



化学交联质谱阐明线粒体蛋白 互作组

PNAS-2017

报告人：尹家康



目录

- 背景
- 实验思路
- 实验结果
- 总结



背景

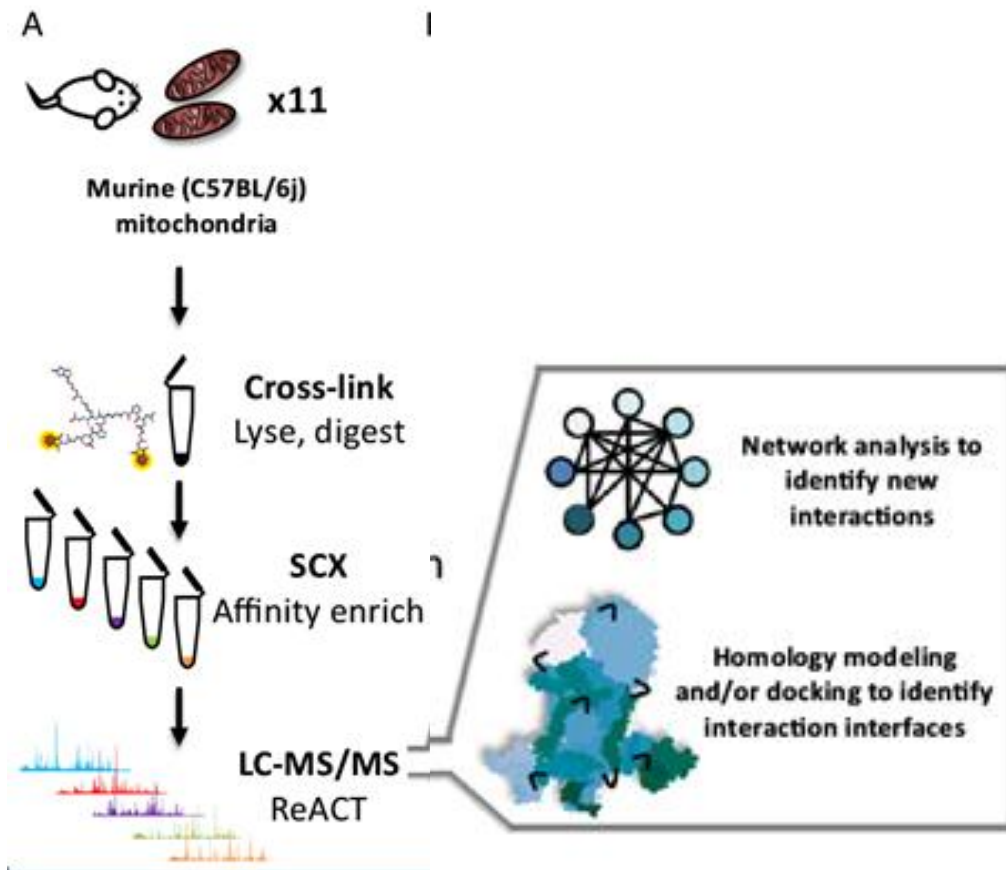
线粒体蛋白:

- 功能紊乱将导致神经衰弱、癌症、心血管疾病等
- 氧化磷酸化(OXPHOS)相关蛋白发挥动力工厂作用
- 转录后修饰及构象变化难以阐明广泛Pr互作作用

化学交联质谱 (XL-MS) : 化学交联与质谱技术联用

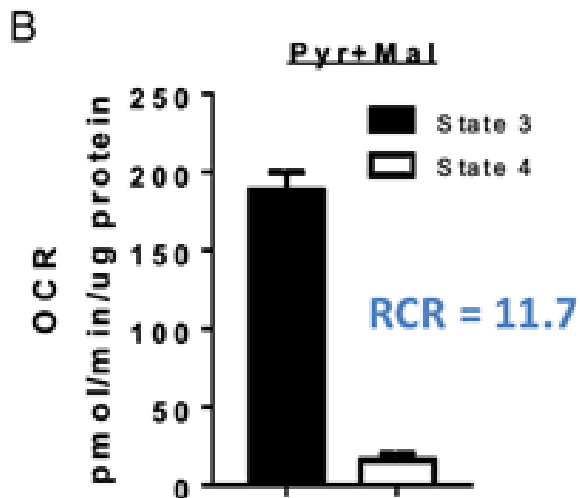
- 与计算机模拟的结构模型结合, 揭示包括膜蛋白在内的蛋白天然结构
- 大规模XL-MS在解析蛋白互作、在复杂和动态天然环境中及应对药物干扰时的构象变化方面起重要作用
- 对冷冻电镜 (cryo-EM) 重要补充

实验思路

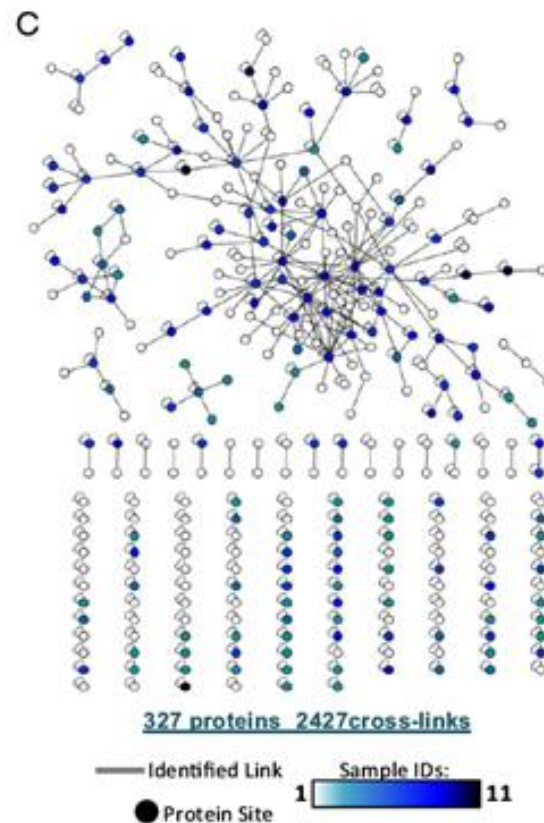


11个小鼠线粒体，化学交联、裂解、消化，阳离子交换进行亲和富集，质谱分析

结果

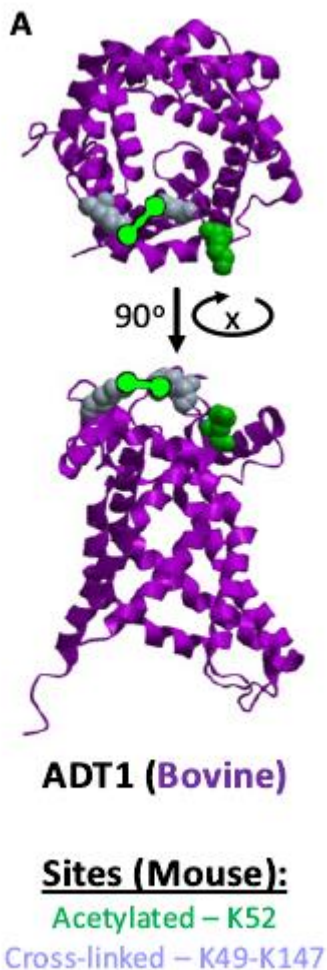


原位交联证明化学交联质谱不影响蛋白的生理活性。
RCR--呼吸控制速率

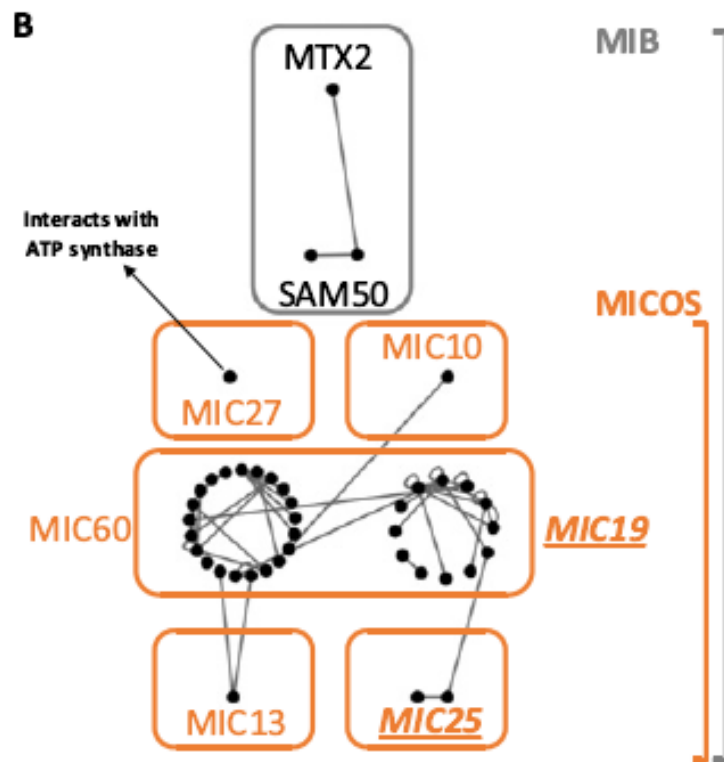


大范围交联质谱所发现的小鼠心脏线粒体蛋白互作网络

结果

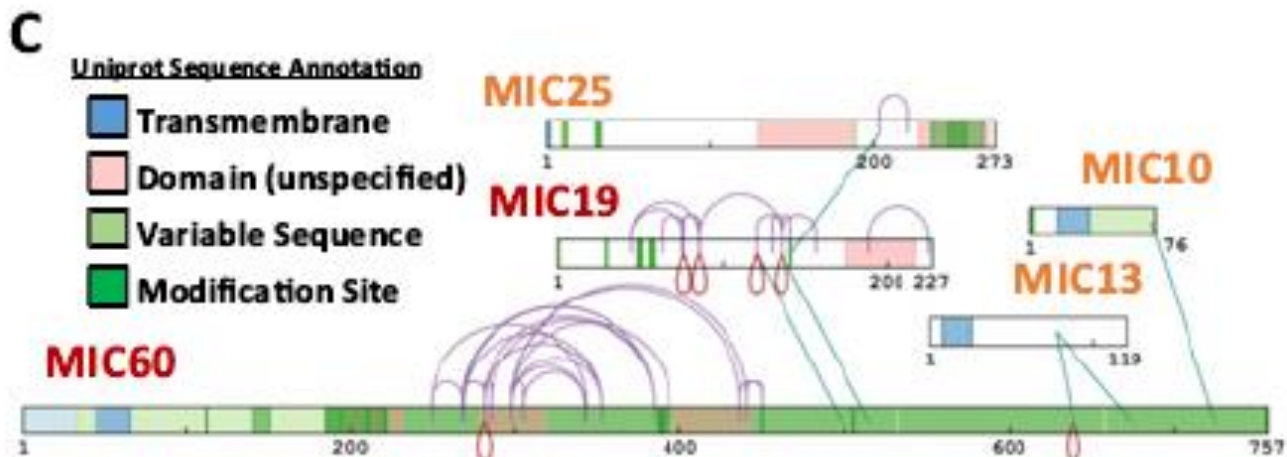


XL-MS阐明的蛋白互作：
 牛ADT1
 （ATP/ADP
 转位蛋白）
 的乙酰化位
 点（green）
 及偶联的
 K49-K147
 交联（light
 purple）。
 表明了XL-
 MS在转录
 后修饰蛋白
 互作应用潜
 力



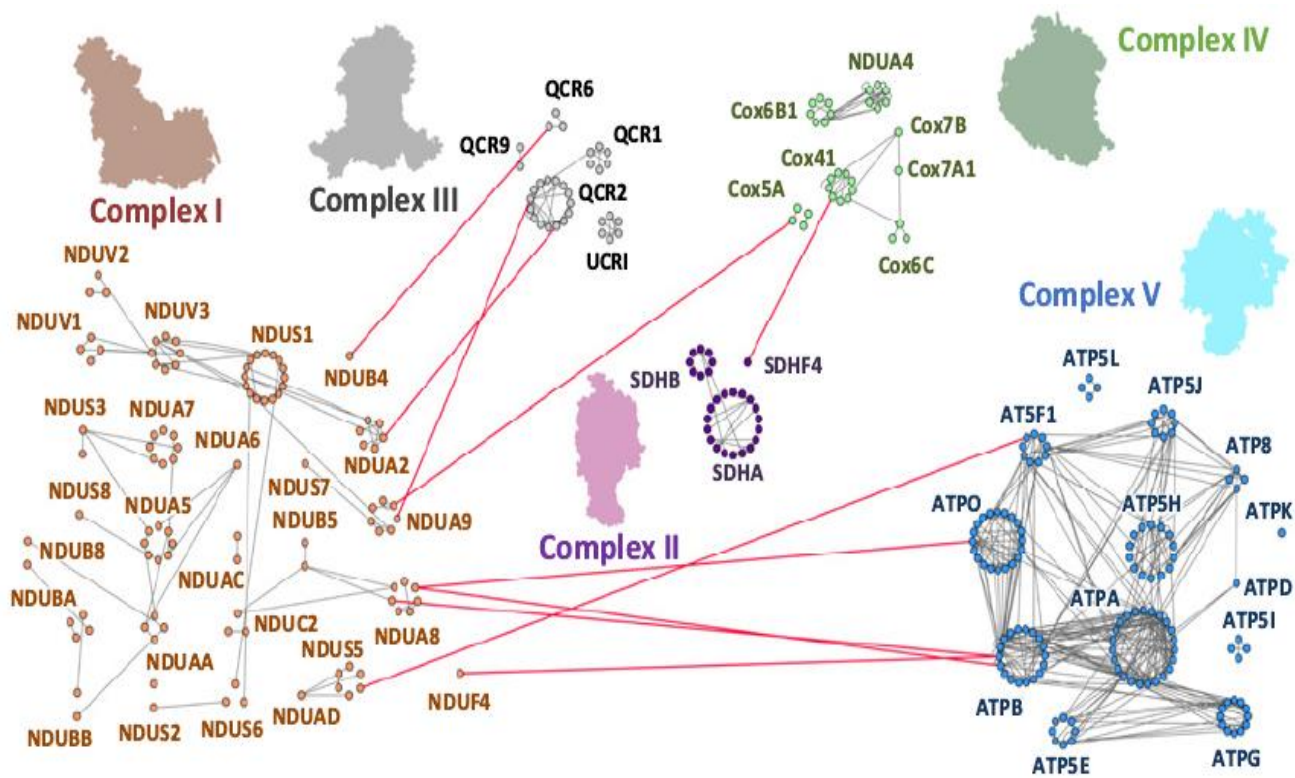
MIB、MICOS的8中蛋白互作关
 系，阐明了线粒体内膜及脊的形
 态发生

结果



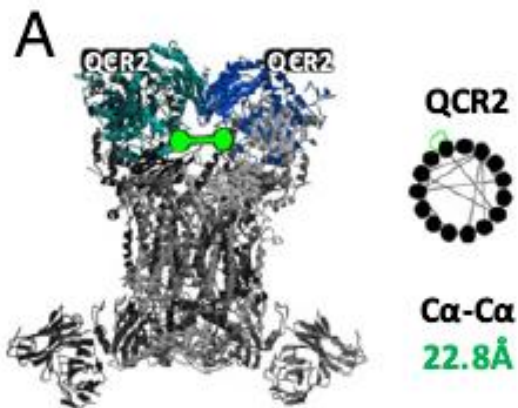
进一步揭示MIC60的C端互作
为阐明ATP synthase发挥作用提供理论依据
(紫-蛋白间、绿-蛋白内、红-同源多聚)

结果

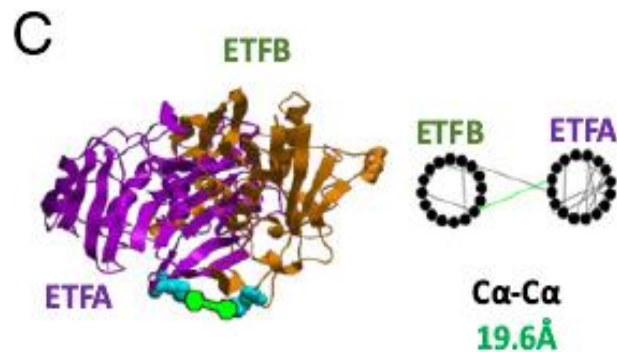


OXPHOS复合体之间的互作
 红线-复合体间相互作用
 圈表示复合体内互作

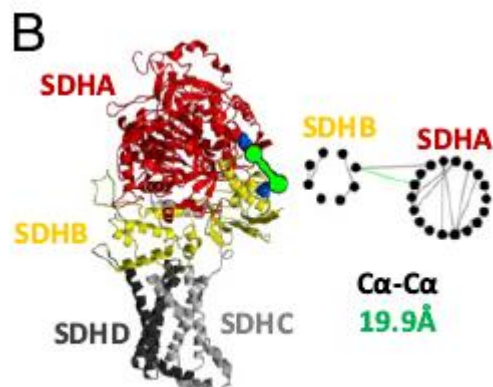
结果



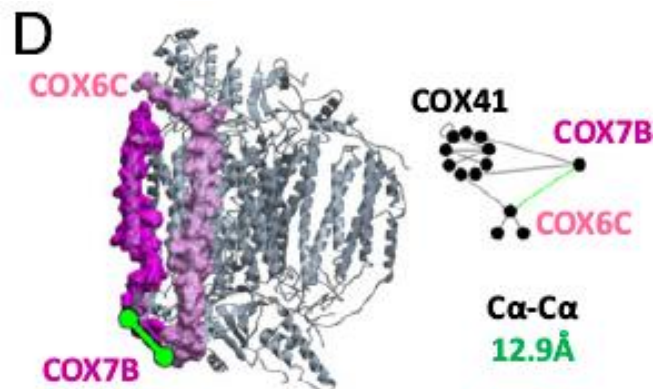
复合体III中的自我互动，
距离<35埃



电子传递黄素蛋白

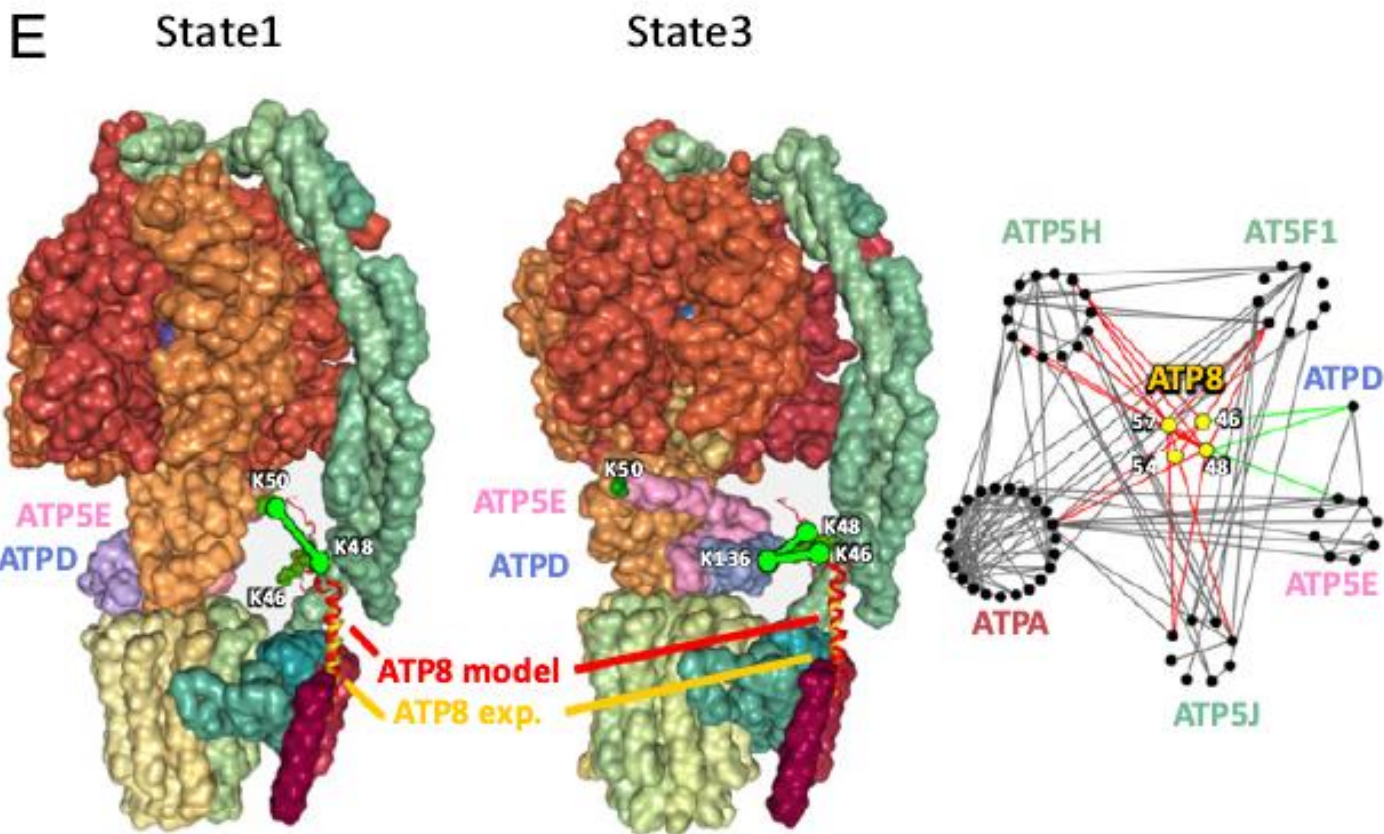


复合体 II



复合体IV

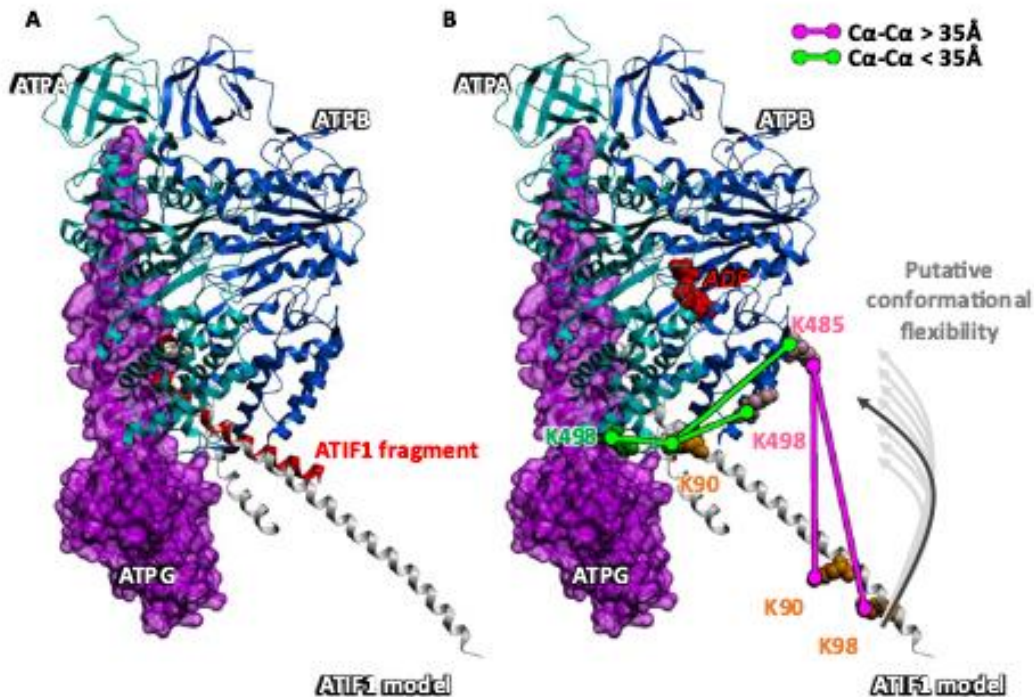
结果



K50-K48在state1可互作,K48-K36-K46在state3可以互作。互作关系是状态依赖性的

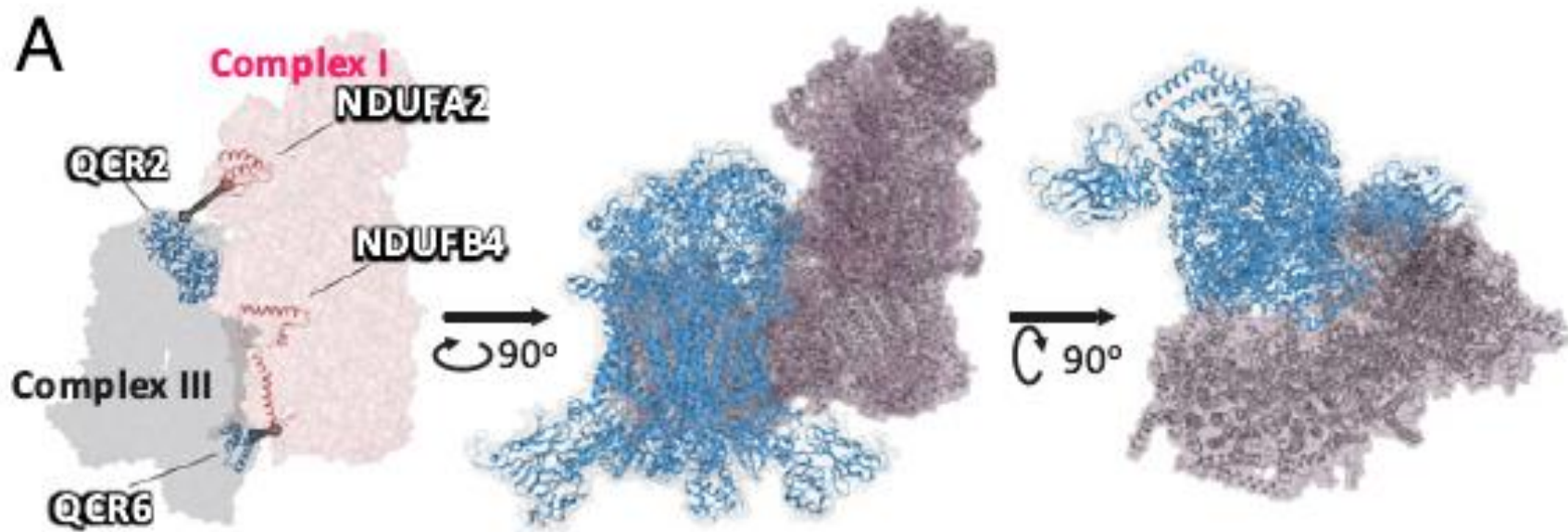
ATP synthase中13%交联发生在ATPA/B与stator之间；ATP8 is crucial,

结果



ATIF1（ATP合酶抑制剂）与F1domain的ATPA/B相互作用
化学交联发现了X-ray晶体衍射未发现的ATIF1 C端 α -helix，它会发生构象变化。

结果



复合体 I、III 的互作

结果

B In situ XL-MS
Complex I



Complex III

Rigid body
docking



 blind

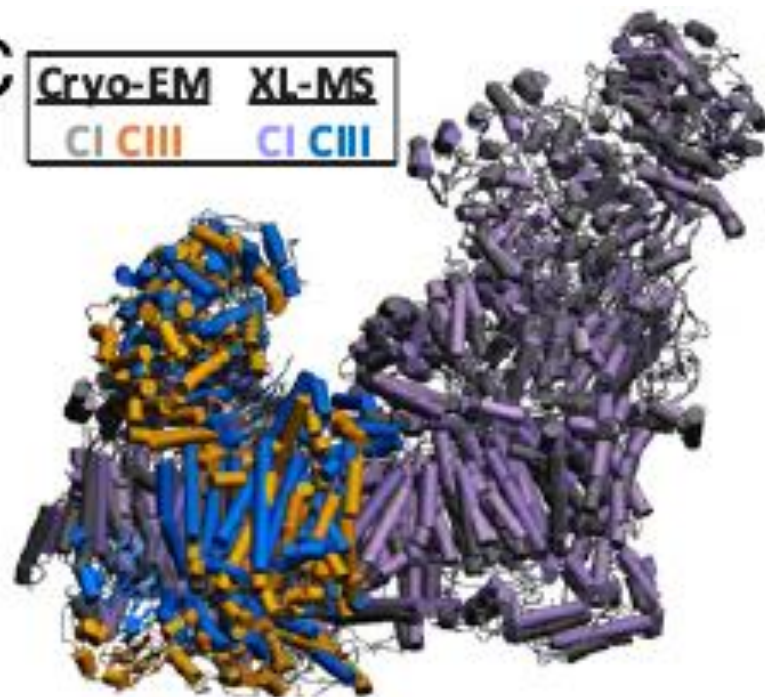
Cryo-EM
PDB: 5j8k



Enriched Mito.
complexes

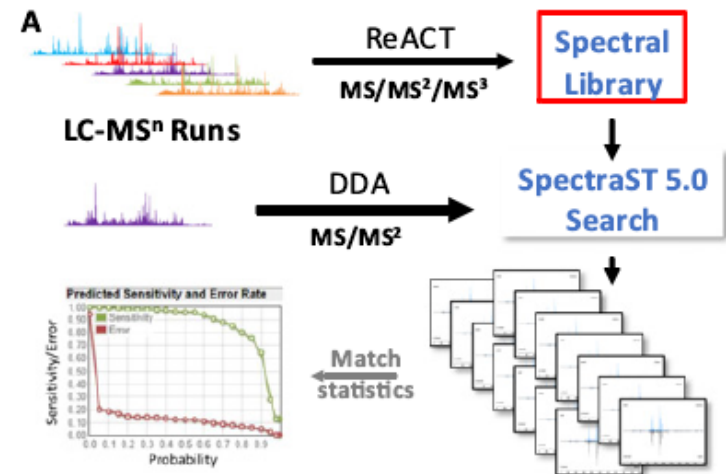
C

Cryo-EM	XL-MS
CI CIII	CI CIII

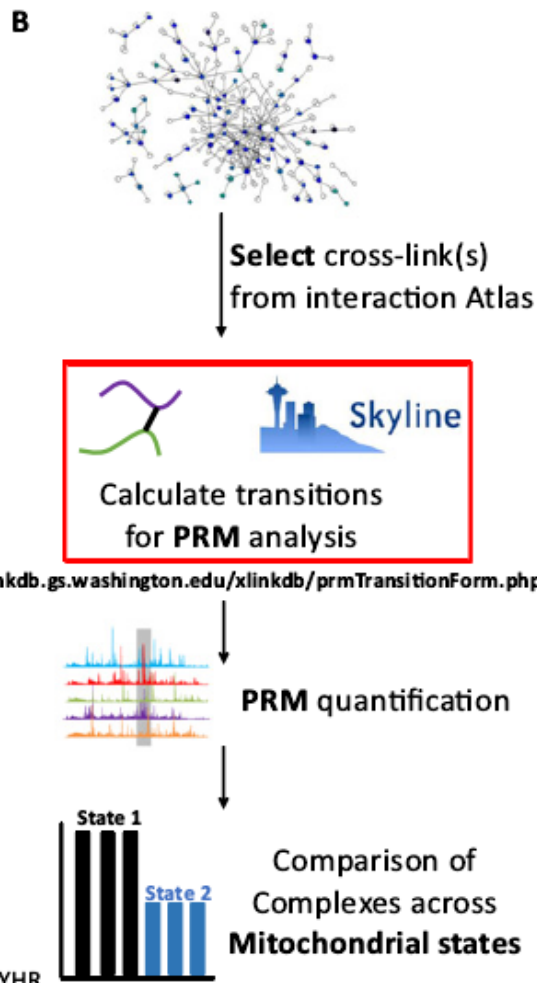
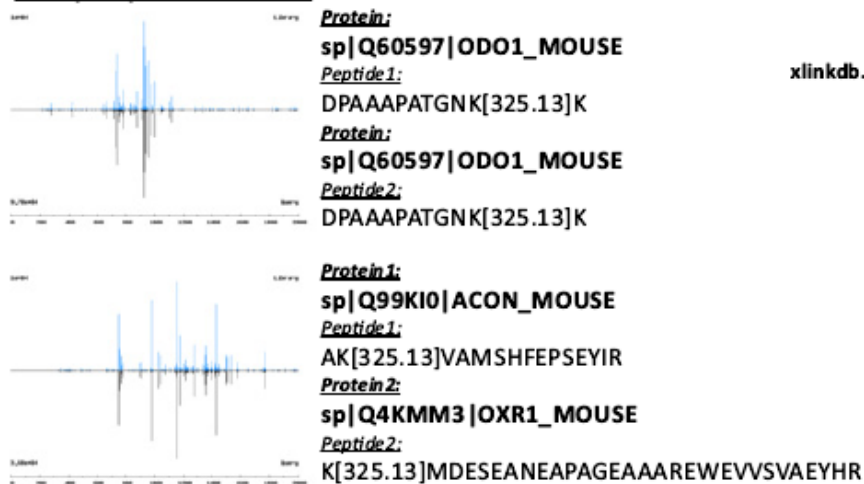


XL-MS所发现的复合体模型和Cryo-Em几乎一致

结果



Example Spectral Matches:



快速、简单
进行蛋白互
作定量分析:
A:spectral
matching
B:PRM



总结

- 1.概括：以原位化学交联质谱阐明了复杂天然条件下的线粒体的重要蛋白互动组，如**OXPHOS**，与结构生物学的研究数据互相补充。可以利用文章中发现的蛋白互动关系，设计探针来研究体内蛋白构象和互动动力学。
- 2.启发：在新的研究工具和方法出来后，要把研究结果和以前的进行比对，发现不同点或肯定前面的研究结果。勇于有证据的质疑，并分析原因。
- 3.改进：把此研究中线粒体上的蛋白互动和其它细胞器上的同类型蛋白（如叶绿体类囊体、光合细菌质膜上的**ATP synthase**）互动比较，发现异同点。



谢谢!