

Detekce protein-proteinových interakcí metodami FRET a BRET

Detection of Protein-protein Interactions by FRET and BRET Methods

Matoulková E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Studium protein-proteinových interakcí *in vivo* se v současné době dostává do popředí zájmu – umožňuje prokázat nebo upřesnit již známé protein-proteinové interakce a odhalit jejich inhibitory, zachytit konformační změny proteinů, objasnit nebo upřesnit signální kaskády v živé buňce s minimálním ovlivněním jejího buněčného prostředí. Jedním z možných přístupů umožňujících tuto charakteristiku jsou metody využívající rezonančního přenosu energie – fluorescenční (FRET) a jeho pozdější modifikace bioluminiscenční (BRET). Tyto metody jsou založeny na zviditelnění proteinových interakcí pomocí excitace fluorescenčních proteinů, ať už světelně nebo enzymaticky. Tyto přístupy umožňují nejen lokalizovat proteiny v buňce nebo jejich organelách (případně i v malých živočiších), ale i kvantifikovat intenzitu fluorescenčního nebo luminiscenčního signálu a odhalit pevnost vazby mezi interakčními partnery. V tomto příspěvku je objasněn princip metod FRET a BRET, jejich konkrétní aplikace při studiu protein-proteinových interakcí a jsou popsány dosavadní poznatky získané s využitím těchto metod a upřesňující některé molekulární a buněčné mechanismy a signalizace související s nádorovou biologií.

Klíčová slova

FRET – BRET – zobrazovací metody – protein-proteinové interakce *in vivo*

Summary

Nowadays, *in vivo* protein-protein interaction studies have become preferable detecting methods that enable to show or specify (already known) protein interactions and discover their inhibitors. They also facilitate detection of protein conformational changes and discovery or specification of signaling pathways in living cells. One group of *in vivo* methods enabling these findings is based on fluorescent resonance energy transfer (FRET) and its bioluminescent modification (BRET). They are based on visualization of protein-protein interactions via light or enzymatic excitation of fluorescent or bioluminescent proteins. These methods allow not only protein localization within the cell or its organelles (or small animals) but they also allow us to quantify fluorescent signals and to discover weak or strong interaction partners. In this review, we explain the principles of FRET and BRET, their applications in the characterization of protein-protein interactions and we describe several findings using these two methods that clarify molecular and cellular mechanisms and signals related to cancer biology.

Key words

FRET – BRET – imaging methods – protein-protein interaction *in vivo*

Práce byla podpořena granty GA ČR P206/12/G151 a GA ČR 13-00956S, Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, Z.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the Czech Science Foundation projects P206/12/G151 and 13-00956S, by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Eva Matoulková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: eva.matoulkova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 1. 2014

Přijato/Accepted: 31. 3. 2014

Úvod

Od objevení primární struktury zeleného fluorescenčního proteinu (green fluorescent protein – GFP) v roce 1992 [1] se v posledních 20 letech fluorescenční proteiny a jejich různorodé aplikace stávají nepostradatelnými při zkoumání a popisování molekulárních buněčných dějů, buněčné fyziologie, buněčných interakcí a signalizací v živých buňkách a v malých organizmech. Významný potenciál fluorescenčních proteinů ve srovnání s fluorescenčními značkami tkví v jejich snadné manipulovatelnosti metodami genového inženýrství, která umožňuje jejich snadnou a stabilní expresi v buňkách a organizmech (příprava stabilních buněčných linií i transgenních organizmů) [2,3]. Fluorescenční proteiny je možné konjugovat nebo fúzovat s nejrůznějšími biomolekulami a je tak možné studovat různé typy vazeb – od protein-proteinových interakcí (antigen-protilátka, ligand-receptor), přes DNA nebo RNA hybridizaci až po vazby proteinu s DNA anebo RNA [4]. Právě ex-

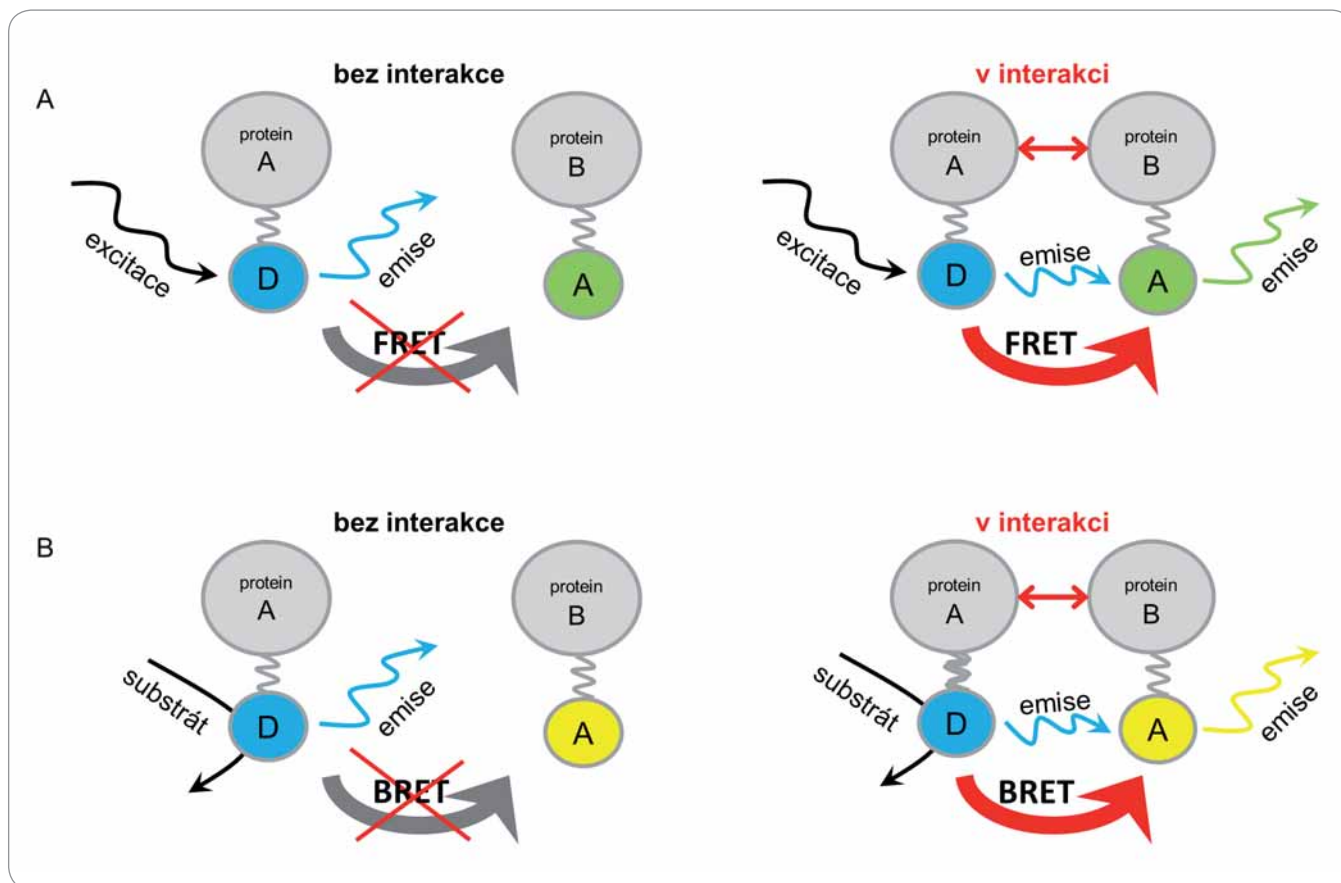
prese fluorescenčních proteinů samotnou buňkou umožňuje sledovat jednotlivé interakce v intaktním buněčném prostředí a reálně tak hodnotit celkový vliv chemických sloučenin (např. léčiv) na živou buňku či organizmus. V současnosti je tento „*in vivo*“ trend stále častěji využíván farmaceutickými firmami při charakterizaci nových sloučenin s potenciálním terapeutickým účinkem.

Fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie

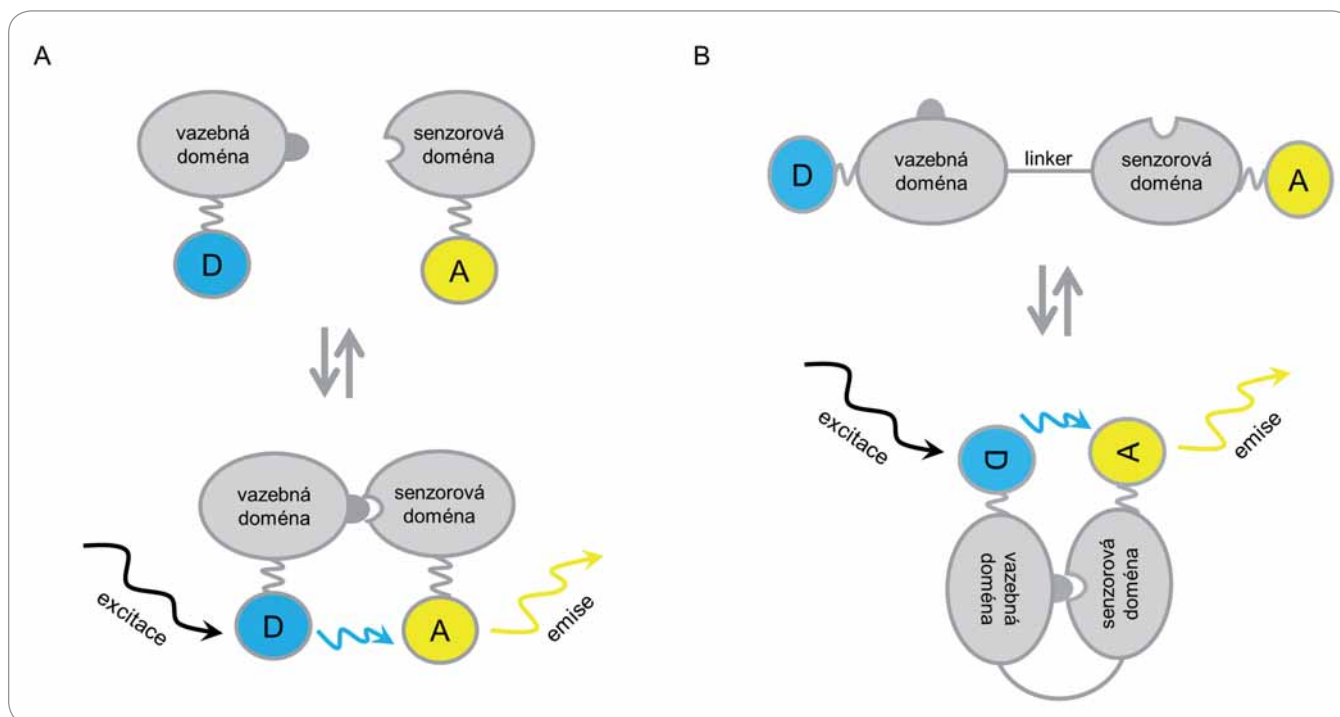
Základní a poprvé popsanou metodou využívající fluorescenční proteiny v živých buňkách je fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer – FRET) (obr. 1A). Metoda je založena na přenosu energie mezi dvěma sousedícími fluorescenčními molekulami (fluorofory) – z donoru na akceptor. Fluorofory se liší rozmezím vlnových délek svých emisních a excitačních spekter. Po excitaci donorové molekuly (externím zdrojem monochromatického světla

o příslušné vlnové délce) dochází k emisi světla o vlnové délce charakteristické pro daný fluorofor. Takto uvolněná energie ve formě světla je zachycena akceptorovou molekulou a dochází tak k její excitaci a následně i k emisi světla o vlnové délce charakteristické pro akceptorovou molekulku. Světlo emitované akceptorem je finálně zachyceno a jeho intenzita je měřena detektorem, případně jej lze pozorovat mikroskopicky za využití příslušného světelného filtru [5].

Pro přenos energie mezi dvěma fluorofory je vždy nezbytné dodržet dvě základní podmínky – donor a akceptor musí být v dostatečné vzdálenosti (1–10 nm) a musí docházet k částečnému překryvu emisního (donorového) a excitačního (akceptorového) spektra (nejméně z 30 %) [6]. Vzájemná využitelnost a kombinovatelnost jednotlivých fluoroforů je tedy vzhledem k jejich rozdílným emisním a excitačním spektrům omezená. Nejčastěji využívané donorové a akceptorové dvojice fluorescenčních molekul jsou: 1. modrý fluorescenční



Obr. 1. Znázornění mechanismu rezonančního přenosu energie (proteinů v interakci a bez interakce).



Obr. 2. Dva typy biosenzorů: intermolekulární (A) a intramolekulární (B) a schéma jejich přenosu energie.

protein (cyan fluorescent protein – CFP) a žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein – YFP), 2. FITC a rhodamin, 3. CFP a červený fluorescenční protein DsRed, 4. modrý fluorescenční protein (blue fluorescent protein – BFP) a GFP, 5. Alexa488 a Cyanin 3 (Cy3), 6. GFP (nebo YFP) a DsRed, 7. Cy3 a Cyanin 5 (Cy5), 8. Alexa488 a Alexa555 [4].

Metodami genového inženýrství je možné jednotlivé fluorofory konjugovat s cílovými proteiny (případně s konkrétními vazebnými doménami) a navrhnout i vytvořit tzv. biosenzory umožňující studovat jednotlivé interakce a vazebné schopnosti těchto proteinů. Rozlišují se biosenzory dvojího typu: 1. intermolekulární (bimolekulární) a 2. intramolekulární (unimolekulární) [7].

Intermolekulární biosenzory jsou tvořeny dvěma molekulami – donorovou a akceptorovou molekulou, které jsou spojeny s vazebnou (donorovou) nebo sensorovou (akceptorovou) doménou (případně proteiny) (obr. 2A). Jsou využívány především při studiu a detekci protein-proteinových interakcí v buňkách. Jejich výhodou je snadná příprava pomocí dvou plazmidů exprimujících proteiny fúzané s fluorofory, jejichž intenzita signálu je zachytitelná detektorem.

Nejsou však vhodné pro rutinní využití, protože měření a kvantifikace FRET-signálu vyžaduje citlivou a rychlou detekci fluorescenčního signálu, který rychle ztrácí svou intenzitu. Nadto dochází ke vzájemné excitaci akceptorových molekul fluoroforu, a tím vytváření falešně pozitivního signálu [6].

Druhým typem biosenzorů jsou intramolekulární biosenzory tvořené jednou molekulou sestávající z akceptorového a donorového fluoroforu navzájem propojených linkerem a konjugovaných s příslušnou vazebnou nebo sensorovou doménou (obr. 2B). Využití tohoto typu slouží ke snazší kvantifikaci v živých systémech než v případě intermolekulárních biosenzorů. Na druhou stranu je obtížnější a zdlohavější jejich návrh, příprava a následná evaluace systému [5].

Doposud bylo vyvinuto množství intramolekulárních biosenzorů sledujících koncentraci iontů v buňce, sacharidy, fosfolipidy, aktivitu proteinkináz nebo GTPas a další. Byly také navrženy a vytvořeny biosenzory sledující aktivitu onkoproteinů, např. zvýšenou aktivitu Ras v lamelipodiích po stimulaci epidermálním růstovým faktorem (epidermal growth factor – EGF), začlenění

c-Raf do plazmatické membrány a vedlejší aktivaci c-Raf po stimulaci EGF nebo zvyšující se fosforylaci CrkII (člen rodiny Crk) po stimulaci EGF [5]. S využitím biosenzorů byla rovněž potvrzena interakce estrogenového receptoru α a transkripčního faktoru Sp1 v živých buňkách. Interakce ER α /Sp1 byla prokázána při regulaci řady genů asociovaných s buněčnou proliferací a buněčným cyklem [8].

První klinicky využitelný geneticky kódovaný biosenzor byl vyvinut a využit pro detekci kinázové aktivity Bcr-Abl a s ní související citlivostí k terapeutickým inhibitorům u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Aktivita Bcr-Abl byla sledována na základě zviditelnění fosforylace CrkL (nejcharakterističtějšího substrátu Bcr-Abl) přímo v izolovaných BMC a PBMC buňkách z krve pacientů s CML. Tyto navržené biosenzory jsou schopné rozlišit již malé populace buněk rezistentních k terapeutickým inhibitorům, a predikovat tak citlivost pacientů k terapii [9].

Nevýhodou FRET je znesnadnění interpretace výsledků vlivem vzájemné excitace akceptorových fluoroforů a samotným monochromatickým světlem excitujícím donorový fluorofor. Dále dochází k rychlému slábnutí signálu do-

Tab. 1. Přehled různých variant BRET a jejich nejčastějších donorových a akceptorových fluoroforů [2,16–20].

Metoda	Donor	Substrát	Donor λ_{emise} [nm]	Akceptor	Akceptor $\lambda_{excitace/emise}$ [nm]
BRET1	Rluc	CLZ-h	480	YFP	514/530
BRET2	Rluc Rluc8	CLZ-400a DeepBlueC	480 395	GFP	400/510
BRET3	luc Rluc8	D-Luc CLZ	565 480	DsRed Cy3, Cy3.5 mOrange	558/583 550/570 548/564
QD-BRET	Rluc Rluc8	CLZ	480	Qdot	605/655

noru a k buněčné autofluorescenci způsobené přítomností buněčných organel (mitochondrií a lysozomů) [4,10–12].

Bioluminiscenční rezonanční přenos energie

Bioluminiscenční rezonanční přenos energie (bioluminescence resonance energy transfer – BRET) je modifikací metody FRET (obr. 1B). BRET je oproti předchozí metodě zahájen enzymatickou reakcí katalyzovanou donorovou molekulou. To vede k až 10násobnému snížení nežádoucího měřeného signálu pozadí a tím umožňuje detekci až 40krát menšího množství proteinu při dosažení stejné intenzity signálu [13]. Jako donorová molekula není využíván fluorofor, a není tedy potřeba k aktivaci přenosu externí zdroj monochromatického světla. U BRET je donorovou molekulou enzym, který konvertuje specifický substrát a přitom uvolňuje světelnou energii, excitující vhodnou akceptorovou fluorescenční molekulu. Ta následně, stejně jako u FRET, emituje světlo o patřičné vlnové délce a to je finálně zachyceno detektorem [14].

Podmínky pro přenos energie jsou podobné jako u FRET – molekuly musí být v dostatečné vzdálenosti (méně než 10 nm) a emisní spektrum donoru a excitační spektrum akceptoru se musí překrývat. Pokud k interakci mezi sledovanými (fúzanými proteiny s donorem a akceptorem) molekulami nedochází, je zachycováno pouze světlo vznikající při transformaci substrátu. Interagují-li fúzané proteiny, dojde k přenosu energie z donoru na akceptor a následně

k emisi světla akceptorem. Tak je možné detekovat interakce mezi různými nebo i stejnými proteiny či strukturální a konformační změny proteinu [12].

Metoda BRET byla poprvé popsána v roce 1999 [15] a od té doby bylo vyvinuto několik jejích variant využívajících různé substráty a kombinace donoru a akceptoru. Jednotlivé modifikace jsou označovány jako BRET1, BRET2, BRET3 (v pořadí podle popisu a charakterizace) a nejnovější QD-BRET (tab. 1).

Původní popsána varianta je označována jako BRET1 [15]. Donorovou molekulou je luciferáza Rluc (pocházející ze žahavce renila fialová), substrátem pak coelenterazine h (CLZ-h) a jako akceptorová molekula je YFP nebo jeho varianty (topaz, citrine, venus, YPet) [12]. Později byla metoda pozměněna do podoby BRET2 [2], u které se místo CLZ-h využívá jeho analog CLZ-400a nebo DeepBlueC a v některých případech se používá mutovaná varianta Rluc – Rluc8. Jako akceptor jsou využívány varianty GFP (GFP2 nebo GFP10). Výhoda BRET2 oproti BRET1 je větší vzdálenost emisních rozmezí donorové a akceptorové molekuly, ovšem DeepBlueC jako substrát má asi 100–300krát sníženou excitační schopnost (což je možné částečně nahradit mutantem Rluc8, který má přibližně 30krát zvýšenou emisní aktivitu).

Další varianta BRET je BRET3 využívající substrát D-luciferin (D-Luc). Donorovou molekulou je světlouščí luciferáza (luc) nebo Rluc8 a akceptorovými molekulami pak DsRed, Cy3, Cy3.5 nebo mOrange [16–18]. Předpokládaná vý-

hoda BRET3 je nižší buněčná autofluorescence a trvalejší světelná emise světlouščí luciferázy ve srovnání s Rluc. To je ovšem limitováno extrémně nízkými emisními signály a podstatným překrytím donorového a akceptorového emisního maxima.

Nejnověji popsána a v praxi vyzkoušená modifikace je tzv. QD-BRET [19,20], využívající jako akceptorovou molekulu tzv. quantum dots. Quantum dots jsou polovodičové nanokrystaly excitovatelné v příslušných vlnových délkách. Vlnová délka jimi emitovaného světla pak závisí na jejich průměru a jsou tak schopny pokrýt emisní spektrum od modré až po infračervenou oblast. Nevýhoda této varianty je ovšem velikost nanokrystalů (1,5–6 nm) a fakt, že k fúzi sledované molekuly (proteinu) s nanokrystaly nemůže dojít geneticky – nanokrystaly nejsou geneticky kódované, a tak nemohou být produkovány v živých buňkách. Lze je ovšem využít pro značení cílových molekul při *in vitro* diagnostice. Velká výhoda této metody je bezesporu jasná separace donorových a akceptorových emisních spekter [12].

V dnešní době je BRET považována za jednu z nejuniverzálnějších metod pro studium protein-proteinových interakcí v živých buňkách. Abnormální funkce (hyperaktivace nebo inhibice) proteinů je často pozorována u různých závažných onemocnění (např. nádorová nebo neurodegenerativní onemocnění). Řada studií tuto metodu využívá: 1. pro screening nových receptorových ligandů a jejich vliv na aktivitu receptoru; 2. pro sledování aktivity enzymů – proteázové, kinázové;

3. pro sledování a identifikace protein-proteinových interakcí a jejich inhibitorů nebo 4. pro popsání signálních buněčných drah [12,21–23]. Slouží tak především k identifikaci bioaktivních sloučenin ovlivňujících buněčné vlastnosti.

Závěr

Metoda FRET a její modifikace BRET jsou v současné době intenzivně se rozvíjející metody a spolu s technickým pokrokem v oblastech mikroskopického zobrazování a vysoce citlivé i přesné detekce světelného záření o různých vlnových délkách umožňují sledovat protein-proteinové interakce a konformační změny proteinů v živých buňkách nebo malých organizmech prostorově a v reálném čase s minimálním zásahem do buněčného prostředí [3]. Vzhledem k nutnosti genového inženýrství při přípravě jednotlivých FRET- nebo BRET-biosenzorů a při přípravě FRET- nebo BRET-fluoroforů fúzovaných se sledovanými proteiny je využití těchto metod v klinické praxi prozatím obtížné, i když první klinická aplikace již byla publikována [9]. Nicméně tyto přístupy studia proteinových interakcí *in vivo* začínají být hojněji využívány při sledování, testování a ověřování vlivu různých doposud necharakterizovaných chemických látek a sloučenin a jejich inhibitorů na buňku nebo živý organizmus (myši). Stejně tak začínají být tyto metody uplatňovány při sledování účinku potenciálních léčiv využitelných nejen ve farmaceutickém průmyslu [24].

Literatura

1. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW et al. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111(2): 229–233.
2. Bertrand L, Parent S, Caron M et al. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J Recept Signal Transduct Res* 2002; 22(1–4): 533–541.
3. De A, Loening AM, Gambhir SS. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7175–7183.
4. Zadrán S, Standley S, Wong K et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 96(4): 895–902. doi: 10.1007/s00253-012-4449-6.
5. Aoki K, Komatsu N, Hirata E et al. Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 614–619. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02196.x.
6. Day RN, Davidson MW. Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells. *Bioessays* 2012; 34(5): 341–350. doi: 10.1002/bies.201100098.
7. Kiyokawa E, Hara S, Nakamura T et al. Fluorescence (Förster) resonance energy transfer imaging of oncogene activity in living cells. *Cancer Sci* 2006; 97(1): 8–15.
8. Kim K, Barhoumi R, Burghardt R et al. Analysis of estrogen receptor alpha-Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer. *Mol Endocrinol* 2005; 19(4): 843–854.
9. Mizutani T, Kondo T, Darmanin S et al. A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15): 3964–3975. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0548.
10. Boute N, Jockers R, Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(8): 351–354.
11. Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 2006; 132(6): 829–837.
12. Bacart J, Corbel C, Jockers R et al. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* 2008; 3(3): 311–324. doi: 10.1002/biot.200700222.
13. Arai R, Nakagawa H, Tsumoto K et al. Demonstration of a homogeneous noncompetitive immunoassay based on bioluminescence resonance energy transfer. *Anal Biochem* 2001; 289(1): 77–81.
14. Xia Z, Rao J. Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(1): 37–44. doi: 10.1016/j.copbio.2009.01.001.
15. Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(1): 151–156.
16. Arai R, Nakagawa H, Kitayama A et al. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. *J Biosci Bioeng* 2002; 94(4): 362–364.
17. Yamakawa Y, Ueda H, Kitayama A et al. Rapid homogeneous immunoassay of peptides based on bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase. *J Biosci Bioeng* 2002; 93(6): 537–542.
18. Loening AM, Wu AM, Gambhir SS. Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* 2007; 4(8): 641–643.
19. De A, Ray P, Loening AM, Gambhir SS. BRET3: A red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J* 2009; 23(8): 2702–2709. doi: 10.1096/fj.08-118919.
20. Yao H, Zhang Y, Xiao F et al. Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46(23): 4346–4349.
21. Boute N, Pernet K, Issad T. Monitoring the activation state of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* 2001; 60(4): 640–645.
22. Gavet O, Pines J. Progressive activation of Cyclin B1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* 2010; 18(4): 533–543. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.013.
23. Couturier C, Deprez B. Setting up a bioluminescence resonance energy transfer high throughput screening assay to search for protein/protein interaction inhibitors in mammalian cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 100. doi: 10.3389/fendo.2012.00100.
24. Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M. Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from *in vitro* to *in vivo*: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Dev Growth Differ* 2013; 55(4): 515–522. doi: 10.1111/dgd.12039.