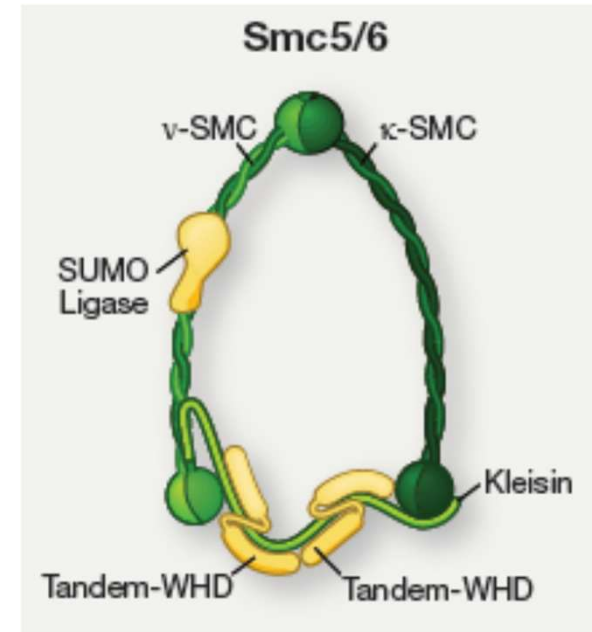


Zkouška: - test + přednáška

- 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)

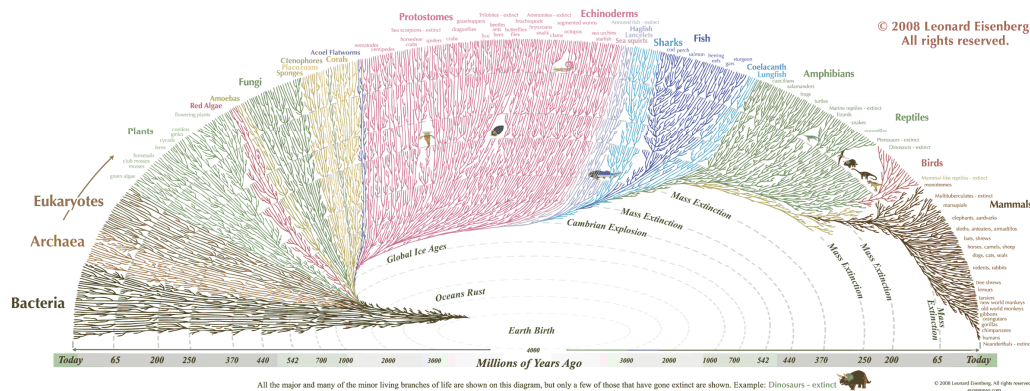


Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

1. Termín: 27.05.2021 9.00 hod C2-2.11 zkouška (test + prezentace)
2. Termín: 10.06.2021 9.00 hod C2-2.11 zkouška (test + prezentace)
3. Termín: 30.06.2021 9.00 hod C2-2.11 zkouška (test + prezentace)

Evolve – „vzestupy a pády“?

- podobně jako srovnání morfologie organismů (fenomů), také srovnání genomů/proteomů ukazuje na vývoj „evoluci“ v čase (genů/proteinů)
- divergence druhů koreluje do značné míry s konzervací/divergencí DNA/proteinových sekvencí
- způsobené „nestabilitou“ DNA (... oprava poškození)
- DNA je replikována s relativně vysokou přesností (1 změna na 10^9 nukleotidů – cca4000 _{TNR12} písmen na A4 stranu – 8000 _{TNR12} na list – 500listů/balík – cca 250 balíků)
- umožňují „vylepšující“ změny (adaptace)



mutace virů ukazují jejich úlohu pro „adaptabilitu“ na prostředí ... hlavní roli však hrají jiné změny ...

Evolve – mutace

- velmi příbuzné sekvence DNA/proteinů mezi člověkem a primáty díky „krátké“ době, po kterou mohlo k mutacím docházet (jsou zachovány i nukleotidy ve 3. pozici synonymních kodonů - odhad 1/400AMK protein za 200,000 let)

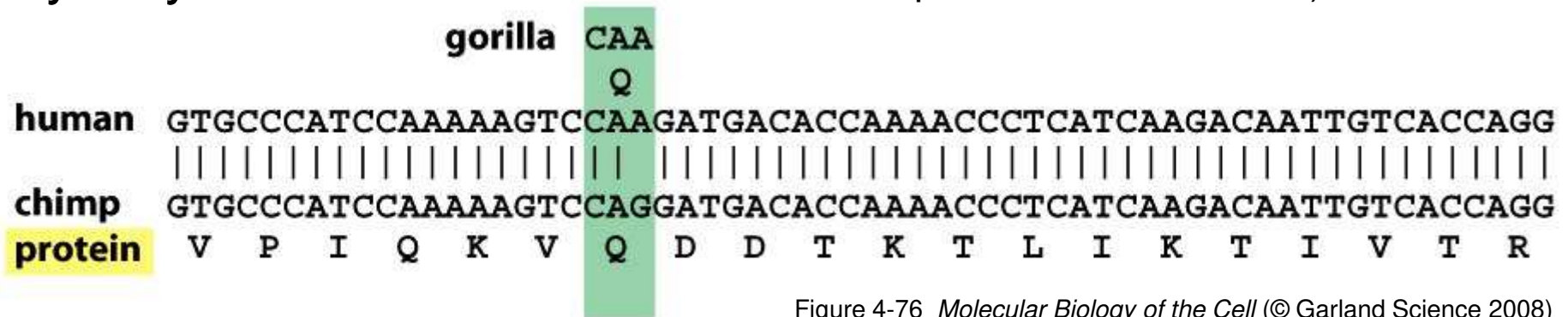
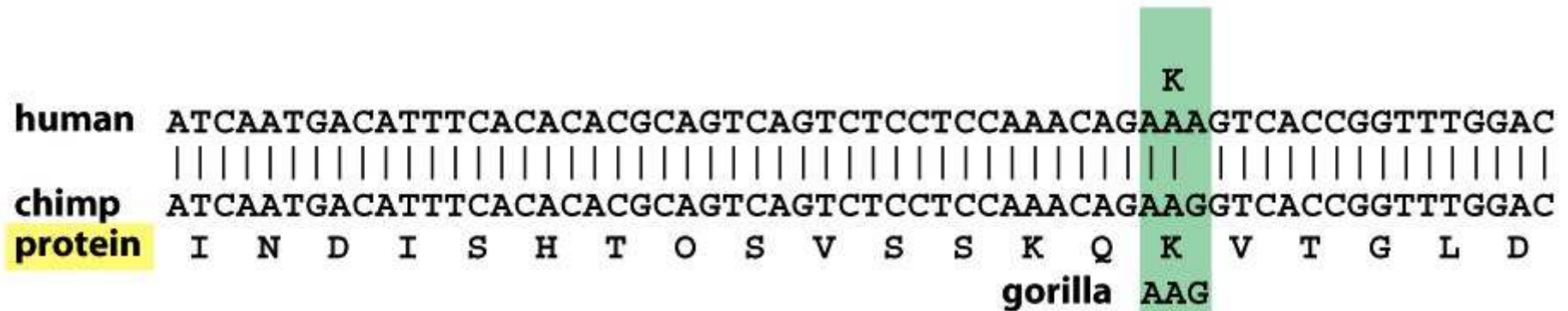


Figure 4-76 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



- druhovou rozdílnost nezpůsobuje mnoho mutací v sekvencích proteinů (nemohlo jich tolik vzniknout), ale ...

- odlišnost druhů je dána spíše rozdílnou regulací (nekódujícími sekvencemi), tj. rozdílem v expresi proteinů než rozdílem v sekvenci proteinů (tj. rozdílnou funkcí proteinů)
- rozdílná exprese tj. rozdílné proteomy v buňkách podmiňují odlišnost buněk v organismu (svaly, játra ...) i odlišnost buněk v čase a prostoru (morfogeneze – odlišný vzhled, vývoj ...
mozek => menší problém když se modifikuje/zmutuje program morfogeneze než když zmutuje protein => vliv na funkci)

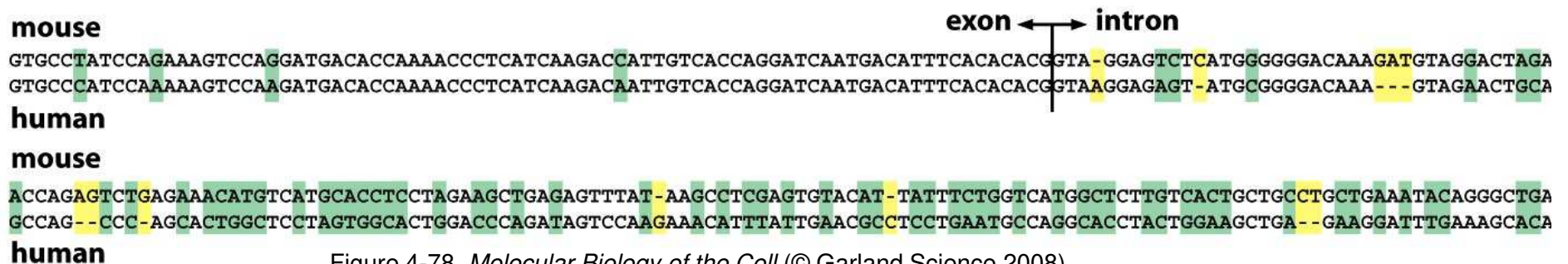
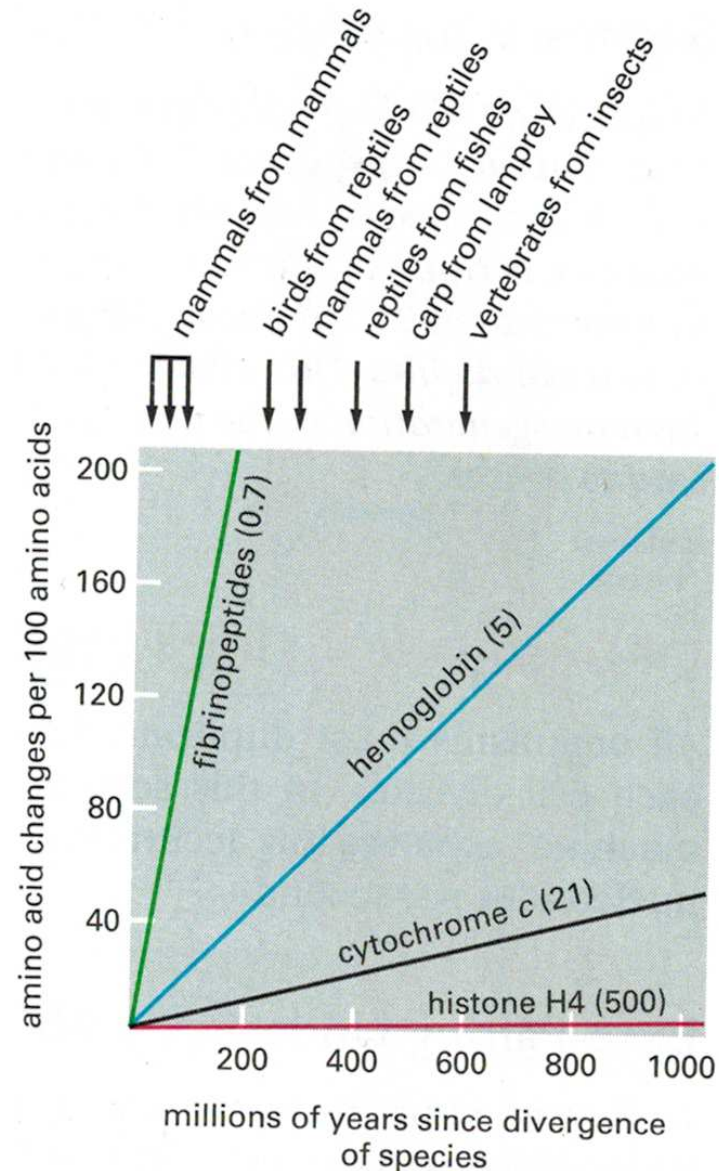


Figure 4-78 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

- srovnání sekvencí (člověk a myš) ukazuje odlišnější nekódující sekvence než protein-kódující (regulační sekvence jako promotor ..., intron je odlišnější než kódující exon) - silnější selekční tlak na proteiny

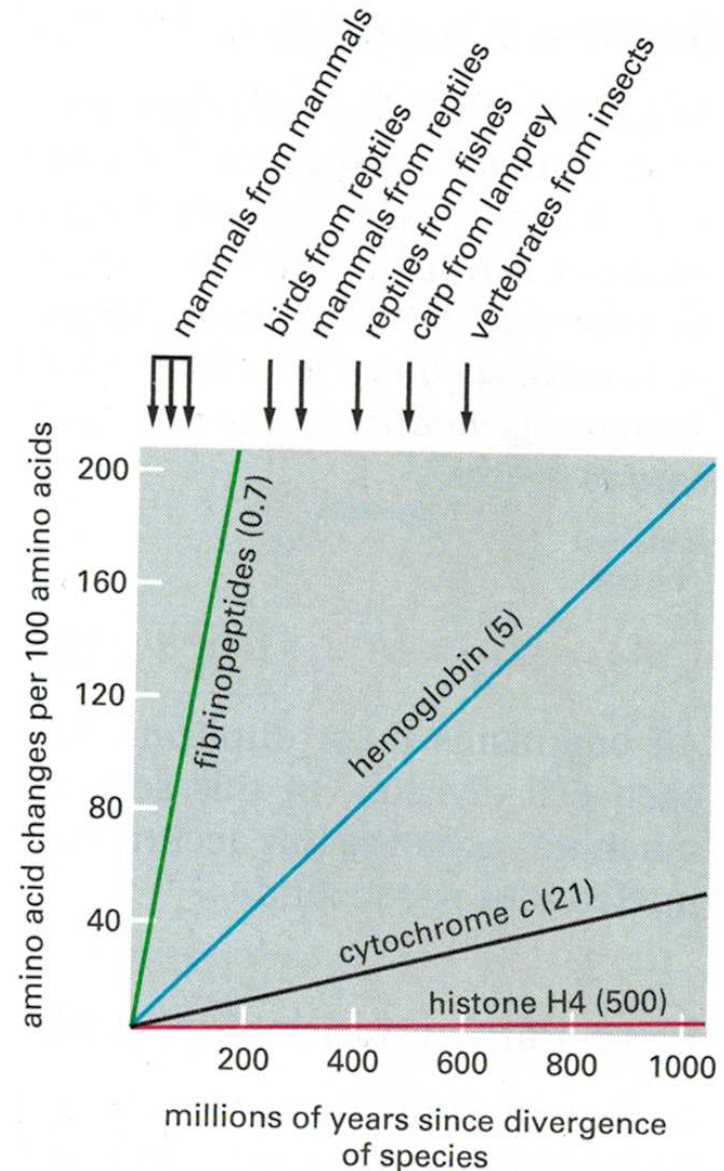
Evolve – mutace

- frekvence mutací by byla +/- stejná podél molekuly DNA ... ale různé proteiny jsou různě změněné díky selekčním tlakům
 - (histony ... kvasinkový a lidský ubikvitin se liší třemi AMK, 6 ze 7 změn v cytochromu C jej poškodí)
- čím důležitější a komplexnější funkce proteinu pro organismus (od nejzákladnějších po specializované) tím více je konzervovaná sekvence proteinu (respektive jeho domén)



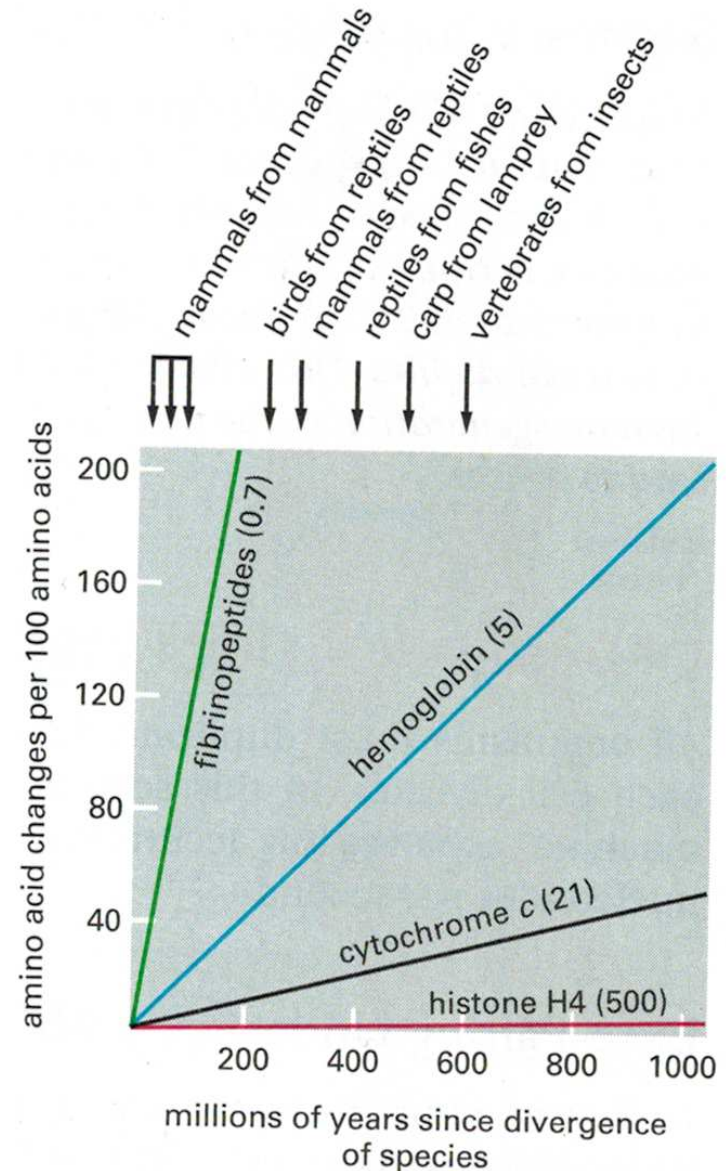
Evolve – selekce

- takto konzervované proteiny jsou lehce identifikovatelné v různých organismech a mají „homologní“ (**ortologní**) funkci
- např. některé lidské proteiny funkčně zastoupí zmutované/deletované kvasinkové proteiny (Y2H cytotrap)
- konzervace je důsledkem „purifikační selekce“ (eliminace buněk/jedinců s mutacemi v esenciálních/důležitých funkcích)
- mutace u pacientů s různými syndromy ...



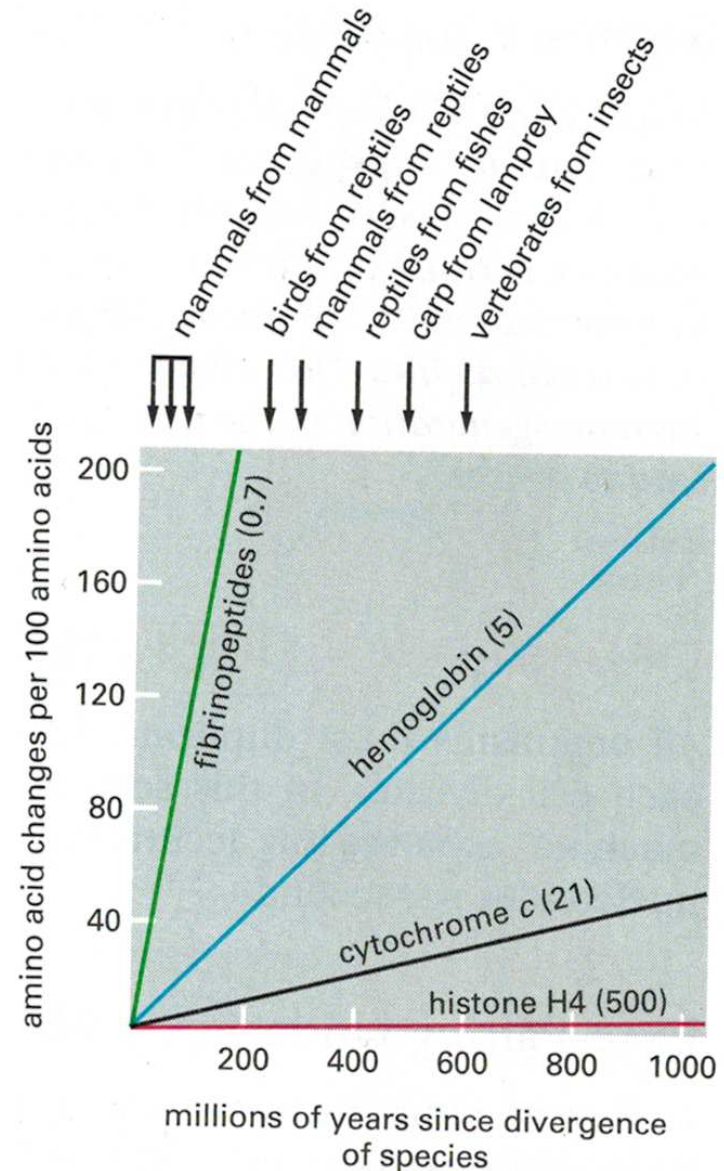
Evolve – selekce

- purifikační tlak na proteinové sekvence pro udržení jejich funkce:
- „tlak“ na **strukturu** proteinu,
- selekční tlak na povrch proteinu = tj. na **interakce** a **PTM**
- mutace, které neruší jsou **neutrální** (protein je částečně modifikován)
- modifikace je kompenzována (i později) mutací partnera
- změní se v čase a v budoucnu může přinést novou vlastnost



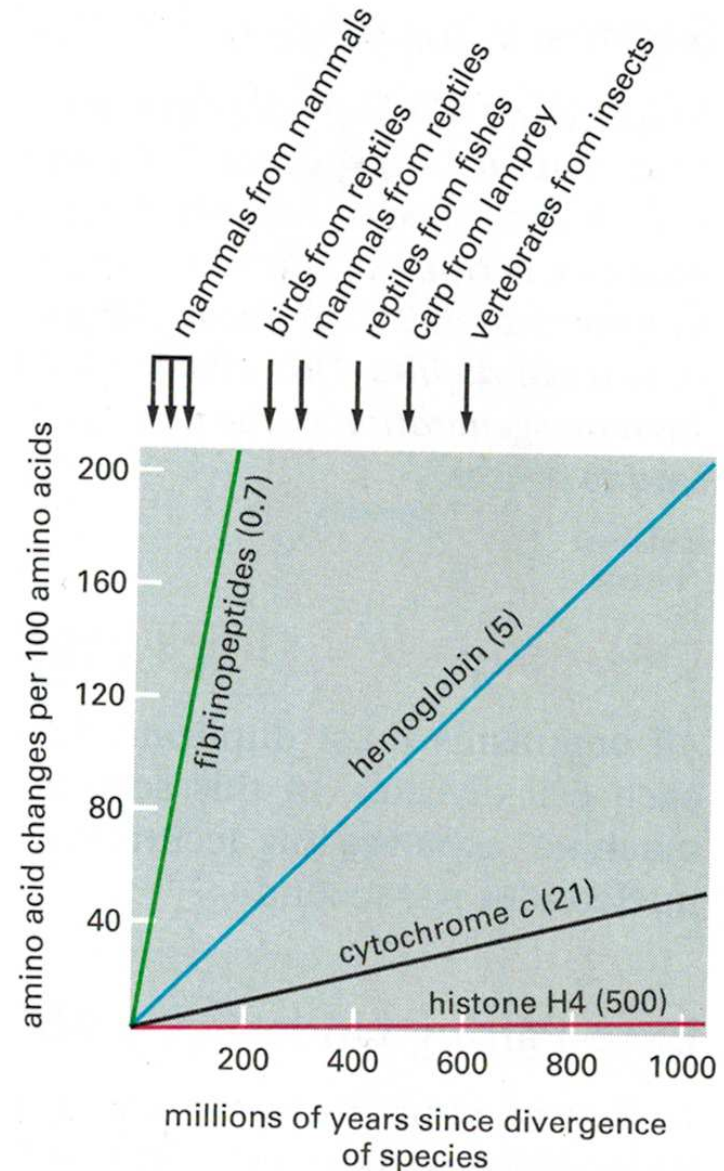
Evolve – selekce

- purifikační tlak na proteinové sekvence pro udržení jejich funkce:
- „tlak“ na **strukturu** proteinu,
- selekční tlak na povrch proteinu = tj. na **interakce** a **PTM**
- nejpomaleji se mění proteiny, které jsou zapojeny do nejvíce interakcí s dalšími proteiny (limitována, jak struktura, tak povrch) - není příliš prostoru pro změny - např. ubikvitin, histony ... („drží“ základní systém)



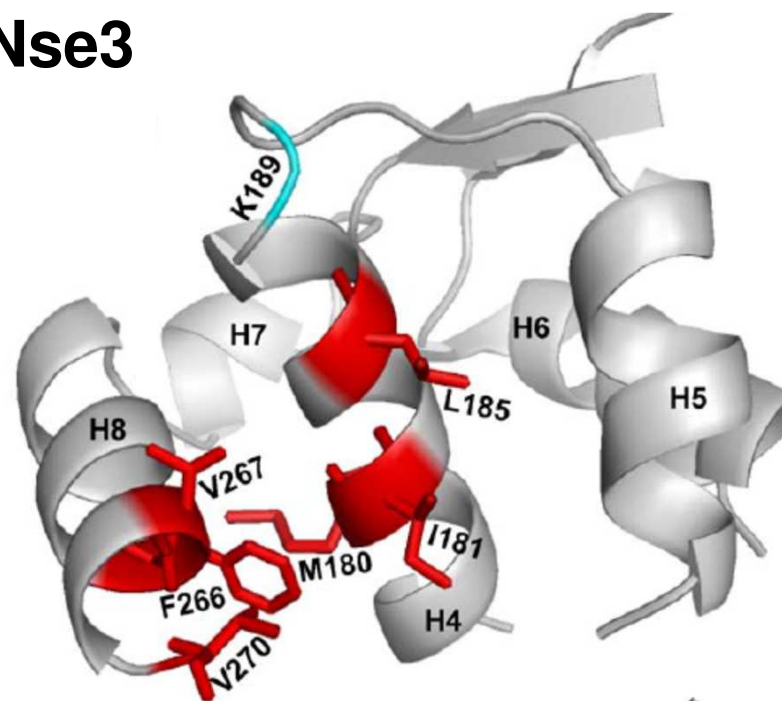
Evolve – selekce

- nutnost zachování funkce neposkytuje příliš prostoru pro evoluci/rozvoj nových vlastností (ale neznamená ani selekci na „nejstabilnější“ či „nejaktivnější“ = určitá volnost)
- neutrální mutace neruší strukturu či interakce proteinu
- taková změna ale může v budoucnu přinést novou vlastnost



blízke organismy

Nse3



Hudson et al, PLoS One, 2011

- mutace specifické AMK na Ala zruší Nse3-Nse4 interakci
- „mutace“/změny těchto AMK na podobné (hydrofobní) AMK tyto interakce neruší

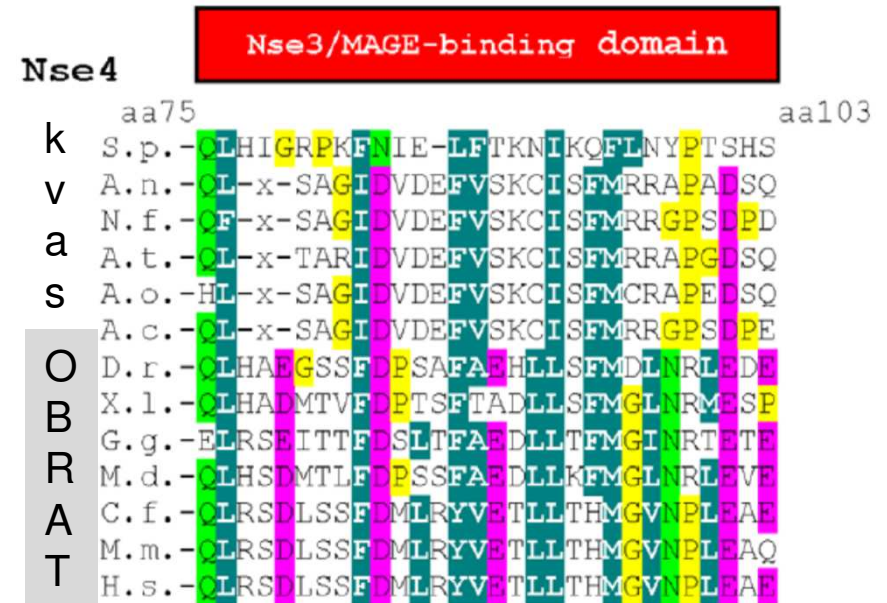
...RYBY, OBOŽIVELNÍCI, PTÁCI ...

N.v.	GLLMLVLSVILM	SxxxxN	YTSLWHFL	KKMGL	EPKKE	HEVFGDP	--EK	LIAQ	EFTR	GGYL	ERRK	VTGG	EE	EATE	EYSW	--GS	RSNKE	----	LT	KRKV	LEFV	SV		
D.r.	GLLFVILSVIFM	KG	GTIK	ENL	VWNTL	KKLR	LD	PGE	KH	DE	FGDV	--KK	VVTE	EFVR	QKYL	EY	GKIP	HT	EE	VE	YEF	RW	GL	
T.n.	GLLFVILSVIFM	KG	GAVR	DS	VWNTL	KKLR	VQ	PER	PE	FGEV	--KR	VMEE	FVRQ	RYL	EC	NRIP	HT	EE	EL	HE	FRW	YQ	RA	
X.t.	GLLMVILSLIFM	KG	NTAK	ESA	VWNTL	KKLR	RI	EPA	KH	SDF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QKYL	EY	SKVL	HT	EE	PV	YEF	RW	YQ	RA
G.g.	GLLIVILSFIFM	KG	NSAK	DSA	VWNTL	KKLR	VH	PE	KH	EVFGDV	--KK	LVMEE	FVRQ	KYL	EIT	PIPL	TD	EE	PP	EF	NF	QW	YQ	RA
O.a.	GLLMVILSLIFM	KG	SATN	ES	WNTL	KKLR	VD	TR	RE	EVFGDV	--KK	LVT	EFVR	QKYL	EY	NRIP	HT	EE	EV	EF	QW	YQ	RA	TK
M.d.	GLLMVILSLIFM	KG	NSAR	ES	LWNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LKDE	FVRQ	KYL	EY	IRVP	HT	EE	PE	YEF	QW	YQ	RA
E.e.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
S	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
Q.p.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
M.cr	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
B.t.	GLLMIVLGLIFM	KG	NSIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
E.v.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
C.f.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
H.c.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIT	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
Mmg1	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIT	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
Ml	GLLMIVLGLIFM	KG	NTVK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
P.a.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
P.t.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA
H.s.	GLLMIVLGLIFM	KG	NTIK	ET	WNTL	KKLR	VD	PE	KR	KTF	GDV	--KK	LITE	EFVR	QRYL	EY	RRIP	HT	EE	PV	YEF	QW	YQ	RA

„kompenzační“ mutace?

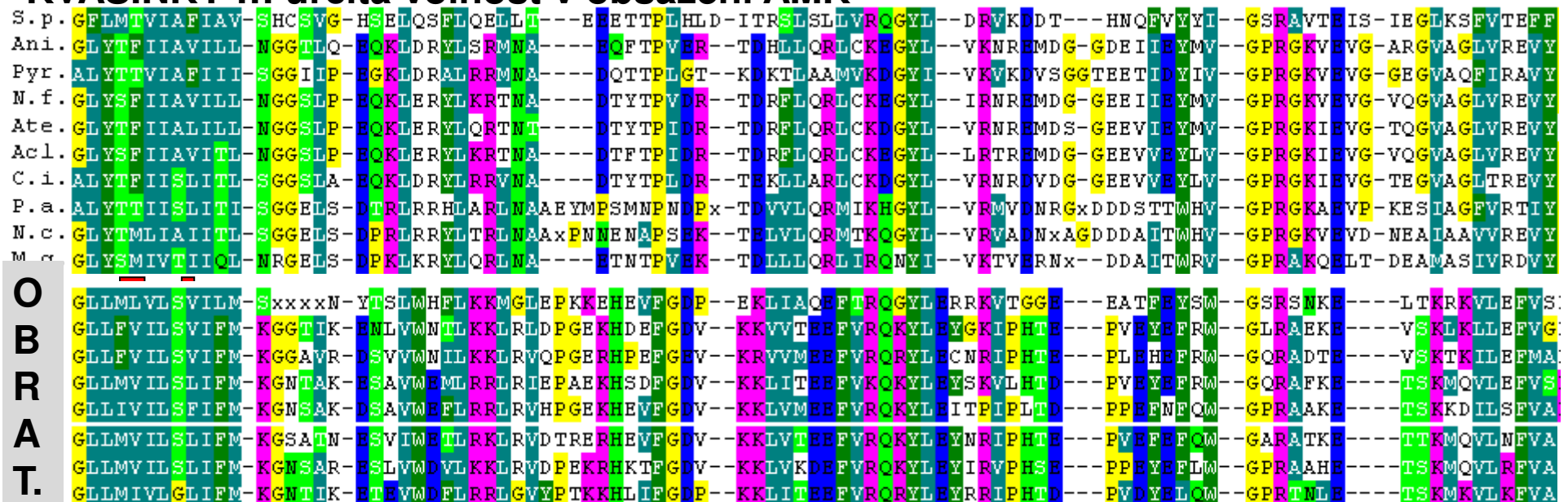
- „mutace“/změny těchto AMK na odlišné (polární Thr nebo posun motivu o 1AMK na konci)
- interakční partner se ovšem také „mění“
- „mutace“/změny zřejmě koevolvuji
- **teorie kompenzačních mutací ...**

NSE4 subfamilies

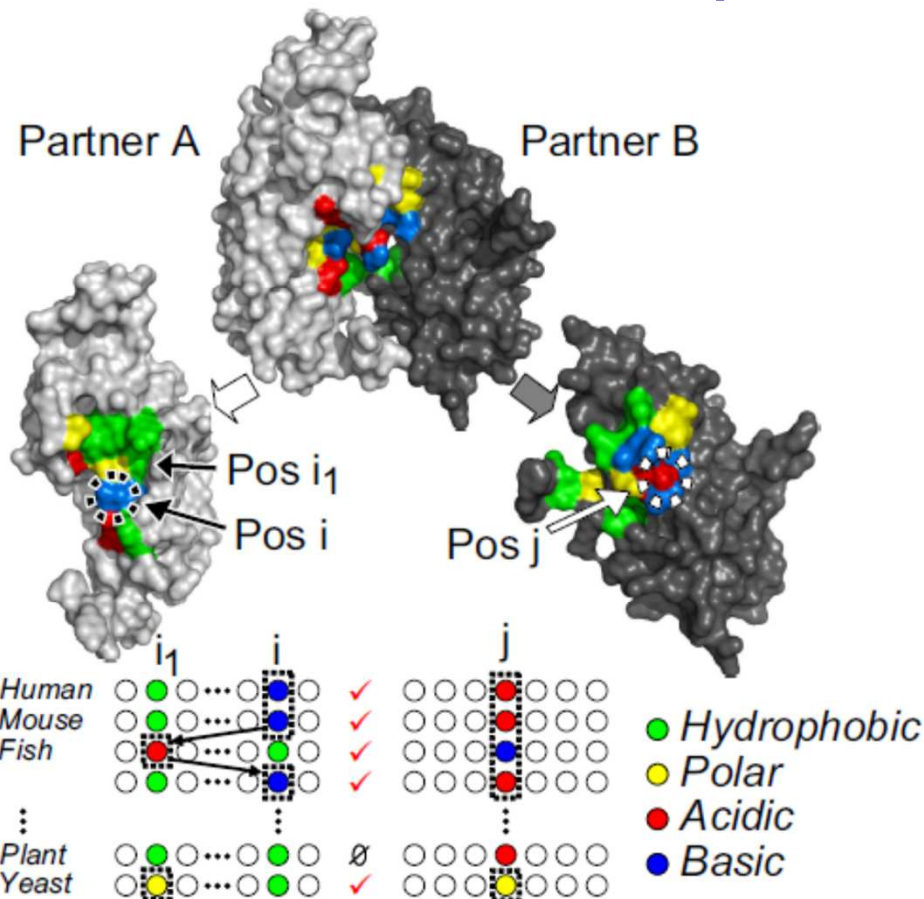


Guerineau et al, PLoS One, 2012

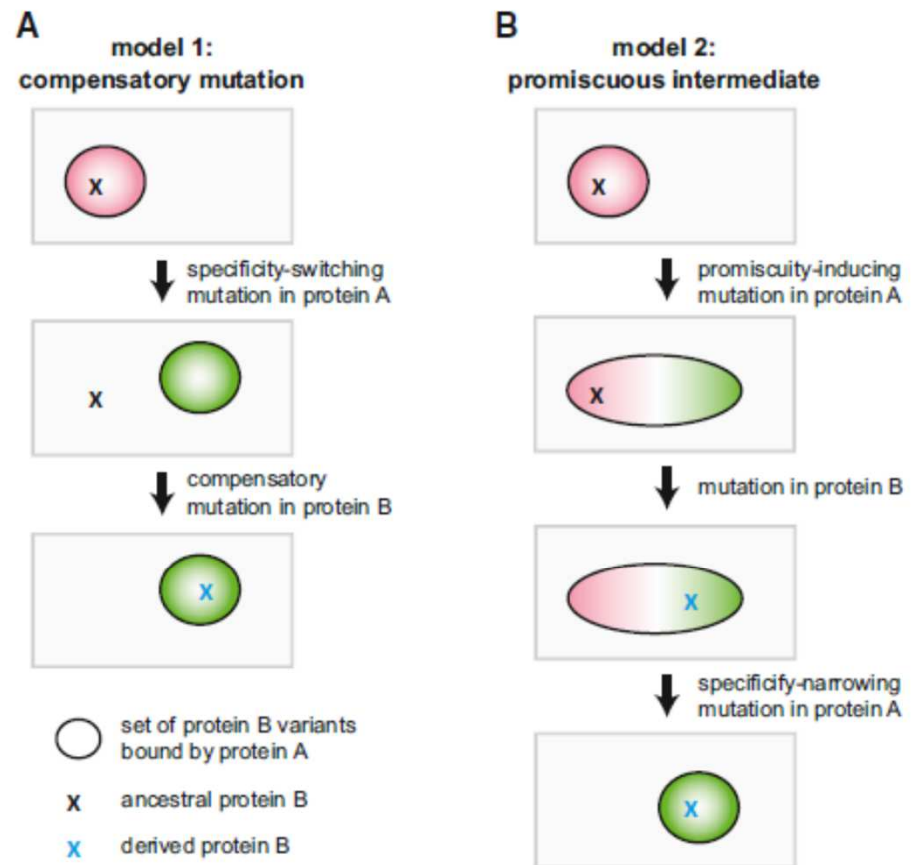
KVASINKY ... určitá volnost v obsazení AMK



Vazební partneři ko-evoluují



Madaoui et al, PNAS, 2007

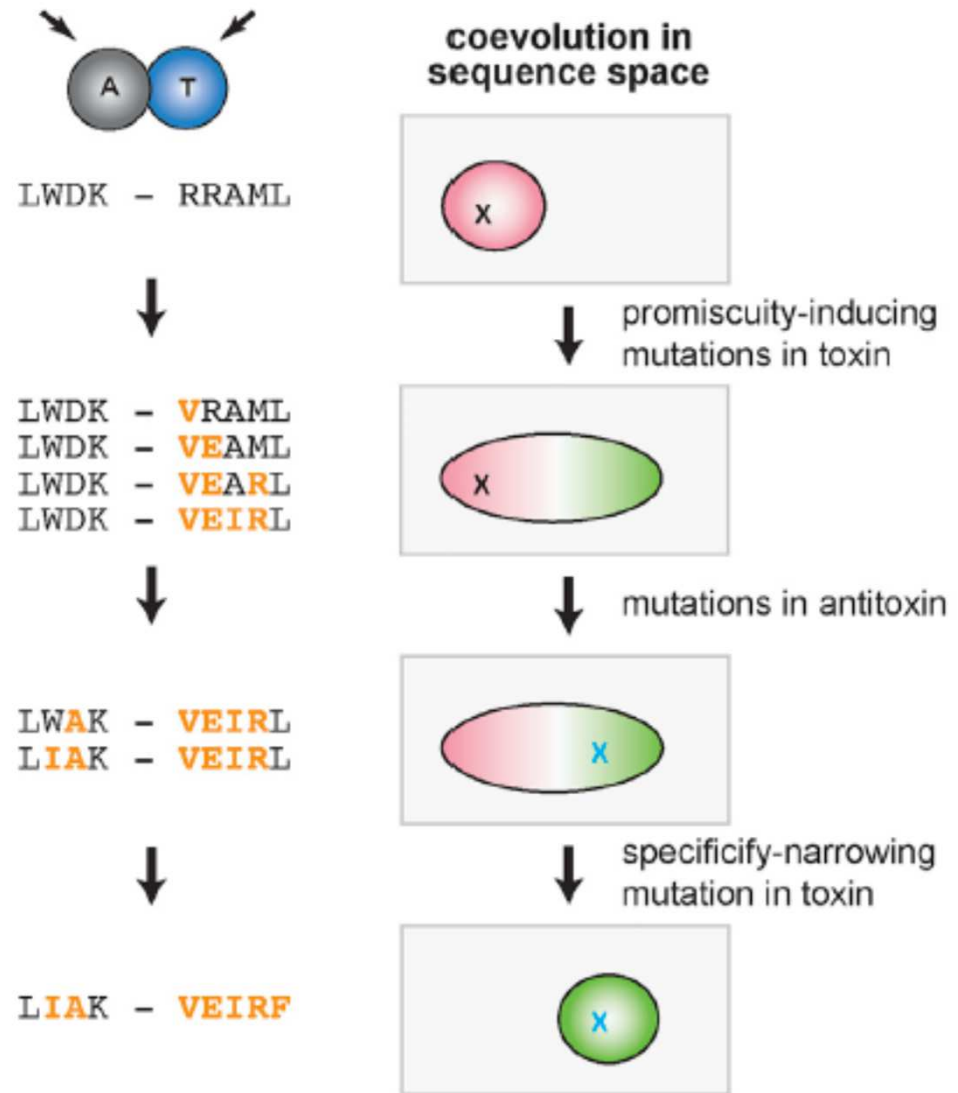
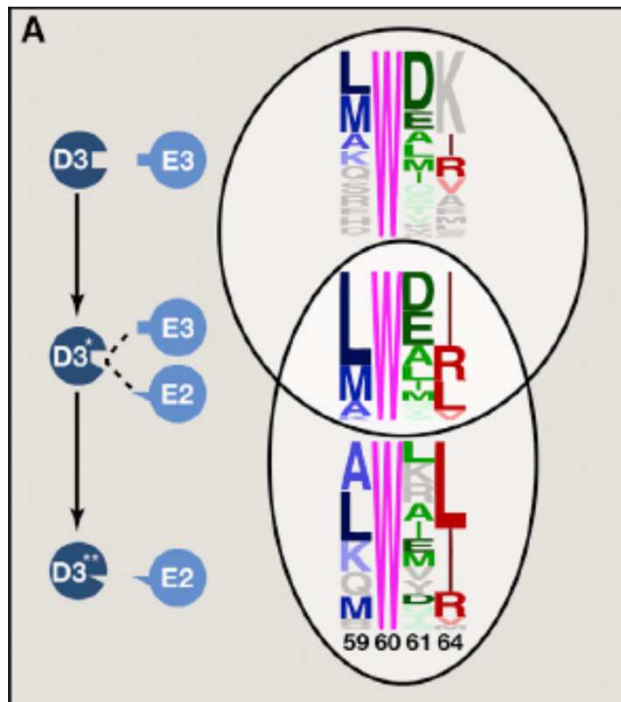


Aakre et al, Cell, 2016

- nutnost zachování funkce nesvědčí o „compensatory mutation“ (mutace v jednom z proteinů přímo kompenzována mutací v partnerském proteinu) – „kompenzace“ přichází postupně přes „promiscuous intermediate“ mutace

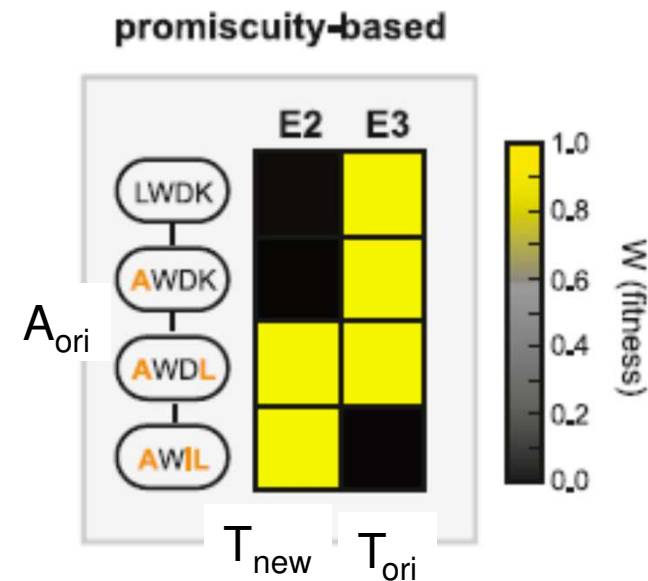
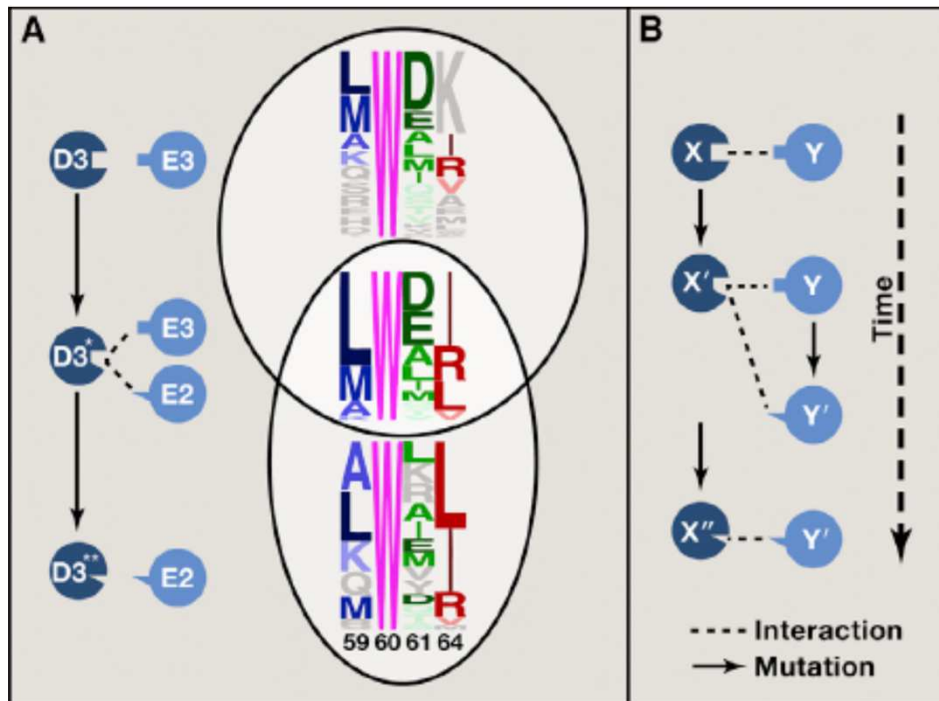
„promiskuitní“ mutace

- „promiscuous intermediate“ mutace jednoho proteinu mohou být doprovázeny „promiscuous“ mutacemi druhého proteinu (nedochází ke ztrátě PPI)



„promiskuitní“ mutace

- u „promiscuous intermediate“ mutací nedochází ke ztrátě PPI
- „promiscuous intermediate“ může interagovat i s **duplikovaným** proteinem (např. tkáňově specifickým – specifický komplex)
- později se může „oddělit“ a vytvořit nový komplex (paralelní ko-evoluce = drift)



Vznik proteinových rodin

- selekční tlak na stabilitu a funkci - nutnost zachování funkce neposkytuje příliš prostoru pro evoluci/rozvoj nových vlastností
- pro rozvoj nových vlastností, nových druhů - spíše než druhově specifické mutace proteinů lze vidět **expansi různých genových/proteinových rodin** v různých živočišných druzích (různé kopie mají různé funkce - **paralogy**)

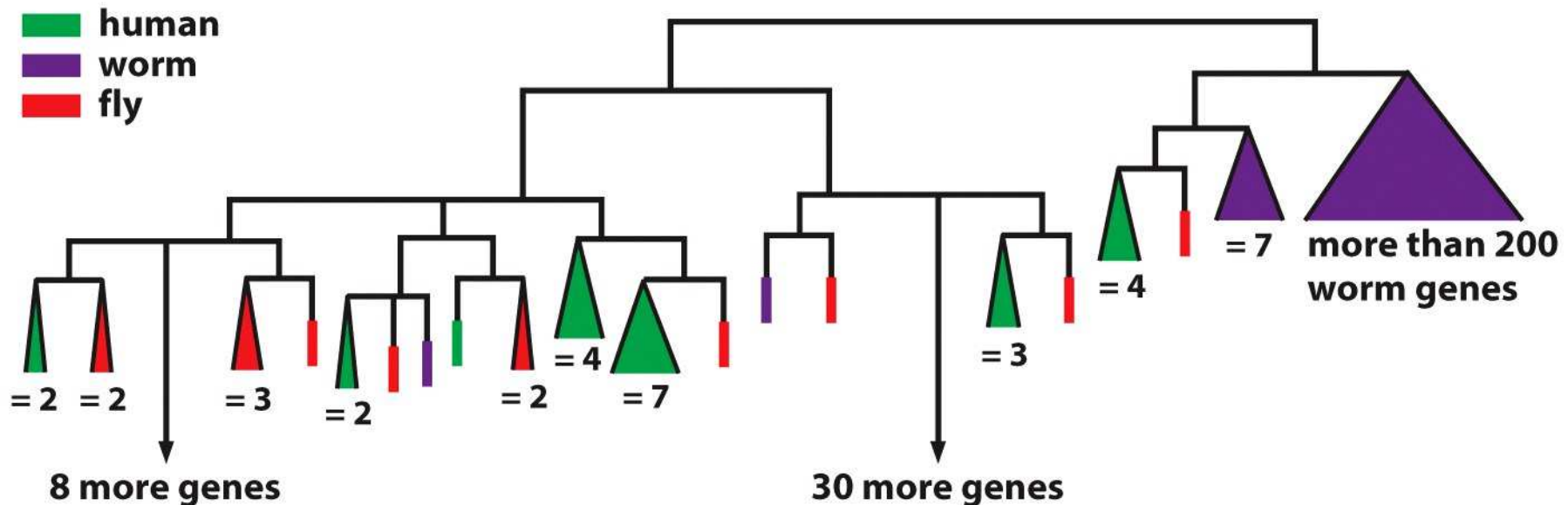
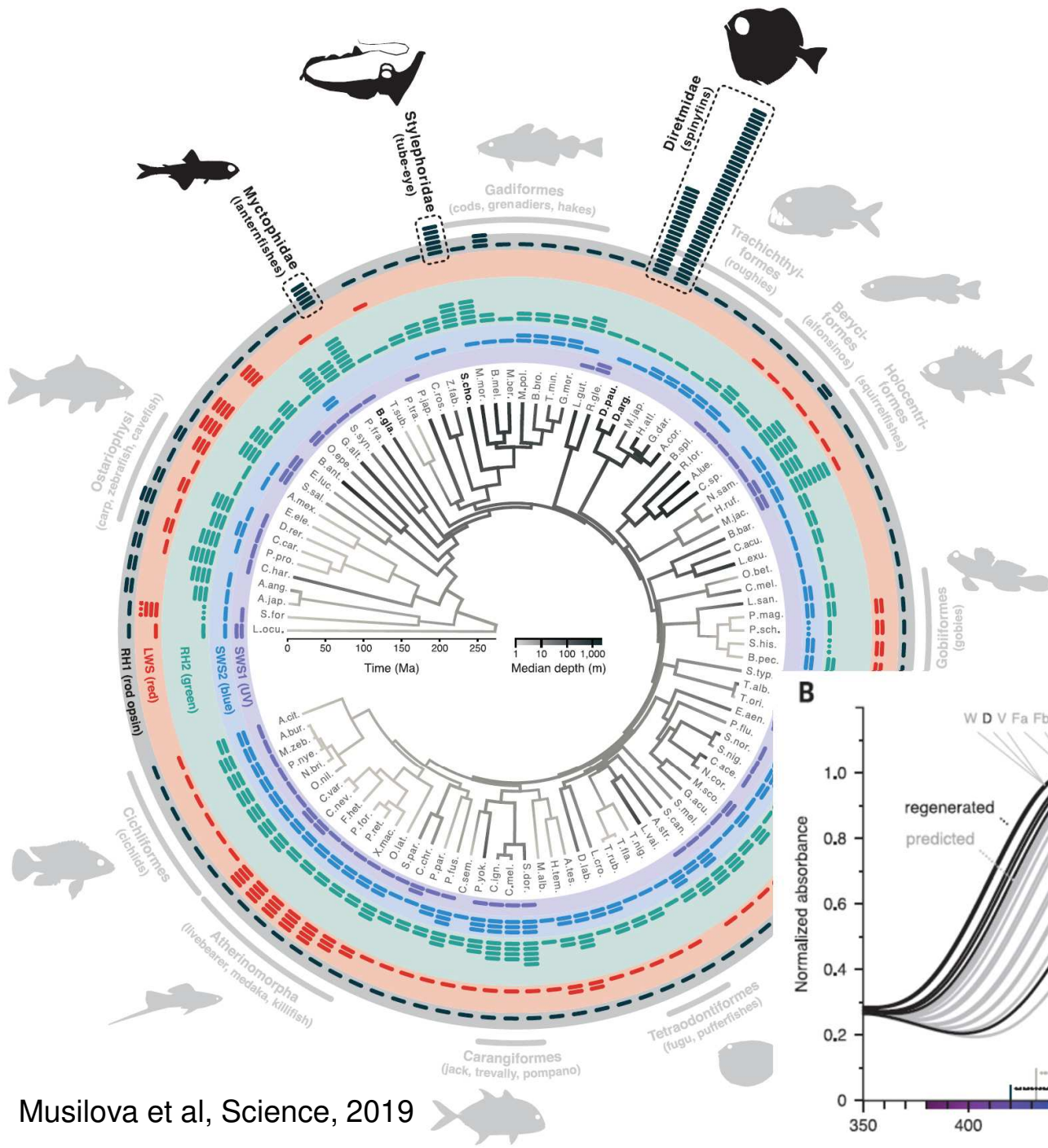
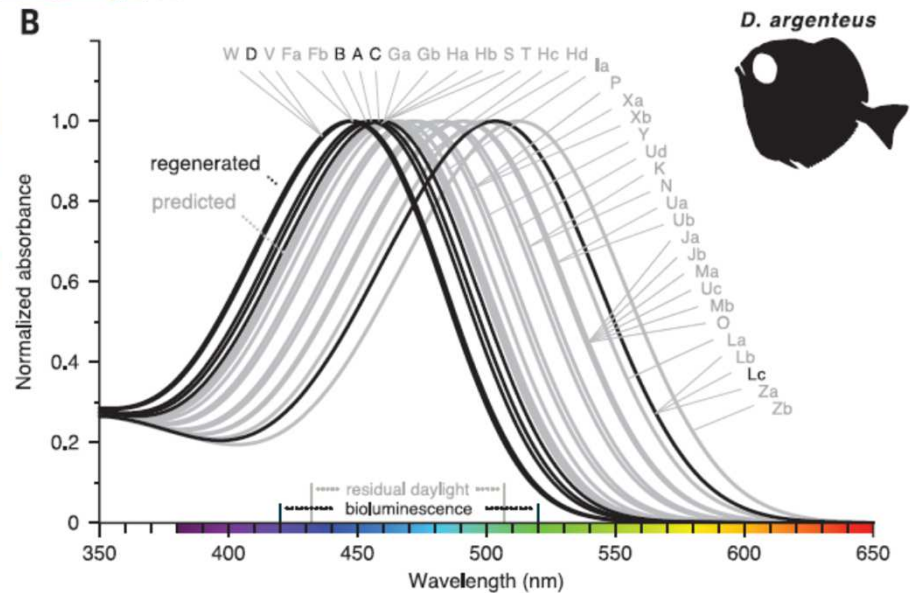


Figure 4-85 *Molecular Biology of the Cell* (2008)

(příklad superrodiny jaderných hormonálních receptorů)



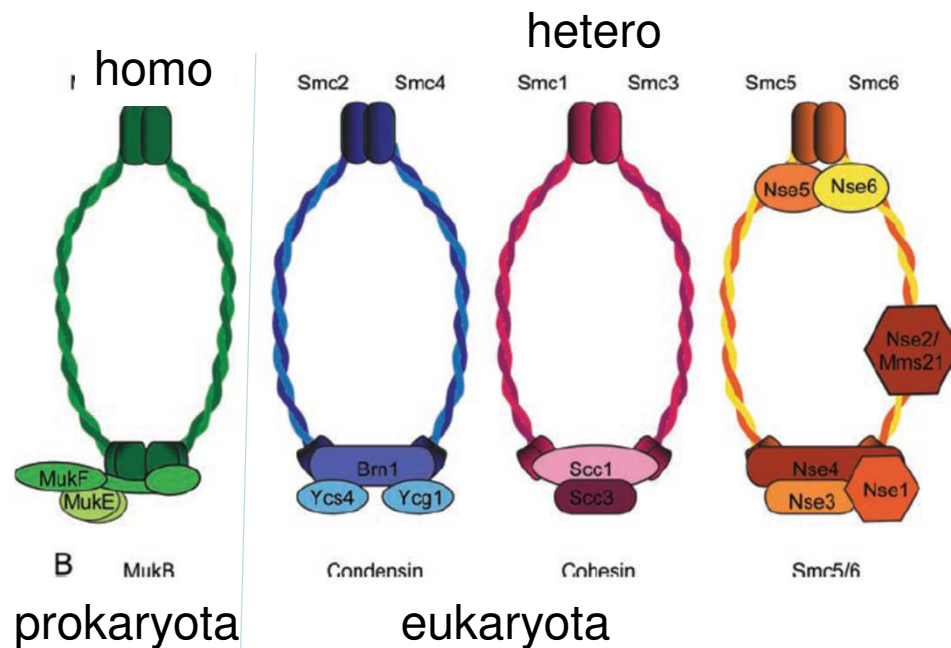
Diretmus argenteus
hlubokomořská ryba
– bioluminiscence



Musilova et al, Science, 2019

Duplikace a divergence (neo- a sub-funkcionalizace)

- hlavními tahouny evolučních procesů (všechny geny/proteiny jsou „potomky“ několika ancestrálních genů/proteinů (foldů), které existovaly v nejčasnějších živých formách (nyní cca 1000 foldů na >100000 struktur v PDB, odhad je cca 2000 foldů))

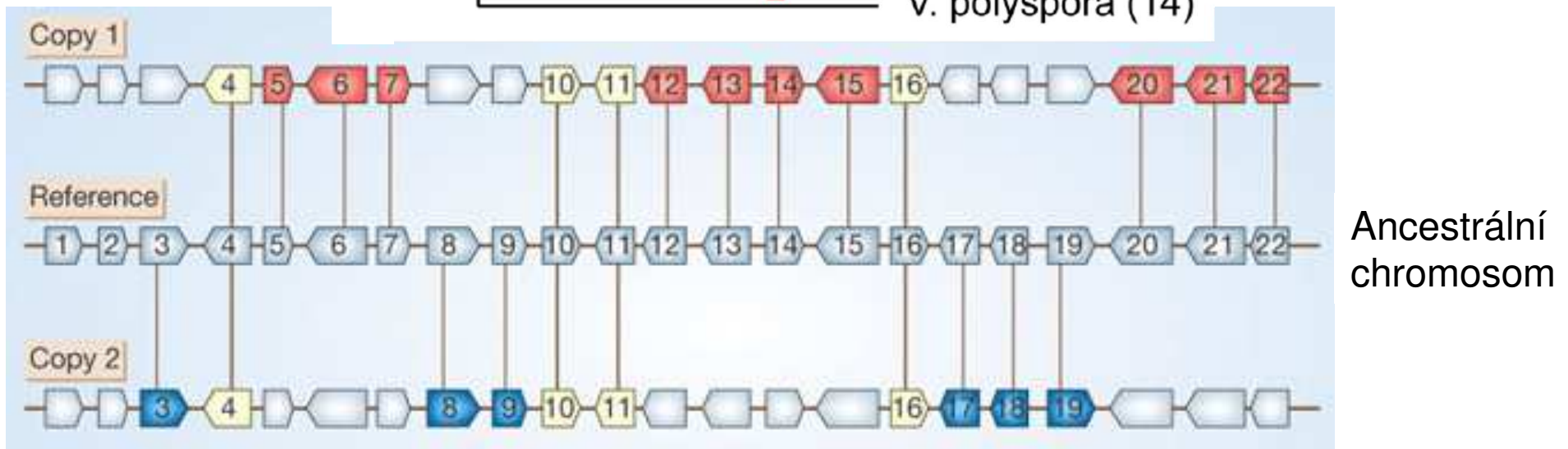
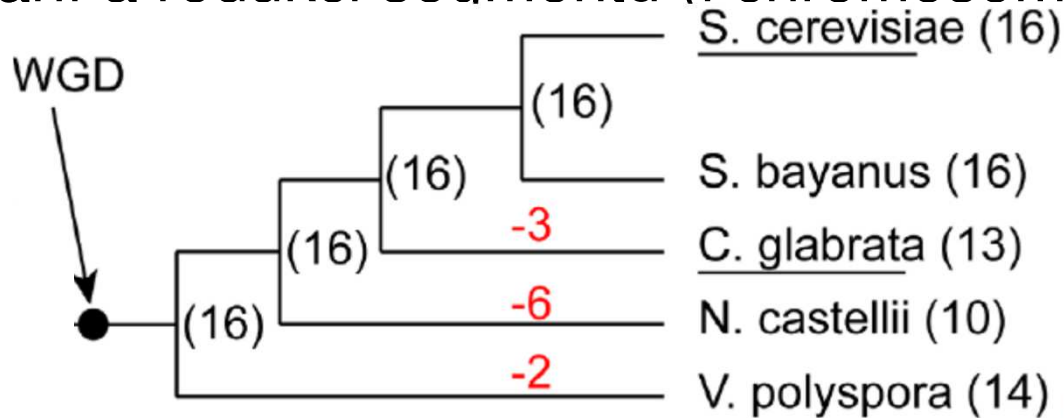


Marsh et al, ARB, 2015

- po **duplikaci** jsou oba proteiny stejné a vytváří stejný homomerní komplex – později jeden protein diverguje (mutace) a vzniká heteromer
- duplikace více genů/proteinů (podjednotek) ... komplexů

Celogenomová duplikace (u kvasinek)

cca 30% genomu *S.c.* vzniklo duplikacemi => došlo k **celogenomové duplikaci** (WGD) => a poté došlo k přeskupování a redukci segmentů (i chromosomů) – polyploidie u kyttek ...

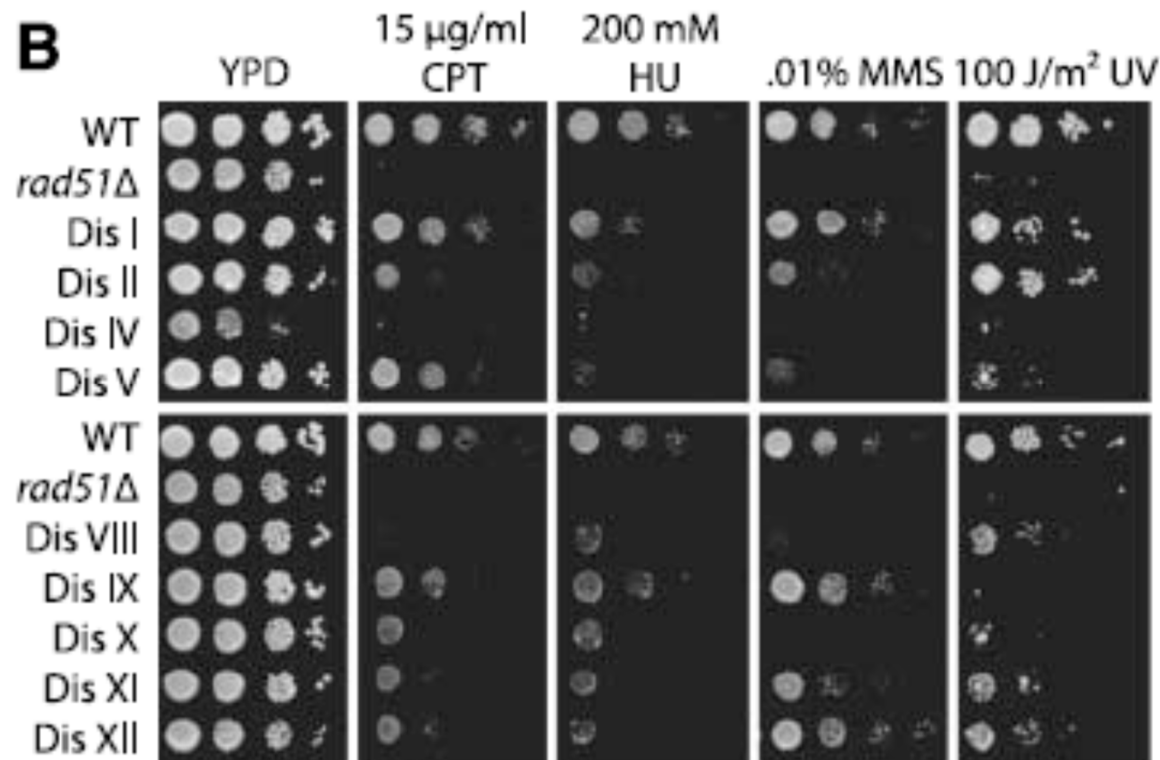


-následují **mutace** – inaktivující tj. pseudogeny (ustaví hladinu proteinu zpět na původní) nebo nefunkční (zatěžují expresní-chaperonový aparát – snaha odstranit)

Aneuploidie - „duplikace“ chromosomu

- duplikace ALE ... – na počátku stejné sekvence = stejné funkce - vyšší hladina proteinu/ů může být toxická

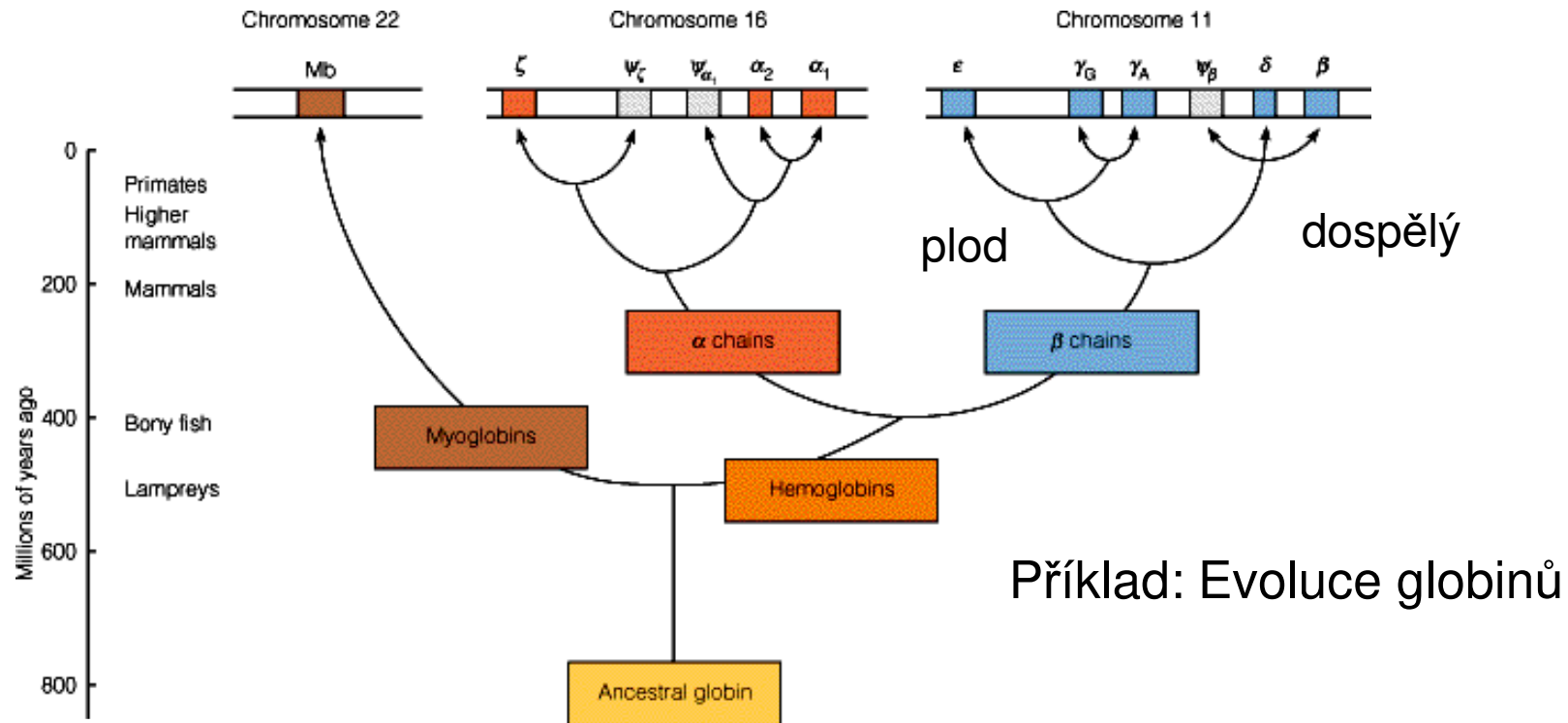
(**aneuploidie** – kvasinky s 1 chromosomem navíc, nádorové buňky)



- nadbytek proteinů (např. transkripčních faktorů) nebo nerovnováha podjednotek komplexů znamená disregulaci některých procesů

Duplikace reverzní transkripcí a integrací DNA

- pouze individuální **geny** nebo pouze domény = exony



- na počátku stejné sekvence = stejné funkce (pod jinými **promotory** – jiný lokus tzn. jiné „okolí“ zaintegrované „mRNA“ tzn. jiná regulace exprese – „nové“ buňky) - pseudogeny (např. rozdíl v genomu člověka a šimpanze je především v duplikaci 30Mbp – cca 50kbp segmenty - nikoli v jednotlivých mutacích tj. SNPs)

Evoluce rodiny globinů (duplikace)

- červy, hmyz a primitivní ryby mají jeden globin (150AMK)

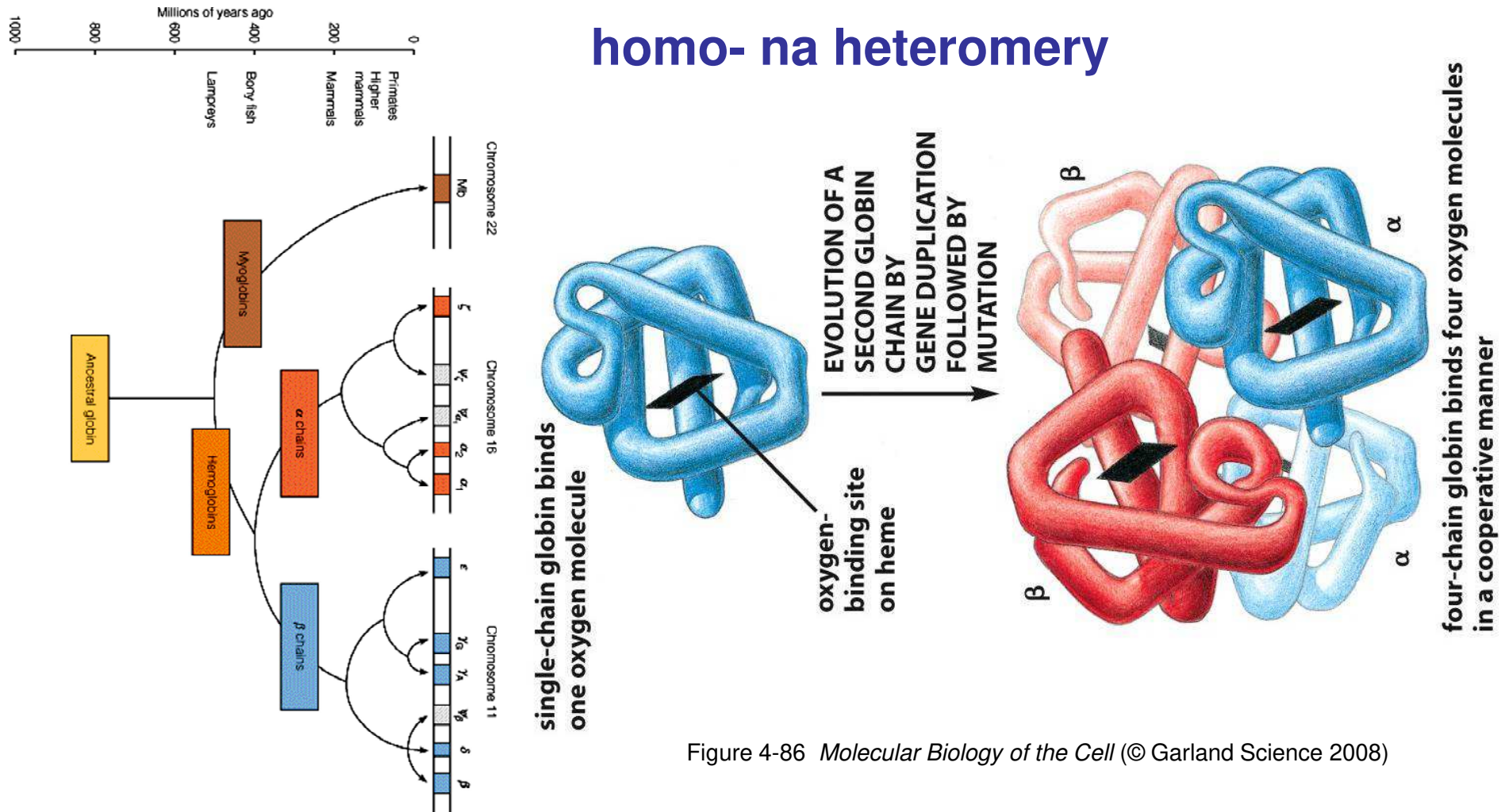
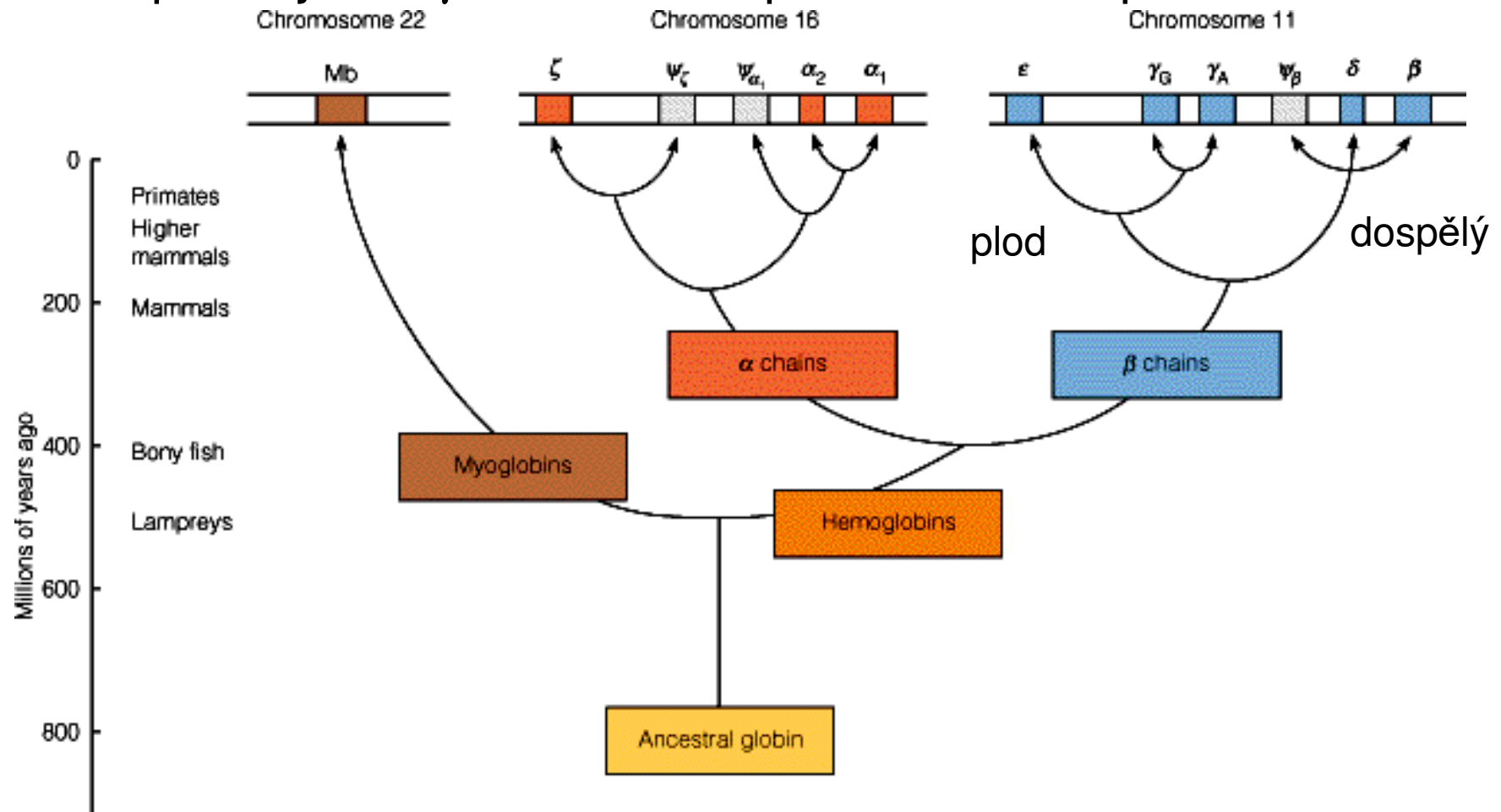


Figure 4-86 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

- vyšší obratlovci mají α- a β-globin (tvoří α₂β₂ komplex – účinnější přenos kyslíku) – vyvinul se u vyšších ryb (500Mya)

Evoluce rodiny globinů (duplikace)

- ... u savců se dále duplikoval β -globin, který je exprimován specificky v embryu – má vyšší afinitu ke kyslíku a napomáhá přenosu kyslíku z krve matky do krve plodu
- dále se duplikoval a specializoval na časná vývojová stádia $\alpha_2\varepsilon_2$ a pozdější $\alpha_2\gamma_2$ - k další duplikaci došlo u primátů $\alpha_2\delta_2$



Duplikace reverzní transkripcí a integrací DNA

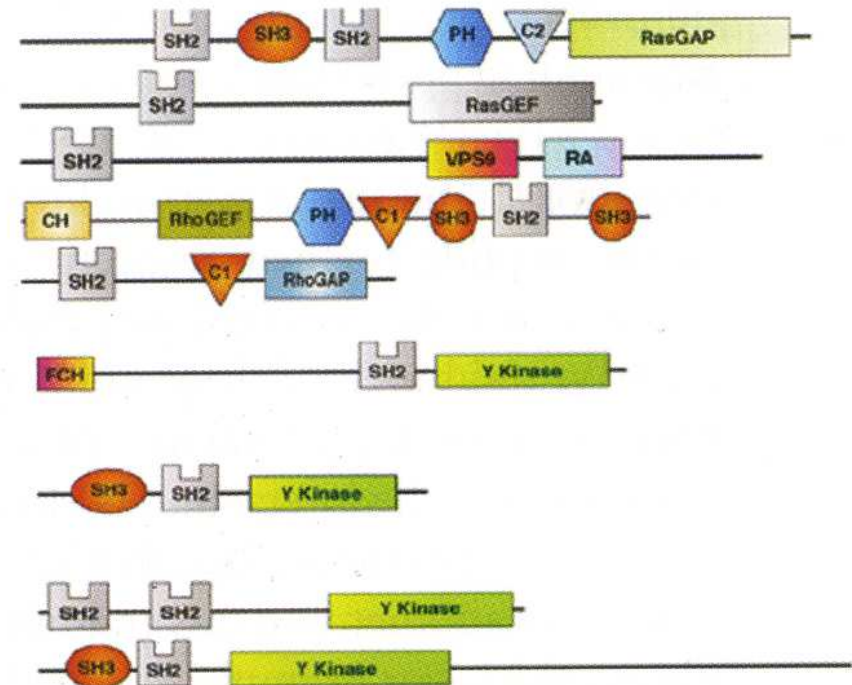
- pouze individuální geny nebo pouze **domény** = exony
- většina domén v proteinech obratlovců pochází/existuje v bezobratlých – pouze 7% lidských proteinů/domén je specifických pro obratlovce)
- fúze domén naznačuje funkční příbuznost nebo dokonce přítomnost v komplexu (v organismu s nefúzovanými doménami - ChimeraDB)

Small GTPase
Signaling

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

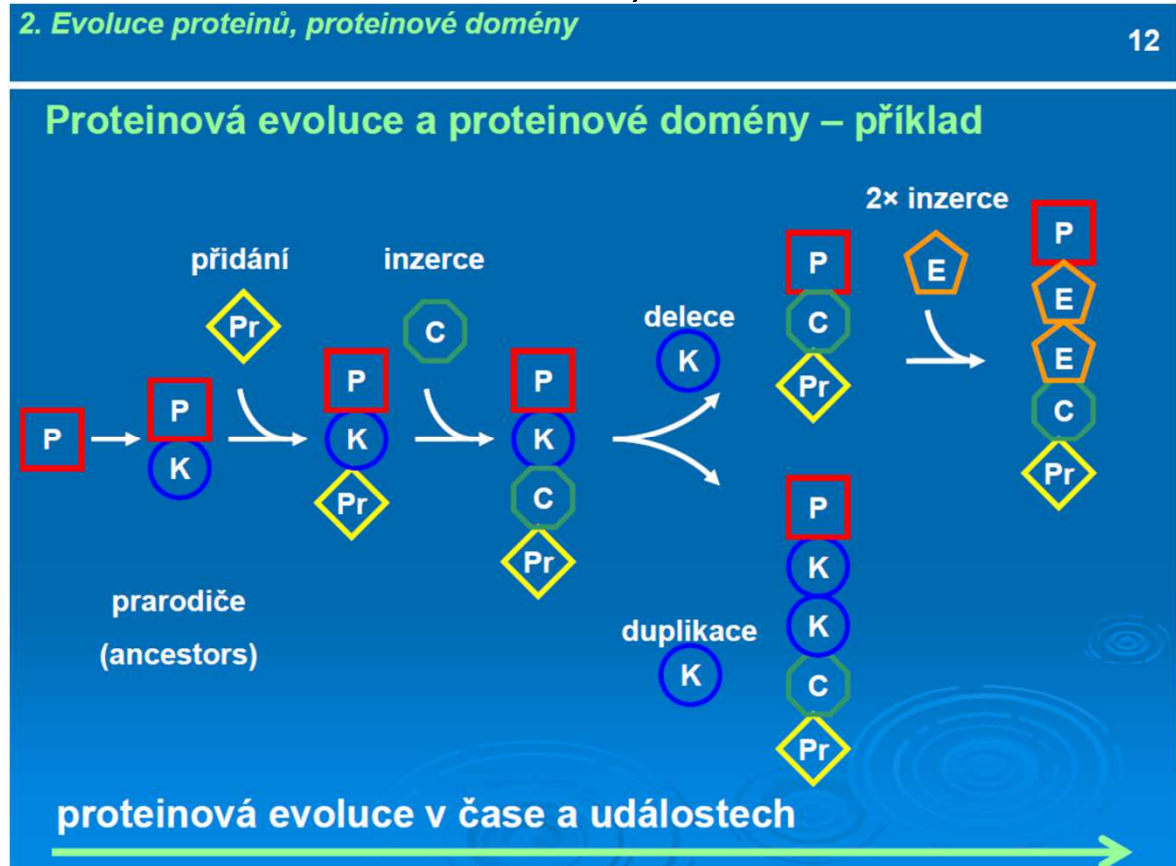
Kinases

Fps, Fer
Src, Csk, Ctk/Hyl,
Fgr, Fyn, Yes, Hck,
Lck, Lyn, Blk, Frk,
Brk, DJ697K14.1
Zap70, Syk
c-Abl, Arg/Abl2



Shuffling domén

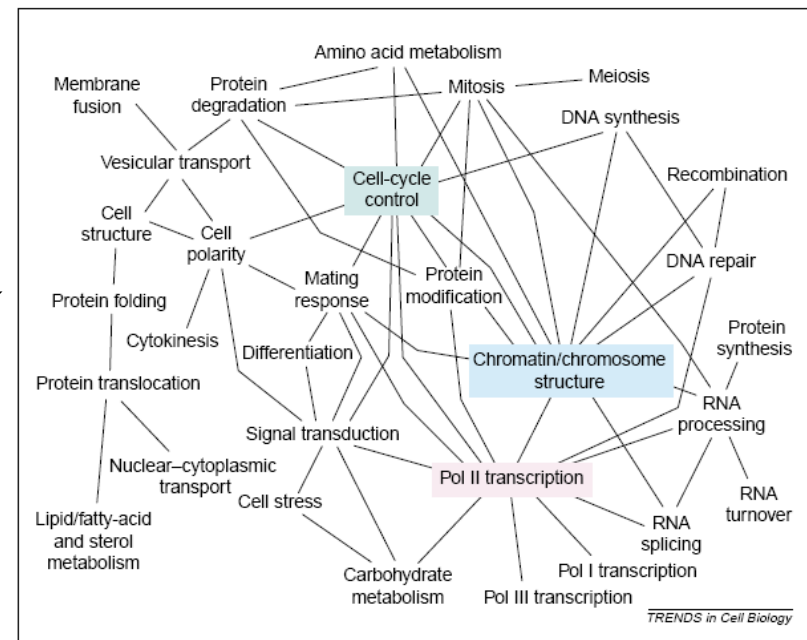
- hranice domén jsou většinou kódovány **introny** – bez intronů by bylo obtížnější přesně vybrat pouze „doménovou“ část
- „**shuffling**“ domén (inzerce/delece) – poskládají se nové geny/proteiny – vytváří nová funkční/fyzická provázání (interakce => nové „prosítování“ interaktomů)



Evoluce interaktomu

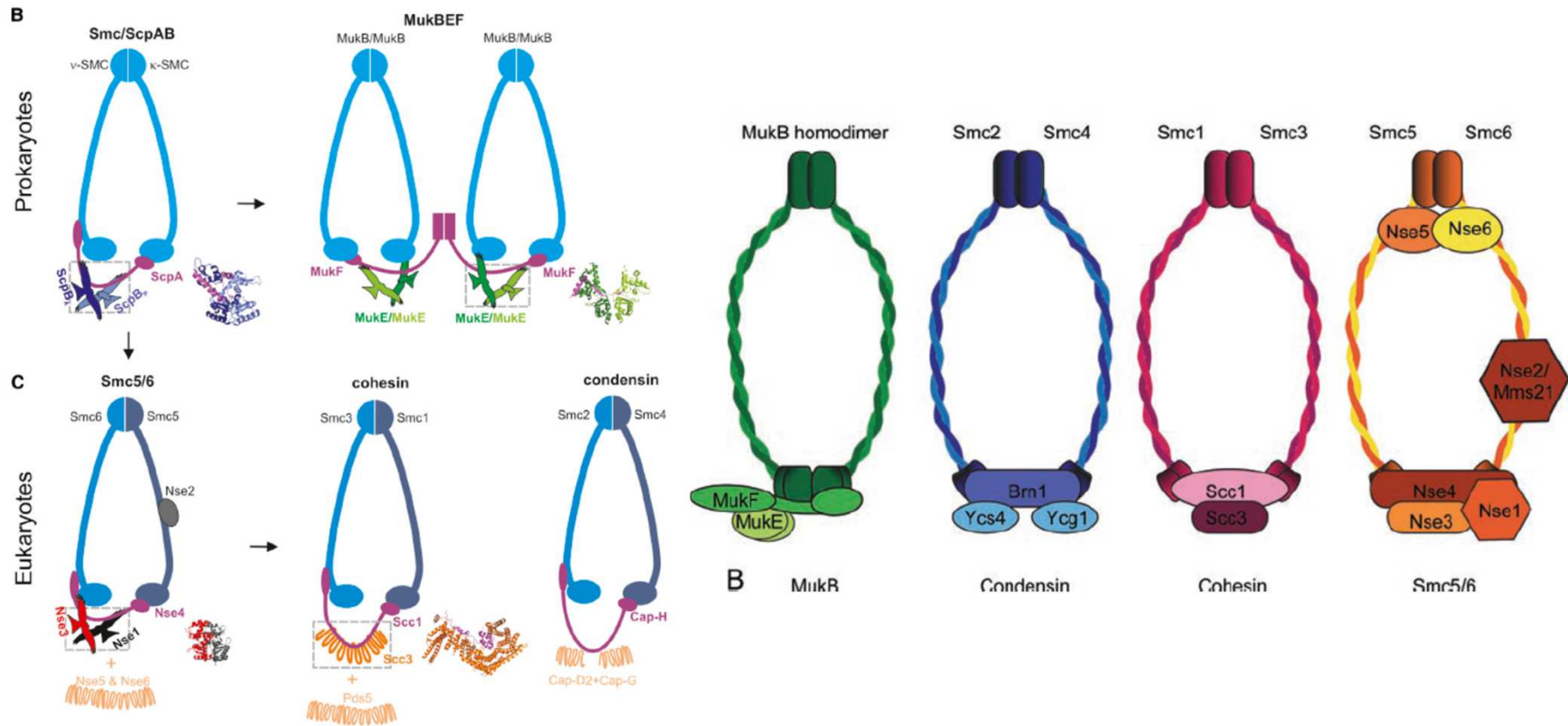
- WGD vede více k redundanci a sub-funkcionalizaci
- WGD zachovává duplikáty komplexů (kvůli zachování stechiometrie podjednotek komplexu – při genové erozi se ztrácí více geny mimo komplexy)...
- více-podjednotkové komplexy jsou pod větším tlakem (musí zároveň „zachovat“ více vazeb „najednou“) než méně-podjednotkové komplexy

- duplikace jednotlivých genů vedou více k diverzifikaci funkce
- duplikace domén (shuffling) vede k neo-funkcionalizaci a k přemodulování (**rewiring**) interaktomu



Příklady evoluce komplexů -SMC

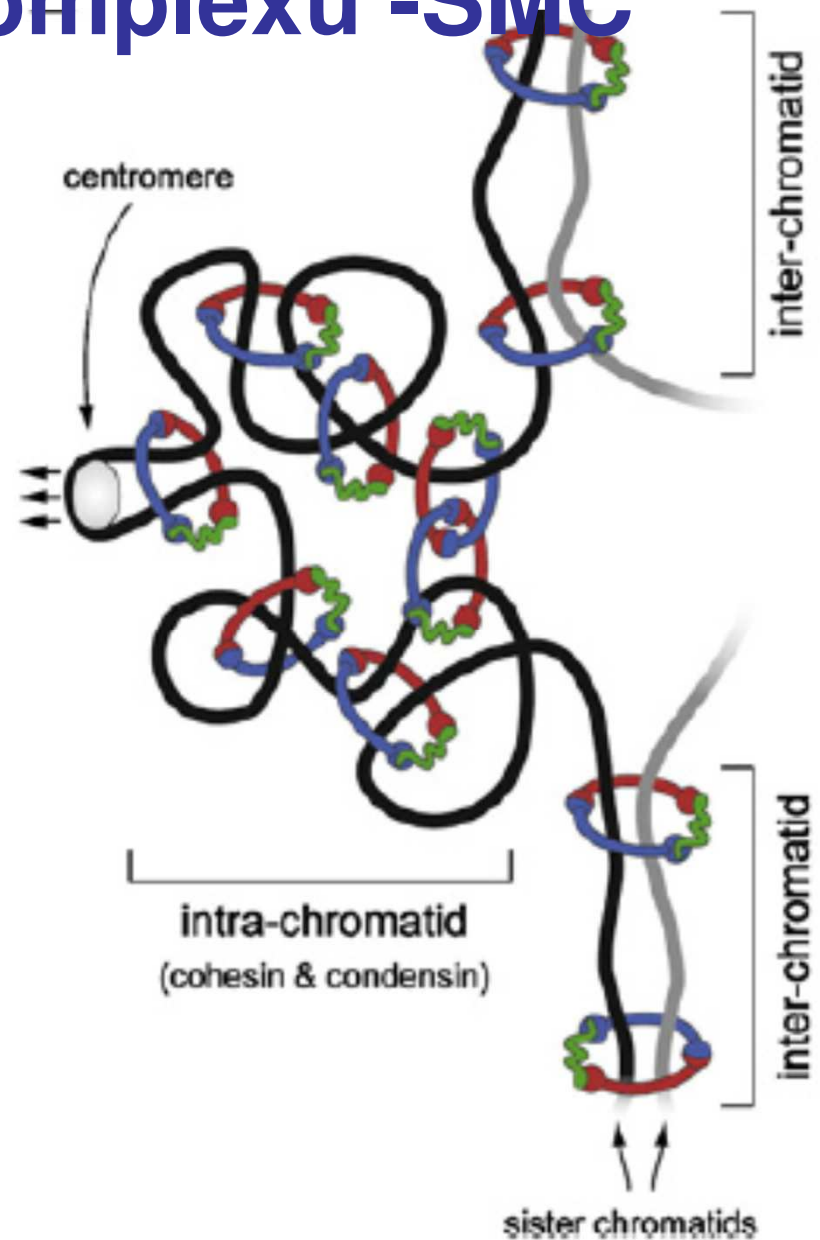
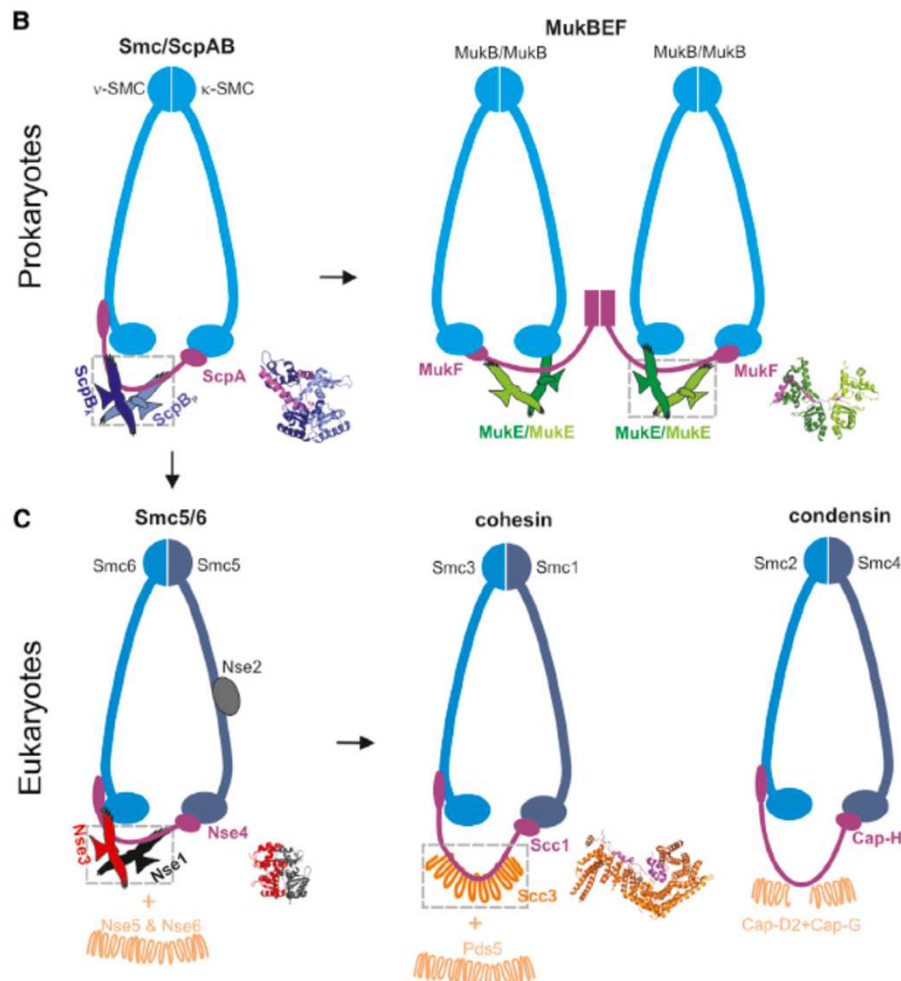
- bakterie mají po jednom komplexu složeném z homodimeru SMC/MukB a 2 Nse



- eukaryota mají 3 SMC komplexy – SMC heterodimery + kleisin (další podjednotky nepříliš konzervované) - (příklad využití konzervovaného motivu a alterace částí systému/komplexu)

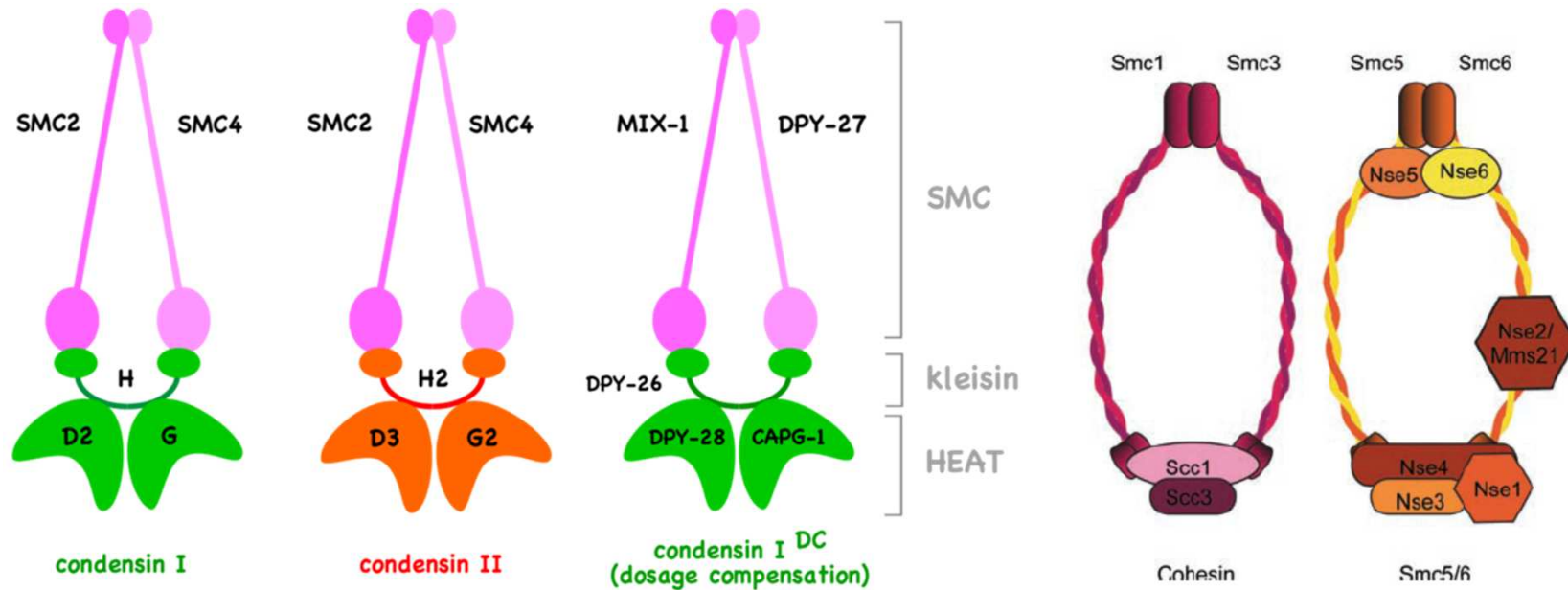
Příklady evoluce komplexů -SMC

- konzervovaný motiv (kroužek)
- SMC heterodimery + kleisin

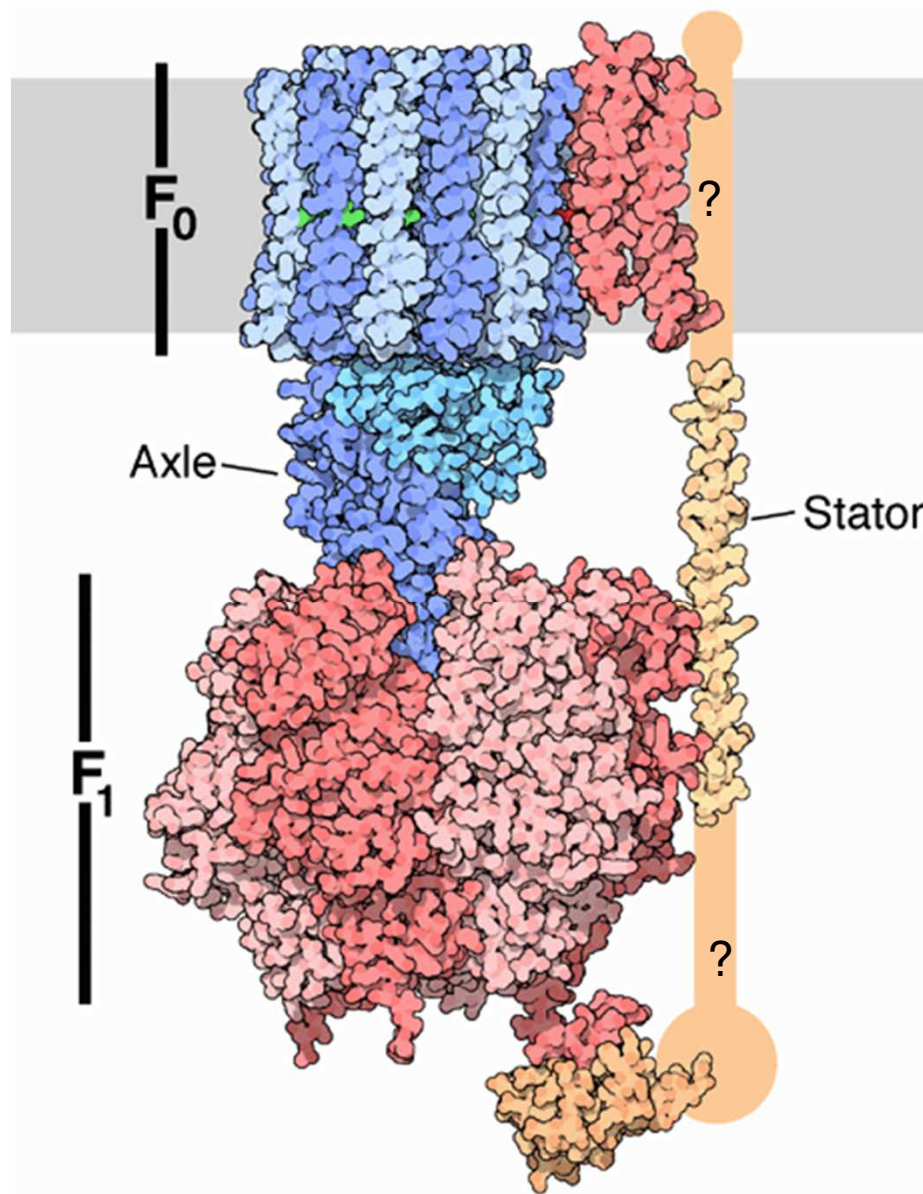


- alterace – kohese x kondensace
(Nse podjednotky, faktory ovlivňující loading = místo, čas ...)

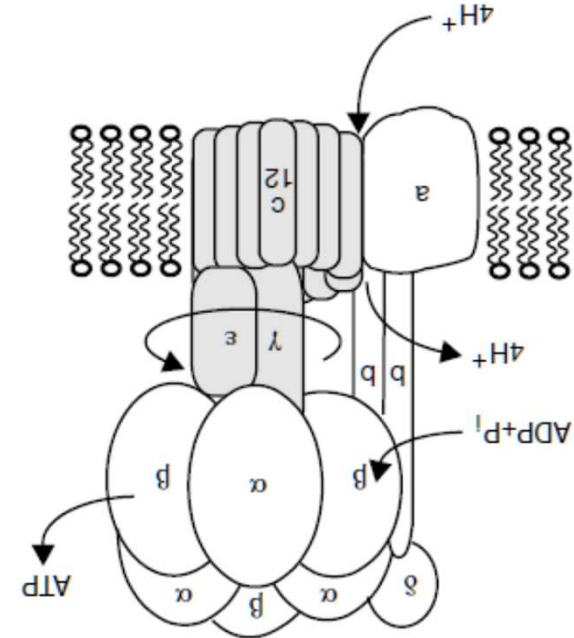
Příklady evoluce komplexů -SMC



- kondensin (I = H+D2+G; II = H2+D3+G2; “dosage compensation” = DC komplex všechny jiné podjednotky)
- kohesin = mitotický a meiotický (liší se kleisinem = kvasinky Scc1xRec8, navíc obratlovci Scc3 2x = SA1 a SA2)
- SMC5/6 komplex = mitotický a meiotický (lidský = NSE4a x NSE4b-testis/meiosa specifický)

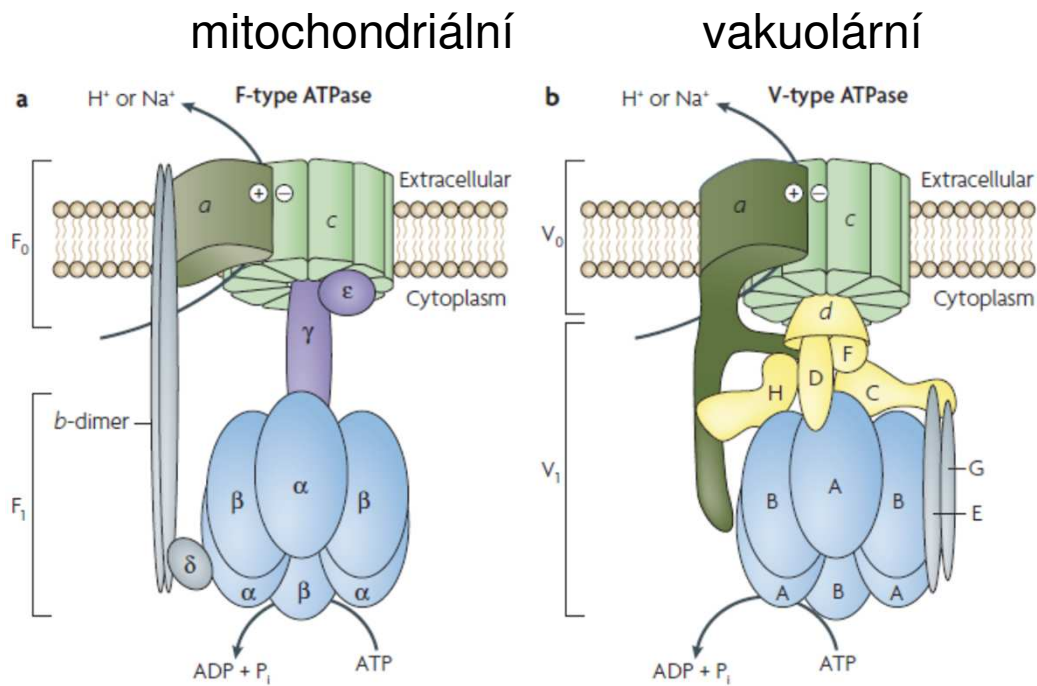


Molekula měsíce v prosinci 2005
Rastogi & Girvin, Nature, 1999



F₀ je protonový motor (uložen v membráně) poháněný tokem vodíkových iontů (z dýchacího řetězce) přes membránu. Tento rotor je spojen s druhým F₁ chemickým motorem poháněným ATP (nebo vyrábějícím ATP). Oba motory jsou spojeny statorem.

„ATP syntasa je jedním z divů molekulárního světa“. Je to dvojitý molekulární motor – „nanostroj“ – vyrábějící většinu ATP (energie).



vytváří ATP

vytváří pH gradient

podobné proteinové komplexy – tzv. AAA ATPasy jsou součástí jiných komplexů (v jiných procesech):

- sekreční systém (T3SS injectisom)
- pohon bičků
- „denaturace“ DNA: helikázy (MCM ...)
- v opravě poškozené DNA: Rad51, RecA

Mulkiđjanian et al, NRM, 2007

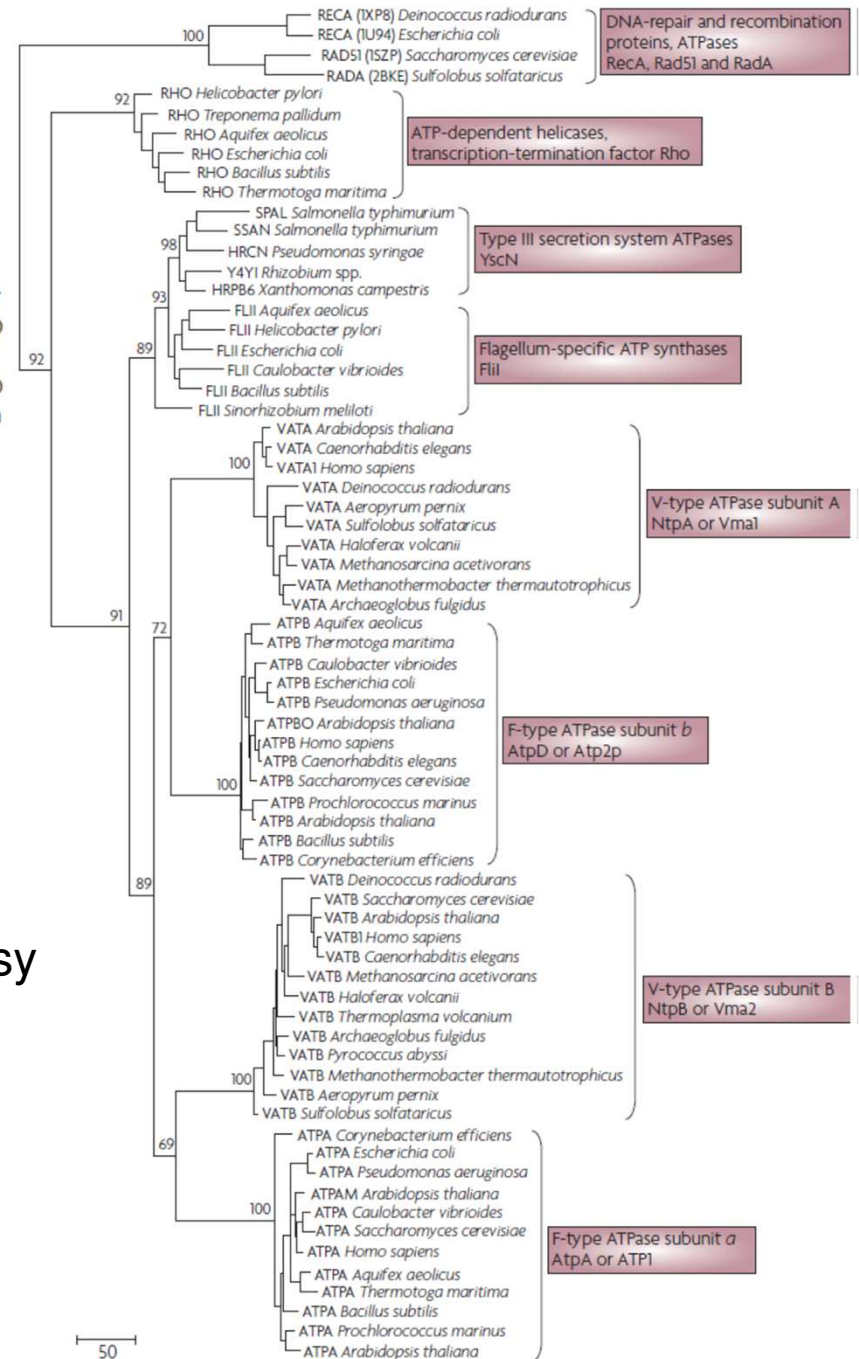
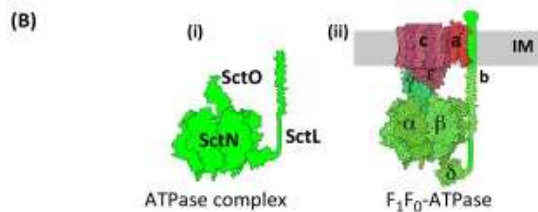
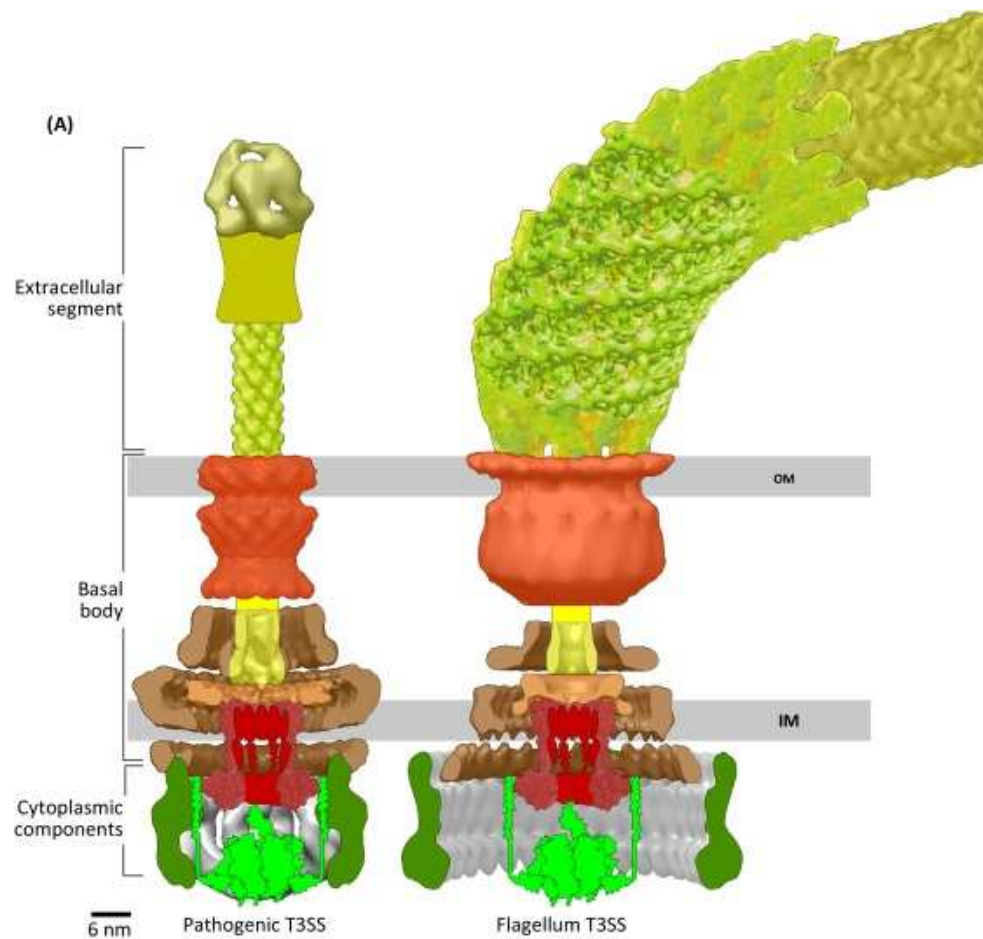


Figure 3 | Phylogenetic tree of the catalytic subunits of the F- and V-type ATPases and related P-loop ATPases. The protein sequences were retrieved from [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (for the RecA family, four



Trends in Biochemical Sciences

- ATPasové pumpy ...
- sekreční systém (T3SS injectisom)
- pohon bičičků ...

Mulkiđjanian et al, NRM, 2007

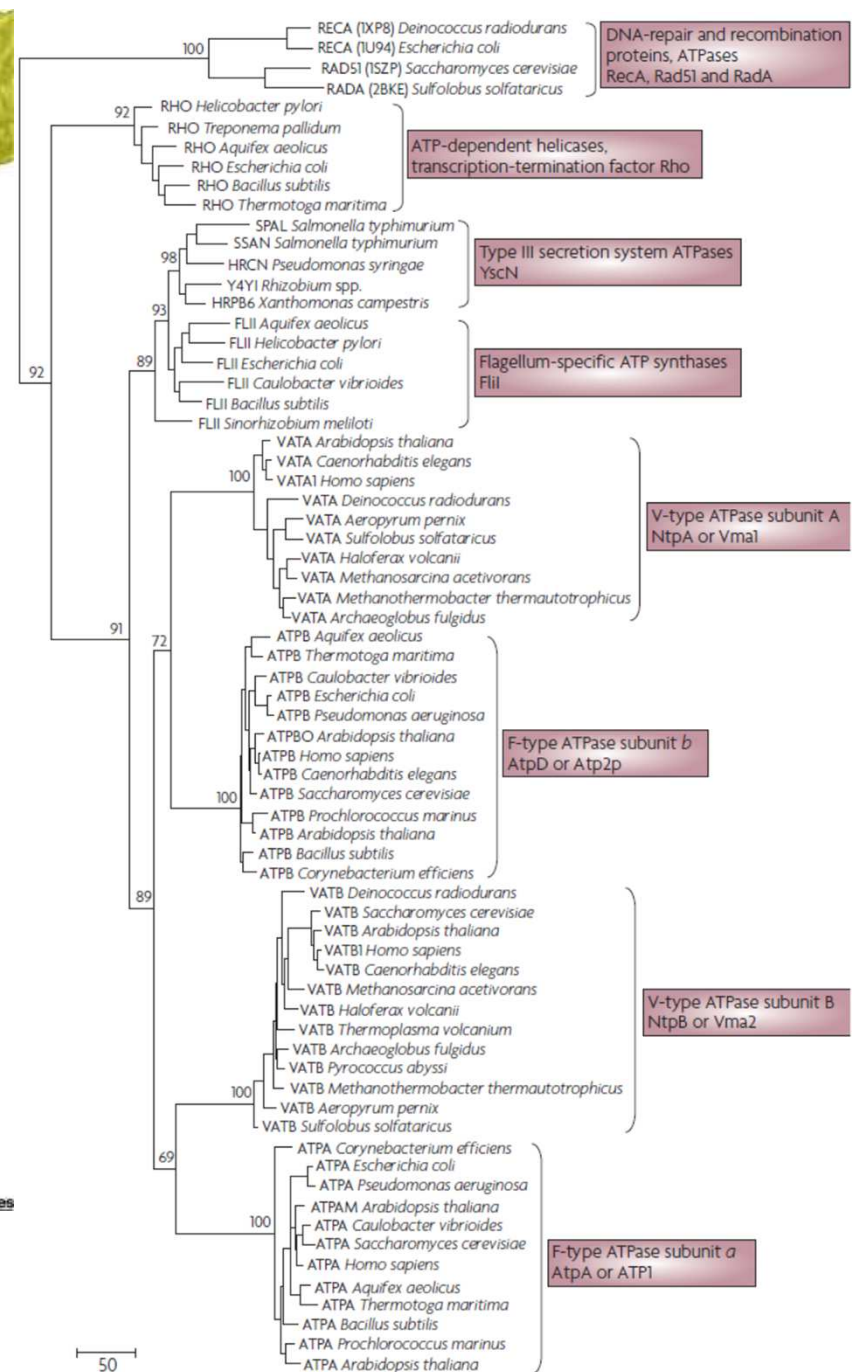
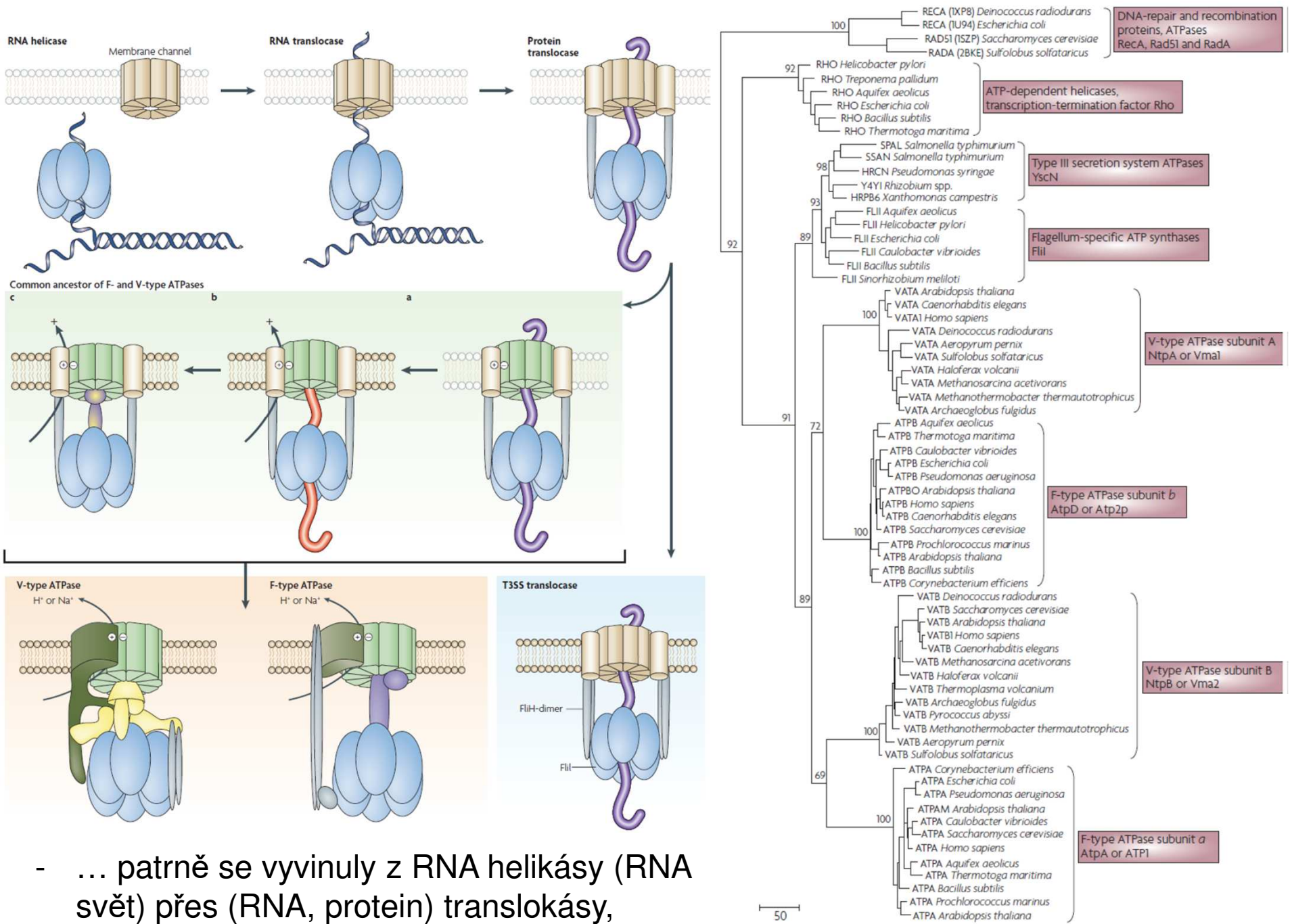


Figure 3 | Phylogenetic tree of the catalytic subunits of the F- and V-type ATPases and related P-loop ATPases. The protein sequences were retrieved from [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (for the RecA family, four



- ... patrně se vyvinuly z RNA helikázy (RNA svět) přes (RNA, protein) translokázy, ATPasové pumpy ...

Figure 3 | Phylogenetic tree of the catalytic subunits of the F- and V-type ATPases and related P-loop ATPases. The protein sequences were retrieved from GenBank (for the RecA family, four

Souhrn

Průběh evoluce je ovlivněn mnoha faktory

- Selektivní tlaky udržující funkční a stabilní (dříve vytvořené) komplexy
- Mutace modifikující proteiny/komplexy (drift) jsou eliminovány u esenciálních proteinů
- Zatímco duplikované mohou podléhat mutacím „volněji“
- Duplikace a neofunkcionalizace (mutace) je hnací silou vzniku nových proteinů (nové kombinace domén) - komplexů – funkcí – typů buněk - organismů

Praktické implikace (pro zkoušku)

- analýza sekvenční podobnosti (stupeň konzervace)
 - napoví o přítomnosti domén (alignment – podobné AMK, doplnit analýzou sek. a terc. struktury)
 - projekce podobnosti do 3D modelu (ConSurf, PatchFinder) - konzervovaná struktura tj. vnitřní AMK držící fold (u ortologů i paralogů)
 - konzervované PPI kontaktní zóny na povrchu proteinu (povrchové AMK jsou konzervované pouze u ortologů – ne u paralogů - pokud jsou v alignmentu i paralogy, pak podobnost neuvidíte)