

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., Obrdlík, 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.



EVROPSKÁ UNIE
ESF
EVROPSKÝ VÝZKUMNÝ FOND
ČESKÁ REPUBLIKA
VÝZKUMNÝ ÚSTAV BIOMOLEKULÁRNÍ FYZIKY
PŘI ČESKÉ AKADEMII VĚD
VĚDECKÝ ÚSTAV BIOMOLEKULÁRNÍ FYZIKY
PŘI ČESKÉ AKADEMII VĚD
VĚDECKÝ ÚSTAV BIOMOLEKULÁRNÍ FYZIKY
PŘI ČESKÉ AKADEMII VĚD

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*

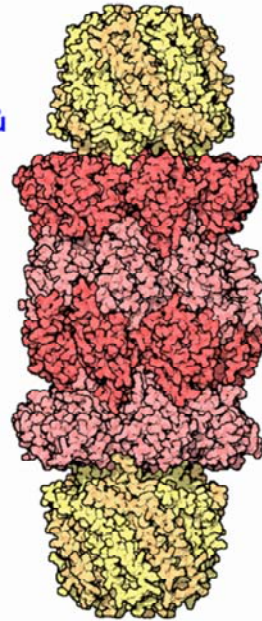


EVROPSKÉ VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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



AVANI

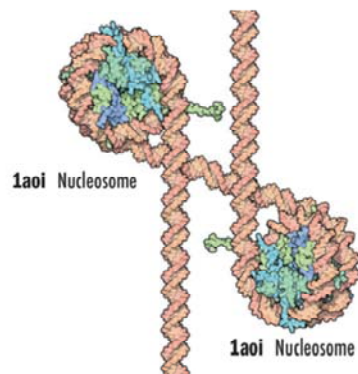
Tato prezentace je realizována pod
Evropskou unárodním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Once obsolete proteins are tagged with at least four ubiquitin molecules, they are destroyed by proteasomes. Proteasomes are voracious protein shredders, but the destructive machinery is carefully protected so that it can't attack all of the normal proteins in the cell. The proteasome, shown here from PDB entry 1fnt, is shaped like a cylinder, with its active sites sheltered inside the tube. The caps on the ends regulate entry into the destructive chamber, where the protein is chopped into pieces 3 to 23 amino acids long.

Most of the non-lysosomal proteolysis that occurs in eukaryotic cells is performed by a nonspecific and abundant barrel-shaped complex called the 20S proteasome. Substrates access the active sites, which are sequestered in an internal chamber, by traversing a narrow opening (alpha-annulus) that is blocked in the unliganded 20S proteasome by amino-terminal sequences of alpha-subunits. Peptide products probably exit the 20S proteasome through the same opening. 11S regulators (also called PA26 (ref. 4), PA28 (ref. 5) and REG) are heptamers that stimulate 20S proteasome peptidase activity in vitro and may facilitate product release in vivo. Here we report the co-crystal structure of yeast 20S proteasome with the 11S regulator from *Trypanosoma brucei* (PA26). PA26 carboxy-terminal tails provide binding affinity by inserting into pockets on the 20S proteasome, and PA26 activation loops induce conformational changes in alpha-subunits that open the gate separating the proteasome interior from the intracellular environment. The reduction in processivity expected for an open conformation of the exit gate may explain the role of 11S regulators in the production of ligands for major histocompatibility complex class I molecules. (PDB, Whitby et al., (2000) *Nature* **408**: 115-120, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1fnt>).

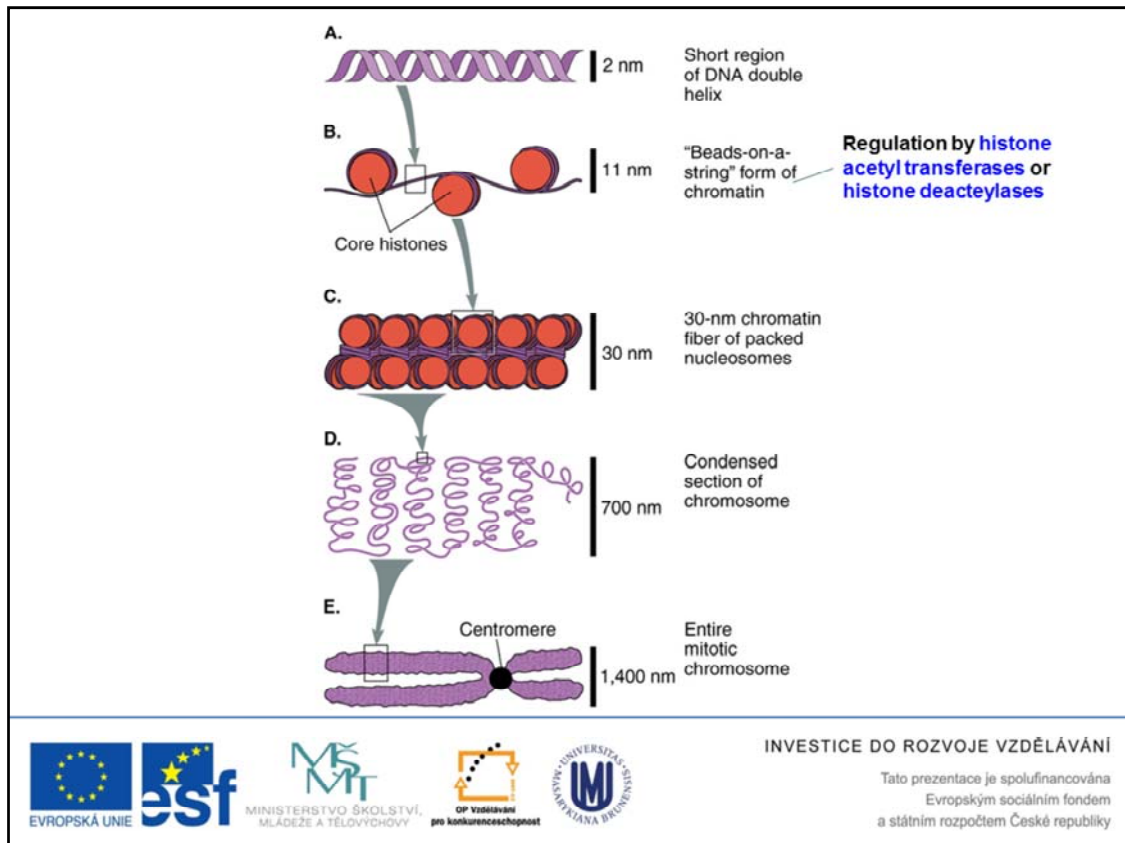
Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - **Struktura chromatinu**



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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




Regulation of the chromatin structure represents one of the very basal gene expression regulatory levels. Chromatin is a substrate for DNA-dependent RNA polymerases that transcribe the DNA encoded information into the “words and sentences” of RNA.

Regulation of chromatin structure and its accessibility to DNA-dependent RNA polymerases depends on many factors, one of the most important is the regulation of chromatin binding to nucleosomes and chromatin methylation.

Regulation of chromatin interaction with histones, the positively charged proteins forming the core of nucleosomes, is performed via modification of acetylation status of the N-terminal portion of histones, especially histones H3 and H4. This occurs via action of 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

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Modification of the chromatin methylation is performed via DNA methyltransferases.

Interestingly, there is difference in the methylation in animals and in plants.

In animals, the methylation takes place mostly on the cytosine that occurs next to guanosine (the sequence is denoted as CpG). In mammals, 60-90% of all CpGs are methylated.

In plants, cytosines are methylated both symmetrically (CpG or CpNpG) and asymmetrically (CpNpNp), where N is any nucleotide.

Methylation status is usually “reset” in the zygote and is reconstituted during development again. E.g. the methylation is very low in the mouse embryo at the blastula stage, however, DNA derived from later stages when organogenesis is initiated is substantially more modified by methylation.

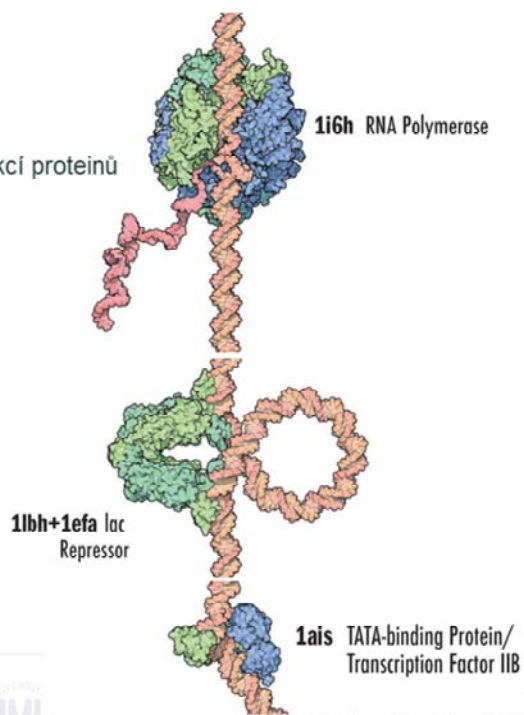
DNA methylation also stably alters the gene expression pattern in cells such that cells can “remember where they have been”; in other words, cells programmed to be pancreatic islets during embryonic development remain pancreatic islets throughout the life of the organism without continuing signals telling them that they need to remain islets.

DNA methylation is involved in the genomic imprinting, i.e. the genes originating from both parents are often diversely methylated, which results into differential expression of parental genomes (for the importance of the imprinting in the parental conflict and epigenetics, see the lecture “Bi0580 Developmental genetics” by prof. Vyskot).

Up to now it is not clear how methylation regulates transcription. Possibly, methylation status affects chromatin configuration or binding general repressor factors.

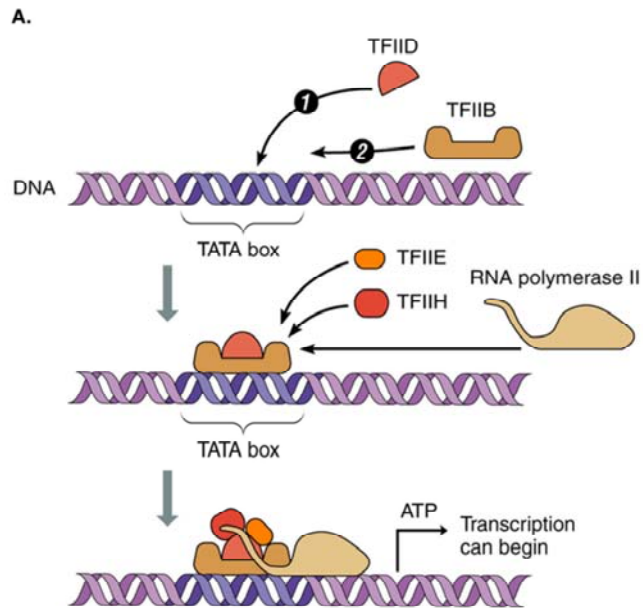
Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce



Projekt financován ze zdrojů ESF
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Formation of transcription initiation complex

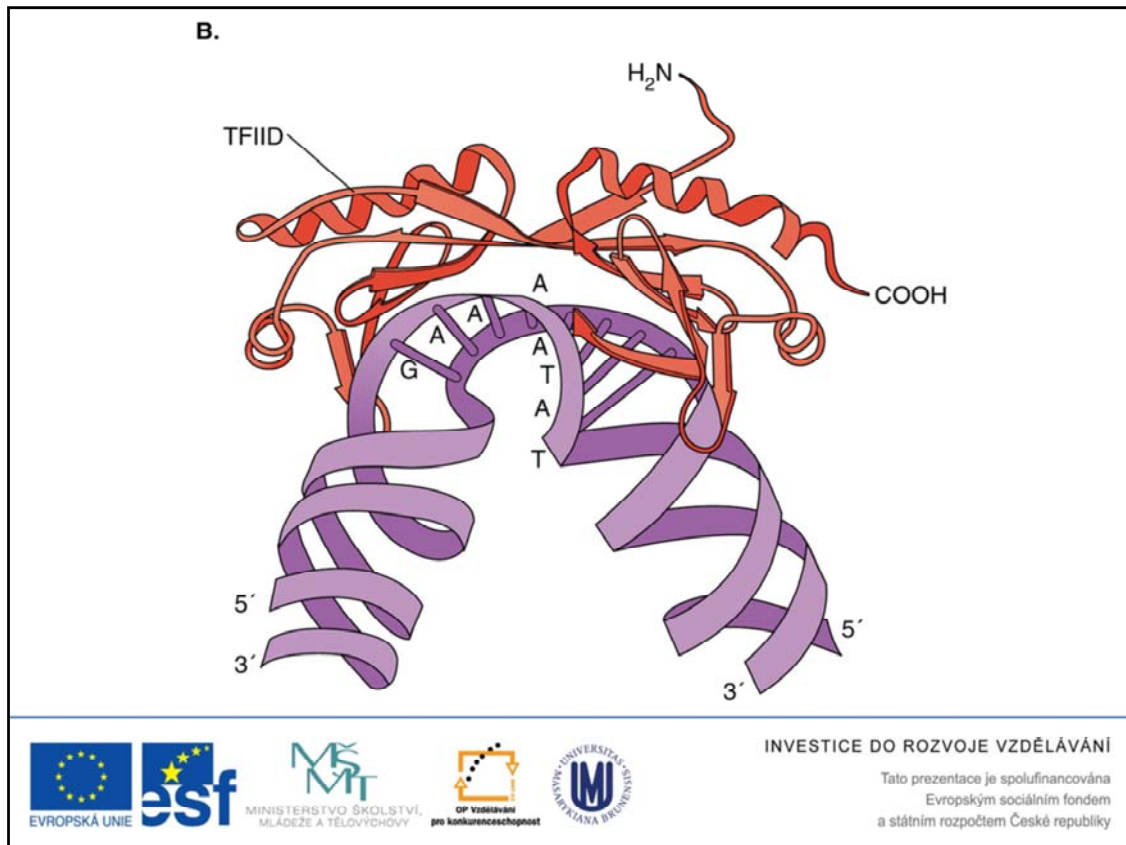


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

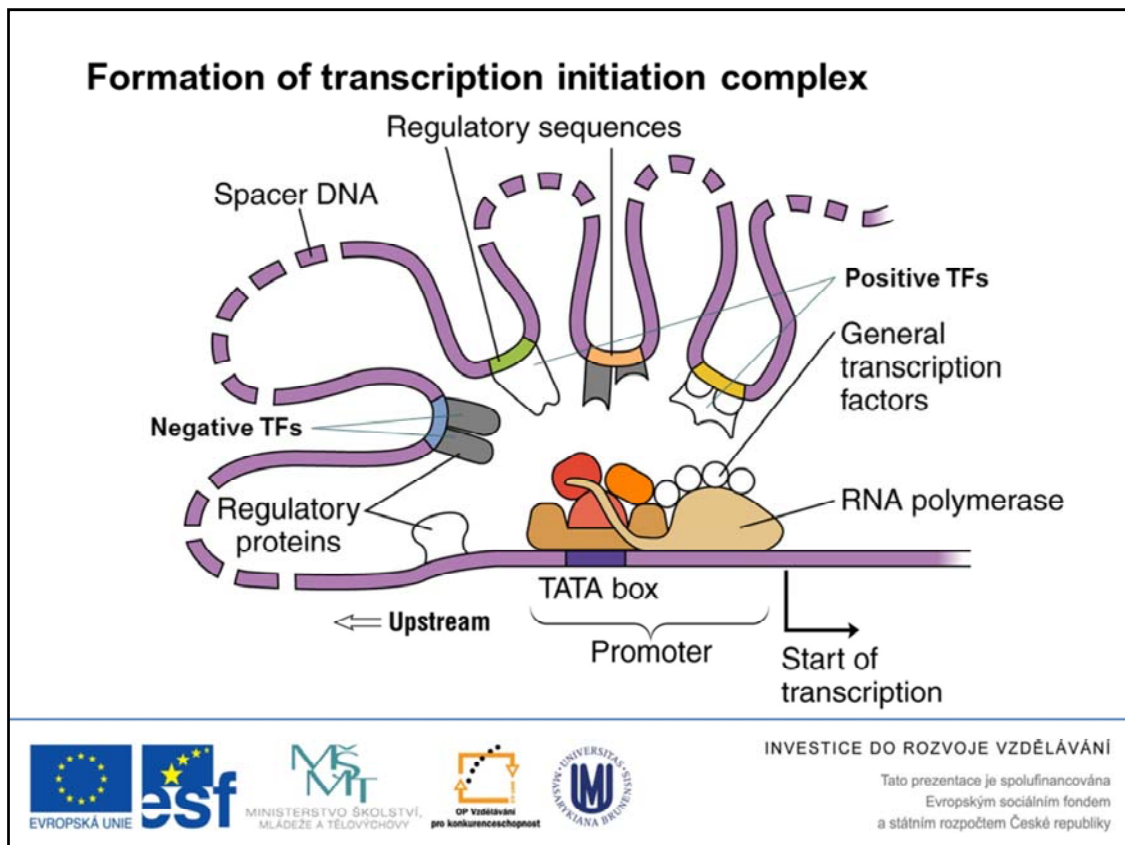
Regulation of transcription occurs via specific interaction of both general and tissue specific transcription factors (TFs) with promoter and/or enhancer sequences.

The scheme above shows simplified subsequent formation of the complex of TFs involved in the regulation of transcription. Interaction of general TFIID with the TATA box induces distortion of the DNA structure (see the next slide).



Induction of structural changes upon interaction of TFIID with DNA. This may be important for the assembly of other TFs involved in the formation of transcription initiation complex.

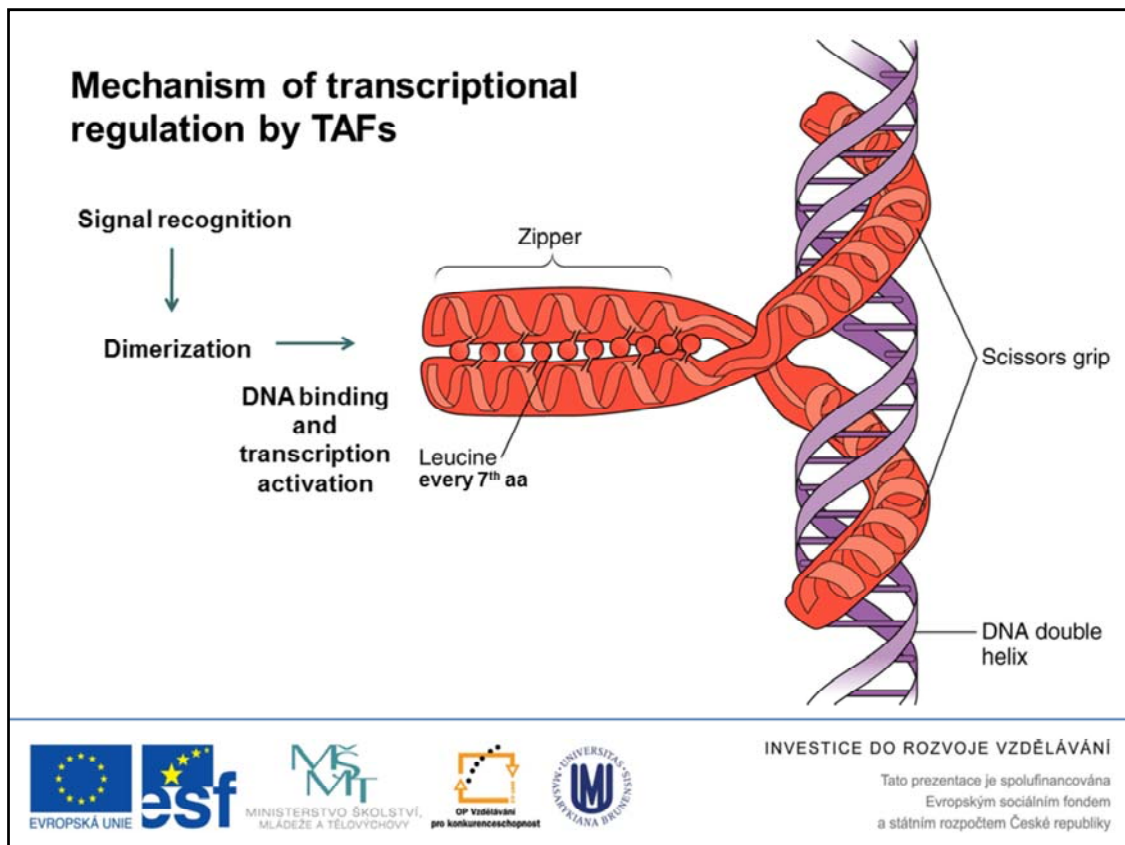
This change of confirmation provides a kind of “signature” that is recognized by other proteins and NA polymerase to recognize the proper binding site. However, there are also TATA box-less promoter, where probably other types of “signatures” occur.



The scheme showing the formation of the transcription initiation complex and the interaction of both positive (open symbols) and negative (solid symbols) factors.

These proteins bind to the regulatory sequences that might be hundreds or even thousands of base pairs away from the promoter. These protein interact with each other and with the RNA polymerase, integrating thus many signals into a “yes” or “no” response of the basal promoter, i.e. the region adjacent to the TATA box and recognized by the RNA polymerase.

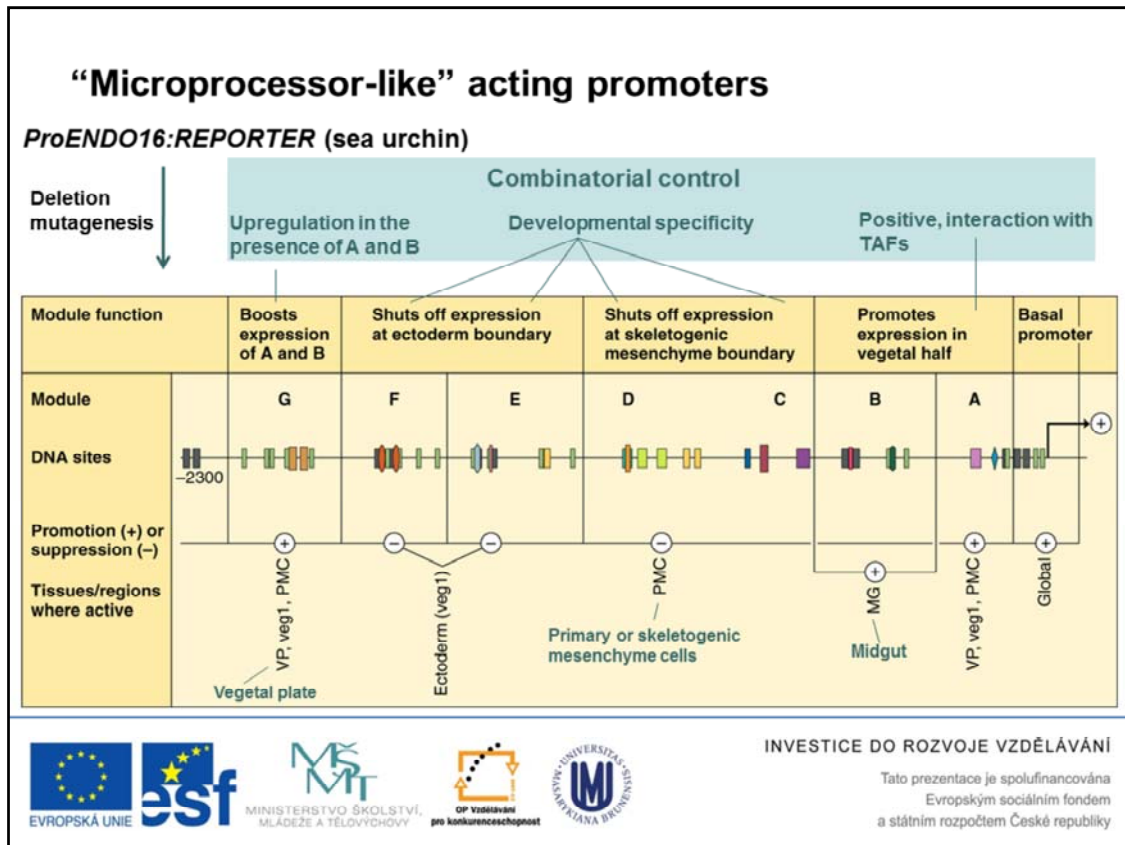
The individual positive or negative factors are complex and their activity might be regulated by their phosphorylation status or via their interaction with other proteins (i.e. monomeric or dimeric) etc..



There is a whole family of transcription activating factors (TAFs) that interact with signalling molecules, e.g. steroid hormones, thyroid hormones or retinoic acid and in a response to the signal transfer to the nucleus where they regulate transcription.

One of the type of TAF are leucine zipper or bZIP type TAFs. These TAFs are dimeric, with leucine-rich hydrophobic face formed by the Leu that occurs every 7th aa.

That allows the factor to take the proper configuration, which provides the dimer with the ability to bind DNA via charged aa.



An example of the “microprocessor”-like acting promoter is a promoter of the *endo16* gene from the sea urchin.

There have been identified several gene regulatory modules in the *endo16* gene that have positive or negative regulatory role. These modules were identified via formation of deletion mutants of the transcriptional fusions with reporter gene.

The analysis has revealed that the module A has a positive function and must interact with its cognate TAFs for transcription to occur.

Module G enhances the expression when the A and B are active.

C, D, E and F are responsible for the specificity of the expression of *endo16* during sea urchin development.

Each of the modules has several protein interaction sites, some of them general, other unique. Site for the protein SpGCF1 is present in many modules and is probably responsible for looping of chromatin, allowing thus bringing of distal regulatory modules close to the basal promoter.

This type of regulation, i.e. based on the different activities of diverse regulatory sequences is sometimes called *combinatorial* and is common for development of many living creatures.

In the combinatorial type of regulations, some modules may act synergistically, some of them antagonistically, some may have both positive and negative roles (e.g. the module B, see the figure). This variability allows very precise and responsive regulations towards changing environmental conditions.

Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA

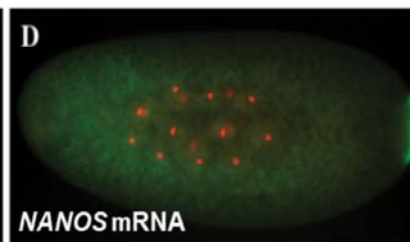
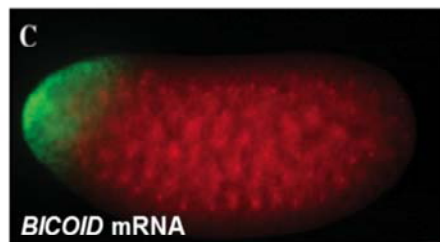
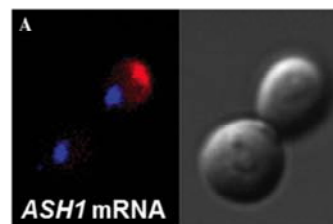


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Lokalizace mRNA

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



Shahbaban and Chartrand, 2012

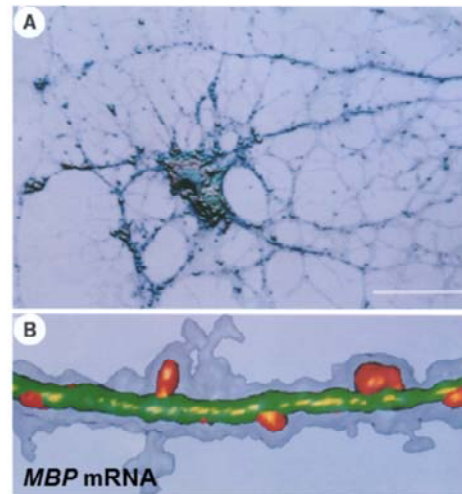


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Myelin basic protein (MBP) is a protein believed to be important in the process of myelination of nerves in the nervous system.

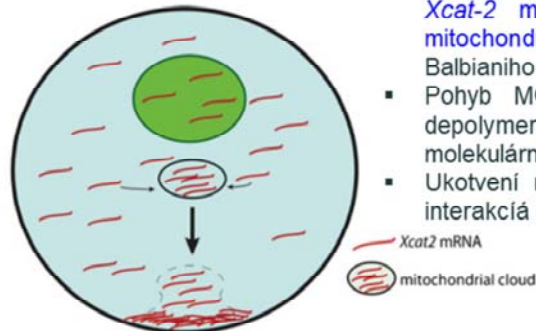
The images show localization of mRNA for MBP. Digoxigenin-labeled MBP RNA was microinjected into mouse oligodendrocytes growing in primary culture. The injected RNA appeared as small granules which were present throughout the cytoplasm and processes, and was also found dispersed in the peripheral membranes of the cell.

To analyze the three dimensional distribution of microinjected labeled MBP mRNA throughout the cell, consecutive optical sections through a single oligodendrocyte were collected, reconstructed, and visualized using volume rendering (Fig. A) or isosurface rendering (Fig. B) techniques. An oligodendrocyte microinjected with MBP mRNA, visualized by volume rendering is shown in Fig. A. RNA granules were observed throughout the perikaryon and in some, but not all, processes. The granules in the perikaryon and in the processes appeared to be equivalent in size. In some regions the granules in the processes were aligned in tracks. Although not apparent from this image, the nucleus was devoid of granules.

Lokalizace mRNA

Mechanizmy

▪ Difúze a ukotvení mRNA



Shahbadian 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 interakcí MO s ER



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Another well studied example of the diffusion-entrapment mechanism is the *Xenopus Xcat-2* mRNA, which encodes a Nos related zinc-finger RNA-binding protein.

During the early stages of *Xenopus* oogenesis, *Xcat-2* mRNA is restricted to a specific structure in the cytoplasm called the mitochondrial cloud (MC). The mitochondrial cloud, also called Balbiani body, consists mostly of mitochondria and small vesicles, and is the source of germinal granule material [32]. The movement of the MC in the cytoplasm results in the localization of the *Xcat-2* mRNA at the vegetal cortex (Shahbadian and Chartrand, 2012).

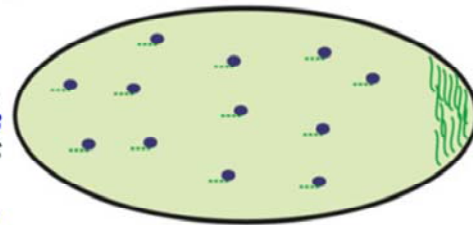
Lokalizace mRNA

Mechanizmy

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 **posteriorního pólu je Hsp83 mRNA chráněna před účinkem SMAUG tzv. HPE elementem v 3'UTR**; mechanismus této ochrany je dosud neznámý



● Smaug
--- degraded Hsp83 transcript
— protected Hsp83 transcript



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropskou strukturální fondy
a státním rozpočtem České republiky

Localized stabilization of a transcript is another mechanism by which an mRNA can be subcellularly targeted. In this case, an mRNA is rapidly degraded in most parts of the cell, but it is protected from degradation at a specific location. The hsp83 mRNA, which encodes a heat shock protein in *Drosophila*, is a well-characterized example of this kind of localization (Fig. 2b). This transcript is localized at the posterior pole of the early *Drosophila* embryo by the selective stabilization of the mRNA at the posterior pole and degradation of the transcript elsewhere in the cytoplasm.

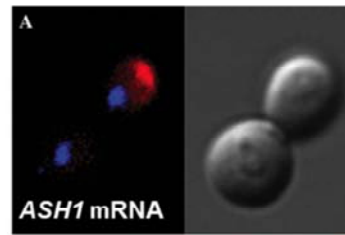
The level of hsp83 mRNA, which is a maternally encoded transcript, decreases more rapidly in embryos than in unfertilized eggs, which suggests that two separate mechanisms control the stability of this transcript [38]. These two independent pathways, which are called “maternal” and “zygotič” pathways, use maternally and embryonic encoded proteins, respectively, to degrade the hsp83 transcript [38]. By analyzing the 3'UTR of hsp83 mRNA, a region from nucleotides 253–349 was identified as the Hsp83 degradation element (HDE), which directs the destabilization of this mRNA in unfertilized eggs. However, this region has no effect in the zygotič degradation pathway, and transcripts without the HDE domain are subject to degradation by the embryonic degradation machinery [38]. The hsp83 ORF has also been shown to affect the stability of the transcript. A region at the 3' end of the ORF, which comprises 615 nucleotides, has been found to be responsible for this destabilization, and was consequently called Hsp38 instability element (HIE) [39]. This region, which has the major effect in the destabilization of the transcript, functions together with the HDE for complete degradation. The HIE domain contains six stem-loop structures that are recognized by the maternally encoded RNA-binding protein Smaug [39, 40]. It was shown that in Smaug mutants, degradation and thus localization of hsp83 mRNA are impaired. Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex, triggering deadenylation and thus degradation of the hsp83 transcript [40]. Although Smaug is present throughout the pole plasm, the hsp83 mRNA is protected from Smaug action at the posterior pole. This protection is related to a 57 nt region in the 3'UTR (nucleotides 351–407) downstream of HDE, which is called HPE (Hsp83 protection element). HPE is sufficient to confer stability to an unstable transcript at the pole plasm [40]. The mechanism by which this domain functions is not clear, and may include interaction of trans-acting factors that block the availability of the transcript to Smaug (Shahbadian and Chartrand, 2012).

Lokalizace mRNA

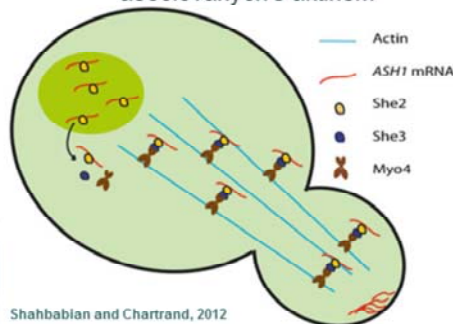
Mechanizmy

▪ Aktivní transport mRNA

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



Shahbalian 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

Localization of *ASH1* mRNA is essential for the asymmetric distribution of Ash1, which acts as a transcriptional repressor of the *HO* endonuclease and results in inhibition of mating-type switching in daughter cells [88, 89]. The *ASH1* mRNA contains four localization elements, three in the coding sequence (E1, E2A, and E2B) and one overlapping the end of the coding sequence and the 3'UTR (E3) [25, 90]. While the presence of these four elements leads to an optimal localization, deletion analysis revealed that each element is sufficient for localization of a reporter mRNA to the bud.

When each of these elements was inserted in multiple copies in the 30UTR, the new constructs showed nearly normal localization. However, for these mRNAs, the asymmetric distribution of Ash1 was impaired, suggesting that the position of these elements is important for Ash1 sorting but not for *ASH1* mRNA localization [91]. Although the primary sequences of the four *ASH1* localization elements are different, they all fold into a stem-loop structure that contains a few conserved nucleotides [92, 93]. All four elements interact with the same RNA binding protein called She2, which is involved in the localization of bud-localized mRNAs in *S. cerevisiae*.

She2 forms a tetramer under physiological conditions, and mutations that disrupt this tetrameric state abolish its RNA-binding capacity and impair She2-dependent localization to the bud tip [94]. She2 interacts directly with the C-terminal domain of She3, an adaptor protein that links the She2–mRNA complex to the molecular motor Myo4 (Fig. 2c) [55, 95, 96]. Recent evidence also suggests that She3, besides its role in connecting the She2–RNA complex to Myo4, is itself able to bind RNA and acts synergistically with She2 to increase the affinity and specificity of RNA binding [97].

Recent studies on Myo4 helped to explain why multiple localization elements are required for proper *ASH1* mRNA localization. Myo4 is a class V myosin whose main function is the transport of mRNAs to the bud tip using actin filaments [98–100]. Myo4, unlike other type V myosins, is a nonprocessive monomer in vivo, but it becomes processive when present in the form of oligomers [101, 102]. Purification of the localization complex associated with a single localization element revealed that multiple copies of Myo4 are associated with this RNA [103]. Moreover, increasing the number of Myo4 attached to the *ASH1* mRNA increased the efficiency of localization of this transcript. These results suggest that each localization element interacts with higher order protein complexes in which a She2 tetramer may recruit multiple copies of Myo4, thus ensuring a continuous and processive movement of the mRNP complex into the bud. Moreover, it is possible that a She2 tetramer binds simultaneously to the localization elements of a single transcript or, alternatively, to those of different mRNAs. This would bring multiple mRNAs together within a single complex in which several Myo4 molecules modulate their transport to the bud tip (Shahbalian and Chartrand, 2012).

Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Sestřih hnRNA



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

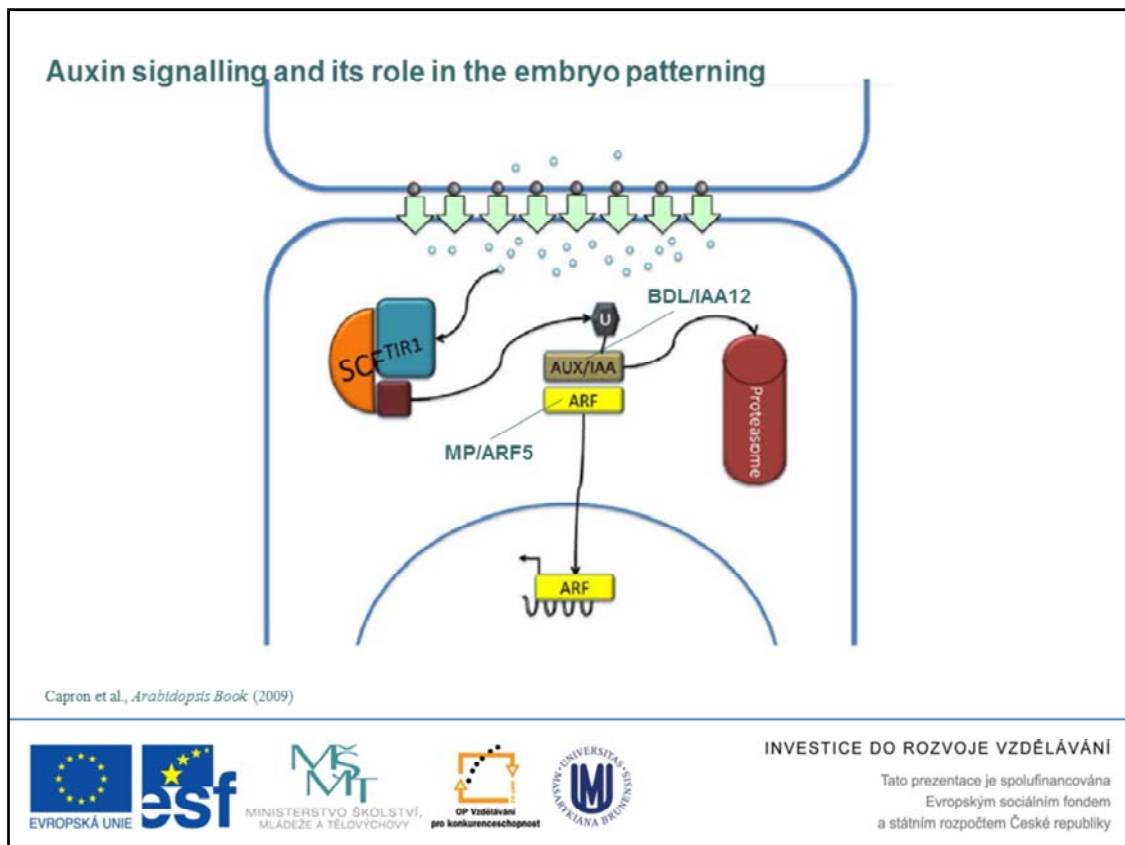
Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Sestřih hnRNA
 - Stabilita proteinů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



Scheme of the auxin signaling pathway as an example of the role of protein stabilization leading to regulation of gene expression.

Under low intracellular auxin concentrations, the transcription activators of auxin-regulated genes, which are called auxin responsive factors (ARFs), are in a complex with negative regulators of transcription, so called AUX/IAA proteins. In the complex, ARFs can not activate transcription.

After auxin is imported into the cell, it binds to the TIR1 protein, that allows interaction with AUX/IAA-ARF complex and targets AUX/IAA protein for the degradation via proteasome.

That allows ARFs to enter nucleus and activate transcription of auxin-induced genes.

Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Sestřih hnRNA
 - Stabilita proteinů
 - Přenos signálu



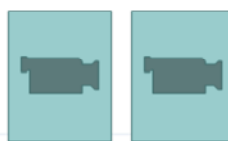
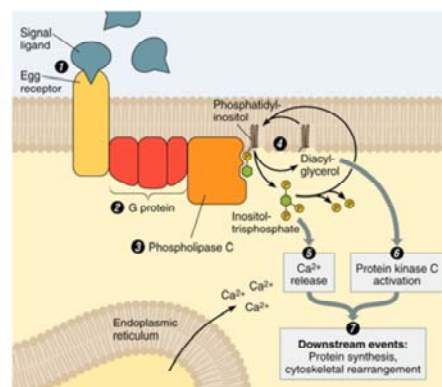
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

PI a přenos signálu

PI a přenos signálu

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita mRNA
 - Stabilita proteinů
 - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace



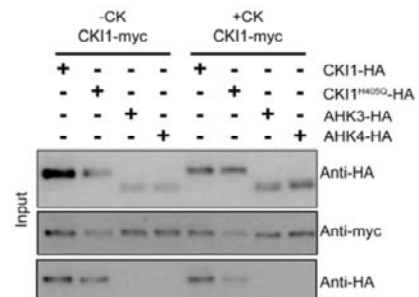
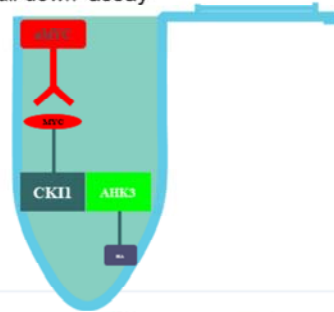
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

PI *in vivo*

Koimunoprecipitace

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita mRNA
 - Stabilita proteinů
 - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)



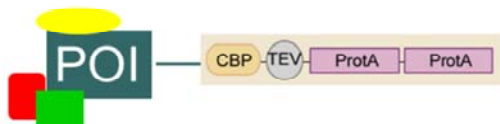
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

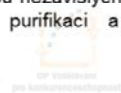
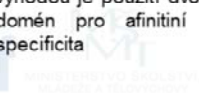
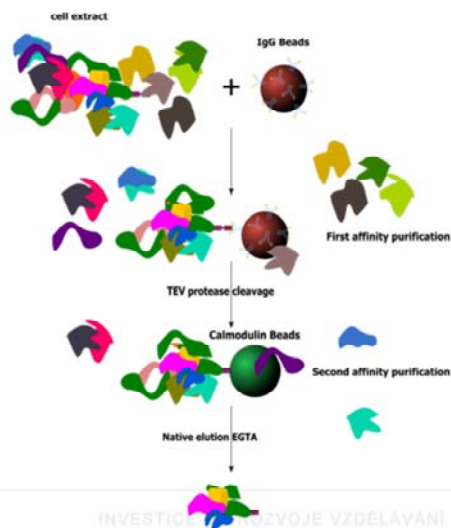
PI *in vivo*

Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, fúzaných 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 afinitní purifikaci a tedy velká specifita



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita mRNA
 - Stabilita proteinů
 - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)



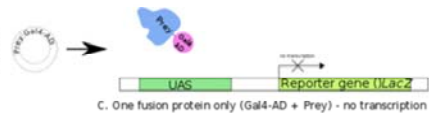
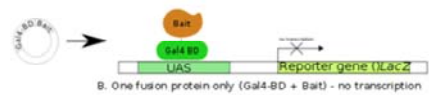
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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 rekonstrukci 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita 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)



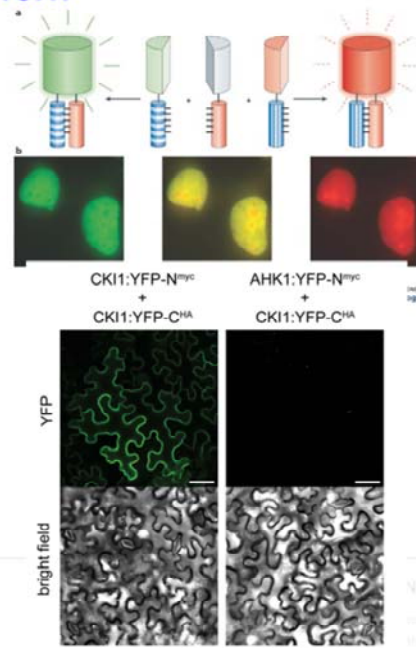
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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



in cooperation with Linnéus University

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita 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)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

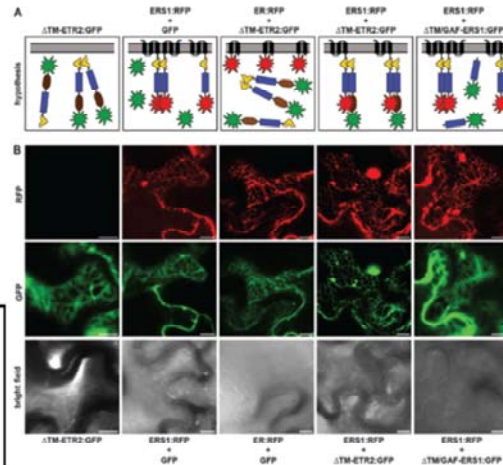
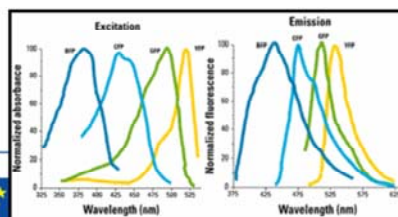
- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny



membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



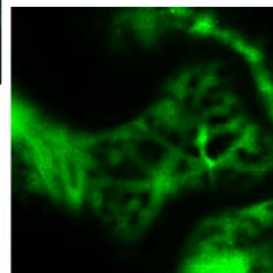
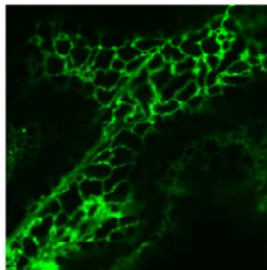
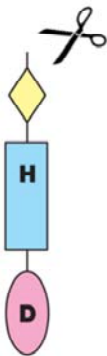
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

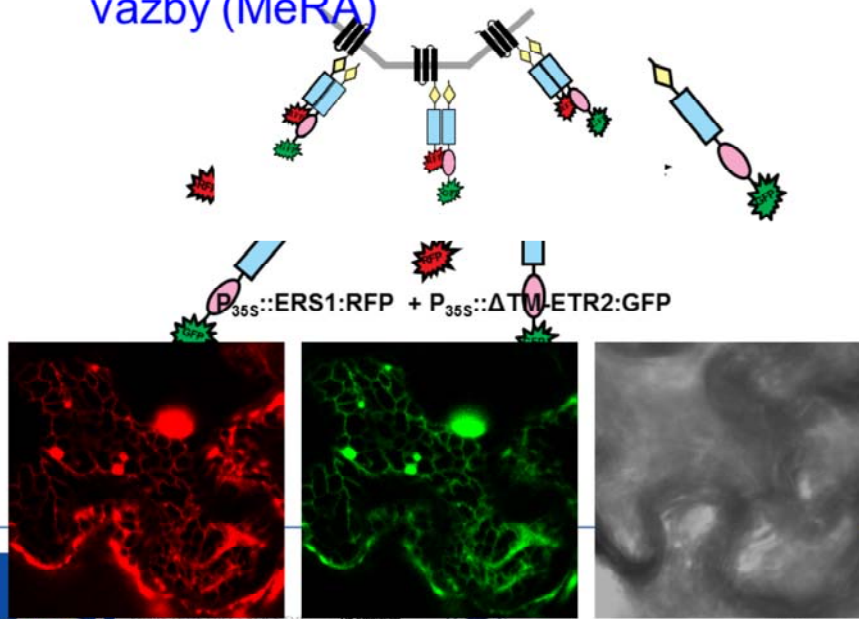


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



EVROPSKÁ UNIE

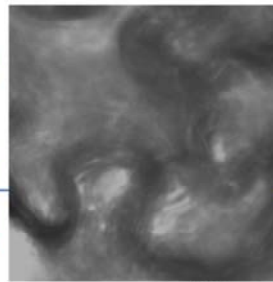
CS

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

ČÍSLO 1



VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancována

sociálním fondem

a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
 - Struktura chromatinu
 - Regulace transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Stabilita 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*

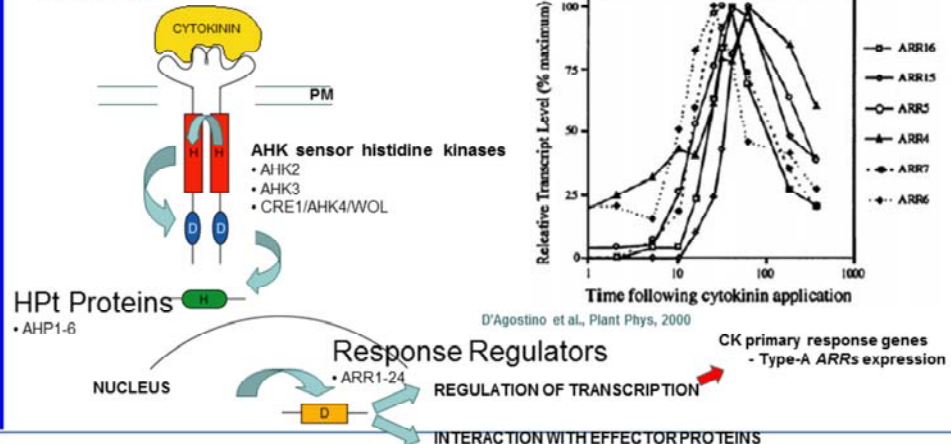


EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
Operační program Výzkum a inovace
pro inteligentní a udržitelný růst
inovativní ekonomiky
Integrovaná operační program

Číslo projektu: J07/98:1431/00:0/00/000/000/0000
ZÁNI
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Signal Transduction via MSP

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

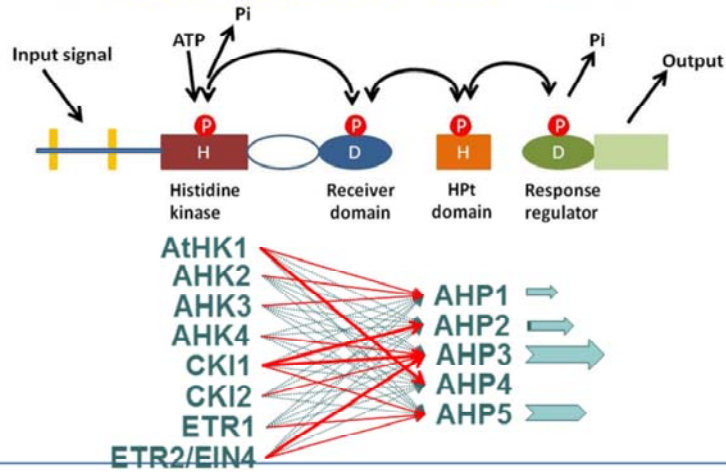


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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?

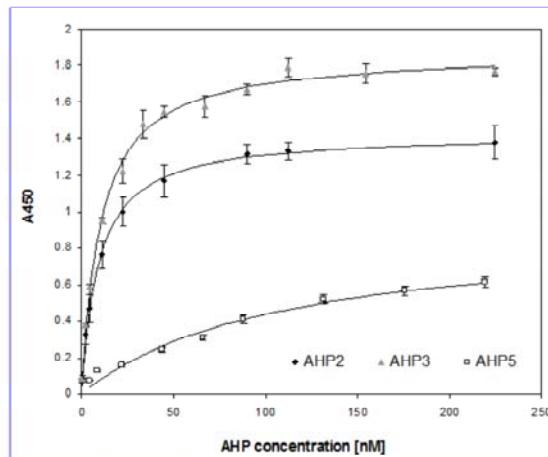


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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)

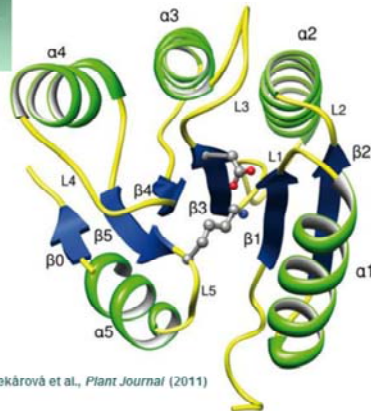
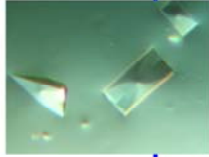


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

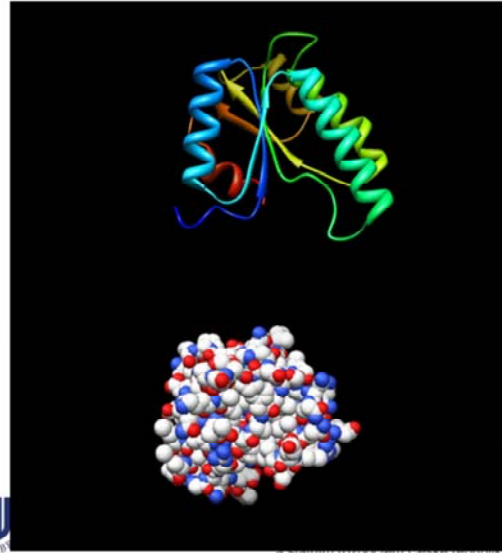
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Structure of CKI1_{RD}

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



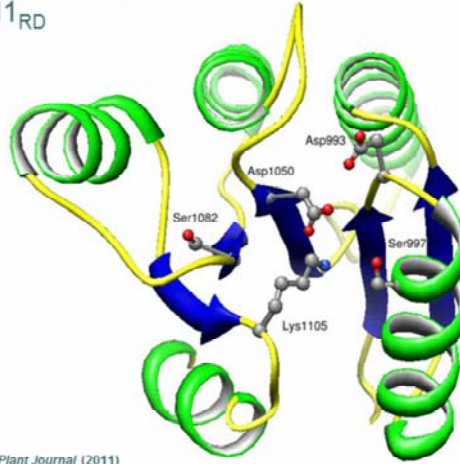
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)



© Státní ústav pro léčbu závislosti na návykových látkách

Dynamics of CKI1_{RD}

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



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

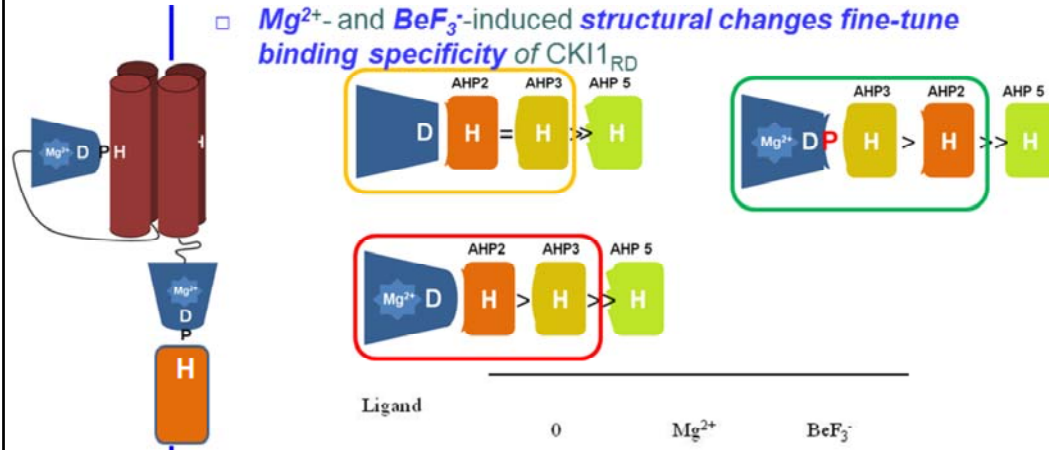


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

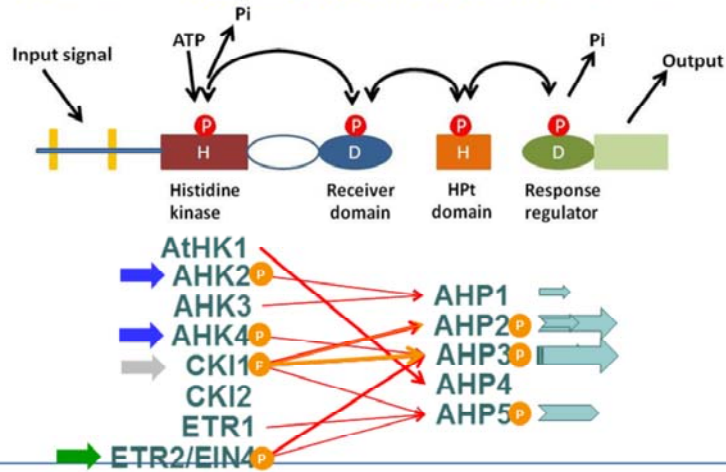
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)



AVÁNI
incována
ř fondem
republiky

Model Suggestion

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



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*



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

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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