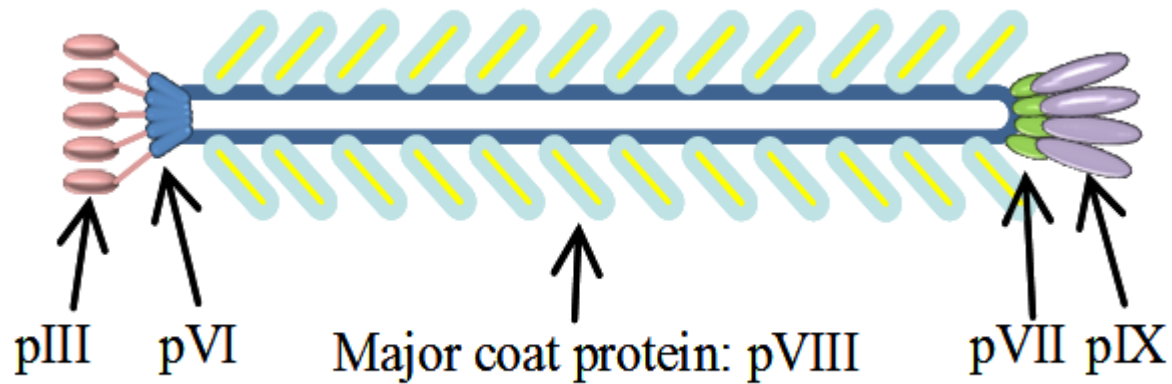


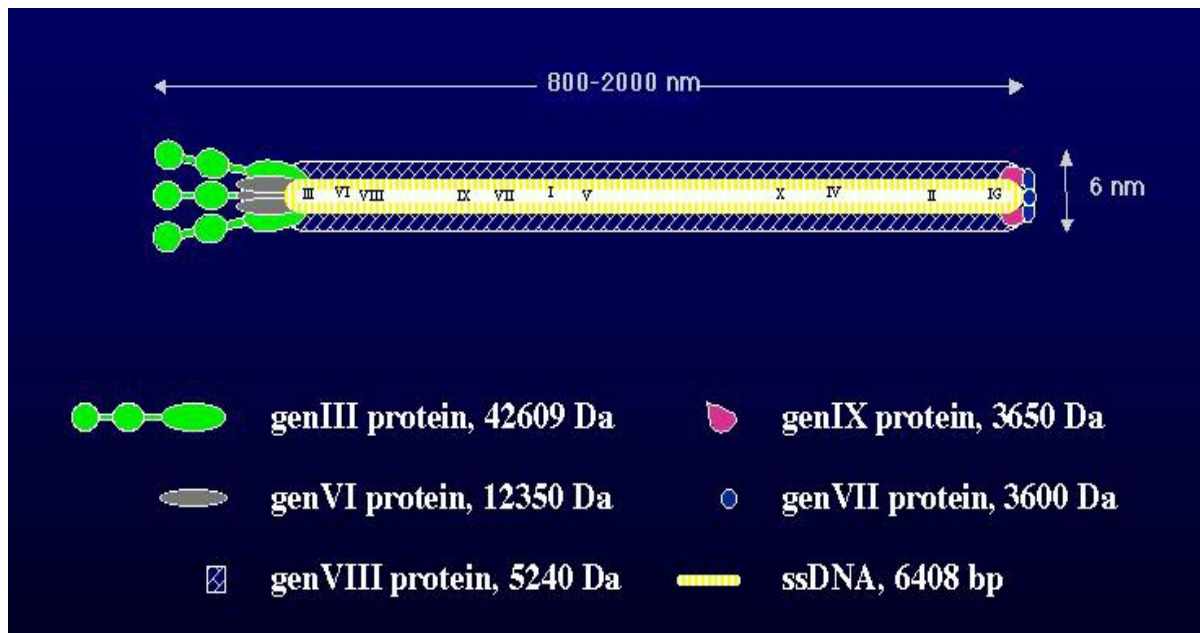
PREDSTAVITEV NA POVRŠINI

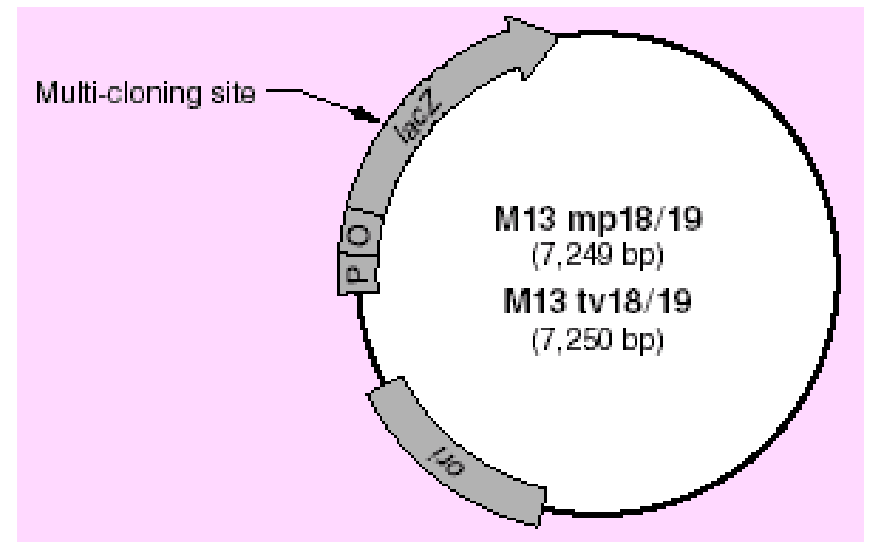
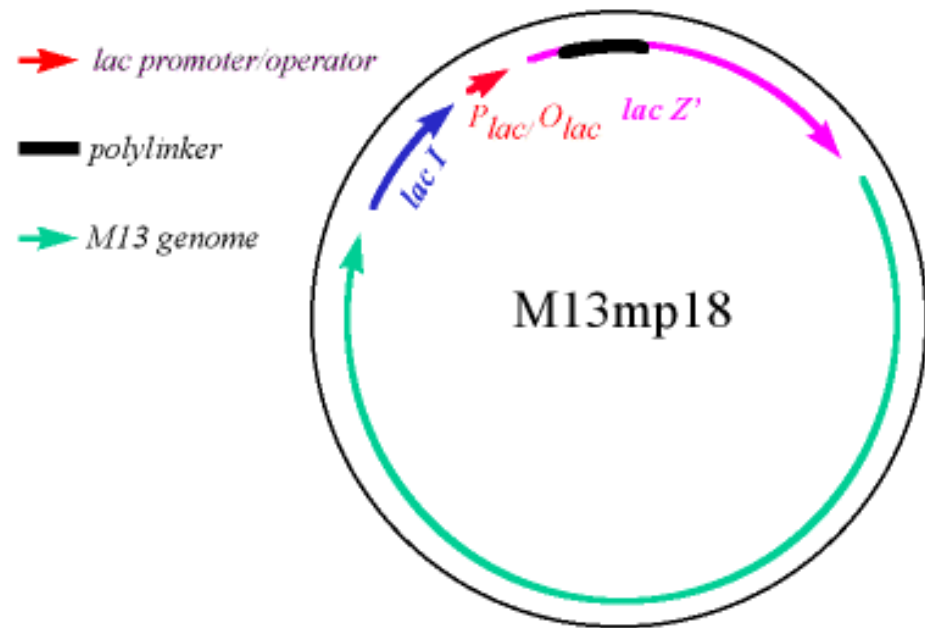
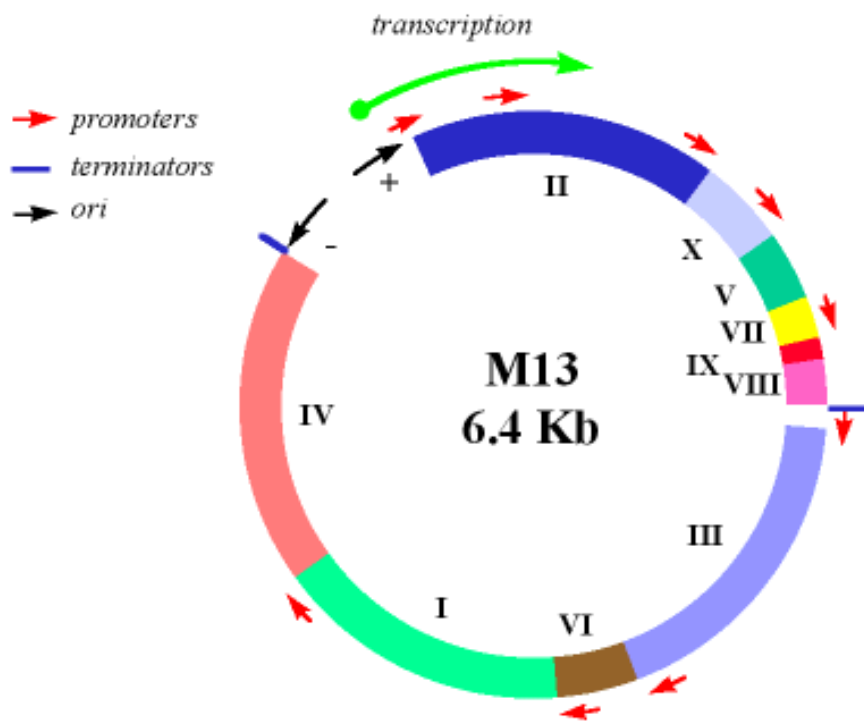
DVOHIBRIDNI SISTEMI



The filamentous phage, shown above, acts as a virus to attack bacteria.

<http://www.eng.auburn.edu/research/centers/audfs/research.html>

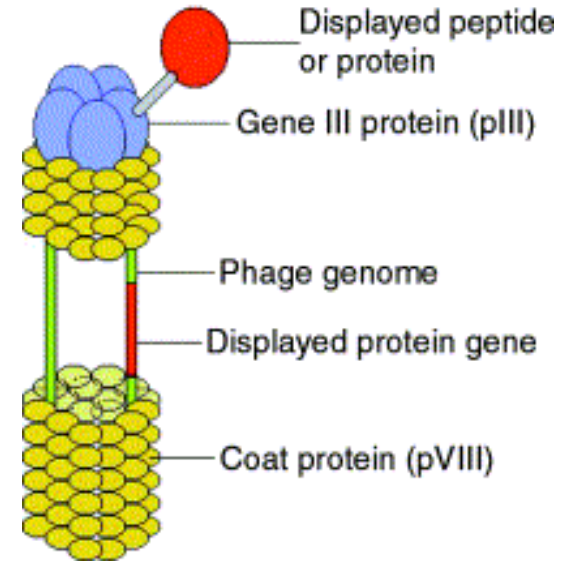




Predstavitev na površini

Nitasti fagi lahko na površini izražajo (kot del lastnih proteinov) proteine, za katere smo zapis vnesli na ustrezno mesto fagne DNA.

Gre za izražanje fuzijskih proteinov, ki so zaradi lokalizacije na površini 'imobilizirani' in zato primerni za testiranje s potencialnimi ligandi.



Na površini lahko izrazimo veliko število mutantov nekega zaporedja, nato pa selekcioniramo tiste, ki specifično interagirajo z neko snovjo (druga makromolekulo ali antigenom ipd.). Tako lahko preučujemo interakcije med proteini, določamo afiniteto in specifičnost povezav.

Predstavitev na površini /2

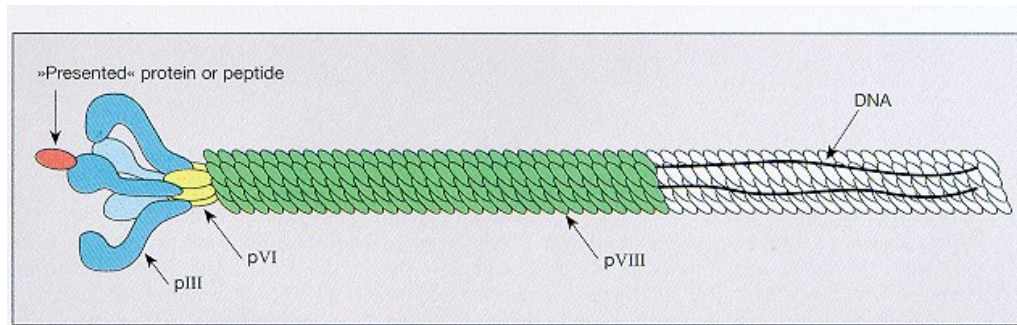
Z izrazom “predstavitev na površini” ali “predstavitev na fagih” pogosto označujemo tudi seleksijsko tehniko, ne samo to, da je rekombinantni protein izražen na površini. Pomembno je tudi, da sta DNA z zapisom in izraženi protein prostorsko povezana, tako da lahko zlahka določimo nukleotidno zaporedje zapisa za protein, ki ima iskane lastnosti. Postopek selekcije se imenuje izpiranje (*biopanning*).

Podobno kot pri fagih lahko zapis za želeni protein vključimo v gen za protein, ki je lokaliziran **na zunanji membrani prokariontskih ali evkariontskih celic**. **Bakulovirusi** nam omogočajo, da pripravimo proteine, izražene na površini virionov oz. insektnih celic.

Pri predstavitvi **na površini ribosomov** ustavimo prevajanje v fazi, ko sta nanj vezani tako veriga mRNA kot tudi nastajajoča polipeptidna veriga.

Predstavitev na fagih

Nitasti fagi (M13) lahko vgrajujejo dodatne (poli)peptide kot fuzijo s proteinom VIII (do ~270 kopij pri 10 % učinkovitosti) ali proteinom III (1-5 kopij).

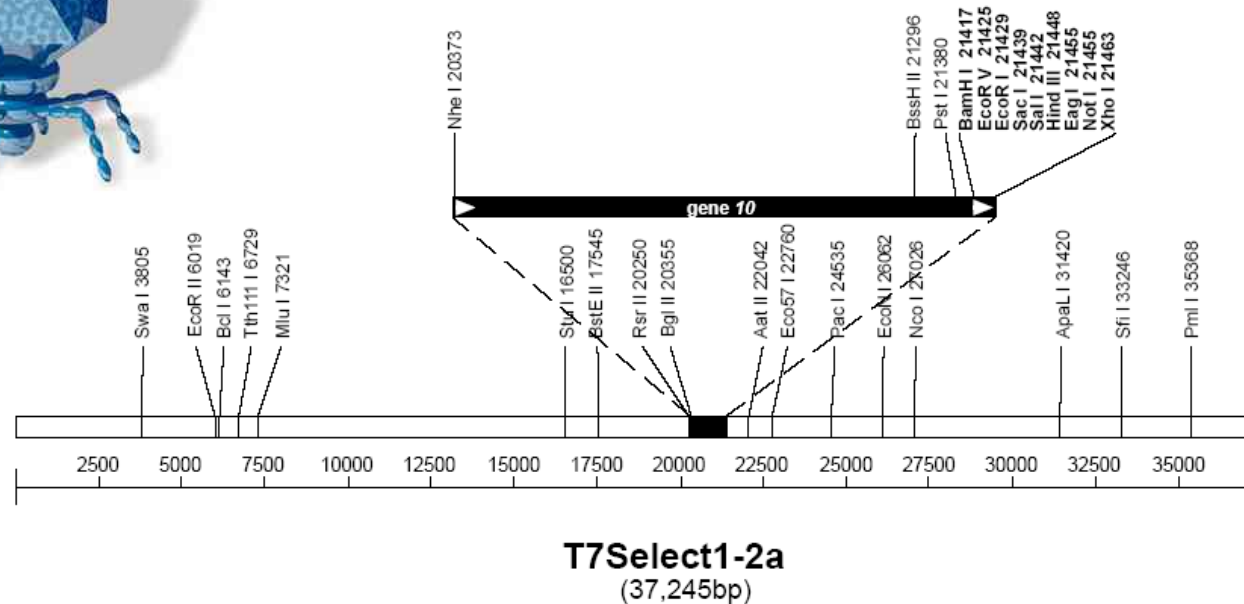
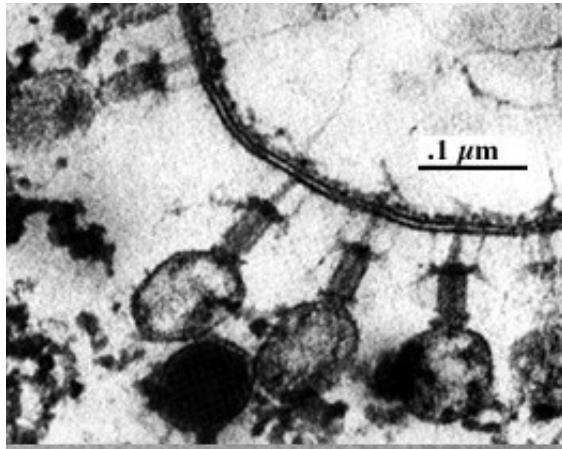


Dolžina inserta znotraj gena VIII je omejena na ~80 bp; daljše fuzije zmanjšajo infektivnost faga M13, ki jo posreduje ta protein.

Če gre za apikalno fuzijo (gen III), je protein lahko večji.

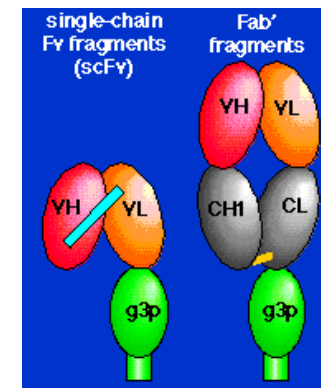
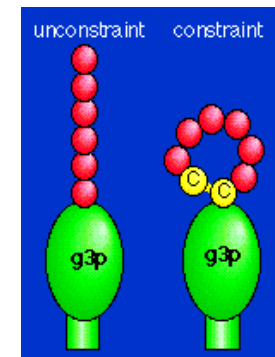
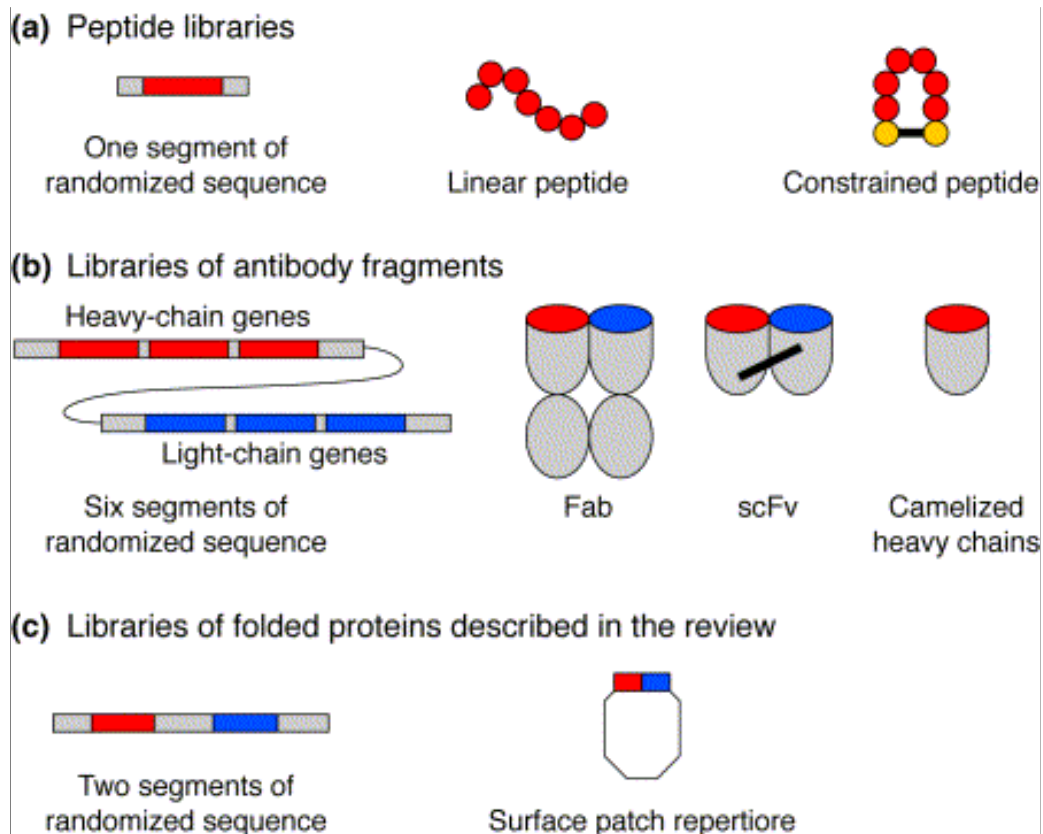
Predstavitev na fagih /2

Obstajajo tudi sistemi za predstavitev na fagu T4 in T7 (T7-Select, Novagen). Peptidi so tu lahko dolgi do 50 aa in se v rekombinantnem fagu izrazijo 415x, dolge fuzije pa so lahko do 1200 aa, a v le 1 kopiji/fag. Oba faga sta bistveno večja od M13 in sta litična.



Fagne predstavivne knjižnice

Na površini lahko izrazimo večje število cDNA ali mutantov, ki predstavljajo kombinatorično knjižnico. Izrazimo lahko peptide, enoverižne fragmente protiteles ali druge polipeptide s terciarno zgradbo.



Fagne predstavitevne knjižnice /2

Komercialno dostopne so fagne predstavitevne knjižnice, ki na površini virusov izražajo **cDNA iz normalnih in obolelih celic** (npr. cDNA iz možganov pacienta z Alzheimerjevo boleznijo ali iz različnih rakastih tkiv) (600 USD/100 μ l; >108 pfu). Knjižnico pa lahko pripravimo tudi sami iz specifičnih tkiv/celic, ki nas zanimajo.

Kupimo lahko tudi knjižnice fagov, ki na površini izražajo **naključne peptide** (7-mere ali 12-mere, vezane preko 4-peptidnega liganda na pIII; knjižnice Ph.D., New England BioLabs).

Dobljeno knjižnico lahko namnožimo, vendar lahko pri tem pride do spremenjene zastopanosti posameznih zaporedij.

Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library

Catalog #	Size	Concentration	Price	Qty	
E8111L	50 panning experiments	1 $\times 10^{13}$ pfu/ml	\$1,260.00	<input type="text" value="1"/>	ADD TO CART

Prices are in US dollars and valid only for US orders.

Download: [Technical Bulletin](#) | [MSDS PDF](#)

Description:

The Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library is based on a combinatorial library of random dodecapeptides fused to a minor coat protein (pIII) of M13 phage (1-6). The displayed peptide (12-mer) is expressed at the N-terminus of pIII, i.e., the first residue of the mature protein is the first randomized position. The peptide is followed by a short spacer (Gly-Gly-Gly-Ser) and then the wild-type pIII sequence. The library consists of approximately 2.7×10^9 electroporated sequences amplified once to yield approximately 100 copies of each sequence in 10 μ l of the supplied phage.

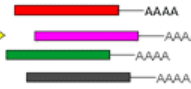
Priprava fagne predstavivene knjižnice

Primer: rekombinantna Ab

B-LYMPHOCYTE

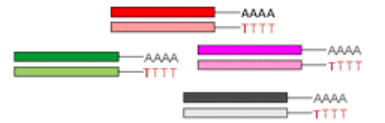


mRNA PREPARATION



cDNA SYNTHESIS

REVERSE TRANSCRIPTASE
dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
OLIGO-p(dT)₁₅ PRIMER



PCR

SPECIFIC PRIMERS
dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Taq POLYMERASE



HEAVY CHAIN PRODUCT

LIGHT CHAIN PRODUCT

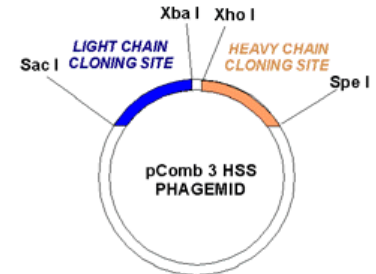
Xho I/Spe I

ENDONUCLEASE

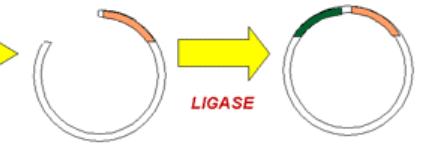
Sac I/Xba I



LIGHT CHAIN CLONING

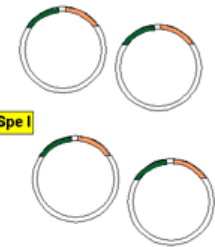


Sac I/Xba I



LIGASE

ELECTROTRANSFORMATION TO XL-1 BLUE



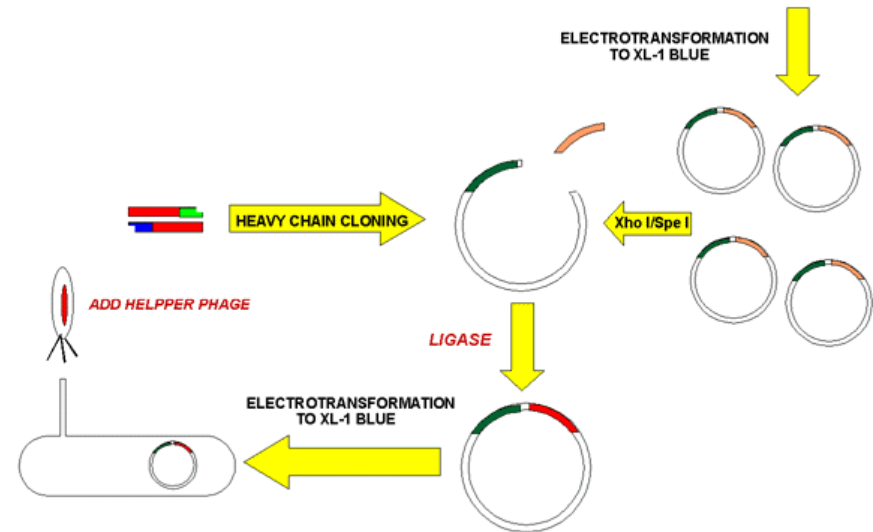
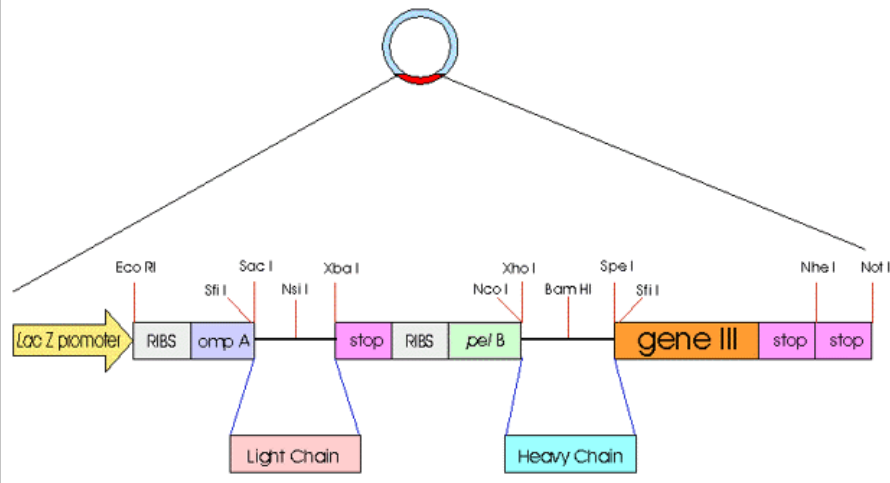
HEAVY CHAIN CLONING



ADD HELPPER PHAGE

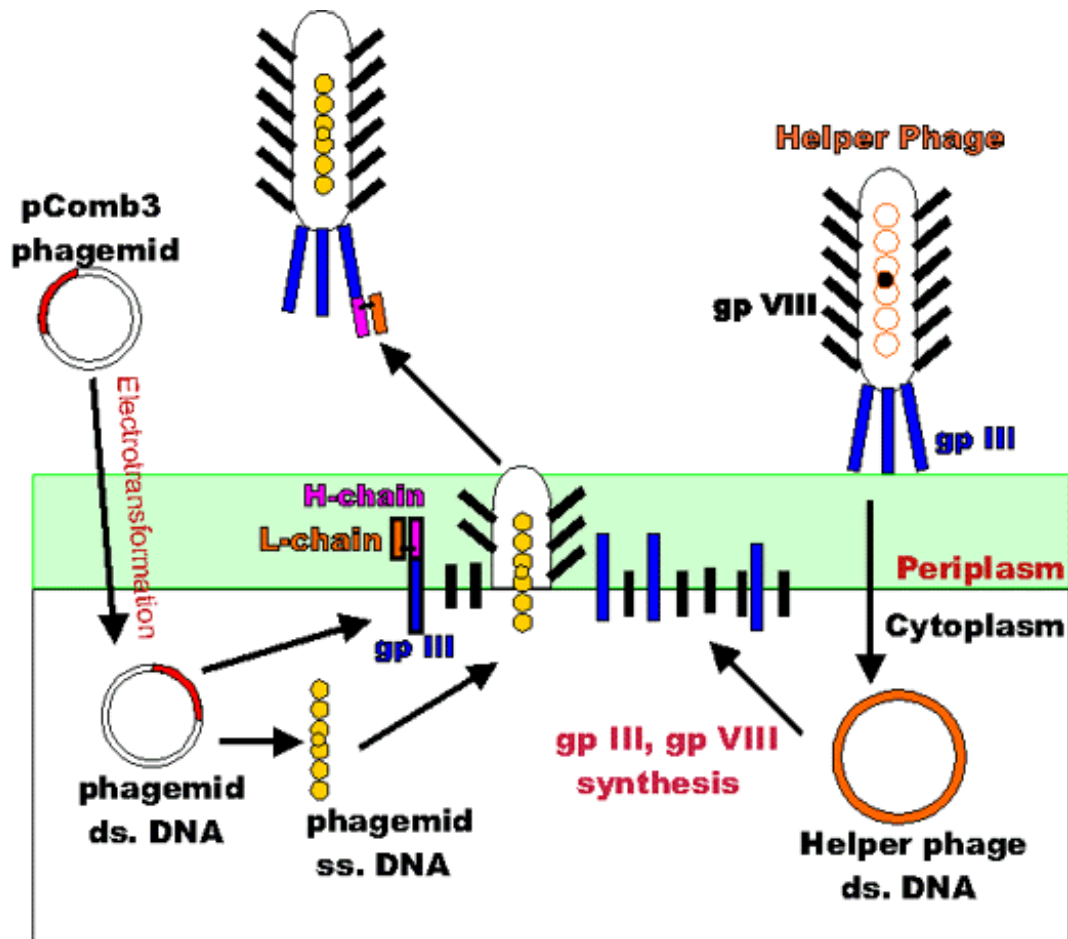
LIGASE

ELECTROTRANSFORMATION TO XL-1 BLUE



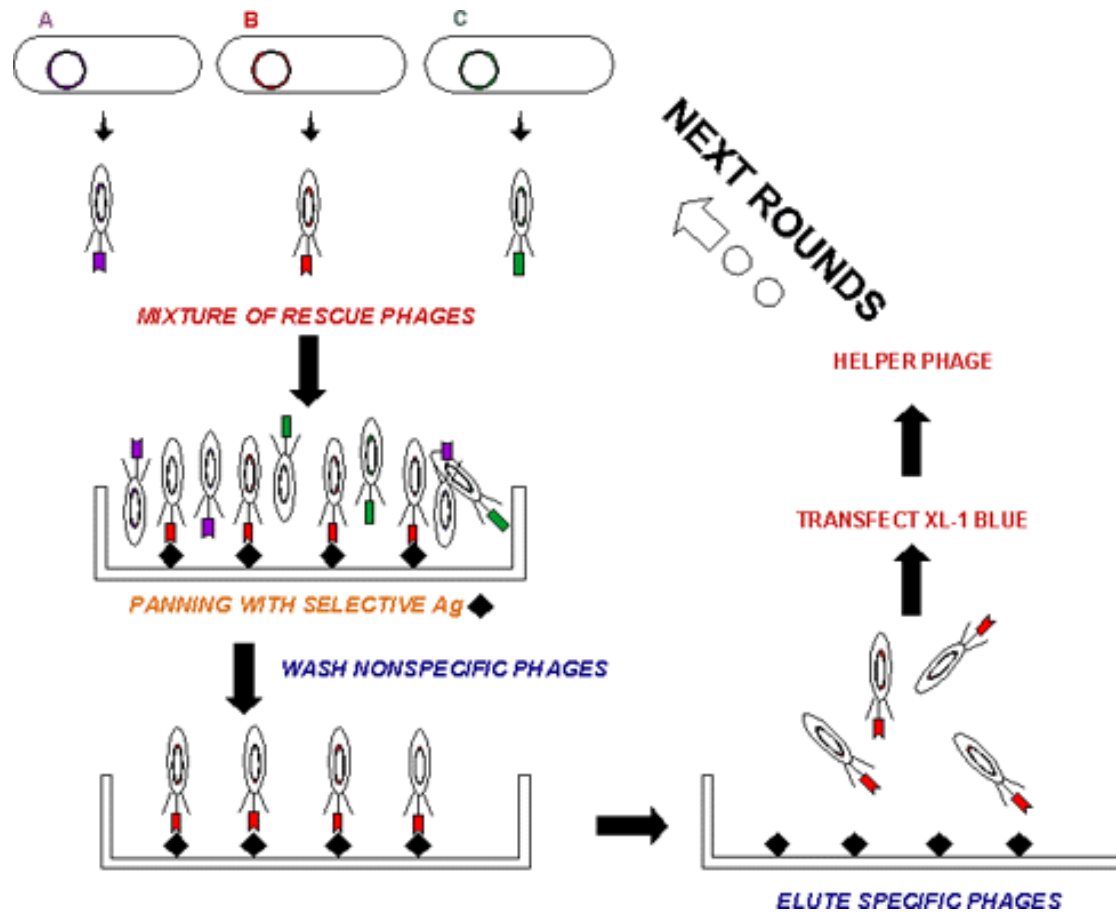
Priprava virionov

Fagmidni vektorji za tvorbo virionov rabijo pomožni fag.



Selekcija

Postopek selekcije klonov ('izpiranje'):



Postopek selekcije

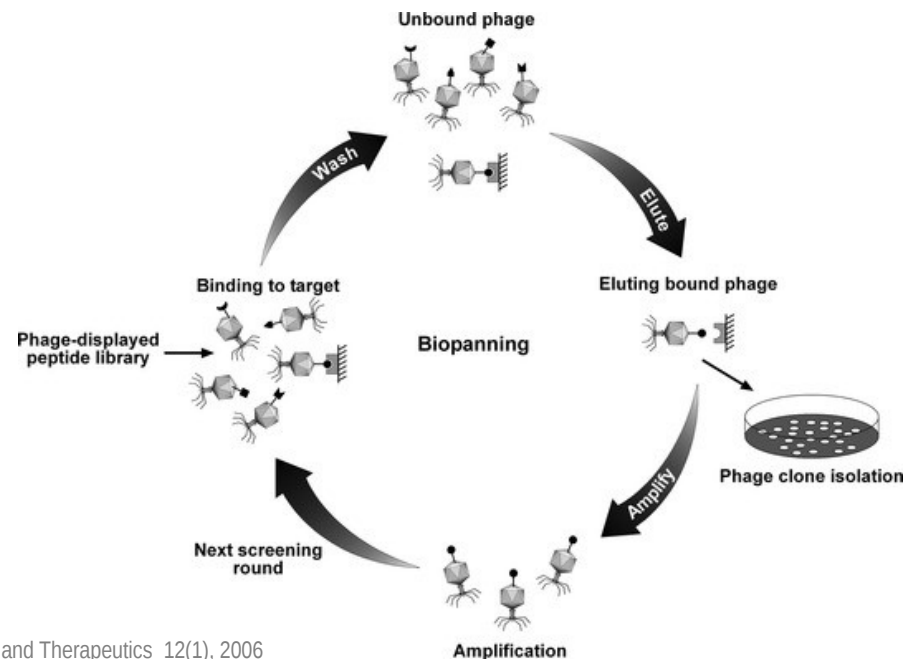
Pri selekciji lahko delamo tudi s 5×10^{10} različnimi kloni hkrati. Peptidna knjižnica z naključno razporeditvijo 7 aa ima $6,4 \times 10^7$ različnih zapisov, taka z 12 aa pa 4×10^{15} zapisov. Ker imajo običajne peptidne knjižnice $10^8 - 10^9$ različnih klonov, pomeni da knjižnice z 12-mernimi peptidi na površini fagov niso več popolne.

Z vsakim ciklom selekcije (izpiranja) dosežemo 100-1000x izbor. Običajno postopek ponovimo 3x. Molekule, ki delujejo kot tarče, so običajno imobilizirane; lahko so tudi cele celice. Detekcija vezave je direktna (npr. ELISA s protitelesi proti proteinom fagnega plašča).

Po končani selekciji analiziramo nukleotidna zaporedja fragmentov v fagni DNA. Zaporedja so običajno zelo podobna, tako da lahko na podlagi prileganja zaporedij lahko določimo konsenzno zaporedje, ki je odločilno za močno interakcijo s tarčnimi molekulami (ligandi).

Primer uporabe v odvisnosti od liganda:

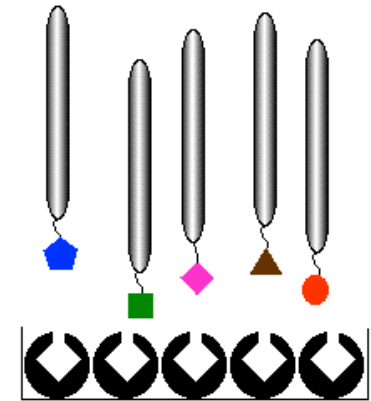
Z na površini izraženimi naključnimi peptidi bi lahko določili substratno specifičnost neke nove proteaze. Če pa bi na površini izrazili različne cDNA iz npr. rakastih celic, bi lahko ugotovili, ali je v njih kakšen encim, ki cepi laminin (in morda tako prispeva k prehodu bazalne membrane pri metastaziranju).



Predstavitev na površini: Uporaba

Aplikacije:

- mapiranje epitopov
- mapiranje kontaktnih regij med proteini
- identifikacija encimskih substratov/inhibitorjev
- identifikacija agonistov/antagonistov receptorjev



- cepiva (žive vakcine; imobilizirani antigeni so pogosto bolj imunogeni od prostih)
- diagnostična sredstva (na površini so fragmenti Ab)
- čiščenje v okolje sproščenih snovi (npr. *E. coli* s His6 na površini učinkovito veže Cd²⁺ iz okolja)
- biokatalizatorji (npr. β -laktamaza na površini *Staphylococcus carnosus*: 10.000 imobiliziranih aktivnih molekul na 1 celici)

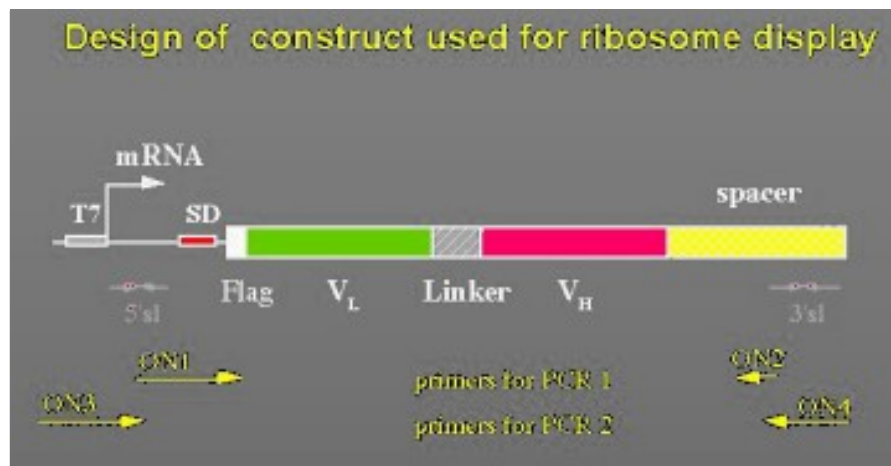
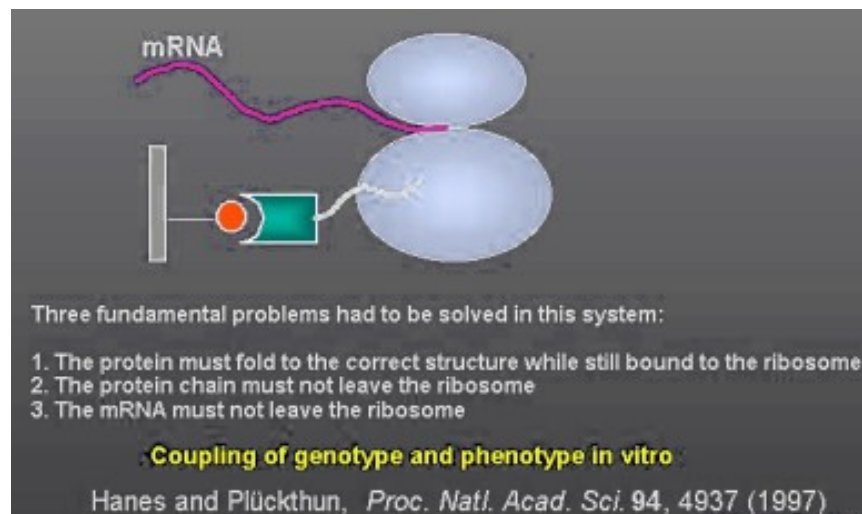
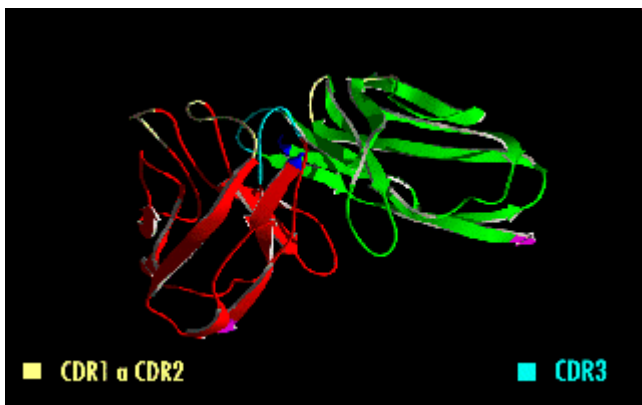
Zaradi posttranslacijskih modifikacij preiskovanega proteina moramo včasih poseči po evkariontskih sistemih za predstavitev na površini.

Ribosomski sistem omogoča presejanje do 10^{13} variant zapisa ter najlažji dostop do genetske informacije. Poskus izvajamo v brezceličnem sistemu, zato ni omejitev, ki jih predstavlja stopnja transformiranja gostiteljskih celic.

Predstavitev na ribosomih /1

Ribosomi predstavljajo idealno združitev proteinske informacije in zapisa zanjo. Da bi lahko zamrznili sistem v položaju, ko sta na ribosomu 'imobilizirana' RNA in pravilno zviti protein, so pripravili konstrukte brez stop-kodona (ki sicer daje signal za odcep obeh komponent z ribosoma), translacijo pa ustavili z ohladitvijo na ledu ob dodatku Mg-acetata.

Konstrukt scFv so pripravili s fleksibilnim linkerjem med obema variabilnima deloma, na 3'-koncu pa je bil zapis za distančnik, ki je omogočal zvijanje sintetiziranih domen izven ribosoma.



Predstavitev na ribosomih /2

Princip predstavitve na ribosomih

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4937-4942, 1997)

Presejanje knjižnic nativnega scFv (enoverižni konstrukt variabilnega dela protiteles) za vezavo liganda (Ag):

1: knjižnico DNA z zapisi za scFv pomnožimo s PCR in ob tem vgradimo T7-promotor, RBS in zaporedja, ki tvorijo zanke; prepisemo v RNA

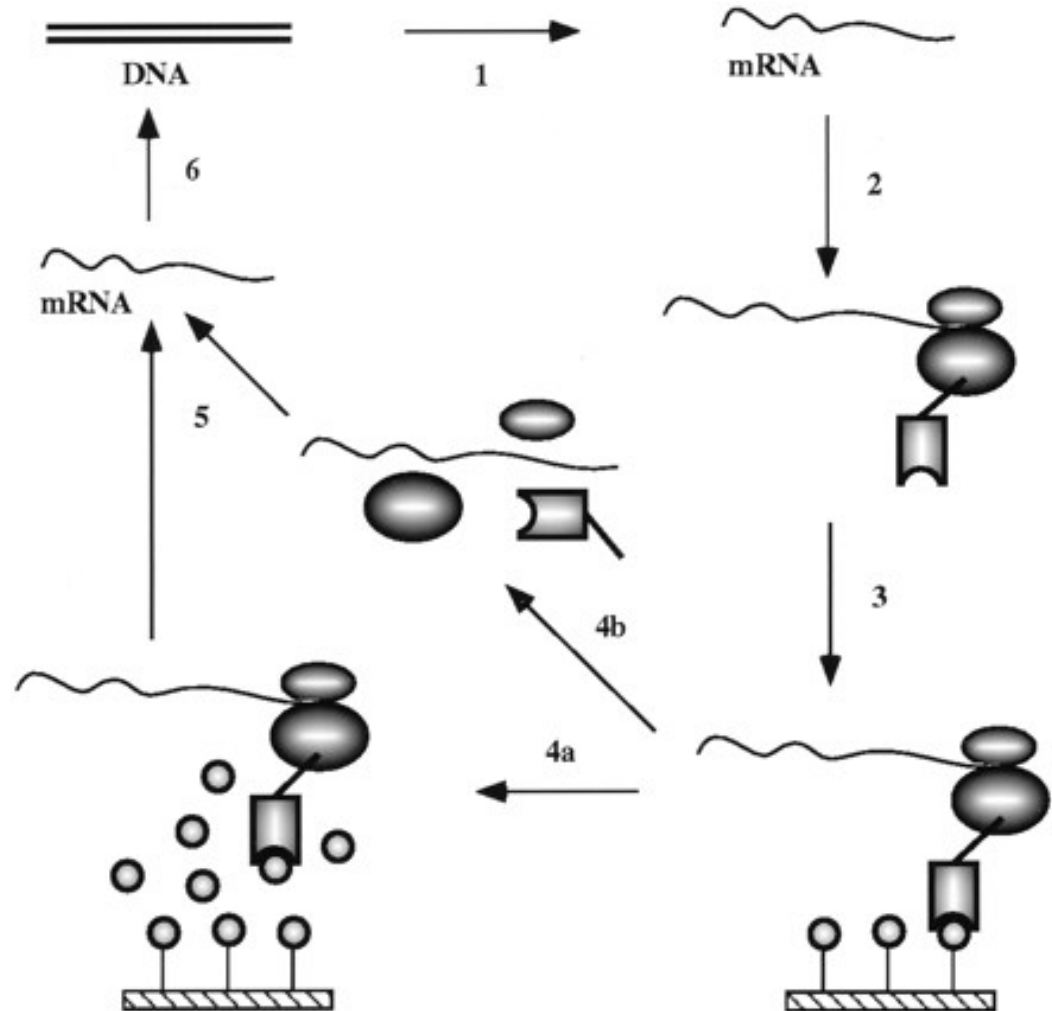
2: Očiščeno mRNA prevedemo *in vitro* v sistemu *E. coli* S-30 v prisotnosti faktorjev, ki povečujejo stabilnost ribos. kompleksov in izboljšajo zvijte protiteles na ribosomih. Translacijo ustavimo z ohlajanjem (na ledu), ribos. komplekse pa stabiliziramo s povečano konc. Mg.

3: selekcija ribosomskih kompleksov iz translacijske mešanice poteče na podlagi afinitete in to z vezavo rekombinantnih scFv na imobilizirani antigen.

4: Vezane komplekse razbijemo z EDTA (4b) ali jih eluiramo s prebitkom topnega antigena (4a).

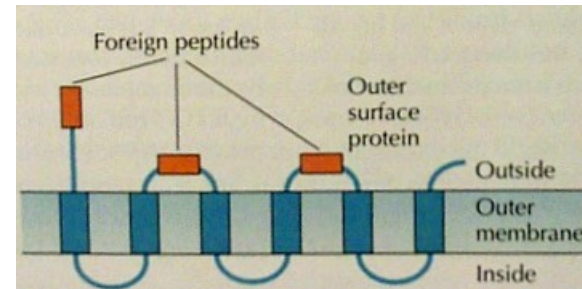
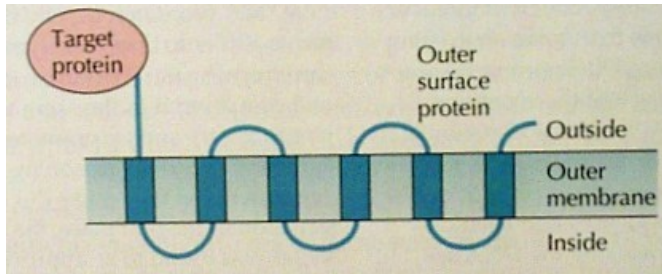
5: RNA izoliramo iz kompleksa

6: mRNA prepisemo v cDNA, to pa pomnožimo s PCR in uporabimo za nadaljnje delo.



Predstavitev na celicah

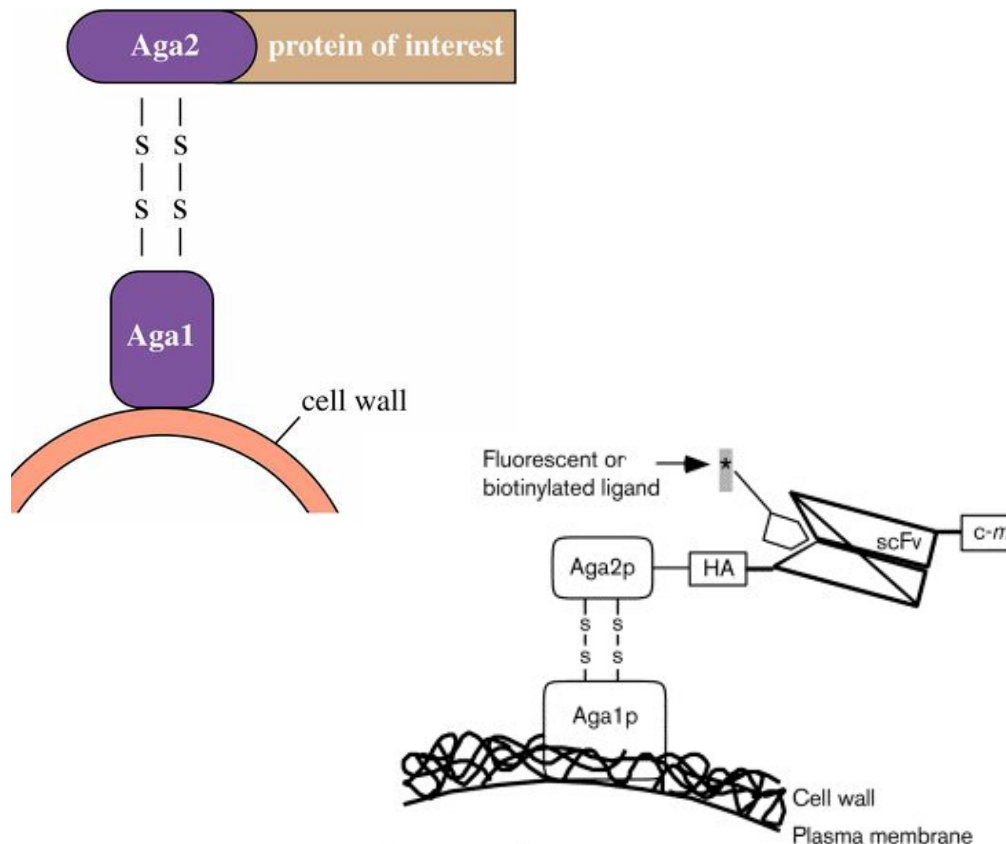
Za predstavitev na površini **prokariotskih** celic (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) pripravimo lahko fuzijski konstrukt, kjer je želeni protein na N- ali C-koncu, krajše peptide pa izrazimo tako, da jih vključimo v regije, ki so locirane na zunanji površini proteina. Uporabni 'gostiteljski' proteini so OmpA, LamB (maltoporin), flagelin in PAL (lipoprotein, povezan s peptidoglikanom).



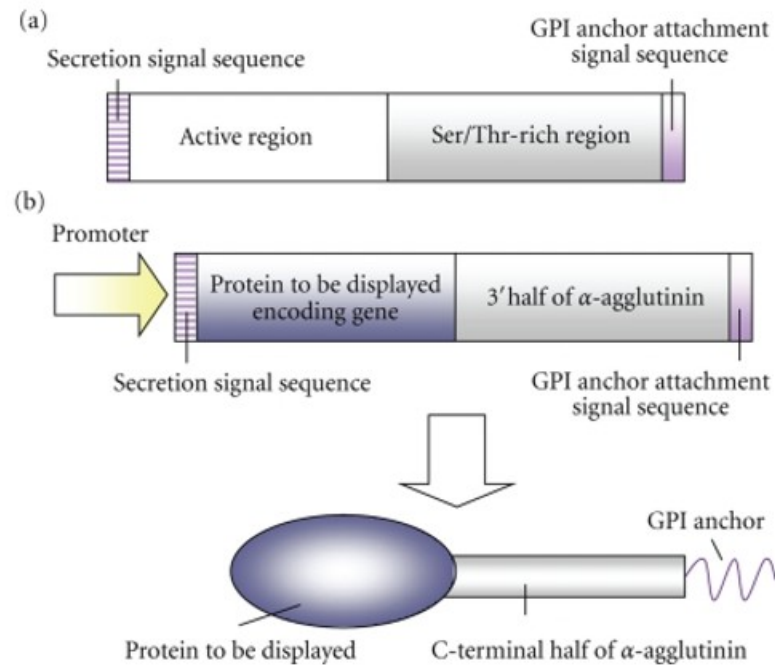
Predstavitev na celicah /2

Pri predstavitvi proteinov na površini **kvasovk** pripravimo fuzijski protein z adhezijskim receptorjem α -aglutininom (Aga1).

Receptor ima 2 podenoti; fuzijski protein pripravimo s podenoto Aga2 (na vektorju) pod kontrolo promotorja *gal*, ki uravnava tudi izražanje Aga1 (na kromosomu). Aga1 se poveže z membrano s fosfatidilinozitolglikanskim sidrom, z Aga2 pa preko S-S. (Boder&Wittrup, Nature Biotechnology, 1997)



Current Opinion in Biotechnology



J. Biomed. Biotechnol. (2011)

Izražanje na površini mikroorganizmov

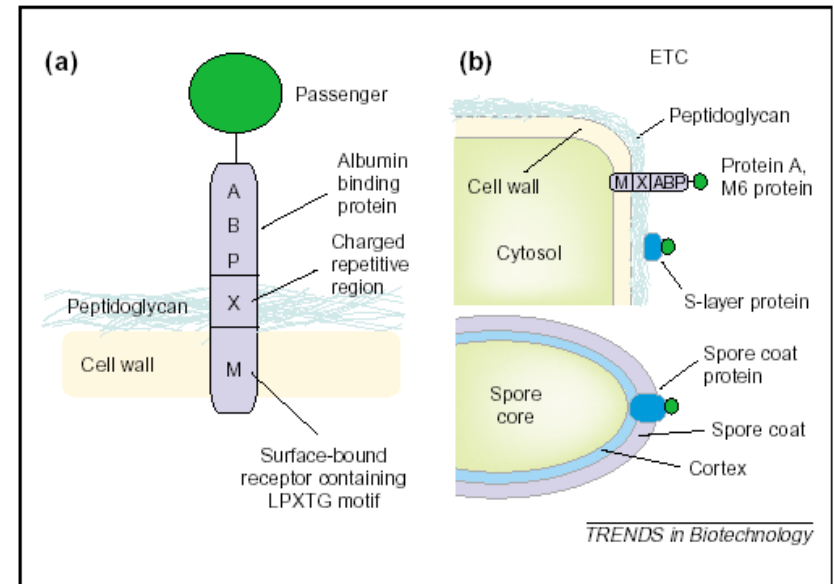
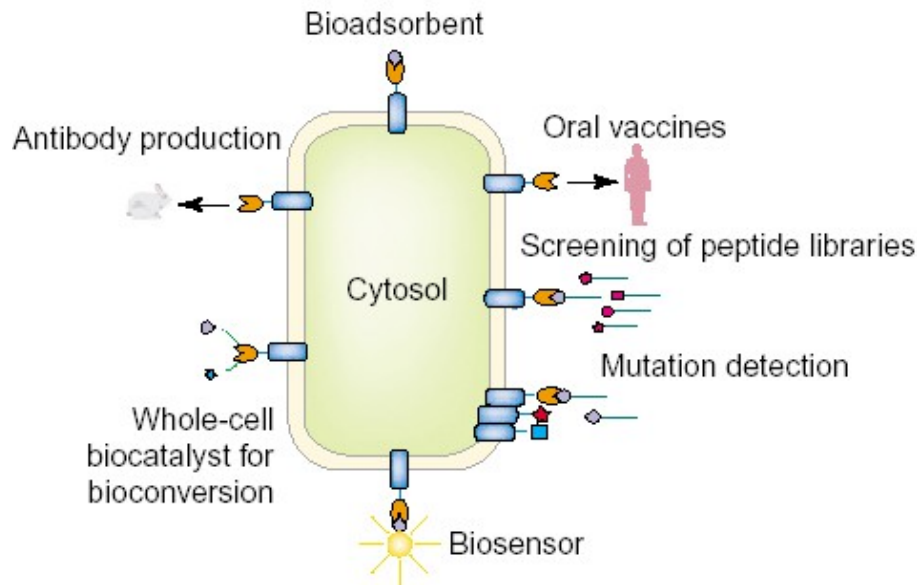


Fig. 3. Cell-surface display systems in Gram-positive bacteria; green circles represent heterologous passenger proteins. (a) Cell-surface display system using staphylococcal protein A, which is a representative example of the N-terminal fusion method. (b) Schematic illustration of surface display systems constructed in Gram-positive bacteria. Several patents are available for using protein A as an anchoring motif (WO9709437, US5616686, WO9318163, US5958736, WO9640943 and US5821088).

TRENDS in Biotechnology Vol.21 No.1 January 2003, 45-52



Review

TRENDS in Biotechnology Vol. not known No. not known Month 0000

Microbial cell-surface display

Sang Yup Lee^{1,2}, Jong Hyun Choi^{1,2} and Zhaohui Xu¹

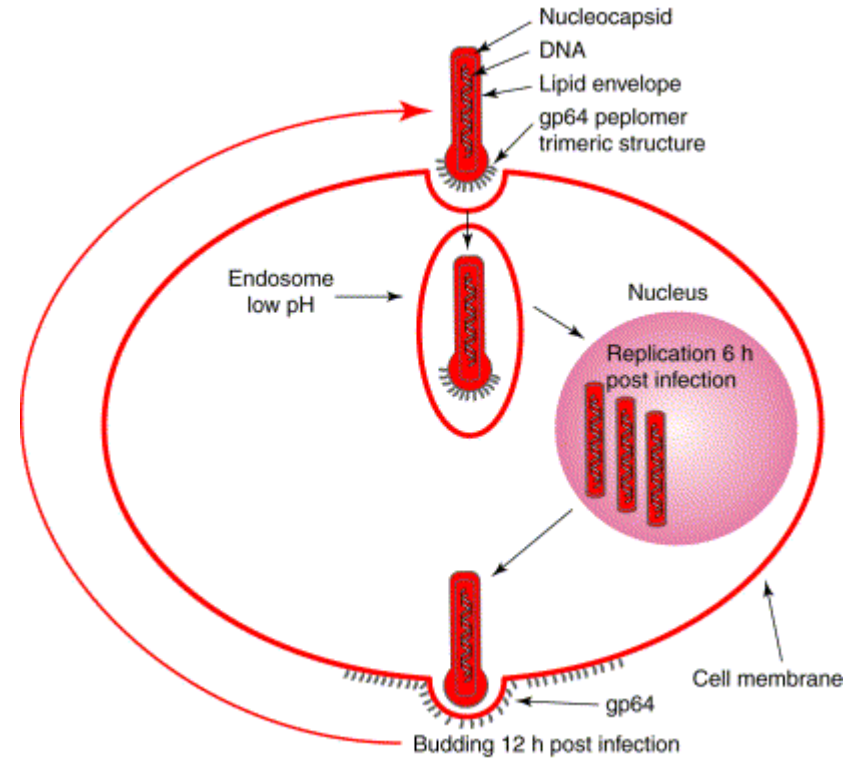
Grampozitivne bakterije so bolj uporabne za predstavitev na površini, ker imajo samo 1 membrano (lažji prehod proteinov), so bolj rigidne (zaradi debelejšje stene) in omogočajo vnos daljših insertov v naravne membranske proteine. Gramnegativne bakterije so primernejše za pripravo knjižnic, ker jih je lažje transformirati, pa tudi proteini na površini so bolj stabilni, ker izločajo manj proteaz kot grampozitivne bakterije.

Predstavitev na bakulovirusih

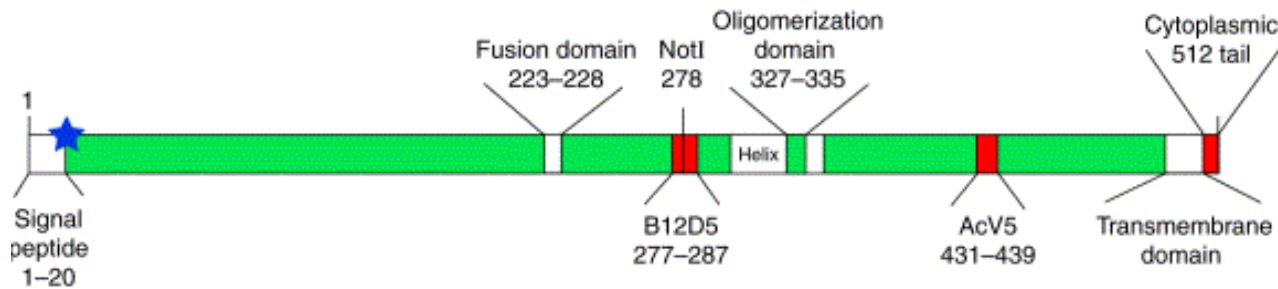
Pripraviti moramo fuzijo s poveljnim površinskim glikoproteinom gp64 v virusu AcMNPV.
V bakulovirusnih virionih tvori trimere na površini; tja se vgrajuje preko membrane gostiteljske celice, kjer je izražanje najmočnejše 8 h in 24 h po infekciji (dvofazni promotor).

Fuzijo lahko konstruiramo tako, da zapis vgradimo tik za zapisom za signalno zaporedje gp64 ali v mesto *NotI* v sredini gena.

(Grabherr et al., Trends in Biotechnology, 2001)

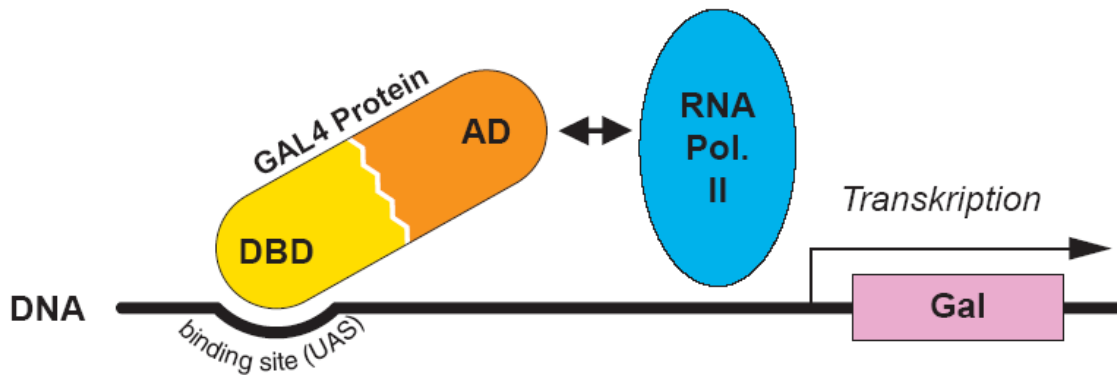


TRENDS in Biotechnology



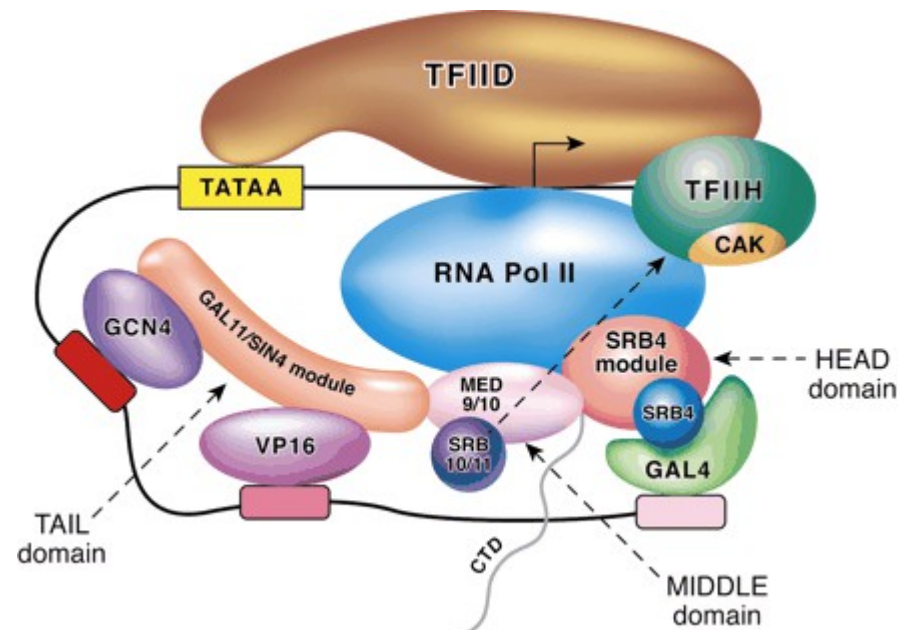
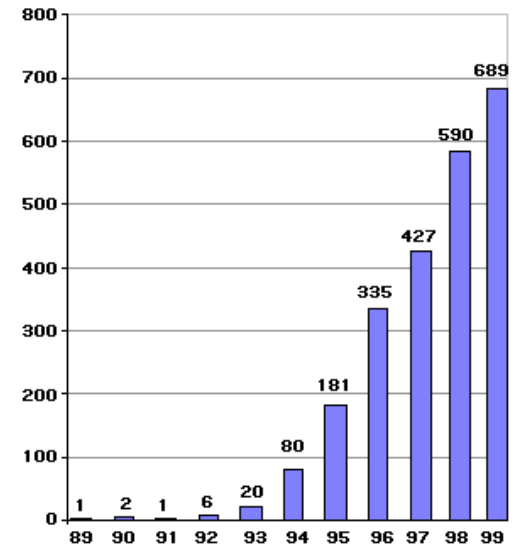
TRENDS in Biotechnology

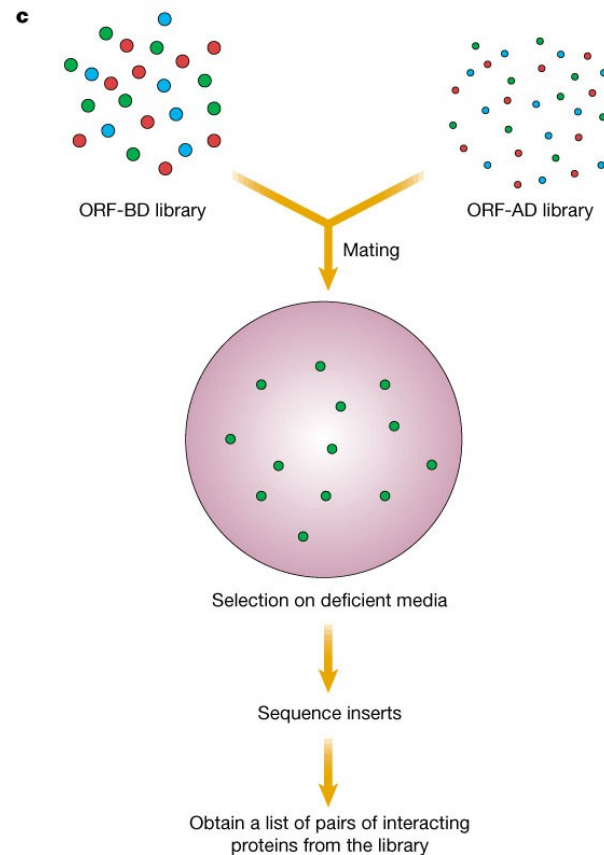
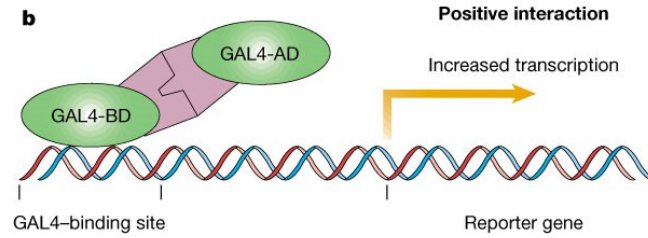
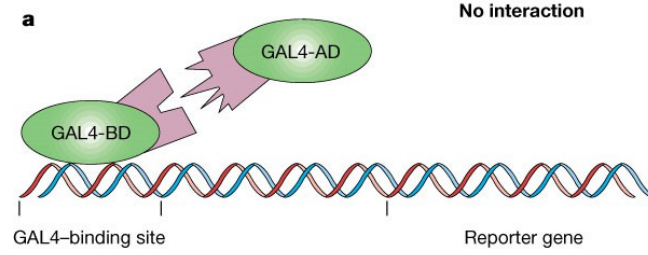
Dvohybridni sistemi



Dvohibridni sistemi izkoriščajo dvofazno naravo aktivacije DNA in deluje po načelu vabe in plena (*bait and prey*).

Fields & Song, Nature 340, 1989

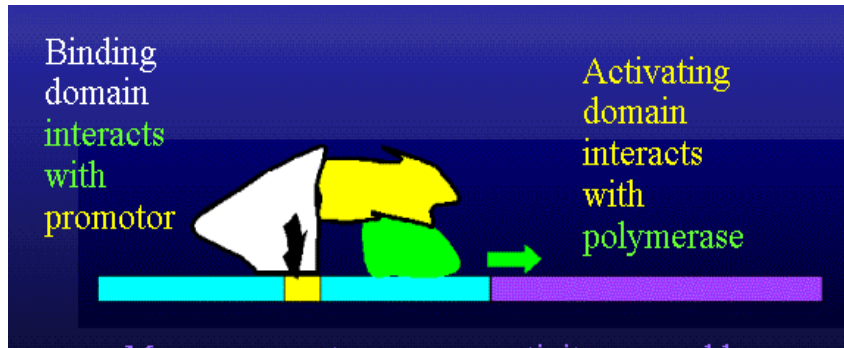




Dvohibridni sistemi

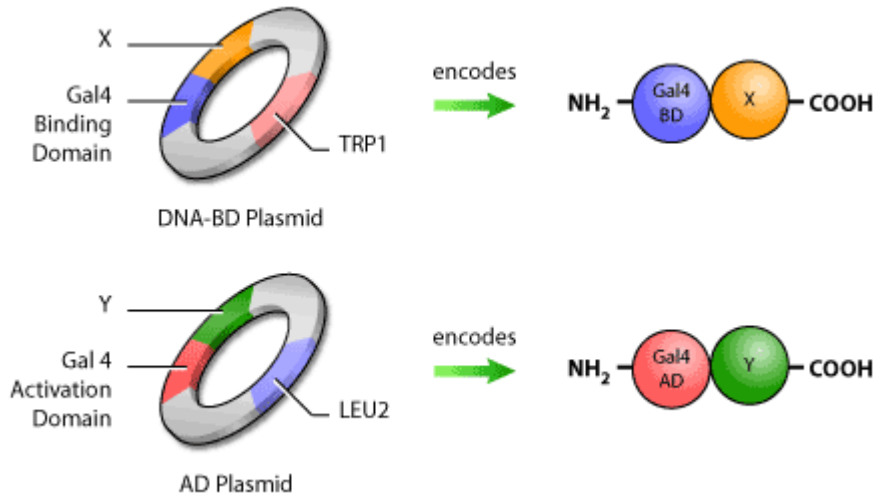
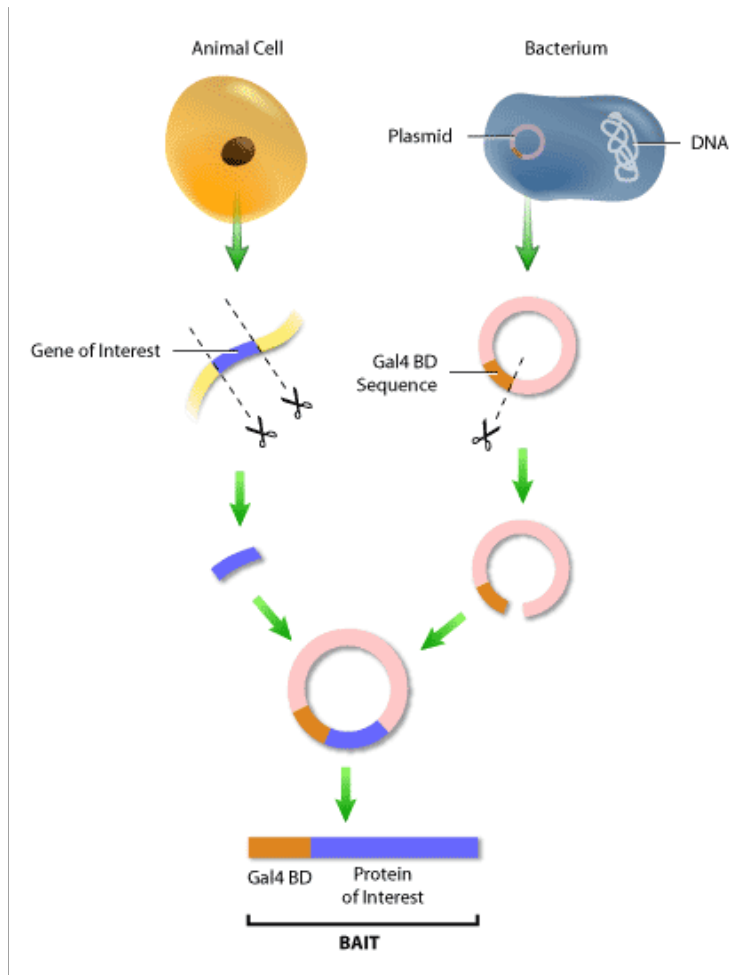
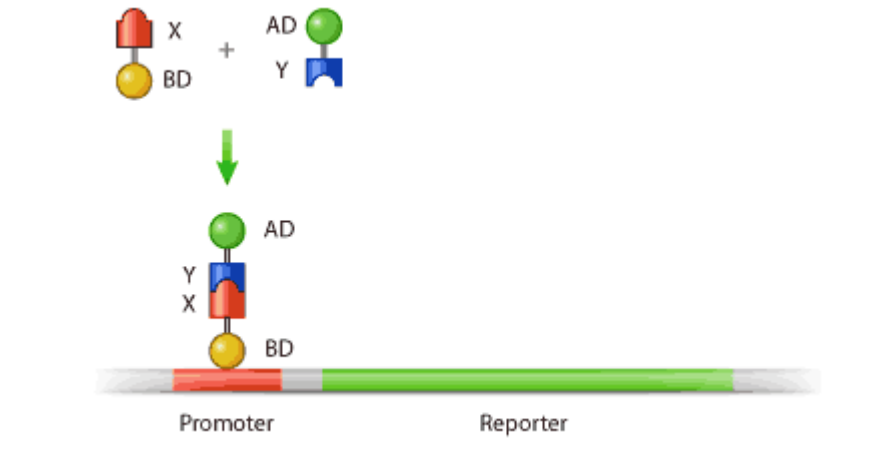
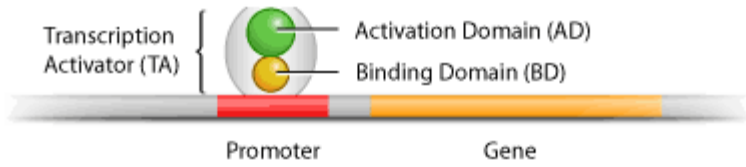
Y2H = dvohibridni sistem kvasovke; obstajata tudi bakterijski in sesalski dvohibridni sistem.

Protein Gal4 pri kvasovkah ima 2 domeni. Ena je odgovorna za vezavo na DNA, druga pa deluje kot transkripcijski aktivator.



Domeni se lahko izražata tudi kot ločeni polipeptidni verigi. Protein začne delovati, čim pride do stika obeh domen. Če promotor *gal* regulira prepisovanje npr. β -galaktozidaze, lahko zaznamo aktivnost preko kromogenega substrata.

Na vsako od domen pa lahko vežemo še druge proteine. Če pride do interakcije med fuzijskimi deli, bo stekla tudi interakcija med domenama Gal4 in interakcijo bomo zaznali preko aktivnosti reporterskega sistema.



Dvohibridni sistem kvasovk:

genetski test za določanje interakcij med proteini

Predpostavimo, da imamo dva proteina...

in vprašanje je,
ali se vežeta drug na drugega?



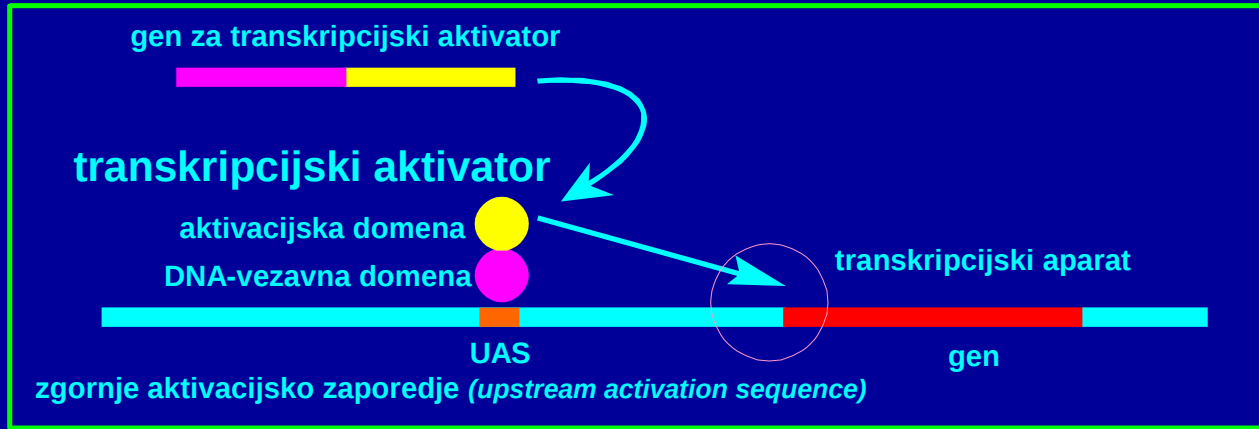
Na to vprašanje lahko odgovorimo s pomočjo dvohibridnega sistema kvasovk.

Da bi razumeli, kako deluje, si moramo najprej ogledati, kako poteka regulacija izražanja genov pri kvasovkah...

Dvohibridni sistem kvasovk:

genetski test za določanje interakcij med proteini

Regulacija izražanja genov pri kvasovkah

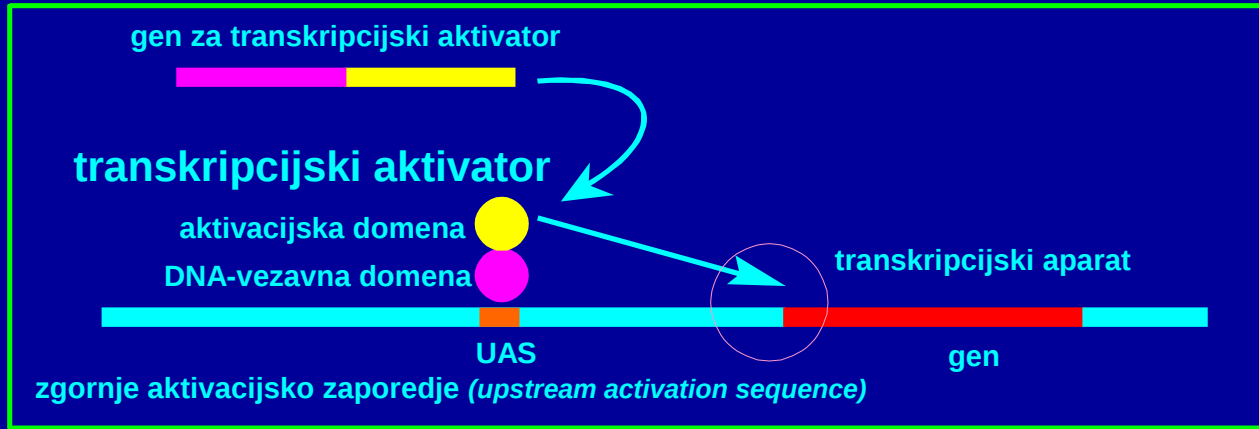


vrnimo se k osnovnemu vprašanju:

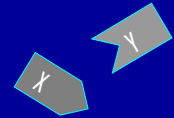
Dvohibridni sistem kvasovk:

genetski test za določanje interakcij med proteini

Regulacija izražanja genov pri kvasovkah



Ali se ta dva proteina vežeta drug na drugega?



Izhodišče so kvasovke z zapisom za reporterski gen (gen z zapisom za protein, ki ga je lahko detektirati).

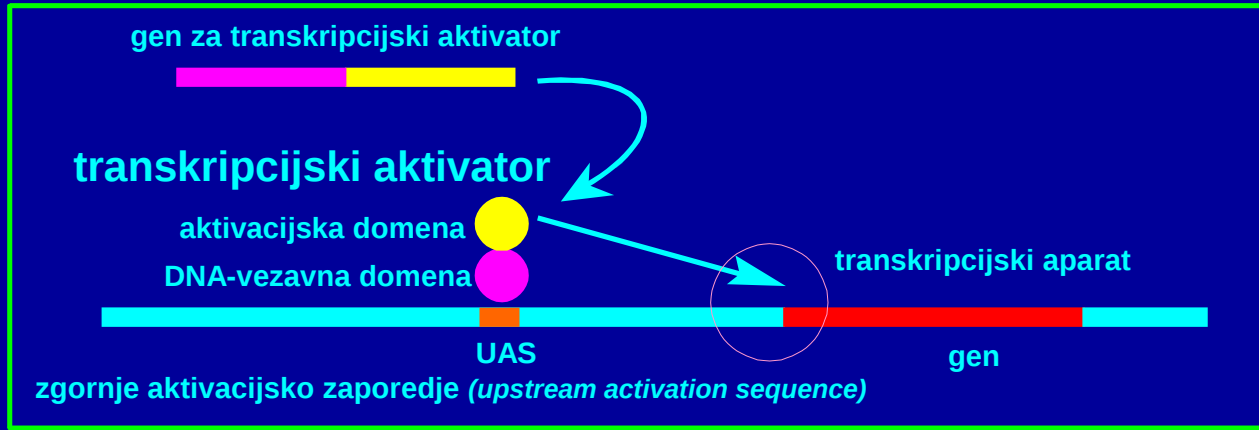


Zdaj pa vnesemo gena z zapisi za dva hibridna proteina:

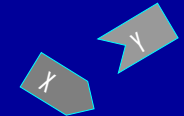
Dvohibridni sistem kvasovk:

genetski test za določanje interakcij med proteini

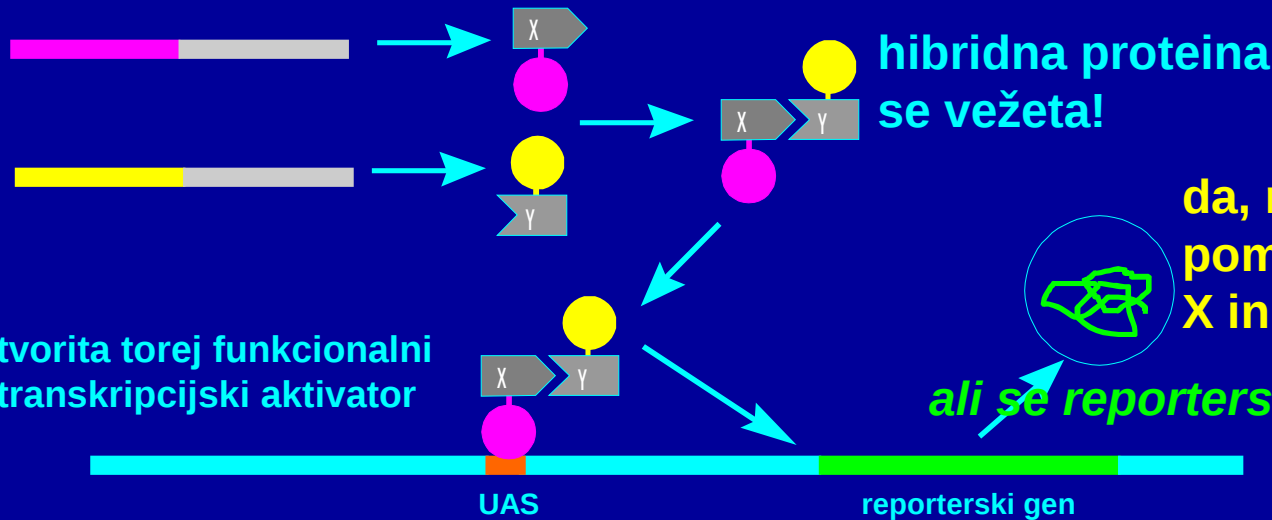
Regulacija izražanja genov pri kvasovkah



Ali se ta dva proteina vežeta drug na drugega?



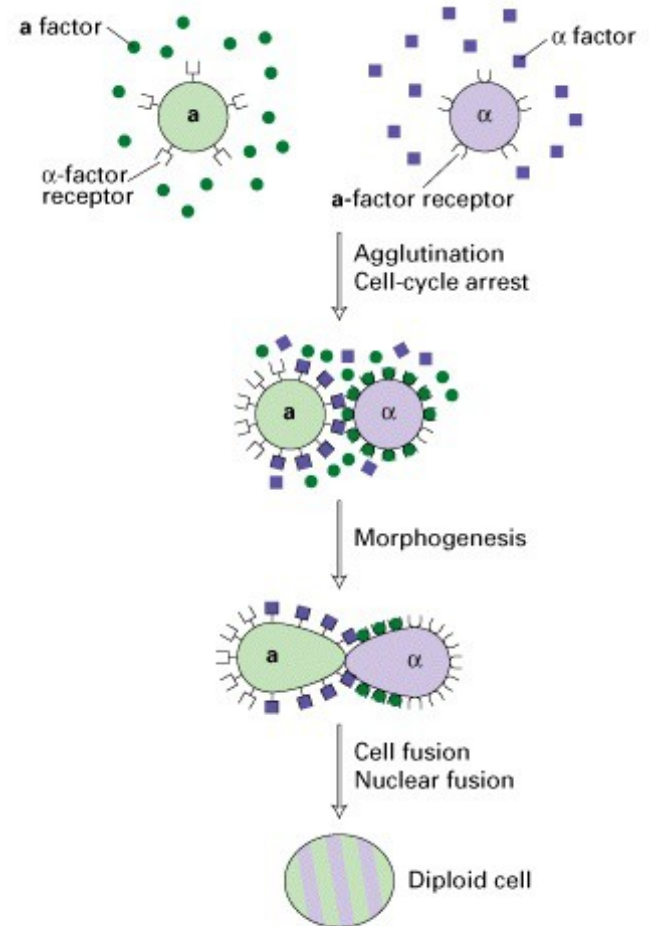
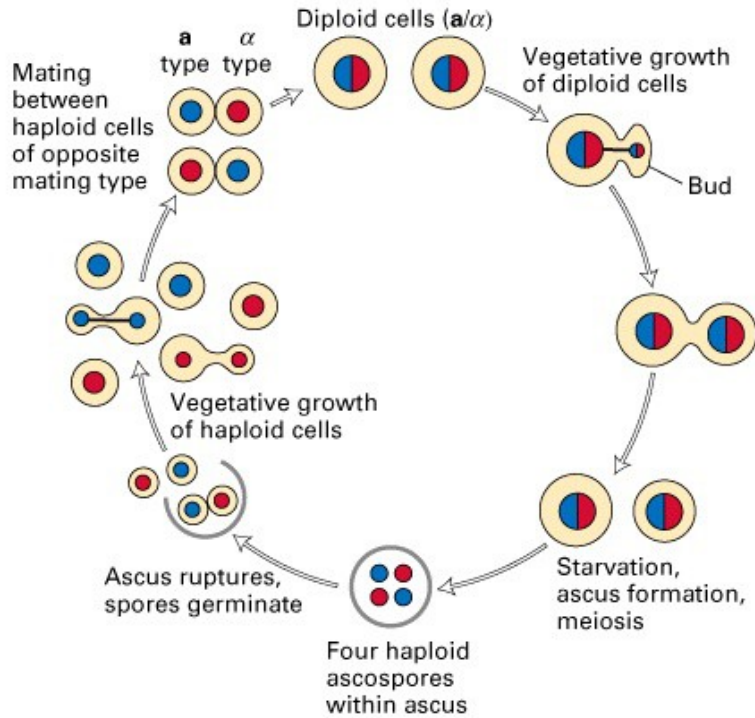
genska konstrukta



da, reporter se je izrazil, kar pomeni, da se proteina X in Y vežeta!

ali se reporterski protein izraža?

Življenjski cikel kvasovk / parjenje



Dvohibridni sistem kvasovk /2

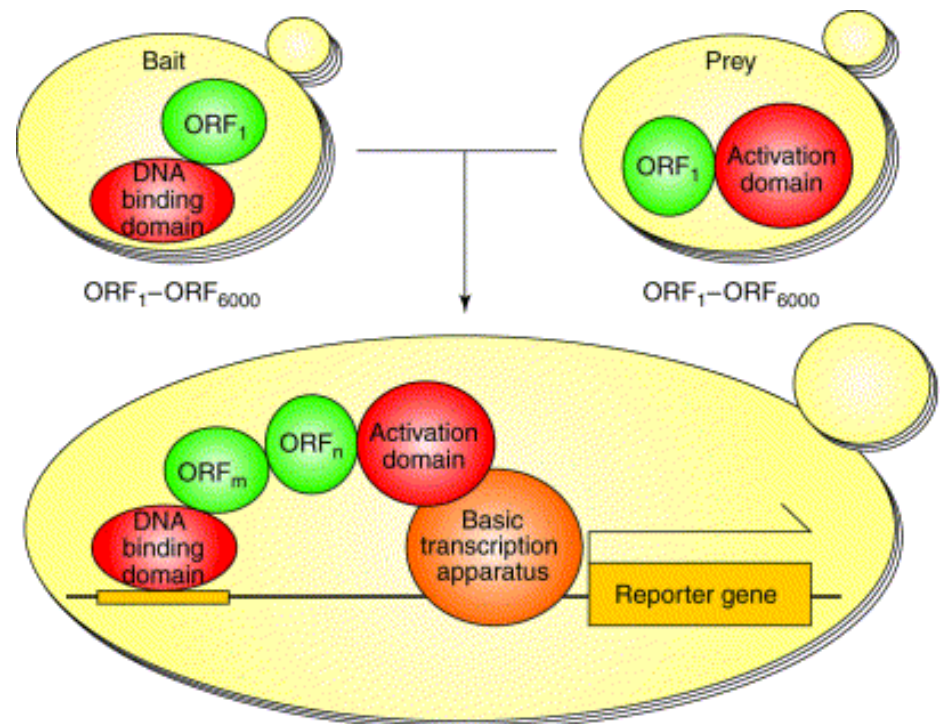
Običajno v dvohibridnih sistemih uporabljamo za identifikacijo dva sistema hkrati: ob reporterskem sistemu še selekcijski marker (npr. popravljanje okvarjenega gena *his*). Tako zrastejo na ploščah le tisti kloni, pri katerih je do aktivacije prišlo, kar nam še olajša selekcijo pozitivnih klonov.

Poskus izvedemo tako, da v enem sevju kvasovk (MAT α) v plazmidu pripravimo fuzijske proteine z domeno, ki se veže na DNA, v drugem sevju (MAT α) pa fuzijske proteine z aktivacijsko domeno. Na vsako od domen vežemo po 1 ORF npr. genoma kvasovk (skupaj ~6000, dobljenih s PCR).

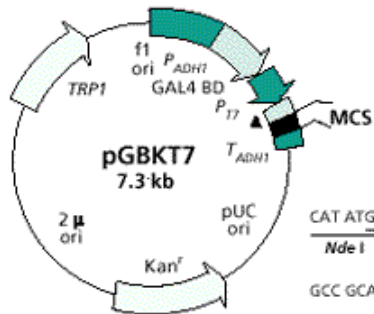
Klone med sabo parimo v vseh možnih kombinacijah. V primerih, kjer ORF med sabo interagirata, bo prišlo do prevajanja reporterskega gena. Če nas zanimajo samo interakcije z nekim določenim proteinom, potem uporabimo zapis zanj za fuzijo z eno od domen Gal4.

Analiza zaporedij na plazmidih v obeh izhodnih sevjih nam da podatek o proteinih, ki interagirata. Rezultati so zelo odvisni od strategije dela in zahtevajo močno podporo bioinformatike.

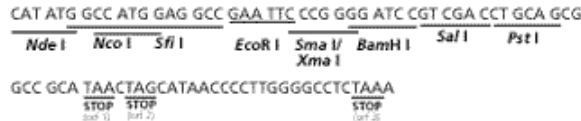
(Ito et al., TIBTECH 19, S23, oktober 2001)



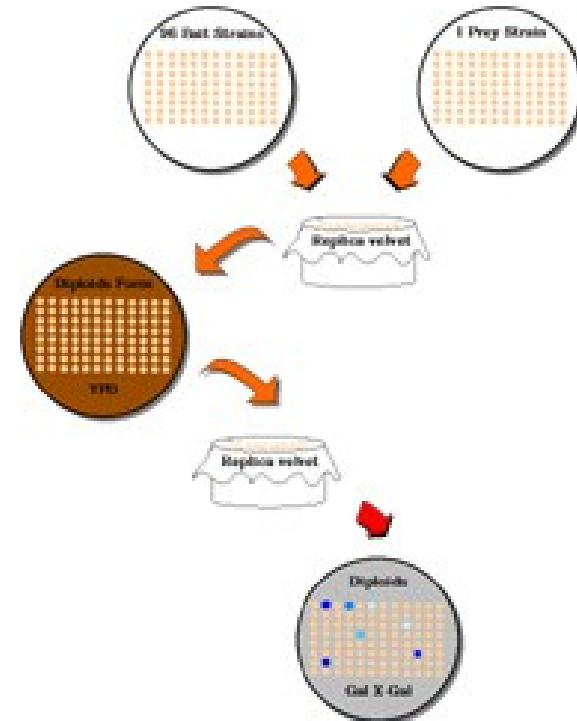
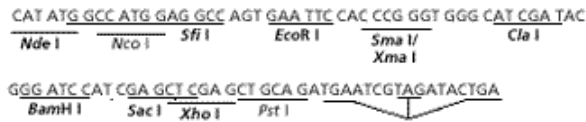
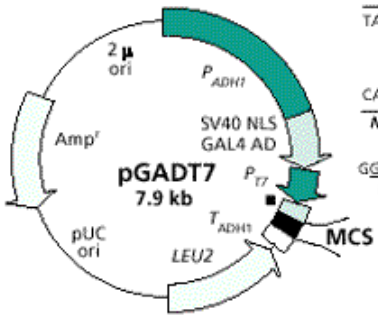
Dvohibridni sistem kvasovk /3



BD Matchmaker™ Two-Hybrid System 3



▲ Myc epitope tag

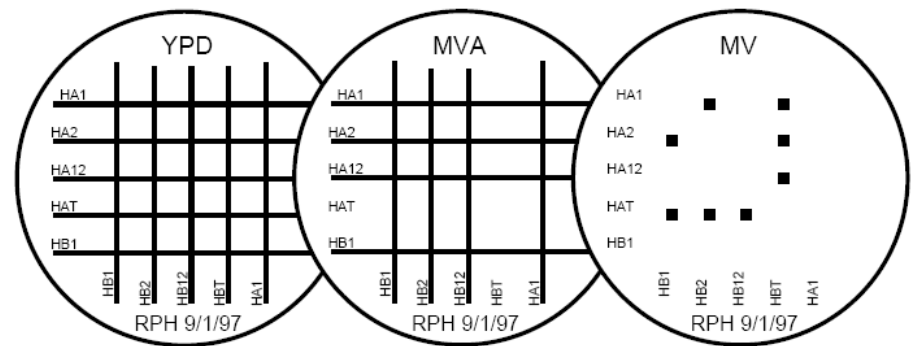
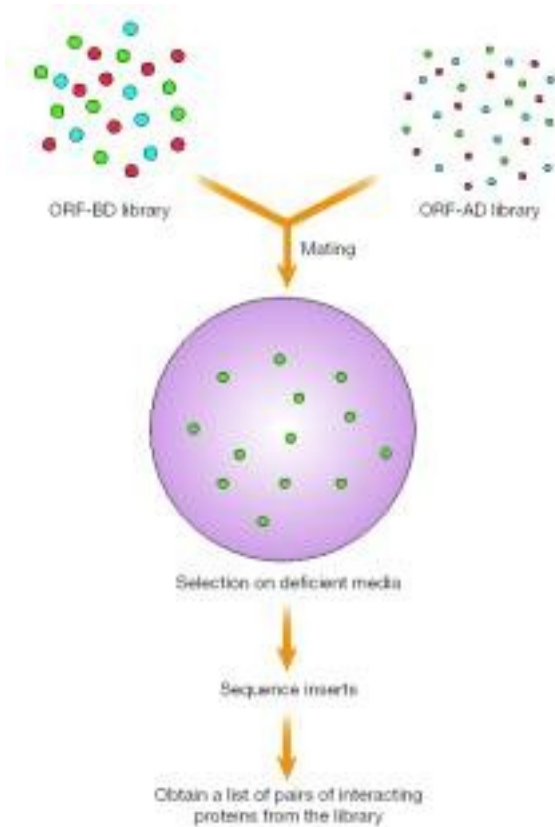


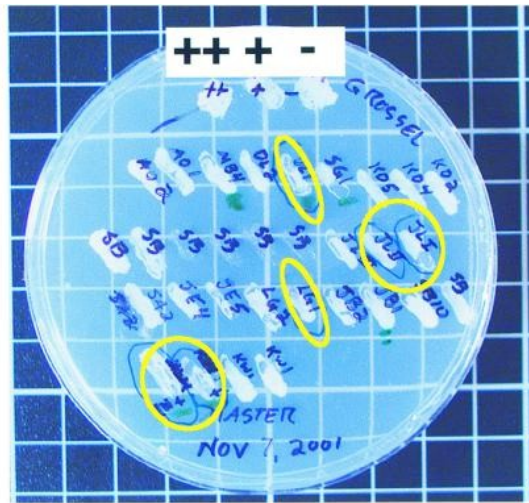
Postopek parjenja med vsemi kloni dveh komplementarnih haploidnih MAT sevov lahko izvedemo s pomočjo prenosa na tkanini. Celice z vabo in celice s plenom prenesemo na isti kos žametne tkanine in odtisnemo na svežo ploščo brez selekcijskega agensa. Na stiku dveh sevov, ki sta rasla na istem mestu, pride do tvorbe diploidnega seva. Regenerirane diploidne kvasovke preko žametne krpice odtisnemo na ploščo s selekcijskim markerjem.

Primer:

- **sev z vabo:**
(raste na plošči brez Trp; platiramo npr. kot vertikalne črte)
- **sev s plenom:**
(raste na plošči brez Leu; platiramo kot horizontalne črte)
- prenesemo na žamet, odtisnemo; na stiku črtic pride do parjenja na plošči YPD (brez selekcije)
- prenesemo na žamet, odtisnemo na ploščo z X-Gal in brez Trp, Leu
- detektiramo intenzivno modre kolonije
- analiziramo zapise na plazmidih v kvasovkah, ki so se obarvale modro (kjer je do interakcije prišlo)

Dvohibridni sistem kvasovk: mikrobiološki del



A

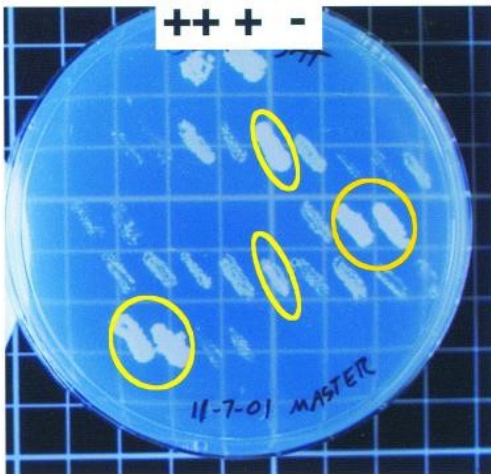
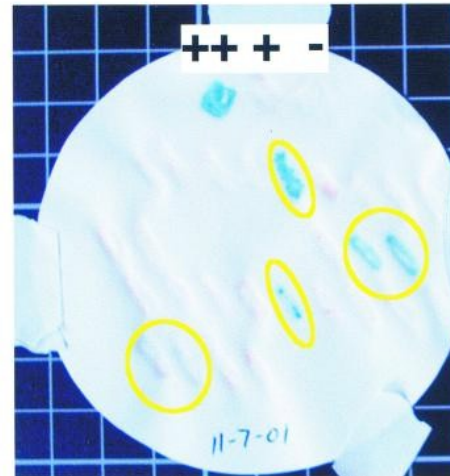
Yeast reporter plates showing a typical outcome of a yeast two-hybrid screen. Controls for the experiment included a strong positive (Fos/Jun; ++), a weak positive (pRB/E2F; +), and a negative (empty vector; -) control yeast strain. Circled yeast colonies are hits.

(A) The master plate containing transformed yeast colonies that are suspected hits and controls (++, +, -) for the experiment.

(B) A 3AT reporter plate. Growth indicates transcriptional activation of the *HIS3* gene. Circled yeast are hits.

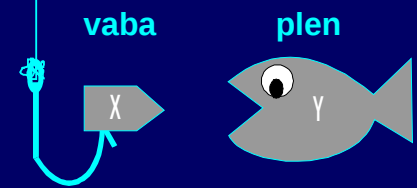
(C) A β -galactosidase assay. Blue color formation indicates transcriptional activation of the *lacZ* gene and a hit. Note that not all yeast that grew well on the 3AT plates turned blue, which likely indicates a weaker protein-protein interaction.

Using the Two-Hybrid Screen in the Classroom Laboratory
Daniel P. Odom and Martha J. Gossel*
Cell Biol Educ. 2002 March; 1: 43

B**C**

(ribo)lov z dvohibridnim sistemom kvasovk

Bruce Jenks, Odd. za celično fiziologijo živali, Univerza v Nijmegnu, Nizozemska
<http://www.celanphy.sci.kun.nl/jenks.htm>



**ali se X veže
na kakšen protein?**

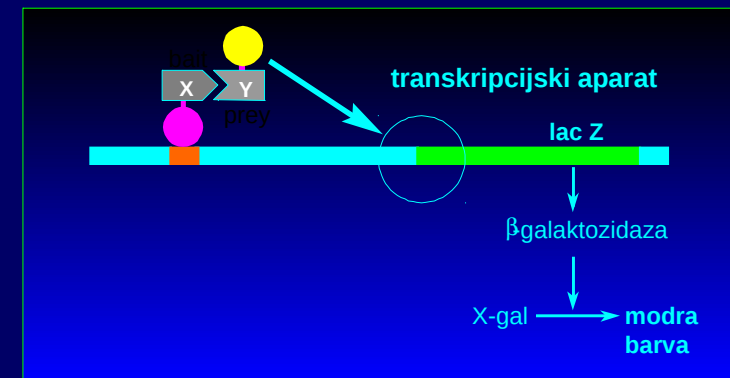
... z drugimi besedami: ali obstaja protein Y?

Da bi to ugotovili, bomo uporabili dvohibridni sistem kvasovk.

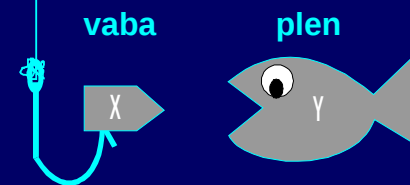
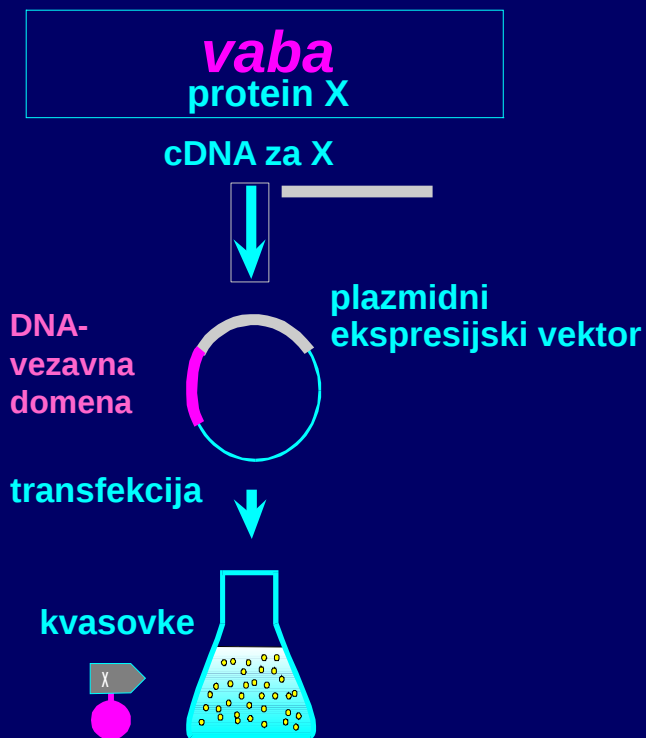
Kot vabo bomo uporabili X... in lovili Y.

Skica na desni opisuje, kako deluje dvohibridni sistem pri kvasovkah.

(če ne razumete, kako deluje, si oglejte razlago samega sistema še preden se odpravite loviti!)

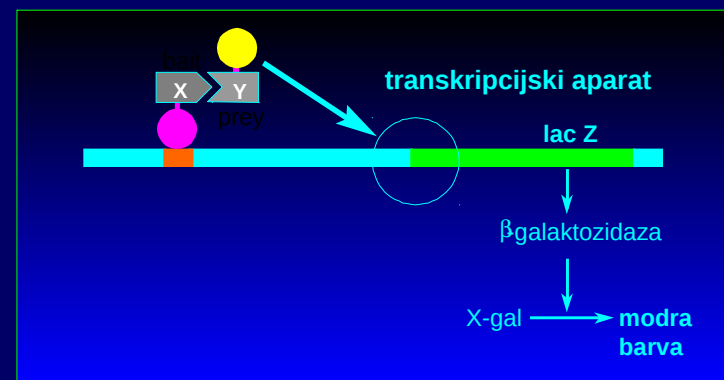


(ribo)lov z dvohibridnim sistemom kvasovk

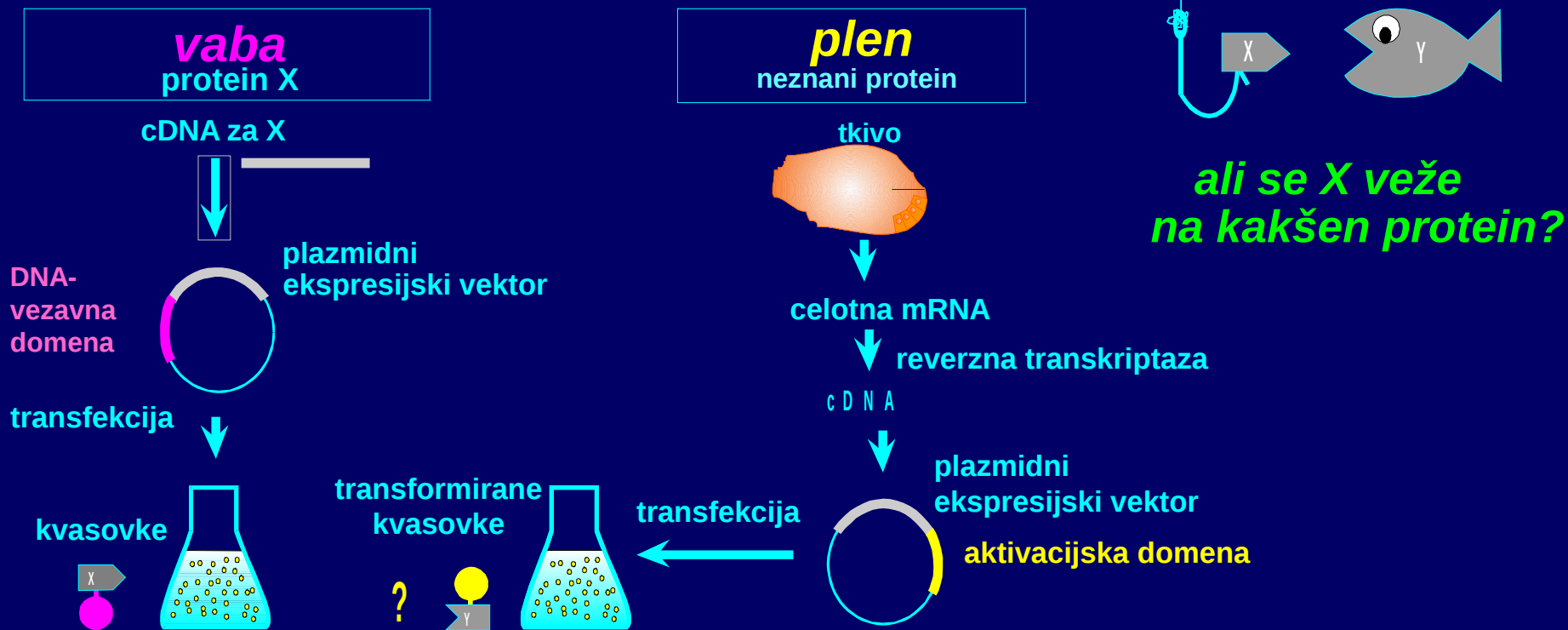


ali se X veže na kakšen protein?

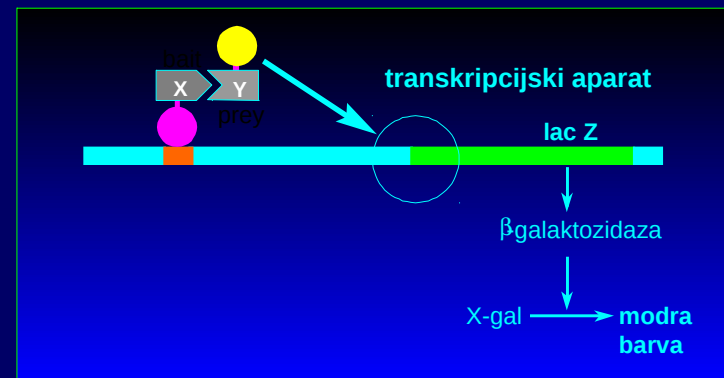
Na začetku bomo pripravili kvasovke, ki bodo izražale protein X...



(ribo)lov z dvohibridnim sistemom kvasovk



Zdaj pripravimo še kvasovke, ki bodo izražale protein Y (če ta sploh obstaja)....



(ribo)lov z dvohibridnim sistemom kvasovk

vaba
protein X

plen
neznani protein

vaba

plen

*ali se X veže
na kakšen protein?*

cDNA za X

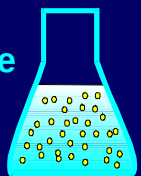


DNA-
vezavna
domena

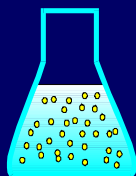
plazmidni
ekspresijski vektor

transfekcija

kvasovke



transfekcija

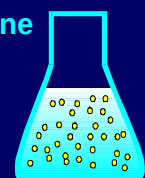
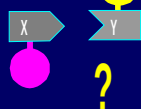


aktivacijska domena

transfekcija

izolacija plazmidov

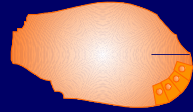
retransformirane
kvasovke



Zdaj pripravimo retransformirane kvasovke.

**Y smo ujeli, če pride do izražanja
reporterskega gena (lac).**

tkivo

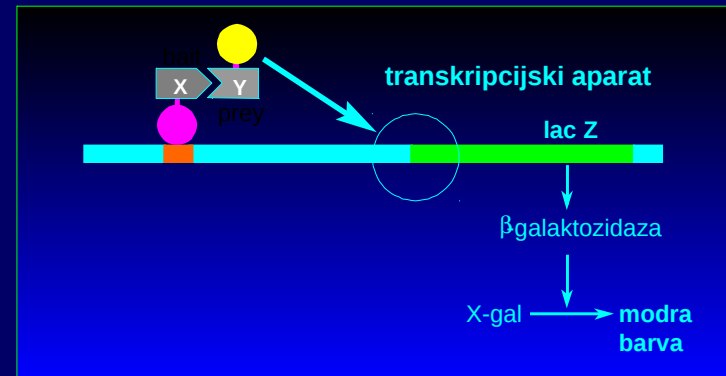


celotna mRNA

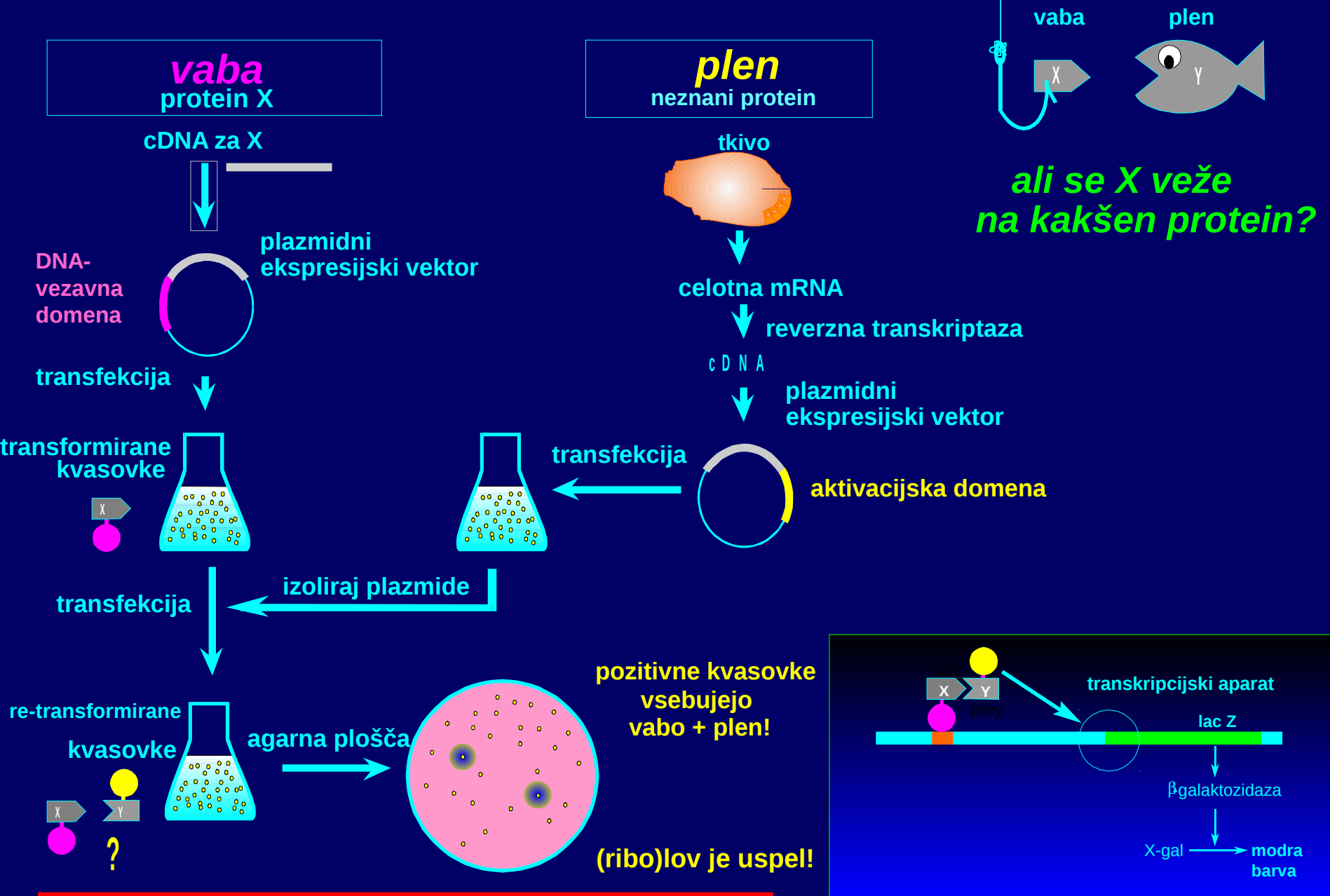
reverzna transkriptaza

cDNA

plazmidni
ekspresijski vektor



(ribo)lov z dvohibridnim sistemom kvasovk



Dvohibridni sistemi: Analiza

Po identificiranju sevov, ki kažejo na interakcijo med vabo in plenom, je treba interakcijo dokazati v ponovljenem poskusu s samo izbranimi kombinacijami.

Vseeno je število lažnih pozitivnih signalov lahko veliko. So rezultat nespecifičnega delovanja na vabo, ki je že sama šibak aktivator reporterskega gena (povečajo konc. vabe v celici) ali zaradi stabilizacije produkta. Molekule plena lahko delujejo na regije navzgor od promotorja reporterskega gena, do lažno pozitivnih (nefizioloških) interakcij pa lahko pride tudi zaradi tega, ker so naravni proteini v celicah lokalizirani v različnih razdelkih kot v dvohibridnem sistemu.

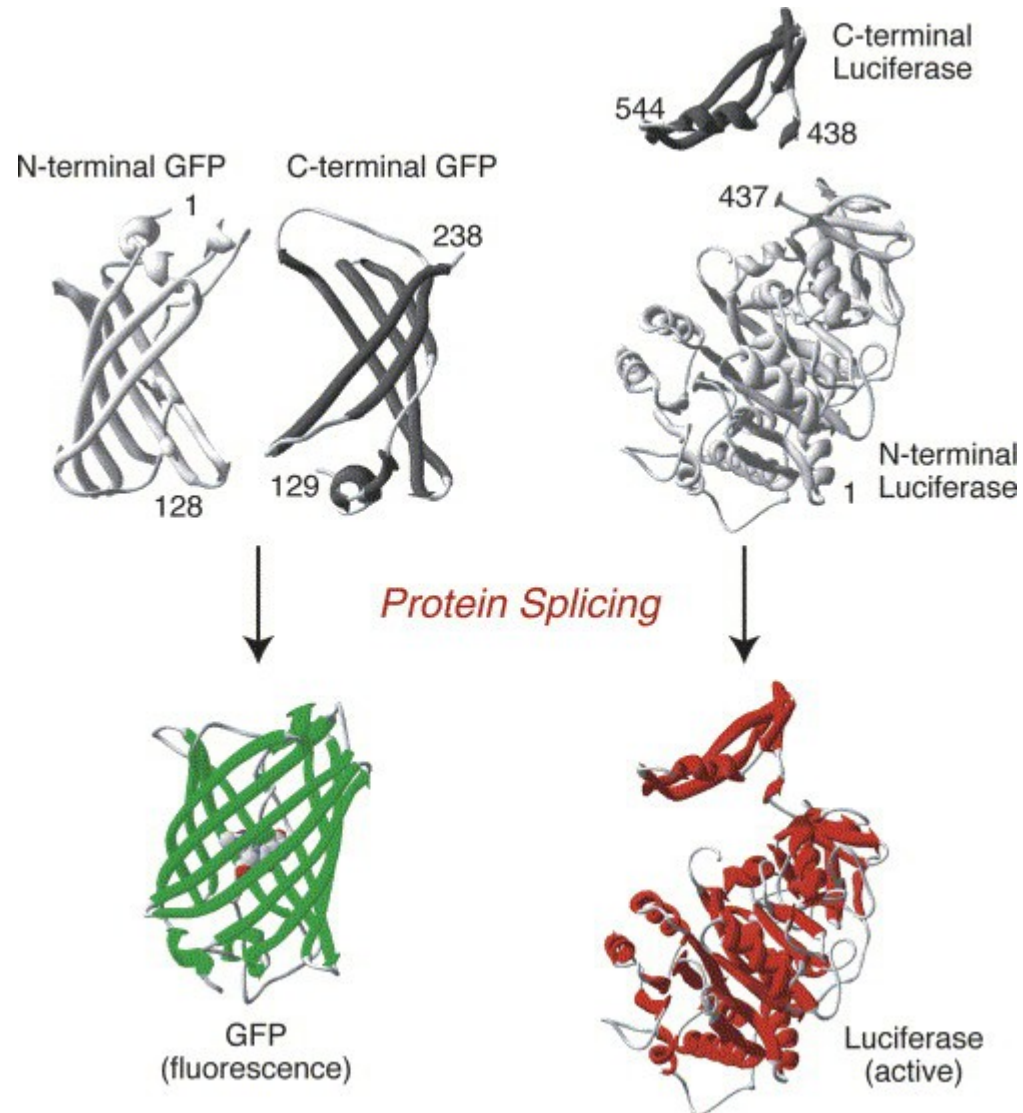
Pogoste lažno pozitivne interakcije so že katalogizirali in se jim je tako mogoče izogniti. Pomaga nam tudi, če imamo ob končni analizi v poskusu nekaj sevov, ki nosijo zapis za podobne proteine in nekaj nesorodnih, ki bi lahko služili kot negativne kontrole. Prav tako moramo upoštevati informacije o lokalizaciji posameznih proteinov, za katere se je v poskusu pokazalo, da bi lahko interagirali.

Obstajajo tudi sistemi z 2 vabama, s katerimi lahko ugotavljamo interakcije med 3 proteini. Kadar pa so za interakcijo med proteini višjih evkariontov potrebne pravilne posttranslacijske modifikacije, kvasovkin sistem ni primeren. V sesalskih sistemih kot reporterski marker najpogosteje uporabljamo kloramfenikol-acetiltransferazo (CAT).

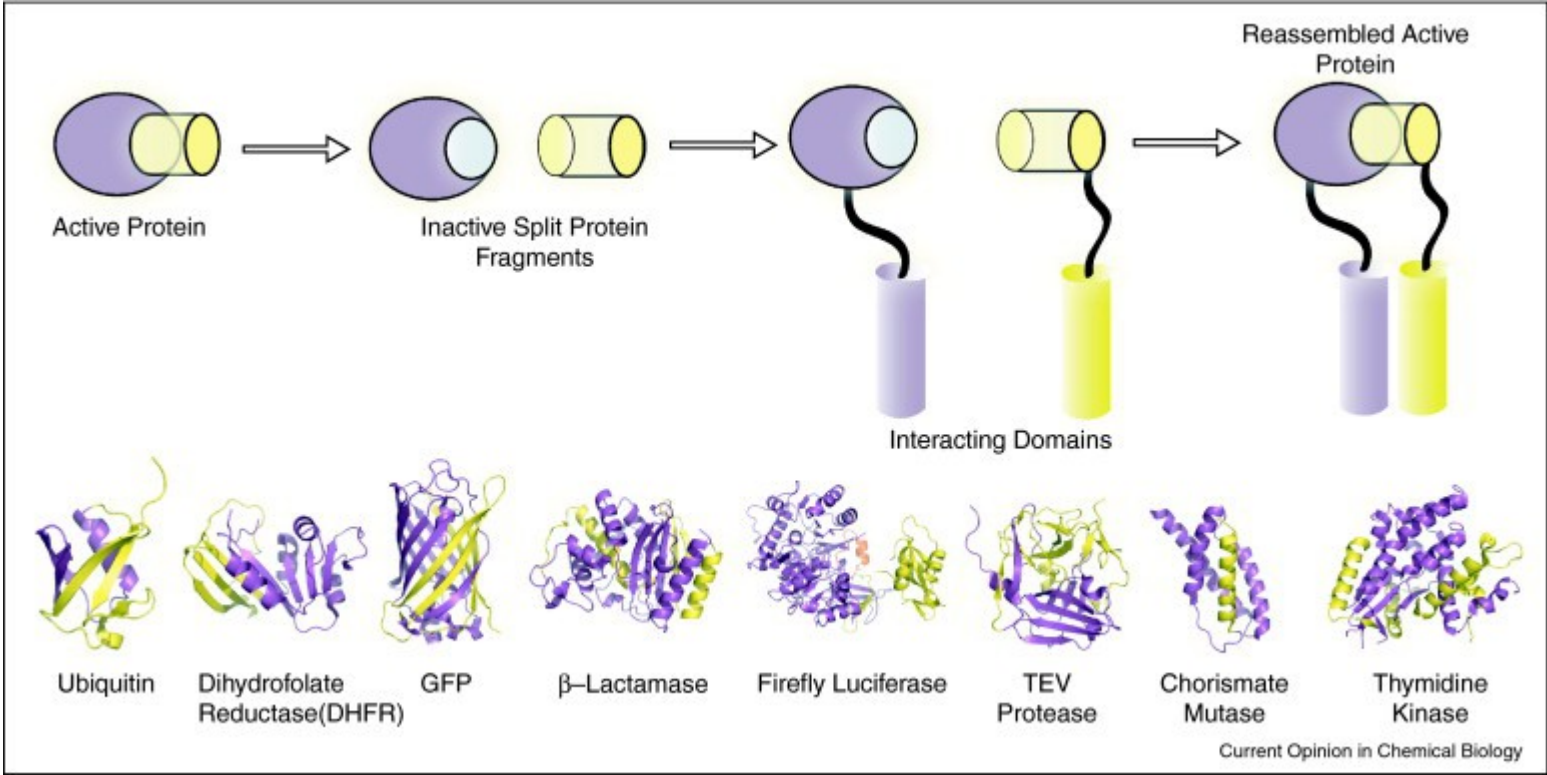
Dvohibridne sisteme uporabljamo pri odkrivanju proteinov, ki naj bi interagirali *in vivo*. Dobljene podatke je treba preveriti še z drugimi metodami, rezultati pa kažejo, da je interakcij med proteini bistveno več, kot smo si predstavljali na podlagi študij *in vitro*.

Dvohibridni sistemi so pomembno orodje v funkcijski genomiki. Pomagajo nam lahko tudi pri ugotavljanju možnih interakcij novih terapevtskih (poli)peptidov s proteini v organizmu, za katerega so bili (poli)peptidi razviti. Testiramo lahko tudi nepeptidna zdravila, če morda ne vplivajo na pomembne interakcije med proteini v živi celici.

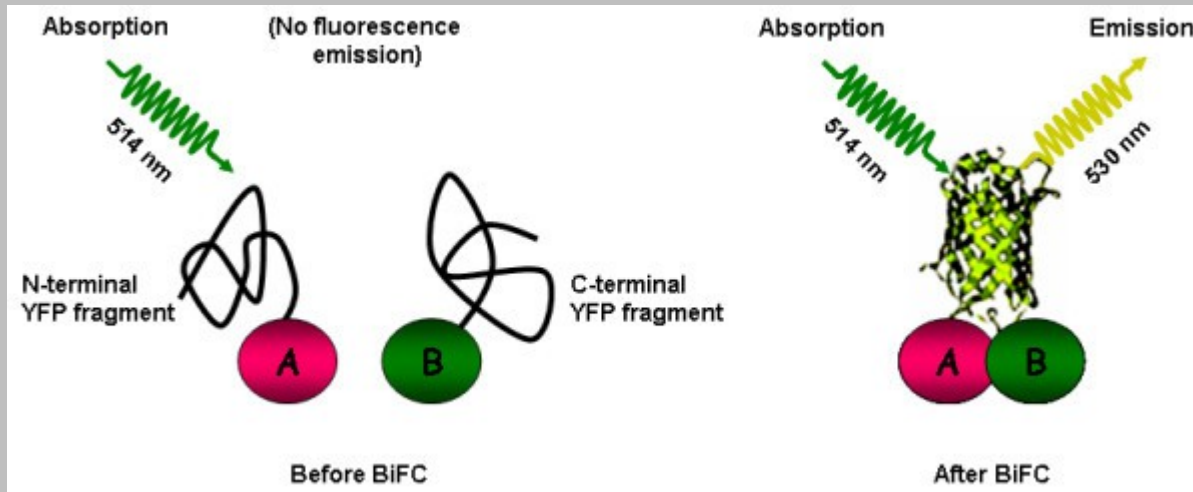
Interakcijske študije s cepljenimi reporterskimi proteini



Fuzije s cepljenimi reporterji in regeneriranje signala



Bimolekulska fluorescenčna komplementacija (BiFC)



Bhat et al. *Plant Methods* 2006 2:12

Pri GFP in njegovih izpeljankah se N- in C- del ne sestavita spontano. Do povezovanja pride le, če sta oba dela povezana z drugima proteina, ki se medsebojno združita, s tem pa dobimo funkcionalen fluorescirajoč protein (GFP, YFP itd.). Če na podoben način izpeljemo povezovanje nefluorescirajočih proteinov, govorimo o FCA (komplementacijski test s fragmenti; angl.: *fragment complementation assay*). Spojeni fragmenti morajo povzročiti neko opazno spremembo v celici, npr. razgradnjo ali cepitev kakšnega proteina ipd.