

**Занятие №14. Изучение белок-
белковых взаимодействий
(интерактомика)**

Интерактомика и её применение

- Интерактомика – изучение белок-белковых взаимодействий путём поиска белковых партнёров для известных белковых молекул.
- 1. Изучение белков в их “естественной среде”.
- 2. Получение информации о функциональной роли новых белков, для которых в базах данных нет аннотации (т.е. их функция неизвестна).
- 3. Сравнительная характеристика интерактомов различных организмов для целей эволюционной биологии.
- 4. Выявление мишеней для конструирования новых

Методы интерактомики

- I. Биоинформатические
 - анализ генома
 - анализ эволюционных белок-белковых взаимодействий
 - анализ 3D-структуры белков
 - анализ белковых доменов
 - анализ первичной структуры белков
- II. Экспериментальные
 - 1. Биохимические
 - аффинная очистка с масс-спектрометрией
 - белковые биочипы с/без масс-спектрометрией
 - 2. Генетические
 - двугибридные клеточные системы

Принцип молекулярной рыбалки (фишинг)

- Экспериментальная интерактомика использует принцип “молекулярной рыбалки”:
- известный (целевой) белок (белок-приманка, bait-protein) используется для “вылавливания” из анализируемого образца своего белка-партнёра (белок-добыча, prey-protein).
- По способу идентификации выделяют методы:
 - Прямой – белок-приманка находится на твёрдой фазе, с которой контактирует изучаемый образец;
 - Непрямой – белок-приманка инкубируется в жидкой фазе с образцом, затем образующиеся комплексы “вылавливаются” с помощью молекул, имеющих сродство к белку-приманке (напр., АТ).

Биохимические методы: Аффинная очистка + масс-спектрометрия

На этапе очистки используется хроматографическая колонка, заполненная частицами сорбента (полимер, напр. ионнообменная смола, сефароза или др.) с закреплёнными на их поверхности молекулами, имеющими сродство (*аффинитет*) к белку-добыче.

Два этапа:

1). Отмывка – жидкий образец пропускают через колонку, в которой в итоге остаются аффинно-связавшиеся белки;

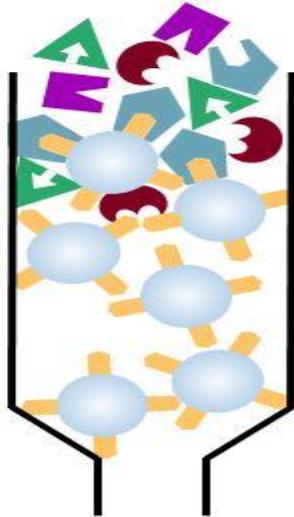
2). Элюция белков – через колонку пропускают буфер с другим рН или содержащий избыток лиганда (того вещества, что “пришито” к частицам сорбента).

Бывает АХ прямая и непрямая. В последнем случае белок-наживка может быть “нативным” или гибридным, с присоединённым специфическим фрагментом для связывания с

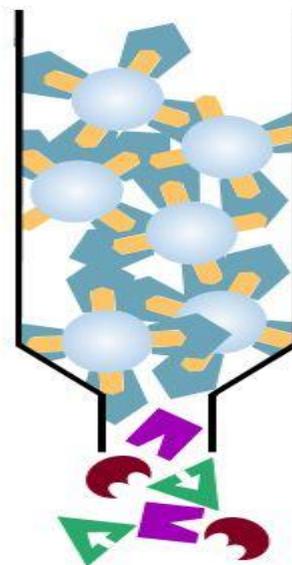
Твёрдофазная аффинная хроматография

Protein Affinity Chromatography

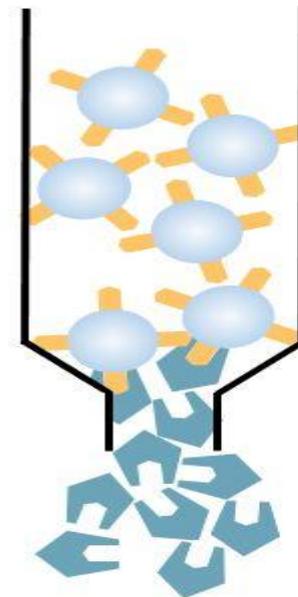
1. Bind



2. Wash



3. Elute



Target Protein

Other Proteins

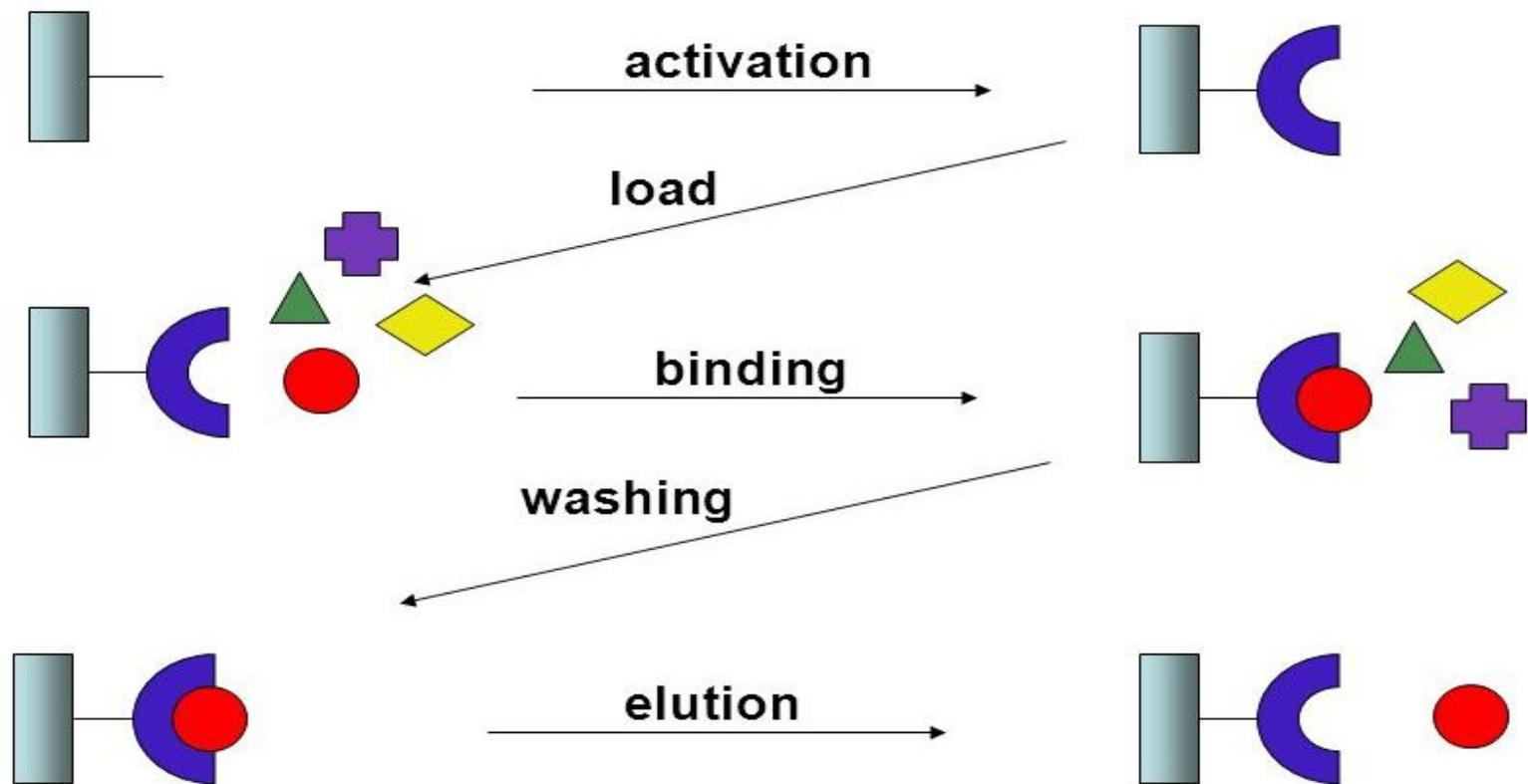


Ligand

Affinity Resin with
Ligand attached

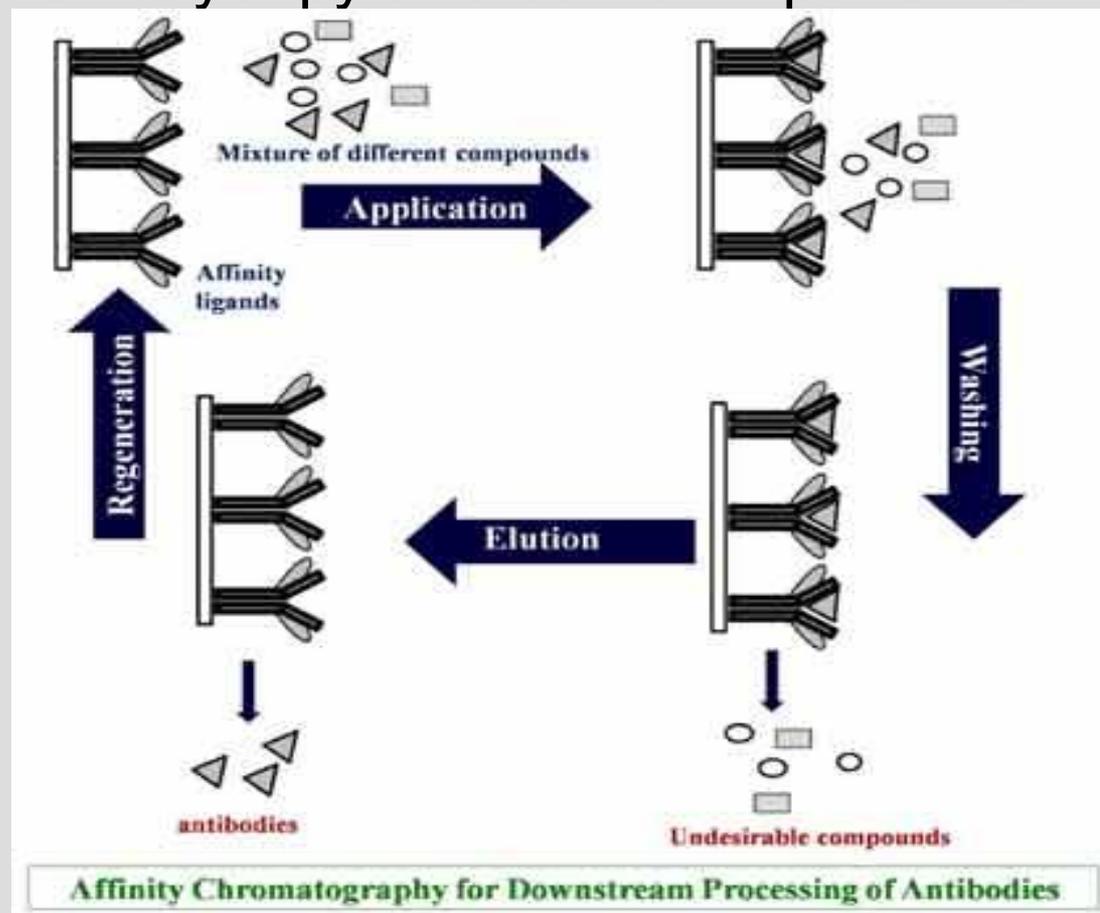
АХ: прямой метод

Молекулы белка-наживки находятся непосредственно на частицах сорбента.



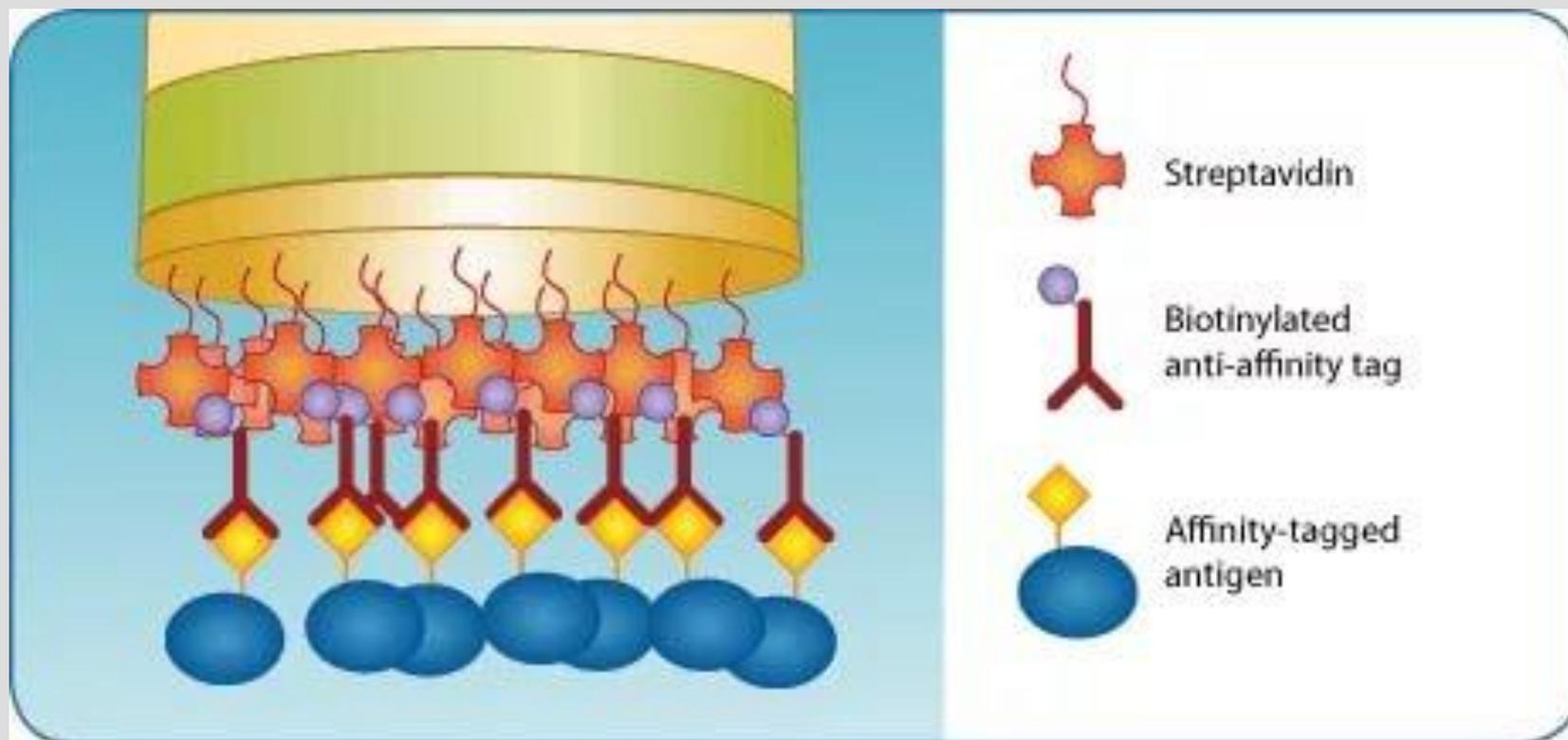
Непрямой метод АХ: использование сорбированных антител

К частицам сорбента Fc-концом “пришиты” антитела, специфичные к белку-наживке (может быть гибридным), образец предварительно инкубируют с белком-приманкой.



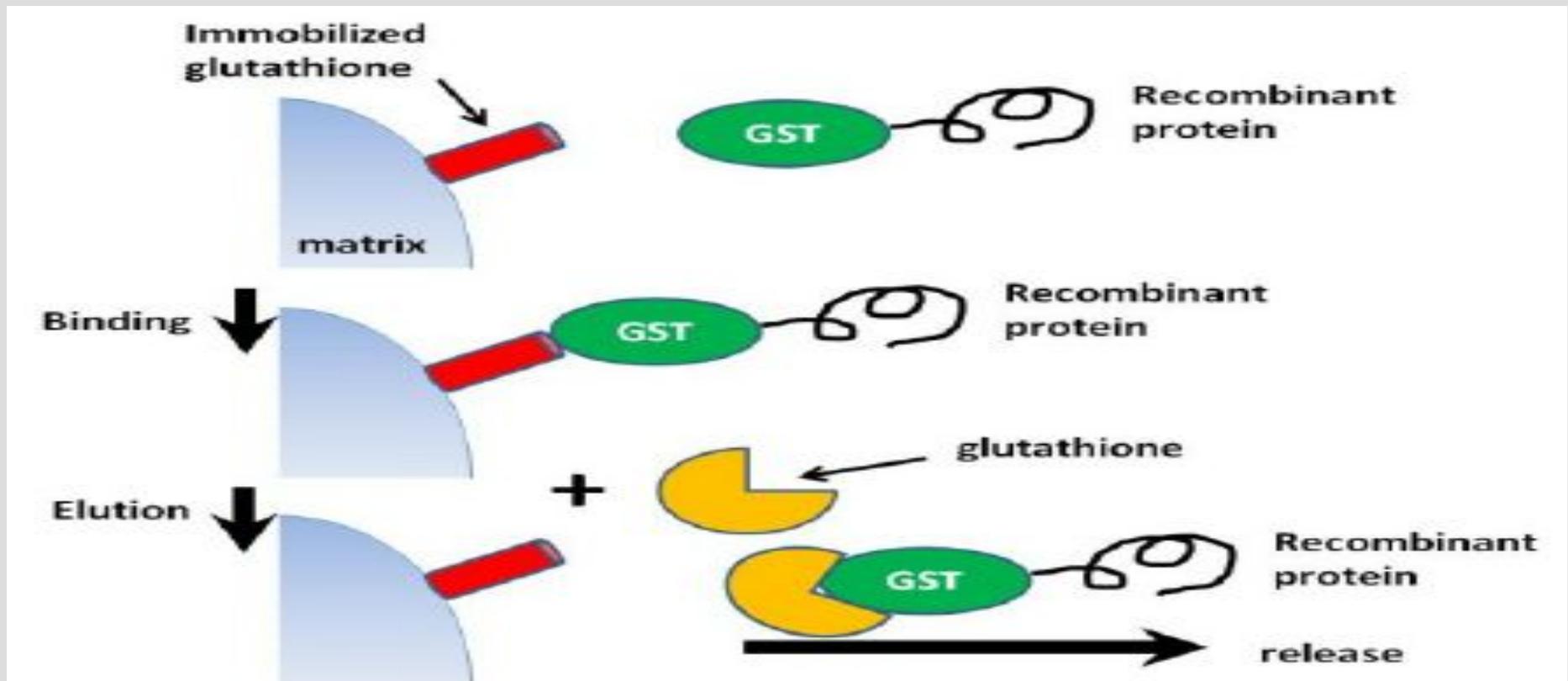
Непрямой метод АХ: использование свободных антител

К частицам сорбента “пришиты” белки, специфически связывающие Fc-фрагмент АТ (белок А, белок G; стрептавидин в случае меченных биотином АТ); образец предварительно инкубируют с белком-приманкой и антителами к нему.



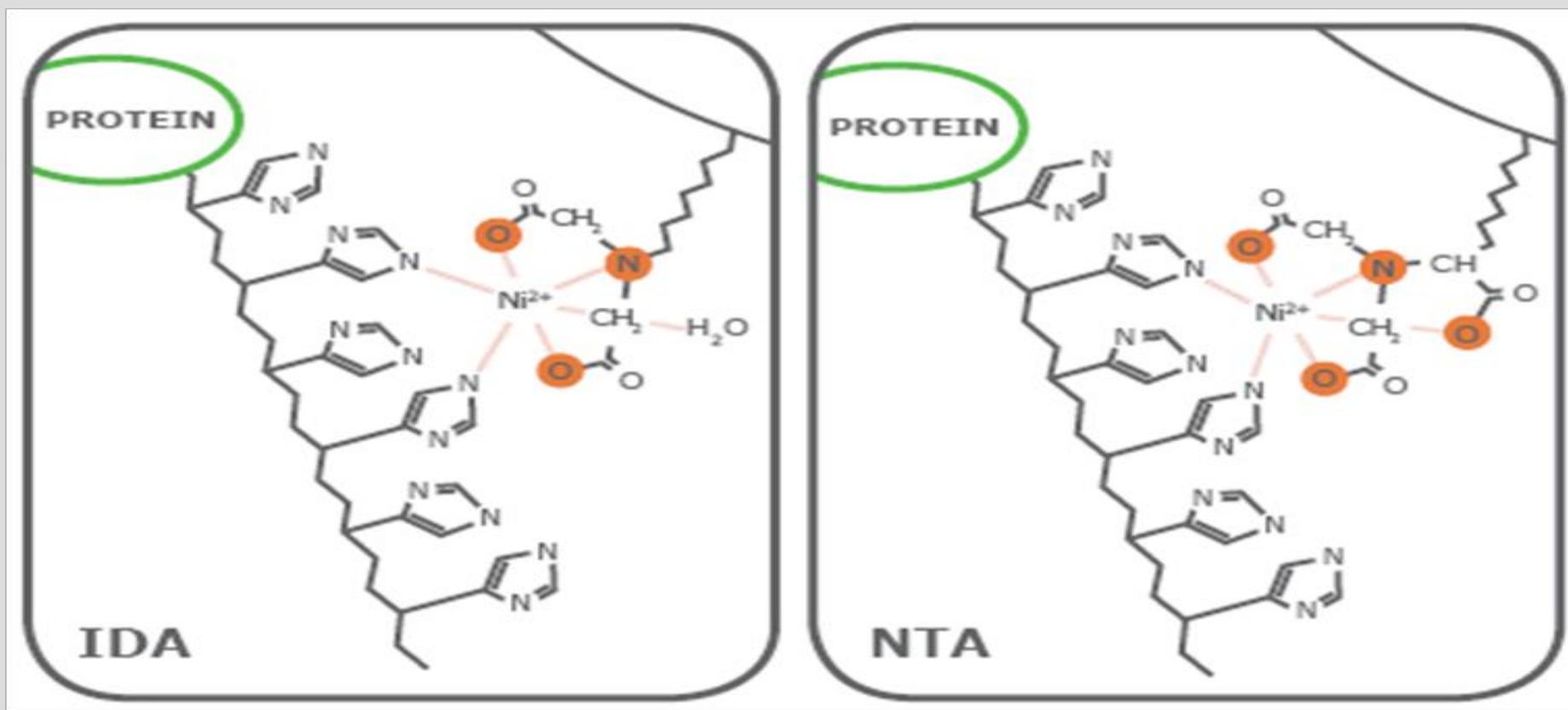
Непрямой метод: использование глутатиона

К частицам сорбента “пришит” глутатион (лиганд), имеющий сродство к глутатион-S-трансферазе (GST); образец предварительно инкубируют с гибридным целевым белком (в качестве дополнительного фрагмента содержит GST).



Непрямой метод: использование хелатирующих агентов

Сорбент покрыт нитрилотриуксусной кислотой (NTA) или иминодиуксусной кислотой (IDA), которые образуют комплексы через ионы Ni^{2+} с гистидиновым гексапептидом белка-приманки

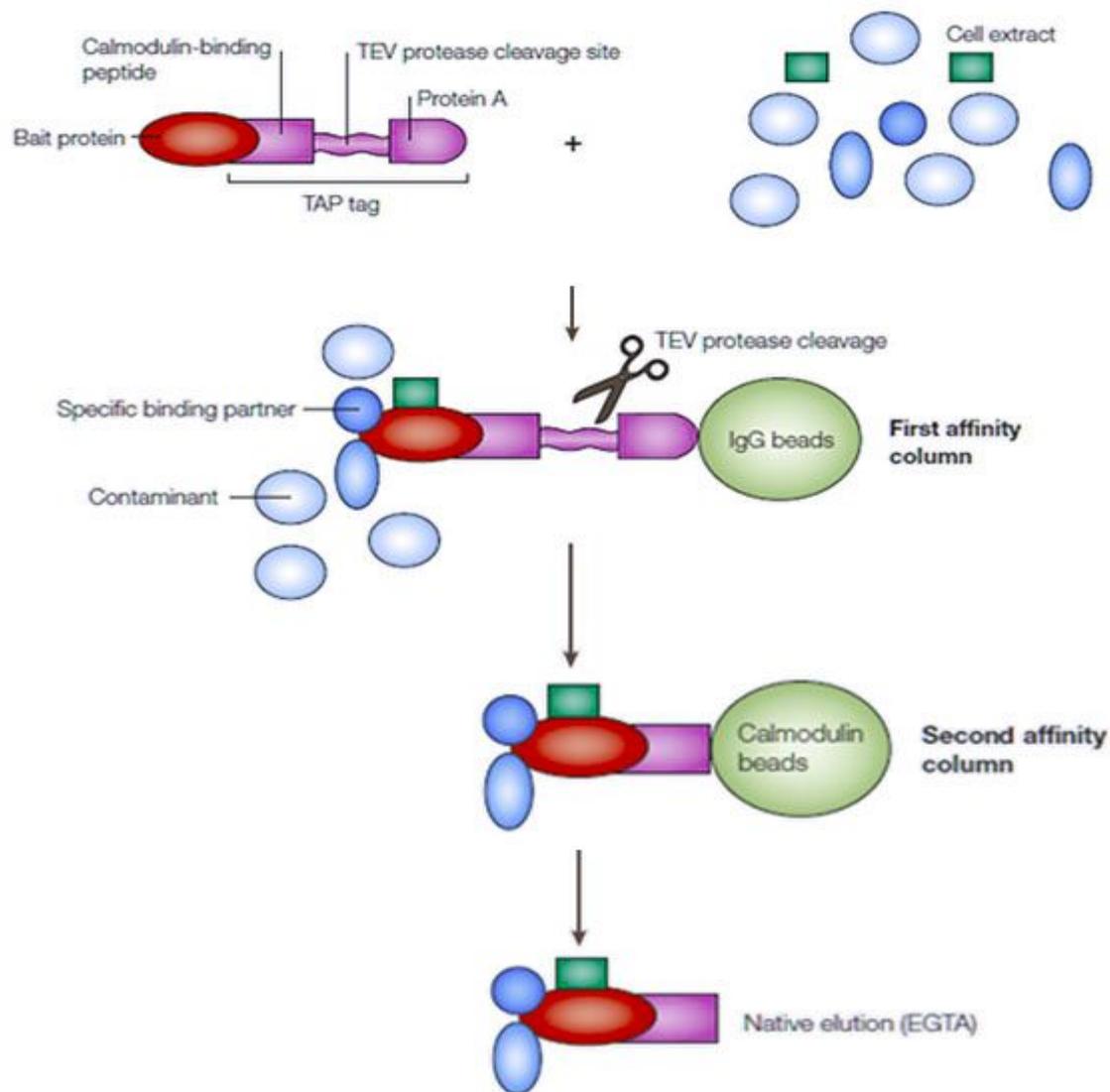


Непрямой метод: тандемная аффинная хроматография

- В качестве белка-приманки используется гибридный белок, состоящий из целевого белка и метки:
- кальмодулин-связывающий пептид + сайт разрезания протеазой TEV + белок А
- Метод включает два последовательных этапа аффинной хроматографии через две колонки:
 - с сорбентом, покрытым IgG;
 - с сорбентом, покрытым кальмодулином.
- Между этапами хроматографии производится обработка протеазой TEV.
- Наличие двух этапов обеспечивают высокую степень очистки, что определяет большую специфичность по сравнению с обычной аффинной хроматографией.

Тандемная аффинная хроматография

Tandem affinity purification

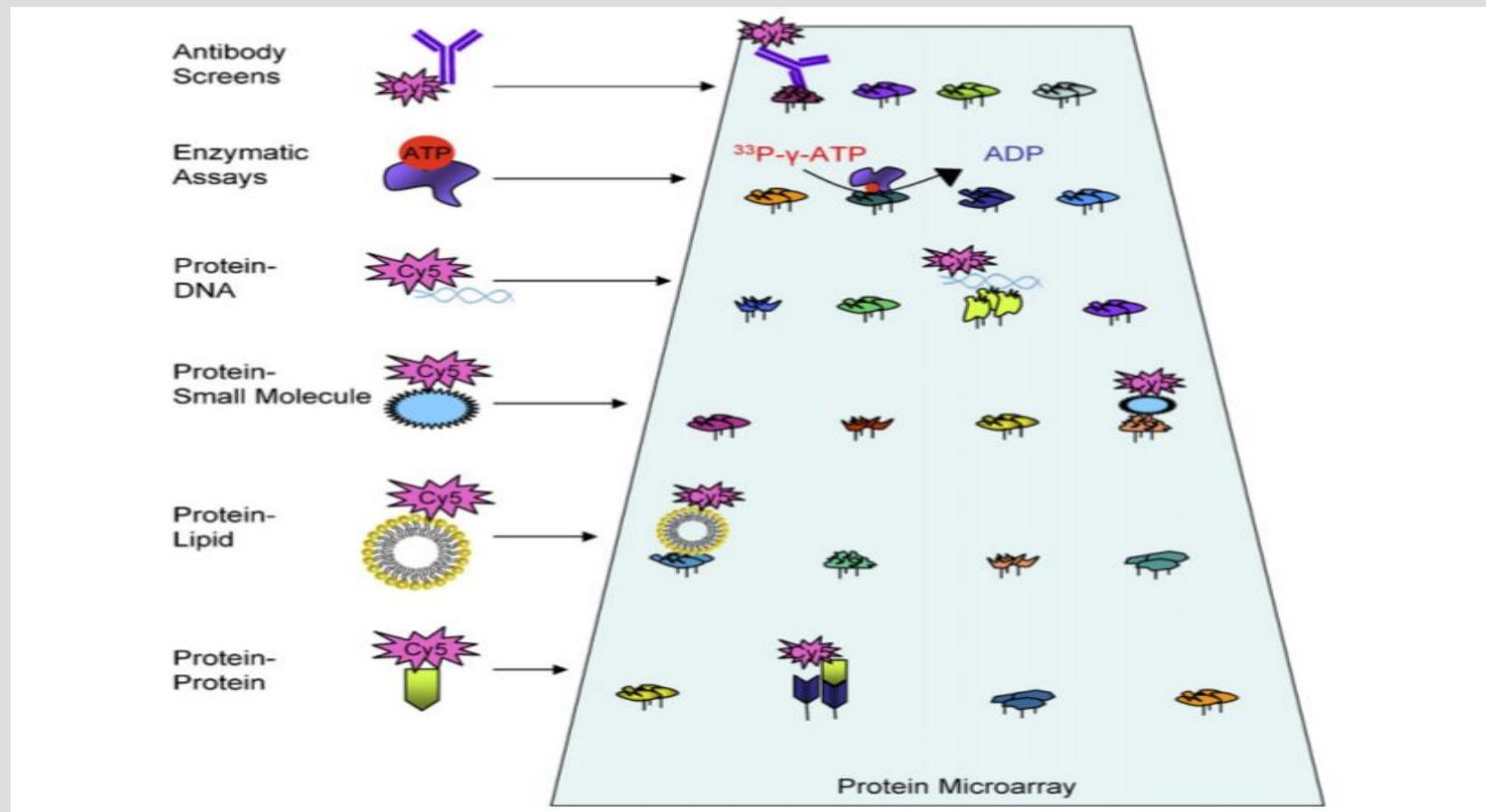


Белковые биочипы

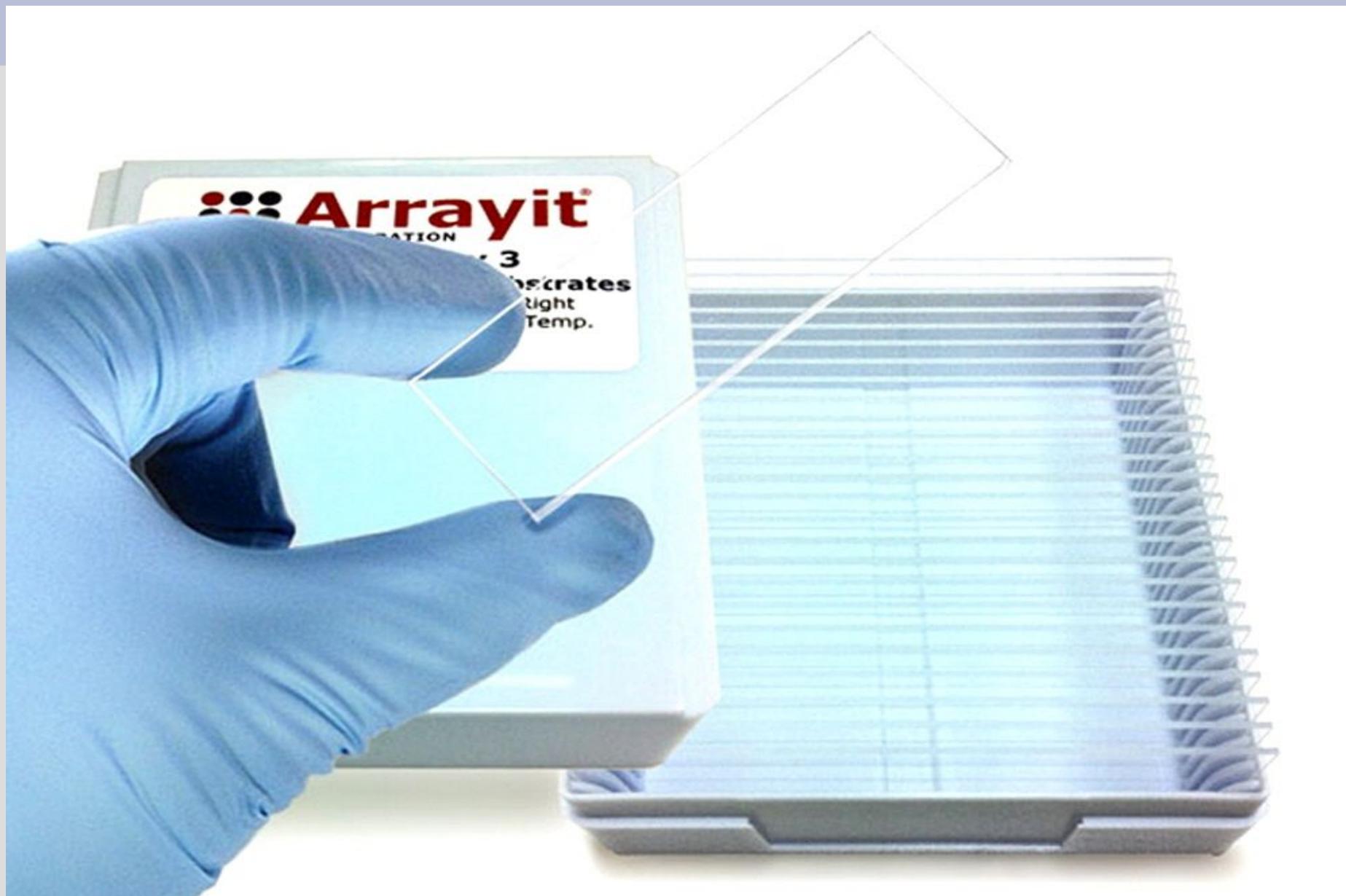
- Это тонкие пластинки с прикреплёнными к их поверхности молекулами пептидной природы, имеющими сродство к интересующим исследователя белкам. Поскольку белок-белковое взаимодействие измеряется с помощью оптических детекторов, биочипы также называют оптическими чипами.
- Существует два типа белковых биочипов:
- Биочипы для флуоресцентной детекции – microarrays (микрочипы)
- Биочипы для детекции на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР; SPR) – чаще называются биосенсорами

Флюоресцентные микрочипы (protein microarrays)

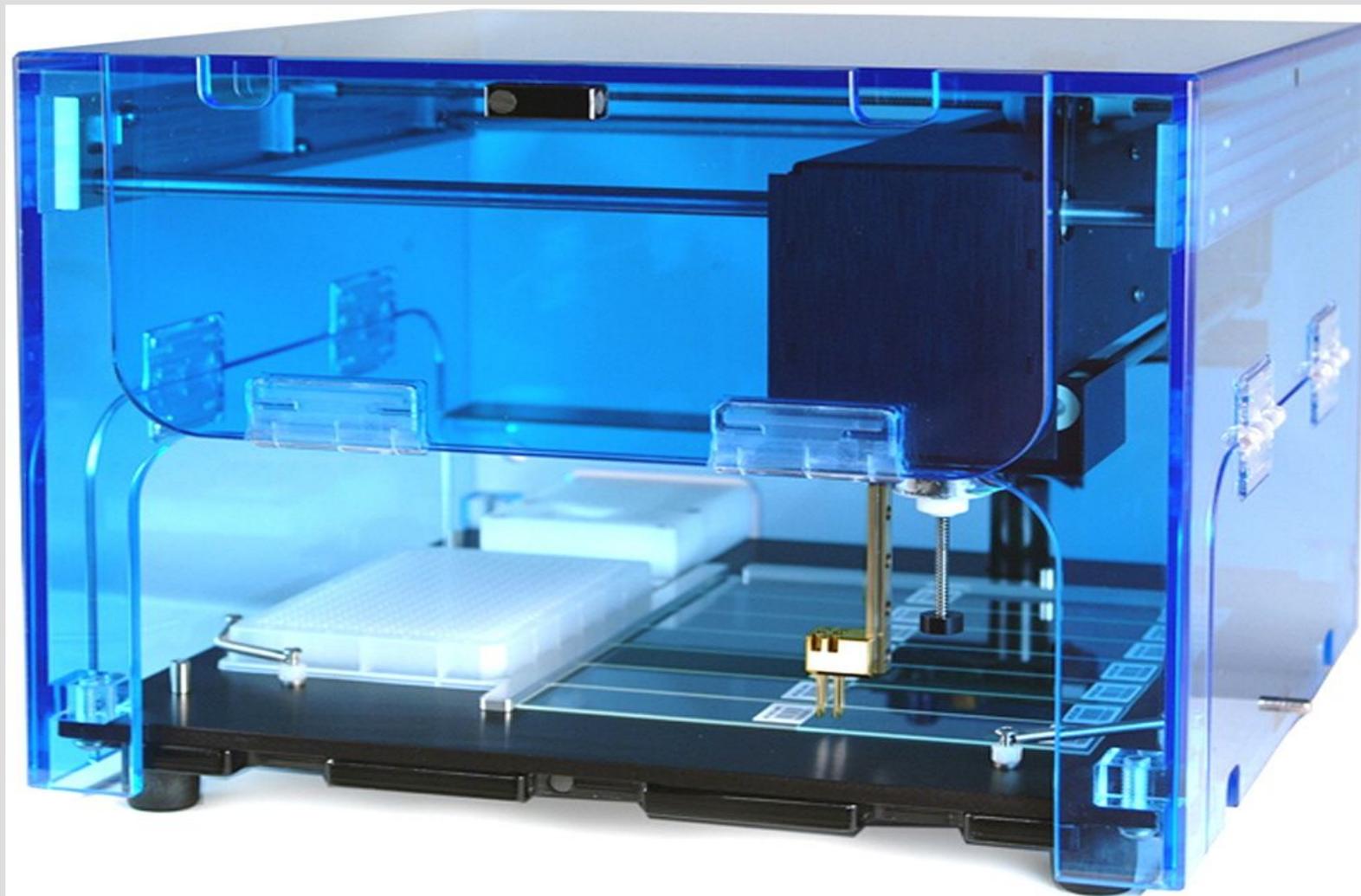
Это набор (библиотека) специфичных к искомым молекулам лигандов пептидной природы (в т.ч. белки-приманки), закреплённых на поверхности тонкой пластинки. Образцы помечаются флюорохромом и наносятся на поверхность биочипа.



Стекло для изготовления (печатания) флюоресцентных белковых микрочипов



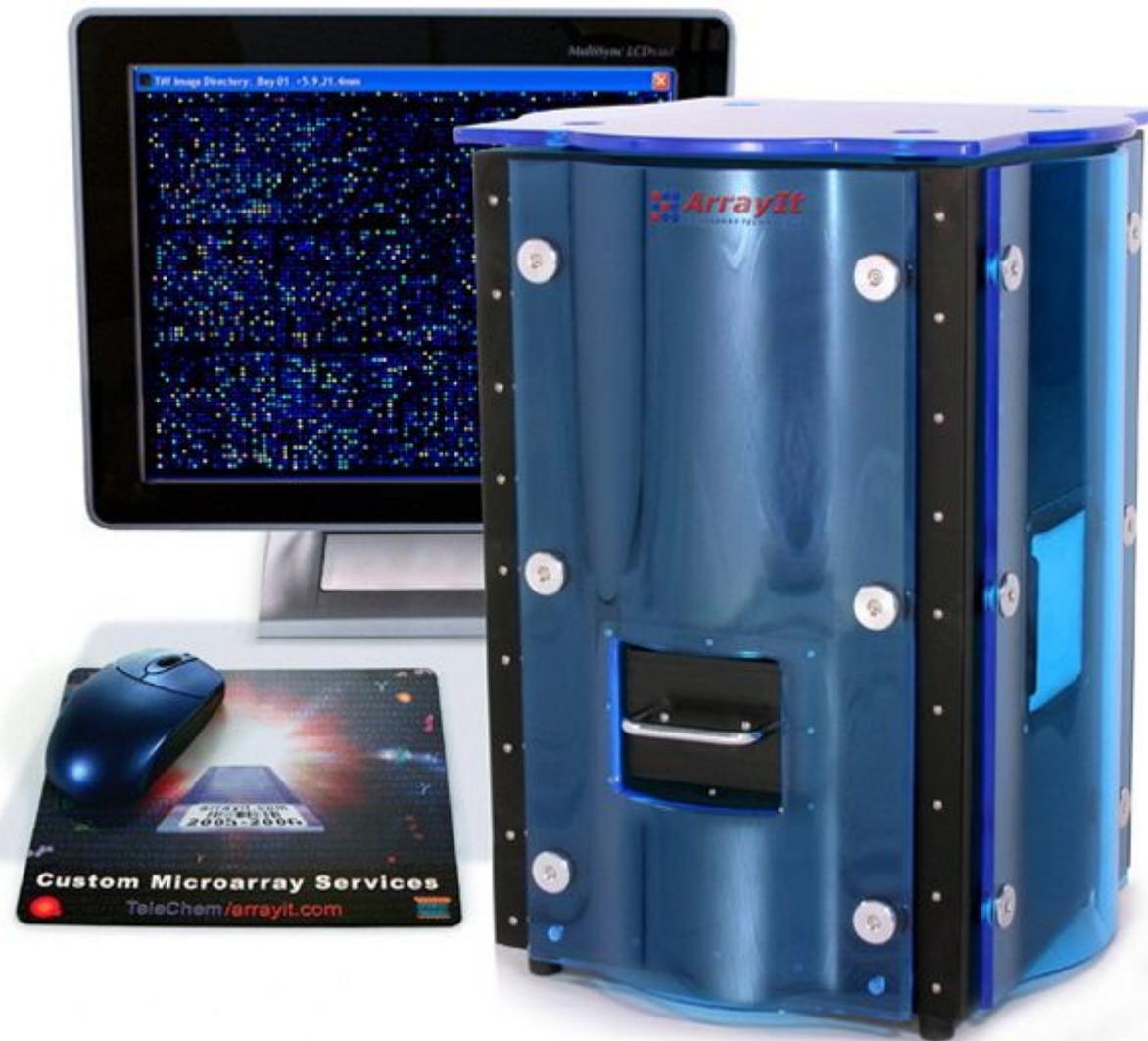
Система печати микрочипов SpotBot



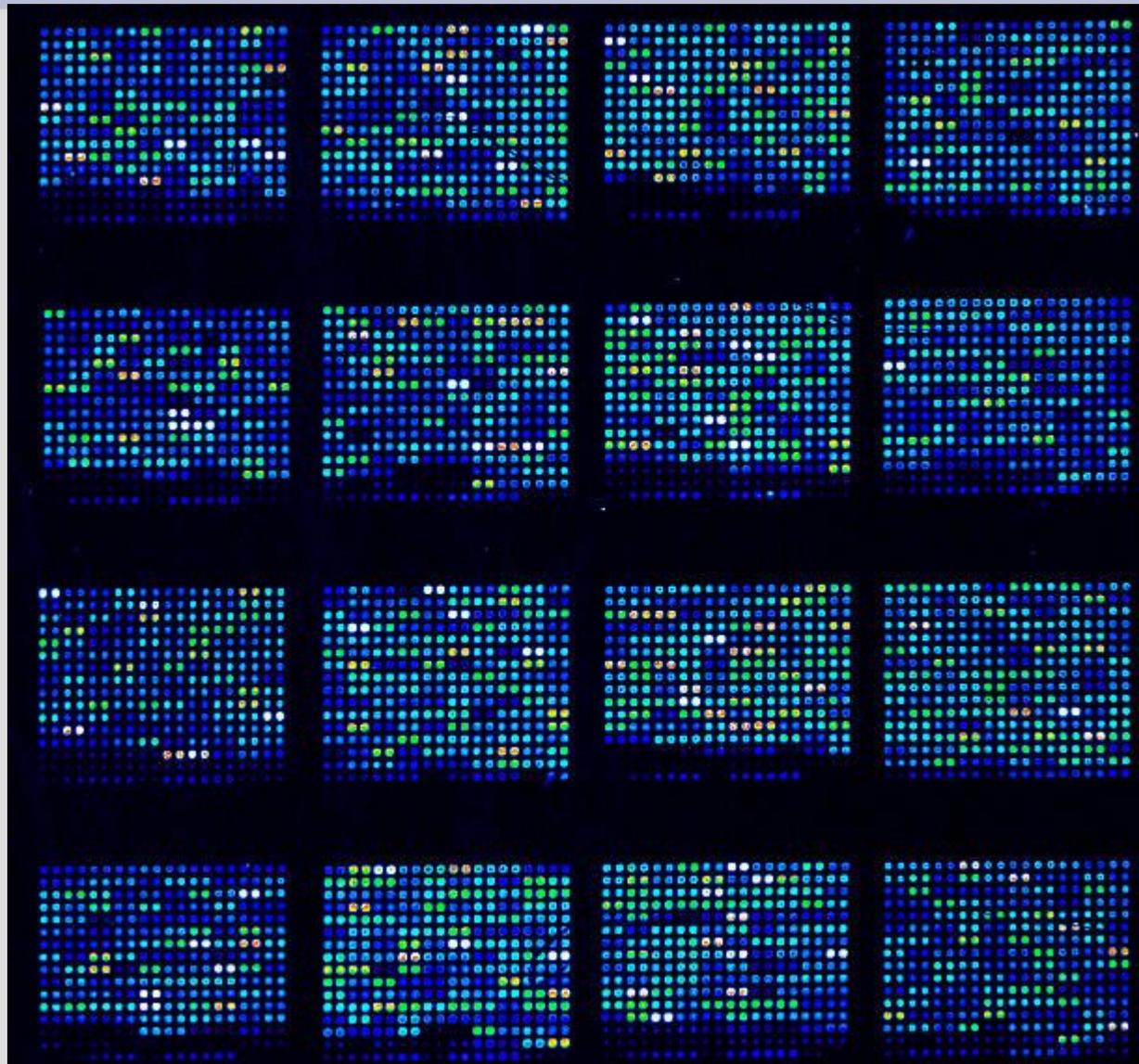
4 микрочипа в штативе для нанесения образцов (по 24 образца на каждый)



Сканнер для микрочипов



Анализ результатов флюоресцентного анализа



- Цветовая кодировка отражает концентрацию детектируемых молекул:
• $C > З > Ж > К > Б$

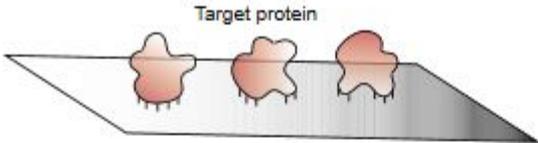
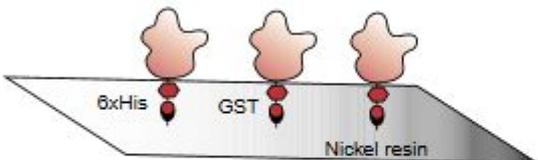
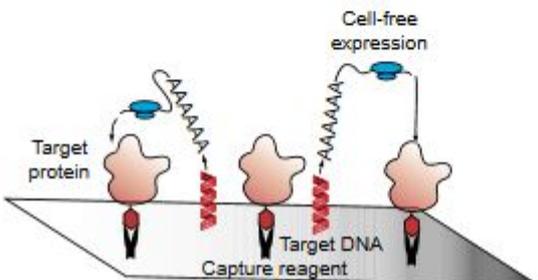
Виды белковых чипов

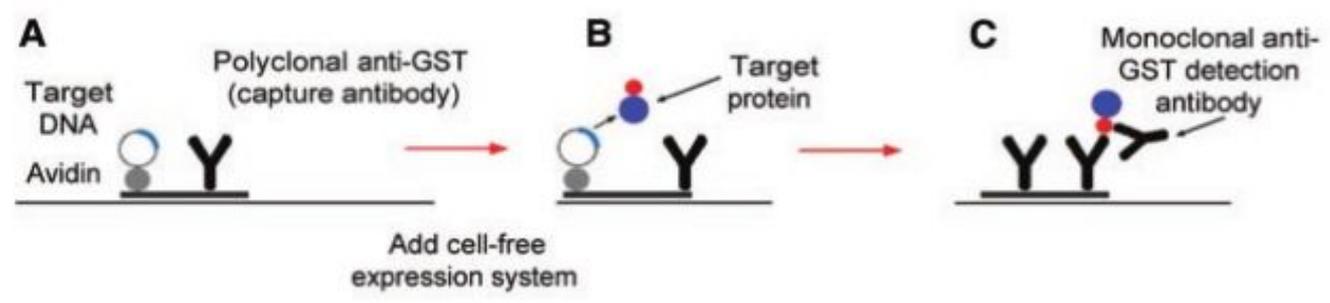
- 1. Аналитические чипы.
- на поверхности чипа закреплена библиотека лигандов, способных только связывать белки на основании стереохимического сродства, но не способных взаимодействовать в соответствии с функциональной ролью белка-добычи
- лиганды – либо фрагменты белка-приманки (пептидные аптамеры), либо антитела к белку-добыче (в т.ч. и “неполноценные” аффитела)
- 2. Функциональные чипы.
- на поверхности чипа закреплены полноценные белки-приманки
- возможно не только качественное и количественное измерение содержания белков, но и анализ их функциональной активности (ферменты)

Виды функциональных микрочипов

- Для функционального исследования белков используют два подхода:
- 1. Прикрепление белка-приманки к поверхности биочипа:
 - ковалентное присоединение к веществу чипа (напр., через эпоксидную группировку к аминогруппе лизина)
 - использование специфических меток для белка
- 2. Использование самособирающихся систем (self-assembling systems): к чипу присоединяют фрагмент кДНК гена белка-приманки и добавляют бесклеточную белоксинтезирующую систему – белок-приманка

Варианты функциональных белковых микрочипов

		Advantages/disadvantages
(a)	 <p>Target protein</p> <p>Chemical linkage</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Random orientation + Covalent binding – Bound close to surface – Chemical linkage may affect folding
(b)	 <p>6xHis GST Nickel resin</p> <p>Peptide fusion tag</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Uniform orientation + Protein held away from surface – N- or C-terminus always blocked – Proteins must be tagged
(c)	 <p>Cell-free expression</p> <p>Target protein Target DNA Capture reagent</p> <p>Self assembling protein arrays</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Proteins produced just-in-time for assay + Proteins expressed in a mammalian milieu + No need to express and purify protein + Printed arrays are very stable – Same as peptide fusion tag



Бесклеточная белоксинтезирующая система – лизат ретикулоцитов + полимеразы T7

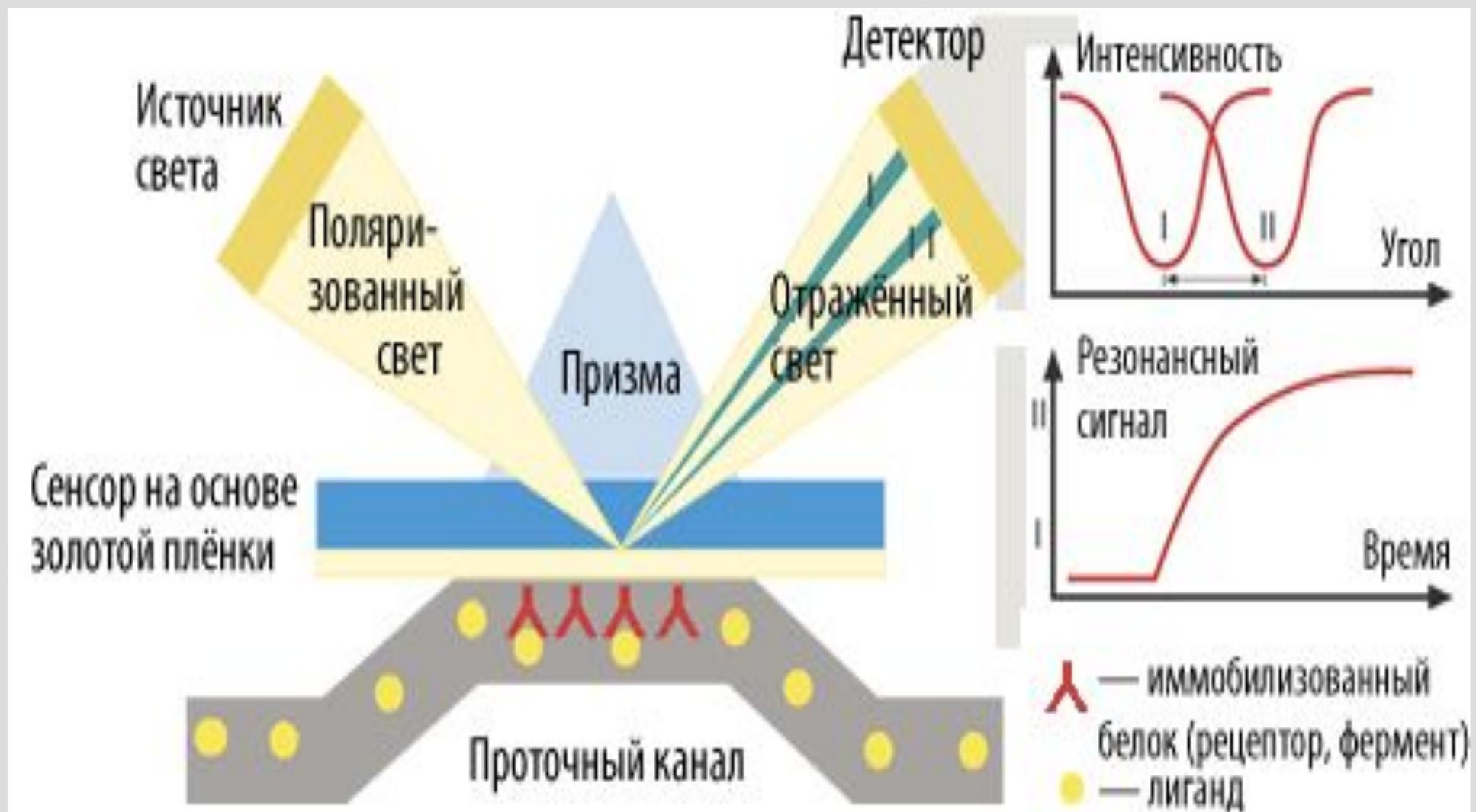
Детекция сигнала на биочипе с использованием поверхностного плазмонного резонанса

- Тонкая плёнка металла (золота) на поверхности биочипа способна резонансно поглощать энергию излучения определённой длины волны. Это выражается в появлении минимума интенсивности в отражённом от поверхности плёнки свете. При наличии на поверхности плёнки других (био-) молекул происходит сдвиг минимума интенсивности отражённого света.

Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

- 1. Растворы белков-партнёров пропускают через проточную систему биосенсора, где на поверхности оптического чипа иммобилизован целевой белок-приманка.
- 2. Белок-белковое связывание приводит к изменению свойств поверхности чипа, в результате чего регистрируется изменение сигнала. Зависимость уровня сигнала от времени записывается в виде графика – сенсограммы.
- 3. Через проточную систему подаётся буфер и регистрируется распад белковых комплексов.
- 4. Анализ сенсограмм позволяет рассчитывать параметры белок-белковых взаимодействий (скорости распада, образования, константа диссоциации, энтропия образования комплекса).
- 5. Идентификация белков комплекса проводится с помощью МС.

Поверхностный плазмонный резонанс на биочипе



Кинетика сигнала при ППР

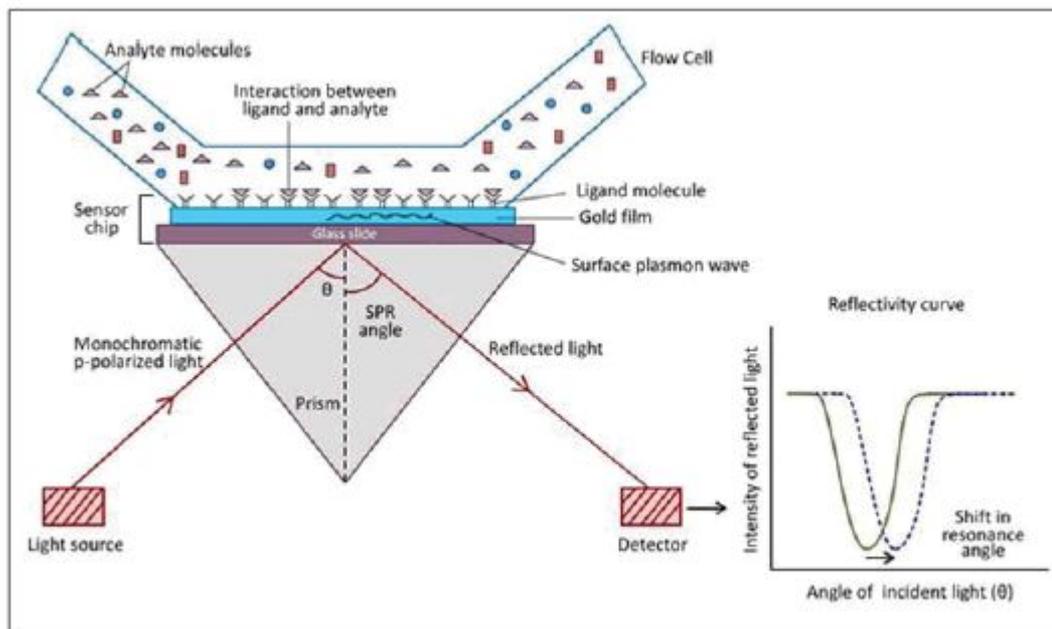


Figure 1: Diagram of the working principle of a SPR-based optical biosensor.

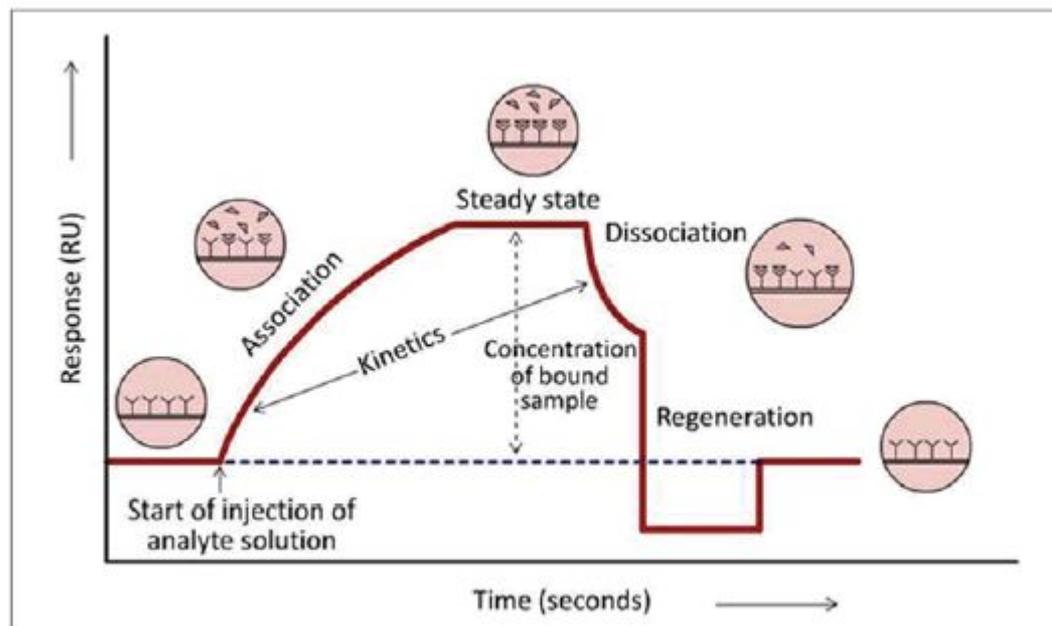


Figure 2: A SPR sensogram depicting different phases in a typical SPR experiment.

Биочип для ППР



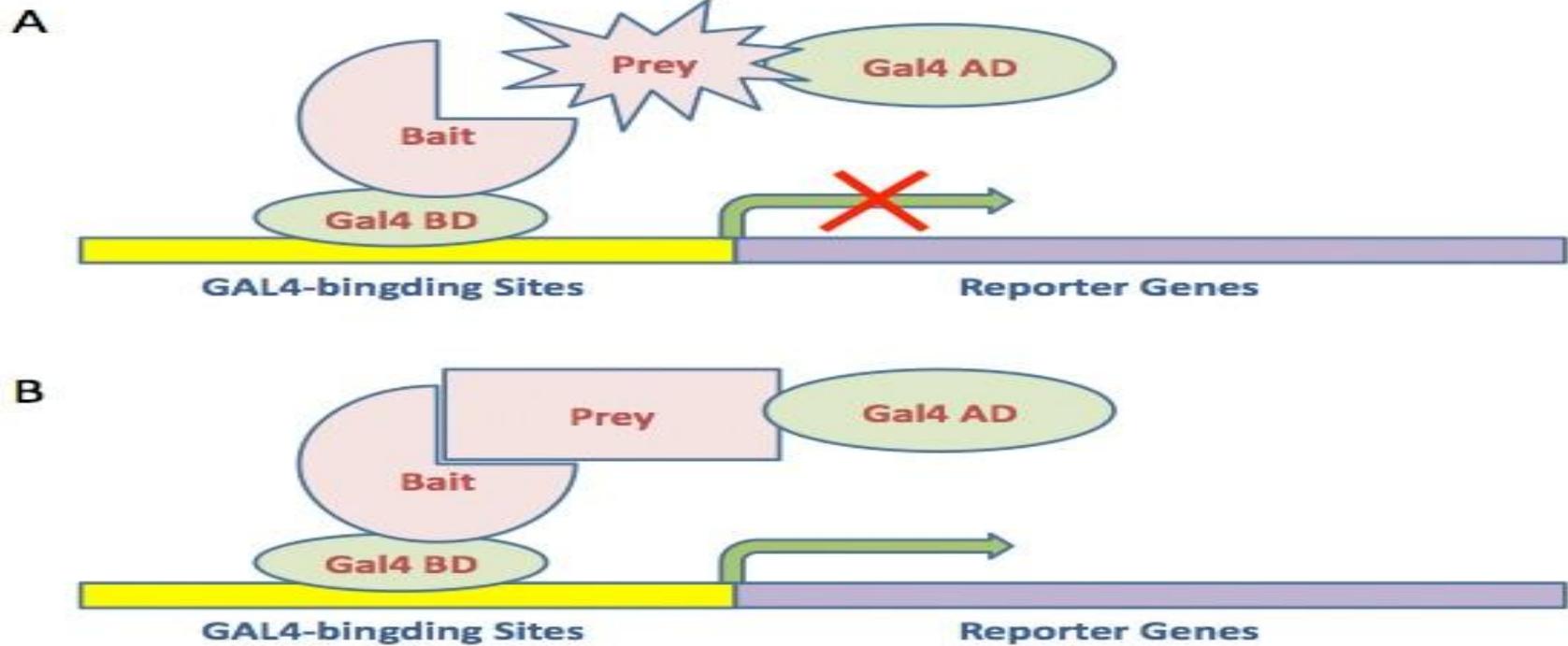
SPR биосенсор Biacore T200



Двугибридные клеточные системы

- Метод основан на использовании белковых факторов транскрипции (напр., Gal4). Такие факторы содержат два домена: ДНК-связывающий (BD) и активирующий (AD). В норме Gal4 узнаёт специфическую промоторную последовательность, связывается с ДНК и инициирует транскрипцию мРНК гена. В двугибридных системах используют гибридные белки:
 - 1). Белок-приманка, связанный с BD (BP-BD).
 - 2). Белок-добыча, связанный с AD (PP-AD).
- Если приманка специфически связывается с добычей, происходит восстановление функции транскрипционного фактора => считывание определённого (репортерного) гена => изменение фенотипа клеток.

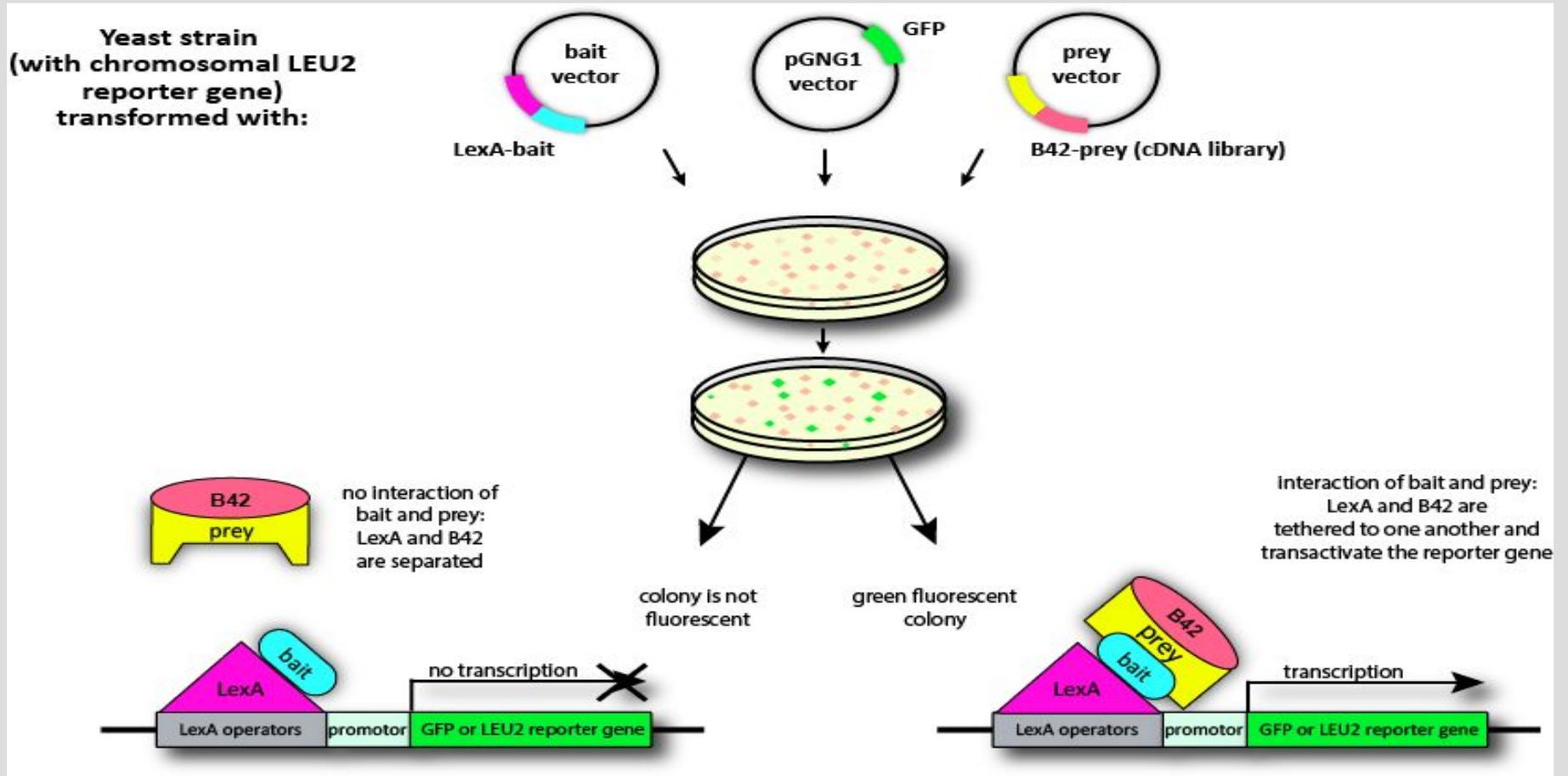
Принцип, используемый в 2H-системах



Варианты 2Н-анализа

- 2Н-анализ – это синтез генно-инженерного и культурального методов: клеточную культуру трансформируют путём введения 3-х плазмид с генами BD-BP, AD-PP и репортерным геном. В зависимости от используемого организма выделяют:
- Y2H-система – дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*
- C2H-система – дрожжи *Candida albicans*
- B2H-система – бактерия *Escherichia coli*
- M2H-система – культура клеток млекопитающих
- P2H-система – культура протопластов *Arabidopsis thaliana*
- I2H-система – культура клеток тутового шелкопряда

Схема двугибридного анализа (в качестве репортерного гена – ген зелёного флюоресцентного белка GFP)



Источники ошибок в 2H-анализе

- **Ложноположительные результаты:**
 1. Избыточная экспрессия введённых генов может привести к неспецифическому взаимодействию в условиях повышенных концентраций.
 2. Тестируемые белки в норме не экспрессируются одновременно.
- **Ложноотрицательные результаты:**
 1. У гибридных белков в результате гибридизации может возникнуть изменение пространственной структуры, и взаимодействие не произойдёт.
 2. Используемый для культивирования вид может не иметь шаперона, необходимого для правильной укладки взаимодействующих белков.
 3. Если тестируемые белки имеют внеядерную локализацию,

Методы изучения интерактома: Биохимические VS Генетические

- **Преимущества:**

- возможность изучать все белки, взаимодействующие с целевым (функциональный комплекс белков)
- меньшая доля ложноположительных и ложноотрицательных результатов (выше специфичность и чувствительность)
- отсутствие необходимости использовать трудоёмкие и времязатратные методы (культуральный и генно-инженерный)

- **Недостаток:**

- вероятность не обнаружить имеющуюся тенденцию к белок-белковому взаимодействию или кратковременные взаимодействия
- необходимость использовать дорогостоящую аппаратуру