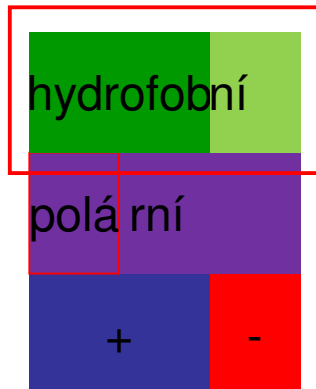


Minule: metody ... moduly

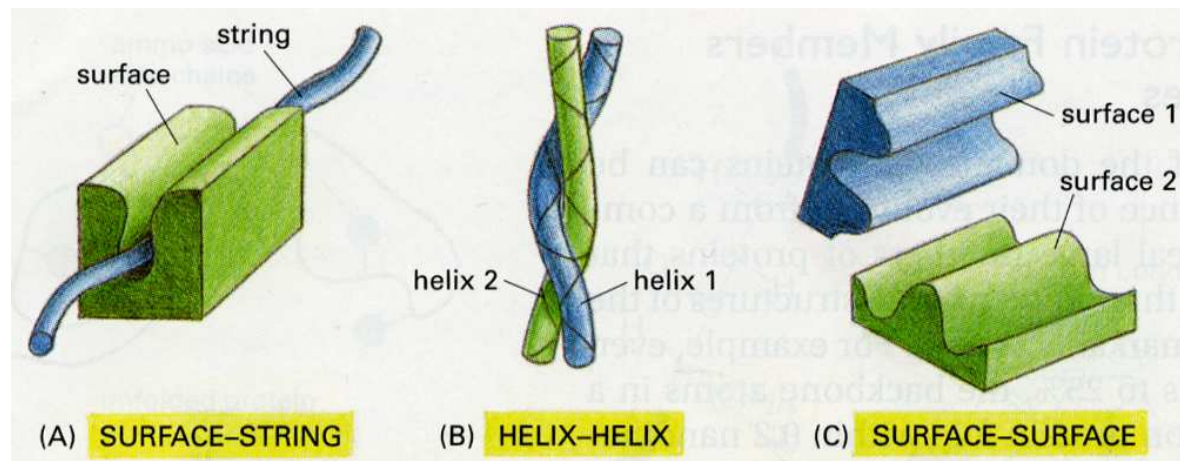
## Osnova 2. přednášky

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

primární struktura

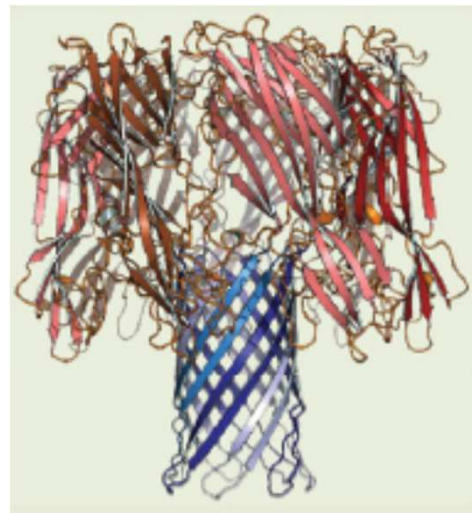


sekundární a terciární struktura



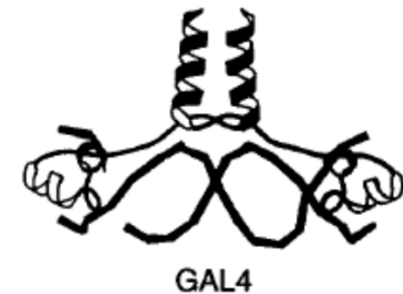
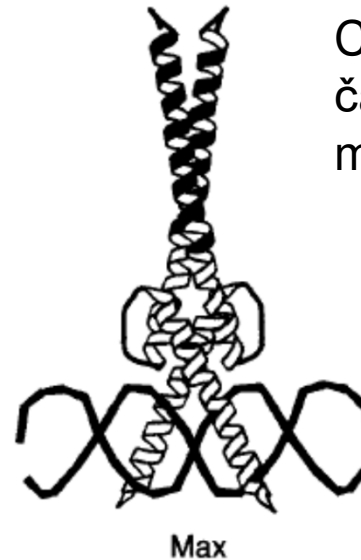
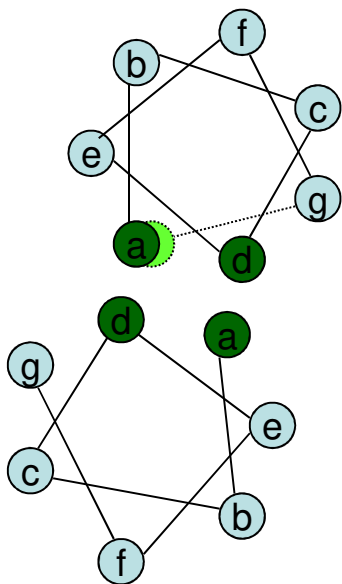
# Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím protein-proteinových interakcí

- 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



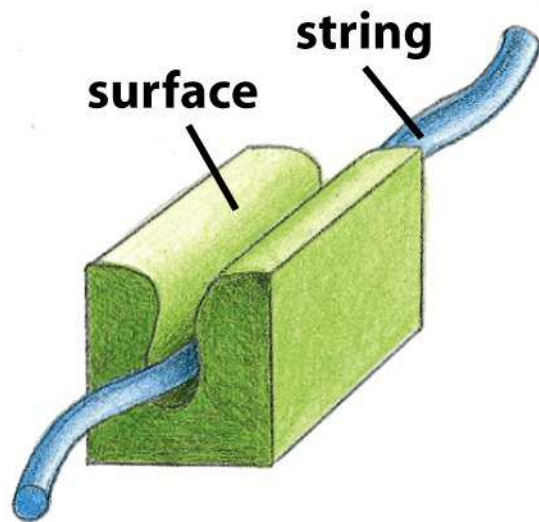
# Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím hydrofobních protein-proteinových interakcí

- **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



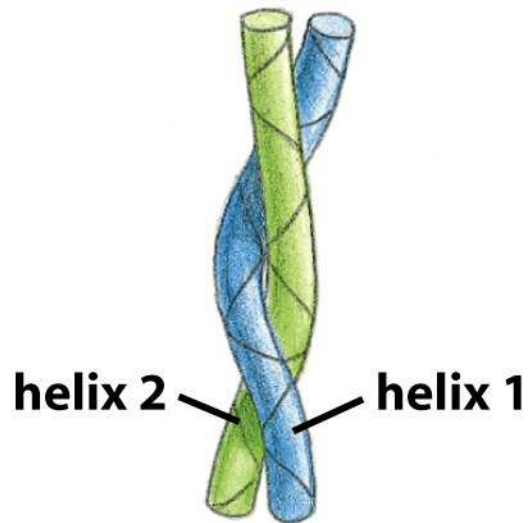
Coiled-coil doména je častým **dimerizačním** modulem proteinů

# Typy protein-proteinových interakcí

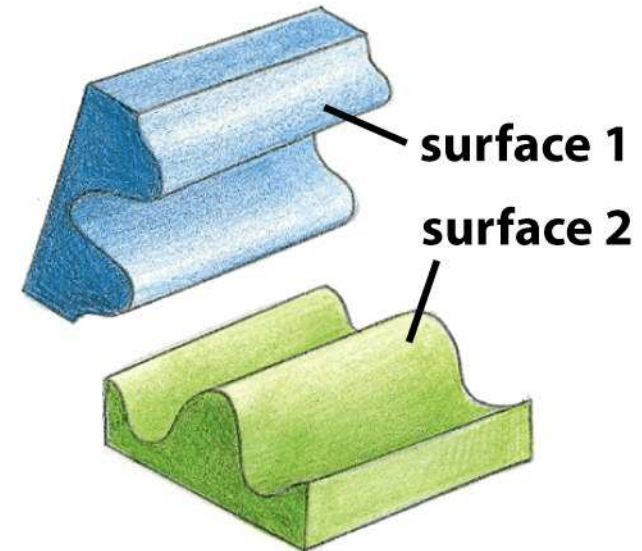


(A) SURFACE-STRING

doména-motif



(B) HELIX-HELIX



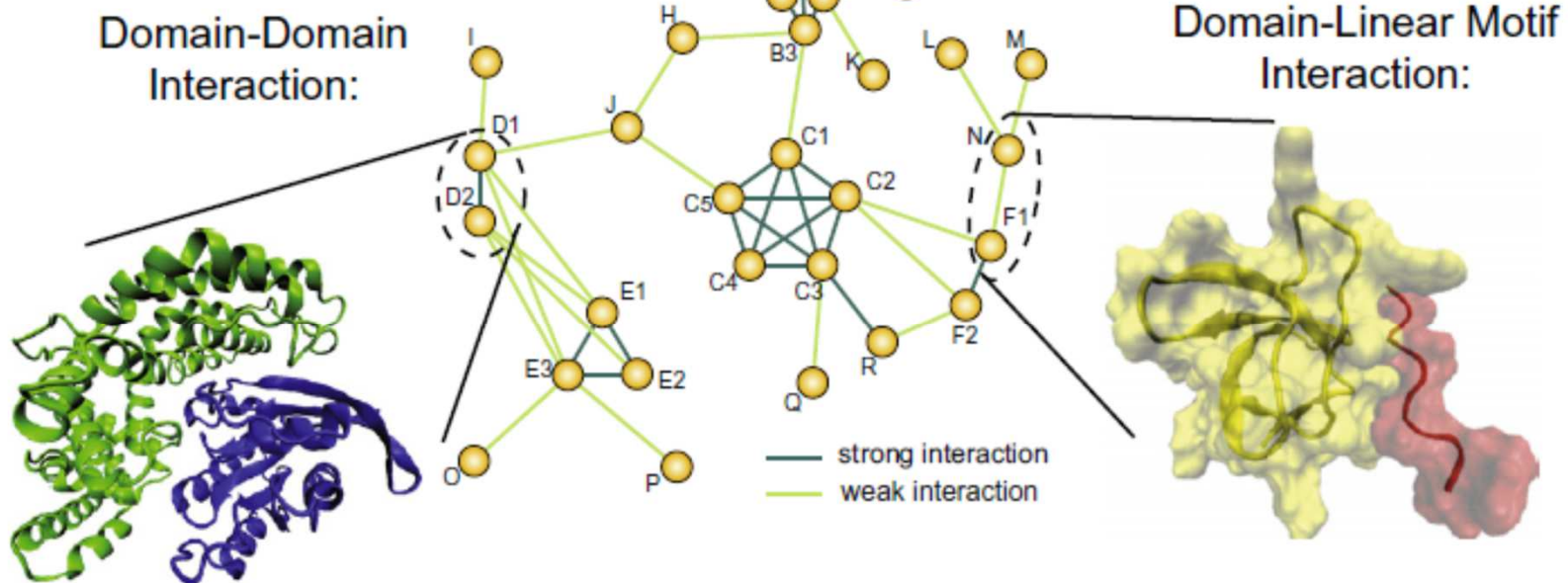
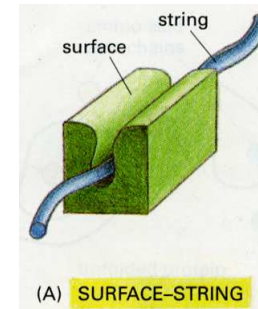
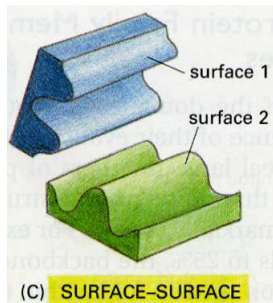
(C) SURFACE-SURFACE

doména-doména

- 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 – CoZold, cvičení **CG031**)

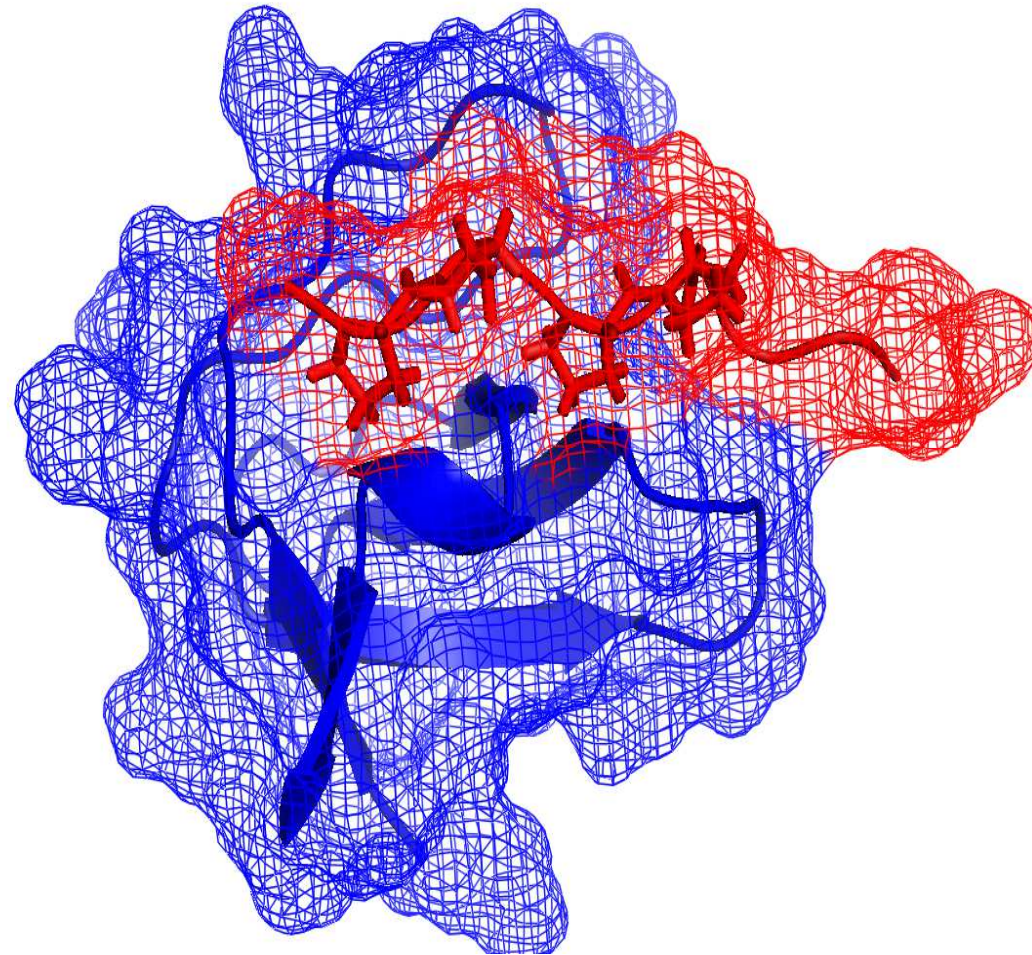
# silné vs slabé interakce



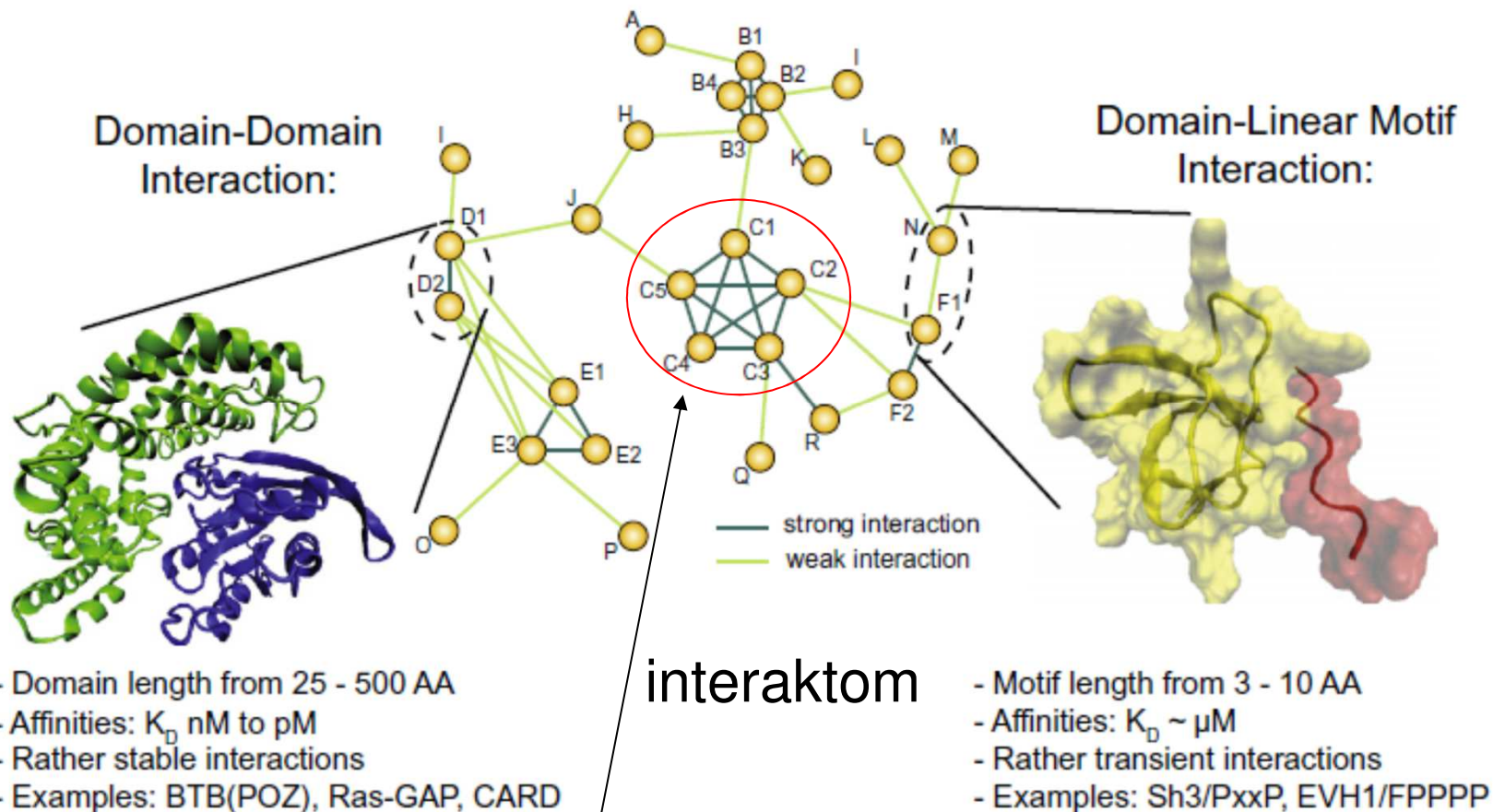
- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities:  $K_D$  nM to pM - stabilní/komplexy
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD

- Motif length from 3 - 10 AA  $\sim 350A^2$
- Affinities:  $K_D \sim \mu M$  - přechodné interakce
- Rather transient interactions
- Examples: Sh3/PxxP, EVH1/FPPPP
- regulace PTM - vazba na fosfo-, acetyl ...

- Interakční plocha  $500-10000A^2$  (vs pro ligandy  $100-600A^2$ )



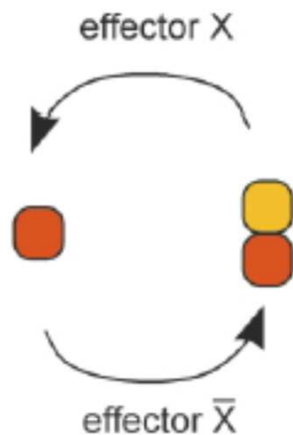
SH3 domény vážou **prolin-rich** (PxxP) peptidy PDB: 4RTV



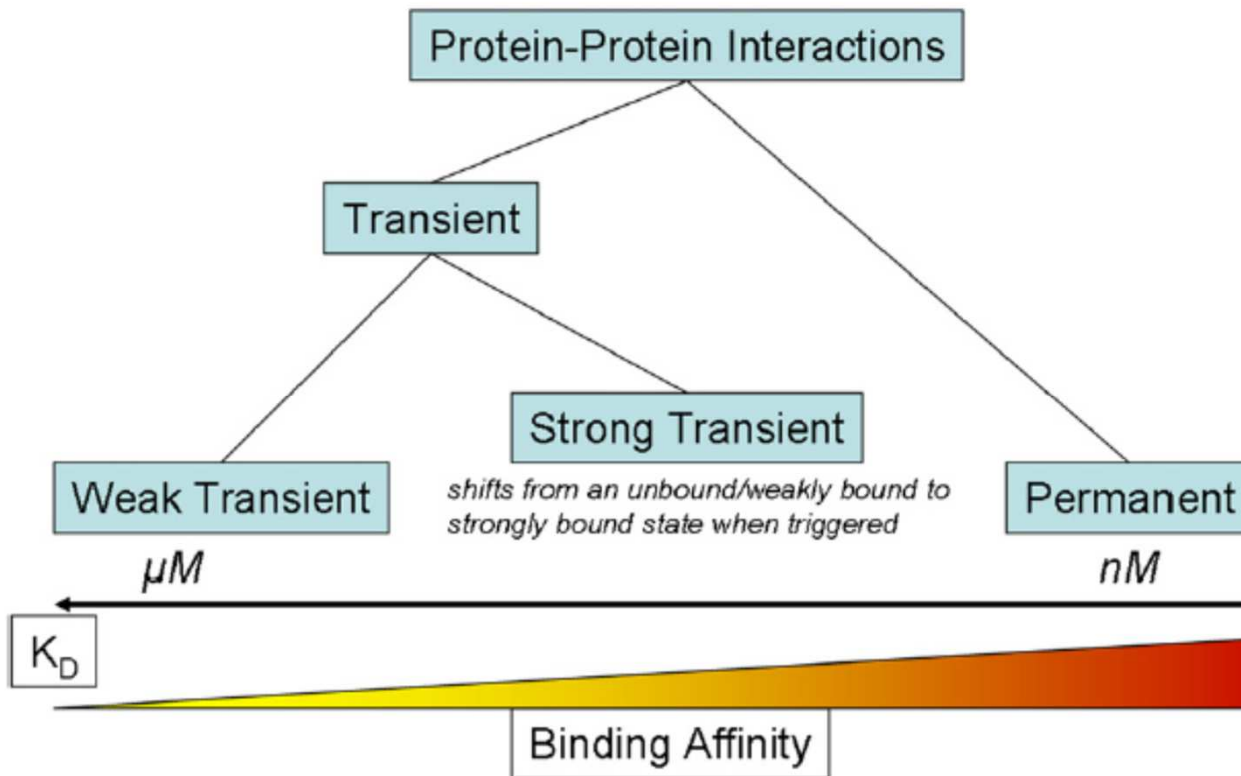
Bader et al, FEBS Lett, 2008

- 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

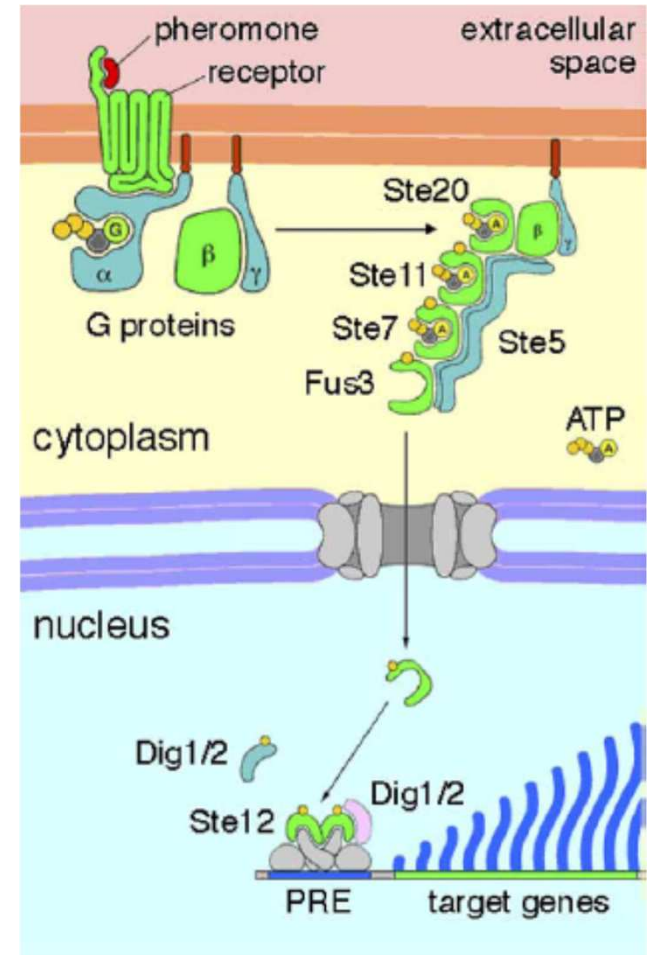
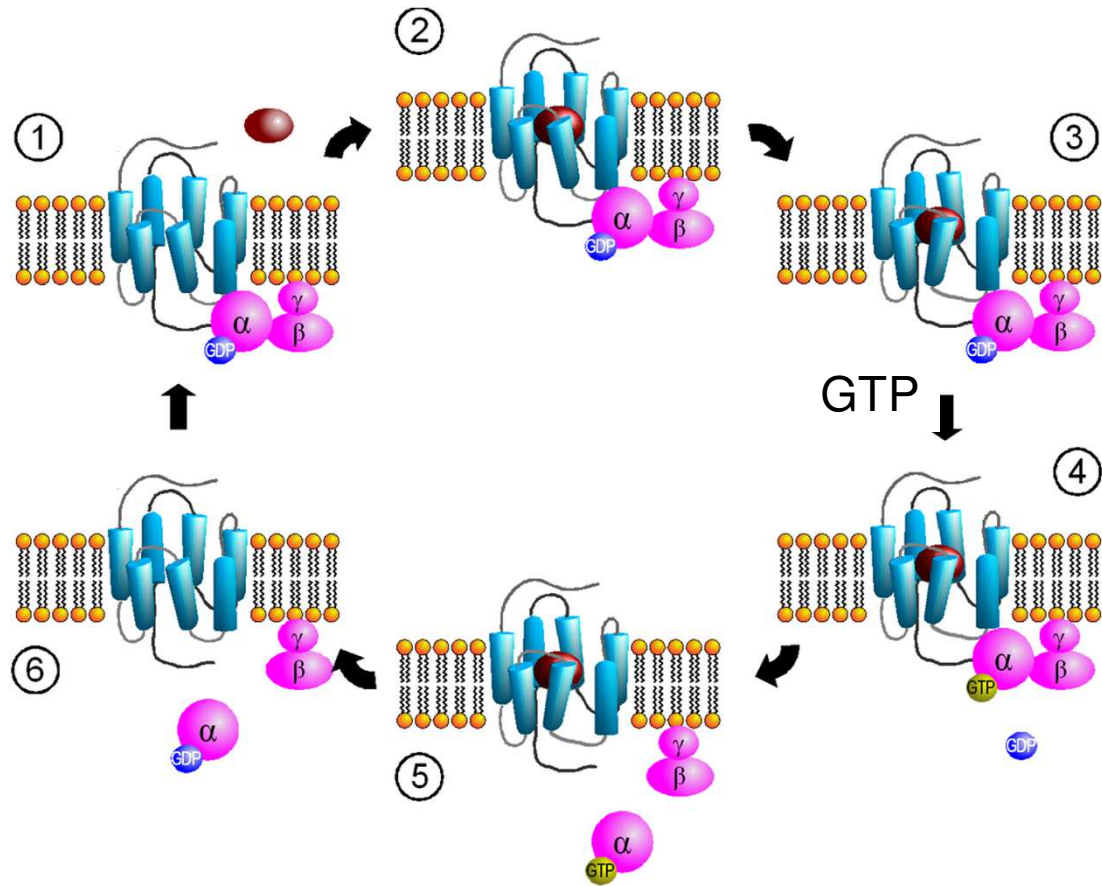
X:  $\Delta$  pH,  $\Delta$  temperature,  $\Delta$  ionic strength

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.  $PO_4$ )

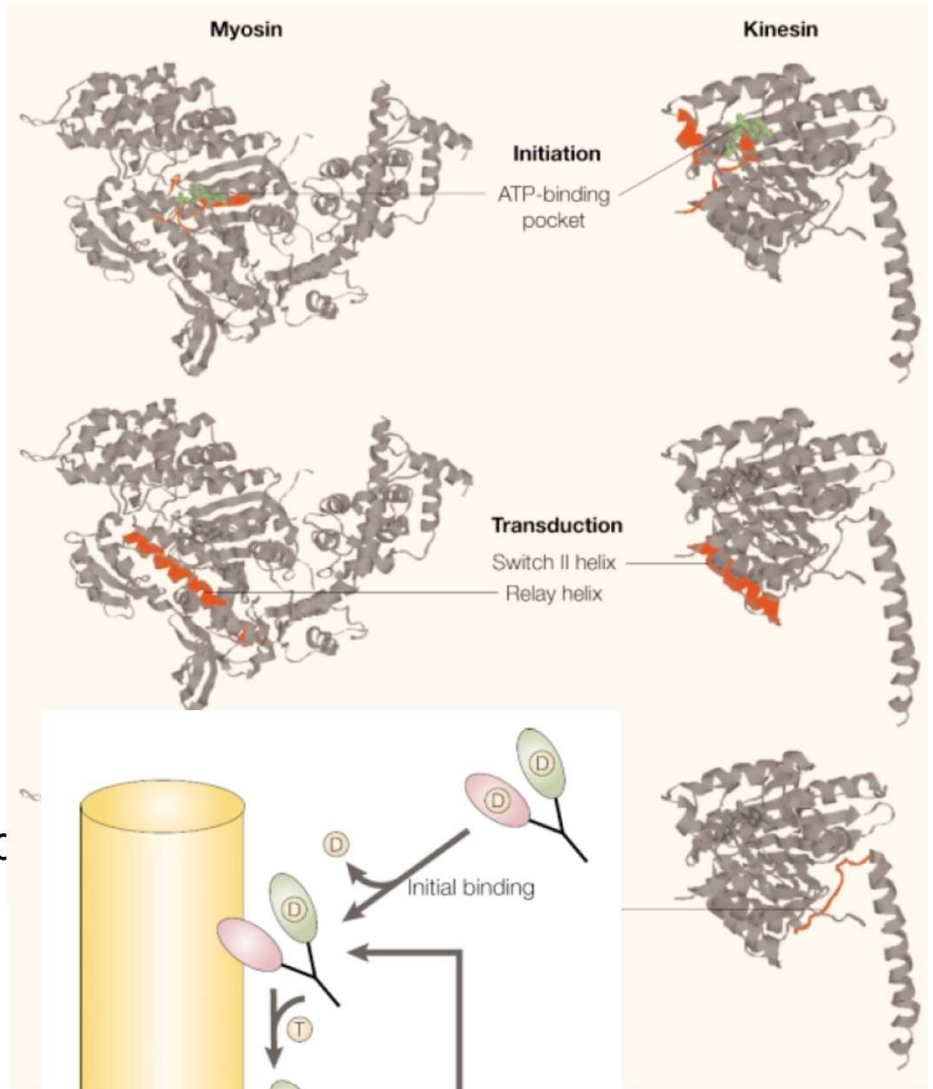
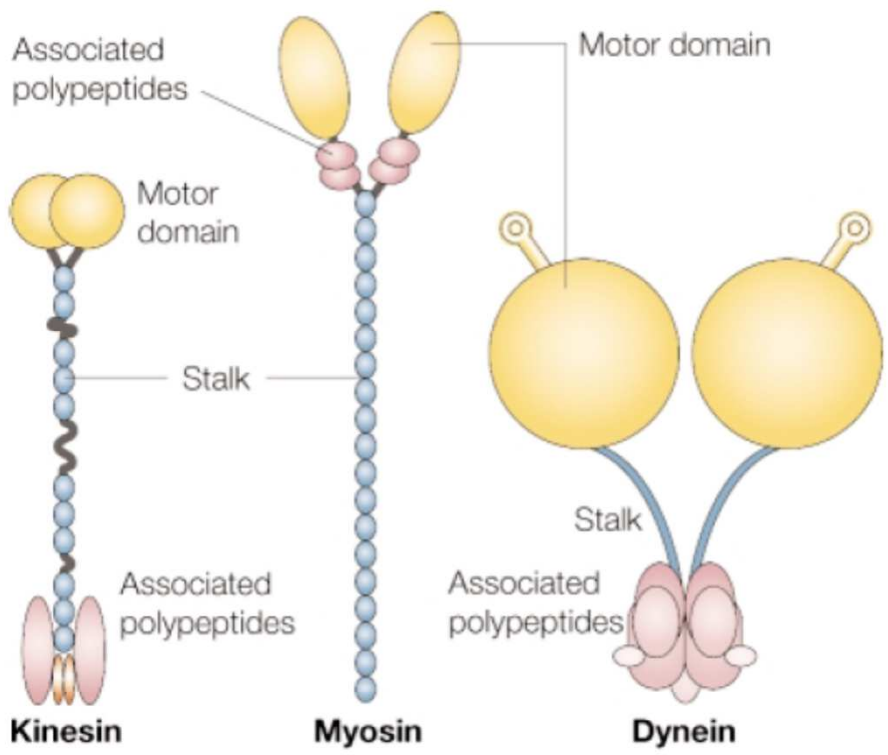


Nooren a Thornton, JMB, 2003  
Perkins et al, Structure, 2010

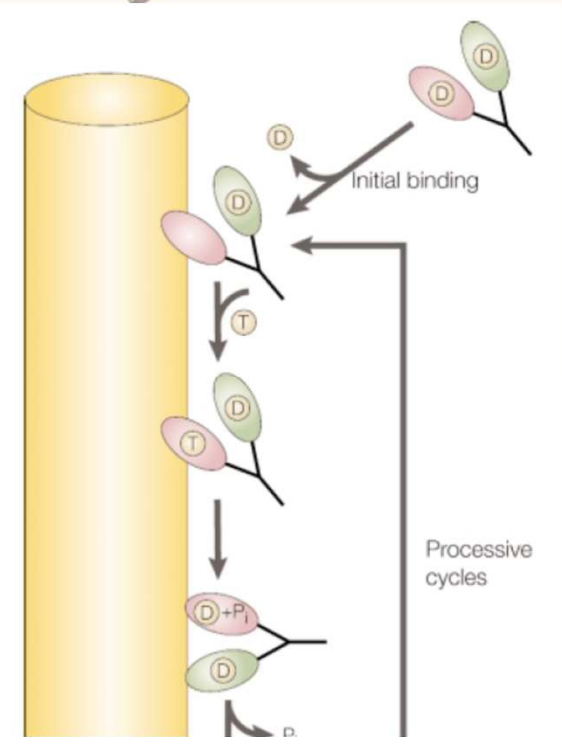
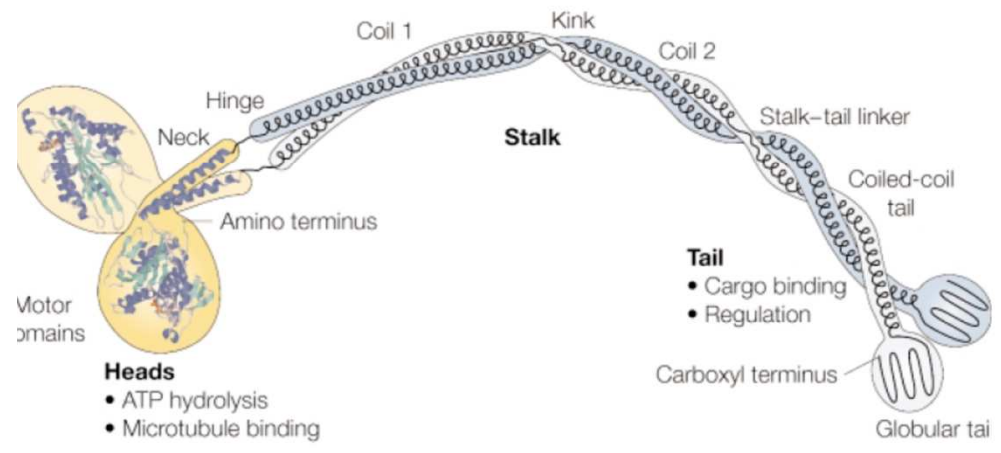




Protein-proteinové interakce moduluji velmi často GTP/GDP, ATP/ADP ... G-proteiny spolu interagují s 1000x vyšší afinitou za přítomnosti GDP než pokud je na G $\alpha$  navázané GTP (viz Ras) – dochází ke konformační změně – „přenáší“ signál



Woehlke, NRMCB, 2000



Processive cycles

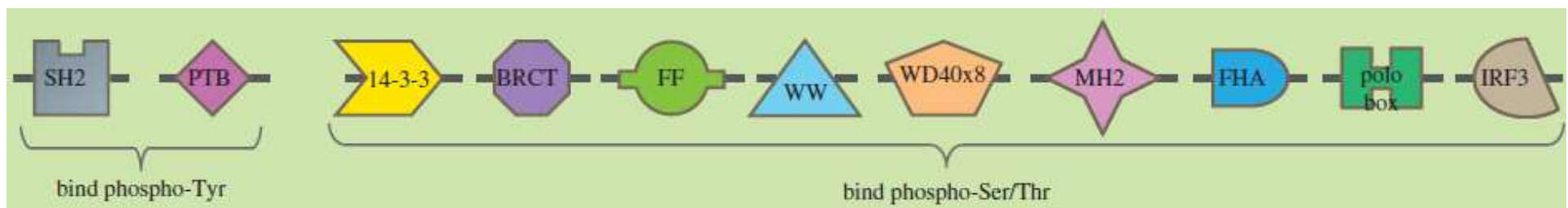
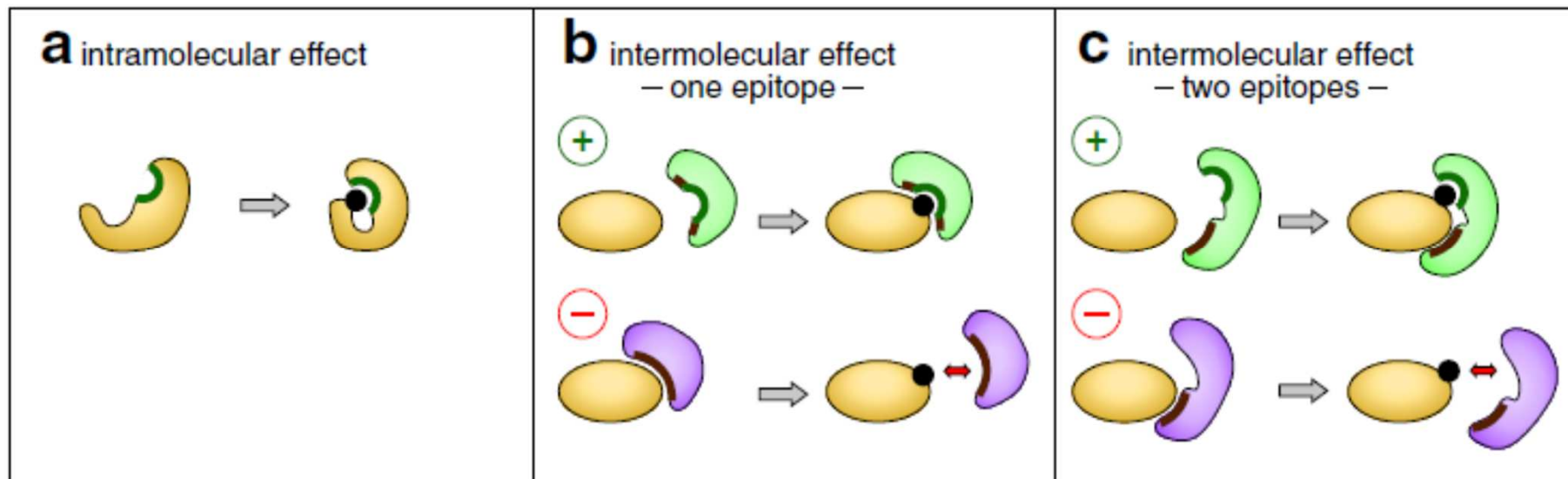
# výskyt domén v různých organismech

<i>S. pombe</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>C. elegans</i>		<i>A. thaliana</i>		Interpro name
Proteins	Rank	Proteins	Rank	Proteins	Rank	Proteins	Rank	Proteins	Rank	Proteins	Rank	
213	1	267	1	436	5	231	4	191	7	331	5	ATP/GTP-binding site motif A (Ploop)
114	2	97	3	277	8	183	5	102	19	210	10	G protein $\beta$ WD40 repeats
111	3	119	2	579	3	377	2	450	2	1,049	1	Eukaryotic protein kinase
80	4	61	5	307	7	182	6	97	21	255	8	RNA binding region RNP1
67	5	63	4	155	20	101	17	80	27	148	13	Helicase C-terminal domain
44	6	33	12	215	15	120	11	126	12	379	4	RING finger
38	7	33	12	150	21	92	18	46	43	125	17	TPR repeat
36	8	46	8	44	64	45	34	55	37	98	26	Sugar transporter
33	9	42	9	75	40	67	28	61	36	103	25	ABC transporter family
32	10	51	7	712	2	403	1	154	10	115	20	Zinc finger, C2H2 type
14	23	10	30	24	82	17	61	25	60	17	83	BRCT domain
8	29	9	31	8	98	9	68	6	79	13	87	Replication factor C conserved domain
5	32	5	35	4	102	6	70	3	82	5	95	DNA directed DNA polymerase family $\beta$
6	31	6	34	12	94	13	64	5	80	8	92	MCM family
5	32	3	37	3	103	4	72	2	83	6	94	FIZZY/CDC20 domain
21	16	23	18	220	14	82	23	62	35	3	97	Src homology 3 (SH3) domain
21	16	26	16	253	11	89	22	75	31	27	73	PH domain
9	28	11	29	112	29	47	40	110	16	21	79	Tyrosine-specific protein phosphatase and dual-specificity protein phosphatase family
27	13	52	6	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	Fungal transcriptional regulatory protein
21	16	32	13	43	65	36	45	32	54	65	42	Permease for amino acids and related compounds
7	30	2	38	26	80	20	58	15	70	24	76	Chromodomain

## Vliv PTM na PPI

Post-translační modifikace mění povrch (tvar, náboj) – vytváří specifický nový povrch

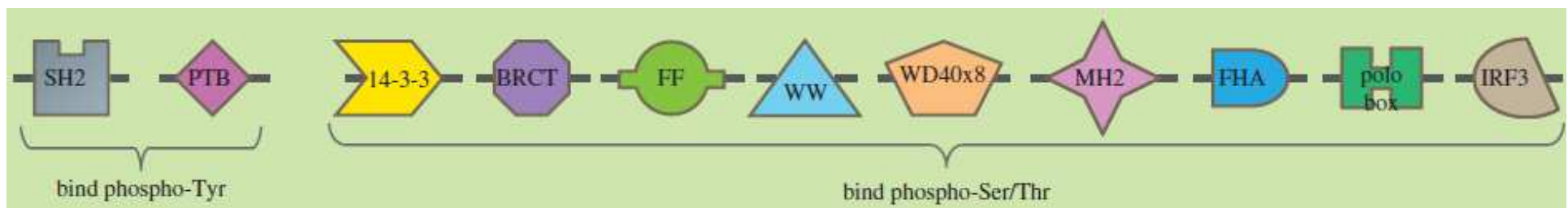
- může blokovat nebo posílit vazbu partnera

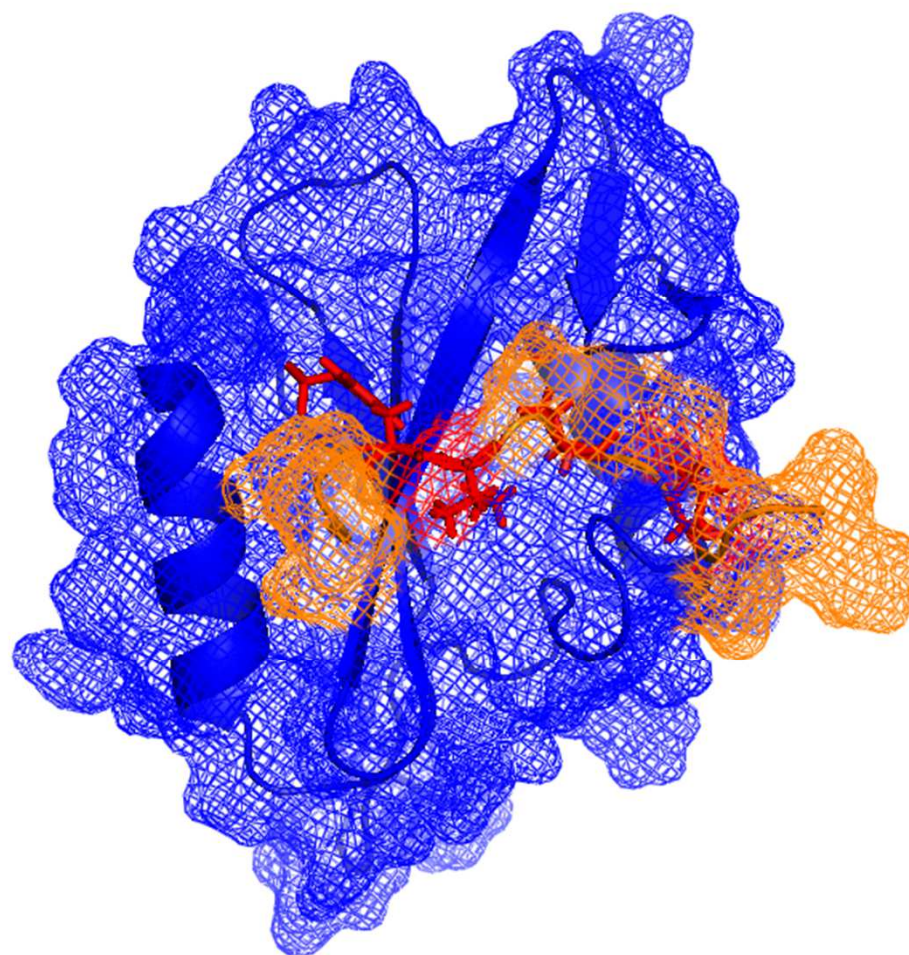


## Vliv PTM na PPI

Post-translační modifikace 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





SH2 domény váží **fosfopeptidy** – dvě vazebná místa (fosfoTyr a peptid – peptid určuje vazebnou specificitu) – změna tvaru i náboje interakčního povrchu (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

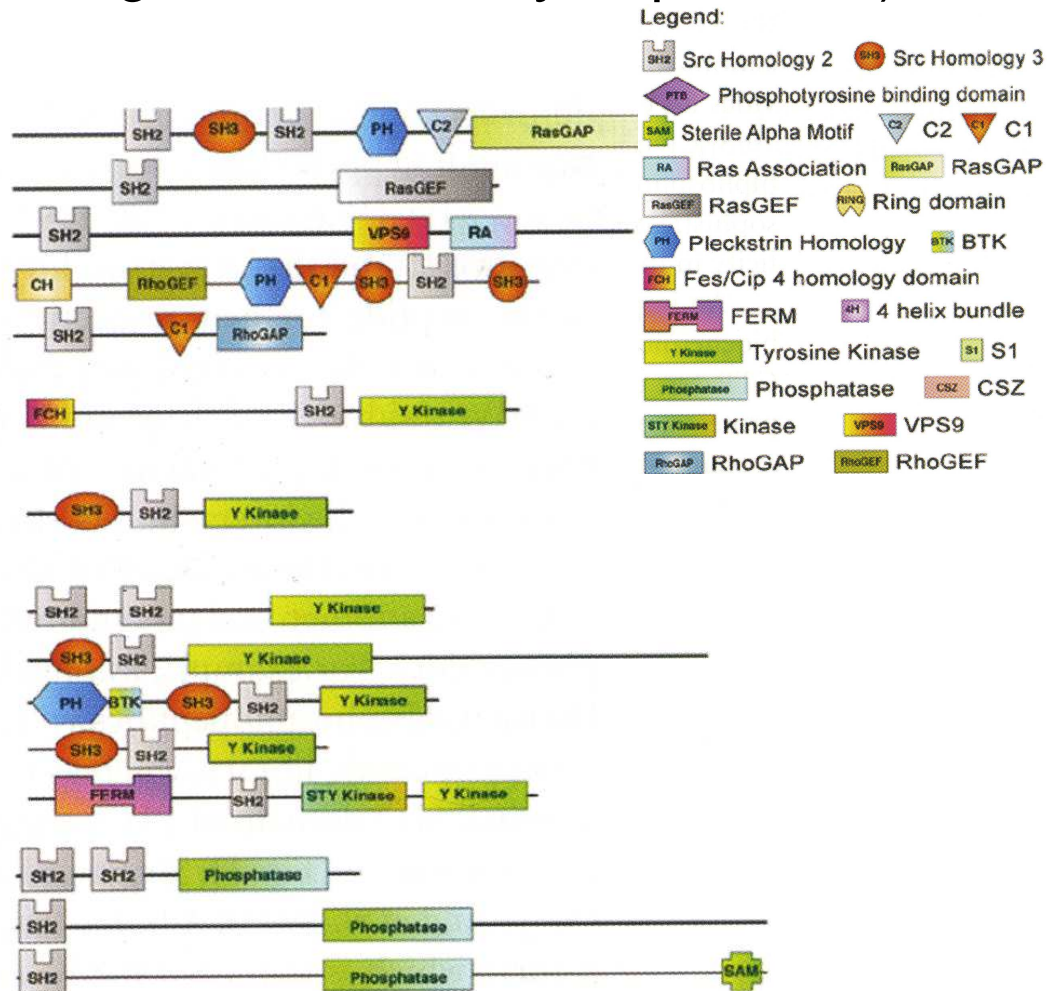
- Ras-GAP
- Nsp1,2,3
- Rin1
- Vav1,2,3
- Chimerin

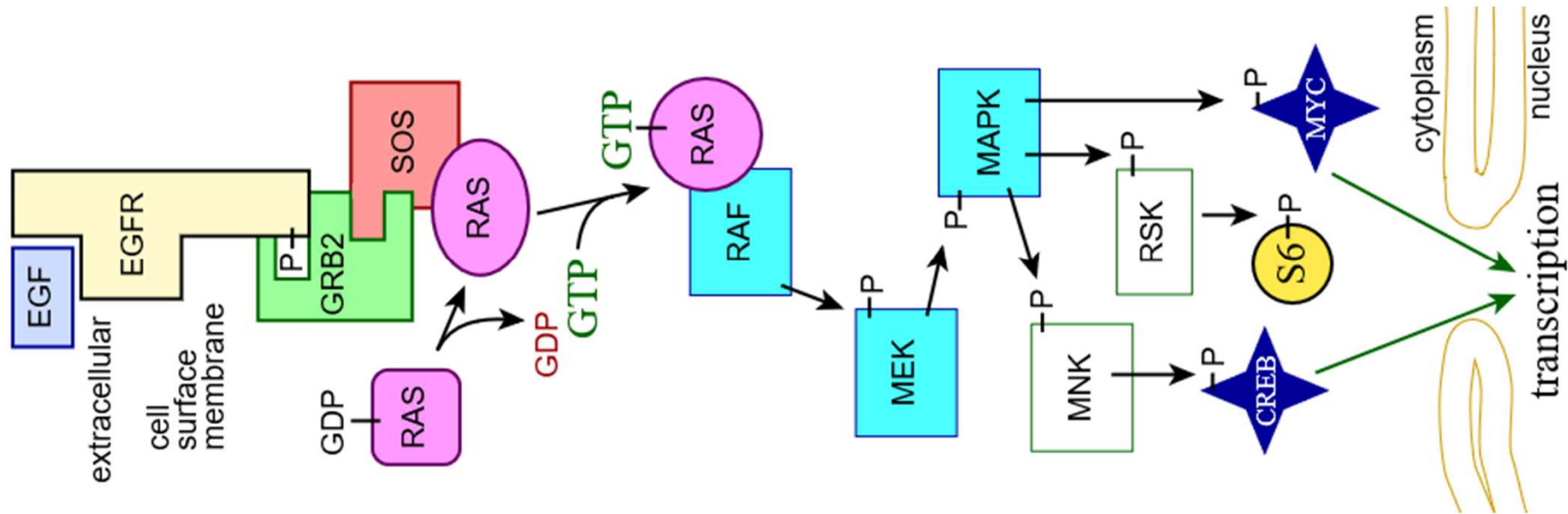
Kinases

- 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



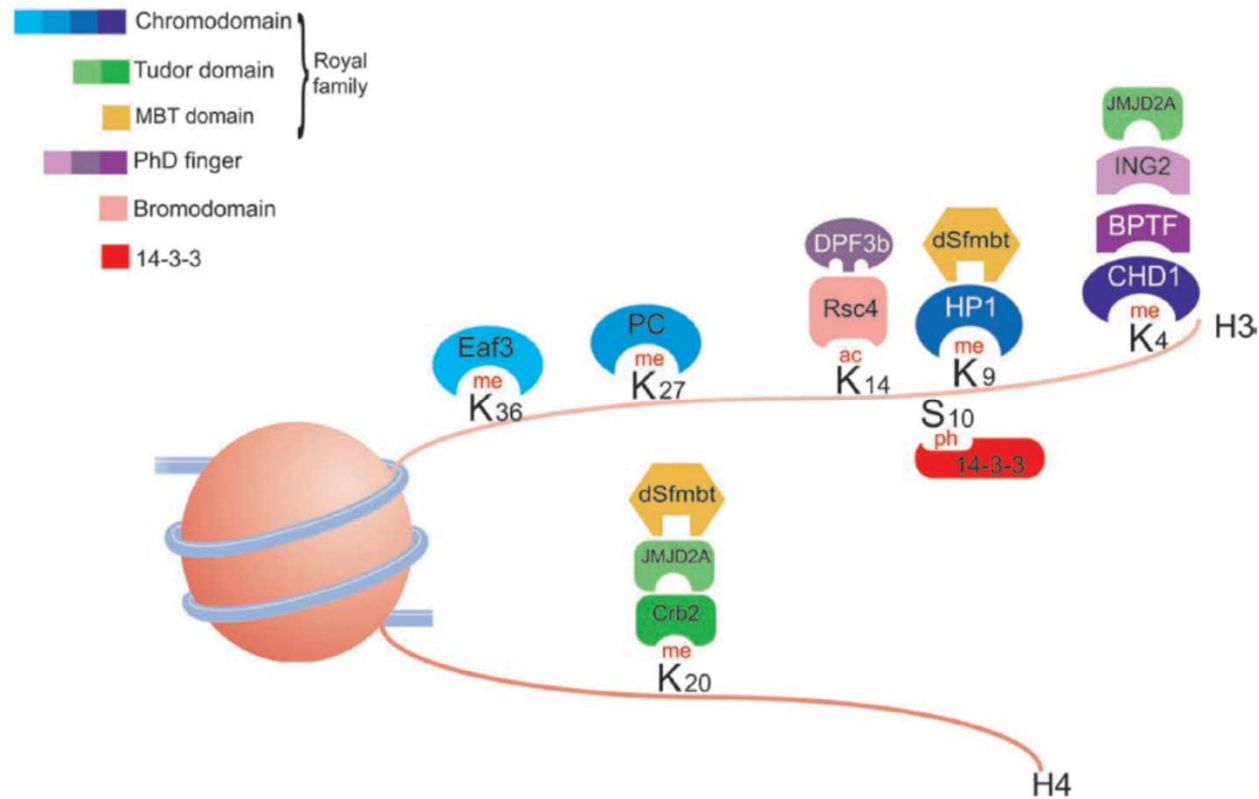


Signální Ras dráha: EGF váže EGFR (aktivuje cytoplasmatickou kinasovou doménu = autofosforylace) – SH2 v GRB2 interaguje s EGFR - SH3 domény GRB2 dimerizují s prolin-rich doménou SOS – EGFR-GRB2-SOS je aktivní (SOS = guanin nukleotid exchange faktor) a odstraní GDP z Ras – Ras může navázat GTP (podobný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

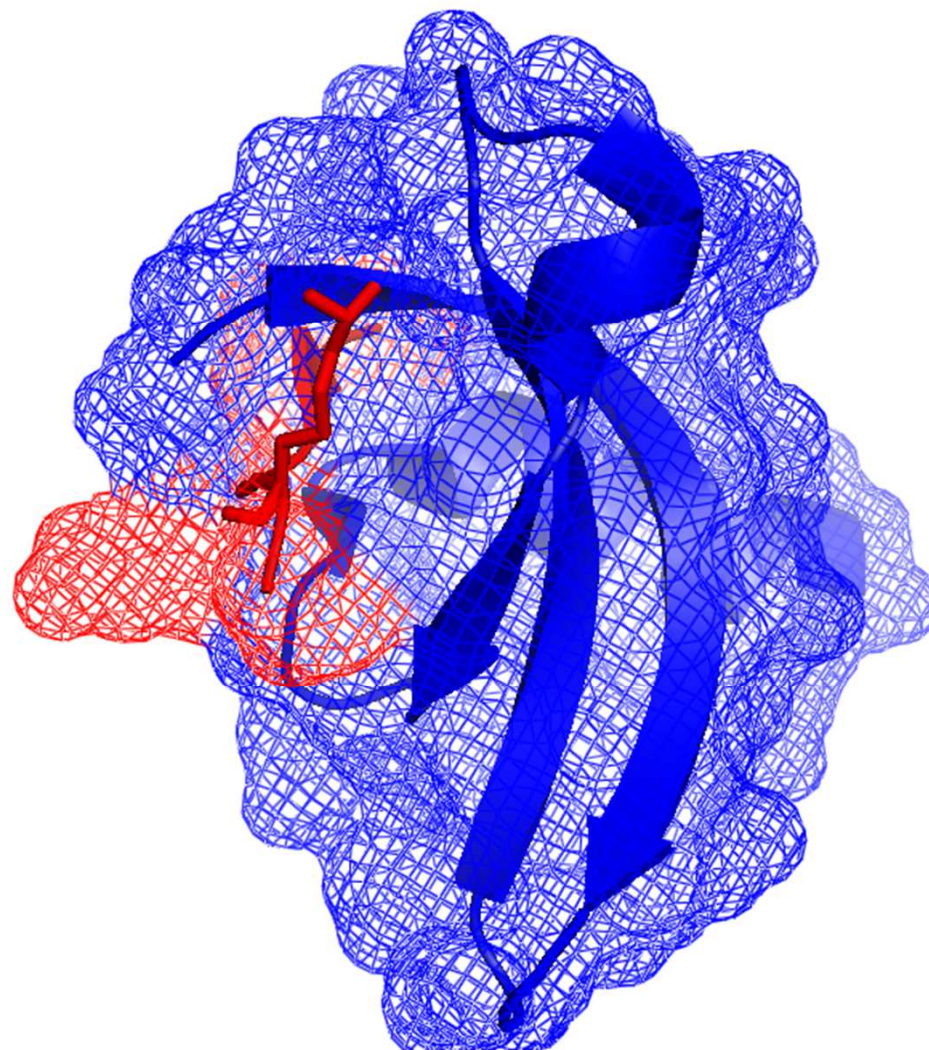
rakovina – Ras mutace stabilizující vazbu GTP mají za následek konstitutivní aktivaci (aktivace i bez EGF stimulu)



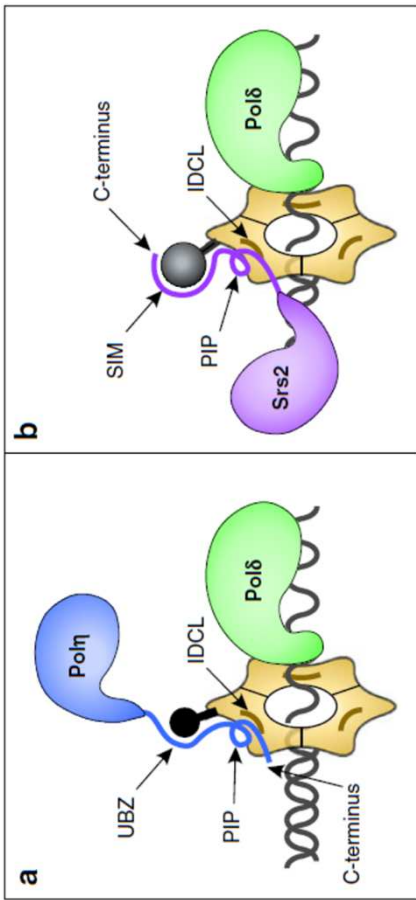
# Vliv PTM na PPI – histony H3 a H4



chromodoména HP1 navázaná na H3 lysin K9 – heterochromatin ...



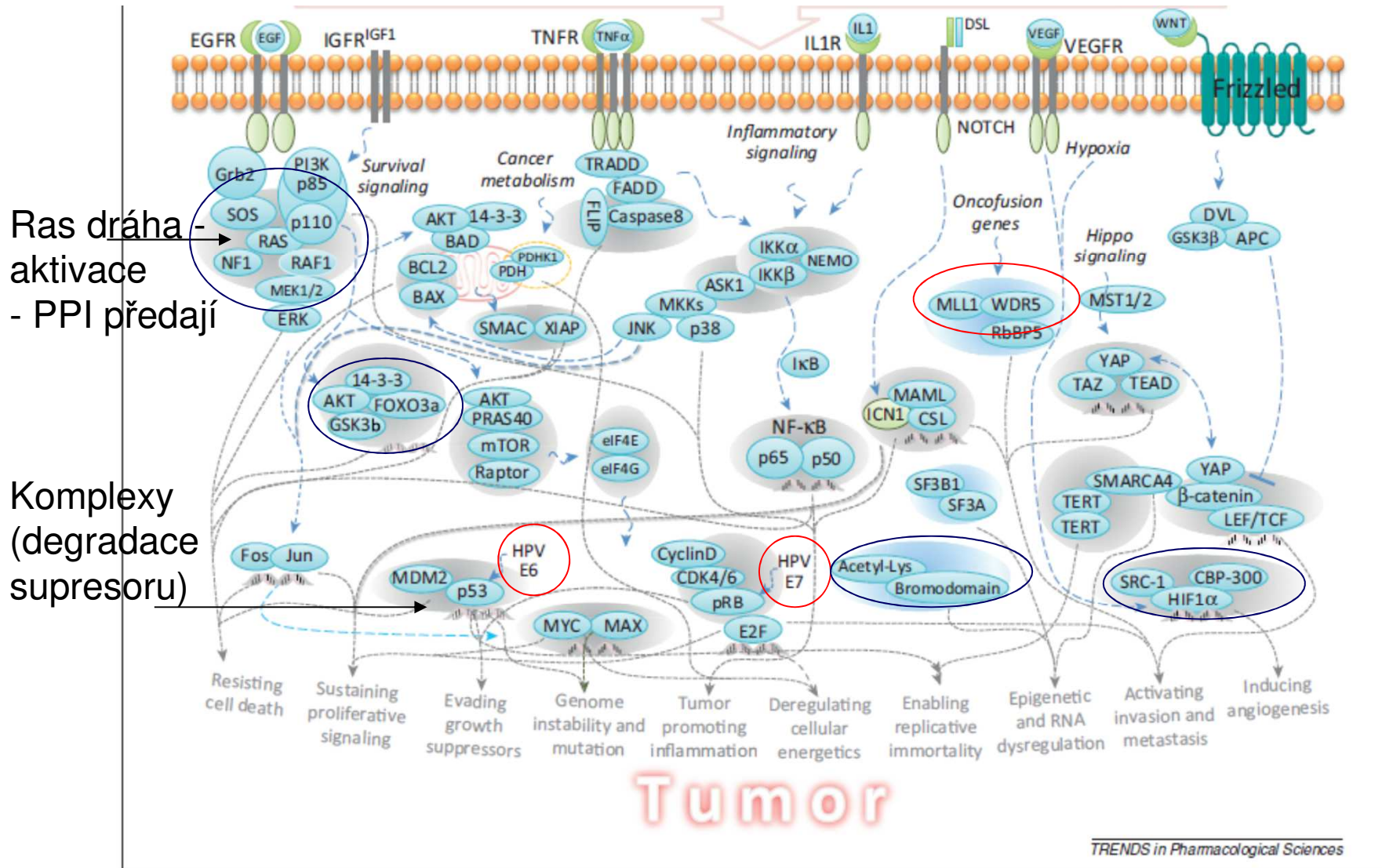
chromodoména HP1 navázaná na H3 lysin K9 – PDB: 1KNA



**Table 1** PCNA modifications and their effectors

Modification	Effector	Effect	Domains	Pathway	References
Ubiquitylation	Y family polymerases	Binding	PIP, UBZ, UBM	DNA damage bypass	Stelter and Ulrich 2003
	hELG1	Binding	?		Bienko et al. 2005
	Srs2	Binding	PIP-like SIM		
	PARI	Binding	PIP SIM		
	scElg1	Binding	PIP-like SIM		
	scRad18	Binding	SIM		
	Eco1	Dissociation (?)	PIP-like		
Sumoylation					
		Recruitment	Lys 164		
		Translesion synthesis	TLS polymerase		
		Unknown mechanism	Unknown factor(s)		
		Recruitment	Lys 164		
		Inhibition of recombination	Srs2		
		Unknown mechanism	Lys 164		
		Repulsion	Lys 127		
		Inhibition of cohesion establishment	Eco1		
			PCNA		
			PCNA deubiquitylation		Lee et al. 2010
			Inhibition of recombination		Papouli et al. 2005
			Inhibition of recombination		Pfänder et al. 2005
			Genome maintenance		Moldovan et al. 2012
			PCNA ubiquitylation		Parnas et al. 2010
			Cohesion establishment		Parker and Ulrich 2012
					Moldovan et al. 2006

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)



Ras dráha -  
 aktivace  
 - PPI předají

Komplexy  
 (degradace  
 supresoru)

**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.

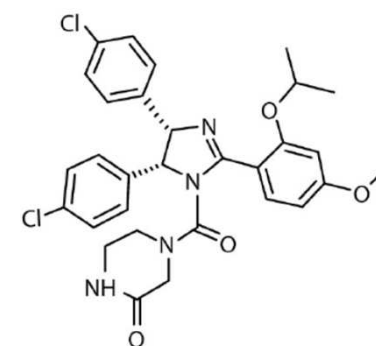
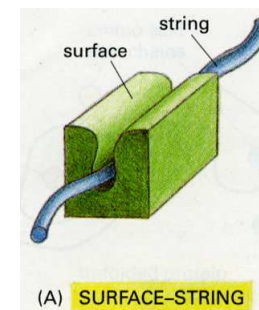
# Inhibice PPI

Problémy inhibice (vývoje léků) ...

- interakční plocha  $500-10000\text{\AA}^2$  (větší než kapsy enzymů pro malé ligandy)
- ploché bez hlubokých kapes (ne jako pro ligandy)
- hydrofobní charakter PPI (nerozpustnost léku)
- nelze vycházet z přirozených ligandů (jako u enzymů)

... ale

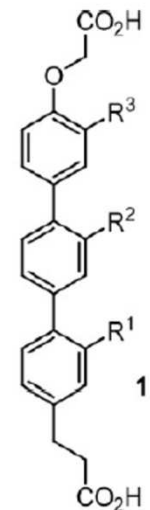
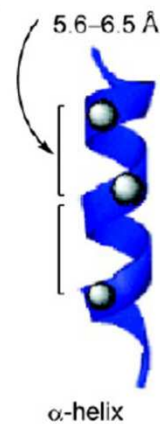
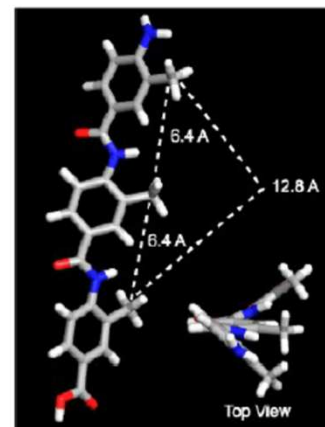
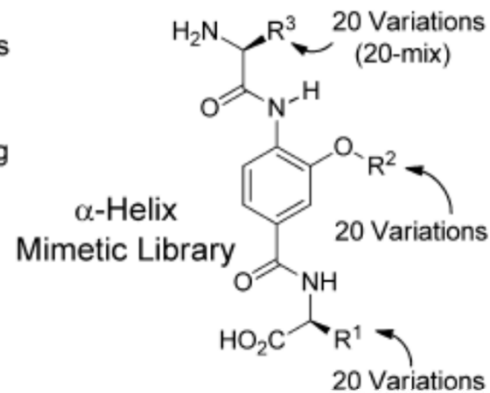
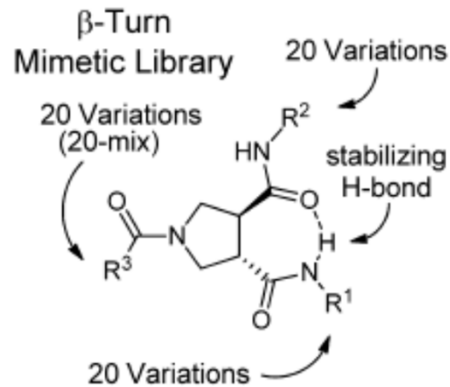
- interakce „peptid ve žlábků“ jsou relativně malé
- lze inhibovat interakci i relativně malou molekulou (hot-spot)
- vhodné je cílení na interakce regulované post-translační modifikací (viz fosfopeptidy)
- proteiny nebo mimikování peptidů



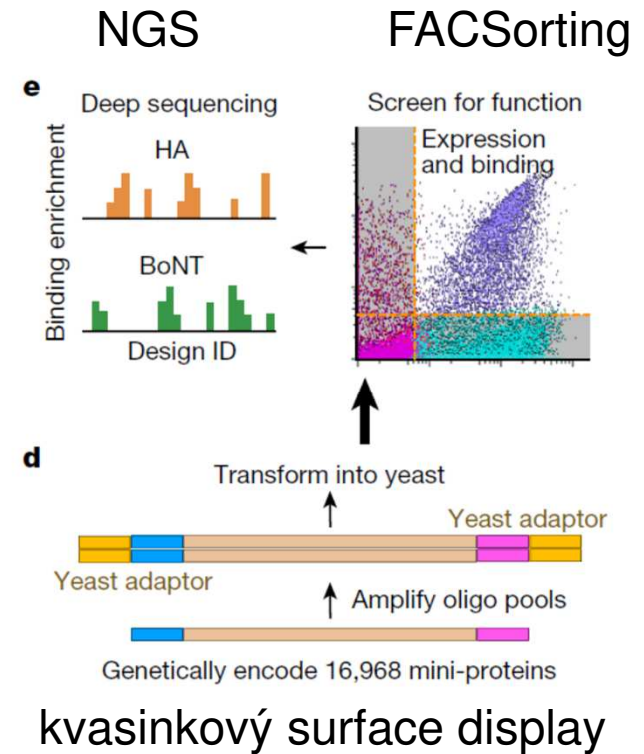
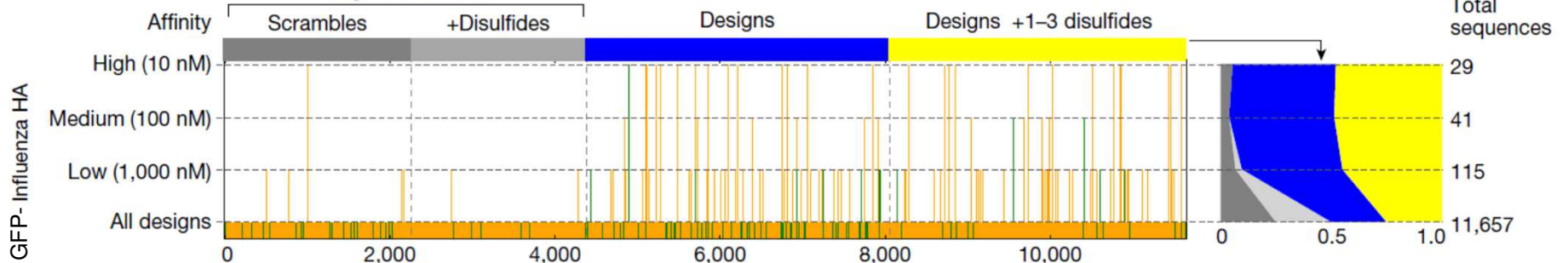
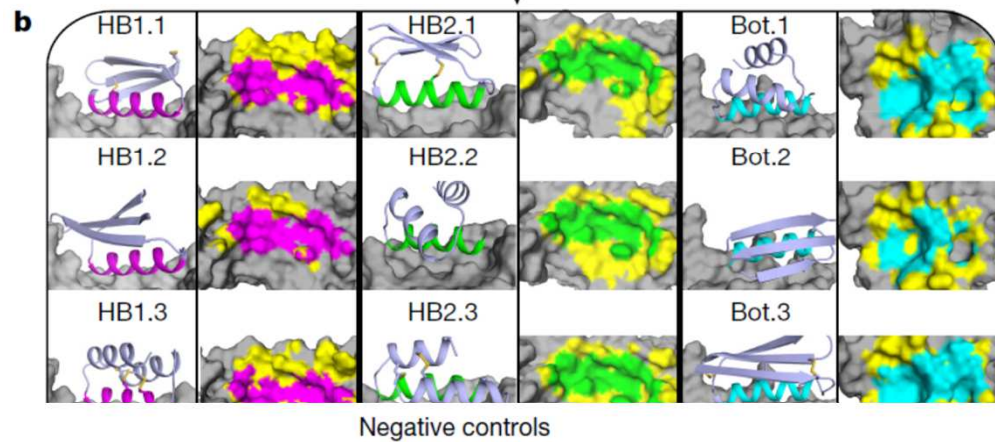
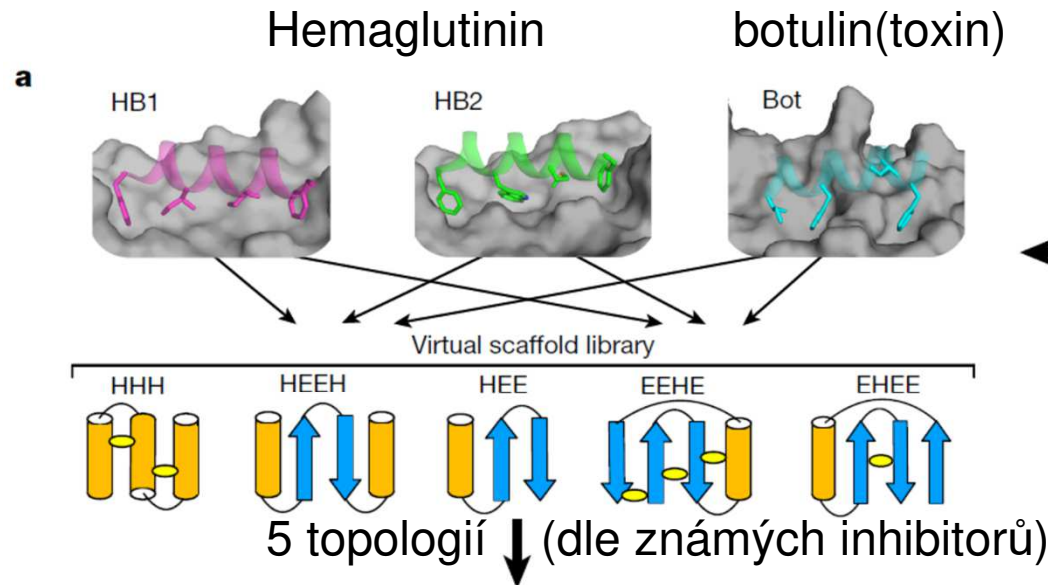
Nutlin-3a

# Inhibice PPI – mimikování peptidů

- mimikování peptidů:
  - sekundárních struktur  $\alpha$
  - sekundárních struktur  $\beta$



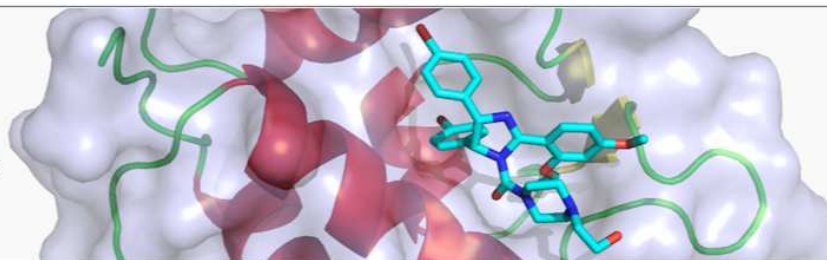
# Inhibice PPI - proteiny



40 AMK dlouhé (cca 200nt oligo) – lze syntetizovat peptidy (peptidy modifikovat)

# 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

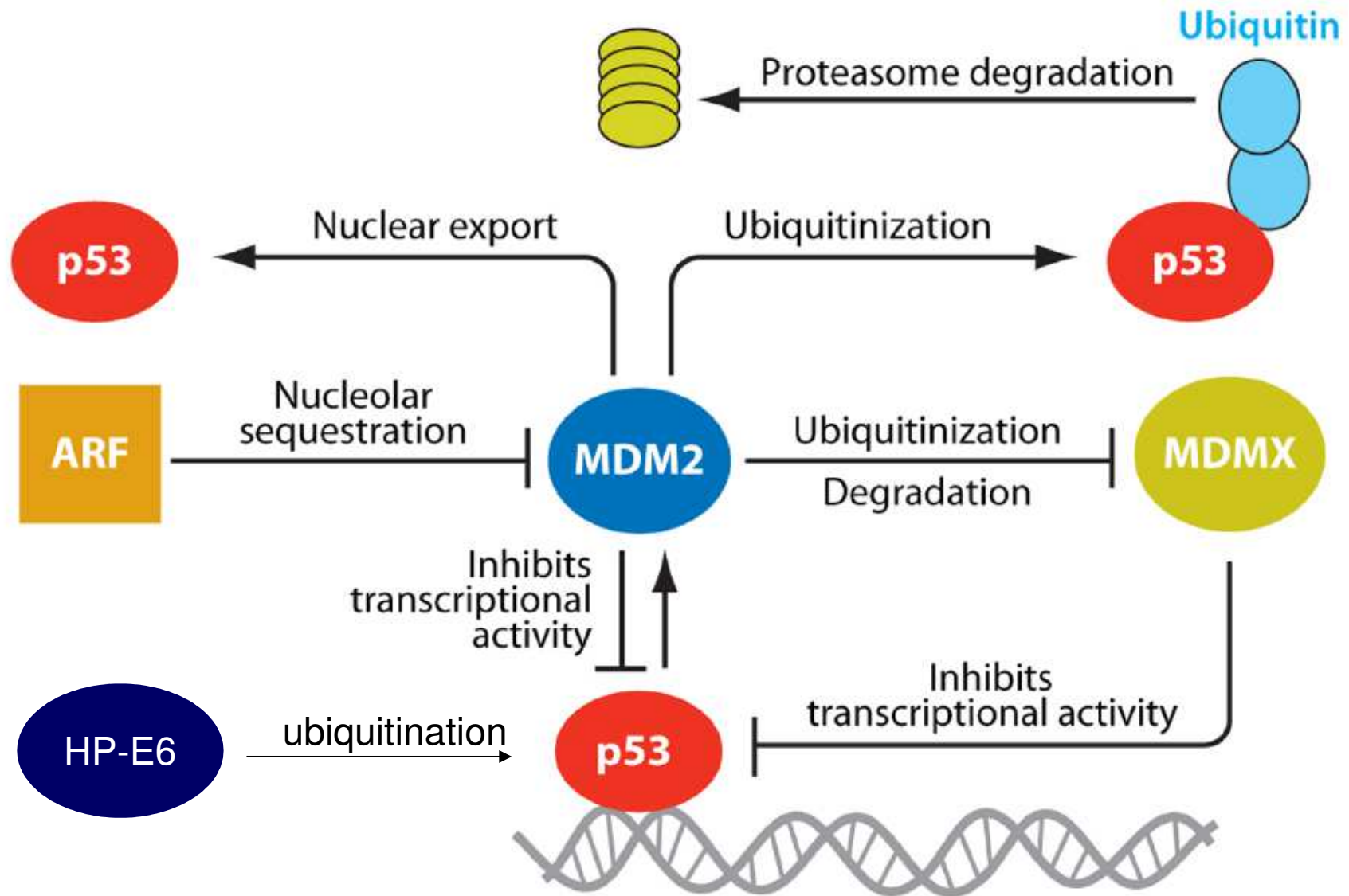
Showing 1 to 47 of 47 entries

← Previous 1 Next →

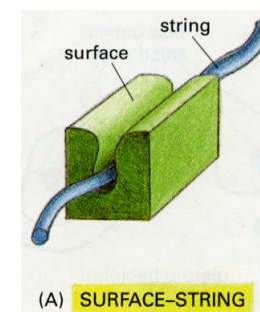
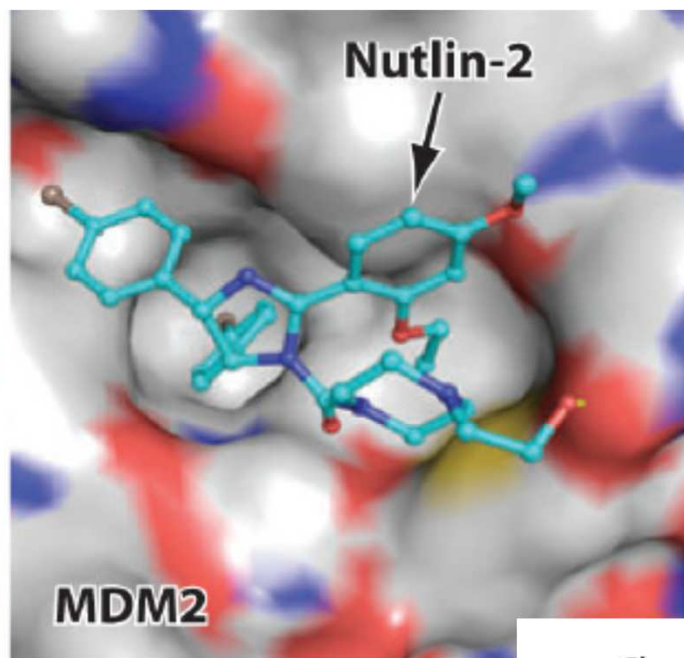
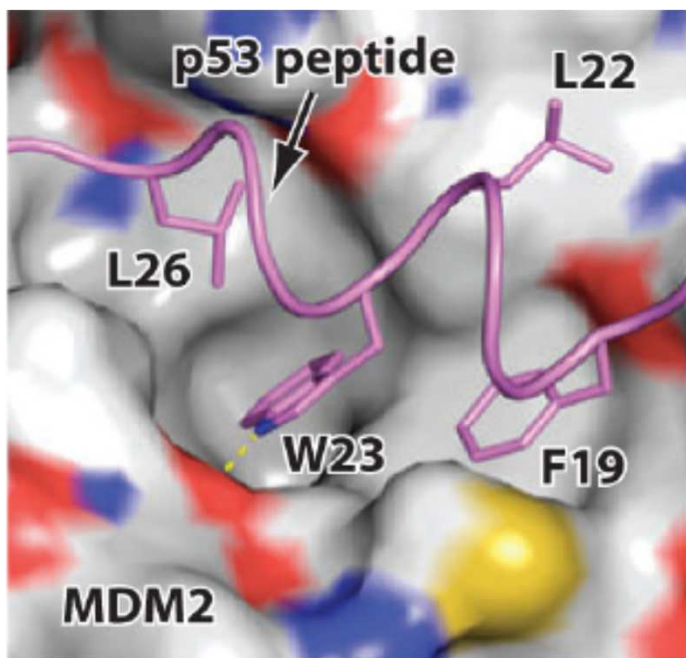
Tn	ID	Compound	RadarChart	Target	Assay	Type	Activity	MW	ALogP	HBD	HBA	TPSA	RB	Ar	Fsp3	R/S	LE	LLE	Biblio
0.34	682			MDM2 Q00987	FP	pKi	6.52	459.15	4.45	2	5	61.44	4	2	0.42	4	0.29	2.07	[57]
0.34	682			MDM2 Q00987	proliferation assay*	pIC50	5.68	459.15	4.45	2	5	61.44	4	2	0.42	4	0.25	1.23	[57]
0.34	682		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



# Inhibice PPI: p53-MDM2

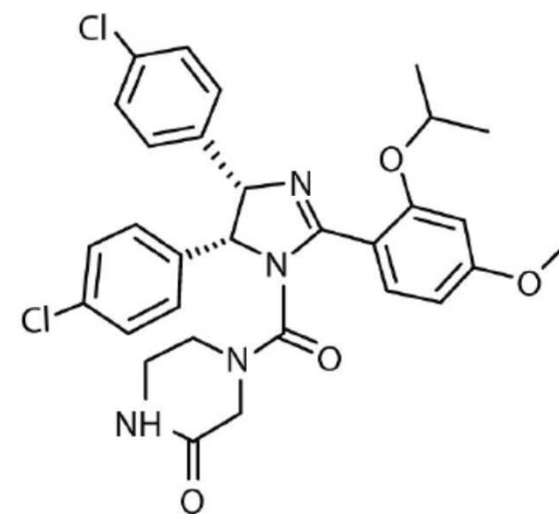


# Inhibice PPI: p53-MDM2



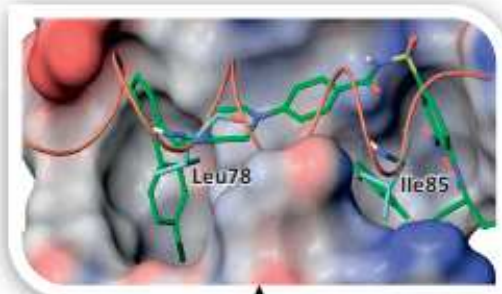
jeden z prvních

- Inhibice interakce MDM2 stabilizuje p53 –  
podpora nádorové suprese

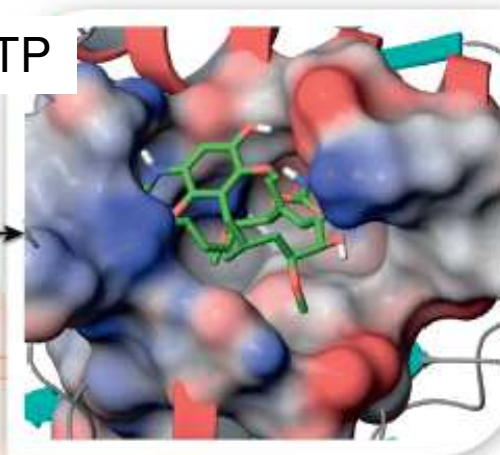


**Nutlin-3a**

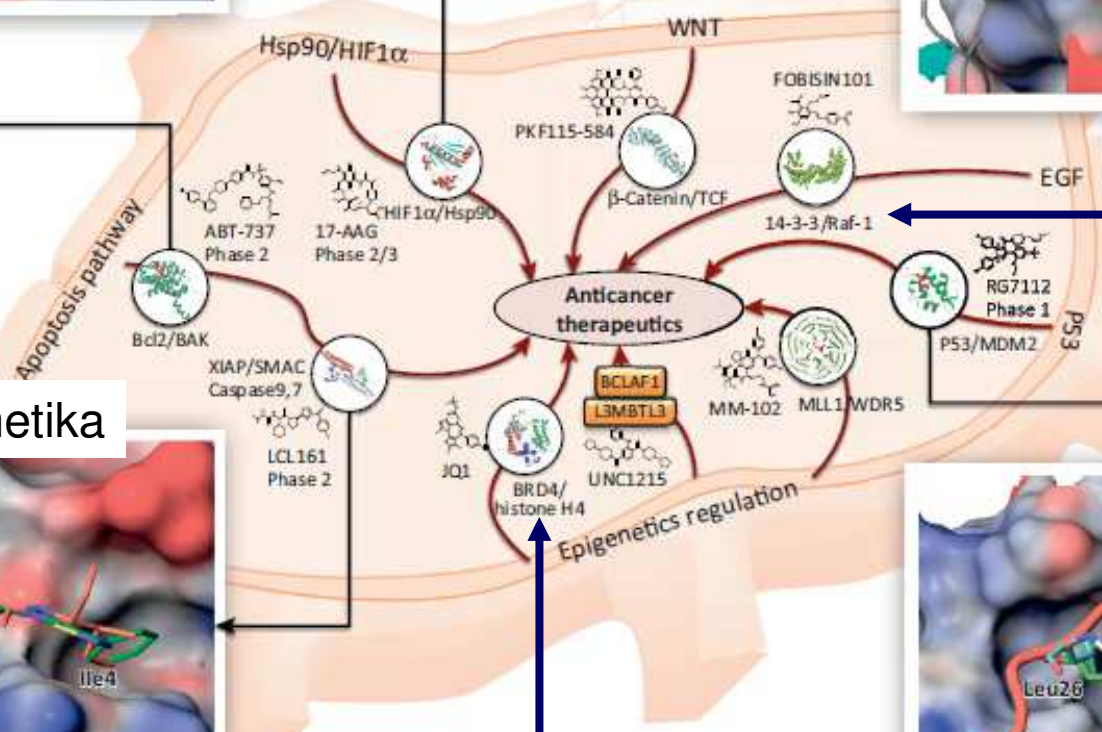
peptidomimetika



kapsa pro ATP

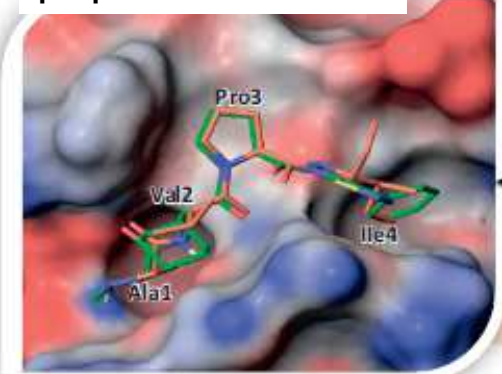


Ivanov et al, TIPS, 2013

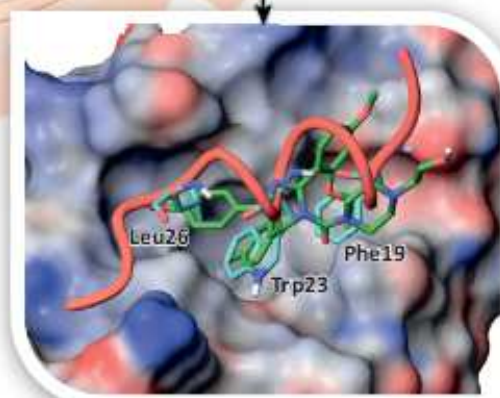


fosfopeptidová vazba

peptidomimetika



acetyl-peptidová vazba



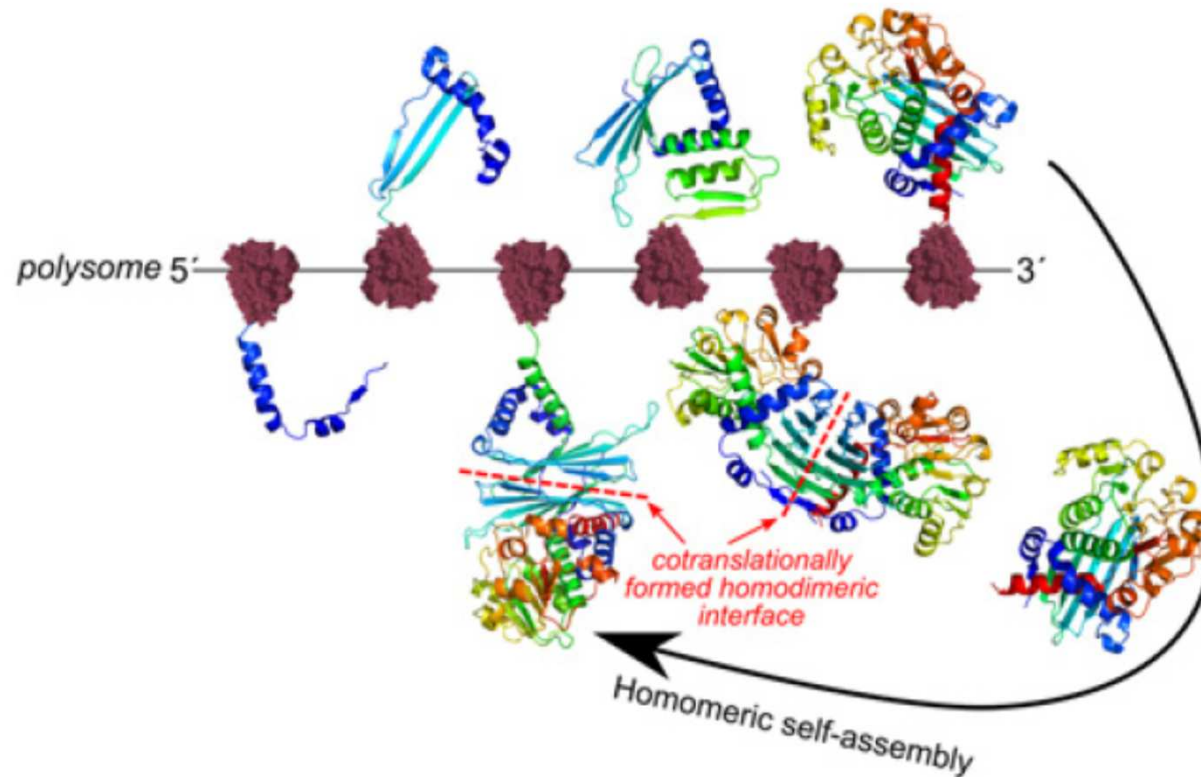
nová peptidomimetika

větší komplexy jsou stabilizovány více interakcemi, ale může se rozpadnout/zablokovat i celý komplex – např. otázka skládání komplexu

# Jak se komplexy sestavují - homomery?

nejjednodušší (běžné) je sestavování homooligomerů (homodimerů), ke kterému může docházet při translaci

Wells a spol, BST, 2015



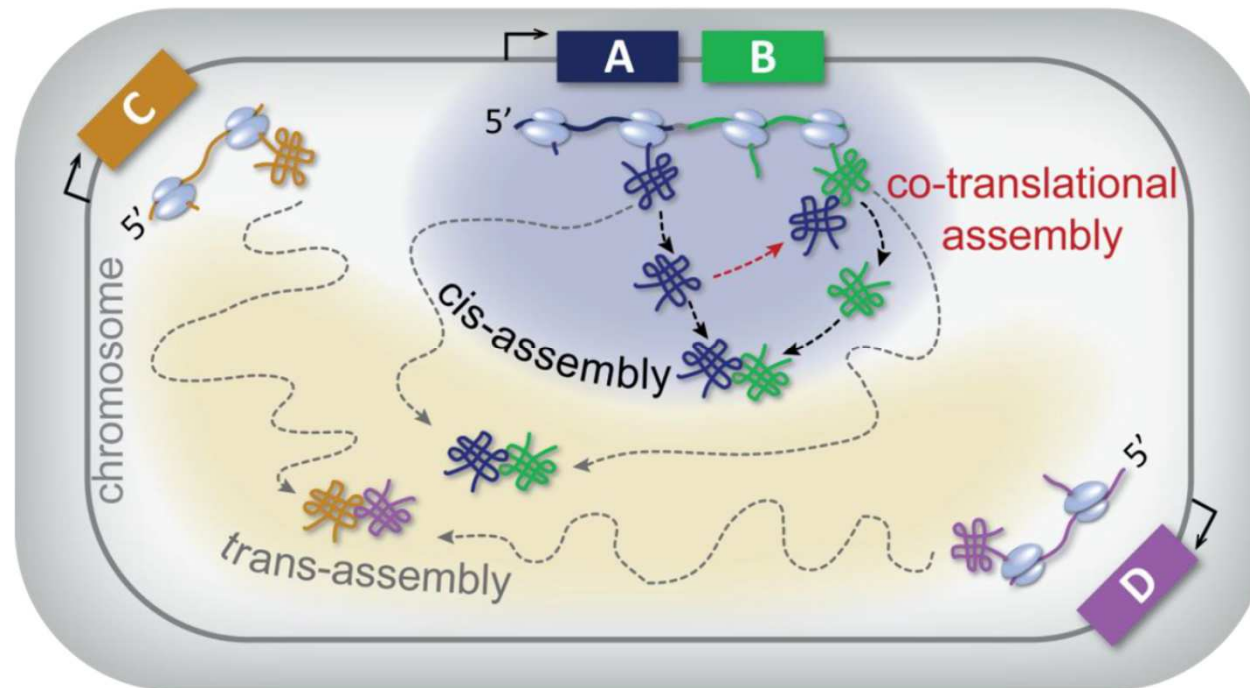
tento toxin je spíš vyjímka - skládání je iniciováno až na místě (indukce)



Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> kvarterní tj. komplexy již během syntézy (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 ...

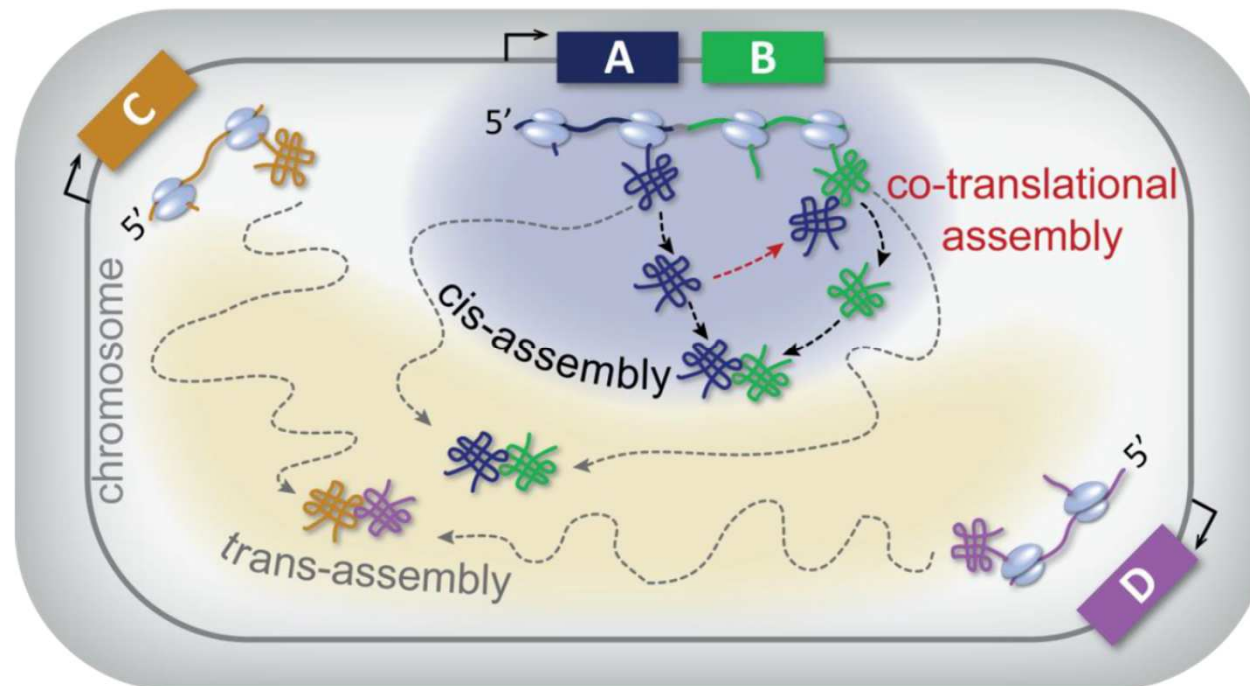


... samostatně by se proteiny neposkládaly, byly by nestabilní (degradace), toxické nebo by agregovaly (proteiny s hydrofobními povrchy – interakce je skryje před solventem)

# Jak se komplexy sestavují - heteromery?

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

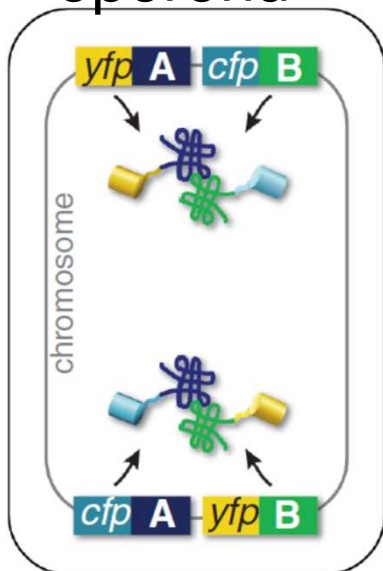
prokaryota



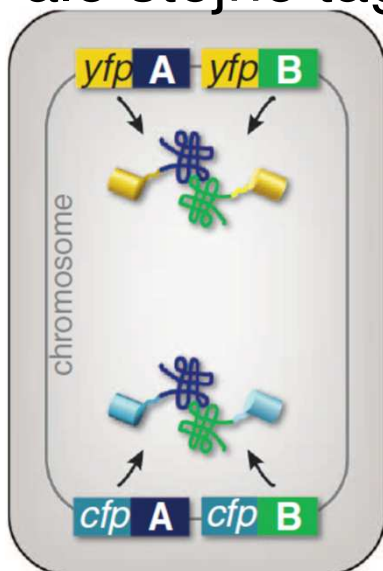
transkripce genů u prokaryot je regulována operony: funkčně vztažené geny/proteiny (komplexy) se transkribují z jednoho operonu (tandemově uspořádané) – polycistronic mRNA – ko-translace a ko-skládání (koordinované v prostoru i čase)

# heterodimer luxA-luxB (luminiscenční komplex)

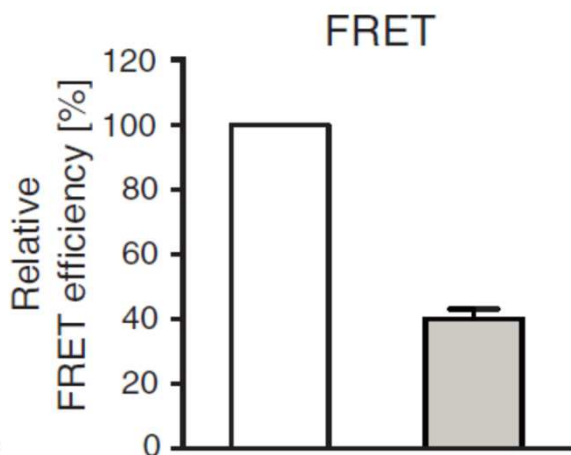
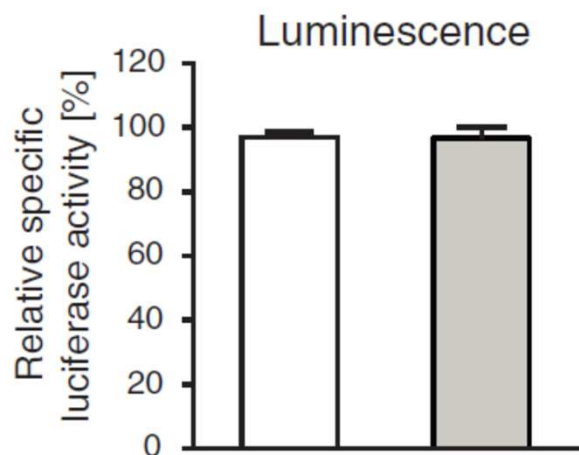
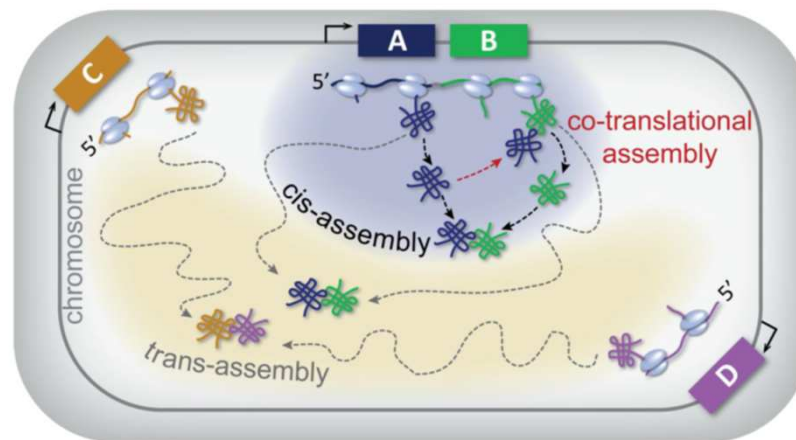
ze stejného operonu



ze stejného operonu, ale stejné tagy

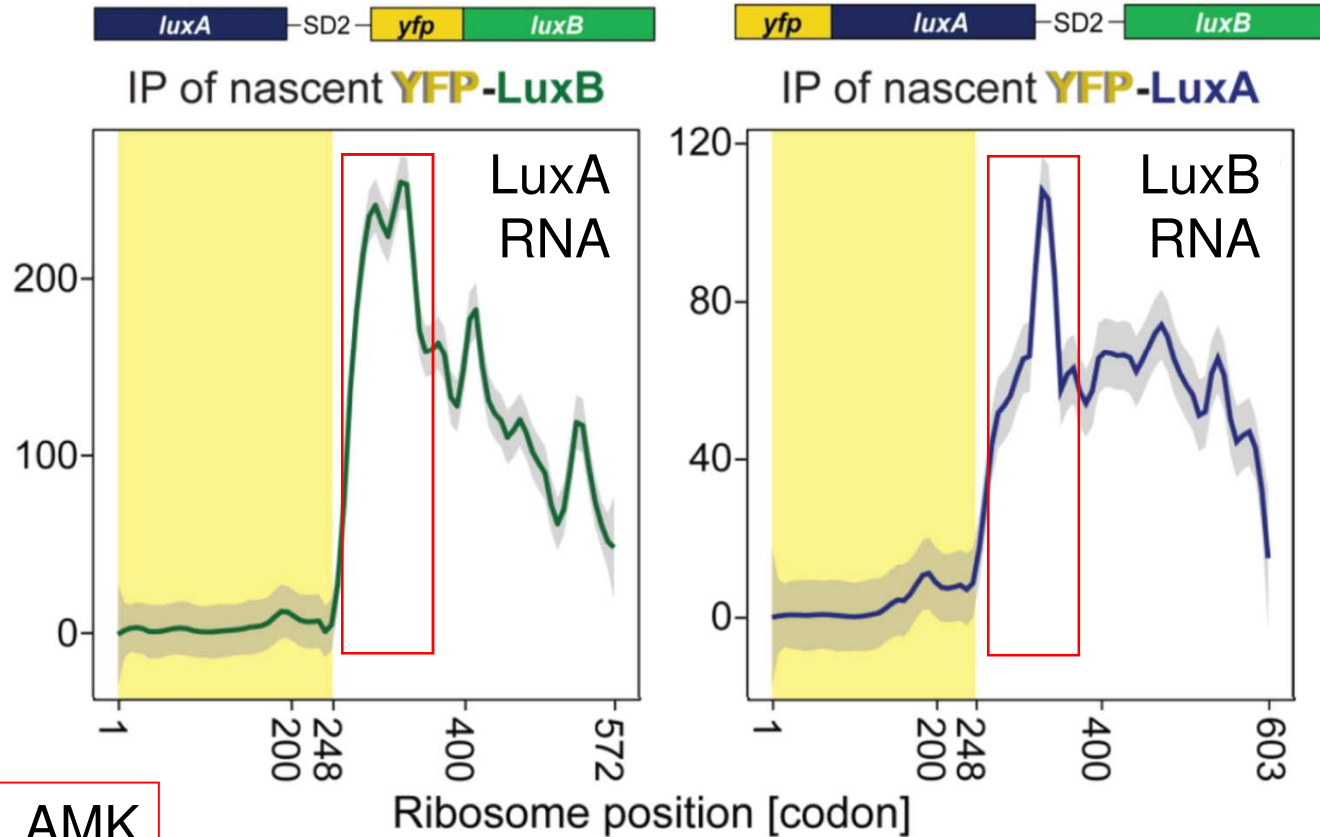


prokaryota



Shieh et al, Science, 2015

**koexprimujte (v bakteriích) své proteiny i s partnery z jedné RNA!**

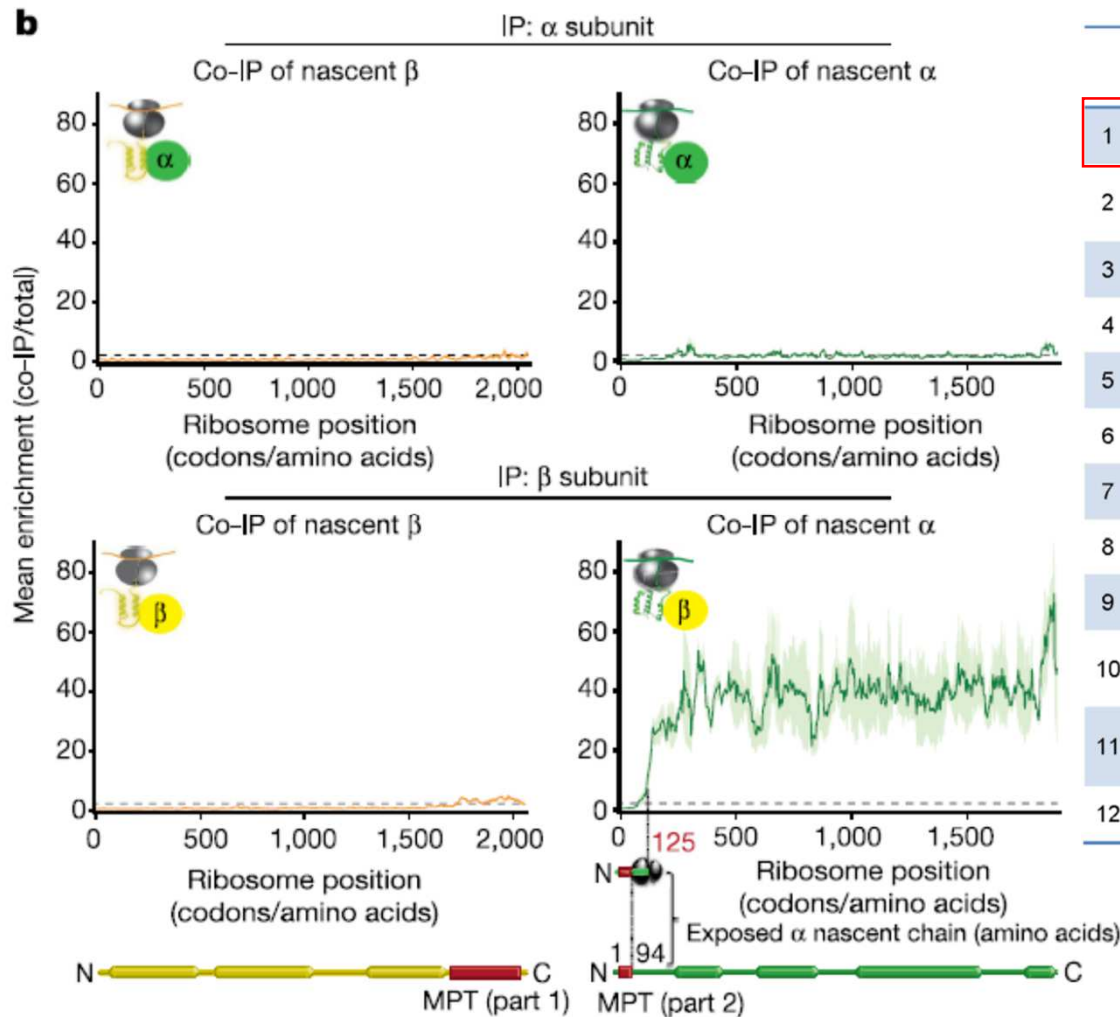


+ 30AMK/90nt uvnitř ribosomu

„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)

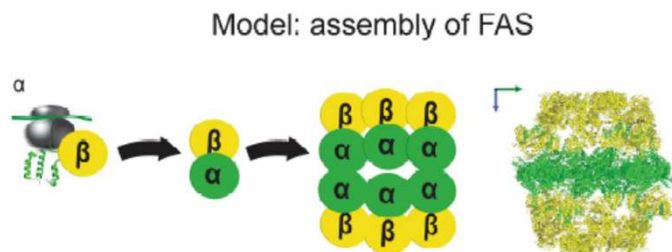


# Podjednotky komplexů jsou ko-exprimovány (eukaryota)



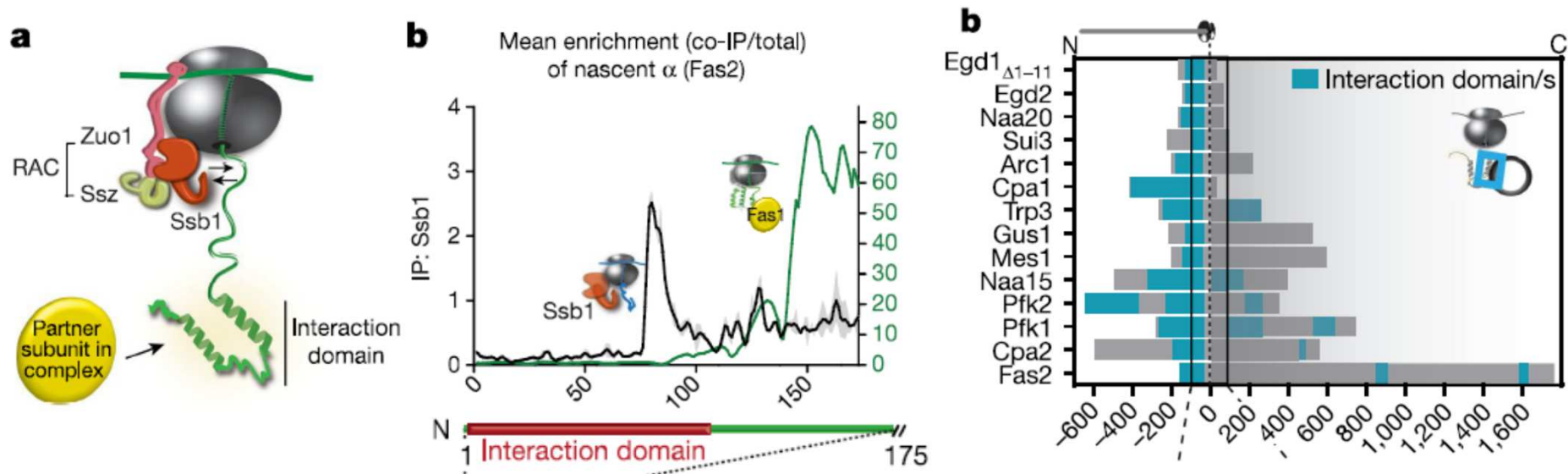
	Complex	Bait Subunit	Nascent Polypeptide engaged	Aggregation propensity in $\Delta ssb1/2$
1	Fatty Acid Synthase	$\beta$	$\alpha$	$\alpha, \beta$
2	Aminoacyl-tRNA Synthetase	GluRSp, Arc1p, MetRSp	GluRSp, Arc1p, MetRSp	GluRSp, Arc1p, MetRSp
3	N-acetyltransferase A	Naa10	Naa15	Naa10,15
4	N-acetyltransferase B	Naa25	Naa20	N.D
5	Anthranilate Synthase	Trp2p	Trp3p	Trp2p
6	Carbamoyl Phosphate synthetase A	Cpa2p	Cpa1p, Cpa2p	N.D
7	Phosphofructokinase	$\alpha, \beta$	$\alpha, \beta$	$\alpha, \beta$
8	Translation Initiation Factor eIF2	$\gamma$	$\beta$	$\gamma, \beta$
9	Nascent chain Associated Complex	$\alpha, \beta$	$\alpha, \beta$	N.D
10	Peripheral sub-complex; Vma1,2	N.D	N.D	Vma1,2
11	RiboNucleotide Reductase sub-complex RNR2,4	N.D	N.D	RNR2
12	20S proteasome; $\alpha 1,2$ subunits	N.D	N.D	$\alpha 1,2$

9 z 12 komplexů ko-translace (ostatní 3 - speciální chaperony)



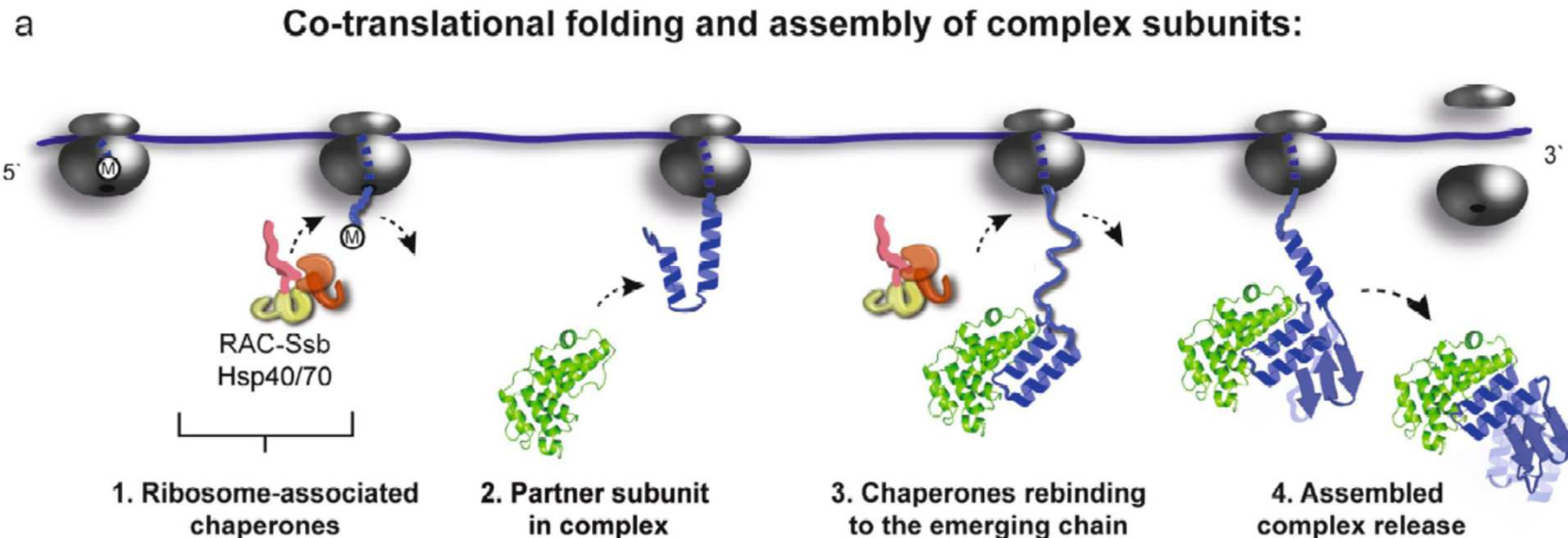
Precipitace (ko-translace) byla „jednosměrná“, tj. jedna podjednotka se vážala na RNA druhé (nikoli naopak) – první byla stabilní, zatímco druhá bez první agregovala (vazba na první zajistila její stabilitu)

Shiber et al, Nature, 2018



chaperon Hsp70/Ssb1 asociovaný s ribozomem – zajišťuje folding domény (hydrofobní části) a poté se uvolní – pak se váže partner

*?nejsou na stejné RNA – mechanismus není znám?*



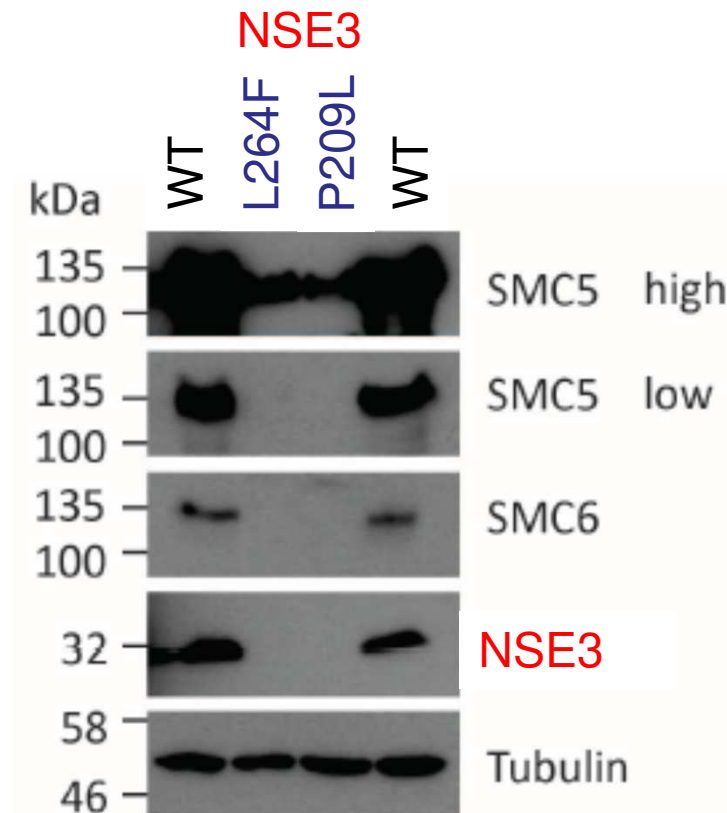
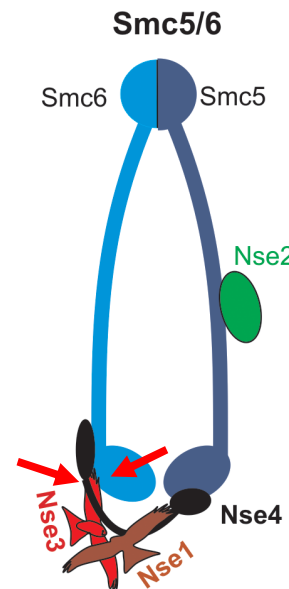
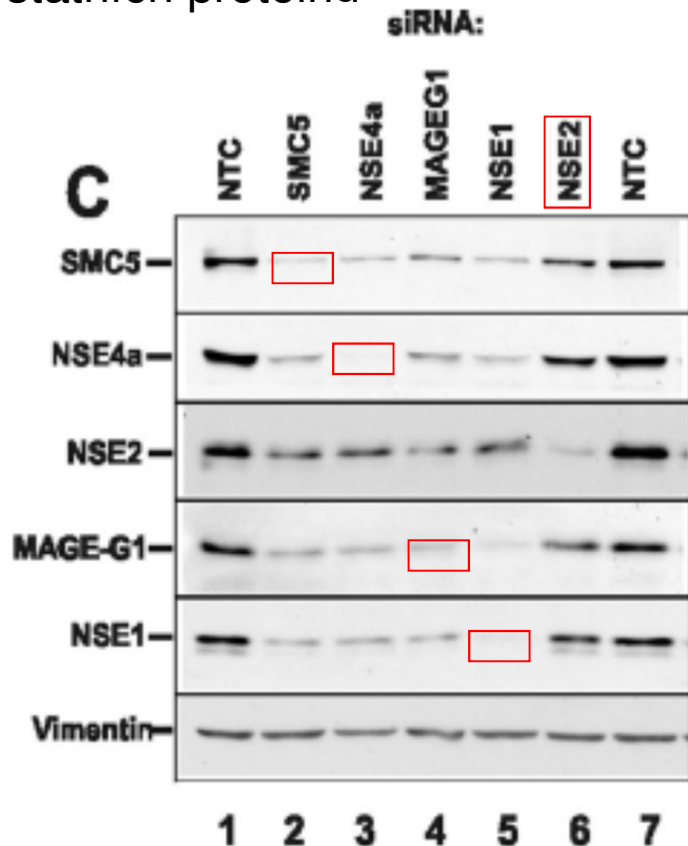
Mayr, Nature, 2018  
Shiber et al, Nature, 2018

pokud schází podjednotka (ve stabilním komplexu), tak nefunguje celý komplex – komplex se nesestaví nebo rozpadá (nestabilní – degradace ...)

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

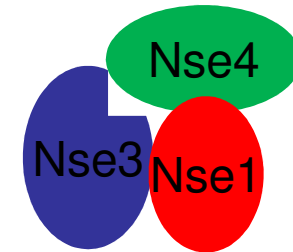
mutace podjednotky držící pohromadě komplex (narušila Nse3-Nse4) může mít podobný efekt ale ...

Taylor E.M. et al., MCB, 2008



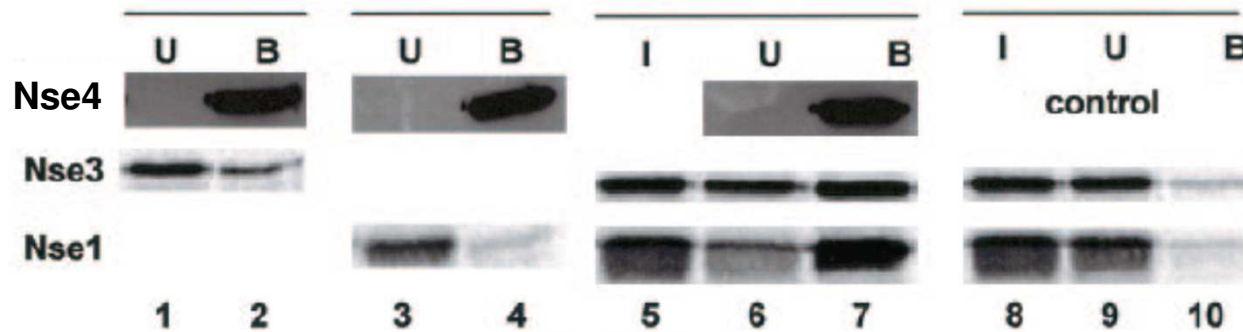
van der Crabben et al., JCI, 2016

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



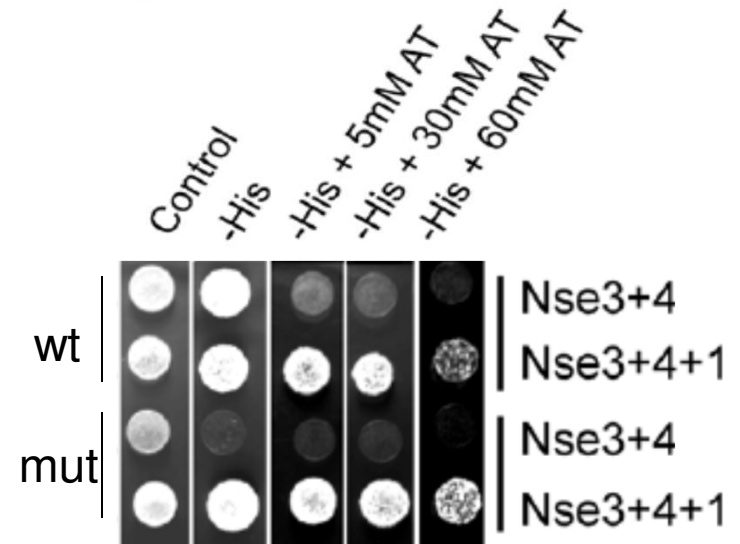
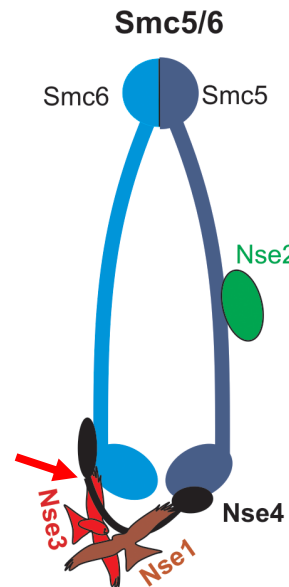
Proteinový komplex

### Pull-down



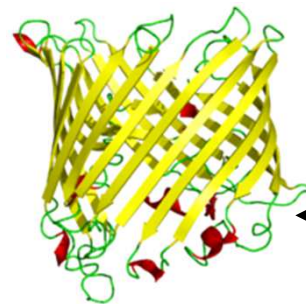
### Kvasinkový 3Y2H (2-hybridní systém)

... 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) ... pořadí sestavování!



## Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

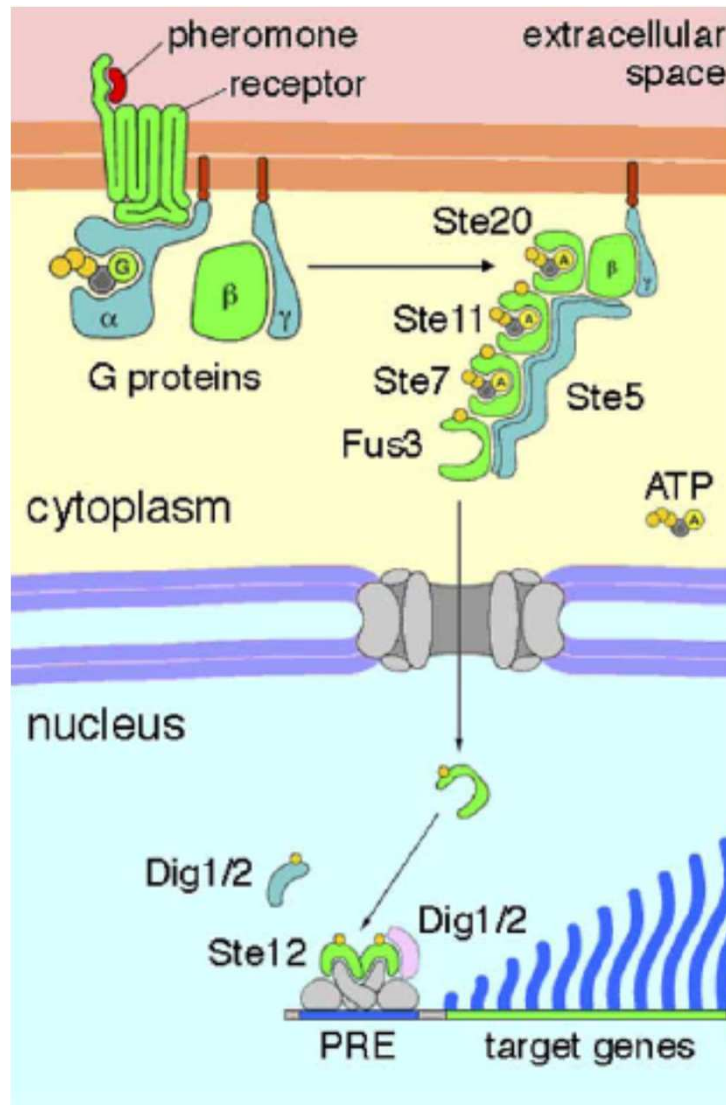
- skládání funkčního komplexu na specifickém místě (toxin je transportován jako rozpustný monomer a poté se skládá => stává se toxickým až mimo původní buňku)
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)
- velký komplex (homo-oligomer) může být kódován relativně krátkou genetickou informací (skládá se menší protein – větší je méně stabilní a hůře se skládá)
- menší pravděpodobnost defektní makromolekuly (menší gen => méně mutací + dá se relativně snadno vyhnout chybám – odstraní/degraduje se pouze jedna poškozená menší podjednotka => méně energie než pro nápravu celé struktury)
- komplexy mohou být dynamičtější (flexibilnější)
- evoluční výhoda modulů (nový komplex vzniká záměnou podjednotek)



bakteriální toxin →

← porin v mitochondrii





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)

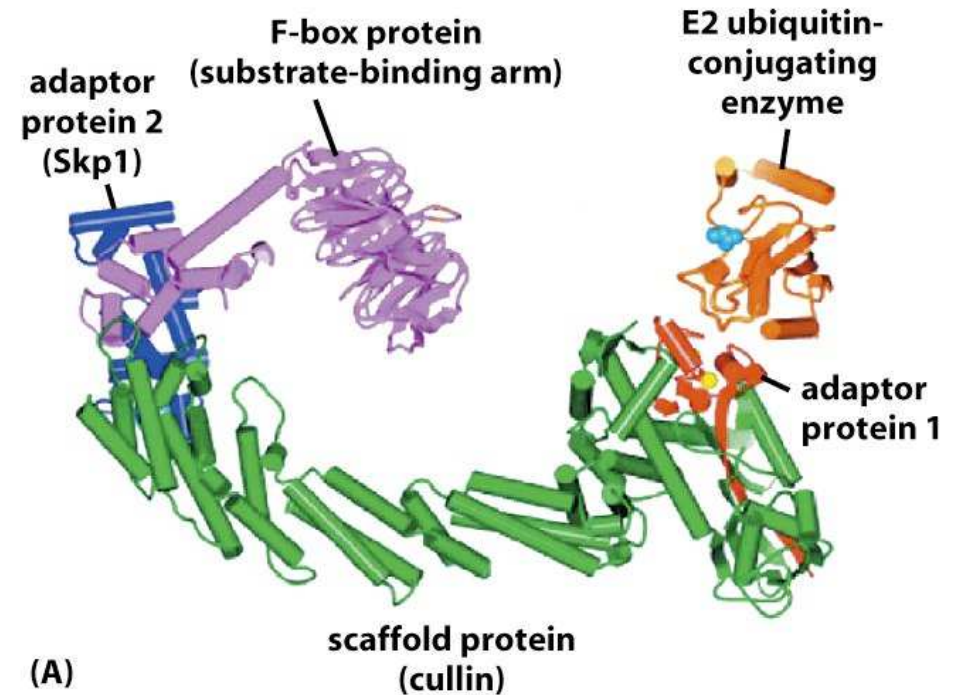
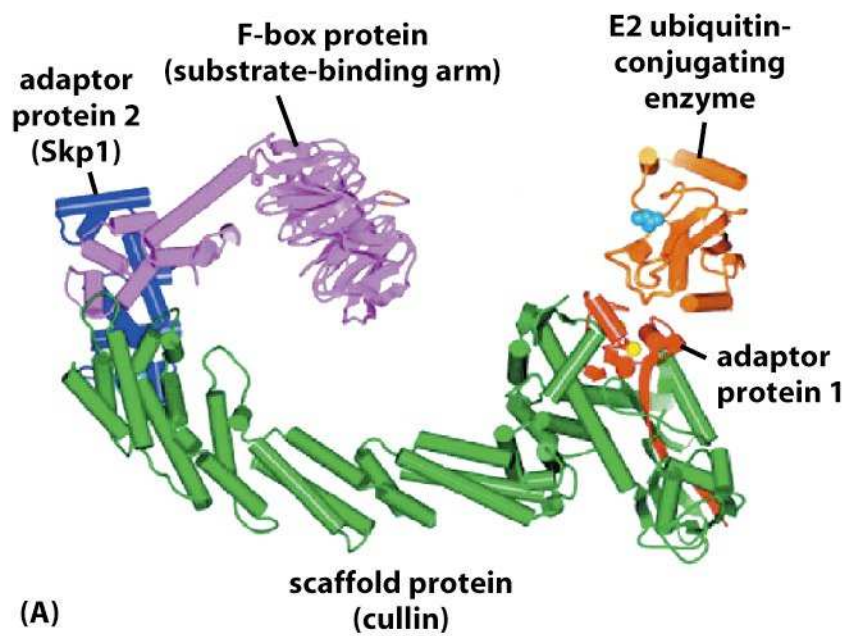
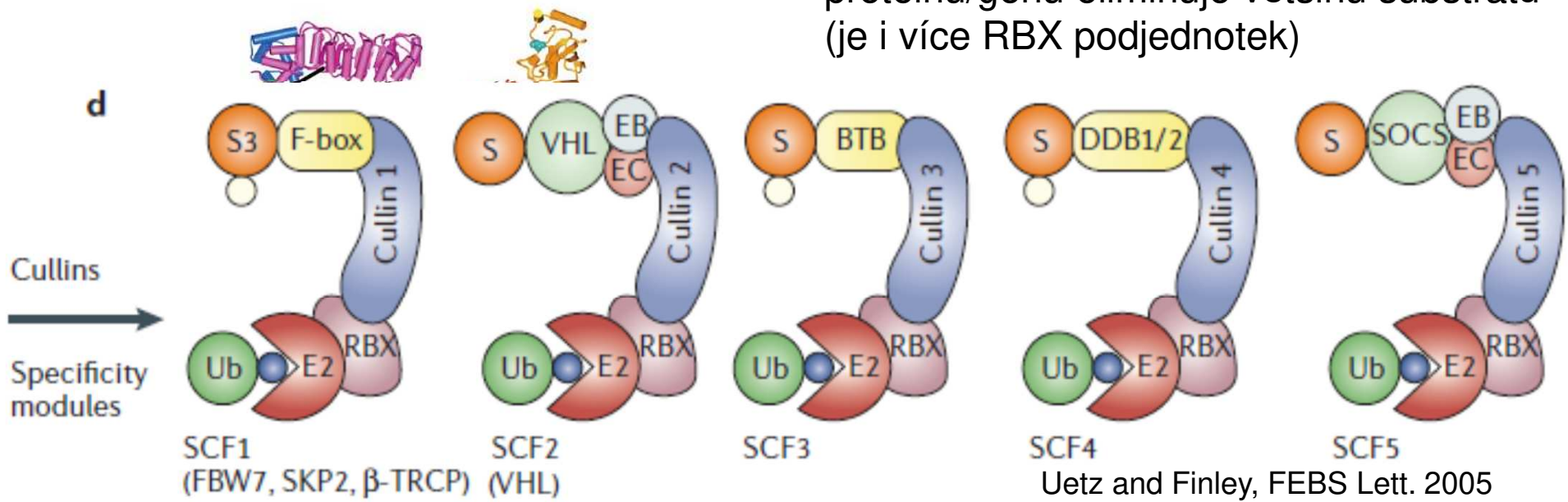


Figure 3-79 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



Některé komplexy jsou modulární – např. SCF (Skp-cullin-Fbox)  
 různé cullin (scaffold) 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

# Network/interaktom SCF komplexů a jejich substrátů

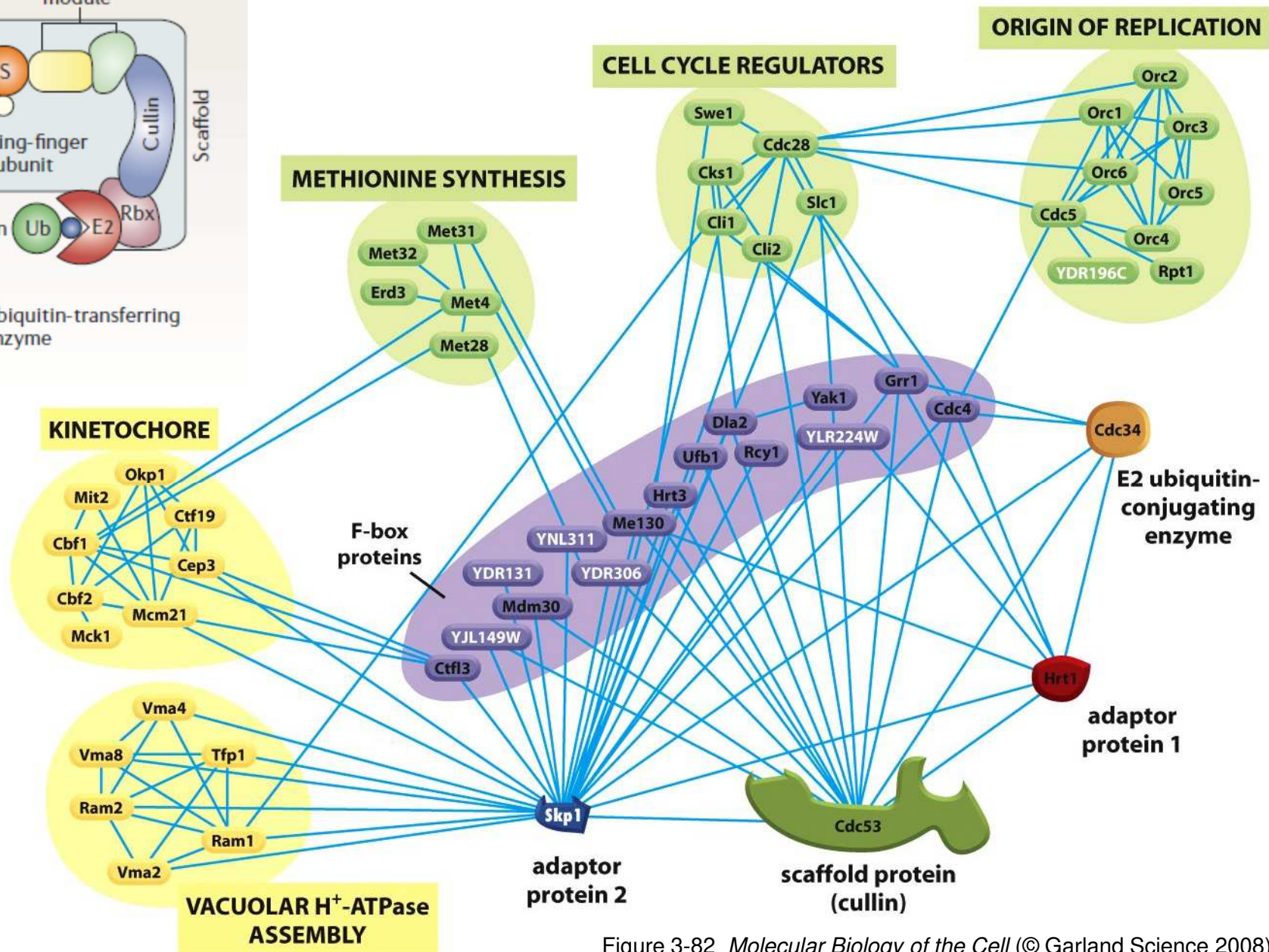
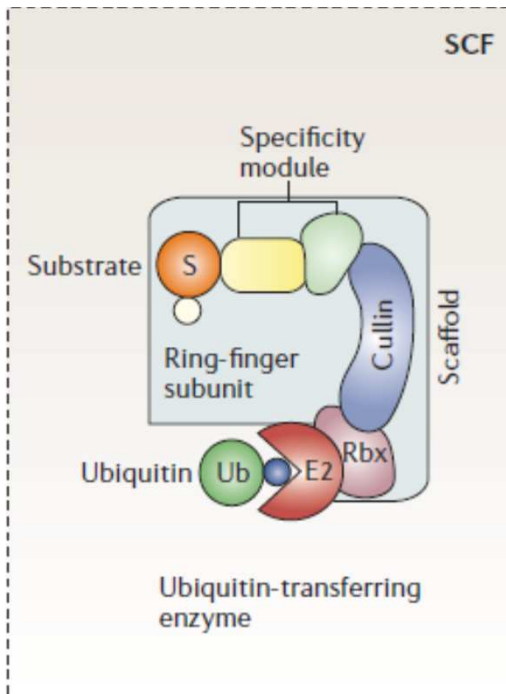


Figure 3-82 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Závěry

- proteiny jsou spojeny prostřednictvím interakcí mezi doménami – interakce mohou být modulovány posttranslačními modifikacemi (dynamické komplexy)
- PTM (či jiná změna) může interakci posílit nebo oslabit – asociace „podjednotky“ a modulace komplexu nebo rozpad komplexu (či „odtržení“ podjednotky)
- Stabilita komplexu je zpravidla větší než pouhý součet jednotlivých protein-proteinových interakcí – záleží na způsobu sestavování (pořadí sestavování)
- funkce celého „kompaktního“ komplexu je závislá na každé podjednotce (komplex se nesestaví nebo rozpadne bez všech podjednotek, „stabilnější“ podjednotky pomáhají skládání „labilnějších“ podjednotek – ko-translace)
- u „modulárních“ komplexů mohou některé podjednotky plnit funkci adaptérů či lešení (scaffold)