

Ingeniería Genética II

Unidad X

Interactómica

Interactómica

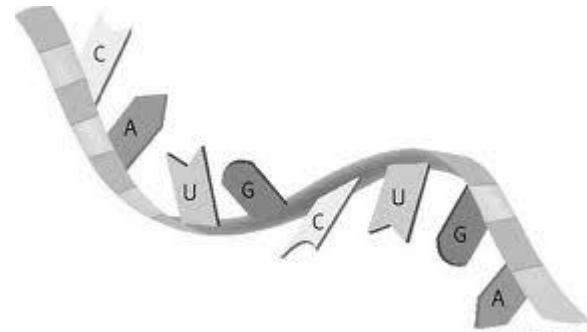
- Los **sistemas biológicos** están sostenidos por **múltiples interacciones** entre las distintas especies moleculares que componen a cada entidad.
- Este **conjunto de interacciones** conforma el **interactoma**, pudiéndoselo entender como la **red de relaciones entre las moléculas** de una entidad biológica en un momento dado.
- El **interactoma** puede **categorizarse dentro** de una **entidad** en función de las **moléculas que interactúan** (ácidos nucleicos, proteínas), **o** en función de los **compartimientos** (núcleo, membrana, etc.), **y entre entidades** cuando existen **relaciones simbióticas**.

Interactómica

- Las **interacciones** que se determinan suelen ser: **ácido nucleico-ácido nucleico** (RNA con RNA y RNA con DNA), **ácido nucleico-proteínas** (RNA-proteínas, DNA-proteínas) y **proteínas-proteínas**.
- Existen numerosas **metodologías** para hacer **diagnósticos** precisos de interacciones entre **grupos reducidos de moléculas**, y otros del tipo *high throughput*.
- En cualquiera de los casos, el **objetivo** es **comprender la red de contactos** entre moléculas para a partir de allí **inferir funciones biológicas**.
- La **comprensión** de las **redes de interacción** en un organismo es un conocimiento básico esencial que **posibilita inferir efectos pleiotrópicos** causados por cambios individuales en las cantidades o identidades de ciertas moléculas

***¿Cuáles son las metodologías
asociadas a la determinación
de la red de interacciones?***

Interacciones entre ácidos nucleicos



Interactómica

Ácido nucleico-Ácido nucleico

Las **interacciones** más **comunes** en este universo son:



- **RNA con RNA** (en general, asociadas a procesos de silenciamiento)
- **RNA con DNA** (asociado a procesos regulatorios)

Interactómica

Ácido nucleico-Ácido nucleico: RNA/RNA

- En la mayoría de los casos, las interacciones **RNA/RNA** se determinan por **hibridación** (individual, en microarreglos) o mediante el análisis de la información suministrada por **procedimientos de RNA seq**.
- La presencia de **RNAs** con **ambas polaridades** en una misma temporalidad podría sugerir que **existiría** un proceso de **silenciamiento**.
- La **longitud** de los **RNAs** y la **inferencia** sobre su **biogénesis** permite **especular** sobre los **mecanismos involucrados**.

Interactómica

Ácido nucleico-Ácido nucleico: RNA/DNA

- Existen numerosos **lncRNAs** (*long non-coding RNAs*) que **interactúan** con los **genomas de dsDNA** de los organismos eucariotas influyendo en el **estado de la cromatina**, y como consecuencia, en su actividad transcripcional.
- La **determinación** de estas **interacciones** puede realizarse mediante el procedimiento experimental denominado **ChiRP** (*Chromatin Isolation by RNA purification*).

Interactómica

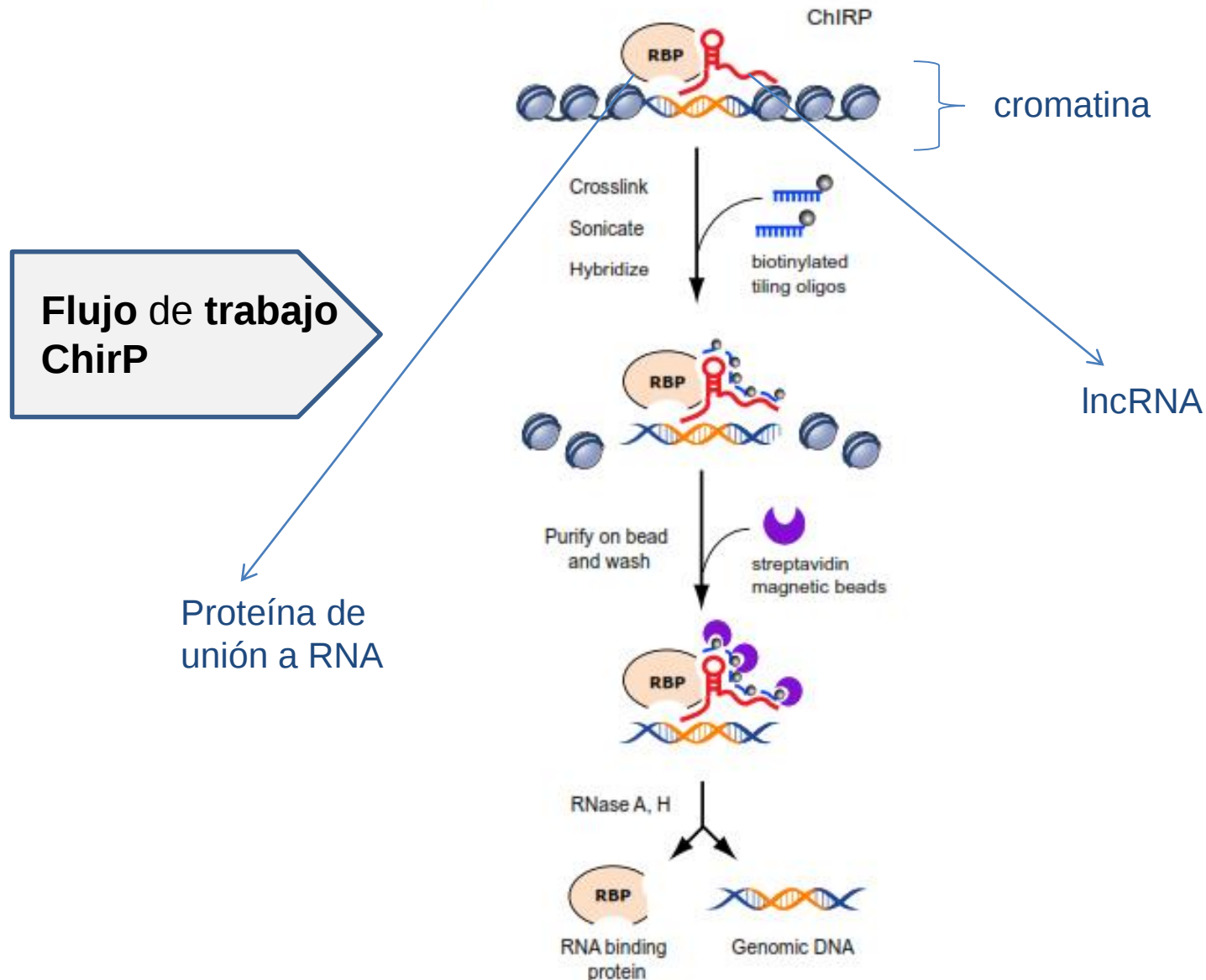
Ácido nucleico-Ácido nucleico: **DNA**/proteínas

Flujo de trabajo para tecnología ChiRP



Interactómica

Ácido nucleico-Ácido nucleico: RNA/DNA



Interactómica

Ácido nucleico-Ácido nucleico: RNA/DNA



Crosslink

Sonicate

Hybridize

biotinylated
tiling oligos

Con formaldehído o
glutaraldehído al 1%



Purify on bead
and wash

streptavidin
magnetic beads



Fragmentos de
100-500 pb

RNase A, H

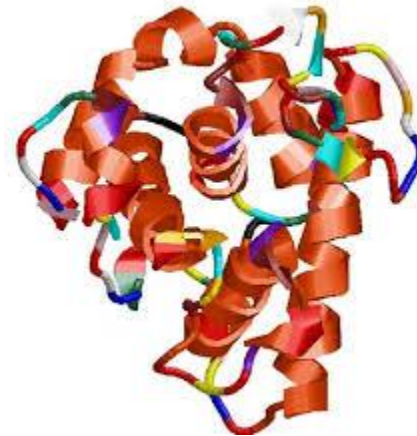
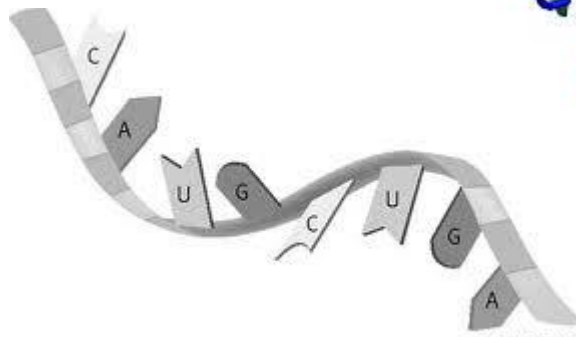
RBP
RNA binding
protein

Genomic DNA

NGS

Flujo de trabajo
ChirP

Interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas



Interactómica

Ácido nucleico-Proteína

- Las **interacciones** de **ácidos nucleicos** y **proteínas** influyen fuertemente en la **regulación transcripcional** y **traduccional** de la carga genética de un organismo.
- También, estas **interacciones** de ácidos nucleicos con proteínas pueden tener **impacto** en la **estructuración** de la **cromatina**, que es un complejo del gDNA, proteínas y RNA.
- Hoy en día, se disponen de **tecnologías *High throughput*** para la determinación de este conjunto de relaciones entre moléculas.
- Sin embargo, siguen **vigentes** los **ensayos tradicionales** (EMSA, *footprinting*) que sirven para **validar** cualquiera de las informaciones que se generen con los métodos de alto rendimiento.

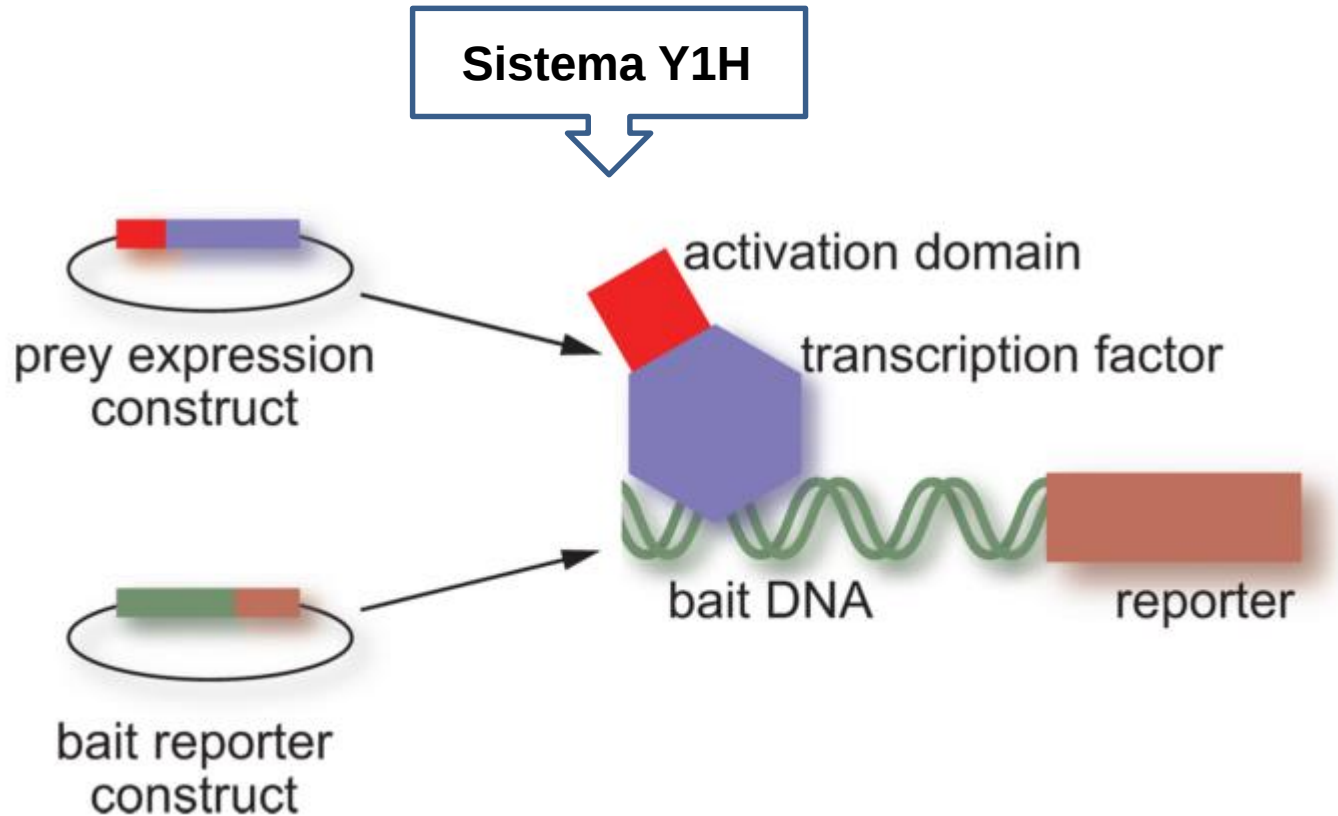
Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: **DNA**/proteínas

- Las **proteínas interactúan** con el **DNA** para **estructurar la cromatina** y para **regular su transcripción**.
- Uno de los **primeros métodos** desarrollados fue el de **Y1H** (*Yeast One Hybrid*)
- Luego surgieron otros métodos para el **análisis *high throughput*** que aplican la **tecnología ChIP** (*Chromatin Immunoprecipitation*).
- El **objetivo** es **determinar la secuencia** del **DNA genómico** involucrado en una **interacción** específica con una **proteína particular**.
- El **análisis** puede realizarse por **PCR**, hibridación en microarreglos (**ChIP-on-chip**) o por secuenciación (**ChIP-seq**).

Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: **DNA**/proteínas



Interactómica

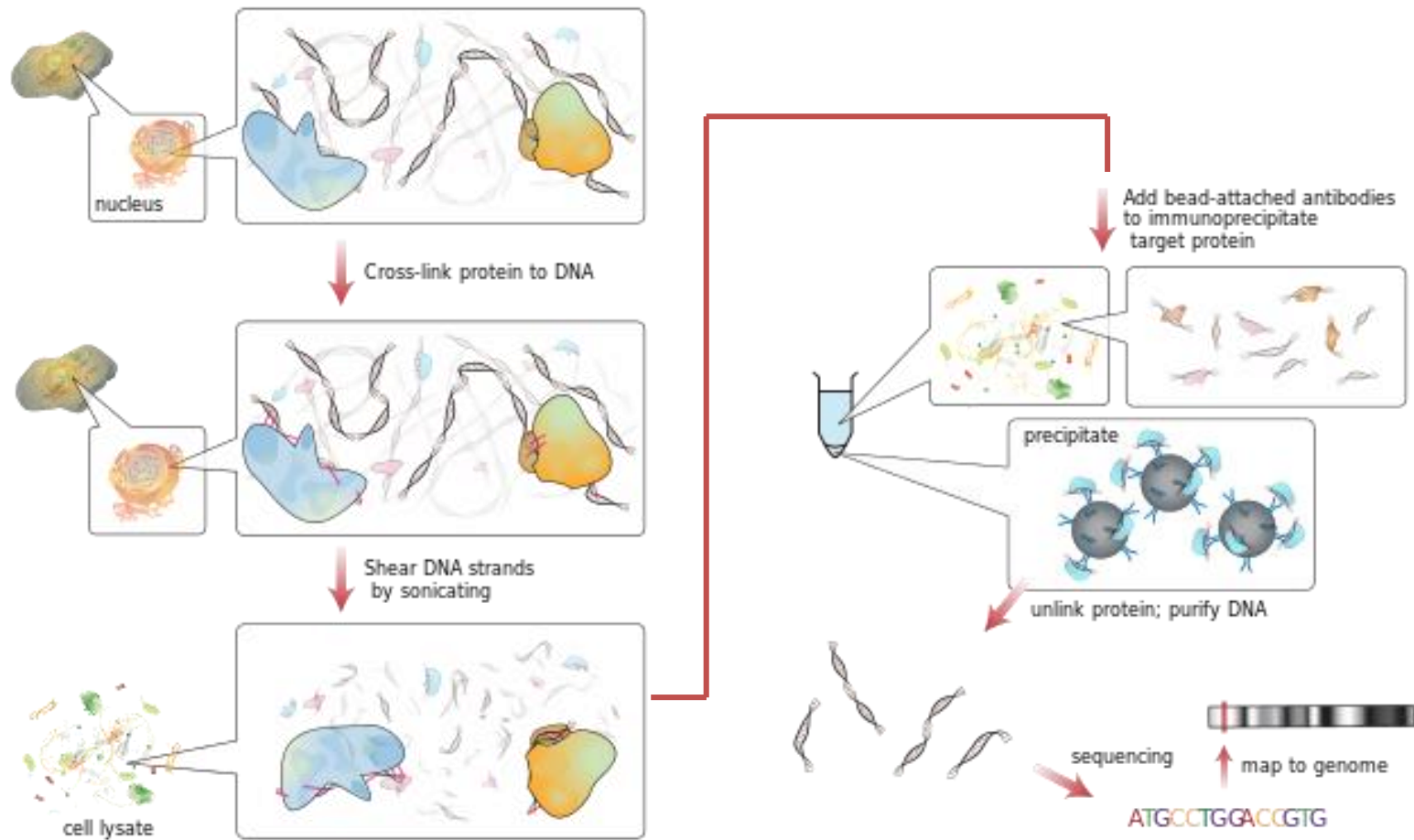
Ácido nucleico-Proteína: **DNA**/proteínas

Flujo de trabajo para tecnología ChIP



Interactómica

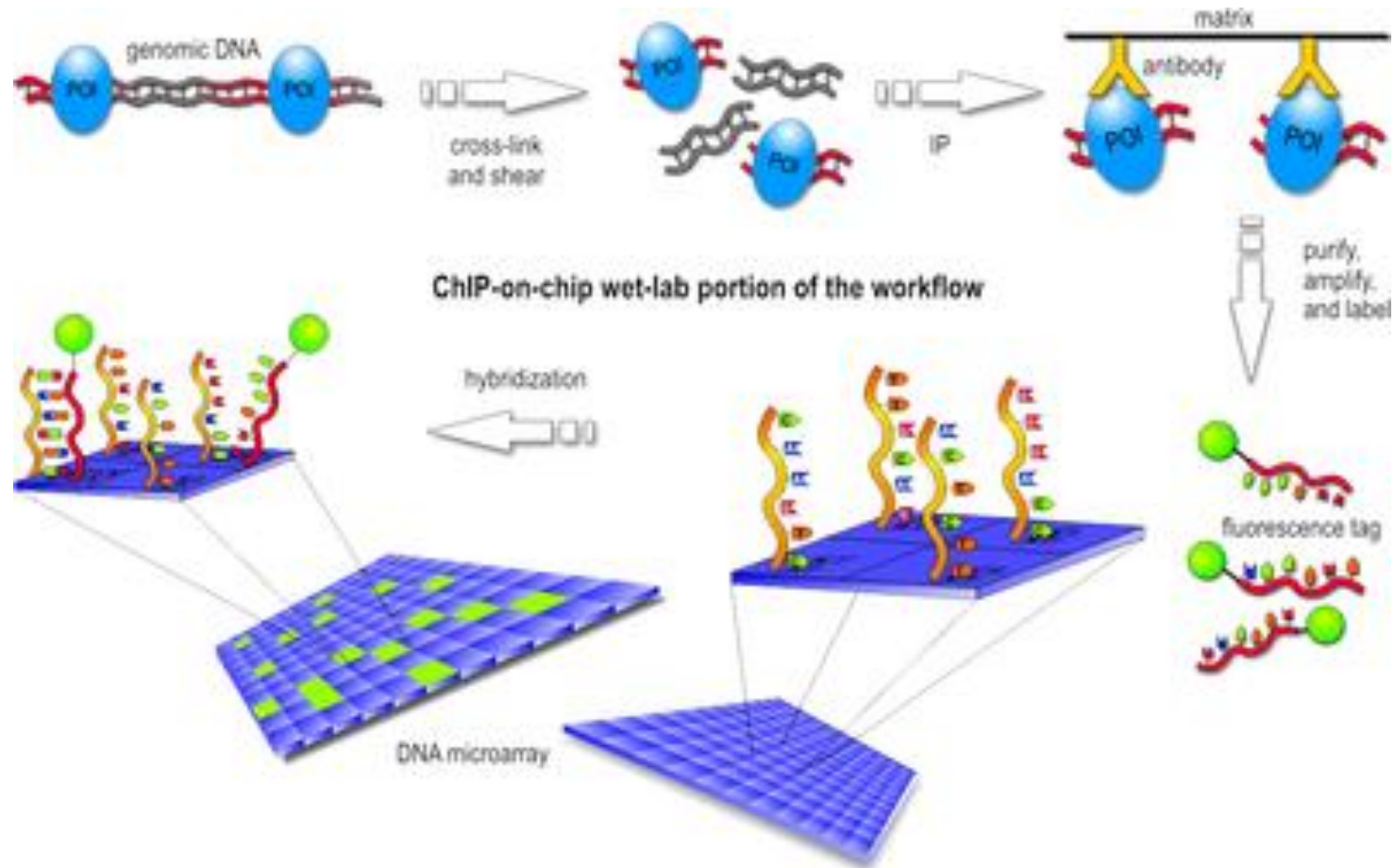
Ácido nucleico-Proteína: **DNA**/proteínas



ChIP-seq

Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: **DNA**/proteínas



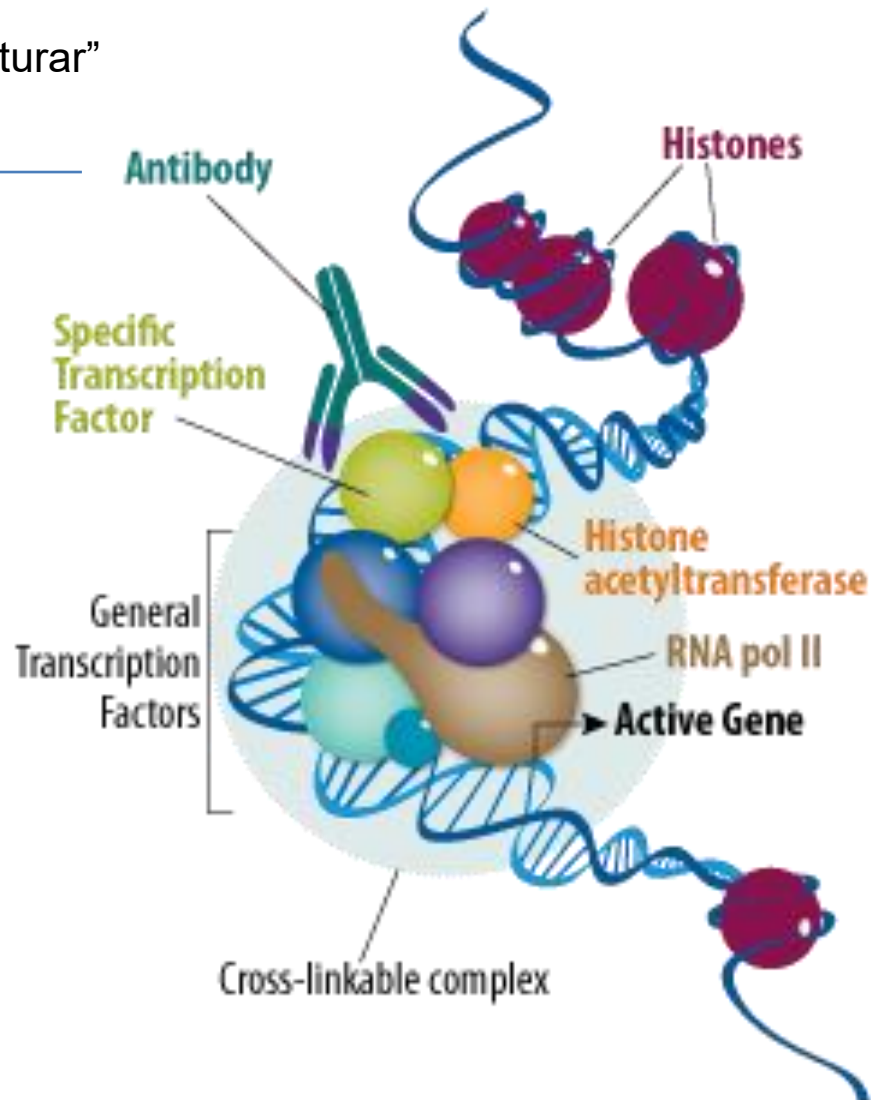
En función del diseño del microarreglo es la información que se obtendrá.

ChIP-on-chip

Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: **DNA**/proteínas

Herramienta para “capturar”
las regiones del gDNA
involucradas ←



Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: RNA/proteínas

- Las **proteínas interactúan** con los **RNAs**, ya sea para la **biogénesis** de los **transcriptos** y para su **posterior modificación**.
- Estas **interacciones** pueden ser **determinadas** por **inmunoprecipitaciones** y posterior análisis de las moléculas aisladas.
- Dentro de todos estos ensayos, la **tecnología ChIP** (*Chromatin immunoprecipitation*) **asociada al RNA** es una de los procedimientos más empleados.
- En general, el **objetivo** es **analizar** las **moléculas de RNA** mediante la **captura diferencial** de **complejos ribo-proteicos** utilizando **anticuerpos específicos** contra proteínas particulares (por ejemplo, asociadas a los mecanismos de interferencia de RNA, a polimerasas, a RNAsas, entre otros)..

Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: RNA/proteínas

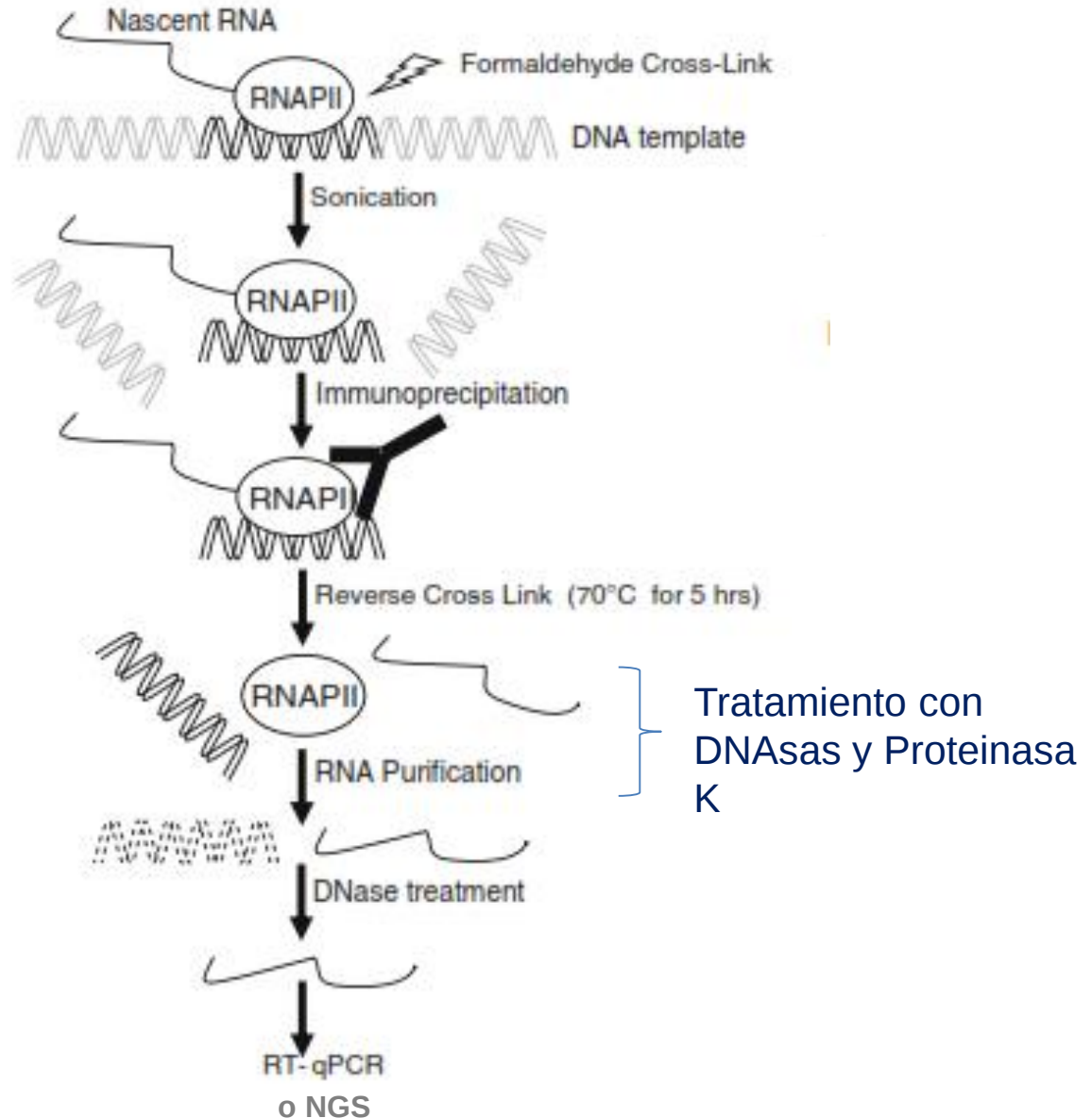
Flujo de trabajo para tecnología ChIP asociada al RNA



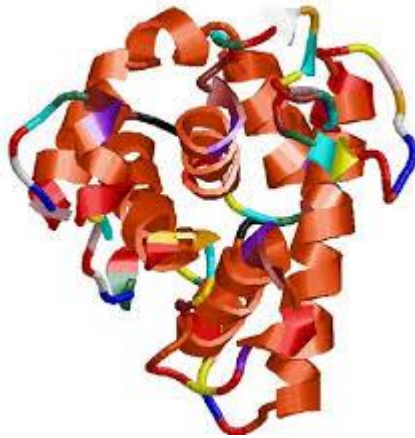
Interactómica

Ácido nucleico-Proteína: **RNA/proteínas**

Ejemplo del estudio de los **RNAs nacientes** mediante **Chip**



Interacciones entre proteínas



Interactómica

Proteína-Proteína

- La **mayoría** de las **actividades** que suceden en la **célula** están centradas en las **proteínas**.
- En función de ello, la determinación de las **interacciones entre proteínas** o **PPI** (*Protein-Protein interactions*) son sumamente informativas dado que permiten **inferir** los **mecanismos funcionales** catalíticos, de transferencias de mensajes y estructurales.
- Se disponen de **varios procedimientos experimentales**, muchos de ellos del tipo **high throughput**, para la determinación de relaciones entre polipéptidos.

Interactómica

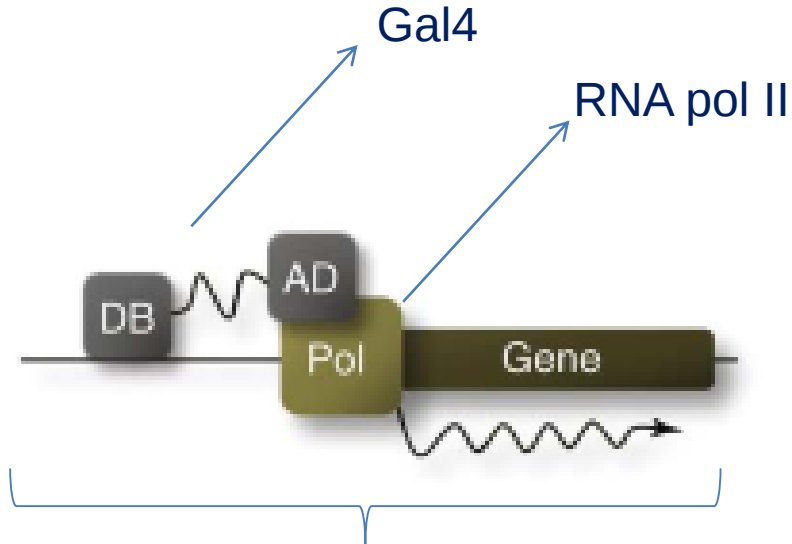
Proteína-Proteína: Y2H

- El **sistema** conocido como **Doble Híbrido de Levaduras** (Y2H por *Yeast two Hybrid*) es una de las **herramientas** más poderosas para la determinación de **interacciones entre proteínas**.
- El sistema **Y2H** puede utilizarse para **grupos reducidos de proteínas**, o incluso **adaptarse** para inferir **interactomas globales**.
- Hoy en día, se disponen de **numerosas variantes** que se aplican para discernir redes de relaciones entre proteínas de entidades biológicas.

Interactómica

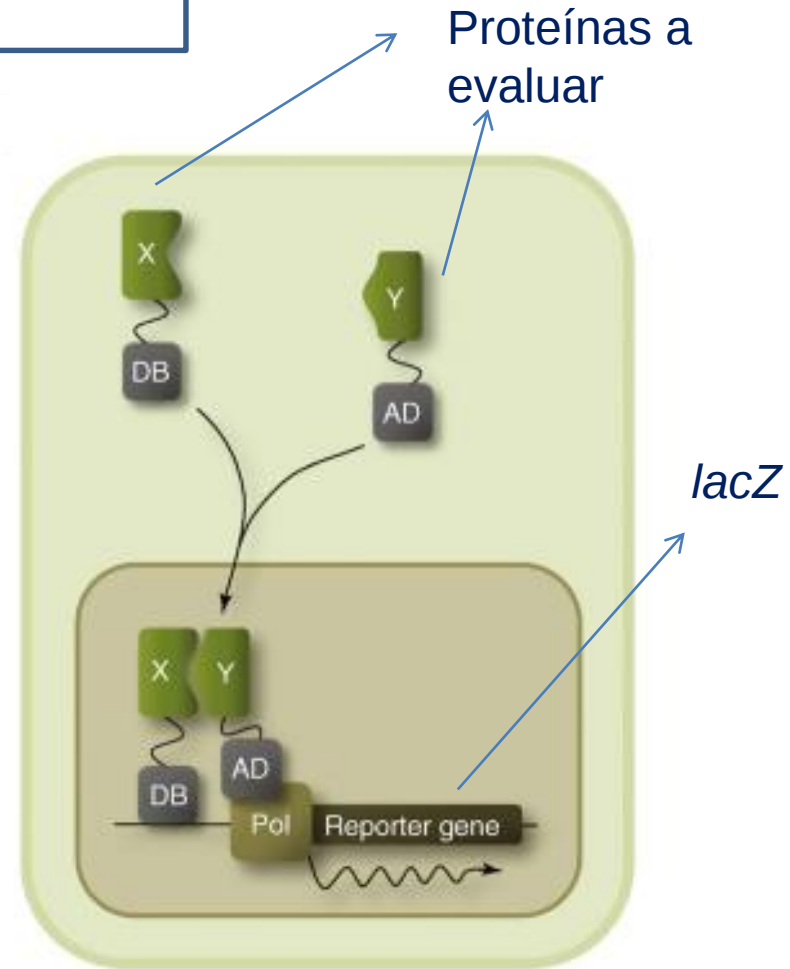
Proteína-Proteína: Y2H

Sistema tradicional Y2H



Mecanismo presente en la levadura

DB: Binding Domain
AD: Activation Domain



Aplicación del mecanismo natural

Interactómica

Proteína-Proteína: Y2H tradicional

NATURE | VOL 403 | 10 FEBRUARY 2000 | www.nature.com

articles

A comprehensive analysis of protein–protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*

Peter Uetz^{†‡}, Loic Giot^{†‡}, Gerard Cagney[†], Traci A. Mansfield[‡], Richard S. Judson[‡], James R. Knight[‡], Daniel Lockshon[†], Vaibhav Narayan[‡], Malthreyan Srinivasan[‡], Pascale Pochart[‡], Alia Qureshi-Emili^{†§}, Ying Li[‡], Brian Godwin[‡], Diana Conover^{†§}, Theodore Kalbfleisch[‡], Govindan Vijayadamodar[‡], Meijia Yang[‡], Mark Johnston^{†||}, Stanley Fields^{†§} & Jonathan M. Rothberg[‡]

[‡] CuraGen Corporation, 555 Long Wharf Drive, 11th Floor, New Haven, Connecticut 06511, USA

[†] Departments of Genetics and Medicine and [§] Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Box 357360, Seattle, Washington 98195-7360, USA

* These authors contributed equally to this work

Two large-scale yeast two-hybrid screens were undertaken to identify protein–protein interactions between full-length open reading frames predicted from the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. In one approach, we constructed a protein array of about 6,000 yeast transformants, with each transformant expressing one of the open reading frames as a fusion to an activation domain. This array was screened by a simple and automated procedure for 192 yeast proteins, with positive responses identified by their positions in the array. In a second approach, we pooled cells expressing one of about 6,000 activation domain fusions to generate a library. We used a high-throughput screening procedure to screen nearly all of the 6,000 predicted yeast proteins, expressed as Gal4 DNA-binding domain fusion proteins, against the library, and characterized positives by sequence analysis. These approaches resulted in the detection of 957 putative interactions involving 1,004 *S. cerevisiae* proteins. These data reveal interactions that place functionally unclassified proteins in a biological context, interactions between proteins involved in the same biological function, and interactions that link biological functions together into larger cellular processes. The results of these screens are shown here.

Interactómica

Proteína-Proteína: **Y2H** (variantes)

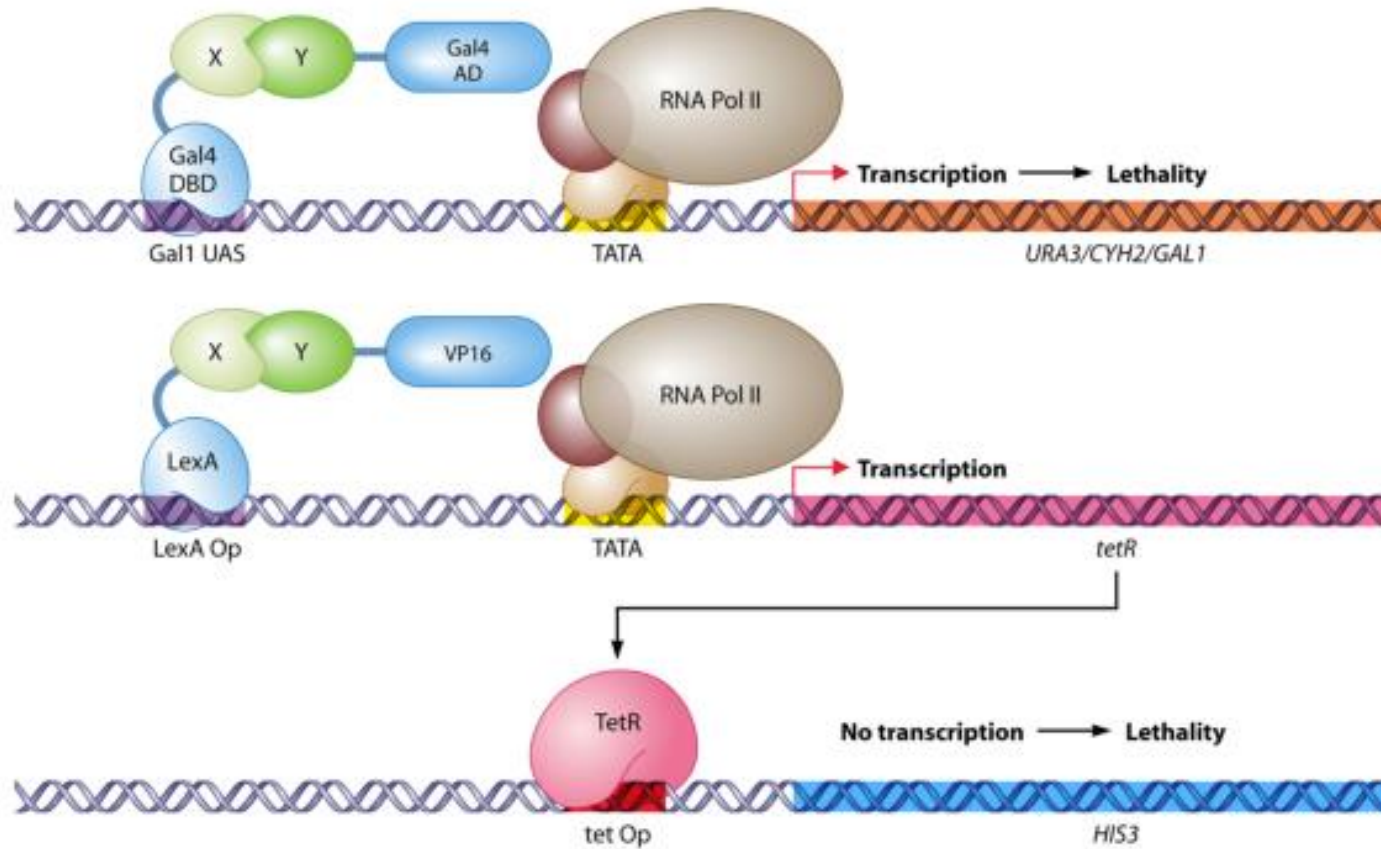


Variantes del Y2H

- El sistema **Y2H** ha sido muy explotado para la búsqueda de **interacciones entre proteínas**.
- Dado su alto grado de efectividad, se han **diseñado variantes** que presentan algunos cambios con el sistema original.
- Las **principales diferencias** están dadas por el **fenotipo** que expresa la **levadura** cuando **existe interacción** entre las proteínas en evaluación.

Interactómica

Proteína-Proteína: Y2H (variantes)



Interactómica

Proteína-Proteína: M2H

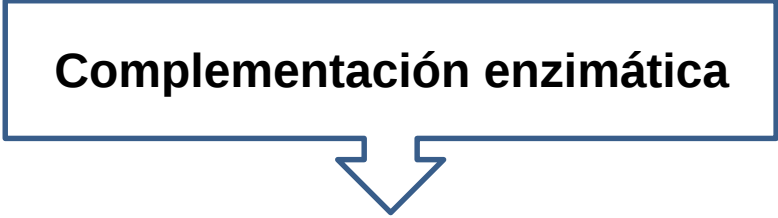
M2H (*Mammalian Two Hybrid*)



- El **M2H** es **similar** al **Y2H** con la diferencia que el sistema se desarrolló para **células de mamífero**.
- El **sistema** se compone del **BD de Gal4**, el **AD** del factor de transcripción de la proteína **VP16 del virus herpes simplex**, y un **gen indicador** como lacZ.
- Además de lo anterior, existen **otras variantes** que involucran la **complementación de enzimas** o la **transferencia de energía**.

Interactómica

Proteína-Proteína: **complementación enzimática**

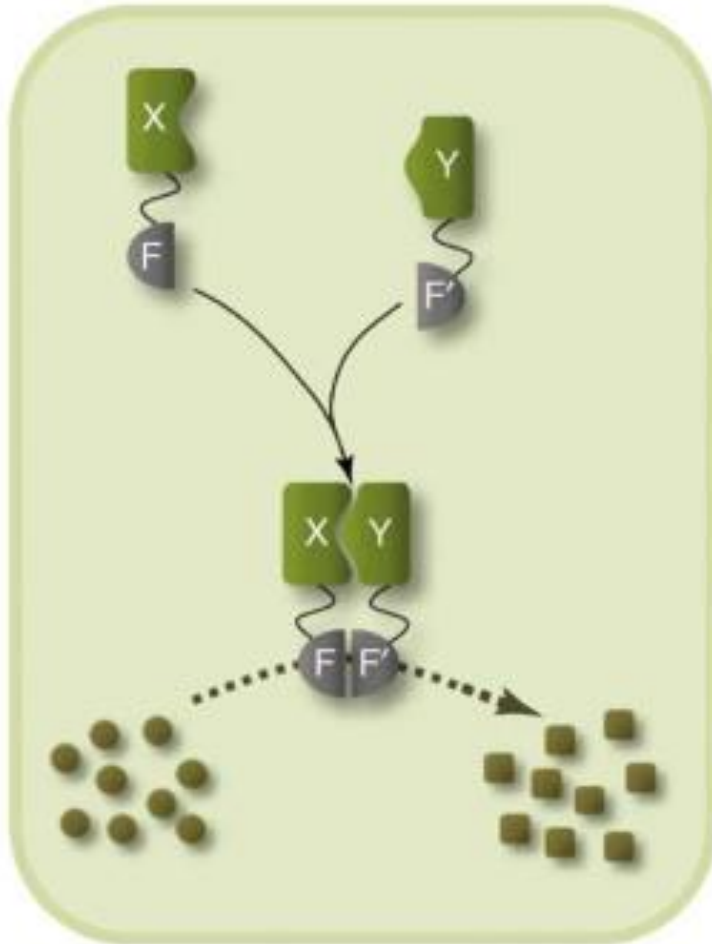


Complementación enzimática

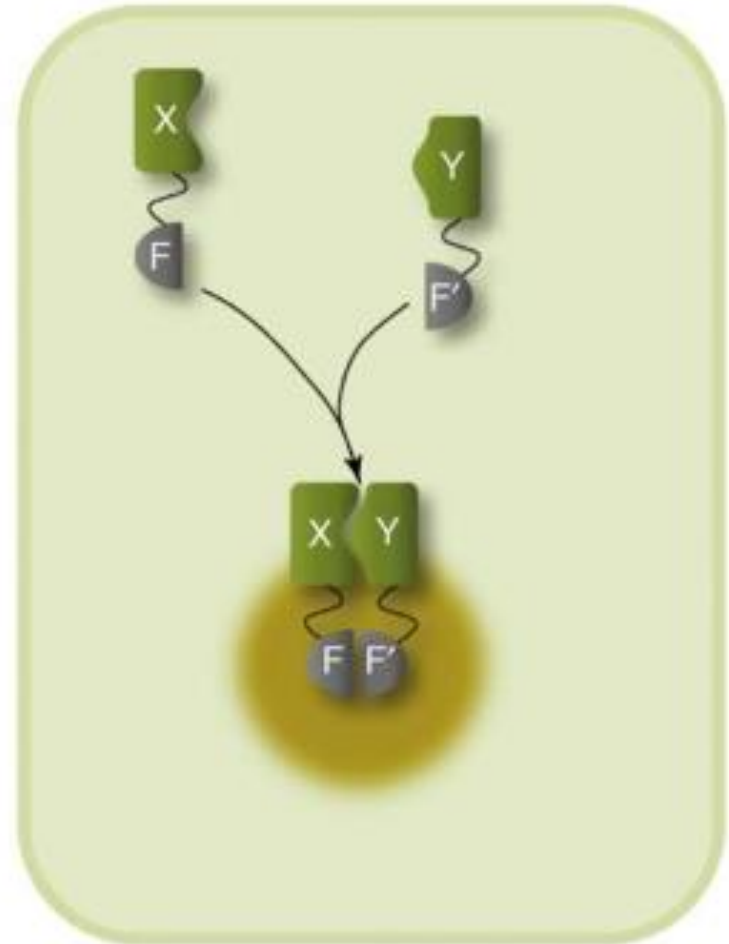
- Las metodologías basadas en **complementación enzimática** también han sido **muy exploradas**.
- En general, se basan en **proteínas** que constan de **dos dominios** para ser funcionales.
- Las más utilizadas son la **β -galactosidasa** y la **luciferasa**.

Interactómica

Proteína-Proteína: **complementación enzimática**



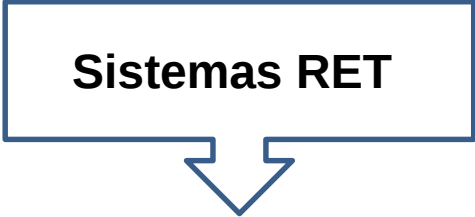
Actividad β -galactosidasa



Actividad luciferasa

Interactómica

Proteína-Proteína: **Sistemas de resonancia energética**

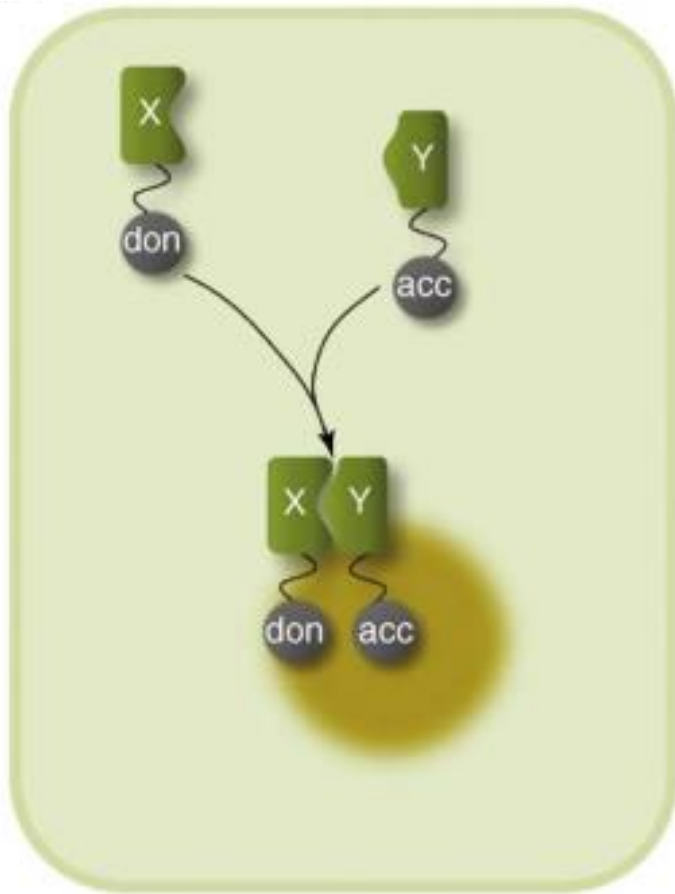


Sistemas RET

- Las **metodologías** basadas en **resonancia energética** (*Resonance energy transfer systems*) también son abordados.
- Las principales tecnologías son **FRET** (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y **BRET** (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*).
- En estas aproximaciones, **sólo se observa** un tipo de **fluorescencia** particular **si existe interacción**.

Interactómica

Proteína-Proteína: **resonancia energética**



FRET y BRET

- En **FRET**, el *Donor* (don) suele ser una proteína fluorescente y el *Aceptor* (acc) también.
- Cuando se incide con una longitud de onda de absorción propia del *Donor*, éste se excita y fluoresce, energía que es tomada por el *Aceptor* si está próximo (cuando hay interacción) y entonces sucede la fluorescencia de este último.
- En **BRET**, el *Donor* suele ser luciferasa, quien al producir bioluminiscencia excita al aceptor que suele ser una proteína fluorescente.

Interactómica

Proteína-Proteína: *Split TEV assay*

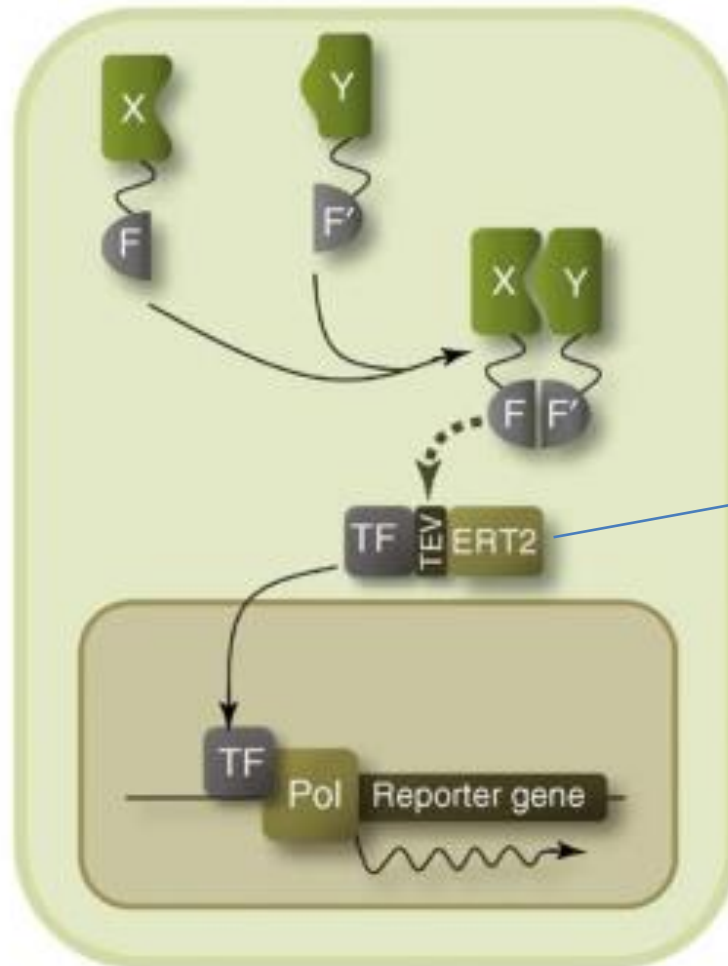


Split TEV assay

- El sistema conocido como ***Split TEV assay*** utiliza la **actividad** de una **proteasa** derivada de un virus de tabaco (*tobacco etch virus* o TEV).
- Si existe **interacción** entre las dos proteínas en estudio, se **reconstituye** la actividad de la **proteasa TEV**.
- Esta **proteasa dispara** una **serie de pasos** que derivan en la **expresión** de una **proteína indicadora**.

Interactivómica

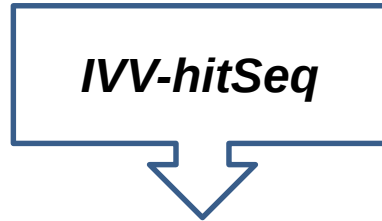
Proteína-Proteína: **resonancia energética**



Proteína con
localización
citoplasmática

Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

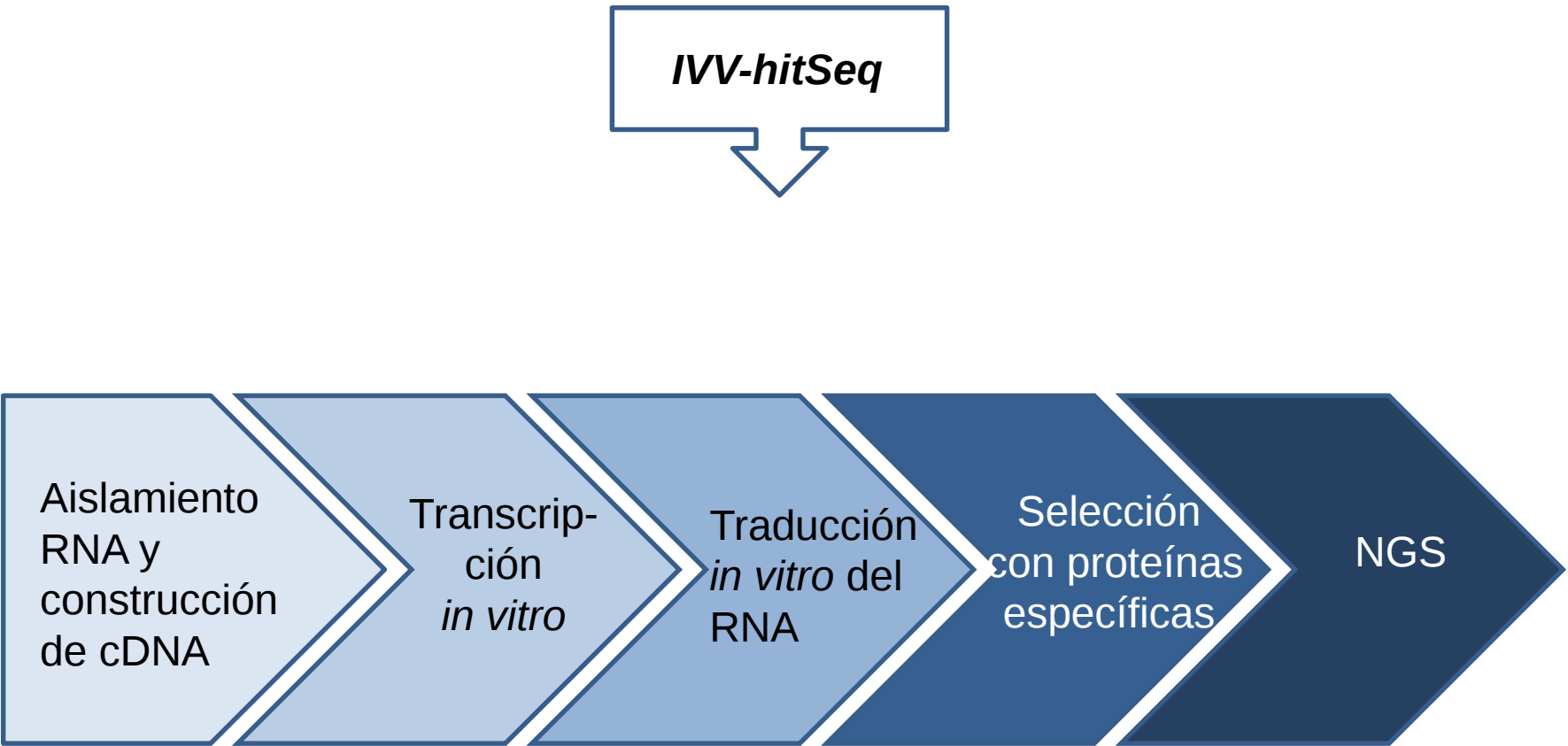


- El sistema conocido como ***IVV-HitSeq*** (*In vitro virus high throughput Sequencing*) es una **aproximación de alto rendimiento** para la adquisición de secuencias genómicas involucradas en unión a proteínas.
- Este sistema se basa en la **generación de híbridos RNA-proteínas** (descrito como genotipo-fenotipo).

Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

IVV-hitSeq



Aislamiento
RNA y
construcción
de cDNA

Transcrip-
ción
in vitro

Traducción
in vitro del
RNA

Selección
con proteínas
específicas

NGS

Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

IVV-hitSeq

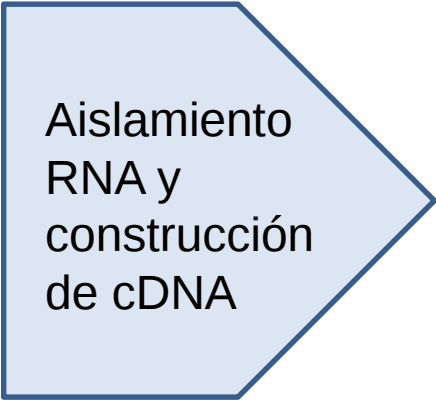


Se obtiene el **mRNA** de una entidad y se construye **cDNA con *random primers***.



Se **modifica** con **adaptadores** los extremos del dsDNA. (uno de ellos contiene promotor del fago T7).

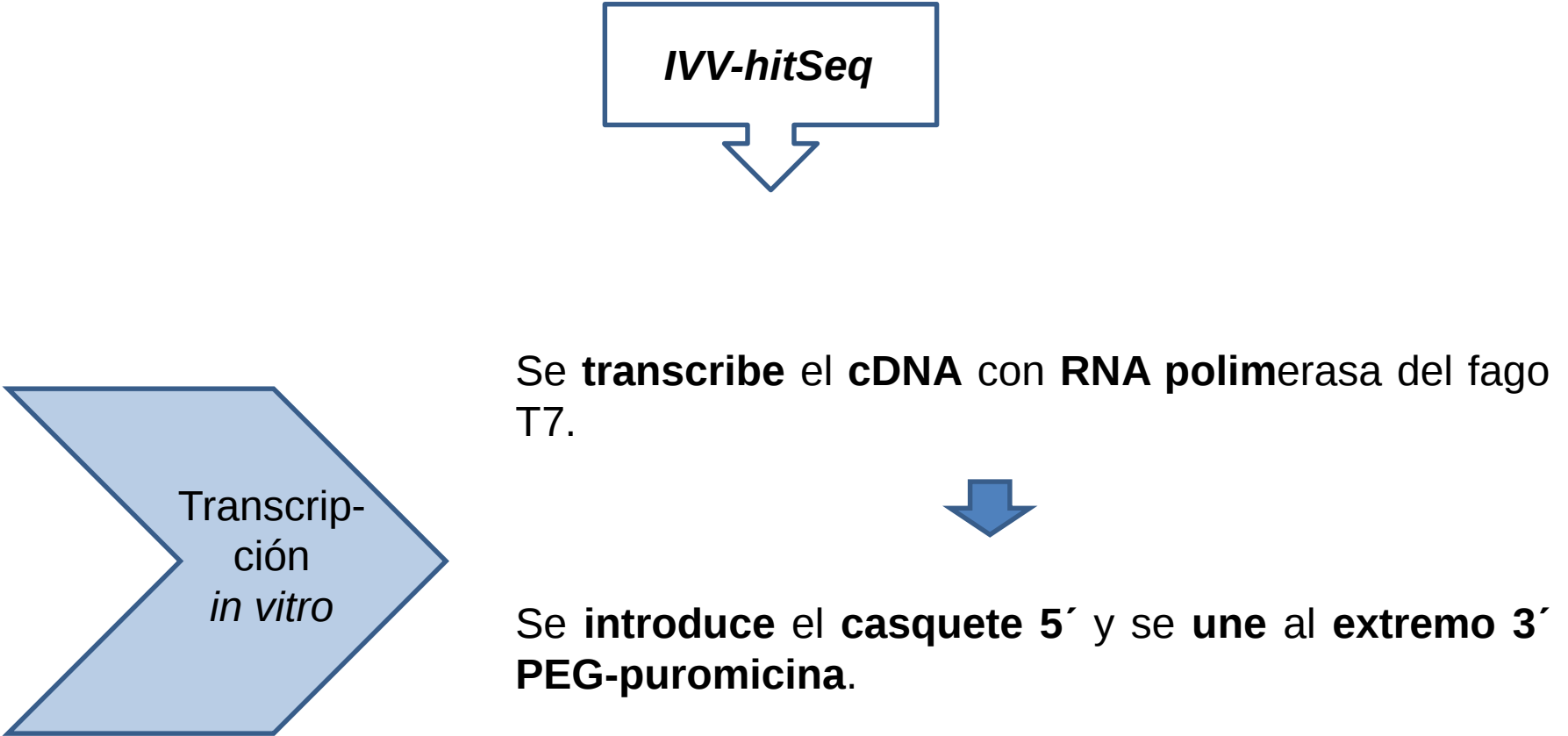
Aislamiento
RNA y
construcción
de cDNA



Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

IVV-hitSeq



```
graph TD; A[IVV-hitSeq] --> B[Se transcribe el cDNA con RNA polimerasa del fago T7.]; C[Transcripción in vitro] --> B; B --> D[Se introduce el casquete 5' y se une al extremo 3' PEG-puromicina.];
```

Se **transcribe** el **cDNA** con **RNA polimerasa** del fago T7.

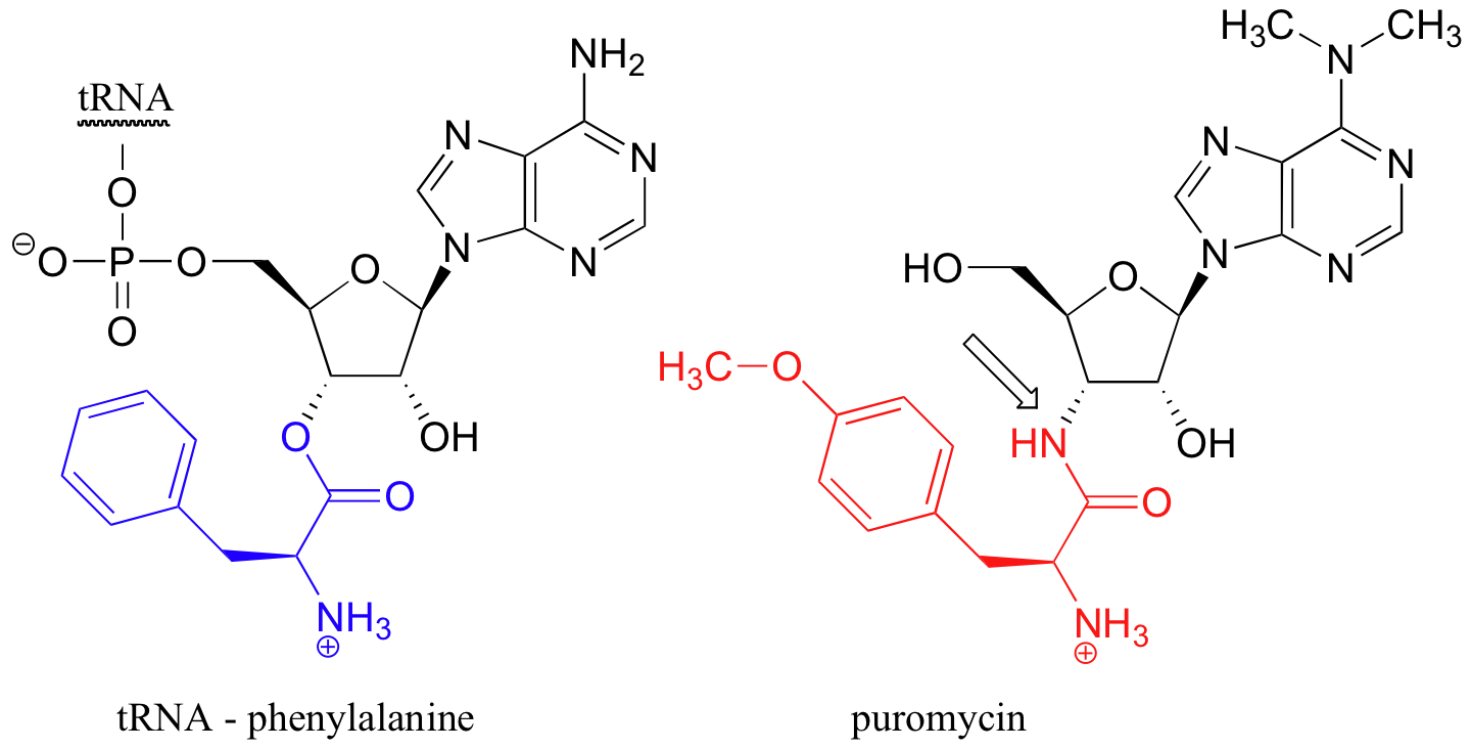
Transcrip-
ción
in vitro

Se introduce el **casquete 5'** y se une al **extremo 3'** **PEG-puromicina**.

Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

IVV-hitSeq



La puromicina se une a una cadena polipeptídica

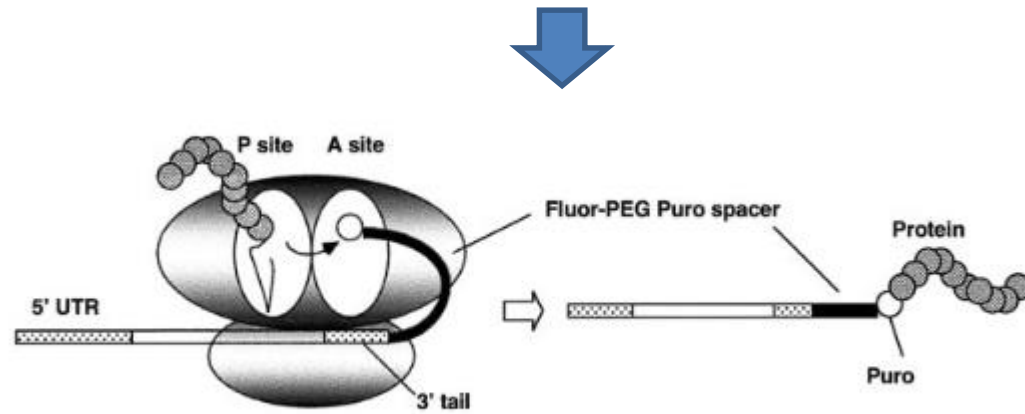
Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

IVV-hitSeq

El **RNA generado** (con cap 5' y puromicina en el extremo 3') es **traducido *in vitro***.

Traducción
in vitro del
RNA



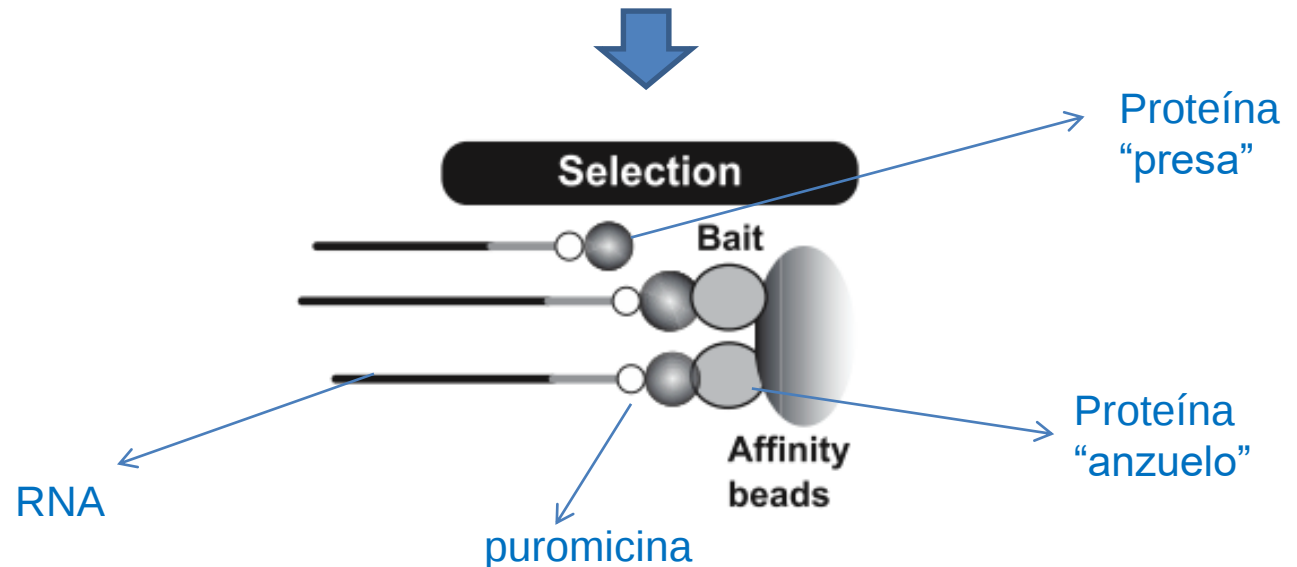
Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

IVV-hitSeq

Las fusiones RNA-proteína son expuestas con microesferas conteniendo proteínas “anzuelo”

Selección
con proteínas
específicas



Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*

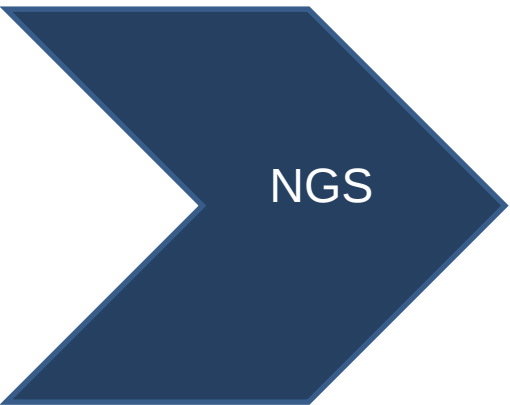
IVV-hitSeq



Las **fusiones RNA-proteínas** específicamente capturadas son **recuperadas**.

El **RNA** es pasado a **cDNA** y **amplificado**.

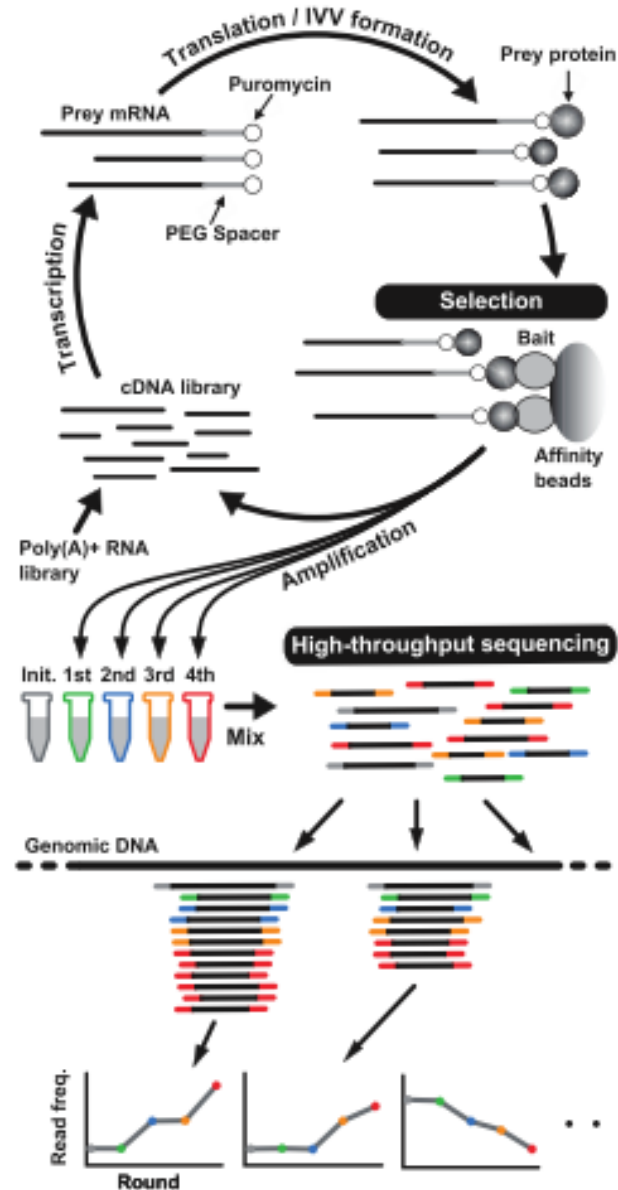
El producto de amplificación es “input” de **NGS**.



NGS

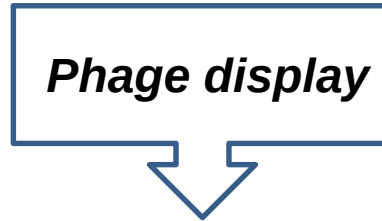
Interactómica

Proteína-Proteína: *IVV -HitSeq*



Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

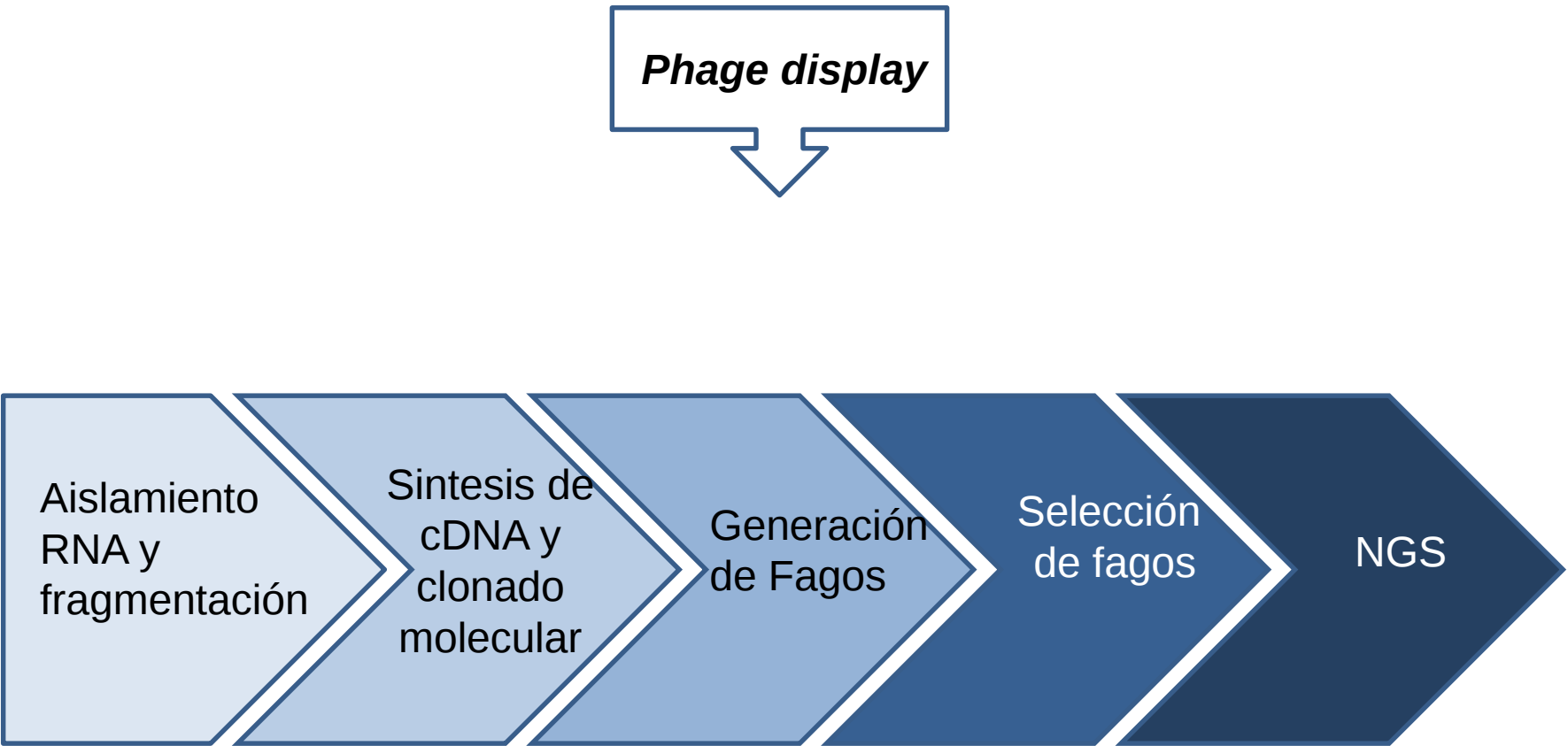


- El sistema conocido como *Phage display* permite generar una **colección de fagos filamentosos** recombinantes que exponen **distintos epitopes** en uno de sus extremos.
- Estos **fagos** pueden ser **diferencialmente capturados** con **proteínas “anzuelo” específicas**, y luego de amplificados, secuenciados para inferir las secuencias involucradas.

Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display



Aislamiento
RNA y
fragmentación

Síntesis de
cDNA y
clonado
molecular

Generación
de Fagos

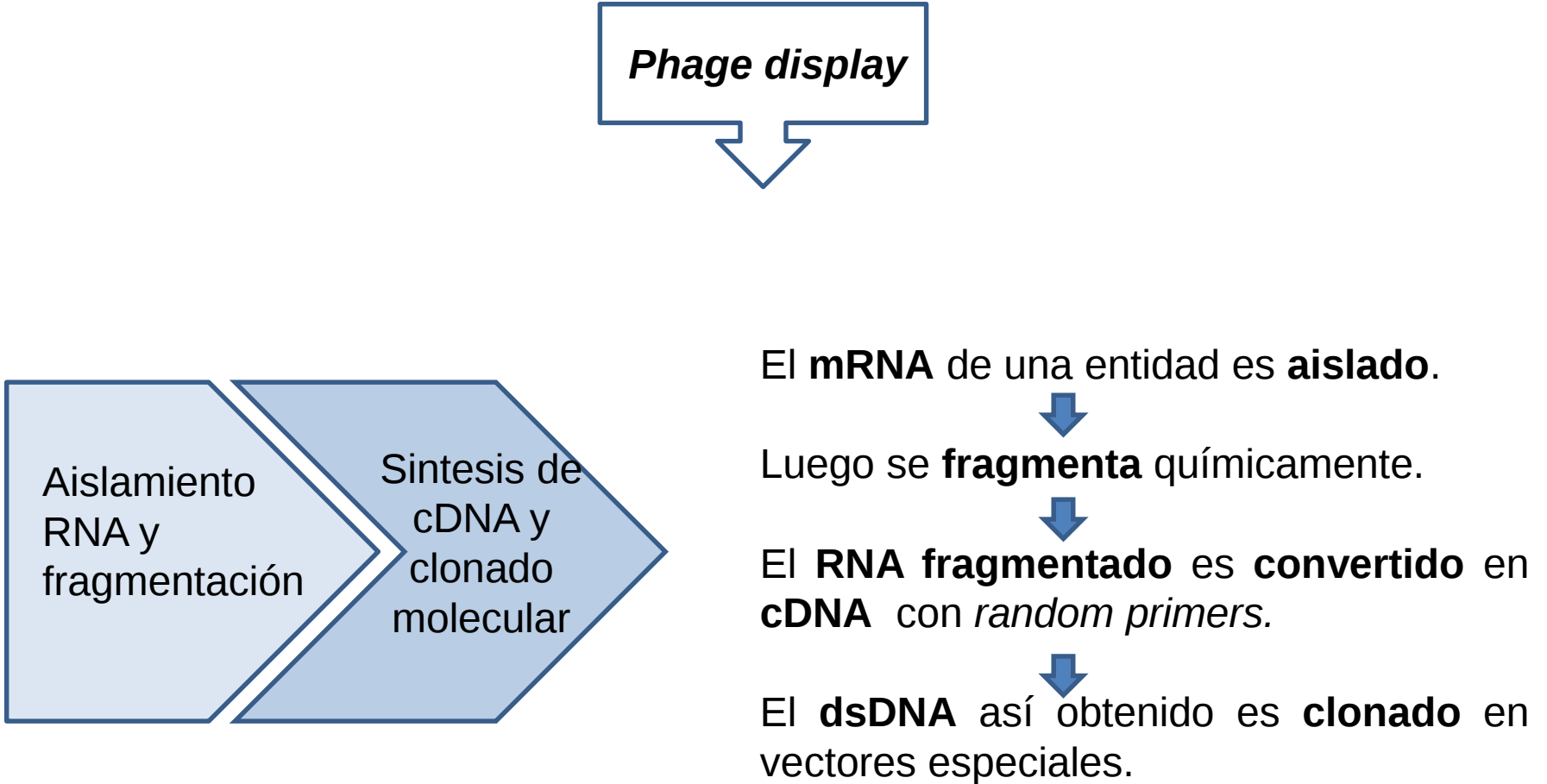
Selección
de fagos

NGS

Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display



Aislamiento
RNA y
fragmentación

Síntesis de
cDNA y
clonado
molecular

El **mRNA** de una entidad es **aislado**.

Luego se **fragmenta** químicamente.

El **RNA fragmentado** es **convertido** en **cDNA** con *random primers*.

El **dsDNA** así obtenido es **clonado** en vectores especiales.

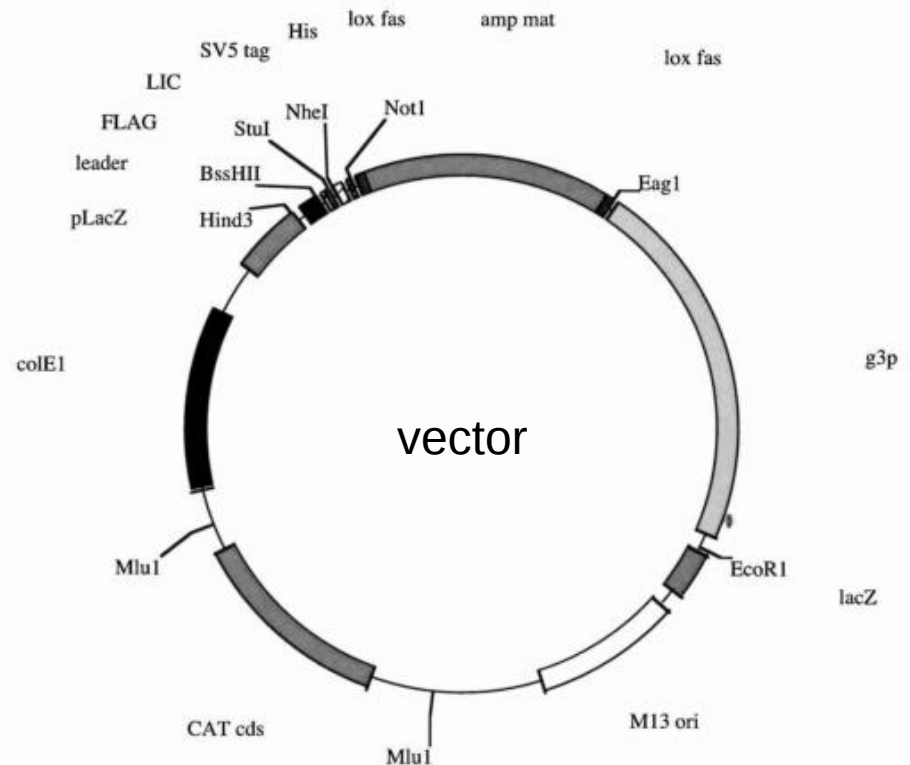
Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display

Aislamiento
RNA y
fragmentación

Síntesis de
cDNA y
clonado
molecular



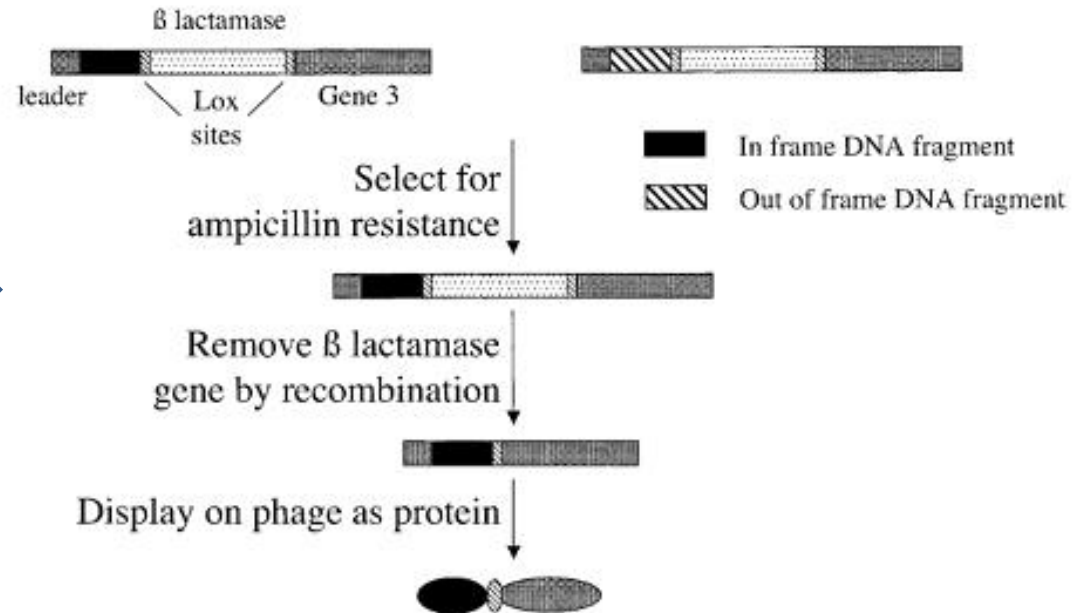
Interactivómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display

Aislamiento
RNA y
fragmentación

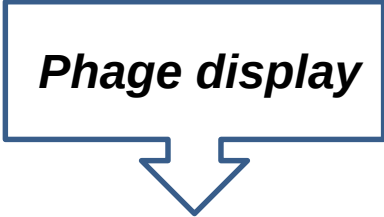
Síntesis de
cDNA y
clonado
molecular



Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display



Generación
de Fagos

Selección
de fagos

Los **clones bacterianos** conteniendo fragmentos de **ORFs** en las construcciones genéticas son **infectados** con **fago filamentoso helper**.



De este modo, se **genera** una **colección** de **pseudofagos** exponiendo diversos **epitopes** en la **proteína gp3** del extremo del filamento.

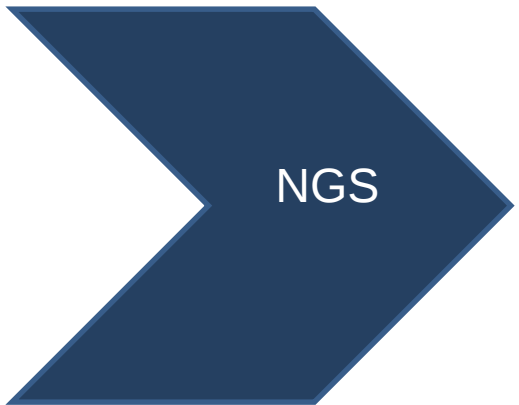
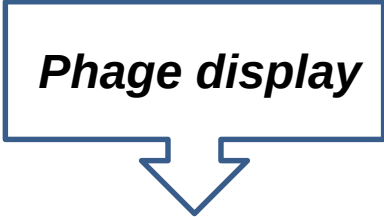


Los **fagos** son **expuestos** con la **proteína “anzuelo”** para su **selección**.

Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display



NGS

Los fagos seleccionados son
amplificados en *Escherichia coli*.



Los **insertos** son **recuperados** y sometidos
a **secuenciación**.

Interactómica

Proteína-Proteína: *Phage display*

Phage display

