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

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Genomika 06

- Zdrojová literatura

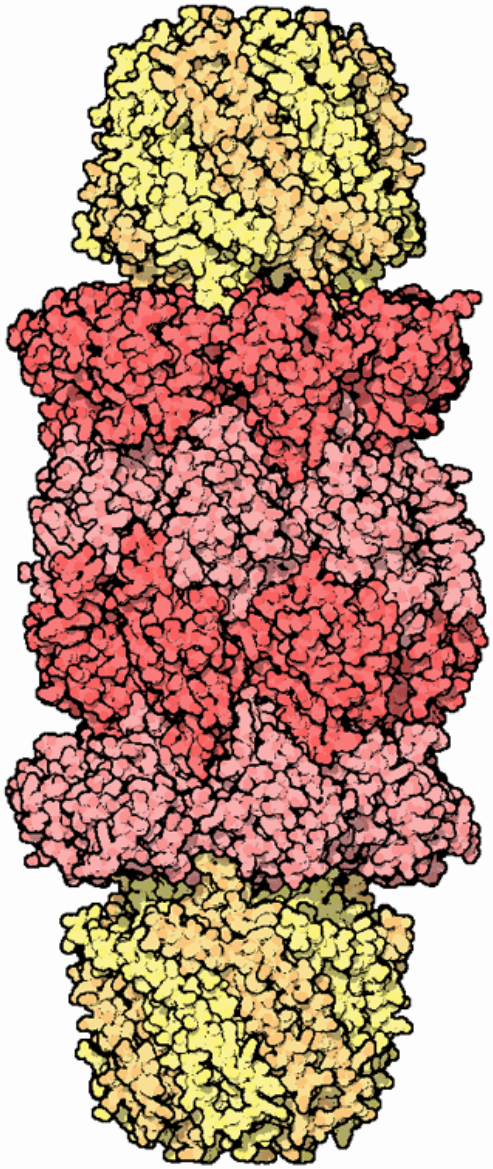
- Wilt, F.H., and Hake, S. (2004). **Principles of Developmental Biology**. (New York ; London: W. W. Norton).
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. 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.
- Shahbabian, 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*

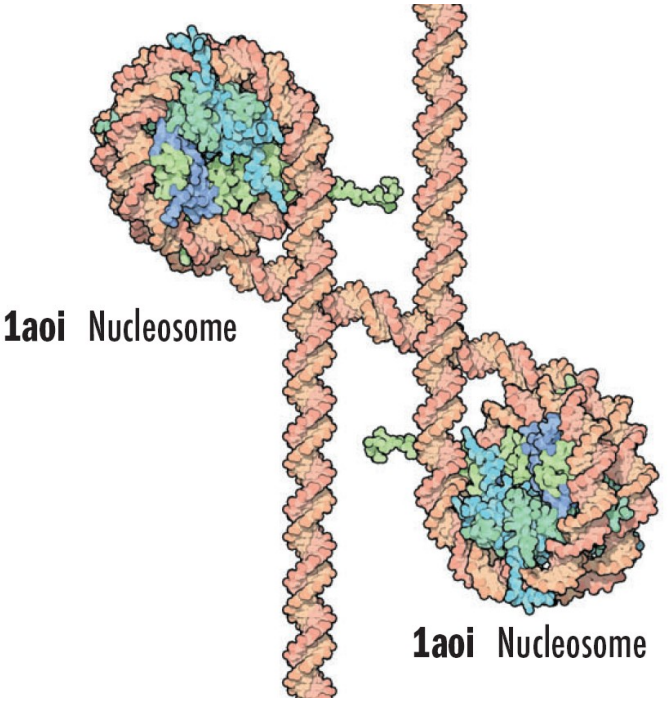
Význam interakcí proteinů

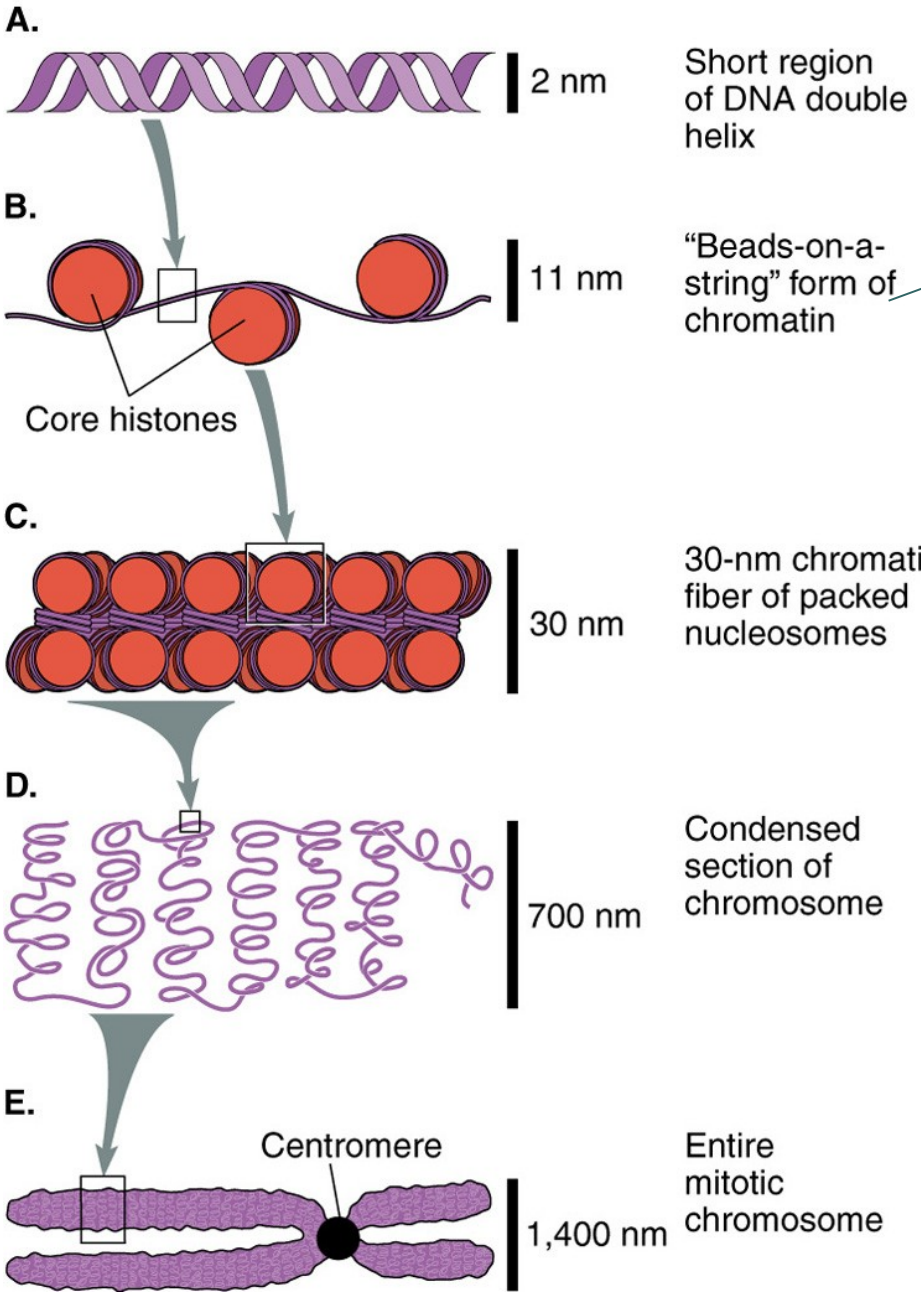
- **Funkční význam specifických interakcí proteinů**
  - Většina proteinů v buňce existuje ve formě komplexů, které mohou dále navzájem interagovat
    - Proteazom
      - proteinový komplex zodpovědný za degradaci nepotřebných proteinů v buňce



Význam PI

- Funkční význam specifických inteakcí proteinů
  - Struktura chromatinu

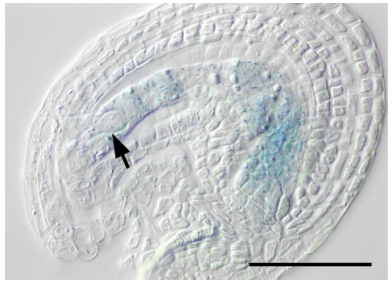




Regulation by histone acetyl transferases or histone deacteylases

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

DNA methylation in animals vs. in plants



methylation status

CpG

methylation status

CpG or CpNpG

CpNpNp

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

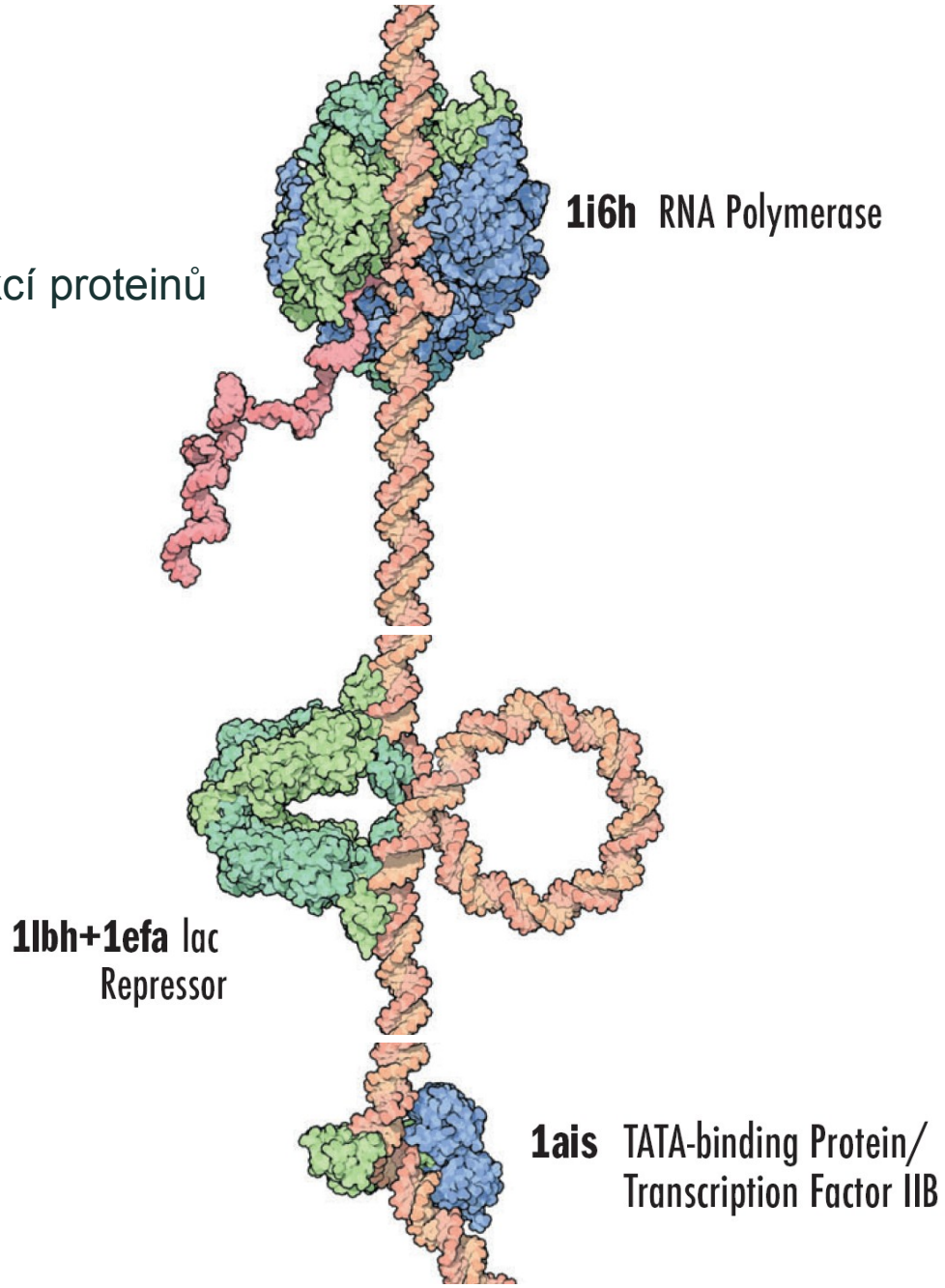
↓

Imprinting and "cell memory" → **Mechanism of transcriptional regulation by DNA methylation mostly unknown**

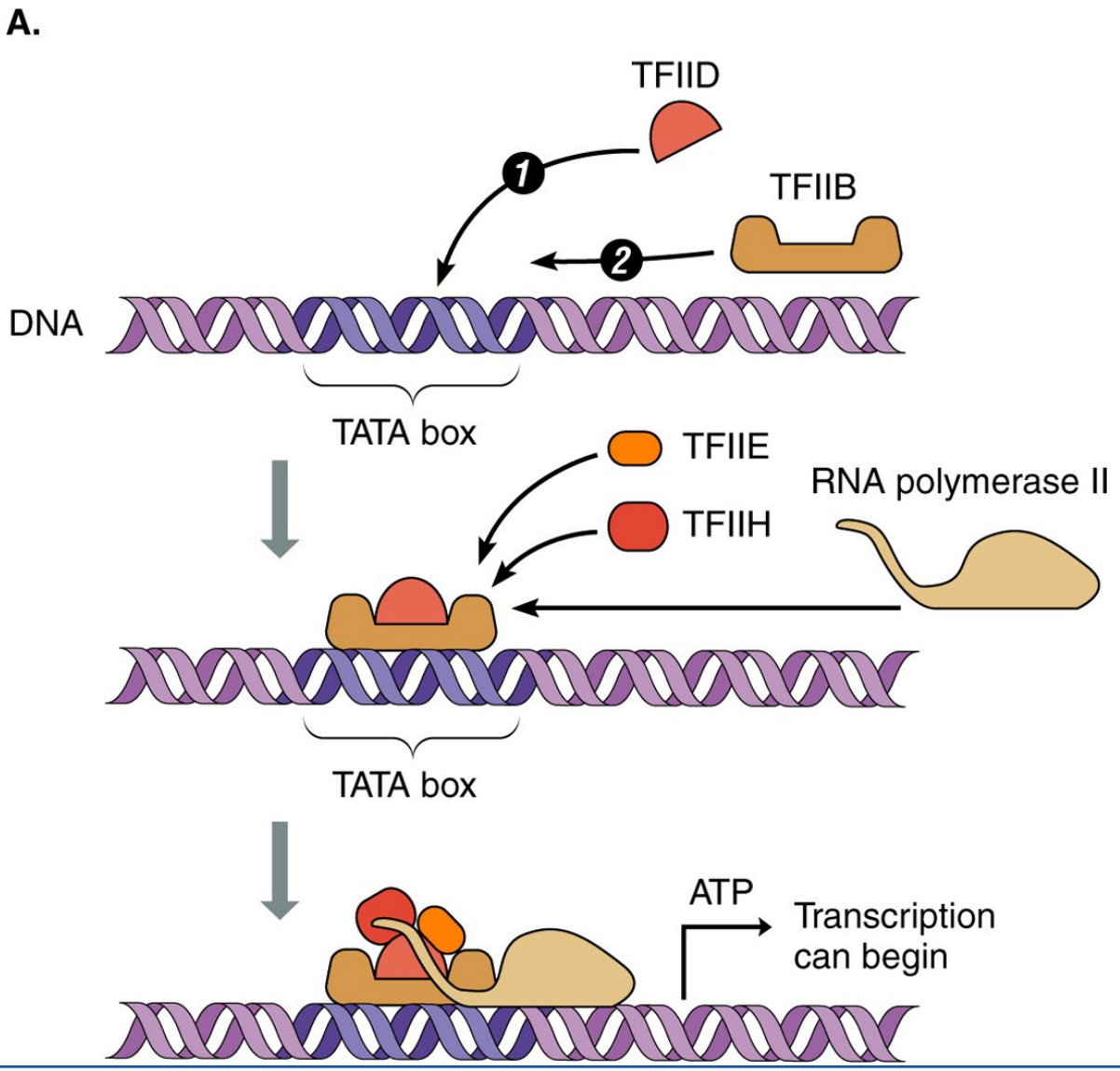
EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Význam PI

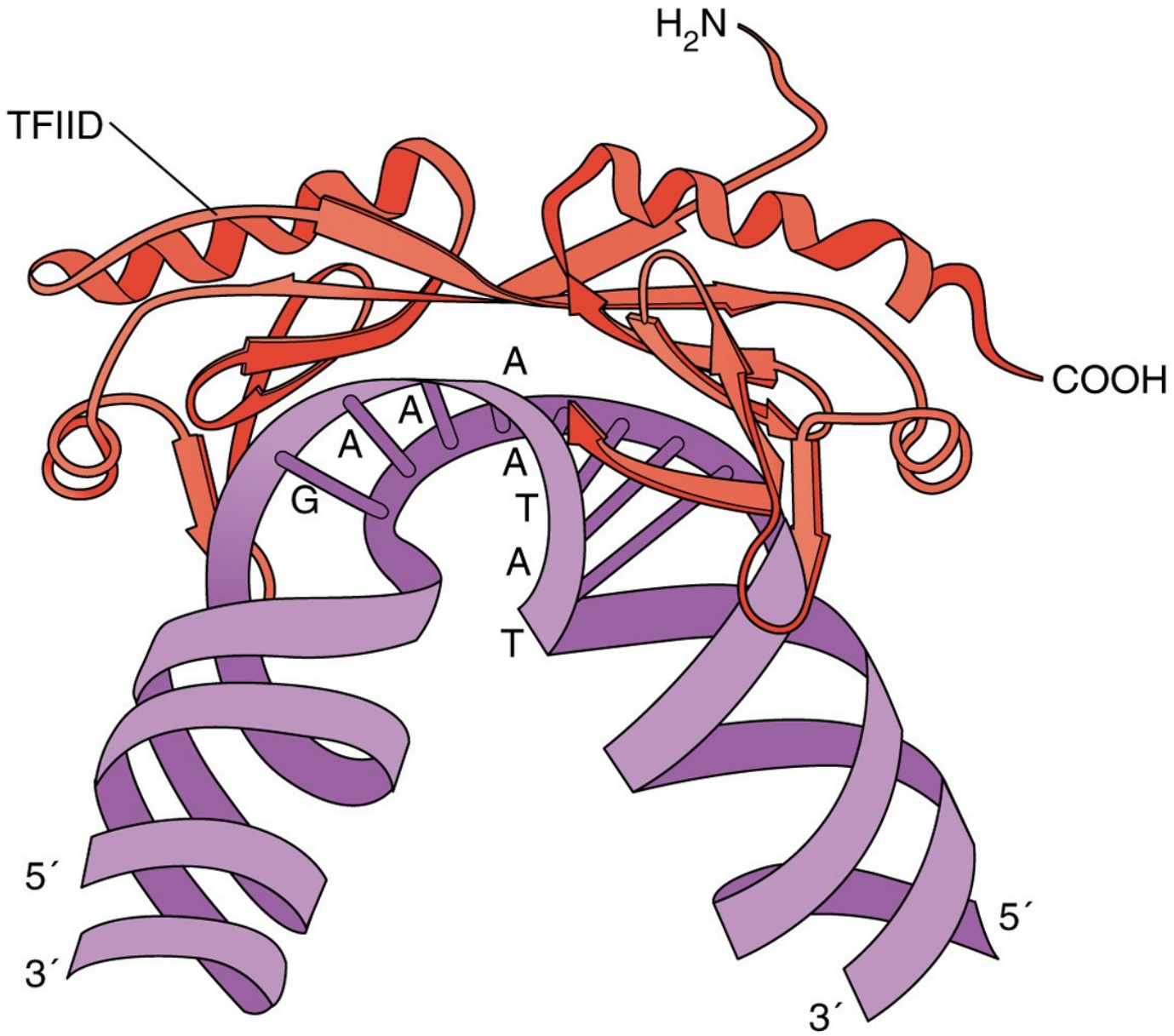
- Funkční význam specifických inteakcí proteinů
  - Regulace transkripce



Formation of transcription initiation complex

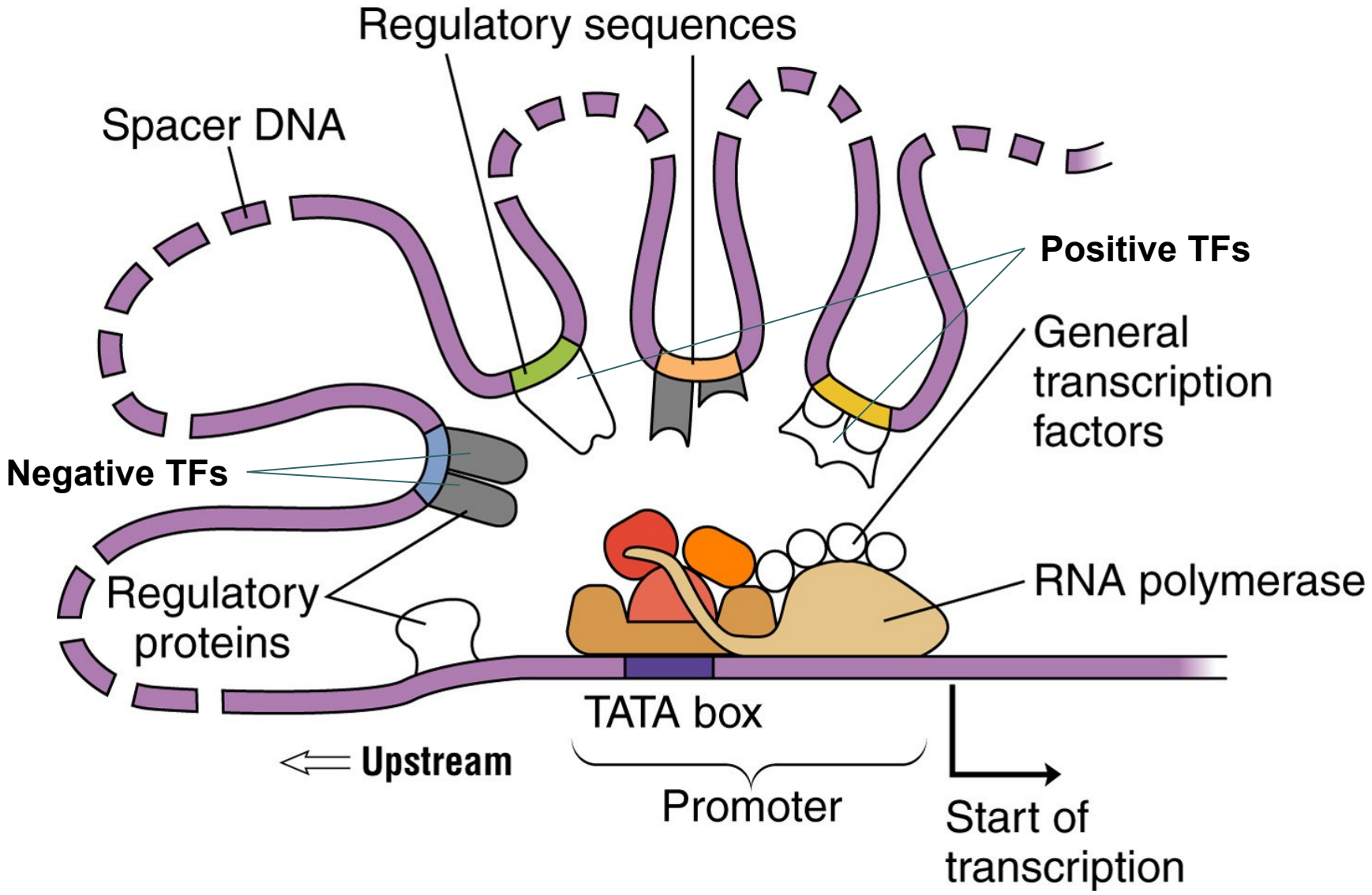


B.



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Formation of transcription initiation complex



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

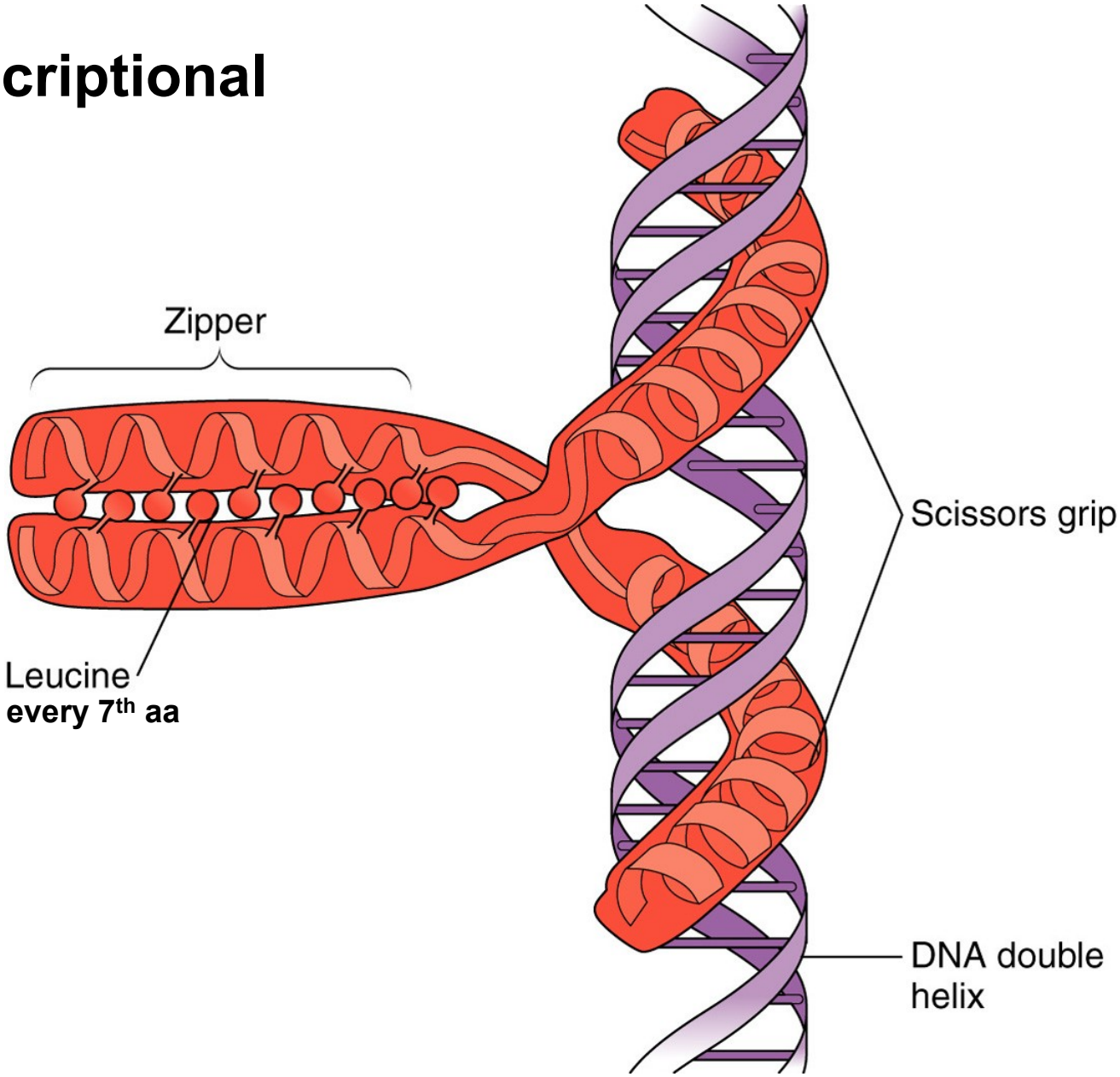
Mechanism of transcriptional regulation by TAFs

Signal recognition

↓

Dimerization →

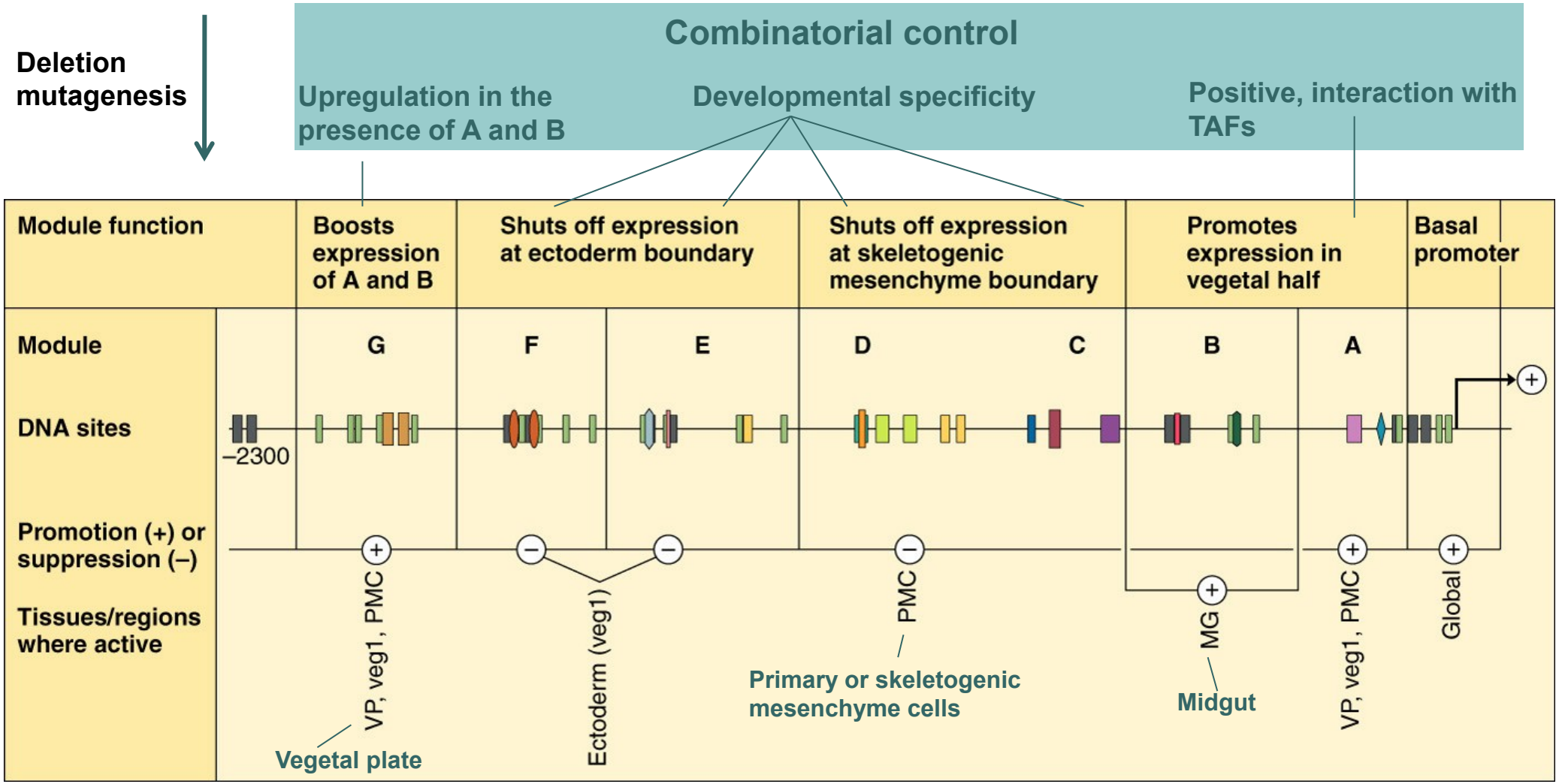
DNA binding and transcription activation



EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

“Microprocessor-like” acting promoters

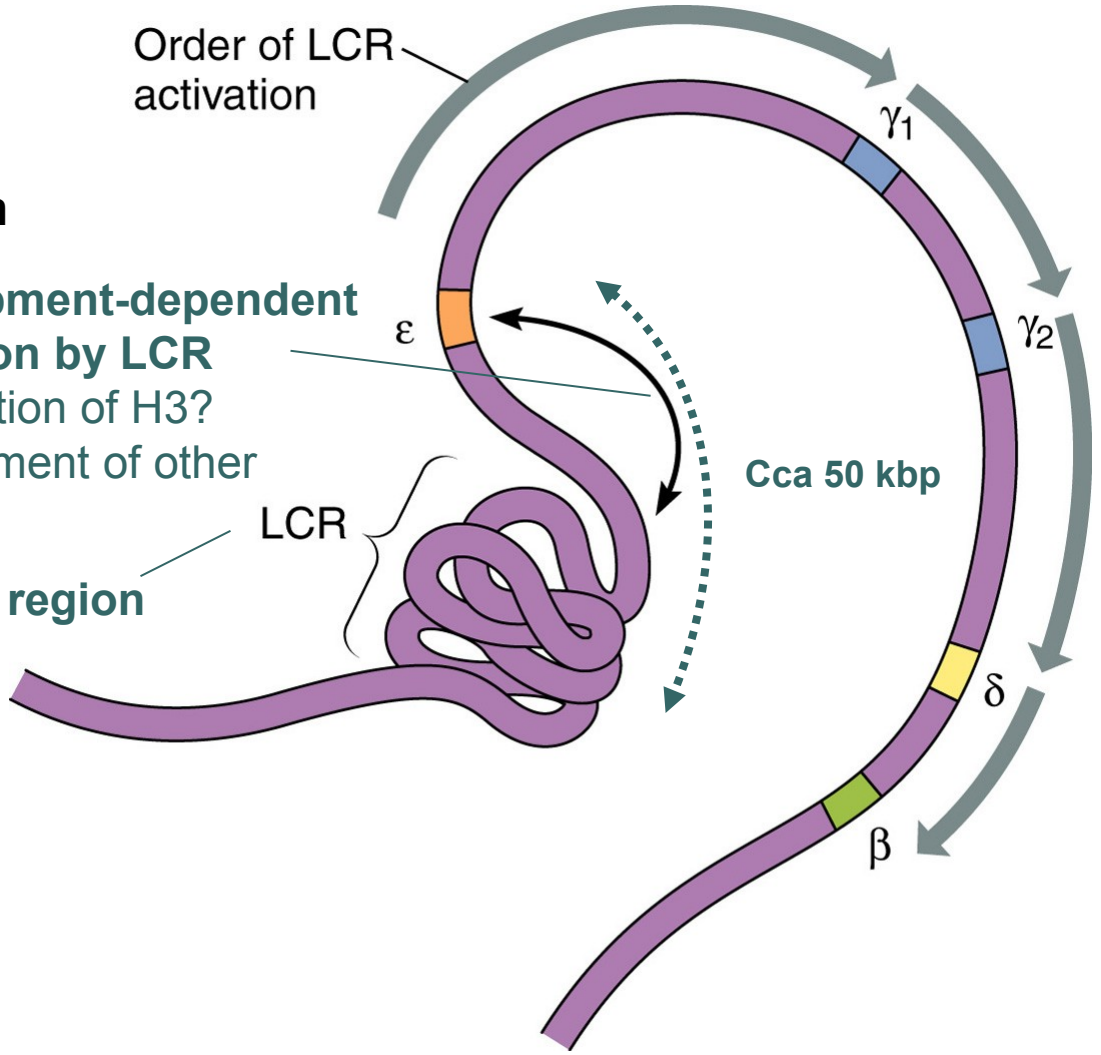
ProENDO16:REPORTER **(sea urchin)**



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

“Microprocessor-like” acting promoters

Regulation of β-globin type of hemoglobin chains expression



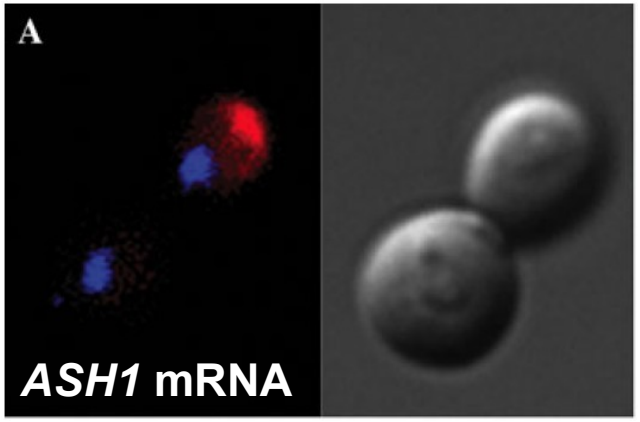
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

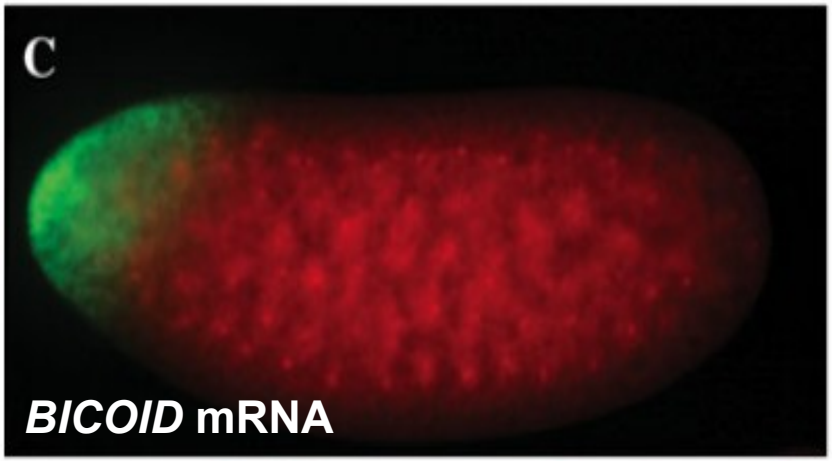
Význam PI

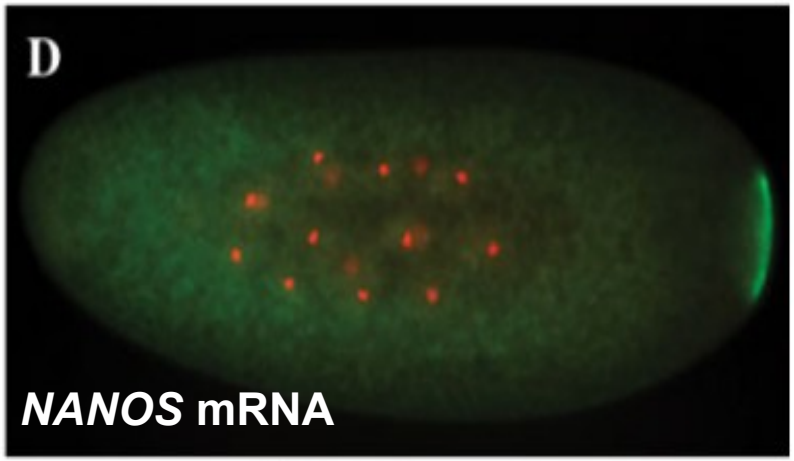
- Funkční význam specifických inteakcí proteinů
  - Lokalizace mRNA

Lokalizace mRNA

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





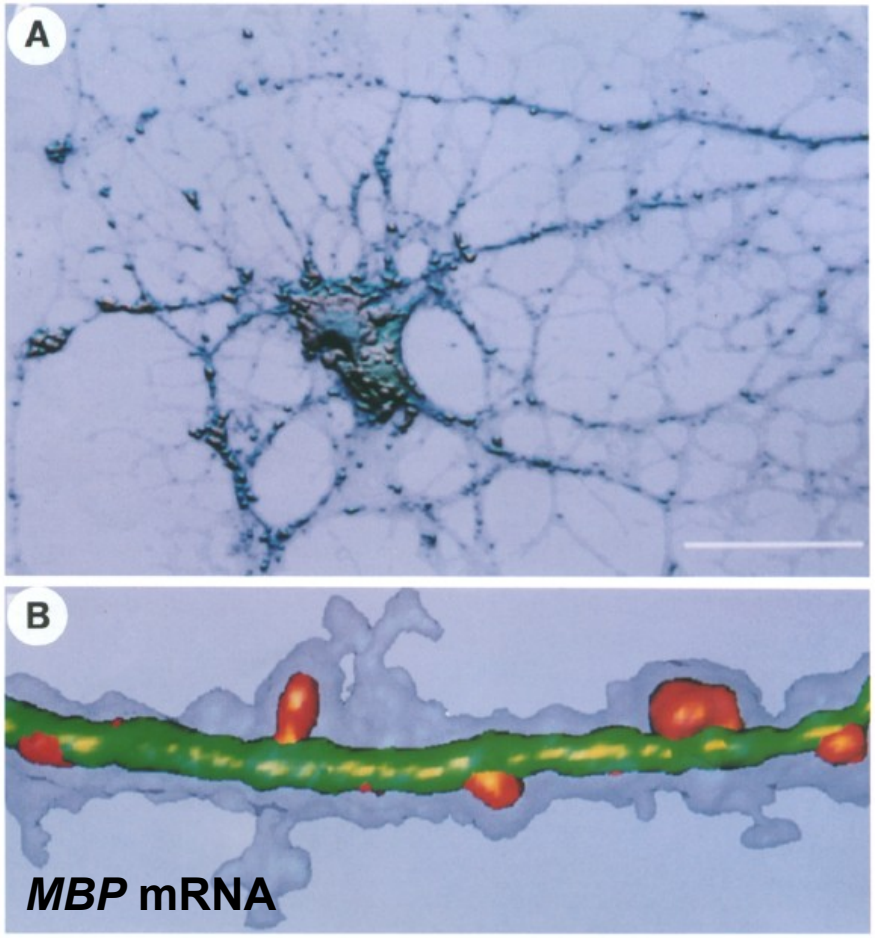


Shahbabian and Chartrand, 2012

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Lokalizace mRNA

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



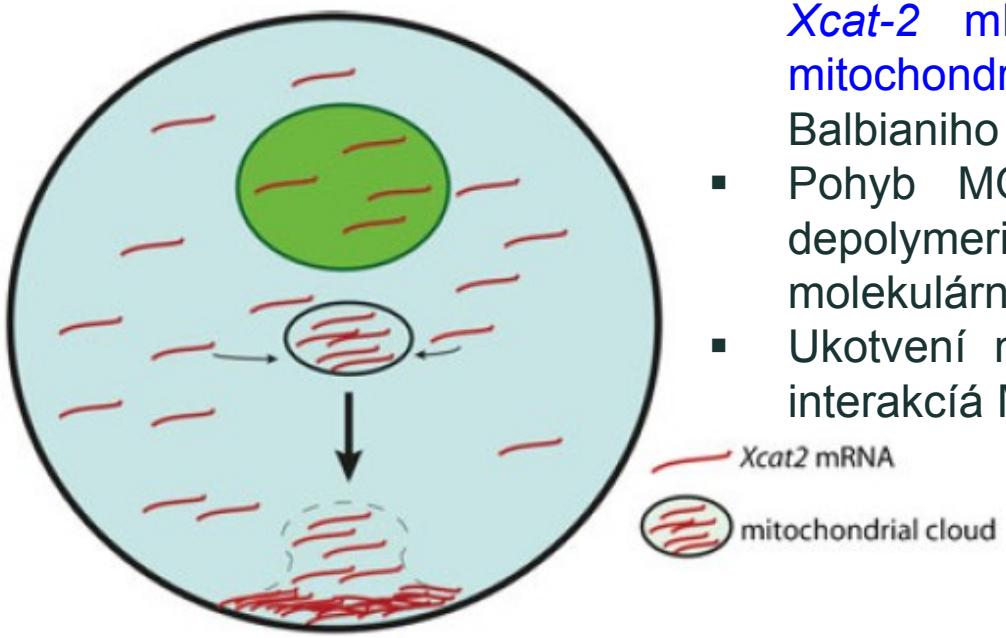
Ainger et al., 1993

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Lokalizace mRNA

Mechanizmy

- **Difůze a ukotvení mRNA**



Shahbabian and Chartrand, 2012

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

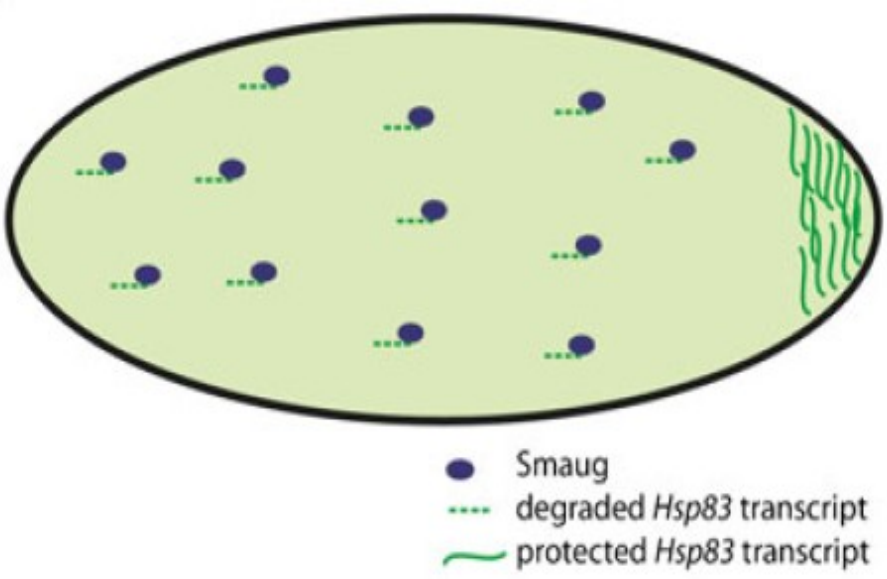
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Lokalizace mRNA

Mechanizmy

- **Lokalizovaná degradace mRNA**

Shahbabian and Chartrand, 2012

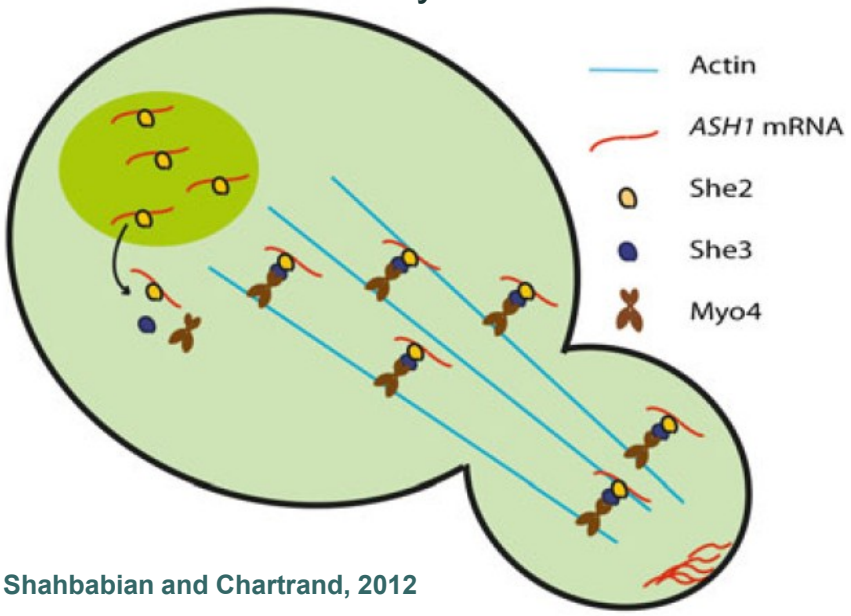


  - V embryogenezi u *Drosophila m.* dochází polární lokalizaci *Hsp83* mRNA, podobně jako *NANOS* mRNA
  - *Hsp83* mRNA je lokalizována v celém embryu, zde je však destabilizována prostřednictvím cis elementů jak v 3'UTR (HDE), tak v kódující oblasti (HIE)
  - HIE elementy jsou rozpoznávány proteinem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

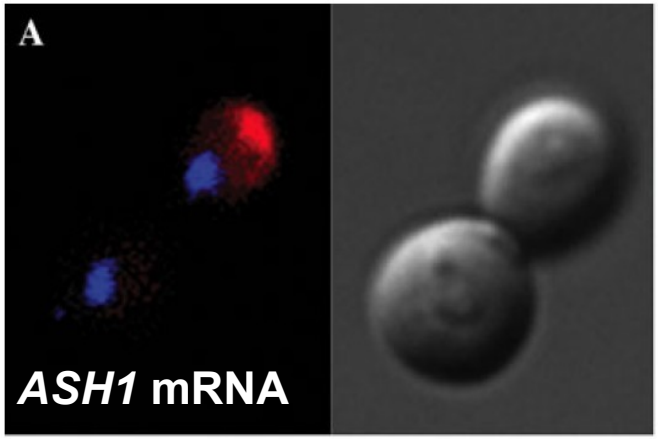
Lokalizace mRNA

Mechanizmy

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



Shahbabian and Chartrand, 2012



Shahbabian and Chartrand, 2012

- *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

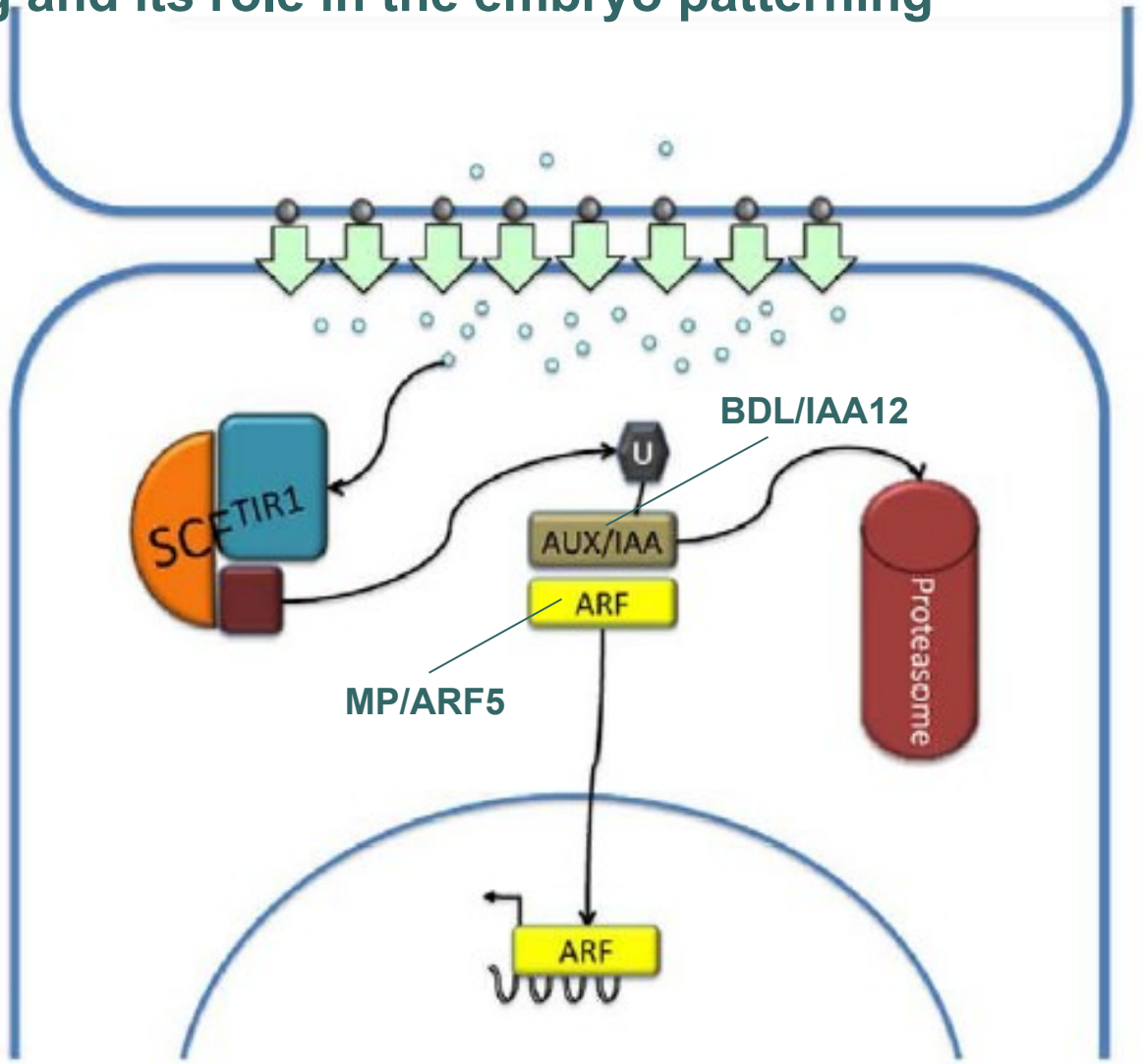
Význam PI

- Funkční význam specifických inteakcí proteinů
  - Sestřih hnRNA

Význam PI

- Funkční význam specifických inteakcí proteinů
  - Stabilita proteinů

Auxin signalling and its role in the embryo patterning



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

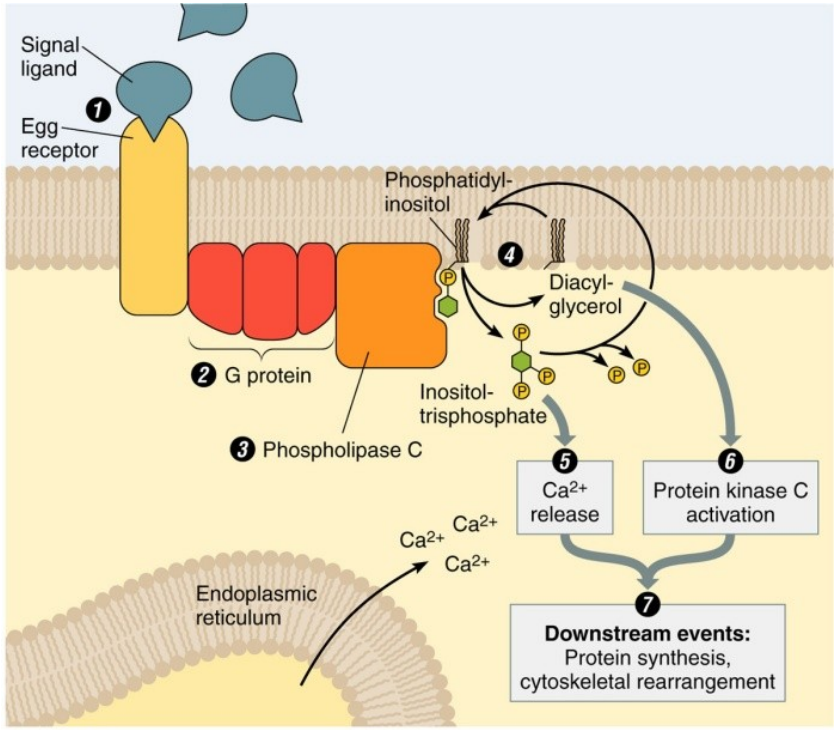
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

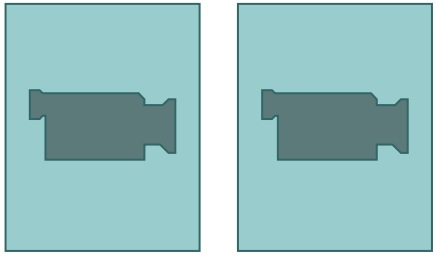
Význam PI

- Funkční význam specifických inteakcí proteinů
  - Přenos signálu

PI a přenos signálu

- **PI a přenos signálu**
  - prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
  - Signální kaskády využívající cAMP





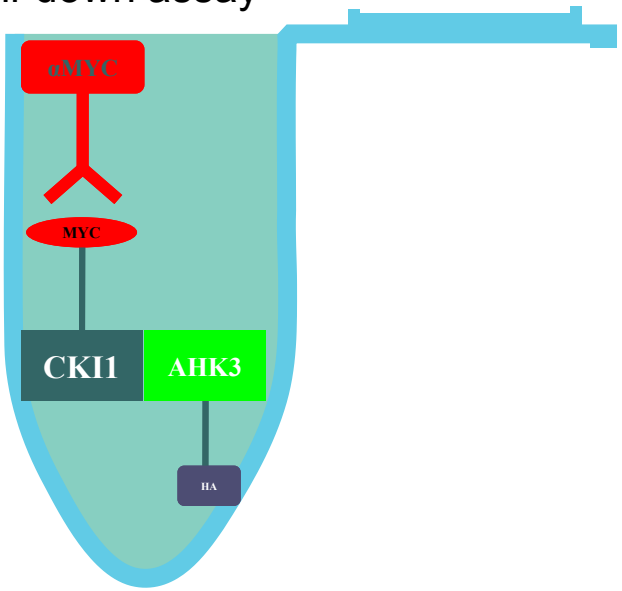
Osnova

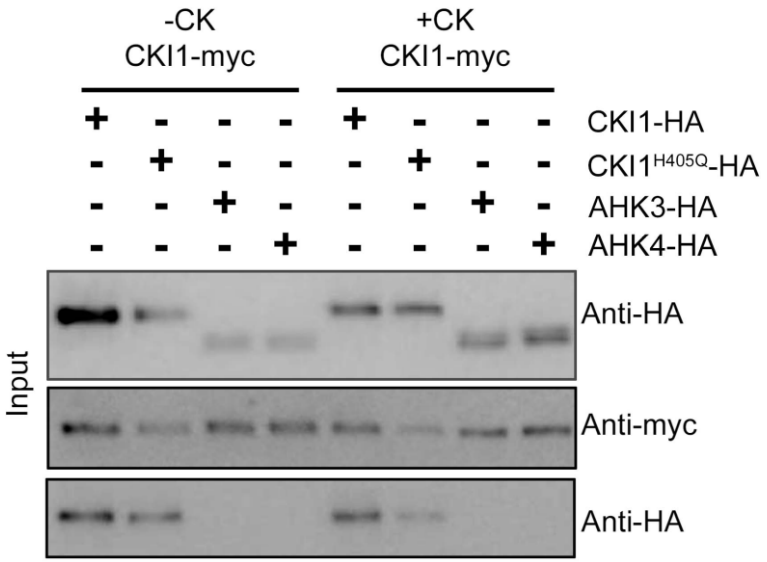
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - Koimunoprecipitace

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





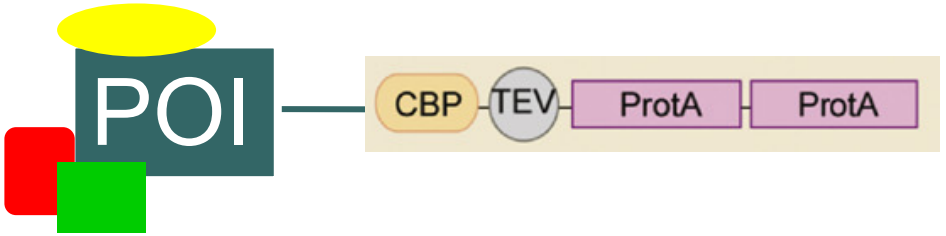
Osnova

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

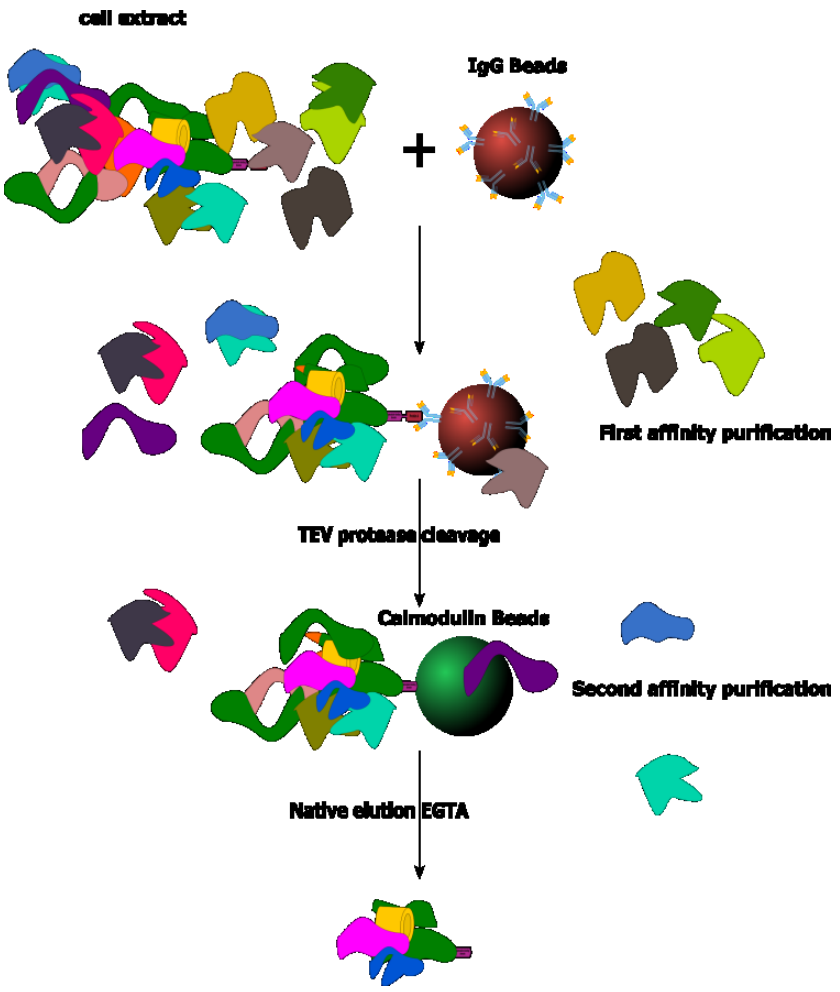
PI *in vivo*

Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

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



  - calmodulin-binding protein (CBP)
  - IgG vázající 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 afinitiní purifikaci a tedy velká specificita



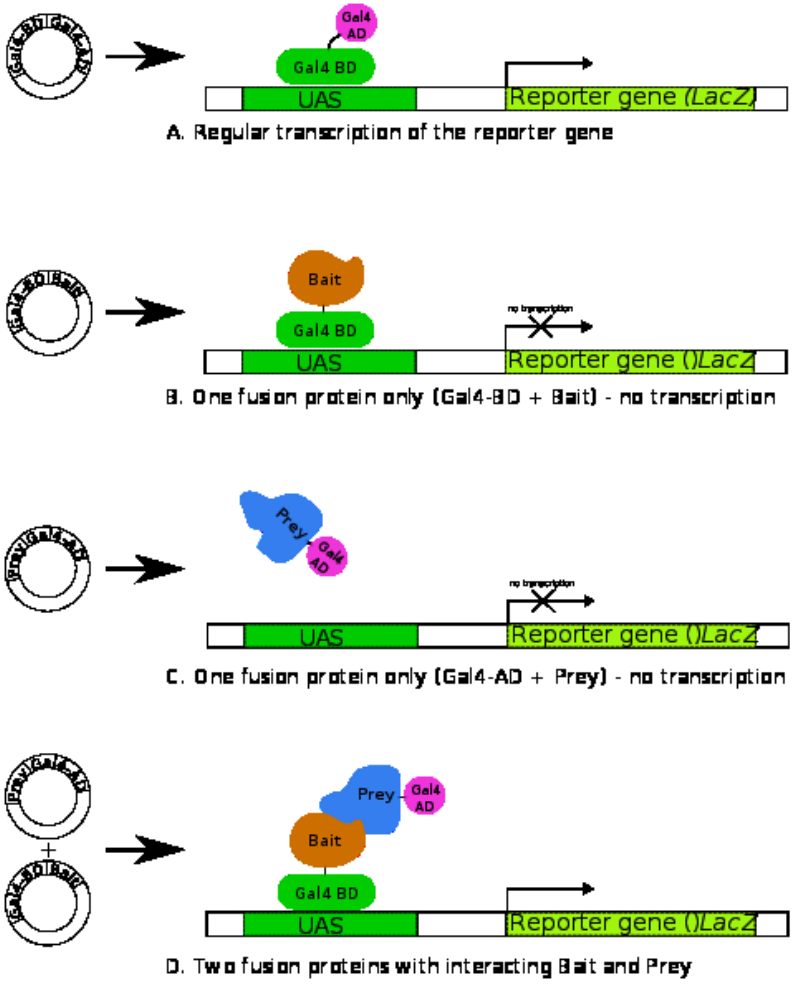
Osnova

- 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

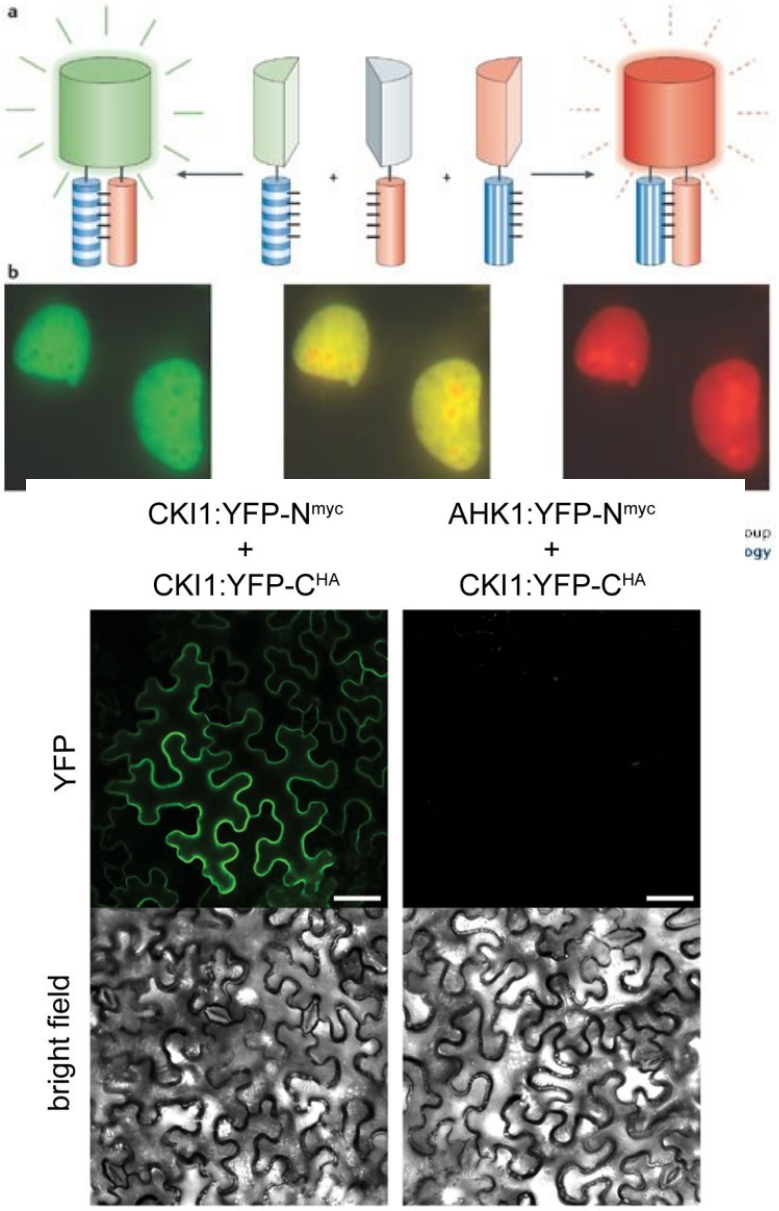
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - Koimunoprecipitace
  - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
  - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)

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 znovuobnovení 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*

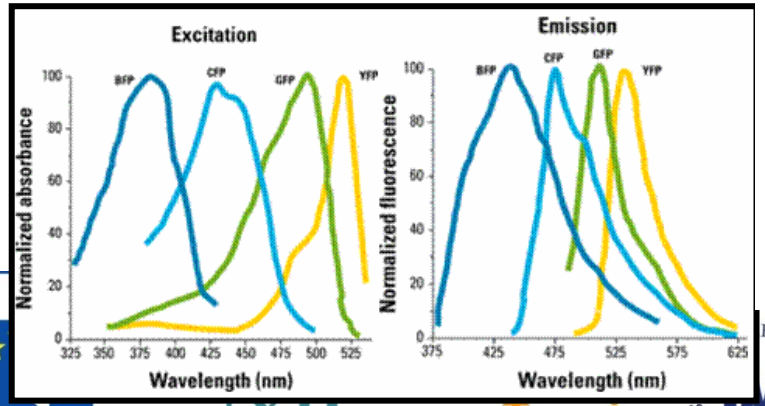
Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

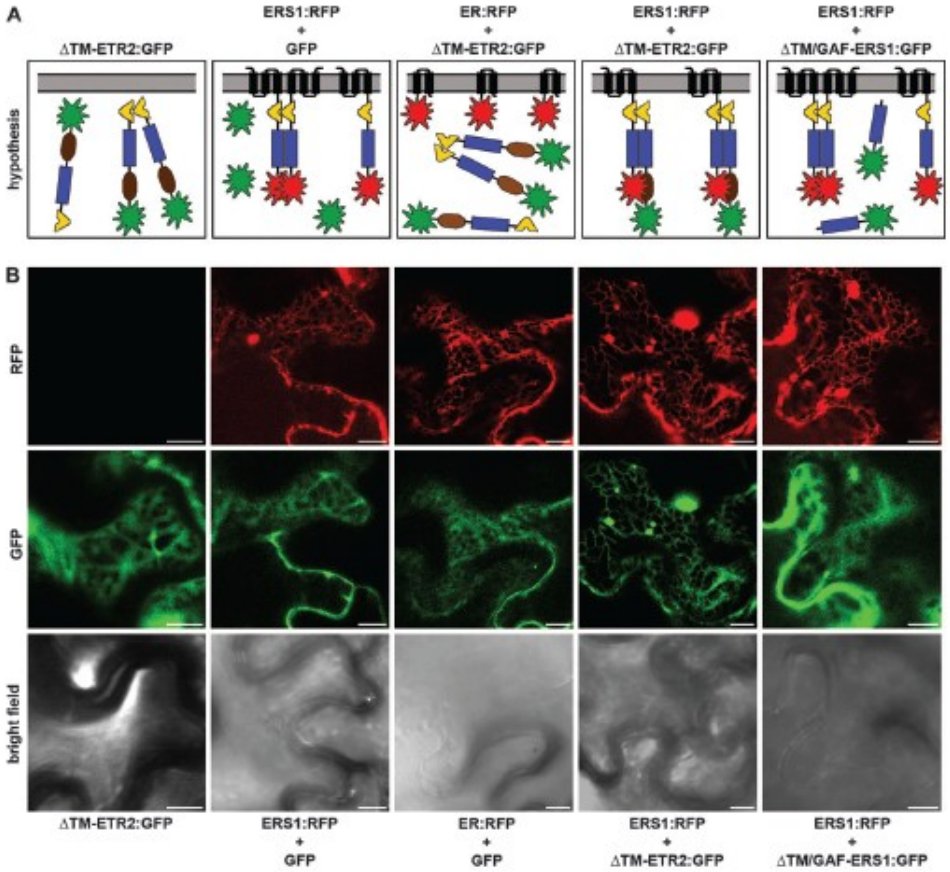
- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny

membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

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

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

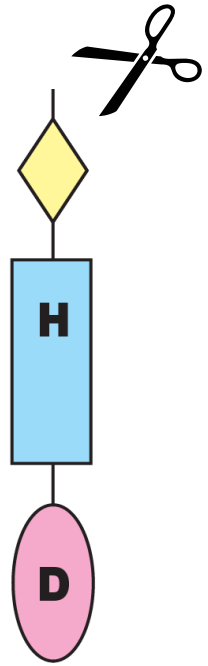


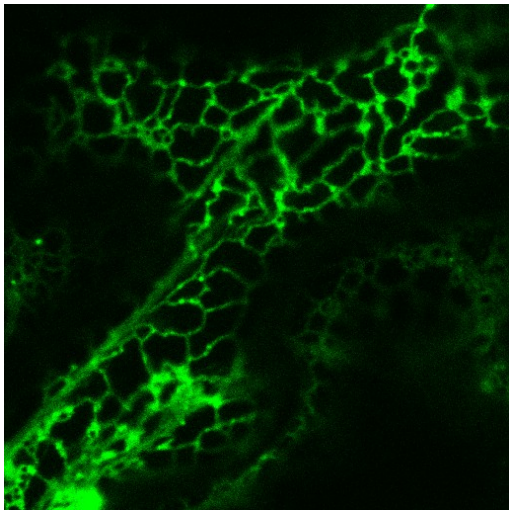


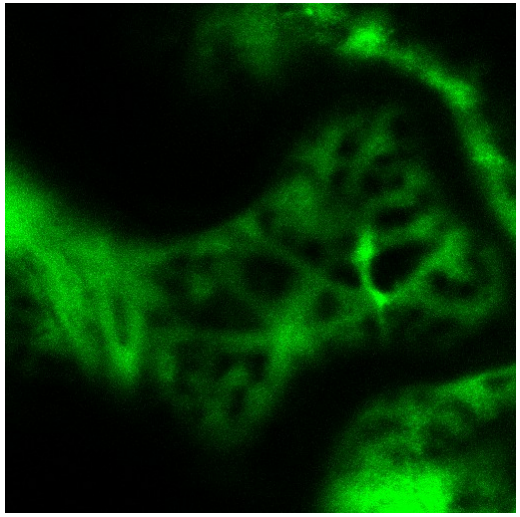
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



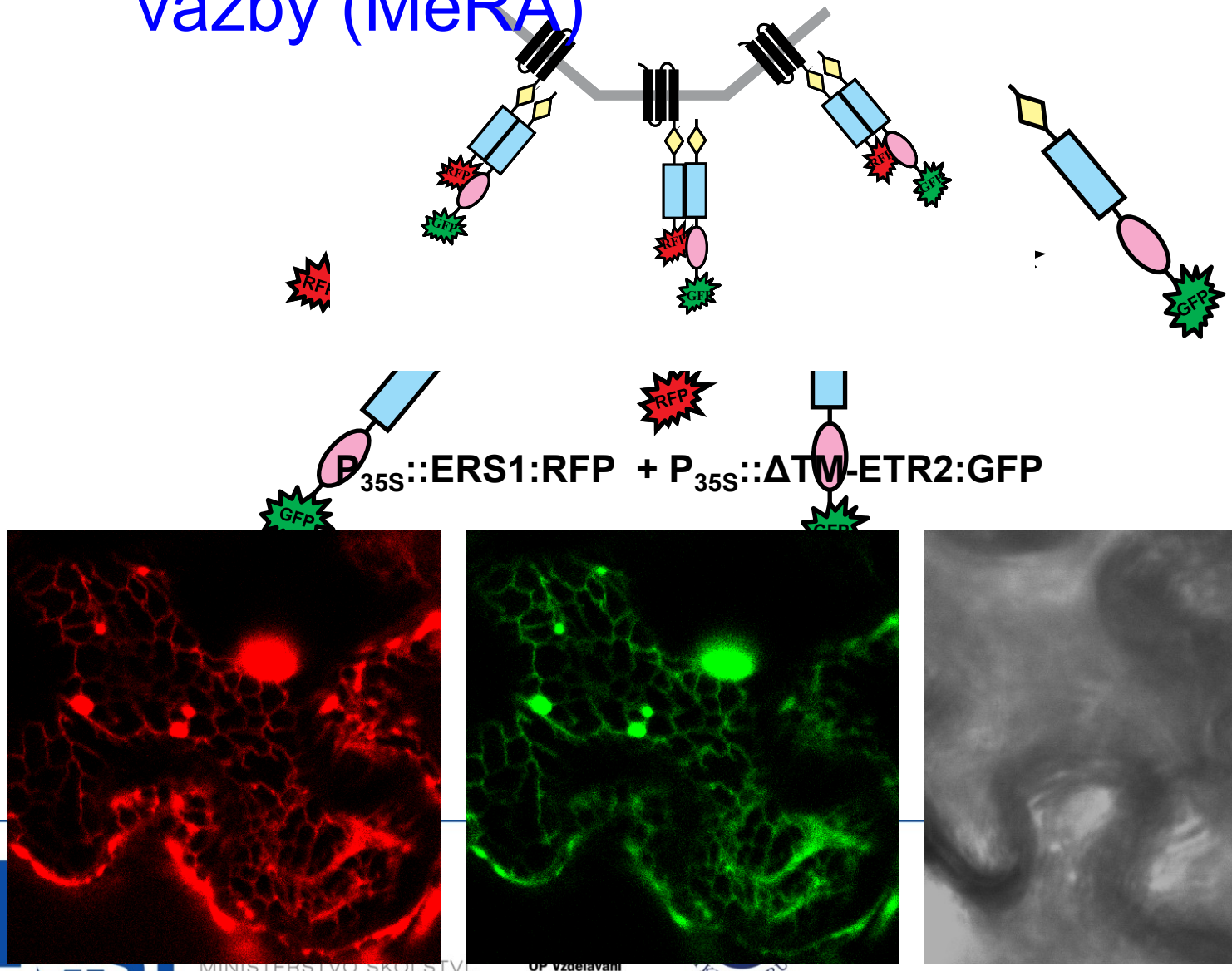




EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

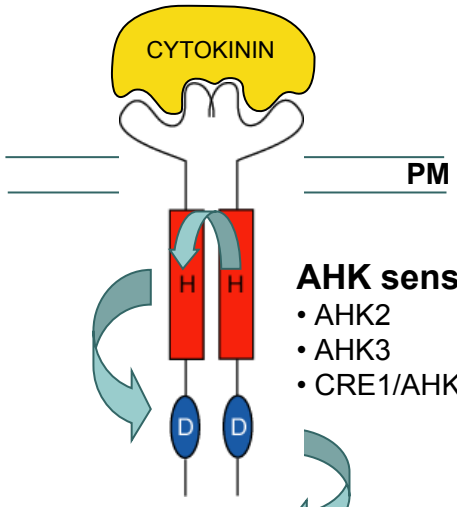


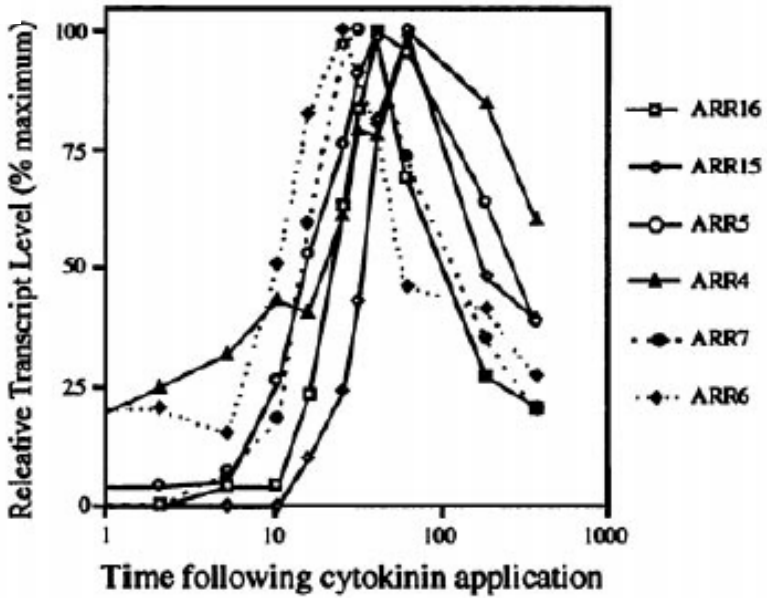
Osnova

- Praktické využití metod pro studium PI *in vivo*

Signal Transduction via MSP

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





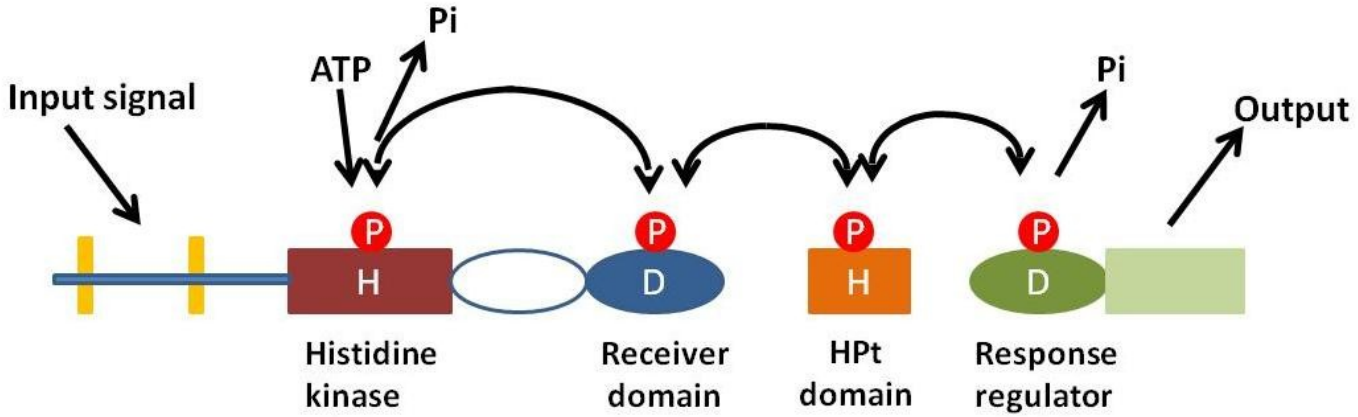
D'Agostino et al., Plant Phys, 2000

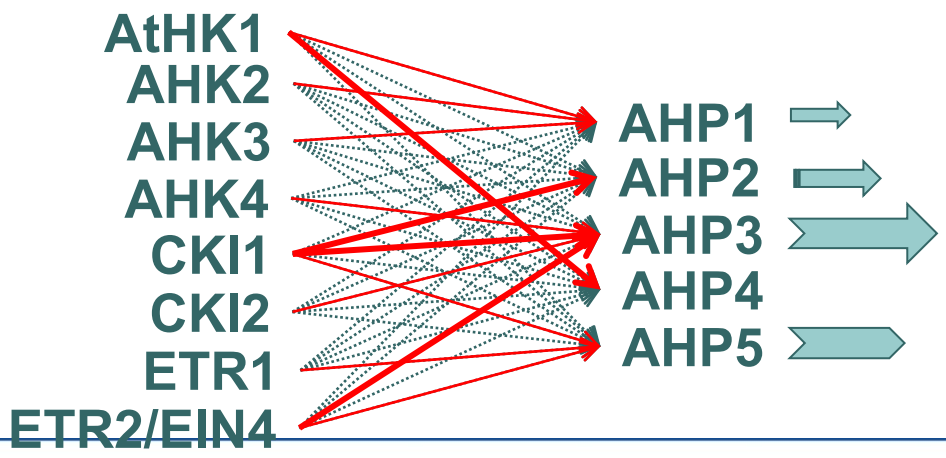
CK primary response genes
- Type-A *ARRs* expression

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Is there any specificity in plant MSP?

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



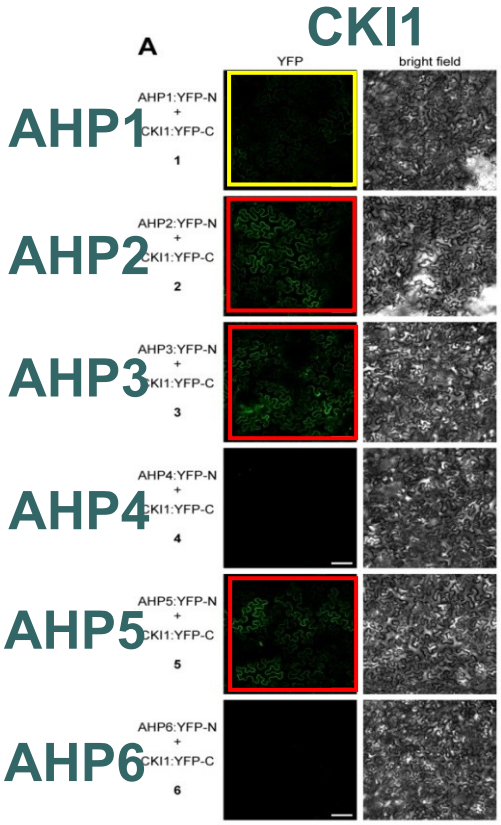


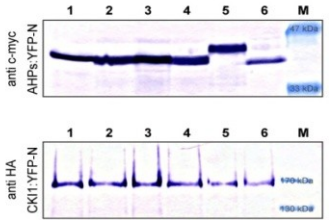
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

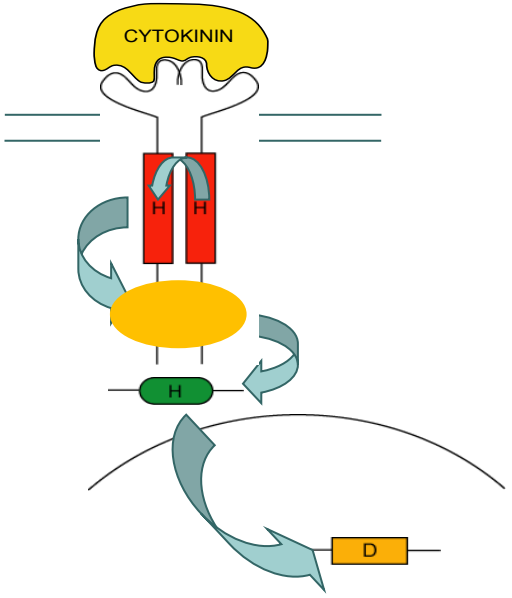
Specificity of CKI1 signalling

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

BiFC **Y2H**





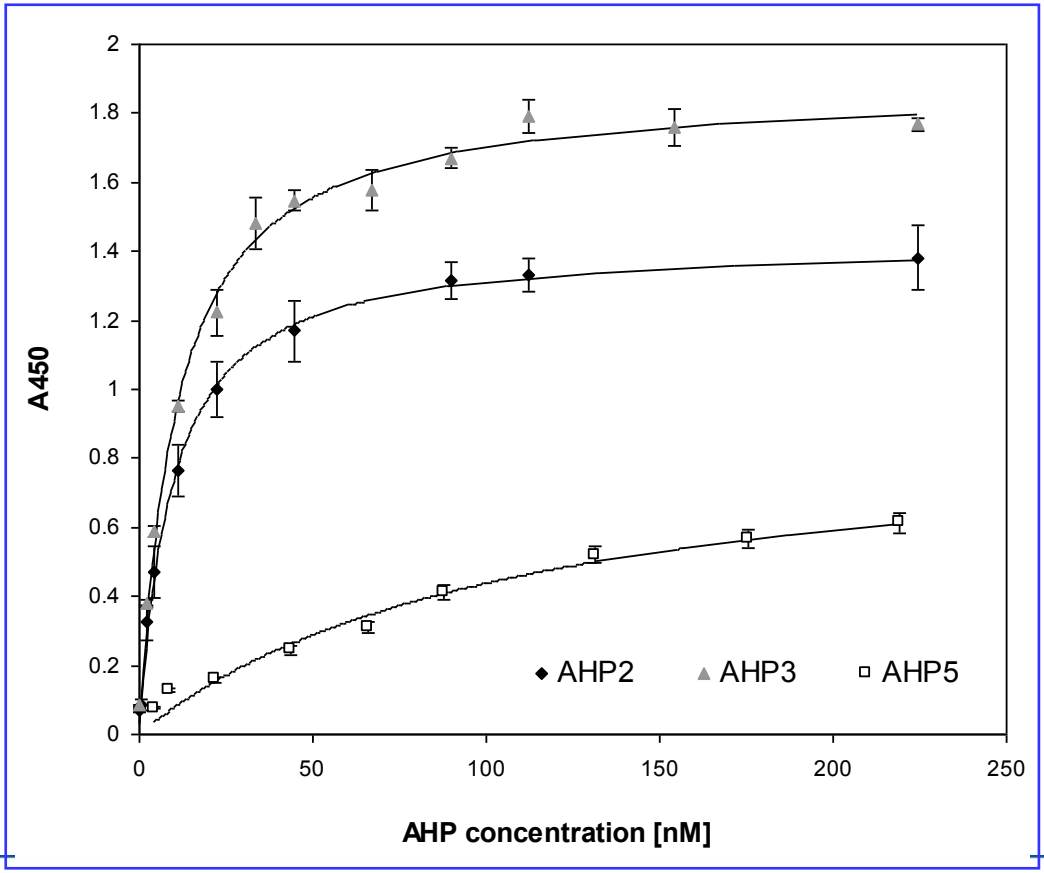


Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

EVROPSKÁ UNIE
MIN
VZDĚLÁVÁNÍ
spolufinancována sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Specificity of CKI1 Signalling

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



AHP3: K_d ~ 10,5 nM

AHP2: K_d ~ 9,17 nM

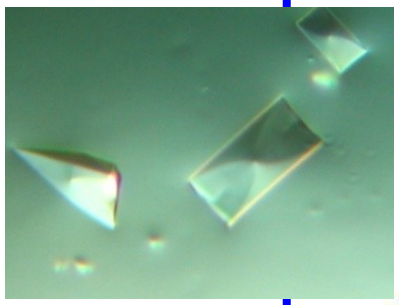
AHP5: K_d ~ 108 nM

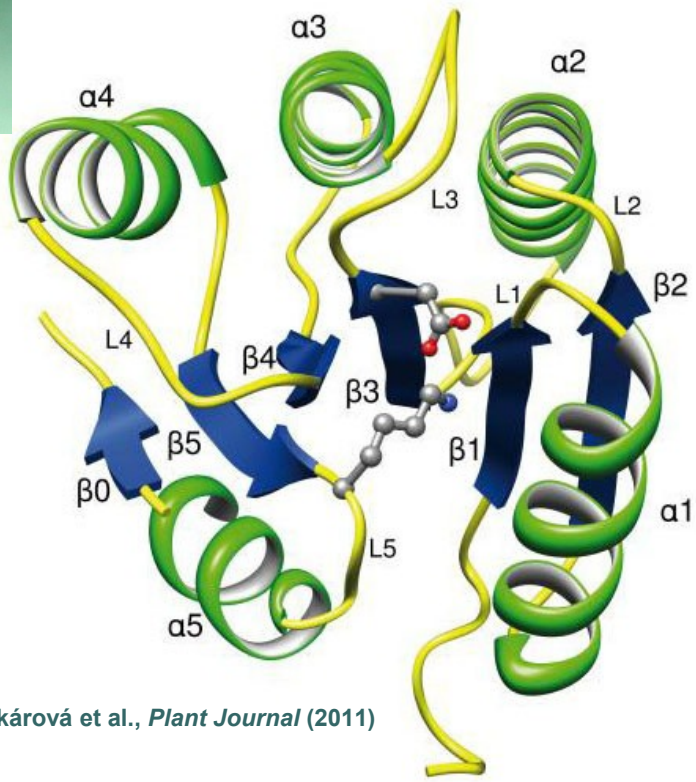
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

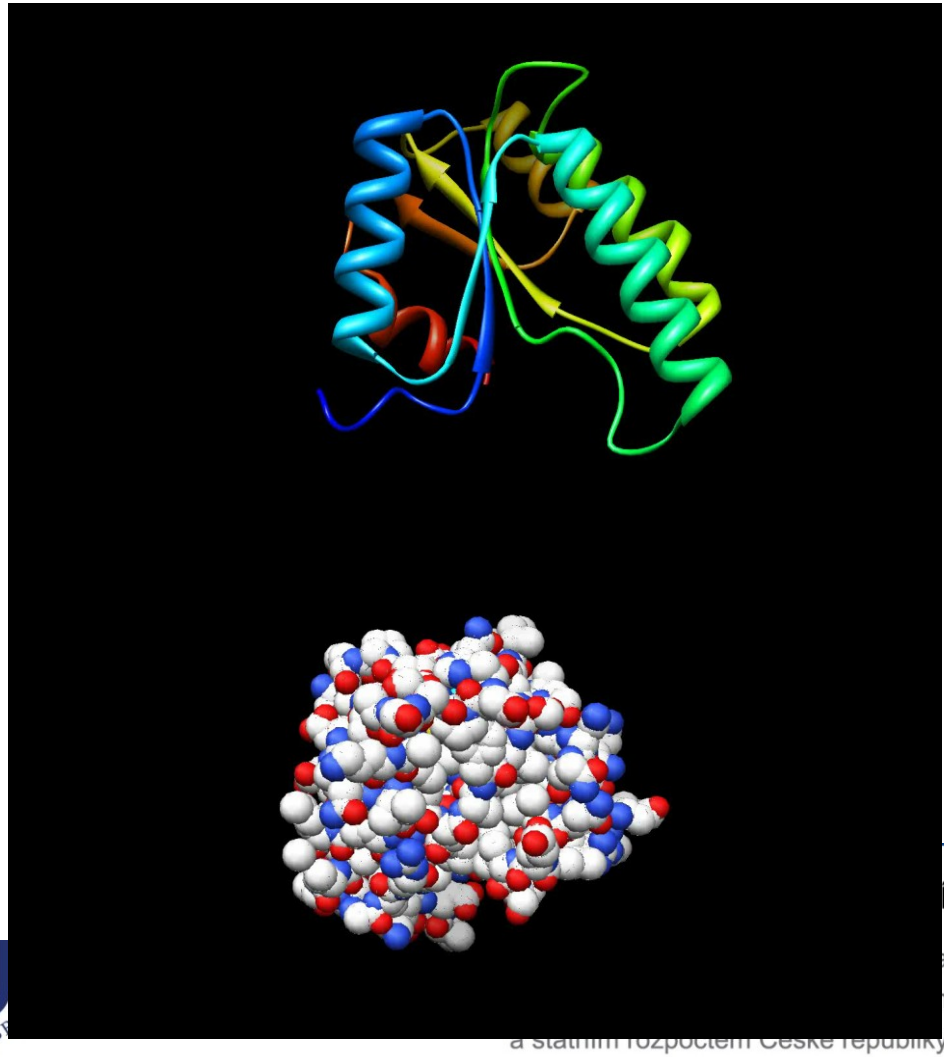
Structure of $CKI1_{RD}$

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





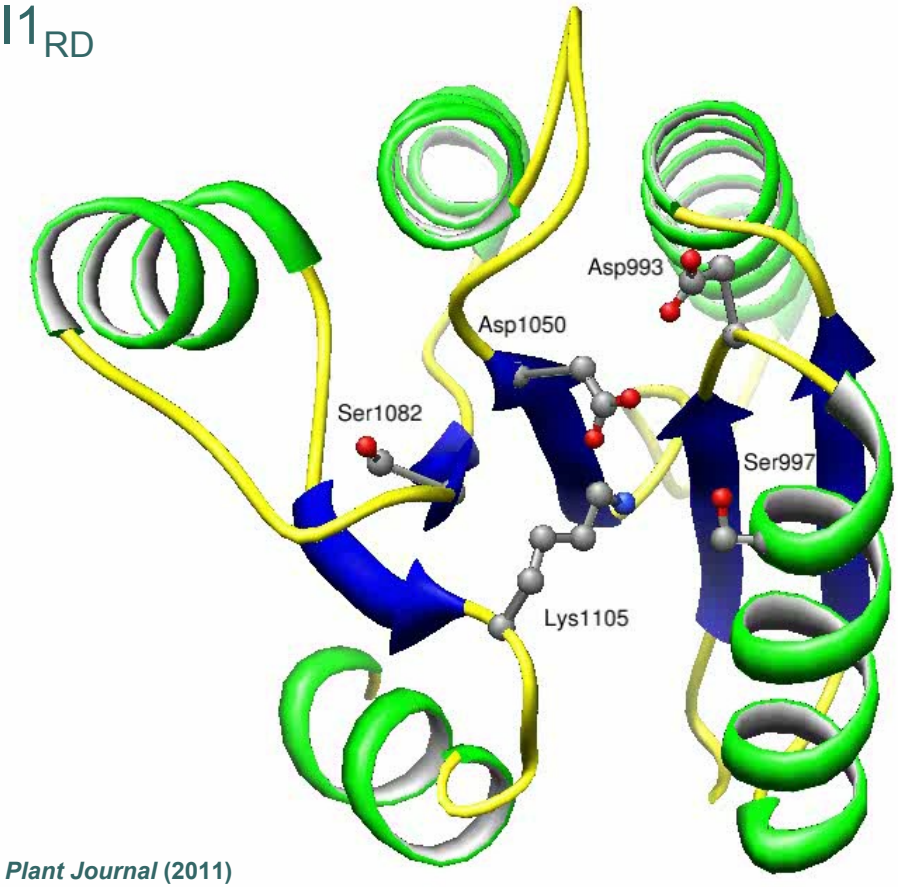
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
a státním rozpočtem České republiky

Dynamics of $CKI1_{RD}$

- ***Mg^{2+}binding*** leads to ***remodelling of active centre*** of $CKI1_{RD}$

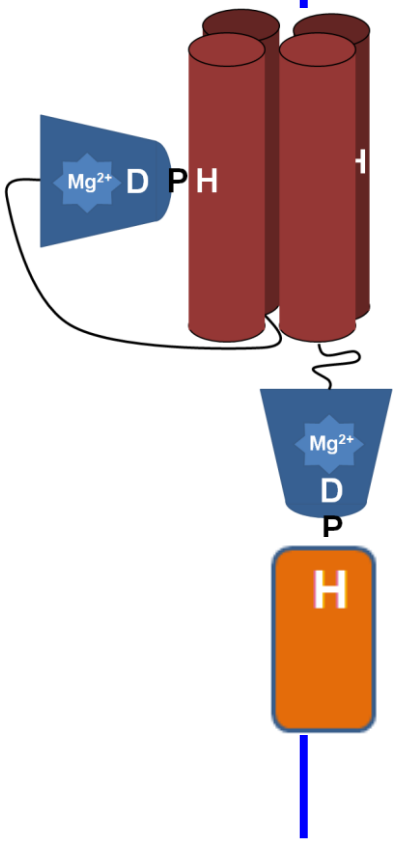


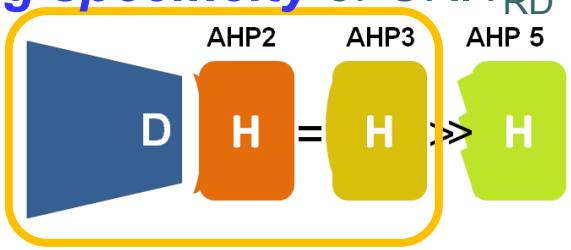
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

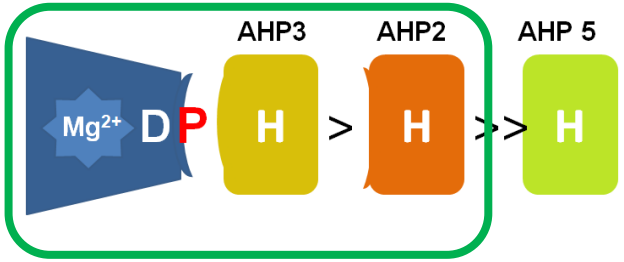
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

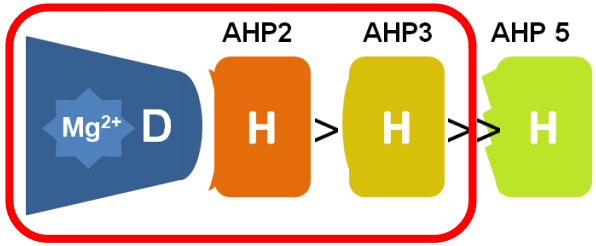
$CKI1_{RD}$ structural changes are associated with its binding specificity

- ***Mg^{2+}***- and ***BeF_3^-***-induced ***structural changes fine-tune binding specificity*** *of* $CKI1_{RD}$









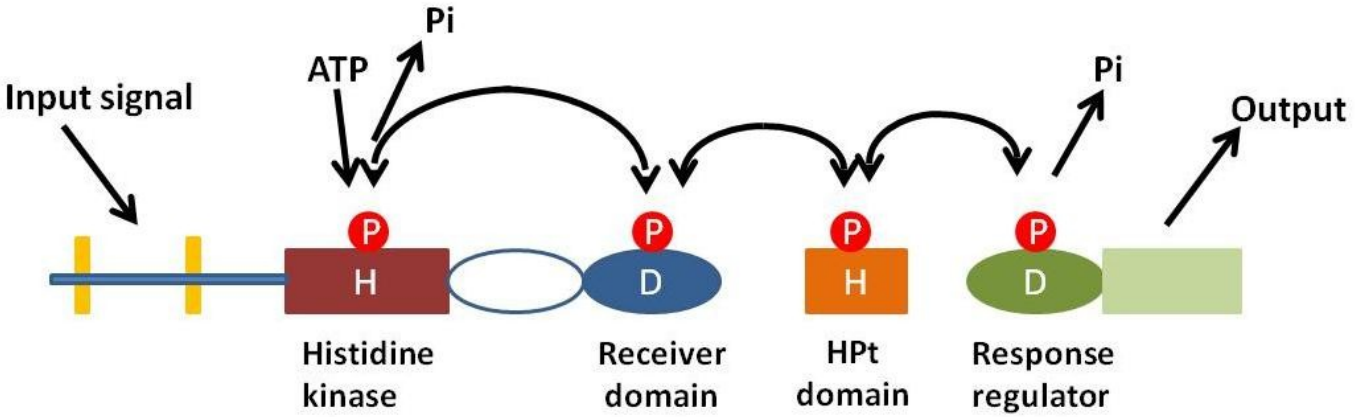
Ligand	0	Mg^{2+}	BeF_3^-
AHP2	9.17 ± 0.49	6.2 ± 0.98	11.6 ± 2.0
AHP3	10.5 ± 0.73	12.9 ± 0.72	8.0 ± 0.42
AHP5	108 ± 18	152 ± 26	119 ± 32

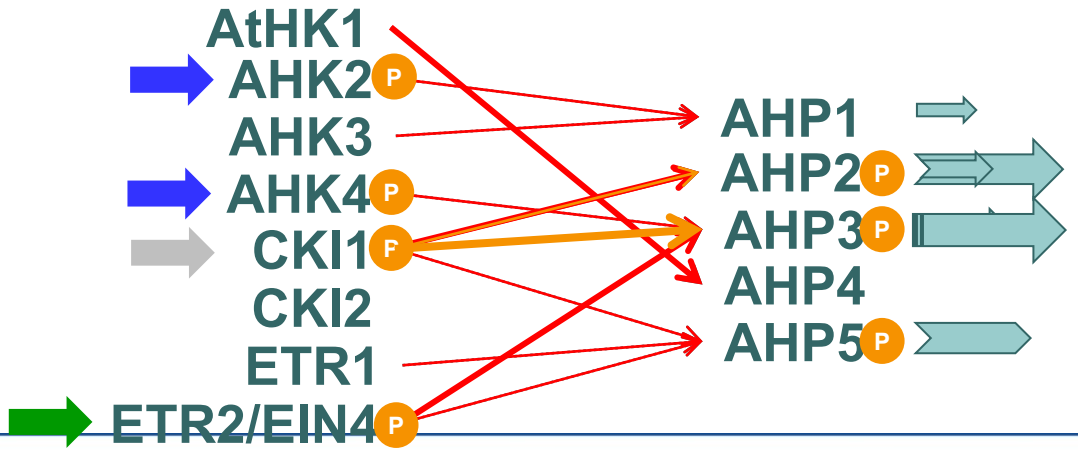
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO MLÁDEŽE A TĚ
ÁVÁNÍ
ancována
n fondem
republiky

Model Suggestion

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





EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

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

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky