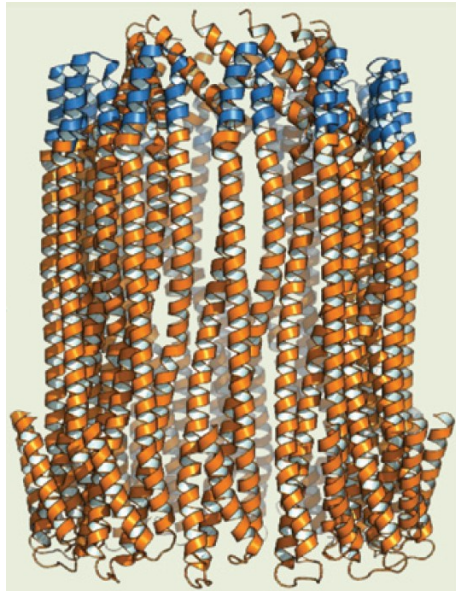


Souhrn předchozí přednášky

- protein-proteinové interakce (interakce, příklady)

Tropomyosin

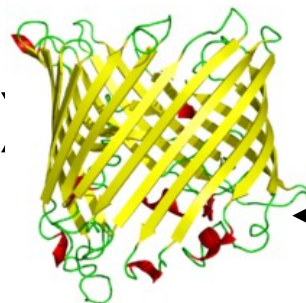


Interakce mezi:
šroubovicemi (coiled-coil)
žlábkem a strunou
komplementárními povrchy

- podobné síly/principy jako při skládání proteinů
- interakce stabilní i dočasné ...



- Proč skládat makromolekuly z menších (pod-)jednotek?
- Velký komplex (homo-oligomer) může být kódován relativně krátkou genetickou informací
- Menší pravděpodobnost defektní makromolekuly (menší gen => méně mutací + dá se relativně snadno vyhnout chybám – odstraní se pouze jedna poškozená menší podjednotka => méně energie než pro nápravu celé struktury)
- Skládání (i rozpad) komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí tj. nízká energie (toxin je transportován jako rozpustný monomer a poté se skládá => stává se toxickým až mimo původní buňku)
- Komplexy mohou být dynamičtější (flexibilita)



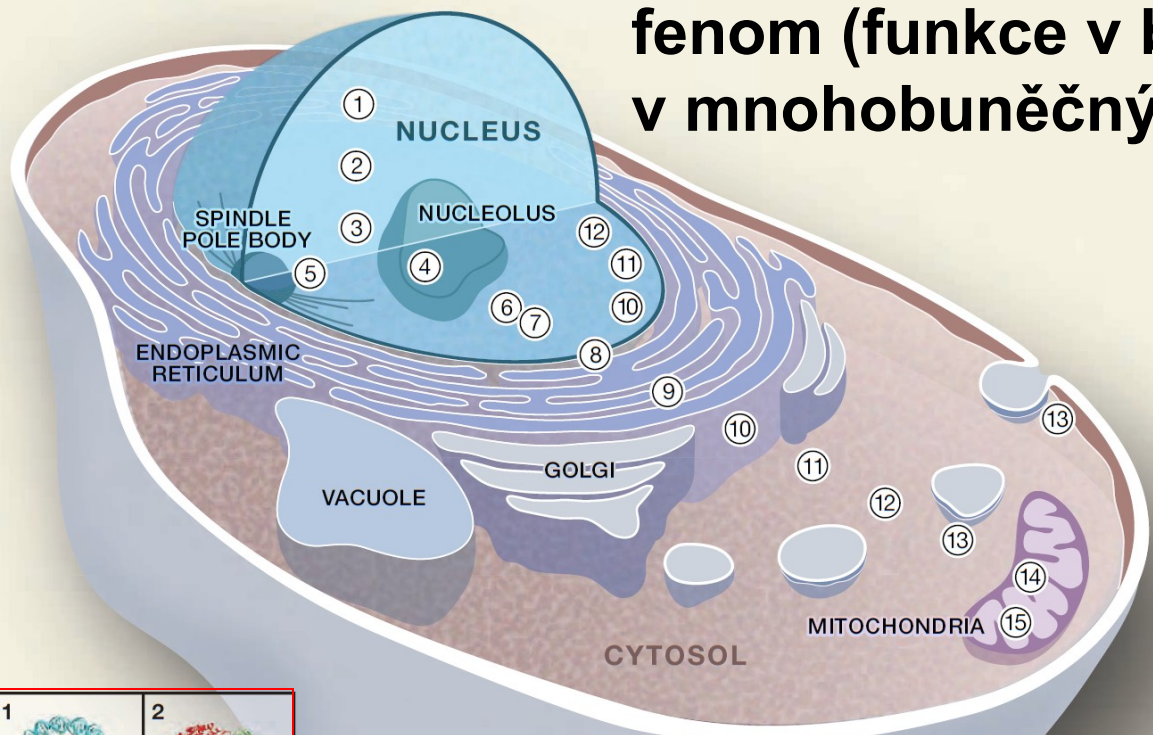
bakteriální toxin →

← porin v mitochondrii

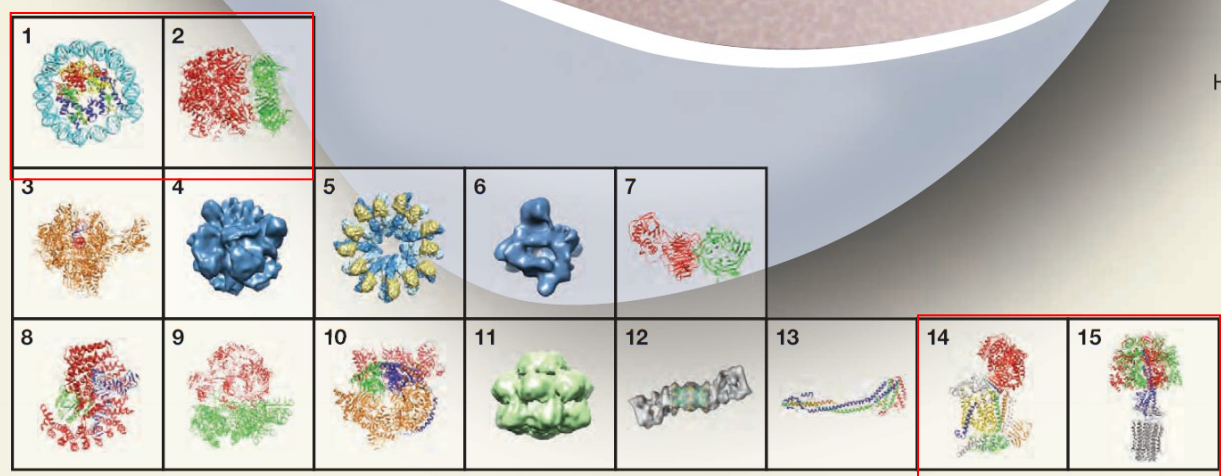


gen -> protein -> interakce -> komplex -> superkomplex
 ... (molekulární stroj) -> kompartment -> buňka ...

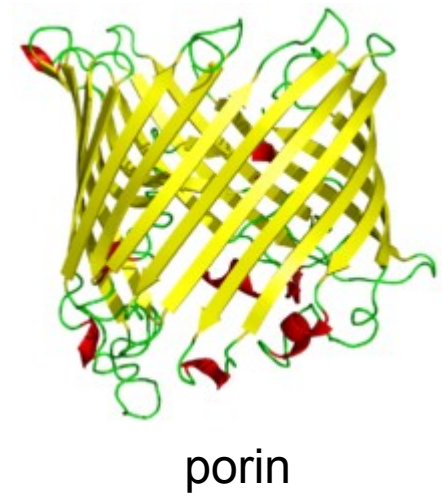
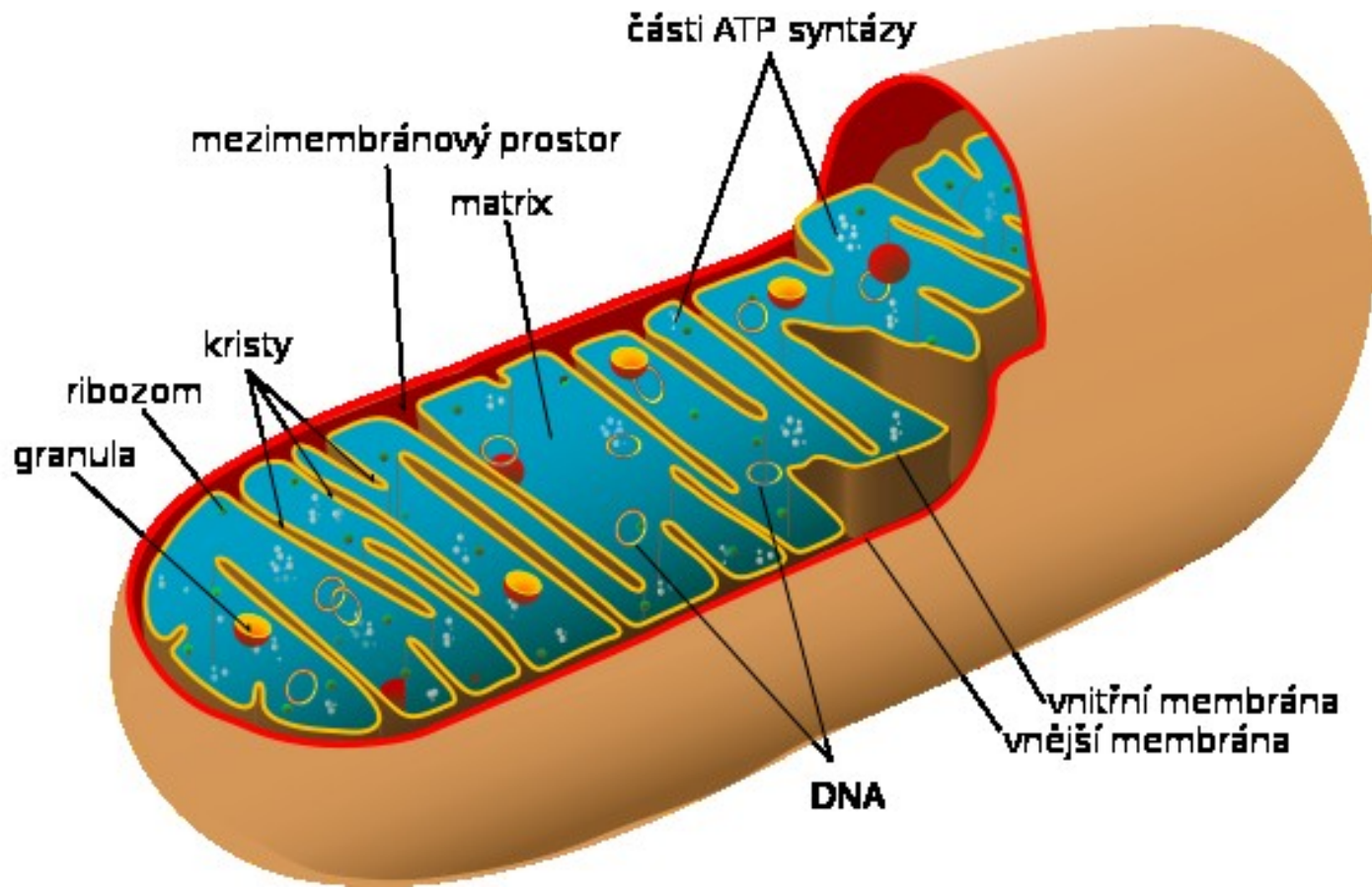
genom -> proteom -> interaktom -> komplexom -> ...
 fenom (funkce v buňce -> funkční znak v mnohobuněčných organismech)



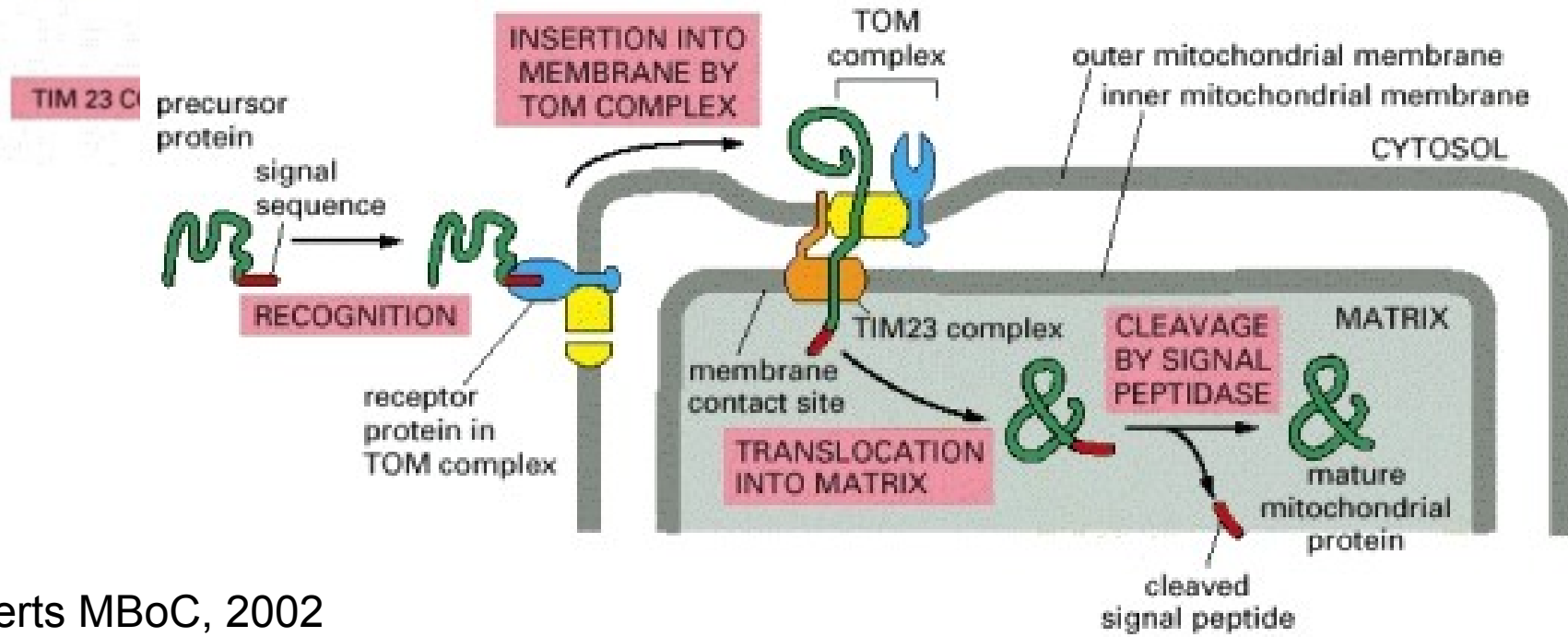
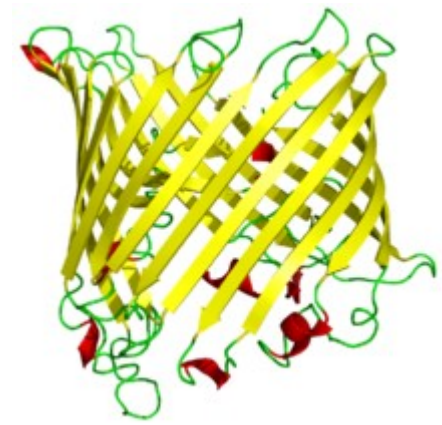
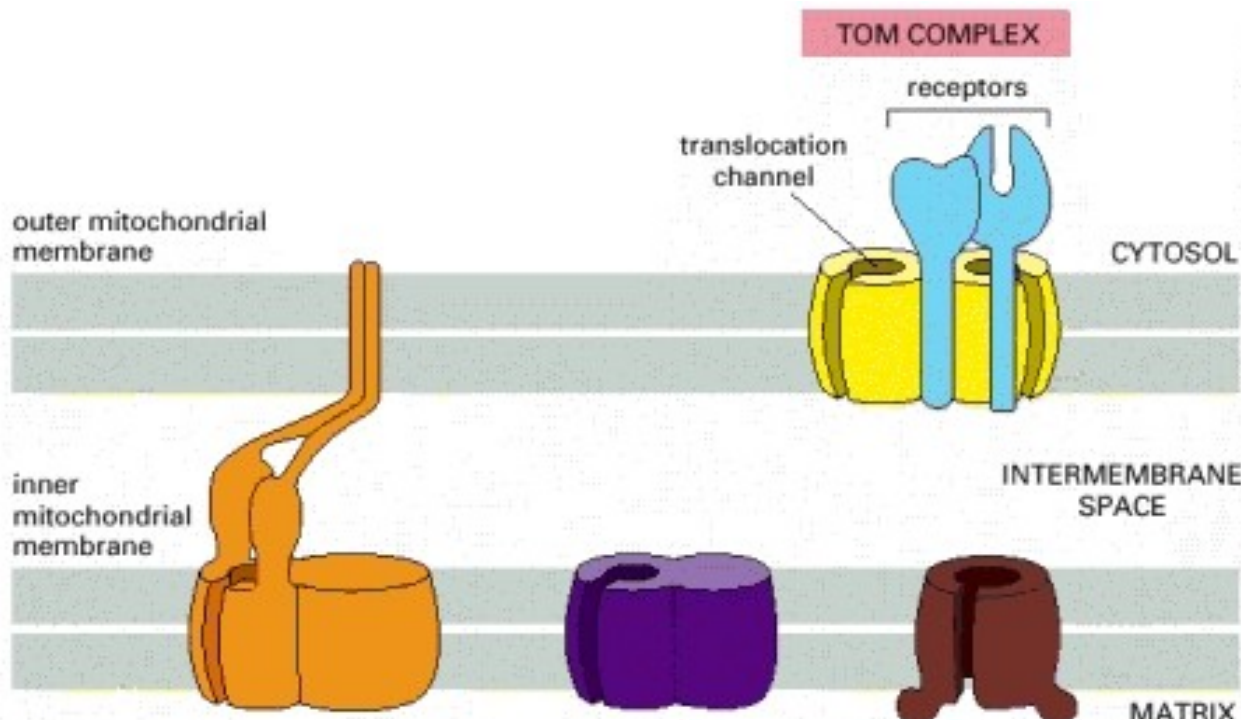
		NUCLEUS	NUCLEOLUS	CYTOPLASM	PDB EMBL
Nucleosome	1	■			2ID3
Clamp and DNA sliding clamp	2	■			1SXJ
RNA polymerase II	3	■			1Y1W
RNA polymerase I	4		■		1435
Microtubule nucleator, γ -TuSC rings	5	■			1731
RNA polymerase III	6	■			1322
Tau60/DTau91	7	■			2J04
Exportin-1/tRNA/RanGTP	8	■		■	3ICQ
Ribosome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

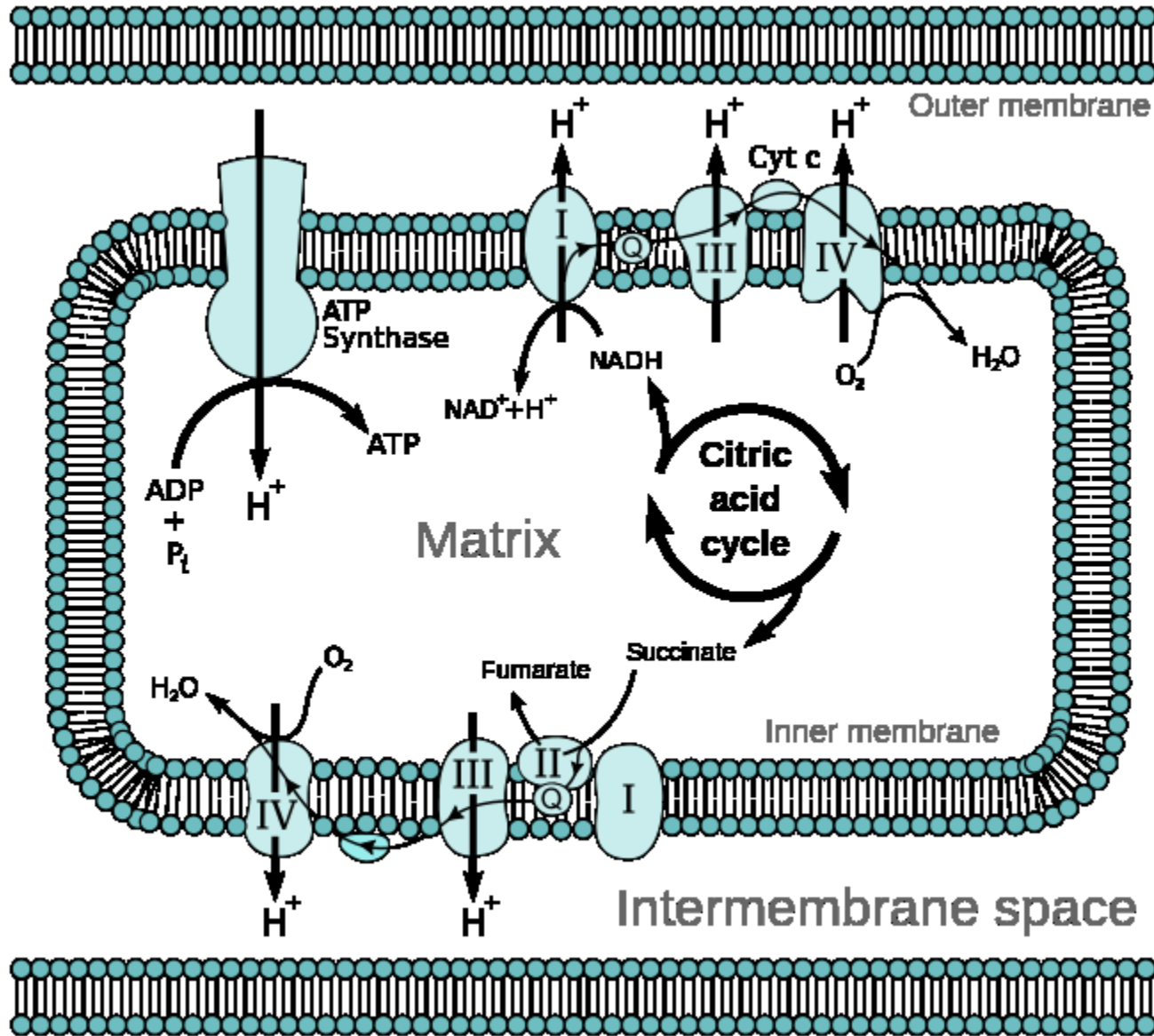


~800 komplexů v S.c.
 Bertero et al, Cell, 2010



- vnější membrána představuje první bariéru s **poriny** (beta barely) a **TOM** komplexy
- v mezimembránovém prostoru je zastoupen hlavně cytochrom C a kinázy
- vnitřní membrána má kristy (velká plocha) s **TIM komplexy, enzymy dýchacího řetězce a ATP syntázou**
- hustá matrix obsahuje enzymy Krebsova (citrátového) cyklu, ribozomy a mtDNA (kóduje pár vlastních enzymů)

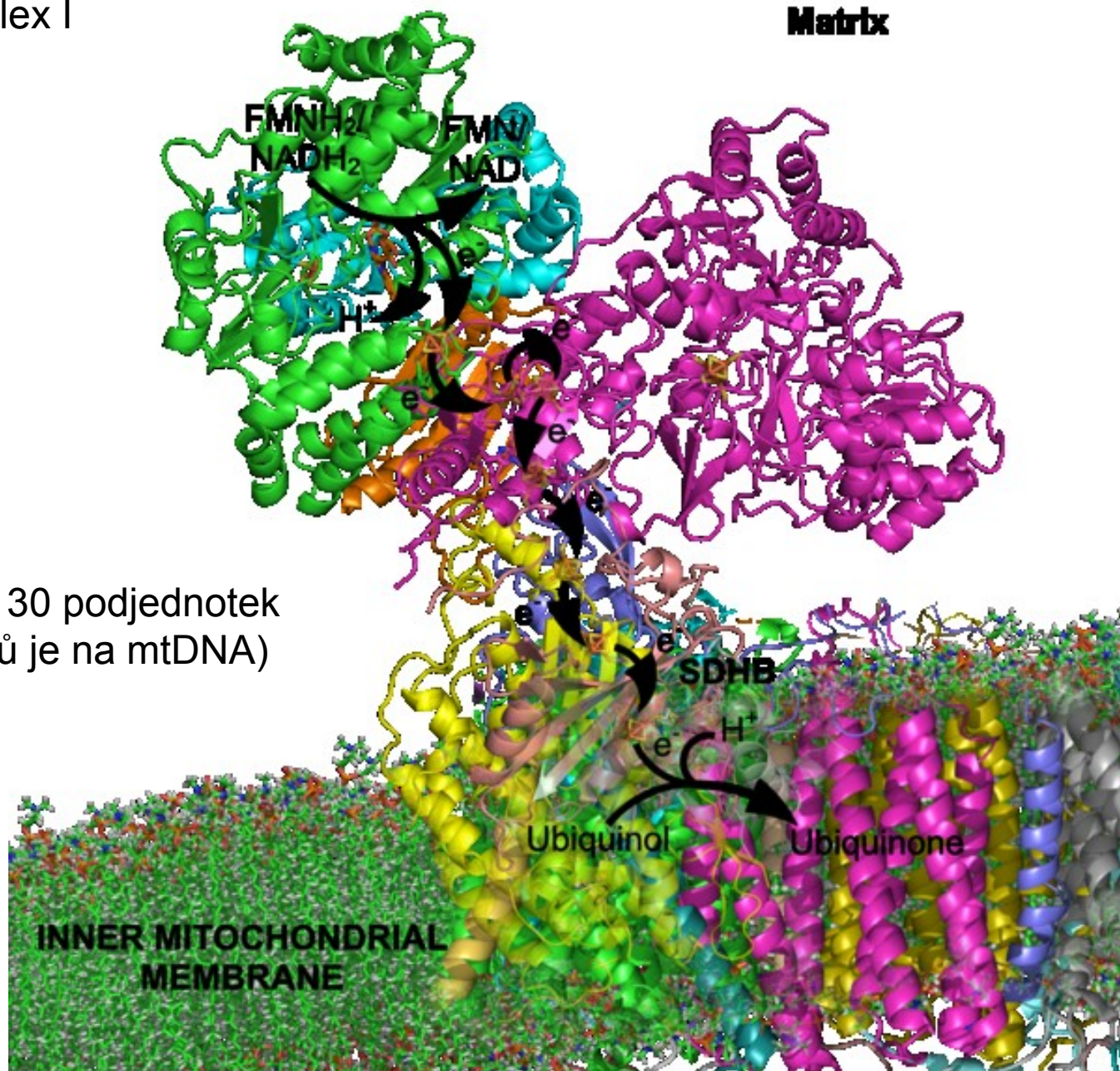




- Kotvený komplex I: [NADH-Q-oxidoreduktasa](#) ([ubichinon-reduktasa](#))- vstup [NADH+H⁺](#)
- Kotvený komplex II: postranní vstup pro [FADH₂](#) ze [sukcinátdehydrogenázy](#)
- Kotvený komplex III: [cytochrom-c-reduktasa](#) ([ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza](#))
- Kotvený komplex IV: [cytochrom-c-oxidasa](#)

Komplex I

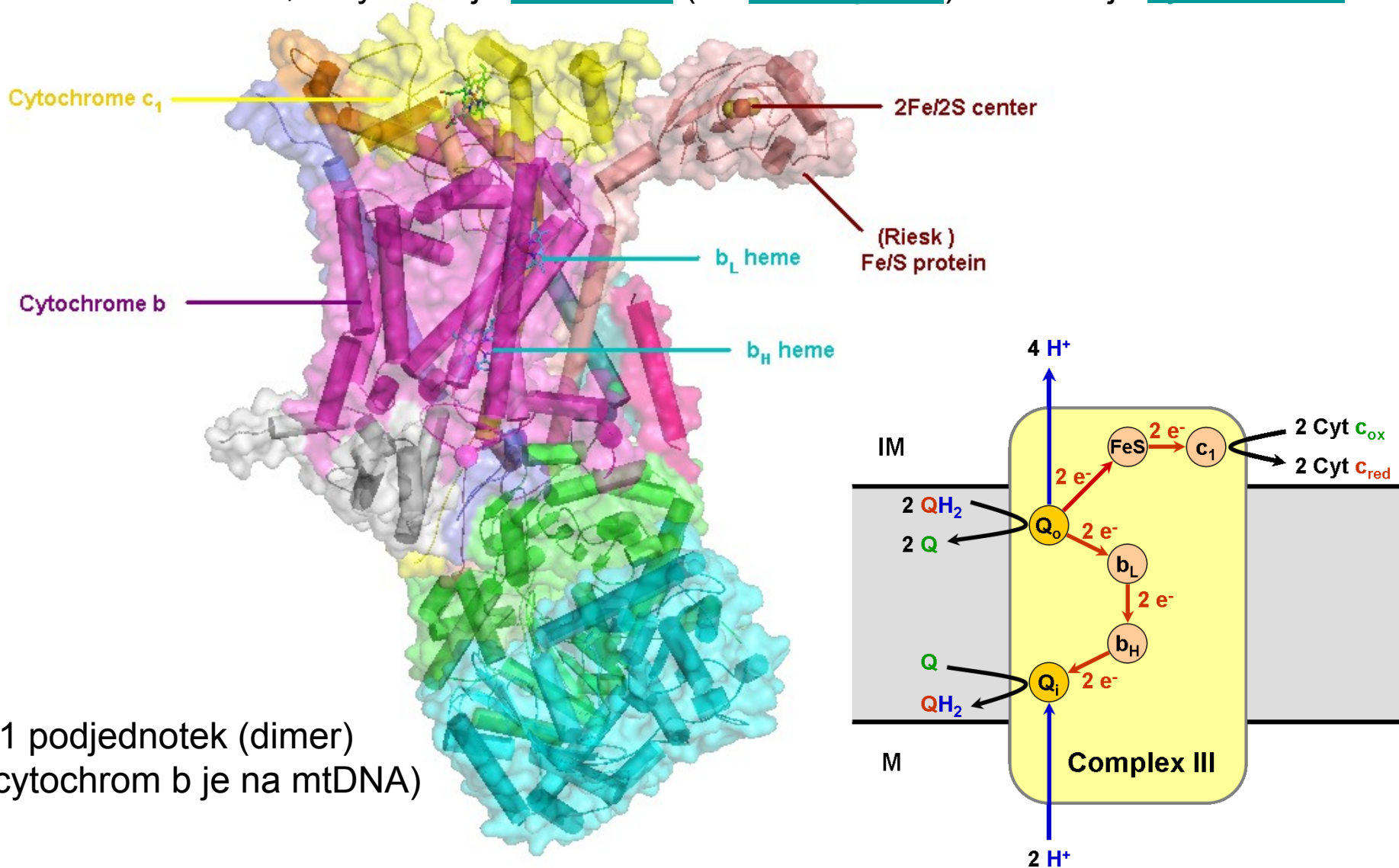
Mitochondrial Matrix



víc jak 30 podjednotek
(7 genů je na mtDNA)

INNER MITOCHONDRIAL
MEMBRANE

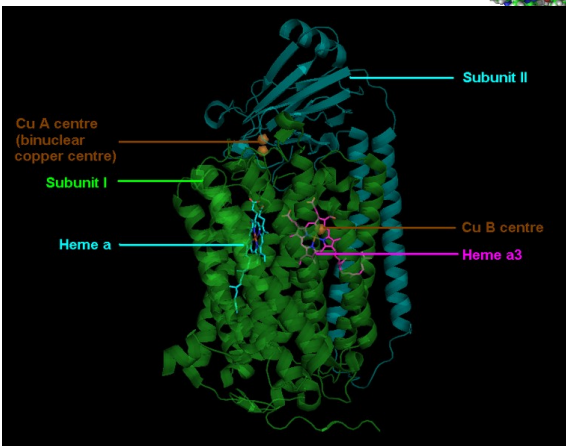
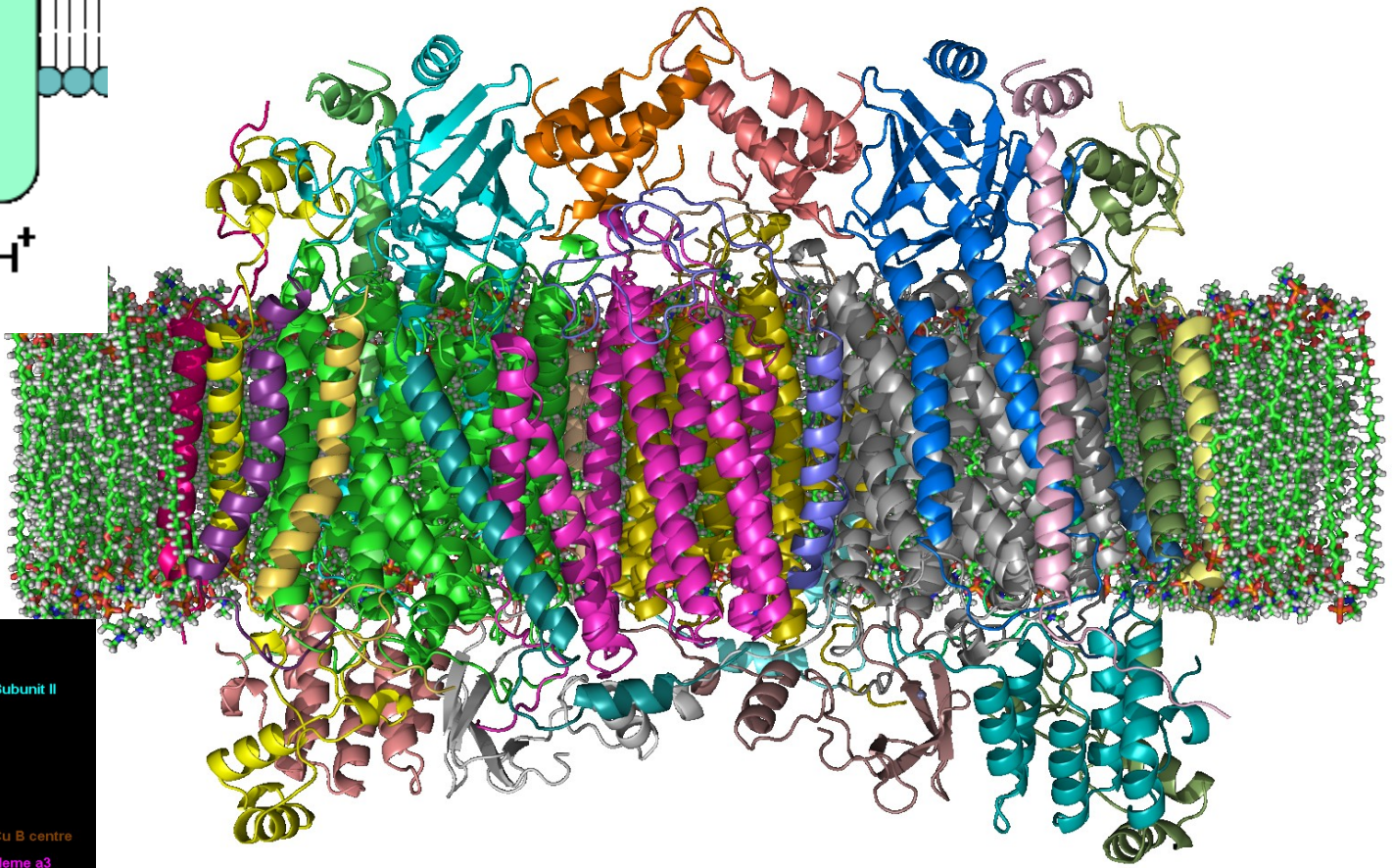
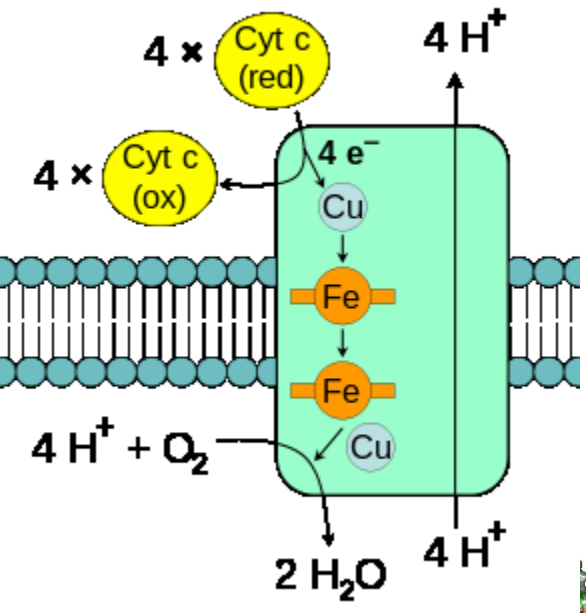
Cytochrom bc1 komplex (též komplex III, kód EC 1.10.2.2) je ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza, tedy oxiduje ubichinol (čili koenzym Q) a redukuje cytochrom c



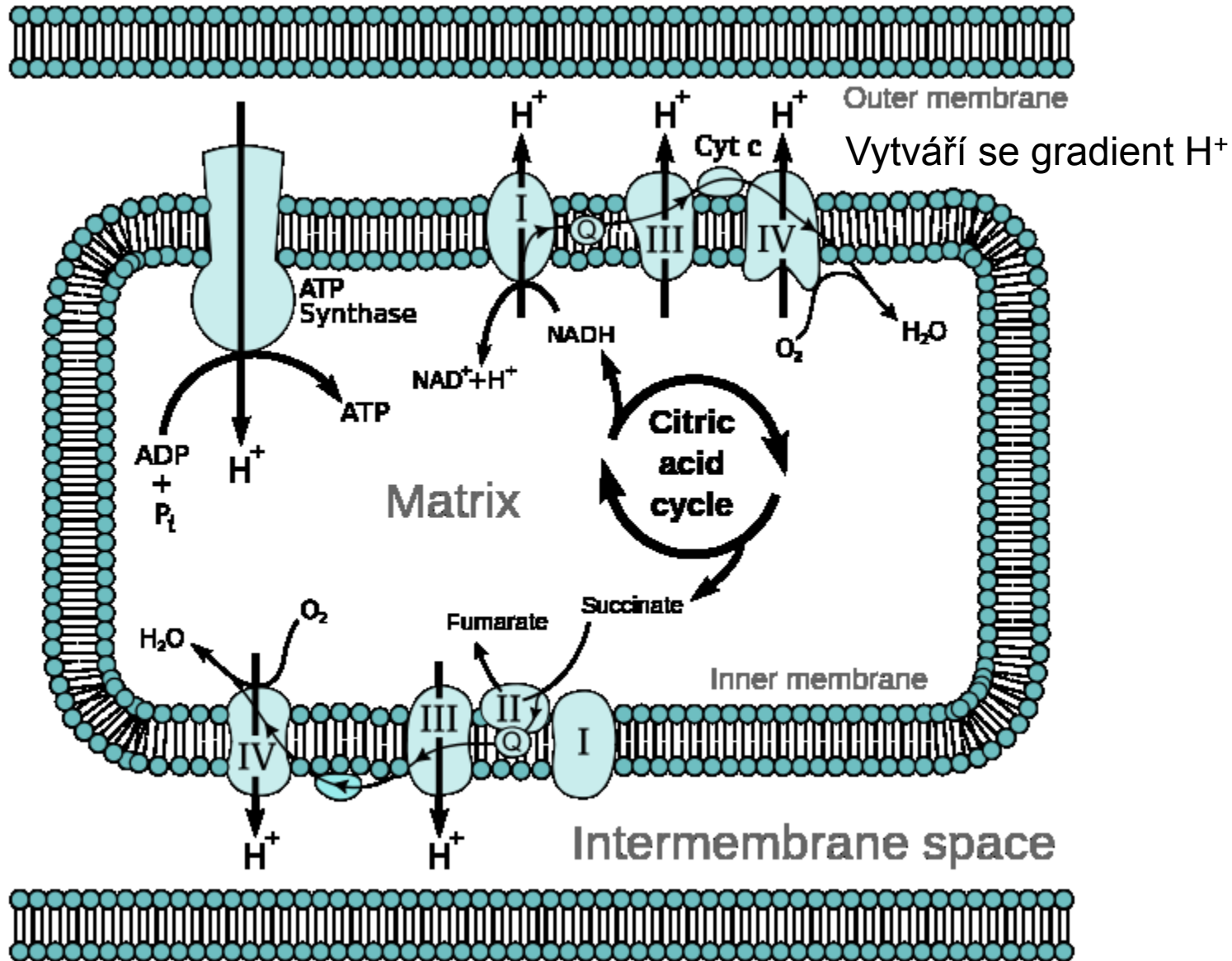
11 podjednotek (dimer)
(cytochrom b je na mtDNA)

V komplexu III se nachází čtyři redoxní centra, cytochrom b562, cytochrom b566, cytochrom c1 a konečně tzv. Rieskeho protein (obsahující FeS centrum Fe2-S2)

...ž COX, **komplex IV**, kód EC 1.9.3.1) tedy oxiduje cytochrom
 redukcce kyslíku na vodu
 8-12 podjednotek (3 nejhydrofobnější jsou syntetizovány
 přímo v mitochondrii)
 homodimer



V komplexu IV se nachází čtyři redoxní centra, 2x heme a, 2x Cu centra

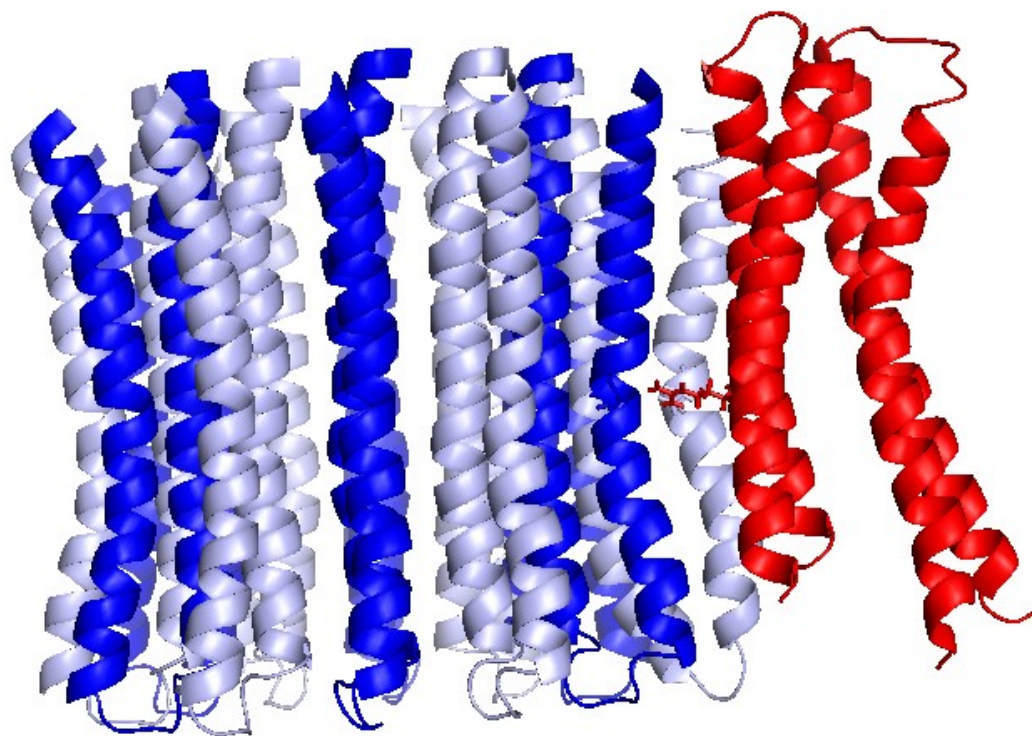
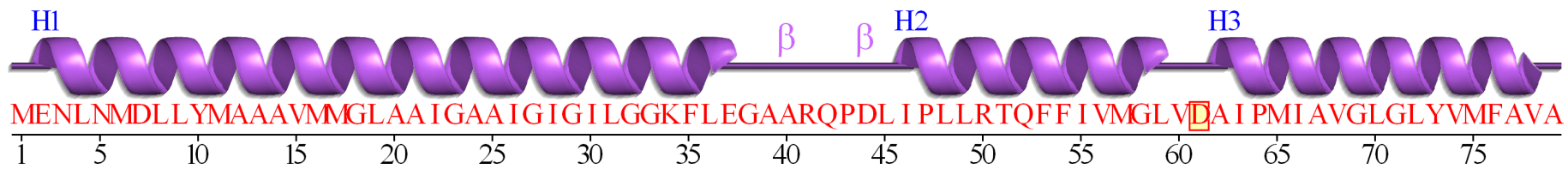


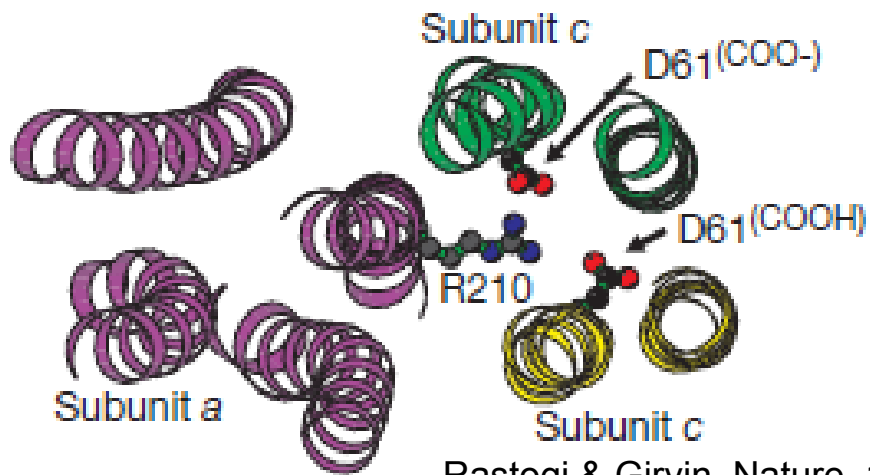
Kotvený komplex I: [NADH-Q-oxidoreduktasa](#) ([ubichinon-reduktasa](#))- vstup [NADH](#)

Kotvený komplex II: postranní vstup pro [FADH₂](#) ze [sukcinátdehydrogenázy](#)

Kotvený komplex III: [cytochrom-c-reduktasa](#)

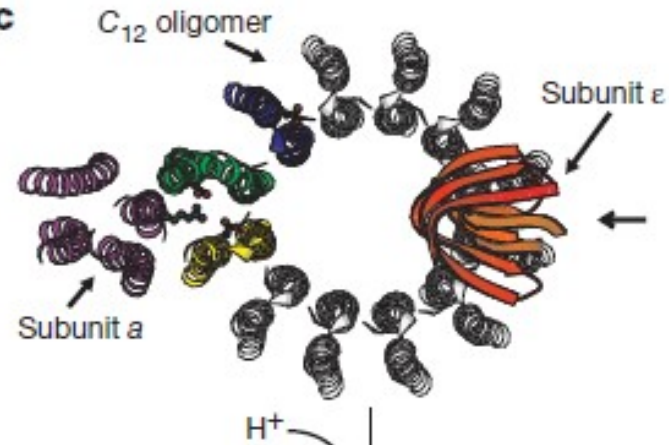
Kotvený komplex IV: [cytochrom-c-oxidasa](#)



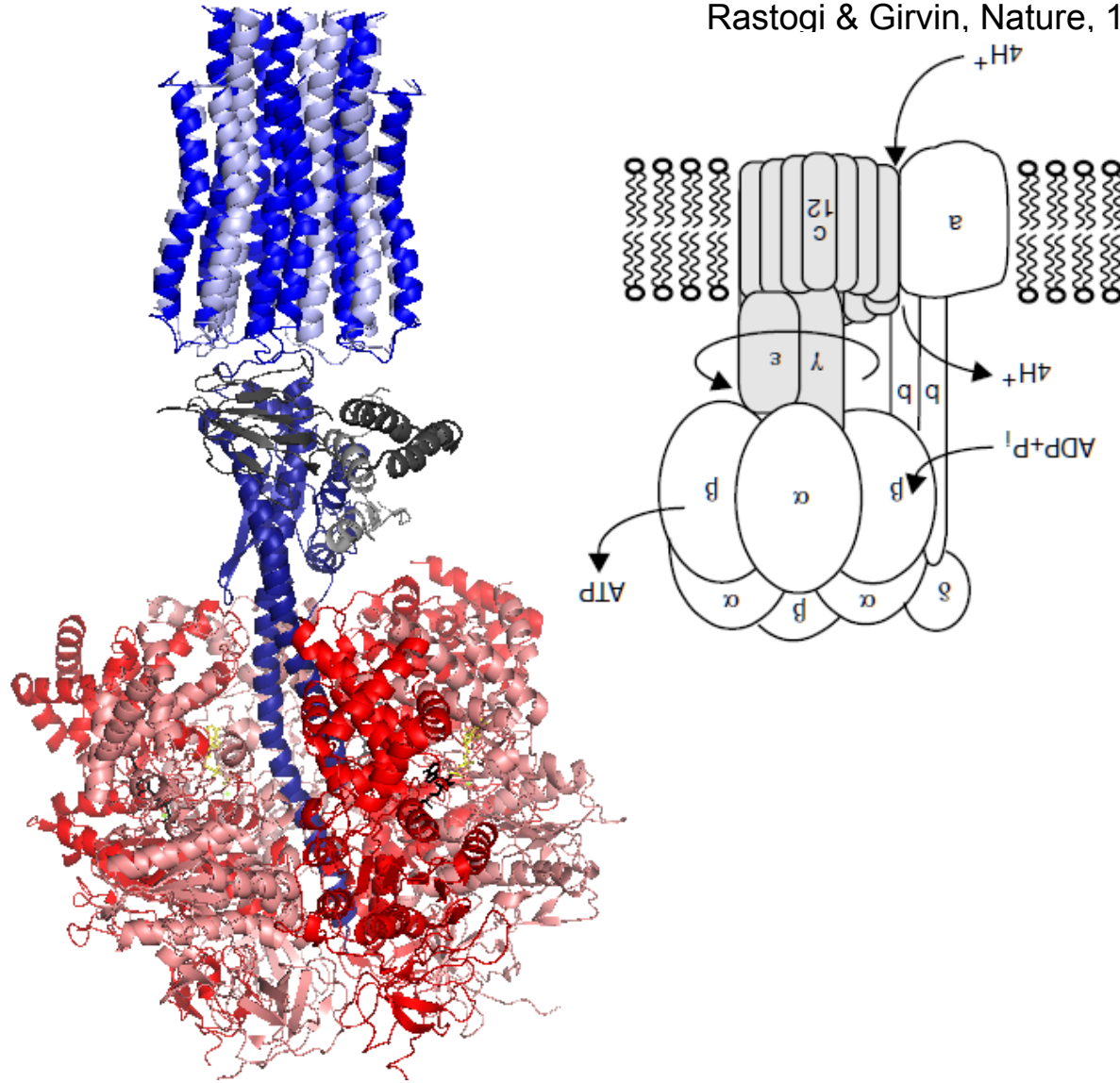
a

Rastogi & Girvin, Nature, 1999

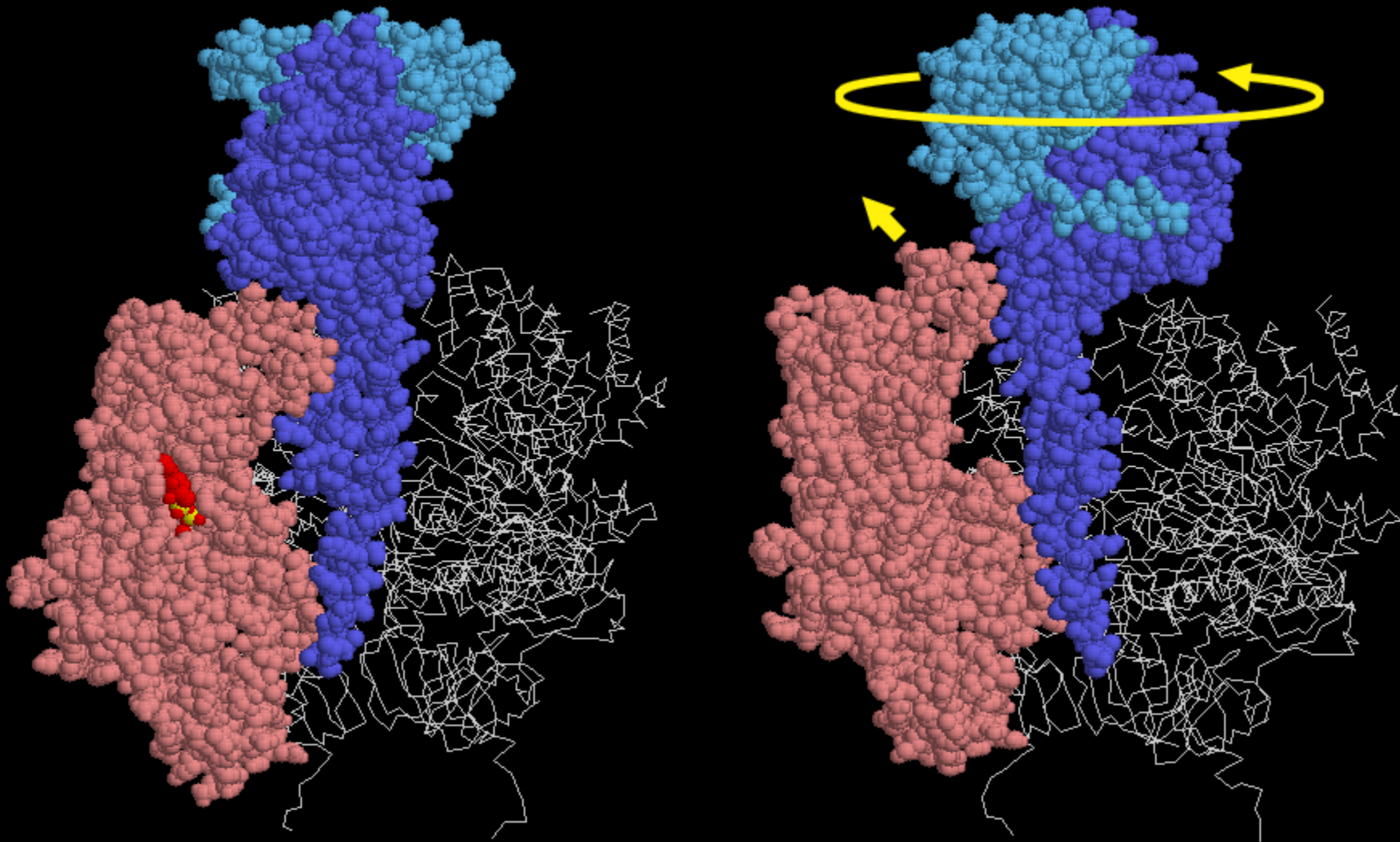
pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu (ve vodném prostředí by byl negativně nabitý, ale v prostředí lipidické membrány nikoli). Dochází k neutralizaci náboje – otočka. Přesný mechanismus není jasný

c**d****e****f**

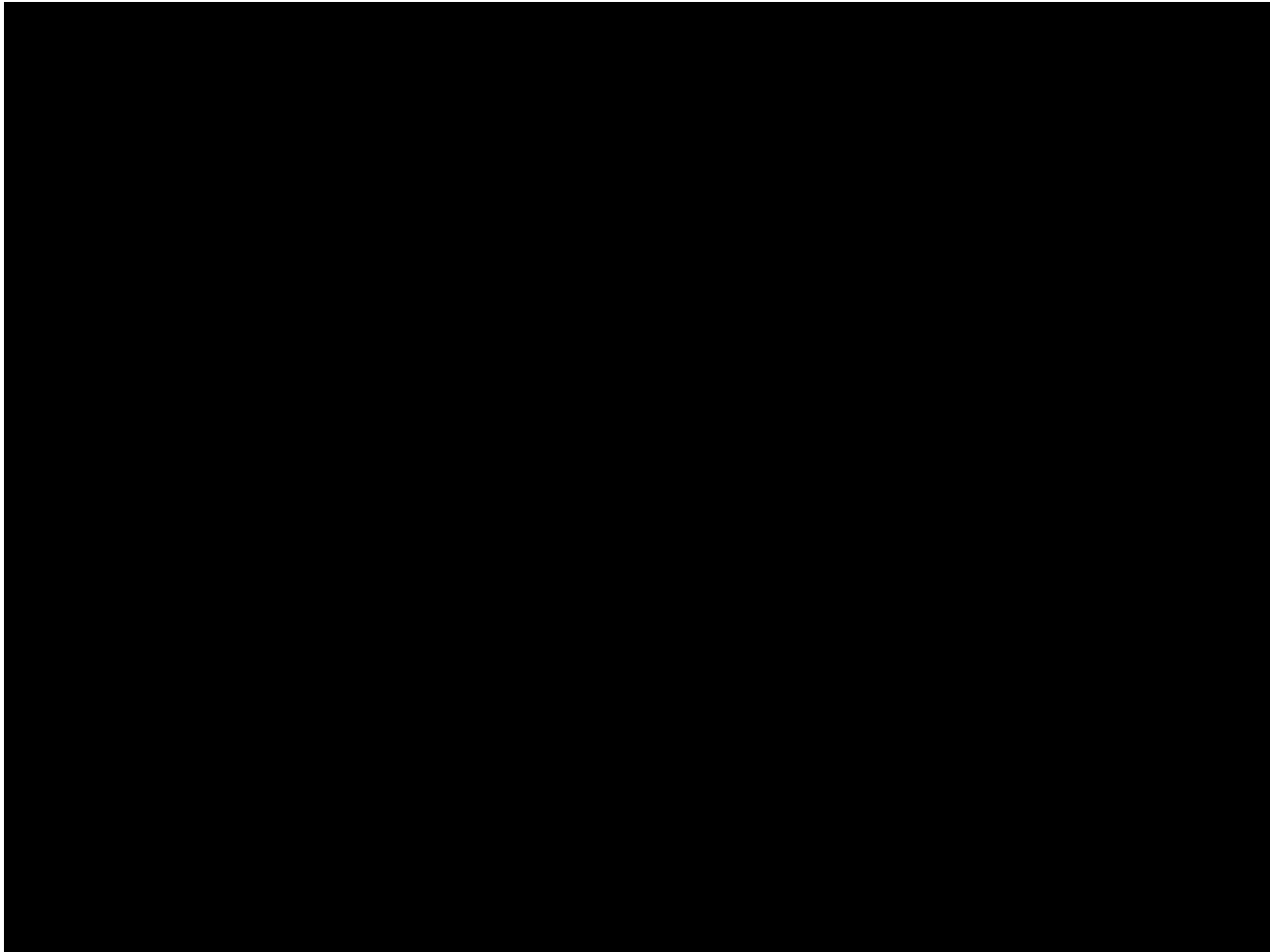
Molekula měsíce v prosinci 2005
Rastogi & Girvin, Nature, 1999



ATP syntasa – ukázka kompletní struktury – ve skutečnosti se točí „modré“ části a modulují „červený“ generátor

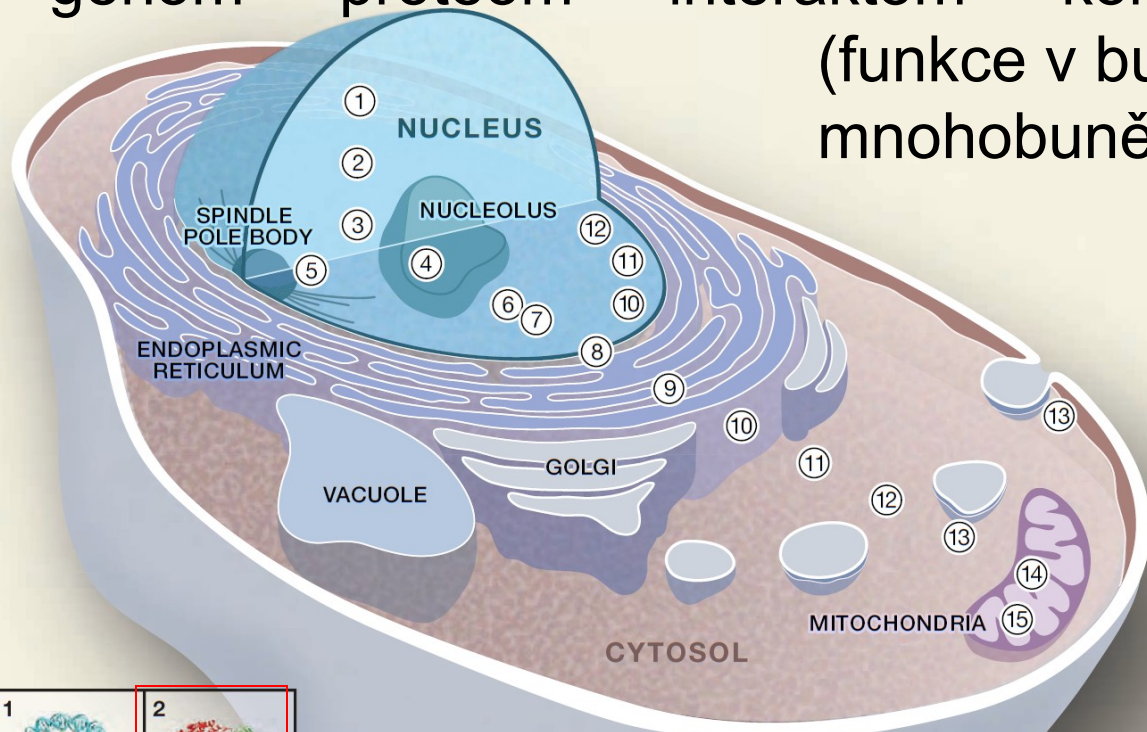


Při otočce osa tlačí na F1 motor (3 různé konformace)
– levý panel = konformace vhodná pro vazbu ADP
- pravý panel = ATP molekula byla vytlačena

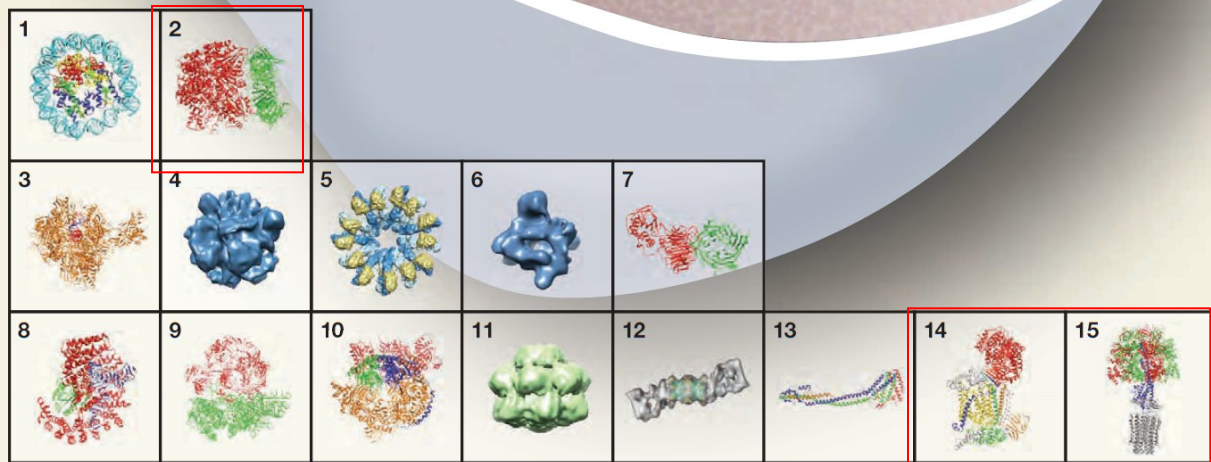


gen -> protein -> interakce -> komplex -> superkomplex ...
 (molekulární stroj) -> kompartment -> buňka ...

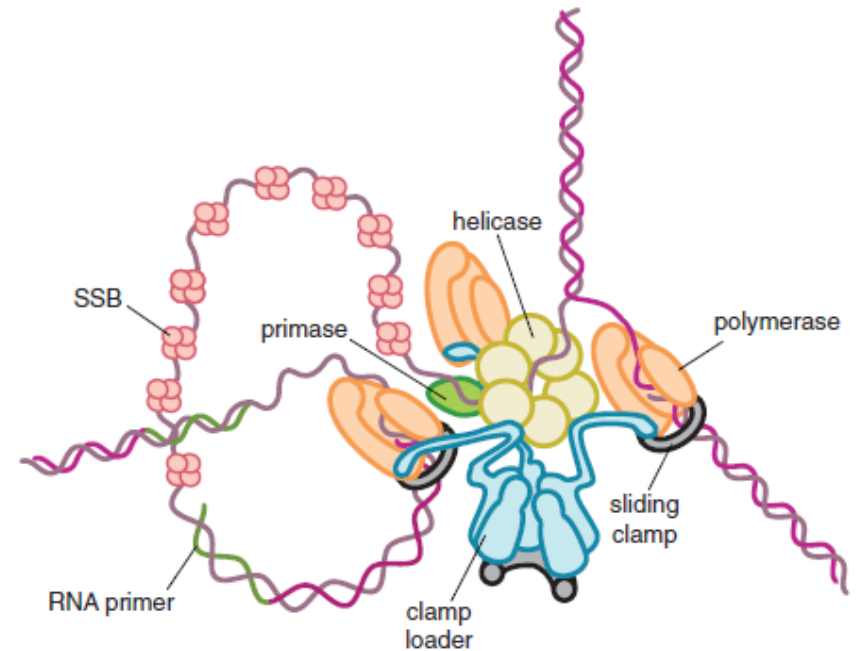
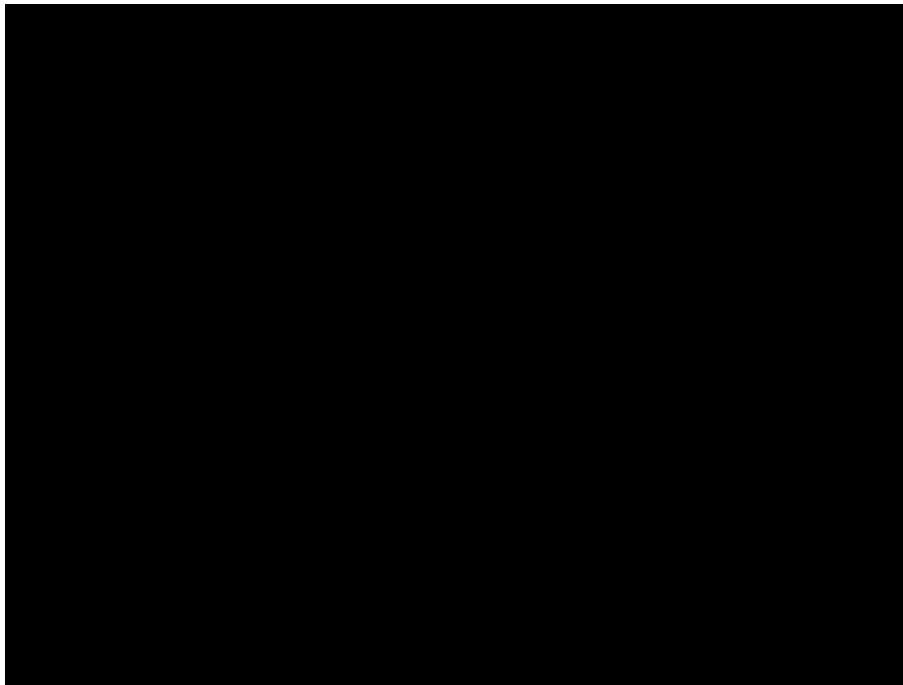
genom -> proteom -> interaktom -> komplexom -> ... fenom
 (funkce v buňce -> funkční znak v
 mnohobuněčných organismech)



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



~800 komplexů v S.c.
 Bertero et al, Cell, 2010



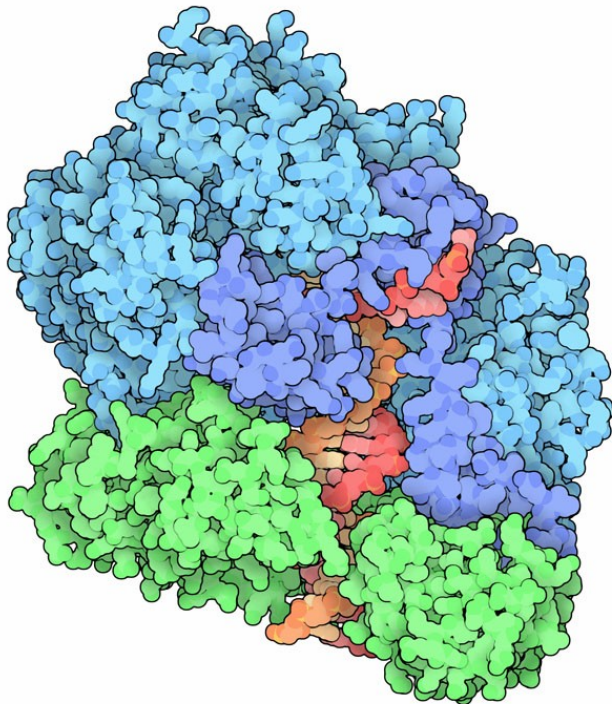
Kelch et al, BMC Biol, 2012

Replikace DNA (video): DNA helikasa “denaturuje” dvoušroubovici (modrá) – připojen je „clamp loader“ (šedá tlapka) - 2 raménka drží DNA polymerázy (fialové) spojené s PCNA („sliding clamp“, zelená). „Leading strand“ je syntetizován kontinuálně zatímco „lagging strand“ musí být primásou (žluto-zelená) odstartován (RNA primer = žlutý – Okazakiho fragmenty).

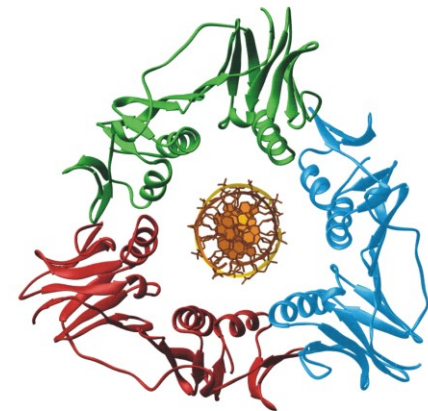
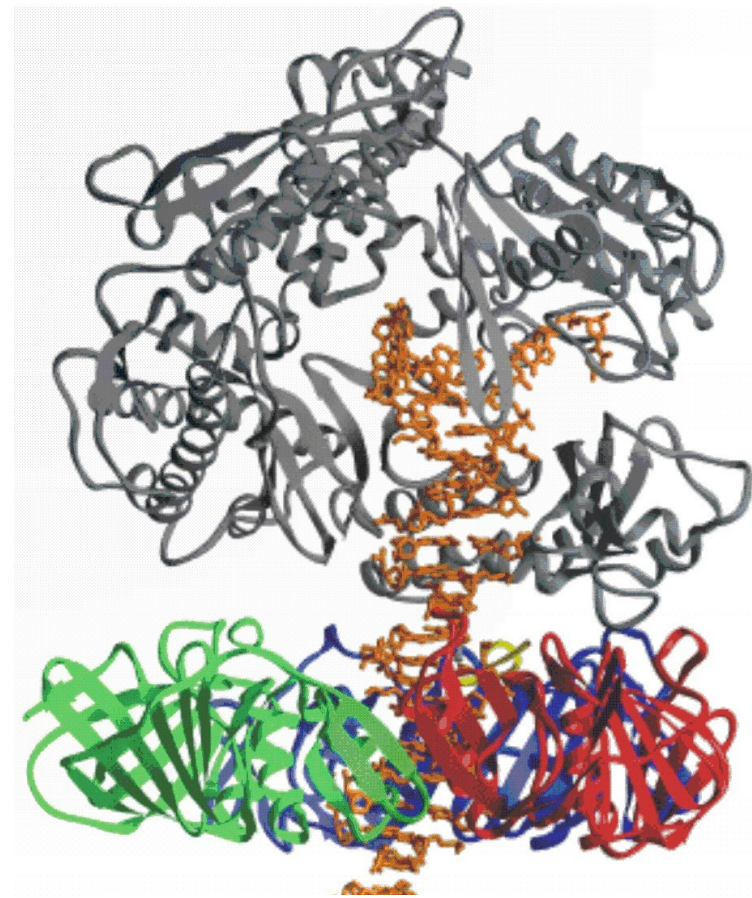
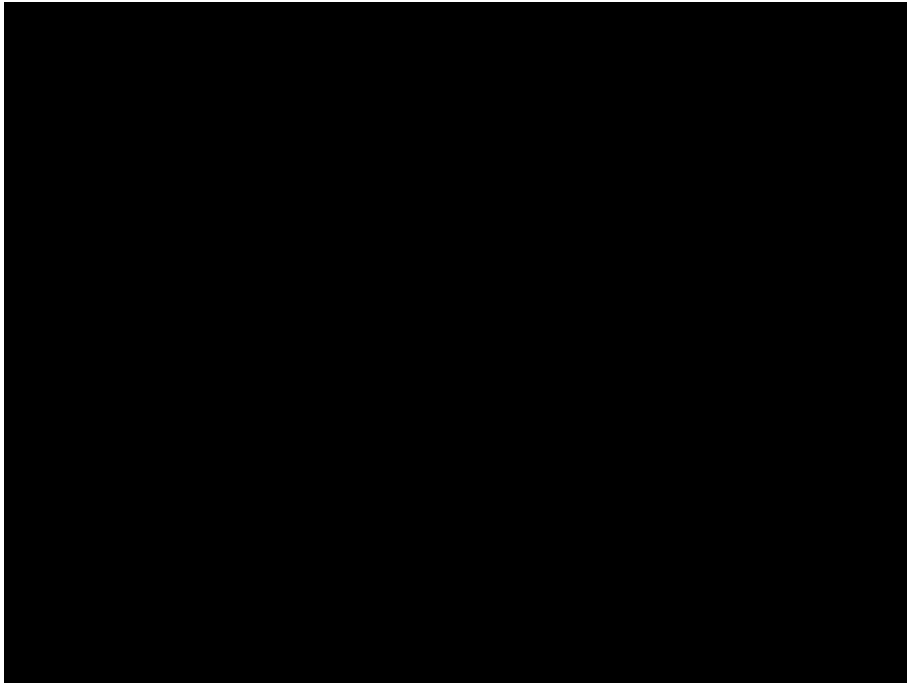
PCNA zvyšuje procesivitu DNA polymerás

Clamp loader – RFC-PCNA

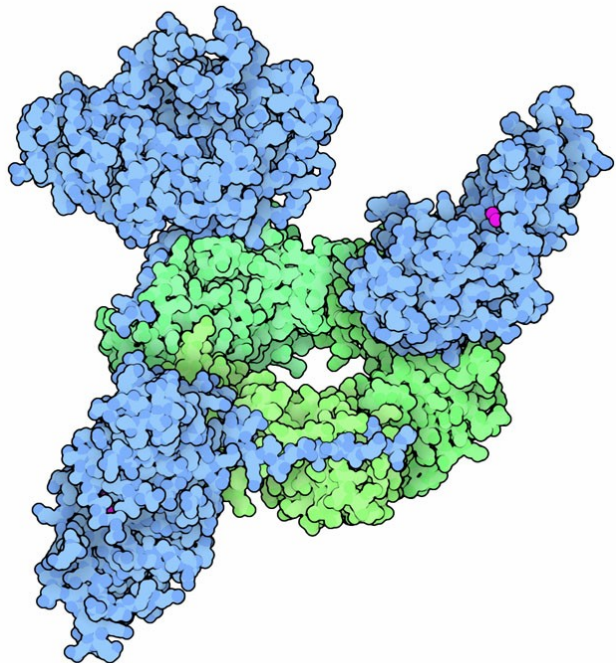
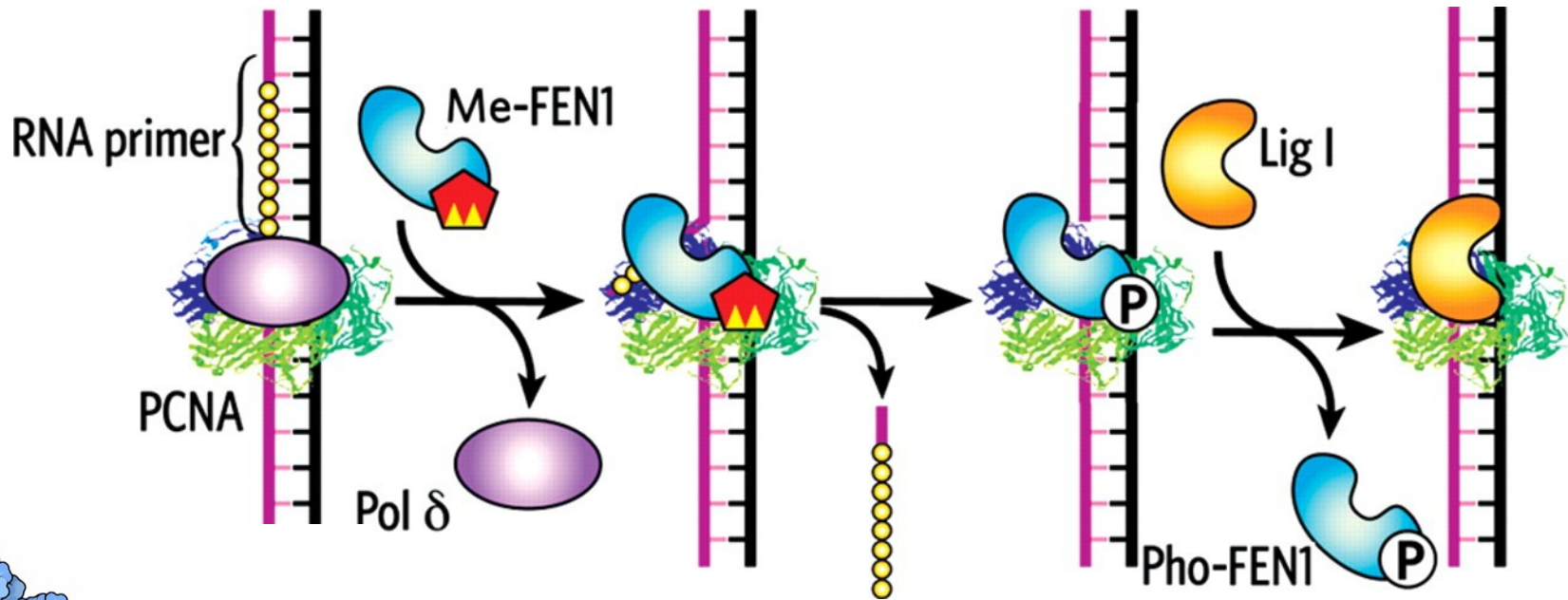
Kelch et al, BMC Biol, 2012



Clamp sliding – PCNA-Pol δ

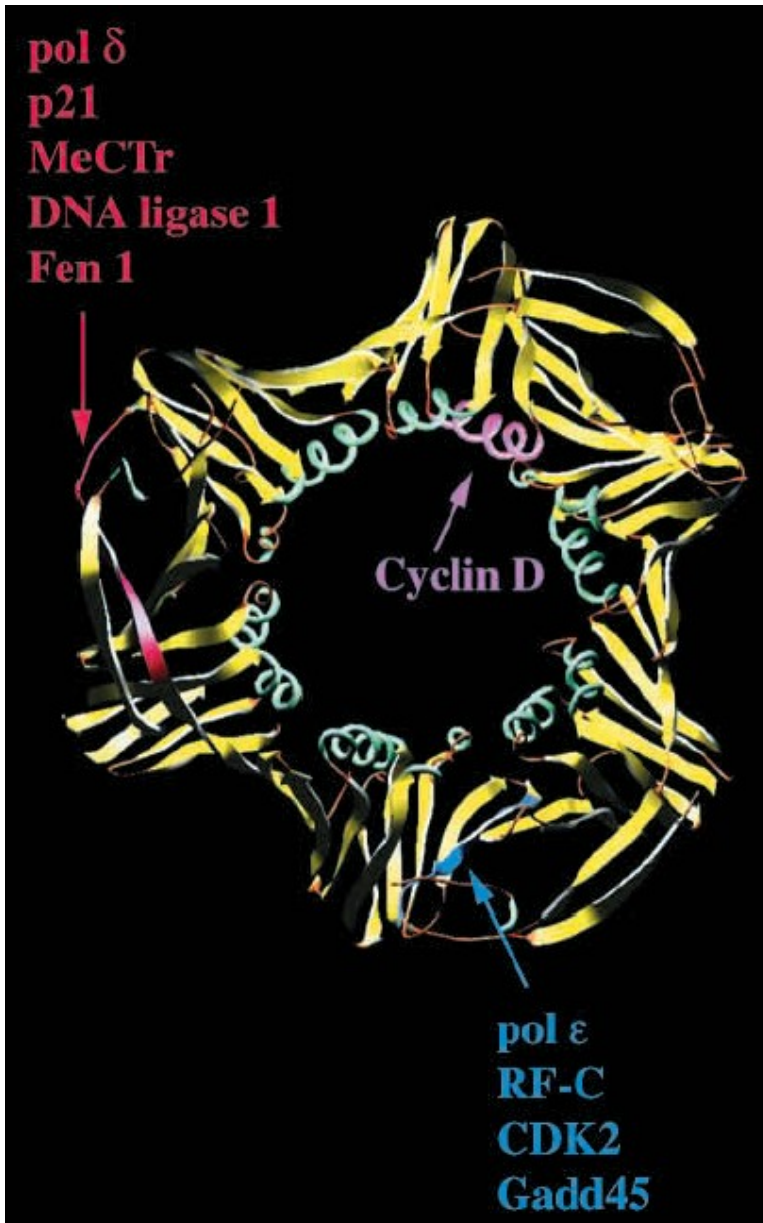


PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1

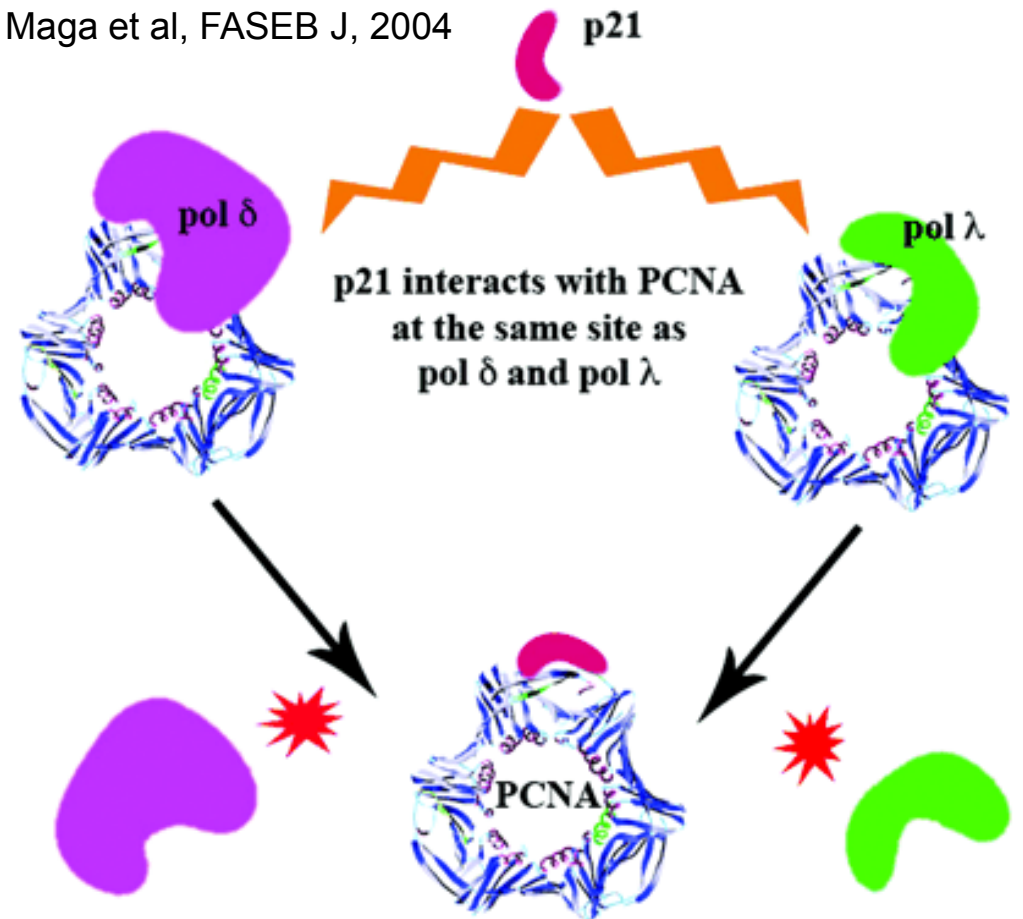


Po skončení syntézy „lagging strand“ metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) odštěpí RNA primer (demetylace a fosforylace disociuje Fen1)
Poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru

PCNA – regulace buněčného cyklu



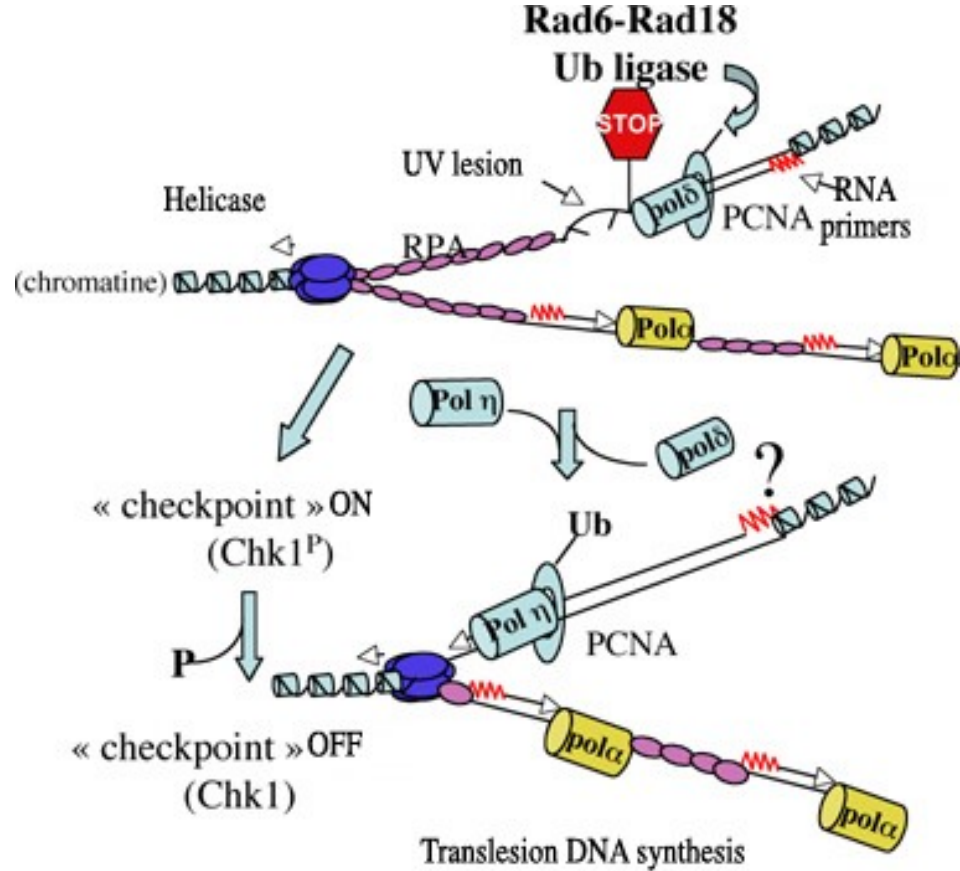
Maga et al, FASEB J, 2004



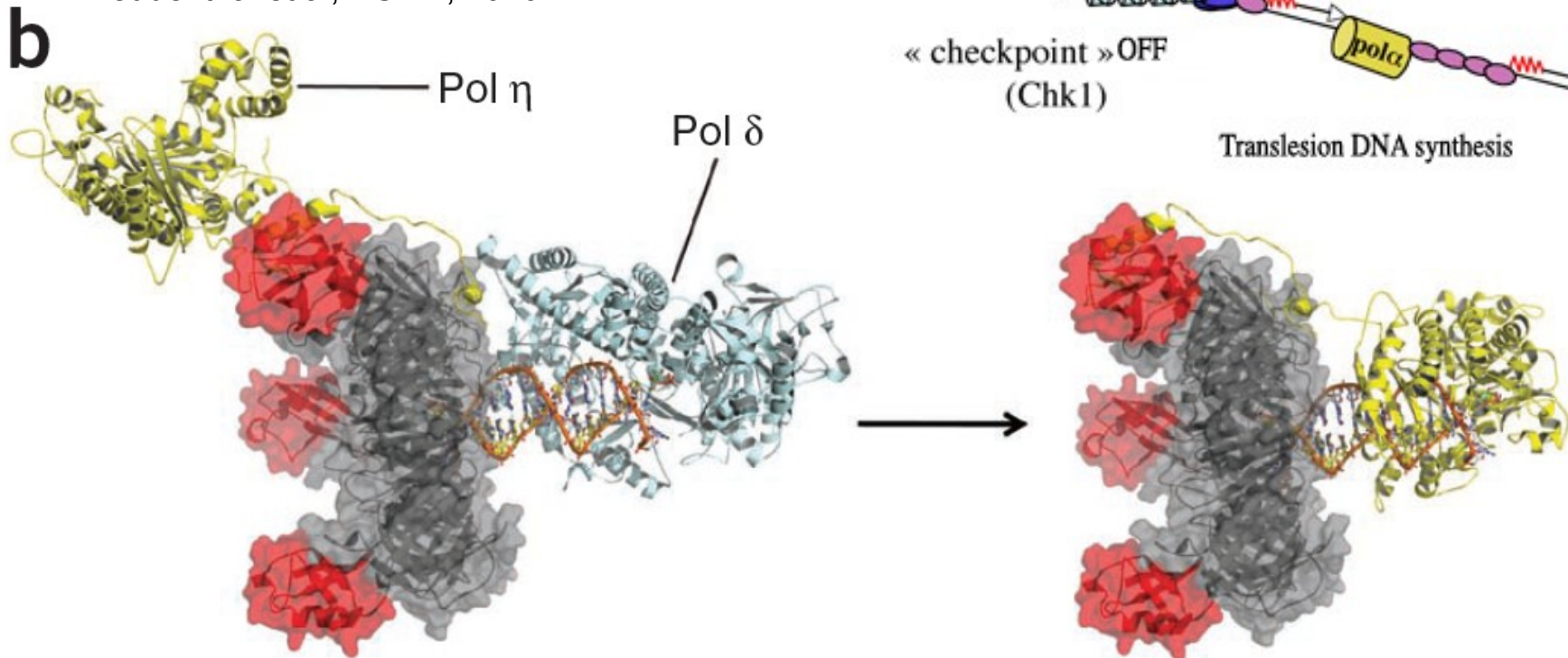
Upon binding of p21, subsequent interaction of PCNA with pol δ and pol λ is prevented

p21 je upregulován nádorovým supresorem p53

Pokud je DNA poškozená, pol δ se zastaví a je třeba poškození nejdříve opravit – jednou z možností je „zastoupení“ jinou polymerásou, která poškozené místo „toleruje“ a překopíruje (translesion synthesis) – přepíná se ubiquitylací PCNA (na „zadní straně“) - TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují PIP a UBM motivy pro interakce s Ubi-PCNA

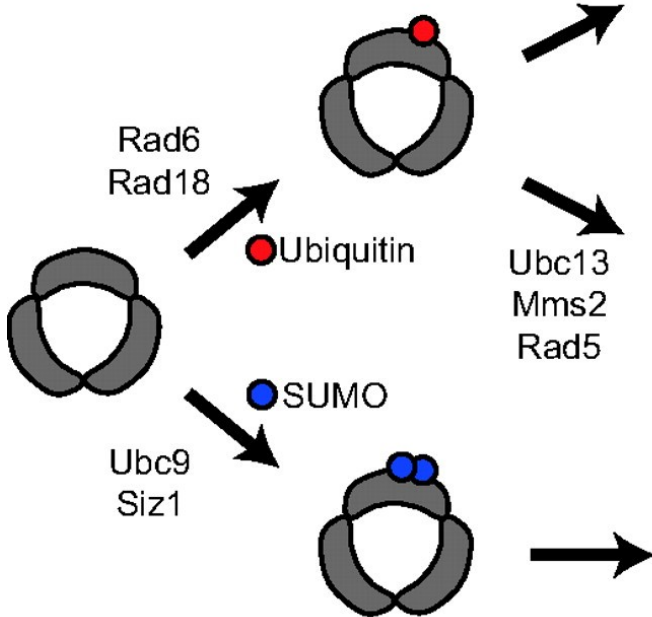


Freudenthal et al, NSMB, 2010



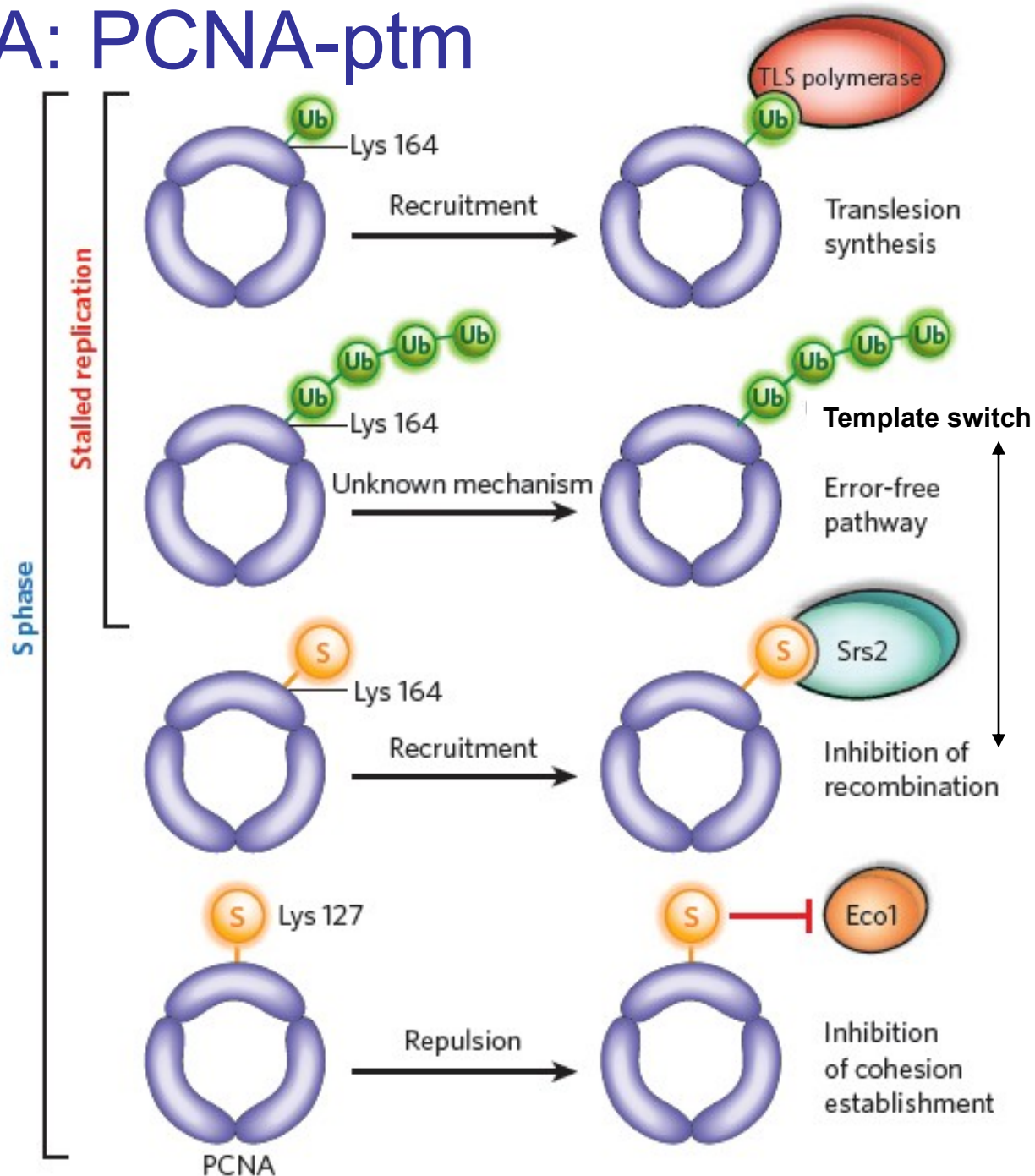
Oprava DNA: PCNA-ptm

TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují UBM (správně přečtou chybu a zařadí správnou bázi)



Srs2 (antirekombinása) obsahuje SIM (nedovolí rekombinaci v průběhu replikace)

Bergink & Jentsch, Nature, 2009
Sale et al, JCS, 2012



Tsurimoto, FiBS, 1999
 Maga et al, FASEB J, 2004
 Naryzhny, CMLS, 2008

PCNA-pol δ fills gaps
 formed during DNA repair
 (BER, NER, MMR, HR)

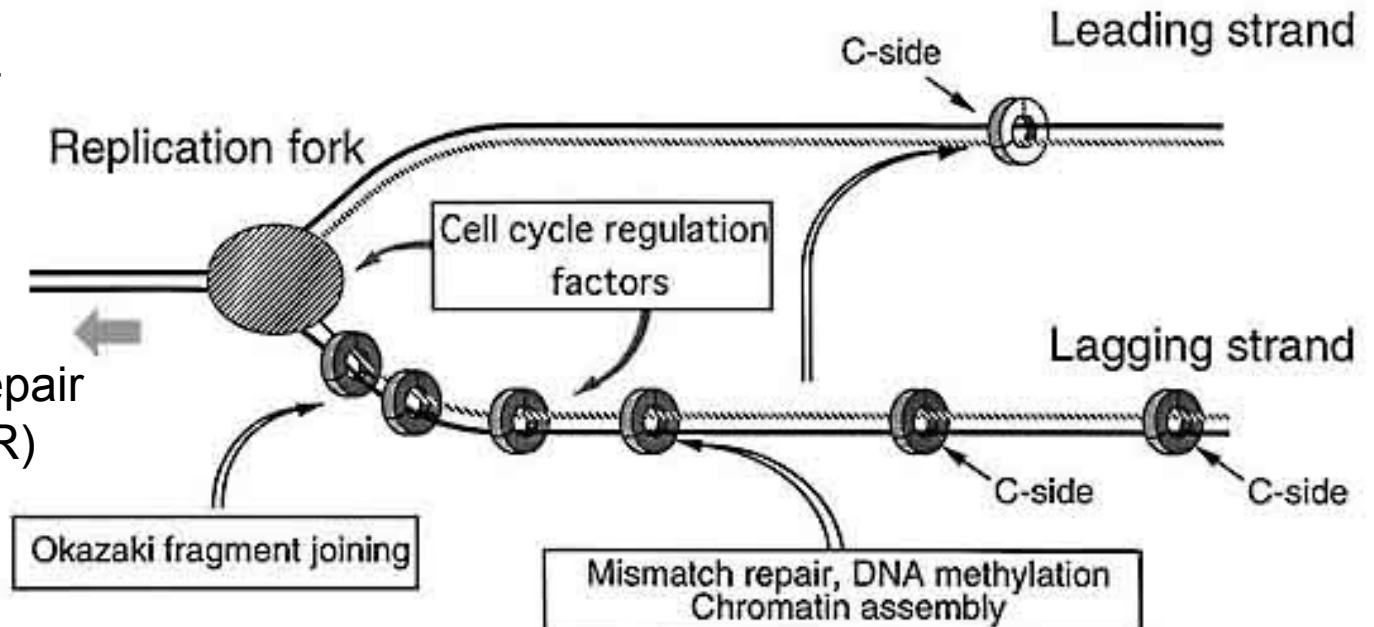


Table 1. PCNA-interacting proteins (PIPs) in DNA replication, DNA repair and cell cycle control

PIP	Function	References
Pol δ	DNA replication and repair	Zhang et al., 1999; Zhou et al., 1997; Ducoux et al., 2001
Pol ϵ	DNA replication and repair	Eisenberg et al., 1997; Dua et al., 2002
RF-C	DNA replication and repair	Fotedar et al., 1996
DNA ligase I	DNA replication and repair	Levin et al., 1997
Fen1	DNA replication and repair	Warbrick et al., 1997
Topo I	DNA replication and repair	Loor et al., 1997
Topo II α	DNA replication and repair	Niimi et al., 2001
MLH1, MSH 2/3/6	Mismatch DNA repair	Umar et al., 1996; Clark et al., 2000
XP-G endonuclease	Nucleotide excision repair	Gary et al., 1997
WRN helicase	Double strand breaks DNA repair; linked to the Werner Syndrome disease	Lebel et al., 1999
UBC9	SUMOylation	Hoegge et al., 2002
AP-endonucleases APN1, APN2	Base excision repair	Dianova et al., 2001; Unk et al., 2002
Uracil-DNA glycosylase	Base excision repair	Krokan et al., 2001
Pol β	Base excision repair	Kedar et al., 2002
Pol η	Translesion synthesis; linked to the XP-V disease	Haracska et al., 2001a
Pol ι	Translesion synthesis	Haracska et al., 2001b
Pol κ	Translesion synthesis	Haracska et al., 2002
Pol λ	Translesion synthesis	Maga et al., 2002
Cyclin/CDKs	Cell cycle control	Xiong et al., 1992; Zhang et al., 1993
p21	Cell cycle control	Waga et al., 1994c

Shrnutí

- Proteiny mohou být součástí jednoho nebo více komplexů (dynamické)
- Stabilní komplexy
 - Podjednotky jsou často koexprimovány (koexprese je vzájemně stabilizuje, lepší rozpustnost)
 - stabilní komplexy disociují proteolyticky
 - pokles hladiny jednoho proteinu má za následek pokles hladiny ostatních podjednotek
- Dynamické komplexy
 - Interakce podjednotek dynamických komplexů jsou modulovány např. posttranslačními modifikacemi