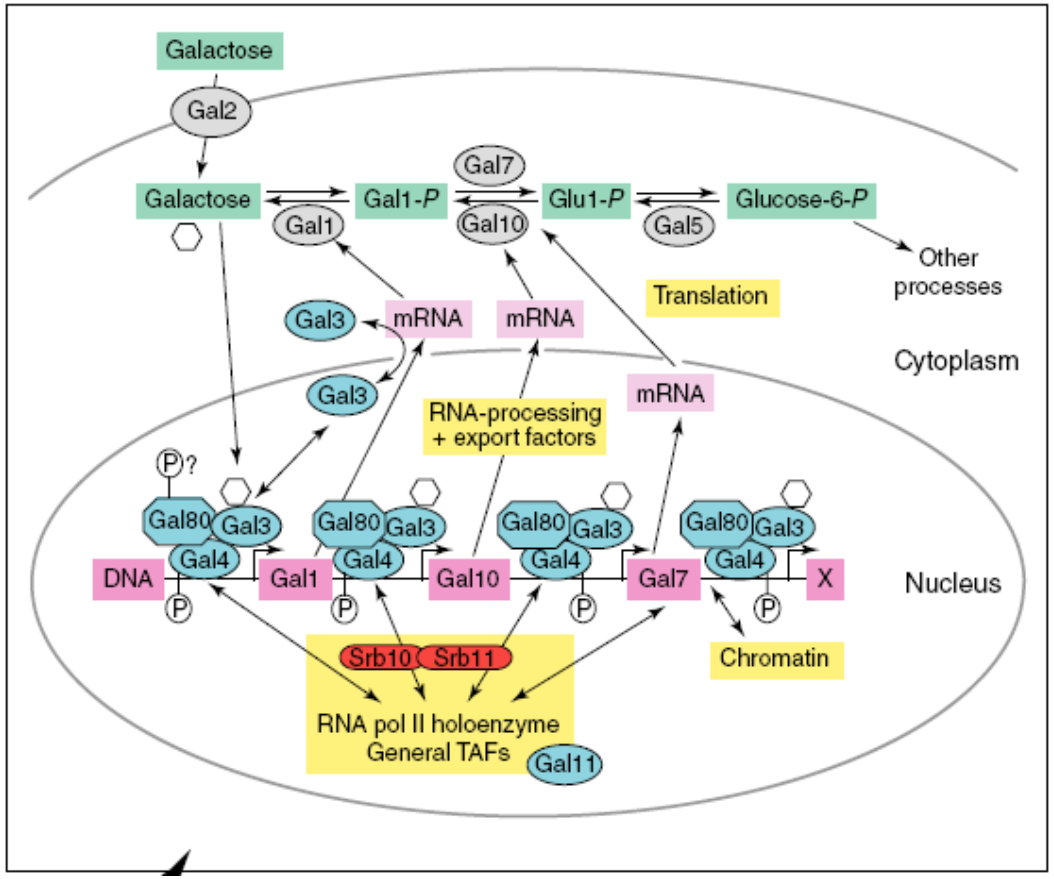
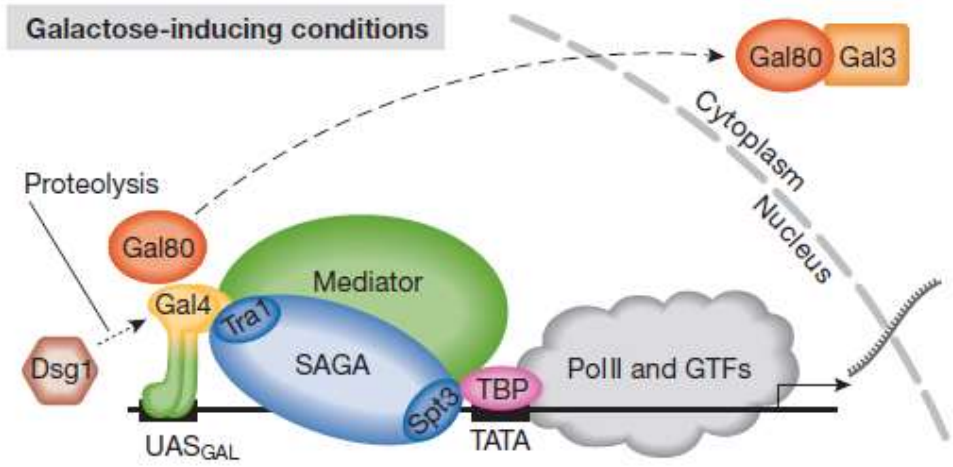
Metody analýzy proteinových komplexů

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)





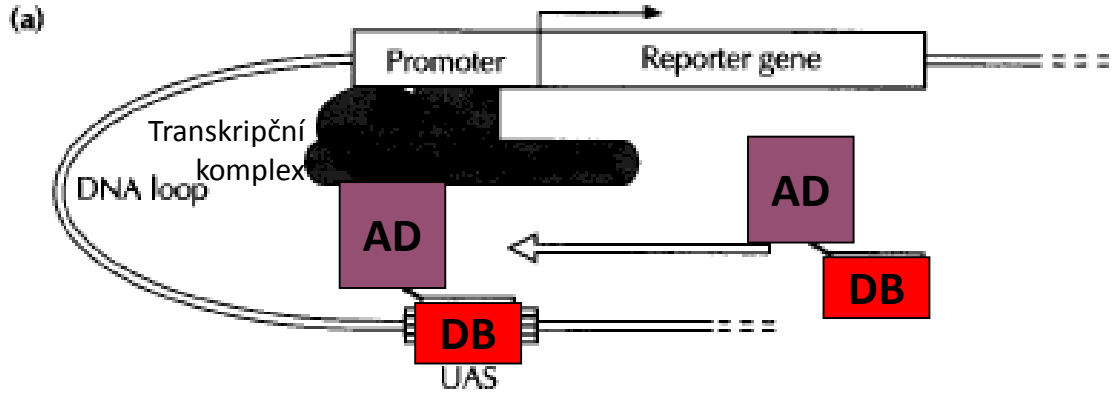
Dvou-hybridní systémy (kvasinkové)

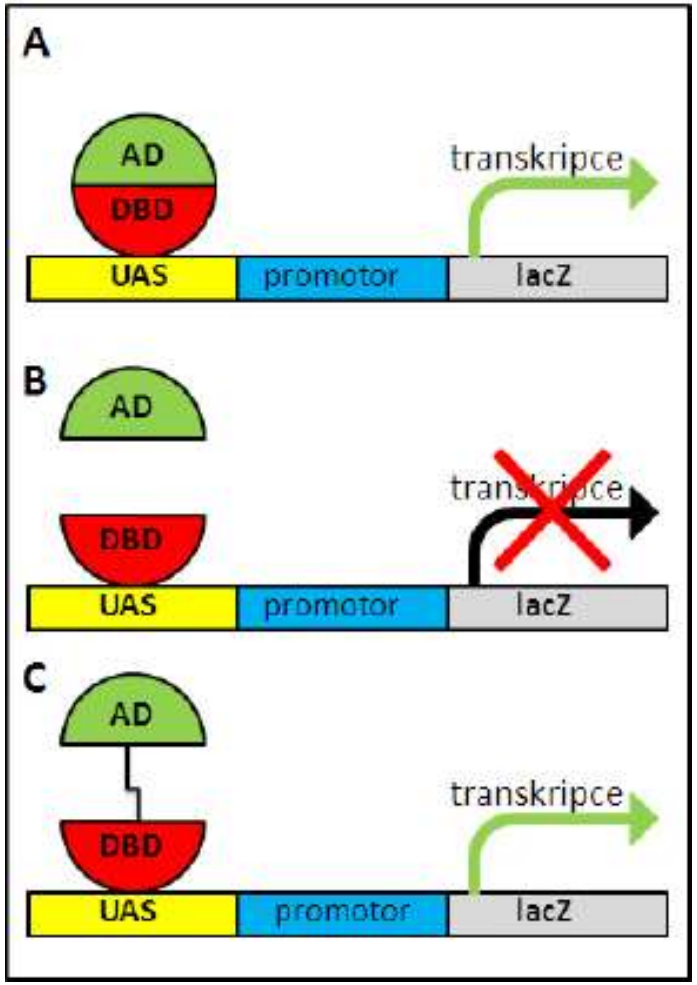
Při studiu mechanismů transkripce v kvasinkách *S. cerevisiae* byl vyvinut tzv. Y2H

Na spínaní/regulaci metabolismu galaktosy se podílí transkripční faktor **Gal4p** – váže specifické sekvence v promotorech genů (Gal enzymů) a aktivuje jejich transkripci

Uetz and Finley, 2005
Traven et al.: EMBO Report, 2006

Ga



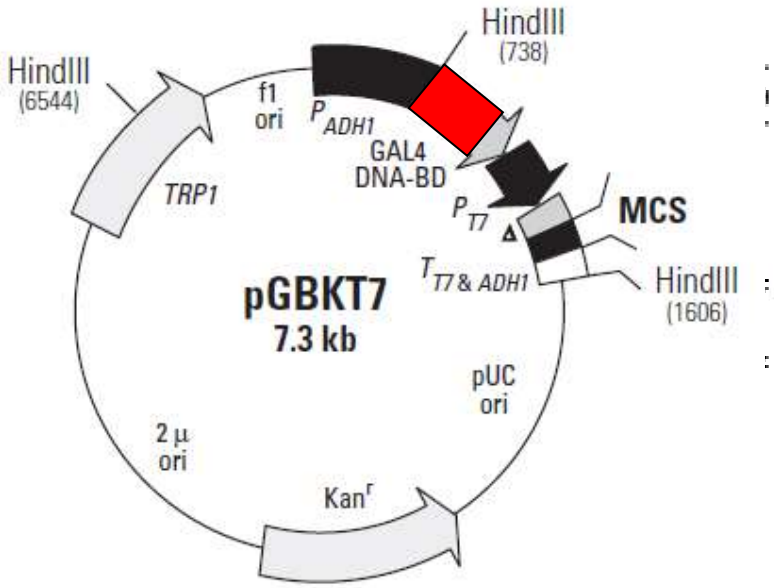


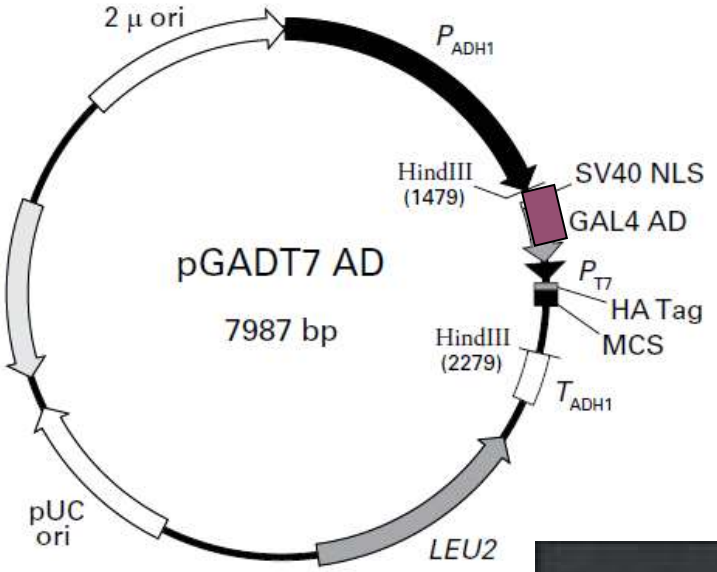
- DNA-vazebná doména (DB) bez aktivační domény (AD)
není schopna aktivace transkripce
Je možné **propojit domény** jakýmkoli linkerem a transkripci reaktivovat

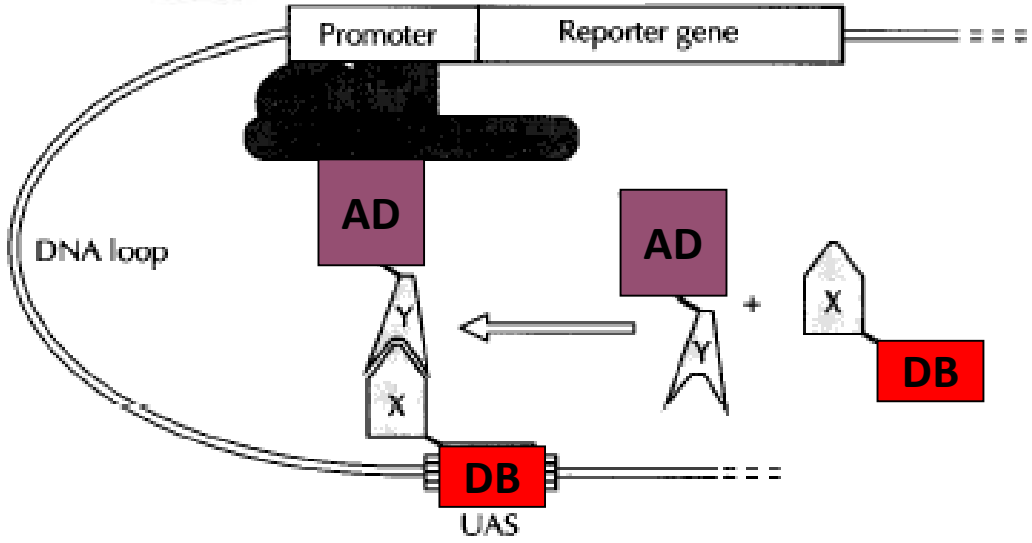
Luban & Goff, CO Biotech, 1995

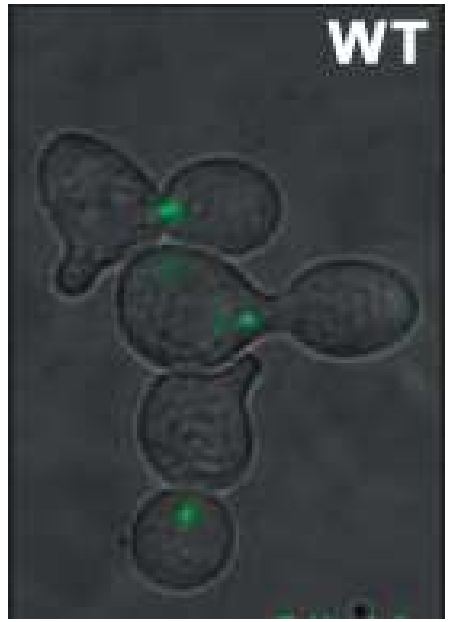
Gal4p

GAL4
1
65
94
106
148
196
768
881
DNA BINDING
DIMERIZATION (DNA-INDEPENDENT)
TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION

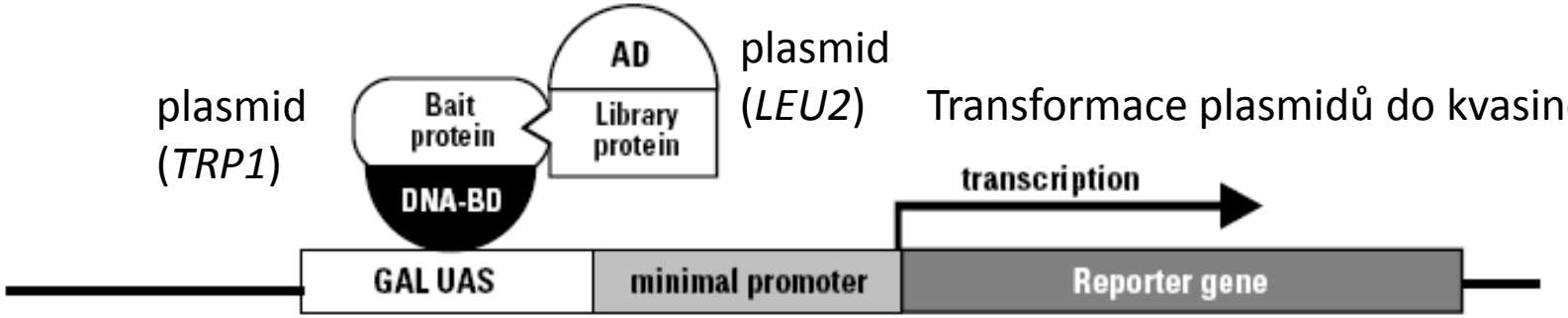

HindIII (738)
HindIII (6544)
f1 ori
P_{ADH1}
GAL4 DNA-BD
TRP1
P_{T7}
MCS
$T_{T7\ \&\ ADH1}$
HindIII (1606)
pGBKT7
7.3 kb
: Amp^r
pUC ori
2 μ ori
Kan^r


2 μ ori
P_{ADH1}
HindIII (1479)
SV40 NLS
GAL4 AD
pGADT7 AD
7987 bp
P_{T7}
HA Tag
MCS
HindIII (2279)
T_{ADH1}
pUC ori
LEU2


Promoter
Reporter gene
AD
DNA loop
AD
Y
X
+
X
DB
DB
UAS


WT

plasmid (*TRP1*)



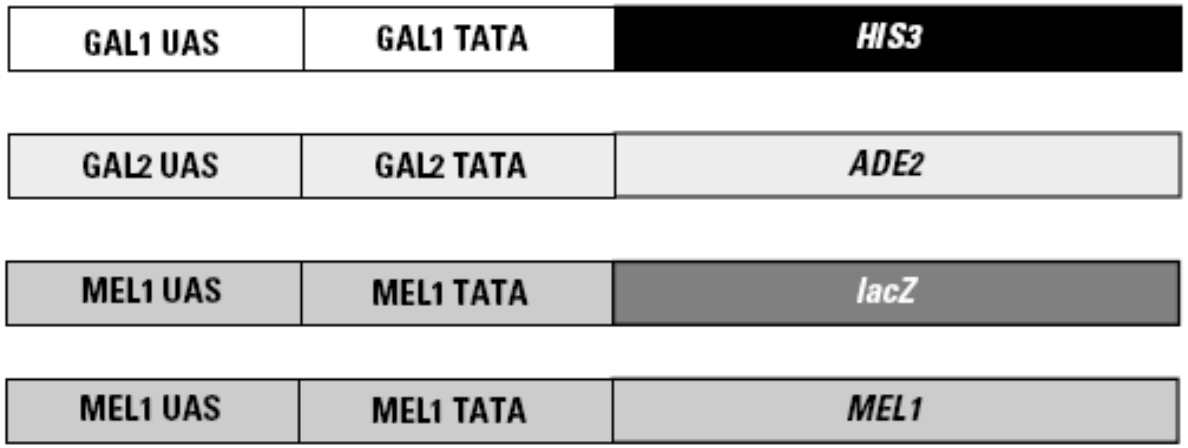
plasmid (*LEU2*)

Transformace plasmidů do kvasinek

Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

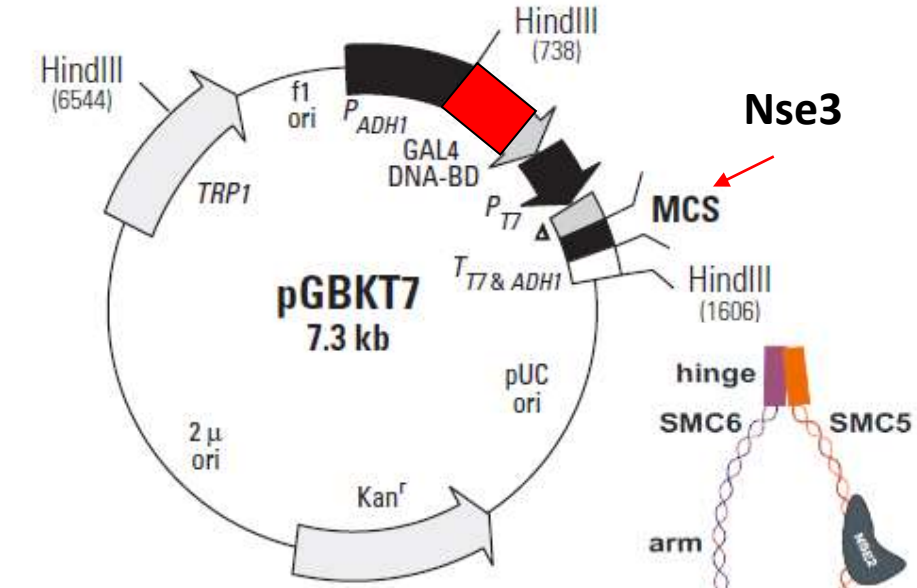
AH109
Kvasinkový kmen

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : $GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-HIS3, $GAL2_{UAS}$-$GAL2_{TATA}$-ADE2, URA3 : : $MEL1_{UAS}$-$MEL1_{TATA}$-lacZ

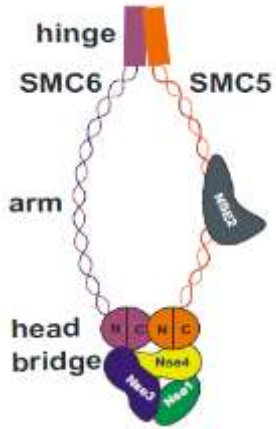


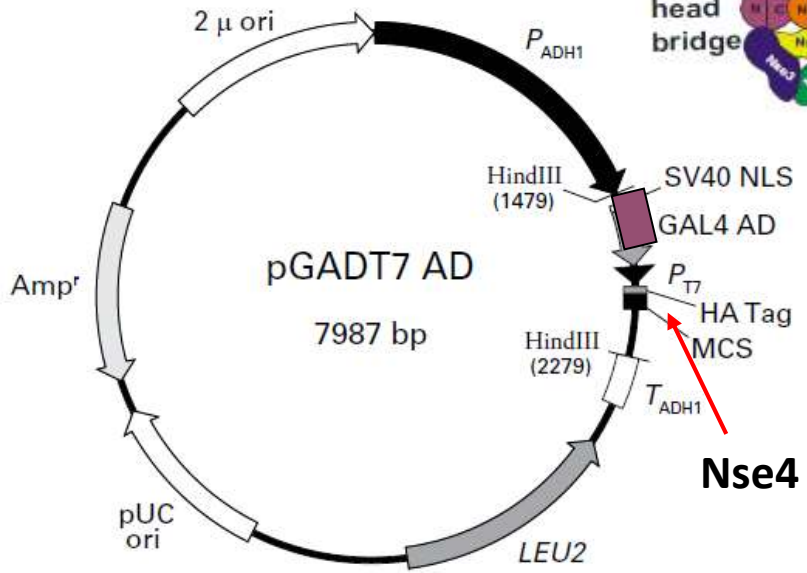
- Testuje se schopnost růstu kvasinek na médiu bez histidinu (nebo adeninu – červená/bílá)
- lze použít i pro hledání proteinových interakčních partnerů (screen knihovny)

MaV203 kmen navíc obsahuje *URA3* reporter gen – lze tedy selektovat na uracilovou auxotrofii + reversní systém tj. mutanty disruptující interakce (na FOA)

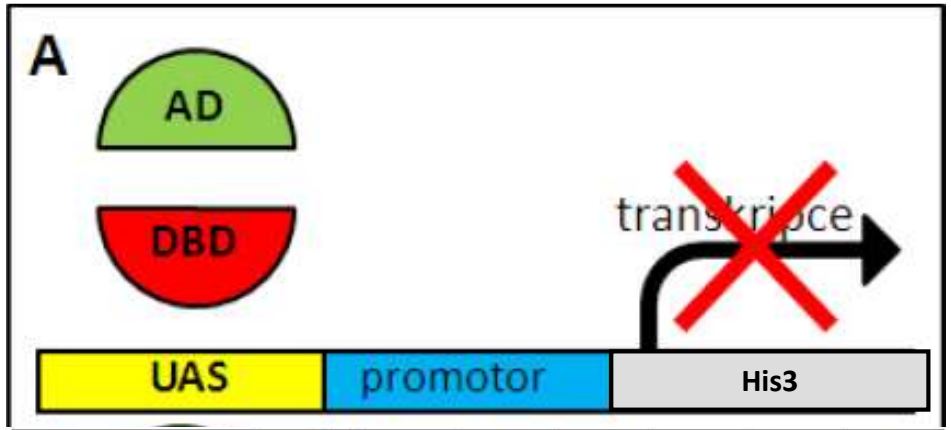


Nse3

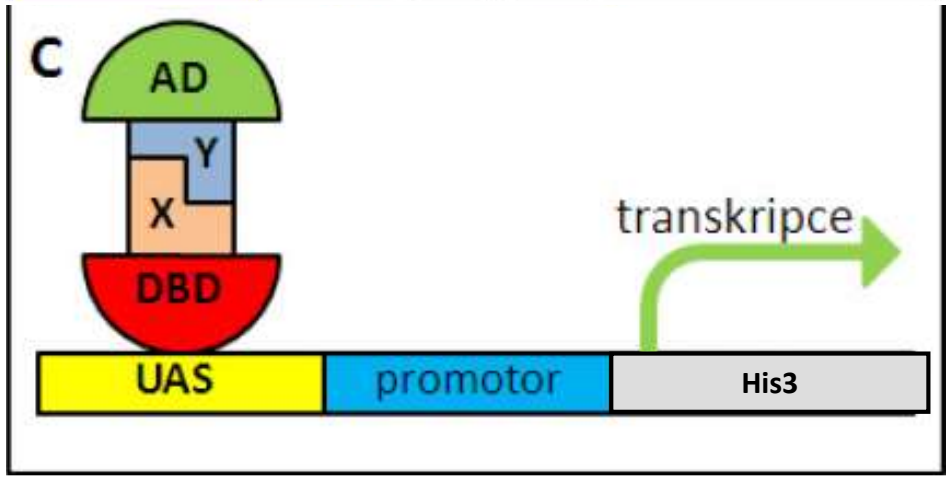


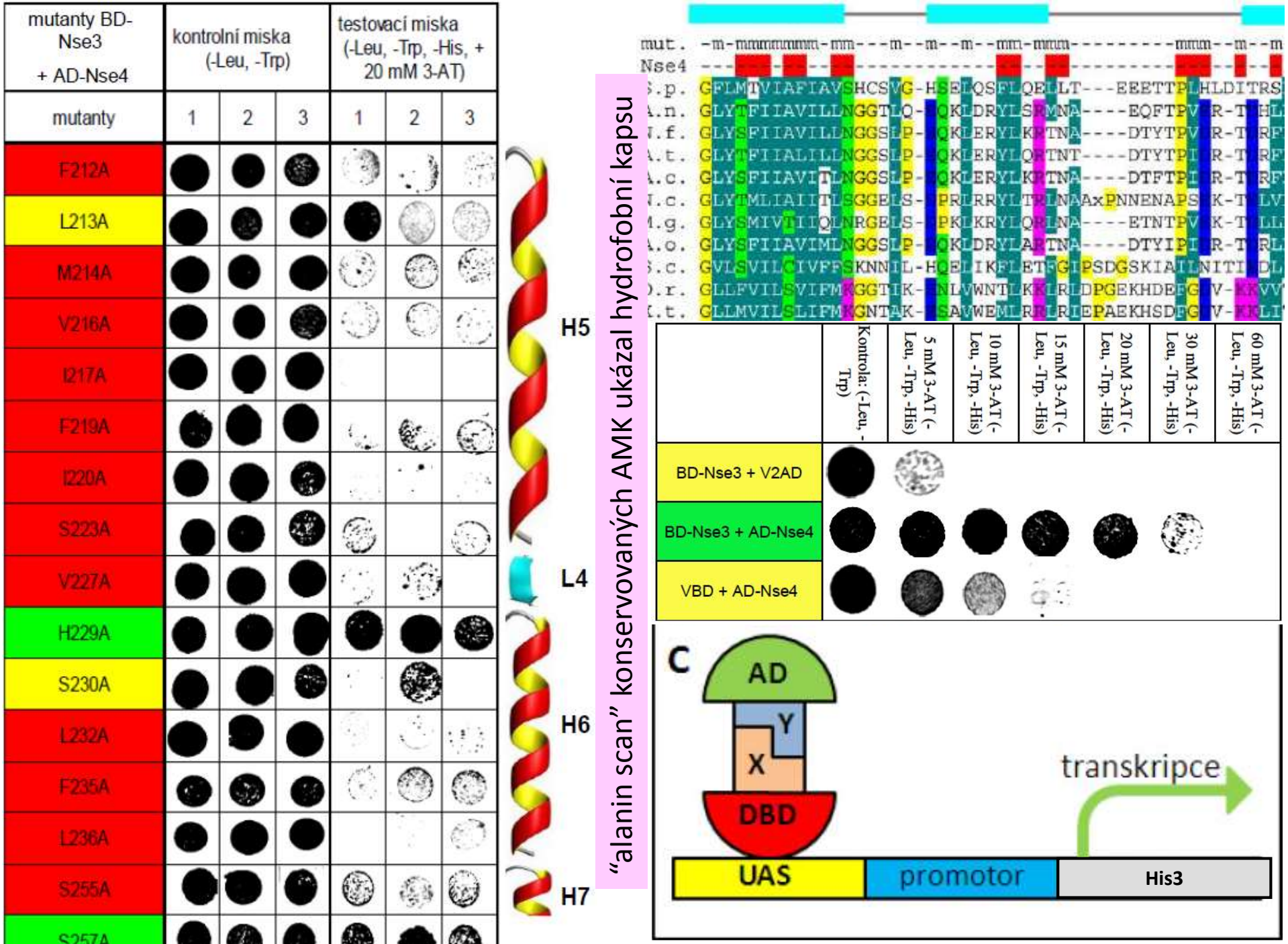


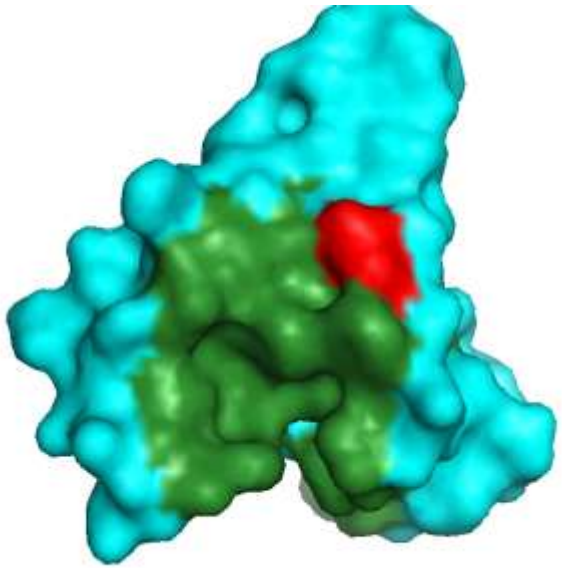
Nse4

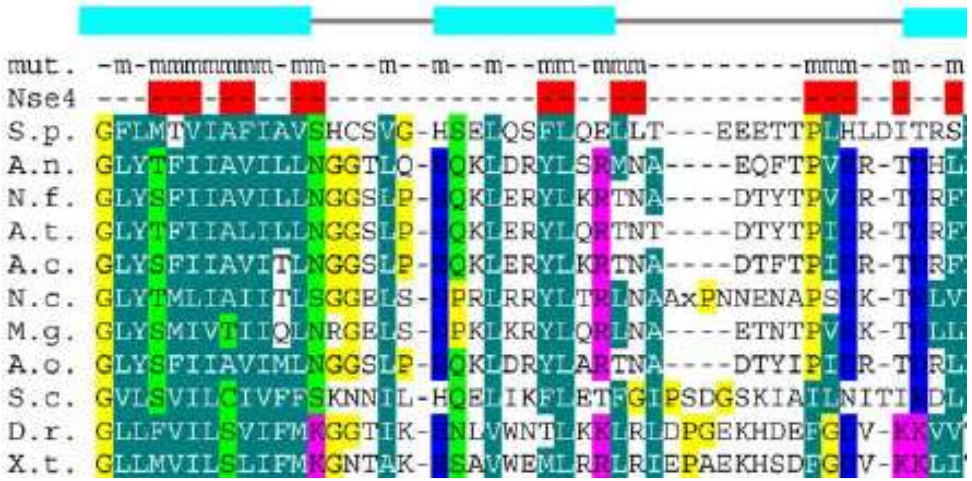


	Kontrola: (-Leu, -Trp)	5 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)	10 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)	15 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)	20 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)	30 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)	60 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
BD-Nse3 + V2AD							
BD-Nse3 + AD-Nse4							
VBD + AD-Nse4							




mutanty BD-Nse3 + AD-Nse4
kontrolní miska (-Leu, -Trp)
testovací miska (-Leu, -Trp, -His, + 20 mM 3-AT)
mutanty
1
2
3
1
2
3
F212A
L213A
M214A
V216A
I217A
F219A
I220A
S223A
V227A
H229A
S230A
L232A
F235A
L236A
S255A
S257A
H5
L4
H6
H7
"alanin scan" konzervovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu
mut.
Nse4
Kontrola: (-Leu, -Trp)
5 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
10 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
15 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
20 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
30 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
60 mM 3-AT (-Leu, -Trp, -His)
BD-Nse3 + V2AD
BD-Nse3 + AD-Nse4
VBD + AD-Nse4
C
AD
Y
X
DBD
transkripce
UAS
promotor
His3

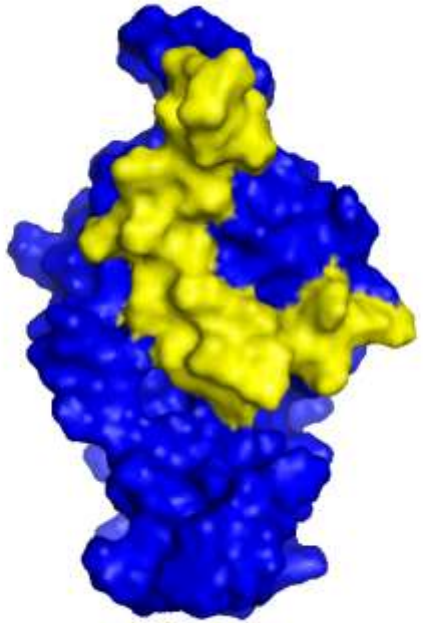




“alanin scan” konzervovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu na povrchu Nse3

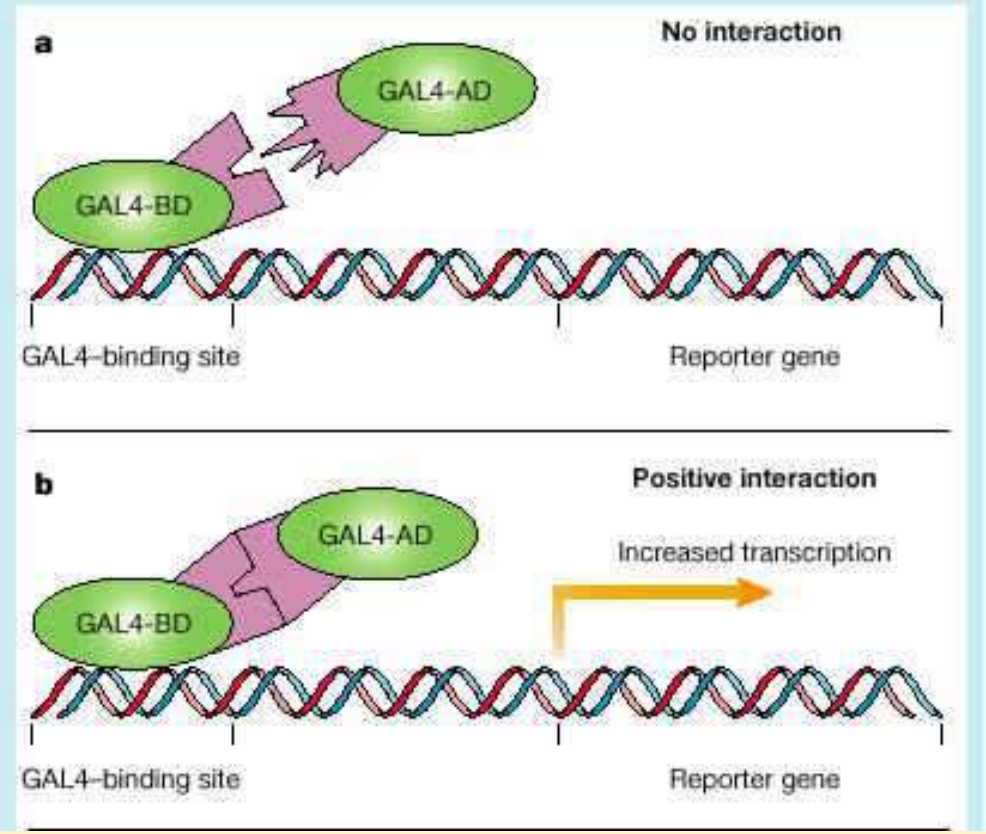
Do níž se váže hydrofobní šroubovice Nse4 proteinu

Pomocí *in silico* (MD) analýzy byl vytvořen model dimeru Nse3-Nse4 (docking)



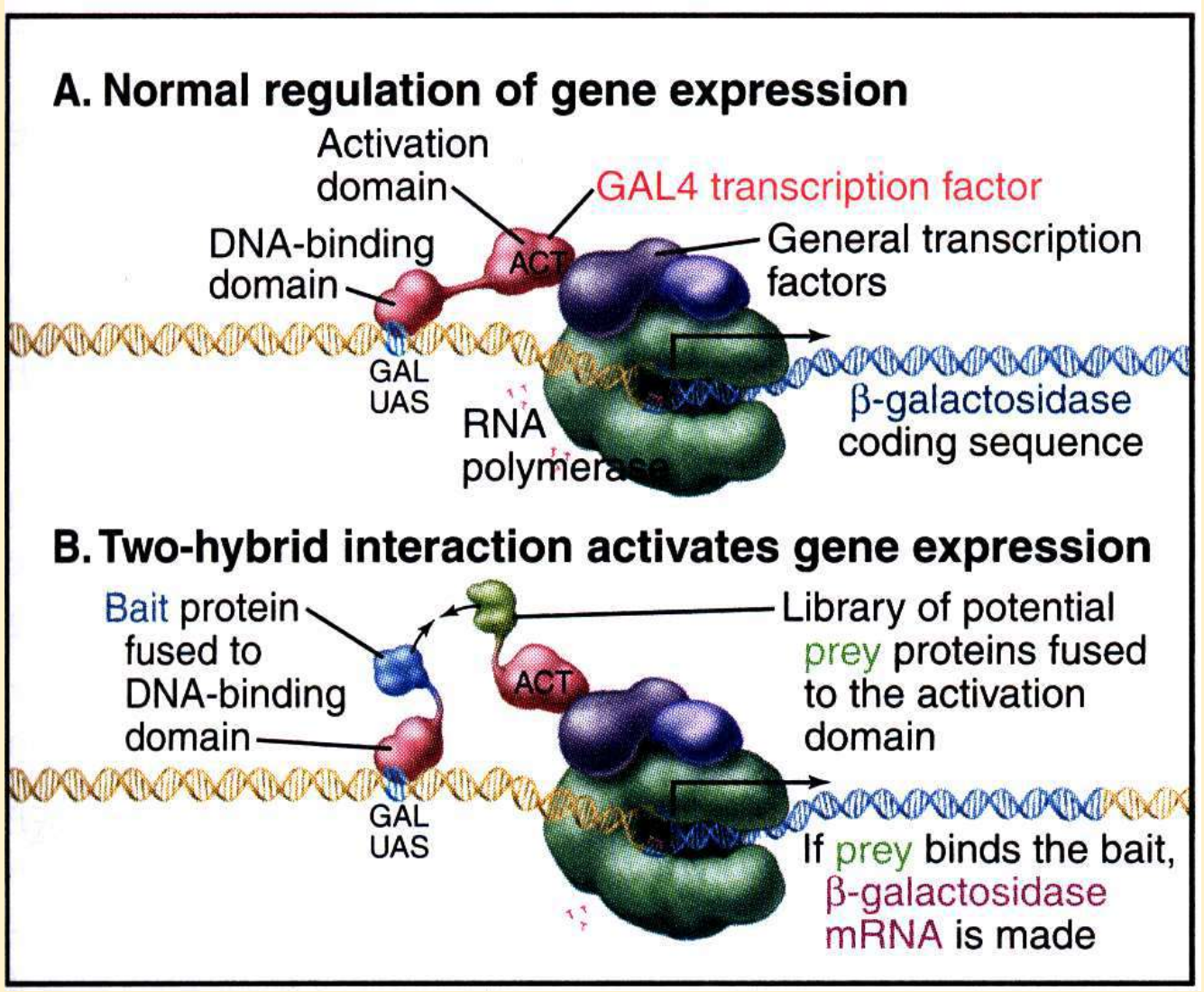
Dvouhybridní systém

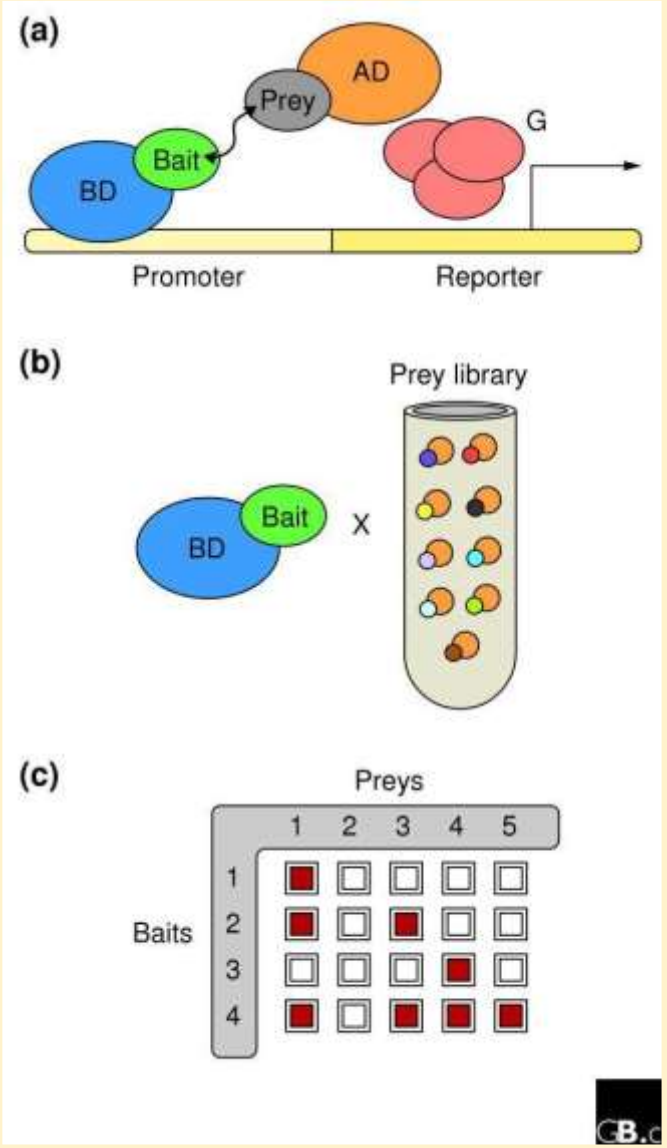
- využívá umělého spojení testovaných proteinů s oddělenými
- doménami transkripčního aktivátoru
- transkripční faktory mají často modulární strukturu:
- doménu pro vazbu na DNA (DBD) a aktivační doménu (AD)
- interakce obou domén vede k aktivaci transkripce
- (kovalentní propojení domén není nutné) cílového genu



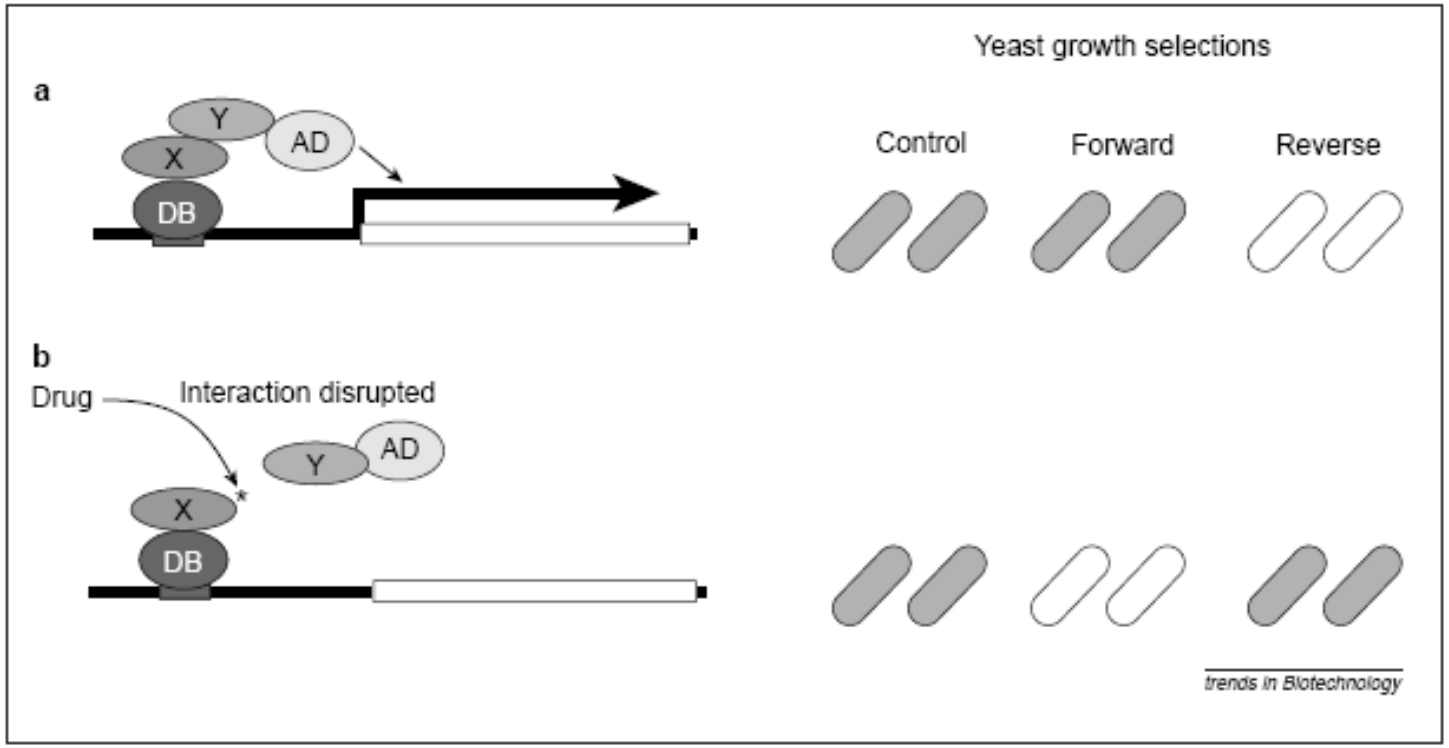
Dvouhybridní systém - princip

- Cíl: otestování interakce proteinu X s proteinem Y
- doména pro vazbu na DNA (DBD) transkripčního faktoru je spojena
- fúzí s proteinem X – tvoří „návnadu“ („bait“)
- aktivační doména (AD) transkripčního faktoru je spojena s
- proteinem Y – tvoří „kořist, oběť“ („prey“)
- oba fúzované geny se exprimují v kvasinkových buňkách obsahujících
- příslušný reportérský gen stabilně začleněný do genomu
- interakce testovaných proteinů se projeví aktivací reportérského
- genu




(a)
AD
Prey
G
Bait
BD
Promoter
Reporter
(b)
Prey library
BD
Bait
X
(c)
Preys
1 2 3 4 5
Baits
1
2
3
4

Reversní systém (Y2H)



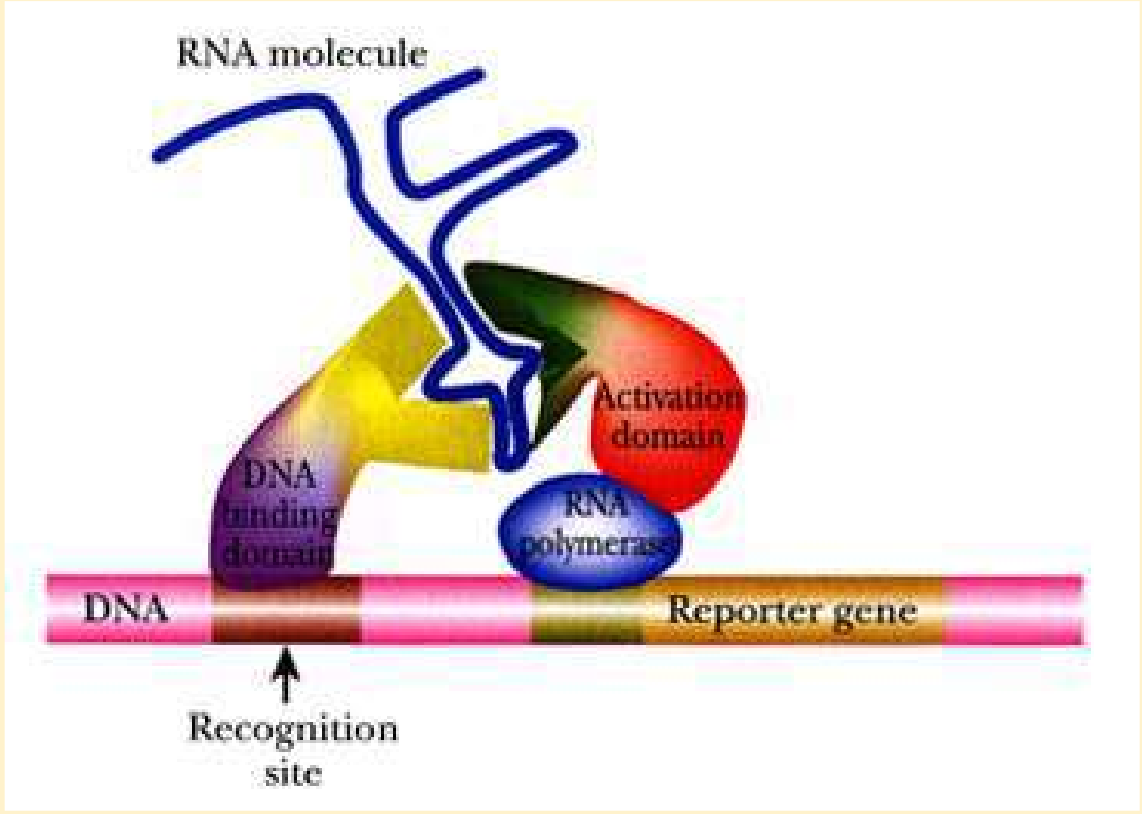
je vhodnější pozitivní selekce (screenovat na rostoucí kvasinky)

-Při použití *URA3* reportéru lze použít toxickou 5-fluoro-orotátovou kyselinu (5-FOA) k negativní selekci tj. interakce povede k záhubě kvasinek, zatímco mutanty neschopné interakce na FOA plotnách porostou (mutanty nebo syntetické látky)

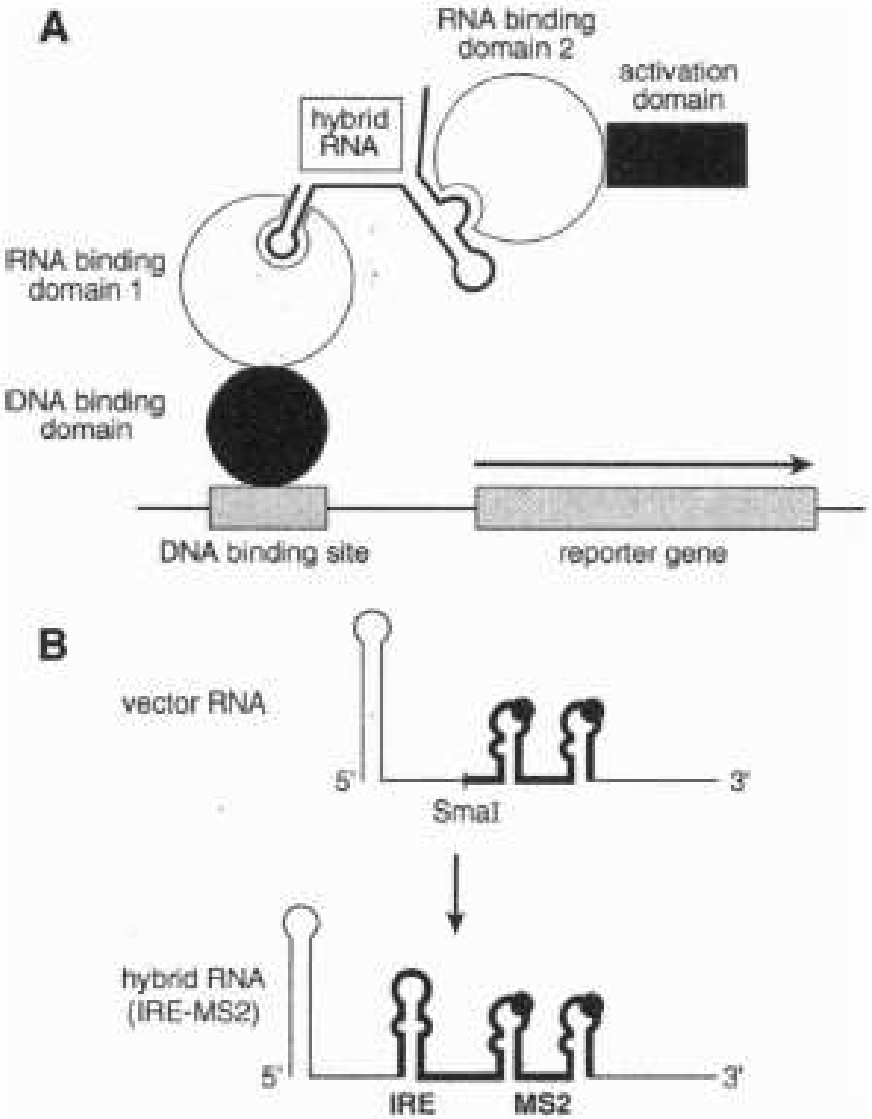
Vidal & Endoh, T in Biotech, 1999

Trojhybridní systém

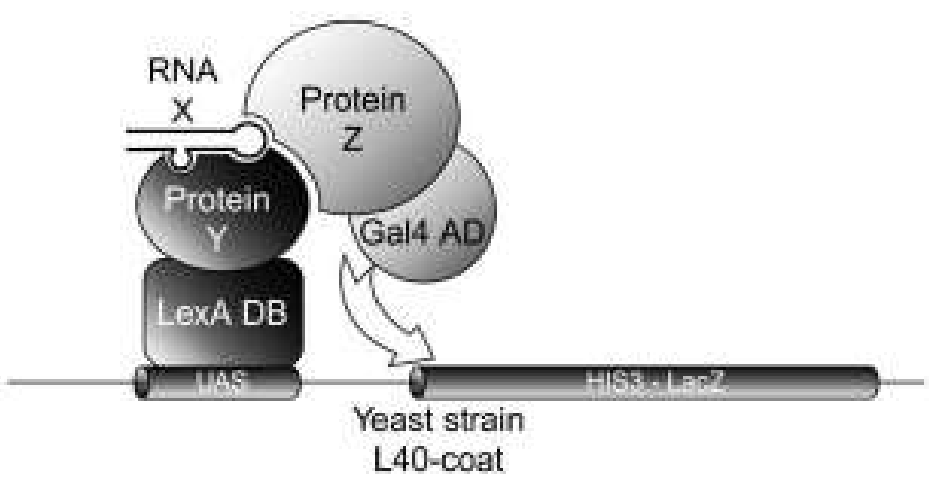
- Slouží k identifikaci proteinů, jejichž interakci zprostředkovává RNA



Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



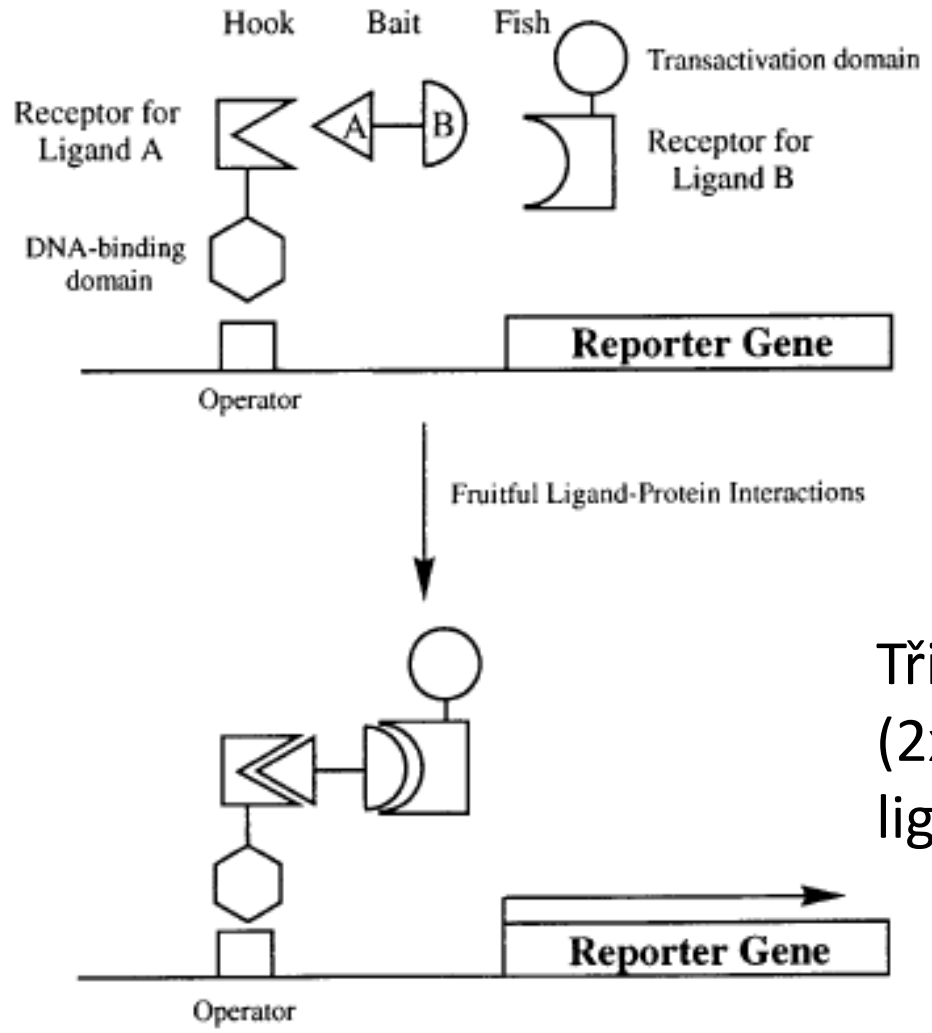
Tři fúzní makromolekuly
(2x protein a 1x RNA)

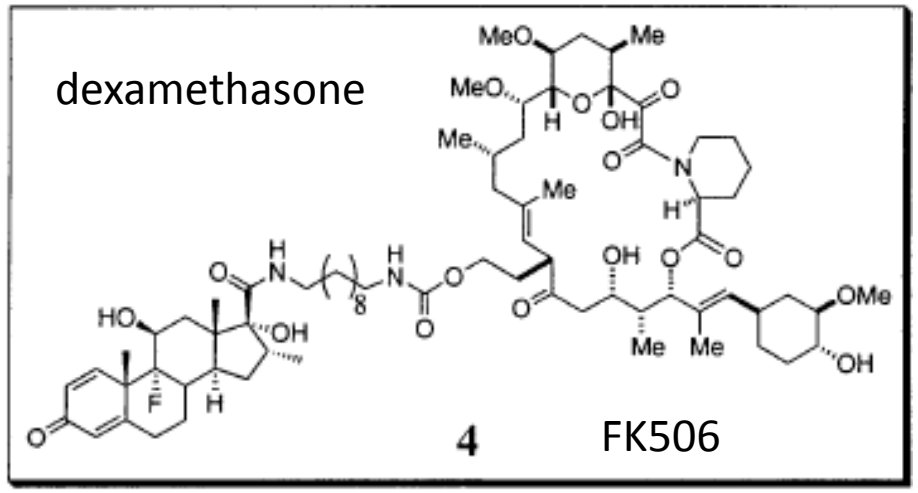


SenGupta et al, PNAS, 1996

Vazba ligand-receptor (Y3H)

glucocorticoid receptor - FKBP12





Tři fúzní makromolekuly
(2x protein a 1x nízkomolekulární ligand)

Licitra & Liu, PNAS, 1996

- Y2H systémy mají výhodu selekce – přežití kvasinek – je možné je využít pro hledání nových partnerů

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

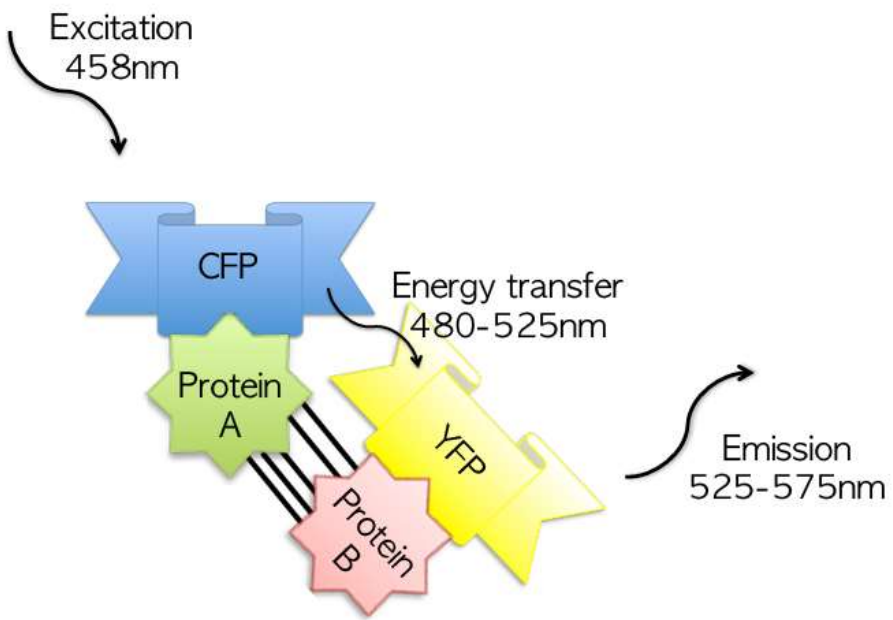
- ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace …
- (kvasinkový) dvou-hybridní systém
- **FRET, BiFC, ko-lokalizace, ko-exprese**
- Flourescenční anisotropie, SPR, ITC …
- ko-krystalizace, cryoEM …
- databáze (interactom a komplexy …)
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)

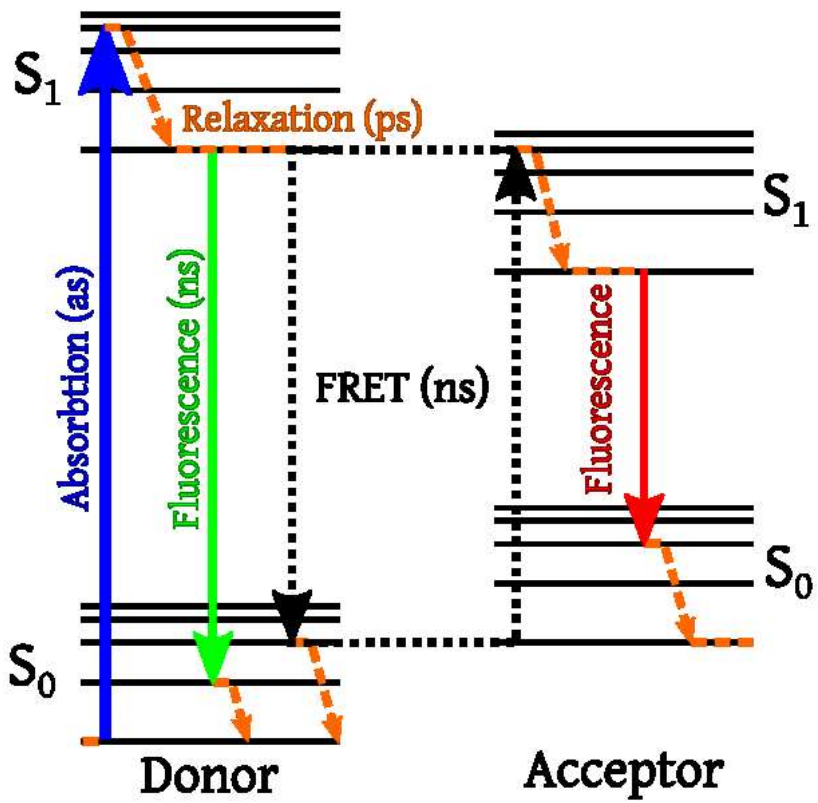
Study of Protein-protein Interactions *In Vivo*

- Popular technique is “Two-hybrid” screen (yeast, mammalian or bacterial)
- Various fluorescent techniques are also in use:
  - FRET – fluorescence resonance energy transfer; reports on distance between 2 fluorophores
  - Fluorescent reporters – expressed proteins emit fluorescence at specific wavelength
  - FRAP (FLIP) – fluorescence recovery after photobleaching (fluorescence loss in photobleaching); allow movement of reporters to be monitored

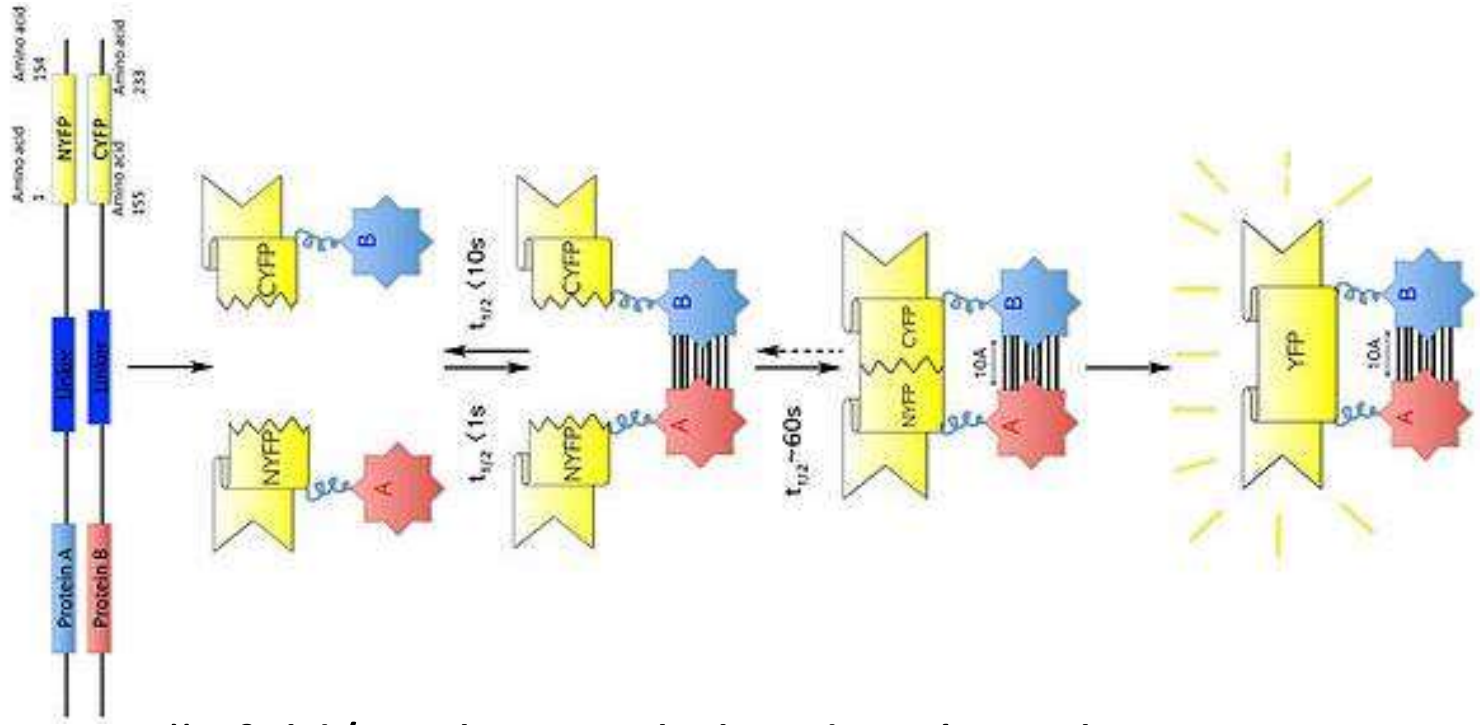
FRET

Förster/fluorescence resonance energy transfer

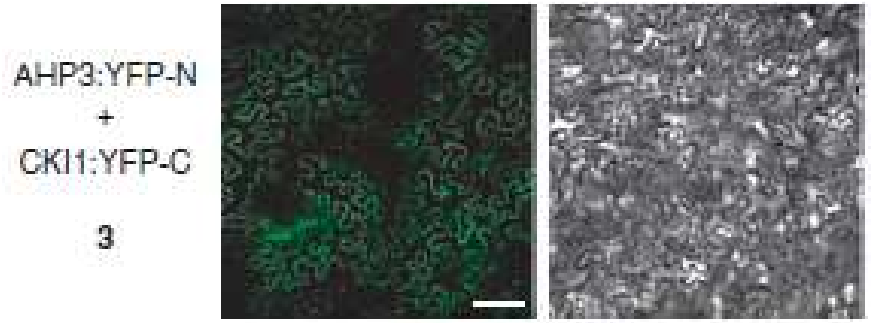


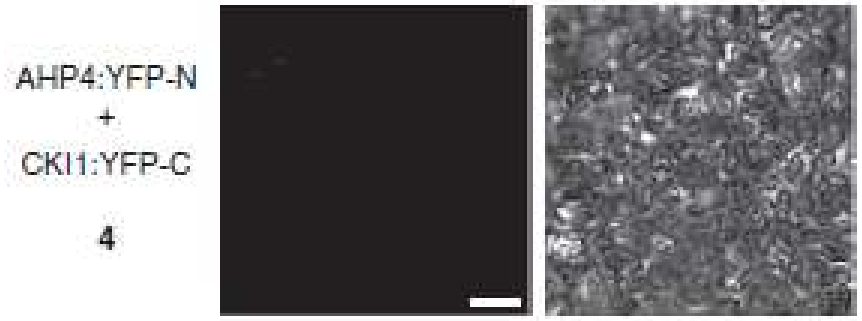


Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



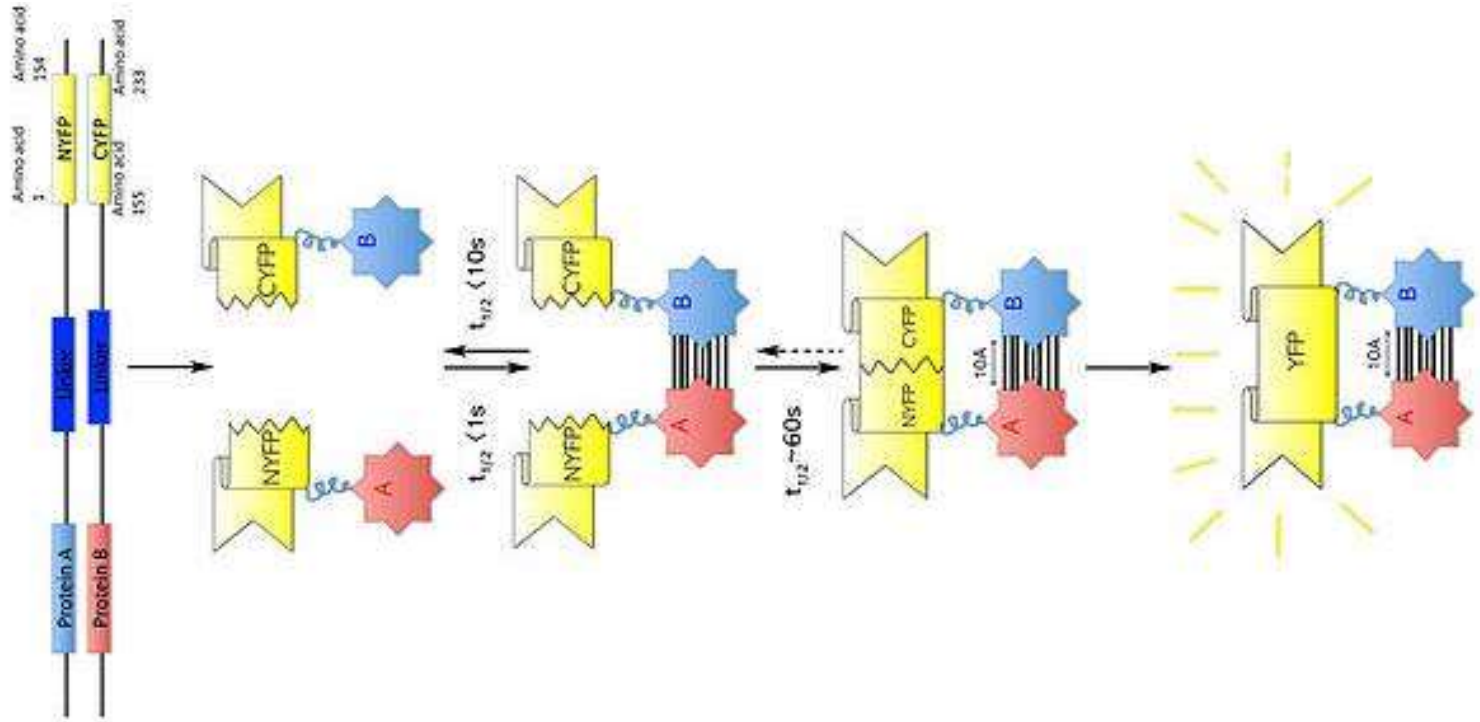
Propojuje se zpět fold/struktura nikoli 2 domény jako u Y2H
(lokalizace proteinů do tkání, buněčných kompartmentů …)



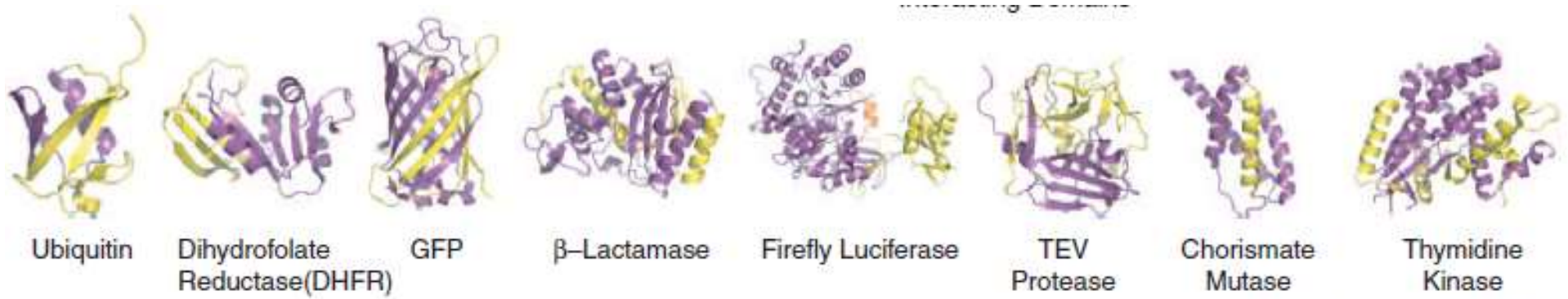


Pekarova et al, Plant J., 2011

Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



Protein-fragment complementation



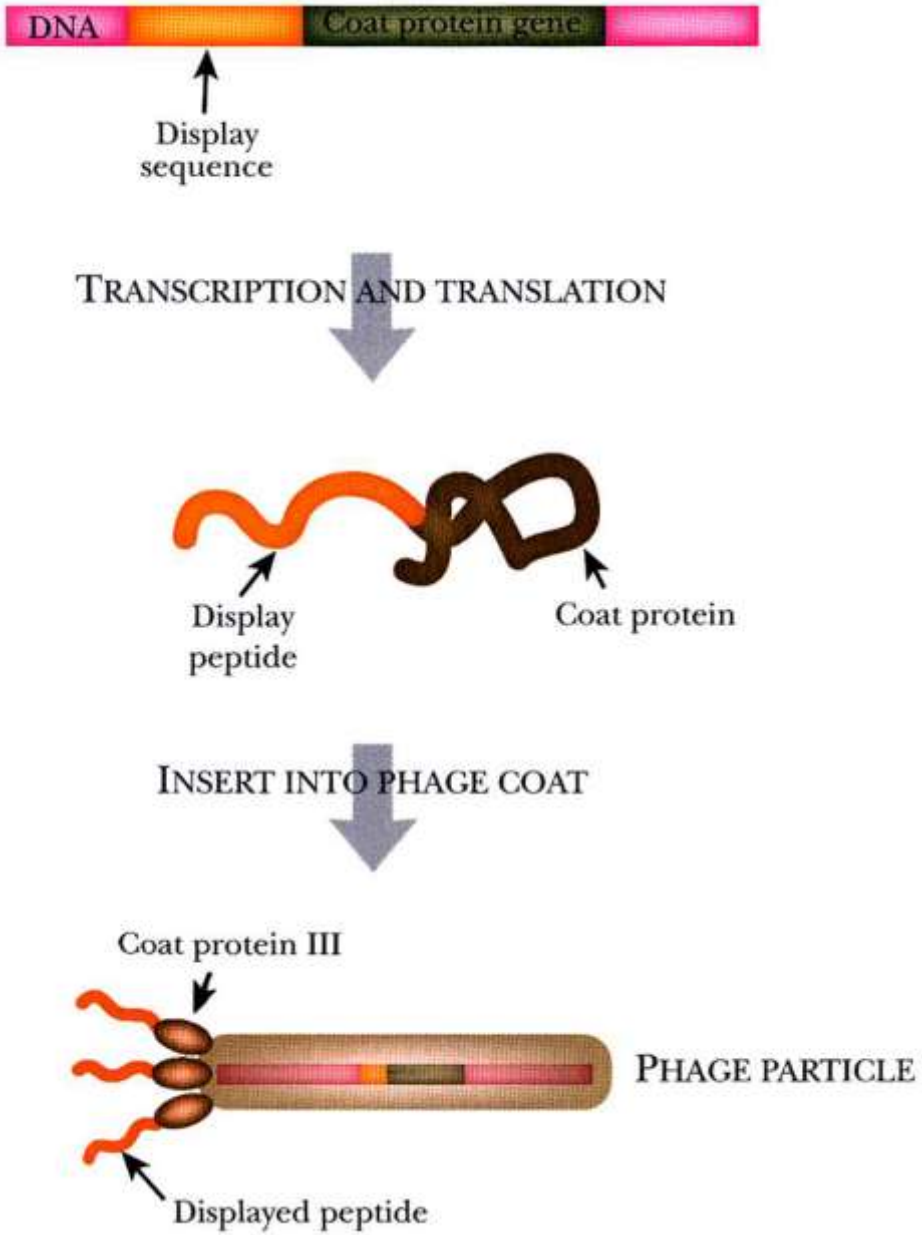
Shekhat & Ghosh, CO in ChB, 2011

Current Opinion in Chemical Biology

„Phage display“

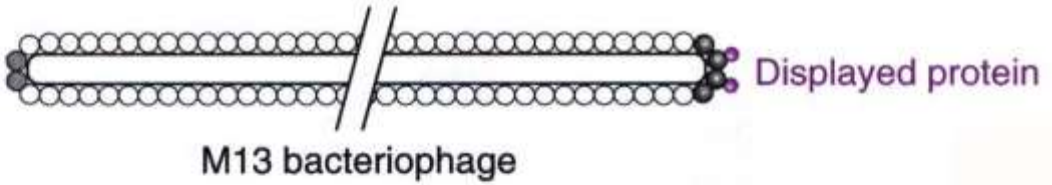
vystavení peptidů nebo proteinů na povrchu bakteriofága pro otestování jeho schopnosti interagovat s jinými proteiny

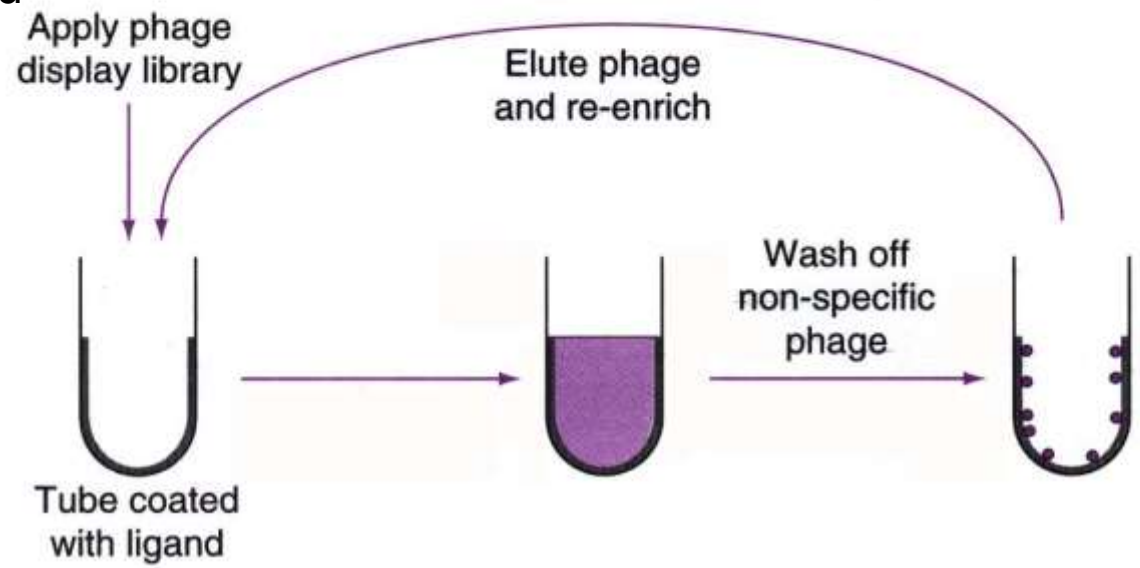
- Princip:
- plášťové proteiny vláknitého
- bakteriofága tolerují
- spojení s cizími polypeptidy
- fúzí připojený cizí peptid
- může být vystaven na
- povrchu fága



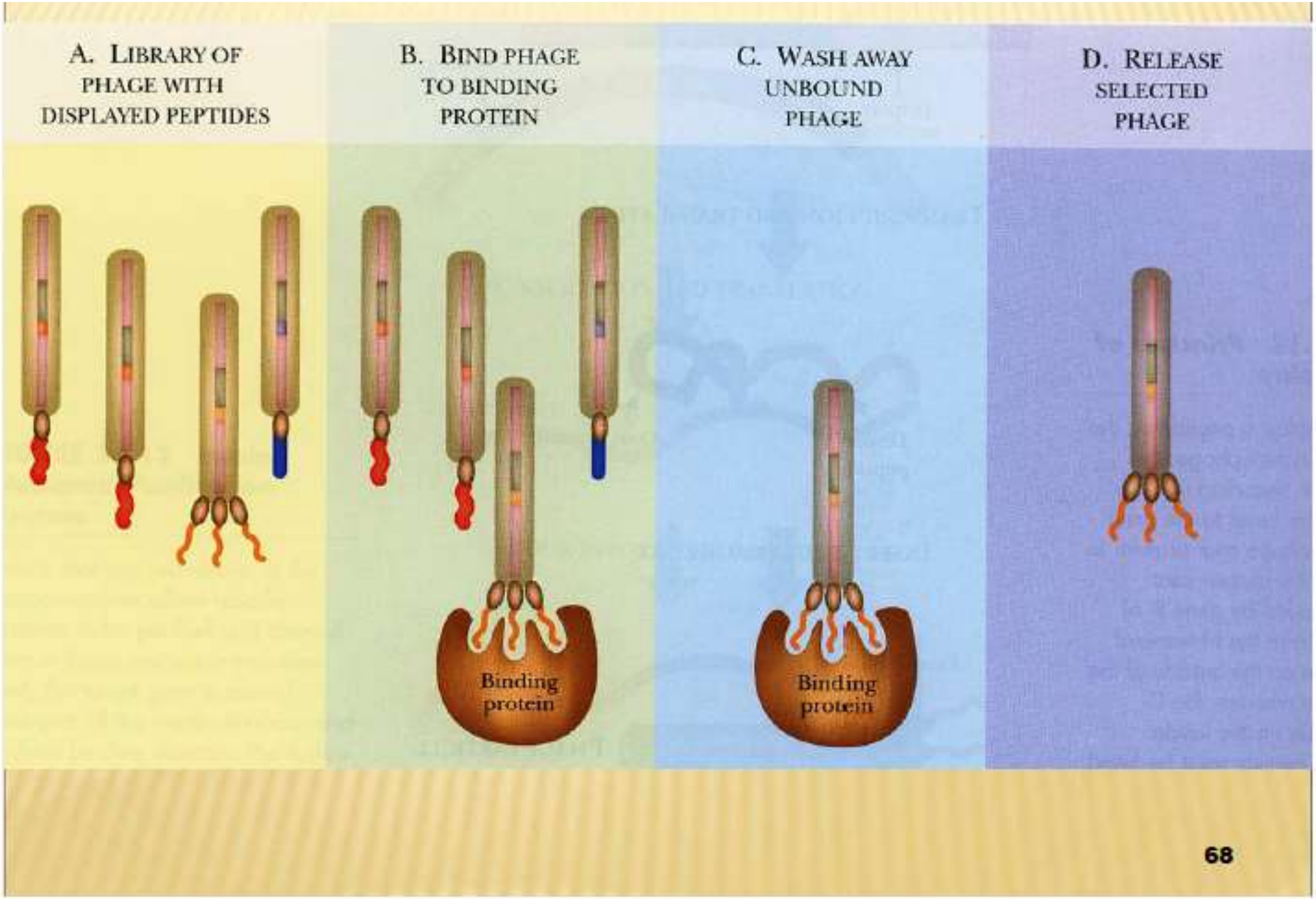
Knihovna „Phage display“

- fragmenty DNA se začlení do klonovacího místa uvnitř genu, který kóduje jeden z povrchových proteinů vláknitého fága M13
- fúzovaný gen kóduje proteinovou chiméru, která bude včleněna do fágové hlavy a to takovým způsobem, že cizí protein bude vystaven na povrchu fágové částice
- v malém objemu může být obrovský počet virionů (10^{12}/ml): lze takto vystavit mnoho různých peptidů





- přenesení knihovny „phage display“ do zkumavky mikrotitrační destičky potažené ligandem, protilátkou, receptorem nebo jiným testovaným proteinem: afinitní screening
  - odmytí nenavázaného fága
  - lze testovat velmi vysoké počty fágových částic a hledat interagující klony


A. LIBRARY OF PHAGE WITH DISPLAYED PEPTIDES
B. BIND PHAGE TO BINDING PROTEIN
C. WASH AWAY UNBOUND PHAGE
D. RELEASE SELECTED PHAGE
Binding protein
Binding protein
68