

Applikation Durchflusszytometrie

Quantifizierung von Protein-Protein Interaktionen

Protein-Protein-Interaktionen spielen bei allen zellulären Prozessen eine essentielle Rolle und sind daher Target vieler therapeutischer Ansätze. Der Nachweis erfolgt herkömmlich durch Immunpräzipitation oder durch auf FRET-basierenden Methoden und anschließender mikroskopischer Auswertung. Kombiniert mit der Durchflusszytometrie ist jedoch eine Hochdurchsatz-Analyse möglich, die es erlaubt, viele Interaktionsereignisse in kurzer Zeit und auf Einzelzellbasis zu messen.

Nachfolgend sind drei Verfahren unter Verweis auf weiterführende Literatur kurz erläutert.

Methodik	Nachweis
FCPIA (flow cytometry protein interaction assay)	u.a. G-Proteine und deren Regulatoren
FCET (flow cytometry energy transfer)	u.a. Transgene Proteine
IP-FCM (immunoprecipitation by flow cytometry)	Interaktion in Suspension (z.B. Blut, Zelllysate)

FCPIA (flow cytometry protein interaction assay)

Hierbei wird der biotinylierte Bindungspartner A an Avidin-beschichtete Beads immobilisiert und diese anschließend mit einer Lösung Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Bindungspartner B inkubiert. Bei einer Interaktion beider Partner kann die Fluoreszenz durchflusszytometrisch detektiert werden. Eine Erweiterung des Assays ist durch den Einsatz unterschiedlich fluoreszierender Beads im Multiplex-Format möglich.

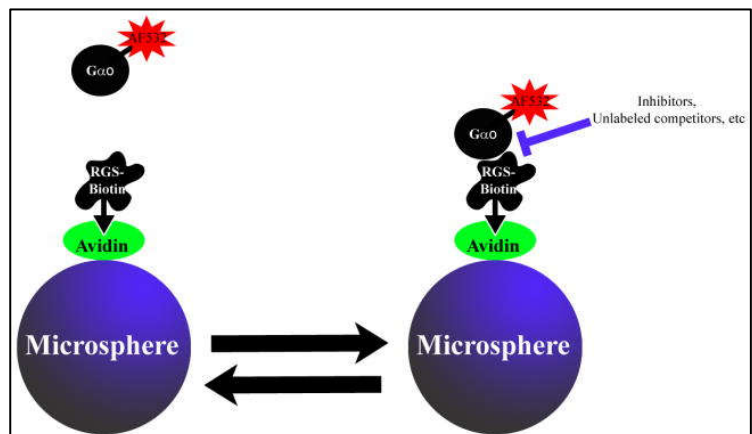


Abbildung 1: Prinzip des FCPIA für den durchflusszytometrischen Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (Blazer *et al.* 2010.)

Weiterführende Literatur:

Blazer *et al.* (2010): Use of Flow Cytometric Methods to Quantify Protein-Protein-Interactions. Current Protocols in Cytometry 13.11.1 – 13.11.15.

FCET (Flow Cytometric Energy Transfer)

Basierend auf dem FRET-Prinzip werden die zu untersuchenden, potentiell interagierenden Proteine markiert:

- über Expressionsvektoren als Fusionsprotein mit fluoreszierenden Farbstoffen oder,
- durch Inkubation mit spezifischen gegen die Bindungspartner gerichteten Antikörpern.

Dabei müssen sich das Emissionsspektrum des Donors und das Exzitationsspektrum des Akzeptors überlagern.

Bei Bindung beider Partner, d.h. einer räumlichen Nähe von ≤ 10 nm, wird die Fluoreszenz des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffes durchflusszytometrisch gemessen.

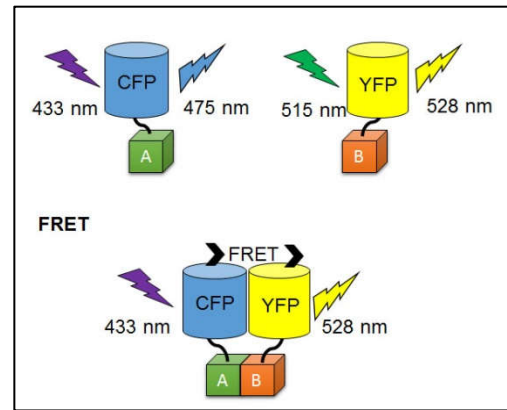


Abbildung 2: Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen am Beispiel der grün fluoreszierenden Proteine CFP und YFP, aus Noguchi und Golden (2017):

Weiterführende Literatur

Banning *et al.* (2010): A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells. PLoS One Vol. 5(2):e9344.

He *et al.* (2003): A Flow Cytometric Method to Detect Protein-Protein Interaction in Living Cells by Directly Visualizing Donor Fluorophore Quenching During CFP->YFP Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Cytometry Part A 55A: 71-85.

Noguchi und Golden (2017): Bioluminescent and fluorescent reporters in circadian rhythm studies

IP-FCM (immunoprecipitation detected by flow cytometry)

Hierbei werden zunächst Protein-spezifische Antikörper kovalent an Beads gekoppelt und mit der Protein-haltigen Probe inkubiert. Der Nachweis der einzelnen interagierenden Komponenten erfolgt durchflusszytometrisch nach Markierung des Komplexes mit spezifischen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern.

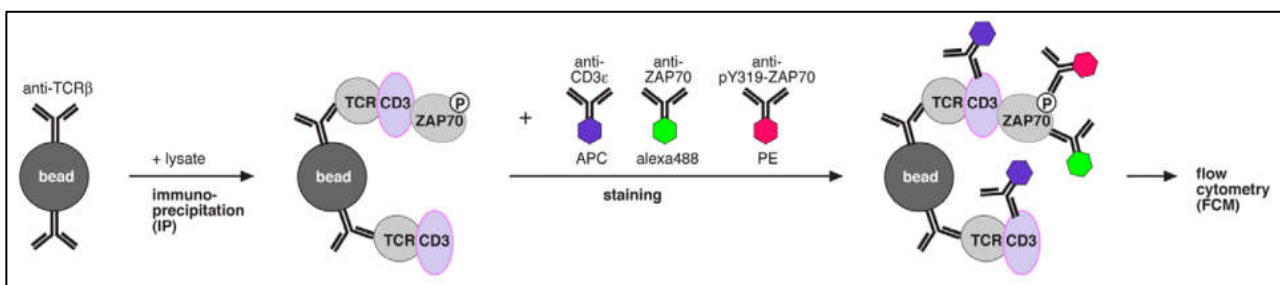


Abbildung 4: Prinzip der durchflusszytometrisch-detektierbaren Immunpräzipitation für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, aus Deswal *et al.* (2011).

Weiterführende Literatur

Davis *et al.* (2010). IP-FCM: immunoprecipitation detected by flow cytometry. Journal of visualized experiments : JoVE, (46), 2066.