

CG090 – Metody v proteomice

Analýza protein-proteinových interakcí

doc. Jan Paleček

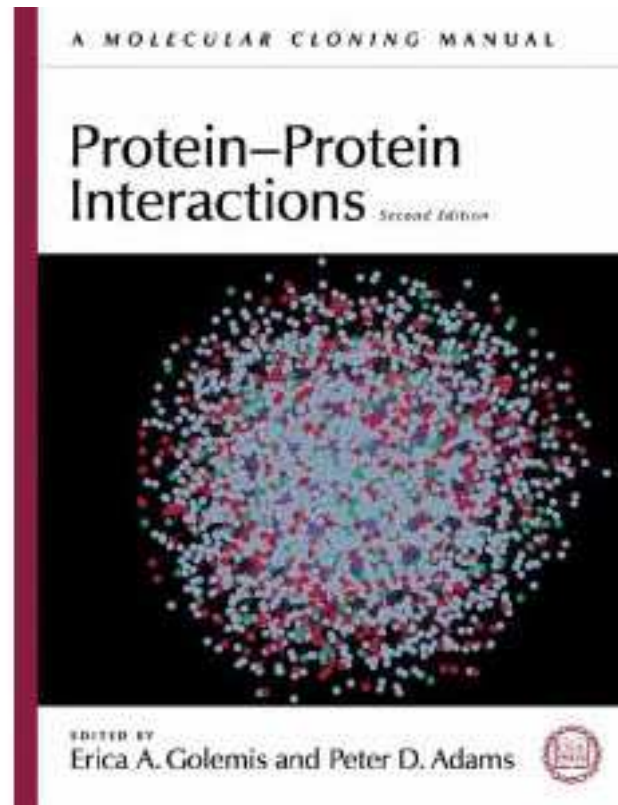
Laboratoř Strukturních proteinů eukaryotických chromosomů, NCBR PŘF
jpalecek@sci.muni.cz

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 ...
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- *in silico* metody (docking)
- 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

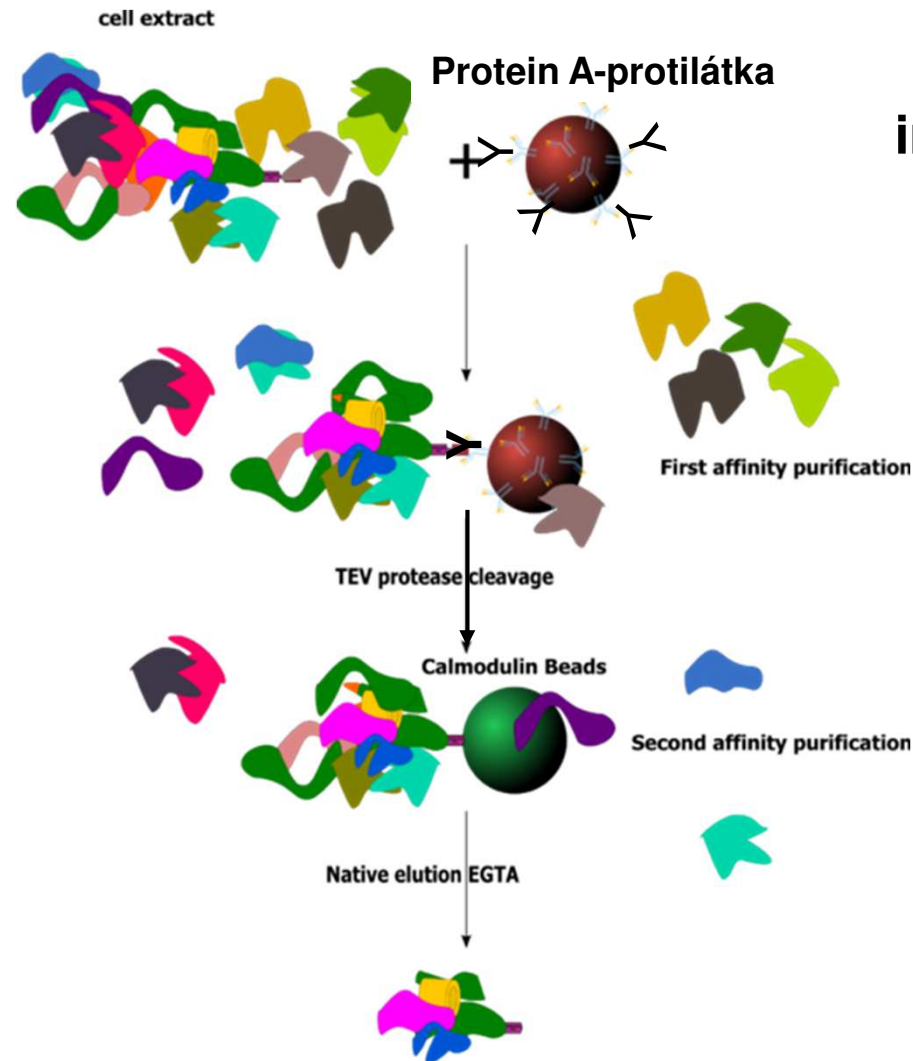
- TAP-tag („Tandem-Affinity Purification“, jiné tagy a protilátky)

Protein Tag

Tagy (a protilátky):
Myc, FLAG, V5, GFP, S-tag, GST, MBP, Strep ...

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	$10^{-14/-17}$

Vassilyeva et al, PNAS, 2017



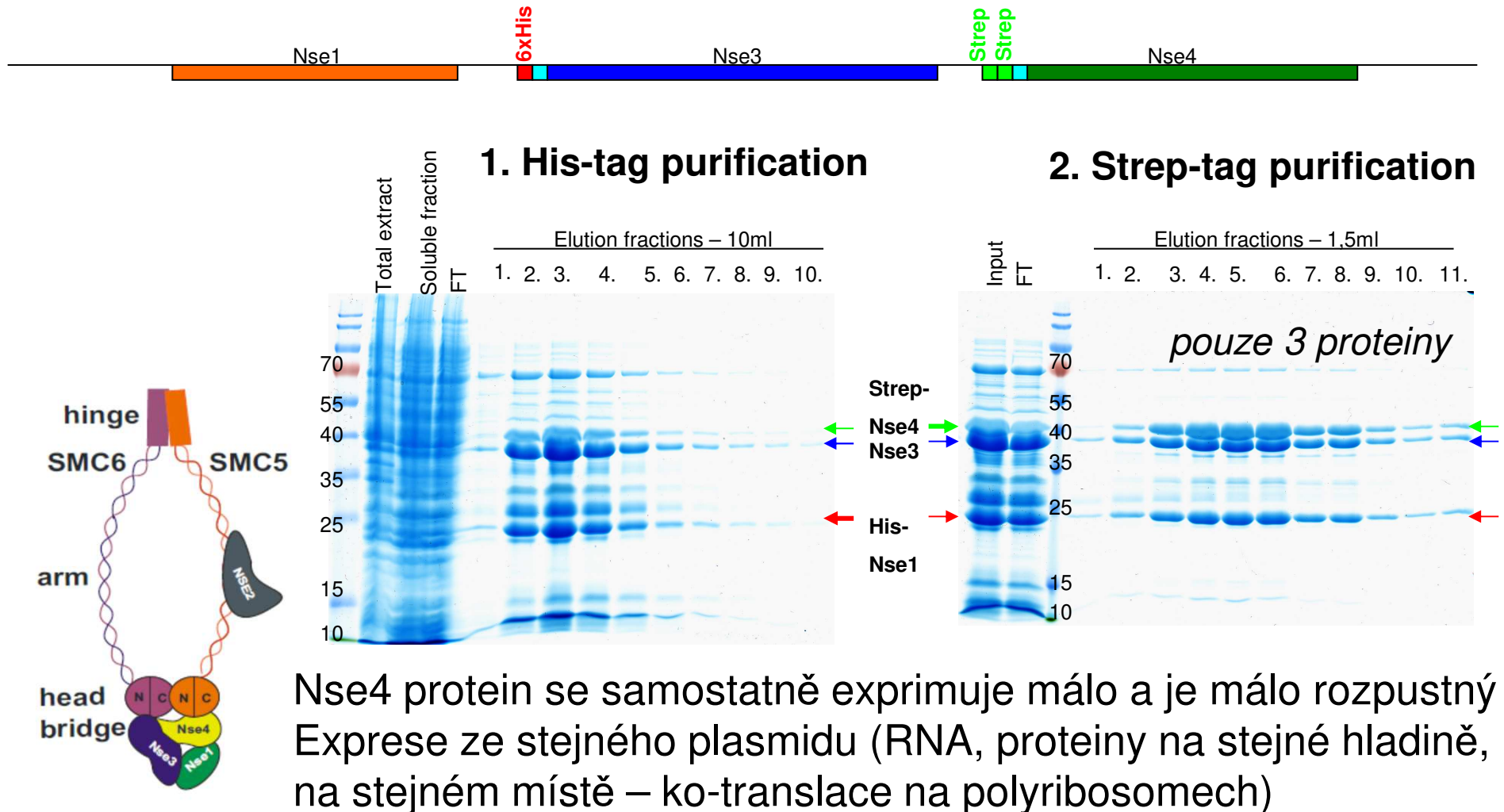
Hybridní!

**ko-
imunoprecipitaci**

Ize 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)



Pull-down (variance)

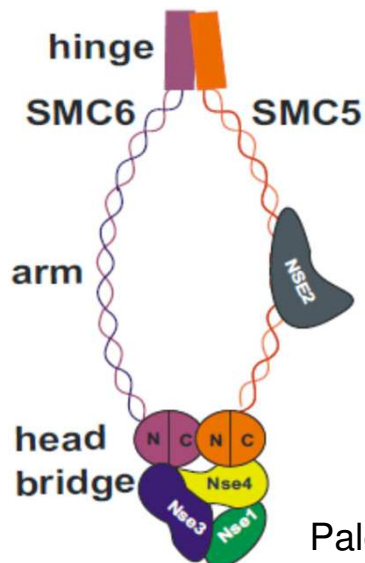
Podobný princip jako při ko-purifikaci/precipitaci

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

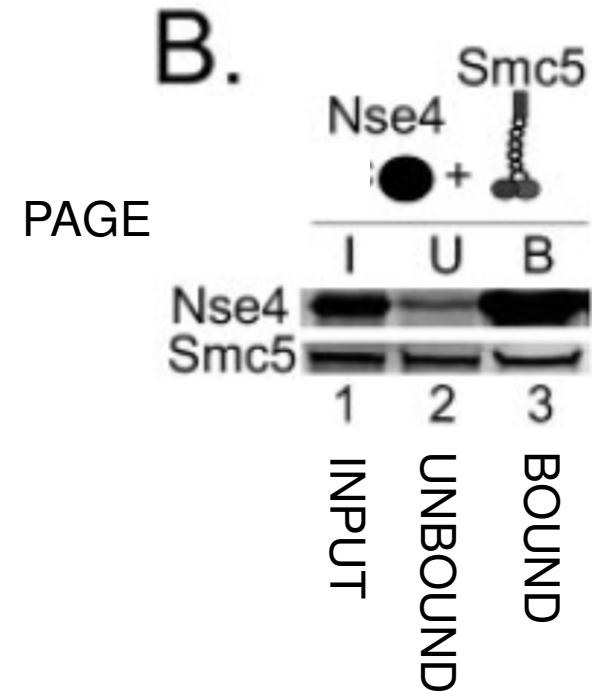
in vitro TNT (Transcription and Translation) systém methionin S³⁵

výhody:

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



Palecek et al, JBC, 2006



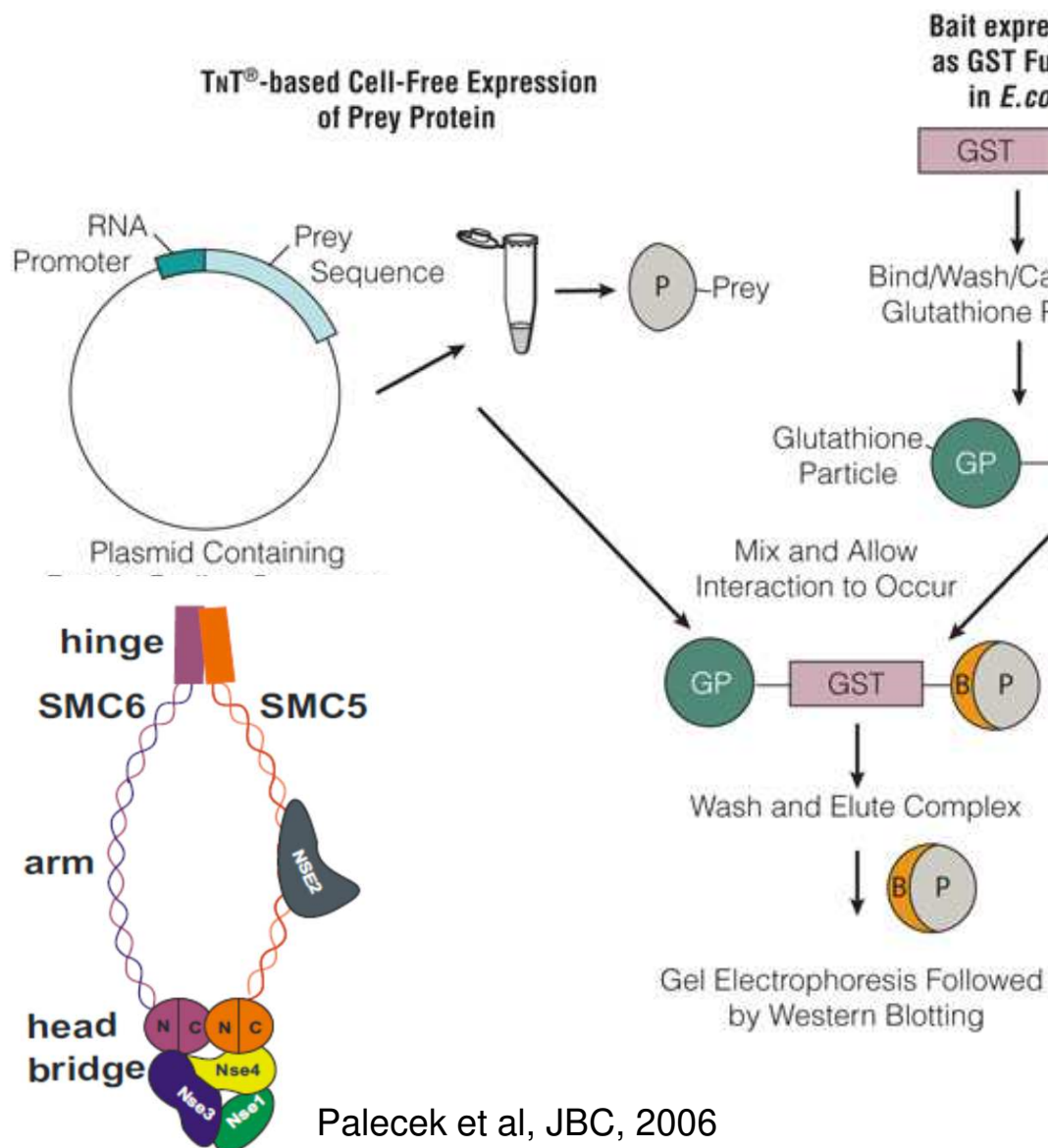
Nse4 protein se dobře exprimuje v TNT (v buňkách je nerozpustný)

Pull-down (variance)

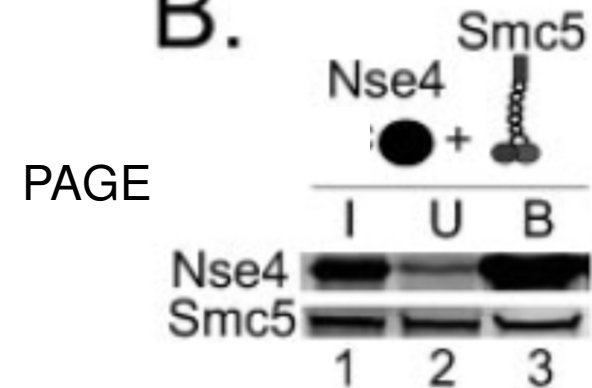
Podobný princip jako při ko-purifikaci/precipitaci

Silné interakce - oba proteiny

v TNT (nM-pM)

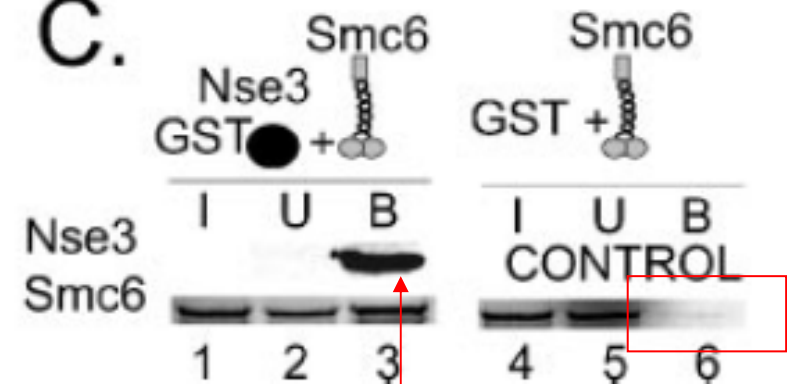


B.

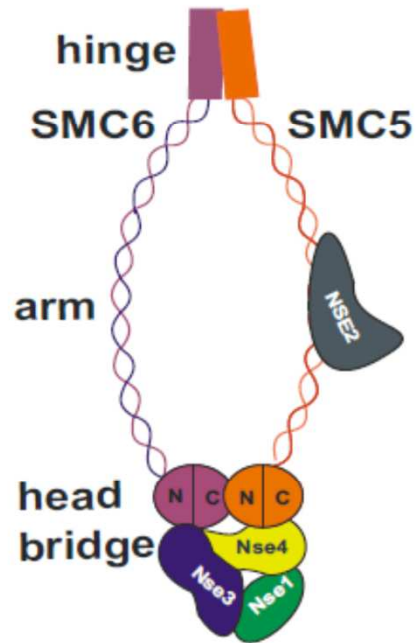


Slabé interakce (μ M) bait v přebytku (bakt. exprese) a prey v TNT

C.

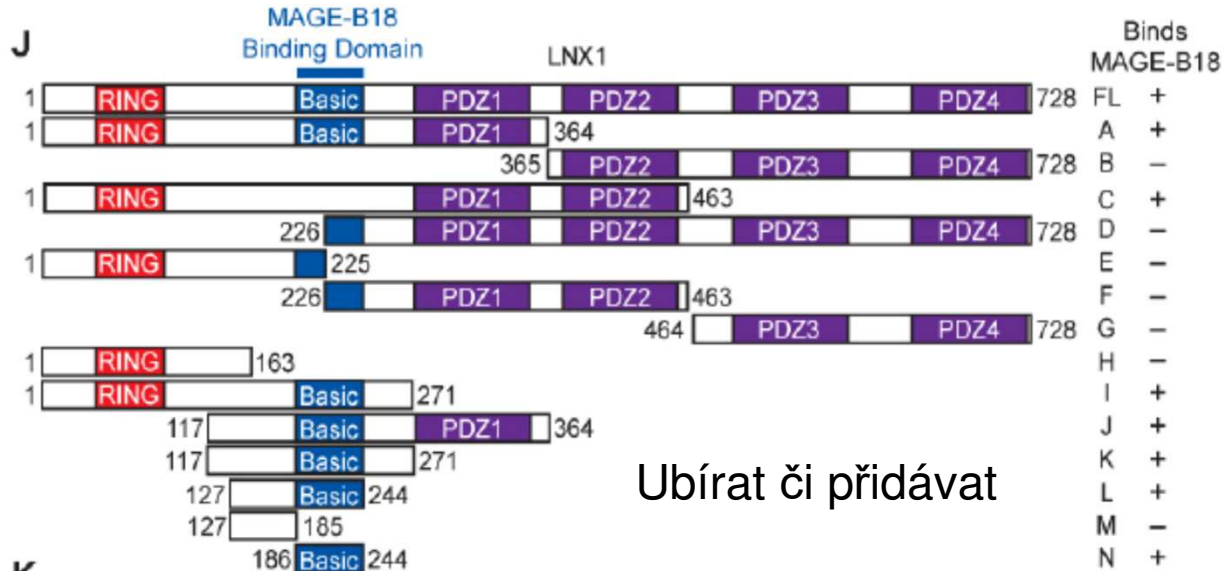
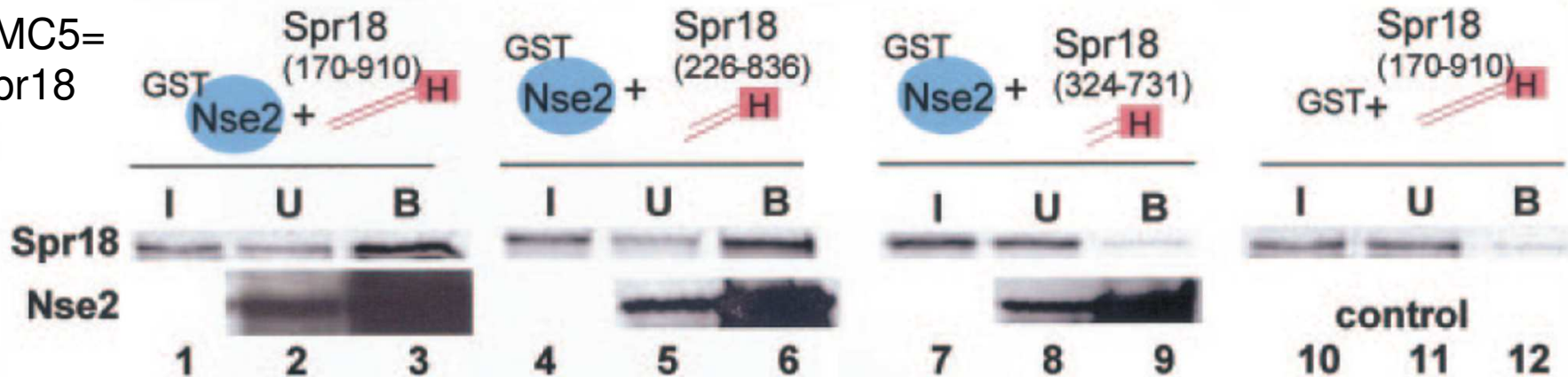


Charakterizace interakcí - domény



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

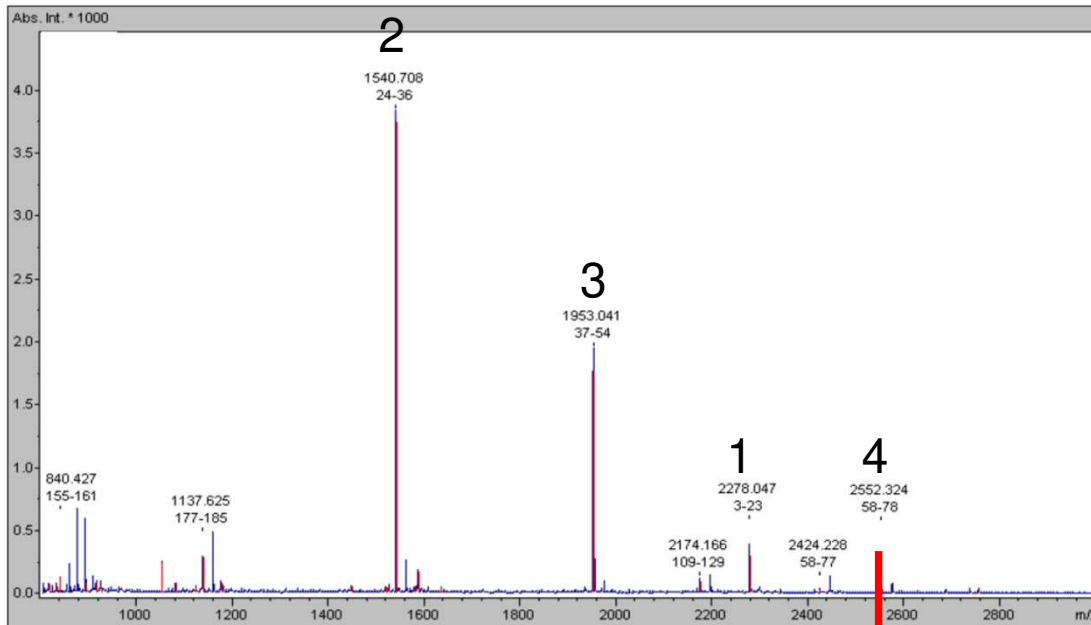
SMC5=
Spr18



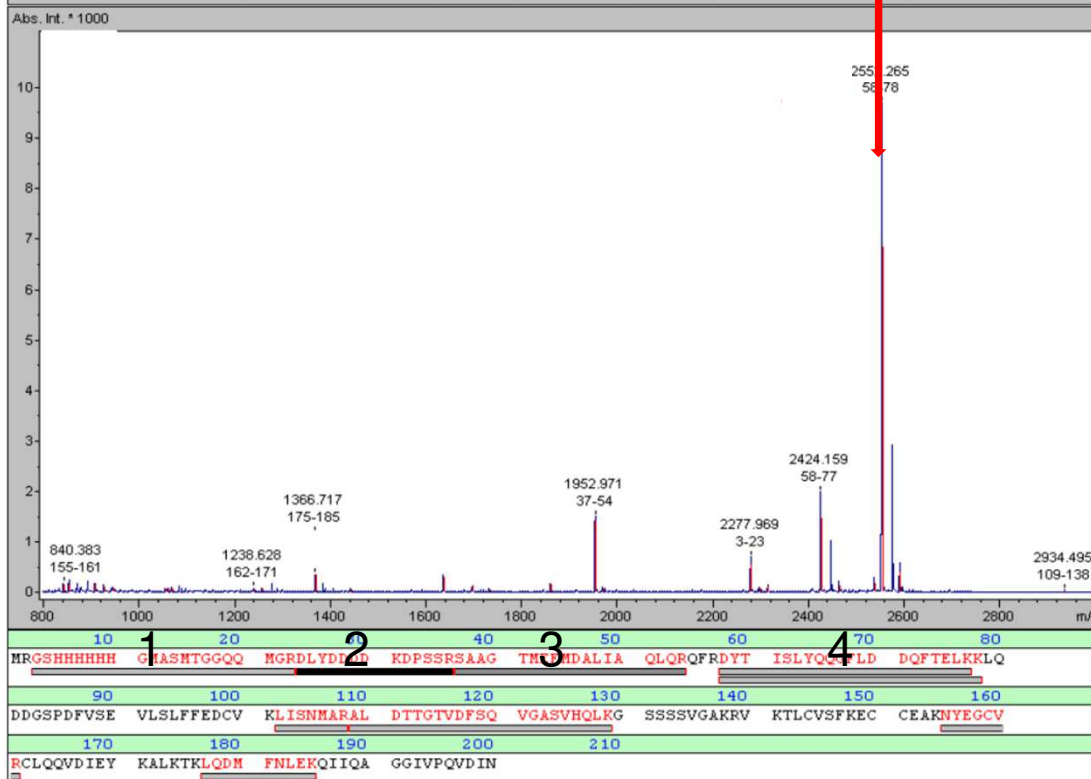
Ubírat či přidávat

Charakterizace interakcí – detailní mapování

MS spektrum celého proteinu
(normální pokrytí sekvence)

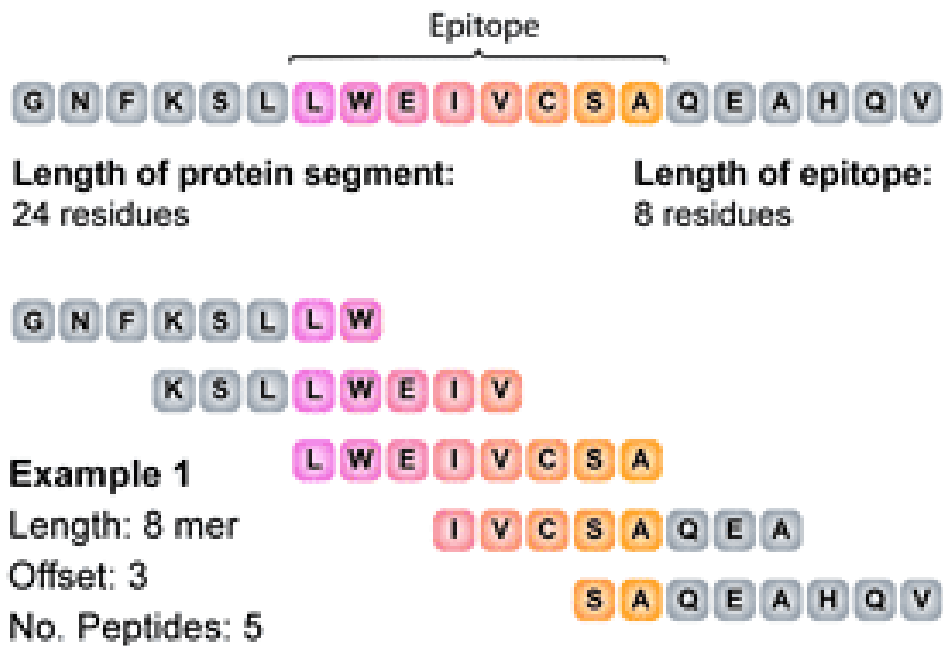
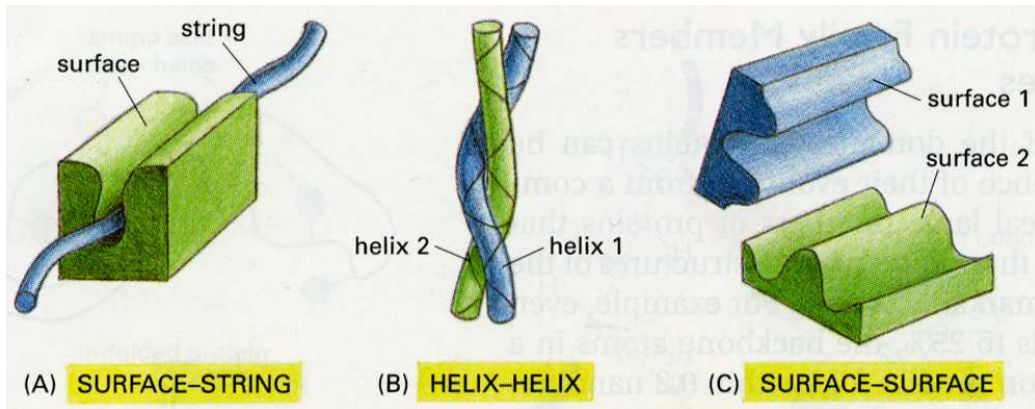


MS spektrum precipitátu
(obohacená interakční část)
P. Reichman (Diplomová práce)



Další MS metody na konci ...

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

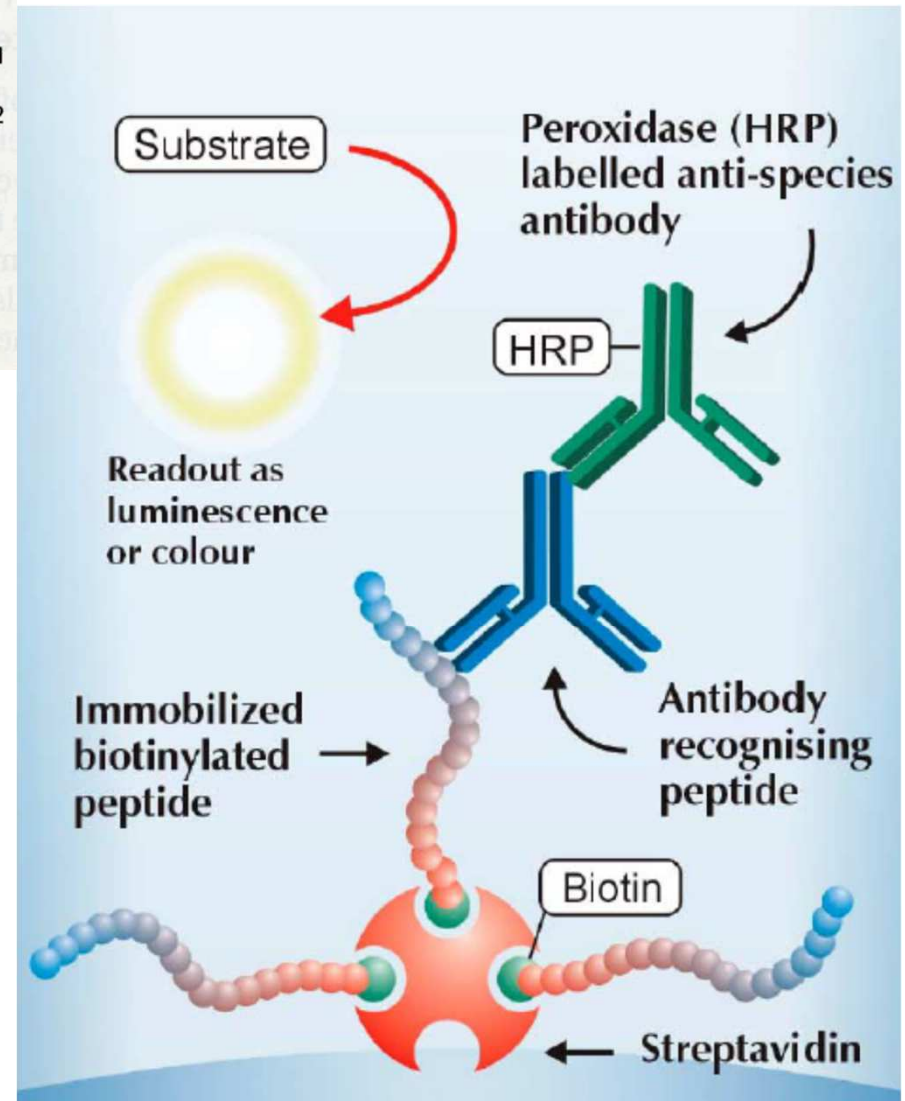
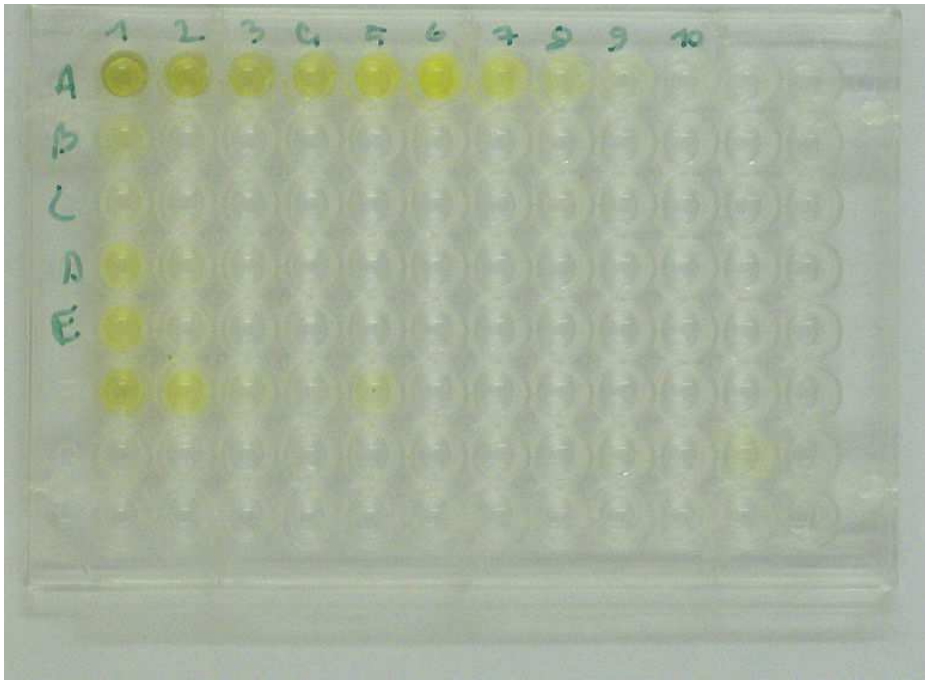


Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates



mikrotitrační miska (potažená streptavidinem)
peptidy se navážou přes biotin

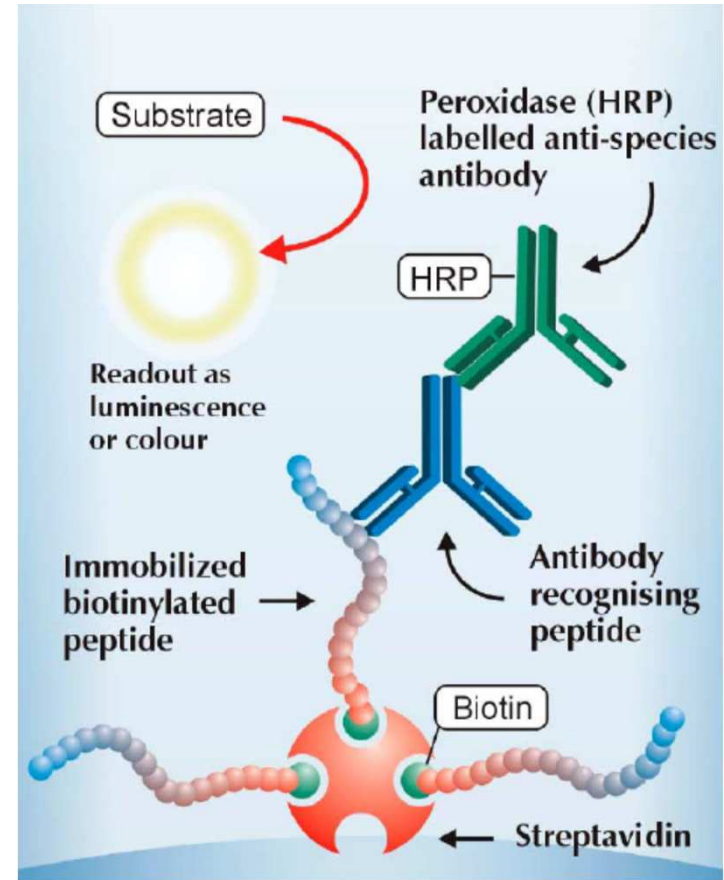


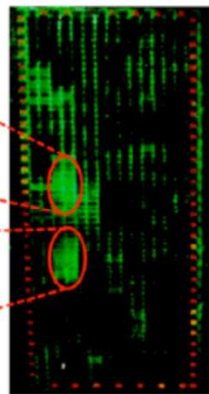
Figure 1: An ELISA using biotinylated peptides and coated plates

Stačí mnohem méně
proteinu

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

Peptide #43 VASRVDEDEDLLEE
Peptide #44 SRVDEDEDLLEEH
Peptide #45 VDEDEDLLEEHITK

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

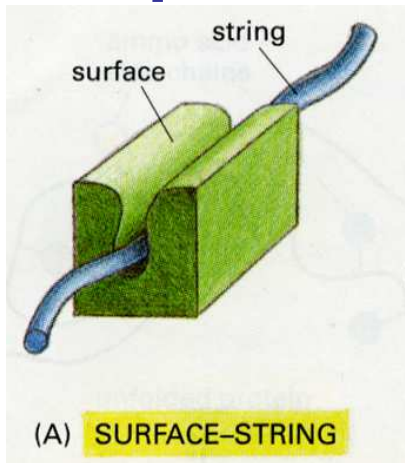
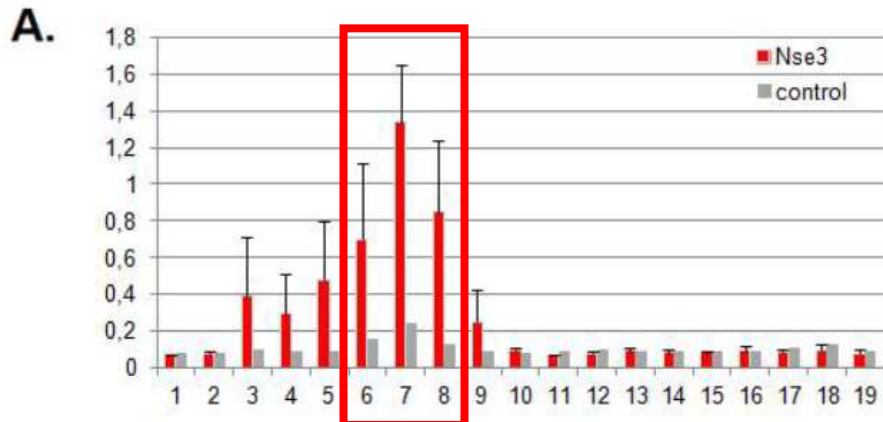


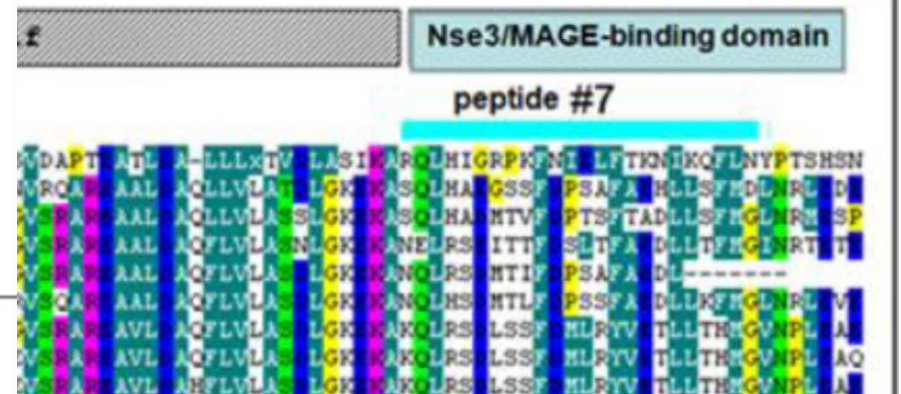
Table 3. *S. pombe* Nse4 synthetic peptides list
Nse4 peptidy

peptide #	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



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



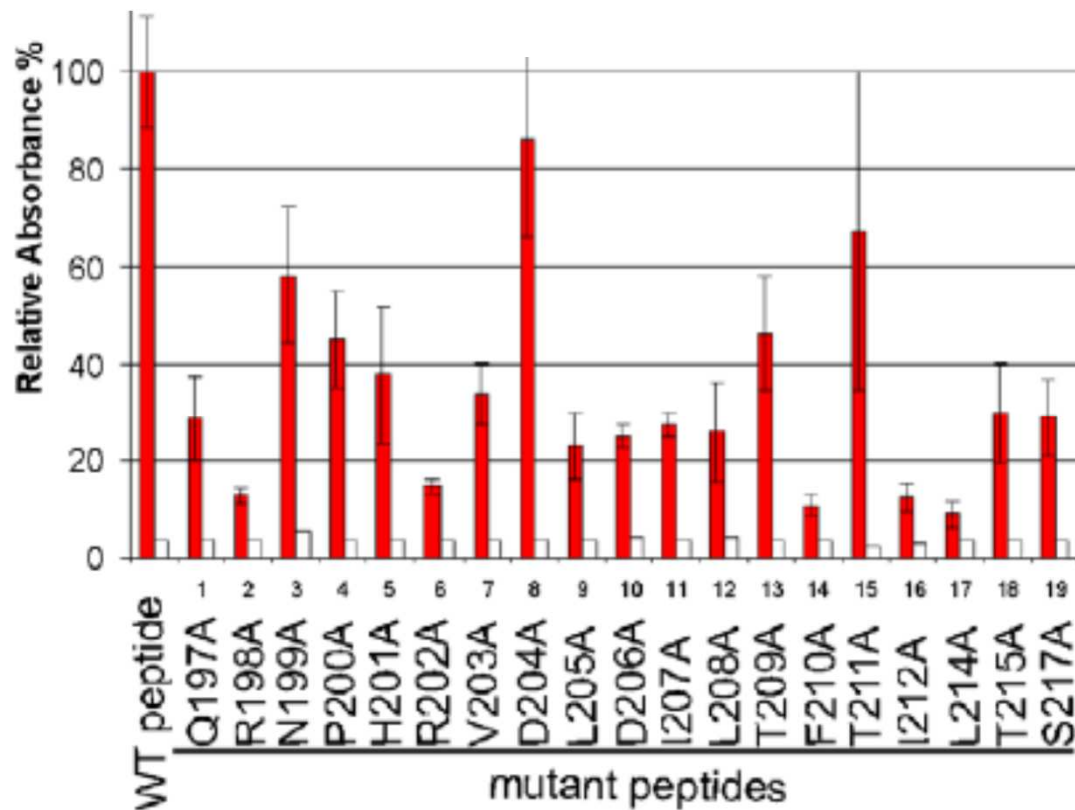
Charakterizace interakcí – „alanin scan“

EID2 peptidy (paralog Nse4)

Délka: 25 AMK

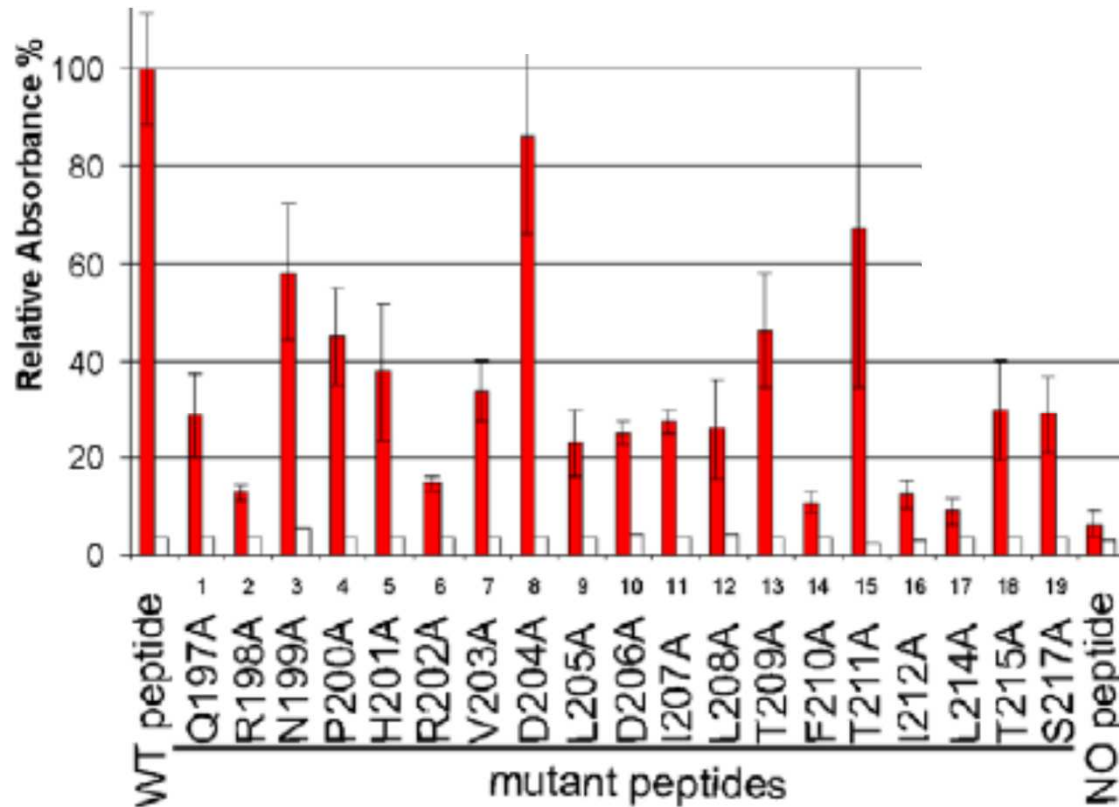
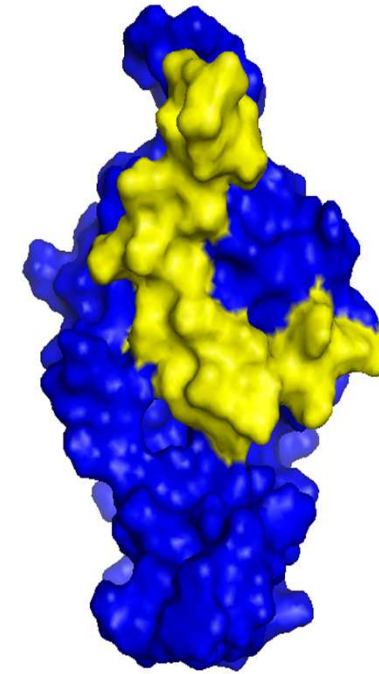
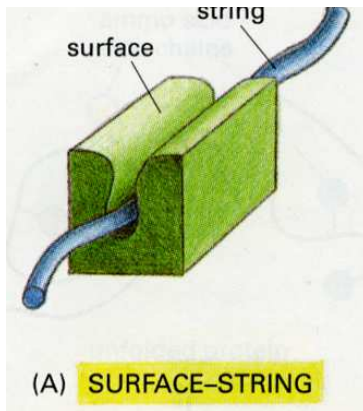
Posuv: mutace po 1 AMK

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 D ALTFTIALTAS
peptide #12	QRNPHRVLDLID I ALTFTIALTAS
peptide #13	QRNPHRVLDLIDIL A FTIALTAS
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*)

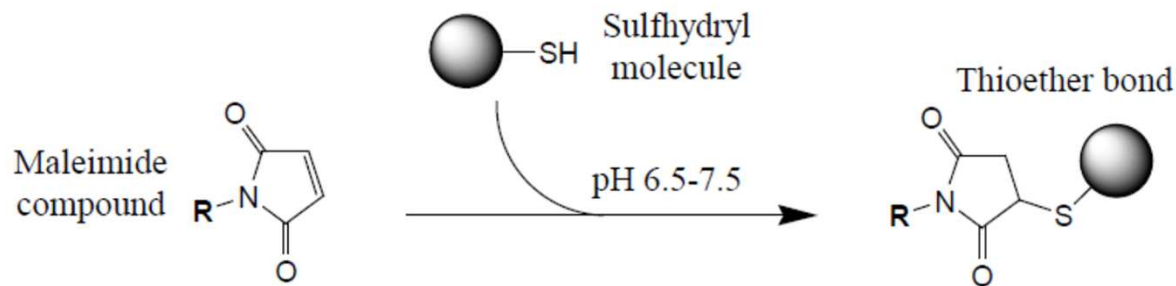
Jak je šroubovice orientována?

Mohou mutace vylepšit interakčních schopností?

Viz dále ...

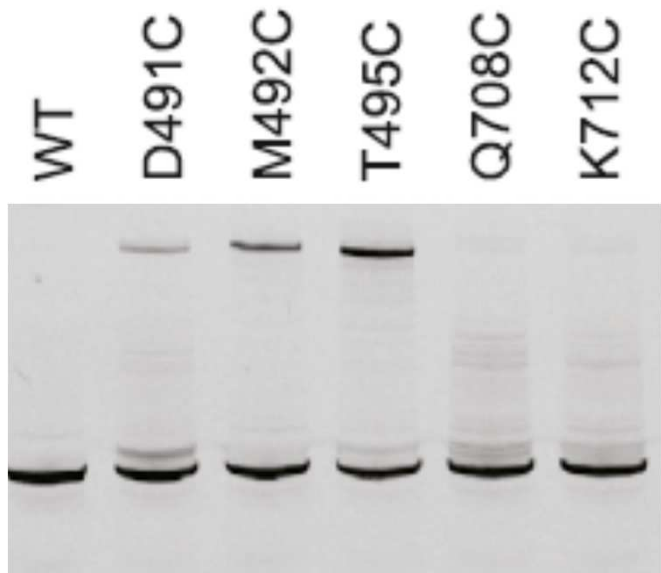
Mapování interakcí - crosslinking

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

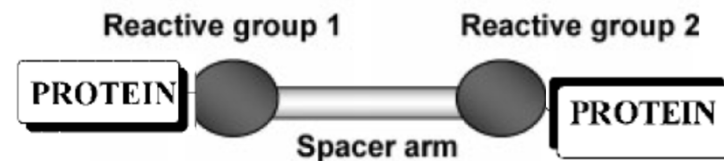
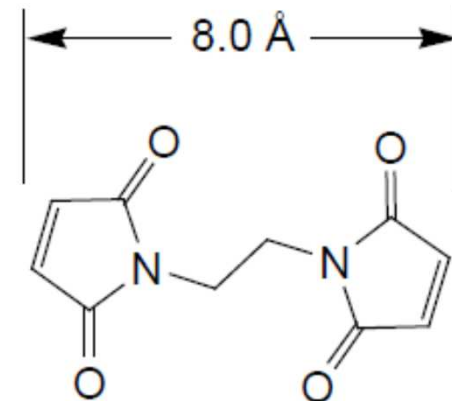


- cílené mutace na Cys
- na SDS-PAGE lze detekovat XL

BMOE, bis(maleimido)ethane.



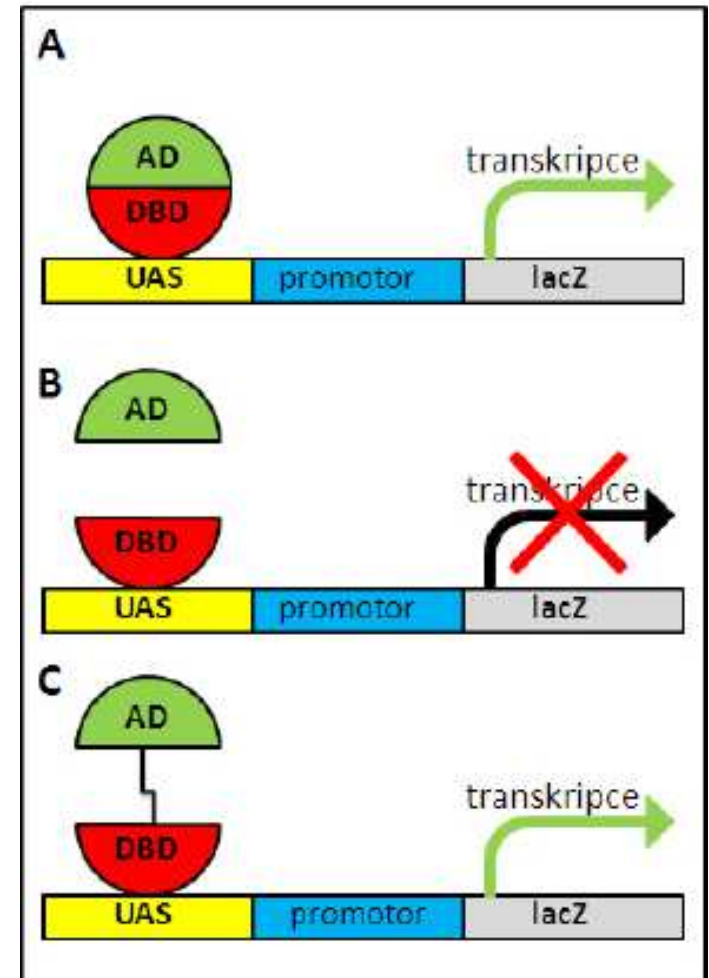
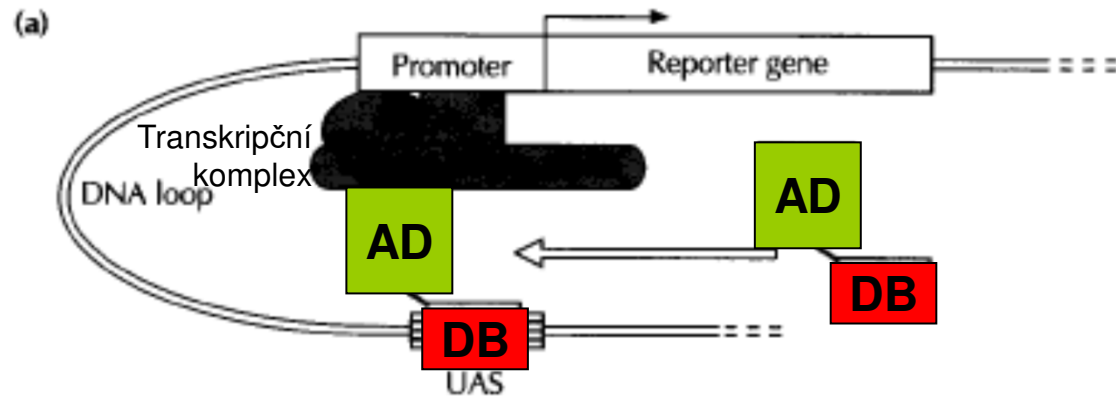
intenzita koreluje se vzdáleností



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 ...)

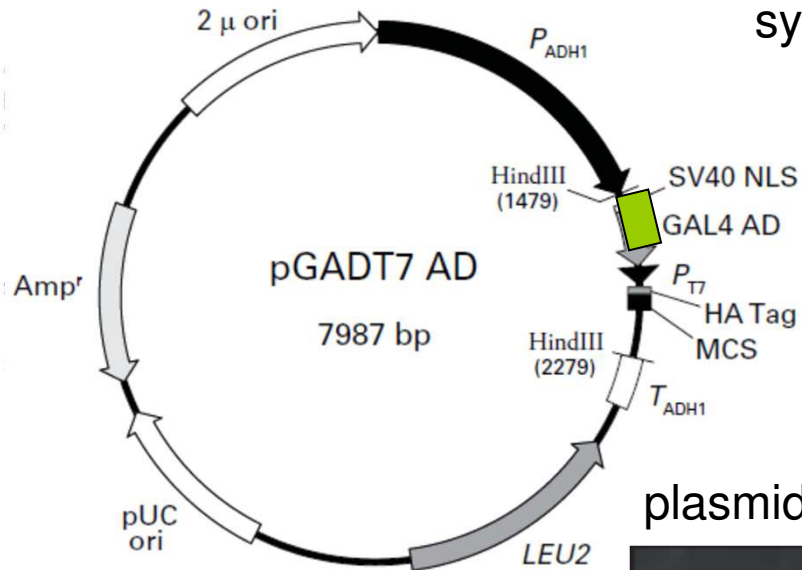
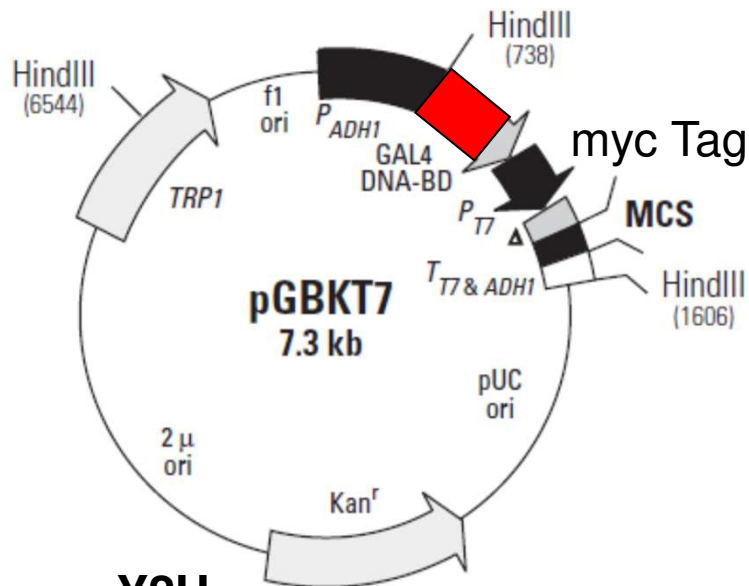


- DNA-vazebná doména (DB) bez aktivační domény (AD) není schopna aktivace transkripce
- Je možné **propojit domény** jakýmkoli linkerem a transkripci reaktivovat

Gal4p

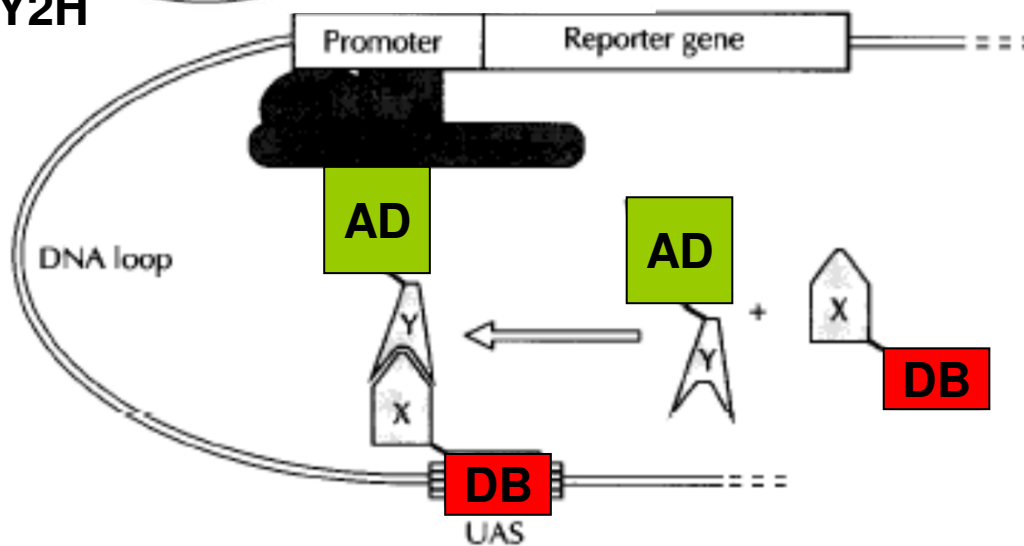


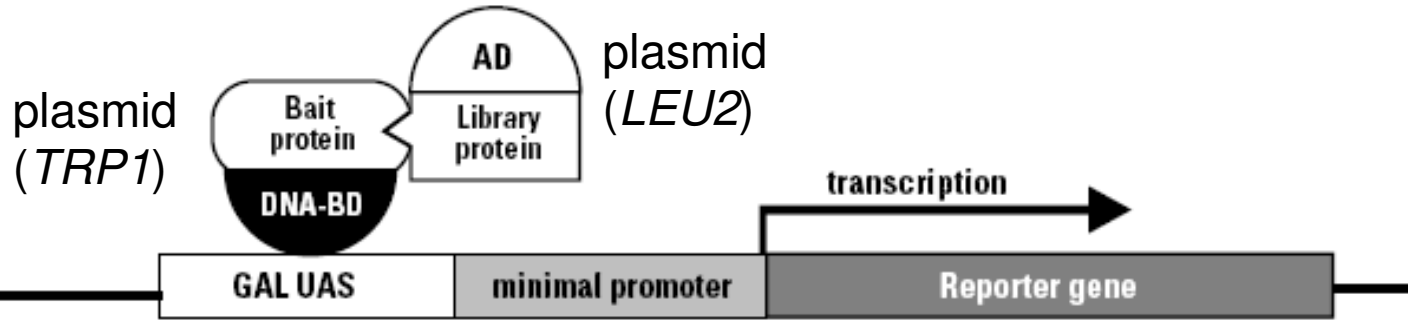
system vhodný i pro pull-down



transformace plasmidů do kvasinky

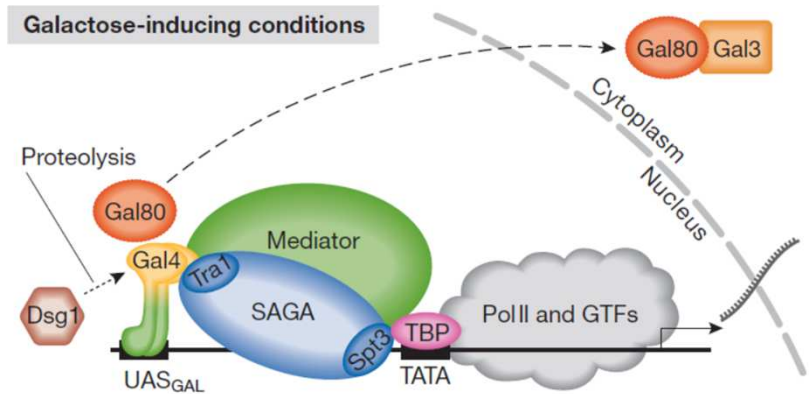
Y2H





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

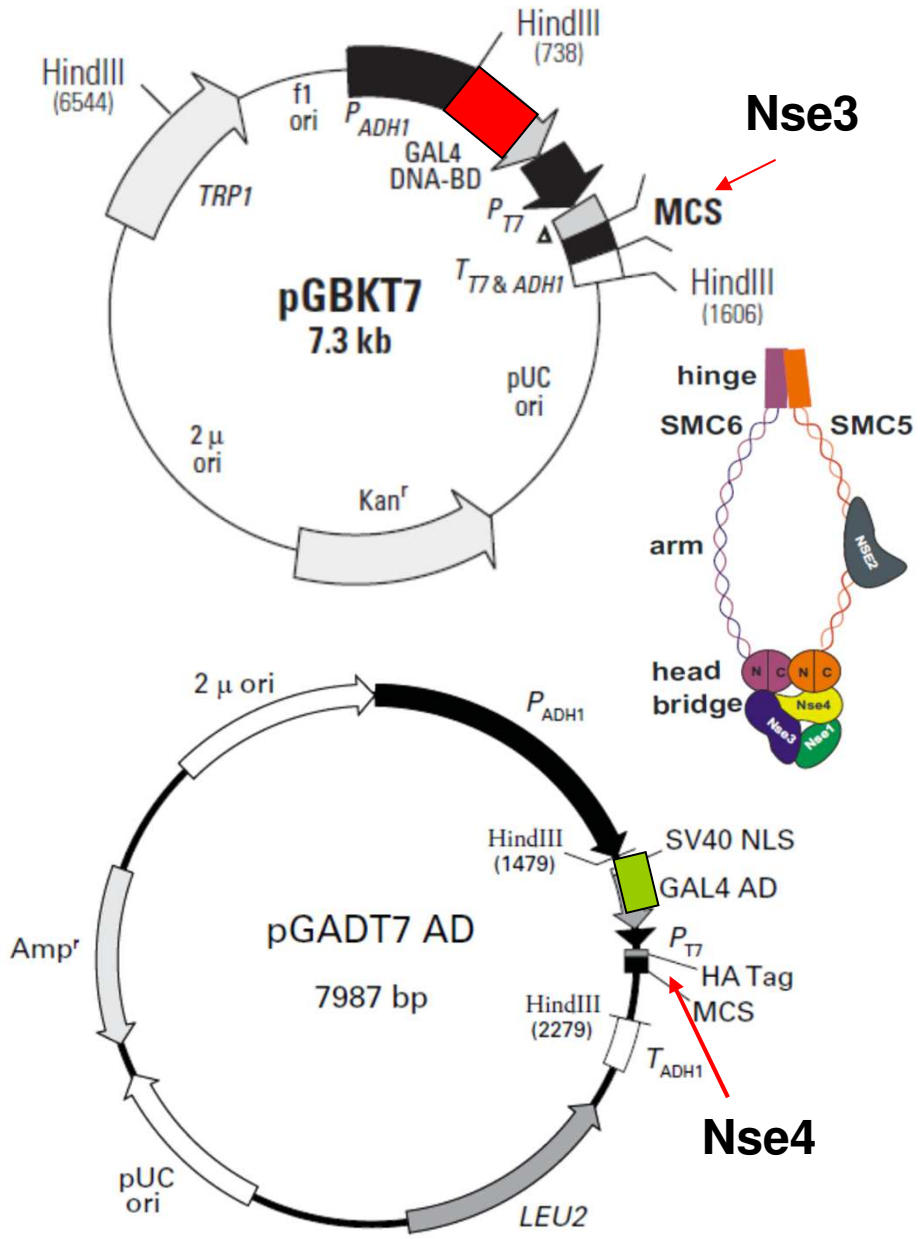
- Testuje se schopnost růstu kvasinek na médiu bez histidinu (nebo adeninu – červená/bílá)
- lze použít i pro hledání proteinových interakčních partnerů (screen knihovny)

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

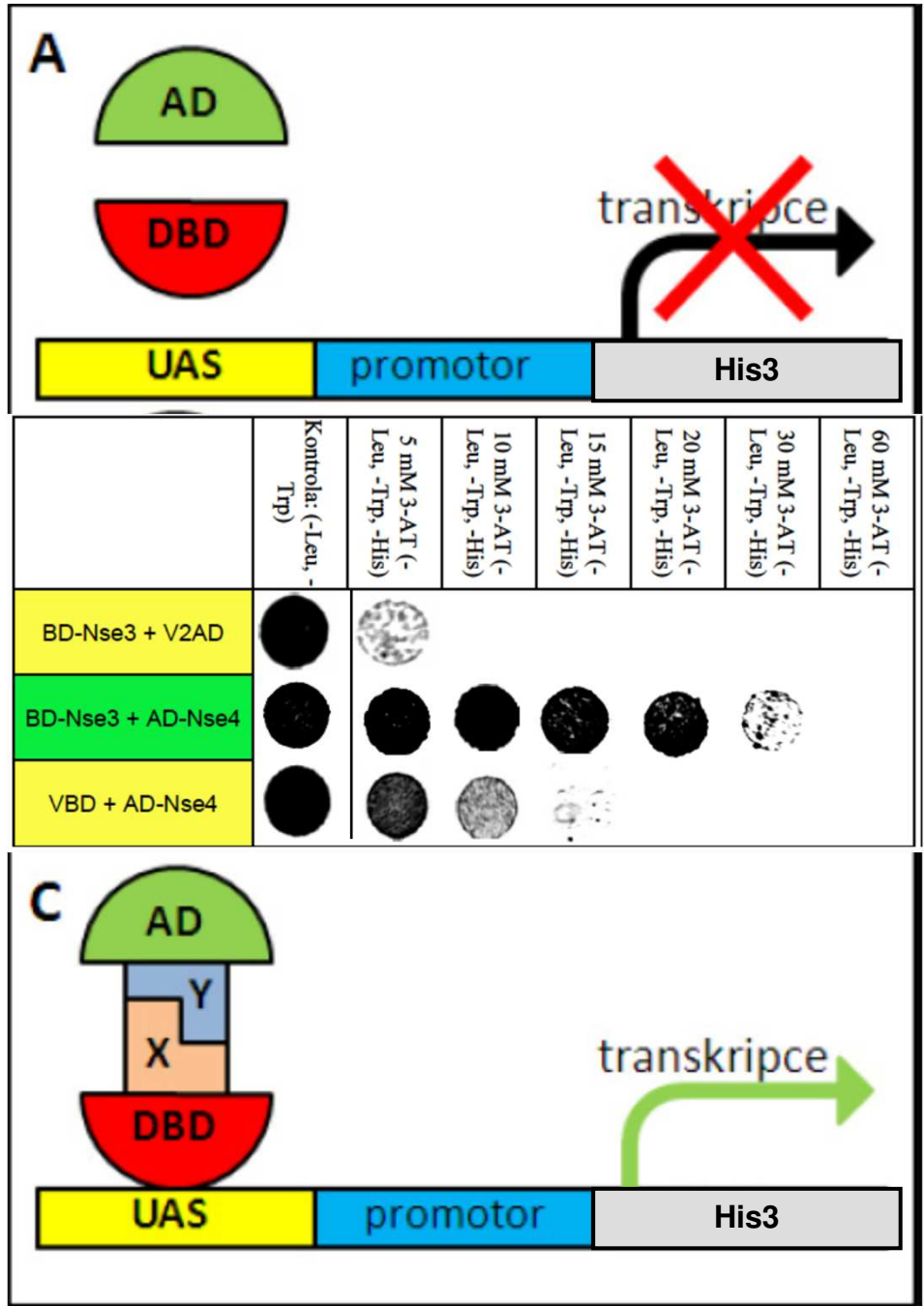
Reportérové geny

Reporter genes

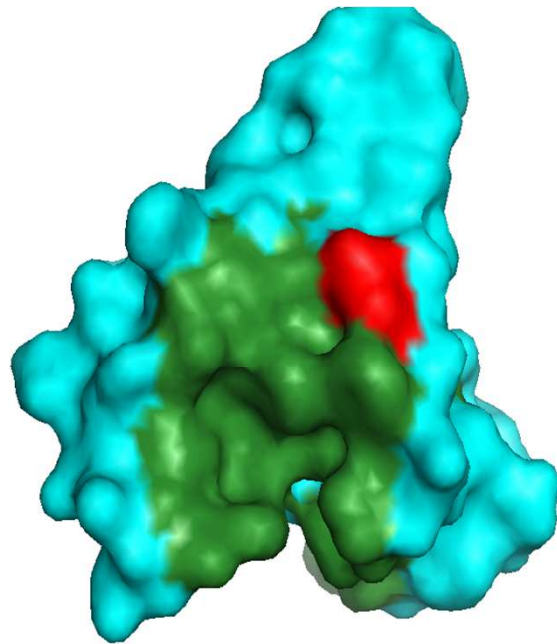
<i>E. coli lacZ*</i>	β -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory α -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	β -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory β -galactosidase chromogenic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

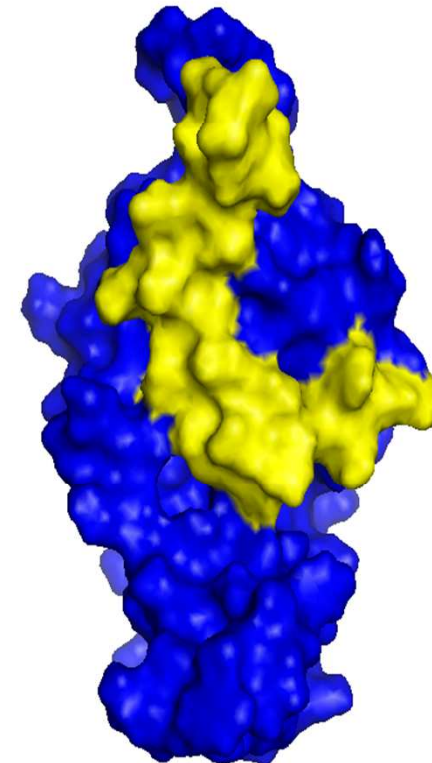
Guerineau et al, PLoS One, 2012

Hudson et al, PLoS One, 2011

“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)





Workflows

<https://console.latch.bio/workflows>
<https://predictomes.org/view/ddr>

Upload Workflow

Workflows All Executions Automations

My Workflows All Workflows

Search...

Sort: Executions Ran

Verified

Domains

Aggregator

COVID

CRISPR

Guide Design

NGS

pre-processing

ColabFold **Verified**

15002

The ColabFold version of AlphaFold2 is optimized for extremely fast predictions on small proteins. It uses the same basic architecture as AlphaFold2, but optimizes the sequence search procedure.

Sergey O · v1.5.2-476ecb

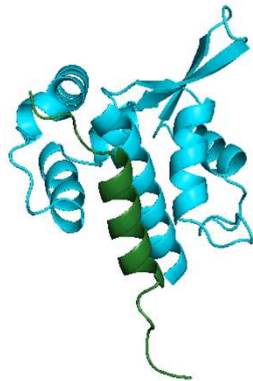
AlphaFold2 **Verified**

13518

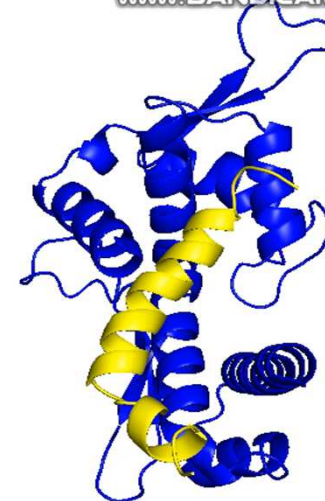
AlphaFold produces highly accurate protein structure predictions

Deepmind · v2.3.1+4

www.BANDICAM.com



www.BANDICAM.com



Split-hybrid systém

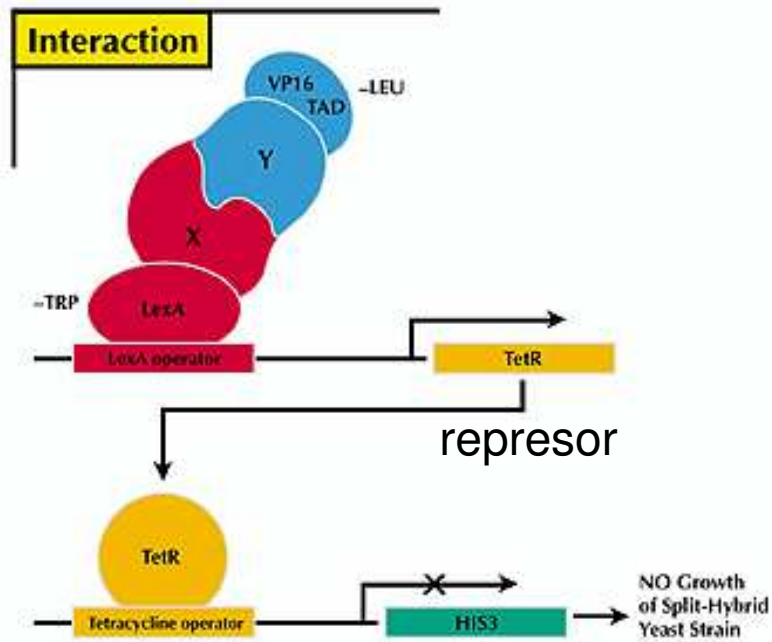


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

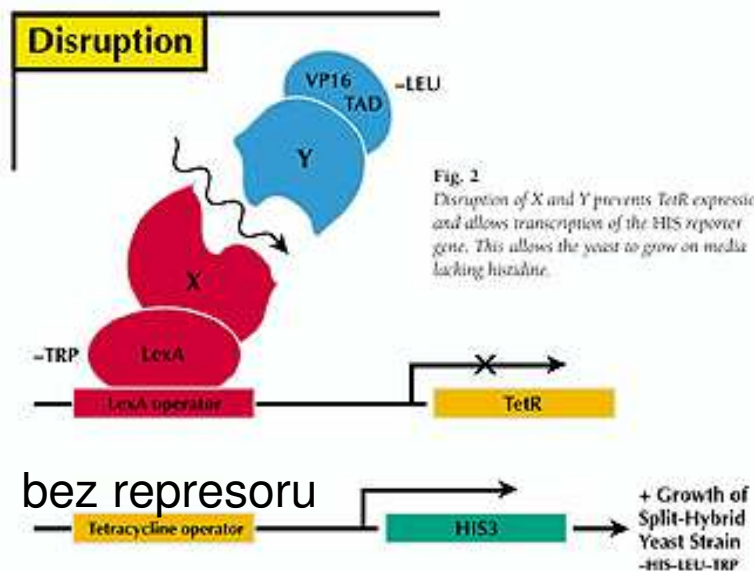
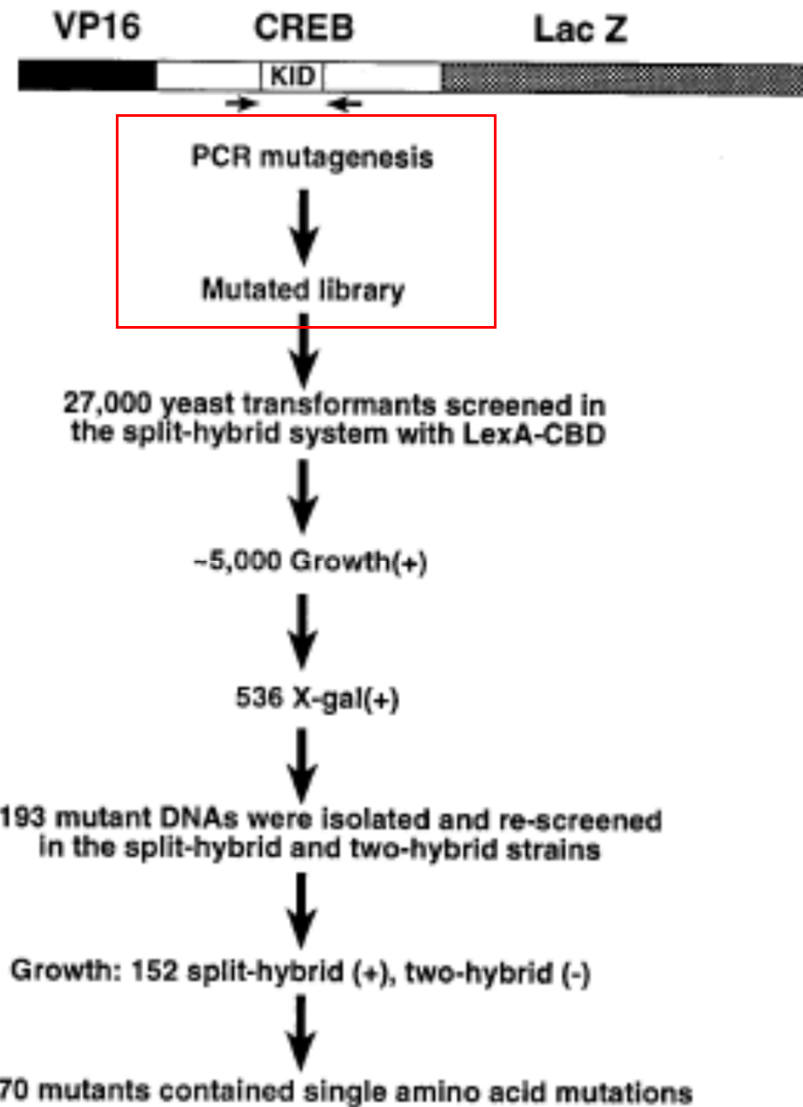
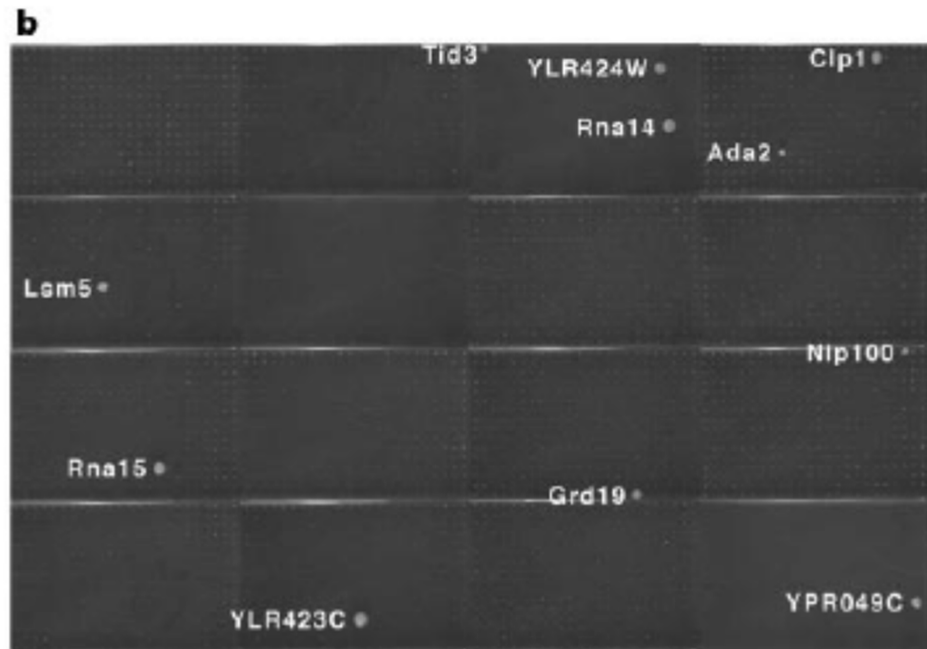
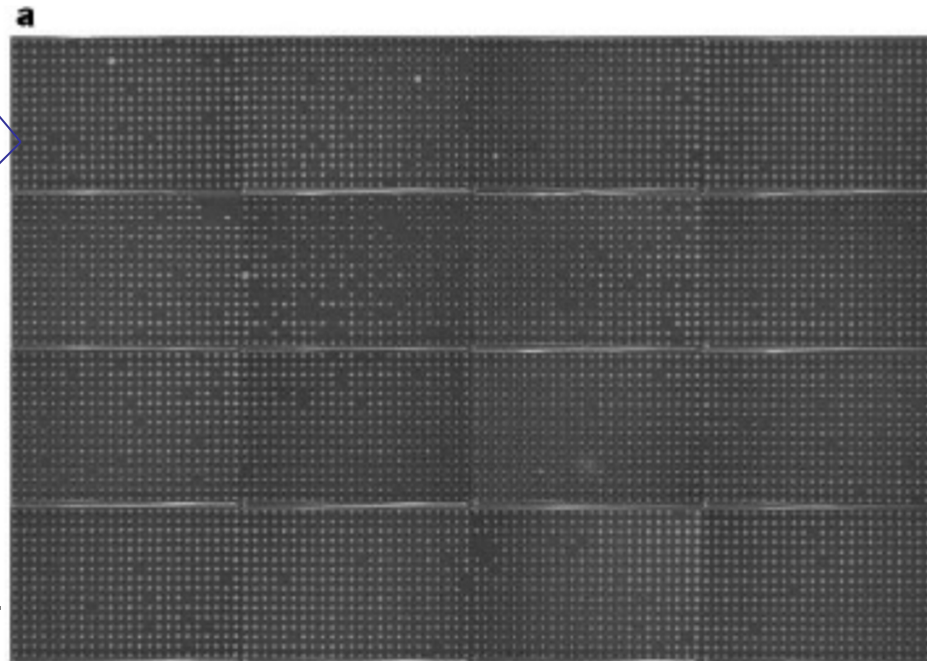
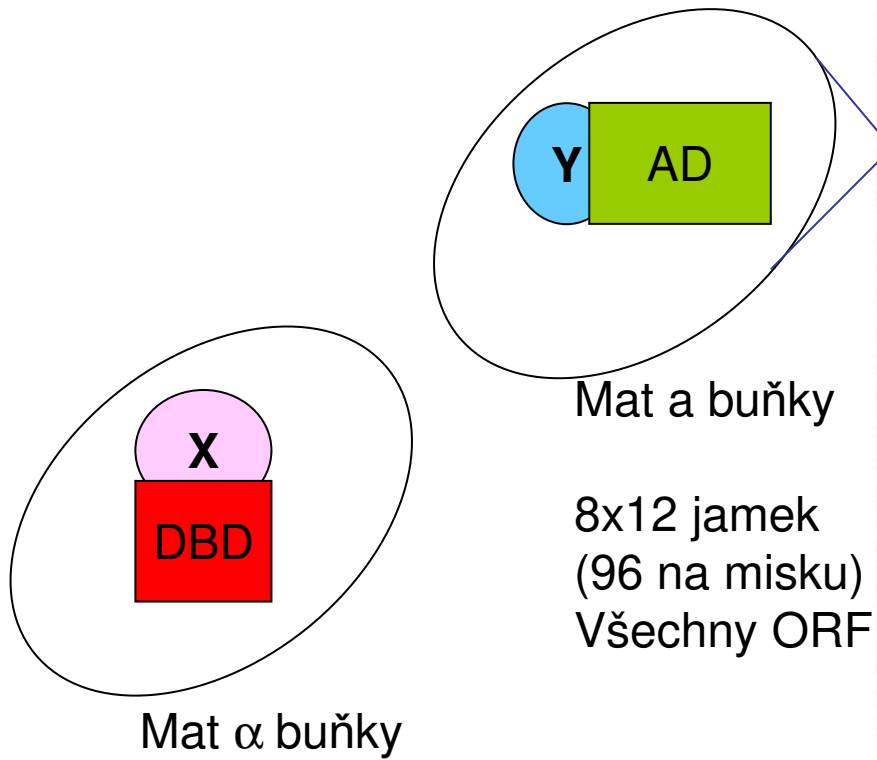


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



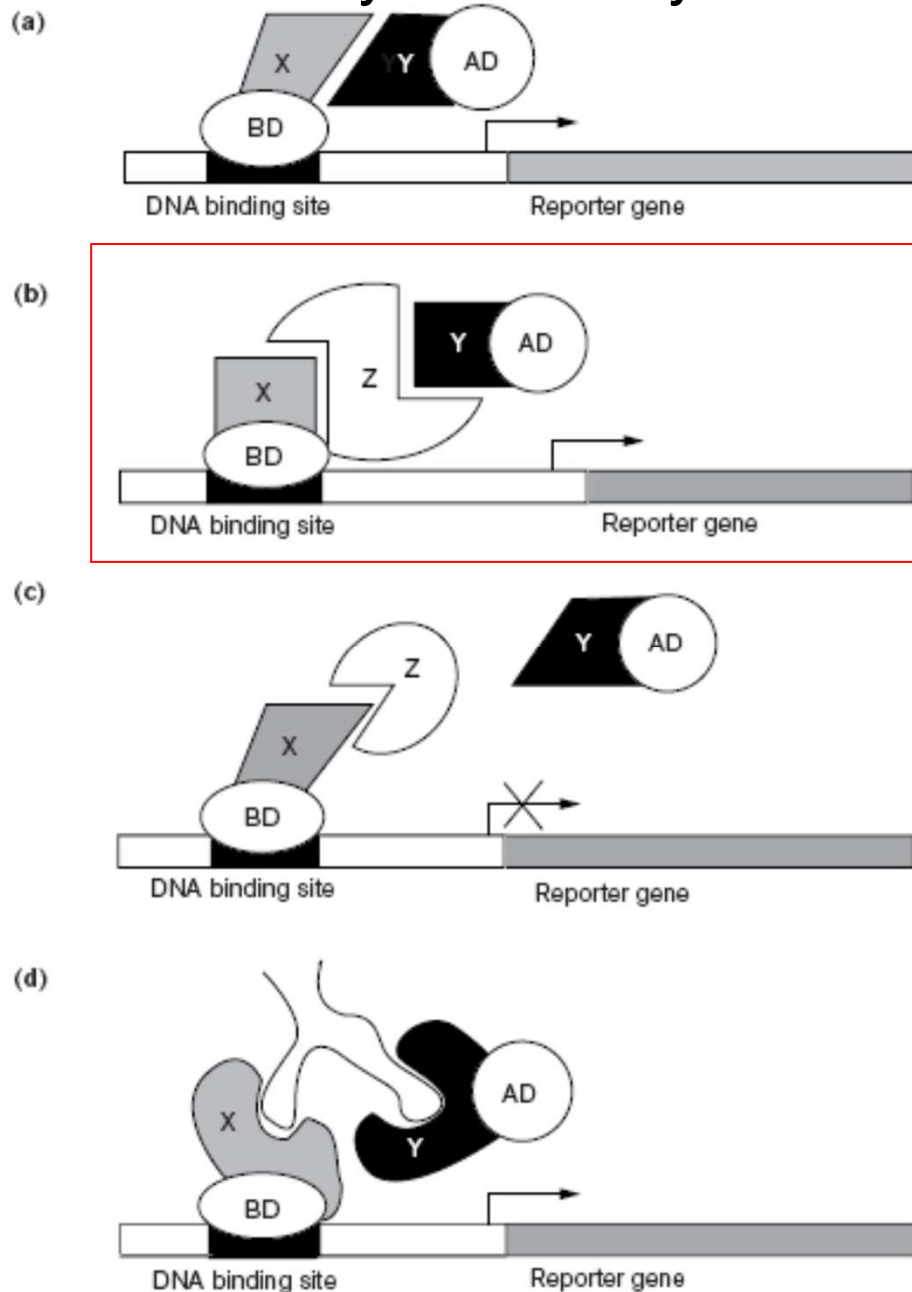


Kvasinkový, lidský ...

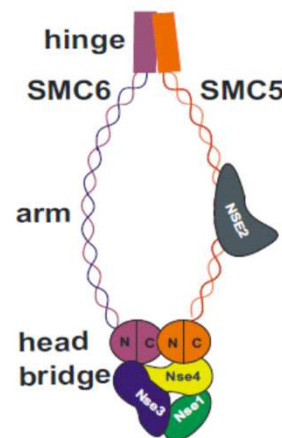
„INTERACTOM“

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

Přehled hybridních systémů

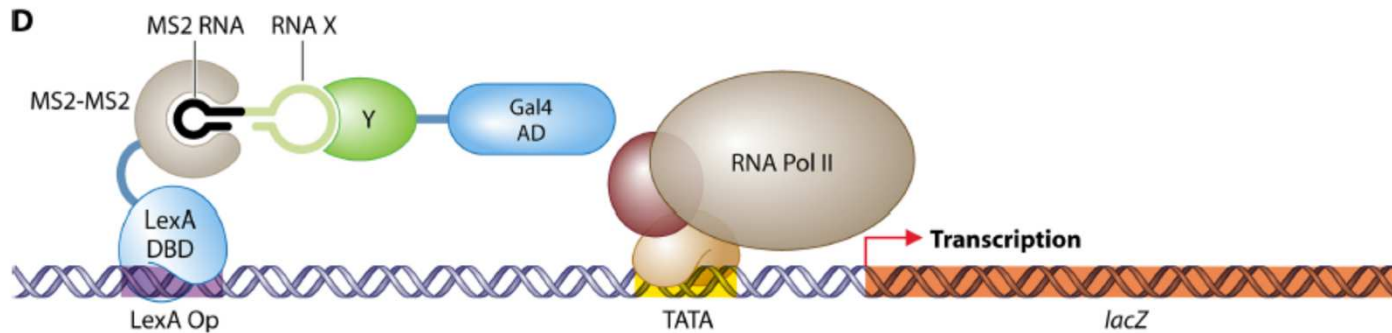


150 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
90 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
30 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
20 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
15 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
10 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
5 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)				
Kontrola: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



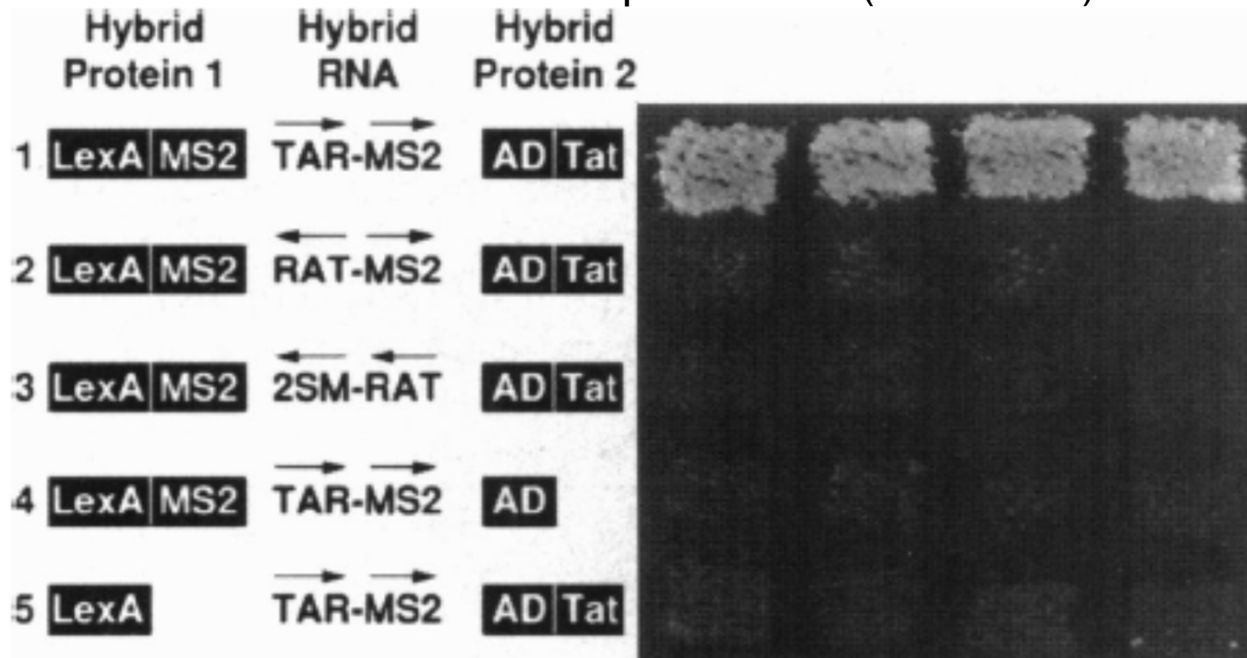
BD-Nse1+V2AD+VP	VBD+AD-Nse4+VP	BD-Nse1+AD-Nse4 AD+VP	BD-Nse1+AD- Nse4+pPM-Nse3
------------------------	-----------------------	----------------------------------	--------------------------------------

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)

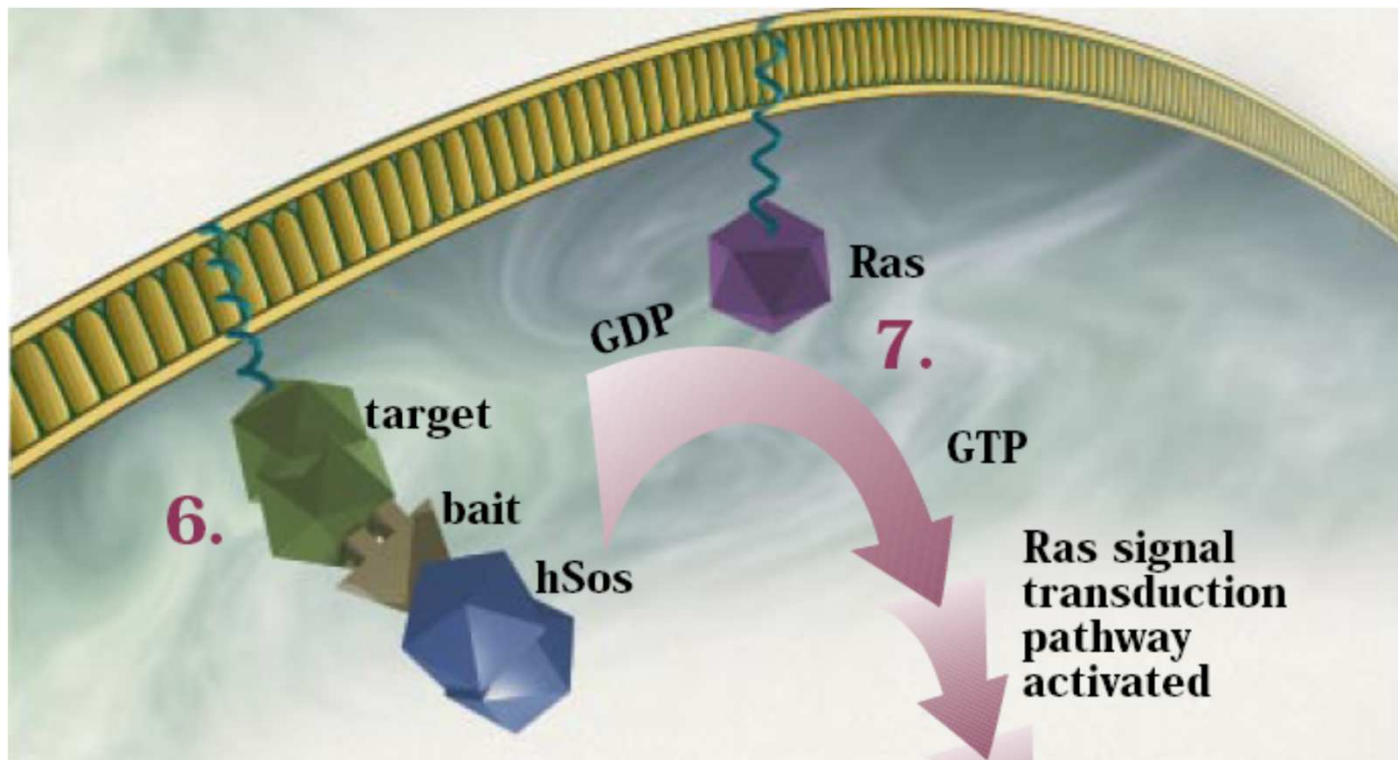


Metody analýzy protein-proteinových interakcí

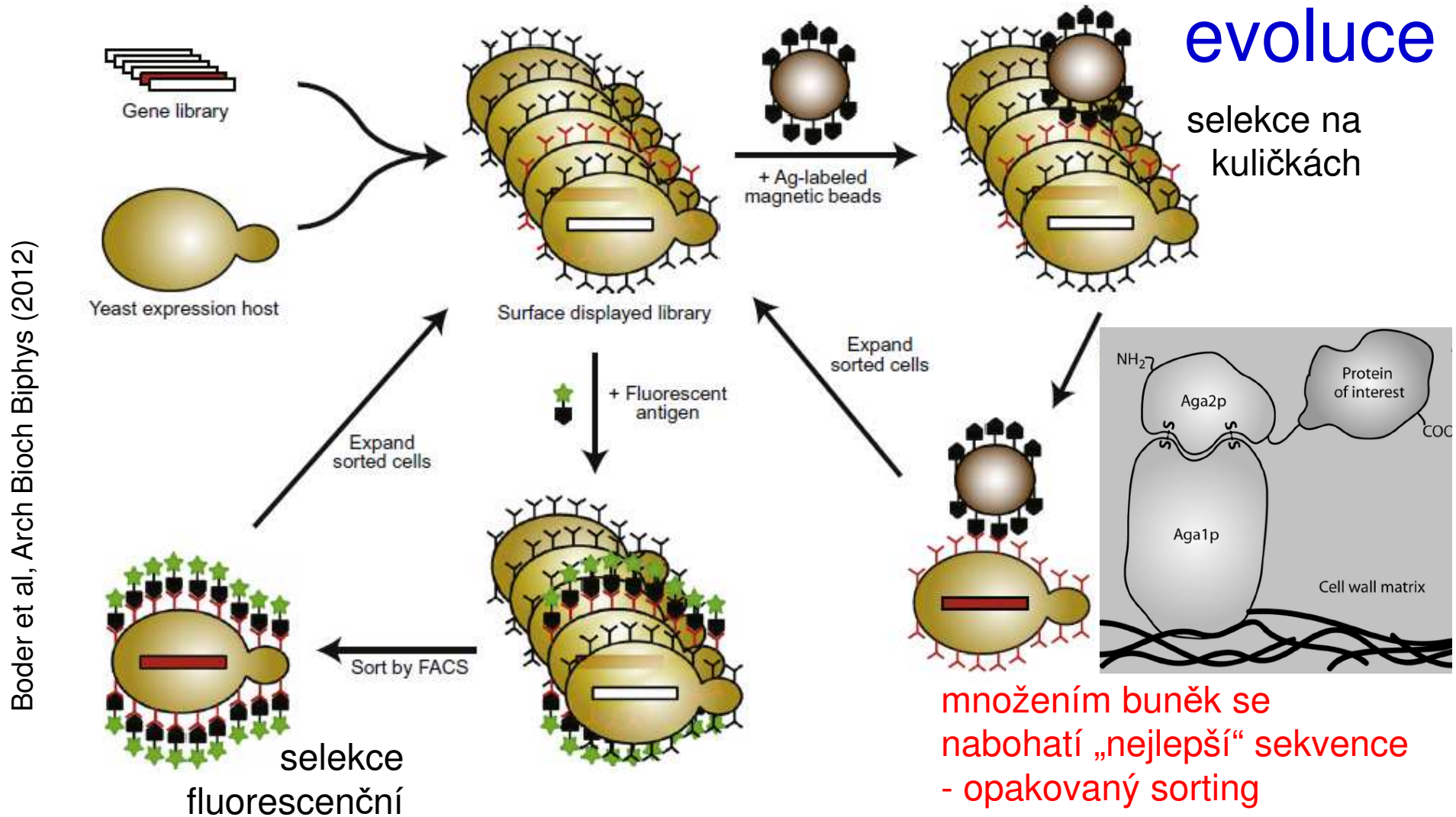
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- **hybridní:**
 - **transkripční 2-hybridní systém - *domény***
 - reverzní systém – analýza PPI
 - **více-hybridní systémy**
 - inhibice PPI
 - **membránový systém - *pathway***
 - **komplementační systémy - *fold***
 - BiFC, DHFR
- proximity-based: FRET, 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)

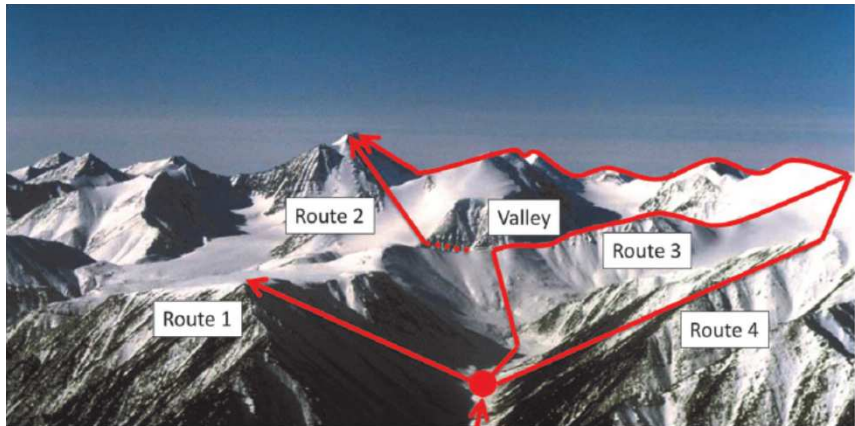


YSD „yeast surface display“ – cílená *in vitro* evoluce

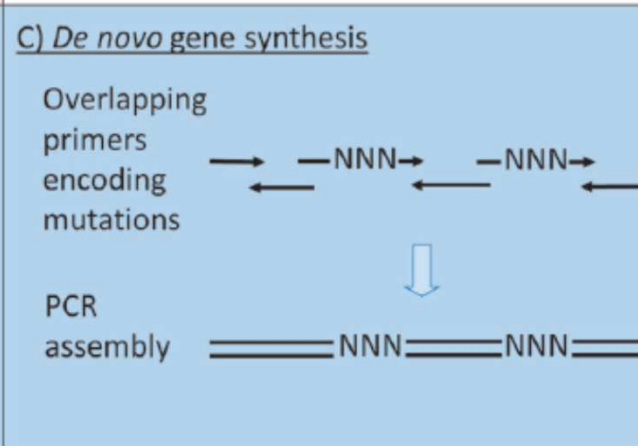
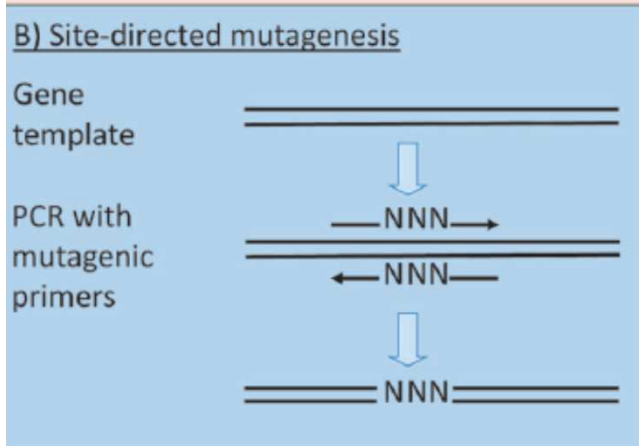
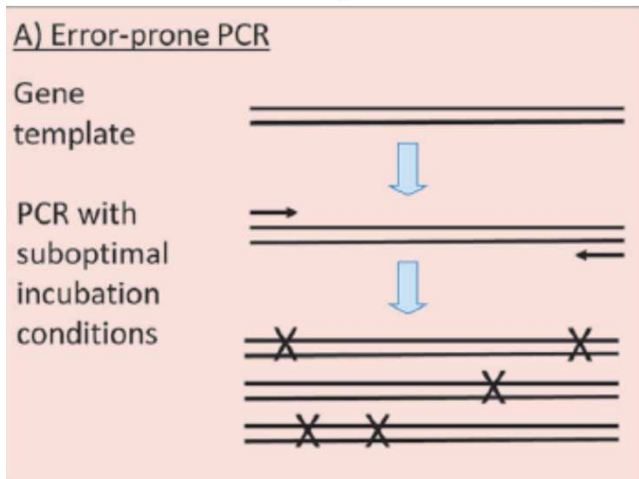
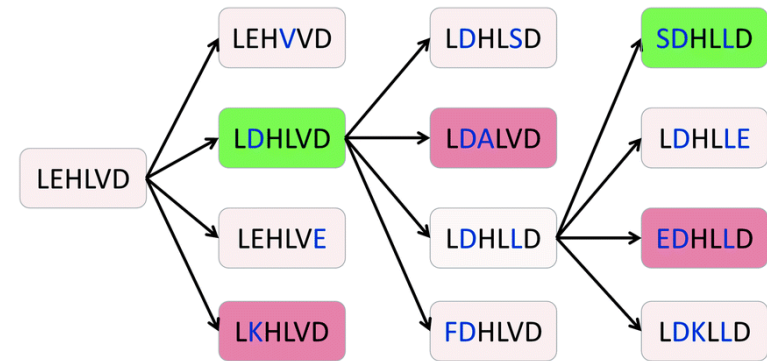


Boder et al., Arch Bioch Biphys (2012)

- 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“)



cílená *in vitro* evoluce

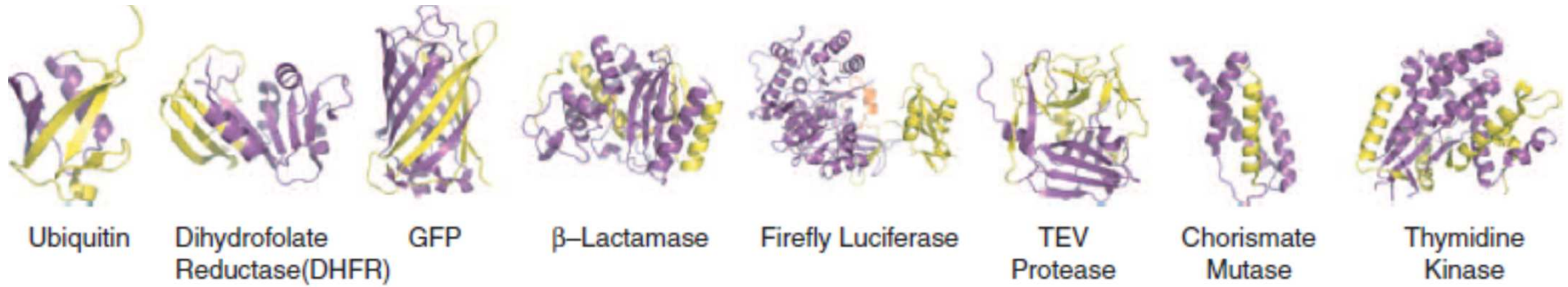


takto lze modifikovat interakční schopnosti proteinů a nalézt motivy s vyšší afinitou ...

Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- **hybridní:**
 - **transkripční 2-hybridní systém – *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 ...)

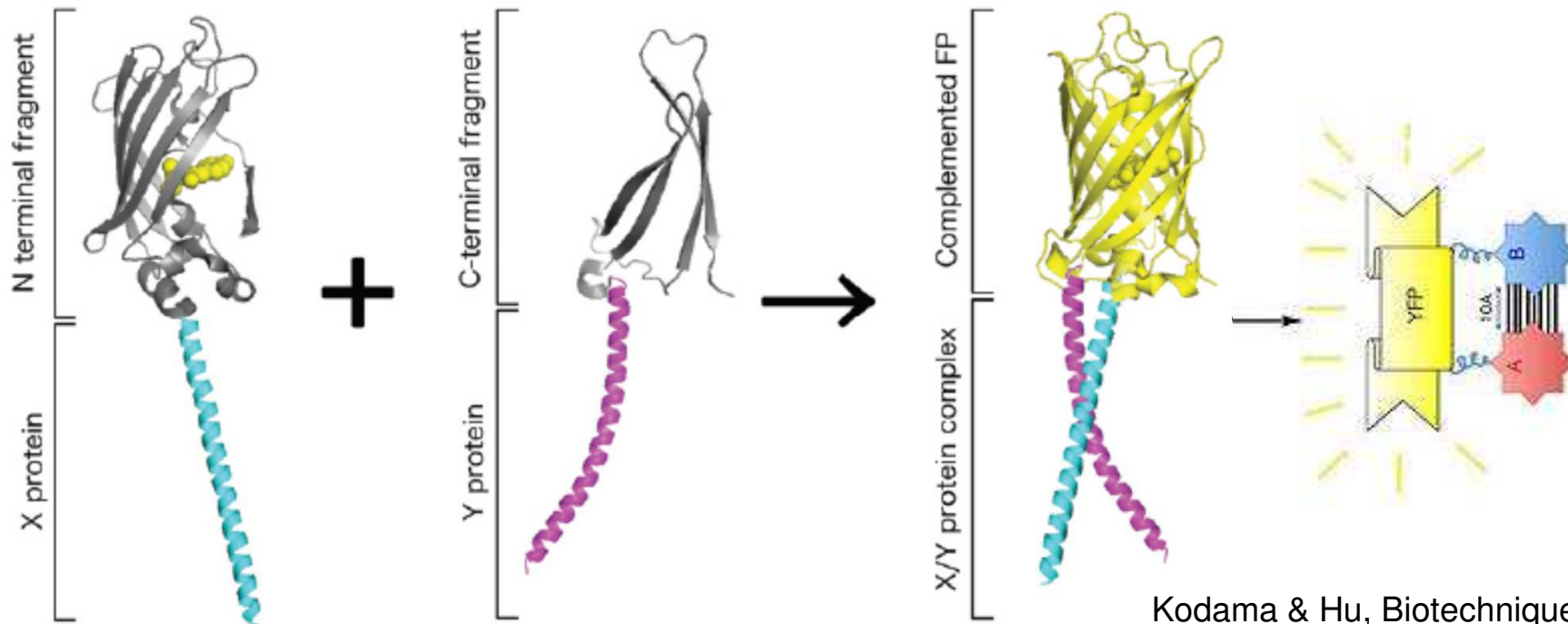
Protein-fragment complementation



Shekhat & Ghosh, CO in ChB, 2011

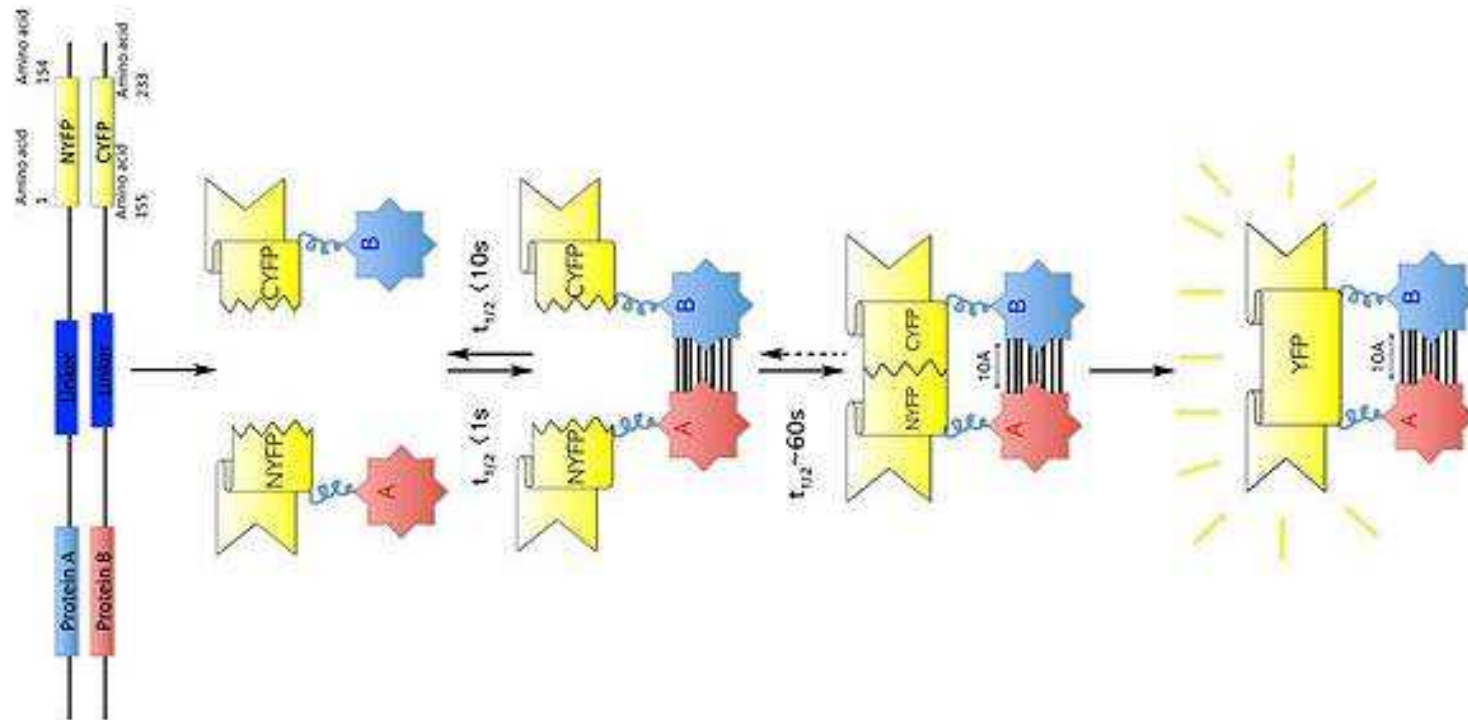
Current Opinion in Chemical Biology

Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



Kodama & Hu, Biotechniques, 2012

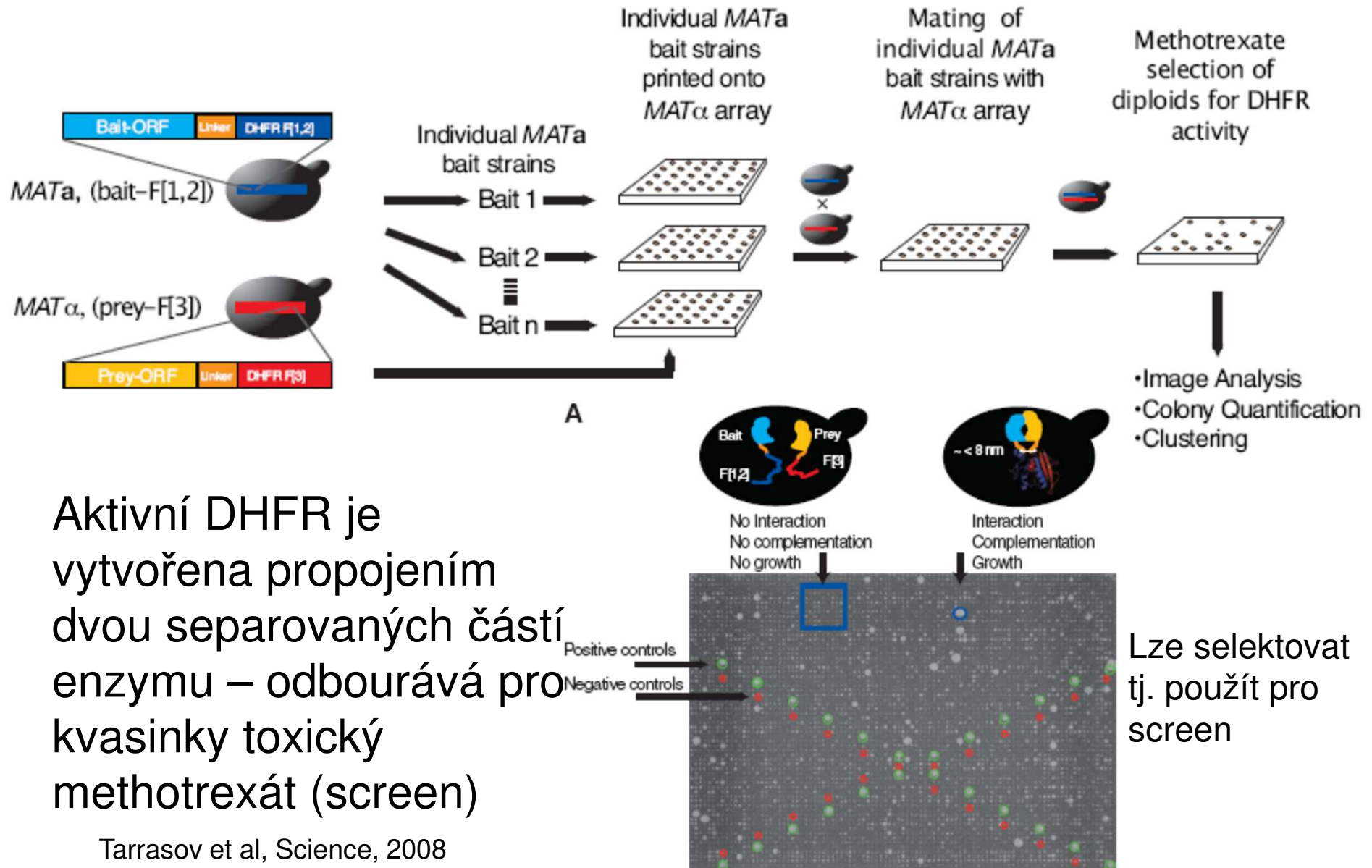
Bimolecular fluorescence complementation - BiFC



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

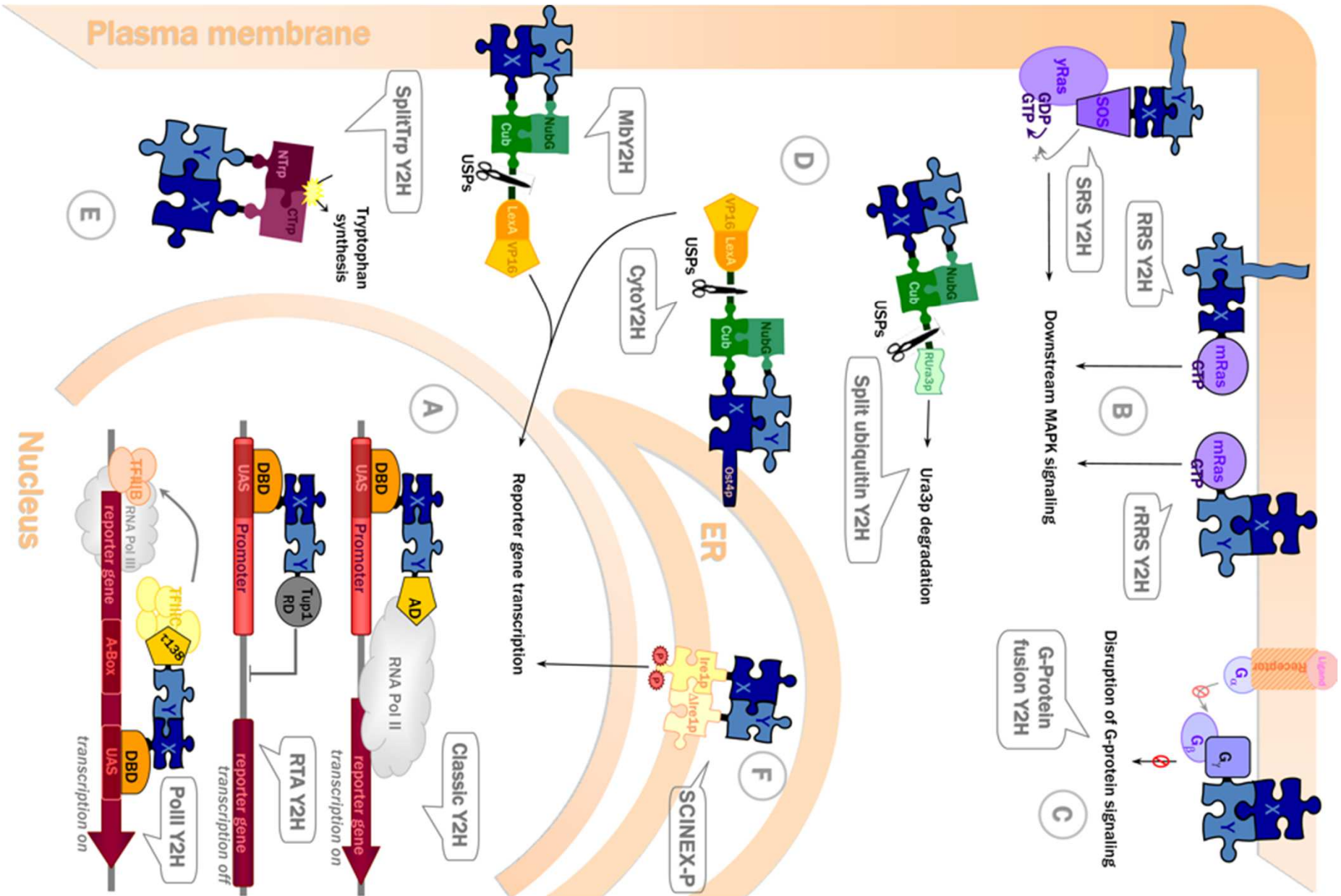


Dihydrofolát reduktáza/methotrexát



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

Přehled kvasinkových PPI biotechnologií

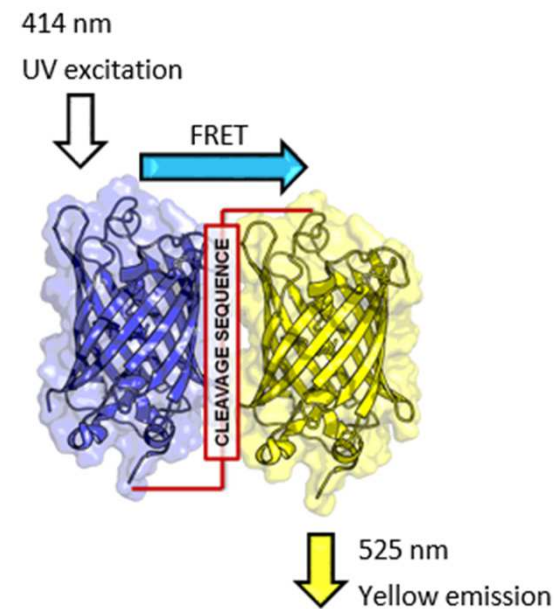
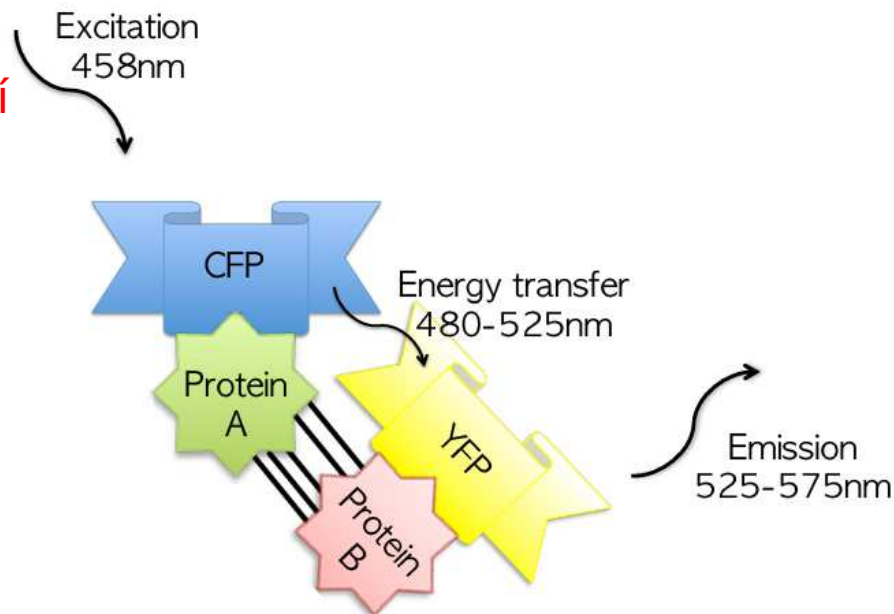
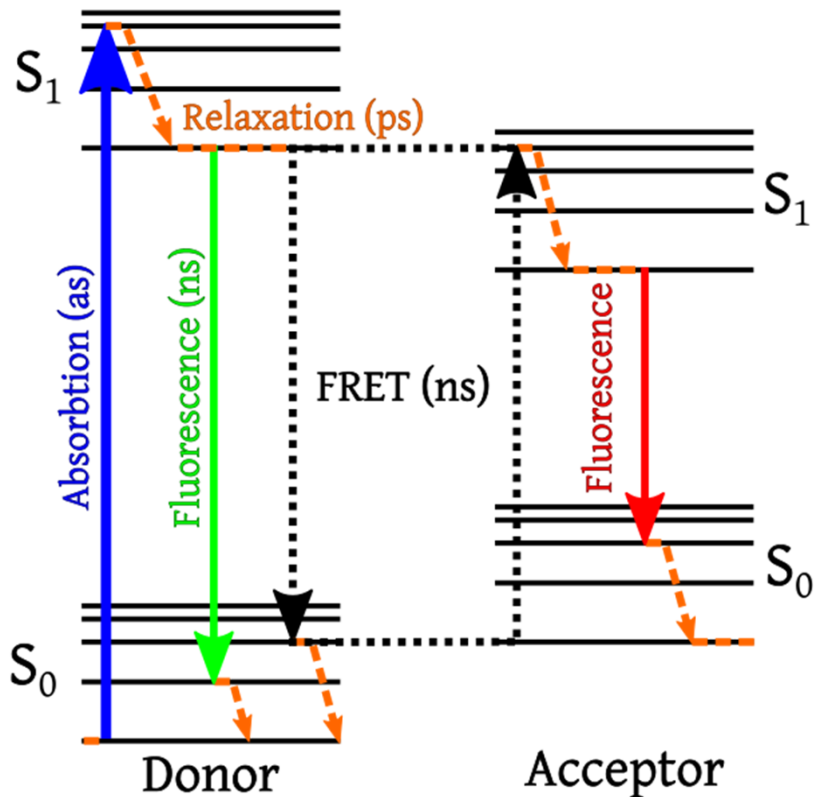


Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- 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 ...)

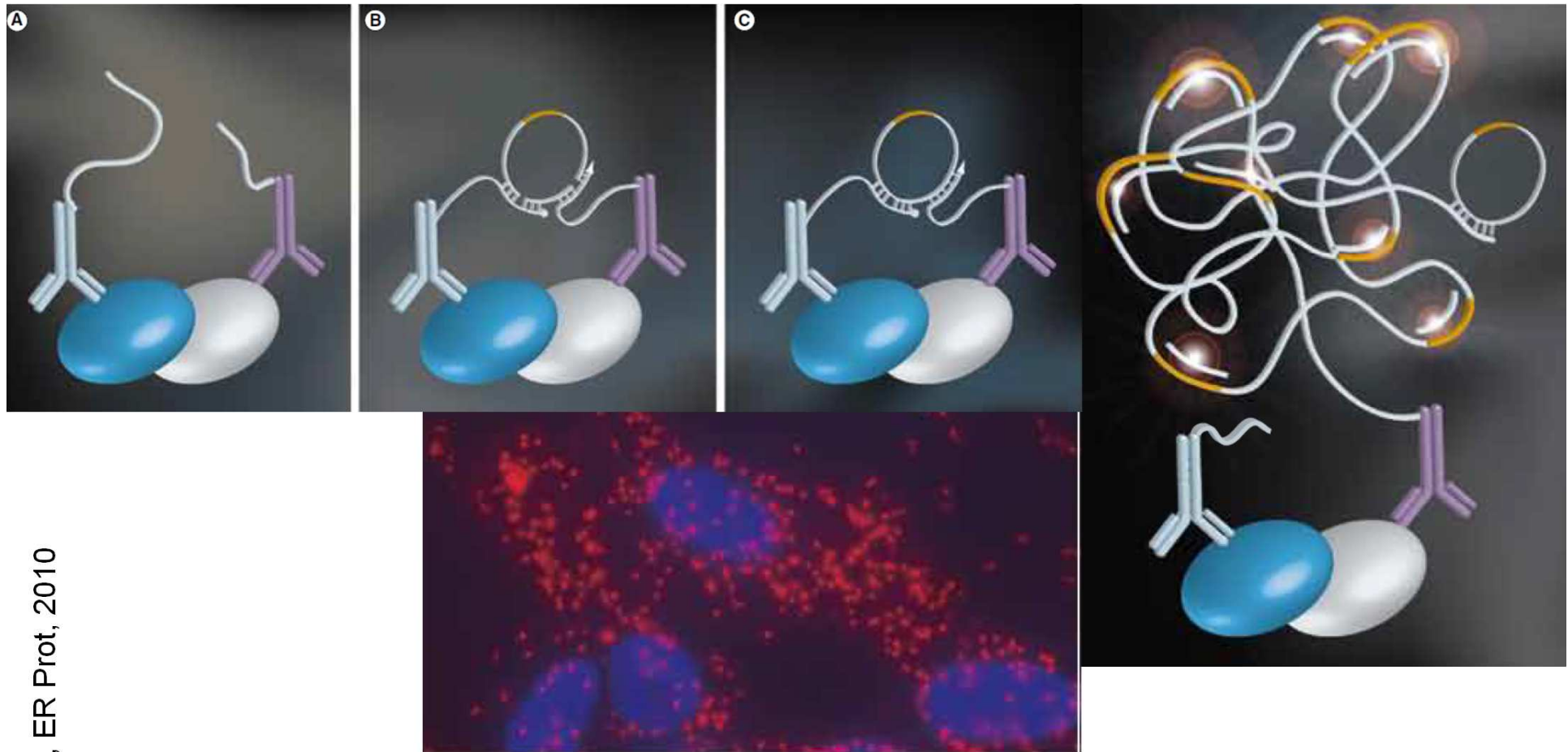
FRET (Forster resonance energy transfer)

hybridní nikoli doménový či komplementační



- energie prvního (CFP) proteinu o vhodné vlnové délce je přenesena na druhý (YFP) protein pokud je dostatečně blízko - záření detekované v mikroskopu

Ko-lokalizace a proximity ligation assay

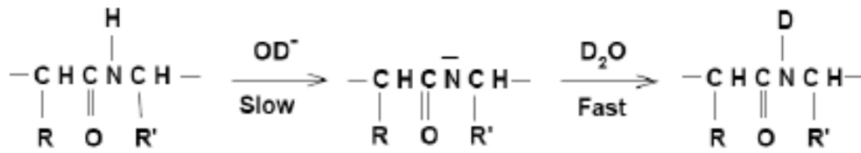


Weibrecht et al, ER Prot, 2010

- 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

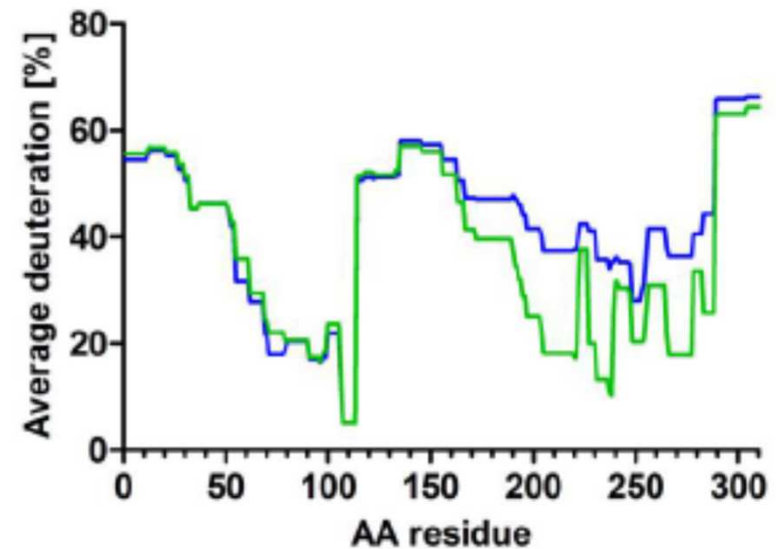
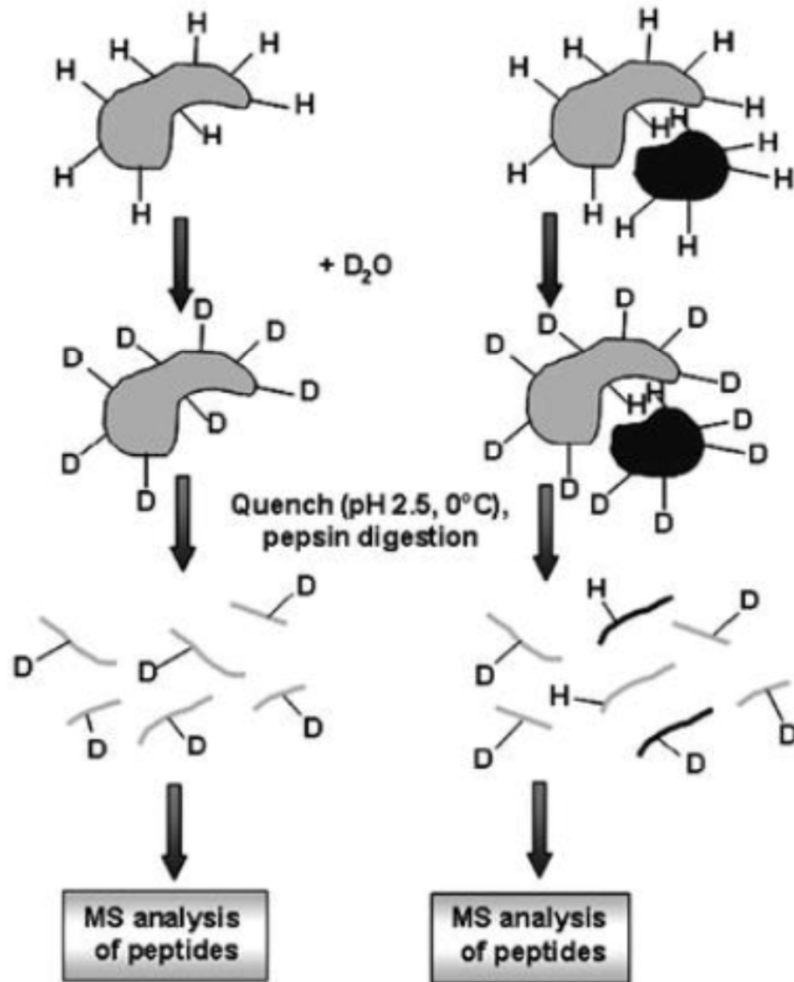
- beads-based: pull-down (*in vitro*), coIP ...
- hybridní: Y2H (kvasinkový 2-hybridní), BiFC ...
- proximity-based: FRET, PLA ...
- **MS-based:**
 - **H/D-exchange** ...
 - **protein painting**
 - **crosslinking**
- kvantitativní: SPR, ITC ...
- ko-krytalizace, NMR analýza ...
- genetické metody (syntetická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



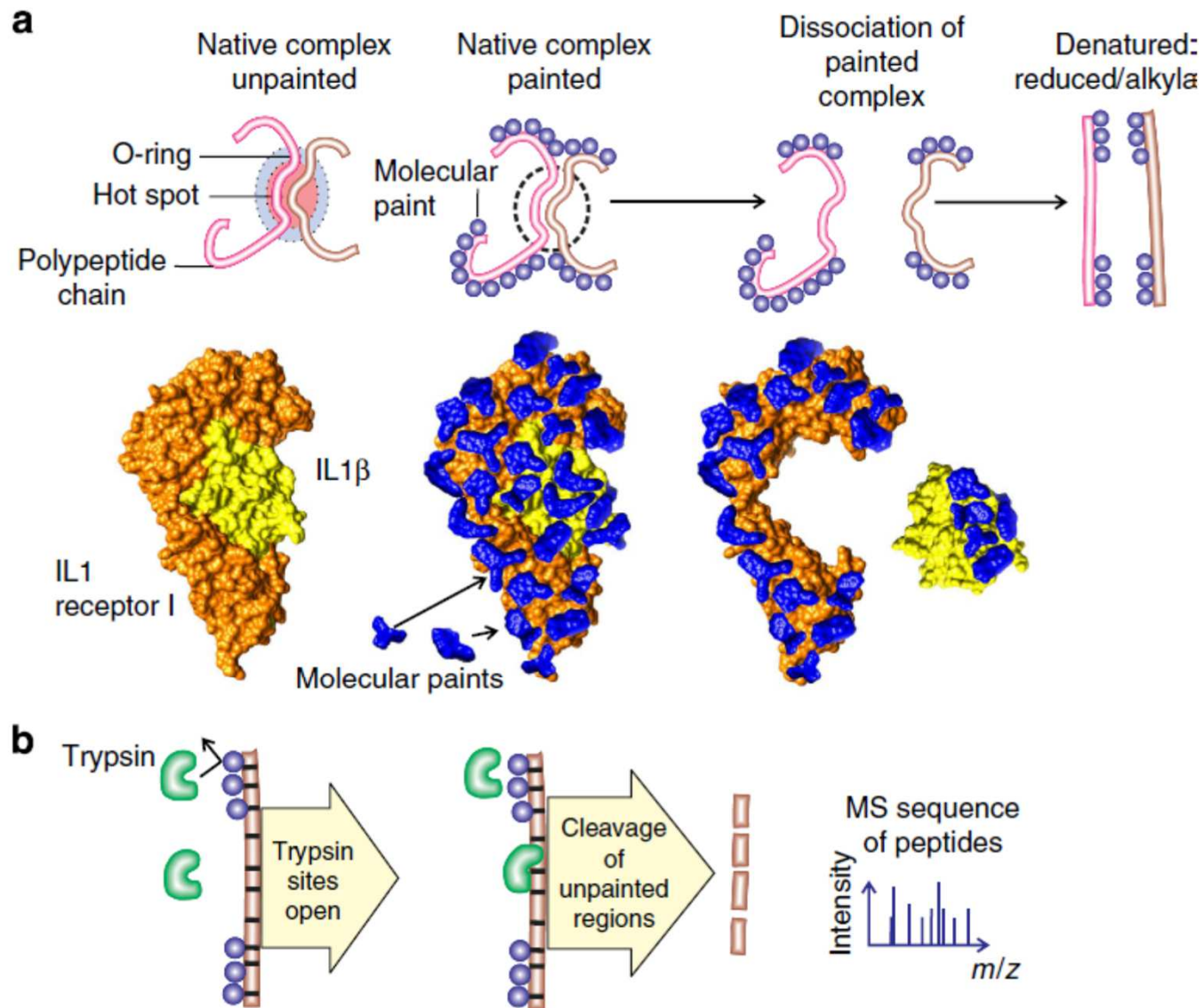
Hydrogen/Deuterium Exchange (HDX)

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

deuteriují se přístupné AMK skupiny
(interakční povrchy jsou skryté)



Protein painting



Protein painting

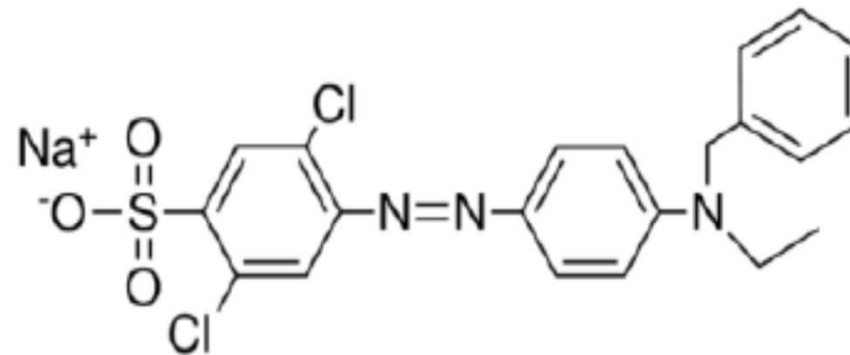
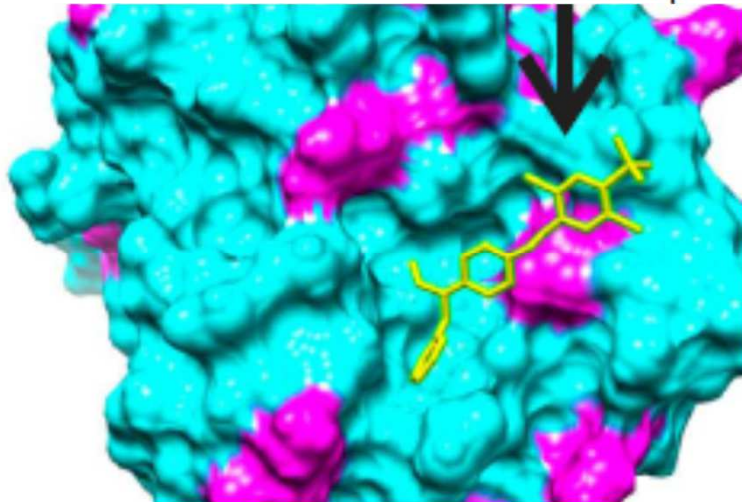
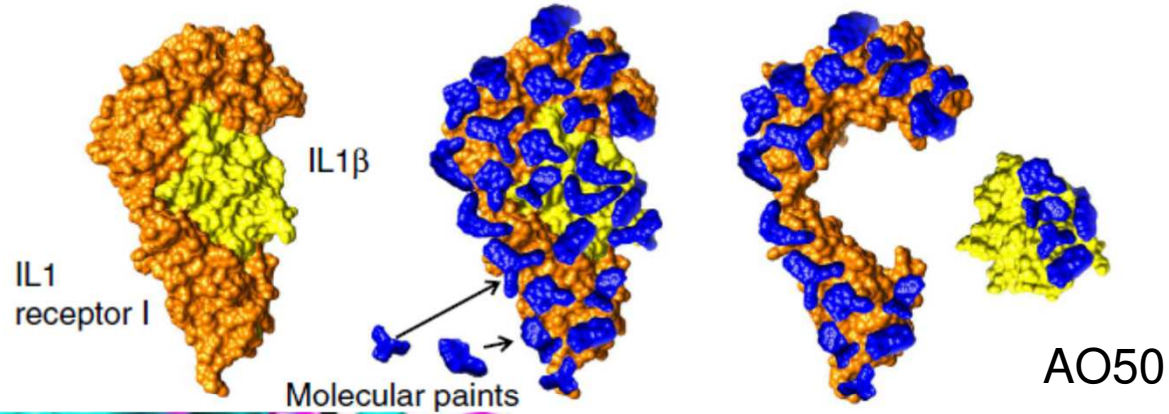
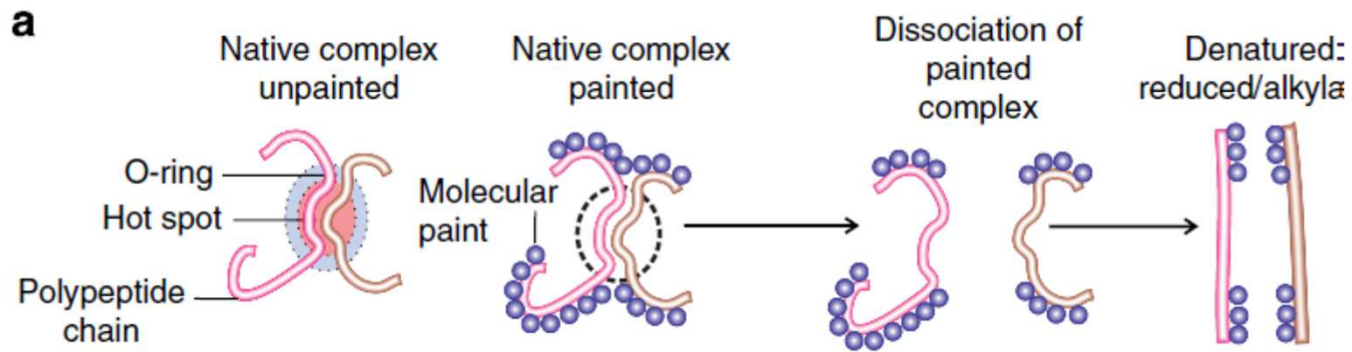


Table 2. Overview of different validation methods.

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), z kterého je přenesena energie excitující druhý fluorofor (např. YFP)?
 - D. fluorescenční resonance etanu?
- testy předat příště přednášejícímu nebo poslat na můj E-mail: jpalecek@sci.muni.cz