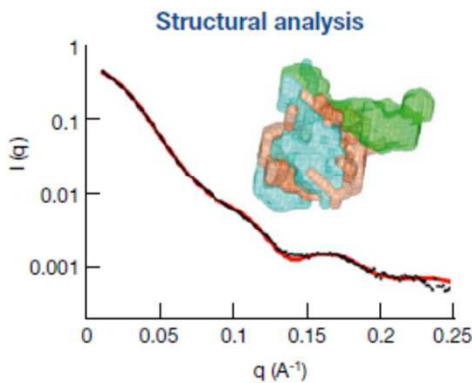
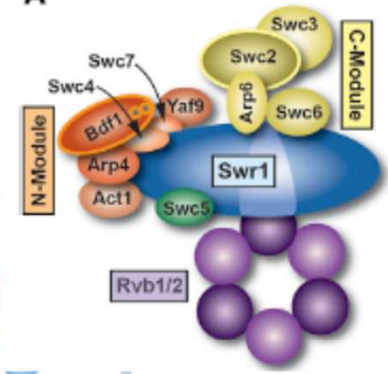


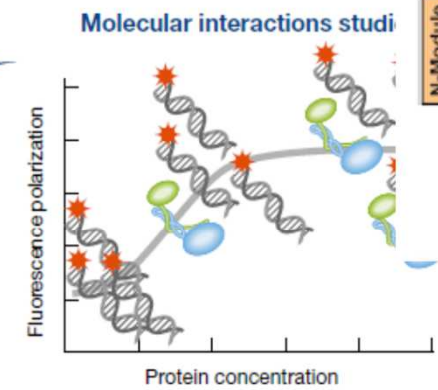
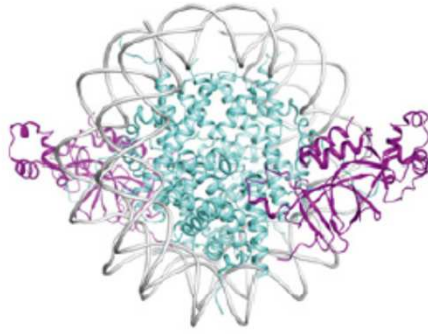
# Minule ... metody analýzy proteinových komplexů ...

A

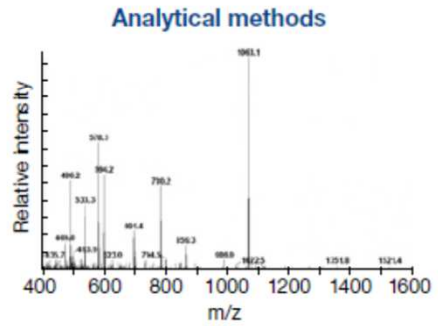


NMR, crystallography, SAXS, electron microscopy

**Nucleosome targeting, complex formation and architecture**

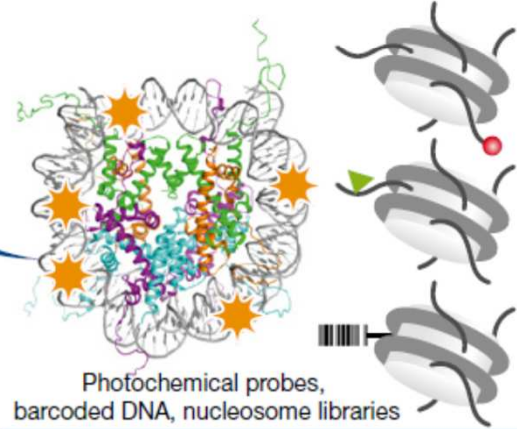


Fluorescence polarization, FRAP, HI-FI, FRET, microscale electrophoresis



Mass spectrometry, pull-down assays, electrophoretic-shift assays, analytical ultracentrifugation

**Chemical probes and libraries**

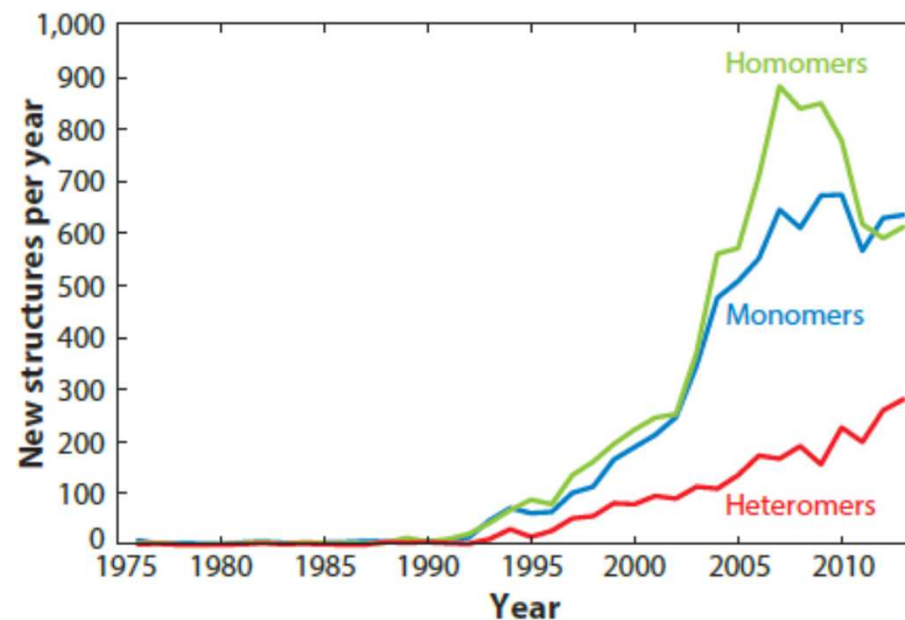


Photochemical probes, barcoded DNA, nucleosome libraries

# Osnova

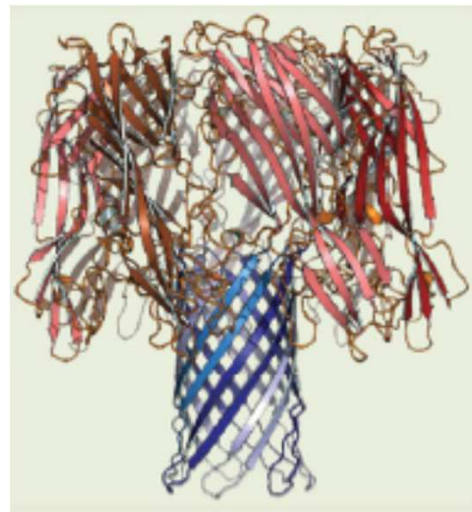
- protein-proteinové interakce (PPI)
  - charakteristika PPI
  - vliv post-translačních modifikací na PPI
  - inhibice PPI ...
- sestavování proteinových komplexů
- typy komplexů (adaptéry, lešení ...)

**a** X-ray crystallography



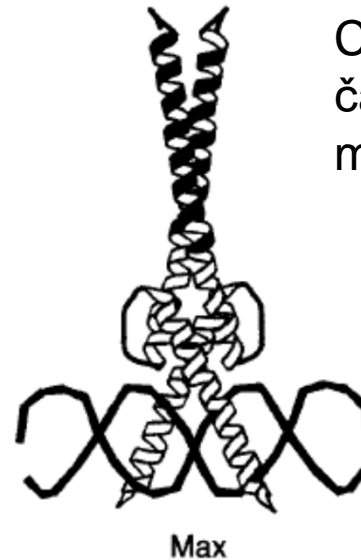
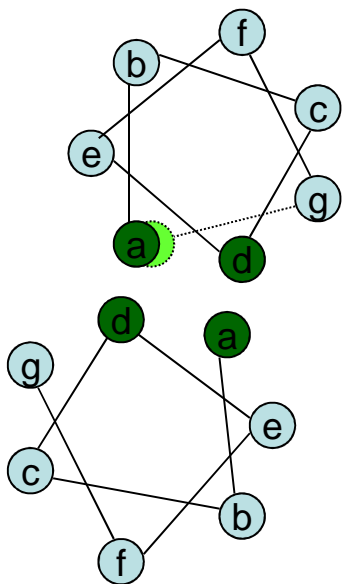
# Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím protein-proteinových interakcí

- Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> kvarterní 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  $\beta$ -listů

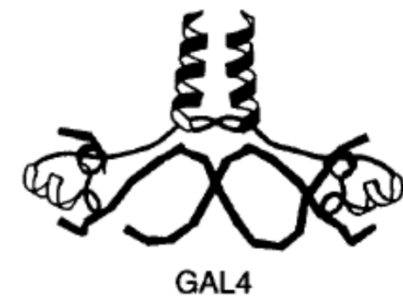


# Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím hydrofobních protein-proteinových interakcí

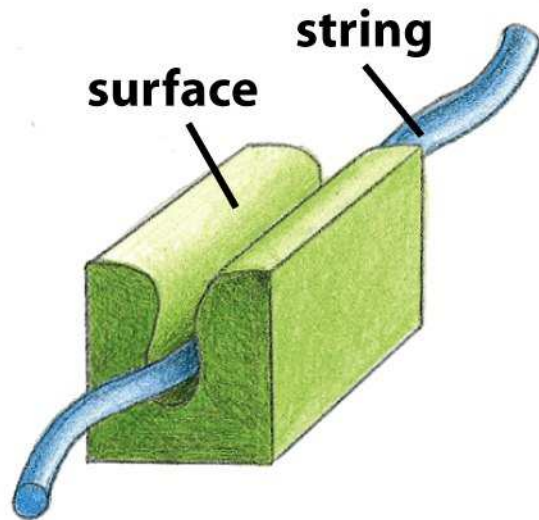
- **hydrofobní zbytky** jsou tlačeny dovnitř proteinu (nikoli do solventu) nebo do interakce (nejčastější způsob vazby)
  - součet hydrofobních sil je značný (převažuje u většiny interakcí)
  - hydrofobní povrchy se podílí na vytváření coiled-coil vláken



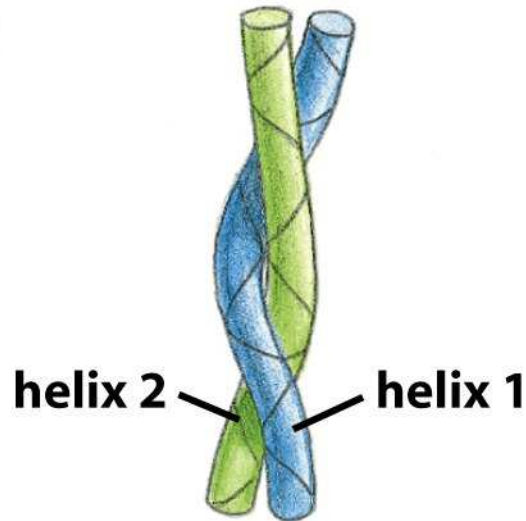
Coiled-coil doména je častým **dimerizačním** modulem proteinů



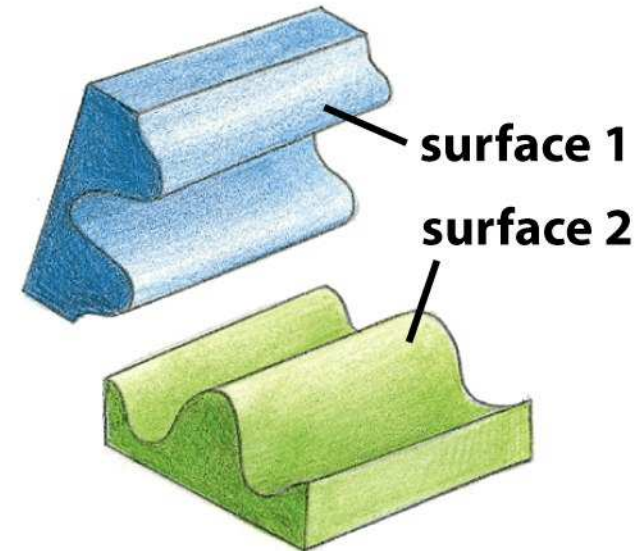
# Typy protein-proteinových interakcí



(A) SURFACE-STRING



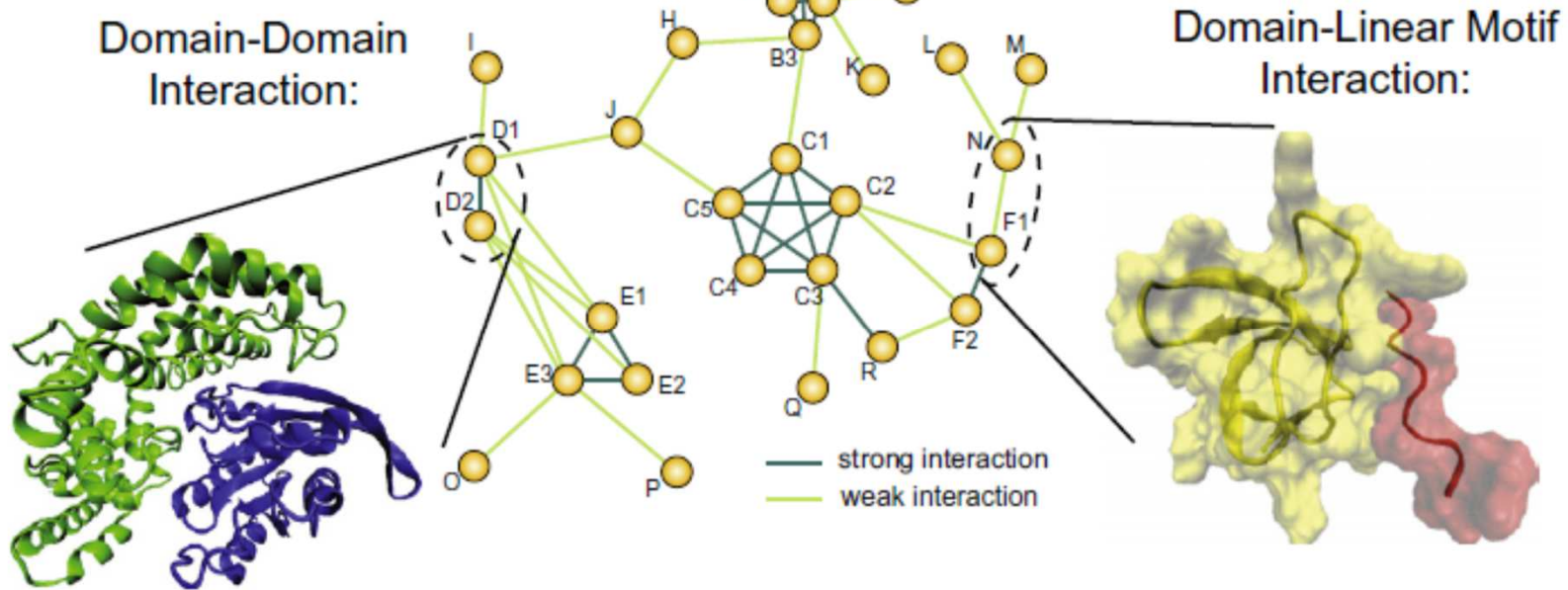
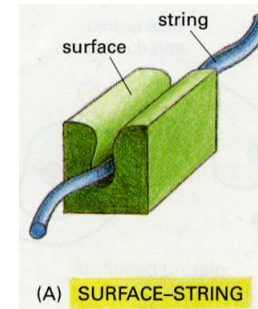
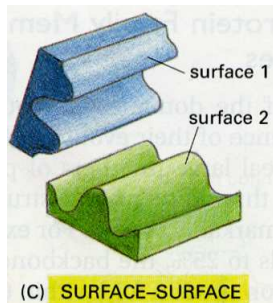
(B) HELIX-HELIX



(C) SURFACE-SURFACE

- Ostatní domény/moduly lze definovat pouze obecně: proteiny musí mít **komplementární tvar i charakter**
- Variabilita je velká – nelze je jednoduše definovat - obtížná **predikce** (modelovat lze komplexy pro něž existují již vyřešené struktury – KBDock, cvičení **CG031**)

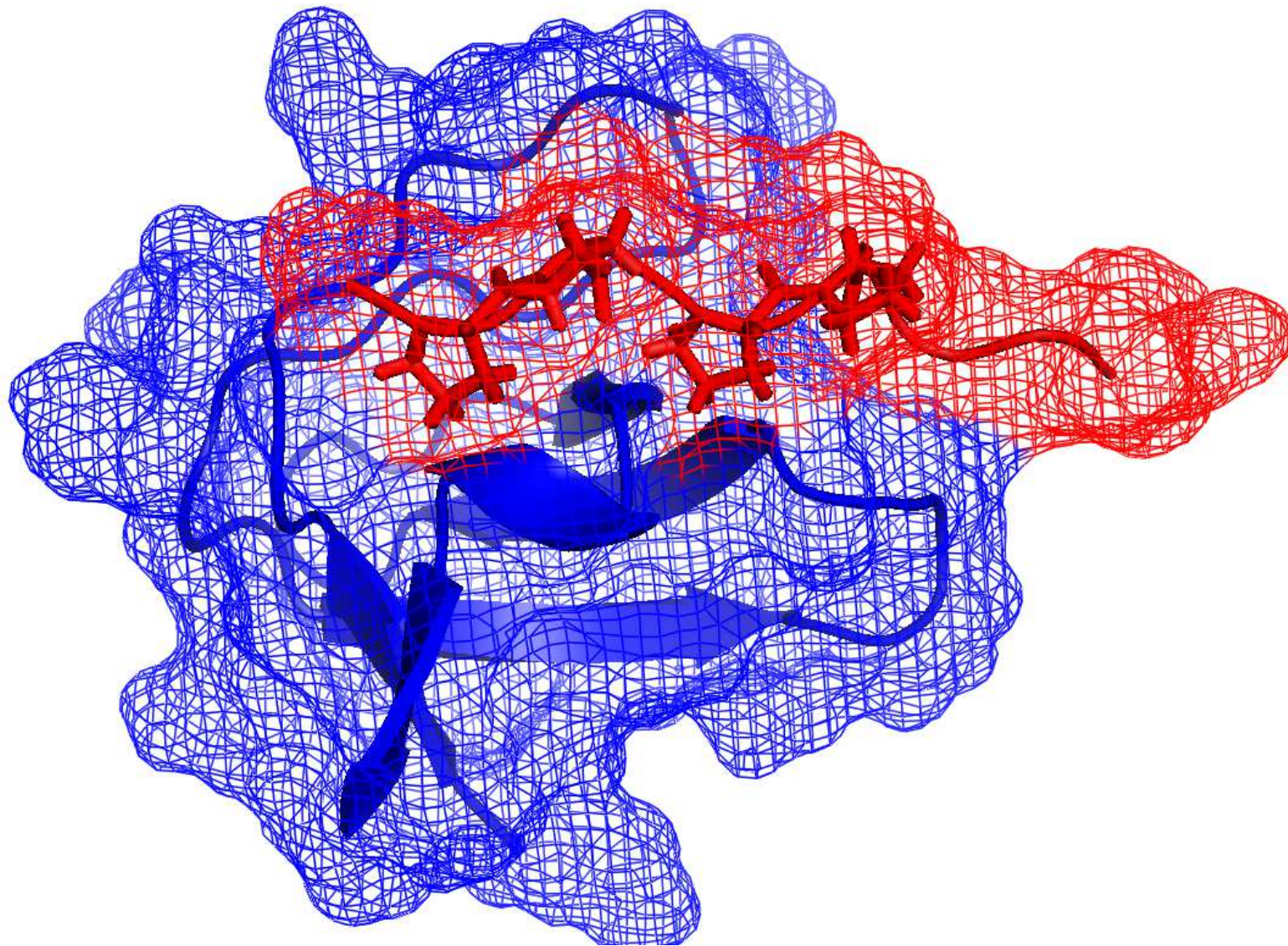
# Dva příklady „vyřešených“ komplexů



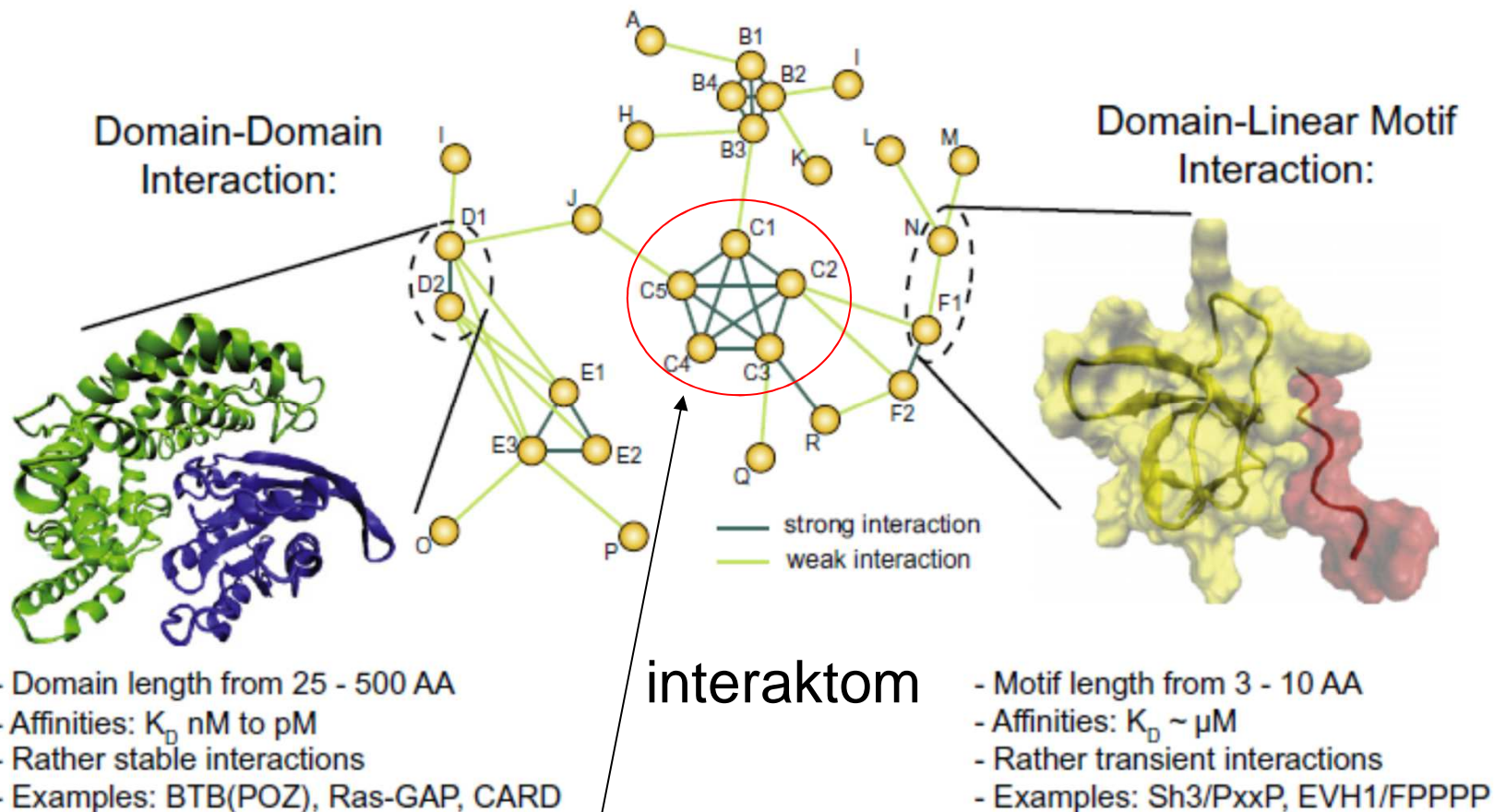
- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities:  $K_D$  nM to pM
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD

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

- Interakční plocha/oblast  $500-10000\text{Å}^2$  (vs pro ligandy  $100-600\text{Å}^2$ )



SH3 domény váží **prolin-rich** peptidy PDB: 4RTV

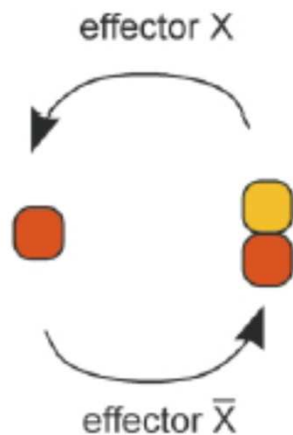


Bader et al, FEBS Lett, 2008

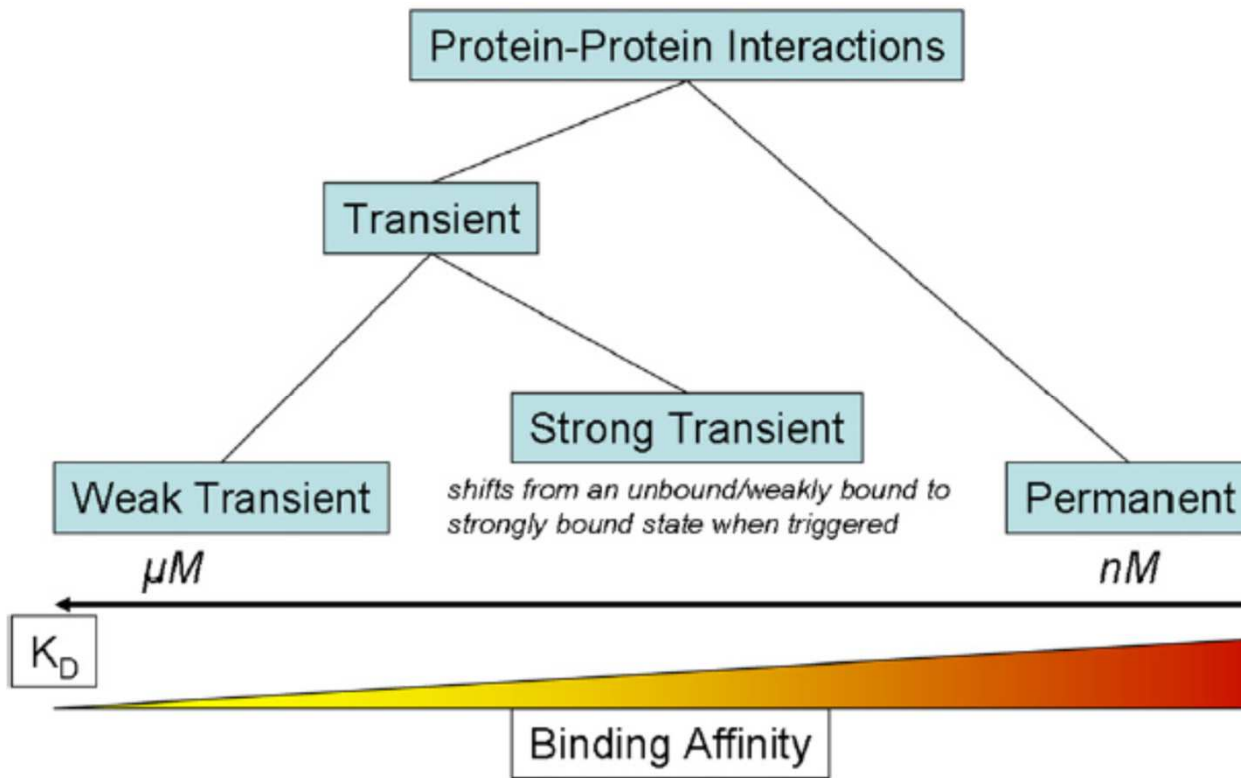
- z analýzy protein-proteinových interakcí lze usuzovat na potenciální **stabilní komplexy** vs **přechodné interakce**
- variabilita interakčních povrchů je velká => variabilita PPI (nelze je jednoduše definovat)

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





faktory ovlivňující vznik vazby?



vazebnou afinitu mohou výrazně ovlivnit PTM nebo vazba ligandu (G-proteiny)

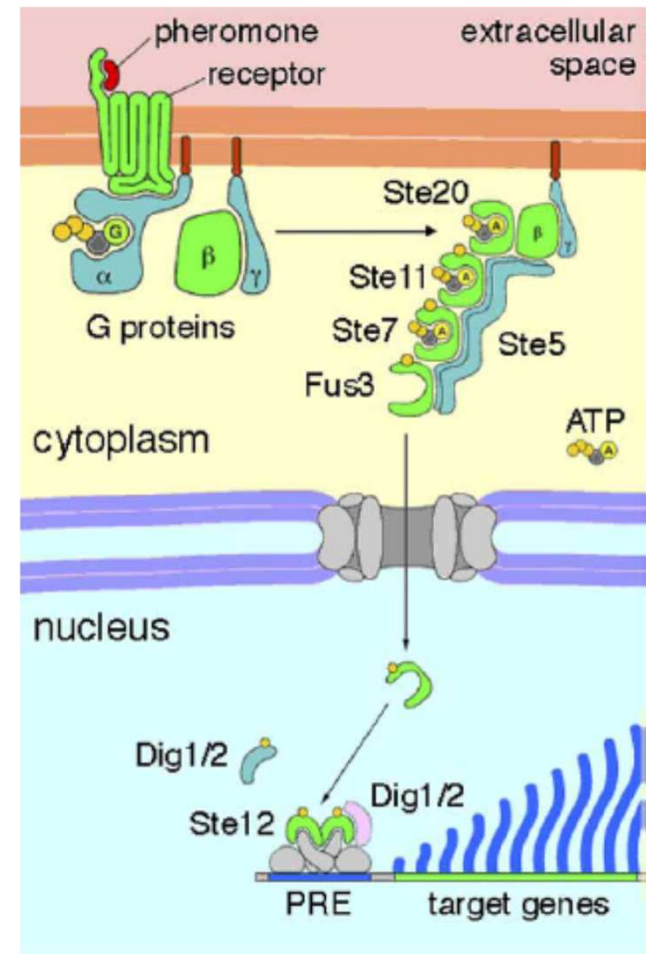
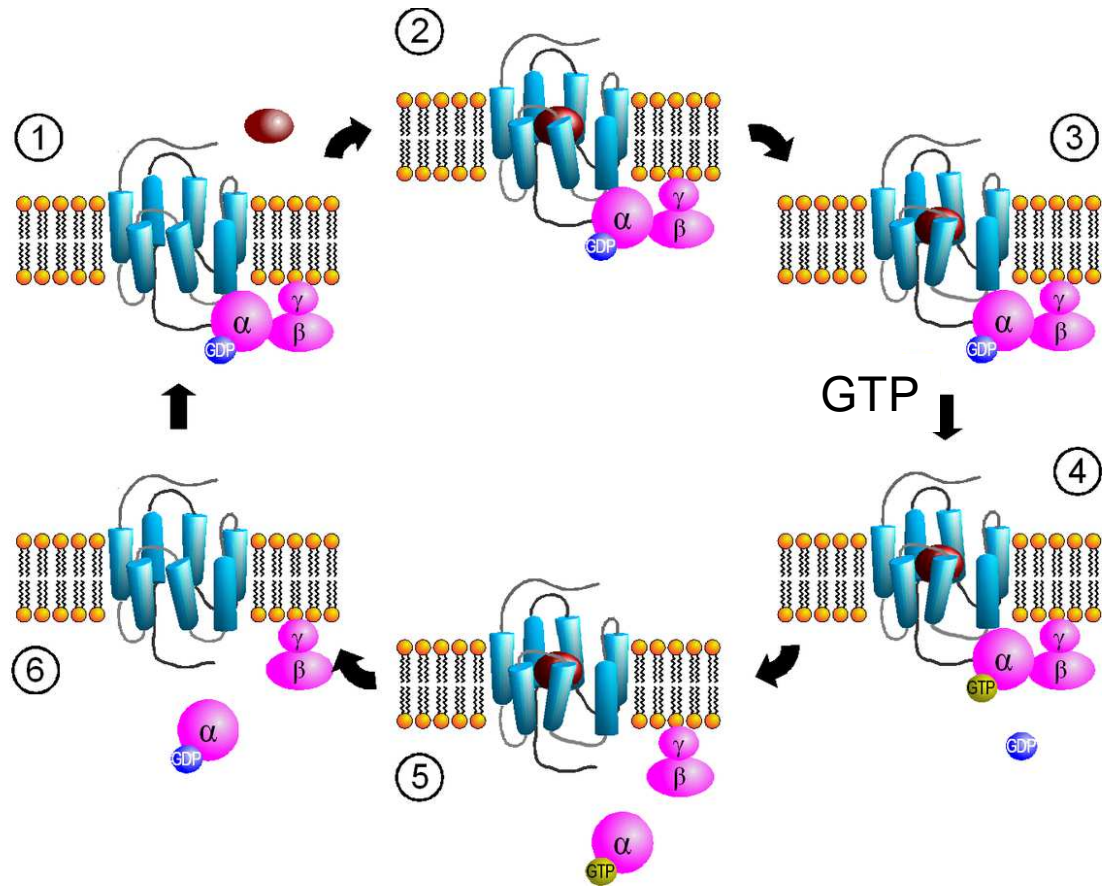
X:  $\Delta$  local protein concentration, i.e. level of gene expression, degradation, temporary storage, diffusion (solvent viscosity, steric environment), molecular presentation

X:  $\Delta$  pH,  $\Delta$  temperature,  $\Delta$  ionic strength

X: molecular (cooperative/allosteric) binding i.e.  $\Delta$  concentration of metabolite, other protein or ion (e.g. ATP,  $Ca^{2+}$ ), or covalent modification, i.e. enzymatic activity (e.g.  $PO_4$ )



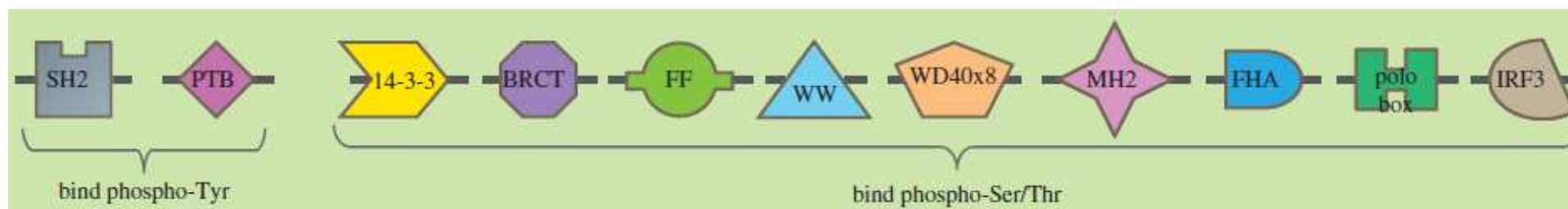
Nooren a Thornton, JMB, 2003  
Perkins et al, Structure, 2010

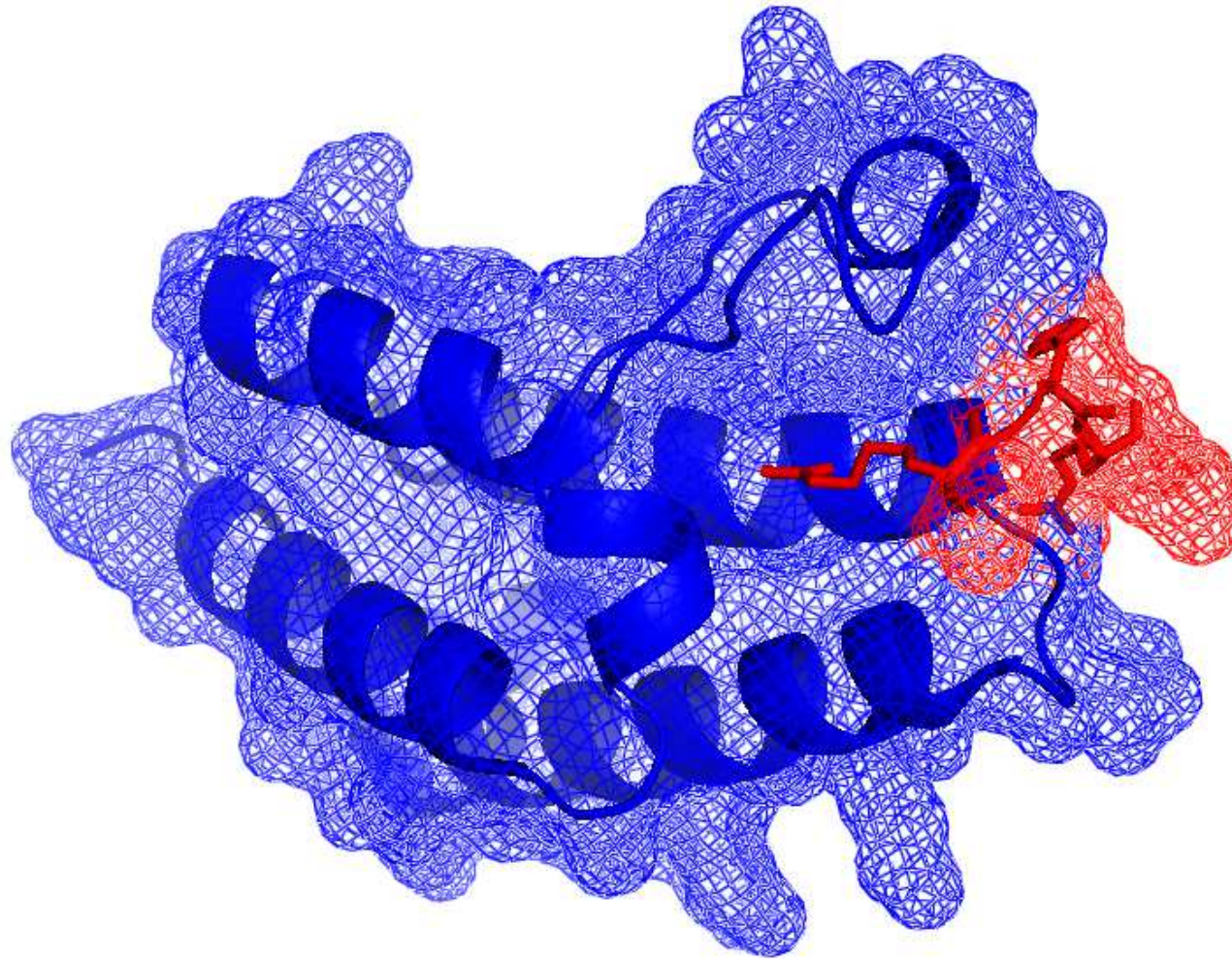


Protein-proteinové interakce moduluji velmi často GTP/GDP, ATP/ADP ... G-proteiny spolu interagují s 1000x vyšší afinitou za přítomnosti GDP než pokud je na G $\alpha$  navázané GTP (viz Ras) – dochází ke konformační změně (doc. Marek) – „přenáší“ signál

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 specifitu)

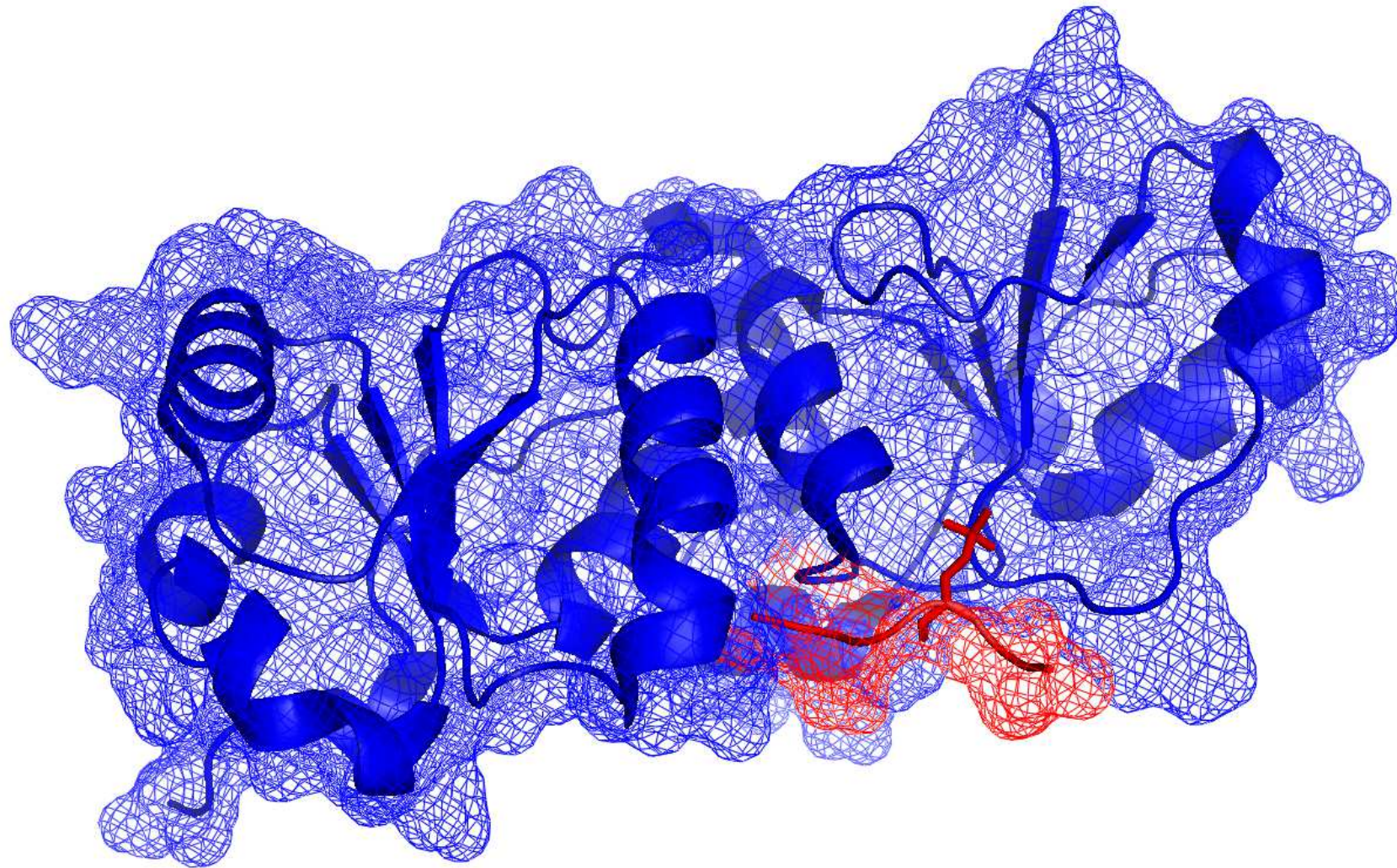
Modifikace	AMK zbytek	interakční doména
Fosforylace	tyrosin	SH2, PTB
	serin/threonin	14-3-3, WD40, WW, BRCT...
acetylace	lysin	bromodoména
metylace	lysin	chromodoména
hydroxylace	prolin	VHL $\beta$
ubiquitinace	lysin	UIM, UBA, CUE
SUMOylace	lysin	SIM



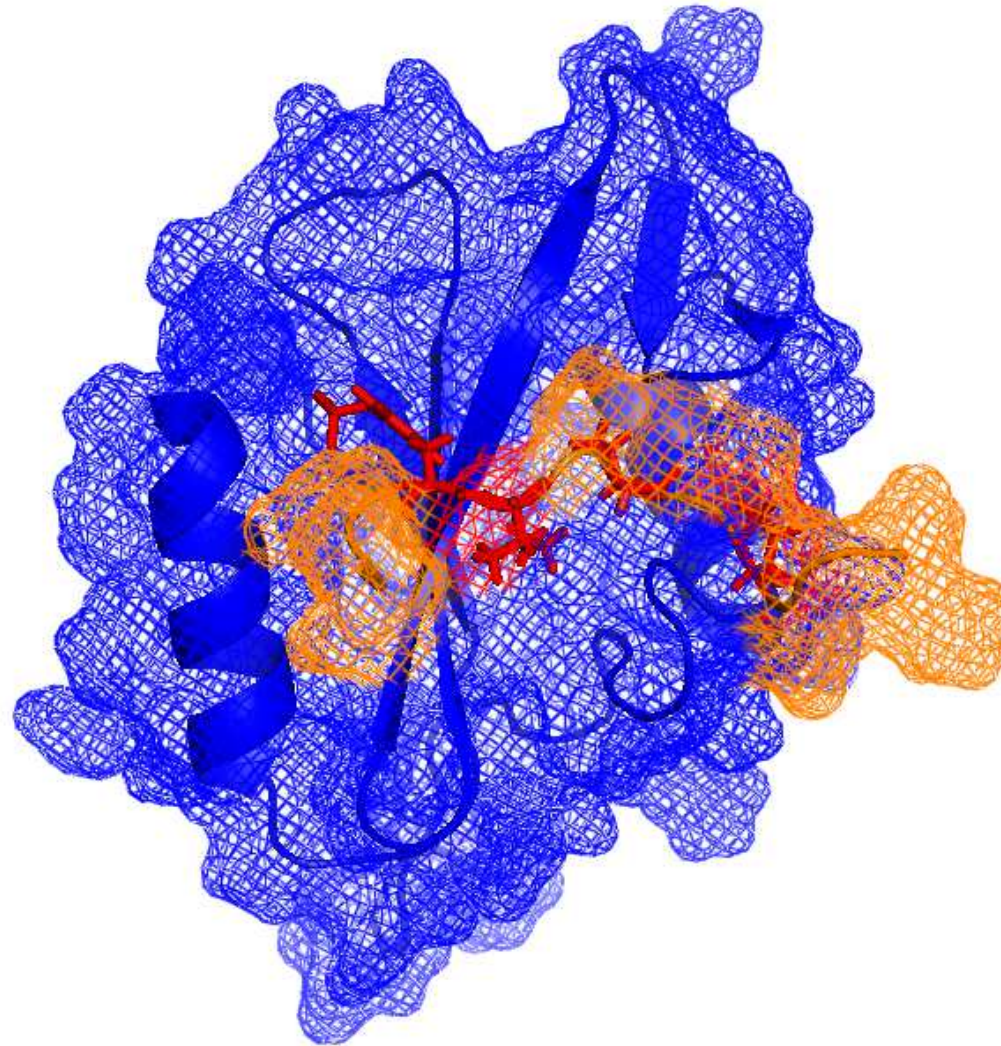


Modifikace histonů ovlivňují složení a přístupnost chromatinu – bromodoména GCN5 (HAT) navázaná na acetylovaný H4 lysin – PDB: 1E6I

Bottomley, EMBO Rep., 2004



Např. BRCT doména váže **fosforylovaný histon** – fosforylace v místě poškození DNA – PDB: 3141



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

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

Small GTPase Signaling

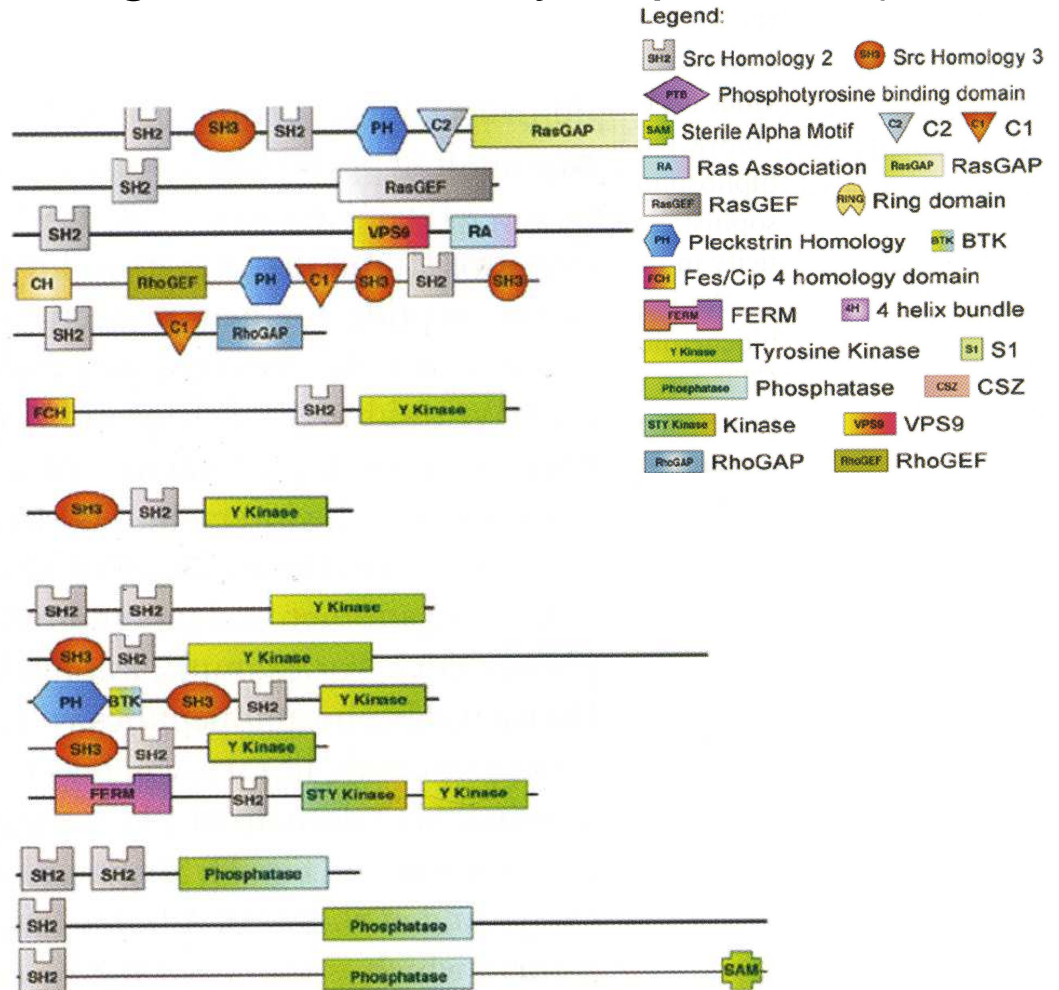
- Ras-GAP
- Nsp1,2,3
- Rin1
- Vav1,2,3
- Chimerin

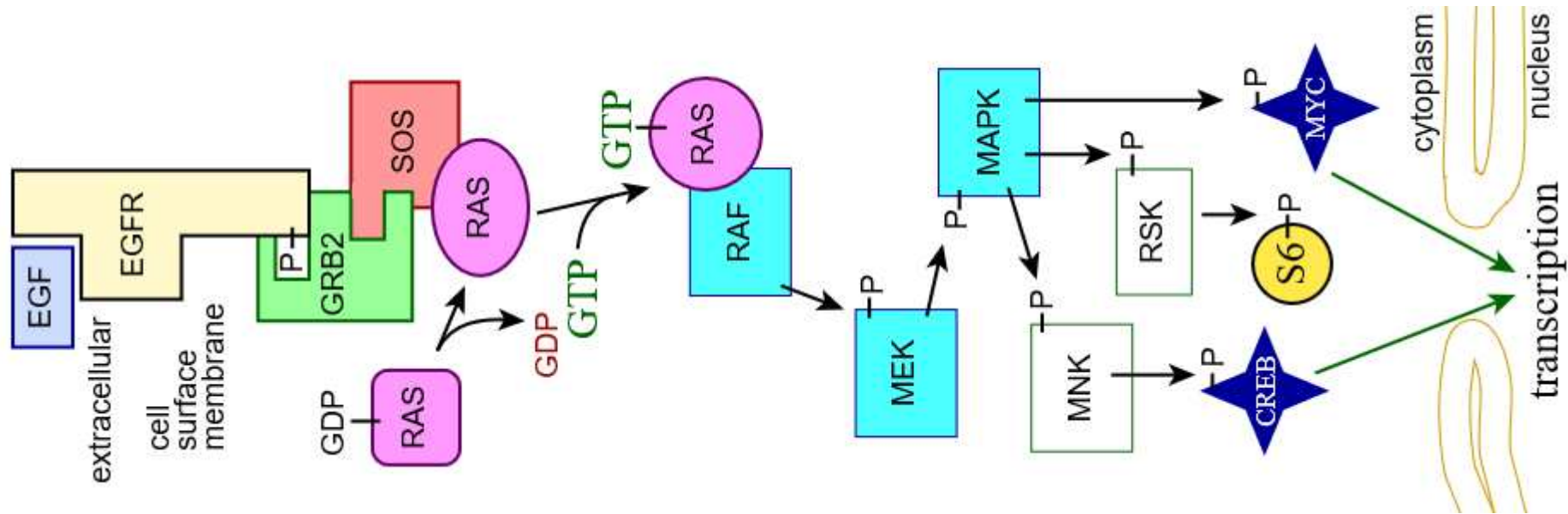
Kinases

- 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



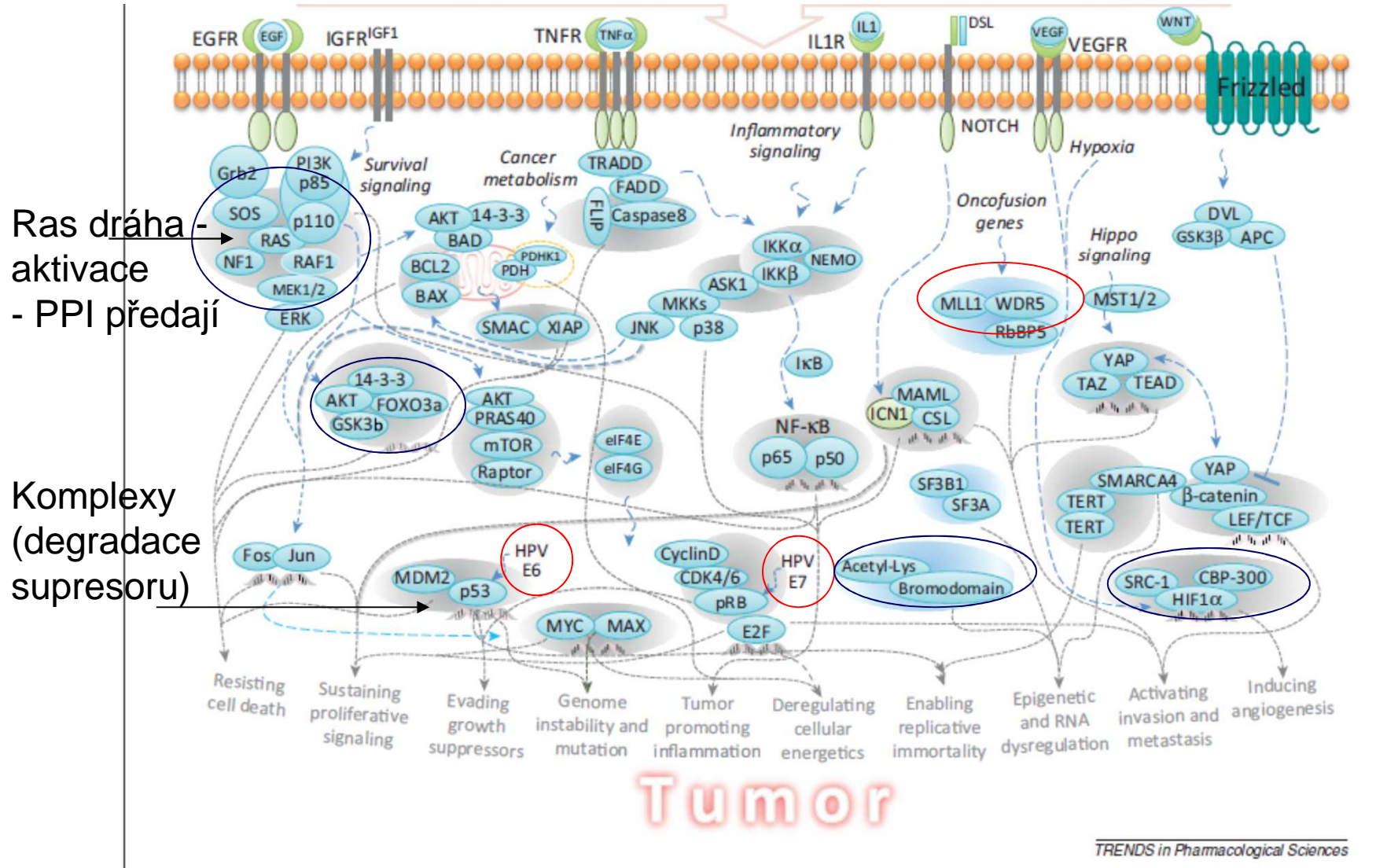


Signální Ras dráha – EGF váže EGFR (aktivuje cytoplasmatickou kinasovou doménu = autofosforylace) – SH2 v GRB2 interaguje s EGFR - SH3 domény GRB2 dimerizují s prolin-rich doménou SOS – EGFR-GRB2-SOS je aktivní (SOS = guanin nukleotid exchange faktor) a odstraní GDP z Ras – Ras může navázat GTP (podobný  $G\alpha$ , ale monomer) a interagovat s RAF kinasou - aktivuje se MAPK dráha

rakovina – Ras mutace stabilizující vazbu GTP mají za následek konstitutivní aktivaci (aktivace i bez EGF stimulu)



některé viry využívají buněčné PPI moduly k invazi do buněk (přesměrování ve prospěch viru – vazba HPV-E6 na p53)  
 některé onkogeny jsou výsledkem fúze modulů (permanentní PPI)



**Figure 2.** Representative PPIs in oncogenic signaling networks that drive the acquisition and development of hallmarks of cancer. Grey broken arrows connect PPIs to corresponding cancer hallmarks. Some PPIs contribute to multiple features of cancer. It should be noted that some PPIs may impact global processes of cell growth and their precise connections to cancer remain to be established.

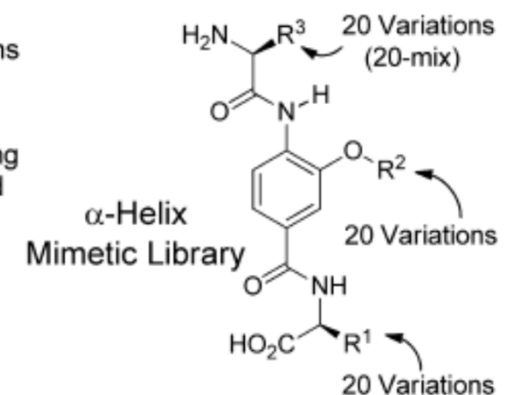
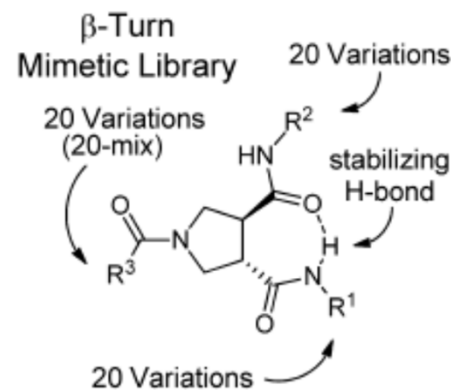
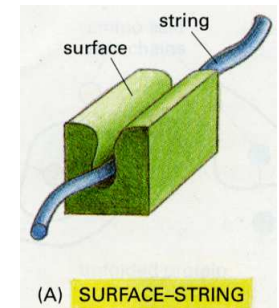
# Inhibice PPI

Problémy inhibice (vývoje léků) ...

- interakční plocha 1150-10000Å<sup>2</sup> (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 žlábků“ 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 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )

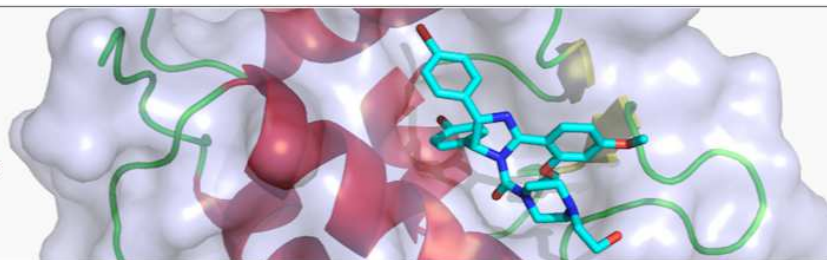


Ivanov et al, TiPS, 2013

Whitby a Boger, ACR, 2012

# iPPI-DB

Inhibitors of Protein-Protein Interaction Database

[Home](#)[Submit a query ▾](#)[User guide](#)[About iPPI-DB](#)[Roadmap](#)[Contribute to iPPI-DB](#)[Acknowledgments](#)[CDithem](#)

## iPPI-DB

iPPI-DB contains [1650 non-peptide inhibitors](#) (iPPI) across [13 families of Protein-Protein Interactions](#). The chemical structures, the [physicochemical](#) and the [pharmacological profiles](#) of these iPPI are [manually extracted](#) from the literature and stored in iPPI-DB.

[+ Learn more !](#)

## Choose how to query iPPI-DB

### ► [By pharmacological criteria](#)

Query iPPI-DB [one PPI target](#) at a time and [optionally](#) refine your search by choosing some specific pharmacological features, physicochemical characteristics for the compounds or extract only drug candidates.

[→ Submit a query now !](#)

### ► [By chemical similarity](#)

Sketch your molecule or copy/paste it as a SMILES, choose

Labbe et al., NAR, 2015

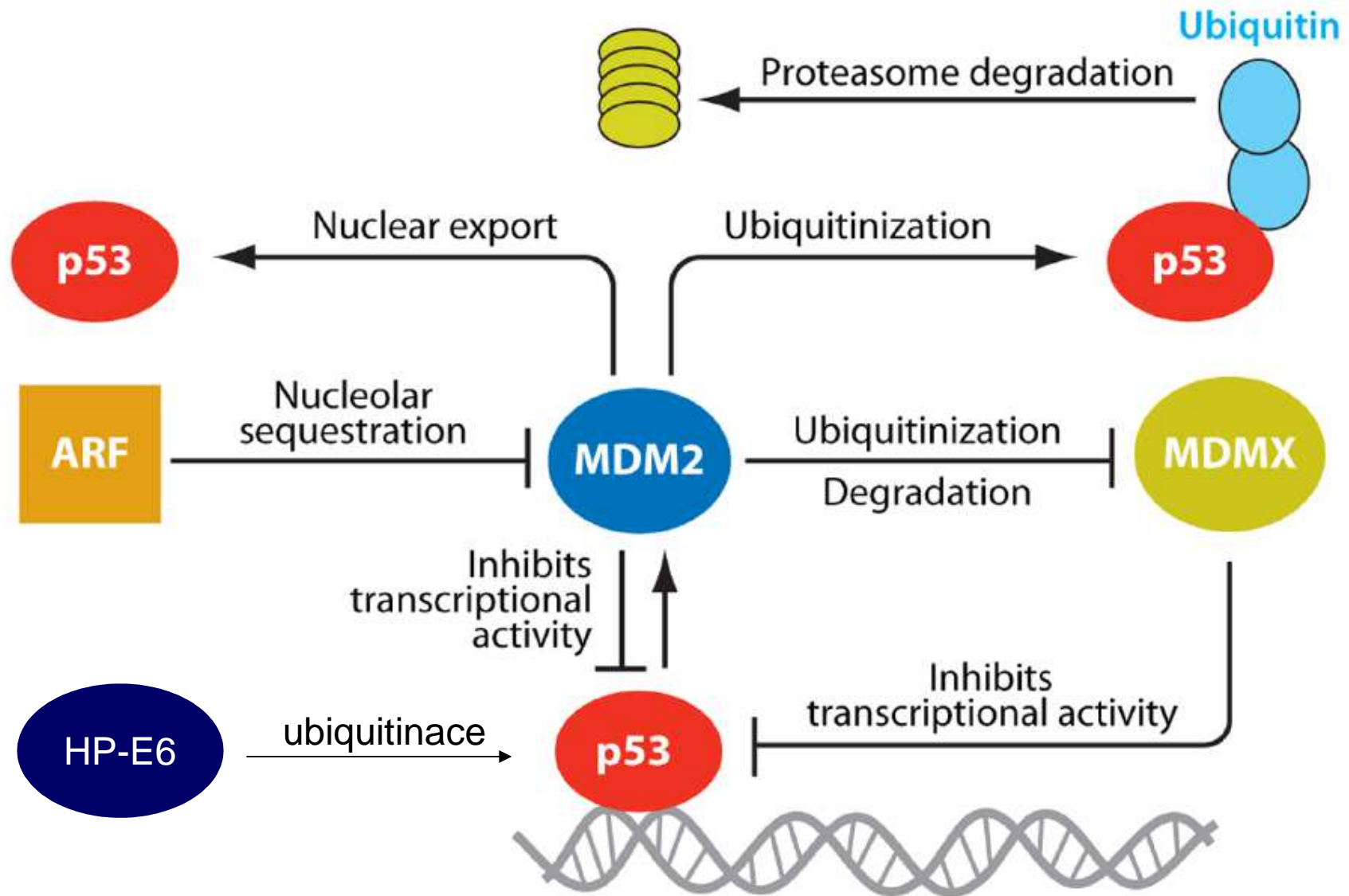
Acknowledgments

Showing 1 to 47 of 47 entries

← Previous 1 Next →

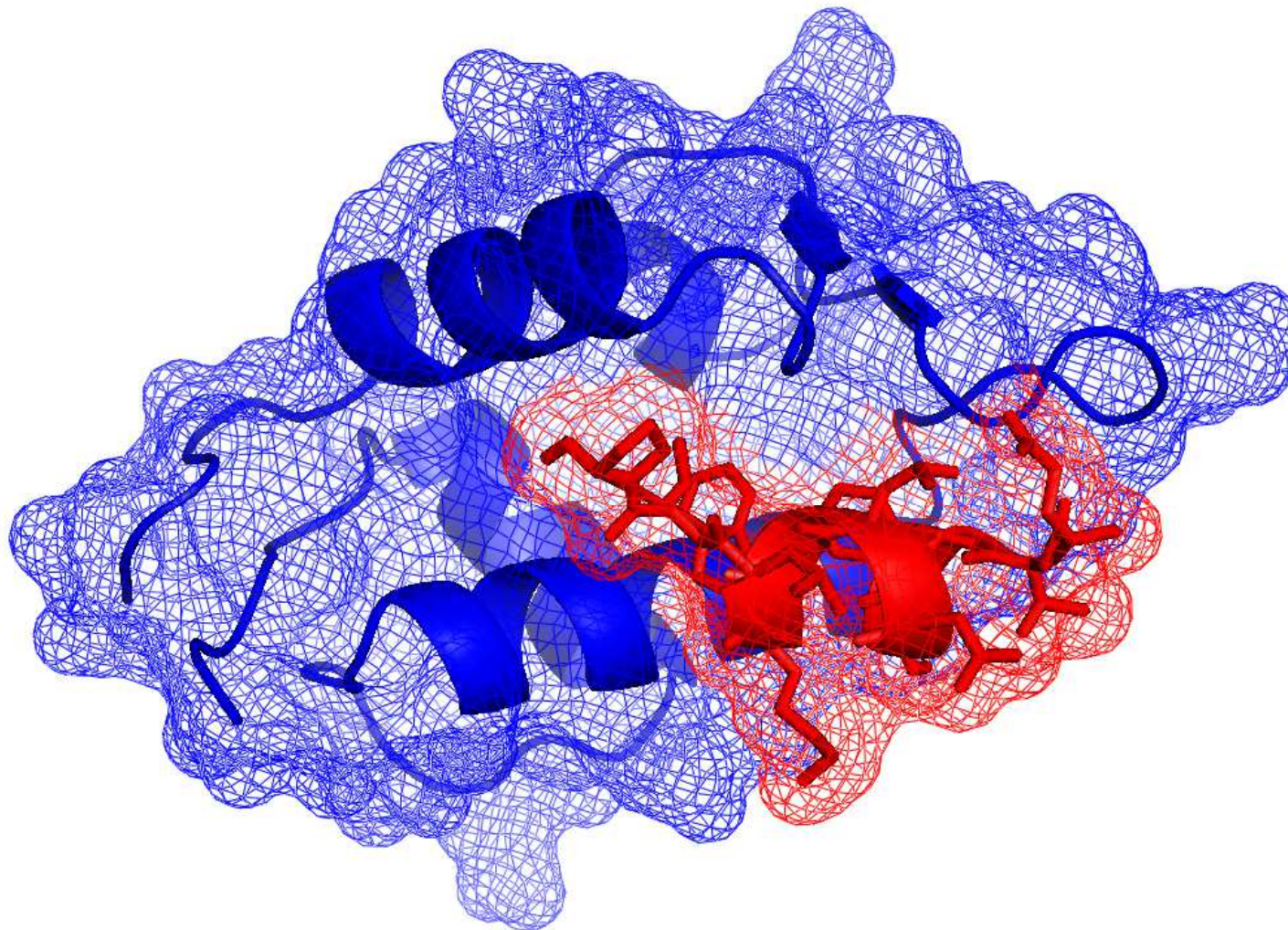
Tn	ID	Compound	RadarChart	Target	Assay	Type	Activity	MW	ALogP	HBD	HBA	TPSA	RB	Ar	Fsp3	R/S	LE	LLE	Biblio
0.34	682			MDM2 Q00987	FP	pKi	6.52	459.15	4.45	2	5	61.44	4	2	0.42	4	0.29	2.07	[57]
0.34	682			MDM2 Q00987	proliferation assay*	pIC50	5.68	459.15	4.45	2	5	61.44	4	2	0.42	4	0.25	1.23	[57]
0.34	682			MDM2 Q00987	proliferation assay*	pIC50	4.77	459.15	4.45	2	5	61.44	4	2	0.42	4	0.21	0.32	[57]

# Inhibite PPI: p53-MDM2



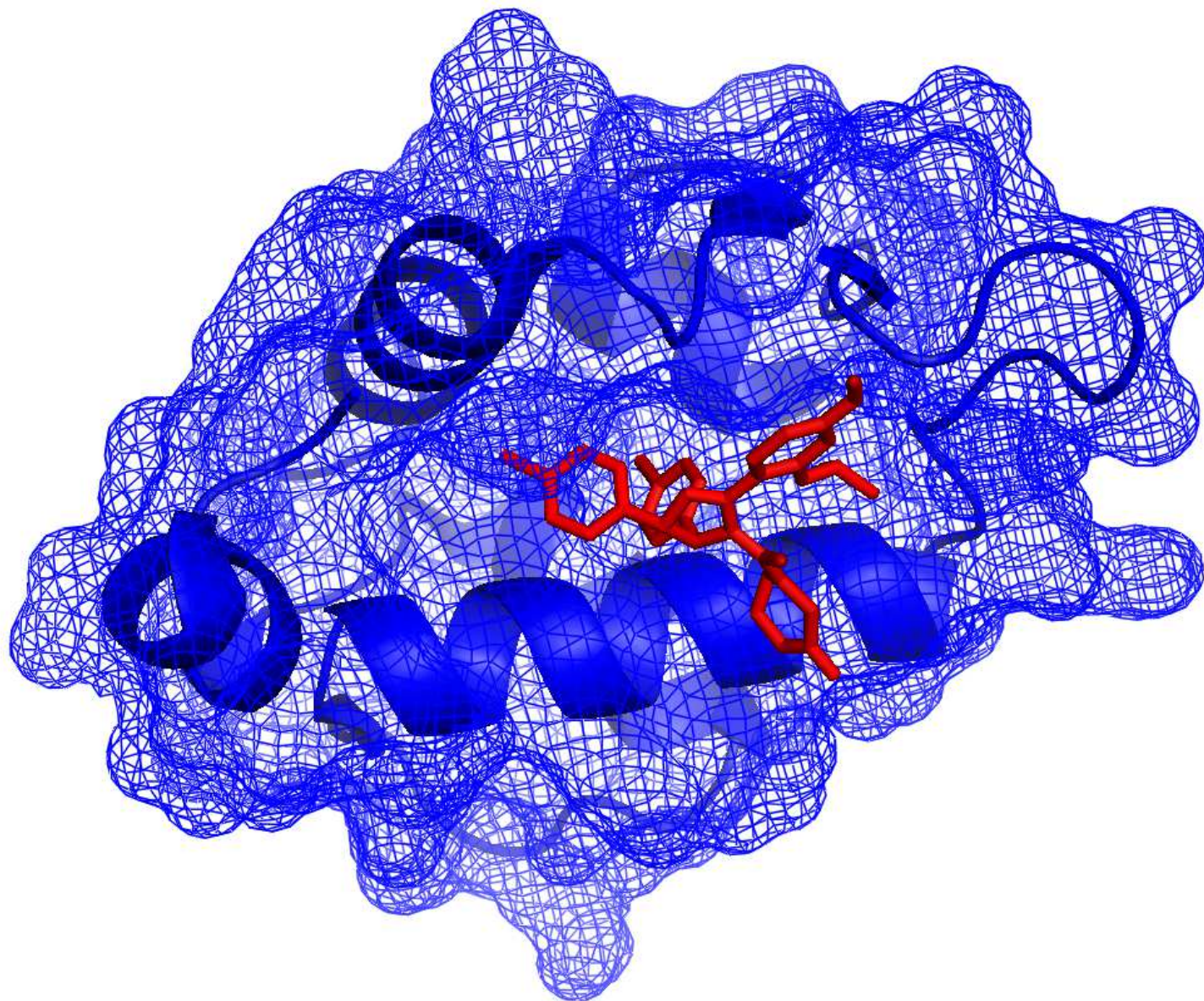
# MDM2-p53 (dimer, PDB: 1YCQ)

---

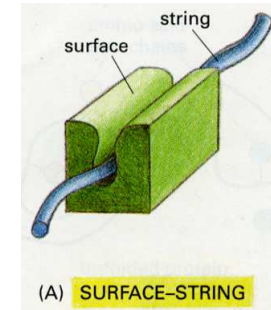
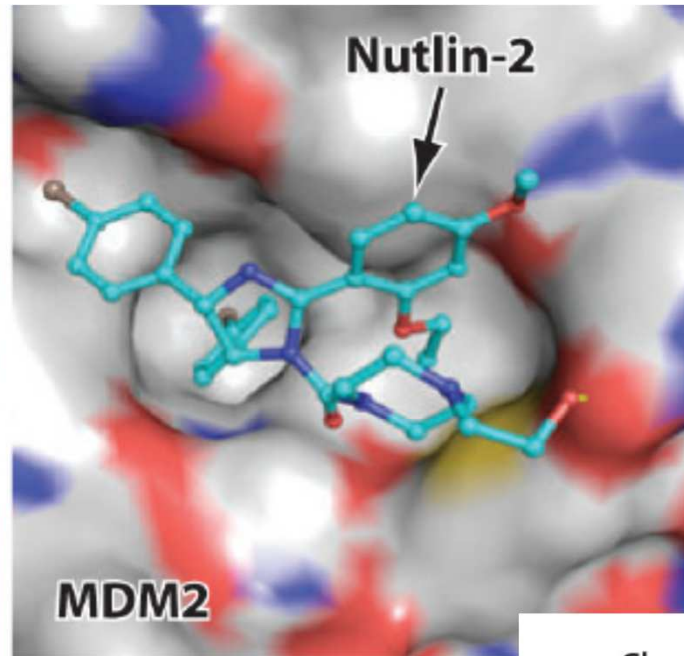
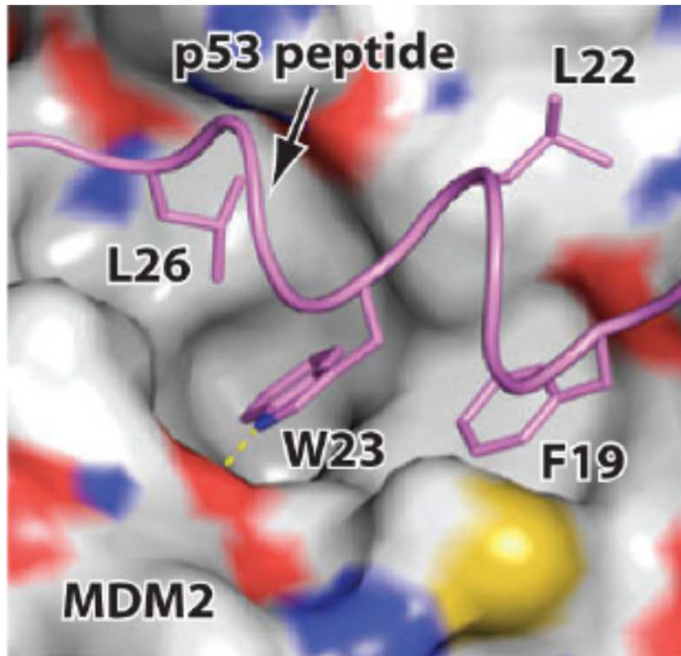


# MDM2-nutlin (PDB: 4HG7)

---

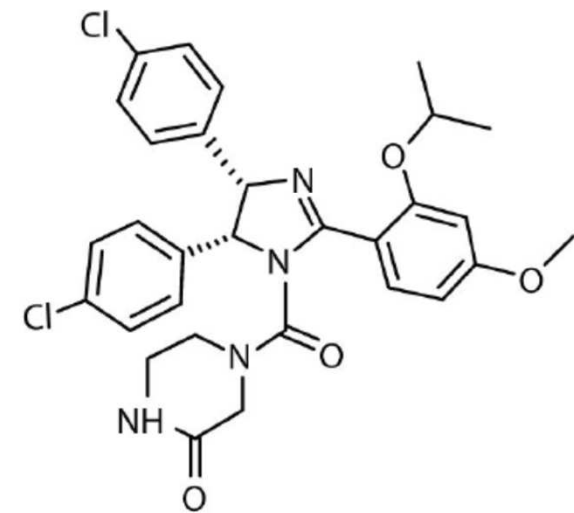


# Inhibice PPI: p53-MDM2



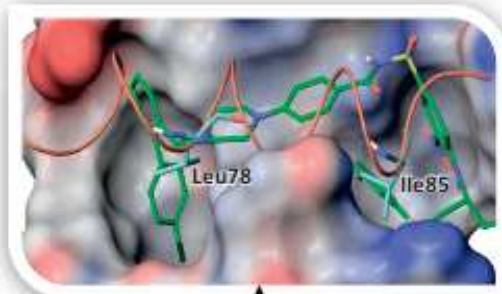
jeden z prvních

- Inhibice interakce MDM2 stabilizuje p53 –  
podpora nádorové suprese

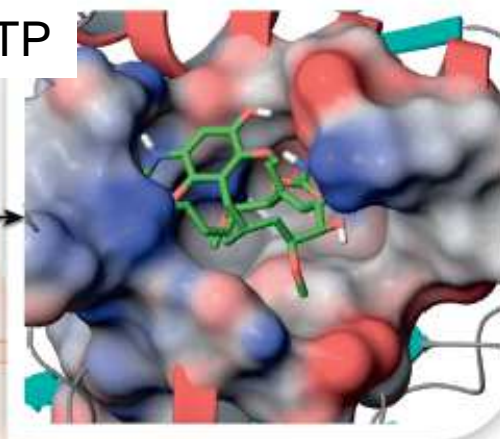


**Nutlin-3a**

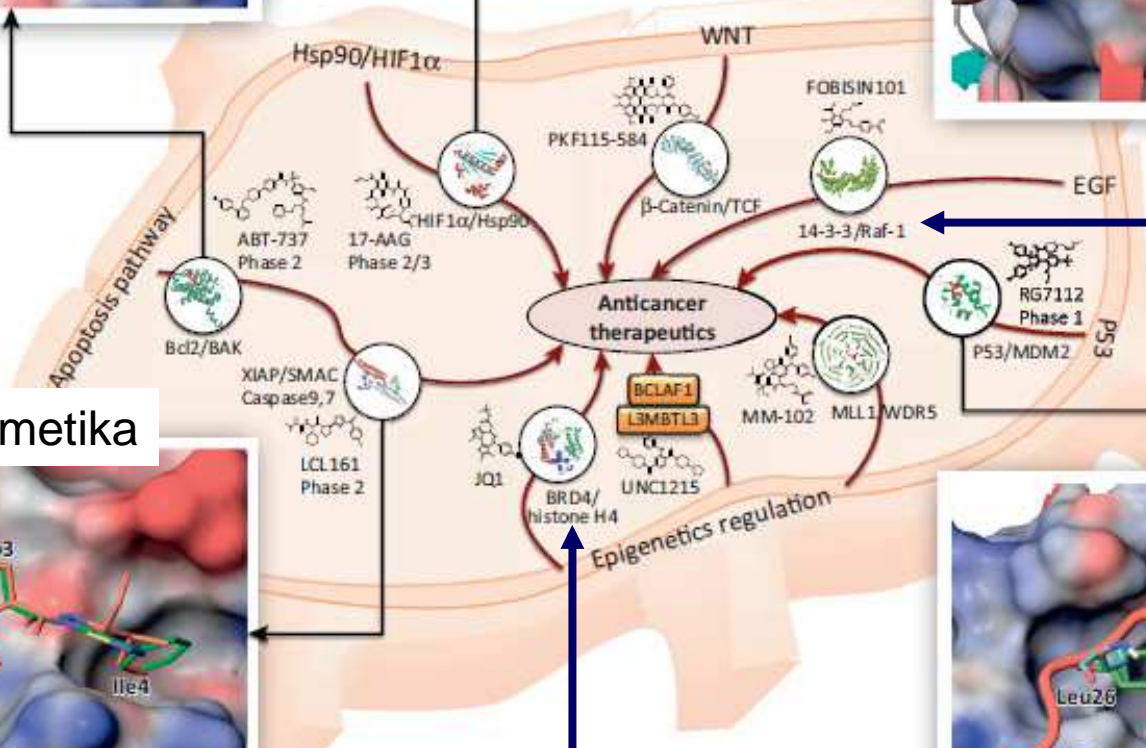
peptidomimetika



kapsa pro ATP

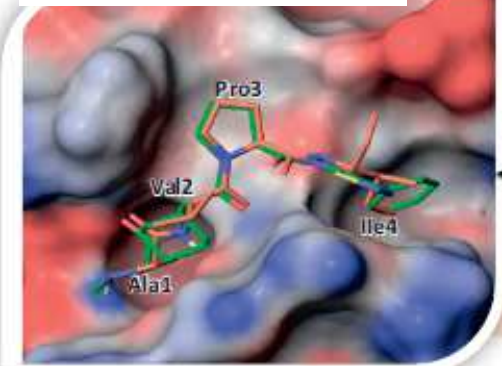


Ivanov et al, TIPS, 2013

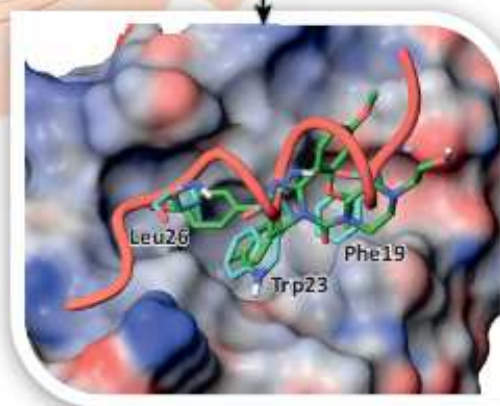


fosfopeptidová vazba

peptidomimetika



acetyl-peptidová vazba



větší komplexy jsou stabilizovány více

nová peptidomimetika

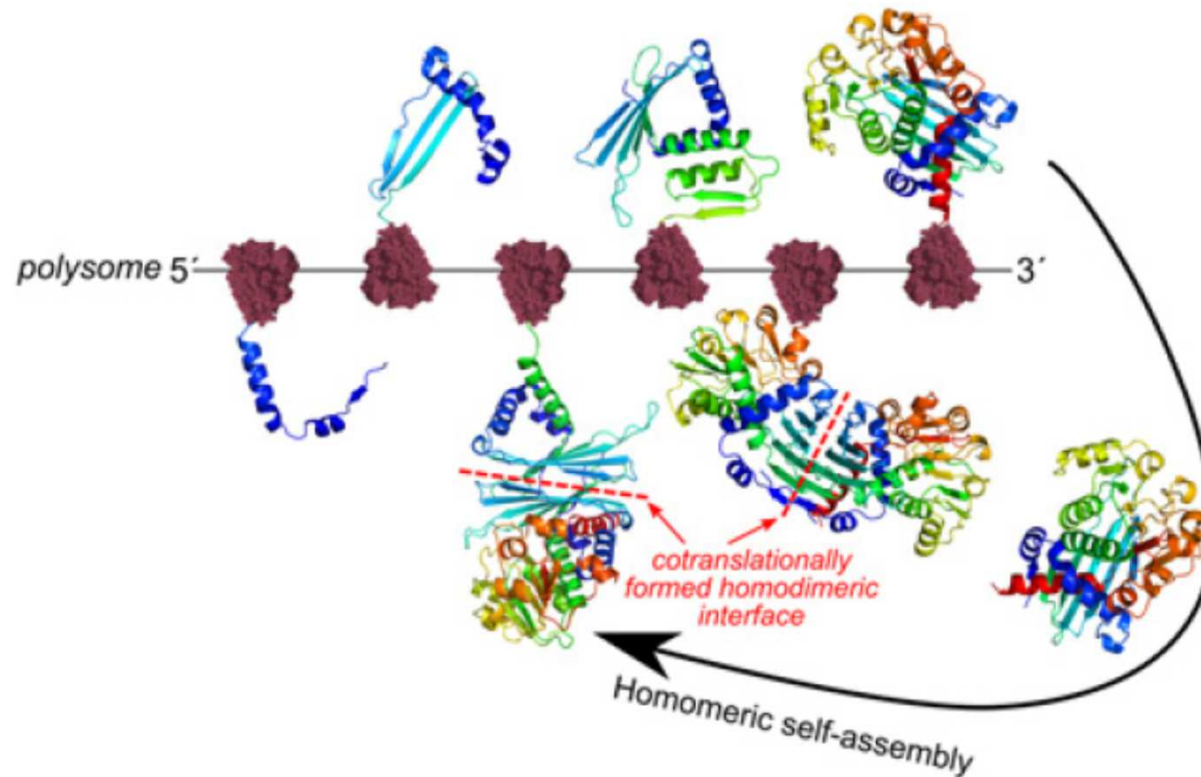
interakcemi, ale může se rozpadnout i celý komplex



# Jak se komplexy sestavují - homomery?

nejjednodušší (běžné) je sestavování homooligomerů (homodimerů), ke kterému dochází (většinou) při translaci

Wells a spol, BST, 2015



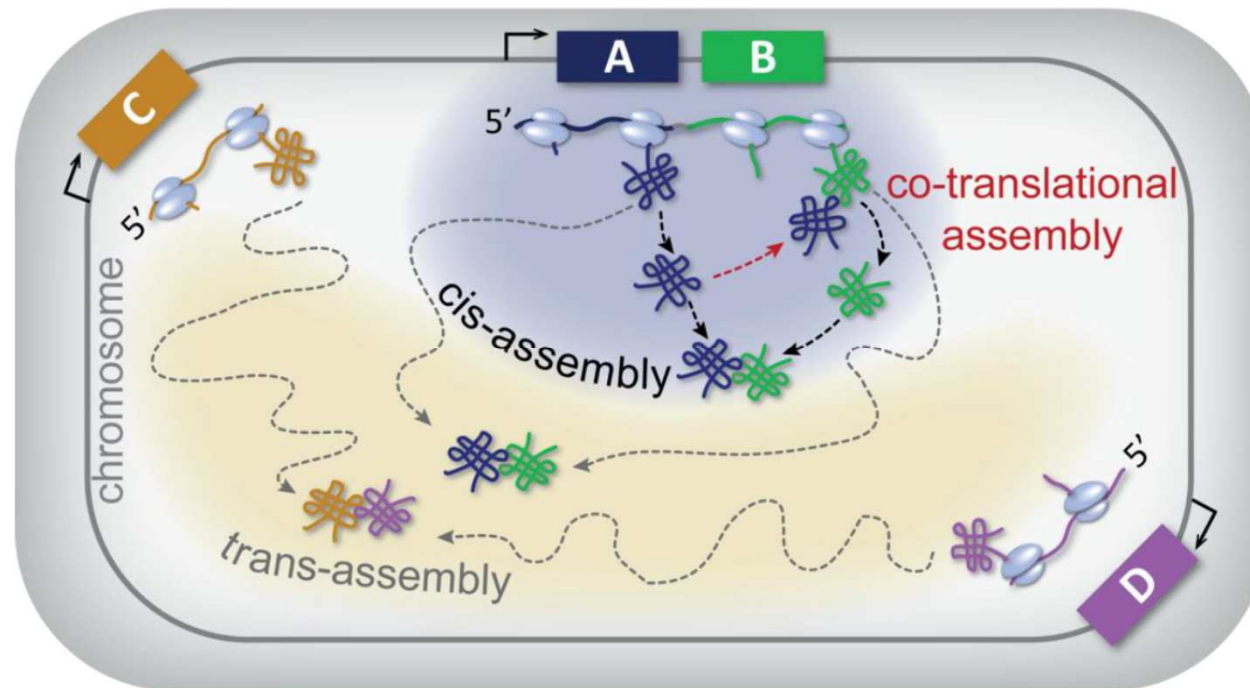
tento toxin je spíš vyjímka



Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> kvarterní tj. komplexy (šroubovice a listy se k sobě skládají podobným způsobem)

# Jak se komplexy sestavují - heteromery?

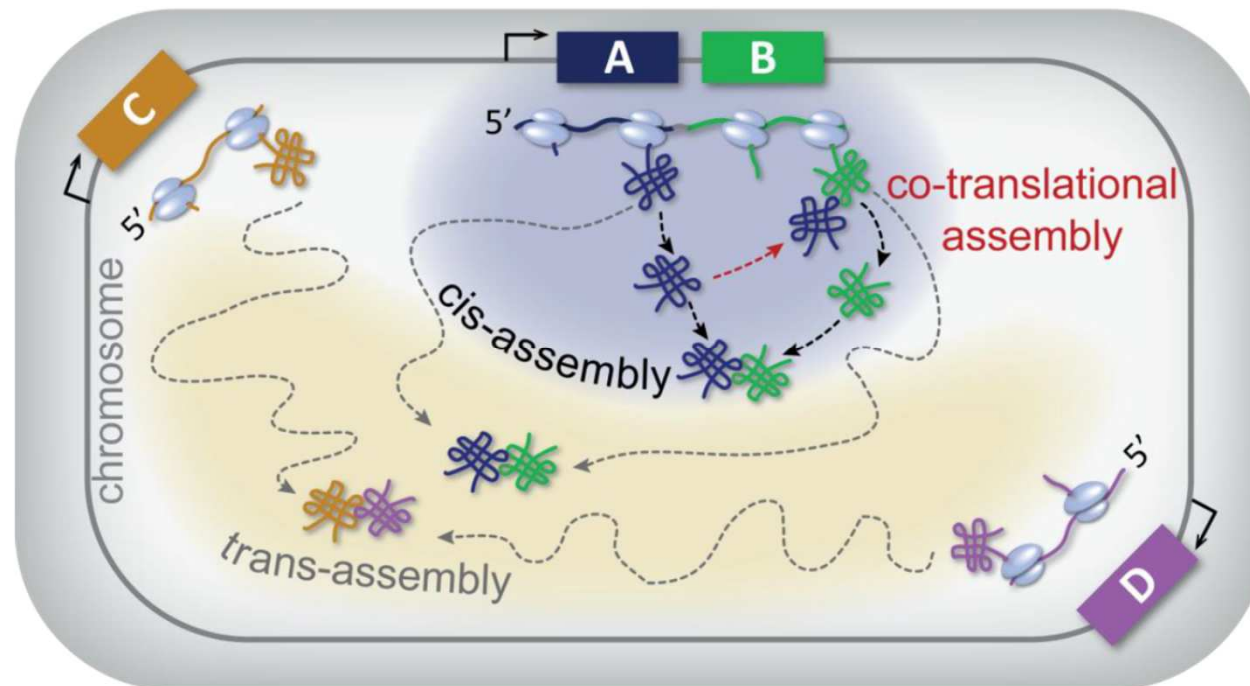
podjednotky se exprimují „nezávisle“ a pak se musí „potkat“ (trans-assembly model) – problém s nespecifickými interakcemi, proteasami, chaotické prostředí buňky ...



... samostatně by se proteiny neposkládaly, byly by nestabilní (degradace), toxické nebo by agregovaly (proteiny s hydrofobními povrchy – interakce je skryje před solventem)

# Jak se komplexy sestavují - heteromery?

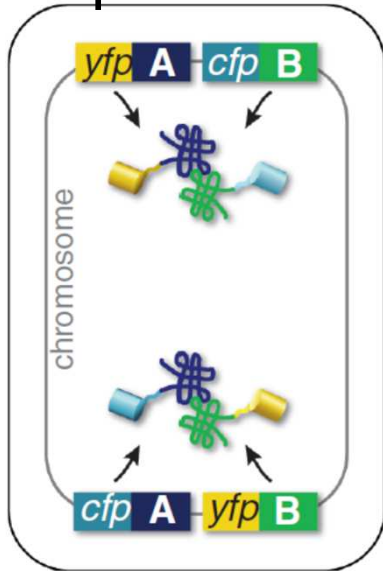
podjednotky se exprimují „nezávisle“ a pak se musí „potkat“ - trans-assembly model ...



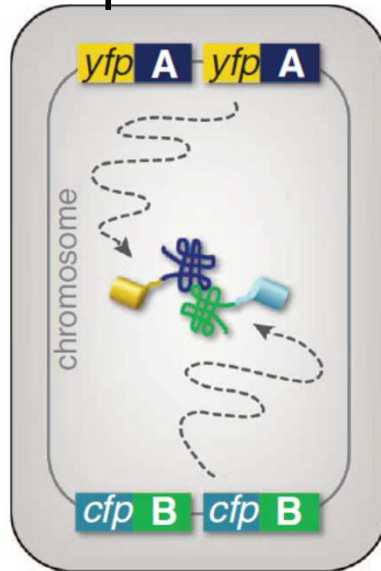
transkripce genů u prokaryot je regulována operony: funkčně vztažené geny/proteiny (komplexy) se transkribují z jednoho operonu (tandemově uspořádané) – polycistronic mRNA – ko-translace a ko-skládání (koordinované v prostoru i čase)

# heterodimer luxA-luxB (luminiscenční komplex)

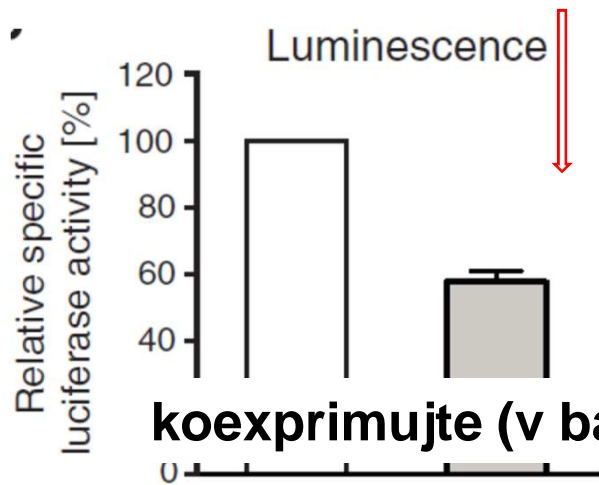
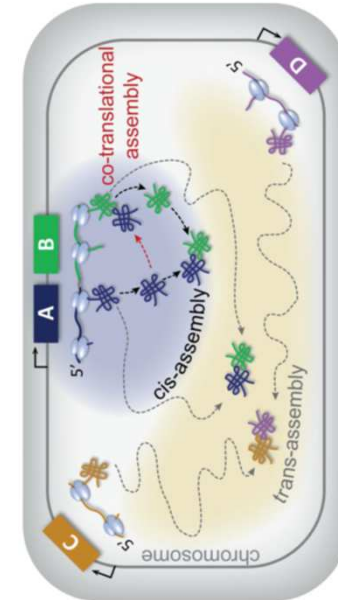
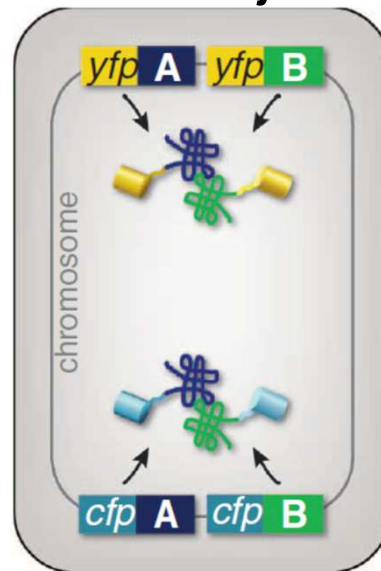
ze stejného operonu



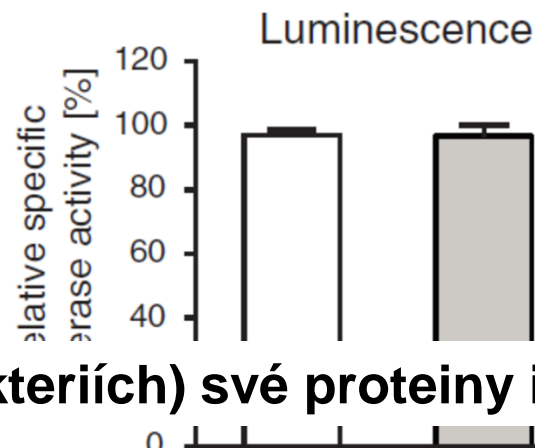
ze různých operonů



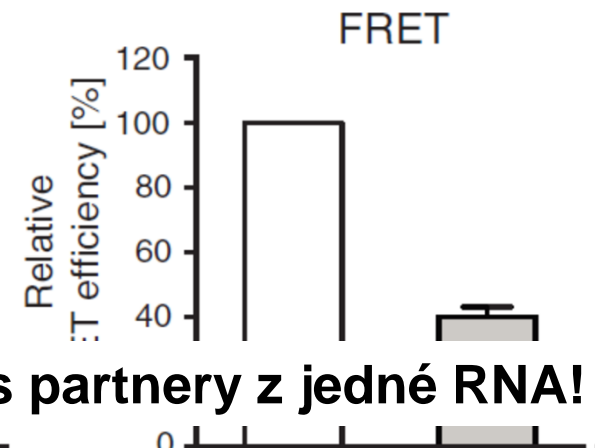
ze stejného operonu, ale stejné tagy

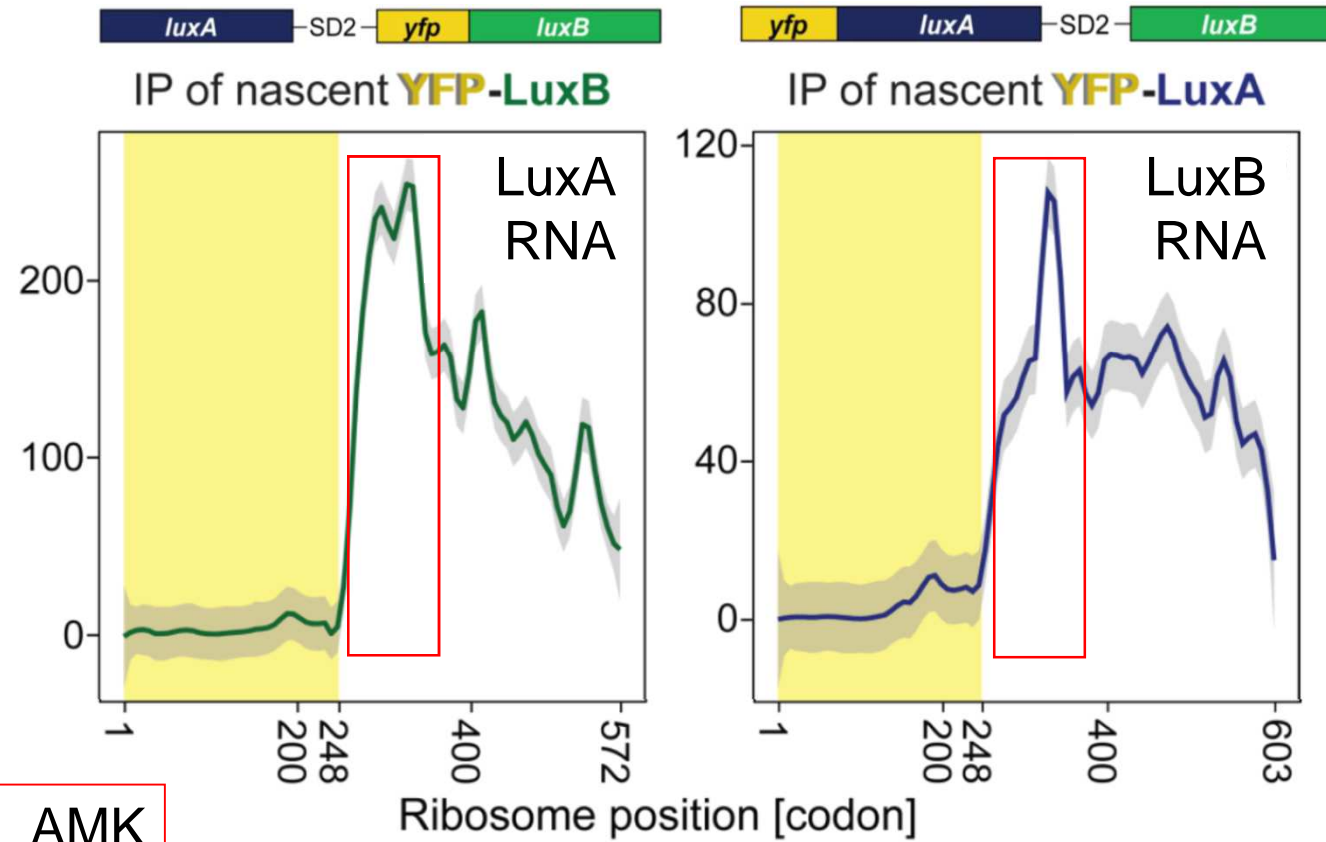
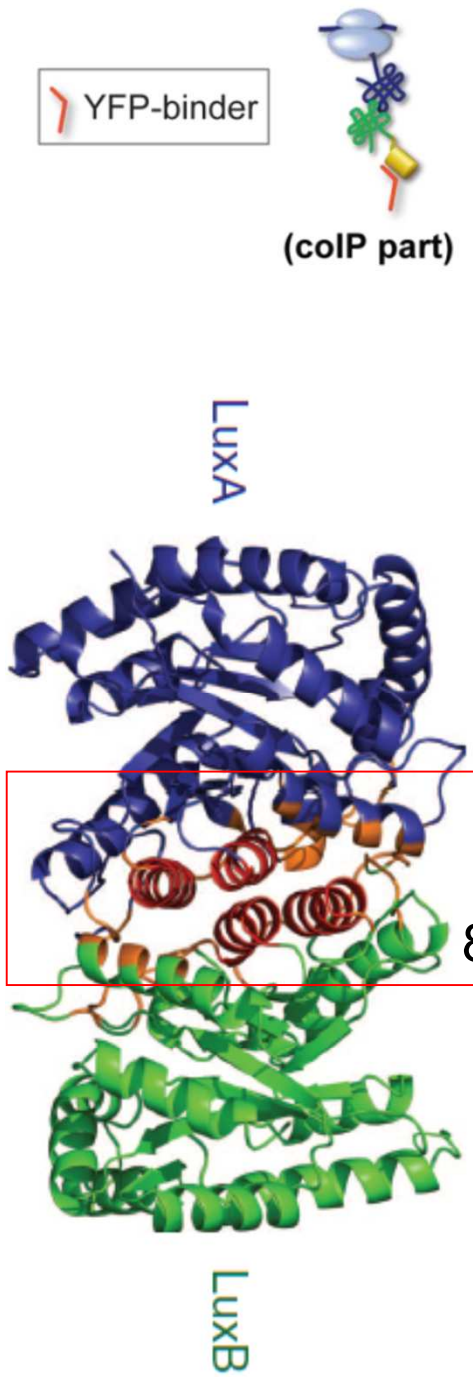


méně složených komplexů



více komplexů složených cis





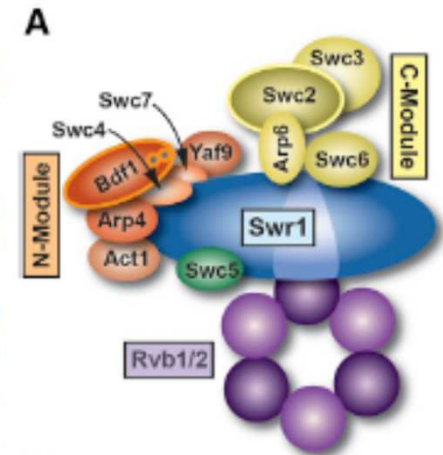
+ 30AMK/90nt uvnitř ribosomu

„ribosome profiling“ – imunoprecipitace jednoho proteinu „stahuje“ partnera – pokud interagují už v momentu translace, je zachycena i RNA (partnera) – interakční povrch LuxA-LuxB koreluje s profilem (je precipitována odpovídající RNA)

# 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
Cdc2p	cyclin-dependent protein kinase [33]	<i>rum1</i> <i>cdc18</i>	CDK (cyclin-dependent protein kinase), DNA replication factor
Sty1p (Spc1p)	MAP kinase; stress-responses [14,34]	<i>pyp2</i> <i>cip2</i>	Tyrosine phosphatase RNA-binding protein
Rpt2p (Mts2p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ubp6</i> <i>rhp23</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase Rad23 homolog * [35]
Rpn12p (Mts3p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ecm29</i> <i>rpn1301</i> <i>rpn1302</i>	Proteasome component 19S proteasome regulatory subunit 19S proteasome regulatory subunit
Atf1p	Transcription factor; stress response [36]	<i>pcr1</i>	Transcription factor, involved in stress response
Mnh1p	Mago nashi homolog; splicing * [35]	<i>mni1</i>	Protein with Mago nashi domain
Arp6p	SWR1 complex; chromatin remodelling [18]	<i>alp5 = Arp4</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]



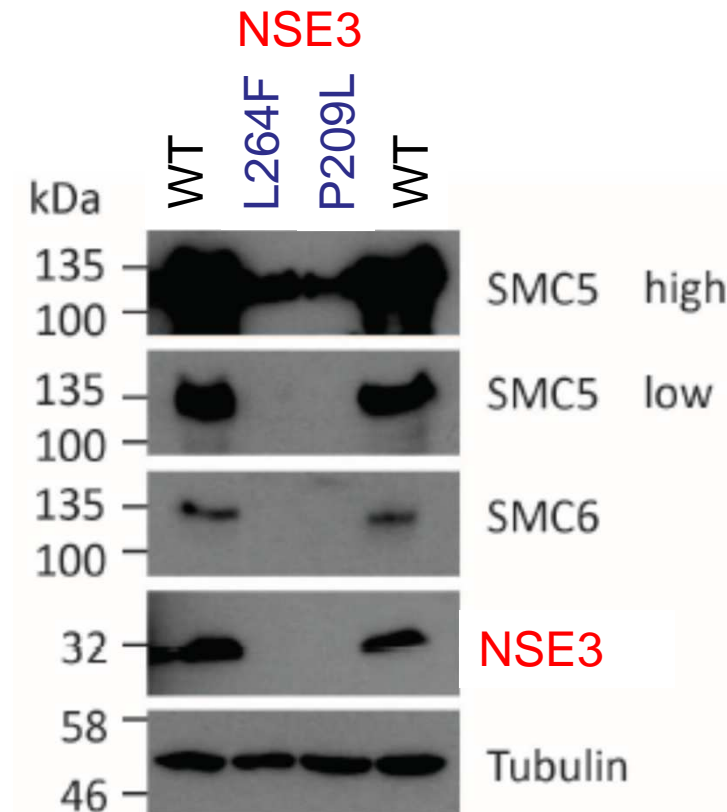
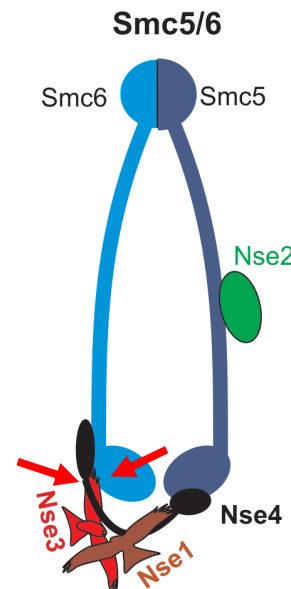
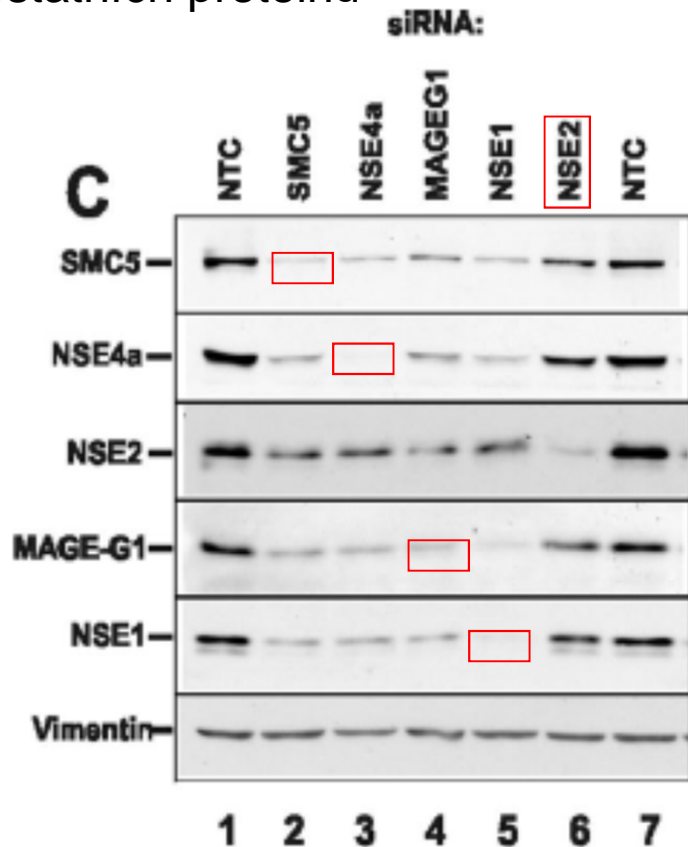
Only proteins that copurified with mRNAs other than their own are shown. Proteins that have not been characterised in *S. pombe*, and for which the information is a prediction based on the behaviour of orthologous proteins are marked with a star.

Podobně u eukaryot – mRNA podjednotek komplexů ko-precipitovaly (ikdyž nejsou na jedné mRNA – ale jsou ko-translatovány)

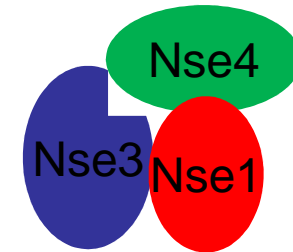
Stabilní proteinové komplexy jsou složeny z jednotlivých proteinů/**podjednotek** které spolu interagují - pokud schází podjednotka, tak nefunguje celý komplex – komplex se nesestaví nebo rozpadá (nestabilní – degradace ...)

Deplece kterékoli podjednotky lidského komplexu má za následek pokles hladiny ostatních proteinů

mutace podjednotky držící pohromadě komplex (narušila Nse3-Nse4 i Nse3-Smc6) může mít podobný efekt ale ...



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



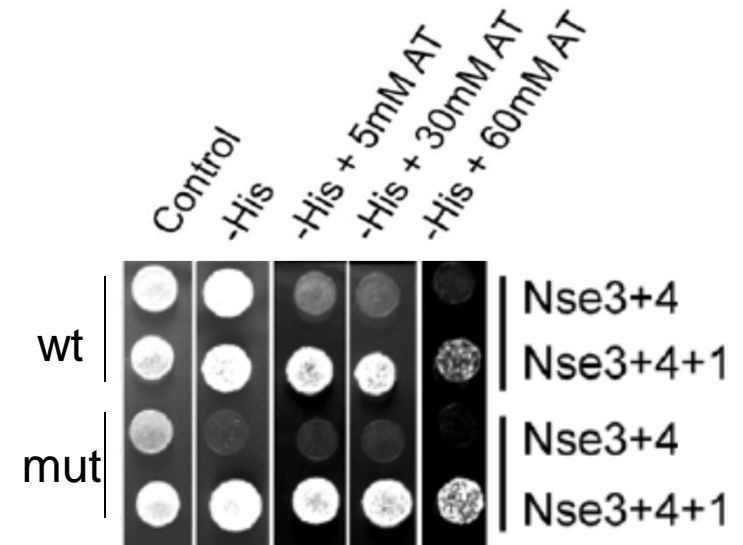
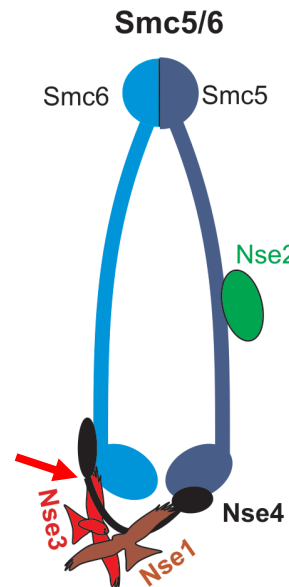
Proteinový komplex

### Pull-down

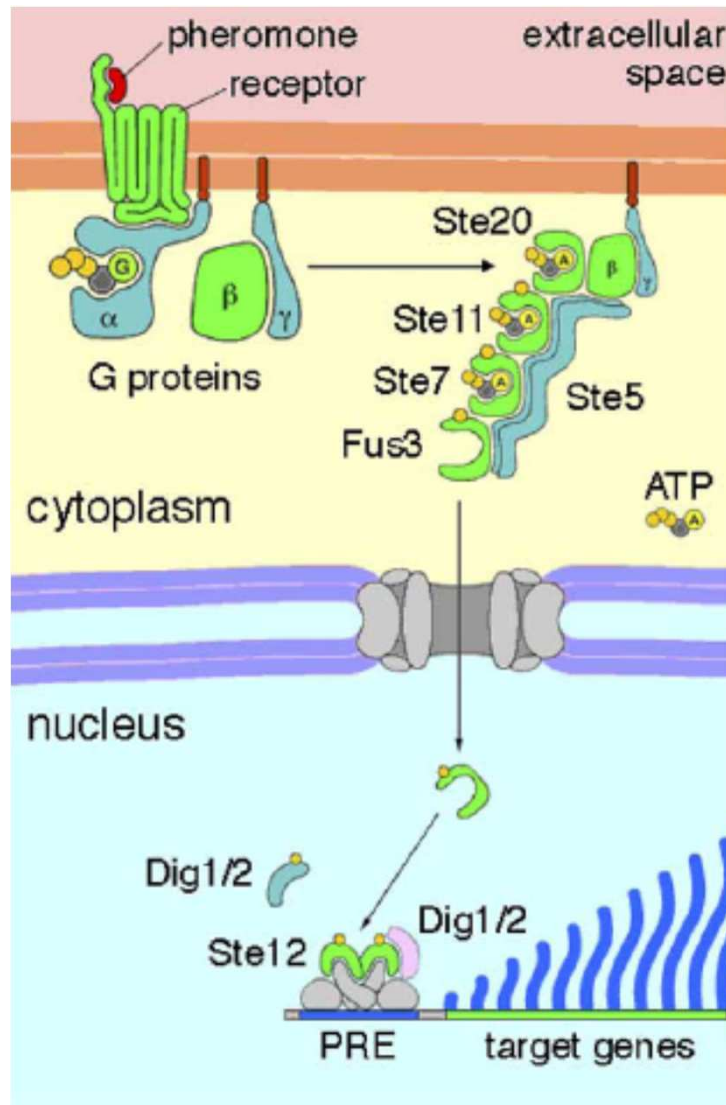


### kvasinkový 2-hybridní systém

... přerušení protein-proteinové interakce je relativně snadné u slabých dimerů – větší komplexy jsou většinou stabilizovány více interakcemi a je tedy obtížnější je narušit (mutací či inhibítorem)







Mnoho proteinů obsahuje pouze interakční domény a mají jediný úkol: nukleace multiproteinových komplexů – **scaffold** (lešení) – komplexy pak mohou být i modulární – např. SCF (Skp-cullin-Fbox) různé cullin nebo Fbox (adaptor) molekuly (přednáška M. Adamus)

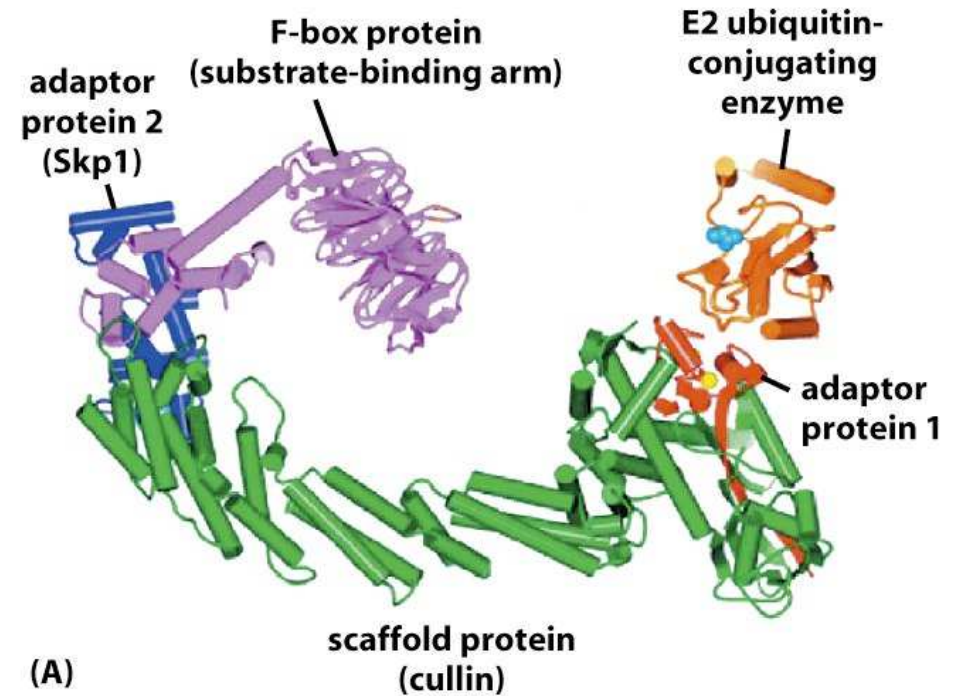
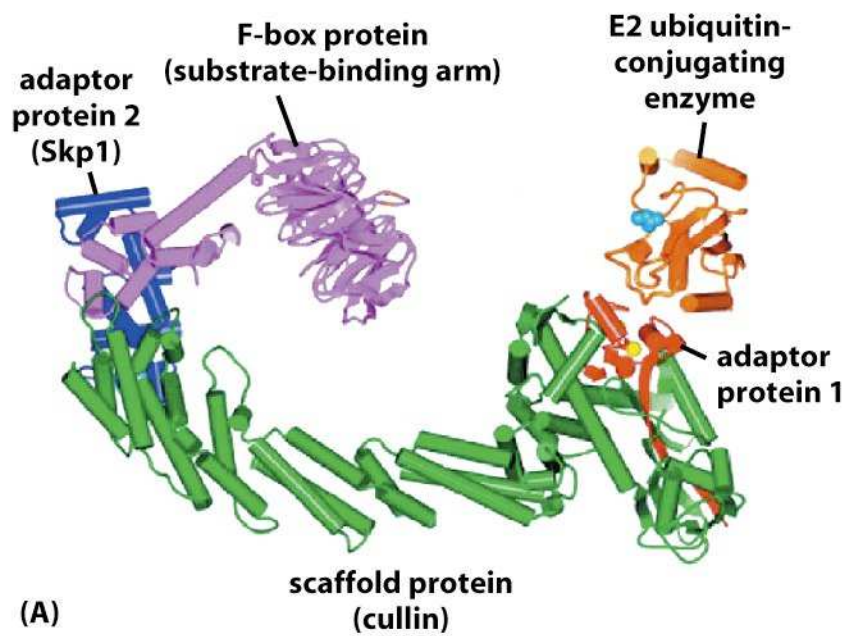


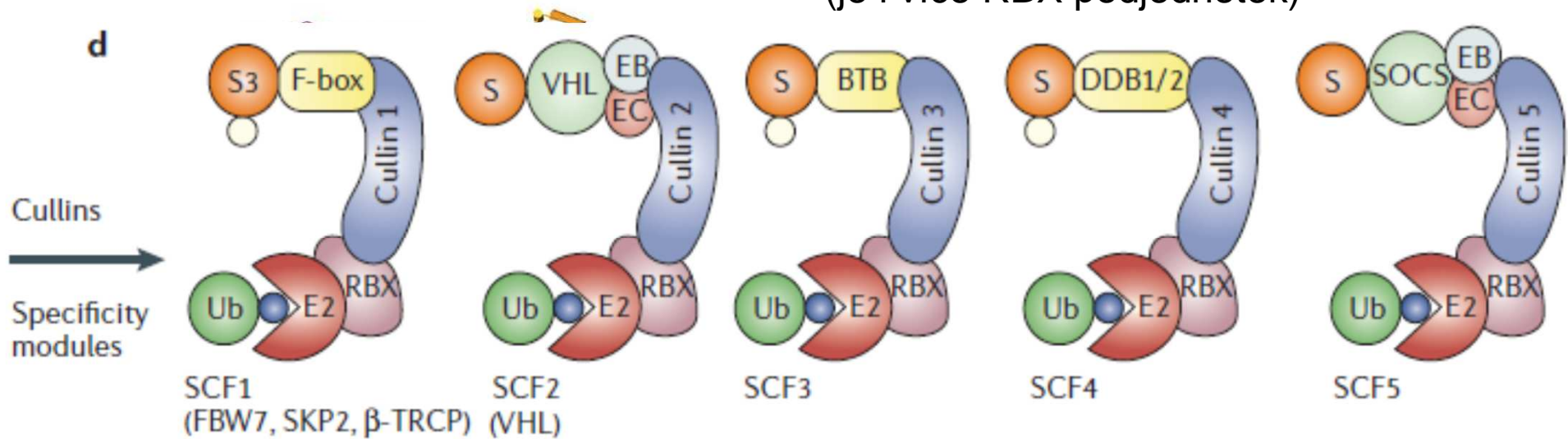
Figure 3-79 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



(A)

Některé komplexy jsou modulární – např. SCF (Skp-cullin-Fbox)  
různé cullin nebo Fbox (adaptor) molekuly

- různé komplexy rozeznávají různé substráty (ubikvitinace)
- delece jednoho F-box proteinu/genu eliminuje pouze subset substrátů
- delece jednoho cullin proteinu/genu eliminuje větší spektrum substrátů
- delece jednoho RBX (RING-finger) proteinu/genu eliminuje většinu substrátů (je i více RBX podjednotek)



Uetz and Finley, FEBS Lett. 2005

Figure 3-79 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Network/interaktom SCF komplexů a jejich substrátů

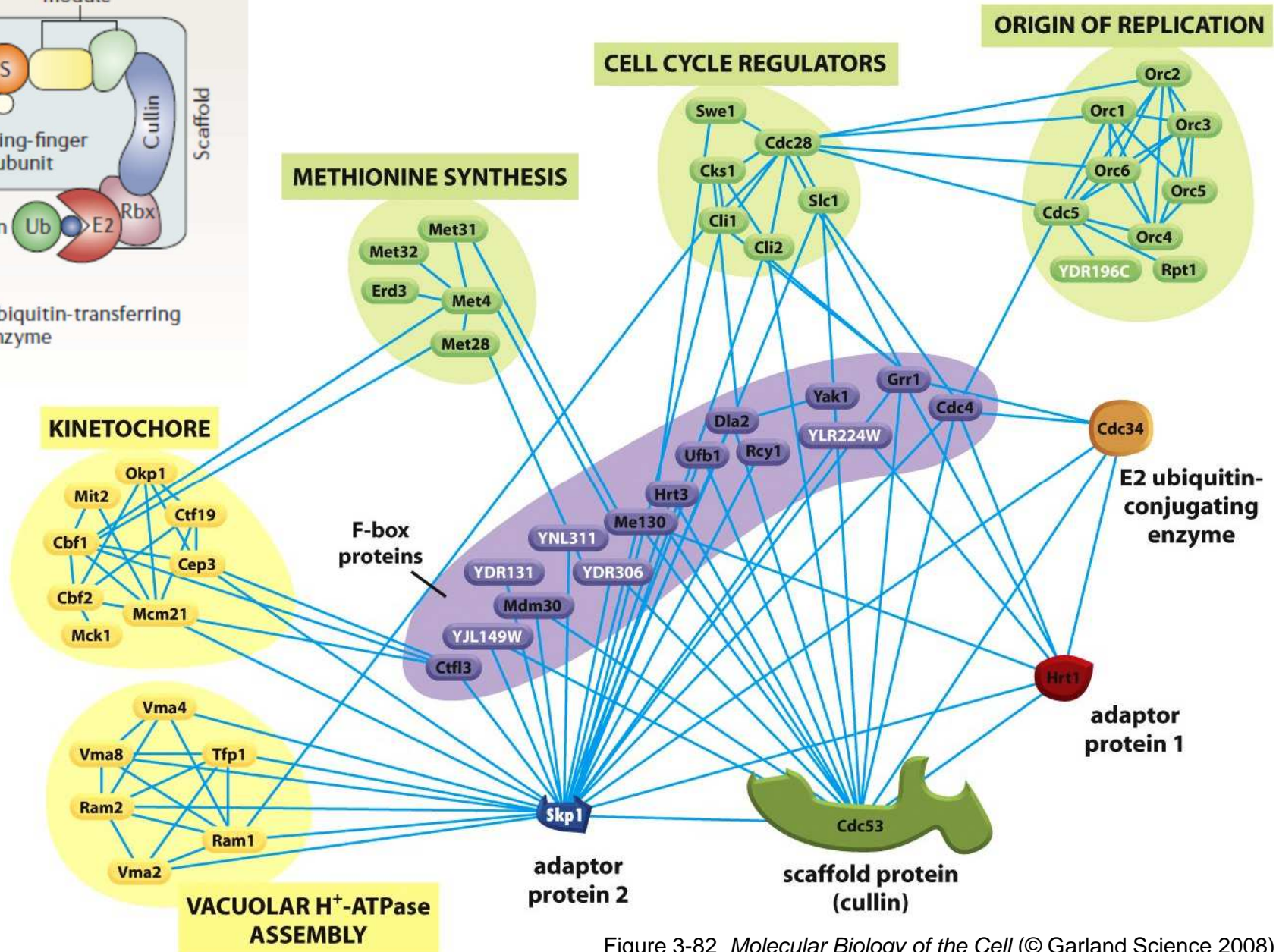
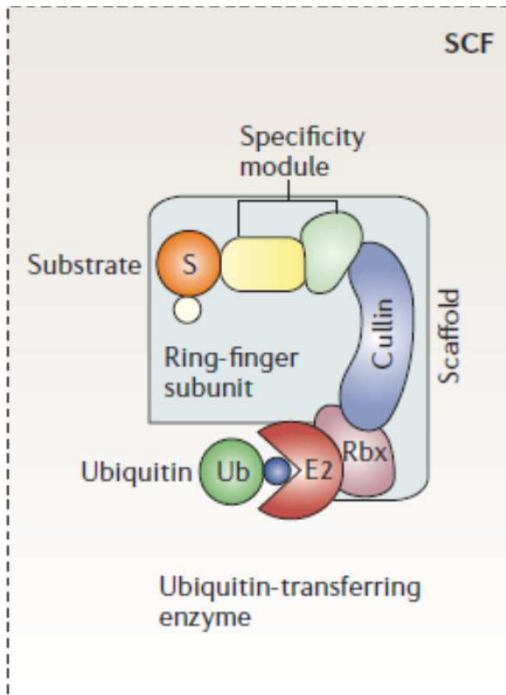


Figure 3-82 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Závěry

- 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 – interakce mohou být modulovány posttranslačními modifikacemi (dynamické komplexy)

