

CG020 Genomika

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.

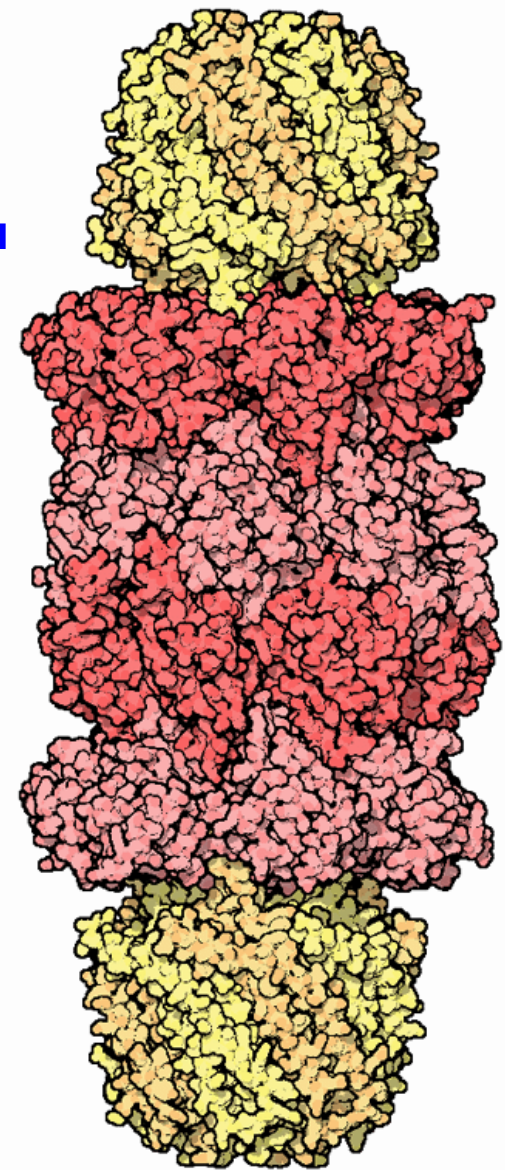
Osnova

- 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**

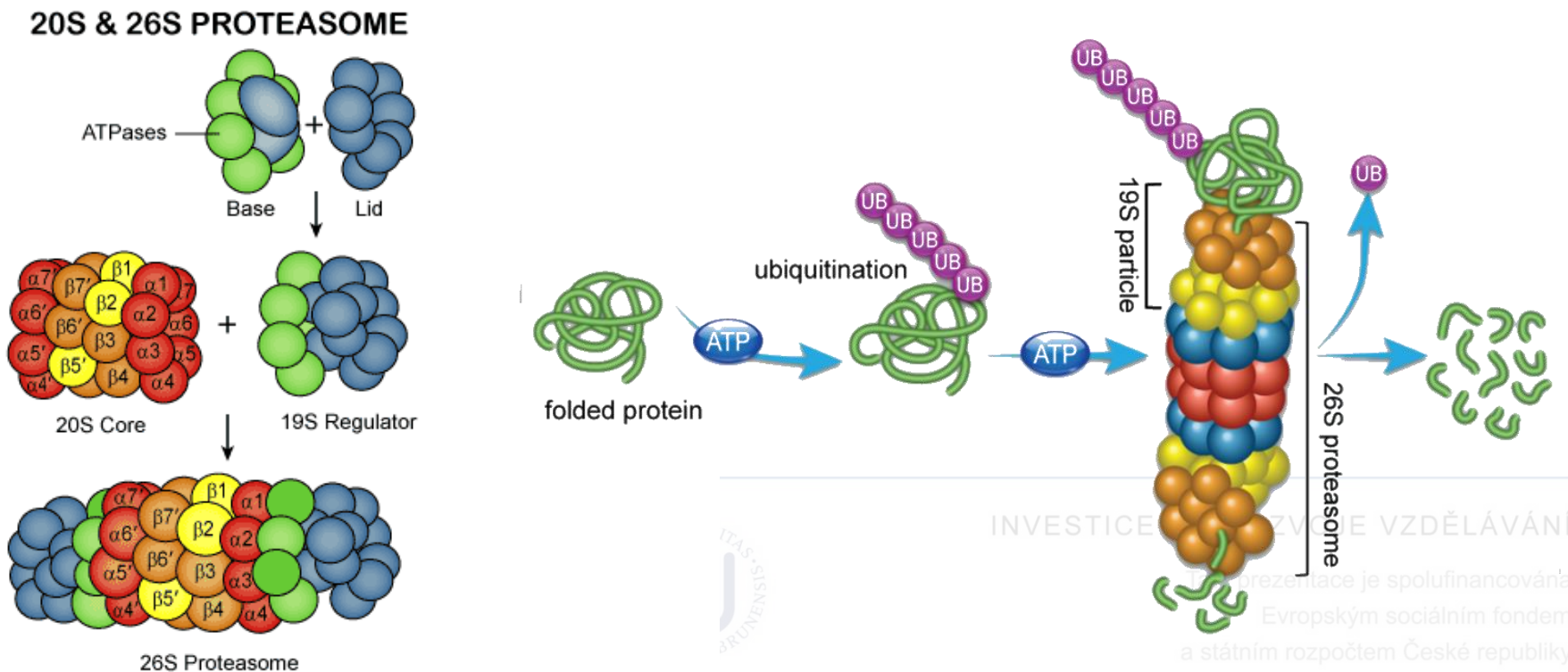
- Většina proteinů v buňce existuje ve formě komplexů, které mohou dále navzájem interagovat
 - **Proteazom**
 - **proteinový komplex** zodpovědný za **degradaci nepotřebných proteinů** v buňce



Význam interakcí proteinů

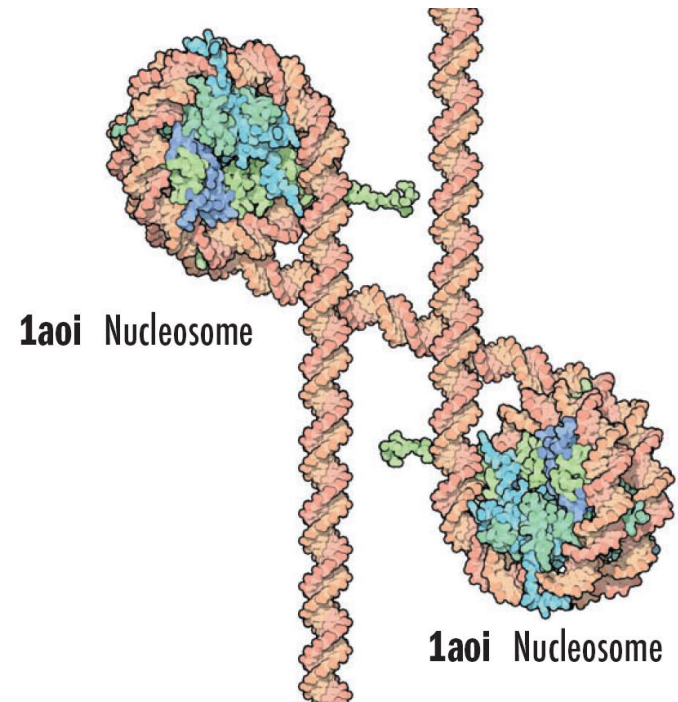
Proteazom

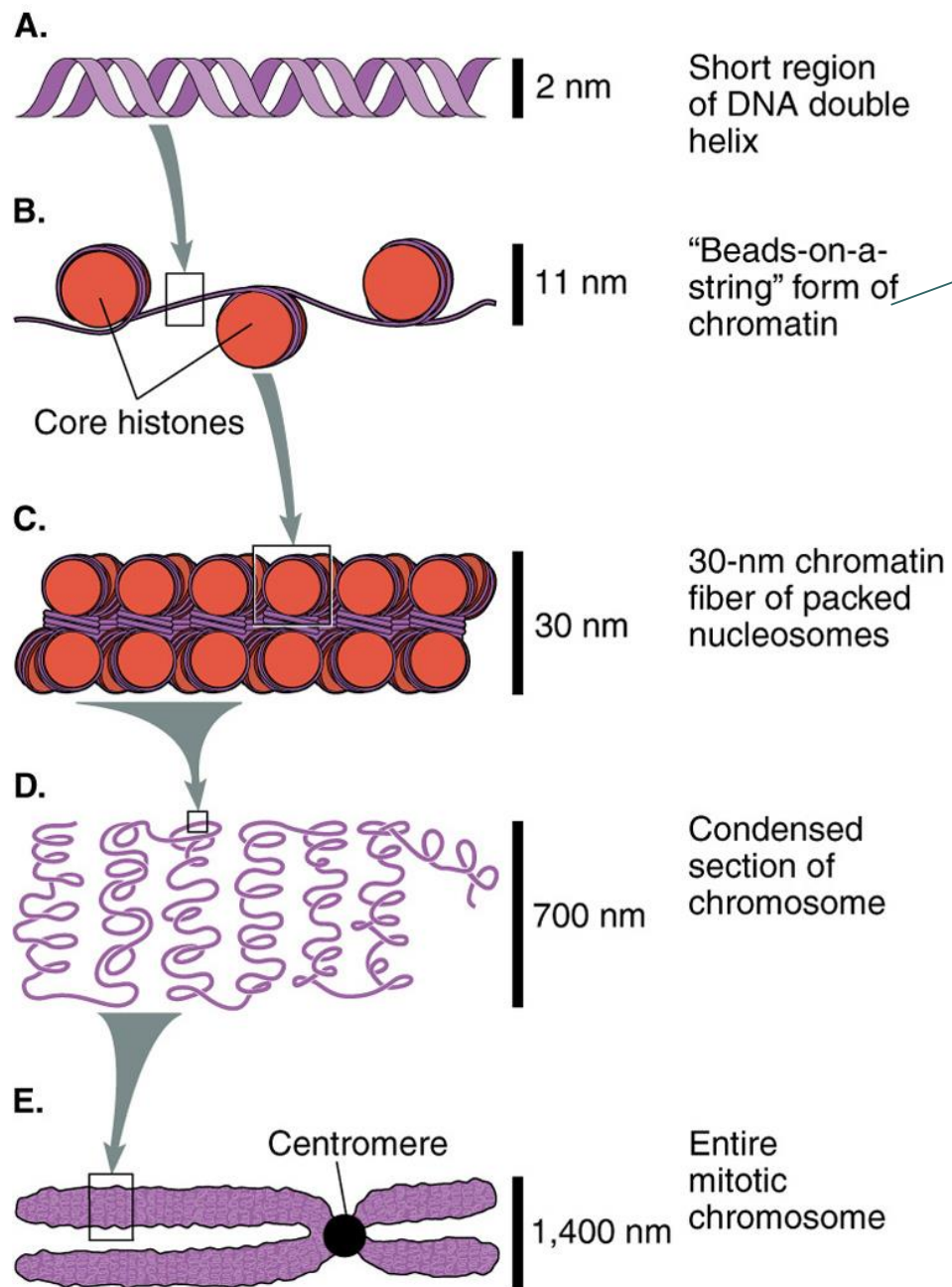
- Skládá se z **centrálního komplexu** označovaného jako **20S** a **regulačních částí** (19S, někdy také 11S)
- Umožňuje **cílenou degradaci proteinů** označených **specifickou značkou**, malým proteinem (76 aa) - **ubiquitem**



Význam PI

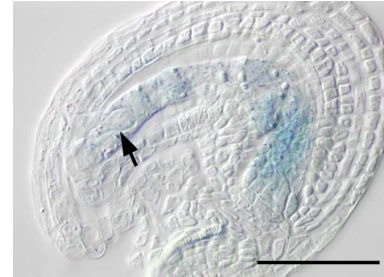
- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu





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



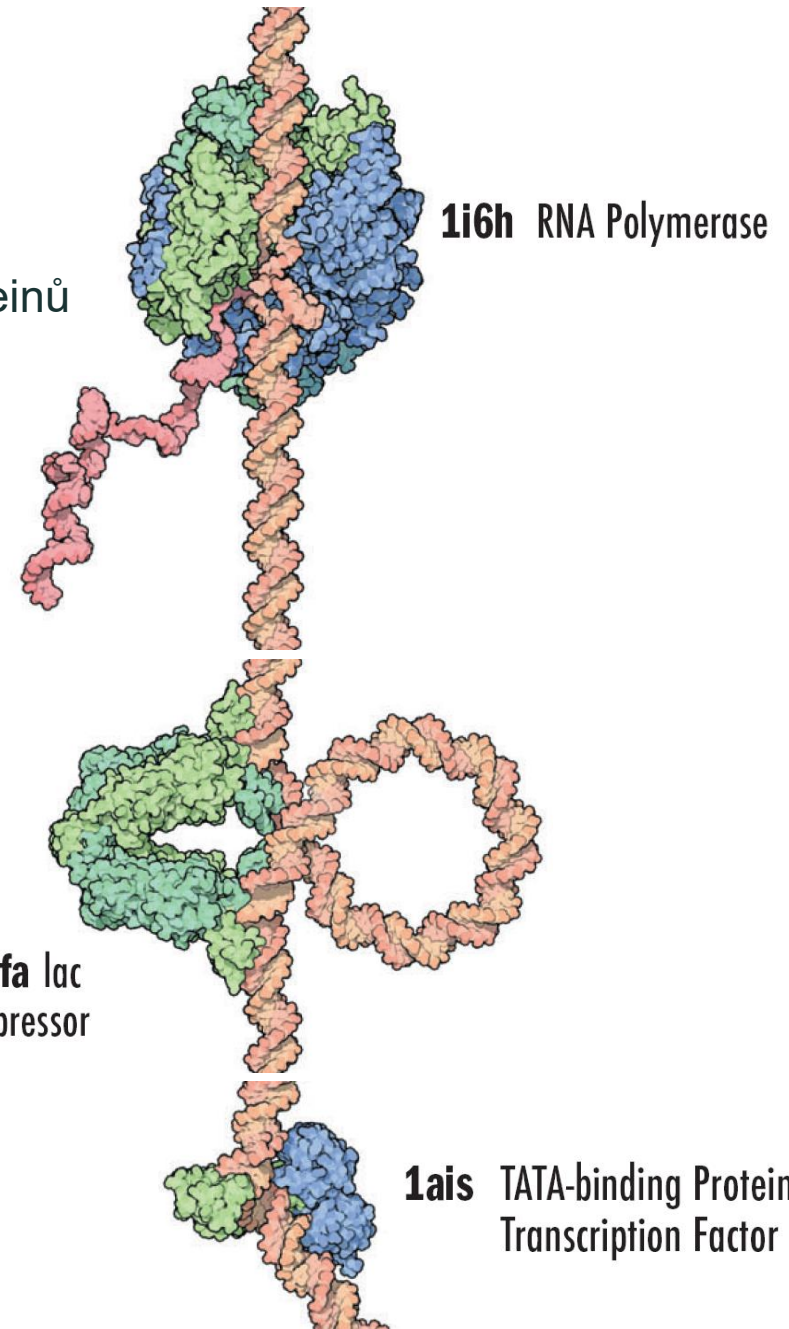
methylation status

CpG or CpNpG

CpNpNp

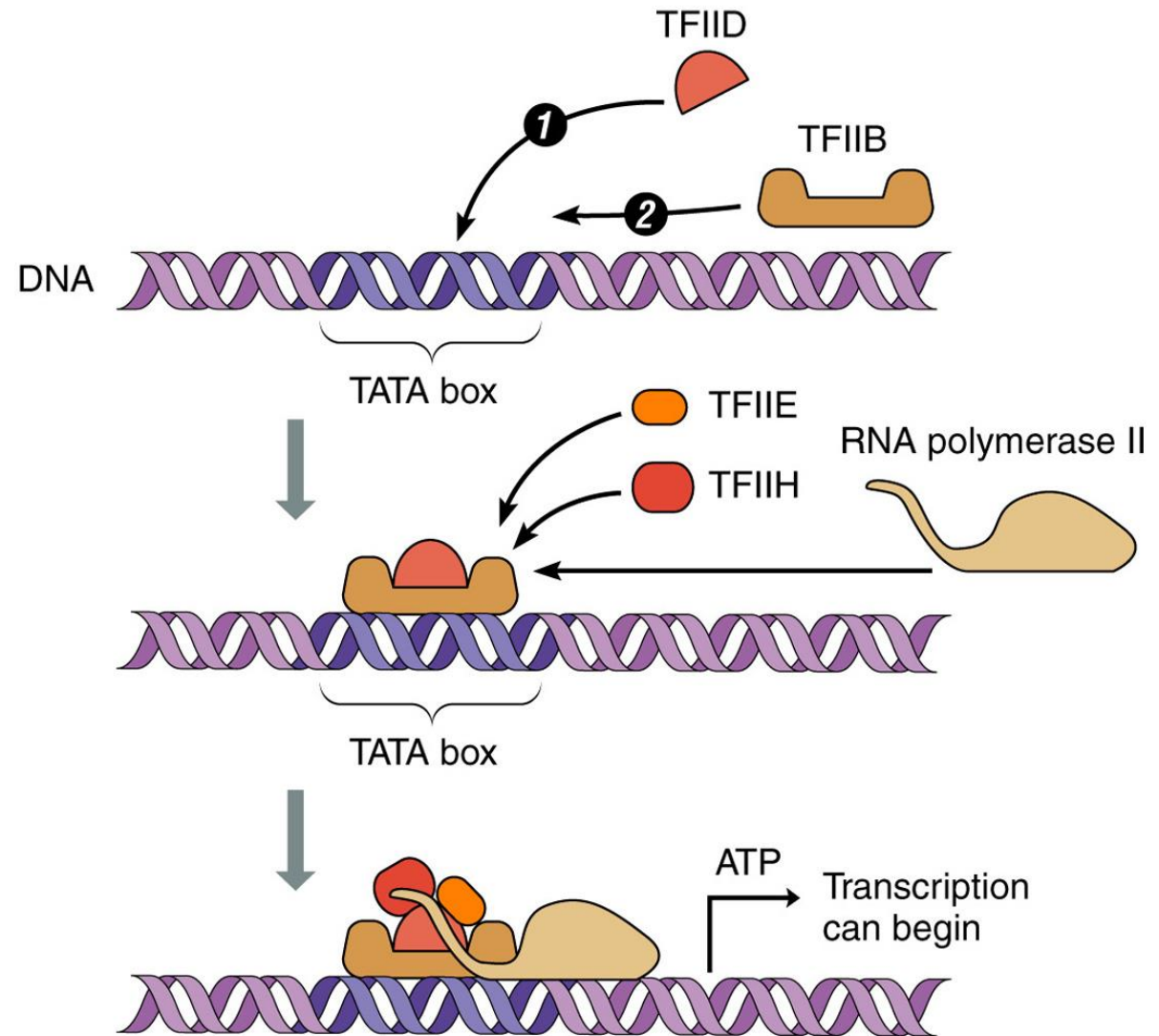
Význam PI

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

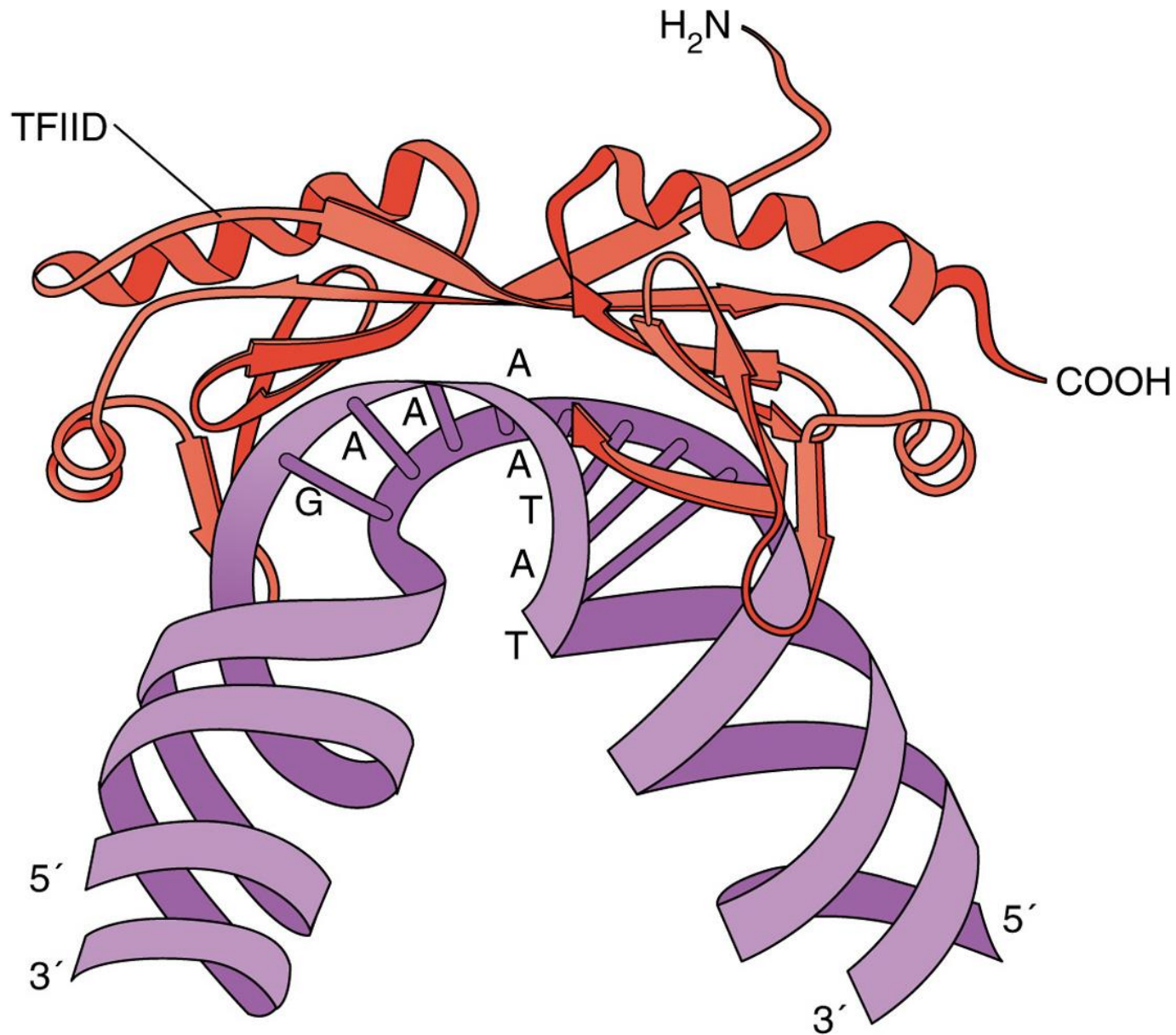


Formation of transcription initiation complex

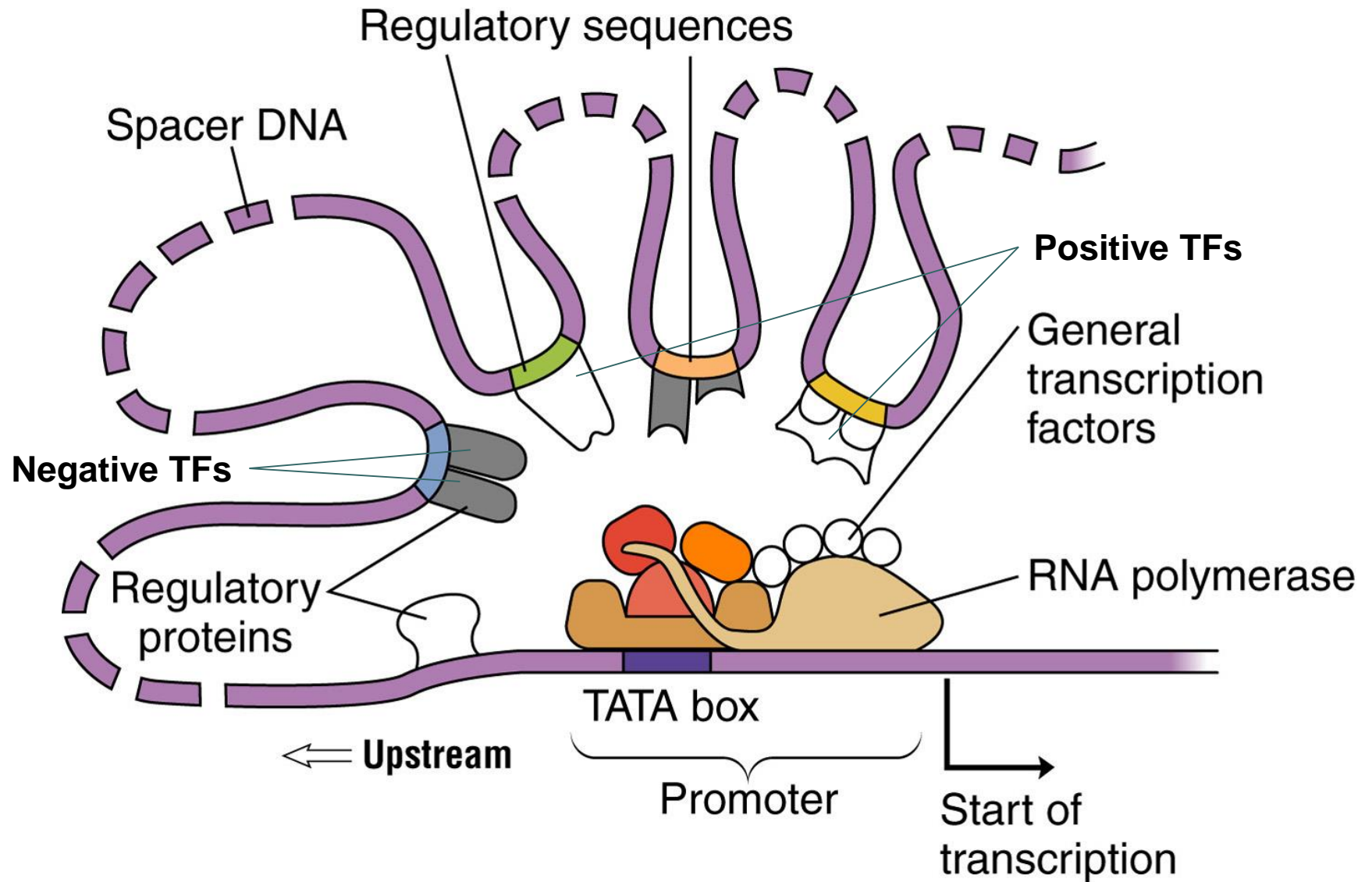
A.



B.



Formation of transcription initiation complex



Mechanism of transcriptional regulation by TAFs

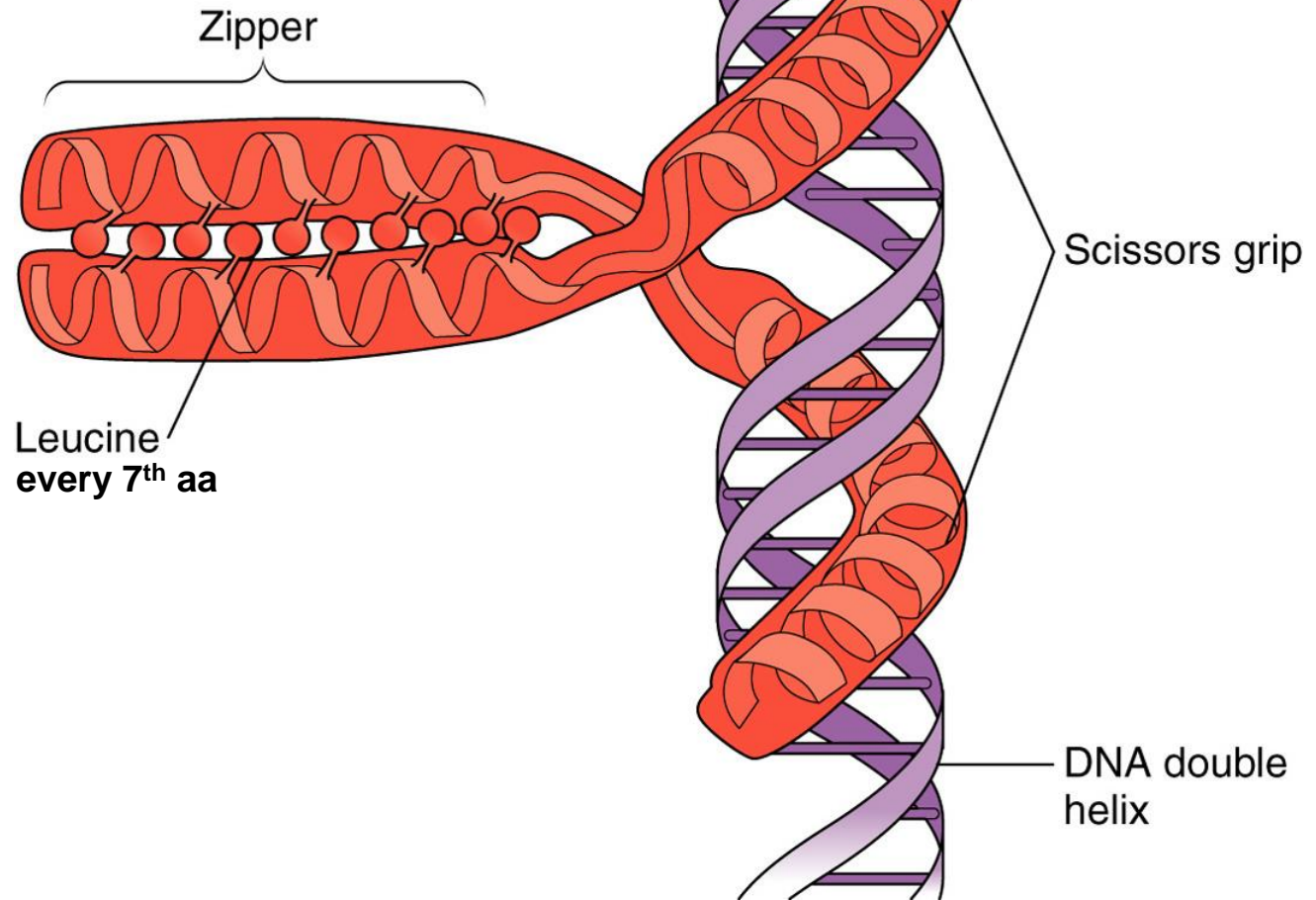
Signal recognition



Dimerization

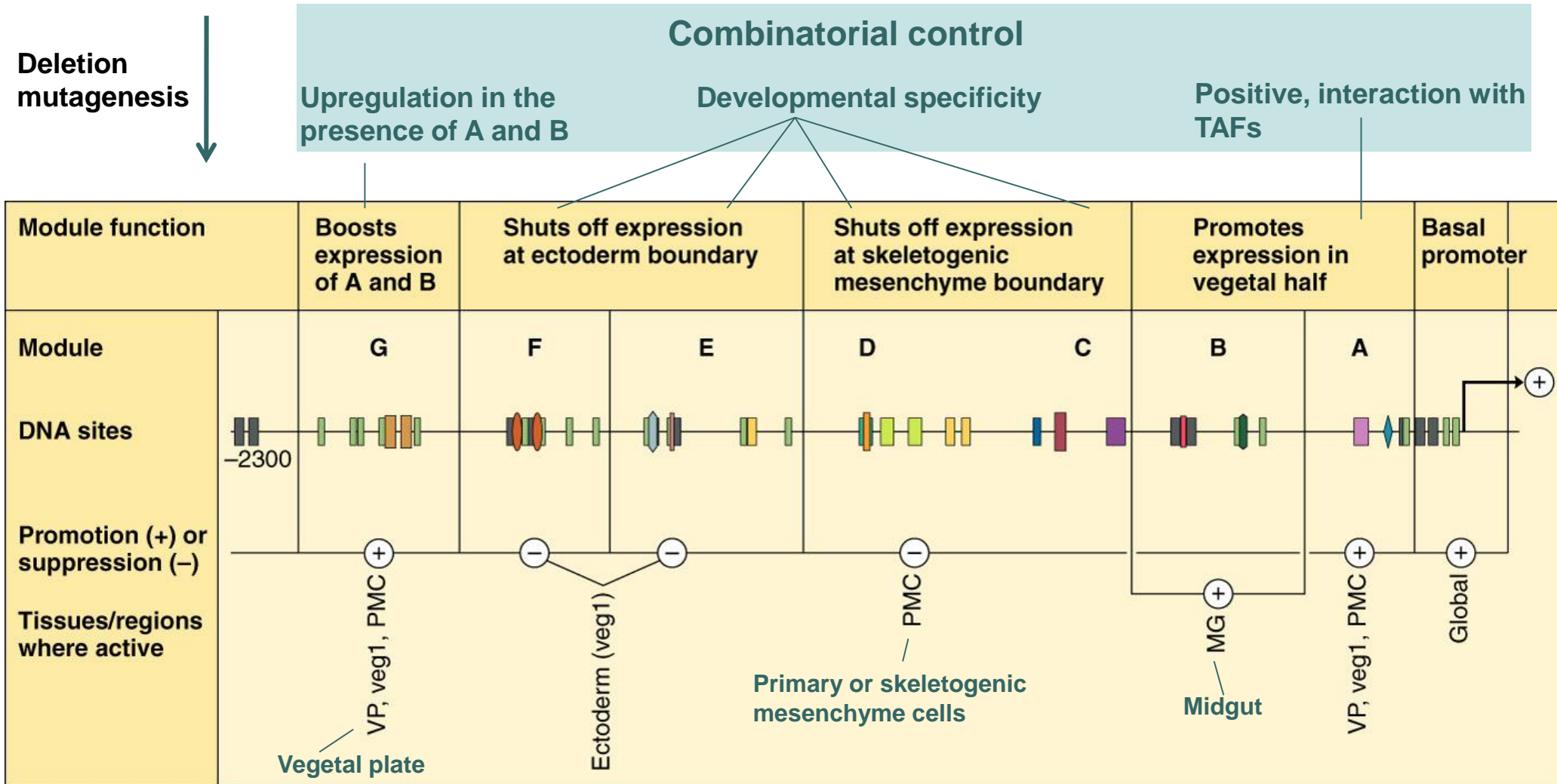


DNA binding
and
transcription
activation



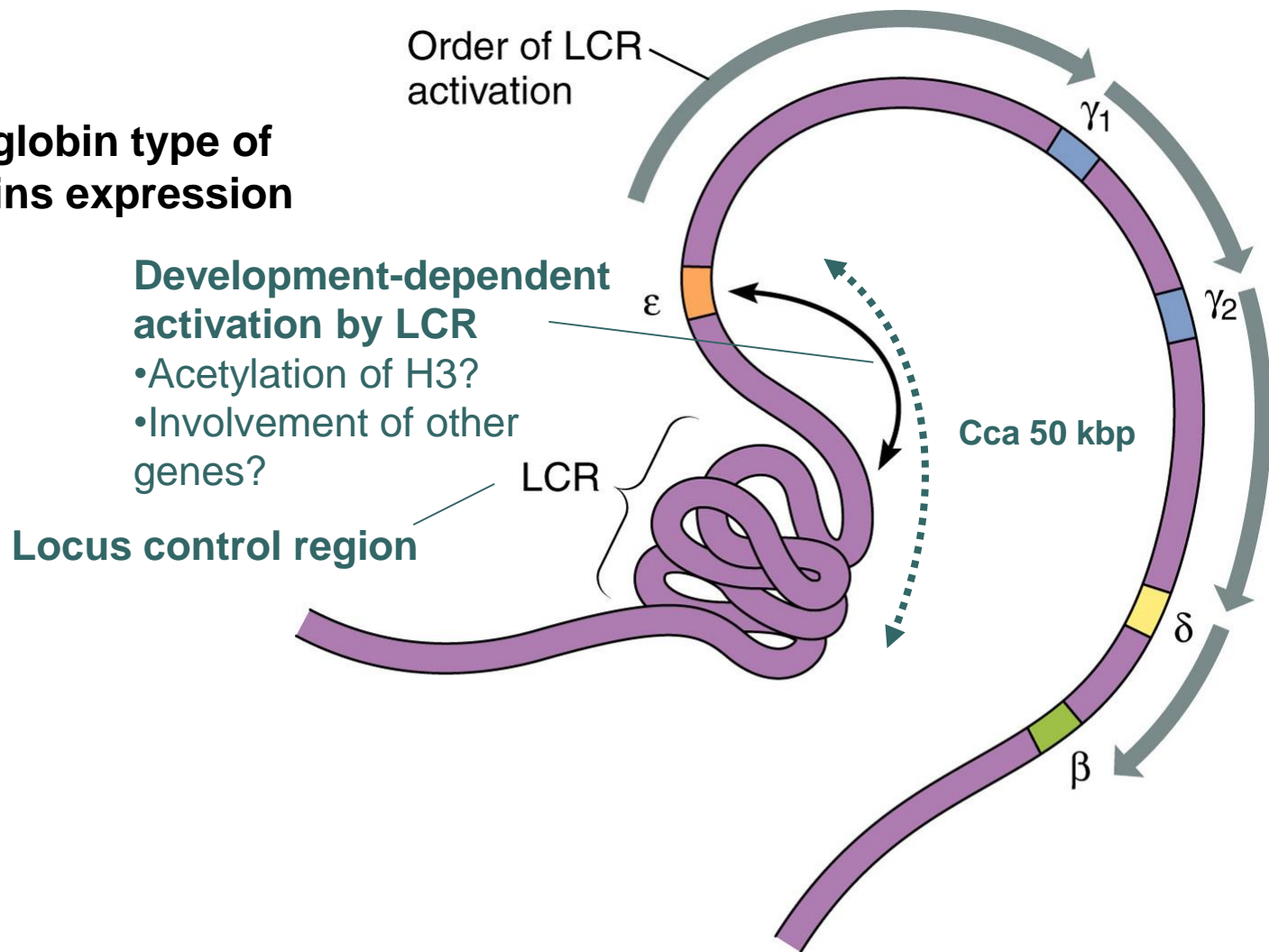
“Microprocessor-like” acting promoters

ProENDO16:REPORTER (sea urchin)



“Microprocessor-like” acting promoters

Regulation of β -globin type of hemoglobin chains expression

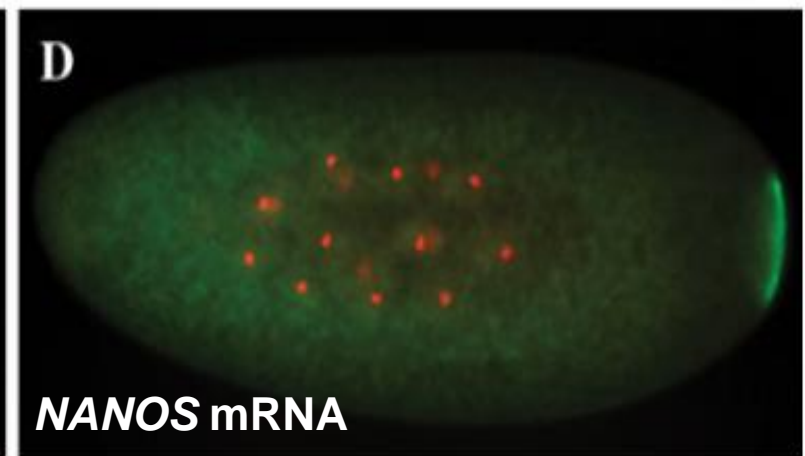
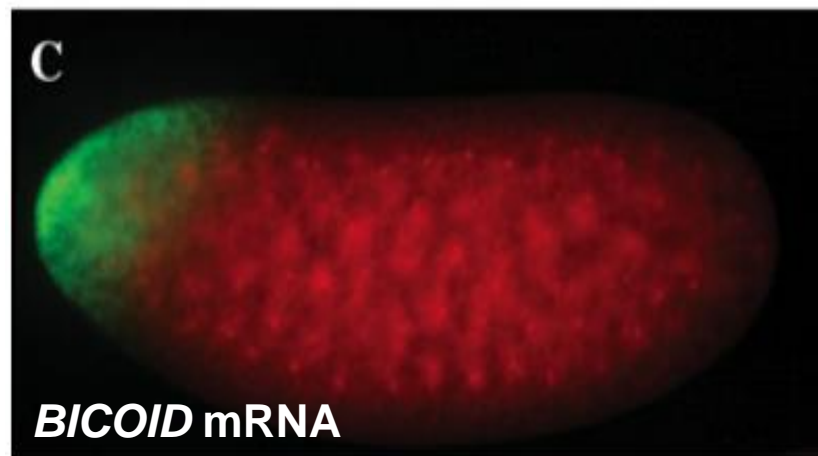
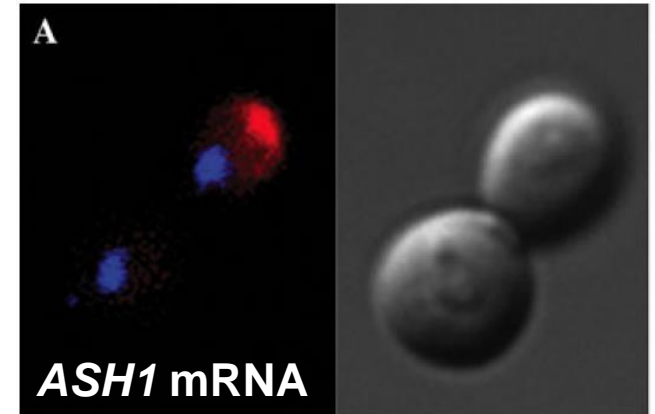


Význam PI

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

Lokalizace mRNA

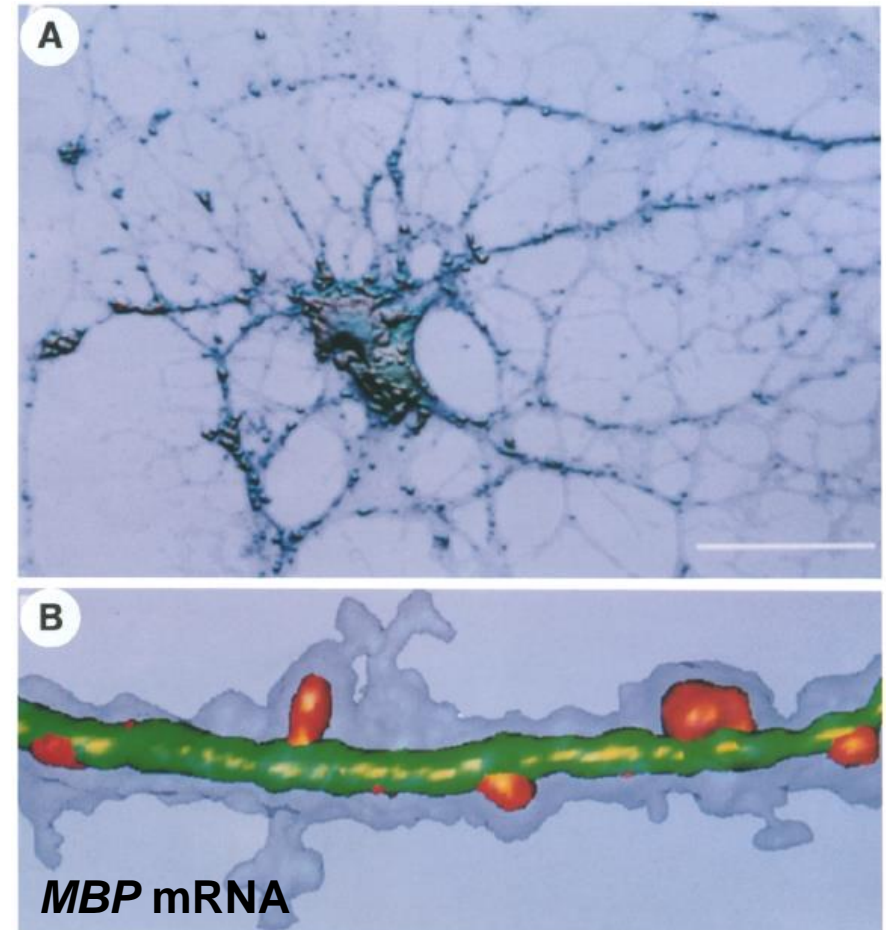
- Význam lokalizace mRNA
 - Lokalizace proteinového produktu genu v čase a místě
 - asymetrické dělení během vývoje
 - polarizace embrya



Shahbadian and Chartrand, 2012

Lokalizace mRNA

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

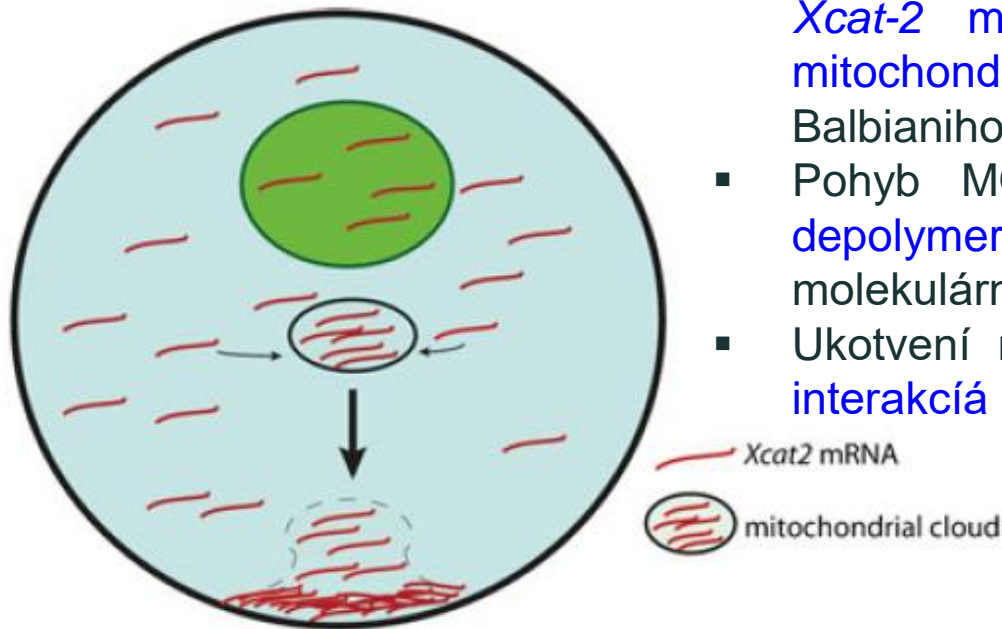


Ainger et al., 1993

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

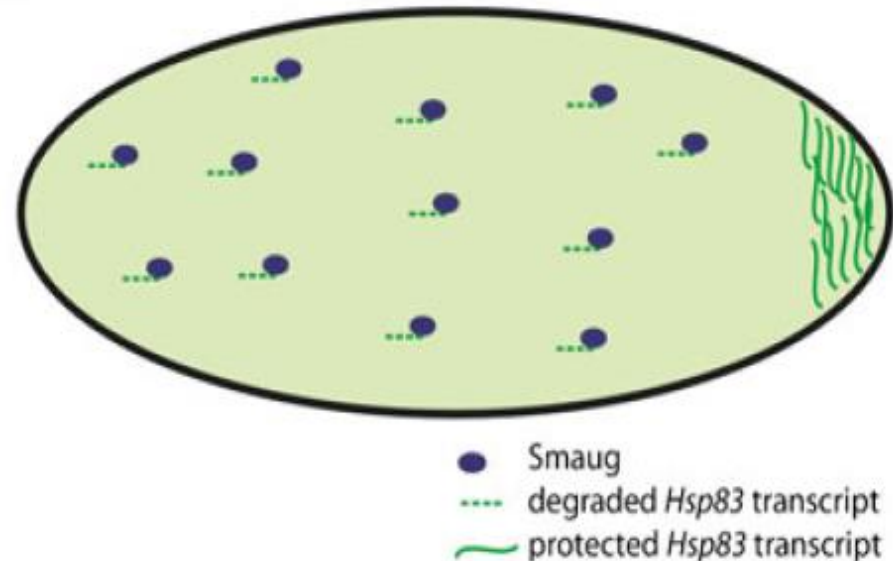
Lokalizace mRNA

Mechanismy

Shahbadian and Chartrand, 2012

▪ Lokalizovaná degradace mRNA

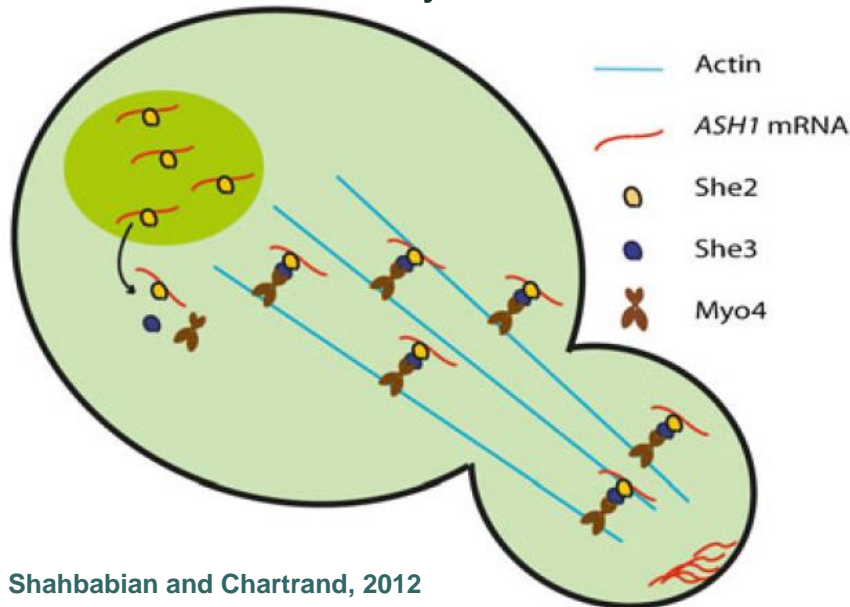
- V embryogenezi u *Drosophila m.* dochází **polární lokalizaci Hsp83 mRNA**, podobně jako *NANOS mRNA*
- *Hsp83 mRNA* je lokalizována **v celém embryu**, zde je však **destabilizována prostřednictvím cis elementů** jak v 3'UTR (HDE), tak v kódující oblasti (HIE)
- **HIE elementy** jsou **rozpoznávány 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



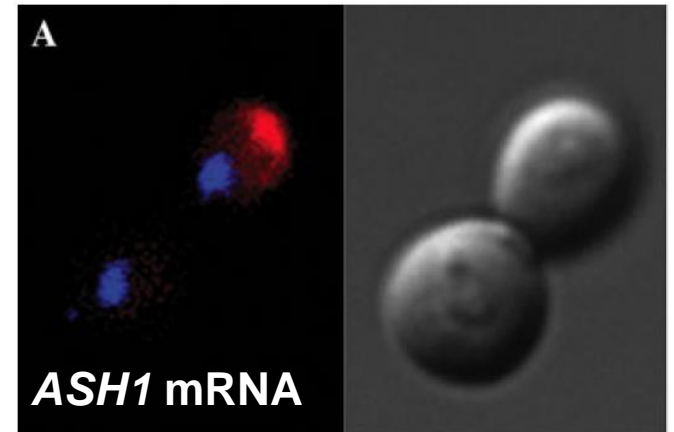
Lokalizace mRNA

Mechanismy

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



Shahbadian and Chartrand, 2012



Shahbadian 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

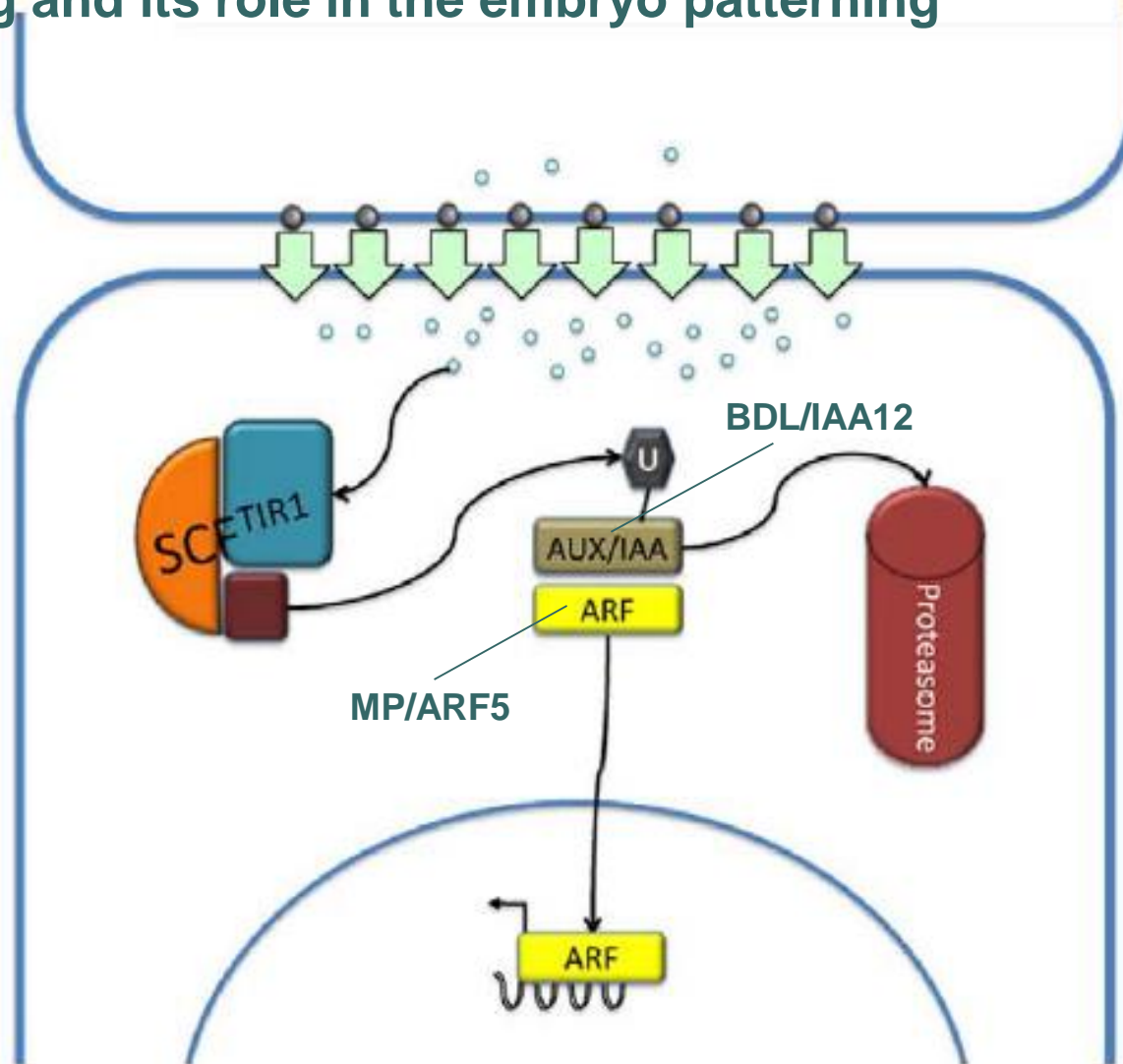
Význam PI

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

Význam PI

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

Auxin signalling and its role in the embryo patterning



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

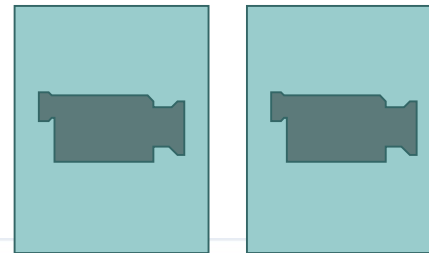
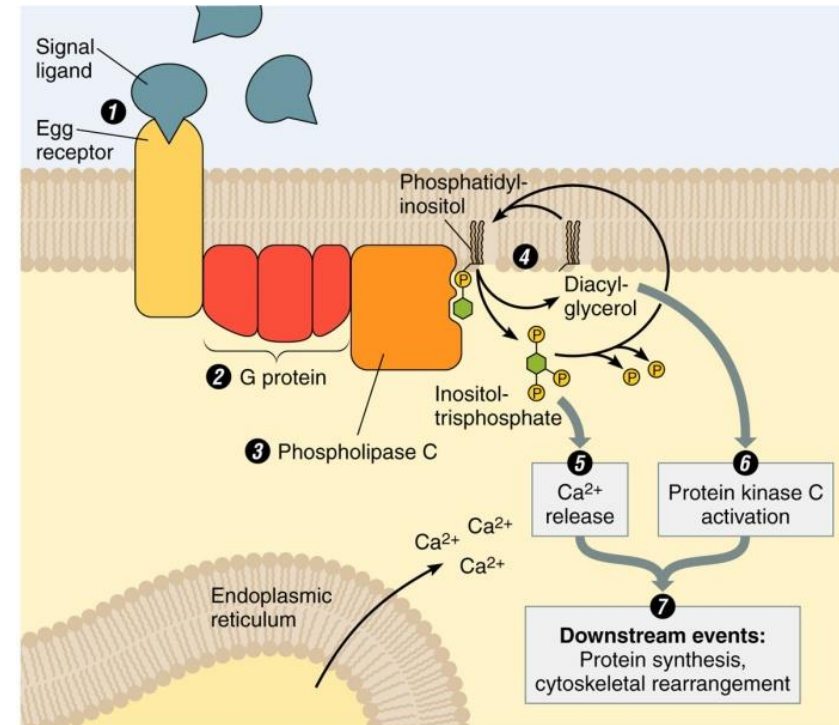
Význam PI

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

PI a přenos signálu

PI a přenos signálu

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



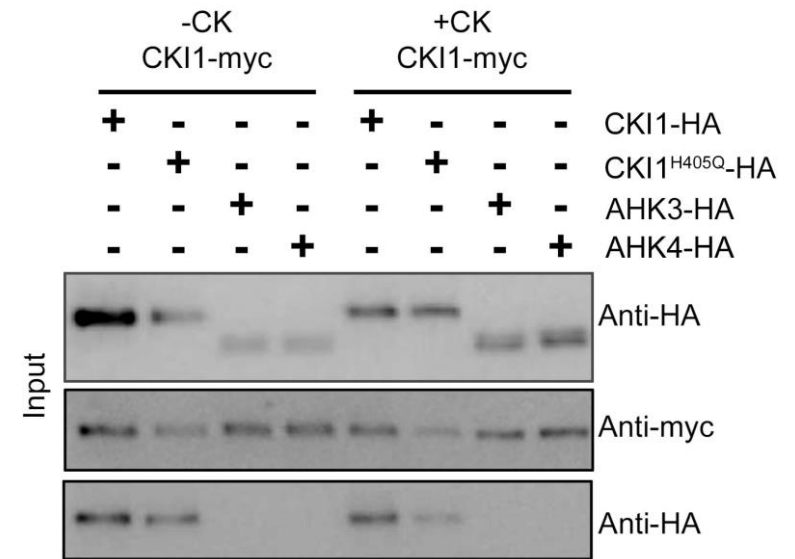
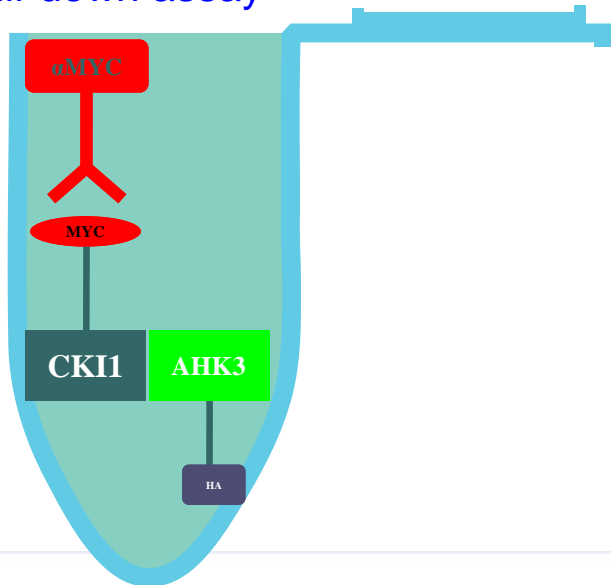
Osnova

- 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

PI *in vivo*

Koimmunoprecipitace

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



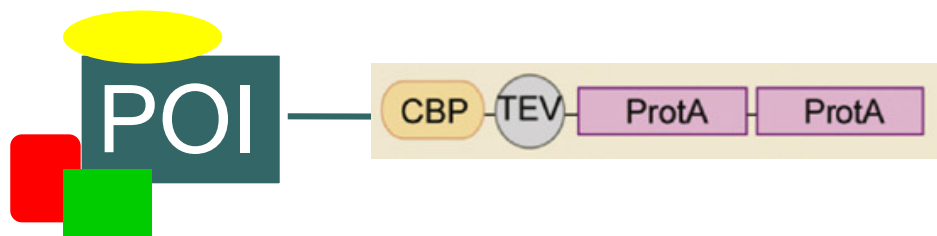
Osnova

- 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)

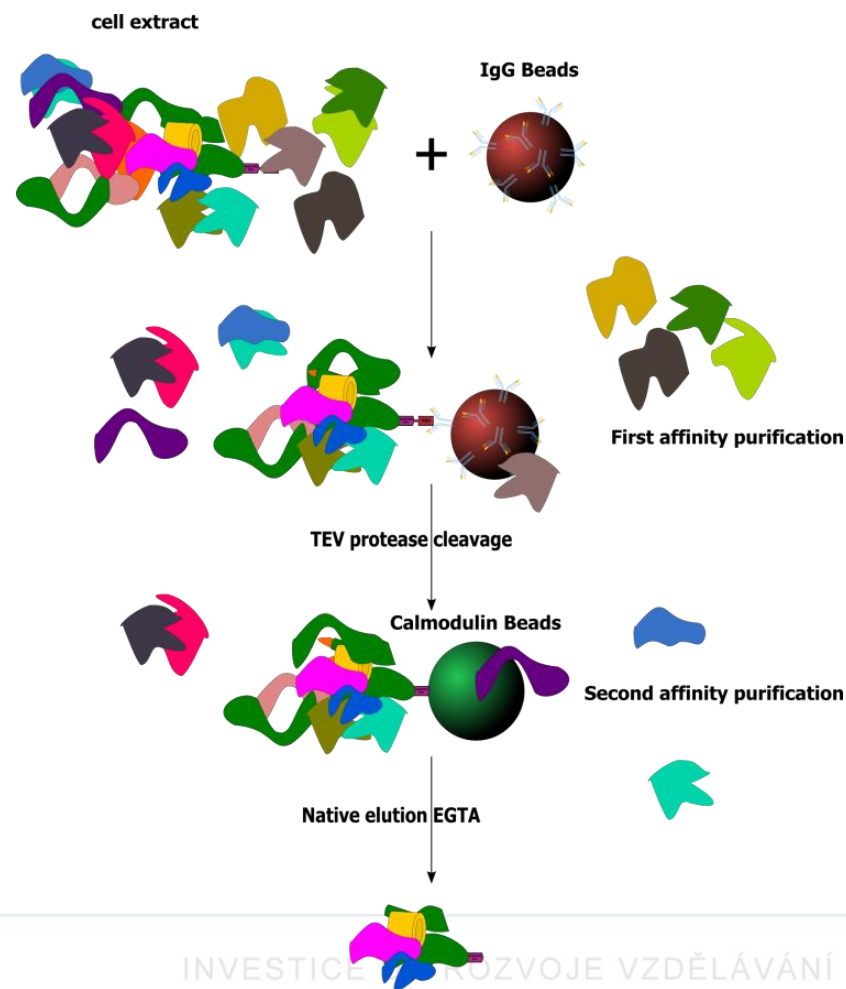
PI *in vivo*

Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

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



- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vazací 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



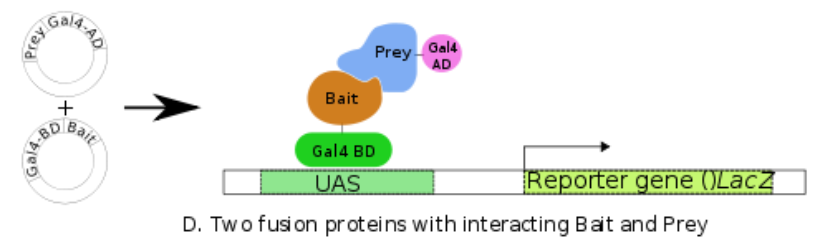
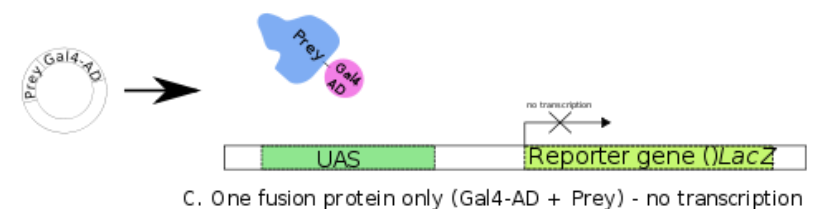
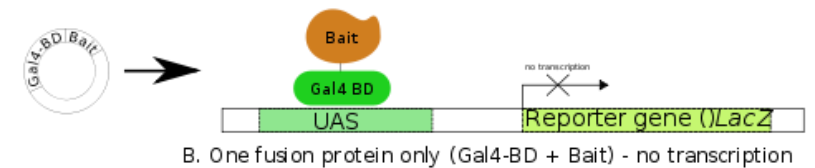
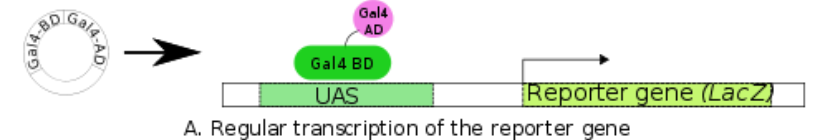
Osnova

- 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)

PI *in vivo*

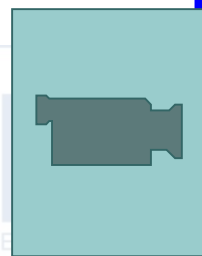
Dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



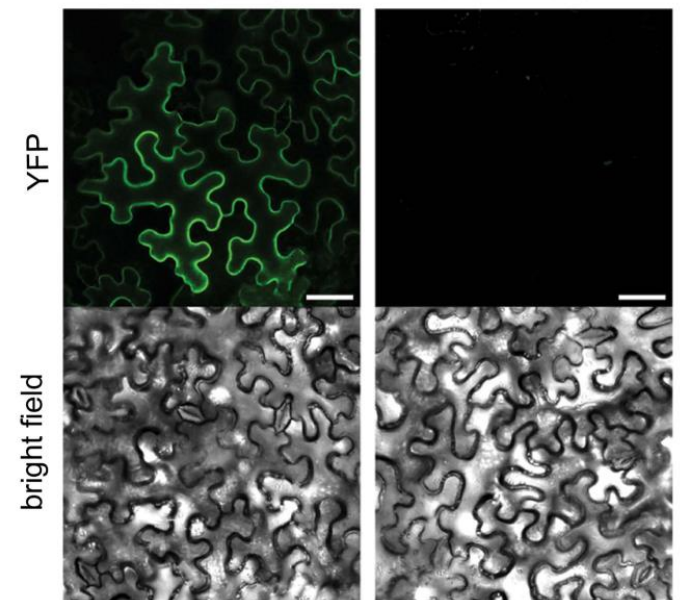
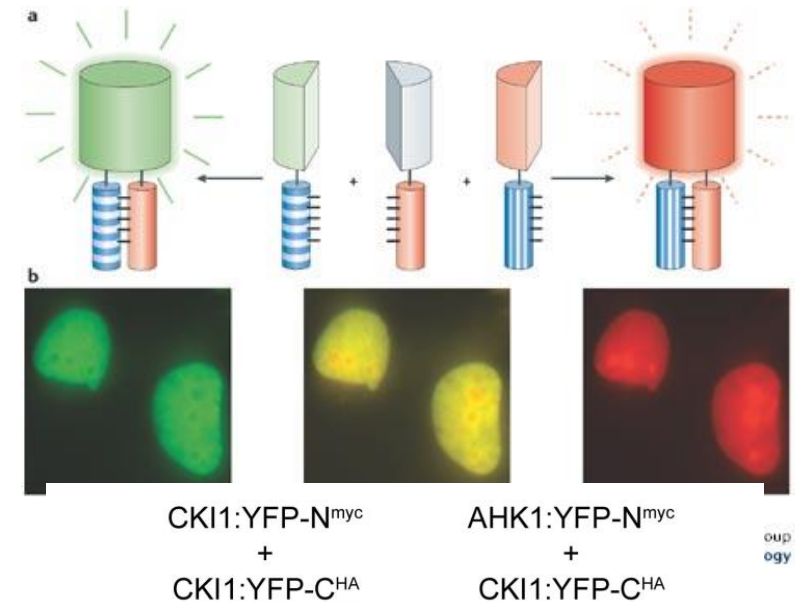
Osnova

- 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)

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

- 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)

PI *in vivo*

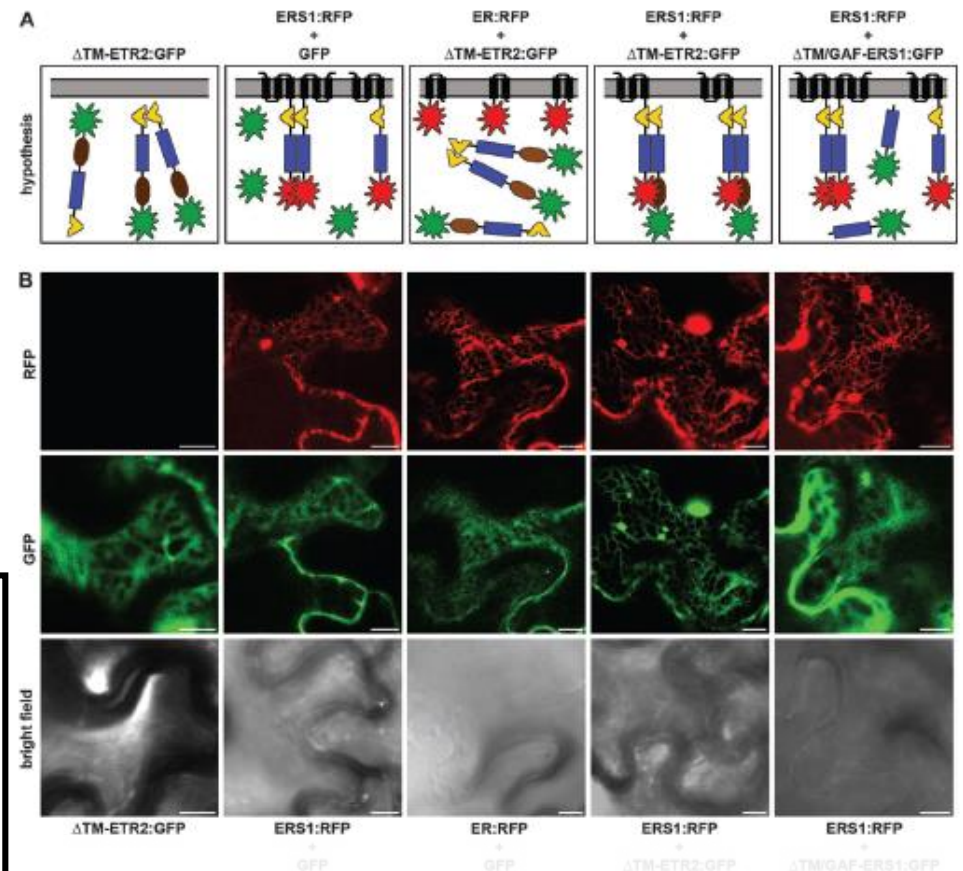
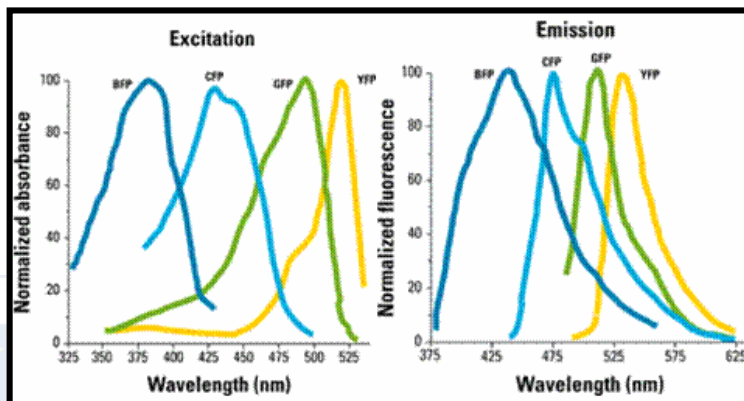
Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny

membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

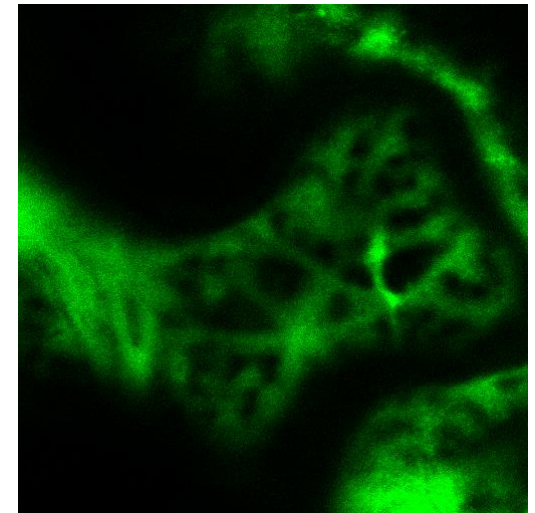
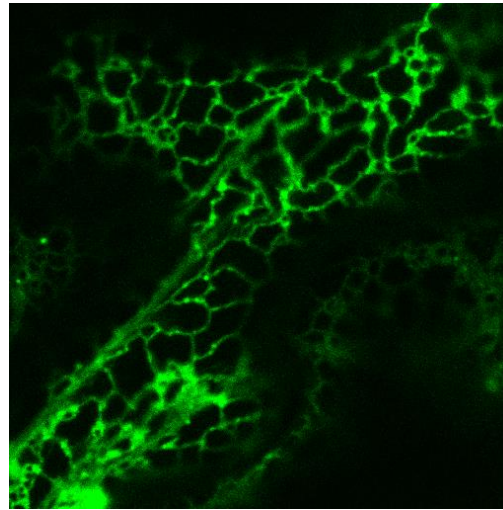
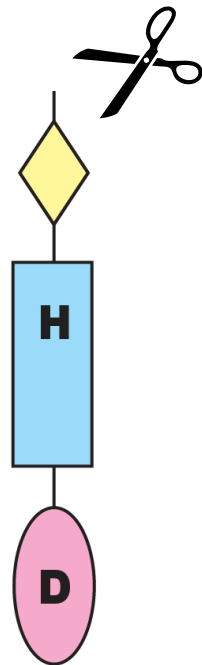
potenciální ineterakční partner je fúzován s jímým fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem

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



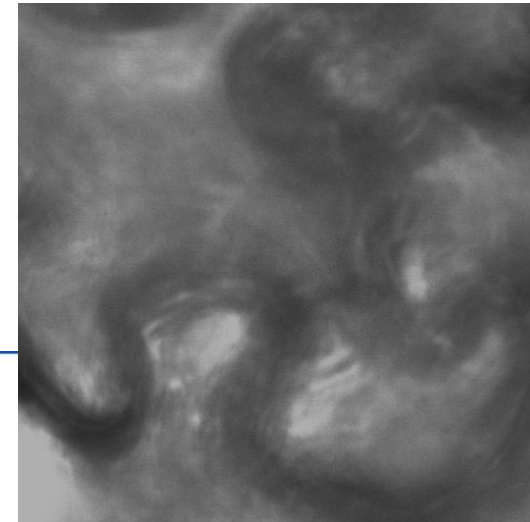
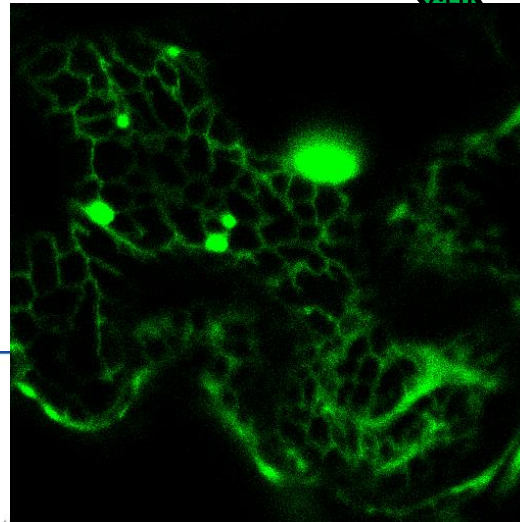
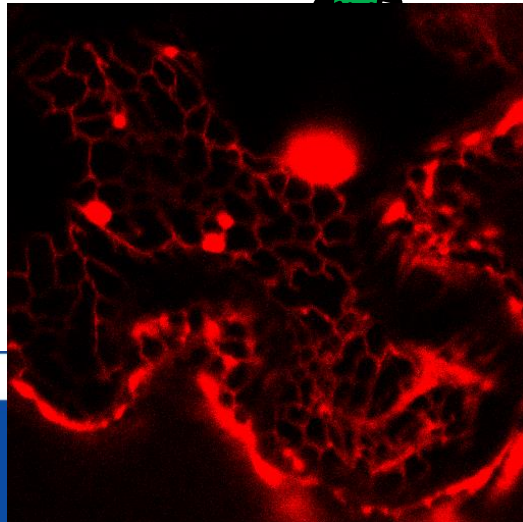
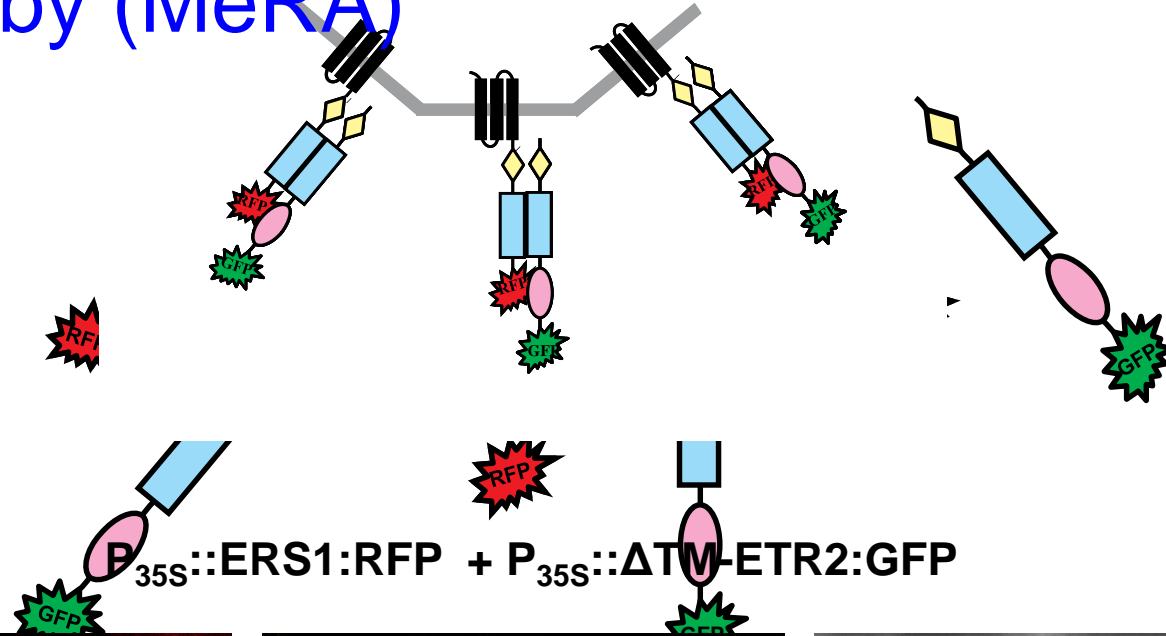
PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

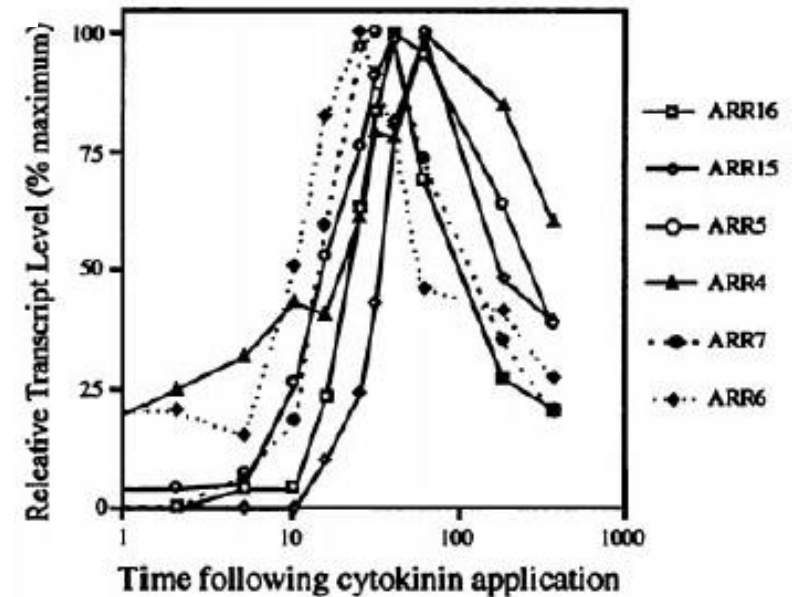
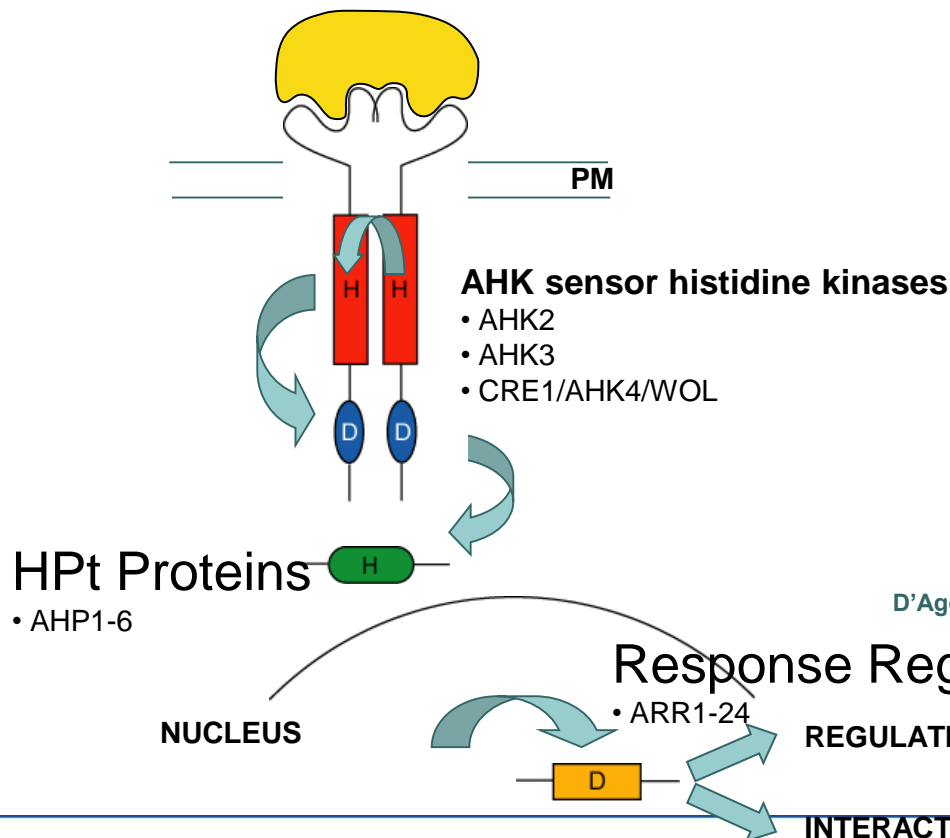


Osnova

- 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*

Signal Transduction via MSP

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

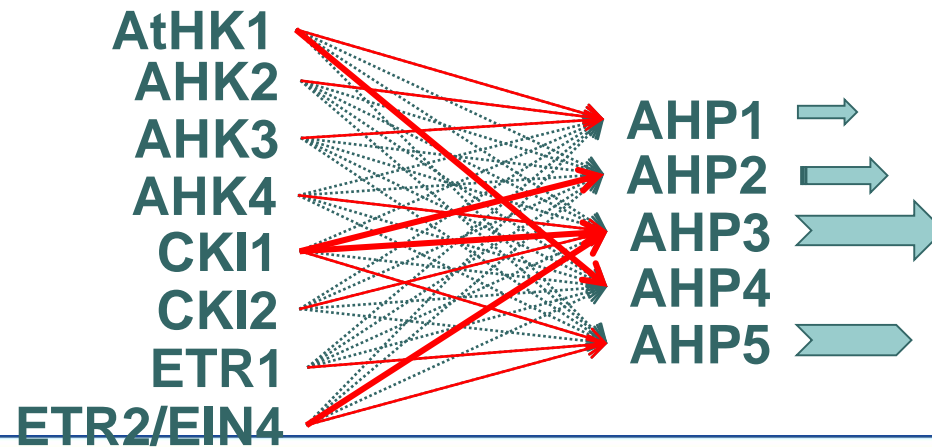
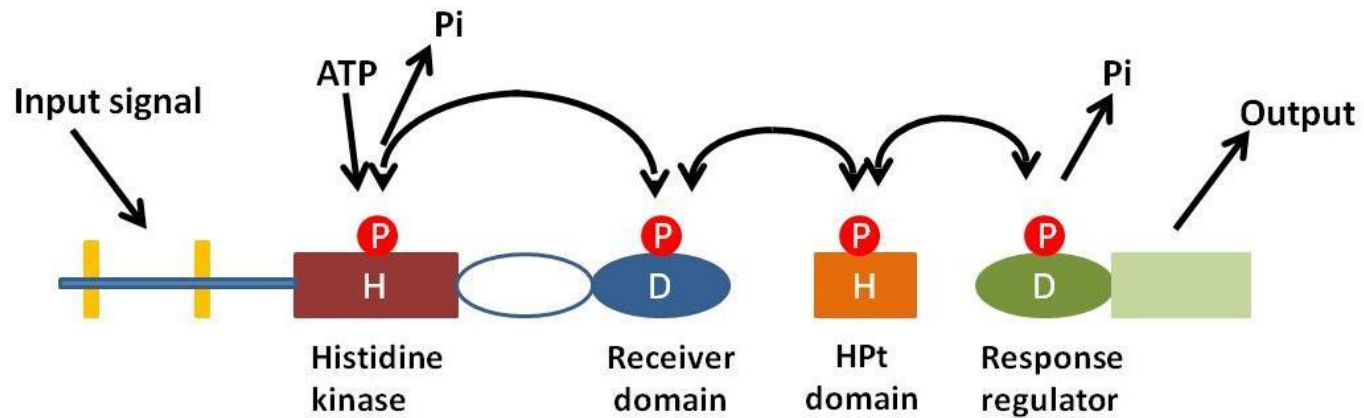


D'Agostino et al., Plant Phys, 2000

CK primary response genes
- Type-A ARR expression

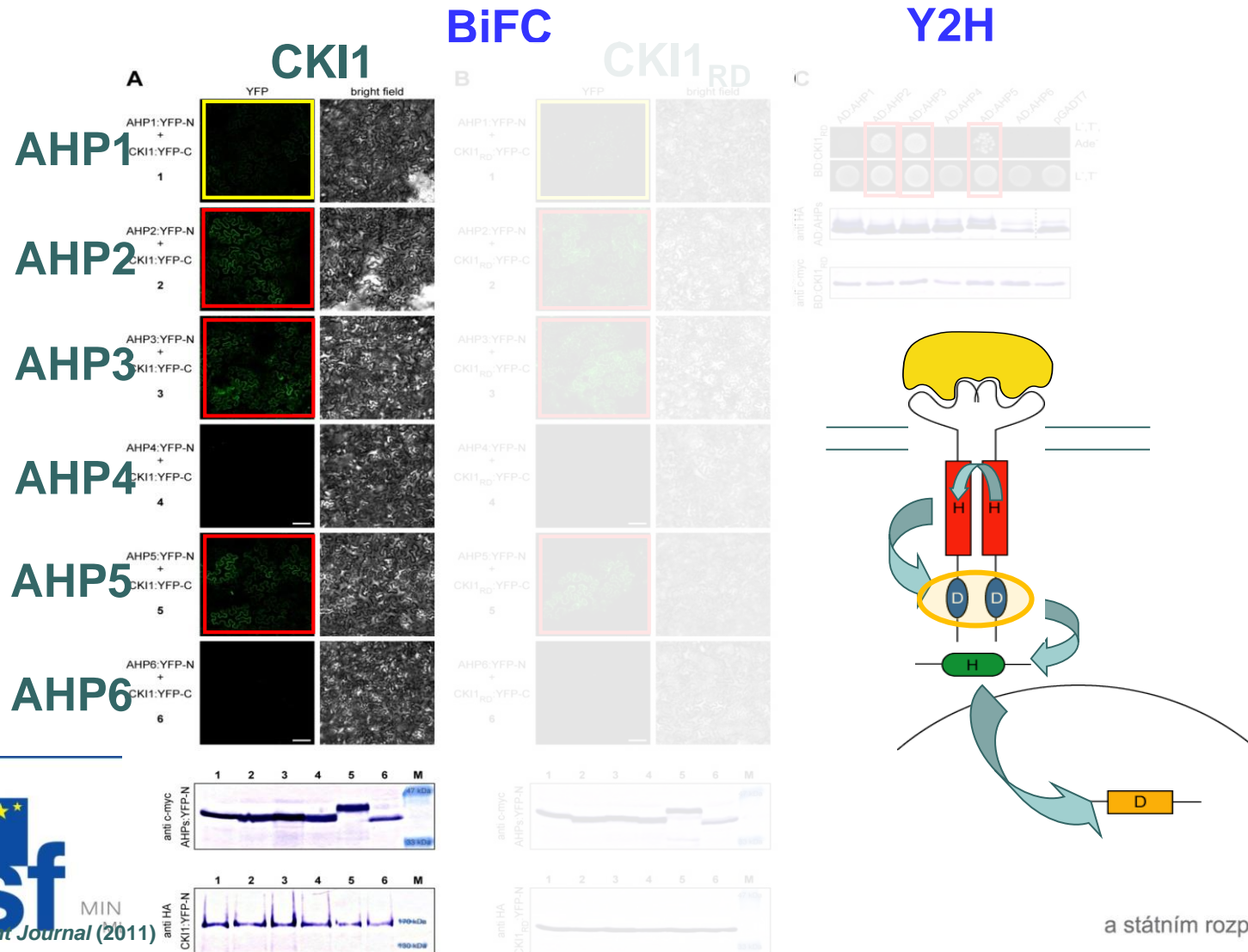
Is there any specificity in plant MSP?

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



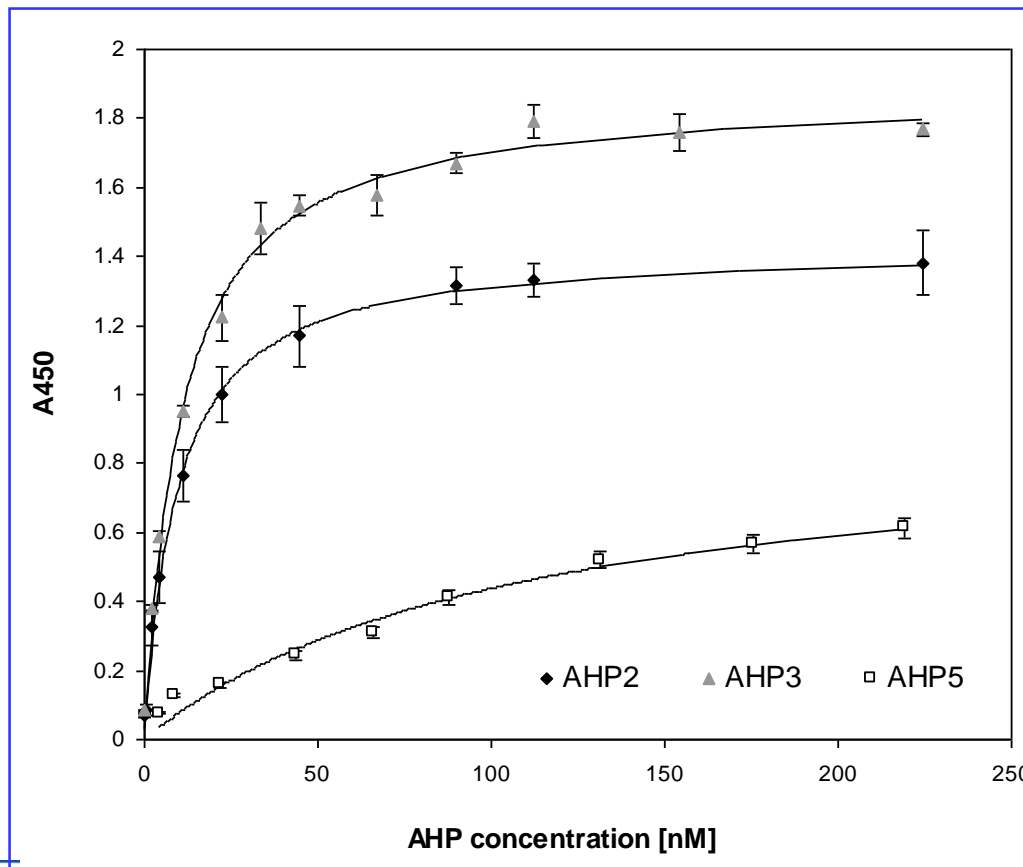
Specificity of CKI1 signalling

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



Specificity of CKI1 Signalling

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



AHP3: $K_d \sim 10,5$ nM

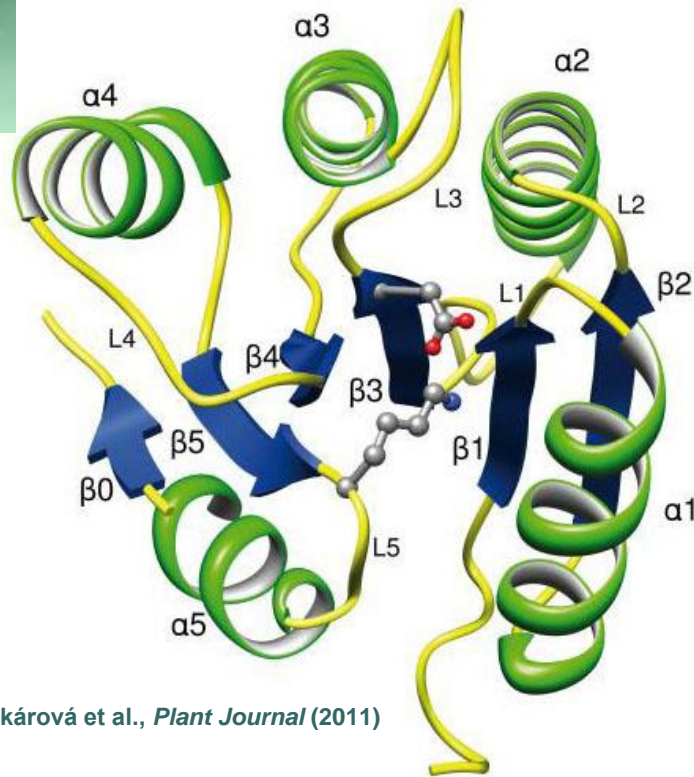
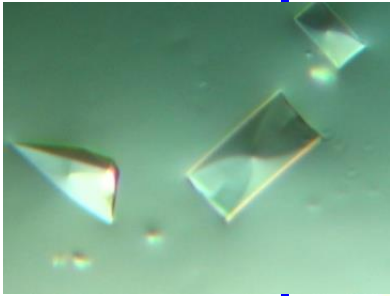
AHP2: $K_d \sim 9,17$ nM

AHP5: $K_d \sim 108$ nM

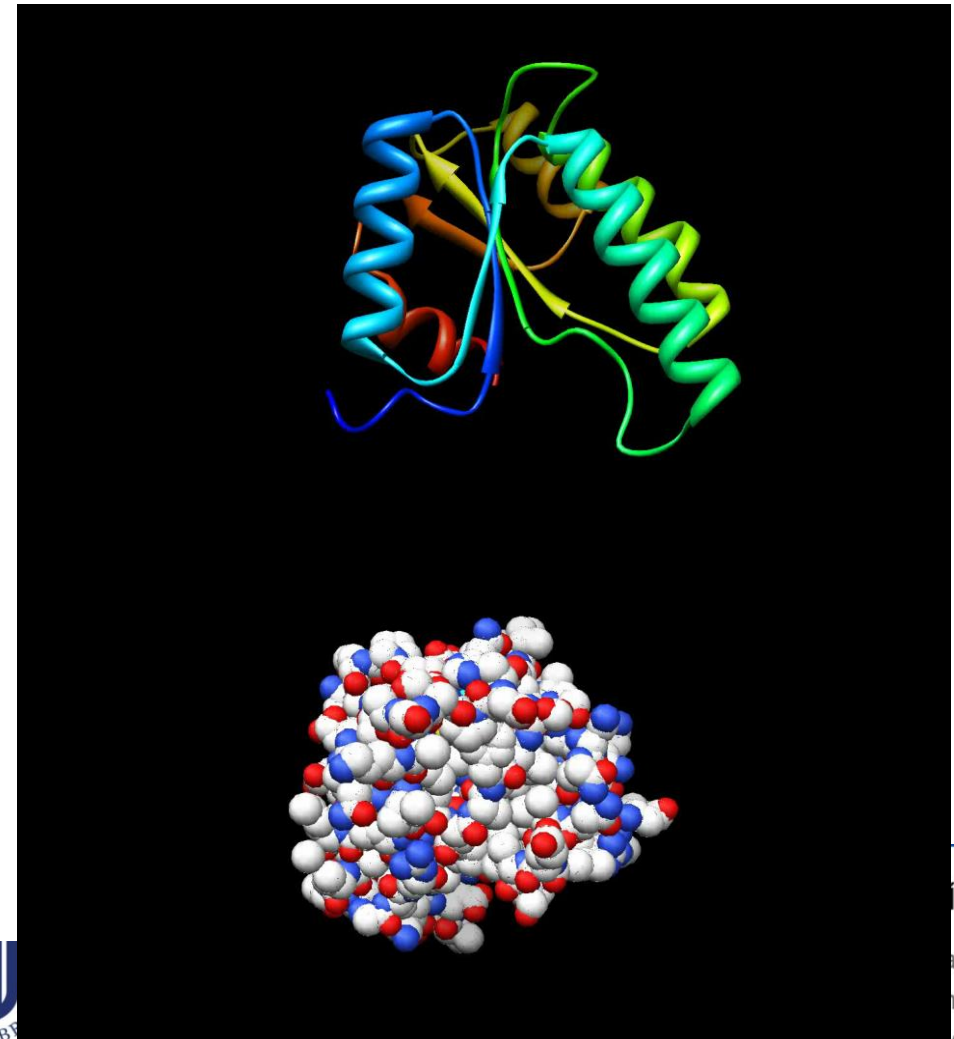
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

Structure of CKI1_{RD}

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

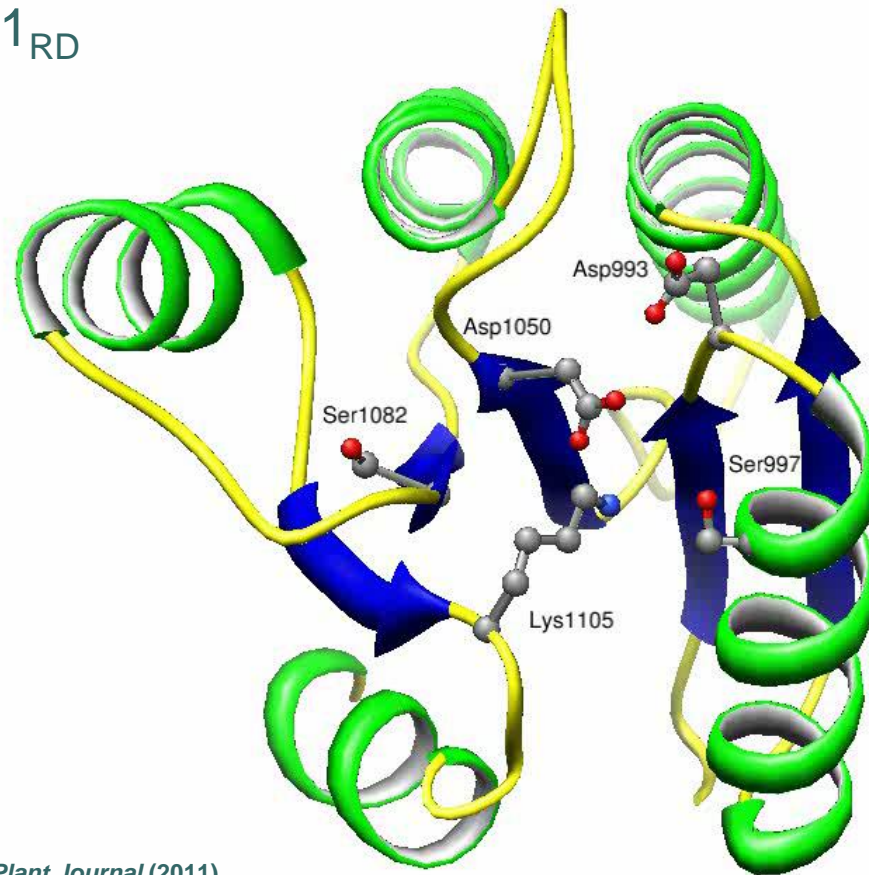


Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)



Dynamics of CKI1_{RD}

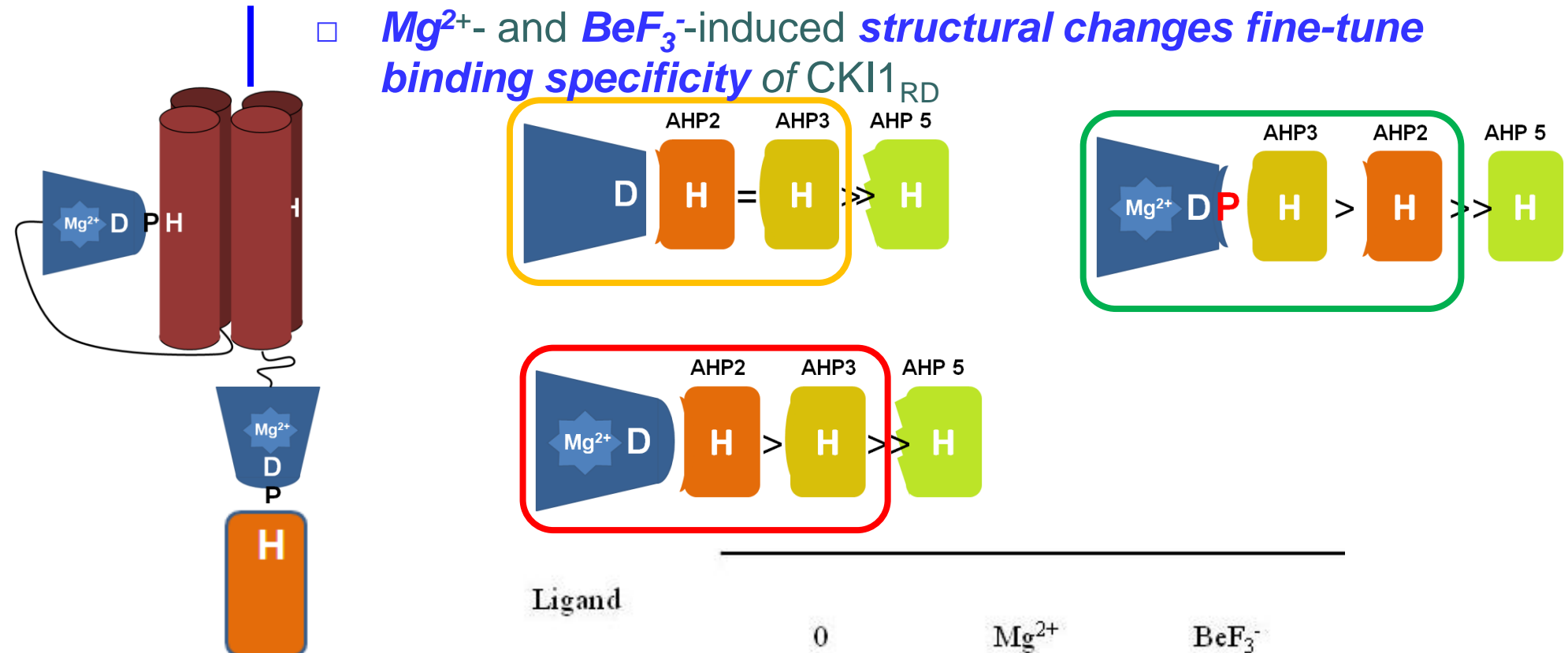
- *Mg²⁺ binding* leads to *remodelling of active centre* of CKI1_{RD}



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 |

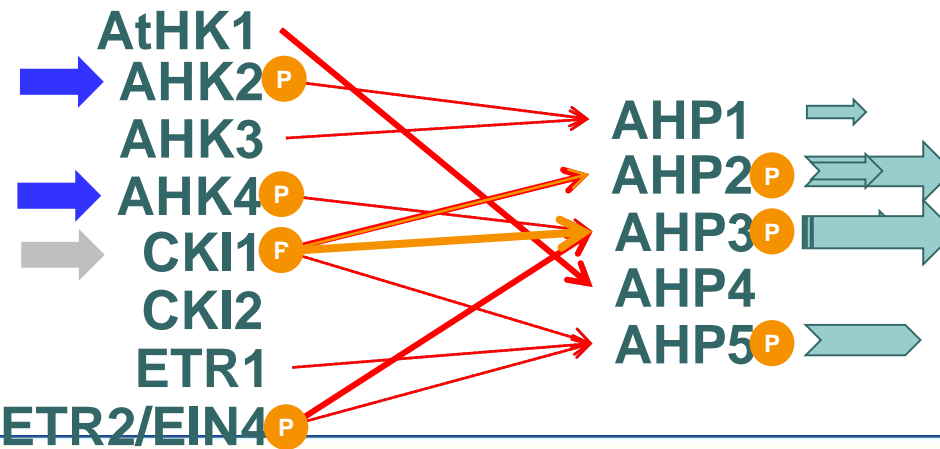
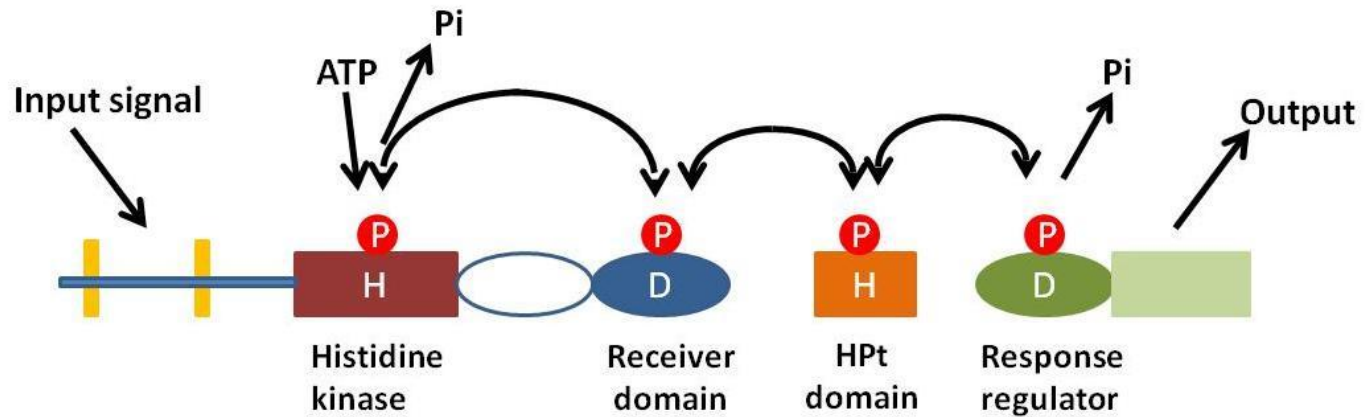
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)



ÁVÁNÍ
incována
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