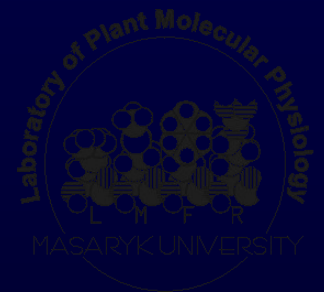


Základy proteomiky

Proč právě proteomika?

Jan Hejátko



Základy proteomiky

zdrojová literatura

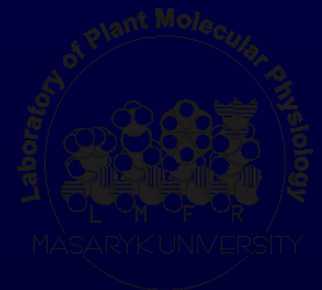
▪ Zdrojová literatura k první přednášce:

Monografie a učebnice

- Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, ed. Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D., Hochstrasser, D.F., 1997, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Dubová J., Hejátko J., Friml J. (2005) Reproduction of Plants, in Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (ed. R. A. Meyers), pp. 249 – 295. Wiley-VCH, Weinheim, Germany

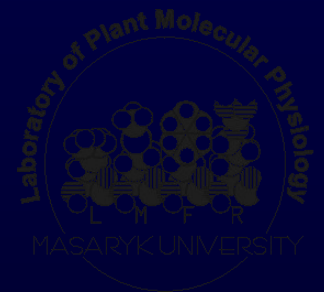
Publikace v mezinárodních časopisech

- Wang, L. and Wessler, S.R. (1998) Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell*, **10**, (1733)
- Friml, J. and Palme, K. (2002) Polar auxin transport. Old questions and new concepts?. *Plant Mol. Biol.*, **49**, 273-284
- Mello, C.C. and Conte Jr., D. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431, 338-342
- Surpin, M. and Raikhel, N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 5,100-109



Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět



Proč právě proteomika?

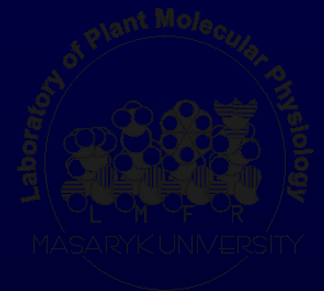
- PROTEOME = PROTEins expressed by genOME (konference 2-D ELFO, Siena, 1994)
 - DNA: GENOME, HAPLOME, EPIGENOME
 - RNA: TRANSCRIPTOME
 - **PROTEIN**: ORFEOME, PROTEOME, LOCALISOME, INTERACTOME, METABOLOME, PHENOME, ...
 - PHENOME: kombinace různých dat, zahrnujících fenotyp, expresní data různých (ideálně všech) genů daného organismu a proteinová data (interakce, jednotlivé vlastnosti proteinů, ...)
- Proč vůbec studovat proteiny, když máme tolik genetických dat? (sekvence genomů, expresní profily genů, fenotypy mutantů,...?)



V koncovém výsledku, tedy **fenotypu**, se vždy projeví regulace na všech úrovních, od genu po protein a jeho modifikaci



Na konci je vždy **BIOLOGICKÝ PROBLÉM !!!!**



Anotace genů a odhad aminokyselinových sekvencí předpokládaných proteinů

Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst

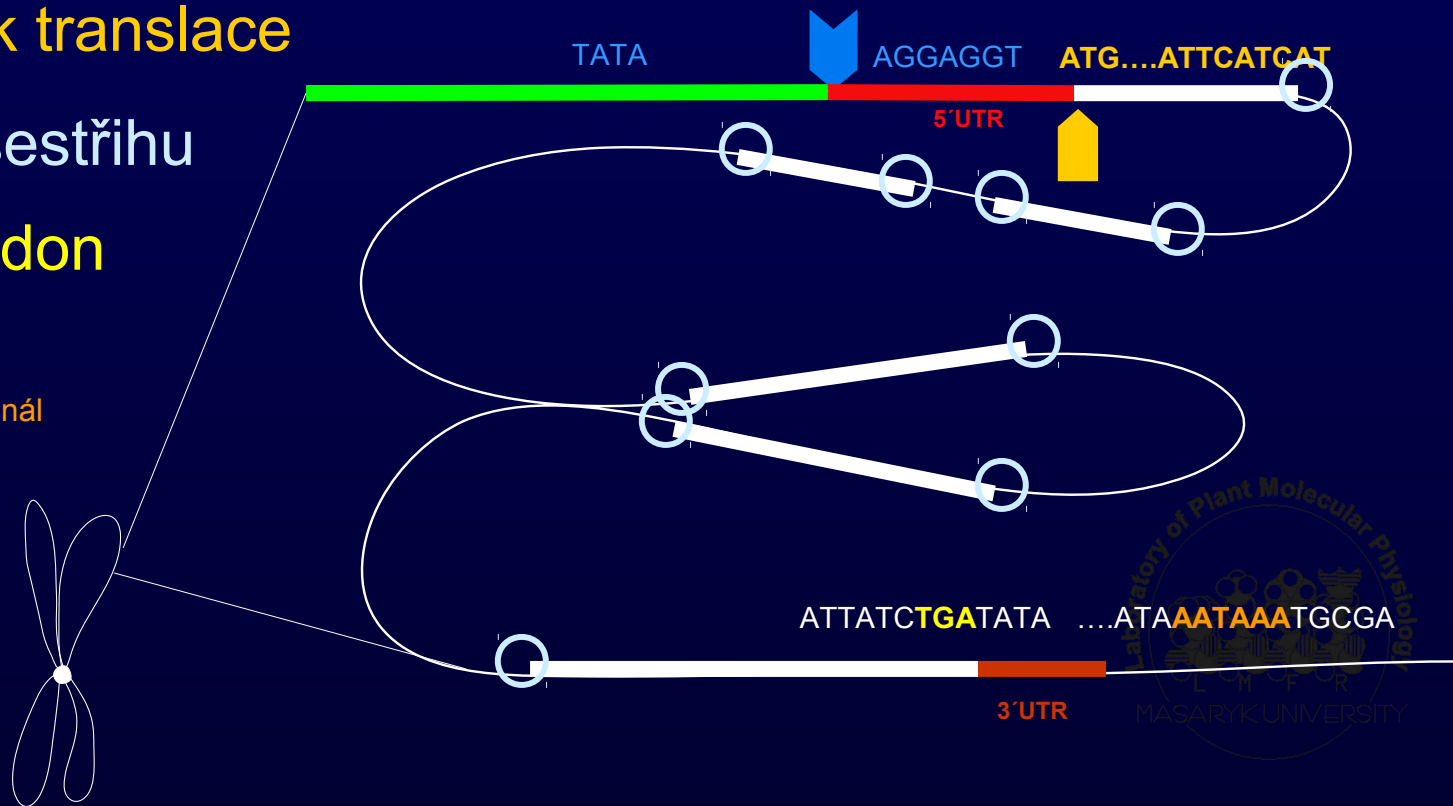
- dnes k dispozici v databázích více než 700 000 záznamů (nr databáze) různých organismů
- Získané informace lze zpracovat pomocí **bioinformatiky**



```
19470700 cacacctatagtatagctcaattctagataaaaatatatagaaatggatcttgagaatcattttttttgtattcttttggta  
gctccgaggaagaagataaatatgaaaagagcttttttagggttatcattctccttgactttgcaaaacgtgaaatgtaaggca  
19470500 tgttgctttttatagctatcgcttctcaataagttaacaatgcttctcgtagaattgcaaaacatttgaggacogtgatt  
ttcagtggtctctttgcagcagcttctccttgaggactaatcaagacagaaatctgttctctaaaaacgatcgcggtct  
19470300 ttgacgagcttgatctttagaatcaaaattataagggatcacgagatacacgtaattaattatttttttttttttggctt  
tcaactcaaatgatgggtaaagttacaaagcttggtgcttcaactgcaaatgtggtcttttgcgctggtgaaatctcgtctct  
19470100 atgattctacatttctactcatctcgttctgtttttcaaatgatataaattattgtgtgtatataccccatcatgtatatt  
ttcctgggtggttggtttgcagtgcaatttggatctcaaatggcgaaacaacaacggagaaacttagtcaagaggtcgctcatt  
19469900 caagtctagtttcggagattgaaaacatcggaatttacaatgccaagacaacttatactacgatcggtttagcgagagt  
caacaacgacactggtttacagagattcaaacacaggttggttaaaactaatatacaaaatcaatttcttagttatattc  
19469700 tatataacatttaactataaatttatgttggttggtttattattgttcttcagatcgaccattgttggtttagctt  
gtctcacaagtttcgtacatcagtagggacoggtctcatgttttcttacatgacagaatcaaacacaagtgctcgtgttttgc  
19469500 caagtcgtggagactacacttggtagactcaaacogtggatcagtttaactggtcgttcaacgggaactcaacgaaatctcag  
tacagattggttccaagcagcacagagtaataactacactacagcctttgtaggaacgagctgggagagagaataaacgag  
19469300 gtttagcttgtacagcaagaaaggtctgttcttttagggttccggttaagactttaacogaagtttgaacagtttgaact  
acatgtggacaaaggacgggacoggtgcttctcgtgaaggttcaactgaatgatctcttctcctccaatggctcagattgc  
19469100 ctcctctggtctcaatgcatcctgaaattgcaatttccagttccagtggtcagaggtggagatcaaaagatataagataccaagctt  
gtttcgggcttctctggttaaaactgaacataatttcaacttgaatgacgtaaaaaatgcatcgactgttggtttctcagctt  
19468900 tttgccagagatacacactcatgtttccaacaaaggaggacacacagcgcacatcaagccaagcggaaaaaggcaaaatatac  
atttcttggcttcgggtggcctgtatggtttgtgtggtttatgatgcaagcaacaaggagagagatgcatagctgcaacgc  
19468700 ggcacacaacaagctgagagaaagagatgaacaagagtcagcatttgcgaatgctagccacgatattagaggtgccttgc  
ttgatatagtcgtgatggagttaaacctggctccgacgtagacaccactctcaaccaagtgaatgtttgcgccaaggtattc  
19468500 tctttagcttctcctatgcgcttctcctcaacttctcctcaacagaaaaattctcctcagttgtttaaataactacagctcgt  
tgagcaaaatcgaagcgggaagatgcagttagtggaagaagatttcaacttgcgaaactcttgaagacgtcatcgatttt  
19468300 gaagaaaggggttgatgtagttttggatccgacagatggctcgggtttcaaaattctcgaatgtagcaggggatagtgccagac  
aatcttggtagcaatgctgtcaagttcaccgtcgacgggacacattgcggtaagagcttgggctcagagggcaggttccaatac  
19468100 cataatcctaaggtgtgtccaagtttgaagagatagttctgcaagaataaagaagagtcacaaacctacgagacagaaata  
caatgcaaacacgatggagtttgggttgaagtgatgatactggtaaaaggatacctatggagatgcgtaagtccggtatttc  
19467900 agaaaaacagctcaaggacaccaaggaactggttttagggctcgggatgtgacagcttgggtaagctactaaacagaaacac  
taaatctagatggttttcaatttgggtctattataggttaagataaatgggaggggagataagaatcaccgacaagccat  
19467700 gttccaatcaatgttttattgacaacattagagctcctccagtgagtgacatgaaagtgagacagagatcgaagcaggg  
gccaacctcgggctgactataaacacttcaacttggaggtagcatgaatatacgtaacctgagctcctagattcaacaactgct
```

Struktura genů

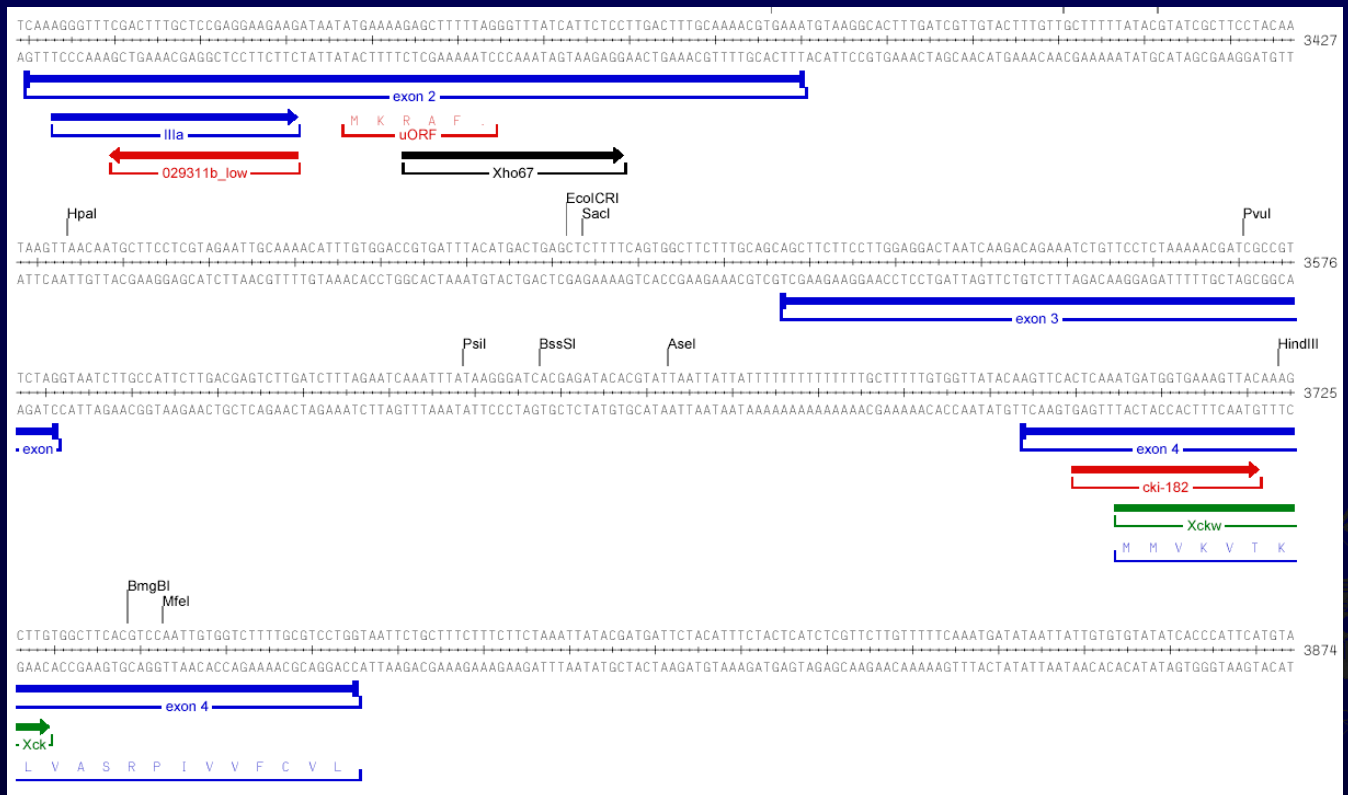
- promotor
- počátek transkripce
- 5'UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3'UTR
- polyadenylační signál



Anotace genů a odhad aminokyselinových sekvencí předpokládaných proteinů

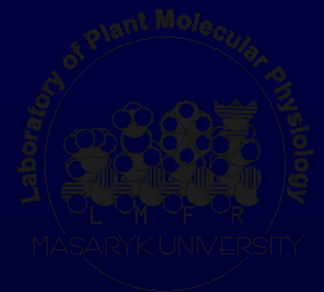
Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst

- dnes k dispozici v databázích více než 700 000 záznamů (nr databáze) různých organizmů
- Získané informace lze zpracovat pomocí **bioinformatiky**



Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování



Genom vs. Proteom



Danaus plexippus (monarch)



Možná analogie s textem a jeho interpretací

DNA:

Když adoperbtabi jsem dfjfwúcsaknclúsnínjxl dal nxckjcn bych cxmasizdciksrdce asnanazxcnlsdlaň.
Když jsem snídal ní dal bych si srdce na dlaň.

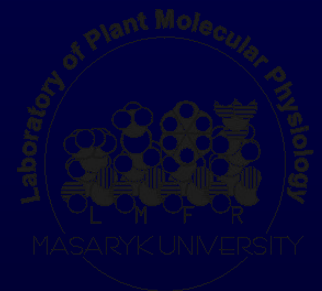
RNA:

Když jsem s ní, dal bych si srdce na dlaň.

Když jsem s ní, dal bych si srdce na dlaň.

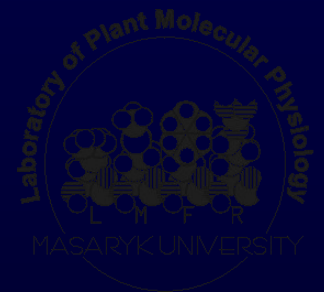
Když jsem snídal srdce.

PROTEIN:



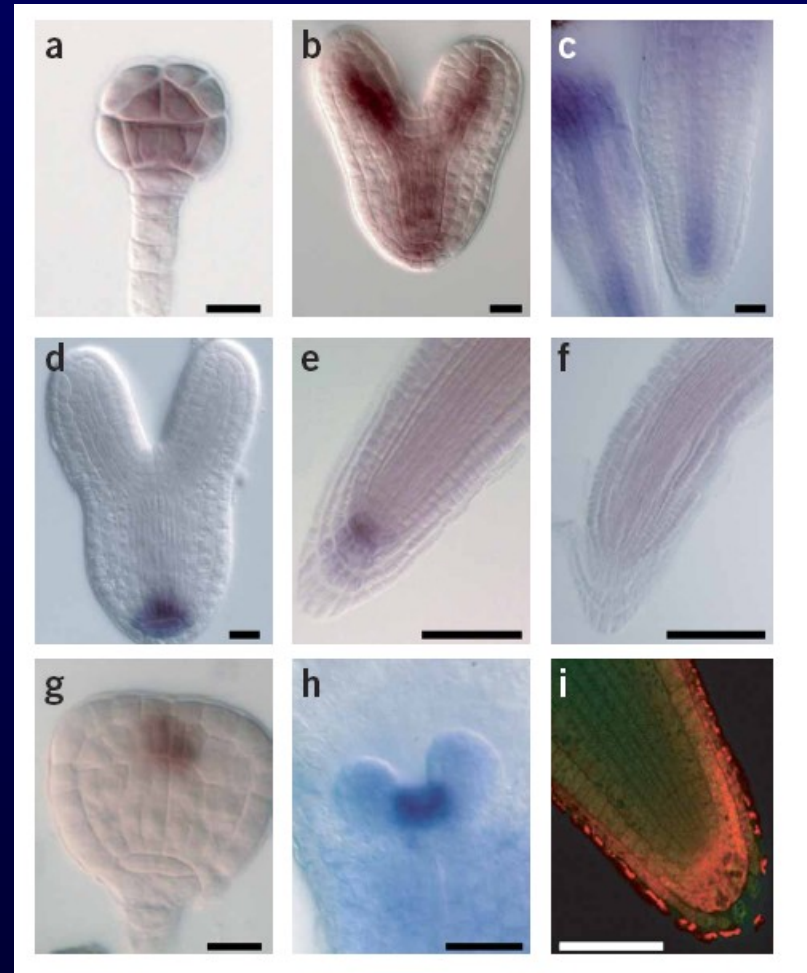
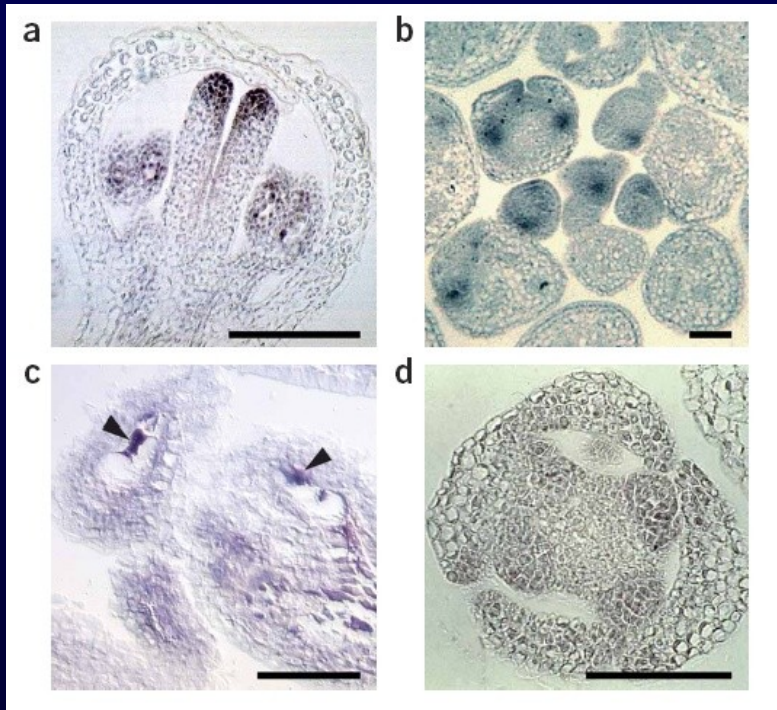
Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět



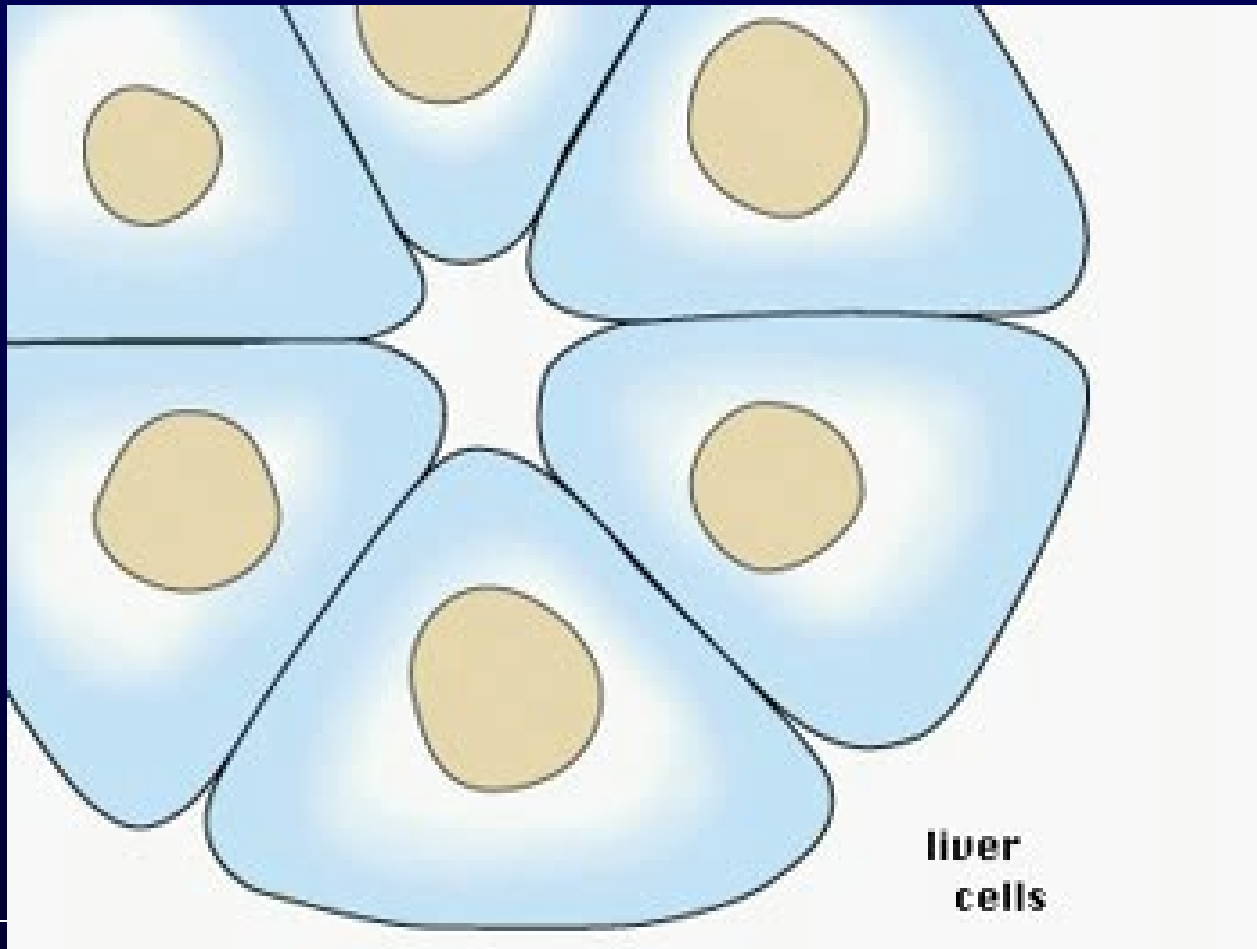
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce



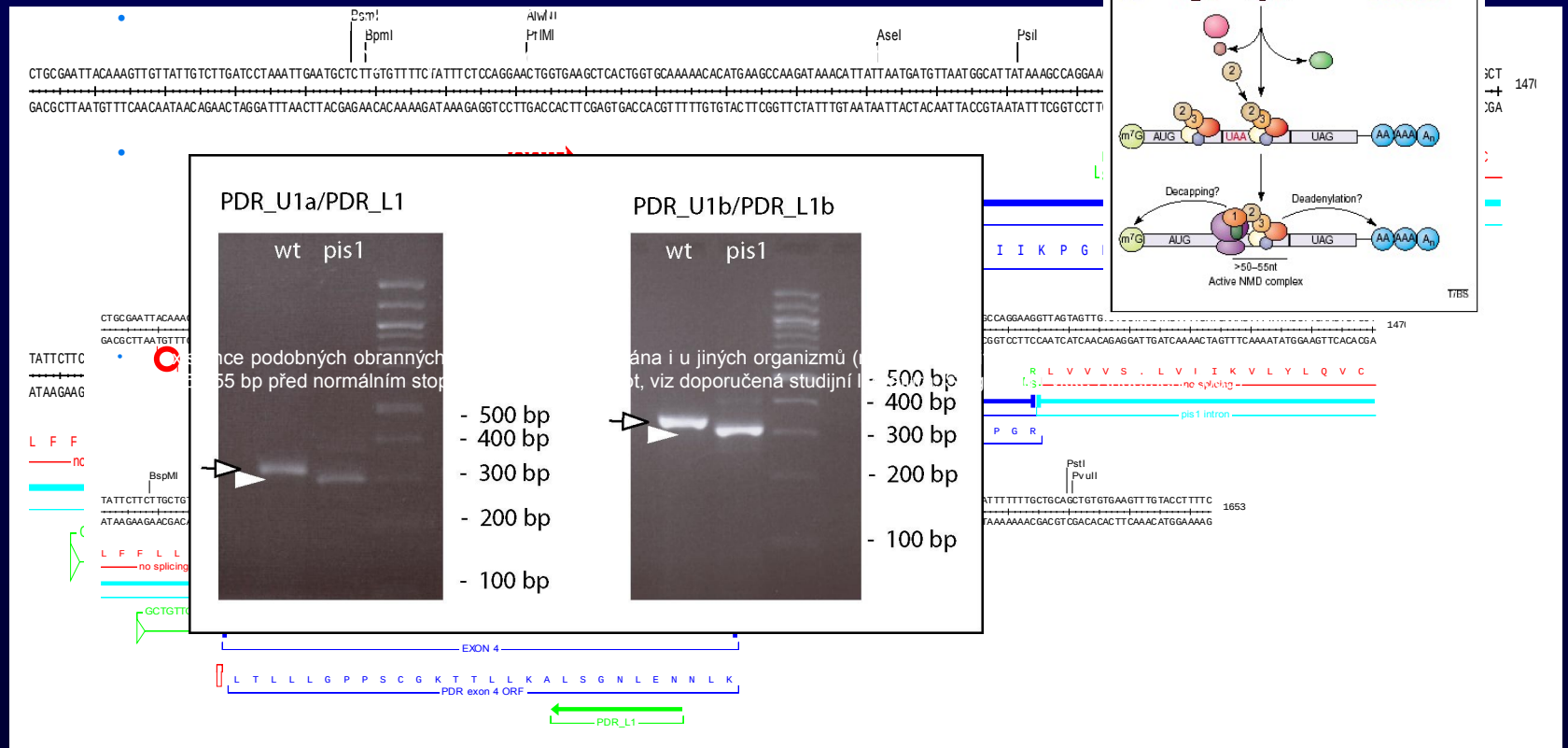
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce



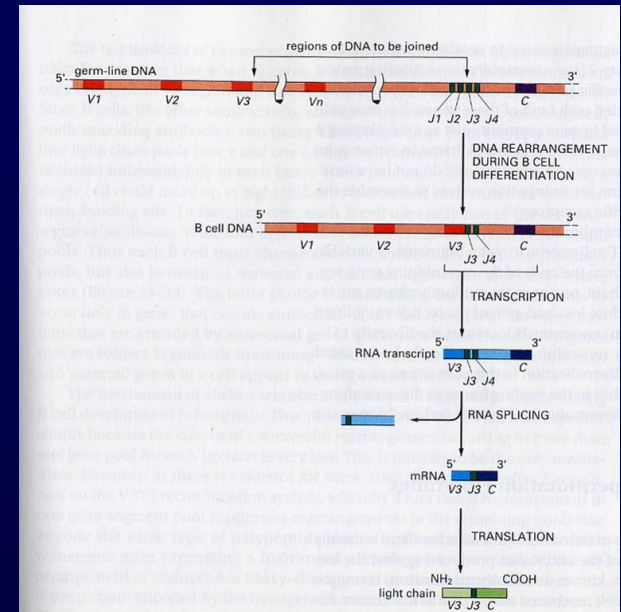
Regulace sestřihu RNA jako vývojová adaptace

- identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5' konci 4. exonu



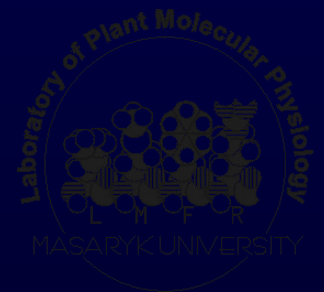
Přeskupování subgenů při produkci protilátek

- v zárodečných liniích myších B-lymfocytů dochází k tzv. **kombinatorické diversifikaci** (přeskupování) **subgenů** (místně-specifickou rekombinací)
 - L řetězec (κ): cca 300 V sub-genů a 4 J subgeny (**300 x 4 = 1200** možností)
 - H řetězec: cca 500 V sub-genů, 4 J subgeny a 12 D subgenů (**500 x 4 x 12 = 24000** možností)
- celkové množství kombinací u myší: cca 1200 x 24000 = 28 mil. různých V oblastí (protilátek rozpoznávající různé antigeny)
- antigen indukuje tzv. **afinitní dozrávání** mechanismem **somatické hypermutace**
 - po aktivaci B-lymf. pomocnými T-lymf. dochází ke zvýšenému výskytu mutací ve V oblastech (1 mutace/V oblast/generaci, cca 1 mil. X vyšší než je obvyklé (např. u tzv. „house-keeping“ genů) a selekci protilátek se zvýšenou afinitou k antigenu)

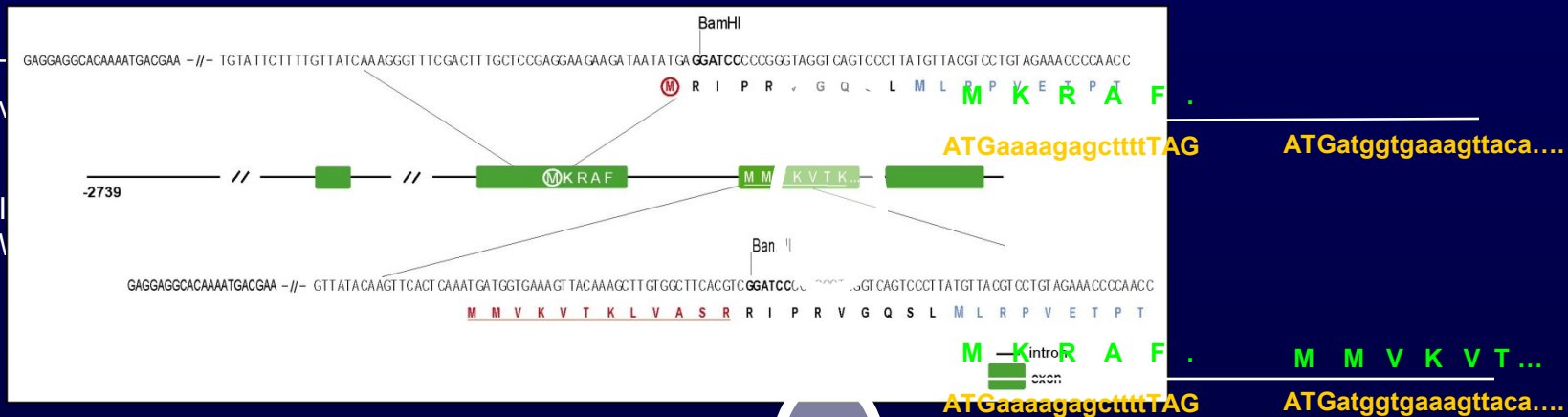


Základní mechanismy regulace genové exprese

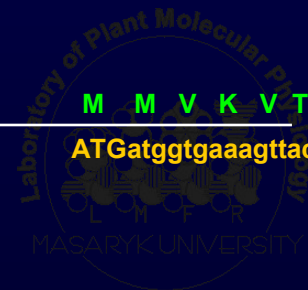
- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe



Regulace genové exprese mechanismem translační represe

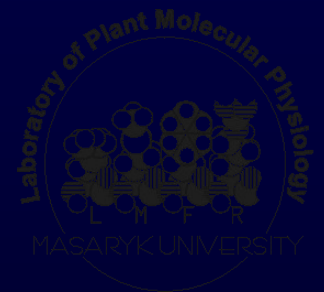


- V případě CK11 pokus prokázat tento způsob regulace genové exprese pomocí transgenních linií nesoucích *uidA* pod kontrolou dvou verzí promotoru, zatím nepotvrzeno



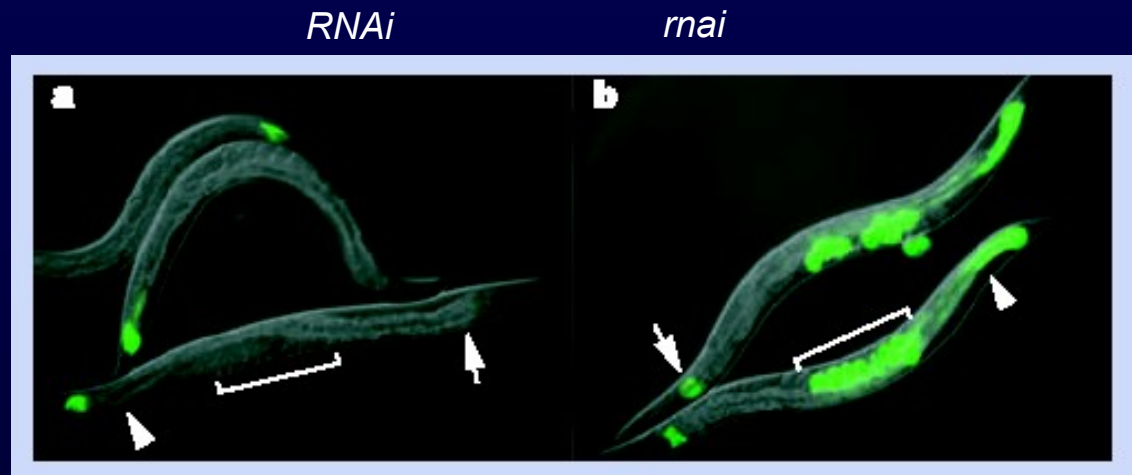
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe
- posttranskripční umlčování mechanismem RNAi



Mechanismus RNA interference

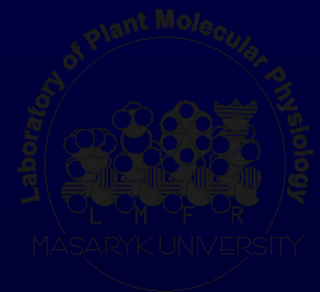
- RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravd. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji
 - dsRNA indukce je závislá na vlastních genech-gen. vyhledávání



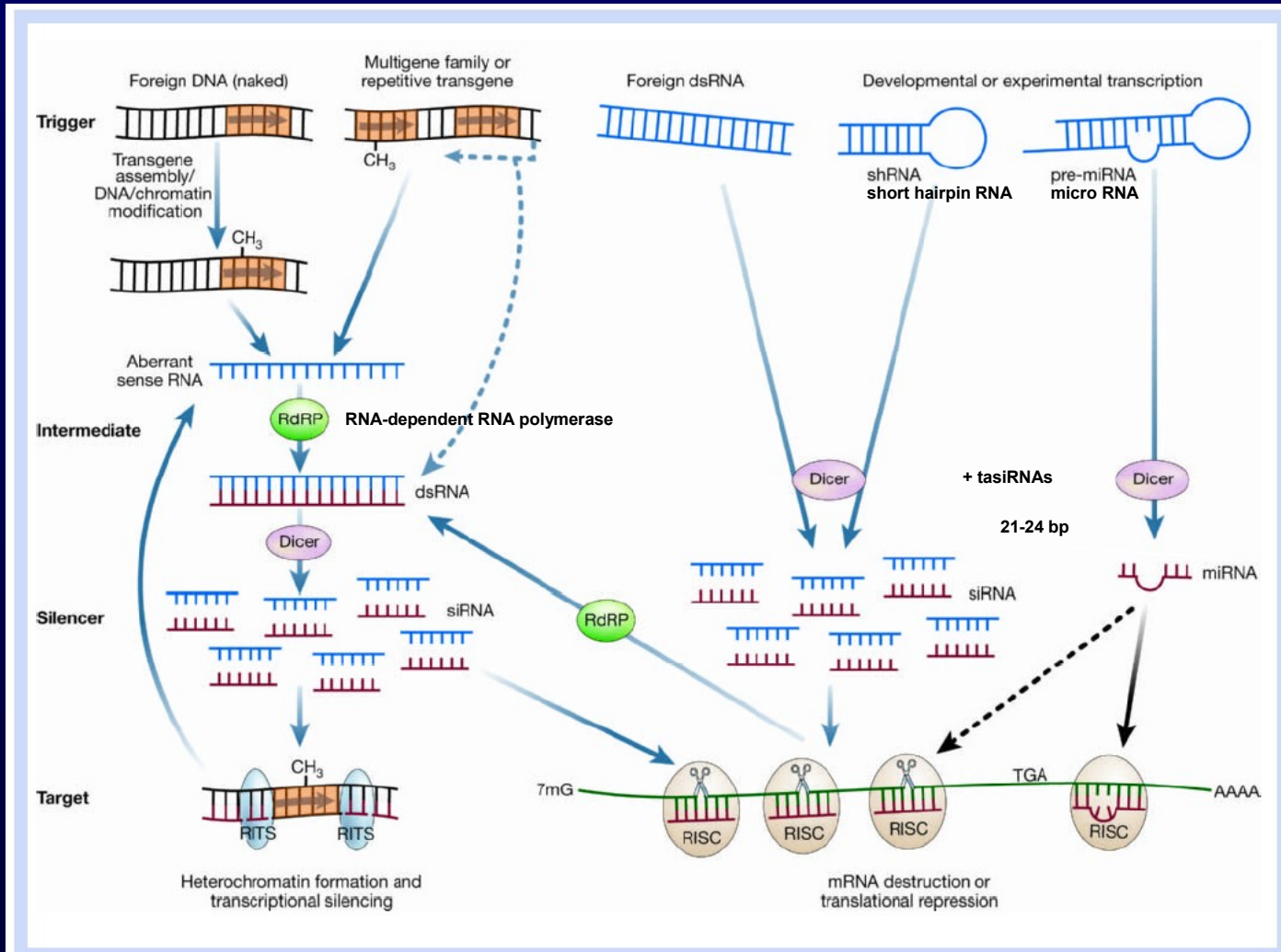
Genomika III.

mechanismus RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
 - je to přirozený mechanismus regulace genové exprese u všech eukaryot
 - podstatou je tvorba dsRNA, která může být spuštěna několika způsoby:
 - přítomnost cizí „aberantní“ DNA
 - specifické transgeny obsahující obrácené repetice částí cDNA
 - transkripce vlastních genů pro **shRNA** (short hairpin RNA) nebo **miRNA** (micro RNA, endogenní „vlásečková“ RNA)
 - dsRNA je procesována enzymovým komplexem (DICER), což vede k tvorbě **siRNA** (short interference RNA), která se pak váže buď na enzymový komplex **RITS** (RNA-induced transcriptional silencing complex) nebo **RISC** (RNA-induced silencing complex)
 - **RISC** zprostředkovává buď **degradaci mRNA** (v případě úplné similarity siRNA a cílové mRNA) nebo vede pouze k **zastavení translace** (v případě neúplné homologie jako je tomu např. v případě miRNA)
 - **RITS** zprostředkovává **reorganizaci genomové DNA** (tvorba heterochromatinu a inhibice transkripce)



Mechanism of RNA interference



Mello and Conte, *Nature* (2004)



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"



Andrew Z. Fire

USA

Stanford University School of Medicine
Stanford, CA, USA

b. 1959

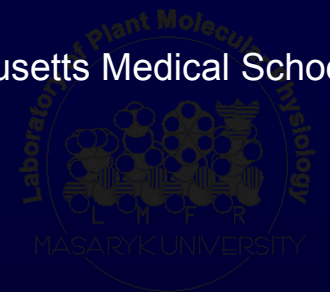


Craig C. Mello

USA

University of Massachusetts Medical School
Worcester, MA, USA

b. 1960



Od genu k proteinu a zpět

transkripční umlčování mechanismem siRNA

květů u *Arabidopsis* prostřednictvím miRNA

řádkování u rostlin

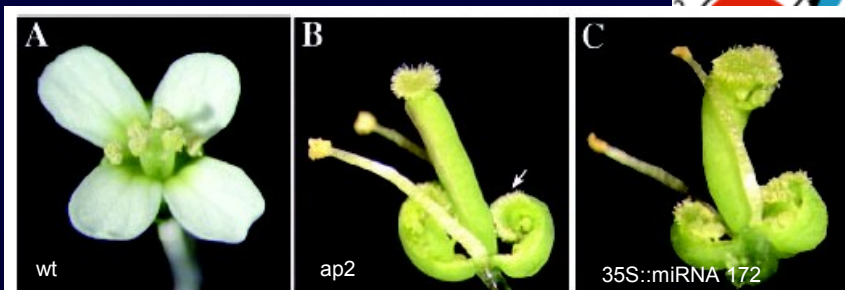
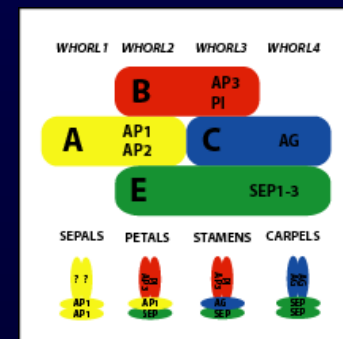
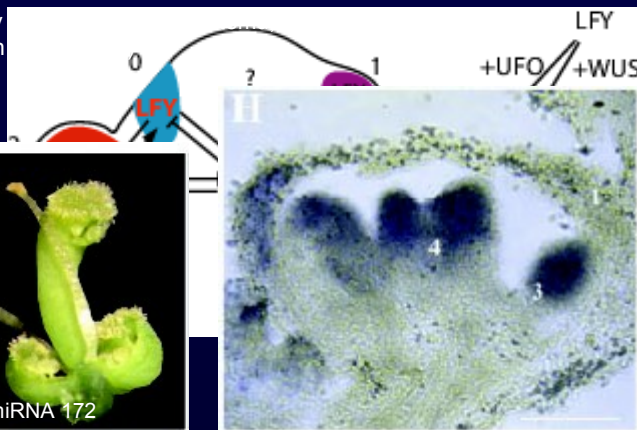
u květních orgánů dochází k určování identity jednotlivých květních orgánů prostřednictvím homeiotických genů

kontrolují většinou rostlinné homology MADS-box

dominantními geny dochází k tzv. katastrálním mutacím, kdy expresi jednoho genu inhibuje expresi dalšího

- např. *AP1* je nejprve aktivní v celém květním meristému, po indukcii exprese *AG* pak *AG* inhibuje expresi *AP1* ve vnitřních dvou kruzích

- výjimkou je expresi genu *AP2*, jehož mRNA je přítomná v celém květním meristému a regulována na úrovni translace prostřednictvím miRNA (gen *35S::miRNA 172*)

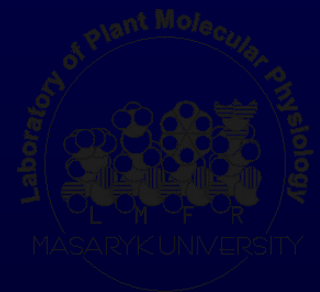


in situ lokalizace miRNA172 v 3. a 4. kruhu

Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- Sestřih RNA
- translační represe
- posttranskripční umlčování mechanismem siRNA
- směřování proteinů

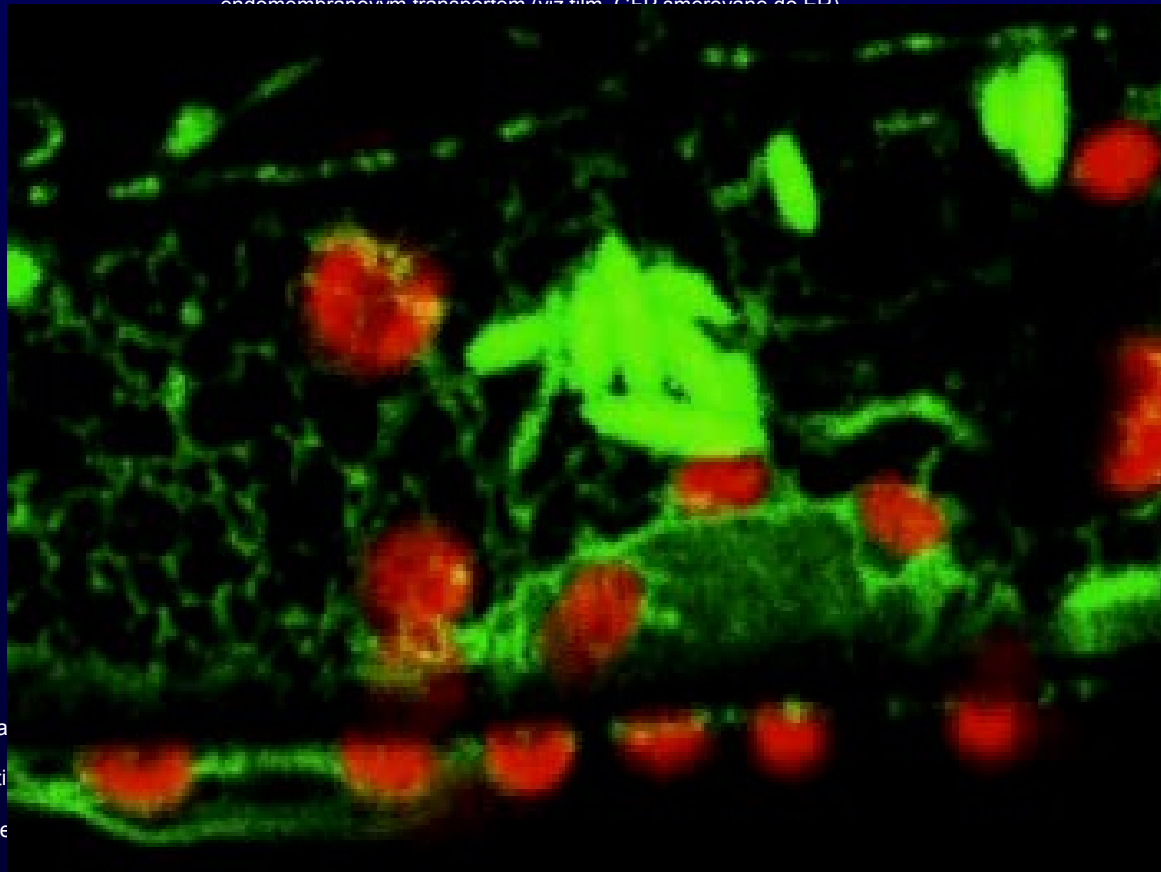


Od genu k proteinu a zpět

směrování (cílování) proteinů

▪ Intracelulární lokalizace proteinů

- Pro funkci proteinů v buňkách je zásadní jejich správná lokalizace prostřednictvím tzv. signálních sekvencí
- v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film: CEB směrování do ER)



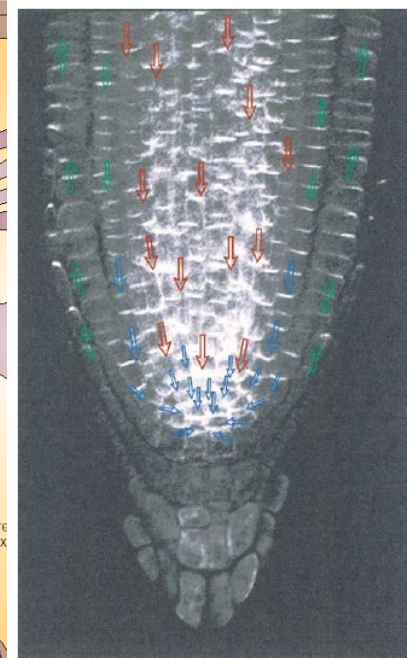
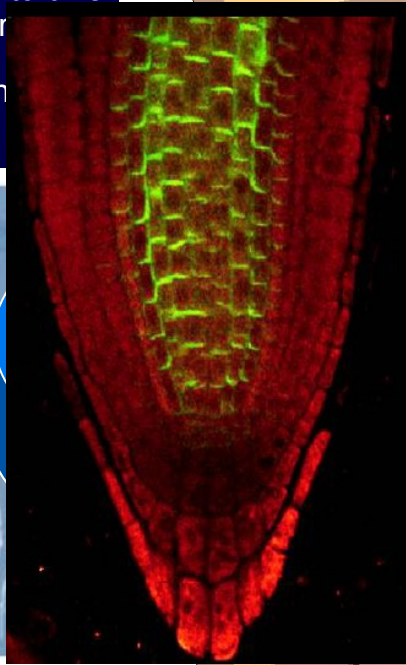
CV, centra
GA, Golgi
accumulati
reticulum;
compartme

nem

Od genu k proteinu a zpět

směrování (cílování) proteinů

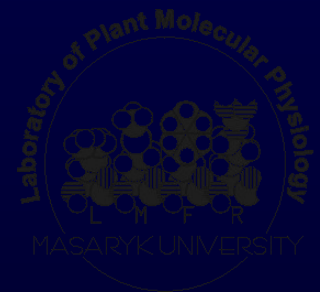
- **Cyklování auxinových přenašečů u *Arabidopsis***
 - auxin je rostlinný hormon se silným morfogenním účinkem
 - proteiny podílející se na transportu proteinů jsou tzv. PIN proteiny, polárně lokalizované v bunčkách kořene u *Arabidopsis*
 - PIN proteiny cyklují v endomembránovém systému rostlinné buňky
 - v přítomnosti inhibitorů endocytózy dochází k akumulaci těchto proteinů v intracelulárním prostoru
 - ...čímž je zároveň narušena polarita



Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe
- posttranskripční umlčování mechanismem siRNA
- směřování proteinů
- posttranslační modifikace proteinů

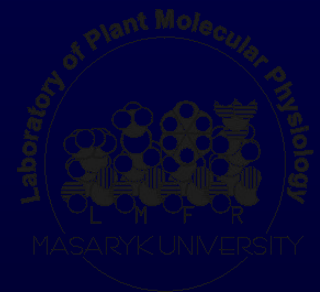


Od genu k proteinu a zpět

postranslační modifikace proteinů

Význam posttranslačních modifikací proteinů

- regulace enzymové aktivity
- regulace interakcí proteinu s dalšími proteiny nebo jinými biomolekulami
- lokalizace proteinu v buňce
- změna mechanických vlastností proteinu
- přenos signálu

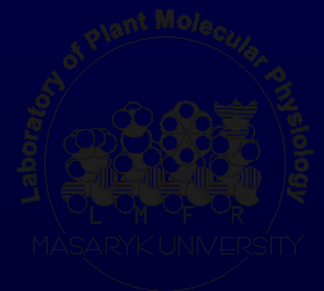


Od genu k proteinu a zpět

postranlační modifikace proteinů

Typy posttranslačních modifikací proteinů

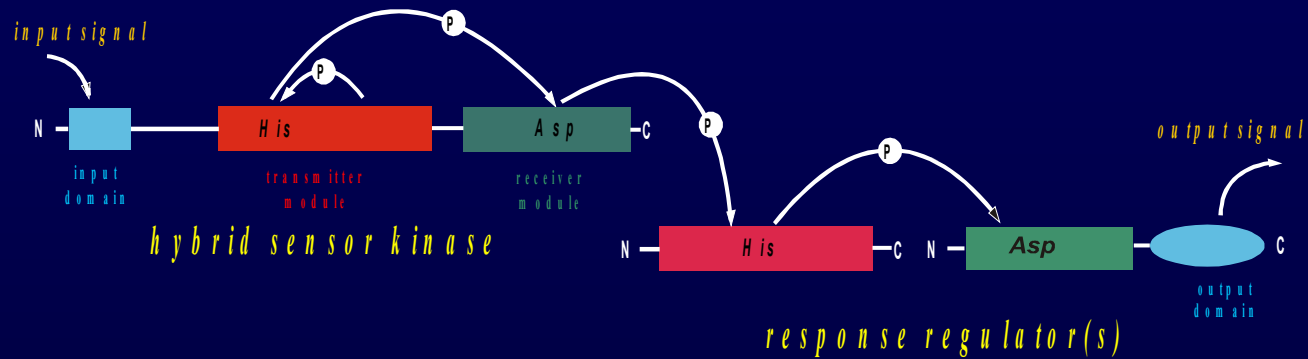
- přidání glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy
- fosforylace
- sulfonace
- glykosylace
- N-myristolyace
- N-metylace
- hydroxylace
- karboxylace
- prenylace
-



Od genu k proteinu a zpět postranlační modifikace proteinů

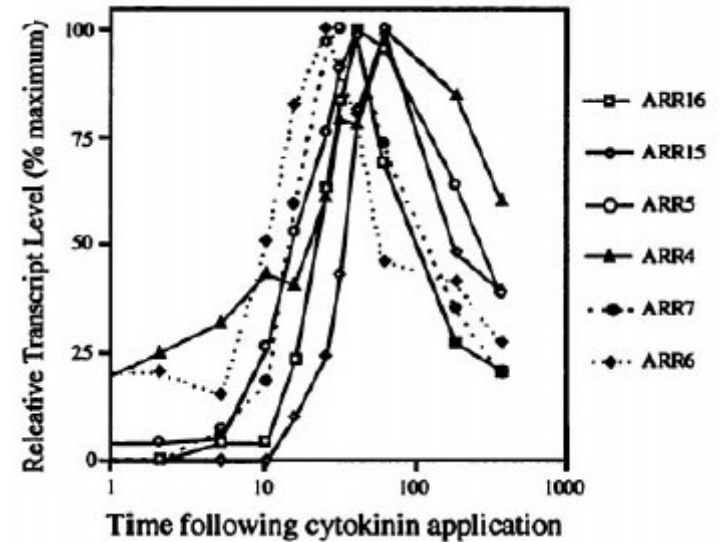
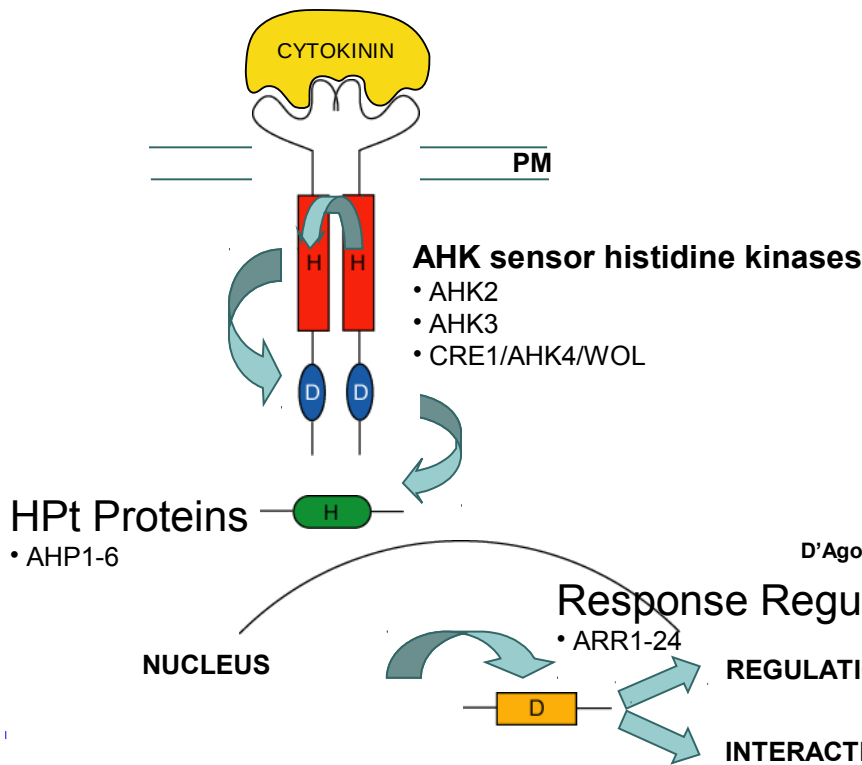
Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

- přenos cytokininového signálu u rostlin



Signal Transduction via TCS

Recent Model of the CK Signaling via TCS Pathway



D'Agostino et al., Plant Physiol, 2000

CK primary response genes
- Type-A ARRs expression



Od genu k proteinu a zpět

postranlační modifikace proteinů

Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

- přenos signálu prostřednictvím TGF β (Transforming Growth Factor) u živočichů



Proč právě proteomika?

Shrnutí

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět

