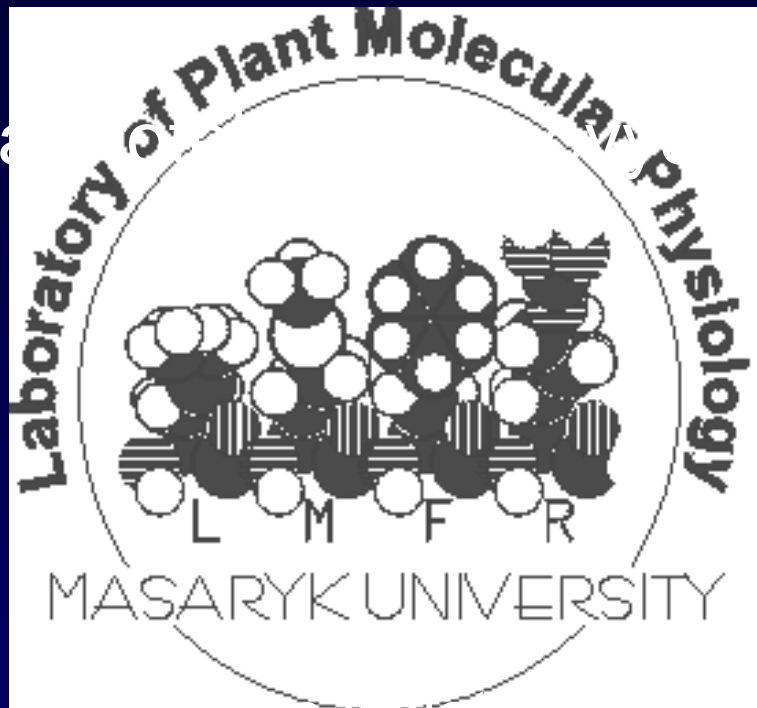


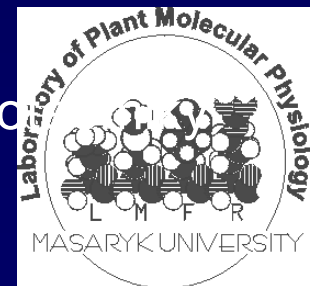
# Základy genomiky

V. Analýza interakcí



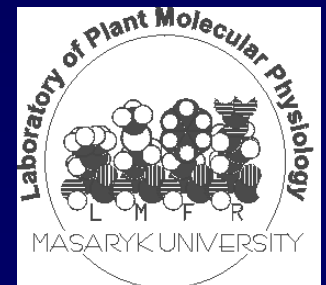
Jan Hejato

Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky  
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin



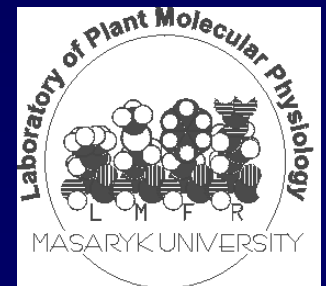
# Základy genomiky V.

- Zdrojová literatura ke kapitole V:
  - Grefen et al., Molecular Plant, 1, 308-320
  - Van Leene et al., Trends in Plant Science, 2008
  - Walter et al., Plant Journal, 2004
  - Wilt and Hake, Principles of Developmental Biology,



# Genomika V.

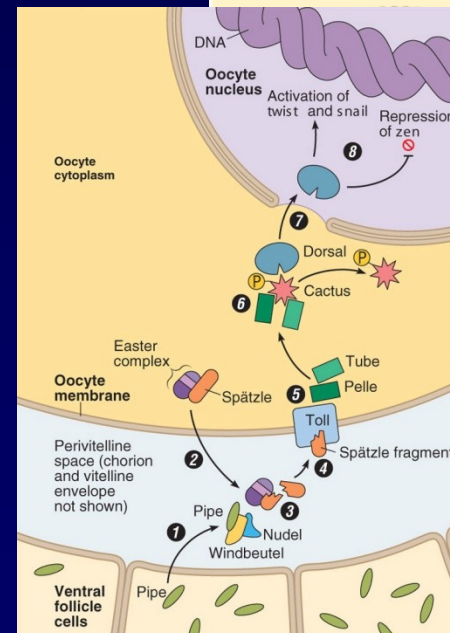
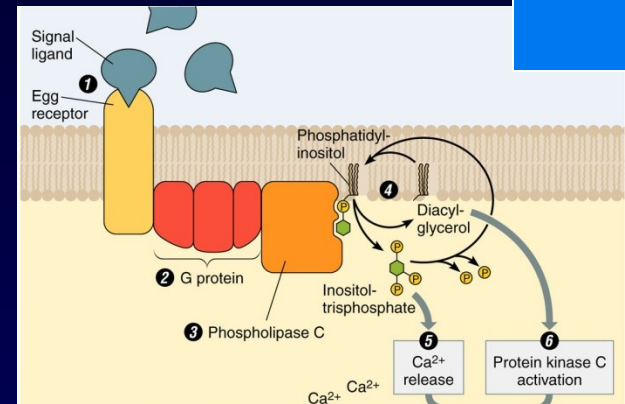
- Proč jsou proteinové interakce důležité
  - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - koimunoprecipitace
  - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
  - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



# Genomika V.

- Proč jsou proteinové interakce důležité
  - Funkční význam specifických interakcí proteinů

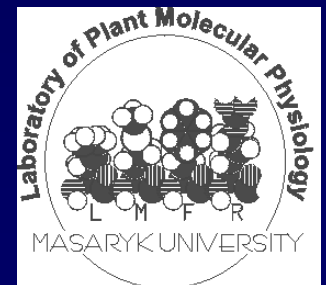
- Většina proteinů v buňce existuje ve formě komplexů, které mohou dále navzájem interagovat
- přenos signálu prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
- signální kaskády využívající cAMP
- sestřih hnRNA
  - interakce 5 snRNA a více než 50 proteinů
- regulace buněčného cyklu
- vývojově specifické procesy
  - např. regulace buněčné diferenciace během embryonálního vývoje u *Drosophily*



- Only ventral follicle cells make Pipe. Complex of Pipe, Nudel, and Windbeutel proteins is secreted (only on ventral side). Pipe sulfates glycosaminoglycans (see Chapter 12) on the ventral side.
- Nurse cells have deposited mRNA for Easter complex in the egg, and the Easter protein complex, which includes Snake and Gastrulation defective (Gdp), is secreted around the egg.
- Easter complex and Pipe complex together cleave Spätzle.
- Spätzle fragment activates the Toll receptor.
- Toll activates Tube and Pelle.
- Tube and Pelle phosphorylate Cactus so that it dissociates from Dorsal.
- Free Dorsal enters the nucleus. It is a transcription factor.
- Dorsal stimulates *twist* and *snail* (in mesoderm) and represses *zen* (in dorsal epithelium).

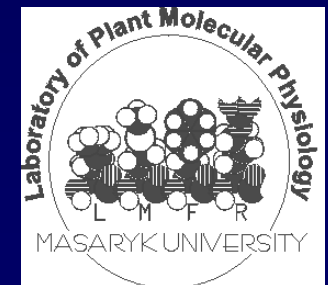
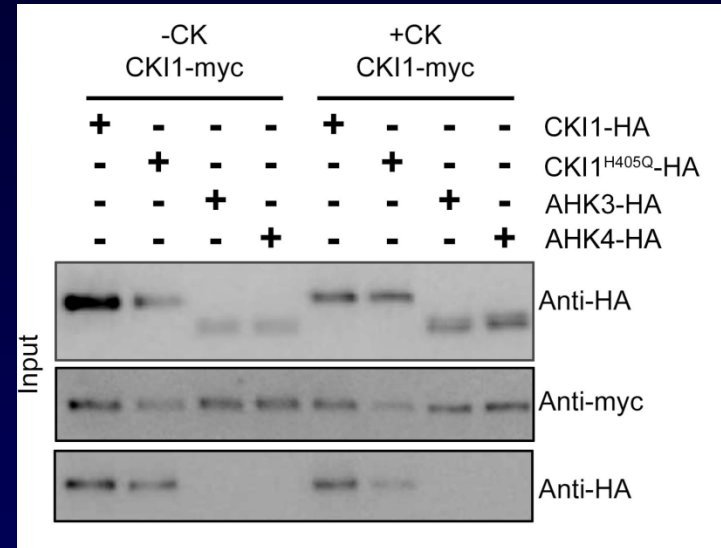
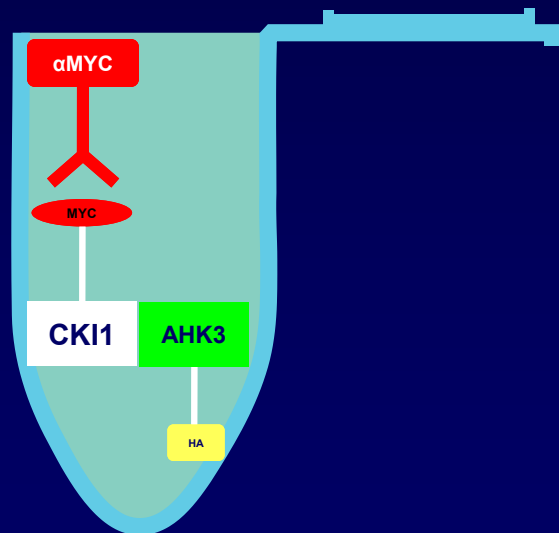
# Genomika V.

- Proč jsou proteinové interakce důležité
  - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - koimunoprecipitace
  - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
  - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



# Genomika V.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - koimunoprecipitace
    - založena na izolaci proteinových komplexů pomocí protilátek rozpoznávajících jeden z interagujících proteinů
    - princip koimunoprecipitace využívá metoda pro potvrzení interakcí u proteinů, kde již tuto interakci předpokládáme pomocí tzv. pull-down assay

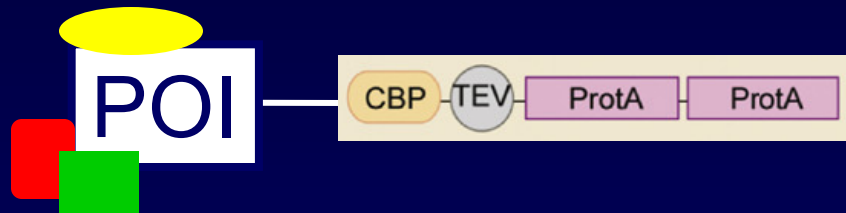


# Genomika V.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

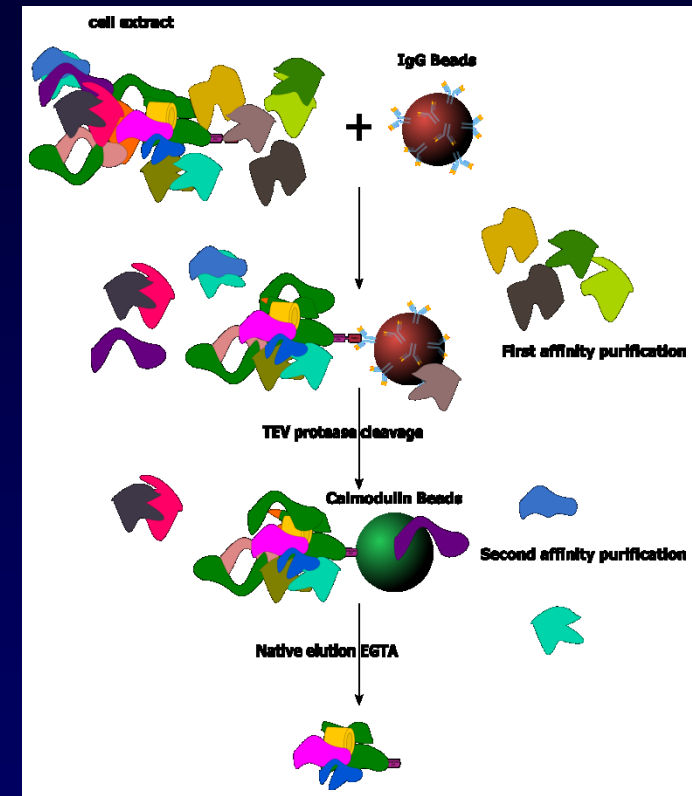
  - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, fúzaných s dvěma různými vazebnými doménami



- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vázající domény proteinu A (ProtA)
- místo rozpoznávané specifickou proteázou z TEV viru (tobacco etch virus)

- proteiny izolovaných komplexů jsou po rozdělení na 1D ELFO identifikovány pomocí MS
- výhodou je použití dvou nezávislých proteinových domén pro afinitní purifikaci a tedy velká specifita

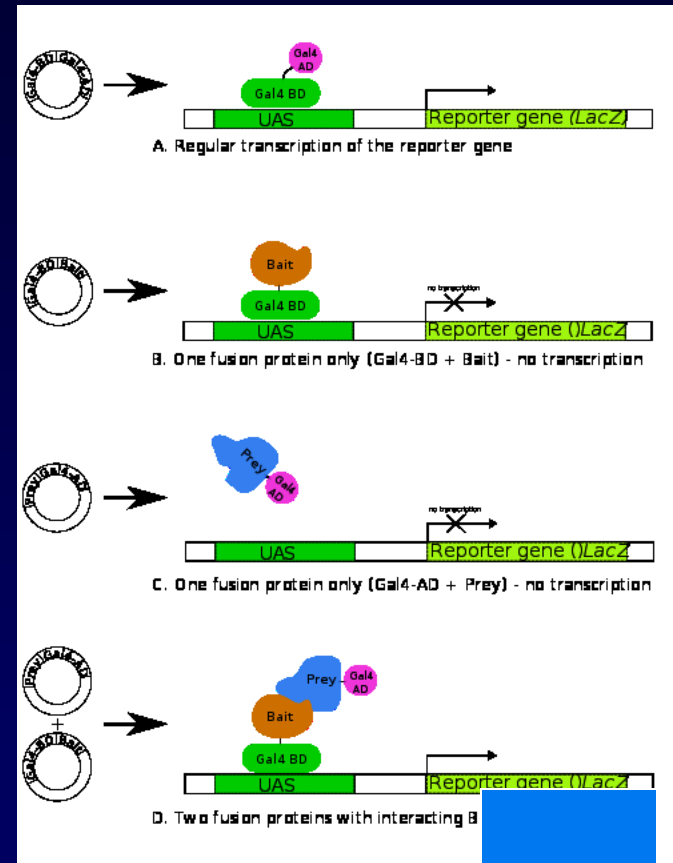


# Genomika V.

## Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

### dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, každý z nich fúzovaný s částí transkripčního faktoru Gal4
- jeden z proteinů (návnada, bait) fúzovaný s DNA vazebnou doménou Gal4 (Gal4-BD)
- druhý z proteinů (kořist, prey) fúzovaný s aktivační doménou Gal4 (Gal4-AD)
- Interakce proteinů umožní rekonstituci vazebné domény s aktivační doménou a spuštění reportérového genu
  - vizuální detekce (modré zbarvení, LacZ)
  - auxotrofní selekce (růst na médiu bez histidinu, His)
- umožňuje vyhledávání interakčních partnerů v expresních knihovnách jednotlivých organismů





# Genomika V.

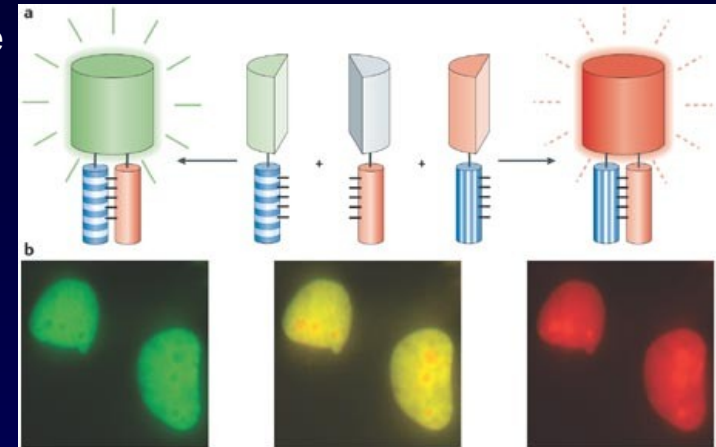
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

  - bimolekulární fluorescenční komplementace

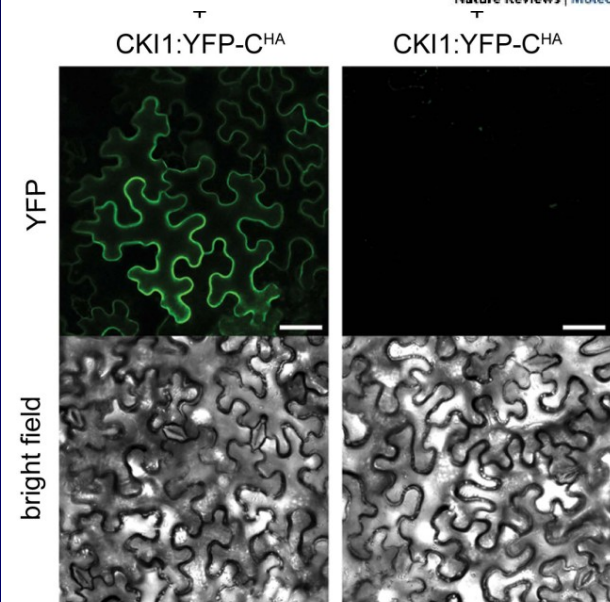
- Proteinová interakce je detekována na základě reasociace fluoreskujícího proteinu

  - každý z potenciálních interakčních partnerů je fúzován s jednou z podjednotek fluoreskujícího proteinu, např. YFP
  - při interakci dojde ke znovuobnovení fluorescence

- Kromě identifikace vlastní interakce umožňuje i lokalizovat interakci v buňce

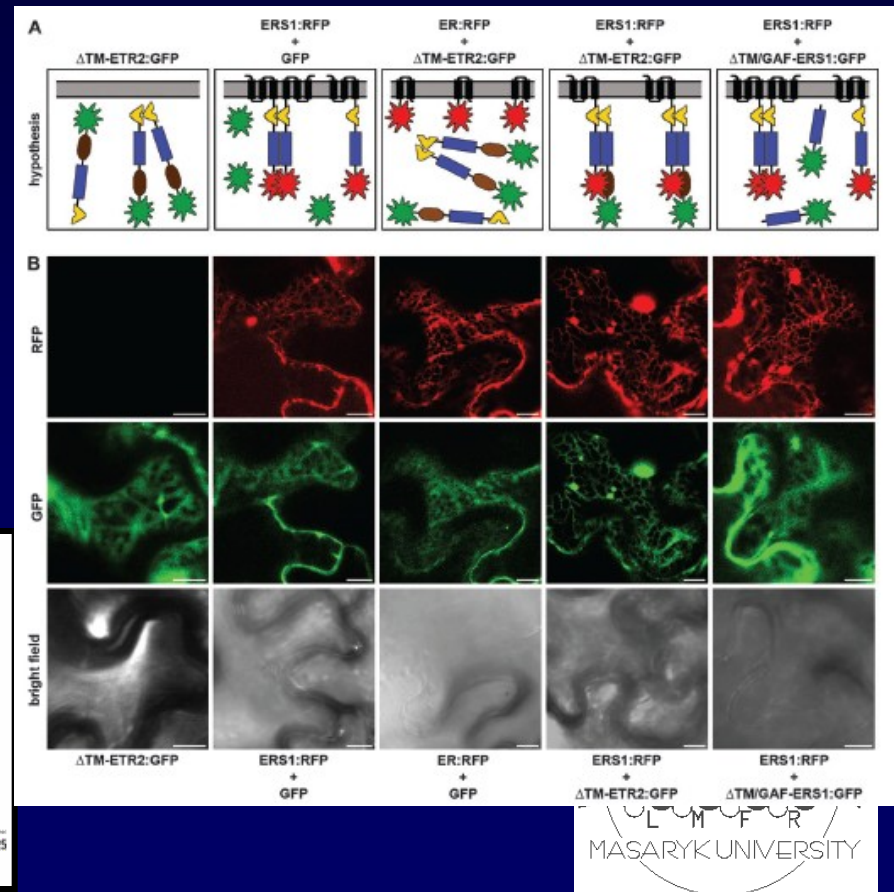
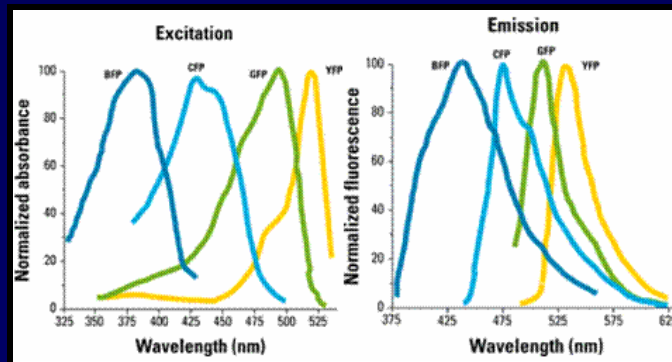


Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Molecular Cell Biology



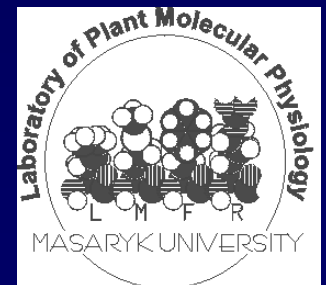
# Genomika V.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)
- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny
  - membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem
  - potenciální ineterakční partner je fúzován s jímým fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem
  - v případě interakce dojde ke změně lokalizace cytoplazmatického proteinu na membránu (kolokalizaci s membránovým proteinem)



# Genomika V.-shrnutí

- Proč jsou proteinové interakce důležité
  - Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - koimunoprecipitace
  - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
  - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



# Genomika V.

## Diskuse

