

METODY STUDIA VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ PROTEINŮ

MARCELA WILDOVÁ a MICHAELA RUMLOVÁ

*Výzkumné centrum GILEAD SCIENCES & ÚOCHB, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 a Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genetiky, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28, Praha 6
rumlova@uochb.cas.cz*

Došlo 19.4.07, přijato 18.5.07.

Klíčová slova: afinitní vazba, fúzní sekvence, identifikace interakčního partnera, imunoprecipitace

Obsah

1. Úvod
2. Metody využívající vazby na nosič
 - 2.1. Koimunoprecipitace
 - 2.2. Separace pomocí afinitních ligandů
 - 2.3. Tandemová afinitní purifikace
3. Detekce interakcí s proteiny imobilizovanými na membráně
4. Chemické prokřížení bifunkčními činidly
5. Otisk proteinu
6. Kvasničný dvojhybridní systém
7. Prezentace peptidů pomocí fágů
8. Přenos rezonance fluorescenční energie
9. Závěr

1. Úvod

Jednou ze základních vlastností proteinů je tvorba specifických nekovalentních komplexů, které hrají klíčovou roli ve většině buněčných procesů. Předpokládá se, že všechny proteiny v buňce jsou součástí obrovské proteinové sítě (angl. „interactome“), ve které vzájemné vazby proteinů přechodně vznikají a zanikají. Odhaduje se, že na jeden protein připadá průměrně pět interakčních partnerů, což značně převyšuje komplexnost genomu¹. K porozumění dějů probíhajících v buňce na molekulární úrovni je tedy třeba studovat kromě izolovaných proteinů i proteinové komplexy. Identifikace a charakterizace interakčních partnerů, proteinových komplexů a jimi tvořených proteinových sítí přispěly během posledních 15 let k poznání řady procesů v organismech. Tohoto pokroku by nebylo možno dosáhnout bez progresivního rozvoje technik a metodik pro studium vzájemných proteinových interakcí.

Typy interakcí mezi proteiny mohou být klasifikovány na základě biologického významu (interakce enzym-inhibitor, antigen-protilátka, receptor-ligand nebo interakce v multiproteinových komplexech jako jsou např. ribosomy) nebo na základě chemické podstaty (slabé a přechodné vs. silné a trvalé, elektrostatické interakce, vodíkové vazby, van der Waalovy síly a hydrofobní efekty). Základní vlastností interakce mezi proteiny je její specifita, která ji odlišuje od náhodných kolizí způsobených Brownovým pohybem.

Řada interakcí je přechodného charakteru např. během enzymové modifikace proteinů (zprostředkovaných proteinkinasami, proteinfosfatasami, transferasami, proteasami atd.), při tvorbě transkripčních komplexů, transportu proteinů přes membrány, sbalení proteinů pomocí dohlížejících proteinů (chaperonů) atd. Studium těchto přechodných komplexů je obtížnější a závisí na nalezení podmínek stabilizace komplexu.

Tento článek poskytuje přehled o technikách, běžně používaných pro identifikaci a charakterizaci vzájemných interakcí mezi proteiny. Důležitý byl i vývoj instrumentálních technik, jako je hmotnostní spektroskopie, mikrokaloimetrie a povrchová plasmonová rezonance. Dále pak rozvoj speciálních mikroskopických technik jako např. mikroskopie atomárních sil nebo metody fluorescenční mikroskopie jako FRET (fluorescence resonance energy transfer), umožňující identifikovat vzájemné interakce proteinů přímo v živých buňkách.

2. Metody využívající vazby na nosič

Studovaný protein je po navázání na nosič (např. sepharosa, agarosa) využit k zachycení interakčních partnerů např. z buněčného extraktu. Protein může být imobilizován kovalentně, na komerčně dostupné aktivované nosiče, nebo nekovalentně, prostřednictvím afinitní vazby. Nejčastěji je pro imobilizaci využívána fúzní sekvence, např. hexahistidinová kotva (6xHis), glutathion S-transferasa (GST), hemagglutinin (HA), 8 aminokyselinový epitop FLAG (viz tab. I), která je při translaci připojena k N- či C-konci studovaného proteinu. Toho lze dosáhnout bakteriální expresí fúzního genu připraveného metodami genového inženýrství. Po odstranění nespecificky navázaných proteinů několikanásobným promytím nosiče, jsou komplexy interagujících a navázaných proteinů z nosiče uvolněny, buď denaturací např. povařením v denaturujícím pufru pro SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu, nebo za nativních podmínek např. zvyšující se koncentrací solí, kompetujícími molekulami, chaotropními rozpouštědly atd. Navázané proteiny jsou detegovány SDS elektroforézou v polyakrylamidovém gelu, western blotem, hmotnostní spektroskopií, N-koncovým sekvenováním nebo,

Tabulka I
Přehled běžných fúzních sekvencí

Fúzní sekvence	Velikost	Typ purifikace	Vázací složka	Eluční činidlo	Dostupnost (příklady)
Protein A	14 kDa	afinitní	IgG	štěpení TEV	GE Healthcare
His	6 ak (HHHHHH)	afinitní	Ni-NTA	imidazol	Qiagen
GST	26 kDa	afinitní	glutathion	glutathion	Novagen
FLAG	8 ak (DYKDDDDK)	imunoafinitní	anti-FLAG Ab	FLAG	Sigma
MBP	40 kDa	afinitní	amylosa	maltosa	Biolabs
CBP	4 kDa	afinitní	kalmulin	EGTA	GE Healthcare
c-myc	10 ak (EQKLISEEDL)	afinitní	anti-c-myc Ab	–	Sigma
HA	9 ak (YPYDVPDYA)	afinitní	anti-HA Ab	–	Sigma

Protein A – povrchový glykoprotein ze *Staphylococcus aureus*, interagující s imunoglobuliny; TEV proteasa – 27 kDa katalytická doména proteinu Nuclear Inclusion a (NIa) z viru TEV (tobacco etch virus); His – sekvence 6 histidinů; GST – glutathion-S-transferasa; FLAG – epitop peptid 8 aminokyselin; MBP – (Maltose-Binding Protein) protein vázající maltosu; CBP – (Calmodulin-Binding Protein) protein vázající kalmulin; c-myc – epitop z protoonkogenu myc; HA – epitop z hemaglutininu; ak – aminokyselina; Ni-NTA – agarosa s chelatačně navázanými nikelnatými ionty; Ab – protilátka

v případě radioaktivně značených proteinů, autoradiograficky.

Důležitými parametry jsou čistota proteinu, zachování nativní struktury, koncentrace imobilizovaného proteinu a množství aplikovaného buněčného lyzátu, obsahujícího interagující protein. Výhody této metody spočívají v její citlivosti (deteguje i interakce, jejichž vazebná konstanta se pohybuje v řádu 10^{-5} M) a ve skutečnosti, že testuje všechny proteiny buněčného extraktu. Zachycené proteiny tedy mezi sebou soutěží o vazebná místa interakčního partnera, imobilizovaného na koloně. Další výhodou je identifikace interakce nejen monomerních proteinů, ale i proteinových komplexů.

Nevýhodou této techniky je paradoxně její citlivost, vedoucí k falešně pozitivním výsledkům. Proto je nutno výsledky získané afinitní chromatografií potvrdit ještě další, nezávislou metodou (např. koimunoprecipitací).

2.1. Koimunoprecipitace

Princip spočívá v šetrné lyzi buněk, nepoškozující proteinové komplexy, s následným přidáním protilátky, rozpoznávající testovaný protein. Poté je komplex interagujících proteinů a dané protilátky imunoprecipitován částicemi sepharosy či agarosy s navázaným proteinem A ze *Staphylococcus aureus* a precipitované proteiny jsou analyzovány². Prokazujeme-li interakci dvou známých proteinů, může být identita interagujícího proteinu potvrzena použitím imunochemických technik, např. pomocí western blotu. Ke zjištění neznámých interakčních partnerů se většinou používá rozdělení proteinů pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s následným barvením komerčně dostupnými barvivými jako Coomassie blue, SYPRO Ruby nebo Deep Pyrole. V případě metabolicky radioaktivně značených proteinů (např. 35 S) probíhá

detekce autoradiograficky. Příslušné proteiny lze po rozdělení identifikovat např. Edmanovým sekvenováním nebo hmotnostní spektroskopií (mass spectroscopy – MS). Pro Edmanovo sekvenování je zpravidla požadováno cca 10 pikomolů proteinu. MS metody jsou citlivější a pro sekvenování vyžadují pikomolová množství proteinu.

Tato metoda se používá pro testování interakcí mezi dvěma známými proteiny nebo pro identifikaci nových interakcí. Při tomto postupu je nezbytné, aby proteinový komplex zůstal nativní během série promývacích kroků. Přechodné interakce a interakce s nízkou afinitou, které v buňce ve stavu dynamické rovnováhy existují, nebudou touto metodou identifikovány. Výhodou koimunoprecipitace je detekce interakcí za fyziologických podmínek v buňce včetně posttranslačních modifikací interagujících proteinů.

2.2. Separace pomocí afinitních ligandů

Tato metoda (anglicky nazývaná Pull-down) je analogická těm, využívajícím k detekci proteinů protilátky (western blot, imunoprecipitace, koimunoprecipitace), a jejich princip spočívá v připojení afinitního ligandu pro navázání nebo identifikaci proteinu. V současné době je využívána řada fúzních ligandů³ jako např. hexahistidinová kotva (6xHis), glutathion S-transferasa (GST), hemaglutinin (HA), 8 aminokyselinový epitop FLAG (viz tab. I).

Tato technika byla poprvé použita ke zjištění interakcí mezi proteinem modifikovaným glutathion S-transferasou (GST) a jeho možnými interakčními partnery v roztoku⁴. Testovaný protein s terminálně připojeným ligandem je purifikován pomocí komerčních afinitních nosičů (tab. I) a je použit jako „návnada“ pro interagující proteiny při-

tomné v buněčném lyzátu. Buněčný lyzát je inkubován s nosičem obsahujícím navázanou „návnadu“. Po odstředění je peletovaný nosič s navázanými proteinovými komplexy promyt a po povaření v denaturačním pufru analyzován SDS elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (např. v kombinaci se specifickou detekcí jako je western blot s protilátkou proti předpokládanému interakčnímu partneru). Obecně lze tuto metodu použít k identifikaci interakcí mezi fúzním proteinem a neznámými proteiny^{4,5} nebo k potvrzení interakce mezi dvěma známými proteiny^{6,7}. V případě charakterizace nových interakčních proteinů je SDS-PAGE následovaná hmotnostní spektroskopií nebo N-terminálním sekvenováním.

2.3. Tandemová afinitní purifikace

Jsou-li k proteinu připojeny dvě nebo více fúzních sekvencí, ať k N- či C-koncové části, hovoříme o tandemové afinitní purifikaci (TAP). Fúzní protein je nejprve purifikován pomocí jedné fúzní sekvence, která je posléze odstraněna proteolytickým štěpením. Tím dojde k odhalení druhé fúzní sekvence, využitelné pro další purifikaci. Tím jsou významně omezeny falešně pozitivní výsledky. Touto metodou byla popsána detekce nových interakčních partnerů v tkáňových buňkách^{8,9}.

V klasickém uspořádání TAP je protein syntetizován s připojenou doménou proteinu A ze *Staphylococcus aureus* vážící imunoglobulin G (IgG). Ta je následovaná další afinitní značkou, zpravidla peptidem vážícím protein

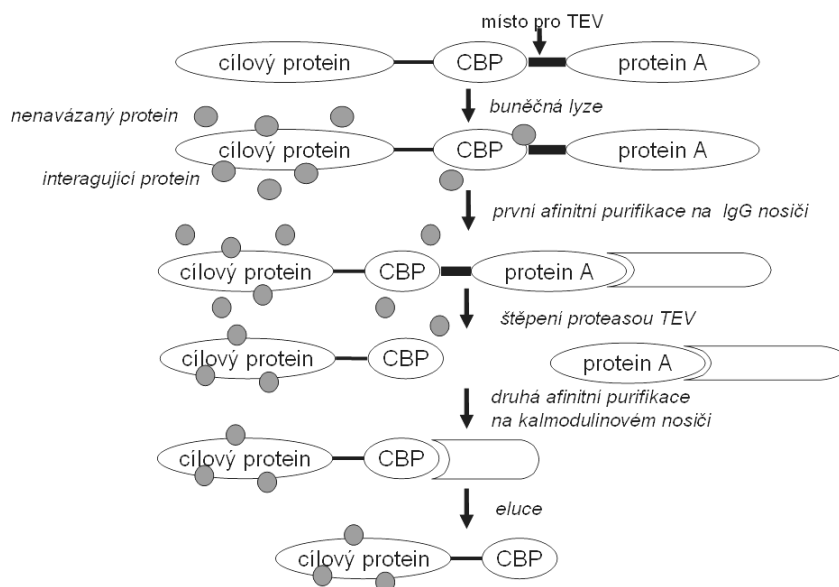
kalmodulin (calmodulin binding peptide – CBP). Mezi oběma doménami je štěpné místo pro proteasu z viru TEV (tobacco etch virus)⁸ (viz obr. 1).

Komplexy TAP fúzních proteinů s interakčními partnery jsou z buněčného lyzátu izolovány pomocí afinitní purifikace použitím IgG nosiče. Fúzní sekvence proteinu A je odstraněna štěpením proteasou TEV, čímž jsou proteinové komplexy s CBP kotvou specificky uvolněny z nosiče. Následuje druhá purifikace využívající kalmodulinového nosiče, za přítomnosti vápenatých iontů. K identifikaci interagujících proteinů po jejich elektroforetickém rozdělení se využívá technik MALDI-TOF MS nebo tandemové hmotnostní spektroskopie¹⁰.

Přes patrné přednosti není TAP univerzální metodou, vhodnou pro všechny případy. Přítomnost TAP-fúzní sekvence (~ 20 kDa) může negativně ovlivňovat konformaci proteinu, a tím i jeho interakci s vazebnými partnery¹¹. Řešením může být například umístění fúzní sekvence na opačný konec proteinu či použití jiných, menších fúzních sekvencí.

3. Detekce interakcí s proteiny imobilizovanými na membráně

Tato metoda (anglicky označována far western) je založena na testování vazby na proteiny imobilizované po elektroforetickém rozdělení na membráně¹². Další variantou je přenesení různých vzorků na membránu vakuovým



Obr. 1. Schématické znázornění tandemové afinitní purifikace; cílový protein je připraven ve fúzi ke dvěma fúzním sekvencím: CBP (sekvence proteinu vážající kalmodulin) a proteinu A, navzájem spojených krátkou sekvencí obsahující místo pro proteasu z viru TEV (tobacco etch virus). Nejprve jsou komplexy fúzních proteinů s interakčními partnery z buněčného lyzátu izolovány pomocí afinitní purifikace použitím IgG nosiče. Fúzní sekvence proteinu A je odstraněna štěpením proteasou TEV, čímž jsou proteinové komplexy s CBP kotvou specificky uvolněny z nosiče. Následuje druhá purifikace využívající kalmodulinového nosiče, za přítomnosti vápenatých iontů

prosátím (tzv. dot nebo slot blot). Membrána, obsahující takto rozdělené proteiny, je po zablokování nespecifických interakcí (inkubací např. s albuminem), inkubována s proteinem, pro nějž hledáme interakční partnery. Po následném promytí eliminujícím slabé, nespecifické interakce je přítomnost navázaného studovaného proteinu zjišťována většinou imunochemicky (detekce analogická western blotu). Místo protilátky lze použít specifickou sekvenci např. hexahistidinovou kotvu (6xHis), glutathion S-transferasu (GST), epitop z hemaglutininu (HA), 8 aminokyselinový epitop FLAG, epitop z protoonkogenu myc (c-myc), která může být připojena k proteinu při bakteriální expresi fúzního genu, kódujícího takovouto chiméru. Interagující protein může být při produkci také radioaktivně značen (inkorporací aminokyseliny značené pomocí ^{35}S) pro velmi citlivou autoradiografickou detekci.

4. Chemické prokřížení bifunkčními činidly

Tato metoda se pro studium vzájemných interakcí proteinů používá již více než 50 let a je tedy jednou z nejstarších a nejpoužívanějších. Cílové skupiny postranních řetězců interagujících proteinů, nacházející se ve vzdálenosti odpovídající délce bifunkčního činidla, jsou chemicky prokříženy kovalentní vazbou, čímž jsou jejich vzájemné interakce stabilizovány. Vzniklé multimery jsou po elektroforetickém rozdělení za denaturačních podmínek (SDS-PAGE) identifikovány na základě vyšší molekulové hmotnosti. Metoda může být kombinována s imunochemickou detekcí či hmotnostní spektroskopií¹³. V současné době našla tato metoda největší uplatnění při potvrzování nově nalezených interakcí proteinů pomocí dvojhybridního systému, imunoprecipitace nebo koimunoprecipitace.

Většinou jsou při prokřížení využívány nukleofilní substituční reakce, ve kterých postranní řetězec atakující aminokyseliny poskytuje pár elektronů bifunkčnímu činidlu, za vzniku kovalentní vazby. Běžně používaná bifunkční činidla obsahují dvě chemicky reaktivní skupiny, které reagují se dvěma postranními řetězci aminokyselin cílových proteinů. Část činidla, spojující dvě reaktivní skupiny, nazývaná linker, určuje vzdálenost mezi reaktivními skupinami a přispívá k celkové geometrii bifunkčního činidla a k jeho rozpustnosti.

Podle reaktivních funkčních skupin můžeme bifunkční činidla rozdělit na homobifunkční, obsahující identické reaktivní skupiny (např. N,N' -*p*-fenylenbismaleimid (p-PDM), dimethyl-pimelimidát (DMP), disukcinimidylglutarát (DSG)), a na heterobifunkční, obsahující různé funkční skupiny (např. *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysukcinimid ester (MBS)). Mezi heterobifunkční činidla patří také tzv. světlem aktivovatelné linkery, které obsahují chemicky reaktivní a fotoreaktivní skupiny¹⁴. Tato fotoreaktivní skupina je aktivována světlem o určité vlnové délce. Nedávno byla také vyvinuta trifunkční činidla, zahrnující látky, které obsahují dvě reaktivní skupiny pro prokřížení proteinů a třetí skupinu (často biotin), umožňující

detekci a purifikaci prokřížených proteinů¹⁵. Další skupinou jsou činidla s nulovou délkou (angl. zero-length cross-linker)¹⁶. Tato činidla (např. 1-ethyl-3-[3-dimethylamino-propyl]karbodiimid (EDC)) aktivují funkční skupiny postranních řetězců na cílových proteinech, čímž umožňují vytvoření kovalentních vazeb bez linkeru. Pro snadnější identifikaci prokřížených proteinů může být použito značené bifunkční činidlo. Mezi nejpoužívanější značky patří fluorofory, chromofory detegovatelné ve viditelné oblasti a radionuklidy, především ^{125}I .

Chemické prokřížení má tu výhodu, že prokřížené proteiny interagují za nativních podmínek a může být tedy prováděno nejen *in vitro* ale i *in vivo*^{17,18}. Další předností ve srovnání s ostatními metodami je možnost zachytit i velmi slabé interakce, jinými metodami téměř nepostihnutelné, a možnost detekce přechodných interakcí, které jsou prokřížením „zamrazeny v čase“. Nevýhodou je nízká specifita při použití dlouhých bifunkčních činidel, kdy k prokřížení proteinů může dojít i tehdy, nacházejí-li se poblíž, aniž by spolu interagovaly.

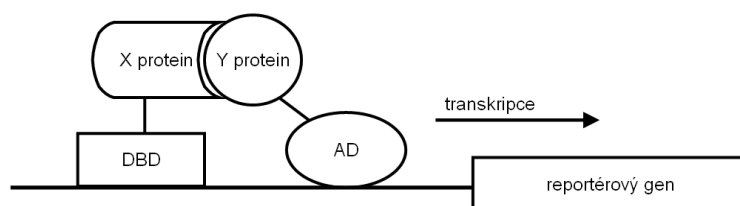
5. Otisk proteinu

Jedná se o metodu, využívající chemického nebo proteolytického štěpení ke zjištění oblastí proteinu, chráněných nebo naopak obnažených při vytváření proteinových komplexů¹⁹. Isotopově *N*- nebo *C*-koncově radioaktivně značený protein je smíchán s interakčním partnerem a tato směs, stejně jako kontrolní vzorek, jsou podrobeny proteolýze. Proteolýza může probíhat působením malých chemických sloučenin (např. vytvářejících hydroxylové radikály) nebo enzymově (např. proteinasou K nebo trypsinem). Produkty štěpení jsou poté analyzovány denaturující SDS elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a jsou porovnány štěpné produkty samotného proteinu a proteinu, který byl součástí komplexu²⁰. Štěpné produkty mohou být identifikovány *N*-koncovým sekvenováním či hmotnostní spektroskopií.

Metoda je snadno proveditelná a díky citlivému koncovému značení postačuje k reakci malé množství proteinu. Protein však nesmí obsahovat endogenní fosforylační místa, rozpoznávaná proteinkinasou A a je třeba ověřit, zda vzorek neobsahuje kratší formy proteinu, které by vedly ke zkreslení výsledků.

6. Kvasničný dvojhybridní systém

Skutečný průlom v testování interakcí proteinů *in vivo* přinesl před 18 lety kvasničný dvojhybridní systém vyvinutý pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (yeast two hybrid Y2H)²¹. Jedná se o metodu založenou na rekonstituci funkčního transkripčního faktoru, sestávajícího z DNA-vazebné domény (DBD), zajišťující lokalizaci faktoru na specifickém místě DNA, a aktivační domény (AD), která je vlastní katalyticky aktivní doménou pro transkripci. Rozdělení DBD a AD inaktivuje transkripci



Obr. 2. Schématické znázornění kvasničného dvojhybridního systému; interakci mezi proteiny X a Y, připravených ve fúzi k vazebné doméně DBD-X a k aktivační doméně AD-Y, je umožněna transkripce reportérového genu

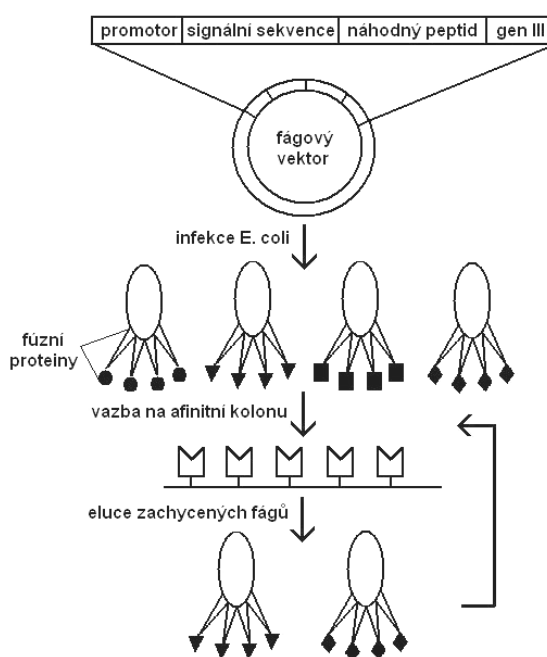
faktor, ale jeho funkce může být obnovena koexpresí a opětovnou asociací DBD a AD. Y2H využívá tohoto jevu k identifikaci interakce proteinů, která zajistí spojení obou domén (DBD a AD) a tím aktivaci transkripčního faktoru. Pro tento účel je konstruována fúze DBD s proteinem X, ke kterému hledáme interakčního partnera, tzv. „návnadový protein“ (bait protein), a fúze AD s knihovnou potenciálních interakčních partnerů Y, tzv. „kořist protein“ (prey protein) (obr. 2).

V případě interakce studovaných proteinů dojde k asociaci připojených domén DBD a AD a k indukcí transkripce reportérového genu komplementujícího poškozený chromosomální gen. Jeho exprese umožní defektním kvasničným buňkám růst na selektivním médiu (např. minimální médium bez histidinu). Kolonie rostoucí na médiu bez histidinu jsou klony, u nichž došlo k hledané interakci. Kromě auxotrofie pro histidin jsou často využívány i geny, kódující snadno detegovatelnou enzymovou aktivitu (např. *lacZ* pro β -galaktosidasu, *MEL1* pro α -galaktosidasu). Kvasničné buňky narostlé na selektivním médiu je nutno nejméně dvakrát testovat opětovným nárůstem na nejselektivnějším médiu (např. minimální médium bez tryptofanu, leucinu, histidinu, adeninu) a s přidavkem X- α -gal pro snadnou selekci modrých a bílých kolonií. Kolonie, které rostou na těchto půdách a mají modré zabarvení, jsou ty, u kterých dochází k interakci mezi proteiny. Pokud se k testování použily plasmidy kódující neznámé proteiny, např. cDNA knihovna, je nutné plasmidovou DNA z příslušné kolonie izolovat, sekvenovat a porovnáním s databází (např. pomocí programu na webových stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) určit, o jaký protein se jedná. Vzájemné, nově identifikované interakce mezi proteiny, je poté nutno ověřit dalšími metodami, např. separací pomocí afinitních ligandů či koimunoprecipitací.

Limitujícím faktorem, vycházejícím přímo z principu Y2H, je, že testování interakce probíhá v jádře kvasničné buňky, kde dochází k aktivaci transkripce²². Proto prošel Y2H mnoha modifikacemi a v současné době jsou k dispozici dvojhybridové systémy pro savčí²³ a bakteriální buňky^{24,25}. Y2H a jeho modifikace mohou být také použity pro ověření interakce dvou známých proteinů a i k vytipování minimální domény, nutné k interakci, nebo k testování vlivu bodových mutací na interakci.

Dvojhybridní systém je citlivá metoda, jejíž výsledek

však závisí na množství faktorů, jako např. koncentrace hybridních proteinů, sekvence a uspořádání vazebných míst pro transkripční faktor na reportérovém genu a také množství reportérového proteinu, nutné pro zachycení změny fenotypu. Limitací je použitelnost této metody pouze pro proteiny, které mohou být transportovány do jádra a které si zachovávají strukturu a aktivitu i ve formě fúzního proteinu.



Obr. 3. Schématické znázornění uspořádání prezentace peptidů pomocí fágů a průběhu experimentu; buňky *E. coli* jsou infikovány bakteriofágy, do jejichž DNA byl vpraven úsek cizorodé DNA či celá knihovna náhodných sekvencí. Exprimované peptidové sekvence jsou exponovány na povrchu fága. Pro selekci interakčních partnerů jsou fágové částice, nesoucí různé typy peptidů, aplikovány na kolonu s imobilizovaným cílovým proteinem. Fágy s exponovaným peptidem, vykazujícím afinitu k imobilizovanému proteinu, jsou na koloně zadrženy, zatímco ostatní fágy jsou promýváním uvolněny

7. Presentace peptidů pomocí fágů

Metoda prezentace peptidů pomocí fágů (anglicky phage display), která byla poprvé popsána Smithem²⁶, je založena na faktu, že vláknité bakteriofágy *E. coli* mohou být geneticky upraveny tak, aby na jejich povrchu byly vystaveny různé peptidy, představující např. knihovnu náhodných sekvencí (1 fág nese pouze peptidy stejné sekvence). Pro selekci interakčních partnerů jsou fágové částice, nesoucí různé peptidy, aplikovány na kolonu s imobilizovaným cílovým proteinem. Fágy s exponovaným peptidem, vykazujícím afinitu k imobilizovanému proteinu, jsou na koloně zadrženy, zatímco ostatní fágy jsou promýváním uvolněny. Fágy zachycené na koloně jsou infikovány bakterií, z nichž je následně izolována DNA, kódující příslušný peptid, která je sekvenována (obr. 3).

Původní použití těchto knihoven fúzních fágů bylo pouze pro konstrukci a testování proteinů, vážících specifické protilátky. Díky mnoha modifikacím je tato technologie nyní použitelná i pro řadu interakcí protein-protein a protein-peptid^{27,28}.

K hlavním výhodám této metody patří zejména možnost testovat velké knihovny peptidů. Vhodným zvolením podmínek během promývání fágů zachycených afinitní kolonou je také možné regulovat specifitu interakce. Nevýhodou je, že proteiny musí být exprimovány v *E. coli*, a tudíž mohou postrádat některé posttranslační modifikace, běžné v eukaryotických buňkách. Všechny proteiny/peptidy na povrchu fágů jsou ve fúzi s povrchovým proteinem, což může ovlivnit jejich aktivitu nebo možnost vázat určité interakční partnery.

8. Přenos rezonance fluorescenční energie

S objevem zeleného fluorescenčního proteinu (green fluorescent protein (GFP)) z medúzy *Aequorea victoria*²⁹ se otevřela nová cesta ke studiu a analýze proteinových interakcí. Přenos rezonance fluorescenční energie (fluorescence resonance energy transfer (FRET)) je jedinečná a velmi účinná metoda pro zjištění konformace, asociace či disociace molekul, a pro detekci intra- či intermolekulárních interakcí proteinů v živých buňkách³⁰. FRET je proces, při kterém dochází k přenosu energie z excitovaného donorového fluoroforu na akceptorový fluorofor, nacházející-li se v těsné blízkosti (typicky 10–100 Å). Pro FRET je možné použít proteiny, připravené jako fúzní konstrukty s GFP nebo jeho variantami (např. modrozelený fluorescenční protein (cyan fluorescent protein – CFP), žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein – YFP), nebo proteiny, které byly chemicky modifikovány kovalentním připojením k syntetickým fluoroforům (například k fluorescein isothiokyanátu – FITC)³¹. FRET se používá v řadě aplikací např. při analýze struktury a konformace proteinů, při zkoumání interakcí receptor-ligand, při studiu struktury a konformace nukleových kyselin, při zkoumání rozdělení a transportu lipidů

v membránách a mnoha dalších aplikacích³².

Techniky, využívající FRET jsou limitovány poměrně vysokým pozadím, způsobeným buněčnou autofluorescencí a přímou excitací fluorescenčního donoru. Tyto nevýhody mohou být odstraněny použitím techniky, nazvané přenos rezonance bioluminiscenční energie (bioluminescence resonance energy transfer (BRET)), která jako zdroj energie donoru využívá bioluminiscenci³³. Jako donor BRET je většinou používán enzym luciferasa, indukující fluorescenci luciferinu v přítomnosti ATP, a akceptory mohou být GFP nebo YFP.

Výhodou FRET mikroskopie je, že ji lze provádět v buňce za fyziologických podmínek. V porovnání s ostatními metodami studia proteinových interakcí, poskytuje FRET mikroskopie navíc také informace o lokalizaci interagujících proteinů v buňce. Spojuje tak v sobě výhody několika různých metod, např. afinitní chromatografie, charakterizující vzájemné interakce proteinů a imunochemické kolokalizace, pro zjištění přítomnosti dvou studovaných proteinů na stejném místě v buňce.

9. Závěr

Tento článek poskytuje přehled řady biochemických metod, využívaných pro identifikaci vzájemných proteinových interakcí. Zde popsané metody např. metody využívající vazby na nosič, koimunoprecipitace, chemické prokřížení nebo kvasničný dvojhybridní systém mohou být použity jak pro zjištění interakce mezi dvěma známými proteiny, tak pro odhalení nového interakčního partnera. Pro tento účel je výhodné použití metod umožňujících testování celých knihoven proteinů, jako např. kvasničný dvojhybridní systém či prezentace peptidů pomocí fágů.

Jednou z hlavních výhod těchto metod je, že detekce vzájemných interakcí probíhá za fyziologických podmínek např. při koimunoprecipitaci nebo přímo v buňce např. v kvasničném dvojhybridním systému nebo při přenosu rezonance fluorescenční energie. Přes nesporný přínos těchto metod má každá z nich určité limity. Jedná se zejména o falešně pozitivní či negativní reakce či omezení na určité podmínky, např. při prokřížení bifunkčními činidly (poměrně úzké pH rozmezí pro jejich aktivitu). Proto je často nutné ověřit výsledek dvěma nebo více metodami.

LITERATURA

1. Piehler J.: Curr. Opin. Struct. Biol. 15, 4 (2005).
2. Golemis E. A., Adams P. D.: *Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbor Academic Press, Cold Spring Harbor, New York 2005.
3. Terpe K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523 (2003).
4. Kaelin W.G., Pallas D. C., DeCaprio J. A., Kayo F. J., Livingston D. M.: Cell 64, 521 (1991).
5. Orlinick, J. R., Chao, M. V.: J. Biol. Chem. 271, 8627 (1996).
6. Cao X., Cismowski M. J., Sato M., Blumer J. B., La-

- nier S. M.: J. Biol. Chem. 279, 27567 (2004).
7. Li L., Xin H., Xu X., Huang M., Zhang X., Chen Y., Zhang S., Fu X. Y., Chang Z.: Mol. Cell. Biol. 24, 856 (2004).
 8. Rigaut G., Schevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., Seraphin B.: Nat. Biotechnol. 17, 1030 (1999).
 9. Knuesel M., Wan Y., Xiao Z., Holinger E., Lowe N., Wang W., Liu X.: Mol. Cell. Proteomics 2, 1225 (2003).
 10. Veraksa A., Bauer A., Artavanis-Tsakonas S.: Dev. Dyn. 232, 827 (2005).
 11. Gavin A. C., Boshe M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A.: Nature 415, 141 (2002).
 12. Carr D. W., Scott J. D.: Trends Biochem. Sci. 17, 246 (1992).
 13. Hurst G. B., Lankford T. K., Kennel S. J.: J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 15, 832 (2004).
 14. Fisher K. D., Helms J. B., Zhao L., Wieland F. T.: Methods 20, 455 (2000).
 15. Alley S. C., Ishmael F. T., Jones A. D., Benkovic S. J.: J. Am. Chem. Soc. 122, 6126 (2000).
 16. Simon M. J., Day R. A.: Anal. Lett. 33, 861 (2000).
 17. Jackson V.: Methods 17:125 (1999).
 18. Alaedini A., Day R. A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 191 (1999).
 19. Heyduk E., Heyduk T.: Biochemistry 33, 9643 (1994).
 20. Golemis E. A., Adams P. D.: *Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbor Academic Press, Cold Spring Harbor, New York 2001.
 21. Fields S., Song O.: Nature 340, 245 (1989).
 22. Kuroda K., Kato., Mima J., Ueda M.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 127 (2006).
 23. Dang C. V., Barrett J., Villa-Garcia M., Resar L. M. S., Kato G. J., Fearon E. R.: Mol. Cell. Biol. 11, 954 (1991).
 24. Dove S.L., Joung J. K., Hochschild A.: Nature 386, 627 (1997).
 25. Karimova G., Pidoux J., Ullmann A., Ladant D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5752 (1998).
 26. Smith G. P.: Science 228, 1315 (1985).
 27. Sidhu S. S., Fairbrother W. J., Deshayes K.: ChemBioChem 4, 14 (2003).
 28. Fuh G., Sidhu S. S.: FEBS Lett. 480, 231 (2000).
 29. Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Pendergast F. G.: Gene 111, 229 (1992).
 30. Sekar R.B., Periasamy A.: J. Cell. Biol. 160, 629 (2003).
 31. Wallrabe H., Periasamy A.: Curr. Opin. Biotechnol. 16, 19 (2005).
 32. <http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes/0422.html>, staženo 11.4.2007
 33. Issad T., Blanquart C., Gonzales-Yanes C.: Expert. Opin. Ther. Targets. 11, 541 (2007).

M. Wildová and M. Rumlová (*Gilead Sciences & IOCB Research Centre, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*): **Methods of Study of Protein-Protein Interactions**

The knowledge of the pattern and mechanism of protein-protein interactions helps in elucidation, on the molecular basis, of functioning of living organisms as well as in understanding cellular processes and functions. This review summarizes the widely used biochemical methods, from the oldest (but still powerful) to the most recent techniques, for identification and characterization of novel protein-protein interactions.

IVAX



TEVA

Člen skupiny Teva

IVAX Pharmaceuticals s.r.o. (člen skupiny TEVA) se sídlem v Opavě-Komárově hledá **výzkumné a vývojové pracovníky pro divizi aktivních substancí** (se zaměřením na organickou a analytickou chemii) a výhledově rovněž **technology, kontrolory kvality a registrační pracovníky** (přednostně absolventy farmaceutických a chemických oborů).

Bližší informace o volných místech najdete na **www.ivax-cz.com**