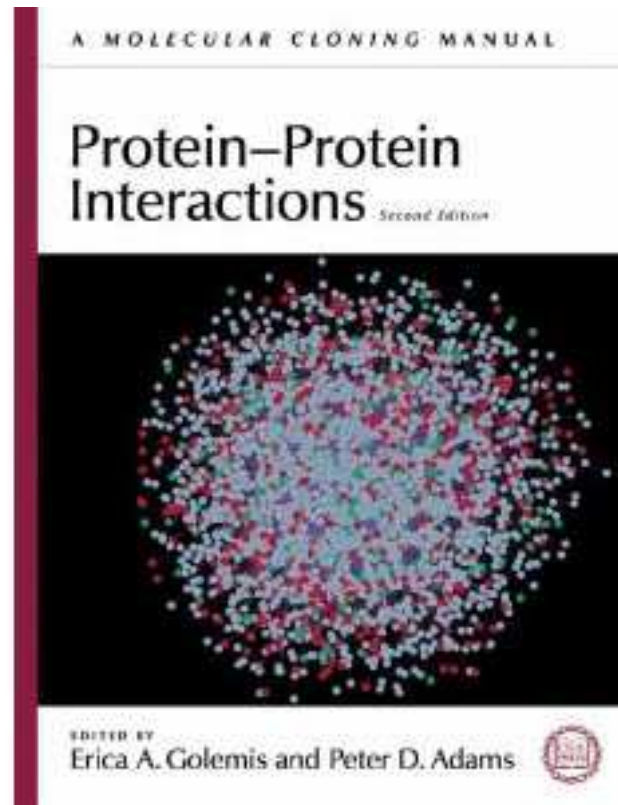


Informační zdroje

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)

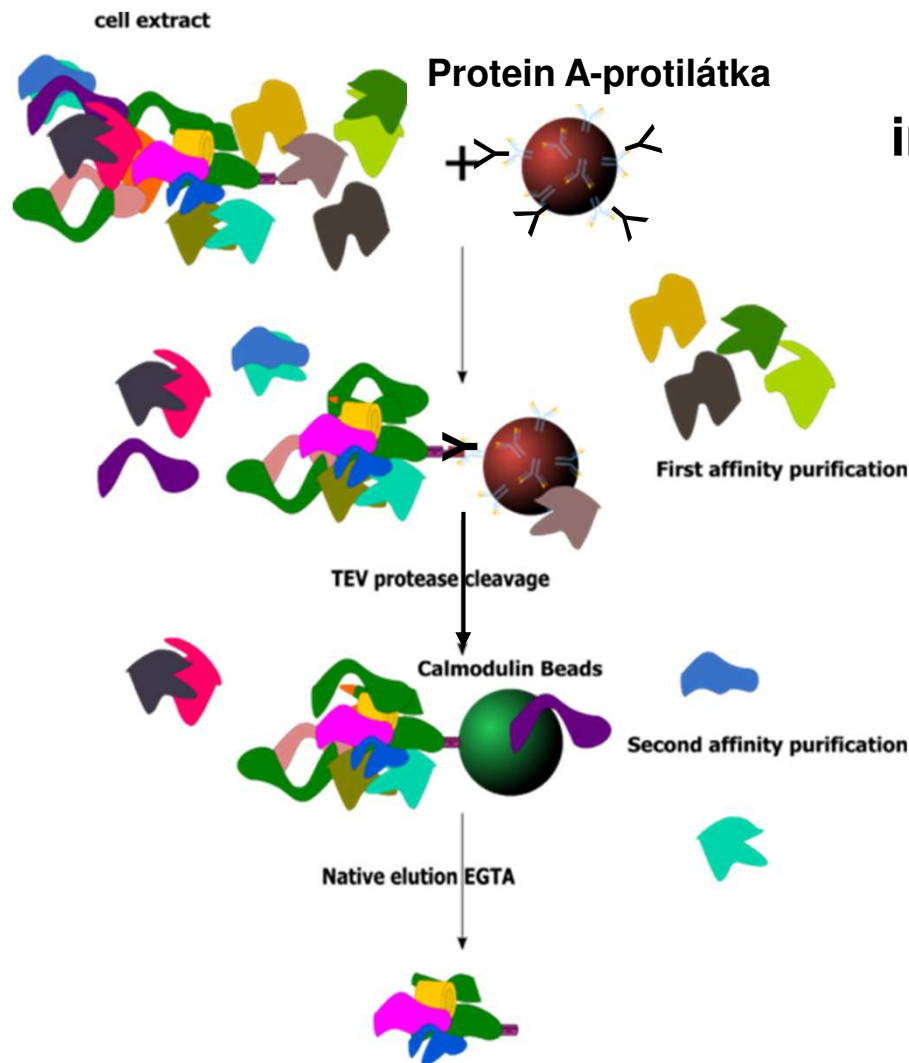


Tagy (a protilátky):
Myc, FLAG, V5, S-tag, Streptactin
 (biotin-streptavidin),
<<GFP, GST, MBP

...

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	$10^{-14/-17}$

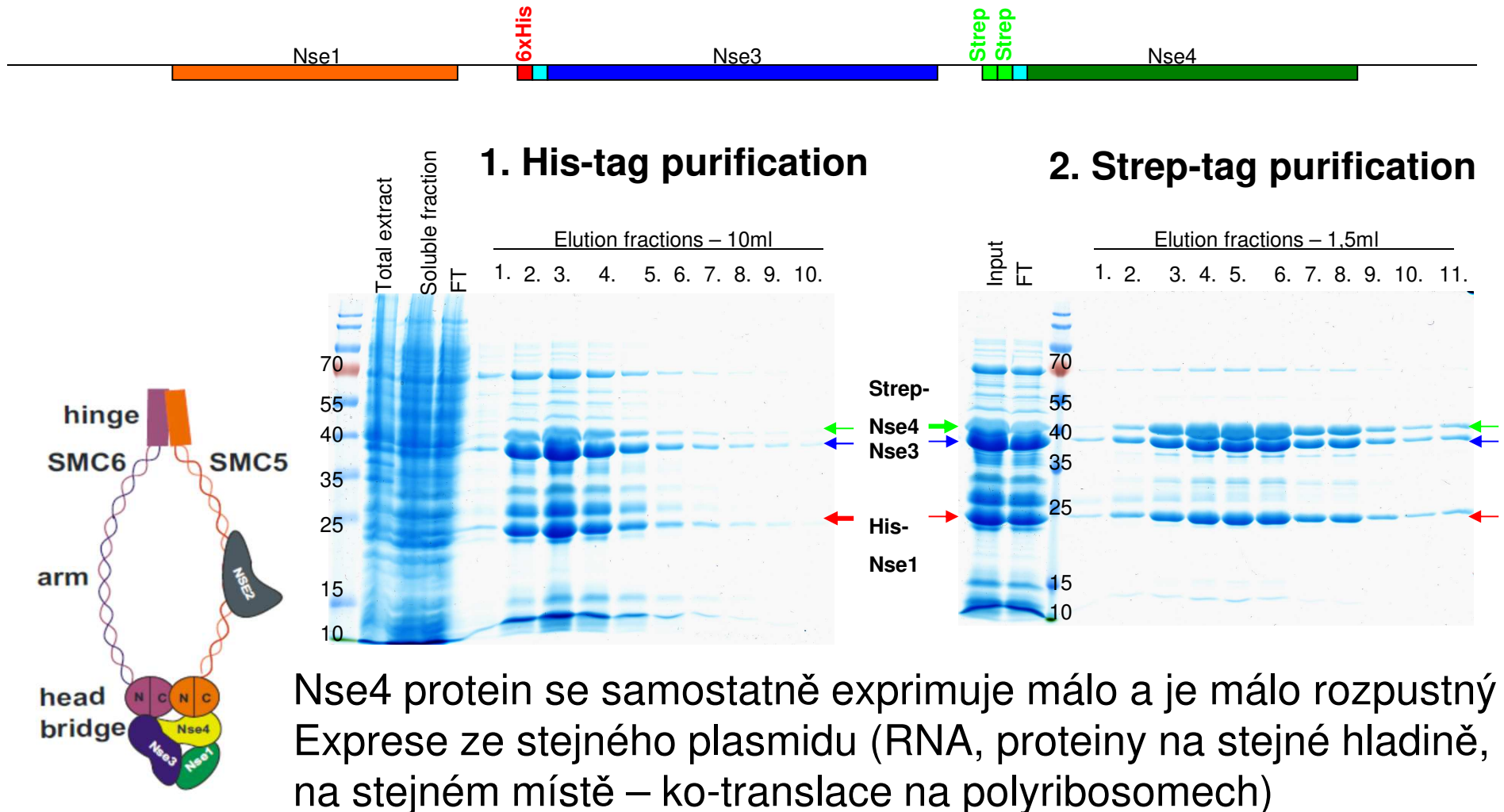


Hybridní!

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

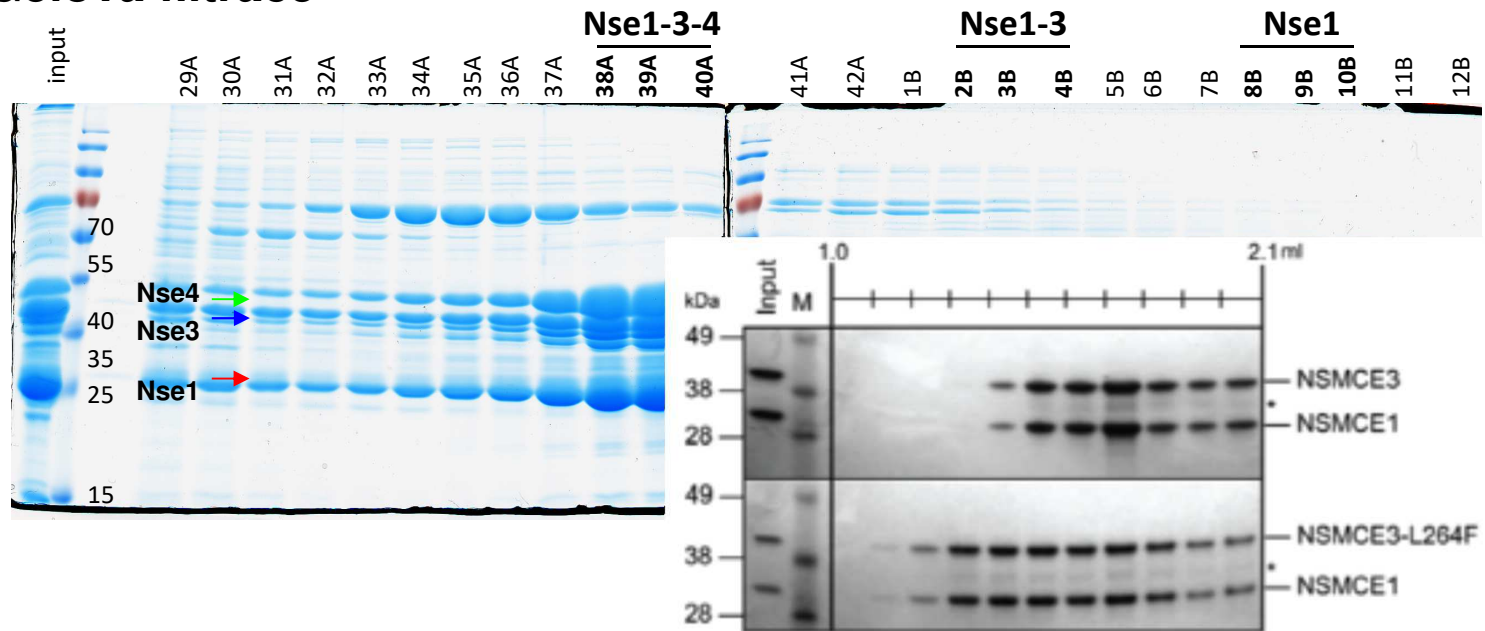
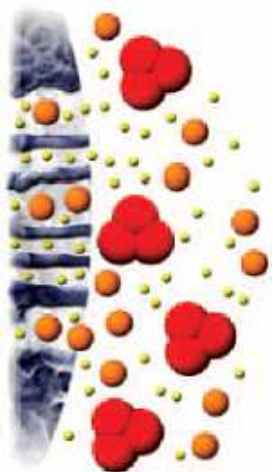
Ko-purifikace

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

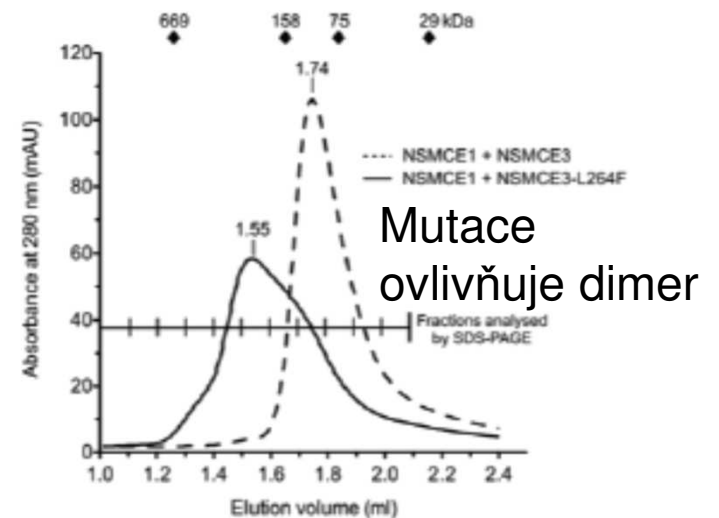
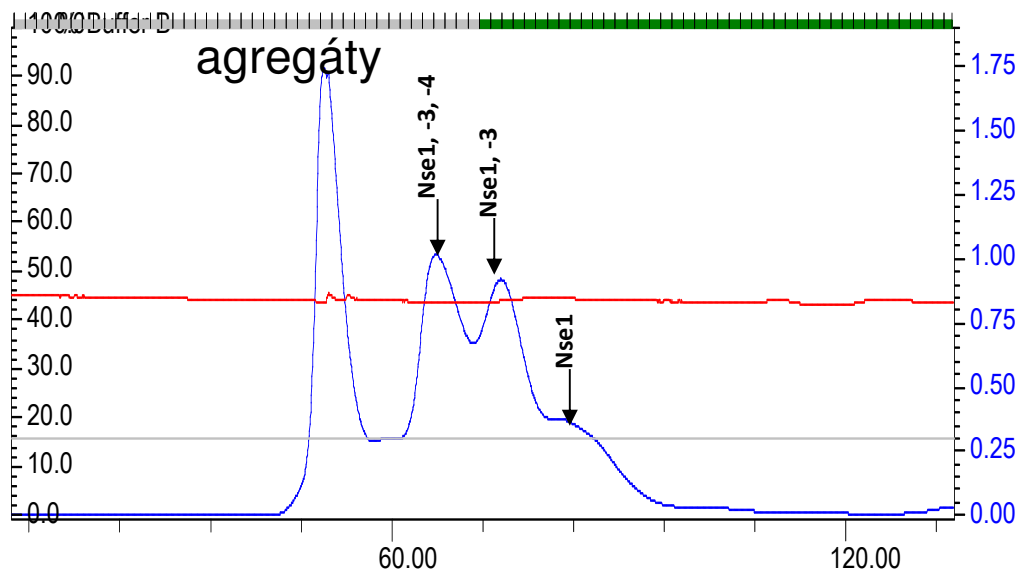


Ko-purifikace

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



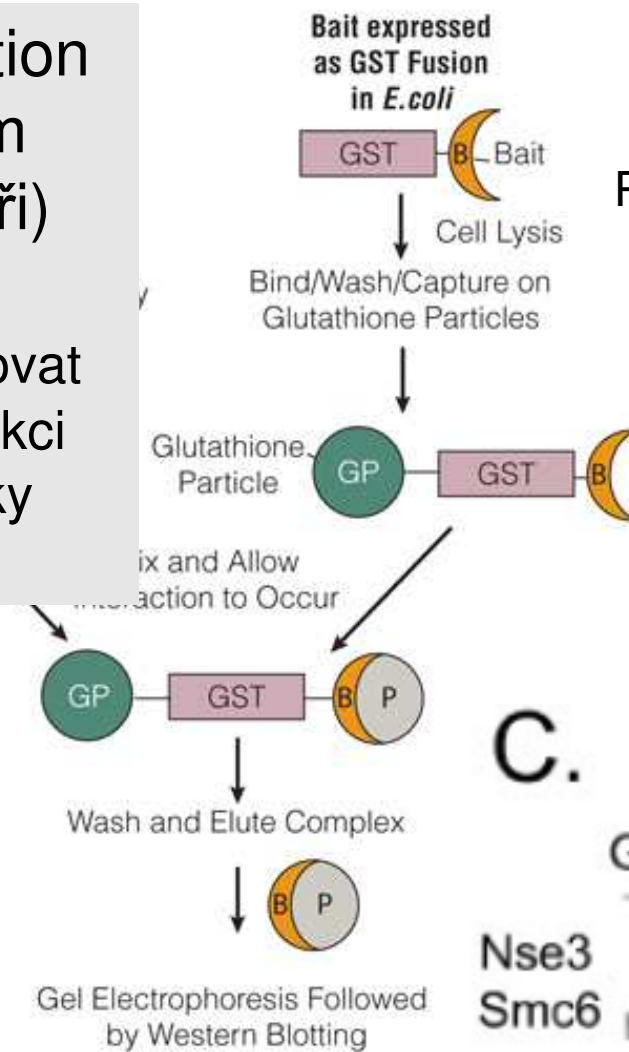
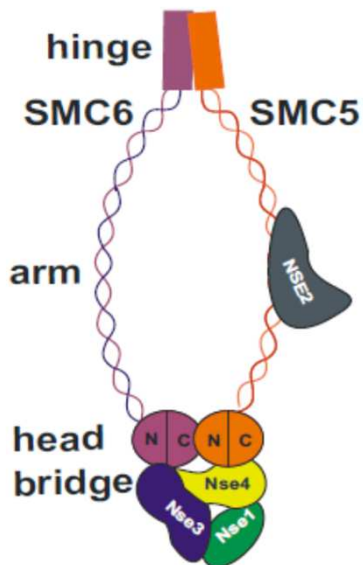
Van Crabben et al, JCI, 2016

Pull-down (variance)

Podobný princip jako při ko-purifikaci

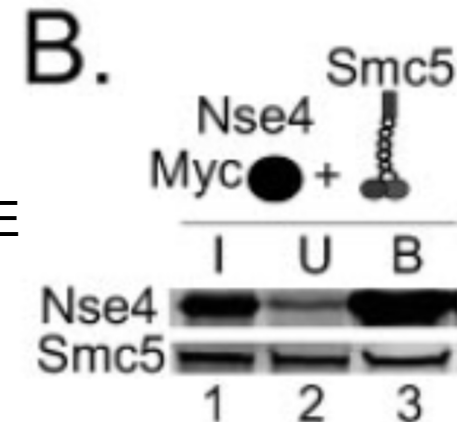
***in vitro* TNT (Transcription and Translation)** systém methionin S³⁵ (2 partneri)
výhody:

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



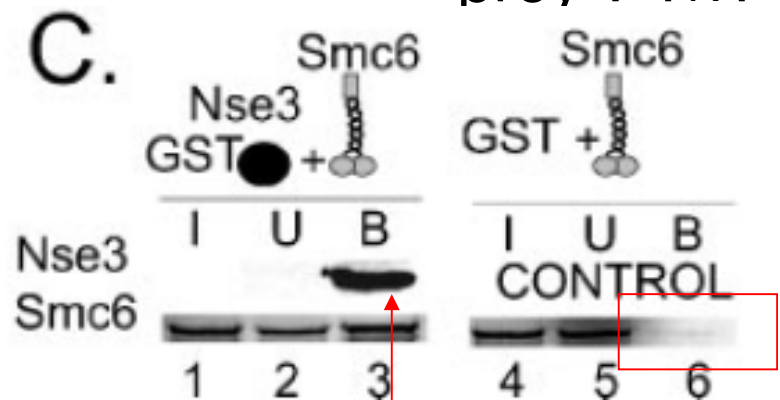
Palecek et al, JBC, 2006

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



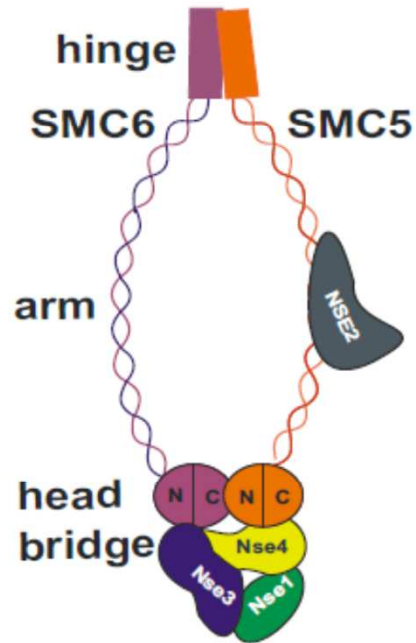
PAGE

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



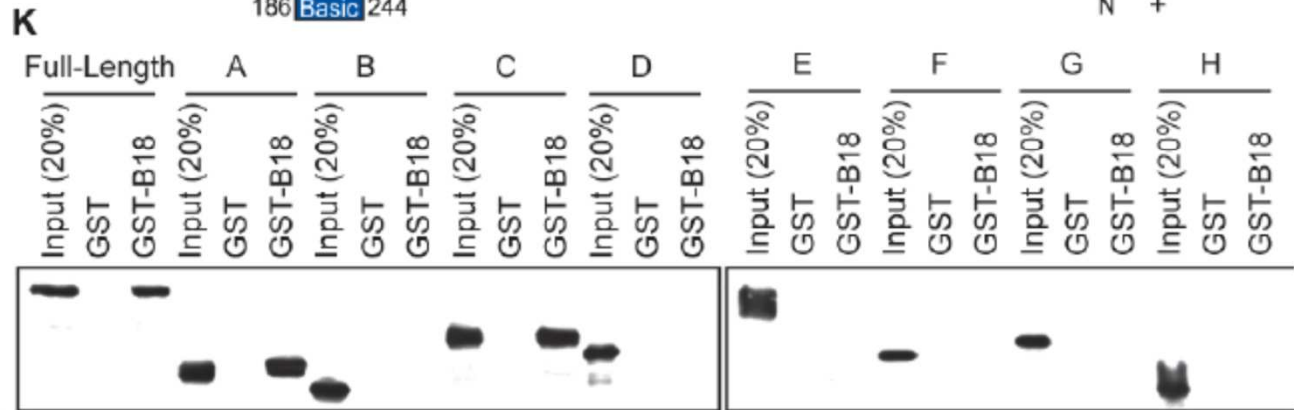
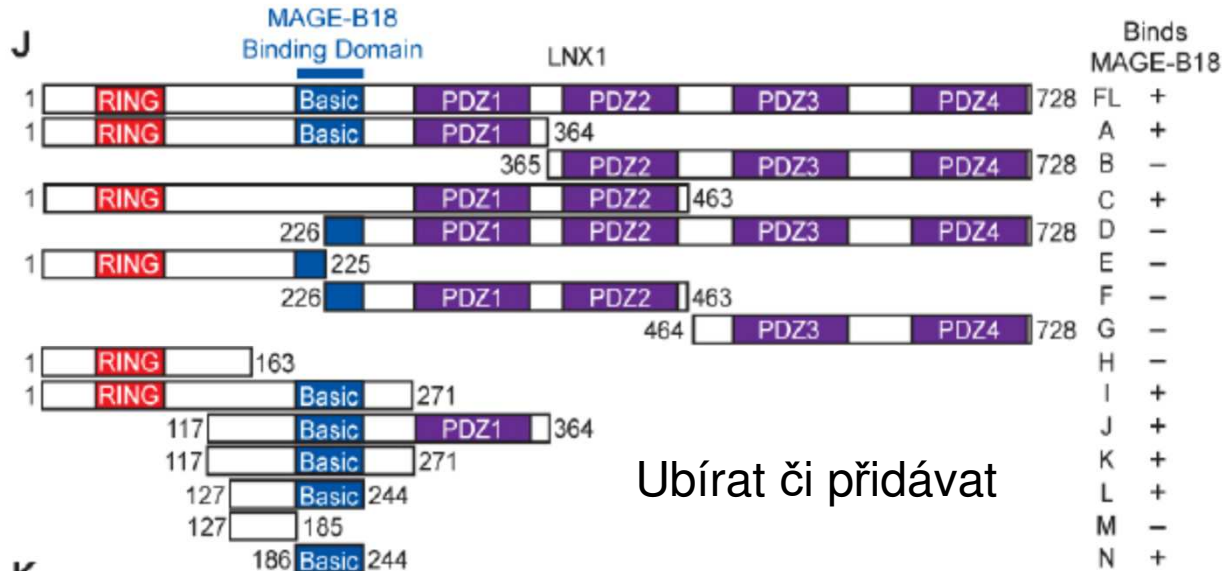
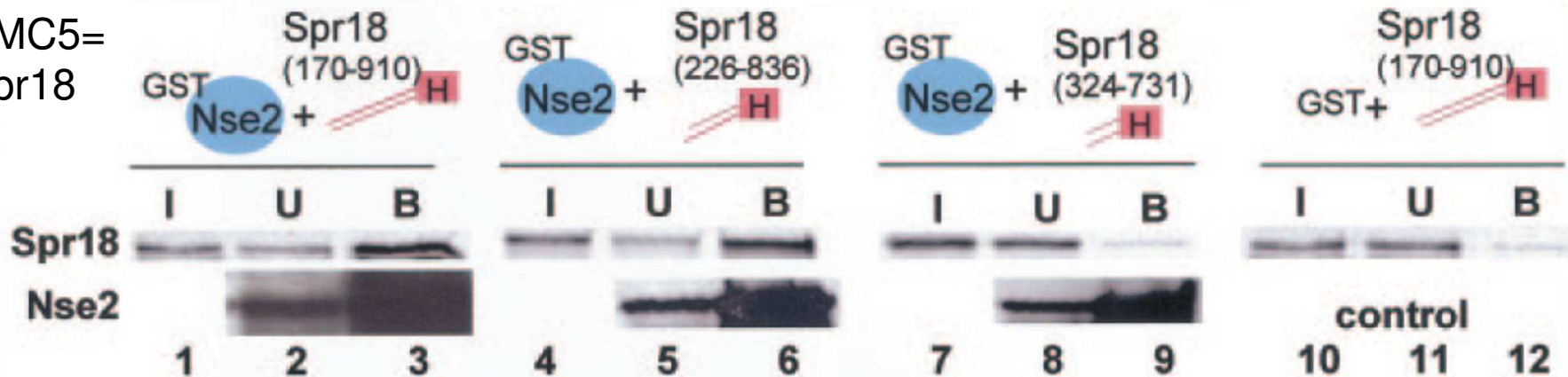
PAGE => Western (anti-GST)

Charakterizace interakcí - domény



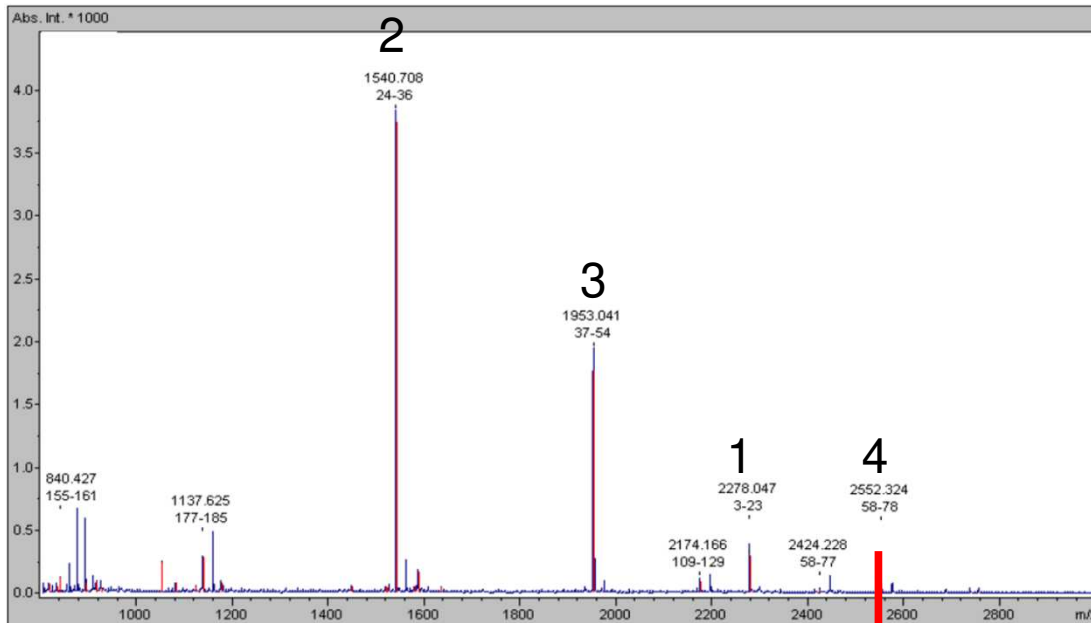
Sergeant et al, MCB, 2005
Doyle et al, Mol Cell, 2010

SMC5= Spr18

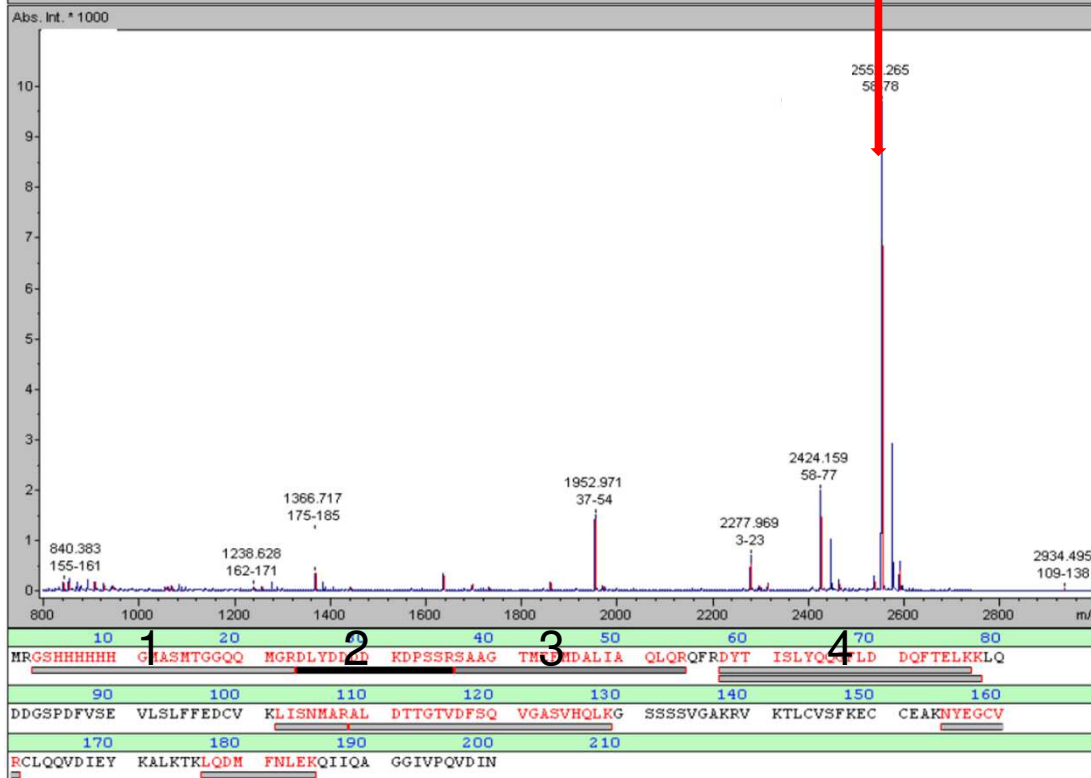


Charakterizace interakcí – detailní mapování

MS spektrum celého proteinu
(normální pokrytí sekvence)

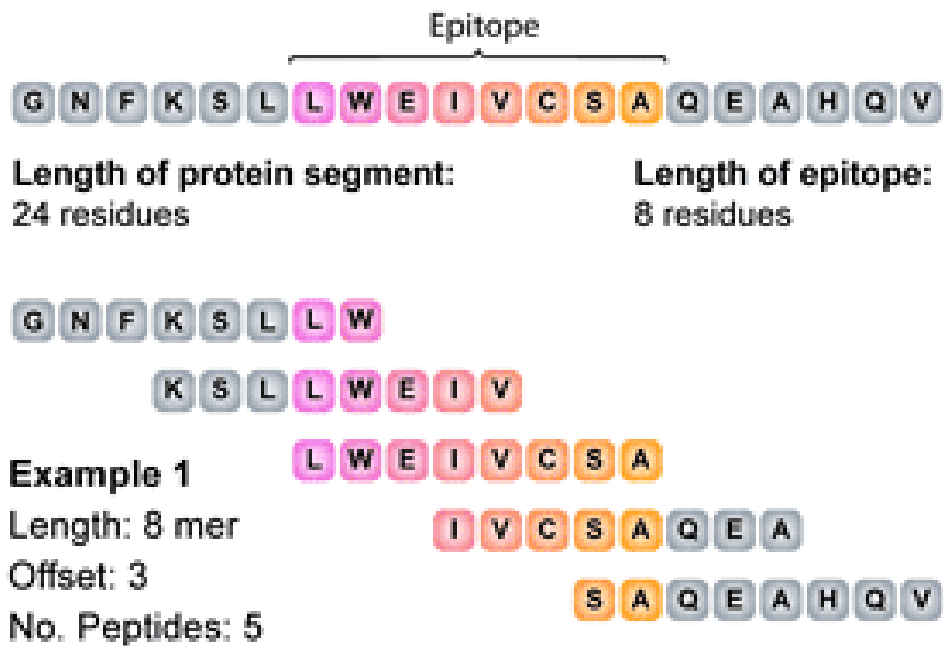
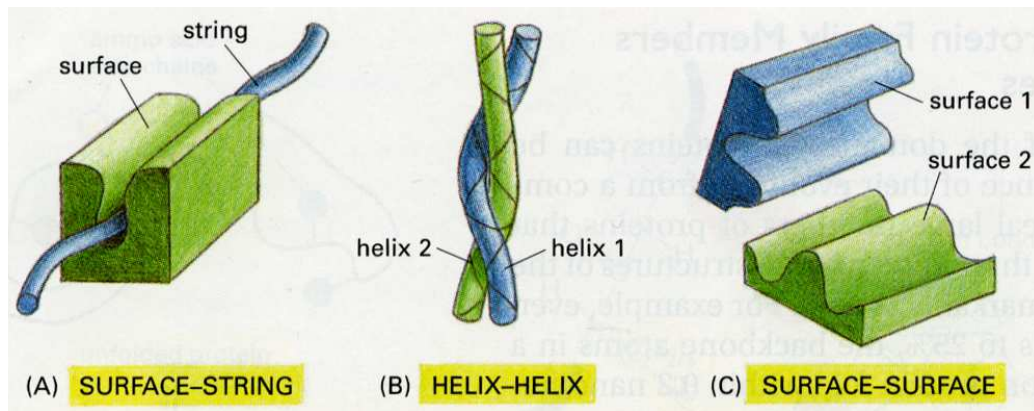


MS spektrum precipitátu
(obohacená interakční část)
P. Reichman (Diplomová práce)



Další MS metody dále ...

Peptidové mapování



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

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

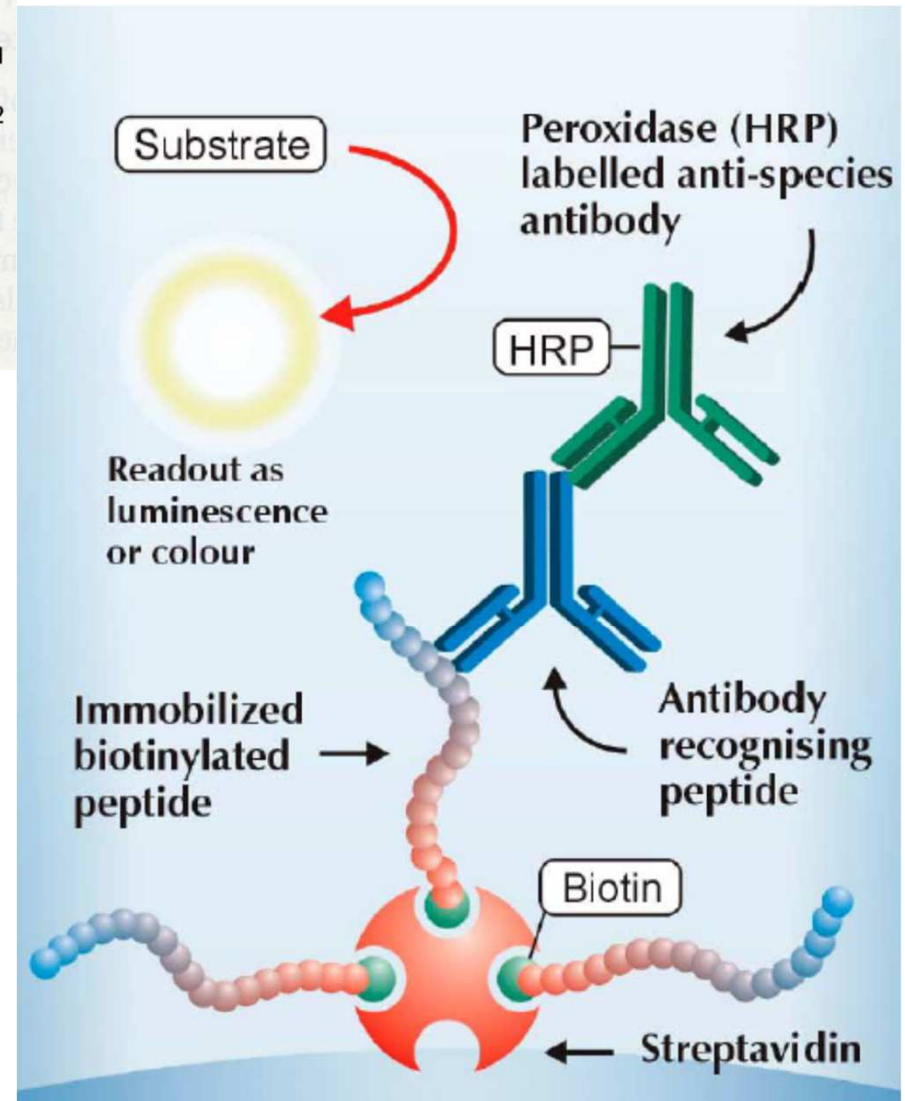


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Charakterizace interakcí – pe

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

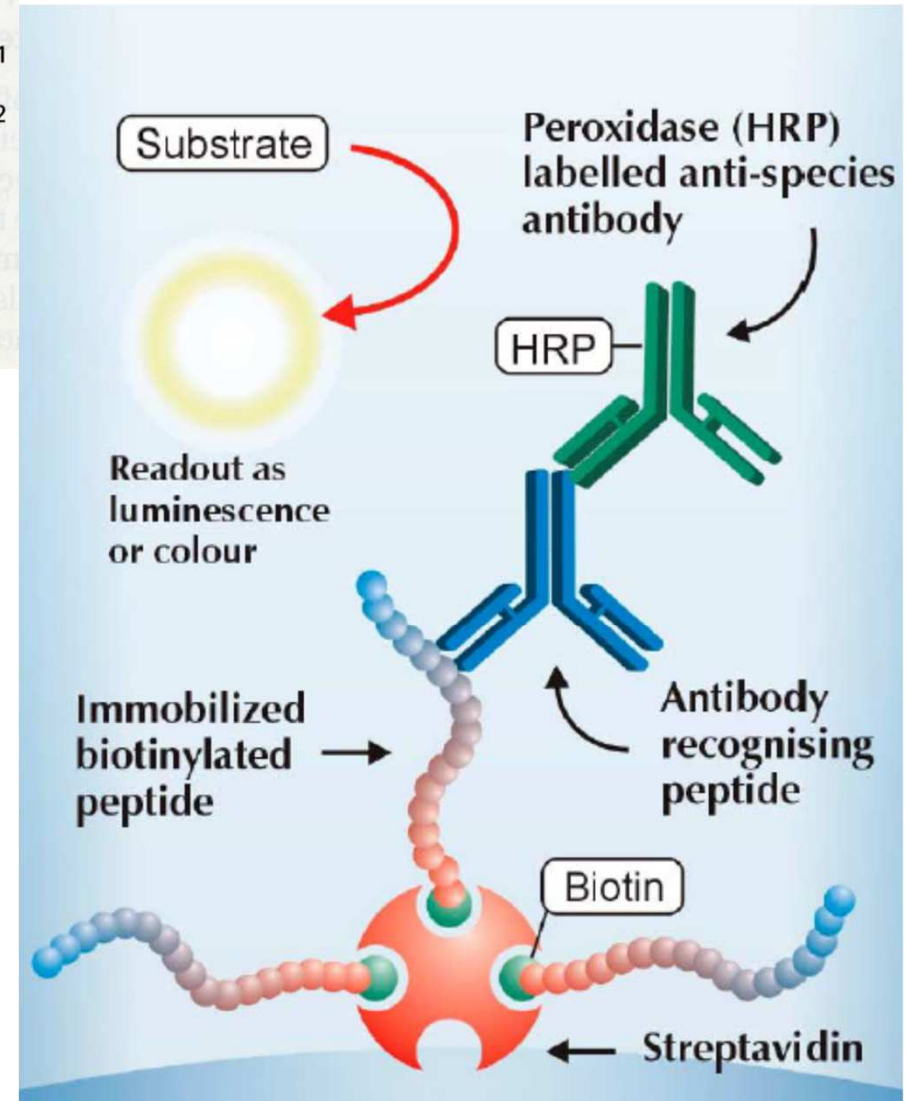
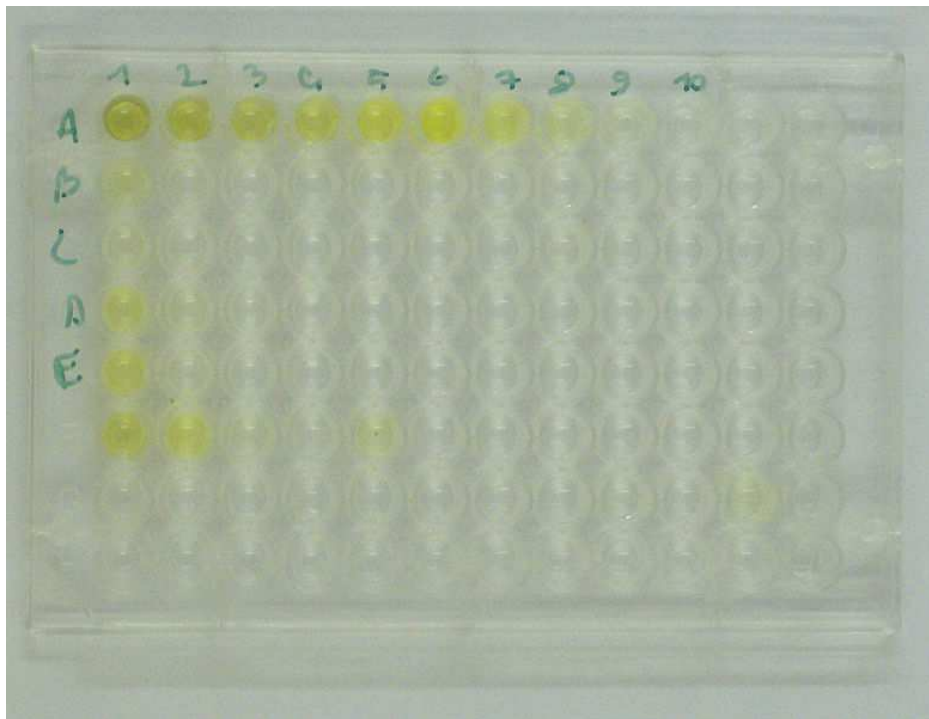
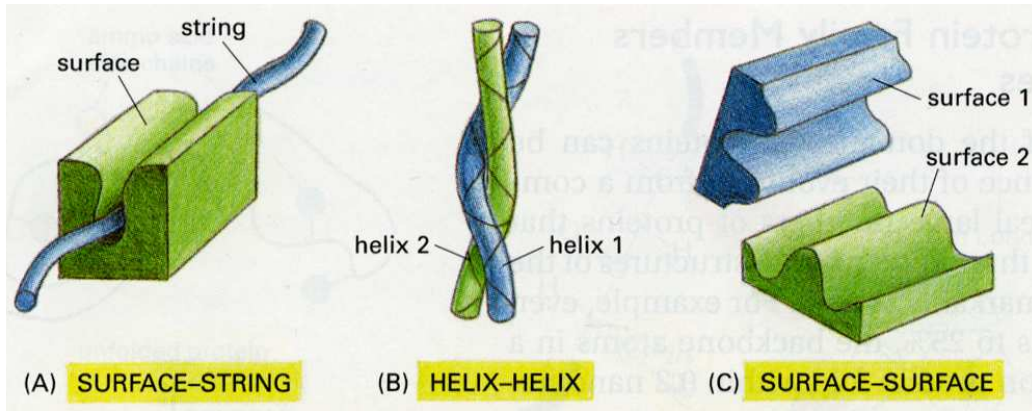


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Peptidové mapování

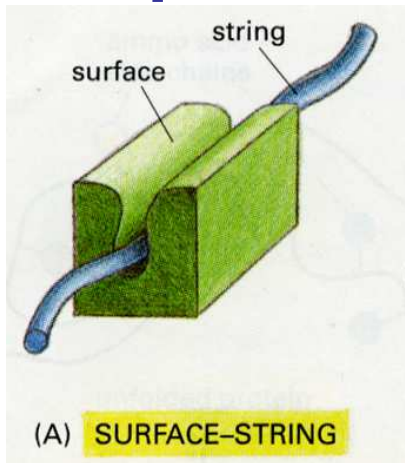
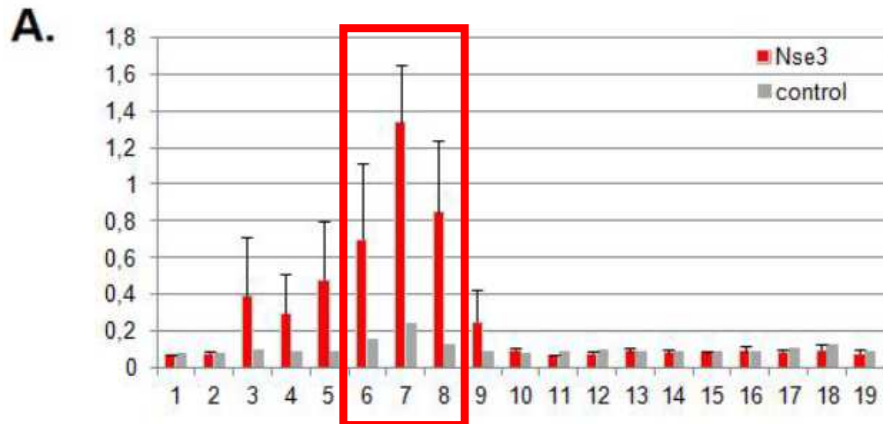


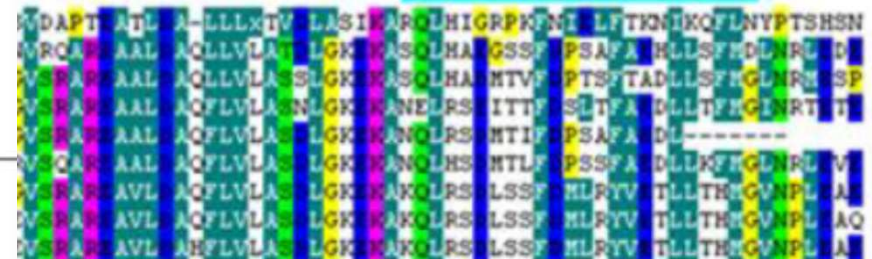
Table 3. *S. pombe* Nse4 synthetic peptides list
Nse4 peptidy

	peptide 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.

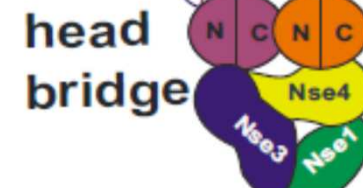
#6 aa70-94-----SIKARQLHIGRPKFNIELFTKNIKQ
 #7 aa74-98-----RQLHIGRPKFNIELFTKNIKQFLNY
 #8 aa78-102-----IGRPKFNIELFTKNIKQFLNYPTSH

Analýza Nse3-Nse4 interakce

Délka: 25 AMK

Posuv: 5 AMK

Knihovna: 18 peptidů



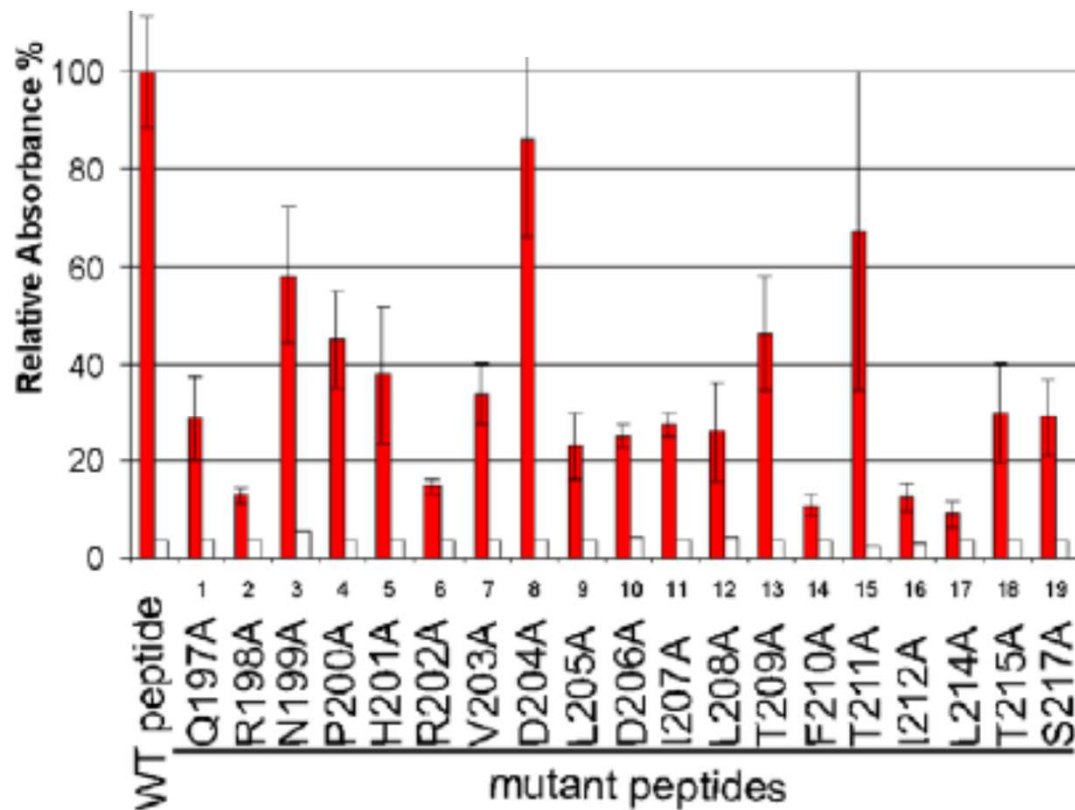
Charakterizace interakcí – „alanin scan“

EID2 peptidy (paralog Nse4)

Délka: 25 AMK

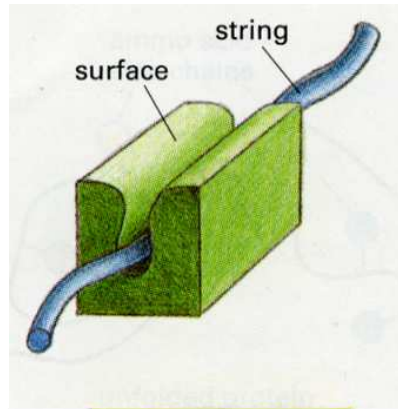
Posuv: mutace po 1 AMK

Knihovna: 20 peptidů



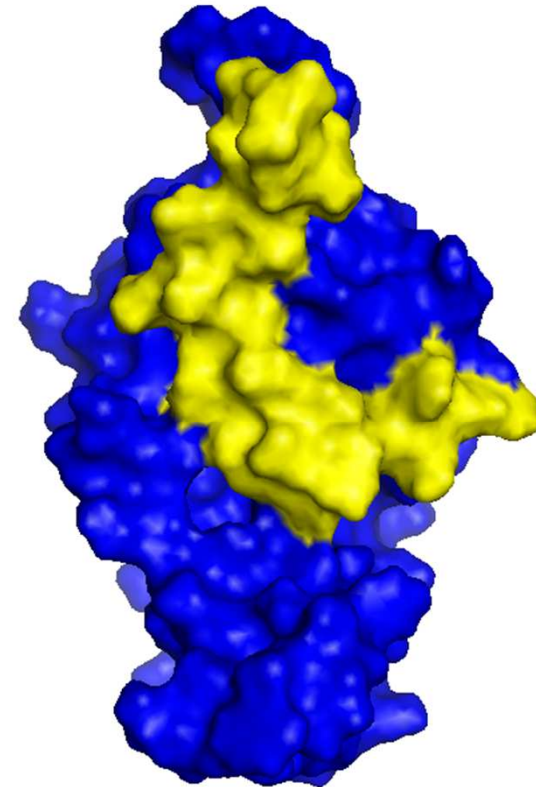
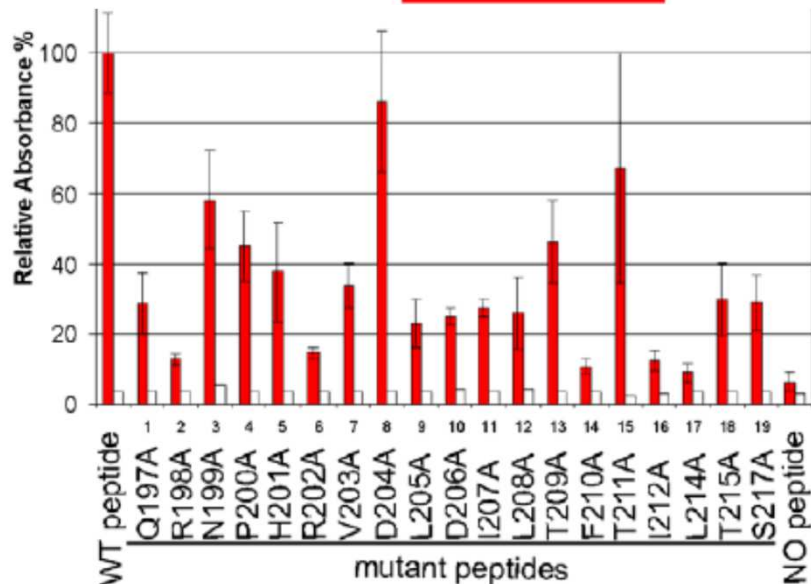
WT peptide	QRNPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #1	A RNPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #2	Q A NPHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #3	QR A PHRVLDLILTFTIALTAS
peptide #4	QRN A HRVLDLILTFTIALTAS
peptide #5	QRNP A RVLDLILTFTIALTAS
peptide #6	QRNPH A VLDLILTFTIALTAS
peptide #7	QRNPHR A DLILTFTIALTAS
peptide #8	QRNPHRV A LILTFTIALTAS
peptide #9	QRNPHRV D ADILTFTIALTAS
peptide #10	QRNPHRV L AILTFTIALTAS
peptide #11	QRNPHRV L DALTFTIALTAS
peptide #12	QRNPHRV L DIATFTIALTAS
peptide #13	QRNPHRV L DILAFTIALTAS
peptide #14	QRNPHRV L DILTAIALTAS
peptide #15	QRNPHRV L DILTF A IALTAS
peptide #16	QRNPHRV L DILTFT A AALTAS
peptide #17	QRNPHRV L DILTFTTIA A TAS
peptide #18	QRNPHRV L DILTFTTIAL A AS
peptide #19	QRNPHRV L DILTFTTIALTA A

Mutace - mapování interakcí



D.n. - QLNSDMSSFNEVAFCDFLFIFVGLNWMEDE
 C.f. - QLNSDMSEFNQVAFCDFFIFLVGLNWMEED
 M.m. - CLNTDMNFFNPIAFCDLLLLFVGFNWVEEE
 H.s. - QLNSDMNFFNQLAFCDFLFIFVGLNWMEGD

--- + --- +
 core
 region



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

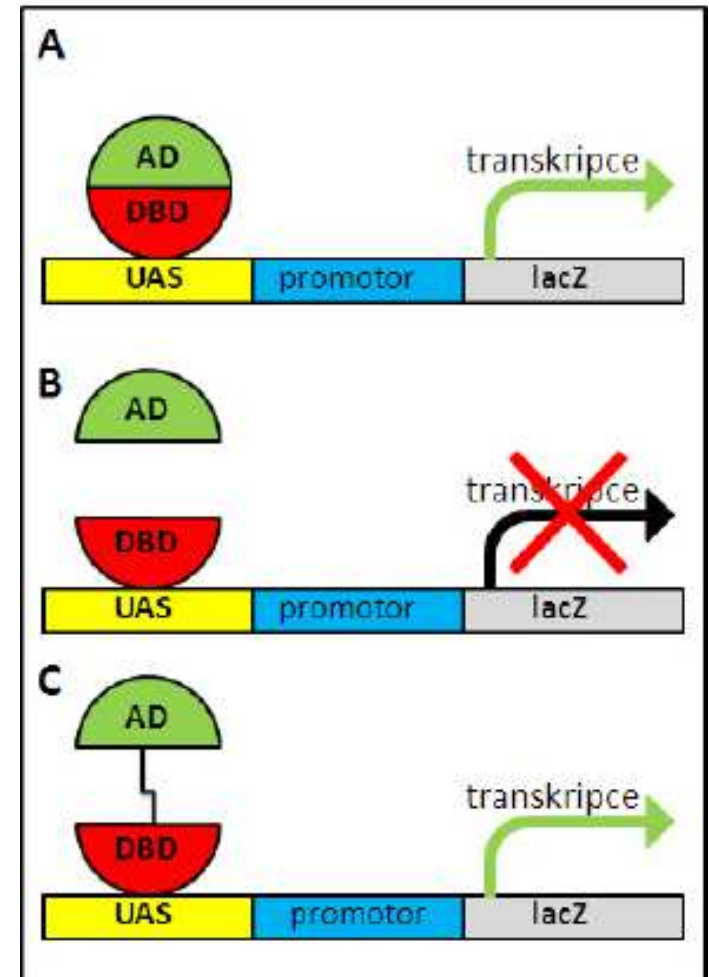
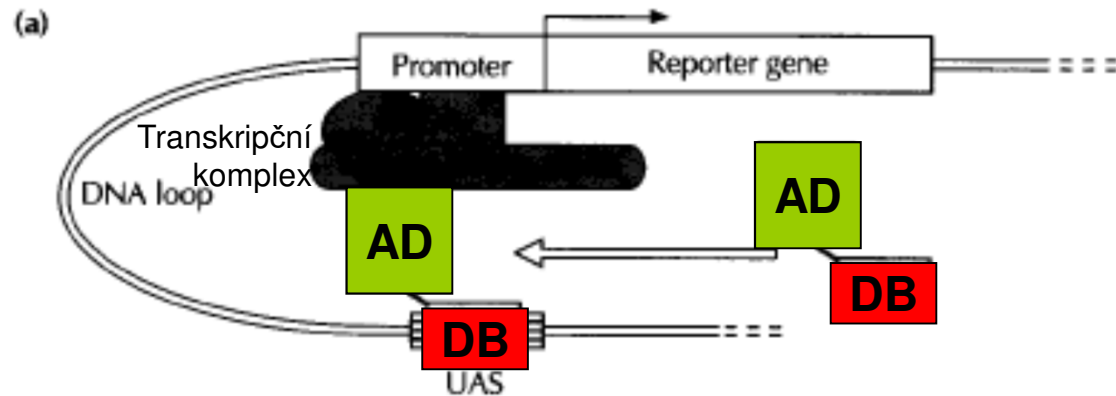
Jak je šroubovice orientována?

Mohou mutace vylepšit interakčních schopnosti?

Viz dále ...

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 ...)

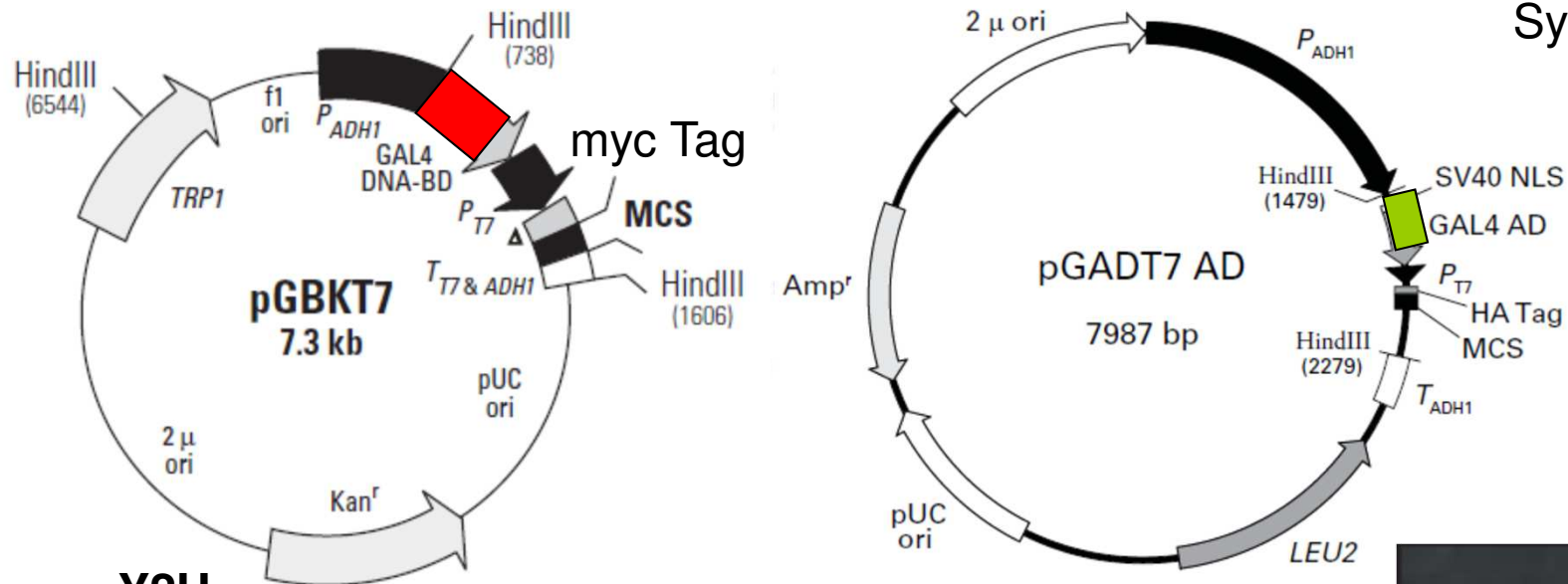


- DNA-vazebná doména (DB) bez aktivační domény (AD) není schopna aktivace transkripce
Je možné **propojit domény** jakýmkoli linkerem a transkripci reaktivovat

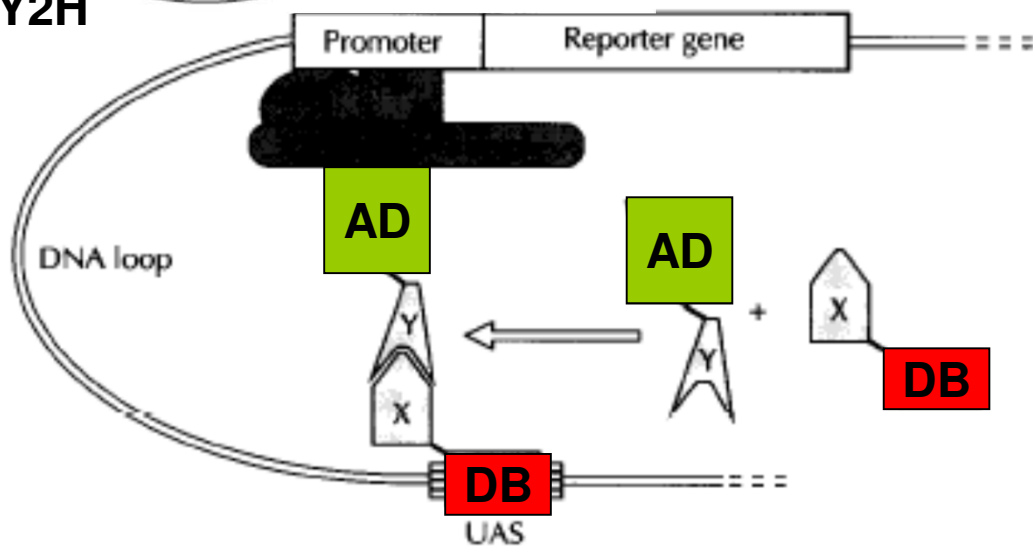
Gal4p

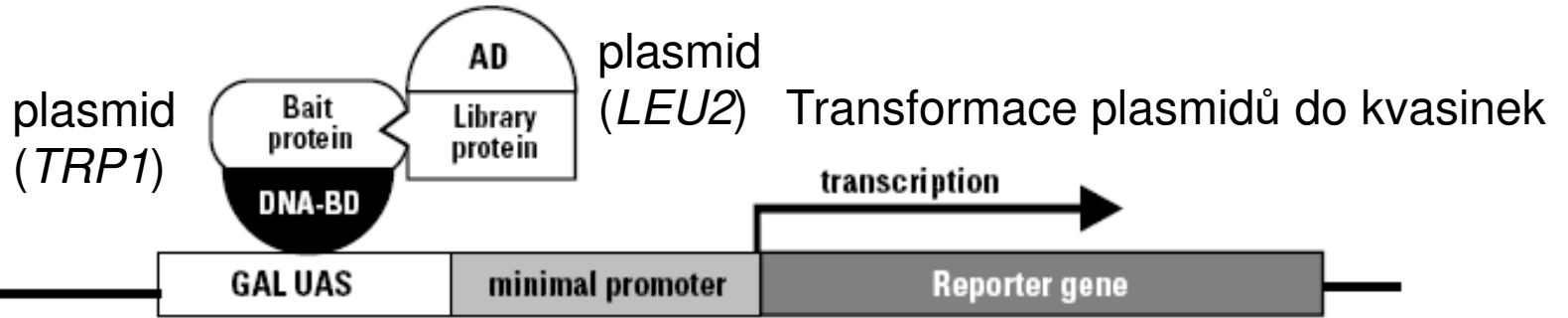


System vhodný i pro pull-down



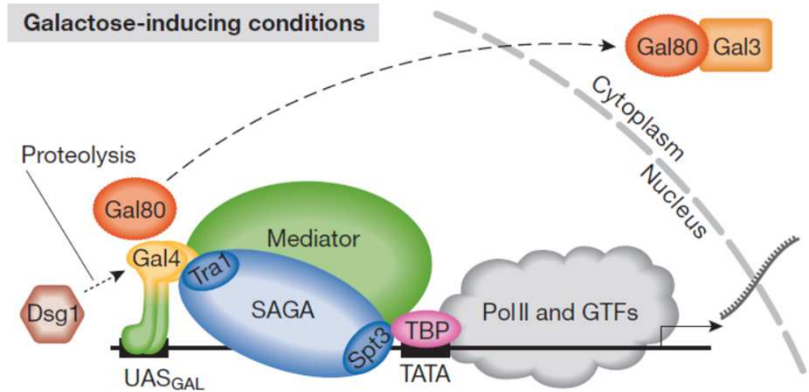
Y2H





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>

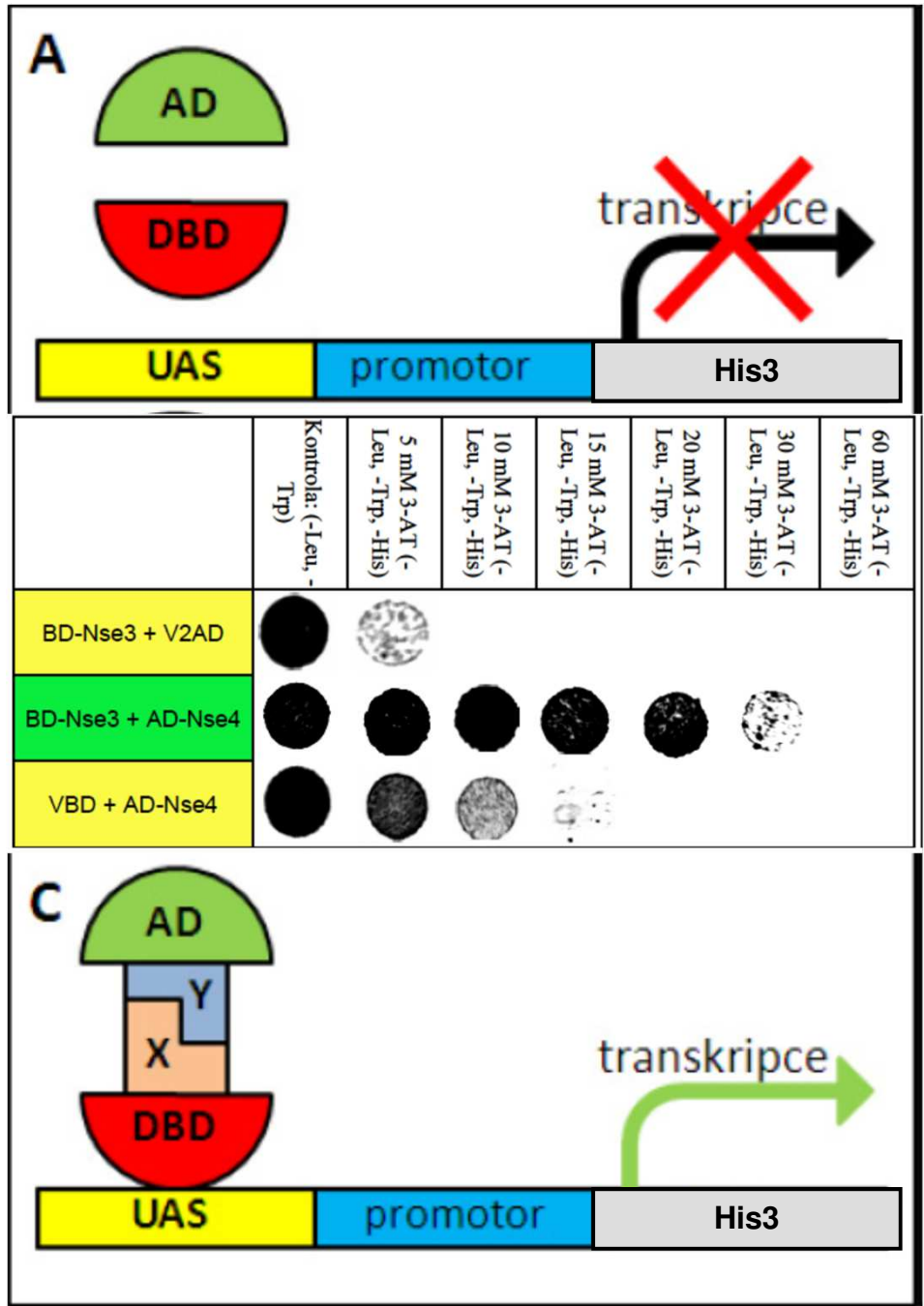
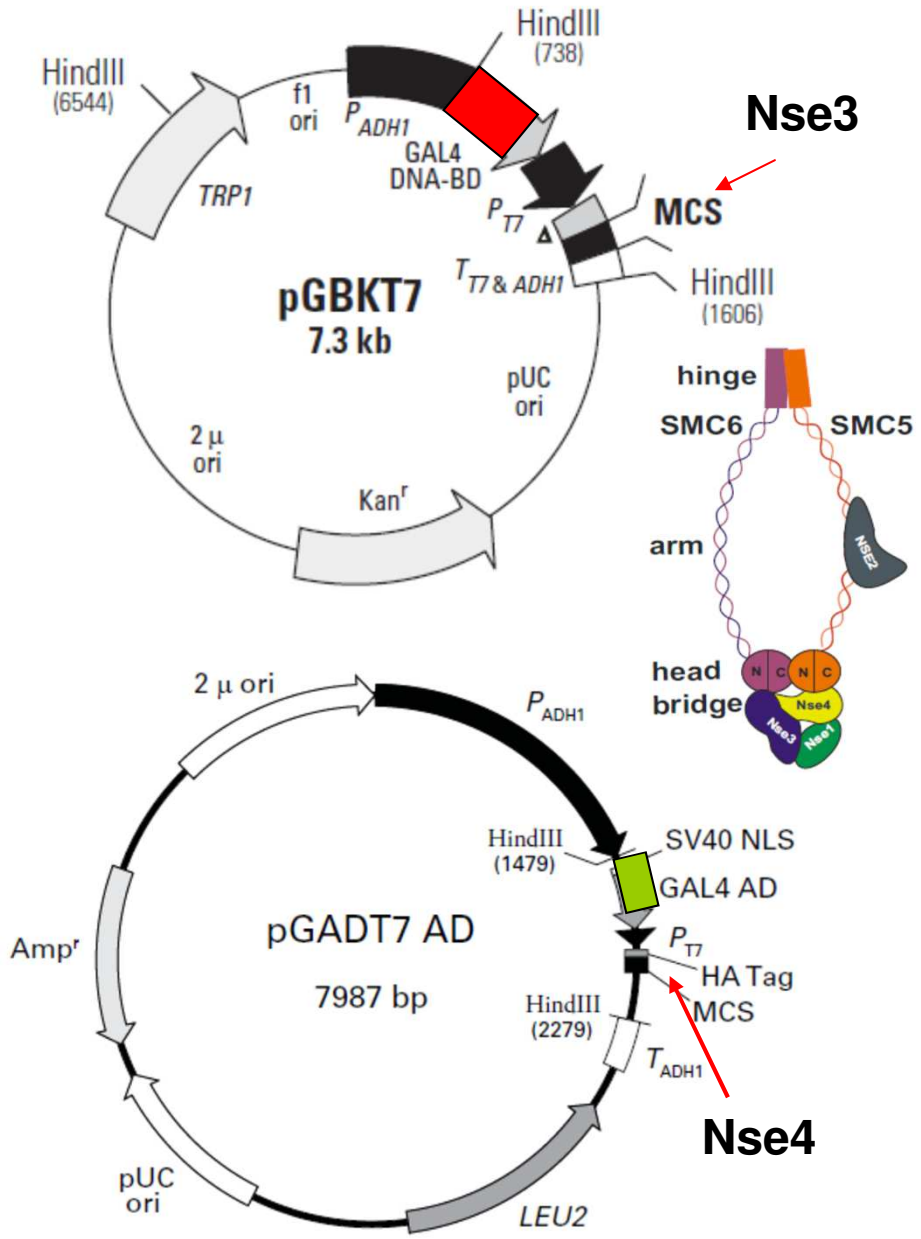
- Testuje se schopnost růstu kvasinek na médiu bez histidinu (nebo adeninu – červená/bílá)
- lze použít i pro hledání proteinových interakčních partnerů (screen knihovny)

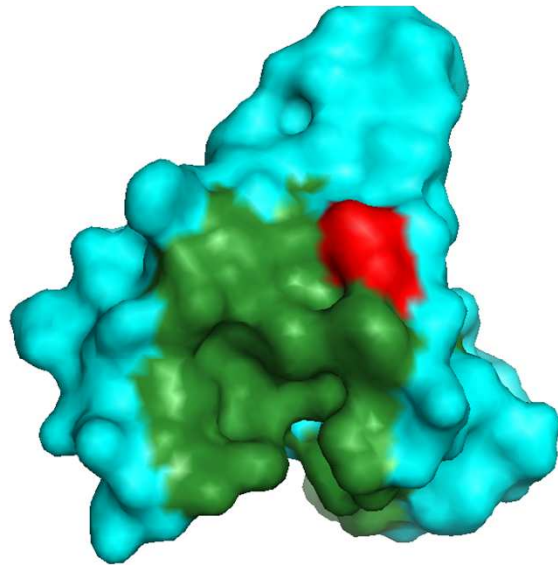
MaV203 kmen navíc obsahuje *URA3* reporter gen – lze tedy selektovat na uracilovou auxotrofii + reversní systém tj. mutanty disruptující interakce (na FOA)

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)



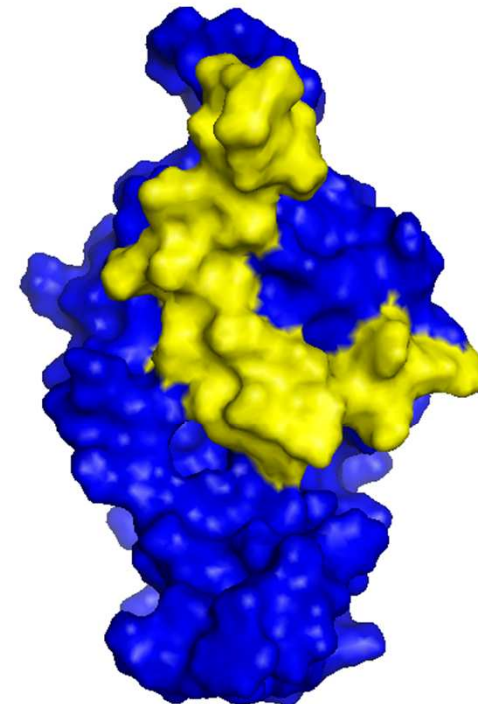


mut.	-m	mmmmmmmm	mm	--m	-m	-m	mm	mmmm	-----	mmm	--m	-m																																				
Nse4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---																																				
S.p.	G	F	L	M	T	V	I	A	F	I	A	V	S	H	C	S	V	G	-	H	S	E	L	Q	S	F	L	Q	E	L	L	T	---	E	E	T	T	P	L	H	L	D	I	T	R	S		
A.n.	G	L	Y	T	F	I	I	A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

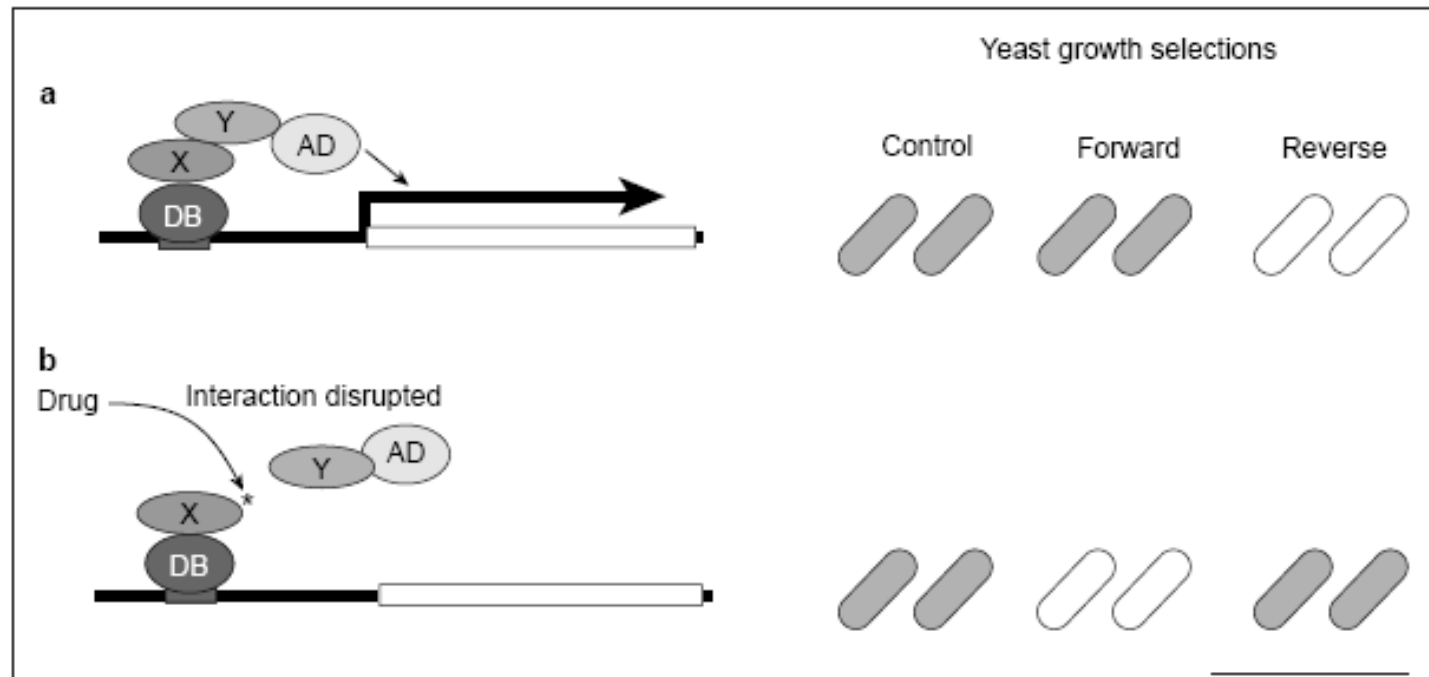
“alanin scan” konzervovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu na povrchu Nse3 ...

... do níž se váže hydrofobní šroubovice Nse4 proteinu

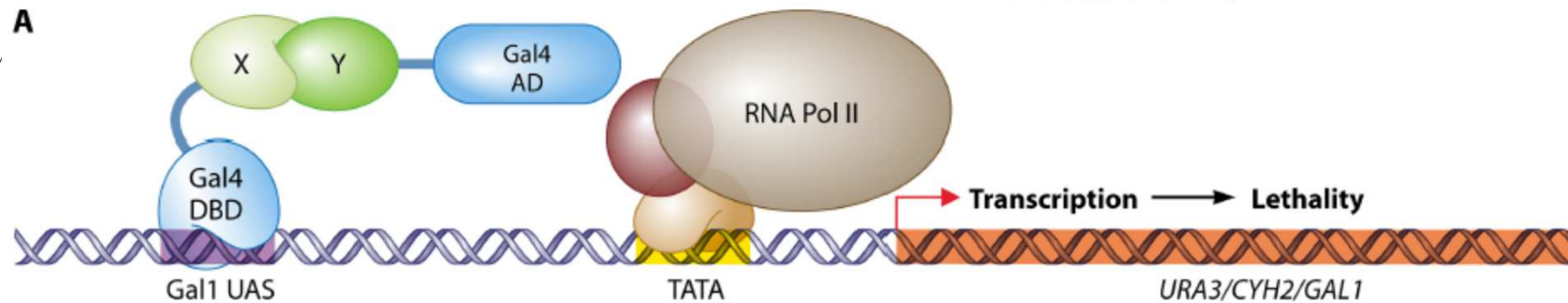
Pomocí *in silico* (MD) analýzy byl vytvořen model dimeru Nse3-Nse4 (docking)



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

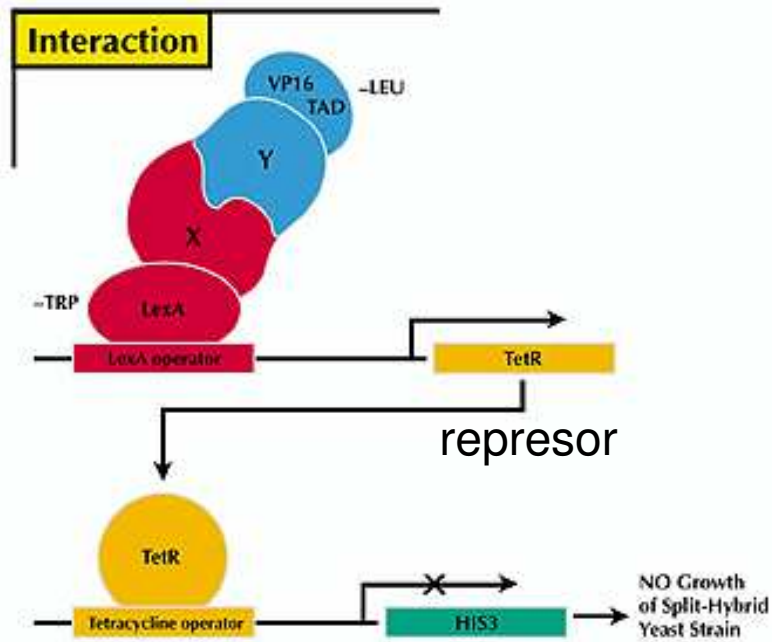


Fig. 1
 Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

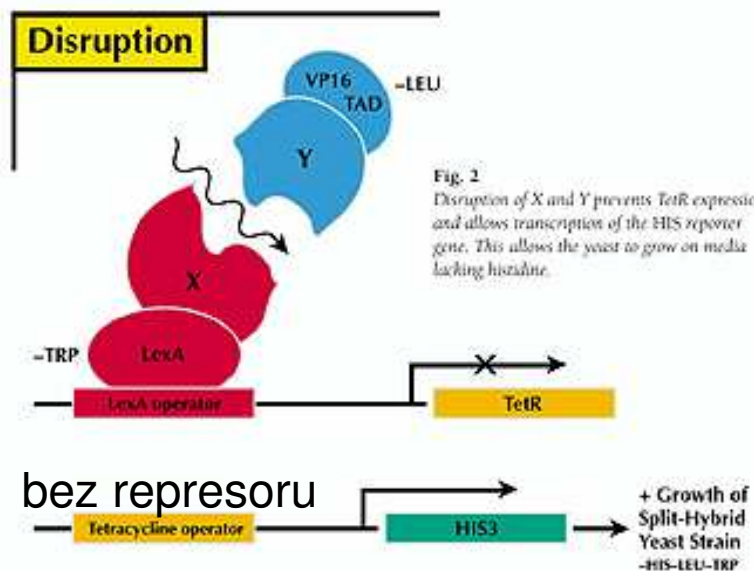
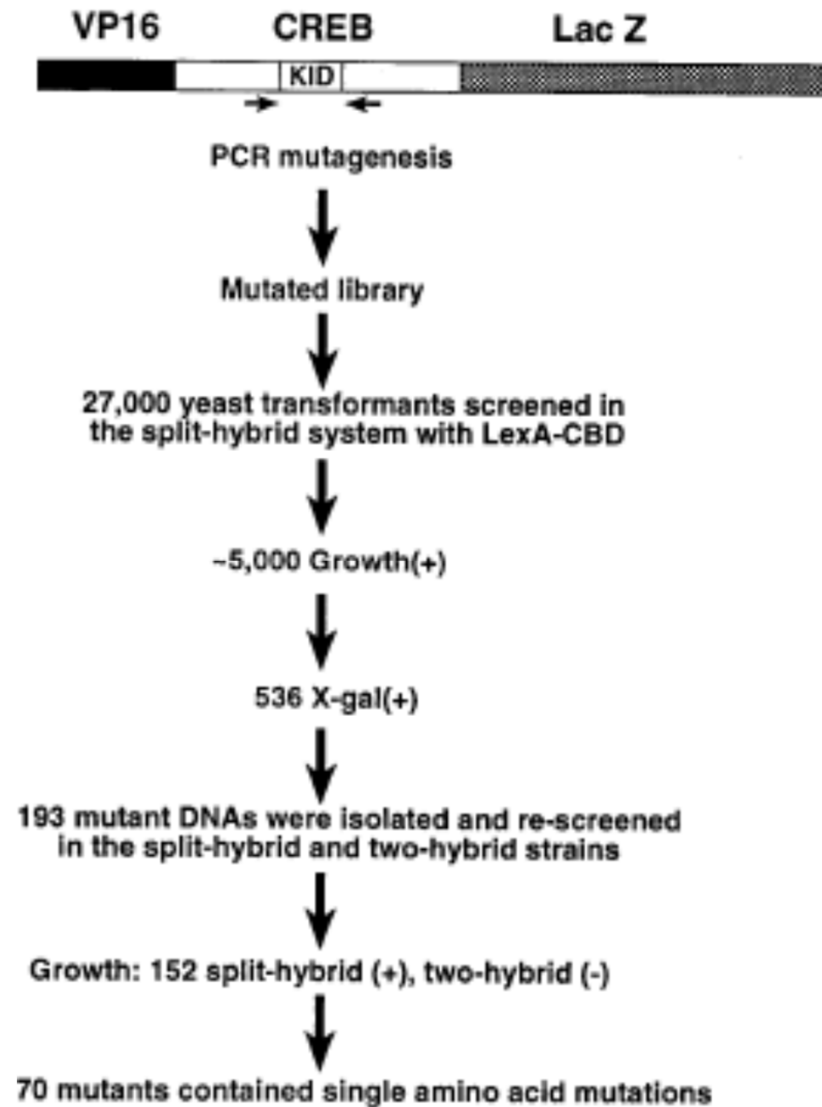
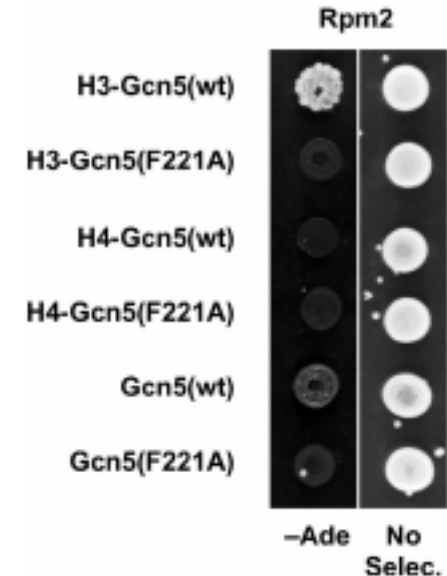
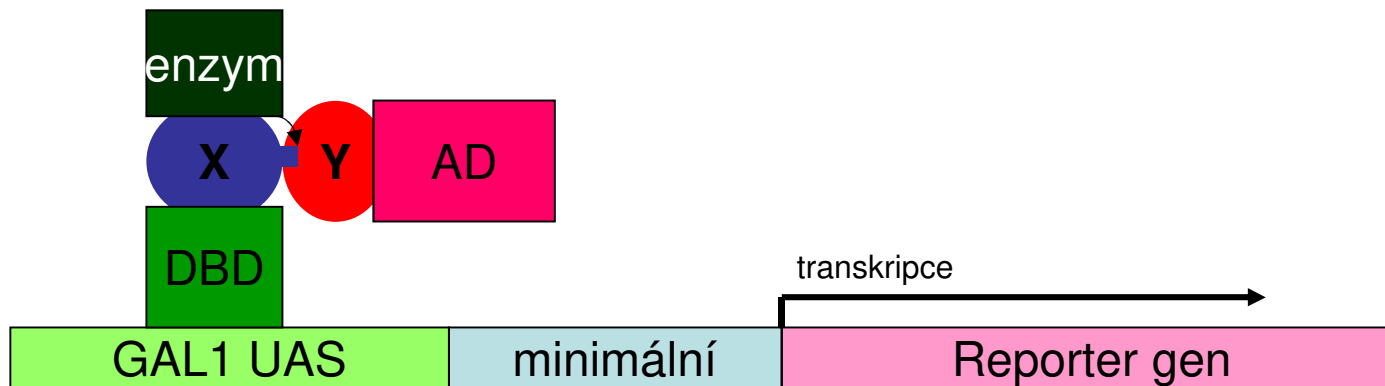


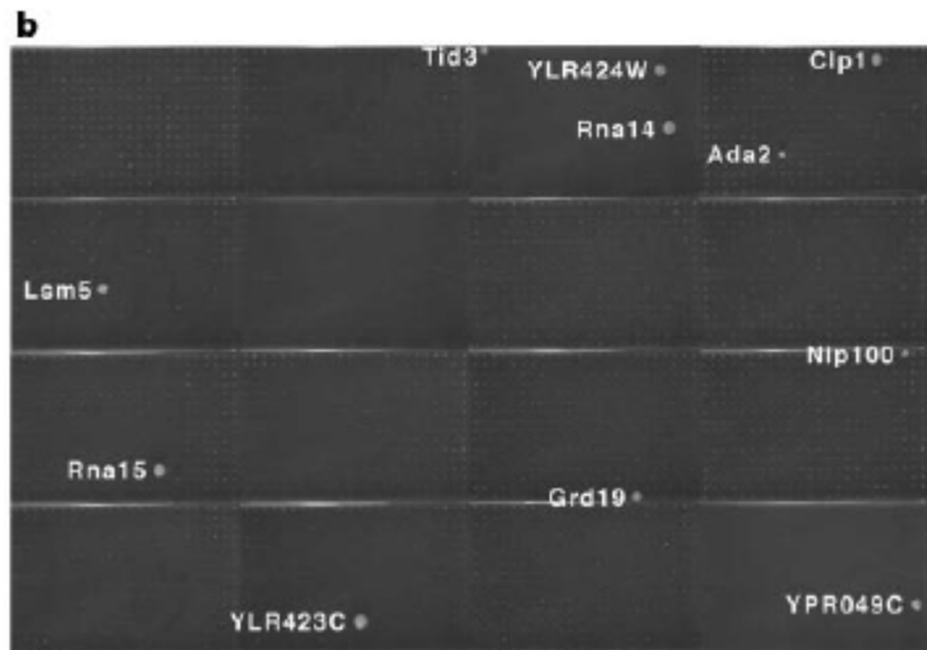
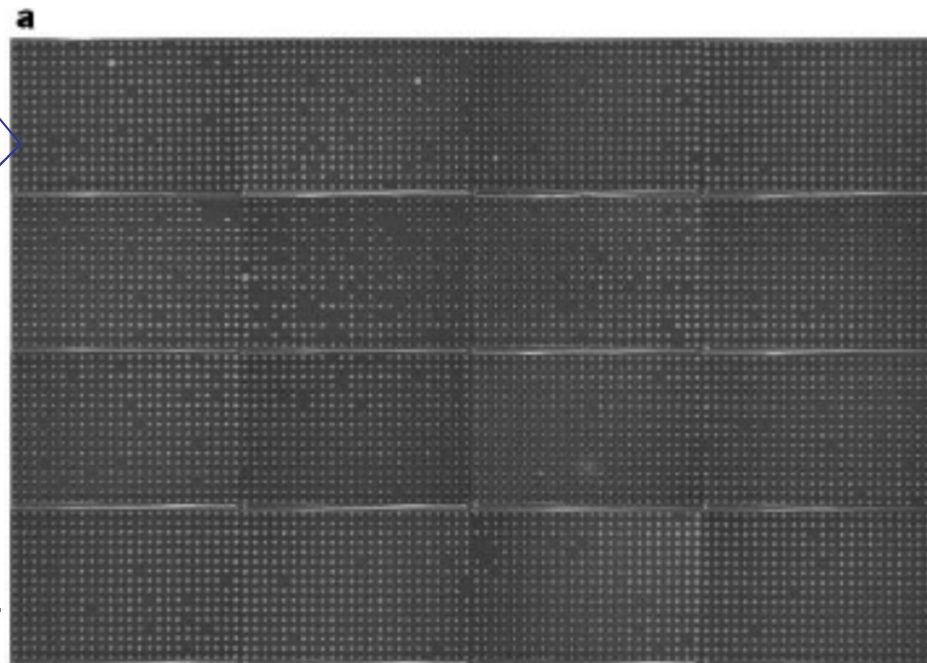
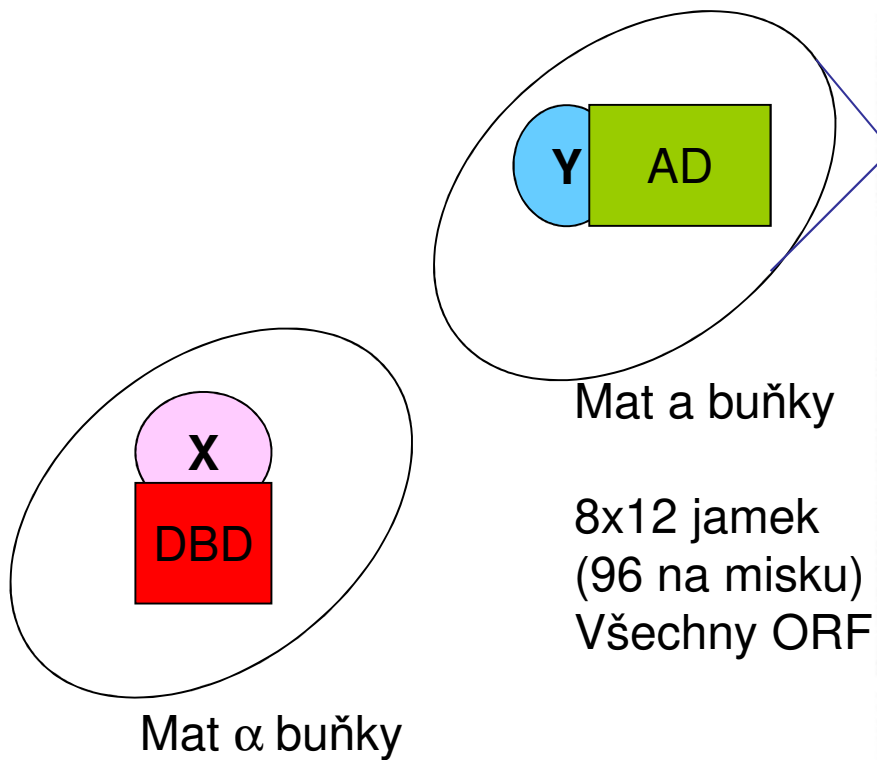
Fig. 2
 Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



Interakce vyžadující post-translační modifikace



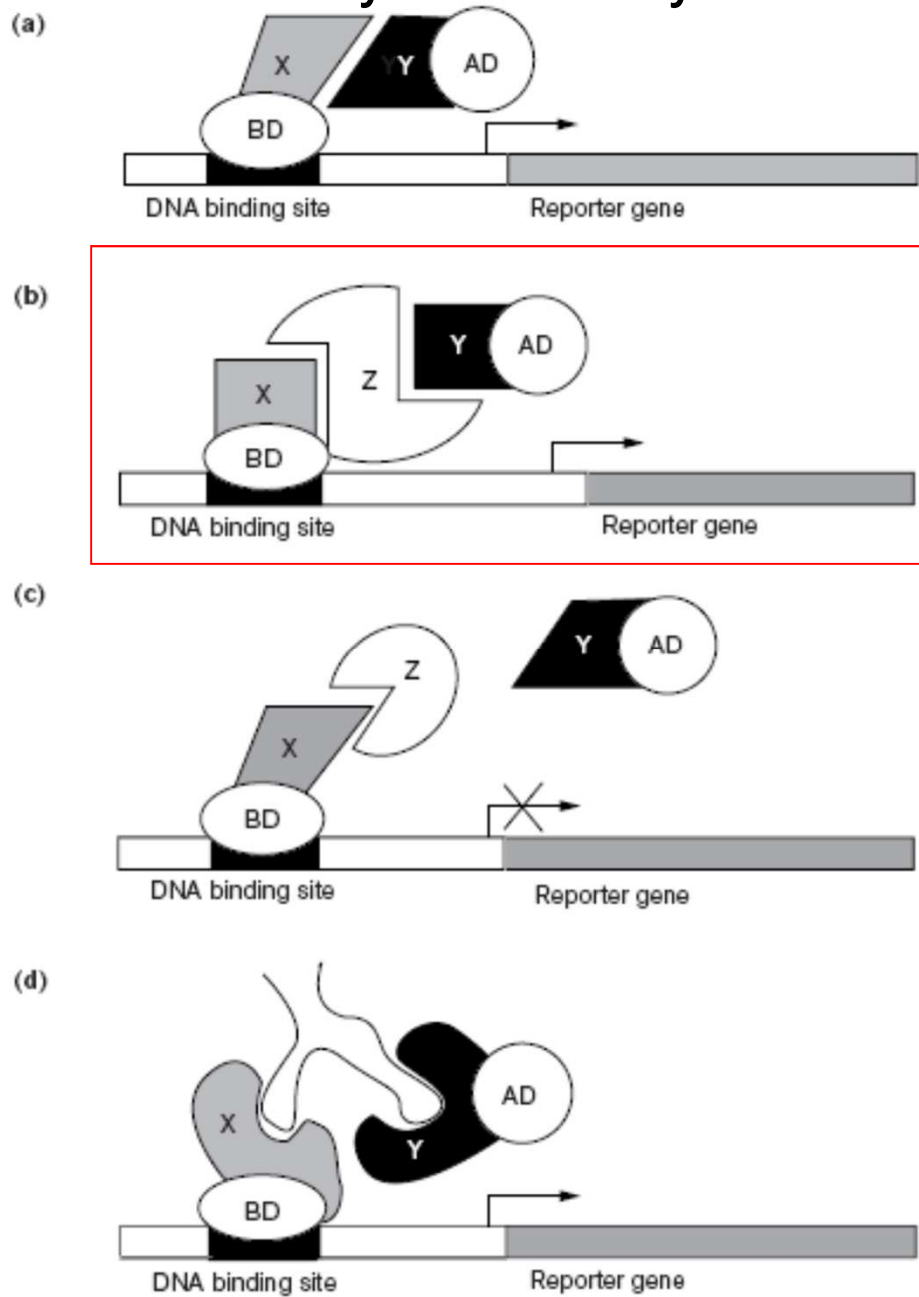
- Některé protein-proteinové interakce jsou závislé na post-translačních modifikacích
- v buňce jsou přítomny např. acetylasy i deacetylasy, ale nemusí docházet k acylaci hybridního proteinu – řešením je „připojení“ příslušného enzymu k hybridu
- konstitutivní modifikace a enzym ve stechiometrickém poměru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



Kvasinkový, lidský ...
„INTERACTOM“

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

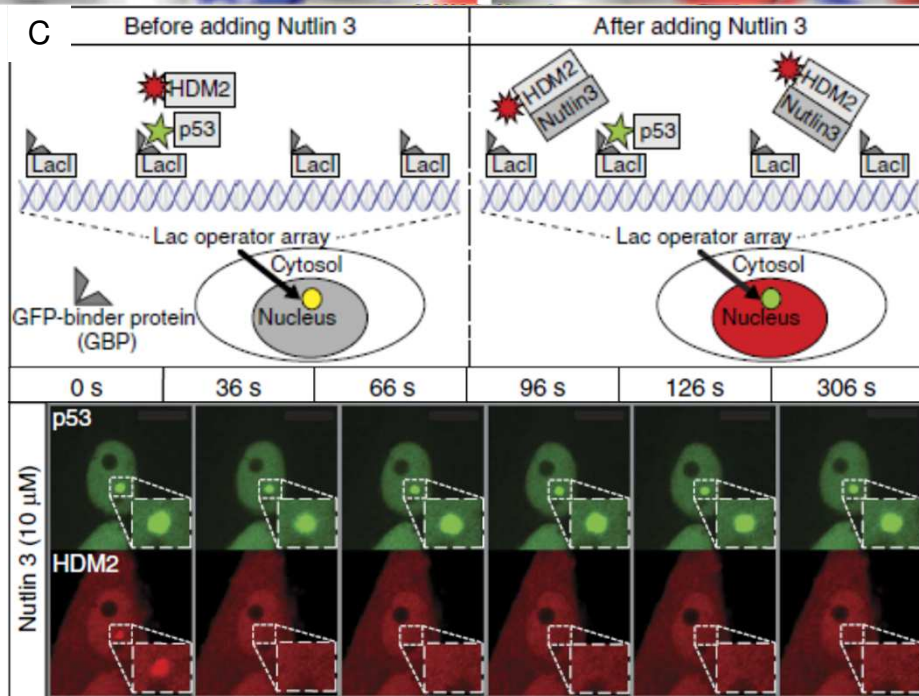
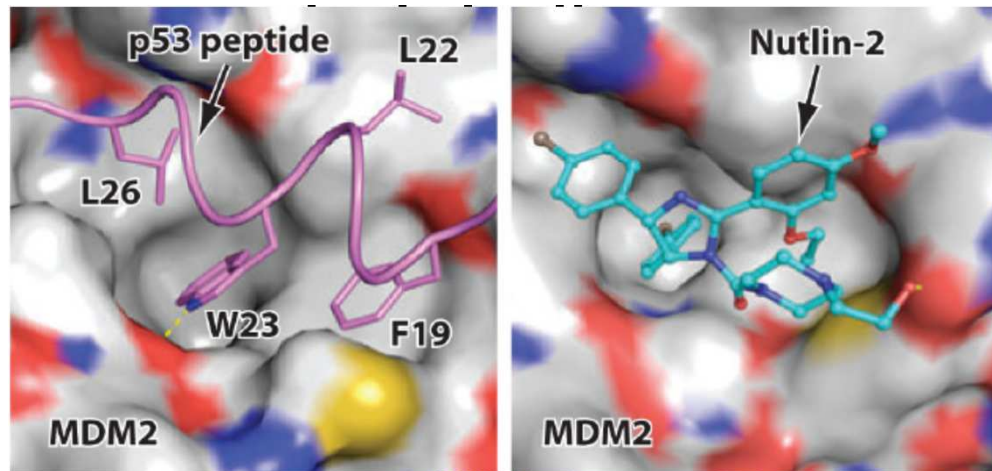
Přehled hybridních systémů



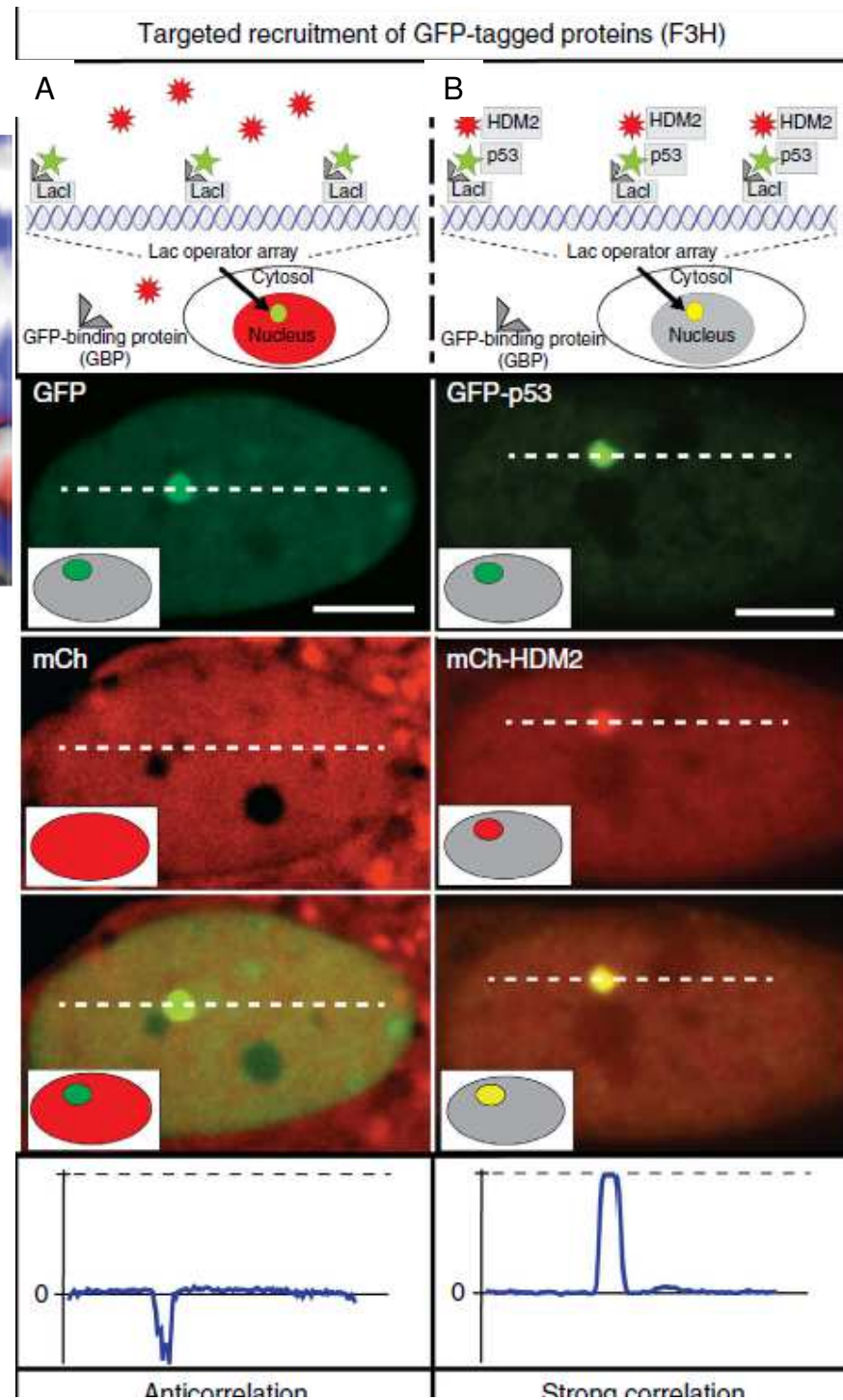
150 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
90 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
30 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
20 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
15 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
10 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
5 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
Kontrola: (-Leu, Trp, Ura)				



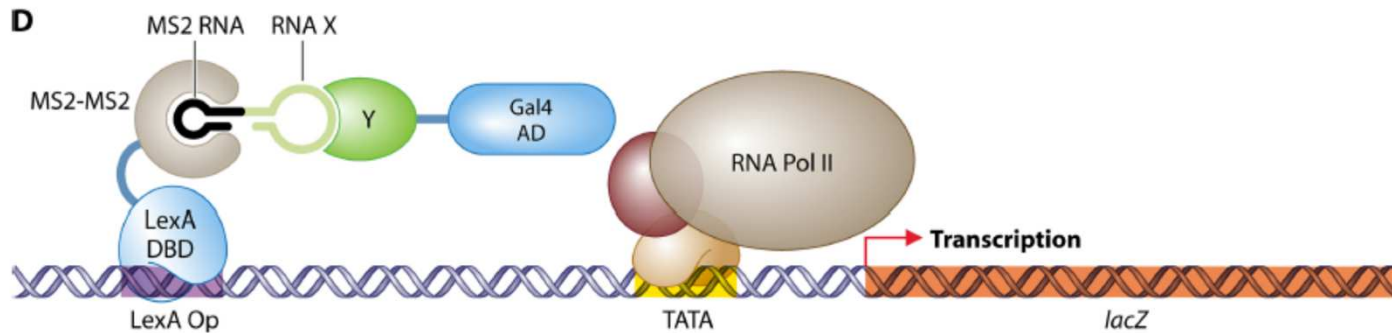
Fluorescenční 3H



Herce et al, Nat Commun., 2013

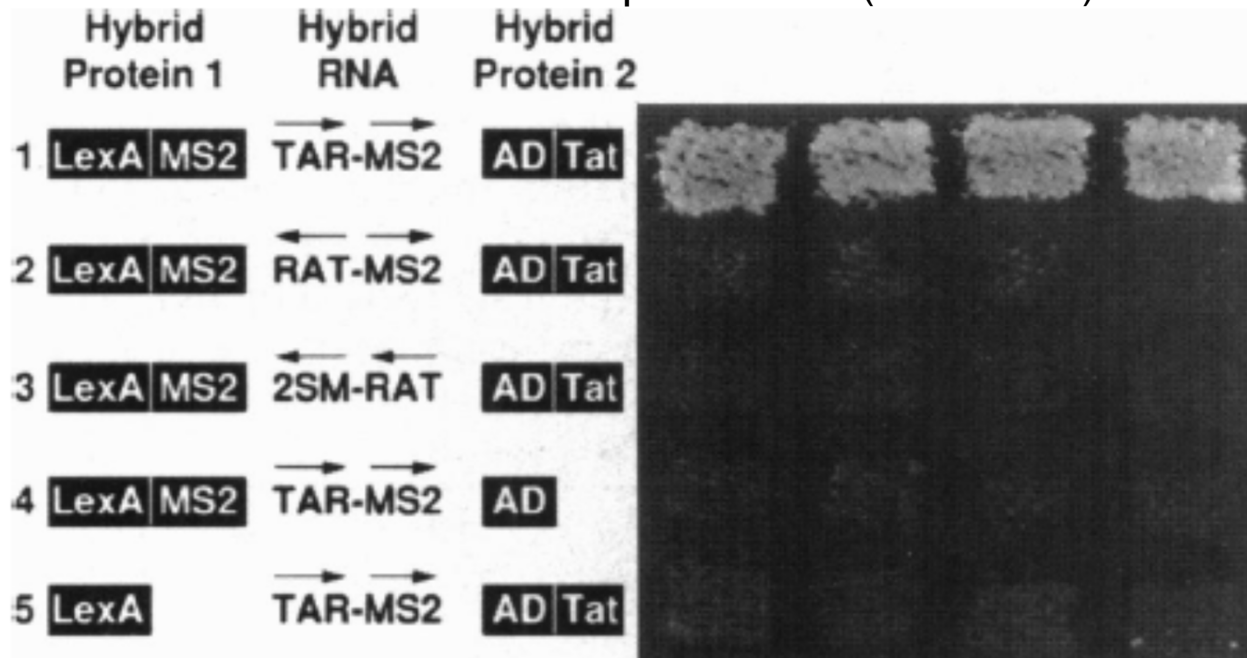


Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



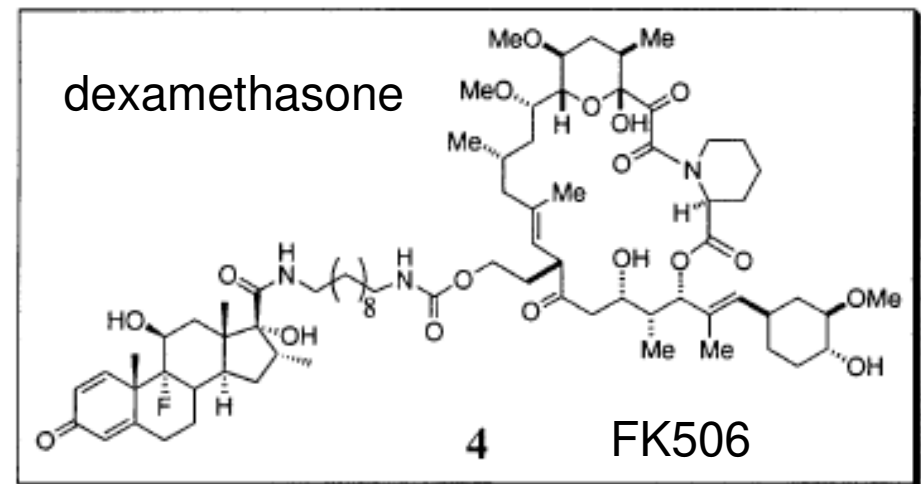
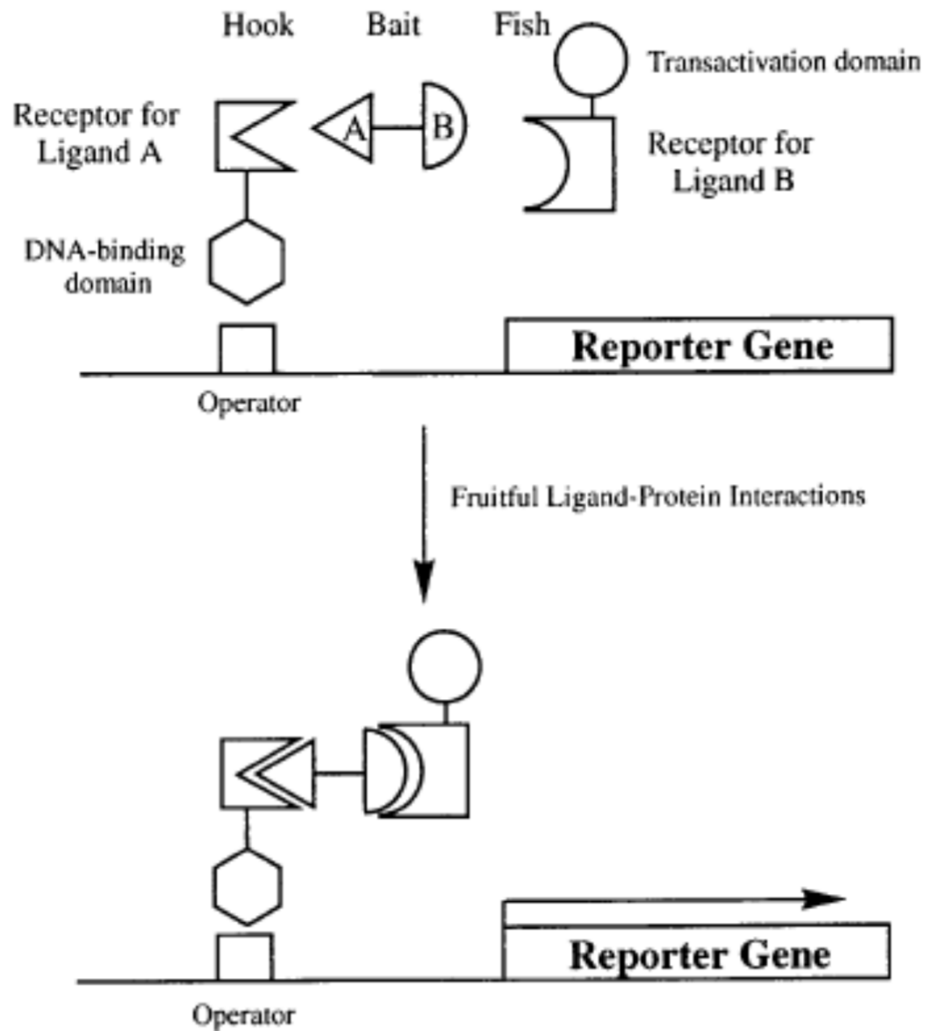
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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)

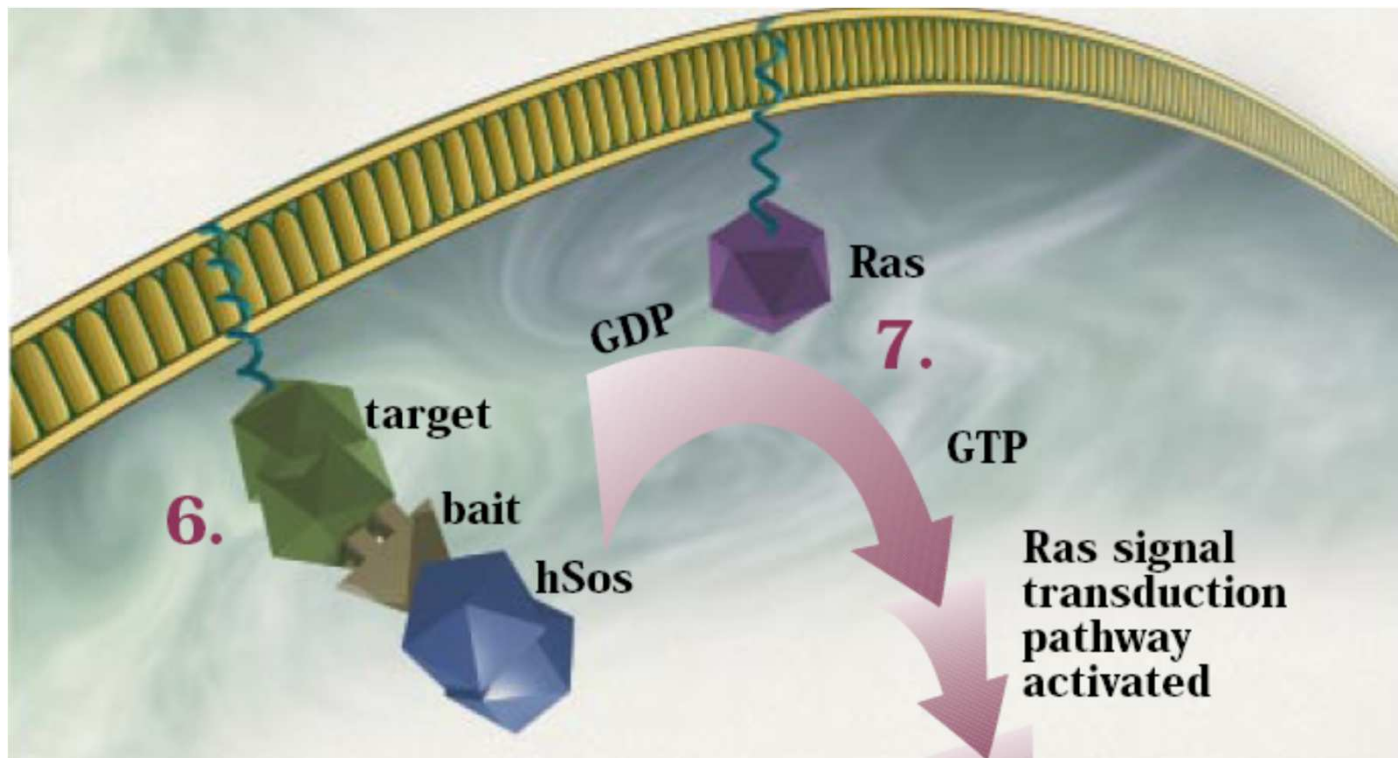
Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- 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 ...)

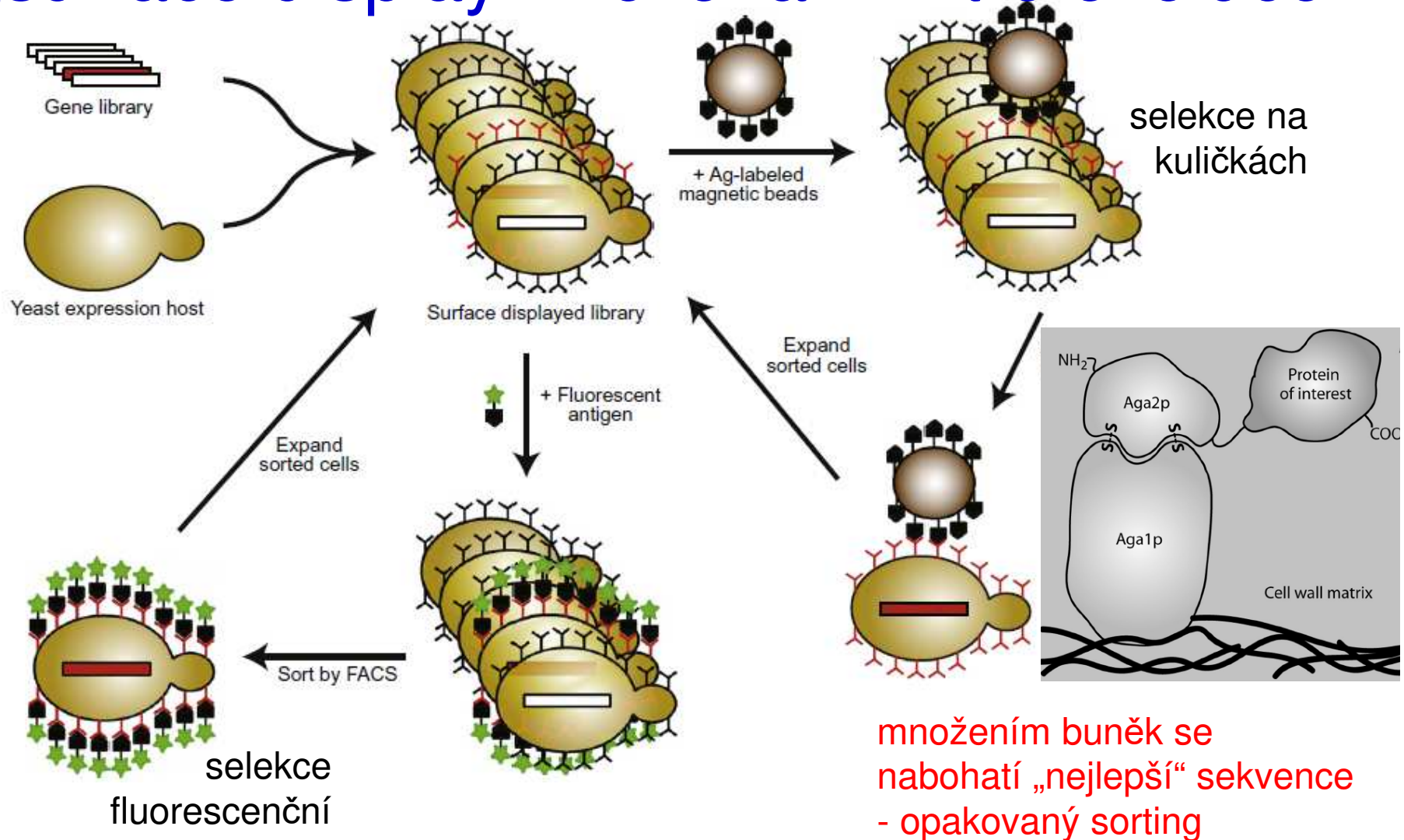
CytoTrap 2-hybridní systém

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)



„surface display“ – cílená *in vitro* evoluce

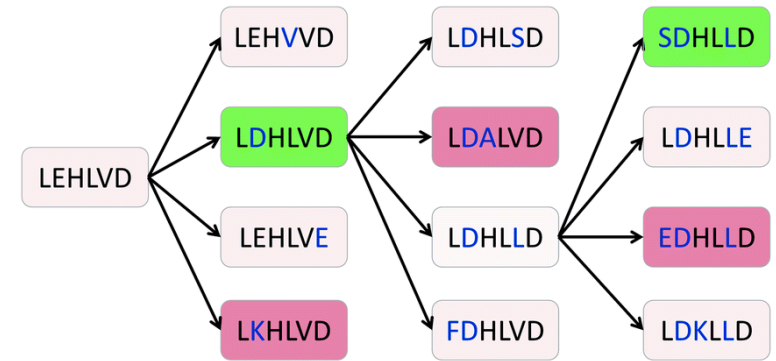


- analyzovaný protein je umístěn na povrchu buňky (kvasinkové, bakteriální/fág) – čím vyšší afinita tím větší pravděpodobnost „zachycení“ – lze vyselektovat nejlepší vazebné sekvence (při použití „knihovny“)

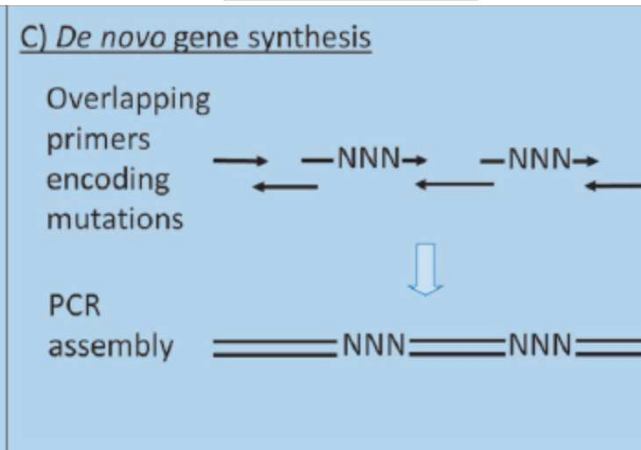
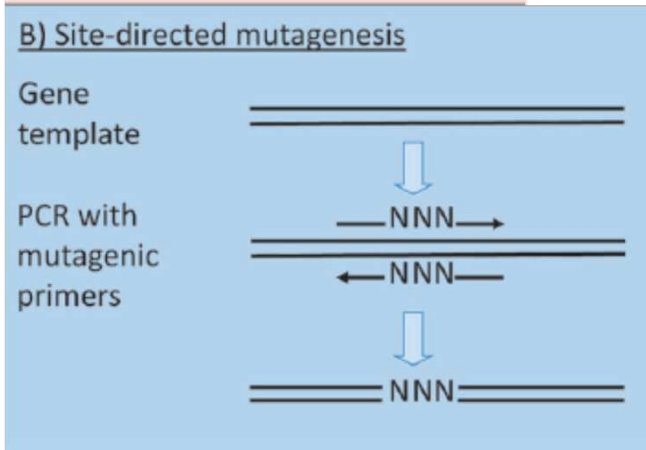
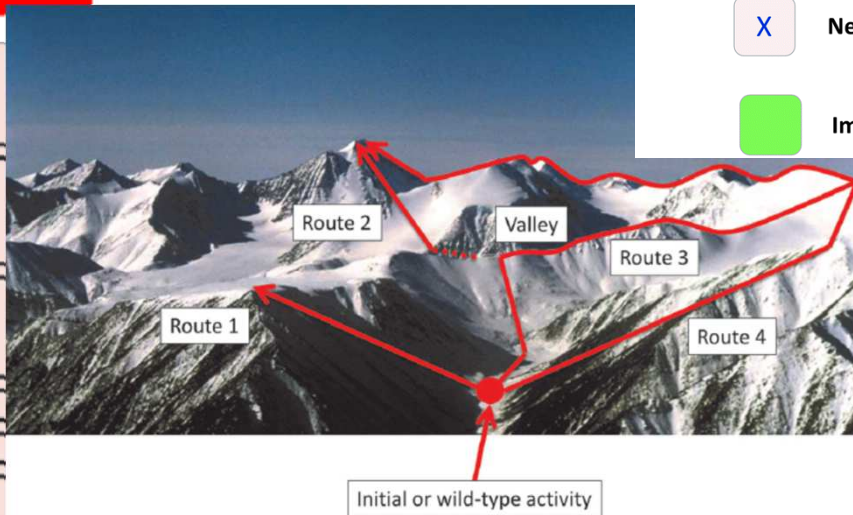
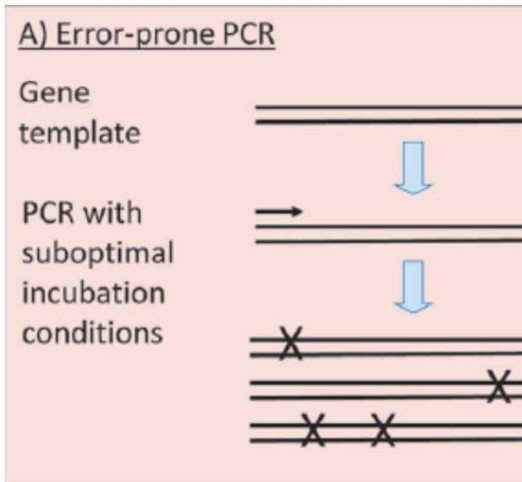
cílená *in vitro* evoluce

D.n. - CLNSDMSSFNEVAFCDLFLFIFVGLNWMEDD
 C.f. - CLNSDMSSFNQVAFCDLFLFIFVGLNWMEDD
 M.m. - CLNTDMNFFNPIAFCDLLLLFVGFNWVEEE
 H.s. - CLNSDMNFFNQLAFCDFLFLFVGLNWMEDD

core region



X New mutation
 Improved fitness
 No fitness increase
 Loss of function

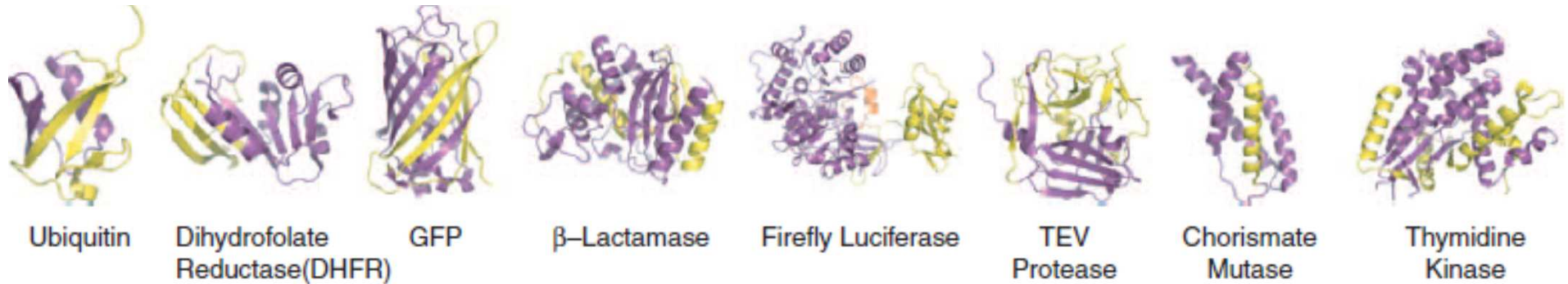


takto lze modifikovat interakční schopnosti proteinů a nalézt motivy s vyšší afinitou ...

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 ...)

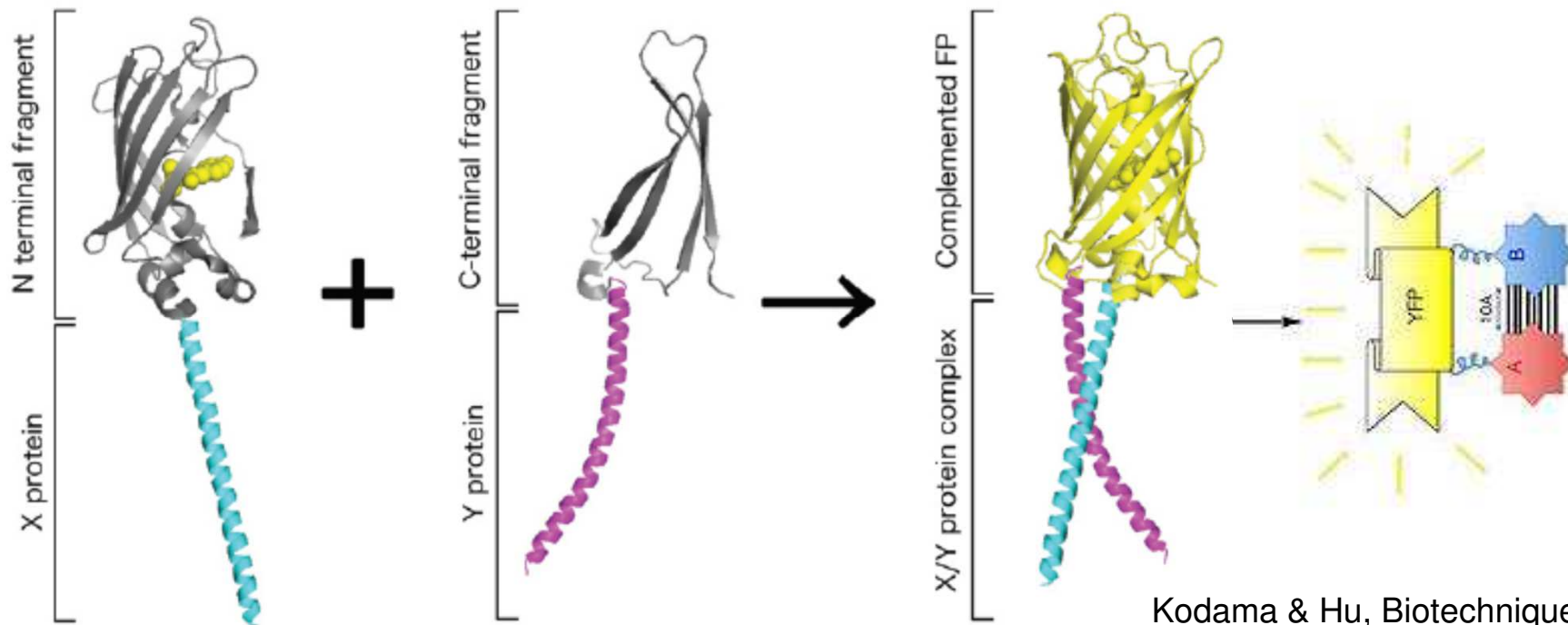
Protein-fragment complementation



Shekhat & Ghosh, CO in ChB, 2011

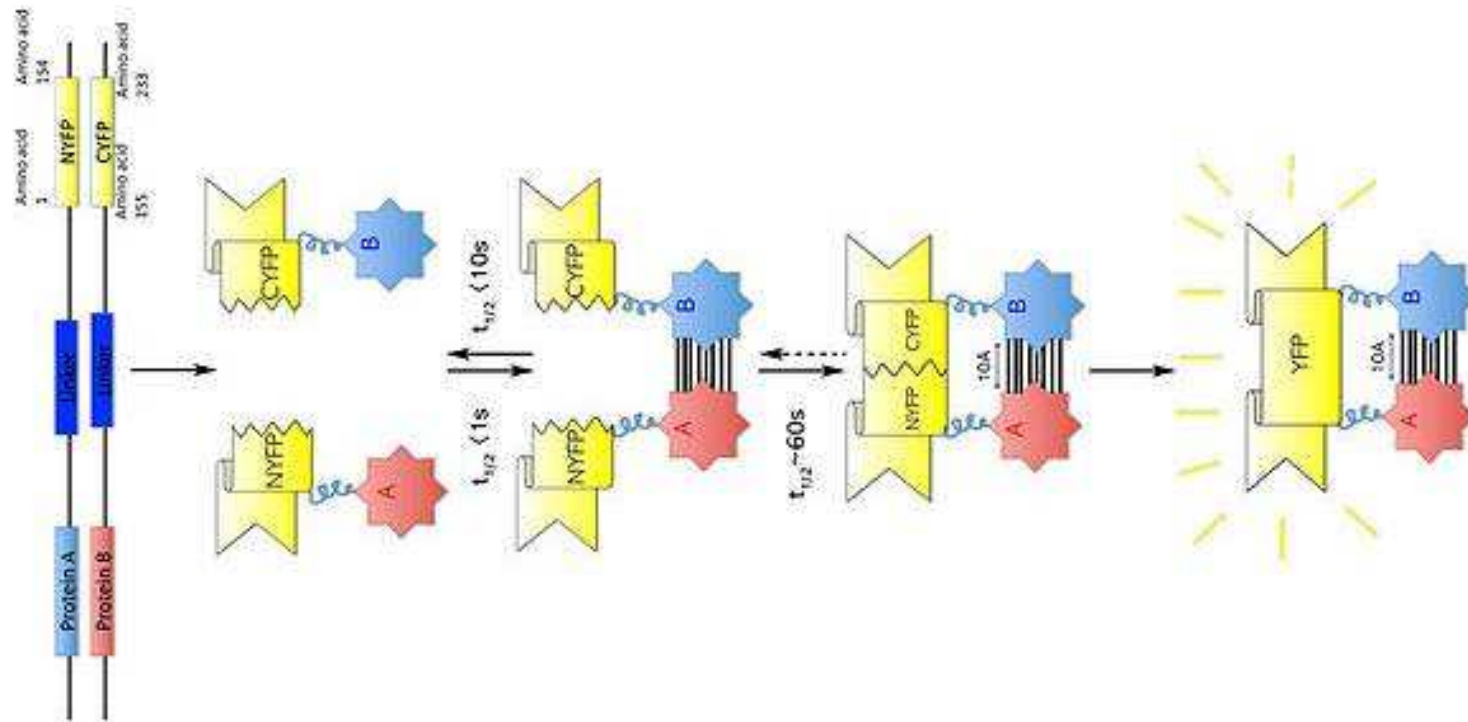
Current Opinion in Chemical Biology

Bimolecular fluorescence complementation - BiFC

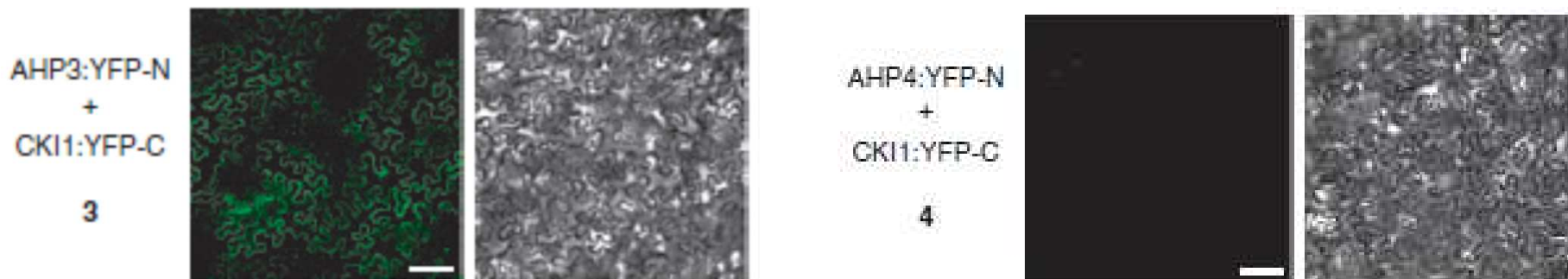


Kodama & Hu, Biotechniques, 2012

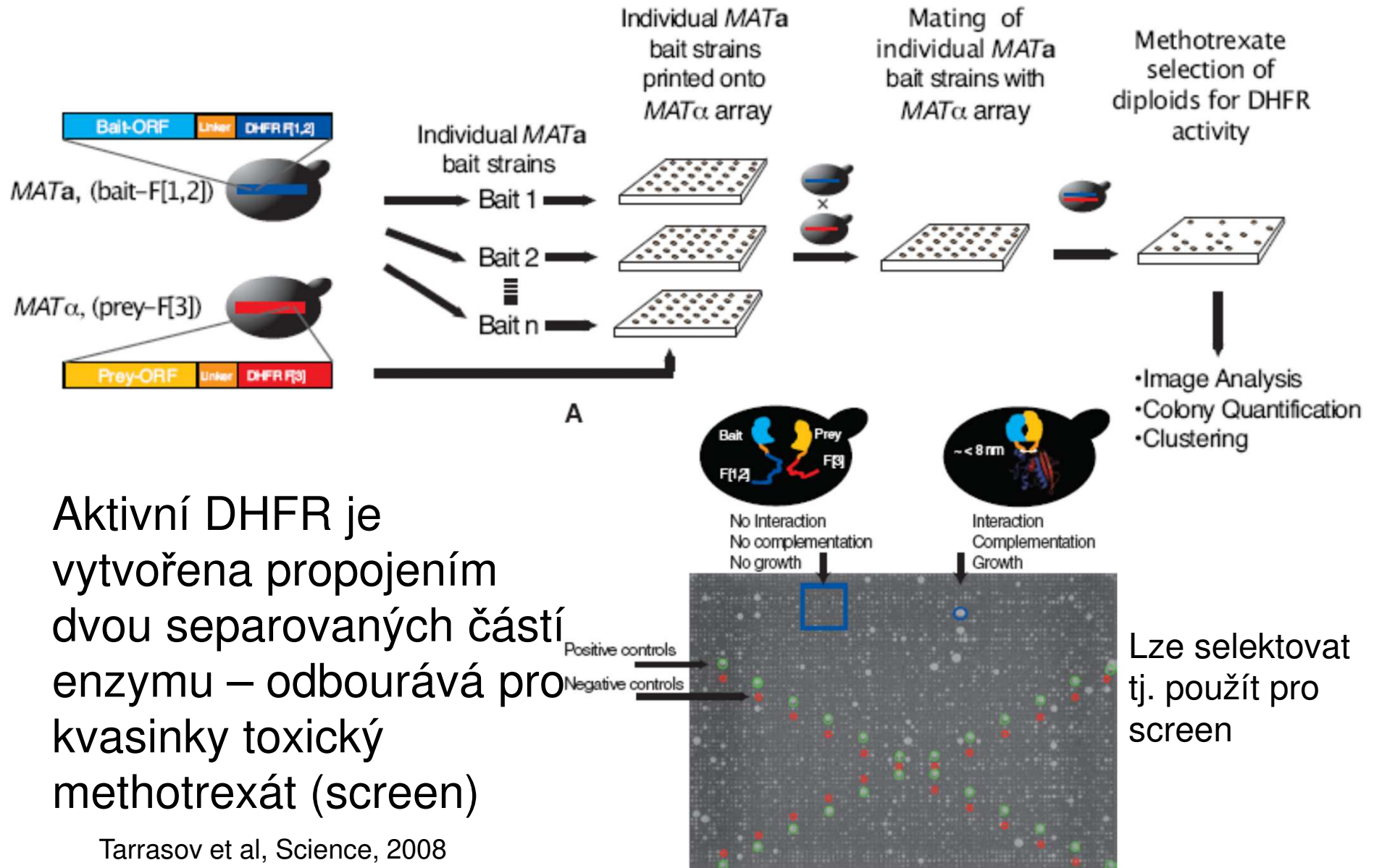
Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



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



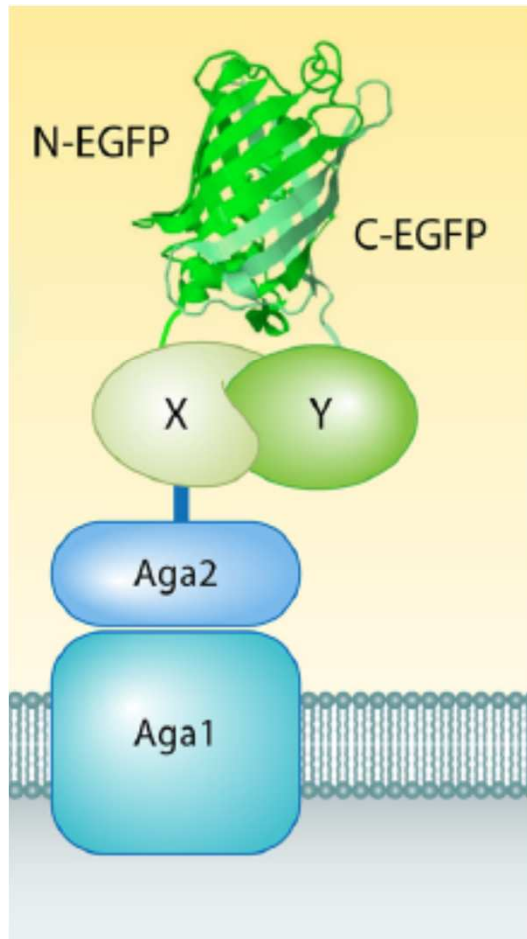
Dihydrofolát reduktáza/methotrexát



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

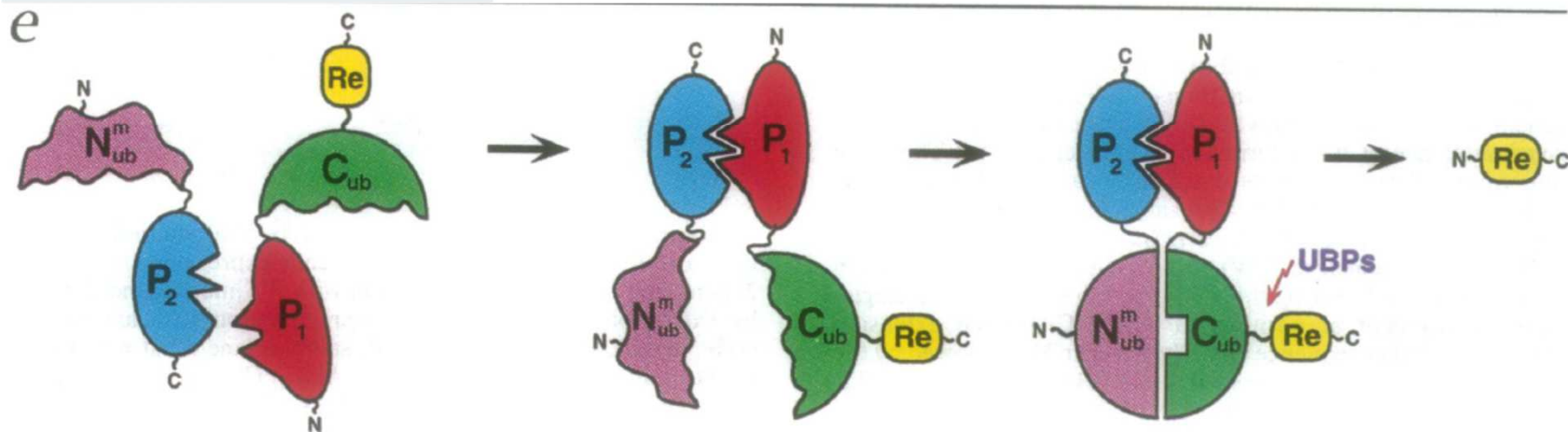
Komplementace proteinů

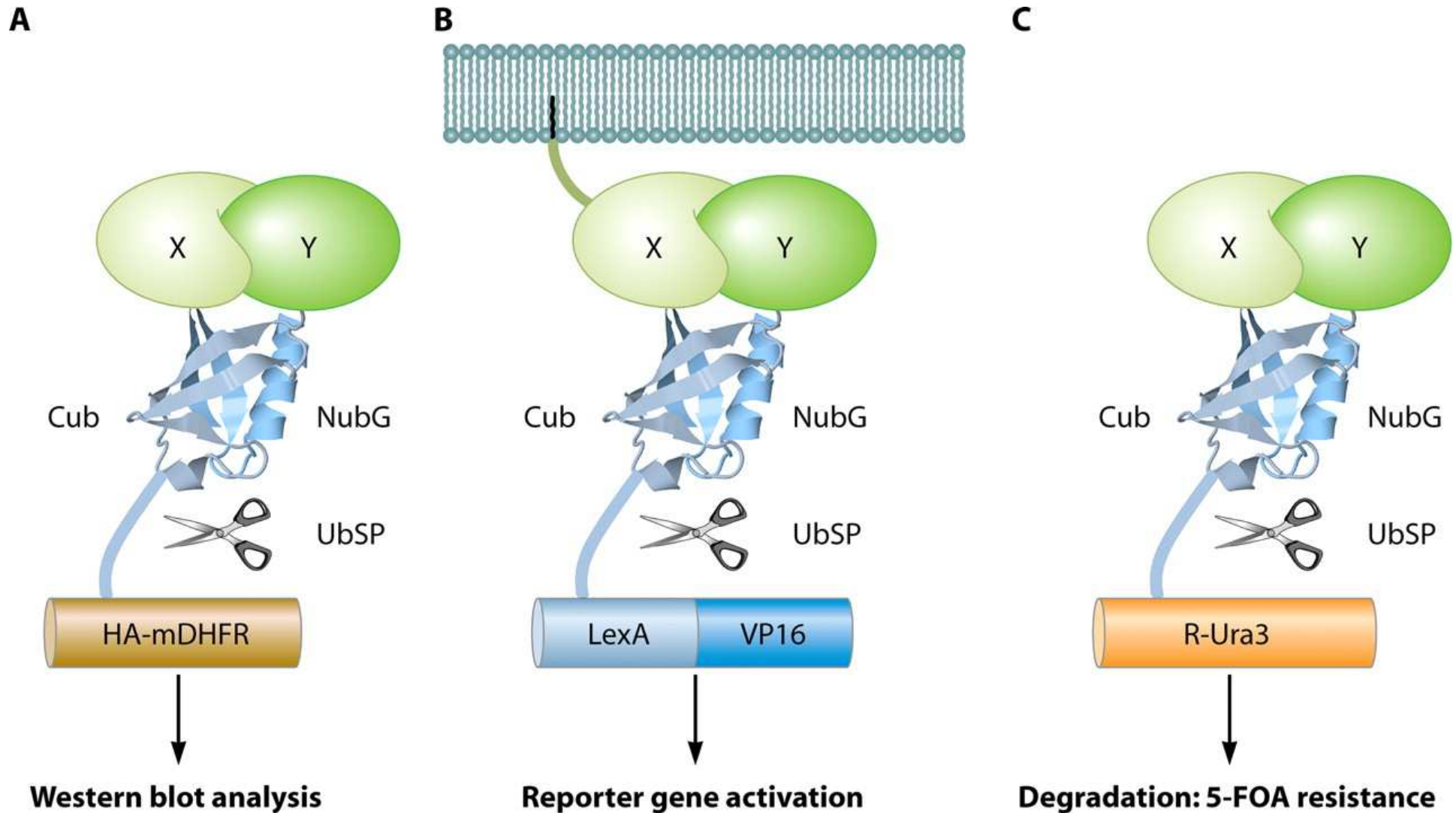
Interakcí dvou partnerů dochází ke komplementaci eGFP na povrchu kvasinkové buňky (ukotveno pomocí fúze s Aga2 aglutininem) – buňky mohou být vyříděny pomocí FACS



Johnsson et al, PNAS, 1994
Stynen et al, MMBR, 2012

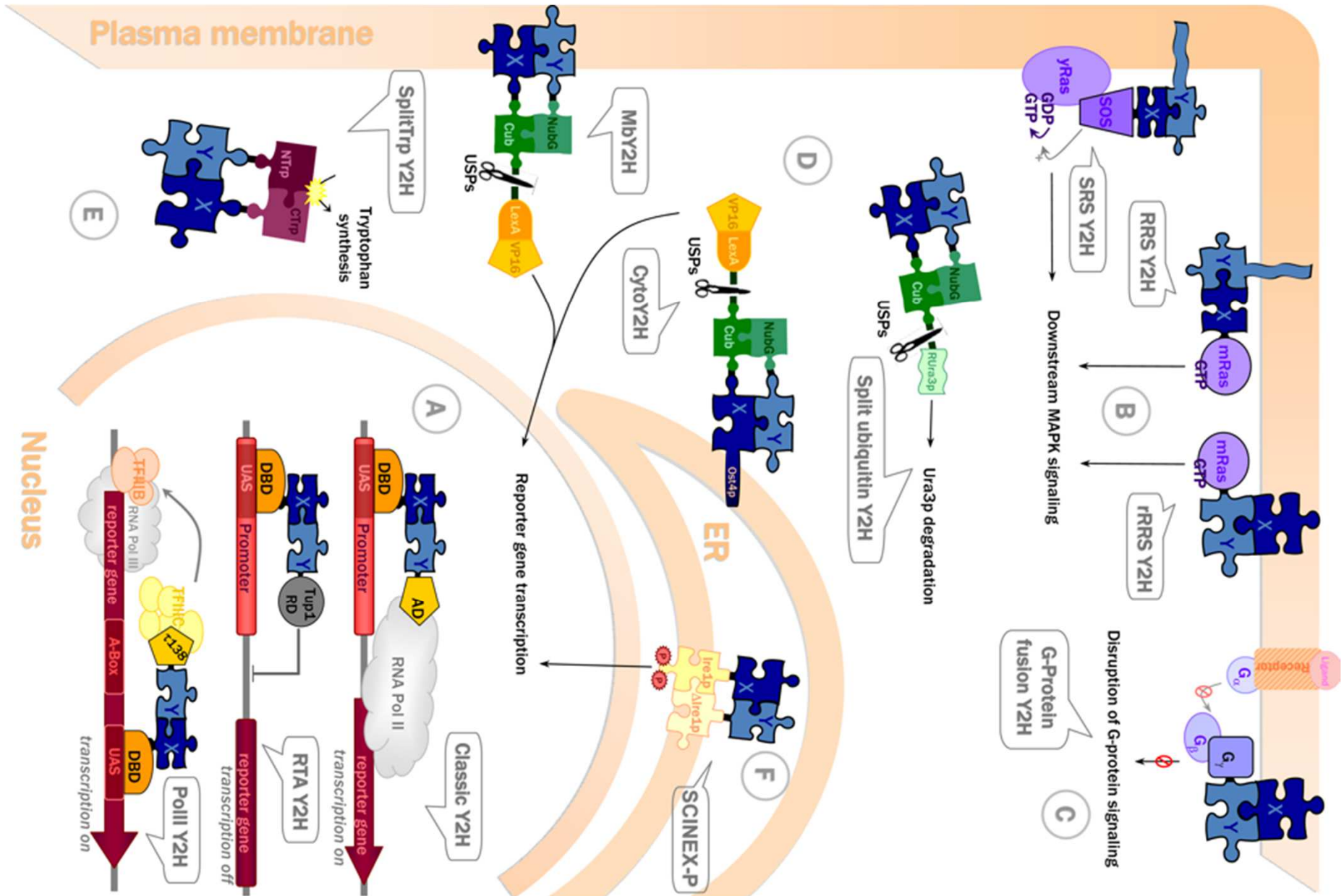
Interakcí dvou partnerů dochází ke komplementaci částí ubikvitinu – původní verze založena na Western blot detekci





Interakcí dvou partnerů dochází ke komplementaci částí ubikvitinu – původní verze založena na Western blot detekci - adaptováno pro kvasinky se selekcí na principu transkripce (klasického reportérového genu LexA-VP16/Gal4 nebo [Ura3 reversní])

Přehled kvasinkových PPI biotechnologií



Metody analýzy protein-proteinových interakcí

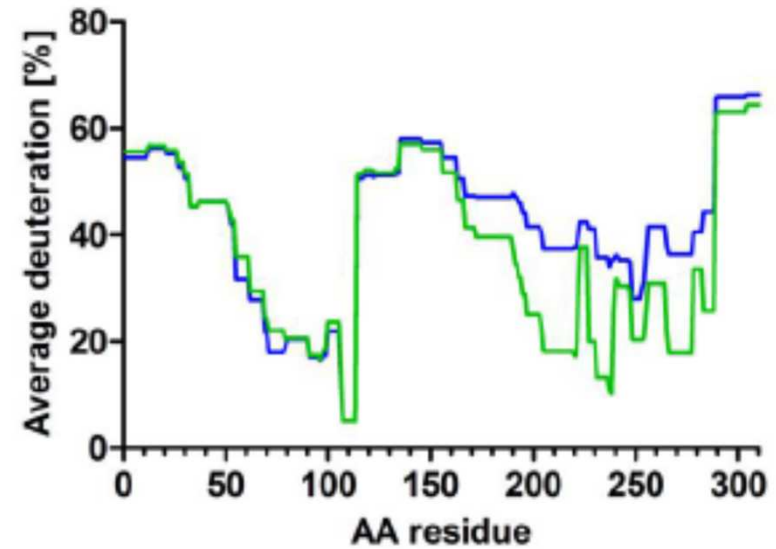
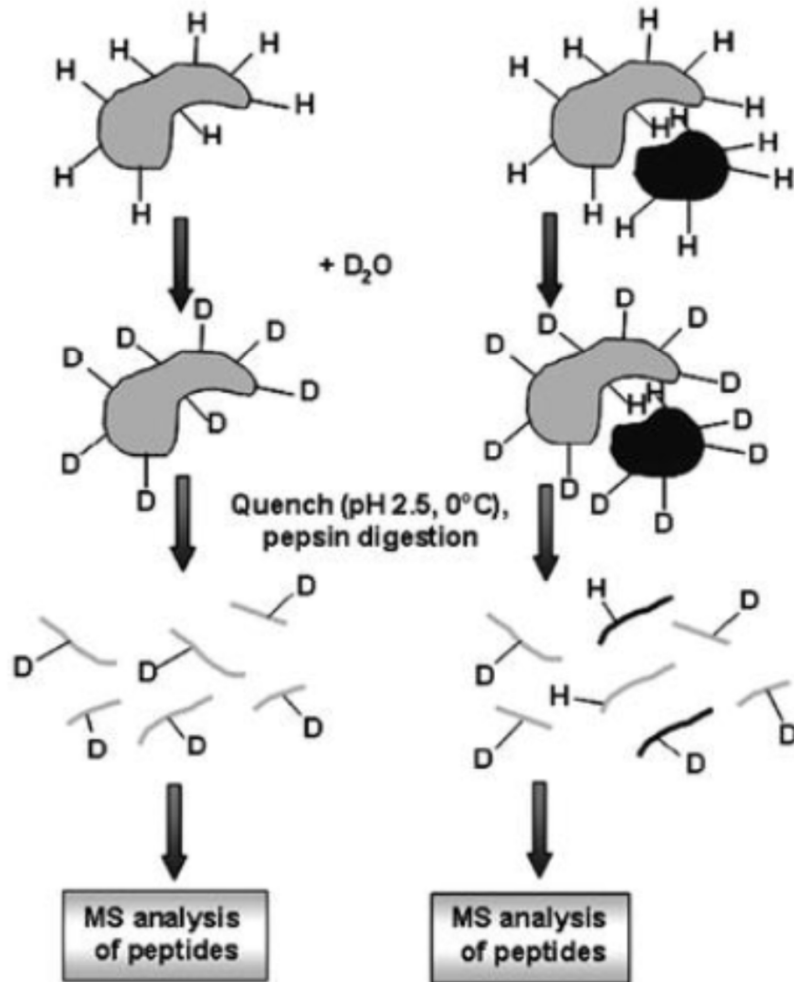
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- **MS-based:**
 - **H-exchange** ...
 - **protein painting**
 - **crosslinking** Přednáška doc. Zdráhala ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krystalizace, NMR analýza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



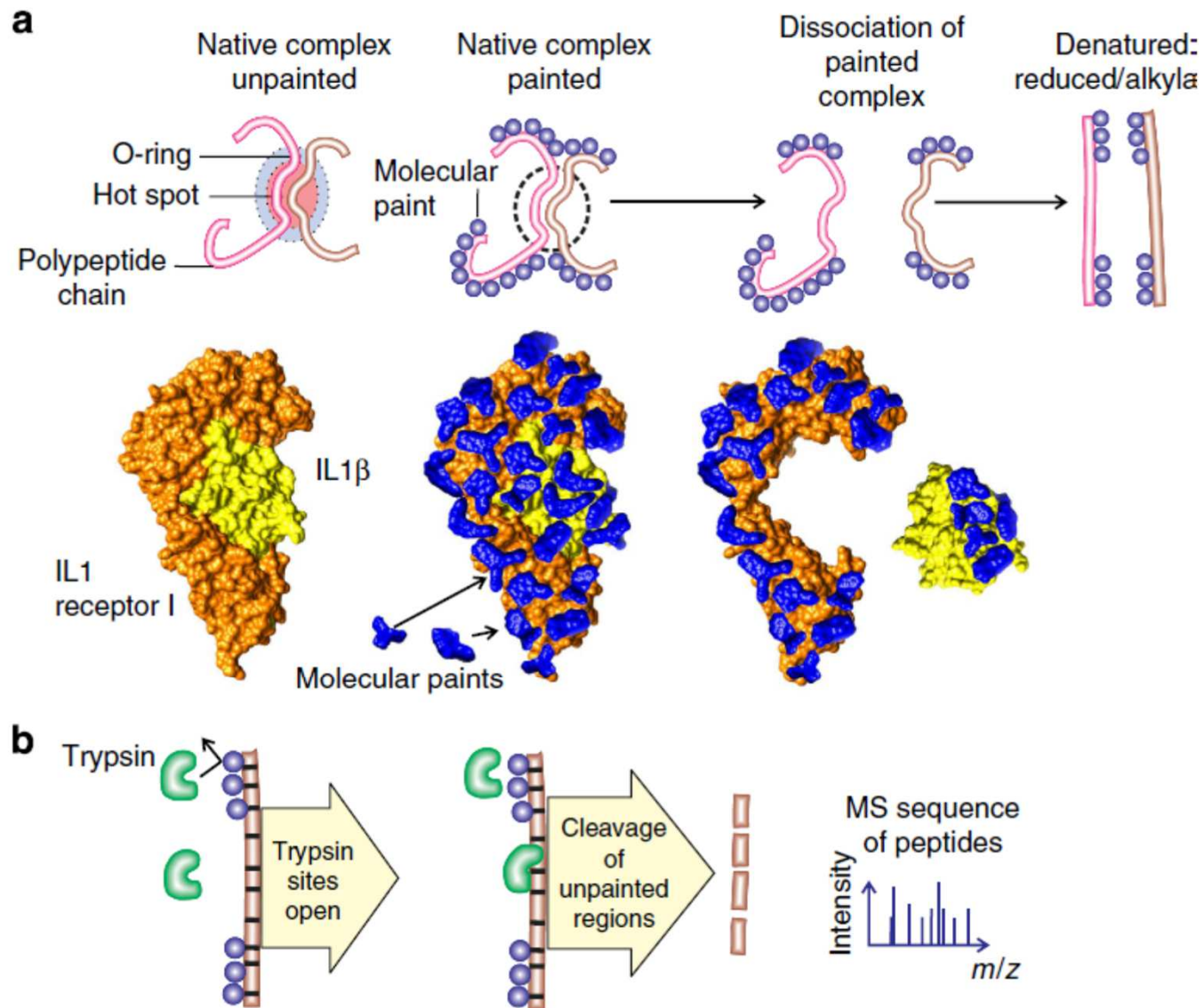
Hydrogen/Deuterium Exchange (HDX)

(P. Muller, MOU)

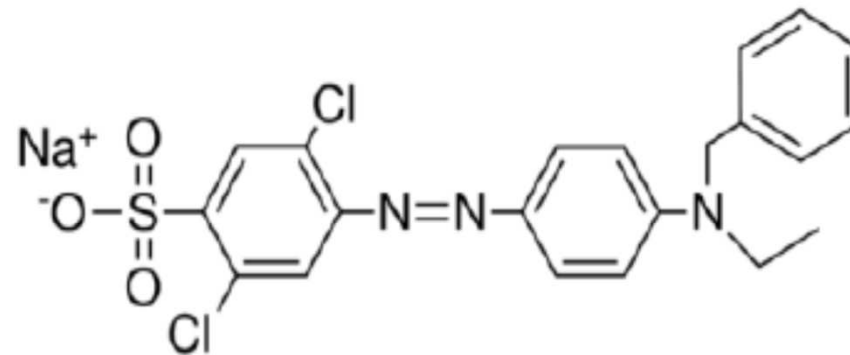
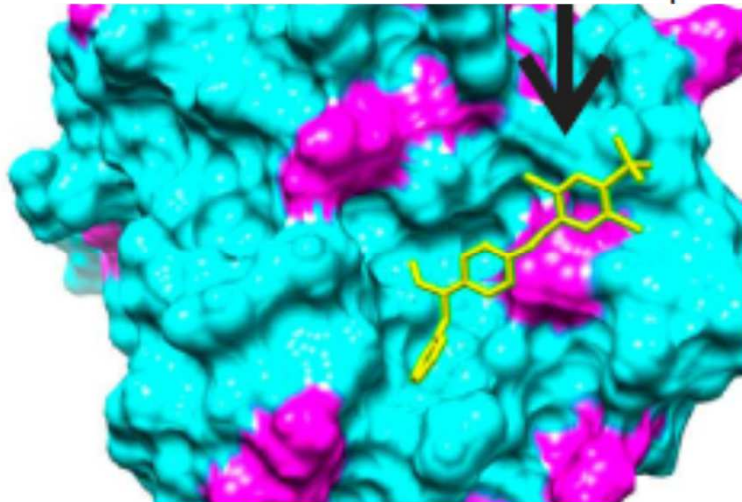
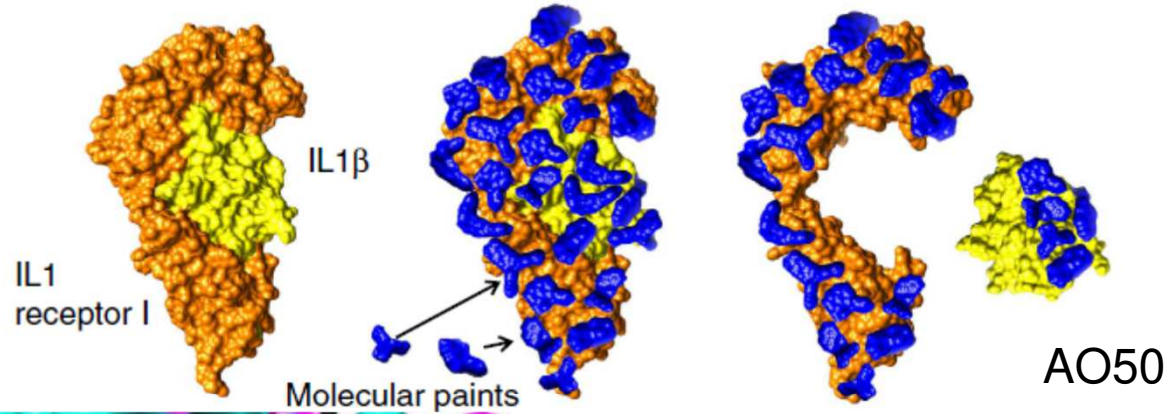
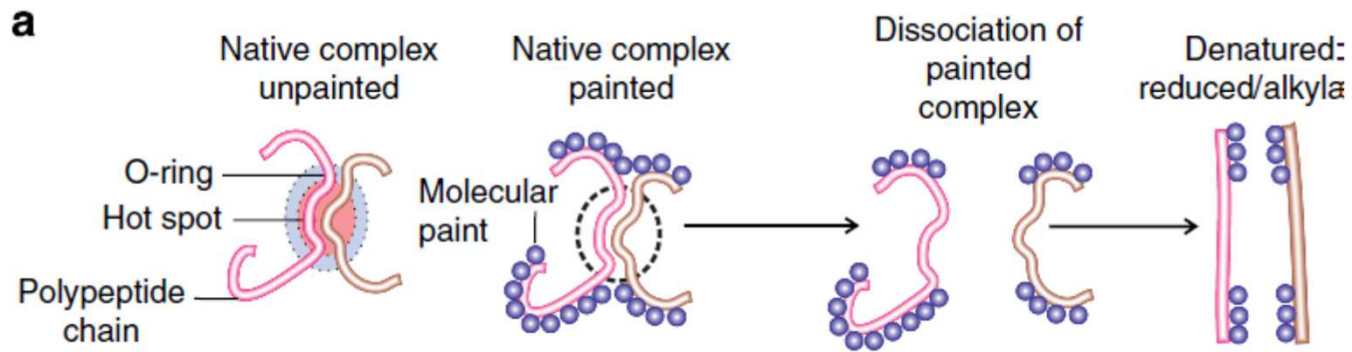
Trcka et al, JBC, 2014



Protein painting

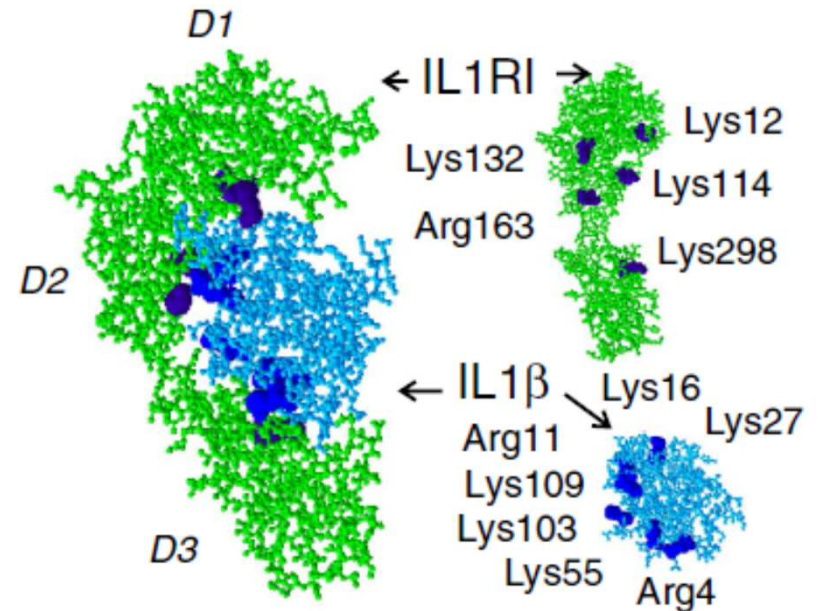
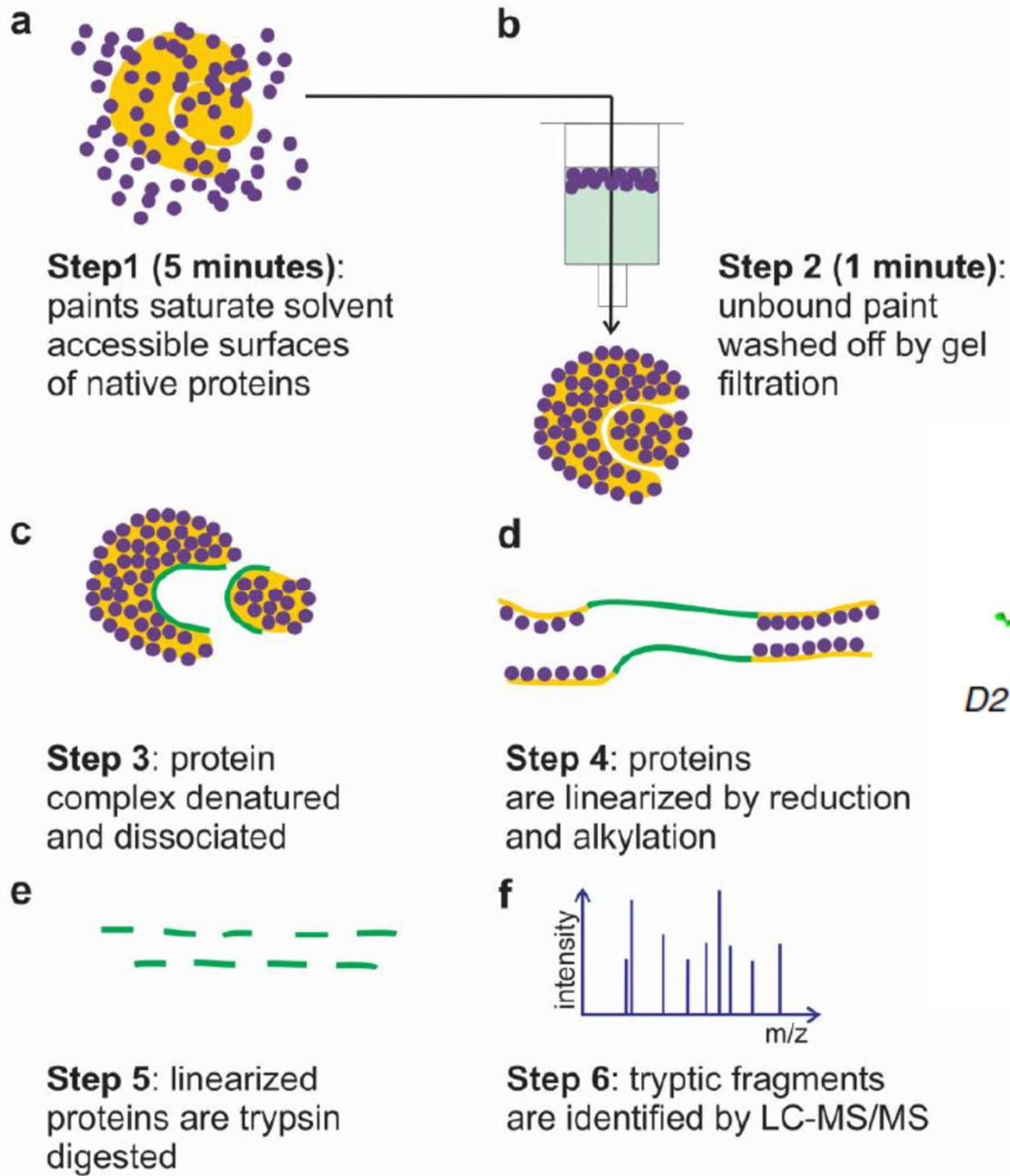


Protein painting

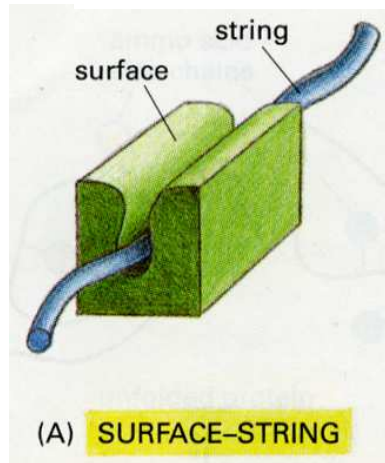


Pro kvalitní interpretaci dat je třeba znát 3D strukturu proteinů

přednáška doc. Marka příště ...

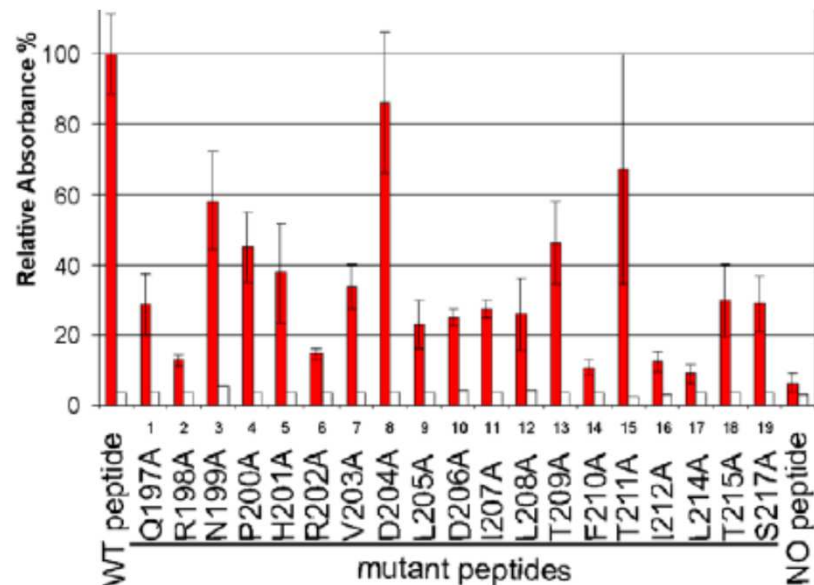
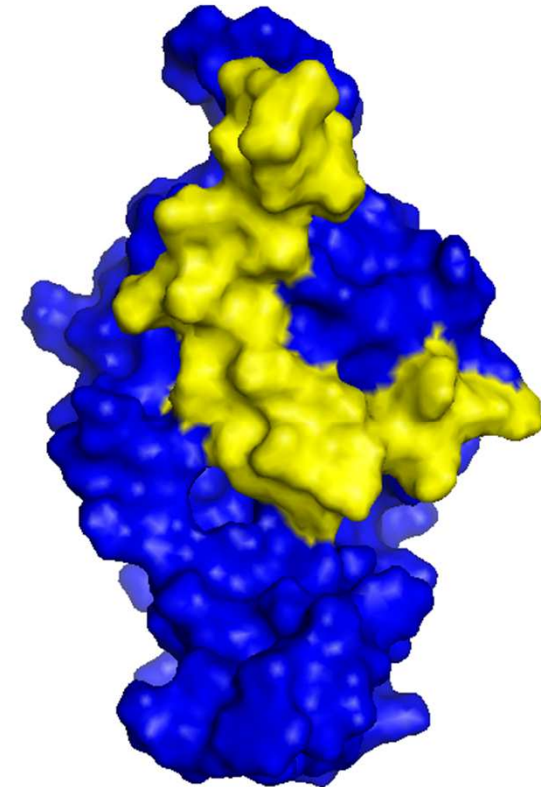


Mapování interakcí



zmapována vazba šroubovice

mutace neukáží, které AMK jsou v kontaktu s AMK v kapse (jedině v krystalu ...)



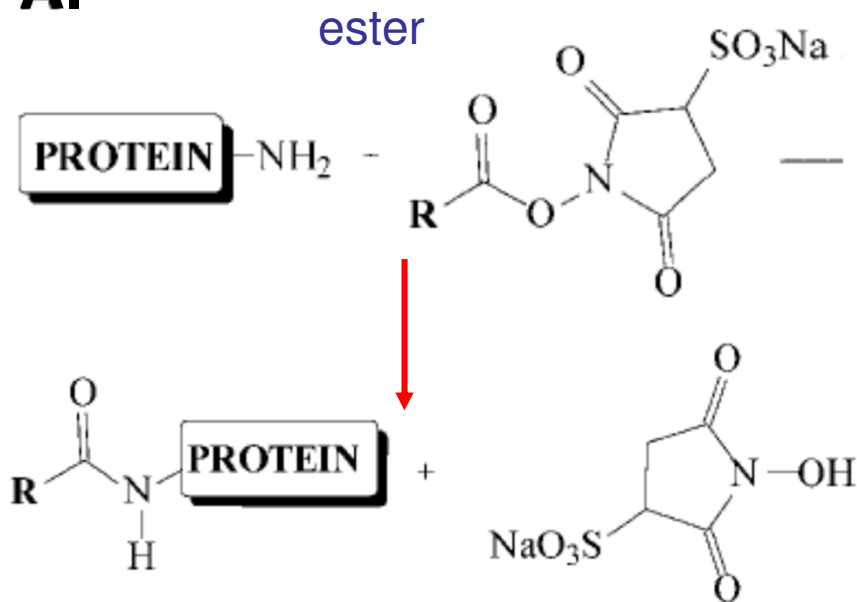
ko-evoluce může napovědět ...

Jak zjistit, jak je šroubovice orientována?

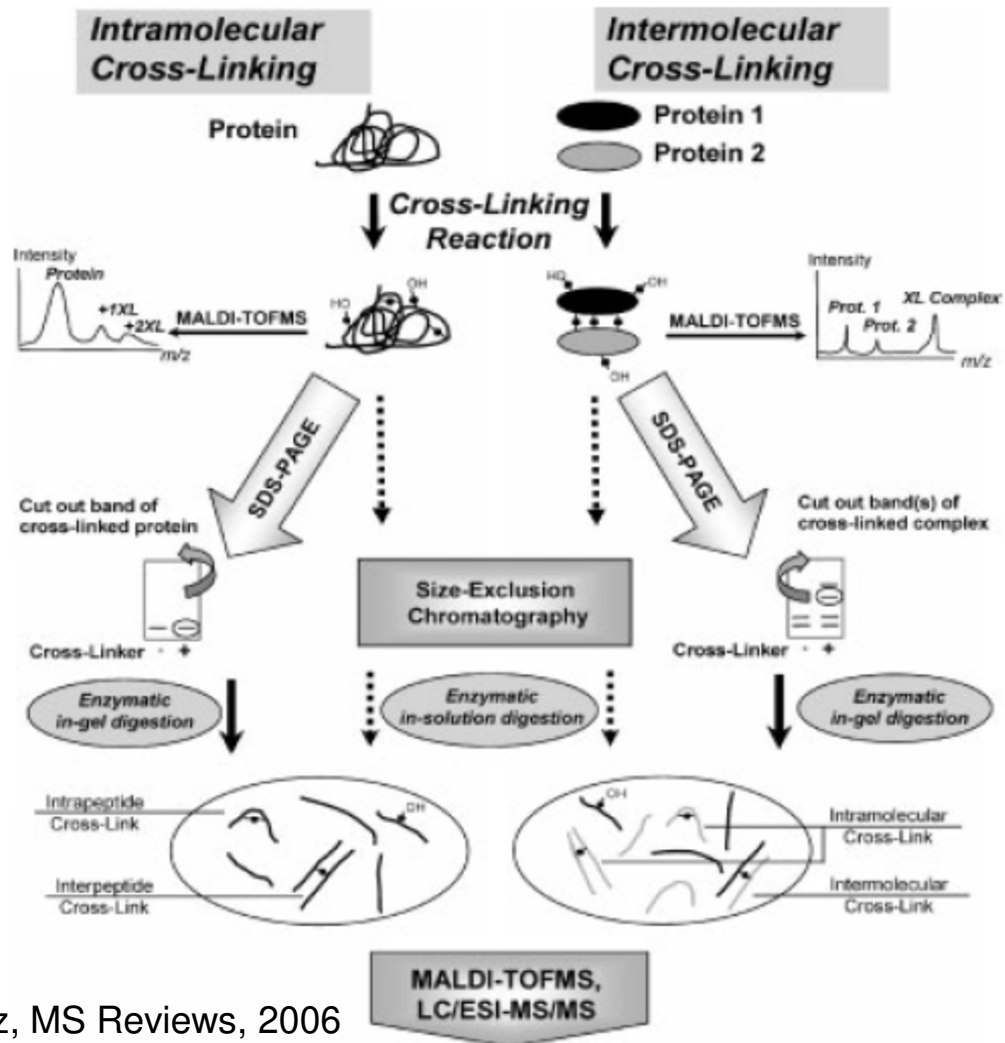
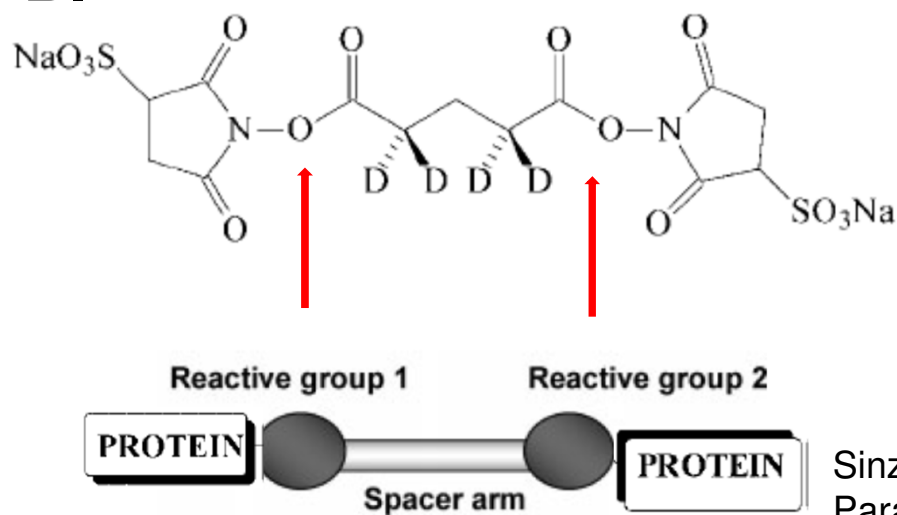
Crosslinking

- 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.



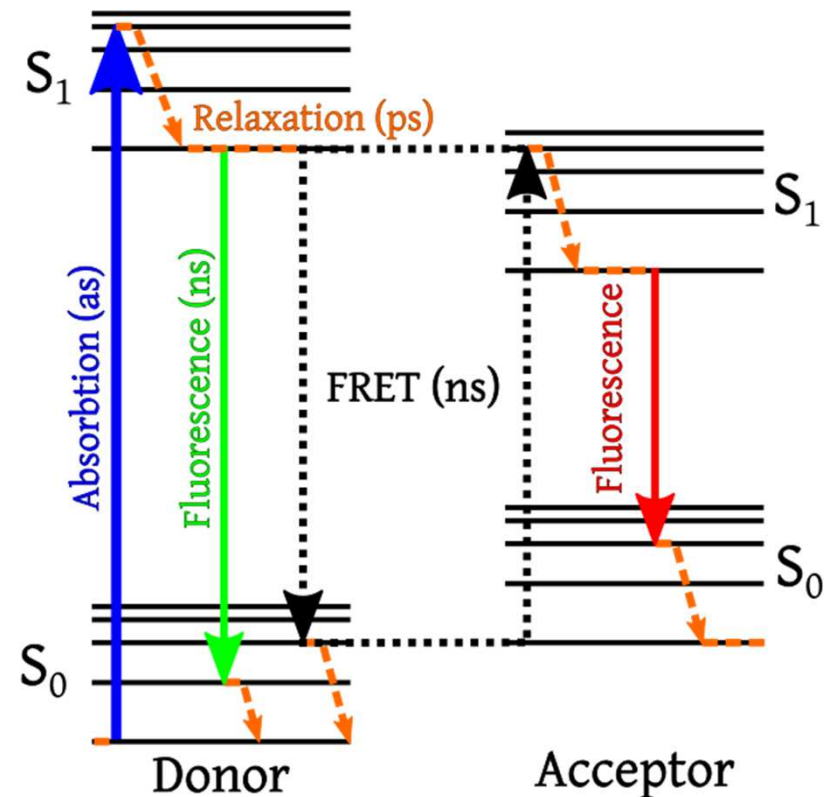
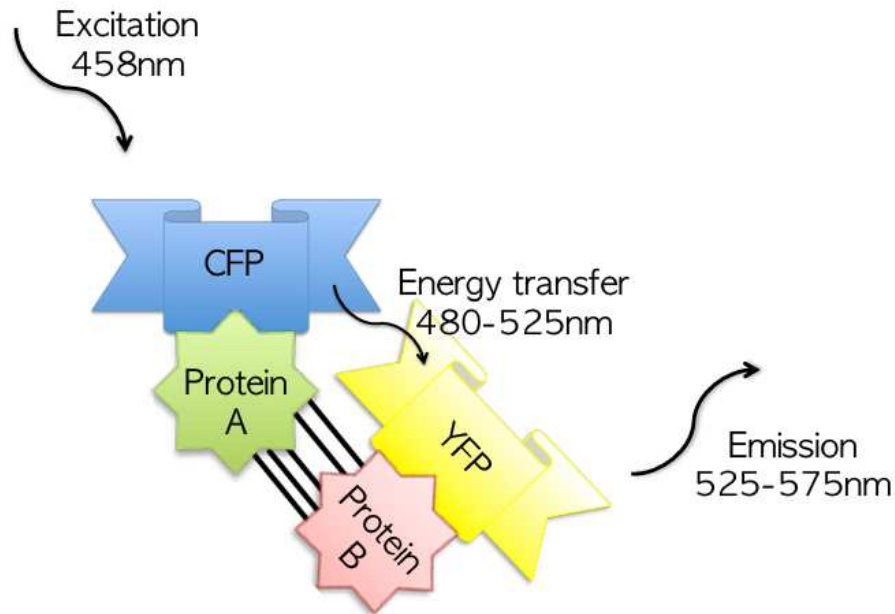
Sinz, MS Reviews, 2006
 Paramelle et al, Proteomics, 2013

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