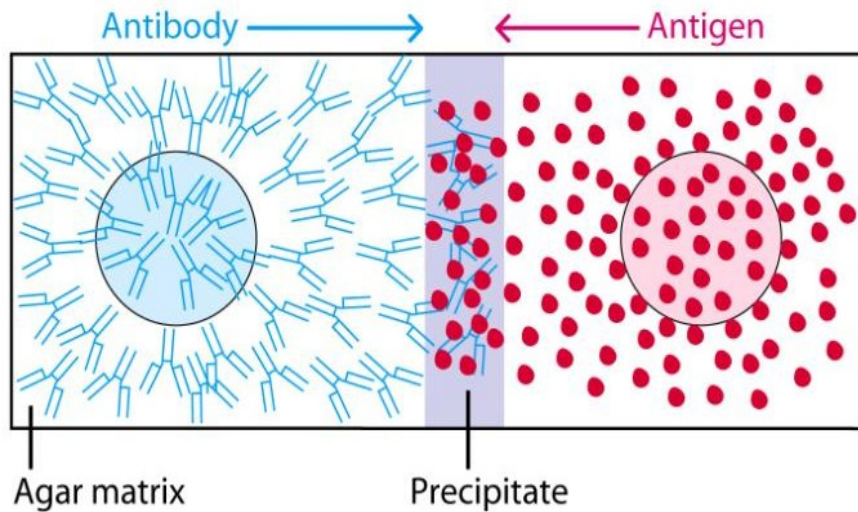


- kvantitativní, nenáročná na přístrojové vybavení
 - 1) vzorek (obs. Ag) na jamku s monosp. Ab
 - 2) inkubace desky při pokojové teplotě 48 – 72 hodin
 - 3) Ag difunduje z jamek radiálně do agarosy; koncentrace protilátky konstantní; až do dosažení ekvivalence
 - 4) komplexy – imunoprecipitát = ostrý bílý prstenec
 - 5) Plocha precipitačního prstence nebo druhá mocnina průměru prstence je přímo úměrná koncentraci antigenu.
- stanovení imunoglobulinů

Jednoduchá radiální imunodifúze

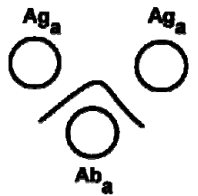


Dvojitá imunodifúze



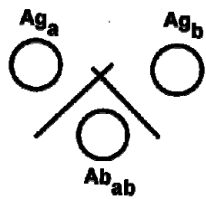
- často se používá úprava podle Ouchterlonyho
- do gelu ve tvaru růžice jamky s Ag nebo Ab
- difundují do okolí jamek radiálně
- při setkání odpovídajících poměrech = precipitát (okolo Ab nanese různé Ag -> precipitáty různých tvarů nebo více Ag ve vzorku -> více linií)
- Podle tvaru linie usuzujeme identitu antigenů

Dvojitá imunodifúze

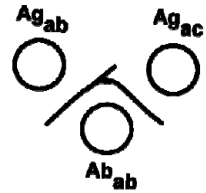


reakce identity

Ab – protilátka, Ag - antigen



reakce neidentity



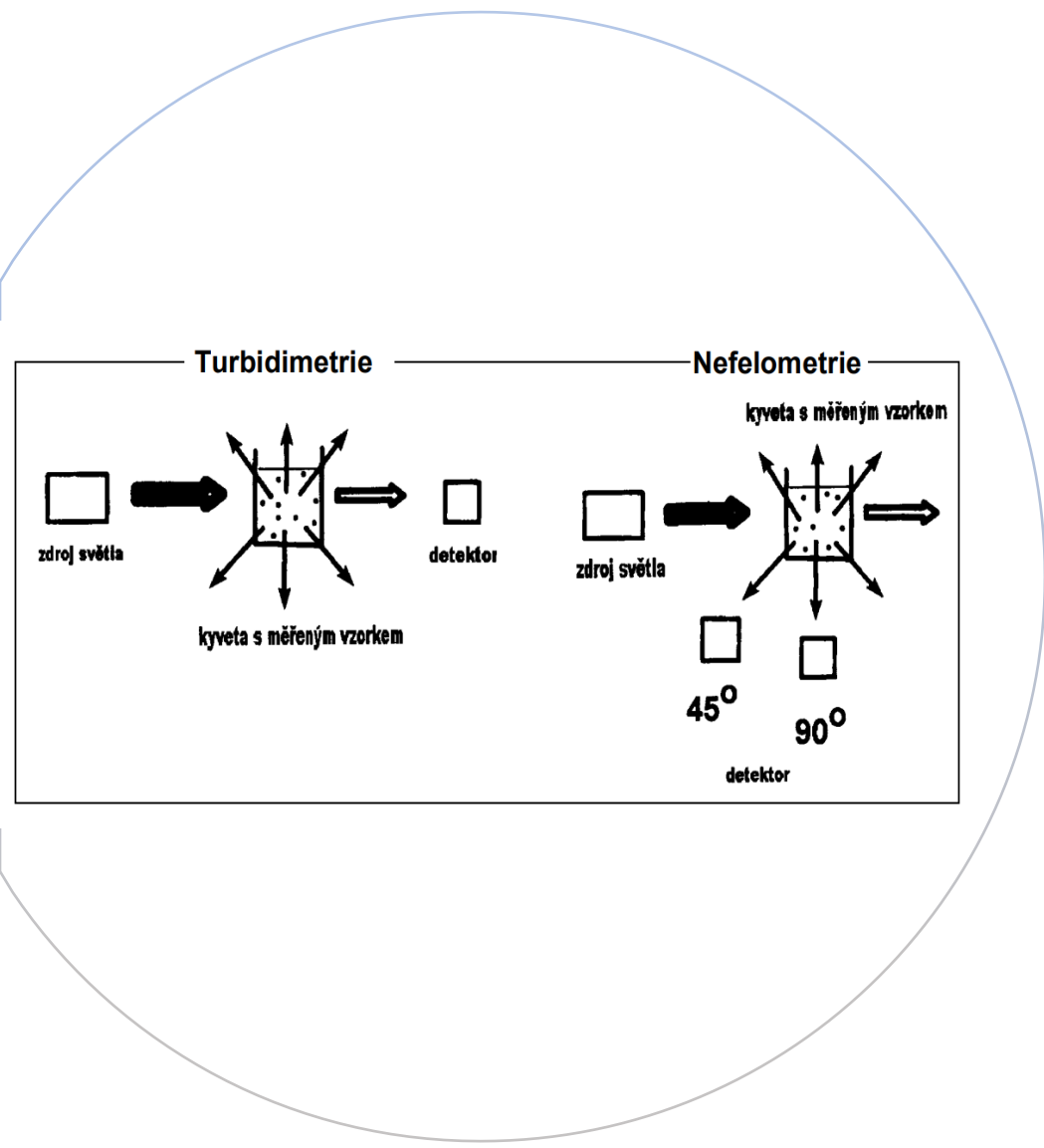
reakce částečné identity

- Ouchterlonyho dvojitá difúze je kvalitativní metoda vhodná k identifikaci Ag a určení jejich imunochemické příbuznosti, pokud jsou k dispozici příslušná antiséra, nebo opačně na důkaz přítomnosti protilátek pomocí čistých antigenů.

Precipitát se může tvořit i v roztoku. Jeho množství se stanovuje kvantitativními metodami: **imunoturbidimetrie** a **imunonefelometrie**.

Metody imunoprecipitace v roztoku jsou rychlejší, ale dražší než radiální imunodifúze

- 1) smícháme roztok s Ag a roztok s Ab
- 2) vznikají malé agregáty a roztok se zakaluje
- 3) agregáty v roztoku rozptylují průchozí světlo a stupeň zákalu je v oblasti nadbytku protilátky úměrný koncentraci antigenu
- 4) a vzniklý zákal se měří turbidimetricky nebo nefelometricky



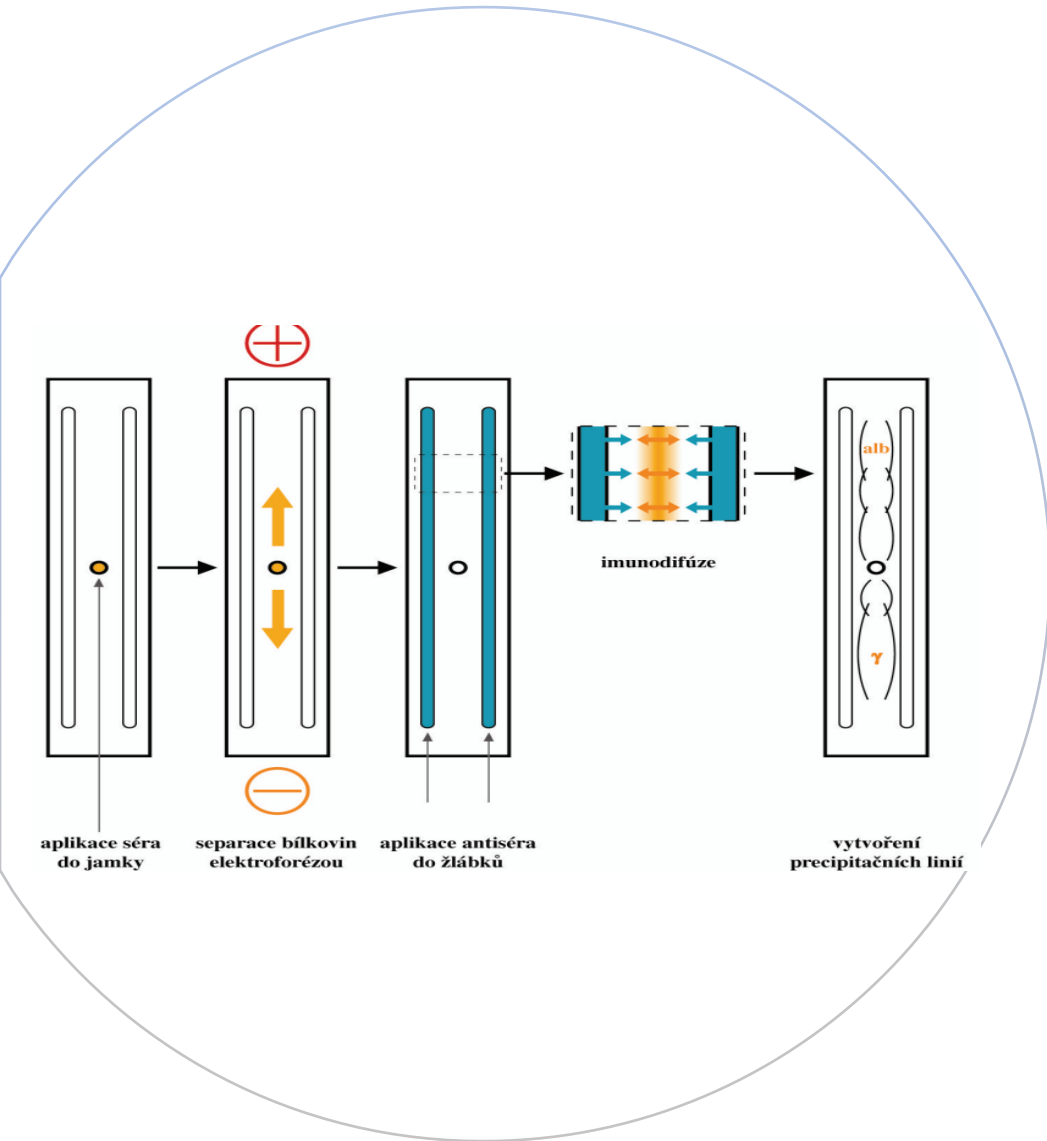
Turbidimetrie využívá optických detekčních systémů, které měří intenzitu světla prošlého v přímém směru jako u klasické fotometrie. Proto je možno k detekci použít běžné spektrofotometry.

Nefelometrie je založena na měření intenzity rozptýleného světla, které vychází z roztoku všemi směry. Měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření, obvykle 45° nebo 90° . Vyžaduje speciální přístroj – nefelometr, využívající jako světelný zdroj obvykle laser.

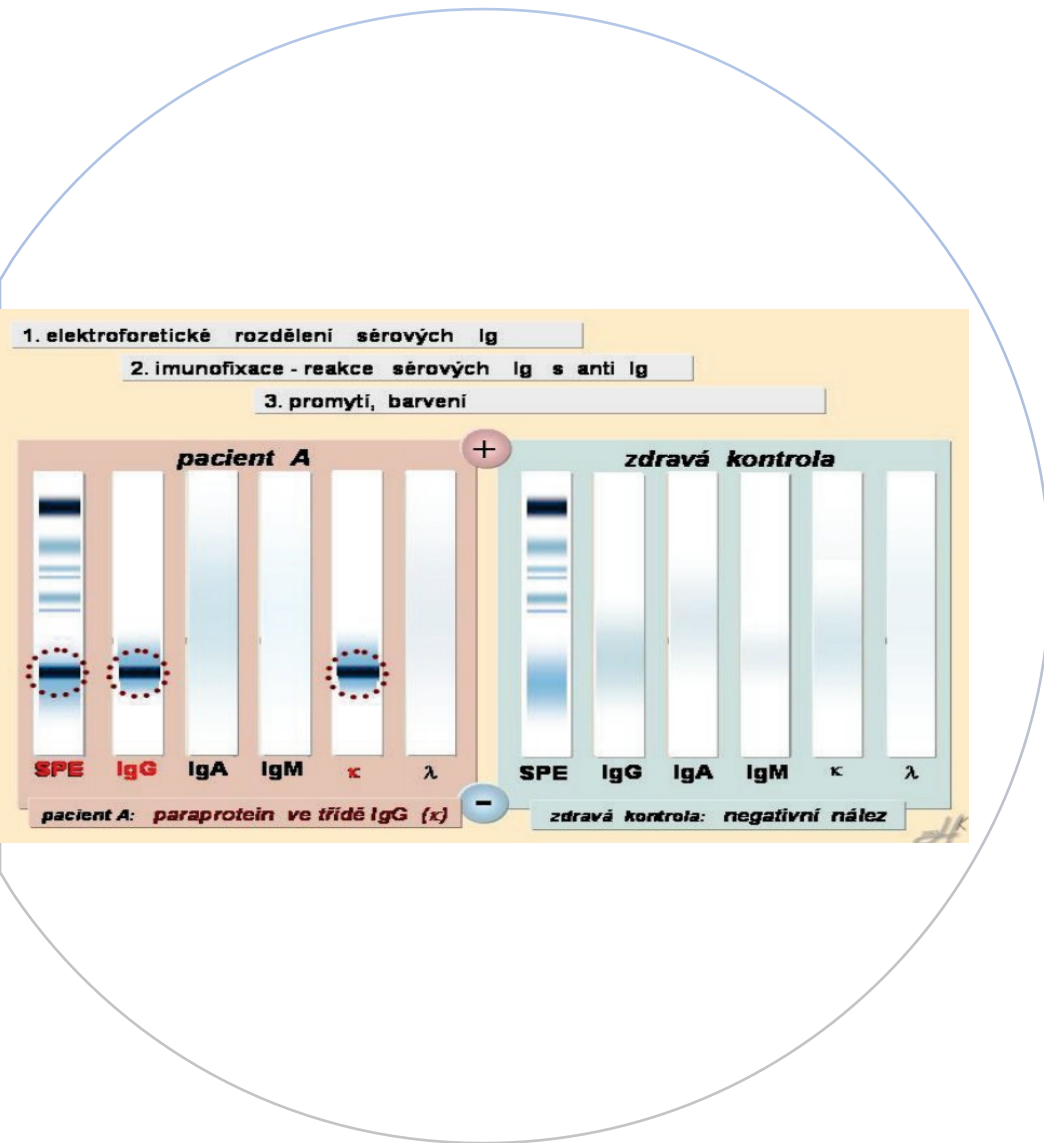
Imunoelektroforéza

= kombinací elektroforézy a difúze

- 1) směs antigenů se rozdělí podle své elektroforetické pohyblivosti na jednotlivé složky
 - 2) kanálek podél elektroforeogramu se naplní požadovaným antisérem – monospecifickým nebo polyspecifickým
 - 3) rozdělené antigeny a protilátky proti sobě difundují a v místě reakce antigenu a odpovídající protilátky se vytvoří precipitační oblouček
- časově náročná technika, ale umožňuje současnou detekci více antigenů



- identifikace a typizace monoklonálních imunoglobulinů v séru, moči nebo mozkomíšním moku
- v gelu
 - 1) směs antigenů se rozdělí podle své elektroforetické pohyblivosti na jednotlivé složky
 - 2) identifikace specifické bílkoviny pomocí imunoprecipitační reakce
- použití vhodného ředění vzorku; k rozpadu imunokomplexu dochází při nadbytku jedné ze složek antigenu nebo protilátky; nízké koncentrace antigenu se nemusí prokázat, pokud vzorek příliš naředíme, a naopak při vysoké koncentraci se imunokomplexy rozpustí a nadbytek je vymyt

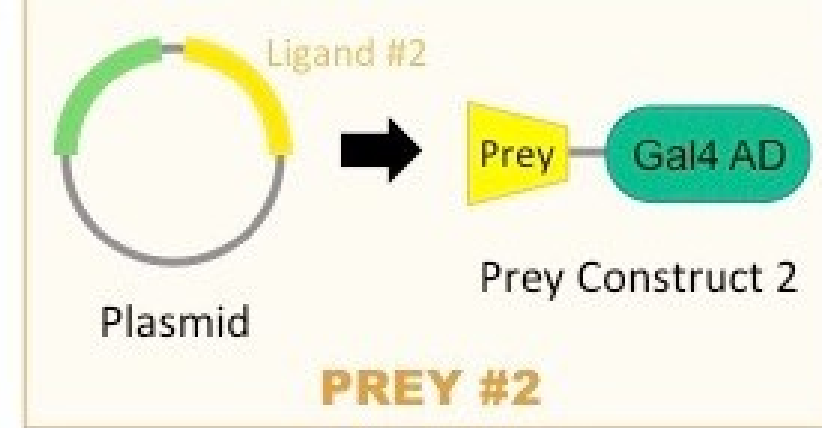
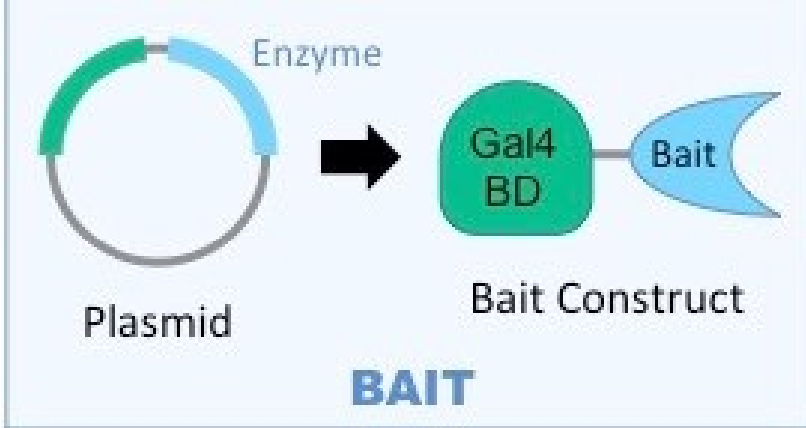


- v gelu 6 startů - vzorek téhož pacienta
- po skončení elektroforézy se na povrch gelu přiloží šablona s vyříznutými proužky v zónách elektroforetických drah
- do prvního proužku, který je určen pouze pro elektroforézu, se aplikuje fixační roztok, do ostatních vyříznutých proužků se nanáší specifické protilátky, které difundují do gelu a v místě, kde reagují s příslušným antigenem vytvářejí imunokomplexy ve formě precipitátu
- promytím vhodným pufrům se odstraní jak antigeny nereagující s aplikovanou protilátkou, tak i nadbytek protilátky
- po promytí v gelu zůstanou pouze nerozpuštěné imunokomplexy, vytvářející ohraničný pruh, který se zvýrazňuje obarvením

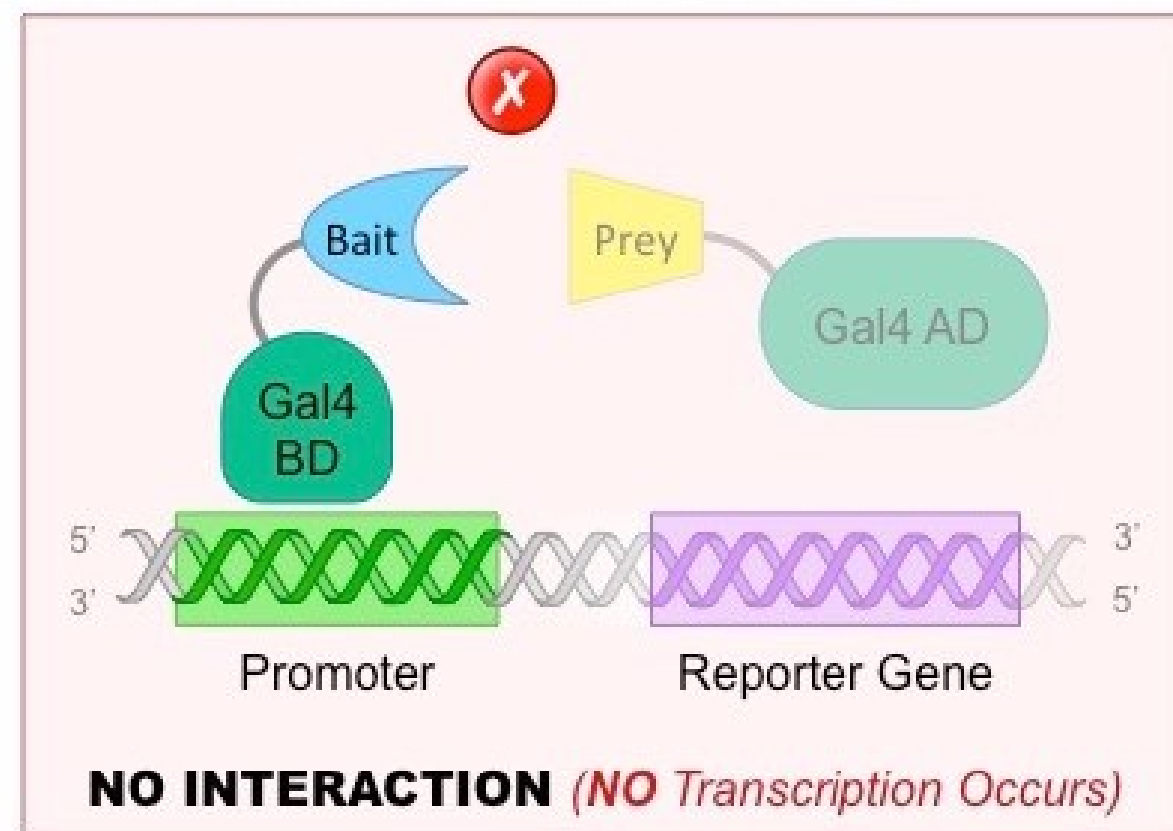
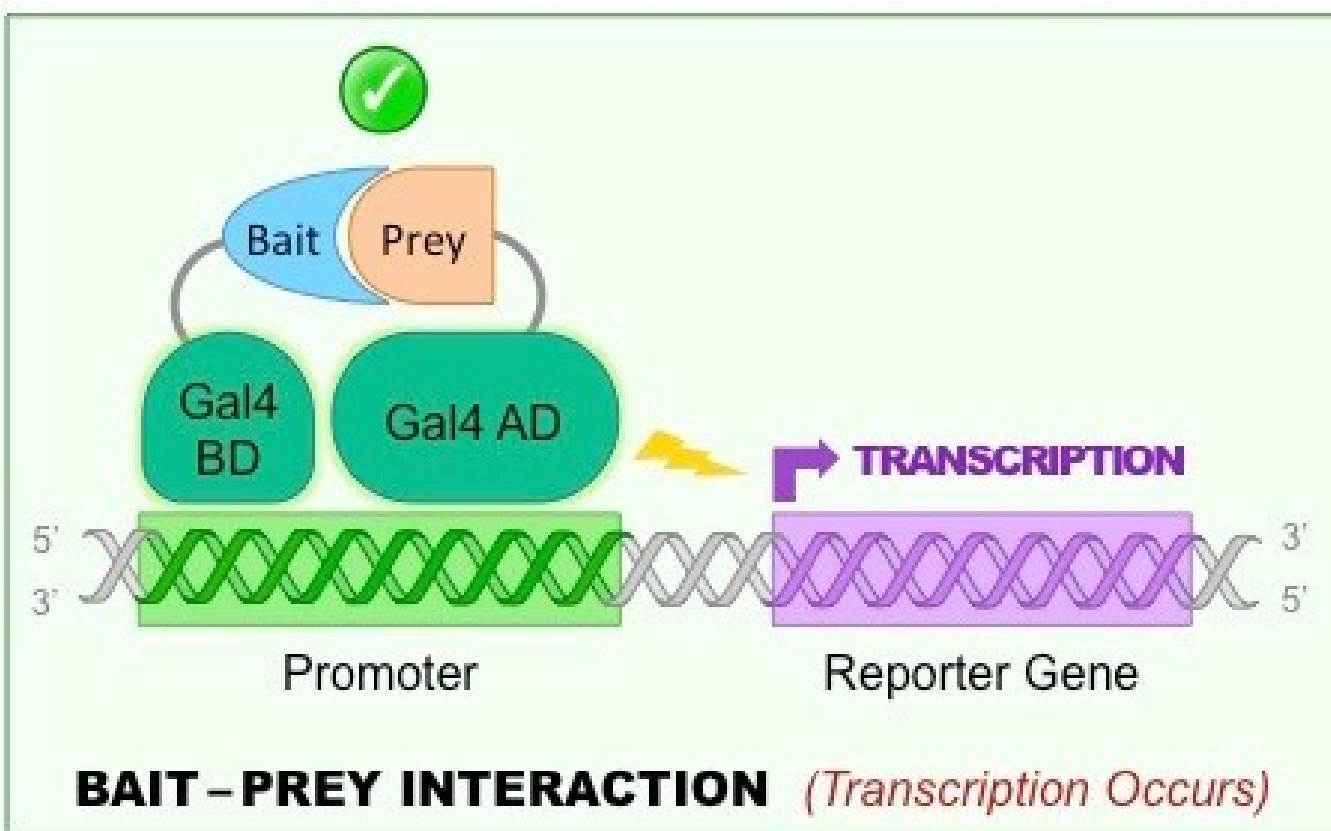
- Použití in vivo – nedochází k ovlivnění umělými podmínkami
- Možnost testovat velké množství proteinů pomocí relativně jednoduchého experimentu
- Nemusíme znát přesný princip chování nebo umístění cílových proteinů

- Obsahuje dvě části AD-schopná aktivovat expresi a DBD- DNA vazebná
- Zkoumaný protein fúzuje s DBD
- Komplex DBDX- návnada (bait)

- Na doménu AD navážeme náhodné proteiny
- Komplex ADY – kořist (prey)



STEP TWO: SCREEN PROTEOME LIBRARY FOR POTENTIAL INTERACTIONS



- Reportérové geny- exprese může být vizualizovaná a kvantitativně hodnocena
 - např. GFP, luciferézy, chloramfenikol acetyl transferéza

- Poskytovala falešné pozitivní či negativní výsledky
- Interakce pouze solubilních proteinů
- Nutné ověření dalšími nezávislými metodami
např. bimolekulární fluorescenční komplementace

- Snížení úrovně exprese cílových proteinů použitím kvasinkových centromerických vektorů
- Využíváno většího počtu reportérských genů

