

CG090 – Metody v proteomice

Analýza protein-proteinových interakcí

doc. Jan Paleček

Laboratoř Strukturních proteinů eukaryotických chromosomů, NCBR PŘF

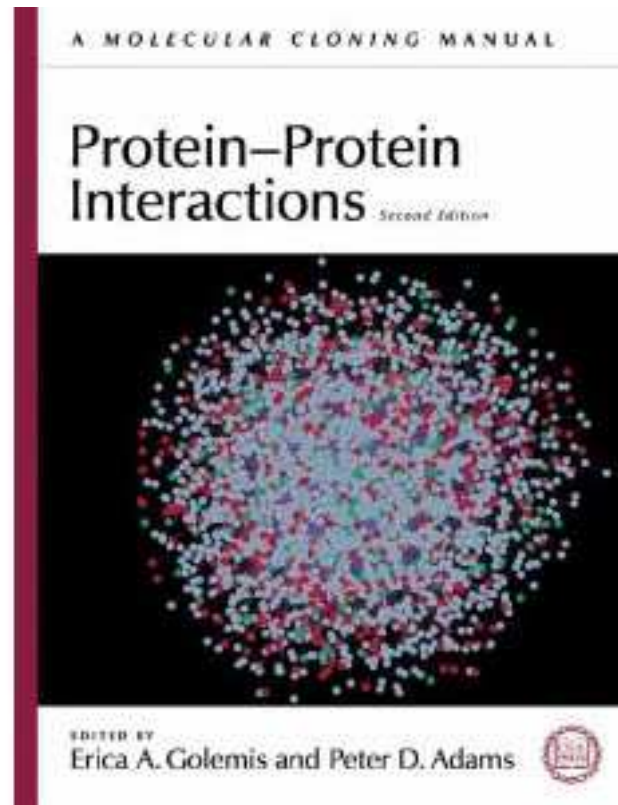
jpalecek@sci.muni.cz

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

mapování binárních interakcí
hybridní!

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 ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- MS-based: painting, H/D-exchange ...
- ko-krystalizace, 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)

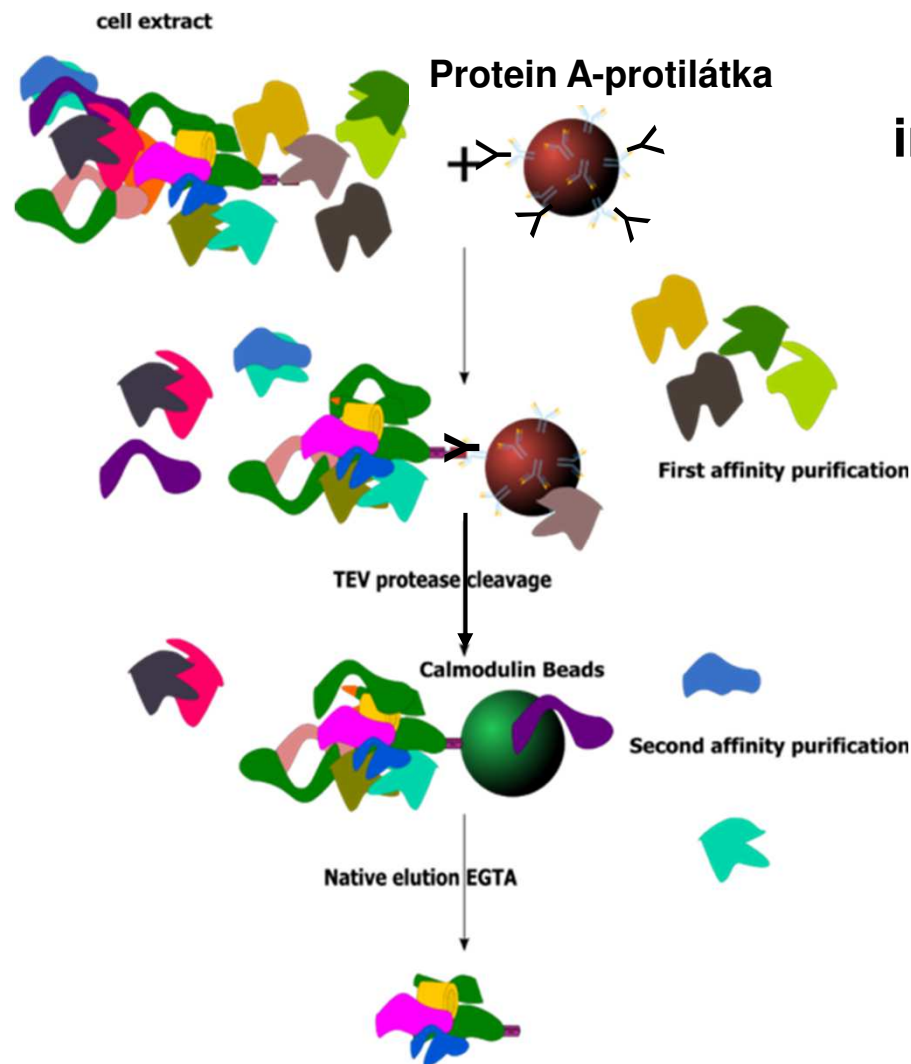


Hybridní!

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

...
 Vassilyeva et al, PNAS, 2017

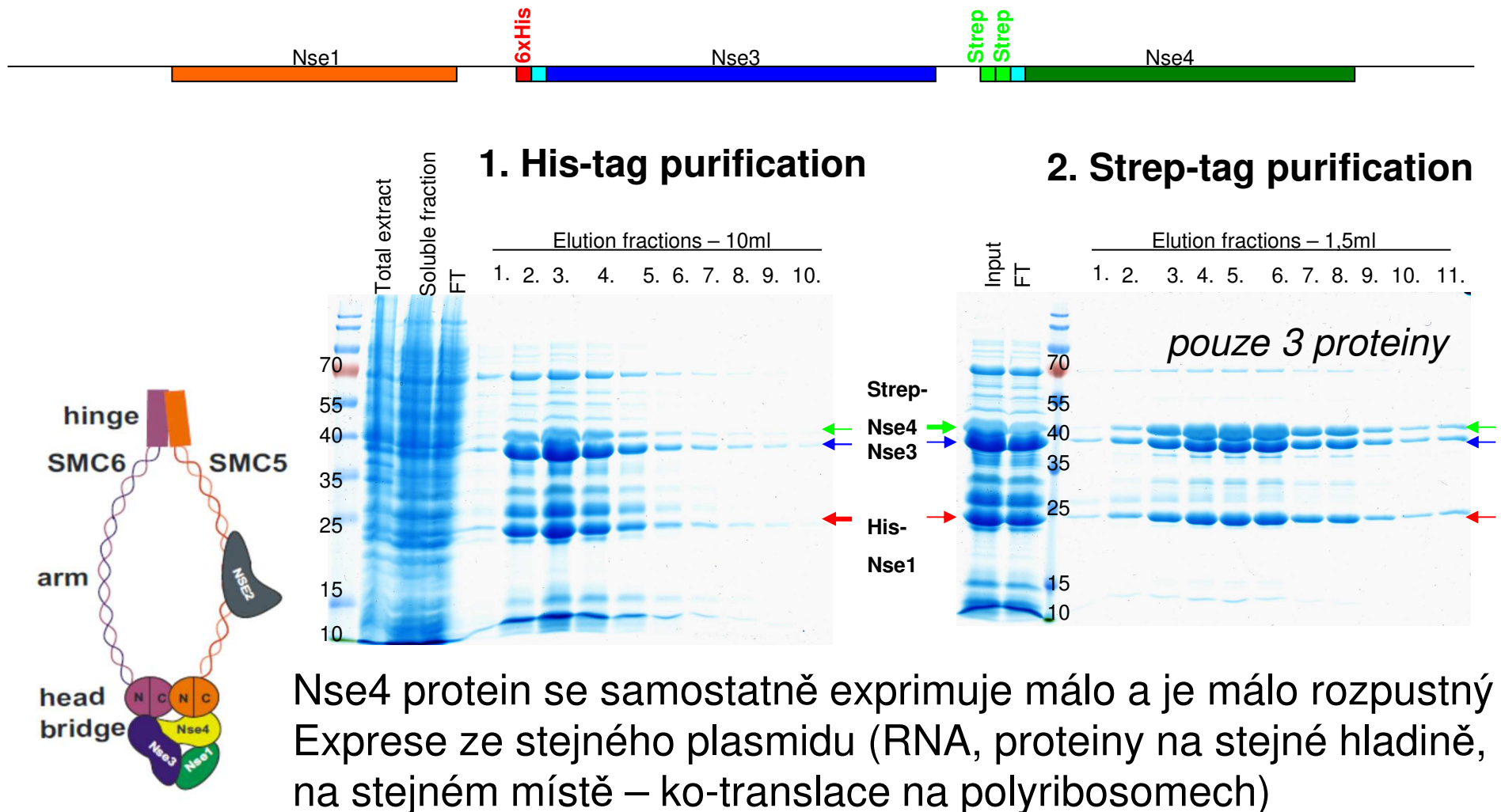
TAG	Affinity K_D^* (M)
FLAG	$10^{-8/-9}$
CalBD	10^{-9}
ChBD	10^{-6}
Pr-A	$10^{-8/-10}$
Strep	10^{-6}
Halo	COV
MBP	10^{-6}
GST	$10^{-6/-7}$
His	$10^{-8/-9}$
CL7	$10^{-14/-17}$



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

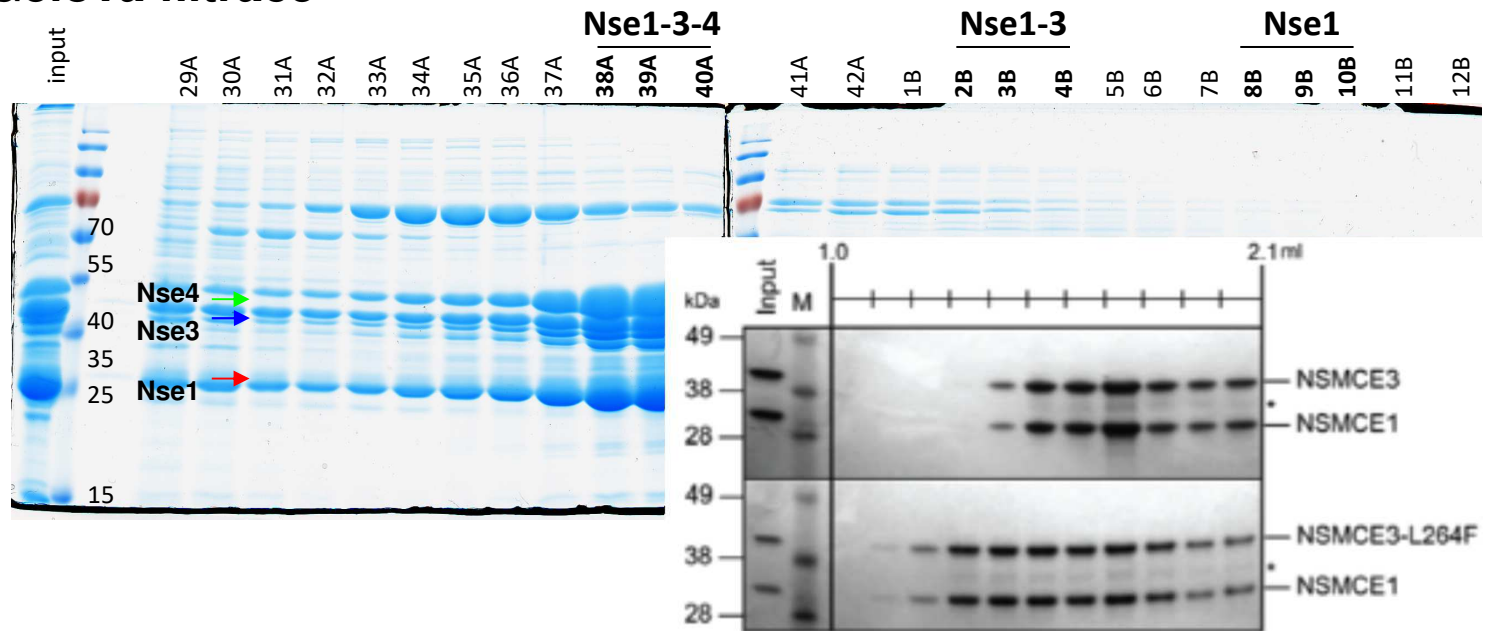
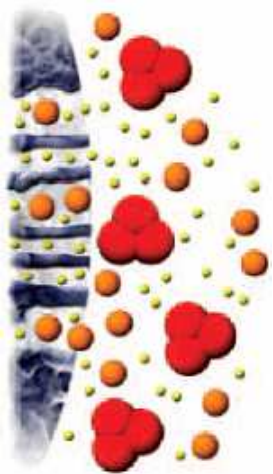
Ko-purifikace

Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat** (viz Dr. R. Dopitová) – jiný organismus (menší riziko zprostředkovaných interakcí)

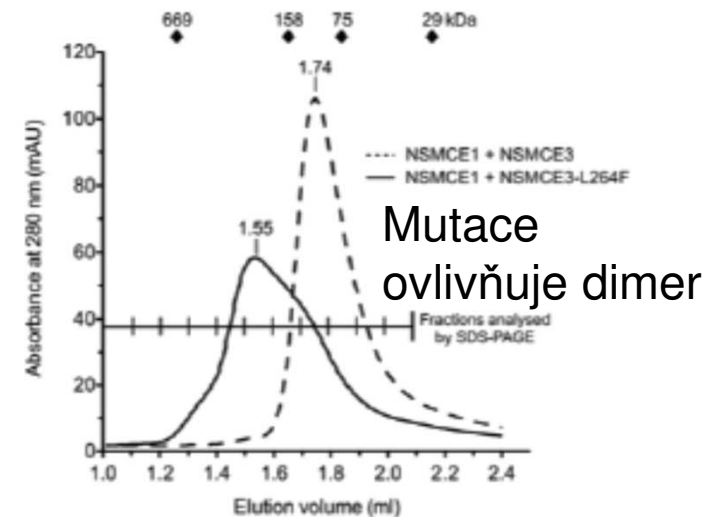
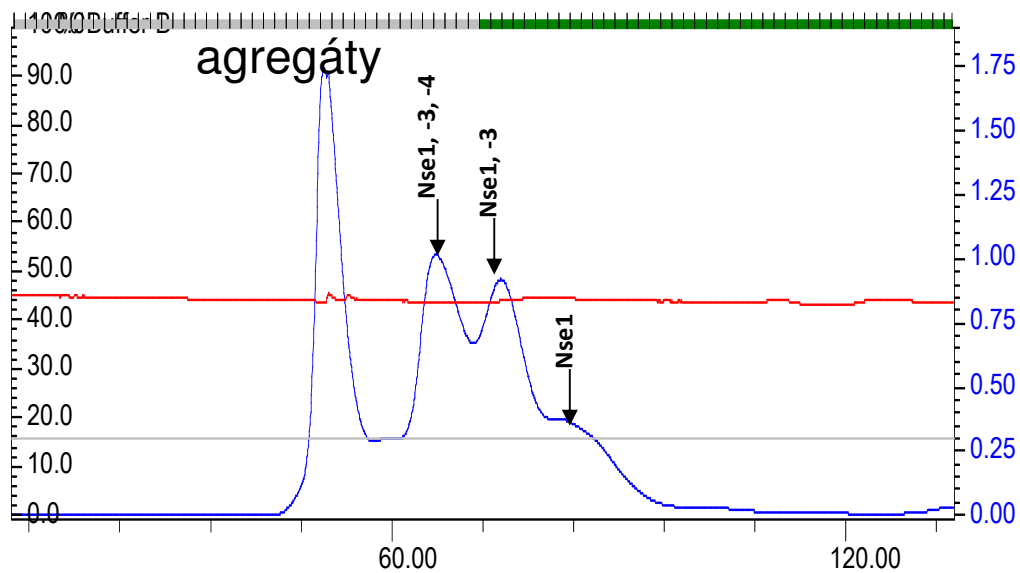


Ko-purifikace

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 (variace)

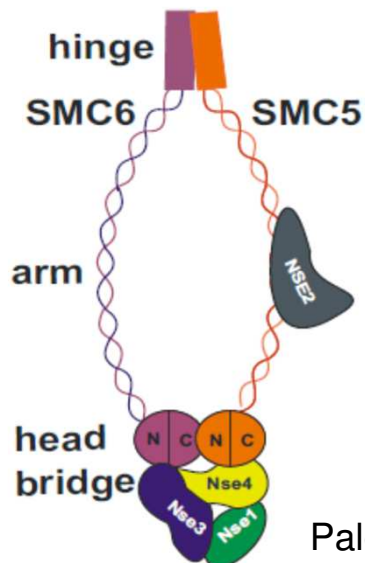
Podobný princip jako při ko-purifikaci/precipitaci

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

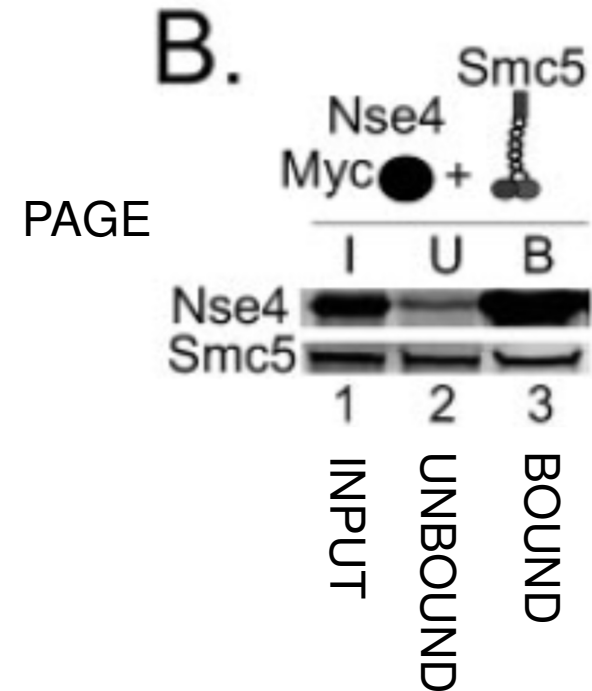
***in vitro* TNT (Transcription and Translation) systém**
methionin S³⁵

výhody:

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



Palecek et al, JBC, 2006



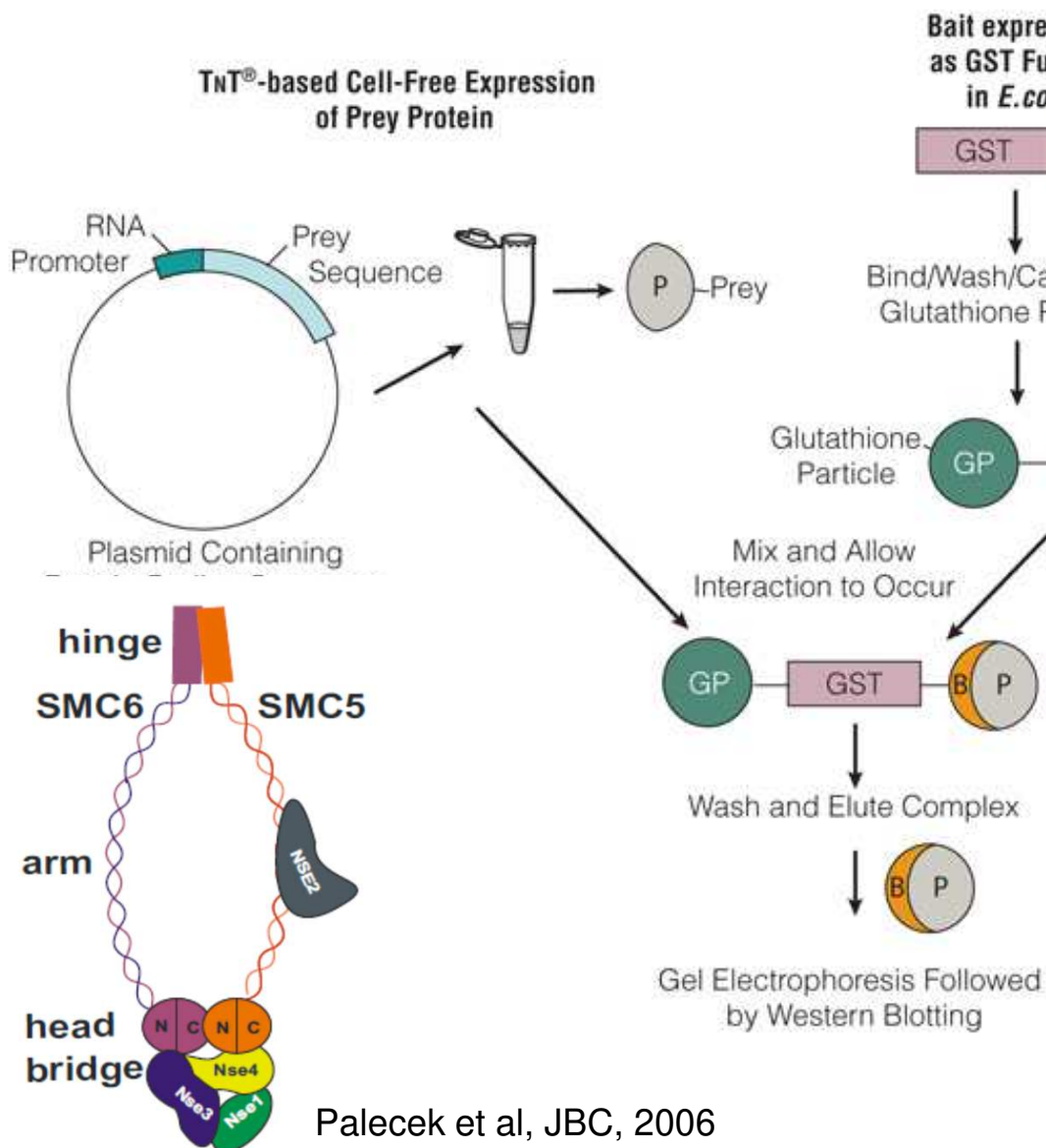
Nse4 protein se dobře exprimuje v TNT (v buňkách je nerozpustný)

Pull-down (variance)

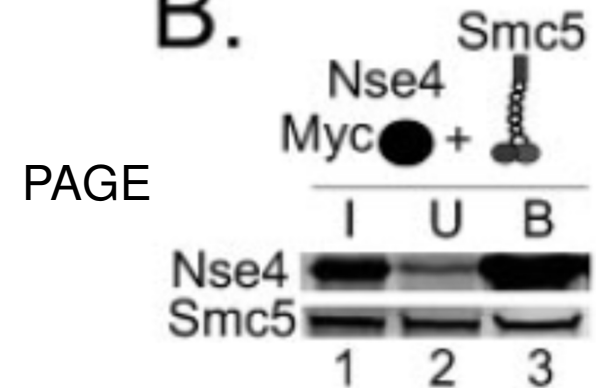
Podobný princip jako při ko-purifikaci/precipitaci

Silné interakce - oba proteiny

v TNT (nM-pM)



B.



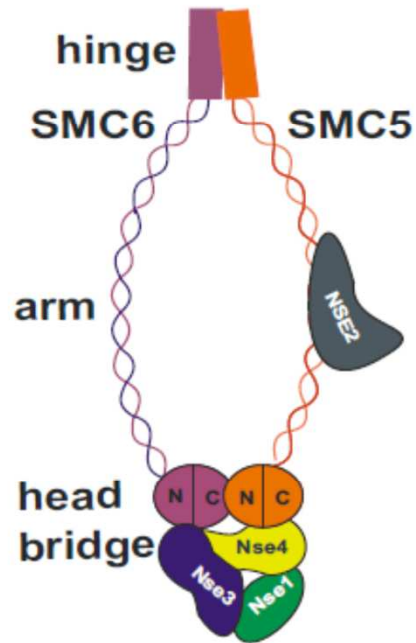
Slabé interakce
(μ M) bait v přebytku (bakt. exprese) a prey v TNT

C.



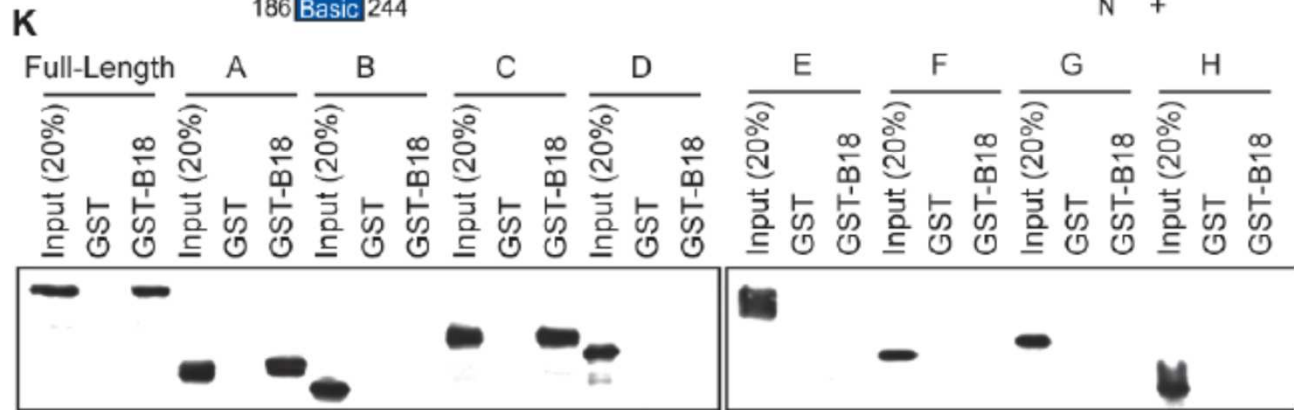
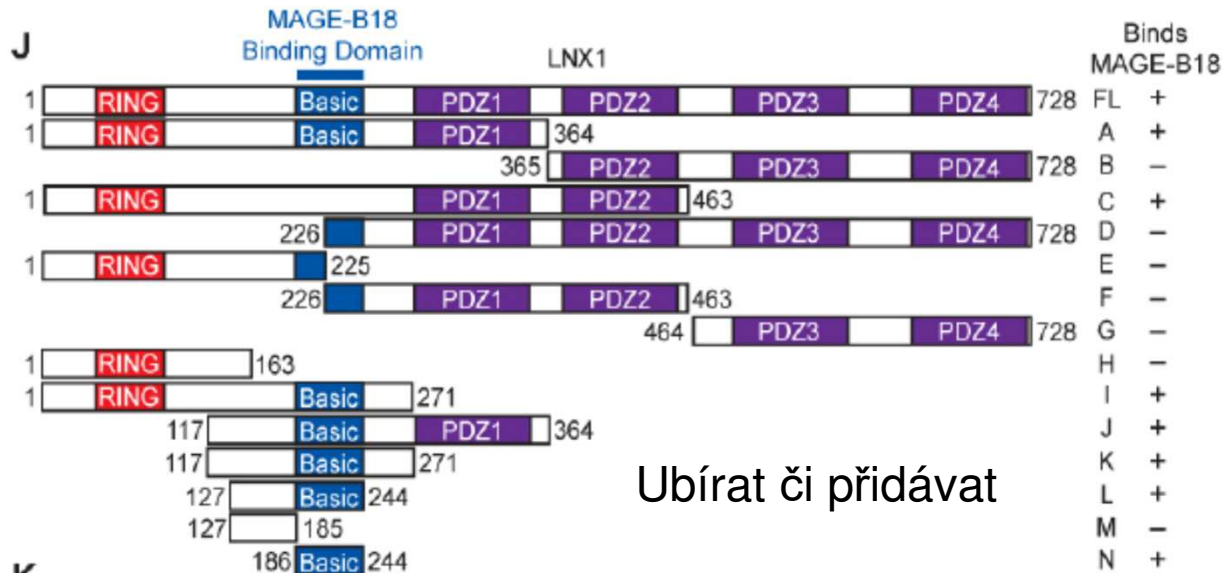
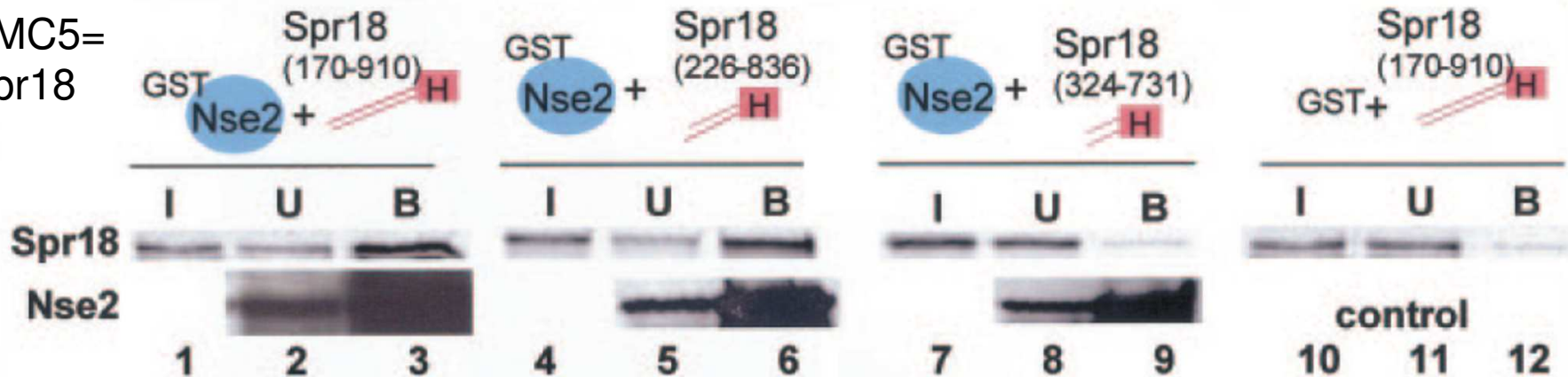
PAGE => Western (anti-GST)

Charakterizace interakcí - domény



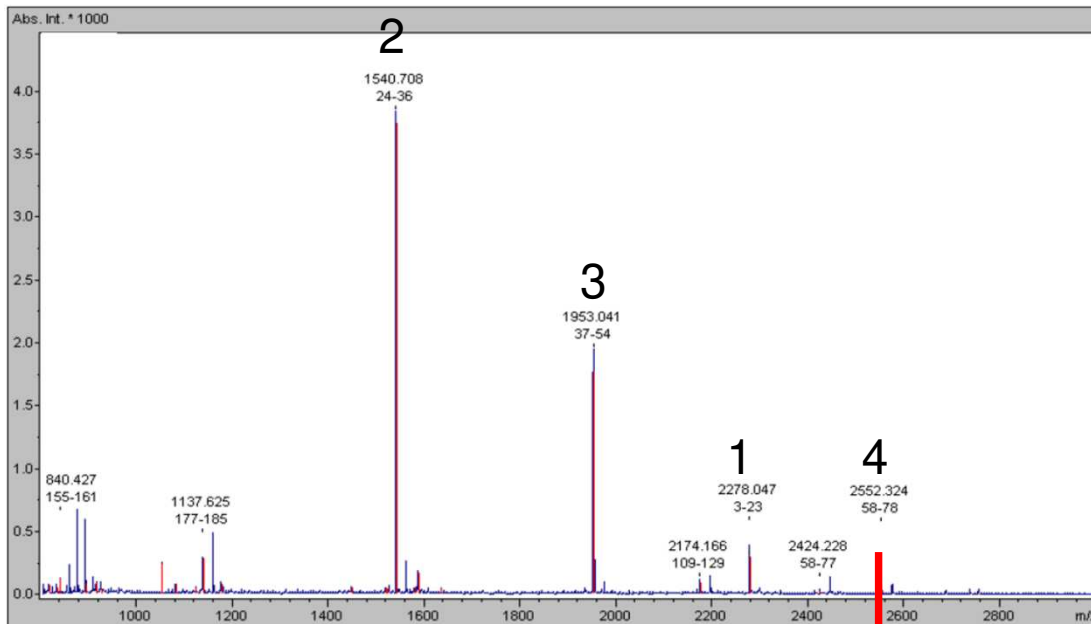
Sergeant et al, MCB, 2005
Doyle et al, Mol Cell, 2010

SMC5= Spr18

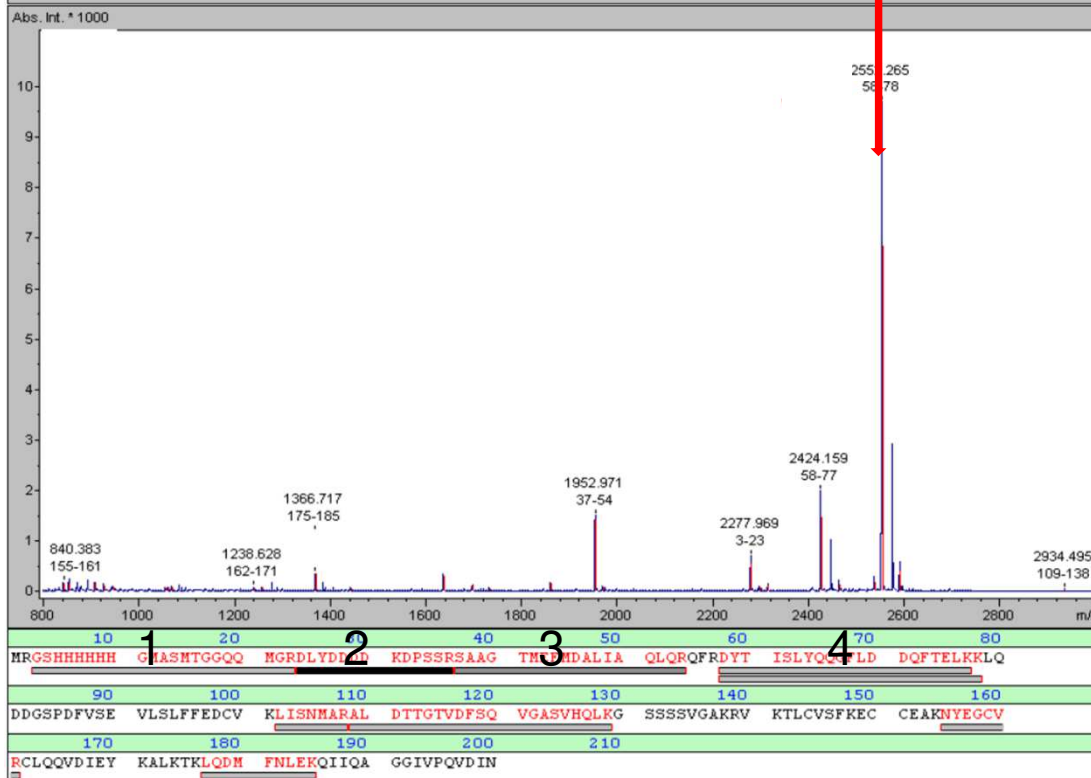


Charakterizace interakcí – detailní mapování

MS spektrum celého proteinu
(normální pokrytí sekvence)

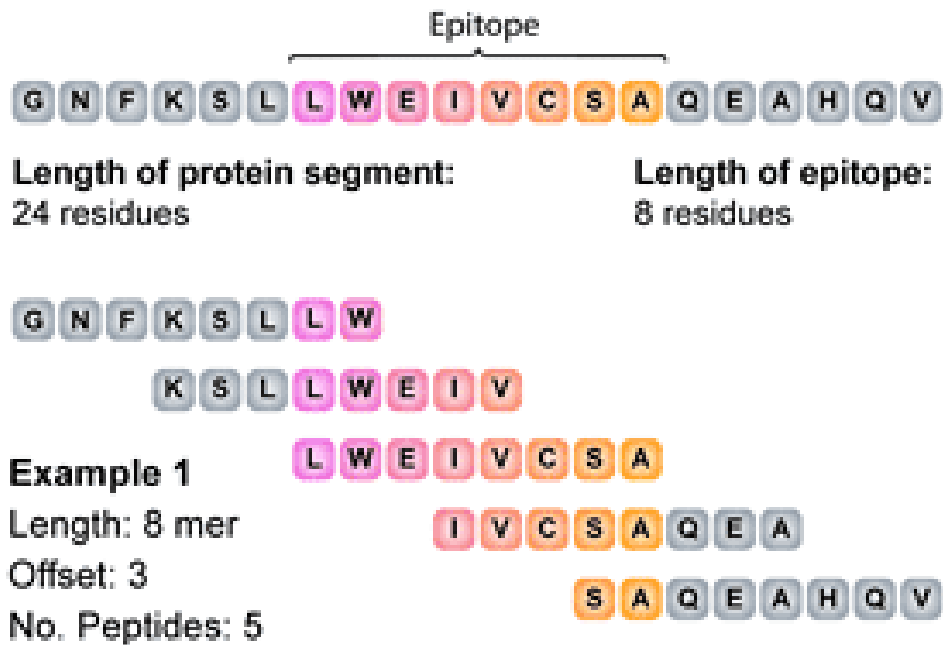
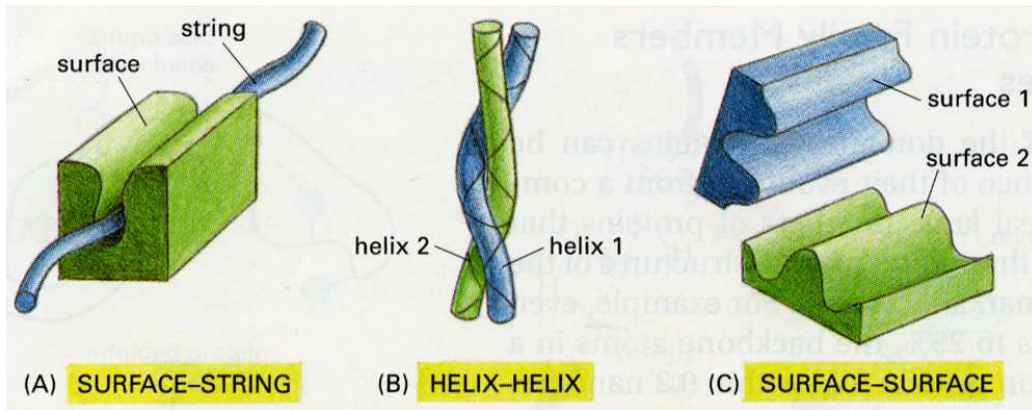


MS spektrum precipitátu
(obohacená interakční část)
P. Reichman (Diplomová práce)



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

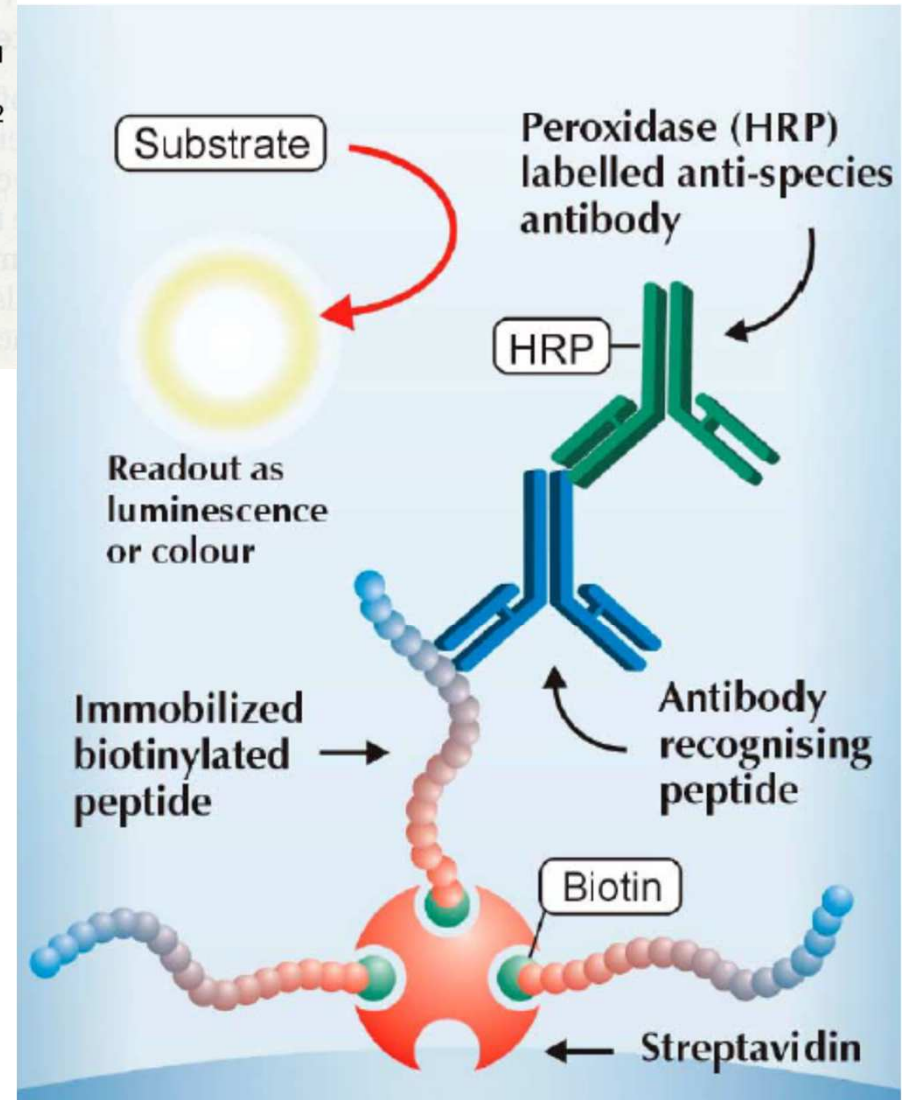
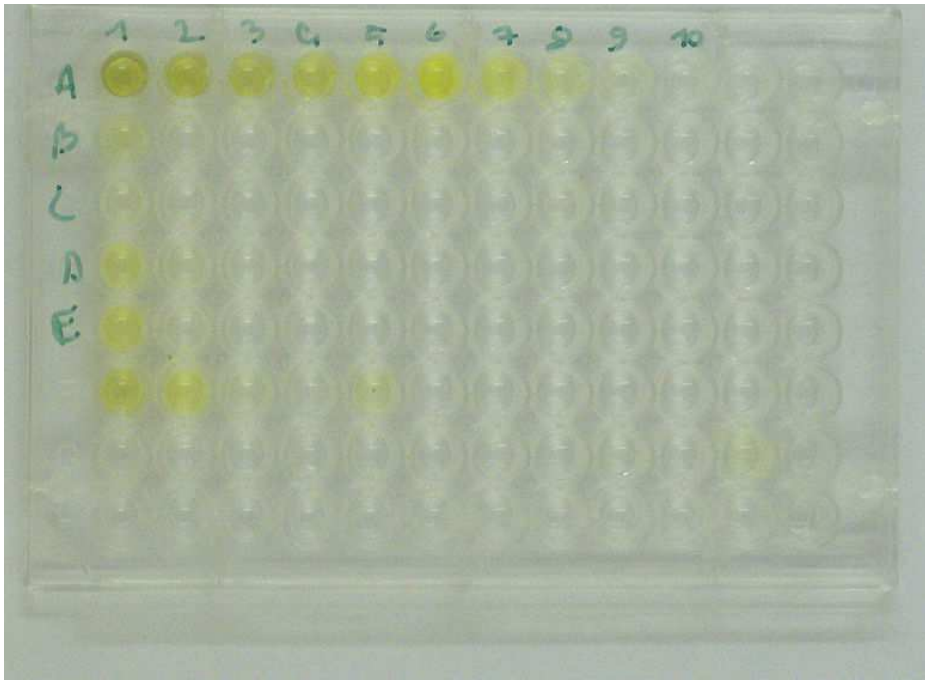


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates



mikrotitrační miska (potažená streptavidinem)
peptidy se navážou přes biotin

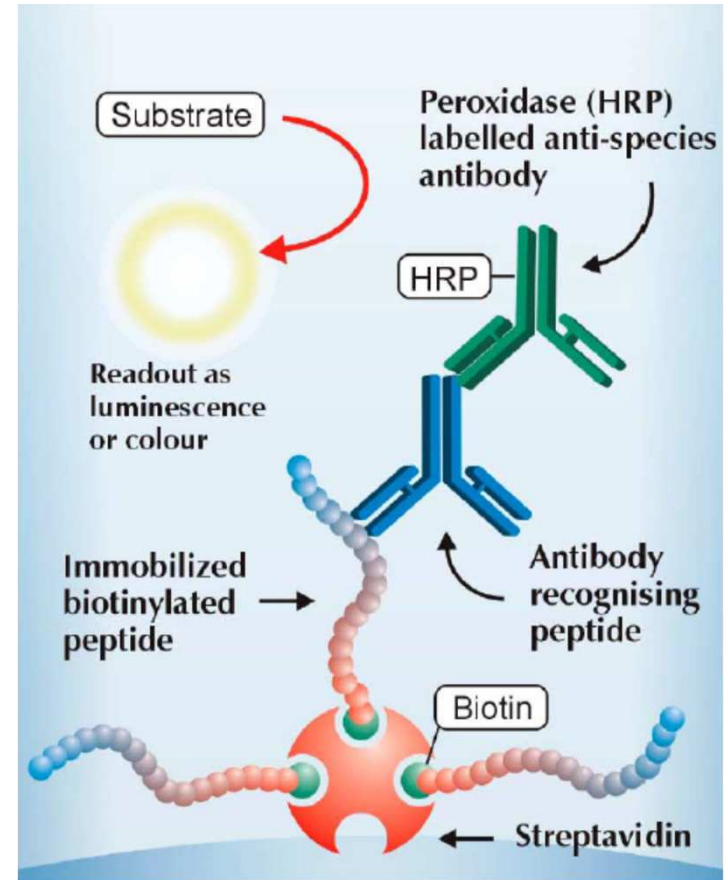


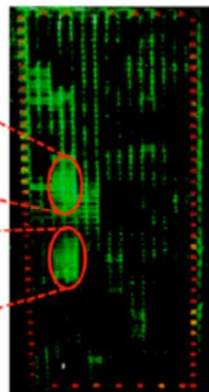
Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Stačí mnohem méně
proteinu

Peptide #31 RLEQLESGEELVLA
Peptide #32 EQLESGEELVLAEY
Peptide #33 LESGEEELVLAEYES

Peptide #43 VASRVDEDEDLLEE
Peptide #44 SRVDEDEDLLEEEHI
Peptide #45 VDEDEDLLEEEHITK

na sklíčku



Flag-Timeless



Control

Cortone et al, PLoS Genet, 2018

DDX11 peptide microarray

DDX11: 906 aa residues
Peptide length: 15 aa
Peptide overlap: 13 aa
Number of peptides: 454
Number of spots: 908 (peptides in duplicate)
Control frame peptides: Flag (green spots); HA (red spots)

Peptidové mapování

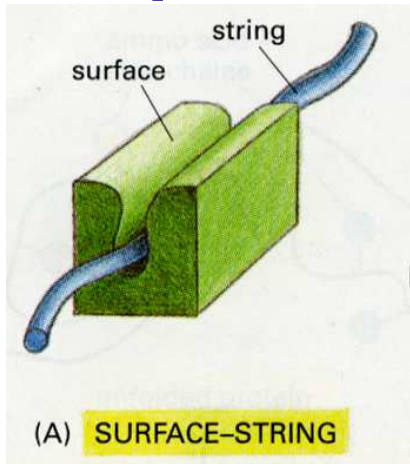
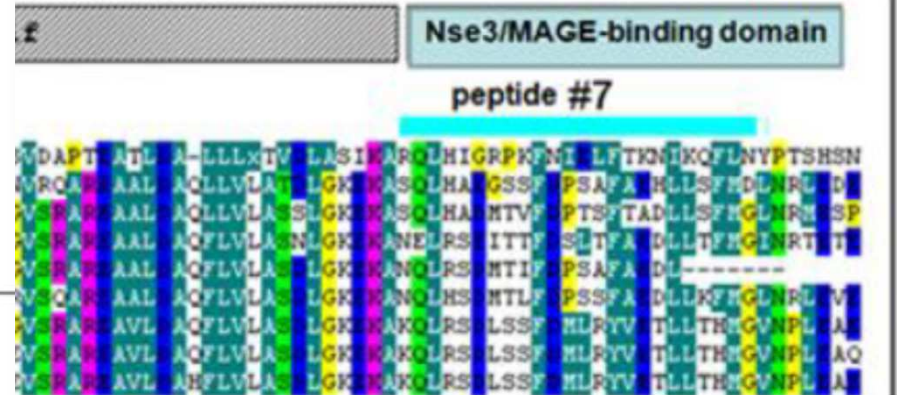
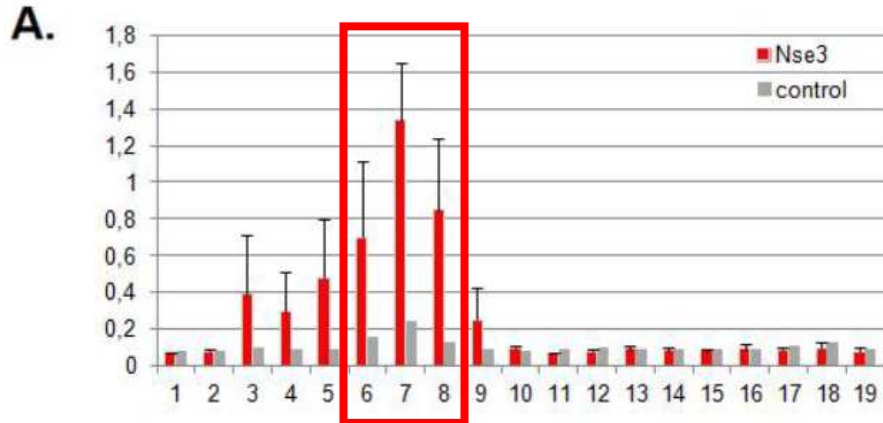


Table 3. *S. pombe* Nse4 synthetic peptides list
Nse4 peptidy

	peptide sequence
peptide #1	DAPTEATLDALLLTKTVDLASIKAR
peptide #2	-----EATLDALLLTKTVDLASIKARQLHI
peptide #3	-----DALLLTKTVDLASIKARQLHIGRPK
peptide #4	-----LTKTVDLASIKARQLHIGRPKFNIE
peptide #5	-----VDLASIKARQLHIGRPKFNIELFTK
peptide #6	-----SIKARQLHIGRPKFNIELFTKNIKQ
peptide #7	-----RQLHIGRPKFNIELFTKNIKQFLNY
peptide #8	-----IGRPKFNIELFTKNIKQFLNYPTSH
peptide #0	-----KFNIELFTKNIKQFLNYPTSHSNVT
	-----ELFTKNIKQFLNYPTSHSNVTRIQE
	-----KNIKQFLNYPTSHSNVTRIQEIDTA
	-----QFLNYPTSHSNVTRIQEIDTAW SRL



B.

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

Analýza Nse3-Nse4 interakce

Délka: 25 AMK

Posuv: 4 AMK

Knihovna: 18 peptidů



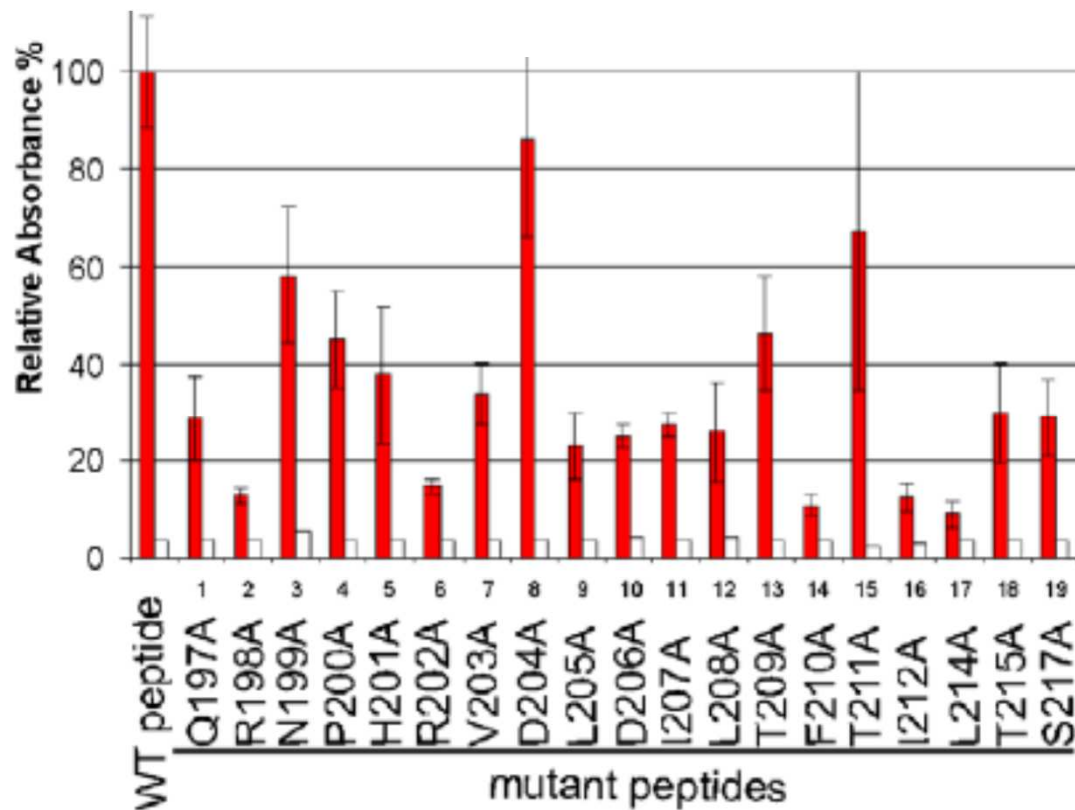
Charakterizace interakcí – „alanin scan“

EID2 peptidy (paralog Nse4)

Délka: 25 AMK

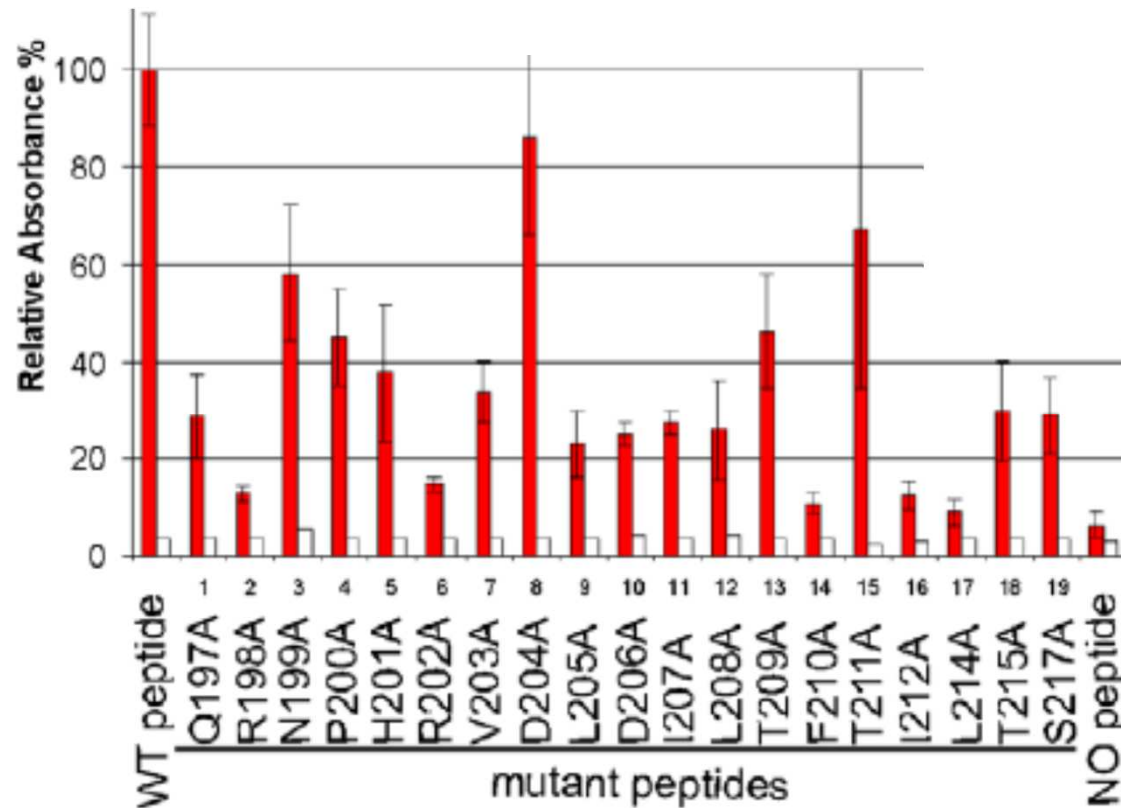
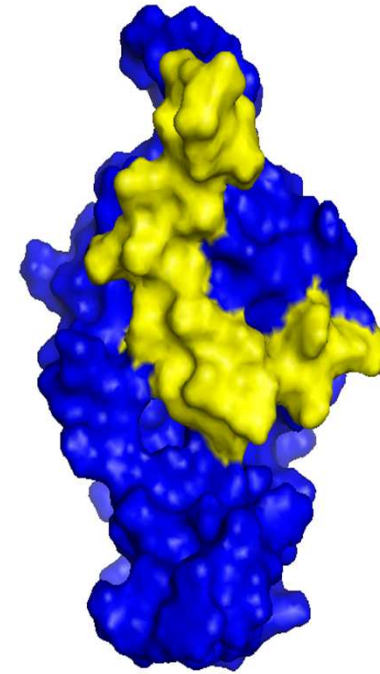
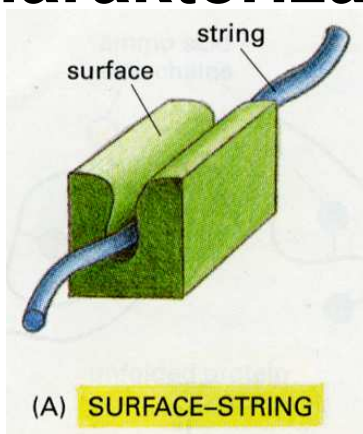
Posuv: mutace po 1 AMK

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 A LFTFTIALTAS
peptide #12	QRNPHRVLDLID I ATFTIALTAS
peptide #13	QRNPHRVLDLIDIL A FTFTIALTAS
peptide #14	QRNPHRVLDLILT A TIALTAS
peptide #15	QRNPHRVLDLILTFT I AIALTAS
peptide #16	QRNPHRVLDLILTFTT A ALTAS
peptide #17	QRNPHRVLDLILTFTTIA A TAS
peptide #18	QRNPHRVLDLILTFTTIAL A AS
peptide #19	QRNPHRVLDLILTFTTIALT A A

Charakterizace interakcí – „alanin scan“



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

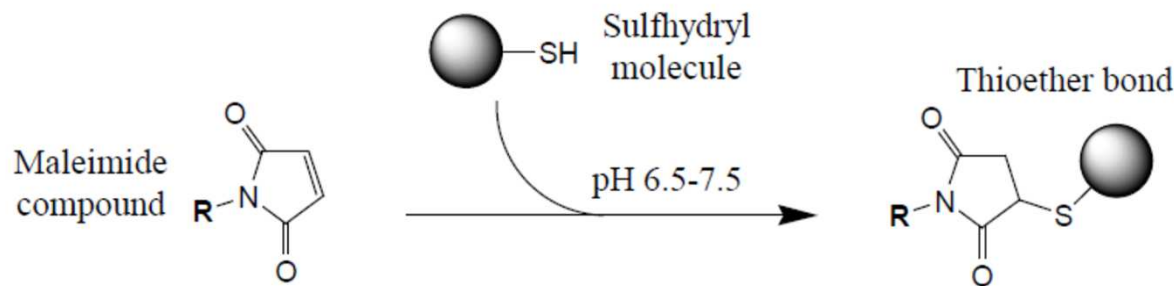
Jak je šroubovice orientována?

*Mohou mutace vylepšit interakčních
schopnosti?*

Viz dále ...

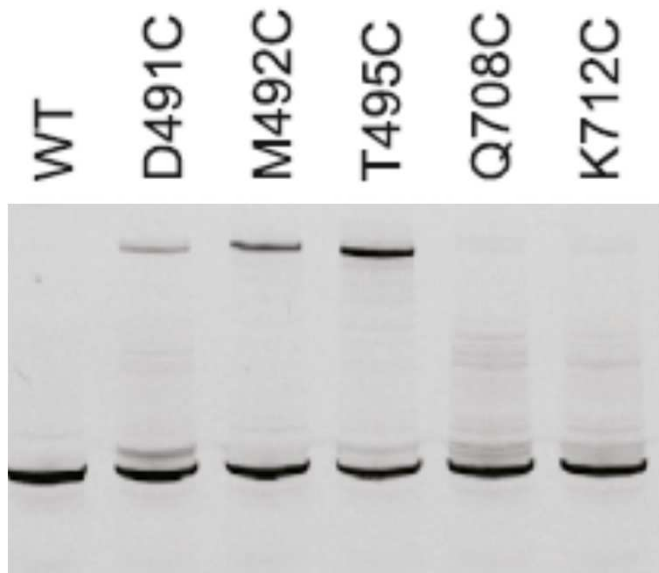
Mapování interakcí - crosslinking

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

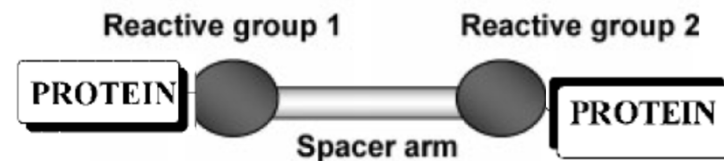
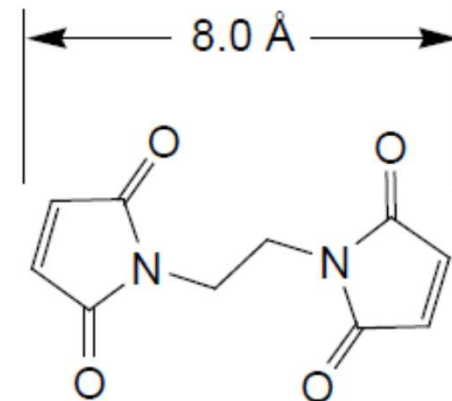


- cílené mutace na Cys
- na SDS-PAGE lze detekovat XL

BMOE, bis(maleimido)ethane.



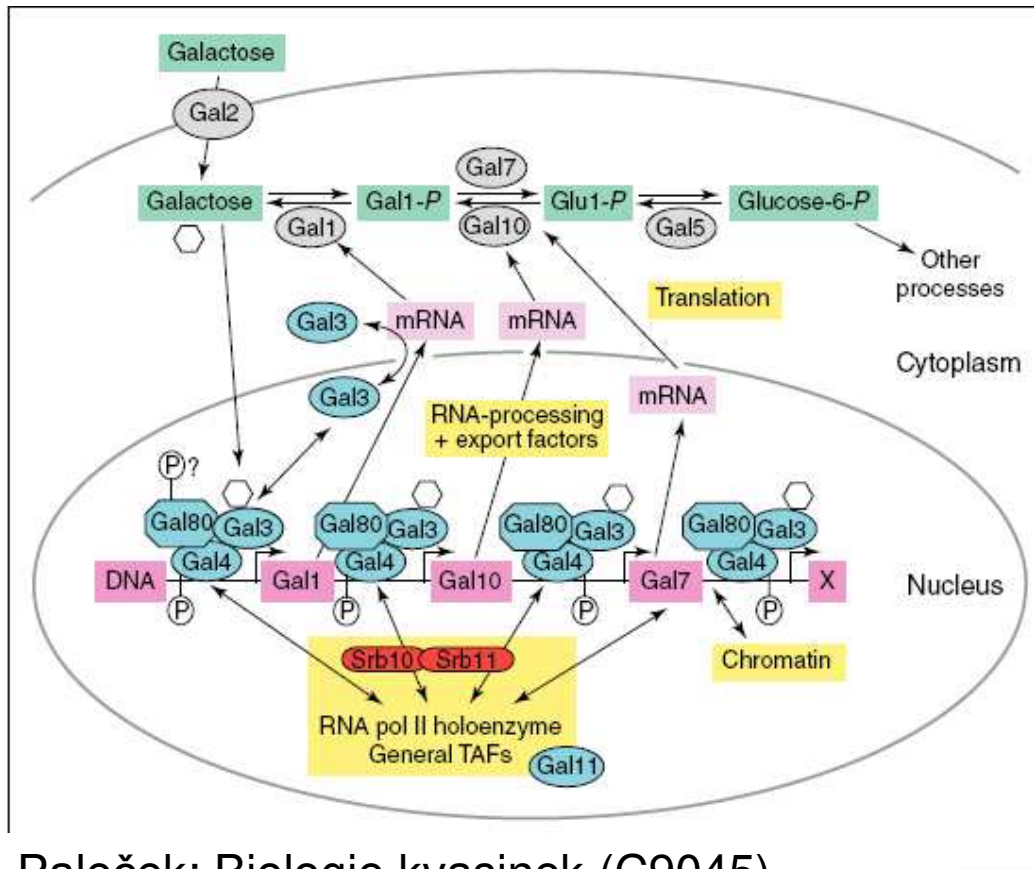
intenzita koreluje se vzdáleností



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



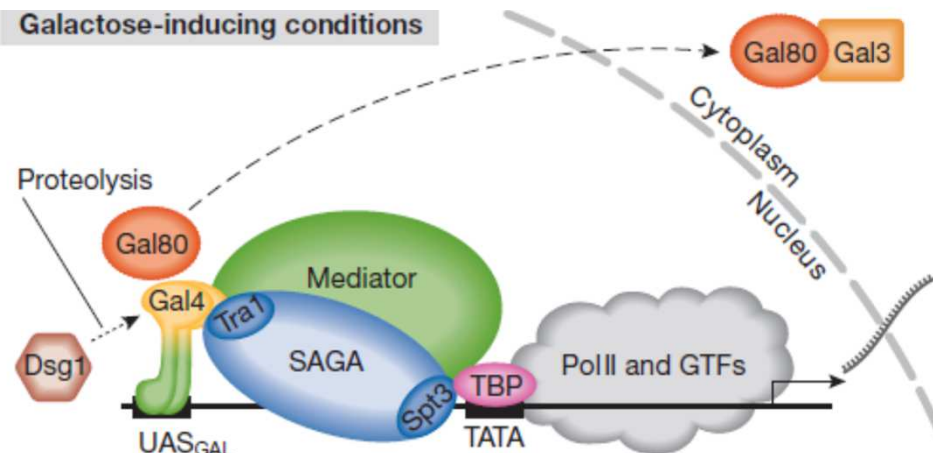
Dvou-hybridní systémy (kvasinkové)

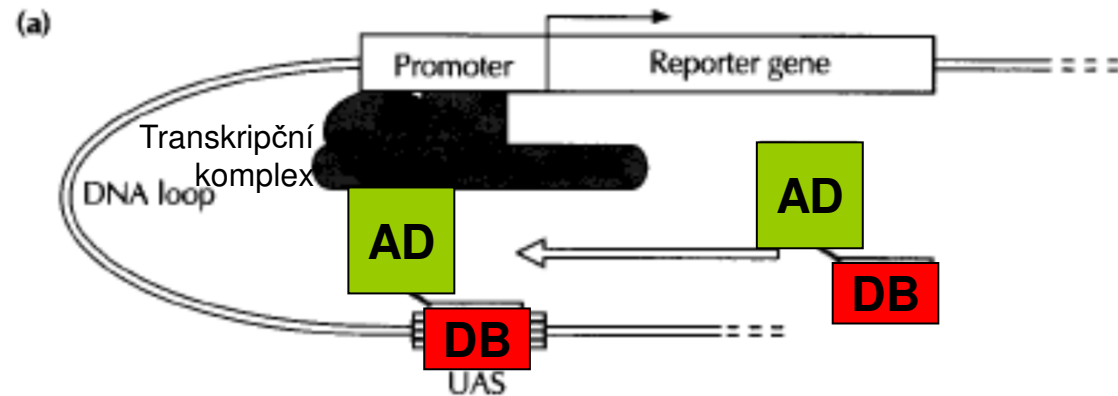
Při studiu mechanismů transkripce v kvasinkách *S. cerevisiae* byl vyvinut tzv. Y2H

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

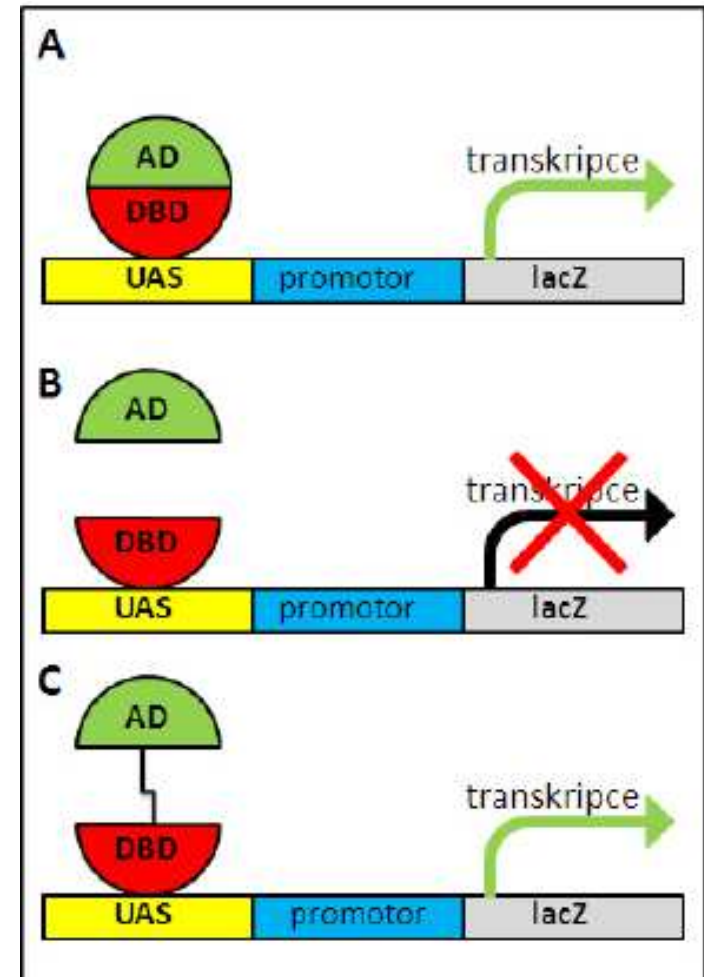
Uetz and Finley, 2005
Traven et al.: EMBO Report, 2006

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





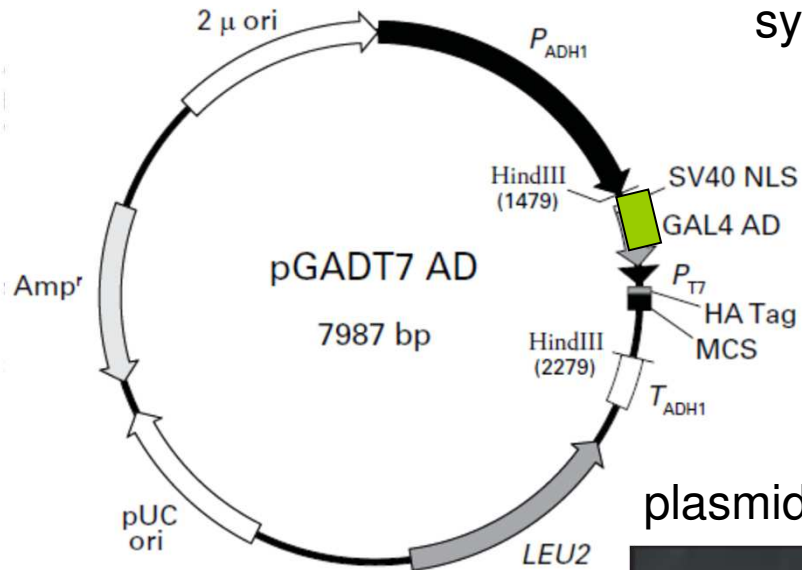
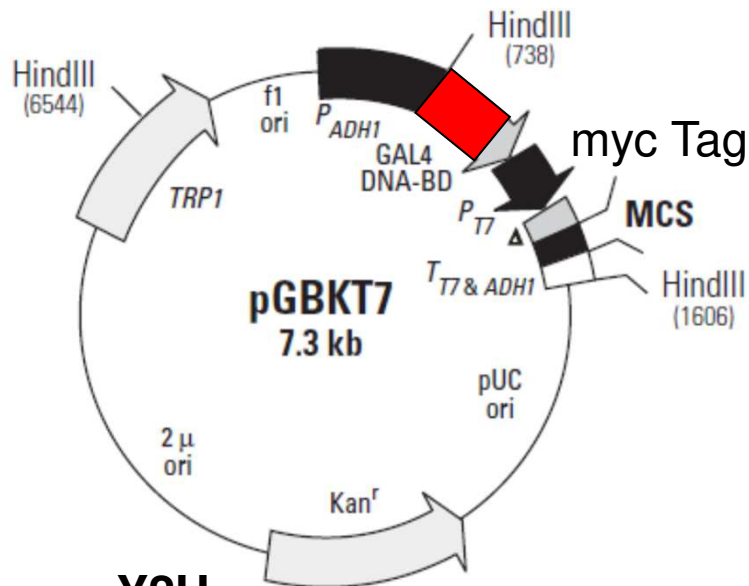
- DNA-vazebná doména (DB) bez aktivační domény (AD) není schopna aktivace transkripce
- Je možné **propojit domény** jakýmkoli linkerem a transkripci reaktivovat



Gal4p

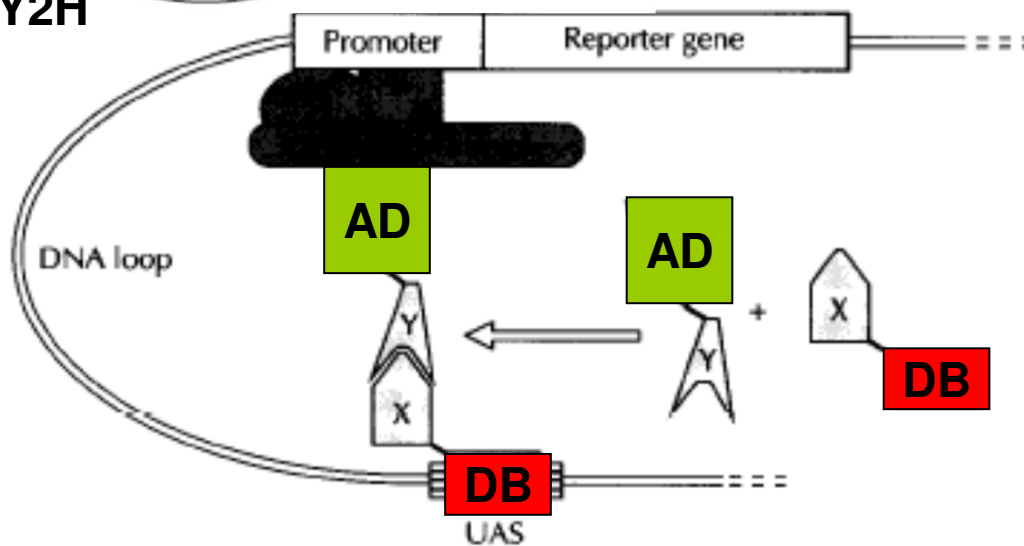


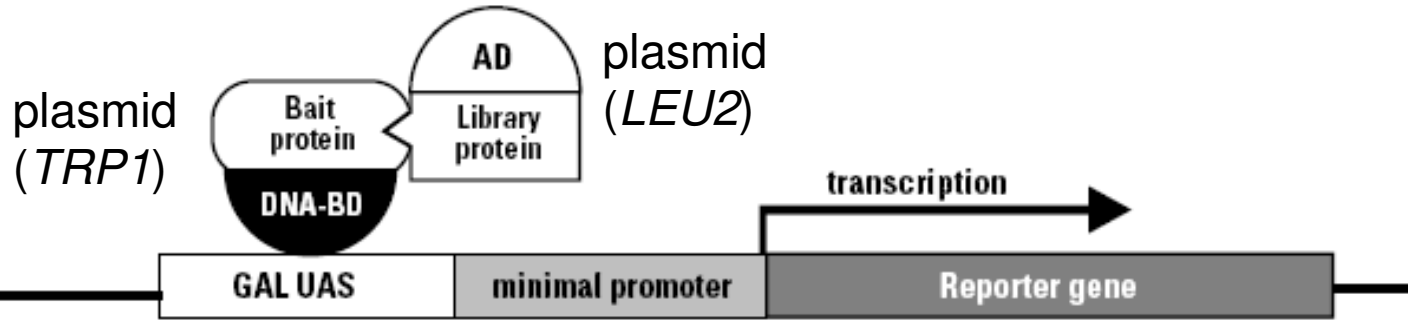
system vhodný i pro pull-down



transformace plasmidů do kvasinky

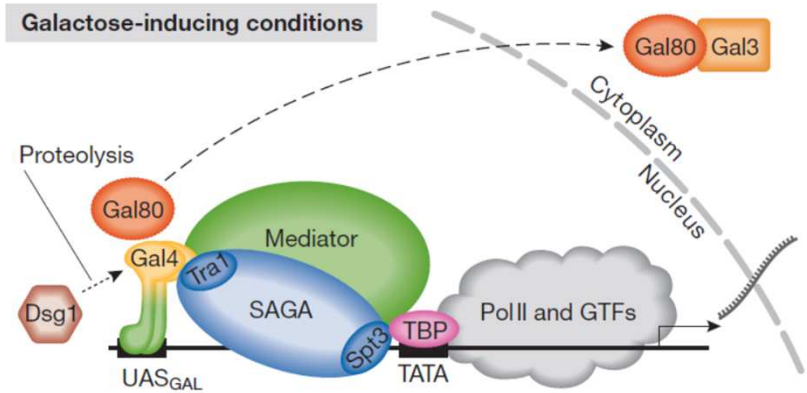
Y2H





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

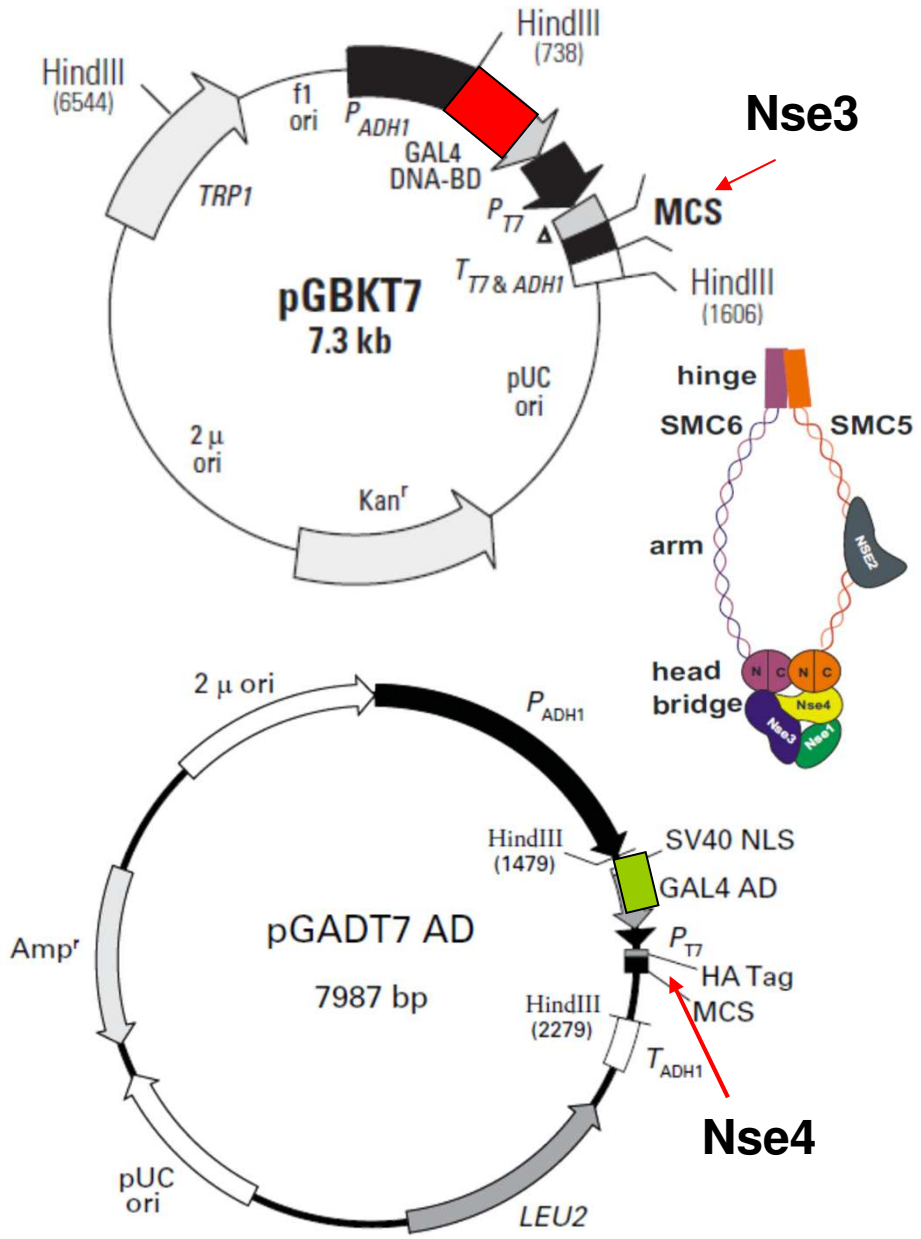
- Testuje se schopnost růstu kvasinek na médiu bez histidinu (nebo adeninu – červená/bílá)
- lze použít i pro hledání proteinových interakčních partnerů (screen knihovny)

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

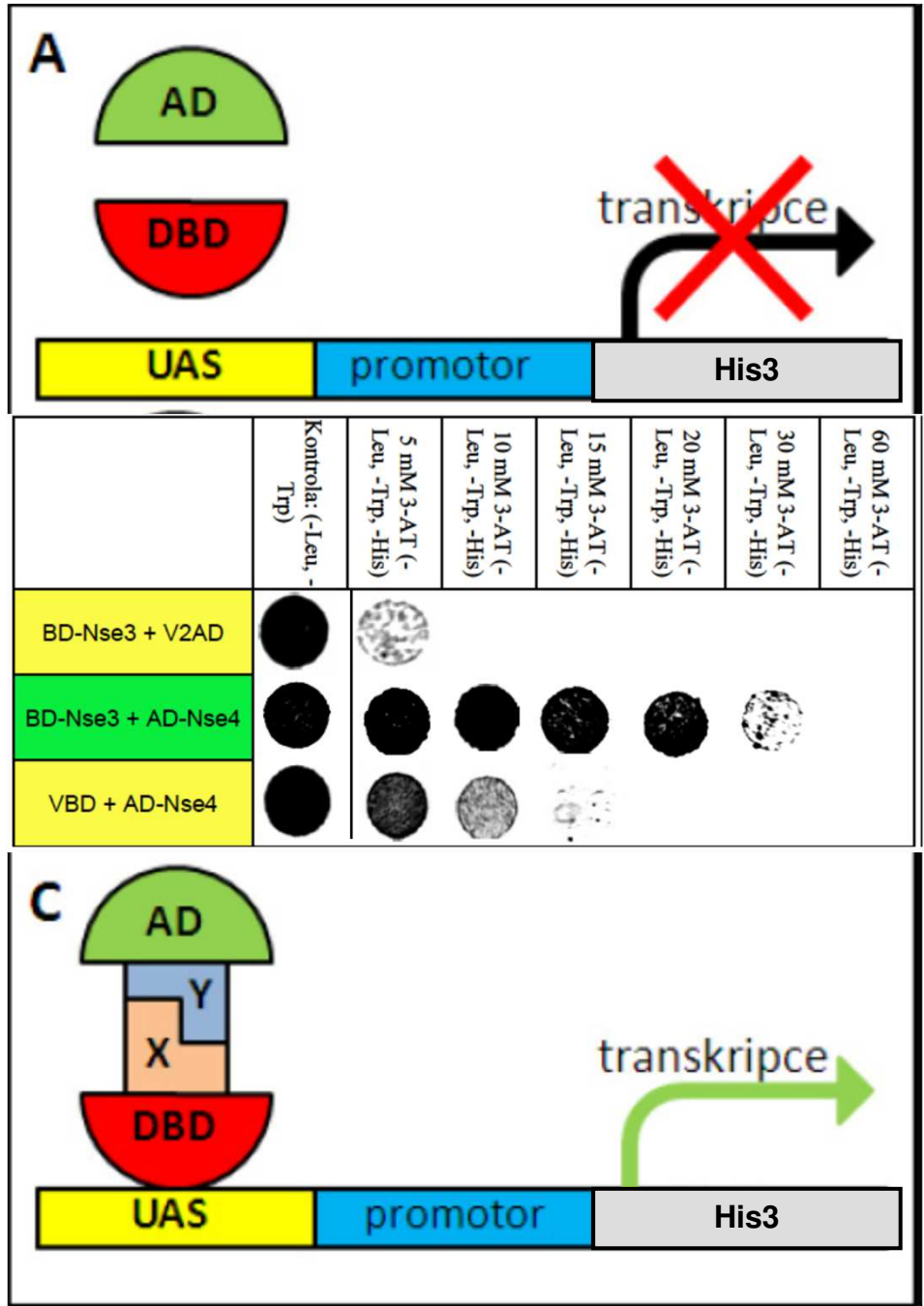
Reportérové geny

Reporter genes

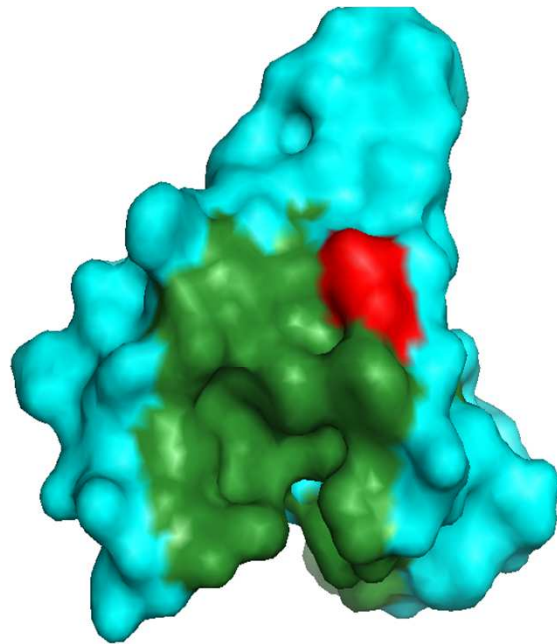
<i>E. coli lacZ*</i>	β -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory α -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	β -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory β -galactosidase chromogenic 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</i> <i>AUR1-C</i>	Aureobasidin A resistance reporter (167)	rezistence (media s AbA)



K. Bednarova (Diplomová práce)



aminotriazol (3-AT) inhibuje His3 enzym

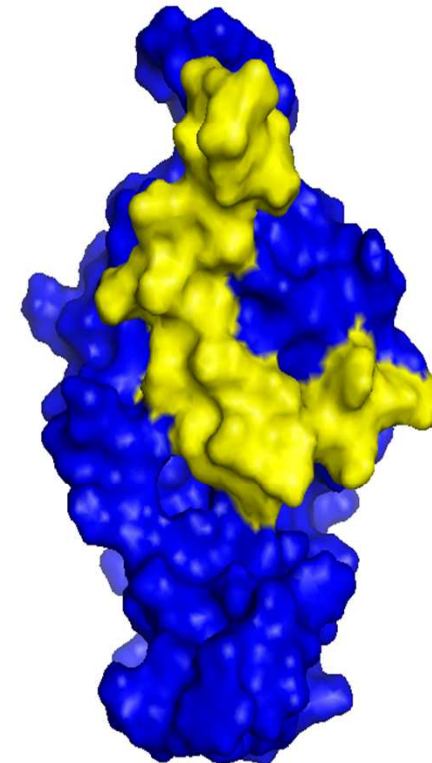


mut.	-m	mmmmmmmm	mm	--m	-m	-m	mm	mmmm	-----	mmm	-m	-m																																				
Nse4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---																																				
S.p.	G	F	L	M	T	V	I	A	F	I	A	V	S	H	C	S	V	G	-	H	S	E	L	Q	S	F	L	Q	E	L	L	T	---	E	E	T	T	P	L	H	L	D	I	T	R	S		
A.n.	G	L	Y	T	F	I	I	A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

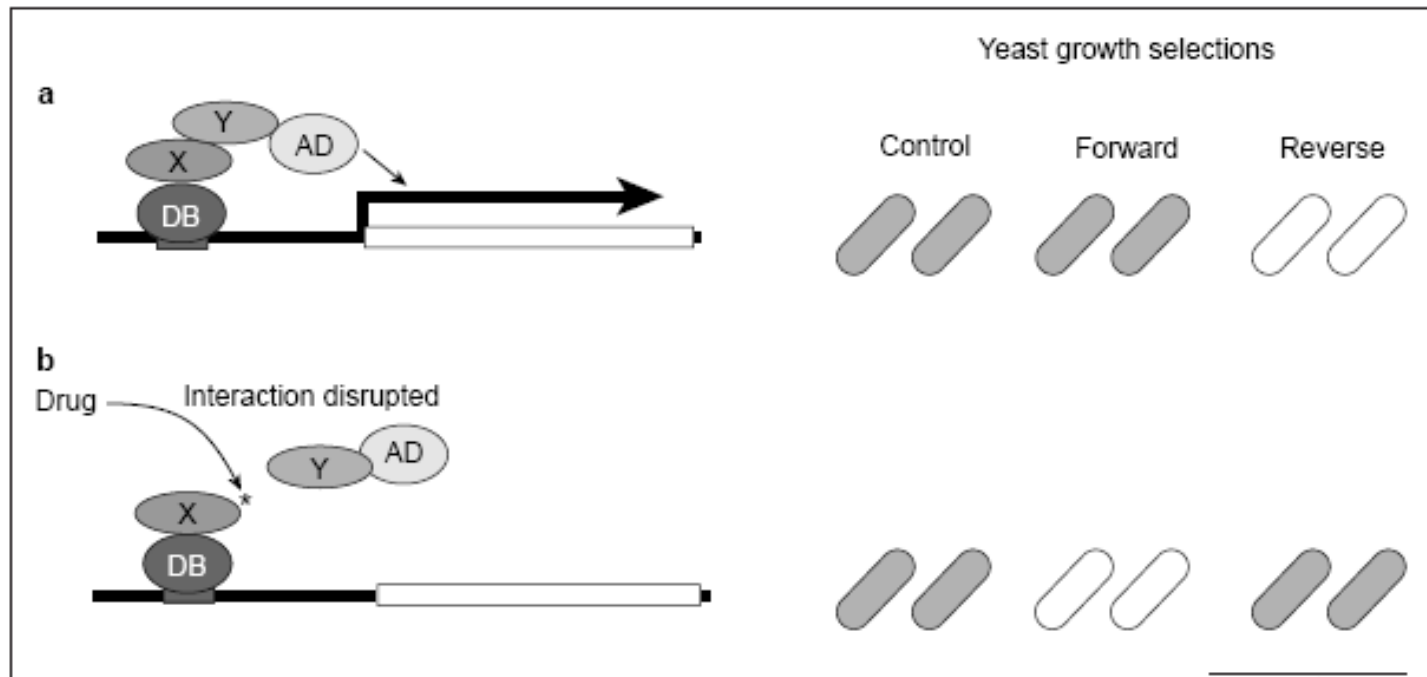
“alanin scan” konzervovaných AMK ukázal hydrofobní kapsu na povrchu Nse3 ...

... do níž se váže hydrofobní šroubovice Nse4 proteinu

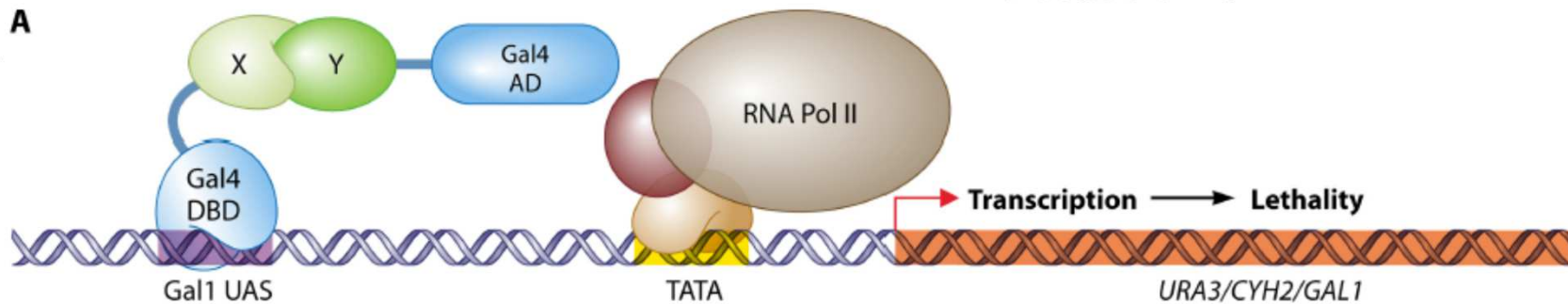
Pomocí *in silico* (MD) analýzy byl vytvořen model dimeru Nse3-Nse4 (docking)



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

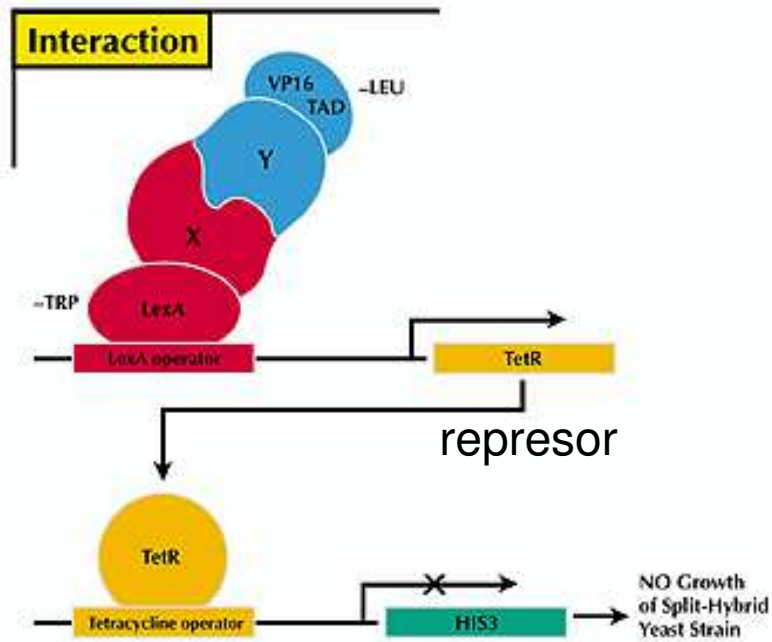


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

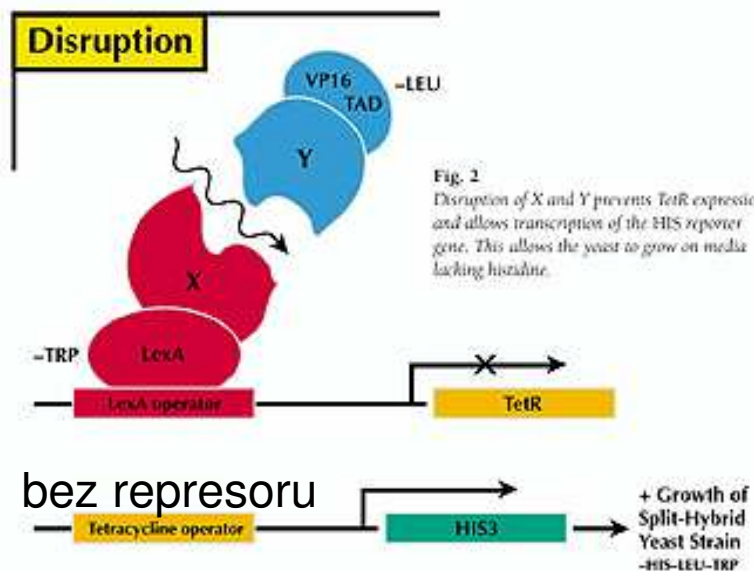
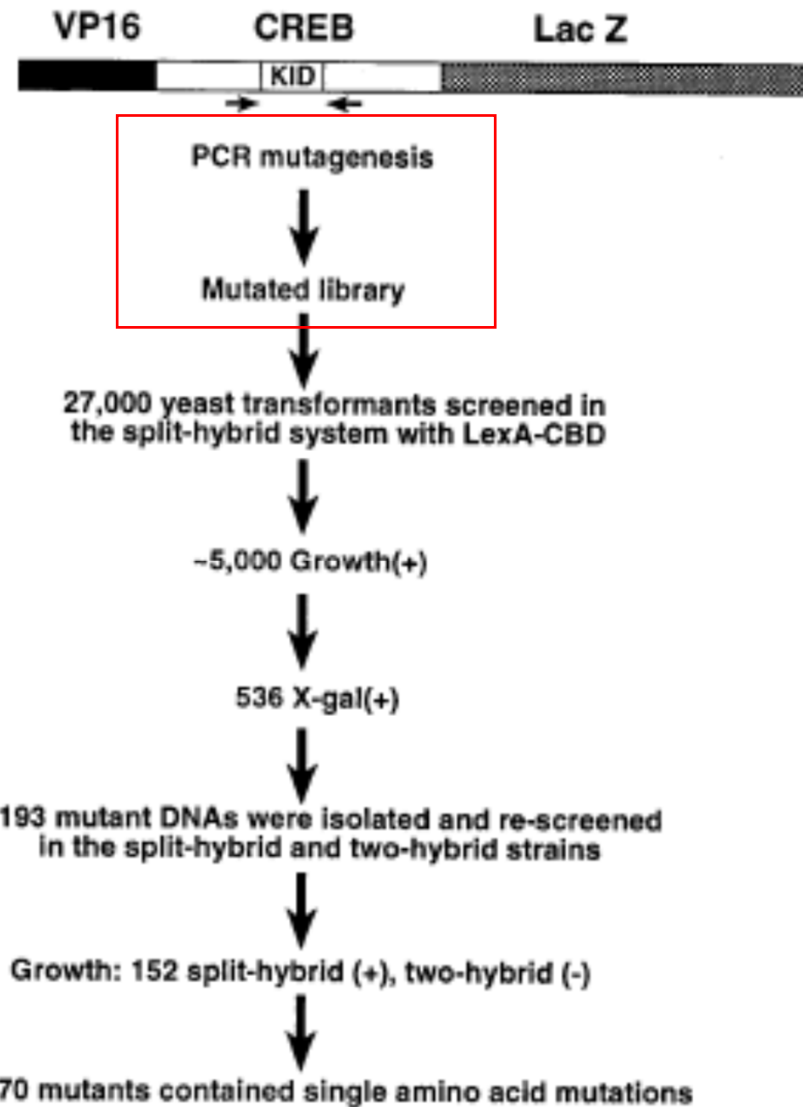
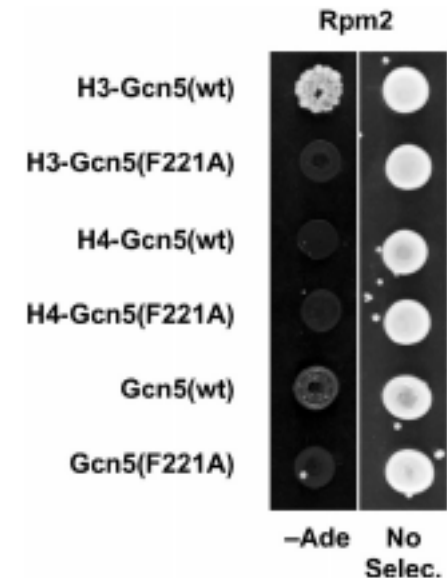
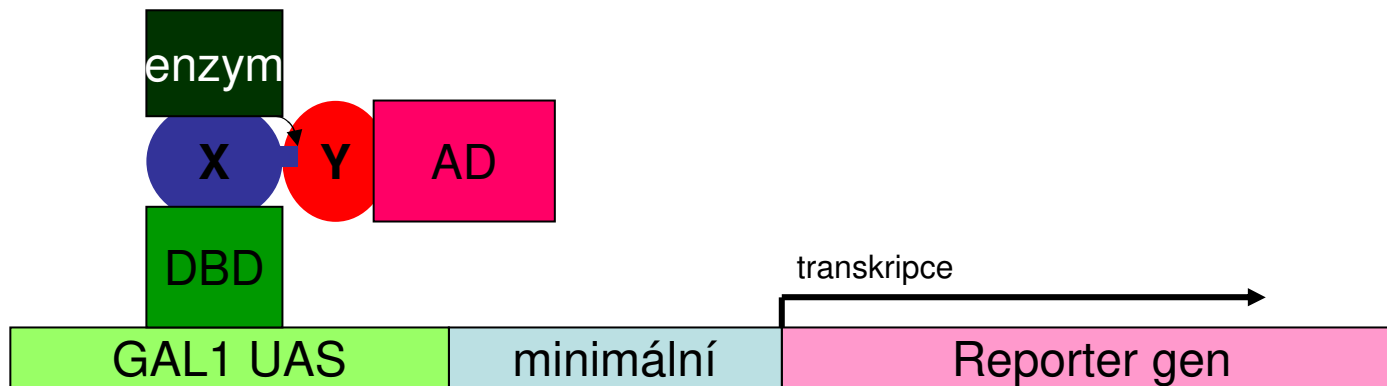


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.

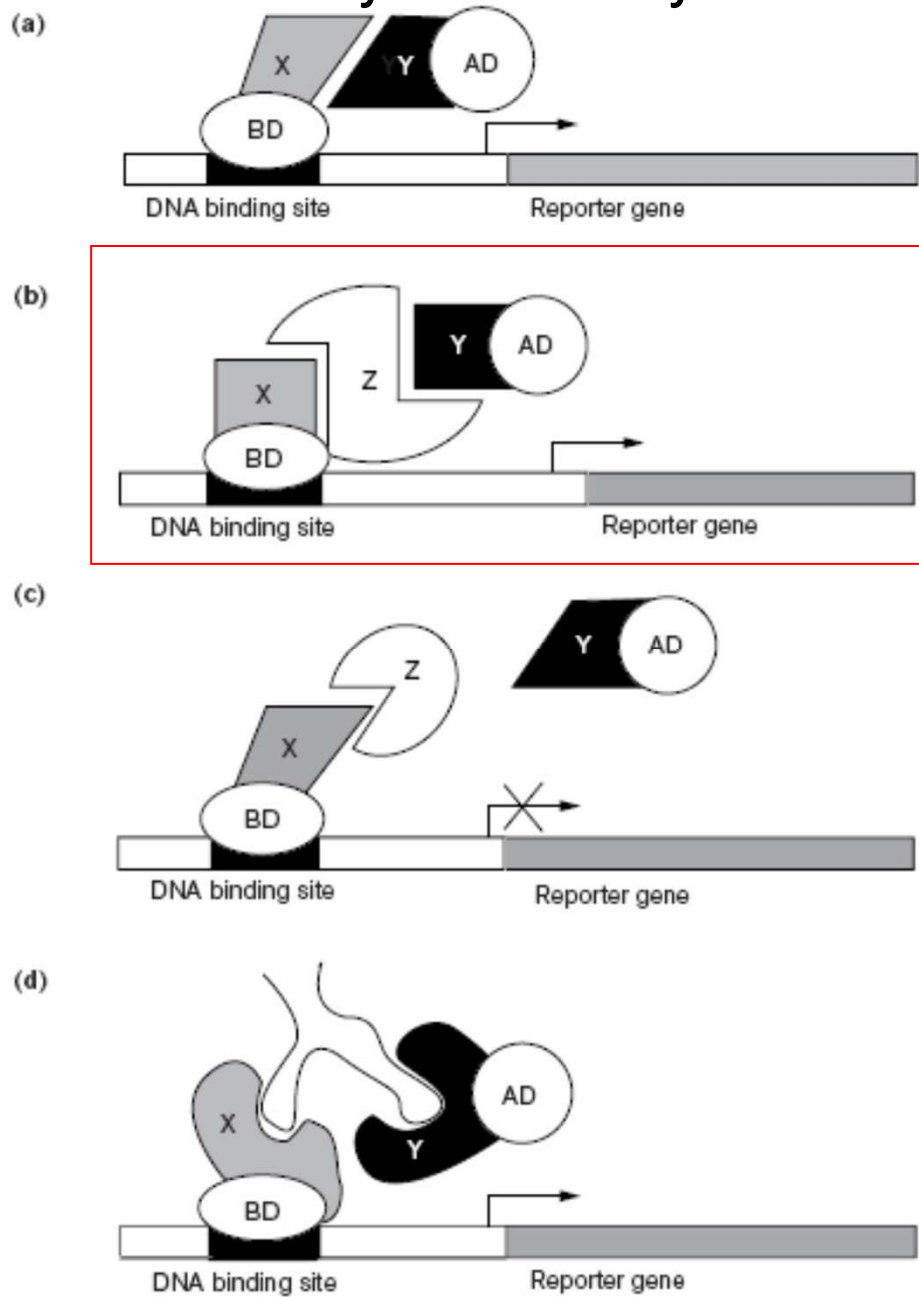


Interakce vyžadující post-translační modifikace



- Některé protein-proteinové interakce jsou závislé na post-translačních modifikacích
- v buňce jsou přítomny např. acetyltransferasy 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)

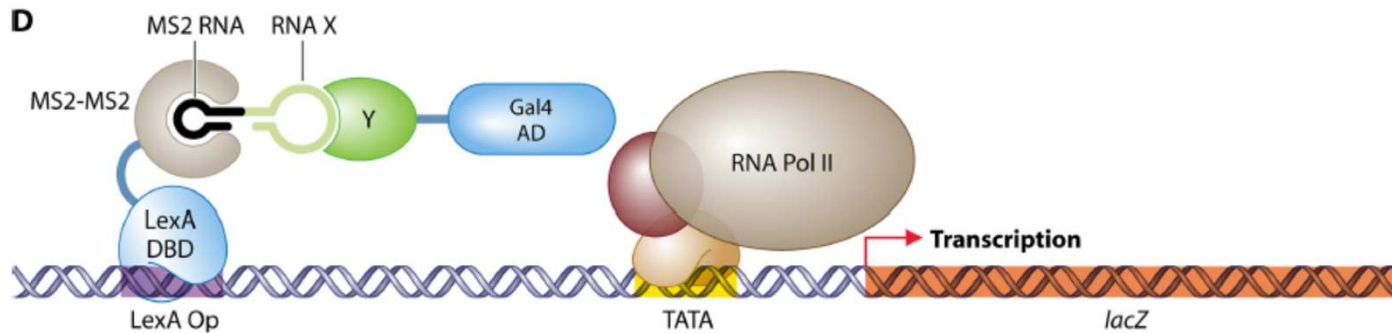
Přehled hybridních systémů



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)				

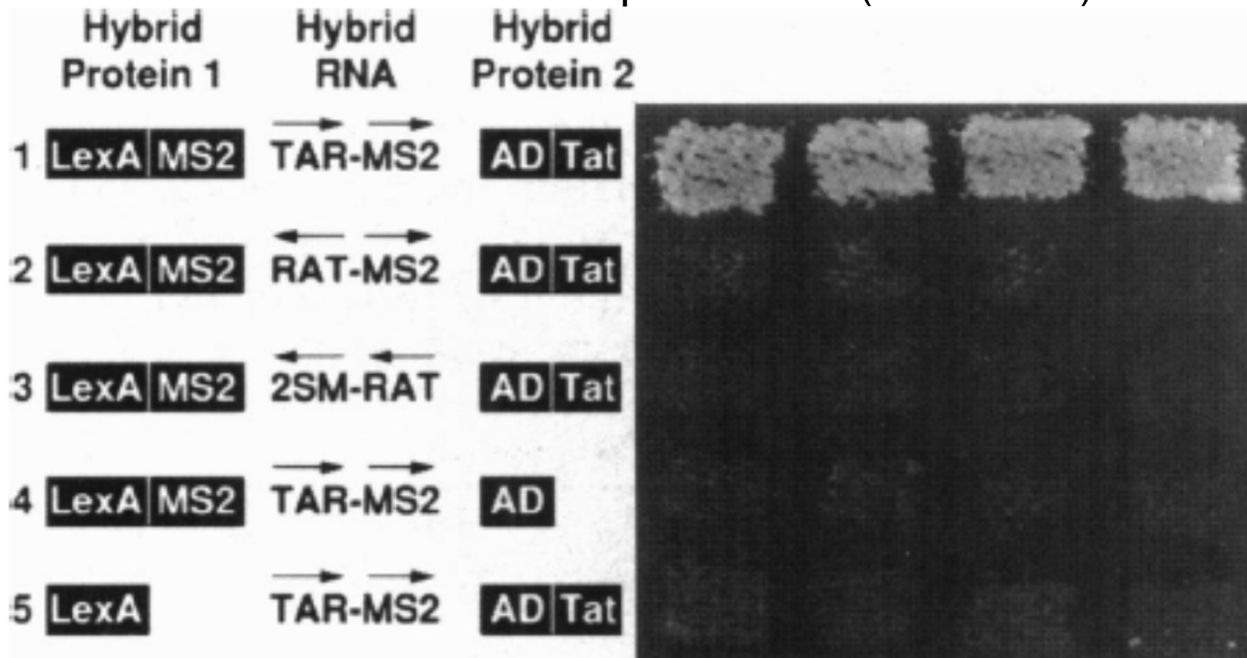


Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



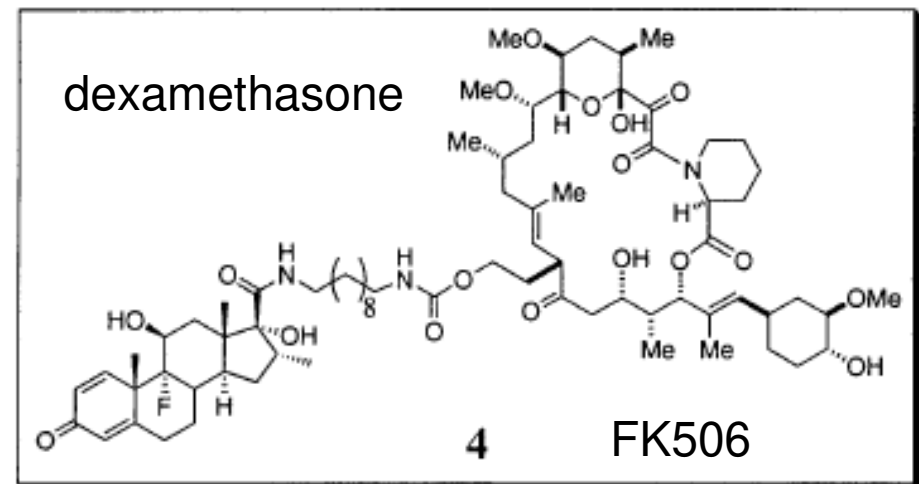
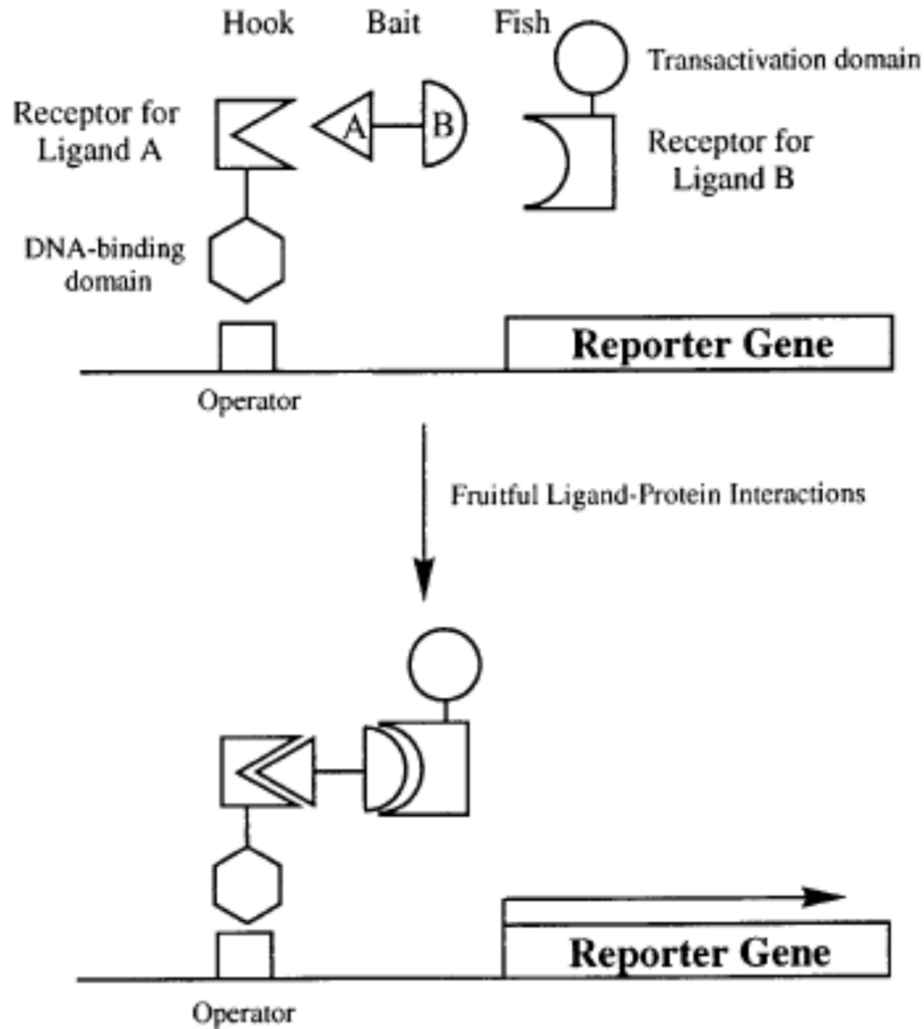
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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



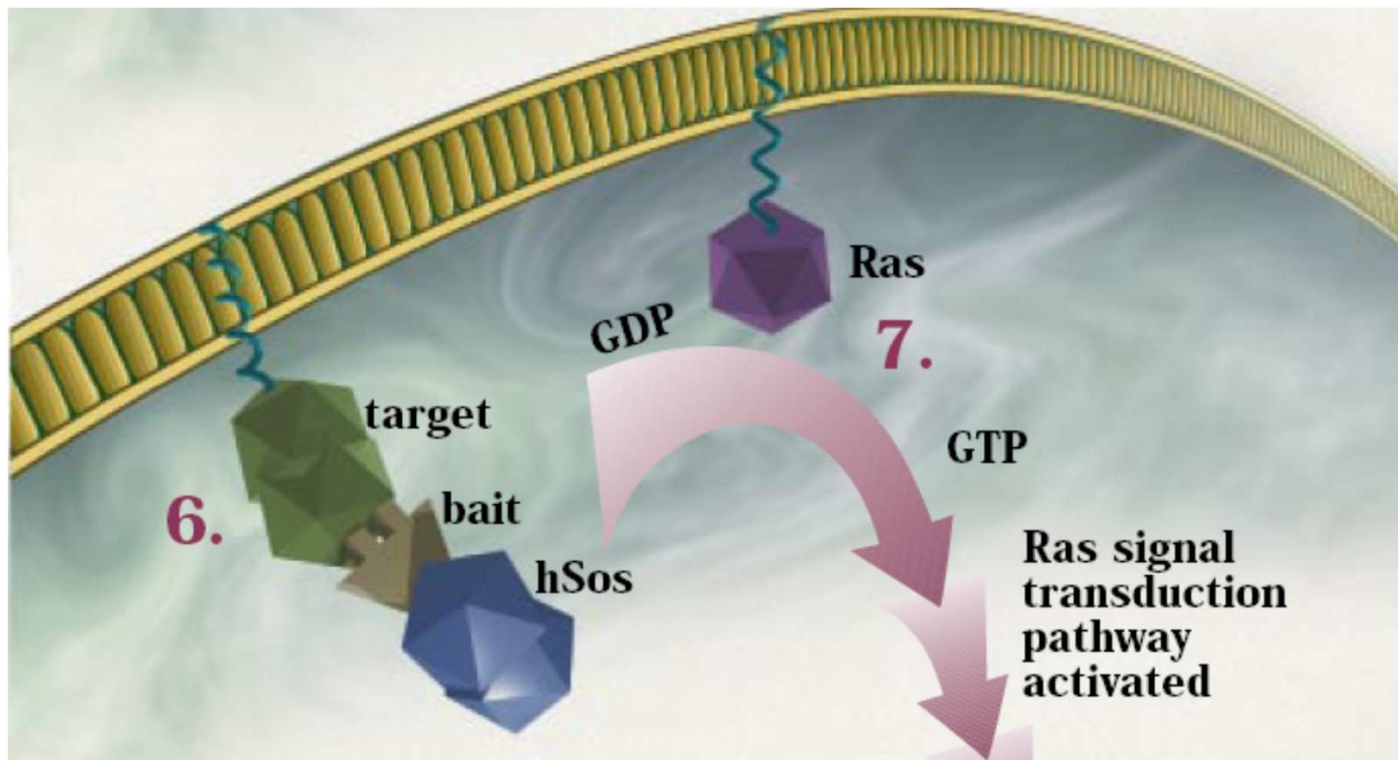
Tři fúzní (hybridní)
makromolekuly
(2x protein a 1x
nízkomolekulární ligand)

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/D-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 (teplotně sensitivní) 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)

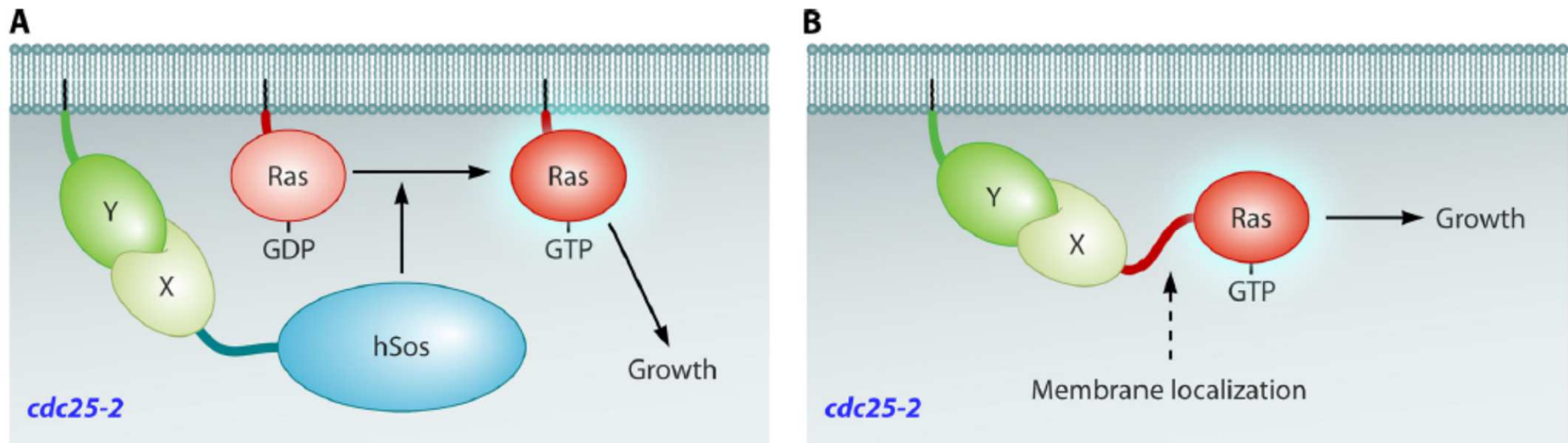


alternativní Ras hybridní systémy

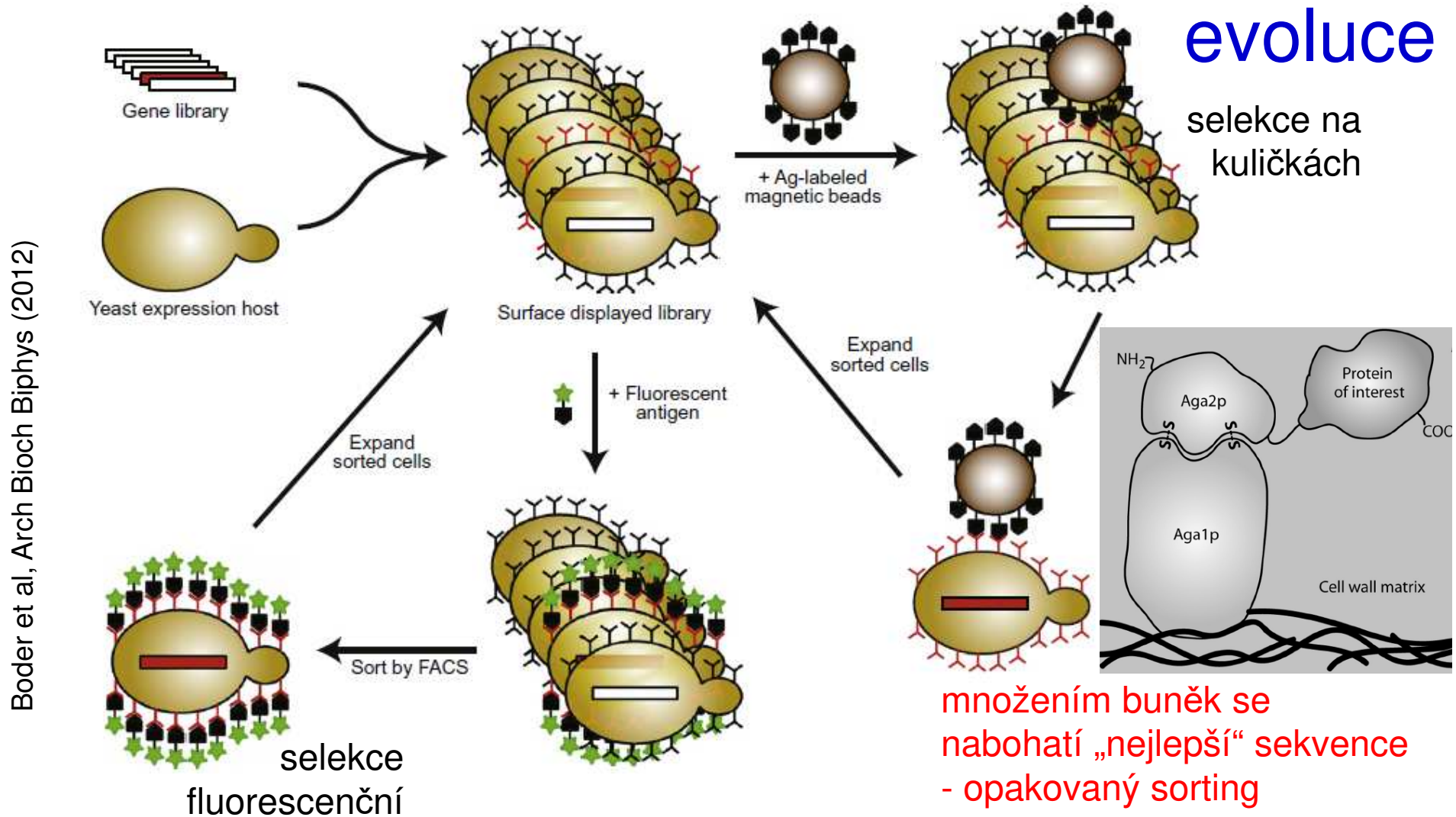
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti (A)

- 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 kotvící 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)



YSD „yeast surface display“ – cílená *in vitro* evoluce



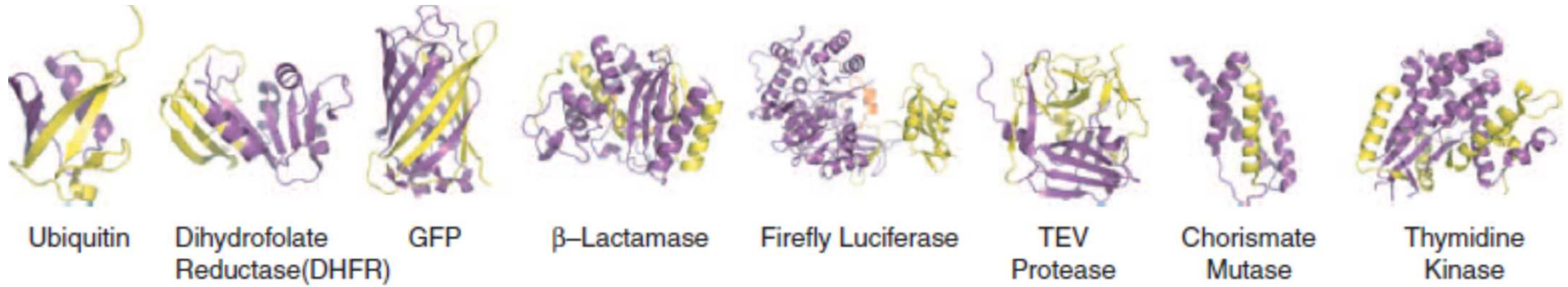
Boder et al., Arch Bioch Biphys (2012)

- analyzovaný Aga2-hybridní protein je umístěn na povrchu buňky (kvasinkové, bakteriální/fág) – partner značen fluorescenčně/biotin - čím vyšší afinita tím větší pravděpodobnost „zachycení“ – lze vyselektovat nejlepší vazebné sekvence („mutace“)

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

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

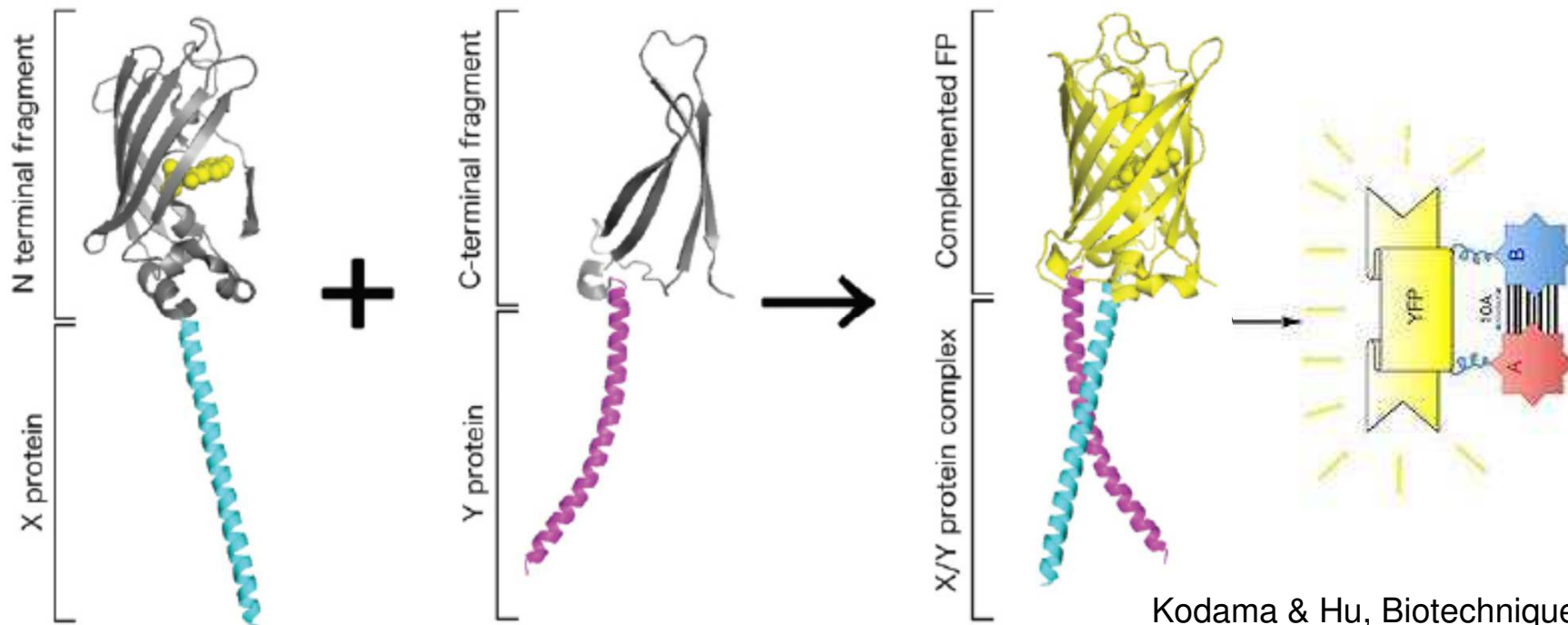
Protein-fragment complementation



Shekhat & Ghosh, CO in ChB, 2011

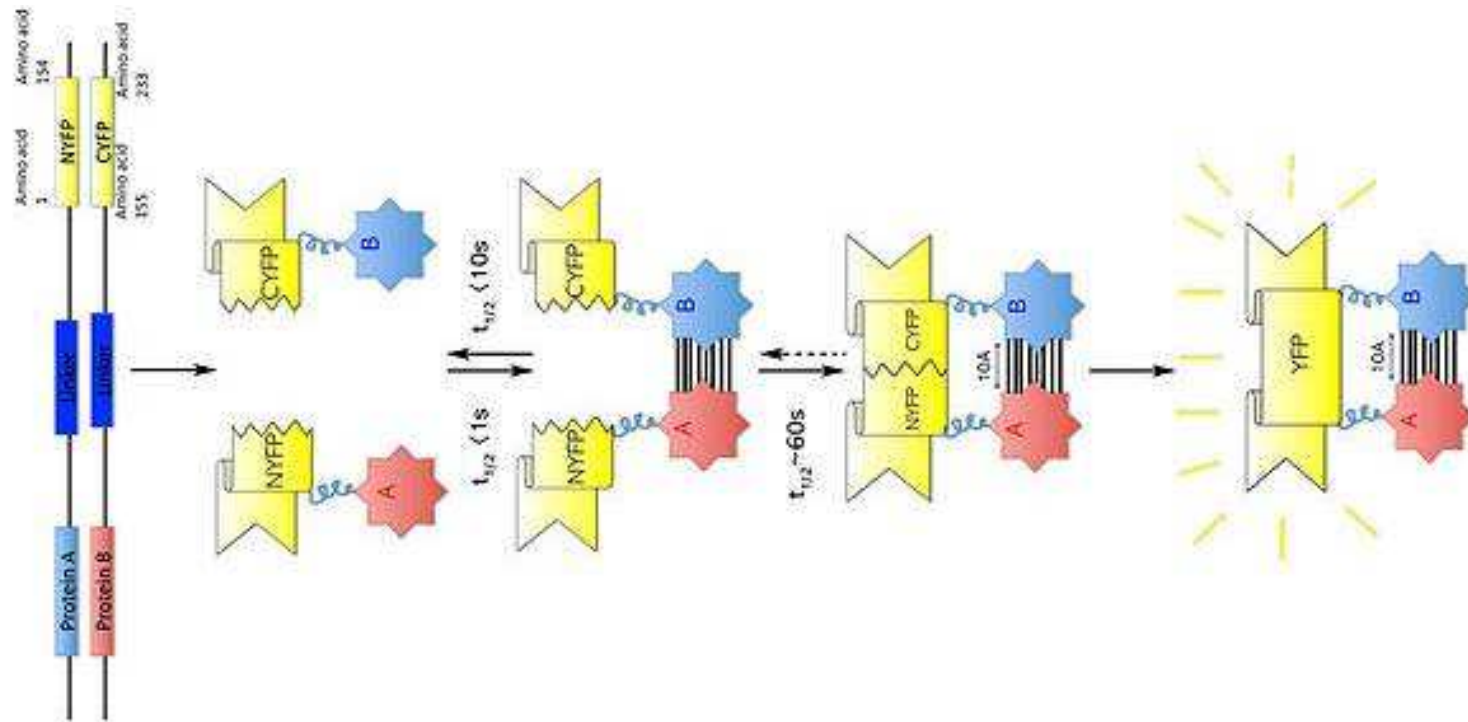
Current Opinion in Chemical Biology

Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



Kodama & Hu, Biotechniques, 2012

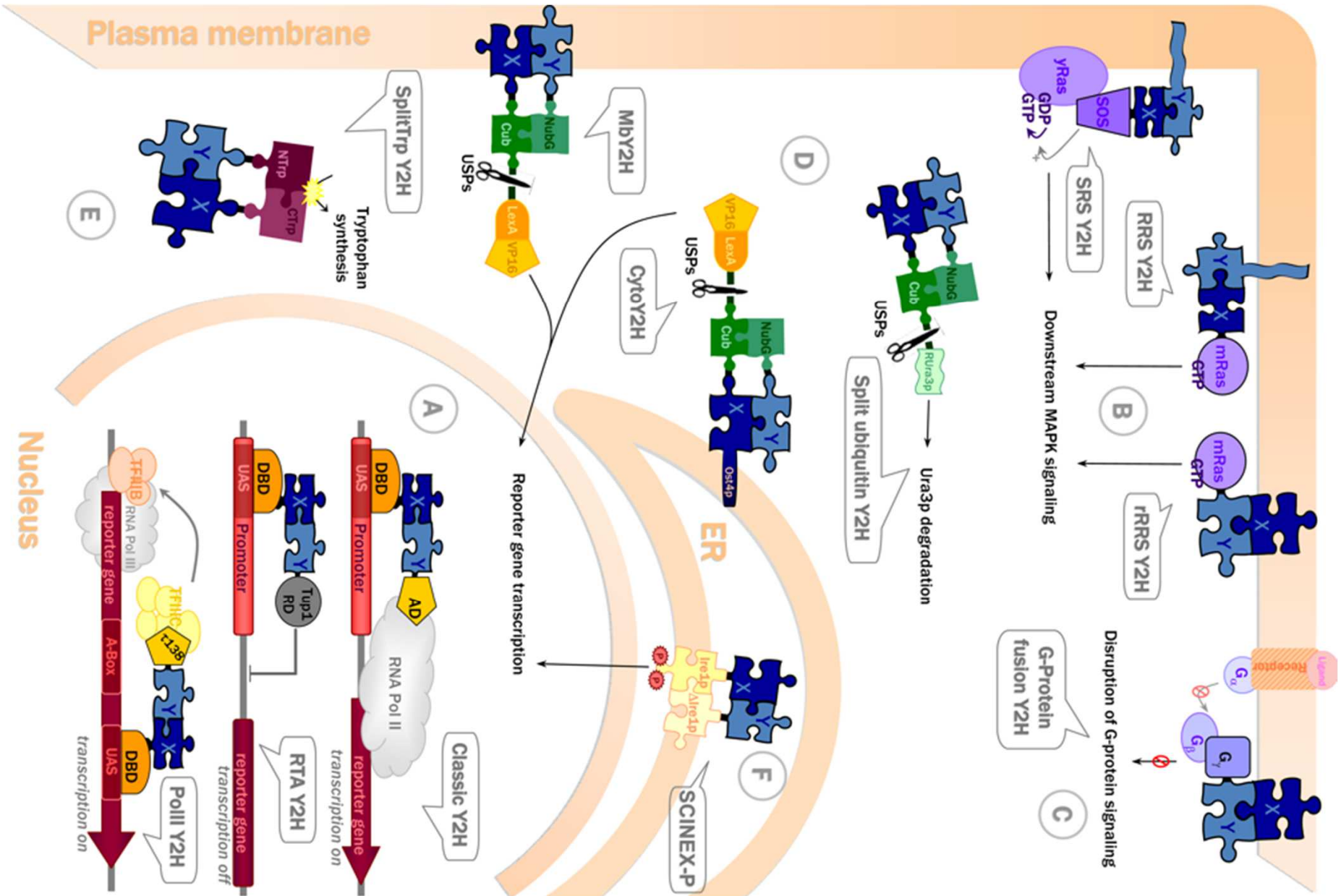
Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



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



Přehled kvasinkových PPI biotechnologií

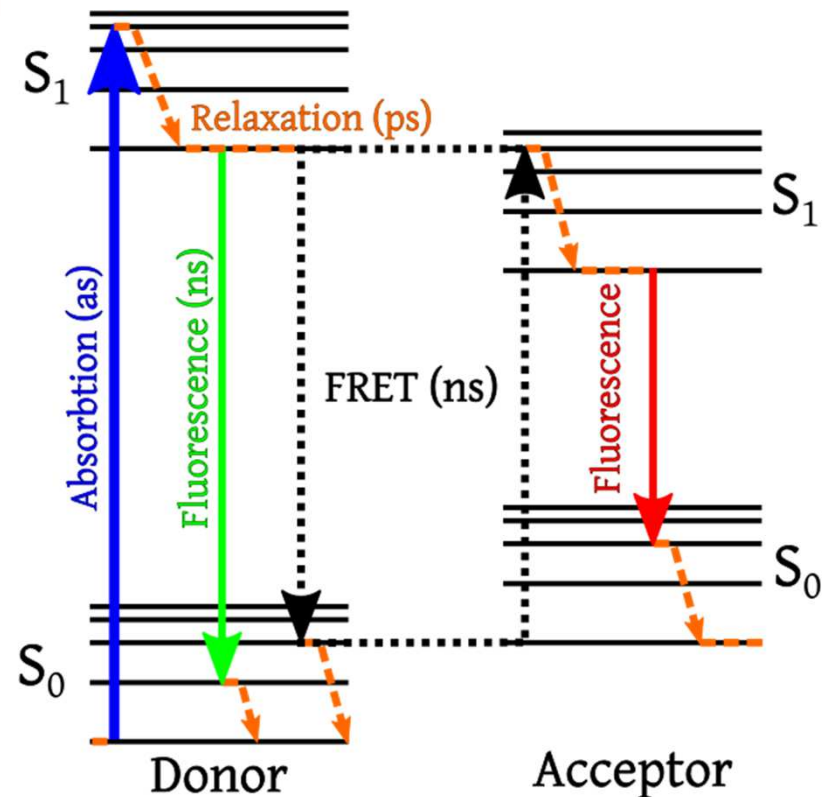
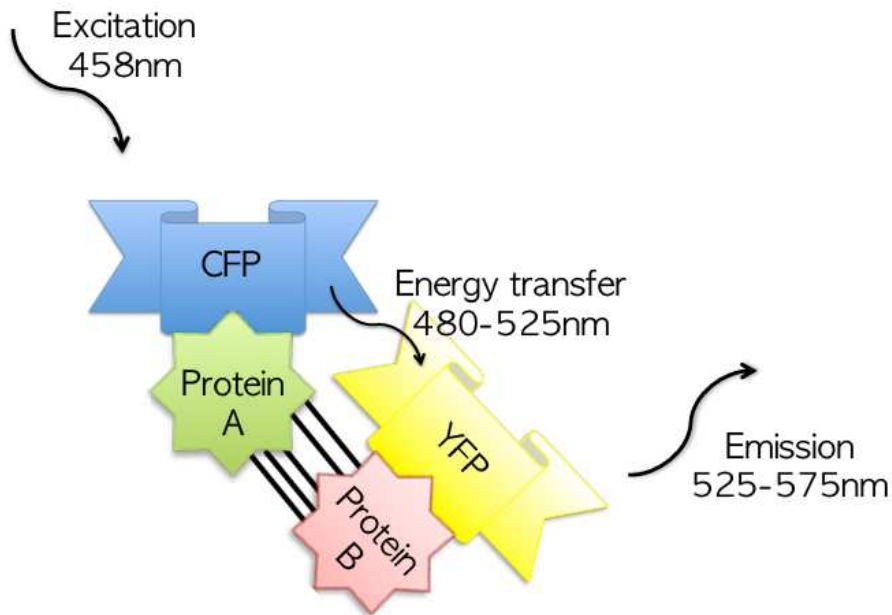


Metody analýzy protein-proteinových interakcí

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

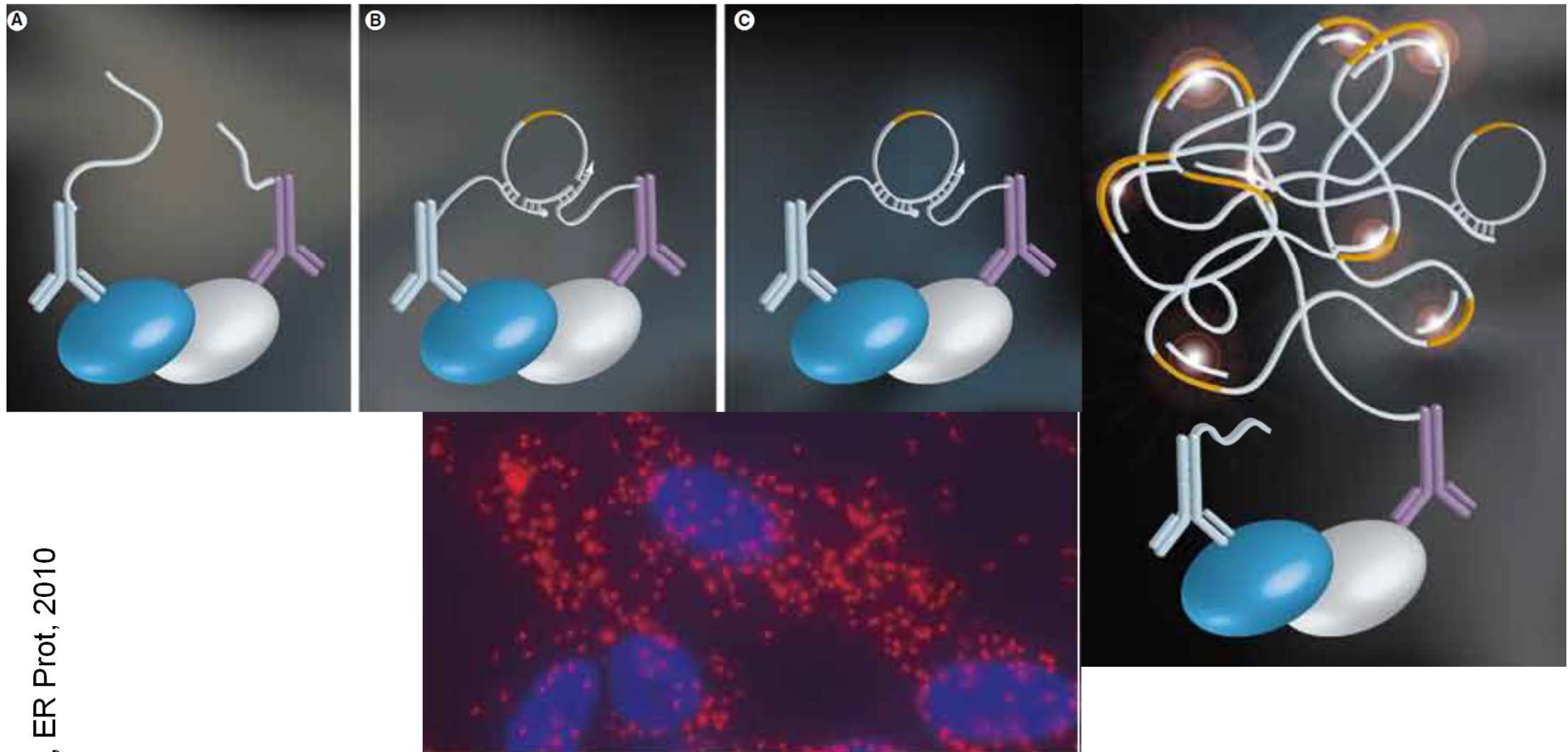
FRET (Forster/fluorescence resonance energy transfer)

hybridní, ale nikoli doménový či komplementační



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

Ko-lokalizace a proximity ligation assay

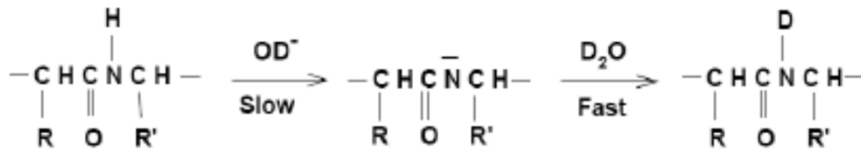


Weibrecht et al, ER Prot, 2010

- kolokalizace dvou proteinů v buňce (mikroskop) neznamená interakci, ale ...
- PLA:** protilátky obsahují oligonukleotidy komplementární k oligonukleotidům schopným tvořit kruhovou DNA – pouze pokud jsou protilátky blízko sebe (<16nm) - po ligaci může polymeráza obíhat po kružnici

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

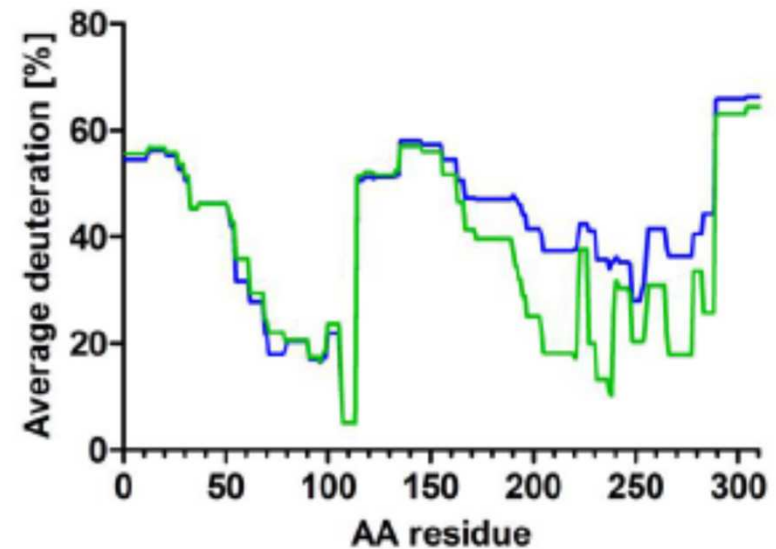
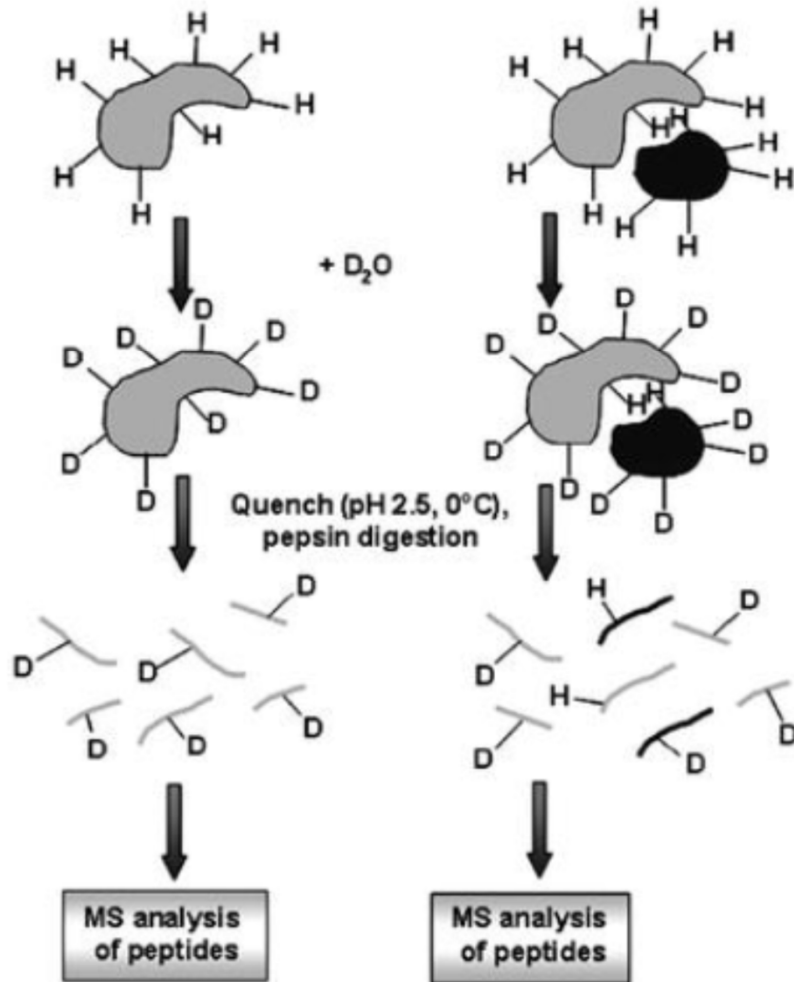
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- **MS-based:**
 - **H/D-exchange** ...
 - **protein painting**
 - **crosslinking**
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická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



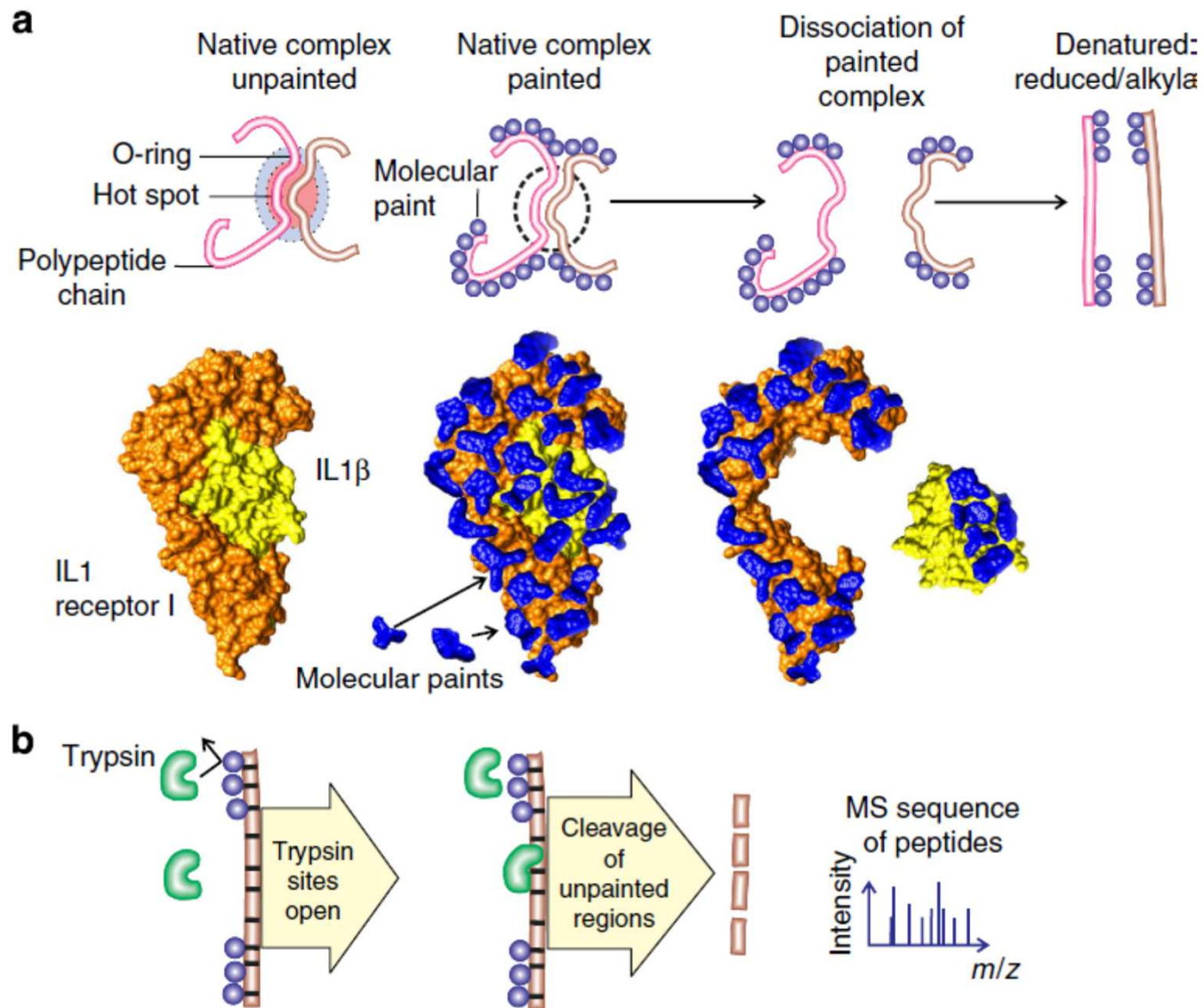
Hydrogen/Deuterium Exchange (HDX)

(P. Muller, MOU) Trcka et al, JBC, 2014

deuteriují se přístupné AMK skupiny
(interakční povrchy jsou skryté)



Protein painting

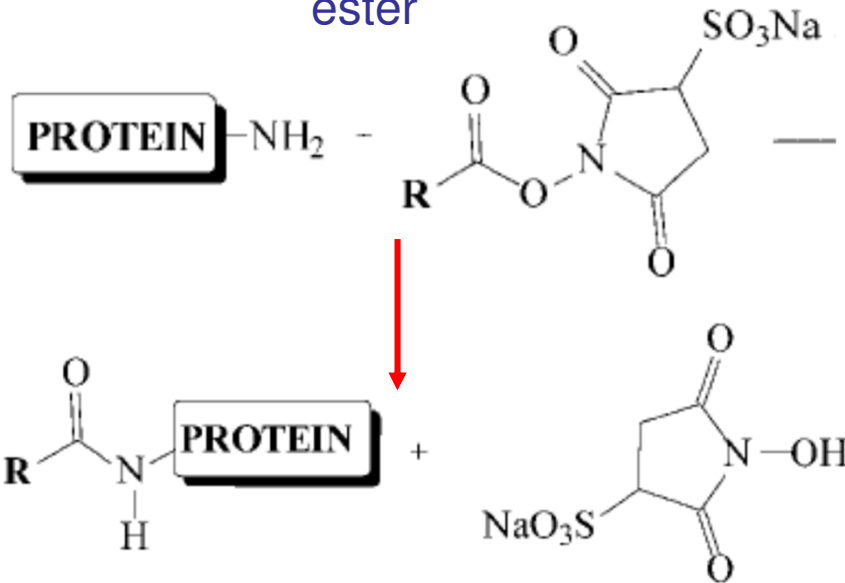


Crosslinking

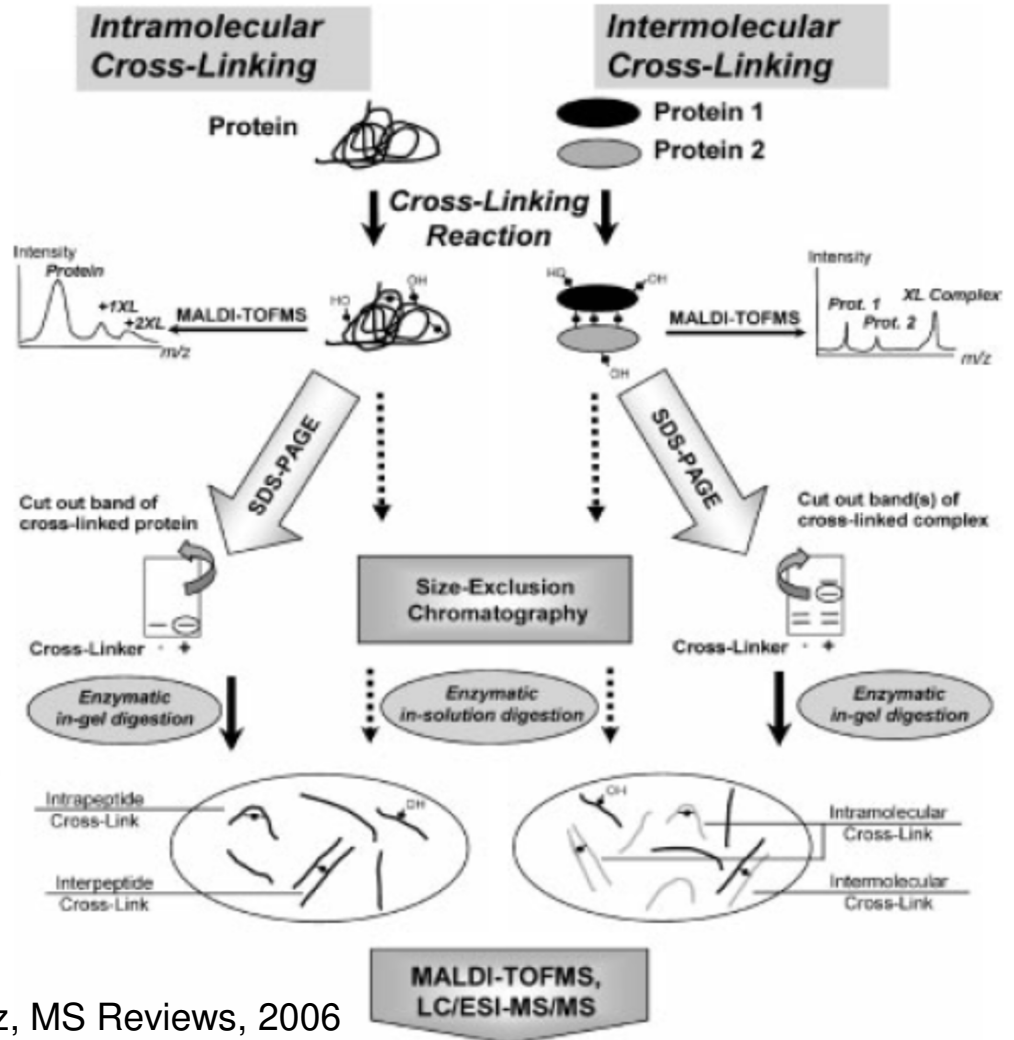
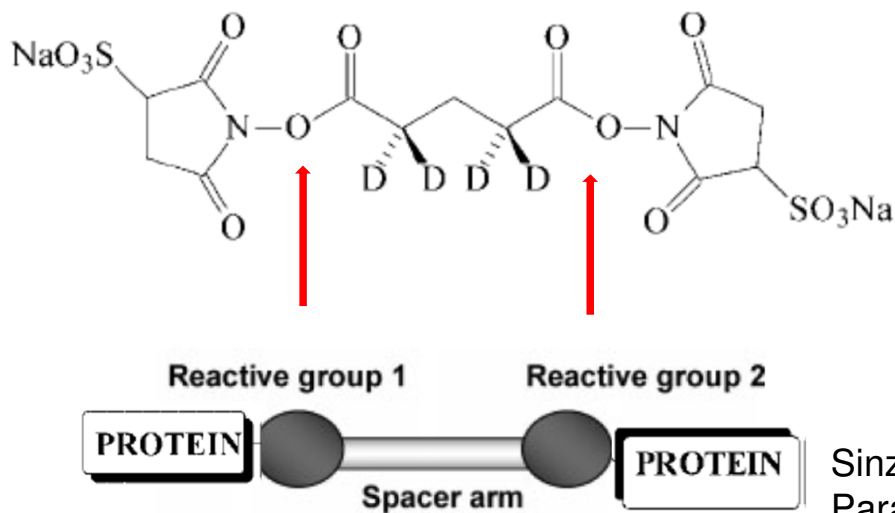
- estery reagují s Lys (ϵ -amin) a amino-koncem
- homofunkční spojí proteiny dohromady v jednom kroku (velmi komplexní vzorky pro MS)
- intra- (struktura) nebo intermolekulární (PPI)

A.

ester



B.



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

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