

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

**M U N I**  
**S C I**



# Genomika 07

## ▪ Zdrojová literatura

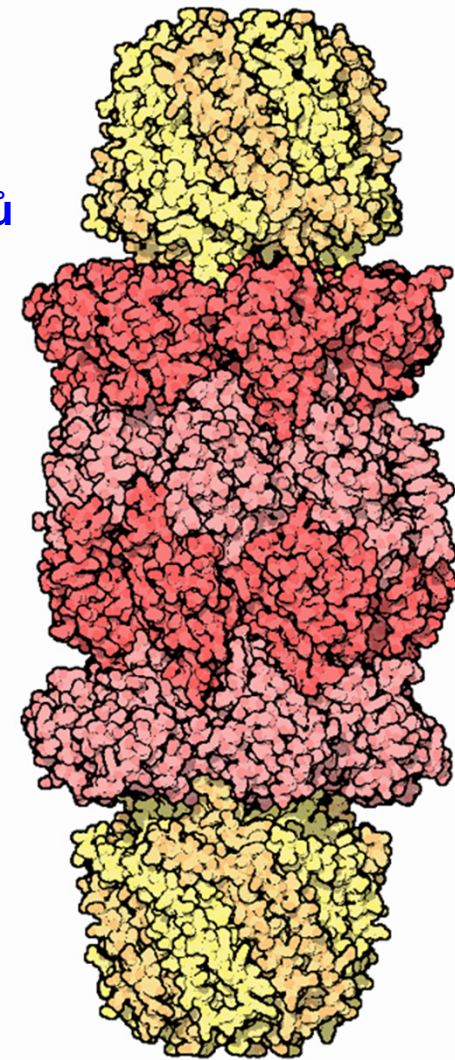
- Wilt, F.H., and Hake, S. (2004). **Principles of Developmental Biology**. (New York ; London: W. W. Norton).
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *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., 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)
  - Blízkostní značení (proximity labeling)
  - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - FLIM/FRET
  - 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

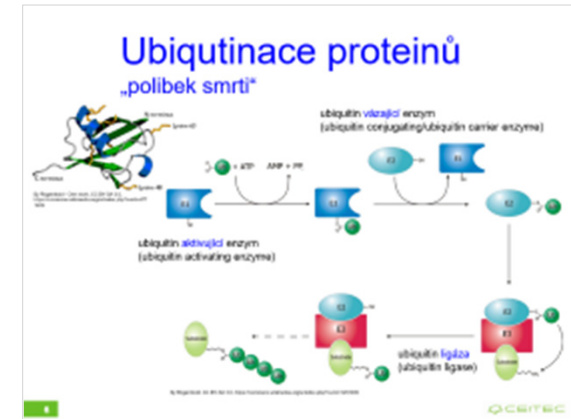


1fnt

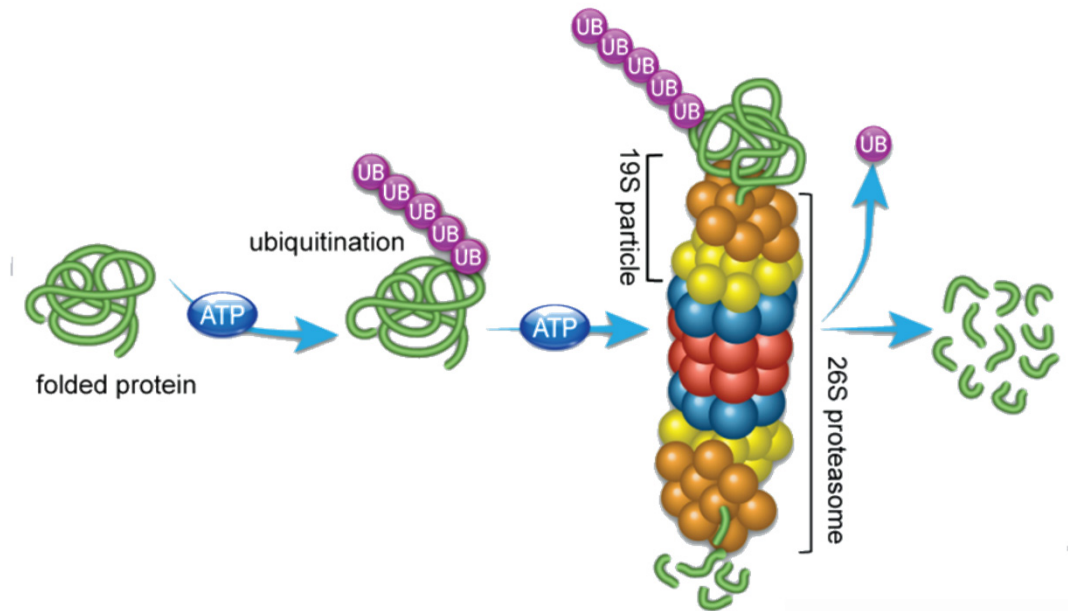
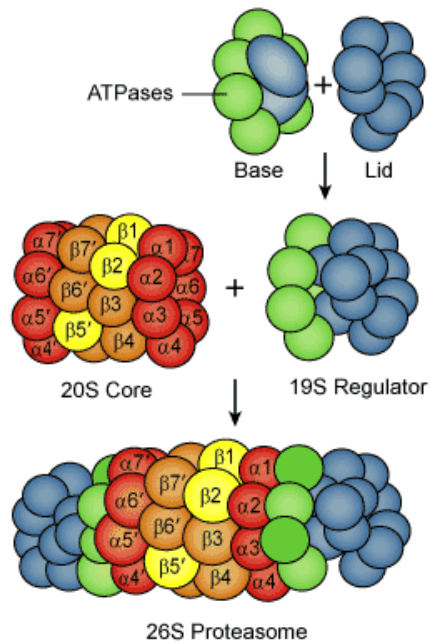
# Význam interakcí proteinů

## 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) - **ubiquitem**

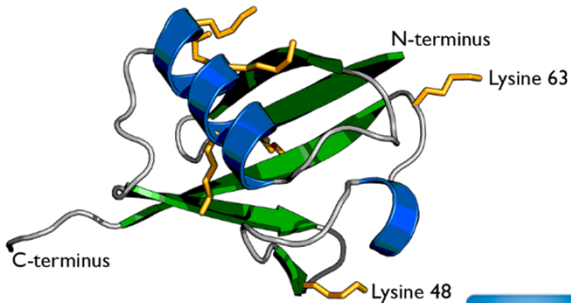


## 20S & 26S PROTEASOME

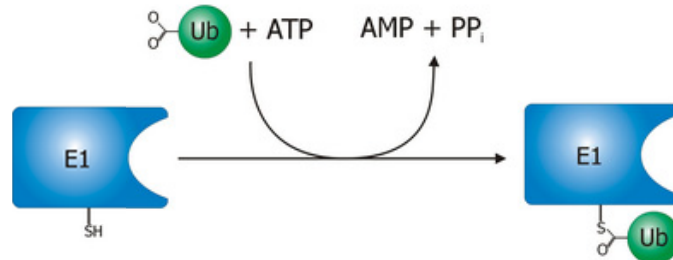


# Ubiquitinace proteinů

## „polibek smrti“

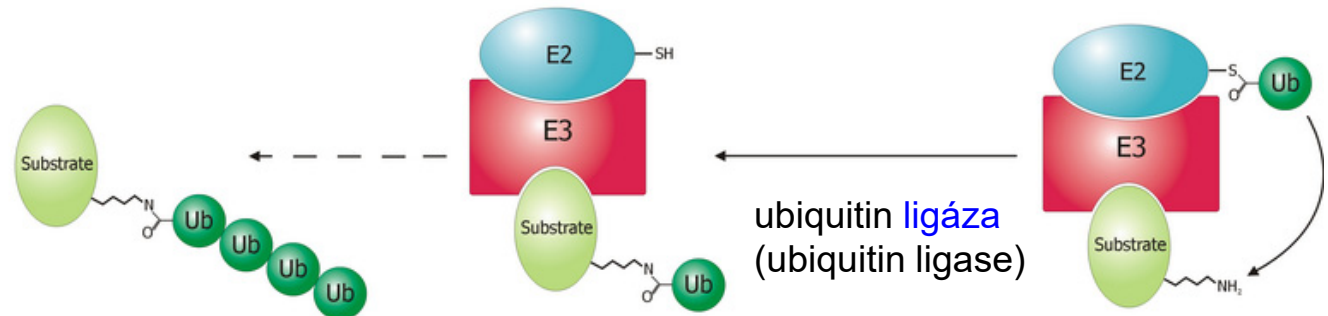
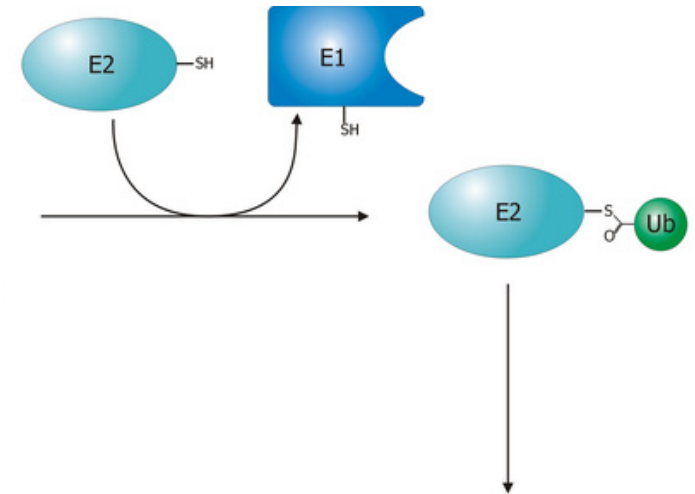


By Rogerdodd - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4771409>



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

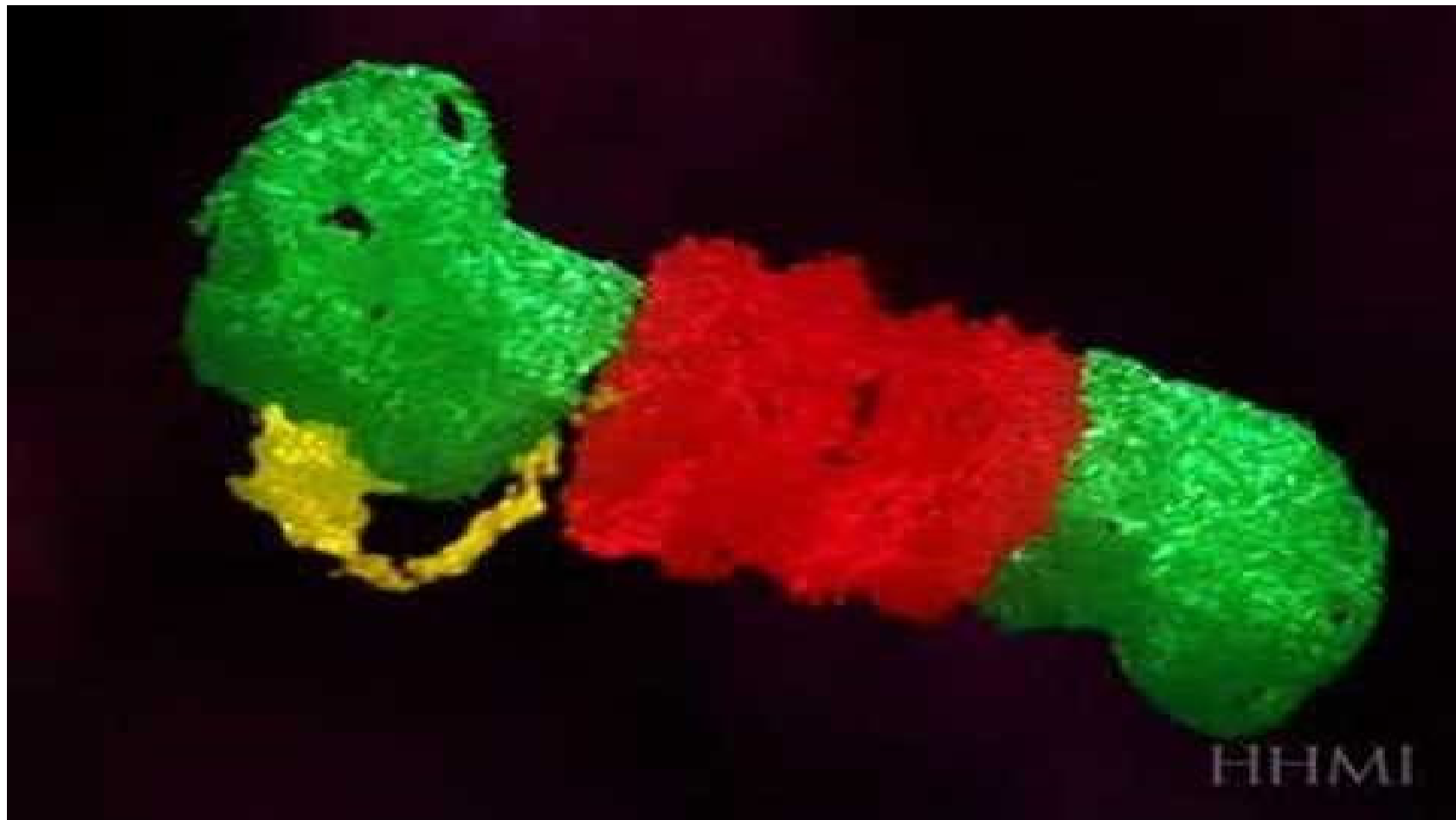
ubiquitin **vázající** enzym  
(ubiquitin conjugating/ubiquitin carrier enzyme)



ubiquitin **ligáza**  
(ubiquitin ligase)

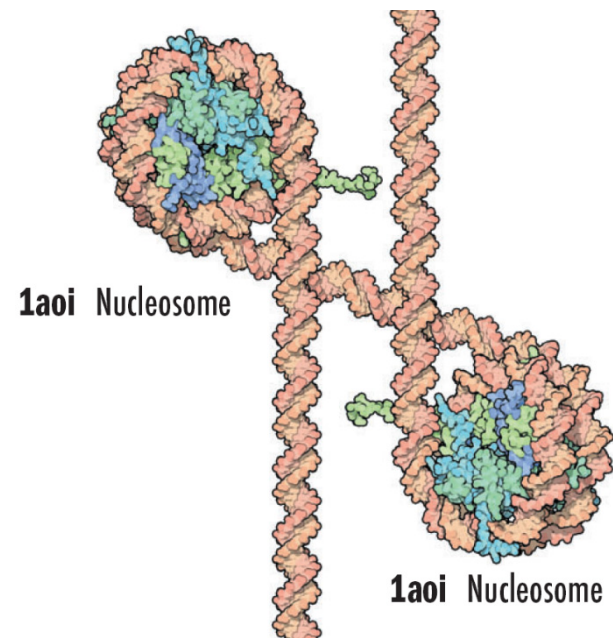
By Rogerdodd, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1291009>

# Proteasome – řízená proteolýza

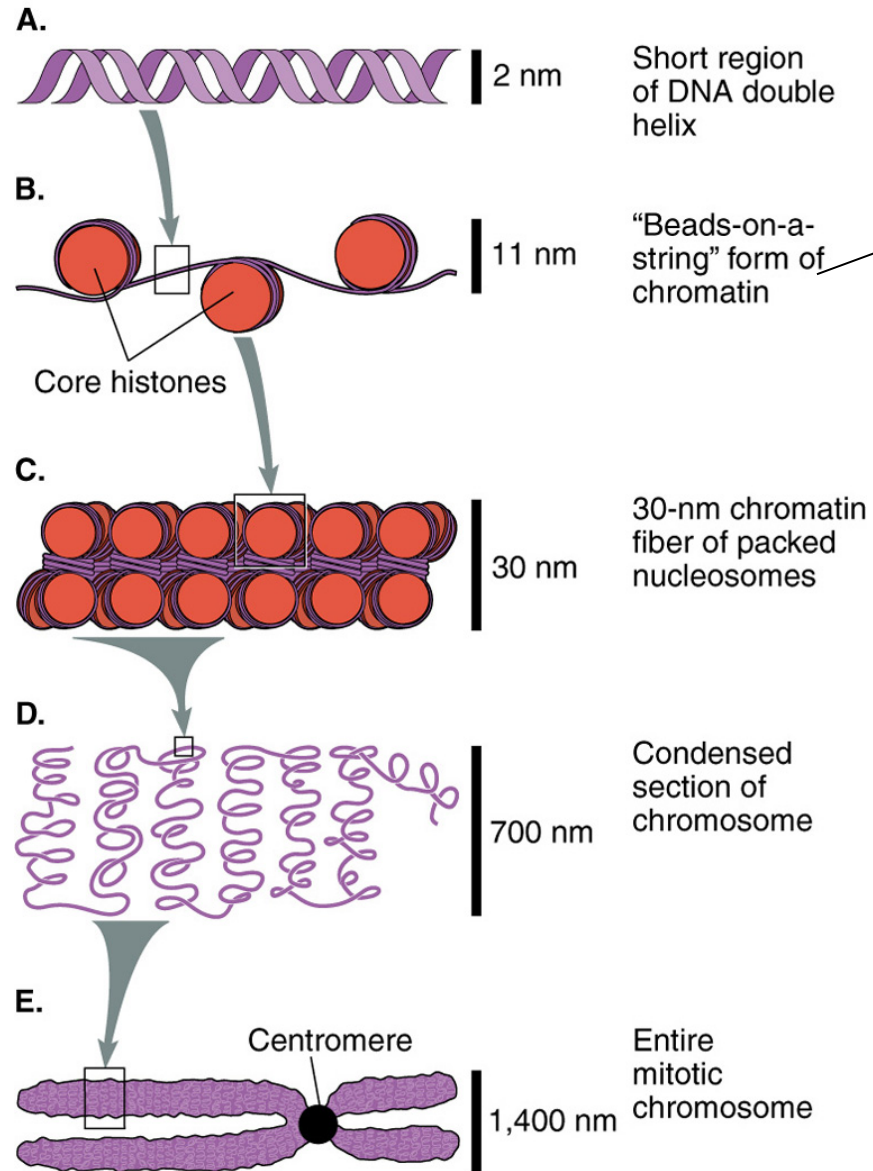


# Význam PI

- Funkční význam specifických interakcí proteinů
  - Struktura chromatinu

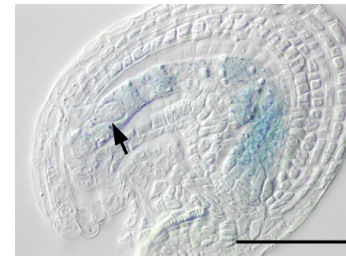
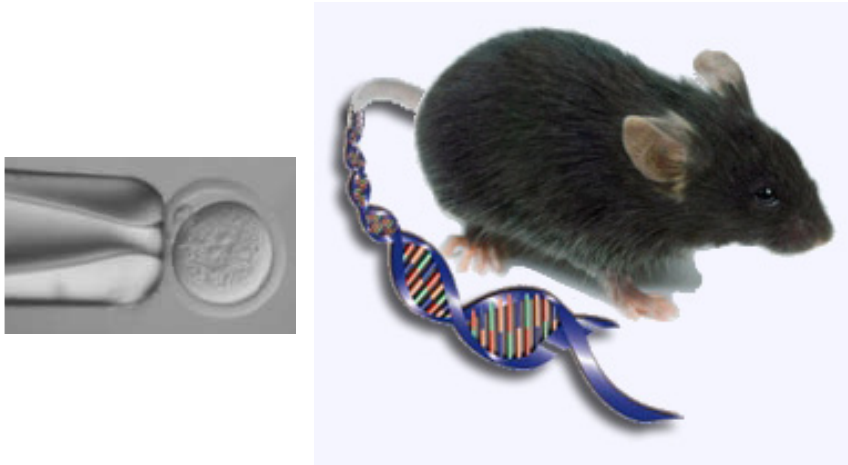






Regulation by **histone acetyl transferases** or **histone deacteylases**

# 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



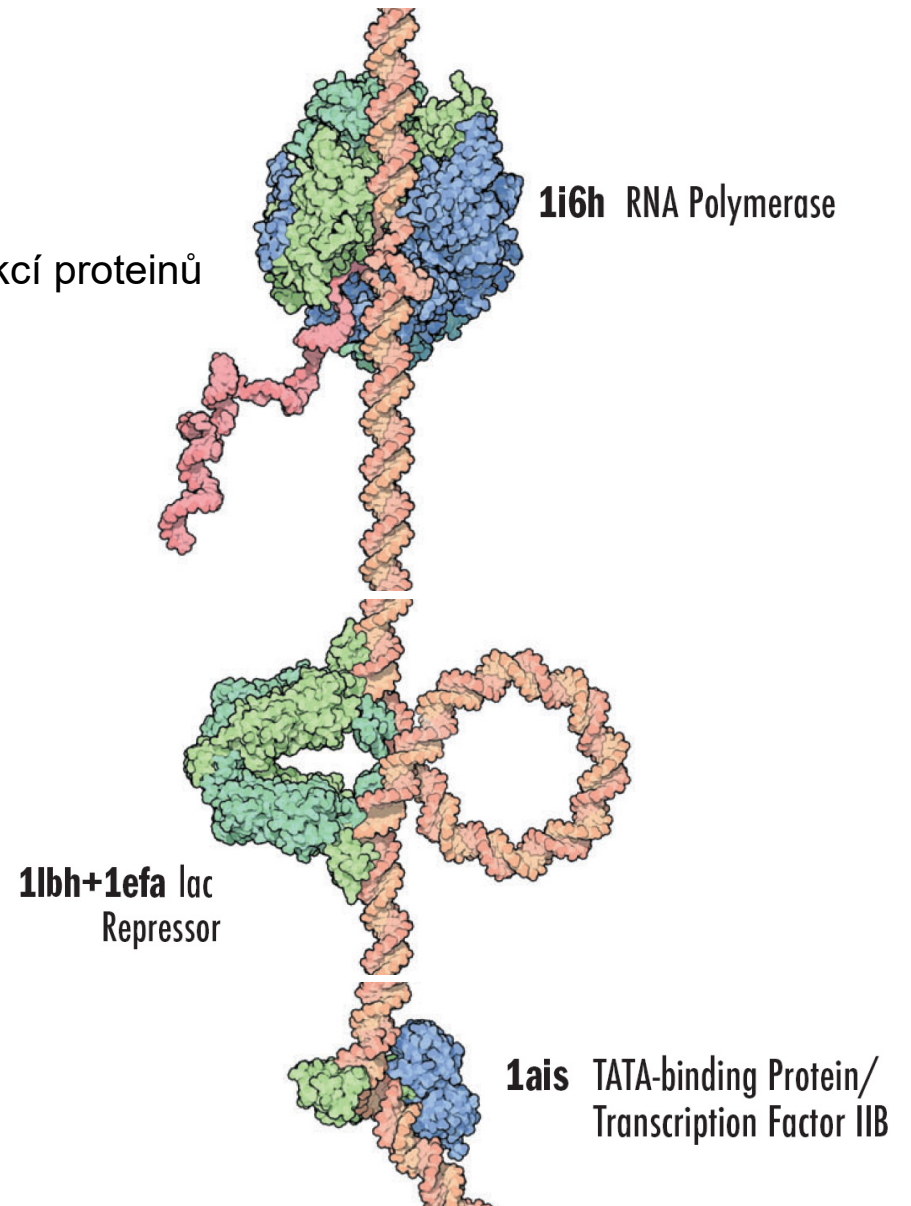
methylation status

**CpG or CpNpG**

**CpNpNp**

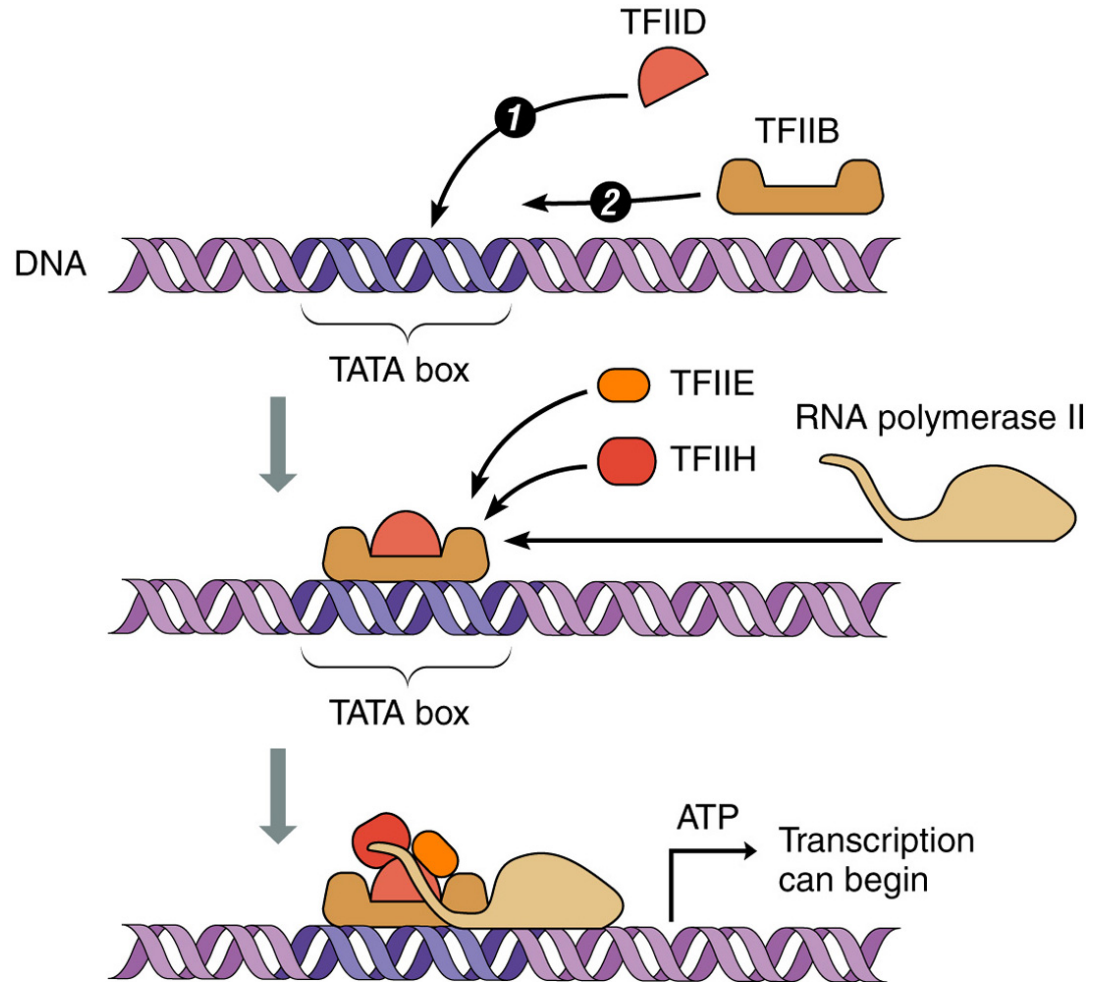
# Význam PI

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

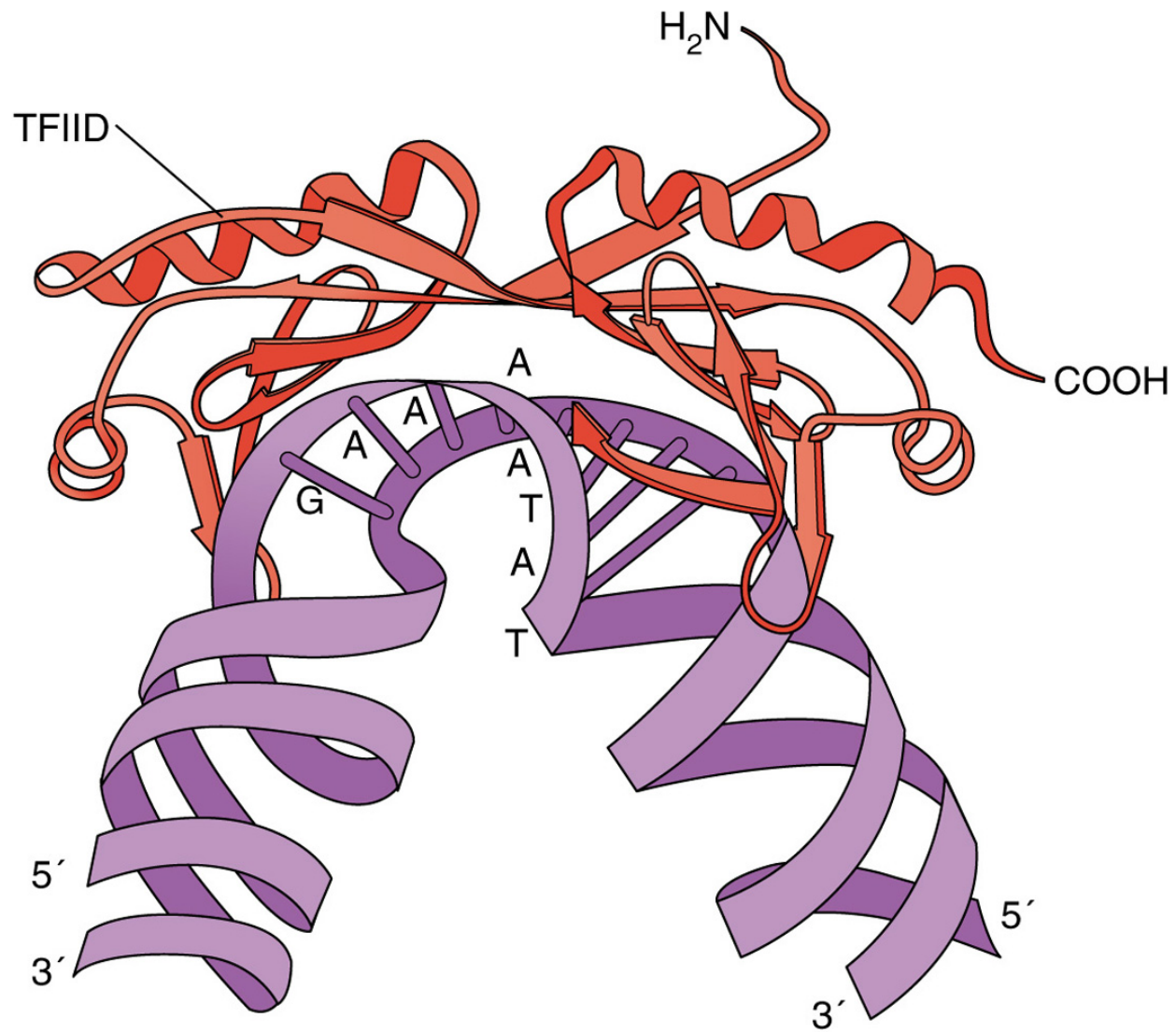


# Iniciace Transkripce

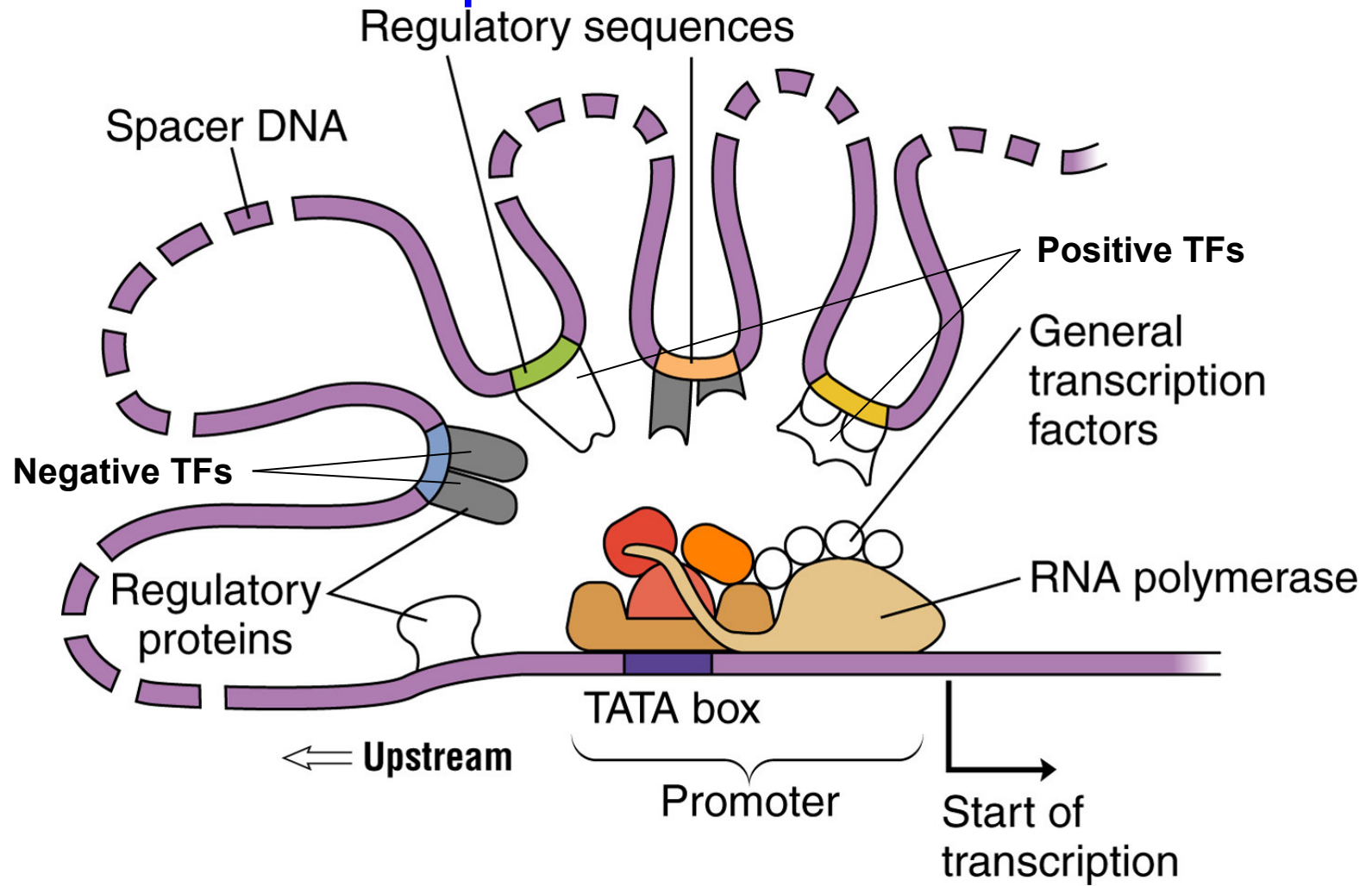
A.



B.



# Iniciace Transkripce



# Transcriční regulace prostřednictvím TAFs

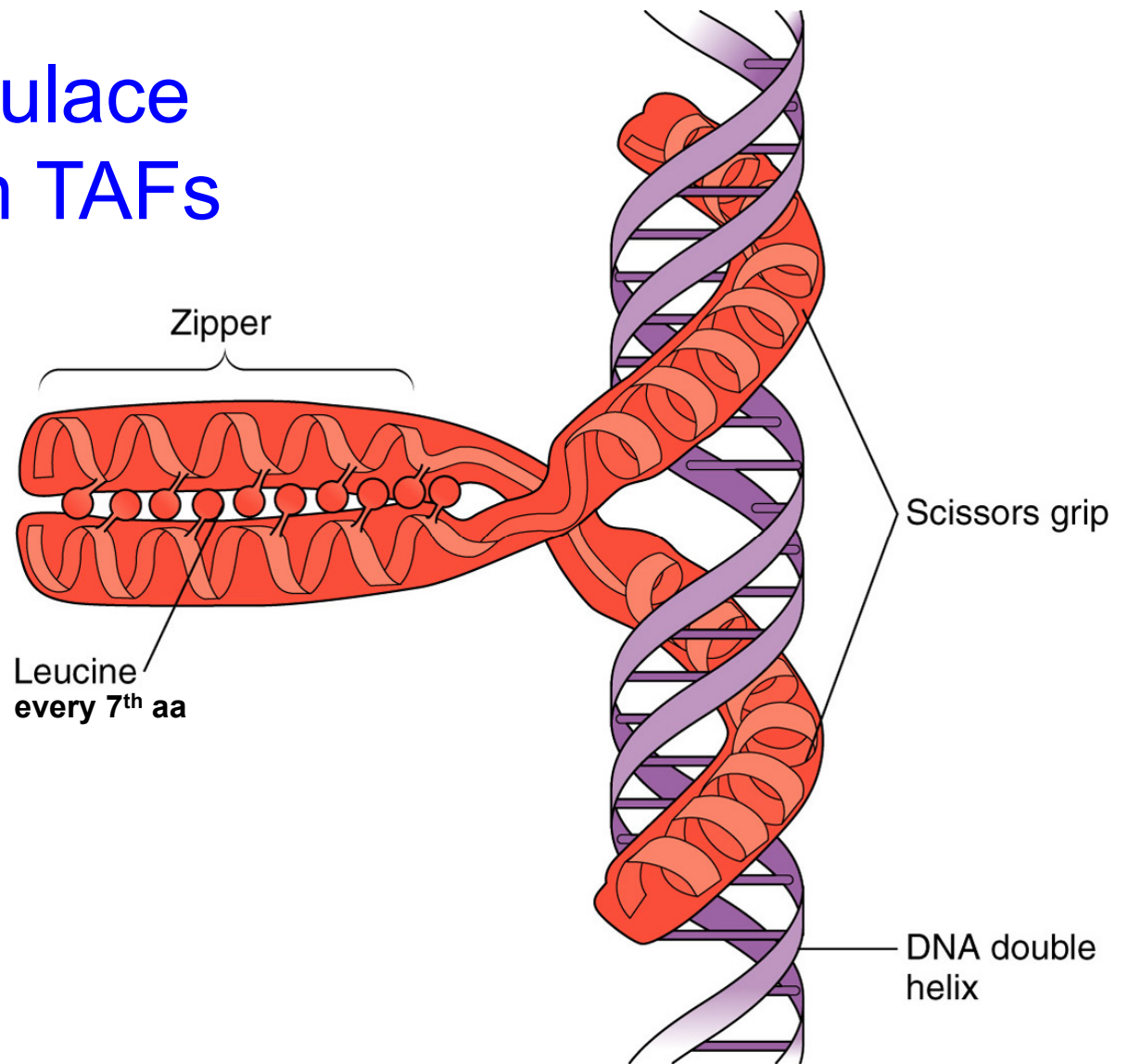
Signal recognition



Dimerization

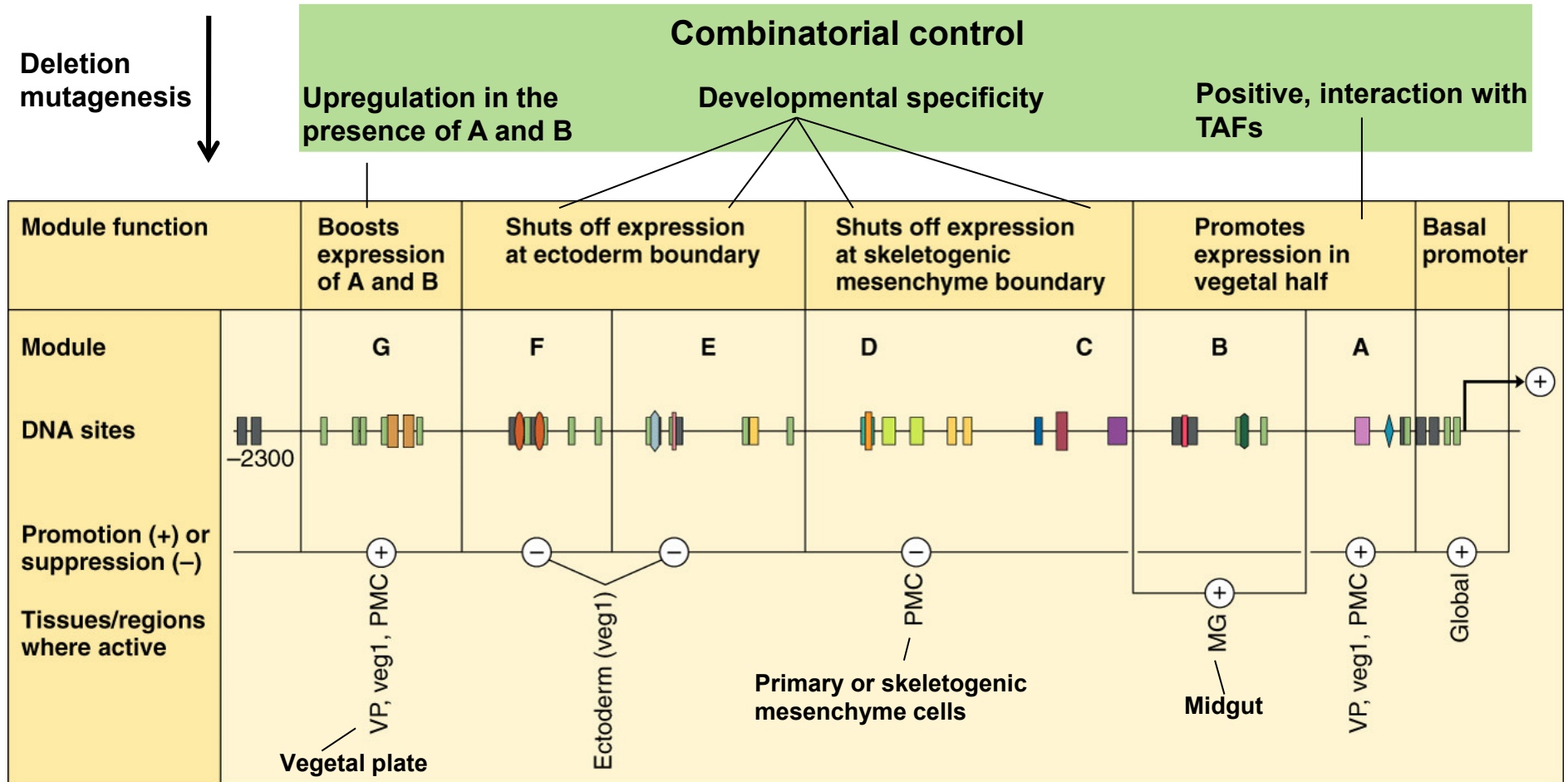


DNA binding and transcription activation



# Multifaktoriální kontrola promotorů

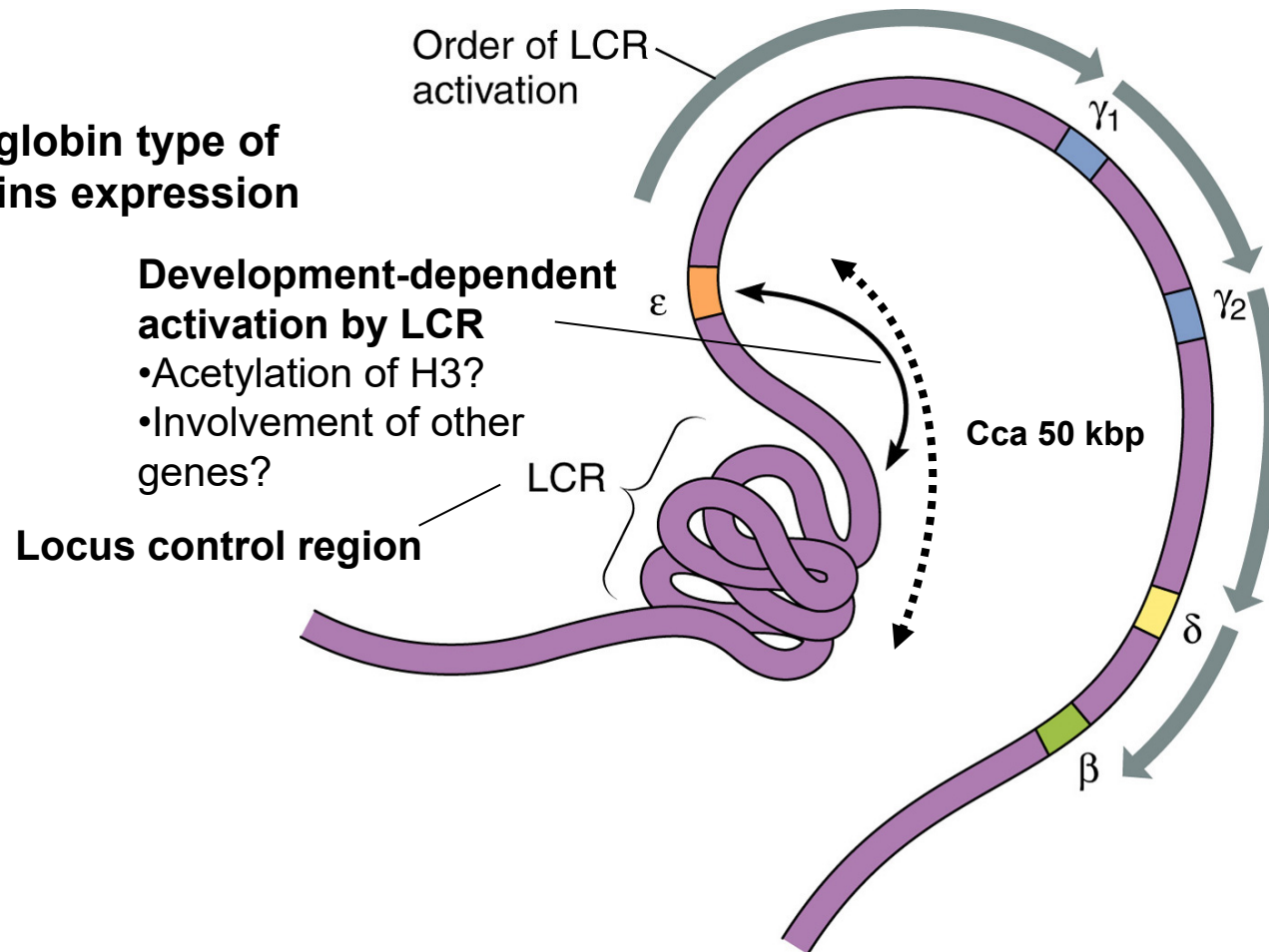
*ProENDO16:REPORTER* (sea urchin)





# Multifaktoriální kontrola promotorů

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

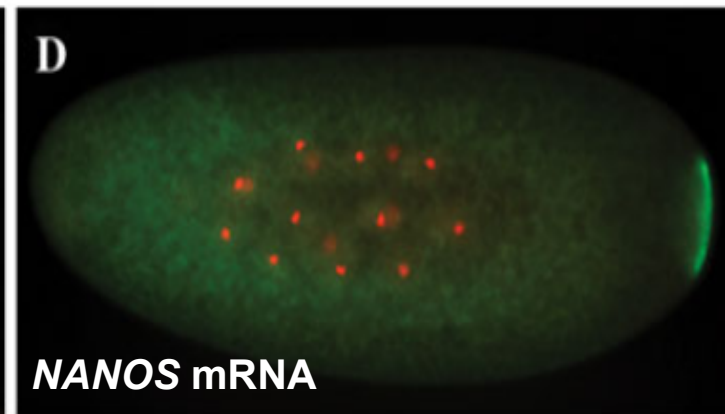
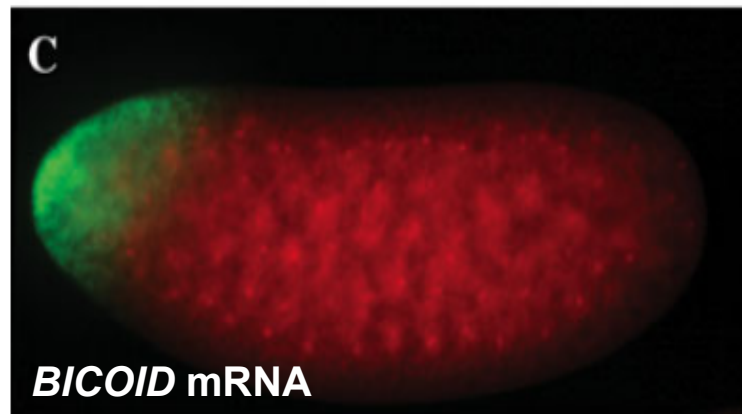
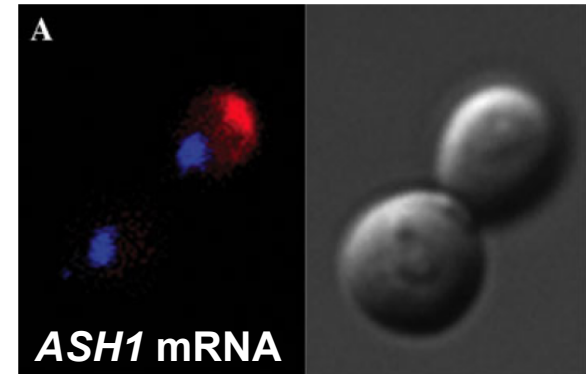


# Význam PI

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

# Lokalizace mRNA

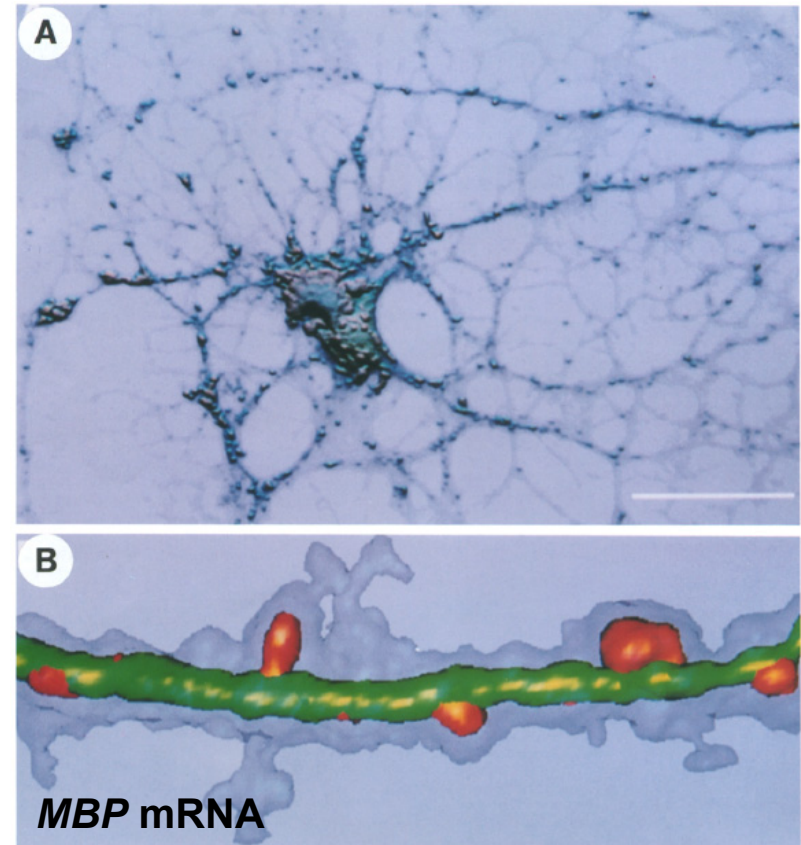
- Význam lokalizace mRNA
  - Lokalizace proteinového produktu genu v čase a místě
    - asymetrické dělení během vývoje
    - polarizace embrya



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

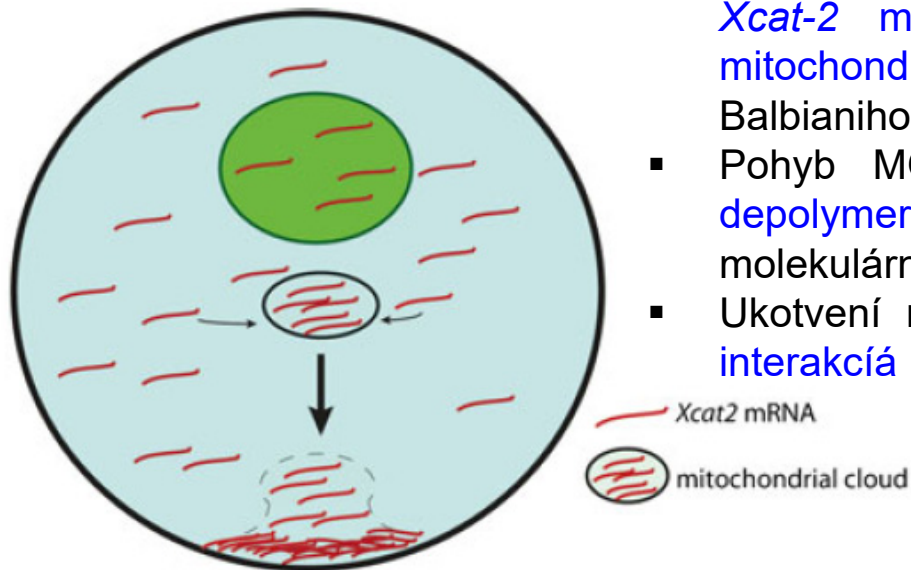


Ainger et al., 1993

# Lokalizace mRNA

## 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

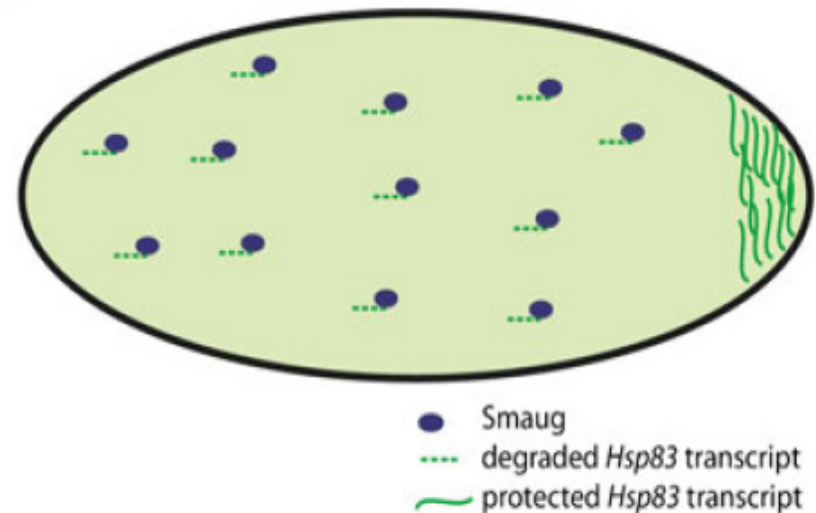
# Lokalizace mRNA

## Mechanizmy

Shahbadian and Chartrand, 2012

### ▪ Lokalizovaná degradace mRNA

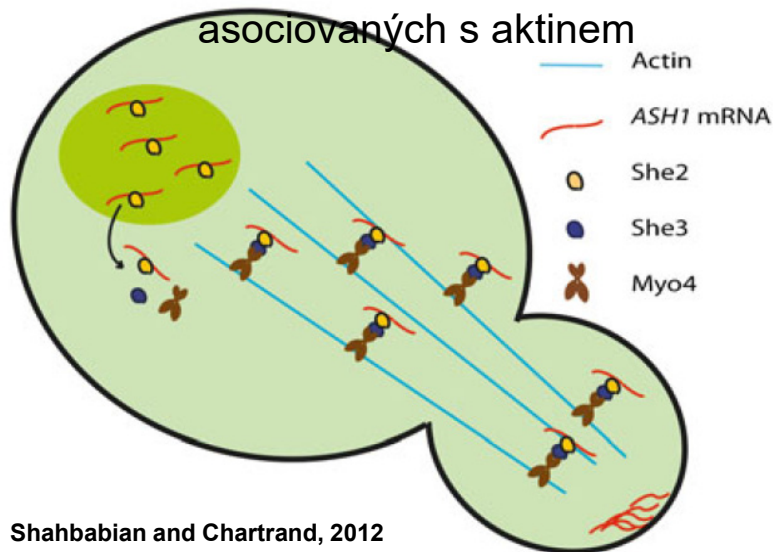
- V embryogenezi u *Drosophila m.* dochází k **polární lokalizaci *Hsp83* mRNA**, podobně jako *NANOS* mRNA
- *Hsp83* mRNA je lokalizována **v celém embryu**, zde je však **destabilizována prostřednictvím cis elementů** jak v 3'UTR (HDE), tak v kódující oblasti (HIE)
- **HIE elementy** jsou **rozpoznávány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



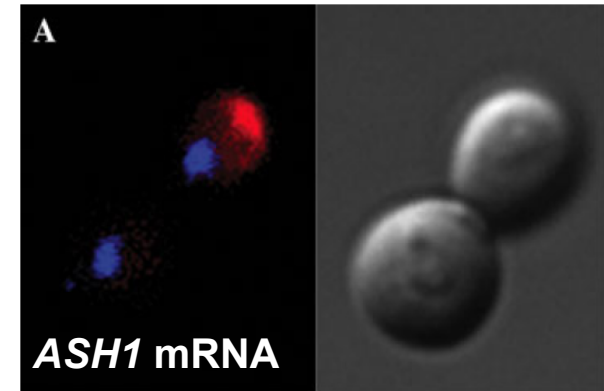
# Lokalizace mRNA

## 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



Shahbabian and Chartrand, 2012



Shahbabian and Chartrand, 2012

- ASH1 mRNA obsahuje 4 cis elementy (3 v CDS a 1 ve 3'UTR), které jsou rozpoznávány RNA vazebným proteinem SHE2
- SHE2 umožňuje prostřednictvím SHE3 vazbu na „molekulární motor“, MYO4, který se váže na aktin a umožňuje transport ASH1 mRNA do dceřinné buňky

# Význam PI

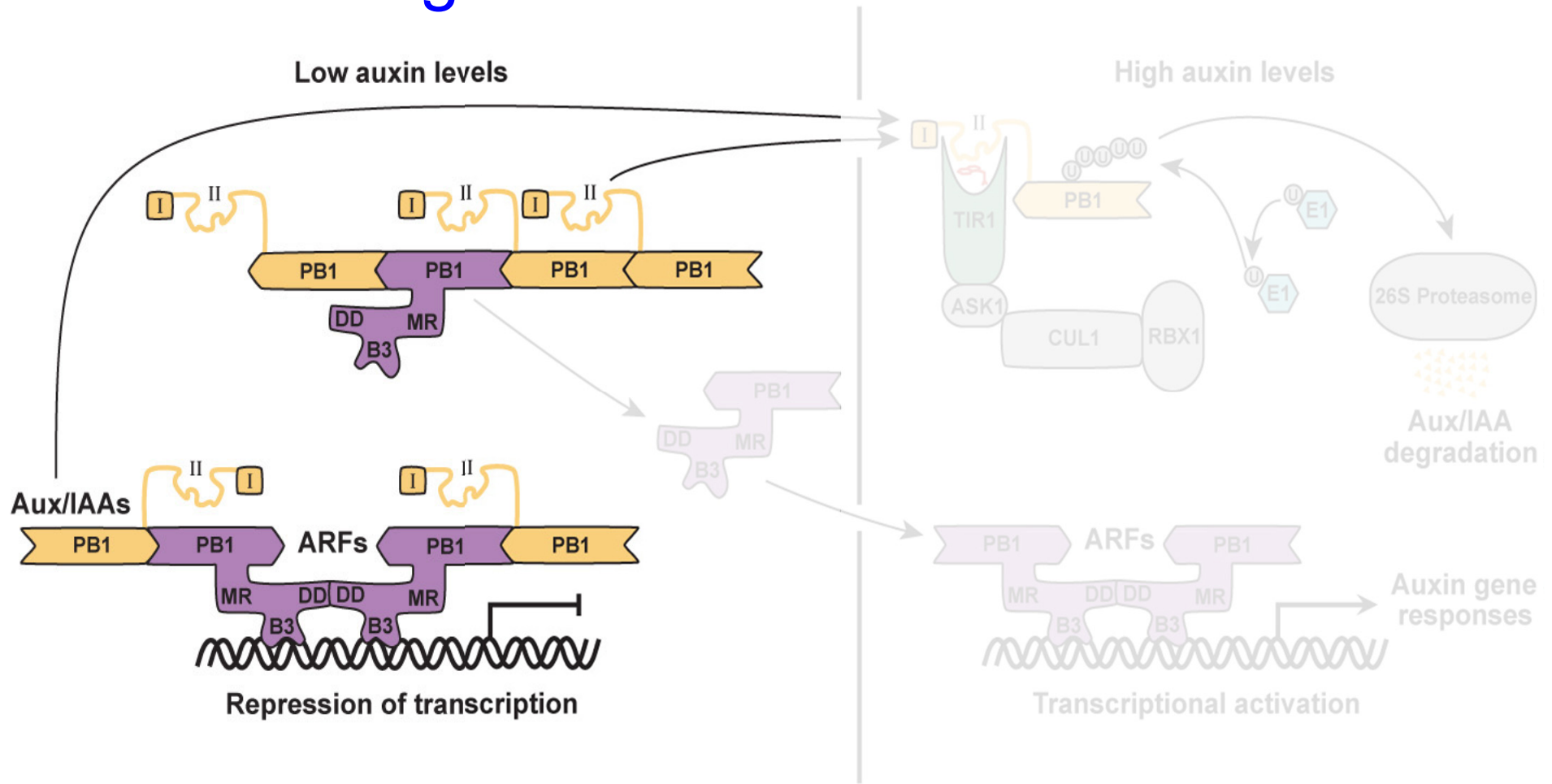
- Funkční význam specifických interakcí proteinů
  - Struktura chromatinu
  - Regulace transkripce
  - Lokalizace mRNA
  - Sestřih hnRNA



# 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)

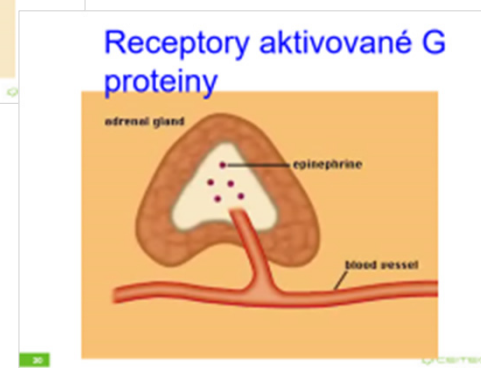
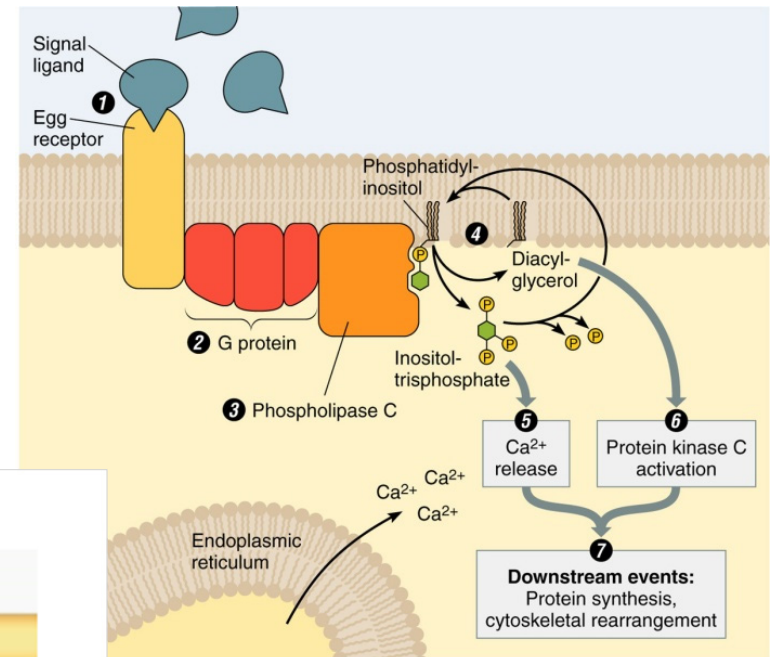
# Význam PI

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

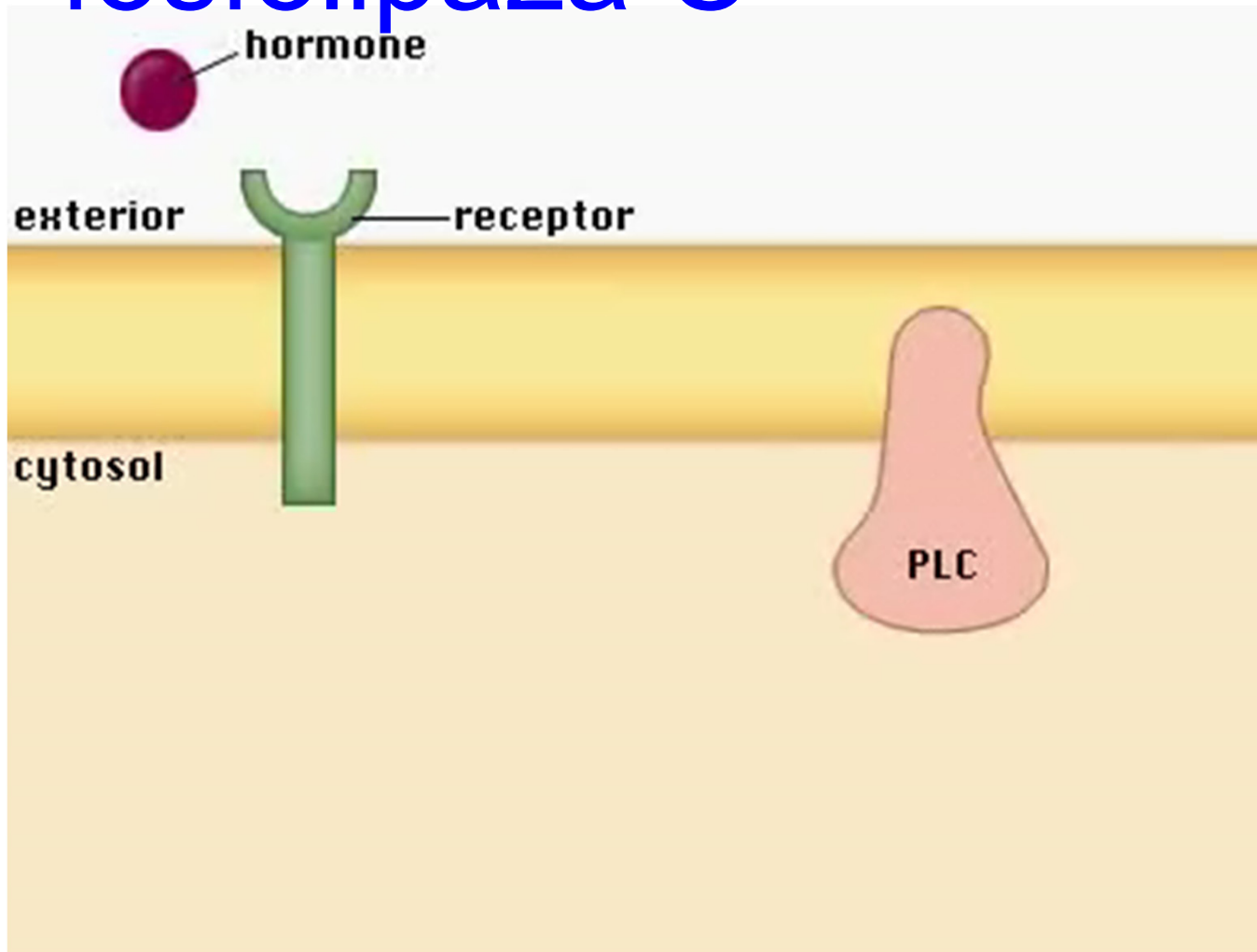
# PI a přenos signálu

## PI a přenos signálu

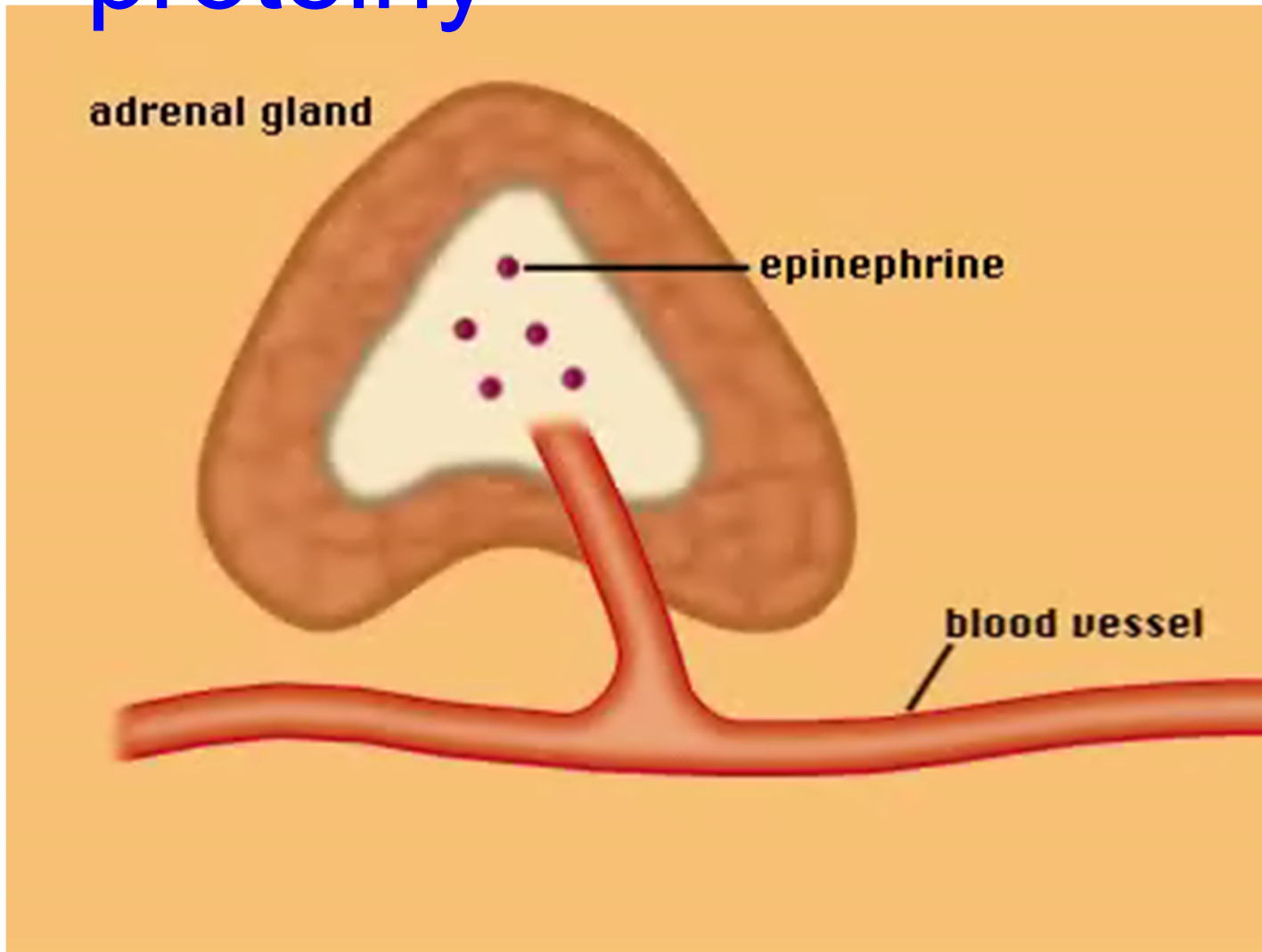
- prostřednictvím G proteinu a fosfolipasy C
- Signální kaskády využívající cAMP



# Přenos signálu a fosfolipáza C



# Receptory aktivované G proteiny



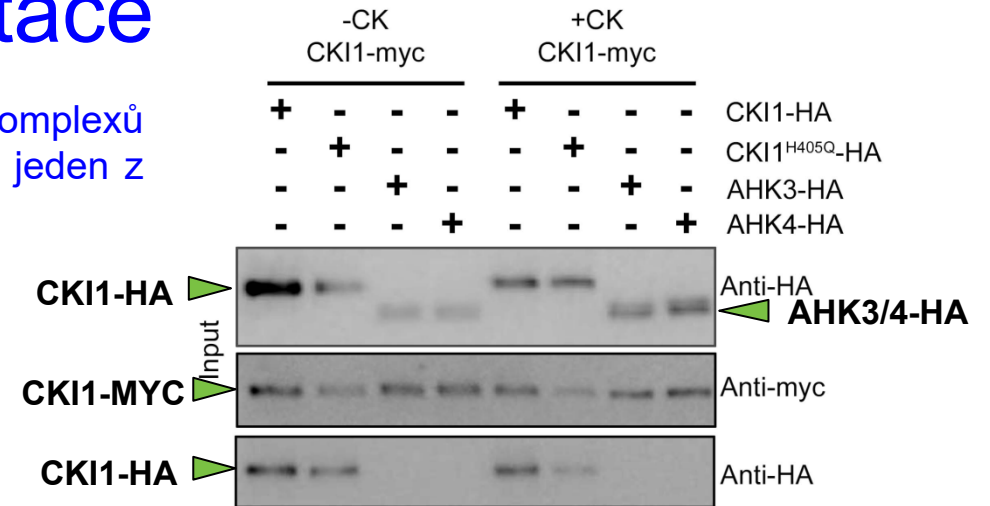
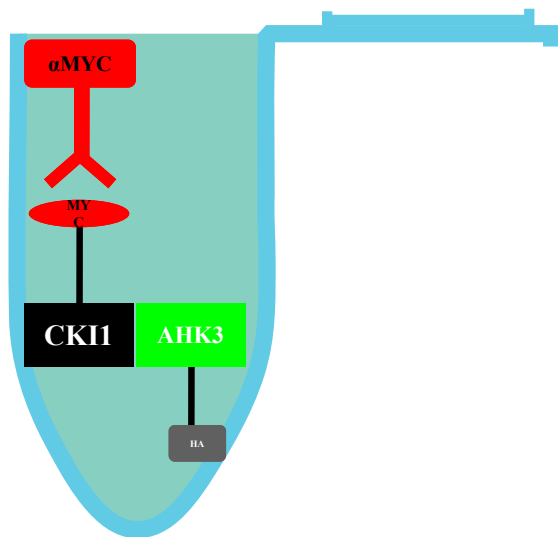
# Osnova

- 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**





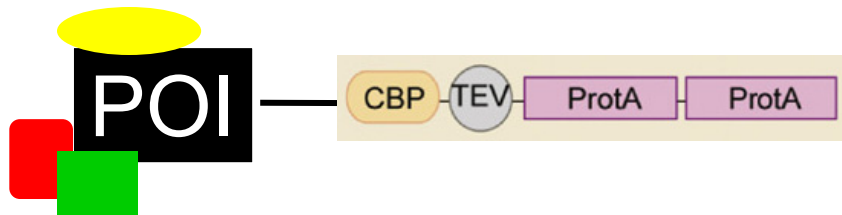
# Osnova

- 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)

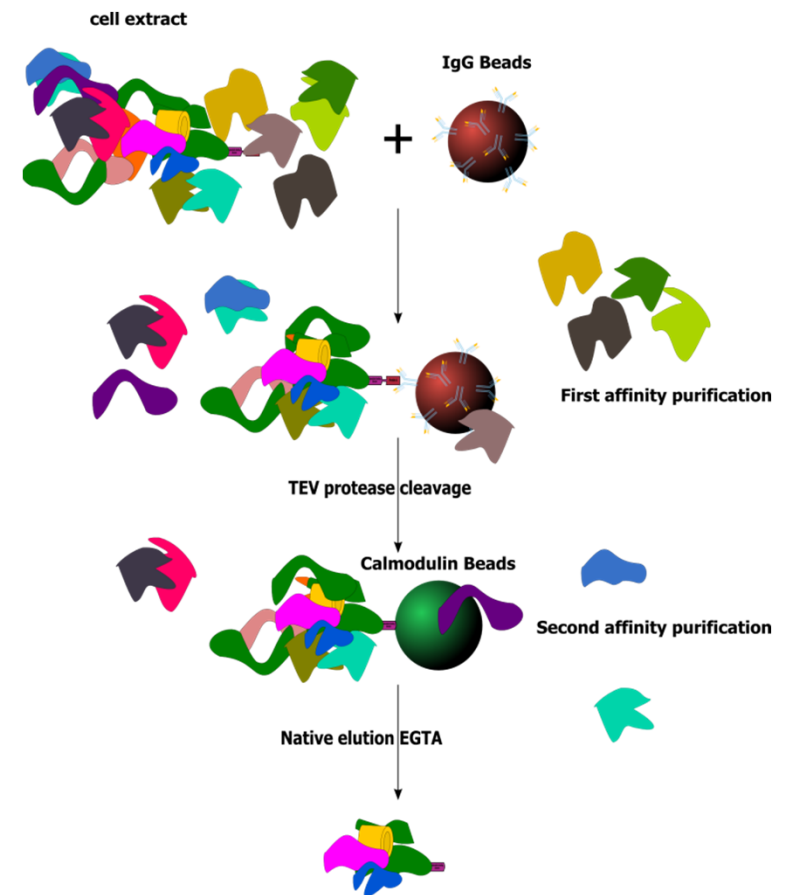
# PI *in vivo*

## Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)

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



- calmodulin-binding protein (CBP)
- IgG vázající domény proteinu A (ProtA)
- místo rozpoznávané specifickou proteázou z TEV viru (tobacco etch virus)
- proteiny izolovaných komplexů jsou po rozdělení na 1D ELFO identifikovány pomocí MS
- výhodou je použití dvou nezávislých proteinových domén pro afinitní purifikaci a tedy velká specifita

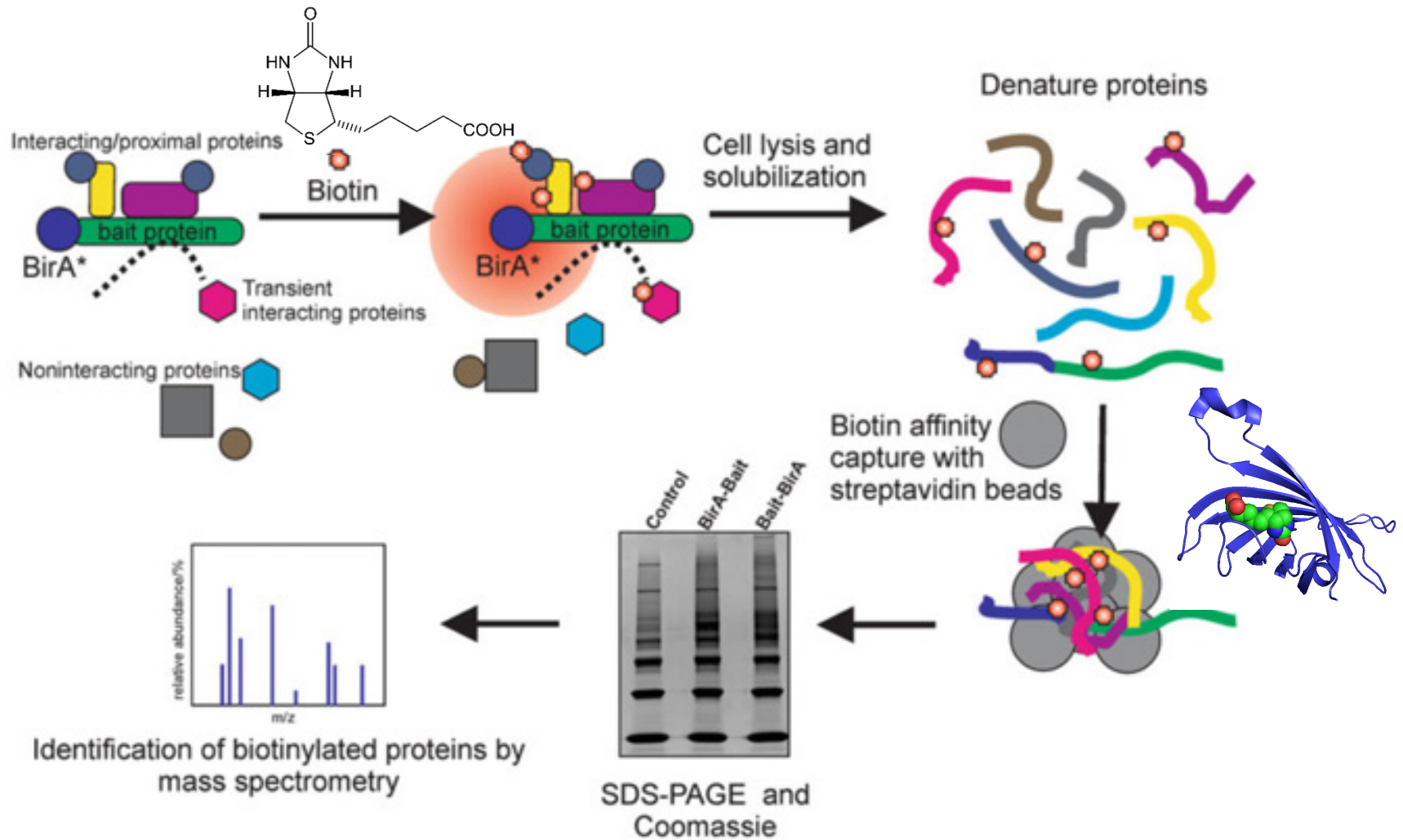


# Osnova

- 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)
  - Blízkostní značení (proximity labeling)

# PI *in vivo*

„Blízkoštní značení“ (proximity labeling)



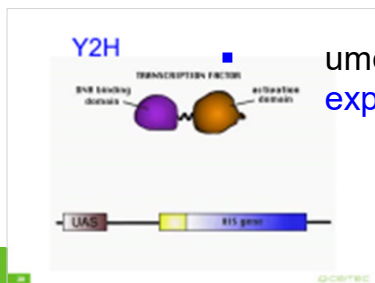
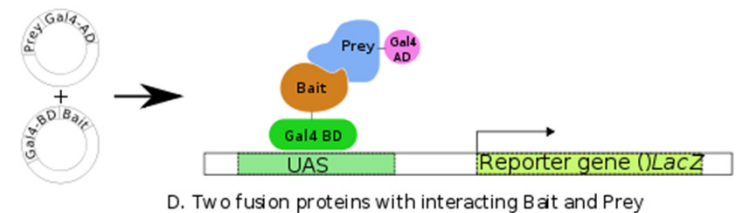
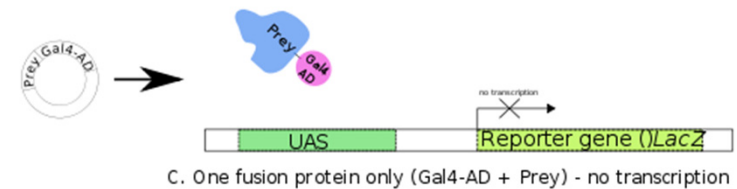
# Osnova

- 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)
  - Blízkostní značení (proximity labeling)
  - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)

# PI *in vivo*

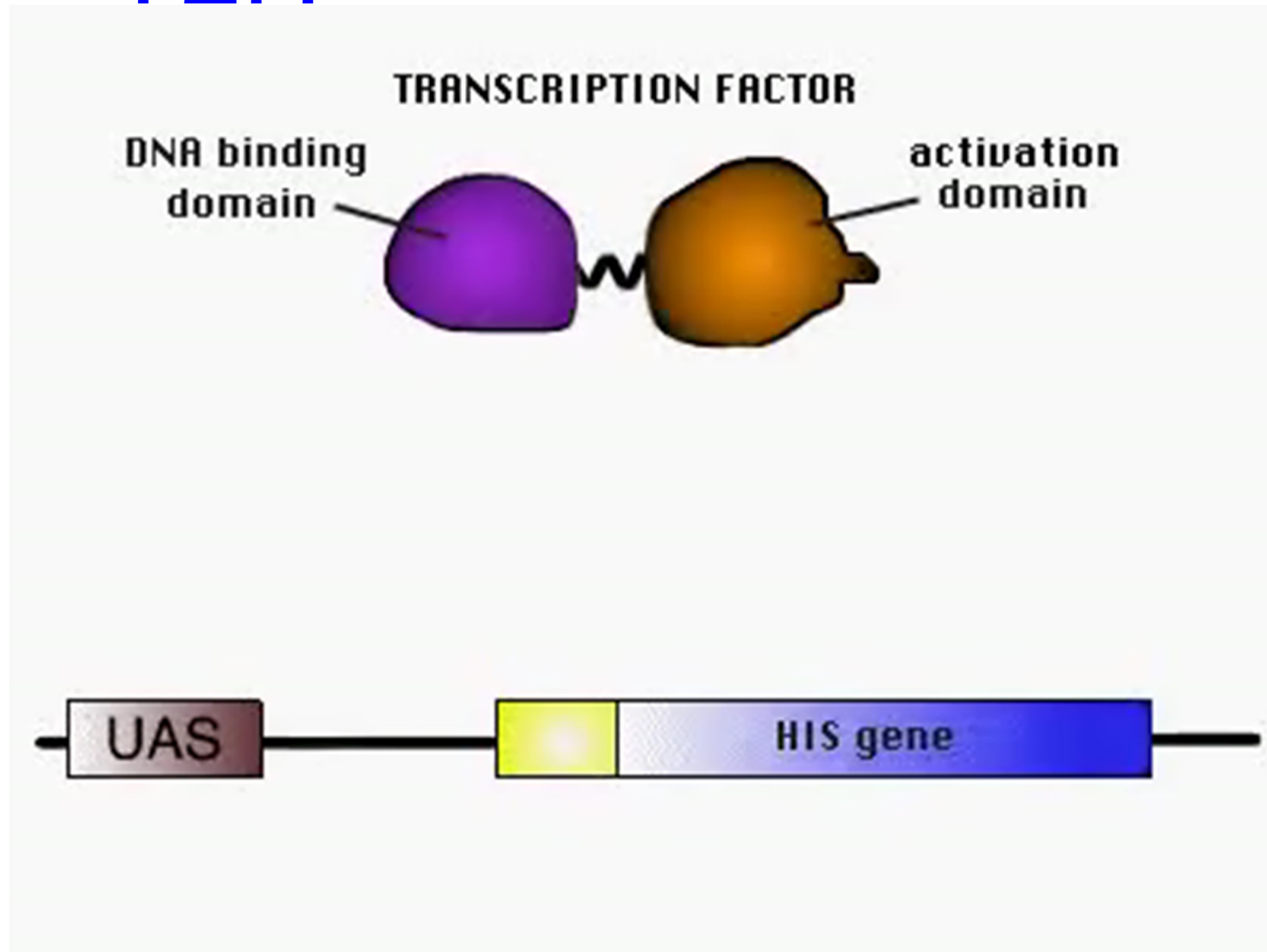
## Dvouhybridní kvasinkový test (Y2H)

- 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



# Osnova

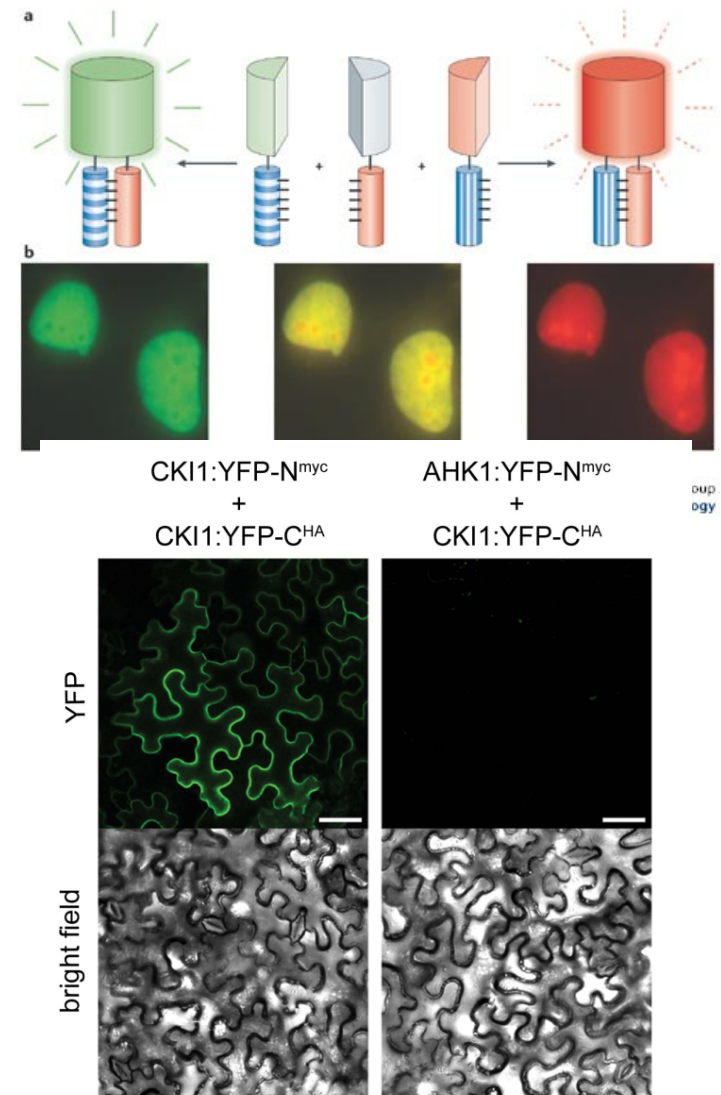
- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
  - Struktura chromatinu
  - Regulace transkripce
  - Lokalizace mRNA
  - Stabilita proteinů
  - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - Koimunoprecipitace
  - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)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

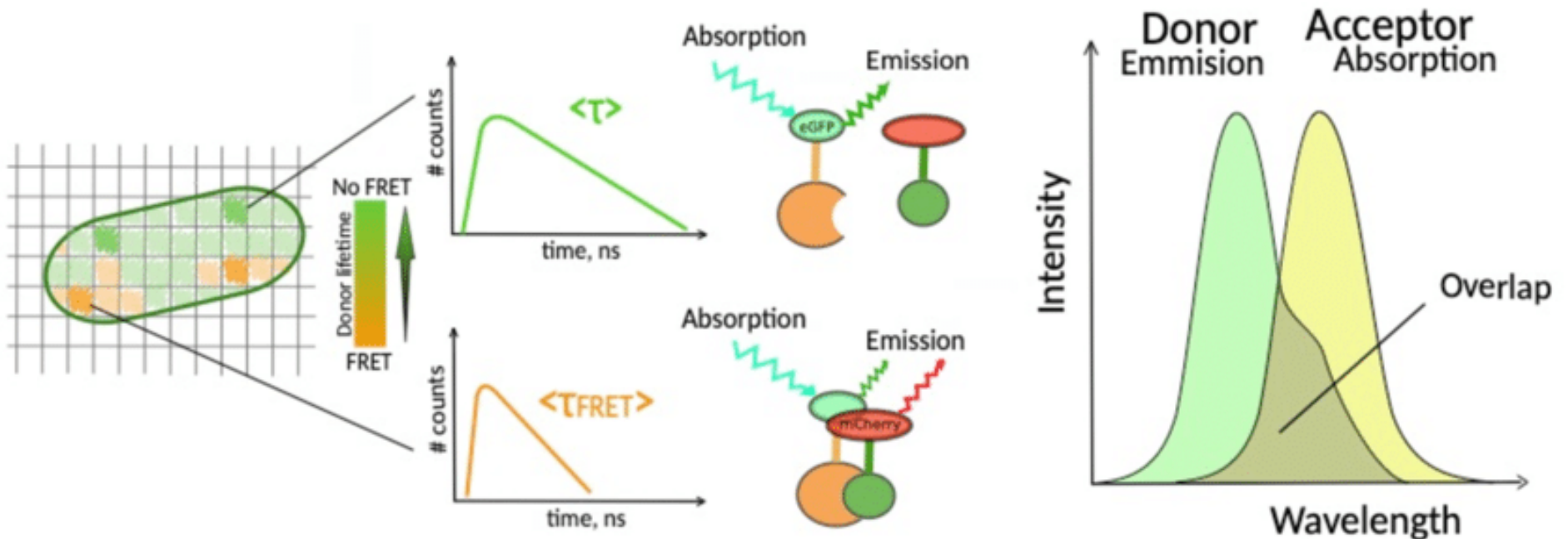


# Osnova

- Funkční význam specifických interakcí proteinů v regulaci genové exprese
  - Struktura chromatinu
  - Regulace transkripce
  - Lokalizace mRNA
  - Stabilita proteinů
  - Přenos signálu
- Metody analýzy proteinových interakcí *in vivo*
  - Koimunoprecipitace
  - Tandemová afinitní purifikace (TAP-tag)
  - Blízkostní značení (proximity labeling)
  - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - FLIM/FRET

# PI *in vivo*

FLIM/FRET (Fluorescence Lifetime  
IMaging/Förster Resonance Energy Transfer)



# 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)
  - Blízkostní značení (proximity labeling)
  - Kvasinkový dvouhybridní test (Y2H)
  - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - FLIM/FRET
  - Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

# PI *in vivo*

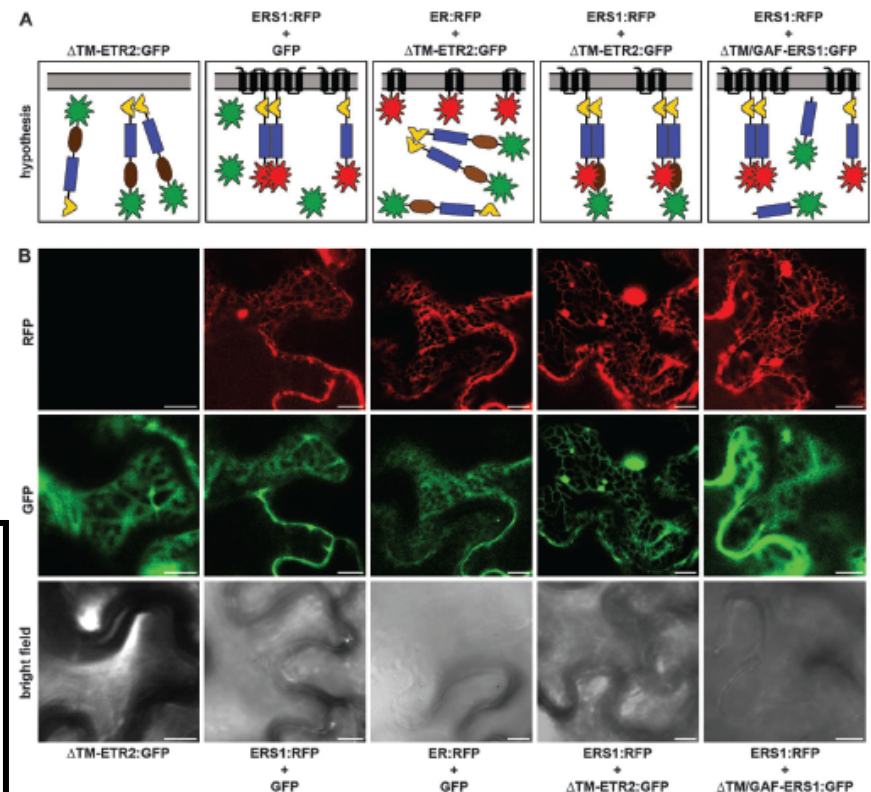
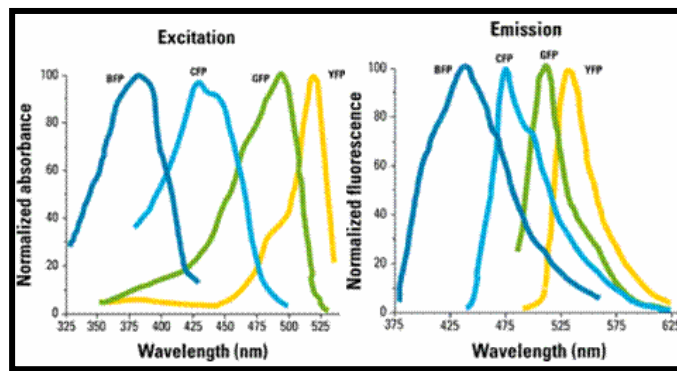
## Analýza zprostředkované membránové vazby (MeRA)

- Umožňuje identifikaci interakcí cytoplazmatických proteinů s membránovými proteiny

membránový protein je fúzován s fluoreskujícím proteinem

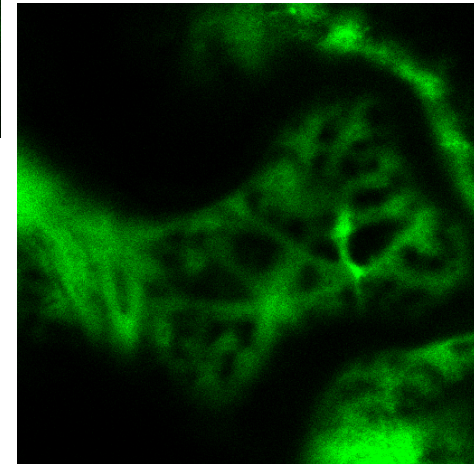
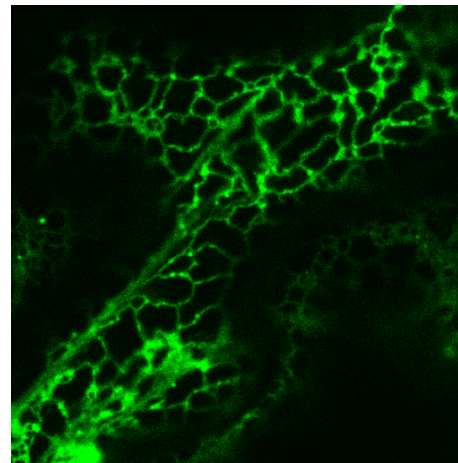
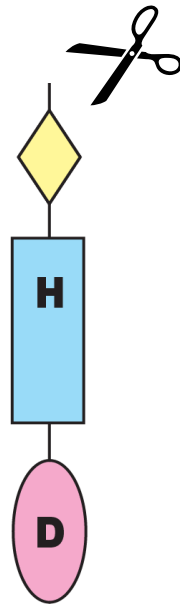
potenciální interakční partner je fúzován s jiným fluoreskujícím proteinem, lišícím se svým emisním spektrem

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



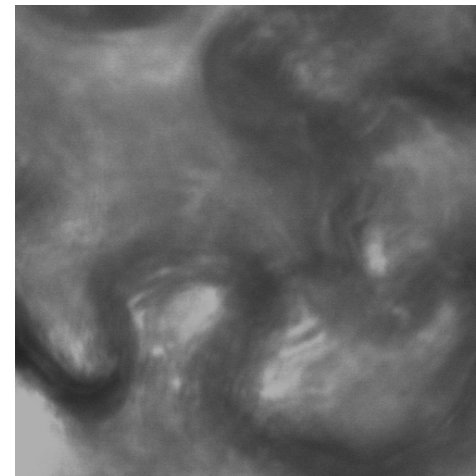
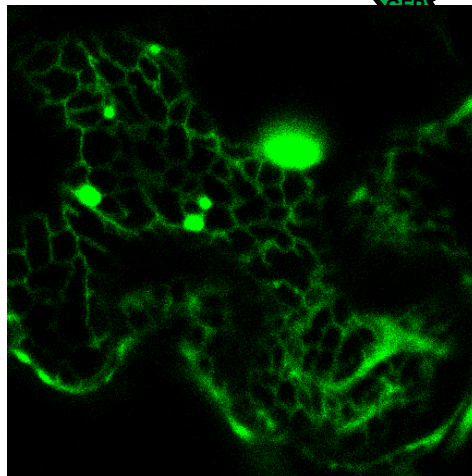
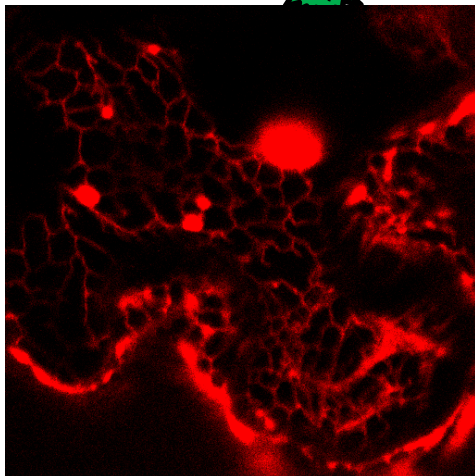
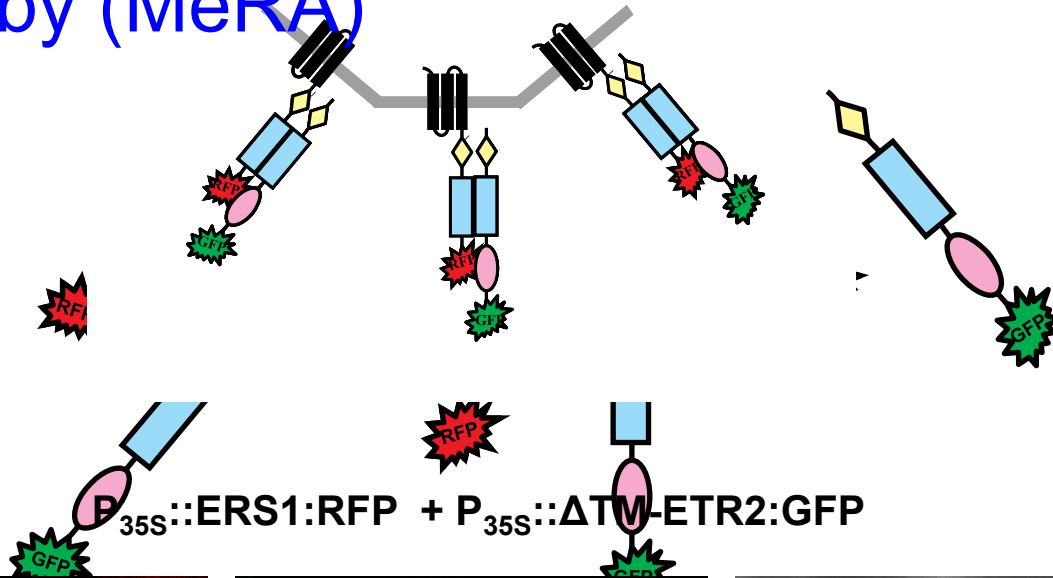
# PI *in vivo*

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
  - Lokalizaci 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)
  - Blízkostního značení
  - Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC)
  - FLIM/FRET



# Diskuse