

CG020 Genomika

Bi7201 Základy genomiky

Přednáška 6

Proteinové interakce v genových regulacích

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika 06

■ Zdrojová literatura

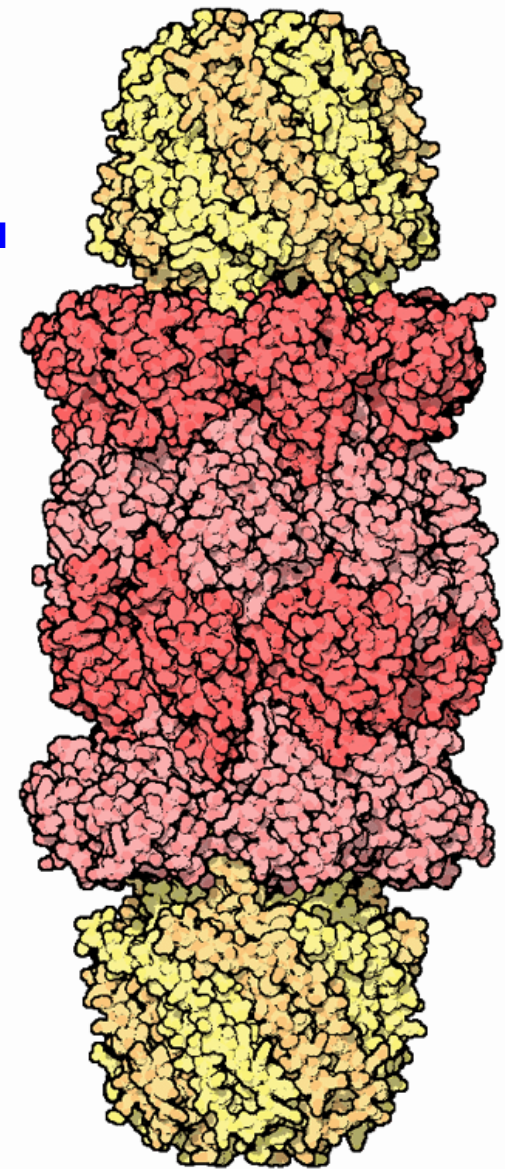
- Wilt, F.H., and Hake, S. (2004). **Principles of Developmental Biology**. (New York ; London: W. W. Norton).
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123, 431-441.
- Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92, 291-294.
- Grefen, C., Stadele, K., Ruzicka, K., Obrdlik, P., Harter, K., and Horak, J. (2008). Subcellular localization and in vivo interactions of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor family members. *Molecular Plant* 1, 308-320.
- Hu, C.D., and Kerppola, T.K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* 21, 539-545.
- Shahbadian, K., and Chartrand, P. (2012). Control of cytoplasmic mRNA localization. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 535-552.
- Van Leene, J., Witters, E., Inze, D., and De Jaeger, G. (2008). Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci* 13, 517-520.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40, 428-438.

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita proteinů
 - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)
- Praktické využití metod pro studium PI *in vivo*

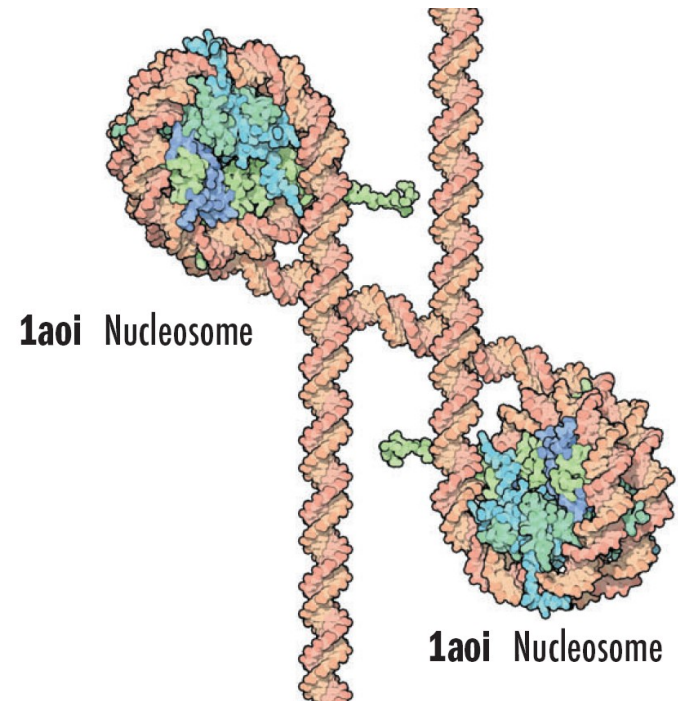
Význam interakcí proteinů

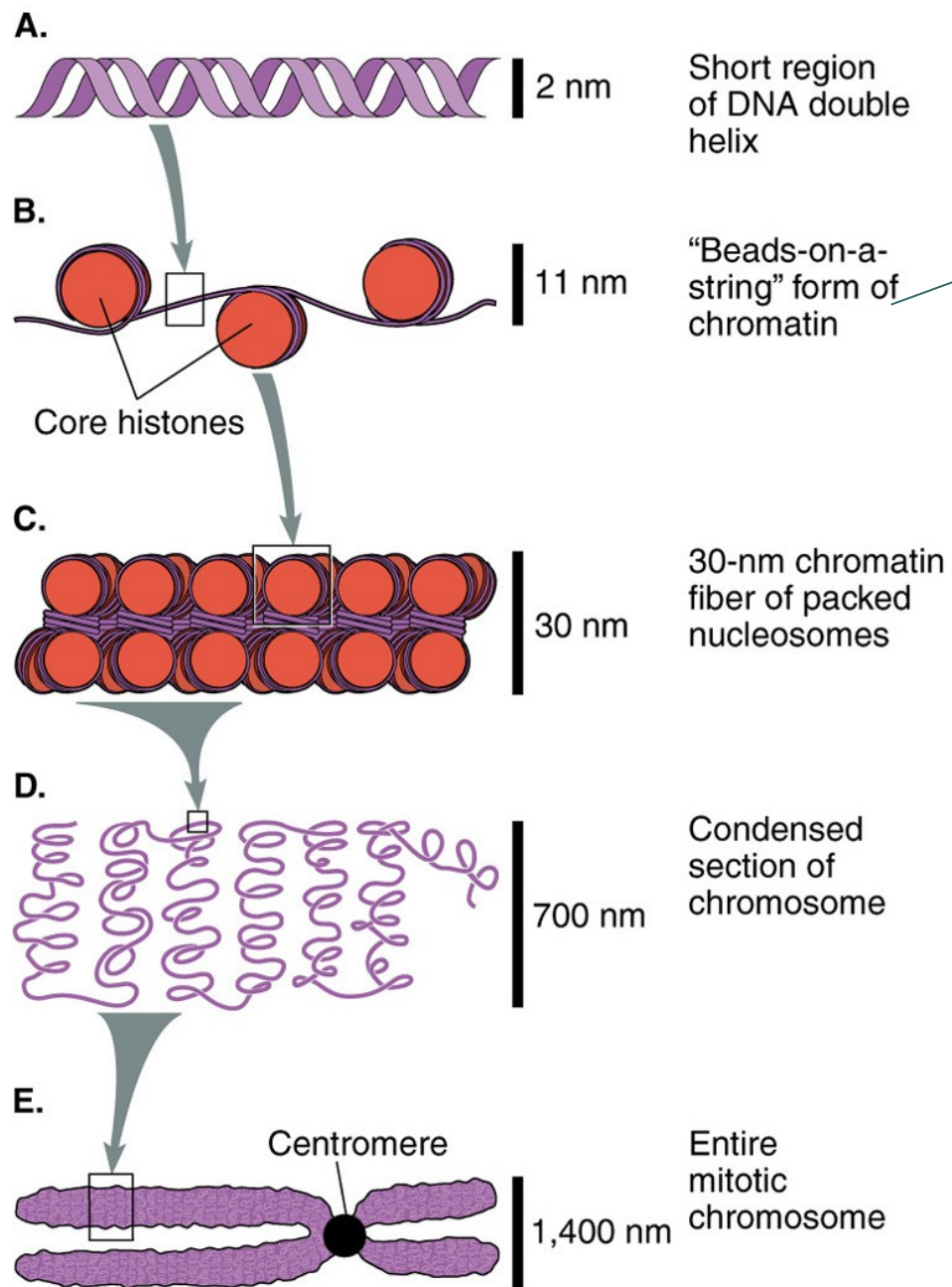
- **Funkční význam specifických interakcí proteinů**
 - Většina proteinů v buňce existuje ve formě komplexů, které mohou dále navzájem interagovat
 - **Proteazom**
 - proteinový komplex zodpovědný za degradaci nepotřebných proteinů v buňce



Význam PI

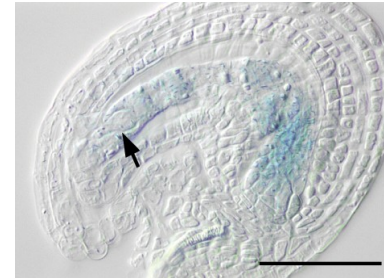
- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu





Regulation by histone acetyl transferases or histone deacetylases

DNA methylation in animals vs. in plants



methylation status

CpG

Cell-specific methylation allows maintain of tissue-specific gene expression profiles



Imprinting and “cell memory”



Mechanism of transcriptional regulation by DNA methylation mostly unknown



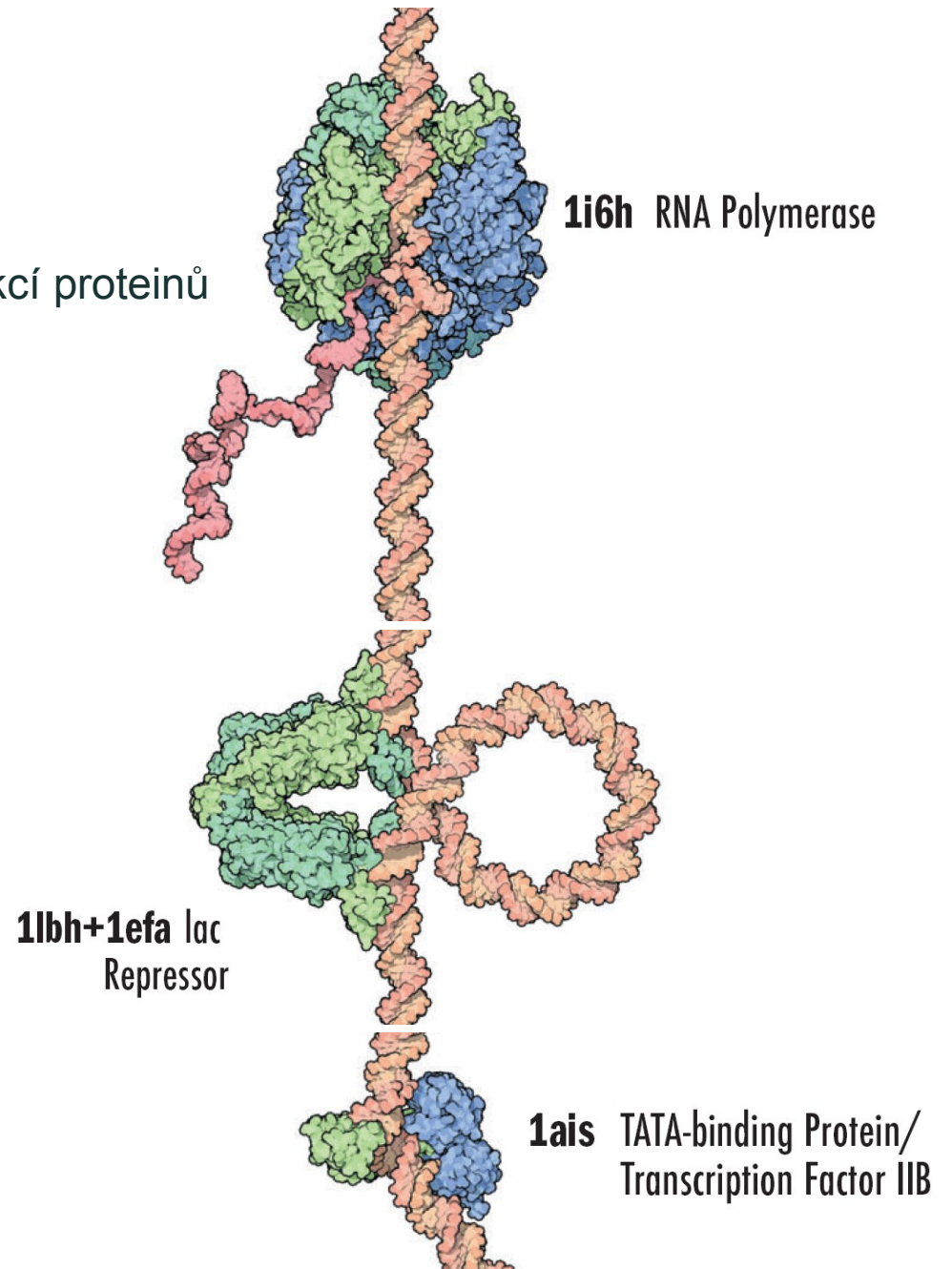
methylation status

CpG or CpNpG

CpNpNp

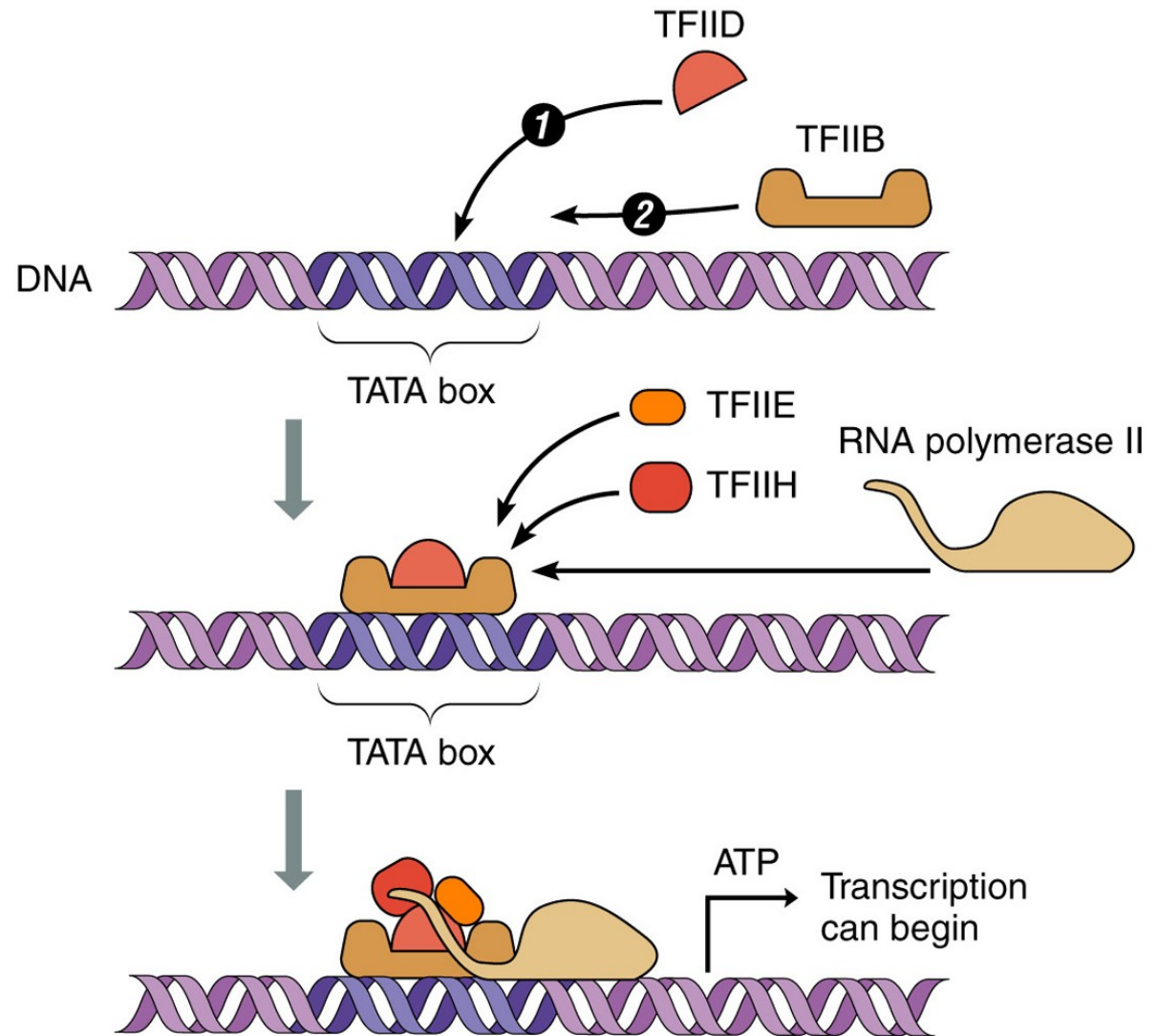
Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Regulace transkripce

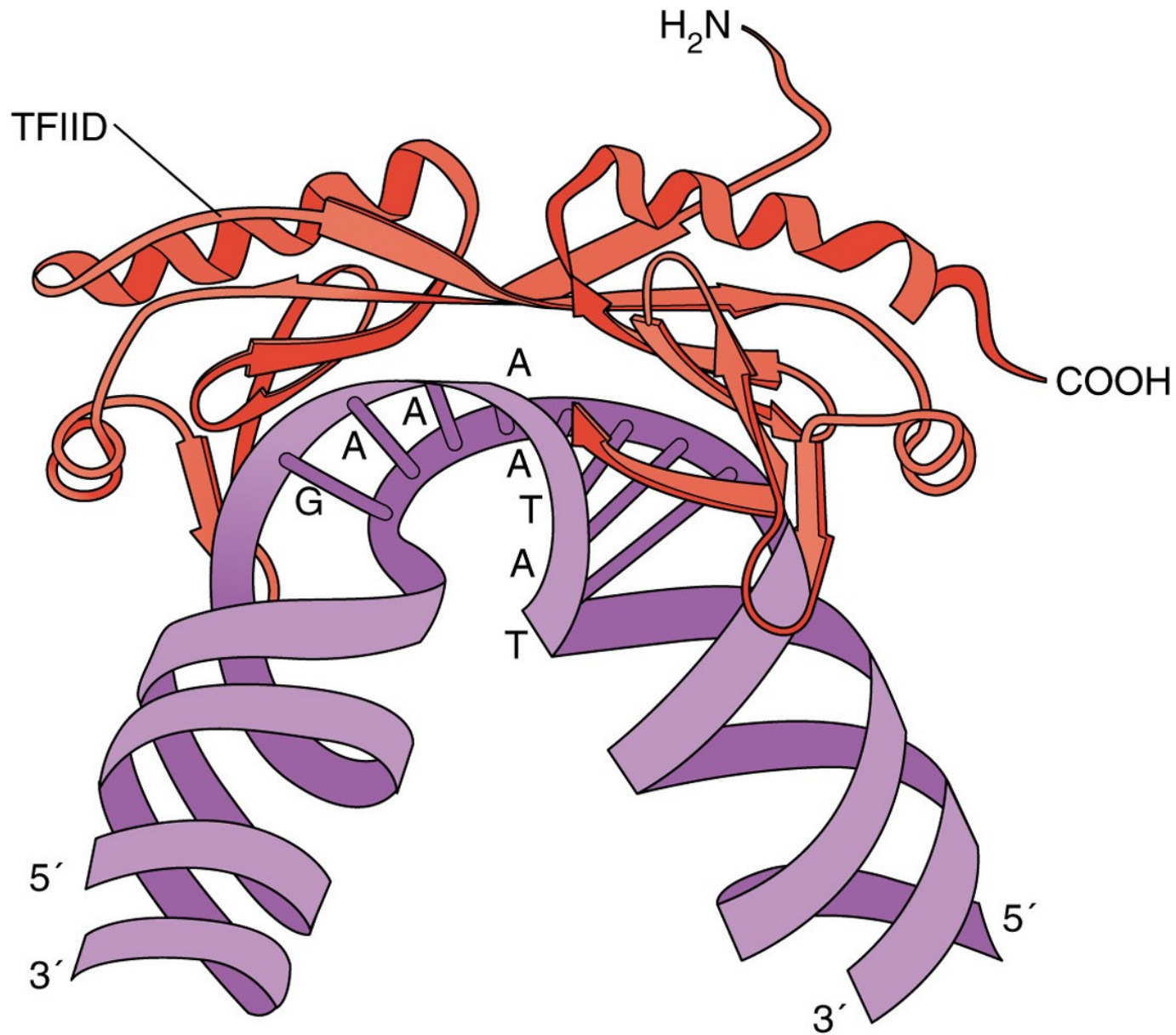


Formation of transcription initiation complex

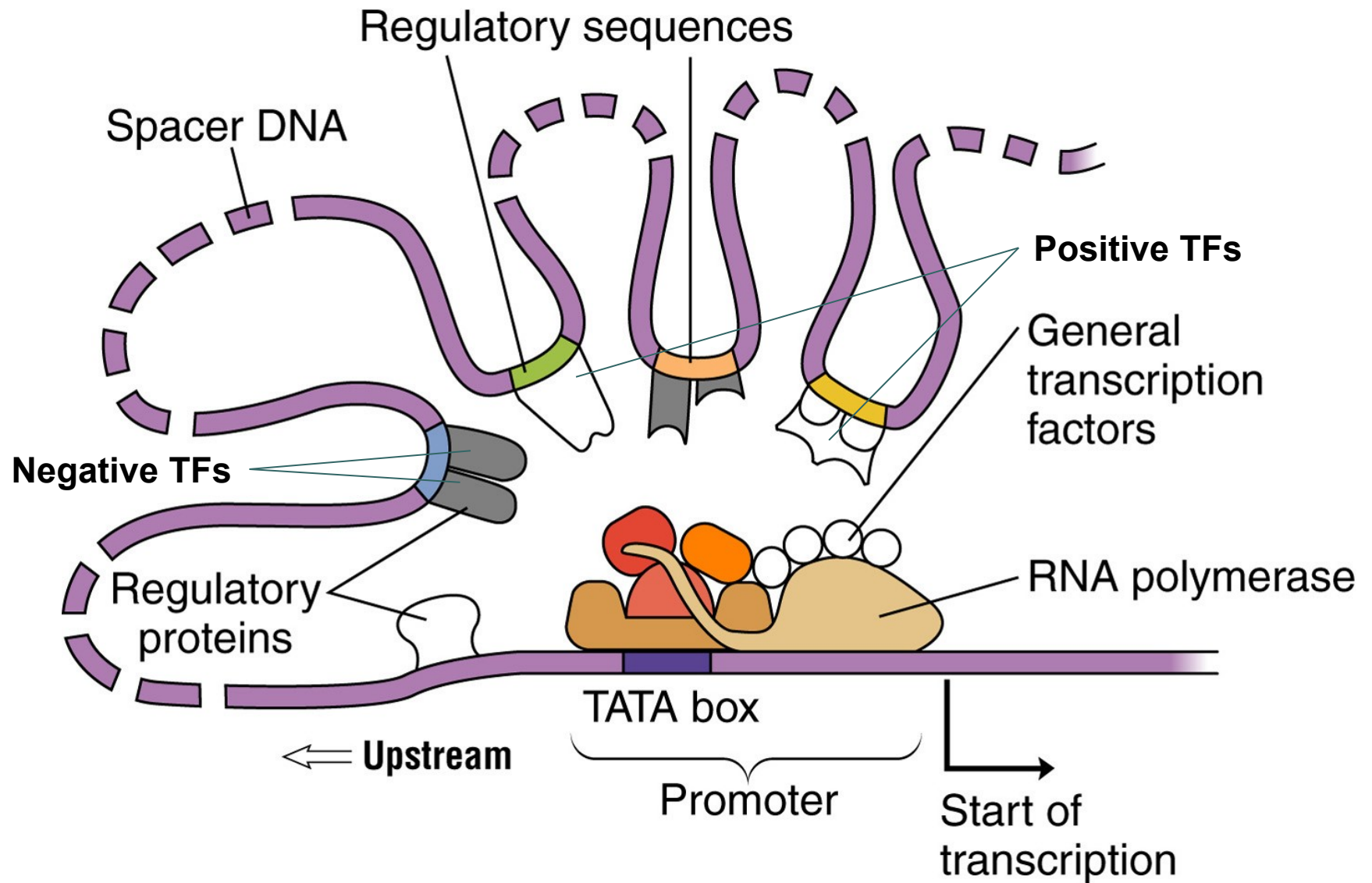
A.



B.



Formation of transcription initiation complex



Mechanism of transcriptional regulation by TAFs

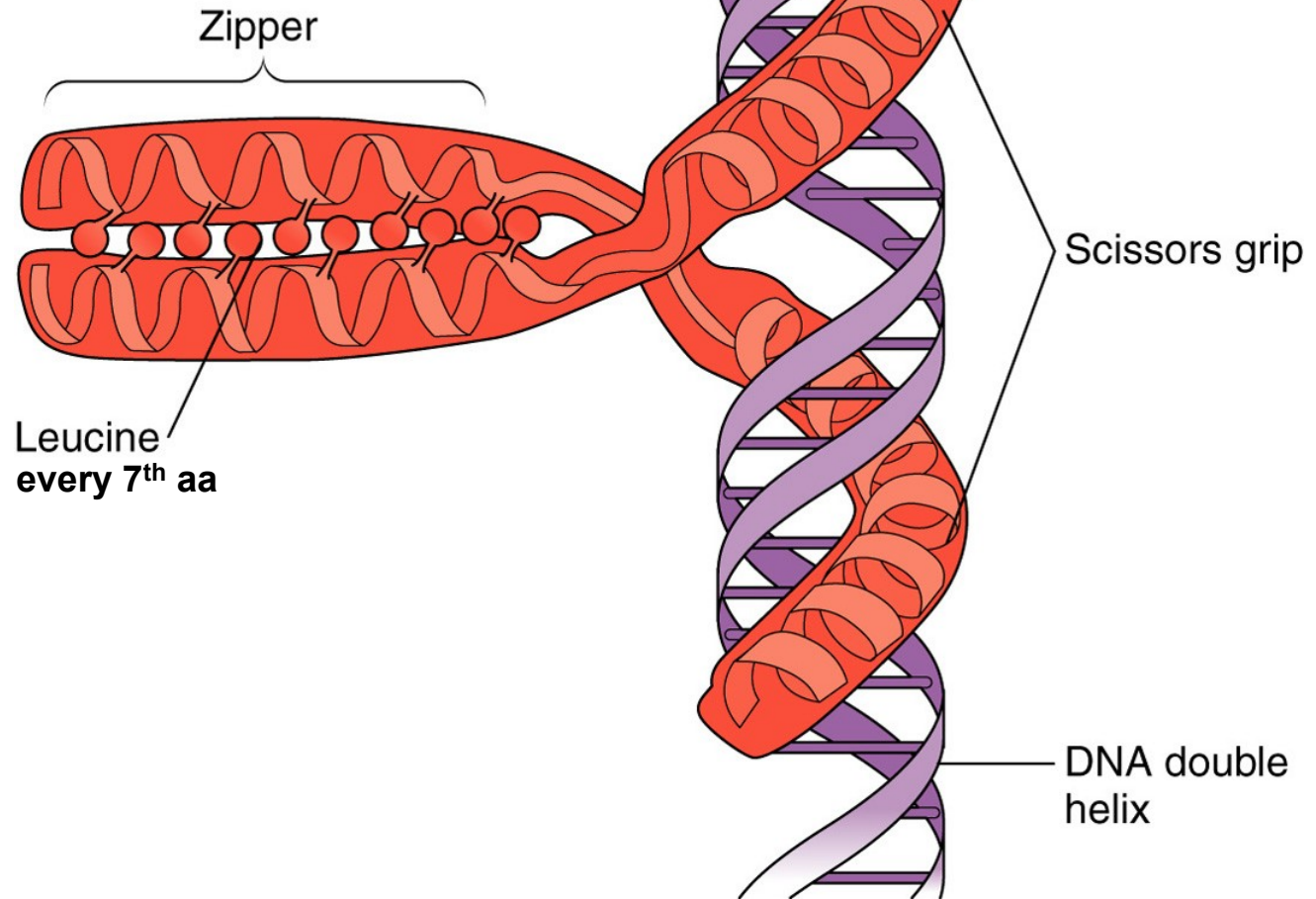
Signal recognition



Dimerization

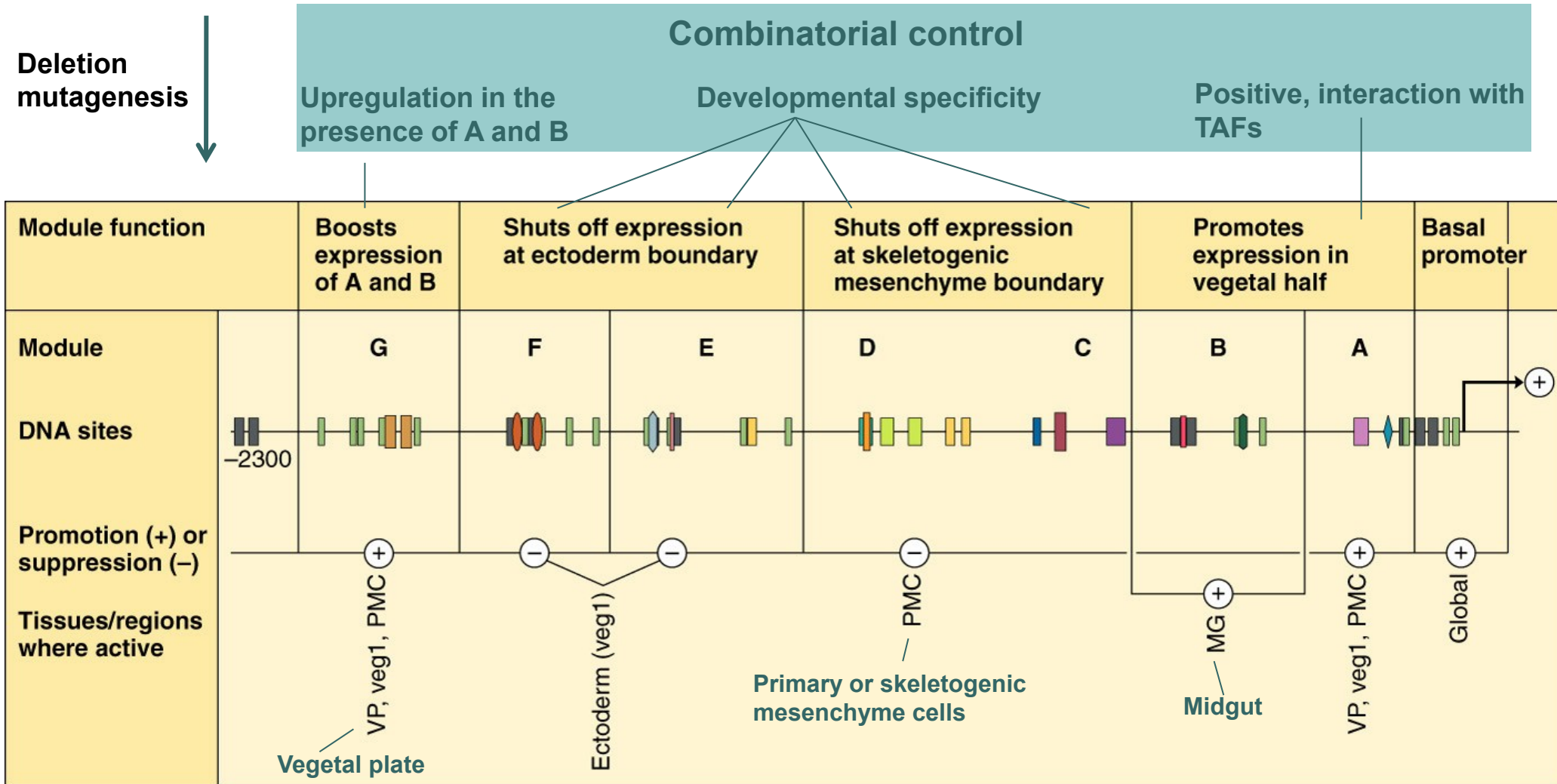


DNA binding and transcription activation



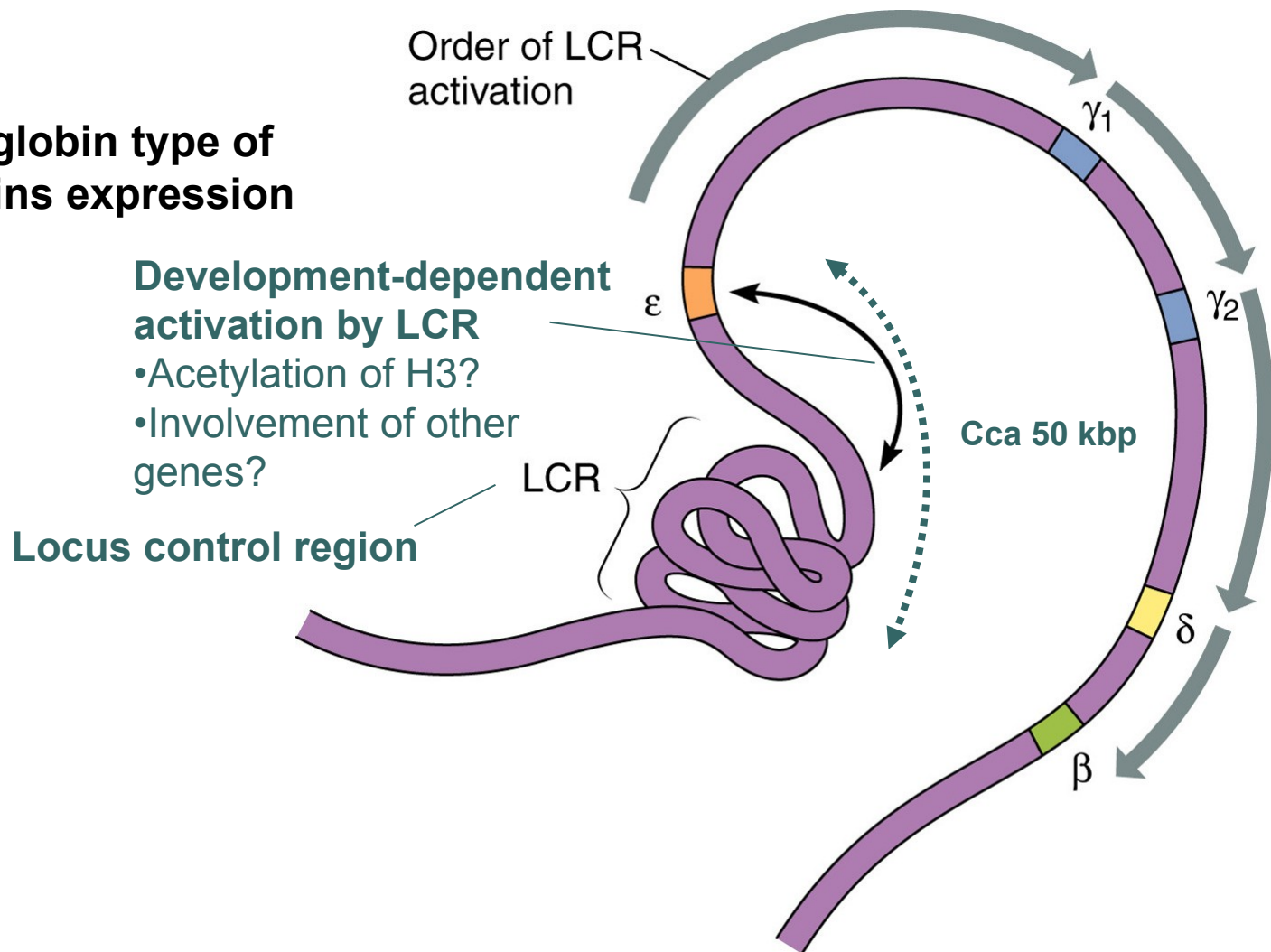
“Microprocessor-like” acting promoters

ProENDO16:REPORTER (sea urchin)



“Microprocessor-like” acting promoters

Regulation of β -globin type of hemoglobin chains expression

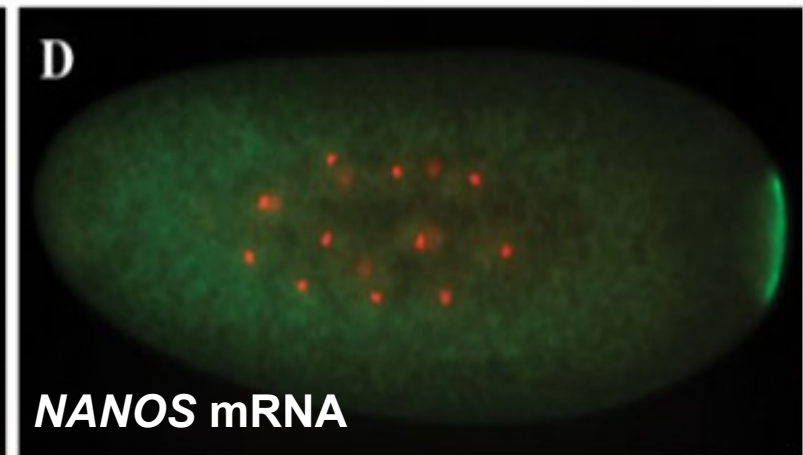
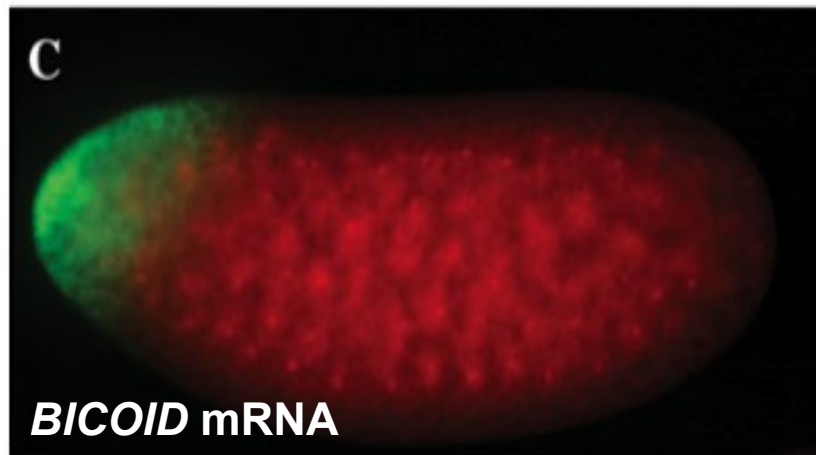
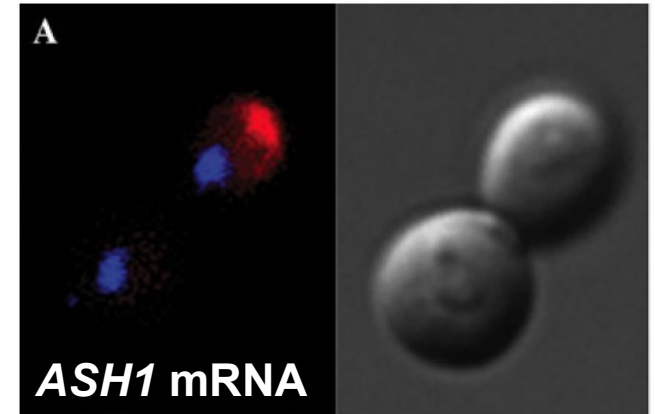


Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Lokalizace mRNA

Lokalizace mRNA

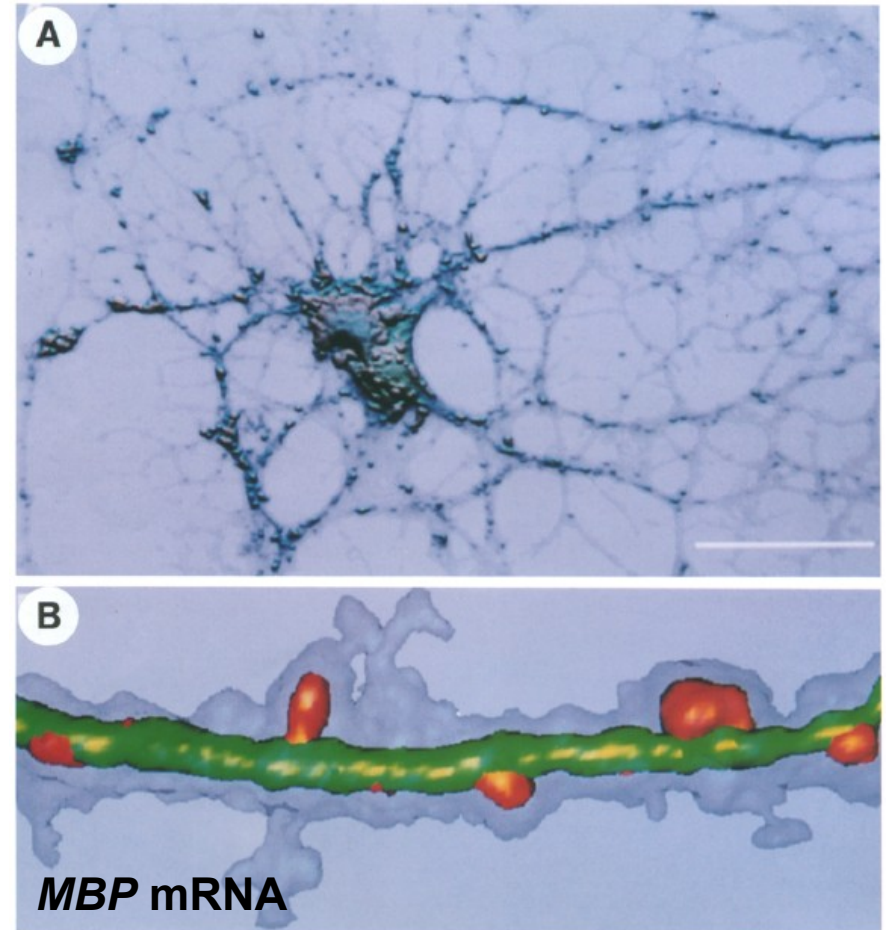
- Význam lokalizace mRNA
 - Lokalizace proteinového produktu genu v čase a místě
 - asymetrické dělení během vývoje
 - polarizace embrya



Shahbadian and Chartrand, 2012

Lokalizace mRNA

- **Role lokalizace mRNA**
 - Omezení exprese potenciálně toxických proteinů
 - lokalizace exprese MBP do oblasti myelinizace nervových buněk

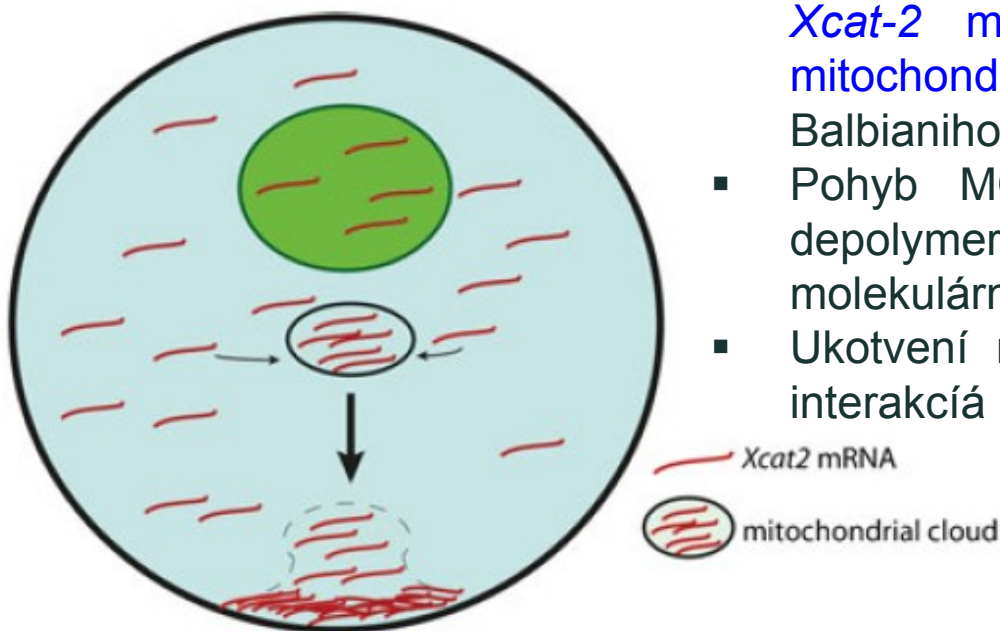


Ainger et al., 1993

Lokalizace mRNA

Mechanismy

- Difúze a ukotvení mRNA



- Během ranné oogeneze u drápatky je *Xcat-2* mRNA lokalizována do tzv. mitochondriálního oblaku (MO, Balbianiho tělíska)
- Pohyb MO je částečně závislý na depolymerizaci mikrotubulů (tzv. molekulární motor)
- Ukotvení na vegetálním pólu je dáno interakcí MO s ER

Shahbadian and Chartrand, 2012

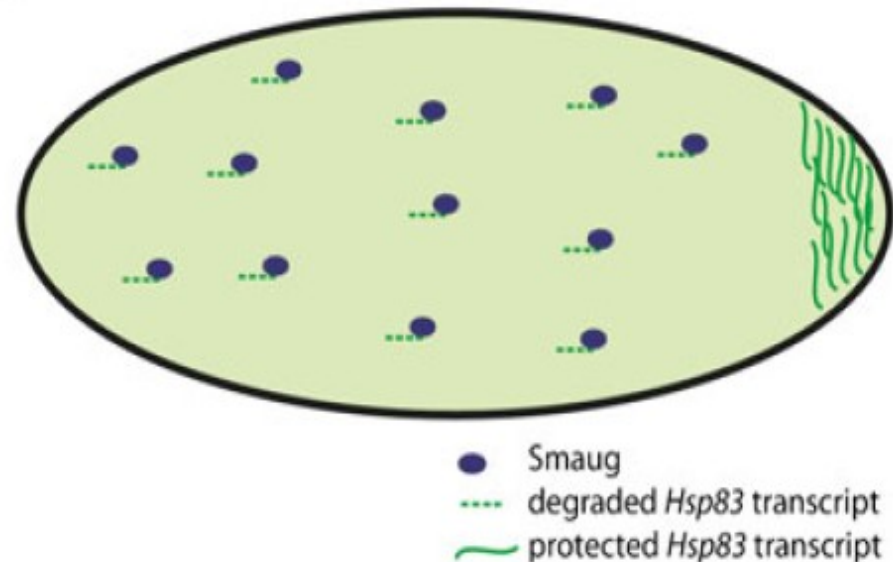
Lokalizace mRNA

Mechanismy

Shahbadian and Chartrand, 2012

▪ Lokalizovaná degradace mRNA

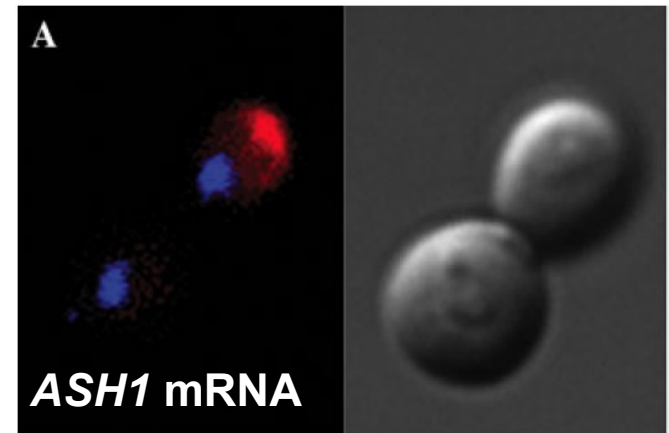
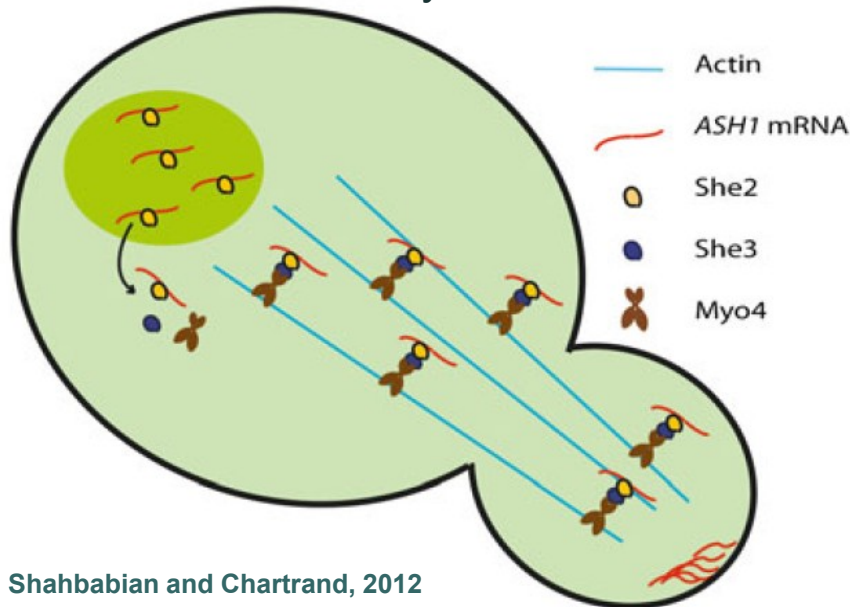
- V embryogenezi u *Drosophila m.* dochází **polární lokalizaci *Hsp83* mRNA**, podobně jako *NANOS* mRNA
- *Hsp83* mRNA je lokalizována **v celém embryu**, zde je však **destabilizována prostřednictvím cis elementů** jak v 3'UTR (HDE), tak v kódující oblasti (HIE)
- **HIE elementy jsou rozpoznávány proteinem SMAUG**, který zprostředkovává **vazbu degradačního komplexu CCR4/POP2/NOT**
- V oblasti **posteriočního pólu je *Hsp83* mRNA chráněna před účinkem SMAUG tzv. HPE elementem v 3'UTR**; mechanismus této ochrany je dosud neznámý



Lokalizace mRNA

Mechanismy

- **Aktivní transport mRNA**
 - *ASH1* je represor *HO* u *S. cerevisiae*; inhibice *HO* v dceřinných buňkách **zabraňuje změně párovacího typu**
 - *ASH1* mRNA je **aktivně transportována** prostřednictvím „molekulárních motorů“ asociovaných s aktinem



- *ASH1* mRNA obsahuje **4 cis elementy** (3 v CDS a 1 ve 3'UTR), které jsou **rozpoznávány** RNA vazebným proteinem **SHE2**
- **SHE2** umožňuje prostřednictvím **SHE3** vazbu na „molekulární motor“, **MYO4**, který se váže na aktin a umožňuje transport *ASH1* mRNA do dceřinné buňky

Význam PI

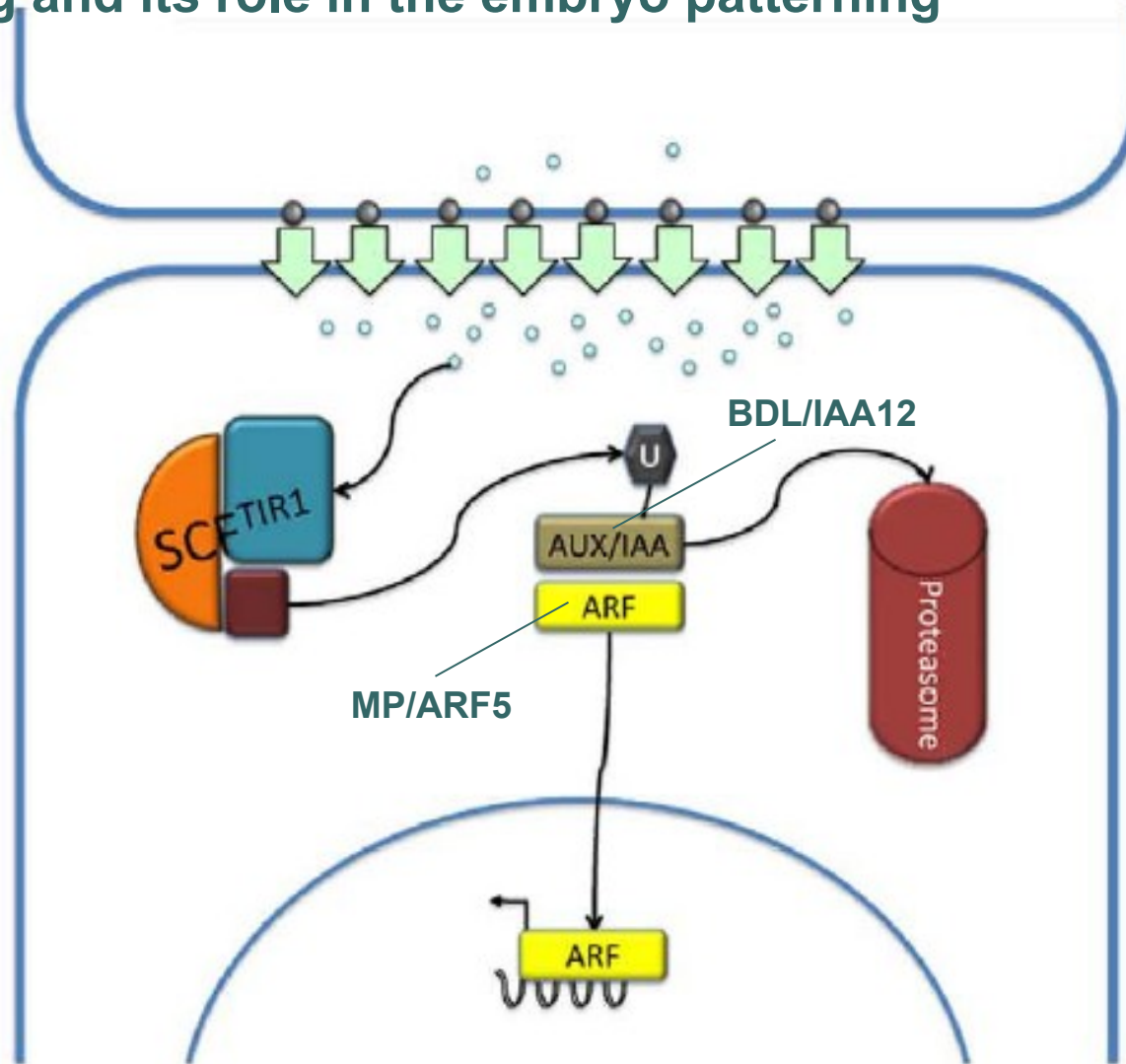
- Funkční význam specifických interakcí proteinů

- Sestřih hnRNA

Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
- Stabilita proteinů

Auxin signalling and its role in the embryo patterning



Capron et al., *Arabidopsis Book* (2009)

Význam PI

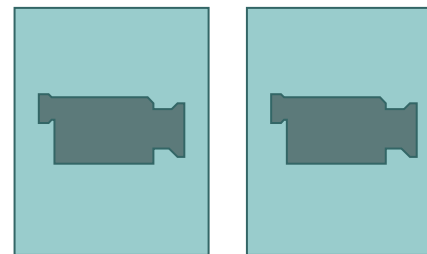
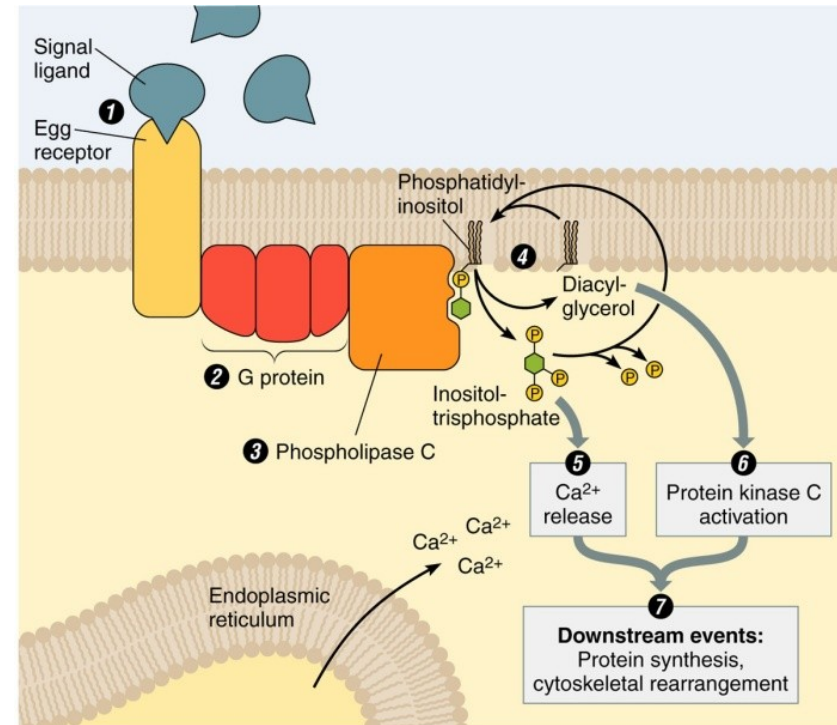
- Funkční význam specifických interakcí proteinů

- Přenos signálu

PI a přenos signálu

PI a přenos signálu

- prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
- Signální kaskády využívající cAMP



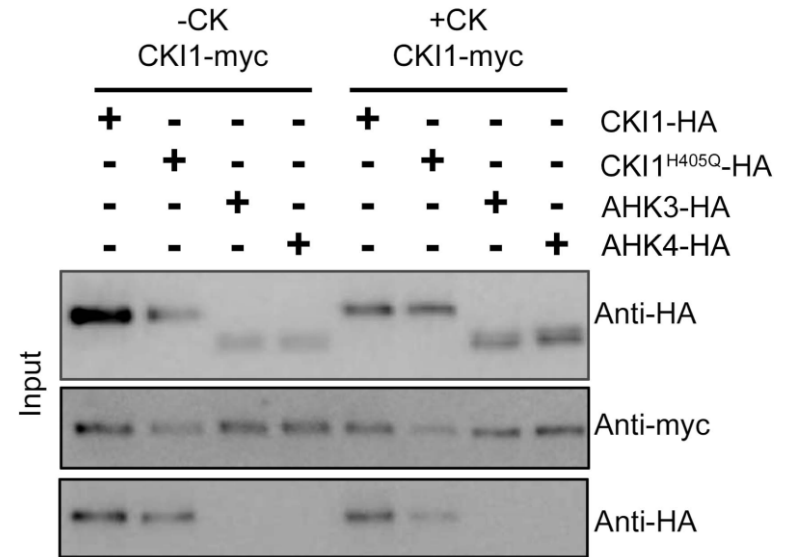
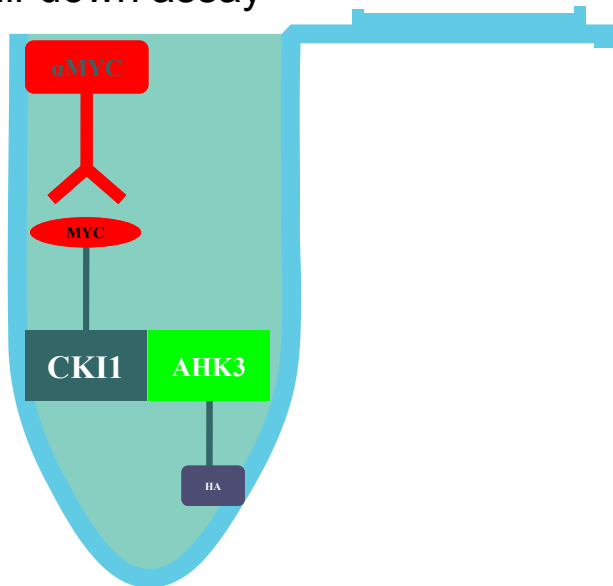
Osnova

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace

PI *in vivo*

Koimunoprecipitace

- založena na izolaci proteinových komplexů pomocí protilátek rozpoznávajících jeden z interagujících proteinů
- princip koimunoprecipitace využívá metoda pro potvrzení interakcí u proteinů, kde již tuto interakci předpokládáme pomocí tzv. pull-down assay



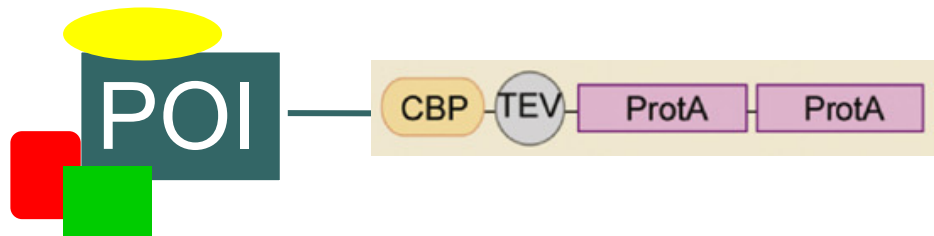
Osnova

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

PI *in vivo*

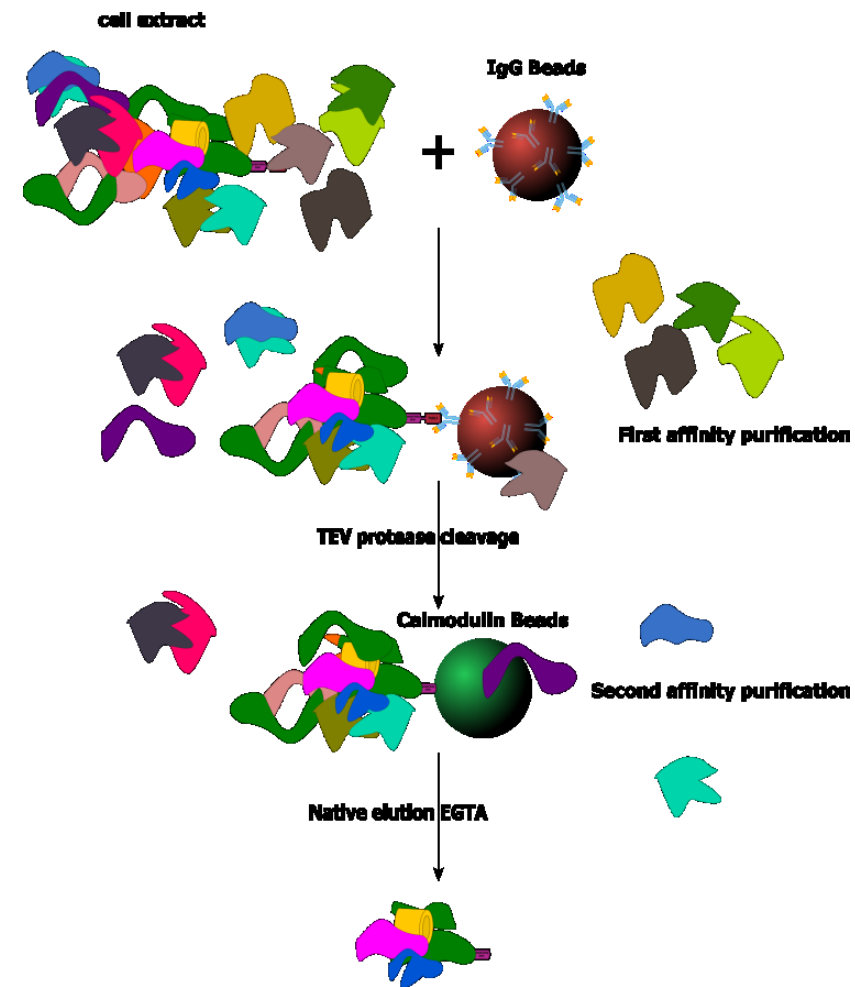
Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, fúzovaných s dvěma různými vazebnými doménami



- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vazující domény proteinu A (ProtA)
- místo rozpoznávané specifickou proteázou z TEV viru (tobacco etch virus)

- proteiny izolovaných komplexů jsou po rozdělení na 1D ELFO identifikovány pomocí MS
- výhodou je použití dvou nezávislých proteinových domén pro afinitní purifikaci a tedy velká specifita



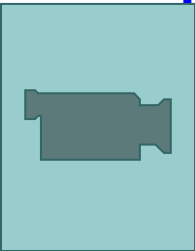
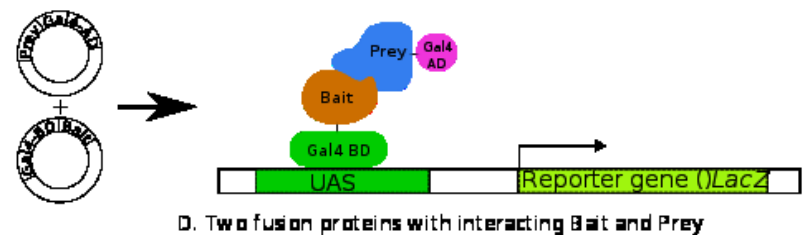
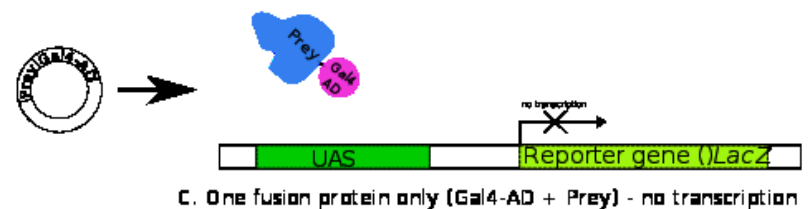
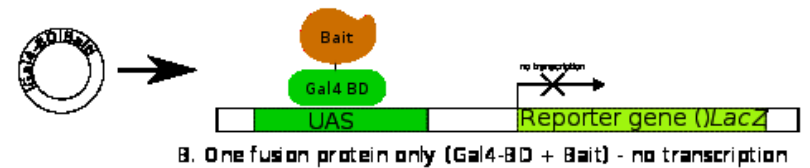
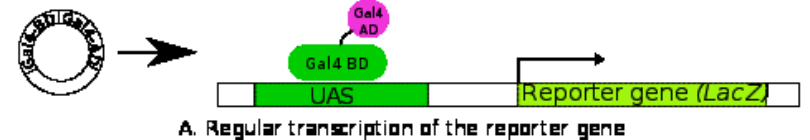
Osnova

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)

PI *in vivo*

Dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, každý z nich fúzovaný s částí transkripčního faktoru Gal4
 - jeden z proteinů (návnada, bait) fúzovaný s DNA vazebnou doménou Gal4 (Gal4-BD)
 - druhý z proteinů (kořist, prey) fúzovaný s aktivační doménou Gal4 (Gal4-AD)
- Interakce proteinů umožní rekonstituci vazebné domény s aktivační doménou a spuštění reportérového genu
 - vizuální detekce (modré zbarvení, LacZ)
 - auxotrofní selekce (růst na médiu bez histidinu, His)
- umožňuje vyhledávání interakčních partnerů v expresních knihovnách jednotlivých organismů



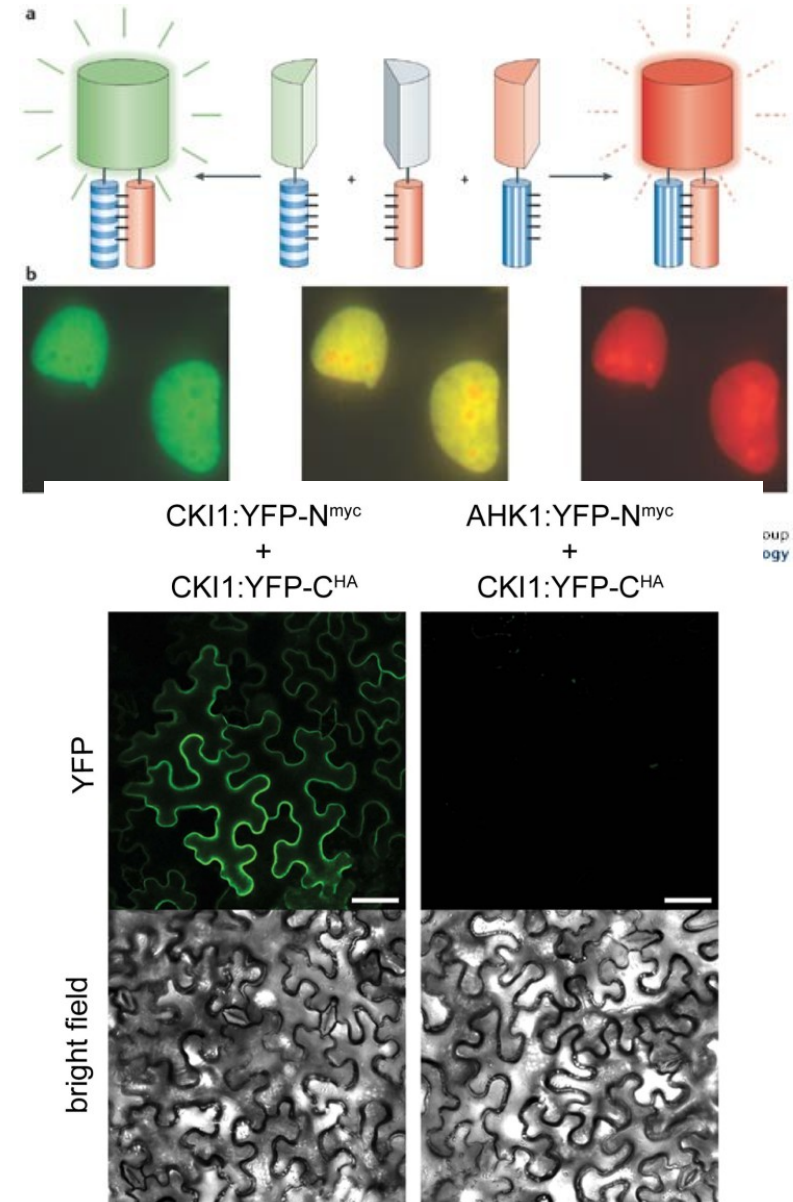
Osnova

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)

PI *in vivo*

bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)

- Proteinová interakce je detekována na základě reasociace fluoreskujícího proteinu
 - každý z potenciálních interakčních partnerů je fúzován s jednou z podjednotek fluoreskujícího proteinu, např. YFP
 - při interakci dojde ke znovuoobnovení fluorescence
- Kromě identifikace vlastní interakce umožňuje i lokalizovat interakci v buňce



Osnova

- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

PI *in vivo*

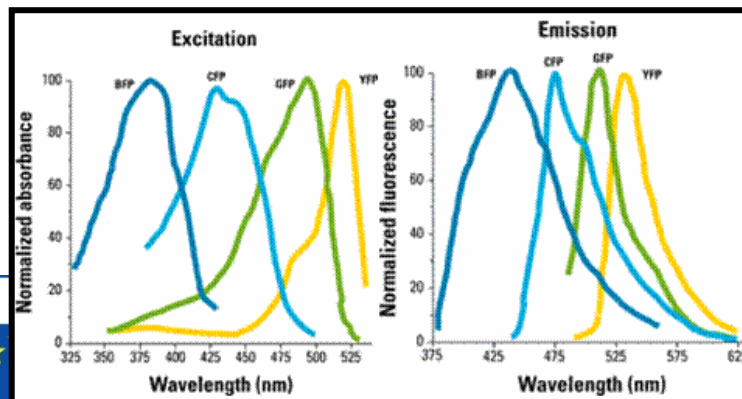
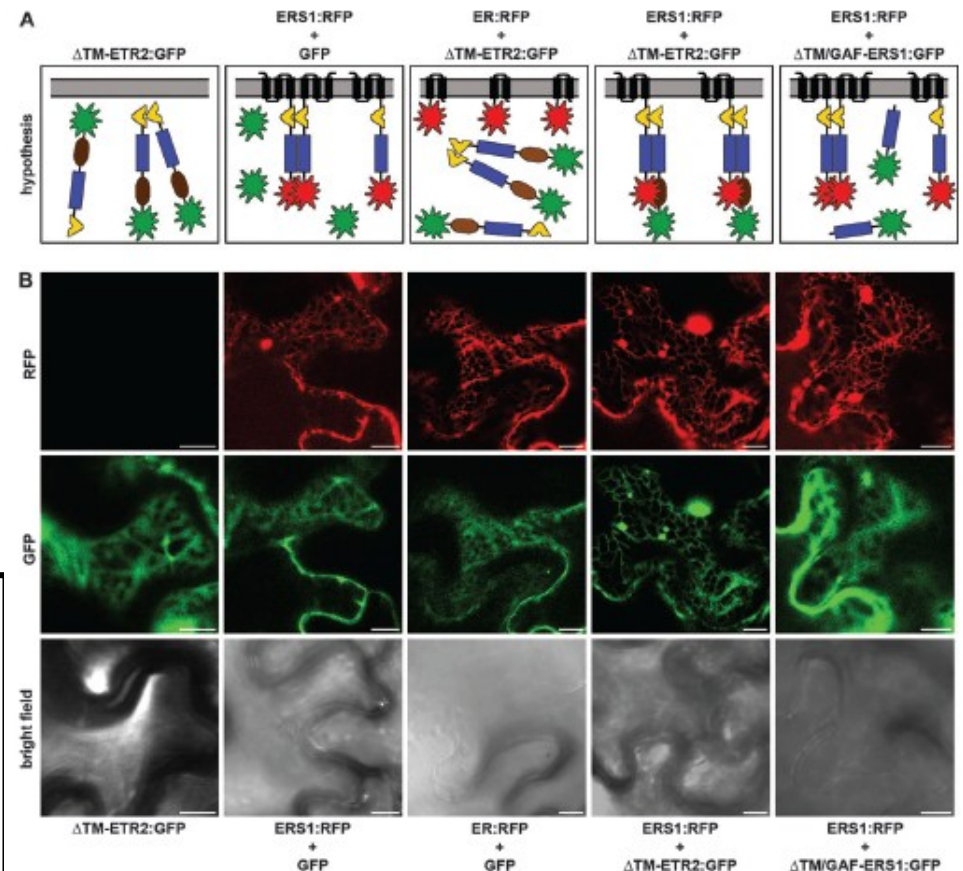
Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplasmatických proteinů s membránovými proteiny

membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

potenciální ineterakční partner je fúzován s jímým fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem

v případě interakce dojde ke změně lokalizace cytoplasmatického proteinu na membránu (kolokalizaci s membránovým proteinem)

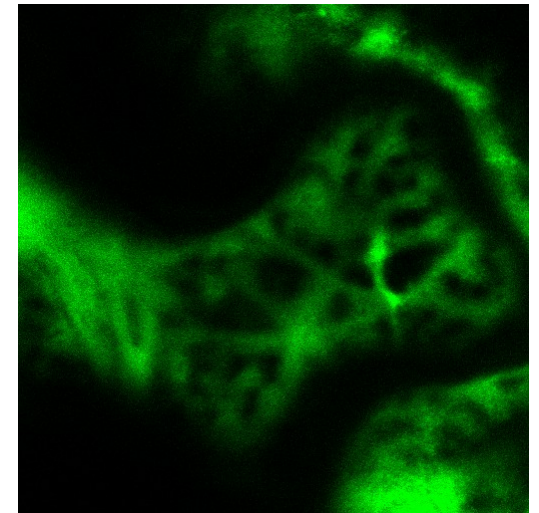
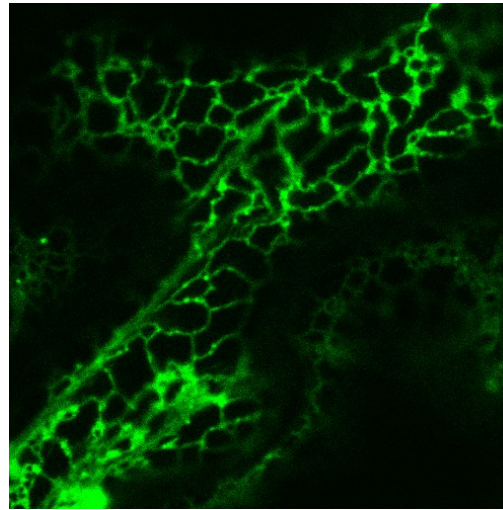
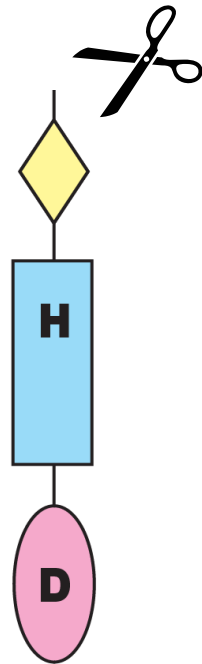


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

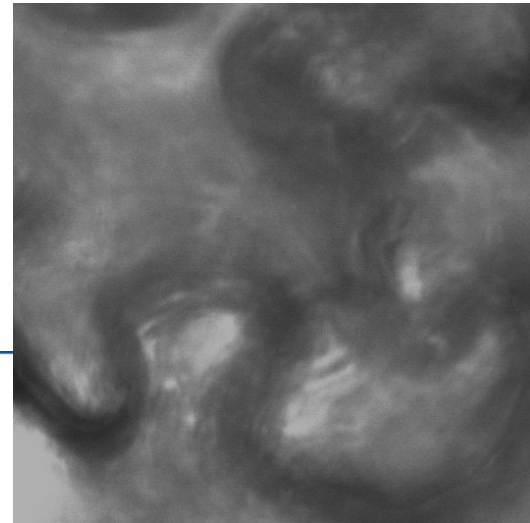
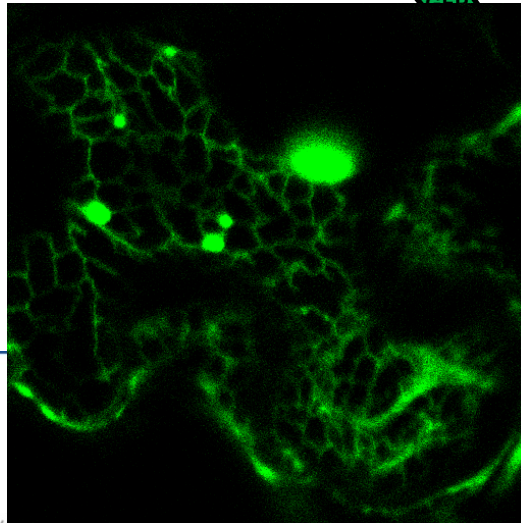
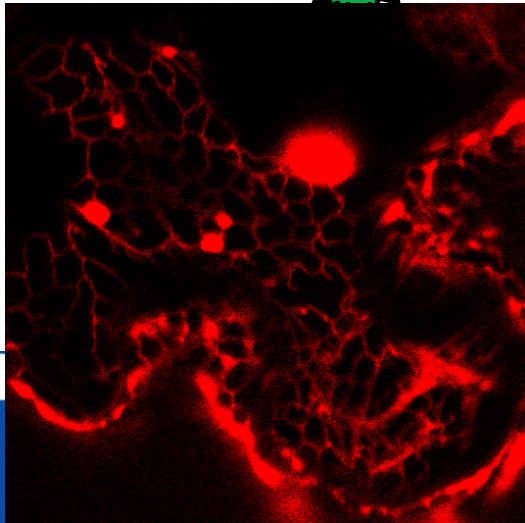
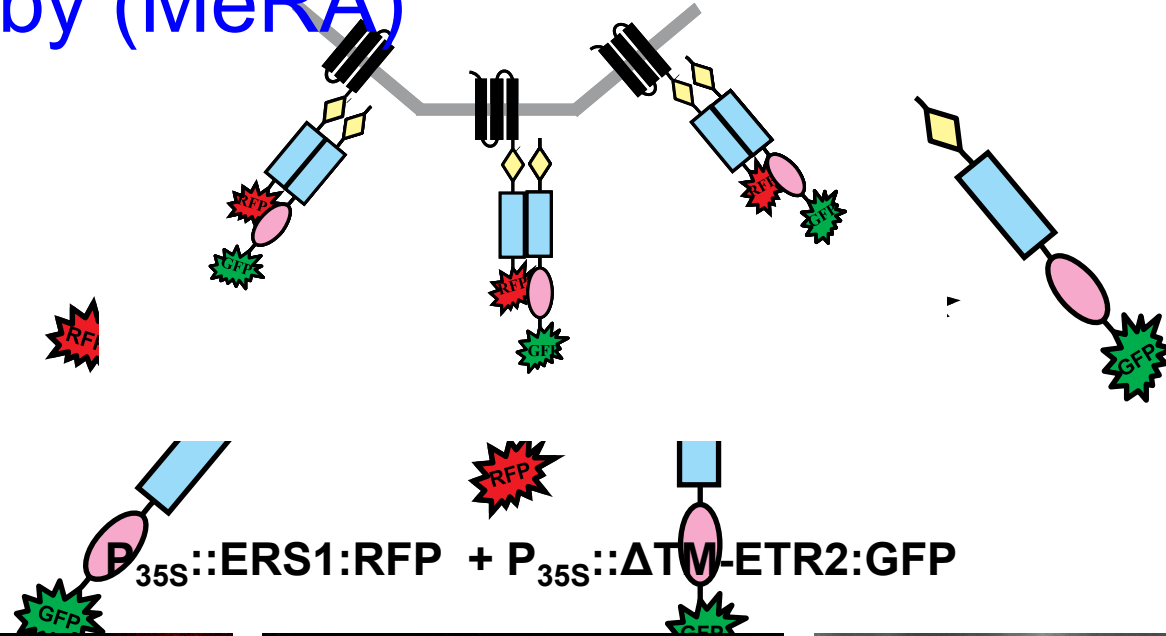
PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

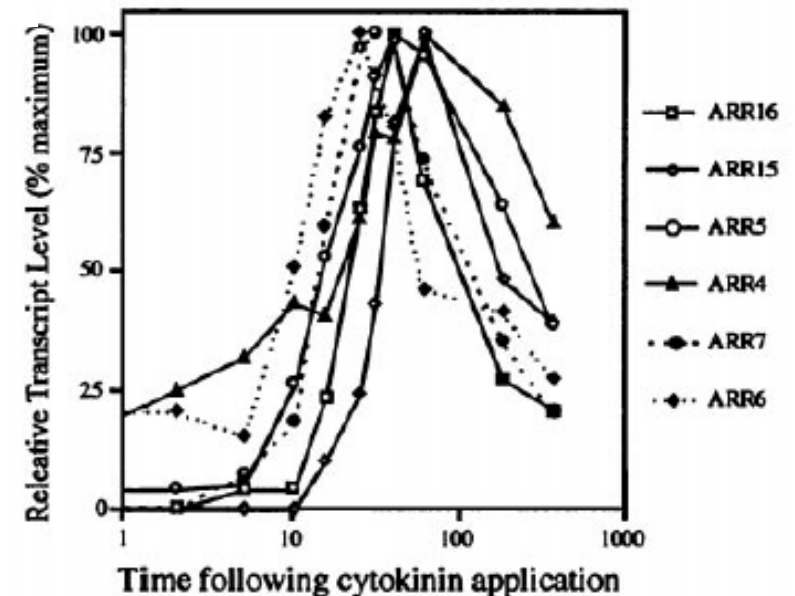
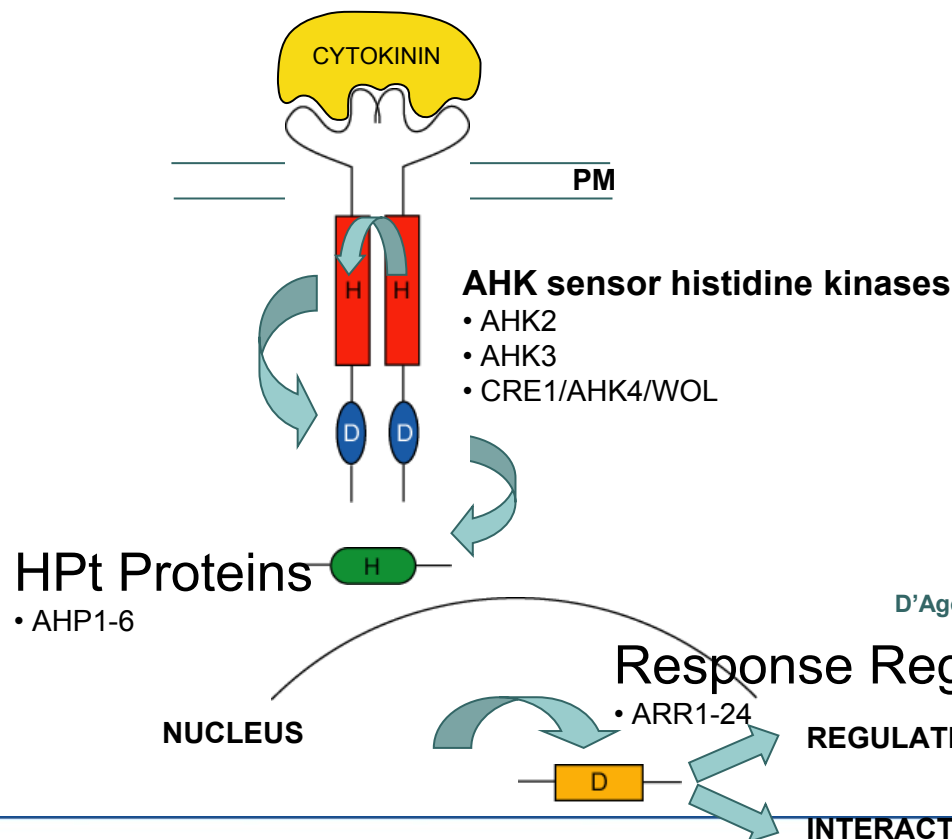


Osnova

- Praktické využití metod pro studium PI *in vivo*

Signal Transduction via MSP

Recent Model of the CK Signaling via Multistep Phosphorelay (MSP) Pathway

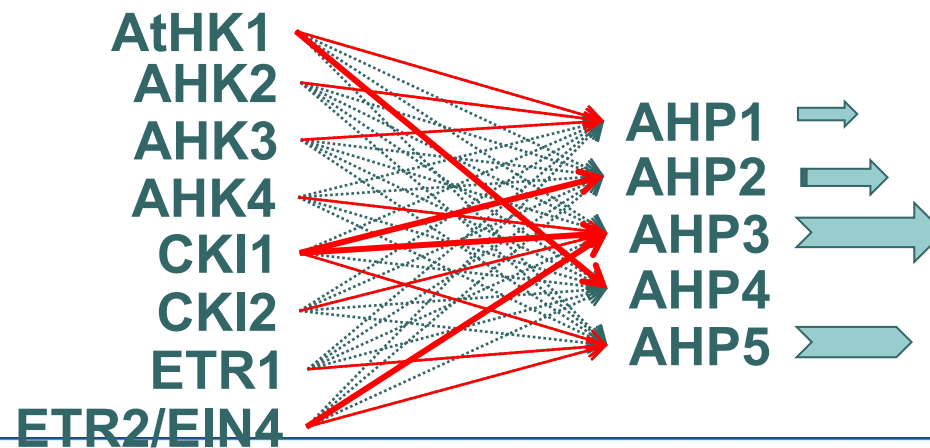
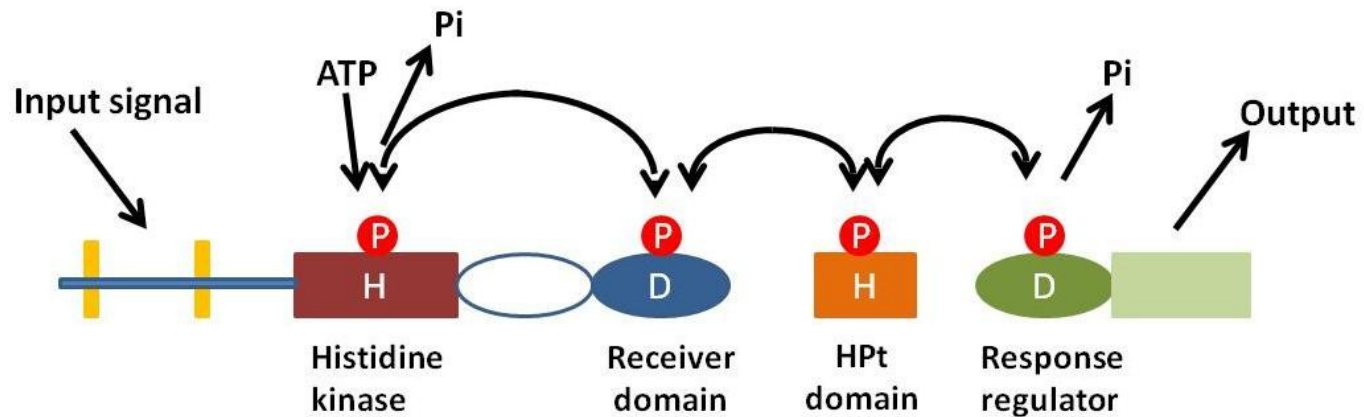


D'Agostino et al., Plant Phys, 2000

CK primary response genes
- Type-A ARR expression

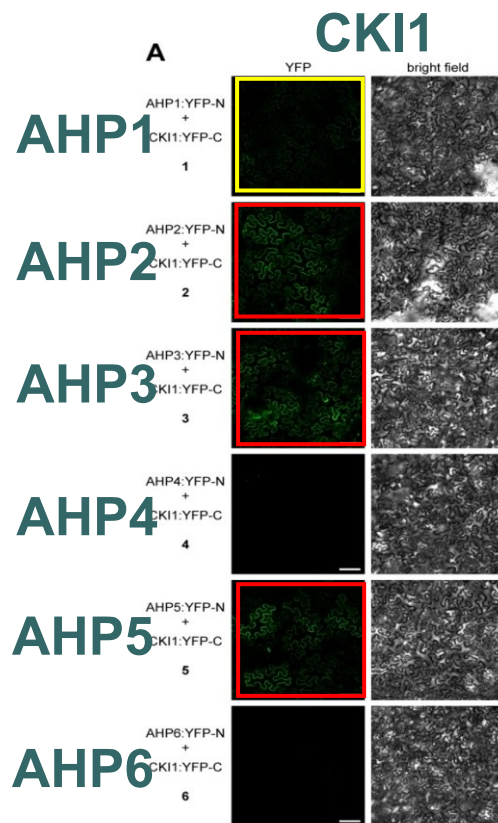
Is there any specificity in plant MSP?

- Is there *a signalling specificity of MSP* in plants?



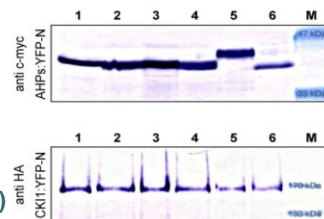
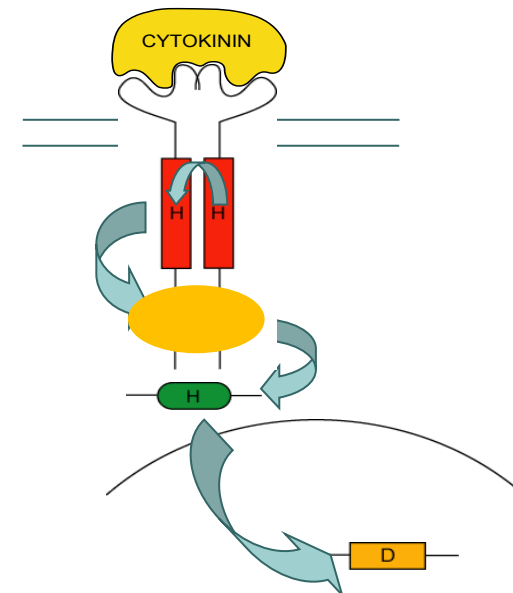
Specificity of CKI1 signalling

- *CKI1 interacts in vivo* with only *subset of AHPs*



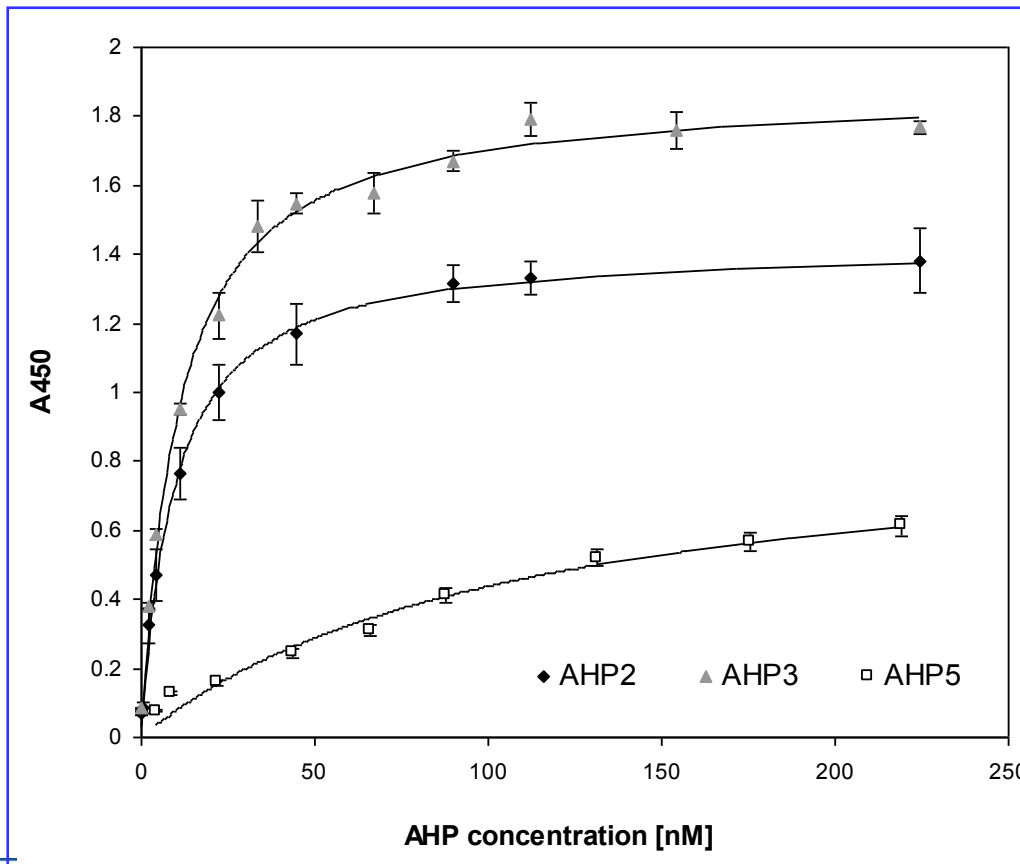
BiFC

Y2H



Specificity of CKI1 Signalling

- **Specificity of CKI1 interaction** was confirmed *in vitro*



AHP3: $K_d \sim 10,5$ nM

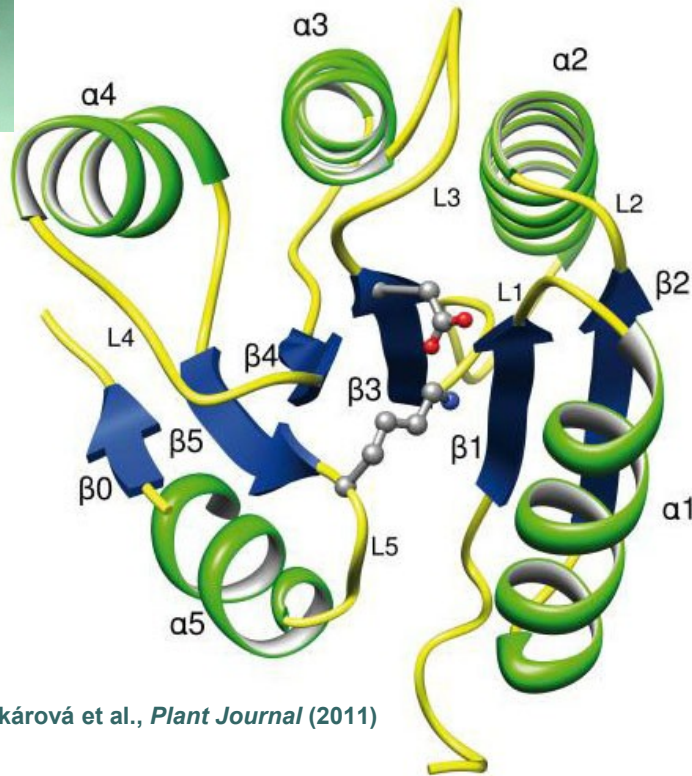
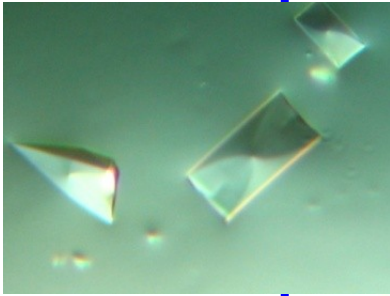
AHP2: $K_d \sim 9,17$ nM

AHP5: $K_d \sim 108$ nM

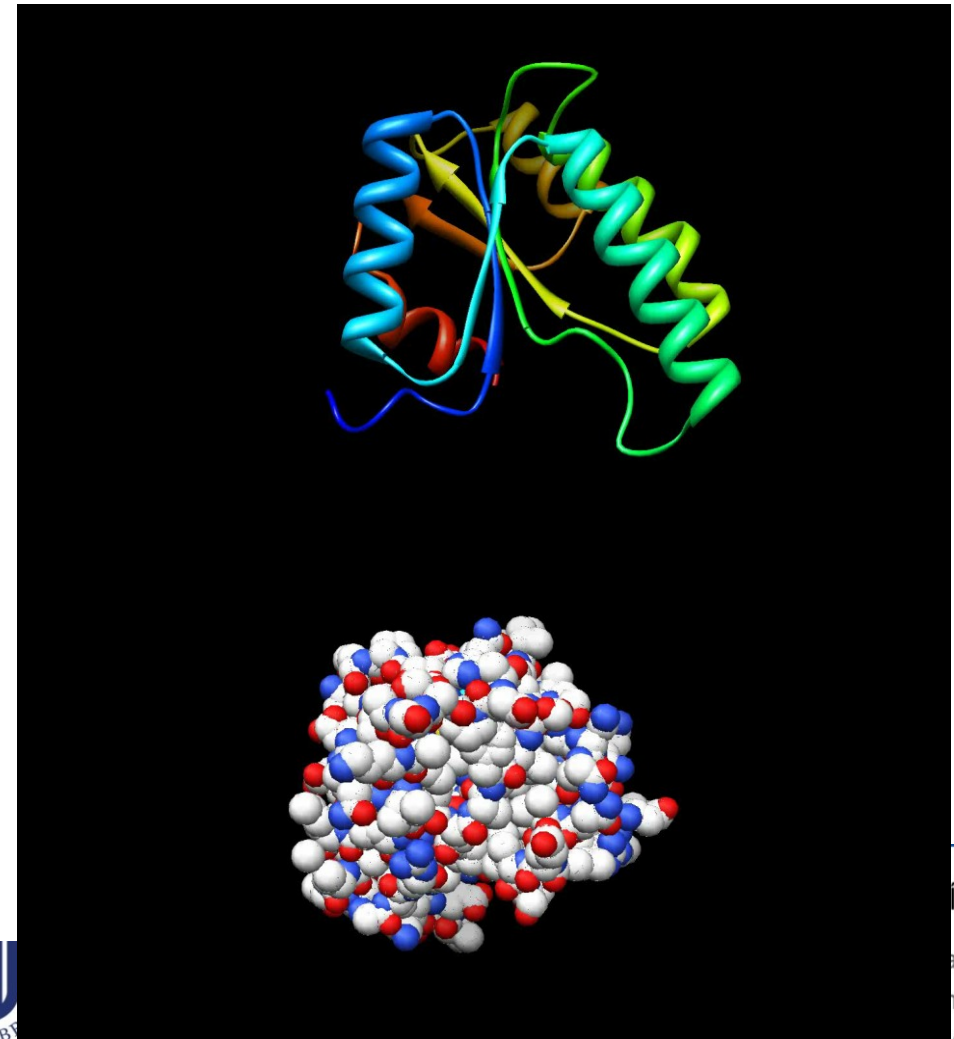
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

Structure of CKI1_{RD}

- X-ray crystallography revealed conserved $(\alpha/\beta)_5$ structural fold of CKI1_{RD}

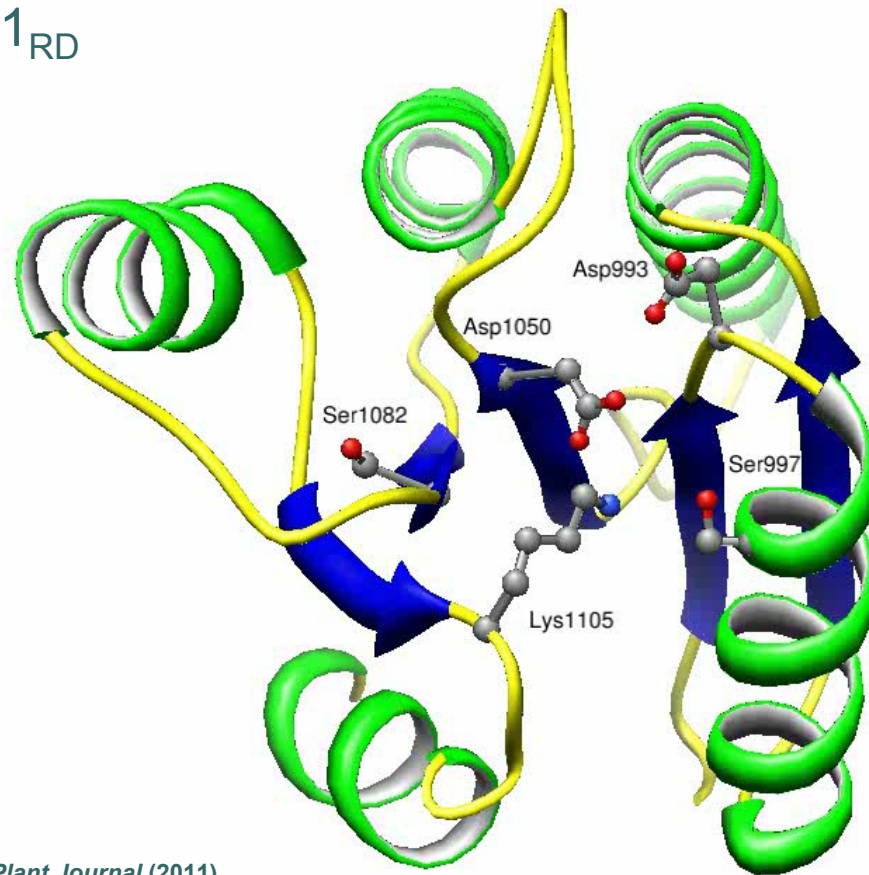


Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)



Dynamics of CKI1_{RD}

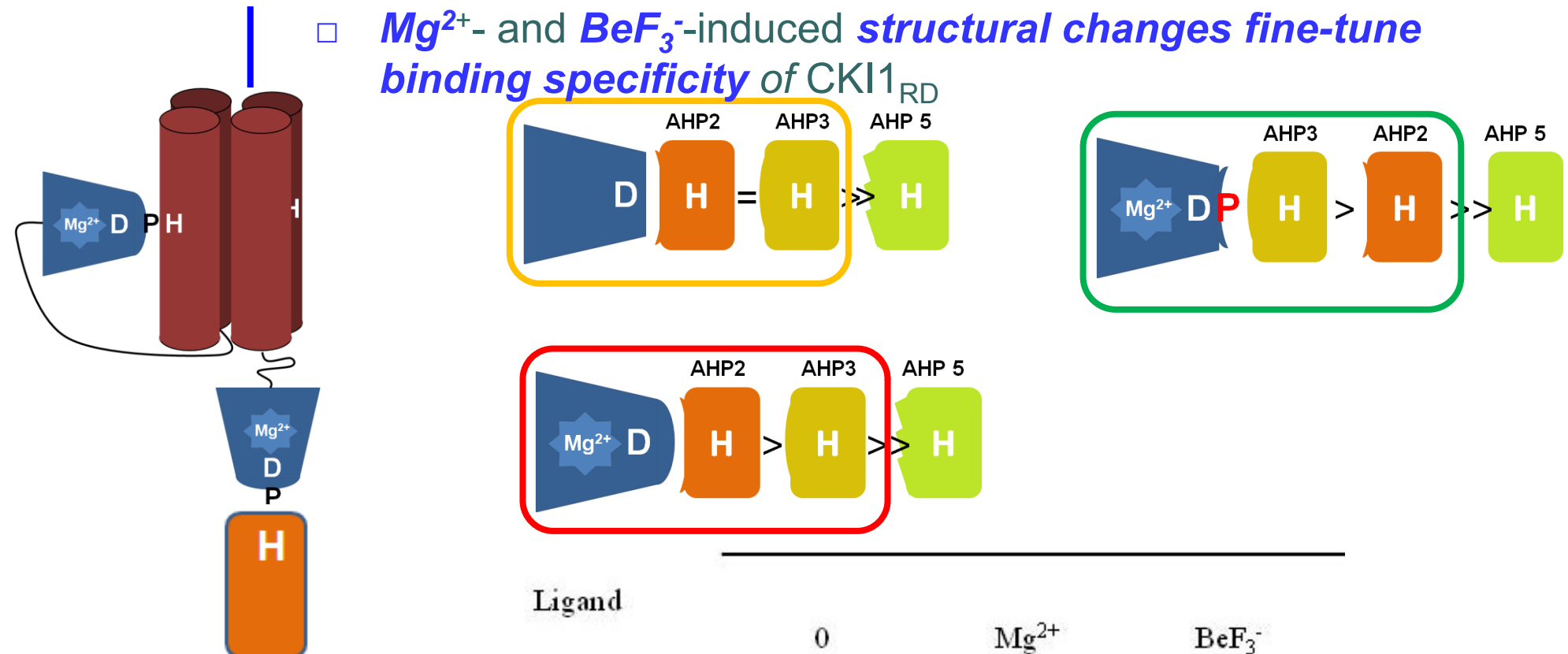
- *Mg²⁺ binding* leads to *remodelling of active centre* of CKI1_{RD}



Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

CKI1_{RD} structural changes are associated with its binding specificity

- *Mg²⁺*- and *BeF₃⁻*-induced **structural changes fine-tune binding specificity** of CKI1_{RD}



Ligand	0	Mg ²⁺	BeF ₃ ⁻
AHP2	9.17 ± 0.49	6.2 ± 0.98	11.6 ± 2.0
AHP3	10.5 ± 0.73	12.9 ± 0.72	8.0 ± 0.42
AHP5	108 ± 18	152 ± 26	119 ± 32

Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

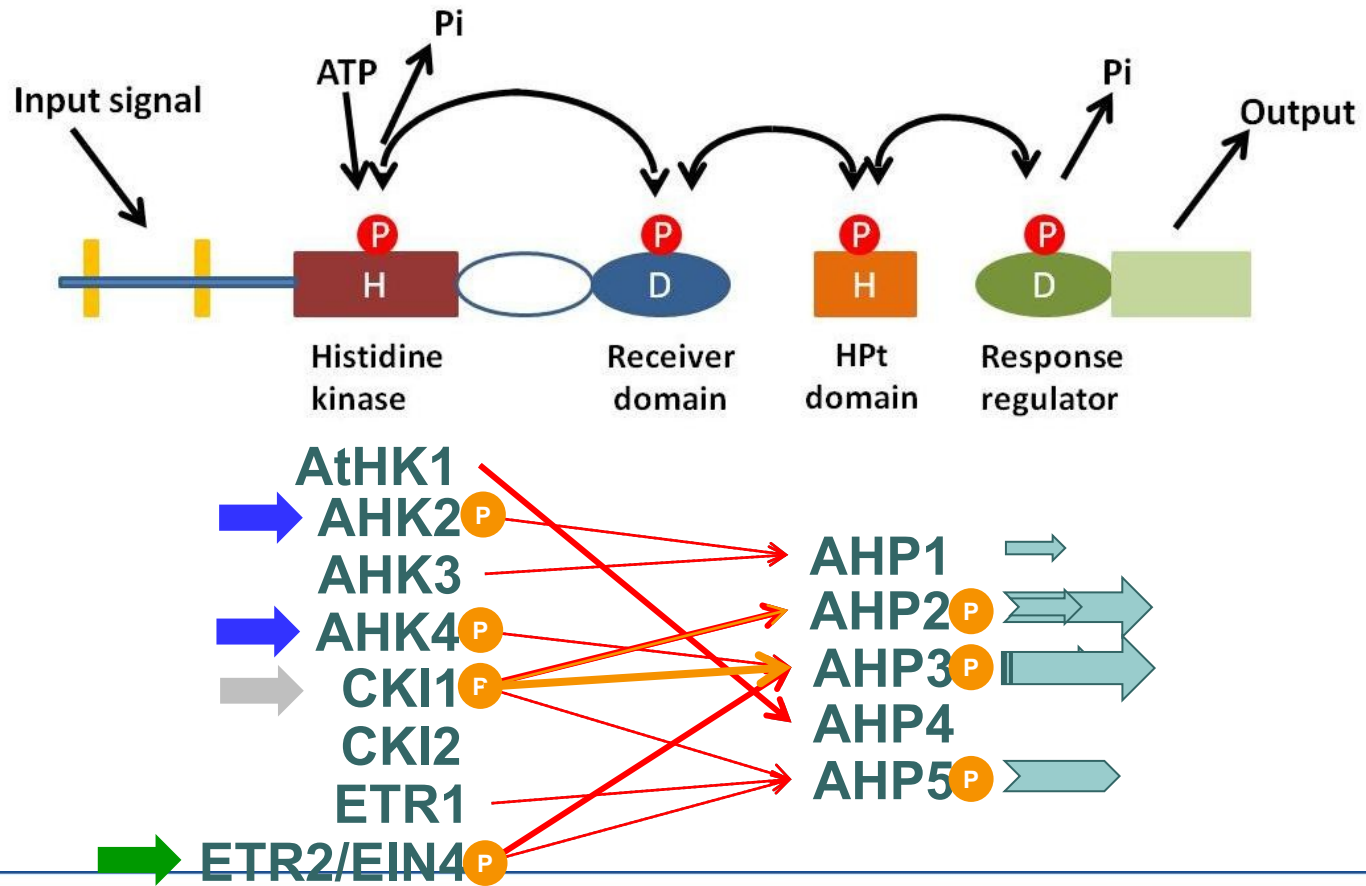


ÁVÁNÍ

ancována
n fondem
republiky

Model Suggestion

- **YES**, there is *signalling specificity of MSP* in plants.



Shrnutí

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita proteinů
 - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
 - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)
- Praktické využití metod pro studium PI *in vivo*

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky