

Лекция 6

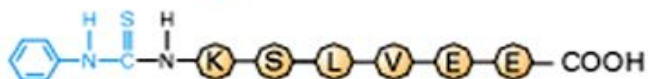
Анализ взаимодействий *in vitro*

Стратегия: от белка к гену

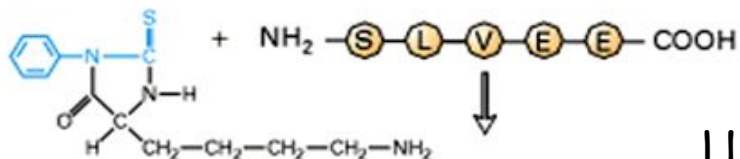
- Изолировать белок на основе его функциональной активности (например, энзиматической или гормональной)
- Частично определить последовательность аминокислот
- Синтезировать олигонуклеотиды, соответствующие определенным последовательностям аминокислот
- Использовать олигонуклеотиды как пробы для отбора из библиотеки кДНК или геномного клона, кодирующих этот белок
- Определить последовательность нуклеотидов изолированного клона



Цикл 1



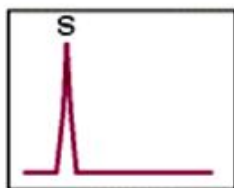
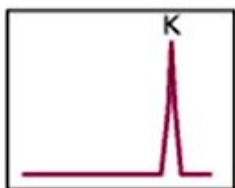
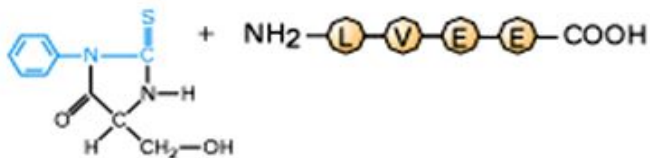
$\downarrow$ гидролиз



Цикл 2

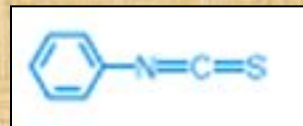


$\downarrow$ гидролиз



Идентификация аминокислотных остатков

Определение
последовательности
аминокислот
с помощью метода
деградации по Эдману



фенилизотиоцианат

Стратегия: от гена к белку

- Изолировать геномный клон, соответствующий измененному белку в мутанте (например, ауксотрофия, наследственные болезни, дефект развития)
- Использовать геномную ДНК для изолирования кДНК, кодирующей этот ген
- Определить последовательность нуклеотидов изолированной кДНК для выведения последовательности аминокислот кодируемого ею белка
- Сравнить выведенную последовательность аминокислот с последовательностью нормального белка
- Использовать экспрессионный вектор для получения мутантного белка

Взаимодействия двух белков



in vitro

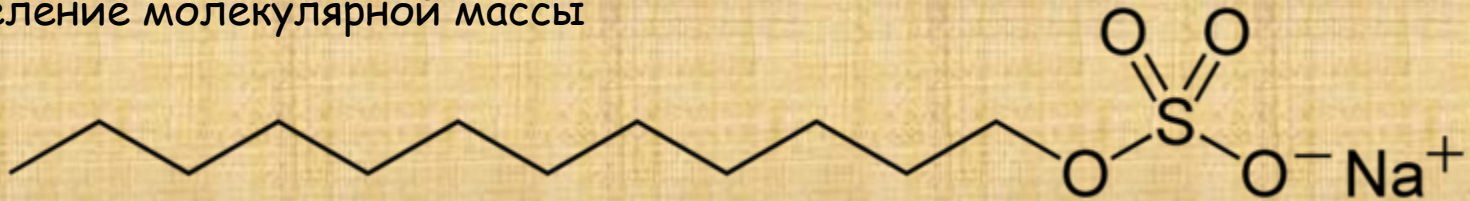
контролируемые условия

in vivo

- центрифугирование
- хроматография
- ко-иммунопреципитация
- Blot-overlay
- Pull-down
- Surface Plasmon Resonance
- бесклеточные модельные системы

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

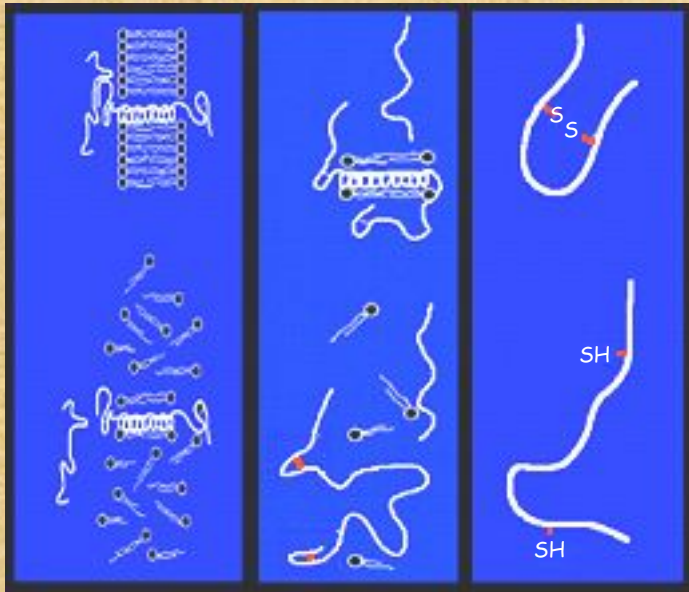
- Определение содержания белка во фракциях
- Выделение белка для последующего анализа
- Оценка чистоты препарата
- Определение молекулярной массы



SDS

100°C

SH-
реагент



Додецилсульфат натрия (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) - анионный детергент; его молекулы сообщают любой полипептидной цепи отрицательный заряд, величина которого пропорциональна длине цепи, поэтому **все белки движутся к аноду**.

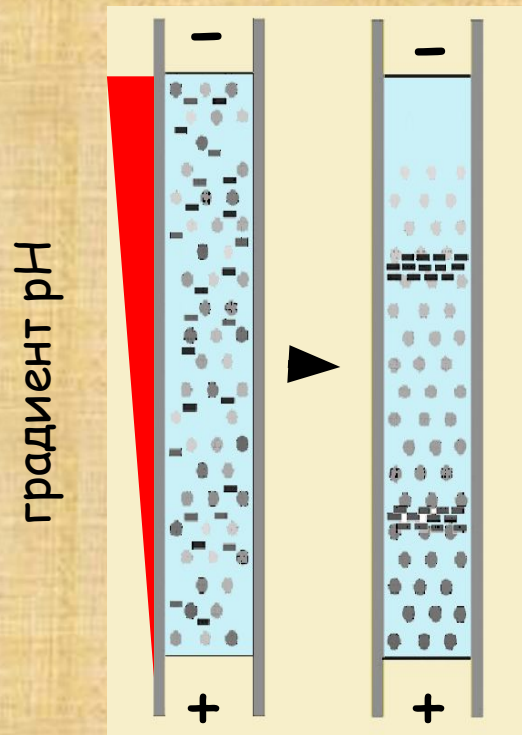
Скорость этого движения обратно пропорциональна логарифму массы молекулы, - хотя плотность заряда одинакова, - **молекулы делятся по размеру** из-за тормозящего действия геля.

Двумерный электрофорез - максимальное разрешение белков в геле

первое направление,

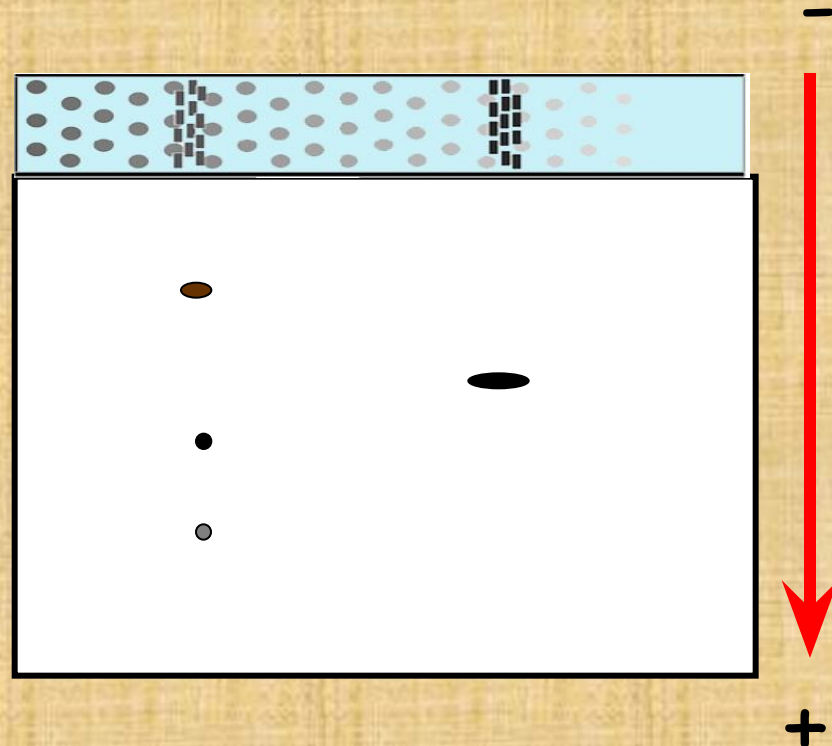
амфолины

300-900 Д



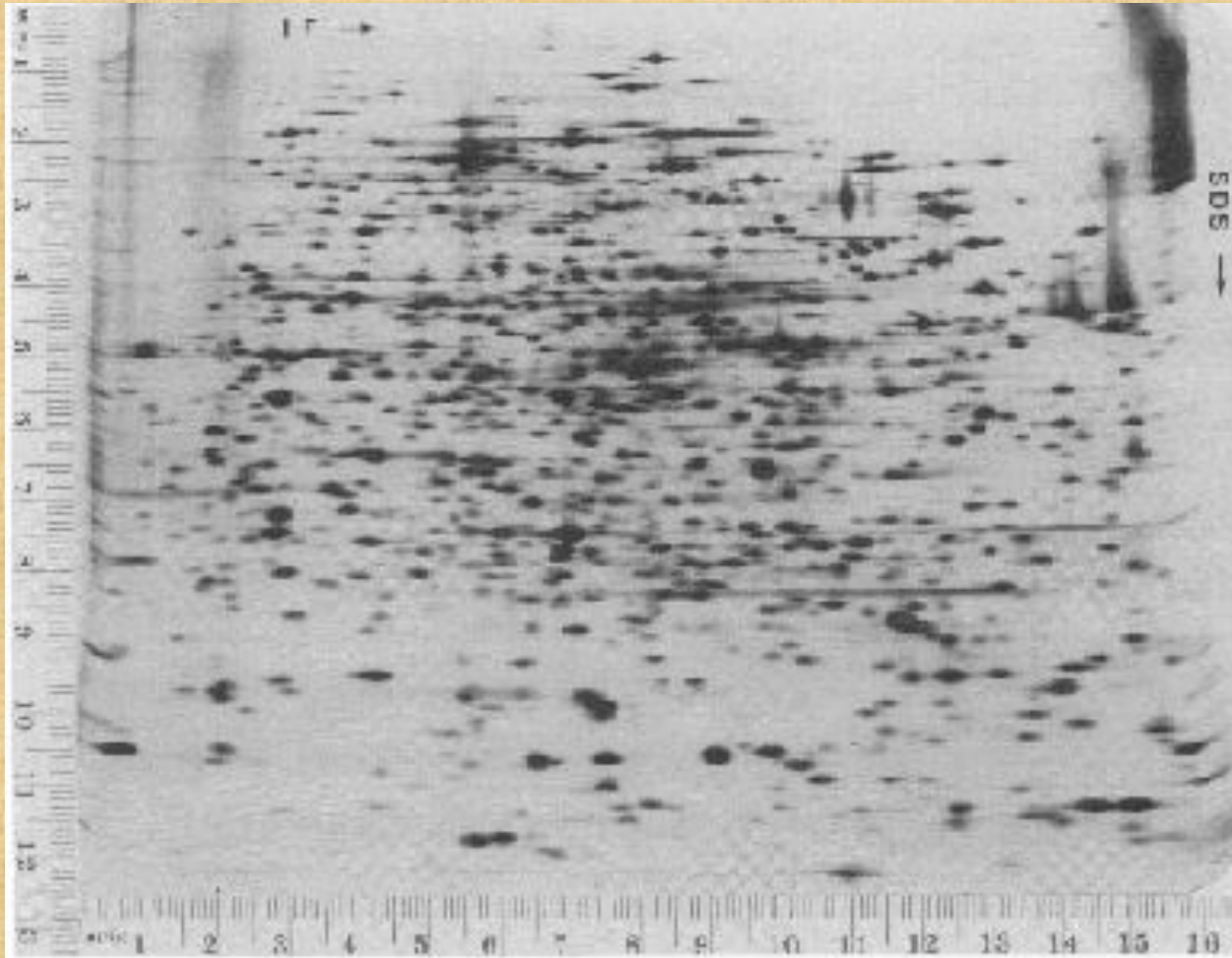
без SDS, но в мочеvine
деление по заряду молекулы

второе направление



в присутствии SDS,
деление по молекулярной массе

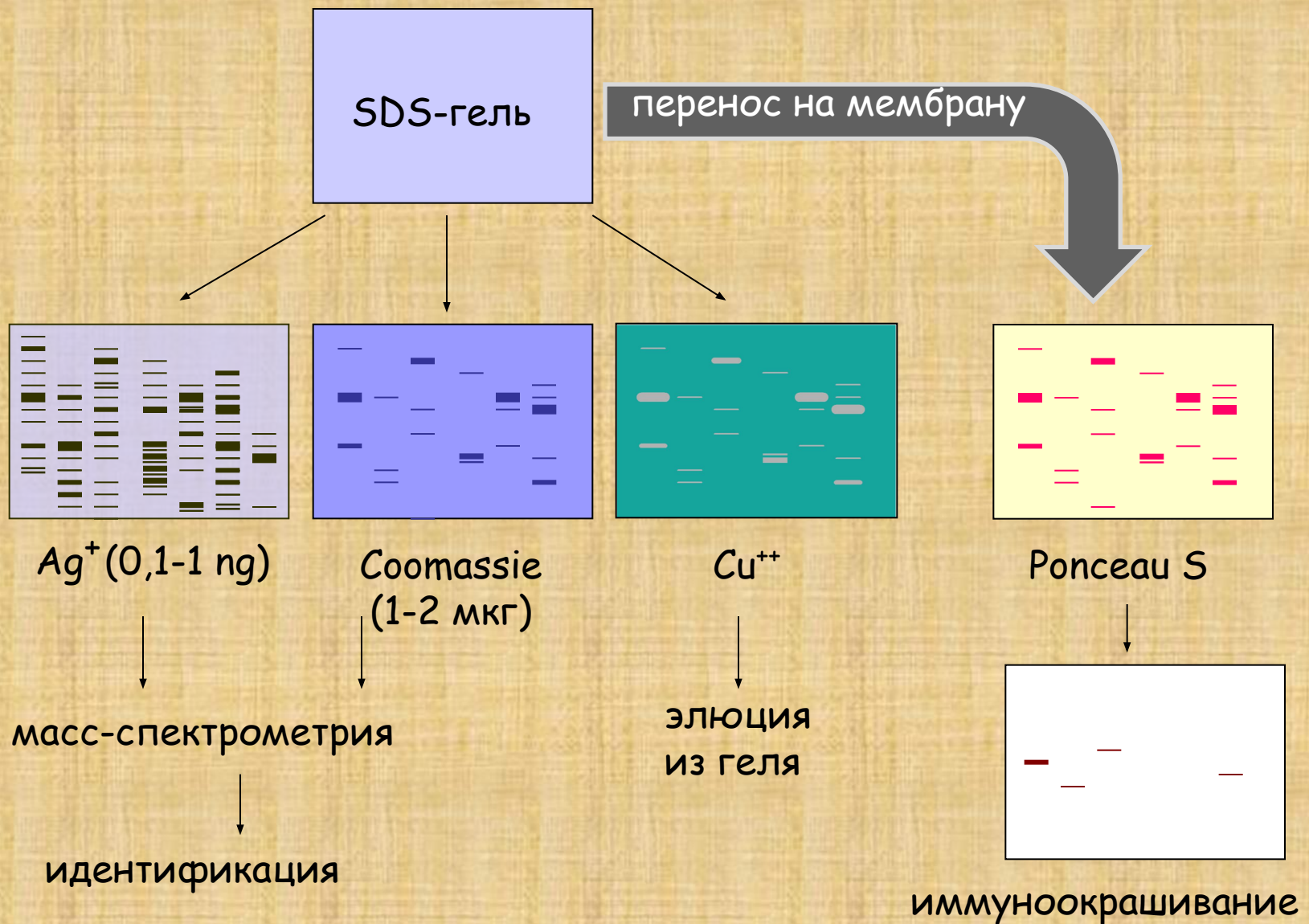
1100 белков *E. coli*, разделенные с помощью двумерного электрофореза



- 10 мкг белка
- ^{14}C -метка
- 825 часов
экспозиции

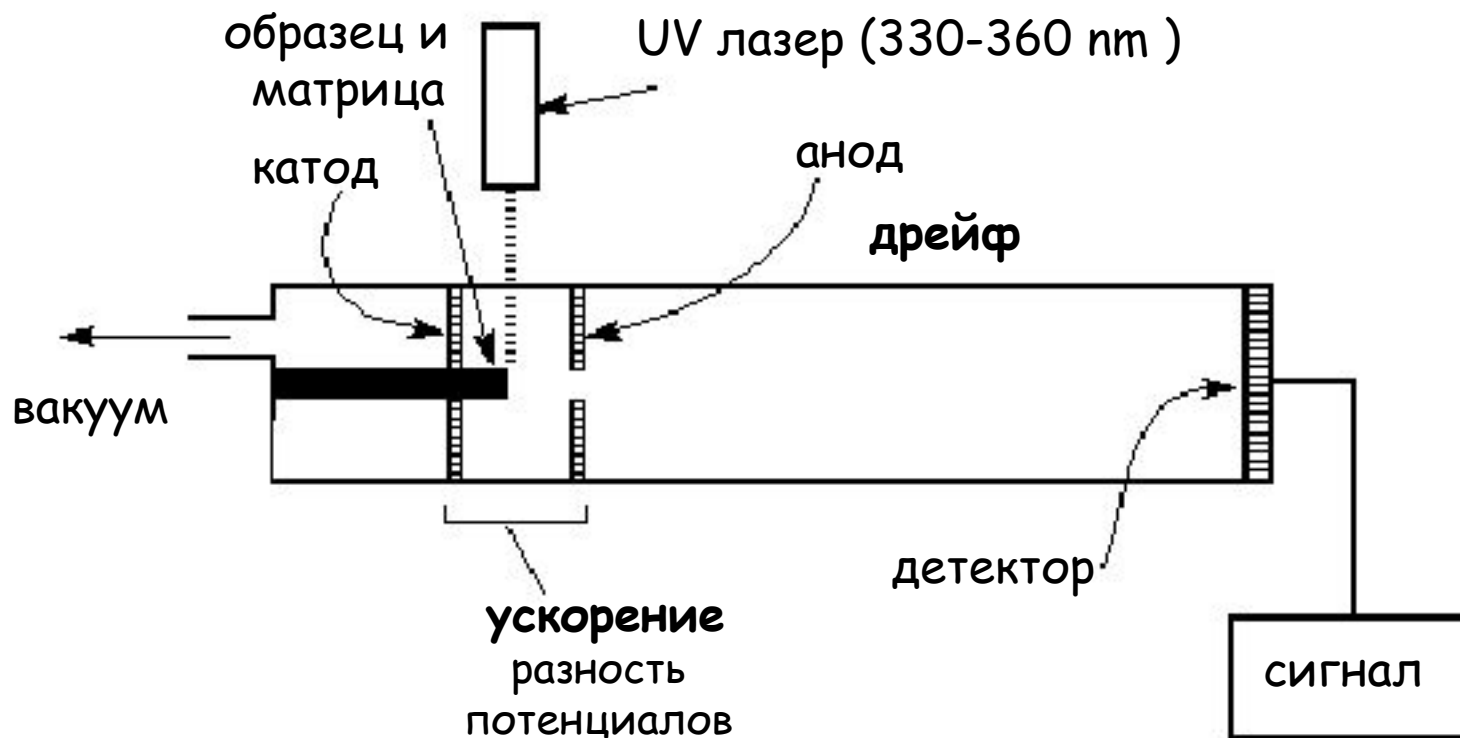
(P. O'Farrell, 1974)

Окрашивание белков в геле и на мембране



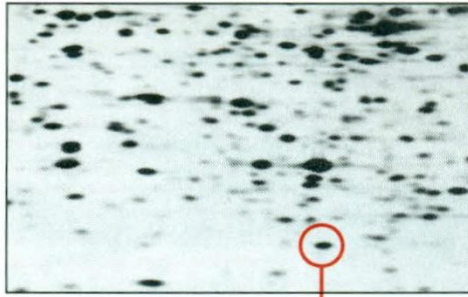
Масс-спектрометрия MALDI-TOF

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight



Принципиальная схема устройства масс-спектрометра

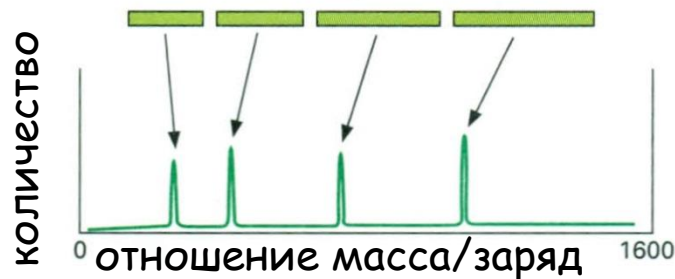
MALDI-TOF



белковое пятно вырезают из геля

N  C

белок переваривают трипсином; смесь пептидов
вносят в масс-спектрометр и получают спектр



поиск в базе белковых последовательностей совпадения с теоретическими
массами, рассчитанными для всех триптических пептидных продуктов

идентификация белка и изолирование соответствующего гена



отдельный пик белка,
очищенного хроматографией

N ————— C

пептиды, полученные обработкой
очищенного белка трипсином



первый масс-спектр дает
массы пептидов



каждый пептид дальше фрагментируется
по пептидным связям

массы фрагментов для каждого пептида
определяются на втором масс-спектре



разница в массах между фрагментами
позволяет составить последовательность
пептида

Центрифугирование: угловой ротор



Type 45 Ti
6 x 94 mL



TLA-100
20 x 0.2 mL

Центрифугирование: бакет (bucket) - ротор

SW 28
6 x 39 mL

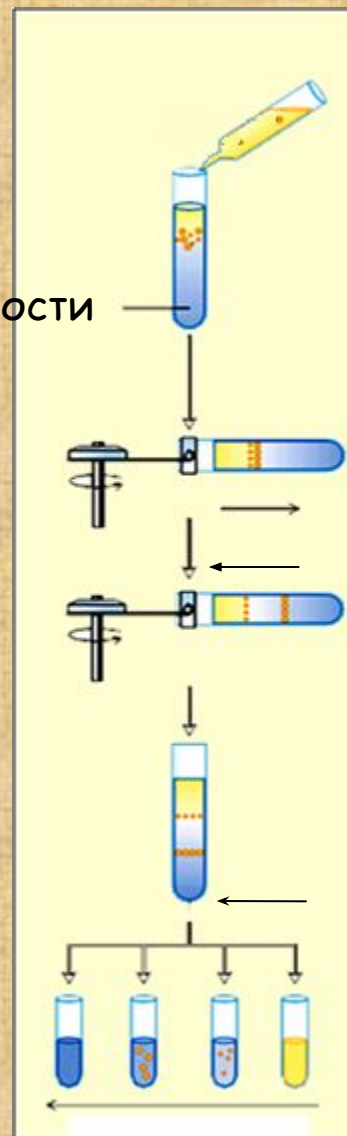


TLS-55
4 x 2.2 mL



Плавучая плотность в CsCl , г/см^3
ДНК: 1,69-1,73, (в воде 1,1, собственная ок.2)
РНК: более 1,9
Белки: 1,30-1,33

градиент плотности

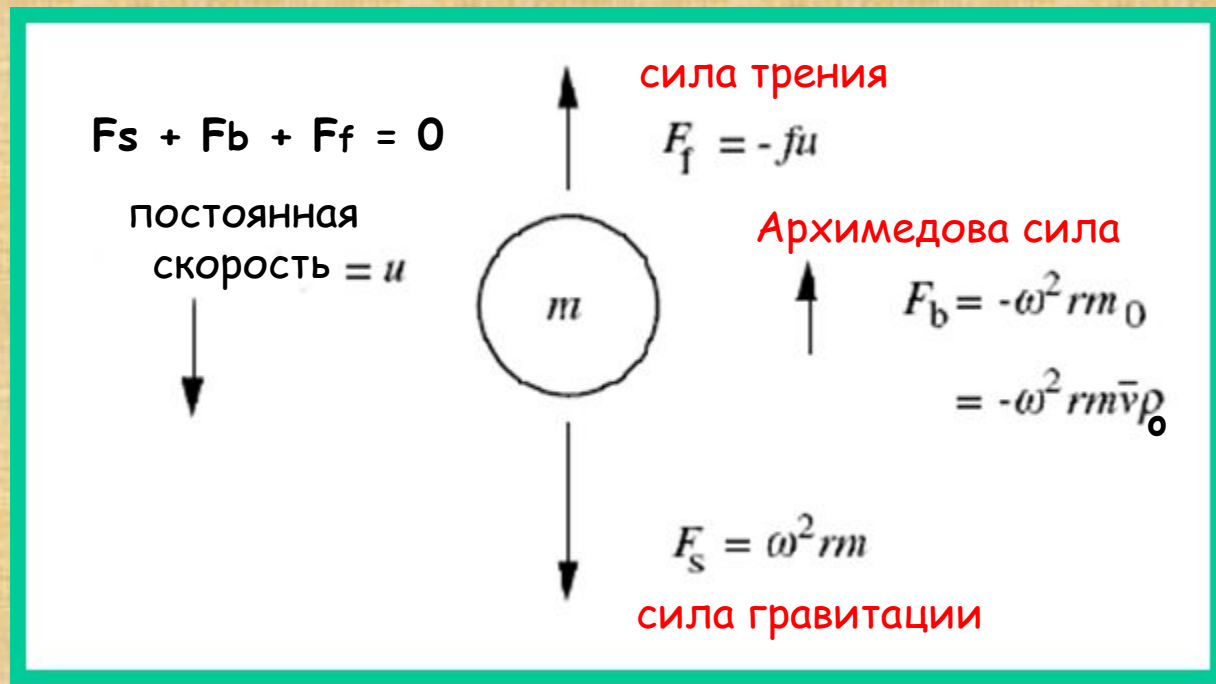


сила гравитации
сила трения

отверстие

частицы возрастающей плотности

Аналитическое ультрацентрифугирование



$$\frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{Nf} = \frac{u}{\omega^2 r} \equiv s$$

S – константа седиментации (сек)

$$10^{-13} \text{ сек} = 1 \text{ S (Svedberg)}$$

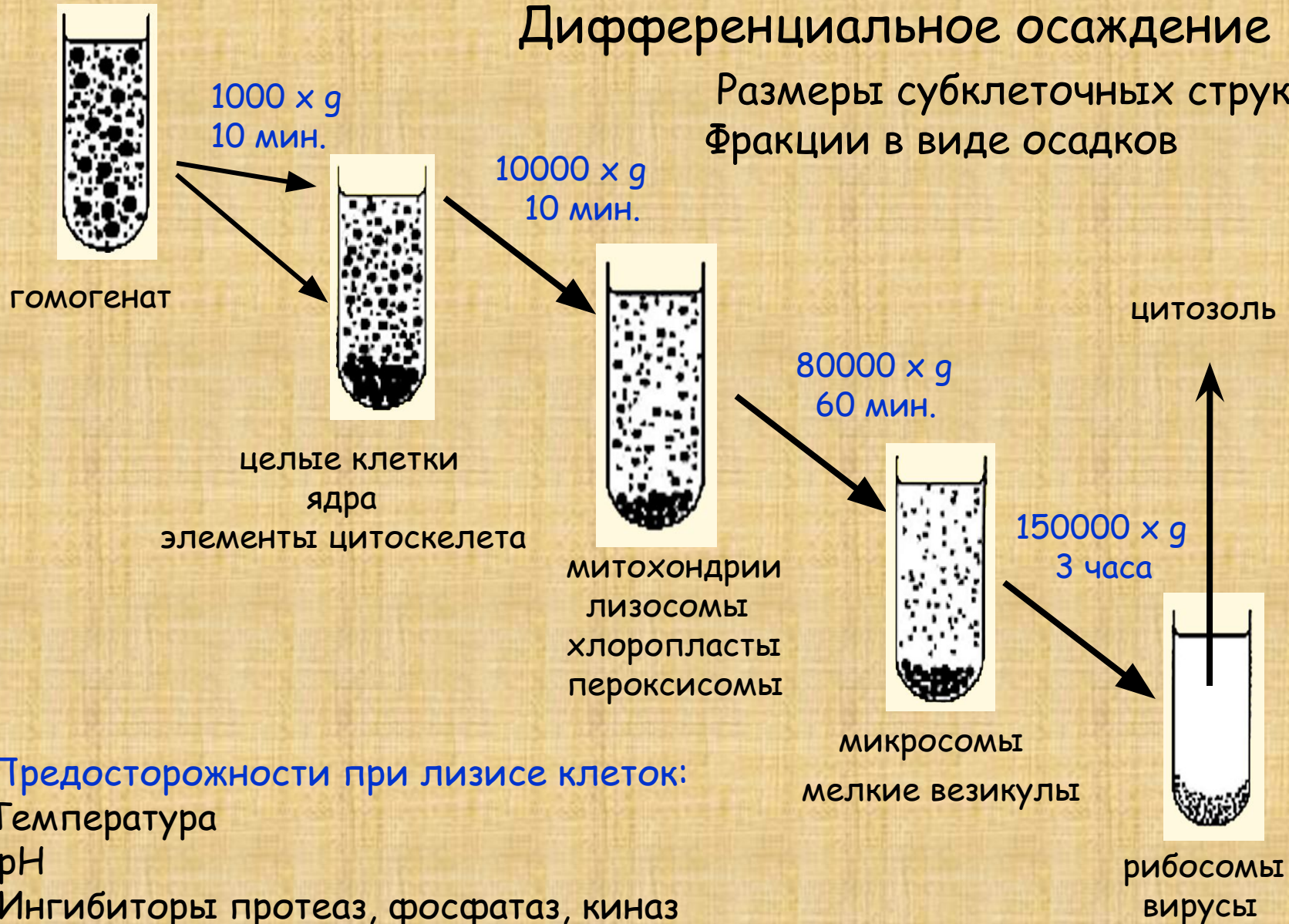
70S=30S+50S рибосомы прокариот

80S=40S+60S рибосомы эукариот

S_{20,w} – коэффициент седиментации

Дифференциальное осаждение

Размеры субклеточных структур
Фракции в виде осадков

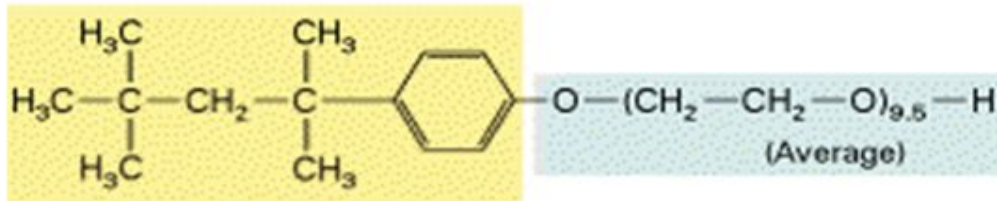


Предосторожности при лизисе клеток:

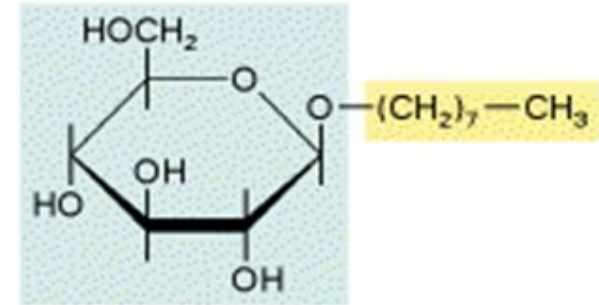
- Температура
- pH
- Ингибиторы протеаз, фосфатаз, киназ
- Детергенты?

Наиболее популярные детергенты

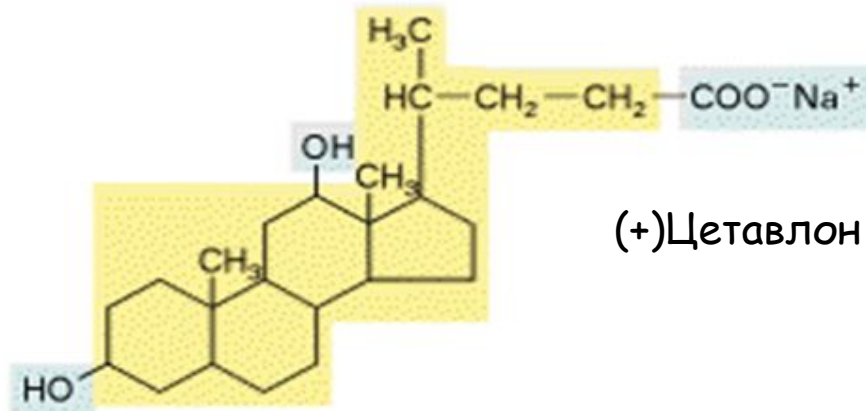
НЕИОННЫЕ



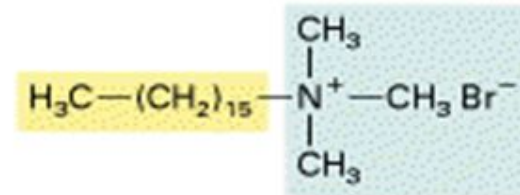
Triton X-100
Octylglucoside



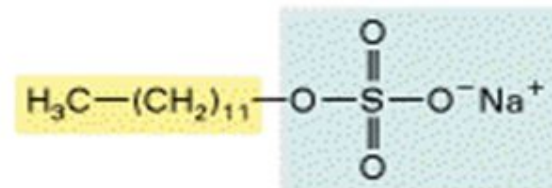
ИОННЫЕ



(-)Sodium Deoxycholate



(+)Цетавлон = Cetyltrimethylammonium bromide

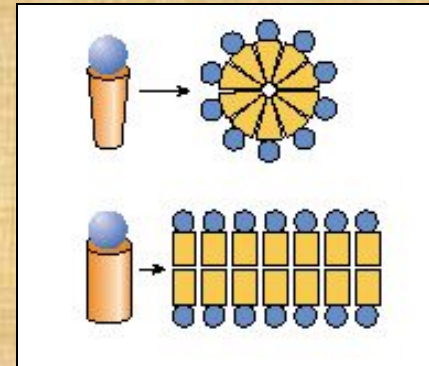


(-)Sodium Dodecylsulfate

Детергенты растворяют гидрофобные белки

амфифильность
(гидрофильные и
гидрофобные области)

ККМ - критическая концентрация
мицеллообразования



детергент

мембрана

детергентно-липидные
мицеллы

Детергент

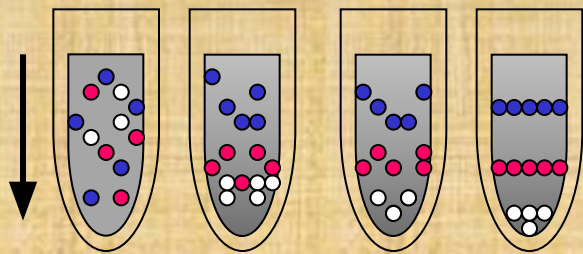
Липидно-белковая
мембрана

Фрагментация

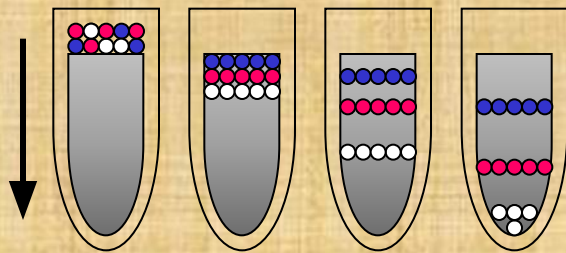
Детергентные
мицеллы

Детергентно-белковые
мицеллы

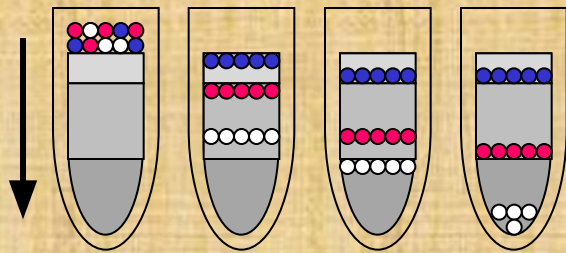
Центрифугирование в градиенте плотности



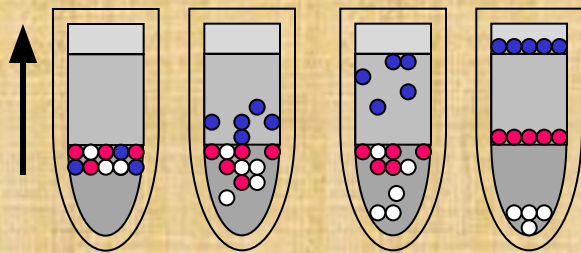
Седиментация:
непрерывный линейный градиент
формируется в процессе центрифугирования
Плавучая плотность ДНК в градиенте CsCl



Седиментация:
непрерывный линейный градиент,
сформированный заранее
Например, градиент сахарозы (органеллы)



Седиментация:
ступенчатый градиент,
сформированный заранее



Флотация:
ступенчатый градиент,
сформированный заранее

Анализ фракций градиента

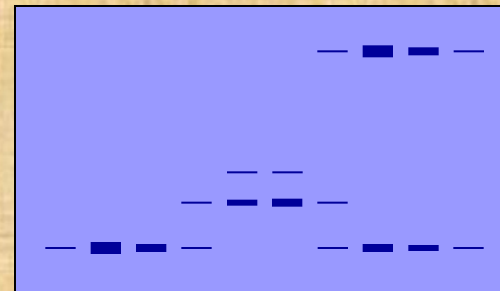
Концентрация сахарозы

Концентрация белка

Энзиматическая активность

Белковый состав фракций

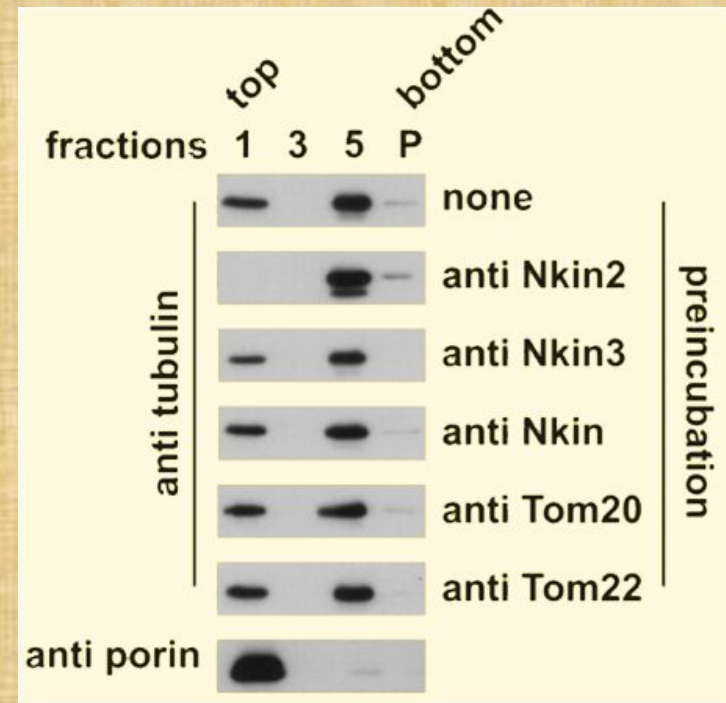
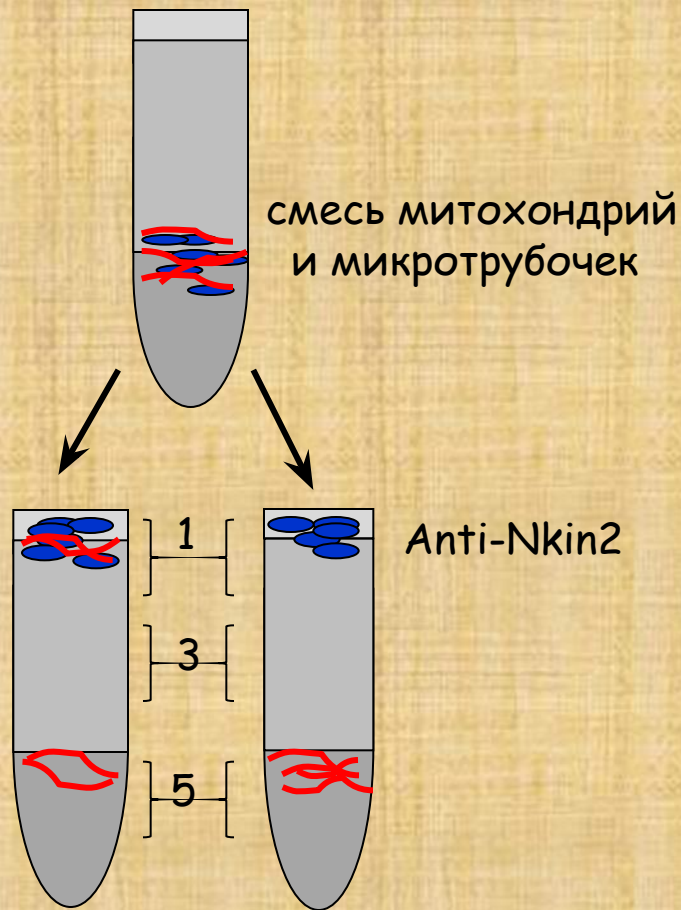
Распределение интересующего
белка



иммуноблоттинг

Пример: флотация микротрубочек

Вопрос: какой из белков на поверхности митохондрий опосредует их связывание с микротрубочками?

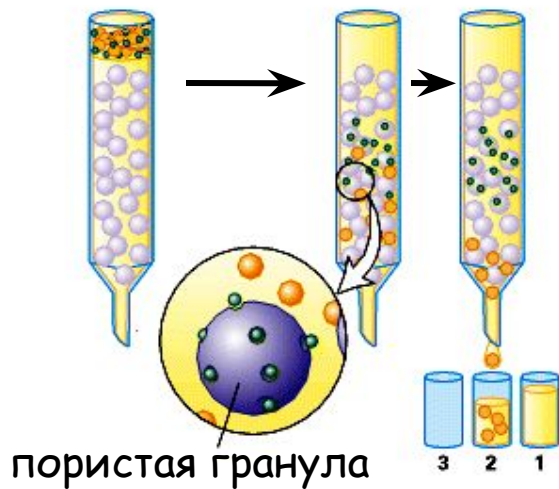


Предварительная инкубация митохондрий с антителами против белка Nkin2 семейства кинезина из *N.crassa* лишает их способности «поднимать» микротрубочки. Остальные антитела не влияют.

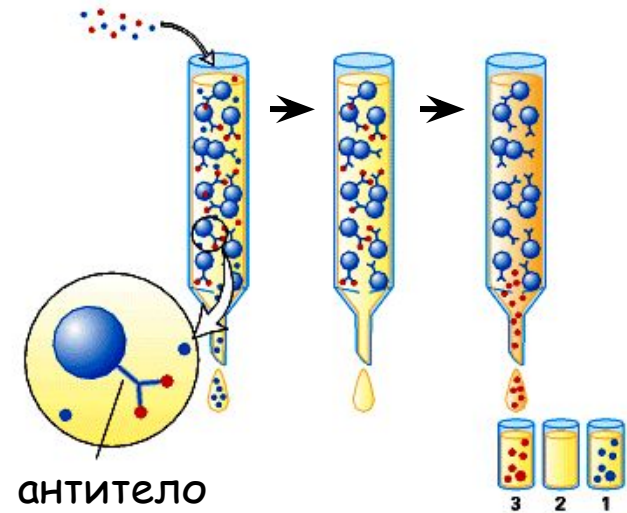
(from Fuchs and Westermann)

Виды хроматографии

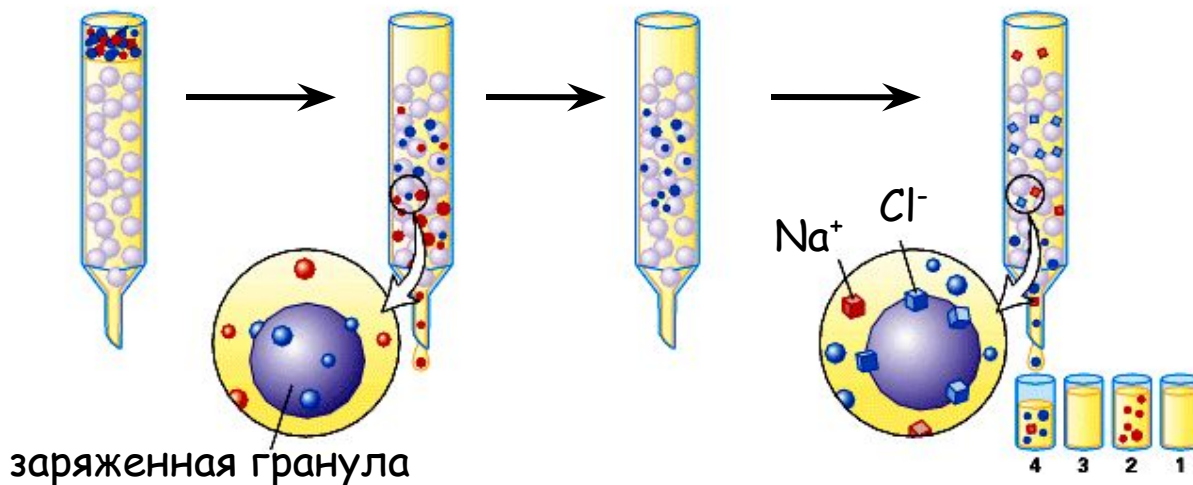
Гель-фильтрация



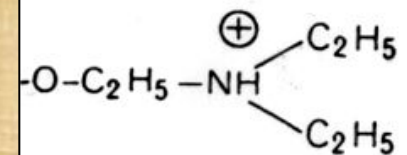
Аффинная хроматография



Ионообменная хроматография

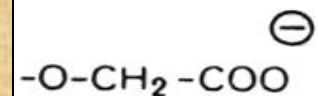


DEAE-группа



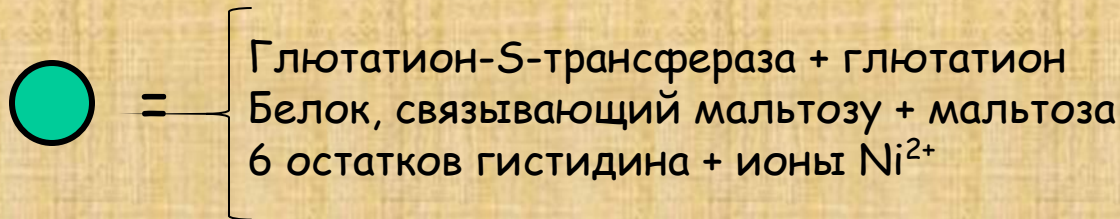
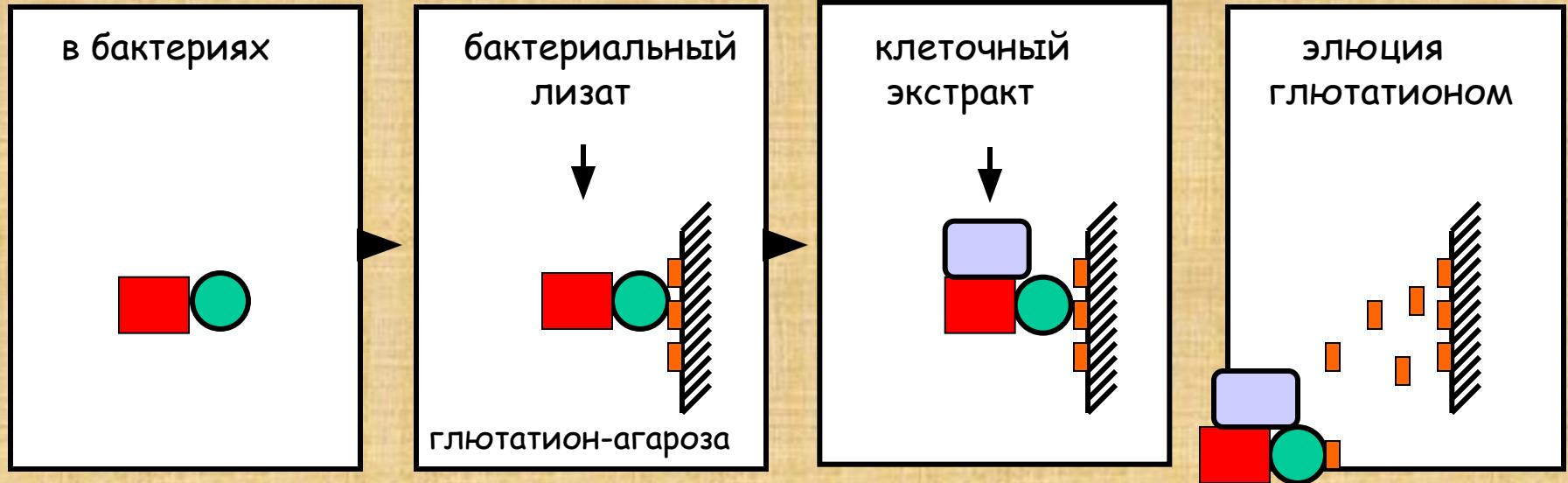
OH⁻ или Cl⁻-формы

CM-группа



Na⁺-форма; щелочные белки

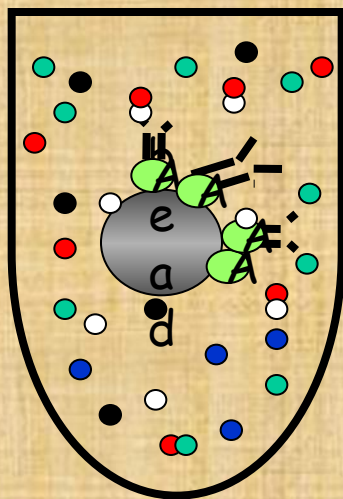
Pull-down анализ: связывание с рекомбинантным белком, синтезированным в бактериях



Ко-иммунопреципитация: нужны антитела к обоим партнерам

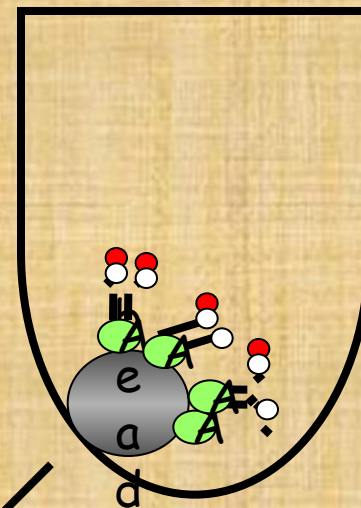
Образуют ли комплекс белки ● и ○ ?

инкубация с анти-○



центрифугирование

и промывание

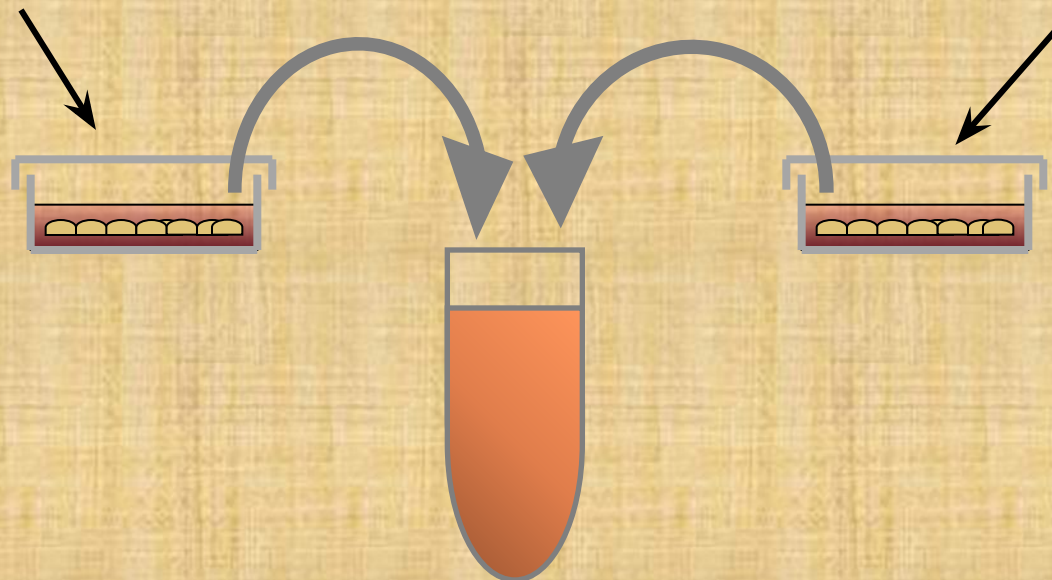


иммуноблоттинг с анти-●

Пример: взаимодействие двух секретируемых белков

ДНК, кодирующая FLAG-белок А

ДНК, кодирующая Мус-белок В



↓
Иммунопреципитация антителами к FLAG

↓
Иммуноблоттинг преципитата с антителами к Мус

Blot-overlay анализ

белки разделяются электрофорезом и
переносятся из геля на мембрану



инкубация с белком-«наживкой»



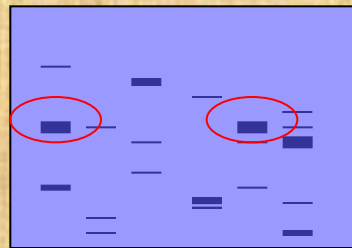
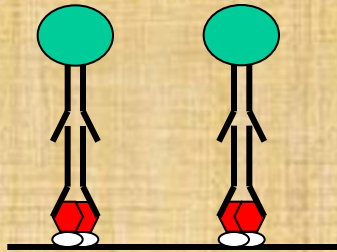
инкубация с антителами против белка-«наживки»



инкубация со вторичными антителами

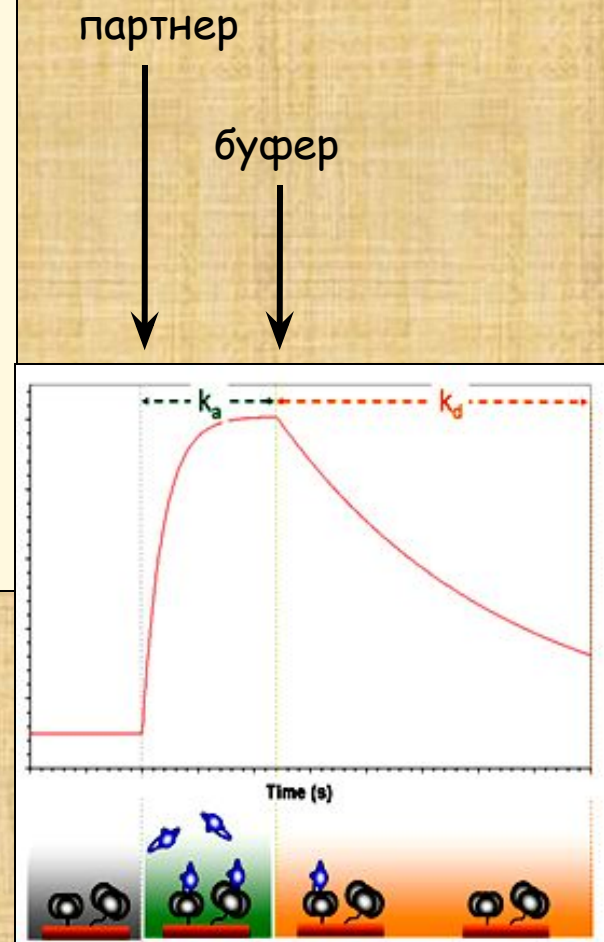
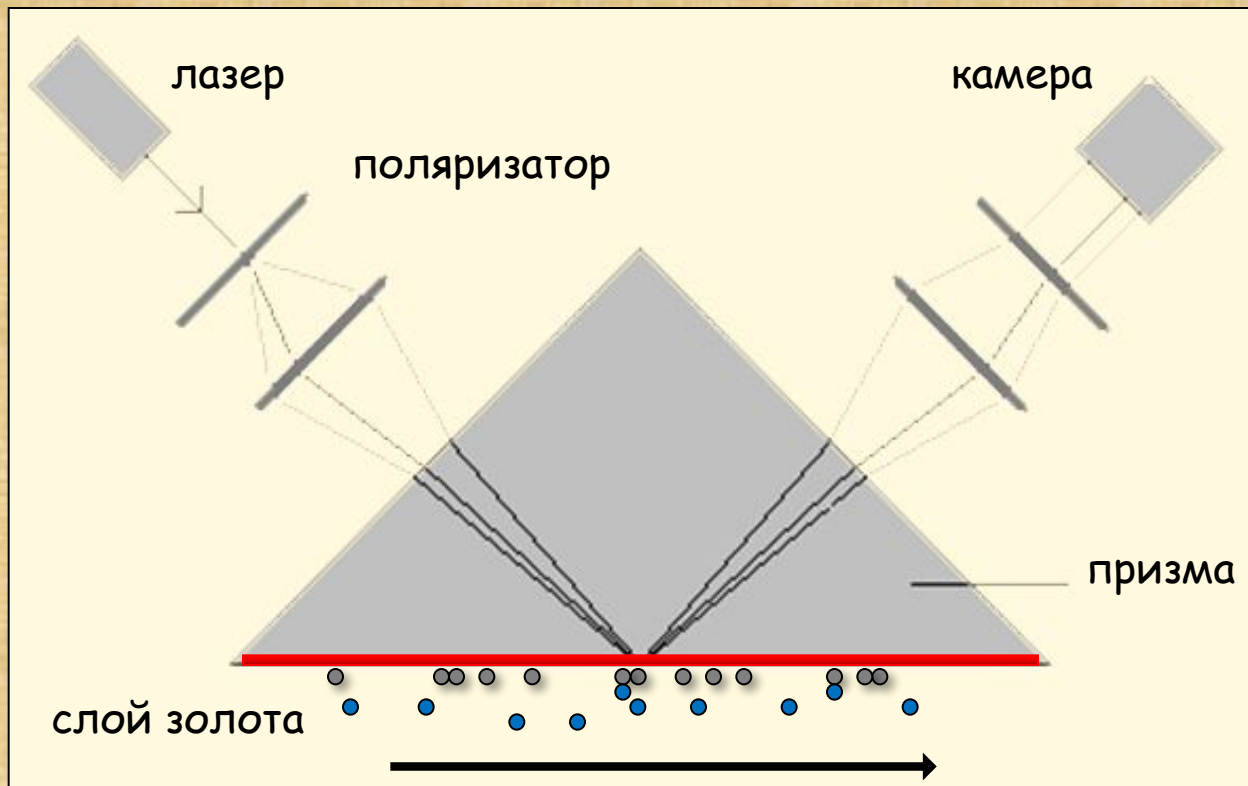


проявление

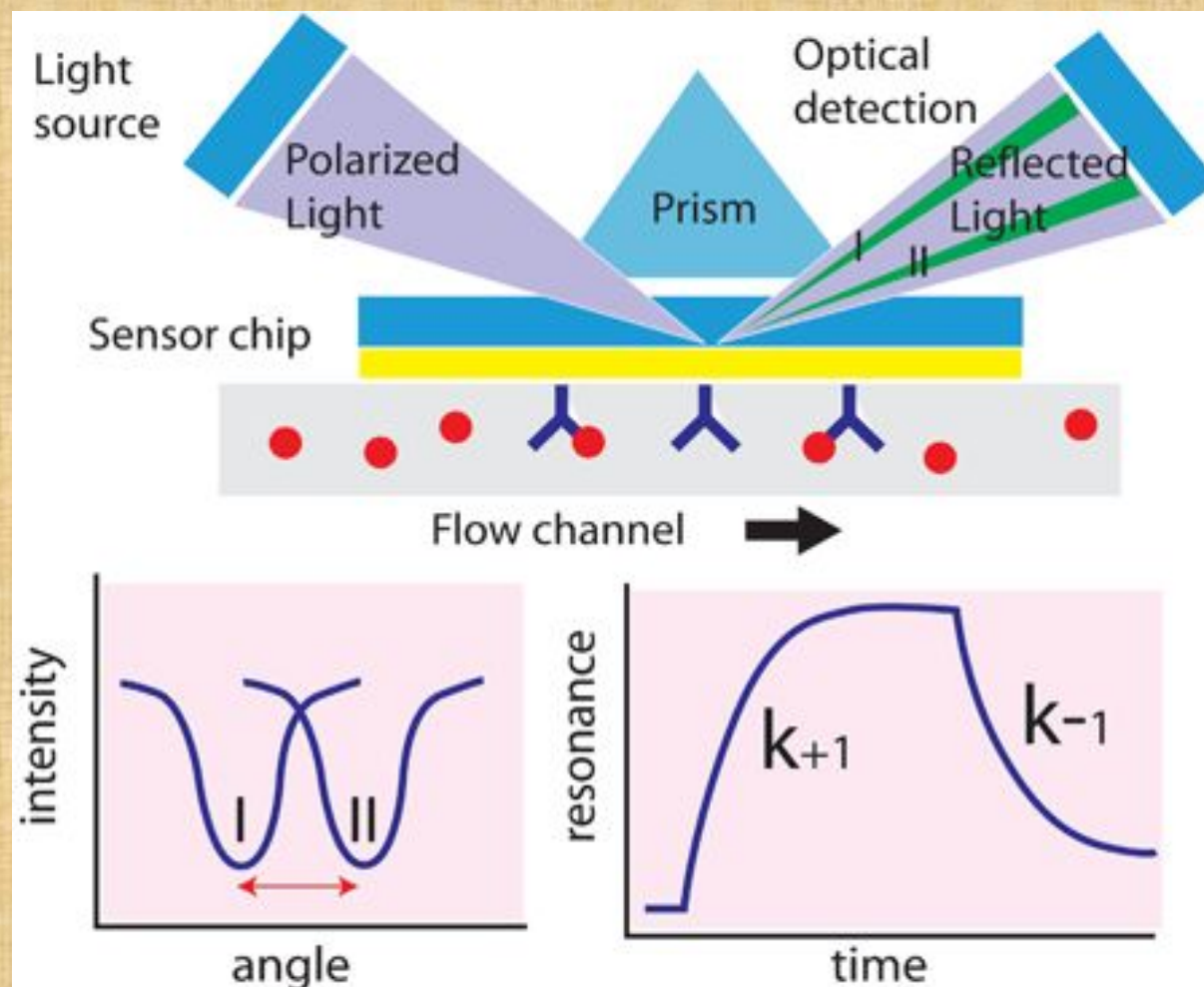


сравнение с гелем

Surface Plasmon Resonance: анализ взаимодействия очищенных белков или белков и нуклеиновых кислот

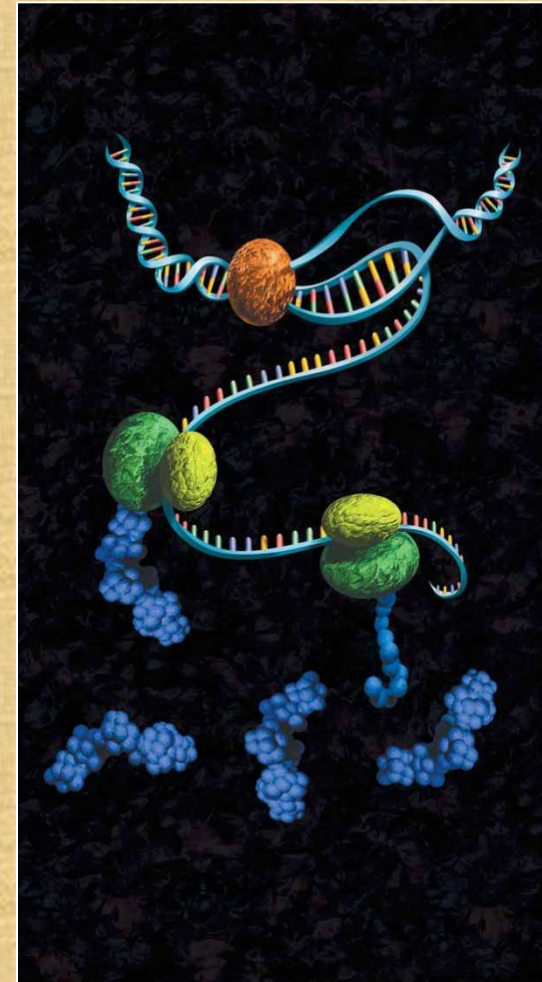


Surface Plasmon Resonance: анализ взаимодействия антиген-антитело



Биохимическая *in vitro* система: синтез белка

- Быстрая идентификация продукта гена
- Локализация мутаций посредством синтеза укороченных продуктов
- Включение модифицированных неприродных аминокислот для структурных исследований
- Исследование сворачивания белка
- Изучение влияния разных факторов на транскрипцию и трансляцию



Обычно используемые системы

1. Экстракт ретикулоцитов кролика.

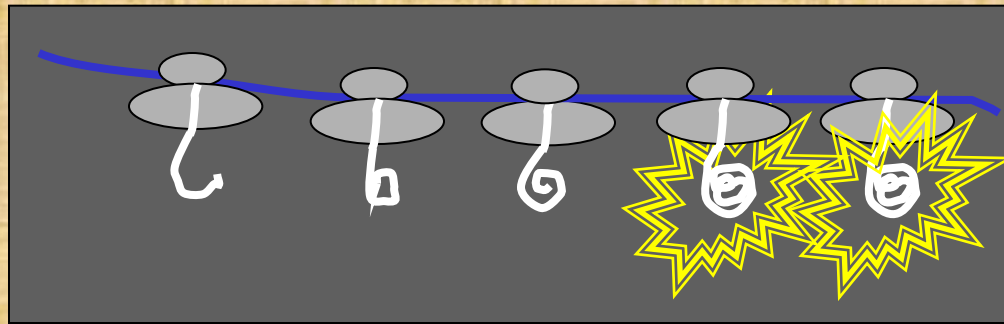
Ретикулоцит – предшественник эритроцита, он уже не имеет ядра. Много эндогенной мРНК, но она в основном глобиновая: 90% синтезируемого белка – глобин. Синтез глобина можно использовать как модель для изучения роли разных факторов в процессах транскрипции и трансляции. В сопряженной системе используется фаговая РНК-полимераза.

2. Экстракт зародышей пшеницы. Низкое содержание эндогенной мРНК.

3. Экстракт *E. coli*. Содержит все, что нужно для транскрипции и трансляции. Синтез белка идет существенно быстрее, чем в «эукариотических» системах. Собственные мРНК нужно удалять.

Пример: синтез люциферазы светлячка в бесклеточной системе

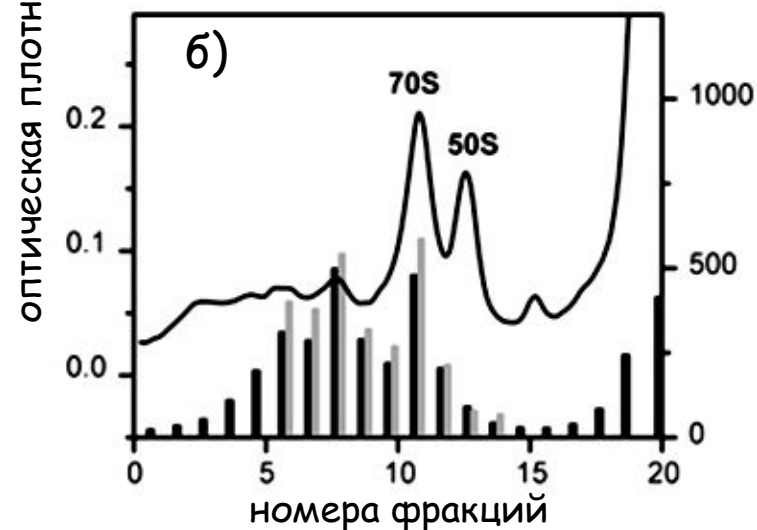
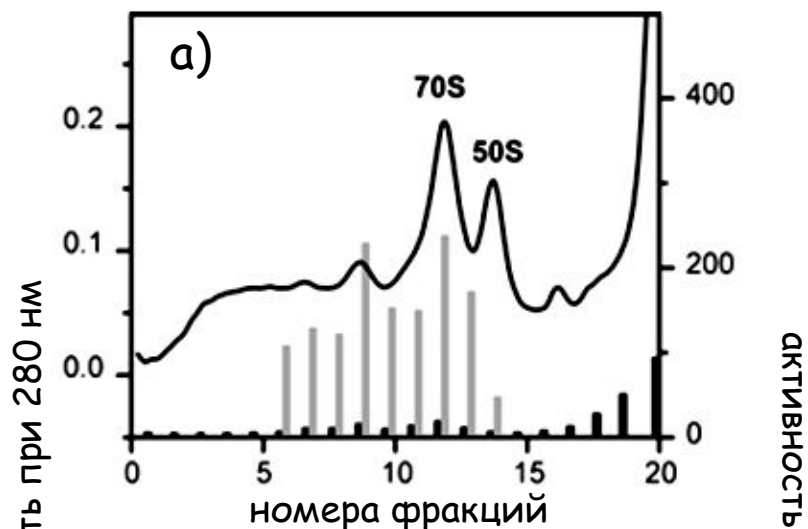
Вопрос: происходит ли при синтезе в бесклеточной системе *E. coli* образование на рибосоме активной конформации каждого из двух пептидов, различающихся по длине их С-концевых участков?



мРНК люциферазы была лишена стоп-кодона, поэтому пептиды оставались связанными с рибосомами.

Пурамицин имитирует аминоксил-тРНК; на него «перебрасывается» С-конец растущего пептида, высвобождается пептидил-пурамицин, синтез белка прекращается.

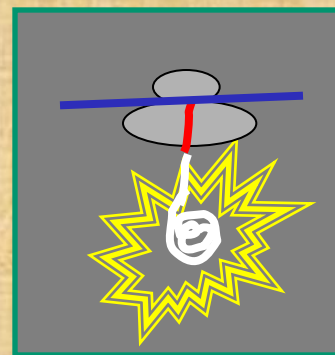
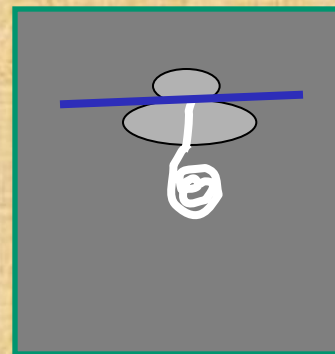
а) «растущая» люцифераза без удлинения С-конца



б) «растущая» люцифераза, удлинённая на 59 аминокислот с С-конца

Результат центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы

Черные столбики - активность люциферазы
Серые столбики - активность люциферазы после добавления пуромицина



(from Kolb V. et al.)

Лекция 7

Взаимодействия in vivo

С какими молекулами взаимодействует данный белок *in vivo*?

Взаимодействуют ли два (три и т.д.) данных белка в клетке?

С какой последовательностью ДНК взаимодействует данный белок?

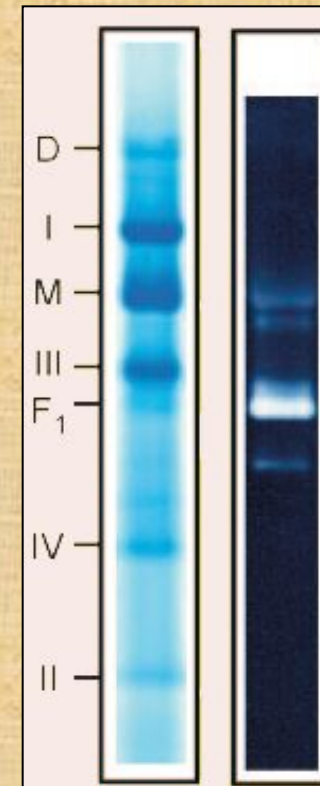
- Электрофорез в неденатурирующих условиях
- Химическая сшивка
- Иммунопреципитация хроматина
- Колокализация в клетке
- Pull-down из клеточного лизата
- Дигибридная дрожжевая система
- Fluorescence Resonance Transfer Energy- FRET
- Tandem Affinity Purification

Электрофорез белков в неденатурирующих условиях

1. Получение белка в очищенном нативном виде
2. Определение свойств выделенного белка:
 - Изменение заряда вследствие химической модификации или деградации
 - Модифицированные конформации - неправильно свернутые, частично денатурированные...
 - Олигомеры и агрегаты (как ковалентно, так и нековалентно связанные)
 - Взаимодействие белков между собой или с лигандами

Свойства ПТААГ
мембранные белковые
комплексы митохондрий
10 kDa - 10 MDa

0,002% Coomassie G-250 в катодном буфере

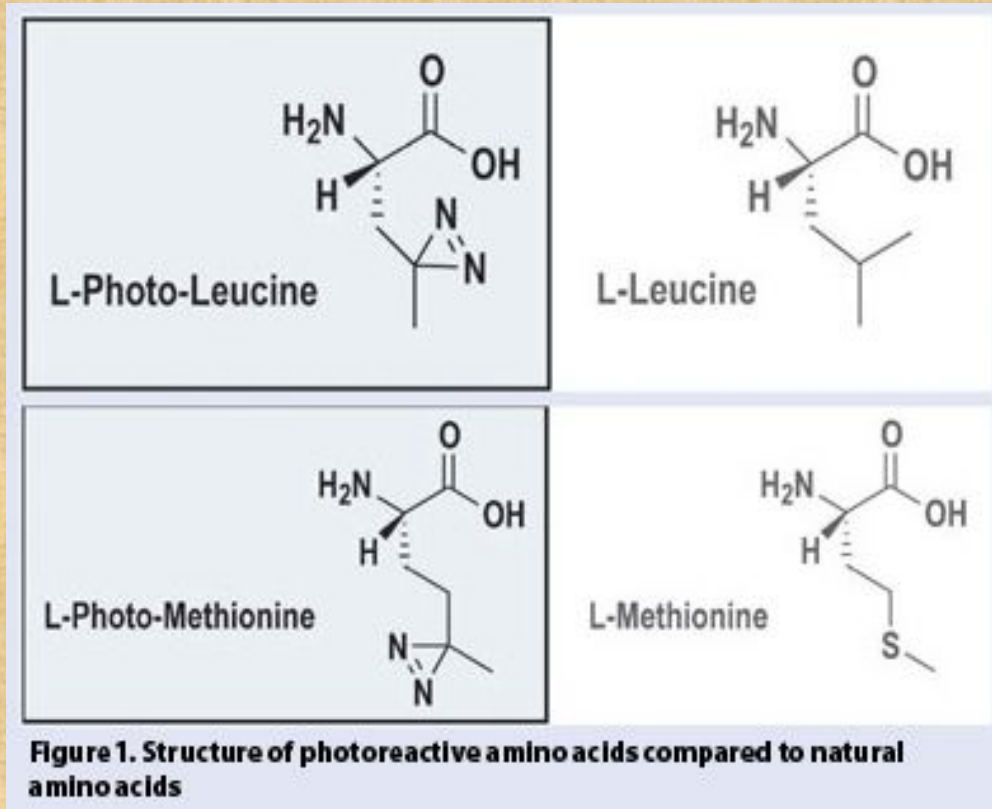


pH 7,5

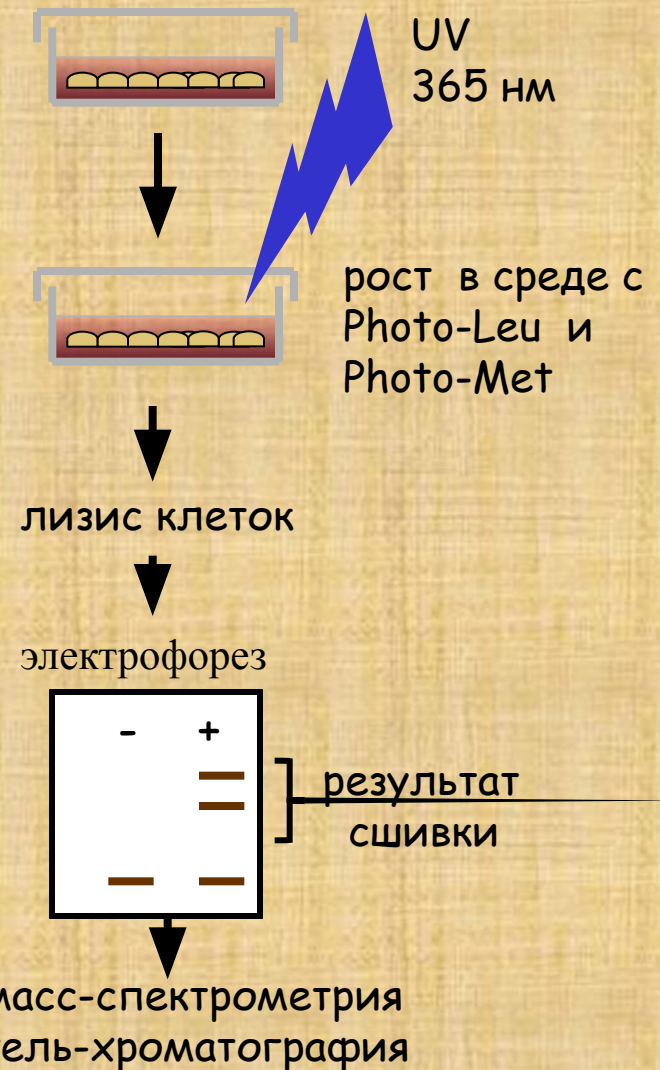
(from I. Wittig et al.)

Химическая сшивка белков посредством фотоактивации

Фото-активируемые аналоги аминокислот

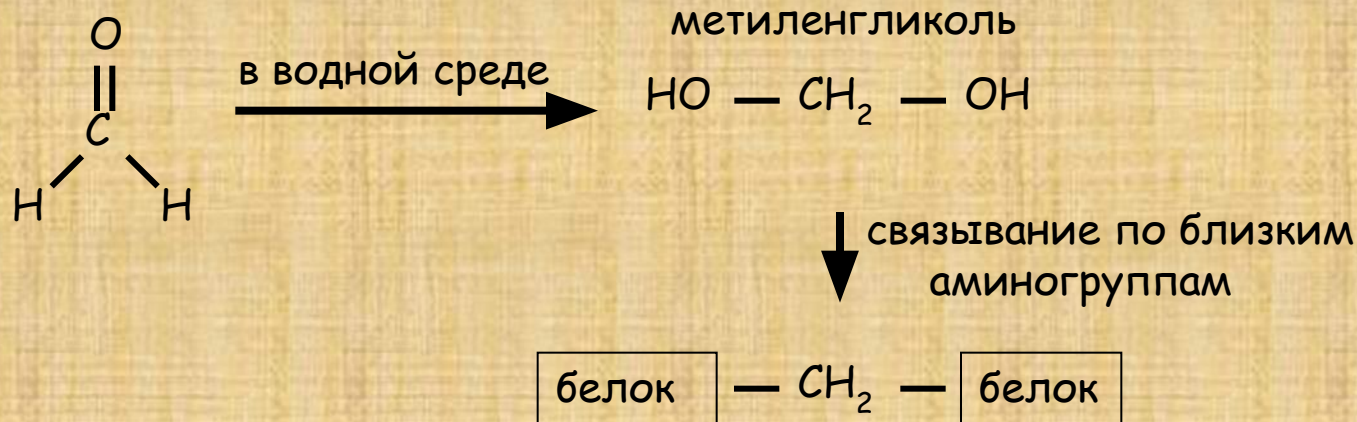


L-Photo-Leucine и L-Photo-methionine - аналоги нормальных аминокислот; присутствуя в среде, они включаются в белки в процессе обычной трансляции



Химические сшивки белков

Простейший способ - «сшить» формальдегидом:



Преимущество: связывание ковалентно, но обратимо при нагревании, поэтому возможен анализ с помощью электрофореза и иммуноблоттинга, а также последующей масс-спектрометрии

Недостаток: нет специфичности в отношении белков, поэтому белки связываются с нуклеиновыми кислотами, углеводами и т.д.

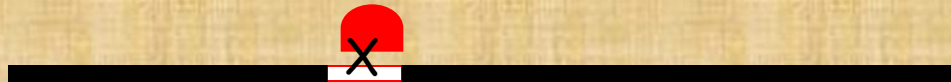
Химическая сшивка белка с ДНК - иммунопреципитация хроматина: идентификация на ДНК сайта связывания белка

регуляторный белок

ДНК



↓ химически сшиваем белок с ДНК



↓ лизируем клетки и ядра

↓ нарезаем ДНК на короткие фрагменты

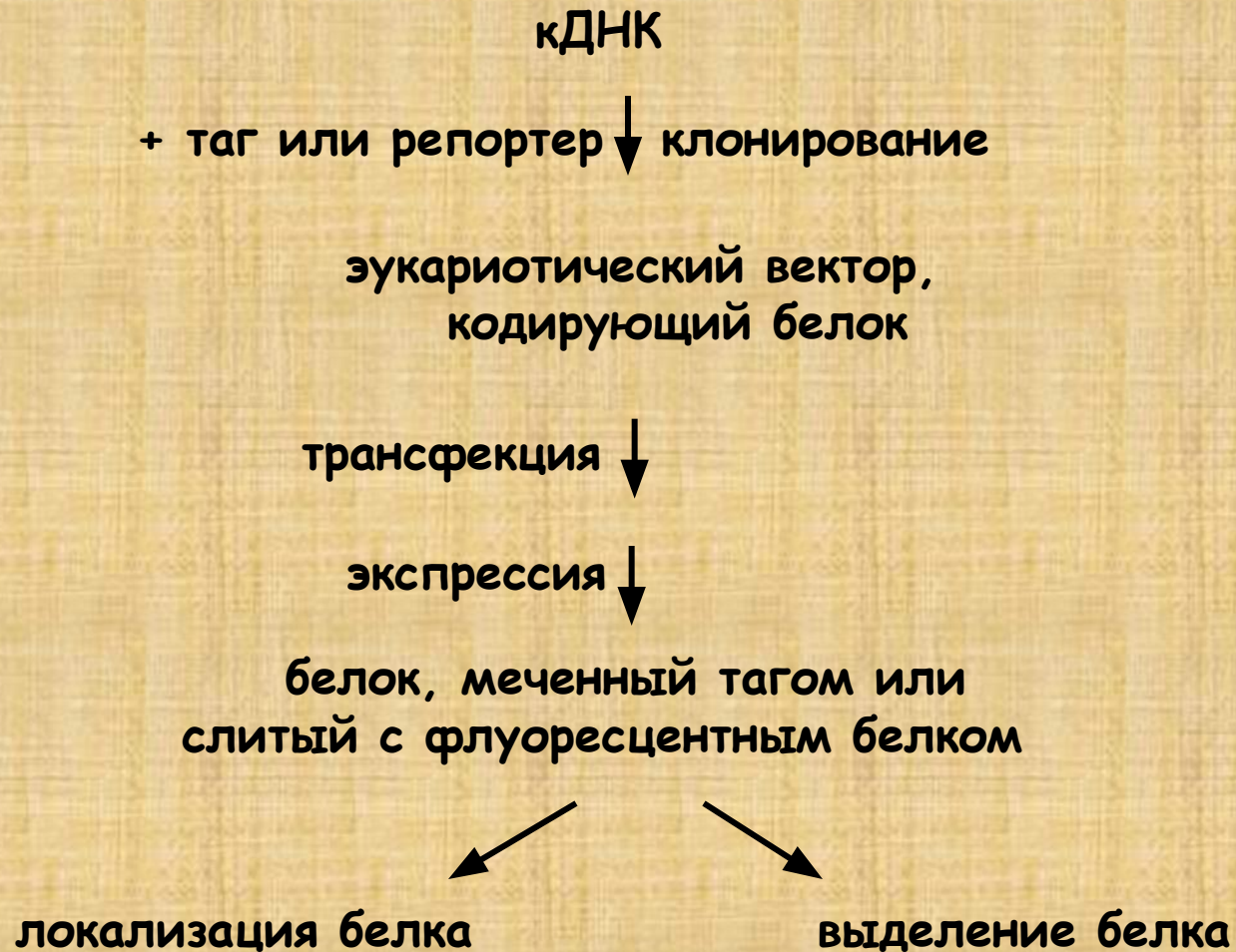


↓ выделяем регуляторный белок и ассоциированный фрагмент ДНК иммунопреципитацией

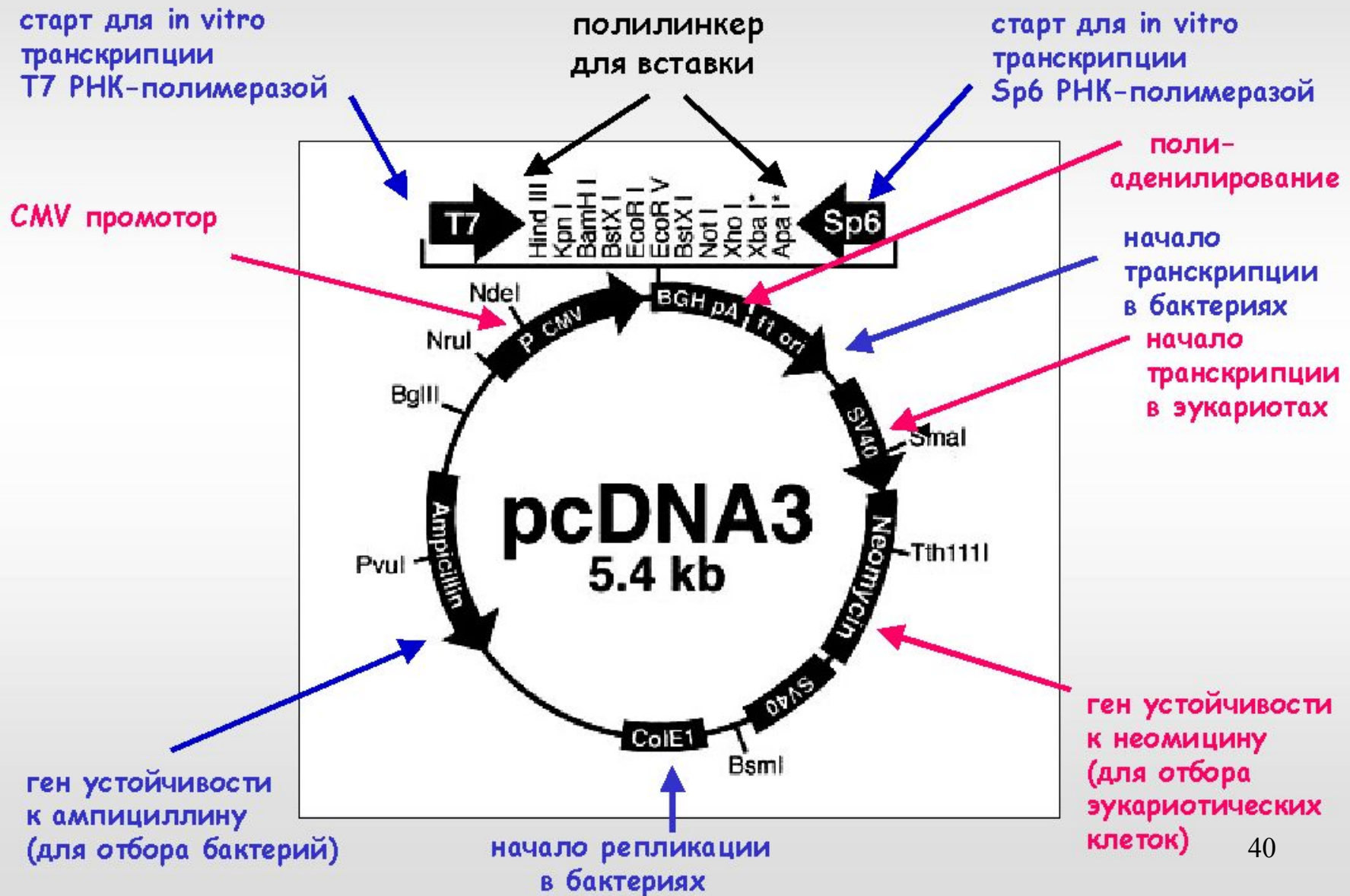


удаляем белок, амплифицируем выделенный фрагмент ДНК в PCR
и определяем в нем последовательность нуклеотидов

Экспрессия трансгена в клетках эукариот



Пример экспрессионного вектора - векторной ДНК, направляющей экспрессию чужеродного гена в эукариотах



Доставка крупных молекул в клетки

- Микроинъекция: ДНК, мРНК, белок
- Липосомная трансфекция: ДНК, мРНК
- Са-фосфатная трансфекция: ДНК
- Электропорация: ДНК, мРНК, белок
- Вирусная инфекция: ДНК
- Фагоцитоз

Ко-экспрессия возможных партнеров: использование клетки как пробирки

таг-1



таг-2



Ко-экспрессия

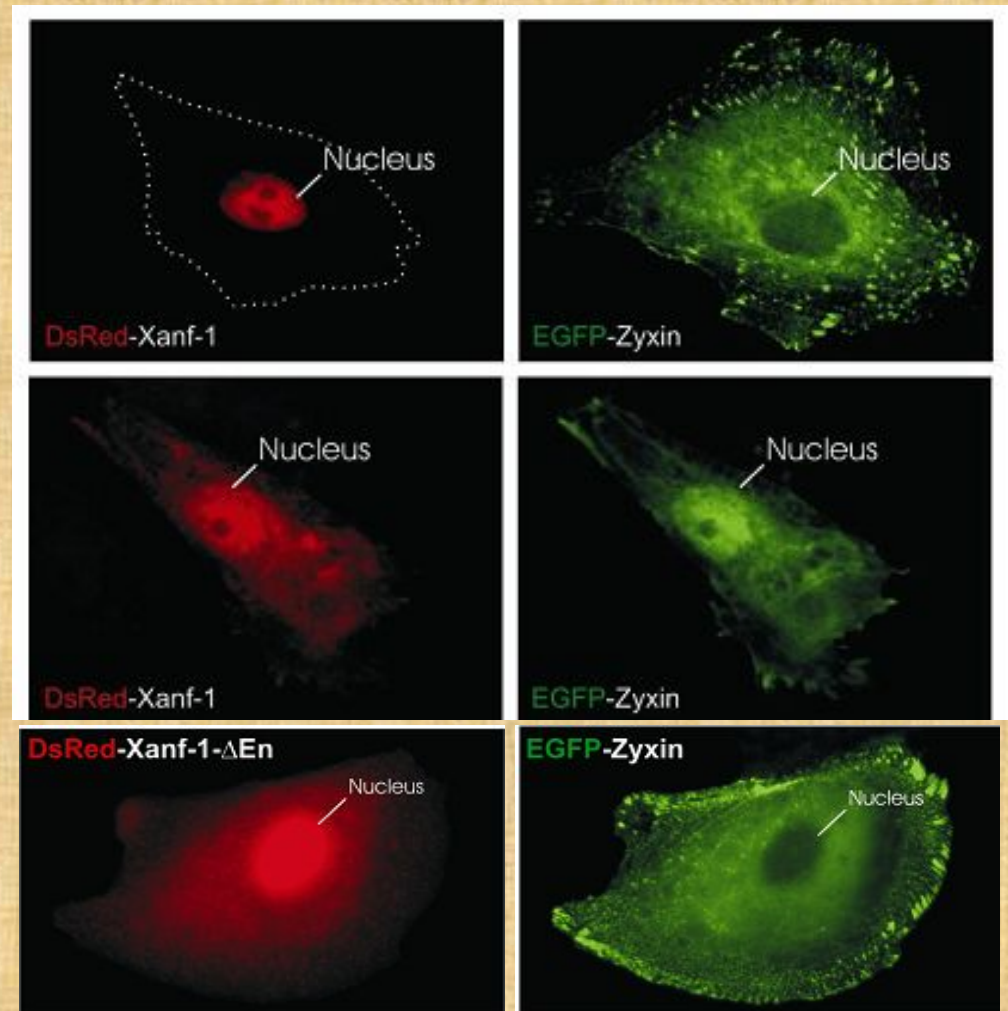


Иммунопреципитация
антителами против
тага-1



Иммуноблоттинг преципитата
с антителами против тага-2

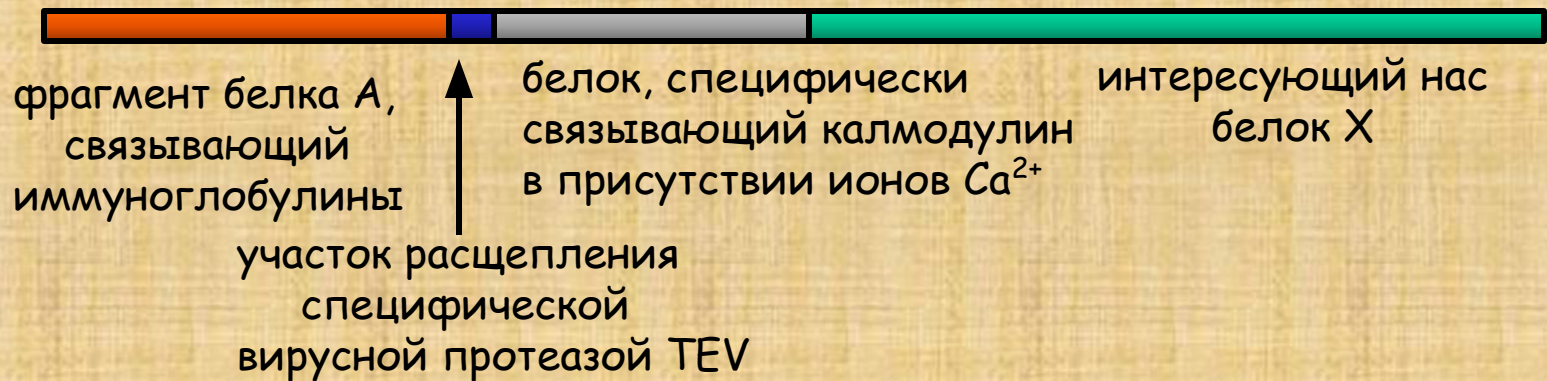
Ко-экспрессия возможных партнеров: ко-локализация



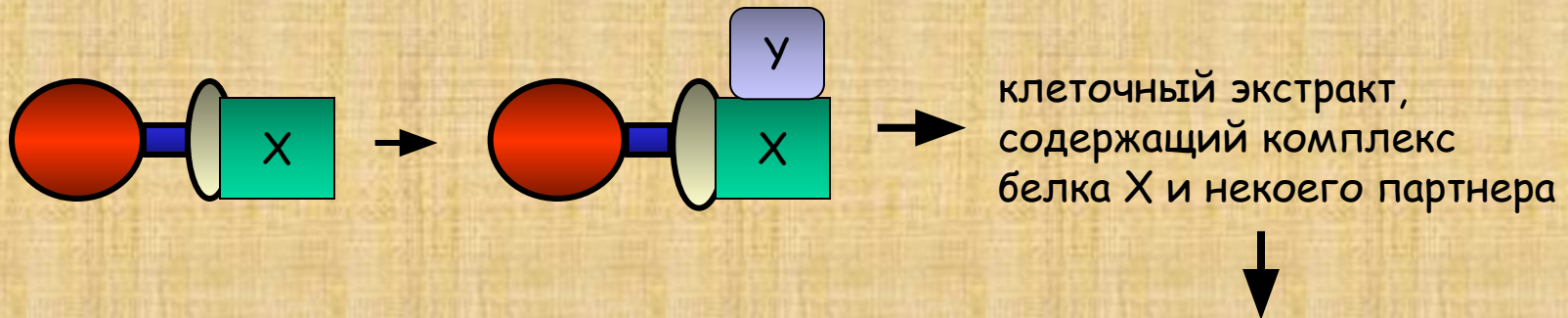
Перераспределение зиксина в ответ на экспрессию фактора Xanf-1

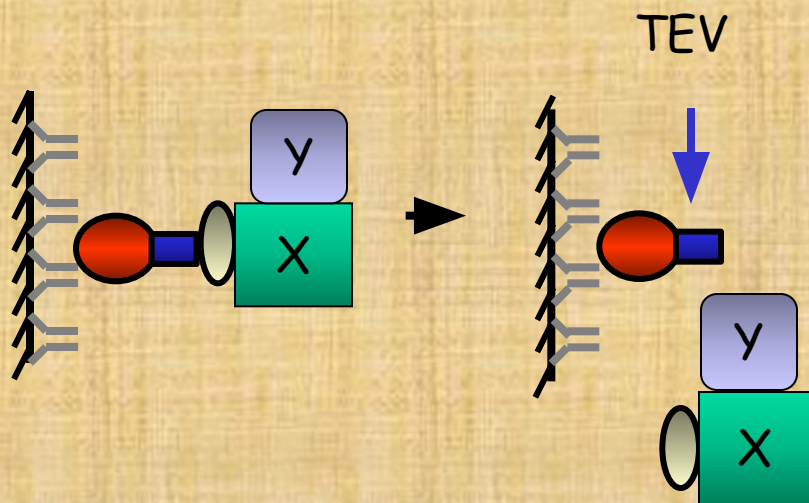
Tandem Affinity Purification

Экспрессия в клетках млекопитающих интересующего белка в виде fusion с двумя аффинными доменами:



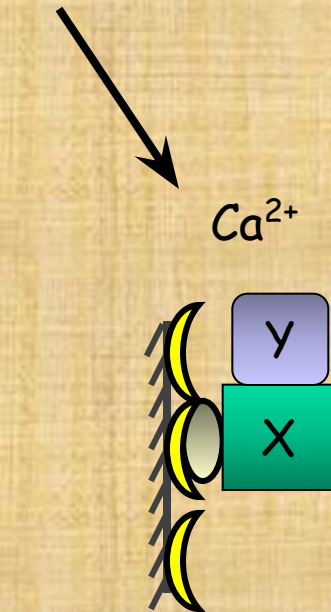
В клетке:





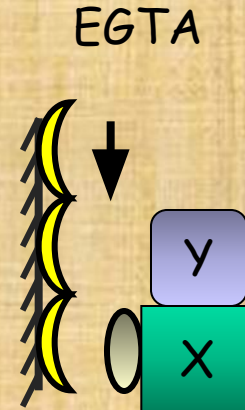
Шаг 1: своим IgG-связывающим доменом комплекс связывается с иммуноглобулинами, иммобилизованными на колонке 1.

Шаг 2: протеаза TEV отщепляет комплекс от этого домена.



Шаг 3: в присутствии ионов Ca^{++} комплекс связывается с калмодулином, иммобилизованным на колонке 2.

Шаг 4: Хелатор Ca^{++} ЭГТА снимает комплекс с колонки.



анализ

Условие: комплекс YX должен сохраняться в присутствии Ca^{2+}