

# Metode istraživanja protein:protein interakcija

---

Štimac, Sarah Silvija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:423937>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Sarah Silvija Štimac

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **METODE ISTRAŽIVANJA PROTEIN:PROTEIN INTERAKCIJA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2018. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

13. rujna 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Proteini.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1. Protein:protein interakcije.....</i>	<i>2</i>
<b>§ 2. METODE ISTRAŽIVANJA PROTEIN:PROTEIN INTERAKCIJA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Biofizikalne metode.....</b>	<b>5</b>
<i>2.1.1. Fluorescentna polarizacija (FP).....</i>	<i>5</i>
<i>2.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR).....</i>	<i>7</i>
<i>2.1.3. Kalorimetrijske metode.....</i>	<i>8</i>
<b>2.2. Biokemijske metode.....</b>	<b>12</b>
<i>2.2.1. Fluorescentni rezonantni prijenos energije (FRET).....</i>	<i>12</i>
<i>2.2.2. Bioluminescentni rezonantni prijenos energije (BRET).....</i>	<i>14</i>
<i>2.2.3. AlphaScreen i AlphaLISA.....</i>	<i>15</i>
<i>2.2.4. Afinitetna kromatografija.....</i>	<i>16</i>
<b>2.3. Genetičke metode.....</b>	<b>20</b>
<i>2.3.1. Prikaz proteina na česticama bakteriofaga.....</i>	<i>21</i>
<i>2.3.2. Metoda dvaju kvašćevih hibrida i ostali dvohibridni testovi.....</i>	<i>22</i>
<i>2.3.3. Proteinski čip.....</i>	<i>24</i>
<b>2.4. Zaključak.....</b>	<b>26</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXVII</b>



## § Sažetak

Za proteine nije karakteristično njihovo izolirano postojanje u stanici, već se oni nalaze u međusobnoj interakciji, ili u interakciji s drugim biomolekulama tvoreći komplekse. U ljudskom interaktomu postoji stotine tisuća protein:protein interakcija zaduženih za biokemijske procese u organizmu, a desetine tisuća njih tek treba biti otkriveno i istraženo. Prilikom potrebe i želje za razumijevanjem protein:protein interakcija došlo je do primjene cijelog spektra različitih metoda i tehnika u svrhu njihovog proučavanja. Razvio se cijeli niz novih tehnika te je došlo do usavršavanja postojećih kako bi se doprinijelo istraživanju i proučavanju protein:protein interakcija, a one se mogu podijeliti na biofizikalne, biokemijske i genetičke metode. Svaka od njih posjeduje određene prednosti, kao i nedostatke, što se može vidjeti u njihovoj osjetljivost i specifičnosti. Pojedina metoda zbog svojih ograničenja može dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate mjerenja. Kako bi se uklonile sve nesigurnosti i mogućnosti pojave pogreške mjerenja, za validaciju protein:protein interakcija najčešće se koristi kombinacija metoda baziranih na različitim tehnikama kako bi se dobili što pouzdaniji rezultati. Otkrivanje novih saznanja iz ovog područja daje široki spektar mogućnosti u budućnosti, primjenom tih znanja u medicini i farmaciji, za otkrivanje novih, ili unaprijeđenje postojećih lijekova za liječenje bolesti.





## § 1. UVOD

### 1.1. Proteini

Proteini su jedna od četiriju glavnih tipova biomolekula koji uz ugljikohidrate, lipide i nukleinske kiseline imaju veliku važnost u živim sustavima.

Proteini su linearni polimeri aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnom vezom. Peptidna veza nastaje vezanjem  $\alpha$ -karboksilne skupine jedne aminokiseline s  $\alpha$ -amino skupinom druge aminokiseline. Aminokiseline su  $\alpha$ -aminokarboksilne kiseline koje se sastoje od središnjeg ugljikovog atoma na koji su vezani: amino skupina, karboksilna skupina, atom vodika i funkcionalna skupina R koju nazivamo i bočnim ogrankom. Središnji ugljikov atom nazivamo još i  $\alpha$ -ugljikov atom.  $\alpha$ -ugljikov atom kiralni je centar budući sadrži četiri različita supstituenta vezana na sebe, a time su i aminokiseline kiralne molekule te mogu postojati kao L-izomeri i D-izomeri koji se međusobno odnose kao zrcalne slike koje se ne mogu preklopiti u prostoru. U staničnim proteinima pojavljuju se samo L-aminokiseline što znači da imaju apsolutnu konfiguraciju S i da zakreću ravninu polarizirane svjetlosti obrnuto od smjera kazaljke na satu. Postoje i izuzeci te za primjer možemo uzeti aminokiselinu glicin koja kao bočni ogranak ima još jedan atom vodika i zato nije kiralna molekula, već akiralna.<sup>1</sup>

Postoje četiri razine strukture proteina. Primarna struktura proteina definirana je kovalentnim slijedom aminokiselina, a određuje strukturu i funkciju proteina. Kada dolazi do prostornog rasporeda aminokiselina koje se u aminokiselinskom slijedu međusobno nalaze u blizini, tj. kada se taj polipeptidni lanac složi u pravilnu strukturu, nastaju sekundarne strukture kao što su  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrani list ( $\beta$ -ploča). Budući je smatanje proteina stupnjevito, prvo se smataju elementi sekundarne strukture, a zatim elementi sekundarne strukture stvaraju lokalnu strukturu. Zatim se smataju cijele domene i na kraju tercijarna struktura predstavlja trodimenzijsku strukturu jednog polipeptidnog lanca, tj. proteina. Kvaternu strukturu posjeduju proteini koji imaju više podjedinica.<sup>1</sup>

Raznolikost proteina potječe od različitosti bočnih ogranaka aminokiselina, koji mogu varirati po veličini, naboju, mogućnosti stvaranja vodikovih veza, kemijskoj reaktivnosti ili hidrofobnom karakteru. Upravo su različite funkcionalne skupine razlog širokog spektra djelovanja proteina i njihove svestranosti. Najbolji primjer za to su enzimi. Enzimi su uglavnom

proteini koji, upravo zbog vezanih funkcionalnih skupina, kataliziraju kemijske reakcije kao što su kiselo-bazne reakcije i stvaranje kovalentnog međuprodukta, a nazivamo ih i biološkim katalizatorima.<sup>1</sup> Specifičnost funkcionalne skupine definira specifičnost reakcije koju će enzim katalizirati.

Struktura nekih proteina je kruta (npr. proteini citoskeleta), dok su drugi prilično ili djelomično fleksibilni (npr. enzimi).<sup>1</sup> S druge strane, proteini se mogu međusobno udruživati ili mogu tvoriti kompleksne strukture s nekim drugim biomolekulama. Svaki od njih posjeduje određene prednosti i kao takav ima bitnu ulogu i funkciju u organizmu.

### 1.1.1. *Protein:protein interakcije*

Kao što proteini mogu djelovati sa drugim biološkim makromolekulama, oni mogu biti i međusobno u interakciji, što se u organizmima događa vrlo često, budući proteini vrlo rijetko djeluju sami i budu izolirani. Protein:protein interakcije imaju važnu ulogu u vitalnim procesima živih organizama budući proteini obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. Protein:protein interakcija može biti uspostavljena između dva ili više proteina kao rezultat biokemijskog procesa djelovanjem nekovalentnih interakcija. Radi se o uspostavljanju specifičnog fizičkog kontakta dva ili više proteina u točno određenom biokemijskom kontekstu. Za primjer može poslužiti protein citokrom c koji služi kao prenositelj elektrona u respiracijskom lancu interagirajući s multiproteinskim kompleksima III i IV u oksidacijskoj fosforilaciji.<sup>2</sup>

Postoji više kategorija podjele protein:protein interakcija što ovisi i o načinu na koji su one određene i detektirane. Tako se interakcije mogu događati između dvije domene (eng. *domain-domain interactions*) te između domene i motiva (eng. *domain-motif interaction*). Ove dvije kategorije klasificirane su prema površini na kojoj dolazi do kontakta, tj. do interakcije između proteina. Kod *domain-domain* interakcija dolazi do vezanja dvije domene i nastanka velike površine na kojoj nastaju interakcije, dok kod *domain-motif* interakcija je ta linija interakcije puno manja budući je jedna jedinica znatno manja.<sup>2</sup> Postoje i druge kategorije po kojima se mogu klasificirati protein:protein interakcije kao što je podjela na stabilne i prolazne interakcije ili homo-oligomeri i hetero-oligomeri kod kojih je razlika u tome da li su proteinske podjedinice sve jednake kao kod homo-oligomera ili su različite kao kod hetero-oligomera.

Za strukturu i stabilnost bioloških molekula važne su kovalentne veze koje na različite načine povezuju atome. Uz njih, tu su i nekovalentne veze, koje, iako su slabije od kovalentnih imaju svoju bitnu ulogu i govore o prirodi interakcija. One su te koje stvaraju dvostruku uzvojniju DNA, a to je samo jedan od primjera njihove ključne važnosti u biološkim procesima. Postoji nekoliko tipa nekovalentnih veza, a to su vodikove veze, hidrofobne interakcije, van der Waalsove interakcije te elektrostatske interakcije. Elektrostatske (ionske) interakcije javljaju se između skupina različitog naboja koje mogu privlačenjem stupiti u interakciju. Također, može doći i do odbijanja ukoliko se u blizini nađu dvije skupine jednakog naboja. Vodikove veze su odgovorne za stvaranje parova baza u dvostrukoj uzvojnici DNA te za stvaranje sekundarne strukture proteina. Također mogu sudjelovati u oblikovanju tercijarne i kvaterne strukture proteina. U vodikovoj vezi, vodikov atom se nalazi između dvaju elektronegativnih atoma kisika i dušika. Kod van der Waalsovih interakcija postoji raspodjela elektronskog naboja oko atoma i tako dolazi do slabe privlačne sile između molekula. Većina biokemijskih reakcija se događa u vodi pa tako voda kao otapalo ima svoj učinak. Tu dolazimo do hidrofobnih interakcija i ona su posljedica svojstava vode. Voda kao polarna molekula neće reagirati, tj. neće sudjelovati u stvaranju vodikovih veza niti u ionskim interakcijama s nepolarnom molekulom. Te interakcije nisu povoljne i u takvim situacijama, molekule vode stvarat će „kaveze“ oko nepolarnih molekula koje će tada imati veću tendenciju združivanja jedne nepolarne molekule s drugom i tako dolazimo i do hidrofobnih interakcija.<sup>1,3,4</sup>

Istraživanje i karakterizacija protein:protein interakcija ima središnju ulogu u razumijevanju biokemijskih mehanizama, transportu preko membrana, transkripciji gena, staničnom metabolizmu, strukturnoj organizaciji te u sistematskoj analizi staničnih mreža budući se stanice mogu smatrati kao kompleksna mreža koja uključuje mnogobrojne protein:protein interakcije. U novije vrijeme protein:protein interakcije imaju važnu ulogu u farmaciji i medicini, odnosno u istraživanju funkcioniranja lijekova, prilikom istraživanja bolesti, identifikaciji potencijalnih meta za otkrivanje novih lijekova kao i njihovu sintezu.<sup>2</sup> Zbog potrebe i želje za razumijevanjem protein:protein interakcija došlo je do primjene cijelog spektra različitih metoda i tehnika u svrhu njihovog proučavanja. Desetine tisuća protein:protein interakcija tek treba biti otkriveno i istraženo. Razvio se cijeli niz tehnika te je došlo do usavršavanja postojećih, kako bi se doprinijelo istraživanju i proučavanju protein:protein interakcija, a one se mogu podijeliti na biofizičke, biokemijske i genetičke metode.<sup>2</sup> Svaka od njih posjeduje određene prednosti, kao i nedostatke što se može vidjeti u

njihovoj osjetljivost i specifičnosti. Pojedina metoda zbog svojih ograničenja može dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate mjerenja. Kako bi se uklonile sve nesigurnosti, za validaciju protein:protein interakcija koristi se kombinacija metoda baziranih na različitim tehnikama kako bi se dobili što pouzdaniji rezultati. Neke metode će se pobliže opisati i objasniti u ovome radu.

## § 2. METODE ISTRAŽIVANJA PROTEIN:PROTEIN INTERAKCIJA

### 2.1. Biofizikalne metode

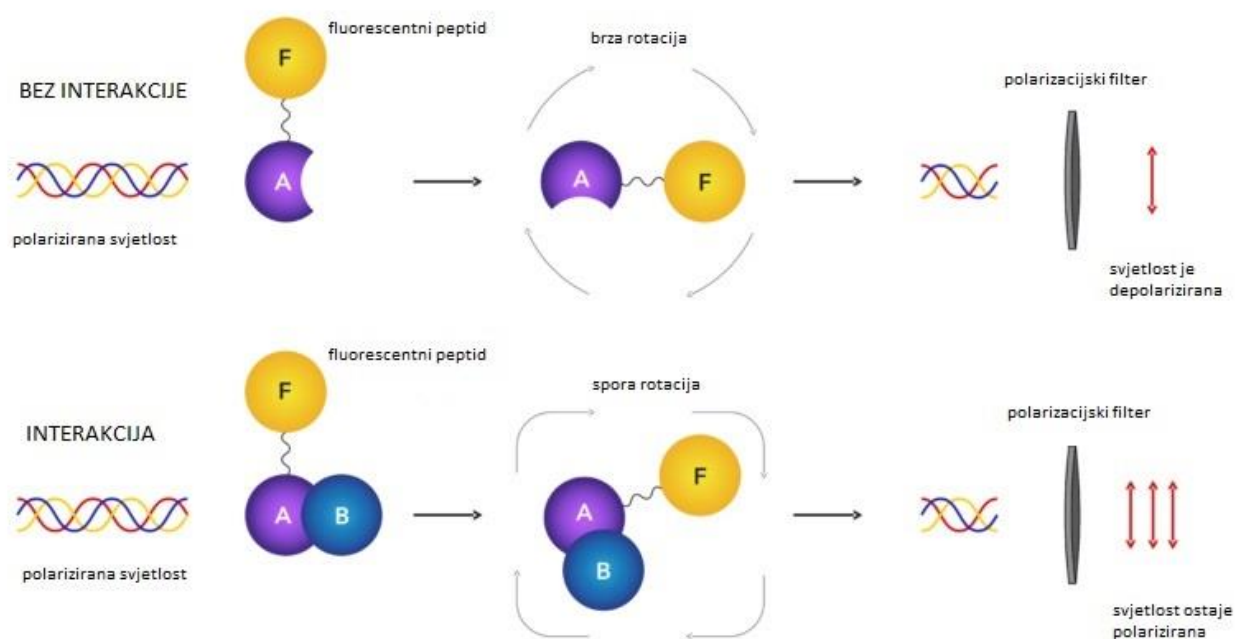
Postoji povećani broj biofizikalnih metoda koje se mogu iskoristiti za istraživanje i otkrivanje protein:protein interakcija. One koriste fizikalne metode i teorije iz grana fizike za istraživanje i proučavanje bioloških molekula i sustava te imaju čestu primjenu u biokemiji. Daju nam informacije o prirodi i osobini interakcija. Svaka od njih sadrži određene prednosti i nedostatke, a neke od njih su fluorescentna polarizacija (eng. *fluorescence polarization*, FP), površinska plazmonska rezonancija (eng. *surface plasmon resonance*, SPR), nuklearna magnetska rezonancija (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR), kružni dikroizam (eng. *circular dichroism*, CD), statično i dinamično raspršivanje svjetlosti (eng. *static and dynamic light scattering*, SLS i DLS), analitičko ultracentrifugiranje (eng. *analytical ultracentrifugation*, AUC), mikroskalarna termoforeza (eng. *microscale thermophoresis*, MST) te kalorimetrijske metode gdje imamo izotermalnu kalorimetrijsku titraciju (eng. *isothermal titration calorimetry*, ITC) i diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC), ali i brojne druge.<sup>2</sup>

#### 2.1.1. Fluorescentna polarizacija (FP)

Fluorescentna polarizacija bazira se na promatranju i detekciji fluorescentnih molekula (eng. *fluorophores*) i kompleksa fluorescentne molekule i biomolekule te na njihovim kretnjama u otopini. Tehnika je to koja se temelji na emisiji zračenja.

Fluorescentna polarizacija izvodi se pomoću izvora svjetlosti kojeg promatramo kao snop valova koji mogu poprimiti bilo koju orijentaciju (slika 1). Valovi svjetlosti dolaze do pobudnog polarizacijskog filtera (eng. *polarization excitation filter*) koji dalje prenosi valove svjetlosti samo jedne orijentacije i tako se dobije pobuđena polarizirana svjetlost. Kada fluorescentna molekula apsorbira polariziranu svjetlost dolazi do emisije svjetlosti. Mala, fluorescentna molekula u otopini nije statična, već je u stanju translacije ili rotacije. Kako se mijenja orijentacija molekule, mijenja se i orijentacija emitirane svjetlosti pa će molekula

emitirati svjetlost u različitim smjerovima tijekom vremena fluorescencije. Upotrebom još jednog polarizacijskog filtera, u ovom slučaju emisijskog polarizacijskog filtera (eng. *polarization emission filter*), snaga signala se mijenja ovisno o orijentaciji emitiranog svjetla jer emisija polarizirane svjetlosti nema jednaki intenzitet duž različitih osi polarizacije. Kako se mala, fluorescentna molekula rotira brzo, njena emitirana svjetlost je depolarizirana. Kada se fluorescentno obilježena molekula veže za drugu molekulu, dolazi do značajnog porasta njezine molekulske mase, time se brzina rotacije i translacije kompleksa smanjuje, a to rezultira promjenom intenziteta emitirane polarizirane svjetlosti. Sporo kretanje kompleksa znači da je polarizacija svjetlosti očuvana dulje vrijeme, a povećanje molekulske mase, tj. stvaranje kompleksa dovodi do povećanja signala fluorescentne polarizacije koja se može mjeriti. Stupanj polarizacije je povezan s rotacijom molekule koja ovisi o molekularnoj masi na način da što je molekula veća pokazuje sporiju rotaciju. Na taj način možemo mjeriti vezanje i disocijaciju između dviju molekula ako je jedna od molekula relativno mala i fluorescentna.



Slika 1. Ilustracija metode fluorescentne polarizacije. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>.

Fluorescentna polarizacija se koristi kod istraživanja protein:protein interakcija na način da pokušava utvrditi da li je između dviju biomolekula došlo do interakcije. Njezina uloga može biti procijeniti mjesto na kojem dolazi do vezanja između dva proteina. Tako je korištena za određivanje mjesta vezanja translacijskog inicijacijskog faktora 3 IF3 na 30S ribosomsku

podjedinicu, ili gdje dolazi do vezanja između proteina koji je kodiran genom 2.5 bakteriofaga T7 i DNA-polimeraze bakteriofaga T7, kao i za mnoga druga mjesta vezanja između proteina. Može imati ulogu detekcije inhibitora koji cilja protein:protein interakcije kao što je inhibitor koji cilja interakciju MDM2:p53, ili kako bi zabilježila molekule koje sprječavaju interakciju ZipA:FtsZ. Isto tako može zabilježiti koji spojevi mogu poremetiti vezanje antiapoptotskih proteina iz obitelji Bcl-2 sa BH3 peptidima.<sup>2</sup>

Njezine prednosti su: niska cijena, visoka protočnost i to što ne zahtijeva korak za izolaciju ili ispiranje, dok su nedostaci: interferencija s autofluorescencijom, suzbijanjem fluorescencije (eng. *quenching*) i raspršivanjem svjetlosti, ali i oslanjanje na veliku promjenu u jačini signala prilikom vezanja.<sup>2</sup>

### 2.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Spektroskopske metode temelje se na interakciji tvari i elektromagnetnog zračenja, a među njih spada i nuklearna magnetska rezonancija. U radiovalnom području spektra apsorpcija zračenja uzrokuje prijelaze među spinskim stanjima, odnosno prijelaze spinova elektrona i jezgri.

Nuklearna magnetska rezonancija ili NMR je jedna od najmoćnijih i najsuvremenijih apsorpcijskih tehnika određivanja atomske strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula u otopini. NMR se može koristiti za analizu različitih jezgri (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F i <sup>31</sup>P) budući se spektroskopijom NMR-a mogu proučavati jezgre koje posjeduju spin različit od nule. Najjednostavniji primjer je jezgra vodika koja je proton. Postoje jednodimenzijske i dvodimenzijske tehnike NMR-a. Neke jednodimenzijske tehnike su: <sup>1</sup>H NMR, *off resonance* <sup>13</sup>C NMR, APT, INEPT, dok su neke od dvodimenzijskih tehnika: COSY, HMQC, HSQC, NOESY, ROESY i dr. Radi se o spektroskopskoj metodi kod koje imamo apsorpciju radiofrekvencijskog zračenja pri prijelazu između kvantnih stanja atomskih jezgri. Magnetski aktivne jezgre neke tvari koje apsorbiraju zračenje moraju biti u jakom magnetskom polju. Nuklearni overhauserov efekt (NOE) se definira kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napućenosti spinova druge jezgre. Vrijedi ako su navedeni procesi povezani mehanizmom križne relaksacije.<sup>5</sup> Može skratiti vrijeme snimanja heteronuklearnih spektara i daje korisne informacije o strukturi molekule, može opisati protein:protein interakcije te odrediti cjelokupnu trodimenzijsku strukturu kompleksa. NOE je NMR ekvivalent fluorescentom rezonancijskom prijenosu energije (FRET).<sup>2</sup>



NMR metodom iz dobivenih spektara može se dobiti mnogo podataka i parametara o protein:protein interakcijama kao što su podaci o kutevima i udaljenostima atoma u molekuli te informacije o perturbaciji kemijskog pomaka, spin-spin sprezanju, dinamici, strukturi i još mnogo toga na razini jedne molekule. Radi se i o kvalitativnoj i o kvantitativnoj metodi.<sup>5</sup> Danas kao jedna od najsuvremenijih metoda ima primjenu u svim područjima znanosti: u medicini, farmaciji, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, a najčešće se koristi u analitičkim laboratorijima, u kontroli kvalitete i autentičnosti te u istraživanjima. Radi se o nedestruktivnoj metodi koja ne oštećuje uzorak prilikom snimanja. Uz to što se može koristiti za snimanje spektara velike raznolikosti molekulskih oblika, može se i koristiti na velikoj raznolikosti temperatura. Pruža mogućnost snimanja spektara uzoraka i u tekućem stanju i u krutom stanju te ne zahtijeva veliku količinu uzorka.

Prednost NMR metode je ta što pruža visoku strukturnu rezoluciju, dozvoljava istraživanje protein:protein interakcija pod fiziološkim uvjetima u živućim stanicama kao i istraživanje membranskih proteina uključenih u protein:protein interakcije.<sup>2</sup> Zanimljivo je da pruža mogućnost promatranja kako stanica funkcionira na molekularnoj razini u stvarnom vremenu. Prilikom snimanja NMR spektara bioloških molekula, u nekim situacijama potrebno je označavanje proteina, metoda može biti dugotrajna, odnosno potrebno je dosta vremena za dobivanje rezultata i potrebnu analizu spektra, a uz to radi se i o veoma skupoj metodi.

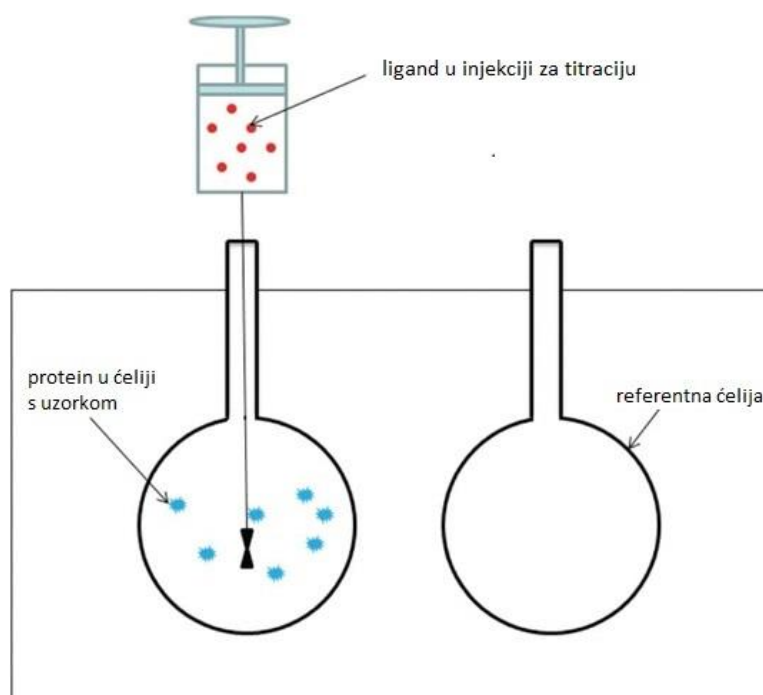
### 2.1.3. Kalorimetrijske metode

Kalorimetrija je jedna od najstarijih metoda fizikalne kemije, a do danas su se razvile mnoge kalorimetrijske metode specijalizirane za specifične namjene, a ujedno su i visoke osjetljivosti. Kalorimetrija je metoda koja služi za određivanje količine topline, odnosno mjeri toplinsku energiju oslobođenu ili vezanu prilikom nekog fizikalnog ili kemijskog procesa. To je moguće budući je većina kemijskih reakcija popraćena promjenama u toplini. Ako je predznak promjene entalpije reakcije negativan, energija se oslobađa iz sustava u okolinu i reakcija je egzotermna. Ako je predznak promjene entalpije reakcije pozitivan, sustav je primio energiju iz okoline i reakcija je endotermna. Pomoću kalorimetrije moguće je odrediti i ostale termodinamičke parametre. Budući su gotovo sve kemijske reakcije i fizikalni procesi popraćeni toplinskim efektima, kalorimetrija je prikladna metoda i za istraživanje protein:protein interakcija. Danas

su u upotrebi izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) i diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC).<sup>2</sup>

Prilikom istraživanja protein:protein interakcija, velika je razlika u prisutnosti interakcija kao što su one elektrostatske, van der Waalsove, hidrofobne ili postojanje vodikovih veza, u primjeru radi li se o izoliranom proteinu ili proteinu vezanom u kompleks. Prisutnost, odnosno odsutnost interakcija rezultira i promjenom u Gibbsovoj energiji sustava, a time i različitim vrijednostima termodinamičkih parametara. Neki od termodinamičkih parametara koje možemo ovom metodom izmjeriti i izračunati su: promjena Gibbsove slobodne energije ( $\Delta G$ ), promjena entalpije ( $\Delta H$ ), promjena entropije ( $\Delta S$ ), konstanta asocijacije ( $K_a$ ), promjena toplinskog kapaciteta ( $\Delta C_p$ ) i dr.

Uređaj za izotermalnu titracijsku kalorimetriju sastoji se od dvije ćelije: referentne ćelije (eng. *reference cell*) uglavnom ispunjene vodom ili puferom i ćelije s uzorkom (eng. *sample cell*) ispunjene s uzorkom proteina. Između i oko njih nalazi se adijabatski omotač (eng. *adiabatic jacket*) koji je, zajedno sa senzorom i grijačima, zadužen da obje ćelije zadrži pod istom temperaturom (slika 2). Prilikom mjerenja, ligandi se pomoću injekcije (eng. *syringe*) u maloj količini titriraju u ćeliju s uzorkom proteina koje ti ligandi vezuju. Prilikom vezanja liganda s proteinom dolazi do promjene u temperaturi koja se detektira i mjeri. Mjeri se sva toplina otpuštena dok reakcija vezanja liganda i proteina ne dođe u ravnotežu. Što manje veza ligand i protein postignu, promjena u količini otpuštene temperature je sve manja. Postupak ubrizgavanja liganda u ćeliju se ponavlja do trenutka kada se u ćeliji s uzorkom ne nađu ligandi u suvišku. U ovom primjeru u kojem se toplina oslobađa reakcija je egzotermna, no u drugom slučaju ona može biti i endotermna. Nakon mjerenja, iz nastale krivulje moguće je odrediti i izračunati termodinamičke parametre.<sup>2</sup>



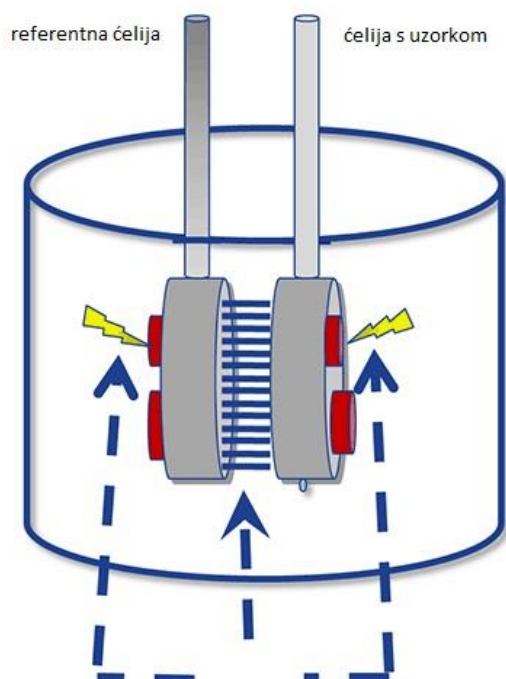
Slika 2. Ilustracija metode izotermalne titracijske kalorimetrije. Preuzeto i prilagođeno prema 7.

Prednost izotermalne titracijske kalorimetrije jest mogućnost dobivanja termodinamičkih parametara eksperimentalnim mjerenjem i izračunom te nije potrebno označavanje proteina (eng. *label-free*), kao ni imobilizacija ili modifikacija istih. Dobiveni podaci omogućuju bolje razumijevanje mehanizama u kojima se protein:protein interakcije nalaze, kao i afinitete proteina koji interagiraju. Moguće je procijeniti hidrofobni učinak aminokiselinskog ostatka na sučelju proteina (eng. *interface*) tako da se izračuna promjena entropije vezanja u otopini, kao i validirati strukturu oligomernih proteina prilikom vezanja pomoću stehiometrijskih podataka.<sup>2</sup> Nedostatak ove metode je ograničenje puferom (eng. *buffer limitation*) pri čemu se velika pažnja daje načinu i vrsti pufera koji se koristi u eksperimentu. Svi uzorci proteina ili ligandi spremni za interakciju moraju biti priređeni i obrađeni identičnim puferom kako ne bi došlo do pogreške prilikom mjerenja zbog različitosti komponenata pufera.<sup>2</sup> Metoda također zahtijeva dugo vrijeme pripreme te je niske propusnosti i osjetljivosti.

Metoda diferencijalne pretražne kalorimetrije mjeri promjenu u toplini tijekom toplinske denaturacije biomolekulskih uzoraka. Proteini se denaturiraju na način da dolazi do odmotavanja proteina, pojedinačni lanci se odvajaju te zauzimaju strukturu nasumičnog klupka.

Denaturacija proteina je praćena mjerljivim promjenama fizičkih svojstava otopine pa se tako denaturacijom proteina mijenja i apsorbanija. Krivulju koju dobijemo nazivamo krivuljom denaturacije, a ona prikazuje ovisnost apsorbanije o temperaturi. Temperatura mekšanja je temperatura u središnjoj točki krivulje denaturacije na kojoj je 50% strukture proteina denaturirano i oznaćavamo ju sa  $T_m$ . Smatra se najpouzdanijim indikatorom termalne stabilnosti proteina pa što je  $T_m$  viša, protein je stabilniji.

Ova metoda takoćer sadrži dvije ćelije, referentnu ćeliju ispunjenu puferom i ćeliju s uzorkom ispunjenu proteinom u istom puferu (slika 3). Na početnoj temperaturi protein se nalazi u svom nativnom obliku i strukturi. Povećavanjem temperature zapoćinje denaturacija proteina i na kraju eksperimenta sve molekule proteina su denaturirane. Iz mjerenih podataka i krivulje denaturacije koja prikazuje ovisnost apsorbanije o temperaturi moguće je odrediti temperaturu mekšanja ( $T_m$ ), promjenu entalpije ( $\Delta H$ ) i promjenu toplinskog kapaciteta ( $\Delta C_p$ ). Podrućje ispod pika odgovara ukupnoj promjeni energije, entalpiji, koja je odgovorna za odmotavanje proteina. Ovdje se radi o endotermnoj reakciji budući smo povišavanjem temperature, odnosno dovoćenjem energije, kidali nekovalentne veze proteina. Ova metoda takoćer ne zahtijeva oznaćavanje proteina kao ni njihovu imobilizaciju ili modifikaciju, a protein:protein interakcije mogu se proućavati gledanjem promjena u vrijednostima temperature mekšanja  $T_m$ .<sup>2</sup>



Slika 3. Ilustracija diferencijalne pretraćne kalorimetrije. Preuzeto i prilagoćeno prema <sup>8</sup>.

## 2.2. Biokemijske metode

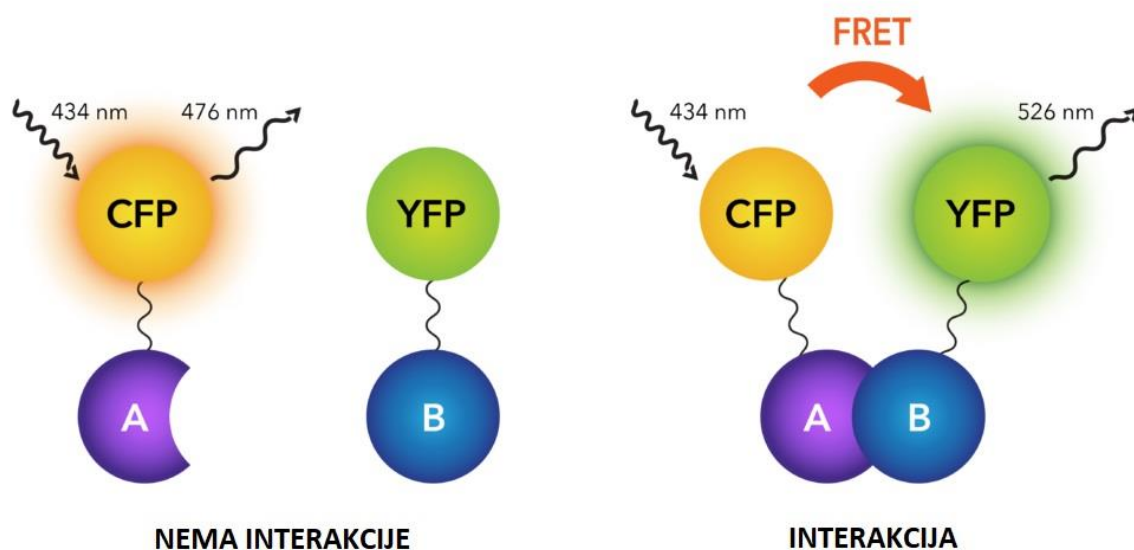
Biokemijske metode su metode koje koriste teorije s područja kemije te kemijske procese i reakcije i primjenjuju ih na žive organizme, odnosno biološke molekule. One se često koriste u kombinaciji s drugim metodama kako bi što preciznije identificirale proteine u interakciji te otklonile mogućnost pogreške. Neke od biokemijskih metoda su: fluorescentni i bioluminescentni rezonantni prijenos energije (eng. *fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer*, FRET i BRET), AlphaScreen i AlfaLISA, komplementacija proteinskih fragmenata (eng. *protein-fragment complementation assay*, PCA), afinitetna kromatografija u koju spadaju i metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom (eng. *pull-down assay*), tandemno afinitetno supročišćavanje (eng. *tandem affinity purification*, TAP), metode bazirane na antitijelima uključujući koimunoprecipitaciju (eng. *co-immunoprecipitation*, Co-IP), enzimski imunoadsorpcijski test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA).<sup>2</sup>

### 2.2.1. Fluorescentni rezonantni prijenos energije (FRET)

Metoda fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije se oslanja na prikupljanje fluorescentnih signala iz proteinskih interakcija. Ova metoda uključuje prijenos energije sa donorske fluorescentne molekule, vezane za molekulu proteina mamca, na akceptorsku fluorescentnu molekulu, vezane za molekulu proteina plijena. Ako mamac i plijen interagiraju i stvaraju kompleks, donorska i akceptorska fluorescentna molekula dolaze u blizinu i mogu ostvariti prijenos energije. Da bi došlo do učinkovitog prijenosa energije važno je napomenuti da mora postojati preklapanje između emisijskog spektra donorske molekule i pobudnog spektra akceptorske molekule. Također, ova metoda zahtijeva početnu pobudu svjetlošću iz izvora zračenja.

Kada se metoda FRET-a koristi za istraživanje protein:protein interakcija intermolekularni FRET se pojavljuje samo kada se molekule plijena i mamca nađu u neposrednoj blizini stvarajući kompleks (slika 4). Plavi fluorescentni protein (eng. *cyan fluorescent protein*, CFP) i žuti fluorescentni protein (eng. *yellow fluorescent protein*, YFP) jedan su od mnogih primjera i često korištenih FRET parova. Ako između plijena i mamca ne

dođe do interakcije, neće doći do prijenosa energije s CFP, kao donorske molekule na YFP, kao akceptorske molekule te će se emitirati zračenje valne duljine 476 nm samo sa CFP donorske molekule, dok se prilikom nastajanja interakcije mamac-plijen donorska i akceptorska molekule približe dovoljno da dođe do prijenosa energije sa CFP donorske molekule na YFP akceptorsku molekulu. Emisija zračenja sa YFP akceptorske molekule može se detektirati pri valnoj duljini 526 nm i vidjeti kao žuto obojenje.



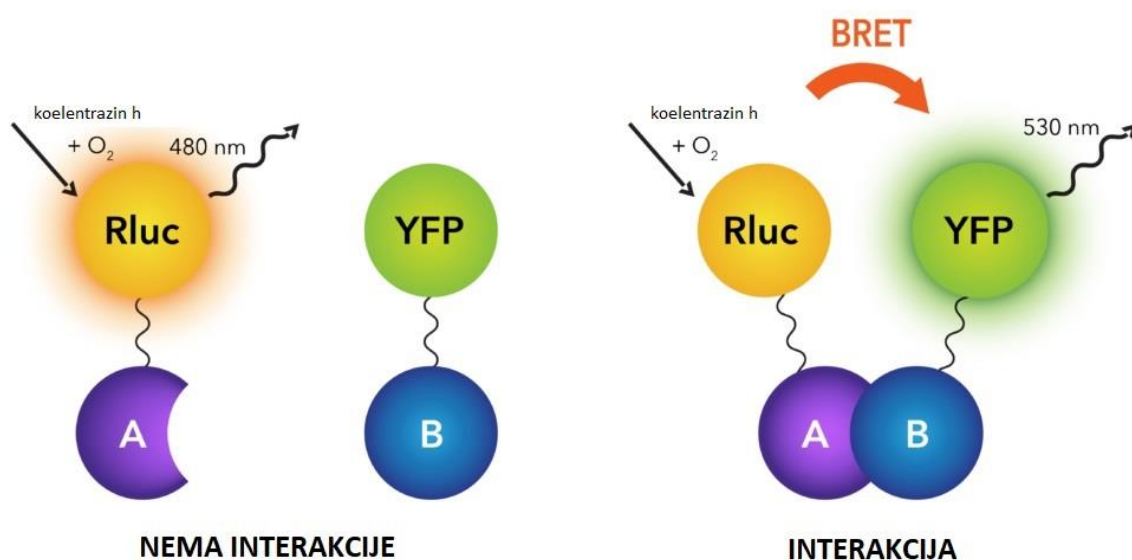
Slika 4. Ilustracija metode fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>.

Radi se na unaprijeđenju i razvoju metode kao i FRET parova kombinirajući ih sa drugim tehnologijama i metodama kako bi se njihova primjena povećala, ili pak ispravili neki postojeći nedostaci. Neki od nedostataka ove metode su pojava autofluorescencije, optička buka, fotoizbjeljivanje signala, samo djelomično preklapanje emisijskog spektra donorskih molekula sa pobudnim spektrom akceptorskih molekula, a jedan od razloga njihovog javljanja jest oslanjanje metode na mogućnost detekcije i prikupljanja fluorescentnih signala nastalih interakcijom proteina. Kod istraživanja protein:protein interakcija FRET se koristi za prikaz inhibitora protein:protein interakcija, a u kombinaciji s drugim metodama može vizualizirati i kvantificirati protein:protein interakcije u stvarnom vremenu u živim stanicama. Postoje i specijalni oblici FRET-a kao što je vremenski FRET (eng. *time-resolved* FRET, TR-FRET) kod kojeg molekule donora imaju dulje trajanje emisije i time omogućuju privremenu odgodu

između emisije donorske molekule i detekcije emisije nakon pobude akceptorske molekule, što ispravlja neke nedostatke i otklanja ograničenja metode FRET-a.<sup>2</sup>

### 2.2.2. Bioluminescentni rezonantni prijenos energije (BRET)

Metoda bioluminescentnog rezonantnog prijenosa energije slična je metodi fluorescentnog rezonantnog prijenosa, ali razlika je u tome što je kod BRET metode donorska molekula nije fluorescentni protein, već bioluminescentni protein. Prijenos energije se događa između donorskog bioluminescentnog proteina Rluc (*Renilla luciferase*) vezanog za protein mamca i akceptorskog fluorescentnog proteina EYFP vezanog na protein plijen (slika 5). Rluc primjer je proteinskog bioluminescentnog donora koji emitira svjetlost valne duljine 480 nm kako bi pobudio akceptorski fluorescentni protein u blizini prilikom interakcije molekule plijena i mamca. Rluc djeluje uz pomoć supstrata koelentrazina h kojeg tijekom procesa oksidira. Ako između molekule mamca i plijena ne dođe do interakcije, dolazi samo do emisije sa Rluc donorske molekule valne duljine 480 nm koje se može detektirati. Kada dođe do interakcije između mamca i plijena, molekule se približe te dolazi do prijenosa bioluminiscentne energije nastale na Rluc molekuli u prisutnosti supstrata na molekulu EYFP na kojoj dolazi do emisije zračenja pri 530 nm koje se može detektirati. BRET nema nedostatke kao što su pojava autofluorescencije, fotoizbjeljivanje signala i druge koji se javljaju kod FRET-a zato što ne zahtijeva početnu pobudu zračenjem. Kao nedostatak možemo navesti nisku razinu emisije svjetlosti dobivene iz bioluminescentnih reakcija čime se ograničava mikroskopsko fotografiranje za BRET.<sup>2</sup>



Slika 5. Ilustracija metode bioluminescentnog rezonantnog prijenosa energije. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>.

Također postoje i novije verzije BRET-a s drugačijim supstratima i donorsko – akceptorskim parovima molekula kao što su BRET1, BRET2, BRET3 i eBRET što je dovelo do povećanja raspona spektra između donorske i akceptorske emisije. eBRET korištenjem posebne vrste supstrata koelentrazina h omogućuje istraživanje protein:protein interakcija u realnom vremenu. Razvojem i primjenom novije tehnologije kamera i mikroskopa u sklopu metode, kreće se u smjeru hvatanja svjetlosti bioluminescencije i fotografiranja BRET-a u pojedinačnim stanicama, tkivima i živim organizmima.<sup>2</sup>

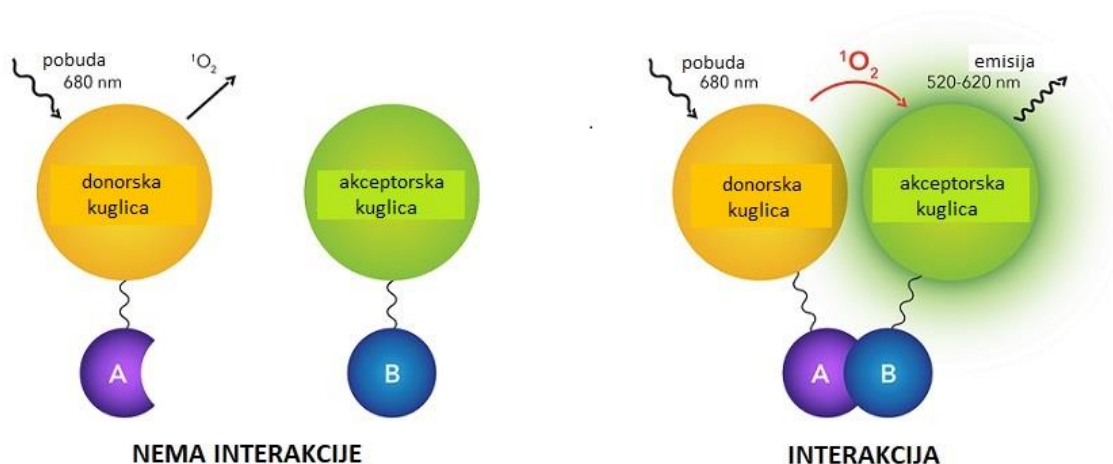
### 2.2.3. AlphaScreen i AlphaLISA

AlphaScreen i AlphaLISA su metode na bazirane na donorskim i akceptorskim kuglicama koje sadrže različite funkcionalne grupe koje mogu poslužiti kao fotoosjetljive i kemoluminescentne kuglice. Glavna razlika između ove dvije metode je u akceptorskim kuglicama, a time i u valnoj duljini emitirane svjetlosti koja je kod metode AlphaScreen od 520 do 620 nm, a kod metode AlphaLISA oko 615 nm. Akronim *alpha* dolazi od engleskog izraza *amplified luminescent proximity homogeneous assay* što bi značilo pojačani luminiscentni blizinski homogeni test.<sup>2</sup>

Prilikom pobude zračenjem valne duljine od 680 nm, fotoosjetljiva donorska jedinica vezana za molekulu mamca pretvara molekulu kisika iz okoline u pobuđeno singletno stanje



kisika. Ako dođe do interakcije i stvaranja kompleksa između molekula mamca i plijena, donorska i akceptorska kuglica dođu u blizinu. Dolazi do prijenosa energije sa singleta kisika na derivat tioksen na akceptorskoj kuglici generirajući luminiscentni signal, tj. emisiju svjetlosti valne duljine od 520 do 620 nm čime se detektira interakcija između biomolekula (slika 6).<sup>2</sup>



Slika 6. Ilustracija metode AlphaScreen. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>.

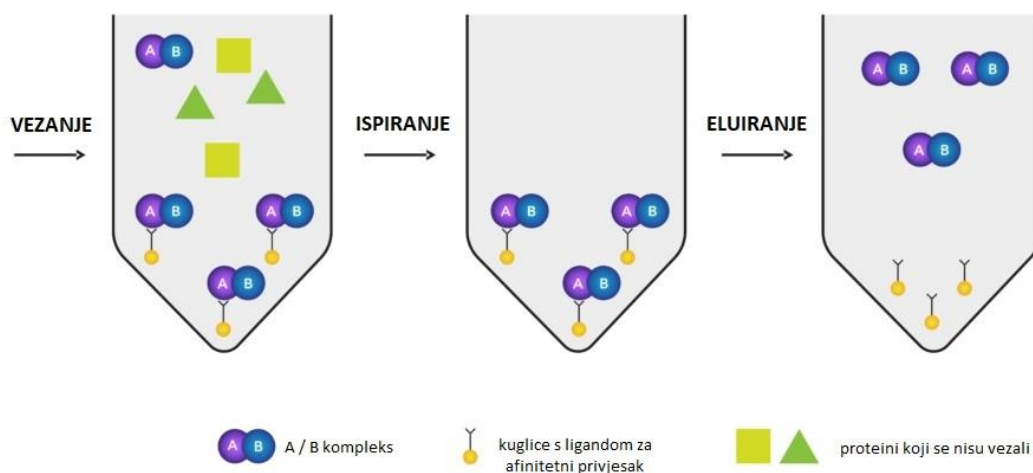
AlphaScreen i AlphaLISA metode mogu prenijeti energiju na veću udaljenost između donorske i akceptorske kuglice za razliku od metode FRET-a, što time omogućuje i veći broj molekula koje se ovim metodama mogu proučavati. Metode se lako koriste, smanjena je sterička smetnja, fleksibilne su prilikom izbora pufera, pokazuju nisku pozadinsku fluorescenciju te mogu detektirati interakcije širokog spektra afiniteta. Problem može stvoriti označavanje kuglica koje je različito za svaki pojedini protein.<sup>2</sup>

#### 2.2.4. Afinitetna kromatografija

Jedna od najvažnijih metoda u kemiji za odjeljivanje sastojaka smjese danas jest kromatografija. Isto tako, kromatografija osim što služi kao metoda odjeljivanja, ima primjenu i za identifikaciju kao i kvantitativnu analizu sastojaka prisutnih u smjesama. Jedna od osnovnih kromatografskih metoda je i afinitetna kromatografija. U ovom slučaju, afinitetna kromatografija je učinkovita i lako primjenjiva metoda koja služi za razdvajanje određenih proteina iz kompleksnih smjesa, a temelji se na visokom afinitetu proteina prema pojedinim molekulama, odnosno određenim kemijskim skupinama. Može biti bazirana na

visokospecifičnim interakcijama između dviju molekula kao što je to interakcija enzima i supstrata, receptora i liganda, antitijela i antigena. Princip metode je takav da se na kolonu kovalentno vežu određene molekule. Prilikom propuštanja smjese proteina kroz kolonu, zadržat će se samo oni proteini koji imaju visoki afinitet prema toj kovalentno vezanoj molekuli te će se specifično vezati za nju, dok će ostali proteini ispiranjem izaći iz kolone zajedno s puferom. Vezane proteine možemo eluirati propuštanjem otopine kovalentno vezane molekule kroz kolonu i na taj način ih pročistimo i izoliramo iz smjese.<sup>3</sup> Afinitetna kromatografija je dala veliki doprinos istraživanju protein:protein interakcija pa tako imamo razne varijacije ove metode koje se danas koriste, a to su metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom (eng. *pull-down assay*), tandemno afinitetno supročišćavanje (eng. *tandem affinity purification*, TAP), metoda bazirana na antitijelima uključujući i koimunoprecipitaciju (eng. *co-immunoprecipitation*, Co-IP) te enzimski imunoadsorpcijski test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA).<sup>2</sup>

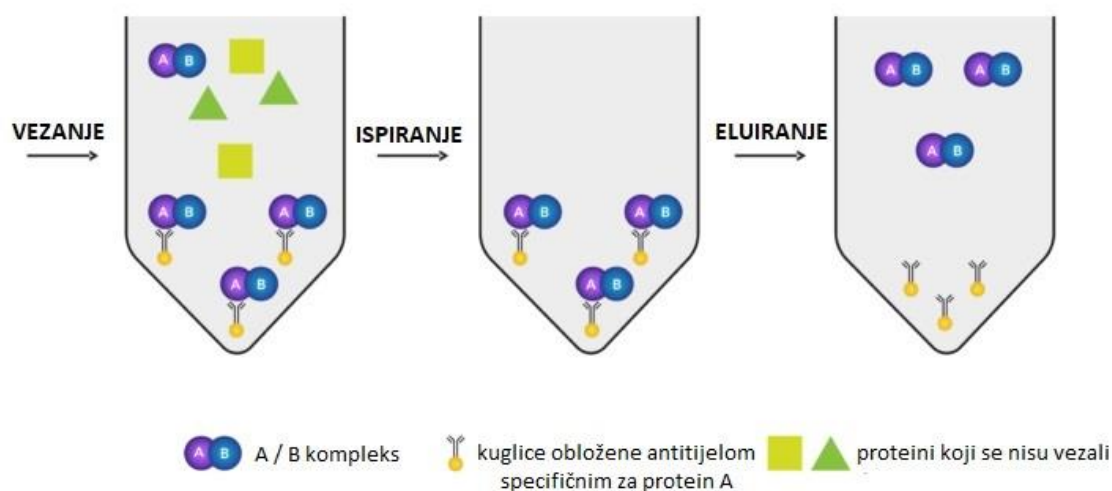
Metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom koristi se za potvrđivanje postojanja protein:protein interakcija otkrivenih nekom drugom metodom kao i za identifikaciju još nepoznatih protein:protein interakcija. Molekula mamca A je vezana za GST (glutation-S-transferaza) protein i inkubirana sa lizatom stanica ili tkiva zajedno sa molekulom plijena B i smjesom drugih proteina (slika 7). Afinitetna oznaka kojom se obilježi molekula mamca ovisi o individualnim svojstvima proteina koji se želi izdvojiti. Dolazi do vezanja kompleksa mamac-plijen, gdje je molekula mamca i dalje vezana na afinitetnu oznaku, tj. GST protein. Dodavanjem kuglica (zrnca) s vezanim glutationom, one se vežu na afinitetnu oznaku, GST protein na kompleksu GST-mamac-plijen. Ispiranjem izlaze svi nevezani proteini. Kompleks mamac-plijen se eluira kako bi se odvojio od afinitetne oznake vezane za molekulu mamca i zatim je spreman za analizu SDS-PAGE metodom.<sup>2</sup>



Slika 7. Ilustracija metode supročišćavanja afinitetnom kromatografijom. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>.

Metoda zahtijeva veliku količinu uzorka proteina te se zato razvila *SINGLE BEAD AFFINITY DETECTION* (SINBAD) metoda. U njoj se pojava vezanja može vizualizirati fluorescentnim mikroskopom, ne zahtijeva korak eluiranja i SDS-PAGE metode separacije izoliranih kompleksa proteina te u globalu izgleda kao minimizirana metoda supročišćavanja afinitetnom kromatografijom.<sup>2</sup>

Metoda koimunoprecipitacije slična je metodi supročišćavanja afinitetnom kromatografijom te je jedna od metoda koje se baziraju na principu reakcije antigena i antitijela. Kompleks mamac-plijen se nalazi u stanici ili tkivu zajedno sa smjesom drugih proteina. Stanice ili tkiva se liziraju. Lizatu se dodaju kuglice (zrnca) na koja je vezano antitijelo specifično za protein mamac A. One se pomoću antitijela specifičnog za molekulu mamca vežu za mamac koji je i dalje u kompleksu sa molekulom plijena B (slika 8). Ispiranjem se izdvajaju ostali nevezani proteini iz smjese, dok se preostali kompleksi mamac-plijen analiziraju pomoću SDS-PAGE metode.<sup>2</sup> SDS oznaka je za detergent natrij-dodecilsulfat pri kojem uz prisutnost 2-merkaptioetanolu i u neutralnom pH dolazi do denaturacije proteina i gubitka sekundarne, tercijarne i kvaterne strukture proteina. SDS-PAGE metodom moguće je određivanje molekulske mase većine proteina mjerenjem njihove pokretljivosti u SDS-poliakrilamidnom gelu.<sup>3</sup>



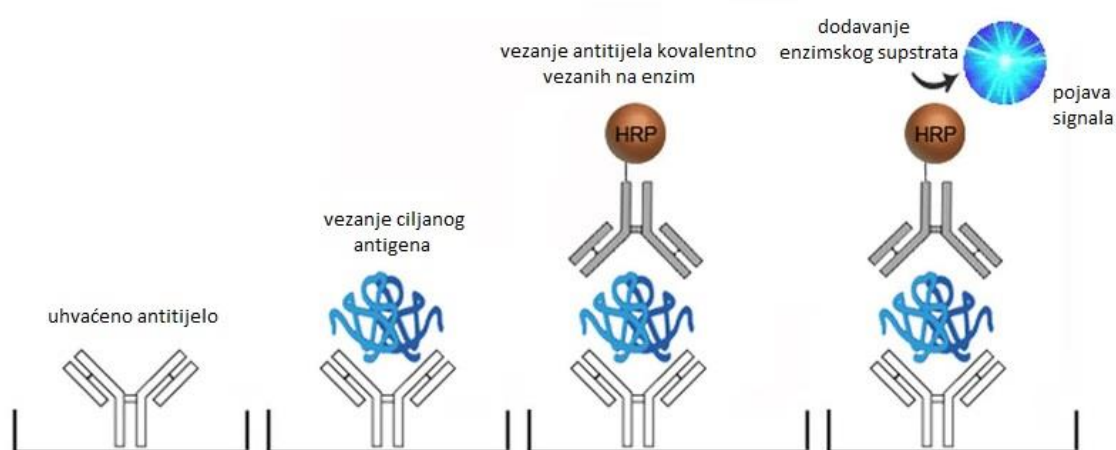
Slika 8. Ilustracija metode koimunoprecipitacije. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>.

Nedostatak metode je taj što zahtijeva veće količine uzoraka za detekciju što je u staničnoj kulturi ponekad teško izolirati. Kako bi ju poboljšali, razvili su metodu koimunoprecipitacije baziranu na mikrosferi koja traži manju količinu uzorka, no ona i dalje pokazuje manju osjetljivost od ostalih metoda iz područja afinitetne kromatografije. Monoklonska i poliklonska antitijela u različitim primjenama pokazuju različite prednosti. Dok poliklonska antitijela omogućuju robusniju detekciju i daju jače signale, monoklonska antitijela vrlo specifično prepoznaju pojedini antigen i smanjuju pozadinski šum.<sup>2</sup>

ELISA je kratica za enzimski imunoadsorpcijski test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*), a osim što se koristi kao kvantitativna metoda za procjenjivanje protein:protein interakcija i analizu inhibitora protein:protein interakcija, koristi se i u medicini kao metoda dijagnoze prisutnosti antigena ili antitijela u uzorku. Postoji nekoliko tipova ELISA metode, a to su: direktna, indirektna, sendvič i kompetitivna ELISA. Naziv sendvič ELISA slikovito opisuje antigen koji se nalazi između dva antitijela.<sup>2</sup>

Analiza se radi na pločici s mikrojažicama zbog lakše pripreme i testiranja. Unutar mikrojažica nalaze se imobilizirane i nekovalentno vezane molekule mamca, odnosno antitijela, i u njih se dodaje otopina lizata stanica koje sadrže molekule plijena. Ako su specifični antigeni za antitijela prisutni, vezat će se za antitijela prisutna na površini jažica. Ispiranjem se uklone

svi antigeni koji se nisu vezali. Zatim se doda otopina antitijela koja kovalentno imaju vezana enzime te se vežu za već vezane antigene, odnosno, vežu se za molekule plijena iz kompleksa mamac-plijen, dok se nevezana antitijela s kovalentno vezanim enzimom isperu kako bismo ih uklonili. Peroksidaza hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) je primjer enzima koji je vezan za antitijelo koji se koristi za detekciju (slika 9). Dodaje se otopina supstrata enzima gdje interakcijom supstrata i enzima kovalentno vezanog na drugo antitijelo dolazi do pojave signala tj. do promjene boje otopine vidljive oku.<sup>2</sup>



Slika 9. Ilustracija metode enzimi imunoadsorpcijski test, ELISA. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>9</sup>.

Problem ove metode predstavlja nekoliko koraka inkubacije molekula te ispiranja koja mogu dovesti do narušavanja slabih interakcija te dugo vrijeme potrebno za izvođenje ove metode.

### 2.3. Genetičke metode

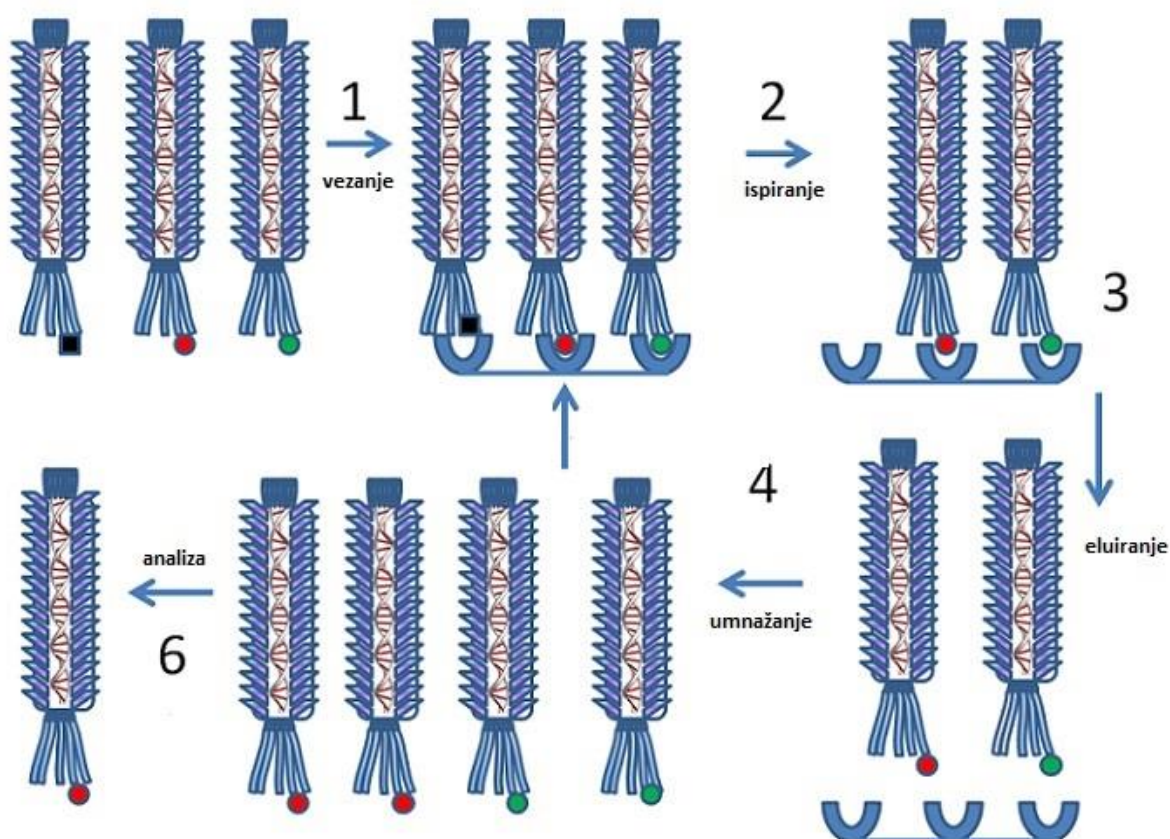
Uz već navedene biofizičke i biokemijske metode, postoje i genetičke metode koje se koriste kao metode istraživanja, između ostalog, i protein:protein interakcija, a neke od njih su i prikaz proteina na česticama bakteriofaga (eng. *phage display*), proteinski čip (eng. *protein microarray*), test dvaju kvašćevih hibrida (eng. *yeast two-hybrid system*) i ostali dvohibridni testovi i mnogi drugi. Rezultati dobiveni genetičkim metodama koji pokazuju novo otkrivene protein:protein interakcije često se potvrđuju biokemijskim metodama.<sup>2</sup>

### 2.3.1. Prikaz proteina na česticama bakteriofaga

Osnovna metoda prikaza proteina na česticama bakteriofaga opisuje nastanak kombiniranog proteina na površini čestica bakteriofaga nakon umetanja strane DNA u gen III bakteriofaga. Ova metoda ima široku primjenu u biomedicini uključujući izolaciju monoklonskih antitijela, mapiranje epitopa antigena uključenih u vezanje antitijela, razvoj modulatora aktivnih mjesta enzima, identifikacije supstrata pojedinih proteaza, pronalazak agonista i antagonista pojedinih receptora, kao i pretraga interakcija proteina.<sup>2</sup>

Za studije interakcije proteina koristi se metoda prikaza proteina na M13 filamentoznom bakteriofagu. DNA slijed koji kodira protein ili peptid ubaci se u gene pIII ili pVIII koji kodiraju proteine membrane bakteriofaga. Na taj način moguće je pripremiti više različitih populacija faga s različitim proteinima ili peptidima na vanjskoj površini bakteriofaga.<sup>2</sup>

Za utvrđivanje koji je od tako eksprimiranih proteina u interakciji s ispitivanim proteinom pripremi se čvrsta površina s imobiliziranim ispitivanim proteinom te se na nju nanese pripremljeni bakteriofazi koji eksprimiraju različite proteine. Bakteriofag koji eksprimira protein koji interagira s ispitivanim proteinom ostane privezan na površini dok se ostali nespecifični bakteriofazi isperu s površine. Vezani bakteriofag se ispere s površine i njime se inficiraju stanice bakterije *Escherichia coli* te se provede njegovo umnažanje i izolira DNA bakteriofaga. Na temelju DNA slijeda identificira se koji protein je u interakciji s ispitivanim proteinom (slika 10).<sup>2</sup>



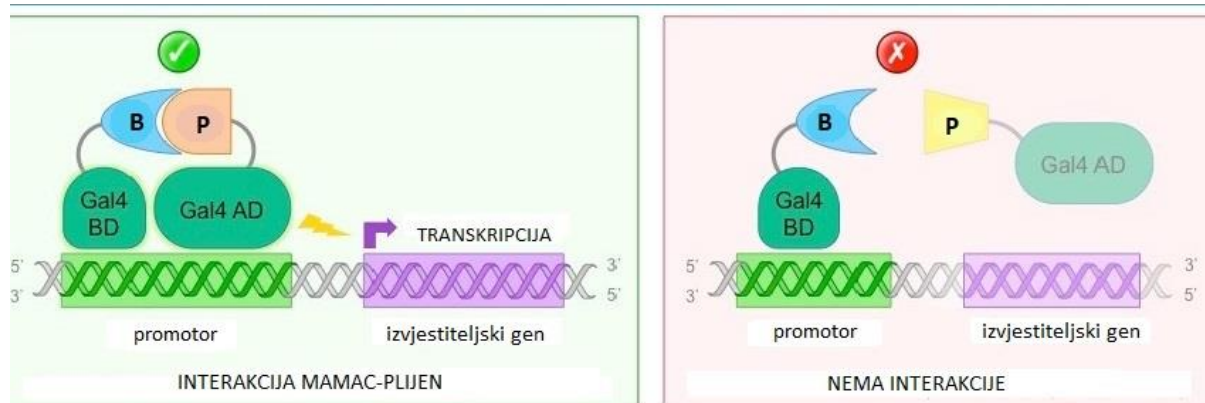
Slika 10. Ilustracija metode prikaza proteina na česticama bakteriofaga. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>10</sup>.

Prednost opisane metode je u kombinaciji proteina s genetskom informacijom unutar pojedinog bakteriofaga što omogućuje brzo određivanje pojedinog bakteriofaga kao i višestruku selekciju koja je znatno osjetljivija u identifikaciji nepoznatih veznih proteina u odnosu na druge metode.<sup>2</sup>

### 2.3.2. Metoda dvaju kvašćevih hibrida i ostali dvohibridni testovi

Metoda dvaju kvašćevih hibrida (eng. *yeast two hybrid*) koristi transkripcijski aktivator kvasaca GAL4 koji ima dvije odvojene domene: DNA-vezujuća domena i aktivacijska domena. Specifičnost koju koristi metoda je u tome što je GAL4 transkripcijski faktor funkcionalan samo kada su te dvije domene u neposrednoj blizini.<sup>2</sup>

Na osnovu tih saznanja predstavljena je nova metoda za ispitivanje interakcije proteina. Ispitivani proteini se spajaju na domene te ako dođe do interakcije proteina dolazi do transkripcije GAL1-lacZ gena koji je moguće analizirati mjerenjem aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze.



Slika 11. Ilustracija metode dvaju kvašćevih hibrida. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>11</sup>.

Nedostaci ove metode su u tome što je potrebna translokacija proteina u interakciji u jezgri što nije prikladno za membranske proteine i proteine lokalizirane u unutarstaničnim odjeljcima. Metoda također nije prikladna za transkripcijske aktivatore zbog mogućnosti spontane aktivacije transkripcije neovisno o interakciji ispitivanih proteina. Isto tako, metoda ne može detektirati interakcije proteina uključenih u post-translacijske modifikacije koje se ne odvijaju u kvascu. Zbog nedostatka metode dvaju kvašćevih hibrida razvile su se dodatne inačice dvohibridnih testova kako bi se proširila primjena.<sup>2</sup>

Za detekciju interakcija s proteinima aktivatorima transkripcije razvijena je metoda potisnutog sistema transaktivatora. U ovoj metodi automatski aktivator protein se veže za DNA vezujuću domenu GAL4, a ispitivani protein se veže za represijsku domenu transkripcijskog represora TUP1 te na taj način prilikom interakcija dva proteina dolazi do represije gena. Za detekciju interakcija regulacijskih proteina RNA-polimeraze II koristi se RNA-polimeraza II (Pol II) test u kojem je ispitivani protein vezan za  $\tau$ p koji može aktivirati RNA-polimerazu III.<sup>2</sup>

*Sos recruitment system* (SRS) metoda koristi Ras signalni put umjesto transkripcijske regulacije na način da se protein veže za Sos, a ispitivani protein se veže za peptid koji usmjerava protein u membranu. Interakcijom dva proteina dolazi do lokalizacije Sos u membrani i aktivacije Ras signalnog puta što dopušta Cdc25-2 temperaturno osjetljivom soju bakterija rast na



ograničavajućim temperaturama. S obzirom da ova metoda ne koristi transkripciju za očitavanje rezultata, moguće je s ovom metodom provesti ispitivanje interakcija koje uključuju transkripcijske aktivatore ili represore. Također, moguće je ispitivati proteine koji nisu pogodni za ulaz u jezgru ili prolaze post-translacijske modifikacije u citoplazmi.<sup>2</sup>

G protein metoda koristi G protein na koji se veže ispitivani protein lokaliziran na membrani. Nakon interakcije s ciljanim proteinom dolazi do pekada u signalizaciji G proteina i smanjenje transkripcijskih događanja.<sup>2</sup>

Za analizu interakcija izvanstaničnih i trans-membranskih proteina razvijena je SCINEX-P metoda. Ispitivani protein vezan je za Ire1p i u interakciji s ispitivanim proteinom dolazi do dimerizacije Ire1p što aktivira signal koji dovodi do aktivacije izvjestiteljskog gena ovisnog o Hac1p.<sup>2</sup>

Bakterijski dvo-hibridni test nudi mnoge prednosti u odnosu na kvasce uključujući povećanje osjetljivosti zbog izostanka endogenih proteina koji se mogu vezati kompeticijski s ispitivanim proteinima, a tu su i lakoća korištenja, izostanak staničnih odjeljaka i brzo vrijeme rasta sojeva bakterije *Escherichia coli*.<sup>2</sup>

Dvohibridni test stanica sisavaca prikladan je zbog analize interakcija proteina u nativnom fiziološkom okruženju i odgovarajuće post-translacijske modifikacije proteina. Jedan od pristupa koristi interakciju između dva proteina za aktiviranje JAK-STAT signala i transkripciju gena povezanog sa STAT-ovisnim promotorom.<sup>2</sup>

U fluorescentnom dvohibridnom testu protein je obilježen fluorescirajućim biljekom, vezan na lac represor i imobiliziran. Interakciju s ispitivanim proteinom moguće je vizualno pratiti i analizirati interakcije unutar različitih unutarstaničnih odjeljaka, uključujući jezgru i mitohondrije u realnom vremenu.<sup>2</sup>

### 2.3.3. Proteinski čip

Metoda dopušta simultanu provjeru tisuća proteina poredanih u velikoj gustoći na čvrstu podlogu. Na taj način moguće je proučavati biokemijska svojstva i aktivnost svih proteina koje pojedina stanica može proizvesti unutar jednog pokusa. Osnova izrade proteinskog čipa sastoji se u kloniranju gena za mnogobrojne stanične proteine, pročišćavanju proteina te vezanju pročišćenih proteina na pločicu (čip). Ova metoda korištena je za identifikaciju proteina koji stupaju u interakcije s kalmodulinom u detekciju na osnovu fluorescencije.<sup>2</sup>

Neke od specifičnosti ove metode su i izrada opsežne knjižice sojeva ekspresijskih klonova, te su do sada izrađeni proteinski čipovi za kvasce, bakteriju *Escherichia coli*, koronavirus, biljku *Arabidopsis thaliana* i čovjeka. Rezultira visoko učinkovitim proizvodnjom proteina uključujući ekspresiju i pročišćavanje. Standardni pristup uključuje kloniranje, ekspresiju, pročišćavanje i imobilizaciju proteina što je dugotrajan i radno intenzivan postupak te postoje problemi sa topivosti, sklapanjem ili gubitkom native post-translacijske modifikacije proteina. Zbog toga je razvijen sustav koji pronalazi ekspresijske plazmide i koristi ekspresijski sistem sisavaca bez potrebe za stanicom za ekspresiju i imobilizaciju proteina *in situ* bez potrebe za pročišćavanjem. Pri imobilizaciji proteina važno je obratiti pažnju na strukturu proteina i koristiti metode koje ne utječu na aktivnost ili orijentaciju proteina prilikom vezanja jer su proteini molekule sa trodimenzijskom strukturom koja je kritična za njihovu funkciju. Prilikom detekcije moguće je korištenje brojnih metoda za očitavanje što uključuje fluorescenciju, radioaktivnost, kemijsku luminescenciju, enzimsku amplifikaciju signala, masenu spektrometriju i brojne druge.<sup>2</sup>

## 2.4. Zaključak

Protein:protein interakcije su sveprisutne, ljudski organizam ih sadrži na stotine tisuća, a većina ih tek treba biti detektirana i istražena. Područje otkrivanja novih protein:protein interakcija nudi brojne mogućnosti usmjerene prema boljem razumijevanju ljudskog organizma, odnosno, rješavanju detaljnih mehanizama svih kemijskih i bioloških procesa. Ostalo je još mnogo neodgovorenih pitanja, nepoznatih mehanizama i neotkrivenih interakcija proteina. Samim time, otvaraju se nova vrata i mogućnosti prilikom otkrivanja i kreiranja novih lijekova, ili poboljšanja postojećih lijekova u farmaciji i medicini. Budući se ima još mnogo toga za otkriti, područje protein:protein interakcija nudi još mnogo toga za istražiti, kao i velike nade za budućnost.

Od navedenih metoda, bilo biofizikalnih, biokemijskih ili genetičkih, svaka nudi mogućnosti i određene specifičnosti, posjeduje određene prednosti, ali i nedostatke. Dok neke otkrivaju nove protein:protein interakcije, druge potvrđuju prisutnost postojećih i već poznatih. Kako niti jedna metoda nije savršena, ograničenja pojedinih metoda mogu dovesti do krivih rezultata pa je za dobivanje najpouzdanijih rezultata validacije protein:protein interakcija najbolje koristiti metode bazirane na analitičkim tehnikama ili kombinaciju metoda baziranih na različitim područjima znanosti. Danas sve više raste interes znanstvenika za ovo područje, a time i broj otkrivenih protein:protein interakcija koje, osim što mogu biti pronađene u javno dostupnim bazama podataka, mogu predstavljati i nova važna otkrića.

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, i L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 6-10, 25-28, 34-51
2. Mi Zhou, Qing Li, and Renxiao Wang, *Current Current Experimental Methods for Characterizing Protein-Protein Interactions*, ChemMedChem, **11**, 2016., str. 738-756
3. P. Karlson, *Biokemija za studente kemije i medicine*, Školska knjiga, Zagreb, 1993., str. 1-2, 46-49
4. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh, P. Matsudaira, *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008., str. 32-38
5. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013., str. 1-30
6. <https://procomcure.com/cms/index.php/interaction-validation/> (preuzeto 26.08.2018.)
7. <https://www.creative-biostructure.com/maghelix%E2%84%A2-isothermal-titration-calorimetry-itc-14.htm> (preuzeto 26.08.2018.)
8. <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry> (preuzeto 26.08.2018.)
9. [https://www.researchgate.net/publication/311583928\\_Lateral\\_Flow-Based\\_Enzyme-Linked\\_Immunosorbent\\_Assay\\_as\\_a\\_Point-of-Care\\_Technique\\_to\\_Predict\\_Type\\_I\\_Reversal\\_Reactions\\_in\\_Lepromatous\\_Patients](https://www.researchgate.net/publication/311583928_Lateral_Flow-Based_Enzyme-Linked_Immunosorbent_Assay_as_a_Point-of-Care_Technique_to_Predict_Type_I_Reversal_Reactions_in_Lepromatous_Patients) (preuzeto 26.08.2018.)
10. [https://en.wikipedia.org/wiki/Phage\\_display](https://en.wikipedia.org/wiki/Phage_display) (preuzeto 26.08.2018.)
11. <http://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b4-medicine/yeast-2-hybrid-system.html> (preuzeto 26.08.2018.)