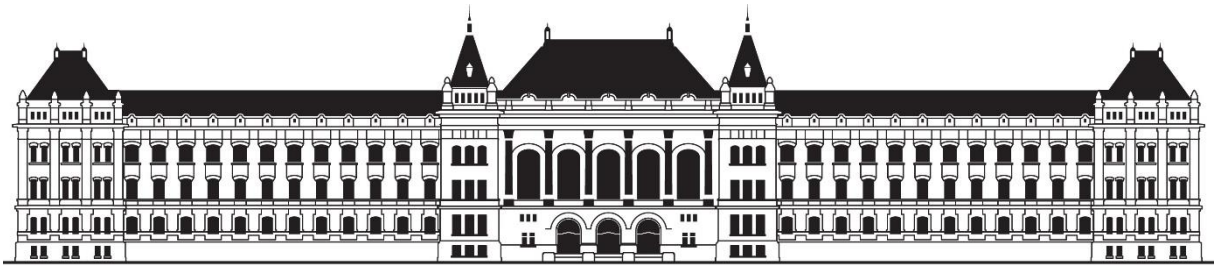


Sejtszintű biológiai szabályozás



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Laborgyakorlat

Kötődés vizsgálat

Fehérje kölcsönhatások kimutatása -
Thermofluor

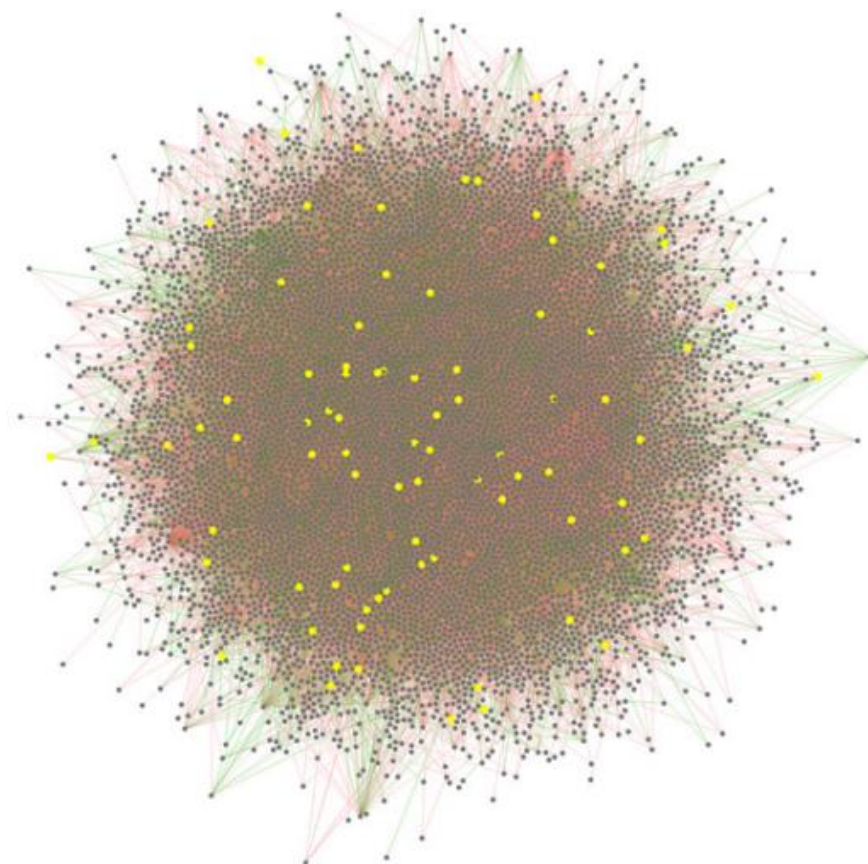
A leíratot készítette:

Nagy Kinga és Benedek András

2018 október 3.

Bevezetés

Egy élő sejtben belül lejátszódó folyamatok zöme fehérje kölcsönhatások által szabályozódik. Ezek lehetnek két vagy több fehérje között lejátszódó interakciók, illetve fehérjék más anyagokkal való kölcsönhatásai. A sejtben belül kialakult kölcsönhatási hálózatot „interactome”-nak nevezzük. Ez magában foglalja a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat (1. ábra), de minden más a sejtben belül kialakuló pl. a fehérje nukleinsav kölcsönhatásokat is. Értelemszerűen ez nagyfokú változatosságot mutat fajok között valamint adott fajon belül is sejttípusonként változik, mivel a differenciálódott sejtek más-más szerepet töltenek be, így más gének fejeződnek ki bennük. Adott sejtben belül is sejtciklustól illetve a környezeti hatásoktól függően változnak a kifejeződő gének, így a sejtben belül végbemenő folyamatok és kialakuló kölcsönhatások is folyamatos változáson mennek keresztül.



*1. ábra Emberi sejt fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózata
7840 gén között kialakuló 17671 kapcsolat.
A piros vonalak pozitív korrelációt jelölnek, a zöldek negatív korrelációt. (Liu H 2011)*

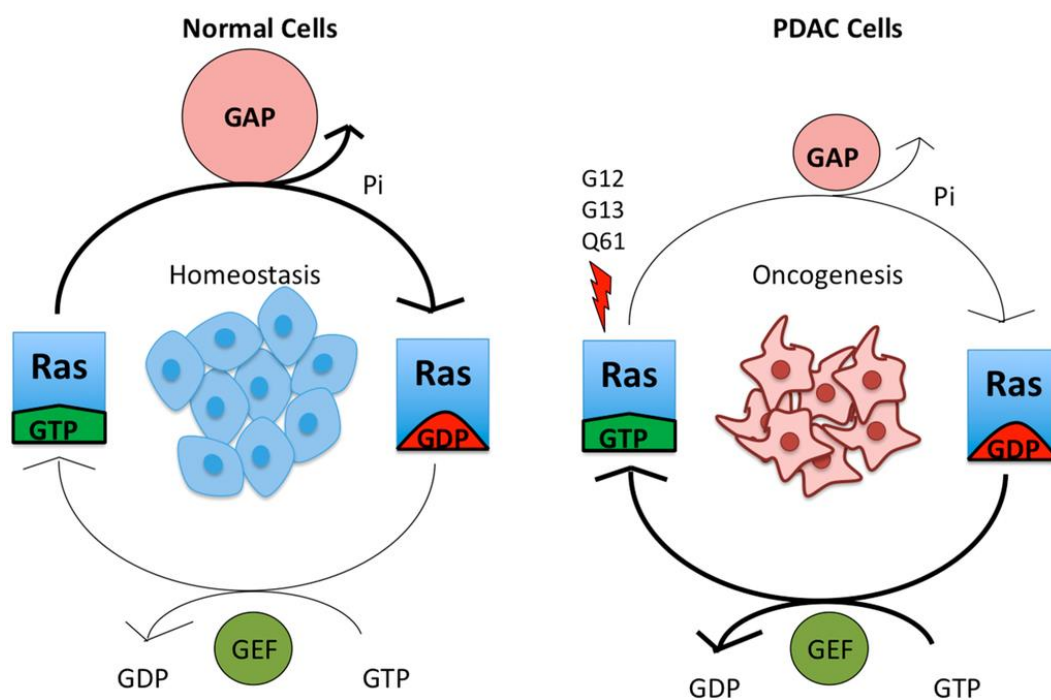
A sejt saját fehérjéi és más molekulái között kialakuló kölcsönhatásokon kívül más sejtek vagy vírusok fehérjéivel és más molekuláival, illetve kívülről felvett „idegen” anyagokkal (pl. gyógyszerek hatóanyagai) is kialakíthatnak az adott sejt fehérjéi kapcsolatokat.

Néhány példa:

1. sejt saját anyagai között létrejövő:

- fehérje-fehérje kölcsönhatással történő szabályozásra:

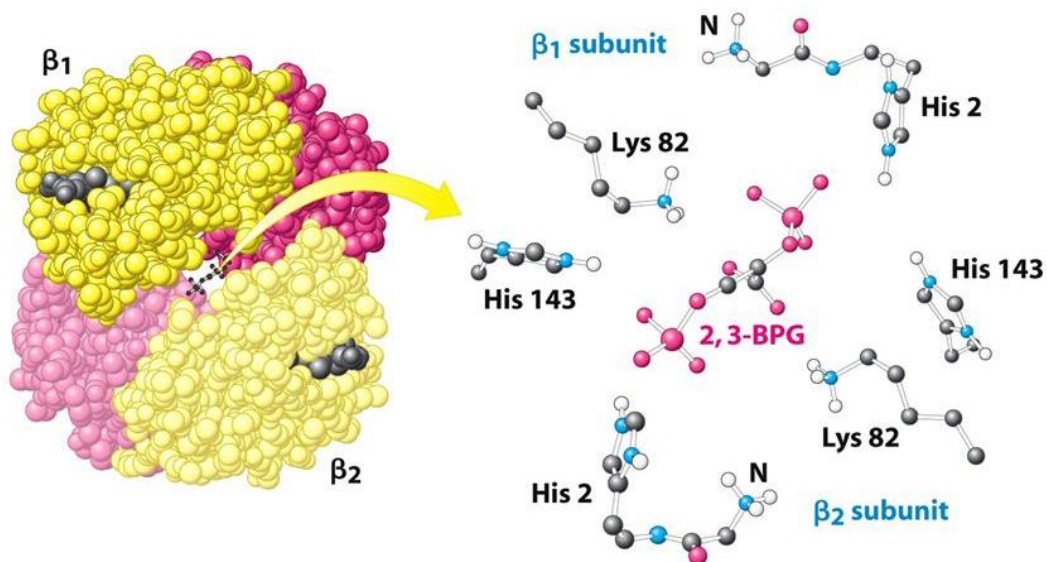
A KRAS fehérje olyan jelátviteli folyamatokban játszik fontos szerepet, amelyek hatással vannak a sejtek differenciálódására, a sejtosztódásra valamint apoptotikus folyamatokra. Aktív állapotban a fehérje amennyiben GTP-t köt, a GDP kötött forma inaktív. A GTP hidrolízisét GDP-vé a GAP fehérje (GTPase Activating Protein) segíti. Egy onkogén mutáció következtében megszűnik a KRAS és GAP fehérjék között létrejövő kölcsönhatás, amely következtében eltolódik az egyensúly és a KRAS fehérje aktív állapotban lesz az idő túlnyomó részében, ezzel pedig hibásan olyan jelátviteli folyamatokat aktiválva, amelyek kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezetnek.



2. ábra Egy normálisan működő sejtben a KRAS GTP kötött (aktív) állapotából a GTP kötött (inaktív) állapotba való átalakulást a GAP fehérje segíti. Egy onkogén mutáció következtében a KRAS már nem képes a GAP-pal való kölcsönhatás kialakítására és „beragad” a GTP kötött aktív állapotba, ennek következtében olyan jelet továbbítva a sejt számára, amely folyamatos proliferációt eredményez. (Daniel Zeitouni 2016)

- fehérje-más anyag kölcsönhatásával történő szabályozásra:

Erre egy lehetséges példa a hemoglobin 2,3-BPG-tal (2,3-biszfoszfoglicerát) való kölcsönhatása (3. ábra), amely a hemoglobin oxigénhez való affinitását szabályozza. A szabályozás az által jön létre, hogy a 2,3-BPG kötődése olyan térszerkezetet stabilizál, amelyhez nehezebben kötődik oxigén. Ennek a szabályozásnak nagy szerepe van várandós anyák esetében. Az ő vörösvértestjeikben akár 30%-al is megemelkedhet a 2,3-BPG szint, ezzel lecsökkentve a saját hemoglobinjaik oxigén affinitását, ennek hatására pedig több oxigén tud átjutni a magzat számára. A magzati hemoglobin eltér a felnőttétől, alacsony affinitással rendelkezik a 2,3-BPG felé, így a magzati hemoglobin oxigén affinitását kevésbé befolyásolja ez a molekula, vagyis adott 2,3-BPG szint mellett a magzati hemoglobin fog előbb telítődni oxigénnel.



3. ábra Hemoglobin 2,3-biszfoszfogliceráttal való kölcsönhatása és a kölcsönhatásban részvevő aminosavak

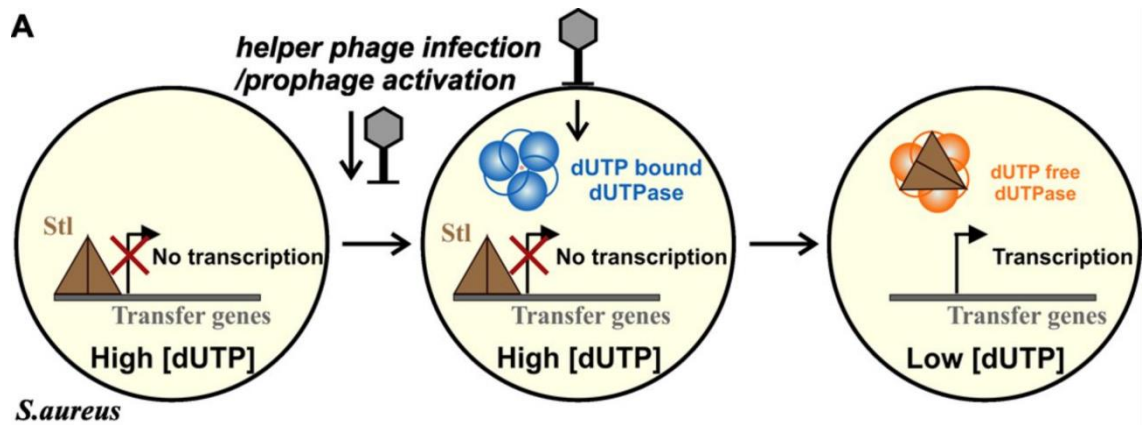
2. adott sejt fehérjéje és kívülről jövő:

– „idegen” fehérje között létrejövő kölcsönhatásra:

Számos vírusfertőzés során a vírus sejtbe való bejutását követően olyan virális fehérjék termelődnek (vagy már a vírus burokból egyből kész fehérjeként jutnak be a sejtbe), amelyek „átprogramozzák” az adott sejt működését. A daganatokat okozó vírusok tipikusan a sejtosztódást befolyásoló / kontrolláló fehérjék működését gátolják.

Szintén vírusfertőzés indukálta szabályzásra példa a $\phi 11$ bakteriofág dUTPáza és a *Staphylococcus aureus* baktérium StI fehérjéje között kialakuló kölcsönhatás. Az StI egy represszor fehérje, a baktérium bizonyos génszakaszához kapcsolódva gátolja egyes gének

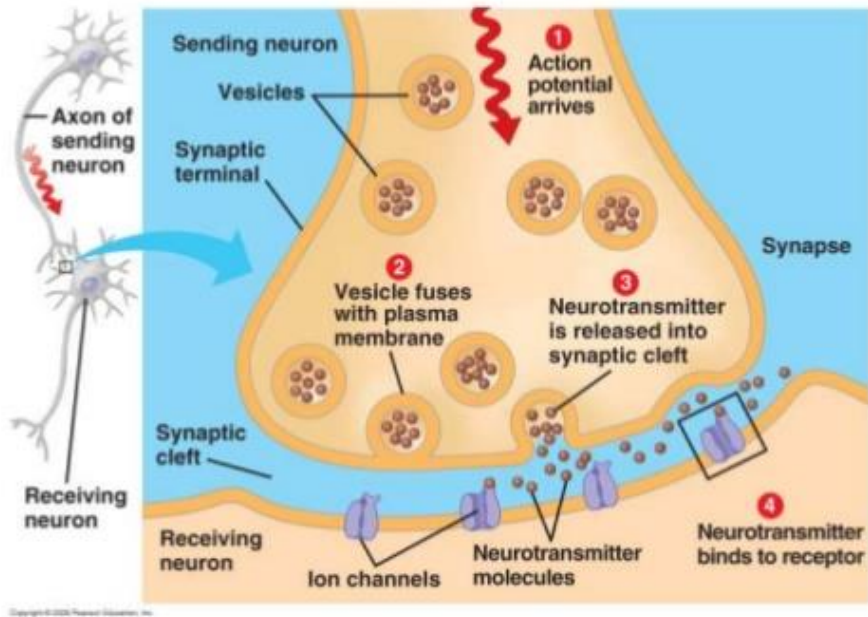
átíródását. A vírusfertőzés során a virális eredetű dUTPáz fehérje kötődik az Stl fehérjével, ezzel egyidőben megszüntetve az Stl – DNS kölcsönhatást. Az eddig gátolt genom régiók felszabadulnak a gátlás alól, eddig ki nem fejeződő gének átíródását lehetővé téve (4. ábra).



4. ábra A bakteriális represszor Stl fehérje és a fág eredetű dUTPáz kölcsönhatása, valamint az ebből eredő génátíródás szabályozása (Judit E. Szabó 2014)

– „idegen” molekula között létrejövő kölcsönhatásra:

Különböző típusú sejtek egymás közötti kommunikációja valósul meg egy idegsejtek és izomsejtek közötti (neuromuszkuláris) ingerület átvitel során. Az idegsejtekből felszabaduló acetilkolin serkenti az izomsejt membránjában található nikotinos acetilkolin receptorokat. Na^+ áram aktiválódik, az izomsejt membránpotenciálja depolarizálódik, ami citoplazmikus Ca^{2+} szint emelkedéshez vezet. Ennek hatására végbemennek az izomösszehúzódáshoz, majd elernyedéshez szükséges biokémiai folyamatok (5. ábra).



5. ábra A neuromuskuláris ingerület átvitel acetilkolin hatására

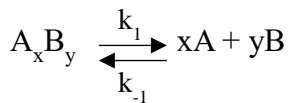
Fehérje kölcsönhatások kimutatásának lehetőségei:

A fehérjék kölcsönhatásainak kimutatására *in vitro* és *in vivo* módszerek léteznek attól függően, hogy az élő sejtben vagy a sejtben kívül, izoláltan kívánjuk-e megvizsgálni azokat.

Az *in vitro* módszerek egy része közvetlenül a molekulaméret változását mutatja ki (pl. gél elektroforézis vagy méretkizárásos kromatográfia). Léteznek a kötődés során fellépő hőváltozást mérő (izotermális titráló kalorimetria) és a hőstabilitás változását vizsgáló módszerek is (differenciális pásztázó fluorimetria vagy más néven termofluorimetria).

A méréssel célunk lehet pusztán a kötődés tényének igazolása, vagy a kölcsönhatás termodinamikai, esetenként pedig kinetikai paramétereinek vizsgálata. Gyakran cél a kölcsönhatás erősségének meghatározása, amit egy termodinamikai paraméter, a komplex disszociációs állandója (K_d) jellemez. Ha a komplex képződésének és megszűnésének sebességére vagyunk kíváncsiak, akkor már a kölcsönhatás egy kinetikai paraméterét szeretnénk meghatározni, amit gyors kinetikai módszerek (például stopped-flow technika) alkalmazásával tehetünk meg.

A disszociációs állandó (K_d):



ahol az A_xB_y komplex szétesik x A és y B alegységre

A reakció disszociációs konstansa:

$$K_d = \frac{[A]^x[B]^y}{[A_xB_y]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

Ahol $[A]$, $[B]$ és $[A_xB_y]$ az A anyag, a B anyag és az A_xB_y komplex koncentrációi.

Kísérletesen az $[AB]$ komplex koncentrációja indirekten is meghatározható a szabad A vagy a szabad B anyag koncentrációjának a meghatározásával. Az eredetileg bemért $[A]_0$ illetve $[B]_0$ ismert mennyiségek.

$$[A_0] = [A] + [AB]$$

$$[B_0] = [B] + [AB]$$

Termofluorimetriás mérés fehérje kölcsönhatások kimutatására

A termofluorimetria (differenciális pásztázó fluorimetria) eredendően a fehérjék hőstabilitásának vizsgálatára alkalmazott módszer, ami a letekeredési vagy más néven olvadási hőmérséklet meghatározásán keresztül történik. A módszer közvetetten a fehérjék megfelelő feltekeredésének meglétéről is információt szolgáltat, mivel csak megfelelő térszerkezettel rendelkező fehérjéknek van jellegzetes olvadási görbájük. A hőstabilitás vizsgálata a minta felfűtésével történik, aminek eredményeként felbomlanak az aminosav oldalláncok közötti nem kovalens kémiai kölcsönhatások és a fehérje lánc letekeredik. Azt a hőmérsékletet, amelyen a fehérje molekulák 50 %-a már elveszítette a rá jellemző térszerkezetet, olvadási hőmérsékletnek nevezzük.

A fehérje letekeredésének („megolvadásának”) folyamatát közvetett módon, a minta fluoreszcencia intenzitásának megváltozásán keresztül követjük. A fluoreszcencia egy fénykibocsátási (fényemissziós) folyamat, amelynek során az anyag elektrongerjesztési energiát ad le kisugárzott fény formájában. A jelenség előidézéséhez a mintával energiát kell közölni, ami meghatározott hullámhosszú besugárzással (UV sugárzás vagy látható fény) történhet. Az anyag által felvett energia egy része az oldószer molekulák mozgási energiájává vagy hővé alakul, más részétől pedig foton kibocsátás formájában szabadul meg a besugárzott

molekula. A kibocsátott fotonok energiája ennek megfelelően mindig kisebb lesz, mint a besugárzó fotonok energiája (kisebb lesz a kibocsátott sugárzás frekvenciája, vagyis nagyobb lesz a hullámhossza az $f = \frac{v}{\lambda}$ összefüggésnek megfelelően, ahol f a hullám frekvenciája, v a haladási sebessége és λ a hullámhossza).

A vizsgálni kívánt fehérje mintákhoz egy Sypro Orange nevű fluoreszcens festéket adunk, amely akkor ad jelet, amennyiben a fehérjék apoláros oldalláncaihoz kapcsolódik. A mérés során a hőmérséklet fokozatos emelése mellett a hozzáadott festék fluoreszcenciájának növekedését követjük. A festék vizes közegben alacsony fluoreszcencia jelet ad, mivel azt a víz molekulák nagymértékben csillapítják, a fehérjék apoláros oldalláncai pedig többnyire a víztől elzártan, a fehérje belseje felé néznek. Így a festék nem tud bekötődni és a víz molekuláktól távol kerülni. Azonban a fehérje letekeredése (denaturáció) következtében elérhetővé váló hidrofób régiókhöz kötődve a festék molekulák fluoreszcenciája megnövekszik. Ez a jelenség ad lehetőséget a fehérje lánc letekeredésének nyomon követésére.

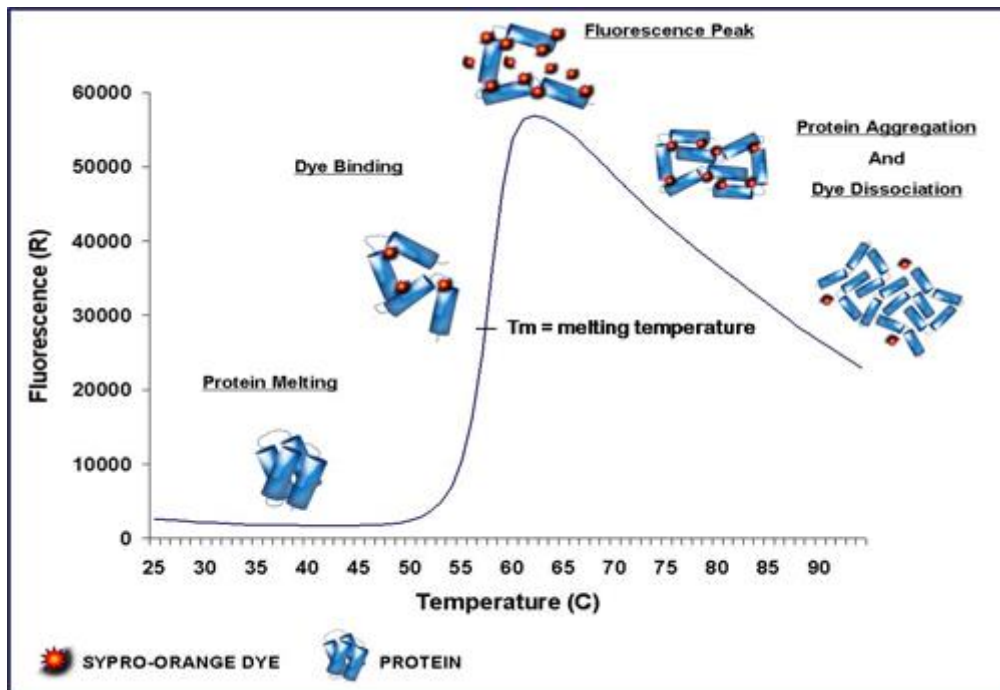
A mérés során tehát a mintát egyidejűleg fűtjük és a Sypro Orange festék gerjesztési energiájának megfelelő hullámhosszú fényel besugározzuk, miközben a festék által kibocsátott fény intenzitását a hőmérséklet függvényében detektáljuk. Minél magasabb az olvadási hőmérséklet és meredekebb a fluoreszcens jel intenzitásának változása a felfűtés során, annál rendezettebb volt a hőközlés előtt a fehérje térszerkezete, és így annál több energia szükséges ahhoz, hogy ezt a rendezettséget megszüntessük.

Amennyiben egy fehérje kölcsönhat egy másik anyaggal, úgy a keletkezett komplex energia állapota a legtöbb esetben alacsonyabb lesz, a komplex stabilabb lesz, így magasabb hőmérséklet kell fehérje letekeredéséhez. Ez teszi lehetővé számunkra, hogy kis molekulák vagy más fehérjék kötődését a célfehérjénkhez termofluorimetriás méréssel kimutassuk.

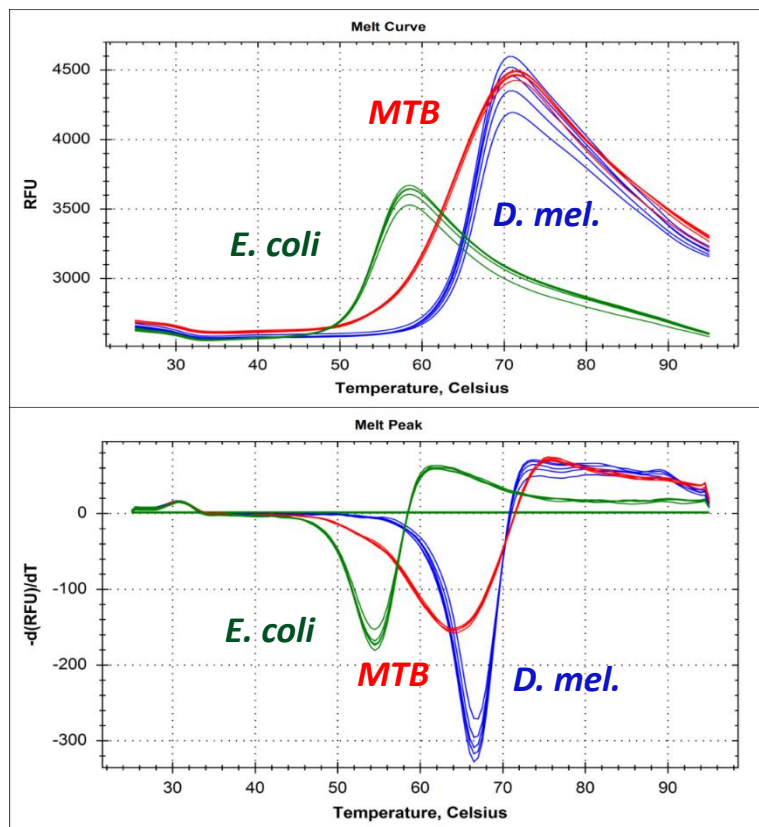
A bekötődő ligand /másik fehérje stabilizáló hatása függ annak koncentrációjától, valamint a fehérje affinitásától a másik anyaghoz. Miután meghatároztuk a szabad fehérje letekeredési hőmérsékletét, adott koncentrációkban összekeverjük azt a feltételezett kölcsönható partnerrel, és az olvadási hőmérséklet eltolódásából következtetünk a komplex létrejöttére.

A mérések kiértékelése során meghatározzuk a hőmérséklet-fluoreszcencia intenzitás görbe inflexiós pontját, amely hőmérséklet a fehérje olvadási pontjának (T_m) tekinthető (6. ábra). Az inflexiós ponthoz tartozó hőmérsékletet úgy tudjuk egyszerűen leolvasni, ha a mérési adatok kiértékelése során a fluoreszcencia intenzitás – hőmérséklet görbe hőmérséklet szerinti első deriváltjának (-1)-szeresét ábrázoljuk a kiértékelő program segítségével (7. ábra).

(Ha x az inflexiós pont, akkor ebben az x pontban a függvény első deriváltjának szélsőértéke van, ami sokkal könnyebben leolvasható egy diagramról, mint maga az inflexiós pont.)



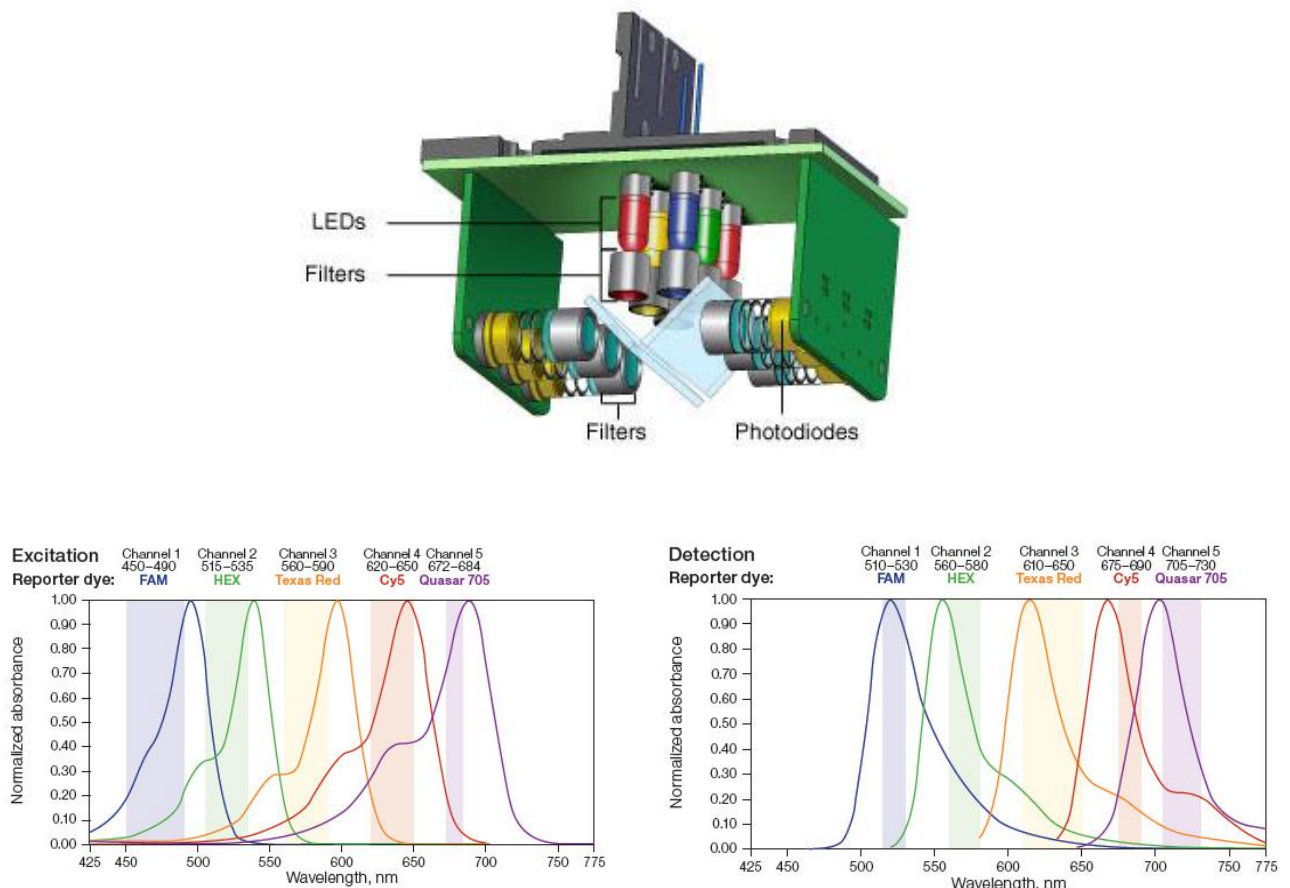
6. ábra A thermofluor mérés sémája



7. ábra Három fehérje hődenaturációs görbéje (fent) és hőmérséklet szerinti első deriváltjaik (lent)

A qPCR készülék működése

A mérés során használt készülék a minták gerjesztésére és a fluoreszcencia detektálására egy motorikusan mozgatott mérőfejet használ, amely a 96 lyukú, átlátszó hőálló fóliával lefedett mérőtálca fölött haladva nagy sebességgel pásztázza végig annak mérőhelyeit. A gerjesztő források LED lámpák (fényt kibocsátó diódák), a detektorok fotodiódák. A mérőfejben 6 darab LED lámpa és 6 darab fotodióda található. A LED lámpák 6 különböző hullámhossz sáv tartományban képesek a mintát gerjeszteni. Minden egyes LED lámpához (gerjesztési hullámhossz tartományhoz) egy-egy fotodióda tartozik, amelyek szintén egy-egy adott hullámhossz sáv tartományban képesek a mintából beérkező sugárzást elnyelni (8. ábra). A készülék nem magának a mintának, hanem a mintához adott fluoreszcens festéknek a fluoreszcenciáját méri. A fotodiódák a nekik megfelelő fluoreszcens festék kibocsátási (emissziós) hullámhossz tartományában képesek a beérkező sugárzást detektálni.



8. ábra A BioRad CFX 96 Touch qPCR készülék mérőfejének sematikus rajza (fent), a LED lámpák gerjesztési sáv tartománya és a fluoreszcens festékek abszorpciós spektruma (balra lent), a fotodiódák detektálási tartománya és a fluoreszcens festékek emissziós spektruma (jobbra lent)

A mérés során használt festék gerjesztési és kibocsátási spektrumának ismeretében kell a méréshez a megfelelő gerjesztési és elnyelési hullámhossz sáv tartományt (tehát a megfelelő LED lámpát és fotodiódát) a készülék szoftverén keresztül kiválasztani.

A kívánt hullámhossz sáv tartományok beállítását a LED-ek és a fotodiódák elé helyezett szűrők segítségével érik el. A fényforrások és a detektorok elé helyezett, összesen 12 különböző szűrő teszi lehetővé, hogy egyidejűleg akár több lehetséges hullámhosszon is gerjesszük a mintát és detektáljuk a mintából érkező fluoreszcenciát.

A fluoreszcencia mérése során az optimális mérési elrendezést akkor érjük el, ha a detektort a fényforrásra merőlegesen helyezük el, mert így a legkisebb a valószínűsége, hogy a gerjesztéshez használt sugárzás közvetlenül vagy a mintáról visszaverődve bejut a detektorba. A mintából érkező fluoreszcens sugárzás a tér minden irányába azonos intenzitással terjed tovább, de a merőleges elrendezés segítségével lehet a leghatékonyabban kiszűrni a besugárzó fényforrásból származó zavaró komponenseket. (Azért kell ezzel törődni, mert a szűrők „nem ideálisak”, vagyis nem szűrnek 100 %-ban tökéletesen.)

A 8. ábra felső panelén látható, hogy a fényforrások és a detektorok valóban egymásra merőlegesen helyezkednek el. Az ábrán látható két kékes árnyalatú lemez két speciális tükör (dikroikus szűrő). Ezek csak egy szűk hullámhossz tartományban működnek tükröként, az ezen kívül eső hullámhosszú sugárzást viszont átengedik. Leghatékonyabban éppen a mintából érkező fluoreszcens sugárzás hullámhosszán tudják a mintából rájuk eső sugárzást reflektálni, és a beesési síkhoz képest 45 fokos szögben „egyenesen” a detektorokra (fotodiódákra) irányítani. A LED-ekből érkező sugárzás viszont akadálymentesen keresztülhalad rajtuk.

A mérés menete

A mérést Bio-Rad CFX 69 Touch qPCR készülékben végezzük. A 25 µl végtérfogatú elegyeket 96-lyukú PCR-tálcán mérjük össze, amelyet egy átlátszó, hőálló fóliával fedünk le. A SYPRO® Orange fluorofór festéket (Invitrogen) az eredeti koncentráció 1/1000-szeresére hígítva fogjuk felhasználni. Ezért desztillált vízzel 1 µl 40-szer hígított oldatot készítünk belőle, és ebből adunk 1-1 µl-t a 24 µl 1 mg/ml végső koncentrációjú fehérje, illetve fehérje-ligand komplex oldatokhoz. A fehérjék koncentrációjának mérését a laborban található Nanodrop spektrofotométer segítségével fogjuk elvégezni, és ez alapján kell majd a beméréshez szükséges mintatérfogatokat kiszámolni. A bemérést mikropipetta segítségével fogjuk elvégezni. Ügyelni kell majd a buborékmentes bemérésre és arra, hogy a mintákat a tálca mélyedéseinek aljára

tudjuk pipettázni. (Nem maradhat levegőrétég a minta és a tálca alsó, valamint oldalsó fala között, mert ez pontatlanná teheti a méréseinket.)

A mérés során a műszer 25 °C-ról 85 °C-ra melegíti fel a mintákat, 0.5 °C értékenként leolvasva azok fluoreszcenciáját.

Az értékeket ábrázoljuk, majd a nyers adatsor pontjaira szigmoid görbét illesztünk, ahol a görbe inflexiós pontja a becsült olvadási hőmérséklet (melting temperature, T_m). A szigmoid görbe negatív deriváltját szokás ábrázolni, mivel annak minimuma az eredeti görbe inflexiós pontjánál lesz.

A mérés során egy enzimfehérje(dUTPáz, dezoxiuridin nukleotid trifoszfátáz) kölcsönható partnereinek az enzim olvadáspontjára gyakorolt hatását fogjuk termofluorimetriás módszerrel megvizsgálni. Magnézium ionoknak (Mg^{2+}), az enzim által katalizált reakció termékének (dezoxiuridin monofoszfát, dUMP) és egy fehérje kölcsönható partnernek (Stl fehérje) az enzimhez való kötését fogjuk nyomon követni. Magával a szubsztráttal (dezoxiuridin trifoszfát, dUTP) nem tudjuk a mérést elvégezni, mert a mérés időtartamánál jóval rövidebb idő alatt az összes dUTP az enzimreakció végtermékévé, dUMP-vé alakul át a dUTPáz katalitikus aktivitásának köszönhetően. A mérés során 3-3 párhuzamost fogunk a 96 lyukú tálcára felvinni minden egyes mérési beállítás mellett. Így a véletlen mérési hibák hatását a kiértékelés során ki tudjuk majd küszöbölni.

Irodalomjegyzék

Daniel Zeitouni, Yuliya Pylayeva-Gupta, Channing J. Der and Kirsten L. Bryant. „KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment.” *Cancers*, 2016.

Frank H Niesen, Helena Berglund & Masoud Vedadi. „The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability.” *Nature protocols*, 2007.

Judit E. Szabó, Veronika Németh, Veronika Papp-Kádár, Kinga Nyíri, Ibolya Leveles, Ábris Á. Bendes, Imre Zagyva, Gergely Róna, Hajnalka L. Pálinkás, Balázs Besztercei, Olivér Ozohanics, Károly Vékey, Károly Liliom, Judit Tóth, Beáta G. Vértessy. „Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control.” *Nucleic Acids Research*, 2014.

Liu H, Su J, Li J, Liu H, Lv J, Li B, Qiao H, Zhang Y. „Prioritizing cancer-related genes with aberrant methylation based on a weighted protein-protein interaction network.” *BMC Syst Biol*, 2011.