



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

# CG030 – Struktura (architektura) a funkce proteinových komplexů



doc. Jan Paleček  
[jpalecek@sci.muni.cz](mailto:jpalecek@sci.muni.cz)  
(garant)

2013  
Paleček  
Marek

Blažek  
Kozáková  
Krejčí

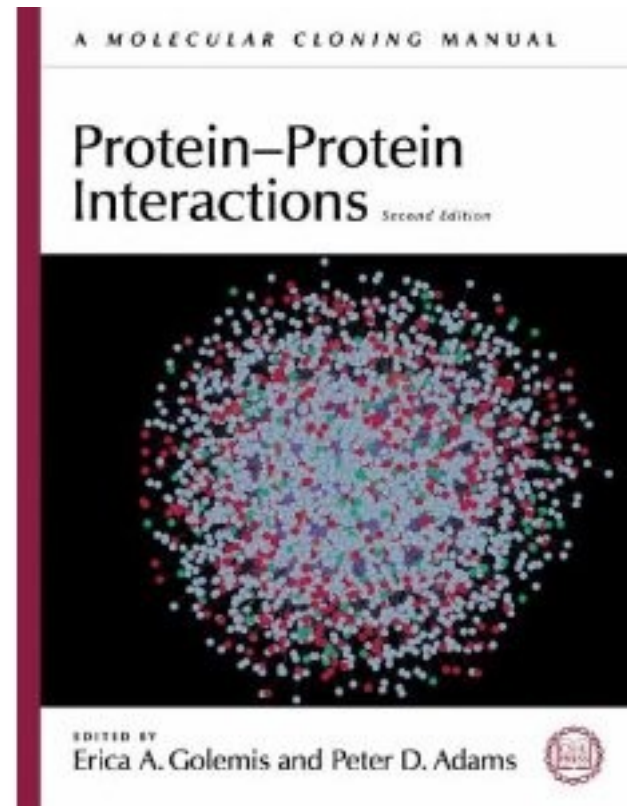
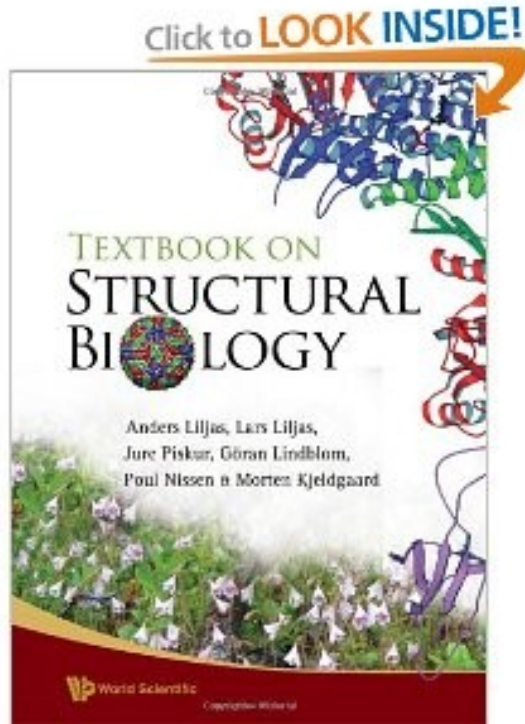
Murray

# Informační zdroje

**Liljas a spol:** Structural biology (2009)

**Golemis a Adams:** Protein-protein interactions (2005)

... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science, PLoS ...



Databáze proteinových struktur: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>,  
<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>

Database protein-proteinových interakcí: <http://string-db.org/newstring.cgi> ...  
<http://www.ebi.ac.uk/intact/?conversationContext=1>

- vyhodnocení výsledků testu z proteomiky – dobrý background
- „díky za poznámky v anketě“ - písemný test – hlavní závěry z přednášek
- kdo na čem pracuje (zapsat) – přednášky o komplexech, na kterých pracují studenti – prohloubení znalostí s novým úhlem pohledu
  
- Pohled na vybrané procesy probírané v biochemii a molekulární biologii z hlediska proteomiky a především z hlediska proteinových komplexů
- výběr komplexů majících vztah k tématům probíraným v laboratořích „chromatinových molekulárních komplexů“ a skupin z MU
  
- doporučení přednášek: Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041), Proteomické metody (CG080 - střet zájmů? :-)

# CEITEC semináře (3. čtvrtěk v měsíci)

You are cordially invited to the lecture

## „Dynamics in protein molecular recognition“

delivered by

**Prof. Michael Sattler**

Technische Universität Munich

21.2. ve 14.00 – A11, 132

### **Abstract:**

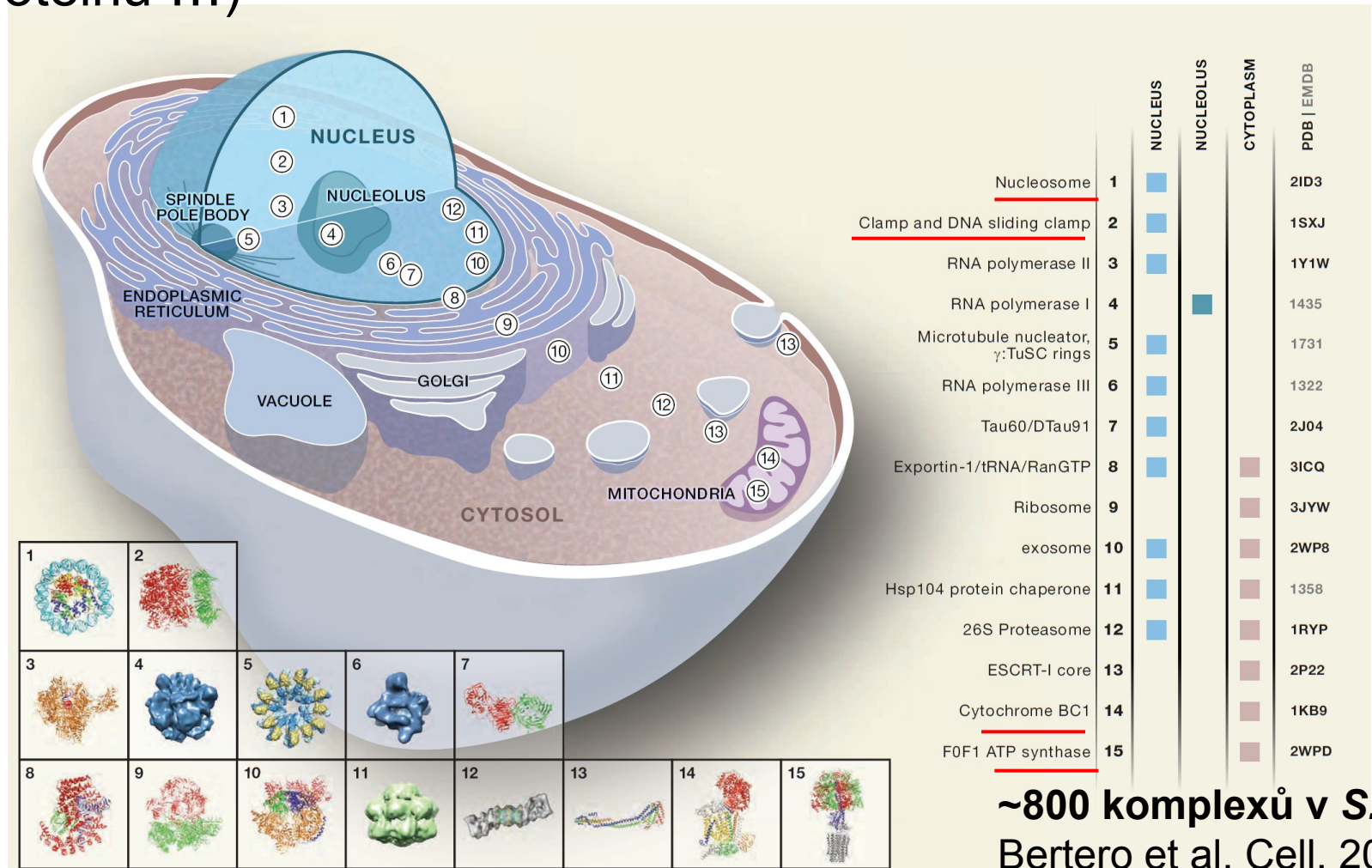
Eukaryotic multi-domain proteins play crucial roles in the regulation of gene expression and cellular signaling. Individual domains that mediate distinct molecular interactions function cooperatively in the full-length proteins to control protein activity. Additional regulation is mediated by posttranslational modifications. As the molecular functions of these multi-domain proteins often depend on dynamic domain arrangements that are modulated by ligand binding it is important to use solution techniques to study their structure, dynamics and molecular interactions. The important roles of dynamics and posttranslational modifications for molecular recognition and protein function will be demonstrated with proteins involved in splicing regulation and peroxisomal biogenesis. The cooperative recognition of

Kdo viděl minulý seminář o dyneinu (A. Carter)?

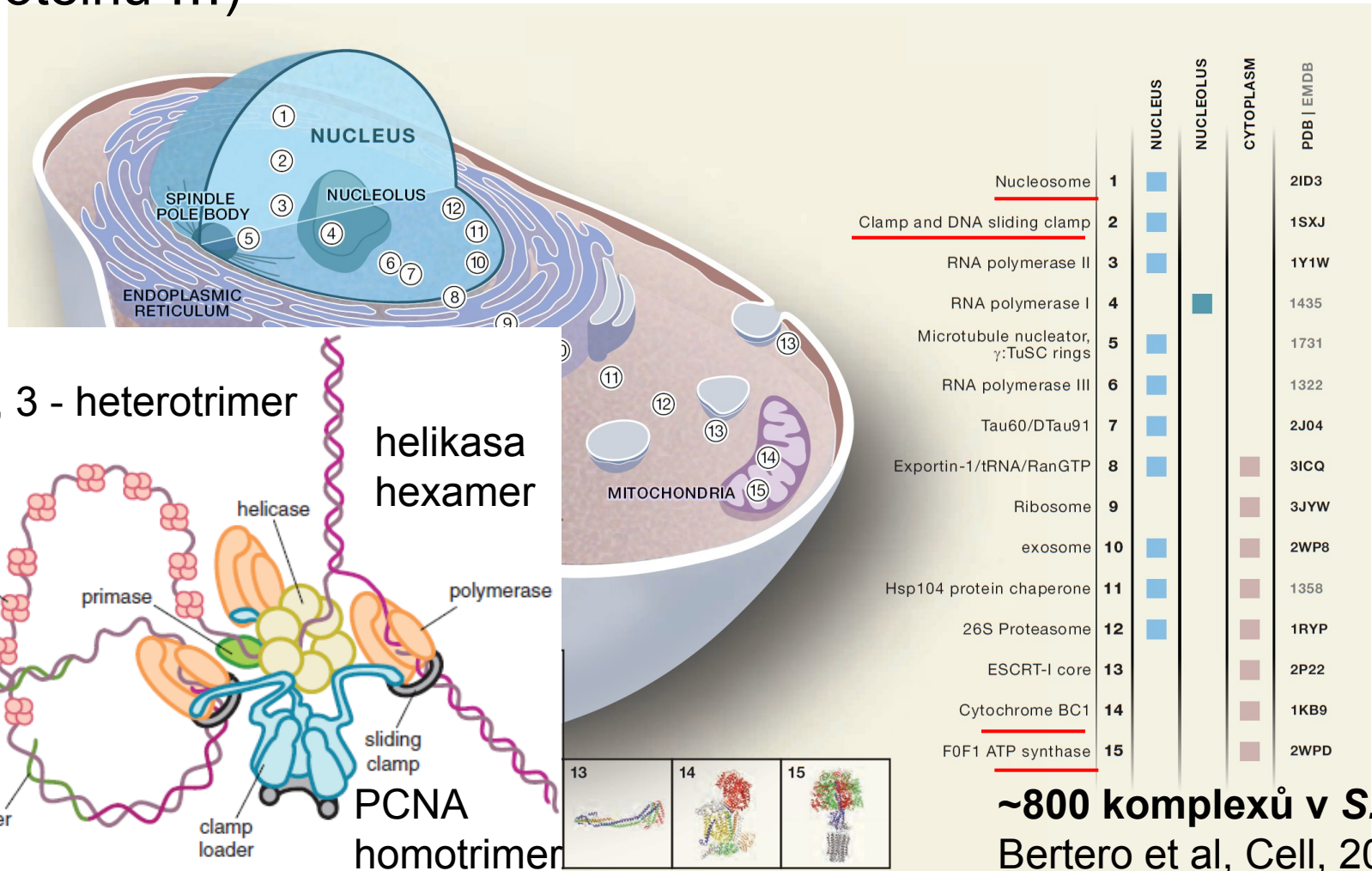
19.2.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod - proteinové interakce, komplexy
26.2.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Marek	uvod do strukturni biologie
5.3.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Marek	signální dráhy, GPCR
12.3.2013	12-13.50hod	???	Mgr. Kozáková	ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom
19.3.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy
26.3.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Krejčí	Oprava poškozené DNA, homologní rekombinace, Fanconi anemia komplex
2.4.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	chromatinové komplexy, modifikace histonů a remodelovací komplexy
9.4.2013	12-13.50hod	A2-2.11	Dr. Blažek	CDK
16.4.2013	12-13.50hod	A2-2.11		přednášky studentů
23.4.2013	12-13.50hod	A2-2.11	Dr. Murray	Restart replikačních vidlic
30.4.2013	12-13.50hod	A2-2.11		přednášky studentů
7.5.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce komplexů
14.5.2013	12-13.50hod	A2-2.11		seminar v Praze
21.5.2013	12-13.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Zkouška - test

- pohled na evoluci z hlediska proteinových komplexů (tzv. komplexně neredukovatelné systémy, od genetické změny k proteinu a zase zpět)

- **na většině buněčných procesů se podílí komplexy** (většina studií se zabývá jednotlivými proteiny nebo aktivitami – pro zjednodušení problému analyzujeme většinou jednu enzymovou aktivitu či funkci jednoho proteinu ...)



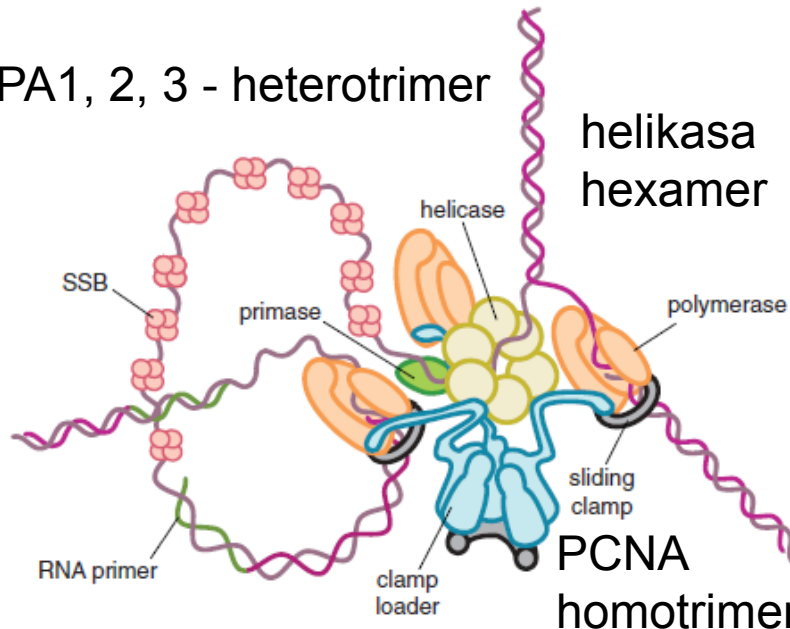
- **na většině buněčných procesů se podílí komplexy** (většina studií se zabývá jednotlivými proteiny nebo aktivitami – pro zjednodušení problému analyzujeme většinou jednu enzymovou aktivitu či funkci jednoho proteinu ...)



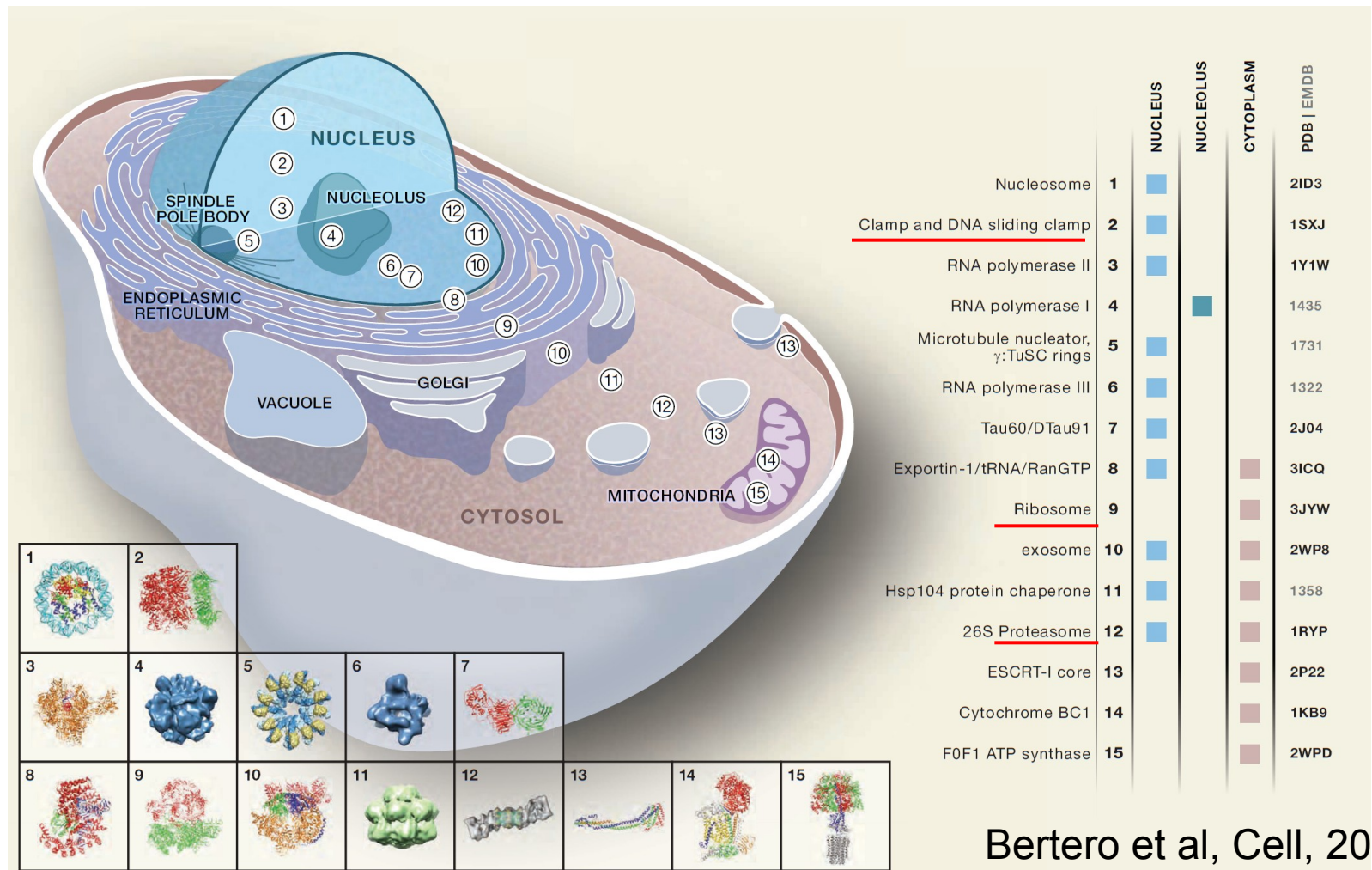
RPA1, 2, 3 - heterotrimer

helikasa  
hexamer

PCNA  
homotrimer

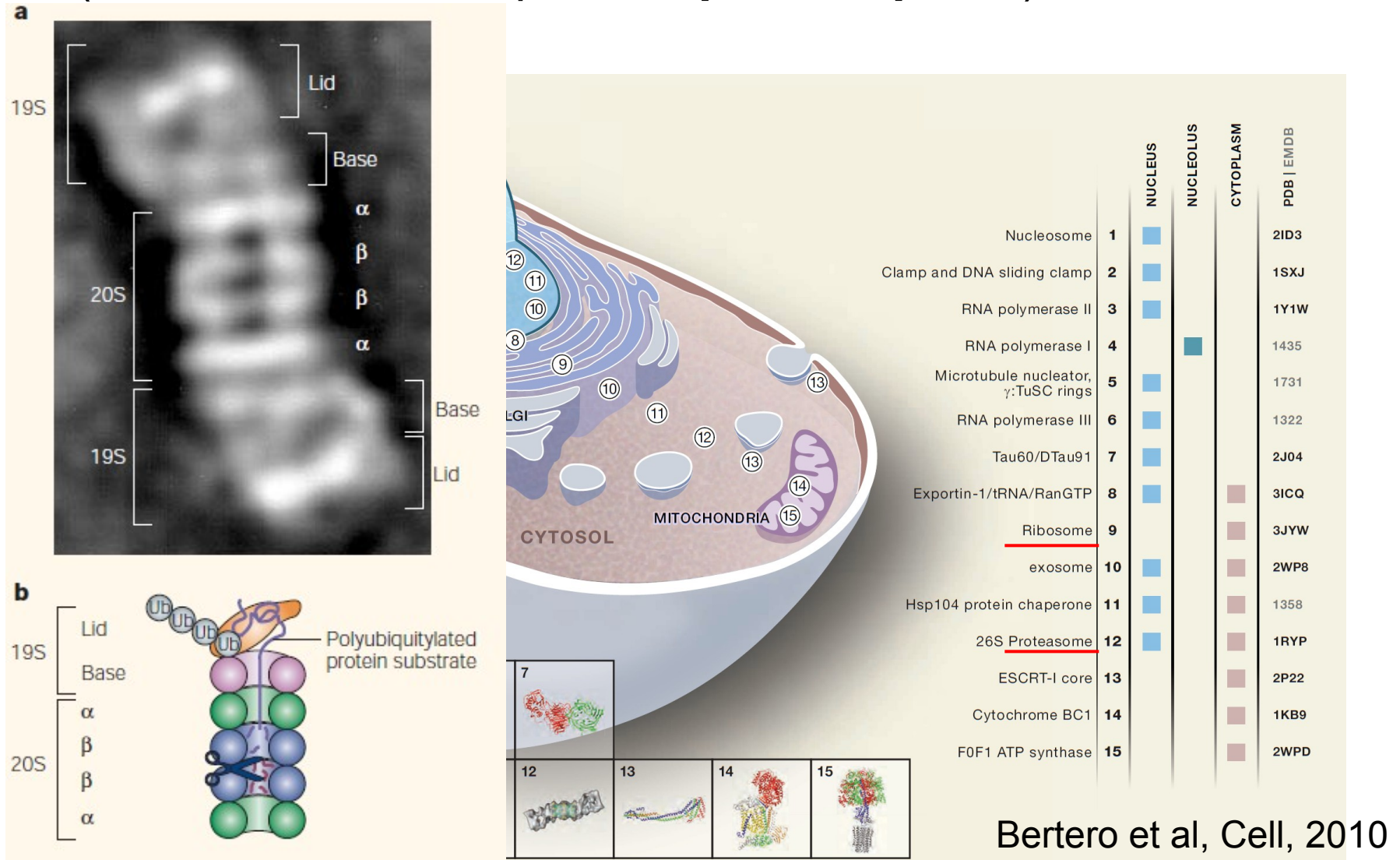


- většiny klíčových procesů jako replikace DNA, transkripce, translace se účastní multiproteinové **molekulární stroje**





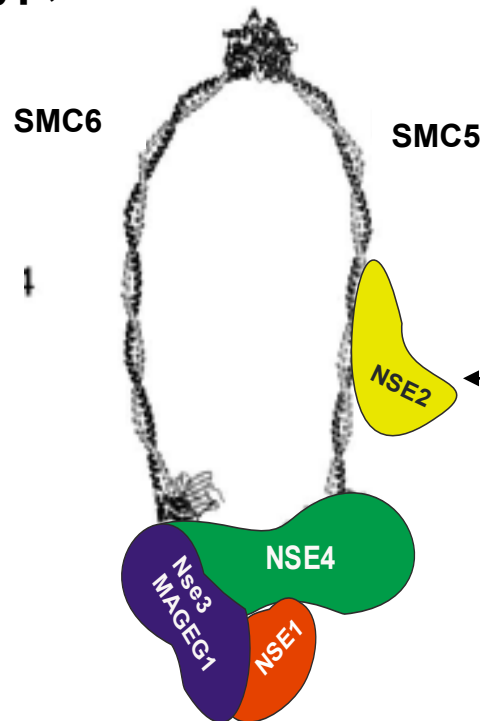
- většiny klíčových procesů jako replikace DNA, transkripce, translace se účastní multiproteinové **molekulární stroje** (složené z více komplexů či **podkomplexů**)



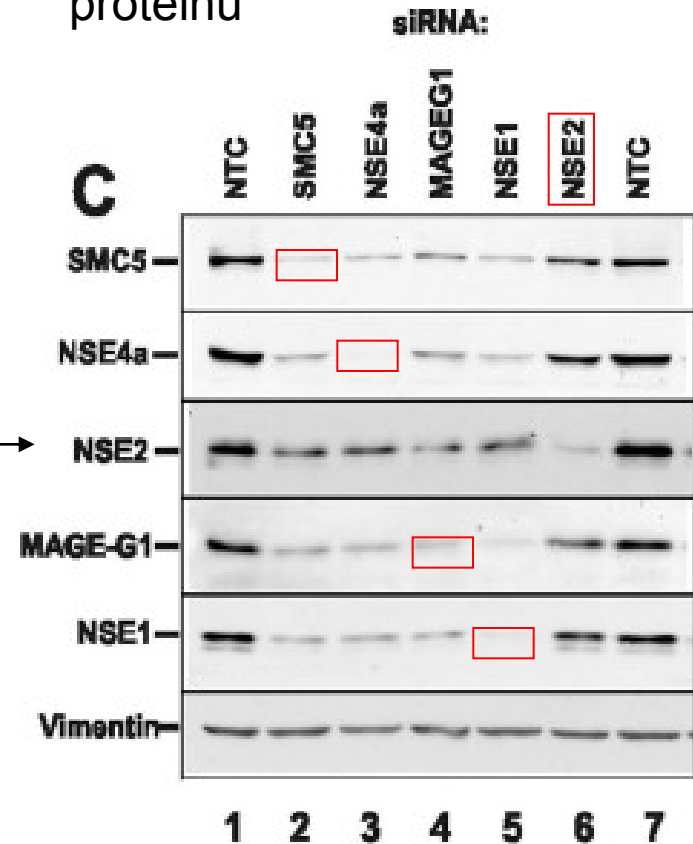
Proteinové komplexy jsou složeny z jednotlivých proteinů/**podjednotek** které spolu interagují - pokud schází podjednotka, tak nefunguje celý komplex – komplex se nesestaví/rozpadá

Delece kterékoli podjednotky je pro kvasinkovou buňku letální  
- Mutace mají relativně podobný **fenotyp**, ale ...

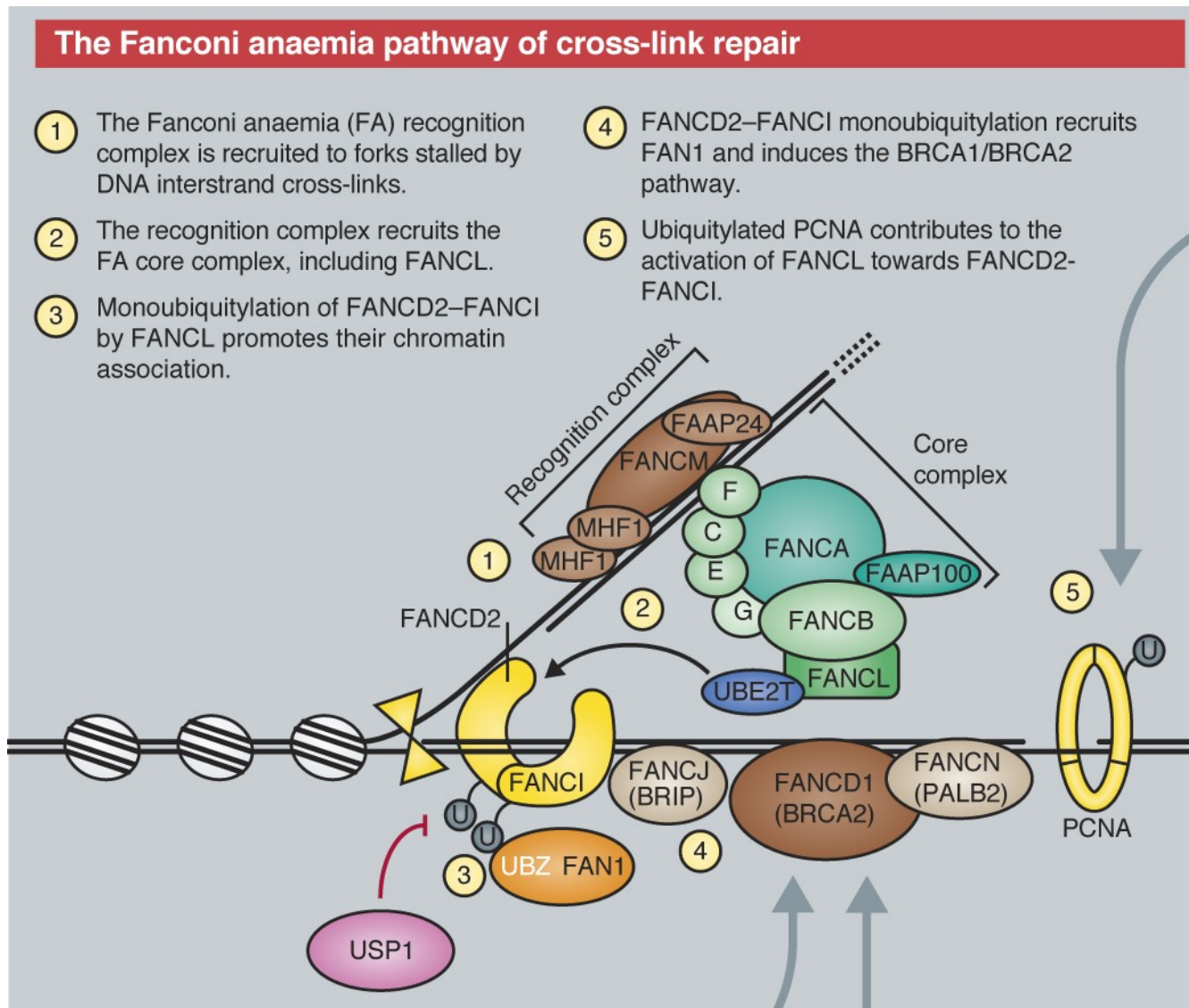
Delece kterékoli podjednotky lidského komplexu (není esenciální) má za následek pokles **hladiny** ostatních proteinů



Sergeant et al., MCB, 2005

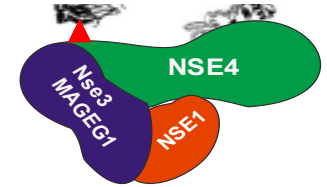
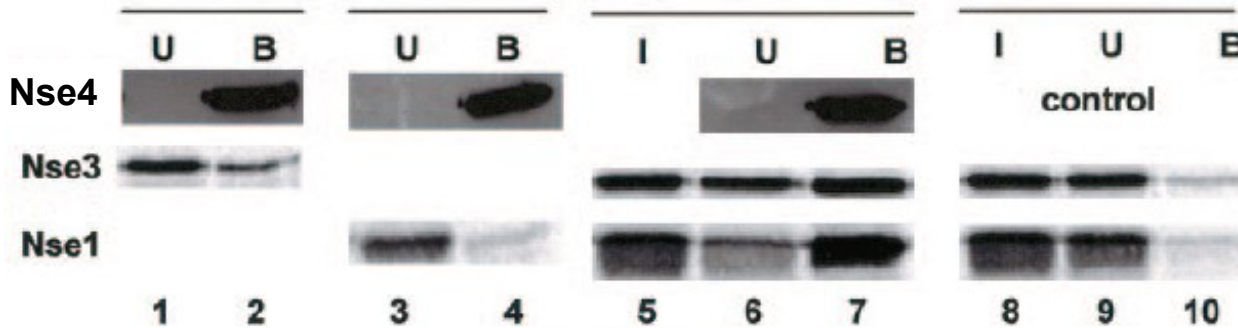


# Fanconi anemia „komplementační skupiny“ – geny/proteiny jejichž mutace způsobují FA syndrom – ukázalo se, že většina z nich tvoří jádro FANC komplexu (Krejčí)



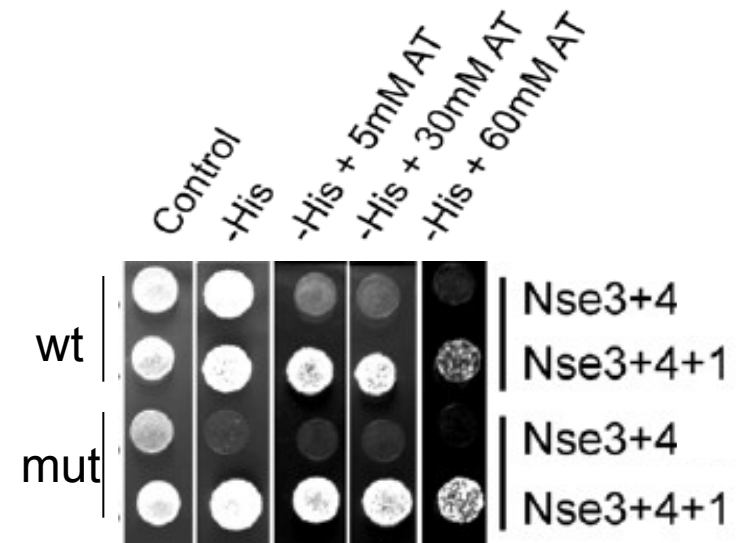
**Stabilita** komplexu je zpravidla větší než pouhý součet jednotlivých protein-proteinových interakcí mezi podjednotkami (efekt přiblížení a zorientování partnera)

### Pull-down



### kvasinkový 2-hybridní systém

přerušení protein-proteinové interakce je relativně snadné u slabých dimerů – větší komplexy jsou většinou stabilizovány více interakcemi a je tedy obtížnější je narušit



# Podjednotky komplexů koexprimovány (ko-translace)

**Table 1.** Proteins analysed by Rlp-chip and mRNAs associated with them.

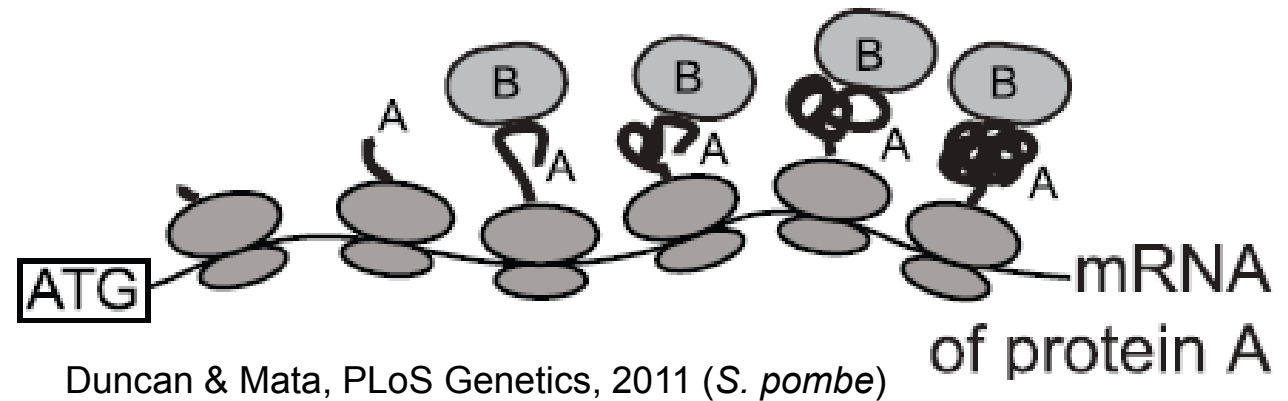
Bait	Bait function/protein complex	Enriched mRNAs	Function of proteins encoded by interacting mRNAs
Tea2p	Kinesin motor protein [32]	<i>tip1</i>	CLIP170 family, binds to Tea2p [9]
Cdc2p	cyclin-dependent protein kinase [33]	<i>rum1</i> <i>cdc18</i>	CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor [12] DNA replication factor [13]
Sty1p (Spc1p)	MAP kinase; stress-responses [14,34]	<i>pyp2</i> <i>cip2</i>	Tyrosine phosphatase, acts on Sty1p [14] RNA-binding protein [15]
Rpt2p (Mts2p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ubp6</i> <i>rhp23</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase * [35] Rad23 homolog * [35]
Rpn12p (Mts3p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ecm29</i> <i>rpn1301</i> <i>rpn1302</i>	Proteasome component * [35] 19S proteasome regulatory subunit * [35] 19S proteasome regulatory subunit * [35]
Atf1p	Transcription factor; stress response [36]	<i>pcr1</i>	Transcription factor, interacts with Atf1p [16]
Mnh1p	Mago nashi homolog; splicing * [35]	<i>mni1</i>	Protein with Mago nashi interacting domain * [35]
Arp6p	SWR1 complex; chromatin remodelling [18]	<i>alp5</i>	INO80 and SWR1 chromatin remodelling complexes [18]
Arp9p	SWI/SNF and RSC complex; chromatin remodelling [17]	<i>snf21</i> <i>snf22</i>	DNA helicase, RSC complex [17] DNA helicase, SWI/SNF complex [17]
Arp42p	SWI/SNF and RSC complex; chromatin remodelling [17]	<i>snf21</i> <i>snf22</i>	DNA helicase, RSC complex [17] DNA helicase, SWI/SNF complex [17]
Arp8p	Ino80 complex; chromatin remodelling [18]	<i>ino80</i>	INO80 chromatin remodelling complex [18]
Arp2p	Arp2/3 complex; actin polymerization [37]	<i>arp8</i> <i>arp9</i>	INO80 chromatin remodelling complex [18] SWI/SNF and RSC complexes [18]

Only proteins that copurified with mRNAs other than their own are shown. Proteins that have not been characterised in *S. pombe*, and for which the information is a prediction based on the behaviour of orthologous proteins are marked with a star.

Proteiny s nimiž ko-purifikovala jiná než jenom vlastní mRNA

Proteiny se skládají hned po translaci, nebo za pomoci chaperonů, nebo až v určitém místě (např. v mitochondrii po odštěpení signální sekvence ...) - často jsou podjednotky komplexů **koexprimovány** (podobná regulace transkripce + ko-translace)

### 3. Cotranslational Assembly

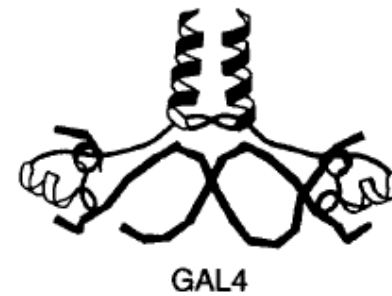
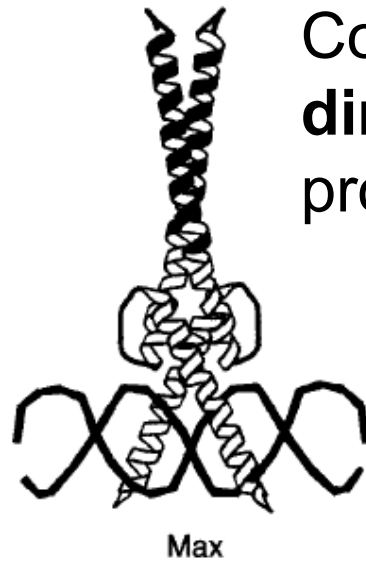
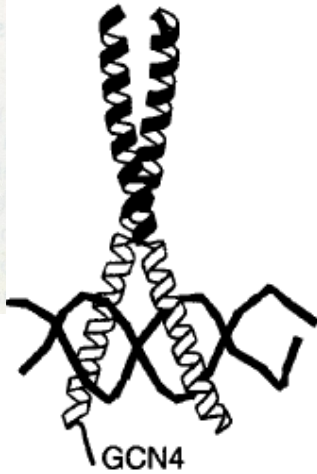
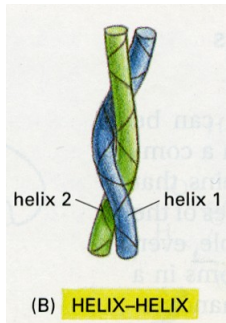


samostatně by se neposkládaly, byly by nestabilní, toxické nebo by agregovaly (protein-proteinové interakce často přes hydrofobní povrchy a je třeba je vytvořit co nejdřív) - **koexprese a kopurifikace proteinů** (*kdo purifikuje proteiny?*)

# Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím protein-proteinových interakcí

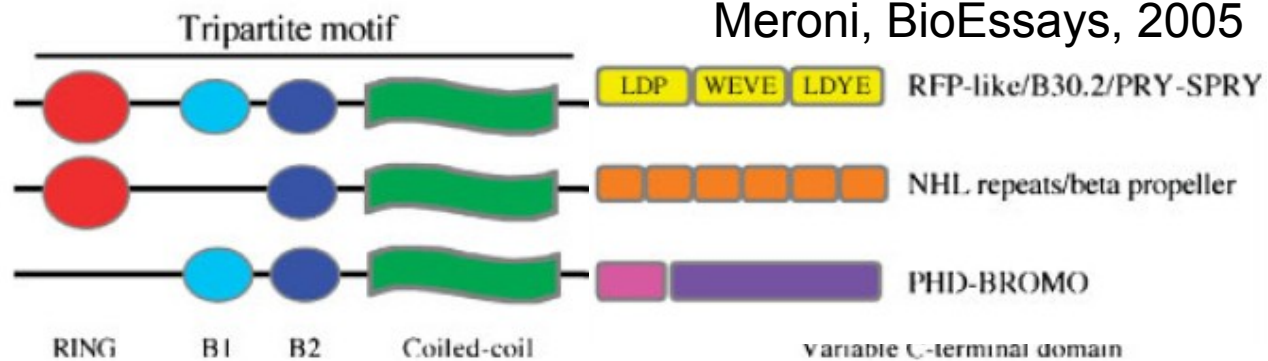
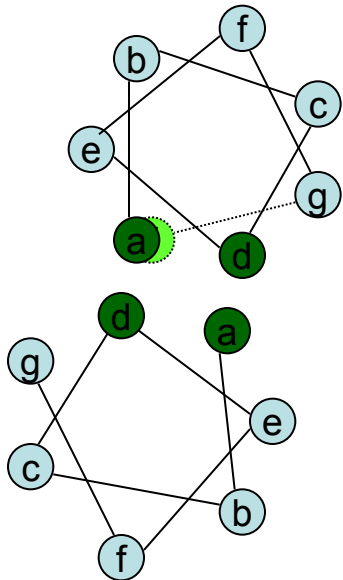
- Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> quaterní tj. komplexy (stejně typy **nekovalentních** vazeb, kritérium minimální energie) (šroubovice a listy se k sobě skládají podobným způsobem)
  - iontové, vodíkové, van der Waals, hydrofobní síly (kovalentní vazby - disulfidické můstky především u extracelulárních proteinů)
    - vodíkové můstky především u  $\beta$ -listů
- **hydrofobní zbytky** jsou tlačeny dovnitř proteinu (nikoli do solventu)
  - součet hydrofobních sil je značný (převažuje u většiny interakcí)
    - hydrofobní povrchy se podílí na vytváření coiled-coil vláken
- Variabilita je velká – nelze je jednoduše definovat - obtížná **predikce** (založená na struktuře „vyřešených“ komplexů, v 2010 pouze 300 struktur s partnery z celkem desítek tisíc PDB dat)

Lupas, TiSB, 1996



Coiled-coil doména je častým dimerizačním modulem proteinů

Dvě šroubovice s tzv. heptádovou repeticí (hxxhxxx) (vláknité struktury – A. Carter)

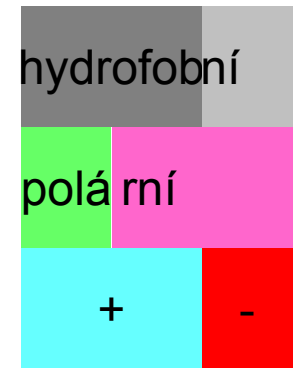
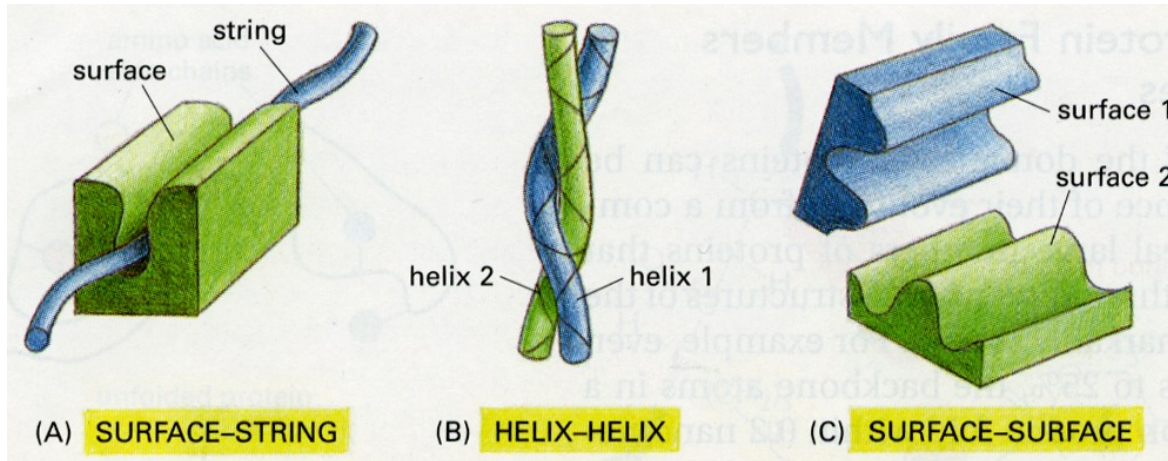


Meroni, BioEssays, 2005

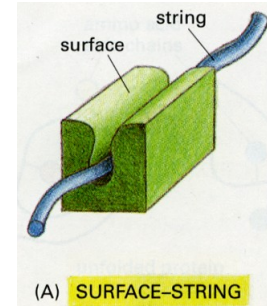
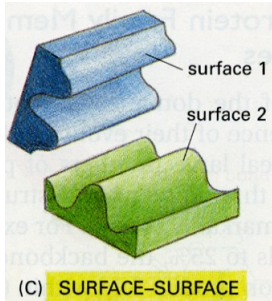
TRIM/RBCC proteiny vytváří bodies v buňkách (např. PML)



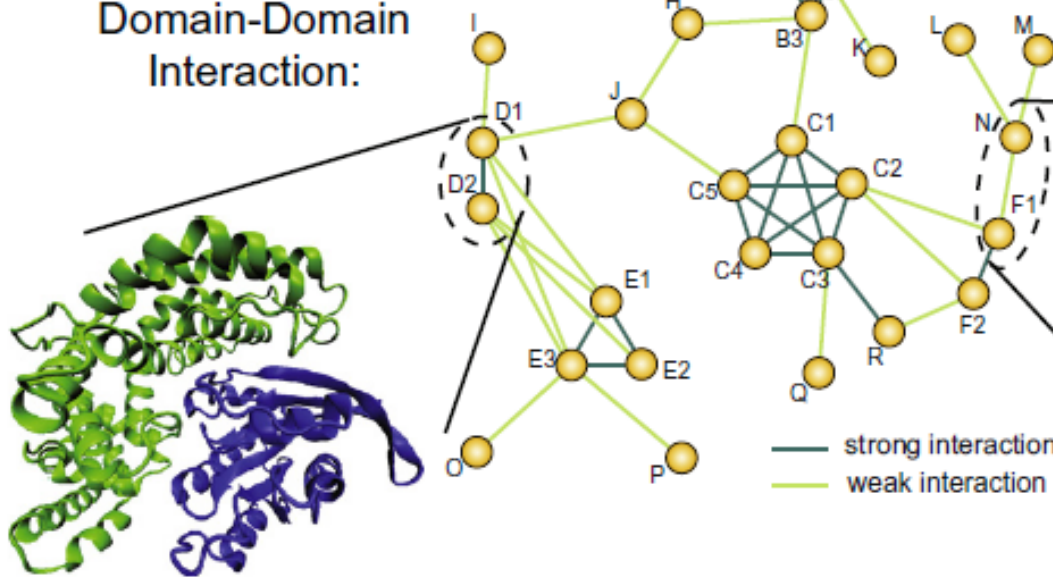
Ostatní domény/moduly lze definovat pouze obecně:  
proteiny musí mít **komplementární tvar i charakter** -  
malá změna povrchu může změnit interakční schopnosti  
(např. WHD váže DNA i proteiny - Paleček)



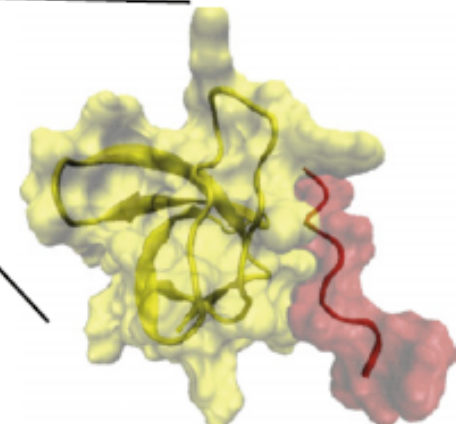
Ostatní domény/moduly lze definovat pouze obecně: proteiny musí mít **komplementární tvar i charakter** - malá změna povrchu může změnit interakční schopnosti (např. WHD váže DNA i proteiny - Paleček)



Domain-Domain Interaction:



Domain-Linear Motif Interaction:



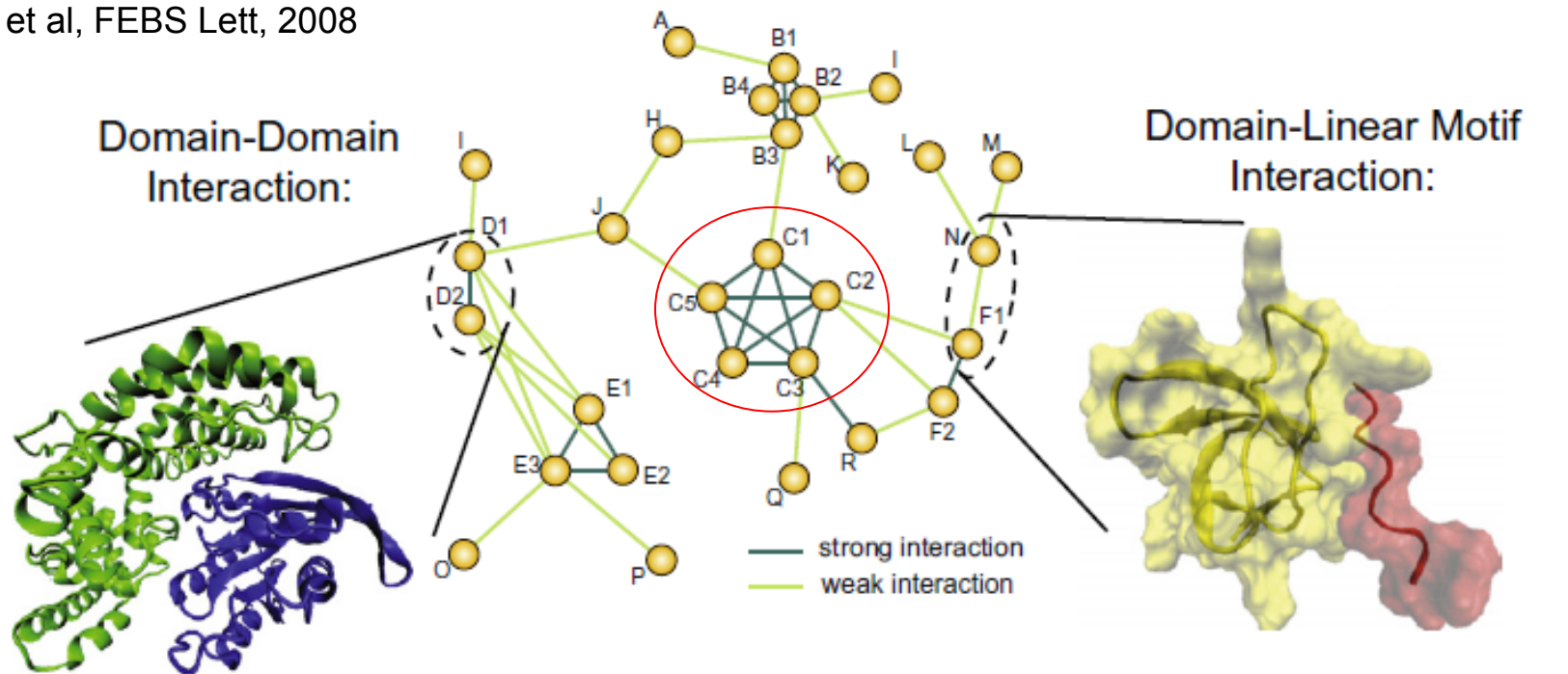
- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities:  $K_D$  nM to pM
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD

- Motif length from 3 - 10 AA
- Affinities:  $K_D \sim \mu\text{M}$
- Rather transient interactions
- Examples: Sh3/PxxP, EVH1/FPPPP

# Z analýzy protein-proteinových interakcí lze usuzovat na potenciální stabilní komplexy vs přechodné interakce

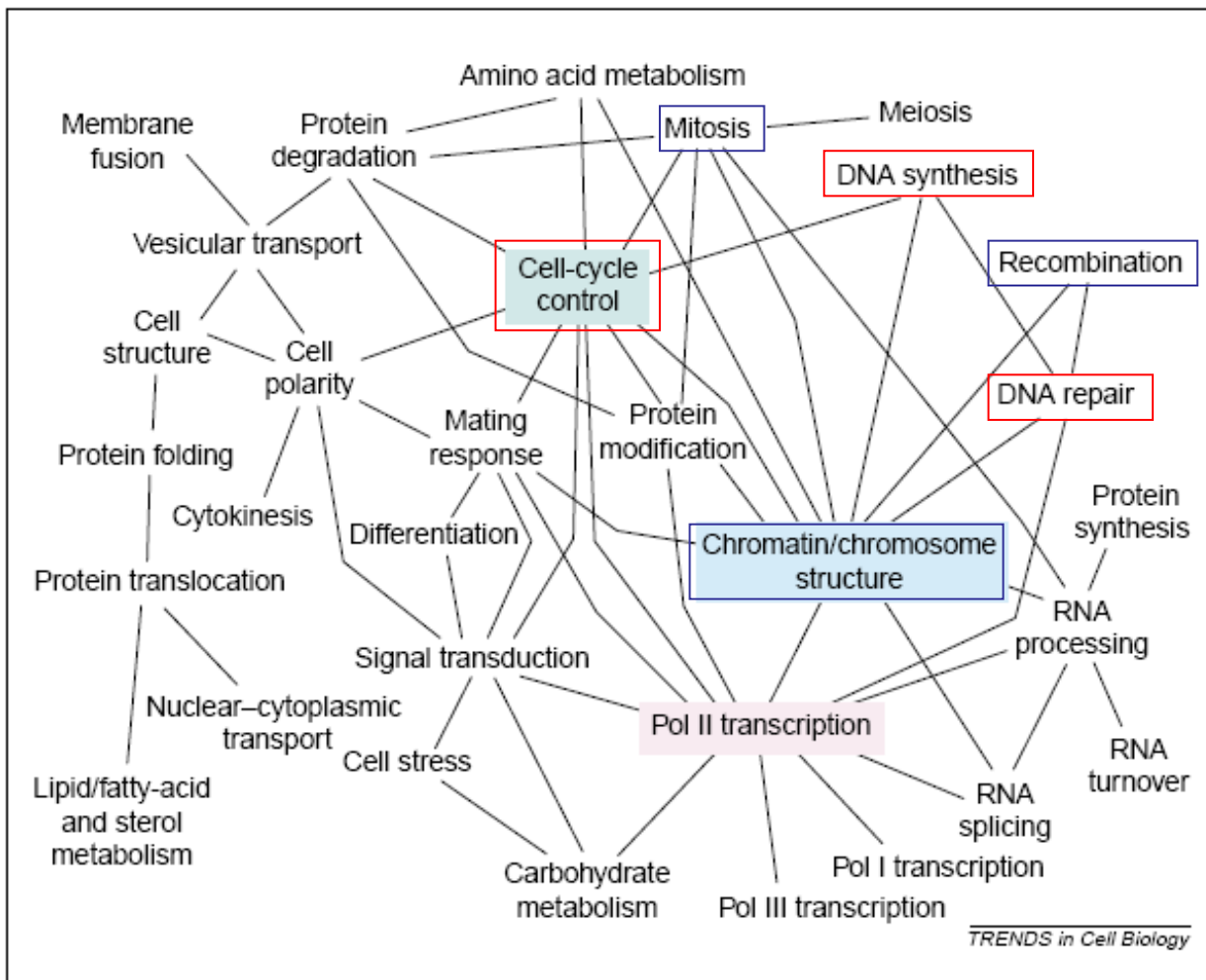
S jakými partnery a jak silně interagují vaše proteiny?

Bader et al, FEBS Lett, 2008



- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities:  $K_D$  nM to pM
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD

- Motif length from 3 - 10 AA
- Affinities:  $K_D \sim \mu\text{M}$
- Rather transient interactions
- Examples: Sh3/PxxP, EVH1/FPPPP



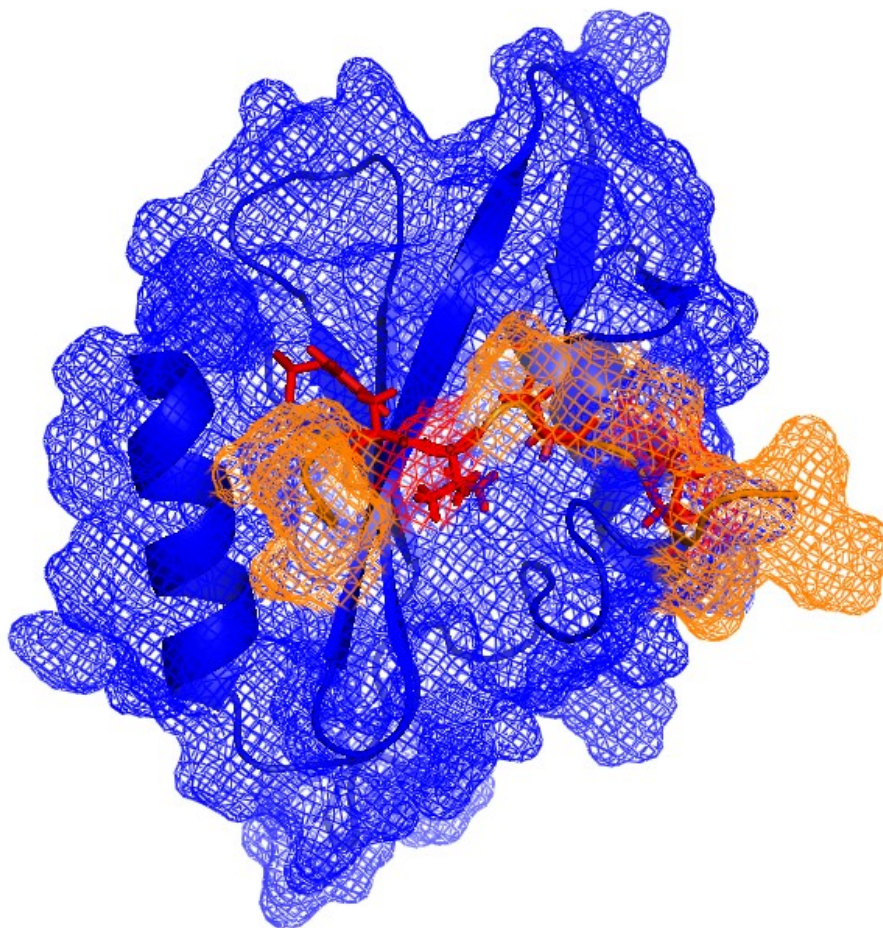
Interakční síť  
(>15 protein-  
proteinových  
interakcí)

Velkou roli hraje  
multi-modulární/-  
doménové složení  
proteinů a jejich  
interakce  
(proteomika)

Fig. 2. Functional group interaction map based on Fig. 1 (modified from Ref. 10). Shown are interactions between

Multiproteinové komplexy (stabilní či přechodné) jsou dále fyzicky spojeny s dalšími komponentami buňky – interakční a funkční **sítě** (algoritmy sociálních sítí)

# Post-translační modifikace mění povrch – pro určité modifikace známe specifické vazebné domény

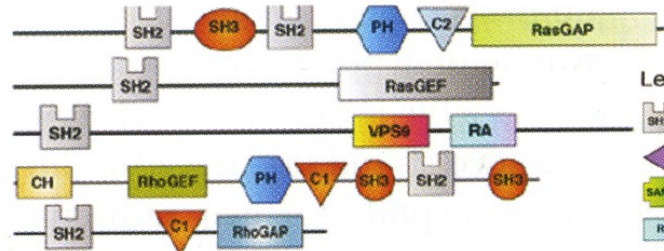


Např. **SH2** domény váží **fosfopeptidy** – dvě vazebná místa (fosfoTyr a peptid – peptid určuje vazebnou specifitu) – PDB: 2PLD

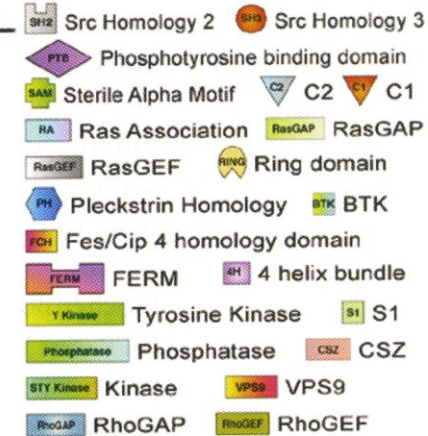
# Takovéto domény jsou často jako moduly součástí proteinů rozmanitých funkcí

## Small GTPase Signaling

Ras-GAP  
Nsp1,2,3  
Rin1  
Vav1,2,3  
Chimerin

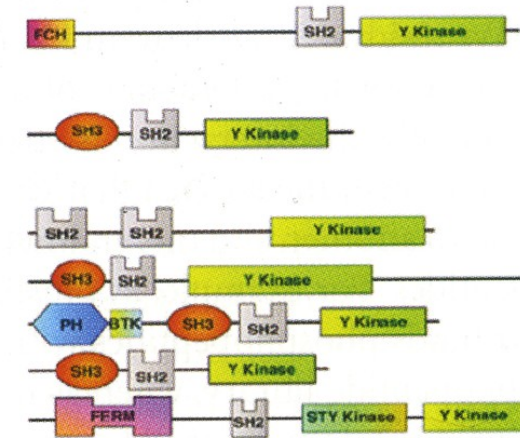


### Legend:



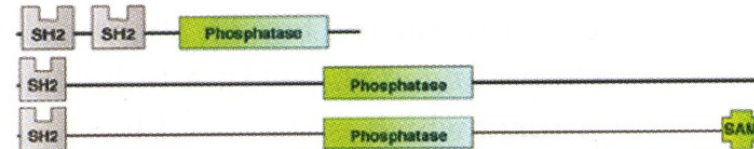
## Kinases

Fps, Fer  
Src, Csk, Ctk/Hyl,  
Fgr, Fyn, Yes, Hck,  
Lck, Lyn, Blk, Frk,  
Brk, DJ697K14.1  
Zap70, Syk  
c-Abl, Arg/Abl2  
Btk, Tec, Itk, Bmx  
Txk  
Jak1,2,3, Tyk2



## Phosphatases

Shp1, Shp2  
Ship  
Ship2

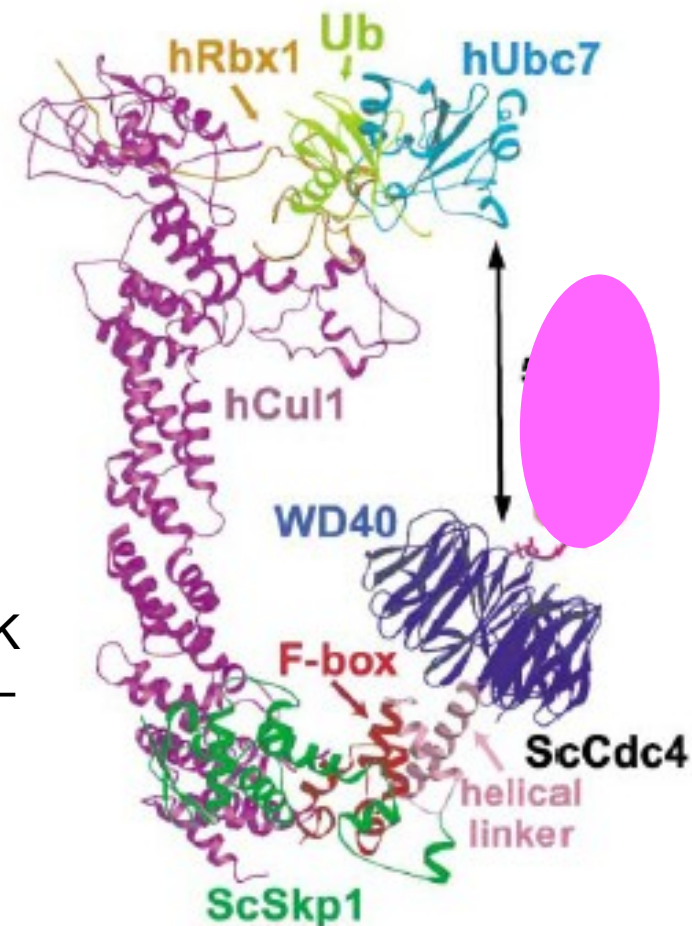


Např. SH2 domény se vyskytují v proteinech s různými biochemickými aktivitami (doménami) – způsob jakým jsou propojeny funkčně odlišné proteiny fyzicky s regulátorem (např. kinasa s autofosforylovaným Tyr dále fosforyluje proteiny, které obsahují SH2 vážící fosfoTyr-peptid a jsou následně fosforylovány)

Fosforylace a vazba fosfopeptidu je velice rozšířeným mechanismem spouštění biologických odpovědí – kromě SH2 rozeznávají pTyr tzv. PTB domény (v dokovacích proteinech)

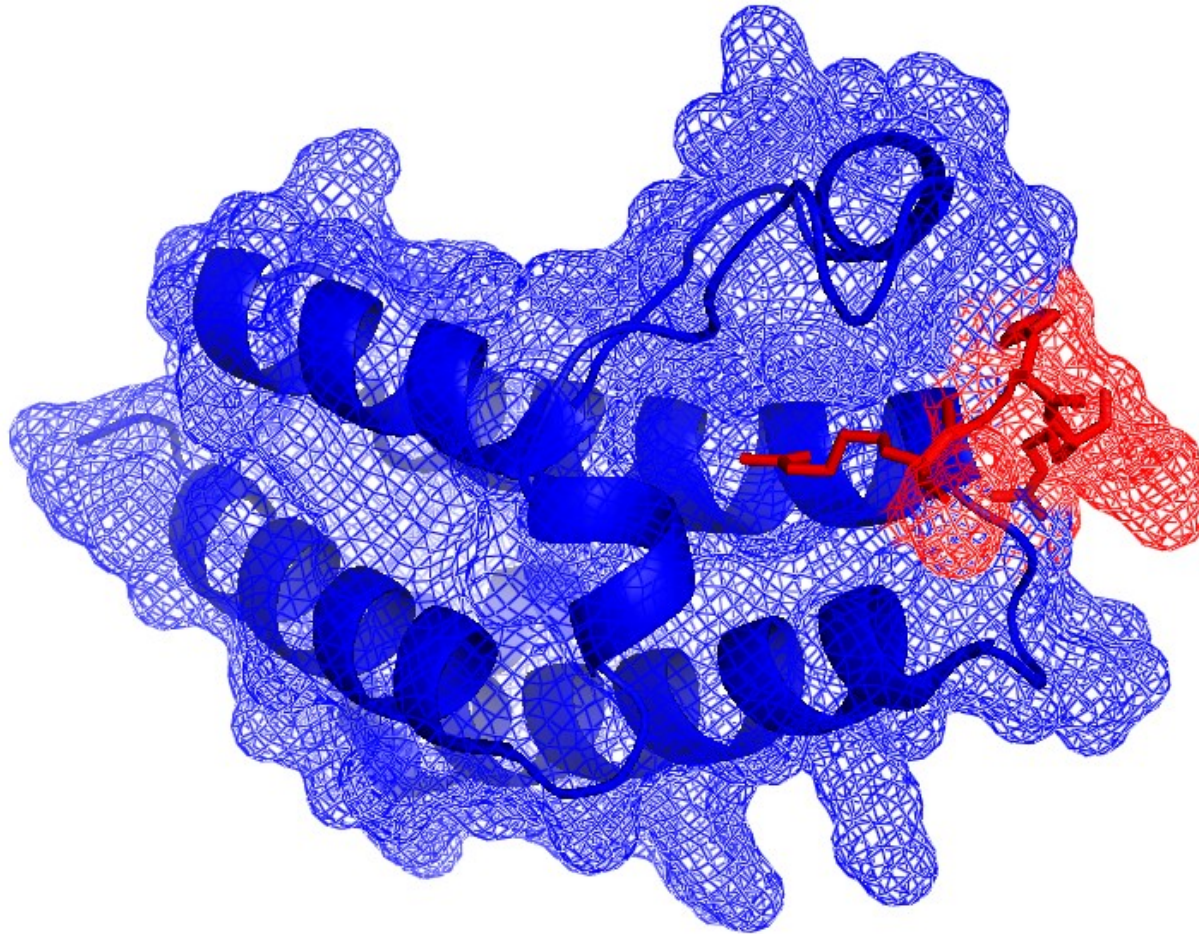
Modifikace	AMK zbytek	interakční doména
Fosforylace	tyrosin	SH2, PTB
	serin/threonin	14-3-3, WD40, WW, BRCT
acetylace	lysin	bromodoména
metylace	lysin	chromodoména
hydroxylace	prolin	VHL $\beta$
ubiquitinace	lysin	UIM, UBA, CUE
SUMOylace	lysin	SIM

SCF komplex – vazba fosfopeptidu (inhibitoru CDK na WD40 doménu) ukotví substrát pro ubiquitinaci – b. cyklus (Kozáková, Blažek)



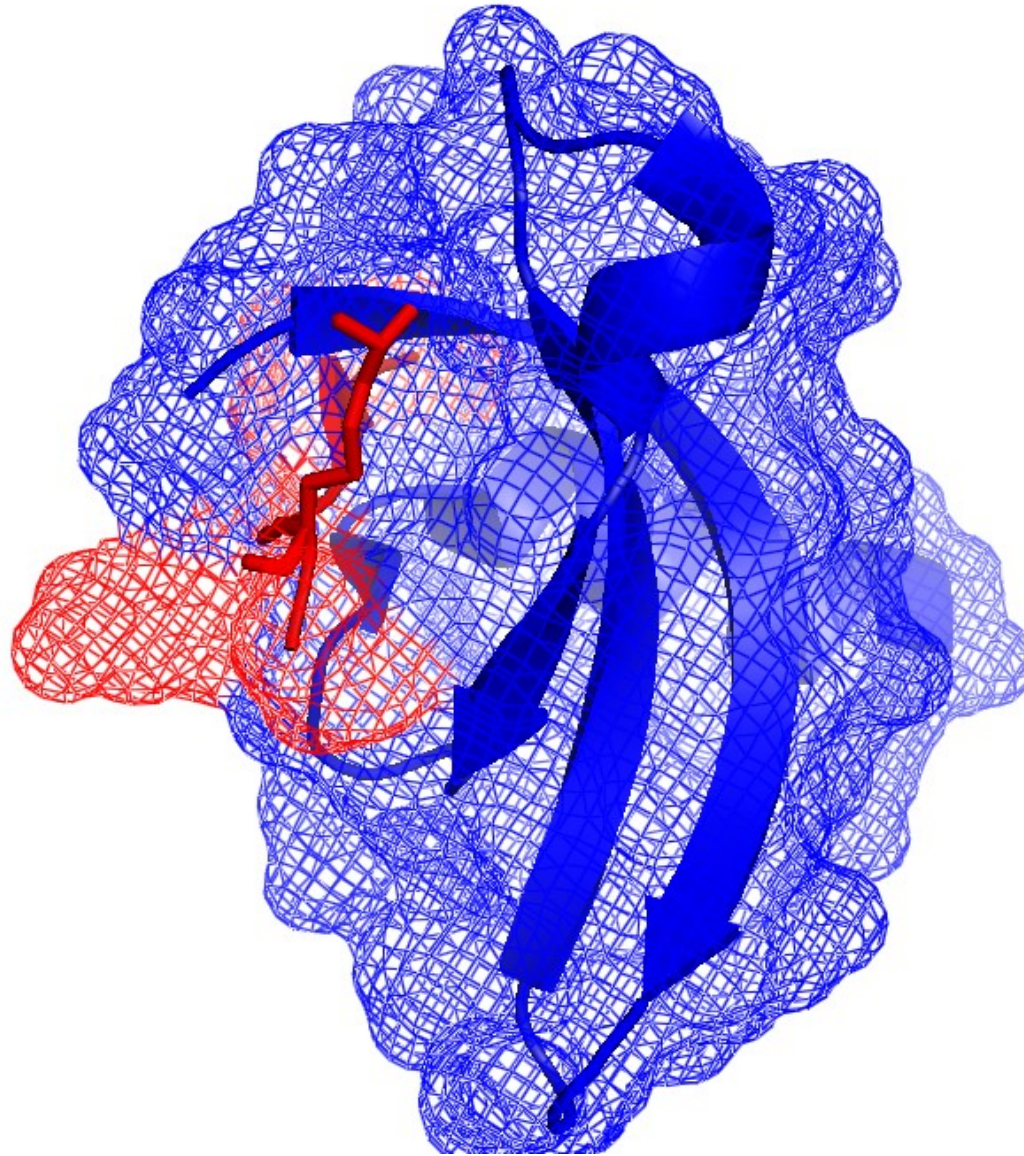
Golemis a Adams  
Orlicky et al, Cell, 2003

SCF komplex je typem **adaptéru** – substrát přiblíží k enzymu



Modifikace histonů ovlivňují složení a přístupnost chromatinu – bromodoména GCN5  
HAT navázaná na H4 lysin – PDB: 1E6I - (Fajkus, Paleček) Bottomley, EMBO rep., 2004



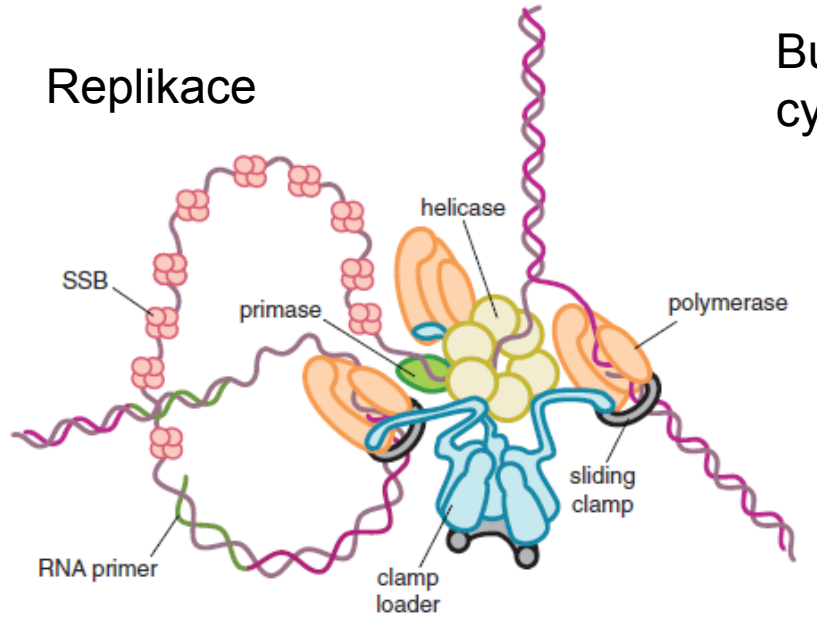


Acetylace uvolňuje konce histonů, zatímco metylace neutralizuje náboj (kompaktnější)  
– chromodoména HP1 navázaná na H3 lysin – PDB: 1KNA - (Fajkus, Paleček)

Bottomley, EMBO rep., 2004

většinou jsou vlastnosti proteinů/komplexů kontrolovány a modifikovány prostřednictvím jejich **modifikací a interakcí** se sousedními proteiny a dalšími komponentami buněk (DNA, RNA, fosfolipidy, cukry a sekundárními posly)

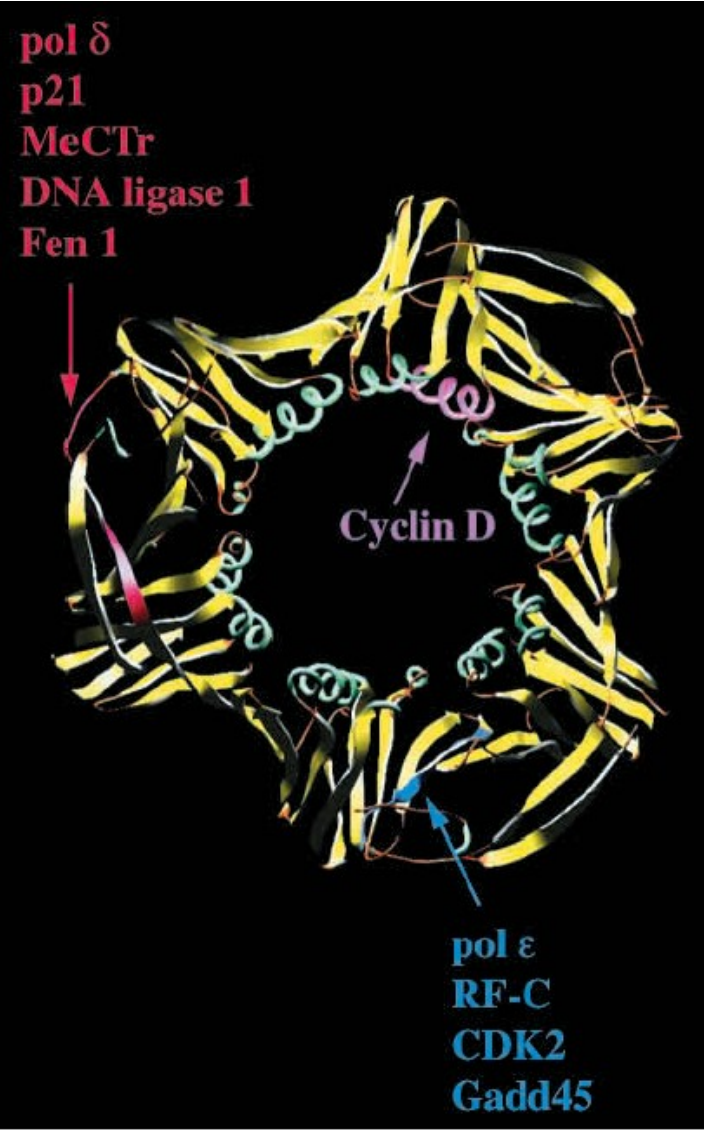
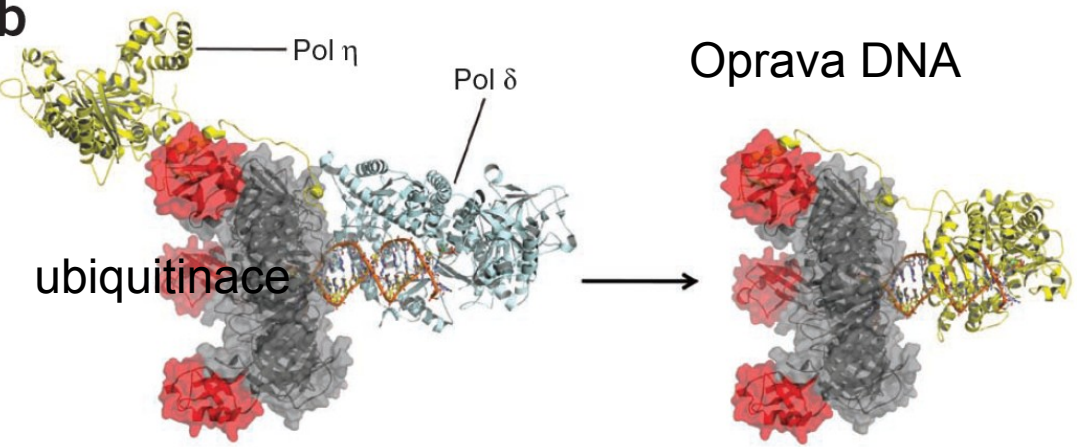
Replikace

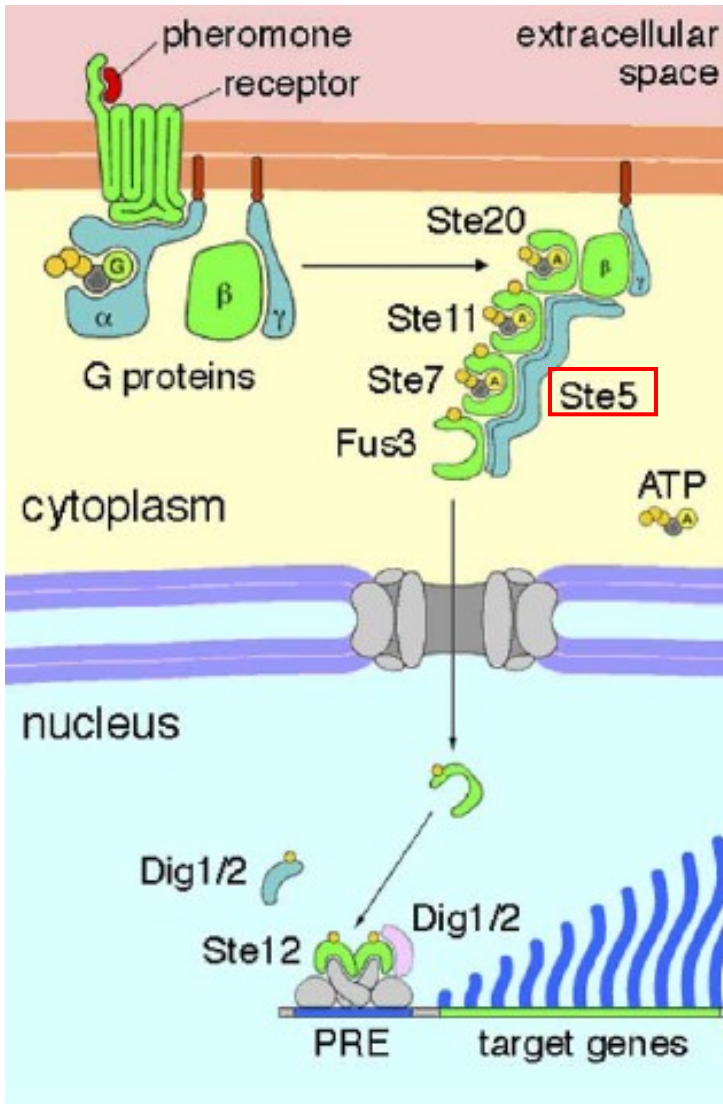


Buněčný →  
cyklus

**b**

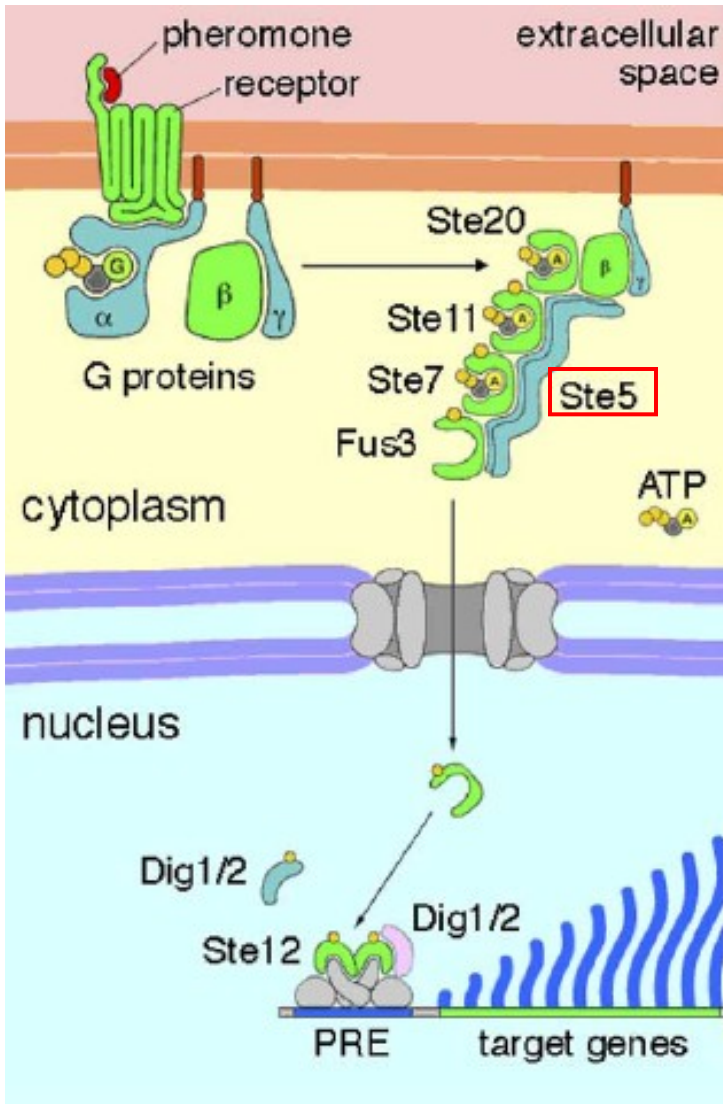
Oprava DNA





Protein-proteinové interakce moduluje velmi často GDP-GTP konverze – konformační změna (doc. Marek)

Mnoho proteinů obsahuje pouze interakční domény a mají jediný úkol: nukleace multiproteinových komplexů – **scaffold** (lešení)

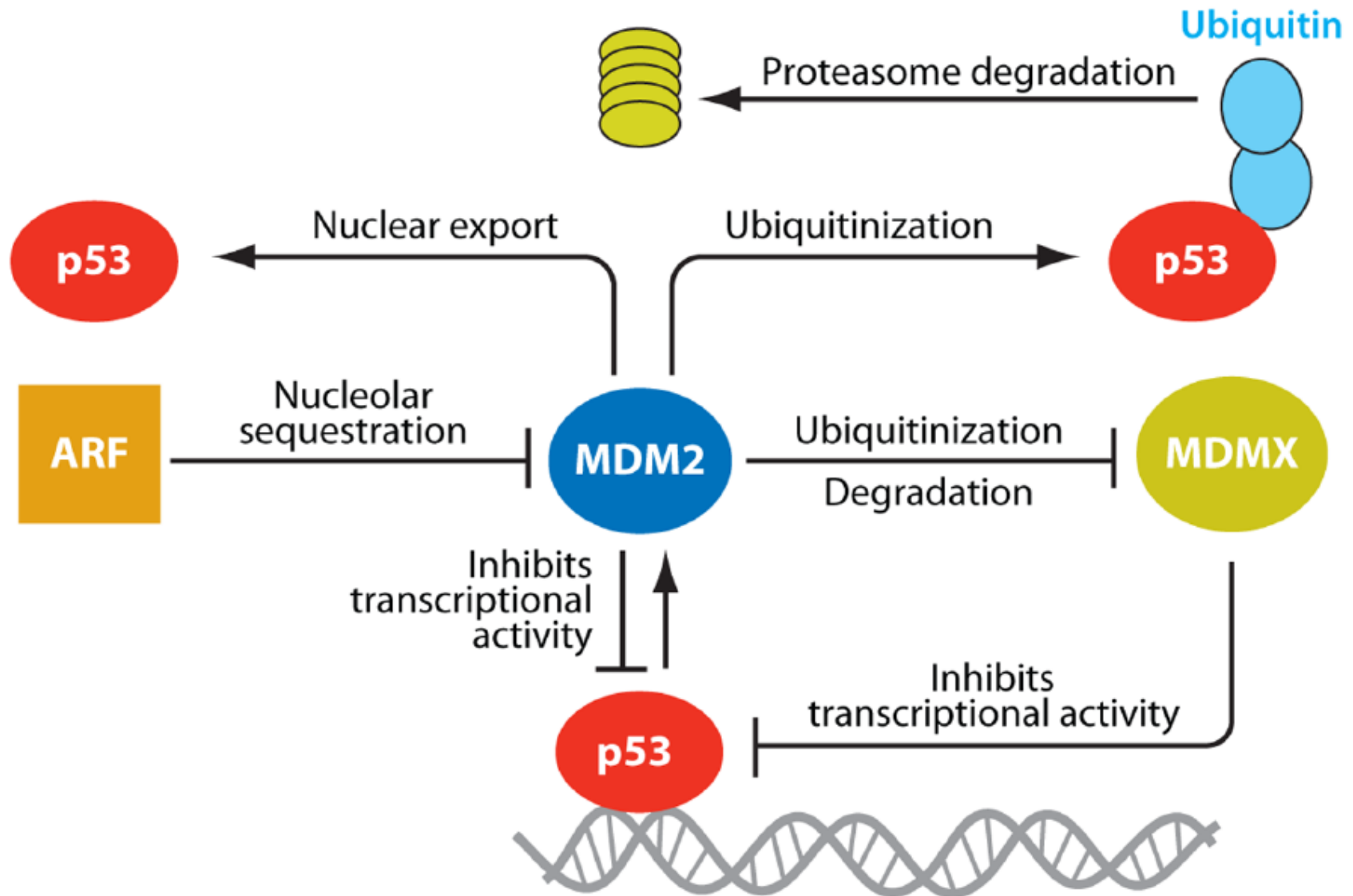


Přeskládáním modulů lze vytvářet komplexní biologické systémy

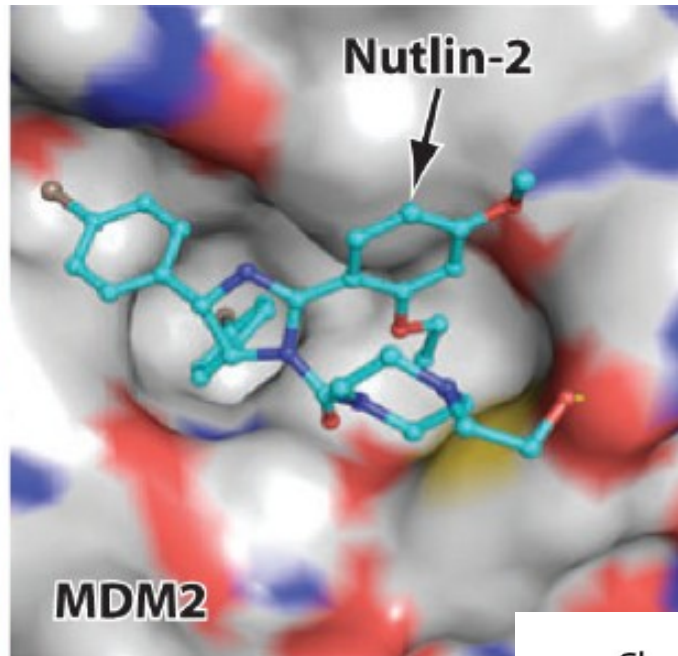
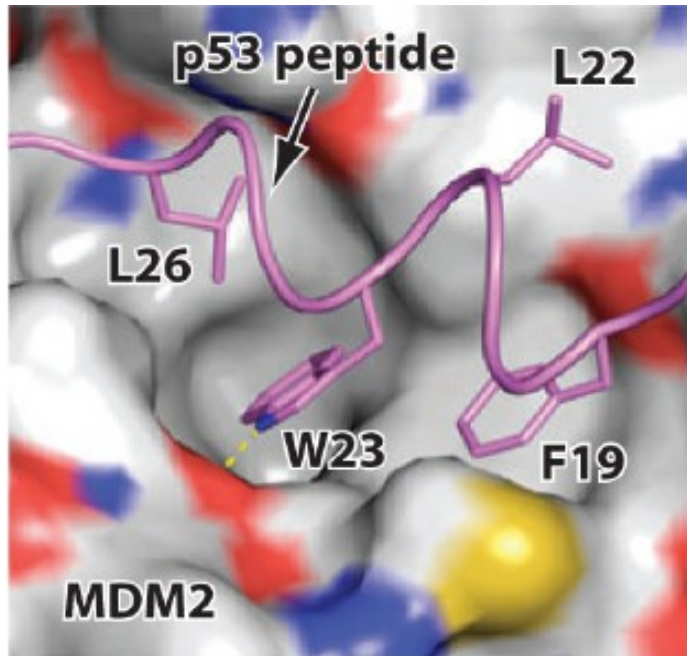
- některé viry využívají buněčné moduly k invazi do buněk
- v průběhu evoluce některé moduly fúzovaly
- některé oncogeny jsou výsledkem fúze modulů

Snaha připravit **inibitory** proteinových interakcí

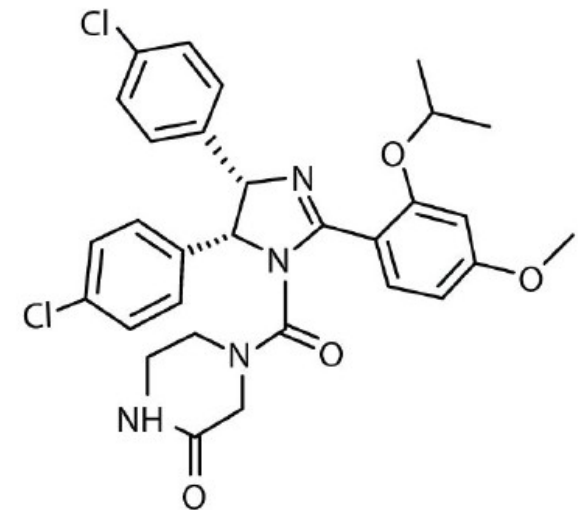
# Inhibice protein-proteinových interakcí/p53-MDM2



# Inhibice protein-proteinových interakcí/p53-MDM2



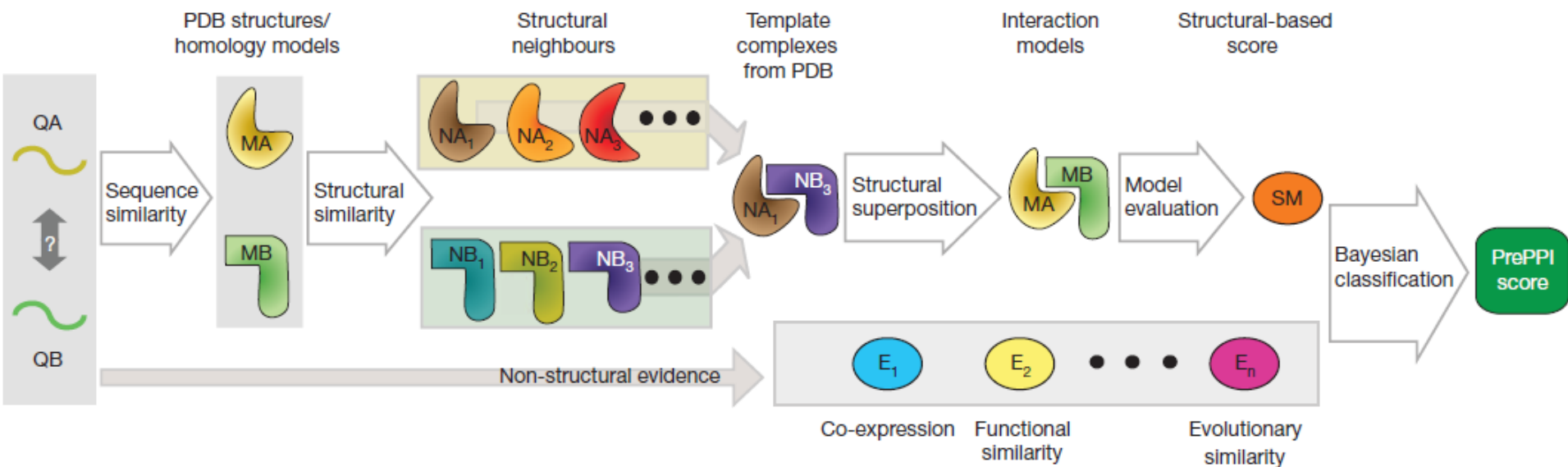
přerušení protein-proteinové interakce je relativně snadné u malých komplexů (dimerů) – větší komplexy jsou stabilizovány více interakcemi => inhibice?



**Nutlin-3a**

# Otázky při studiu nových proteinů

- Konzervace sekvence? Strukturní data?
- S jakými partnery interaguje přímo? Jsou koexprimovány a kolokalizovány? Skrze jaké domény interagují?
- Je součástí komplexu? Architektura/funkce komplexu?
- Ovlivňují nějaké interakce aktivitu daného proteinu?
- Kde v buňce/organismu se protein nachází?



# Závěry

- na většině buněčných procesů se podílí komplexy (stabilní či dynamické)
- Stabilita komplexu je zpravidla větší než pouhý součet jednotlivých protein-proteinových funkce celého komplexu je závislá na každé podjednotce (komplex se nesestaví nebo rozpadne bez všech podjednotek)
- některé podjednotky mohou plnit funkci adaptérů či lešení
- proteiny jsou spojeny prostřednictvím interakcí mezi doménami
- protein-proteinové interakce můžeme znázorňovat jako interakční/funkční sítě (databáze mohou napovědět ...)