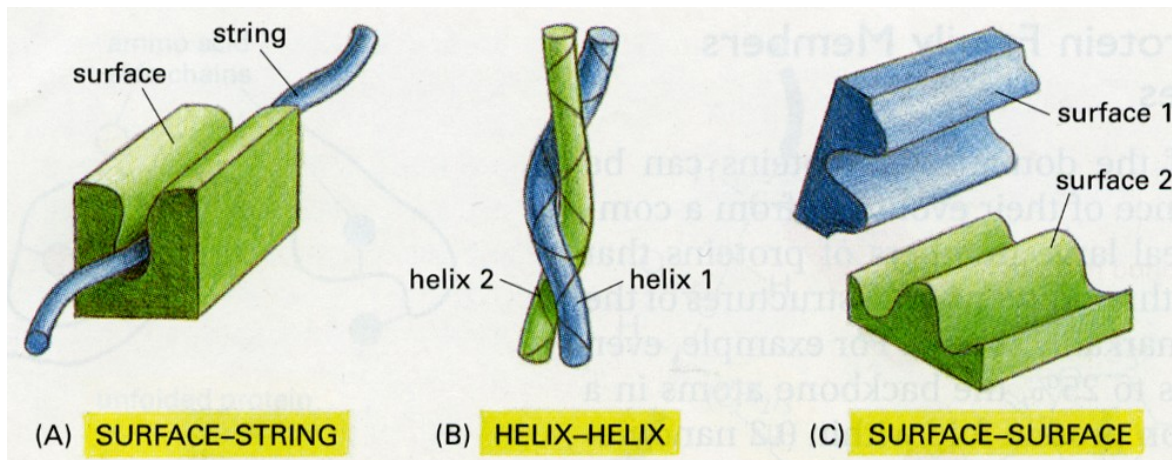


# Souhrn - protein-proteinové interakce

- proteiny jsou troj-rozměrné - mají různé tvary a více domén => mají mnoho vazebných míst na povrchu => komplexy a "sítě"
- části proteinů/domény interagují s doménami partnerů
  - domény mají určitou strukturu, která do značné míry determinuje tvar jejího povrchu, ale ...
  - charakter (hydrofobicitu, polaritu, náboj) povrchu určují postraní řetězce aminokyselin směřujících do solventu, takže ...
  - interakce proteinu je determinována povrchem, který musí mít tvar i charakter komplementární s interakčním partnerem (typy interakcí: ...)



# Protein-proteinové interakce

- stabilní (velké plochy, většinou součástí komplexů)
- přechodné/slabé (součást dynamických procesů – předávání signálů, modifikace)
- posttranslační modifikace mohou změnit vazebné vlastnosti povrchu (fosforylace, ubiquitinace, SUMO)
- souhrn proteinových interakcí = interaktom  
(modularita díky interakcím domén – různé kombinace domén)

gen -> protein -> interakce -> komplex -> superkomplex ...

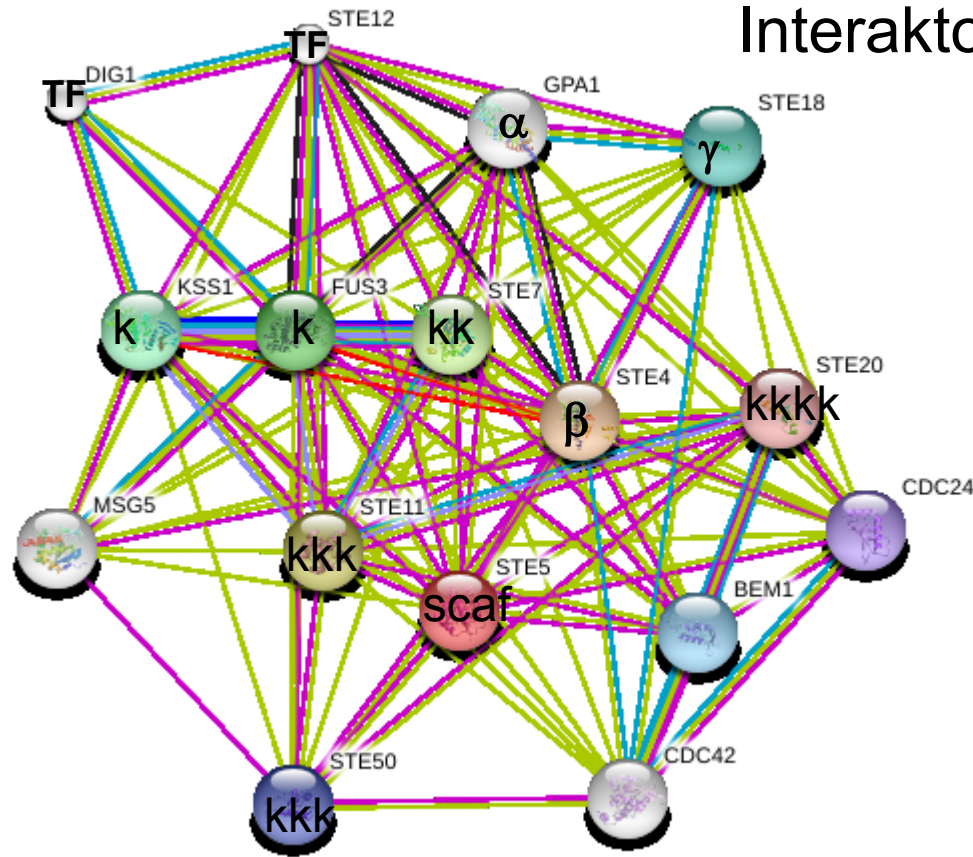
(molekulární stroj) -> kompartment -> buňka ...

genom -> proteom -> interaktom -> komplexom -> fenom

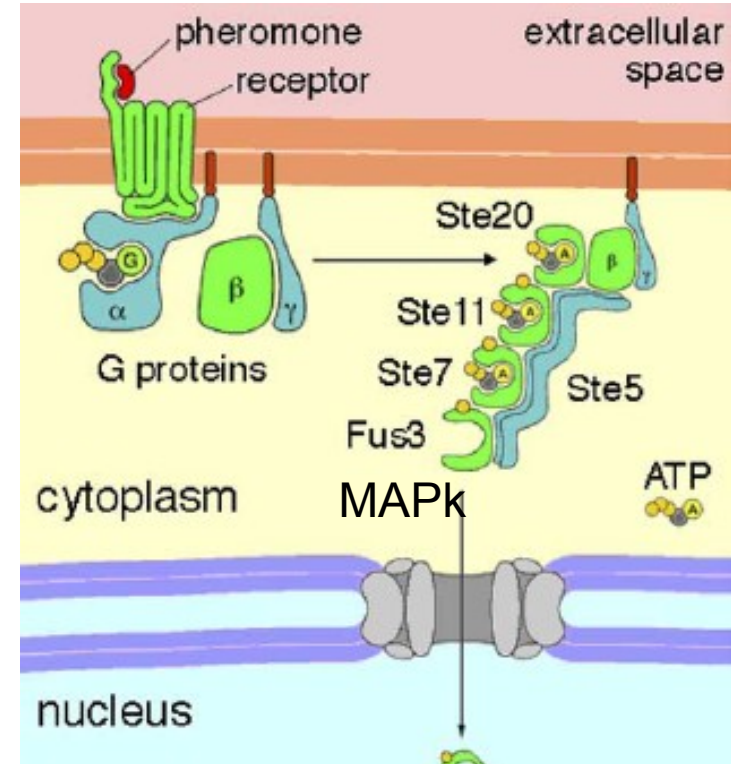
(funkce v buňce -> funkční znak v  
mnohobuněčných organismech)

# PPI ukazují proteinové sítě – chybí info o komplexech

## Interaktom x komplexom



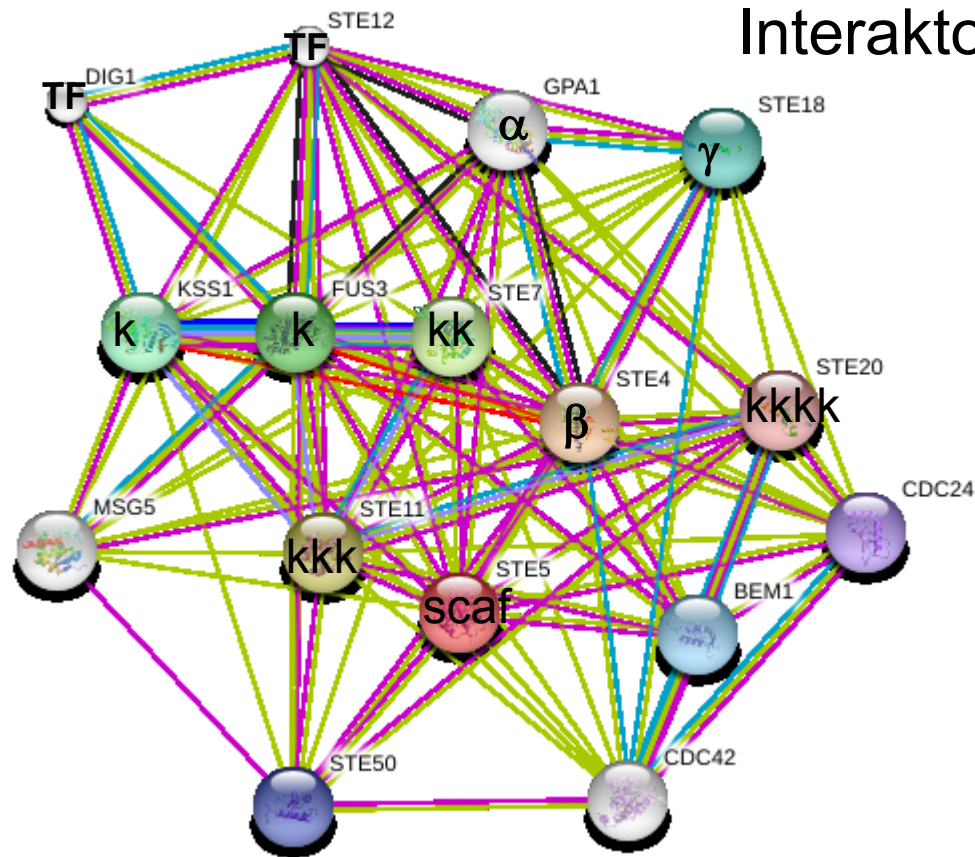
- Experiments Y2H, coIP ...
- Databases
- Textmining STRING
- Gene Fusion
- Coexpression <http://string-db.org>



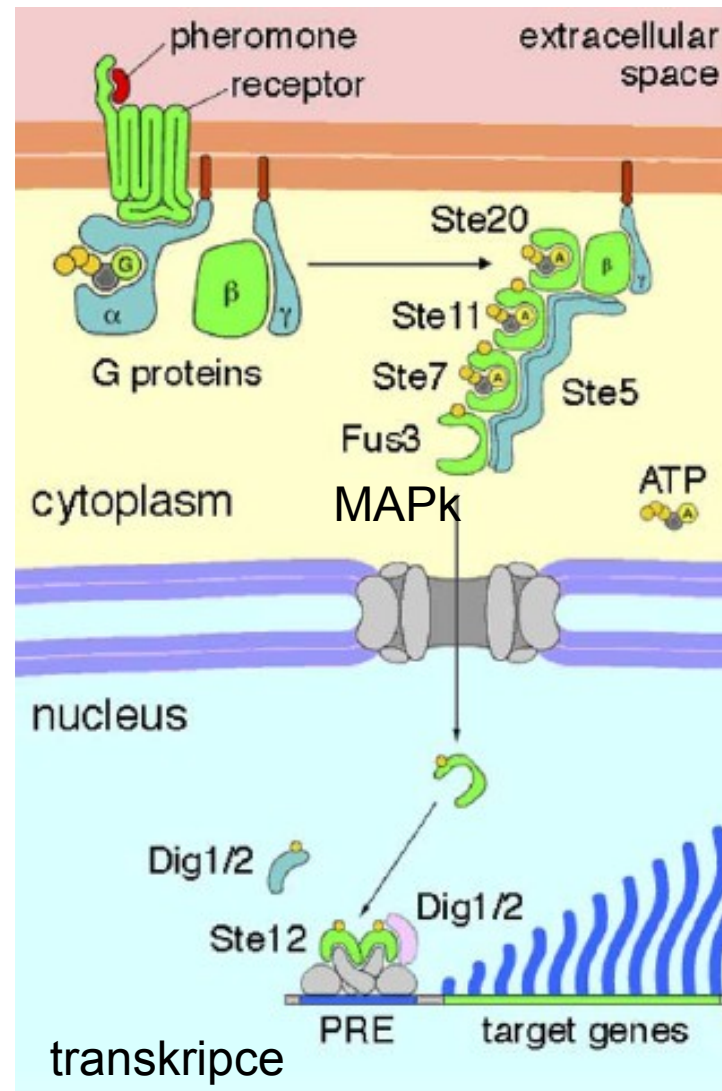
Většina proteinů je v komplexech (plní svoji funkci ve spojení s dalšími proteiny)

# Jaké jsou výhody komplexů?

Interaktom x komplexom



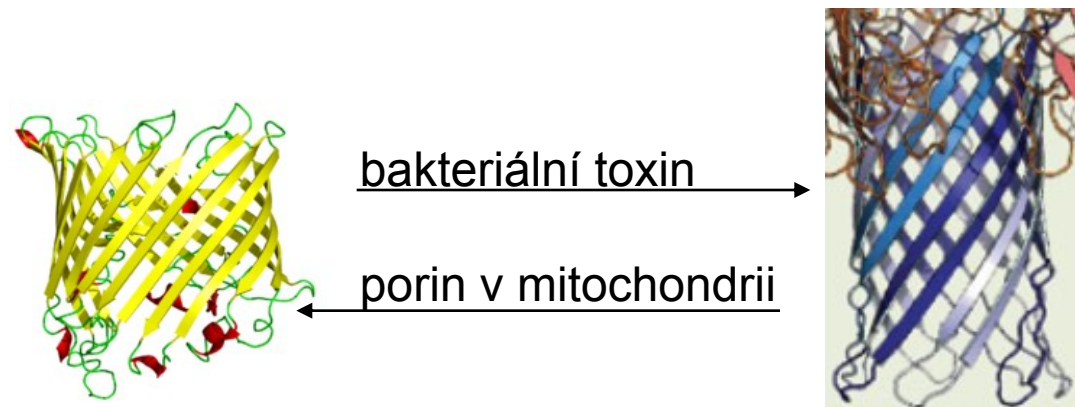
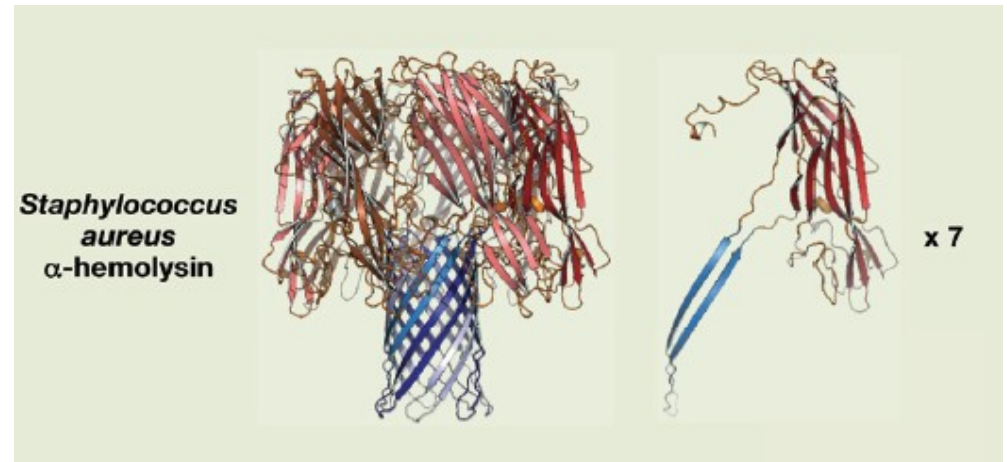
- proteiny jsou si blízko vs difuze
- koordinované předávání signálů, substrátů ...





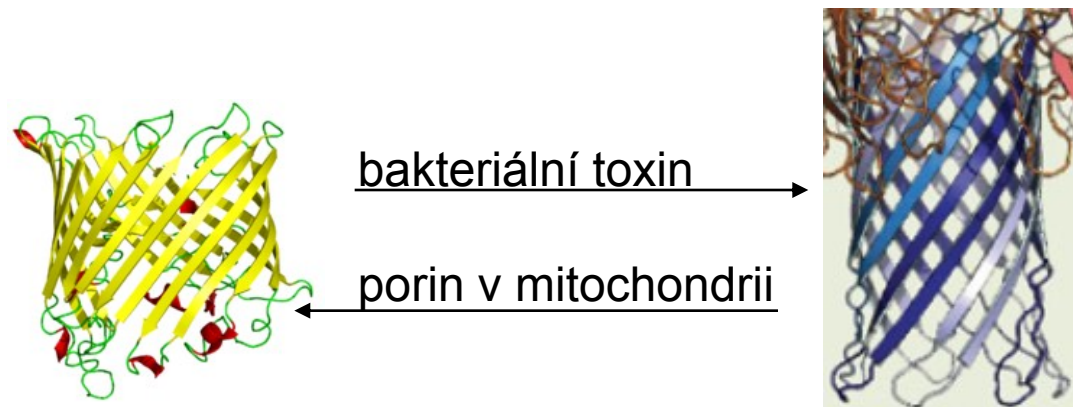
# Proč skládat makromolekuly z menších podjednotek?

- skládání funkčního komplexu na specifickém místě (toxin je transportován jako rozpustný monomer a poté se skládá => stává se toxickým až mimo původní buňku)



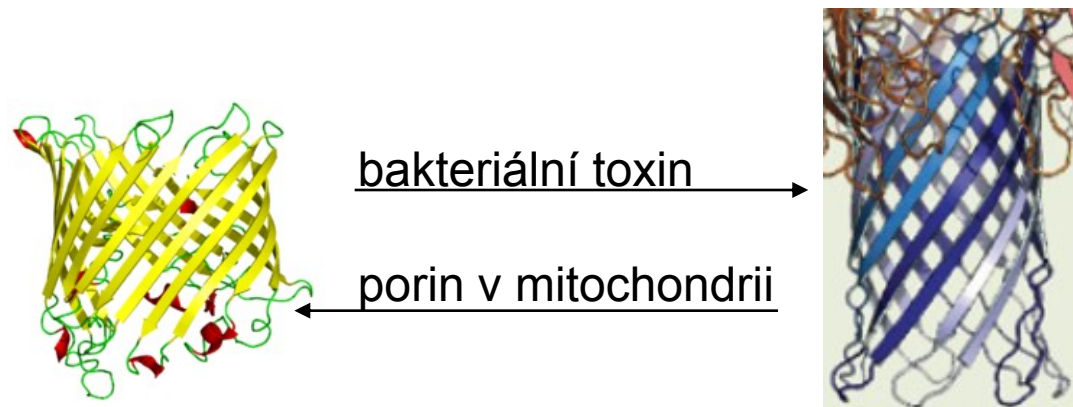
# Proč skládat makromolekuly z menších podjednotek?

- 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 je snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)



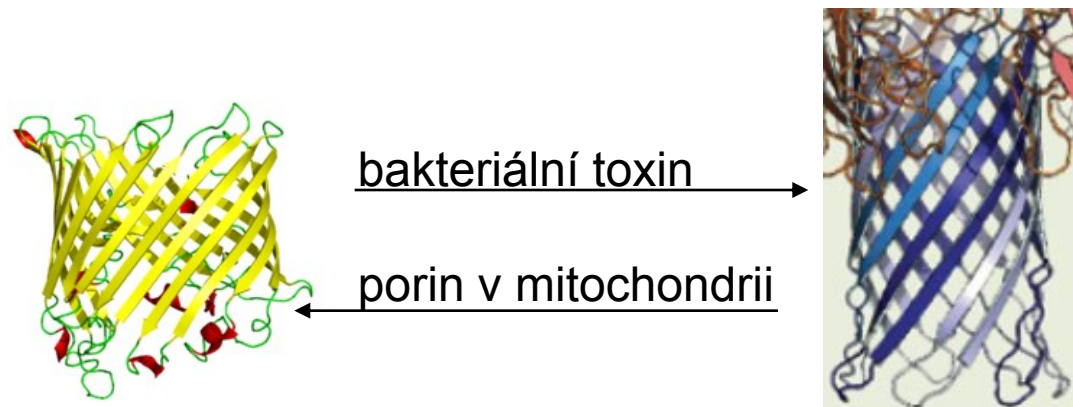
# Proč skládat makromolekuly z menších podjednotek?

- 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 je snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)
- velký komplex (homo-oligomer) může být kódován relativně krátkou genetickou informací



# Proč skládat makromolekuly z menších podjednotek?

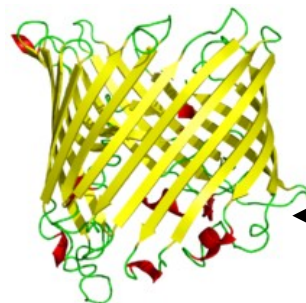
- skládání funkčního komplexu na specifickém místě (toxin je transportován jako rozpustný monomer a poté se skládá => stává se toxickým až mimo původní buňku)
- skládání i rozpad komplexů je snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)
- 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/degraduje se pouze jedna poškozená menší podjednotka => méně energie než pro nápravu celé struktury)





# Proč skládat makromolekuly 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
- 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)

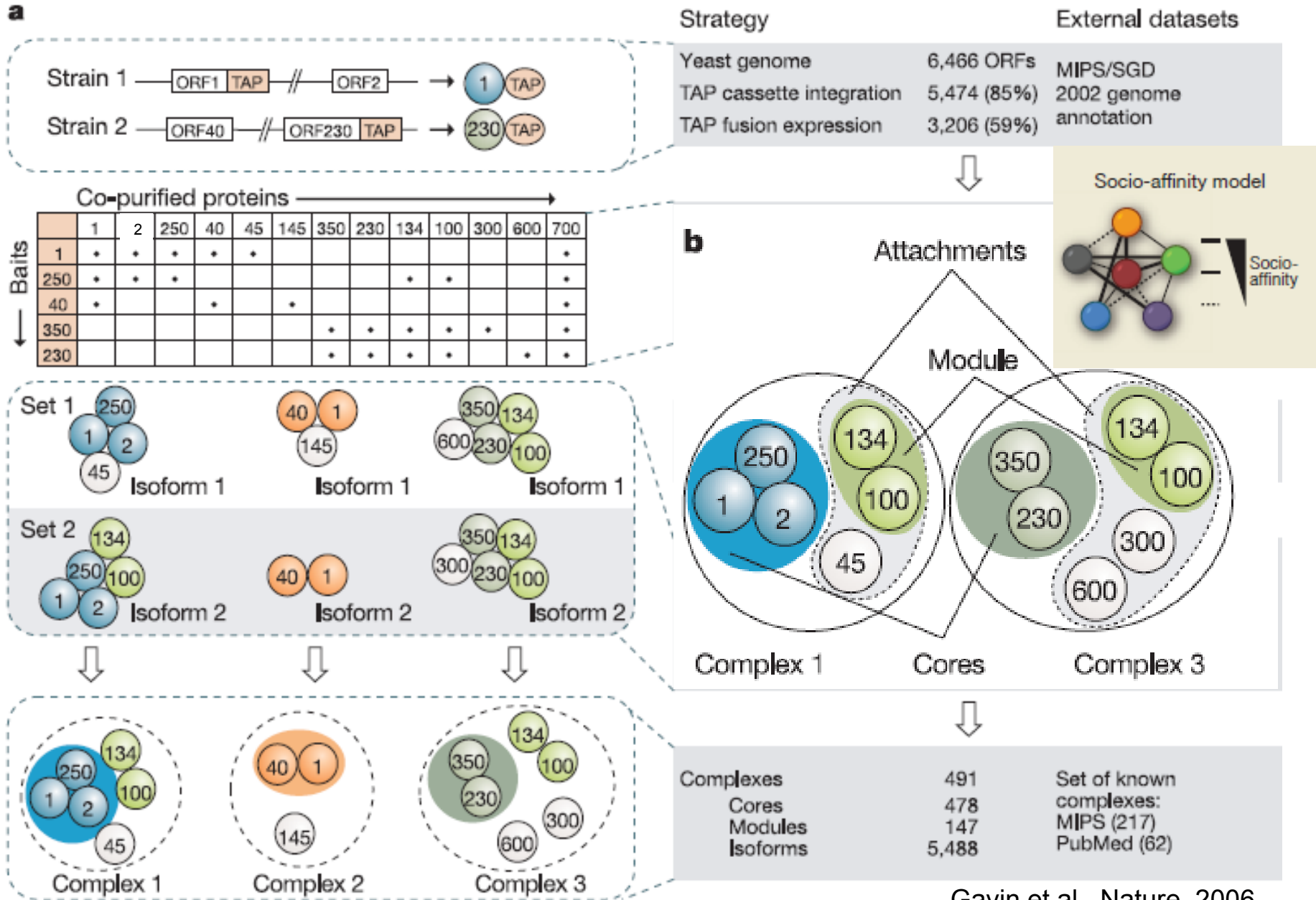


bakteriální toxin →

← porin v mitochondrii



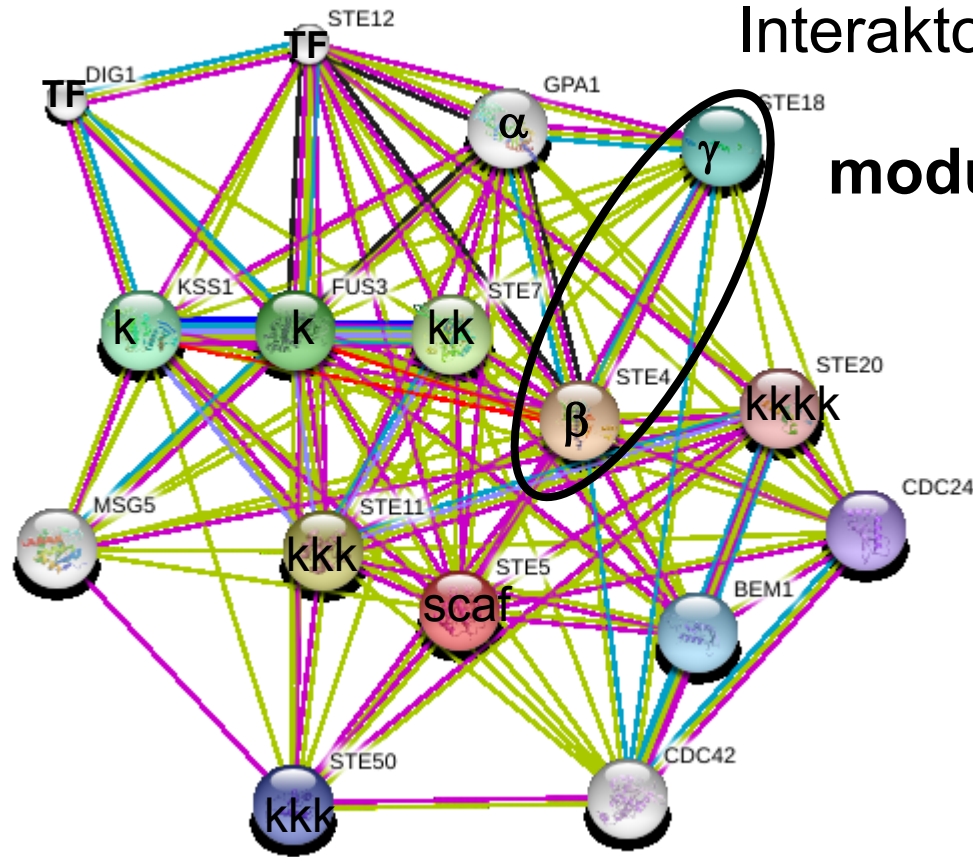
# Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



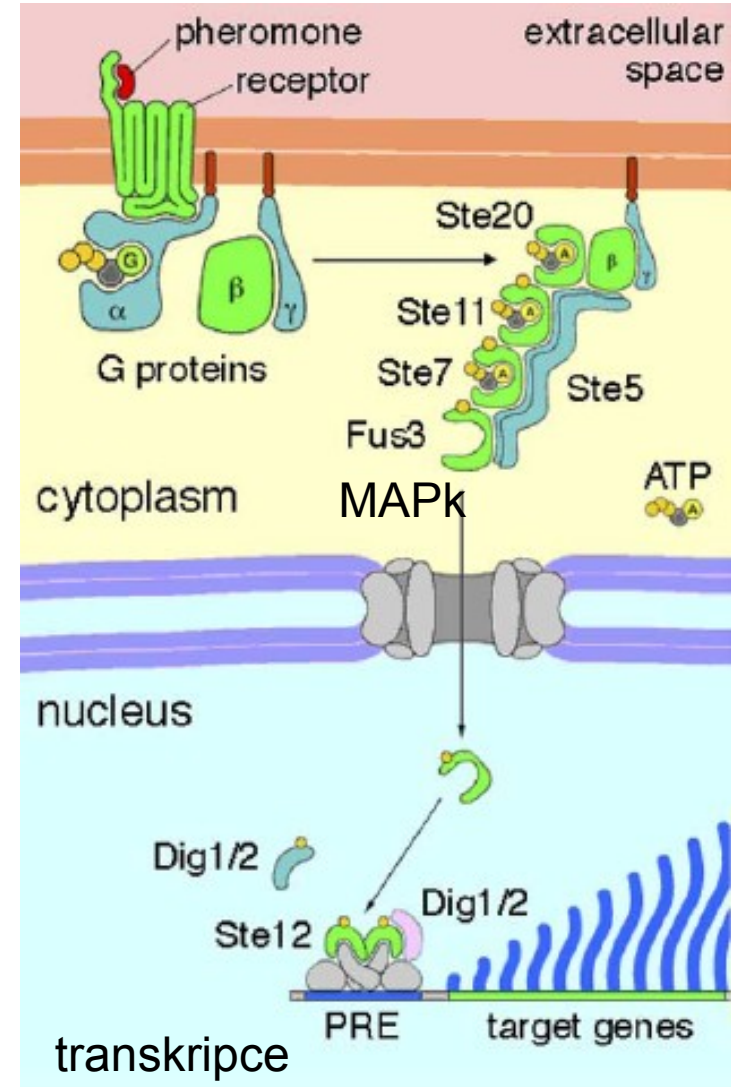
# Komplexy – core, modul, attachment

Interaktom x komplexom

modul



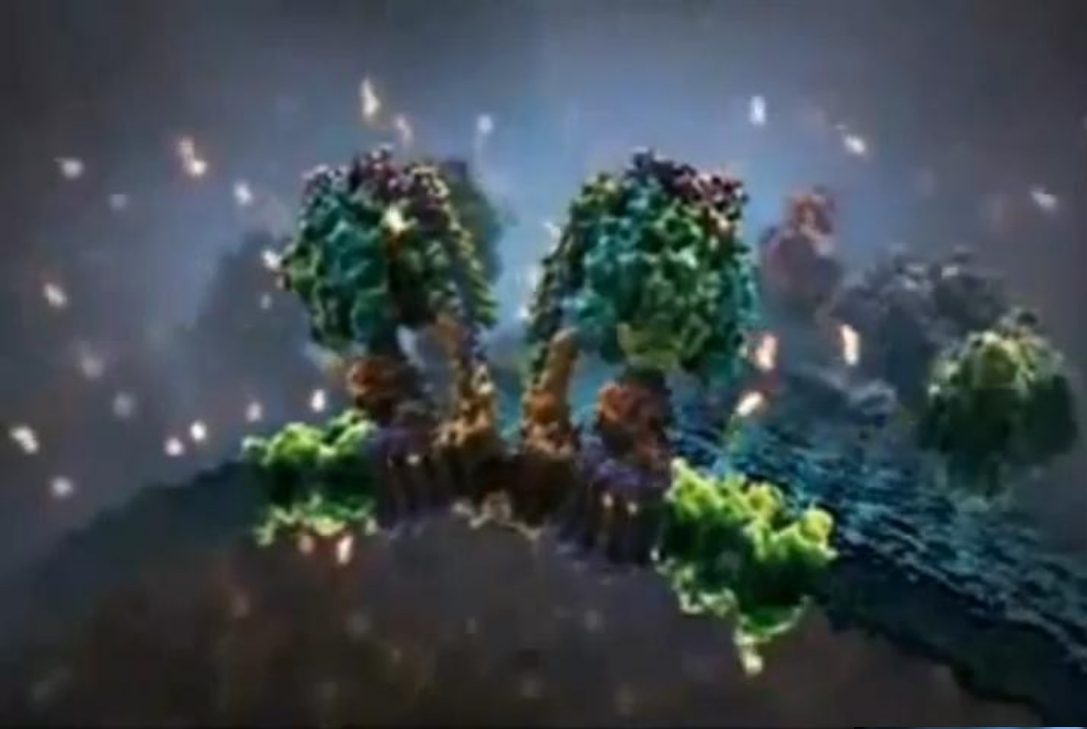
- Experiments Y2H, coIP ...
  - Databases
  - Textmining
  - Gene Fusion
  - Coexpression
- STRING  
<http://string-db.org>



Kvíz – zapište komplexy či „molekulární stroje“, které jste zahlédli během videoprojekce

Molecular machinery of life:

<http://www.youtube.com/watch?v=ztXiU3c3poM>

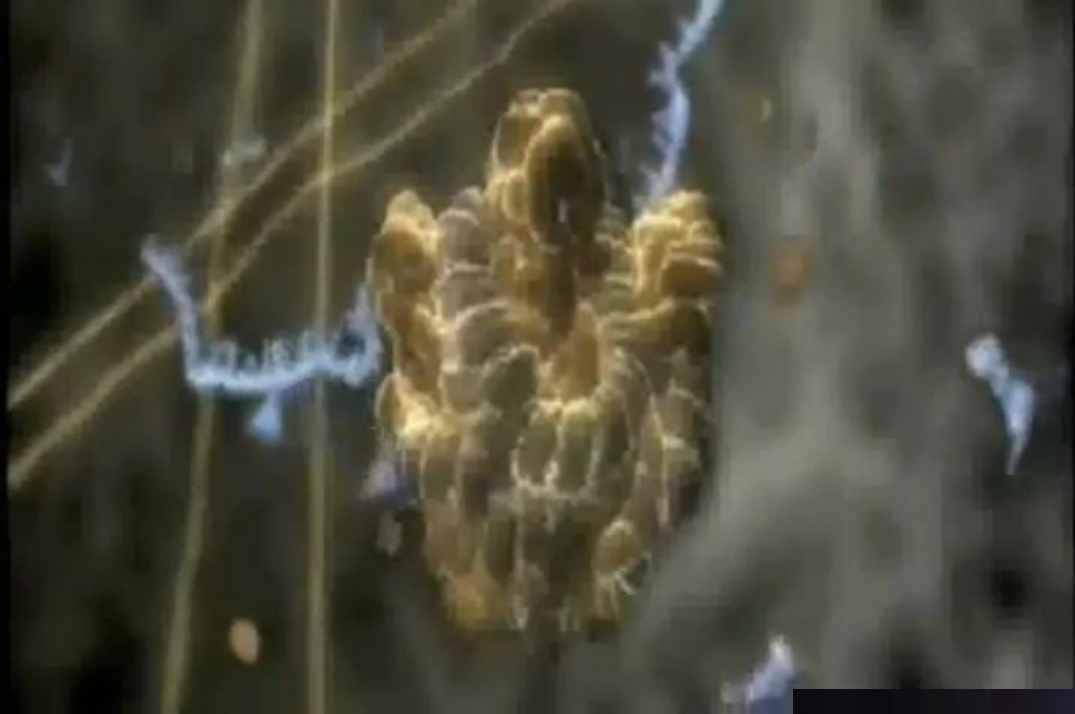


ATPasová pumpa

Jaderný pór

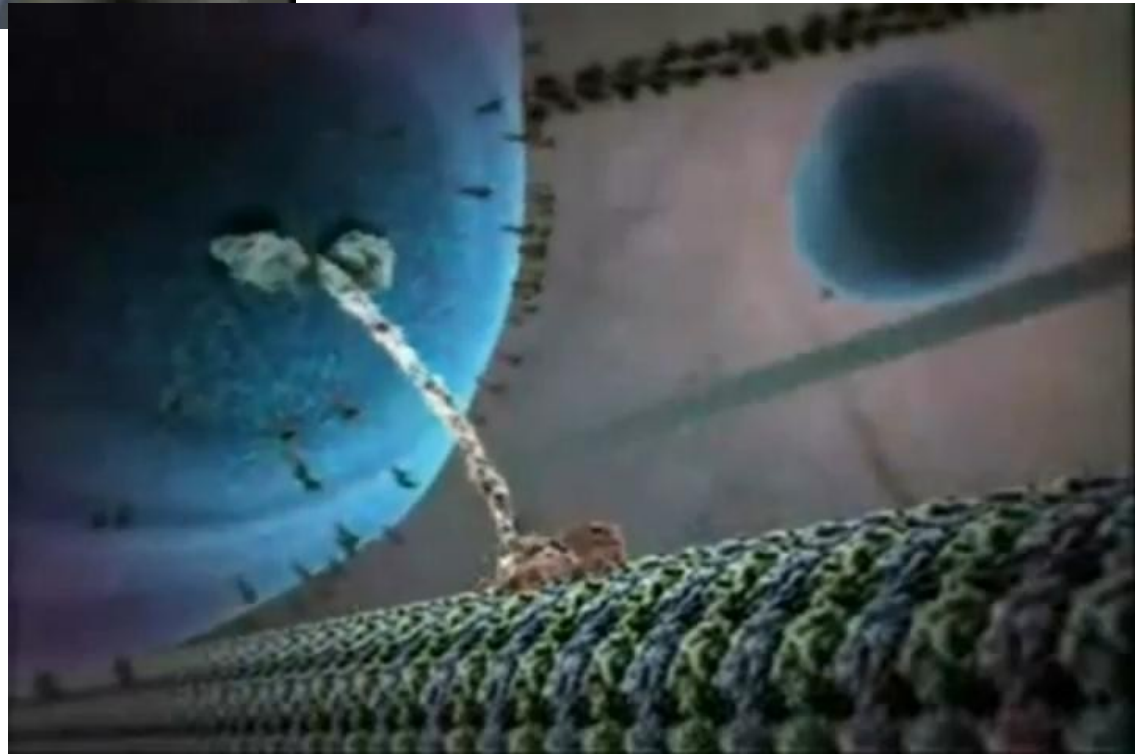


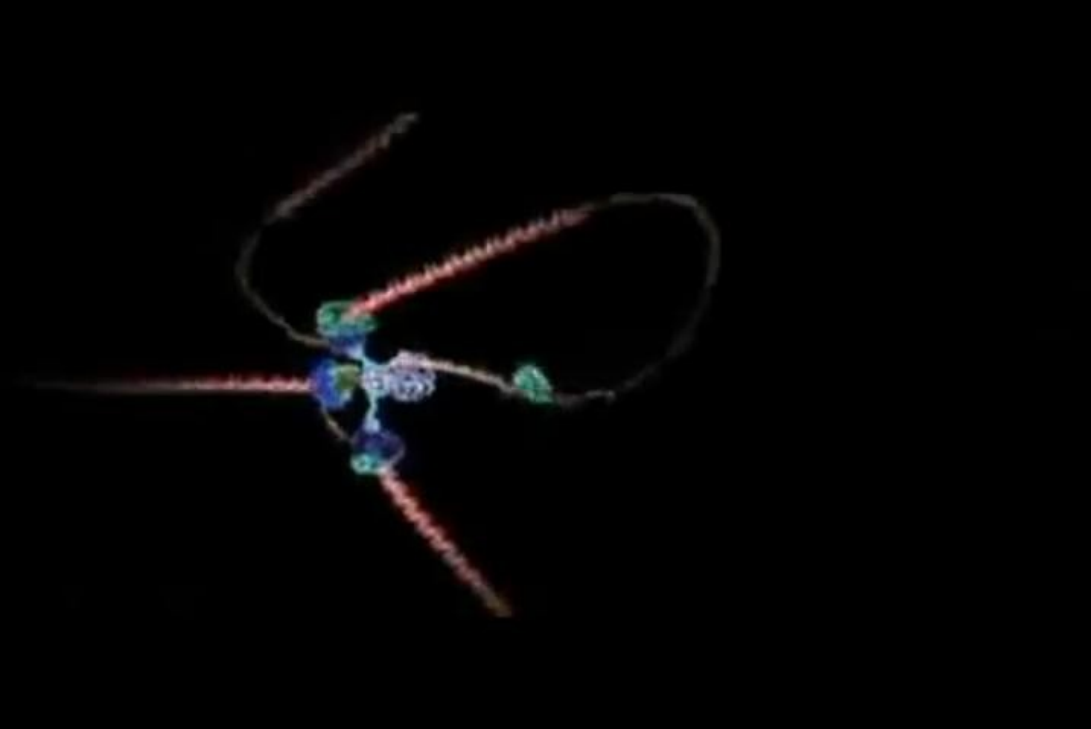




proteosyntéza  
ribosom (mRNA, tRNA)

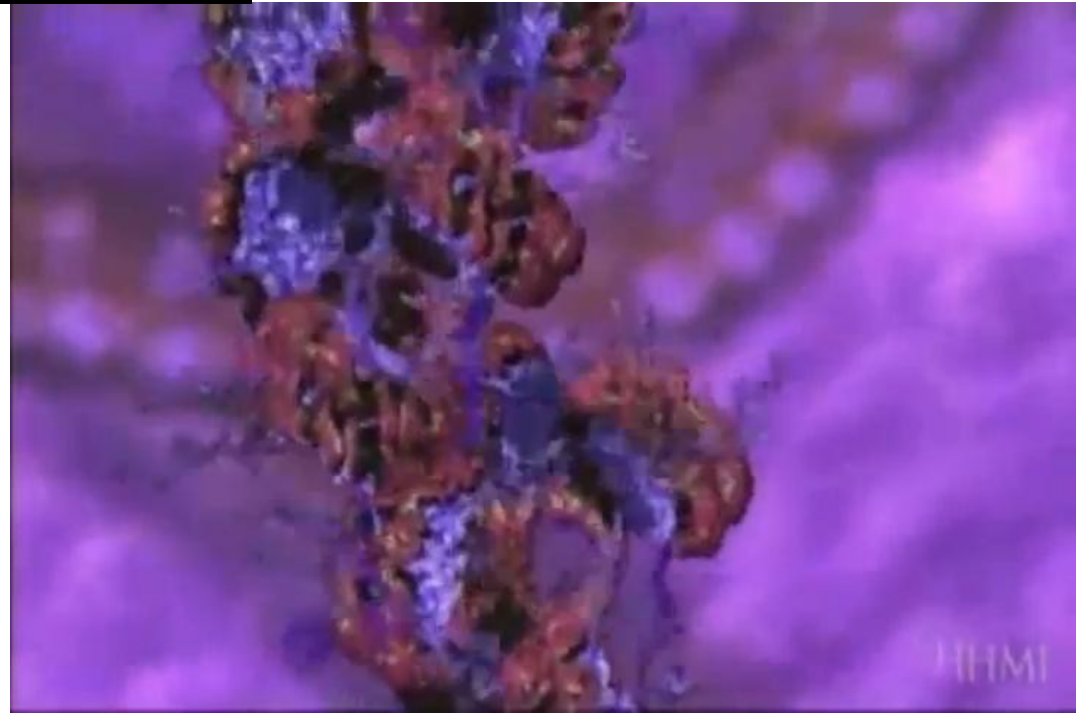
transport váčku po cytoskeletu  
(mikrotubuly, kinesin/dynein)

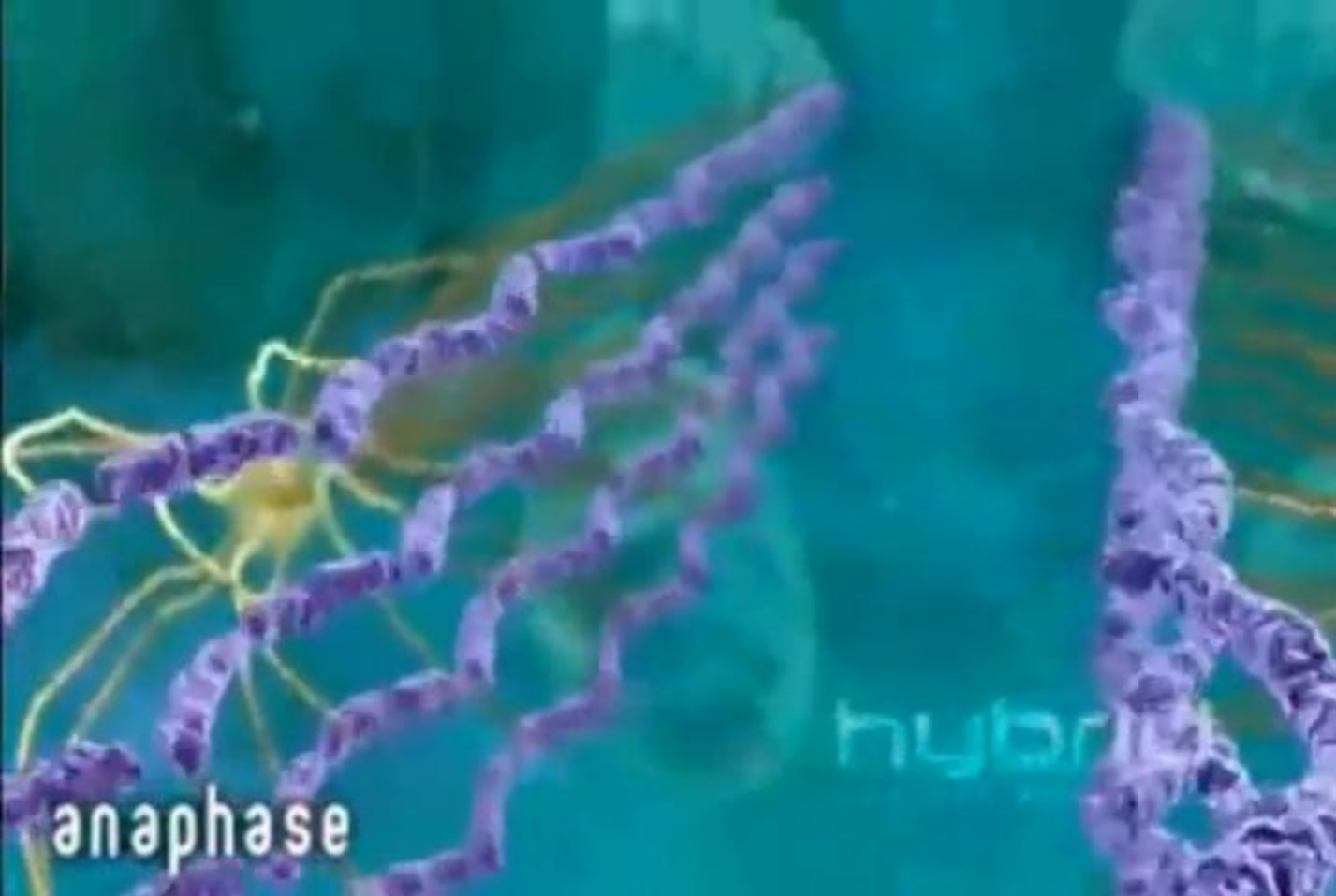




replikace (helikása,  
primáza, DNA polymeráza,  
PCNA)

nukleosomy





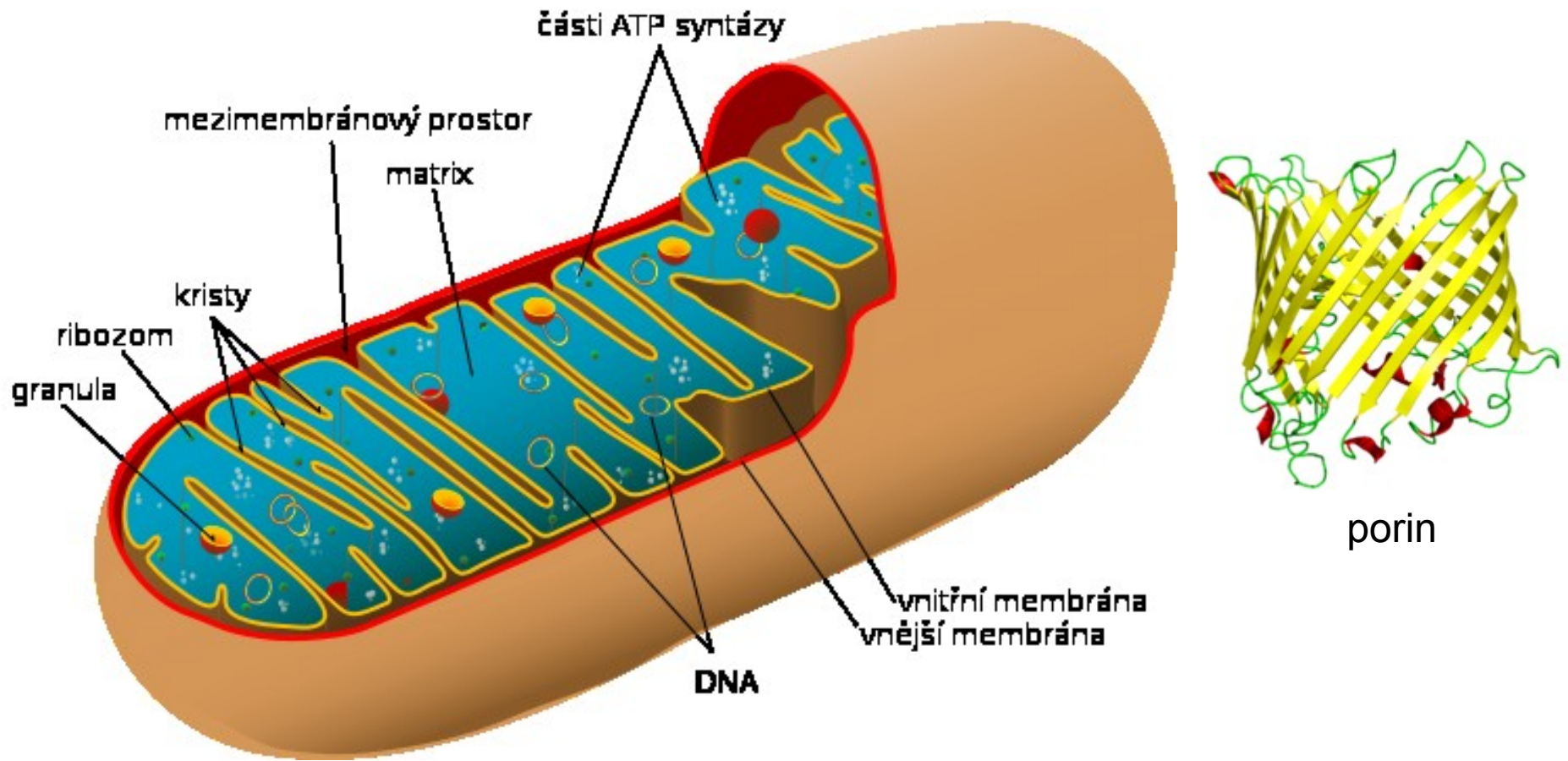
Průběh mitózy (mikrotubuly, chromosomy)

**C9041 – Struktura a funkce eukaryotických chromosomů**

**Prof. Jiří Fajkus**

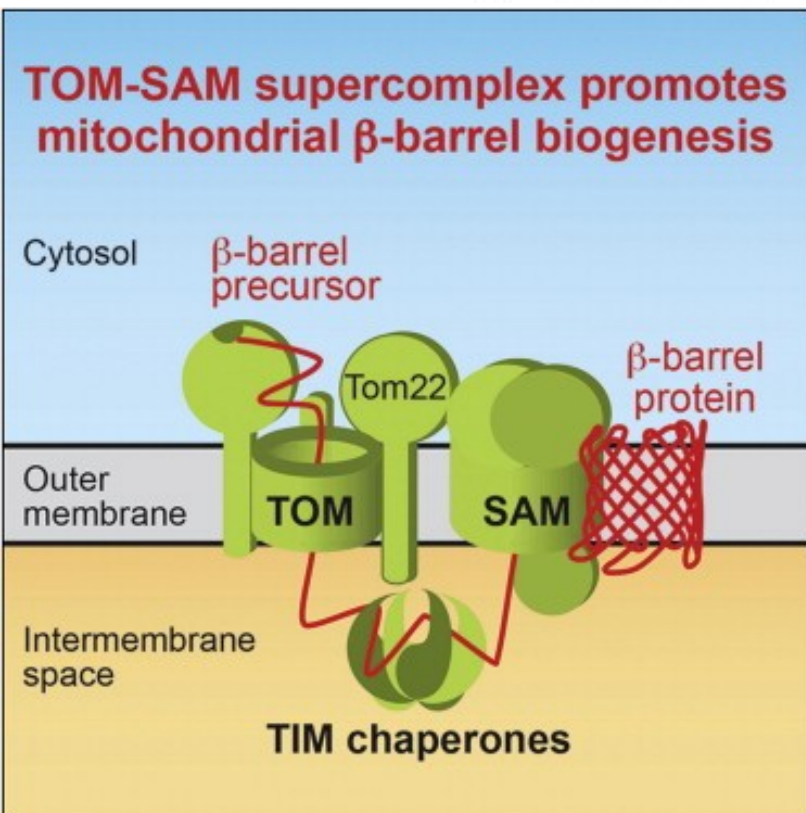
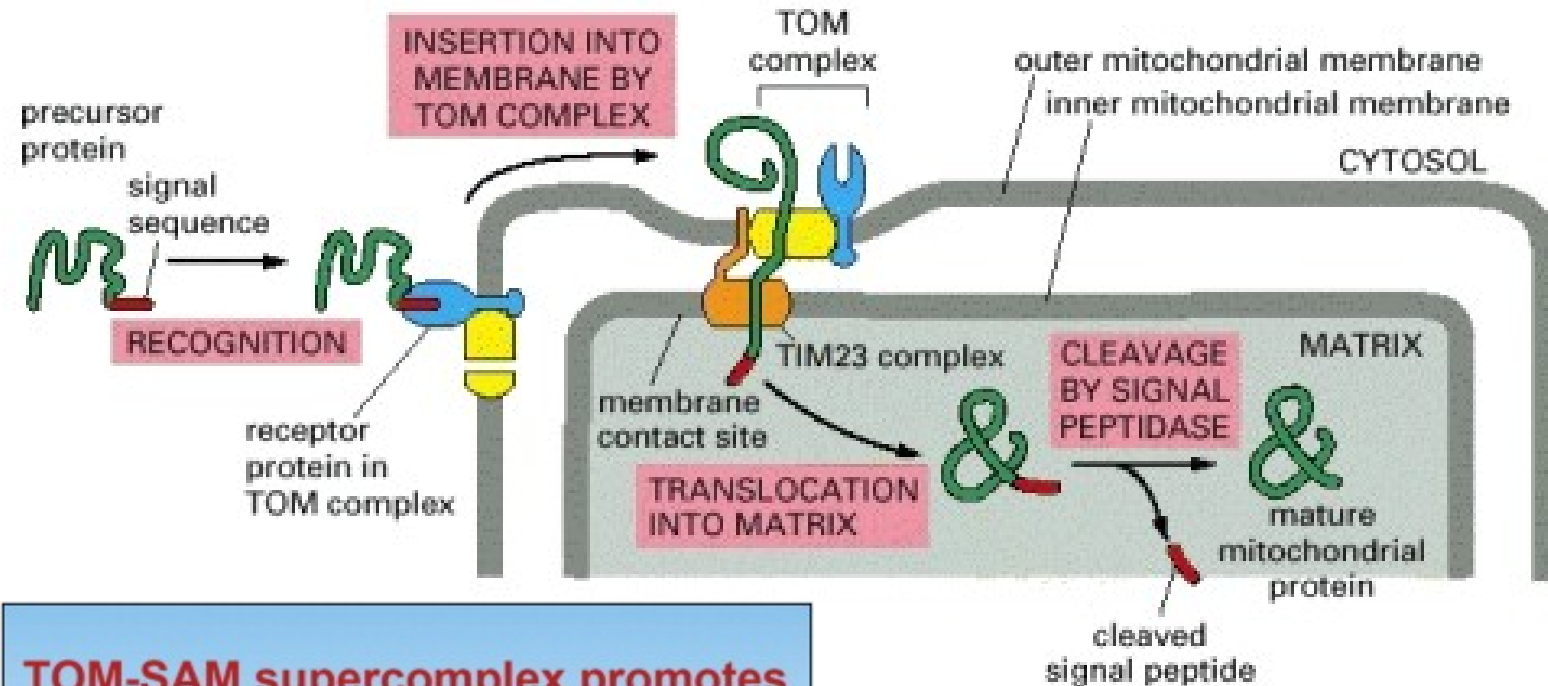
**CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů**

**Doc. Jan Paleček**

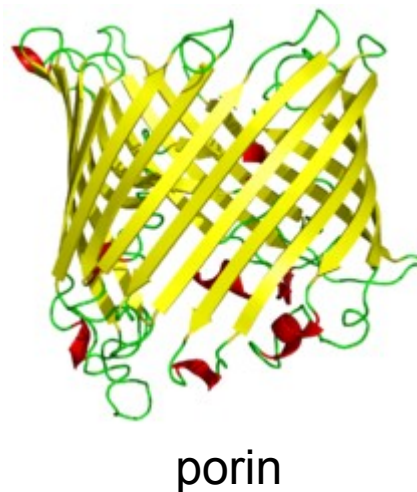


- vnější membrána představuje první bariéru s **poriny** (beta barely) a **TOM** komplexy
- v mezimembránovém prostoru je zastoupen hlavně cytochrom C a kinázy
- vnitřní membrána má kristy (velká plocha) s **TIM komplexy, enzymy dýchacího řetězce a ATP syntázou**
- hustá matrix obsahuje enzymy Krebsova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

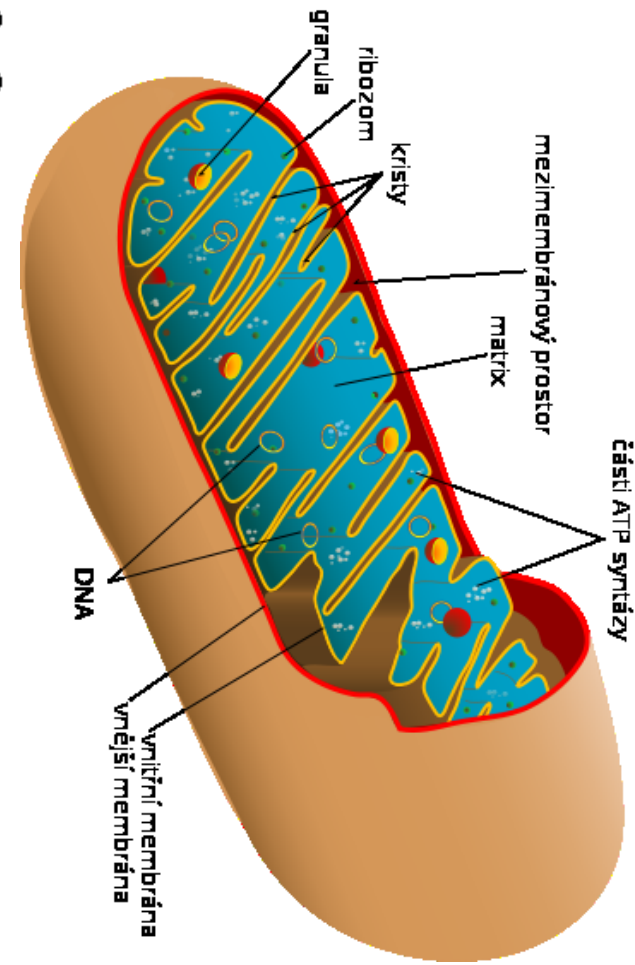
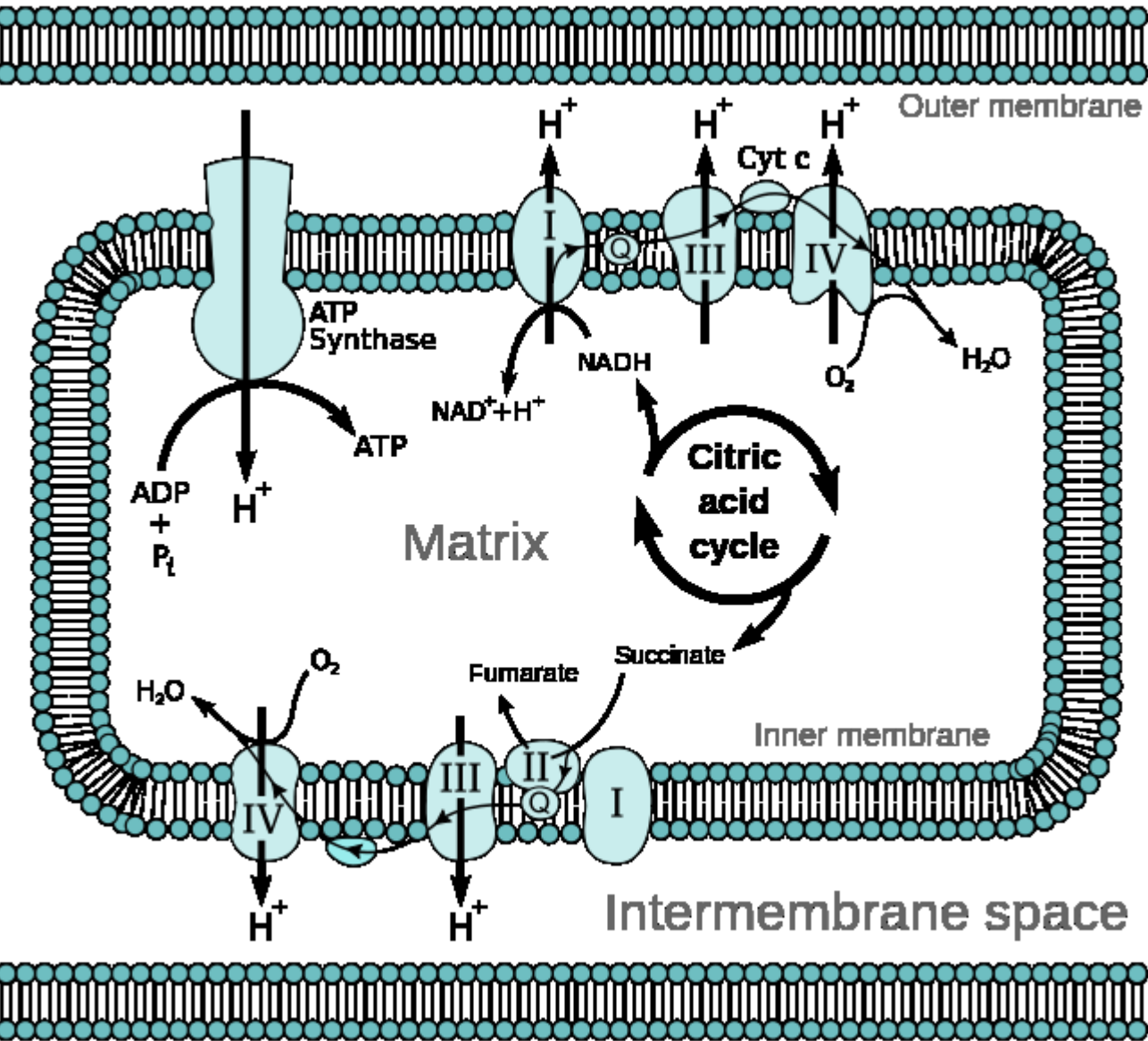




Folding až v mitochondrii po průchodu membránou (pórem)

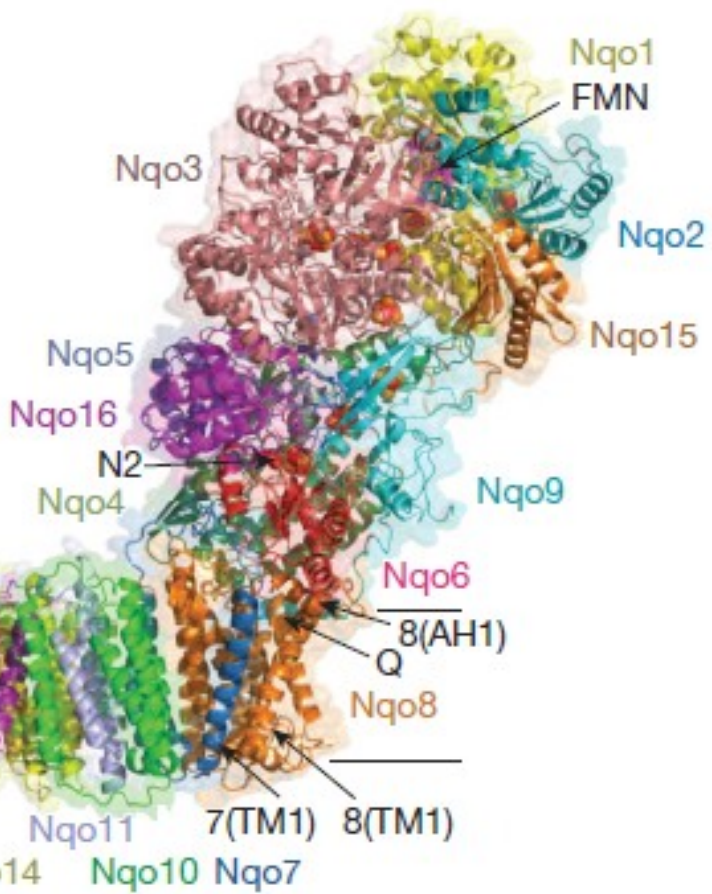
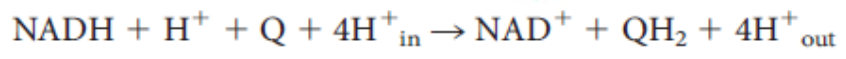
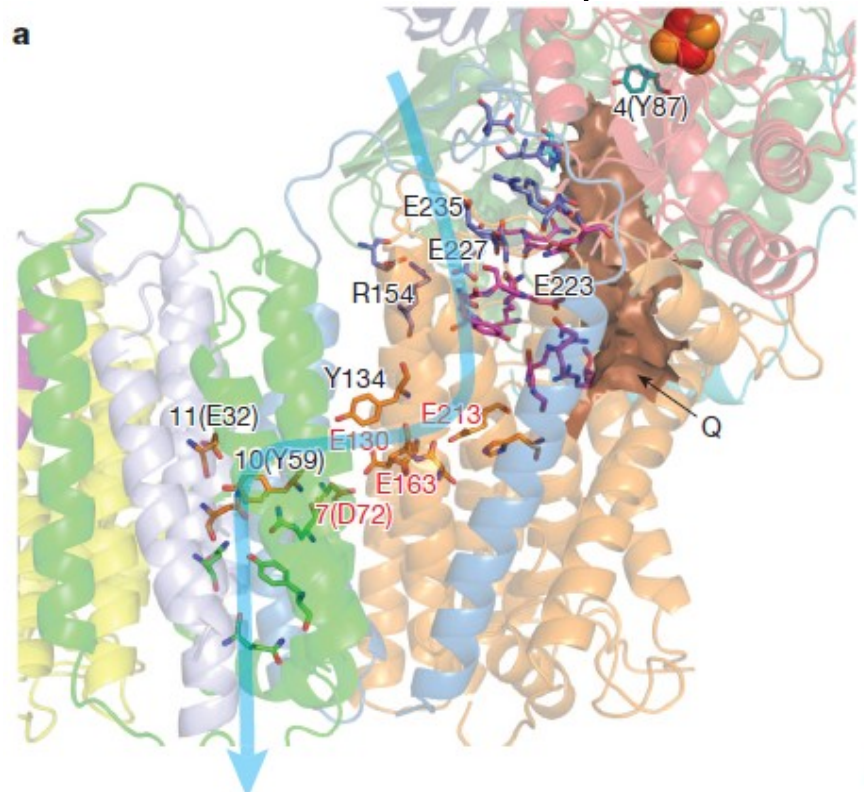




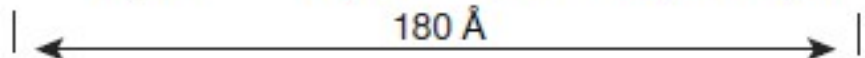
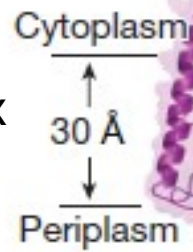


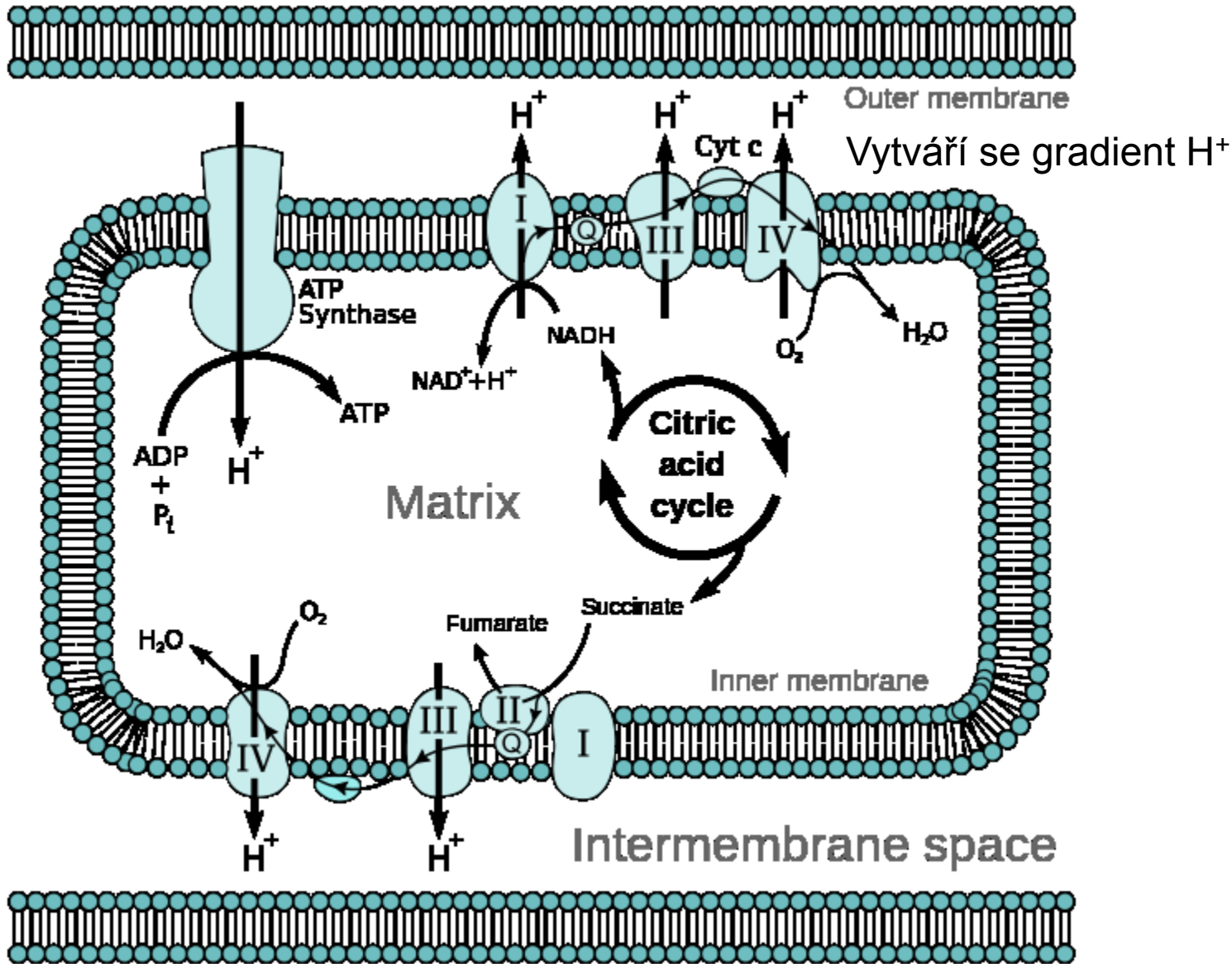
- Kotvený komplex I: [NADH-Q-oxidoreduktasa](#) ([ubichinon-reduktasa](#))- vstup [NADH+H+](#)
- Kotvený komplex II: postranní vstup pro [FADH2](#) ze [sukcinátdehydrogenázy](#)
- Kotvený komplex III: [cytochrom-c-reduktasa](#) ([ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza](#))
- Kotvený komplex IV: [cytochrom-c-oxidasa](#)

komplex I: NADH-Q-oxidoreduktasa (ubichinon-reduktasa) vstup NADH+H+ - Předávání elektronů – vytváření H<sup>+</sup> gradientu



Multiproteinový komplex (7 genů je na mtDNA)





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

Kotvený komplex II: postranní vstup pro [FADH<sub>2</sub>](#) ze [sukcinátdehydrogenázy](#)

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

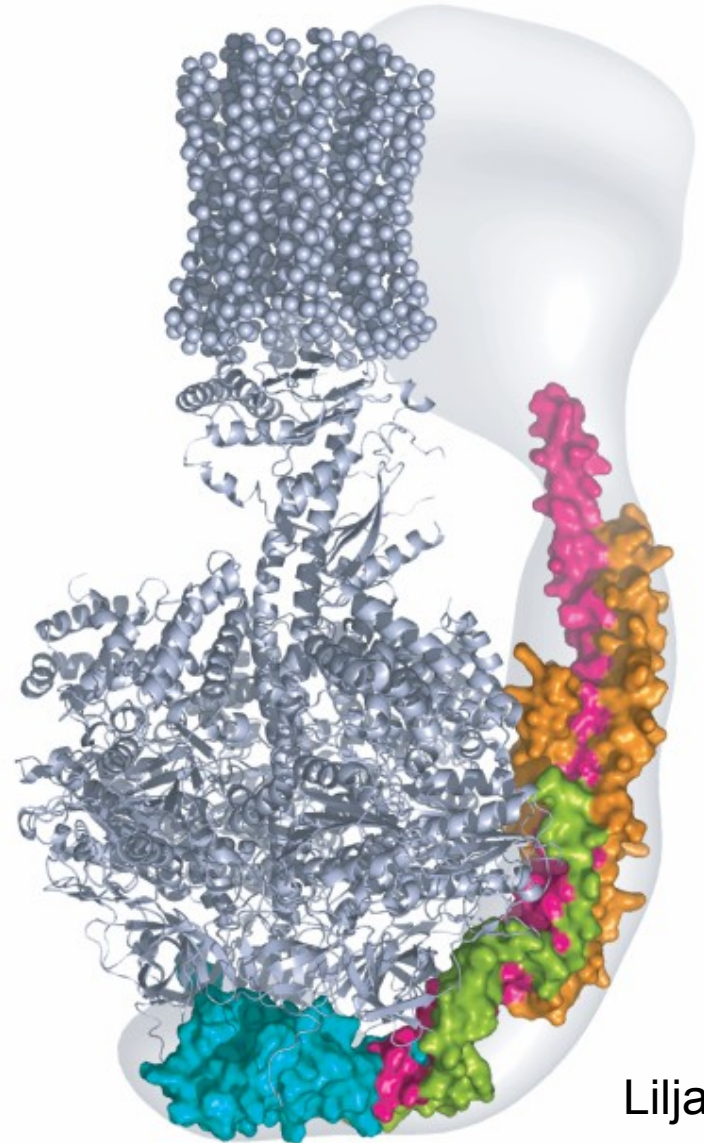
Kotvený komplex IV: [cytochrom-c-oxidasa](#)



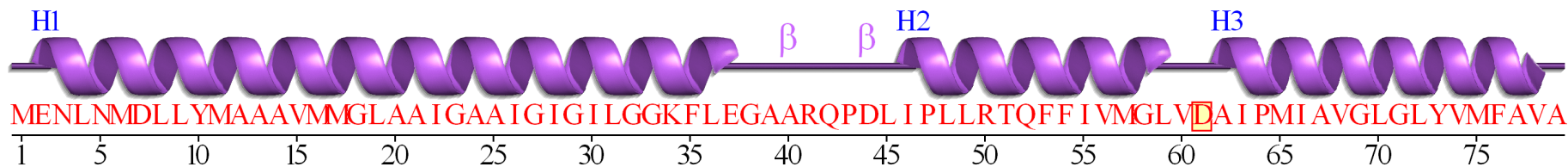
# Jak funguje ATPasová pumpa?



Pouze některé části byly vykrytalizovány (zbylé části doplněny dle EM)

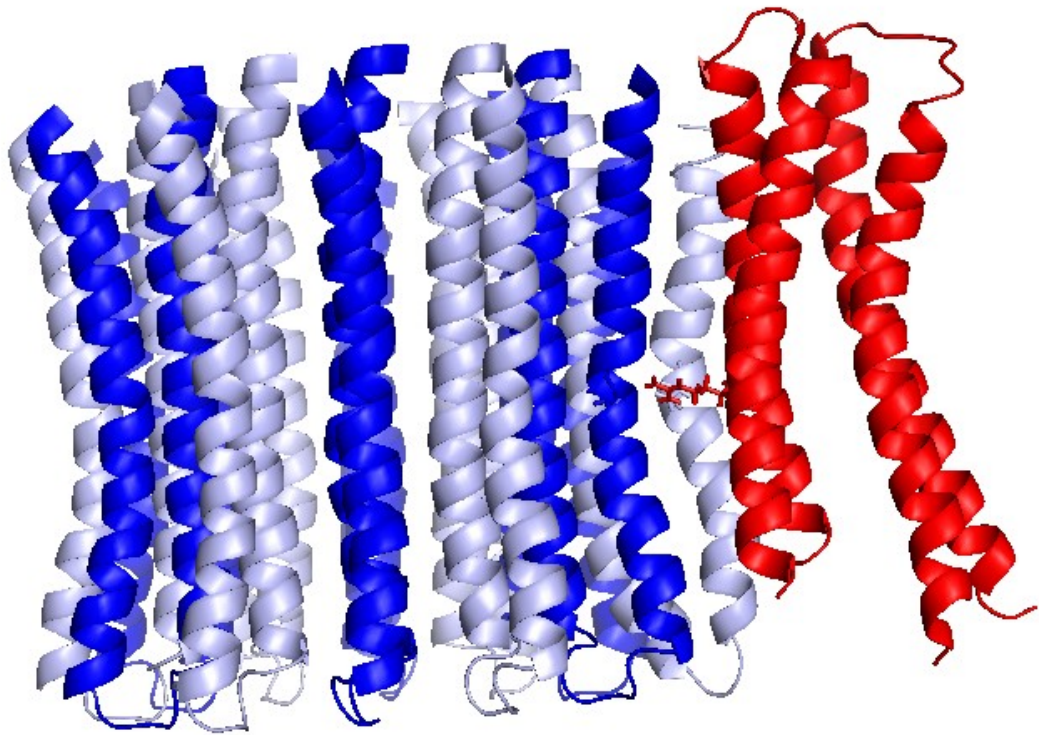


Liljas a spol.

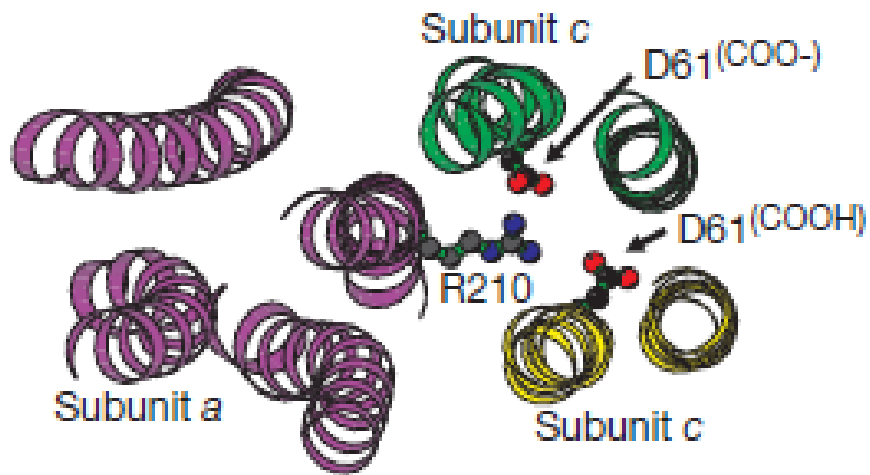


PDB: 1C17:A

pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu

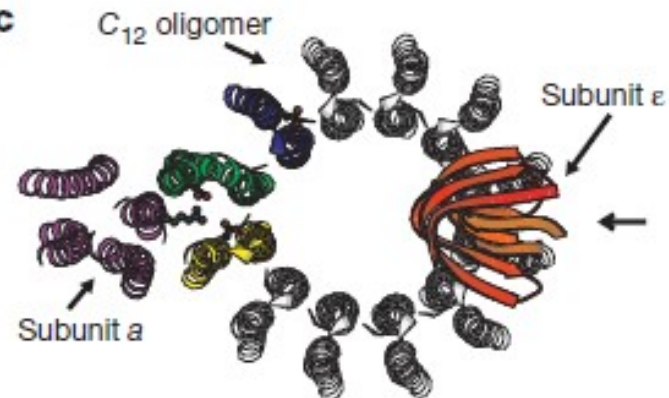
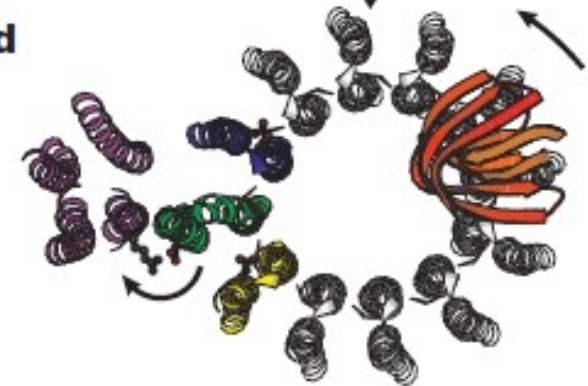


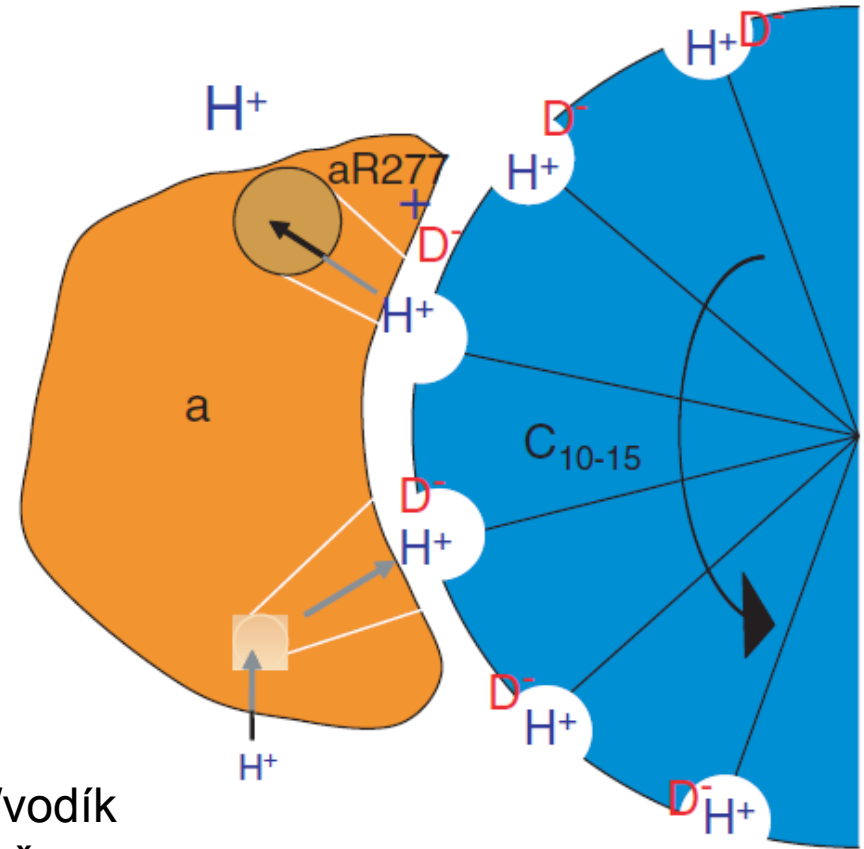
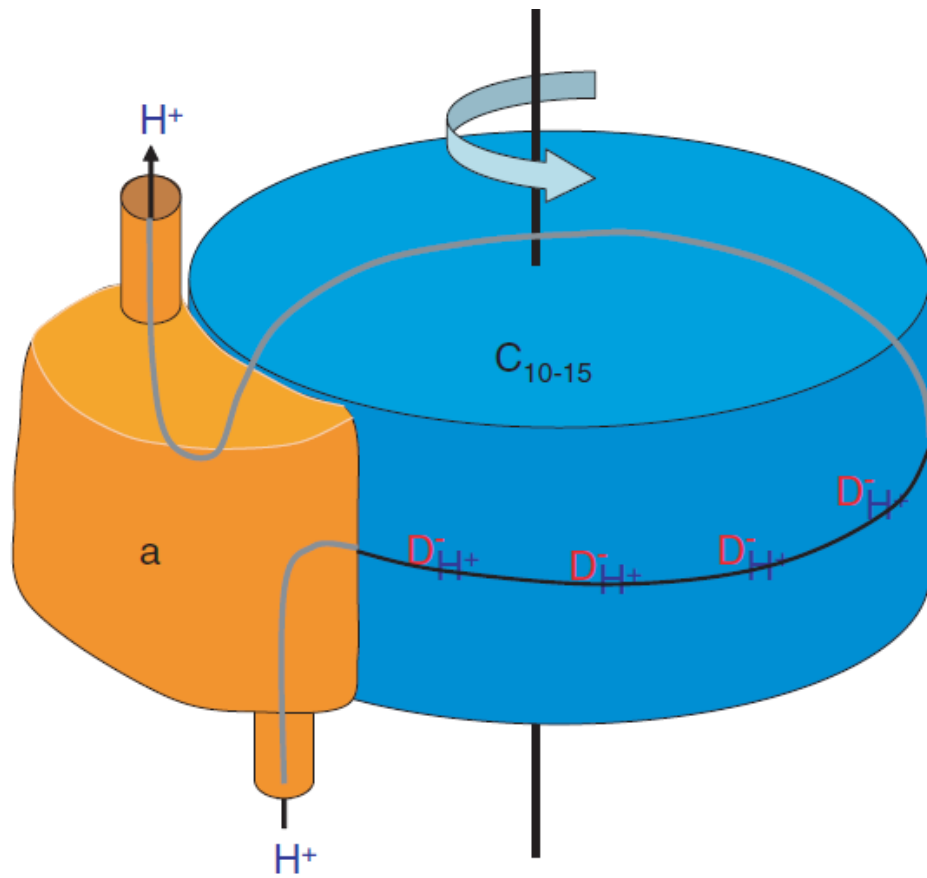


**a**

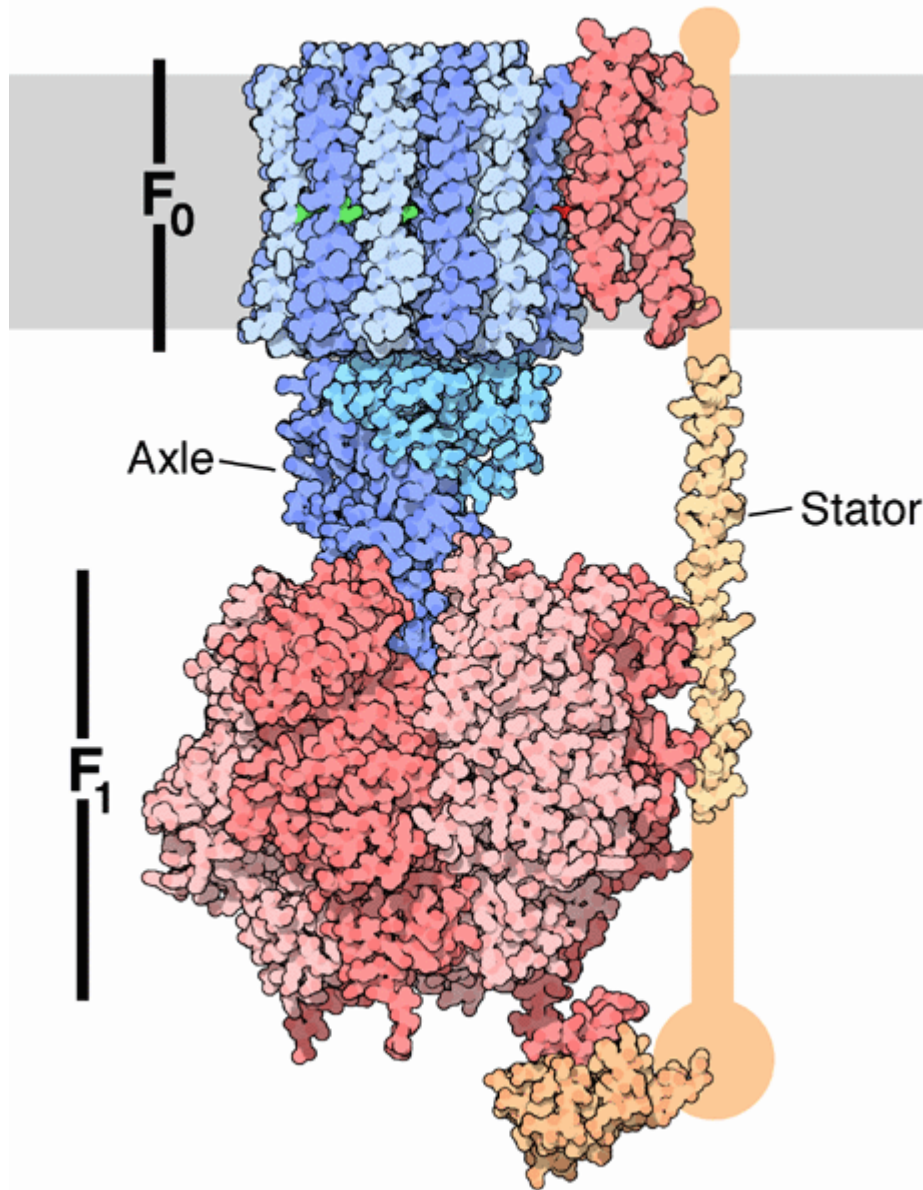
Rastogi &amp; Girvin, Nature, 1999

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.

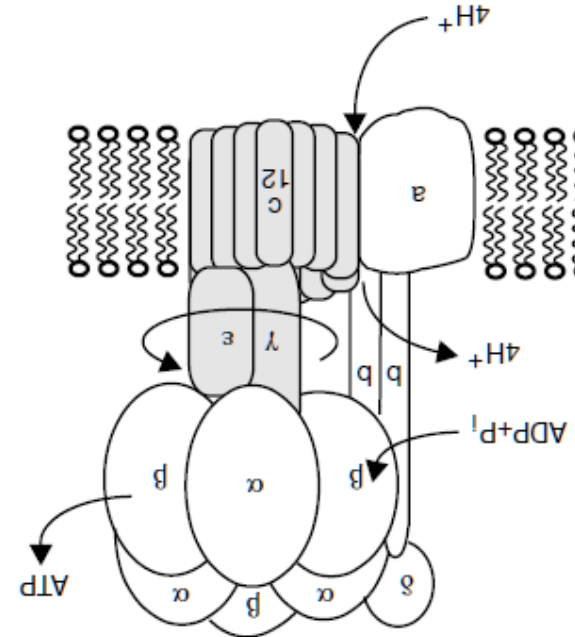
**c**H<sup>+</sup>**d****e****f**



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.



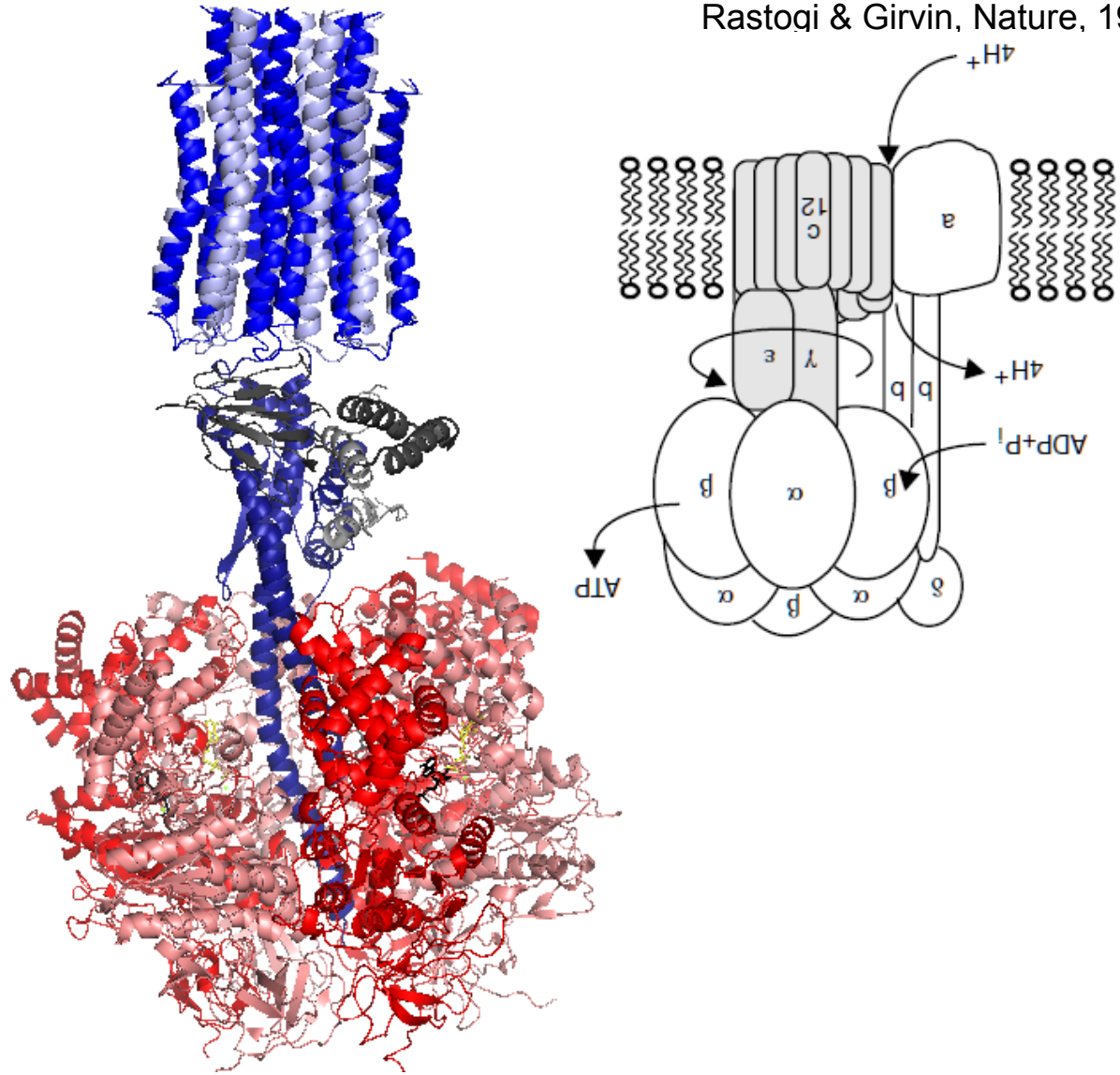
Molekula měsíce v prosinci 2005  
Rastogi & Girvin, Nature, 1999



F<sub>0</sub> je protonový rotor (uložen v membráně) poháněný tokem vodíkových iontů (z dýchacího řetězce) přes membránu. Tento rotor je spojen s druhým F<sub>1</sub> chemickým motorem poháněným ATP (nebo vyrábějícím ATP). Oba rotory jsou spojeny státorem.

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

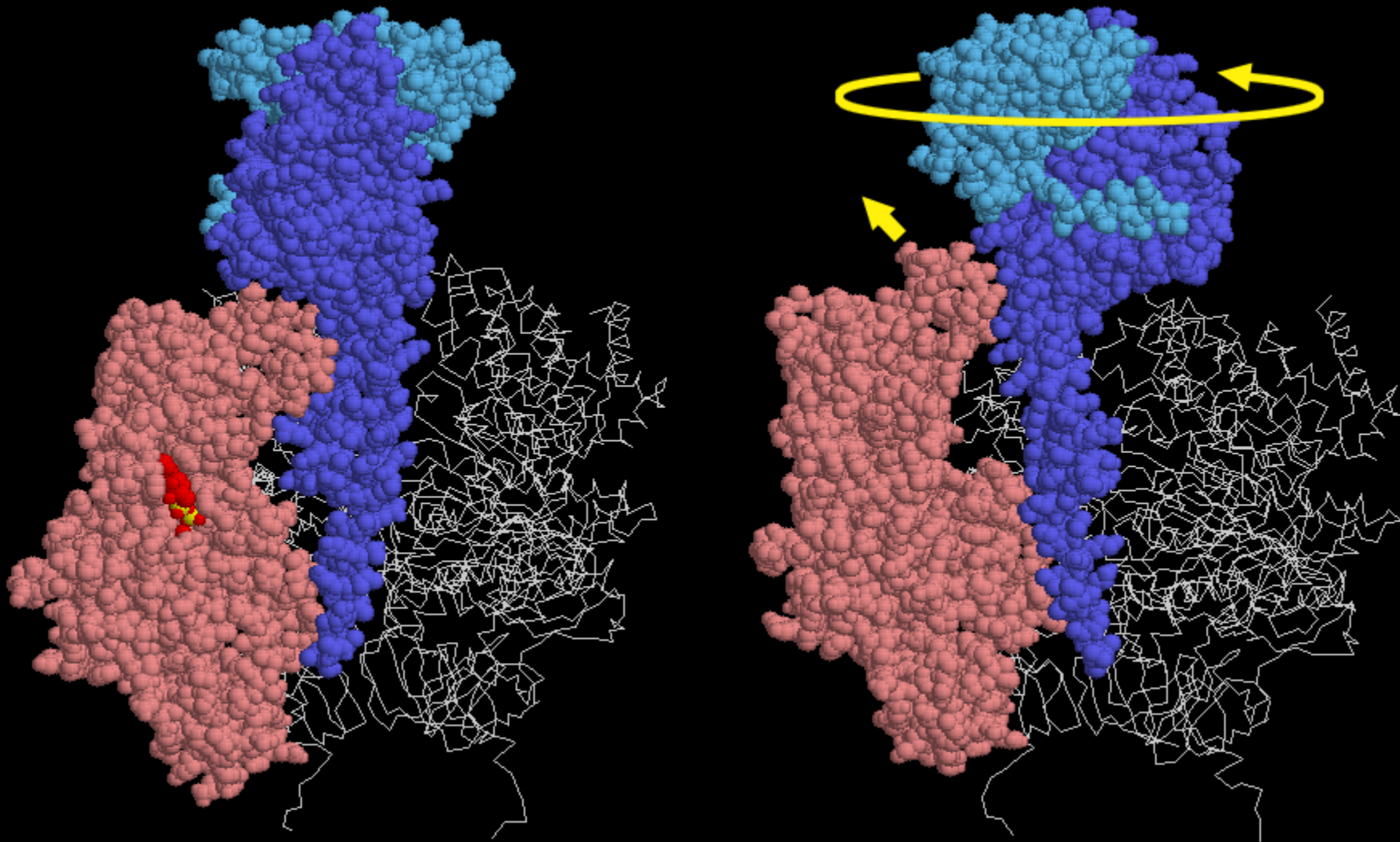
Molekula měsíce v prosinci 2005  
Rastogi & Girvin, Nature, 1999



PDB: 2WPD

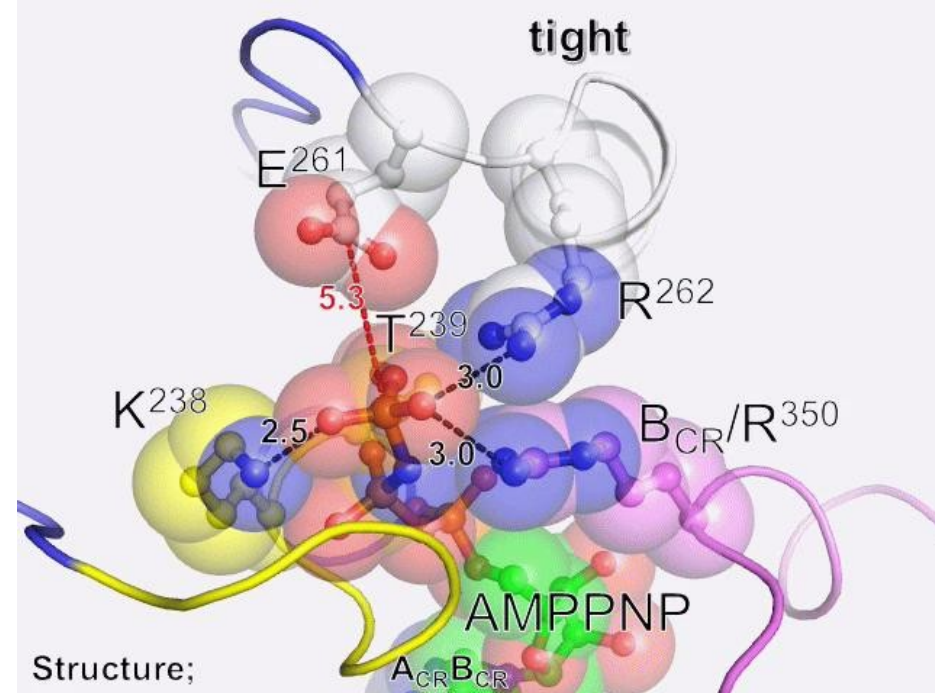
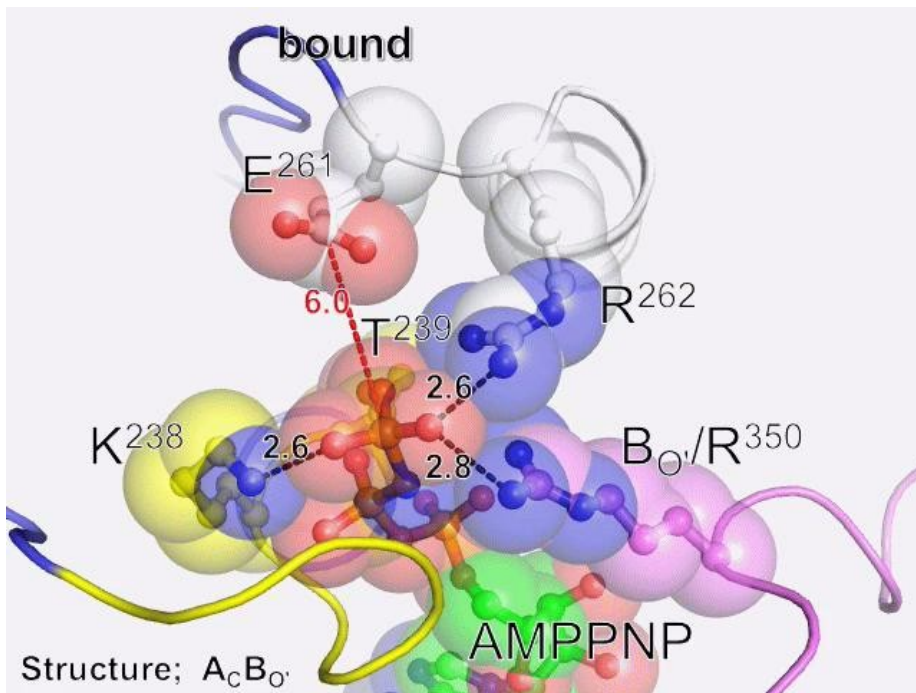
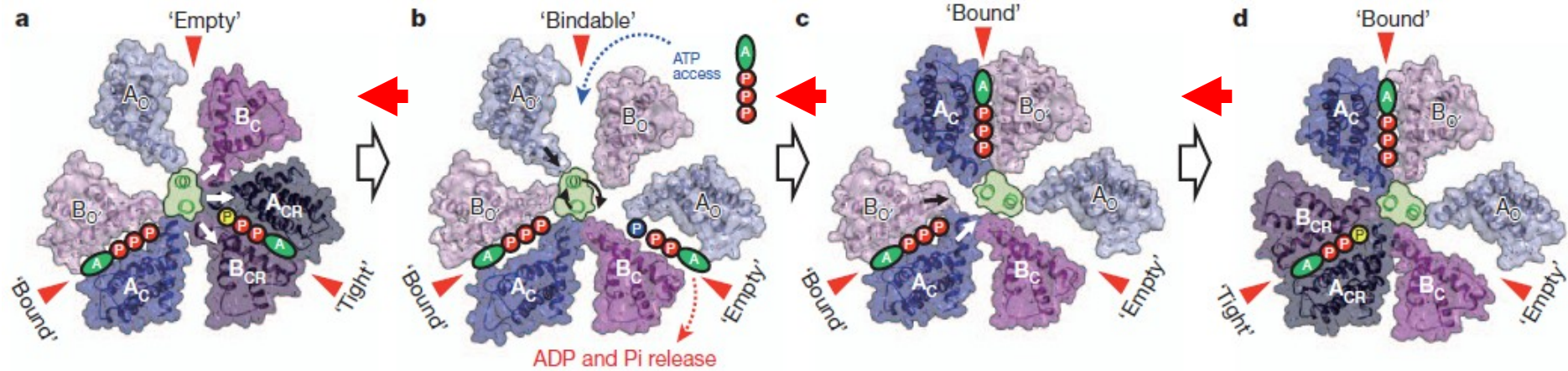
ATP syntasa – ukázka kompletní struktury – ve skutečnosti se točí „modré“ části a modulují „červený“ generátor

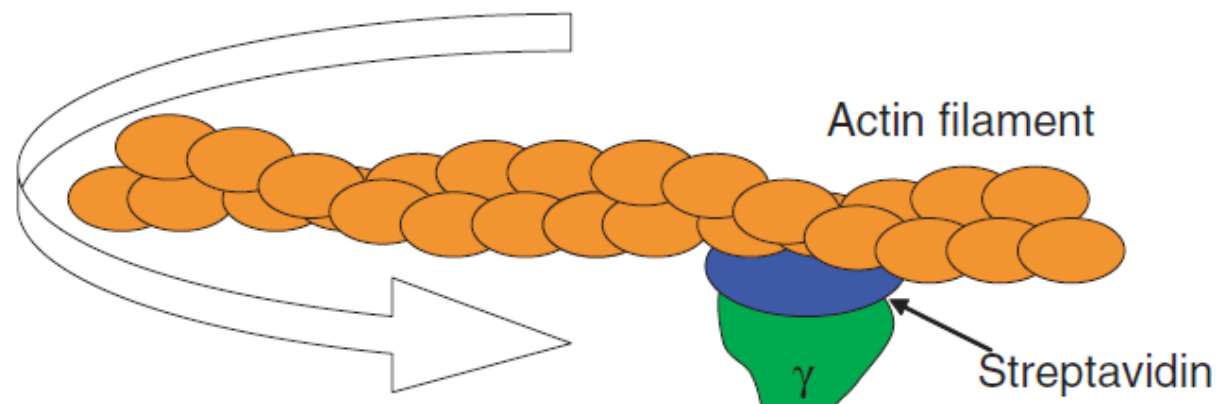
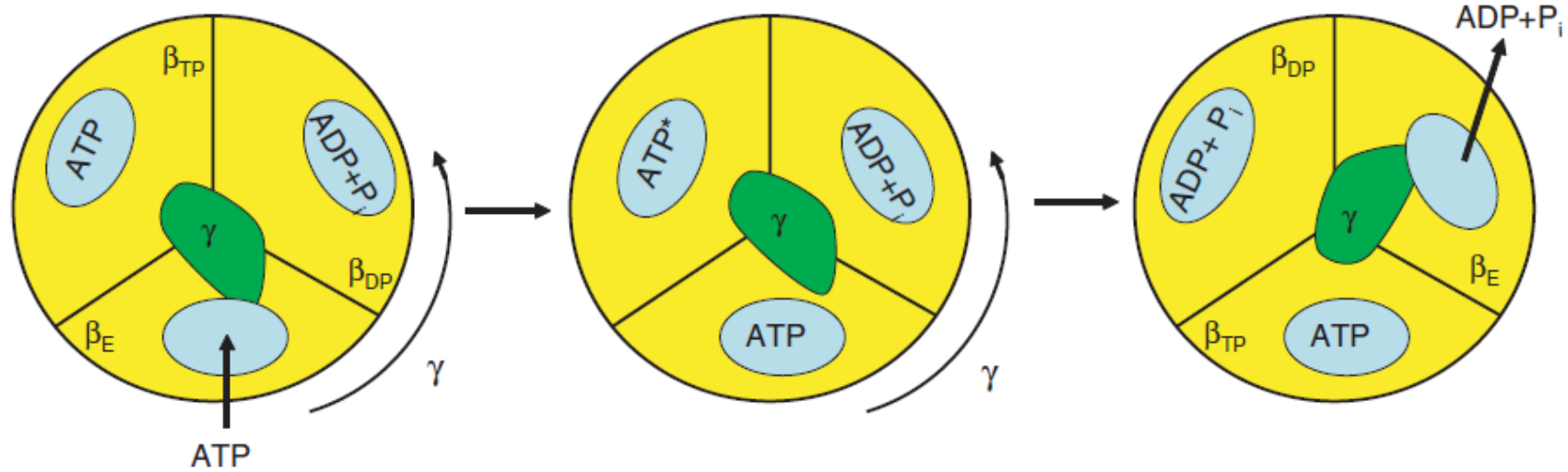




Při otočce osa tlačí na F1 motor (3 různé konformace)  
– levý panel = konformace vhodná pro vazbu ADP  
- pravý panel = ATP molekula byla vytlačena

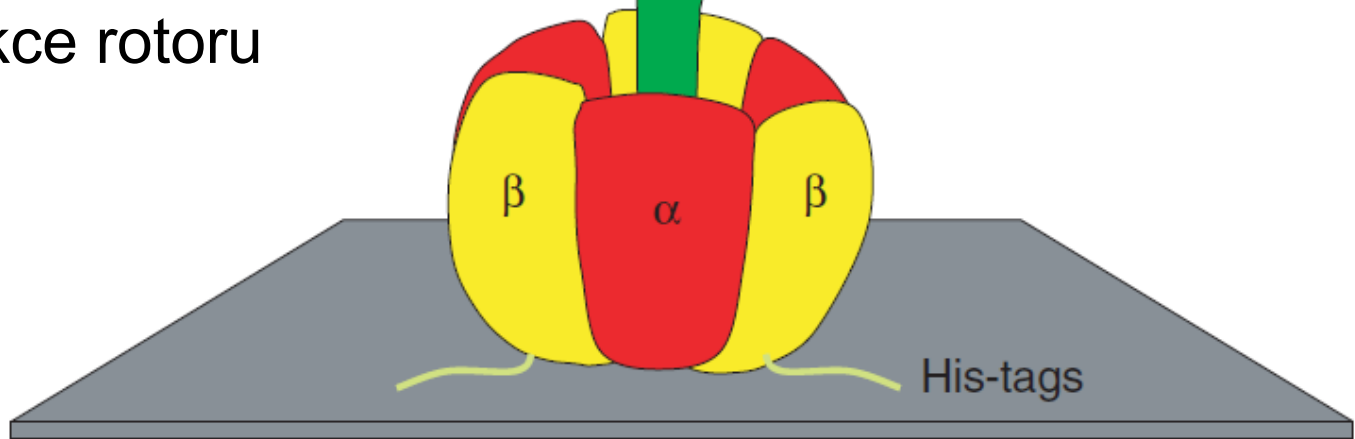
# Hydrolýza ATP vs tvorba ATP

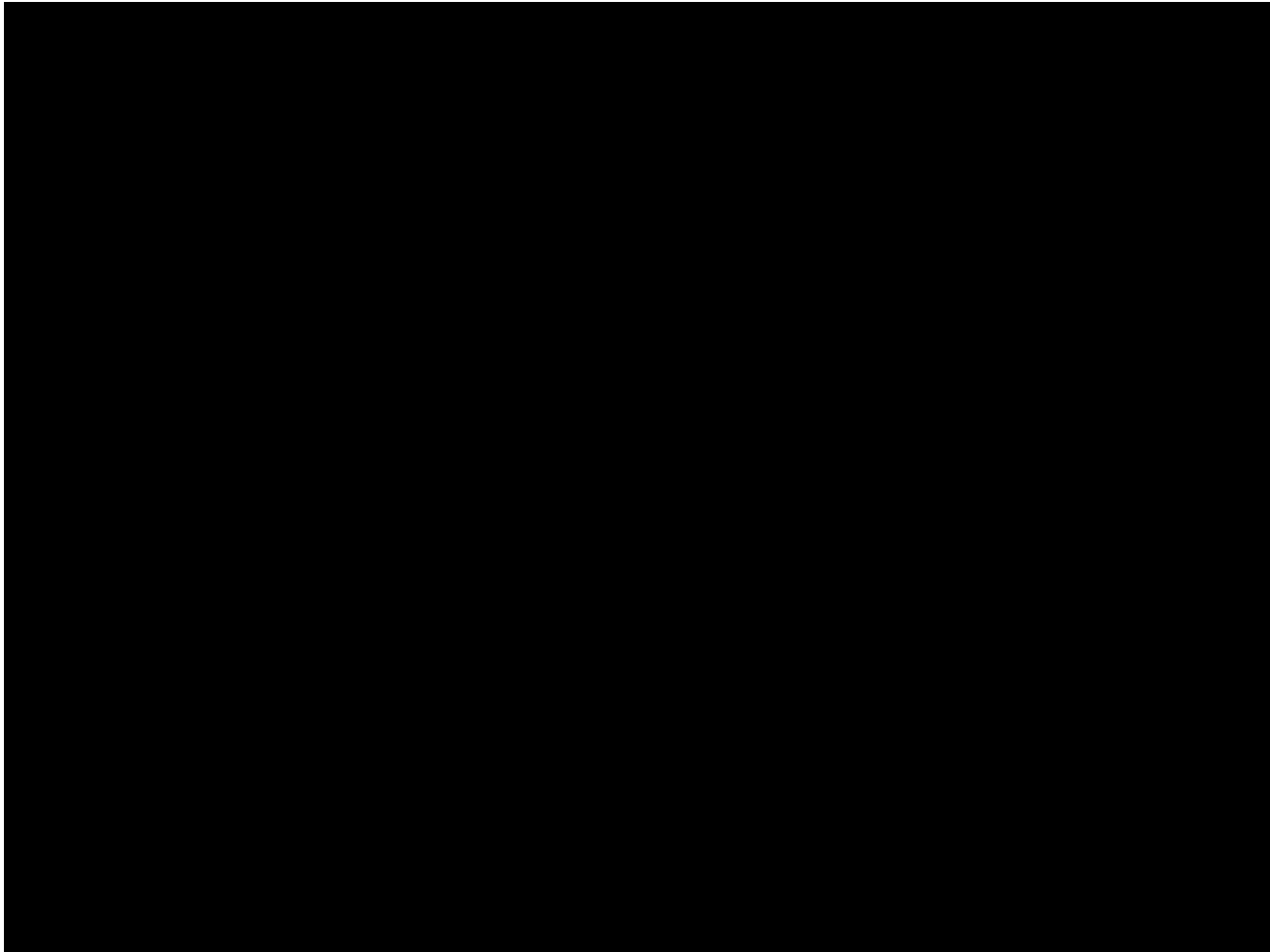




*in vitro* prükaz funkce rotoru

Liljas, Structural Biology (kniha)

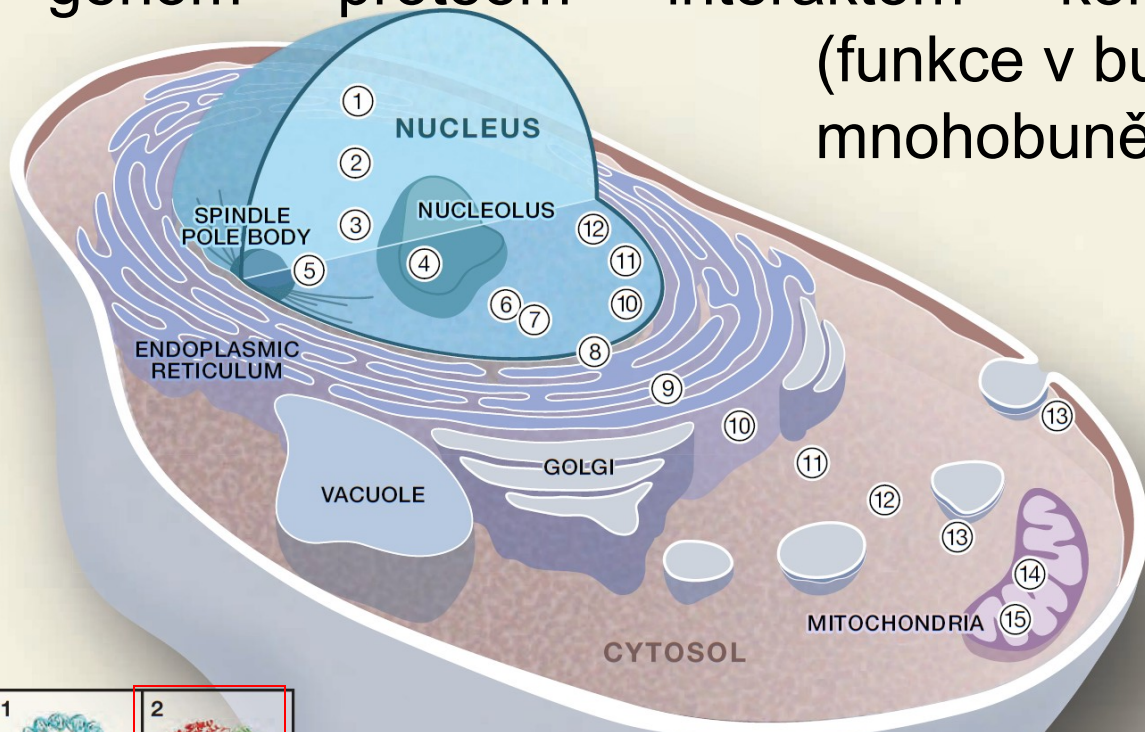




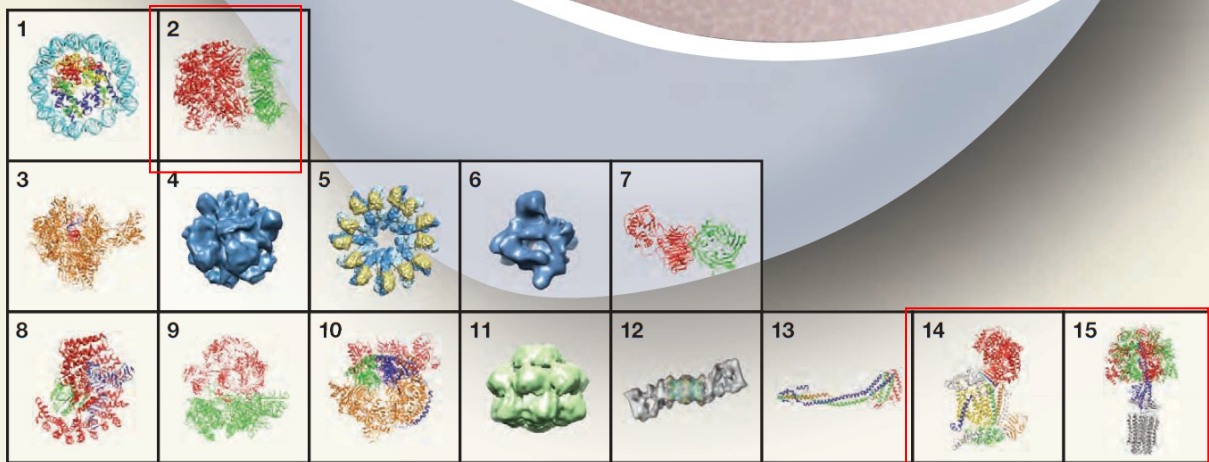


gen -> protein -> interakce -> komplex -> superkomplex ...  
 (molekulární stroj) -> kompartment -> buňka ...

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

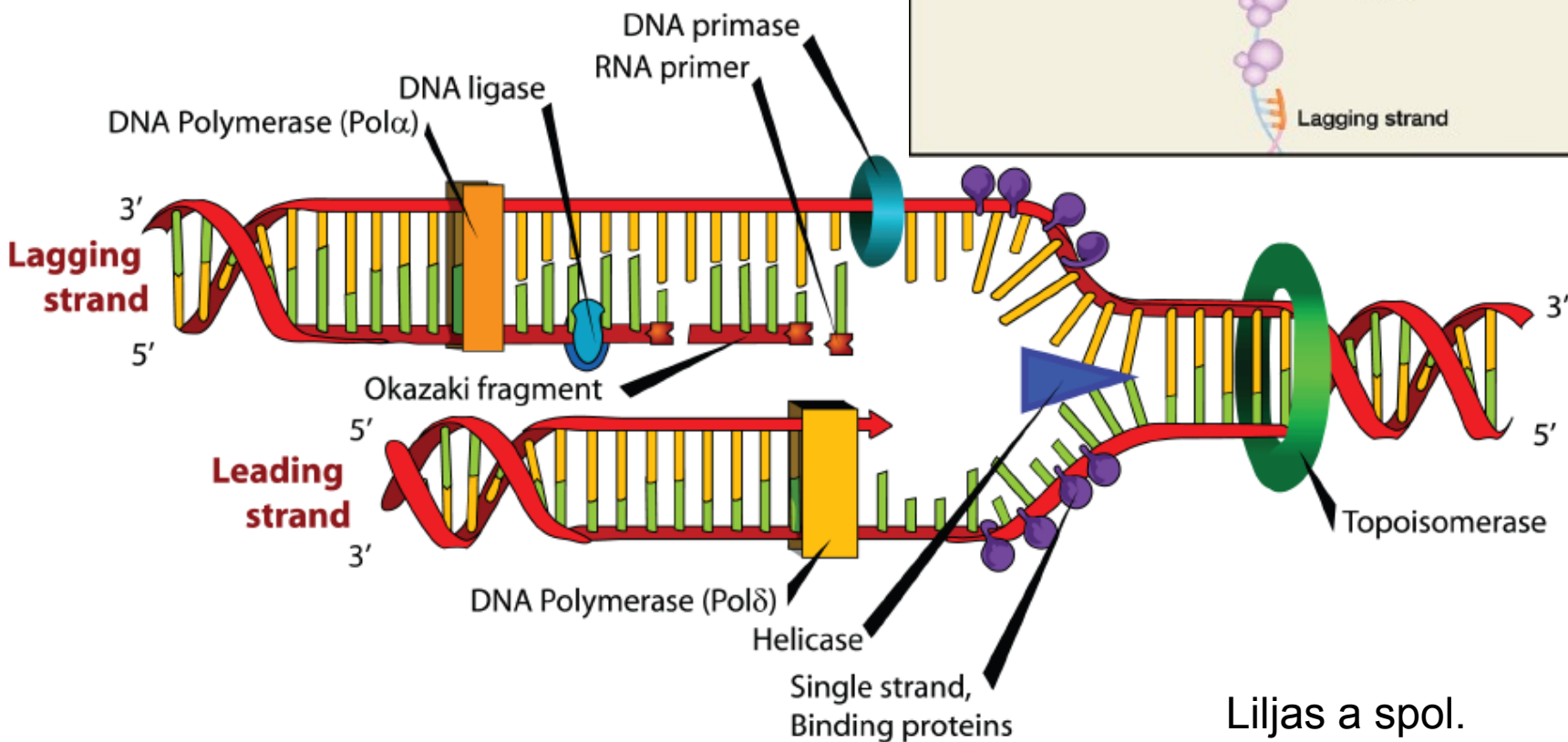
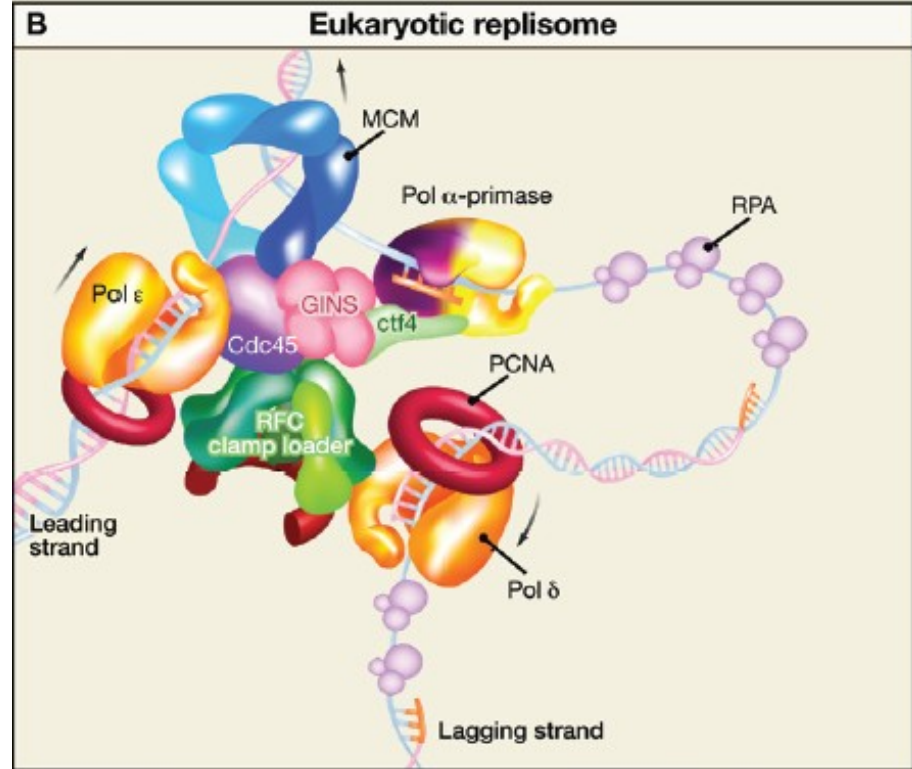


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	PDB   EMDB
Nucleosome	■															2ID3
Clamp and DNA sliding clamp	■															1SXJ
RNA polymerase II	■															1Y1W
RNA polymerase I				■												1435
Microtubule nucleator, $\gamma$ :TuSC rings	■															1731
RNA polymerase III	■															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



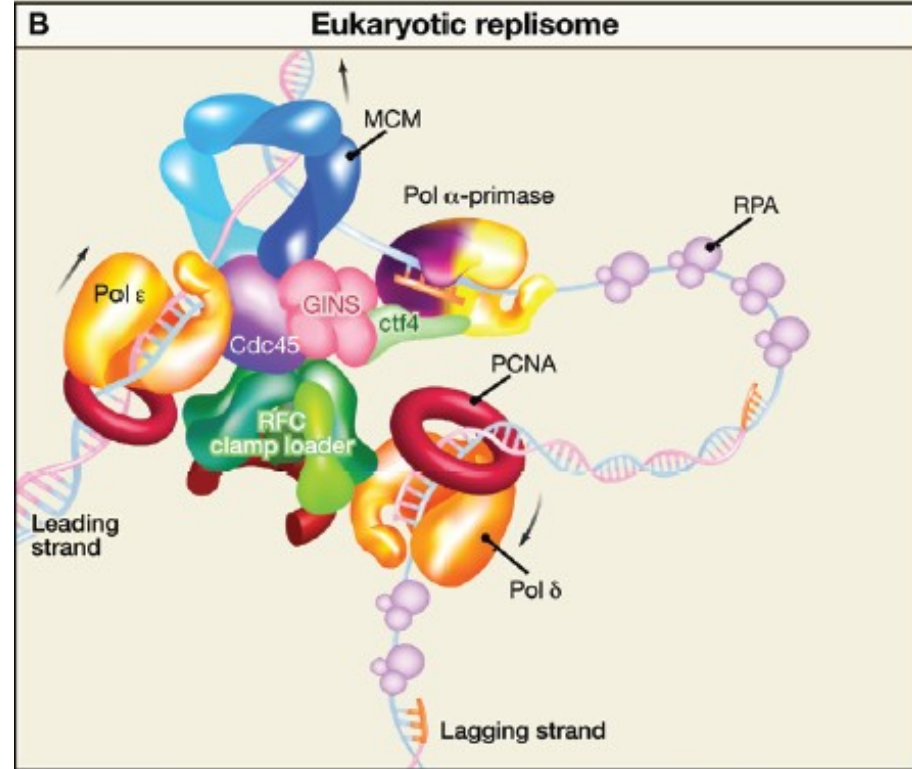
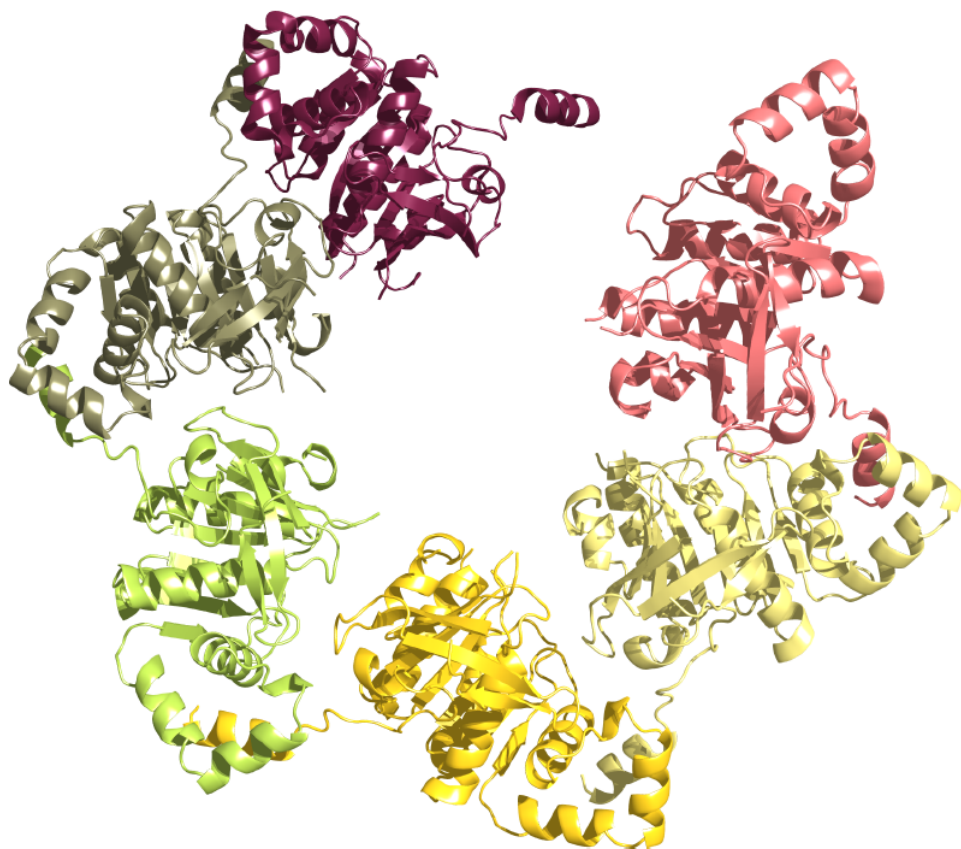
**~800 komplexů v S.c.**  
 Bertero et al, Cell, 2010

# Replikace DNA



Liljas a spol.

# Replikace DNA



## Helikásy

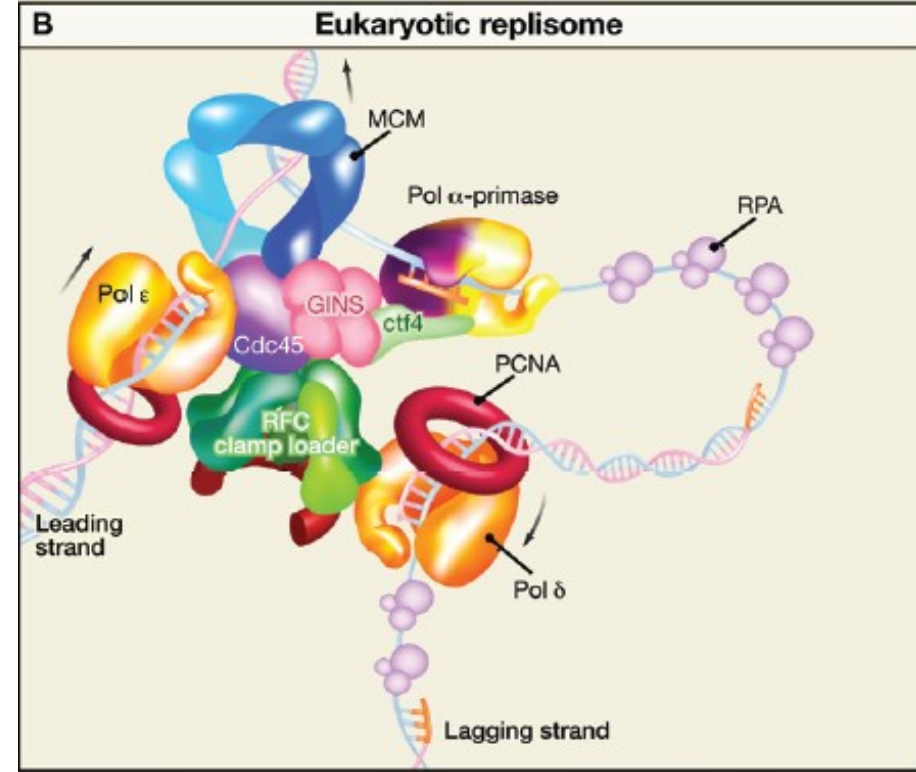
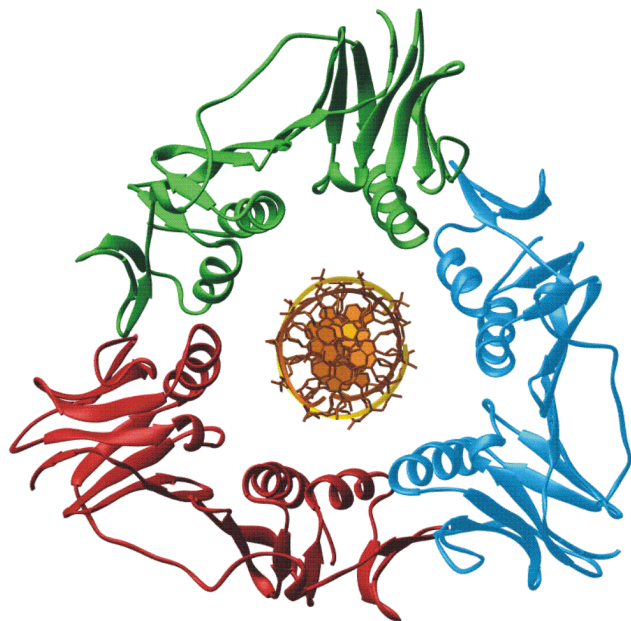
(MCM2-7)

hydrolýza ATP –  
pro denaturaci párů basí



# PCNA

(homotrimer)



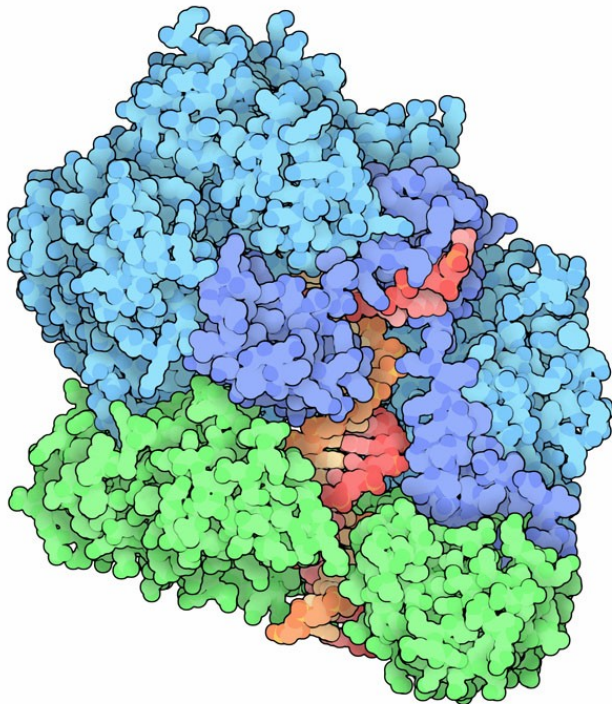
**Table 1. PCNA-interacting proteins (PIPs) in DNA**

PIP	Function
Pol δ	DNA replication and repair
Pol ε	DNA replication and repair
RF-C	DNA replication and repair
DNA ligase I	DNA replication and repair
Fen1	DNA replication and repair
Topo I	DNA replication and repair
Topo IIα	DNA replication and repair
MLH1, MSH 2/3/6	Mismatch DNA repair
XP-G endonuclease	Nucleotide excision repair
WRN helicase	Double strand breaks DNA repair; linked to the Werner Syndrome disease
UBC9	SUMOylation
AP-endonucleases APN1, APN2	Base excision repair
Uracil-DNA glycosylase	Base excision repair
Pol β	Base excision repair
Pol η	Translesion synthesis; linked to the XP-V
Pol ι	Translesion synthesis

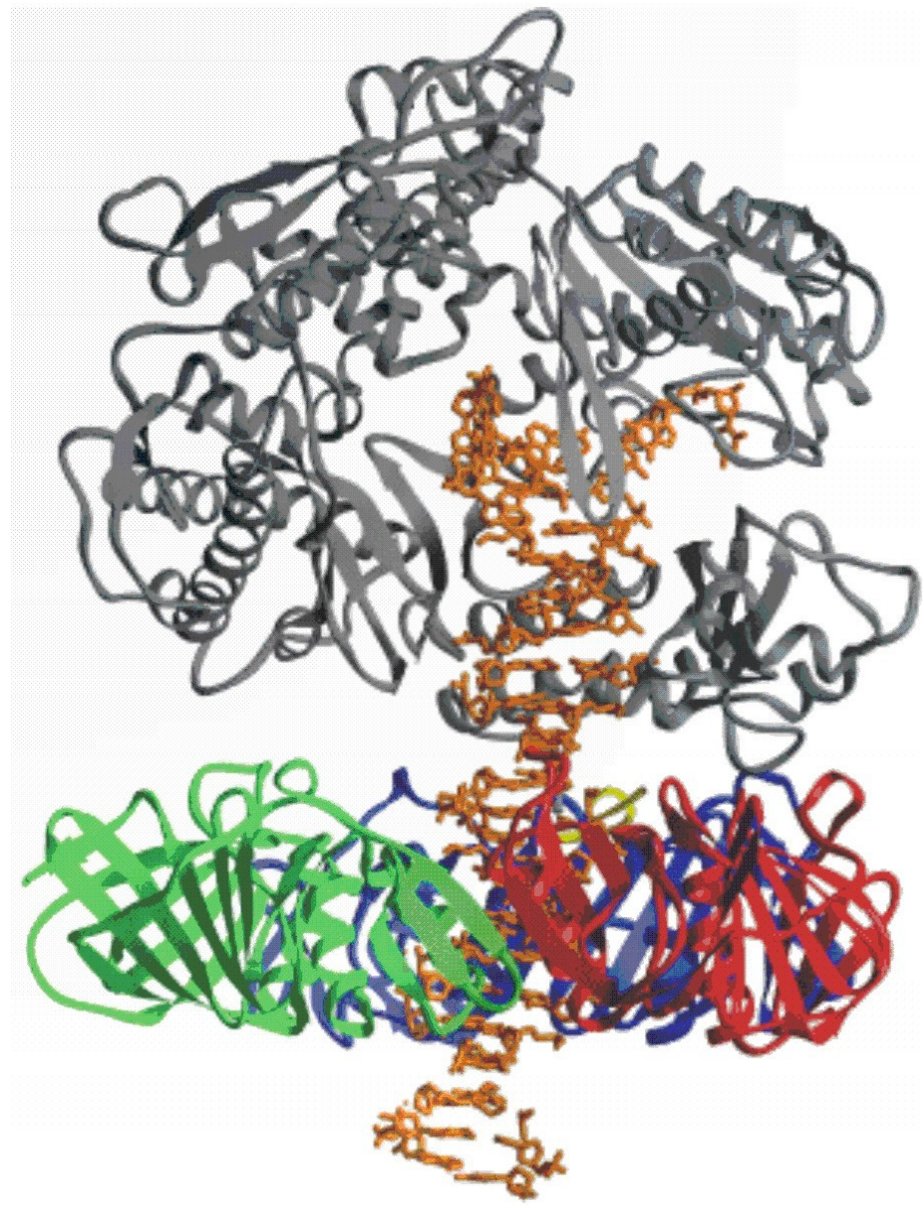
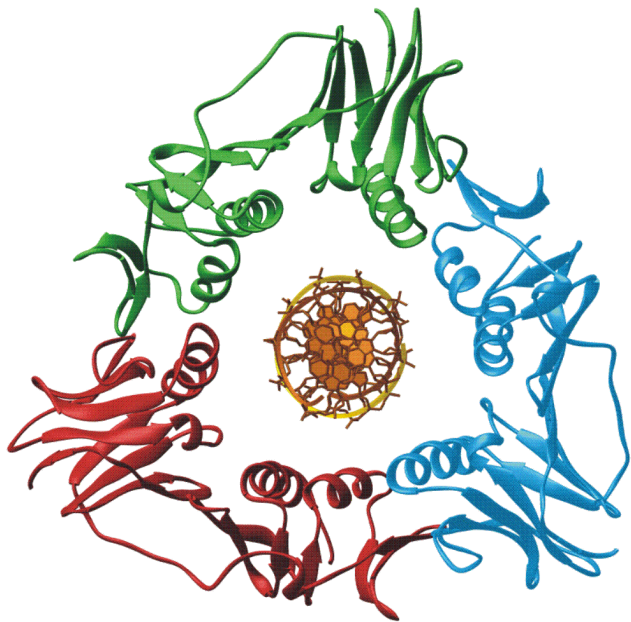


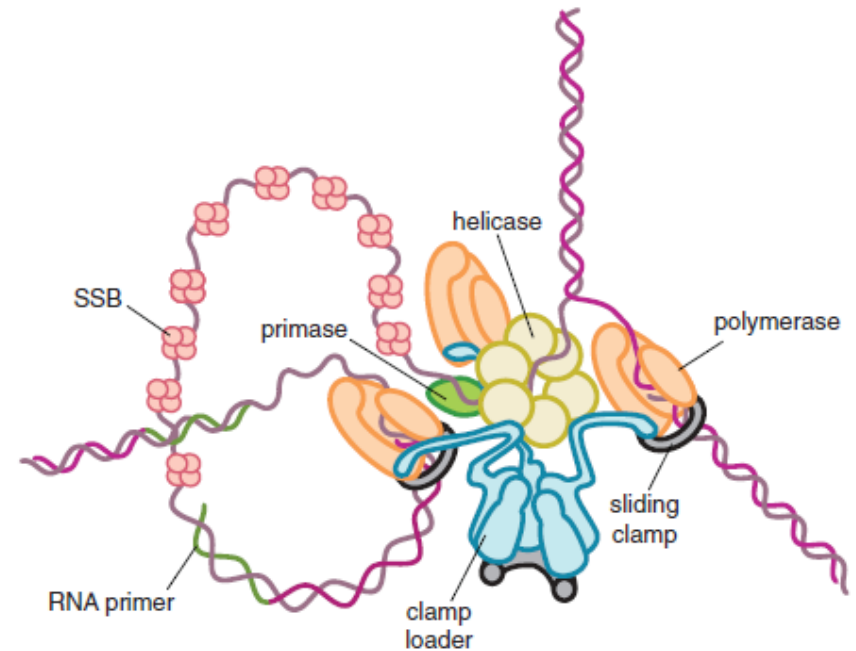
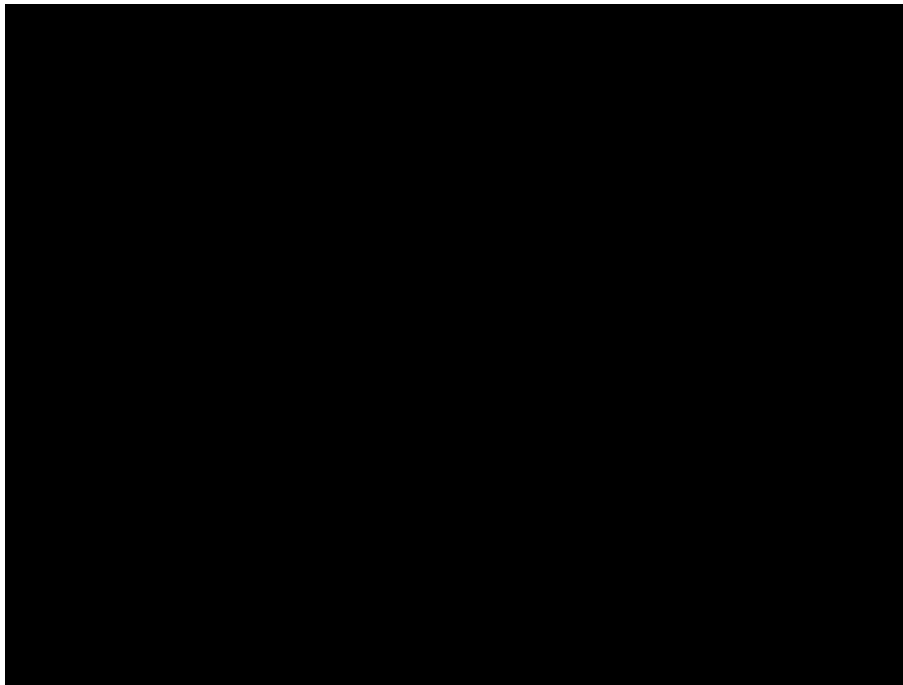
# Clamp loader – RFC-PCNA

Kelch et al, BMC Biol, 2012



# Clamp sliding – PCNA-Pol $\delta$





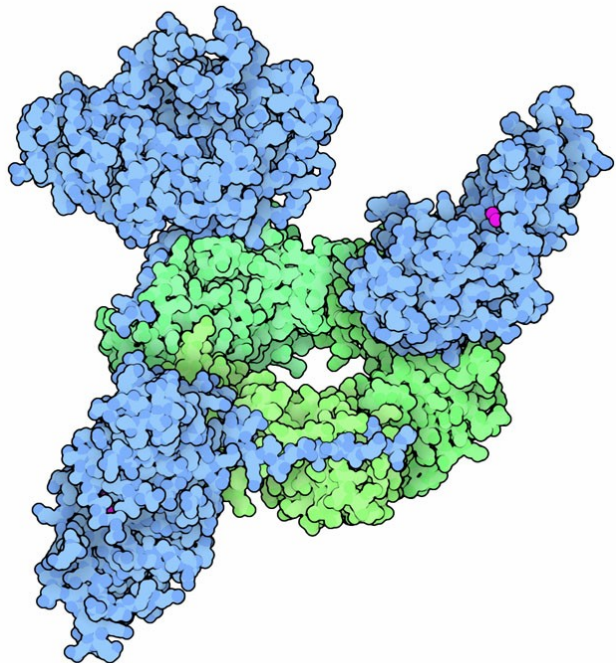
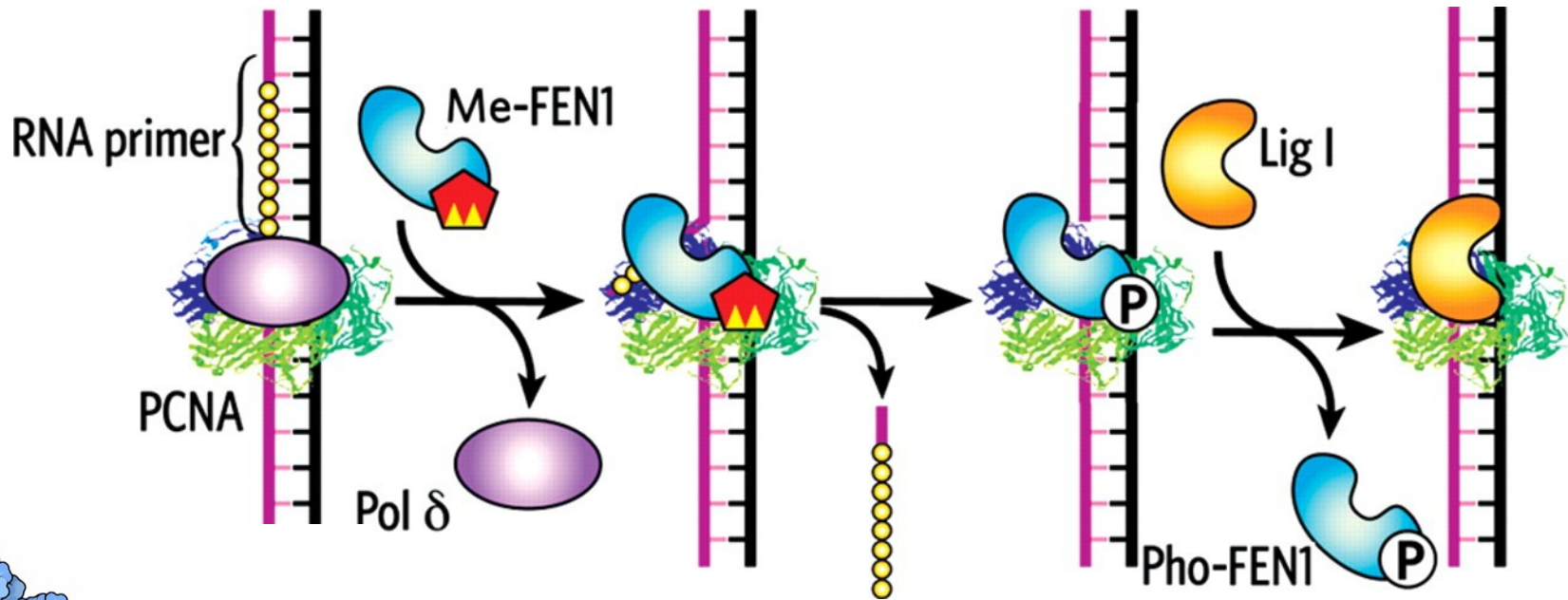
Kelch et al, BMC Biol, 2012

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



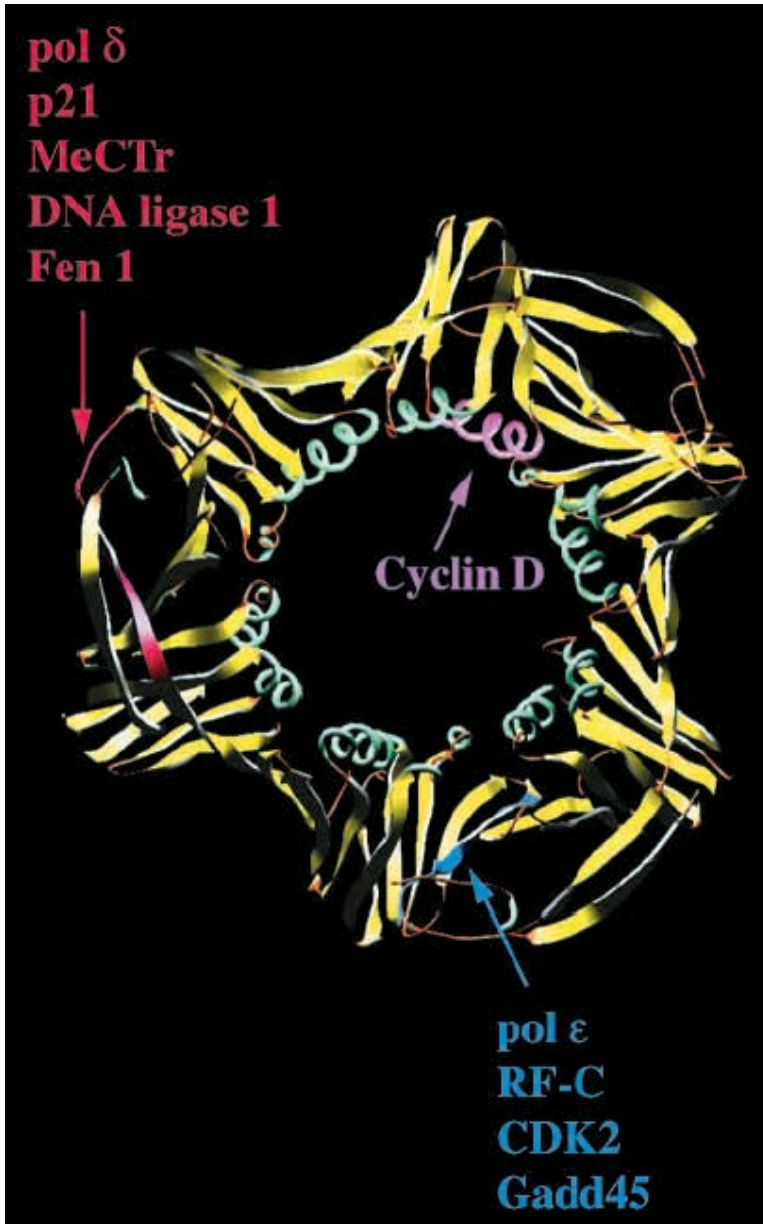
# PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1



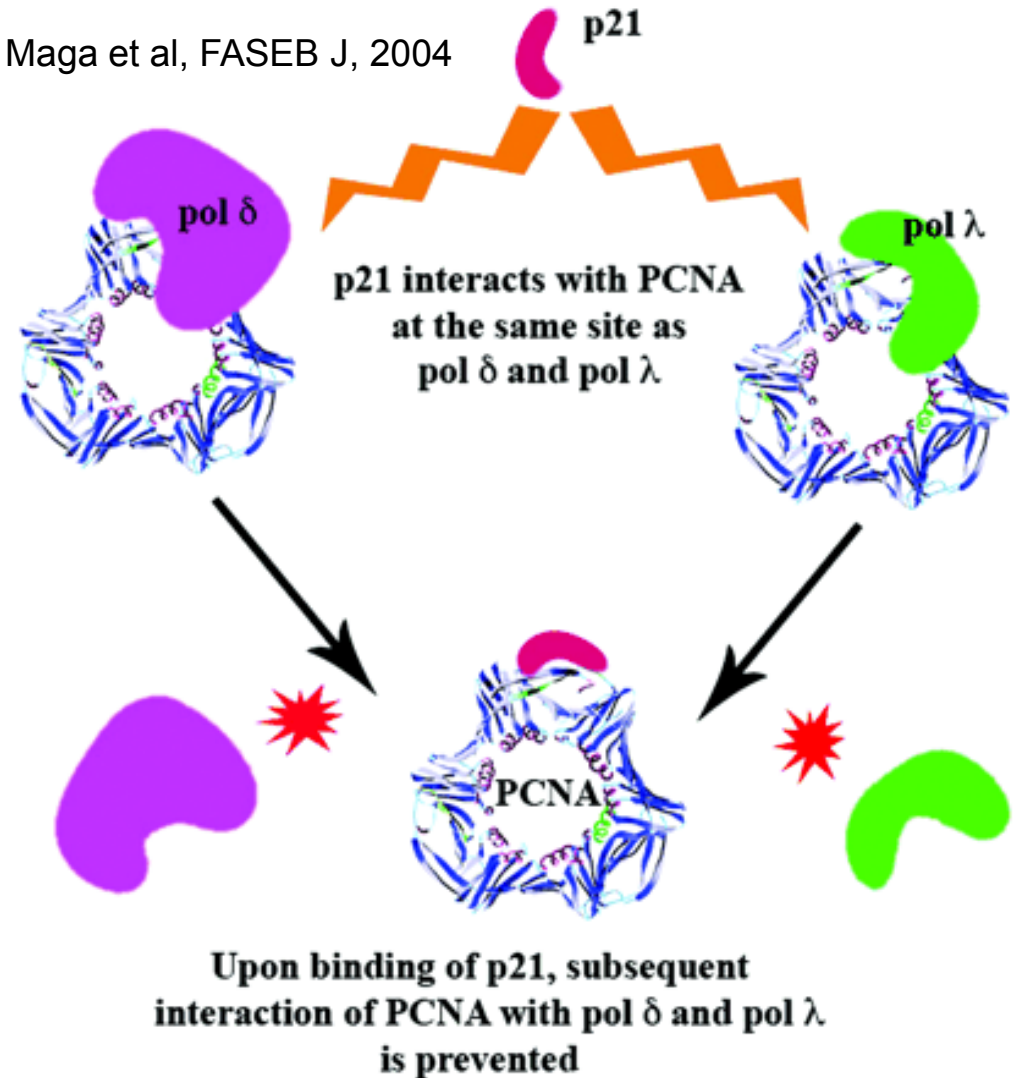
Po skončení syntézy „lagging strand“ metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) odštěpí RNA primer (demetylace a fosforylace disociuje Fen1)  
Poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru



# PCNA – regulace buněčného cyklu

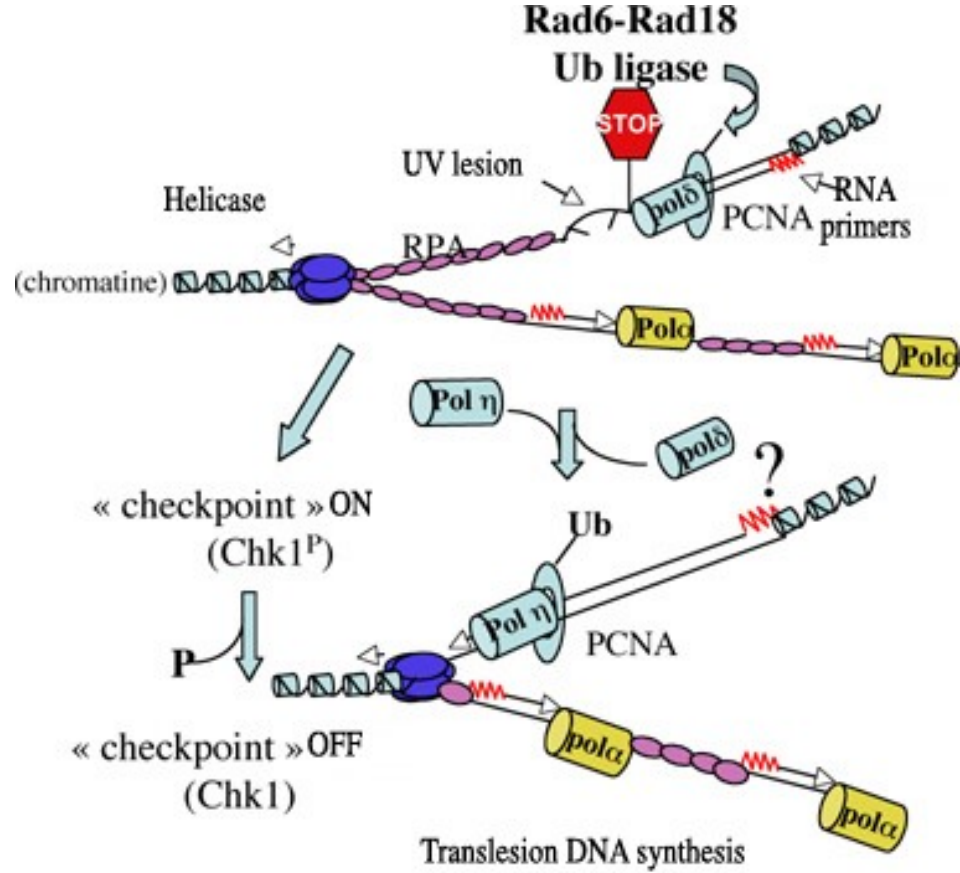


Maga et al, FASEB J, 2004

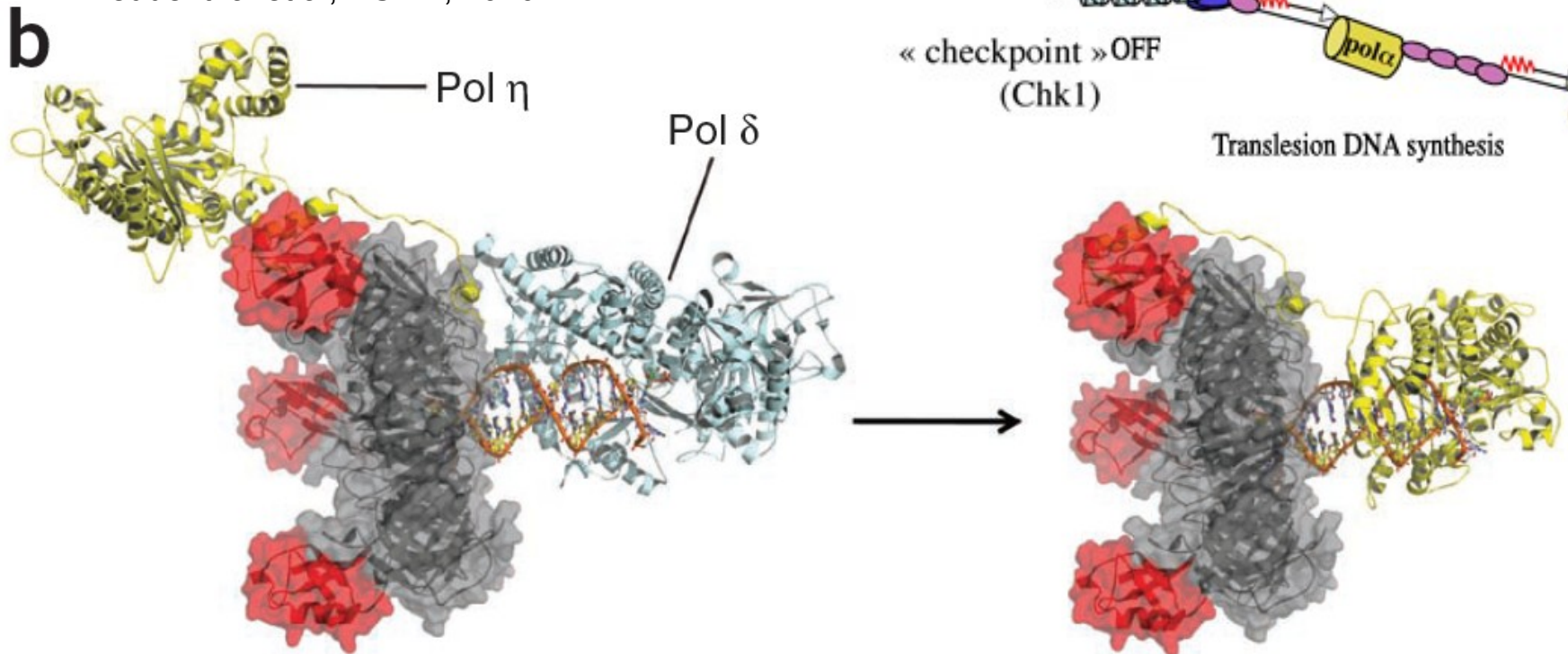


Analýza PPI PCNA naznačila mechanismus ...  
p21 je upregulován nádorovým supresorem p53

Pokud je DNA poškozená, pol $\delta$  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 ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ) obsahují PIP a UBM motivy pro interakce s Ubi-PCNA

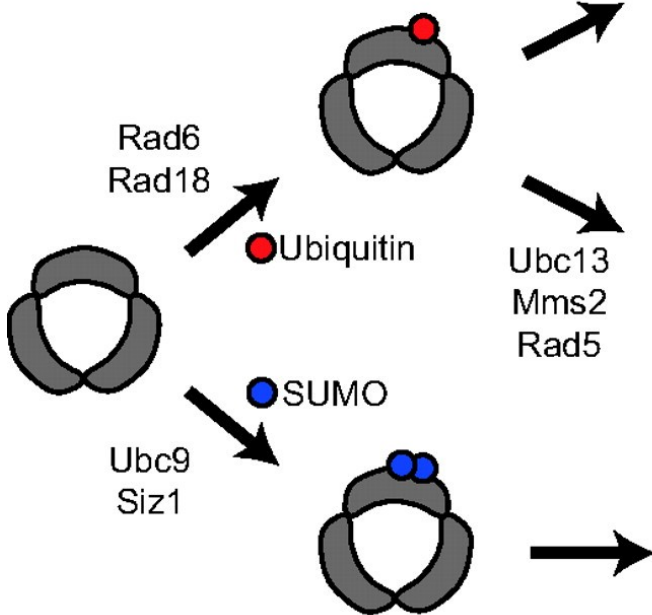


Freudenthal et al, NSMB, 2010



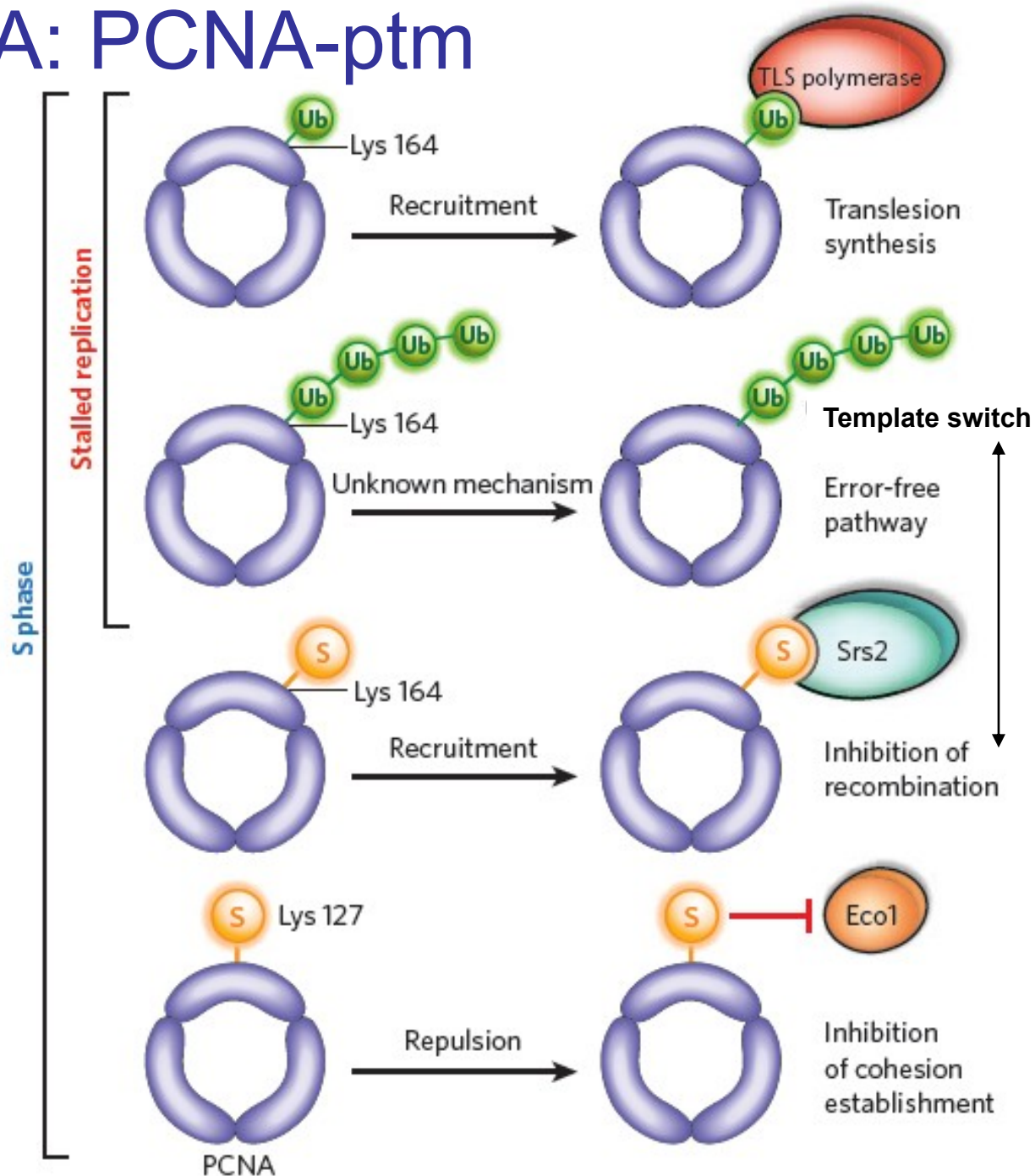
# Oprava DNA: PCNA-ptm

TLS polymerasy ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ) 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





# Shrnutí

- Proteiny mohou být součástí jednoho (stabilní) nebo více komplexů (dynamické)
- Stabilní komplexy (ATPasová pumpa)
  - 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 (PCNA)
  - Interakce podjednotek dynamických komplexů jsou modulovány např. posttranslačními modifikacemi