

蛋白质与蛋白质相互作用研究技术

武君 沈秀张 综述 林吉进 审校

【摘要】 蛋白质-蛋白质相互作用的研究是蛋白质组学的重要内容,随着研究的深入,促进了研究技术的发展和完美。本文将对研究蛋白质相互作用的技术--酵母双杂交、化学能量共振能量转移、双分子荧光互补技术、荧光能量转移技术、生物分子相互作用分析技术、蛋白质芯片等技术的特点及应用做一综述。

【关键词】 蛋白质组学;蛋白质-蛋白质相互作用;酵母双杂交

The Techniques of Studying Protein-Protein Interaction WU Jun, SHEN Xiu-zhang, LIN Ji-jin. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong, 515041, China

【Abstract】 The study of protein-protein interaction is an important part of the proteomics, with the further study of protein-protein interaction, the research techniques of it has been developed and perfected. The article will introduce the features and applications of these skills, such as the two-hybrid system, bioluminescence resonance energy transfer, bimolecular fluorescence complementation, fluorescence resonance energy transfer, bimolecular interaction analysis, protein chips et al.

【Key words】 Proteomics; Protein-protein interaction; Yeast two-hybrid

蛋白质间相互作用是细胞各种基本功能的主要完成者,参与几乎所有的重要生命活动。因此,蛋白质-蛋白质相互作用研究以及建立相互作用关系的网络图,具有十分重要的意义,也是目前蛋白质研究领域的热点。如何能高通量、大规模地筛选相互作用的蛋白质,从而绘制出蛋白质相互作用图谱,帮助我们了解这些蛋白质的功能,给实验技术提出巨大挑战,从而促进蛋白质-蛋白质相互作用技术的进步和完美^[1]。

1 酵母双杂交系统(The two-hybrid system)

1.1 酵母双杂交系统的原理:酵母双杂交系统由 Stanley Fields 和 OK-kyu Song 等人^[2] 基于对酵母转录因子 GAL4 的认识,在研究真核基因转录调控中创建的一种分子生物学方法。GAL4 由结构上可以分开、功能上相互依赖的 2 个结构域组成:位于 N 端 DNA 结合域(DNA binding domain, DNA-BD)和位于 C 端转录激活域(Activation domain,

DAN-AD)。DNA-BD 或 AD 单独作用不能激活转录反应,但当二者在上游较为接近时,呈现完整的 GAL4 转录因子活性,使启动子下游基因得到转录。将编码蛋白 X 的 DNA 序列和 GAL4 分子的 BD 基因融合,形成诱饵(bait)基因;将编码蛋白 Y 的 DNA 序列和 GAL4 分子的 AD 基因融合,形成猎物(pre or target protein)基因。当这两个融合基因同时转化入酵母细胞,如果 X 蛋白和 Y 蛋白可相互作用,会使 BD 和 AD 在空间上相互接近形成一个有效的转录激活因子,激活 GAL4 调控启动子的下游融合的报告基因;如果 X 和 Y 不存在相互作用,BD 和 AD 将无法互相靠近,就无法激活报告基因的转录。设计报告基因的产物对营养缺陷表型补偿(如腺嘌呤、组氨酸等),或者是一些特殊的酶(如 β -半乳糖苷酶),用其底物(X-gal)进行颜色筛选,从而通过检测报告基因是否转录来确定 X 蛋白与 Y 蛋白是否有相互作用。

1.2 酵母双杂交系统的优缺点及该系统的改进:酵母双杂交系统是在细胞内进行的一种灵敏的检测方法,具有以下优点:不仅能检测弱的、暂时的蛋白质间相互作用,还能立即识别相互作用蛋白质的基因编码,且可用于确定已知的蛋白质-蛋白质相

基金项目:本课题受国家自然科学基金项目(编号 30600254),广东省自然科学基金项目(编号 06301076)资助

作者单位:515041 汕头大学医学院第一附属医院心内科

通信作者:林吉进 Email:linjijin@yahoo.com.cn

相互作用的特异性结合域;该技术是在转录水平上的操作,不需分离纯化蛋白质;且酵母生长速度快、易操作。同时,不能忽视酵母双杂交系统的缺点:不适用于研究一些对酵母细胞有毒性的蛋白质。且该技术有“假阳性”和“假阴性”的缺点,“假阳性”可见于在酵母细胞发生的相互作用不会在其他生物体细胞出现,也可见于可以激活报告基因的蛋白质(如转录激活因子)、融合蛋白的自我激活、两个融合蛋白通过“第三者”结合或无需特异结合就能启动转录。酵母双杂交技术上要求相互作用的两个蛋白定位于核内,因此,“假阴性”见于蛋白质翻译后修饰(例如糖基化、二硫键形成、磷酸化等)不发生在核内;蛋白质定位于膜表面或胞浆;一些蛋白质很难转运而且正确折叠入核。“假阴性”还见于因为嵌合区域导致的部分解聚,融合蛋白失去其功能。为此,双杂交系统建立近二十年来,在广泛应用中始终不断在发展和完善。Vidal 等人^[3]建立的反向双杂交系统(reverse two-hybrid system)掺入一种表达产物对细胞生长有毒的报告基因,用于监测蛋白间的相互作用,提供了简便的鉴定阻断蛋白间相互作用的方法。为了克服双杂交系统仅能研究核内蛋白的缺点,Aronheim 等人构建的 SOS 恢复系统(SOS recruitment system, SRS)^[4],RAS 募集系统^[5]也是针对此缺点的一种改进。由于酵母双杂交在原核生物细胞进行,不能真正反映高等动物体内蛋白质活动,哺乳动物双杂交技术弥补了这一缺陷^[3]。酵母双杂交技术目前向大规模、自动化、高通量方向发展,虽然大规模的筛选结果有假阴性、假阳性高和重复性低等问题,且自动化程度并不高。但是酵母双杂交已经建立了自动工作站,而且为了提高整个流程自动化程度,进一步的研究仍在进行^[6]。

2 化学发光共振能量转移技术(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)

2.1 化学发光共振能量转移技术的原理:化学发光共振能量转移技术是在活细胞内实时检测蛋白质相互作用的一种生物物理方法^[7]。该技术是基于荧光共振能量转移理论发展起来的。荧光共振能量转移理论是 Forster 于 1948 年提出,具体原理是:一对合适的荧光物质构成一个能量供体(donor)和能量受体(acceptor)对,当供体和受体之间达到合适的距离内(1~10 nm),由于偶极之间的相互作用,实现光子能量从供体到受体的非辐射转移。化学发光

能量转移技术运用上述理论,将研究的两个蛋白分别与供体酶(donor)和受体荧光基团(accepter)融合,当这两个融合蛋白达到一定距离时,供体酶和酶作用底物作用后发生从供体酶到互补受体荧光基团的非辐射性(偶极-偶极)能量转移,通过自发光仪对 BRET 的信号检测(受体荧光基团发出的光的量和供体酶发出的光的量的比率)来判定蛋白质是否发生相互作用。

2.2 化学发光共振能量转移技术应用及其特点:化学发光共振能量转移技术最初用于研究生物钟蛋白 KaiB 二聚体作用^[8]。之后, BRET 用于 G 蛋白耦联受体的研究,特别是二聚体和寡聚体,同样也进行膜蛋白和胞浆蛋白的相互作用的研究^[9]。BRET 具有高敏感性、可以实时分析活细胞内的蛋白质-蛋白质相互作用的优点^[10]。因为 BRET 信号是个比率,避免了细胞数、细胞类型和其他实验变量对实验数据量的影响。而且由于能量转移对距离的高度依赖性(1~10 nm)意味着不同位置的含有供体和受体融合蛋白复合物之间的相互作用都会被检测出来。因此 BRET 适合测定不同亚细胞结构或特殊细胞器的蛋白质-蛋白质相互作用^[11]。当然该技术也有自己的局限性,融合蛋白的空间构象可能使偶极对处于不能发生能量转移的空间位置上;由于供体酶或受体基团是融合在研究的相互作用蛋白的尾部,有可能研究的蛋白的一部分已经发生相互作用,而融合蛋白没有足够近发生化学发光,上述两种情况都会检测不到 BRET 的信号。另一个局限性是,如果 BRET 信号太弱时,没有高灵敏度的光测量仪器将不会测量到。相比分光光度和荧光测量的仪器, BRET 检测的仪器通常较少,特别是需要高灵敏度的检测时,所需要的仪器通常非常贵。

3 双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BIFC)

双分子荧光互补技术由 Hu 等^[12]在 2002 年报道的一种研究活细胞中蛋白质-蛋白质相互作用的荧光技术。该技术利用了来源于水母的 GFP 荧光蛋白家族的荧光特性:GFP 定点突变体具有多色光的特性,并明显改变波长。GFP 可突变为青色荧光蛋白(CFP),黄色荧光蛋白(YFP),蓝色荧光蛋白(BFP)^[13]。此外, GFP 蛋白结构有至少 10 个位点可以插入外源蛋白而荧光活性不受影响^[14]。BIFC 技术利用该荧光特性,在特异位点把荧光蛋白分为

没有荧光特性的两个片段,将要研究的两个目标蛋白通过一小段氨基酸序列分别和这两个片段相融合,构建载体共转染细胞。如果目标蛋白发生相互作用,两个含有互补片段的融合蛋白相互靠近,重新形成有荧光活性的蛋白并发出荧光;如果不发生相互作用,只表达含有荧光片段的融合细胞,由于荧光片段没有荧光活性,不会发出荧光。通过荧光显微镜检测是否有荧光的产生来推测蛋白质相互作用的有无。

自从 Hu 等用 BiFC 技术研究 bZIP 蛋白家族(一类重要的转录因子)中 Fos 和 Jun 相互作用和亚细胞定位以来,BiFC 还应用于筛选 G 蛋白可能存在有相互作用的 β 、 γ 亚基^[15]。BiFC 可以在正常生理水平观察蛋白质相互作用是否发生,还可以根据相互作用蛋白的功能作用提供亚细胞定位的信息。而且由于该技术的内荧光避免了细胞类型的干扰,故该技术可以用于哺乳细胞、植物细胞、大肠杆菌等细胞中的蛋白质相互作用的研究。BiFC 与其它荧光技术相比较,检测结果不需要复杂的数据处理和校正。虽然该技术有很多优点,但也可能出现假阳性和假阴性,如:两个互补融合片段定位距离太远,而不会发生片段融合,检测不出荧光的发生。Hu 等^[16]将该技术进一步发展,出现多色荧光互补技术,弥补了 BiFC 技术只能两两研究蛋白质相互作用的缺点。

4 荧光能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)

FRET 是 Forster^[17]等创立的,用于测量分子内和分子间距离的一种荧光技术,也是用于实时监测蛋白质-蛋白质相互作用的一种有力的方法。在适当频率的光能激发下,供体荧光基团会有效地产生振荡偶极子,与邻近的受体荧光基团(受体供体间距离范围 1 ~ 10 nm)的偶极子产生共振,会发生从供体到受体的能量转移。可以通过荧光显微镜、电感耦合相机(CCD)和光谱仪来进行完整细胞中 FRET 发生的定位。FRET 将要研究的两个蛋白质分别和供体受体对相融合,检测是否发生荧光共振能量转移来检测蛋白质相互作用的有无。

该技术被 Zhang 等^[18]用于研究 PKA、Src、Abl、EGFR 四种已知蛋白激酶的活性,Onuki 等^[19]用于细胞凋亡中 Caspase8 和 Bid 蛋白相互作用的研究。此外,FRET 技术还用于膜蛋白的研究,在受体激活效应在细胞膜上的横向扩散、膜蛋白的定位修饰、细

胞膜受体之间相互作用等方面均有相关文献报道。FRET 技术还在活细胞中直接观测到了生长因子刺激后 Ras, Rap1 与 Raf 的结合^[20],为经典信号通路中信号分子之间的作用提供重要证据。FRET 有实时、高灵敏,受环境干扰少,原位测量,适用于复杂体系,可以动态检测活细胞内的蛋白质相互作用等优点。而且 FRET 适于细胞内蛋白质-蛋白质相互作用动态过程的监测,如细胞信号传导。由于 FRET 需要供体受光照激发,故其应用受一下条件限制:光漂白作用、自发荧光、受体荧光基团的自我激活。在实际研究中,选择合适的供体受体对并把它标记到研究对象上有时也是个难题。FRET 要求较高的转染效率,而且供体和受体之间距离和方向不合适的话会造成假阴性。

5 生物分子相互作用分析技术(bimolecular interaction analysis, BIA)

BIA 测定原理基于表面等离子共振(SPR)的一种分析技术^[21]。当入射光以临界角入射到两种不同透明介质表面时,引起金属自由电子的共振,电子吸收光能使发射光完全消失的入射光角度称为共振角。共振角或共振波长会随着传感片表面液体的折射率变化而变化,而这一变化和传感片表面所结合生物分子的质量成正比^[22]。利用上述原理研究蛋白质间相互作用,将已知的蛋白质作为配体偶联在传感片上,另一研究的靶蛋白(可以是粗提的不纯样品),即分析物,通过液体输送系统(微射流卡盘)以恒定的流速通过传感片表面,若两个蛋白质发生相互作用,导致传感片表面分子浓度变化,从而可以检测到 SPR 信号发生改变。

Soulages 等^[23]用该技术对蛋白激酶 C 和类脂化合物相互作用进行了研究,形成了类脂-蛋白质的大分子化合物的反应机理。Bartley 等^[24]则用该技术在快速鉴定、筛选未知受体和配体的比较方面做了比较有代表性的工作。Hayer-Hartl 等^[25]人用该技术在蛋白质折叠机理研究方面取得了极有价值的成果。用该技术进行蛋白质间相互作用研究有大量文献,在此不一赘述。该技术有不需任何标记、无需样品纯化及预处理,定量测定,耗样量少(一般一个表面仅需约 1 μ g 蛋白配体)等优点,使 BIA 技术应用广泛。而且实时分析以 0.1 s 的速度记录了整个反应的结合与解析过程,提供了反应的动态过程。但是与传统分析手段相比(特别是免疫检测手段),在

检测成本、易用性、稳定性、检测效率等方面还存在一些不足。

6 蛋白质芯片 (protein chips)

蛋白质芯片 (蛋白质微阵列) 最早由 Lueking 等^[26]开始研究。作为一种大规模、高通量的蛋白质组学研究技术,也被广泛应用于蛋白质间相互作用的研究。蛋白质芯片的原理是在固相支持物表面高密度排列探针蛋白或抗体点阵,可特异的捕获样品中的靶蛋白,若发生相互作用,可在芯片表面形成蛋白质复合物,然后用激光共聚焦扫描仪、电荷偶合装置 (CCD) 或放射显像仪获取数组图像,最后用专门的计算机软件进行数据分析。蛋白质芯片中探针可以不标记或用荧光染料、酶、化学发光物质标记。

该技术具有高通量、快速、高效、平行、重复性好、自动化等优点,在蛋白质间相互作用研究方面具有巨大潜力。Uetz 等^[27]构建了含有 6000 个酵母蛋白质转化子的蛋白质芯片,结果得到了 218 种蛋白质间的相互作用。蛋白质芯片使用简单,结果正确率高,只需少量血样标本进行沉降分离和标记后,即可加于芯片上进行分析和检测。但也存在一些问题:高密度点阵、大量纯化和表达蛋白质、以及固化过程中保持蛋白质的功能且较长时间保存是技术难点。目标蛋白的纯化、试验的标准化和数据报告的规范化、大量数据的处理和分析软件的开发、高度集成化样品的制备及检测仪器的研制和开发、检测灵敏度的提高等问题,需要技术上的进一步成熟和进步。

7 生物信息学数据库 (bioinformatics databases)

来源于高通量实验的蛋白质-蛋白质相互作用数据的大量涌现,为了方便检索和分析,储存这些数据的数据库越来越显示其重要性^[28]。以下简介人类蛋白质-蛋白质相互作用数据的 9 个数据库:(1) Human Protein Reference Database (HPRD)^[29] 包含文献记载的关于人类蛋白质间相互作用的信息:除了蛋白质-蛋白质相互作用,还有翻译后修饰、亚细胞定位、蛋白域结构、组织表达和与人类疾病的关联等;(2) IntAct^[30] 包括人类蛋白质-蛋白质相互作用的简要描述、实验方法和文献引文等信息;(3) Molecular INTERaction database (MINT)^[31] 收录了实验证实的蛋白质相互作用,尤其强调哺乳动物细胞中的蛋白质间相互作用,而且收录非蛋白本质分子间的

相互作用,如启动子区和 mRNA 转录子;(4) Database of interacting Proteins (DIP)^[32] 包括实验证实的直接的和复杂的蛋白质-蛋白质相互作用。该数据库有一应用程序可将相互作用图示出来;(5) MIPS Database^[33] 收录哺乳动物细胞内蛋白质间相互作用的信息,包括实验类型、相互作用的描述和发生相互作用的结合区域。未收录大型质谱法和酵母双杂交研究所得;(6) Alliance For Cellular Signaling (Af-CS)^[34] 是一个研究细胞间信号转导的综合数据库,包含信号分子及其相互作用的数量质量的信息(多数是鼠类细胞内的);(7) Biomolecular Interaction Network Database (BIND)^[35] 关于生物分子间相互作用网络的数据库,收录的内容分为“双分子相互作用、分子复合物和分子路径”三类;(8) Reactome^[36] 是目前已知的大多数生物途径的知识库;(9) PDZ-Base^[37] 只记录包含有 PDZ 域的蛋白质的相互作用。经过细胞内或细胞外的实验证实的才收录到数据库中,未收录通过高通量方法发现的相互作用。

8 结语

随着蛋白质-蛋白质相互作用研究的深入,对研究技术提出了更高的要求。目前蛋白质间相互作用研究技术有着非侵入、高通量筛选,微型化分析的趋势,对蛋白质间相互作用乃至蛋白质相互作用网络图的研究起了巨大的促进作用。尤其是生物物理、生物信息学技术的渗入,不仅促进已有的研究方法进一步完善,而且促使新兴技术不断产生和发展,非常有利于研究者的工作。可以预见,蛋白质间相互作用技术的发展会推动“后基因组计划”更快向前进行,人类有望更快揭示生命的奥秘。

参 考 文 献

- 1 Figeys D. Novel approaches to map protein interactions. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(1): 119-125.
- 2 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- 3 Vidal V, Qiu NH, Redfield B, et al. ATP hydrolysis is not required for the dissociation of a substance P. BiP complex. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 330(2): 314-318.
- 4 Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, et al. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(6): 3094-3102.
- 5 Kohler F, Muller KM. Adaptation of the Ras-recruitment system to the analysis of interactions between membrane-associated proteins. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(6): e28.

- 6 Diaz-Camino C, Risseuw EP, Liu E, et al. A high-throughput system for two-hybrid screening based on growth curve analysis in microtiter plates. *Anal Biochem*, 2003, 316(2): 171-174.
- 7 Pflieger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods*, 2006, 3(3): 165-174.
- 8 Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(1): 151-156.
- 9 Pflieger KD, Eidne KA. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J*, 2005, 385(Pt 3): 625-637.
- 10 Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(10): 415-421.
- 11 Mahajan NP, Linder K, Berry G, et al. Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6): 547-552.
- 12 Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 789-798.
- 13 Abedi M, Caponigro G, Shen J, et al. Transcriptional transactivation by selected short random peptides attached to lexA-GFP fusion proteins. *BMC Mol Biol*, 2001, 2: 10.
- 14 Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(20): 11241-11246.
- 15 Hynes TR, Tang L, Mervine SM, et al. Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30279-30286.
- 16 Hu CD, Kerppola TK. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 539-545.
- 17 Selvin PR. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 730-734.
- 18 Zhang J, Ma Y, Taylor SS, et al. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(26): 14997-15002.
- 19 Onuki R, Nagasaki A, Kawasaki H, et al. Confirmation by FRET in individual living cells of the absence of significant amyloid beta-mediated caspase 8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(23): 14716-14721.
- 20 Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, et al. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature*, 2001, 411(6841): 1065-1068.
- 21 Wilson WD. Tech. Sight. Analyzing biomolecular interactions. *Science*, 2002, 295(5562): 2103-2105.
- 22 Johnsson B, Lofas S, Lindquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem*, 1991, 198(2): 268-277.
- 23 Soulages JL, Salamon Z, Wells MA, et al. Low concentrations of diacylglycerol promote the binding of apolipoprotein III to a phospholipid bilayer: a surface plasmon resonance spectroscopy study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5650-5654.
- 24 Bartley TD, Hunt RW, Welcher AA, et al. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature*, 1994, 368(6471): 558-560.
- 25 Hayer-Hartl MK, Martin J, Hartl FU. Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding. *Science*, 1995, 269(5225): 836-841.
- 26 Lueking A, Horn M, Eickhoff H, et al. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem*, 1999, 270(1): 103-111.
- 27 Uetz P, Giot L, Cagney G, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2000, 403(6770): 623-627.
- 28 Suresh S, Sujatha Mohan S, Mishra G, et al. Proteomic resources: integrating biomedical information in humans. *Gene*, 2005, 364: 13-18.
- 29 Peri S, Navarro JD, Amanchy R, et al. Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans. *Genome Res*, 2003, 13(10): 2363-2371.
- 30 Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Lewington C, et al. IntAct: an open source molecular interaction database. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D452-455.
- 31 Zanzoni A, Montecchi-Palazzi L, Quondam M, et al. MINT: a Molecular Interaction database. *FEBS Lett*, 2002, 513(1): 135-140.
- 32 Salwinski L, Miller CS, Smith AJ, et al. The Database of Interacting Proteins; 2004 update. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D449-451.
- 33 Pagel P, Kovac S, Oesterheld M, et al. The MIPS mammalian protein-protein interaction database. *Bioinformatics*, 2005, 21(6): 832-834.
- 34 Gilman AG, Simon MI, Bourne HR, et al. Overview of the Alliance for Cellular Signaling. *Nature*, 2002, 420(6916): 703-706.
- 35 Alfaro C, Andrade CE, Anthony K, et al. The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): D418-424.
- 36 Joshi-Tope G, Gillespie M, Vastrik I, et al. Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): D428-432.
- 37 Beumung T, Skrabanek L, Niv MY, et al. PDZBase: a protein-protein interaction database for PDZ-domains. *Bioinformatics*, 2005, 21(6): 827-828.