

Základy proteomiky

Proč právě proteomika?

Jan Hejátko



Základy proteomiky

zdrojová literatura

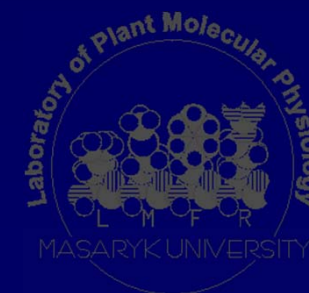
▪ Zdrojová literatura k první přednášce:

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

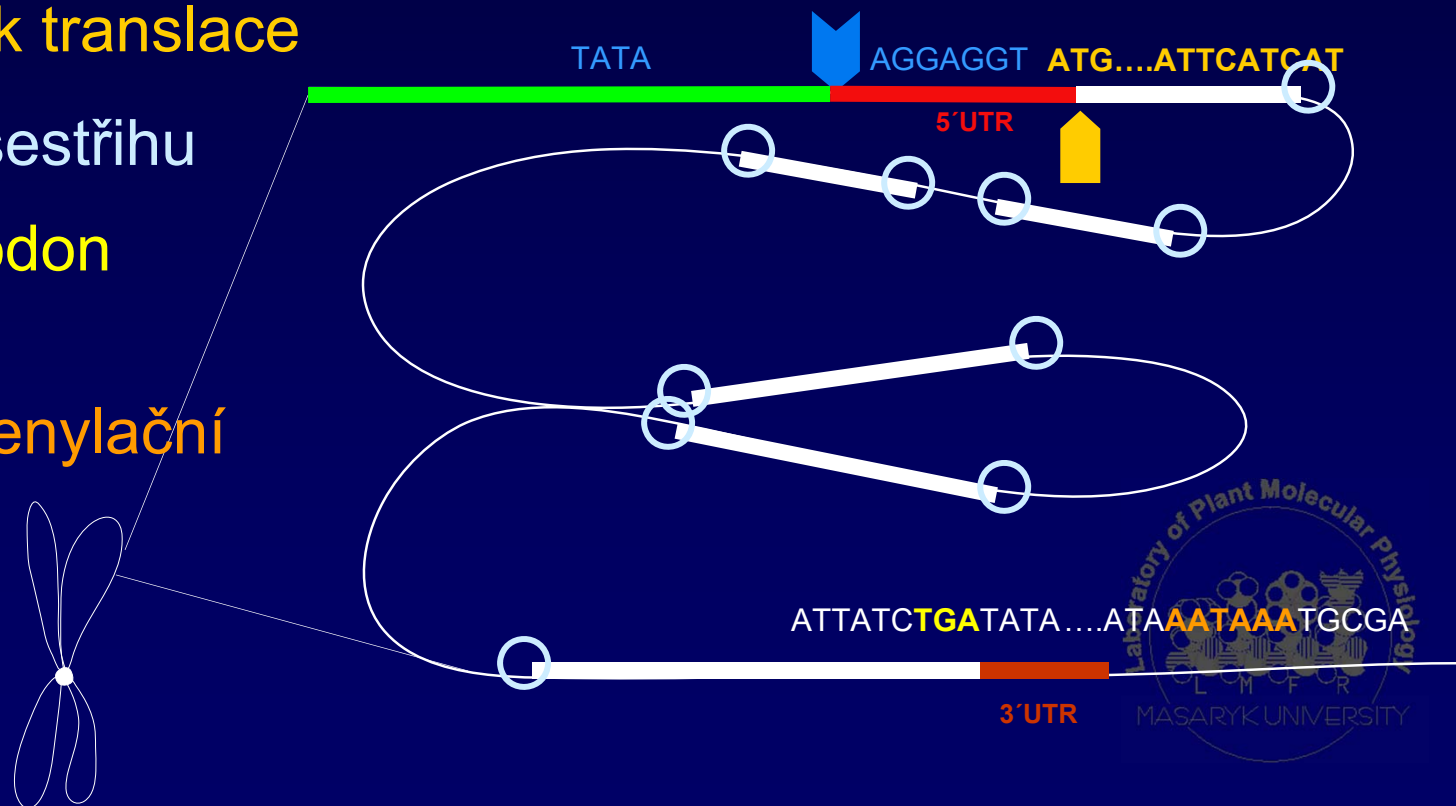
- dnes k dispozici v databázích více než 700 000 záznamů (nr databáze) různých organismů
- Získané informace lze zpracovat pomocí **bioinformatiky**



```
19470700 cacacctatagttagctcaattctagataaaaatatagaaatggatcttgagaatcattttttttgtattctttttgttat
gctccgaggaagaagataaatatgaaaagagcttttttagggtttatcattctccttgactttgcaaaacgtgaaatgtaaggca
19470500 tgttgctttttatacgtatcgcttcttacaataagttaacaatgcttctcgtagaatgcaaaacatttgggaccggtgat
ttcagtggtctctttgacgagcttcttcttggaggactaatcaagacagaaaactgttctctaaaaacgatcgccgttct
19470300 ttgacgagcttgatctttagaatcaaatttataagggatcacgagatacacgatttaattatttttttttttttggctt
tcactcaaatgatggtgaaagtacaaagcttgggttccactccaattgtggtcttttgcgtcctggtaattctgctttct
19470100 atgattctacatttctactcatctcgttctgtttttcaaatgatataaattattgtgtgtatcaccattcatgtatattt
ttcctgggtggttttctcagtgcatctggatctcaaatggggaacaacaacggagaacctagtcacaagaggtcgctcatt
19469900 caagtctagtttcggagattgaaaacatcggaatttacatatgccaagacaaacttatctacgatcggtttagcgagagtt
caacaacgacactggttttacagagattcaaacacaggttgttaaaactaattacataaattcaattattcttagttattatc
19469700 tataaacatttaactataatttatgttgttggttgttattattgttcttcagatcgcaccattgttggttgtagctt
gtctcacaagtttctgacatcagtagggacggtctcatgttttcttacattgcagaatcaaacacaaggtgctgctgttttgc
19469500 caagtctggagactacacttggtagactcaaacacgtaggacagtttaactggctccttaacgggaactcaacgaaatctcac
tacagattggttccaagcagcacagagtaataactacactacagcctttgtaggaacgagcttgggaggagaagataacgagc
19469300 gttagcttgtacagcaagaaggtcttggtttctttagggtttccggttaagactttaaccgaagtttgaacagtttgaatct
acatgtggacaaggacgggacggtgcttggctggaaggttcaactgaatgatctttcttcatctccaatggctcagtttgc
19469100 ctccctctggtctcaatgcatcctgaaaattgcagttccagtggttacgaggtggagatcaaaaagatcaagataccaagctt
gtttcgggcttctctggtaaatactgaaacataatctcactttgatgcagtaaaaatgcatcagcttgttgtttctcagctt
19468900 tttgccagagatacacactcatgtttccaacaaaaggaggagcaaacacgcatcaagcaccacgcaaaaaggcaaaaatcaac
atctctggcttccggttggcctgtatggtttgtgtggtttatgatgcaagcaacaaggagagagatgcataatgctgcaacgc
19468700 ggcacacaacaagctgagagaaagagcatgaacaagagtcagcatttgcaaatgctagccacgatattagaggtgcccctgct
ttgatataatgctgtagggagttaaacctggctccgacgtagacaccactctcaaccaagtgaatgtttgcgccaaggattt
19468500 tcttagcttctcttatgcttcttctcactttctctcaacagaaaattcttctcagttgtttaaattacagctctgctt
tgagcaaaatcgaaagcgggaagatgcagtttagtgaagaagattcaacttgcgaaactcttgaagacgtcatcgattt
19468300 gaagaaagggttgatgtagtttggatccgcagatcggttgcatttcaaatctcgaatgtacgaggggacagagacacac
aatctgttagcaatgctgtcaagttcacogtcgacgggacacattgcggttaagagcttgggctcagagggccaggttccaatac
19468100 catactctaaagggtgtgtccaagtttgaagagatattgtctgcaagaataaagaagagtcatacactacgagacagaaatac
caatgcaaacacgatggagttgtgtttgaagtggatgatactggtaaaaggatcctatggagatgcgtaagtccggtattt
19467900 agagaaacagctcaaggacaccaaggaactggtttagggctcgggattgtgcagcttttggtaagctactaaaacagaaacac
taaatctagatggttttcatttgggtctattattataggttaagattaatgggaggggagataagaaatcaccgacaaggccat
19467700 gttccaattcaatgttttattgacaacattagagctcctccagtgagtgacatgaaagtgagacaggagatcgaagcagge
gcaaacctcgggctgactataaacacttcaacttggaggtagcatgaaatatacgtaacctgagtcctagattcaacaactgct
```

Struktura genů

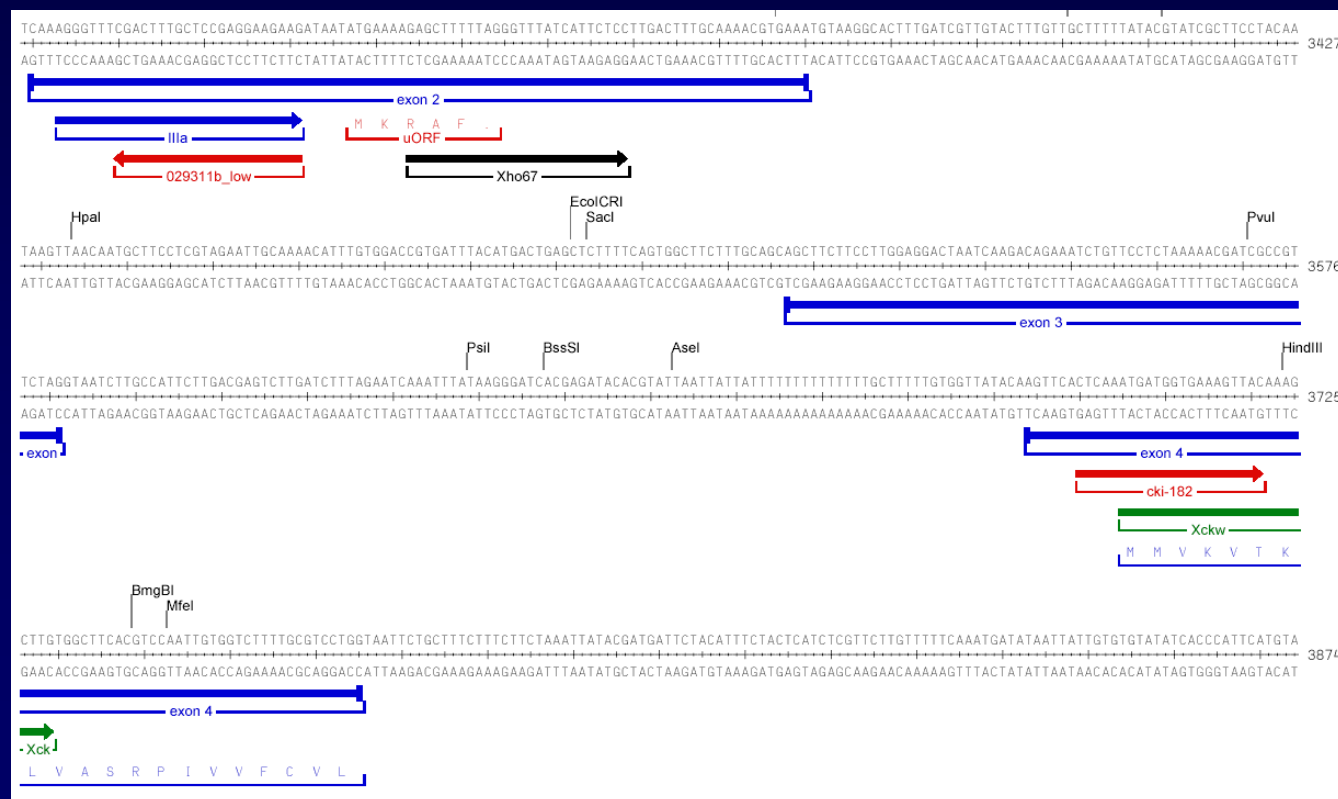
- promotor
- počátek transkripce
- 5'UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3'UTR
- polyadenylační signál



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 organismů
- 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 adoperbtabijs emdfjfwűcsaknclűsnínjxl dalnxckjcnbychcxmasizdciksrdceasnana zxcnlsdlaň.
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:



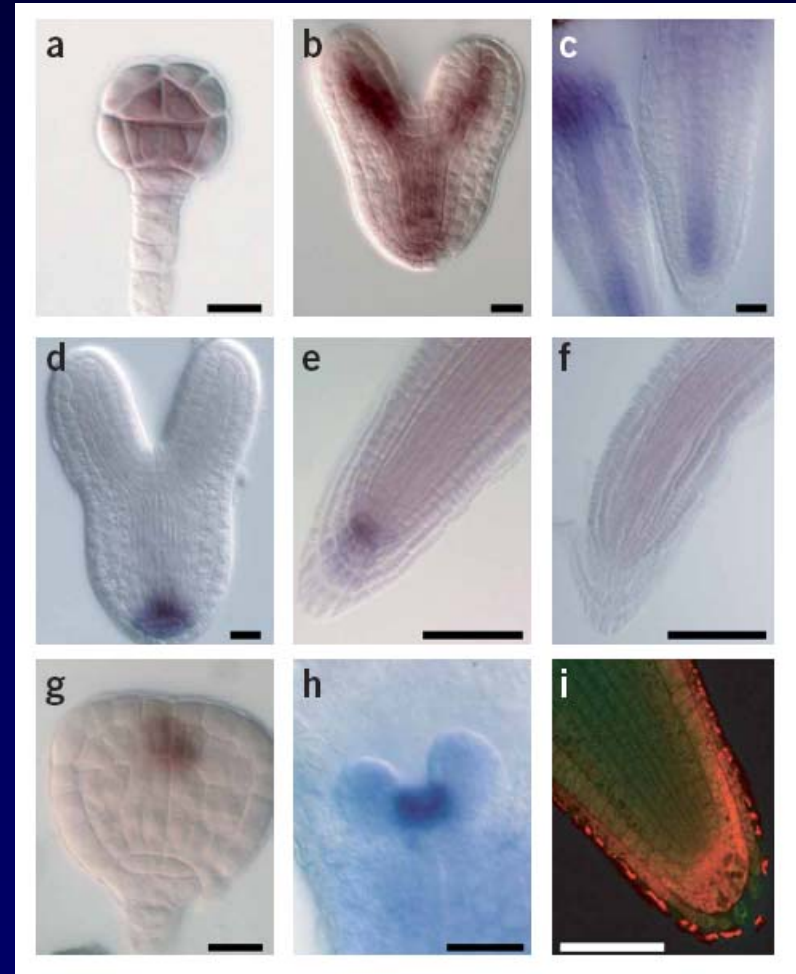
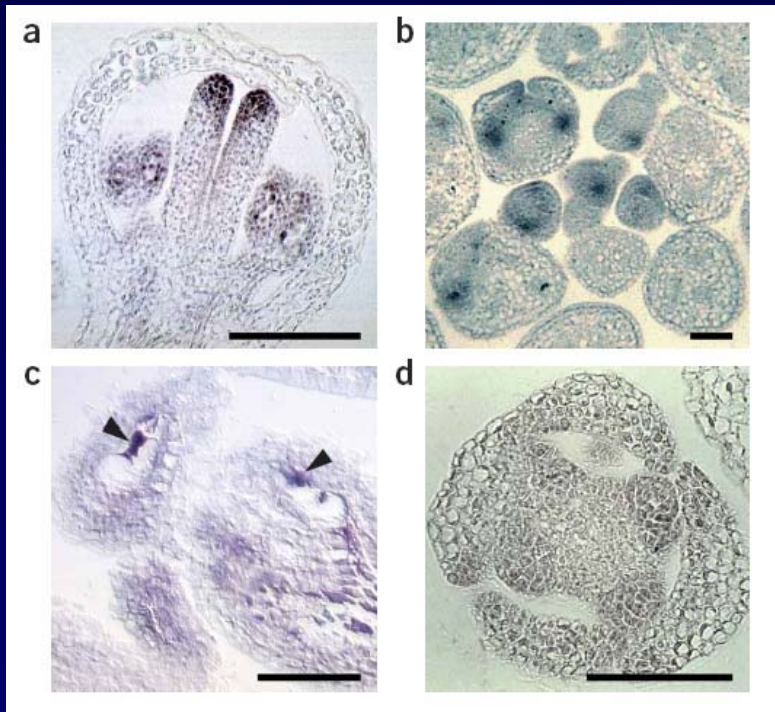
Proč právě proteomika?

- 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



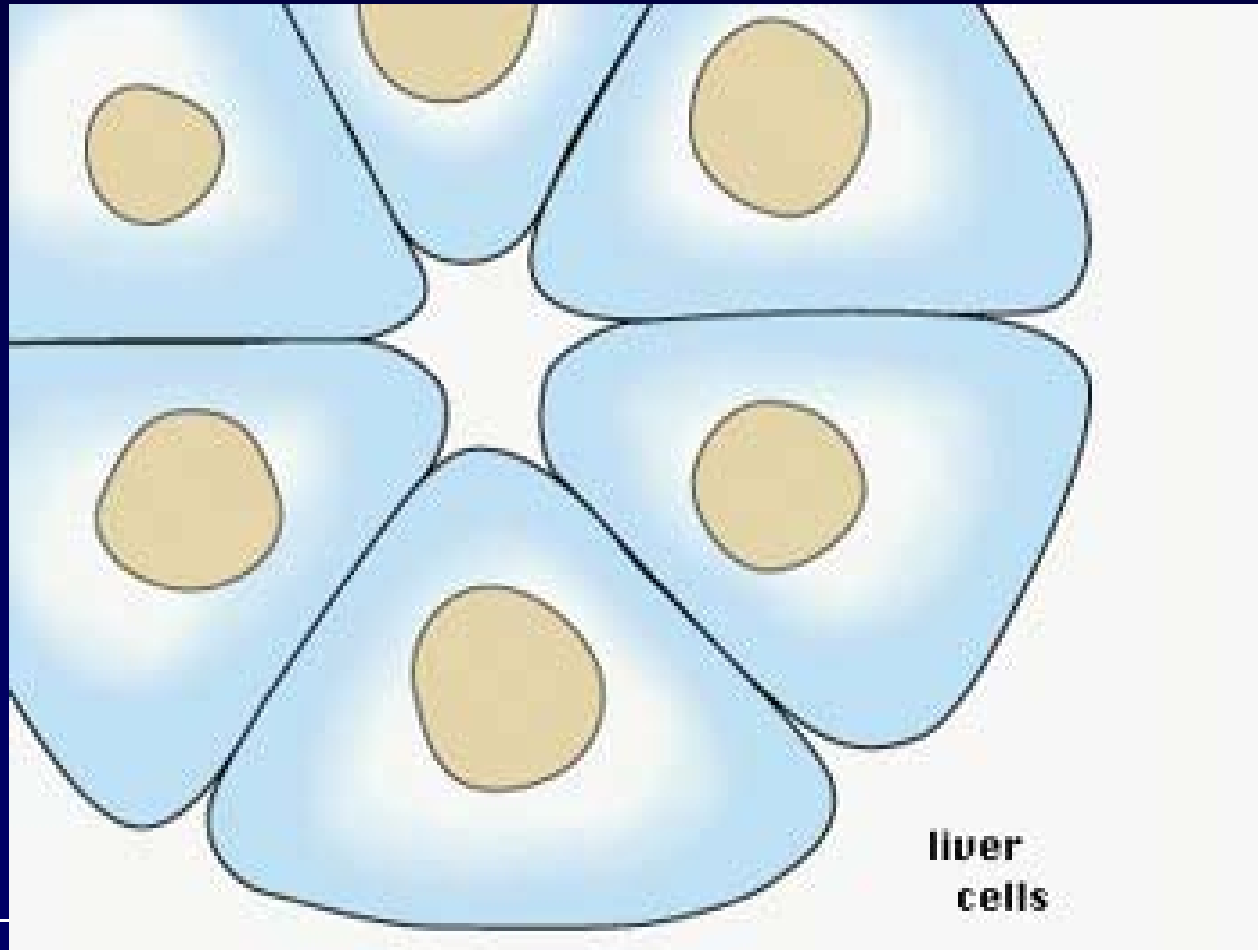
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce



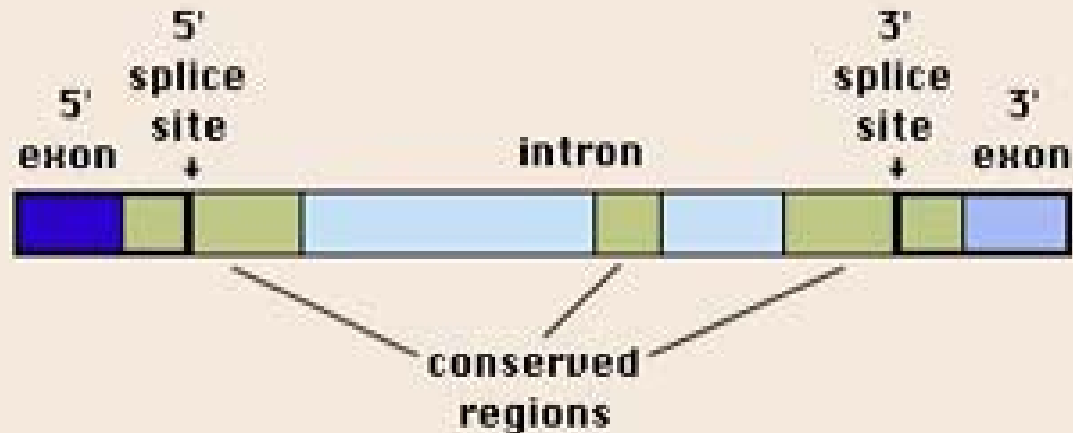
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce



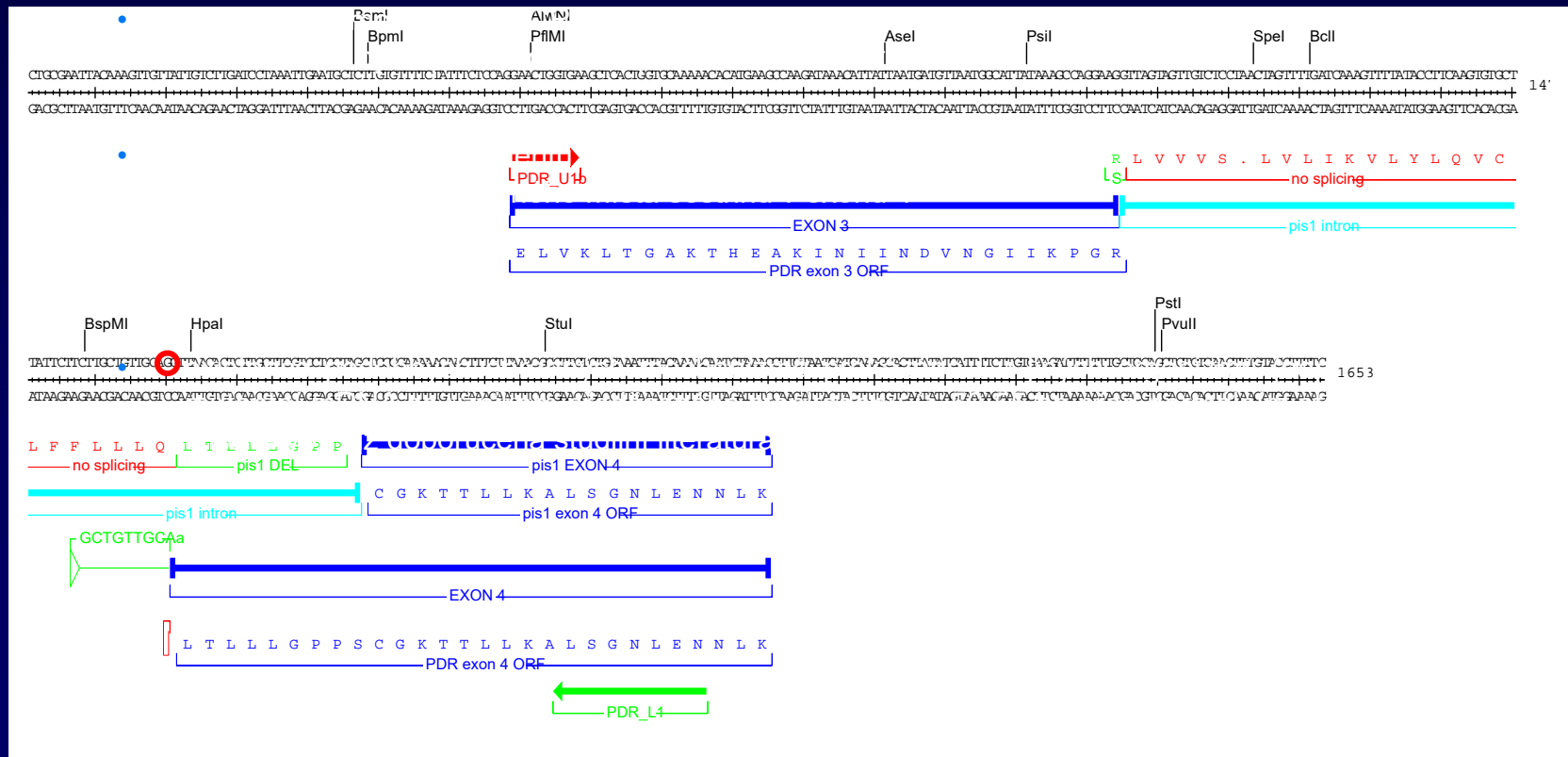
Základní mechanismy regulace genové exprese

- sestřih RNA



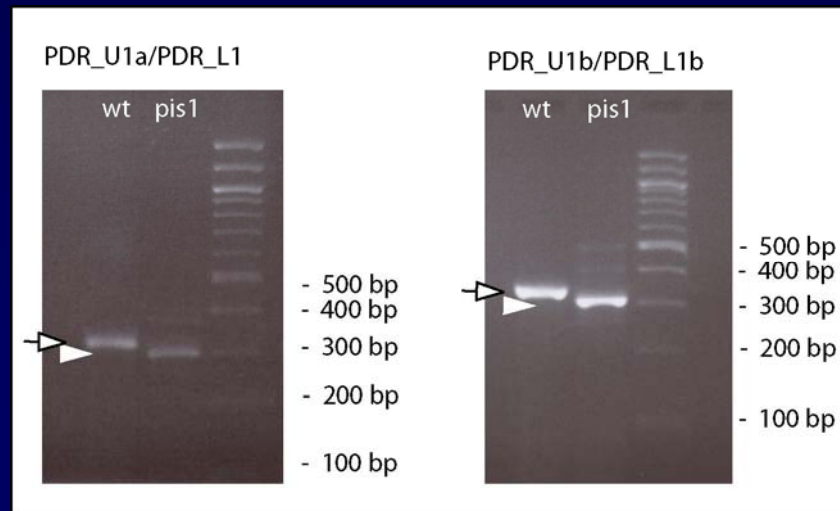
Regulace sestřihu RNA jako vývojová adaptace

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



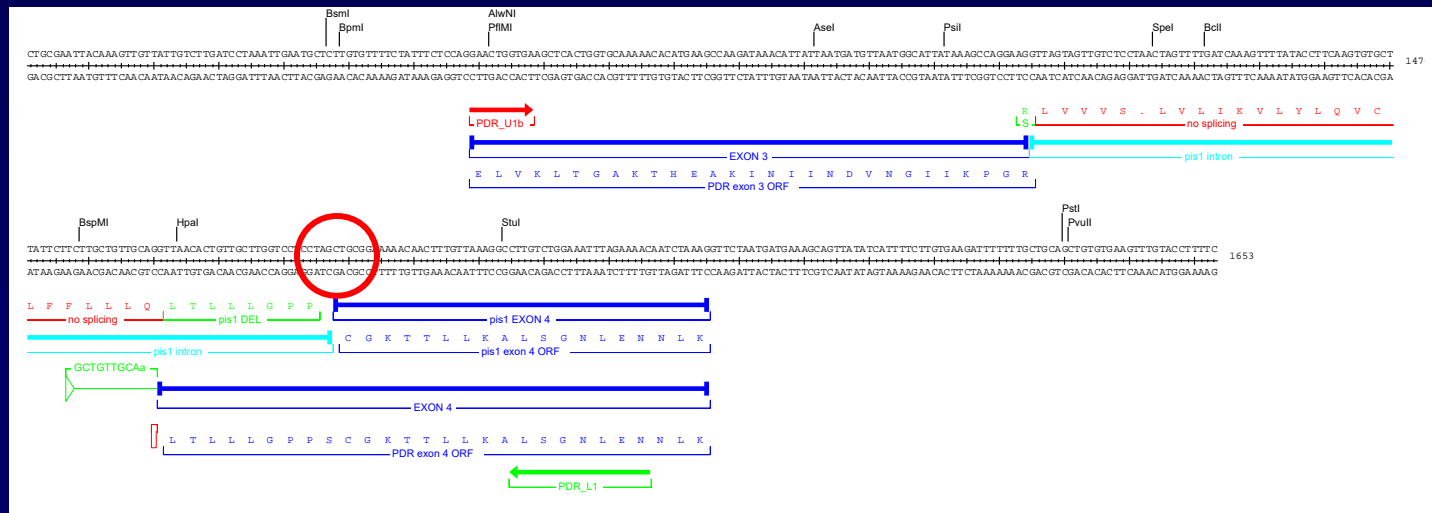
Regulace sestřihu RNA jako vývojová adaptace

- identifikace mutantu s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5' konci 4. exonu
- analýza pomocí RT PCR prokázala přítomnost fragmentu kratšího než by odpovídalo cDNA po normálním sestřihu



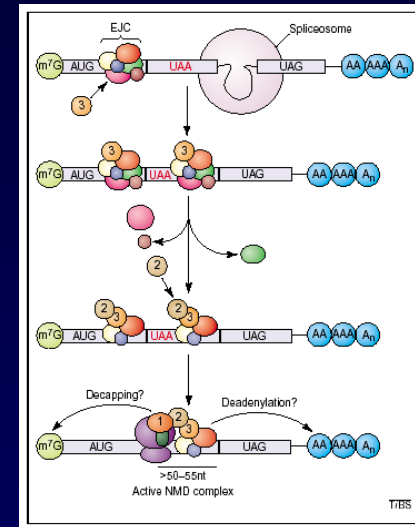
Regulace sestřihu RNA jako vývojová adaptace

- identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5' konci 4. exonu
- analýza pomocí RT PCR prokázala přítomnost fragmentu kratšího než by odpovídalo cDNA po normálním sestřihu
- sekvenace tohoto fragmentu pak ukázala na alternativní sestřih s využitím nejbližšího možného místa sestřihu v exonu 4



Regulace sestřihu RNA jako vývojová adaptace

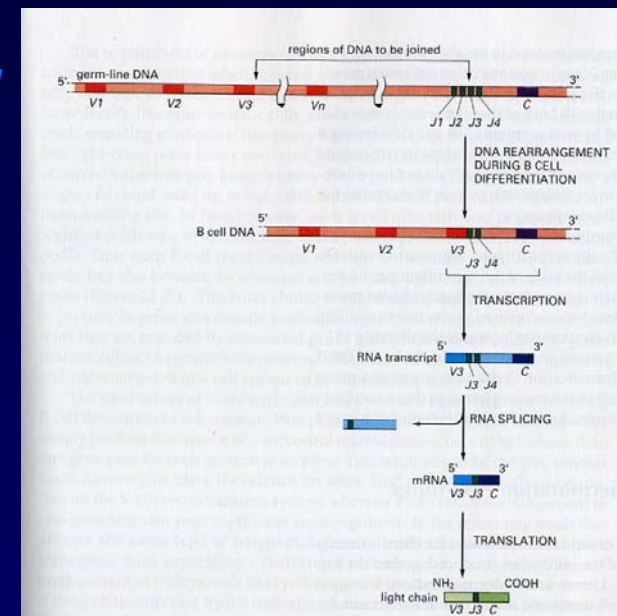
- identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5' konci 4. exonu
- analýza pomocí RT PCR prokázala přítomnost fragmentu kratšího než by odpovídalo cDNA po normálním sestřihu
- sekvenace tohoto fragmentu pak ukázala na alternativní sestřih s využitím nejbližšího možného místa sestřihu v exonu 4



- existence podobných obranných mechanismů prokázána i u jiných organismů (např. nestabilita mutantní mRNA se vznikem předčasného stopkodonu (> 50-55 bp před normálním stop kodonem) u eukaryot, viz doporučená studijní literatura, Singh and Lykke-Andersen, 2003)

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 (**$300 \times 4 = 1200$** možností)
 - H řetězec: cca 500 V sub-genů, 4 J subgeny a 12 D subgenů (**$500 \times 4 \times 12 = 24000$** možností)
- celkové množství kombinací u myši: cca $1200 \times 24000 = 28$ 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

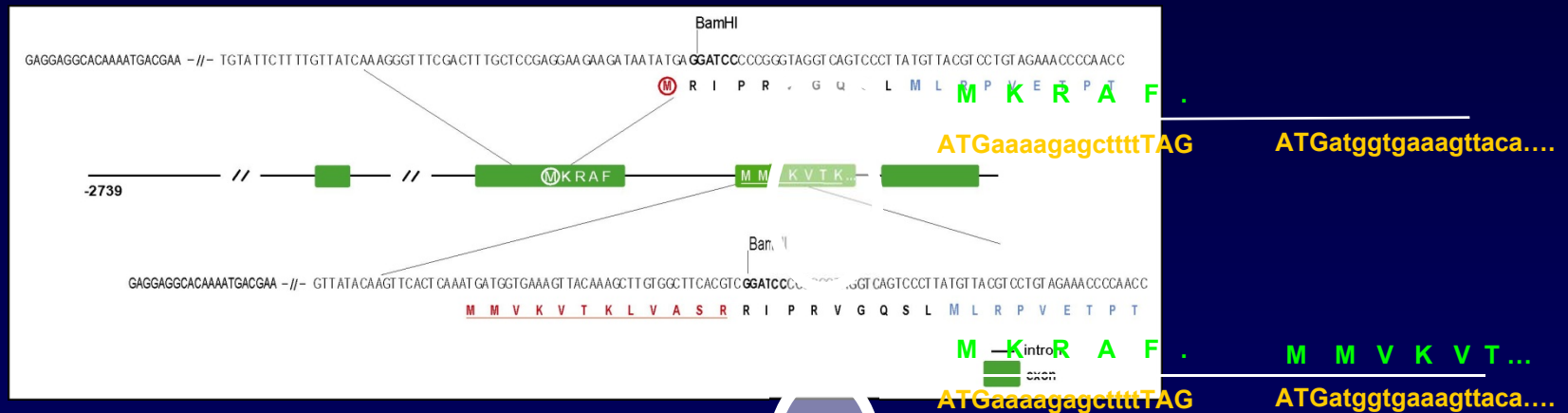


Základní mechanismy regulace genové exprese

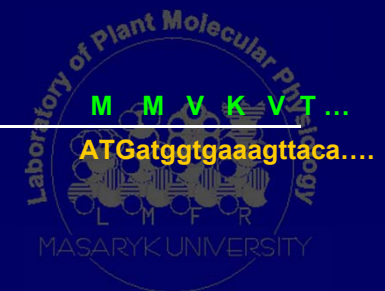
- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe



Regulace genové exprese mechanismem translační represe



- V případě CKI1 pokus prokázat tento způsob regulace genové exprese pomocí transgenních linií nesoucích *uidA* pod kontrolou dvou verzí promotoru, zatím nepotvrzeno



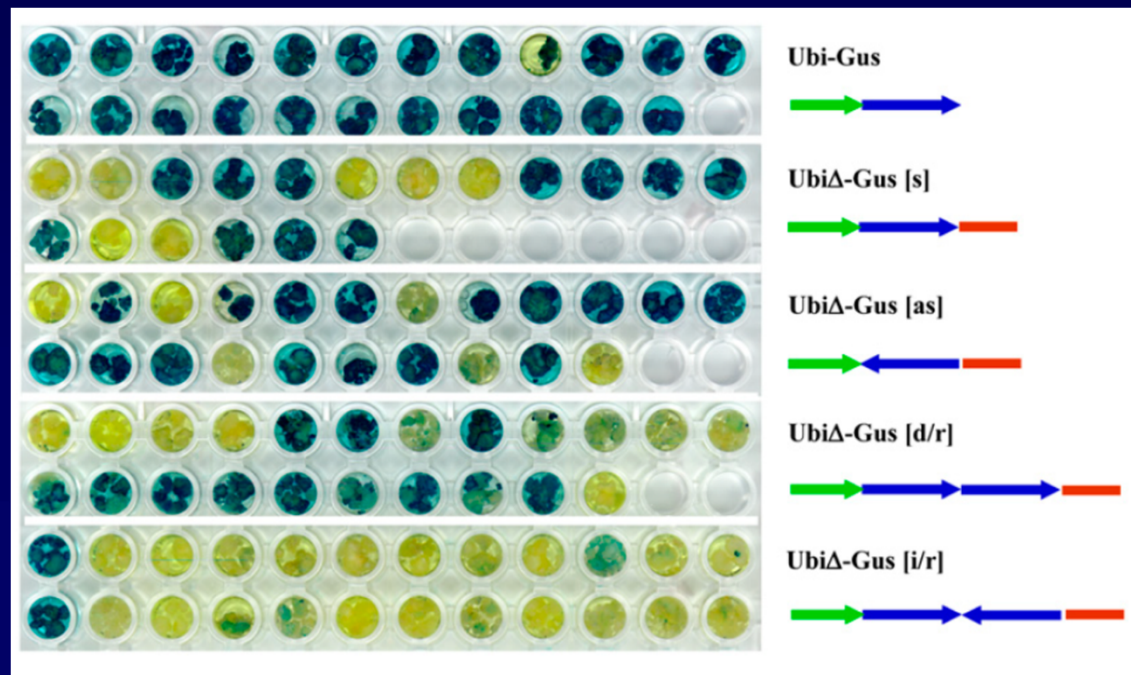
Základní mechanismy regulace genové exprese

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



RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - RNAi objevena u rostlin a *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravdř. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji



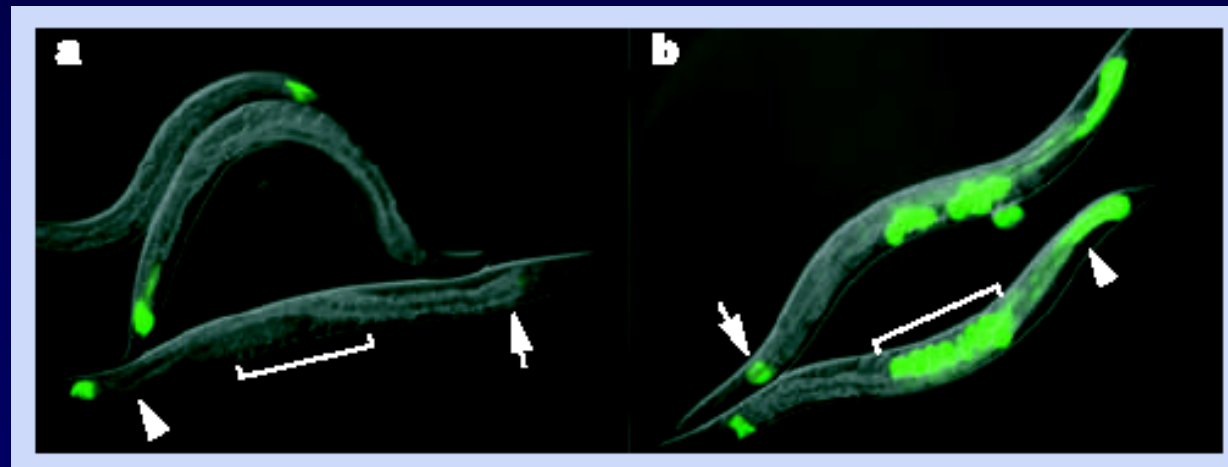
Waterhaus et al., *PNAS* (1998)

RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - dsRNA indukce je závislá na vlastních genech - gen. vyhledávání

RNAi

rnai



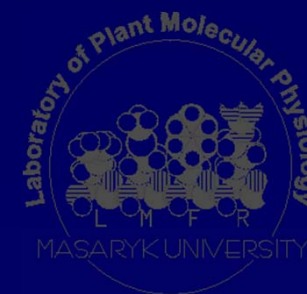
Mello and Conte, *Nature* (2004)



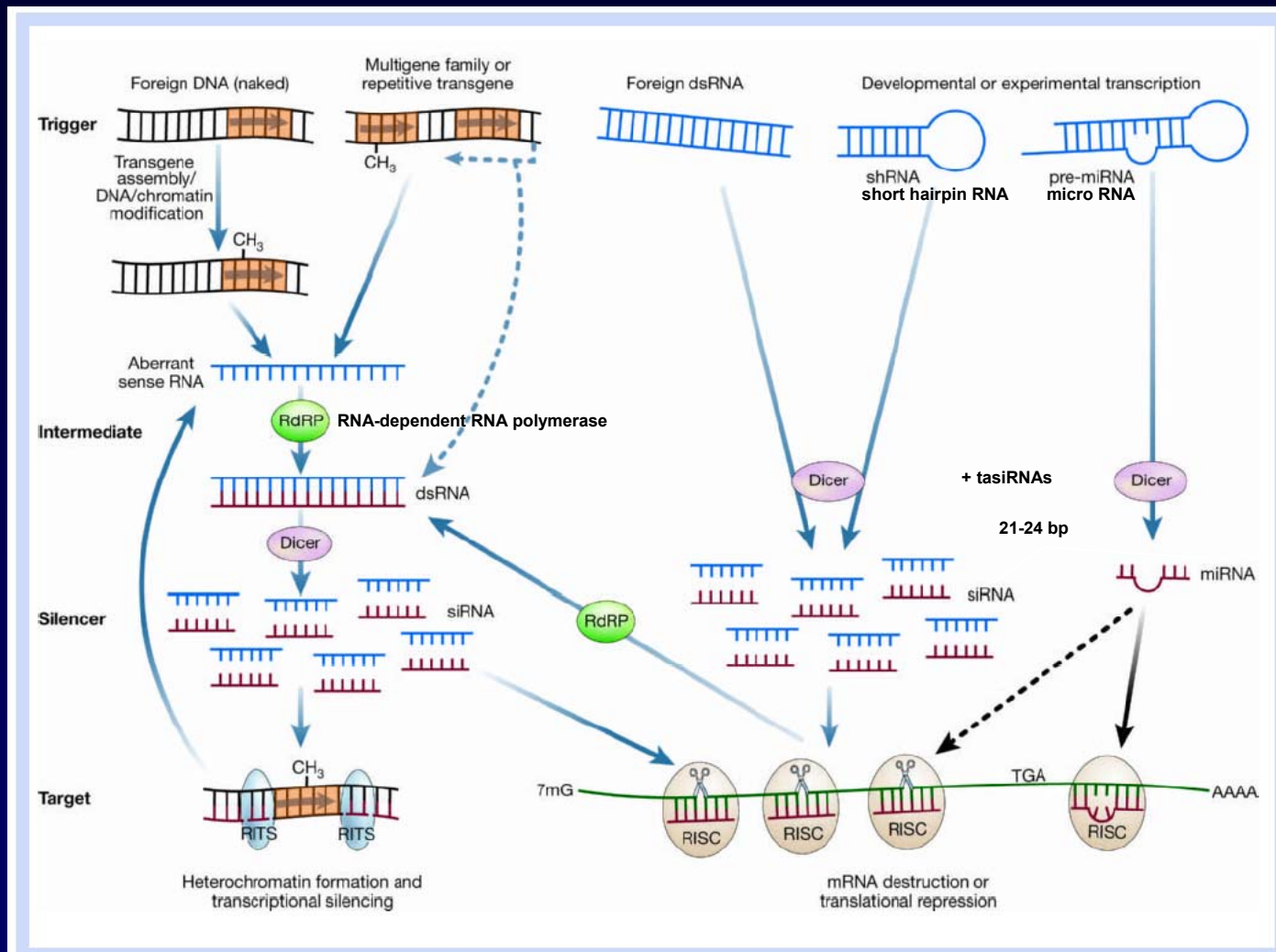
Genomika III.

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

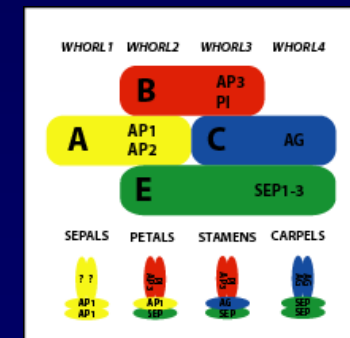
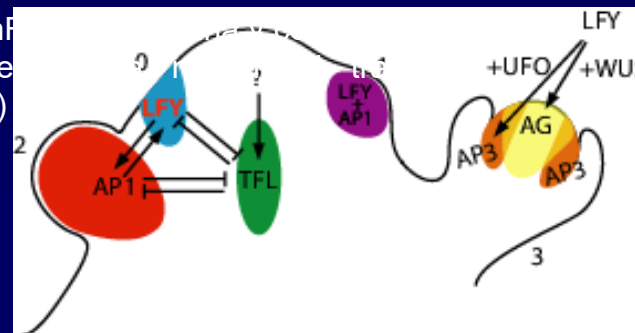


Od genu k proteinu a zpět

posttranskripční umlčování mechanismem siRNA

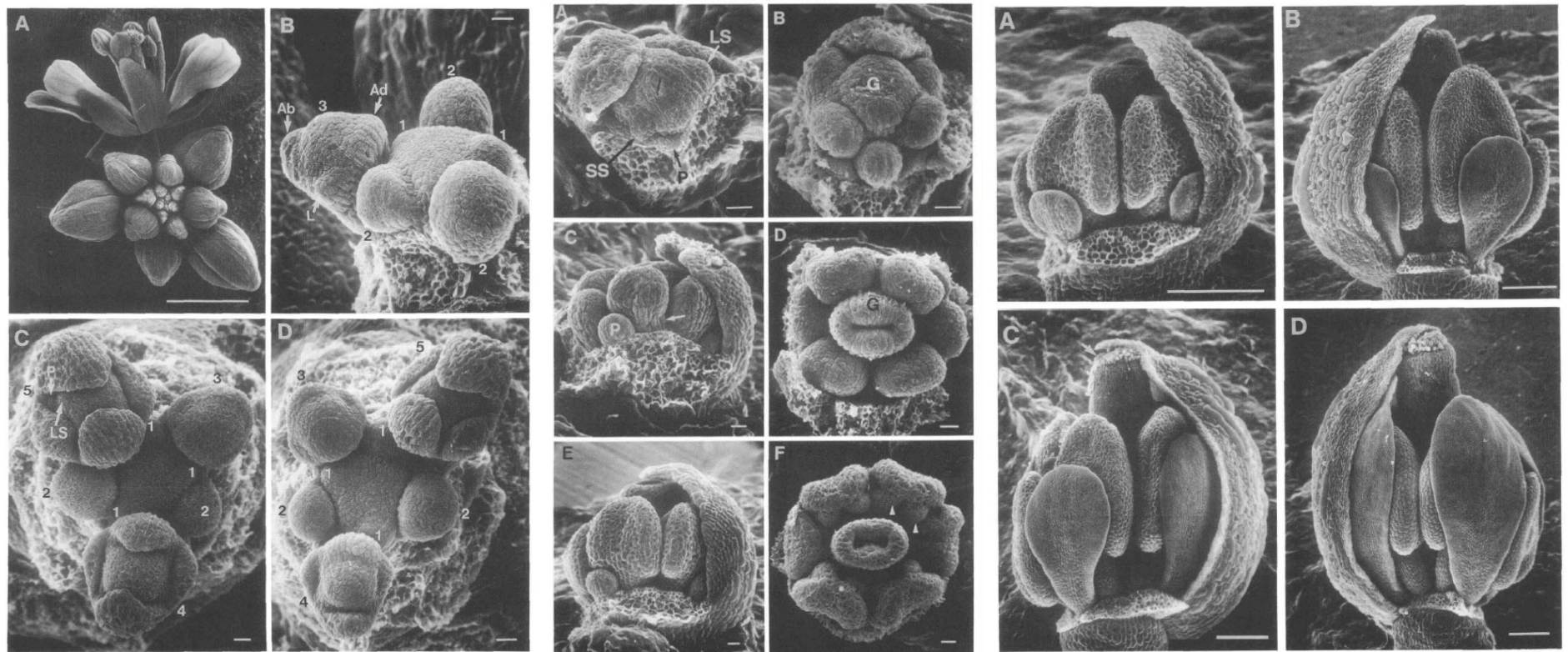
Regulace vývoje květů u *Arabidopsis* prostřednictvím miRNA

- ABC model vývoje květních orgánů u rostlin
 - během vývoje květních orgánů dochází k určování identity jednotlivých květních orgánů kombinací exprese tzv. homeiotických genů
 - homeiotické geny kódují většinou rostlinné homolgy MADS-box transkripčních faktorů
- mezi jednotlivými homeiotickými geny dochází k tzv. katastrálním interakcím, kdy exprese jednoho genu inhibuje expresi dalšího
 - např. *AP1* je nejprve aktivní v celém květním meristému, po indukci exprese *AG* pak *AG* inhibuje expresi *AP1* ve vnitřních dvou kruzích)
- výjimkou je exprese genu *AP2*, jehož mRNA je stabilní v celém meristému, ale exprese *AP2* je reprimována prostřednictvím miRNA (gen miRNA 172)



Od genu k proteinu a zpět
posttranskripční umlčování mechanismem siRNA

Regulace vývoje květů u *Arabidopsis* prostřednictvím miRNA



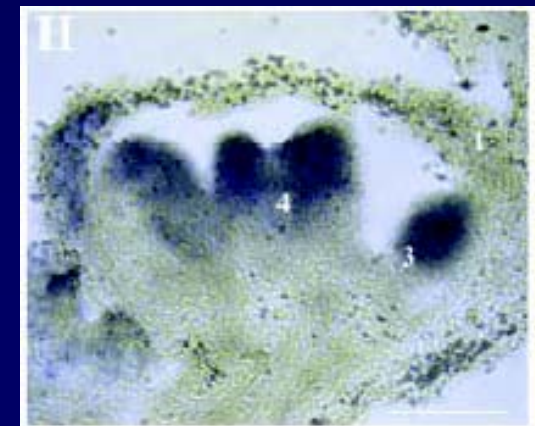
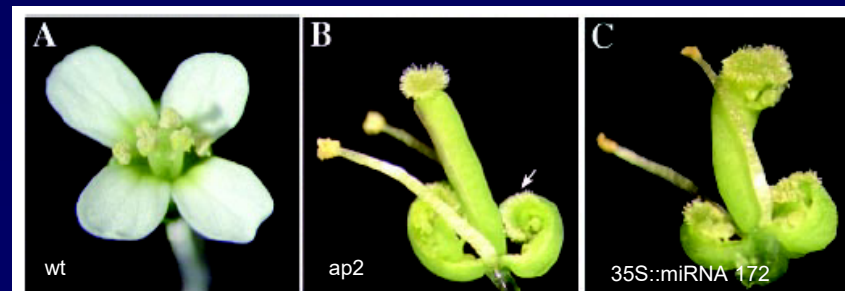
Od genu k proteinu a zpět

posttranskripční umlčování mechanismem siRNA

Regulace vývoje květů u *Arabidopsis* prostřednictvím miRNA

- ABC model vývoje květních orgánů u rostlin
 - během vývoje květních orgánů dochází k určování identity jednotlivých květních orgánů kombinací exprese tzv. homeiotických genů
 - homeiotické geny kódují většinou rostlinné homolgy MADS-box transkripčních faktorů
- mezi jednotlivými homeiotickými geny dochází k tzv. katastrálním interakcím, kdy exprese jednoho genu inhibuje expresi dalšího
 - např. *AP1* je nejprve aktivní v celém květním meristému, po indukci exprese *AG* pak *AG* inhibuje expresi *AP1* ve vnitřních dvou kruzích)
- výjimkou je exprese genu *AP2*, jehož mRNA je přítomná v celém květním meristému, ale exprese *AP2* je regulována na úrovni translace prostřednictvím miRNA (gen 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

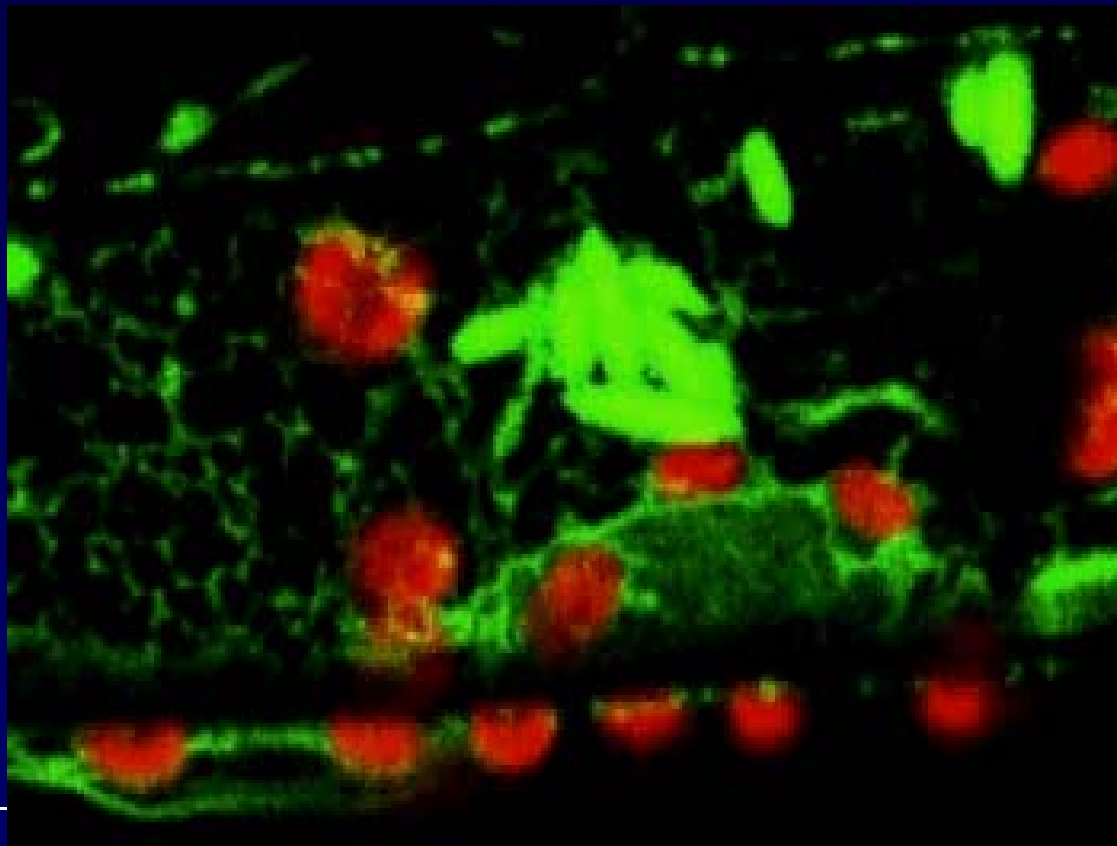


Od genu k proteinu a zpět

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, GFP směrované do ER)

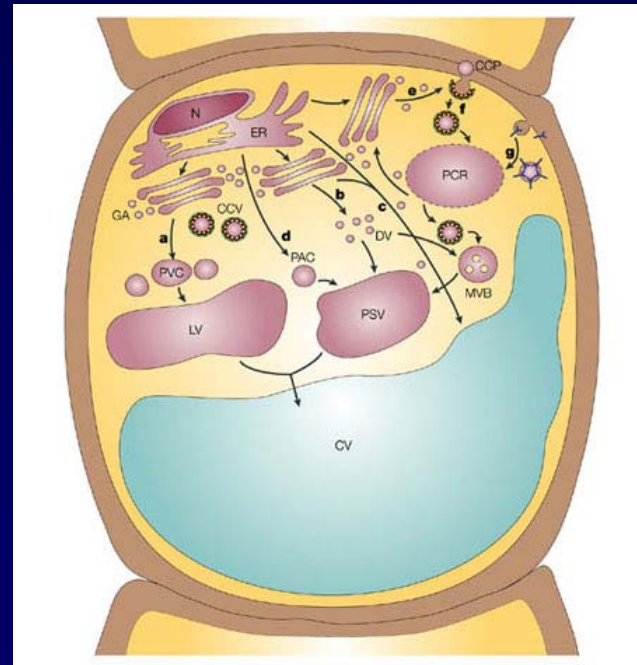


nismem

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, GFP směřované do ER)
 - endomembránový transport je důležitým regulačním mechanismem při přenosu signálu a regulaci buněčných procesů

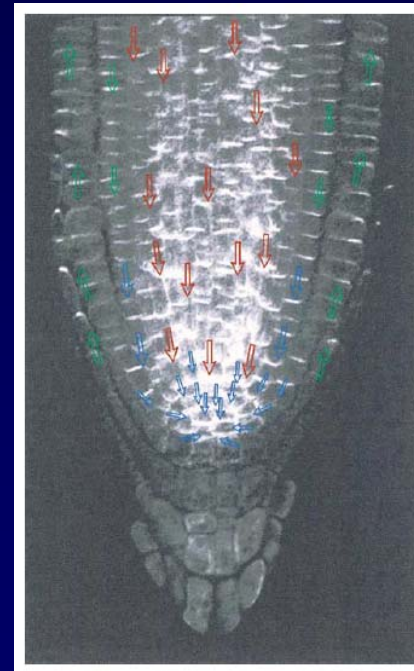
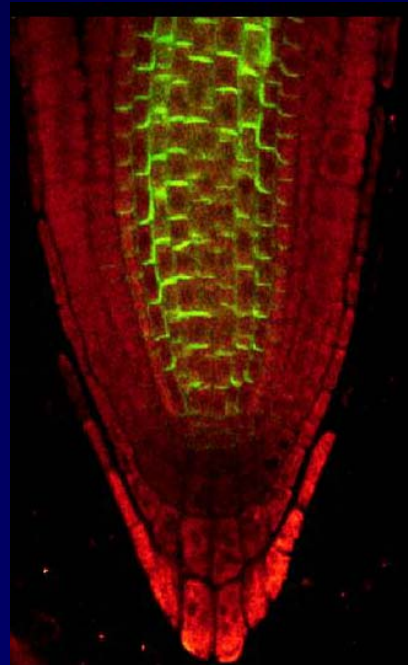


CV, central vacuole; DV, dense vesicle; ER, endoplasmic reticulum; GA, Golgi apparatus; LV, lytic vacuole; N, nucleus; PAC, precursor-accumulating compartment; PB, protein body; PCR, partially coated reticulum; PSV, protein-storage vacuole; PVC, pre-vacuolar compartment; SV, secretory vesicle. Surpin and Raikhel, 2004.



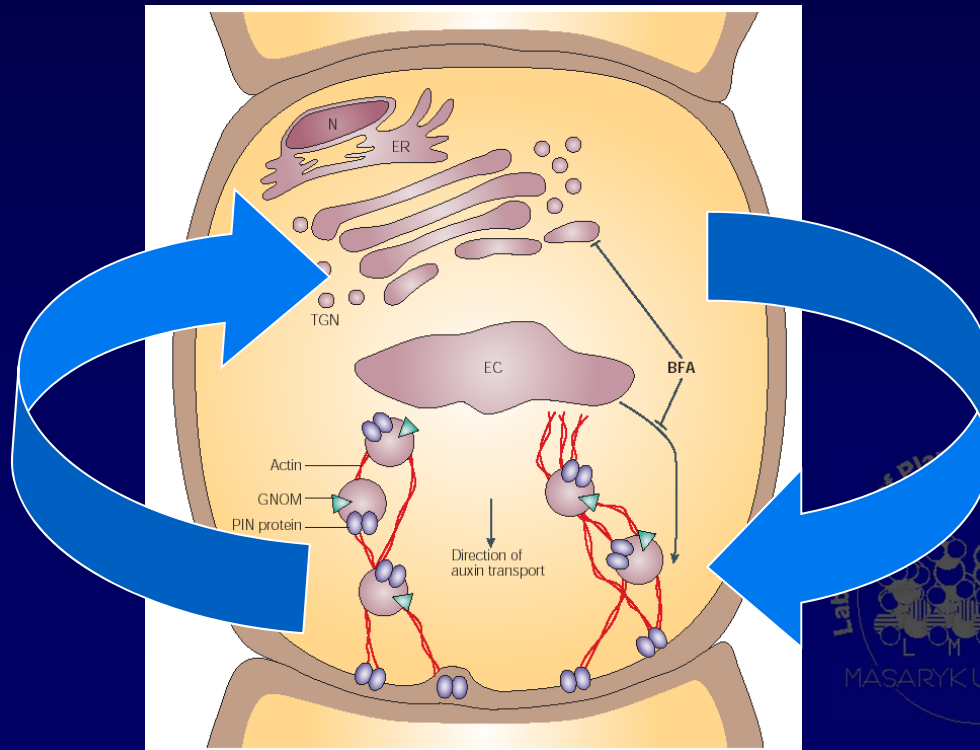
Od genu k proteinu a zpět směřování (cílování) proteinů

- **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*



Od genu k proteinu a zpět směřování (cílování) proteinů

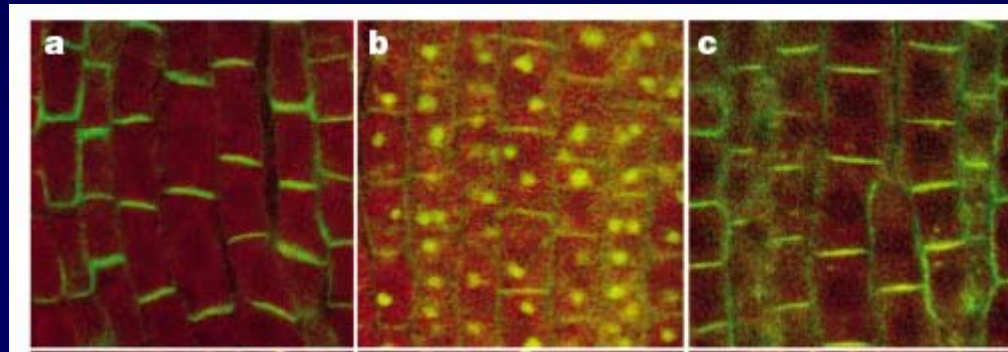
- **Cyklování auxinových přenašečů u *Arabidopsis***
 - auxin je rostlinný hormon se silným morfogenním účinkem
 - proteiny podílející se na transportu proteinů jsou tzv. PIN proteiny, polárně lokalizované v bunčkách kořene u *Arabidopsis*
 - PIN proteiny cyklují v endomembránovém systému rostlinné buňky



Od genu k proteinu a zpět

směřování (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 (BFA) dochází k akumulaci těchto proteinů v intracelulárních kompartmentech....

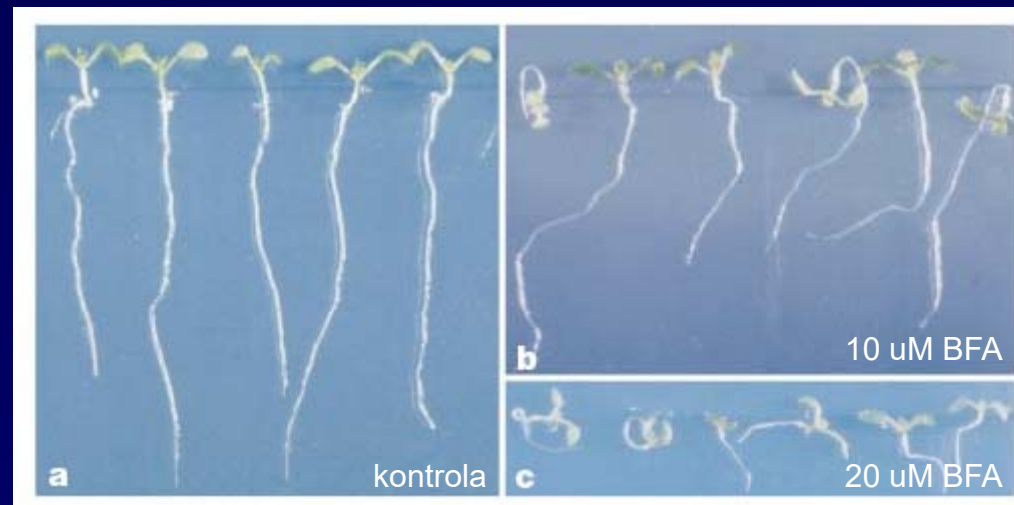


Od genu k proteinu a zpět

směřování (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 (BFA) dochází k akumulaci těchto proteinů v intracelulárních kompartmentech....
- ...čímž je zároveň negativně ovlivněn gravitropismus u rostlin



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

postranlační 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
-

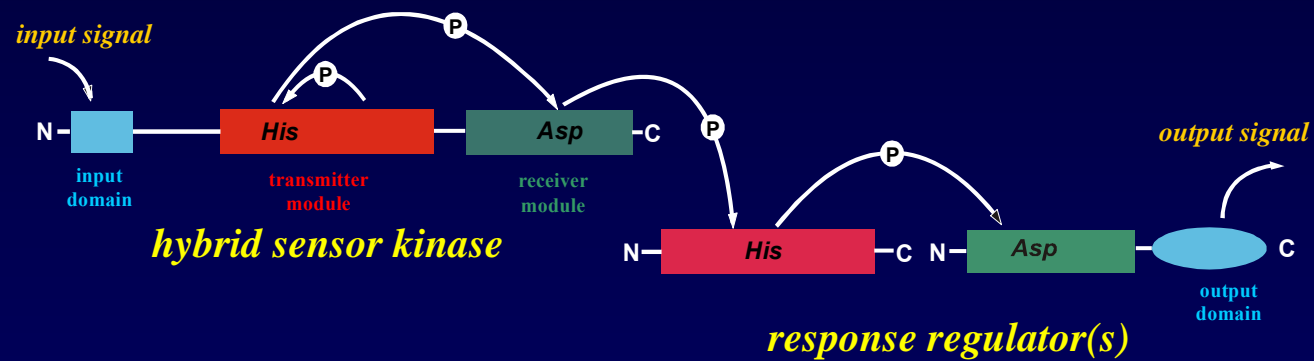


Od genu k proteinu a zpět

postranlační modifikace proteinů

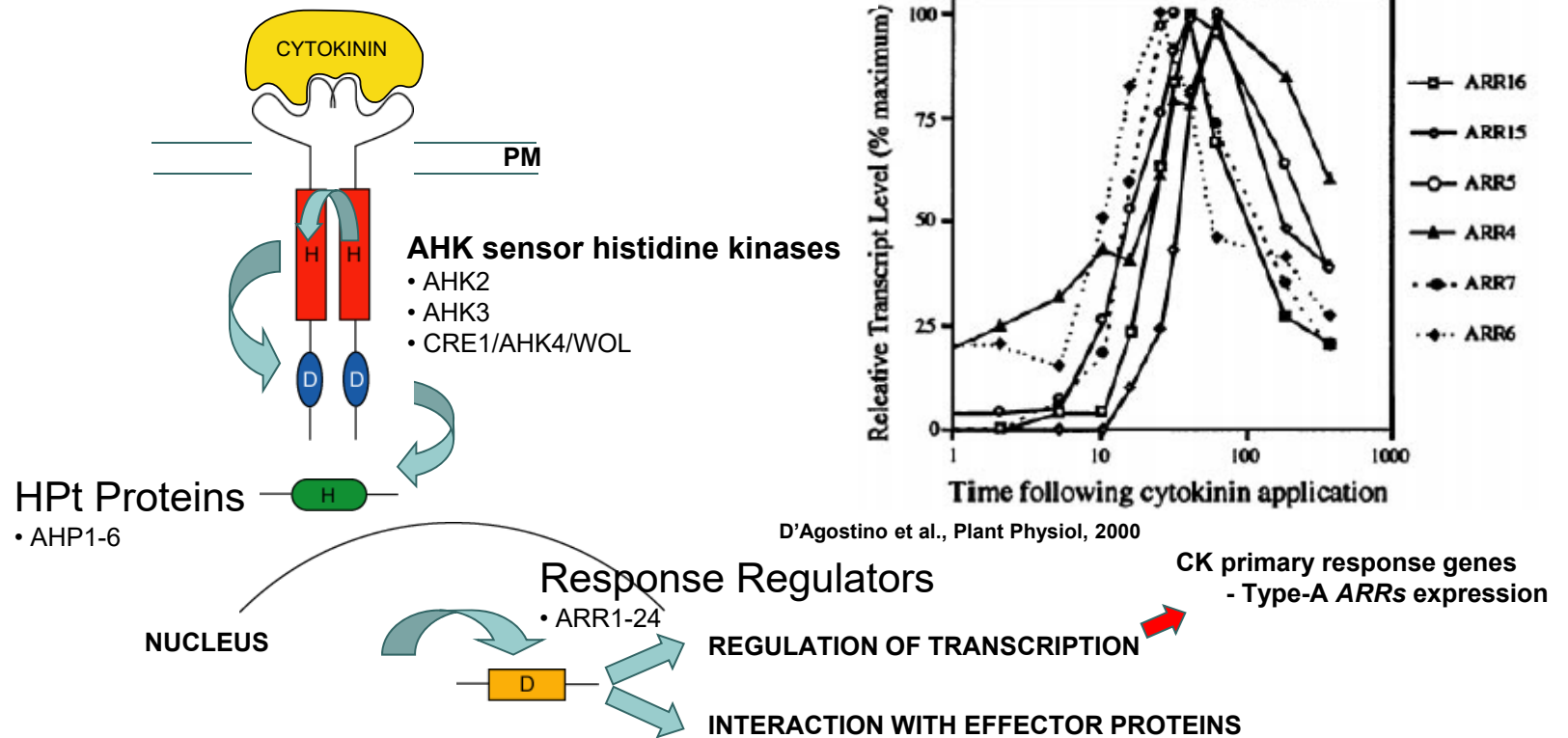
Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

- přenos cytokininového signálu u rostlin



Signal Transduction via TCS

Recent Model of the CK Signaling via TCS Pathway



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

