

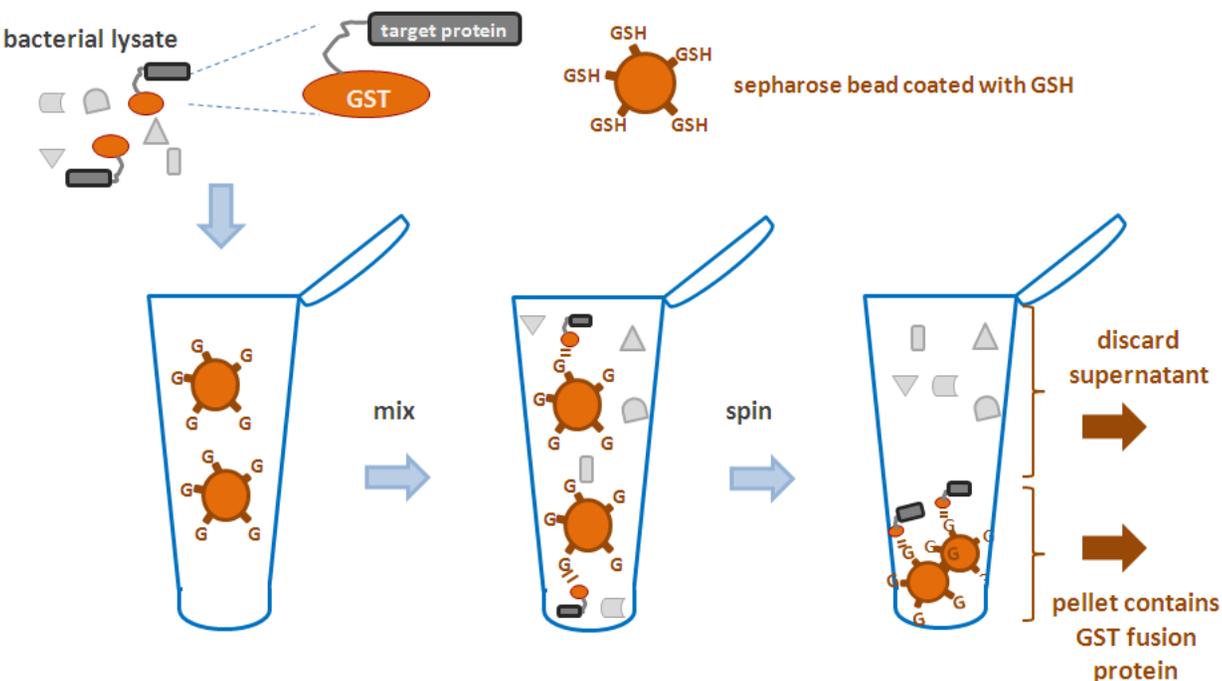
Interacción proteína-proteína

Ensayo de pull-down GST

La afinidad entre la enzima glutatión-S-transferasa y su sustrato, el glutatión (GSH), se puede utilizar para semipurificar cualquier proteína X que se fusiona con GST (en el plásmido pGEX-4T1 por ejemplo) al pasarlas por columnas de glutatión-sefarosa. En este caso no solo eluiremos la proteína de de la columna sino que usaremos las proteínas atrapadas en la columna para "pescar" cualquier compañero de interacción, y analizaremos la presencia o ausencia de la proteína que sospechamos que interactúa con ella. Se debe tener cuidado al clonar proteínas de fusión a GST en los codones de START y STOP

ya que tanto la secuencia como el marco de lectura deben verificarse y confirmarse la expresión de la proteína de fusión. Una vez que se confirma la presencia de la proteína de fusión en los lisados, este lisado se incuba con glutatión-sefarosa (GSH-) durante un tiempo. La proteína de fusión GST se unirá a la columna debido a la afinidad enzima-sustrato, junto con cualquier otra proteína que pueda interactuar con la proteína X fusionada a GST.

STEP 1 - purification

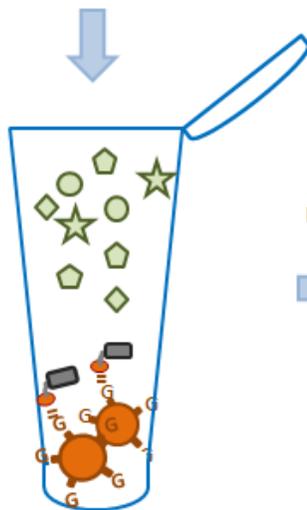


A veces, una proteína eucariota se puede expresar en bacterias como una fusión GST para fines de purificación. En ese caso, su compañero de interacción estaría en la célula de origen eucariota. Por lo tanto, en un segundo paso, la columna que contienen proteínas de fusión GST se incubarán con el lisado celular u otra proteína purificada para

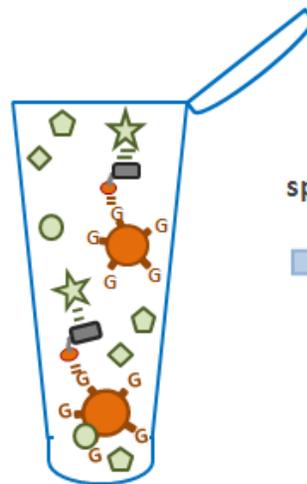
Análisis de interacción. Por lo tanto, los gránulos del primer paso serán mezclados con este lisado (por ejemplo, lisado de células de mamífero u homogenato mitocondrial, etc.), y extraído por segunda vez. El segundo sedimento contendrá, además de la proteína de fusión GST que se une a GSH en la columna, cualquier compañero de interacción de la proteína de fusión.

STEP 2 – interaction identification

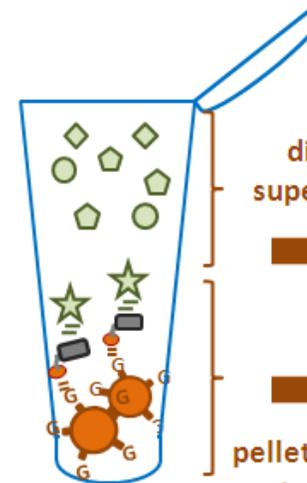
Other lysate or protein
to be analyzed



mix



spin



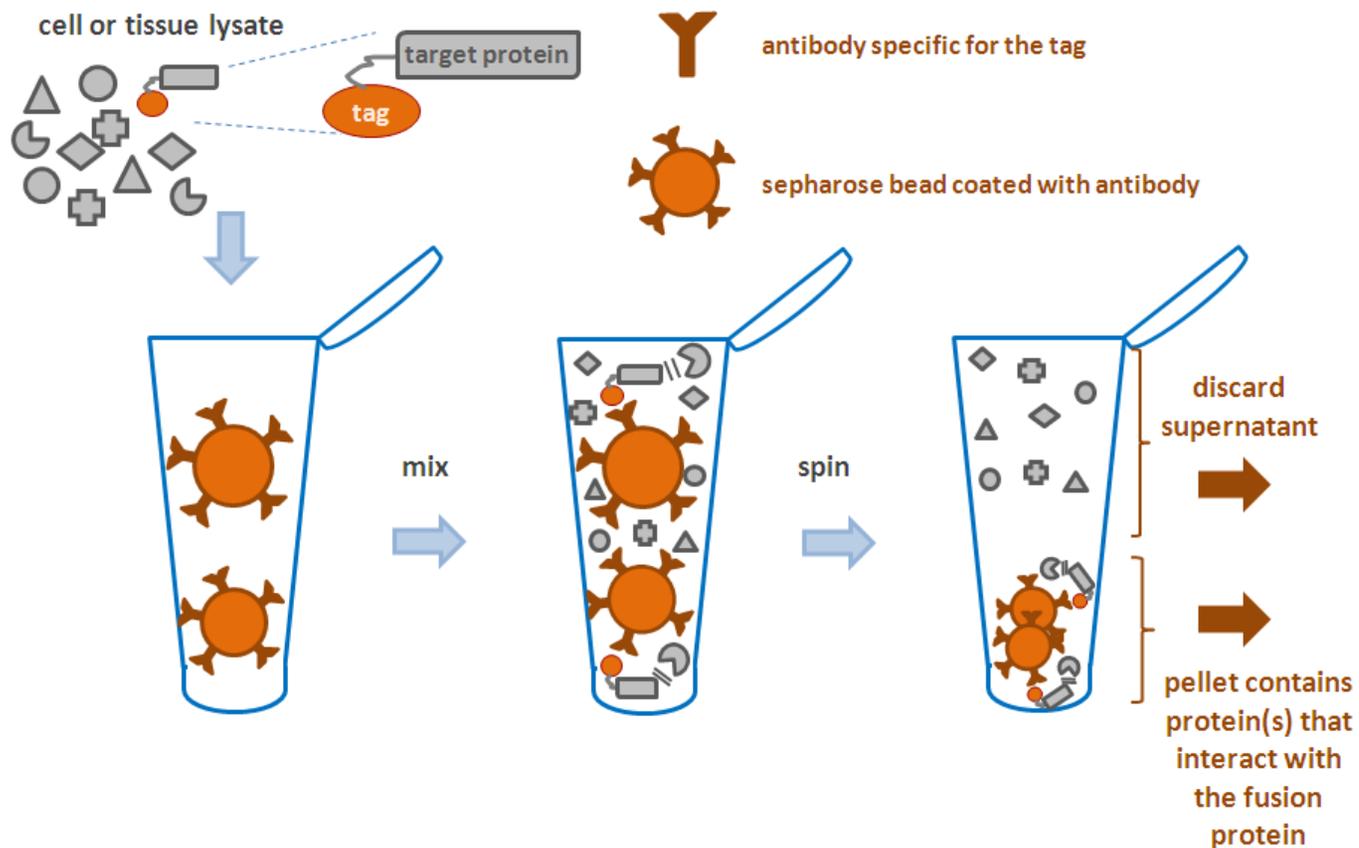
discard
supernatant



pellet contains
protein(s) that
interact with
the GST fusion
protein

Coinmunoprecipitación (co-IP)

Este ensayo es similar en principio al ensayo de pulldown GST descrito anteriormente, con la diferencia de que, en lugar de la fusión con una enzima, GST, o bien el gen de interés se clona en un vector etiquetado (como pCMV-HA) y se precipita usando columnas de anticuerpos (es decir, inmunoprecipitación). La afinidad antígeno-anticuerpo será explotada para precipitar la proteína de interés, junto con cualquier posible compañero de interacción (por lo tanto, coinmunoprecipitación).



Ensayo de doble híbrido (Y2H) en levaduras

El sistema de doble híbrido de levaduras, así como el doble híbrido de mamíferos que sigue el mismo principio, se basa en el hecho de que los factores de transcripción son modulares, que contienen un dominio de unión al ADN y un dominio de activación (como mínimo) que son unidades funcionalmente separables. El ejemplo estándar que se usa en muchos vectores de Y2H es la proteína GAL4 en la levadura y su sitio de unión a ADN de gal4.

Este ensayo puede usarse para analizar la interacción entre dos proteínas conocidas (llamémoslas X e Y), o para identificar nuevos socios de interacción de una proteína X de una biblioteca de ADNc. La interacción se identifica a través de la transcripción de un gen reportero, más comúnmente lacZ, y la posterior reacción de color usando el sustrato X-gal. Las proteínas probadas para la interacción no tienen que ser factores de transcripción o incluso proteínas nucleares, cualquier proteína soluble intracelular puede ser probada. Sin embargo, el sistema no es adecuado para el análisis de las interacciones de proteínas de membrana (se utiliza una adaptación diferente del sistema para ese propósito).

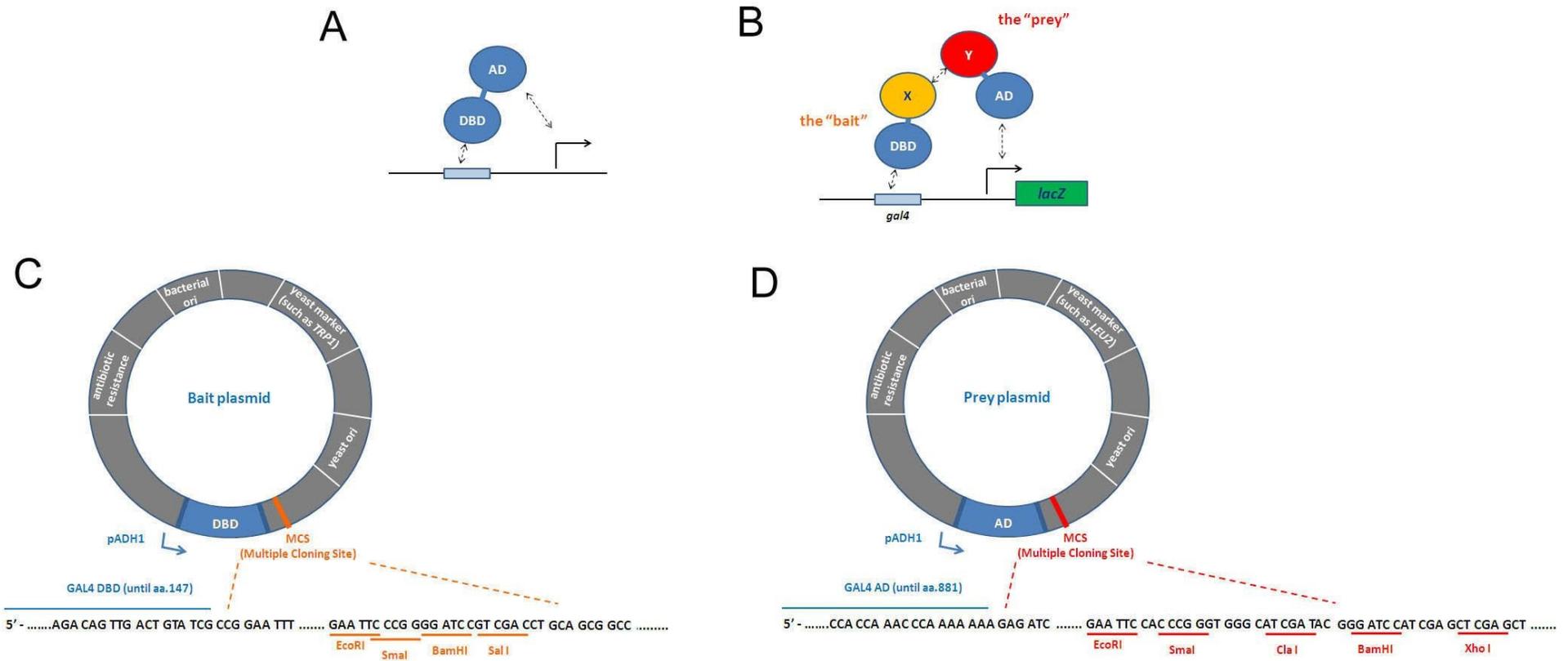


Figura 6.2. Un diagrama esquemático que muestra el principio básico detrás del sistema de doble híbrido de levaduras (Y2H). (a) la estructura modular de los factores de transcripción, con un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de activación (AD), y un motivo de reconocimiento afín en el ADN (que se muestra con una caja); (b) el principio detrás del sistema Y2H, donde una proteína X se fusiona con un DBD (típicamente el de GAL4), y una proteína Y se fusiona con un AD (típicamente de GAL4), y la interacción entre las proteínas X e Y es monitoreado a través de la expresión de un gen reportero, tal como lacZ; (c) el mapa del vector típico para X; (d) el mapa del vector típico para Y.

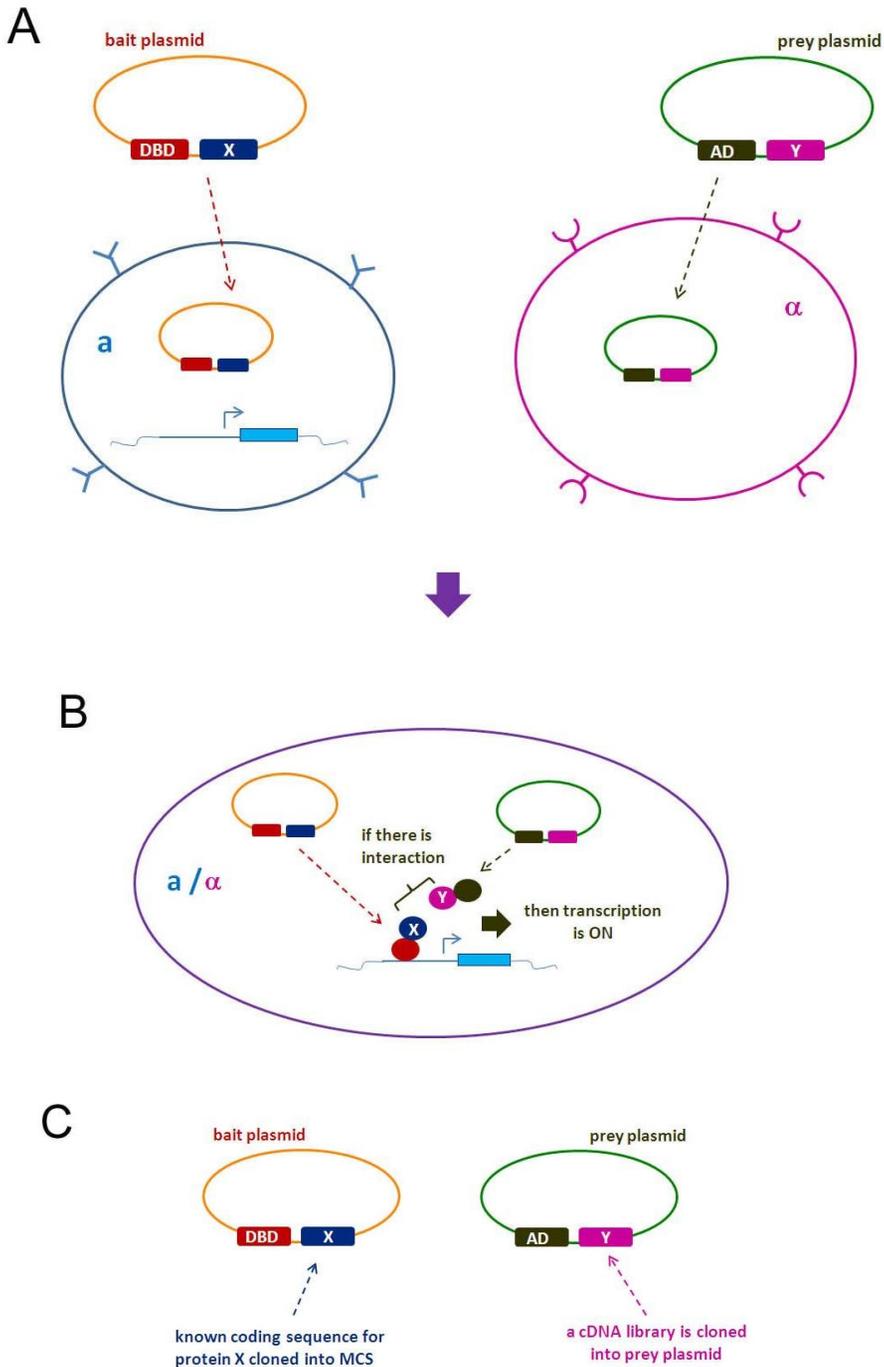


Figura 6.4. Un resumen del ensayo de doble híbrido de levaduras. Típicamente, levaduras haploides de tipos de apareamiento opuestos se transforman por separado con un plásmidos conteniendo el cebo (bait) y la de presa (prey) (a), cada uno de los cuales codifica el dominio de unión al ADN (DBD) fusionado a la proteína X (cebo) y un dominio de activación (AD) fusionado a la proteína Y (presa). Una de las levaduras haploides ya puede tener un plásmido reportero (rectángulo azul) integrado en su genoma (llamado levadura reportera). Cuando estas levaduras de tipos de apareamiento opuestos se aparean (b), el diploide resultante contendrá los tres componentes de la levadura dos híbridos: plásmido de cebo, plásmido de presa y el gen reportero. Si las proteínas X e Y interactúan, esta interacción provocará la activación del dominio en las proximidades del elemento promotor que impulsa al reportero la expresión génica y la transcripción se activará. (c) Si uno quiere encontrar con quien interactúa mi proteína X, entonces lo que hace es generar una biblioteca de ADNc en el plásmido presa para llevar a cabo la detección de todos los posibles socios de interacción de mi proteína X. Para conocer la identidad de Y luego tendré que secuenciar el plásmido presa aislado de la colonias de levaduras azules.

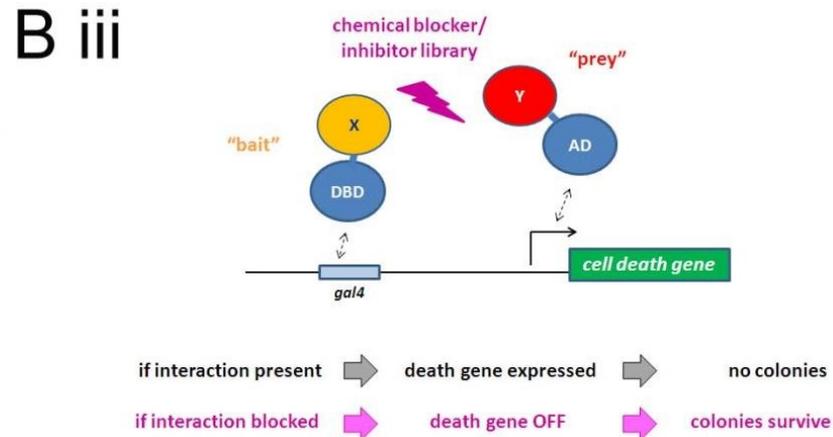
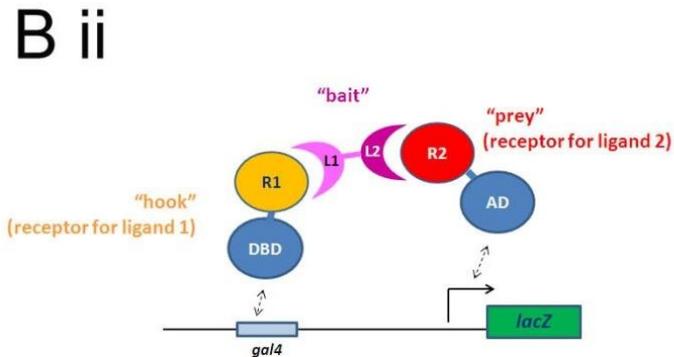
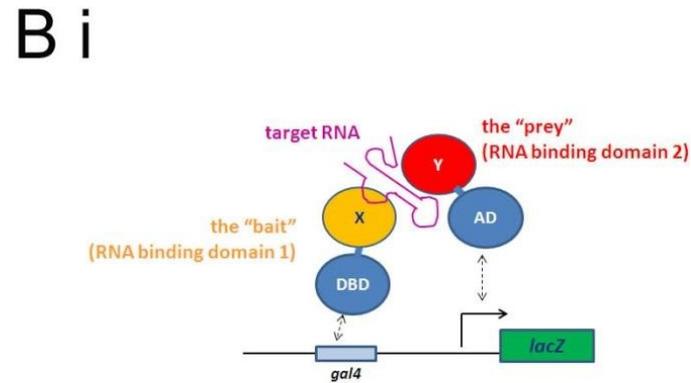
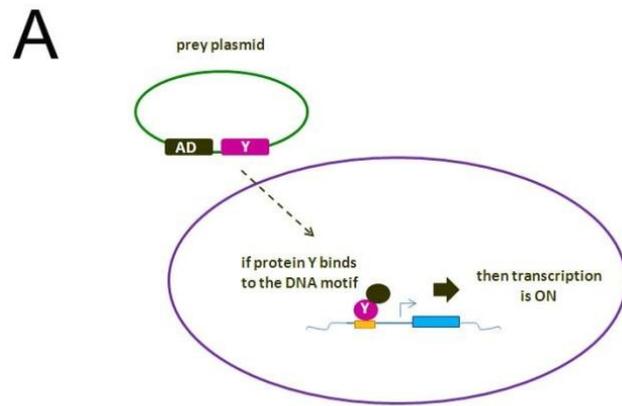
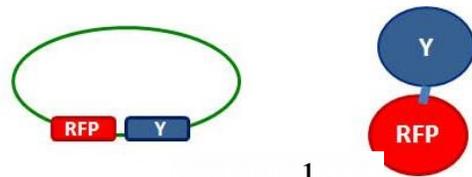
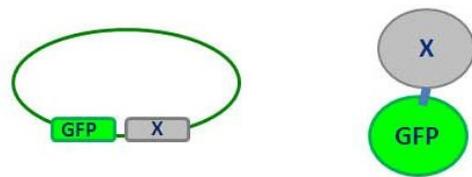


Figura 6.6. Sistema de un híbrido (a) y sistemas de tres híbridos (b). (a) En Y1H, se examina la biblioteca de presas para cualquier interacción positiva con el motivo de unión al ADN de interés. (b) El sistema de triple híbrido se puede usar por varias razones diferentes, como (i) identificación de interacciones tripartitas entre una molécula de ARN y dos dominios que interactúan con ARN, (ii) análisis de dos receptores diferentes (R1, R2) con el mismo ligando (no mostrado) o diferente (L1, L2), o (iii) selección de una biblioteca química para bloqueadores potenciales de interacción entre dos proteínas X e Y. Para este último caso, el screening de alto rendimiento se facilita mediante el uso de un gen citotóxico (gen de muerte celular) como reportero.

Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)

Los ensayos de interacción in vitro son métodos altamente artificiales para el análisis de interacciones proteína-proteína; el sistema de doble híbrido de levaduras o mamíferos investigan las interacciones in vivo, sin embargo, el ensayo se basa en análisis de punto final y no proporciona mucha información sobre la naturaleza dinámica de las interacciones en tiempo real. Por lo tanto, se han desarrollado nuevos métodos para tales estudios dinámicos. Uno de los métodos comúnmente utilizados para este estudio dinámico es la transferencia de energía fluorescente resonante (FRET). Este método se basa en la transferencia de energía de resonancia cuando dos moléculas fluorescentes están lo suficientemente cerca como para interactuar (varios angstroms). Sin embargo, un inconveniente es que ambas proteínas bajo investigación deben fusionarse a diferentes fluoróforos (proteínas o acoplarse a compuestos químicos) para que se produzca dicha transferencia de energía, que puede interferir con la localización o la función de las proteínas en algunos casos.

A



$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

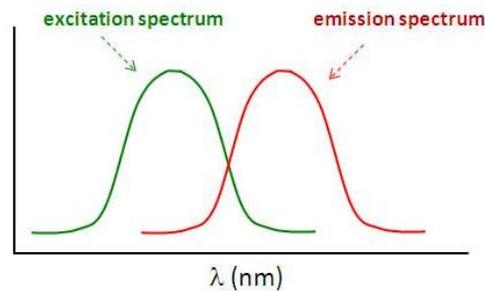
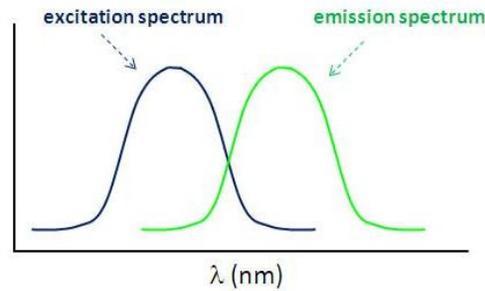


Figura 6.7. Una visión general del análisis FRET.

(a) Clonado de ambas proteínas X e Y para investigar la interacción en un vector de expresión apropiado como fusión a una proteína fluorescente pEGFP y pDsRed, por ejemplo. Ejemplo de espectro de excitación y de emisión (paneles derechos). Como pueden ver en la fórmula, la energía emitida depende inversamente de la distancia entre las proteínas interactuantes elevada al 6. Esto implica que proteína que actúa físicamente entre sí darán positivo en este ensayo y no cuando dos proteínas formen un mismo complejo multiproteico.

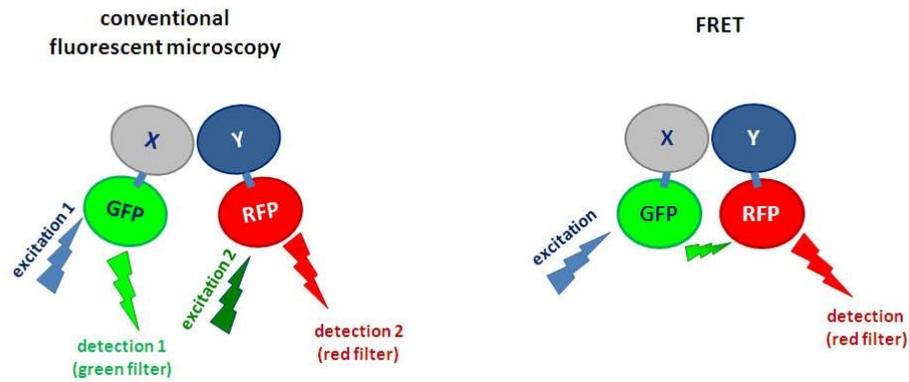
B

Figura 6.7. Una visión general del análisis FRET.

(b) comparación de excitación y detección de fluorescencia en microscopía convencional (panel izquierdo) versus FRET (panel derecho); (c) una tabla de muestra los picos de excitación y emisión (filtros en microscopios fluorescentes) de algunas proteínas fluorescentes comunes

C

| Fluorescent Protein | Excitation (nm) | Emission (nm) |
|---------------------|-----------------|---------------|
| mPlum | 590 | 649 |
| mCherry | 588 | 610 |
| DsRed | 566 | 586 |
| mOrange | 548 | 586 |
| EYFP | 514 | 527 |
| EGFP | 488 | 527 |
| mCFP | 433 | 475 |
| T-Sapphire | 399 | 511 |