# 15. Fehérje interakciók

Mivel döntően a fehérjék határozzák meg az élőlények tulajdonságait, a molekuláris biológiai technikákkal végzett kutatások egy jelentős része adott fehérjék működésének alapjaival, többek között a fehérjék más molekulákkal létrejövő kapcsolataival foglalkozik. A fehérjék jellegzetes szerkezetüknek köszönhetően adott térszerkezetű anyagokhoz képesek specifikusan kötődni. Ebben a fejezetben azokat a technikákat ismertetjük, amelyekkel egy adott fehérje kapcsolódási partnerei kideríthetőek. A módszerek között vannak olyanok, amelyek izolált, vagy tisztított fehérjék tesztcsőben (*in vitro* körülmények közti) kapcsolatait igazolják, és vannak olyanok, amelyek élő sejteken belüli (*in vivo*) kapcsolatokat mutatnak ki. Az *in vivo* és *in vitro* meghatározás önkényes, a módszerek jellege között éles határvonal nem húzható; gyakran *in vivo* létező komplexeket izolálva *in vitro* módszerekkel lehet kimutatni.

**15.1. *In vitro* kapcsolatok kimutatása**

**15.1.1. Kapcsolatok kimutatása fúziós fehérjével**

Ez egy viszonylag egyszerű technika, használatával egy ismert fehérje **kapcsolódó fehérjepartnereit** tudjuk kideríteni ***in vitro***. Az ismert fehérjét egy affinitáskromatográfiára alkalmas fehérjével vagy peptiddel fuzionáltatva valamilyen **expressziós rendszerben** meg kell termeltetni, és meg kell tisztítani. Az affinitásoszlophoz kötődő fúziós fehérjét ezután nem kell eltávolítani az oszlopról, hanem ezen az oszlopon kell végigfuttatni azt a sejtlizátumot, amely feltételezések szerint tartalmazhatja a tisztított fehérjéhez kapcsolódó más fehérjéket. Ezek a fehérjék megkötnek. Az aspecifikus kötődésű fehérjéket mosással eltávolítjuk. Ezután az oszlophoz specifikusan kapcsolódó fehérjéket az oszlopról leszedjük (például elúcióval, a kémhatás megváltoztatásával, detergensekkel, forralással stb.) és analizáljuk. Az analízis gyakori lépése az SDS-poliakrilamid **gélen történő elválasztás**, majd a fehérjék gélből való izolálása és limitált hasítása után történő **mikroszekvenálás**, vagy **tömegspektrometriás** vizsgálat. Ha vannak feltételezések, hogy mi lehet a kapcsolódó fehérje, azt a gélelektroforézist követő **western blot** technikával, specifikus antitest segítségével igazolni lehet (15-1. ábra).

15-1. ábra

**15.1.2. Immunprecipitáció**

Az immunprecipitáció valójában nem elsősorban fehérjekapcsolatokat vizsgáló módszer, részben a **technikai hasonlóságok** miatt került ebbe a fejezetbe. Ez a technika főleg arra való, hogy a sejtlizátumban nagyon kis mennyiségben jelen lévő fehérjét **koncentrálja**, ezáltal **láthatóvá tegye** például a western blot során (vagy mérhetővé tegye az aktivitását egy adott enzimreakcióban). A kis mennyiségű fehérje elleni specifikus antitesteket hozzáadjuk a sejtlizátumhoz, majd az antitestek Fc részét kötni tudó **protein A**-t vagy **protein G**-t kötő agaróz gyöngyöket kell a keverékhez adni. A gyöngyökhöz odakötnek az antitestek, amelyek magukkal hozzák a felismert fehérjéket. (Már a kísérlet előtt, akár kovalensen is hozzá lehet kötni a protein A-s vagy protein G-s gyöngyöket az antitestekhez; ugyanazt az eredményt kapjuk, ha ezekhez köt hozzá a koncentrálandó fehérje.) A gyöngyöket koncentrálással ülepítjük, mossuk, majd a kötött fehérjéket gélelektroforézissel (és ehhez kapcsolódó western blottal) analizáljuk, vagy megvizsgáljuk az enzimaktivitásukat. Ez a módszer elsősorban az adott fehérjék **mennyiségi kimutatására** alkalmas.

15-2. ábra

http://www.leinco.com/includes/templates/LeincoCustom/images/immunoprecipitation.gif

2013.10.23.

**15.1.3. Ko-immunprecipitáció**

Ez a módszer nagyon hasonlít a fúziós fehérjékkel való horgászáshoz, de itt **antitestet használunk,** és nincs expressziós rendszerben történő fúziós fehérje-termelés. Az ismert fehérjére specifikus antitesteket a már ismertetett módon kötjük fel a **protein A** (vagy **protein G**) agaróz gyöngyökre. Ezeket a gyöngyöket inkubáljuk a sejtlizátummal, amelynek során az antitestekhez kiköt az ismert, vizsgálni kívánt fehérje, ami **hozza magával a** hozzá közvetlenül, vagy közvetve **kapcsolódó fehérjéket**. A gyöngyök mosása után SDS-gélelektroforézissel választjuk el egymástól az interakciós partnereket, amelyeket azután a már ismert módokon (western blot, mikroszekvenálás, tömegspektrometria) azonosíthatunk (15-3. ábra). A ko-immunoprecipitáció **félig-meddig *in vivo*** módszernek is tekinthető, hiszen a sejtlizátumban már eredetileg meglévő **fehérjekomplexeket** mutatja ki.

A módszer lényege a fehérje-fehérje interakció kimutatása, használhatjuk a fúziós fehérjékkel történő horgászás alternatívjaként is. Ilyenkor a fúziós tag nélküli (overexpresszáltatott és/vagy tisztított) fehérjéket specifikus antitestekkel kötjük a gyöngyökhöz, és azokkal horgászunk a sejtlizátumban. Természetesen az így felfedezett fehérjekapcsolatok kizárólag *in vitro* kapcsolatoknak tekinthetőek.

Előfordulhat, az is, hogy a gyöngyökhöz nem specifikus antitesteket kötünk, hanem specifikus aptamert, vagy valamilyen specifikus ligandot.

15-3. ábra

http://b2b.bio1000.com/file/upload/201305/30/10-31-18-85-9657.jpg

2013.10.24.

**15.1.4.Gél-shift**

A gél-shift módszerrel azt lehet kideríteni, hogy egy adott **DNS-szakaszhoz** vagy **RNS-molekulához** kapcsolódik-e valamely **fehérje *in vitro***. A vizsgálni kívánt (radioaktívan) jelölt nukleinsavat agaróz- vagy natív poliakrilamid gélen futtatjuk. A másik gélzsebbe olyan mintát teszünk, ahol a nukleinsavhoz előzetesen hozzákevertük a sejtlizátum fehérjéit. Ha a lizátum hozzáadásának eredményeképp a **nukleinsav futása** a gélben **lassul**, ez azt jelenti, hogy valamilyen fehérje **specifikusan hozzákötődött**, és így megnövelte a tömegét. Azt hogy a lassulás valóban fehérjekötődés miatt következett be, úgy bizonyítjuk, hogy nem radioaktív, ugyanazt a szekvenciát hordozó nukleinsavat is adunk az eddigi keverékhez. Ilyenkor a nem radioaktív nukleinsav **le fogja szorítani** a radioaktív nukleinsav egy részét a kötésből, ezért azok ismét **gyorsabb vándorlást** produkálnak. A nukleinsav-fehérje kötés specifikussága mutáns nukleotidok alkalmazásával bizonyítható: ha a nem-radioaktív nukleinsav **(pont)mutációt** tartalmaz, akkor **nem** lesz **képes leszorítani** a radioaktívat a kötésből, tehát **marad a lassabb vándorlás** a gélben.

A specifikusan kötődő fehérjét a már ismert módszerek egyikével azonosíthatjuk. Még egy fajta nagyon elegáns azonosításra van lehetőség, melynek neve **szupershift**. Ha sejtjük, milyen fehérje kapcsolódik a nukleinsavhoz, akkor az ellene termeltetett **antitestet is** belekeverjük a sejtlizátumba, és úgy futtatjuk meg a mintát a gélen. Az antitest kapcsolódása még jobban le fogja lassítani a radioaktív nukleinsav futását a gélen (15-4. ábra).

15-4. ábra

http://www.piercenet.com/media/EMSAOverview615x416.jpg

2013.10.24.

**15.1.5. Fág-display technika**

A fág-display technika **protein-protein** vagy **protein-DNS interakciókat** képes kimutatni ***in vitro***. Alkalmazásával arra a kérdésre kaphatunk választ, hogy egy adott fehérje vagy nukleinsav (DNS, RNS) mely másik fehérjéhez kapcsolódik specifikusan.

A kísérlethez M13 bakteriofágot használunk. Az **M13 fágok DNS-ébe** egy adott organizmus adott sejtjeiből kinyerhető **cDNS-könyvtárat klónozunk** úgy, hogy azok kifejeződve **fúziós fehérjét** alkossanak a fág-kapszid egyik **burokfehérjéjével**. A különböző vektor-konstrukciókkal transzformált baktériumokból kiszabaduló fágok azt a fehérjét fogják a burokfehérjéjükhöz fúzionáltan megjeleníteni, amelyik cDNS-e a genomjukba lett integrálva. A sokféle fágot tartalmazó szuszpenziót olyan lemezre vagy oszlopra öntjük, amelyen **immobilizálva** van a feltételezett interakcióra képes **fehérje vagy nukleinsav**. Azok a fágok fognak specifikusan kötődni, melyeknek felszíni fehérjéi specifikusan kötődnek az immobilizált fehérjéhez (nukleinsavhoz). Az aspecifikus kötődésű fágokat lemossuk, majd a specifikusa kötődő fágokat is leszedjük a gyantáról (például a kémhatás megváltoztatásával). A specifikusan kötődő fágokkal azután **újrafertőzzük** baktériumokat. Az ezekből kiszabaduló fágoknak már jóval nagyobb része fog specifikusan kötődni az immobilizált fehérjékhez (nukleinsavakhoz). A következő mosás már olyan körülmények között zajlik, amelyek között már csak a legerősebben kötődő fágok maradnak a gyantához kötött fehérjékhez kötve. Ezt a felszaporítás-kiszelektálás **ciklust** többször is el lehet végezni, minden alkalommal az egyre specifikusabban kötődő fágok maradnak az oszlopon. A végén kiszelektálható az a fág, amely a legspecifikusabban kötődő fehérjét hordozza a burkán. Ennek a fágnak szokták megvizsgálni a **beültetett cDNS**-ét, hogy mely fehérje szekvenciáját kódolja (15-5. ábra).

15-5. ábra

http://www.chemie.uni-hamburg.de/bc/spillner/bc\_bredehorst\_mitarbeiter\_spillner\_selektion.JPG

2013.10.24.

**15.1.6. Kromatin-immunprecipitáció**

Kromatin-immunprecipitációval kideríthető, hogy egy adott **protein mely DNS-szakaszokhoz köt**.A módszer a ko-immunprecipitációhoz hasonlóan félig meddig ***in vivo*** módszernek tekinthető. A vizsgálat során feltárják a sejteket, majd a sejtlizátumban a **nukleinsavakat** *Staphylococcus aureus*-ból származó ún. micrococcal nuclease **enzimmel emésztik**. Az emésztés során a DNS kisebb szakaszokra vágódik. Az emésztés után a lizátumhoz az adott protein elleni **antitesteket keverik a mintához**. Az antitestek specifikusan kötik a fehérjéket, amik specifikusan kötődnek az érintett DNS-szakaszokhoz. Az antitesteket az ismert módon, Fc-részüknél fogva protein A-t (vagy protein G-t) tartalmazó gyöngyökhöz lehet kötni, így **immobilizálva az antitest/fehérje/DNS komplexeket**. A gyöngyöket centrifugálják, mossák, majd a DNS-szakaszokat izolálják a rendszerből. A DNS-szakaszok végeit tompává alakítják, és vektorokba ligálják őket. A vektorokat baktériumokba transzformálják, majd a kinövő klónokból plazmidot izolálnak. A tisztított plazmidok szekvenálása során derítik ki az adott fehérjéhez kötődő DNS-szakaszok nukleotid-sorrendjét.

Az imént leírt módszer elsősorban nagyon erős fehérje-DNS kapcsolatok kimutatására alkalmas, pl. **hisztonfehérjék** esetében. Főleg hisztonfehérjék poszttranszlációs módosulásait vizsgálják a segítségével. A gyengébben kötődő **transzkripciós faktorok** vizsgálata során a sejtlizátumban először **kovalensen keresztkötik** a fehérjéket a nukleinsavakkal (például formaldehid, vagy UV-sugárzás segítségével). Ezután történik a **DNS-lánc törése**, többnyire ultrahanggal történő **szonikálással**. Az antitesttel történt immunprecipitáció után a fehérjéket **proteázokkal emésztik** le a DNS-ről, a DNS-szakaszok azonosítása az előbbieknek megfelelően zajlik (15-6. ábra).

15-6. ábra

http://www.promega.com

2013.10.24.

A kötődő DNS-fragmentumok azonosítására van egy egyszerűbb módszer is. A DNS-szakaszokat izolálásuk után **megjelölhetjük fluoreszcens festékkel**. Ha az adott élőlény genomját reprezentáló **DNS-chipet** használunk, akkor az adott DNS-szekvenciák a nekik homológ szakaszokhoz fognak kötni. Ezt nevezzük **ChIP on chip** technológiának. Mivel a chiphez kötött nukleinsav-szakaszoknak a szekvenciáját ismerjük, tudni fogjuk, hogy az adott fehérje mely DNS-szakaszokhoz való kötődést preferálja ***in vivo***.

**15.2. *In vivo* kapcsolatok kimutatása**

**15.2.1. Élesztő két-hibrid rendszerek**

Élesztő két-hibrid rendszerrel **fehérje-fehérje kapcsolatokat** tudunk detektálni ***in vivo***. A módszer a különböző gének szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok felépítésén és működésén alapul. Az élesztő hibridrendszereken kívül léteznek **bakteriális hibridrendszerek** is. Ezekkel metodikailag könnyebb dolgozni, viszont az esetek többségében megvan a lehetőség arra, hogy a keletkező fehérjék feltekeredése máshogy történik, mint eukariótákban, ami megkérdőjelezheti az asszociációs kísérletek eredményeinek a hitelességét.

15.2.1.1. Szolubilis fehérjék kapcsolódásához

A transzkripciós faktorok két egymástól eltérő funkciójú részből állnak. Az egyik doménjük specifikusan felismeri az adott DNS-szakaszt (**DNS-kötő domén**), a másik doménjük odavonzza az RNS-polimeráz enzimet (**transzaktivátor-domén**), hogy az katalizálja a gén átírását RNS-sé. Észrevették, hogy a két doménnek nem feltétlenül kell egy peptidláncon lenniük; ha két különböző fehérjeként termelődött doméneket valami **fizikai közelségbe** hozza, akkor a transzkripciós faktor működőképes lesz, elindítja az adott gén átírását.

Az élesztősejtbe sorban háromféle plazmidot kell transzformálnunk:

1. Az első plazmidon található egy **promóter-régió** (amit majd a használt transzkripciós faktor DNS-kötő doménje fel fog ismerni), mögötte egy **riportergénnel**. A riportergénről termelődő fehérje lehet fluorszecens fehérje (GFP), lehet valamilyen szín- vagy fényreakciót generálni képes enzim (β-galaktozidáz, luciferáz), vagy lehet valamilyen, az élesztő auxotrofiáját komplementálni képes aminosav- vagy nukleotid-anyagcserében működő enzim.

Az esetek többségében a riportergént tartalmazó plazmidot **nem szükséges** az élesztőbe transzformálnunk, ugyanis kaphatóak olyan, direkt a két-hibrid rendszerre kifejlesztett élesztőtörzsek, amelyek a **genomjukban hordozzák a riportergént** a megfelelő promóter-régió mögött.

2. A következő plazmidon található egy konstitutív promóter mögött átíródó **fúziós fehérje**. A fehérje **két részből áll**: az előbb említett riportergén promóter-régiójához kötődni képes transzkripciós faktor **DNS-kötő doménjéből** és a vizsgálni kívánt fehérjéből (ezt a fehérjét hívják „**csalinak**”).

3. A harmadik vektorban szintén konstitutív promóter mögött található a **másik fúziós fehérje**: az említett transzkripciós faktor **transzaktivátor doménjéhez** egy cDNS-könyvtár **véletlenszerű tagja** van fuzionáltatva (ezt hívják „**áldozatnak**”).

A „csali” és „áldozat” összehozására az egymást követő transzformálásokon kívül van egy másik lehetőség is. Ha mindkét konstrukciót „ellenkező nemű” haploid élesztőbe juttatjuk, akkor az élesztők „párosításával” létrejött diploid utódokban mindkét konstrukció jelen lesz.

Az egymást követő transzformálások és szelektálások után az összes élesztősejt azonos lesz abban, hogy mind a riportergént, mind a DNS-kötő domén/csalifehérje konstrukciót tartalmazza. A harmadik konstrukció viszont minden élesztősejtben **más és más** lesz, hiszen ezekbe a könyvtár különböző tagjait tartalmazó vektorokat transzfektálják. Ha valamelyik élesztősejtben a vizsgálandó, ismert fehérje, és a cDNS-könyvtárról termelődő fehérje kapcsolódik, az fizikai közelségbe hozza a hozzájuk fuzionáltatott transzkripciós faktor két doménjét, mely így el fogja indítani a riportergén átírását (15-7. ábra). A riportergént kifejező élesztőklónokat megvizsgálva kideríthető az „áldozat” fehérje cDNS-e. Ebből kiderül, hogy mely fehérje kapcsolódik a kiszemelt fehérjéhez az élesztősejten belül.

15-7. ábra

http://www.promega.com

2013.10.24.

15.2.1.2. Membránfehérjék kapcsolódásához

A membránokba lévő fehérjék nem képesek odaúszni a DNS-hez és ott összekapcsolódva működőképes transzkripciós faktort alkotni. Membránfehérjék kapcsolódásának vizsgálatához az egyik lehetséges megoldás az ún. **split-ubiquitin rendszer** alkalmazása. A rendszer elméleti háttere a következő:

Az **ubiquitin** egy olyan kis fehérje, amelyek képes a fehérjékhez kapcsolódni, kijelölve őket a későbbi **proteaszomális degradációra**. Létezik egy olyan enzim, az **ubiquitin-proteáz**, amely képes az ubiquitint a hozzá kapcsolódó fehérjéről lehasítani. Az ubiquitint mesterségesen szét lehet választani **két alegységre**, melyek **képesek összetapadni** egymással, az összetapadt proteint a ubiquitin-proteáz szubsztrátként felismeri. Ha a két mesterséges alegység (Nub és Cub) egyikébe egy **pontmutációt** illesztenek (a Nub 3. izoleucinját glicinre cserélik: NubG) akkor a két alegység **nem képes** egymással **összekapcsolódni**, csak akkor, ha két egymással kapcsolódó fehérjéhez vannak kapcsolva, és ez a kapcsolódás térbeli közelségbe hozza az alegységeket. Ha az alegységek összenyomódtak, akkor az ubiquitin proteáz ezt szubsztrátként felismeri és a hozzá kapcsolódó **proteinszekvenciát** a specifikus hasítóhelynél **lehasítja**. Ha ez a lehasadt protein egy **transzkripciós faktor**, akkor a membrántól elszabadulva képes a **DNS-hez odakapcsolódni**, és ott meghajtani a riportergént. A szolubilis fehérjéknél ismertetetthez képest az élesztőbe transzfektált konstrukciók közül kettő összetétele az alábbiak szerint módosul:

2. A második plazmid a konstitutív promóter után egy **három részből álló** fúziós fehérjét kódol. A szekvencia tartalmazza a „**csali**” membránprotein cDNS-ét (ezt ismerjük, a fehérje interakcióira vagyunk kíváncsiak), az ubiquitin C-terminális részének (**Cub**) szekvenciáját, ehhez kapcsolva az 1. plazmid riportergénjét meghajtani képes **transzkripciós faktor** szekvenciája.

3. A harmadik plazmid a konstitutív promóter után tartalmazza az adott organizmus **cDNS-könyvtárának** véletlenszerű darabját (szerencsés esetben erről íródik át az „áldozat” membránfehérje), ehhez kapcsolódik az ubiquitin pontmutációt szenvedett N-terminálisának (**NubG**) szekvenciája.

Ha a két membránfehérje kapcsolódik egymáshoz, akkor az ubiquitin két fele is „összenyomódik”, ezt az ubiquitin proteáz észreveszi (az enzim élesztősejtekben is megtalálható), elhasítja a C-terminális és a transzkripciós faktor közötti szekvenciát. A transzkripciós faktor szabaddá válik, és ki tudja fejteni a hatását (15-8. ábra).

15-8. ábra

http://www.dualsystems.com

2013.10.24.

**15.2.2. Élesztő egy-hibrid rendszerek**

Az egy-hibrid rendszerek felépítése és működési elve nagyon hasonló a két-hibrid rendszerekéhez, ezért csak a legfontosabb különbségeket ismertetjük. Alapvetően kétféle egy-hibrid rendszer létezik, mindkettő DNS-protein kapcsolatot vizsgál.

15.2.2.1. Ismeretlen fehérje DNS-kötődése

Az egyik fajta egy-hibrid rendszerben azt lehet kideríteni, hogy egy adott DNS-szekvenciához mely fehérjék kötnek specifikusan. Az élesztőbe mindössze kétféle konstrukciót kell transzfektálni:

1. Az első plazmidban található az **ismert szekvenciájú DNS**-szakasz, majd rögtön utána található a **riportergén** szekvenciája.

2. A második plazmidban a konstitutívan működő promóter után fúziós fehérje található. A fúziós fehérje két részből áll: az adott organizmus **cDNS-könyvtárának** véletlenszerű tagjából és egy ismert transzkripciós faktor (például GAL4) **transzaktivátor doménjéből**.

Amelyik élesztőben a véletlenszerű cDNS-ről olyan fehérje íródik át, amely az adott DNS-szekvenciához specifikusan tud kötődni, abban a transzkripciós faktor transzaktivátor doménja iniciálni fogja a riportergén átíródását (15-9. ábra). Az élesztőklónokból szerzett cDNS-információ alapján lehetséges a DNS-kötő fehérje aminosav-sorrendjét meghatározni.

15-9. ábra

http://www.takarabiomed.com.cn/sxproducts/clontech/2/160-1.JPG

2013.10.24.

15.2.2.2. Transzkripciós faktorok promóter/enhancer-preferenciája

A másik fajta egy-hibrid rendszerben arra keressük a választ, hogy egy adott **DNS-kötő fehérje** (például transzkripciós faktor) **milyen nukleotid-sorrendet preferál** a kötőhelyén. Megvalósíthatósági szempontok miatt ezt a fajta egy-hibrid rendszert baktériumban (E. coliban) és nem élesztőben szokták alkalmazni (egyszerűbb, és nem jár információvesztéssel). A másik típusú egy-hibrid rendszerhez hasonlóan itt is kétfajta konstrukciót kell transzfektálni a megfelelő E. coli törzsbe:

1. Az első plazmidon az általunk **vizsgálni kívánt fehérje** (transzkripciós faktor) és a bakteriális **RNS-polimeráz II ω alegységének** cDNS szekvenciái találhatóak, a róluk átíródó fúziós fehérjét („csali”) konstitutív promóter hajtja meg.

2. A második plazmidon a riportergén előtt található RNS-polimeráz kötőhely elé egy általunk választott hosszúságú (többnyire 20–40 bázispár) **random szintetizált** szekvencia-poolból származó DNS-szekvenciát illesztenek. Minden plazmidban más és más random szekvencia található majd a riportergén előtt.

Ha a fúziós fehérje kapcsolódni képes valamelyik random szekvenciához, akkor az ω alegységhez kapcsolódni fog az **RNS-polimeráz többi része**, és elindul a riportergén kifejeződése. Minél **erősebb** lesz a **kötődés**, a génkifejeződés annál erősebb, annál **nagyobb szelekciós nyomásnak** tud például az adott baktériumkolónia ellenállni. Többfajta random szekvencia is alkalmas lesz arra, hogy génexpressziót okozzon. A különböző szekvenciákat összehasonlítva meg tudjuk határozni a vizsgált fehérje nukleotid-preferenciáját, és hogy a specifikus kötődés során melyek a fontosabb és melyek a kevésbé fontos nukleotidok (15-10. ábra).

15-10. ábra

http://labs.umassmed.edu/WolfeLab/B1H\_introsized.png

2013.10.24.

**15.2.3. Élesztő három-hibrid rendszer**

Az élesztő három-hibrid technika arra a kérdésre keres választ, hogy ismert **RNS-molekulához mely fehérjék** (vagy ismert fehérjéhez mely RNS-molekulák) **kötődnek** specifikusan. A rendszer feltételezi, hogy van már olyan ismert RNS/fehérje párunk, amely egymáshoz specifikusan tud kötődni. A három-hibrid rendszer nagyon hasonlít a két-hibrid rendszerhez mind elméleti, mind gyakorlati megvalósításában, csak még egy (a már említett, ismert RNS/fehérje) specifikus kapcsolódást feltételez. Ezek alapján az élesztőbe négy különböző konstrukciót kell bevinnünk:

1. Az első plazmidon található egy promóter-régió (amit majd a használt transzkripciós faktor DNS-kötő doménje fel fog ismerni), mögötte egy riportergénnel (ugyanúgy, ahogy ezt a két-hibrid rendszernél láttuk, de többnyire ebben az esetben is már az **élesztő genomja tartalmazza a konstrukciót**, transzformálni nem kell).

2. A második konstrukcióban található egy konstitutív promóter mögött átíródó fúziós fehérje. A fehérje két részből áll: a fenti konstrukció promóter régiójához kötődni **képes transzkripciós faktor DNS-kötő doménjéből**, és az előbb említett, ismert **RNS-kötő fehérjéből**.

3. A harmadik vektorban szintén konstitutív promóter mögött található egy fúziós gén, amiről RNS keletkezik, de az nem transzlálódik. A **fúziós RNS** (vagy hibrid RNS) első tagja az ismert RNS-kötő fehérjéhez köt specifikusan, a másik tagja pedig a fehérjekötődés szempontjából vizsgálni kívánt RNS-szekvencia.

4. A negyedik vektorban konstitutív promóter mögött található egy **másik fúziós fehérje**: Az említett transzkripciós faktor **transzaktivátor doménjéhez** egy **cDNS-könyvtár** véletlenszerű tagja van fúzionáltatva (csakúgy, mint a két-hibrid rendszernél).

Ha az ismert, vizsgálandó fúziós RNS-hez valamelyik élesztőklónban kötődik a könyvtárból származó cDNS-ről átíródott fehérje, akkor a transzkripciós faktor DNS-kötő és transzaktivátor doménje elég közel kerül ahhoz, hogy meghajtsa a riportergént (15-11. ábra).

**Ismert fehérjék** és **ismeretlen RNS-ek** kapcsolódását is ugyanezzel a módszerrel lehet detektálni. Ilyenkor a 3. plazmidba a vizsgálandó RNS DNS-szekvenciája helyett cDNS-könyvtár tagjait kell inzertálni, a negyedik plazmidba pedig nem a cDNS-könyvtárat, hanem a vizsgálandó fehérje szekvenciáját kell helyezni (15-11. ábra).

15-11. ábra

http://www.promega.com

2013.10.24.