

Lineáris motívumok SPR-alapú kölcsönhatásmérése



Dosztányi Zsuzsanna, PhD,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
dosztanyi@caesar.elte.hu



Bioinformatika,
fehérje rendezetlenség
lineáris motívumok



Nyitray László, DSc,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
nyitray@ttk.elte.hu

Izomfehérjék
Ca²⁺-kötő fehérjék
fehérje-kölcsönhatás



ELTE TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Központi Kutató és Műszer Centrum



Pál Gábor, PhD,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
gabor.pal@ttk.elte.hu



Fehérje-kölcsönhatás
irányított fehérjeevolúció,
felületi plazmon rezonancia



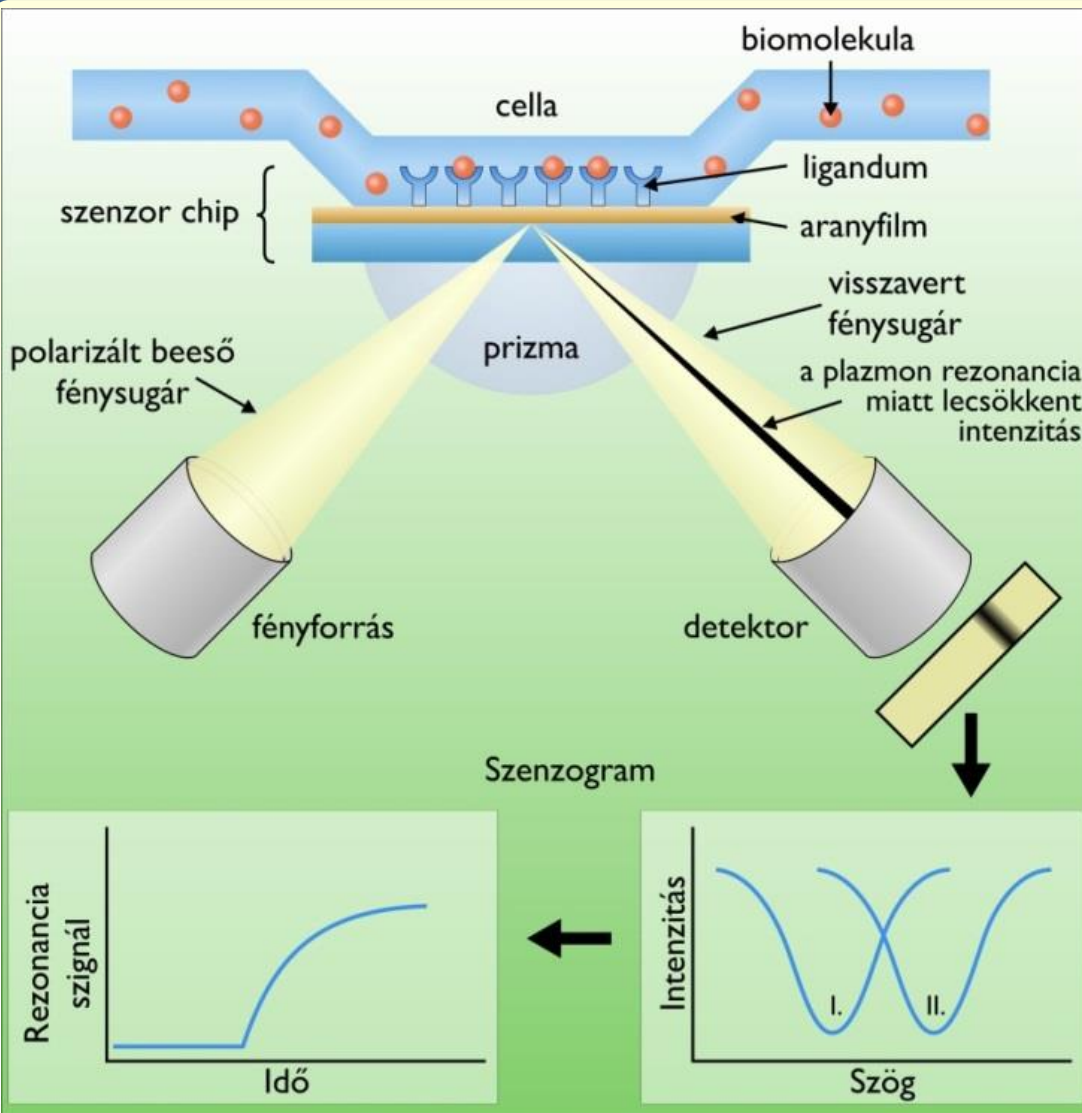
Reményi Attila, PhD,
MTA TTK
Enzimológiai Intézet,
remenyi.attila@ttk.mta.hu

Jelátviteli útvonalak,
MAPK
lineáris motívumok



Lineáris motívumok SPR-alapú kölcsönhatásmérése

Surface Plasmon Resonance = Felületi Plazmon Rezonancia



Mikro-méretű áramlási csatornák

Áramlási csatorna egyik oldala arany

Egyik fehérje rögzítése aranyfelszínre

Aranyréteg túloldalának megvilágítása síkban poláros fénnel

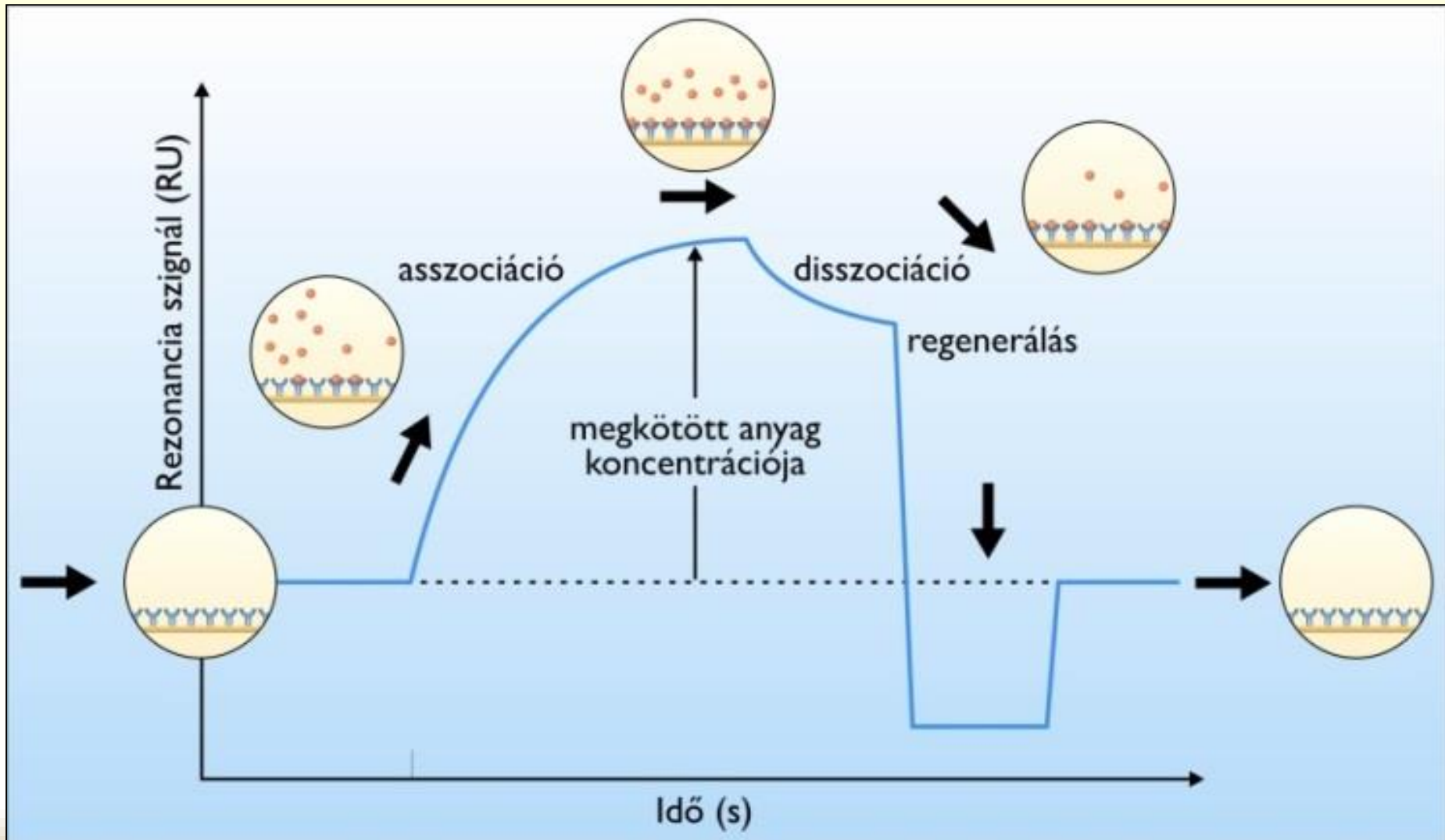
Teljes visszaverődés - evaneszcens mező (100-200 nm)

Evaneszcens mező - felületi plazmon rezonancia – intenzitáscsökkenés

Intenzitás-minimumhoz tartozó szög függ a felületre kötődött molekulák össztömegétől, ~ pg felbontás

Lineáris motívumok SPR-alapú kölcsönhatásmérése

SPR: *közel univerzális* módszer fehérje-kölcsönhatások valós idejű mérésére: k_{on} ; k_{off} ; K_d ; hőmérsékletfüggés, összetett komplexek

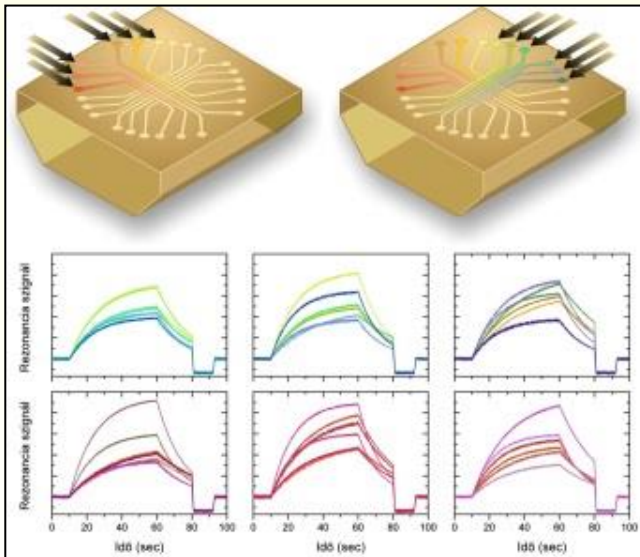


Lineáris motívumok SPR-alapú kölcsönhatásmérése

ProteOn XPR36 – multiplex vizsgálati elrendezés

Párhuzamos vizsgálatok egyszerre 36 kölcsönhatási felületen

6-féle rögzített fehérje kölcsönhatása 6-féle injektált molekulával



ELTE TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Központi Kutató és Műszer Centrum



Lineáris motívumok funkcionális tulajdonságai

- Rövid, ~ 5-20 aminosavas szakaszok, globuláris doménhez kötnek
- 1-1 domén rá jellemző motívumot ismer fel
- A motívum a kölcsönhatás kulcsfontosságú aminosavait írja le, pl. SH3 domén-kötő motívum: -X-P-P-X-P-
- A motívum általában rendezetlen fehérjerészekben található
- Átmeneti, de specifikus kölcsönhatások
- Kompakt, sűrűn „pakolható” egység, motívumok át is fedhetnek
- Poszt-transzlációs módosítások, pl. foszforiláció helye lehet
- Molekuláris kapcsolók
- Fehérje kölcsönhatási hálózatok plaszticitása
- Gyors evolúció

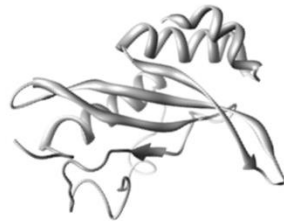
Lineáris motívumok SPR-alapú kölcsönhatásmérése

Protein complexes



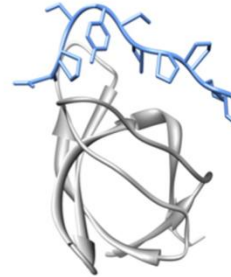
>1,000

Globular domains



~100

Binding motifs



~10

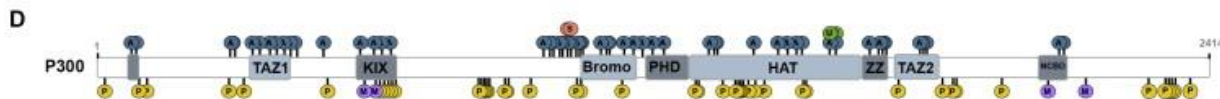
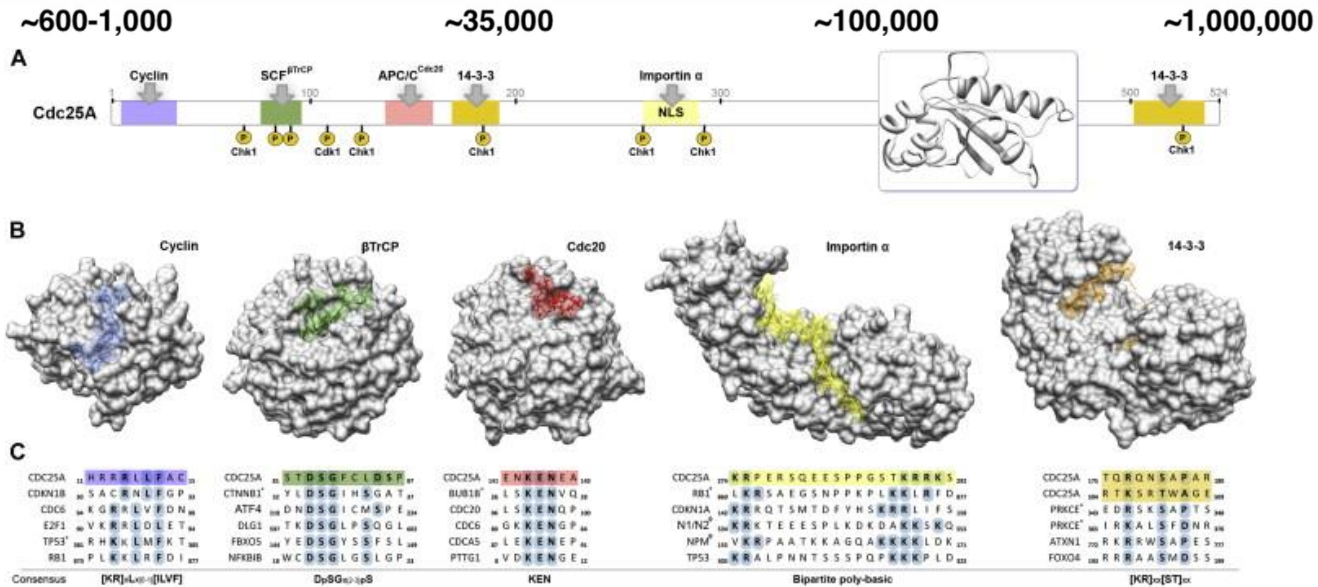
PTM sites



~1

Typical size (residues)

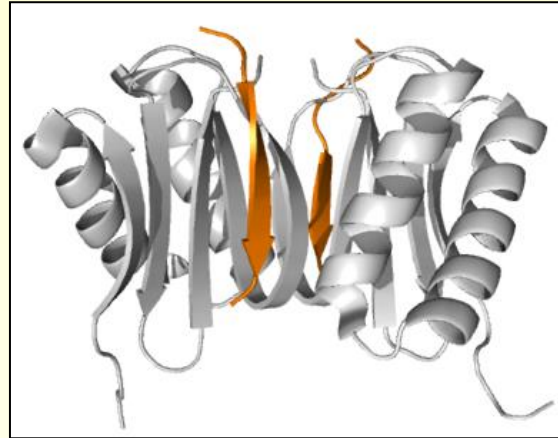
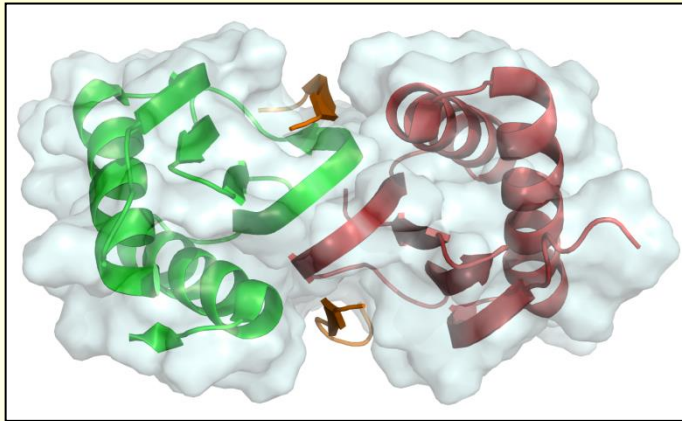
Estimated instances



Eukarióta Lineáris Motívum adatbázis

- Körülbelül 200 ismert motívum osztály
- 2000 azonosított kölcsönhatás – a jéghegy csúcsa
- Csoportjai:
 - Poszttranszlációs Módosítások pl. foszforilációs helyek
 - Lokalizációs jel pl. Golgi-to-ER szignál szekvenciák
 - Hasító-helyek pl. kaspáz I hasító-helye
 - Ligandum-kötő helyek pl. SH2 domén kötőmotívum
 - Dokkoló szekvencia pl. MAPK2 dokkoló motívum
 - Degron pl. KENbox degradációs motívum - E3 ligáz kötőhely

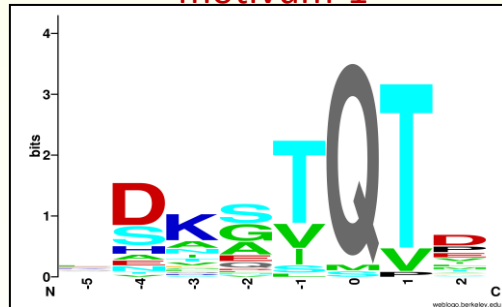
LC8 Dynein Light Chain (DLC) egy csomóponti fehérje



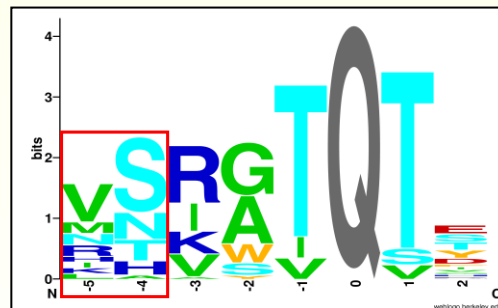
apoptózis,
jelátvitel,
transzport,
vírusfertőzés,
DNS hibajavítás,
transzkripció

Rendkívül konzervált, homodimer, eukarióta, ragasztó-funkció?

motívum-1



motívum-2



Ismert kötőpartnerek alapján Irányított fehérjeevolúció alapján

humán kötő-peptid keresés
bioinformatikai módszerrel

- intracelluláris
- rendezetlen régióban
- pontozómátrix alapján rendezve
- több száz potenciális kötőhely!
- határvonal megszabása?

OPEN ACCESS Freely available online

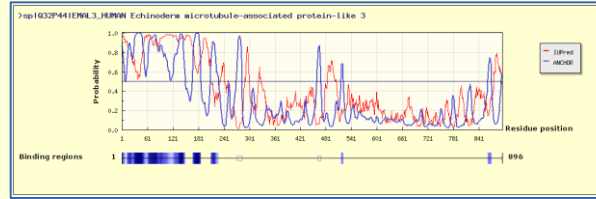
PLoS one

Directed Evolution Reveals the Binding Motif Preference of the LC8/DYNLL Hub Protein and Predicts Large Numbers of Novel Binders in the Human Proteome

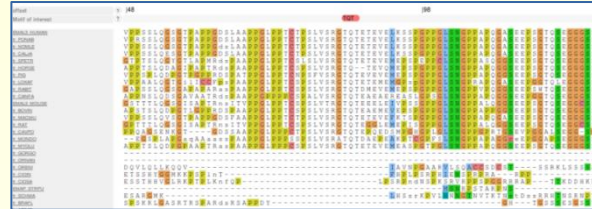
Péter Rapali¹, László Radnai¹, Dániel Sűveges¹, Veronika Harmat^{2,3}, Ferenc Tölgyesi⁴, Weixiao Y. Wahlgren⁵, Gergely Katona⁵, László Nyitrai^{1*}, Gábor Pál^{1*}

Továbbfejlesztett eljárás extra funkciókkal

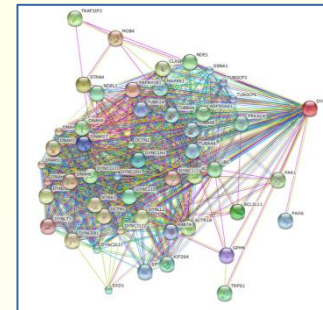
- rendezetlen kötőhely jóslás



- evolúciós konzerváltság



- ismert kölcsönhatási hálózatban szerepel?



- machine learning – optimalizálás

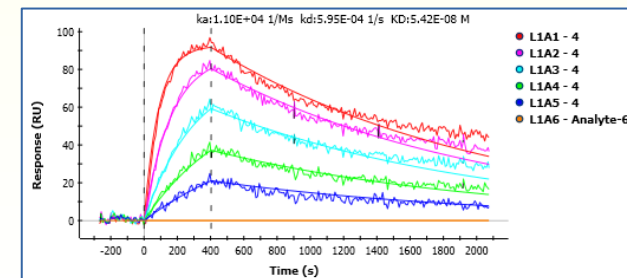
- a pontozómátrix tesztelése: peptidek DLC-kötésének mérése SPR-rel

- 11 „határesetként” jóslt peptidből: 8 kötődik, 3 nem

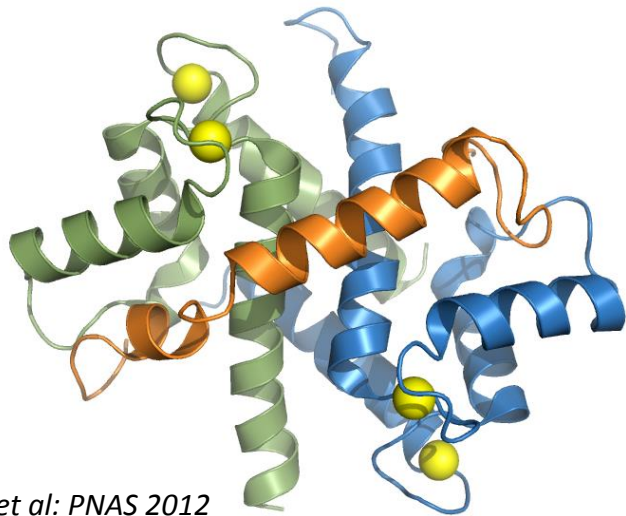
- eljárás iteratív fejlesztése, motívum finomítása



Dosztányi Zsuzsanna, PhD,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
dosztanyi@caesar.elte.hu



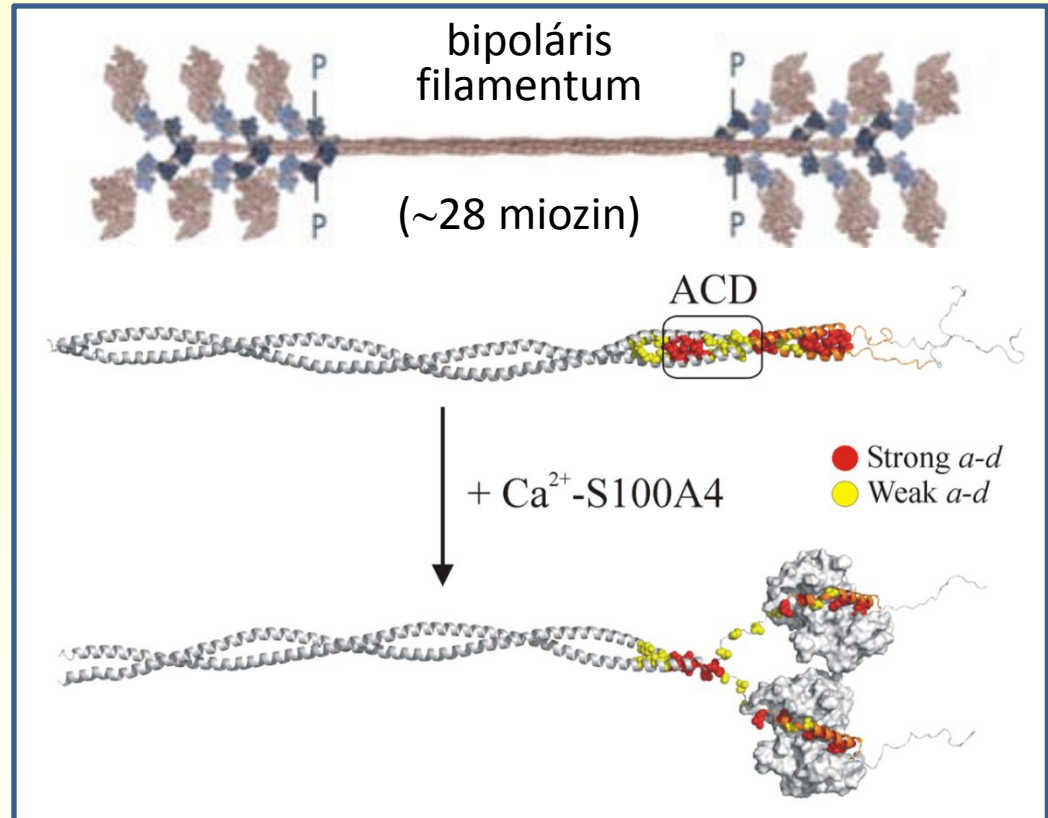
Az S100A4-NM2A kölcsönhatás részletes elemzése



Kiss Bence



Kalmár Lajos

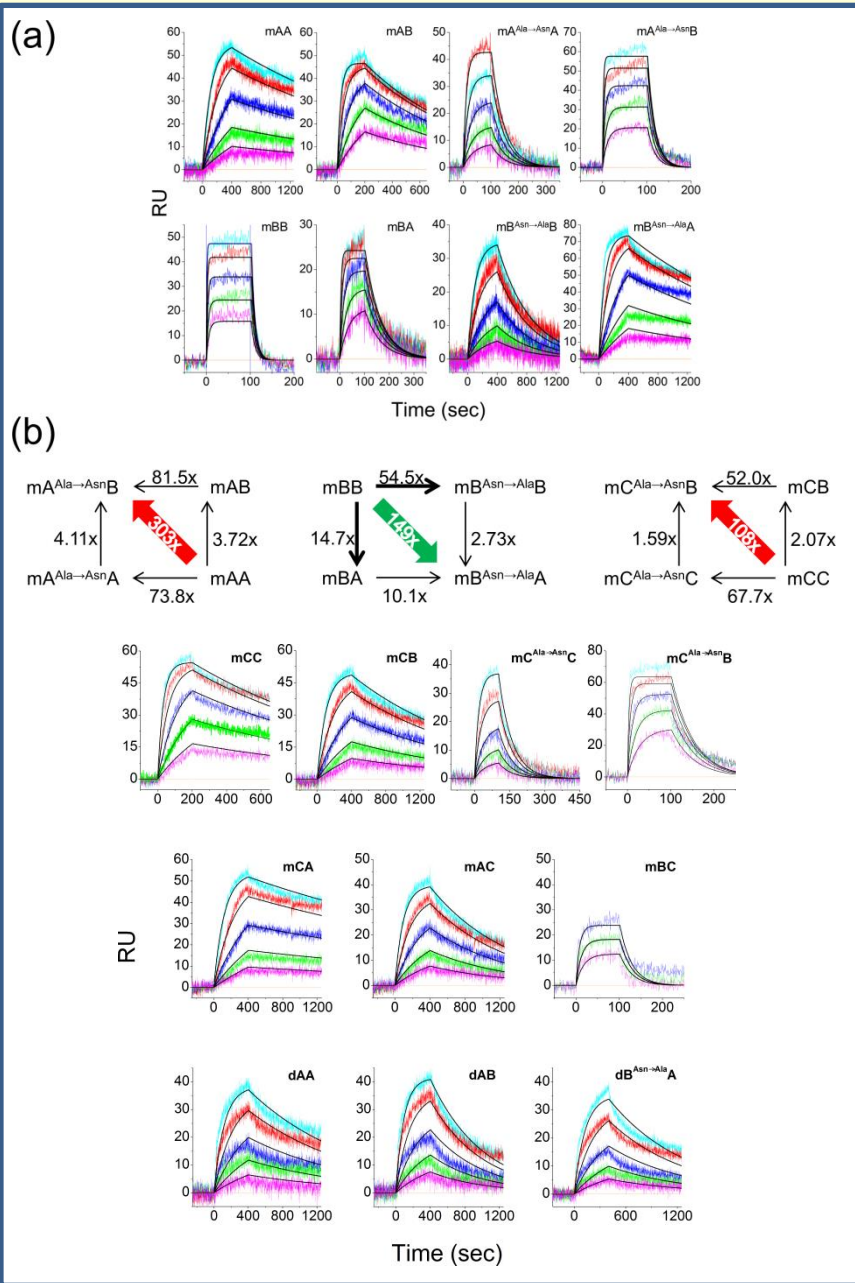


S100A4 az **NM2A filamentumot szétszedi**, míg az **NM2B filamentumot nem**

Oknyomozás:

- Irányított evolúció – paralóg szkennelés – kulcspozíció azonosítása
- Reciprok kulcspozíció cseréje + farok modulok kombinált cseréberéje
- SPR mérések özöne
- molekuladinamikai szimulációk
- coiled-coil stabilitás mérés
- filamentum (parakristály) felbomlás mérése

Az S100A4-NM2 kölcsönhatást részletesen jellemeztük



NMIIA

NMIIIB

1

2

3

Kiss és mtsi., kézirat beküldve

Köszönöm a figyelmet!

