



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

CG080 – Metody v genomice a proteomice

# Analýza protein-proteinových interakcí



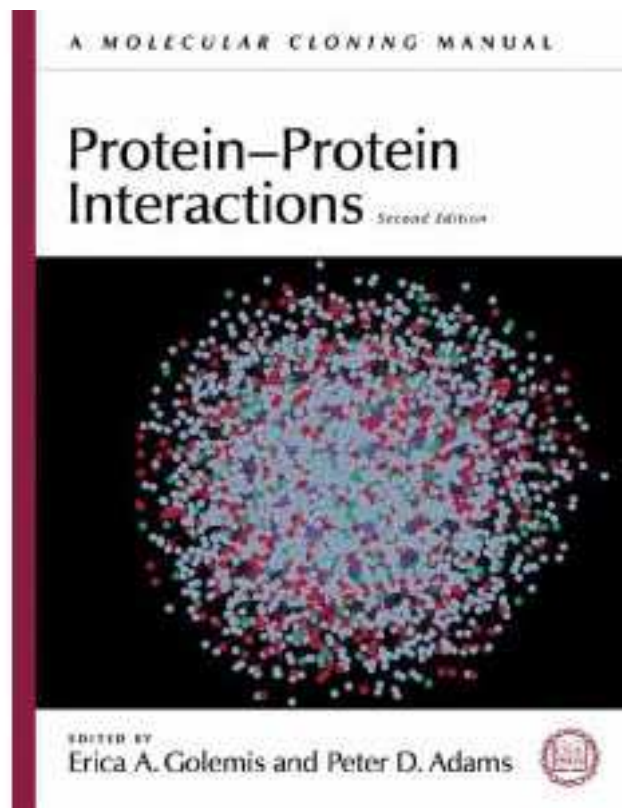
doc. Jan Paleček  
[jpalecek@sci.muni.cz](mailto:jpalecek@sci.muni.cz)

doporučená přednáška: Struktura a funkce proteinových komplexů (CG030)

# Informační zdroje

Golemis a Adams: Protein-protein interactions ...

... **nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science, PLoS ...**



Database protein-proteinových interakcí: <http://string-db.org/newstring.cgi> ...  
<http://www.ebi.ac.uk/intact/?conversationContext=1> – viz níže

# Metody analýzy proteinových komplexů

- ultracentrifugace, gelová filtrace,
- TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
- ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...
- cross-linking MS, (cryo) elektronová mikroskopie ...

# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- matrix/beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

V úvodní přednášce „Struktura a funkce proteinových komplexů“

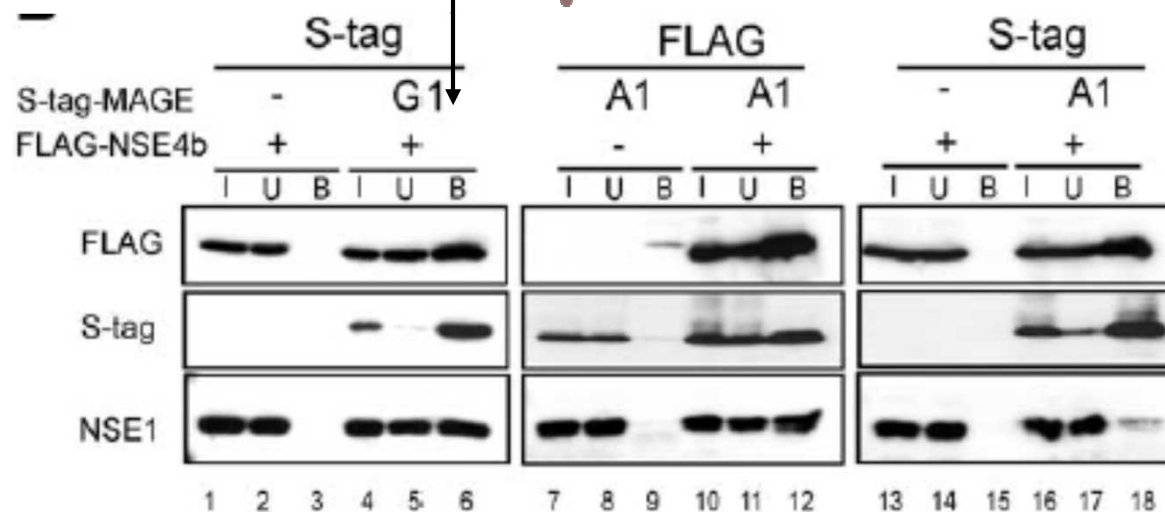
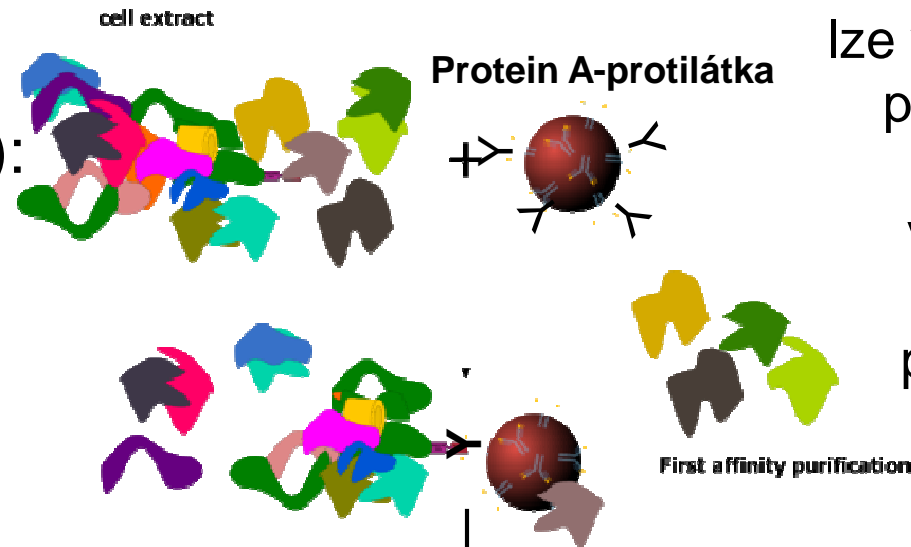
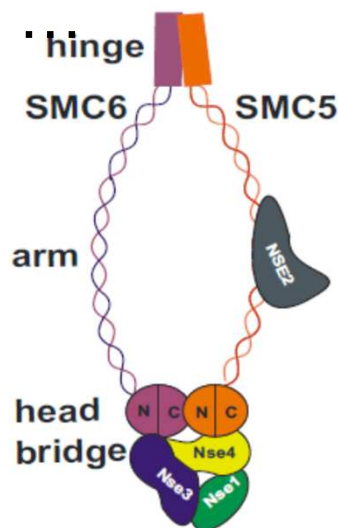
- **matrix/beads-based:**
  - ko-imunoprecipitace
  - ko-purifikace – gelová filtrace
  - pull-down
    - analýza proteinových domén
    - analýza interakčních povrchů
    - použití peptidů
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- TAP-tag („Tandem-affinity purification“, jiné tagy a protilátky)

Protein Tag

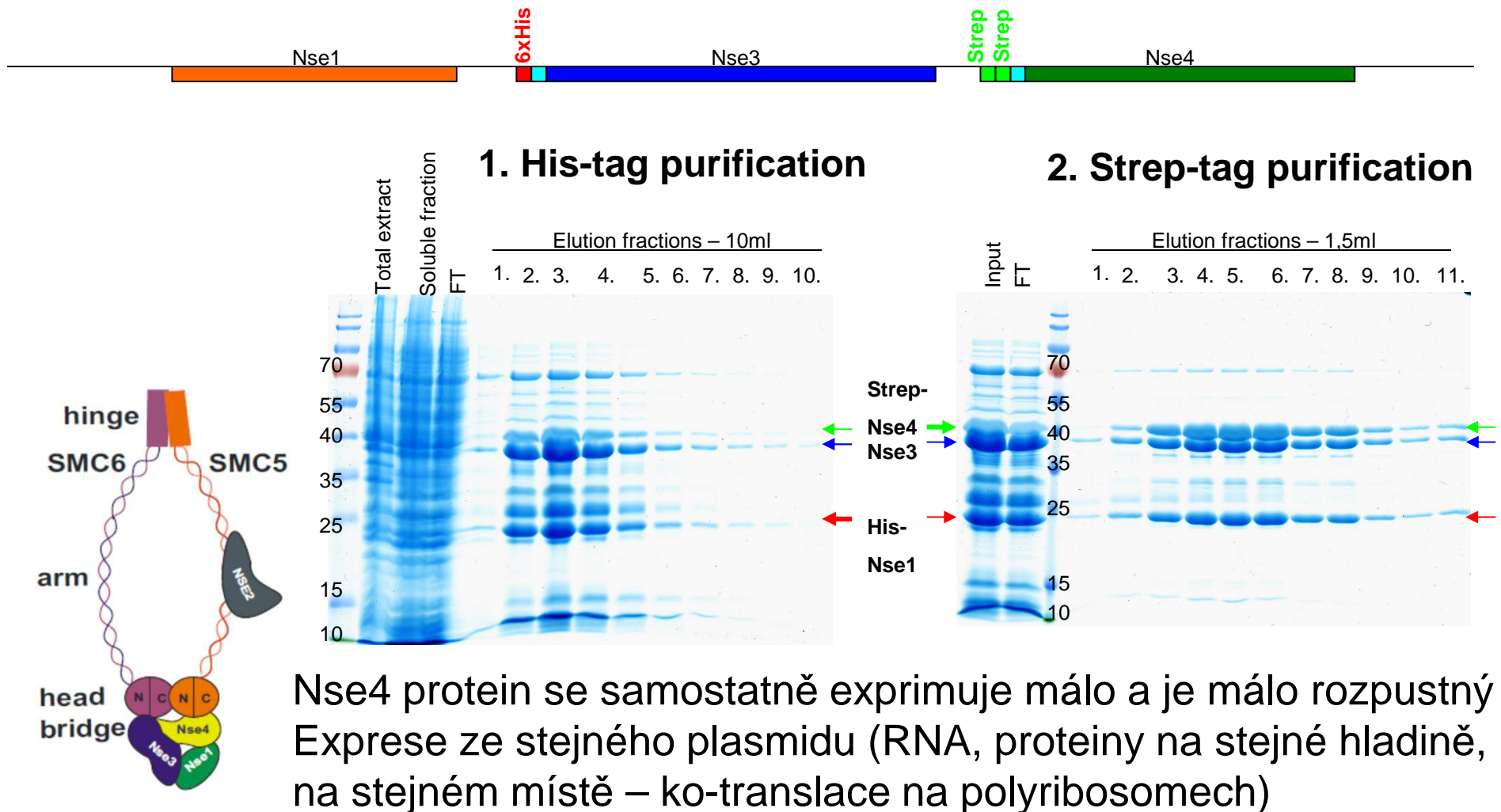
Tagy (a protilátky):  
**Myc, FLAG, V5,**  
**S-tag, GFP,**  
**GST, Streptactin**  
 (biotin-streptavidin),  
**MBP**



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

# Ko-purifikace

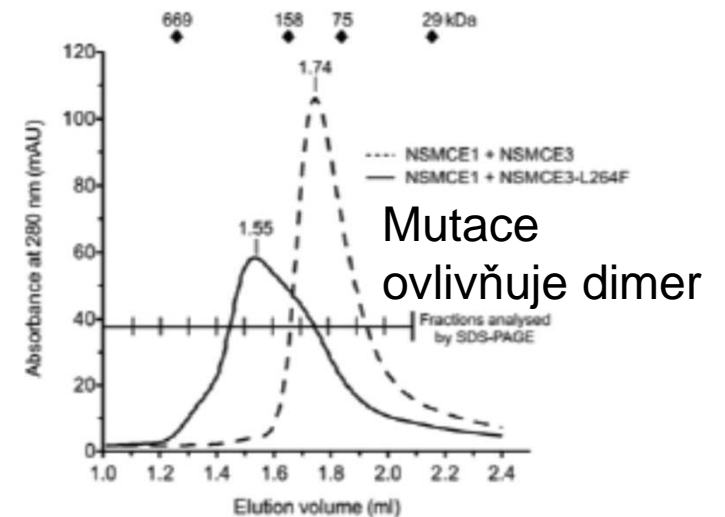
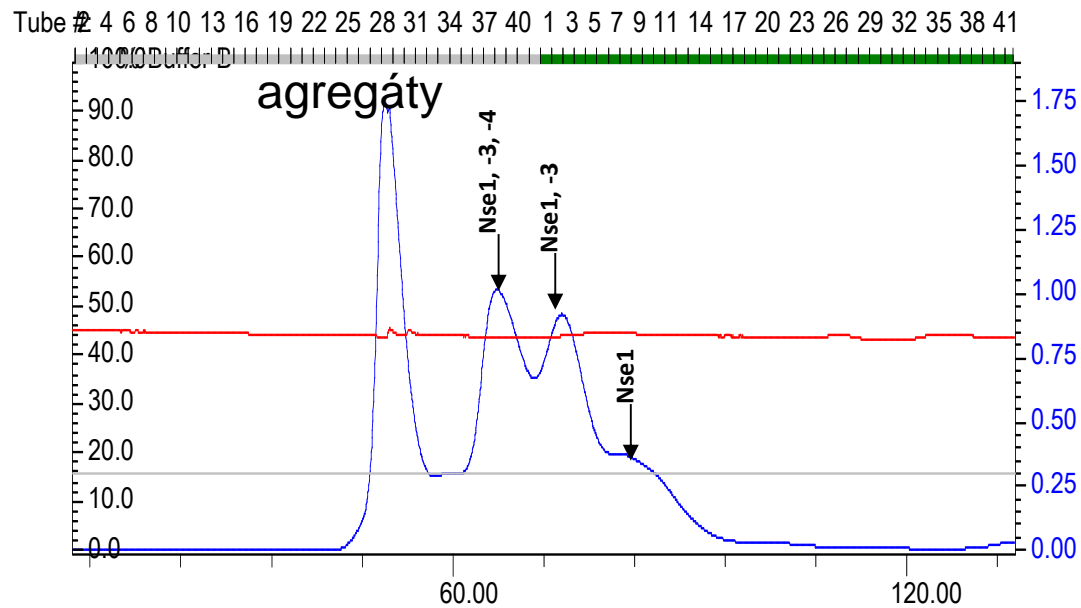
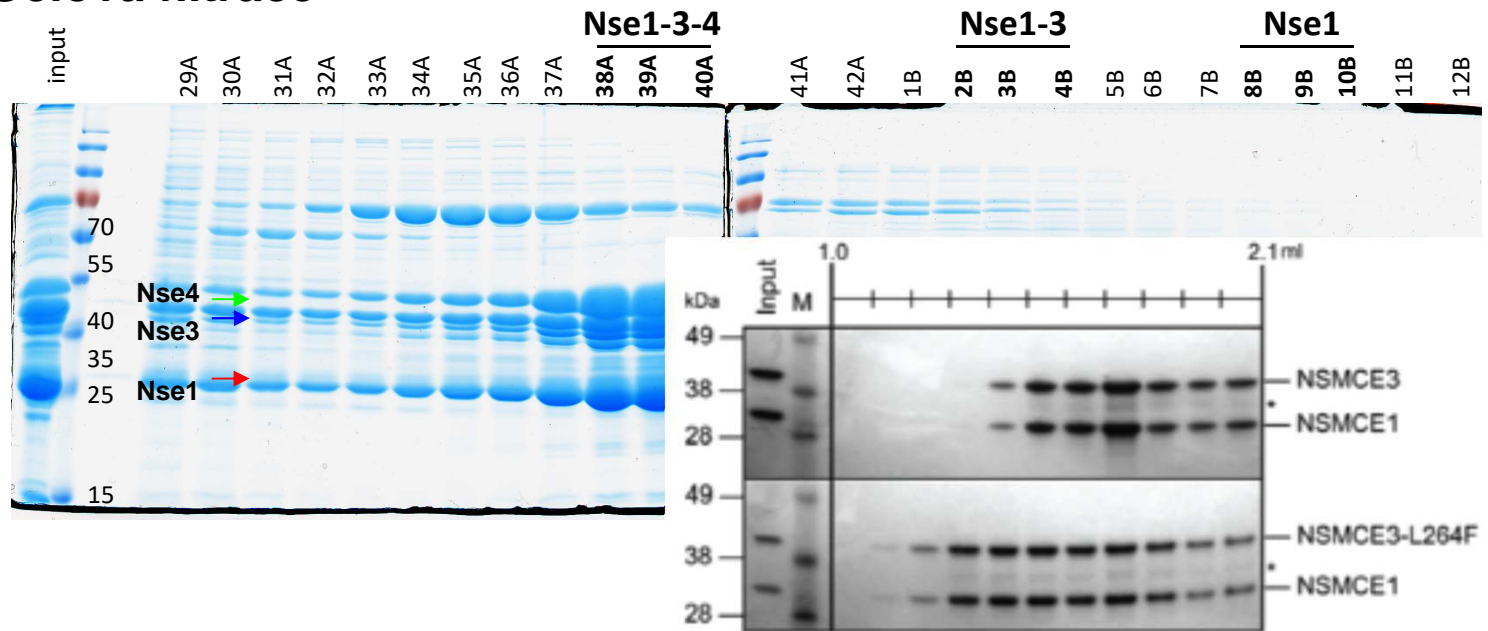
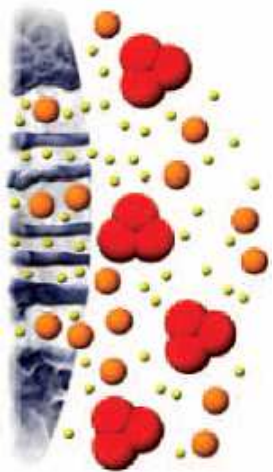
**Silné interakce/komplexy** – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat** (více Dr. R. Dopitová)





# Ko-purifikace

## 3. Gelová filtrace



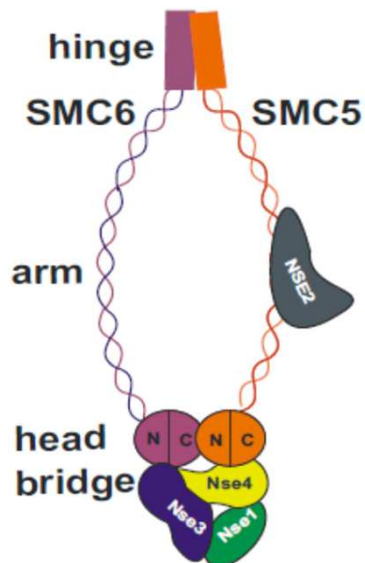
Mutace  
ovlivňuje dimer

# Pull-down (variace)

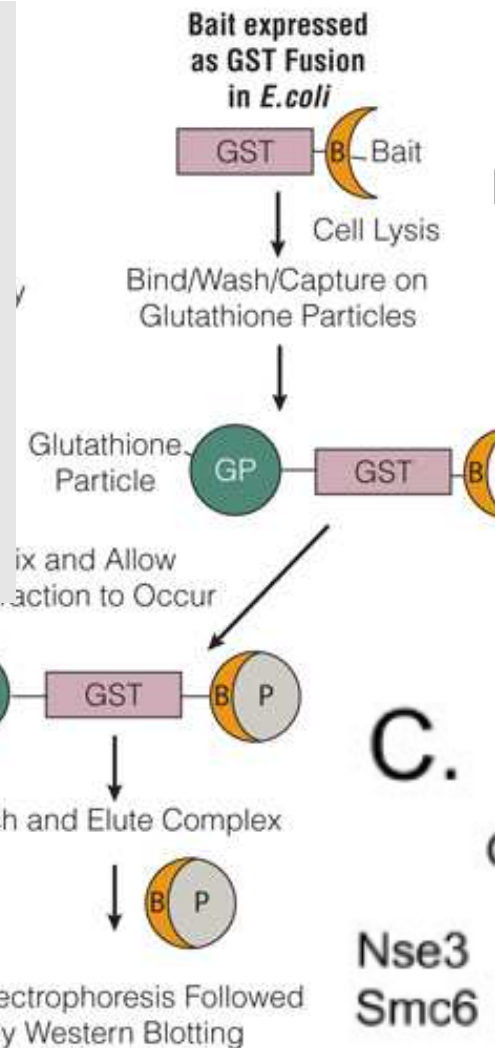
Podobný princip jako při ko-purifikaci

***in vitro* TNT (transcription and translation) systém methionin S<sup>35</sup> (2 partneři) výhody:**

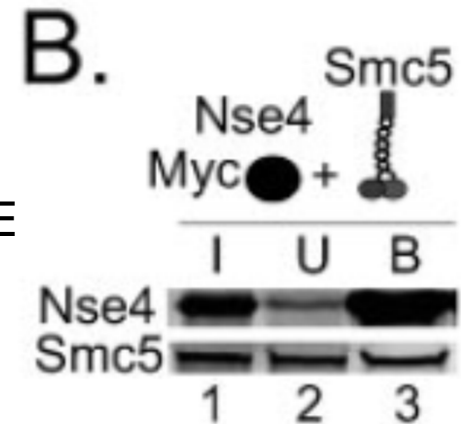
- není třeba proteiny purifikovat
- není třeba protilátky k detekci
- není toxický efekt pro buňky
- lépe rozpustné ...



**Silné interakce** - oba proteiny v TNT (nM-pM)

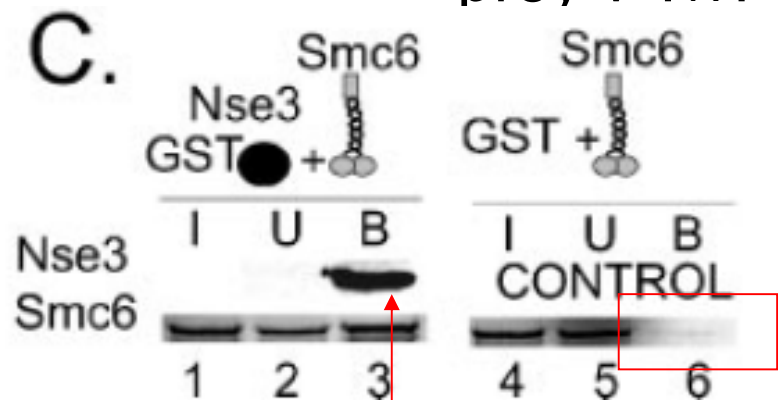


Palecek et al, JBC, 2006



PAGE

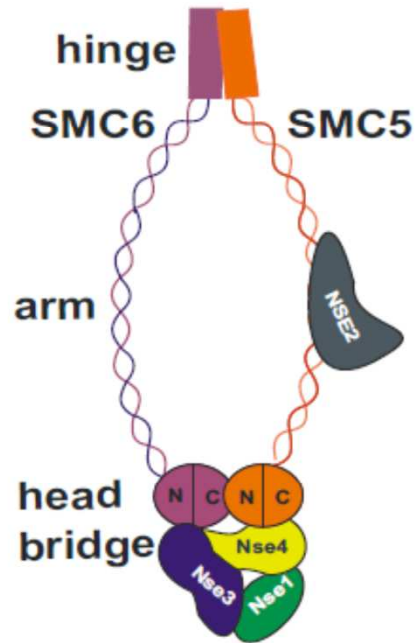
**Slabé interakce** ( $\mu$ M) bait v přebytku (bakt. exprese) a prey v TNT



PAGE => Western (anti-GST)

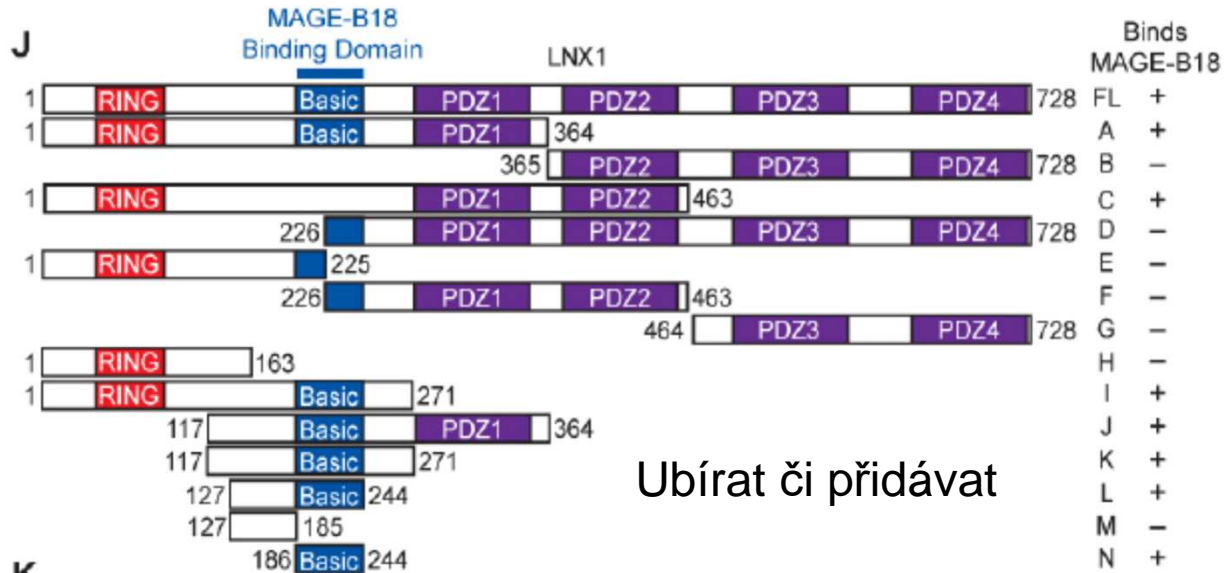
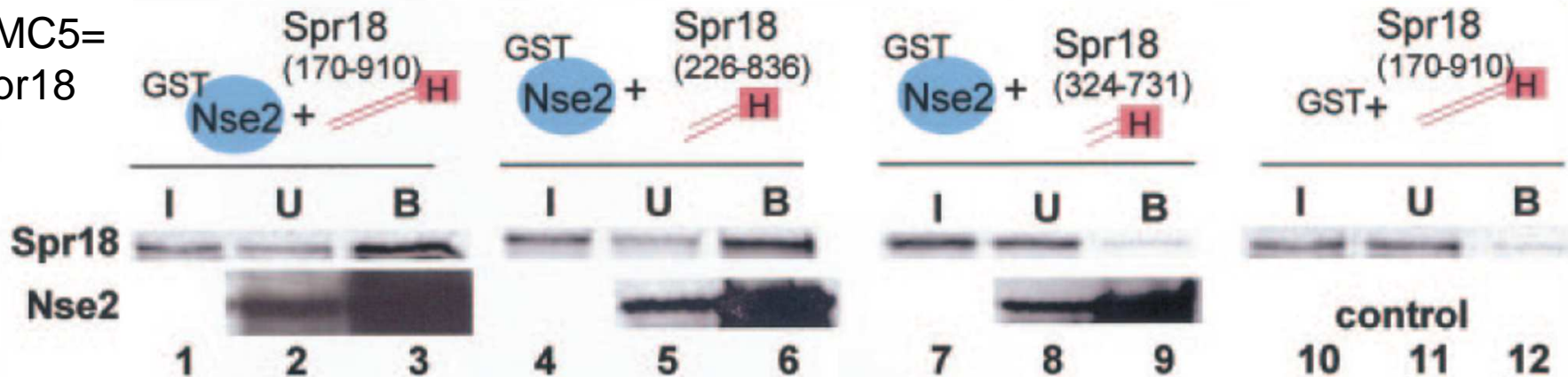


# Charakterizace interakcí - domény

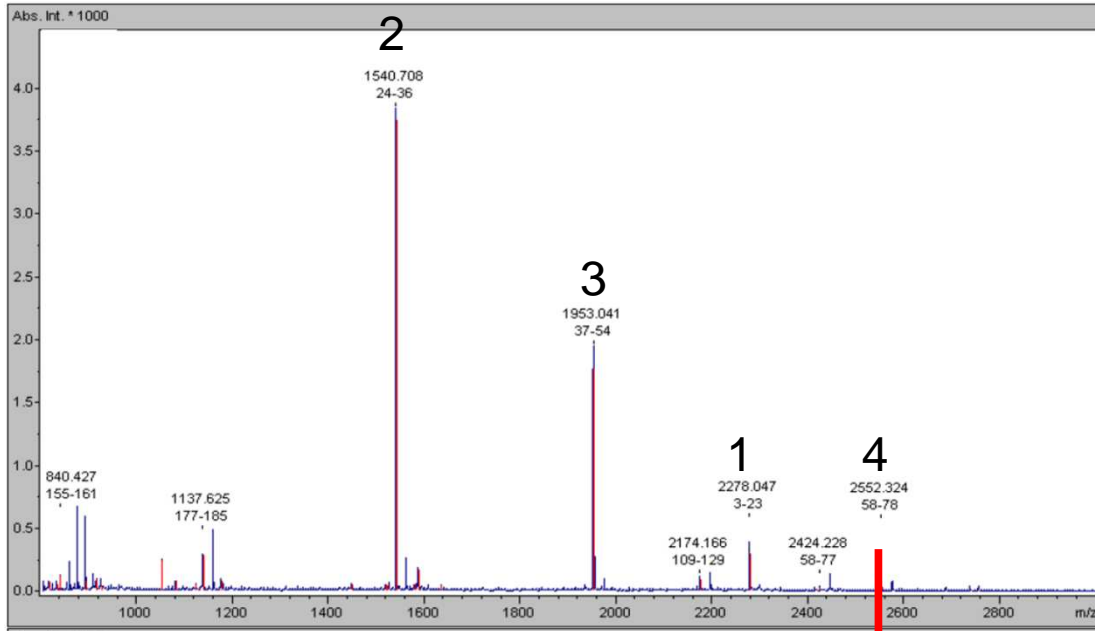


Sergeant et al, MCB, 2005  
Doyle et al, Mol Cell, 2010

SMC5= Spr18

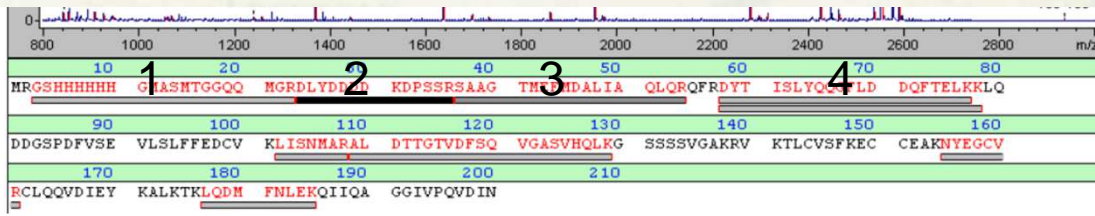
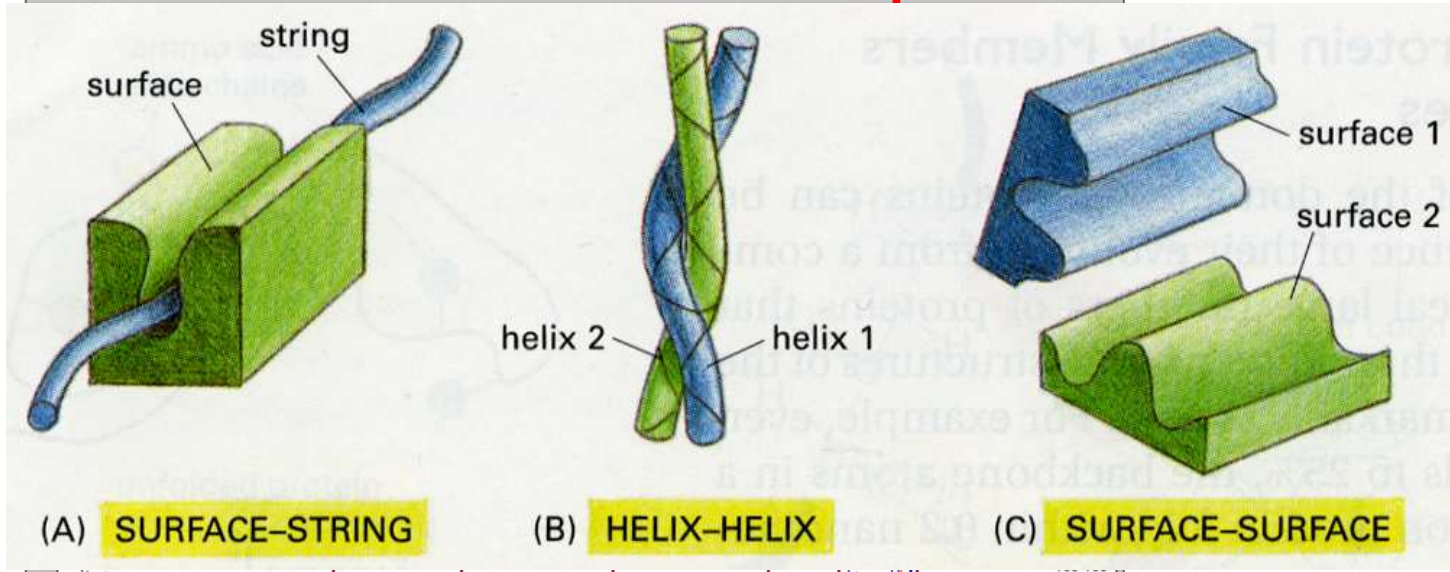


Ubírat či přidávat



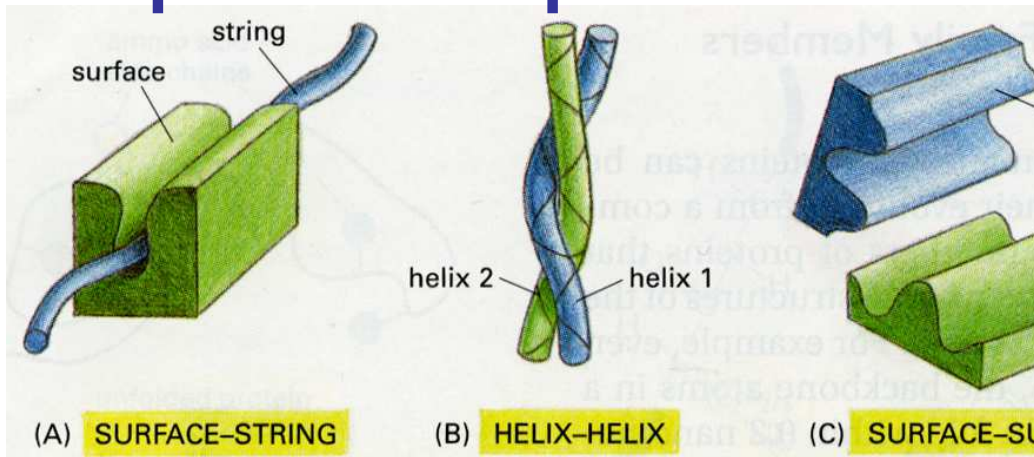
# Charakterizace interakcí – detailní mapování

MS spektrum celého proteinu (normální pokrytí sekvence)



MS spektrum precipitátu (obohacená interakční část)  
P. Reichman (Diplomová práce)

# Peptidové mapování



Epitope

G N F K S L L W E I V C S A Q E A H Q V

Length of protein segment:  
24 residues

Length of epitope:  
8 residues

G N F K S L L W

K S L L W E I V

Example 1

L W E I V C S A

Length: 8 mer

I V C S A Q E A

Offset: 3

No. Peptides: 5

S A Q E A H Q V

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

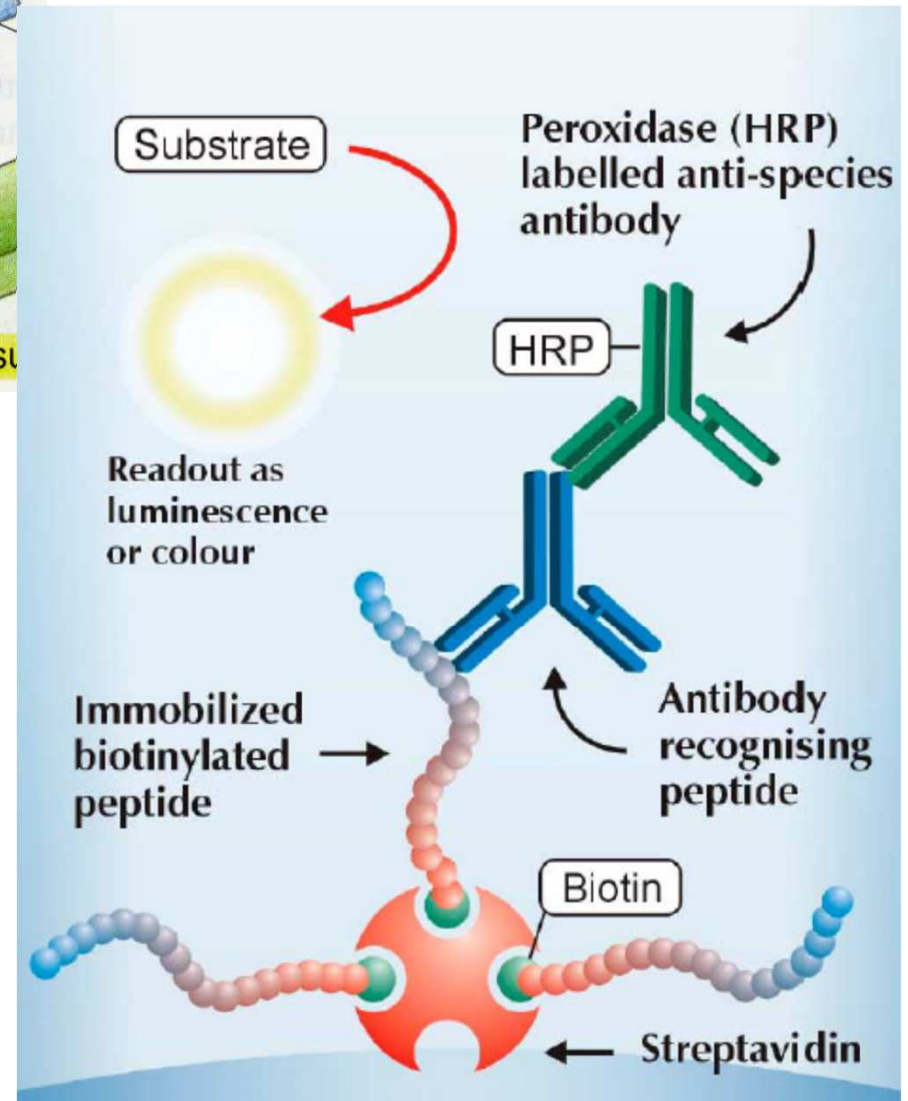


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

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



# Charakterizace interakcí – pe

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

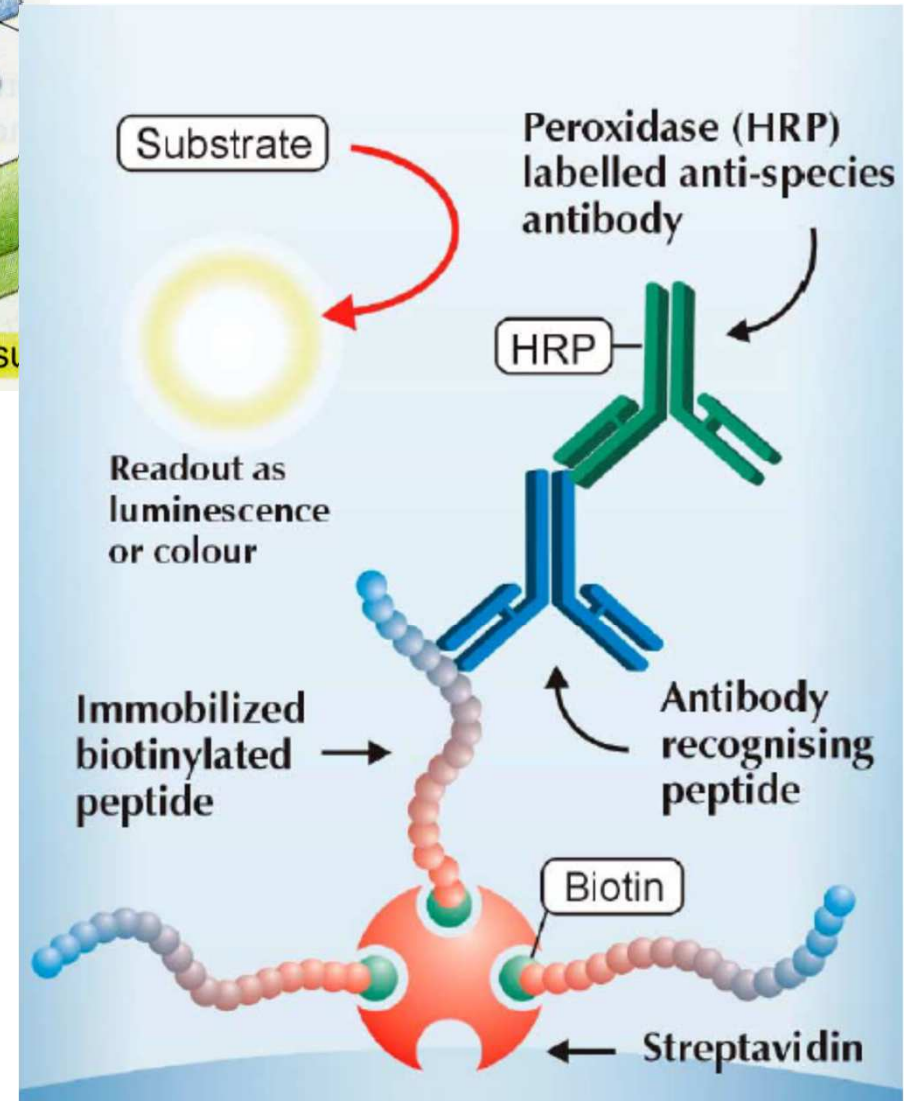
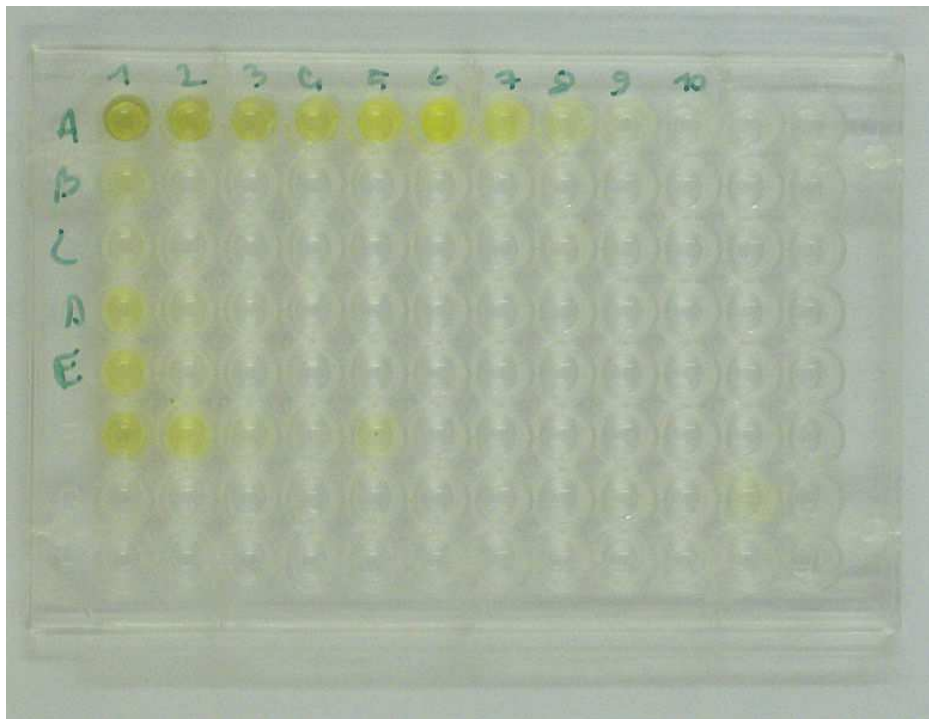
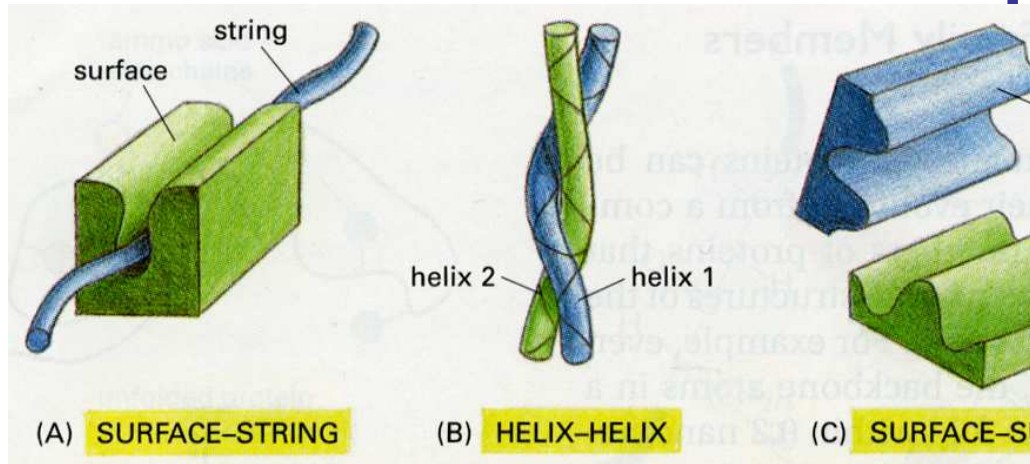


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

# Peptidové mapování

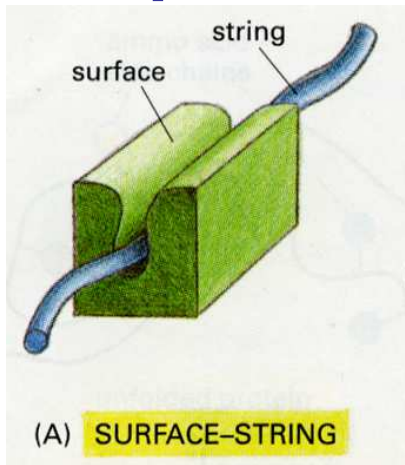
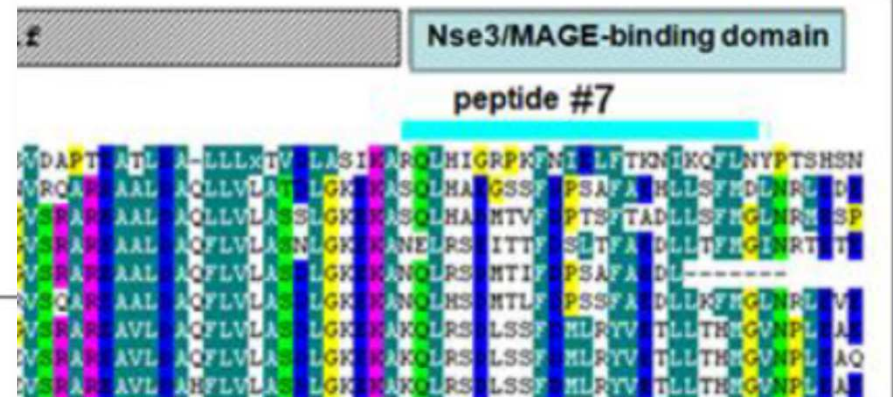
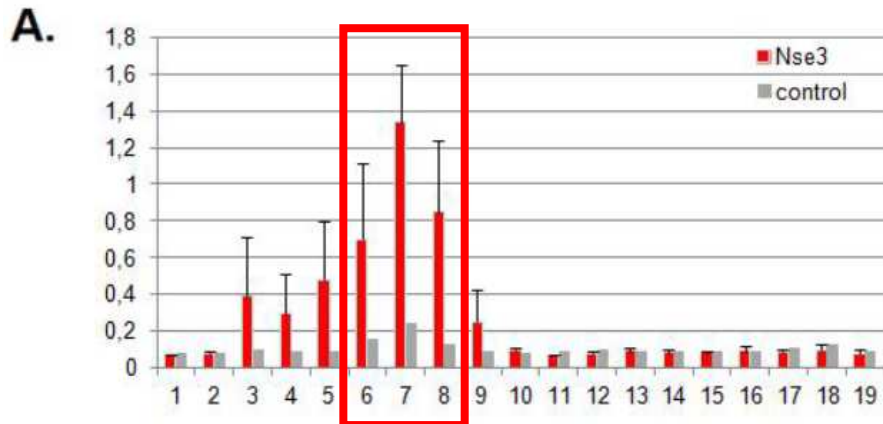


Table 3. *S. pombe* Nse4 synthetic peptides list  
Nse4 peptidy

peptide #	peptide sequence
peptide #1	DAPTEATLDALLTKTVDLASIKAR
peptide #2	-----EATLDALLTKTVDLASIKARQLHI
peptide #3	-----DALLTKTVDLASIKARQLHIGRPK
peptide #4	-----LTKTVDLASIKARQLHIGRPKFNIE
peptide #5	-----VDLASIKARQLHIGRPKFNIELFTK
peptide #6	-----SIKARQLHIGRPKFNIELFTKNIKQ
peptide #7	-----RQLHIGRPKFNIELFTKNIKQFLNY
peptide #8	-----IGRPKFNIELFTKNIKQFLNYPTSH
peptide #9	-----KFNIELFTKNIKQFLNYPTSHSNVT
peptide #10	-----ELFTKNIKQFLNYPTSHSNVTRIQE
peptide #11	-----KNIKQFLNYPTSHSNVTRIQEIDTA
peptide #12	-----QFLNYPTSHSNVTRIQEIDTAW SRL



B.

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

Analýza Nse3-Nse4 interakce

Délka: 25 AMK

Posuv: 5 AMK

Knihovna: 18 peptidů





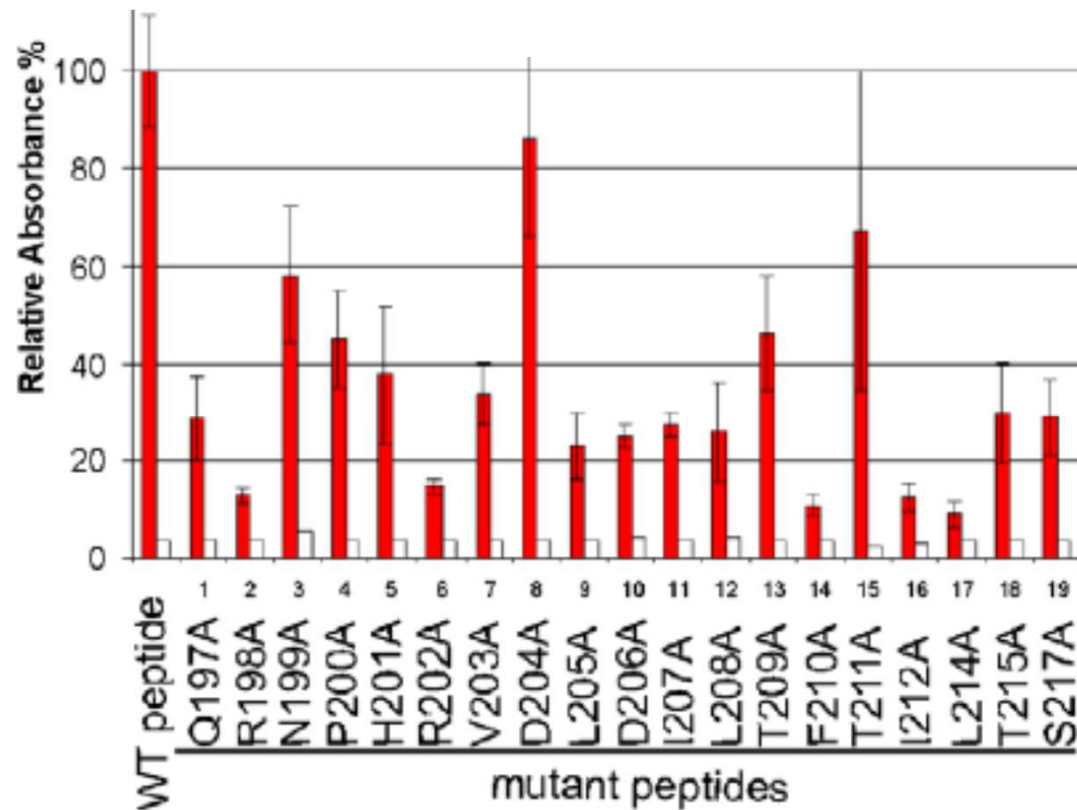
# Charakterizace interakcí – „alanin scan“

EID2 peptidy (paralog Nse4)

Délka: 25 AMK

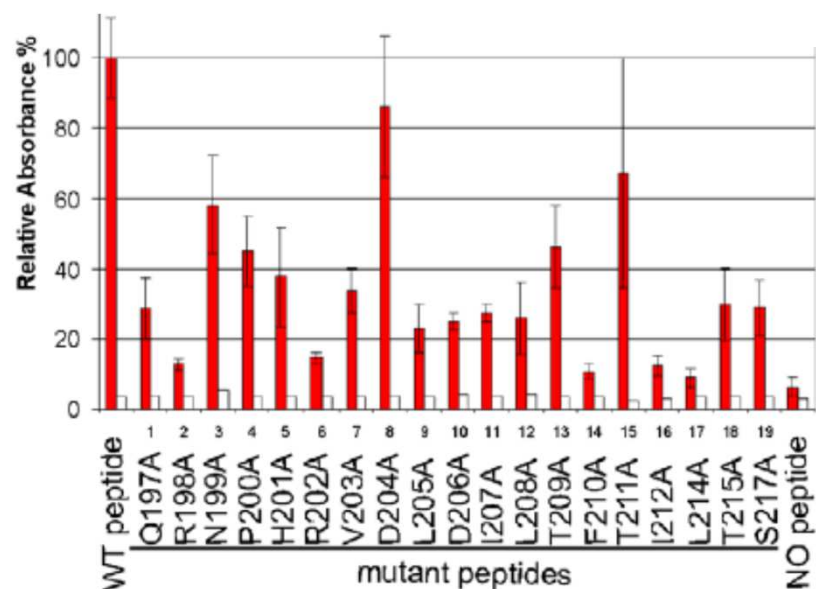
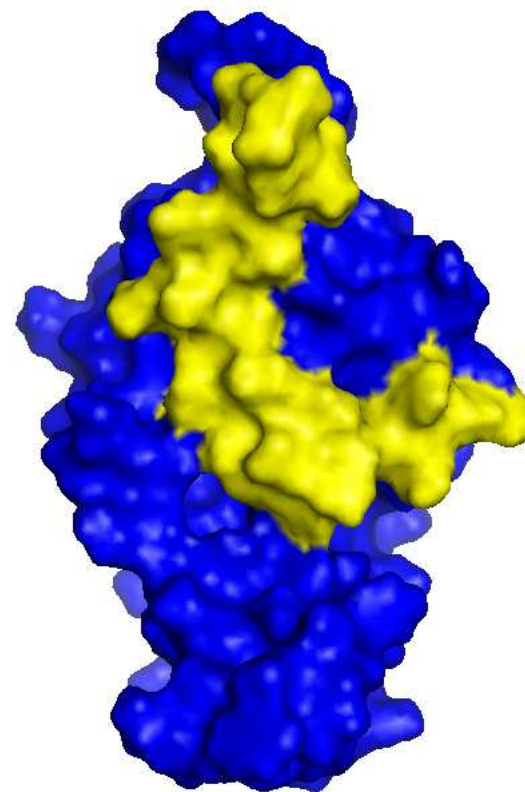
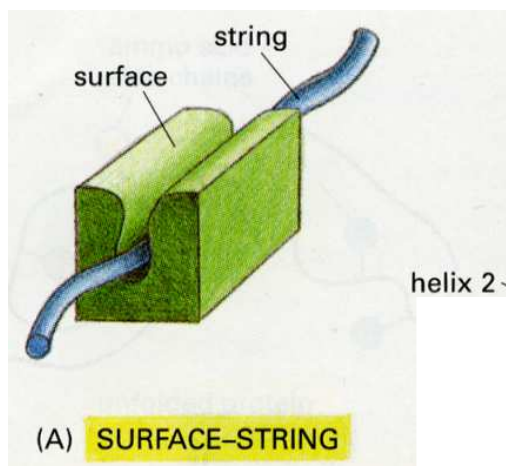
Posuv: mutace po 1 AMK

Knihovna: 20 peptidů



WT peptide	QRNPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #1	<b>A</b> RNPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #2	Q <b>A</b> NPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #3	QR <b>A</b> PHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #4	QRN <b>A</b> HRVLDLILTFTIALTAS
peptide #5	QRNP <b>A</b> RVLDLILTFTIALTAS
peptide #6	QRNPH <b>A</b> VLDLILTFTIALTAS
peptide #7	QRNPHR <b>A</b> DLILTFTIALTAS
peptide #8	QRNPHRV <b>A</b> LILTFTIALTAS
peptide #9	QRNPHRV <b>D</b> ADILTFTIALTAS
peptide #10	QRNPHRVLD <b>L</b> AILTFTIALTAS
peptide #11	QRNPHRVLDL <b>A</b> LITFTIALTAS
peptide #12	QRNPHRVLDLID <b>I</b> ATFTIALTAS
peptide #13	QRNPHRVLDLIDIL <b>A</b> FTIALTAS
peptide #14	QRNPHRVLDLILT <b>A</b> TIALTAS
peptide #15	QRNPHRVLDLILTFT <b>I</b> AALTAS
peptide #16	QRNPHRVLDLILTFT <b>A</b> AALTAS
peptide #17	QRNPHRVLDLILTFTT <b>I</b> AALTAS
peptide #18	QRNPHRVLDLILTFTTIAL <b>A</b> AS
peptide #19	QRNPHRVLDLILTFTTIALT <b>A</b> A





Interakce NSE3-NSE4 (obecně MAGE-EID) detailně zmapovány pomocí pull-down, peptidů, mutagenese ...  
hydrofobní šroubovice Nse4 proteinu sedí v kapse Nse3 proteinu ...

# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

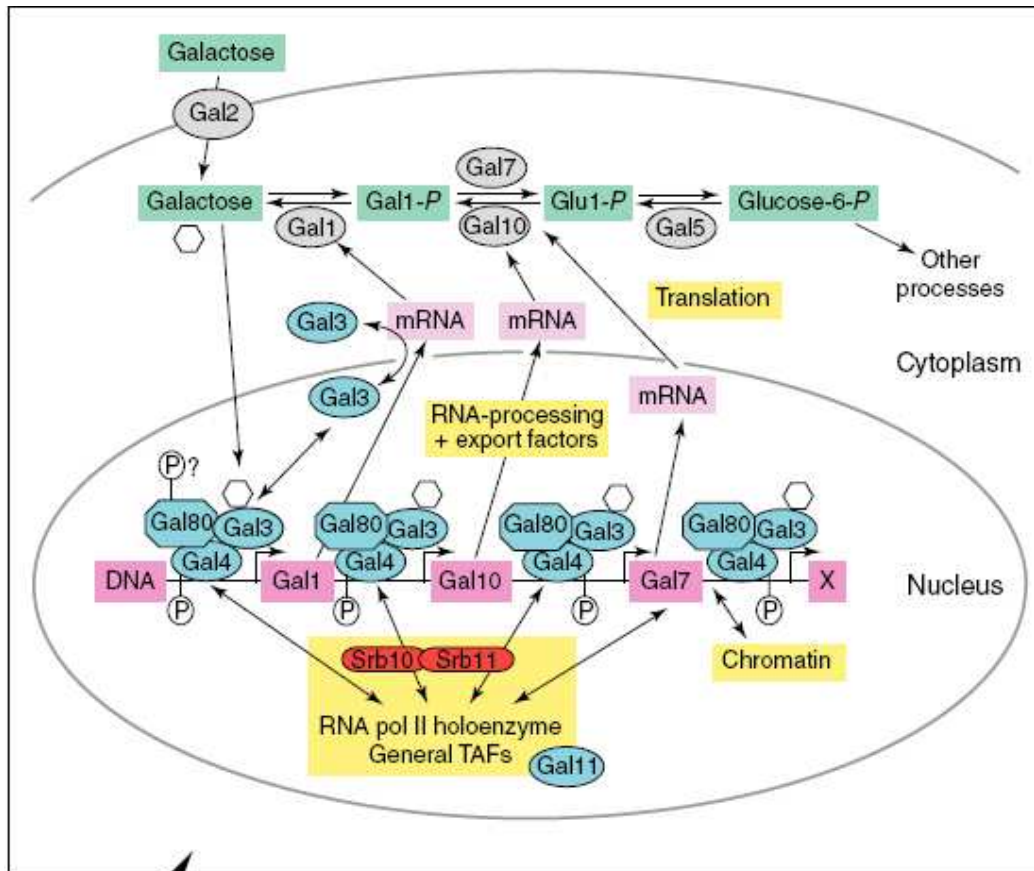
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- **hybridní:**
  - **transkripční 2-hybridní systém - *domény***
    - reverzní systém – analýza PPI
  - **více-hybridní systémy**
    - inhibice PPI
  - **membránový systém - *pathway***
  - **komplementační systémy - *fold***
    - BiFC, DHFR
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

# Dvou-hybridní systémy (kvasinkové)

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

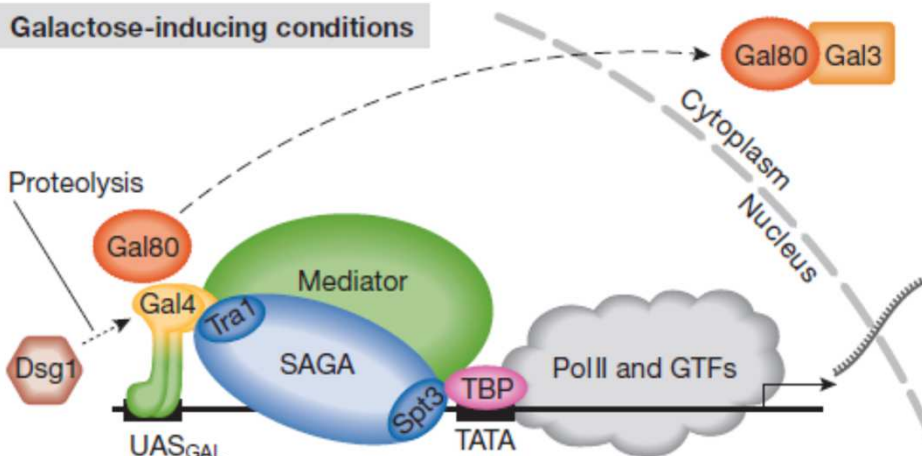
Na spínání/regulaci metabolismu galaktosy se podílí transkripční faktor **Gal4p** – váže specifické sekvence v UAS genů (Gal enzymů) a aktivuje jejich transkripci

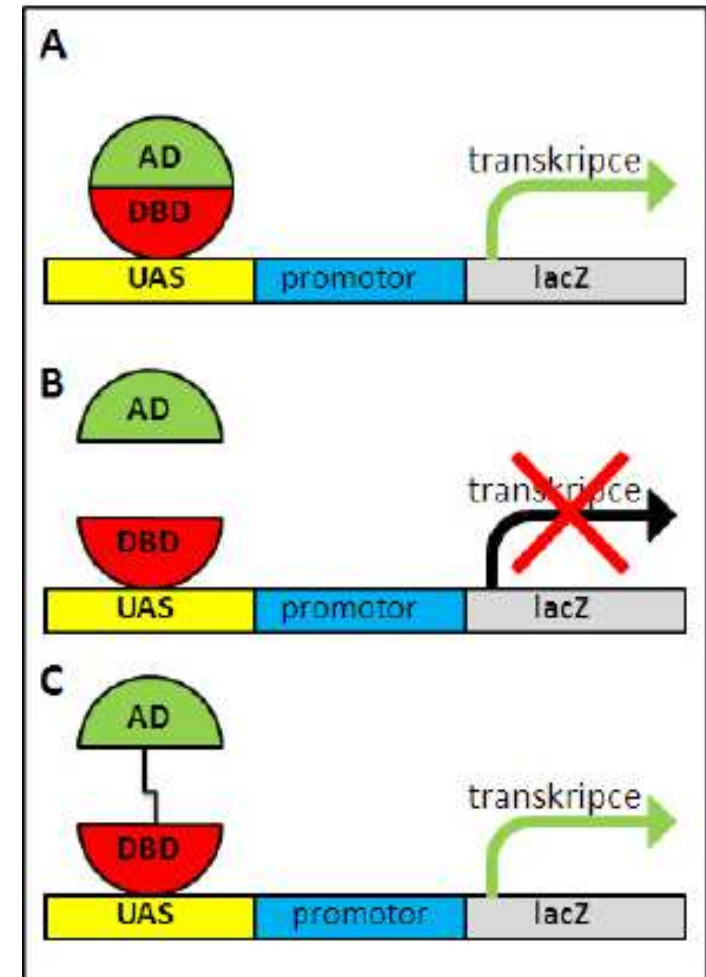
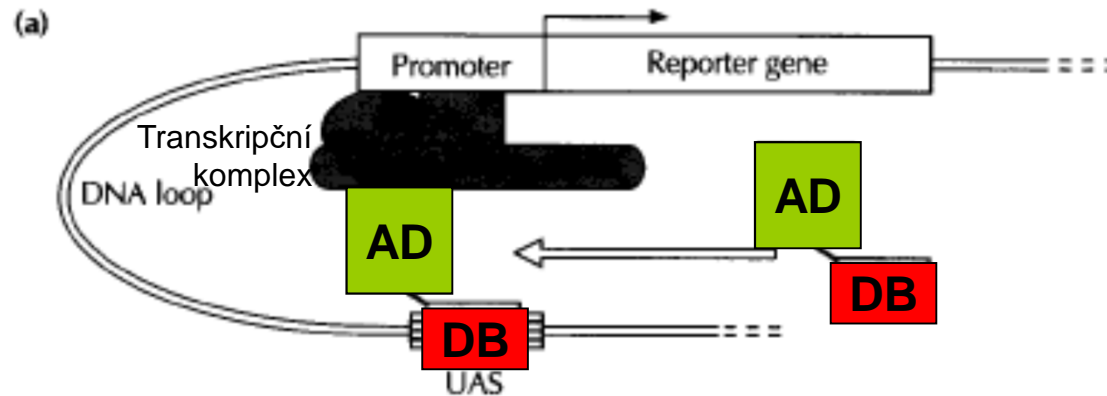
Uetz and Finley, 2005  
Traven et al.: EMBO Report, 2006



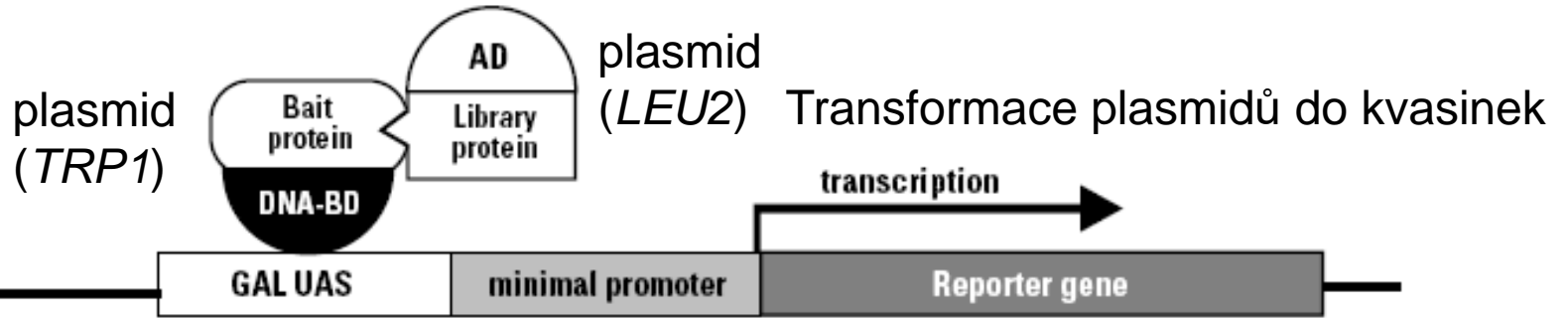
doc. J. Paleček: Biologie kvasinek (C9045)

Galactose-inducing conditions



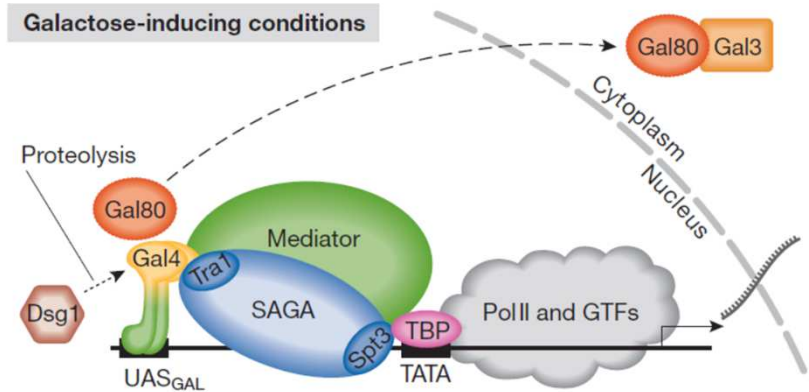


- DNA-vazebná doména (DB) bez aktivační domény (AD) není schopna aktivace transkripce
- Je možné **propojit domény** jakýmkoli linkerem a transkripci reaktivovat



AH109  
Kvasinkový  
kmen

*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*



GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

- 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)



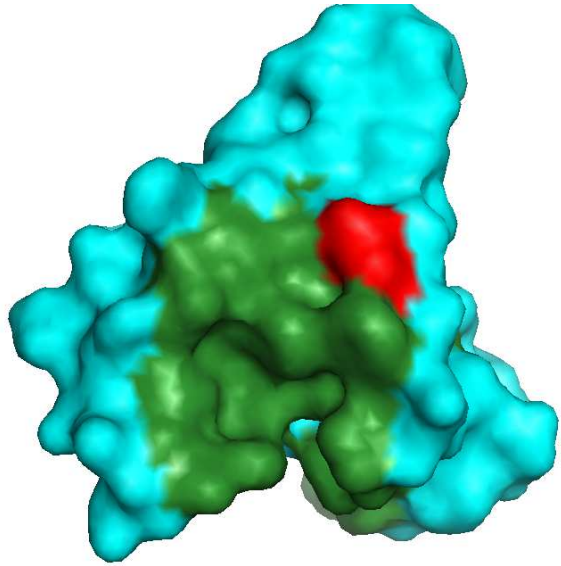
# Reportérové geny

## Reporter genes

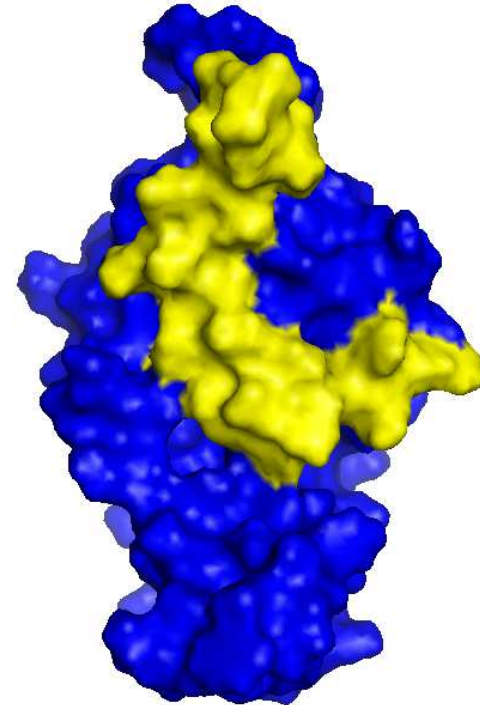
<i>E. coli lacZ*</i>	$\beta$ -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory $\alpha$ -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	$\beta$ -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory $\beta$ -galactosidase chromogenic reporter (318)	
<i>S. cerevisiae HIS3*</i>	Prototrophic reporter for histidine biosynthesis (673)	
<i>S. cerevisiae LEU2*</i>	Prototrophic reporter for leucine biosynthesis (234)	
<i>S. cerevisiae URA3</i>	Prototrophic reporter for uracil biosynthesis (374)	auxotrofie (media bez ...)
<i>S. cerevisiae ADE2*</i>	Prototrophic reporter for adenine biosynthesis (299)	
<i>S. cerevisiae LYS2</i>	Prototrophic reporter for lysine biosynthesis (580)	
<i>Aequorea victoria GFPuv</i>	Fluorescent reporter (107)	
<i>EGFP</i>	Fluorescent reporter (613)	FACSsorting
Yeast <i>EGFP</i>	Fluorescent reporter for flow cytometry screens (88)	
<i>Aureobasidium pullulans AUR1-C</i>	Aureobasidin A resistance reporter (167)	rezistence (media s aureob)







mut.	-m-mmmmmmm- Nse4	-m--m--m-- S.p.	mm-mm	---	mm-mm	---	mmm	--m--m																																	
Nse4																																									
S.p.	GFLM	VIAFIAV	SHCS	VG-H	SEI	QSFL	QELLT	---EEETT	PI	HLDITRS																															
A.n.	GLY	FII	AVILL	NGG	TLO-	OKL	DRLSR	MNA---	EQFT	PV	RR-T	HLLI																													
N.f.	GLYS	FII	AVILL	NGGS	LP-	OKL	ERYLK	RRTNA---	DTYT	PV	RR-T	RFRF																													
A.t.	GLYT	FII	ALILL	NGGS	LP-	OKL	ERYLQ	RNTNT---	DTYT	PI	RR-T	RFRF																													
A.c.	GLYS	FII	AVITL	NGGS	LP-	OKL	ERYLK	RRTNA---	DTFT	PI	RR-T	RFRF																													
N.c.	GLY	TML	IAI	IITL	S	GGEL	S-UP	RRL	RYL	TRL	NAAx	P	NNEN	AP	S	K-T	ELV																								
M.g.	GLYS	MIV	TII	QLN	R	GEL	S-TP	KL	KRY	LQ	R	LNA---	ETNT	PV	K-T	ELL																									
A.o.	GLYS	FII	AVIM	L	NGGS	LP-	OKL	DRLA	R	TNA---	DTYT	PI	RR-T	RLI																											
S.c.	GVLS	VIL	CIV	FFS	KNN	L-H	OEL	I	K	F	L	E	T	F	G	I	P	S	D	G	S	K	I	A	I	L	N	I	T	I	D	L									
D.r.	GLL	FV	IL	S	V	F	M	K	G	T	I	K-	E	N	L	V	W	N	T	L	K	K	L	R	L	D	P	G	E	K	H	D	E	F	G	V-	K	K	V	V	
X.t.	GLL	M	V	I	L	S	L	I	F	M	K	N	T	A	K-	S	A	V	W	E	M	L	R	L	R	I	E	P	A	E	K	H	S	D	F	G	V-	K	K	L	I

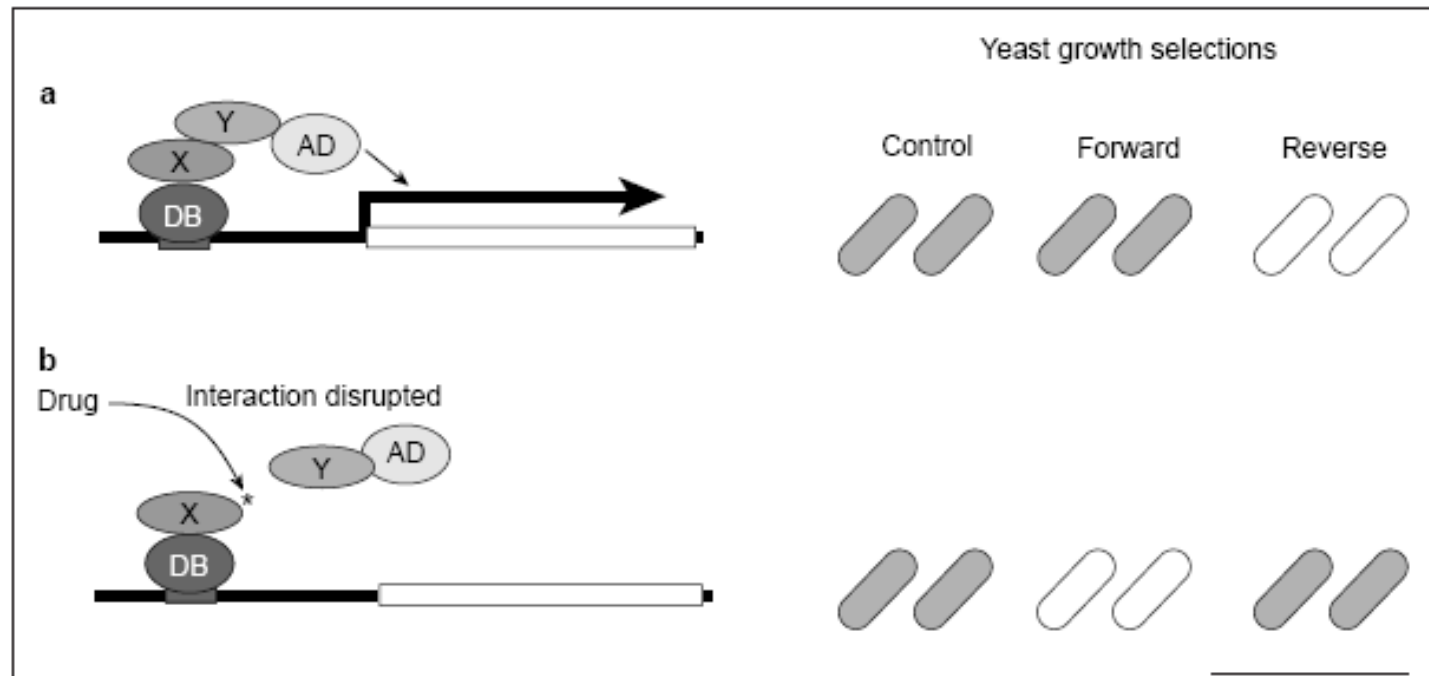


“alanin scan” konzervovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu na povrchu Nse3 ...

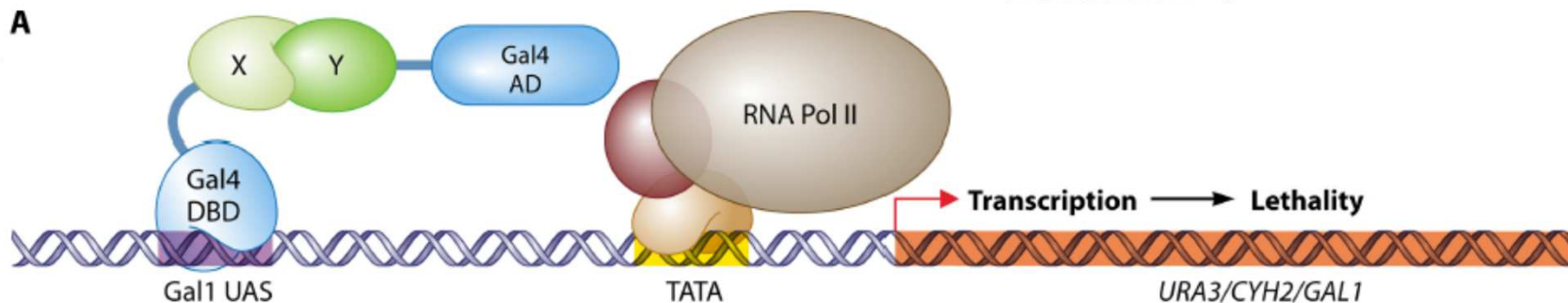
... do níž se váže hydrofobní šroubovice Nse4 proteinu

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

# Reversní systém (Y2H)



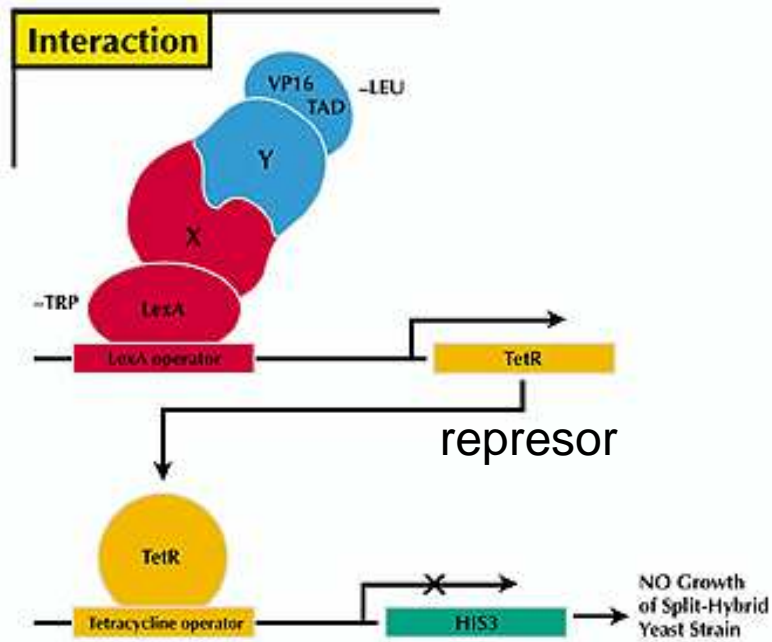
je vhodnější  
pozitivní selekce  
(screenovat na  
rostoucí  
kvasinky)



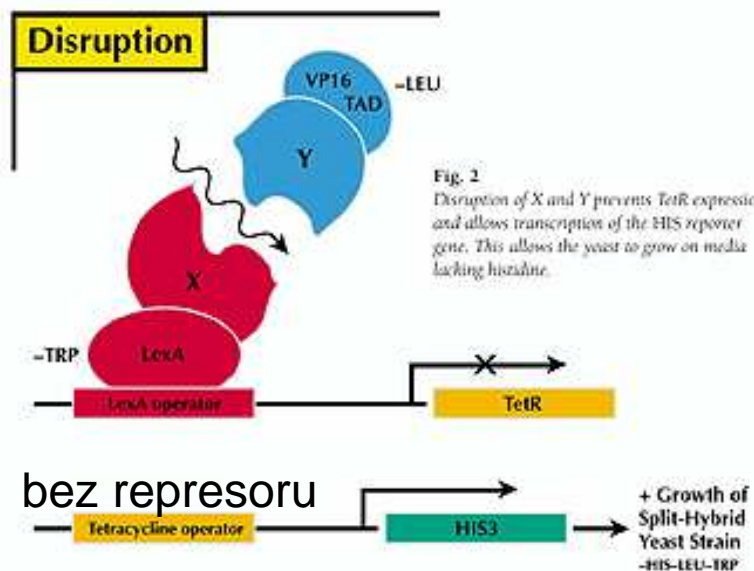
- při použití *URA3* reportéru lze použít toxickou 5-fluoro-orotátovou kyselinu (5-FOA) k negativní selekci tj. interakce povede k záhubě kvasinek, zatímco mutanty neschopné interakce na FOA plotnách porostou (mutanty nebo syntetické látky)



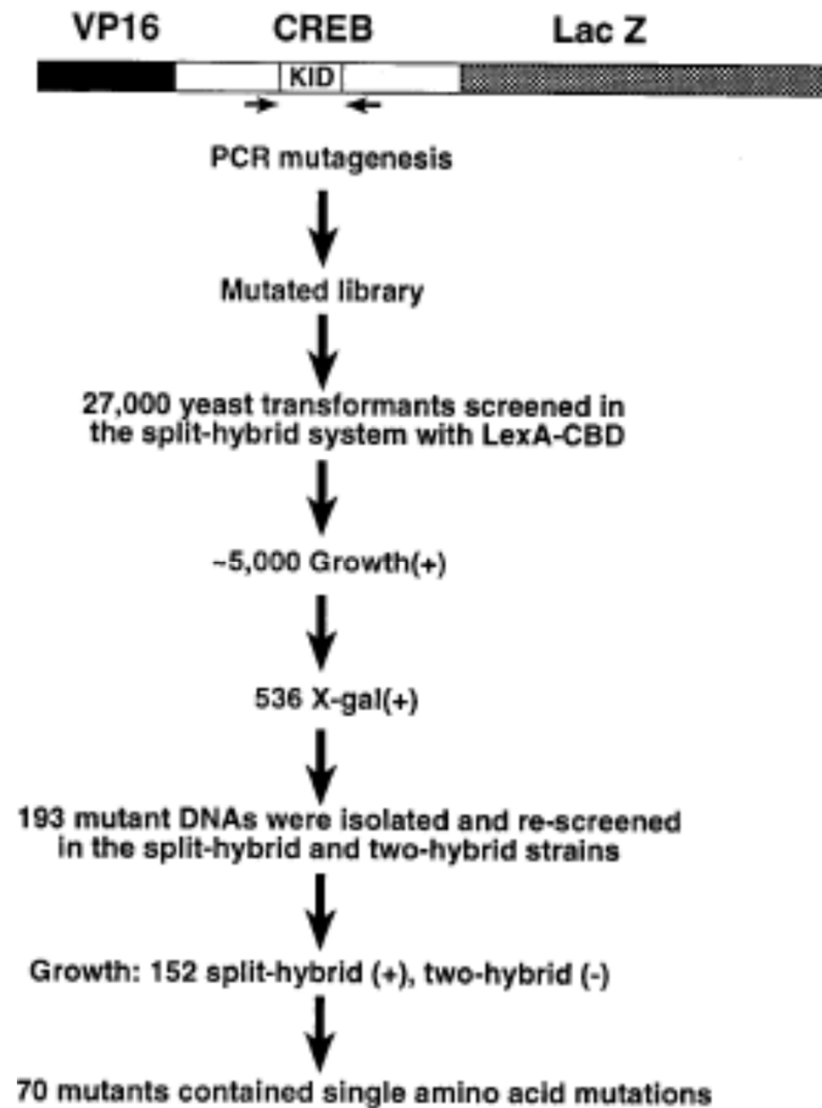
# Split-hybrid systém

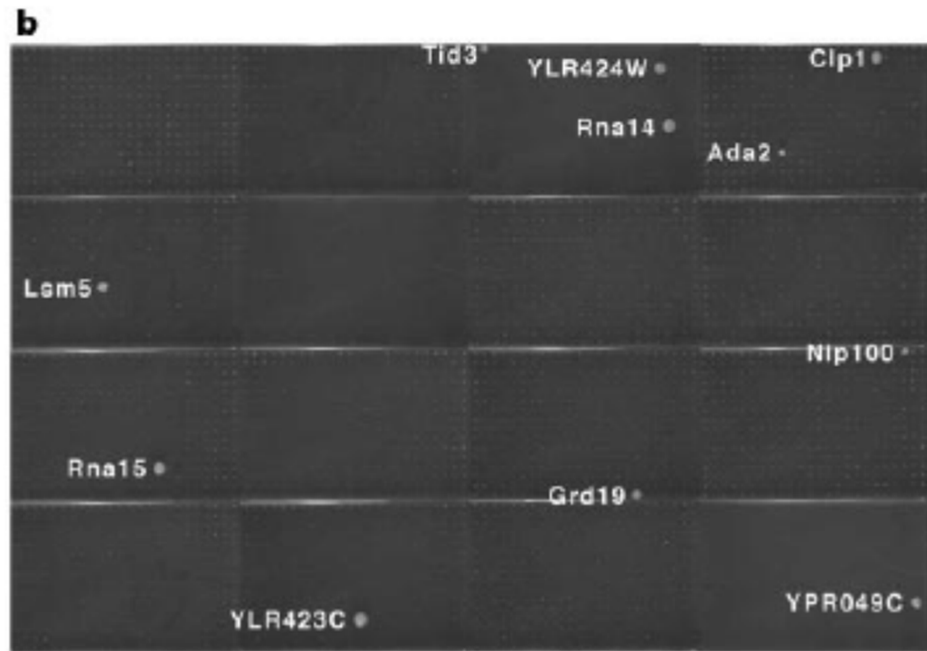
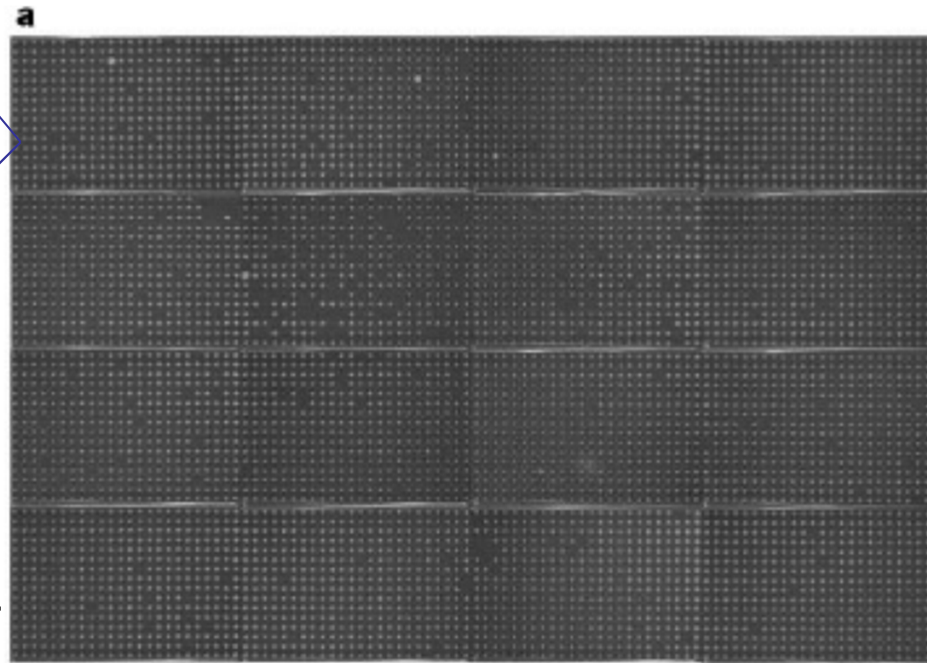
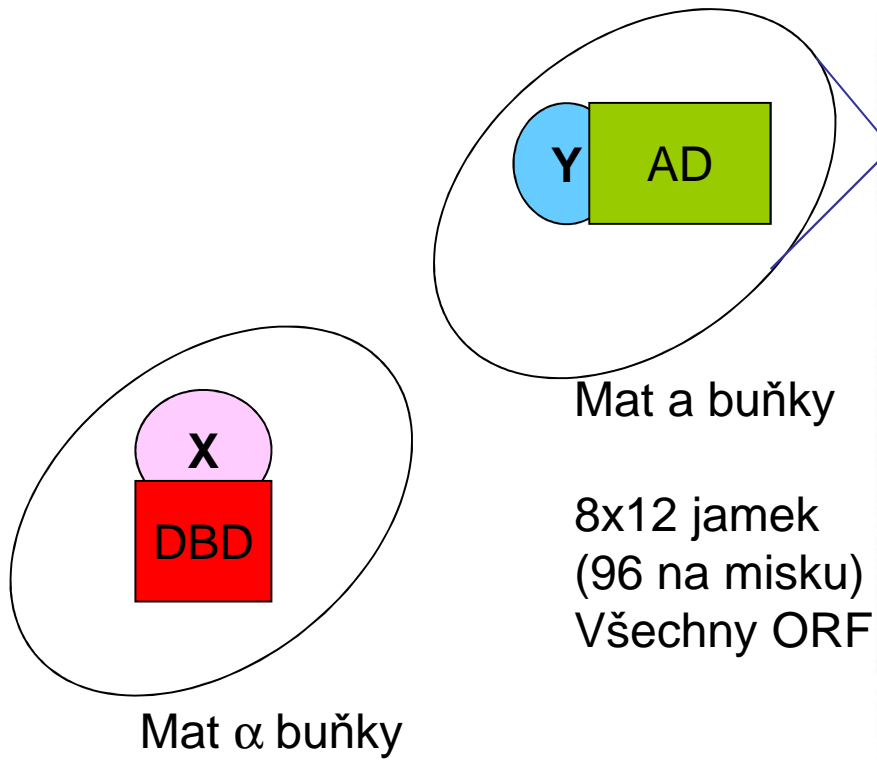


**Fig. 1**  
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells unable to grow on media lacking histidine.



**Fig. 2**  
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



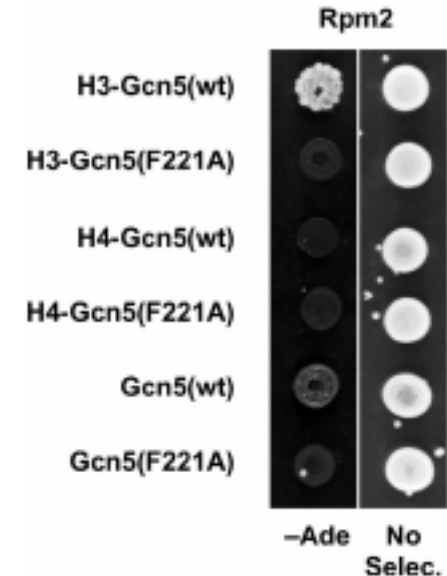
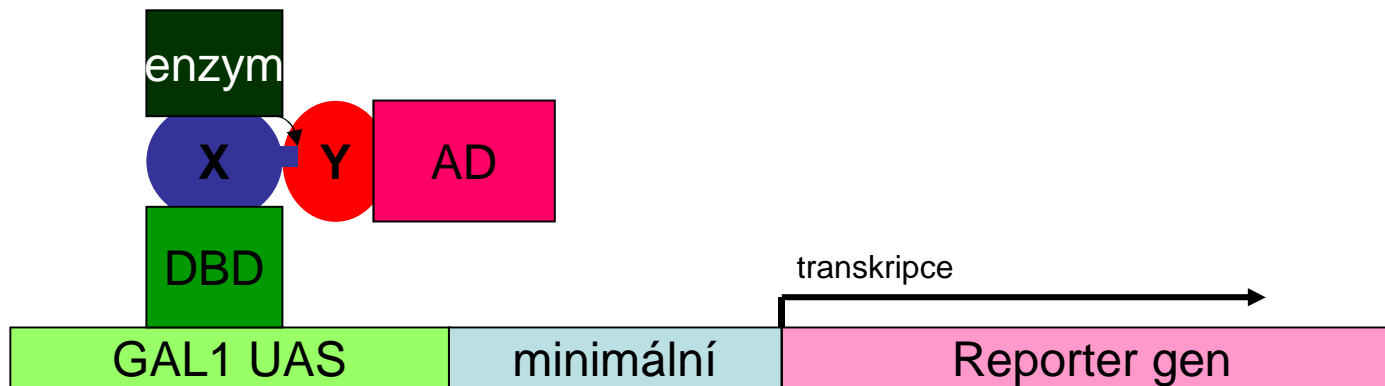


Kvasinkový, lidský ...

„INTERACTOM“

High-throughput – testovány knihovny 6000x6000 proteinů (kombinace pomocí párování místo transformace)

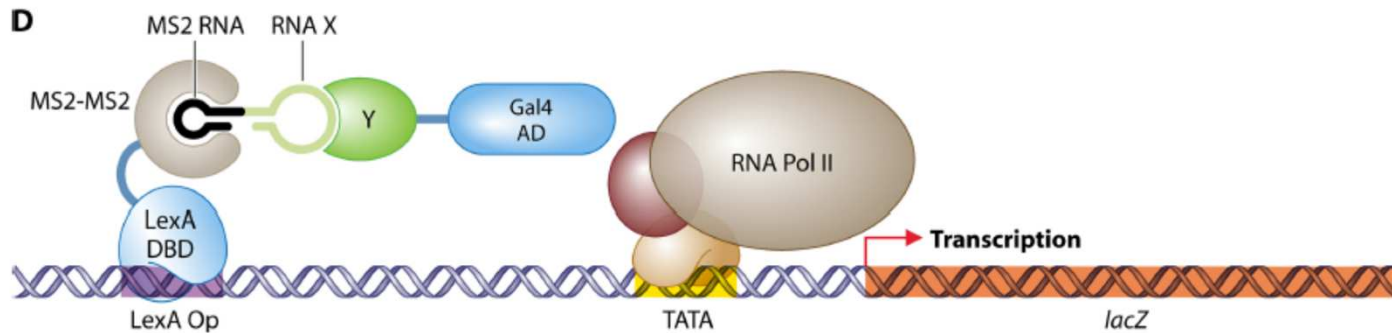
# Interakce vyžadující post-translační modifikace



- Některé protein-proteinové interakce jsou závislé na post-translačních modifikacích
- v buňce jsou přítomny např. acetylasy i deacetylasy, ale nemusí docházet k acylaci hybridního proteinu – řešením je „připojení“ příslušného enzymu k hybridu
- konstitutivní modifikace a enzym ve stechiometrickém poměru k substrátu (nejsou nutné kofaktory regulující interakci/modifikaci)

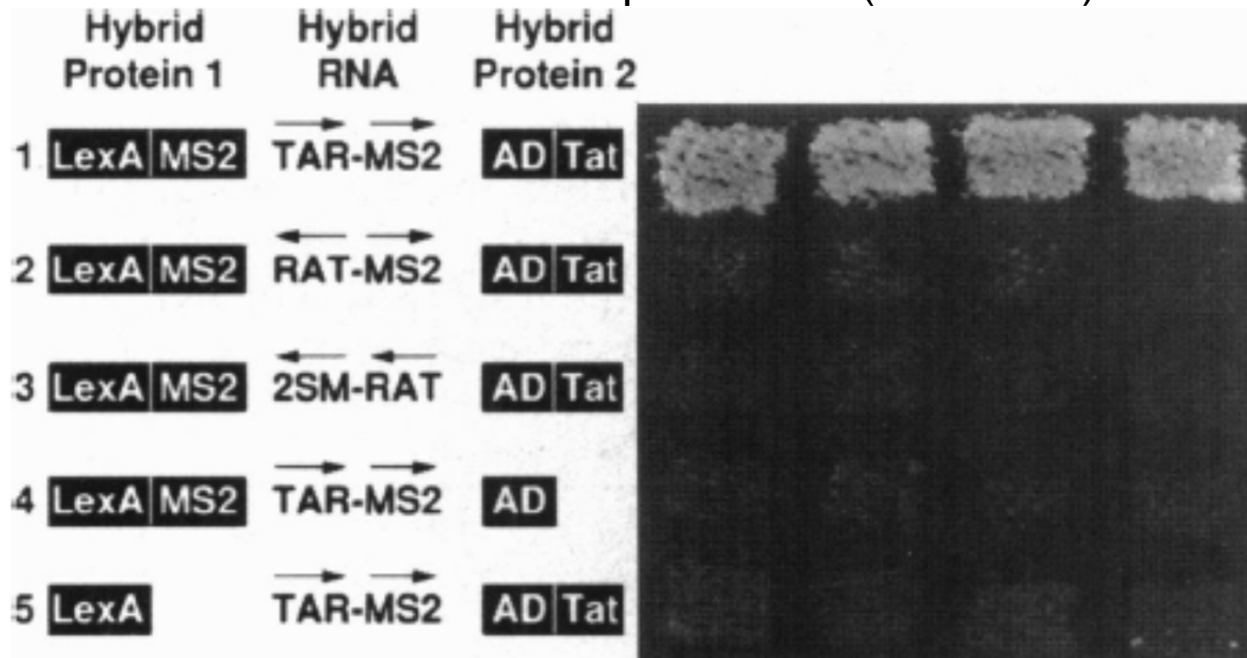


# Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



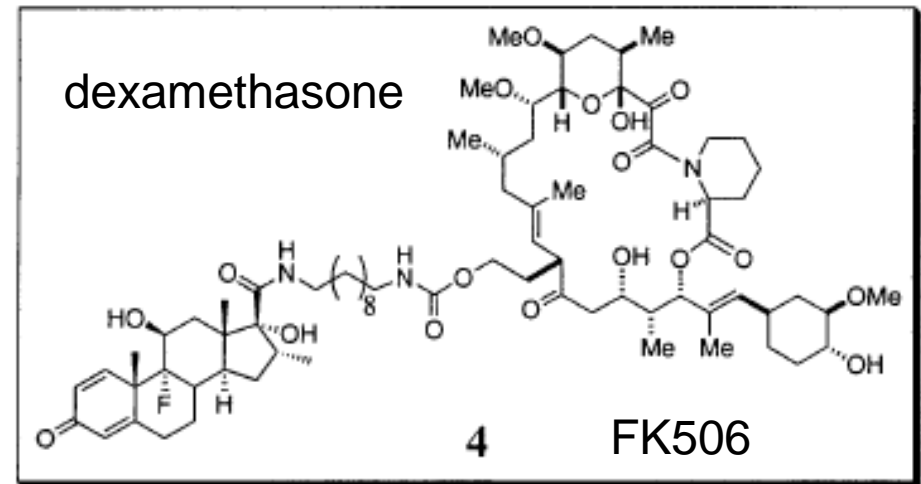
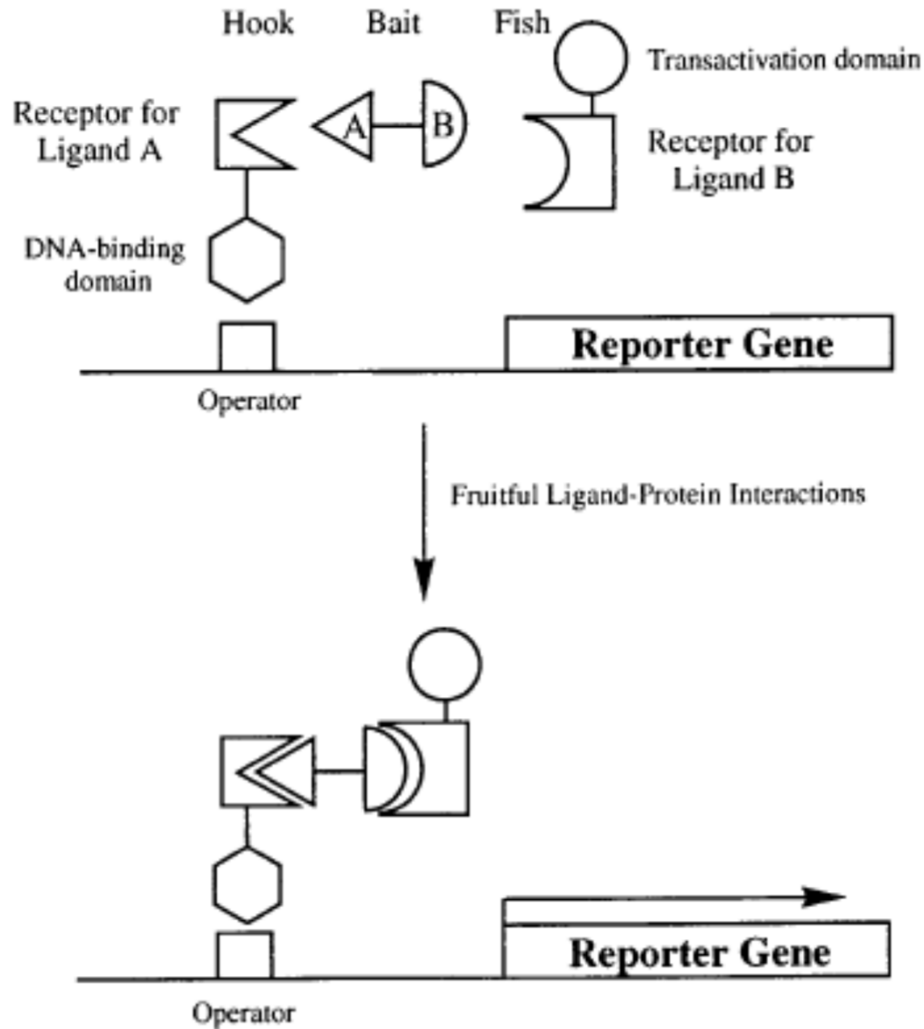
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

1. DB-Gal4 a RNA-vazebný protein (MS2 virový coat protein)
2. RNA molekula složená z TAR (HIV trans-activation response element) a MS2 sekvence
3. AD-Gal4 a trans-activation protein Tat (váže TAR)



# Vazba ligand-receptor (Y3H)

## glucocorticoid receptor - FKBP12



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

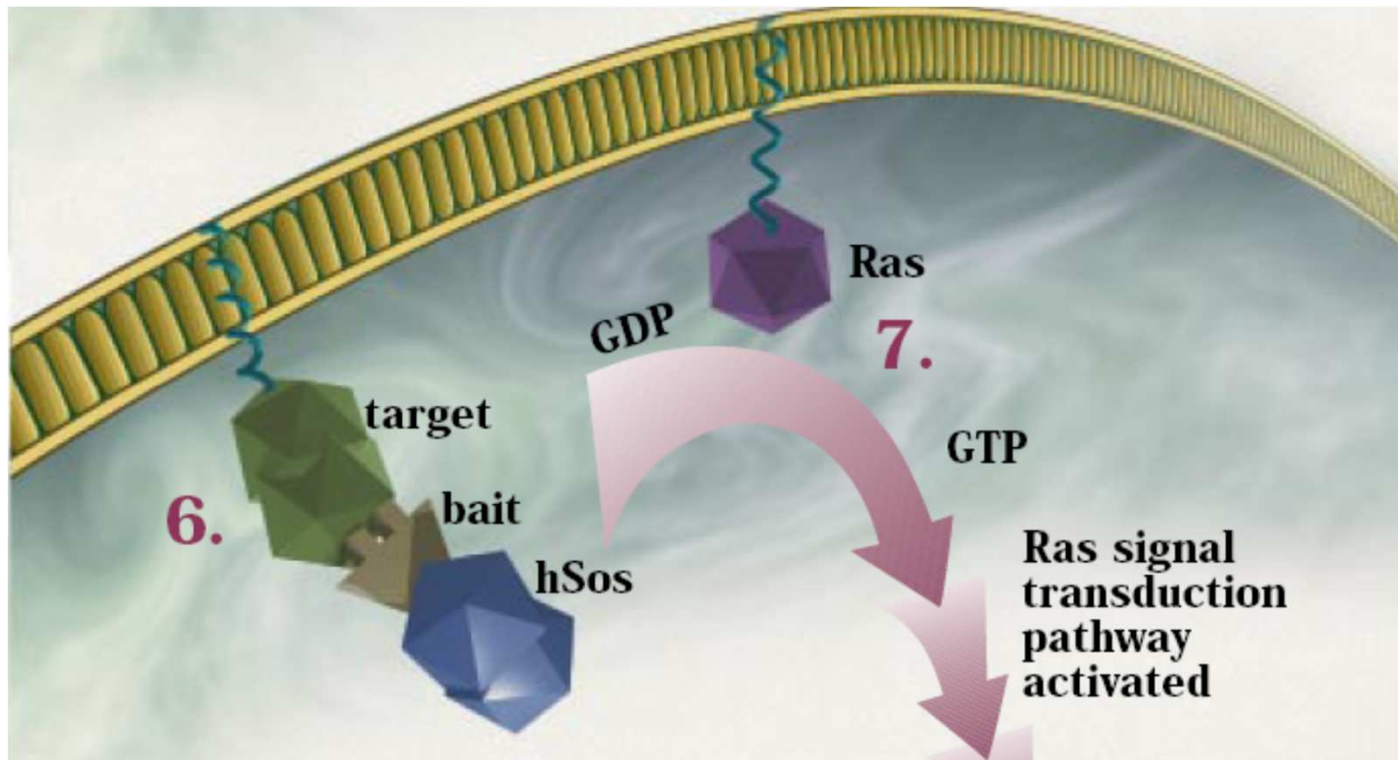
# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- **hybridní:**
  - **transkripční 2-hybridní systém - *domény***
    - reverzní systém – analýza PPI
  - **více-hybridní systémy**
    - inhibice PPI
  - **membránový systém - *pathway***
  - **komplementační systémy - *fold***
    - BiFC, DHFR
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

# CytoTrap 2-hybridní systém

Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti

- jeden partner je myristylován (signální sekvence) a ukotven na membránu a druhý (interakční) partner je fuzován k hSOS – spustí Ras dráhu (roste i na vyšší teplotě)

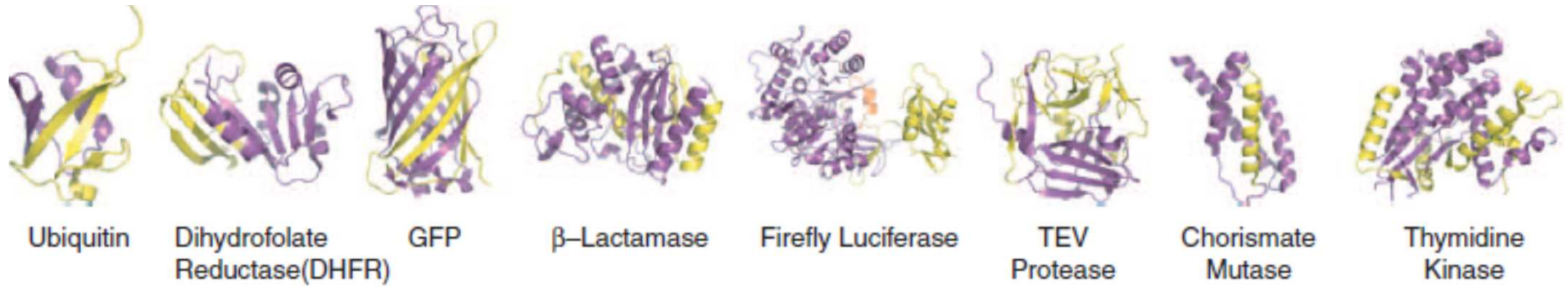




# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- **hybridní:**
  - **transkripční 2-hybridní systém - *domény***
    - reverzní systém – analýza PPI
  - **více-hybridní systémy**
    - inhibice PPI
  - **membránový systém - *pathway***
  - **komplementační systémy - *fold***
    - BiFC, DHFR
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

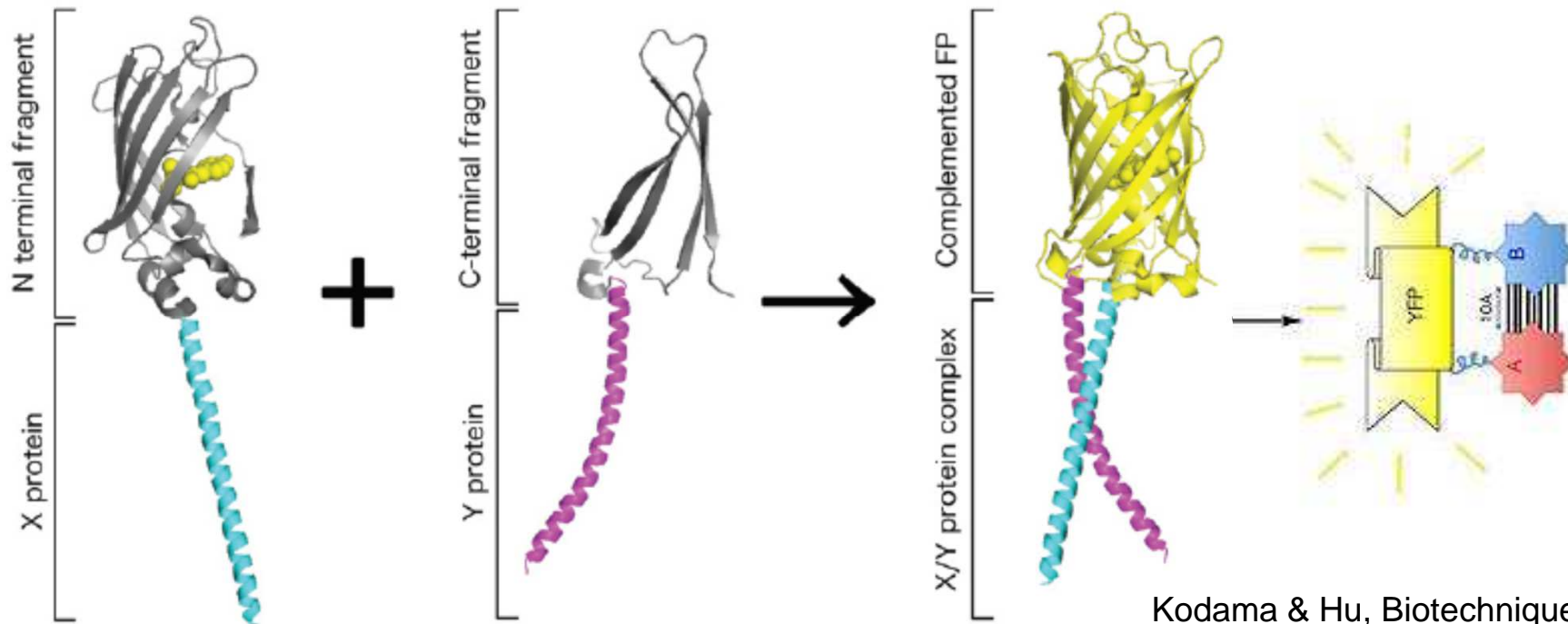
# Protein-fragment complementation



Shekhat & Ghosh, CO in ChB, 2011

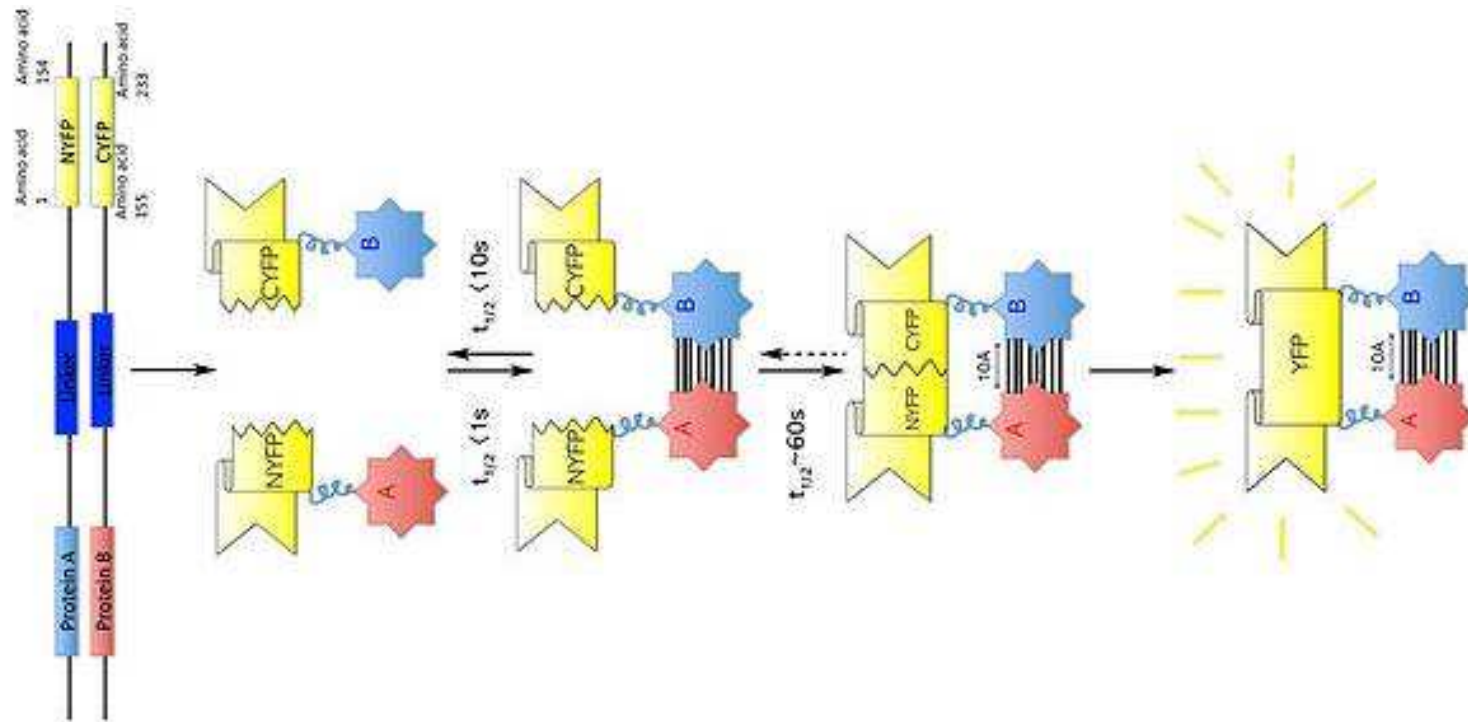
Current Opinion in Chemical Biology

# Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



Kodama & Hu, Biotechniques, 2012

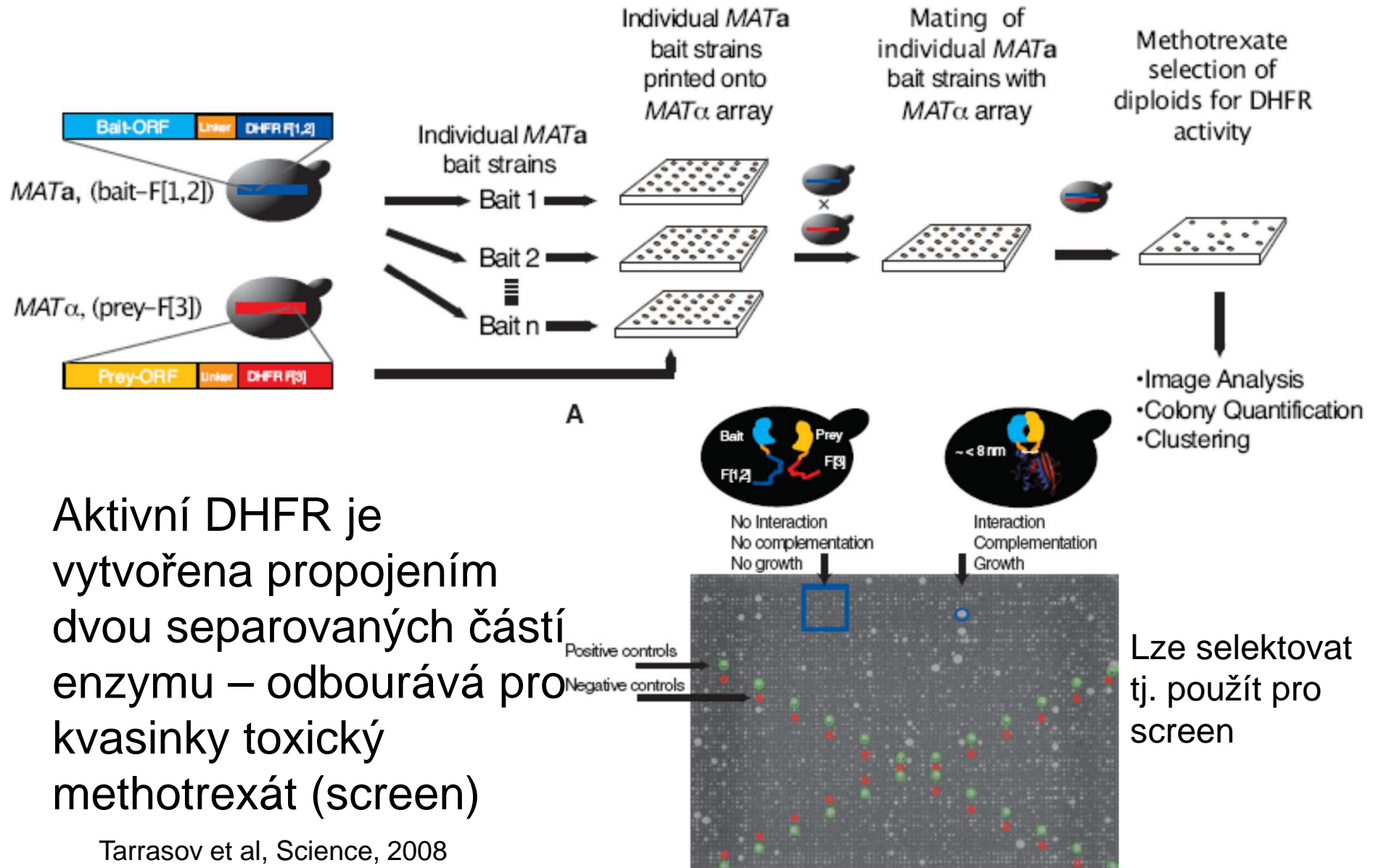
# Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



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



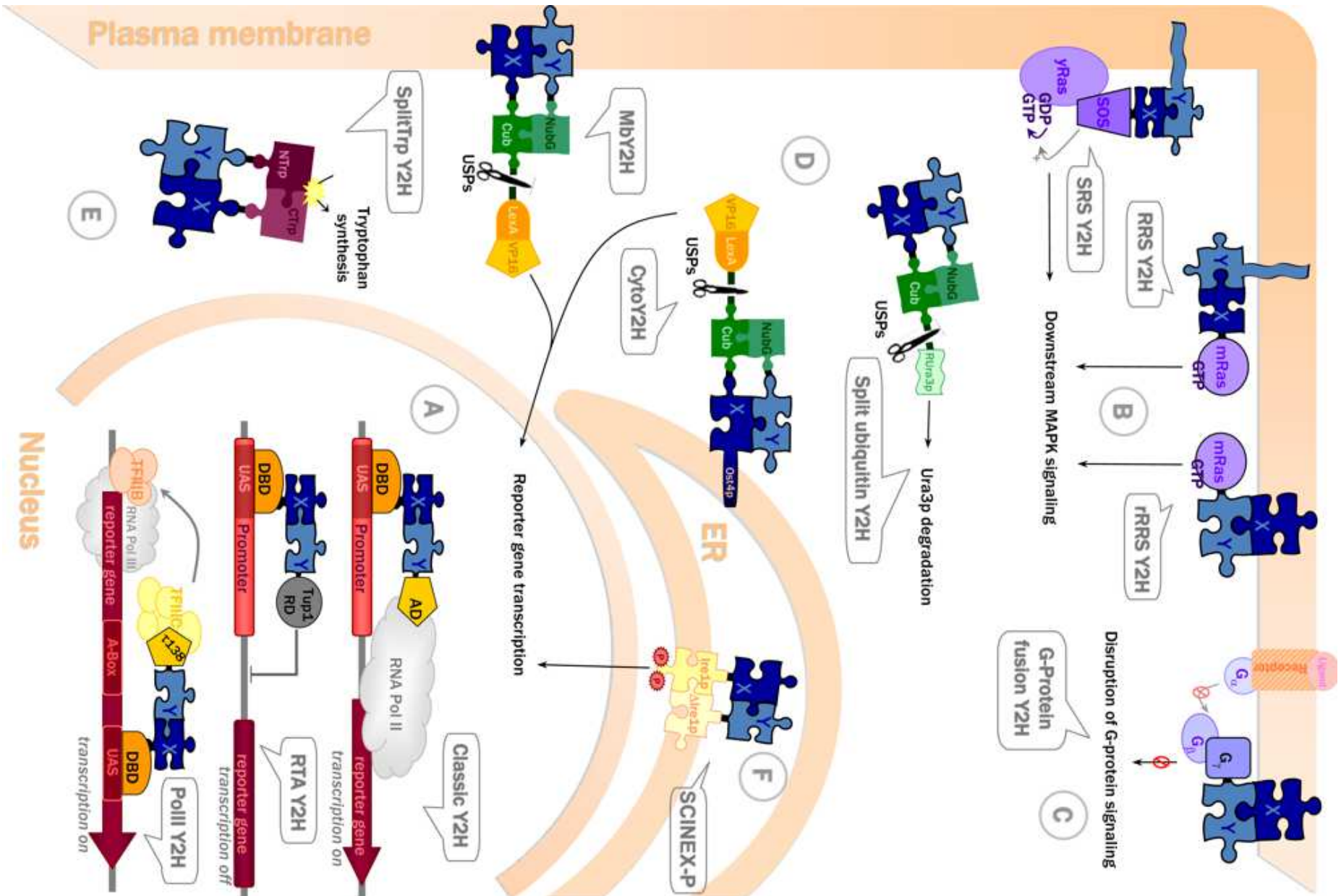
# Dihydrofolát reduktáza/methotrexát



Aktivní DHFR je vytvořena propojením dvou separovaných částí enzymu – odbourává pro kvasinky toxický methotrexát (screen)



# Přehled kvasinkových PPI biotechnologií

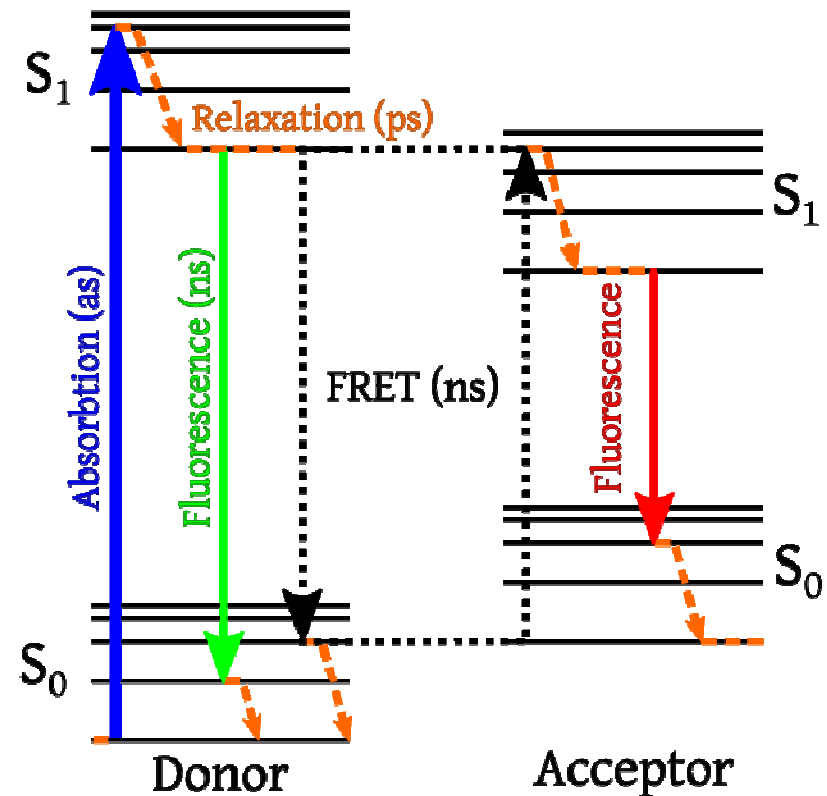
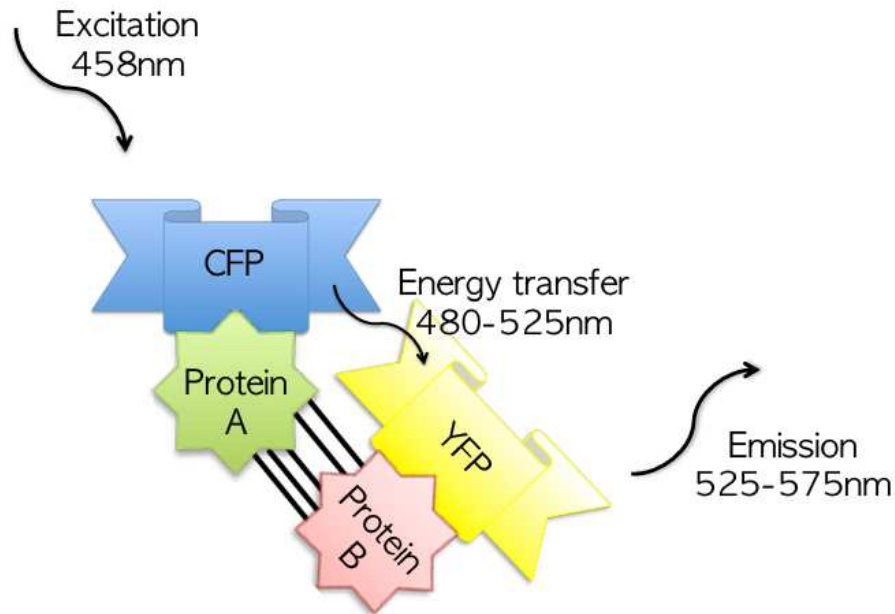


# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- **proximity-based**
  - **FRET**
  - **PLA**
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

# FRET (Forster/fluorescence resonance energy transfer)

Hybridní!!



- fluorescence prvního (CFP) proteinu o vhodné vlnové délce excituje druhý protein - (pokud je dostatečně blízko) - druhý protein emituje (YFP, fluorescence) záření detekované v mikroskopu

# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

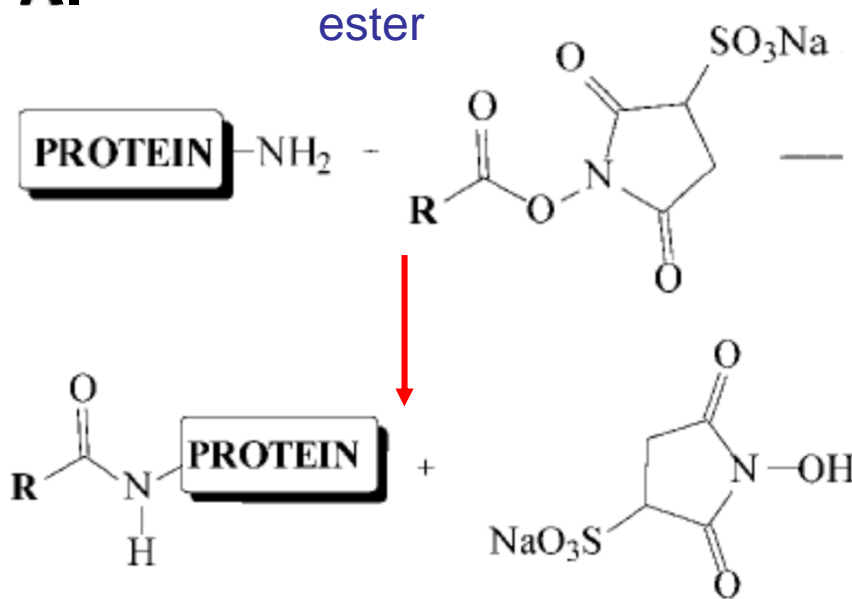
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- **MS-based:**
  - **crosslinking** Přednáška doc. Zdráhala minule ...
  - **protein painting**
  - **H-exchange** ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krystalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)



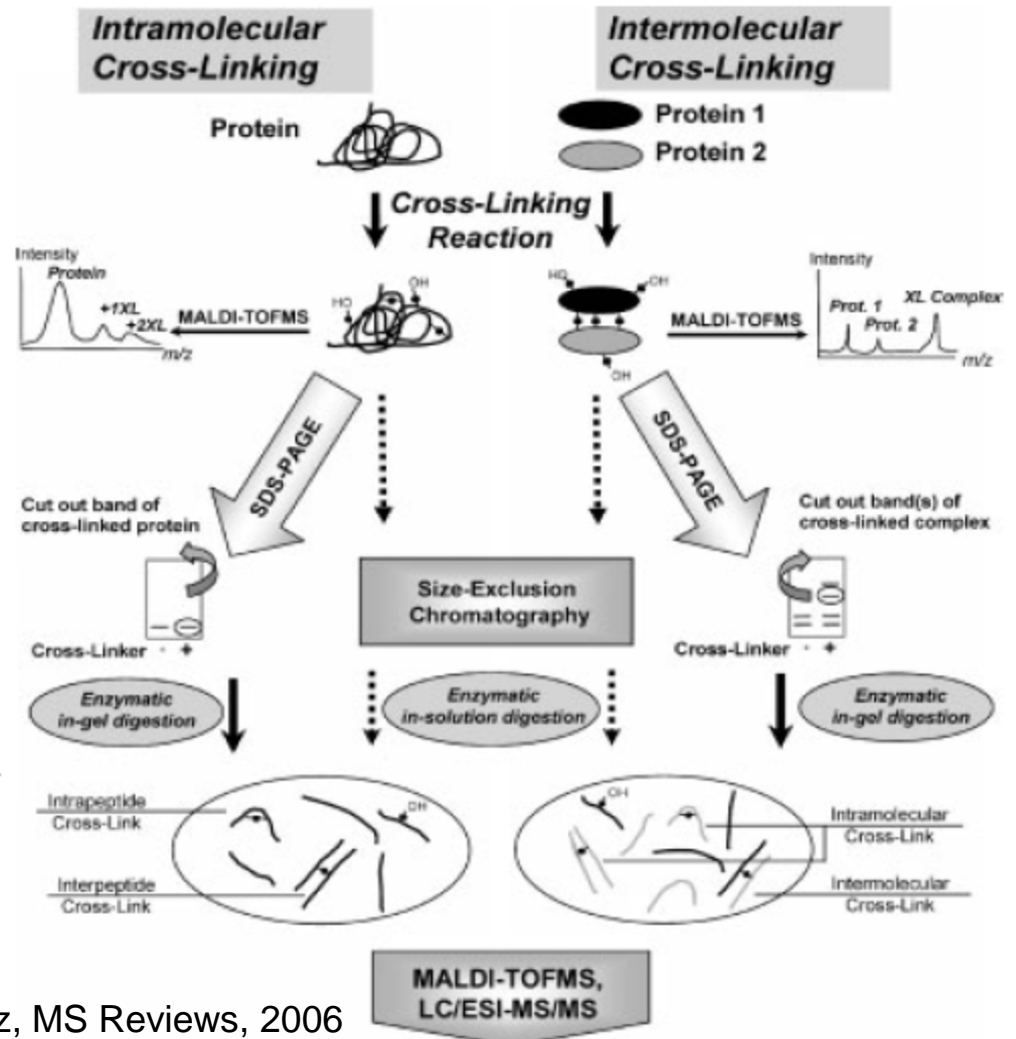
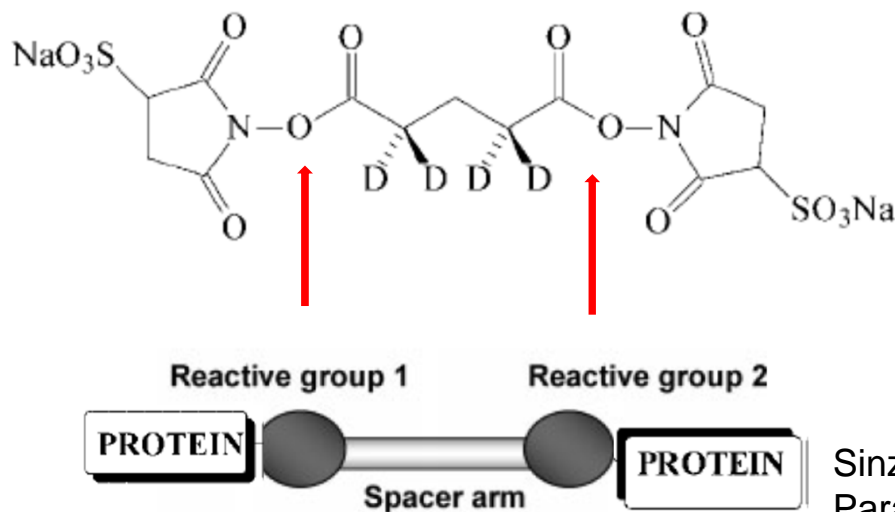
# Crosslinking

- estery reagují s Lys ( $\epsilon$ -amin) a amino-koncem
- homofunkční spojí proteiny dohromady v jednom kroku (velmi komplexní vzorky pro MS)
- intra- (struktura) nebo intermolekulární (PPI)

**A.**



**B.**



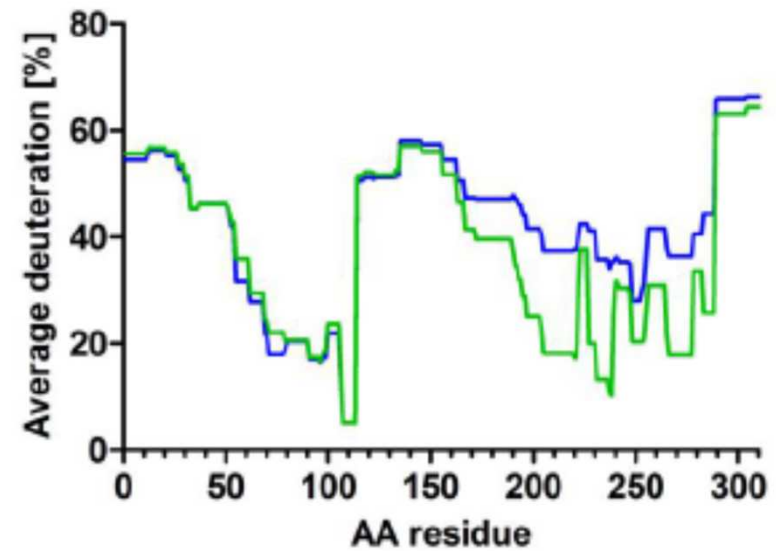
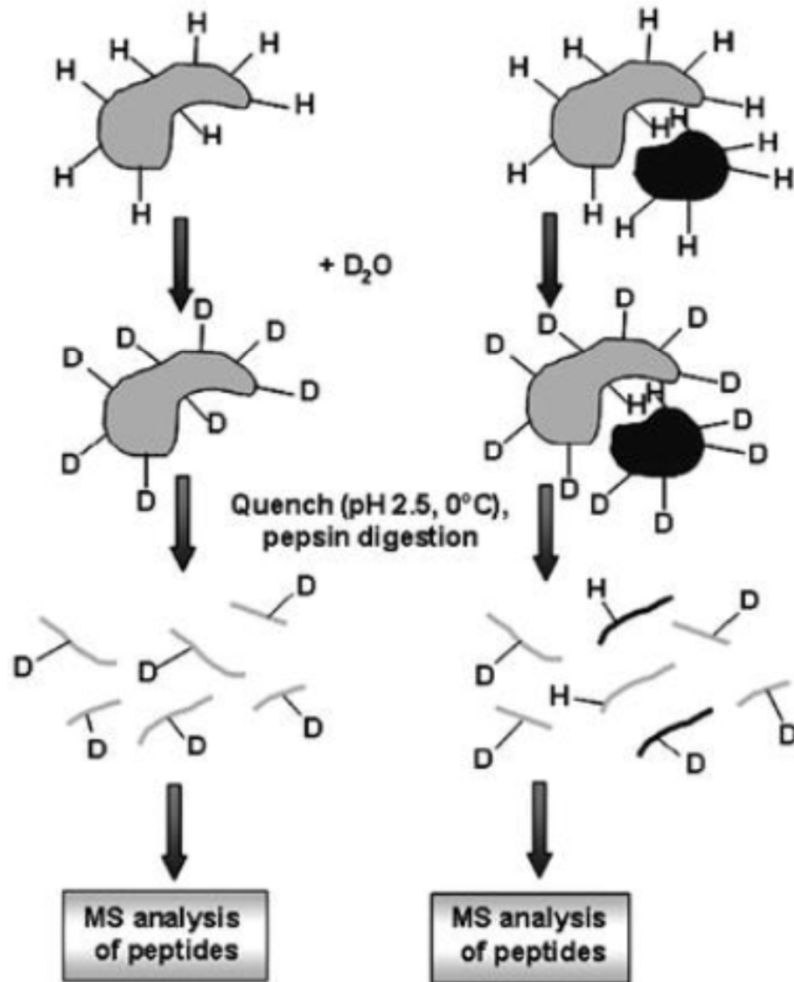
Sinz, MS Reviews, 2006  
 Paramelle et al, Proteomics, 2013



# Hydrogen Exchange

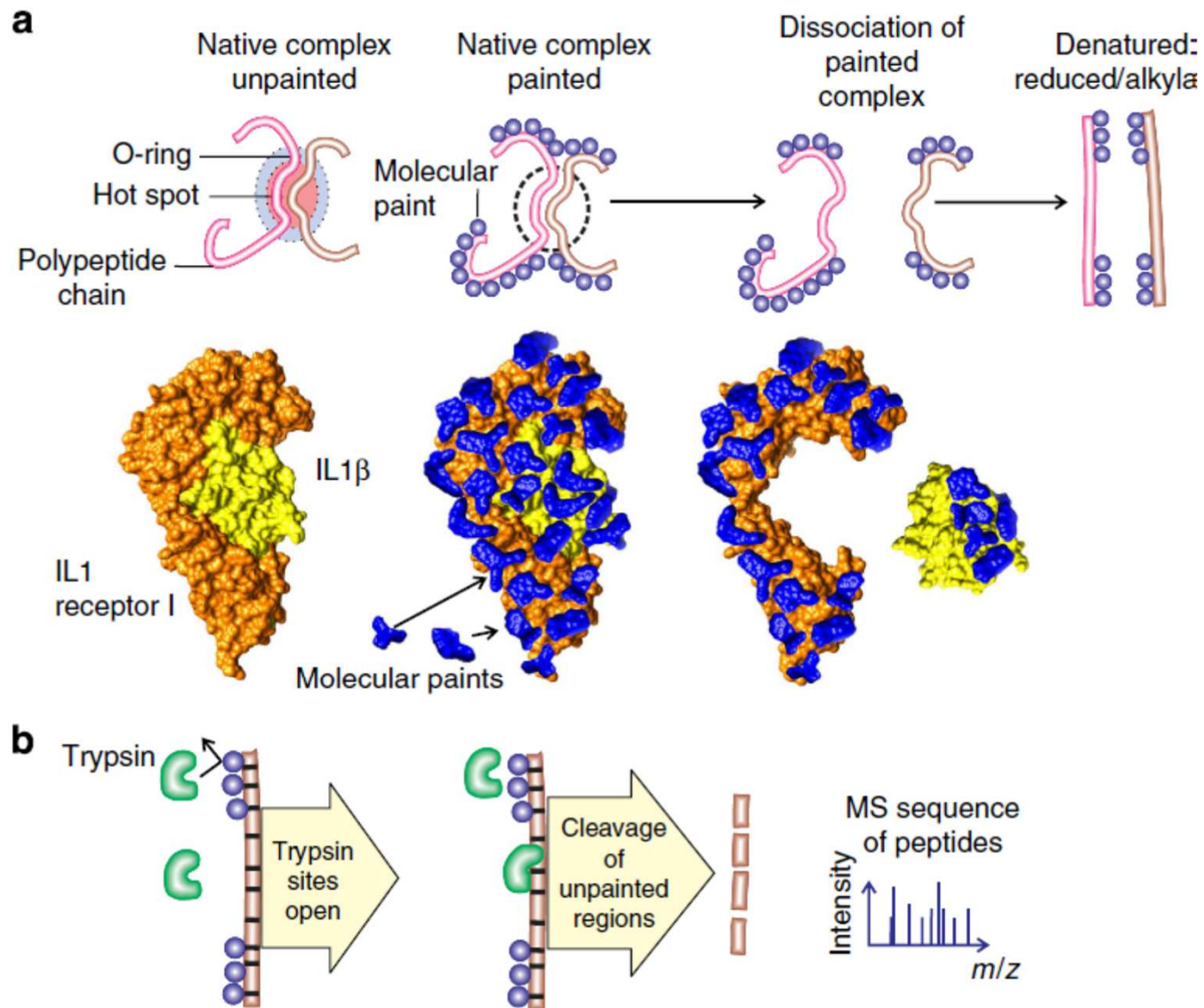
(P. Muller, MOU)

Trcka et al, JBC, 2014

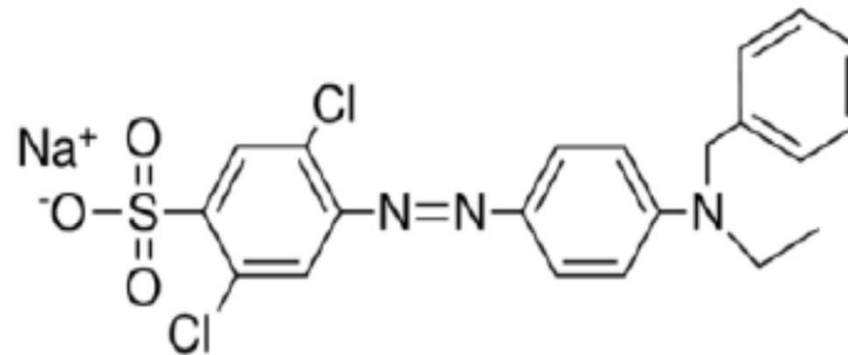
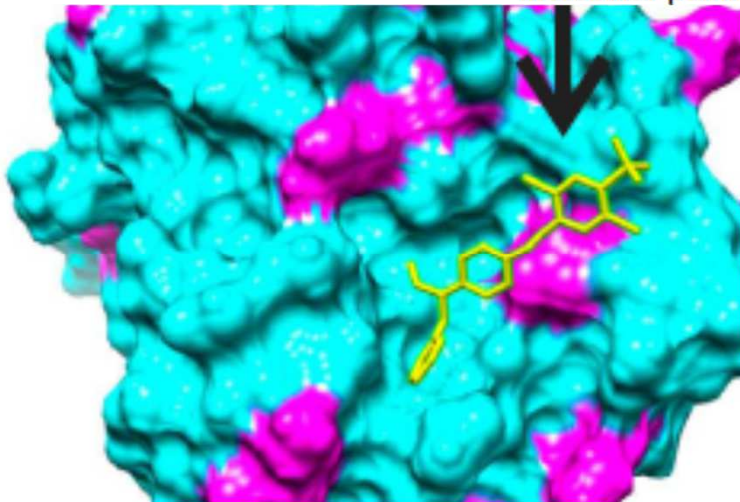
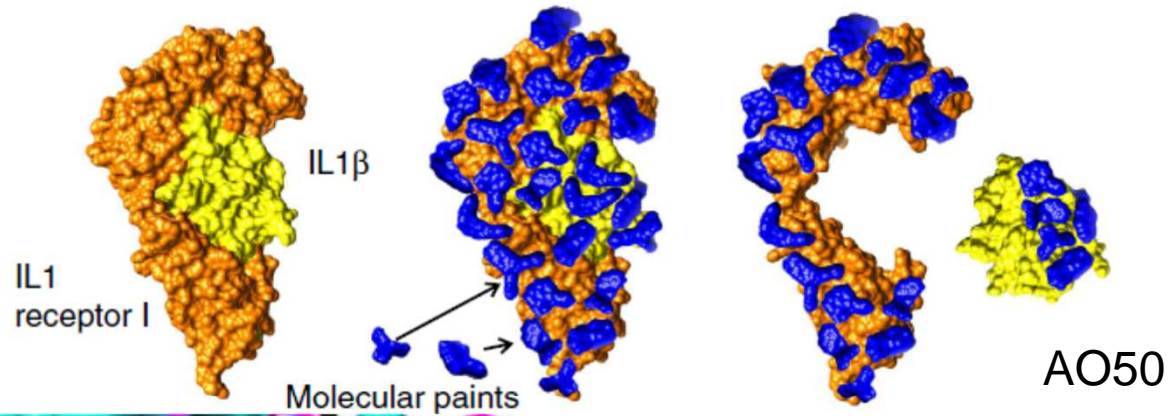
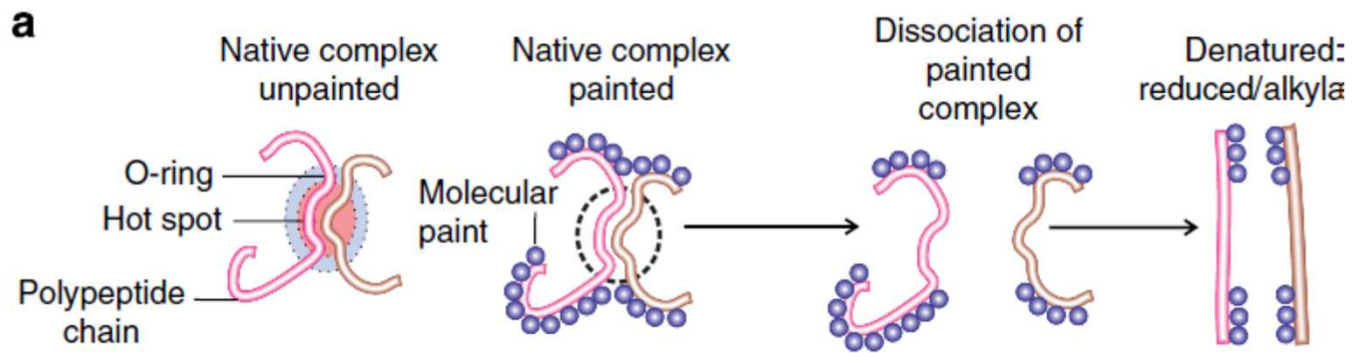


— Tomm34  
 — Tomm34+Hsp90

# Protein painting



# Protein painting





**Table 2.** Overview of different validation methods.

Method	Type	Description
Pull-down assay [89-91]	<i>in vitro</i>	Tagged bait (mostly expressed in <i>E.coli</i> ) is immobilized on a resin and subsequently “pulls down” target protein (prey) from lysates (of eukaryotic cells or of <i>E.coli</i> expressing proteins of interest). After washing steps, prey is detected by SDS-PAGE/immunoblot or MS.
Coimmunoprecipitation [80,89,90,92]	<i>ex vivo</i>	A specific antibody is used to precipitate the bait from cell lysates (see above). After washing steps, coimmunoprecipitated prey is detected as above.
Surface plasmon resonance (Biacore) [93]	<i>in vitro</i>	Bait immobilized on the surface of a sensor chip is probed by injection of prey onto the surface. Protein interaction is detected online via a biophysical principle (using the change in refractive index at the sensor surface in case of protein interaction). Protein is eluted and analyzed by MS.
<i>In situ</i> hybridization [90]	<i>in situ</i>	Hybridization of a labelled complementary DNA or RNA strand (i.e. probe) to a specific DNA or RNA sequence in a tissue section. Visualizes expression of specific genes to evaluate potential coexpression of proteins of interest in the same cell of a given tissue.
Immunohistochemistry, immunocytochemistry [80,89,90]	<i>in situ</i>	Proteins in fixed cells or tissue sections are detected by immune-labelling with fluorescently tagged antibodies, e.g. using confocal microscopy. Visualizes coexpression of proteins of interest in the same cell and potential subcellular colocalization.
Fluorescent detection in live cells [91]	<i>in vivo</i>	Proteins in living cells are detected with fluorescently tagged antibodies as above (using permeabilized cells) or after expression of fluorescently tagged protein variants. Visualizes colocalization of proteins of interest.
Fluorescence resonance energy transfer (FRET) [80]	<i>in vivo</i>	Bait and prey are fused to two different fluorescent tags with overlapping emission/excitation spectra. If both proteins are in close proximity, excitation of the first fluorophore (donor) leads to energy transfer to the second fluorophore (acceptor). Acceptor fluorescence can be observed <i>in vitro</i> (fluorimeter) or in living cells (confocal microscopy).
Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) [92]	<i>in vivo</i>	Similar to FRET (see above), but with bait fused to bioluminescent luciferase, thus avoiding the external excitation step susceptible to generate background. Detection as with FRET.



# Metody analýzy proteinových komplexů

- ultracentrifugace, gelová filtrace,
- TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
- ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...
- cross-linking MS, (cryo) elektronová mikroskopie ...

# Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...      přednáška doc. Marka příště ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

doporučená přednáška: Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii (C7230), doc. C. Hofr