Двугибридный анализ

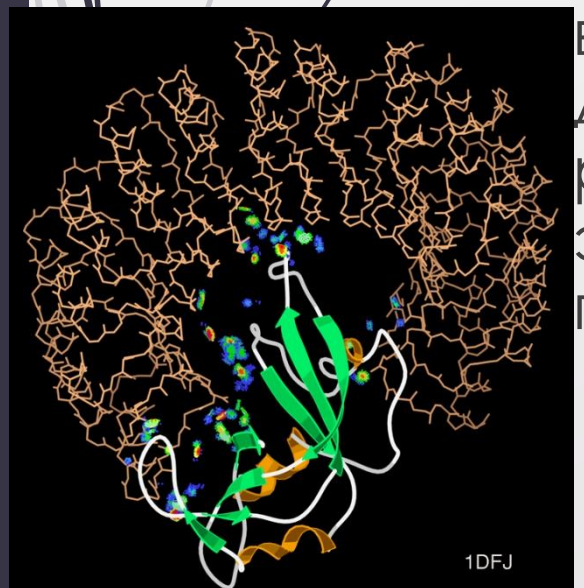
Выполнено студентами 01-705гр

Свитко С., Муллакаева А.

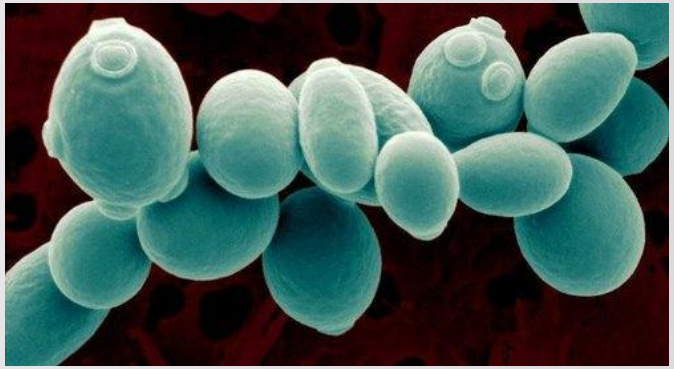
Двугибридный анализ

- **Двугибридный анализ** — молекулярно-биологический метод для исследования белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий.

- **Белок-белковые взаимодействия (ББВ)** — обладающие высокой специфичностью физические контакты между двумя и более белками. Эти контакты образуются в результате биохимических событий с помощью электростатических взаимодействий, в том числе гидрофобного эффекта



История метода

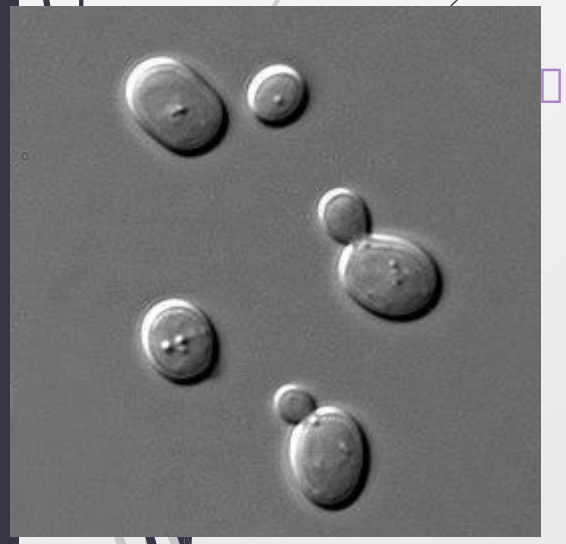


- В **1989** г. в *Proteomics journal* была опубликована **статья**, где впервые был описан новый метод для обнаружения белок-белковых взаимодействий с помощью активатора транскрипции **GAL4** в дрожжах Saccharomyces cerevisiae (пекарские дрожжи).
- За 2 года до этого был разработан **первый набросок**, описывающий идею практического применения разделения ДНК связывающего и активационного доменов белка GAL4.

История метода

- Начиная с конца 80х годов XX века, метод активно развивался и адаптировался.
- Помимо *Saccharomyces cerevisiae* в исследованиях стали использовать использовать *Escherichia coli* («кишечная палочка»).
- С помощью этого метода стало возможно исследовать не только пары белков, но **и мульти-белковые комплексы и белково-нуклеотидные взаимодействия**

Идея метода

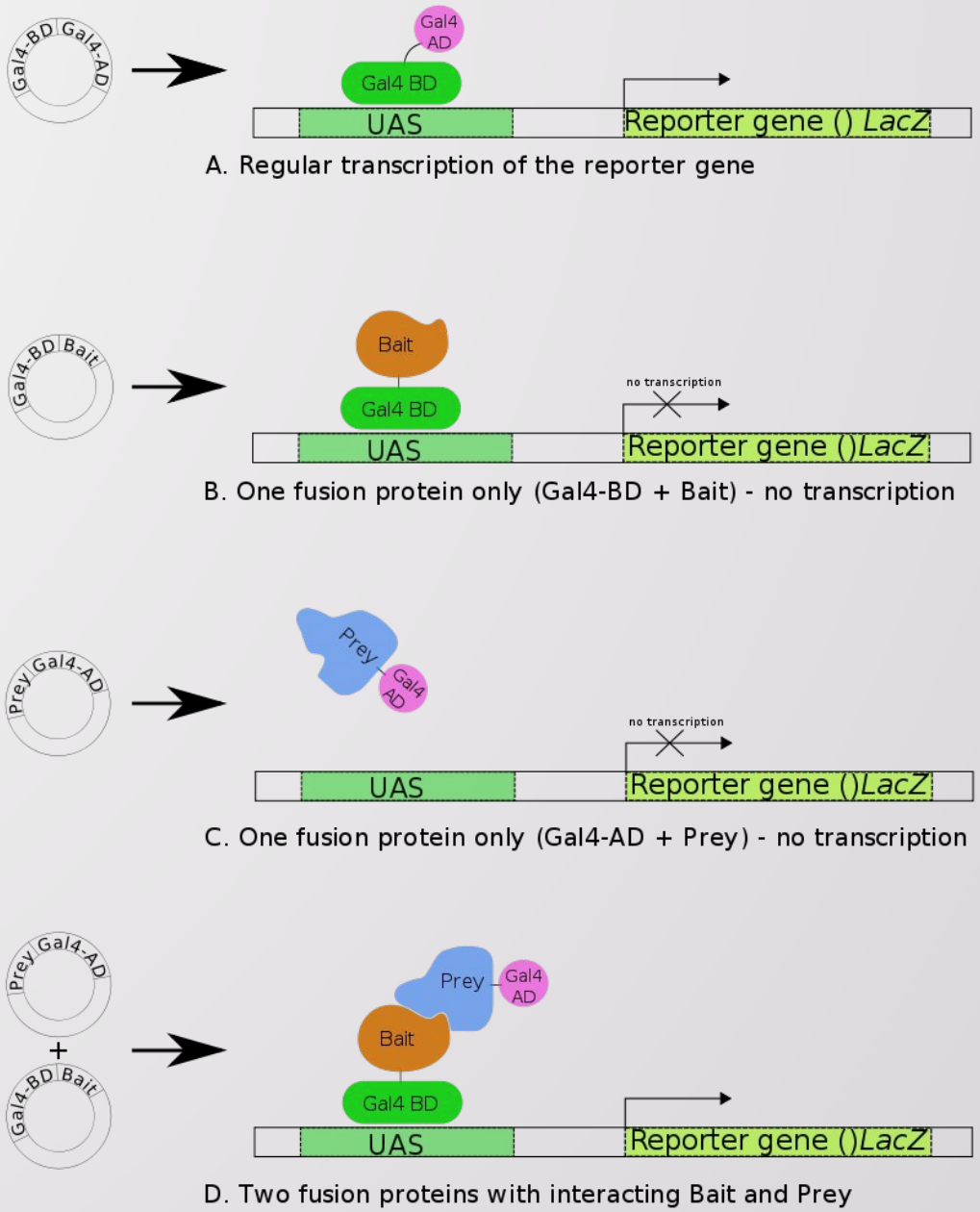


- Базовый компонент дрожжевой двугибридной системы это активатор транскрипции **GAL4**, эндогенно экспрессируемый белок длиной в 881 а.о. Содержит **ДНК-связывающий** (1-147 а.о.) и **активирующий** (771—881 а.о.) домены.
- Для проверки взаимодействия между белком А и Б делают **химеры** А-ДНК-связывающий домен (СД) и Б-активирующий домен (АД). В составе химерных белков домены сохраняют свои функции. Находясь в непосредственной близости, возможно обусловленной взаимодействием между белками А и Б, воссоздается исходная функция белка GAL4, и происходит активация репортерного гена

Идея метода

- При дрожжевом двугибрином скрининге часто используются генетически модифицированные штаммы дрожжей, в которых биосинтез некоторых питательных веществ (как правило, аминокислот или нуклеиновых кислот) отсутствует. В мутантный штамм дрожжей вводится чужеродная ДНК в форме плазмиды. Как правило, плазмиды, кодирующие АД- и СД- химерные белки вводятся в клетку раздельно. Чаще всего, слитый с СД белок является заранее известным белком, к которому ищется потенциально новый партнер, и плазмида, кодирующая данный химерный белок, изначально вводится во все клетки. Слитый с АД белок является либо единичным белком, либо целой библиотекой возможных партнеров, которая может быть представлена всеми белками, экспрессируемыми в конкретном организме, или же может быть получена путём синтеза случайных последовательностей ДНК. Независимо от источника, будет получен набор плазмид, которые позже будут трансфицированы в клетки. Методы с использованием библиотеки предполагают попадание всего одной пары плазмид в исследуемую клетку, тем самым каждая клетка выражает не более одного белка из библиотеки
- При успешном взаимодействии А и Б, АД и СД факторы становятся опосредованно связаны, и АД оказывается в непосредственной близости от сайта начала транскрипции репортерного гена. При отсутствии взаимодействия нет и транскрипции. Следовательно, успешное взаимодействие связано с изменением клеточного фенотипа

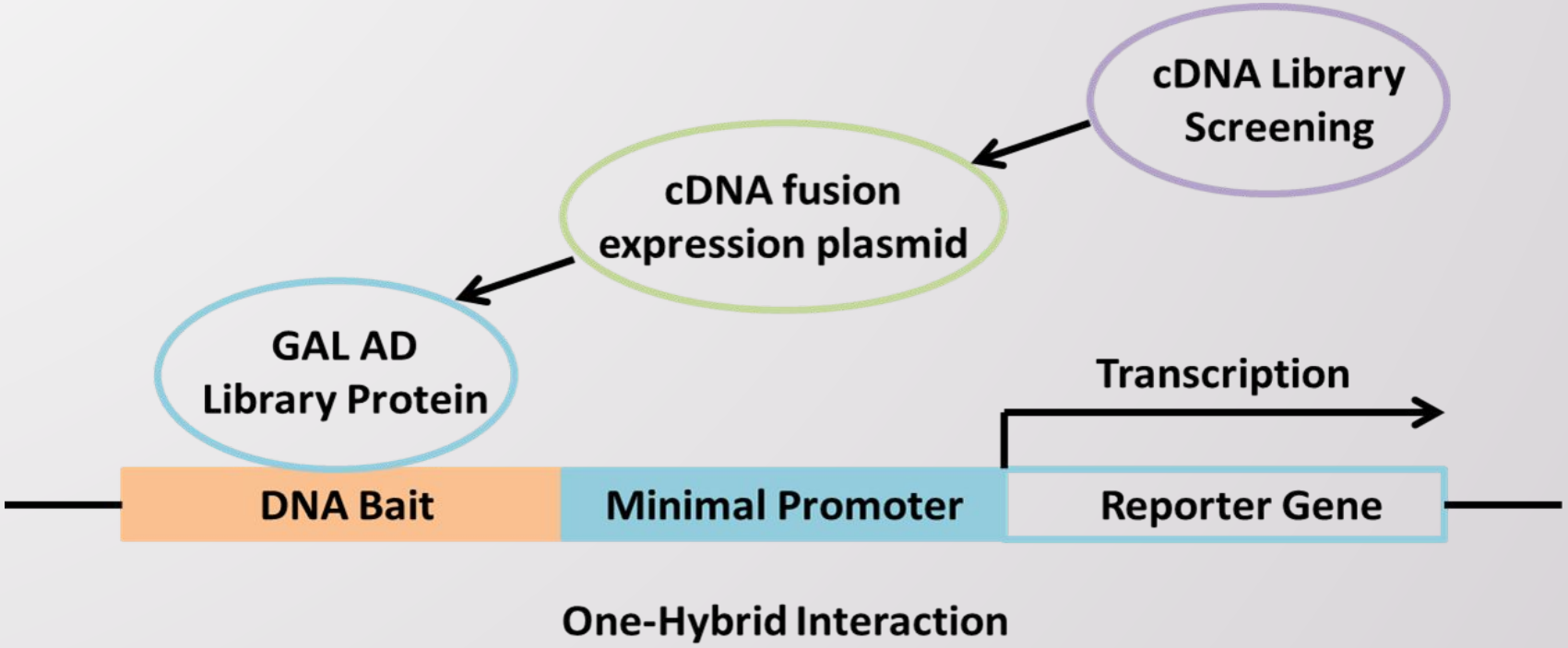
Идея метода


Gal4-BD
Gal4-AD
Gal4 AD
Gal4 BD
UAS
Reporter gene () LacZ
A. Regular transcription of the reporter gene
Gal4-BD
Bait
Bait
Gal4 BD
no transcription
UAS
Reporter gene ()LacZ
B. One fusion protein only (Gal4-BD + Bait) - no transcription
Prey
Gal4-AD
Prey
Gal4 AD
no transcription
UAS
Reporter gene ()LacZ
C. One fusion protein only (Gal4-AD + Prey) - no transcription
Prey
Gal4-AD
+
Gal4-BD
Bait
Prey
Gal4 AD
Bait
Gal4 BD
UAS
Reporter gene ()LacZ
D. Two fusion proteins with interacting Bait and Prey

Вариации двугибридной системы

- **Одногибридная система**

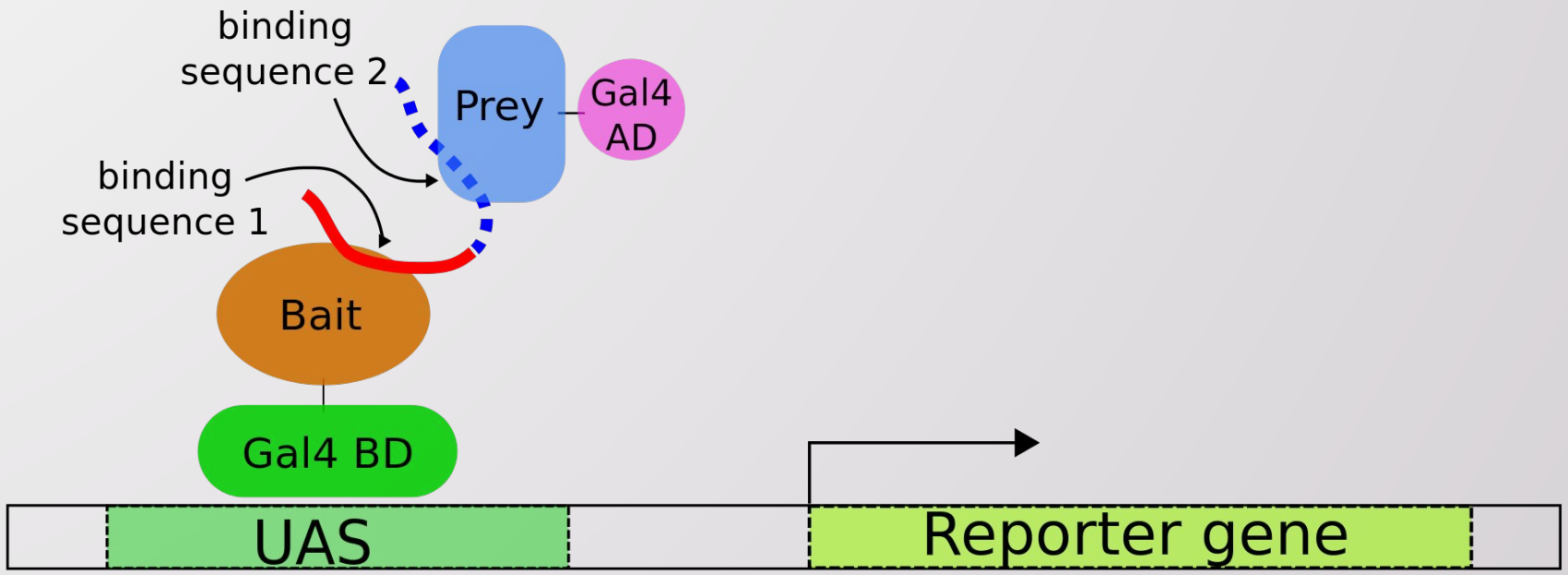
Одногибридная система представляет собой способ для идентификации ДНК-белковых взаимодействий. АД заранее связан с СД, однако участок для посадки СД является случайным набором нуклеотидов. Кроме того, СД может быть представлен библиотекой ДНК-связывающих доменов. Если ДНК-связывающий домен взаимодействует с потенциальным участком связывания целевой ДНК, то АД будет активировать транскрипцию репортерных генов. Выбор ДНК-связывающих доменов, не ограничивается использованием одногибридной системы, и может быть выполнен с использованием двугибридной системы, в которой ДНК-связывающий домен различен, а А, Б белки и АД постоянны.



Вариации двугибридной системы

- **Тригибридная система**

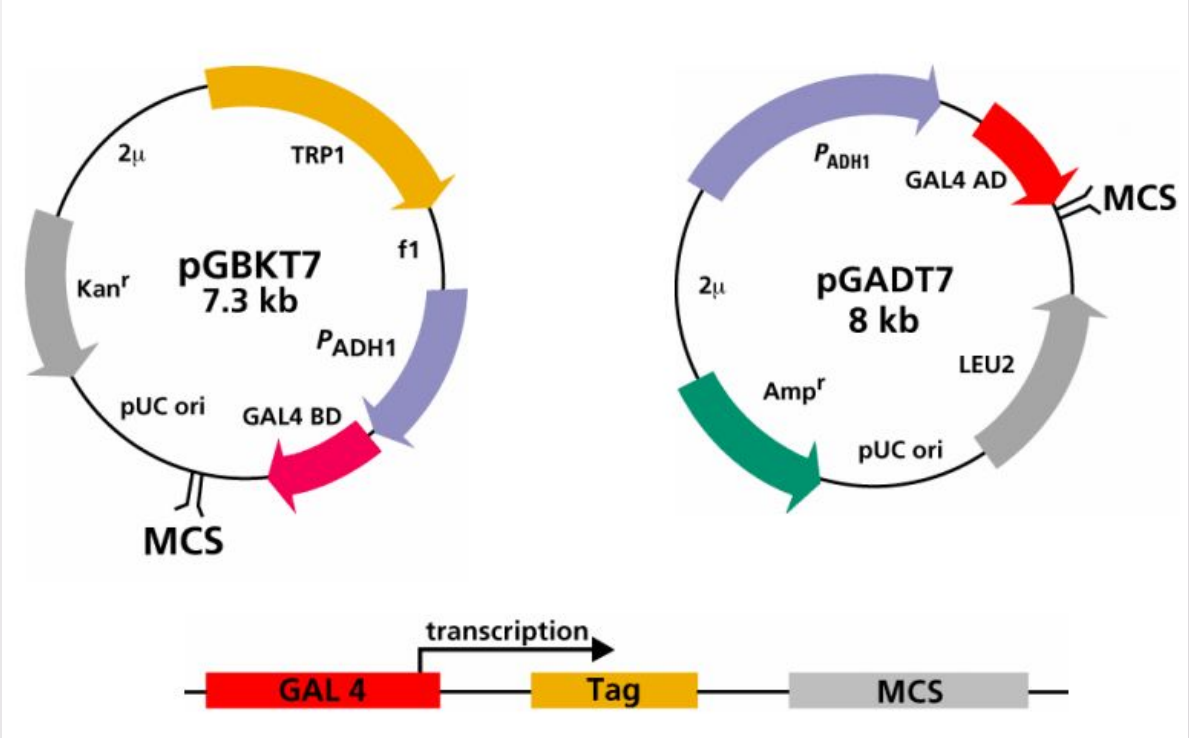
Исследование РНК-белковых взаимодействий привело к появлению «тригибридных систем». В данной системе белки А и Б являются РНК-связывающими белками и вовсе не обязаны взаимодействовать между собой. Молекулы РНК используются в качестве линкера РНК-связывающих белков или доменов, тем самым обеспечивая близость активационного и ДНК-связывающего доменов.



Вариации двугибридной системы

- **«Одно-дву-гибридная» система**

Прогрессивные исследования породили новый «одно-дву-гибридный» подход для скрининга библиотек для выявления новых факторов транскрипции. Одновременное использование одногибридной и двугибридной системы увеличивает точность получаемых результатов, и уменьшит количество ложных срабатываний.

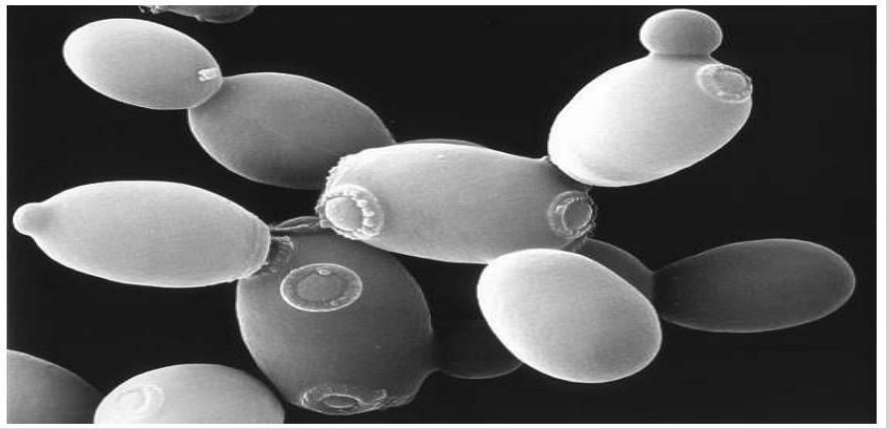


Клеточные линии, пригодные для двугибридного анализа

Любая живая клетка может быть использована для двугибридой системы, однако имеются практические соображения о дешевизне и устойчивости выбранной клеточной линии

- ***S. Cerevisiae (пекарские дрожжи)***

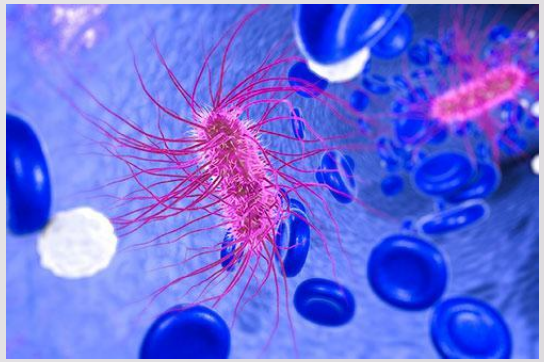
Исторически первым для двугибридной системы организмом являются дрожжи. Дрожжи стабильный, простой и хорошо изученный модельный организм. Дрожжевые клетки поддерживают нейтральные значения pH внутри клетки, несмотря на кислые pH во внешней среде. Также дрожжи слабочувствительны к внеклеточным токсинам, ими можно манипулировать, не используя молекулярных методов.[4] Важно отметить необходимость сигналов ядерной локализации, так как весь генетический аппарат дрожжей локализован в ядре. При их отсутствии потенциально взаимодействующая пара белков не будет транслирована и не провзаимодействует.



Клеточные линии, пригодные для двугибридного анализа

- ***E. coli***

Бактериальные системы могут быть использованы аналогично дрожжевым. Они имеют заведомо больший потенциал и являются более предпочтительными для использования двугибридной системы. Бактериальные системы позволяют использовать и анализировать библиотеки размером больше 108, имеют более быстрый темп роста и больший потенциал для проницаемости небольших молекул. Так же отсутствует необходимость в сигналах ядерной локализации, и появляется возможность изучать белки, токсичные для дрожжей. Ввиду более быстрых селективных методов обеспечивается низкий уровень ложных результатов (3·10−8)



Клеточные линии, пригодные для двугибридного анализа

- Так же в последние годы была разработана двугибридная система для изучения белок-белковых взаимодействий, характерных для млекопитающих (так называемая «mammalian two hybrid (**M2H**) system»).
- ***Arabidopsis thaliana***

В 2005 году была разработана система двугибридного анализа растений, с использованием протопластов (protoplast two hybrid (**P2H**) system).

- ***Aplysia californica***

Aplysia californica – модельный организм для изучения долговременной памяти в нейробиологии. Для исследования белковых взаимодействий в нервной системе, так же применяется двугибридный метод (на нейронах)

- ***Bombyx mori***

Двугибридный анализ для изучения насекомых

(insect two-hybrid (I2H) system)

Применение двугибридной системы

- **Определение функции белка**

При исследовании взаимодействия белков, возможно выявление новых функций. С помощью одного известного белка A_0, библиотеки неизвестных белков B_n, и последующего сравнения с предварительно известной парой взаимодействующих белков A_0B_0 можно получить информацию о схожести B_n и B_0. Похожие данные можно получить путём исследования взаимодействий известной библиотеки белков с одним белком с неизвестной функцией.

- **Определение важных для взаимодействия аминокислотных остатков**

Одна из наиболее популярных областей применения двугибридной системы. У заранее известной и взаимодействующей пары белков зачастую необходимо определить аминокислотные остатки, формирующие данное взаимодействие. При формировании библиотеки с точечными изменении аминокислотных остатков и использованием двугибридной системы появляется возможность определить их важность для взаимодействия с белком-партнером

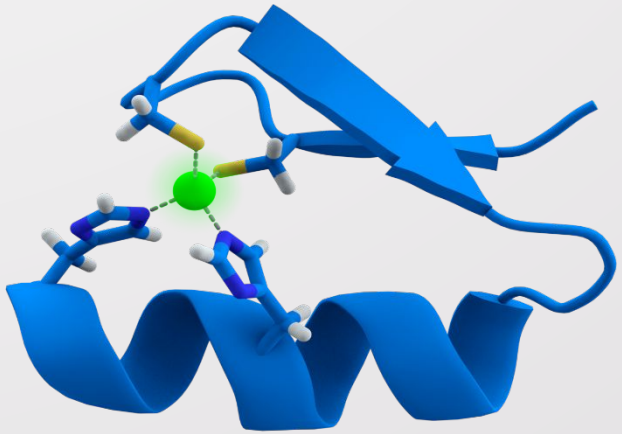
Применение двугибридной системы

- **Практическое применение**

При создании лекарств часто возникает проблема побочных эффектов. Двугибридная система может использоваться для тестирования специфичности и точности доставки лекарств. Аналогичный подход используется и для токсинов и ядов.

- **«Цинковые пальцы»**

Для выбора цинковых пальцев (ZPF) с успехом применяется метод двугибридного анализа. Основой подхода является создание библиотеки случайных ZPF (случайное изменение определенных аминокислотных остатков) и выбор тех, которые осуществляют связывание с UAS областью. Каждый ZFP обычно распознает только 3-4 пары оснований, поэтому для точного, локального связывания используется система из заранее известных ZPF, которые связываются по краям необходимой области и предотвращают связывание вне UAS



***Цинковый палец** (англ. *zinc finger*) — тип белковой структуры, небольшой белковый мотив, стабилизированный одним или двумя ионами цинка, связанными координационными связями с аминокислотными остатками белка. Как правило, цинковый палец включает около 20 аминокислот, ион цинка связывает 2 гистидина и 2 цистеина. Цинковые пальцы являются белковыми модулями, взаимодействующими с ДНК, РНК, другими белками или небольшими молекулами.

Заключение

Сильные стороны метода

- Двугибридный анализ не требует специального дорогостоящего оборудования и может быть выполнены в любой лаборатории.
- Двугибридный анализ является основным предварительным методом идентификации партнеров по взаимодействию.
- Двугибридный анализ можно проводить с целыми библиотеками, что говорит о масштабности и одновременно возможности автоматизации метода.

Недостатки метода

- Основным и почти единственным недостатком является возможность большого количества ложных положительных и ложных отрицательных результатов. Существует большое количество причин, которые могут вызвать неспецифическое связывание или, наоборот, подавить экспрессию. Вероятность получения ложных результатов означает, что все полученные данные должны быть подтверждены более точными методами анализа, например коиммунопреципитацией белков. Так же возможно использование нескольких двугибридных систем или параллельный биоинформатический анализ.

Список использованной литературы

- https://en.wikipedia.org/wiki/Two-hybrid_screening#Basic_premise
- *Fields S.* Interactive learning: Lessons from two hybrids over two decades 2009
- *Young K.* Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. (англ.) // Biol Reprod : journal. — 1998.
- *Joung J., Ramm E., Pabo C.* A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America : journal. — 2000