



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
(garant)

- anglicky nebo česky? biochemici nebo mol. biol.?
- 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“, NCBR a dalších skupin z MU
- doporučení přednášek: Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041), Proteomické metody (CG080)

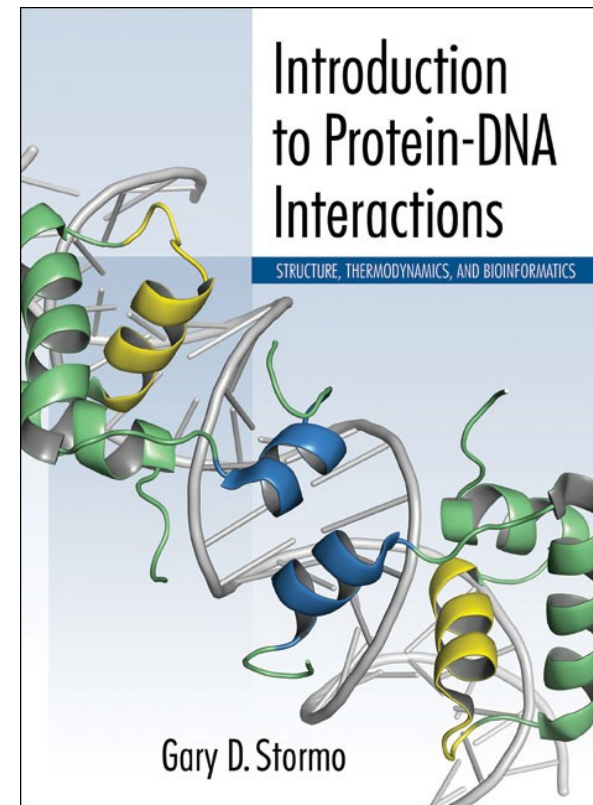
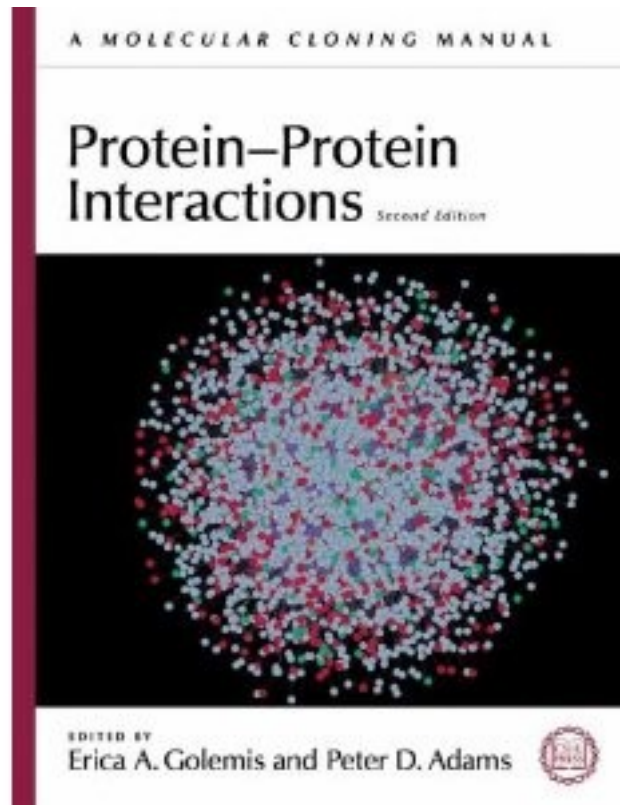
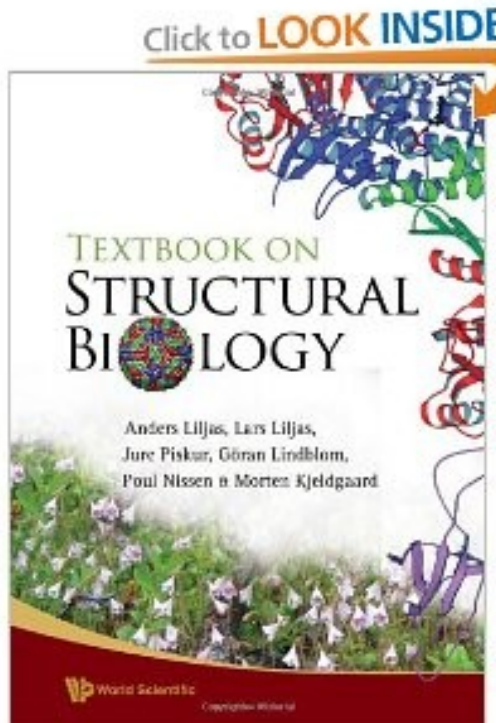
Program přednášek 2014

27.2.2014	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Marek	úvod do strukturní biologie
6.3.2014	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	protein-proteinové interakce, komplexy
13.3.2014	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesár	ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom
20.3.2014	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Marek	signální dráhy, GPCR
27.3.2014	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, vazebné motivy
3.4.2014	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy
10.4.2014	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Blažek	cyclin/CDK komplexy v buněčném cyklu a transkripci
17.4.2014	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesar	Oprava DNA, homologní rekombinace
24.4.2014	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	chromatinové komplexy
1.5.2014				svatek
8.5.2014				svatek
15.5.2013	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce komplexů
22.5.2013	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Zkouška - test

Informační zdroje

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

... 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>

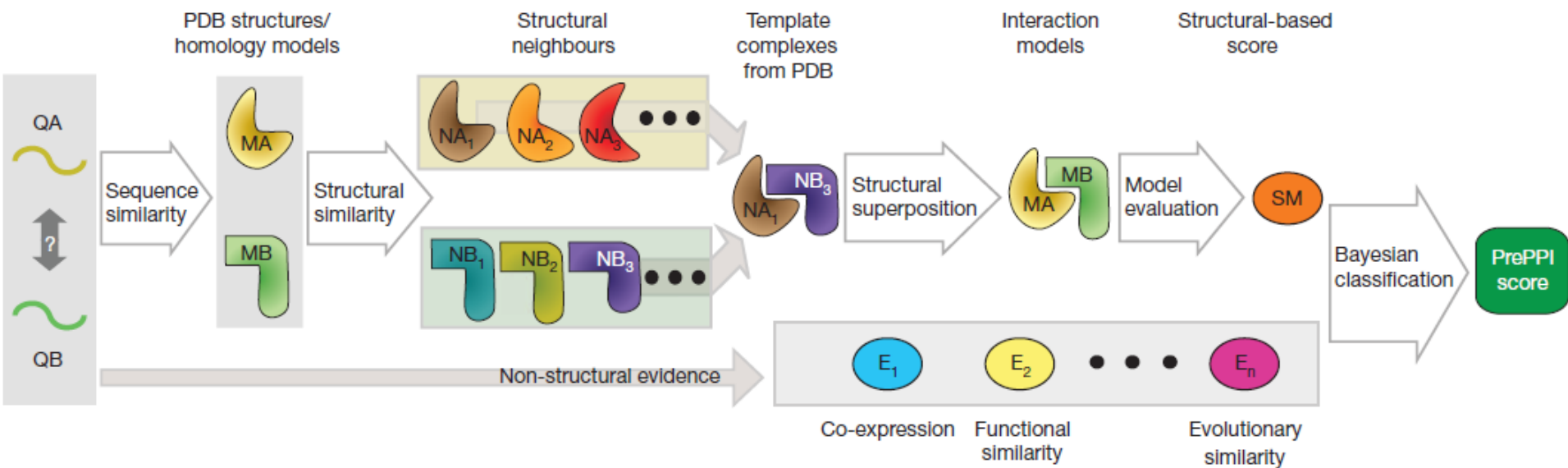
Zkouška: - přednáška x test?

- Úvod - Analýza proteinu
 - Domény
 - fold-struktura (ss, PDB)
 - v PyMolu připravit 3D strukturu
 - Interakce (IntAct)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - evoluce
- Konkrétní nová data – článek (< 5 let)

Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

Otázky při studiu nových proteinů

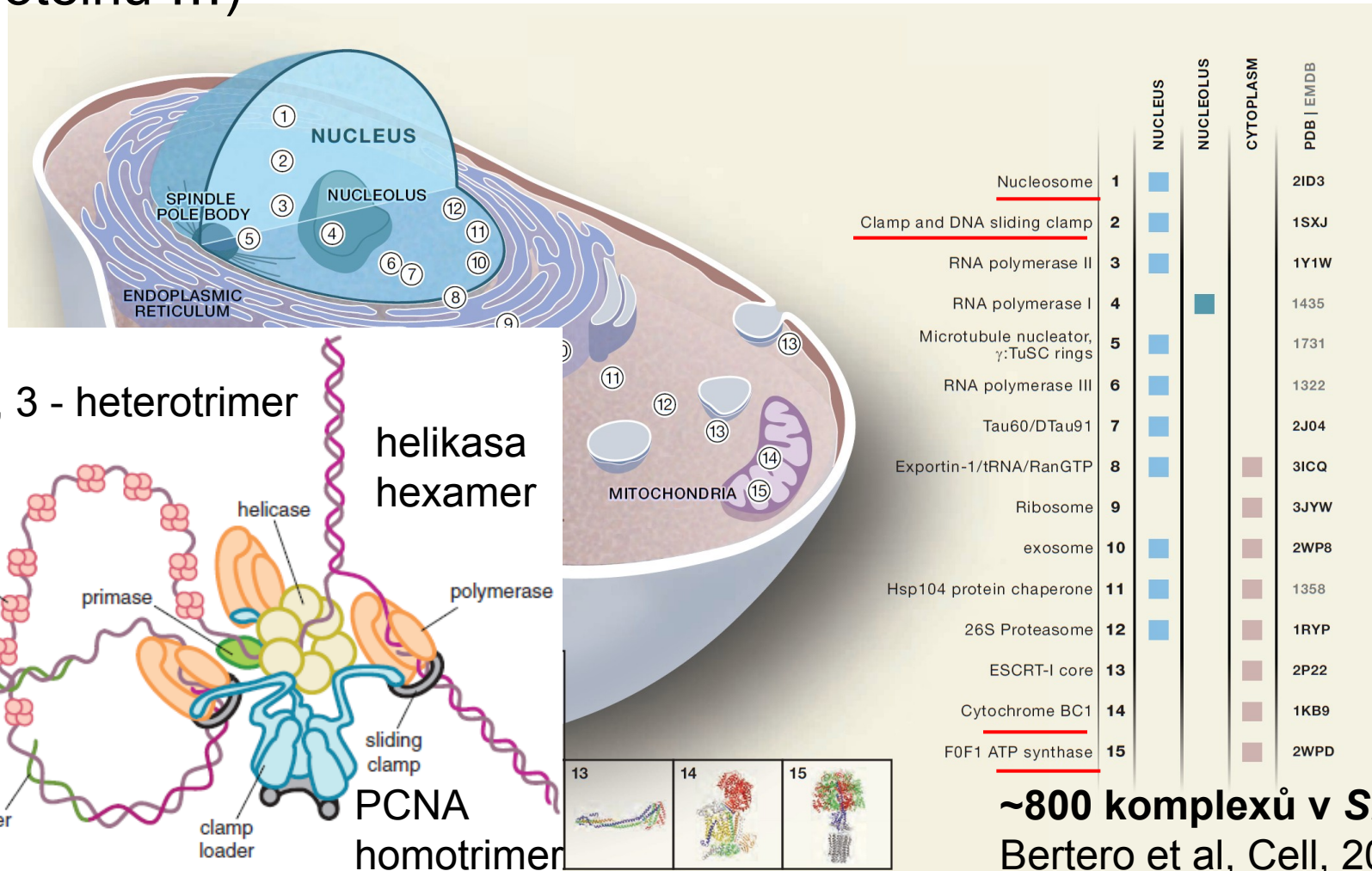
- Konzervace sekvence? Strukturní data?
- S jakými partnery interaguje přímo? Jsou koexprimovány a kolokalizovány? Skrze jaké domény interagují?
- Je součástí komplexu? Architektura/funkce komplexu?
- Ovlivňují nějaké interakce aktivitu daného proteinu?
- Kde v buňce/organismu se protein nachází?



Osnova

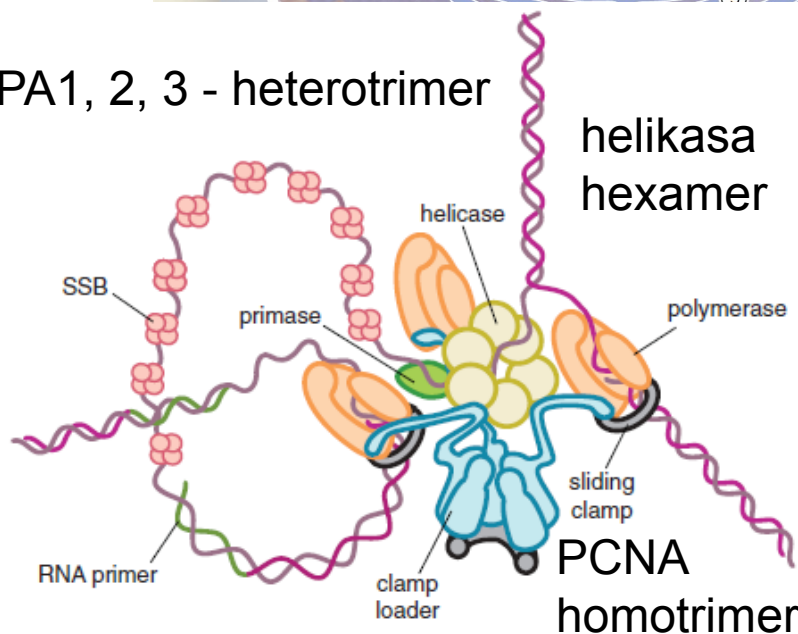
- Úvod do komplexů
 - příklady komplexů
 - sestavování a soudržnost komplexů
 - funkce komplexu a fenotyp
 - protein-proteinové interakce
 - vliv post-translačních modifikací na PPI
 - komplexy jako adaptéry a lešení
 - inhibice PPI ...

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

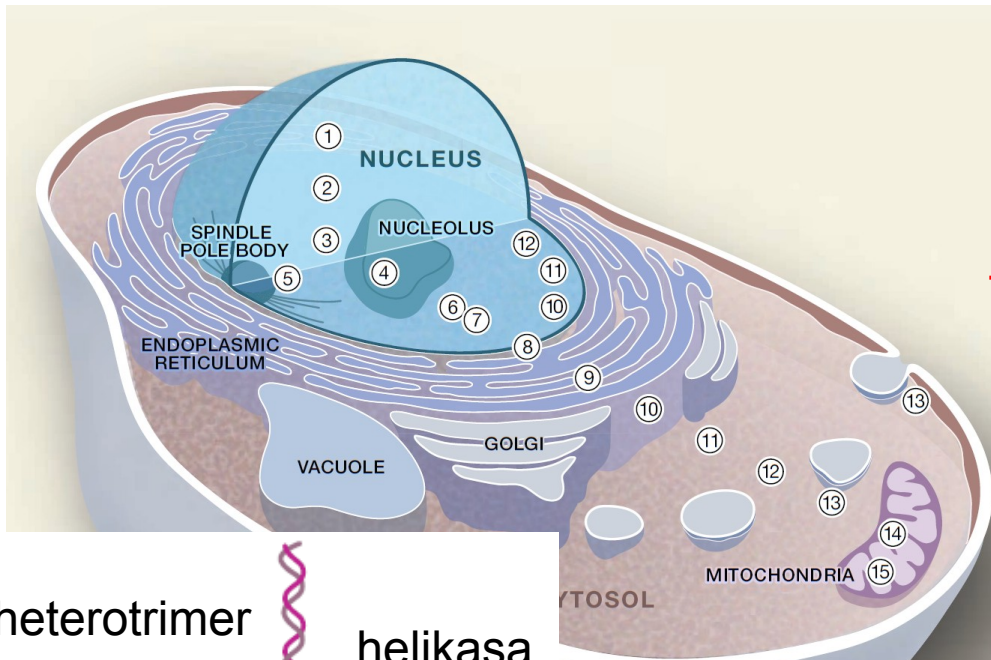


RPA1, 2, 3 - heterotrimer

helikasa hexamer



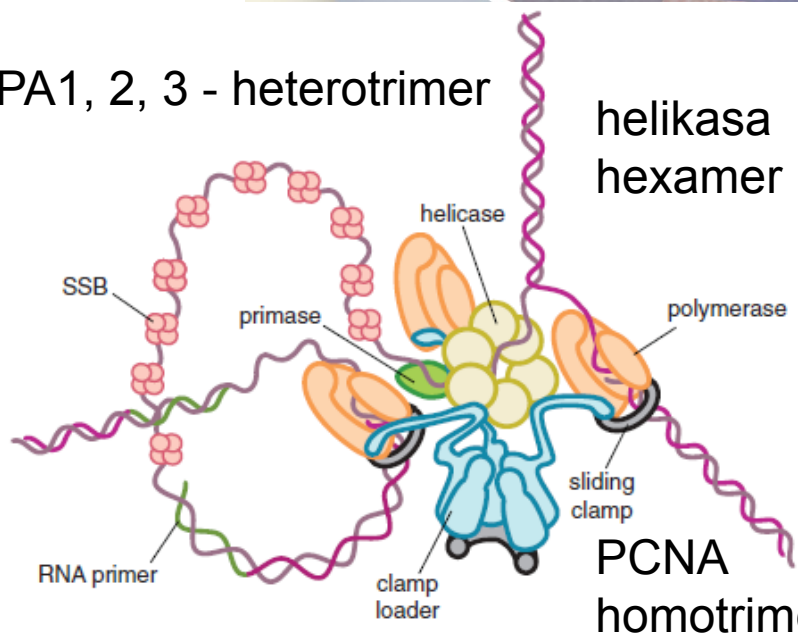
- většiny klíčových procesů jako replikace DNA, transkripce, translace se účastní multiproteinové **molekulární stroje**



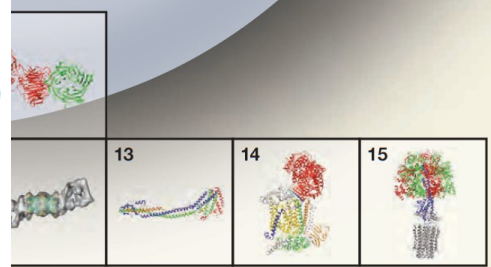
	NUCLEUS	NUCLEOLUS	CYTOPLASM	PDB EMDB
Nucleosome	1			2ID3
<u>Clamp and DNA sliding clamp</u>	2			1SXJ
RNA polymerase II	3			1Y1W
RNA polymerase I	4			1435
Microtubule nucleator, γ :TuSC rings	5			1731
RNA polymerase III	6			1322
Tau60/DTau91	7			2J04
Exportin-1/tRNA/RanGTP	8			3ICQ
<u>Ribosome</u>	9			3JYW
exosome	10			2WP8
Hsp104 protein chaperone	11			1358
<u>26S Proteasome</u>	12			1RYP
ESCRT-I core	13			2P22
Cytochrome BC1	14			1KB9
F0F1 ATP synthase	15			2WPD

RPA1, 2, 3 - heterotrimer

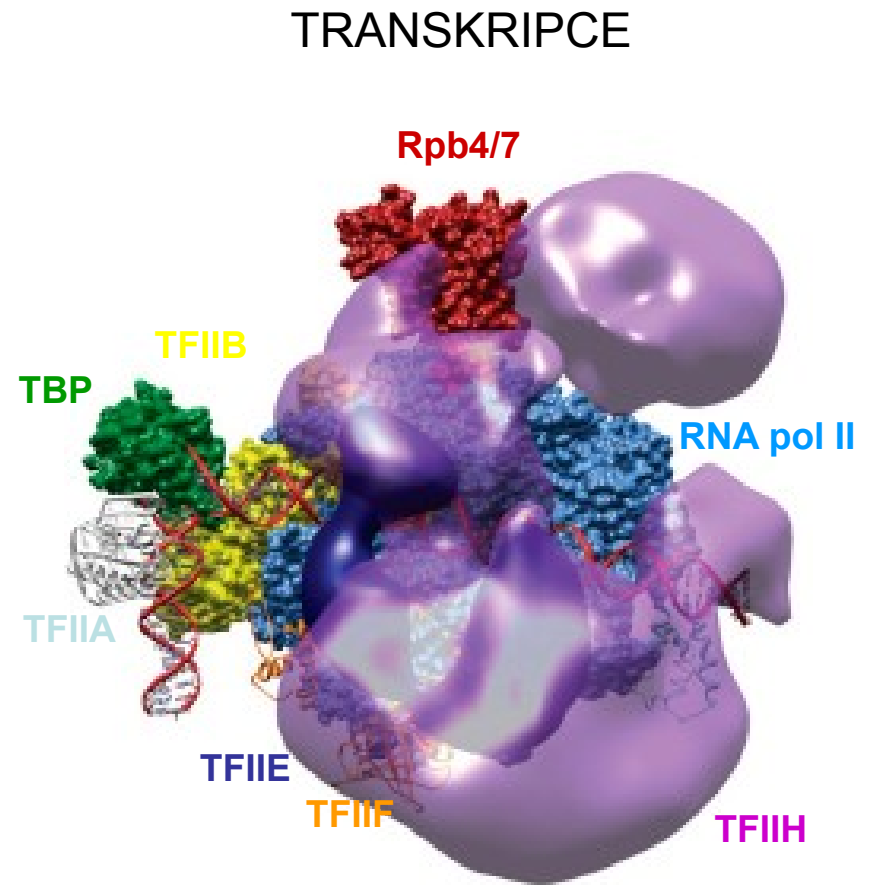
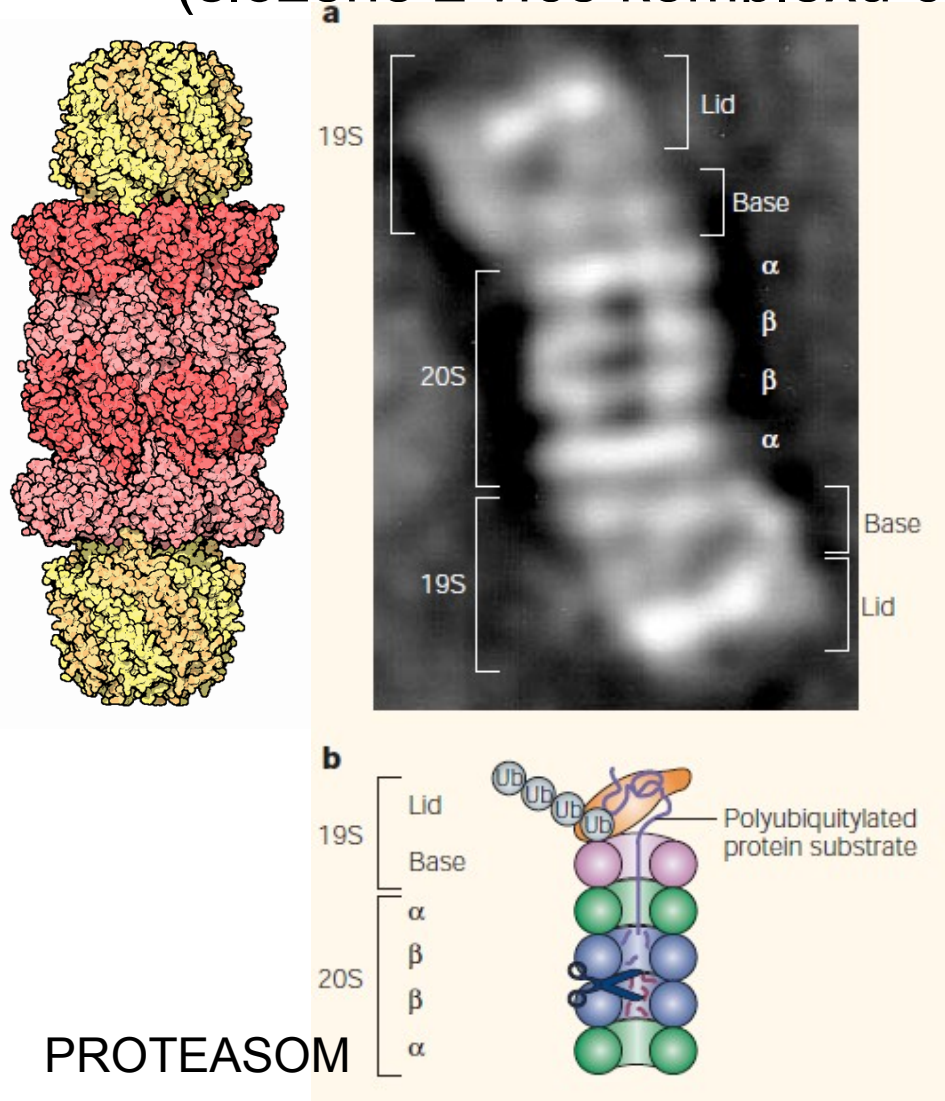
helikasa hexamer



PCNA homotrimer



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

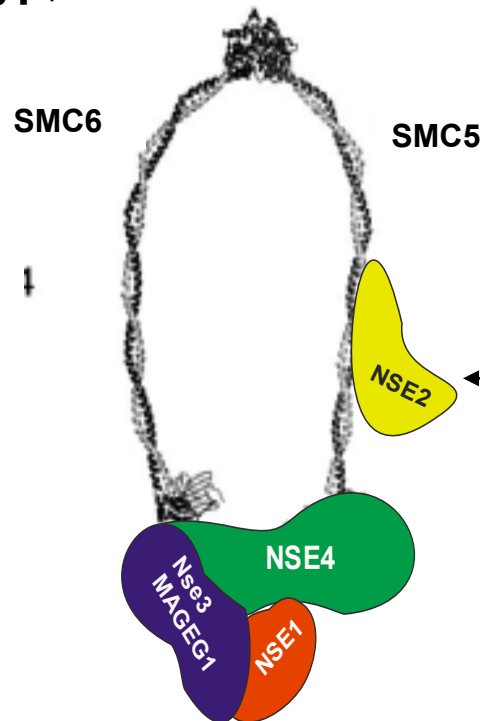


Od jednodušších ke složitějším

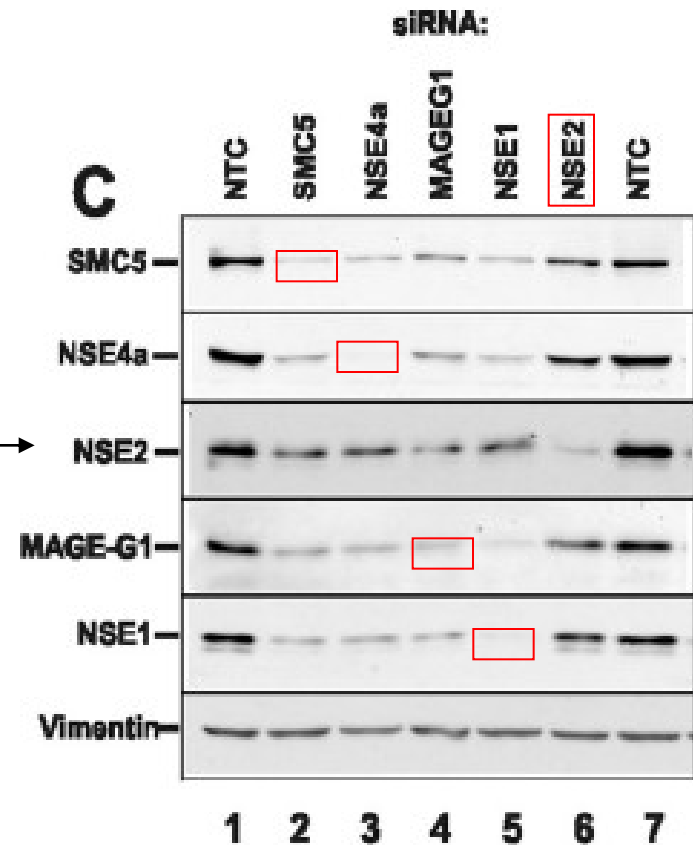
Stabilní proteinové komplexy jsou složeny z jednotlivých proteinů/**podjednotek** které spolu interagují - pokud schází podjednotka, tak nefunguje celý komplex – komplex se nesestaví/rozpadá

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

Delece kterékoli podjednotky lidského komplexu má za následek pokles **hladiny** ostatních proteinů

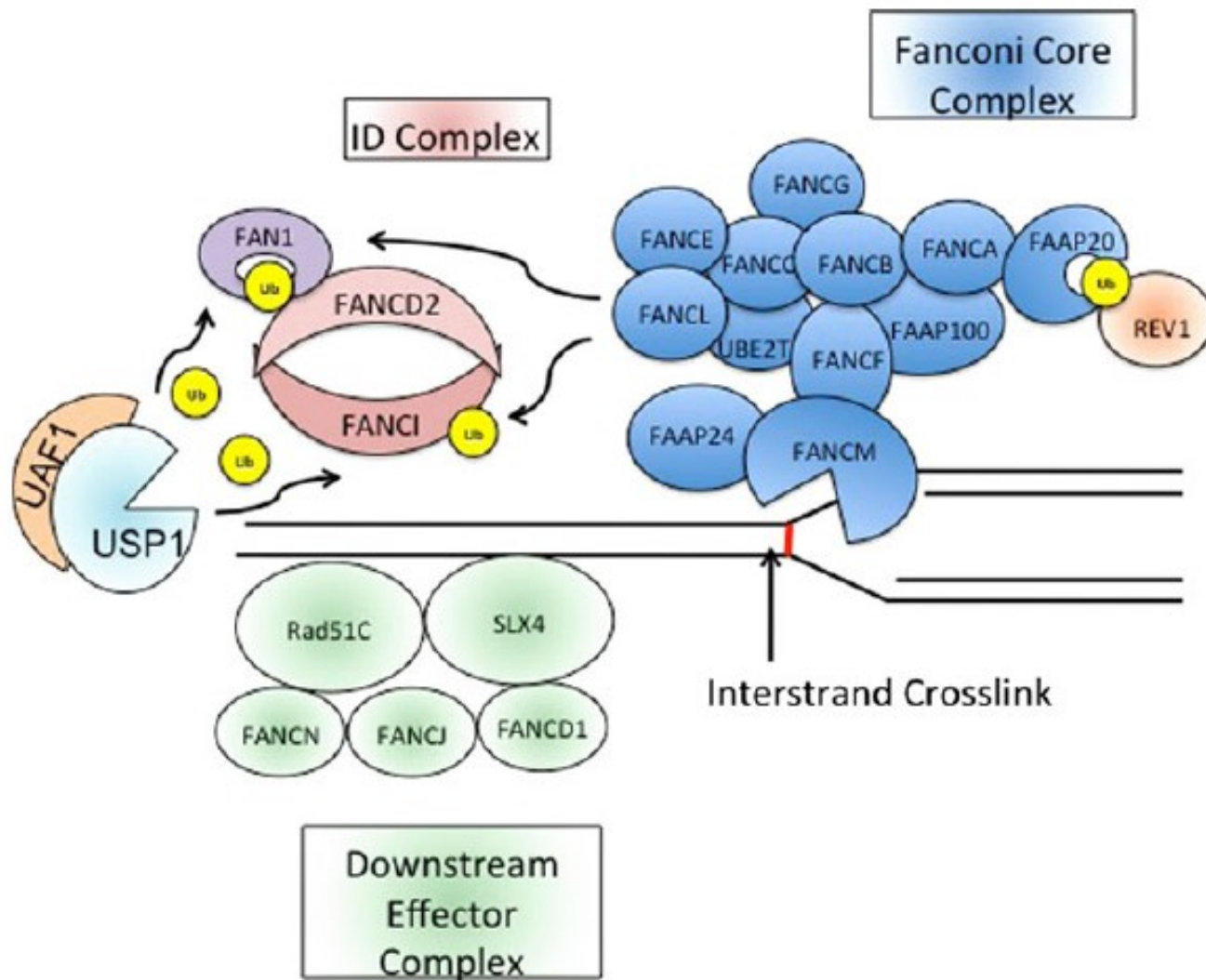


Sergeant et al., MCB, 2005

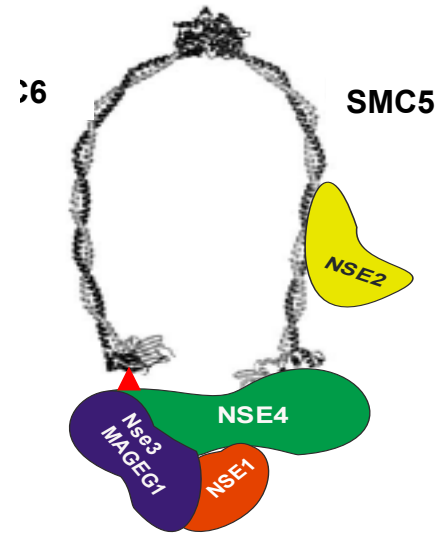


Fanconi anemia „komplementační skupiny“ – geny/proteiny jejichž mutace způsobují FA syndrom – ukázalo se, že většina z nich tvoří jádro FANC komplexu

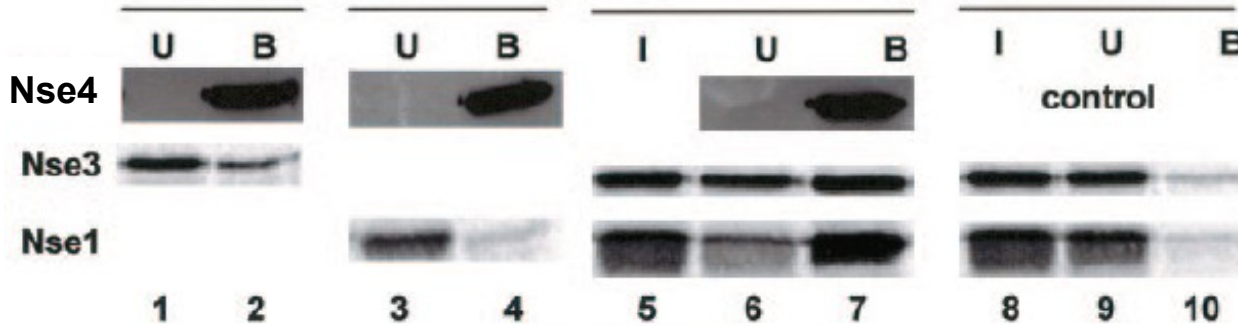
Fig. 1 The Fanconi anemia repair pathway. The FA core complex consisting of FANCA, B, C, D, E, F, G, L and M + accessory components FAAP20, FAAP24 and FAAP100 recognize ICL lesions through FANCM. Recognition of the ICL triggers the core complex to monoubiquitinate the ID complex (FANCI + FANCD2). Once the ID complex becomes monoubiquitinated FANCI binds to the ID complex which localizes with the downstream effector proteins FANCN, FANCI, RAD51C, FANCD1 and SLX4. USP1/UAF1 deubiquitinate the ID complex upon completion of ICL repair



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

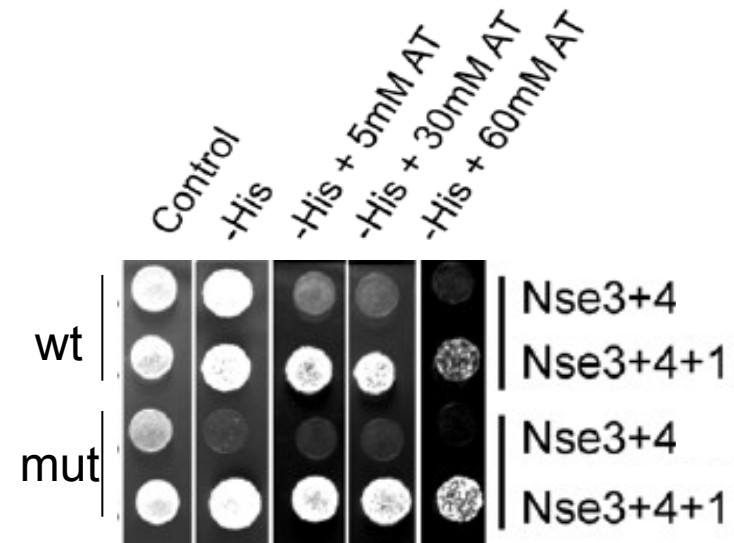


Pull-down



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

kvasinkový 2 a 3-hybridní systém



Podjednotky komplexů koexprimovány (ko-translace)

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

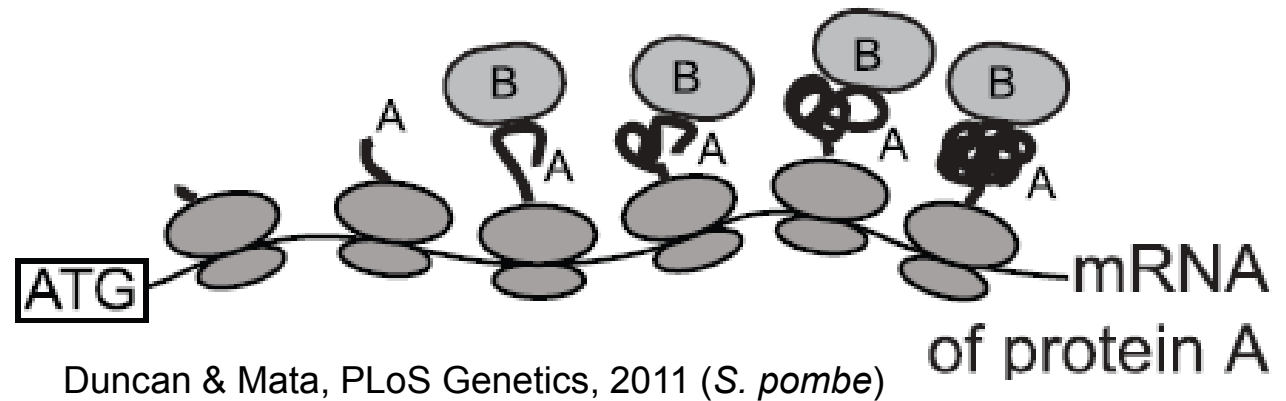
Bait	Bait function/protein complex	Enriched mRNAs	Function of proteins encoded by interacting mRNAs
Tea2p	Kinesin motor protein [32]	<i>tip1</i>	CLIP170 family, binds to Tea2p [9]
Cdc2p	cyclin-dependent protein kinase [33]	<i>rum1</i> <i>cdc18</i>	CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor [12] DNA replication 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)

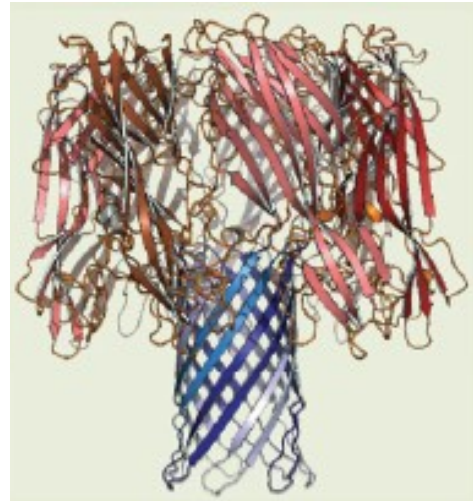
3. Cotranslational Assembly



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

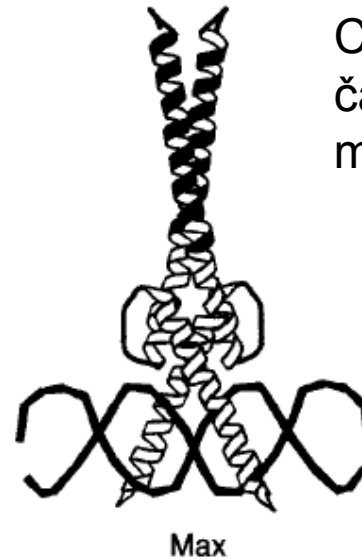
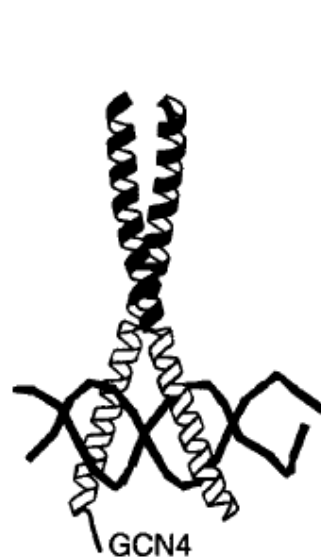
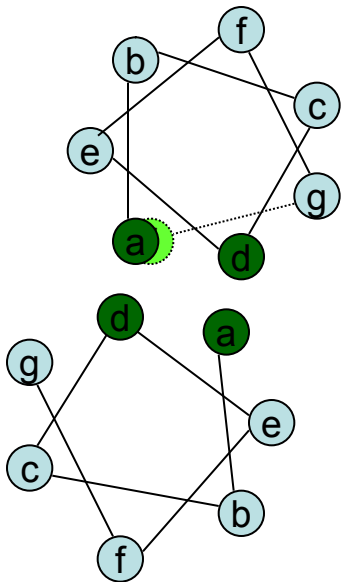
Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím protein-proteinových interakcí

- Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> quarterní tj. komplexy (stejně typy **nekovalentních** vazeb, kritérium minimální energie) (šroubovice a listy se k sobě skládají podobným způsobem)
- iontové, vodíkové, hydrofobní síly (kovalentní vazby - disulfidické můstky především u extracelulárních proteinů)
- **vodíkové můstky** především u β -listů

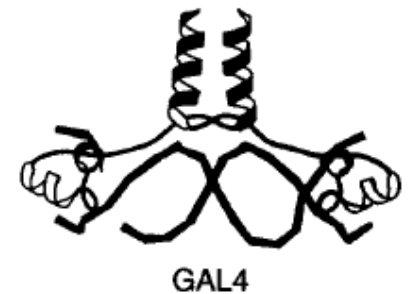


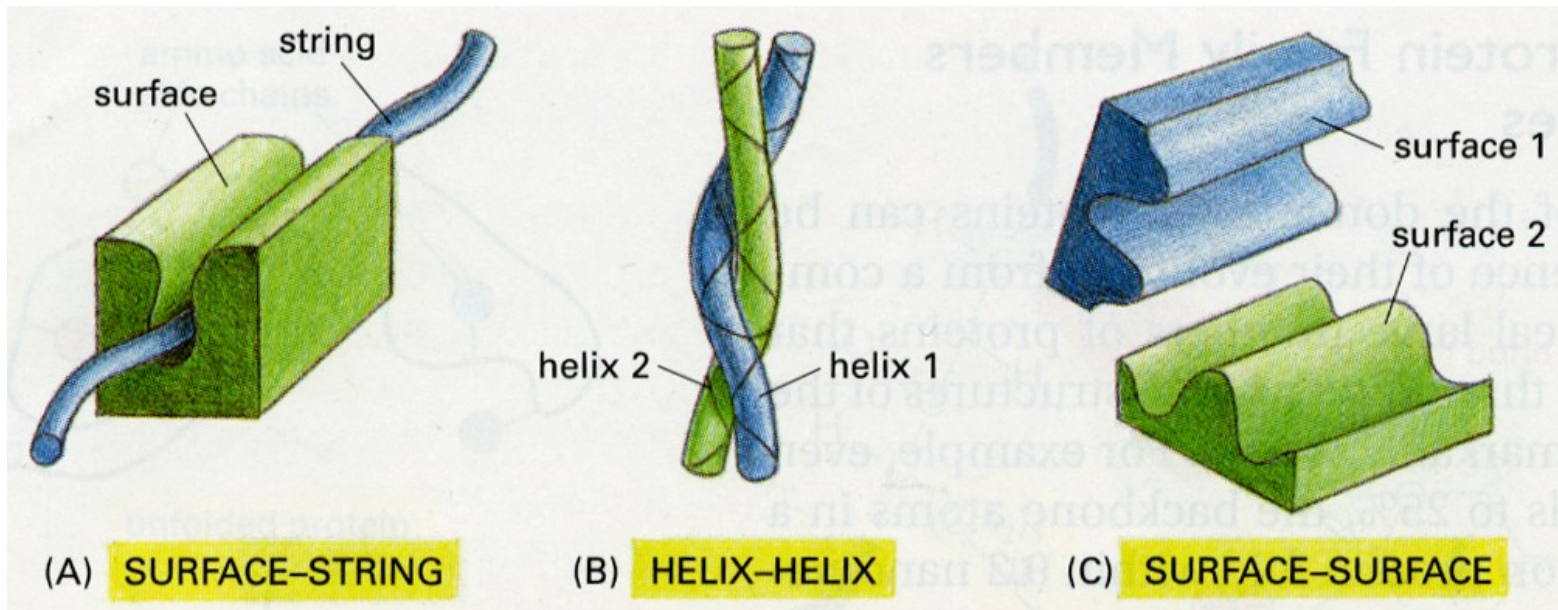
Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím hydrofobních protein-proteinových interakcí

- **hydrofobní zbytky** jsou tlačeny dovnitř proteinu (nikoli do solventu) nebo interakce (nejčastější způsob vazby)
 - součet hydrofobních sil je značný (převažuje u většiny interakcí)
 - hydrofobní povrchy se podílí na vytváření coiled-coil vláken



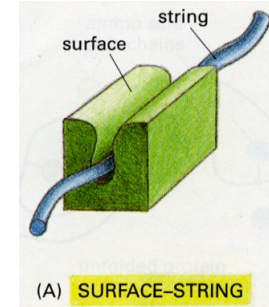
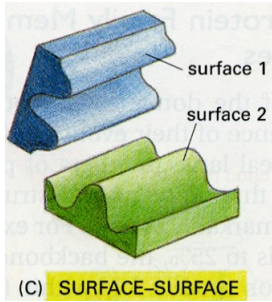
Coiled-coil doména je častým **dimerizačním** modulem proteinů



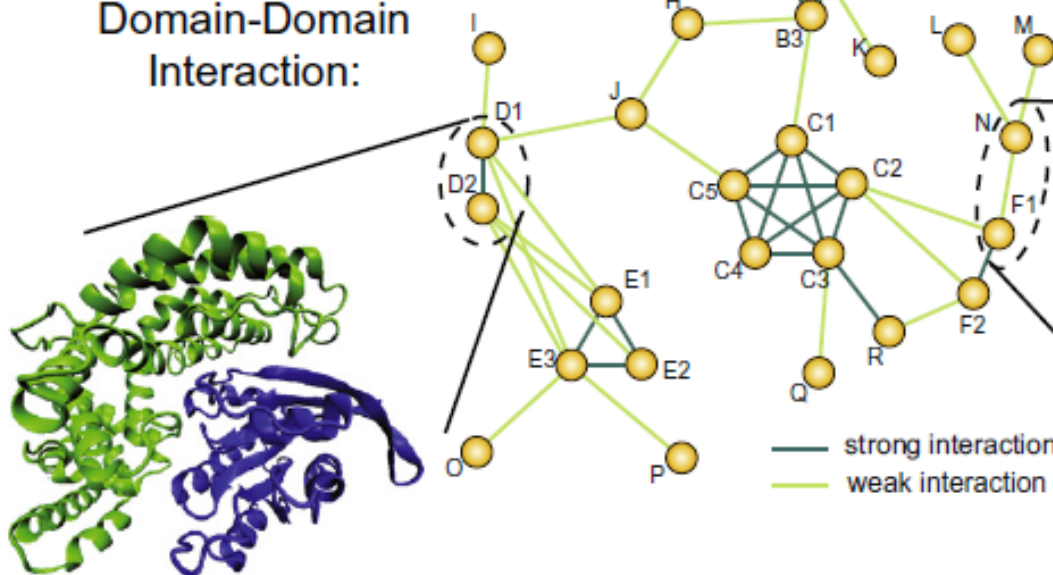


- Ostatní domény/moduly lze definovat pouze obecně: proteiny musí mít **komplementární tvar i charakter**
- Variabilita je velká – nelze je jednoduše definovat - obtížná **predikce** (založená na struktuře „vyřešených“ komplexů, v 2010 pouze 300 struktur s partnery z celkem desítek tisíc PDB dat)

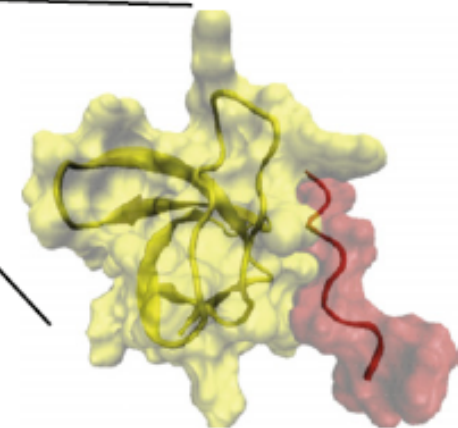
Dva příklady „vyřešených“ komplexů



Domain-Domain Interaction:



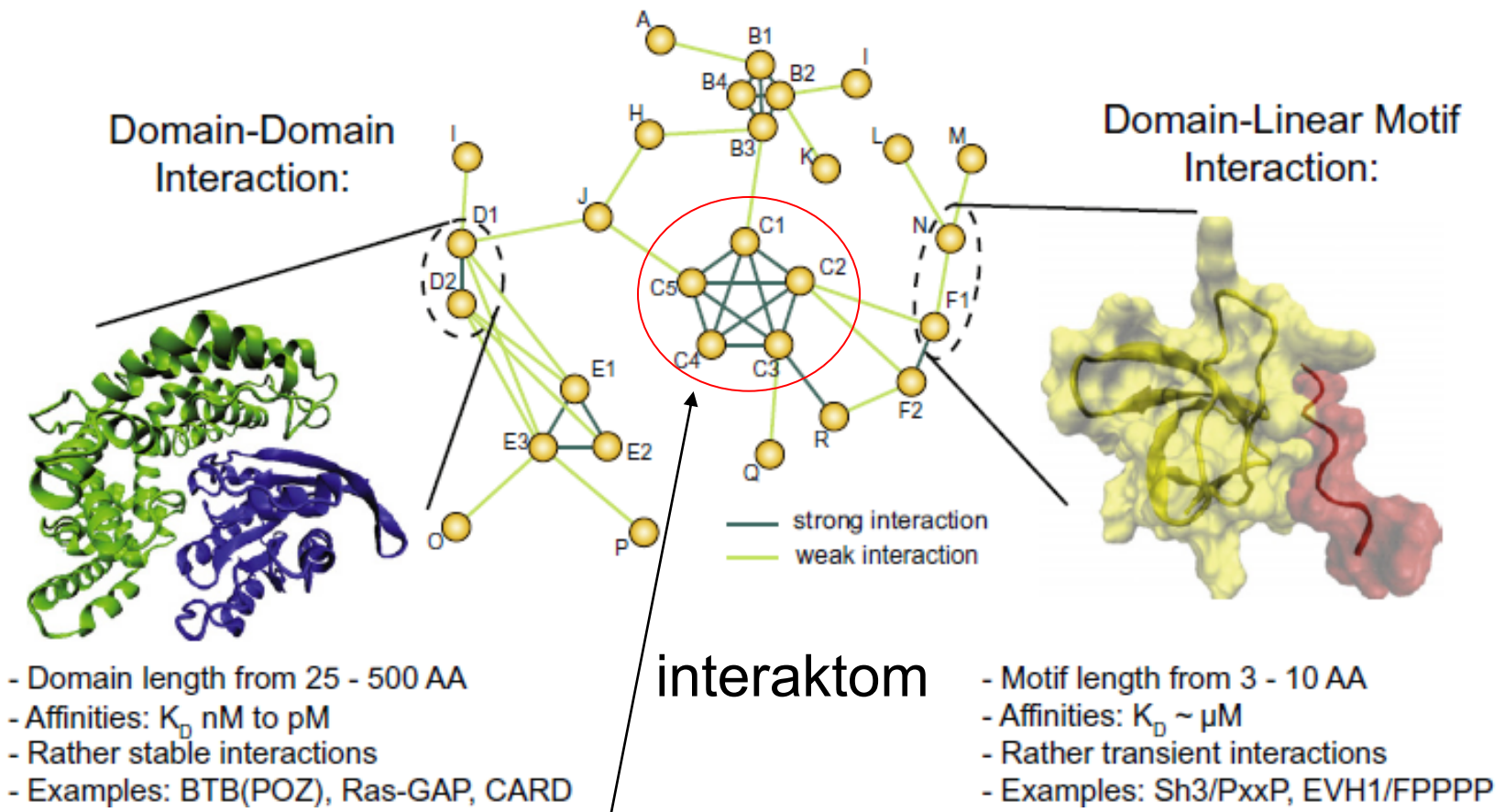
Domain-Linear Motif Interaction:



- 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

- Interakční plocha/oblast $1150-10000\text{\AA}^2$ (vs pro ligandy $100-600\text{\AA}^2$)



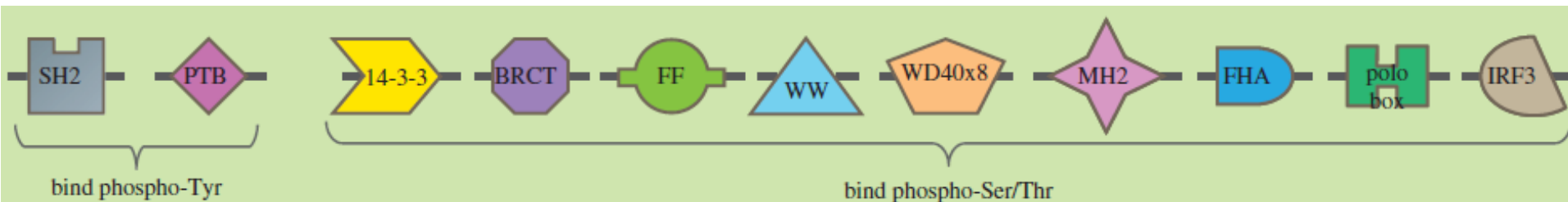
interaktom

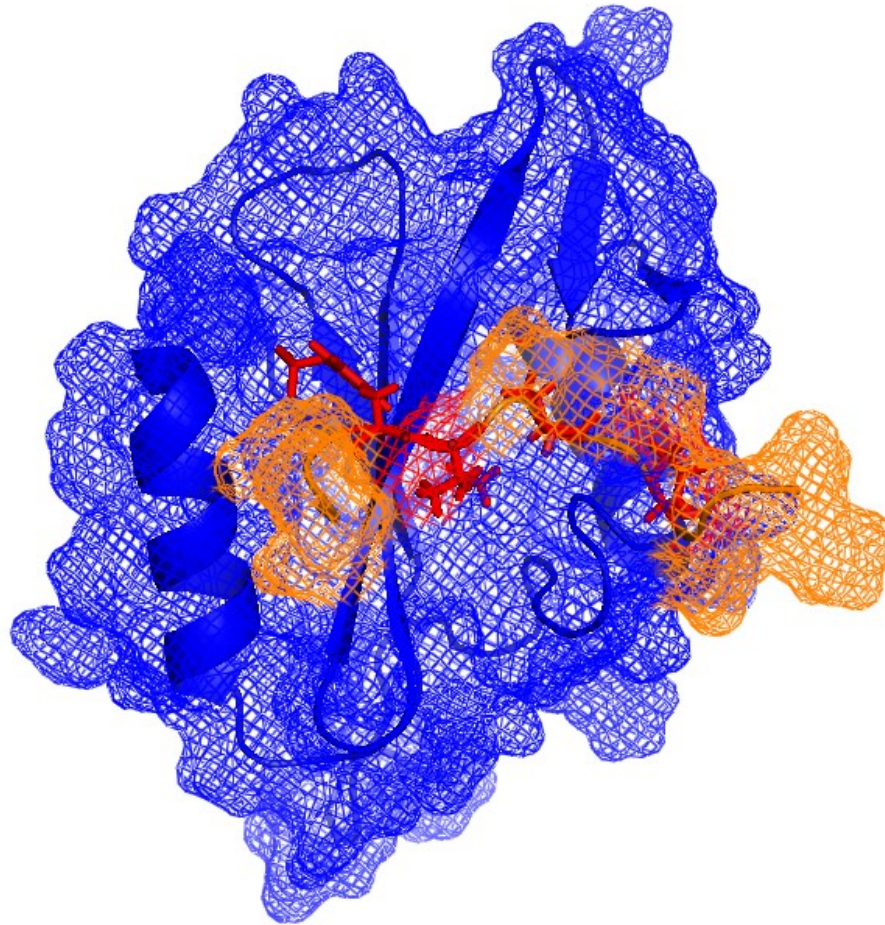
- z analýzy protein-proteinových interakcí lze usuzovat na potenciální **stabilní komplexy** vs **přechodné interakce**
 - variabilita interakčních povrchů je velká => variabilita PPI (nelze je jednoduše definovat)

*S jakými partnery a jak silně interagují vaše proteiny?
 Jaké domény obsahují?*

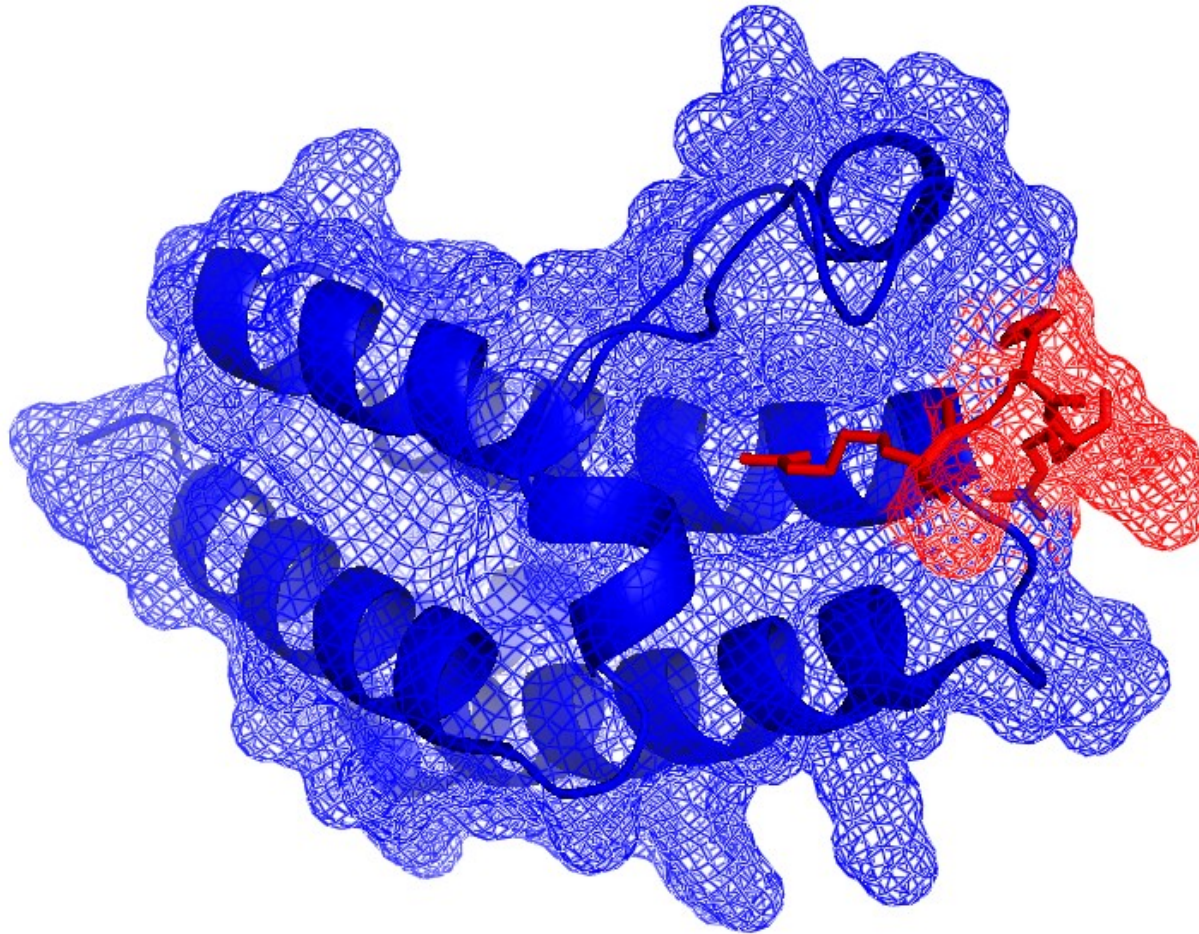
Post-translační modifikace značně mění povrch (tvar, náboj) – vytváří specifický nový povrch – mohou interagovat specifické vazebné domény - např. SH2 domény váží fosfopeptidy – dvě vazebná místa (fosfoTyr a peptid – peptid určuje vazebnou specificitu)

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 β
ubiquitinace	lysin	UIM, UBA, CUE
SUMOylace	lysin	SIM





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



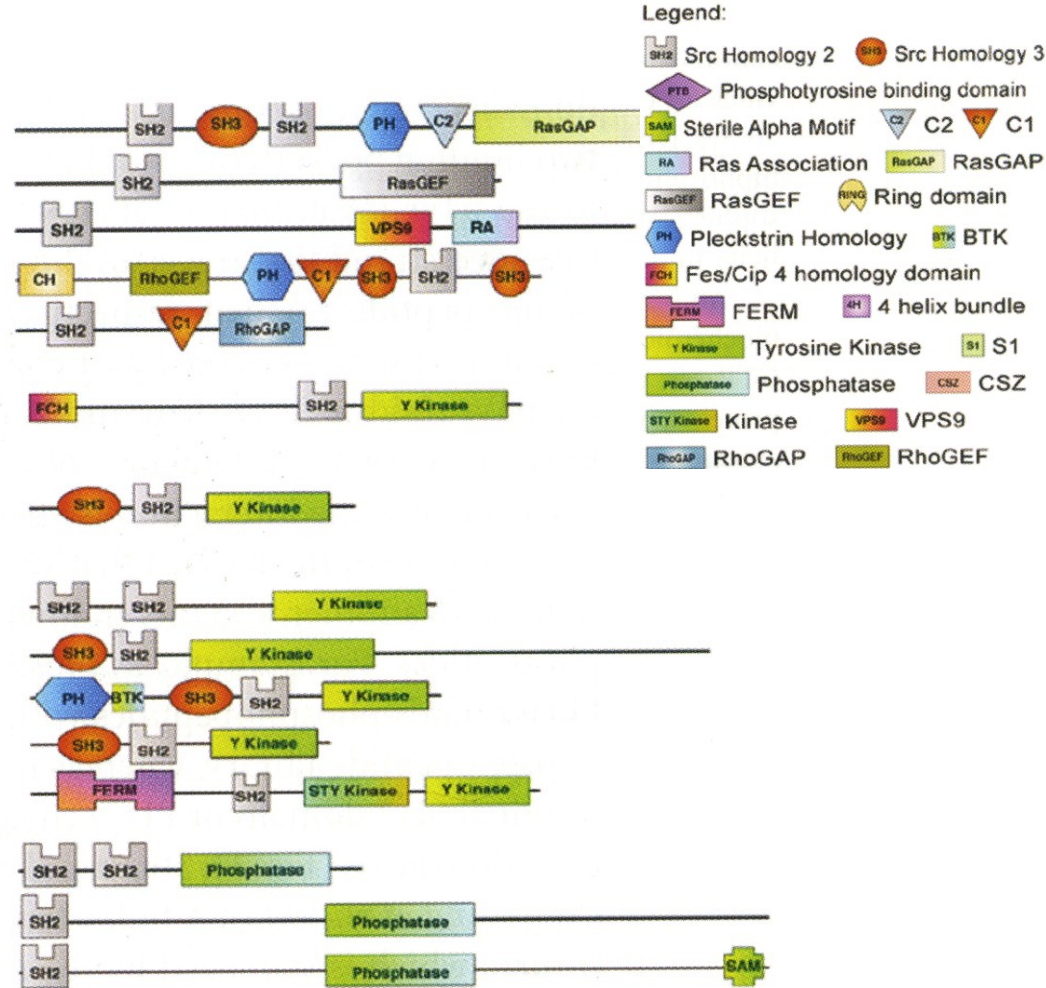
Modifikace histonů ovlivňují složení a přístupnost chromatinu – bromodoména GCN5 (HAT) navázaná na acetylovaný H4 lysin – PDB: 1E6I

Bottomley, EMBO Rep., 2004

SH2 (a jiné) domény jsou často jako moduly součástí proteinů rozmanitých funkcí – provazují proteiny mezi sebou (přechodně, kondicionálně – regulace buněčných procesů)

Small GTPase Signaling

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



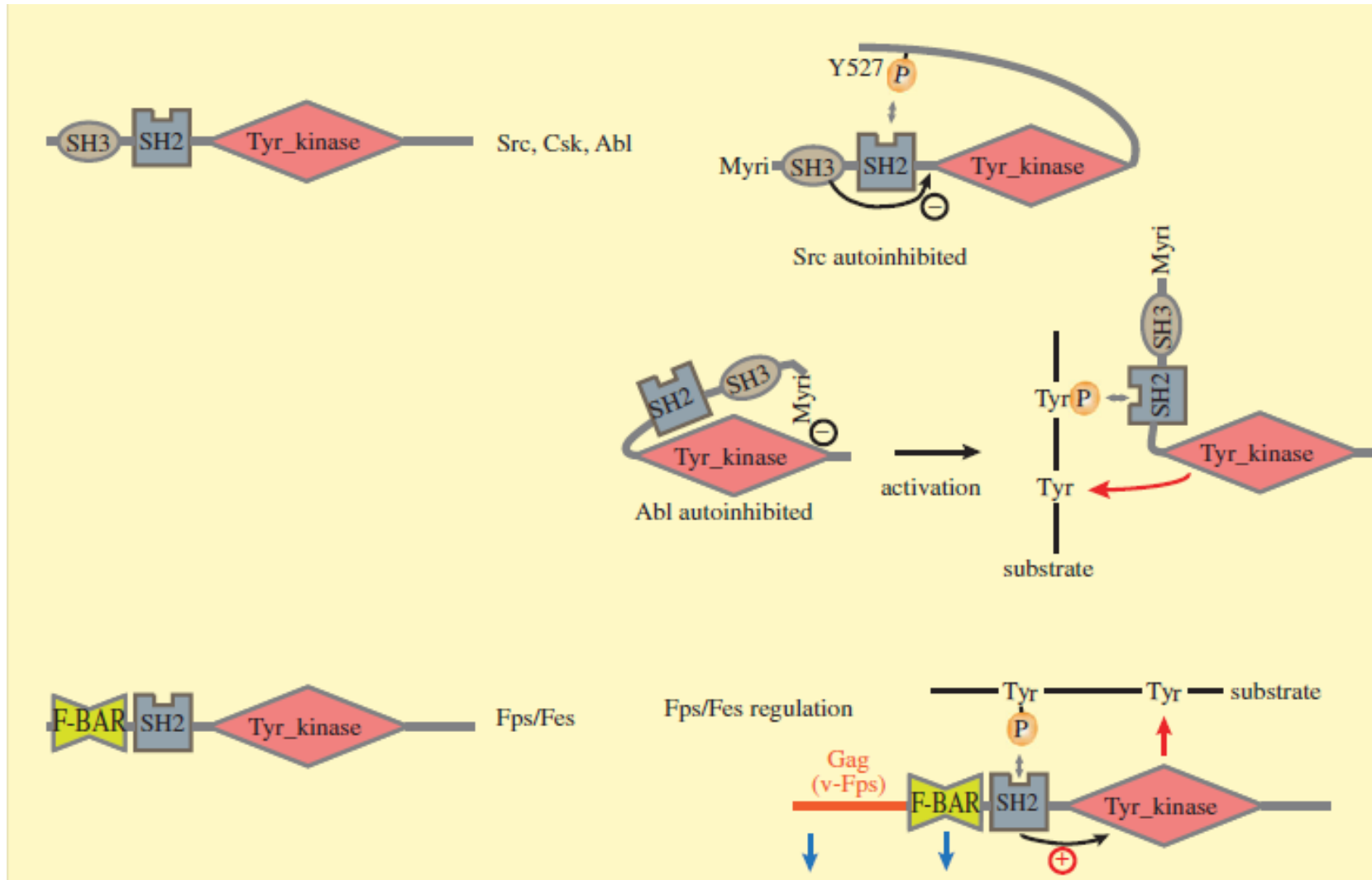
Kinases

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

SH2 (a jiné) domény jsou často jako moduly součástí proteinů rozmanitých funkcí – provazují inter- a intramolekulárně

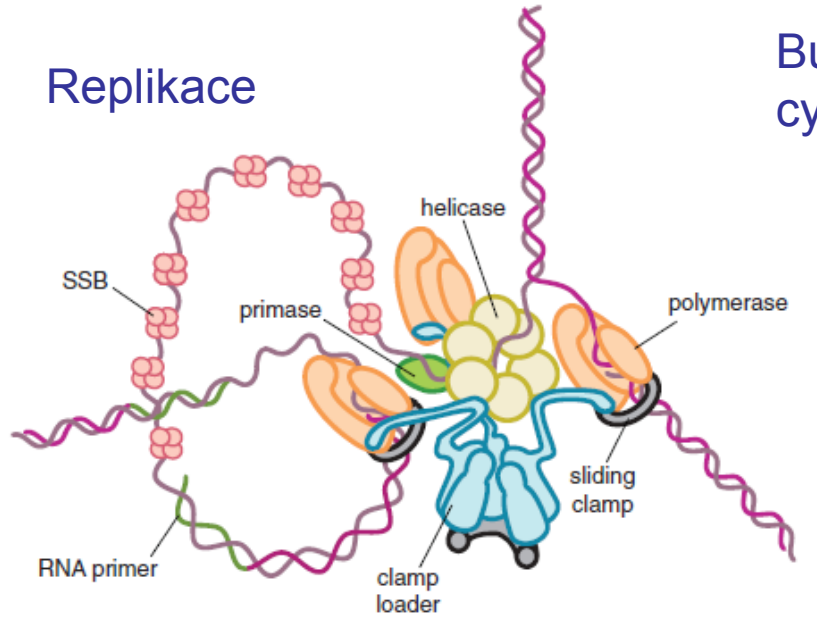


Jin a Pawson, PTRS, 2012

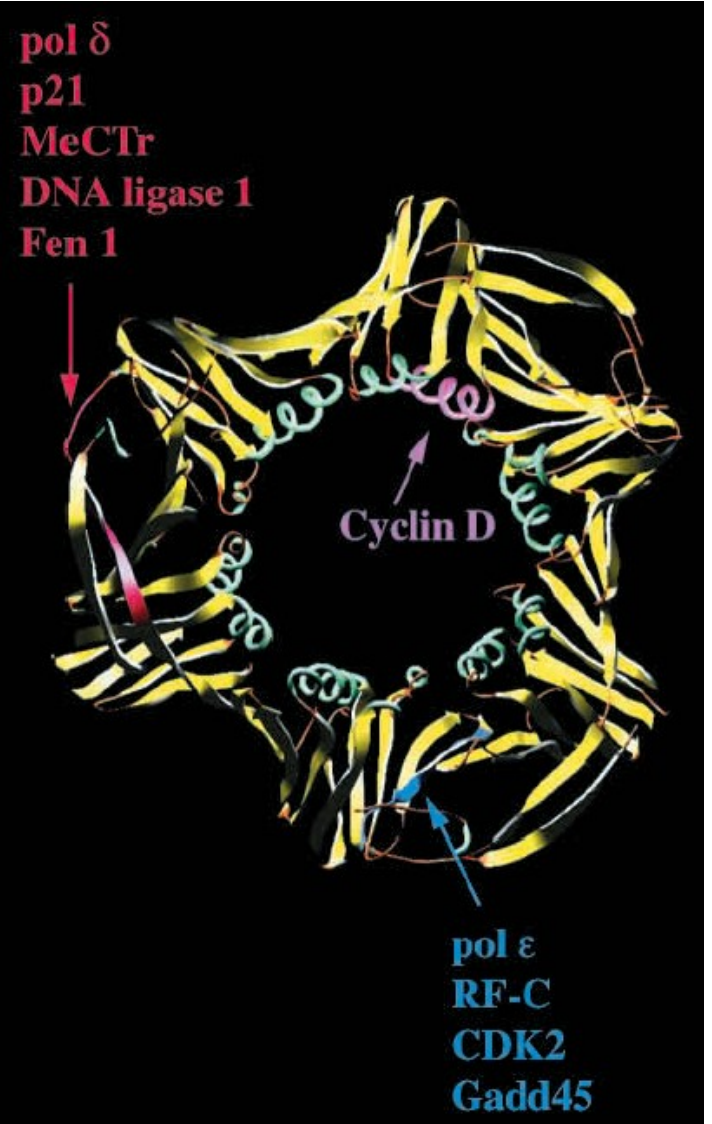
- kináza se váže na částečně fosforylovaný substrát a dále ho fosforyluje (MAPKKK signální dráhy)

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

Replikace

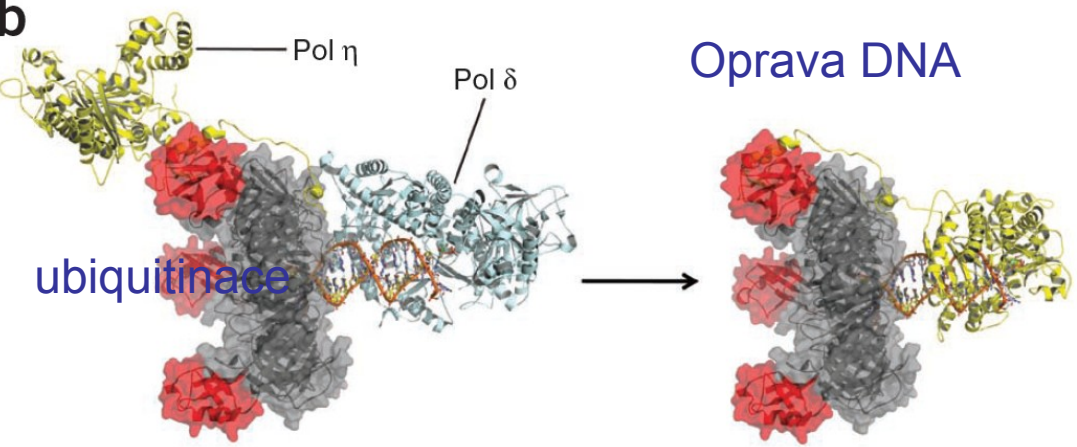


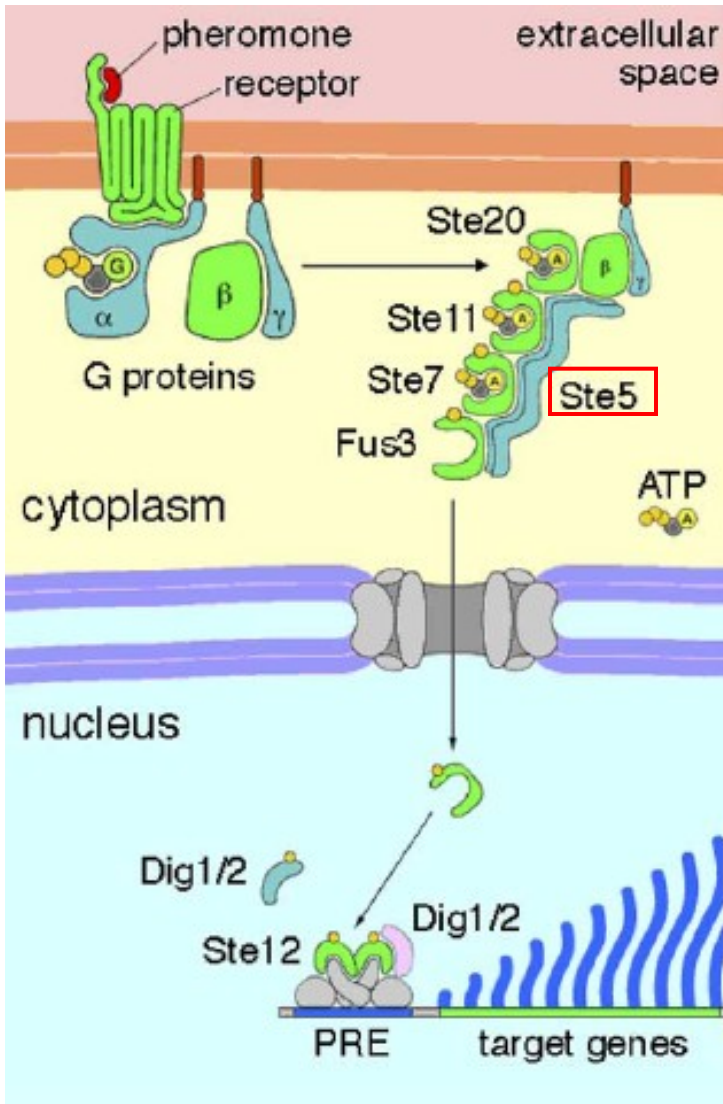
Buněčný cyklus →



b

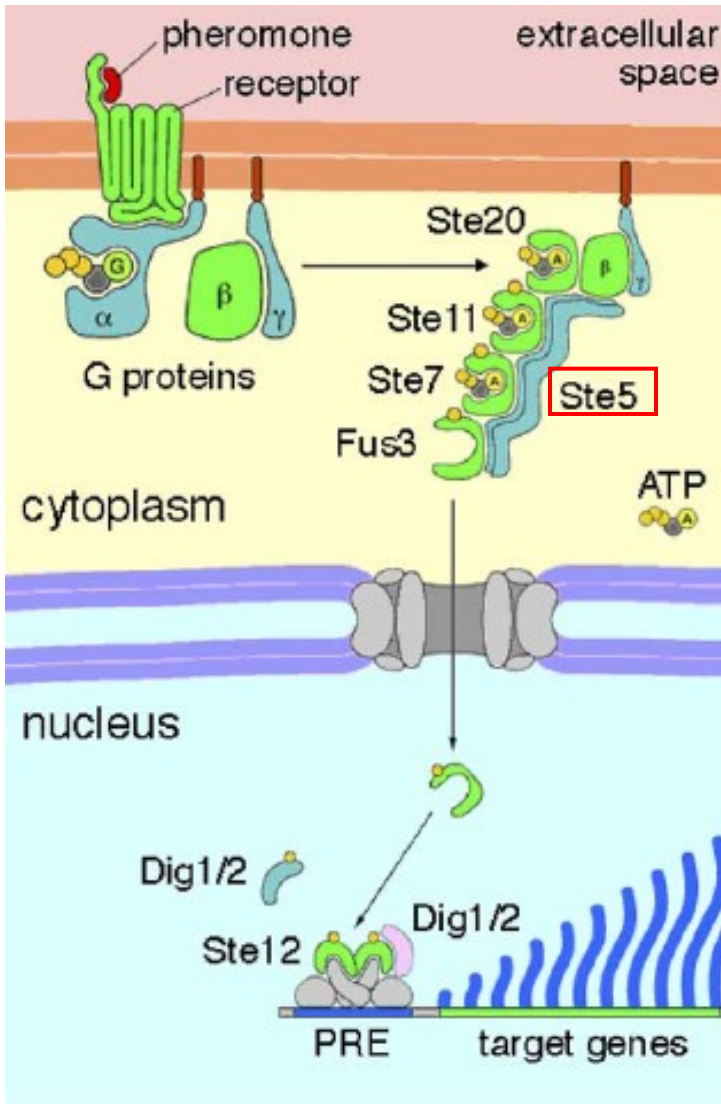
Oprava DNA





Protein-proteinové interakce modulují velmi často GDP-GTP konverze – konformační změna (doc. Marek) – „přenáší“ signál

Mnoho proteinů obsahuje pouze interakční domény a mají jediný úkol: nukleace multiproteinových komplexů – **scaffold** (lešení, STE5)



Přeskládáním modulů lze vytvářet komplexní biologické systémy

- záměna některé kinázy přesměruje signál do jiného cíle
- v průběhu evoluce některé moduly fúzovaly
- některé viry využívají buněčné moduly k invazi do buněk (přesměrování ve prospěch viru)
- některé onkogeny jsou výsledkem fúze modulů

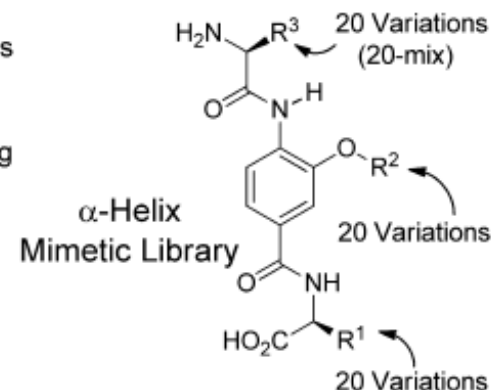
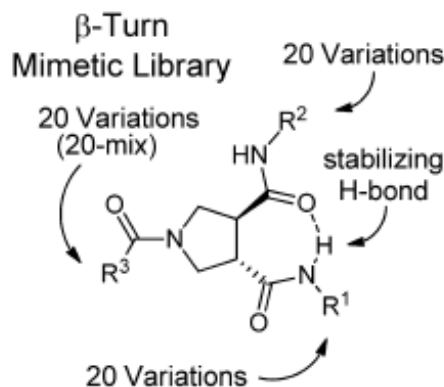
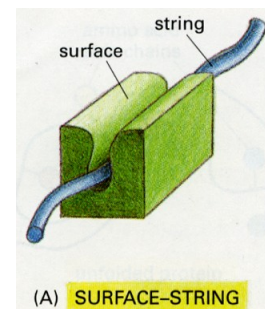
Inhibice PPI

Problémy inhibice (vývoje léků) ...

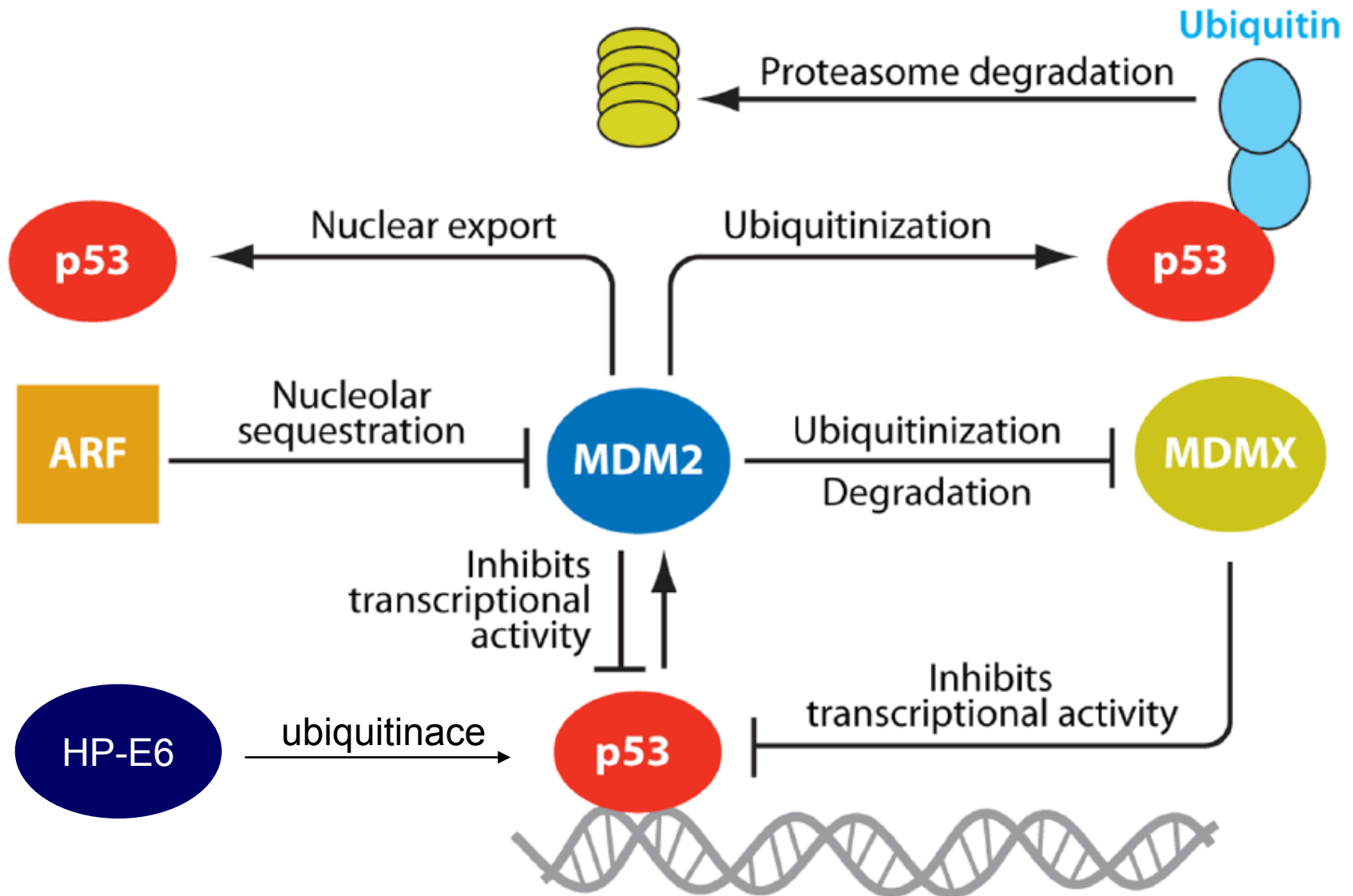
- interakční plocha 1150-10000Å² (větší než kapsy enzymů pro malé ligandy)
- ploché bez hlubokých kapes (jako pro ligandy)
- hydrofobní charakter PPI (nerozpustnost léku)
- nelze vycházet z přirozených ligandů (jako u enzymů)

... ale

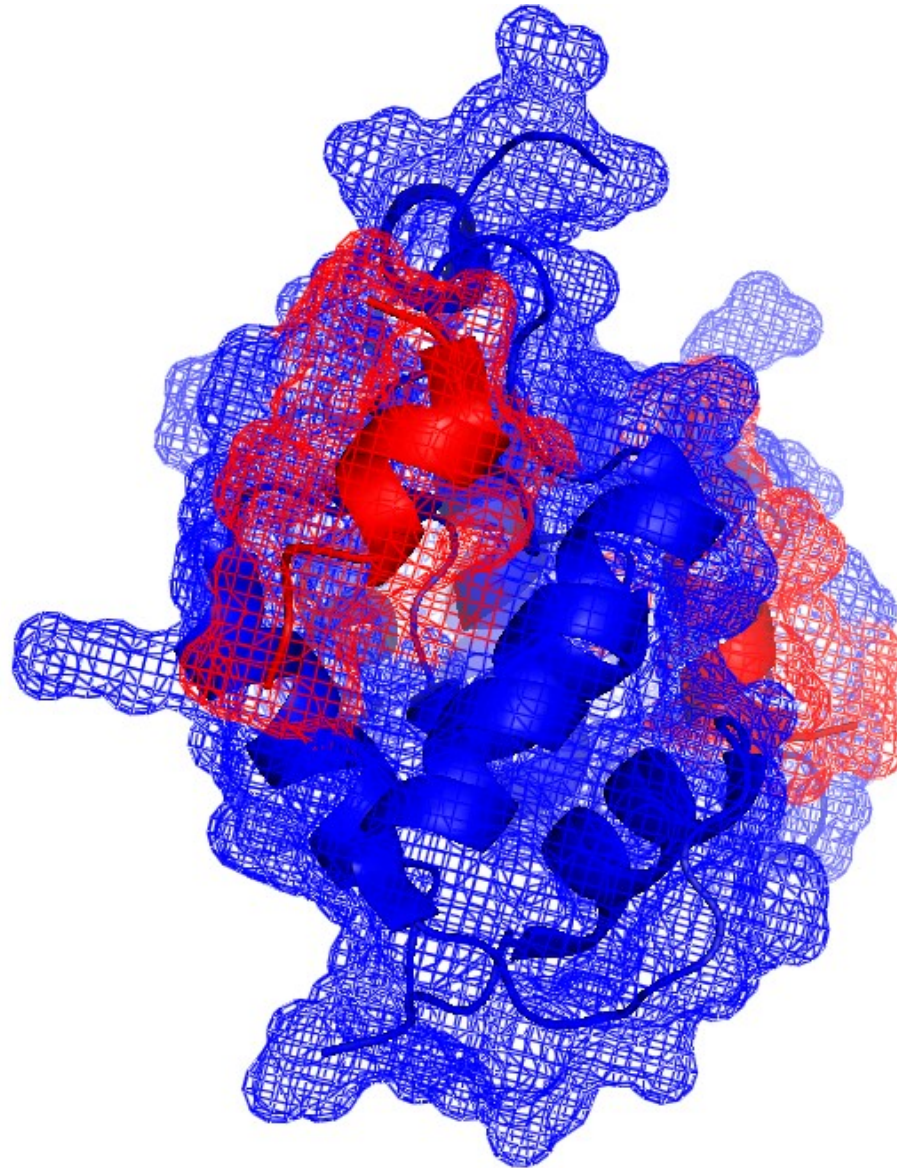
- interakce „peptid ve žlábkku“ jsou relativně malé
- lze inhibovat interakci i relativně malou molekulou (hot-spot)
- vhodné je cílení na interakce regulované post-translační modifikací (viz fosfopeptidy)
- mimikování peptidů



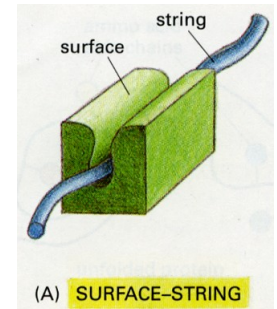
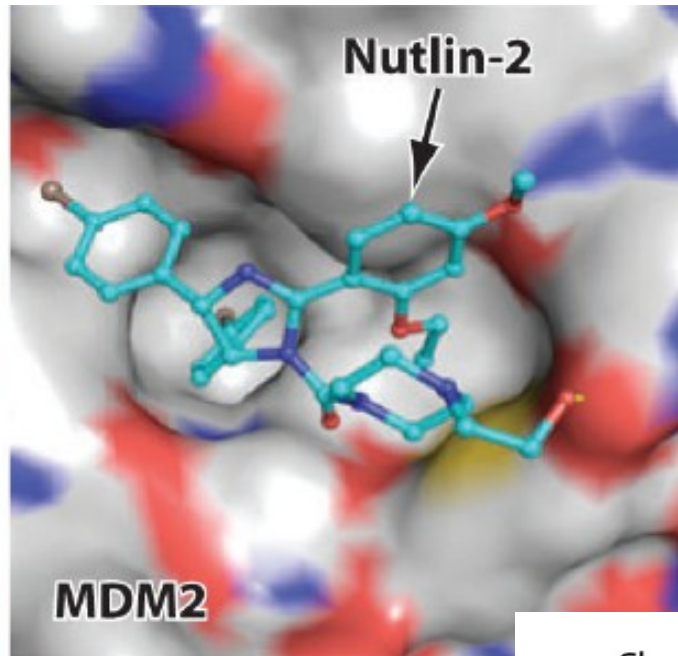
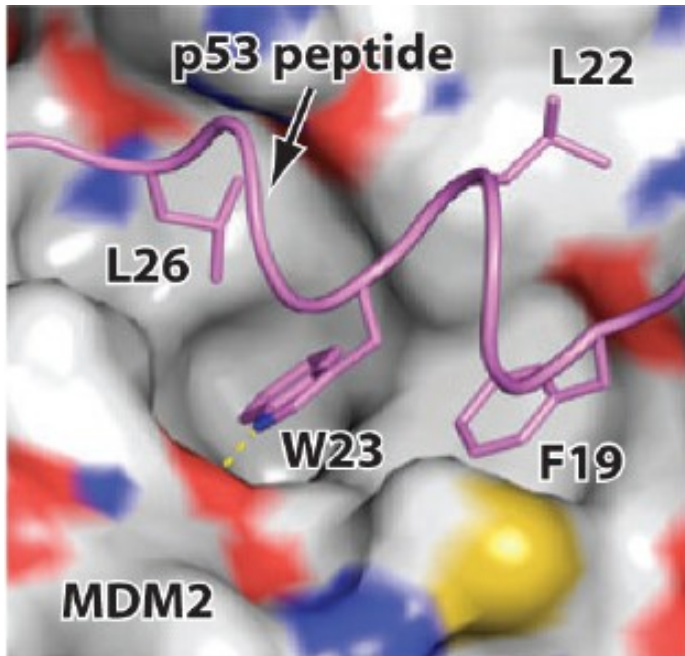
Inhibice PPI: p53-MDM2



p53-MDM2 (4HFZ)

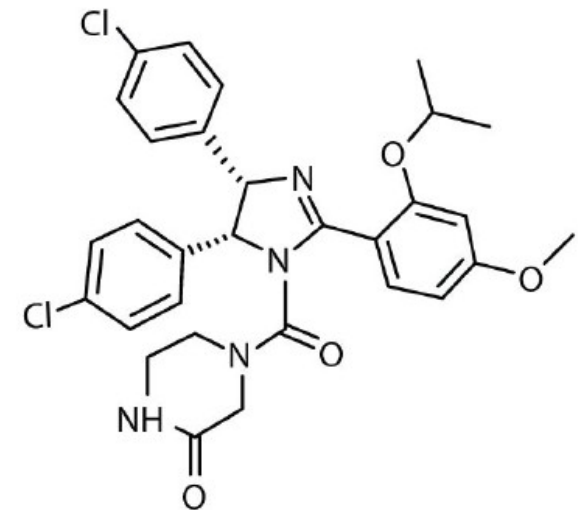


Inhibice PPI: p53-MDM2



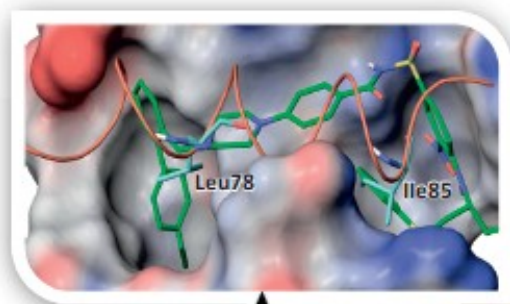
jeden z prvních

- Inhibice interakce MDM2 stabilizuje p53 –
podpora nádorové suprese

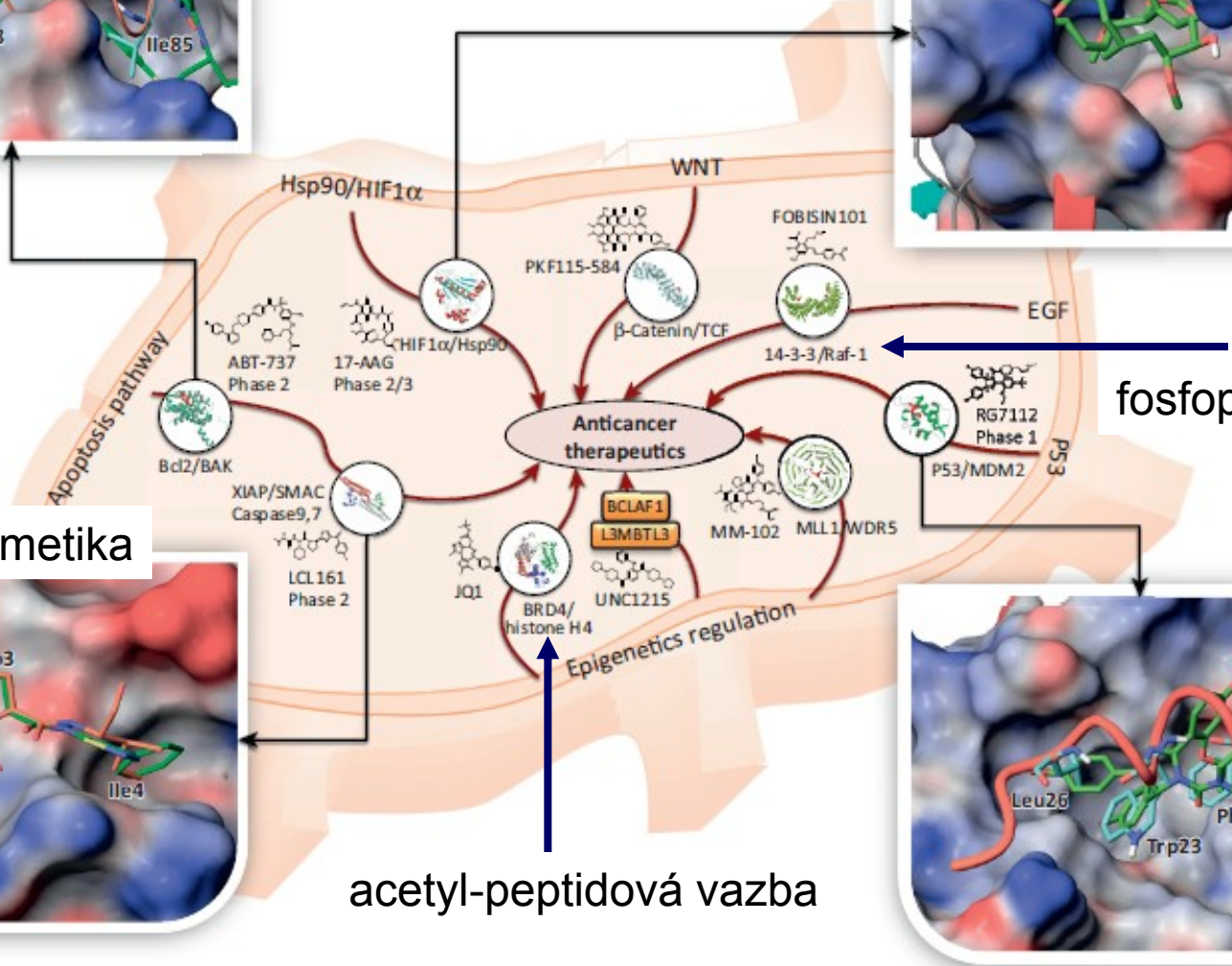
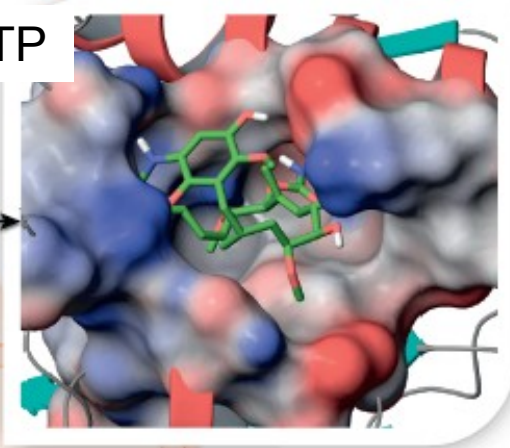


Nutlin-3a

peptidomimetika

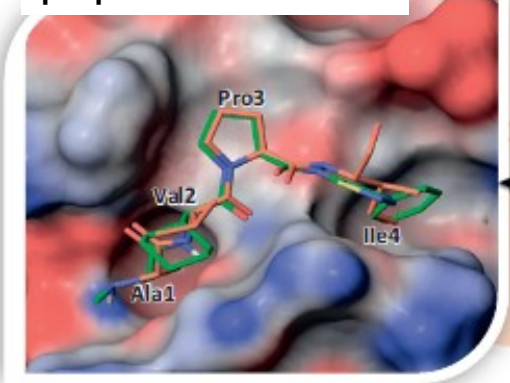


kapsa pro ATP

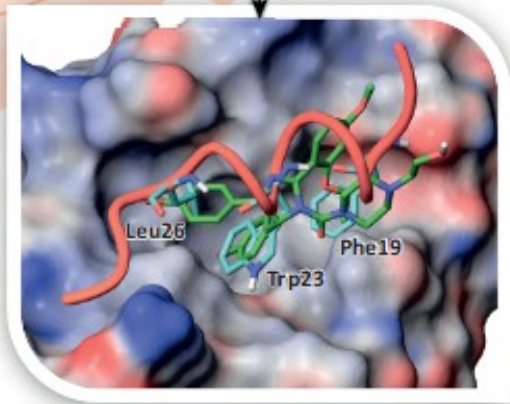


fosfopeptidová vazba

peptidomimetika



acetyl-peptidová vazba



nová peptidomimetika

větší komplexy jsou stabilizovány více interakcemi, ale může se rozpadnout i celý

Závěry

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