



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

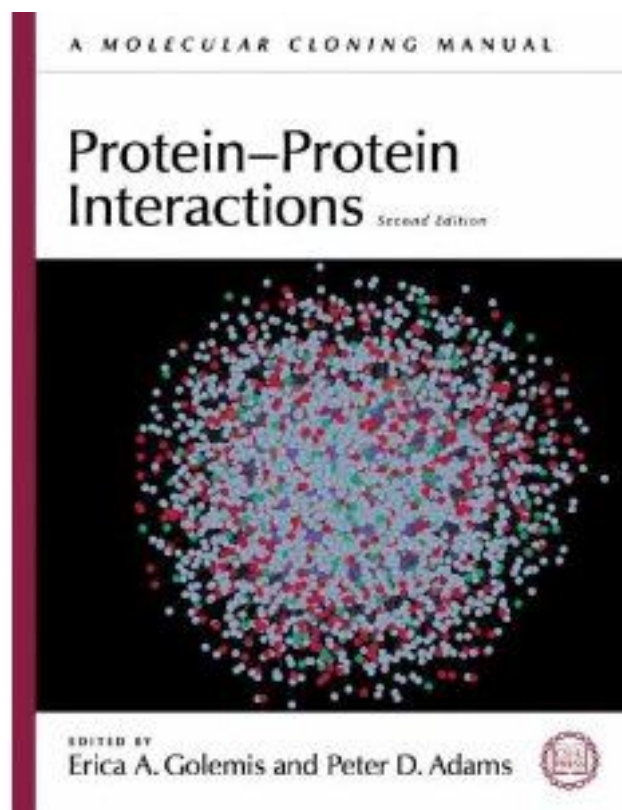
jpalecek@sci.muni.cz

rozšiřující přednáška: Struktura a funkce proteinových komplexů (CG030)

Informační zdroje

Golemis a Adams: Protein-protein interactions ...

... z praxe, nejnovější metody z odborné literatury ...



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

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 ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- proximity-based: FRET, PLA ... **Hybridní!**
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- *in silico* metody (docking)
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ...
- databáze (interactom a komplexy ...)
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- **matrix/beads-based:**

- **ko-imunoprecipitace**
- **ko-purifikace – gelová filtrace**
- **pull-down**
 - **analýza proteinových domén**
 - **analýza interakčních povrchů**
 - **použití peptidů**

- **mapování interakcí**

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

mapování binárních interakcí

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- TAP-tag („Tandem-Affinity Purification“, jiné tagy a protilátky)

Protein Tag

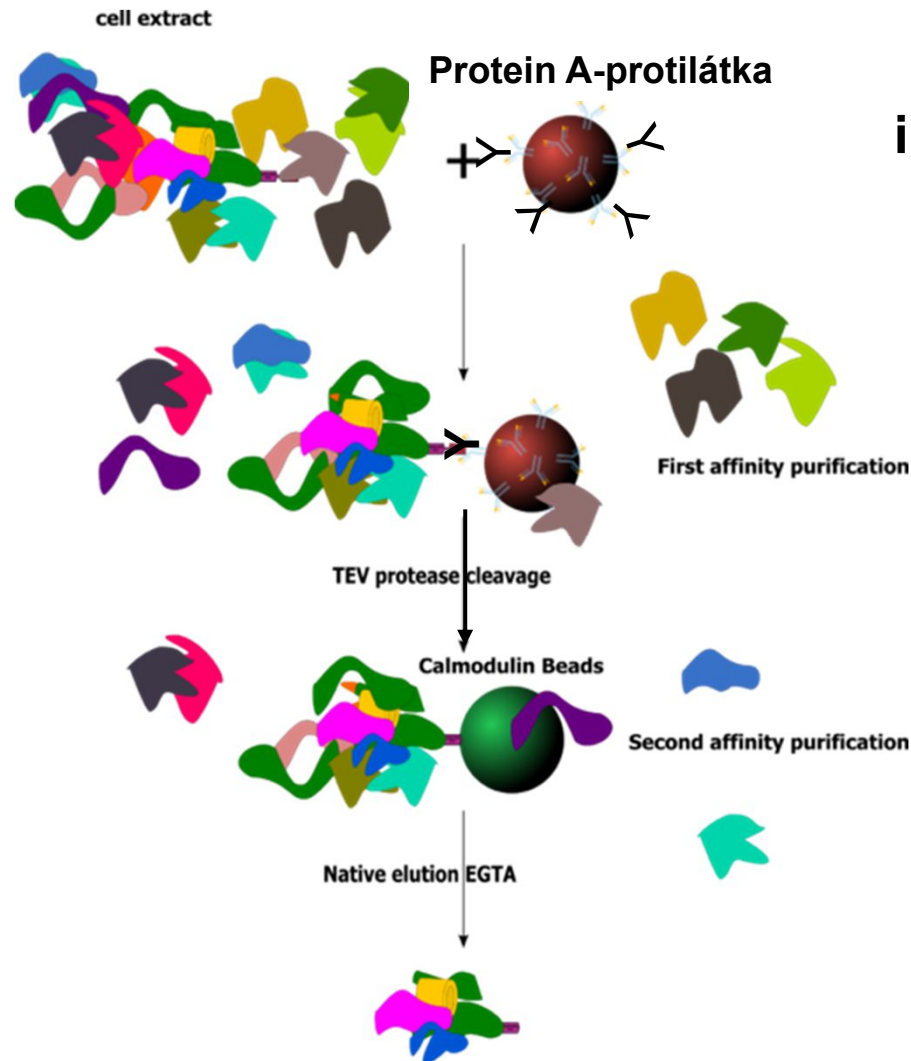


Tagy (a protilátky):
Myc, FLAG, V5,
S-tag, Streptactin
 (biotin-streptavidin),
<<GFP, GST, MBP

...

Vassilyeva et al, PNAS, 2017

TAG	Affinity K_D^* (M)
FLAG	$10^{-8/-9}$
CalBD	10^{-9}
ChBD	10^{-6}
Pr-A	$10^{-8/-10}$
Strep	10^{-6}
Halo	COV
MBP	10^{-6}
GST	$10^{-6/-7}$
His	$10^{-8/-9}$
CL7	$10^{-14/-17}$

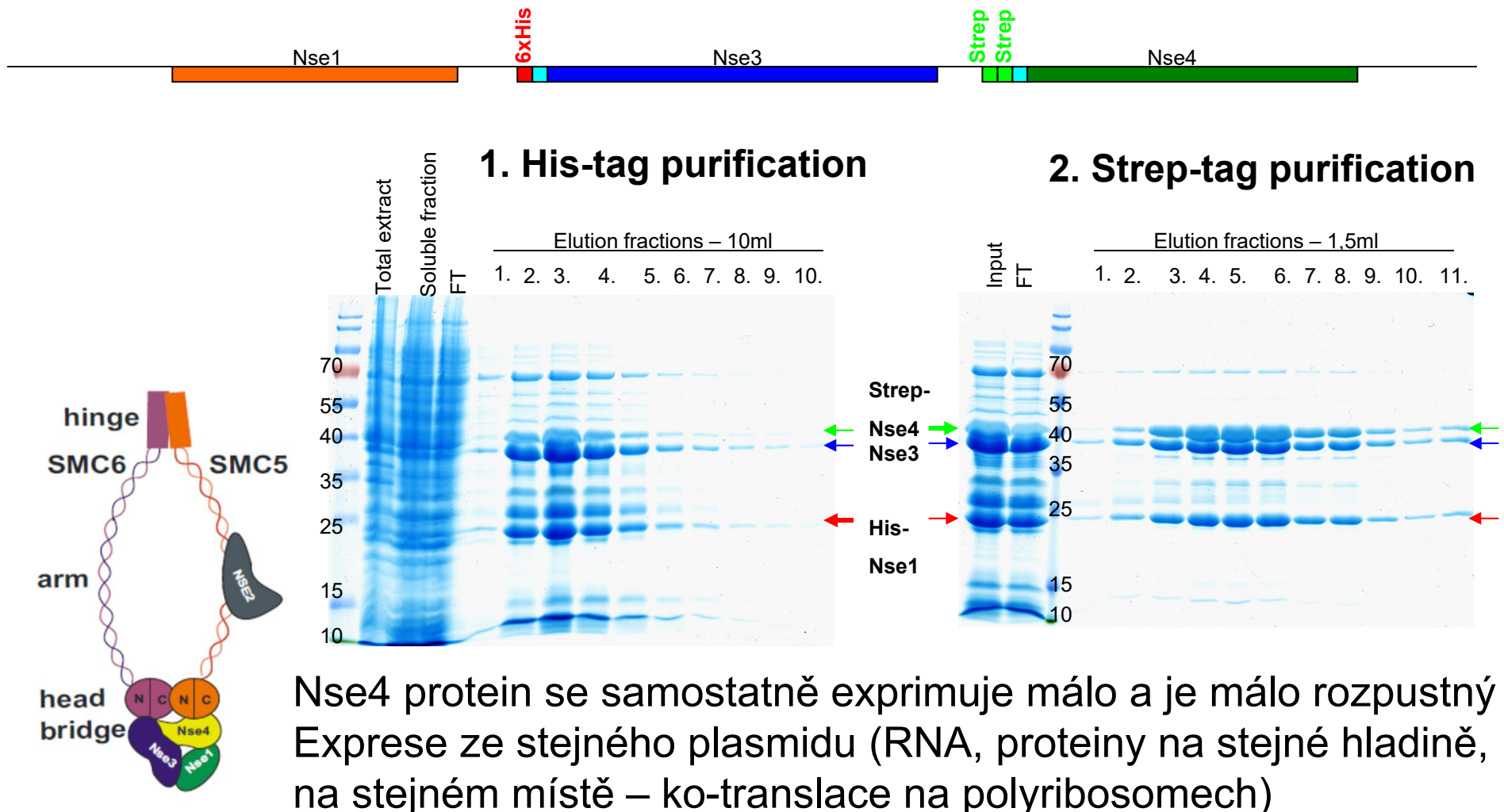


Hybridní!

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

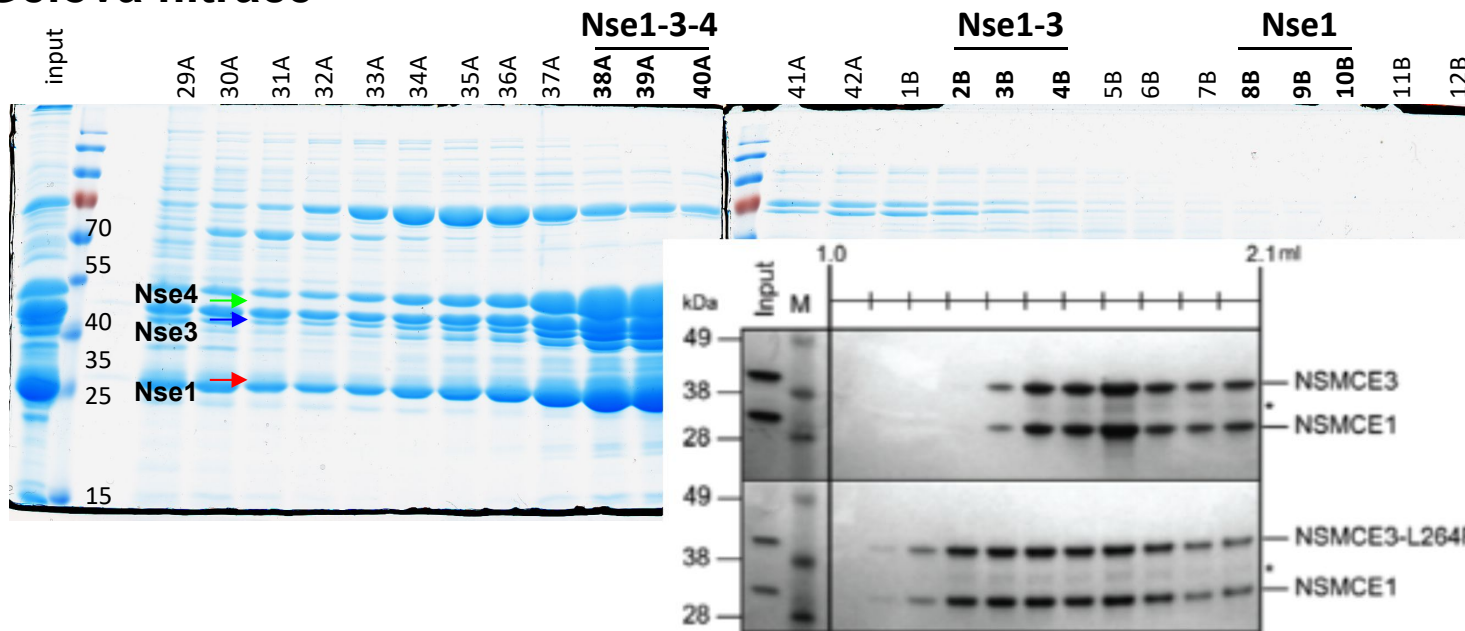
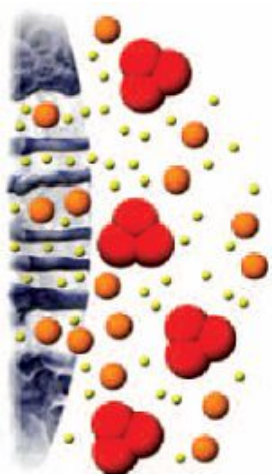
Ko-purifikace

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

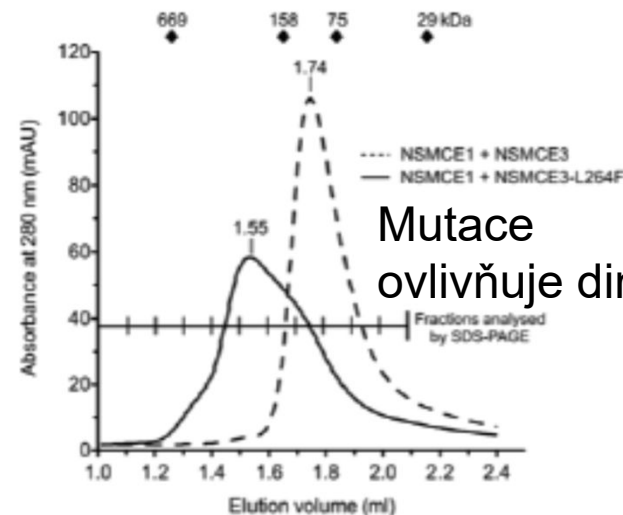
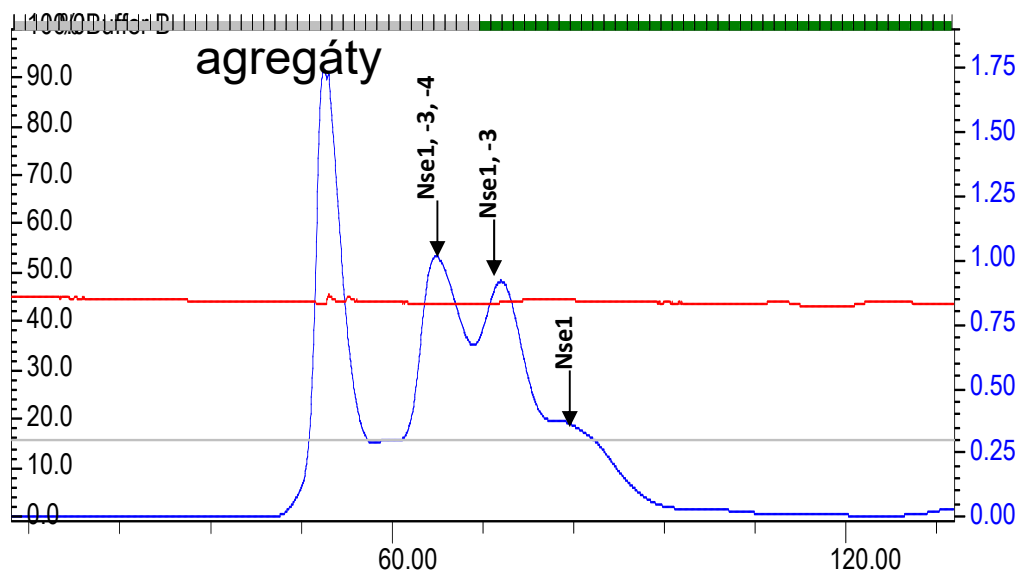


Ko-purifikace

3. Gelová filtrace



Tube # 4 6 8 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 1 3 5 7 9 11 14 17 20 23 26 29 32 35 38 41



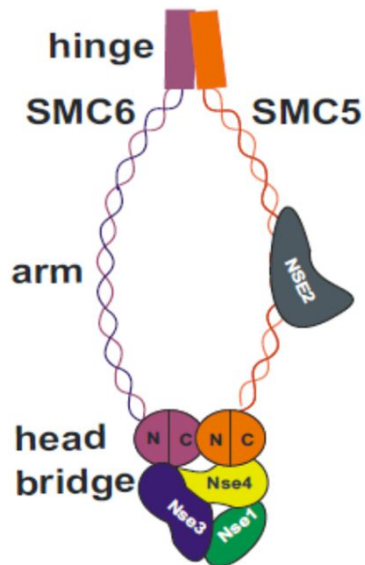
Mutace
ovlivňuje dimer

Pull-down (variance)

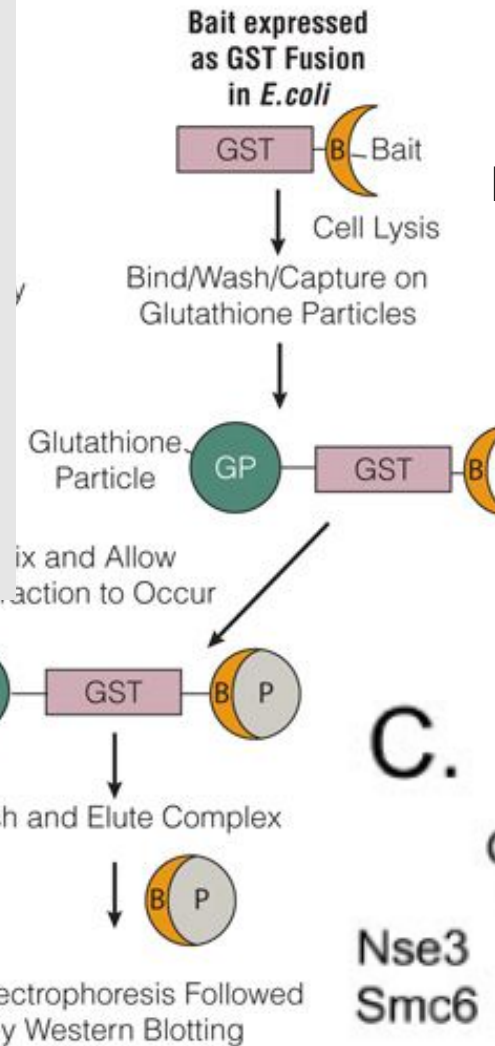
Podobný princip jako při ko-purifikaci

***in vitro* TNT (Transcription and Translation)** systém methionin S³⁵ (2 partneři)
výhody:

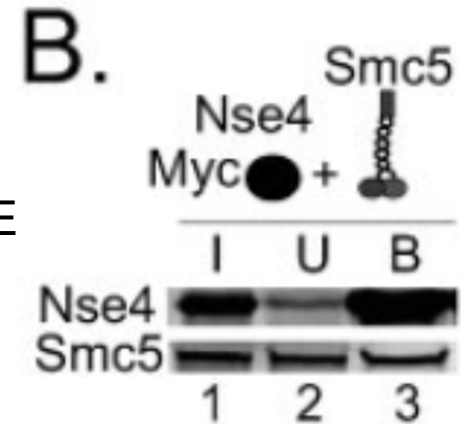
- není třeba proteiny purifikovat
- není třeba protilátky k detekci
- není toxický efekt pro buňky
- lépe rozpustné ...



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



Palecek et al, JBC, 2006



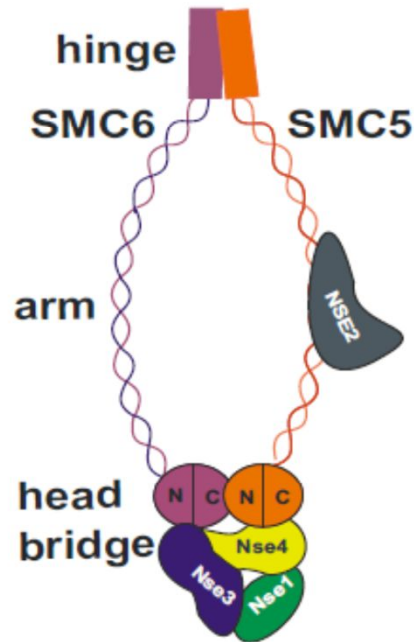
PAGE

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



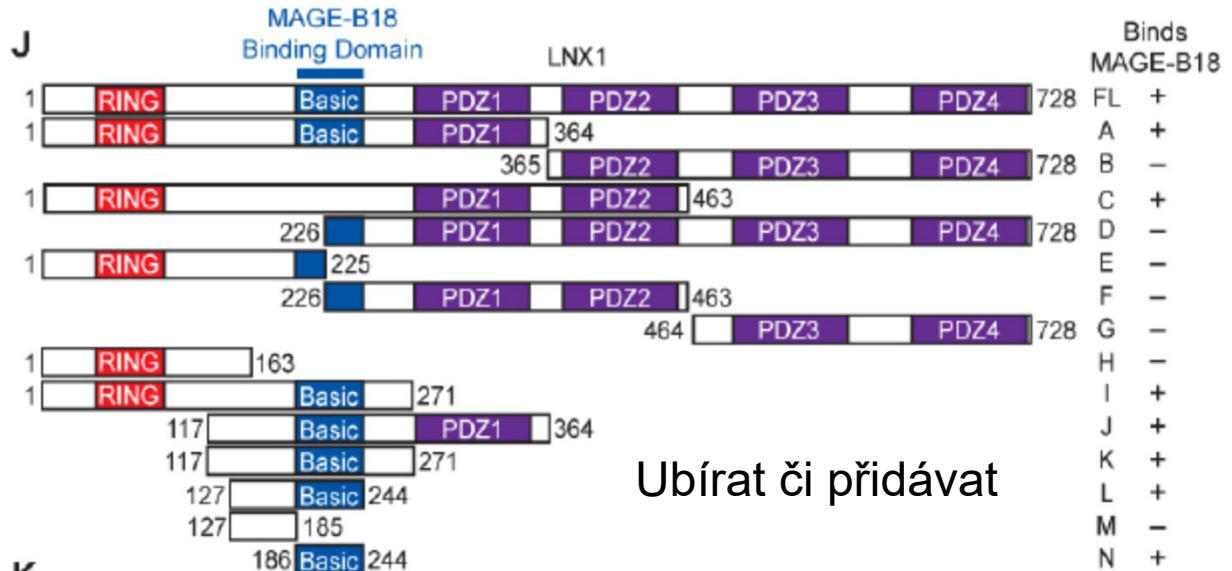
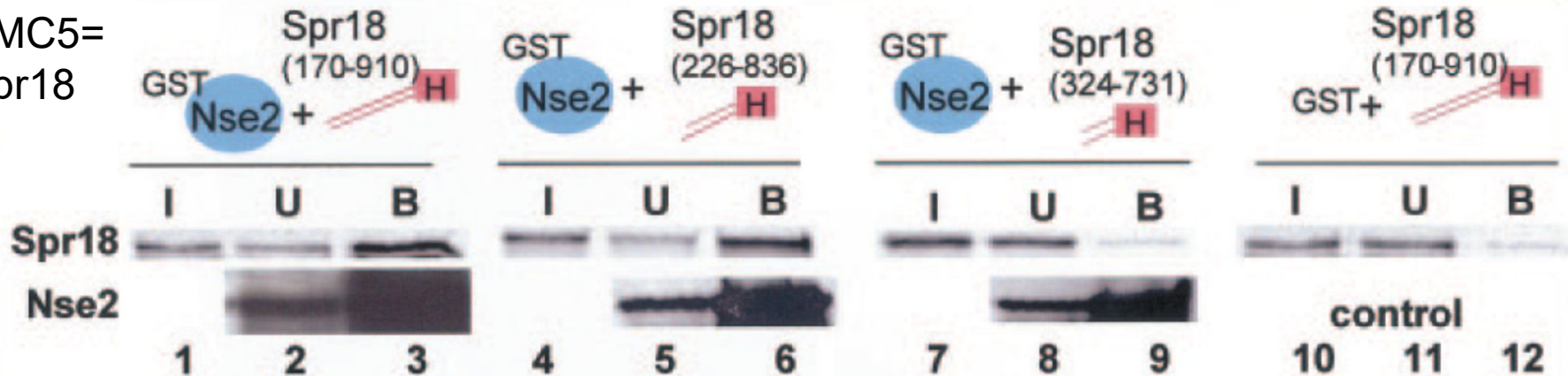
PAGE => Western (anti-GST)

Charakterizace interakcí - domény

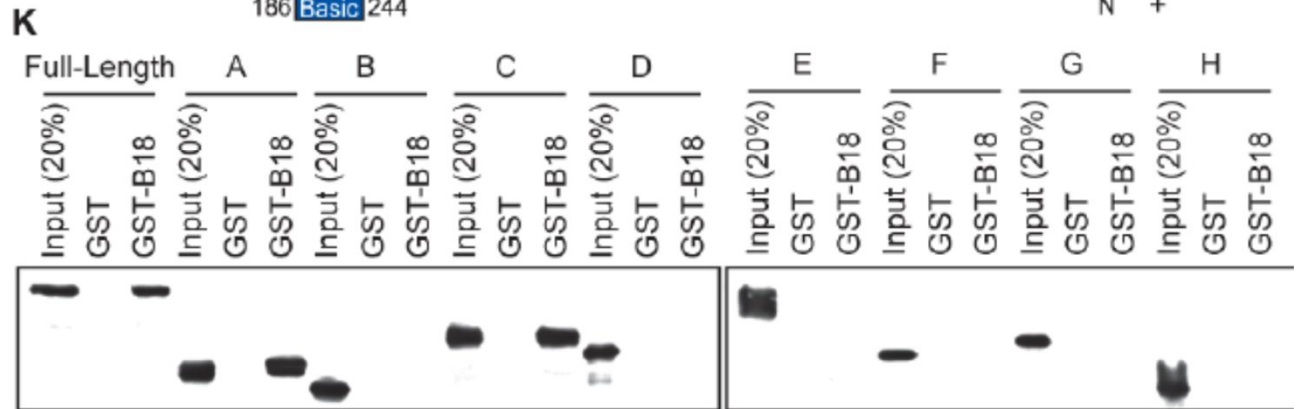


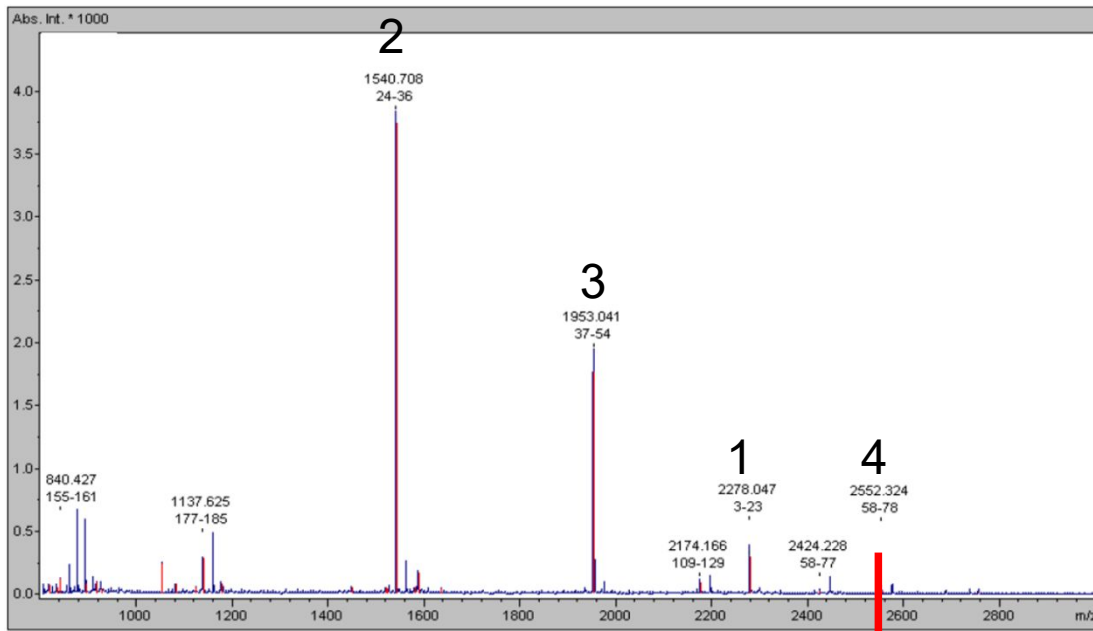
Sergeant et al, MCB, 2005
Doyle et al, Mol Cell, 2010

SMC5= Spr18



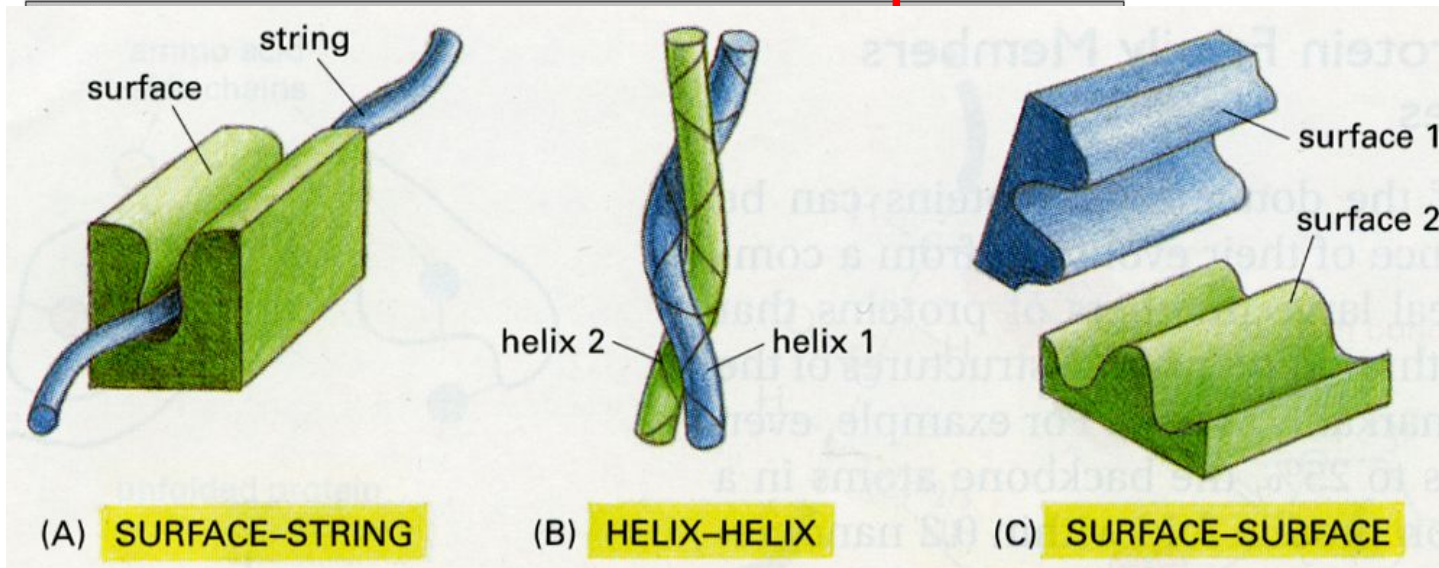
Ubírat či přidávat



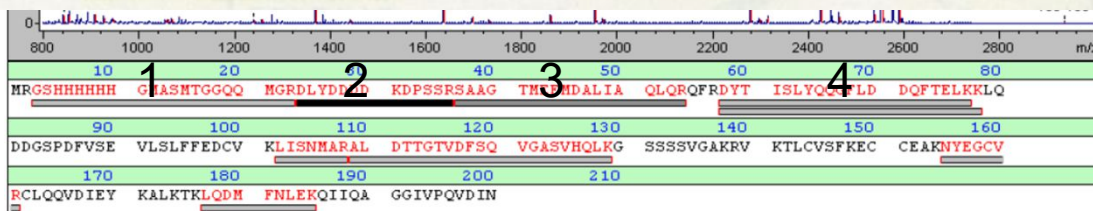


Charakterizace interakcí – detailní mapování

MS spektrum celého proteinu (normální pokrytí sekvence)

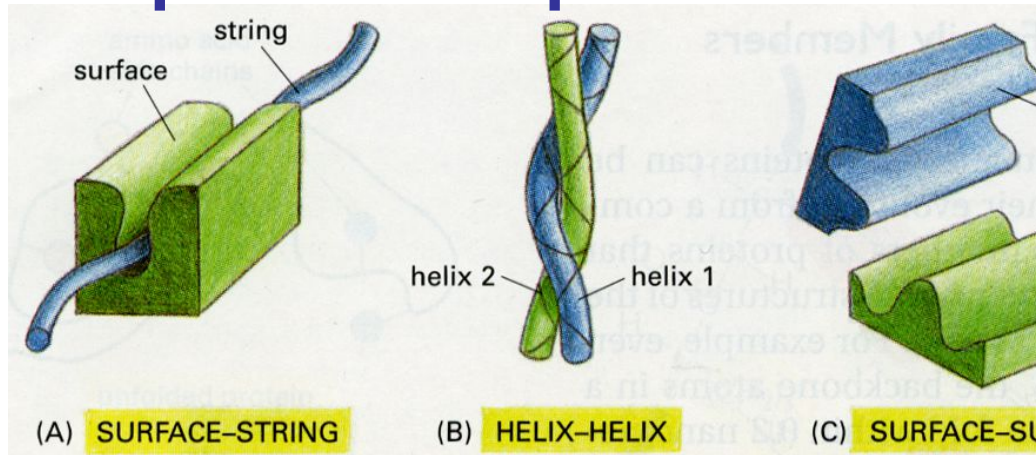


m precipitátu (interakční část) (omová práce)



Další MS metody dále ...

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

S A Q E A H Q V

No. Peptides: 5

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

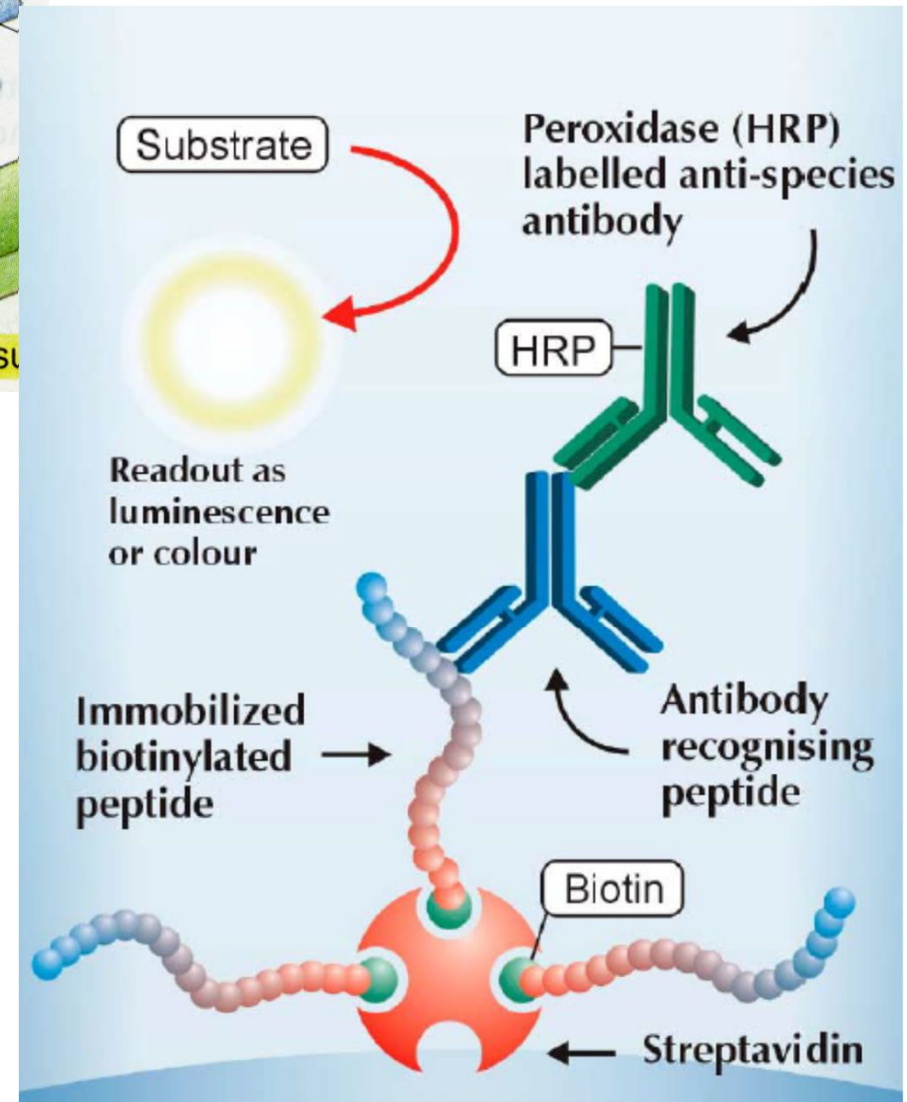


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

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

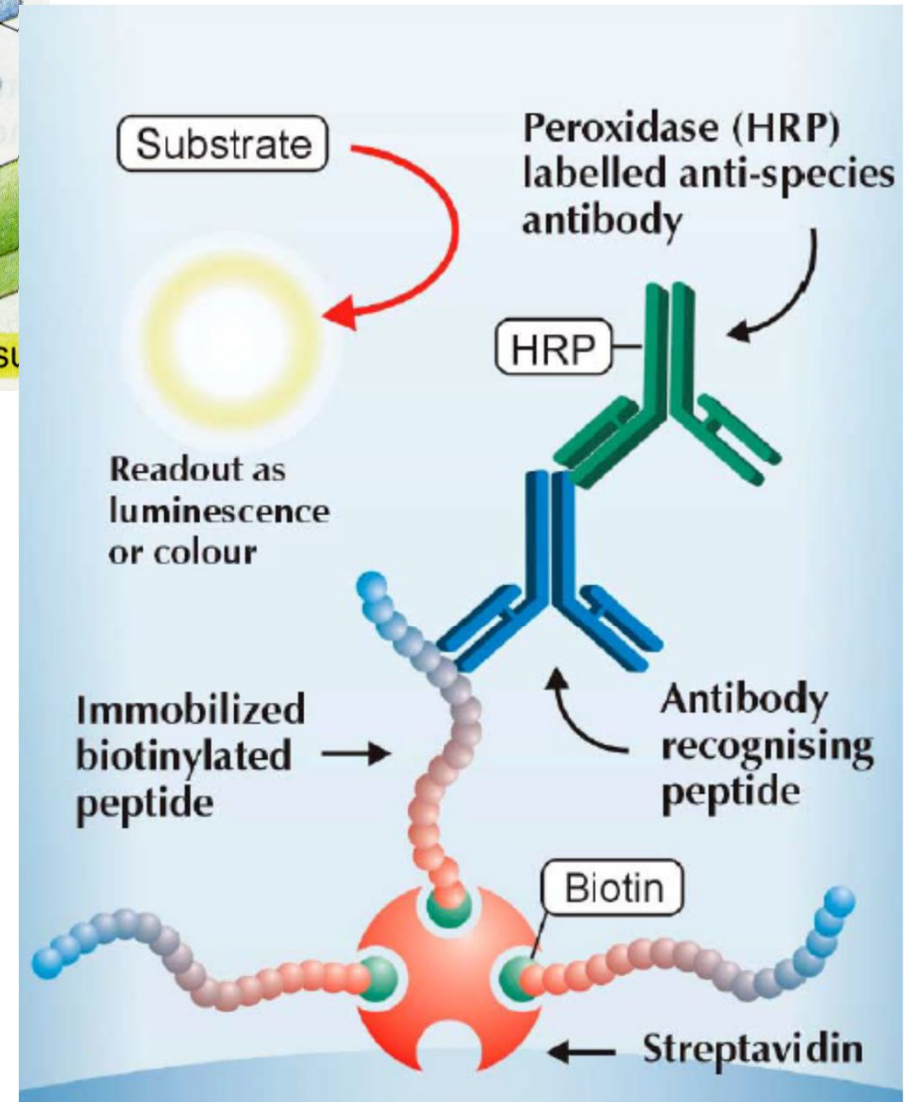
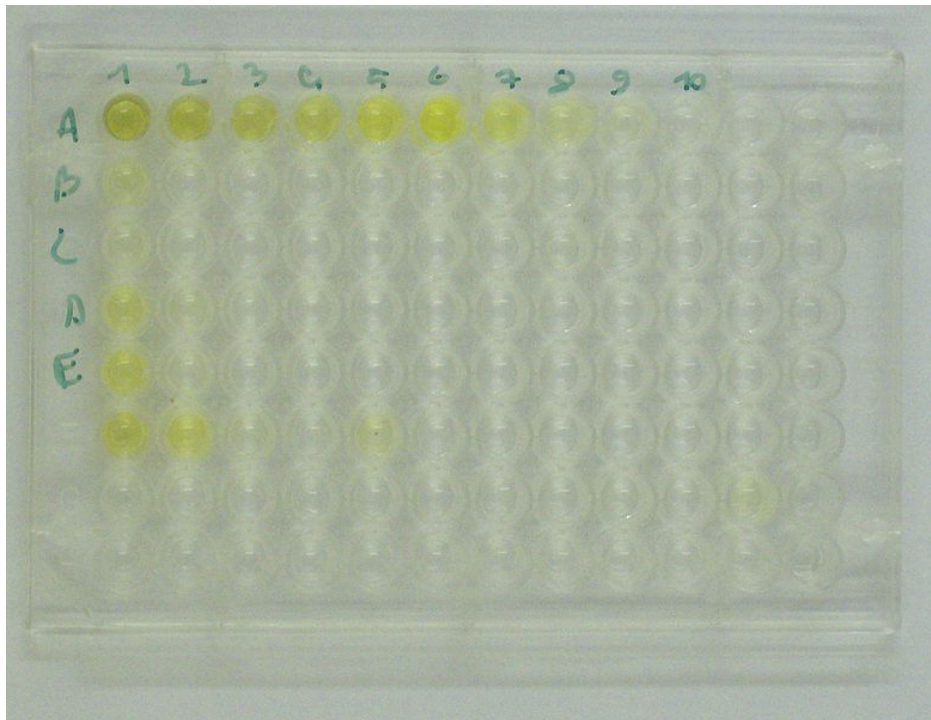
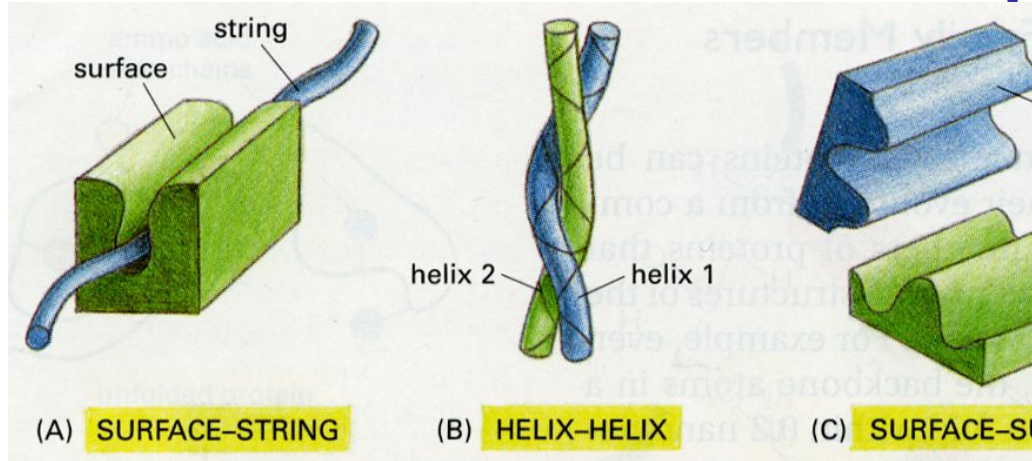


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Peptidové mapování

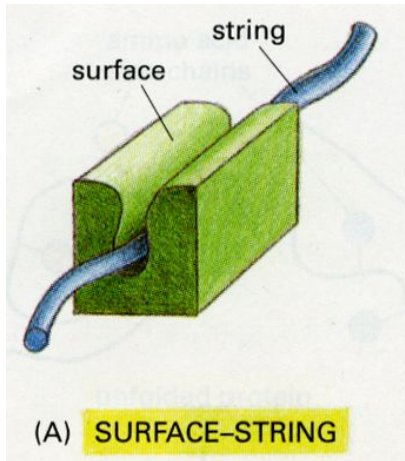
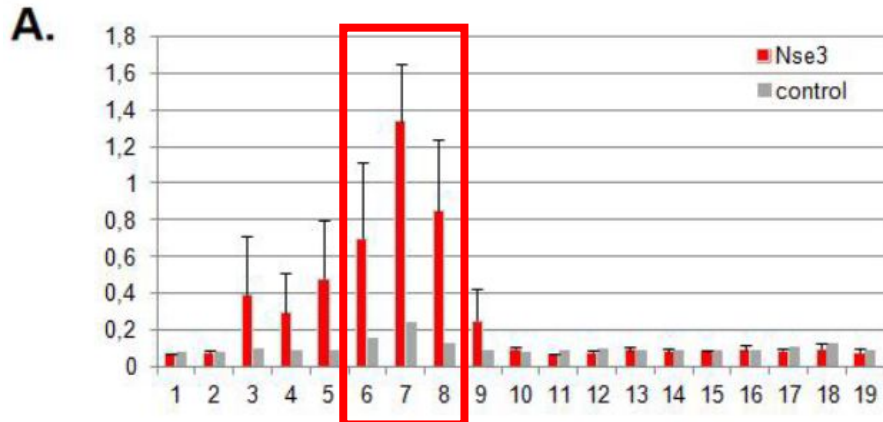


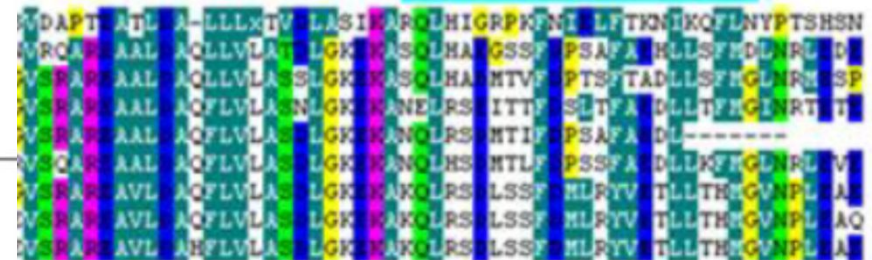
Table 3. *S. pombe* Nse4 synthetic peptides list
Nse4 peptidy

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 #0	-----KFNIELFTKNIKQFLNYPTSHSNVT
	-----ELFTKNIKQFLNYPTSHSNVTRIQE
	-----KNIKQFLNYPTSHSNVTRIQEIDTA
	-----QFLNYPTSHSNVTRIQEIDTAW SRL



£ Nse3/MAGE-binding domain

peptide #7



B.

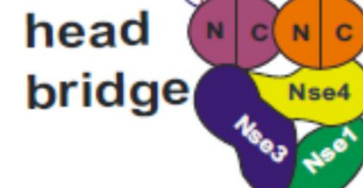
#6 aa70-94-----SIKARQLHIGRPKFNIELFTKNIKQ
 #7 aa74-98-----RQLHIGRPKFNIELFTKNIKQFLNY
 #8 aa78-102-----IGRPKFNIELFTKNIKQFLNYPTSH

Analýza Nse3-Nse4 interakce

Délka: 25 AMK

Posuv: 5 AMK

Knihovna: 18 peptidů



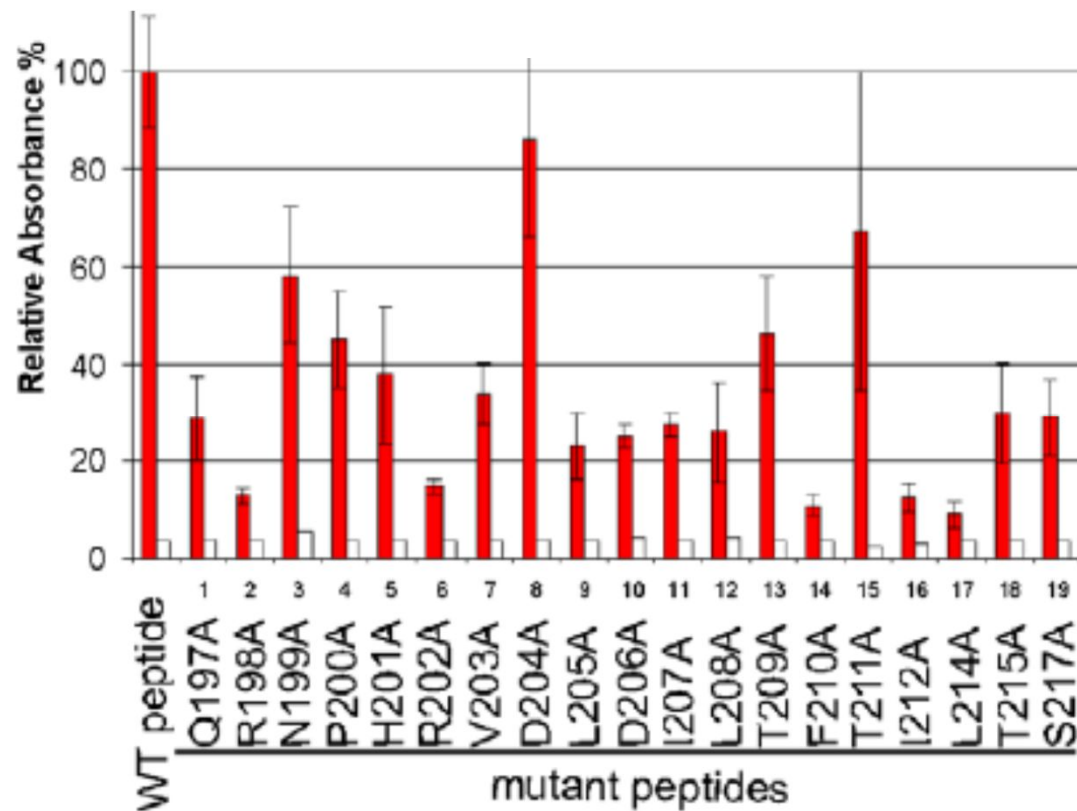
Charakterizace interakcí – „alanin scan“

EID2 peptidy (paralog Nse4)

Délka: 25 AMK

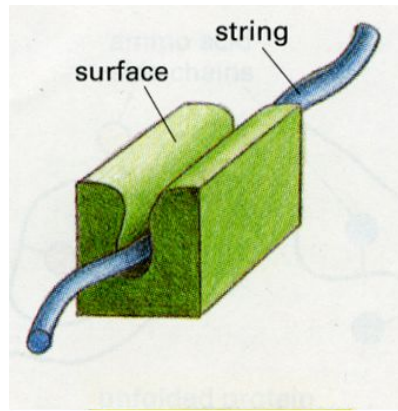
Posuv: mutace po 1 AMK

Knihovna: 20 peptidů



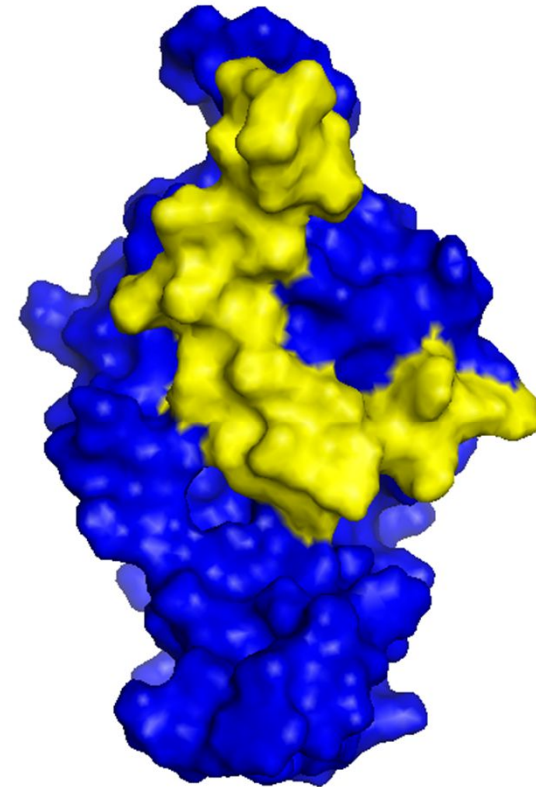
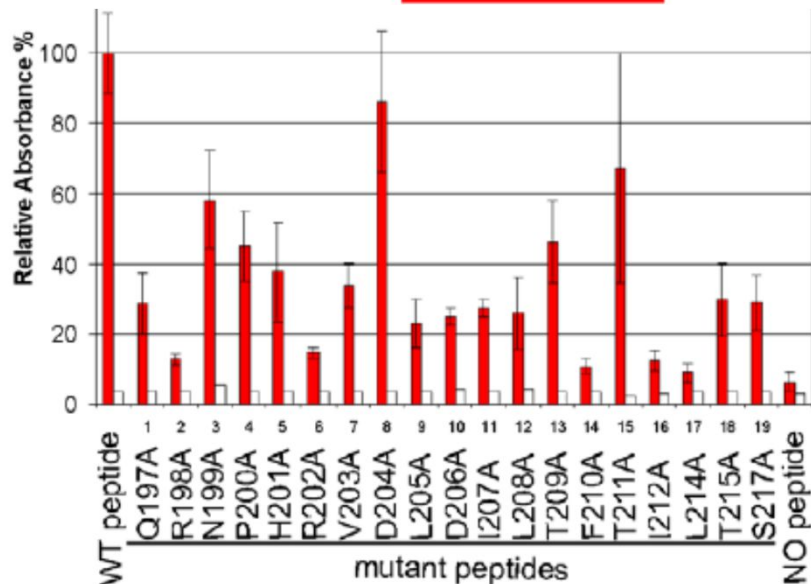
WT peptide	QRNPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #1	A RNPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #2	Q A NPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #3	QR A PHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #4	QRN A HRVLDLILTFTIALTAS
peptide #5	QRNP A RVLDLILTFTIALTAS
peptide #6	QRNPH A VLDLILTFTIALTAS
peptide #7	QRNPHR A DLILTFTIALTAS
peptide #8	QRNPHRV A LILTFTIALTAS
peptide #9	QRNPHRV D ADILTFTIALTAS
peptide #10	QRNPHRVLD L AILTFTIALTAS
peptide #11	QRNPHRVLDL D ALTFTIALTAS
peptide #12	QRNPHRVLDLID I ALTFTIALTAS
peptide #13	QRNPHRVLDLIDIL A FTIALTAS
peptide #14	QRNPHRVLDLILT A TIALTAS
peptide #15	QRNPHRVLDLILTFT I ALIAS
peptide #16	QRNPHRVLDLILTFT A ALIAS
peptide #17	QRNPHRVLDLILTFTTIA A TAS
peptide #18	QRNPHRVLDLILTFTTIAL A AS
peptide #19	QRNPHRVLDLILTFTTIALTA A

Mutace - mapování interakcí



D.n. - QLNSDMSSFNEVAFCDFLFIFVGLNWMDE
 C.f. - QLNSDMSEFNQVAFCDFFIFLVGLNWMEDD
 M.m. - CLNTDMNEFFNPIAFCDLLLLFVGFNWVEEE
 H.s. - QLNSDMNEFFNQLAFCDFLFIFVGLNWMEGD

core region



zmapována vazba šroubovice/string
 mutace (disrupce) ukáží, které AMK jsou důležité pro interakce (nebo *strukturu*)

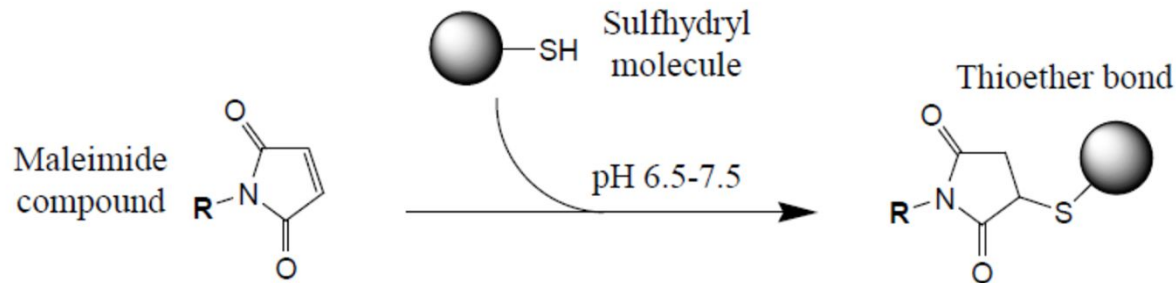
Jak je šroubovice orientována?

Mohou mutace vylepšit interakčních schopnosti?

Viz dále ...

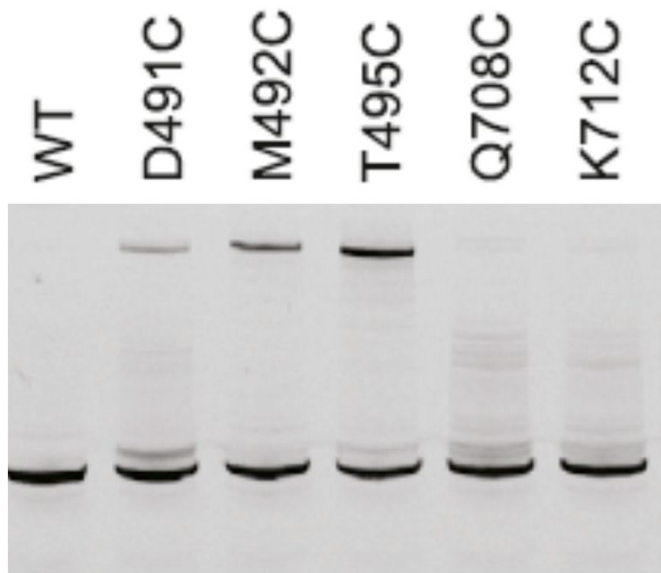
Mapování interakcí - crosslinking

- maleimidy reagují se sulfhydrylovou skupinou Cys (kovalentní)
- ve většině proteinů je málo cysteinů – lze využít pro **cílený crosslink**

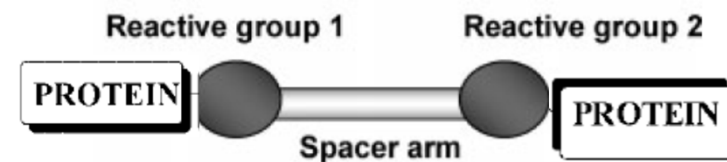
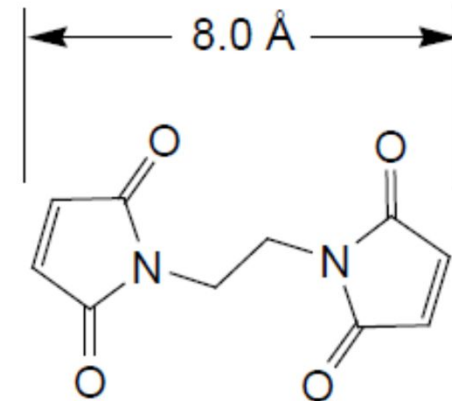


- cílené mutace na Cys
- na SDS-PAGE lze detekovat XL

BMOE, bis(maleimido)ethane.



intenzita koreluje se vzdáleností



více o crosslink ještě dále v MS metodách

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
- MS-based: painting, H-exchange ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

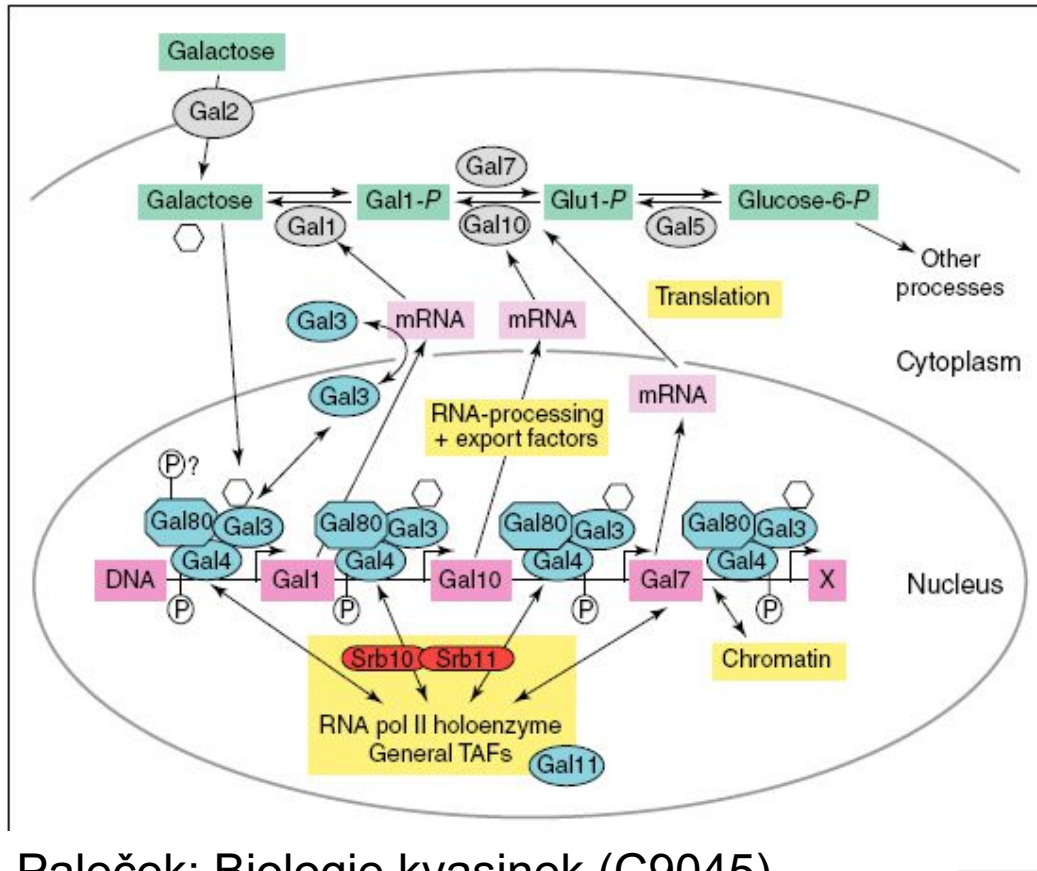
Dvou-hybridní systémy (kvasinkové)

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

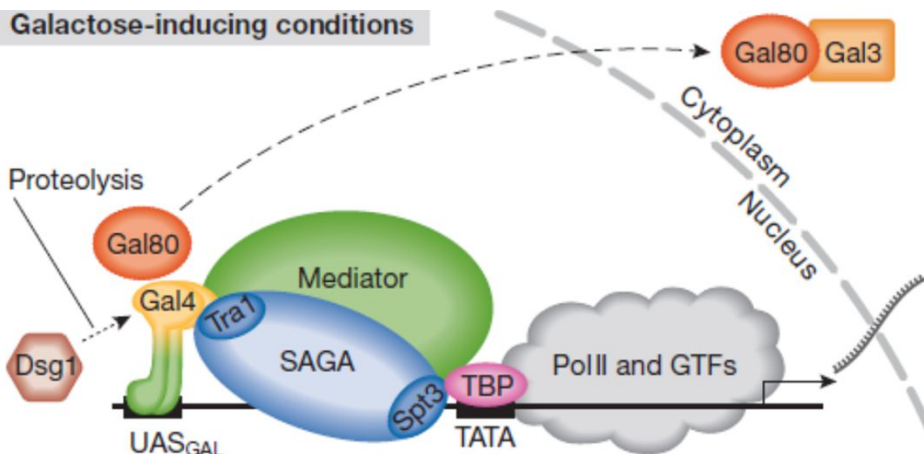
Na spínání/regulaci metabolismu galaktosy se podílí transkripční faktor **Gal4p** – váže specifické sekvence v UAS genů (Gal enzymů) a aktivuje jejich transkripci

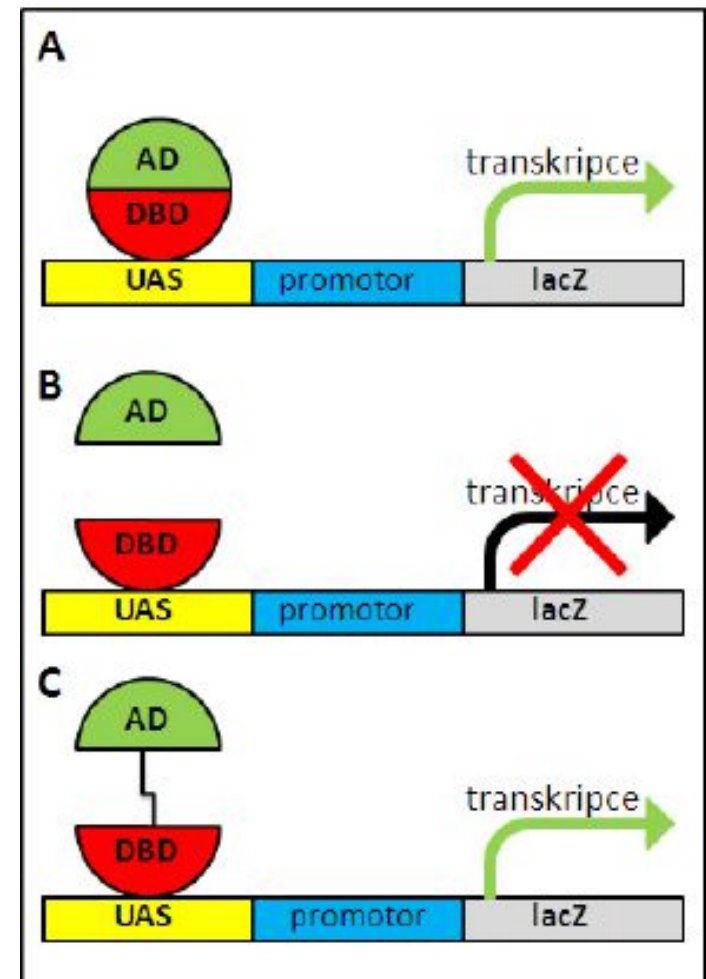
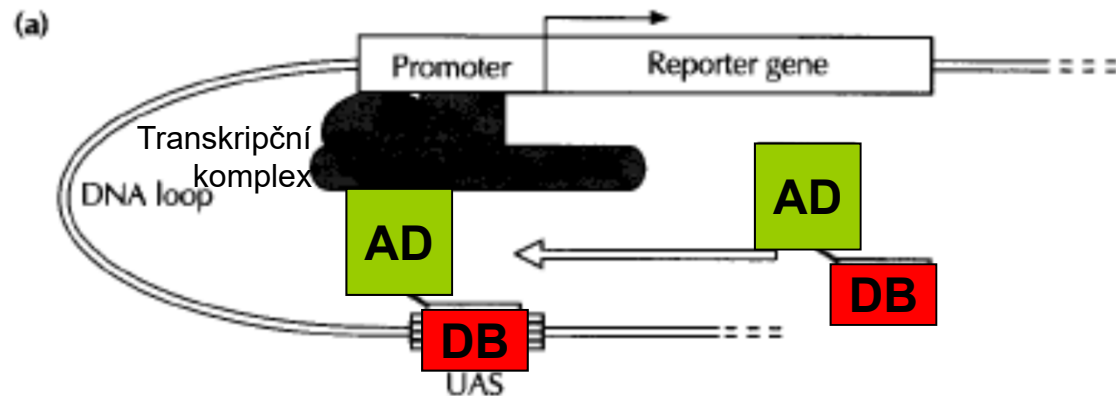
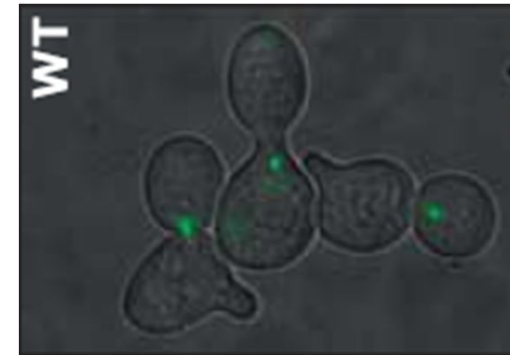
Uetz and Finley, 2005

Traven et al.: EMBO Report, 2006



Paleček: Biologie kvasinek (C9045), Str.& Fun. Prot komplexů (CG030)



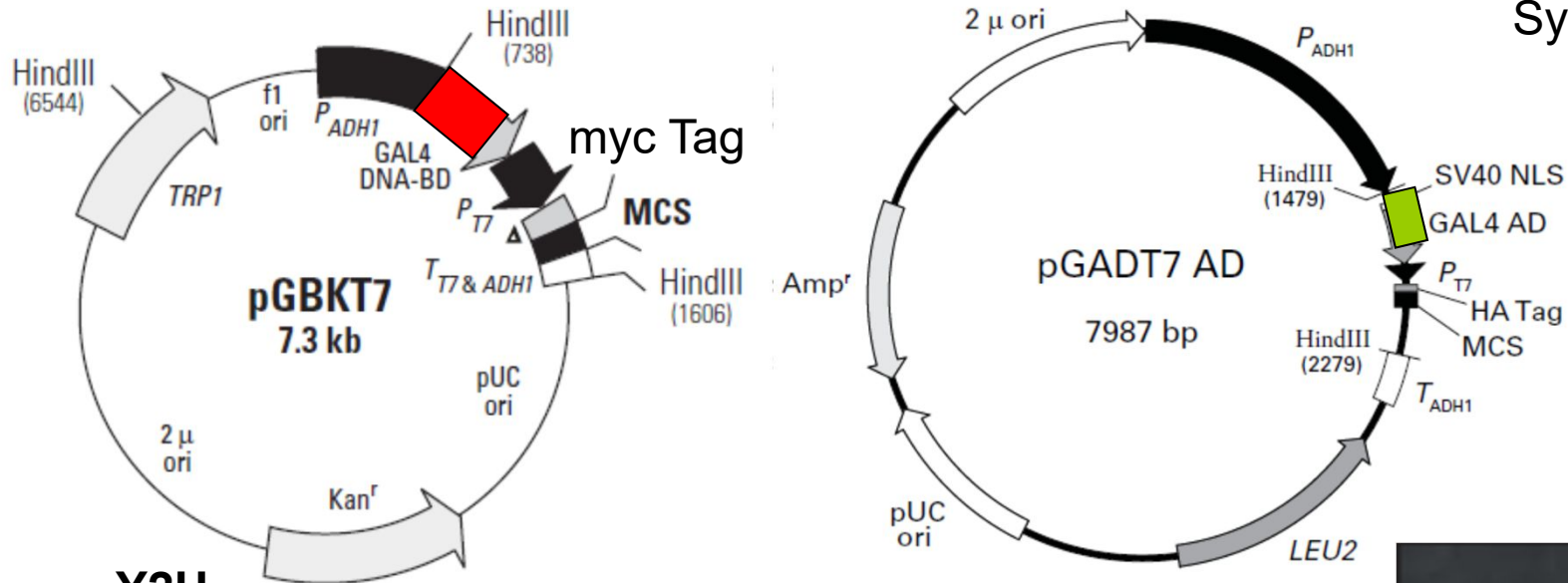


- DNA-vazebná doména (DB) bez aktivační domény (AD) není schopna aktivace transkripce
- Je možné **propojit domény** jakýmkoli linkerem a transkripci reaktivovat

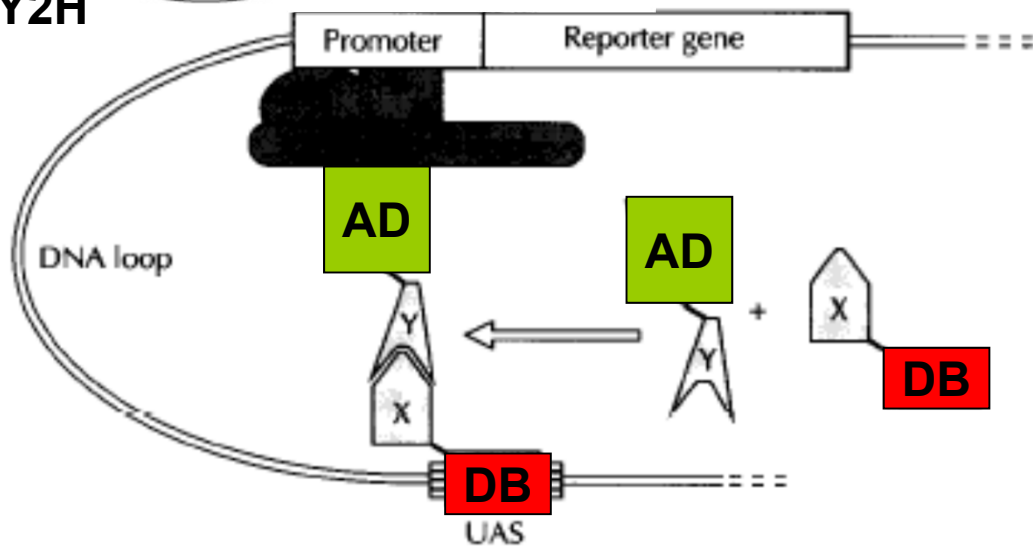
Gal4p

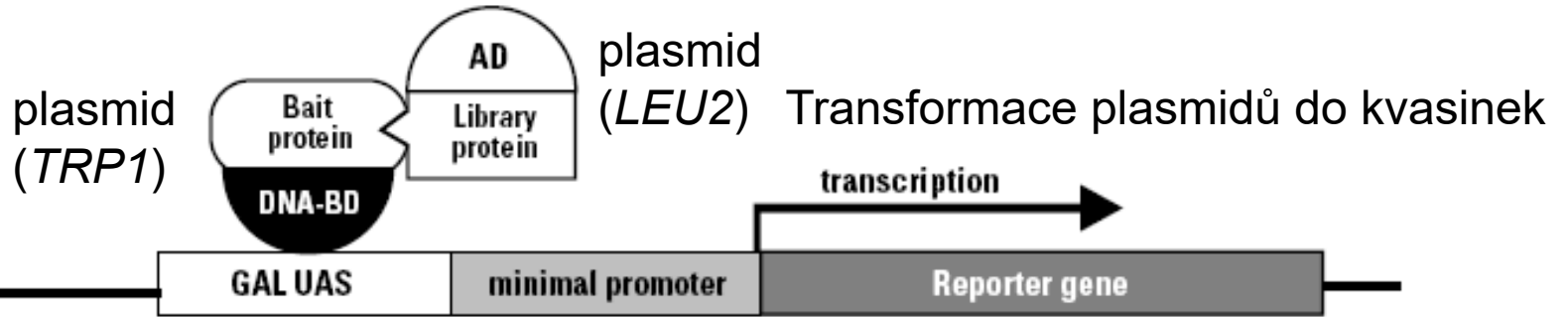


System vhodný i pro pull-down



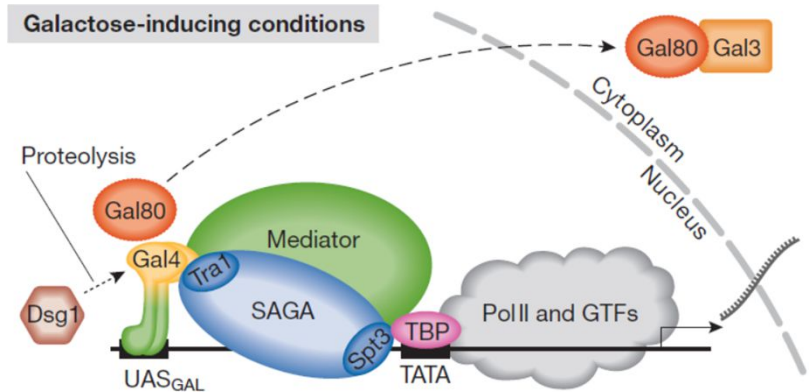
Y2H





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



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>

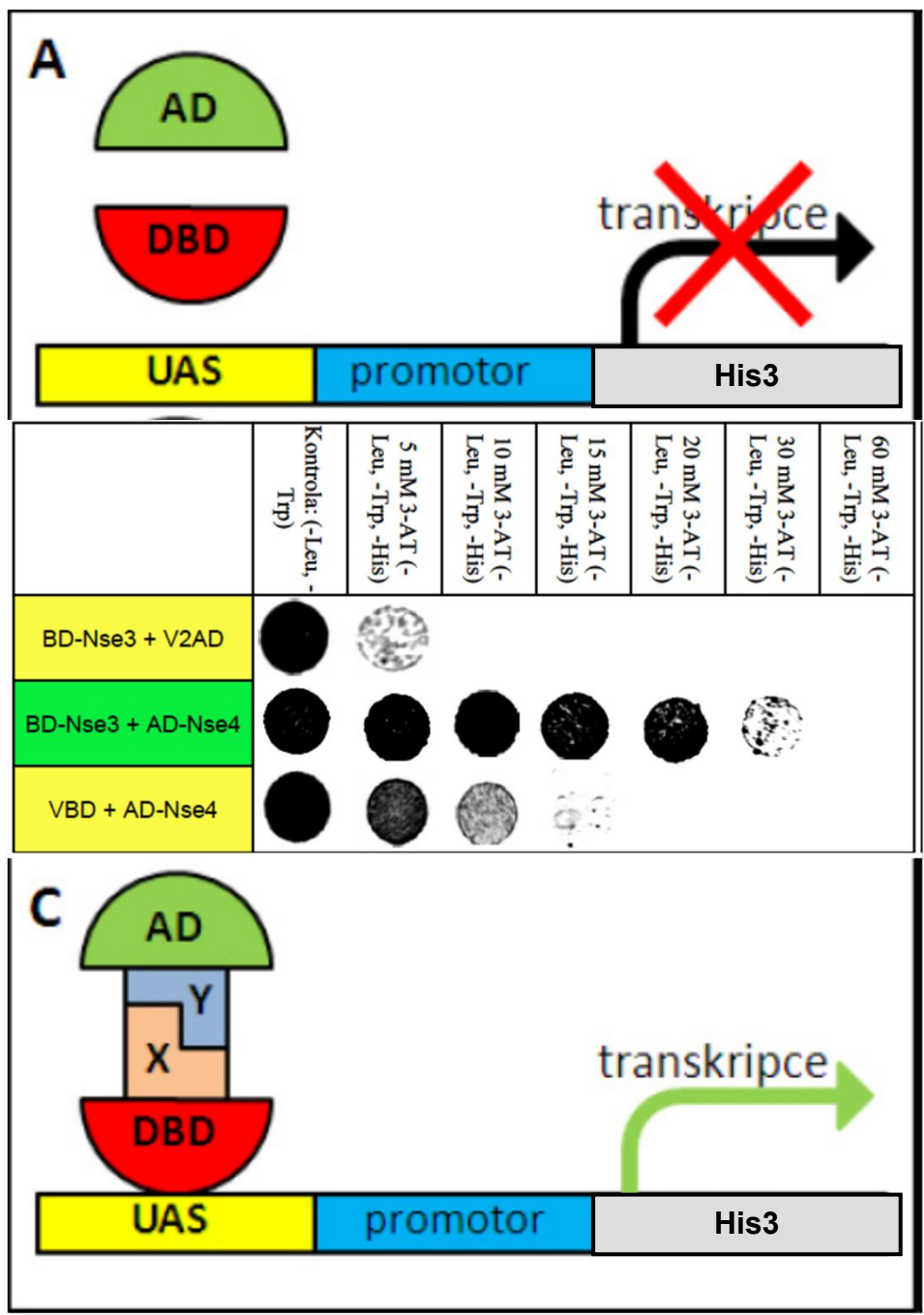
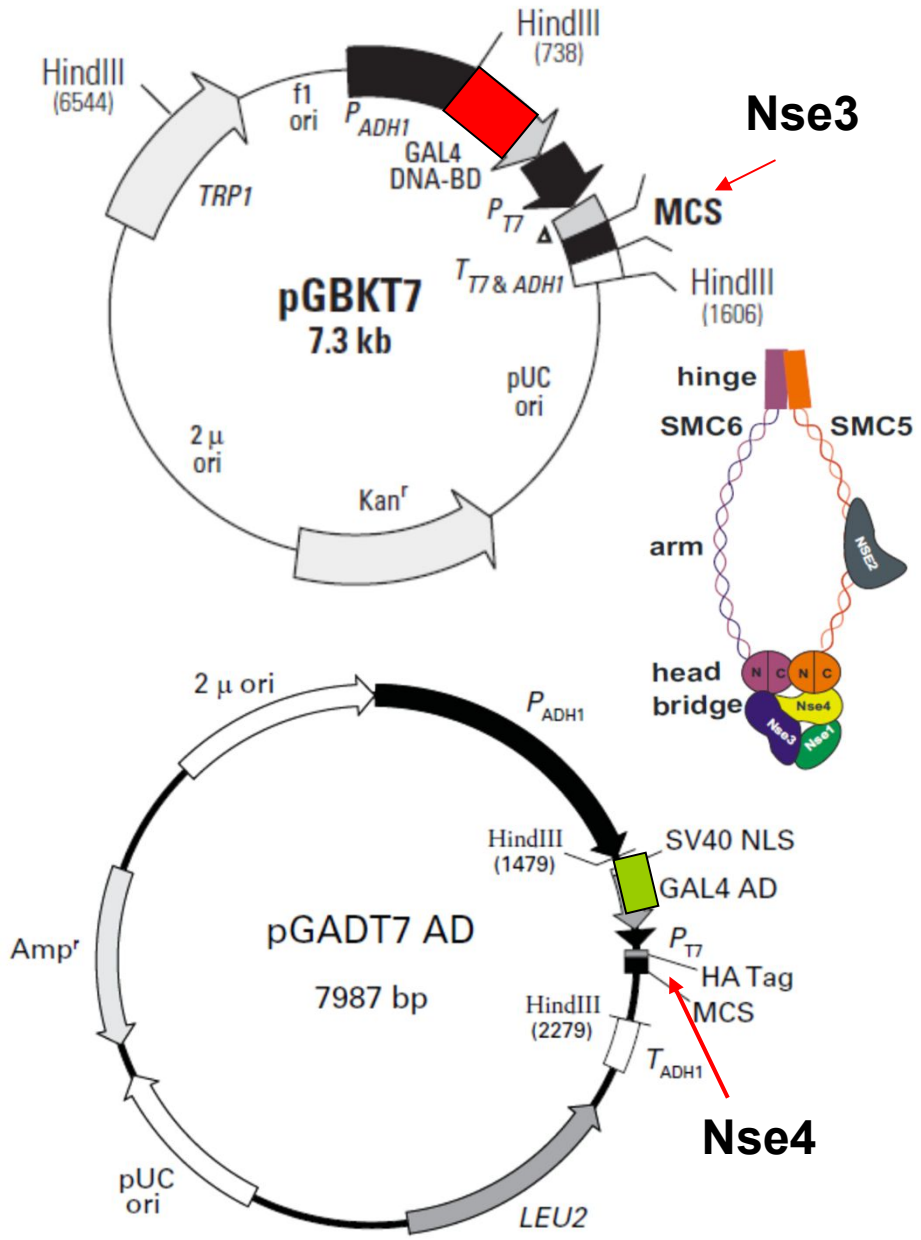
- Testuje se schopnost růstu kvasinek na médiu bez histidinu (nebo adeninu – červená/bílá)
- lze použít i pro hledání proteinových interakčních partnerů (screen knihovny)

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>	β -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory α -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	β -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory β -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)

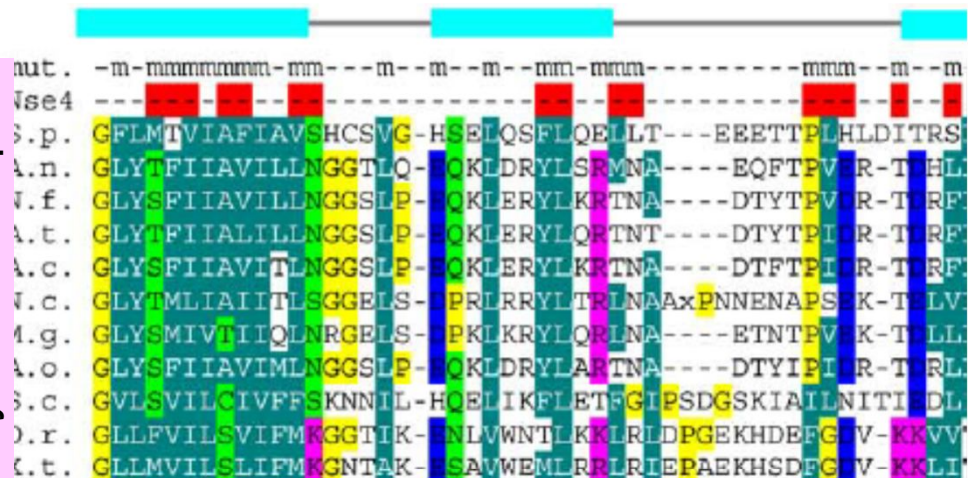


K. Bednarova (Diplomová práce)

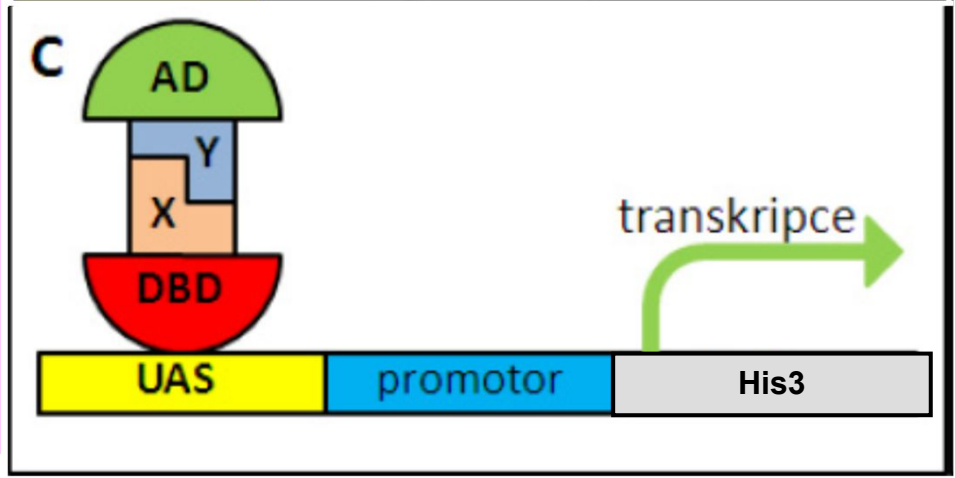
mutanty BD-Nse3 + AD-Nse4	kontrolní miska (-Leu, -Trp)			testovací miska (-Leu, -Trp, -His, + 20 mM 3-AT)		
mutanty	1	2	3	1	2	3
F212A	●	●	●	●	●	●
L213A	●	●	●	●	●	●
M214A	●	●	●	●	●	●
V216A	●	●	●	●	●	●
I217A	●	●	●	●	●	●
F219A	●	●	●	●	●	●
I220A	●	●	●	●	●	●
S223A	●	●	●	●	●	●
V227A	●	●	●	●	●	●
H229A	●	●	●	●	●	●
S230A	●	●	●	●	●	●
L232A	●	●	●	●	●	●
F235A	●	●	●	●	●	●
L236A	●	●	●	●	●	●
S255A	●	●	●	●	●	●
S257A	●	●	●	●	●	●

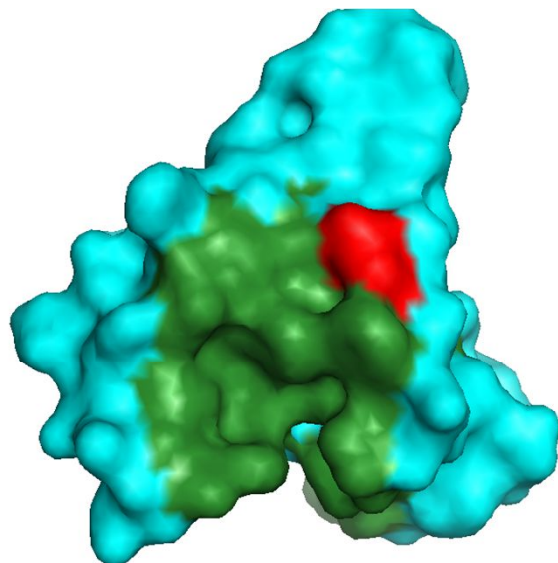


“alanin scan” konservovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu



	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	●	●	●	●	●	●	●



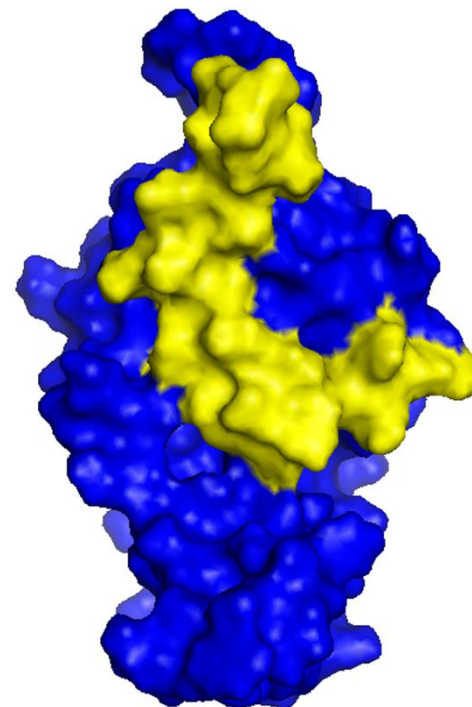


mut.	-m-	mmmmmmmm	mm	--m--	m--m--	mm	mmmm	-----	mmm	--m--	m																																					
Nse4		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---																																					
S.p.	G	F	L	M	T	V	I	A	F	I	A	V	S	H	C	S	V	G	-	H	S	E	L	Q	S	F	L	Q	E	L	L	T	---	E	E	T	T	P	L	H	L	D	I	T	R	S		
A.n.	G	L	T	F	I	I	A	V	I	L	L	N	G	G	T	L	Q	-	E	K	L	D	R	Y	L	S	R	M	N	A	---	E	Q	F	T	P	V	R	-	T	H	L	I					
N.f.	G	L	S	F	I	I	A	V	I	L	L	N	G	G	S	L	P	-	E	K	L	E	R	Y	L	K	R	T	N	A	---	D	T	Y	T	P	V	R	-	T	R	F						
A.t.	G	L	T	F	I	I	A	L	I	L	L	N	G	G	S	L	P	-	E	K	L	E	R	Y	L	Q	R	T	N	T	---	D	T	Y	T	P	V	R	-	T	R	F						
A.c.	G	L	S	F	I	I	A	V	I	L	L	N	G	G	S	L	P	-	E	K	L	E	R	Y	L	K	R	T	N	A	---	D	T	F	T	P	V	R	-	T	R	F						
N.c.	G	L	T	M	L	I	A	I	I	T	L	S	G	G	E	L	S	-	P	R	L	R	R	Y	L	T	R	L	N	A	A	x	P	N	N	E	N	A	P	S	K	-	T	E	L	V		
M.g.	G	L	S	M	I	V	T	I	I	Q	L	N	R	G	E	L	S	-	P	K	L	K	R	Y	L	Q	R	L	N	A	---	E	T	N	T	P	V	R	-	T	L	L						
A.o.	G	L	S	F	I	I	A	V	I	M	L	N	G	G	S	L	P	-	E	K	L	D	R	Y	L	A	R	T	N	A	---	D	T	Y	T	P	V	R	-	T	R	L						
S.c.	G	V	L	S	V	I	L	C	I	V	F	F	S	K	N	N	I	L	-	H	O	E	L	I	K	F	L	E	T	F	G	I	P	S	D	G	S	K	I	A	I	L	N	I	T	I	E	D
D.r.	G	L	L	F	V	I	L	S	V	I	F	M	K	G	G	T	I	K	-	E	N	L	V	W	N	T	L	K	K	L	R	I	D	P	G	E	K	H	D	E	F	G	V	-	K	K	V	
X.t.	G	L	L	M	V	I	L	S	L	I	F	M	K	G	N	T	A	K	-	E	S	A	V	W	E	M	L	R	L	R	I	E	P	A	E	K	H	S	D	E	F	G	V	-	K	K	L	

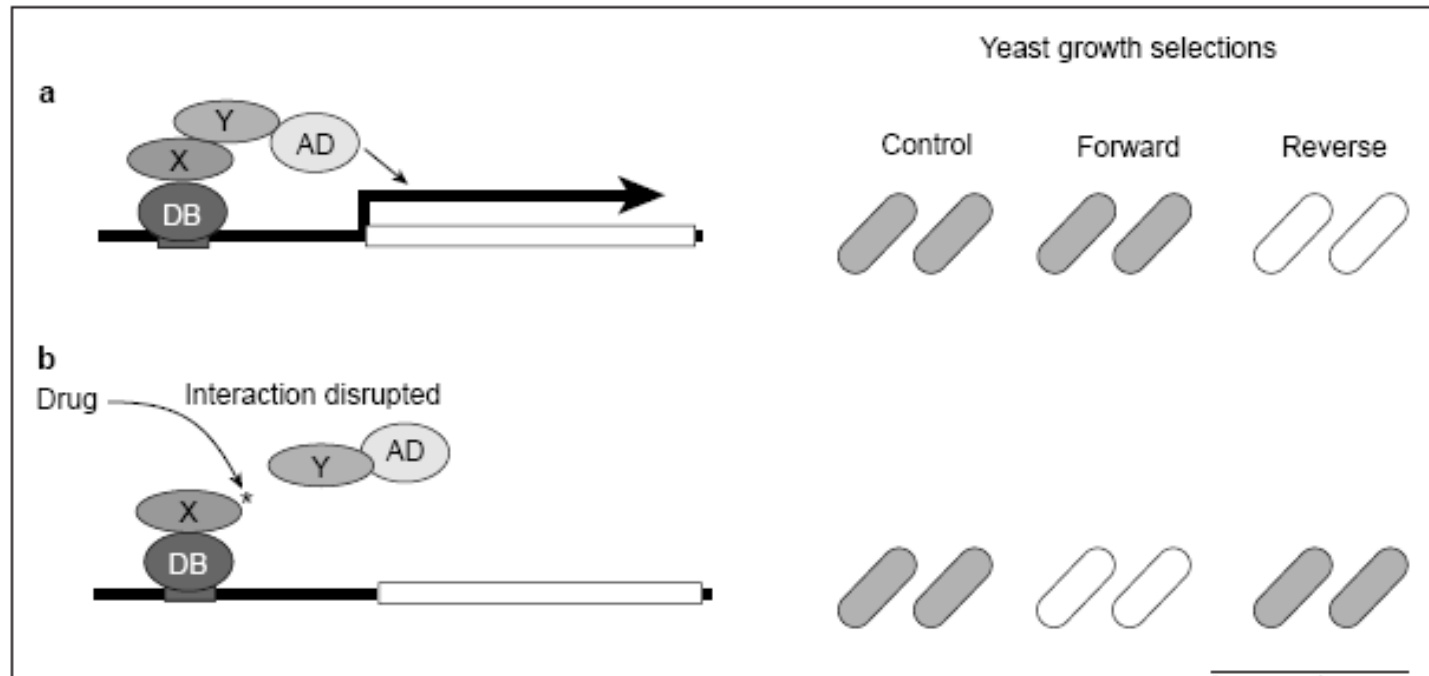
“alanin scan” konzervovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu na povrchu Nse3 ...

... do níž se váže hydrofobní šroubovice Nse4 proteinu

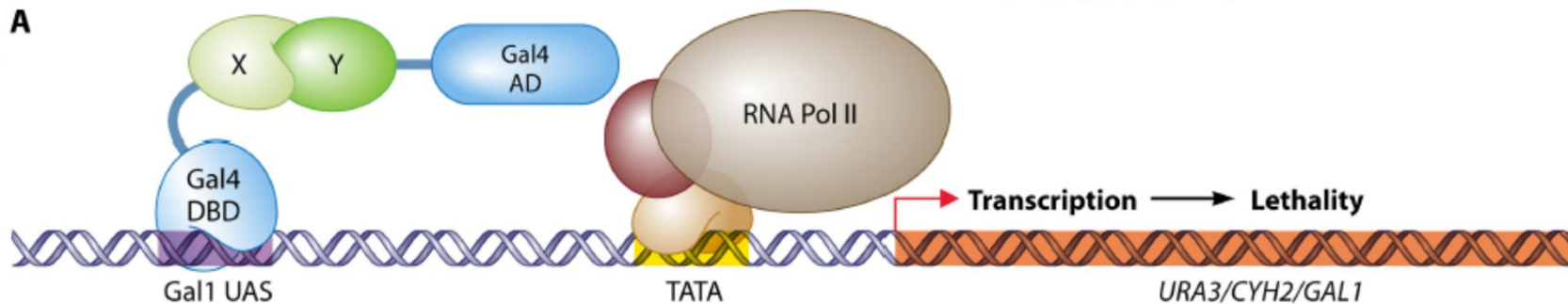
Pomocí *in silico* (MD) analýzy byl vytvořen model dimeru Nse3-Nse4 (docking)



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

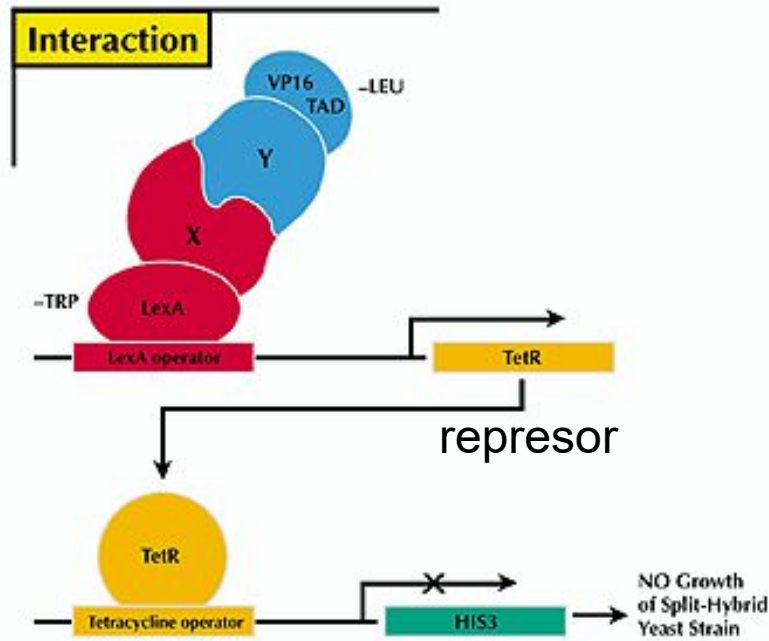


Fig. 1
 Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

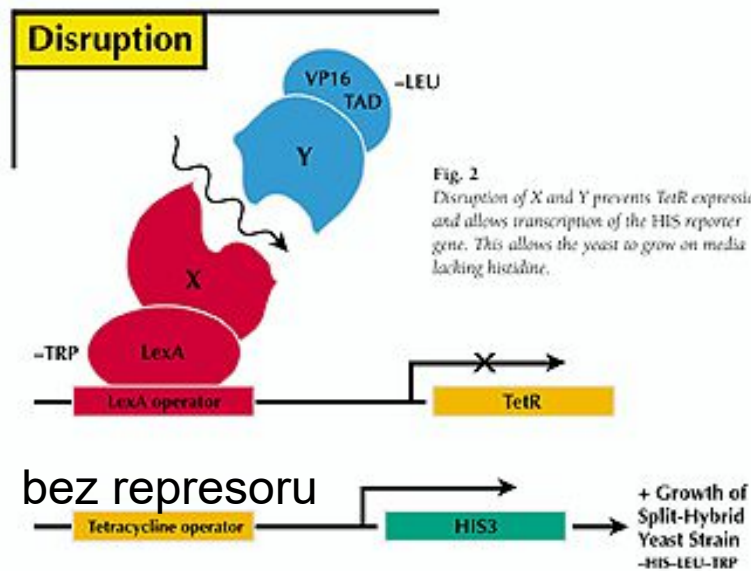
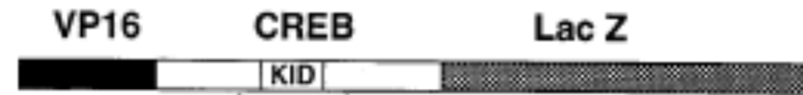


Fig. 2
 Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



PCR mutagenesis

Mutated library

27,000 yeast transformants screened in the split-hybrid system with LexA-CBD

-5,000 Growth(+)

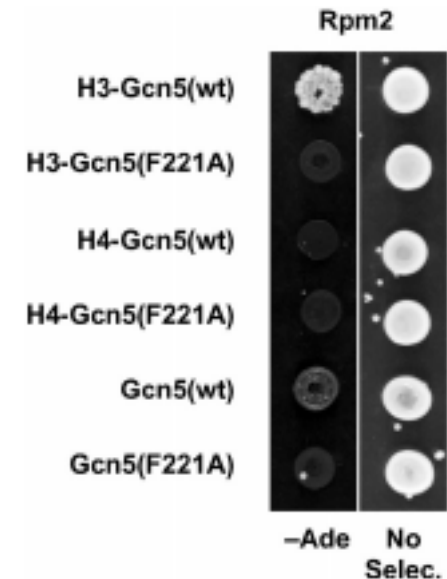
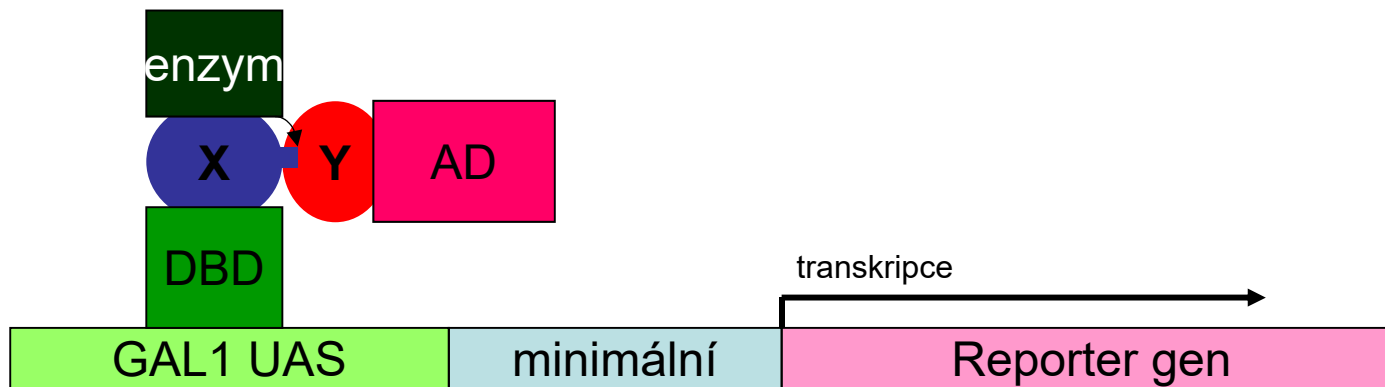
536 X-gal(+)

193 mutant DNAs were isolated and re-screened in the split-hybrid and two-hybrid strains

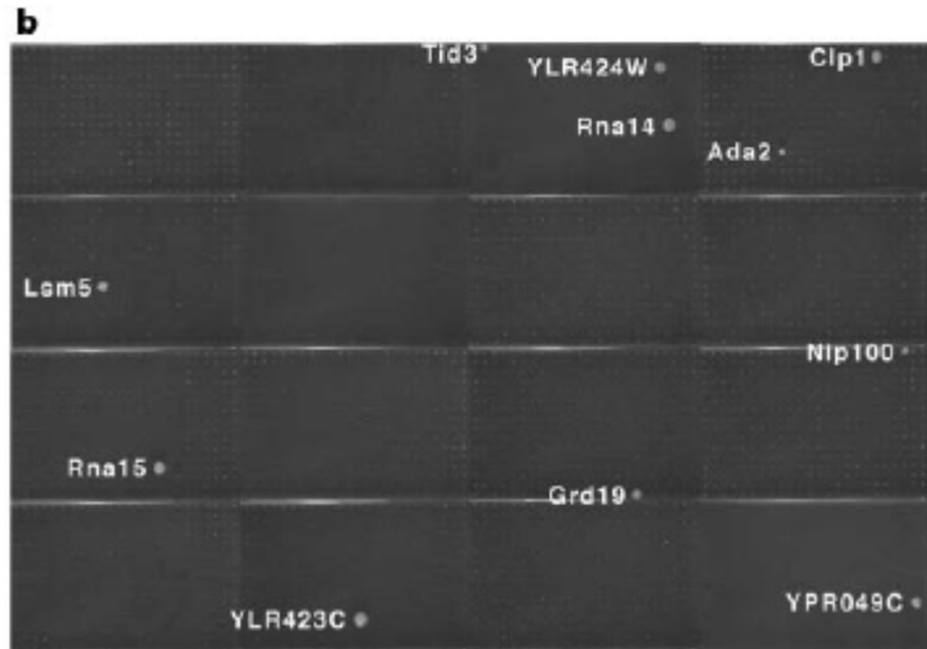
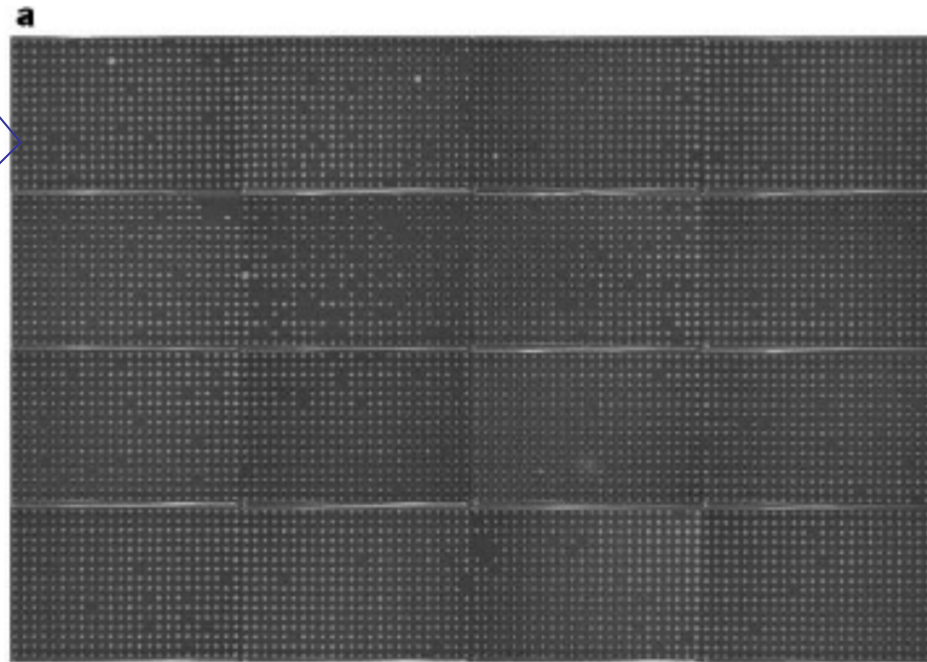
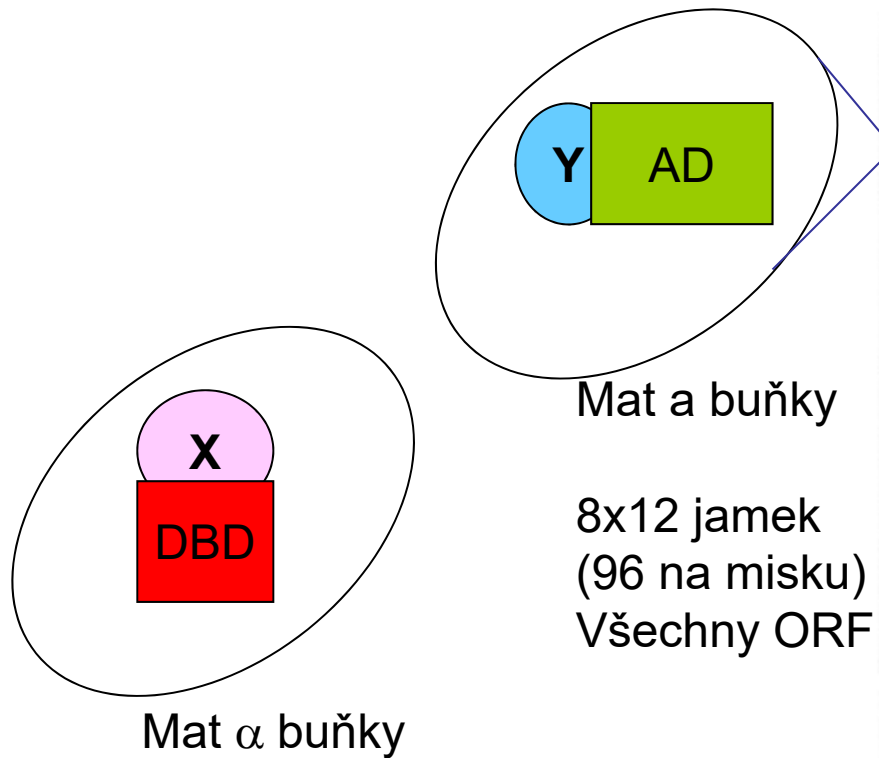
Growth: 152 split-hybrid (+), two-hybrid (-)

70 mutants contained single amino acid mutations

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)

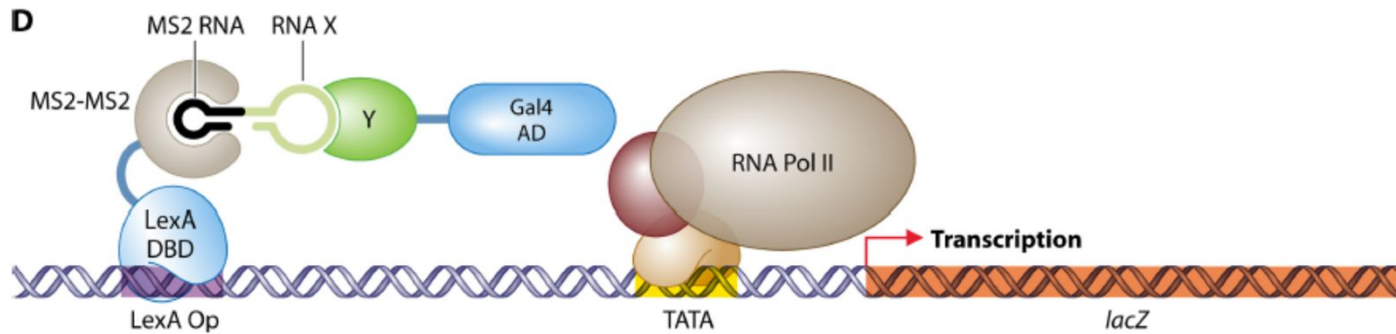


Kvasinkový, lidský ...

„INTERACTOM“

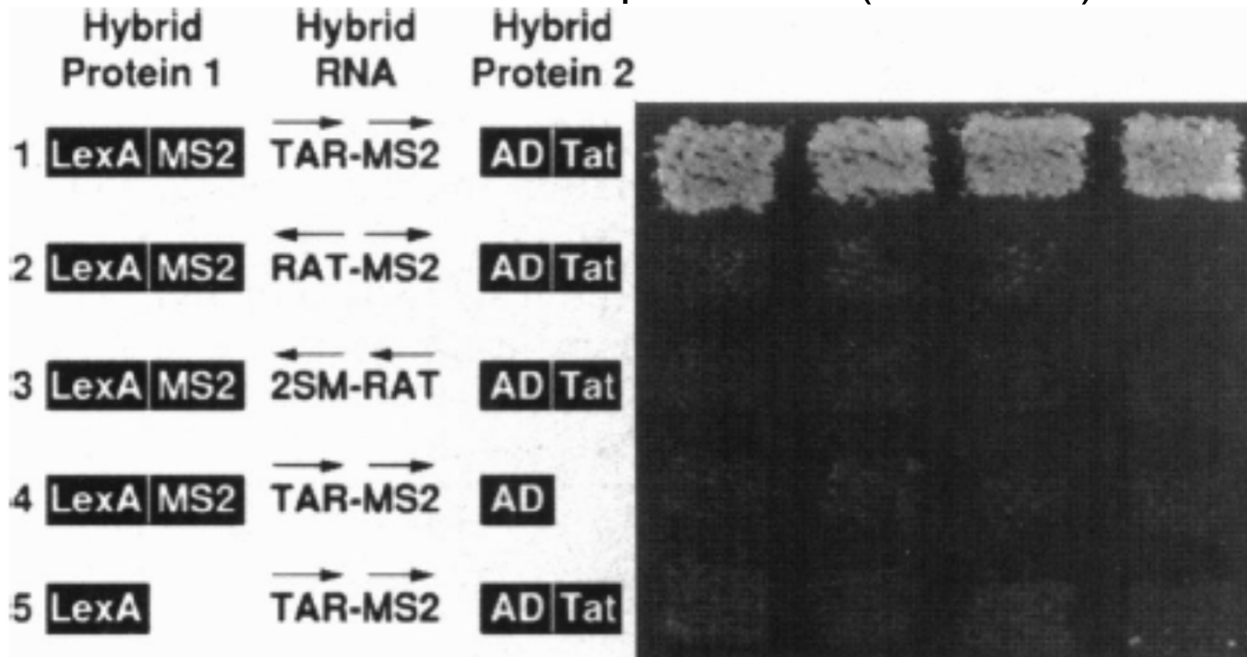
High-throughput – testovány
knihovny 6000x6000 proteinů
(kombinace pomocí párování
místo transformace)

Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



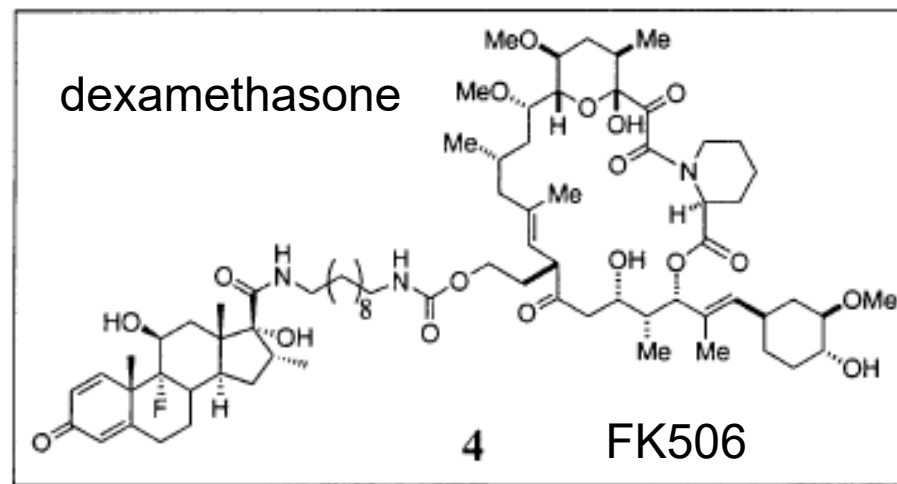
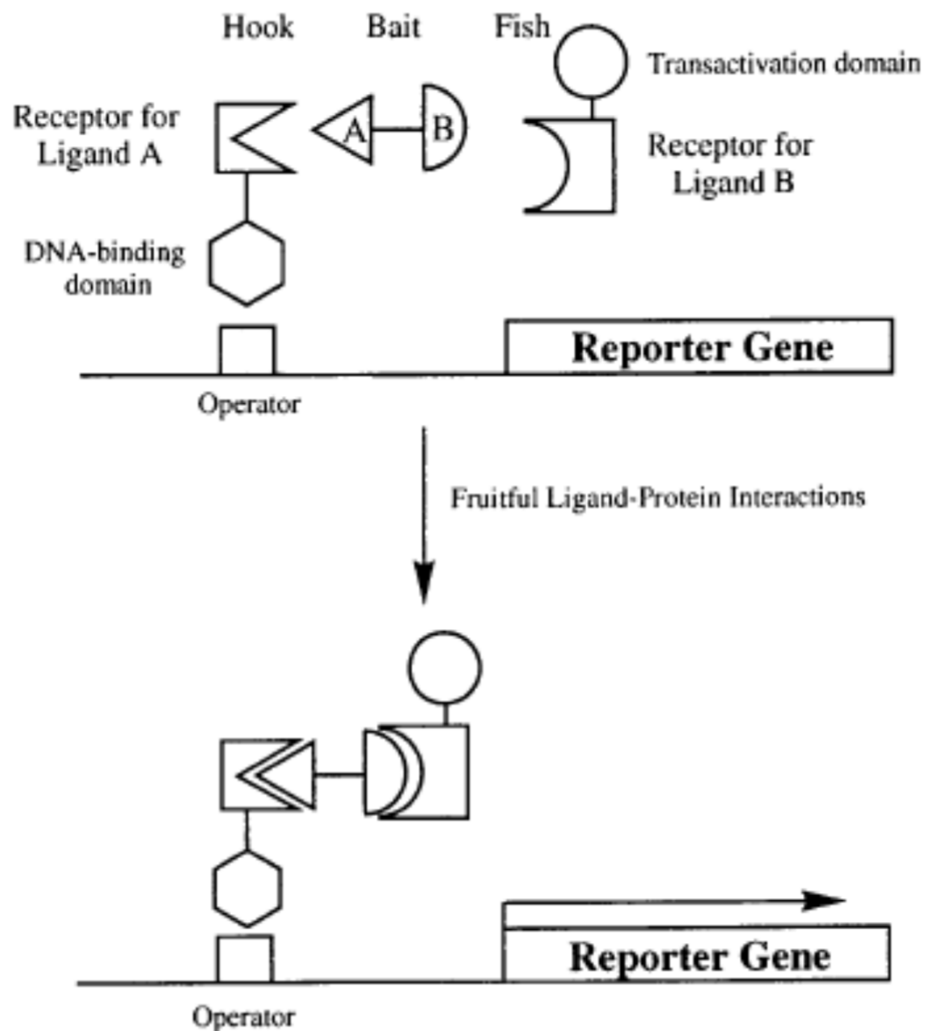
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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)

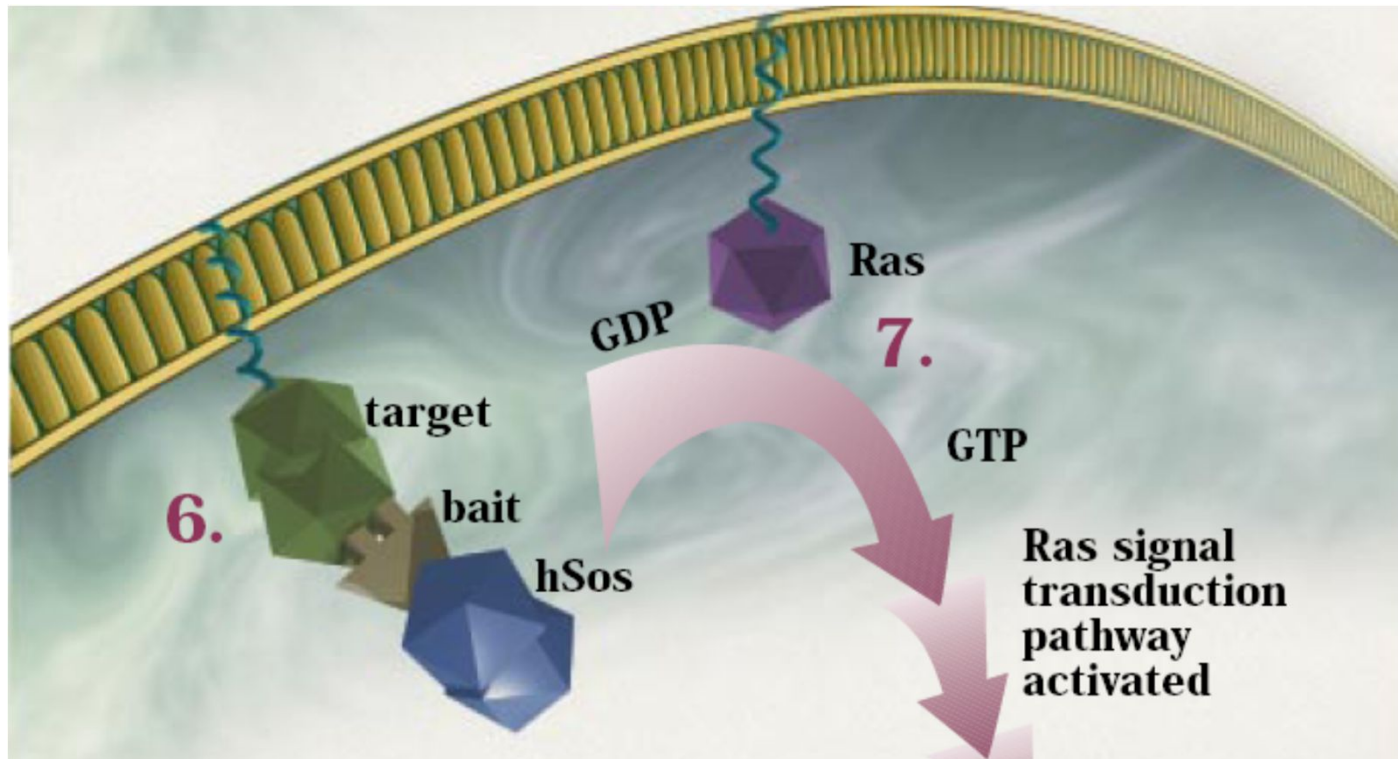
Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- 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
- MS-based: painting, H-exchange ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- 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)

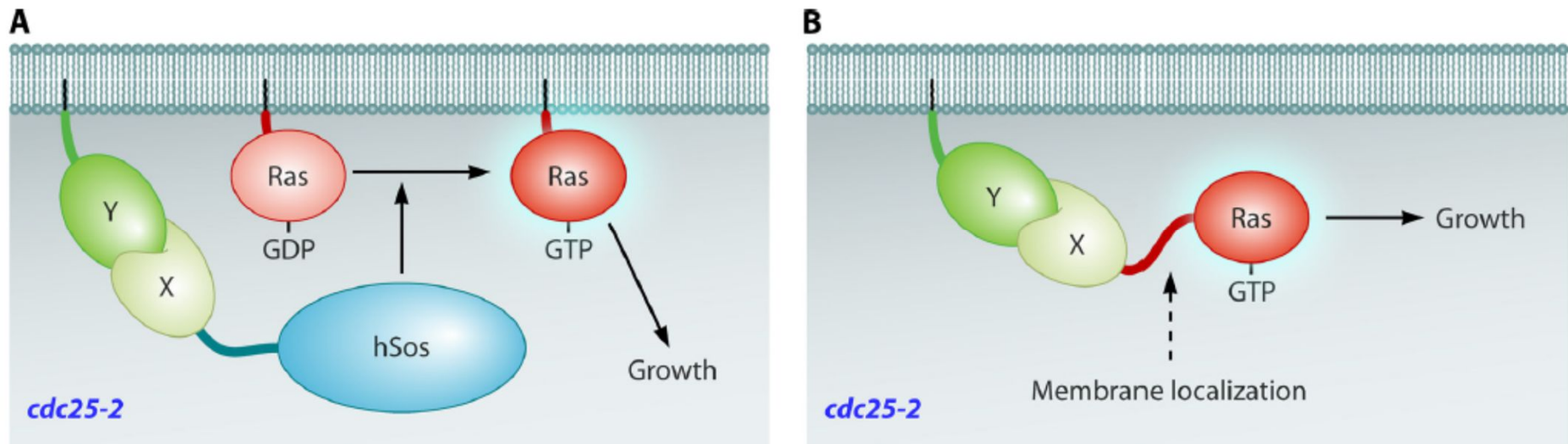


alternativní Ras hybridní systémy

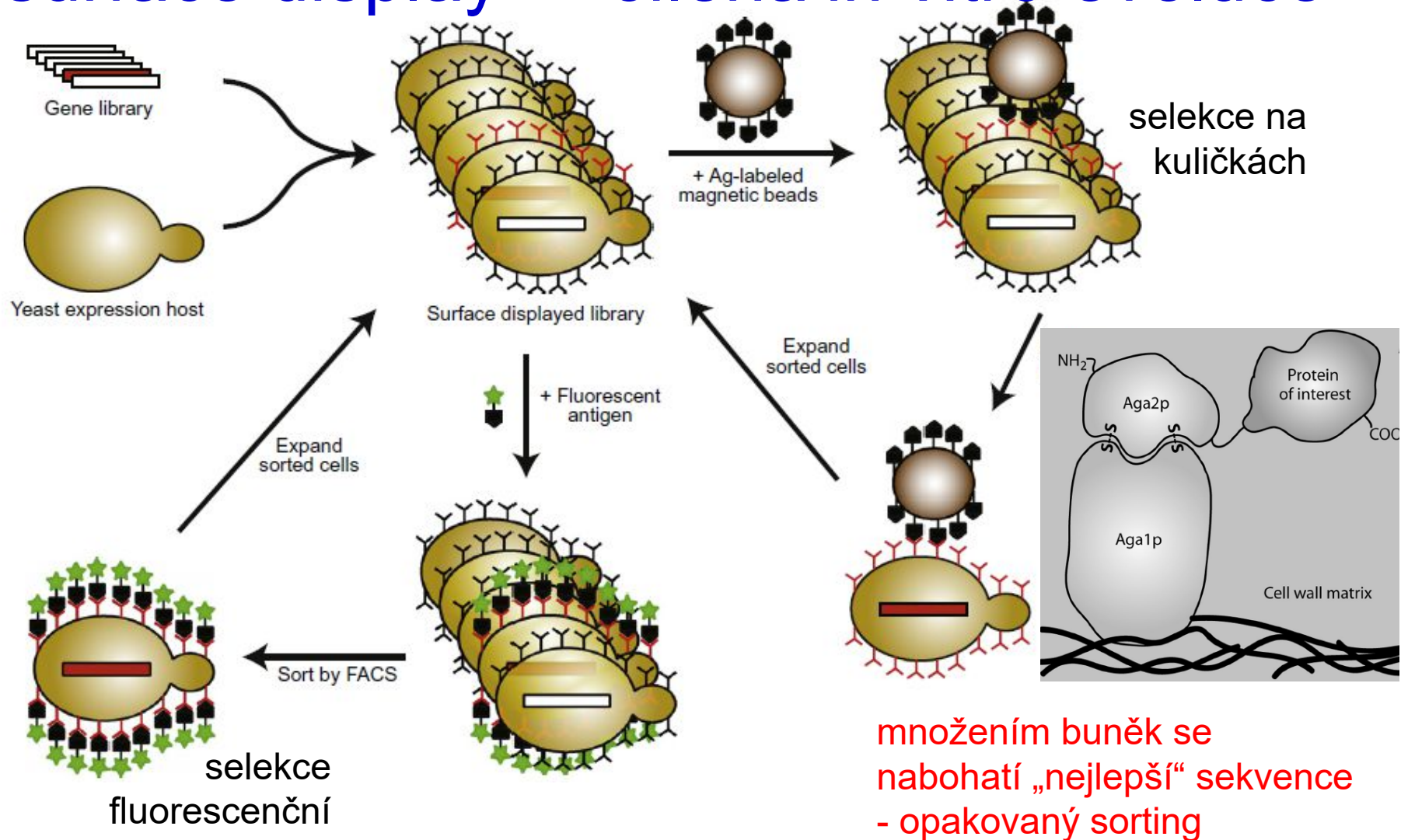
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti (A)

- 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)

(B) – savčí konstitutivně aktivní Ras protein (bez signální sekvence) je fúzován s proteinem, který interaguje s partnerem ukotveným v membráně (spustí se Ras dráha a *cdc25-2* kvasinky rostou i na vyšší teplotě)



„surface display“ – cílená *in vitro* evoluce

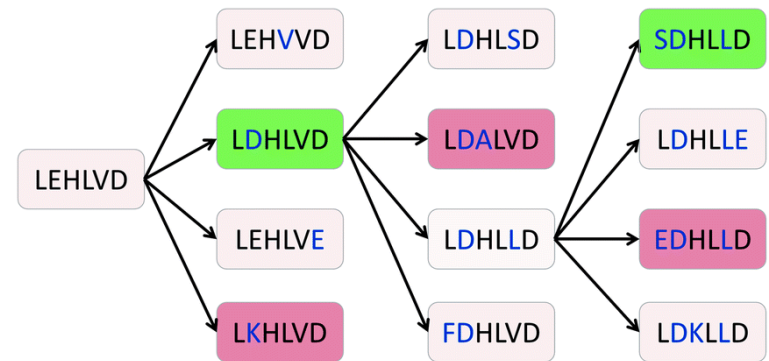


- analyzovaný protein je umístěn na povrchu buňky (kvasinkové, bakteriální/fág) – čím vyšší afinita tím větší pravděpodobnost „zachycení“ – lze vyselektovat nejlepší vazebné sekvence (při použití „knihovny“)

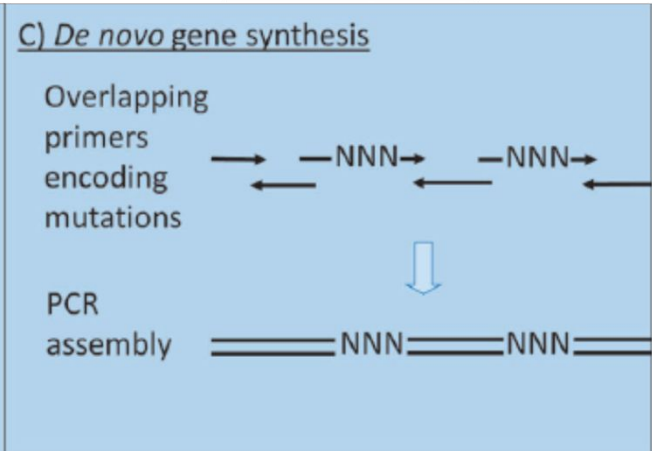
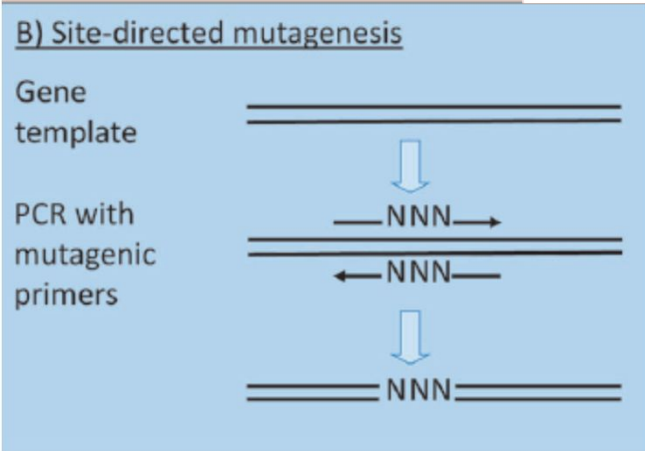
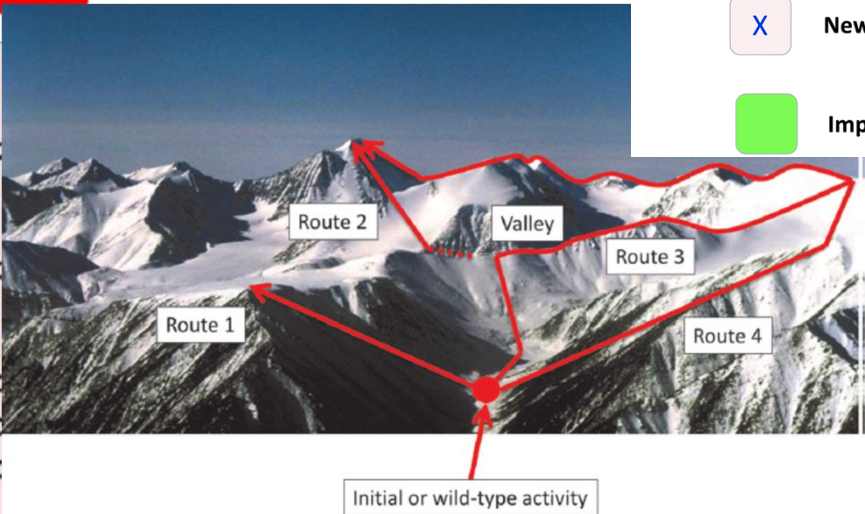
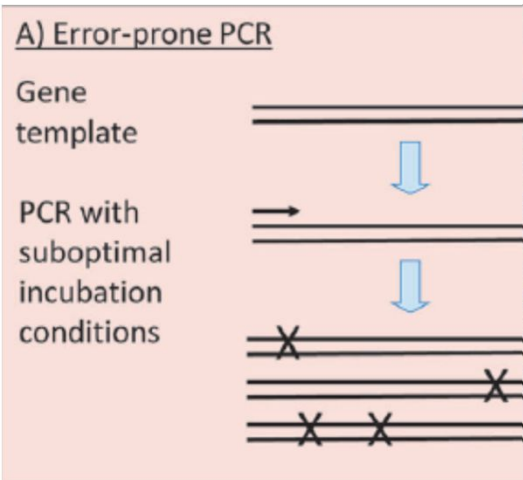
cílená *in vitro* evoluce

D.n. - CLNSDMSSFNEVAFCDLFLFIFVGLNWMEDD
 C.f. - CLNSDMSSFNQVAFCDLFLFIFVGLNWMEDD
 M.m. - CLNTDMNFFNPIAFCDLLLFLVGFNWVEEE
 H.s. - CLNSDMNFFNQLAFCDLFLFIFVGLNWMEDD

core region

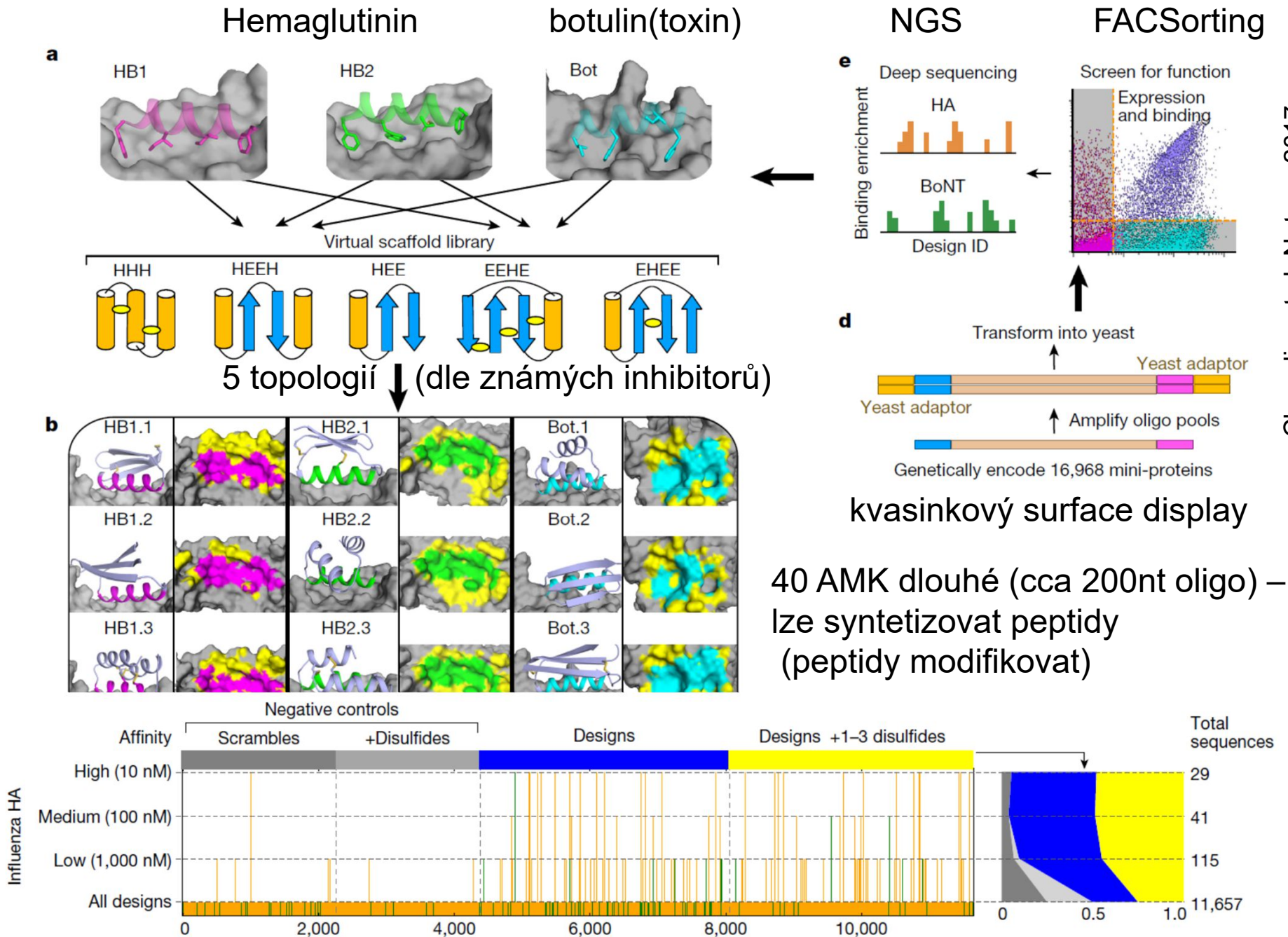


X New mutation
 Improved fitness
 No fitness increase
 Loss of function



takto lze modifikovat interakční schopnosti proteinů a nalézt motivy s vyšší afinitou ...

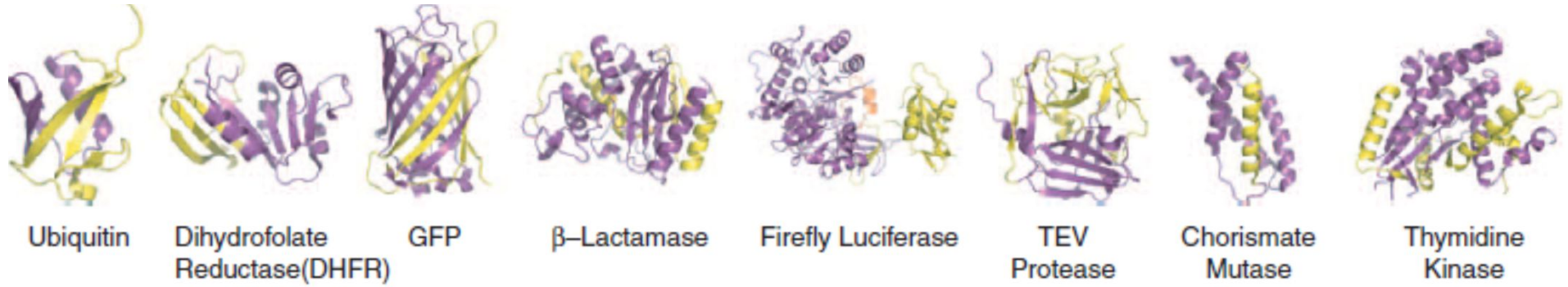
Inhibice PPI - proteiny



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
- MS-based: painting, H-exchange ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

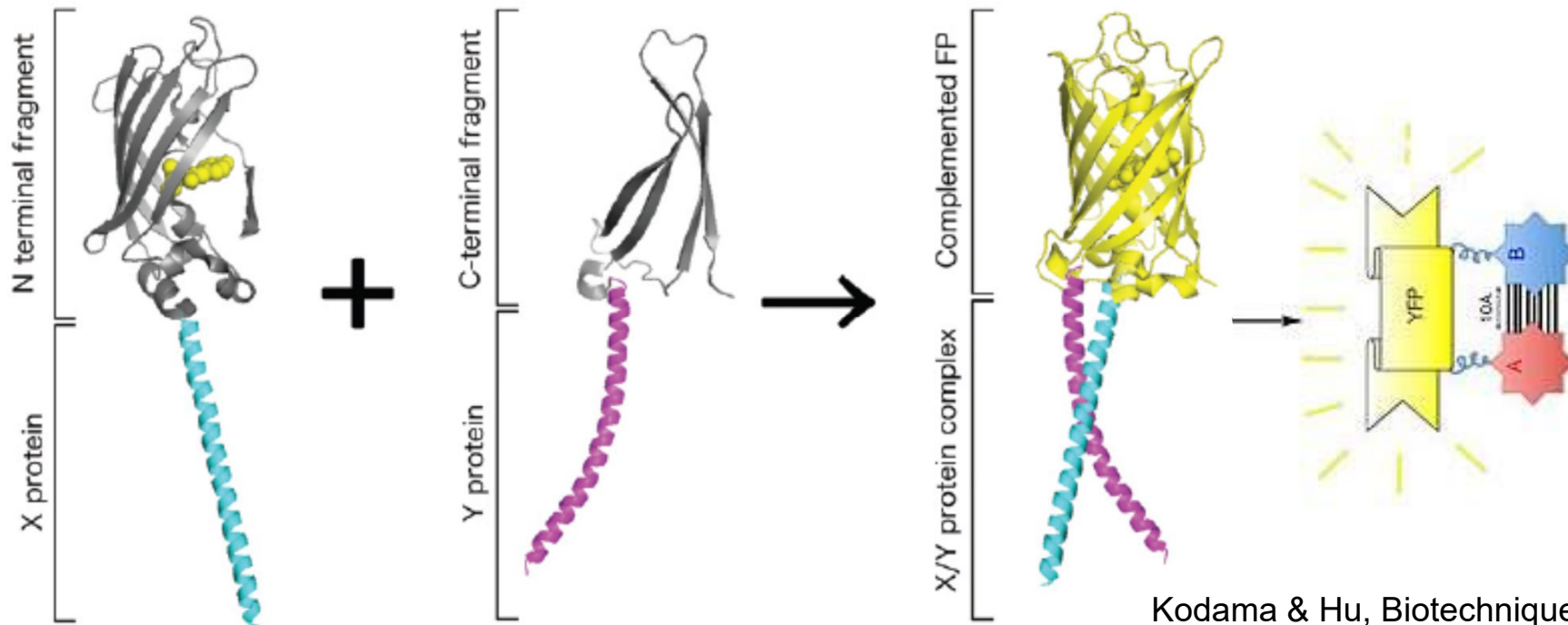
Protein-fragment complementation



Shekhat & Ghosh, CO in ChB, 2011

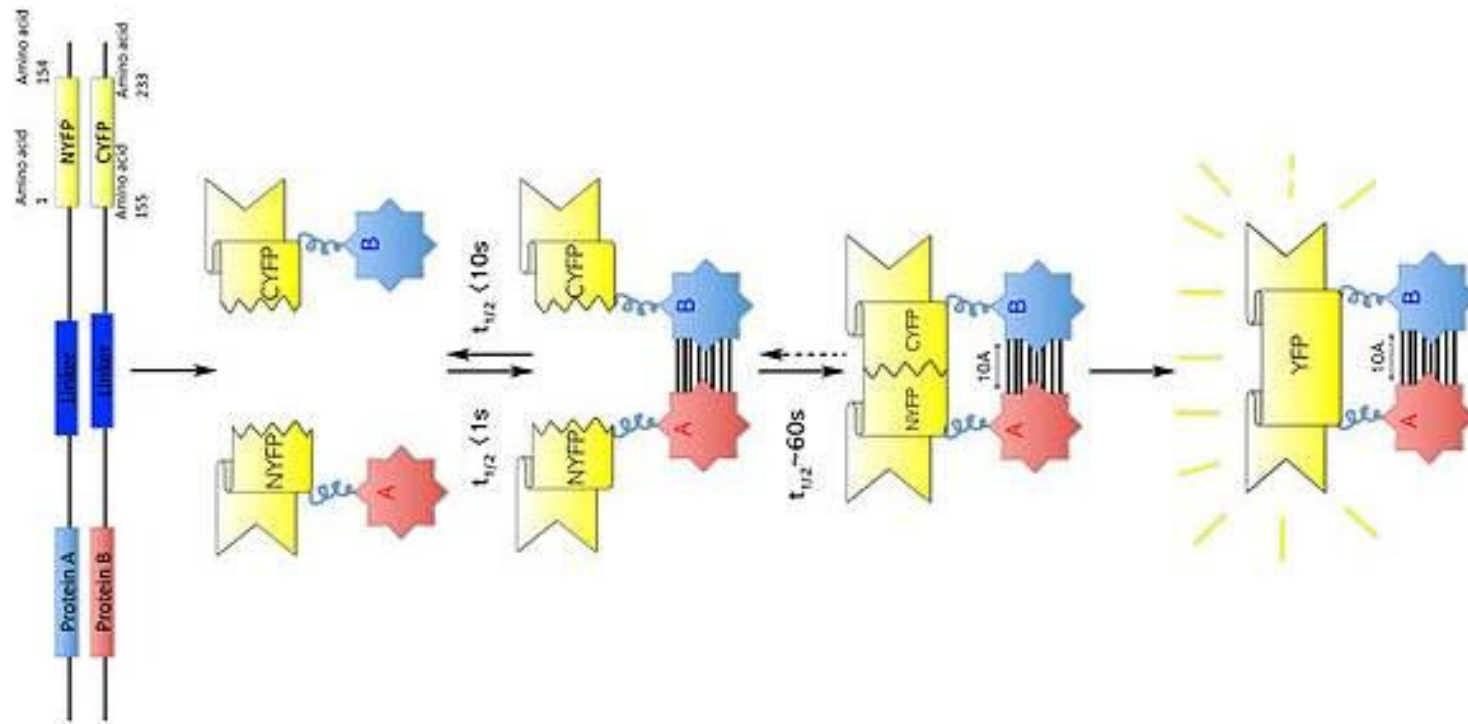
Current Opinion in Chemical Biology

Bimolecular fluorescence complementation - BiFC

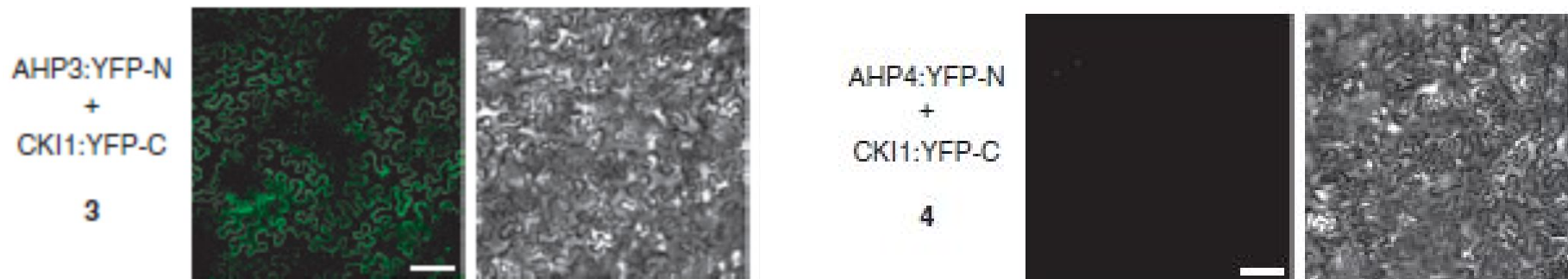


Kodama & Hu, Biotechniques, 2012

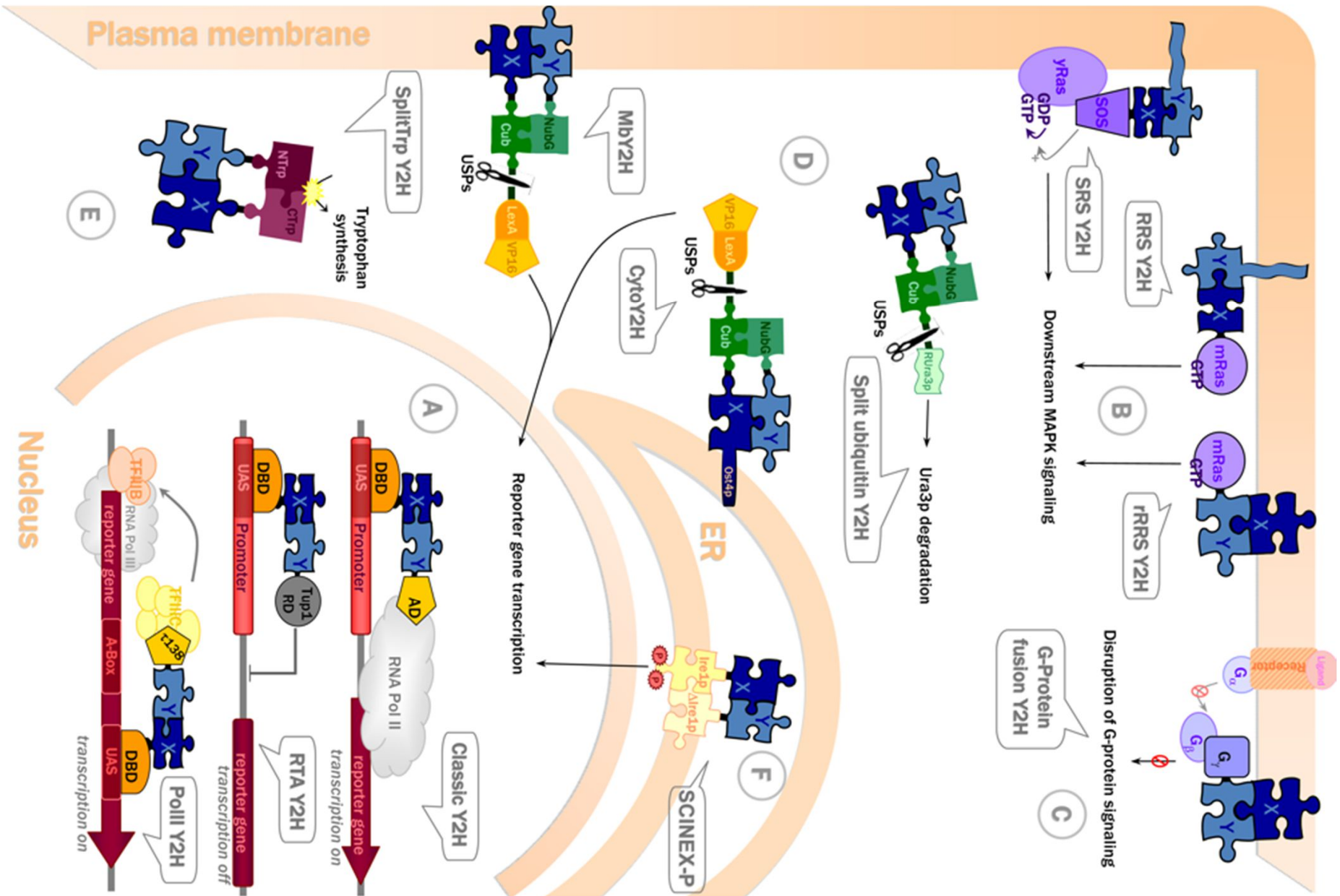
Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



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



Přehled kvasinkových PPI biotechnologií



Metody analýzy protein-proteinových interakcí

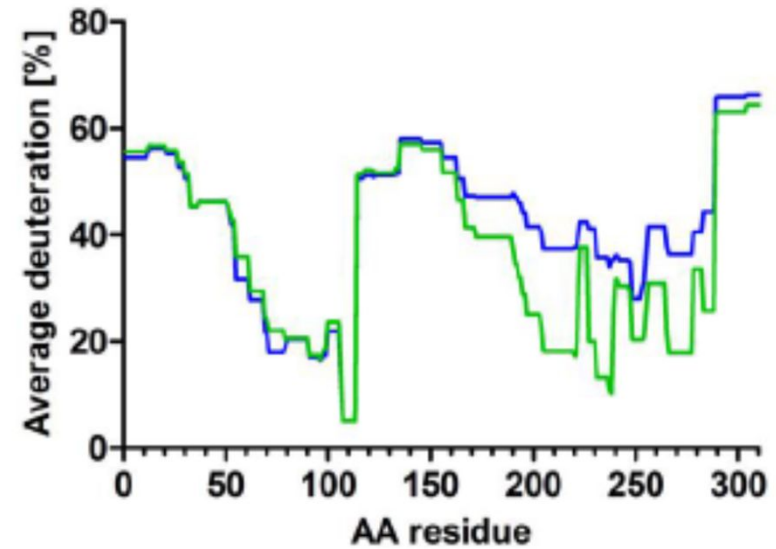
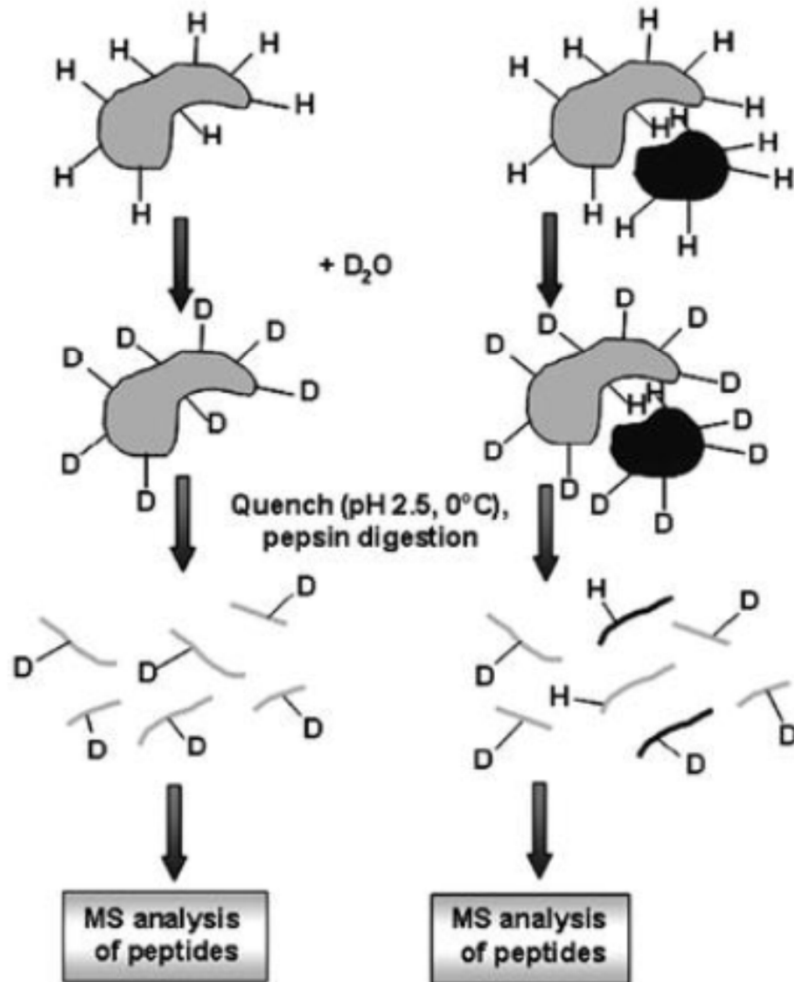
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- **MS-based:**
 - **H-exchange** ...
 - **protein painting**
 - **crosslinking** Přednáška doc. Zdráhala ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza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



Hydrogen/Deuterium Exchange (HDX)

(P. Muller, MOU)

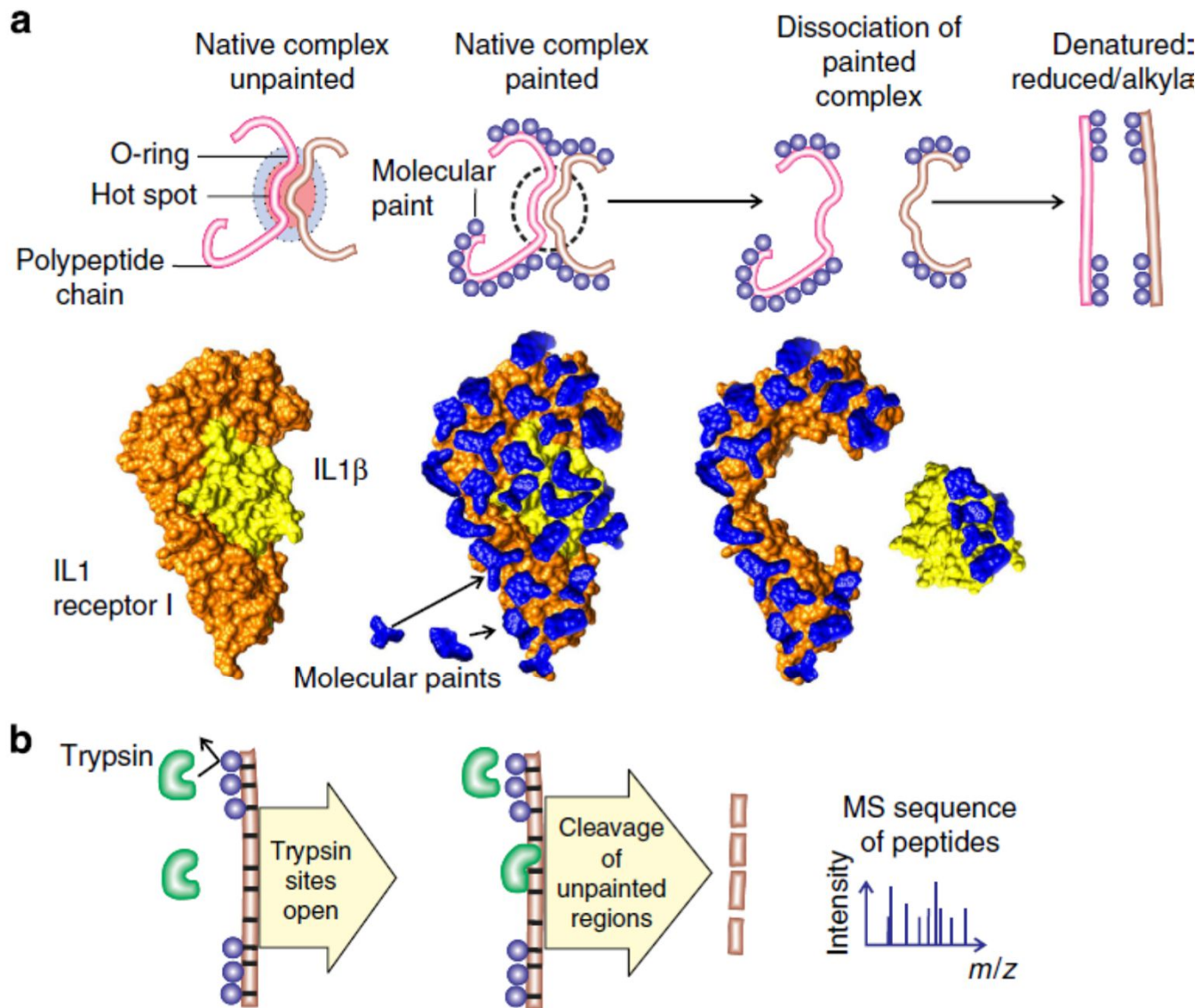
Trcka et al, JBC, 2014



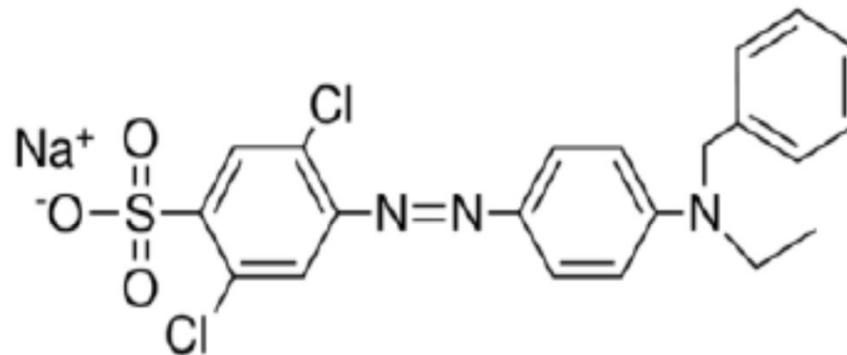
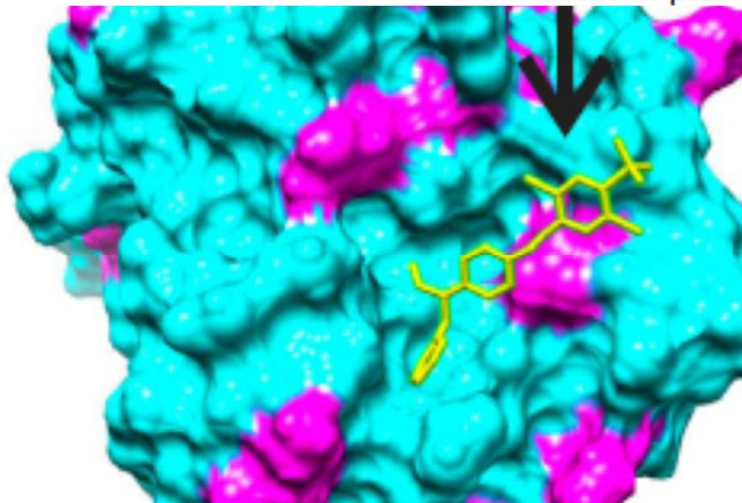
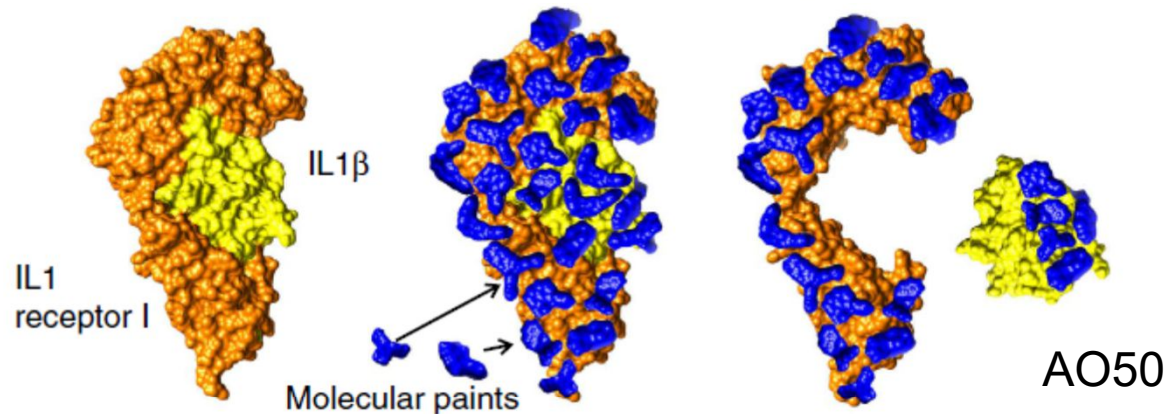
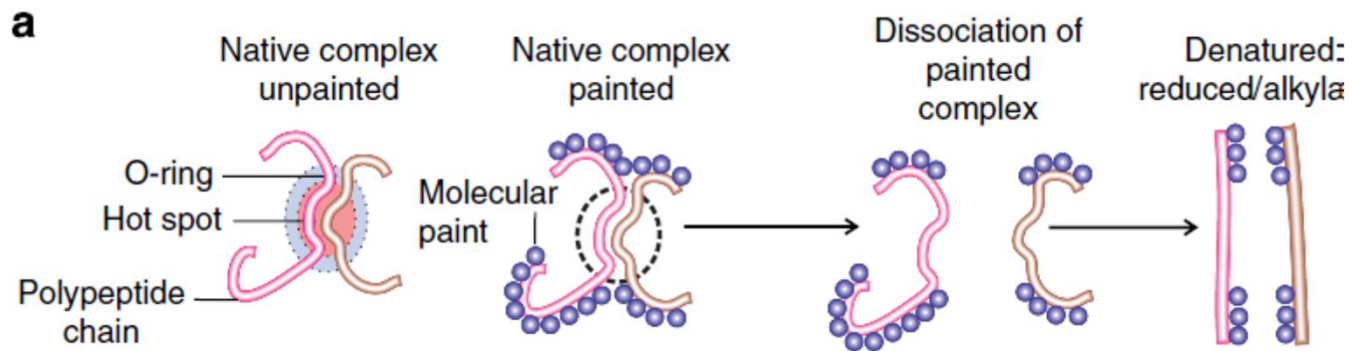
TPR TPR TPR TPR TPR TPR

— Tomm34
— Tomm34+Hsp90

Protein painting

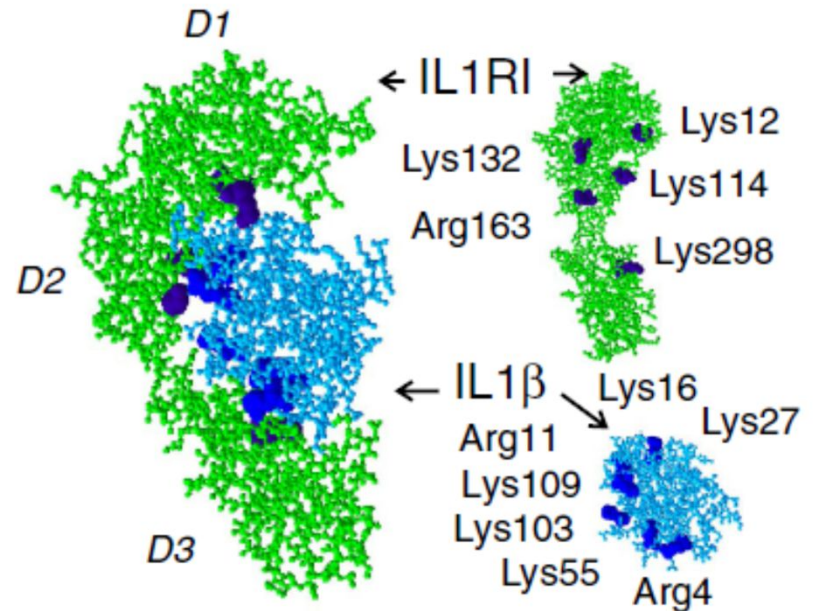
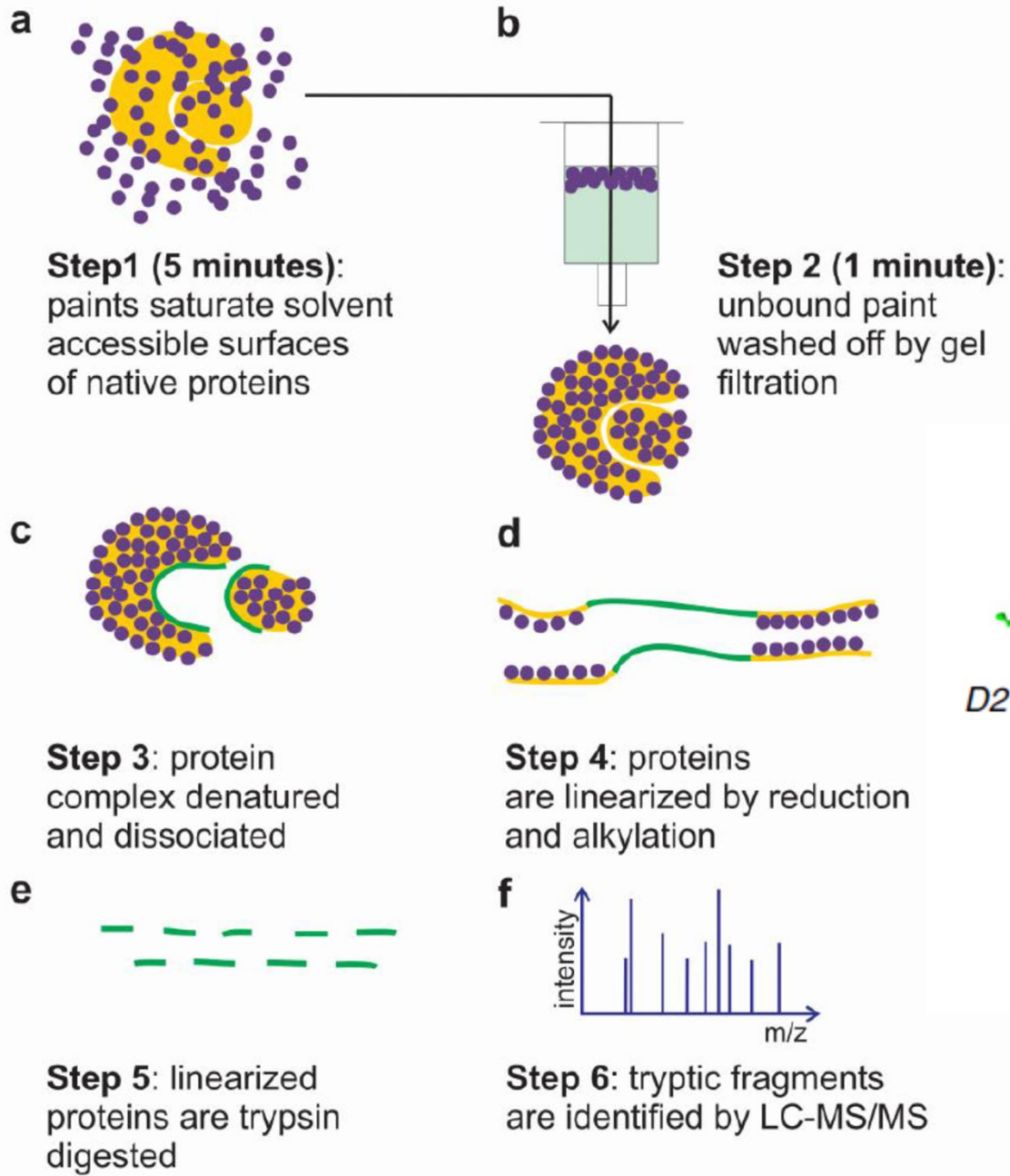


Protein painting



Pro kvalitní interpretaci dat je třeba znát 3D strukturu proteinů

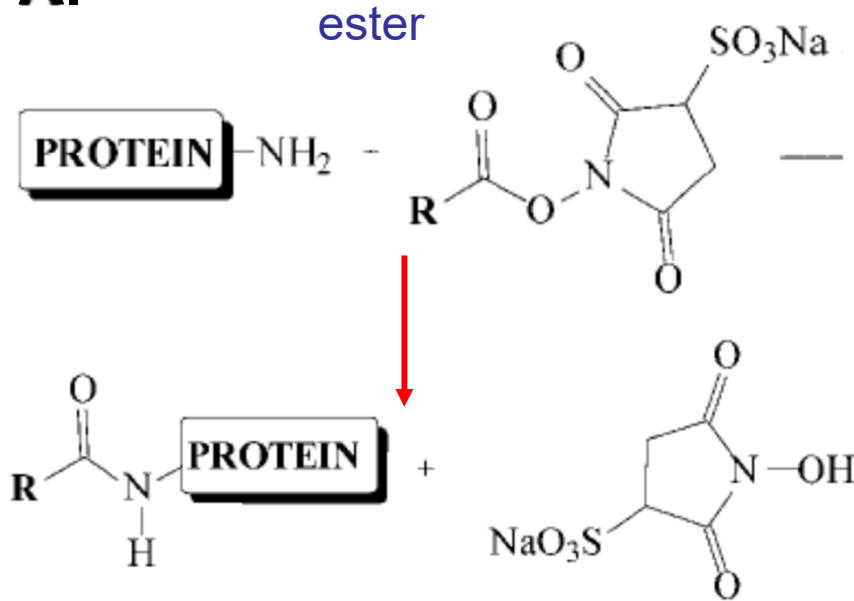
přednáška doc. Marka příště ...



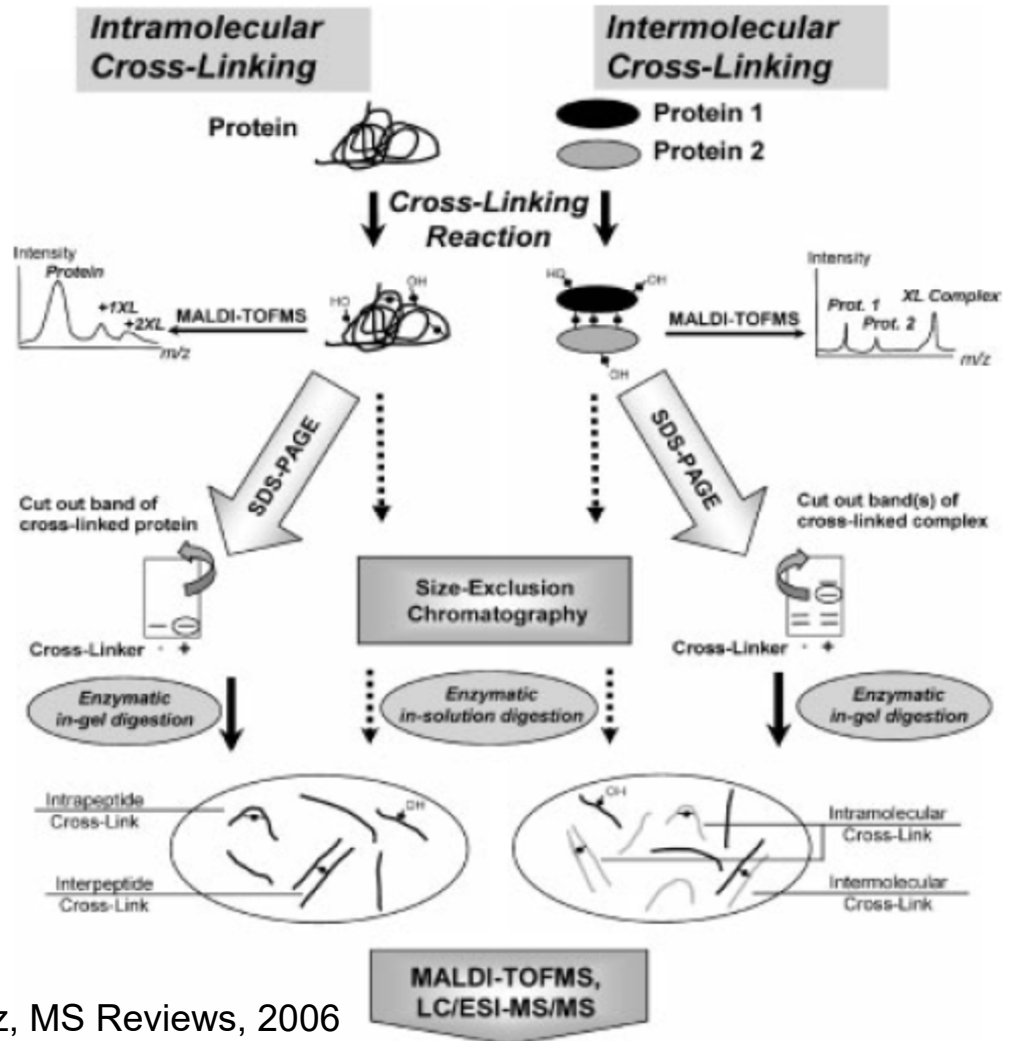
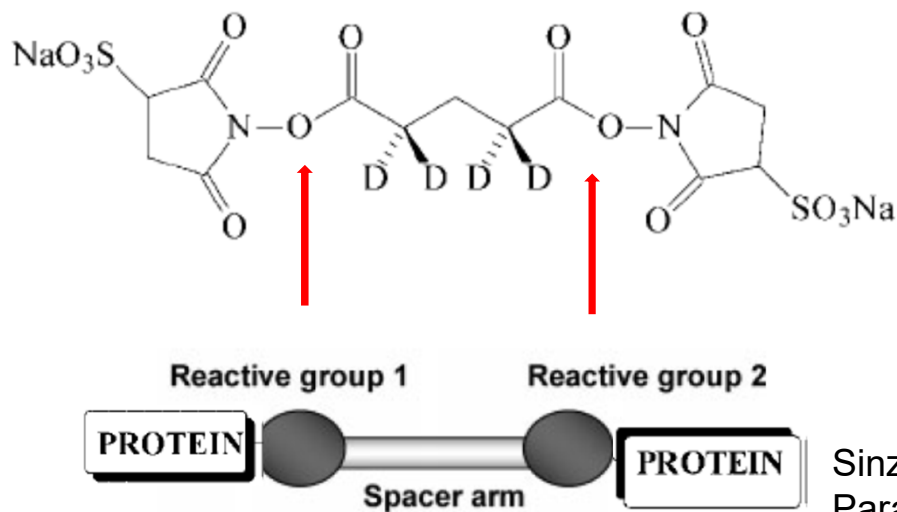
Crosslinking

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

A.



B.



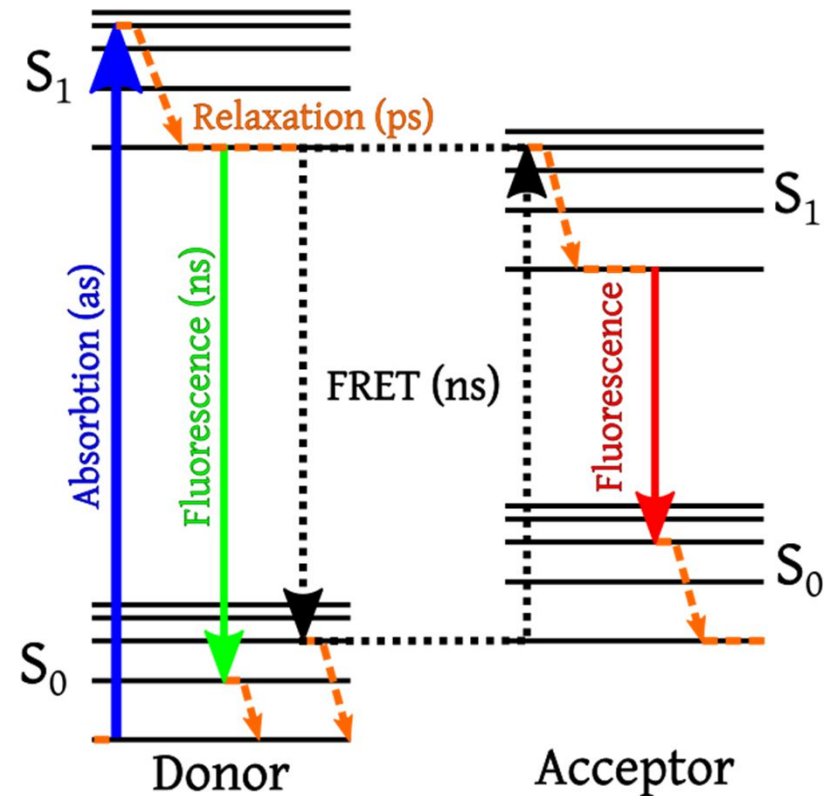
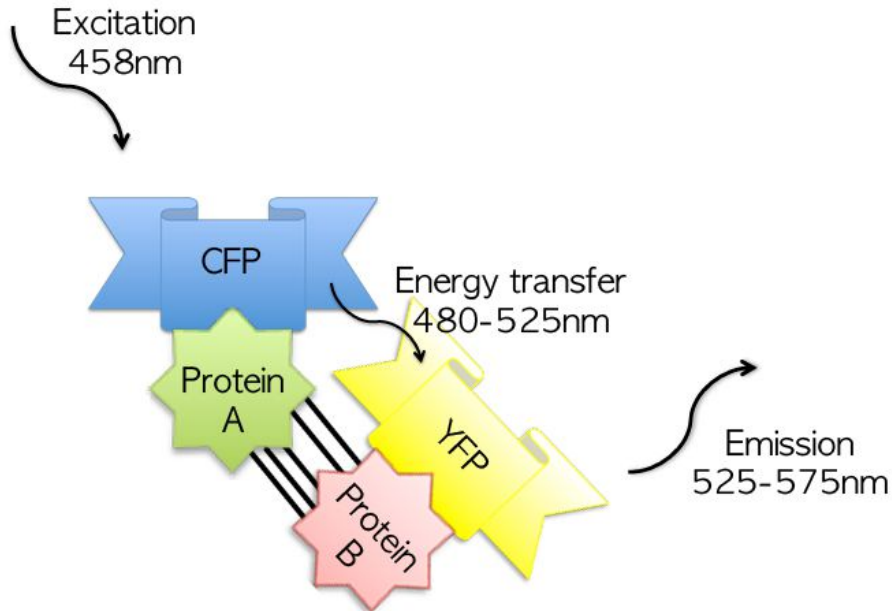
Sinz, MS Reviews, 2006
 Paramelle et al, Proteomics, 2013

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- MS-based: painting, H-exchange ...
- **proximity-based**
 - **FRET**
 - **PLA**
- 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

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.

test

- **1. Alanine scan spočívá v:**
 - A. postupném nahrazování (mutagenesi) AMK alaninem?
 - B. postupném nahrazování (mutagenesi) alaninu bazickými AMK ?
 - C. hledání alaninu v sekvencích interakčních partnerů?
 - D. specifickém „scanning“ proteomických dat?
- **2. Klasický kvasinkový dvou-hybridní systém využívá principu:**
 - A. reaktivace fluorescence GFP proteinu?
 - B. reaktivace transkripčního faktoru (většinou Gal4)?
 - C. reaktivace enzymu DHFR?
 - D. reaktivace signální dráhy Ras?
- **3. Při cíleném „crosslink“ proteinů pomocí BMOE:**
 - A. se kovalentně spojí SH skupiny cysteinů a vznikne disulfidický můstek?
 - B. se kovalentně spojí SH skupiny cysteinů s crosslinkerem?
 - C. se kovalentně spojí NH₂ skupiny lysinů s crosslinkerem?
 - D. se nekovalentně spojí opačně nabitě AMK?
- **4. Metoda FRET využívá principu:**
 - A. reaktivace transkripčního faktoru Gal4?
 - B. reaktivace fluorescence GFP (komplementací jeho fragmentů)?
 - C. přiblížení fluoroforu (např. CFP), který emituje světlo o vlnové délce odpovídající absorpčnímu spektru druhého fluoroforu (např. YFP)?
 - D. fluorescenční resonance etanu?
- testy předat příště přednášejícímu nebo poslat na můj E-mail: jpalecek@sci.muni.cz