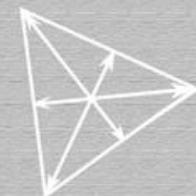
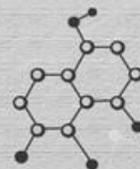


## Lysine acetylation profiling uncovers novel histone deacetylase substrate proteins in Arabidopsis

拟南芥中赖氨酸乙酰化组的分析揭示了新的组蛋白去乙酰酶的底物蛋白——

2017317110033 农业信息工程 郭仪雄



Published online: October 23, 2017

Article



molecular  
systems  
biology

# Lysine acetylome profiling uncovers novel histone deacetylase substrate proteins in *Arabidopsis*

Markus Hartl<sup>1,2,3,§</sup> , Magdalena Füßl<sup>1,2,4,§</sup>, Paul J Boersema<sup>5,†</sup>, Jan-Oliver Jost<sup>6,‡</sup>, Katharina Kramer<sup>1</sup>, Ahmet Bakirbas<sup>1,4,¶</sup>, Julia Sindlinger<sup>6</sup> , Magdalena Plöchinger<sup>2</sup>, Dario Leister<sup>2</sup>, Glen Uhrig<sup>7</sup>, Greg BG Moorhead<sup>7</sup> , Jürgen Cox<sup>5</sup>, Michael E Salvucci<sup>8</sup>, Dirk Schwarzer<sup>6</sup> , Matthias Mann<sup>5</sup>  & Iris Finkemeier<sup>1,2,4,\*</sup> 

# Abstract

在拟南芥中确定了组蛋白去乙酰酶的 RPD3/HDA1-class 在蛋白质组层次上的特征

通过使用两种去乙酰酶的抑制剂，完成了拟南芥叶片的赖氨酸乙酰化水平的定量分析

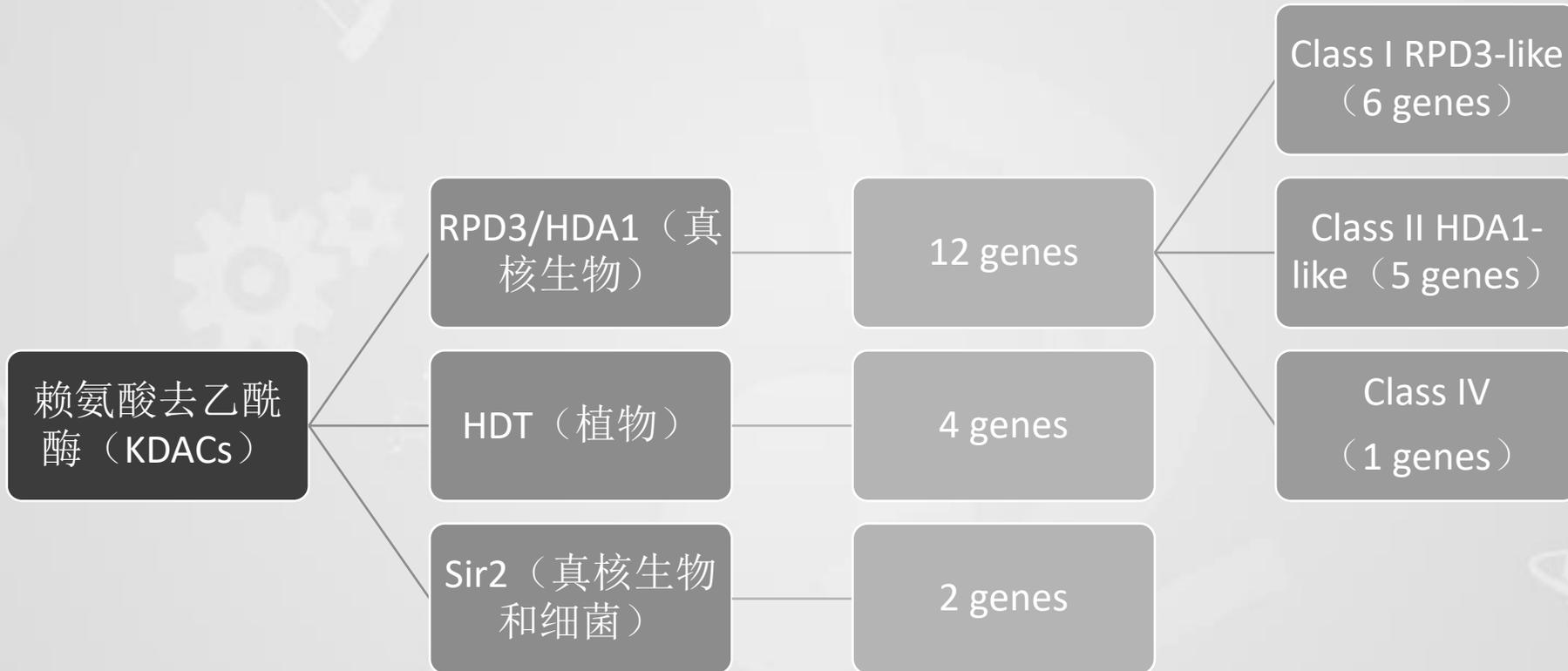
在拟南芥叶片中新发现了91个 RPD3/HDA1-class 的潜在底物蛋白

HDA14是第一个被定位在细胞器中的组蛋白去乙酰酶，其对于 RuBisCO 的调节具有关键作用

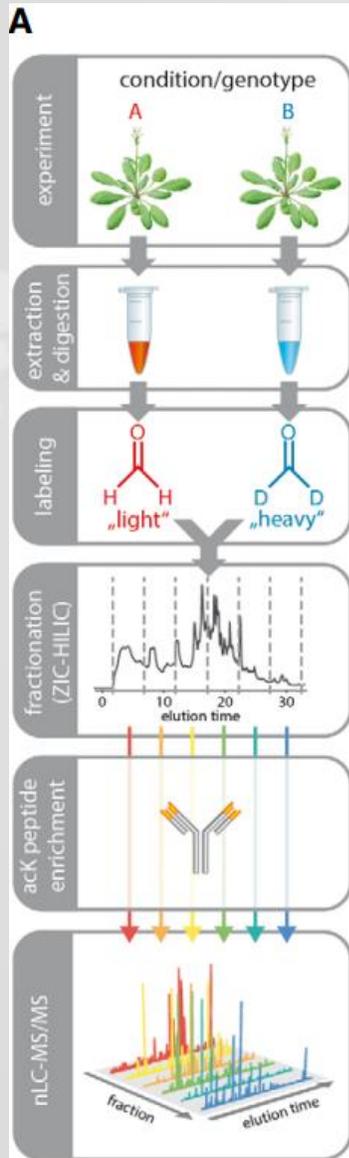
# Introduction

- ① 翻译后修饰 (PTM) 对于植物适应环境变化有重要作用, 包括磷酸化、泛素化、甲基化、乙酰化.....
- ① 赖氨酸的乙酰化首次发现于组蛋白尾, 长时间以来被认为只涉及到染色质结构和基因表达的调节。
- ① 带负电的乙酰基向赖氨酸的转移抵消了氨基的正电荷, 影响到蛋白质间、DNA-蛋白质的互作。
- ① KAT: 赖氨酸乙酰基转移酶, 然而当 $\text{pH} > 8$ 时, 不需要KAT也可以发生赖氨酸的乙酰化, 而在进行呼吸作用的线粒体和进行光合作用的叶绿体中 $\text{pH}$ 都可以大于8。

# Introduction



# The Arabidopsis leaf lysine acetylome 2.0



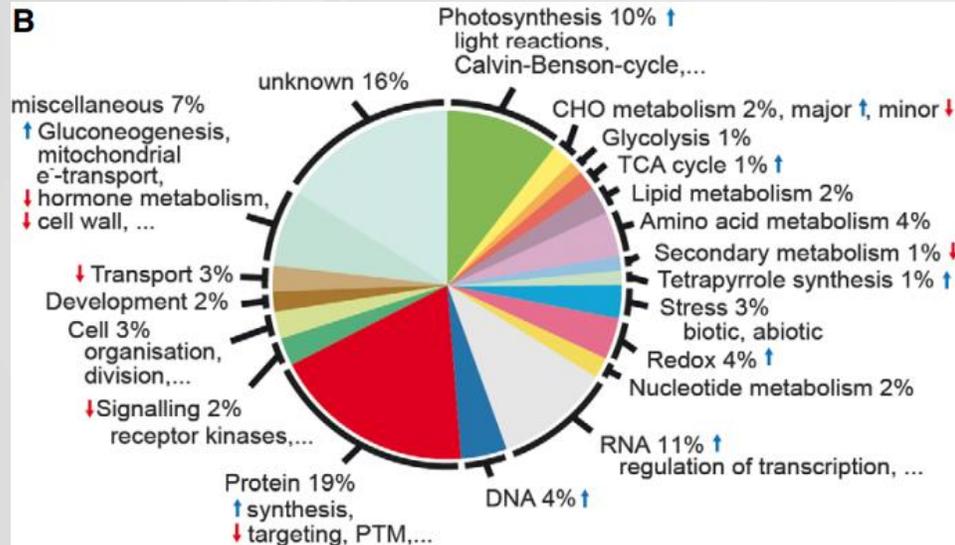
- ① 提取叶片蛋白质。
- ① 胰蛋白酶消化成为肽 ( peptides ) 。
- ① 二甲基同位素标记。
- ① 合并用于比较的样品，定量分析。
- ① 剩余样品利用“亲水相互作用液相色谱”进一步处理减少肽复杂度。
- ① 高分辨率光学图谱和MaxQuant分析。



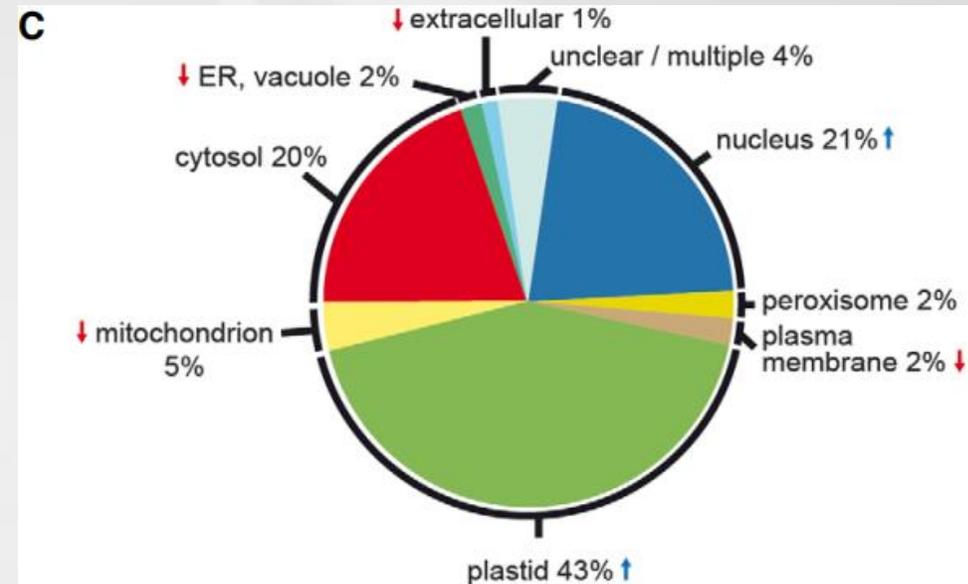
## The Arabidopsis leaf lysine acetylome 2.0

- ① 总共鉴定出6672个蛋白质组。
- ② 其中1022个蛋白质组中鉴定出2152个赖氨酸乙酰化位点。
- ③ 其中959个乙酰化的蛋白质组，2057个乙酰化位点都是之前研究没有报道过的。

# The Arabidopsis leaf lysine acetylome 2.0



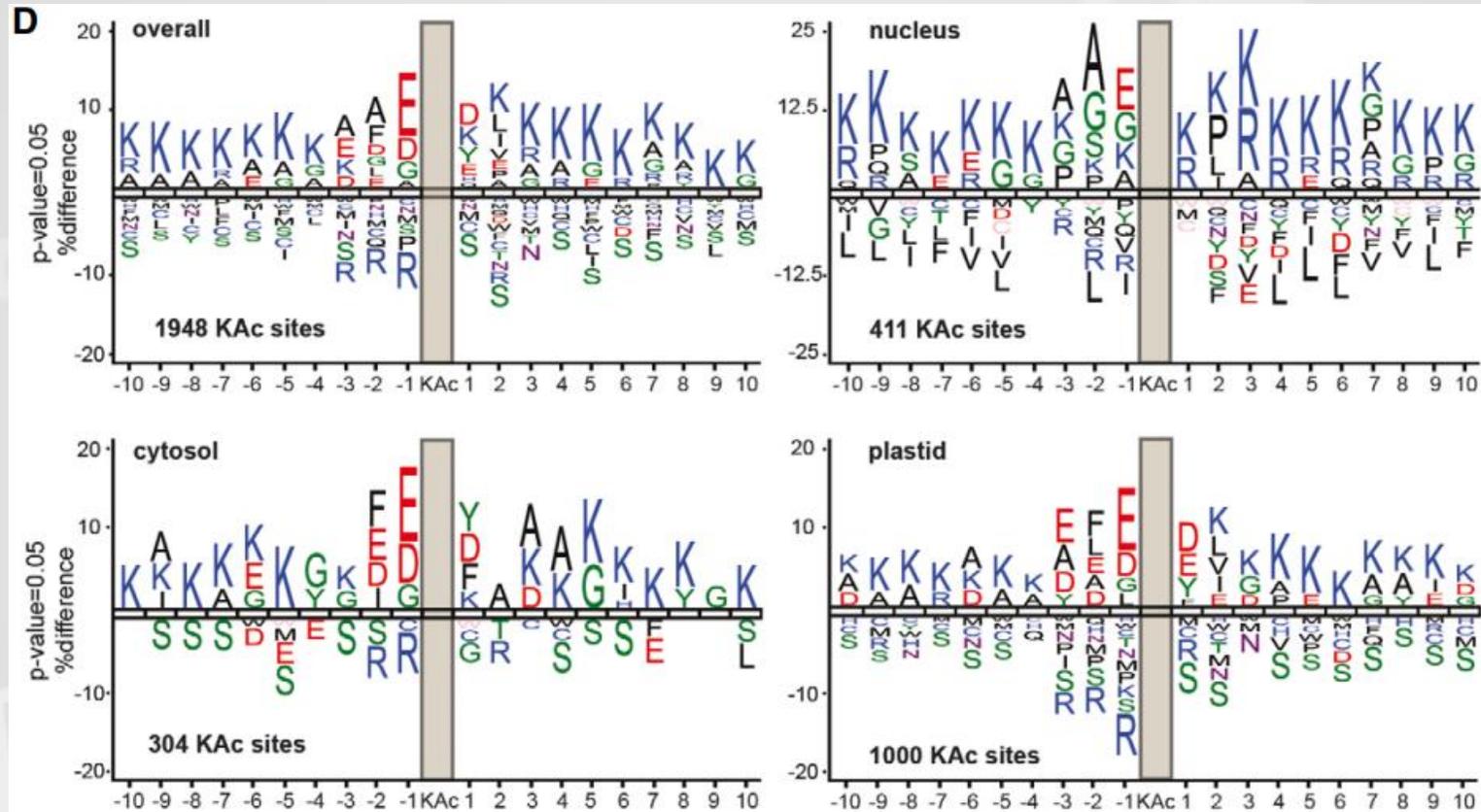
- ① 光合作用、四吡咯合成、糖异生、氧化还原、TCA、转录调控等功能上调
- ② 激素代谢、细胞壁、次级代谢等功能下调



- ① 质体、细胞核中上调
- ② 内质网、液泡、线粒体中下调



# The Arabidopsis leaf lysine acetylome 2.0



- ① 整体来说，带负电的谷氨酸和天冬氨酸富集于乙酰化赖氨酸位点上游的-1，-2，-3位点。
- ② 质体和细胞质中，带负电的氨基酸富集更多，苯丙氨酸F富集于-2。酪氨酸Y只在细胞质中富集于+1。
- ③ 细胞核中只有带正电的精氨酸和赖氨酸富集在+1，中性的甘氨酸和丙氨酸富集在-1，-2，-3，而甘氨酸和丙氨酸刚好是组蛋白继续中占主导地位的氨基酸。

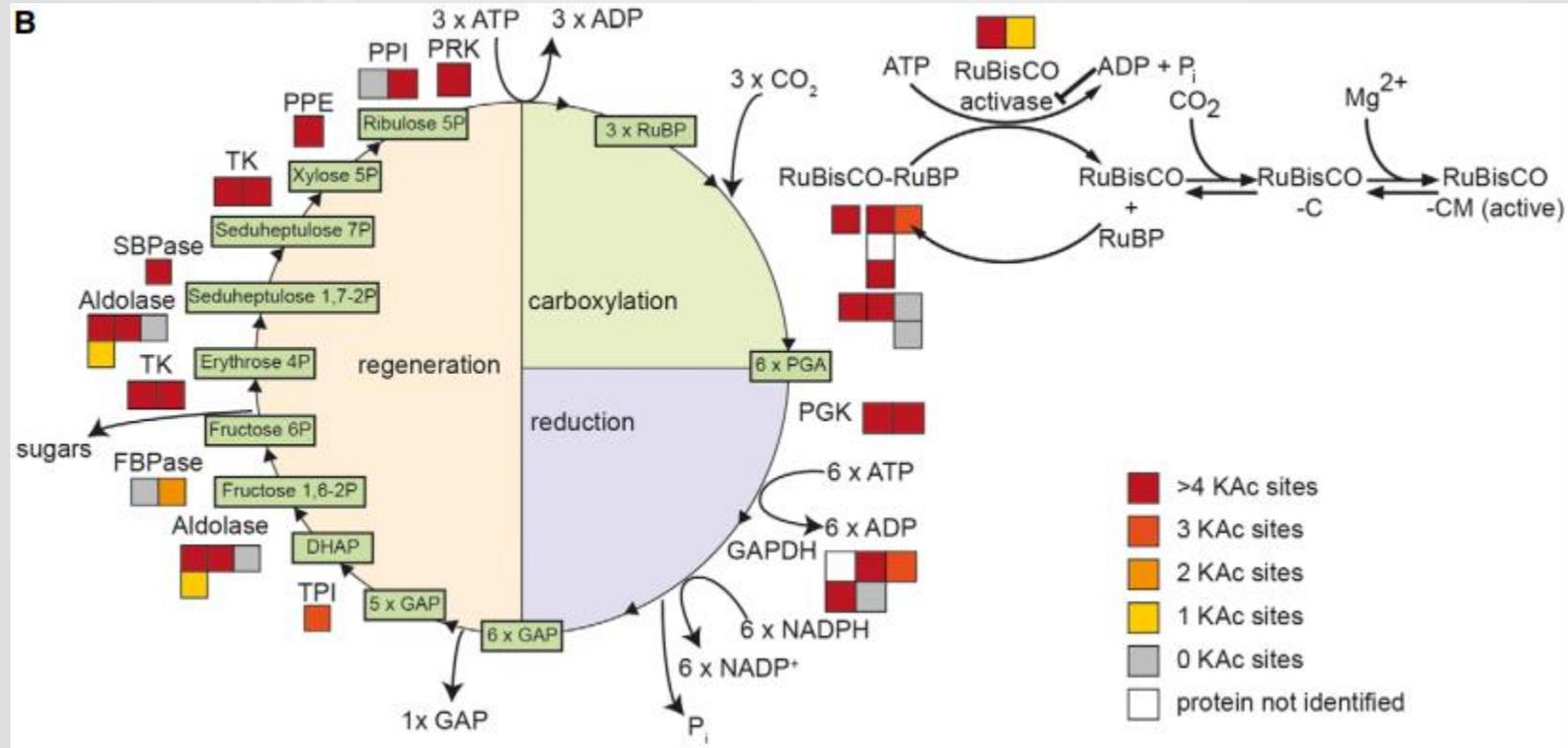


## The Arabidopsis leaf lysine acetylome 2.0

- ④ 43%的赖氨酸乙酰化的蛋白质被认为是质体蛋白。
- ④ 光反应中24%的蛋白至少有4个赖氨酸位点乙酰化；
- ④ PS II和PS I中的光捕获复合物都有很严重的赖氨酸乙酰化：LSC II:29 sites, LSC I:16 sites；
- ④ 所有与碳固定有关的酶复合物和RuBisCO活化酶都含有4个以上赖氨酸乙酰化的位点；
- ④ RuBisCO中的一个亚单元有18个赖氨酸位点发生乙酰化，乙酰化程度最深。

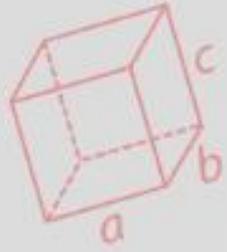


# The Arabidopsis leaf lysine acetylome 2.0



# Identification of novel lysine acetylation sites targeted by Arabidopsis RPD3/HDA1-type KDACs





# Identification of novel lysine acetylation sites targeted by Arabidopsis RPD3/HDA1-type KDACs

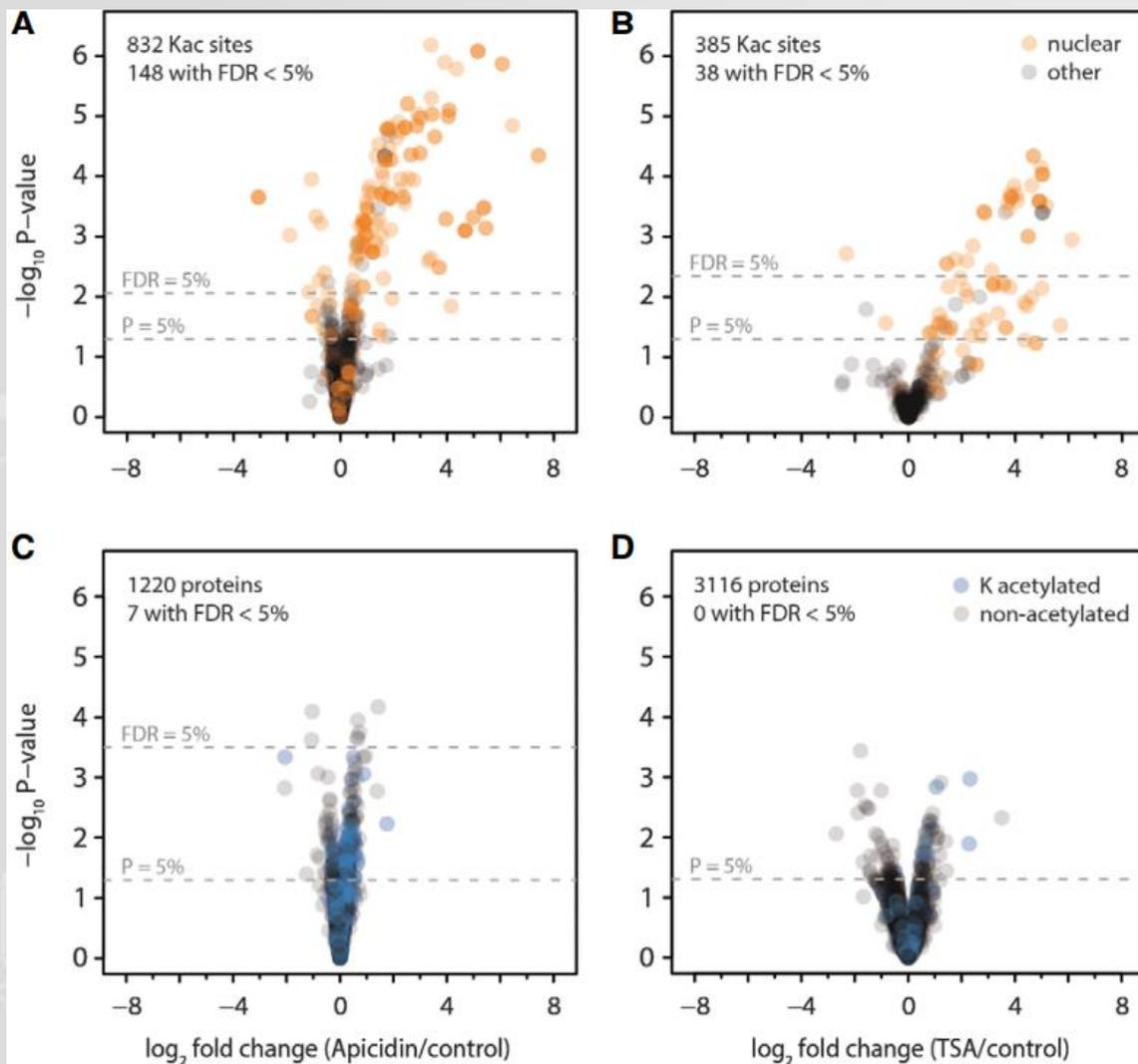
①拟南芥叶带

①对照组、5uM apicidin with 4h、5uM TSA with 4h , 光照处理4小时。

①Protein intensities的皮尔森系数在0.87-0.98之间，实验方法具有比较好的鲁棒性。



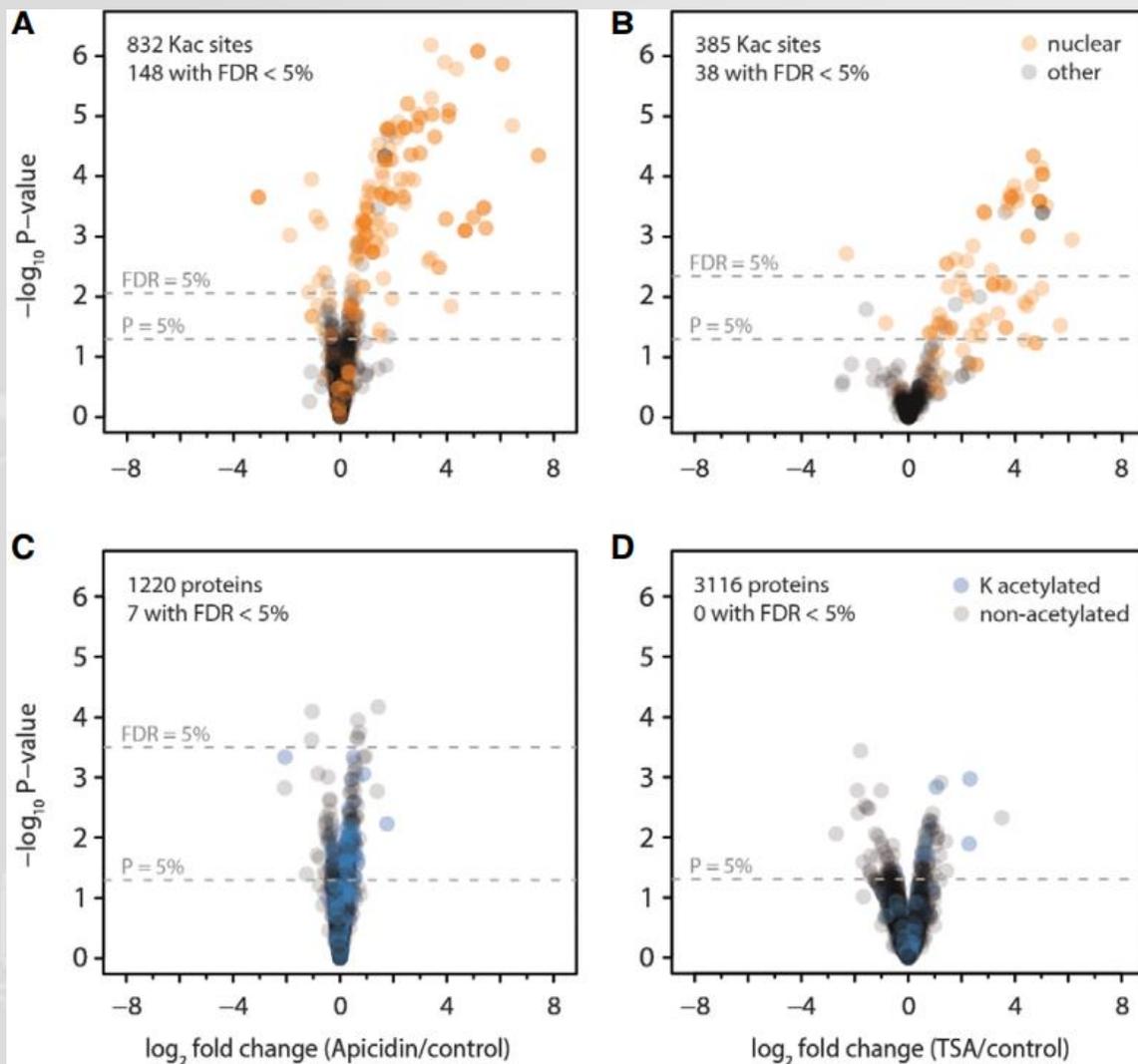
# Identification of novel lysine acetylation sites targeted by Arabidopsis RPD3/HDA1-type KDACs



- ① A,C图以apicidin处理
- ① B,D图以TSA处理
- ① A,B图为乙酰化位点差异情况
- ① C,D图是蛋白质丰度的差异情况



# Identification of novel lysine acetylation sites targeted by Arabidopsis RPD3/HDA1-type KDACs



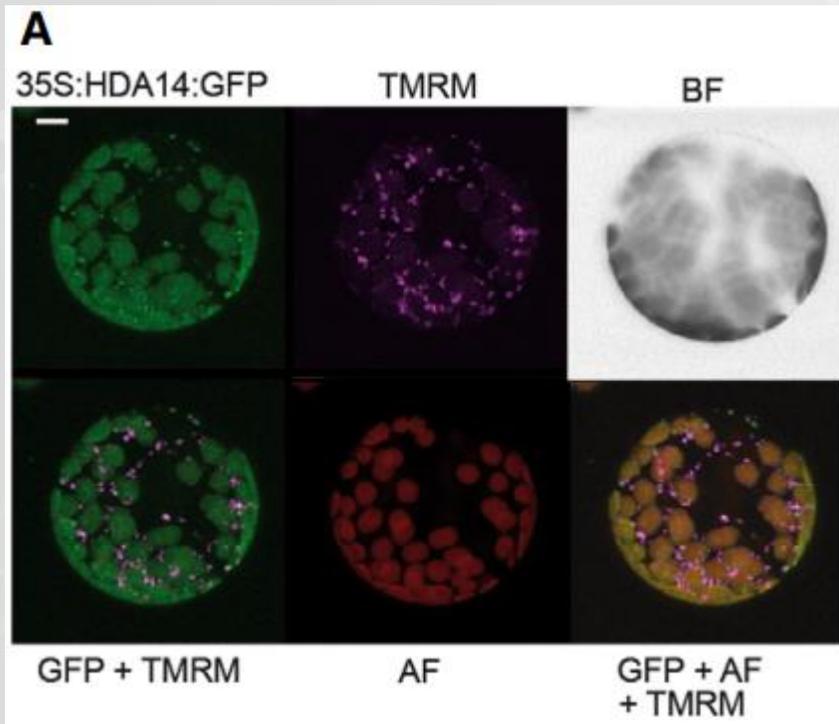
① 蛋白质丰度没有明显变化

② 67-88%的蛋白质携带有赖氨酸乙酰化位点。

③ 蛋白质组分析没有富集低丰度的蛋白质，因此不能以此就认为那些无法定量分析的蛋白质不能被KDAC调节。



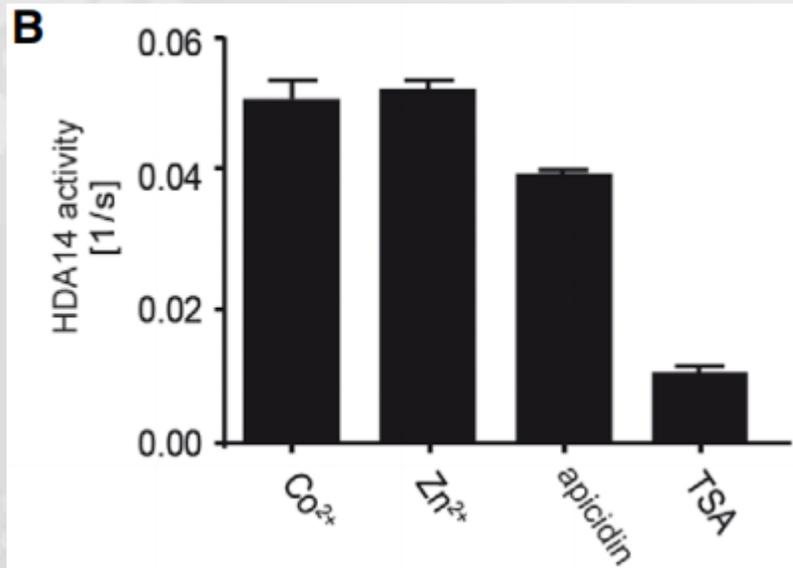
# HDA14 is the first member of a RPD3/HDA1-family protein to be localized in organelles



- ①将GFP连接在HDA14的C端而非N端。
- ①得到稳定的35S:HDA14:GFP植株。
- ①线粒体使用红色荧光标记。
- ①western blot验证。



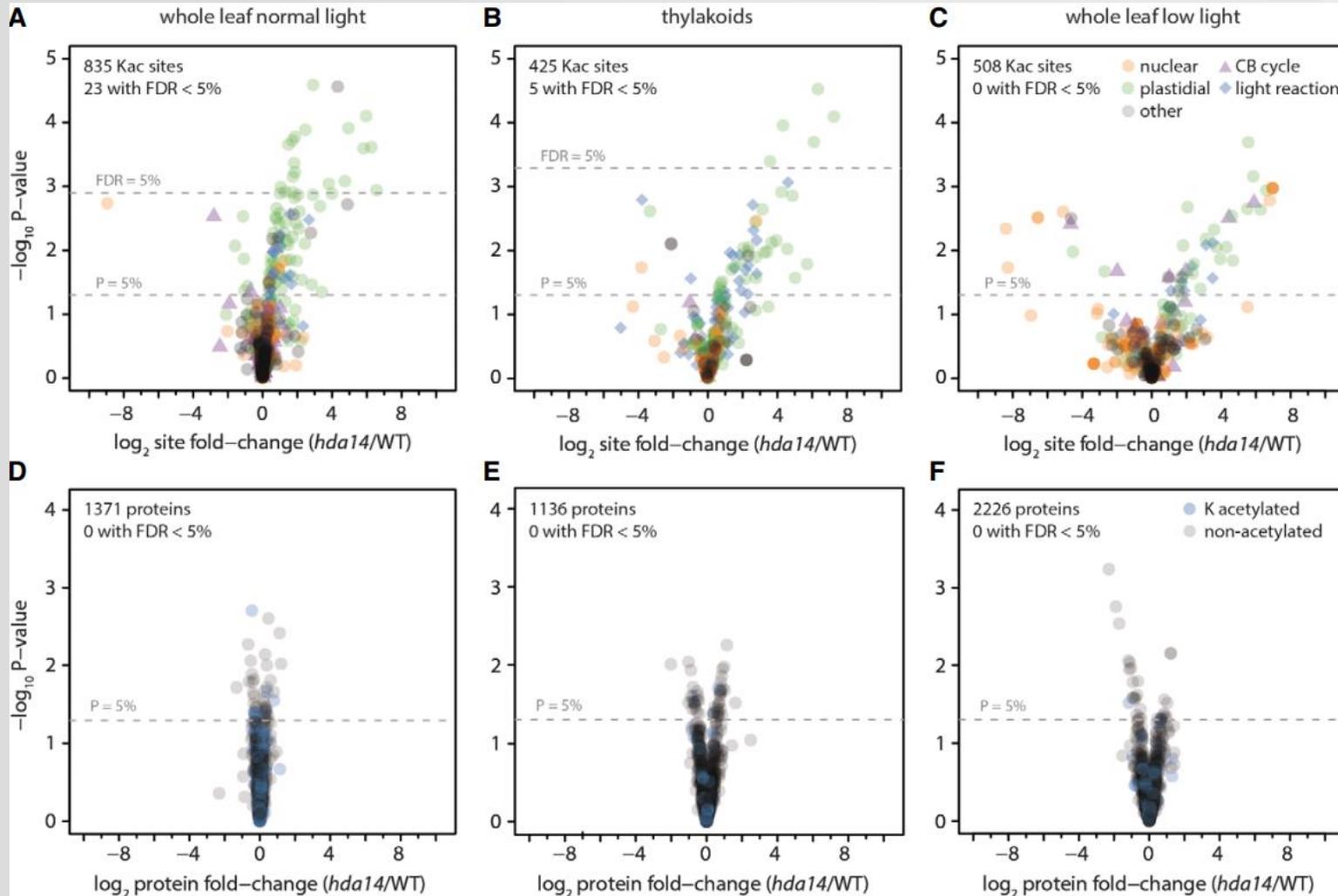
# HDA14 is the first member of a RPD3/HDA1-family protein to be localized in organelles



- ① 100uM基质 ( p53合成肽 )
- ① 去乙酰化的效率 : 0.05/s
- ① 人类HDAC8中使用Co离子也有效



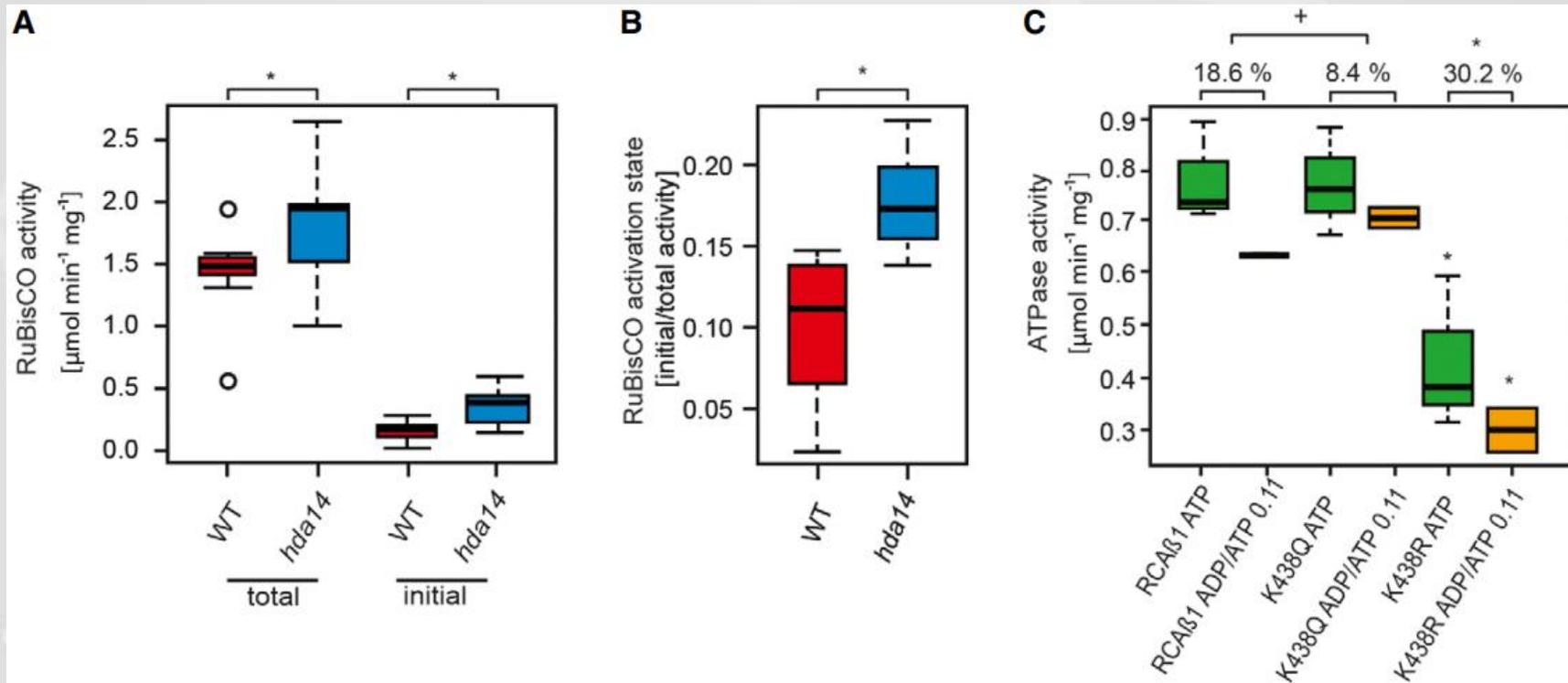
# HDA14 is the first member of a RPD3/HDA1-family protein to be localized in organelles



- ① 构建HDA14基因敲除品系hda14。
- ② 在26个蛋白质组中发现26个赖氨酸乙酰化位点发生上调，在2-80倍之间。
- ③ 所有位点位于质体中。
- ④ P < 0.05时，122个蛋白质组中鉴定出137个赖氨酸乙酰化位点，其中35个仅位于类囊体。MapMan注释后，90%位于质体，大部分与各种生化反应有关。
- ⑤ 8个HDA14的潜在靶向蛋白在质体中编码。



# HDA14 is the first member of a RPD3/HDA1-family protein to be localized in organelles



- ①先测试*hda14*与WT在低光照下2h后的赖氨酸乙酰化水平，32个蛋白质的36个赖氨酸乙酰化位点上调，其中26个蛋白质预测为质体蛋白，MapMan注释显示其均和质体中的调节蛋白有关。
- ②使用“快速叶片蛋白质提取技术”测定RuBisCO的反应活性。
- ③使用CRISPR-Cas技术构建RCA  $\beta$ 1-isoform K438位点的定点突变体，得到K438Q和K438R。

# 总结

①创新点：将HDA14定位在了细胞器中。

②启发：做生物学的课题，最后一定要能回到具体的生物学问题中去，生物学基础知识很重要。

③待改进：apicidin和TSA都是在Hela细胞中起作用的赖氨酸去乙酰酶抑制剂，最后能够定位HDA14是一件幸运的事。

