

# 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](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://www.ceitec.muni.cz)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Genomika 06

## ■ Zdrojová literatura

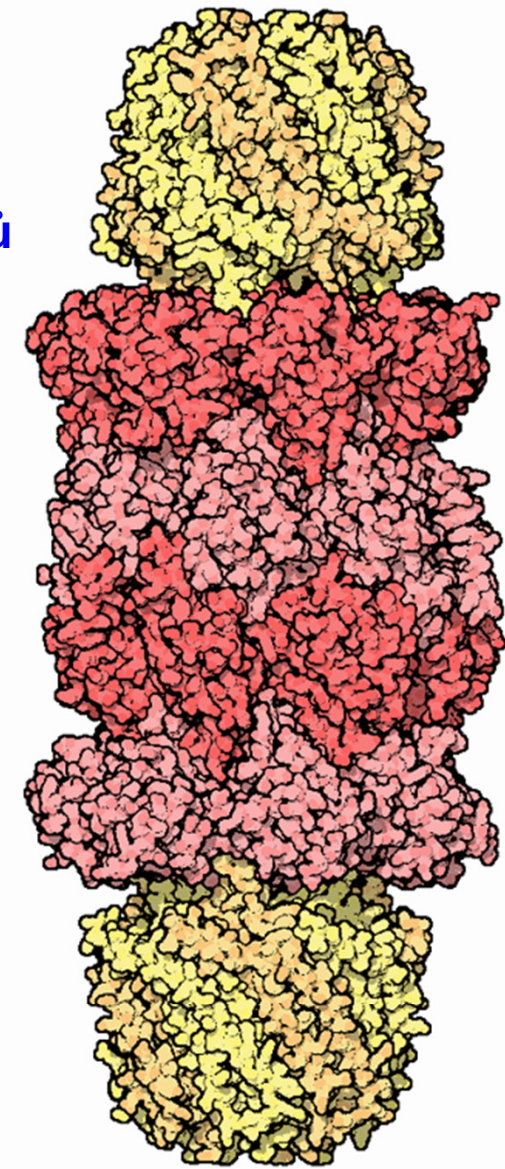
- Wilt, F.H., and Hake, S. (2004). **Principles of Developmental Biology**. (New York ; London: W. W. Norton).
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes.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

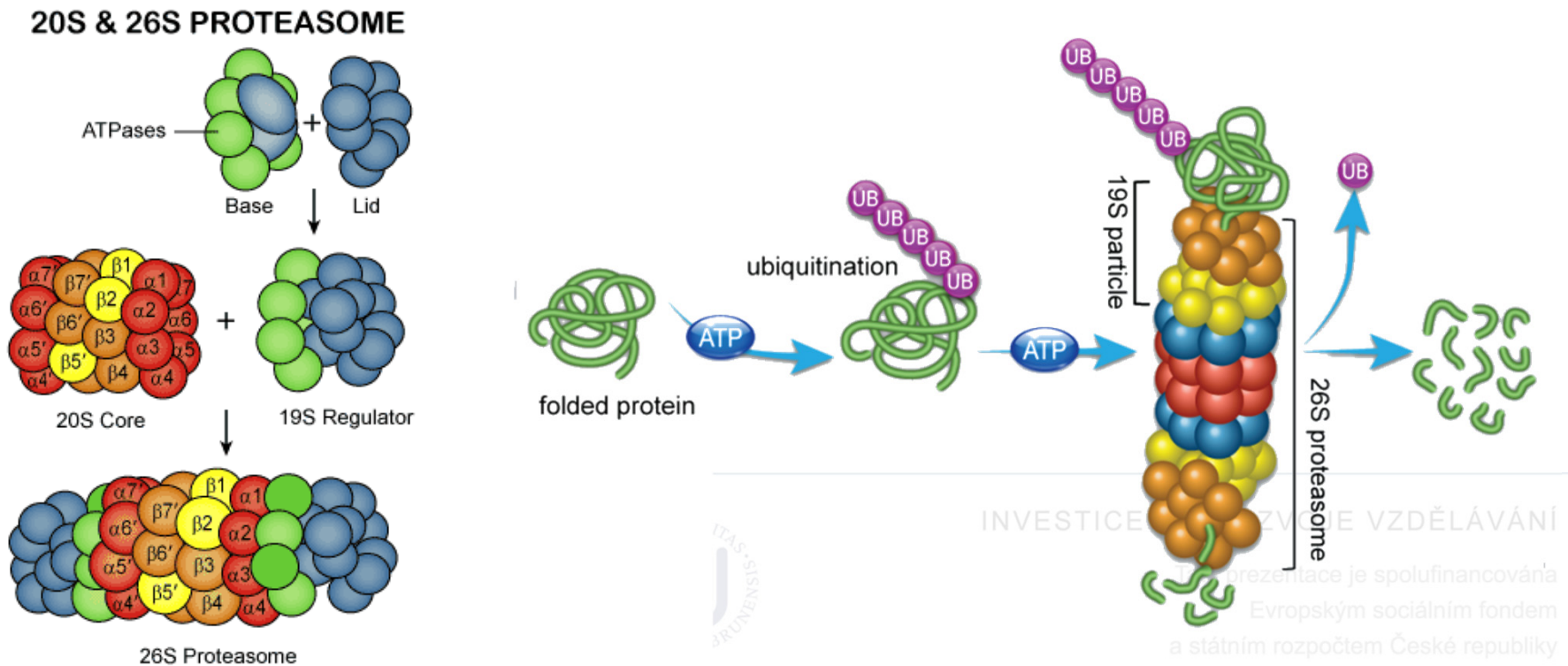




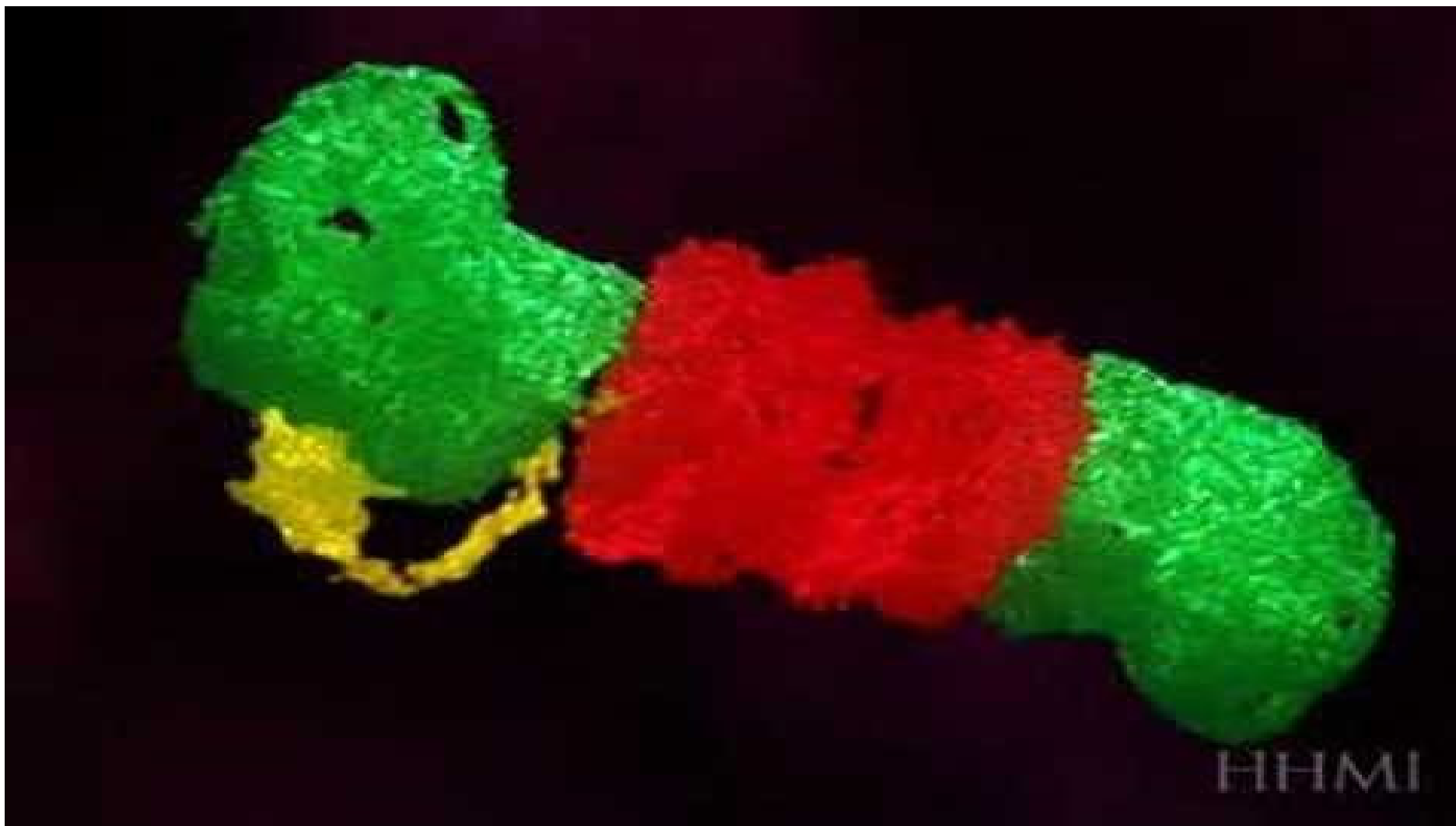
# Význam interakcí proteinů

## 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) - ubiquitinem



# Proteasome – řízená proteolýza

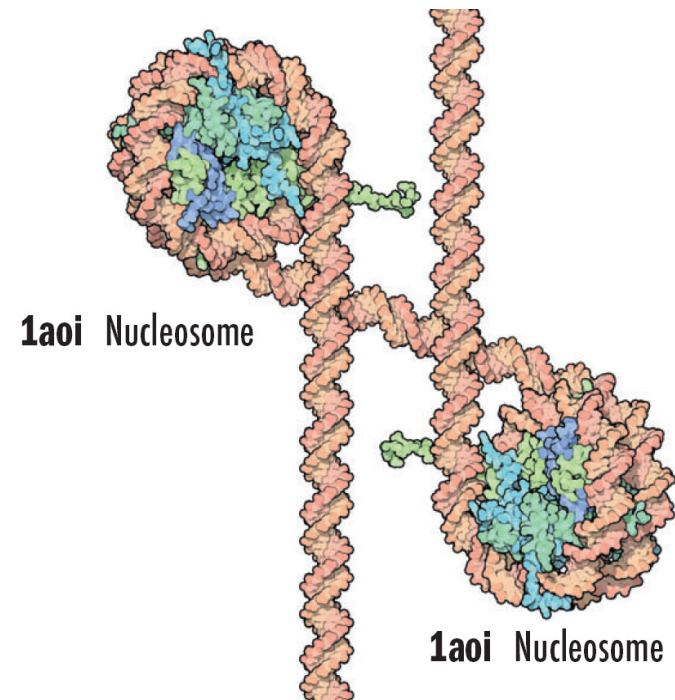


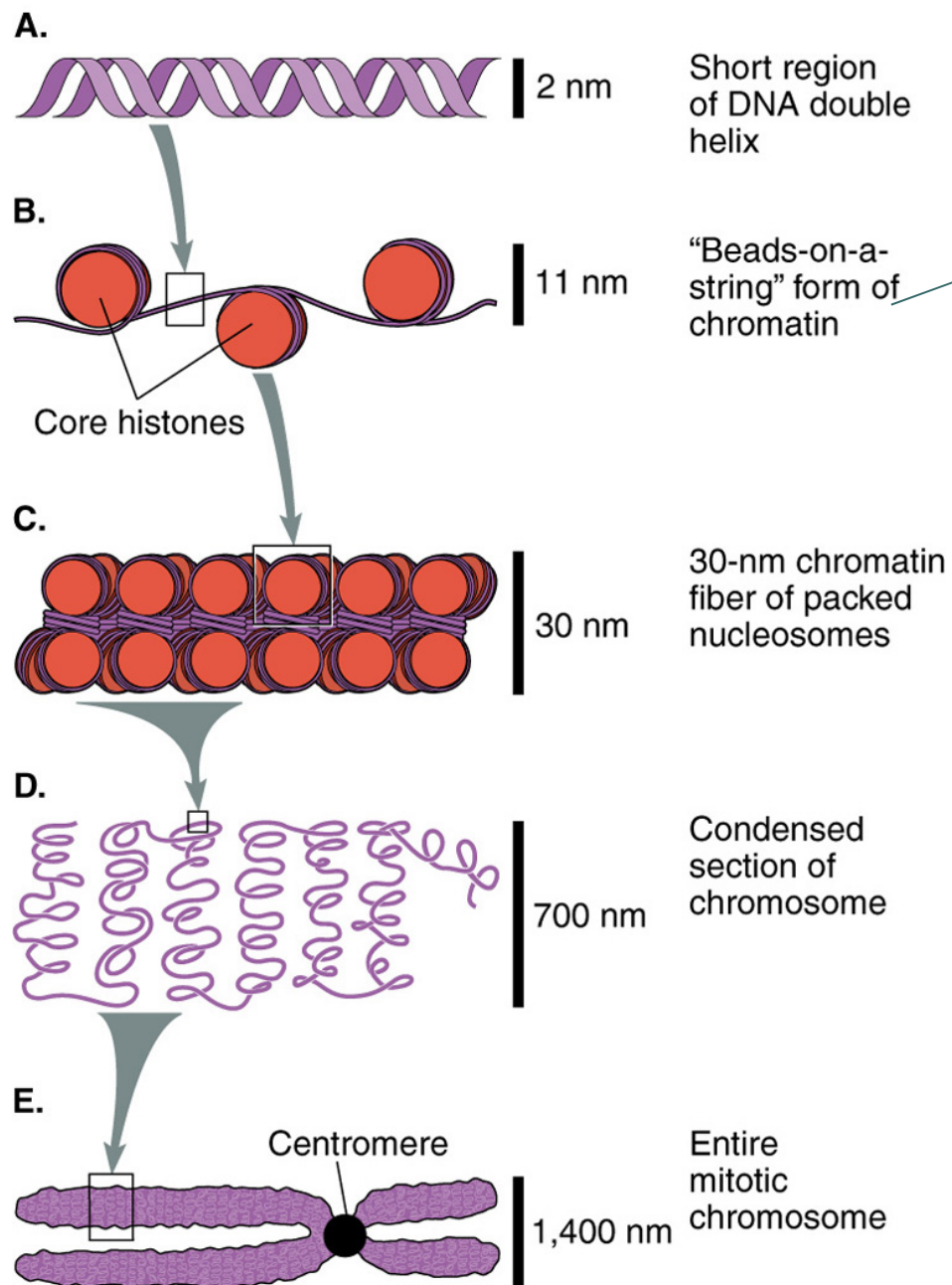
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Význam PI

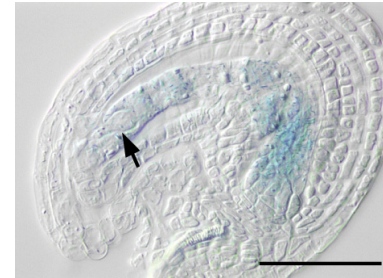
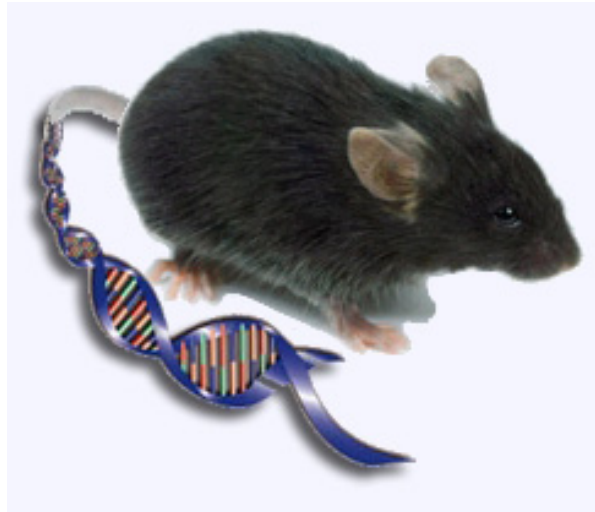
- Funkční význam specifických interakcí proteinů
  - Struktura chromatinu





Regulation by **histone acetyl transferases** or **histone deacteylases**

# 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**



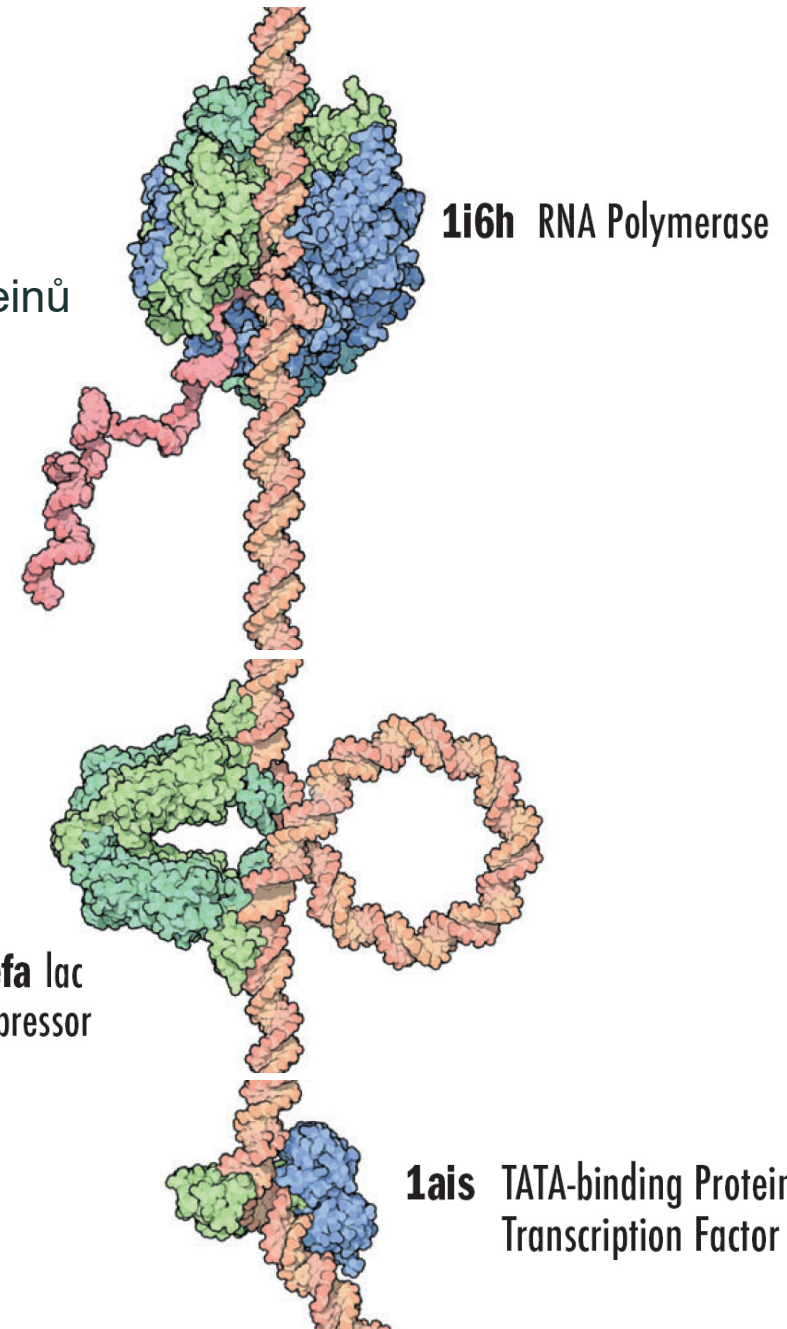
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Význam PI

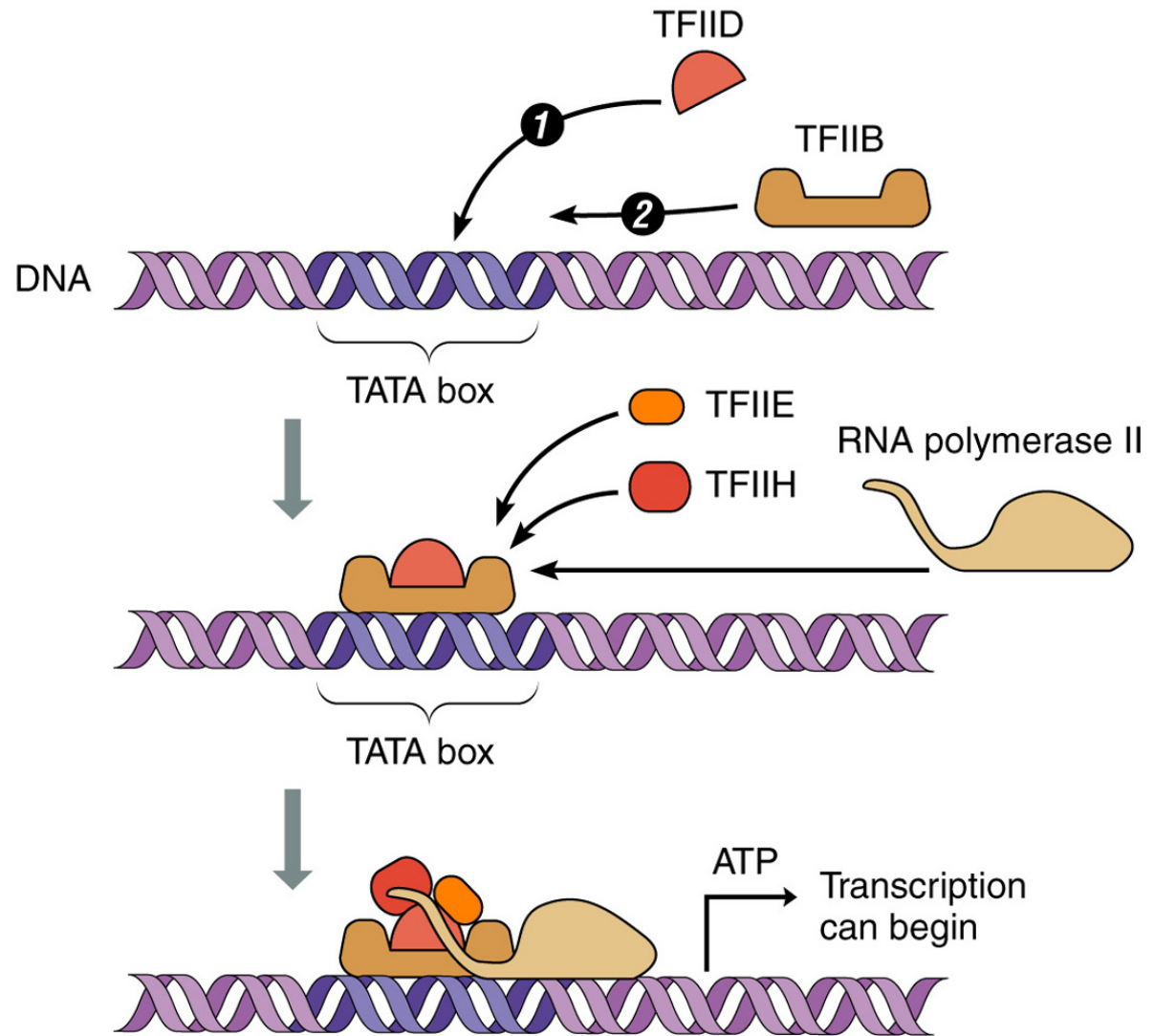
- Funkční význam specifických interakcí proteinů
  - Struktura chromatinu
  - Regulace transkripce



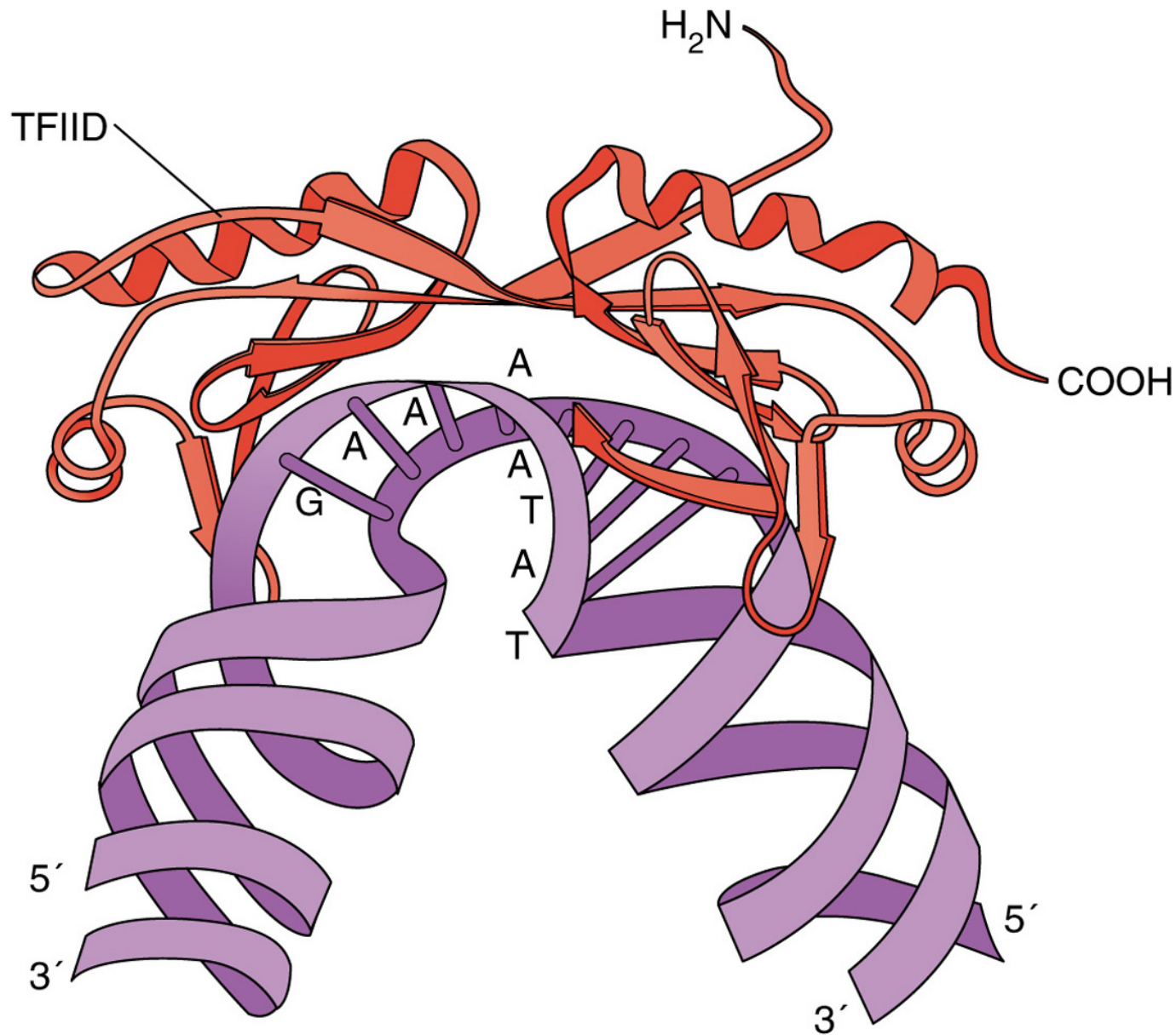


# Iniciace Transkripce

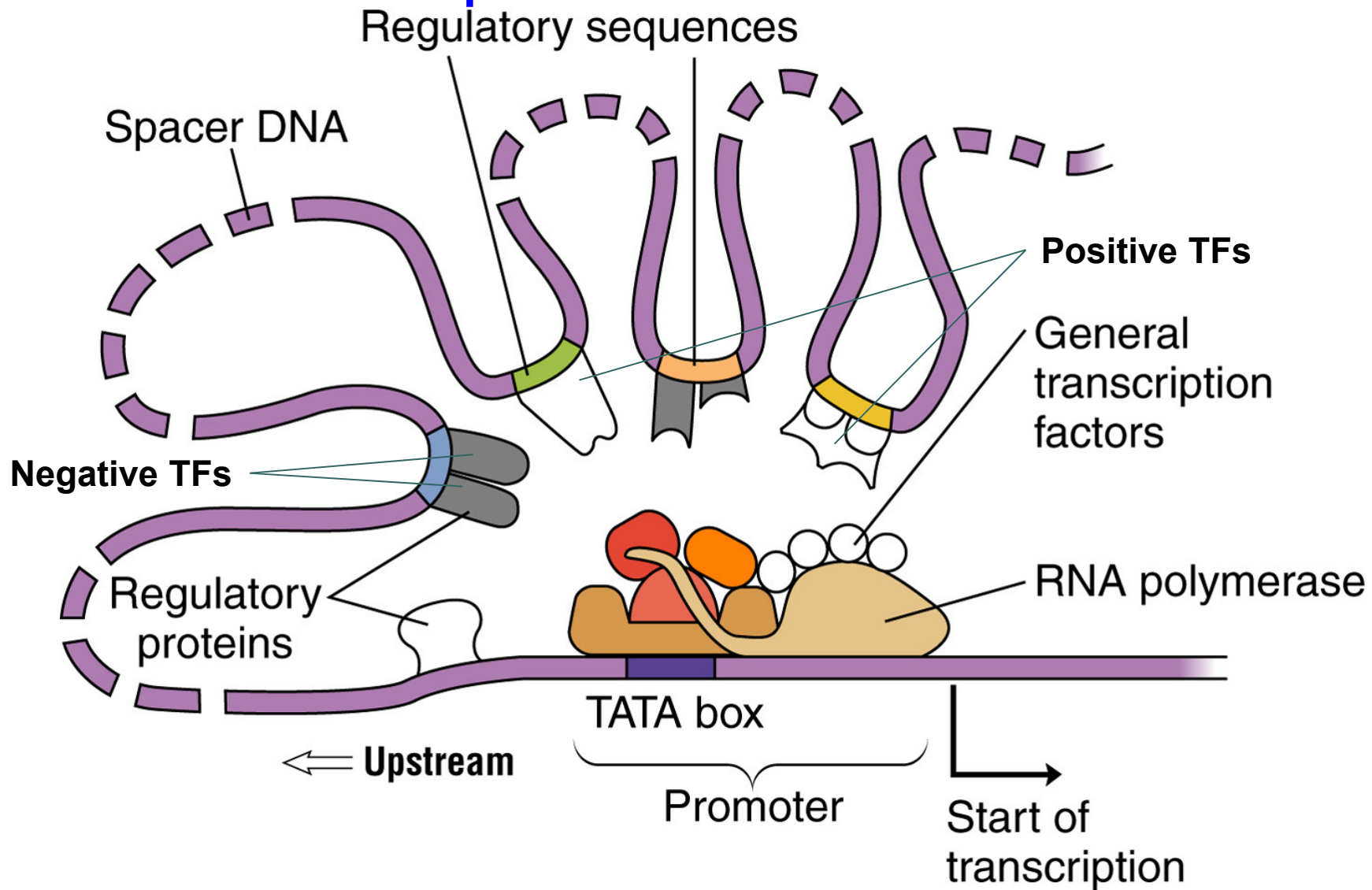
A.



B.



# Iniciace Transkripce



# Transcriční regulace prostřednictvím TAFs

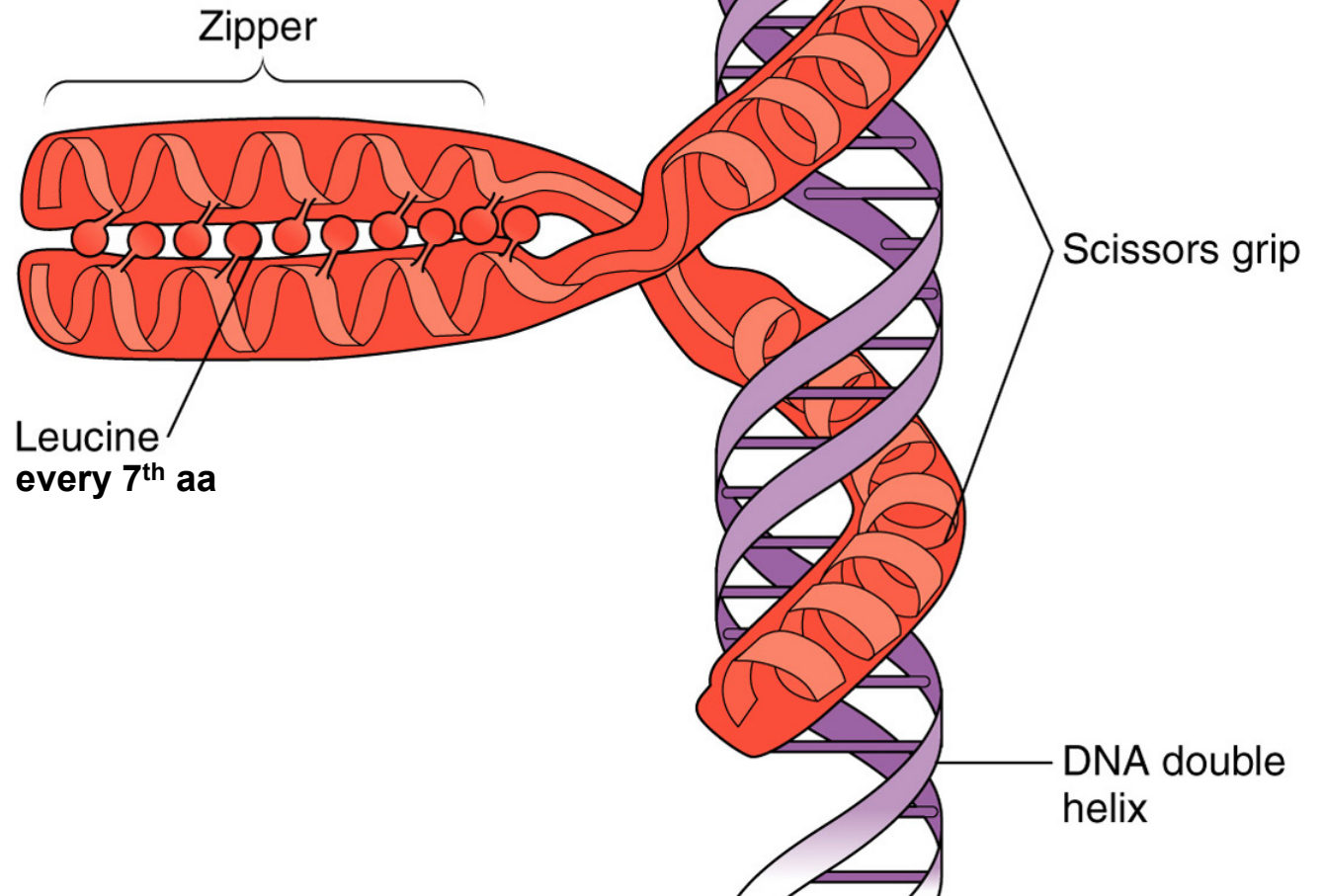
Signal recognition



Dimerization



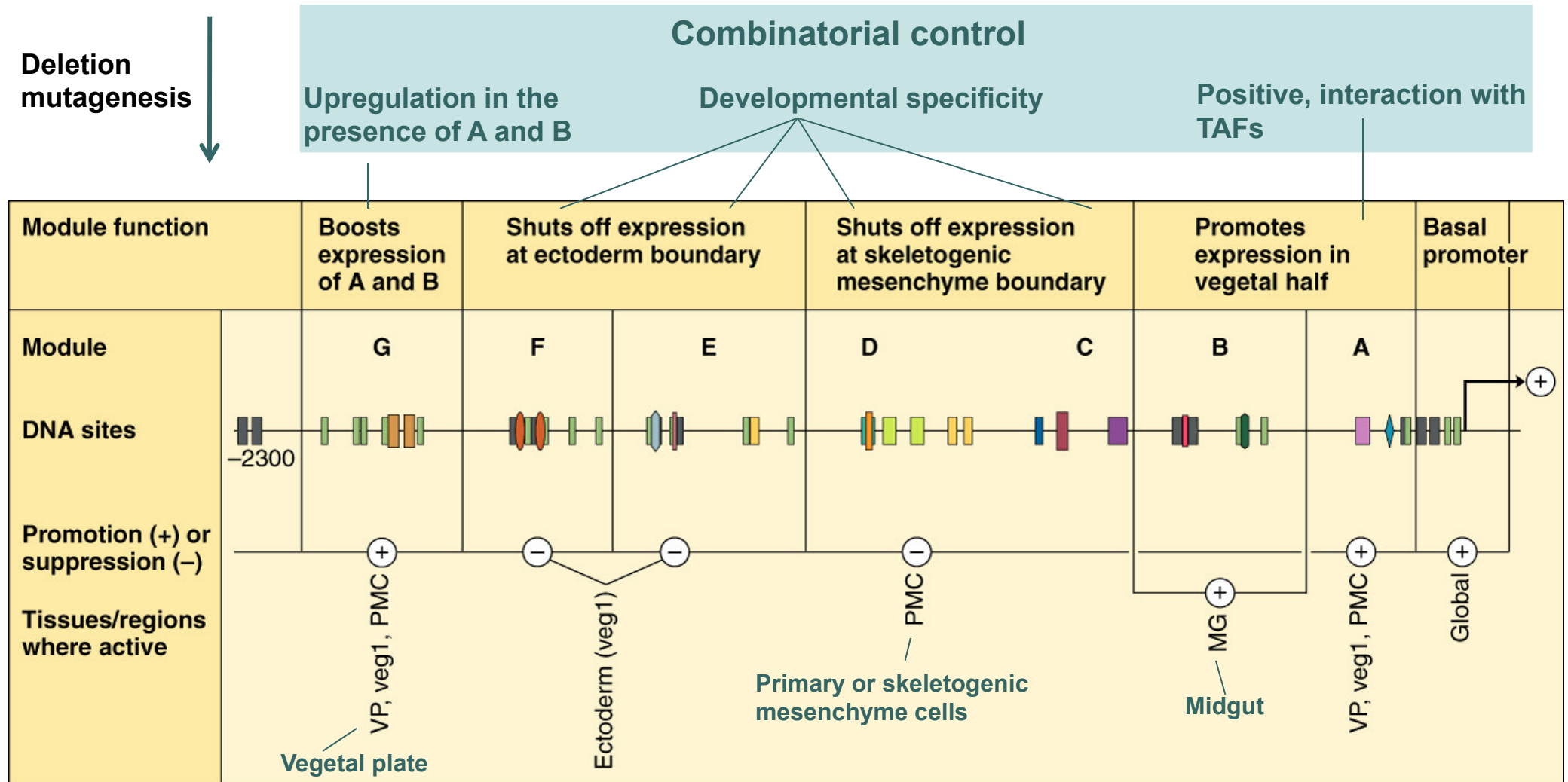
DNA binding and transcription activation





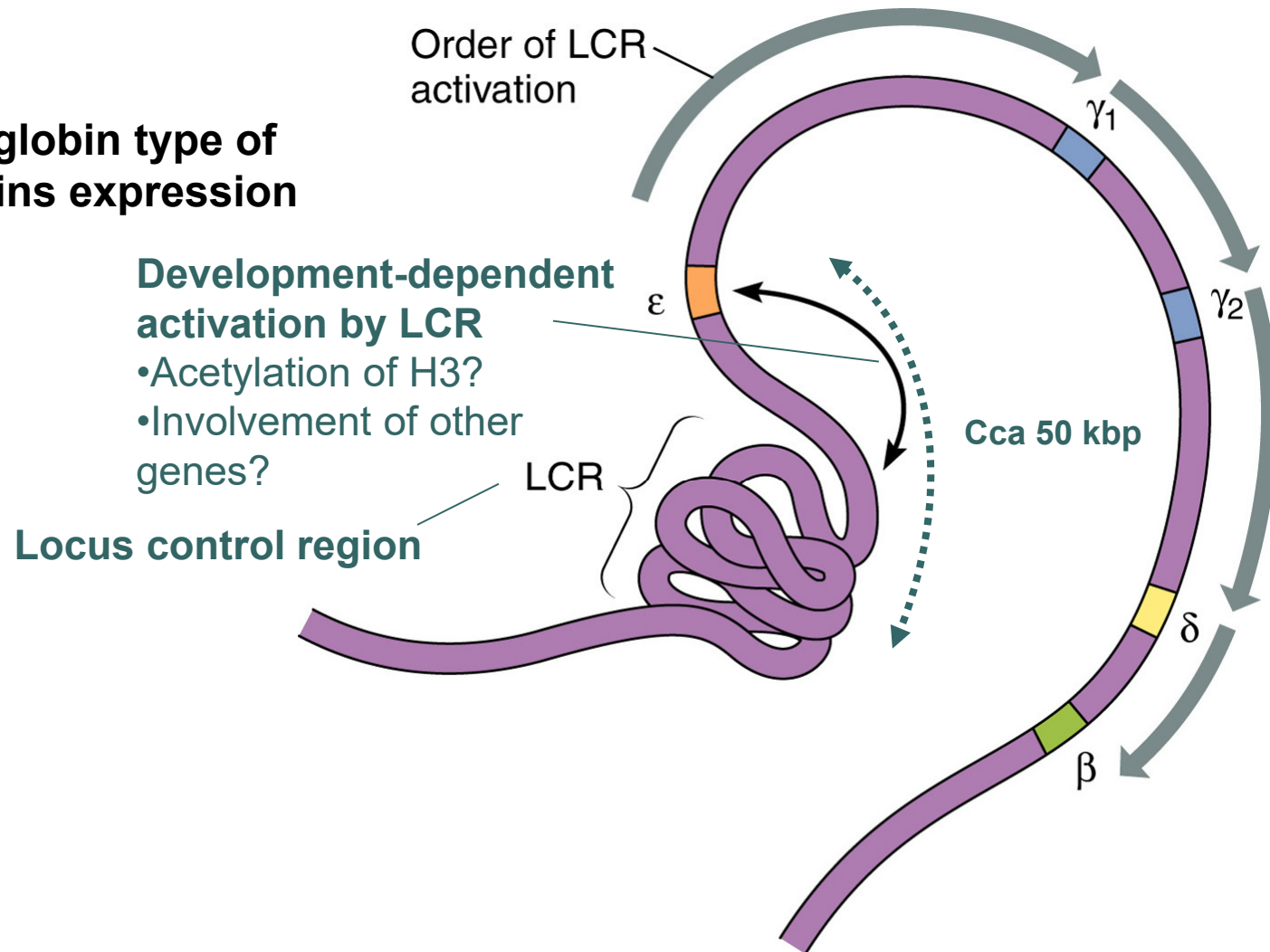
# Multifaktoriální kontrola promotorů

*ProENDO16:REPORTER* (sea urchin)



# Multifaktoriální kontrola promotorů

## Regulation of $\beta$ -globin type of hemoglobin chains expression



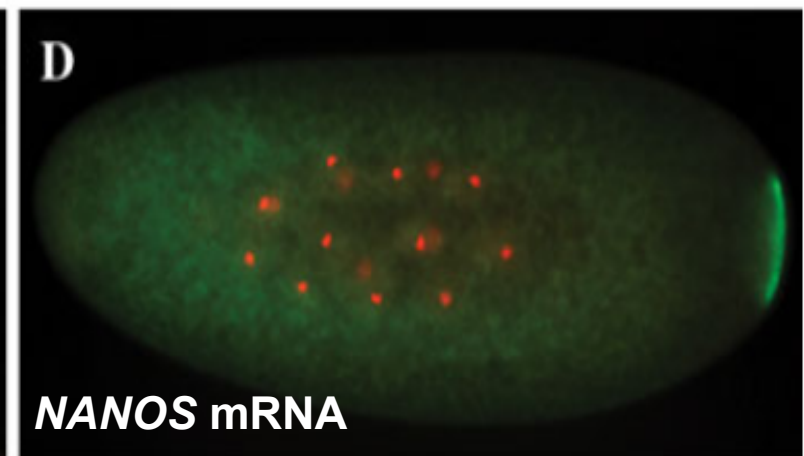
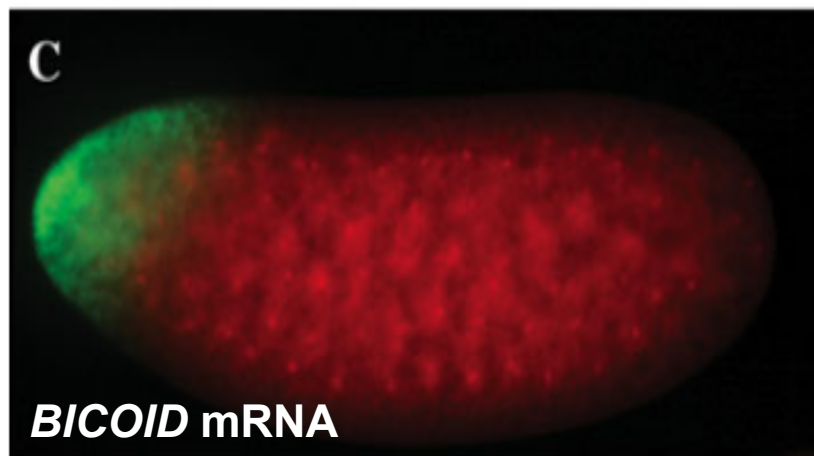
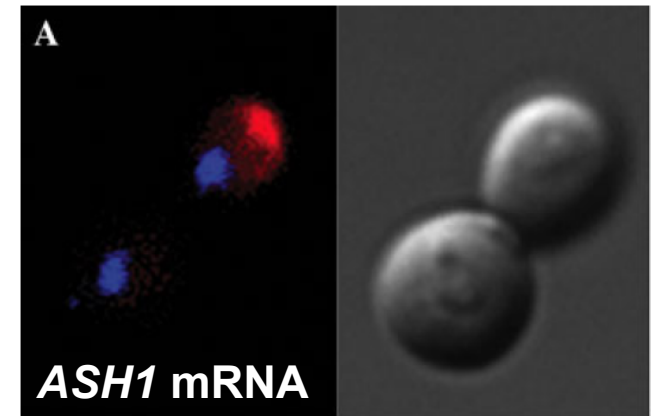


# Význam PI

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

# Lokalizace mRNA

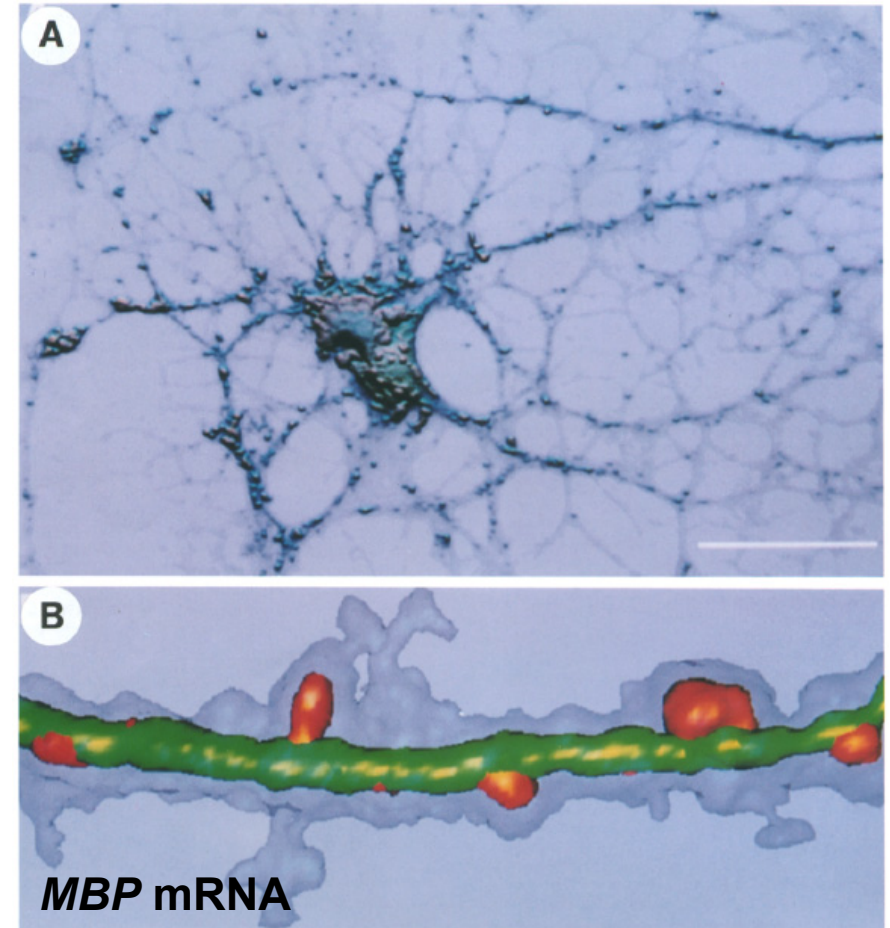
- Význam lokalizace mRNA
  - Lokalizace proteinového produktu genu v čase a místě
    - asymetrické dělení během vývoje
    - polarizace embrya



Shahbadian and Chartrand, 2012

# Lokalizace mRNA

- **Role lokalizace mRNA**
  - Omezení exprese potenciálně toxických proteinů
    - lokalizace exprese mRNA pro **MYELIN BASIC PROTEIN (MBP)** do oblasti myelinizace nervových buněk

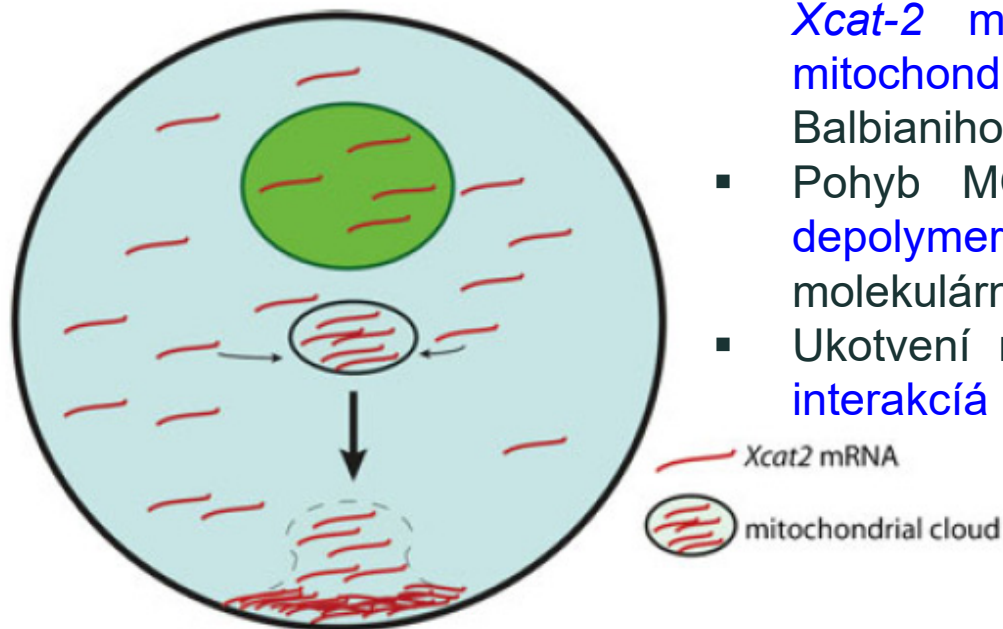


Ainger et al., 1993

# 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

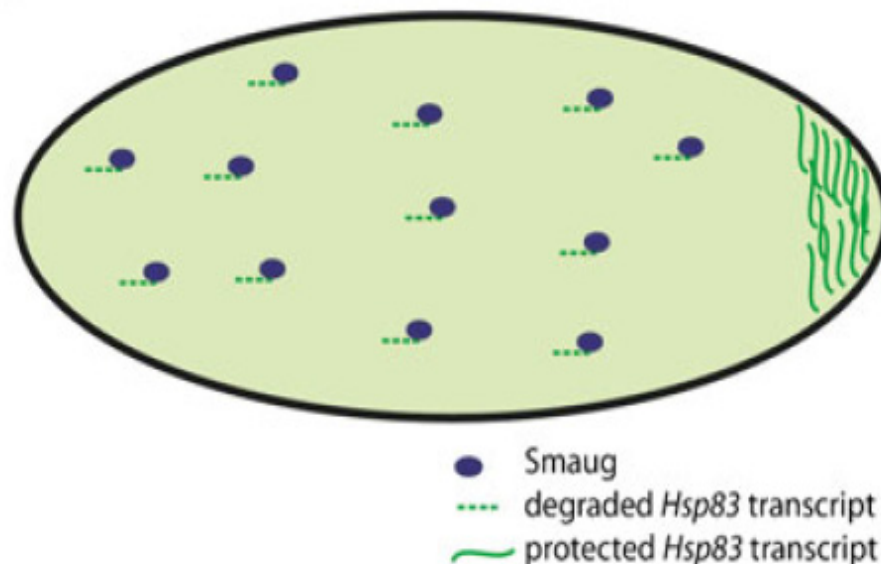
# Lokalizace mRNA

## Mechanismy

Shahbadian and Chartrand, 2012

### ▪ Lokalizovaná degradace mRNA

- V embryogenezi u *Drosophila m.* dochází k **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

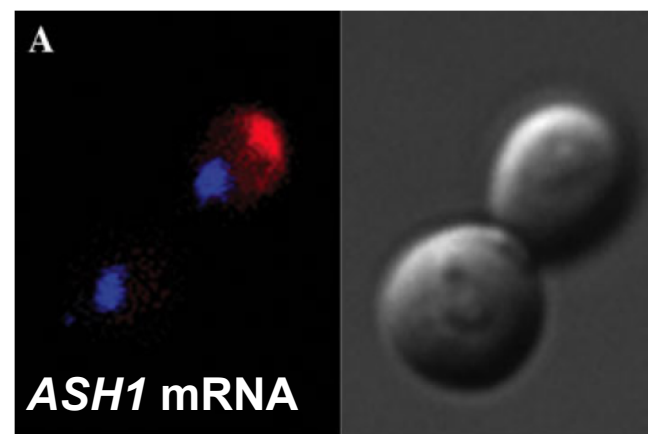
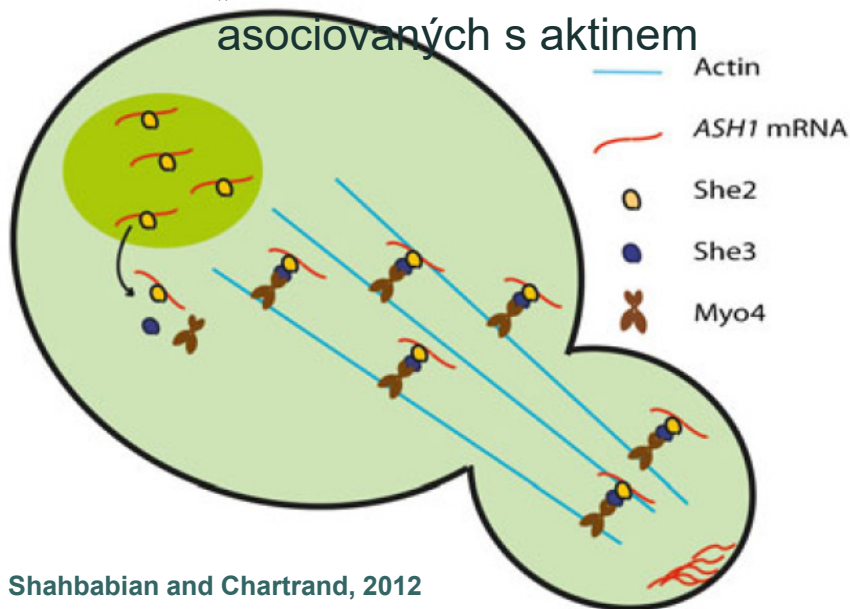




# Lokalizace mRNA

## Mechanismy

- **Aktivní transport mRNA**
  - Asymmetric Synthesis of HO1 (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

- *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



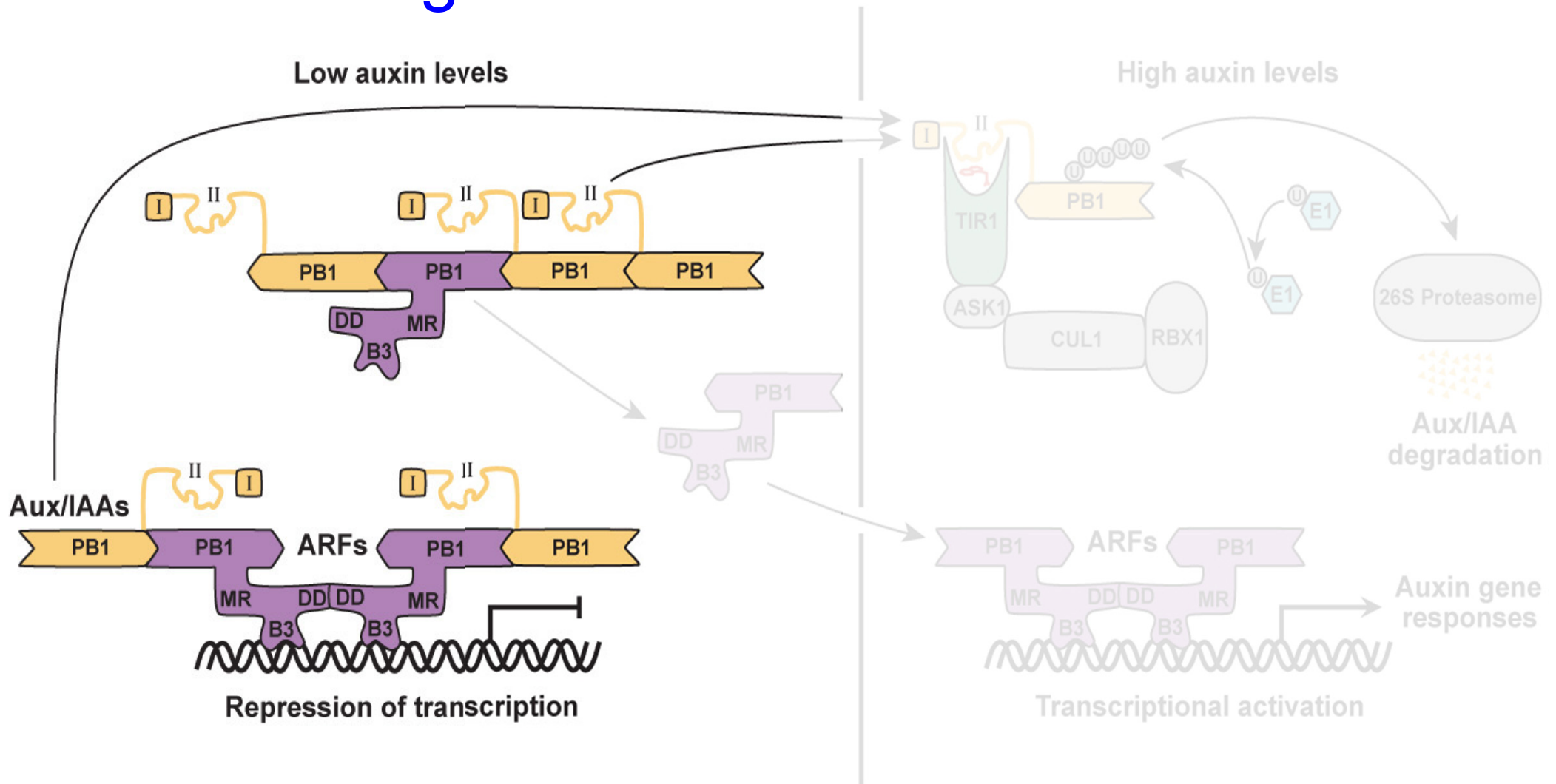
# Význam PI

- 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

# Auxinová signalizace



Jing and Strader, *Plant Structural Biology, Hormonal Regulations* (2018)

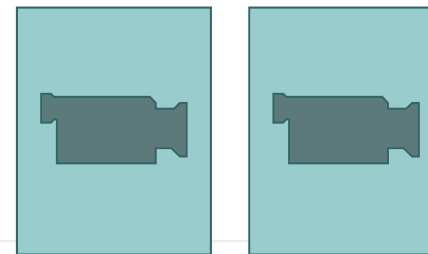
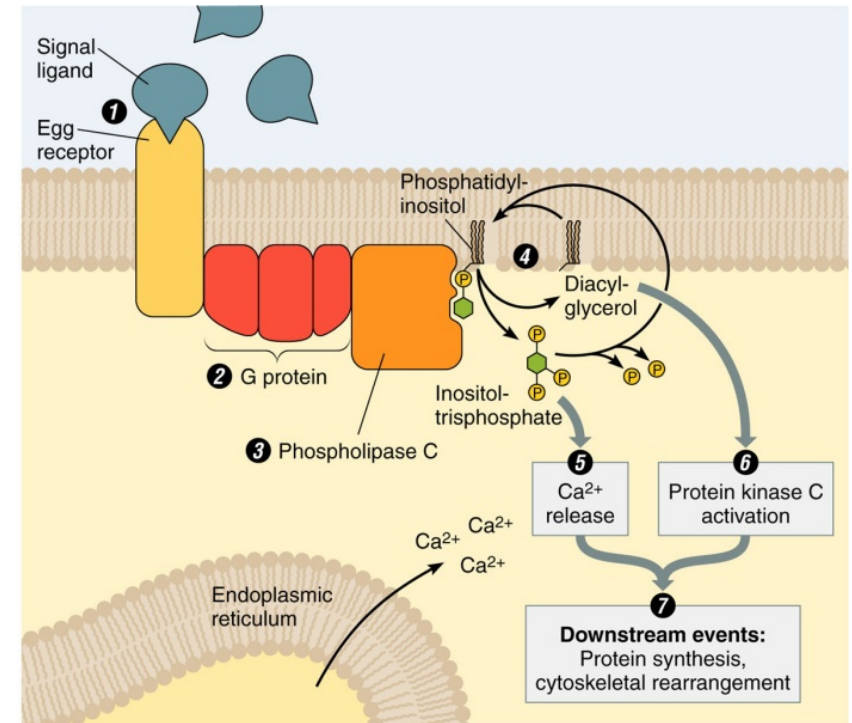
# Význam PI

- 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

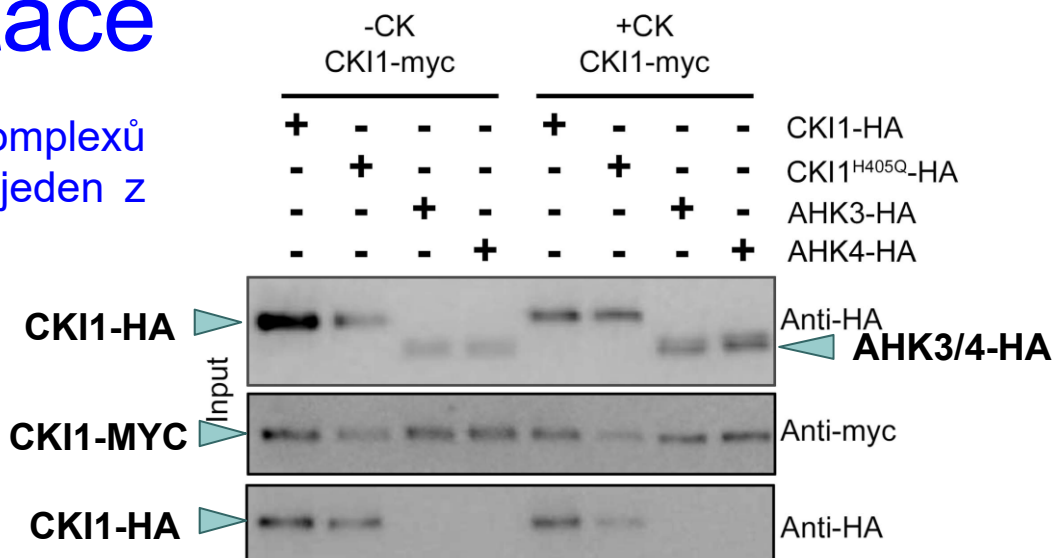
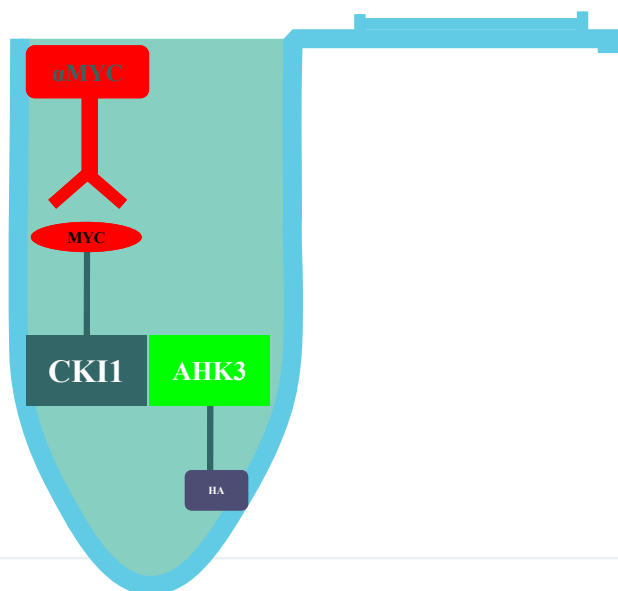
- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
  - Struktura chromatinu
  - Regulace transkripce
  - Lokalizace mRNA
  - Stabilita mRNA
  - Stabilita proteinů
  - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - Koimunoprecipitace



# PI *in vivo*

## Koimmunoprecipitace

- založena na izolaci **proteinových komplexů** pomocí **protilátek** rozpoznávajících **jeden z interagujících proteinů**



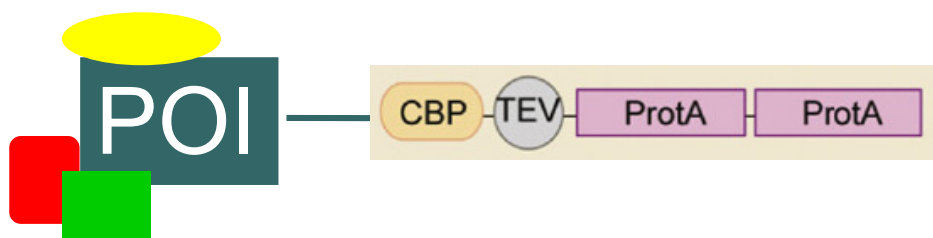
# Osnova

- 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)

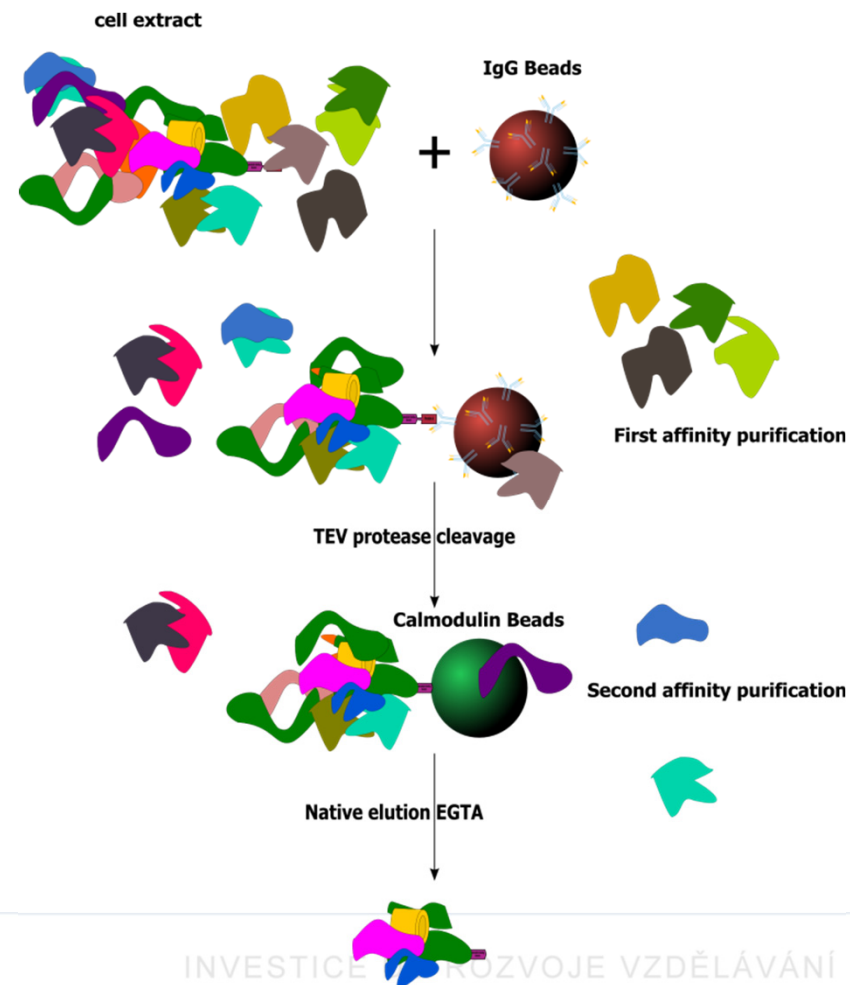
# PI *in vivo*

## Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

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



- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vazební 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



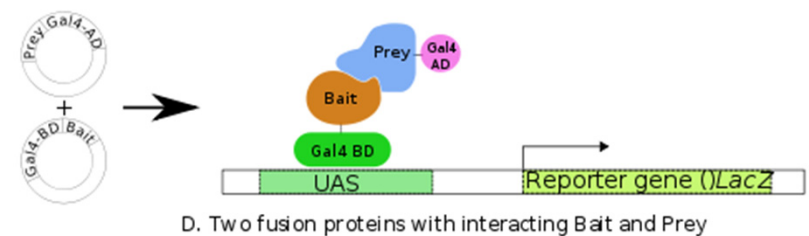
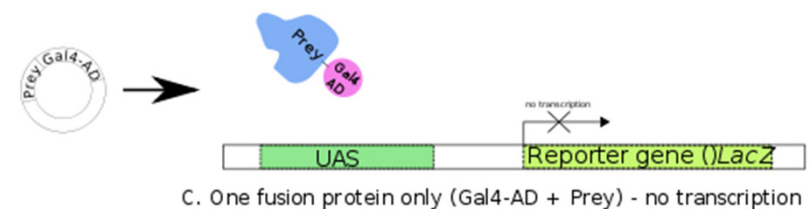
# Osnova

- 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*

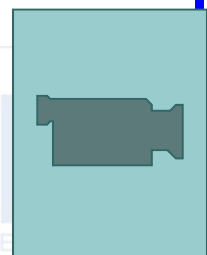
## Dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- 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

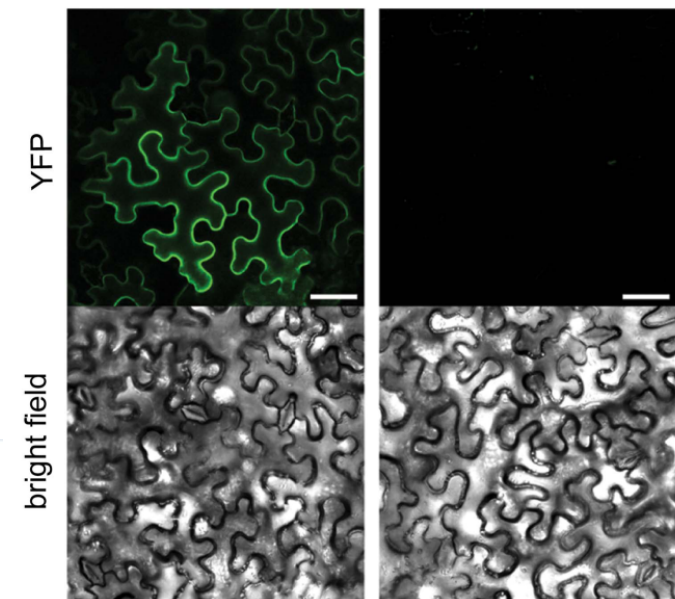
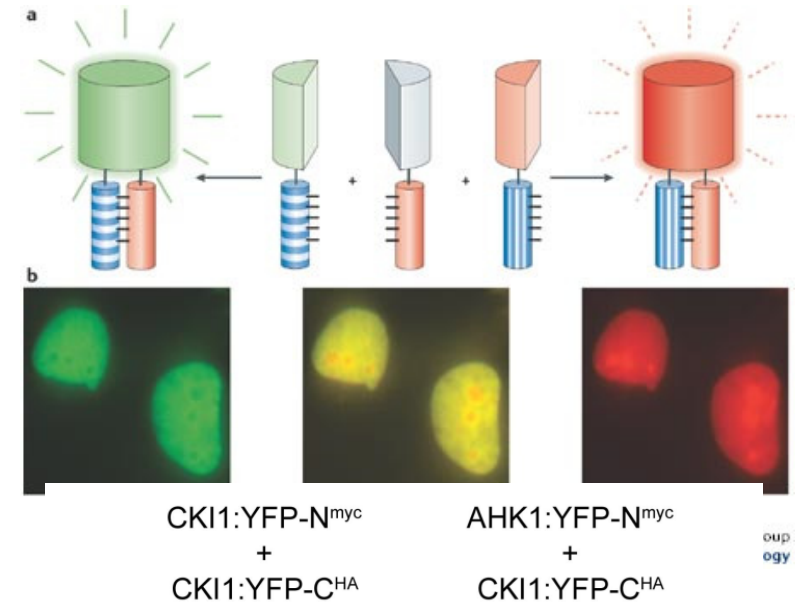
- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
  - Struktura chromatinu
  - Regulace transkripce
  - Lokalizace mRNA
  - Stabilita mRNA
  - Stabilita proteinů
  - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - Koimunoprecipitace
  - Tandemová afinitní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

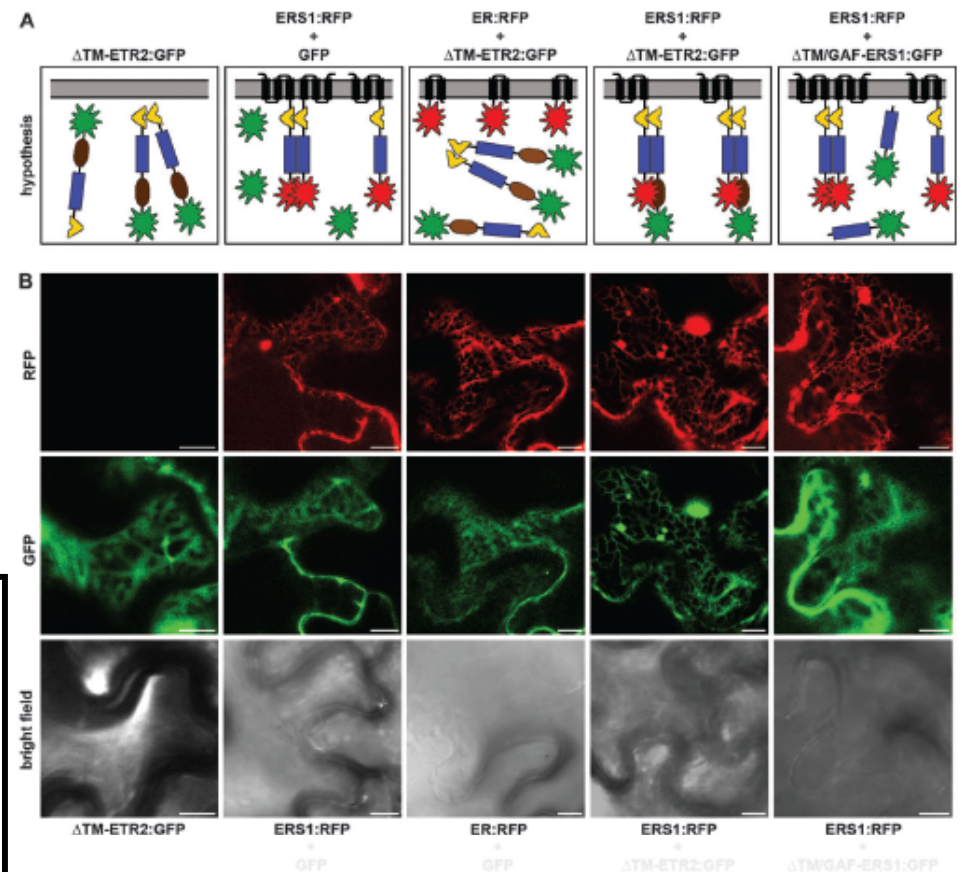
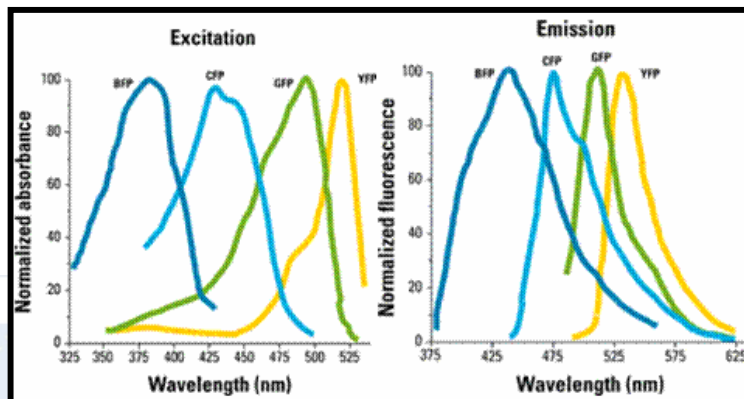
- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny



membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

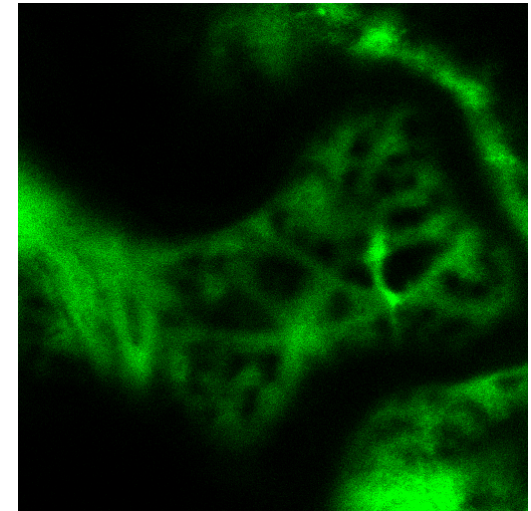
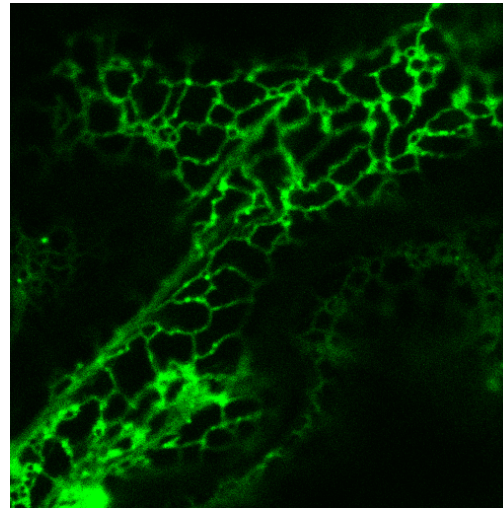
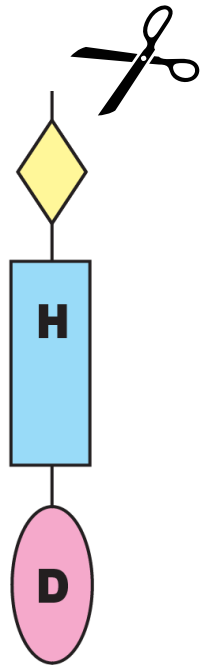
potenciální ineterakční partner je fúzován s jímým fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem

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



# PI *in vivo*

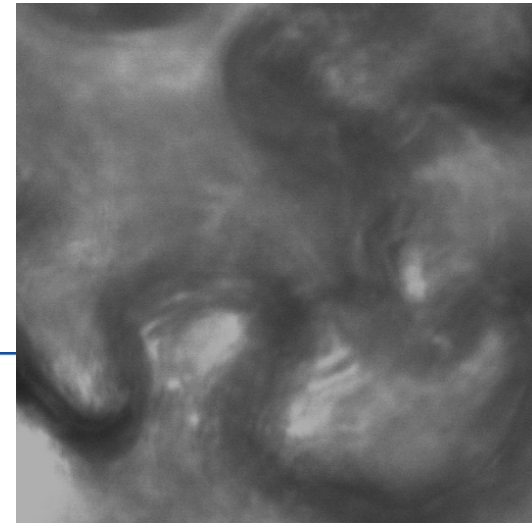
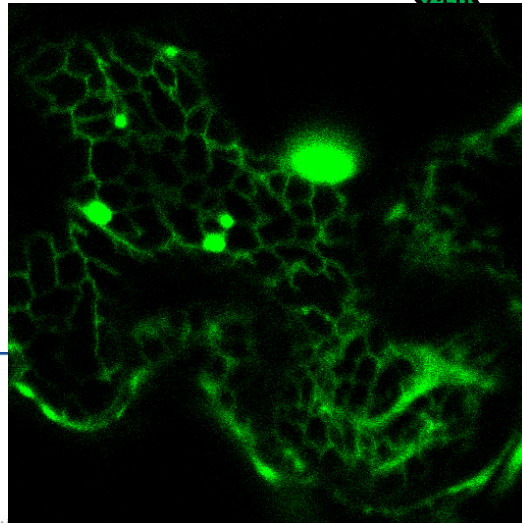
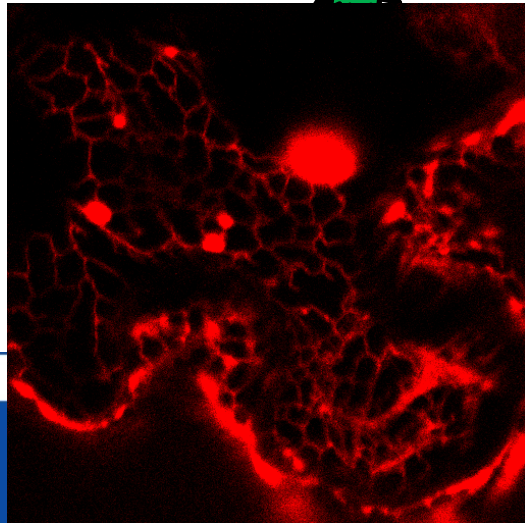
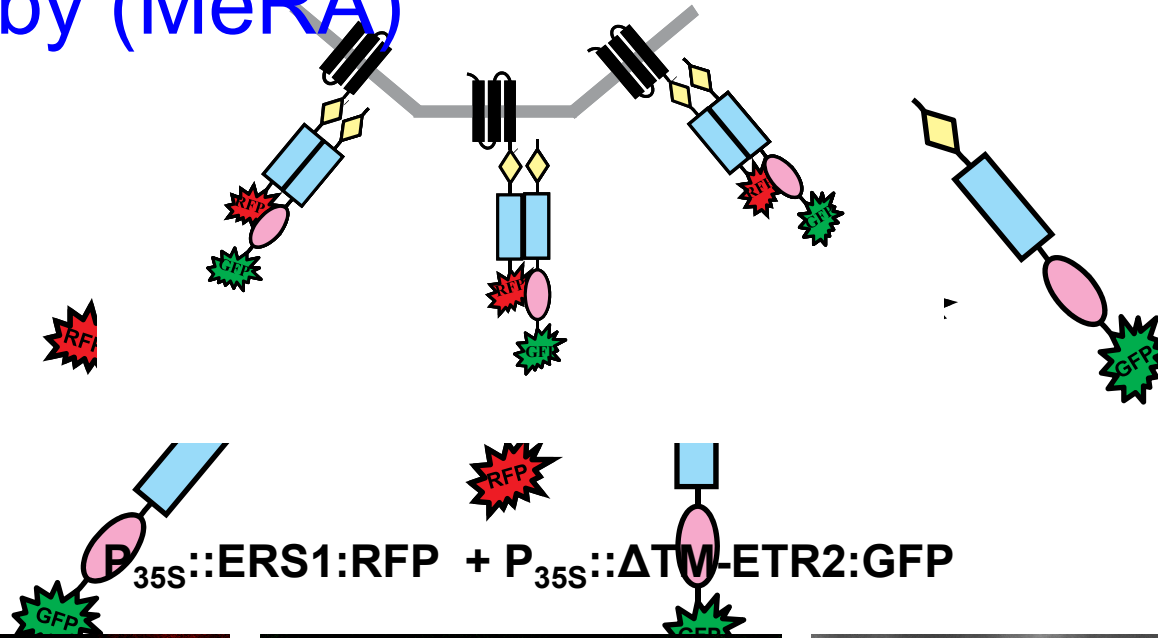
## Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)





# PI *in vivo*

## Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



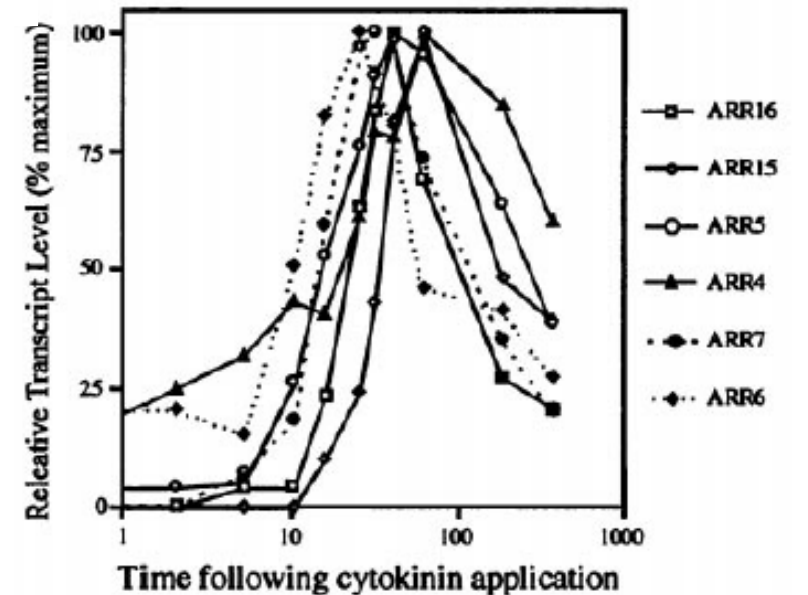
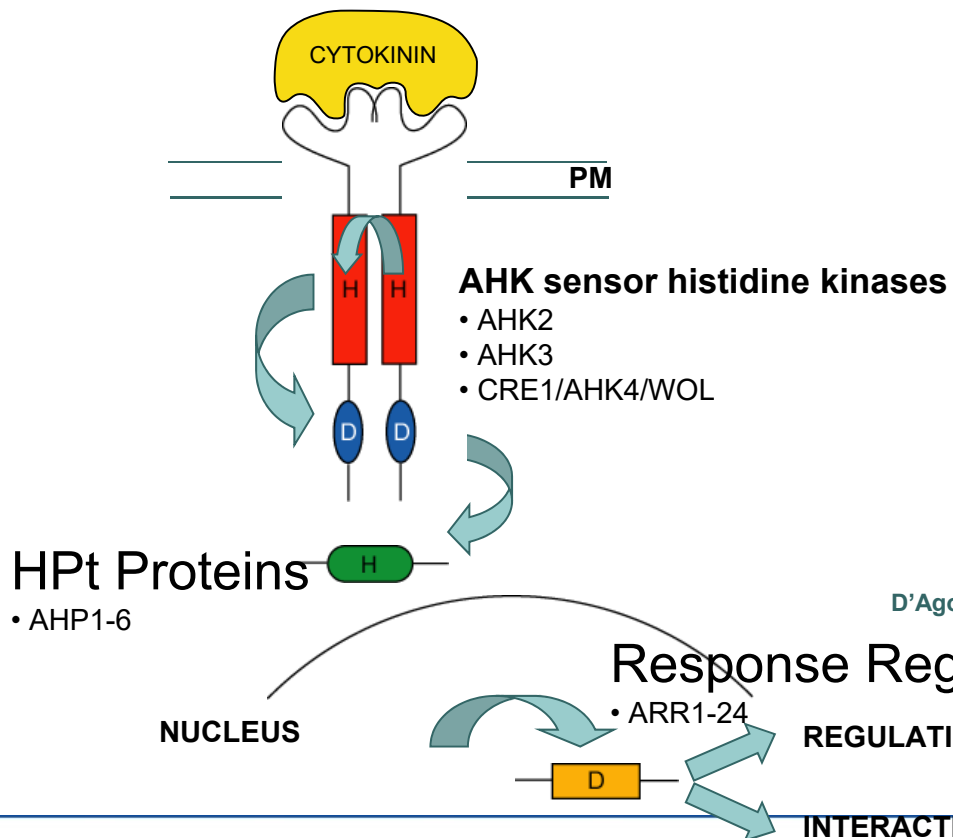
# Osnova

- 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

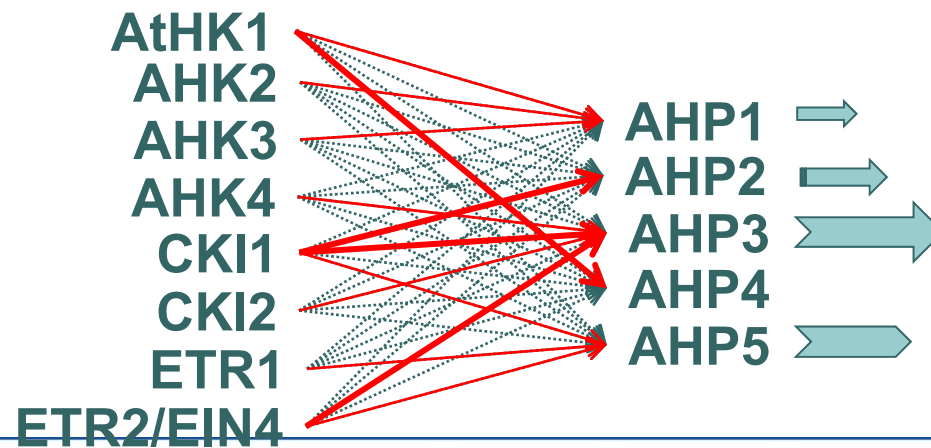
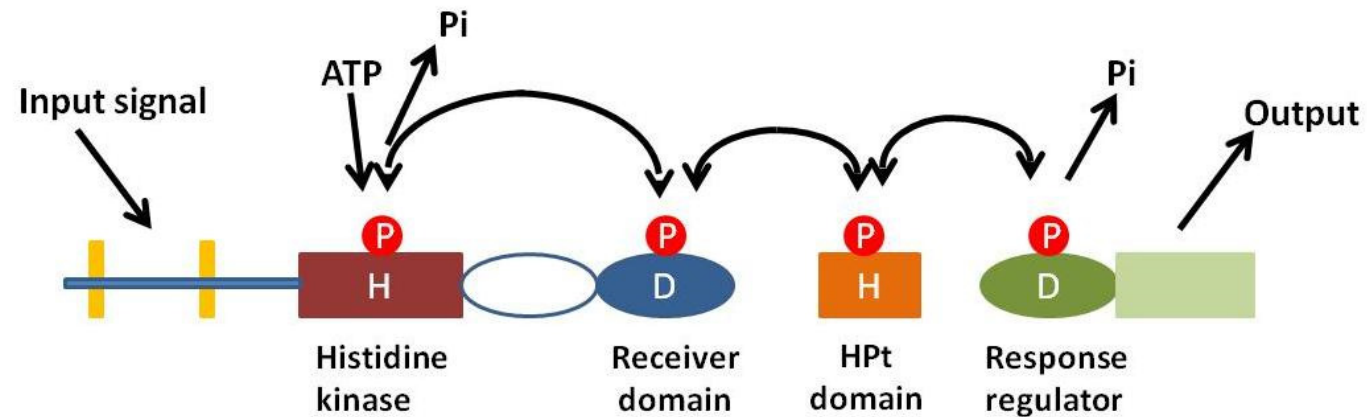


D'Agostino et al., Plant Phys, 2000

CK primary response genes  
- Type-A ARR expression

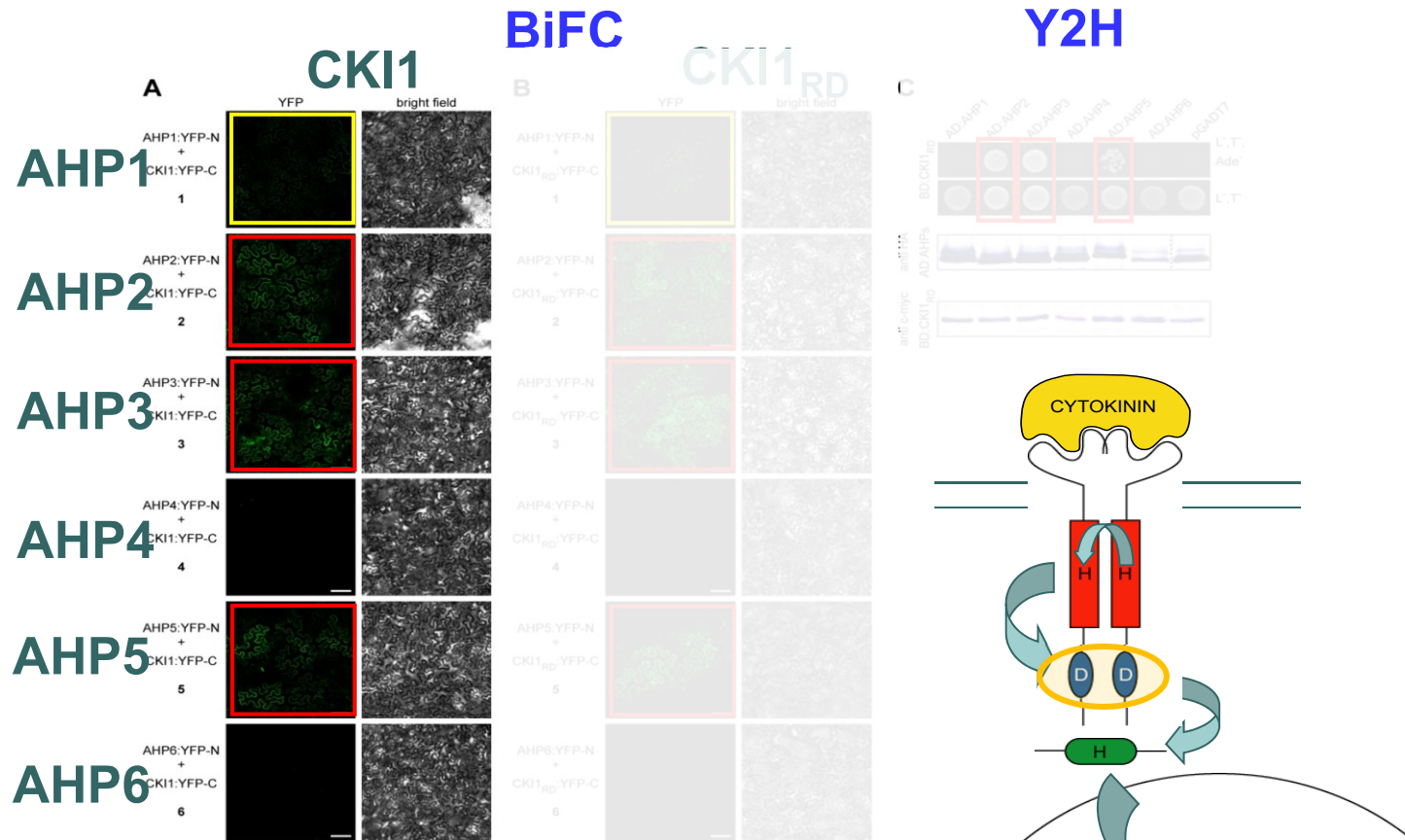
# Is there any specificity in plant MSP?

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



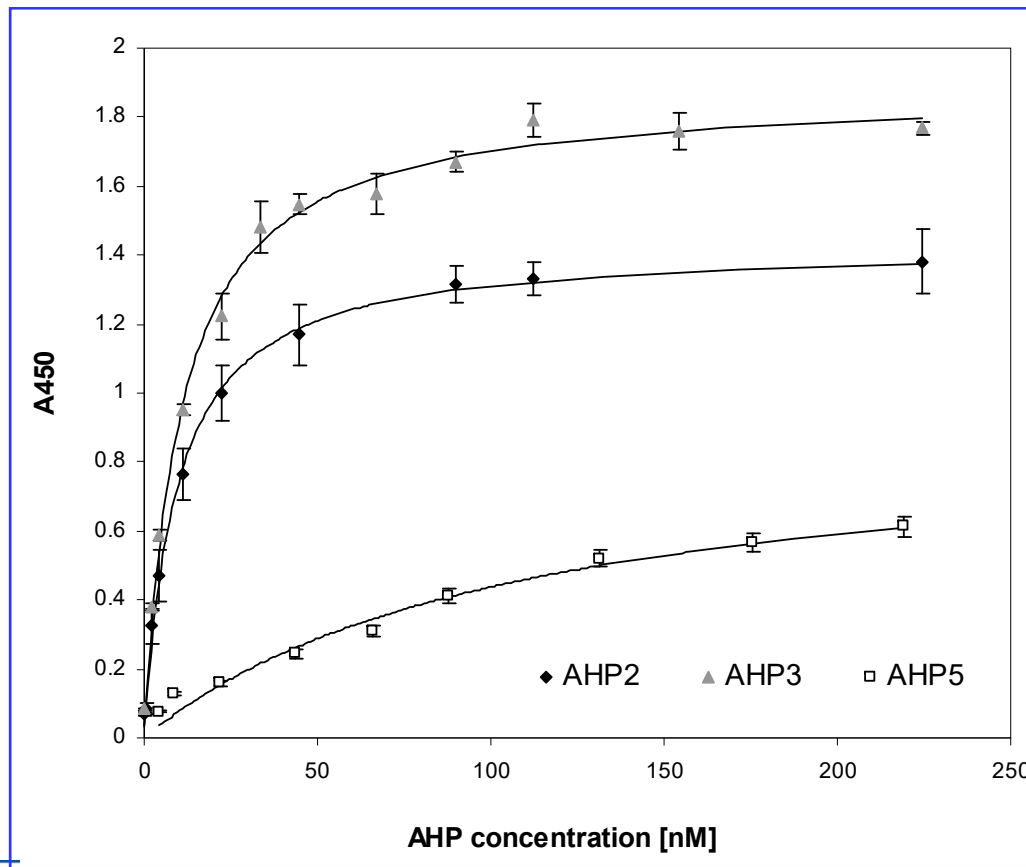
# Specificity of CKI1 signalling

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



# Specificity of CKI1 Signalling

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



**AHP3:  $K_d$  ~ 10,5 nM**

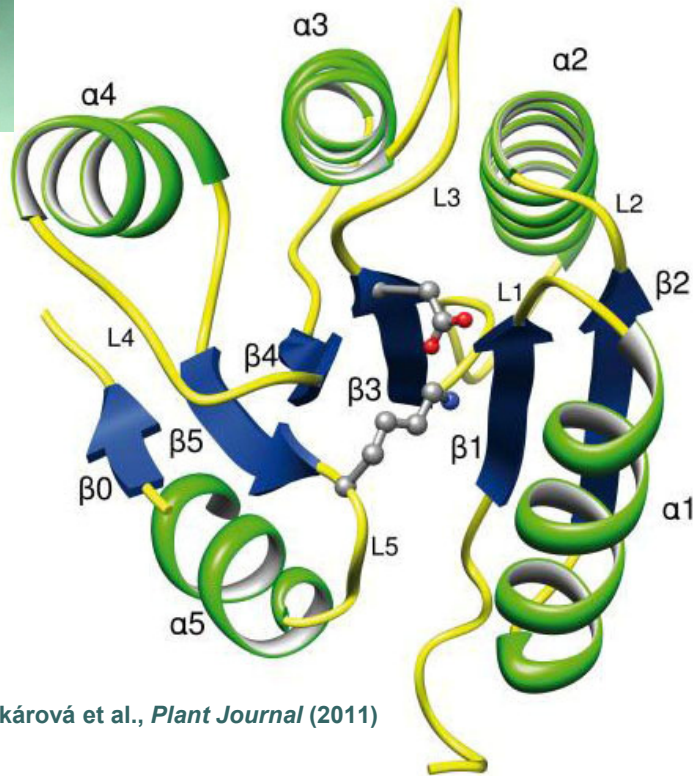
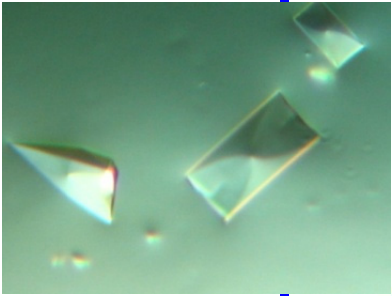
**AHP2:  $K_d$  ~ 9,17 nM**

**AHP5:  $K_d$  ~ 108 nM**

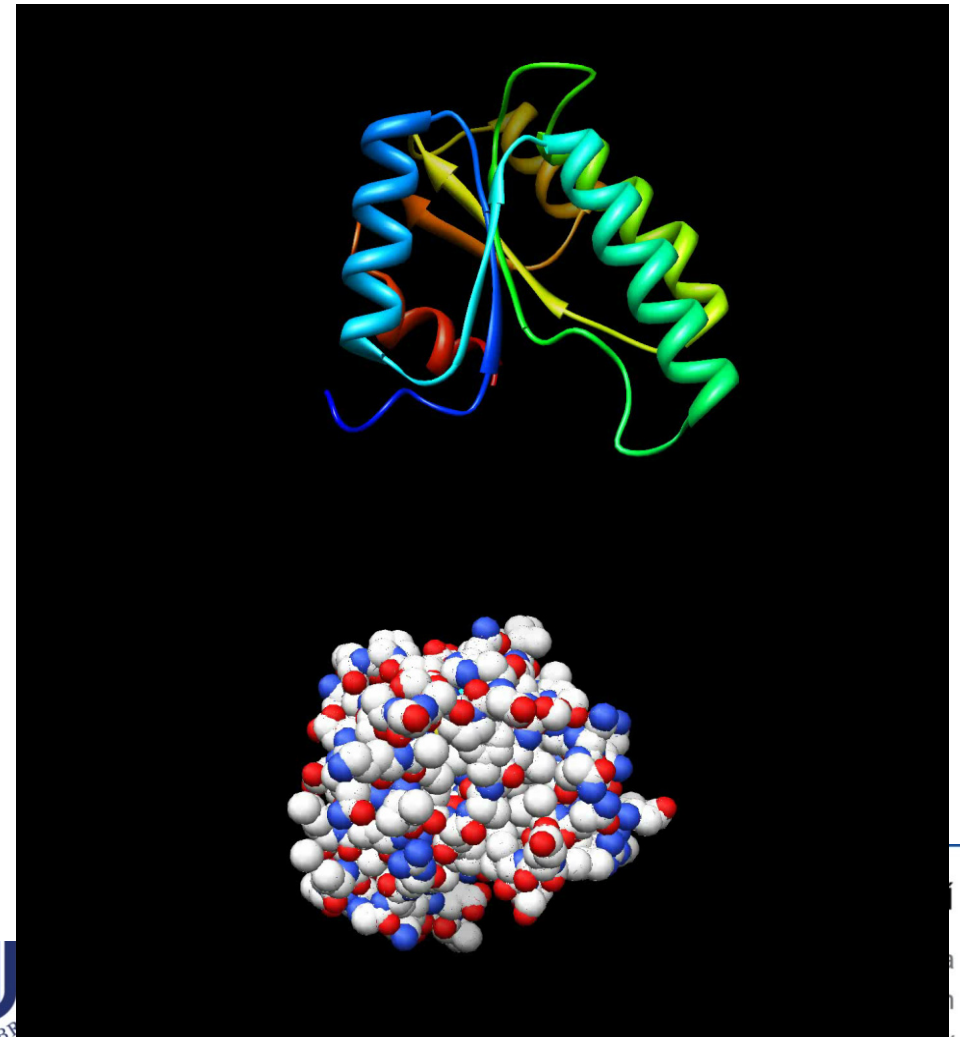
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)

# Structure of CKI1<sub>RD</sub>

- X-ray crystallography revealed conserved  $(\alpha/\beta)_5$  structural fold of CKI1<sub>RD</sub>



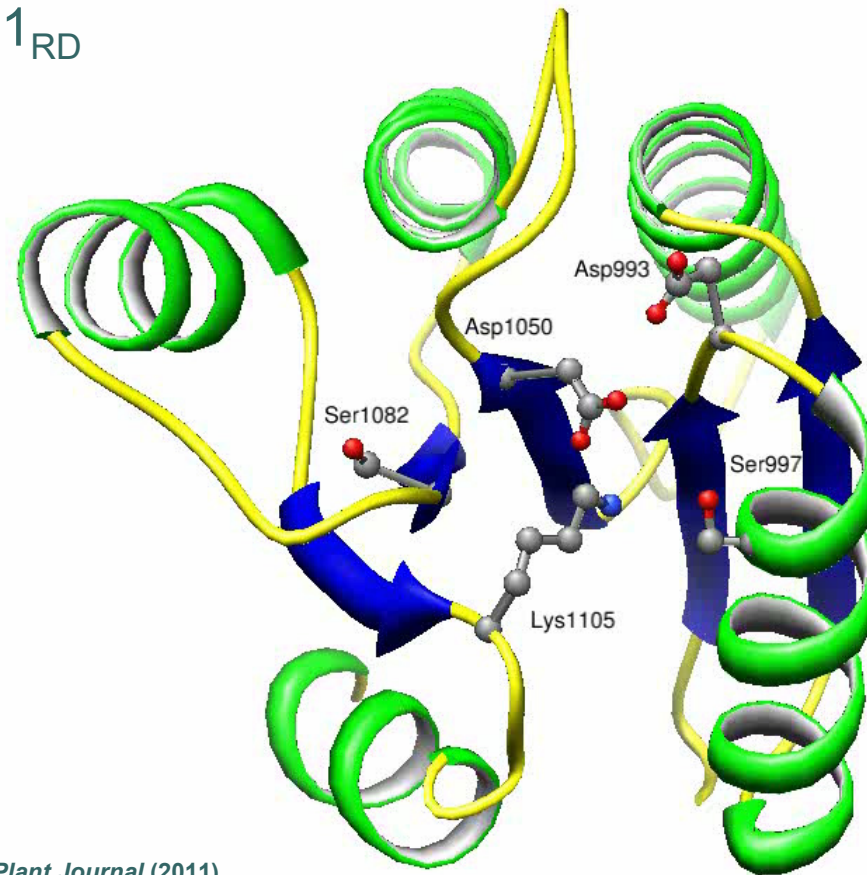
Pekárová et al., *Plant Journal* (2011)





# Dynamics of CKI1<sub>RD</sub>

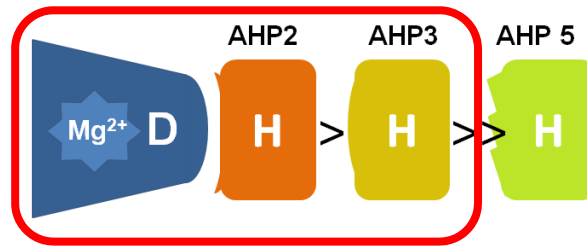
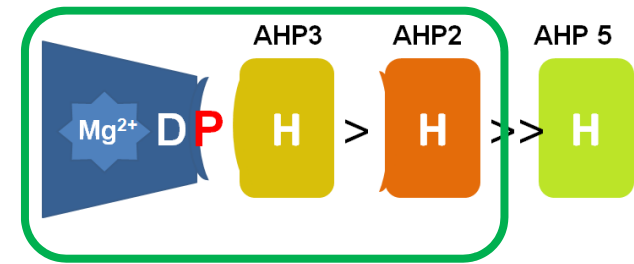
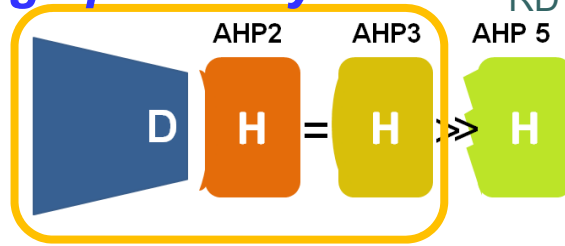
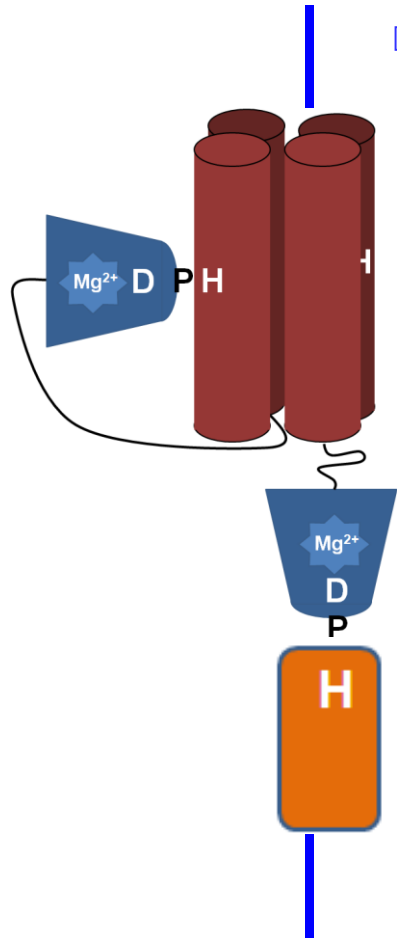
- *Mg<sup>2+</sup> binding* leads to *remodelling of active centre* of CKI1<sub>RD</sub>



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

# CKI1<sub>RD</sub> structural changes are associated with its binding specificity

- *Mg<sup>2+</sup>*- and *BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>*-induced *structural changes fine-tune binding specificity of CKI1<sub>RD</sub>*



Ligand

0

Mg<sup>2+</sup>

BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>

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)

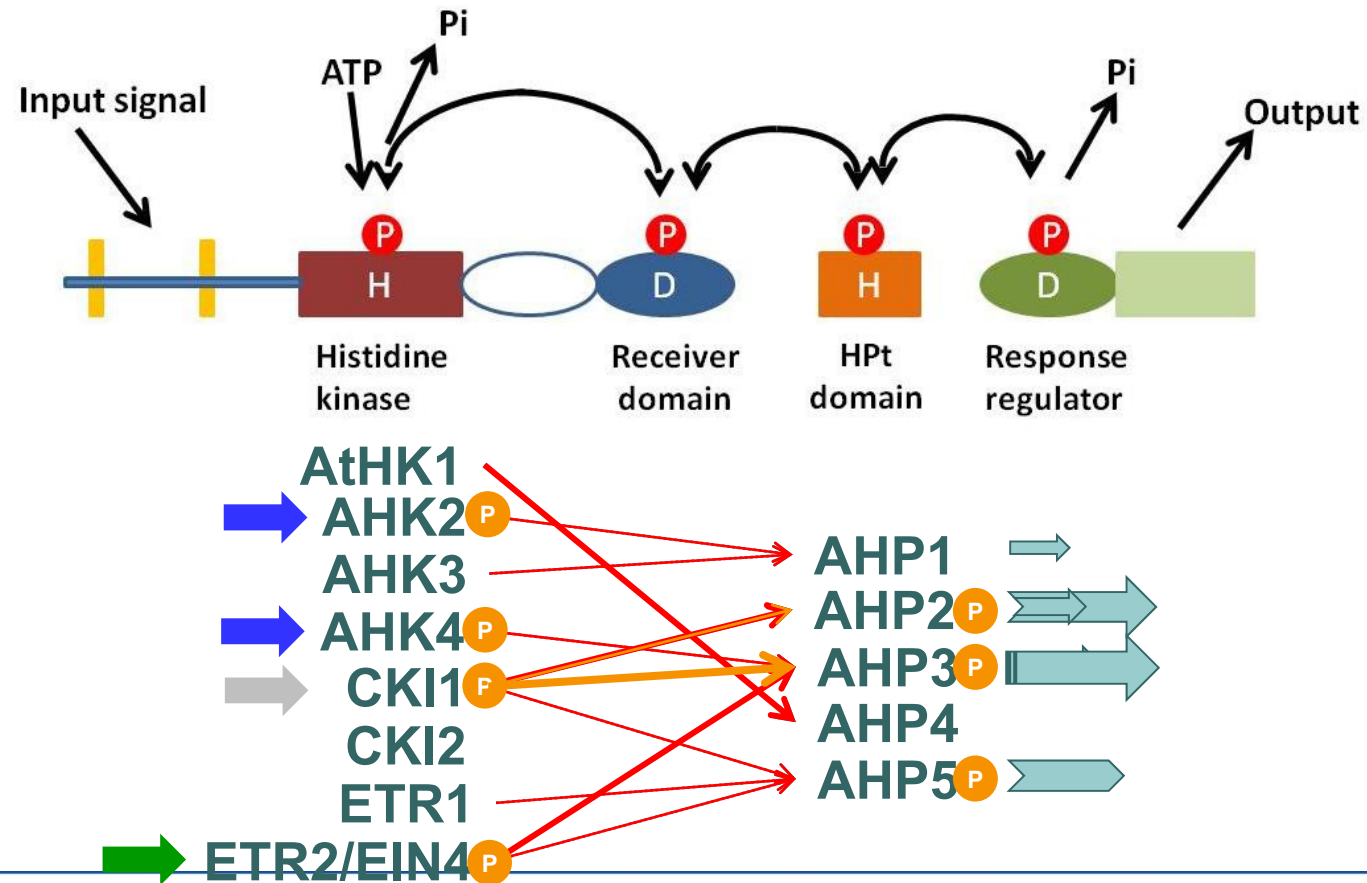


ÁVÁNÍ

ncována  
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