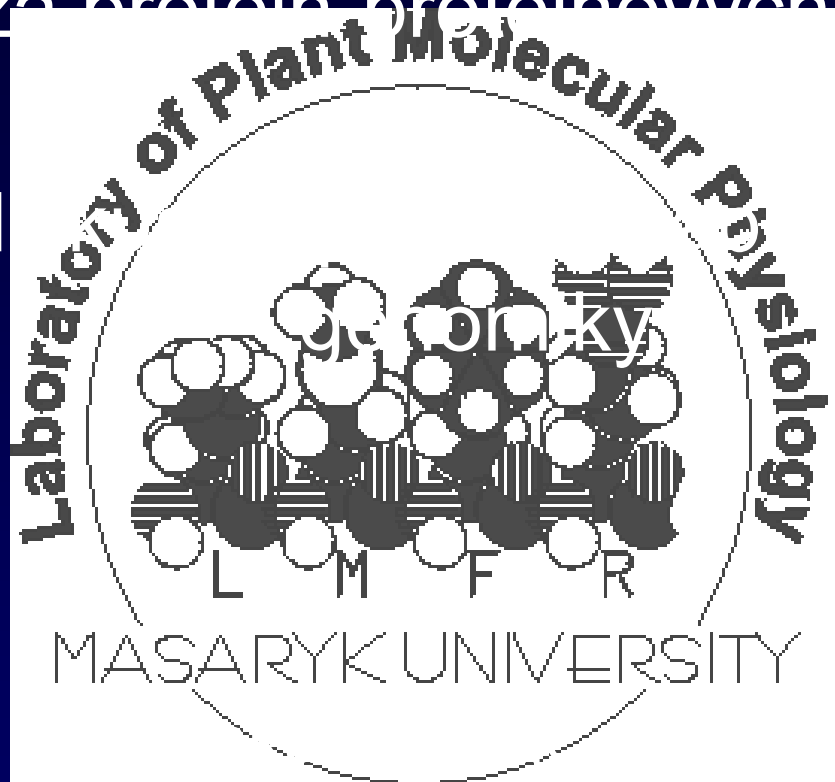


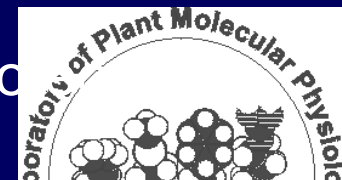
Základy genomiky

VI. Analýza protein-proteinových interakcí

Závěrečná data a funkční analýza



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

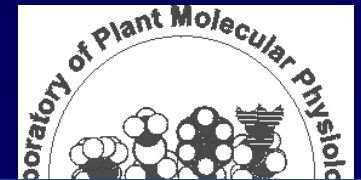


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Základy genomiky VI.

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

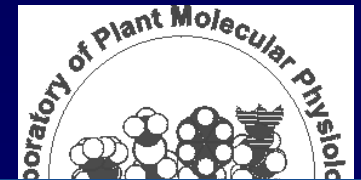


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

- Podstata a funkční význam proteinových interakcí
 - chemická podstata proteinových interakcí
 - proteinové interakce - klíč biologické funkce proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - koimunoprecipitace (Co-IP)
 - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

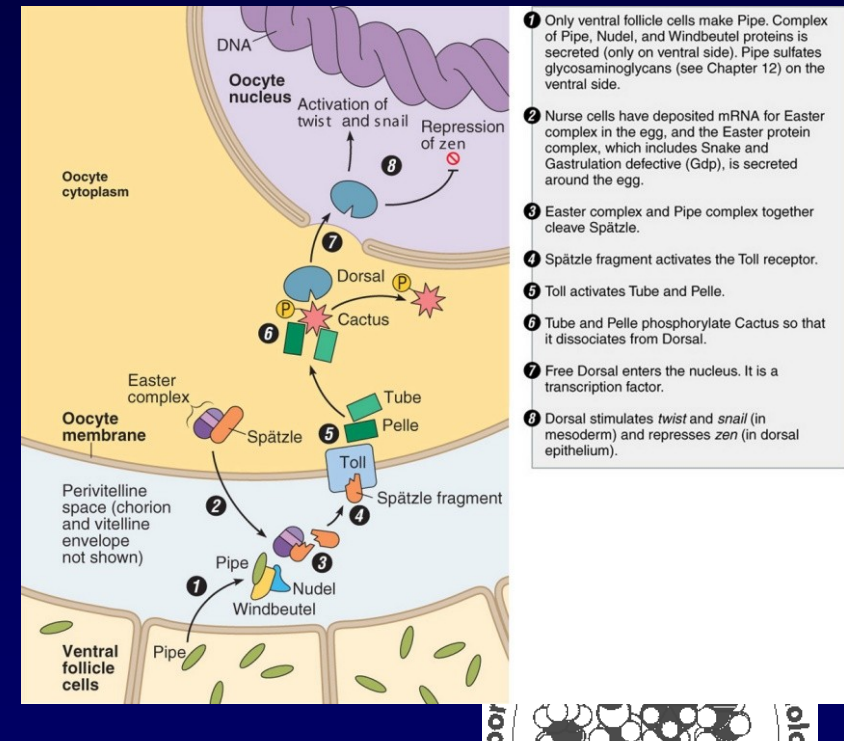
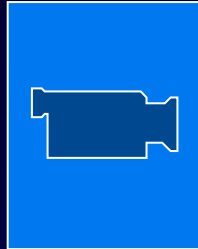


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

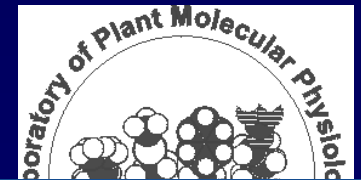
Genomika VI.

- Podstata a funkční význam proteinových interakcí
 - postranní řetězce aminokyselin vstupují do nekovalentních interakcí, které jsou rozhodující pro sbalování proteinů a jejich interakci s dalšími molekulami včetně jiných proteinů
 - většina proteinů v buňce existuje ve formě komplexů, které mohou dále navzájem interagovat, vytváření interakcí je podstatou biologické funkce strukturních proteinů, regulačních a signálních proteinů, protilátek i enzymů
- signální kaskády využívající cAMP
- přenos signálu prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
- vývojově specifické procesy např. regulace buněčné diferenciace během embryonálního vývoje u *Drosophily*
- sestřih hnRNA interakce 5 snRNA a více než 50 proteinů
- regulace buněčného cyklu



Genomika VI.

- Podstata a význam proteinových interakcí
 - chemická podstata proteinových interakcí
 - proteinové interakce – klíč biologické funkce proteinů
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - koimunoprecipitace (Co-IP)
 - tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

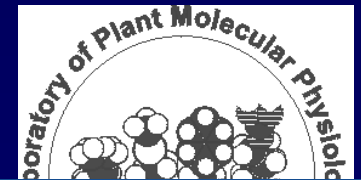
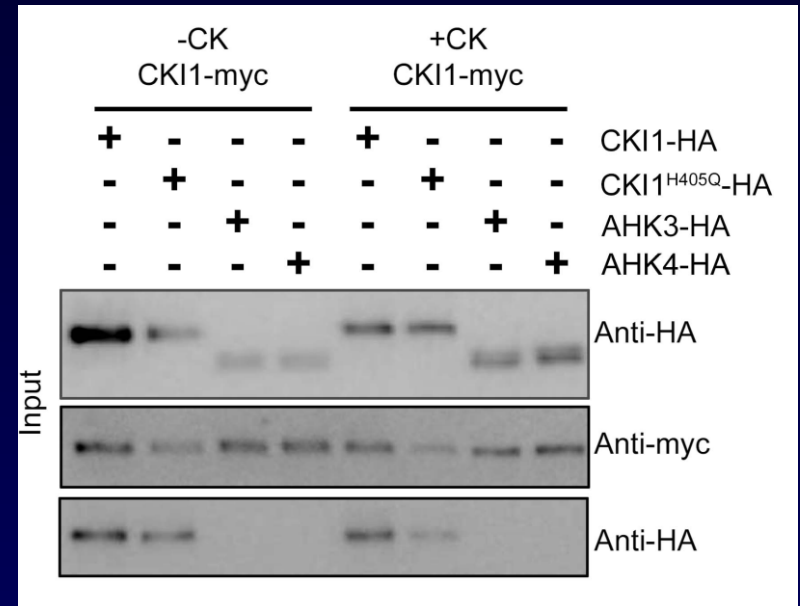
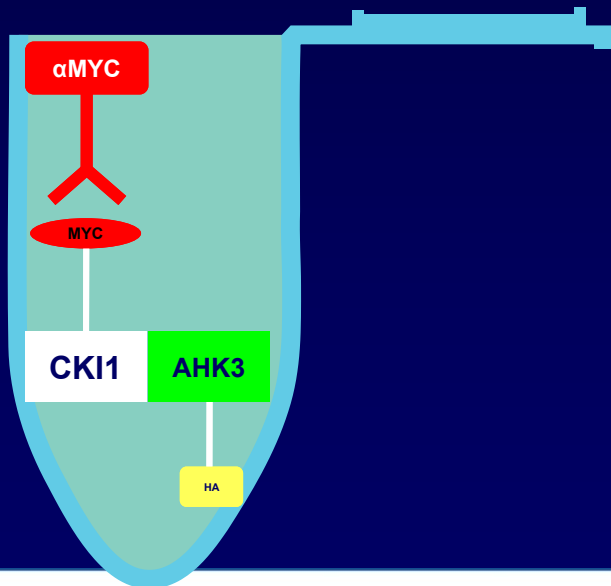
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

koimunoprecipitace

- založena na izolaci proteinových komplexů pomocí protilátek rozpoznávajících jeden z interagujících proteinů
- jednou z metod využívajících princip koimunoprecipitace je tzv. pull-down assay, která se využívá zejména pro potvrzení interakcí u proteinů, kde již tuto interakci předpokládáme

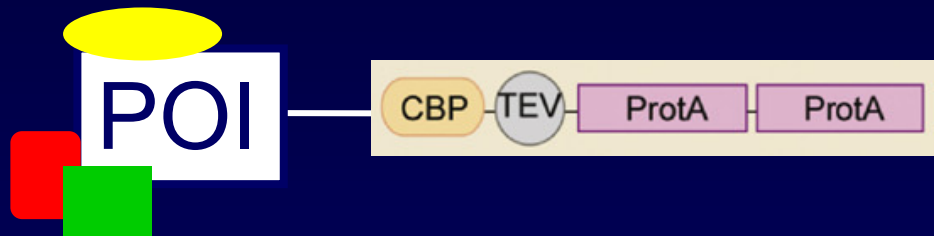


Genomika VI.

Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

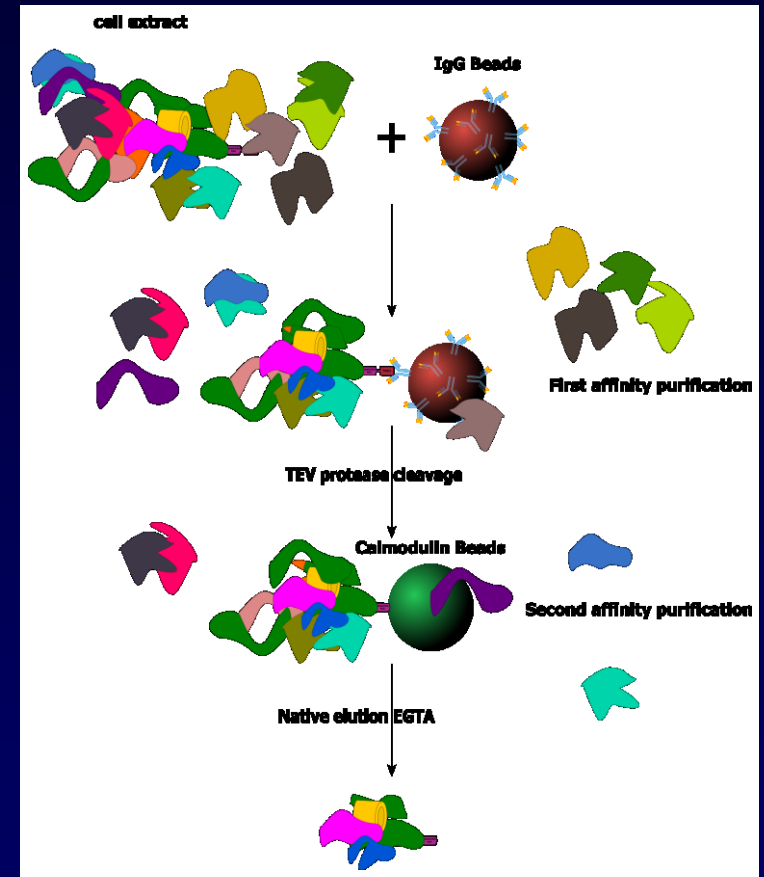
- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, fúzovaných s dvěma různými vazebnými doménami



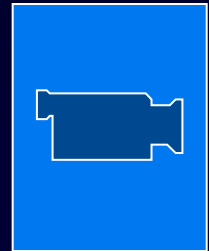
- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vazací domény proteinu A (ProtA)
- místo rozpoznávané specifickou proteázou z TEV viru (tobacco etch virus)

- 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



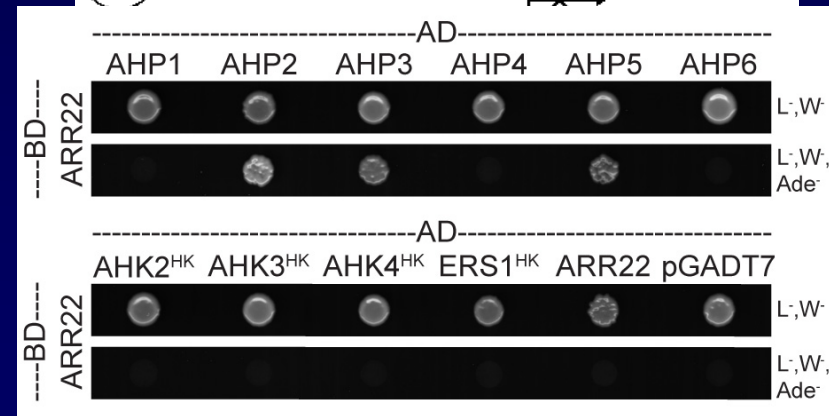
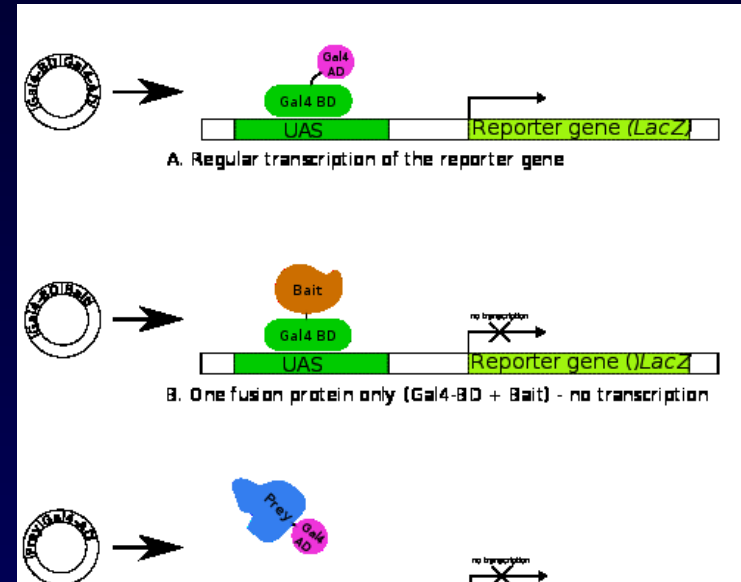
Genomika VI.



Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*

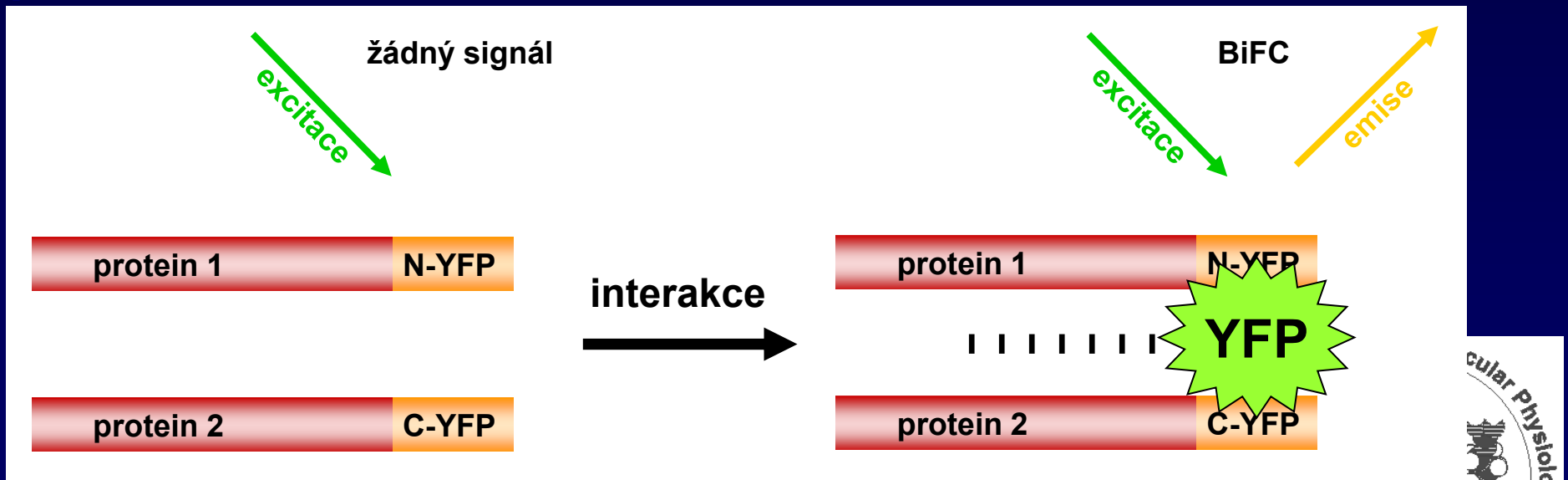
dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- Detekce proteinového komplexu pomocí funkční rekombinace dvou nezávislých domén transkripčního faktoru
 - 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 a tkání



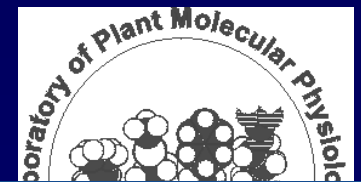
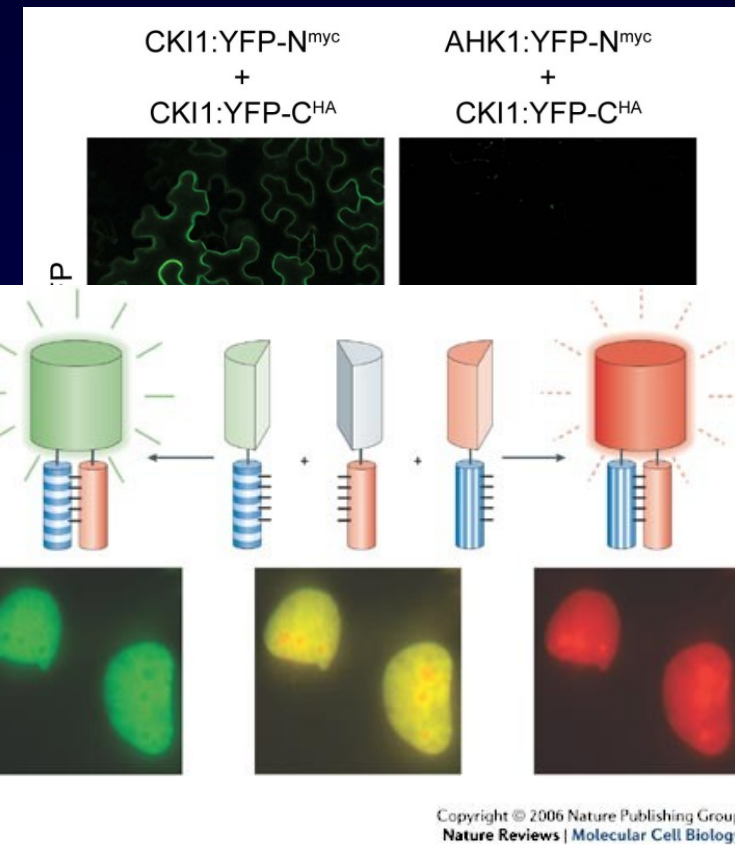
Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
- 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



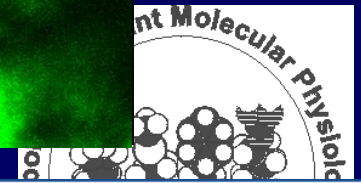
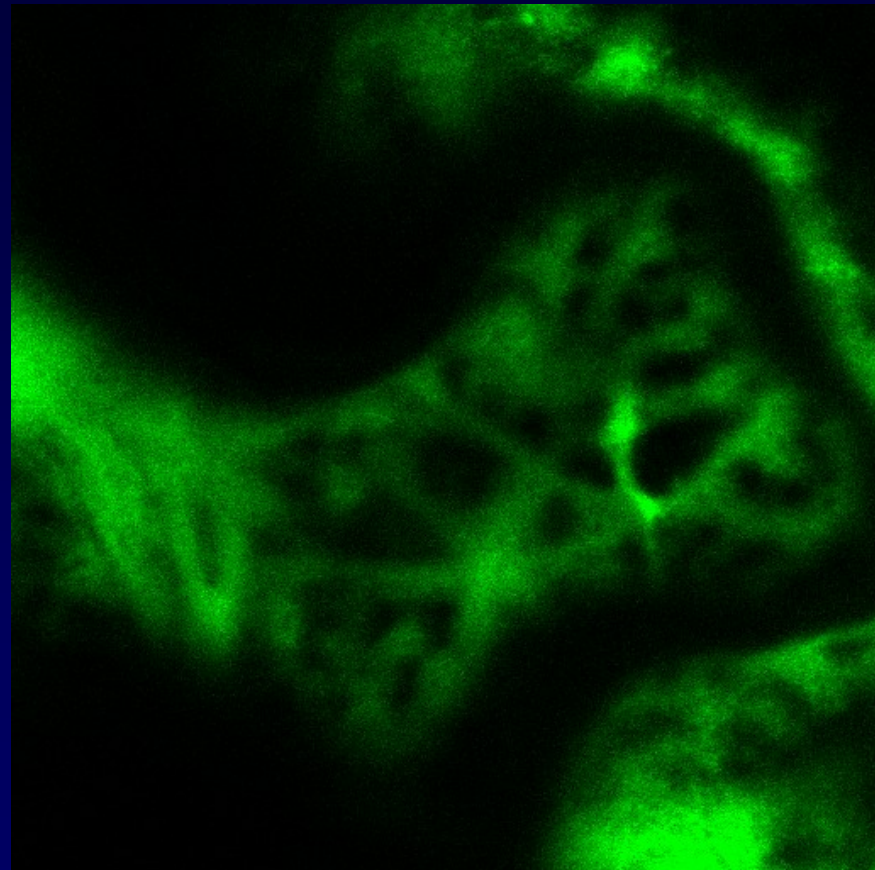
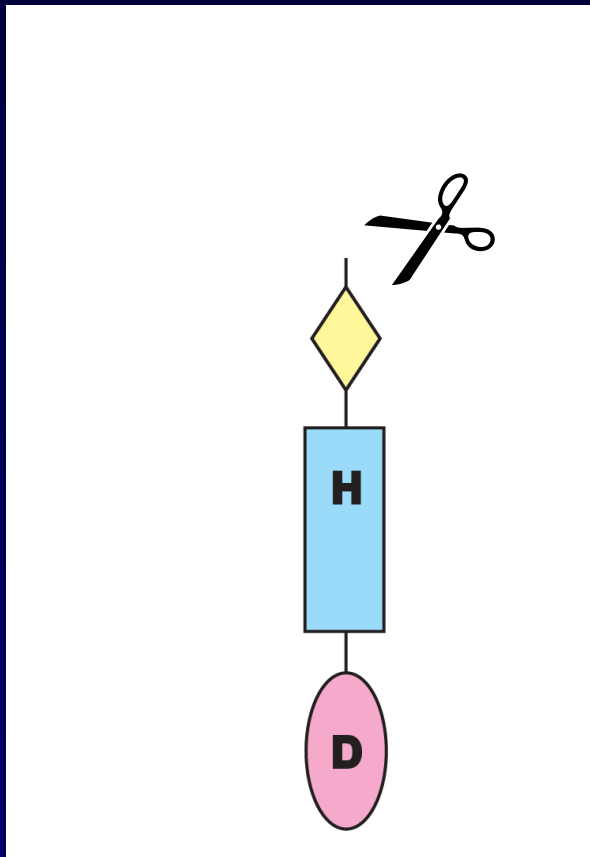
Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - 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
 - BiFC patří do metod, které jsou v současnosti označovány PCA (Protein Complementation Assay) (např. split-LUC aj.) a v modifikované verzi je možné analyzovat více interakcí jednoho proteinu současně (multicolor BiFC)



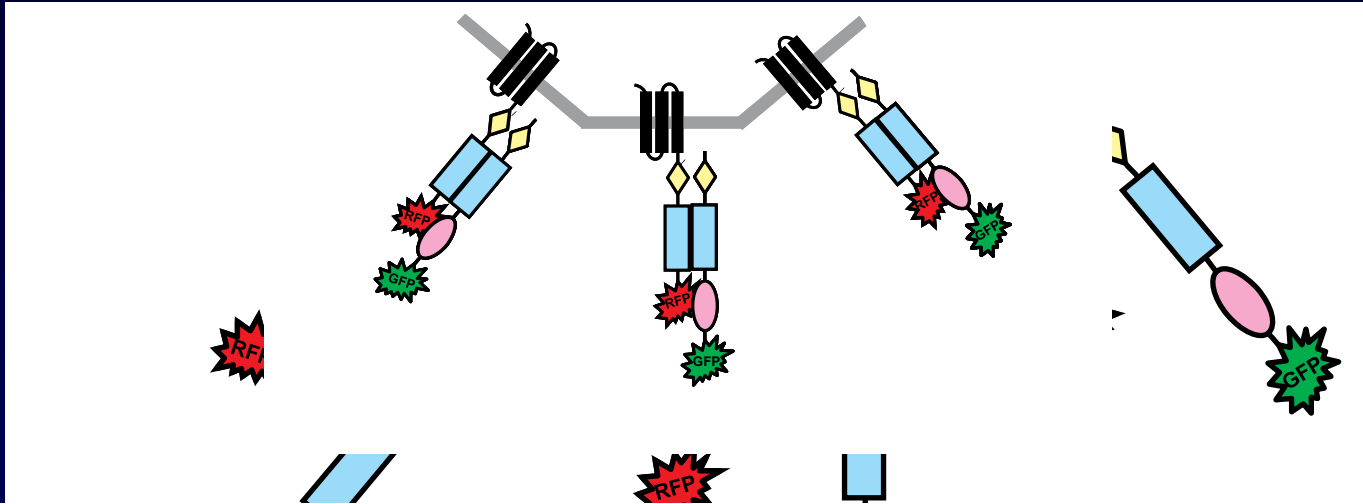
Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

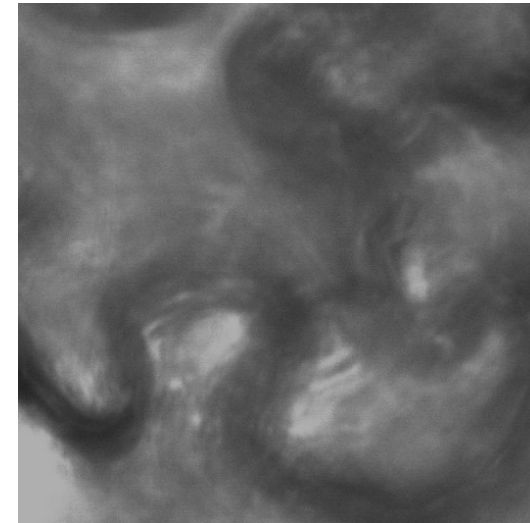
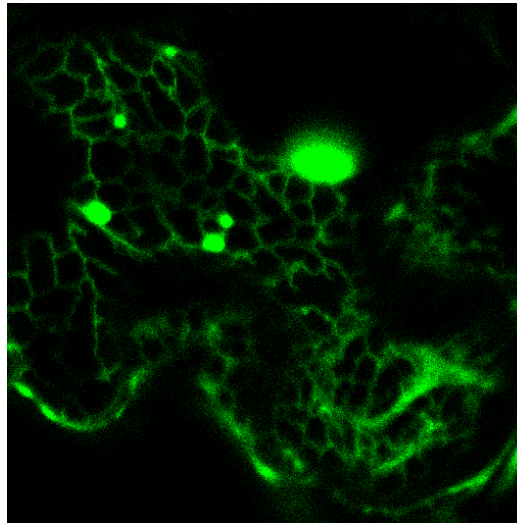
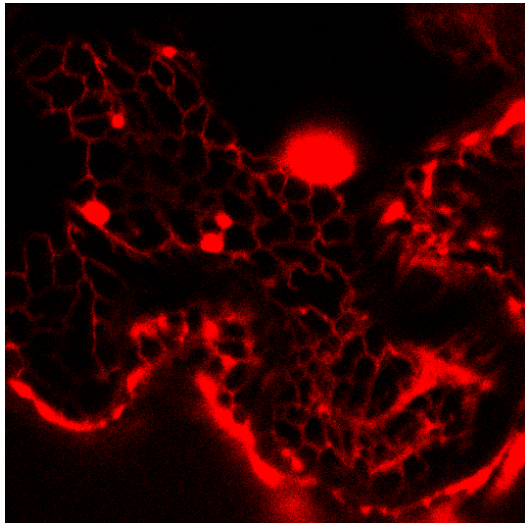


Genomika VI.

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

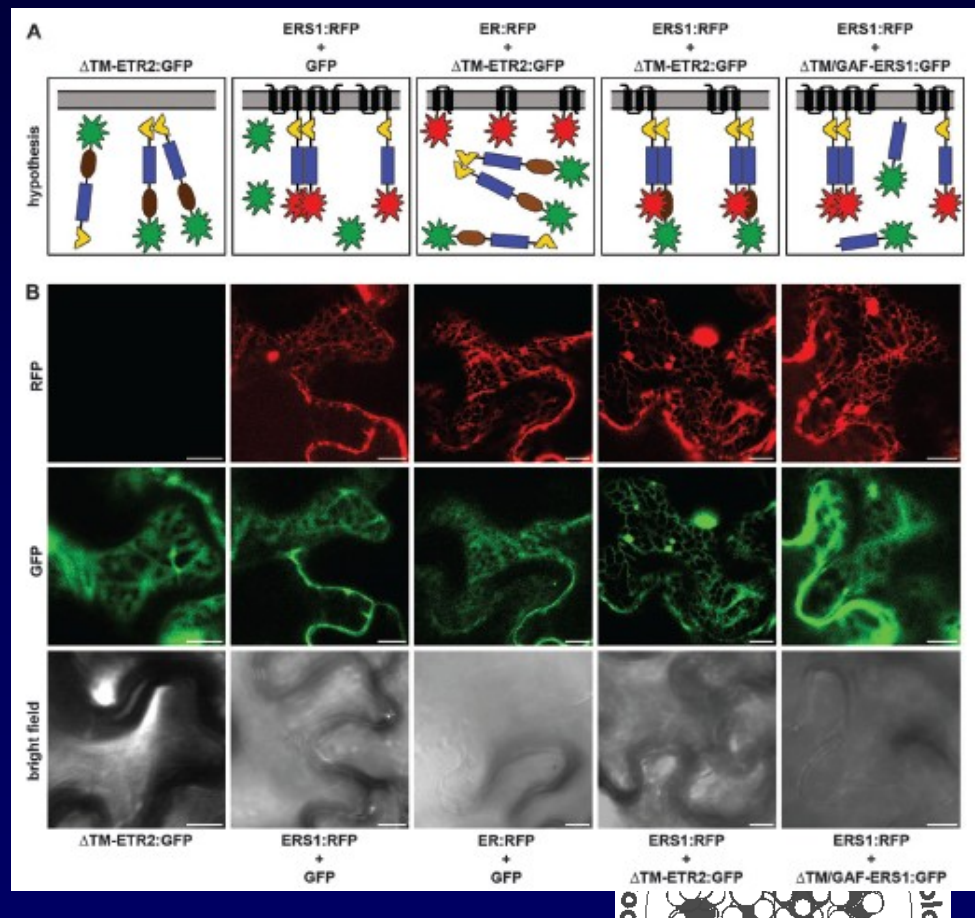


$P_{35S}::ERS1:RFP + P_{35S}::\Delta TM-ETR2:GFP$



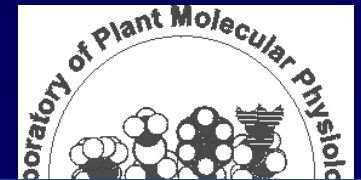
Genomika VI.

- 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 VI.-shrnutí

- Podstata a funkční význam proteinových interakcí
 - chemická podstata proteinových interakcí
 - proteinové interakce – klíč biologické funkce 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)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

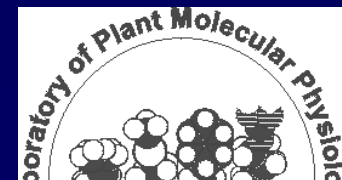
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Závěrečná diskuse

Praktické aplikace funkční genomiky:

- individualizovaná medicína („personalized medicine“)
- pokročilé biotechnologie
- šlechtění rostlin



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

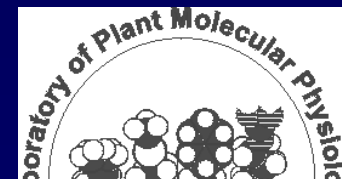
Závěrečná diskuse

Individualizovaná medicína („personalized medicine“)

Jedná se o lékařský přístup, který klade důraz na systematické využití informací o jednotlivém pacientovi za účelem vytvoření individuálně optimalizovaného preventivního a terapeutického plánu.

Některé předpoklady:

- detailní znalost genomu pacienta, ideálně kompletní genomová sekvence
- znalosti funkce jednotlivých genů včetně funkčních odlišností jednotlivých alel zastoupených v populaci
- korelace sekvenčních charakteristik s prognózami onemocnění, s úspěšností terapeutických postupů atd.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

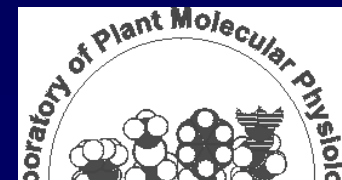
Závěrečná diskuse

Pokročilé biotechnologie

<http://www.efb-central.org>

Některé příklady:

- efektivní využití rostlinné biomasy pro výrobu paliv
- získávání základních jednotek pro výrobu polymerních látek z živých organismů místo z fosilních zdrojů
- fytofarmaceutika – nové metody vakcinace jako je například exprese protilátek, nebo antigenů vhodných k imunizaci v rostlinách



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Závěrečná diskuse

Šlechtění rostlin

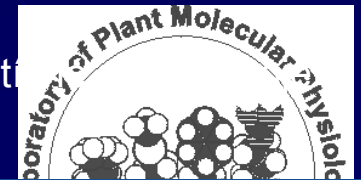
<http://www.efb-central.org>

<http://www.gmo-compass.org/>

<http://www.ugent.be/we/genetics/ipbo/en>

Některá fakta k zamyšlení:

- naše civilizace je postavena na zemědělství, za 10.000 let jeho existence klesla plocha potřebná k obživě jedince o 90%
- k zabránění kolapsu je třeba tuto plochu dále snížit a to ze současných 0,45 ha/osobu až na 0,2 ha/osobu a to do roku 2050
- návrat k původním metodám zemědělství je návratem k původním nárokům na plochu k obživě a je tedy dlouhodobě neudržitelný (Jaké trendy vidíme kolem sebe v Evropě? Jak se to slučuje se solidaritou k rozvojovým zemím?)
- intenzivní zemědělství = konverze vody a ropy na potraviny
- cílem rostlinných biotechnologií je využít všech dostupných poznatků vědy ke šlechtění odrůd s větším výnosem při menších nákladech na vodu a hnojiva
- je nutná obhajoba GMO rostlin („biotech crops“) před veřejností, neboť toto budou plodiny 21. století rostoucí v lepším životním prostředí
- neakceptovatelnost nových metod z ideologických důvodů staví každého vědce do obtížné situace, kterou nerozumem, kterému musí s plným nasazením čelit



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

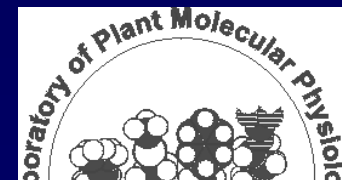
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika VI.

Závěrečná diskuse

Váš úkol:

- neúnavně vysvětlovat, že využívání vědeckých poznatků, a to včetně genomiky, je nutné kromě pokroků v medicíně také pro zachování planety a naší civilizace
- diskuse s širokou veřejností o významu a přínosech GMO pro lidskou společnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky