

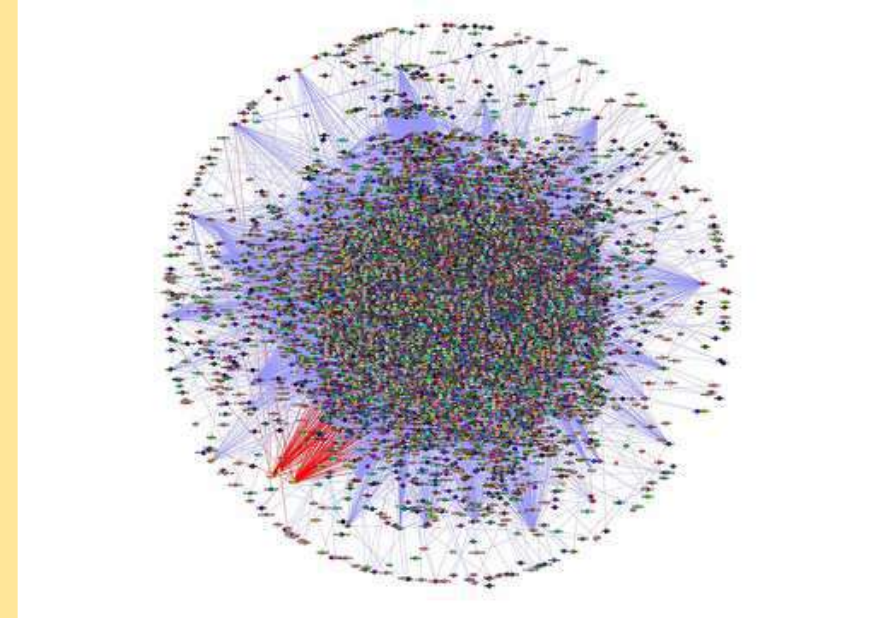
Studium interakcí protein-protein

- Dvouhybridní systém
- Ko-immunoprecipitace
- Knihovna „Phage display“
- „Pull-down assay“
- „Far-western blotting“
- Proteinová „microarray“

Interaktom

- soubor všech meziproteinových interakcí v dané buňce nebo organismu

- Interactions between molecules are central to how cells detect and respond to signals and affect:
 - Gene expression (transcription & translation)
 - DNA replication, repair and recombination
 - Signalling
 - And many other processes....
- Interactions are (mainly) mediated by many weak chemical bonds (van der Waals forces, hydrogen bonds, hydrophobic interactions)
- Accumulation of many bonds influences affinity and specificity of interactions



- Dvouhybridní systém
- Ko-imunoprecipitace
- Knihovna „Phage display“
- „Pull-down assay“
- „Far-western blotting“
- Proteinová „microarray“

Metody analýzy proteinových komplexů

- Gelová filtrace, ultracentrifugace
- TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza

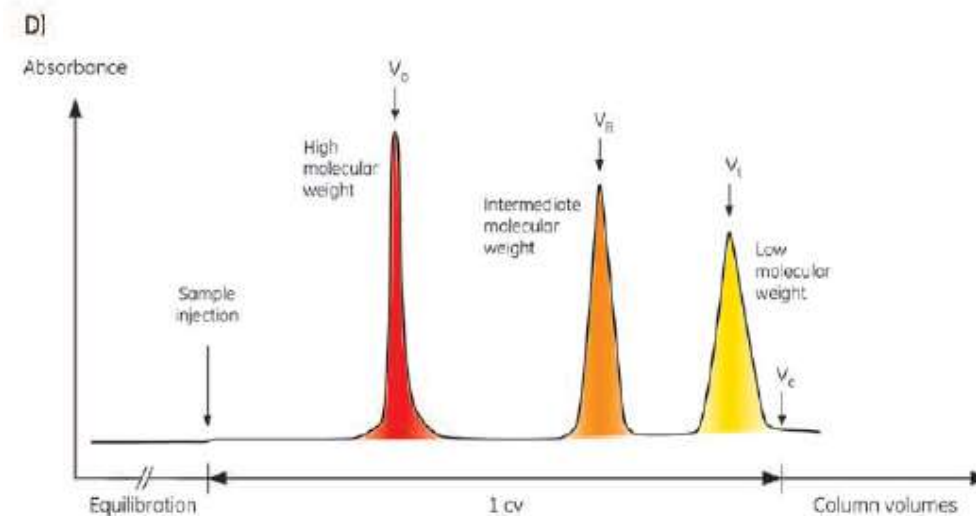
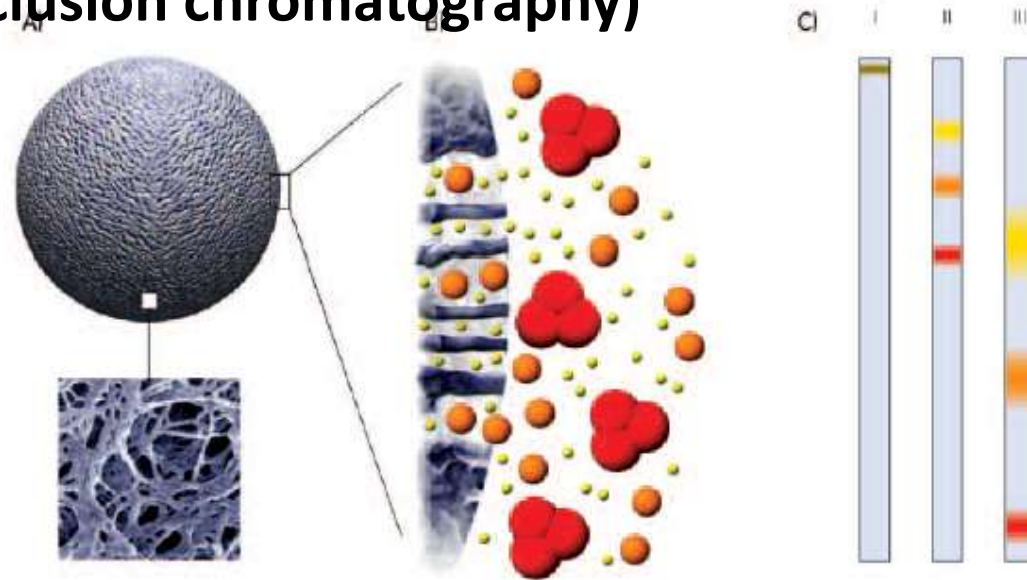
Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- ko-immunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...
- (kvasinkový) dvou-hybridní systém
- BiFC, FRET, ko-lokalizace, ko-exprese
- Fluorescenční anisotropie, SPR, ITC ...
- ko-krystalizace, cryoEM ...
- databáze (interactom a komplexy ...)
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)

Od komplexů k interakcím AMK

Metody analýzy proteinových komplexů

- Gelová filtrace (size exclusion chromatography)



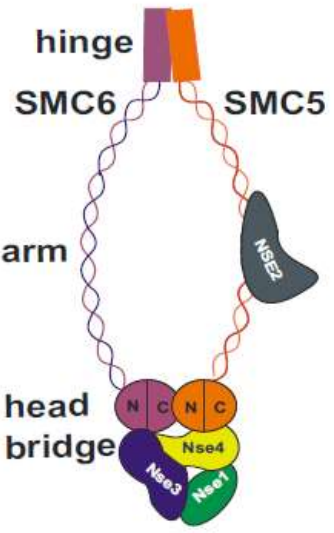
M

- G

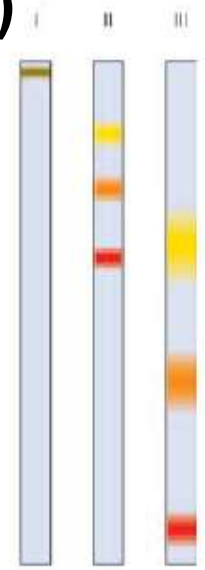
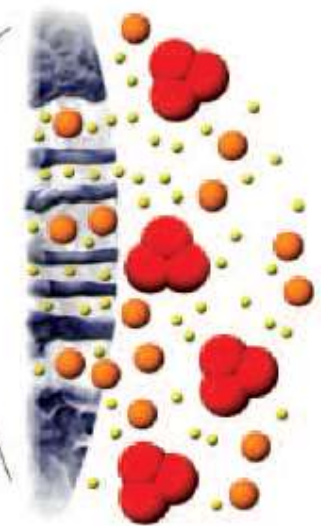
arm

head

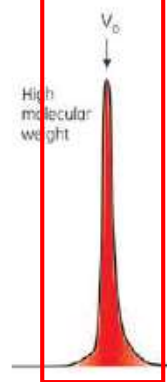
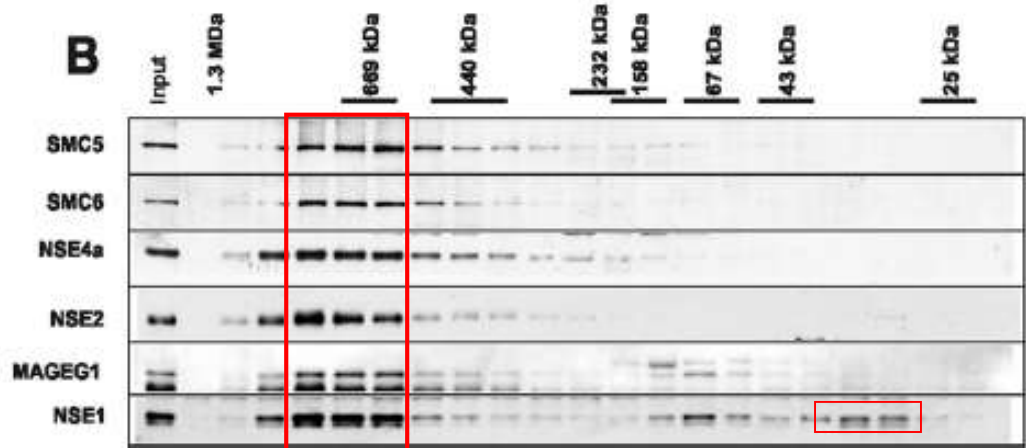
bridge



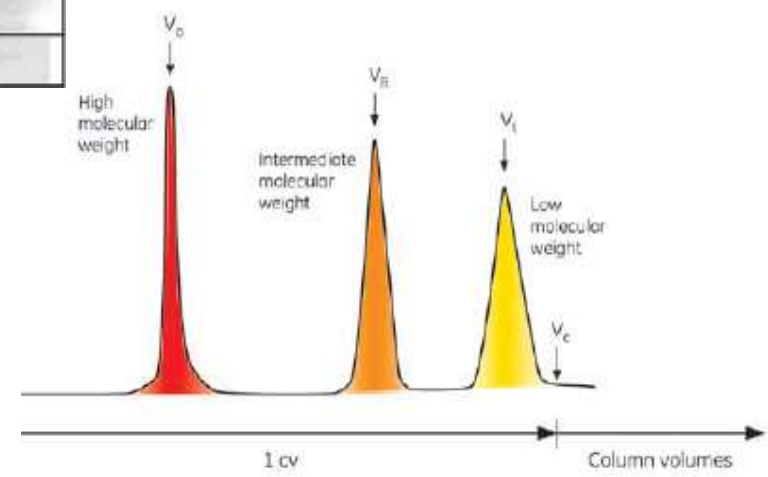
analýzy proteinových komplexů (size exclusion chromatography)



B



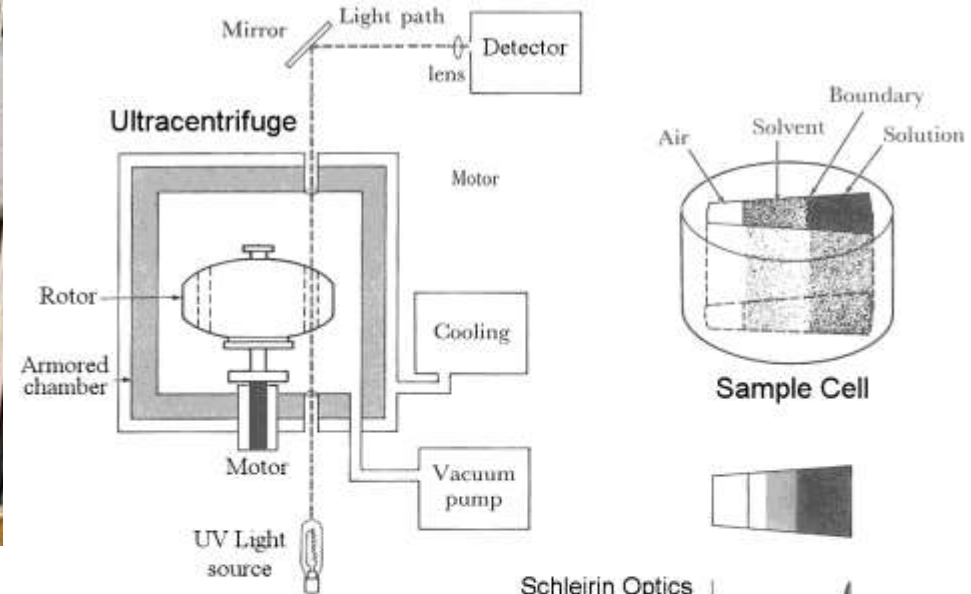
GF frakce lyzátu lidských buněk – podjednotky SMC5-6 komplexu identifikovány pomocí protilátek



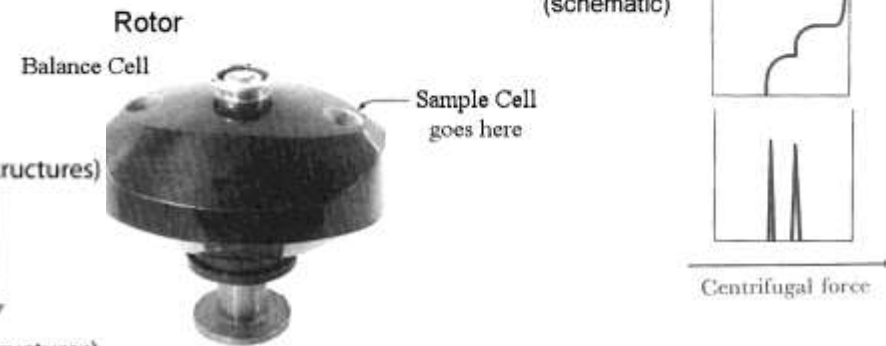
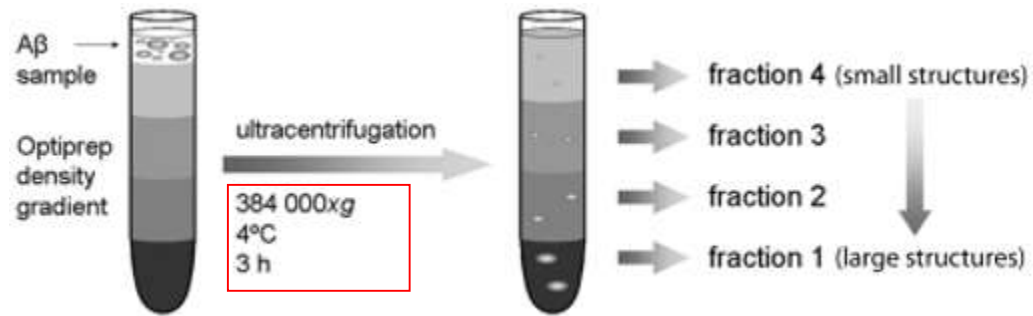
Taylor et al, MCB, 2008

Metody analýzy proteinových komplexů

ultracentrifugace



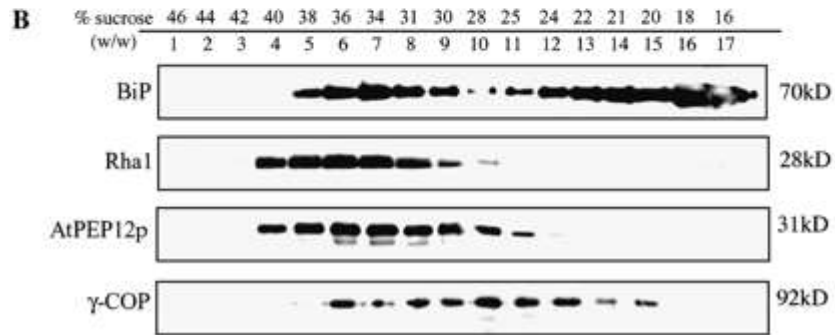
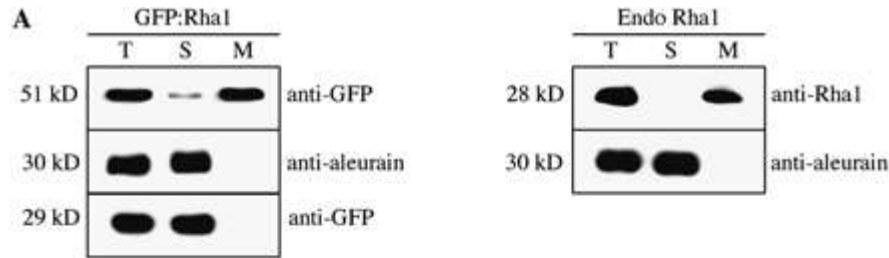
Cukerný/hustotní gradient



Je třeba přesně vyvážit!

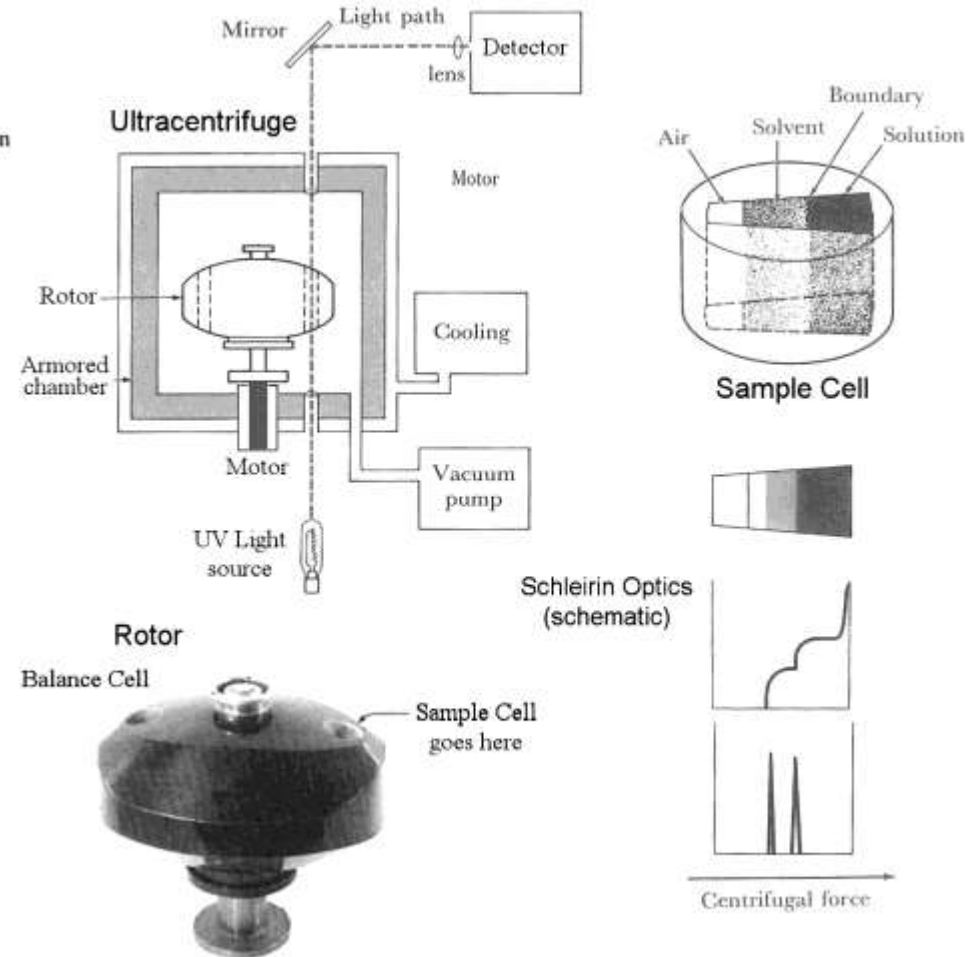
Metody analýzy proteinových komplexů

ultracentrifugace



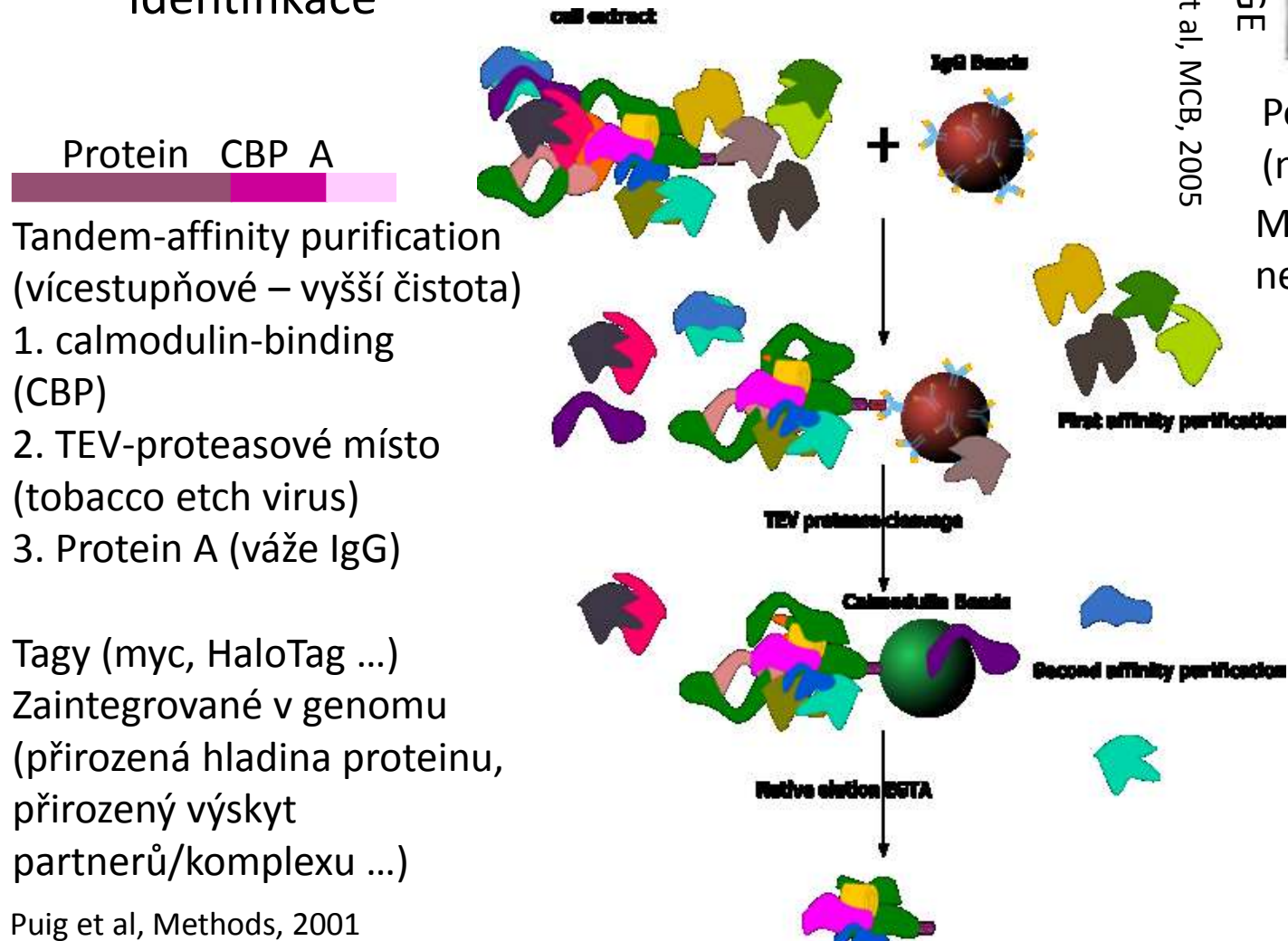
A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely (S – soluble, M – membranové frakce ... jaderná ...)

B. Jemný - cukerný gradient



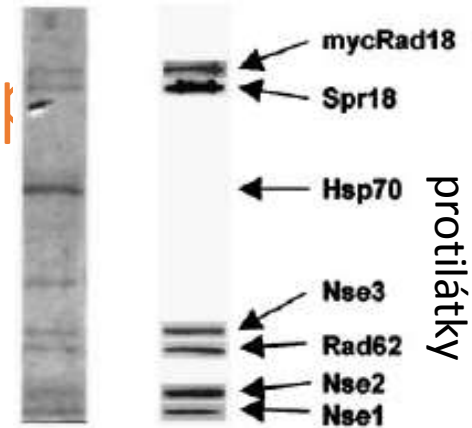
Metody analýzy proteinových komplexů

- Gelová filtrace, ultracentrifugace
- TAP-tag (jiné tagy a protilátky) purifikace a MS identifikace

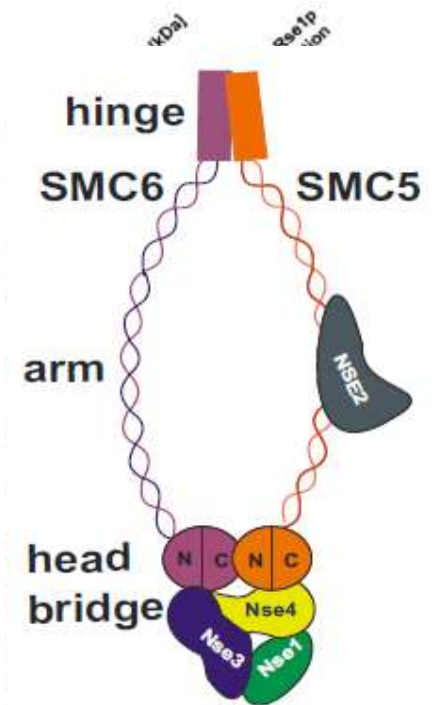


Sergeant et al, MCB, 2005

SDS-PAGE



Pozor na kontaminace (např. chaperony)
MS analýza SDS-PAGE nebo roztoku



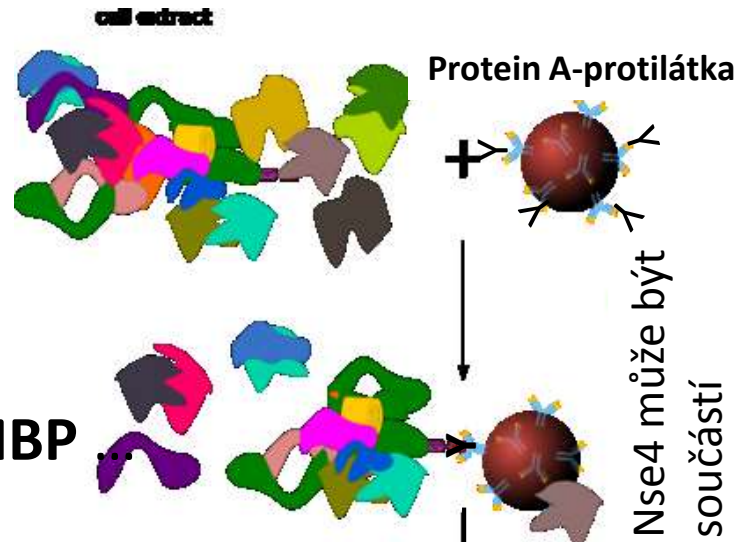
Metody analýzy proteinových komplexů

- Gelová filtrace, ultracentrifugace
- TAP-tag (jiné tagy a protilátky) purifikace a MS analýza

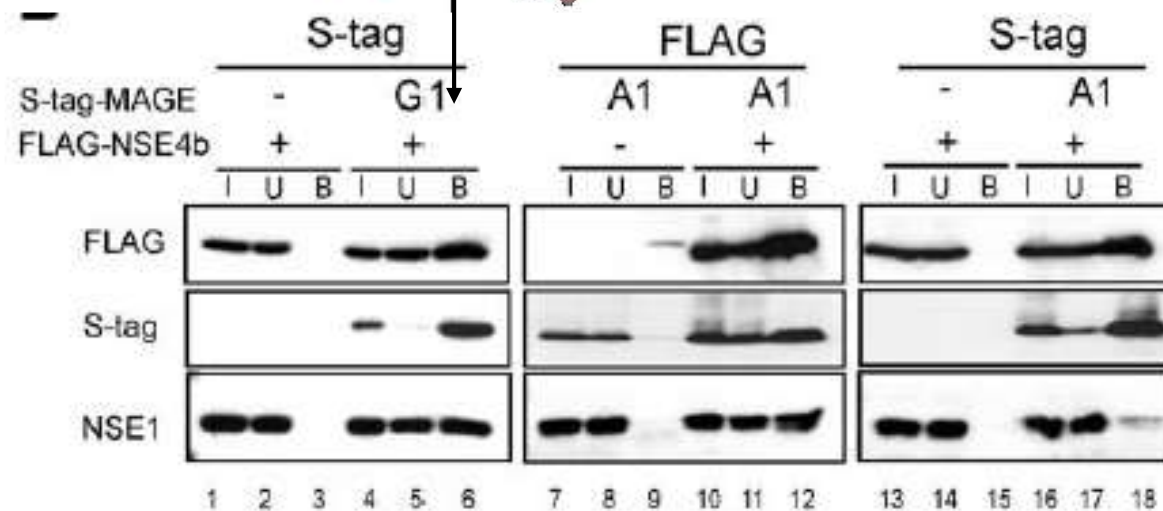
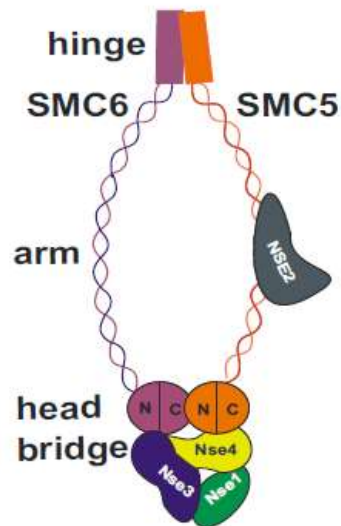
Protein Tag



Tagy (a protilátky):
Myc, FLAG, V5,
S-tag, GFP,
GST, Streptactin, MBP



- **ko-imunoprecipitaci** lze využít i pro analýzu protein-proteinových interakcí – uměle vnesené konstrukty (př. transfekce plasmidů uněk) **riziko nepřímých interakcí**



Metody analýzy proteinových komplexů

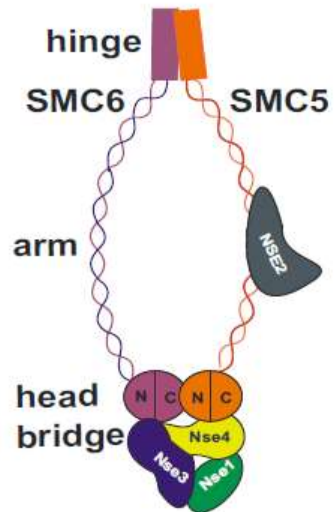
Pro stabilní komplexy – nelze použít pro charakterizaci struktury/architektury komplexů a pro analýzu slabých/přechodných interakcí

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

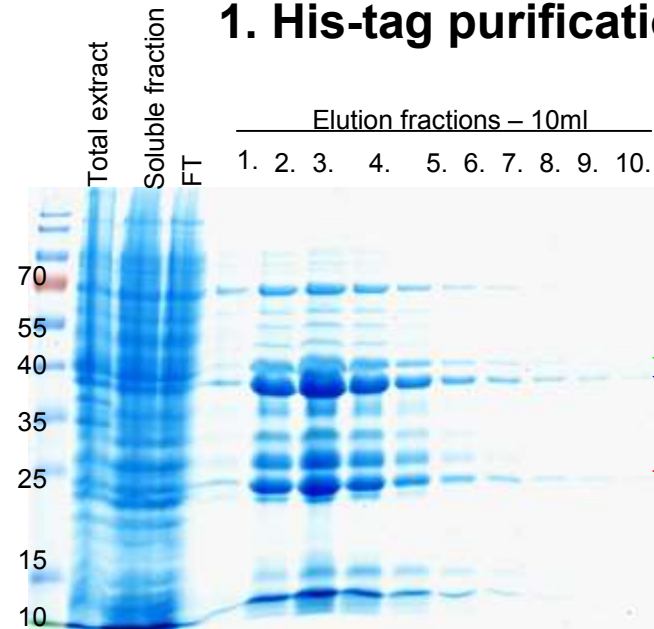
- **ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...**
- (kvasinkový) dvou-hybridní systém
- BiFC, FRET, ko-lokalizace, ko-exprese
- Flourescenční anisotropie, SPR, ITC ...
- ko-krystalizace, cryoEM ...
- databáze (interactom a komplexy ...)
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)

Ko-purifikace

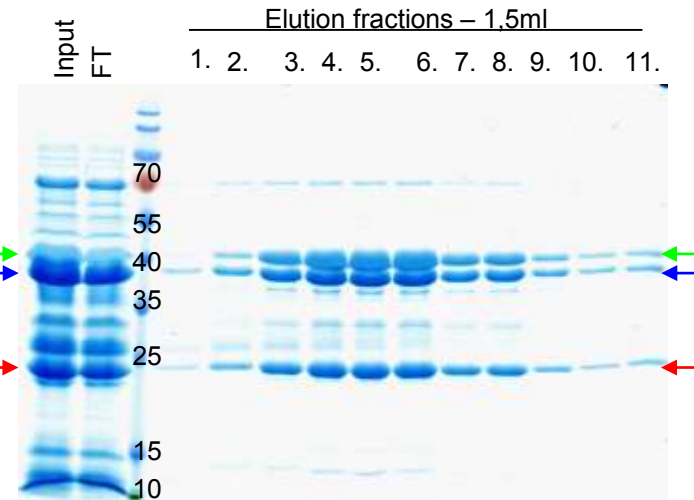
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**



1. His-tag purification



2. Strep-tag purification

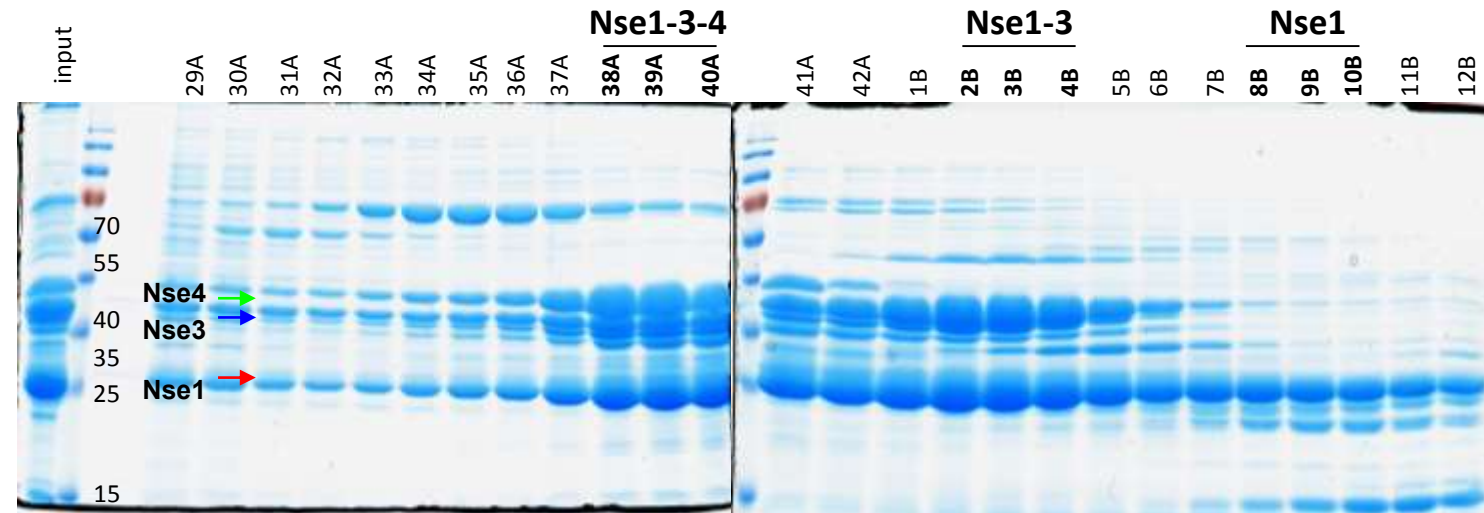
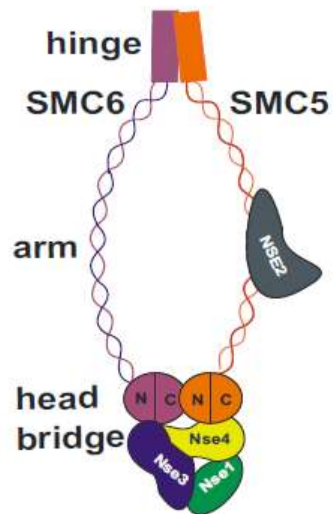
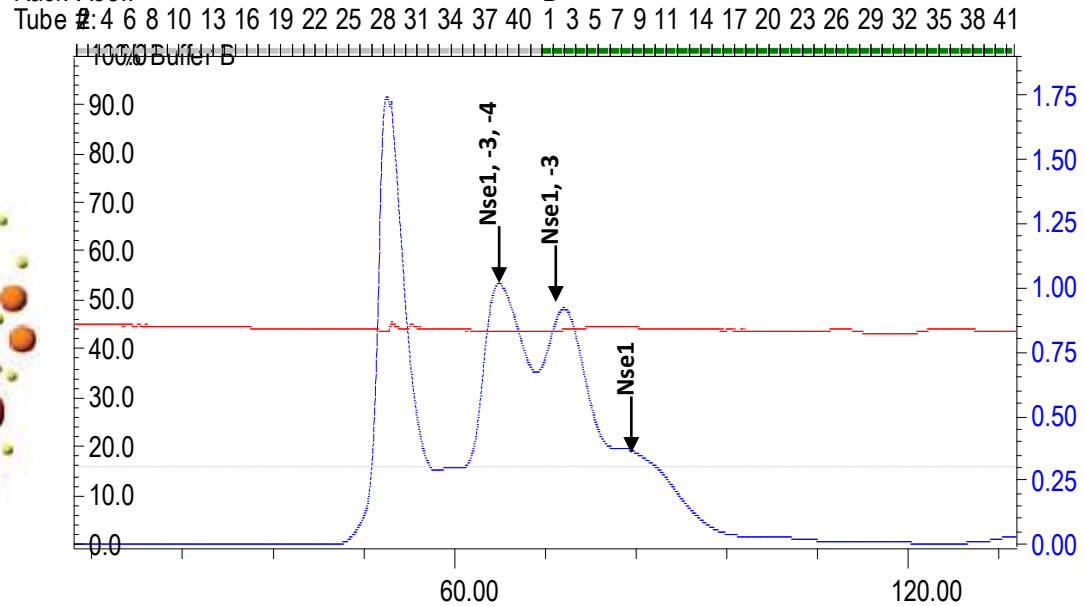
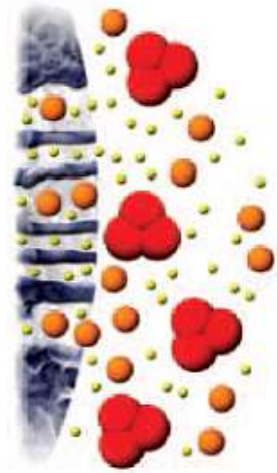


Nse4 protein se samostatně exprimuje málo a je nerozpustný

Ko-purifikace

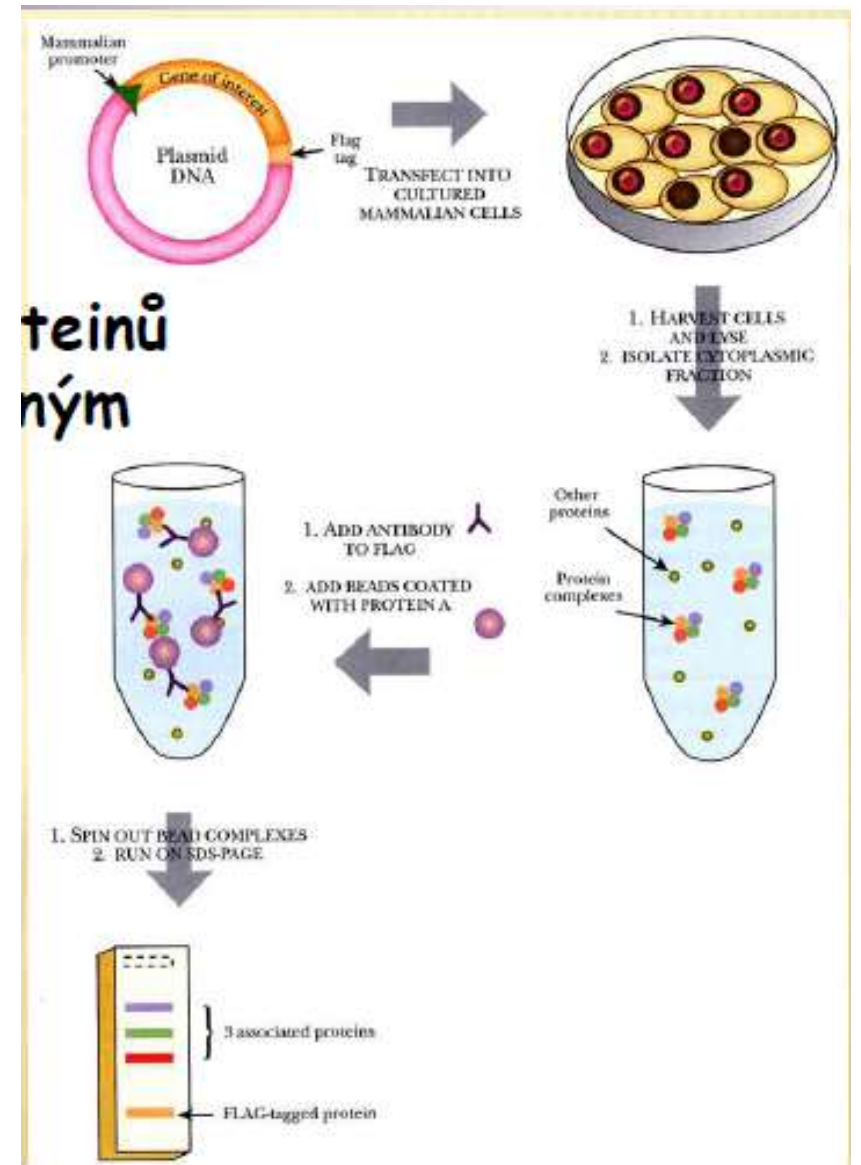
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**

Gelová
filtrace



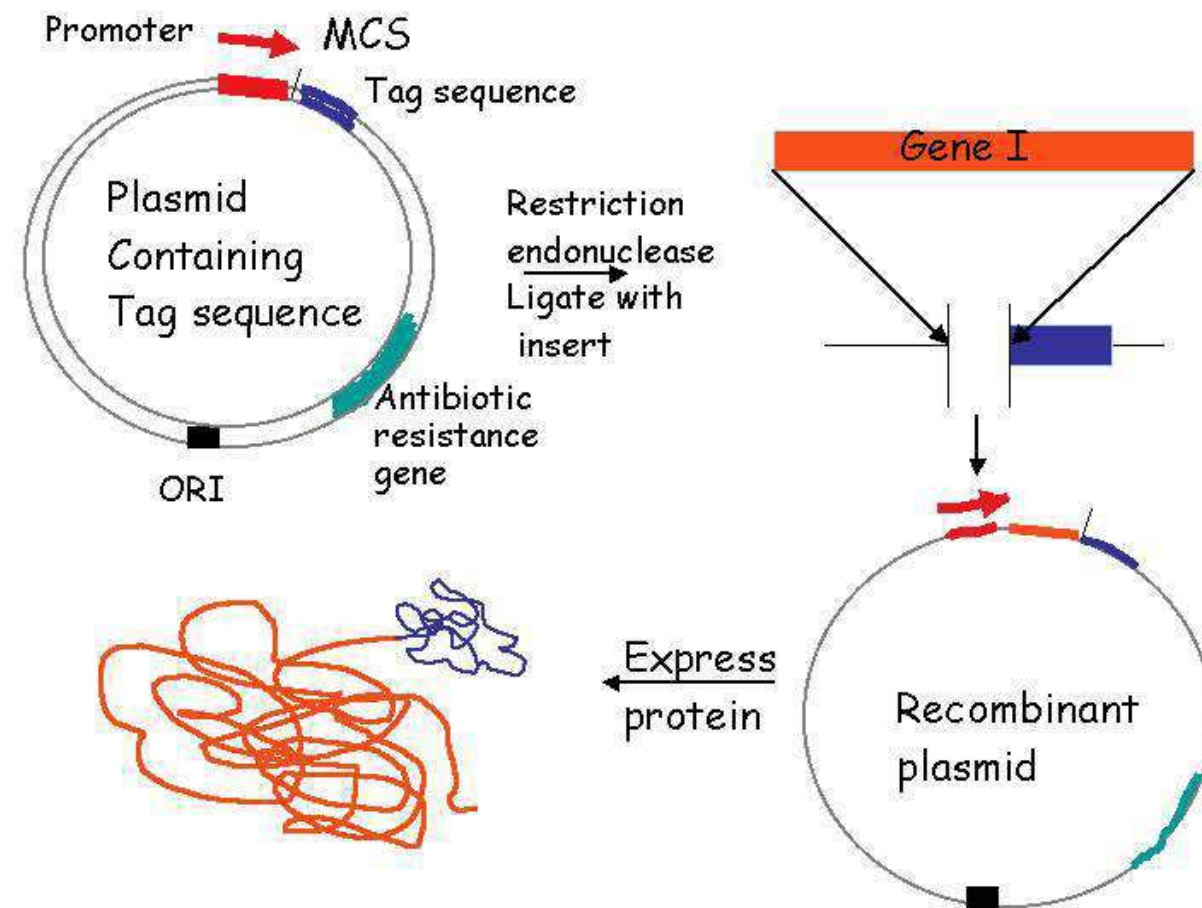
- Ko-immunoprecipitace

Hledání neznámých proteinů asociujících se studovaným proteinem

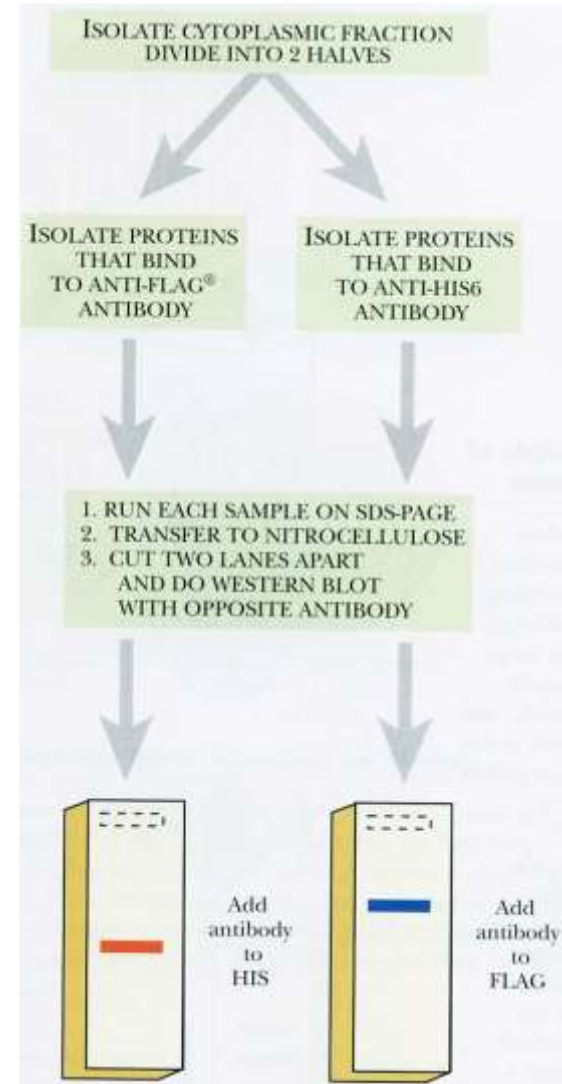
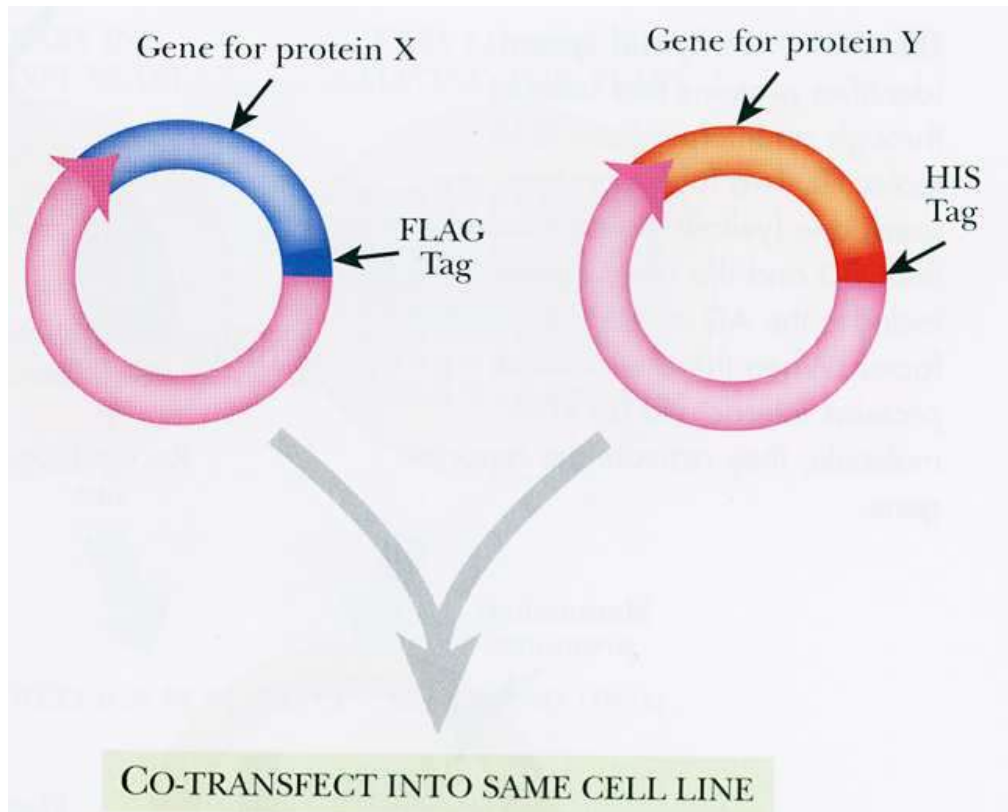


„Protein tagging“

- „tag“ = visačka
- „Protein tagging“ znamená označení proteinu připojením zřetelné značky
- obvykle se provádí geneticky – sekvence DNA je opatřena segmentem kódujícím „tag“
- sekvence musí být klonována ve vhodném vektoru a přenesena do
- vhodné hostitelské buňky, která bude syntetizovat označený
- protein
- značku lze využít např. pro účinnou purifikaci proteinu nebo
- imunoprecipitační experimenty



Ověření interakcí mezi dvěma proteiny



Funkci značky mohou mít nejen krátké peptidy i celé proteiny

- **„FLAG tag“**
- Krátký peptid (AspTyrLysAspAspAspAspLys), který
- je rozeznáván specifickou protilátkou, která je
- komerčně dostupná (Immunex Corp)
- Tato protilátka může být imobilizována na koloně
- pro chromatografickou purifikaci příslušného
- proteinu.
- **„Strep tag“**
- Peptid o velikosti 10 aminokyselin, který napodobuje
- trojrozměrnou strukturu biotinu
- Má afinitu k avidinu nebo streptavidinu

Protein A – afinita k protilátkám

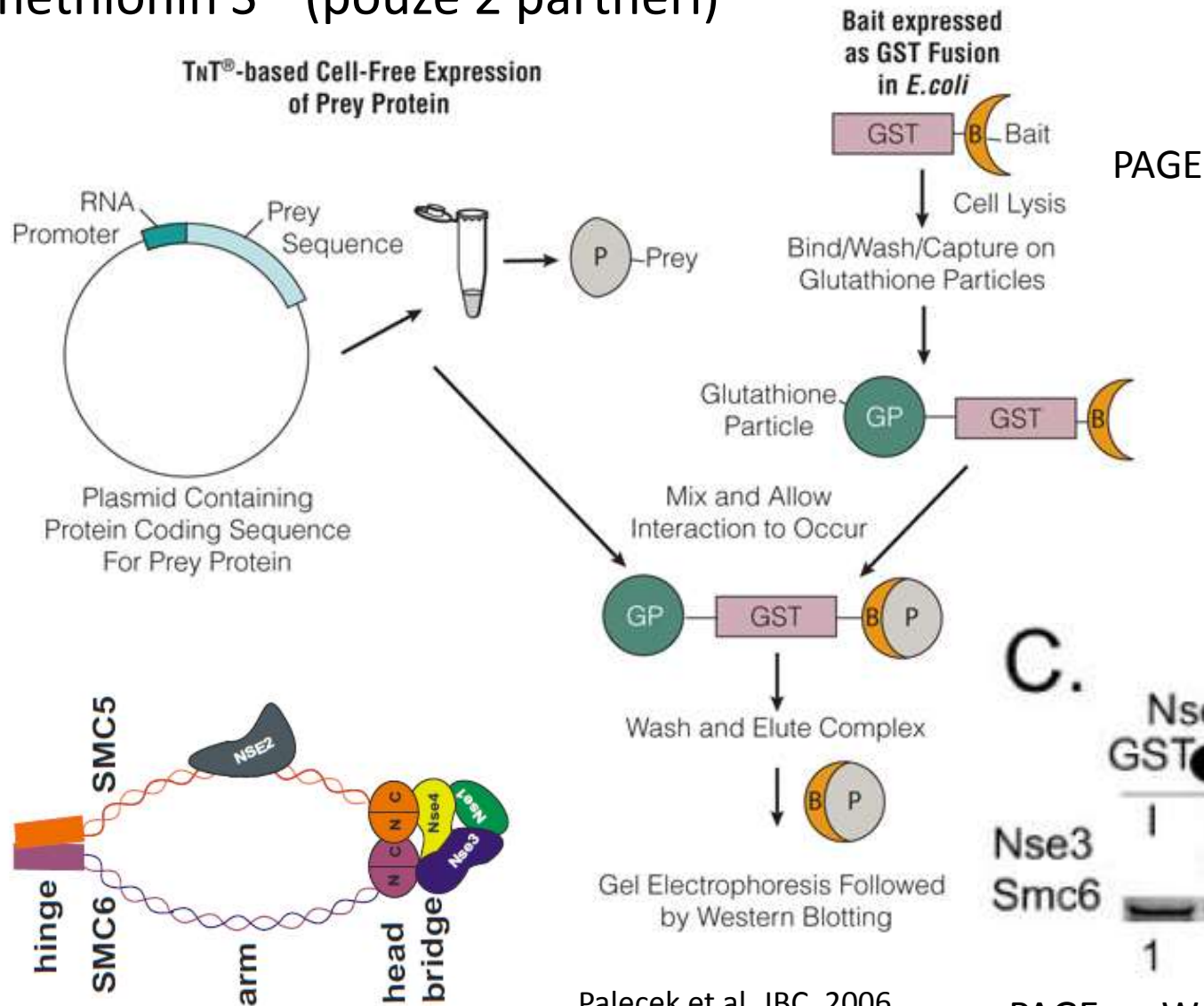
Glutathion S transferáza (GST) – afinita k tripeptidu glutathionu

Protein vážoucí maltózu (MBP) – afinita k maltóze a polymeru maltózy (amylóze)

Green fluorescent protein (GFP) - autofluorescence

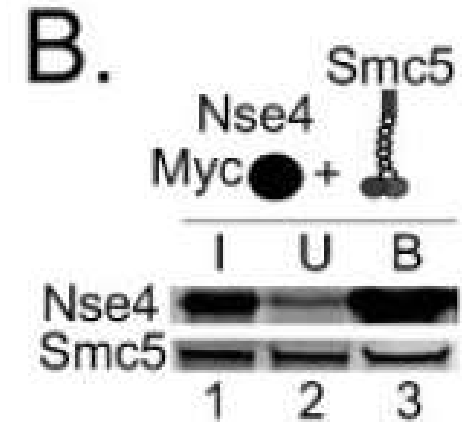
Pull-down (ko-immunoprecipitace)

PROMEGA – *in vitro* TNT systém
methionin S³⁵ (pouze 2 partneři)



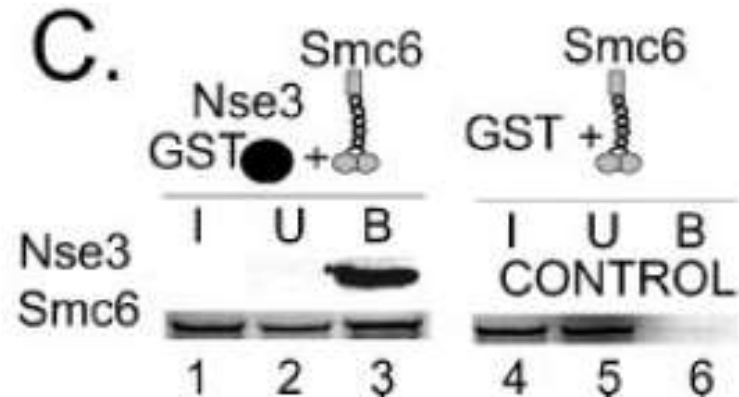
Palecek et al, JBC, 2006

Silné interakce
oba proteiny v TNT



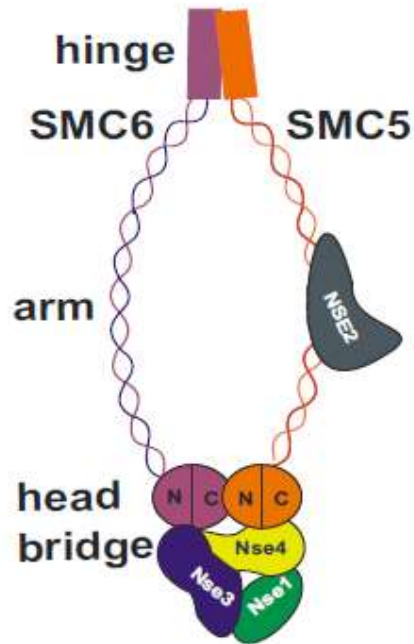
PAGE

Slabé interakce
bait v přebytku
(bakt. exprese) a
prey v TNT

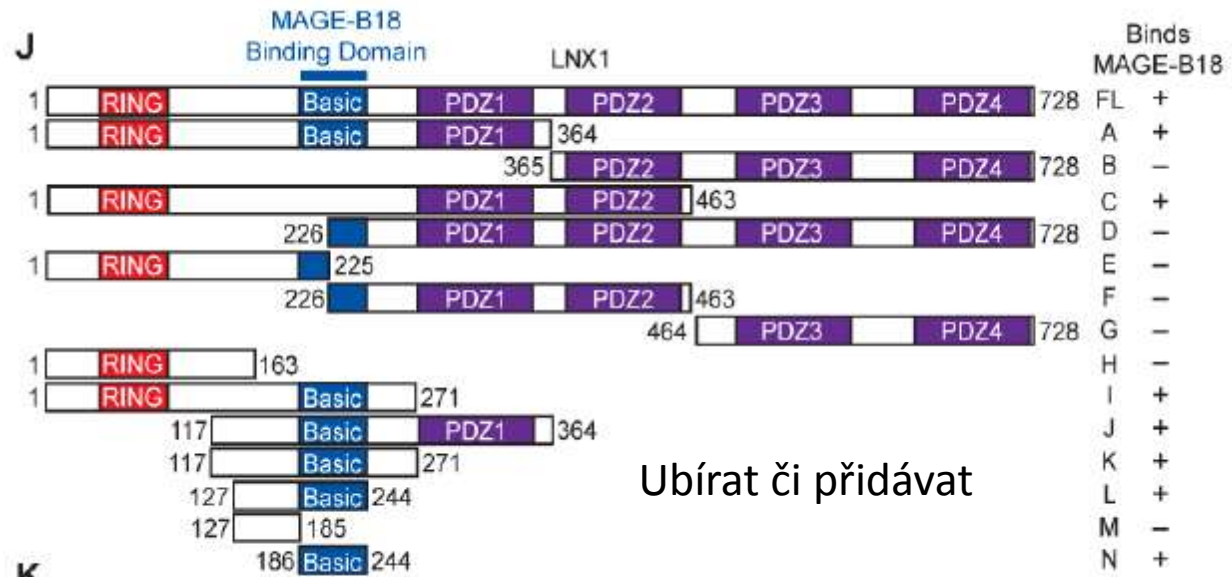


PAGE => Western (anti-GST)

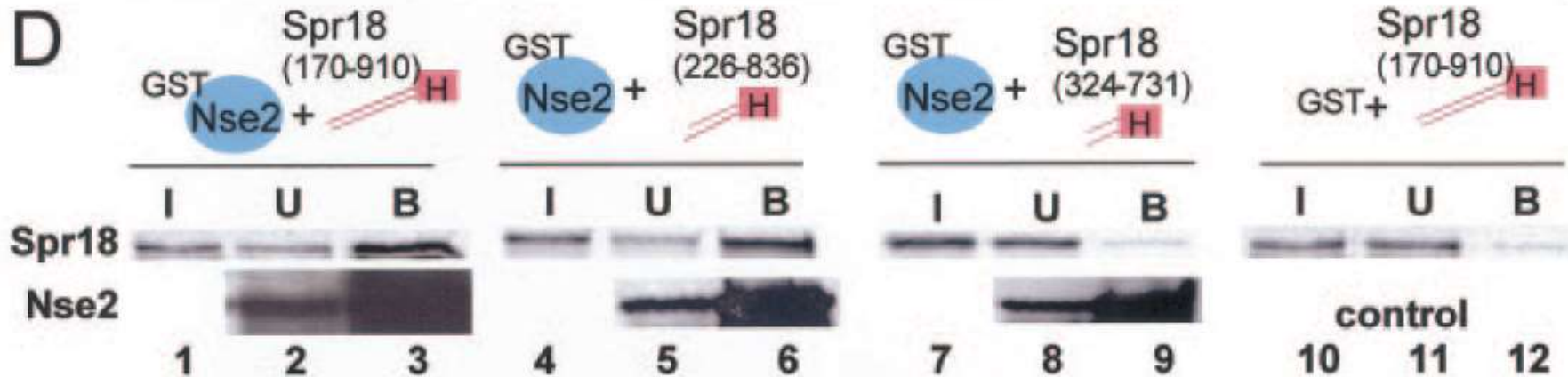
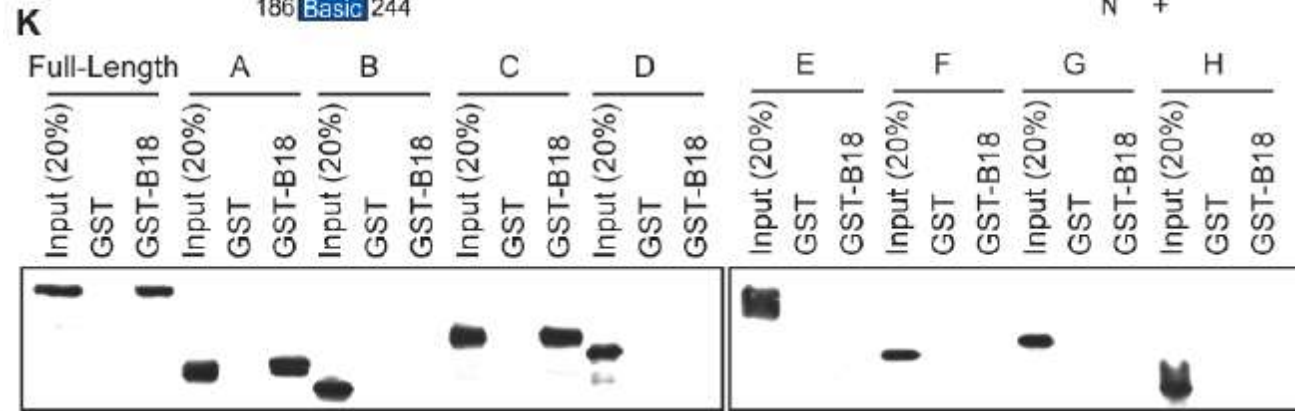
Charakterizace interakcí - domény



Sergeant et al, MCB, 2005
Doyle et al, Mol Cell, 2010

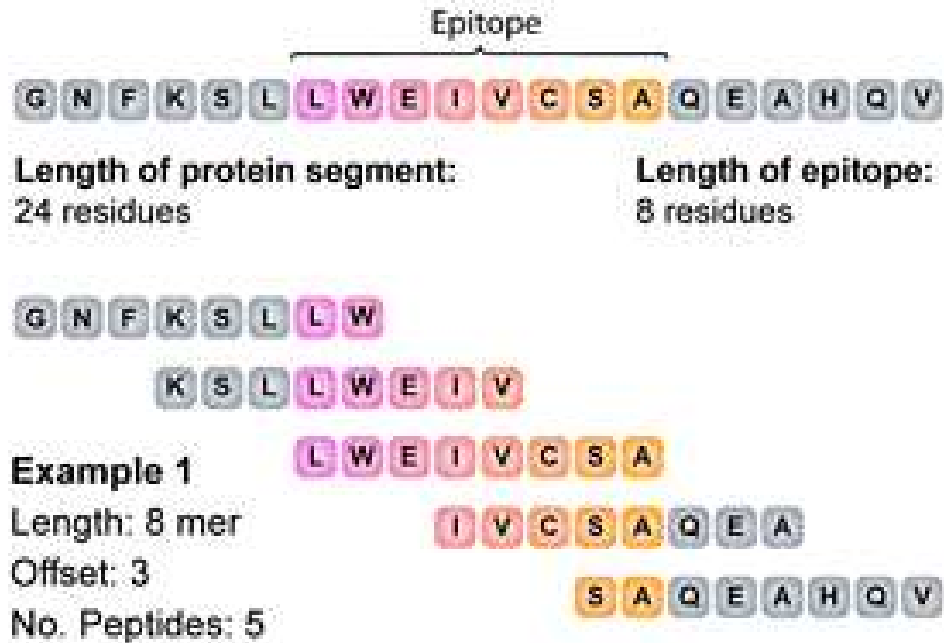
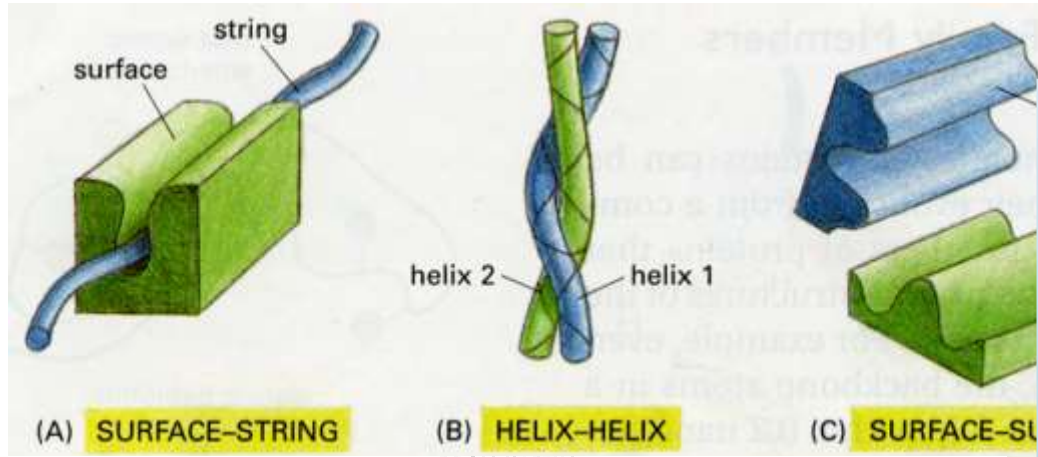


Ubírat či přidávat



Charakterizace interakcí – peptidové n

Podobně jako při ELISA jamky jsou potažené streptavidinem
peptidy se přes biotin ukotví



Lze mapovat epitop pro protilátky (vazbu)
Peptidy jsou na N-konci biotinylované

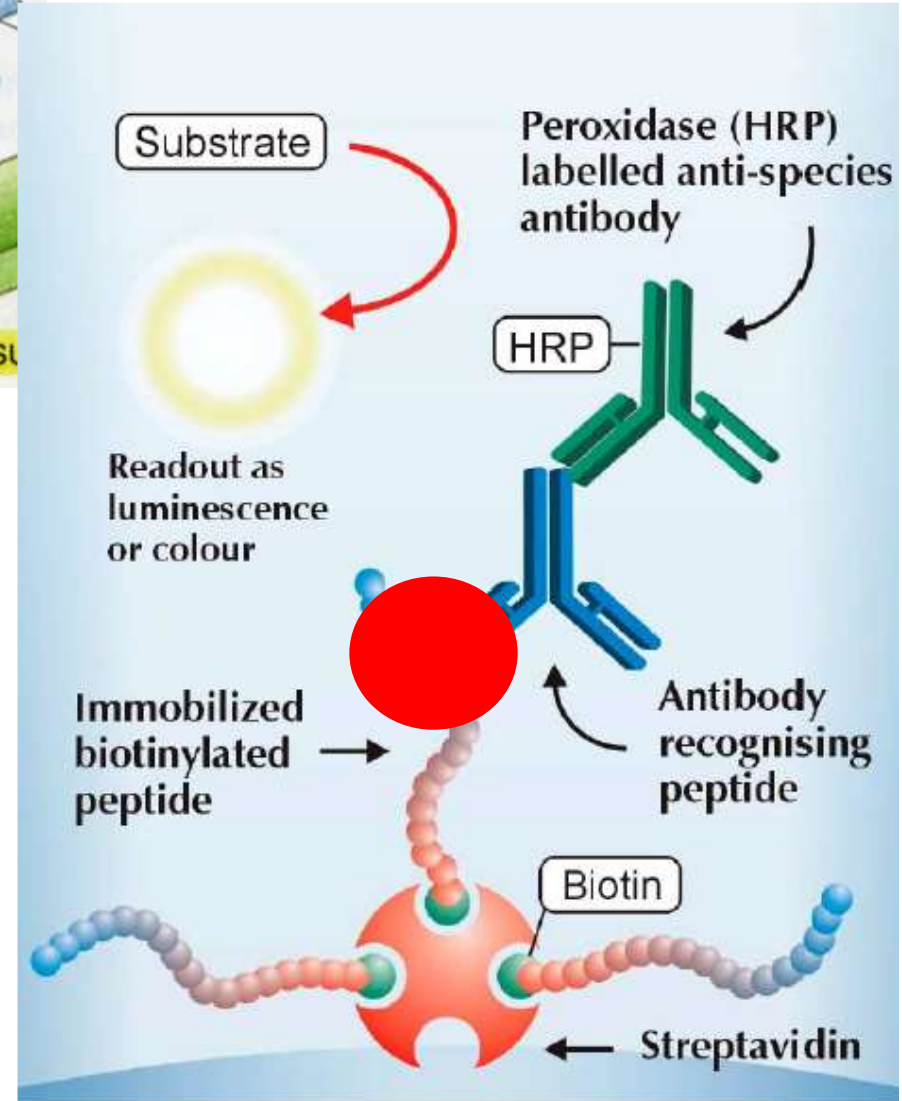


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Charakterizace interakcí – peptidové n

Podobně jako při ELISA jamky jsou potažené streptavidinem peptidy se přes biotin ukotví

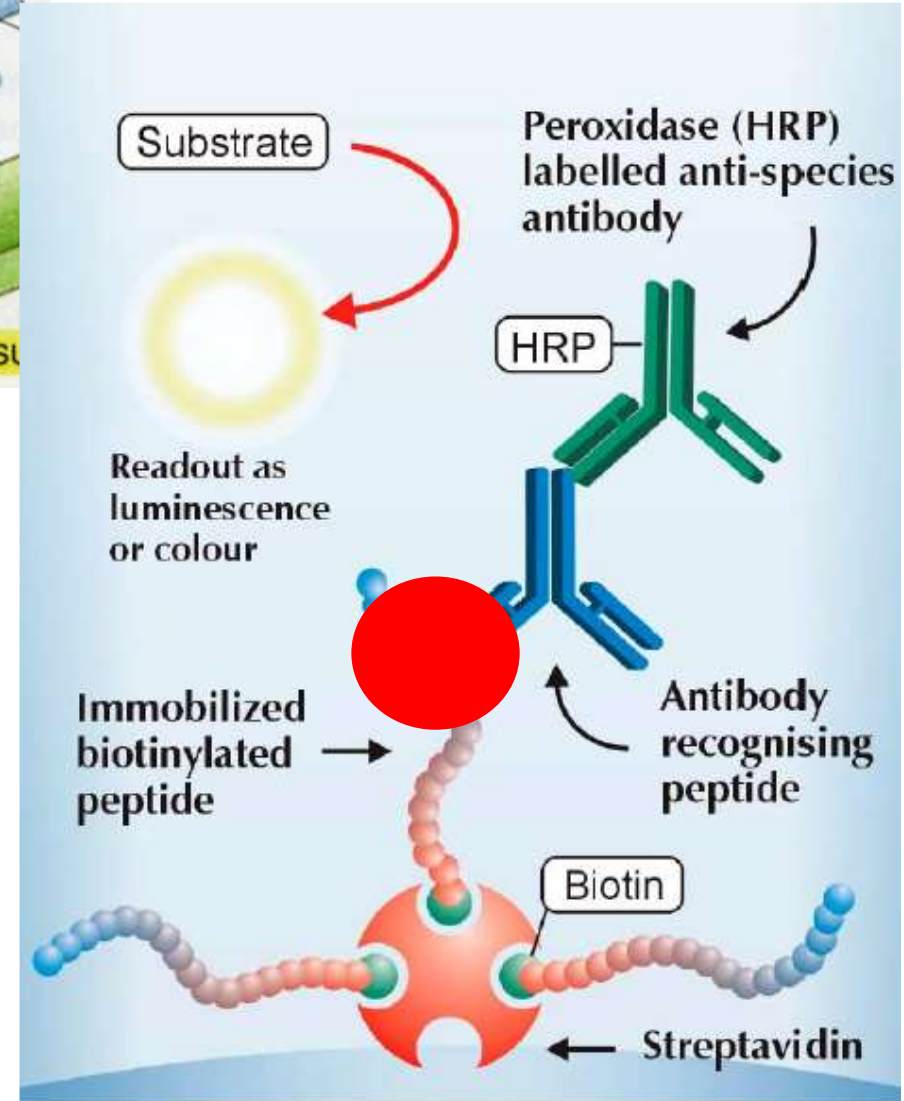
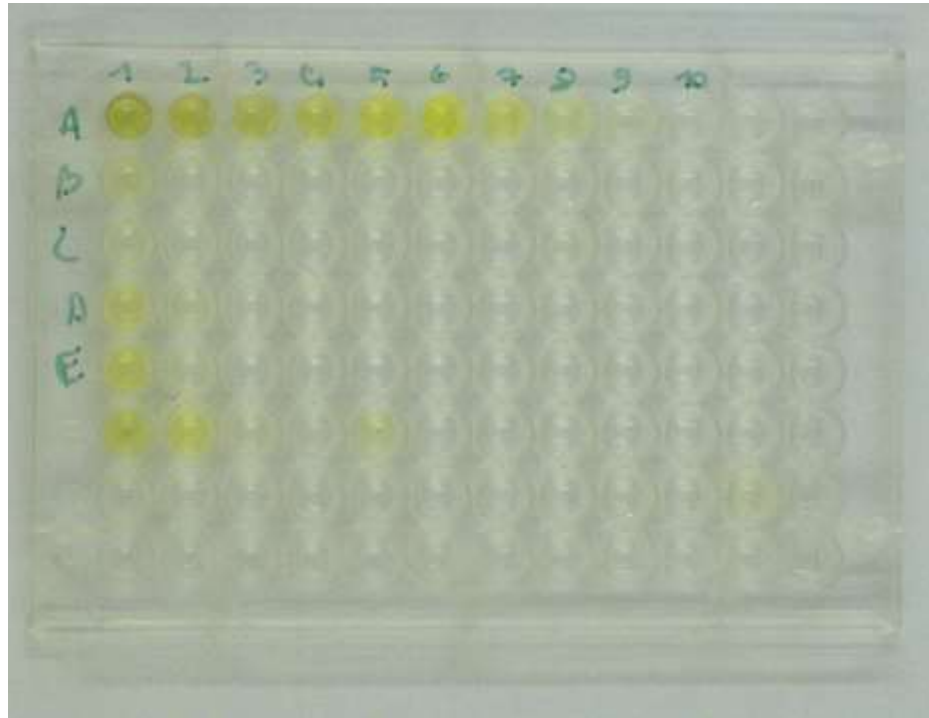
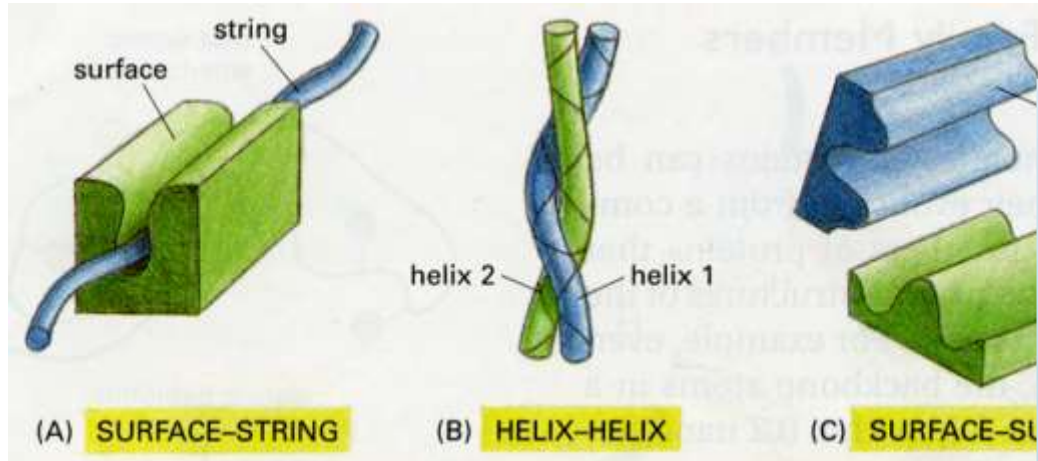
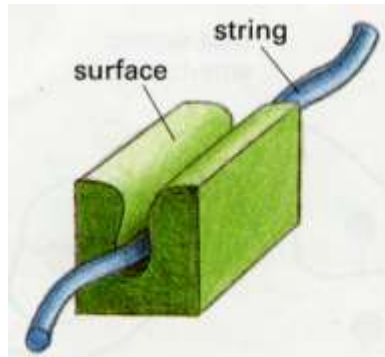


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Charakterizac

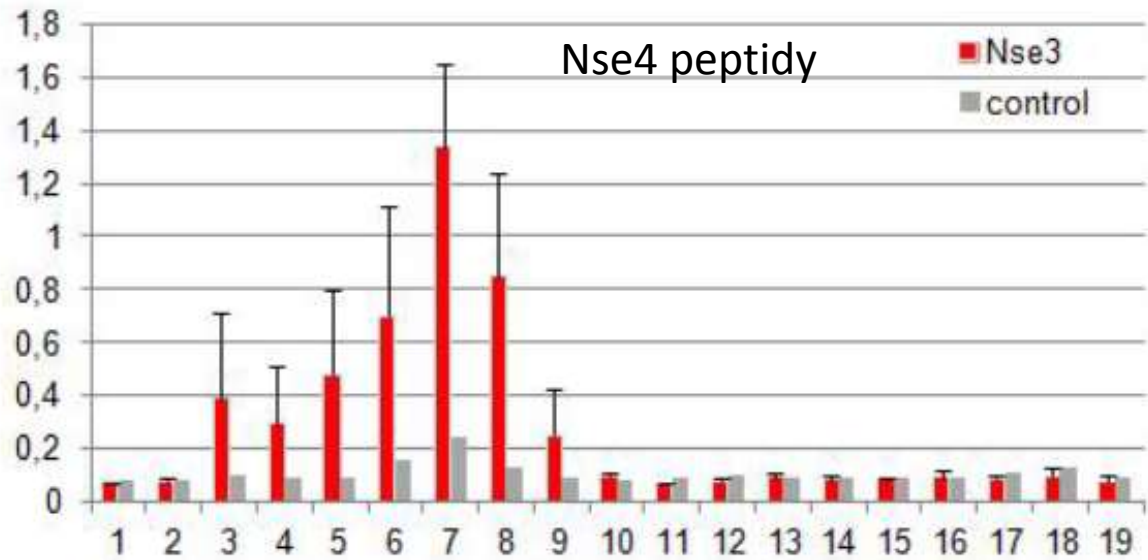
C.



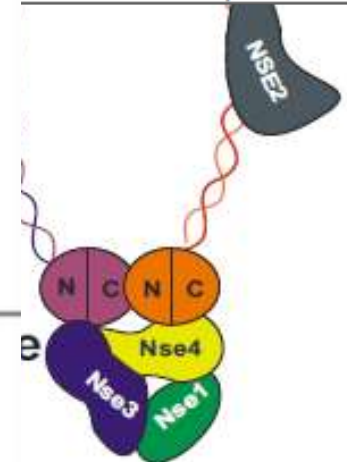
(A) SURFACE-STRING

	Kleisin motif	Nse3/MAGE-binding domain
	peptide #7	
Nse4/Nse4a	<p>S.p.-YNDLNKQESL LVD EENNLY ITTINDLFSSVDAPT ATL A-LLLXTV LASIAPRDLHIGRPKNI LFTDNIKQFLNYPTSHSN</p> <p>D.r.-YNDLNEVQGNH LNPANNLTVL ANKLFANRQPTAAL AQLLVLATLGGKASOLHAGSS PSAFA HLLSYEDLRD</p> <p>X.l.-YVDLIRNVOGNH LSSRTDKLTAIC ANKIFAGVSPAAAL AQLLVLASLGGKASOLHAGSPTSAFADL LSYEDLRD</p> <p>G.g.-YDELICSVQGNH LSSKSNLTLAL ANQLFSGVSPAAAL AQLVLVLA LGGKASOLHAGSITTF SPTFA DDLTFEGEIRTIT</p> <p>O.a.------NPTVHSSKSNLTLAL ANKLFVTGVSPAAAL AQLVLVLA LGGKASOLHAGSHTLIPSAFA D-----</p> <p>H.d.-YDELTHNVOGNH LSSKSNLTLAL ANQLFNPSVQAAAL AQLVLVLA LGGKASOLHAGSHTLIPSAFA DDLKFGDRLR</p> <p>C.z.------QENH IL-NAGDKLTVL ANTLFNGVSPAAAL AQLVLVLA LGGKASOLHAGSLSSP KLPYV TLLTHGVP</p> <p>H.m.-YDALNSVQGNH IL-NAGDKLTVL ANTLFNEVSPAAAL AQLVLVLA LGGKASOLHAGSLSSP KLPYV TLLTHGVP</p> <p>H.s.-YDALNSVQGNH IL-NAGDKLTVL ANTLFNEVSPAAAL ANFLVLA LGGKASOLHAGSLSSP KLPYV TLLTHGVP</p>	
peptide #6	SIKARQLHIGRPKFNIELFTKNIKQ	
peptide #7	----- RQLHIGRPKFNIELFTKNIKQFLNY	
peptide #8	----- IGRPKFNIELFTKNIKQFLNYPTSH	
peptide #9	----- KFNIELFTKNIKQFLNYPTSHSNVT	
peptide #10	----- ELFTKNIKQFLNYPTSHSNVTRIQE	

A.



- L
- RLGKLA
- RLGKLANCE
- SRLGKLANCEKQPA
- VSRLGKLANCEKQPASLNL
- WSRLGKLANCEKQPASLNL MVGP
- LGKLANCEKQPASLNL MVGPLSFR



B.

#6 aa70-94----- SIKARQLHIGRPKFNIELFTKNIKQ
 #7 aa74-98----- **RQLHIGRPKFNIELFTKNIKQFLNY**
 #8 aa78-102----- IGRPKFNIELFTKNIKQFLNYPTSH

