

CG020 Genomika

Přednáška 7

Proteinové interakce v genových regulacích

Jan Hejátko

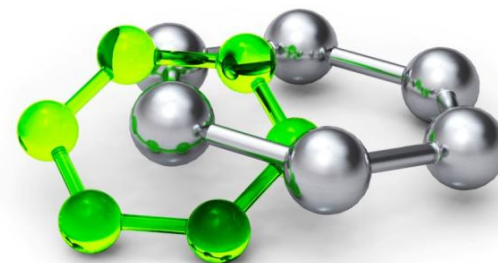
Funkční genomika a proteomika rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

Národní centrum pro výzkum biomolekul,
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.eu

M U N I
S C I



Genomika 07

▪ 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., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazević, 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)

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

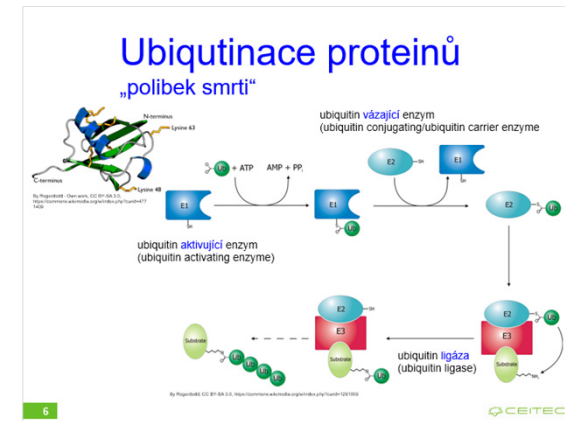


1fnt

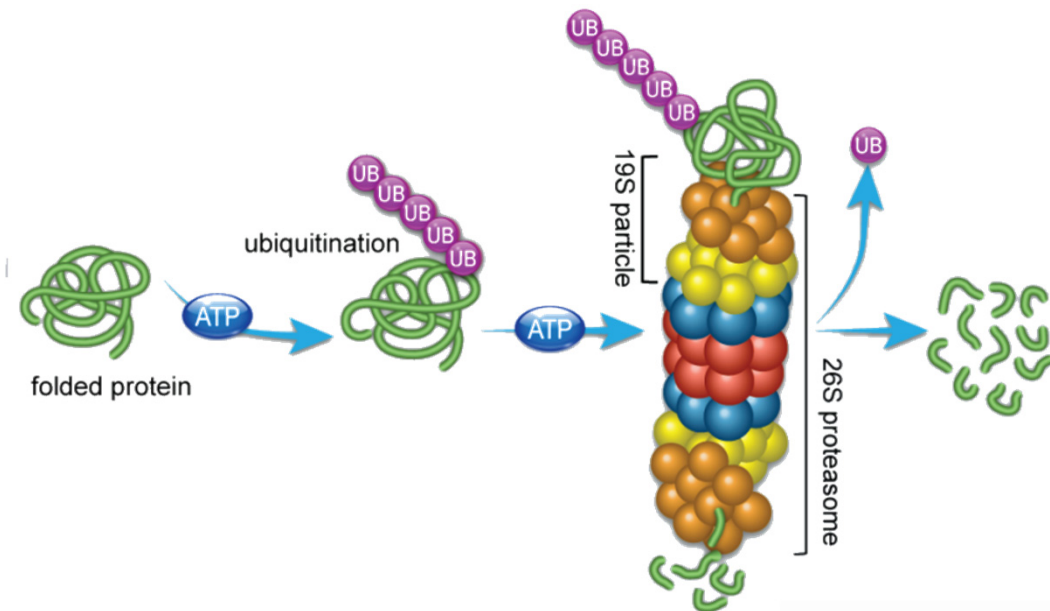
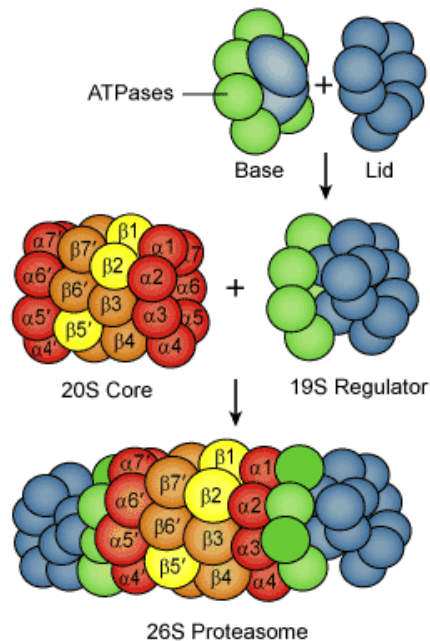
Význam interakcí proteinů

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

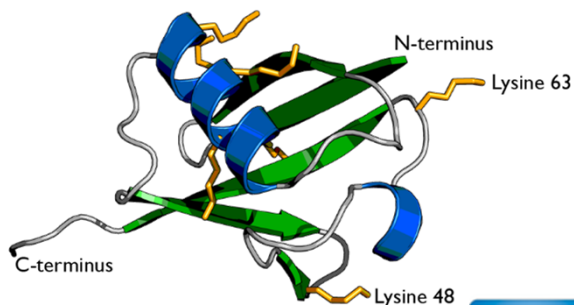


20S & 26S PROTEASOME



Ubiquitinace proteinů

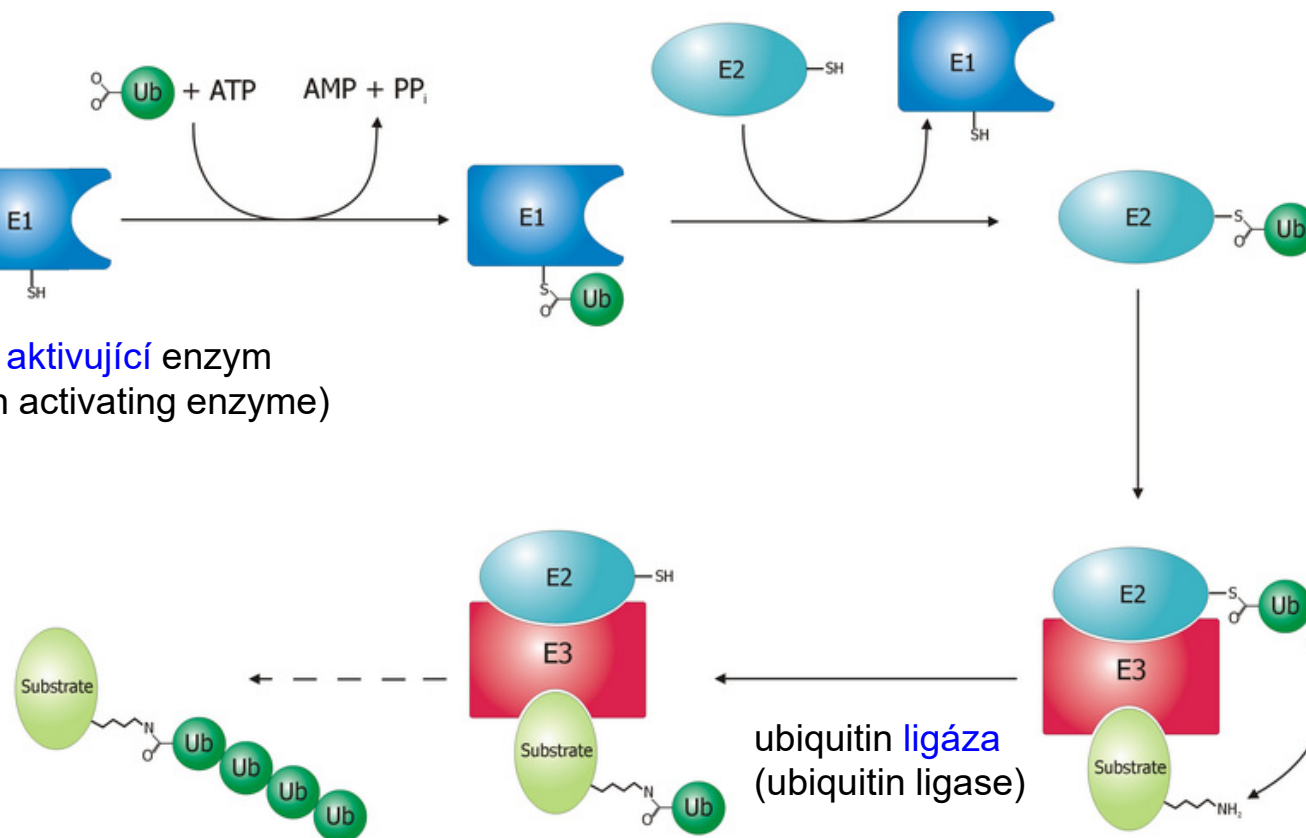
„polibek smrti“



By Rogerdodd - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4771409>

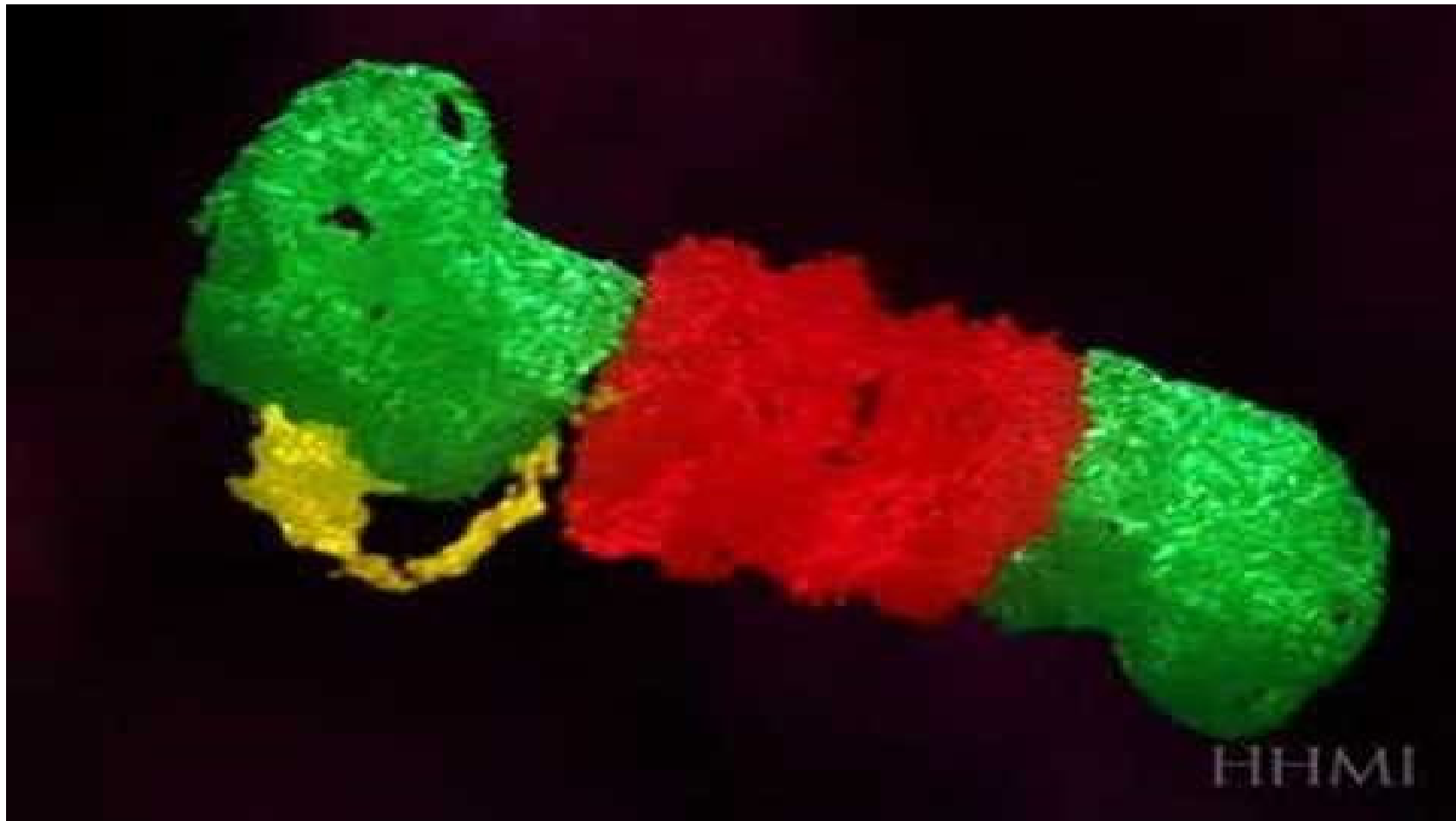
ubiquitin **vázající** enzym
(ubiquitin conjugating/ubiquitin carrier enzyme)

ubiquitin **aktivující** enzym
(ubiquitin activating enzyme)



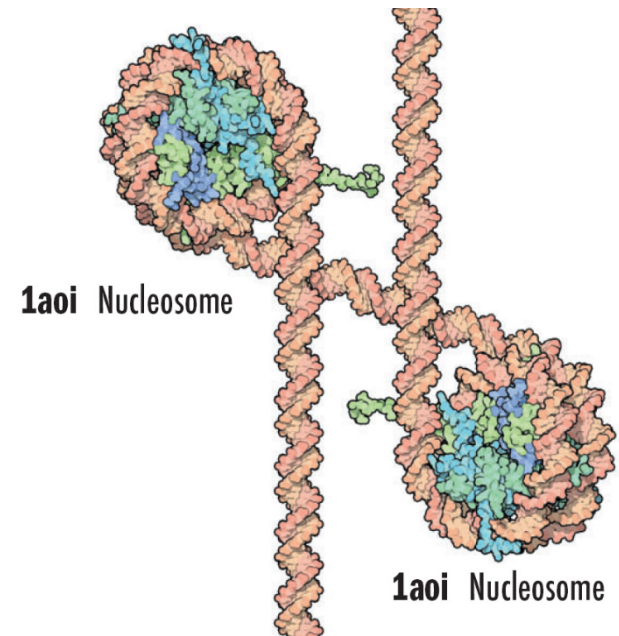
By Rogerdodd, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1291009>

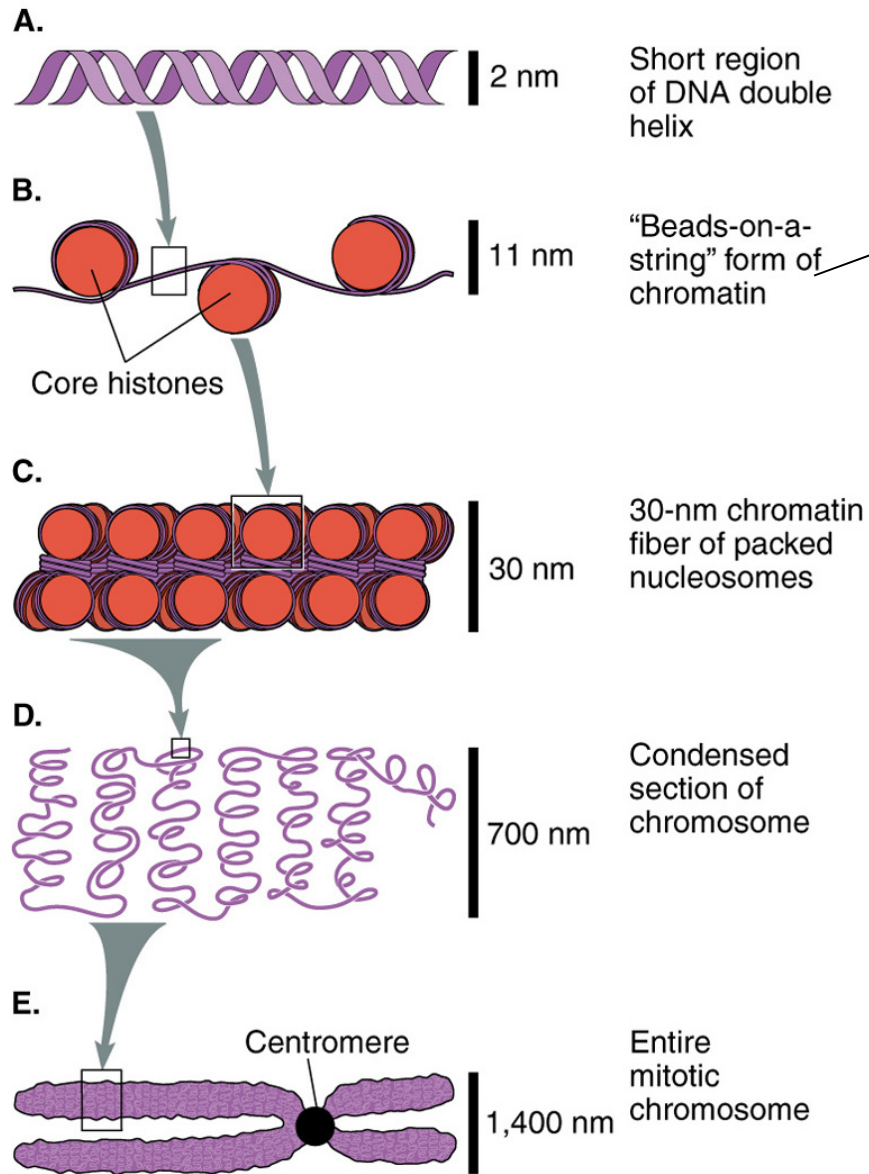
Proteasome – řízená proteolýza



Význam PI

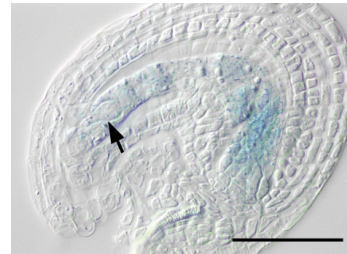
- Funkční význam specifických interakcí proteinů
 - Struktura chromatinu





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



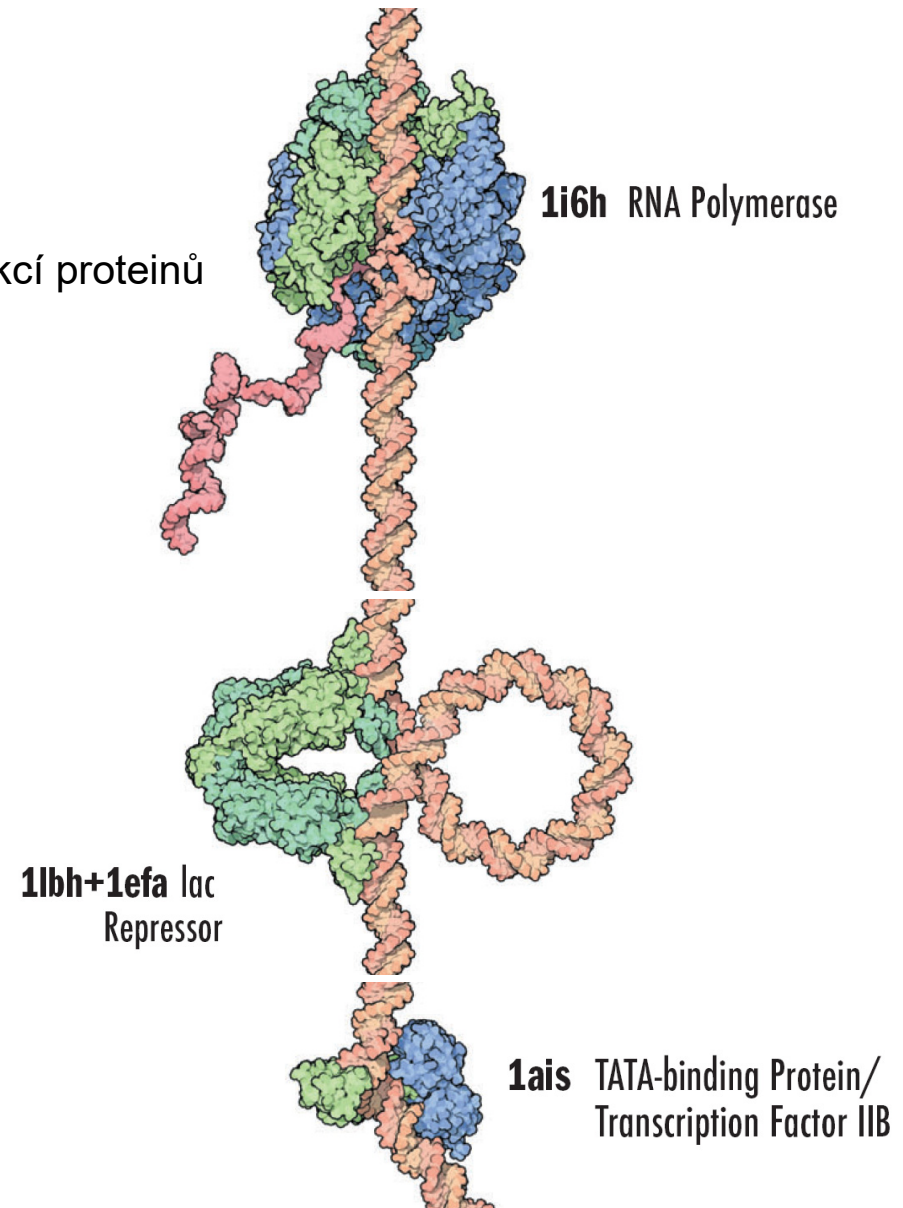
methylation status

CpG or CpNpG

CpNpNp

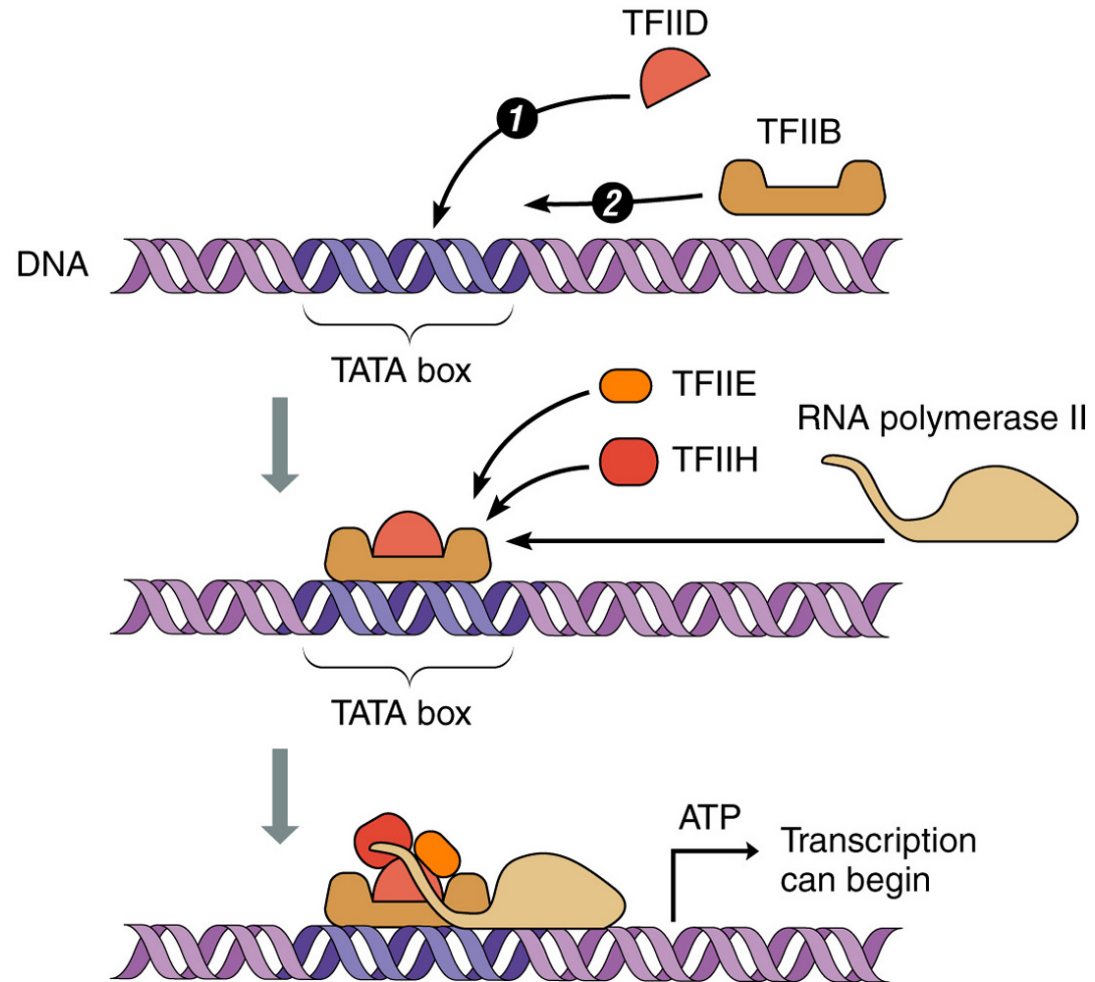
Význam PI

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

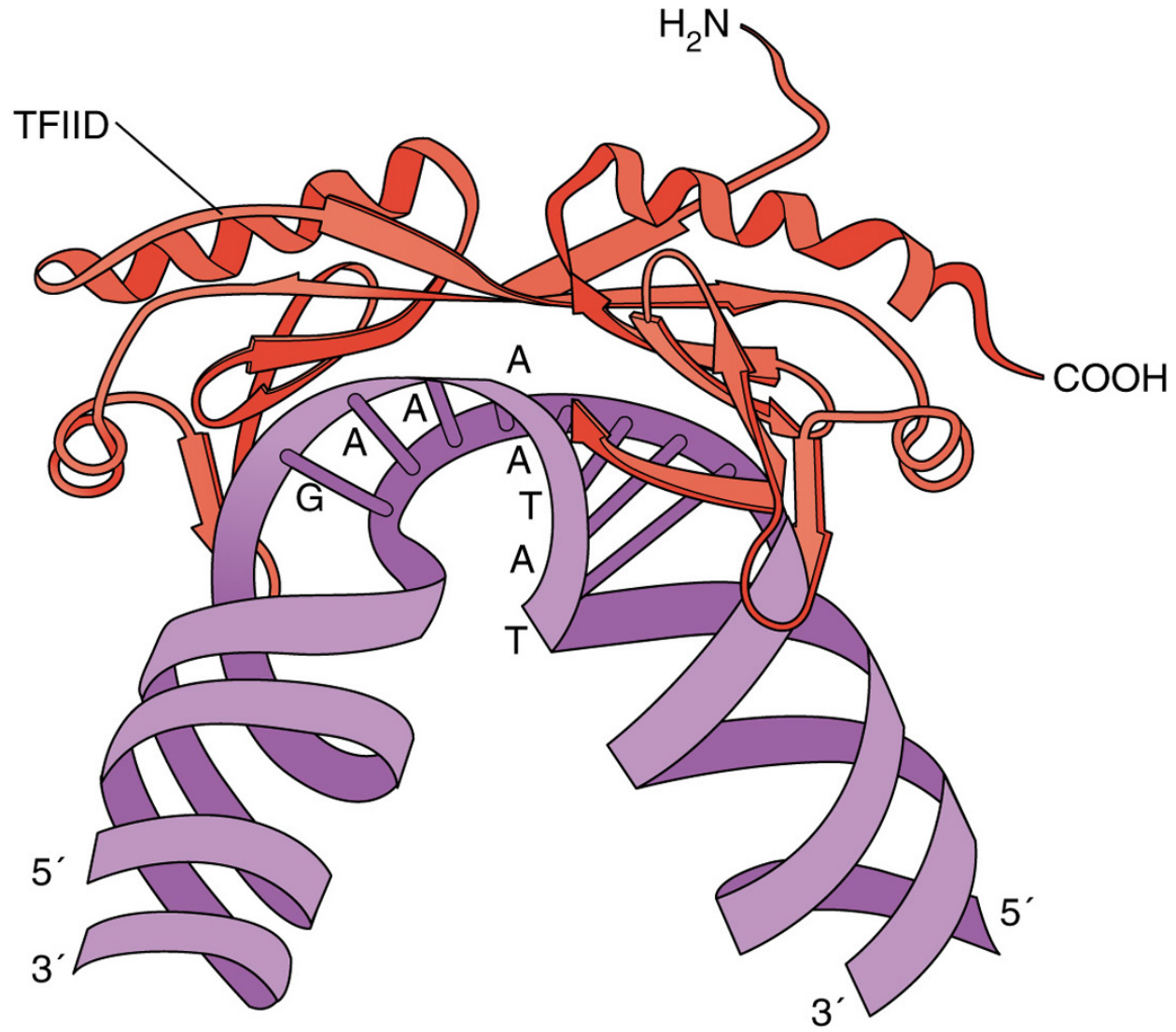


Iniciace Transkripce

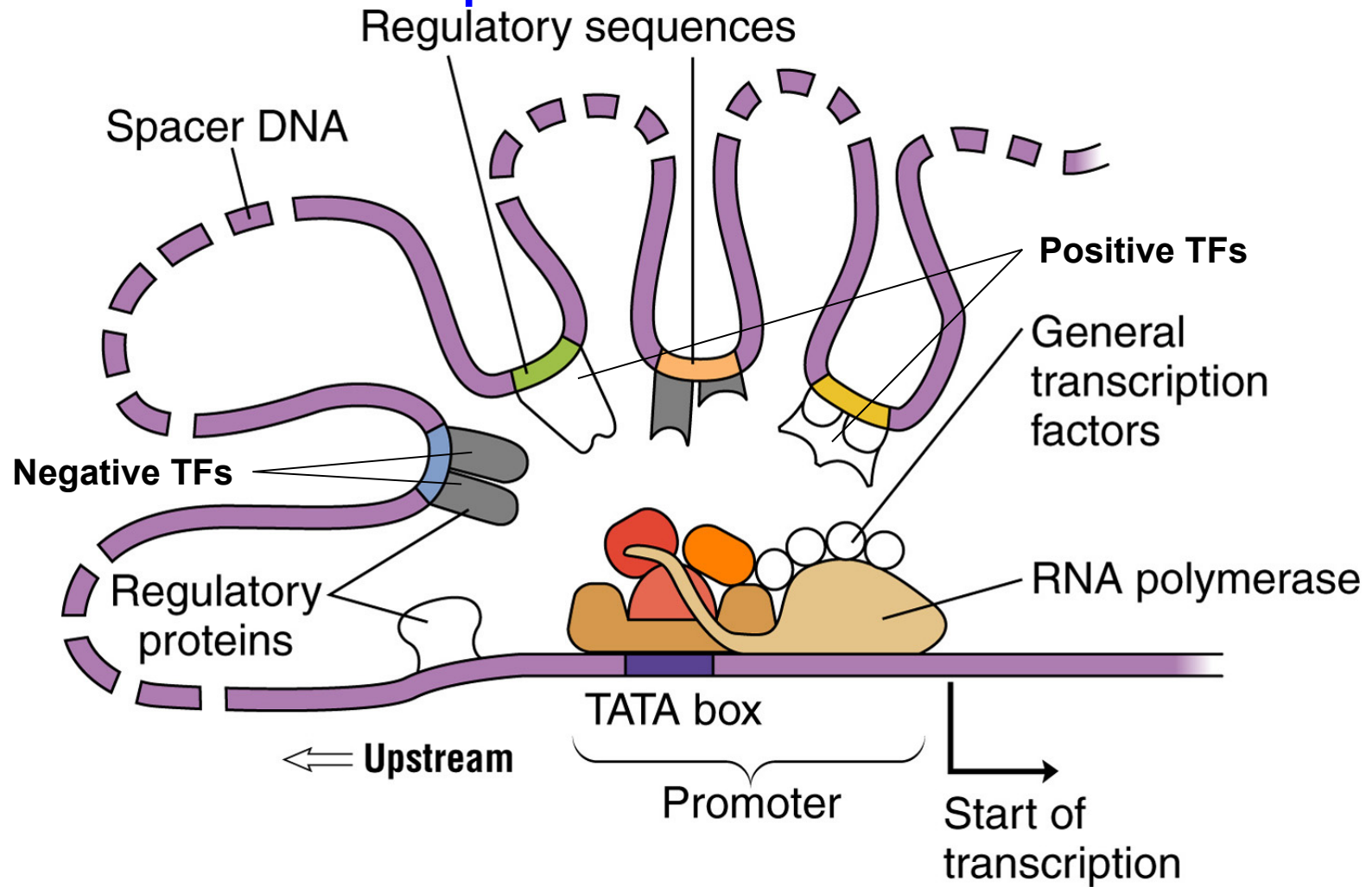
A.



B.



Iniciace Transkripce



Transcriční regulace prostřednictvím TAFs

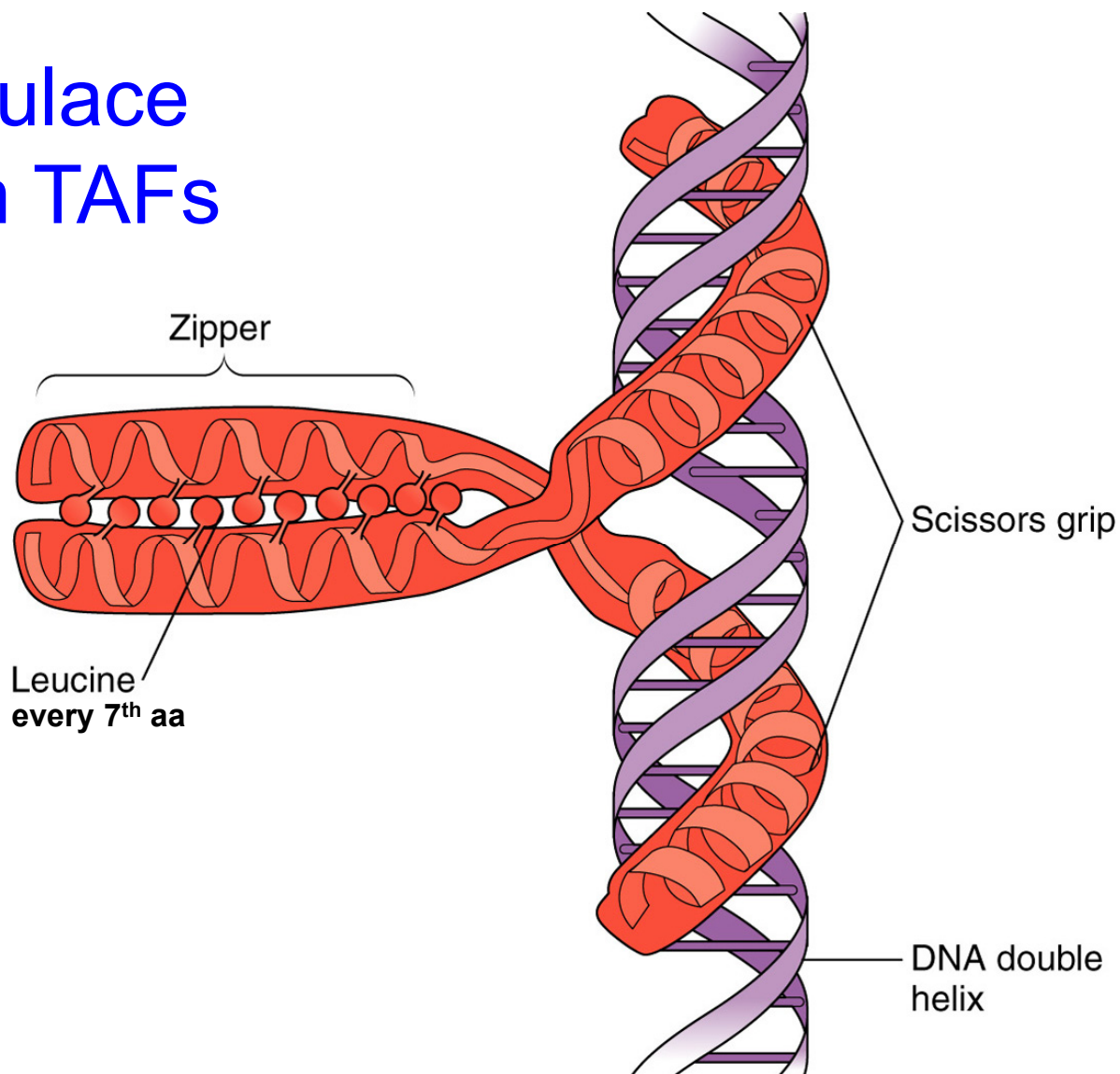
Signal recognition



Dimerization

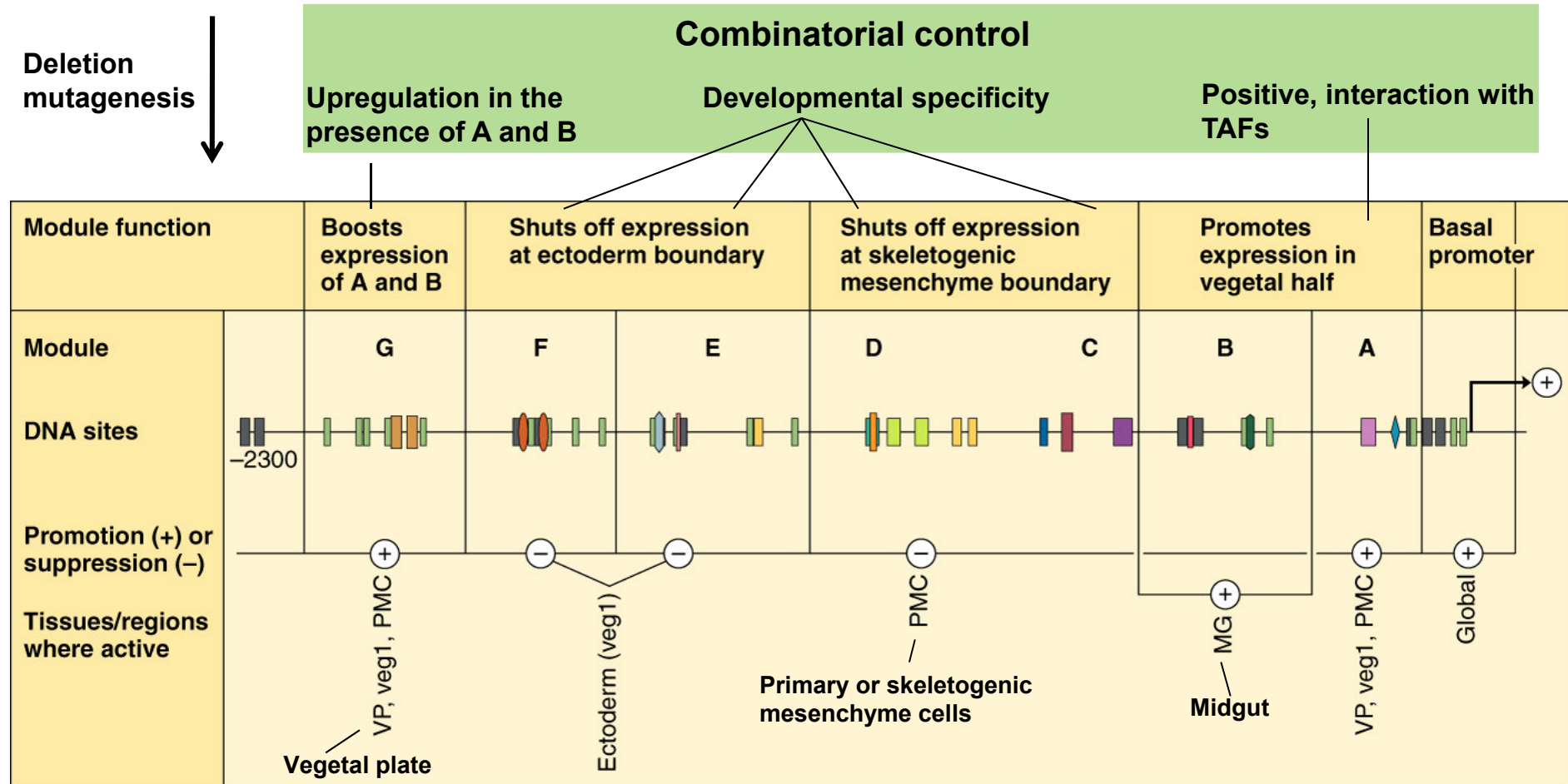


DNA binding and transcription activation



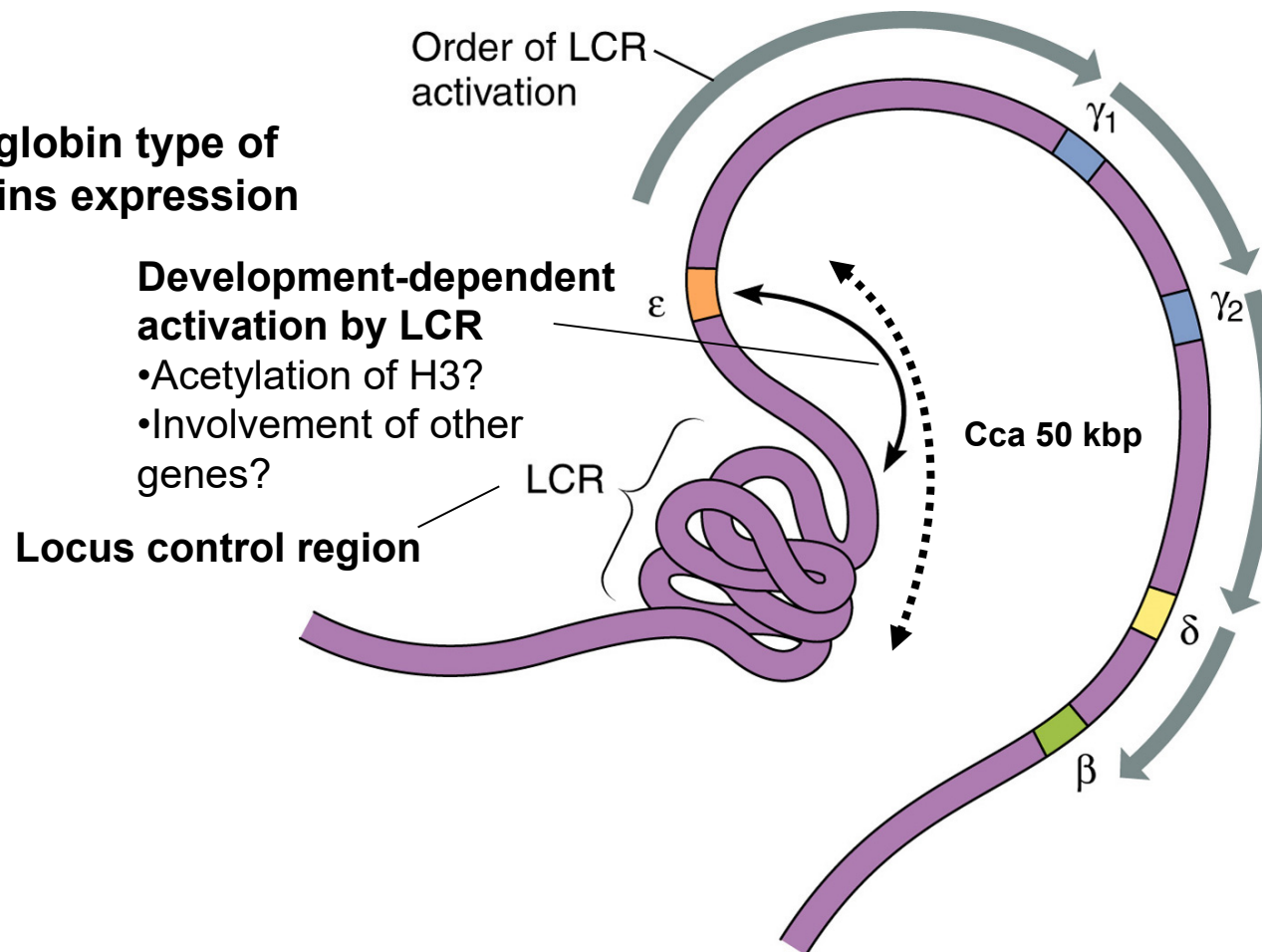
Multifaktoriální kontrola promotorů

ProENDO16:REPORTER (sea urchin)



Multifaktoriální kontrola promotorů

Regulation of β -globin type of hemoglobin chains expression

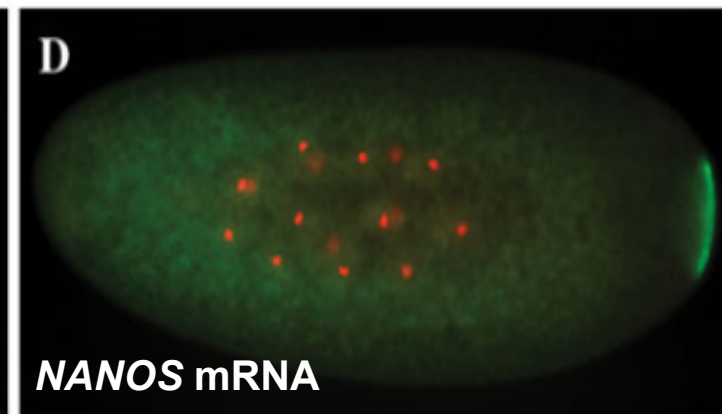
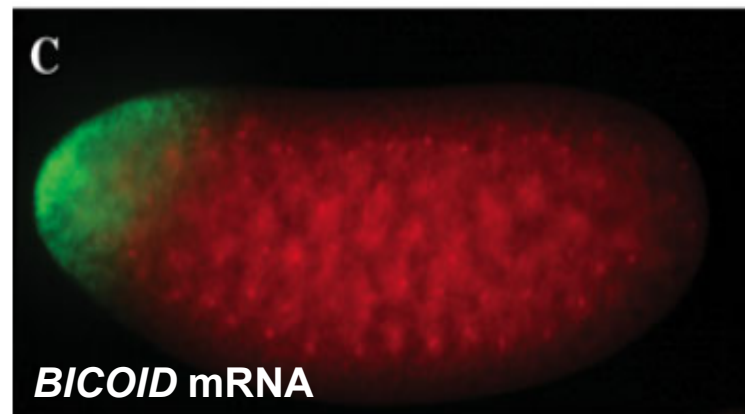
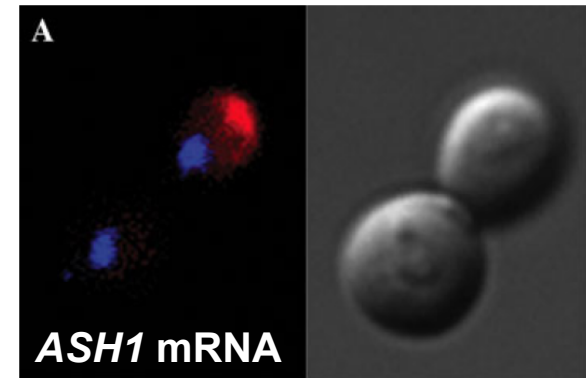


Význam PI

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

Lokalizace mRNA

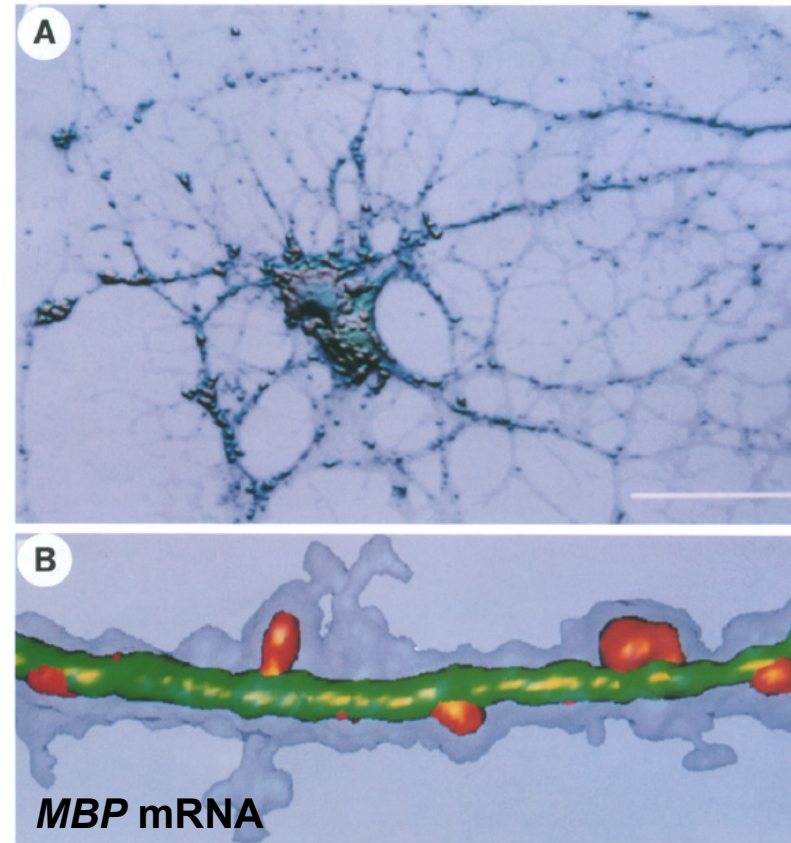
- Význam lokalizace mRNA
 - Lokalizace proteinového produktu genu v čase a místě
 - asymetrické dělení během vývoje
 - polarizace embrya



Shahbadian and Chartrand, 2012

Lokalizace mRNA

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

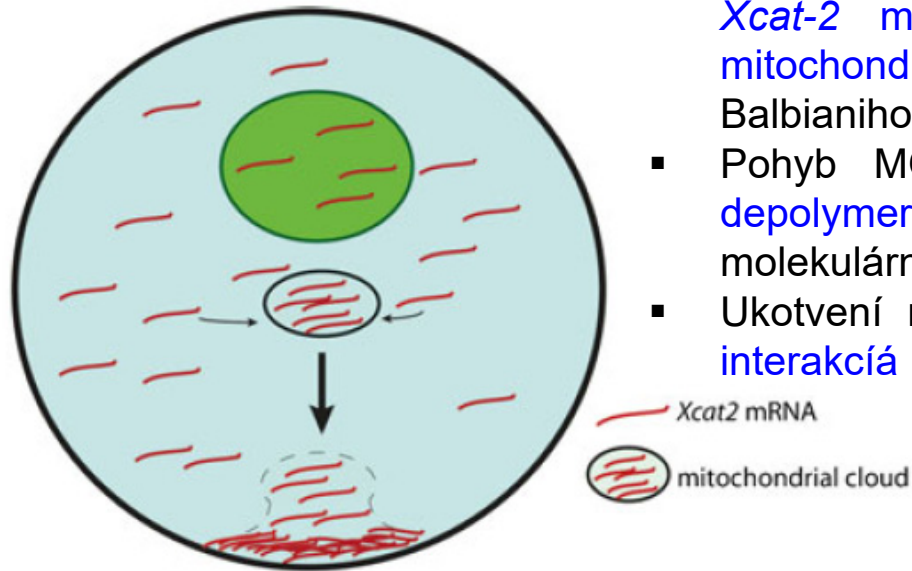


Ainger et al., 1993

Lokalizace mRNA

Mechanizmy

- Difúze a ukotvení mRNA



- 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

Shahbadian and Chartrand, 2012

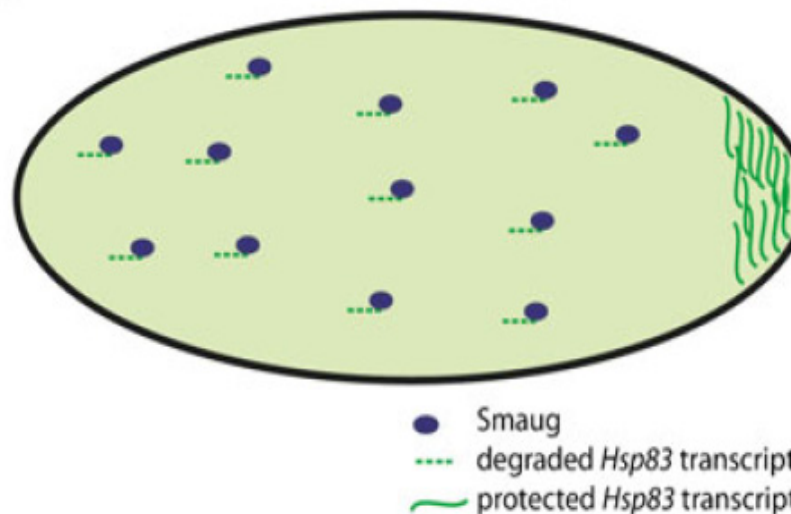
Lokalizace mRNA

Mechanizmy

Shahbadian and Chartrand, 2012

▪ Lokalizovaná degradace mRNA

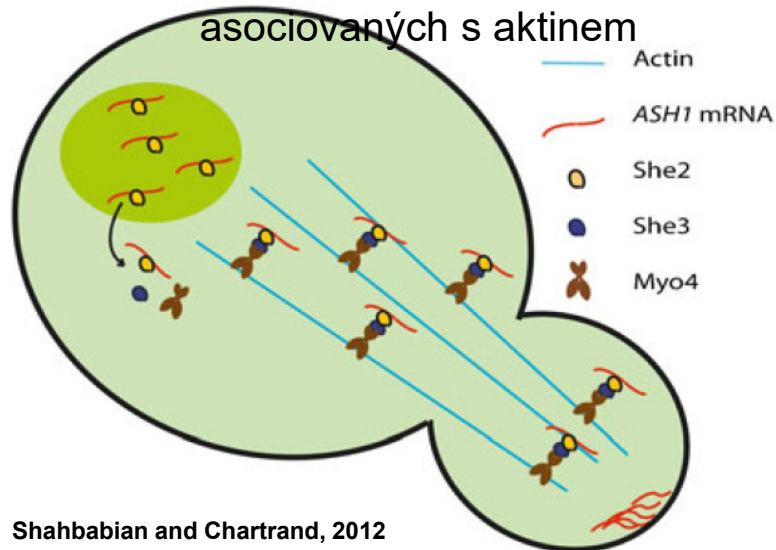
- V embryogenezi u *Drosophila m.* dochází k **polární lokalizaci *Hsp83* mRNA**, podobně jako *NANOS* mRNA
- *Hsp83* mRNA je lokalizována **v celém embryu**, zde je však **destabilizována prostřednictvím cis elementů** jak v 3'UTR (HDE), tak v kódující oblasti (HIE)
- **HIE elementy** jsou **rozpoznávány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



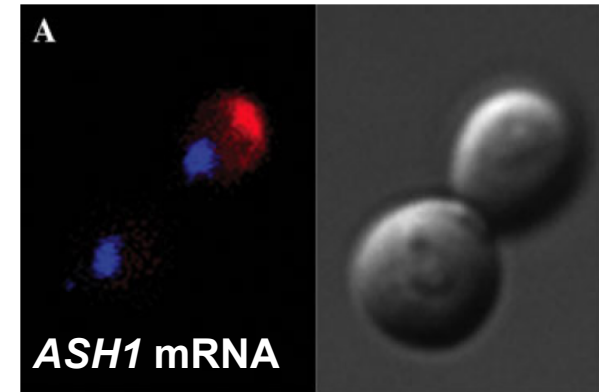
Lokalizace mRNA

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



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

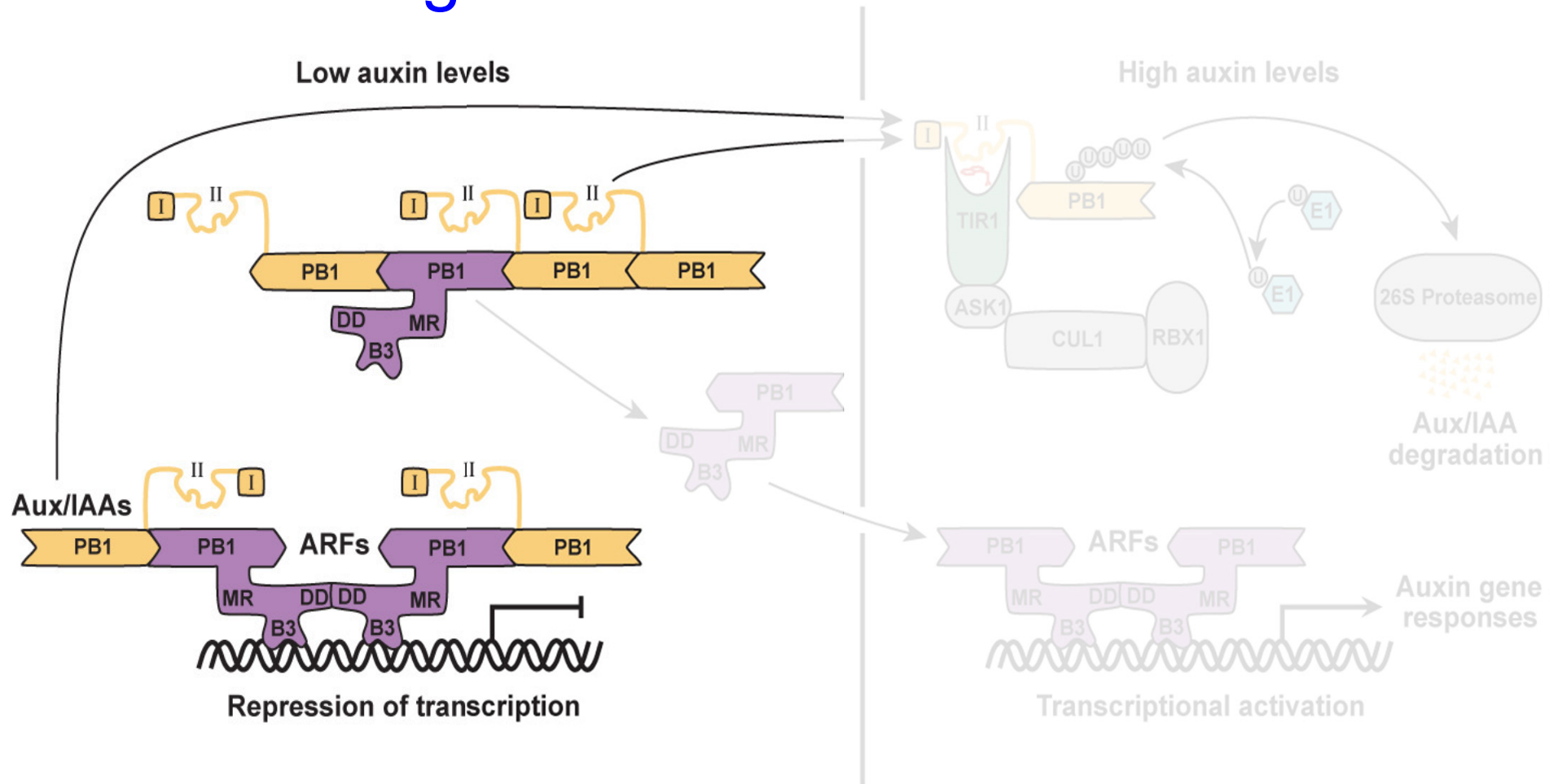
Význam PI

- 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)

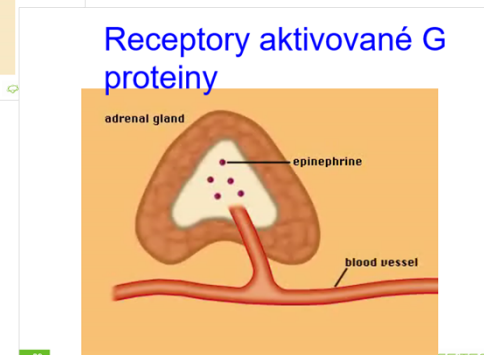
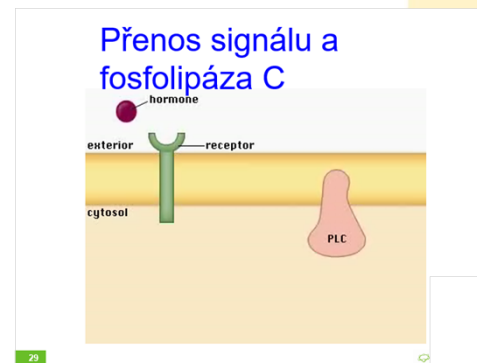
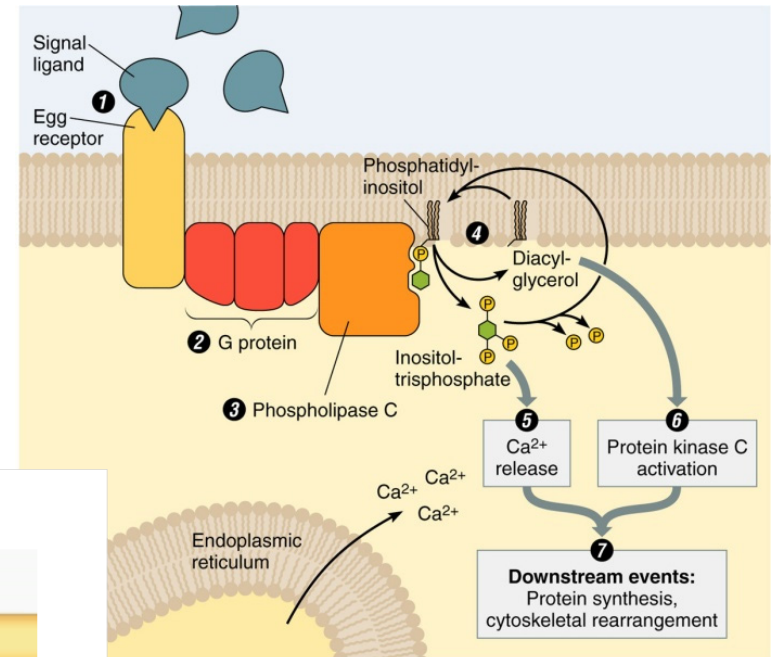
Význam PI

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

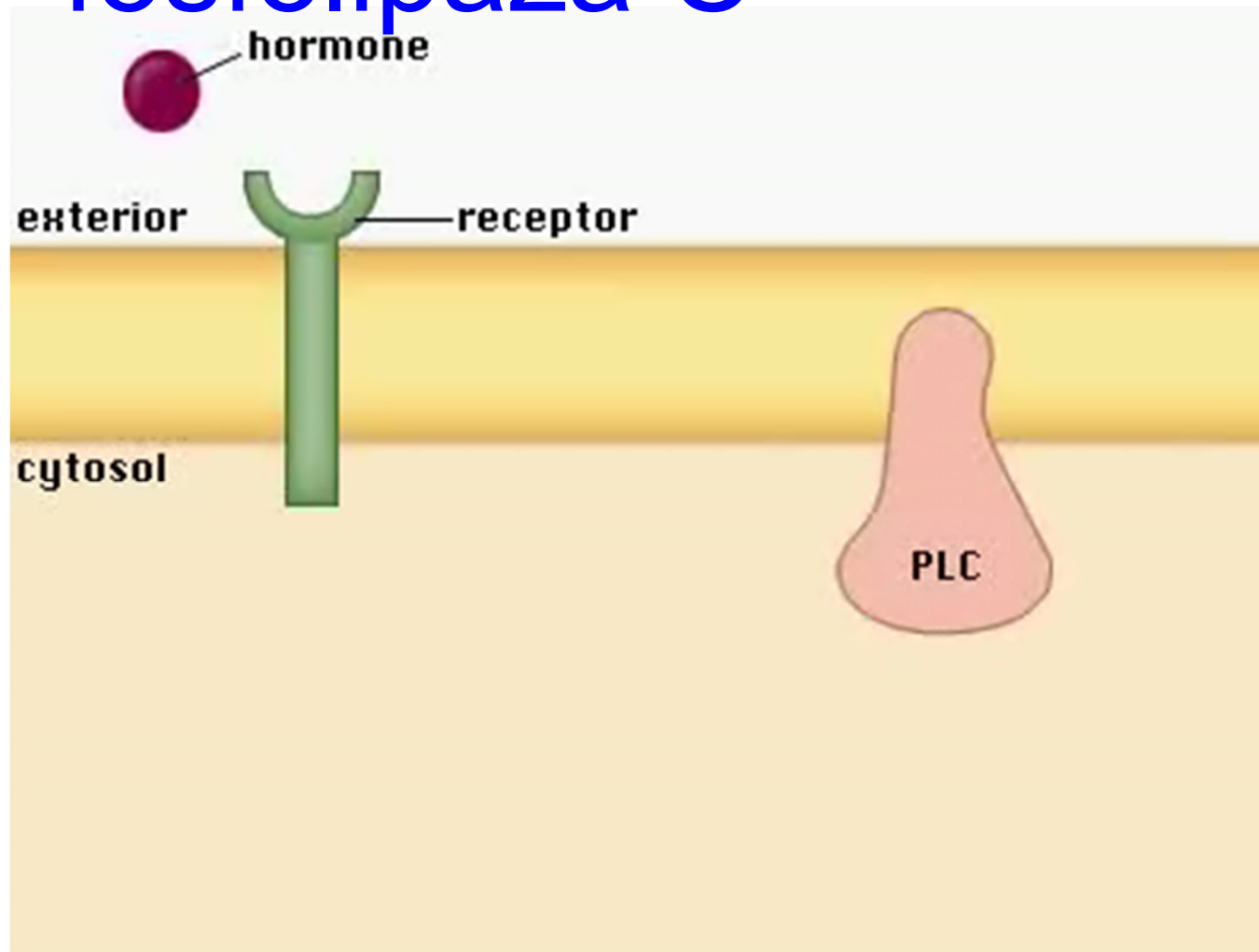
PI a přenos signálu

PI a přenos signálu

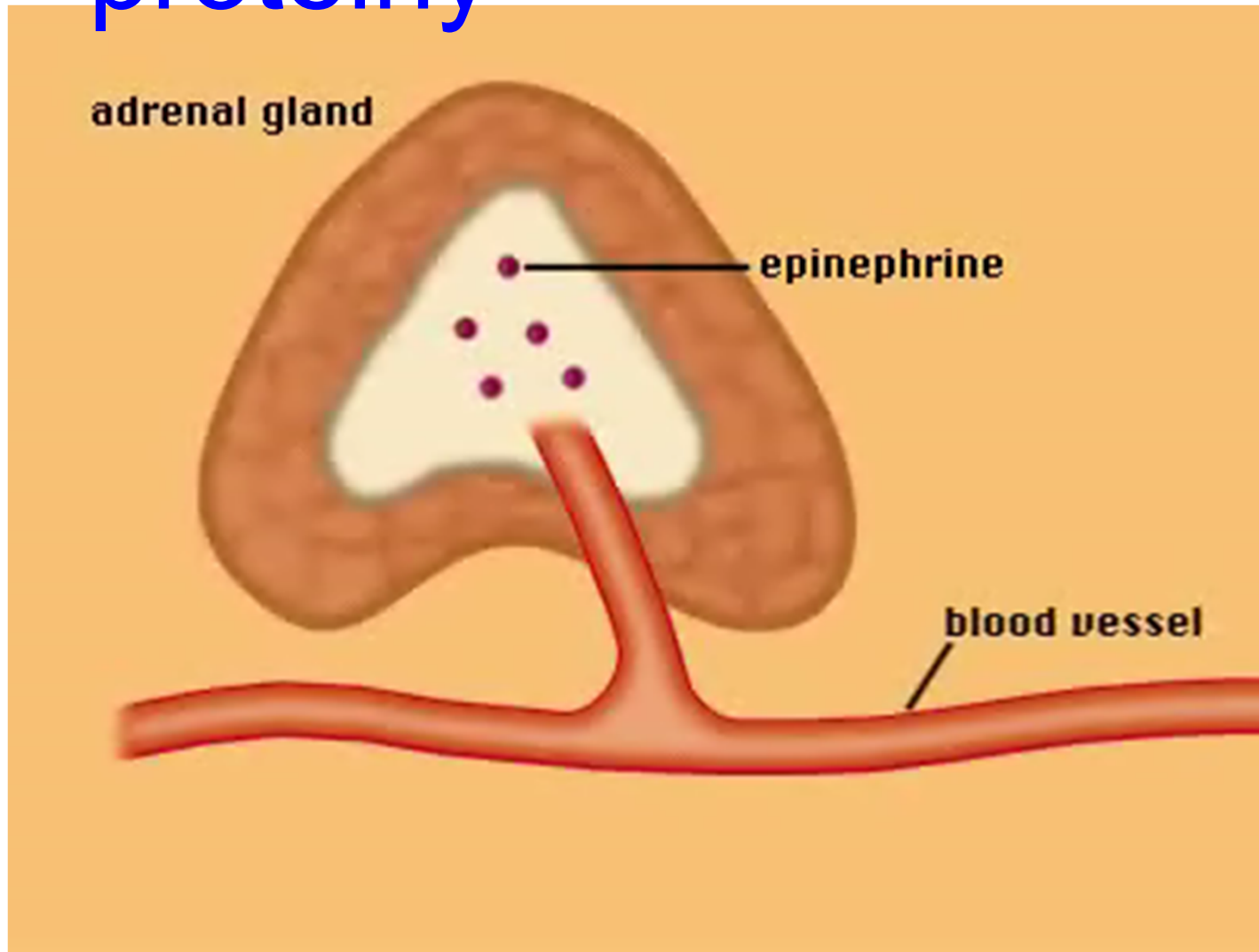
- prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
- Signální kaskády využívající cAMP



Přenos signálu a fosfolipáza C



Receptory aktivované G proteiny



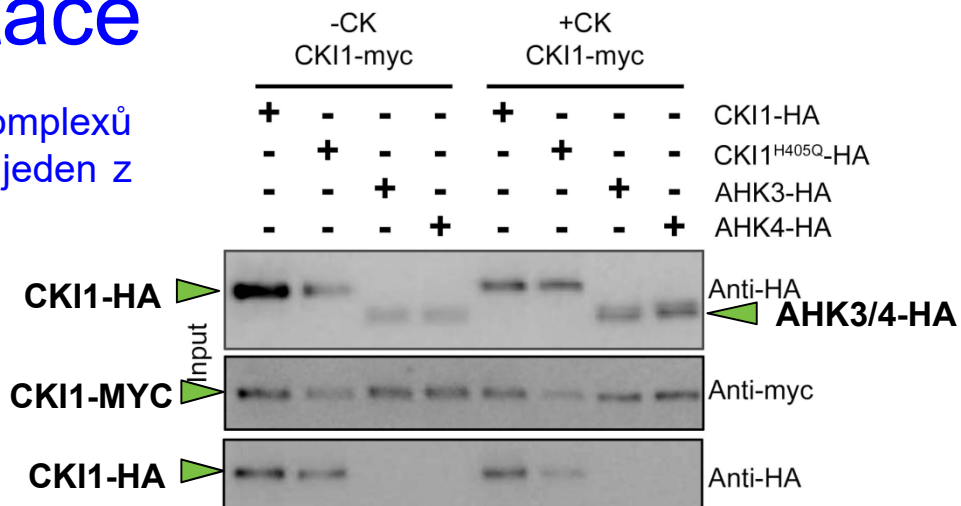
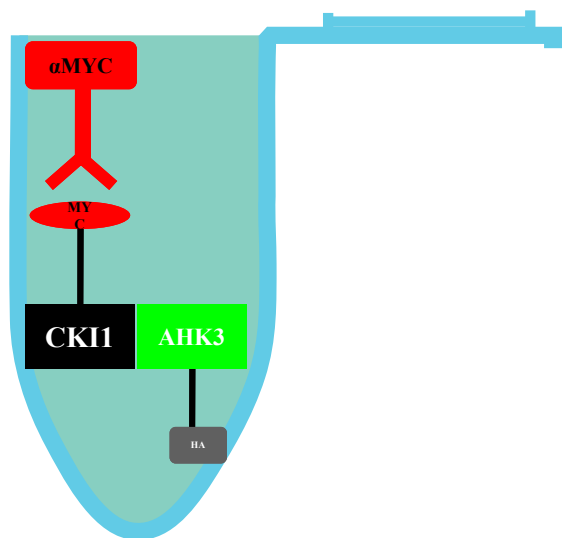
Osnova

- 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**



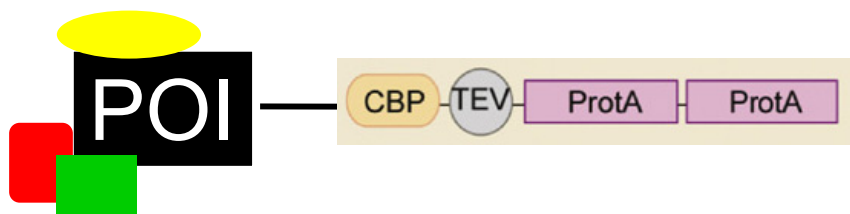
Osnova

- 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)

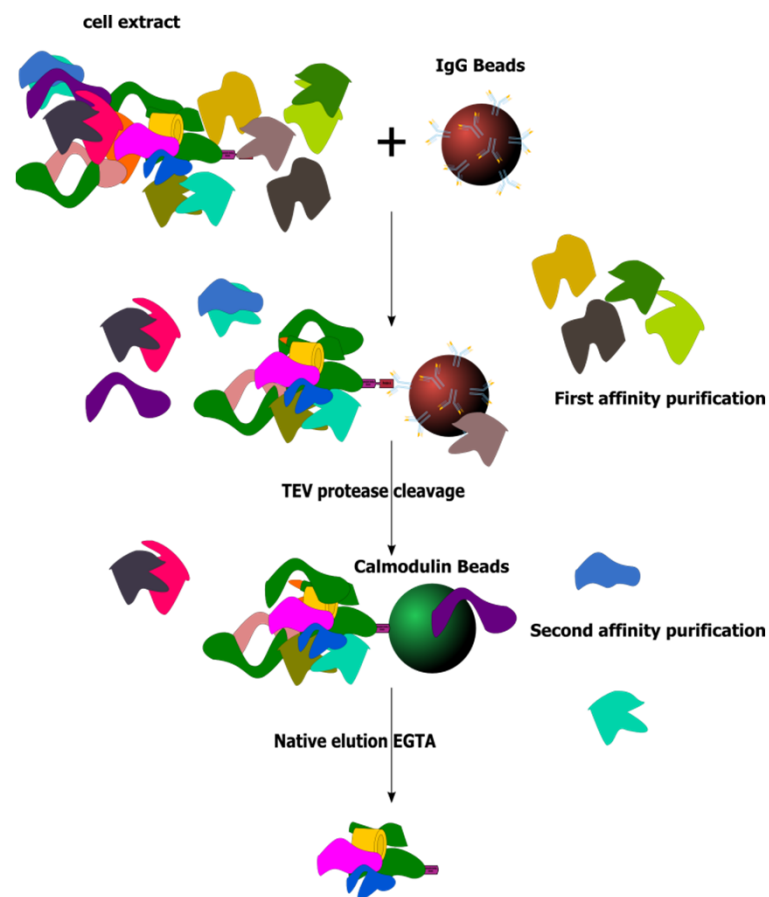
PI *in vivo*

Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

- izolace proteinových komplexů pomocí rekombinantních proteinů, fúzaných 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



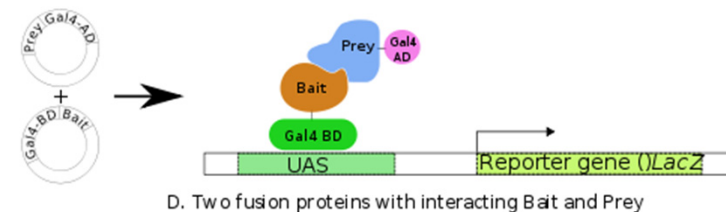
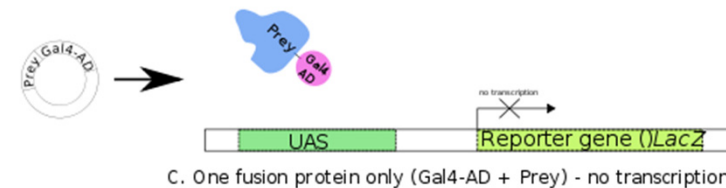
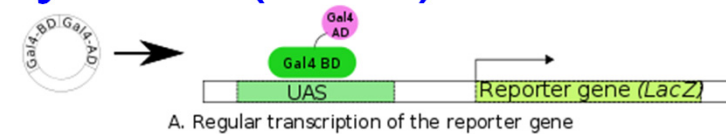
Osnova

- 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)

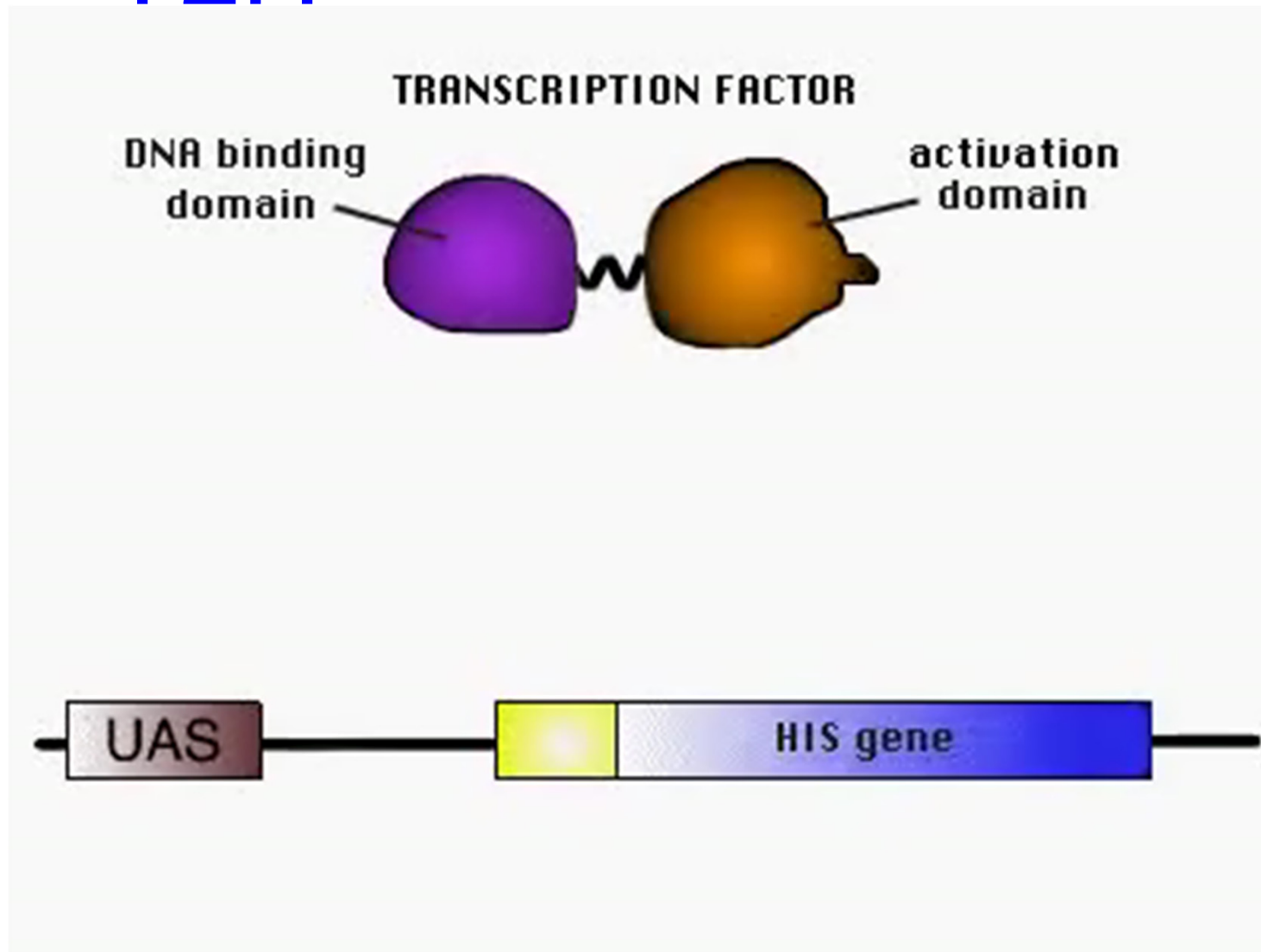


umožňuje vyhledávání interakčních partnerů v expresních knihovnách jednotlivých organismů

Y2H



Y2H



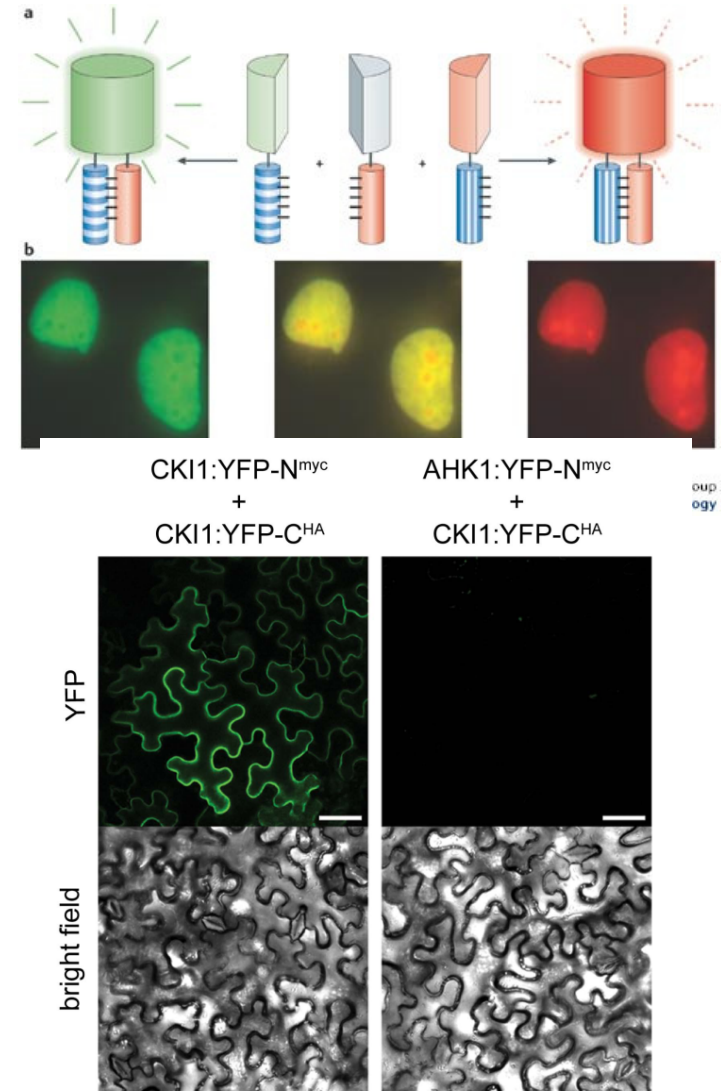
Osnova

- 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)

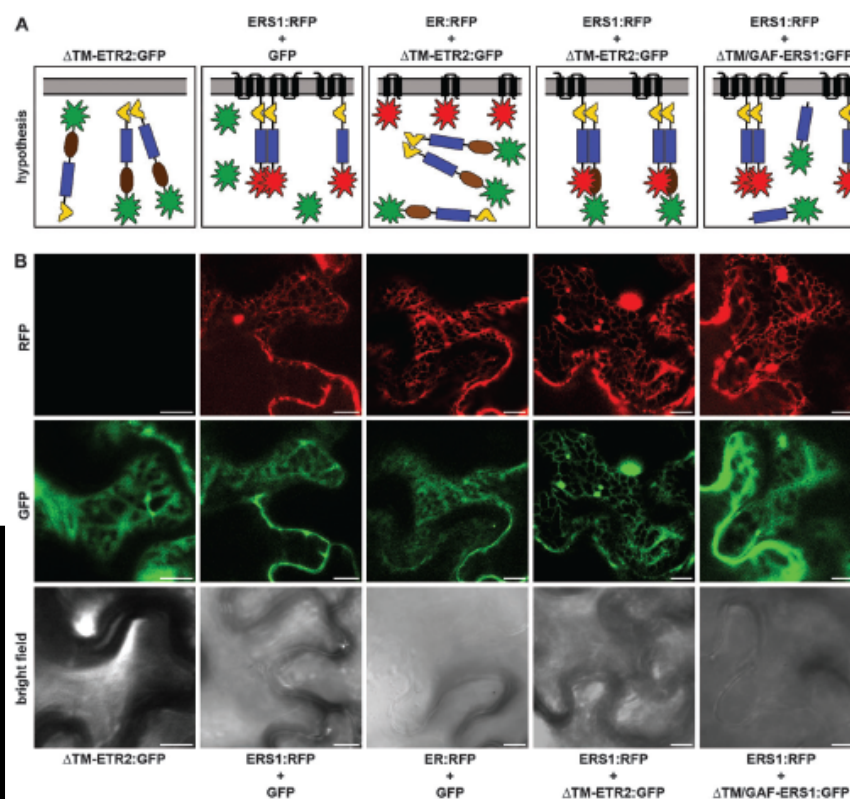
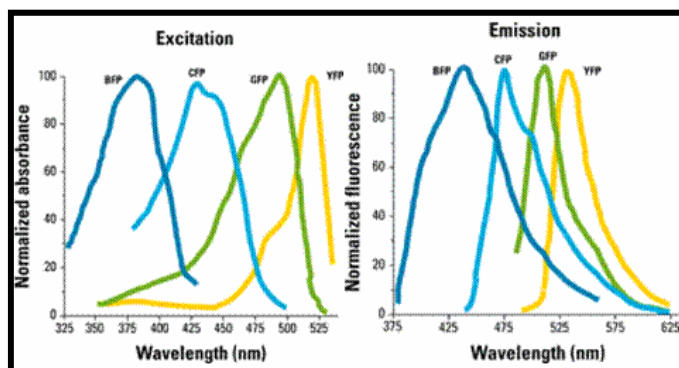
- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny



membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

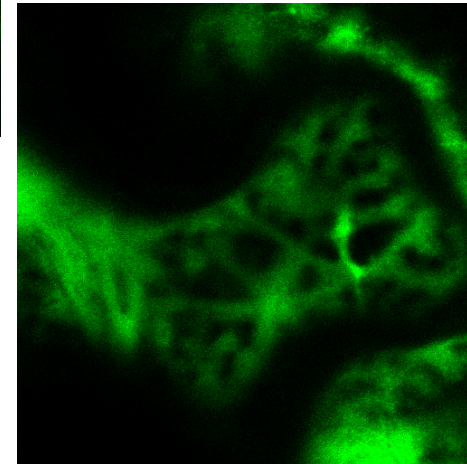
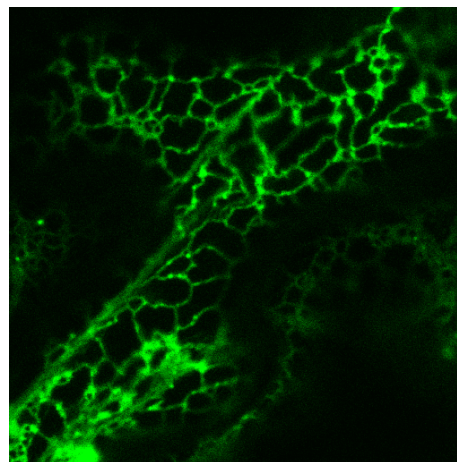
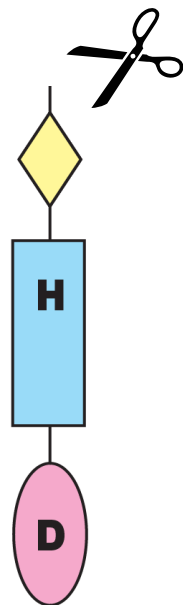
potenciální interakční partner je fúzován s jímým fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem

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



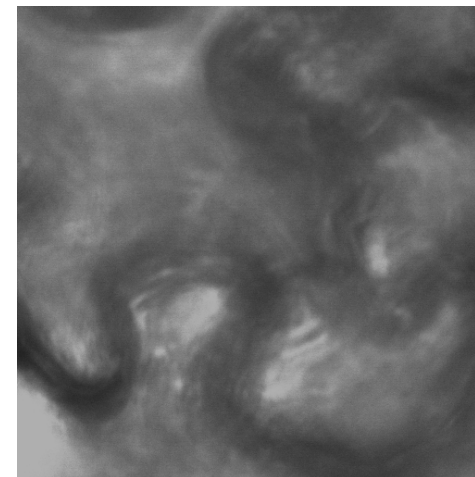
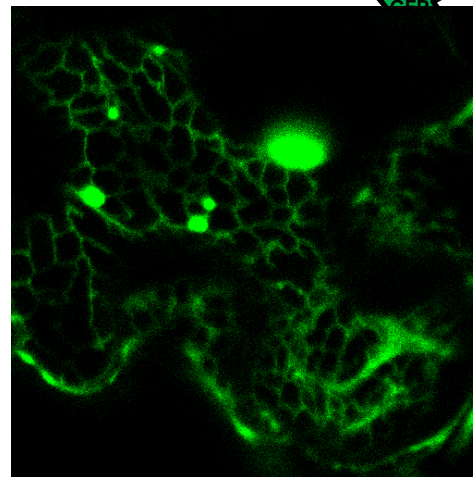
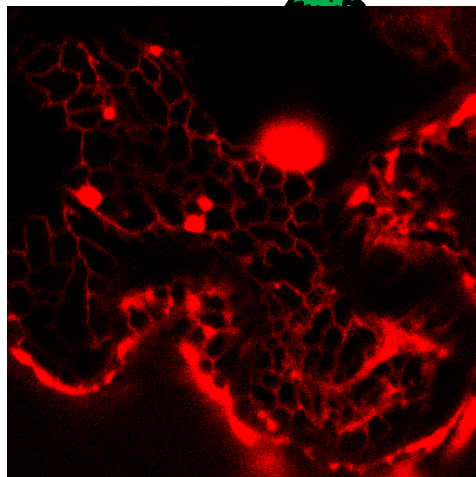
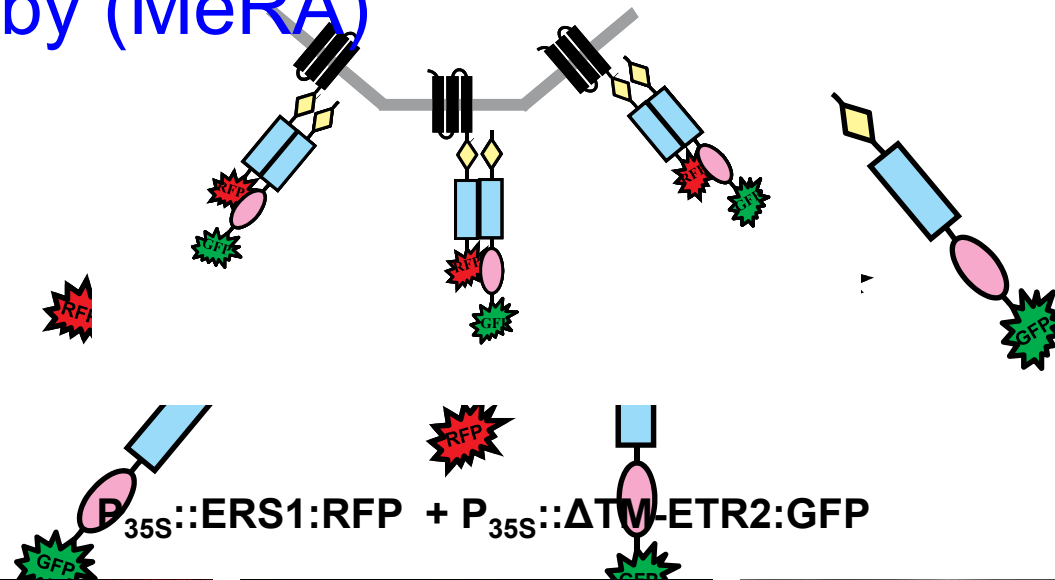
PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



PI *in vivo*

Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)



Klíčové koncepty

- Proteiny a jejich interakce jsou zásadním mechanismem regulace genové exprese
- Podílejí se na regulaci
 - Struktury chromatinu
 - Iniciaci transkripce
 - Lokalizace mRNA
 - Zprostředkovávají regulaci genové exprese v odpovědi na různé typy signálů
- Proteinové interakce lze detekovat *in vivo* např. pomocí
 - Koimunoprecipitace
 - Tandemové afinitní purifikace (TAP-tag)
 - Kvasinkového dvouhybridního testu (Y2H)
 - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
 - Analýzy zprostředkované membránové vazby (MeRA)

Diskuse