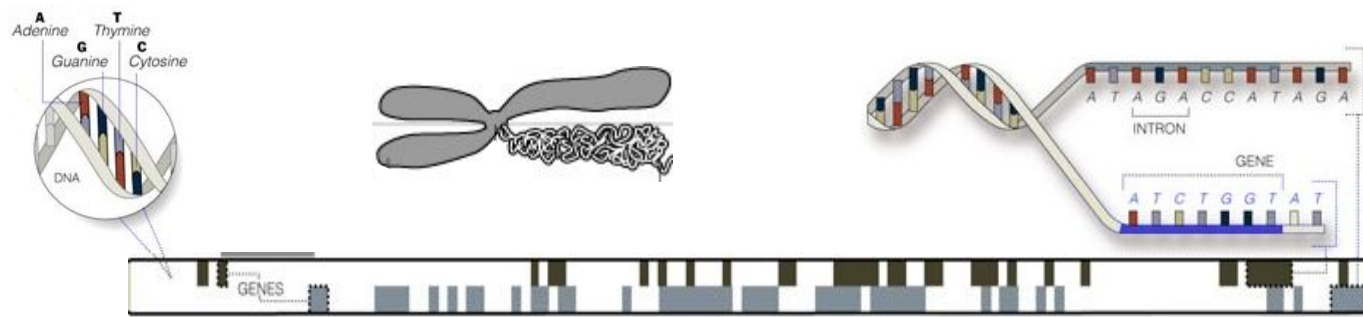
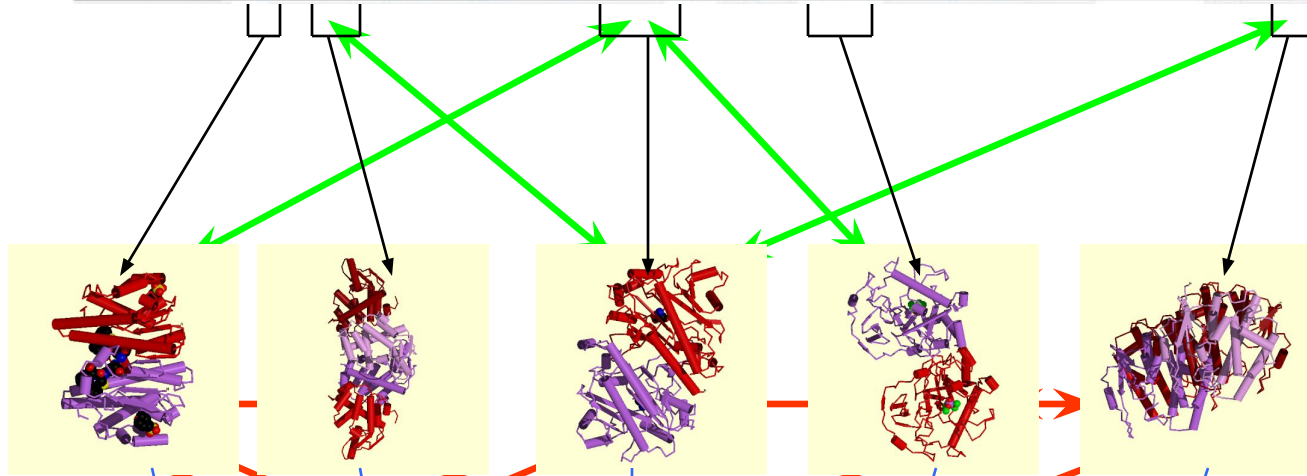


Белок-белковые взаимодействия в протеомике



Геном

**Взаимодействия
Белок-ДНК**

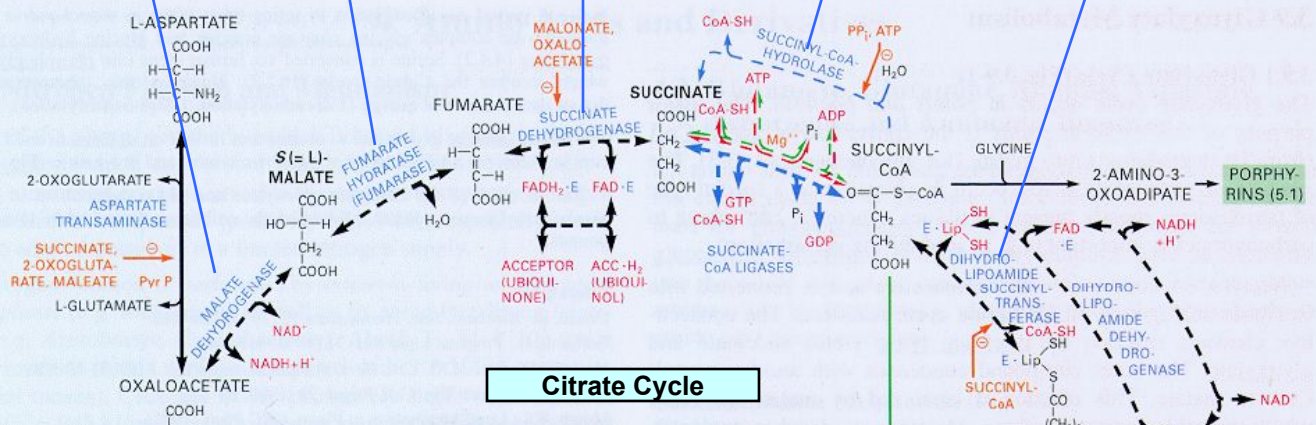


Протеом

**Взаимодействия
Белок-Белок**

Метаболизм

**Биохимически
е реакции**



Белковая сеть (интерактомная карта) дрожжей

Узлы: белки

Связи: физические взаимодействия (Связывание)

Интерактом – совокупность белок-белковых взаимодействий, характерных для данного организма

Размер интерактома коррелирует с уровнем сложности организации

вида:

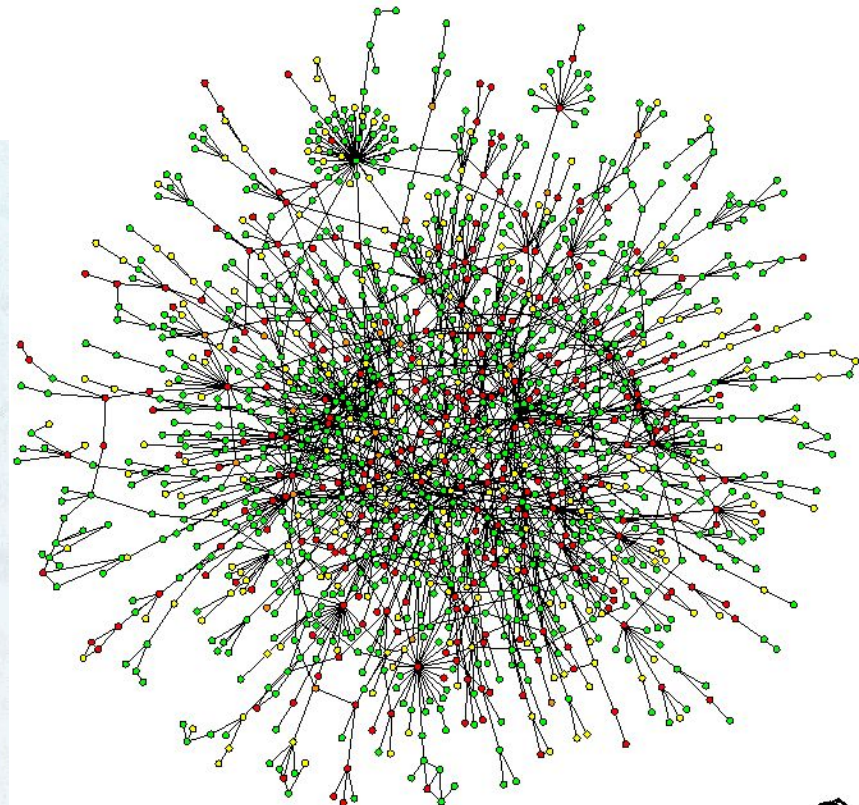
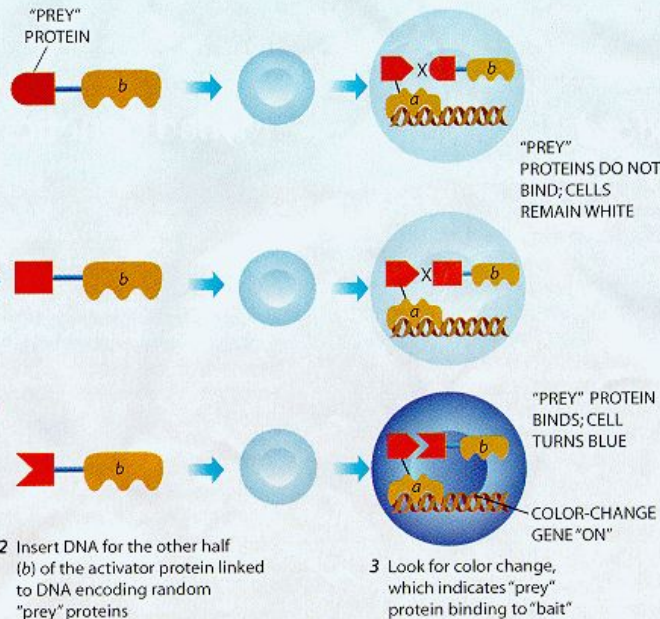
S. cerevisiae – 25 000

D. melanogaster – 60 000

H. sapiens – 65 000

Finding Proteins That Interact

One technique, called the yeast two-hybrid system, relies on bringing into close proximity two halves (*a* and *b*) of a protein that activates a gene that causes a yeast cell to turn blue. It is used to determine which of a pool of unknown "prey" proteins binds to a known "bait" protein.



P. Uetz, et al. *Nature* **403**, 623-7 (2000).

Биофизические методы

Масс-спектрометрия
Поверхностный плазмонный резонанс
Флуоресцентная корреляционная спектроскопия
Изотермальная калориметрия
Атомно-силовая микроскопия
ЯМР
Рентгеноструктурный анализ

Широкомасштабные методы

Совместная иммунопреципитация
Дрожжевая двугибридная система
Бактериальная двугибридная система
Фаговый дисплей

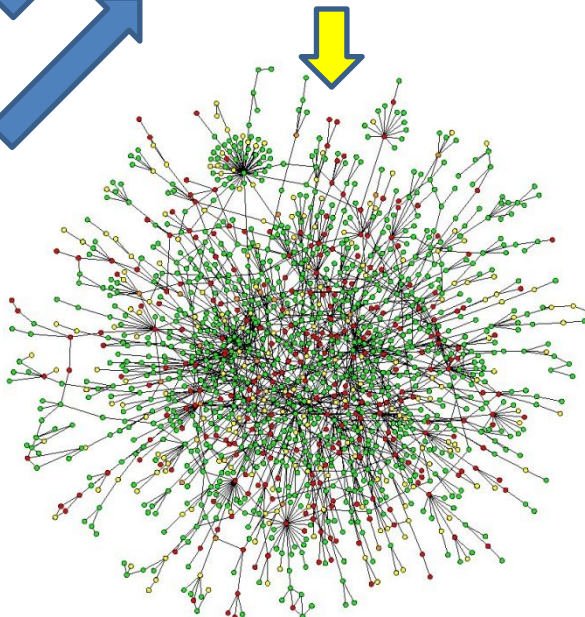
Стандартные методы

Совместная иммунопреципитация
Дрожжевая двугибридная система
Бактериальная двугибридная система
Фаговый дисплей

Анализ белок- белковых взаимодействий

Компьютерные методы

Методы *in vivo*
FRET
BRET

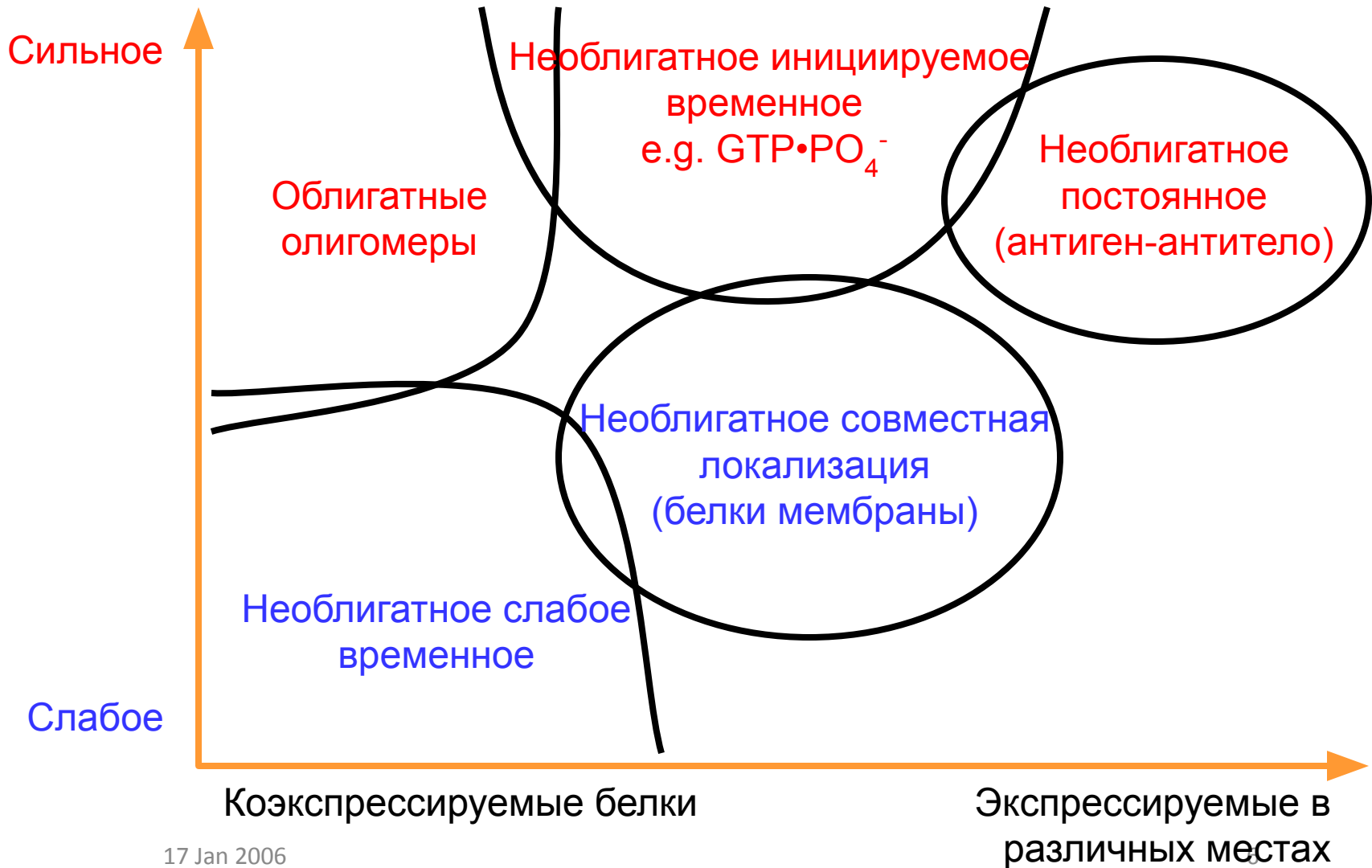


Характеристики ББВ

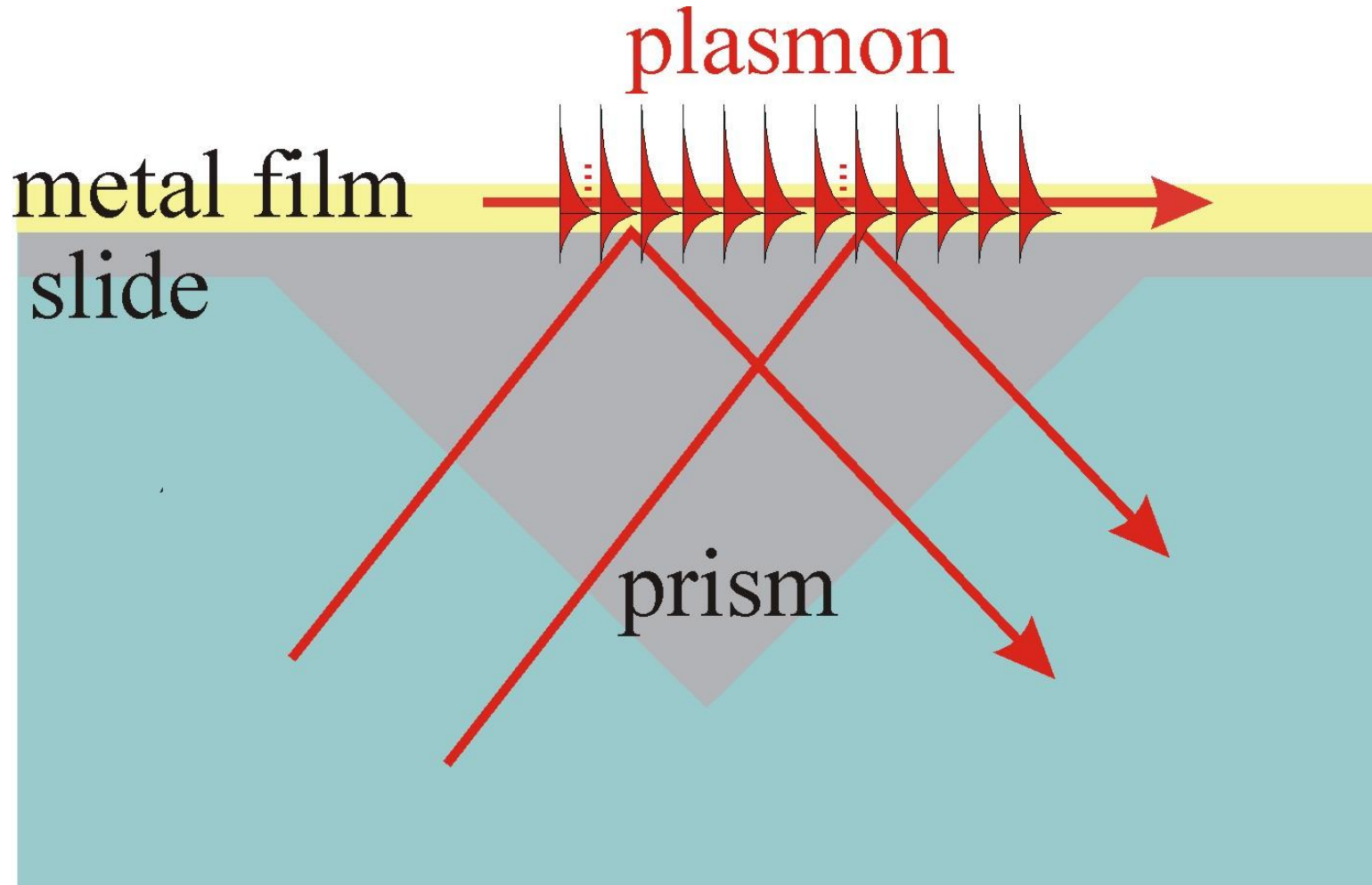
- Универсальны
 - Функционирование клеток – результат белок-белковых взаимодействий
 - Цитоскелет
 - Рибосомы
 - РНК полимеразы
- Многочисленны
 - Дрожжи:
 - ~6.000 белков
 - По крайней мере 3 взаимодействия каждый

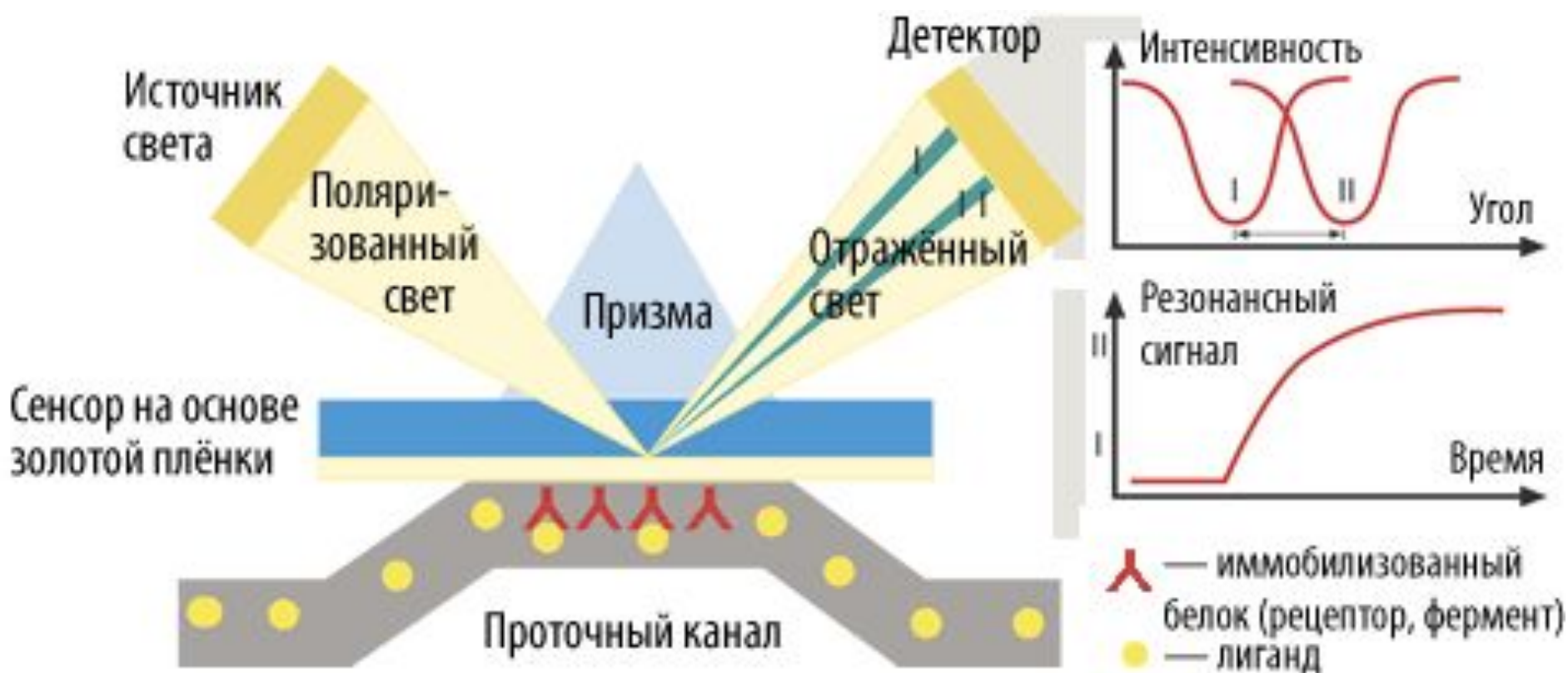
⇒ ~18.000 взаимодействий
 - Человек:
 - приблизительно ~100.000 взаимодействий
- Формируют сеть:
 - простейшие: гомодимер(2)
 - обычные: гетероолигомер (*более 2*)
 - глобальные: белковые сети (*все белки*)

Связывание и локализация



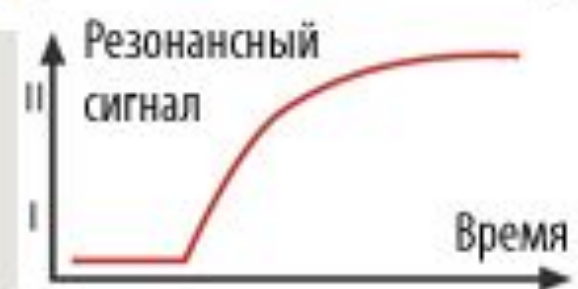
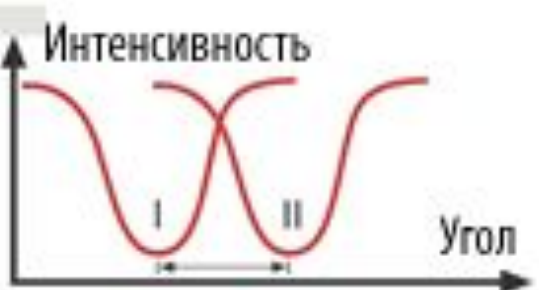
Поверхностный плазмонный резонанс 1







Сенсор на основе золотой плёнки

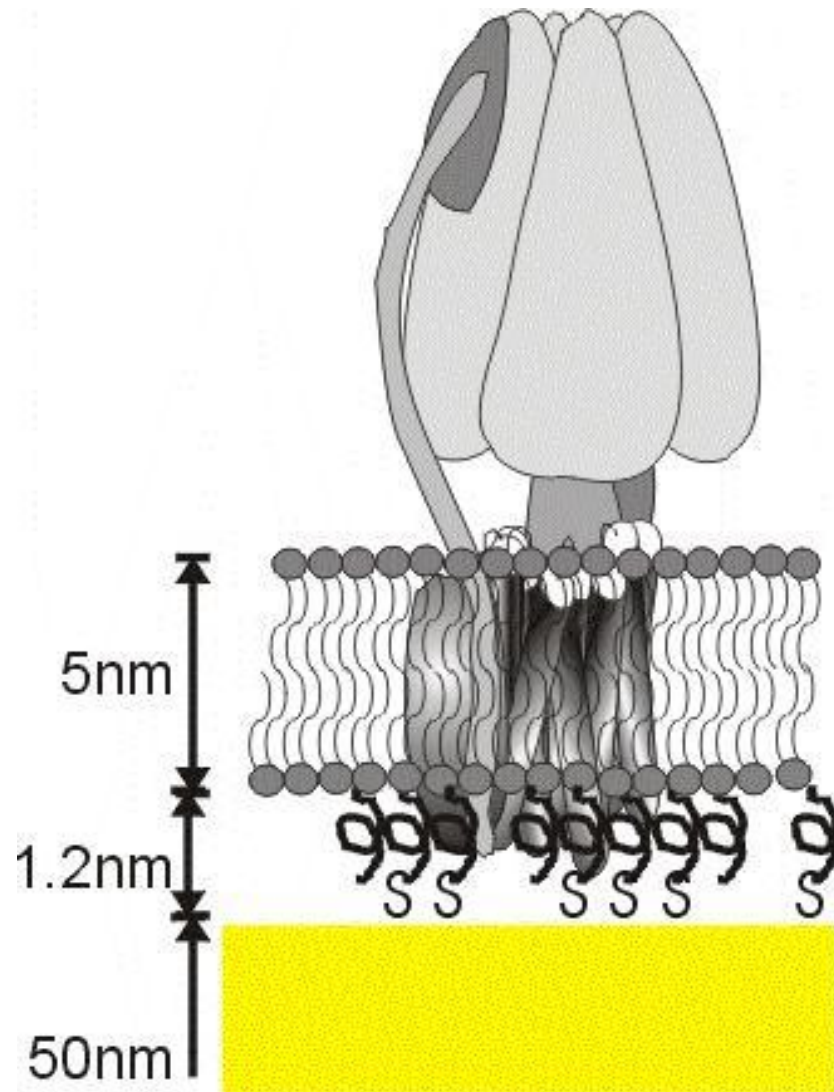
Проточный канал



-  — иммобилизованный белок (рецептор, фермент)
-  — лиганд

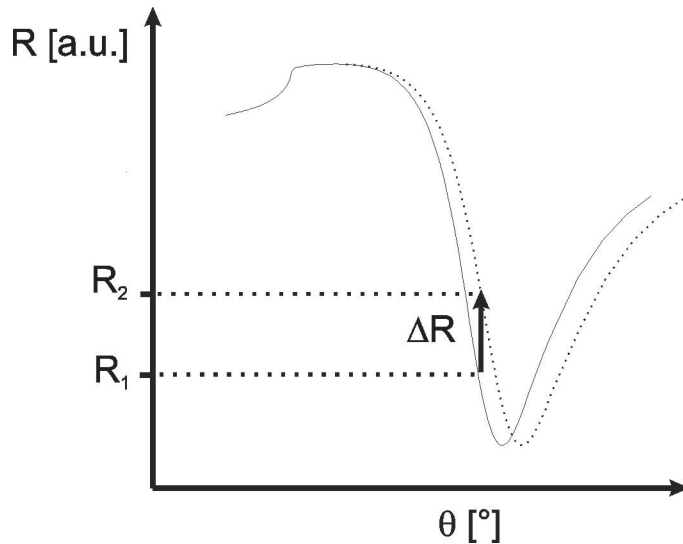
Г Поверхностный плазмонный резонанс

2

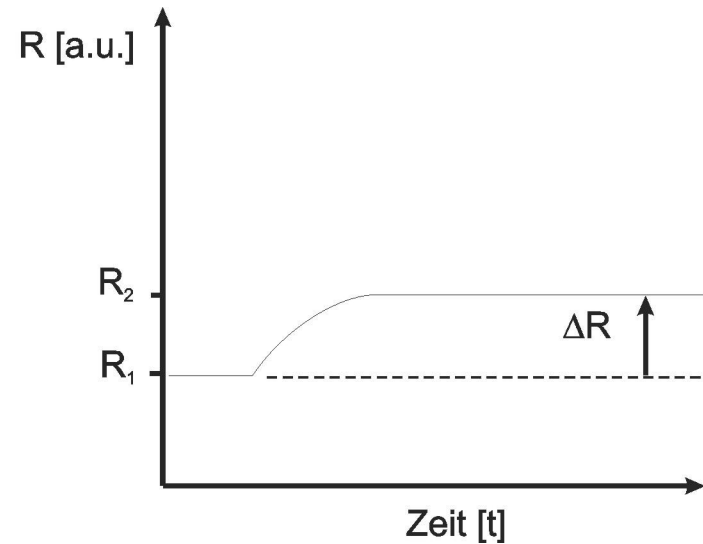


Поверхностный плазмонный резонанс 3

- Плазмонная кривая
 - Интенсивность отражения как функция угла падения Θ
- Прерывистая линия - после адсорбции вещества.

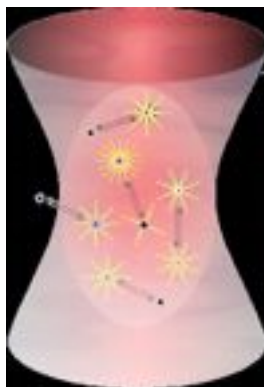
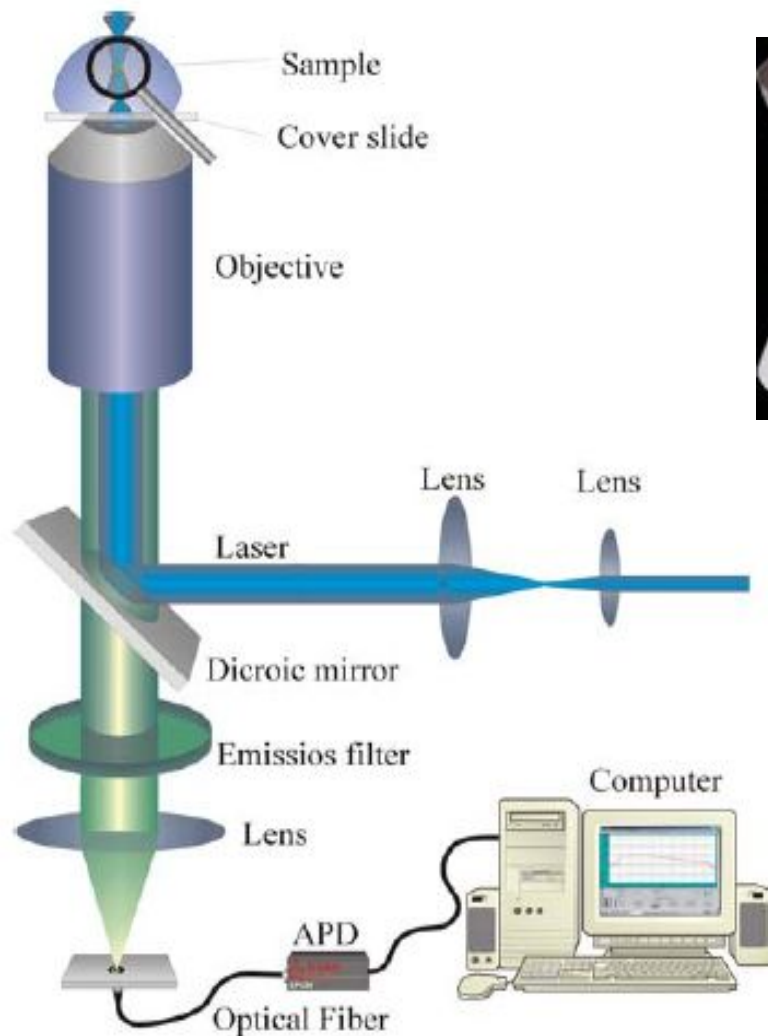


- Кинетика процесса адсорбции
 - Интенсивность отражения как функция времени при фиксированном угле падения Θ .

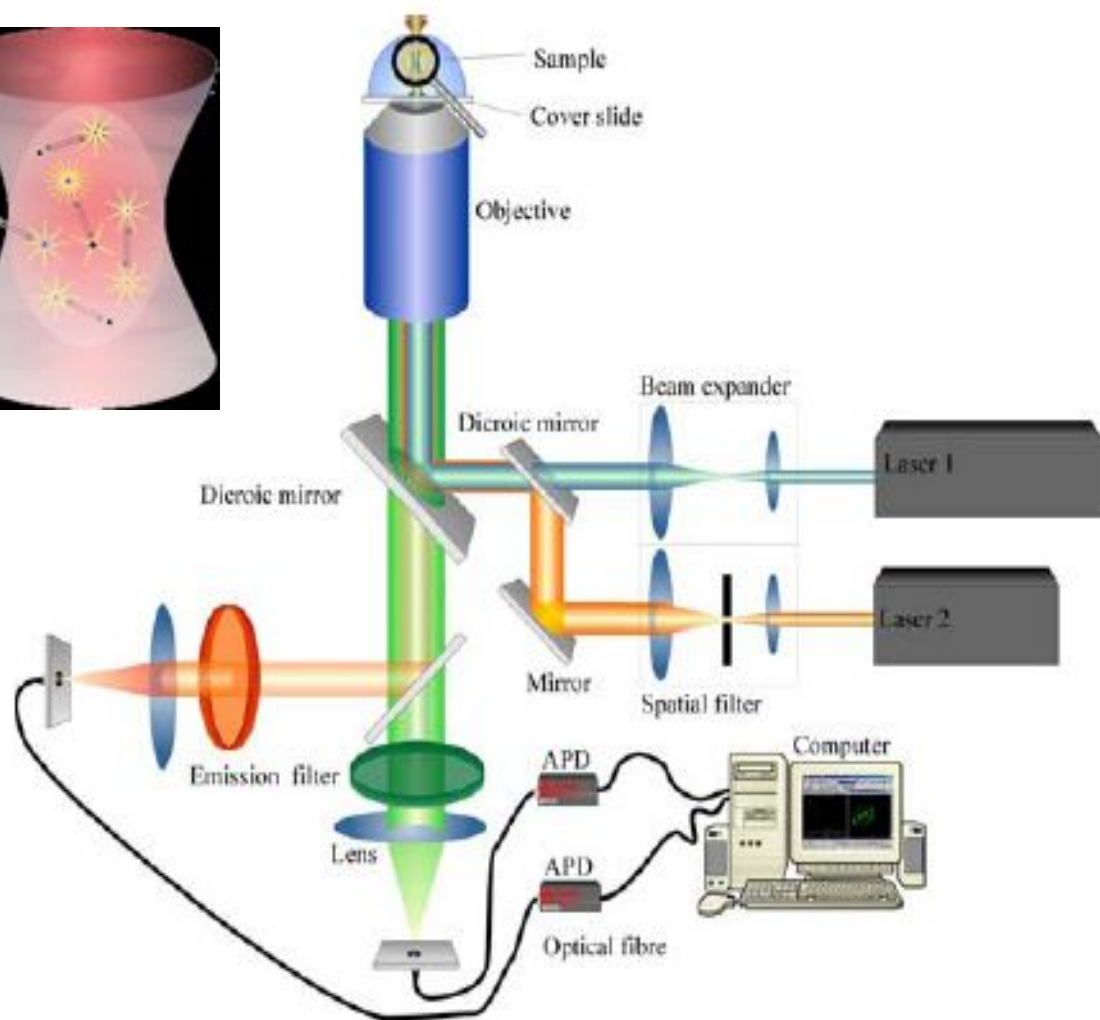


Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

Установка для проведения автокорреляционного анализа



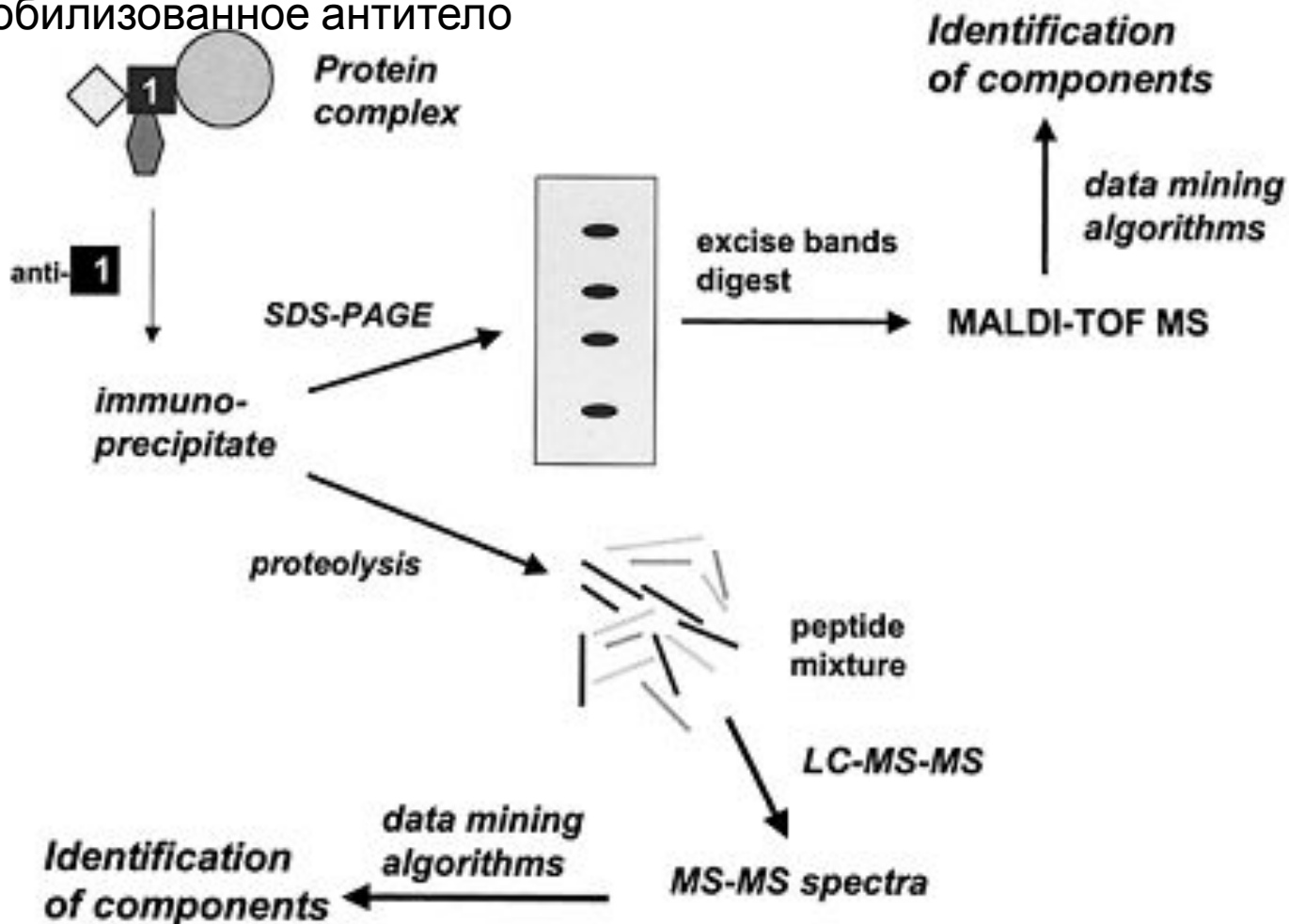
Установка для проведения Кросс-корреляционного анализа



Совместная иммунопреципитация

Возможно использование при условии:

1. Наличие антител
2. Связывание антителом индивидуального белка и белка в комплексе
3. Имобилизованное антитело

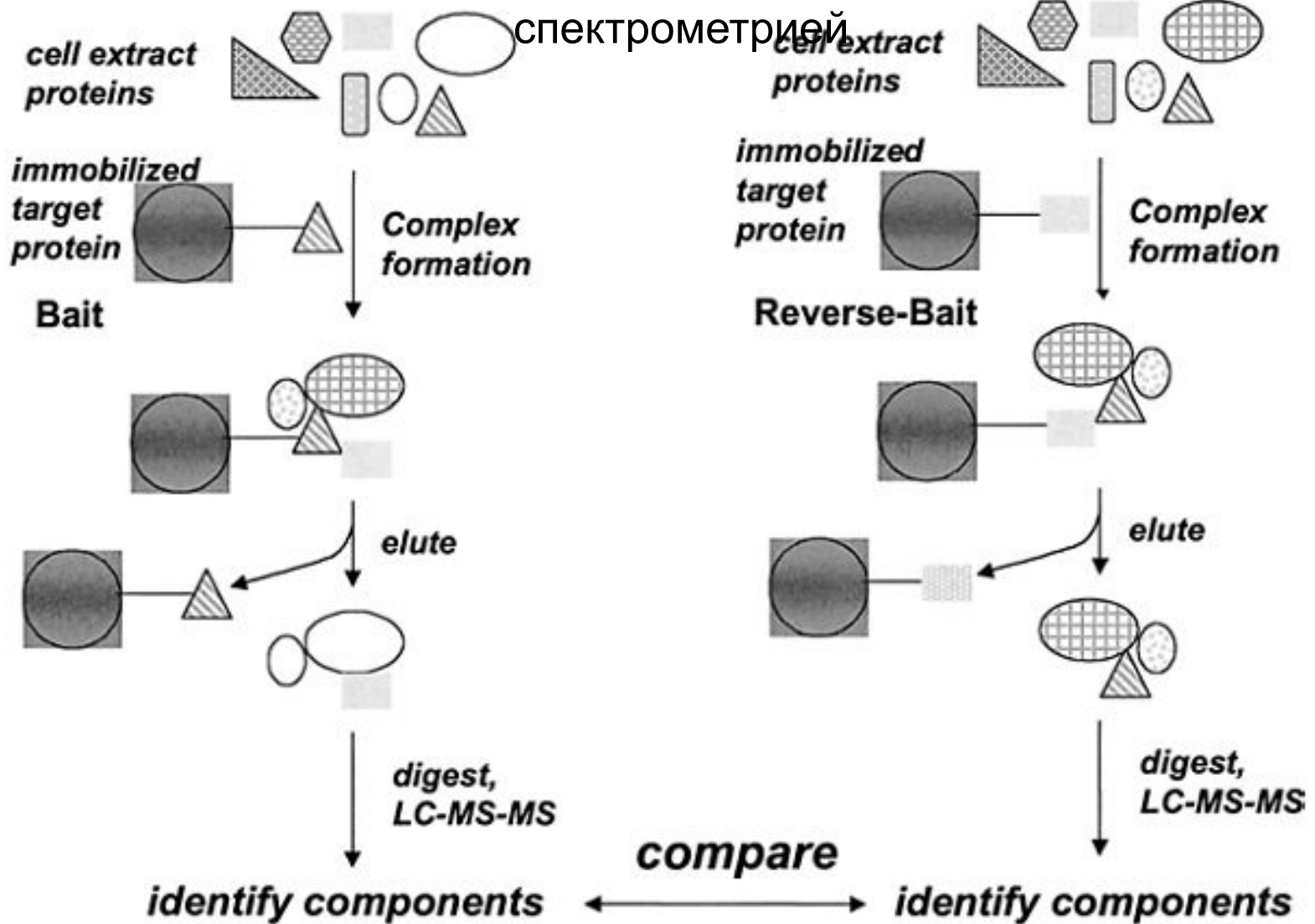


Метод «приманки» и «обратной приманки»

метод аффинной очистки

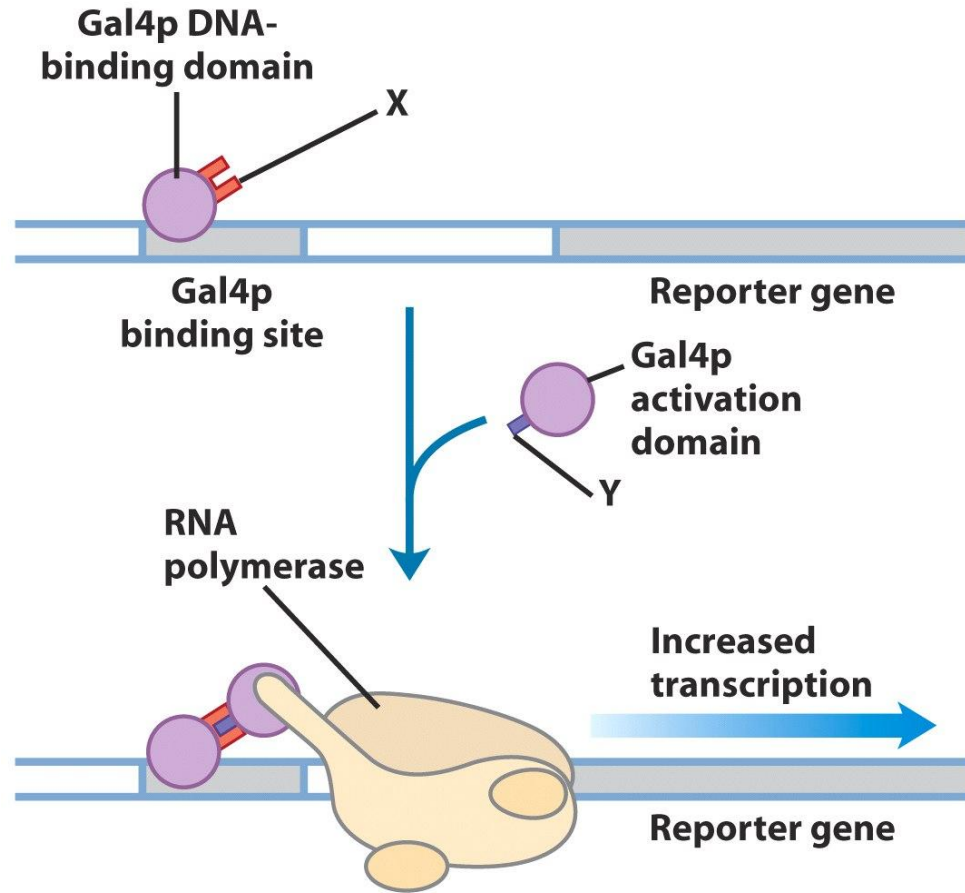
соединение с масс-

спектрометрией



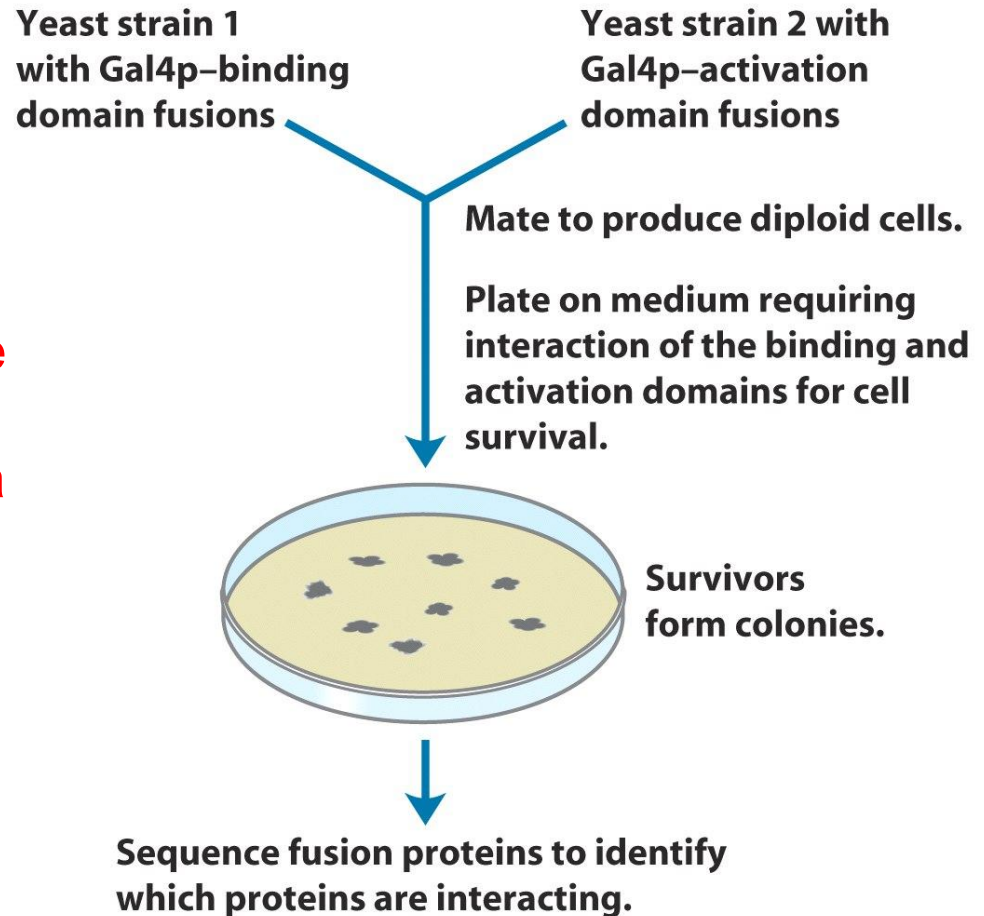
Дрожжевая двугибридная система

При образовании комплекса между исследуемыми белками объединяются ДНК-связывающий домен и фактор активации транскрипции дрожжевого белка Gal4 – происходит экспрессия маркерного гена



Дрожжевая двугибридная система

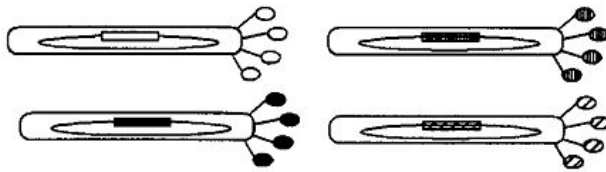
Сшитые белки формируются в двух штаммах дрожжей, которые затем скрещиваются и высеваются на среду, для роста на которой необходима экспрессия маркерного гена. Если формируются колонии – существует взаимодействие между белками.



Фаговый дисплей

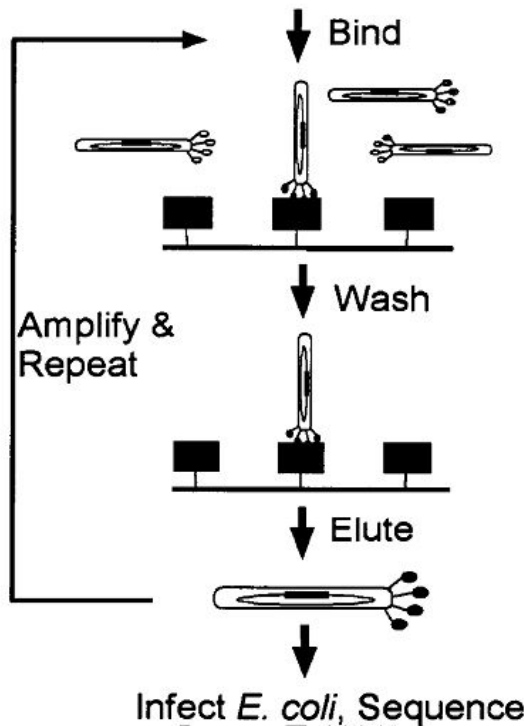
phage display

Фаговый дисплей — это метод изучения белок-белковых, белок-пептидных и ДНК-белковых взаимодействий, который использует бактериофаги для того, чтобы соотнести белки и генетическую информацию, кодирующую их. Для получения соответствия между генотипом и фенотипом требуется тщательный скрининг и амплификация белковых библиотек в процессе, называемом *in vitro* селекцией, который аналогичен естественному отбору.



Фаги

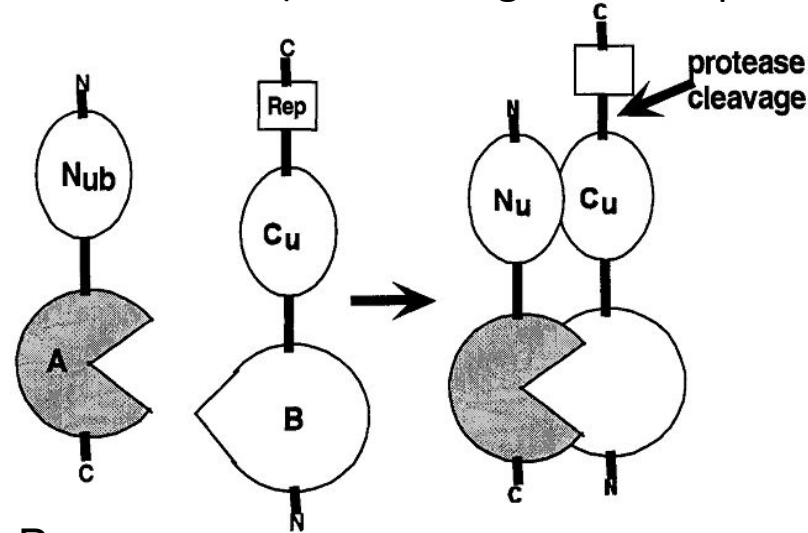
M13, T4, T7, филаментные фаги и фаг λ.



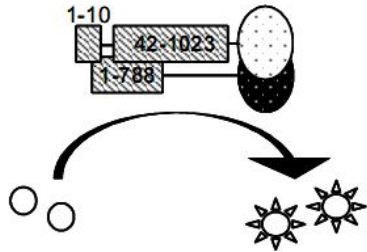
В ген, кодирующий белок оболочки pIII вставляют библиотеку случайных последовательностей из 12 нуклеотидов. После заражения *E. coli* фагом с низкой плотностью получают библиотек фагов. Каждый фаг несет свой вариант оболочечного белка. Все пептиды представлены частицами фага. Библиотеку используют для отбора фагов связывающихся с определенным субстратом.

Сборка белковых фрагментов

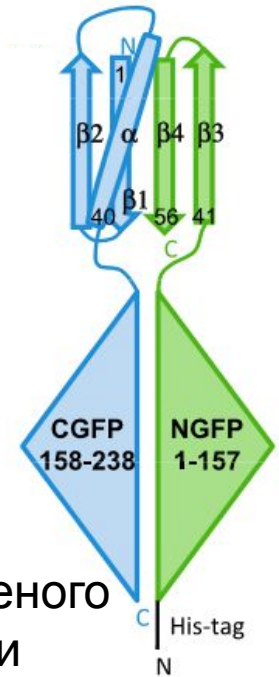
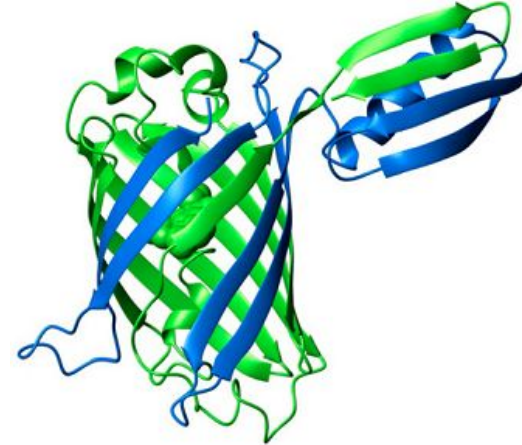
(Protein fragment complementation assay)



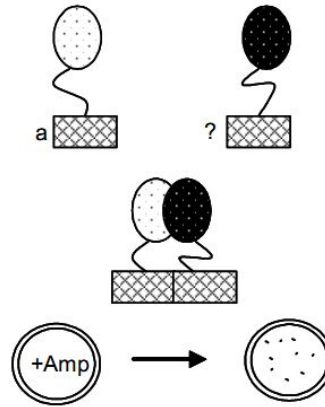
Восстановление структуры уиквитина, и отщепление репортерного белка при связывании



В-
Галактозидаза



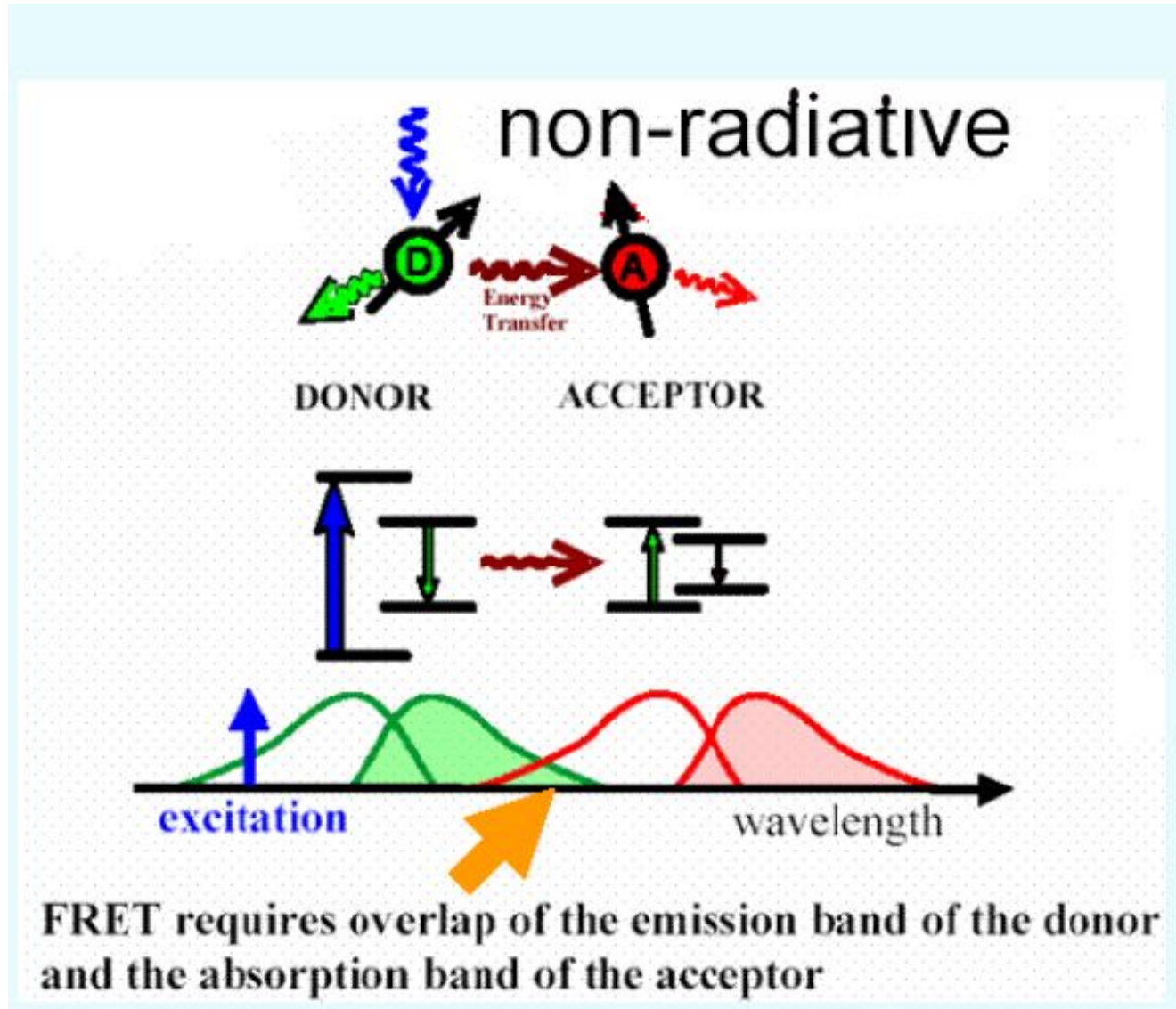
Восстановление структуры зеленого флуоресцирующего белка, и появление флуоресценции



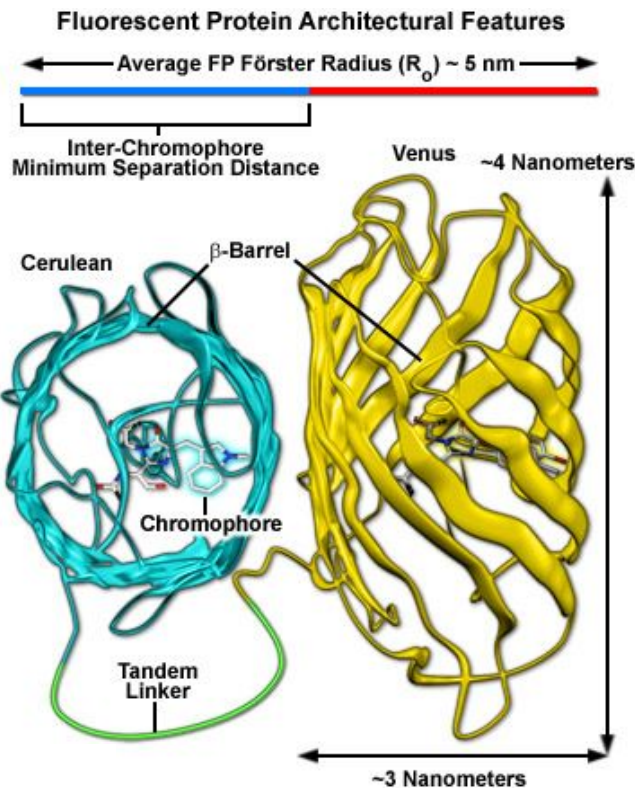
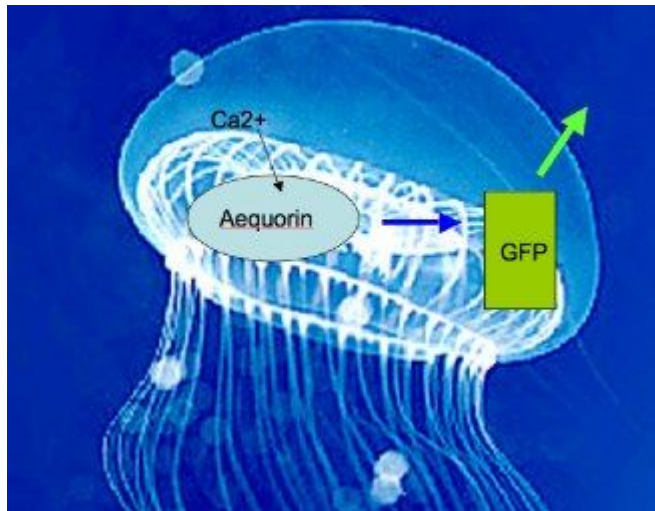
В-
пактамаза

Белок разделяется на два фрагмента, не функциональные в одиночку, фрагменты сшиваются с тестируемыми белками. При взаимодействии белков происходит сближение фрагментов и восстановление активности белка

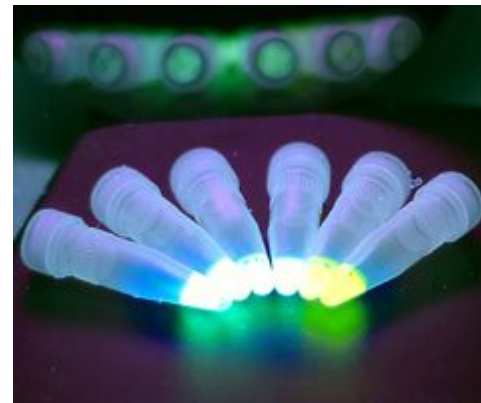
Исследование взаимодействия белков с помощью FRET



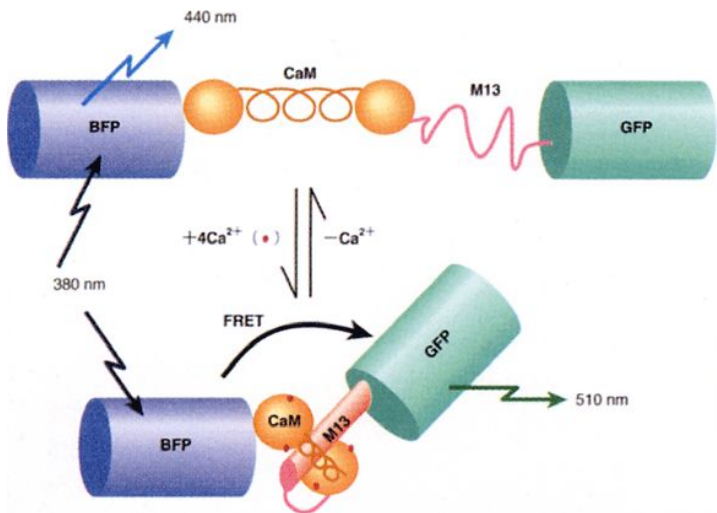
Зеленый флуоресцирующий белок (GFP) и FRET



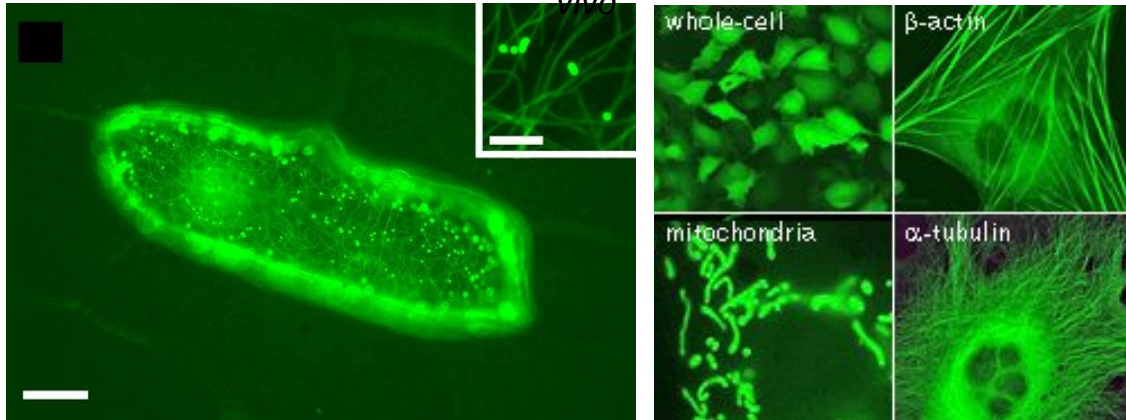
Мутанты и гомологи GFP перекрывают практически весь видимый спектр



Наблюдение за димеризацией кальмодулина в присутствии ионов кальция



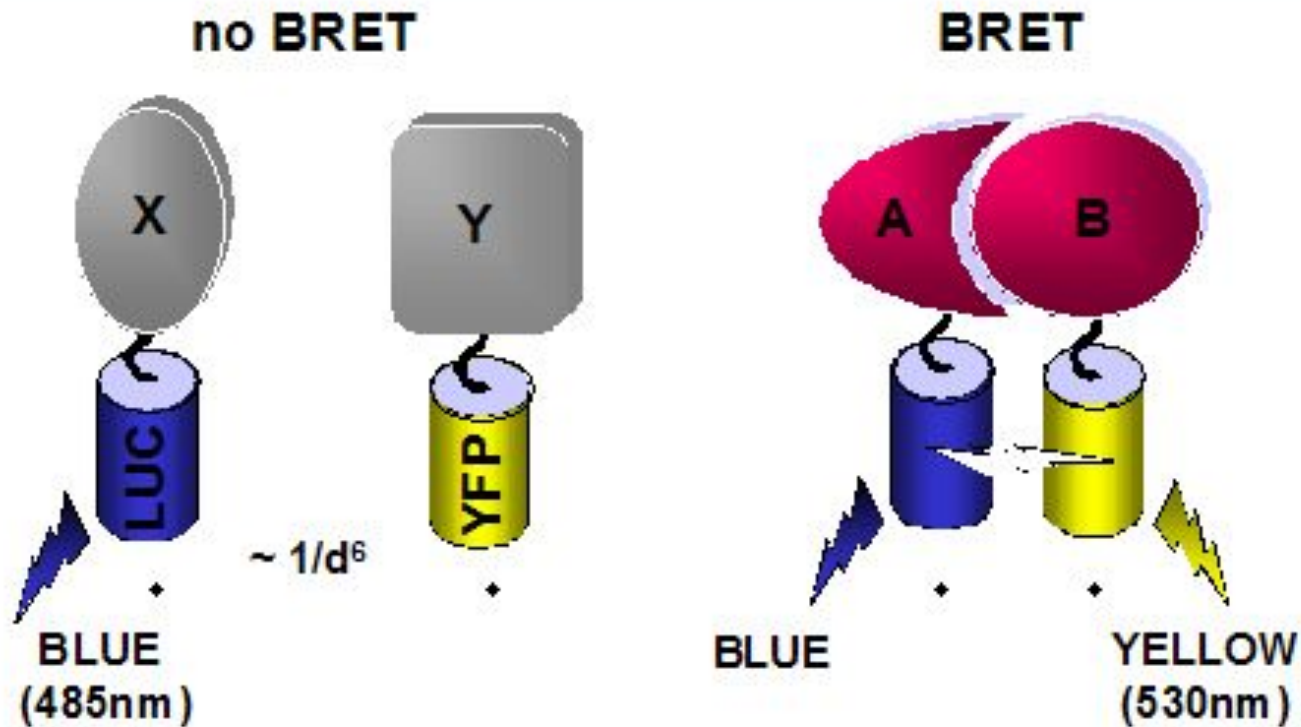
Возможность наблюдения *in vivo*



BRET

Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Bioluminescence Resonance Energy Transfer



Coelenterazine
+ O₂

→
Renilla
luciferase

Coelenteramide
+ CO₂ + hν

485 nm



Белковые микрочипы.

Для создания белковых микрочипов в качестве подложки используют различные носители, поверхность которых подвергается химической обработке и нанесению специальных линкеров или матрикса, обеспечивающих нативно-подобное окружения для последующего внедрения в них белковых молекул. На одном микрочипе возможна фиксация от 30 до 100000 различных белков-зондов в виде микропятен. Фиксация осуществляется физическим или химическим путем. Белковые микрочипы используются для выявления различных белок-белковых взаимодействий, взаимодействий с другими молекулами. Молекулы анализируемого белка взаимодействуют с молекулой-зондом в пятнышке чипа. Несвязавшиеся белки образца вымываются раствором буфера. Молекулы образца метятся радиоактивно или люминесцентно, что позволяет регистрировать связывание целевого белка с молекулой-зондом. Нанесение в качестве зондов специфических моноклональных антител позволяет использовать подобные микрочипы в медицине для диагностики, прогнозирования и мониторинга инфекционных или каких-либо других заболеваний.

Белковые наночипы.

В начале XXI века были изготовлены первые белковые наночипы с использованием метода нанолитографии. С помощью атомно-силового микроскопа на подложку из тонкой золотой пленки наносили химический линкер, способный связывать белки в виде рисунка из точек или решеток. Свободные участки поверхности инактивировали и затем к полученному рисунку из линкера присоединяли белок. Другим методом производства белковых наночипов является использование в качестве подложки пирамидок из германия. Такой субстрат является высоко гидрофильным и таким образом пригоден для адсорбции гидрофильных белков.

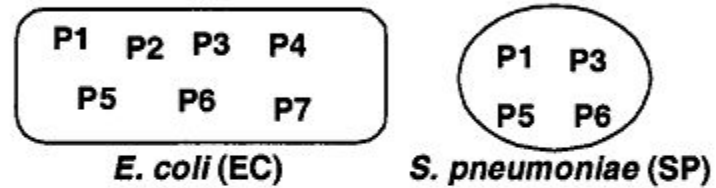
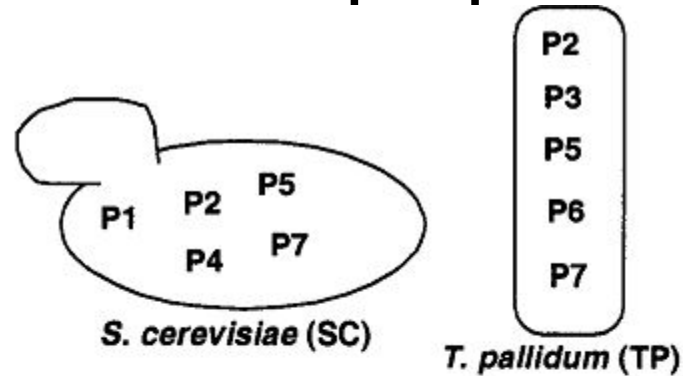
Все большее развитие получает направление нанотехнологии, которое занимается разработкой упорядоченных самособирающихся белковых наноструктур. В качестве примера можно привести удачные эксперименты по созданию подобных структур на основе глюкозооксидазы. Для получения белковых наноконструкций используются в качестве соединяющих элементов так называемые «молекулярные проволоки», представляющие собой пептиды, химические соединения, углеродные нанотрубки.

Компьютерные методы

- Филогенетические профили
- Метод «Розеттского камня»
- Метод «соседских генов»

- Требуют наличия отсеквенированных геномов;
- Основаны на статистических закономерностях

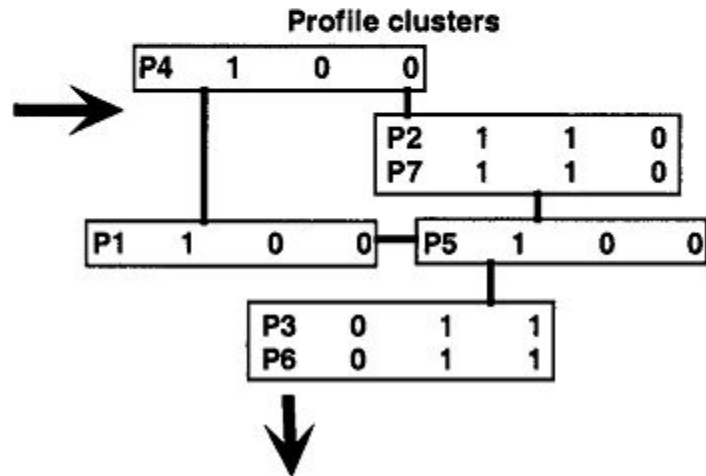
Филогенетические профили



Функционально-связанные белки имеют гомологов в некотором подмножестве организмов

Phylogenetic profile

	EC	SC	TP	SP
P1	1	1	0	0
P2	1	1	1	0
P3	0	0	1	1
P4	1	1	0	0
P5	1	1	1	1
P6	0	0	1	1
P7	1	1	1	0

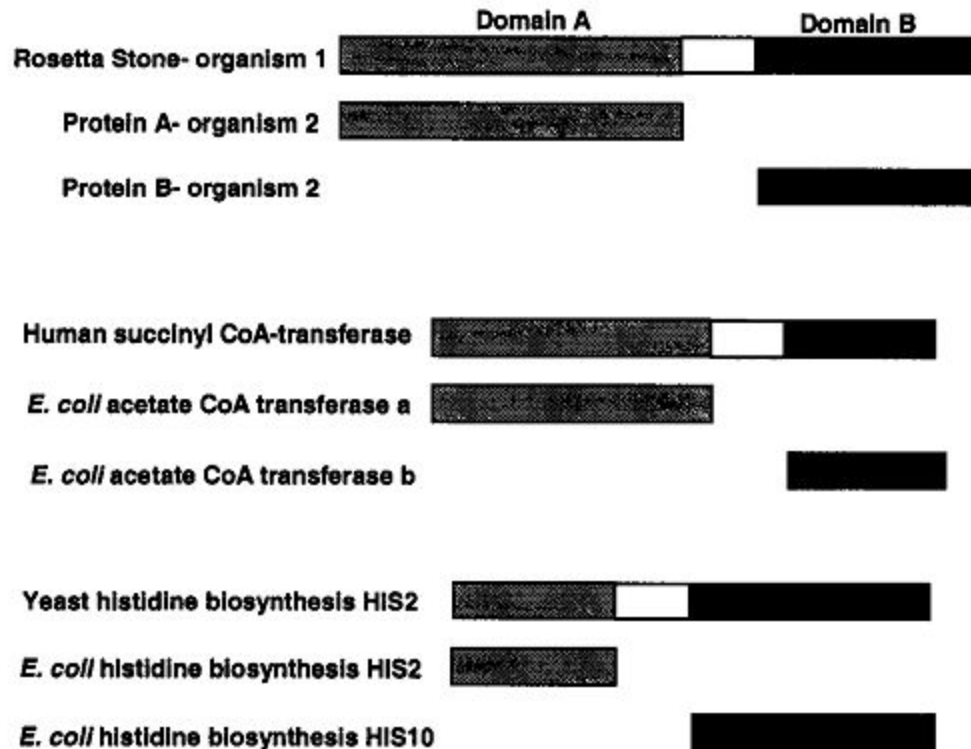
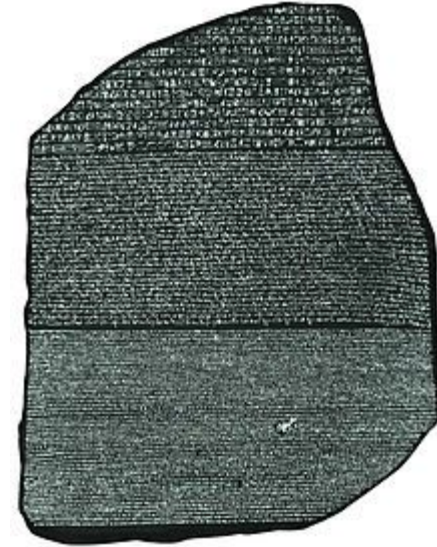


Conclusion: P2 and P7 are functionally linked
P3 and P6 are functionally linked

Розетский камень

Ряд взаимодействующих белков имеет гомологи, имеющие доменную структуру, в других организмах, в которых исходные белки сшиты в одну полипептидную цепь

Gyr A, Gyr B E. coli – топоизомераза II *S. cerevisiae*



В процессе эволюции отдельные белки могут превращаться в функциональные домены одного белка

Метод «соседских генов»

Если в хромосомах различных геномов, два гена-гомолога находятся **рядом**, существует **высокая вероятность** взаимодействия их продуктов



Предсказана функциональная связь

Компьютерные программы для докинга

- ZDOCK, RDOCK
- AutoDock
- Bielefeld Protein Docking
- DOCK
- DOT
- FTDock, RPScore and MultiDock
- GRAMM
- Hex 3.0
- ICM Protein-Protein docking
- KORDO
- MolFit
- MPI Protein Docking
- Nussinov-Wolfson Structural Bioinformatics Group
- ...