

Biológiai mechanizmusok mélyreható elemzése az újgenerációs interaktomika használatával

Zámbó Boglárka, Gógl Gergő

Département de Biologie Structurale Intégrative,
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC),
INSERM U1258/CNRS UMR 7104/Université de Strasbourg,
Illkirch, France

Összefoglaló

Az interaktomika célja a sejtek szövevényes kölcsönhatási hálójának feltárása, hogy ezáltal fényt deríthessünk alapvető biológiai mechanizmusokra. A hagyományos interaktomikai módszerek azonban csak kvalitatív betekintést nyújtanak a sejt hálózatokba, mivel nem képesek meghatározni a modellezéshez szükséges biofizikai paramétereket. Az újgenerációs interaktomika ma már példátlan pontossággal képes meghatározni ezeket a paramétereket, és segítségével feltárhatóak a komplex biológiai folyamatok kritikus komponensei. Jelen munkában bemutatjuk a klasszikus módszerek korlátait és összehasonlítjuk az elmúlt években megjelent innovatív technikákat, melyek a korábbi kihívásokat hivatottak leküzdeni. Részletezzük továbbá legújabb, nagy áteresztőképességű biofizikai módszereinket, amelyek mind az úgynevezett *holdup* technikán alapulnak, és amelyek lehetővé teszik a biofizikai paraméterek kvantitatív térképezését akár a teljes proteomon. Példákkal illusztrálva megmutatjuk, hogyan használhatóak ezek a technikák különféle kulcsfontosságú biológiai kérdések megválaszolására, mint a biológiai hálózatok architektúrájának feltárása és a betegségekhez köthető hálózati elemek azonosítása. Ugy véljük, hogy ezek az új eszközök hamarosan lehetővé fogják tenni a biológiai rendszerek pontos modellezését, mélyebb betekintést engedve sejt mechanizmusokba.

Kulcsszavak: interaktomika, hálózatok, kvantitatív, affinitás, betegség, holdup

Molecular insight into biological mechanisms with new-generation interactomics

Interactomics aims to decipher our cells' intricate web of interactions to shed light on fundamental biological mechanisms. However, traditional interactomics approaches provide mainly qualitative snapshots of cellular functions failing to precisely capture the biophysical parameters needed for accurate interaction network modeling. New-generation interactomics can now determine these parameters with unprecedented accuracy and can uncover critical factors in complex biological processes. In this work, we explore the limitations of classical methods and compare new strategies that have emerged in the past years to overcome these challenges. We present our recent high-throughput biophysical interactomics methods, based on the so-called *holdup* technique, which enable the comprehensive determination of quantitative parameters across the proteome. Through examples, we show how these techniques can answer key biological questions, such as decoding the fundamental architecture of biological networks and identifying key components linked to disease. We believe that these revolutionary tools will soon allow the precise modeling of biological systems, providing deep insights into cellular mechanisms.

Key words: interactomics, networks, quantitative, affinities, disease, holdup

Bevezetés

A sejtjeinkben zajló folyamatokat a jelenlévő molekulák nem-kovalens, átmeneti kölcsönhatásai irányítják. Ahhoz, hogy megértsük hogyan működik egy sejt, minél pontosabb képet kell kapnunk ezen molekulák kölcsönhatási hálózatáról. A molekulák kölcsönhatásait nagyskálán vizsgáló tudományterület az interaktomika. Noha a klasszikus interaktomika már több tízezer interakció jelenlétét sikeresen feltárta, véleményünk szerint nem alkalmas nagyfelbontású és reprodukálható adatot szolgáltatni sejtjeink működésének megbízható modellezéséhez.

Összehasonlítva a jelenlegi klasszikus interaktomikai adatbázisokat, azokban mindössze 25% átfedést találunk a már leírt interakciók között [1]. Ebben az összefoglaló cikkben részletezzük, hogy mik az okai ennek a különbségnek, és bemutatjuk, hogy az újgenerációs interaktomikai technikák, mint például az általunk fejlesztett különféle ún. *holdup* alapú módszerek hogyan képesek megoldást nyújtani a klasszikus interaktomika problémáira, és hogy milyen új dimenziókat nyithatnak ezek a kutatók számára a jövőben.

Az interaktomika módszertára hosszú évtizedekig viszonylag változatlan maradt és a klasszikus interaktomika lényegében két fő módszer típusra épült. Az első valóban interaktomikai módszerek a kettős-hibrid típusú rendszerek voltak, mint például az élesztő kettős-hibrid, ahol a megfelelő címkével ellátott interakciós partnereket ugyanabban a sejtben fejezzük ki és az interakció létrejötte egy riportter gén expressziójához vezet [2]. A módszer adaptálható nagyméretű kombinatorikus könyvtárakra is, lehetővé téve az interakciók feltérképezését akár a teljes fehérjekészleten (ún. proteom-szintű vizsgálatok) [3]. A másik fő módszer típus az úgynevezett *pulldown*, avagy lehúzásos kísérletek [4]. A *pulldown* kísérletek lényege, hogy egy csali molekulát specifikusan kihorgonyozunk egy szilárd hordozóra, ami általában egy valamilyen módon funkcionális agaróz gyanta, majd mosási lépéseket követően a csalival együtt feldúsult fehérjéket, azaz a prédákat, azonosítjuk. A módszer legklasszikusabb képviselője az immunoprecipitáció, amely során egy antitesttel funkcionális gyantát használunk, hogy a sejt kivonatból az antitest által felismert fehérje kölcsönható partnereit azonosítsuk. Mivel minden egyes csali esetén külön antitestre lenne szükség az immunoprecipitáció kivitelezéséhez, ez a módszer alkalmatlan proteom-szintű interaktomikai munkákhoz. Ezt a korlátot kiküszöbölve fejlesztették ki az tömegspektrometria-kapcsolt affinitás tisztítást (affinity purification, coupled to mass spectrometry, AP-MS), ahol a csali fehérjét egy adott címkével ellátva fejeznek ki a sejtben és a prédákat tömegspektrometria segítségével azonosítják, lehetővé téve a nagyskalás interaktomikai kísérletek elvégzését [5,6].

1. táblázat

<i>Kísérlet</i>	<i>Mit mér?</i>	<i>Főbb limitáció</i>
kettős-hibrid	Fehérje párok közti intrinzik kölcsönhatást	A fehérjék koncentrációja és a kölcsönhatások detekciós határa ismeretlen
pulldown	Csali fehérjén keresztül kikötődő fehérjék mennyiségét	A mosási lépések nagymértékben befolyásolják a komplexek mennyiségét
ko-frakcionálás	Együtt szeparálható fehérjekomplexeket azonosít	Számos tranziens komplex a ko-frakcionálás során disszociál
proximitás jelölés	Csali környezetében előforduló fehérjéket azonosítja	Sok fehérjét partnerként azonosít, akik csak hasonlóan lokalizálódnak
fág-bemutató	Csalihoz kötődő peptid ligandumokat azonosítja	Tisztított csali fehérje szükséges a méréshez
holdup	Csali interakcióinak intrinzik affinitását	Tisztított csali fehérje szükséges a méréshez

Mindkét módszer ugyanolyan típusú eredményre vezet, egy listát kapunk azokról a fehérjékről, akik „kötnék” egy bizonyos másik fehérjéhez, illetve jó esetben egy listát azokról a fehérjékről is, akik „nem kötnek”, egy bizonyos detekciós küszöbérték mellett. De mit is jelent az, hogy

„köt” vagy „nem köt”? Noha a két módszer esetén ugyanazt a kifejezést alkalmazzuk az észlelt interakciókra (A köti B-t, vagy A nem köti B-t), a két fő interaktomikai módszertípus természetükben eltérő eredményeket szolgáltat [7] (1-es táblázat). Egyrészt, míg a kettős-hibrid típusú kísérletek csupán a direkt interakciókat mutatják ki, addig a *pulldown* típusú kísérletekkel olyan indirekt kölcsönhatások is detektálhatóak, amik egy harmadik félen keresztül tudnak létrejönni. Másrészt, a két módszer az interakciók más tulajdonságait méri. A makromolekulák interakciói döntően reverzibilisek, gyenge kötési állandókkal és gyors kötési kinetikával rendelkeznek. Ennek következményeképpen a legtöbb sejtes interakció nem sztöchiometrikus, hanem a tömeghatás törvénye határozza meg a létrejövő komplexek koncentrációját, ami a partnerek koncentrációjától is függ. A kettős-hibrid módszerek esetén a partnerek koncentrációja nagyjából állandó értéken van tartva, és a riporter gén expresszió attól függ, hogy ebben a koncentráció tartományban létre tud-e jönni komplexképződés. Ezáltal, ezek a típusú kísérletek leginkább az interakciók *intrinzik* tulajdonságait vizsgálják. Ilyen *intrinzik*, a molekulák természetéből fakadó tulajdonság például az affinitásuk egymással szemben. Ezzel szemben a *pulldown* kísérletek a komplexek mennyiségét próbálják meghatározni, ami egy *extrinzik*, azaz az *intrinzik* tulajdonságok által befolyásolt, de időben, térben és más külső paraméterek mellett változó tulajdonság. Éppen ebből a sajátságból is fakadóan a tömegspektrometria-kapcsolt affinitás tisztítás módszere kevésbé reprodukálható, nagyban függ az adott sejtkivonat tulajdonságaitól, valamint a mosási lépések intenzitásától. Sajnos, általában egyik módszer esetén sincs információnk a detekciós küszöbértékről, mely fölött az adott interakciót létezőnek tekintjük (legyen akár szó affinitás küszöbértékről vagy a komplex koncentrációjának küszöbértékéről), és mivel mindkét módszer viszonylag kvalitatívnak számít, nem képesek pontos képet adni ezekről a különféle interaktomikai tulajdonságokról.

Újgenerációs interaktomikai módszerek

Az elmúlt évtizedekben számos új interaktomikai módszer látott napvilágot, melyek igyekeztek orvosolni a klasszikus interaktomika fentebbi hiányosságait. Ezek közül négy olyan módszert emelünk ki, amelyeket a leginkább izgalmasnak tartunk, és amelyek használata egyre szélesebb körben terjed el a területen.

A ko-frakcionálási kísérletek során a sejtkivonatot egy elválasztástechnikai eljárással frakcionáljuk, mint például ioncserével vagy gélfiltrálással, majd a különféle frakciókat tömegspektrometria segítségével azonosítjuk [8]. A módszer elve, hogy az adott komplex komponensei együtt szeparálódnak arányosan a komplexek (*extrinzik*) koncentrációival. Például A és B molekula több csúcsban jelenhet meg egy gélfiltráció során, ahol az összes komplex csúcsban mind az A és B molekula is jelen van, ezáltal a fehérjék elúciós profiljai korrelálnak. A módszer fő előnye, hogy egyetlen mérésorozat képes a teljes interaktomról egy globális képet adni, a fő hátránya pedig, hogy a fehérjék elúciós profiljából nem triviális az egyes direkt, vagy akár indirekt interakciók azonosítása, illetve, hogy számos ismert komplex nem marad stabil a frakcionálás körülményei között.

A *pulldown*-alapú módszerek egyik nagy hátránya, hogy soklépcsős mosási lépések szükségesek ahhoz, hogy a háttér proteomból kiemelkedjenek a tényleges partnerek. A fehérje-fehérje interakciók gyors kötési kinetikája miatt viszont ugyanezek a mosási lépések drasztikusan csökkentik a kikötődött fehérjék mennyiségét, mivel a partnerek folyamatosan disszociálnak. Ezt a kritikus problémát küszöbölik ki a proximitás jelölési módszerek (angolul Proximity Labeling

Assays), mint a BioID vagy az APEX [9]. Ezeknél a módszereknél a csali fehérjét egy olyan enzimmel címkézzük fel, ami a sejteken belül képes a közvetlen környezetében található további fehérjéket kovalensen megjelölni egy specifikus funkciós csoporttal. Ez a funkciós csoport rendszerint a biotin, vagy más olyan molekula, amit lehetséges kvantitatívan szeparálni a sejt-kivonatból a lassú disszociációs rátájának és erős affinitásának köszönhetően. A módszer fő hátránya, hogy a legtöbb azonosított partner nem közvetlenül köt, csupán a csali fehérje környezetében volt található. Továbbá, mivel a jelölési reakció hosszú időn keresztül zajlik, a kapott szignál az idő során felgyülemelő molekulák mennyiségével arányos, ezért a proximitás jelöléssel kapott interaktomok kvantitatív értelmezése nehézkes.

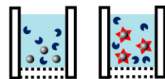
A holdup módszer alapjai

1. Gyanta telítése a csalival: $\sim 10 \mu\text{M}$



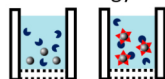
Csali: fehérje, peptid, DNS, RNS, kismolekula...

2. Prédát tartalmazó oldat hozzáadása:



Préda: tisztított fehérje, tisztított peptid, fehérje keverék, peptid keverék, sejt-kivonat...

3. Inkubálás az egyensúly eléréséig:



15 perc – 2 óra

4. Elválasztás és kvantifikálás:



Elválasztás: rövid centrifugálással vagy szűréssel

Kvantifikálás: bármilyen analitikai módszer
gél, kapilláris elektroforézis, fluoreszcencia, tömegspektrometria, dot blot, ELISA...

5. Affinitás kalkuláció

$$BI = 1 - \frac{C_{\text{csali}}}{C_{\text{csali}} + K_d} \quad K_d = \frac{C_{\text{csali}} - C_{\text{csali}} * BI}{BI}$$

1. ábra. A holdup módszer alapjai. A holdup egy összehasonlító kromatográfiás retenciós eljárás, mely a vizsgált reakciópartnerek teljes és nem kötött koncentrációját méri egyensúlyi állapotban, melynek aránya egyensúlyi disszociációs állandóvá konvertálható. A módszer alkalmazása során valamilyen szilárd gyantát kontroll és csalimolekulákkal telítünk, melyek lehetnek fehérjék, DNS, RNS, vagy akár kismolekula. Ezután ezt a gyantát összekeverjük egy préda fehérjét tartalmazó oldattal (fragmentomikai holdup esetén ez tisztított fehérje, míg natív holdup esetén ez sejt-kivonat), majd inkubáljuk az egyensúly beálltáig. Ezután gyorsan szeparáljuk a szilárd és folyadék fázist, és valamilyen analitikai módszer segítségével számszerűsítjük a folyadék fázisban maradt potenciális préda fehérjéket. A kontroll és csali-szaturált gyantával kapott értékek összehasonlításával megkapjuk a kötött frakció értékeit (binding intensity, BI), melyeket az egyensúlyi kötési egyenlettel kötési állandókká (K_d) alakíthatunk.

Konzervatív becslések szerint a fehérje-fehérje interakciók közel 80%-a motívumokon keresztül történik. Motívumoknak nevezzük azokat a rövid fehérje fragmenseket, amik rendezetlen régiókban fordulnak elő és képesek más rendezett fehérjékkel, fehérjerészekkel kölcsönhatni. A motívum-alapú interakciók vizsgálatában a fág-bemutató (angolul phage display) egy kiemelkedően fontos interaktomikai módszerré vált napjainkra [10]. Ezekben a kísérletekben bakteriofágok felszínén mára lehetőségessé vált olyan méretű peptidkönyvtárakat bemutatni, amik képesek lefedni az összes rendezetlen humán fehérje régiót, egymással átfedő 15-mer szakaszokban. Ezeket a fág könyvtárakat egy hordozóra kikötött tisztított csali fehérjével összekeverve tulajdonképpen egy *pull-down* kísérletet lehet kivitelezni, ami kvalitatívan azonosítani tudja azokat a potenciális motívum szekvenciákat, amik a csali fehérjéhez kötődni tudnak, tehát mérhető *intrinzik* affinitással rendelkeznek.

Végül, az általunk továbbfejlesztett ún. *holdup*-alapú módszerek megoldást jelenthetnek a klasszikus interaktomika csaknem minden korábbi problémájára [11]. A *holdup* kísérletek

nagymértékben hasonlítanak a *pulldown* kísérletekhez, mivel mindkét esetben egy szilárd hordozóra kikötött csali fehérjét keverünk össze egy oldatbeli analit molekulával vagy molekulák halmazával. Azonban a *holdup* esetén ennek a csali molekulának a mennyisége nagyságrendekkel nagyobb, mint egy tipikus *pulldown* esetén, mely lehetővé teszi gyenge kölcsönhatások vizsgálatát is. Mivel a csali mennyisége a reakcióelegyben minden esetben nagyobb, mint a préda molekulák összemennyisége, ezért nincs kompetíció az elérhető csali molekulákért a prédák között, ezzel biztosítva az interakciók kvantitatív karakterizálását. A *pulldown* esetén használatos mosási lépések helyett, melyek rendszerint eltüntetik a tranziens interakciókat, a *holdup* esetén azt mérjük, hogy a kötési egyensúly közelében mekkora része tűnik el az analit molekulának az oldatfázisból a kontroll kísérlethez képest, ahol nem volt kikötve a csali molekulánk a szilárd hordozóra (1. ábra). A mosási lépések hiánya és az utolsó lépésben az oldat- és szilárdfázis gyors szeparációja miatt a kötési egyensúly mindvégig megmarad, így egy egyszerű kötési egyenletet használva ez a mért relatív analit koncentráció átalakítható *intrinzik* egyensúlyi kötési állandóvá a csali molekula koncentrációjának ismeretében.

Kvantitatív interaktomikai térképezés *holdup*-alapú módszerekkel

A *holdup* kísérleteket eredetileg Gilles Travé és munkatársai írták le a 2000-es évek közepén és azóta már közel egy tucat közleményben használták már a módszert valamilyen formában. [11–16, a teljesség igénye nélkül]. Kiemelendő, hogy a technika észszerűsége okán több helyen is függetlenül kidolgoztak hasonló alapokon nyugvó módszereket, mint például Martinek Tamás csoportjában (Szegedi Tudományegyetem) [17]. Noha rengeteg variációját dolgozták ki, a két fő típusát érdemes bemutatni. A fragmens-alapú *holdup* kísérletek lehetővé teszik nagy mennyiségű fehérje-peptid típusú interakció biofizikai tanulmányozását. Ezekben a kísérletekben biotinált peptideket immobilizálunk sztreptavidin gyantán és ezt keverjük össze egy tisztított fehérjét tartalmazó oldattal, és a kötési egyensúly eléréséig inkubáljuk a reakcióelegyet. Az inkubálást követően egy gyors szűréssel elválasztjuk az oldatfázist és a megmaradt analit fehérje koncentrációjának változását az intrinzik triptofán-fluoreszcenciáját kihasználva követjük. Ezekkel a kísérletekkel, amik akár 384-es formátumú mikrolemezeken is elvégezhetőek, akár napi több tízezer affinitás mérhető más biofizikai módszerekhez hasonlatos pontossággal és precizitással [14]. A *natív holdup* kísérlet ezzel szemben annyiban tér el, hogy a gyantára kötött csalit nem egy tisztított fehérjét tartalmazó analittal, hanem teljes sejtkivonattal keverjük össze és az egyes fehérjék relatív koncentrációját célzott analitikai módszerekkel határozzuk meg, mint például Western blottal vagy tömegspektrometriával [15]. Ezzel a módszerrel egyetlen kísérlet (reakciócső) elvégzésével több ezer látszólagos affinitás mérést lehet egyidőben végrehajtani (látszólagos, mivel a kötési módot feltételeznünk kell), ráadásul az összes analit fehérje teljes hosszúságú és közel natív állapotú.

A *holdup* alapú módszereknek két fő előnye van a többi interaktomikai módszerrel szemben. Egyrészt, lehetőséget adnak a proteom-szintű biofizikai kötődési állandók mérésére. Ahogy a nevük is sugallja, ezek valóban intrinzik fizikai állandók, ami drasztikus javulást eredményez a reprodukálhatóságban a klasszikus interaktomikai módszerekhez képest. Másrészt, mivel nincsenek mosási lépések a kísérletben, még a leginkább tranziens, gyenge affinitású interakciók sem vesznek el, meghökkentően mély interaktomikai betekintést engedve ezen interakciók hálózatába. A molekuláris interakciók biofizikai karakterizálását leggyakrabban drága, anyag és műszerigényes módszerekkel lehet elvégezni, mint például kalorimetria vagy

felszíni plazmon rezonancia. Ezzel szemben, a *holdup* egyetlen pipetta és egy centrifuga segítségével elvégezhető, és az analitikai módszer is szabadon választható. Ebből következően a *holdup* alapú módszerek széles körben hozzáférhetőek és reményeink szerint egy új korszakot nyithatnak az interaktomikában.

Betekintés biológiai mechanizmusokba a *holdup* segítségével

Mint korábban említettük, a *holdup* módszereket már számos biológiai mechanizmus vizsgálatára használták korábban. Itt szeretnénk bemutatni a legújabb és legizgalmasabb eredményeinket, melyek olyan nézőpontból képesek betekintést nyújtani a hálózatokba, ami más módszerekkel jelenleg nem lehetséges.

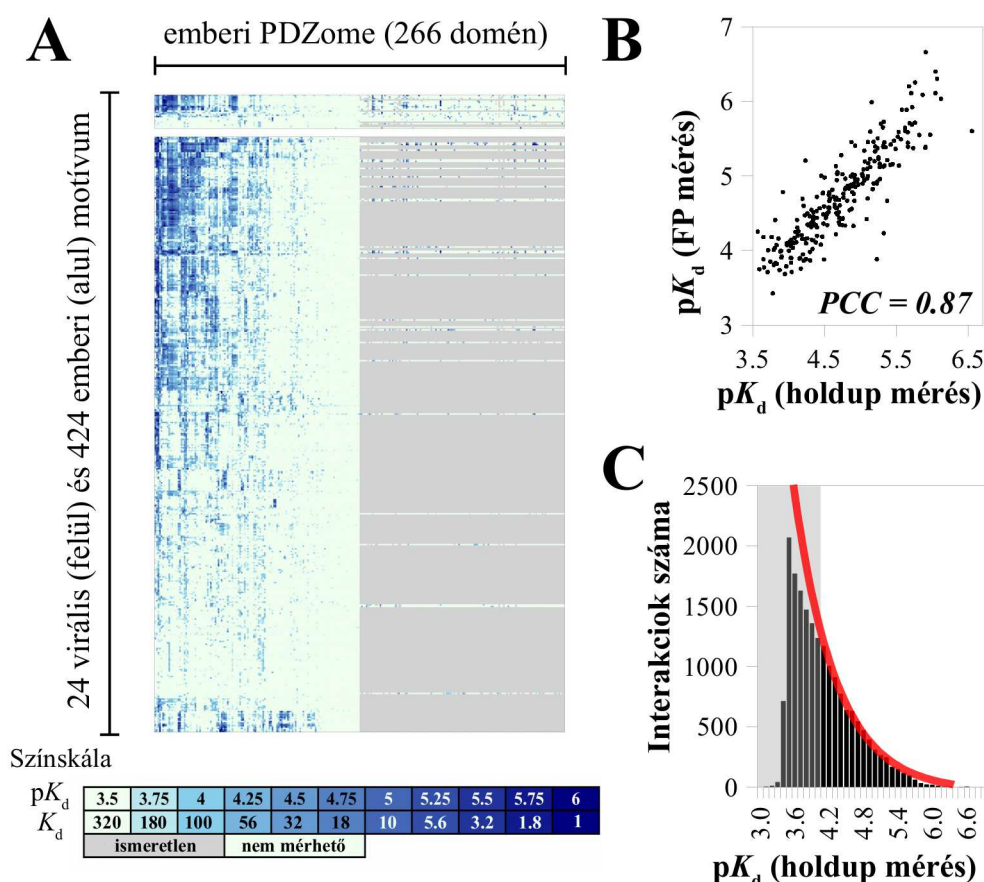
A domén-motívum hálózatok sajátosságainak megismerése a fragmentomikai *holdup* segítségével

A PDZ (postsynaptic density-95, discs-large, zona occludens 1) domének egy népes, fehérje-fehérje kölcsönhatást koordináló domén család, melyek számos jelátviteli folyamatban töltenek be fontos szerepet, például a fehérje transzportban, polarizációban, a sejtek metabolizmusában, vagy éppen a sejt-sejt kommunikációban. A humán proteom 130 PDZ domént tartalmazó fehérjéből és az ezekben megtalálható, összesen 266 PDZ doménből áll, valamint közel 5000 lehetséges PDZ kötő motívumból (PBM-ből), amelyek rendszerint a partner fehérjék extrém C-terminusán helyezkednek el. Kutatócsoportunk a fragmens alapú *holdup* módszer alkalmazásával ebből a csaknem milliós nagyságrendű affinitást magában foglaló PDZ-PBM domén-motívum interaktomból közel 65.000 affinitást határozott meg [14] (2. ábra). Noha, ez csupán a teljes interaktom töredékét (~5%-át) fedi le, a motívumkönyvtárunkat úgy terveztük meg Zeke András (HUN-REN TTK) segítségével, hogy az jó közelítéssel lefedje bizonyos vírusokban (pl. a humán papillomavírusok E6 fehérjéjében) leggyakrabban megtalálható motívumokat, valamint a rák kialakulásában jelentős fehérjék motívumait. A kapott affinitásokat közel 400 fluoreszcencia polarizációs (FP) méréssel összevetve igazoltuk, melyek kiváló egyezést mutattak a *holdup* eredményeivel. Érdekességgé, a korábban szakirodalomban publikált affinitásokkal ellentétben, melyek normális eloszlást követnek, a mi általunk mért affinitások inkább hatványfüggvény-eloszlást mutattak, ami rávilágít arra, hogy a nagy számukhoz képest a gyenge interakciók mennyire alulreprezentáltak a szakirodalomban, és hogy valójában mennyire nagy számú interakciót tartalmaz ez a hálózat. Sikerült továbbá azonosítanunk egy olyan alhálózatot, mely leginkább célpontja lehet a vizsgált vírusoknak a kötési profilok hasonlósága alapján. Ez a nagyszámú mért affinitás azt is lehetővé teszi, hogy az egyes PDZ domének szekvencia alapú specificitási térképeit (logóit) korrigáljuk a mért affinitásokkal, ezzel jobb betekintést engedve az egyes PDZ domének szekvencia preferenciájába. Összefoglalásként, ez a mérésorozat rávilágított, hogy az eddig leírtakhoz képest a domén-motívum interakciók valószínűleg sokkal degeneráltabbak és redundánsabbak, mint azt korábban gondoltuk.

Az SH3 domén hálózat szerepének feltárása a centronukleáris miopátiában

A centronukleáris miopátia egy ritka, a mozgást koordináló izmok gyengeségével és leépülésével járó örökletes vagy *de novo* mutációk okozta betegség. Számos különféle fehérje mutációja okozhatja, de leggyakrabban vagy a dynamin 2 (DNM2) vagy a Bridging Integrator 1 (BIN1) fehérje mutációja áll a háttérben. Erről a két fehérjéről ismert, hogy kölcsönhatásba tudnak lépni egymással a BIN1 fehérje SRC Homology 3 (SH3) doménjén keresztül, ami a DNM2 prolin-

gazdag régióját célozza (PRR). Csakúgy mint a PDZ domének, az SH3 domének is motívumokat kötnek, amik ismertén prolin-gazdag, jellemzően PxxP motívumok (PRM).

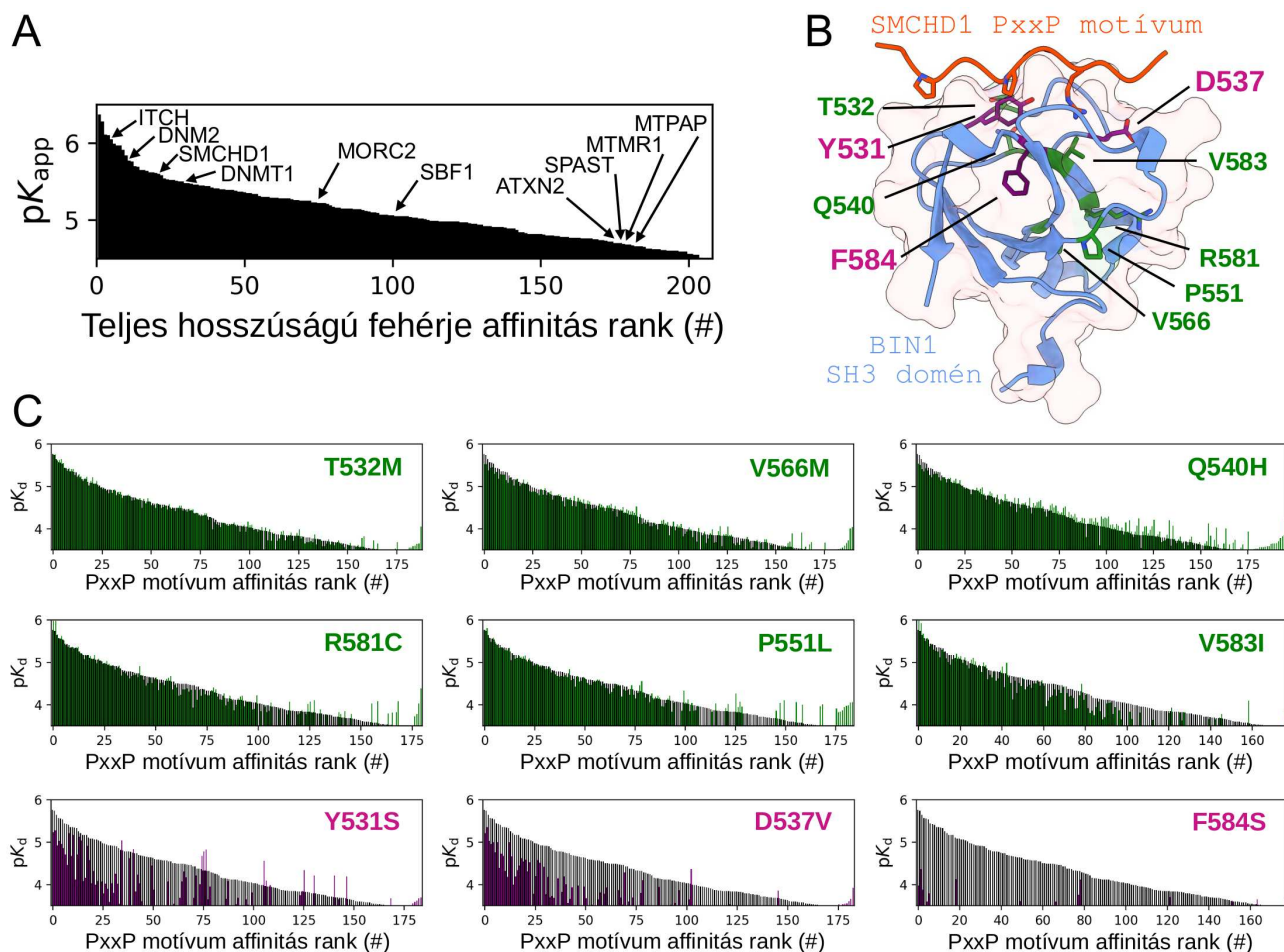


2. ábra. A PDZ-PBM hálózat vizsgálata fragmentomikai holdup segítségével. (A) Affinitás térkép 266 emberi PDZ domén és 448 PDZ kötő motívum között. A méréseink során közel 65.000 affinitást határoztunk meg, köztük virális fertőzésben és rákban fontos elemek affinitásait, melyek a teljes humán PDZ-PBM hálózat ~5%-át fedl le. **(B)** A mért értékek kiváló egyezést mutattak más módszerrel (fluoreszcencia polarizáció, FP) mért affinitás értékekkel. PCC : Pearson korrelációs koefficiens. **(C)** A holdup módszer szenzitivitása miatt képes meghatározni a hálózatok alapvető sajátosságait. A PDZ-PBM hálózat affinitás értékeire korábban leírt normál eloszlás helyett hatványfüggvény eloszlást kaptunk. (A szürke tartomány a méréseink detekciós határát jelöli.) Adaptálva a 14-es referenciából.

Kollégáink (Jocelyn Laporte és csoportja, IGBMC) és más kutatók korábban azonosítottak néhány recesszíven centronukleáris miopátiát okozó BIN1 mutációt, melyek az SH3 doménban helyezkednek el és meggátolják a DNM2 kötődését [18] (3. ábra).

Elképzelésük szerint a BIN1-DNM2 interakció kritikus az izomrostok sejtmembránjainak, mint például T-tubulusainak formálásában és ennek az interakciónak a hiánya vezet a betegség kialakulásához. Azonban számos kérdés továbbra is nyitott volt a betegség patomechanizmusával kapcsolatban, hiszen az SH3 domének szintén rendkívül promiszkusak. Hogy feltárjuk milyen más - a betegség szempontjából fontos - interakciói lehetnek a BIN1-nek a DNM2-n kívül, a *natív holdup* segítségével meghatároztuk a BIN1 SH3 doménjének interaktomját [16]. Rendkívül nagyszámú, összesen 206 kötőpartnert azonosítottunk, amik között a DNM2 a BIN1-nek valóban az egyik legnagyobb affinitással rendelkező partnerének adódott, de rajta kívül számos más nagy affinitású interakciót is azonosítottunk. Ráadásul, a kötőpartnerek között olyan fehérjék is szerepeltek, melyeket már korábban összefüggésbe hoztak különféle miopátiákkal. Hogy pontosan meghatározzuk ezekben a fehérjékben azokat a régiókat, ahova az SH3 domén közvetlenül kötődni tud, először feltérképeztük az összes

lehetséges PxxP motívumot ezekben a fehérjékben (összesen 133 fehérjében volt 448 motívum a partnerek közül), majd megszintetizáltuk és fragmens alapú *holdup*pal vizsgáltuk a kötéseket a BIN1 SH3 doménjéhez.



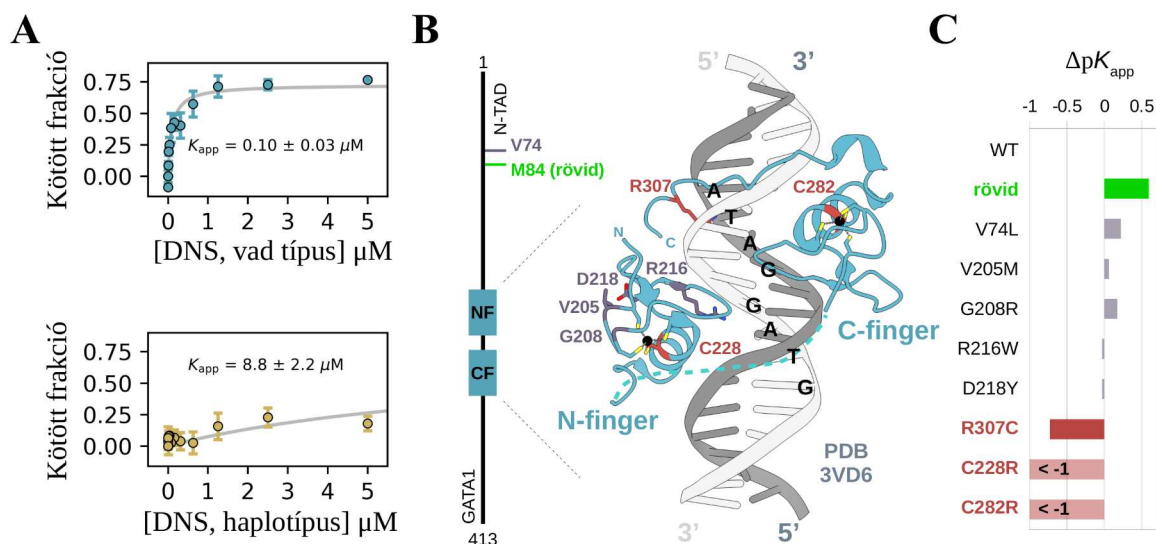
3. ábra. A különféle holdup technikák alkalmazása a centronukleáris miopátia patomechanizmusának megállapítására. (A) A centronukleáris miopátiában fontos BIN1 SH3 doménjével végzett natív holdup kísérlet eredménye, mely meglehetősen sok partnerét azonosította ennek a fehérjének. Ezek közül kiemeltük azokat, melyekről ismert, hogy más miopátiák kialakulásában jelentős szereppel rendelkeznek. **(B)** Ebben a doménben számos ritka mutációt azonosítottak, melyeknek jelentősége ismeretlen a miopátia szempontjából. **(C)** A fragmentomikai holdup segítségével - PxxP motívumkönyvtárát használva - feltártuk, melyek azok a mutációk, melyek jelentősen módosítják az SH3 domén interakcióját vagyis nagy valószínűséggel centronukleáris miopátiát okoznak. Adaptálva a 16-os referenciából.

Összesen 92 fehérjéből származó 176 motívum esetén sikerült azonosítanunk, hogy valóban képesek közvetlenül kötni a BIN1 SH3 doménjét. Több esetben a fehérjékben egyetlen funkcionális motívumot találtunk, amely hasonló affinitást mutatott a peptid-alapú kísérletben, mint teljes hosszúságú fehérjeként. Más esetekben viszont több alacsony affinitást mutató motívumot azonosítottunk, és ilyenkor a teljes hosszúságú fehérje affinitása összességében jóval nagyobbak adódott, mint az egyes motívumok affinitása. Dosztányi Zsuzsanna és Pajkos Mátyás (ELTE Biokémia tanszék) segítségével feltártuk, hogy azok a direkt módon kötődő partnerek, amikben funkcionális motívumokat azonosítottunk szignifikáns dúsulást mutatnak sejtosztódáshoz kapcsolódó mechanizmusokban, amit további sejtes kísérletekkel igazoltunk, egy új biológiai mechanizmust feltárva a betegség hátterében. Lehetőségünk van különféle fehérjékkel mért affinitás interakciók precíz összehasonlítására, így további információt nyerve azok tulajdonságairól. Például azonosítottunk olyan SH3 doméneket, amik hasonló partnereket hasonló affinitásokkal, vagy hasonló partnereket eltérő affinitásokkal kötnek (a

partnerekre számolt $\Sigma|\Delta\Delta G|$ értékeik kicsik vagy nagyok), illetve olyanokat is, akik teljesen eltérő partnereket ismernek fel. Továbbá, ezzel a módszerrel különféle ritka BIN1 variánsokat is jellemeztünk, és közülük azonosítottunk több olyat, amik interaktomikai perturbációt okoznak és sejtekben fenotípusos változásokhoz vezetnek, és ezzel potenciálisan hozzájárulnak a miopátia klinikai kórképéhez.

DNS-protein interakciók feltérképezése natív holduppal

Az interaktomika szinte kizárólagosan fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára korlátozódik, viszont a *holdup* kísérletek előnye, hogy egyéb molekuláris interakciók is tanulmányozhatóak velük. Erre egy példa legújabb kutatásunk, ahol DNS fragmensek kötődését vizsgáltuk transzkripciós faktorokhoz [19] (4. ábra). Korábbi kutatásaink során Sarkadi Balázs kutatólaborjában (Biomembrán Kutatócsoport, Molekuláris Élettudományi Intézet), Várady György és Enyedi Ágnes csoportjának elengedhetetlen közreműködésével azonosítottunk egy erythroid-specifikus promótert, mely a PMCA4b kalcium pumpa expressziójáért felelős vörösvérsejtekben [20]. Leírtuk továbbá ennek a promóternek egy gyakori haplotípusát, ami nagymértékben csökkenti a fehérje expresszióját.



4. ábra. A natív holdup alkalmazása egy kalcium pumpa expressziójának GATA1 általi szabályozásának vizsgálatára. (A) A kalcium pumpa génjében egy haplotípus található, mely módosítja a GATA1 fehérje kötését, melyet natív holdup segítségével tártuk fel úgy, hogy a gyantára különféle mennyiségű vad típusú vagy haplotípust tartalmazó DNS-t kötöttünk ki, és endogén GATA1-et tartalmazó sejt kivonattal inkubáltunk. A GATA1 mennyiségének a változását Western blotolatt követtük. (B) A GATA1 DNS-el alkotott komplexének szerkezete. Munkánk során 6 anémiában vagy myeloproliferatív betegségben fontos természetes mutációt vizsgáltunk (rövid, V205M, G208R, R216W, D218Y, R307C), valamint két mesterséges mutációt, melyek vagy az N-terminális cink-ujjat (C228R), vagy a DNS-kötésben fontosabb C-terminális cink-ujjat teszik tönkre (C282R). (C) A natív holdup titrálási eredmények azt mutatták, hogy két természetes mutáció esetén változik a fehérje DNS-el mutatott affinitása: a rövid variáns és az R307C esetén. Míg a rövid variáns esetén megnövekedett affinitást tapasztaltunk, mely egybecseng a myeloproliferatív klinikai manifesztációval, addig az R307C jelentősen csökkentette az affinitást, mely utóbbi variáns pedig anémiát okoz. ΔK_{app} : a vad típusú GATA1-hez viszonyított affinitás különbség. Adaptálva a 19-es referenciából.

Megfelelő módszerek hiányában a regulációért felelős transzkripciós faktort azonban direkt módon nem sikerült azonosítanunk. Natív *holdup*-ot használtunk ennek az enigmatikus transzkripciós faktornak az azonosítására úgy, hogy a kritikus SNP-eket (Single Nucleotide Polymorphisms) tartalmazó biotinált dupla szálú DNS fragmenseket kötöttük ki a gyantára, amit erythroid-jellegű K562 sejt kivonattal inkubáltuk és tömegspektrometria segítségével analizáltuk a kötőpartnereket. Meglepő módon nagy mennyiségű kötőpartneret detektáltunk a korábbi fehérje-fehérje interakciós vizsgálatainkhoz képest, és a partnerek döntő többsége ismert nukleinsav kötő tulajdonsággal bíró fehérje volt. Ráadásul, ezeknek a partnereknek a többsége

a kevert (scrambled) DNS kontroll szekvenciához is ugyanolyan mértékű kötődést mutatott, tehát feltételezhetően nem-szekvencia specifikusan kötődtek. A partnerek közül azonban kiemelkedett a GATA1 transzkripció faktor, ami egyértelműen szekvencia specifikusan kötődött és a legnagyobb affinitás változást mutatta az SNP-k jelenlétének a hatására. Ezzel összhangban korábbi indirekt riporter gén alapú kísérleteink is a GATA1 kötődését feltételezték a mechanizmus hátterében.

A GATA1 transzkripció faktor a mieloid progenitorok differenciációját irányítja a csontvelőben, és számos *de novo* mutációjáról ismert, hogy súlyos anémiát okoz emberekben. Habár ezen mutációk egy része feltételezhetően a DNS-kötést is befolyásolja, eddig nem állt rendelkezésre olyan technika, mellyel könnyen lehetett volna mérni ezt a paramétert teljes hosszúságú GATA1 fehérjén fiziológias körülmények között. A *natív holdup* ennek vizsgálatára is alkalmas, ugyanis lehetséges a sejtekben egy címke segítségével expresszálni ezeket a mutánsokat és egy ismert GATA1-felismerő DNS ellenében mérni az affinitásváltozásokat. Munkánk során hat, már korábban leírt mutációt hordozó GATA1-et vizsgáltunk ilyen módon, és kettő esetén eltérést tapasztaltunk a DNS kötésben. Az egyik ilyen mutáció esetén a fehérje N-terminális transzaktivációs doménje (N-TAD-ja) hiányzik, vagyis egy rövid izoformát eredményez (GATA1 short, GATA1s).

Érdekes, hogy ez a rövidebb variánst leginkább myeloproliferatív és leukémiás betegségekkel hozták összefüggésbe, vagyis a sejtek túlprodukcióját okozzák a sejtek hiánya helyett. Különböző sejt riporter esszékben is megnövekedett aktivitást lehet tapasztalni a rövid variáns esetén a vad típushoz képest. A *natív holdup* kísérlet segítségével megmutattuk, hogy ez a fehérje négyszer erősebb affinitással képes kötni különböző DNS szubsztrátokat a teljes hosszúságú fehérjéhez viszonyítva. A másik mutáció, ahol különbségeket tapasztaltunk az az R307C mutáció volt. Ez az arginin közvetlenül a második, a DNS-kötésben leginkább résztvevő cink-ujj után helyezkedik el. Habár eddig úgy vélték, hogy egy nuklális lokalizációs szignál (NLS) található ebben a pozícióban, szerkezeti munkák alapján ez az arginin mélyen benyúlik a kis árokba, valószínűleg szignifikánsan hozzájárulva a fehérje DNS kötéséhez. A *natív holdup* kísérleteinkben e mutáció ötszörös csökkenést okozott a szubsztrátok affinitásaiban. Vagyis a *natív holdup* képes - az egyébként *in vitro* nehezen előállítható és vizsgálható - transzkripció faktorok DNS kötési paramétereinek egyszerű és pontos meghatározására, új lehetőségeket nyitva a DNS-kötő fehérjék kutatásában.

Kitekintés

Az interaktomika az elmúlt években a tudományos közösségben vegyes megítélés alá esett. Ez döntően az interaktomikai módszerek nagyon alacsony reprodukálhatóságának köszönhető, másrészt az interaktomikai térképek jellege miatt. A klasszikus interaktomikai módszerek szinte kivétel nélkül irányítatlan és súlyozatlan gráfokként ábrázolják a feltárt hálózatokat. Ezekből gyakran komoly kihívást jelent azonosítani azokat a kölcsönhatásokat, melyek feltételezhetően egy adott biológiai mechanizmus hátterében állnak. A valóságban viszont az interakciók különbözőek a hálózaton belül, és mindegyik kölcsönhatás egy sor intrinzik vagy extrinzik fizikai paraméterrel jellemezhető. Munkánk során azon dolgozunk, hogy olyan újfajta módszereket fejlesszünk az interaktomika területén, melyek képesek nagyskálán ezeket a fizikai paramétereket meghatározni. Elképzelésünk szerint amennyiben sikerrel járunk, és egyszer képesek leszünk katalogizálni az összes lehetséges affinitást a sejtjeinkben előforduló összes

molekula között, az a különféle sejtes mechanizmusok olyan precizitású modellezését teszi lehetővé, ami egy új korszakot nyithat az élettudományok számára.

Irodalomjegyzék

- [1] Goll J & Uetz P (2006) The elusive yeast interactome. *Genome Biol* **7**, 223.
- [2] Fields S & Song OK (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- [3] Luck K, Kim DK, Lambourne L, Spirohn K, Begg BE, Bian W, Brignall R, Cafarelli T, Campos-Laborie FJ, Charlotheaux B, Choi D, Coté AG, Daley M, Deimling S, Desbuleux A, Dricot A, Gebbia M, Hardy MF, Kishore N, Knapp JJ, Kovács IA, Lemmens I, Mee MW, Mellor JC, Pollis C, Pons C, Richardson AD, Schlabach S, Teeking B, Yadav A, Babor M, Balcha D, Basha O, Bowman-Colin C, Chin SF, Choi SG, Colabella C, Coppin G, D'Amata C, De Ridder D, De Rouck S, Duran-Frigola M, Ennajdaoui H, Goebels F, Goehring L, Gopal A, Haddad G, Hatchi E, Helmy M, Jacob Y, Kassa Y, Landini S, Li R, van Lieshout N, MacWilliams A, Markey D, Paulson JN, Rangarajan S, Rasla J, Rayhan A, Rolland T, San-Miguel A, Shen Y, Sheykhkarimli D, Sheynkman GM, Simonovsky E, Ta'an M, Tejeda A, Tropepe V, Twizere JC, Wang Y, Weatheritt RJ, Weile J, Xia Y, Yang X, Yeger-Lotem E, Zhong Q, Aloy P, Bader GD, De Las Rivas J, Gaudet S, Hao T, Rak J, Tavernier J, Hill DE, Vidal M, Roth FP & Calderwood MA (2020) A reference map of the human binary protein interactome. *Nature* **580**, 402–408.
- [4] Keilhauer EC, Hein MY & Mann M (2015) Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS). *Mol Cell Proteomics* **14**, 120–135.
- [5] Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, Szpyt J, Gassaway BM, Panov A, Parzen H, Fu S, Golbazi A, Maenpaa E, Stricker K, Guha Thakurta S, Zhang T, Rad R, Pan J, Nusinow DP, Paulo JA, Schweppe DK, Vaites LP, Harper JW & Gygi SP (2021) Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell* **184**, 3022–3040.e28.
- [6] Cho NH, Cheveralls KC, Brunner A-D, Kim K, Michaelis AC, Raghavan P, Kobayashi H, Savy L, Li JY, Canaj H, Kim JYS, Stewart EM, Gnann C, McCarthy F, Cabrera JP, Brunetti RM, Chhun BB, Dingle G, Hein MY, Huang B, Mehta SB, Weissman JS, Gómez-Sjöberg R, Itzhak DN, Royer LA, Mann M & Leonetti MD (2022) OpenCell: Endogenous tagging for the cartography of human cellular organization. *Science* **375**, eabi6983.
- [7] Weimer K, Zambo B & Gogl G (2023) Molecules interact. But how strong and how much? *BioEssays* **45**, 1–11.
- [8] Skinnider MA, Scott NE, Prudova A, Kerr CH, Stoyinov N, Stacey RG, Chan QWT, Ratray D, Gsponer J & Foster LJ (2021) An atlas of protein-protein interactions across mouse tissues. *Cell* **184**, 4073–4089.e17.
- [9] Qin W, Cho KF, Cavanagh PE & Ting AY (2021) Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat Methods* **18**, 133–143.
- [10] Benz C, Ali M, Krystkowiak I, Simonetti L, Sayadi A, Mihalic F, Kliche J, Andersson E, Jemth P, Davey NE & Ivarsson Y (2022) Proteome-scale mapping of binding sites in the unstructured regions of the human proteome. *Mol Syst Biol* **18**, 1–27.
- [11] Charbonnier S, Zanier K, Masson M & Travé G (2006) Capturing protein-protein complexes at equilibrium: The holdup comparative chromatographic retention assay. *Protein Expr Purif* **50**, 89–101.
- [12] Vincentelli R, Luck K, Poirson J, Polanowska J, Abdat J, Blémond M, Turchetto J, Iv F, Ricquier K, Straub M-L, Forster A, Cassonnet P, Borg J-P, Jacob Y, Masson M, Nominé Y, Reboul J, Wolff N, Charbonnier S & Travé G (2015) Quantifying domain-ligand affinities and specificities by high-throughput holdup assay. *Nat Methods* **12**, 787–93.
- [13] Caillet-Saguy C, Durbesson F, Rezelj V V, Gogl G, Tran QD, Twizere JC, Vignuzzi M, Vincentelli R & Wolff N (2021) Host PDZ-containing proteins targeted by SARS-CoV-2. *FEBS J* **288**, 5148–5162.
- [14] Gogl G, Zambo B, Kostmann C, Cousido-Siah A, Morlet B, Durbesson F, Negroni L, Eberling P, Jane P, Nomine Y, Zeke A, Ostergaard S, Monsellier E, Vincentelli R & Trave G (2022) Quantitative fragmentomics allow affinity mapping of interactomes. *Nat Commun* **13**, 1–18.
- [15] Zambo B, Morlet B, Negroni L, Trave G & Gogl G (2022) Native holdup (nHU) to measure binding affinities from cell extracts. *Sci Adv* **8**, eade3828.
- [16] Zambo B, Edelweiss E, Morlet B, Negroni L, Pajkos M, Dosztanyi Z, Ostergaard S, Trave G, Laporte J & Gogl G (2024) Uncovering the BIN1-SH3 interactome underpinning centronuclear myopathy. *Elife* **13**, RP95397.
- [17] Tököli A, Mag B, Bartus É, Wéber E, Szakonyi G, Simon MA, Czibula Á, Monostori É, Nyitray L & Martinek TA (2020) Proteomimetic surface fragments distinguish targets by function. *Chem Sci* **11**, 10390–10398.
- [18] Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Ivarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL & Laporte J (2007) Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* **39**, 1134–1139.
- [19] Zambo B, Morlet B, Negroni L, Mozner O, Sarkadi B, Trave G & Gogl G (2024) Identification and quantitative characterization of protein-DNA interactions with the native holdup assay: GATA1 regulation of the plasma membrane calcium pump. *bioRxiv*, 2024.08.26.609639.

- [20] Zámbo B, Várady G, Padányi R, Szabó E, Németh A, Langó T, Enyedi Á & Sarkadi B (2017) Decreased calcium pump expression in human erythrocytes is connected to a minor haplotype in the ATP2B4 gene. *Cell Calcium* 65, 73–79.



Zámbo Boglárka diákkörös hallgatóként az ELTE Biokémia Tanszékén Reményi Attila csoportjában kezdte kutatói munkásságát fehérje-fehérje interakciók sejtes vizsgálatával, a doktori munkáját pedig Sarkadi Balázs csoportjában (MTA Enzimológiai Intézet) folytatta, ahol a membránfehérjék proteomikai változásainak genetikai hátterét vizsgálta. Védését követően a franciaországi Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Strasbourg) intézetéhez csatlakozott, ahol „Fondation pour la Recherche Médicale” ösztöndíjasként a fragilis X szindróma molekuláris biológiáját kutatta Hervé Moine csoportjában. Jelenleg Gilles Travé kutatócsoportjában dolgozik, ahol újgenerációs fehérje-fehérje interakciós módszereket fejleszt ki. Jövőre, mint senior kutató csatlakozik Gógl Gergő újonnan alakuló csoportjához. Fő érdeklődési területe a különféle betegségekben fontos genetikai variánsok hatásainak holisztikus megértése nagyskálás módszerek segítségével, mint például az interaktomika, proteomika vagy különféle sejtbiológiai esszék.



Gógl Gergő kutatásait a KutDiák mozgalom keretében kezdte Friedrich Péter laboratóriumában az MTA Enzimológiai Intézetében, Alexa Anita témavezetésével, majd később az ELTE Biokémia Tanszékén Reményi Attila csoportjához csatlakozott. Doktori munkáját 2018-ban védte meg, amelyet Nyitray László és Reményi Attila kettős témavezetésével végzett. 2019 óta Franciaországban, a strasbourgi IGBMC-ben dolgozik, korábban, mint ösztöndíjas kutató Gilles Travé kutatócsoportjában, majd önállóan, mint Inserm kutató. 2024 második felében indítja saját kutatócsoportját a Valrose-i biológiai intézetben (iBV, Nizza) az ATIP-Avenir fiatal csoportvezetői programjának segítségével. Kutatása a biológiai mechanizmusok molekuláris szintű megértése és modellezése újgenerációs kvantitatív interaktomika segítségével.