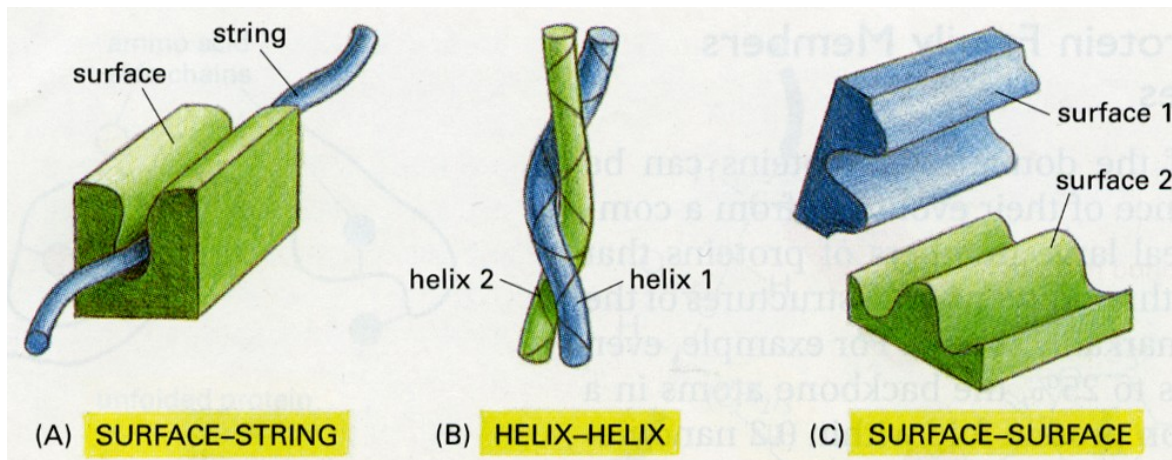


Souhrn přednášky - interaktom

- Proteiny – struktura a funkce
 - Proteiny – primární, sekundární a terciární struktury
 - Skládání proteinů
- Protein-proteinové interakce
 - Typy PPI
 - Vliv PTM na PPI
- Funkční proteomika
- Proteinové interakce – domény, typy vazeb, interaktom
- komplexom

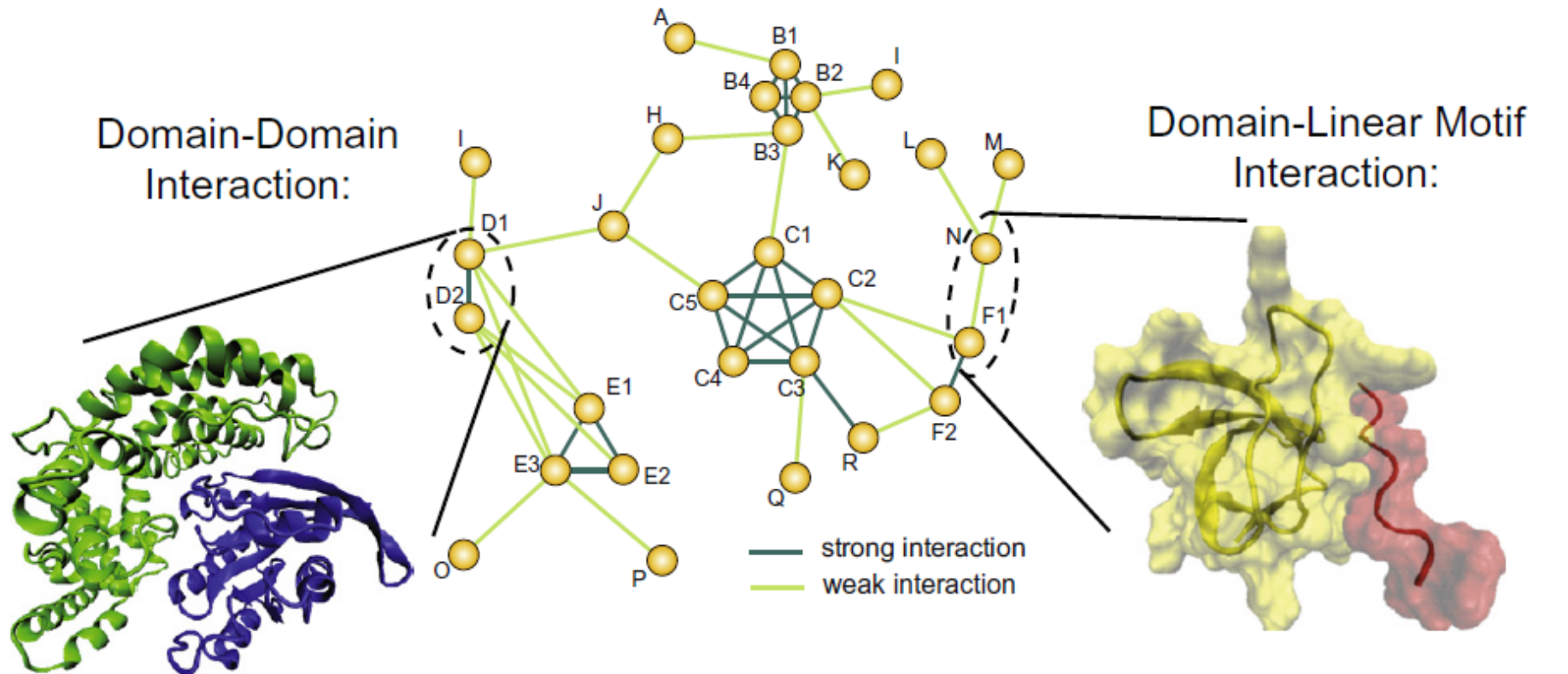
Souhrn - protein-proteinové interakce

- 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: ...)



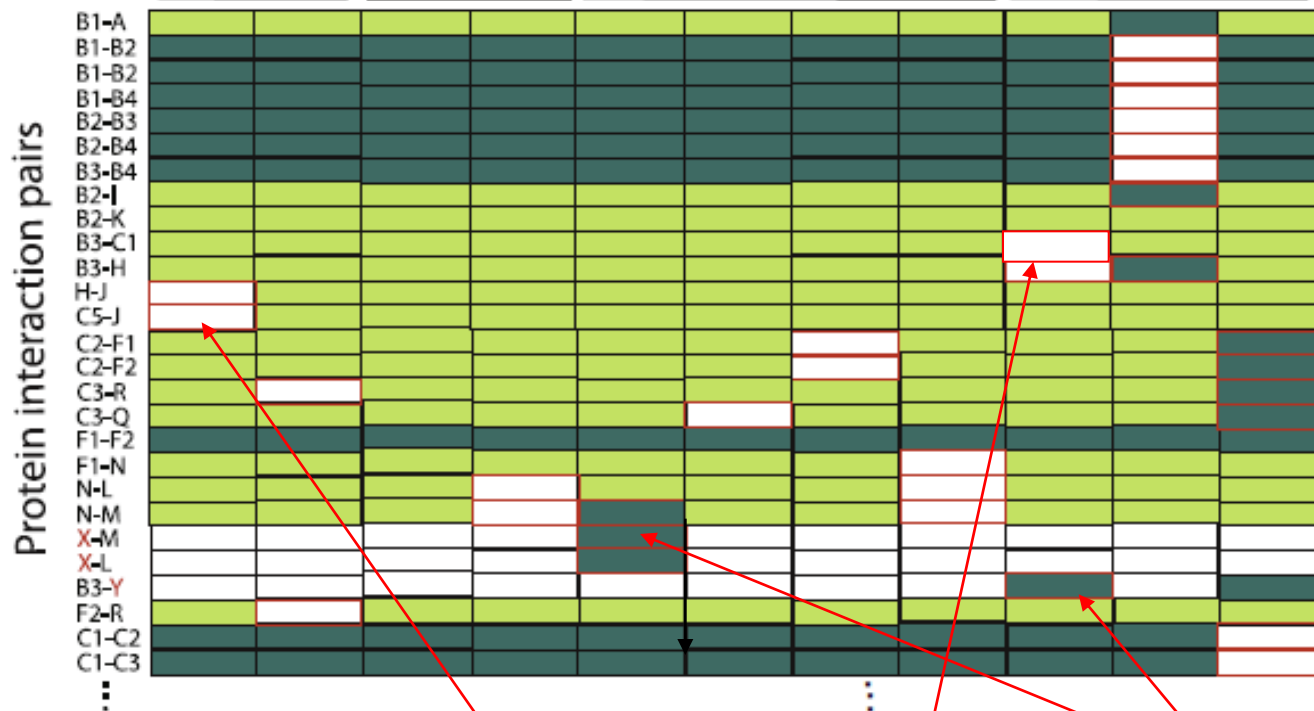
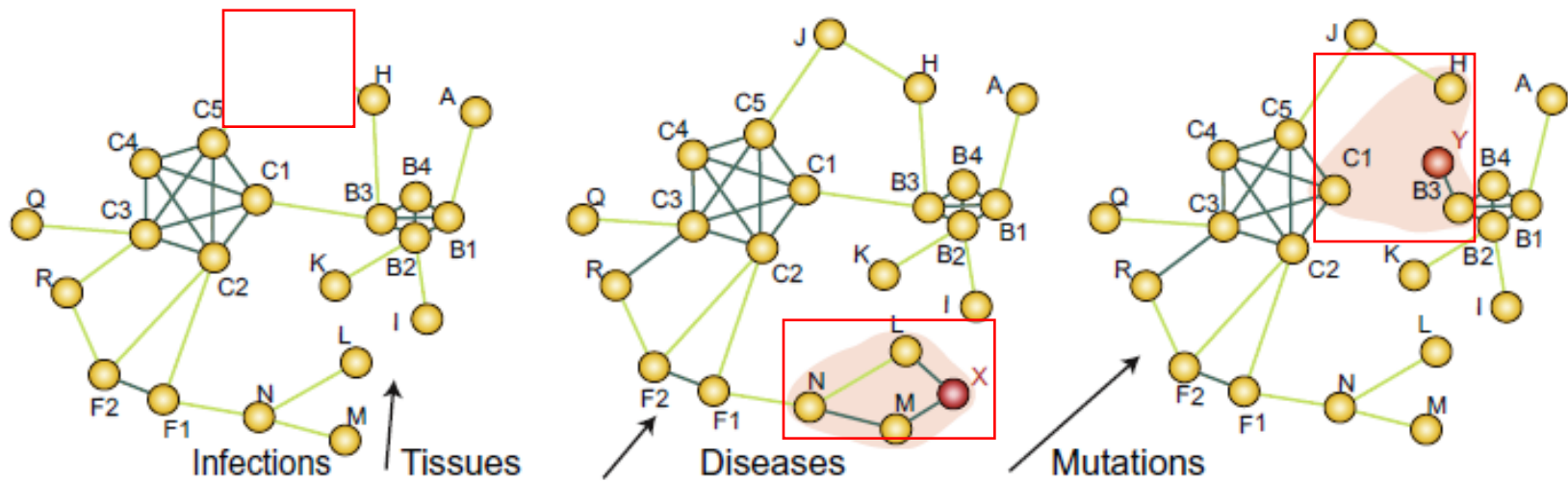
Protein-proteinové interakce

- stabilní (velké plochy, většinou součástí komplexů)
- přechodné/slabé (součást dynamických procesů – předávání signálů, modifikace)

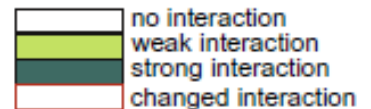


- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities: K_D nM to pM
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD

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



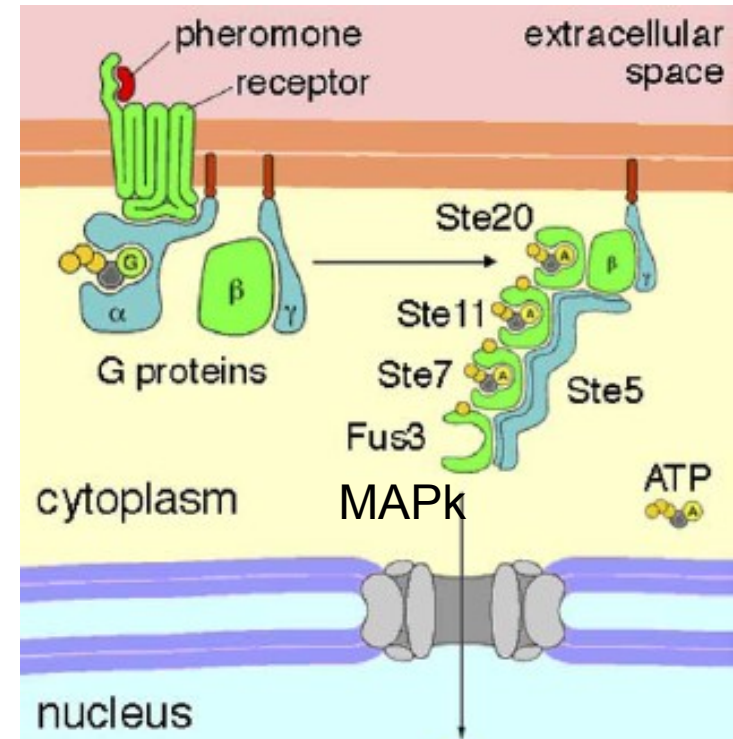
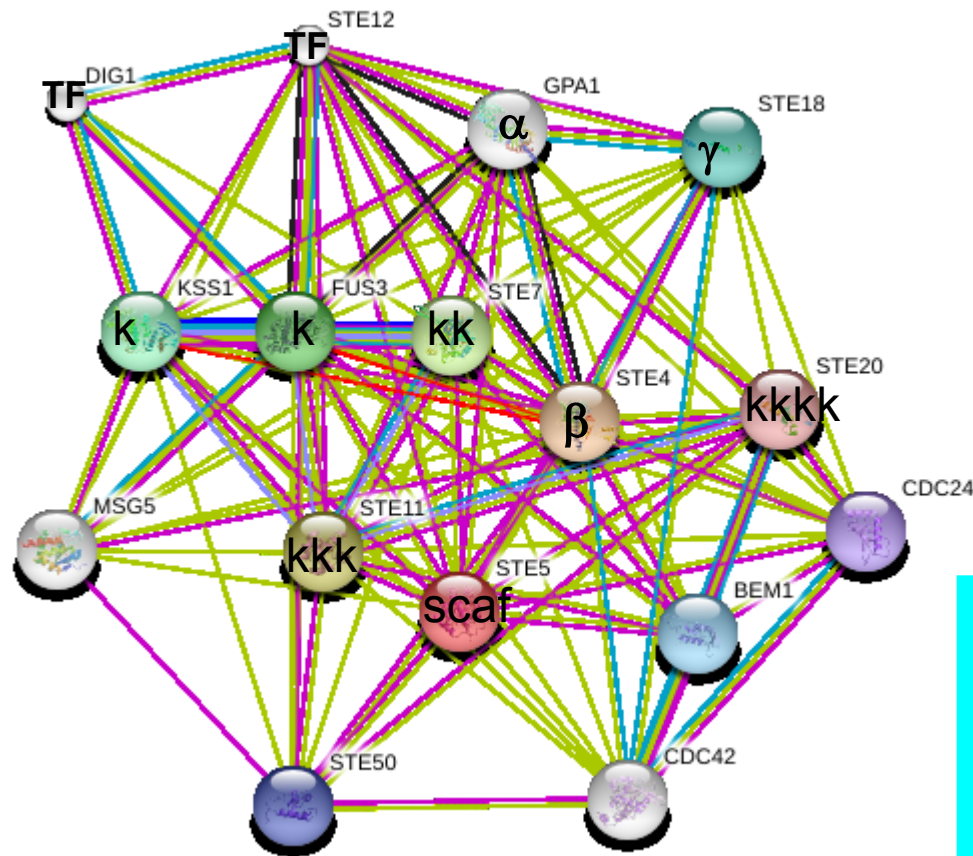
Bader et al, FEBS Lett, 2008



Inhibice interakcí (virovými proteiny, mutacemi) vs. nové interakce
 Srovnání interaktomů => konzerv. interakcí (=> evoluce komplexů => evoluce organismů)

Jaké jsou výhody komplexů?

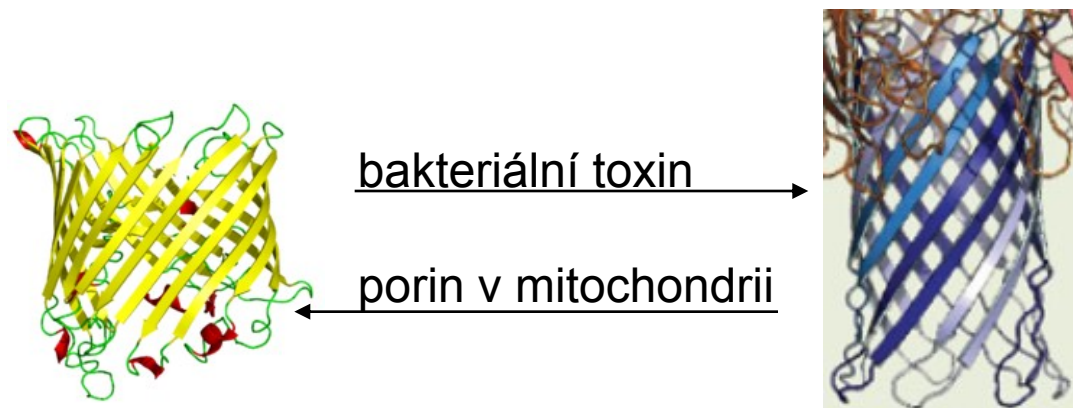
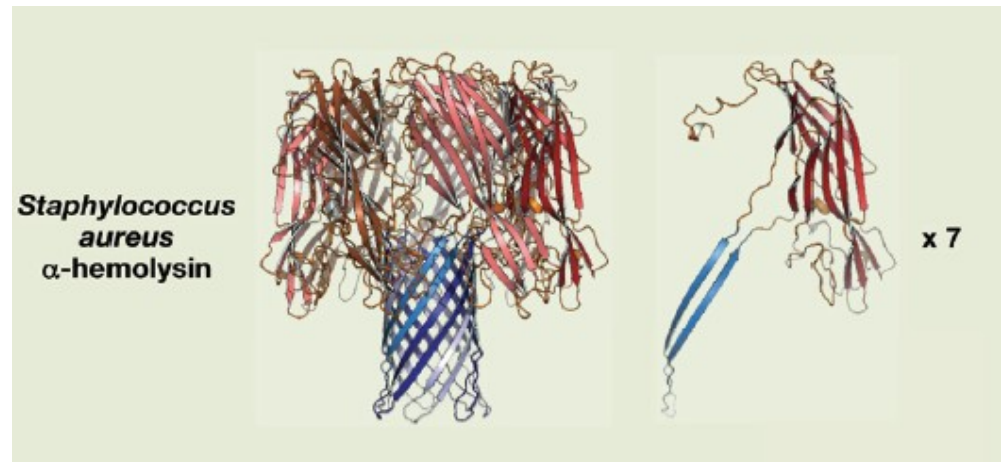
Interaktom x komplexom



- proteiny jsou si blízko vs difuze
- koordinované předávání signálů, substrátů ...
- moduly místo jednoho proteinu

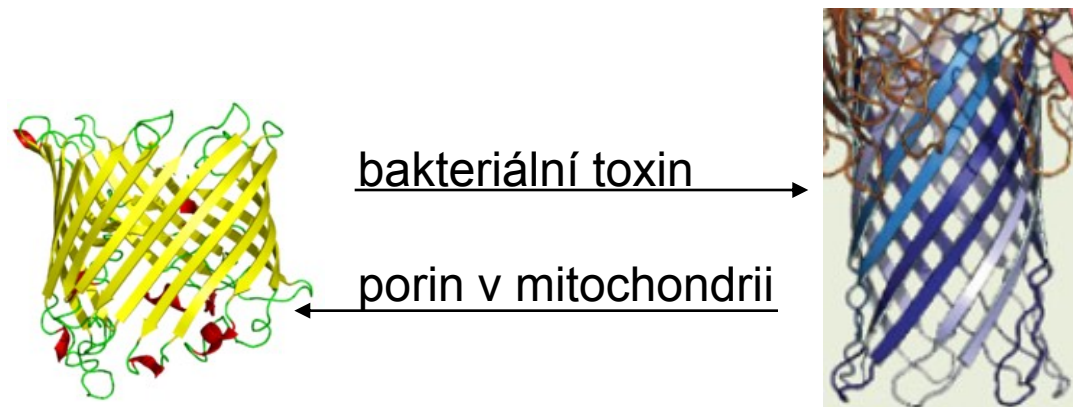
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



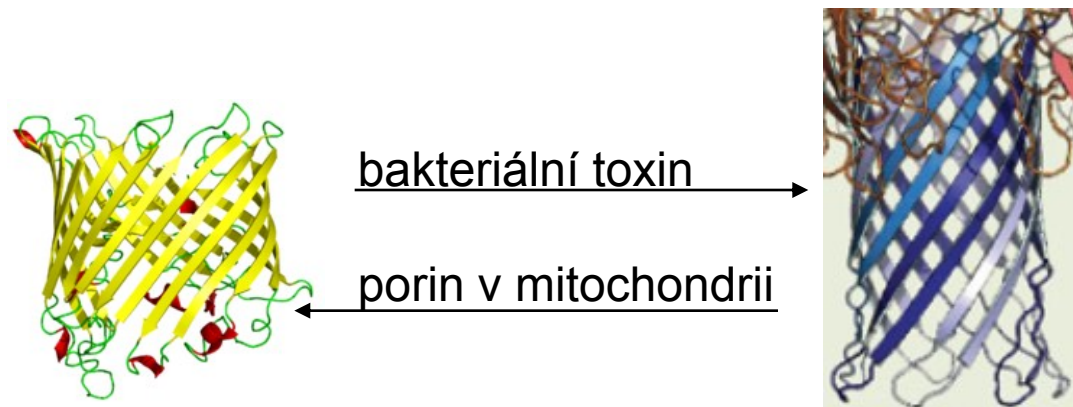
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



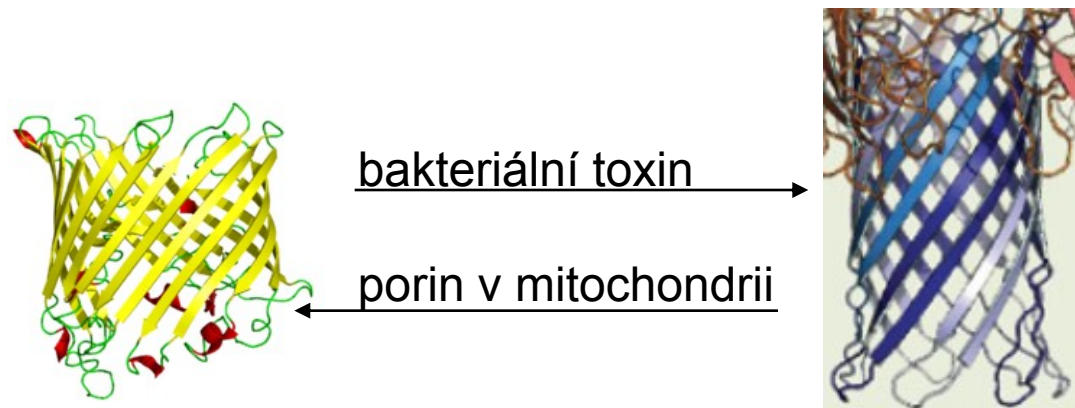
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

- 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 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



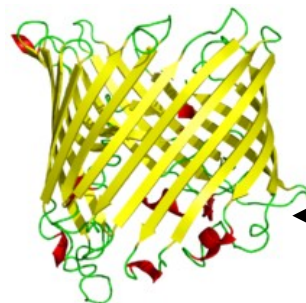
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

- 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 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 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
- 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)

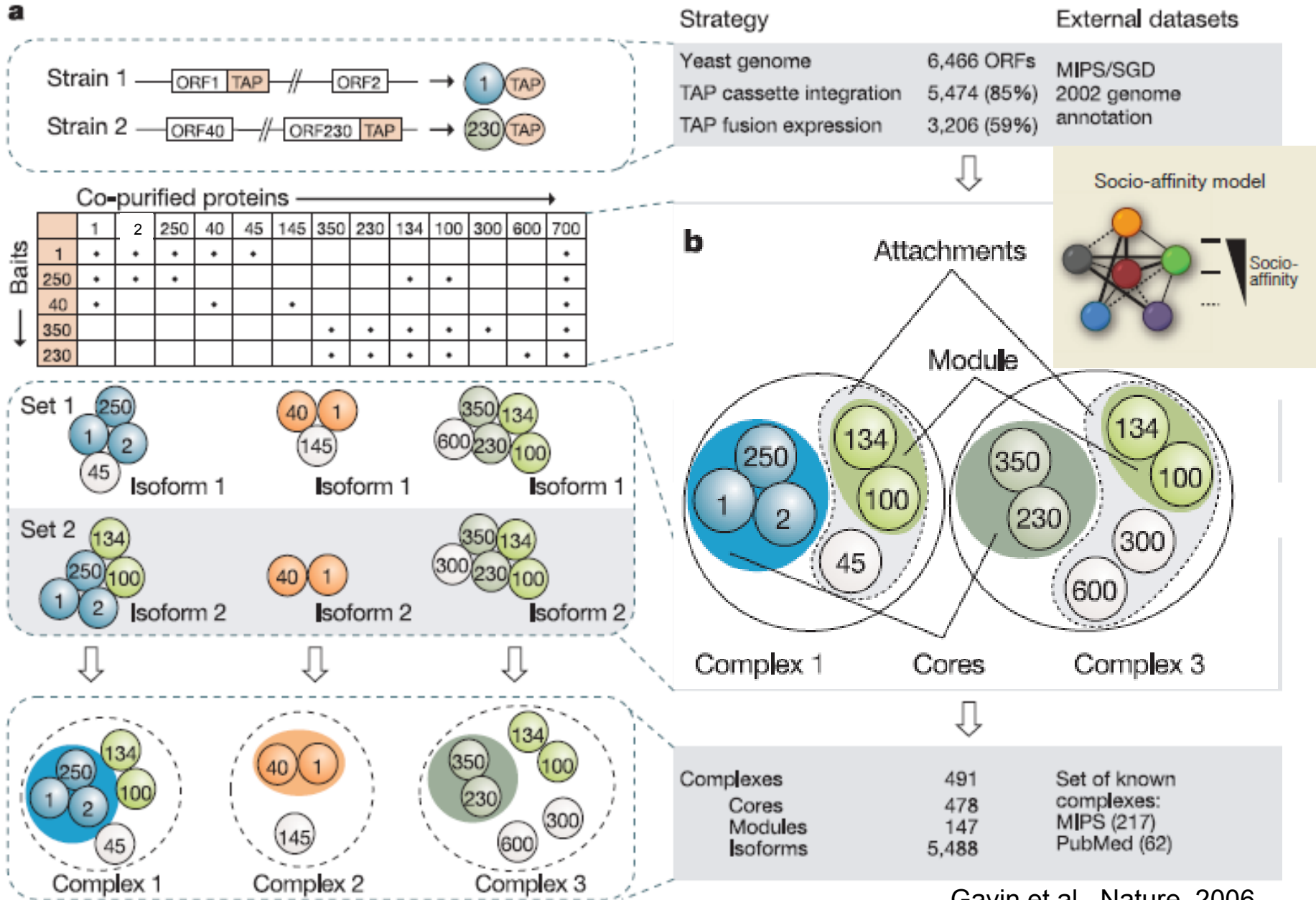


bakteriální toxin →

← porin v mitochondrii



Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



PCNA – moduly

PCNA je „jádrem“ pro mnoho „attachments“
tj. s mnoha funkčními moduly

- Loading
- Sliding
- Termination
- Buněčný cyklus
- TLS a oprava DNA
- Chromatinizace ...

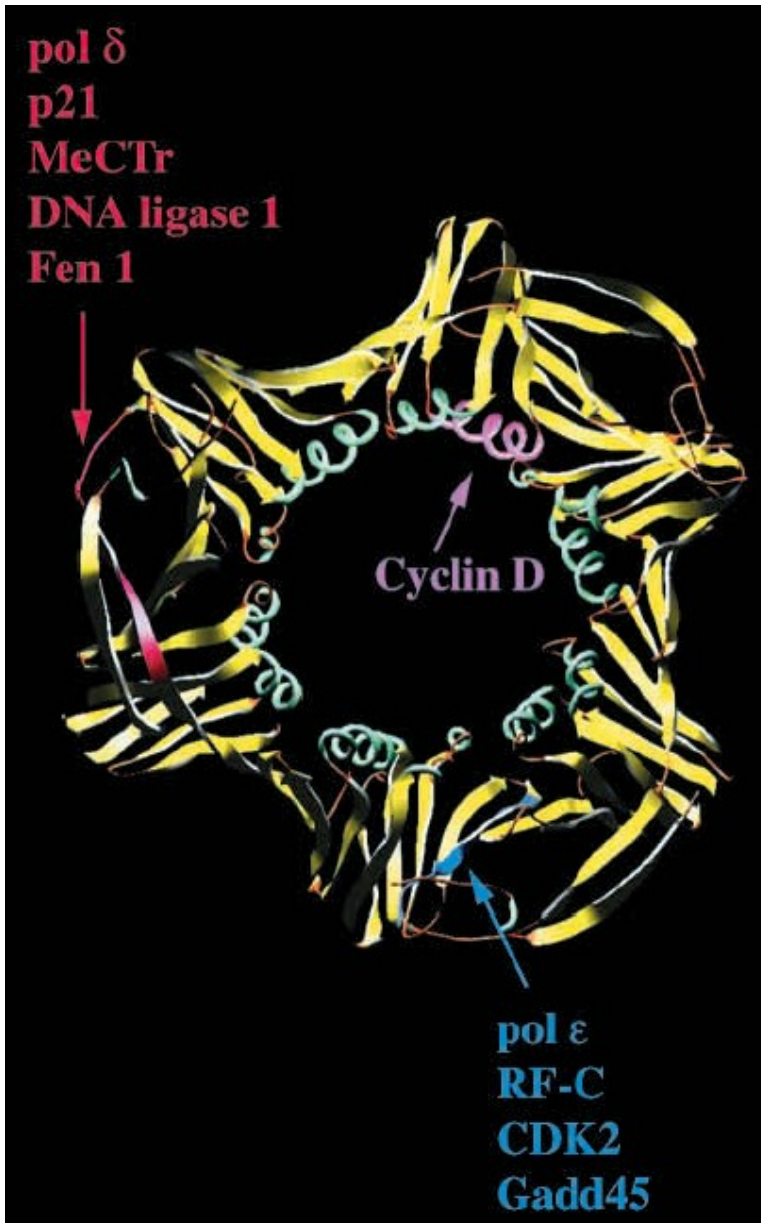
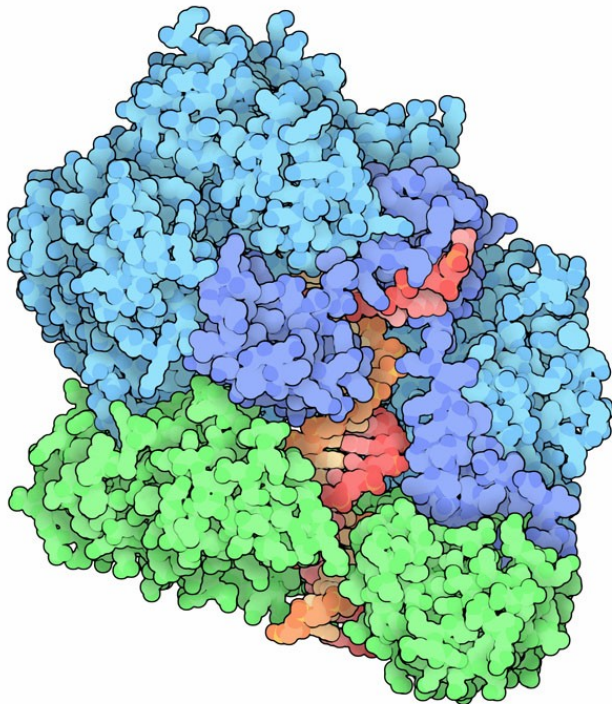


Table 1. PCNA-interacting proteins (PIPs) in DNA replication

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 disease
Pol ι	Translesion synthesis
Pol κ	Translesion synthesis
Pol λ	Translesion synthesis
Cyclin/CDKs	Cell cycle control
p21	Cell cycle control

Clamp loader – RFC-PCNA

Kelch et al, BMC Biol, 2012



Clamp sliding – PCNA-Pol δ

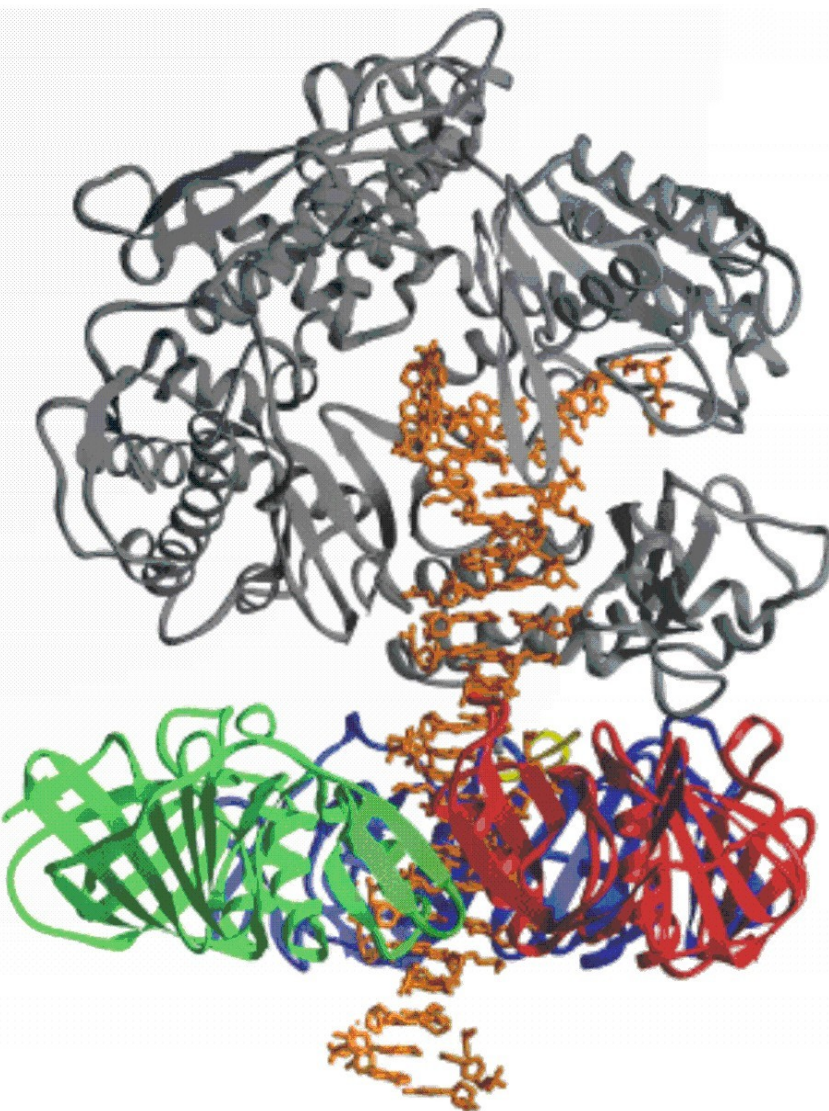
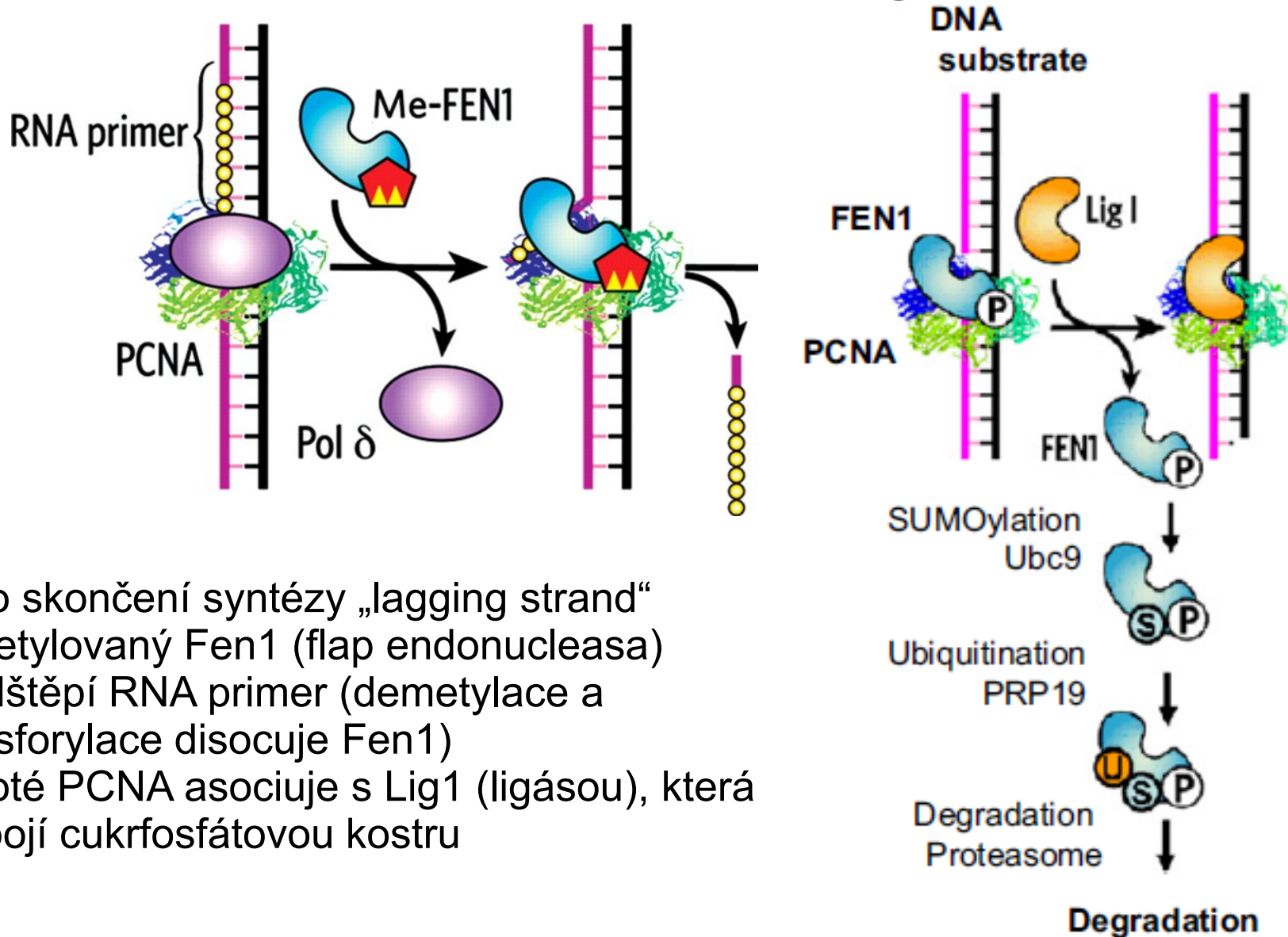


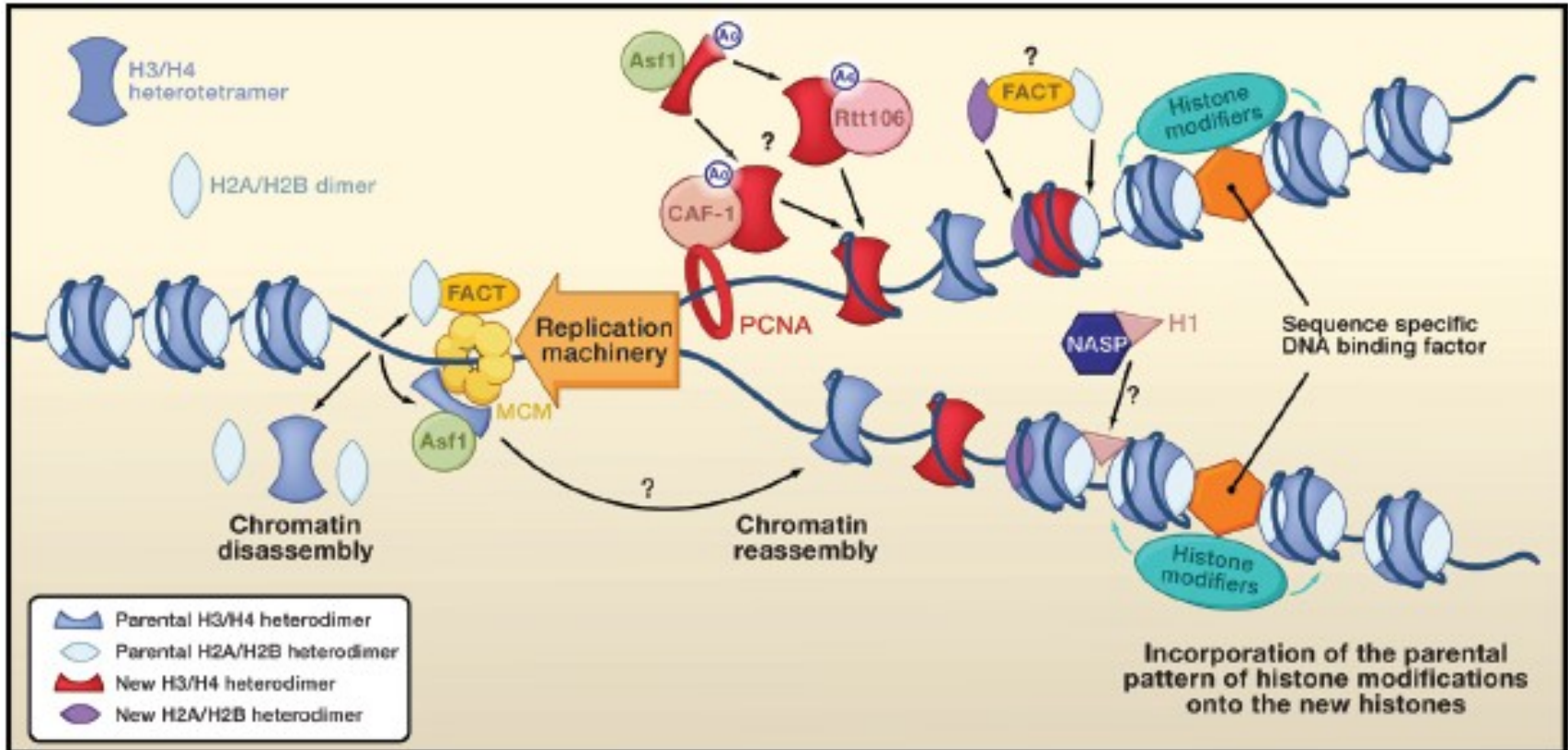
Table 1. PCNA-interacting proteins (PIPs) in DNA replication

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 II α	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 disease
Pol ι	Translesion synthesis
Pol κ	Translesion synthesis
Pol λ	Translesion synthesis
Cyclin/CDKs	Cell cycle control
p21	Cell cycle control

PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1

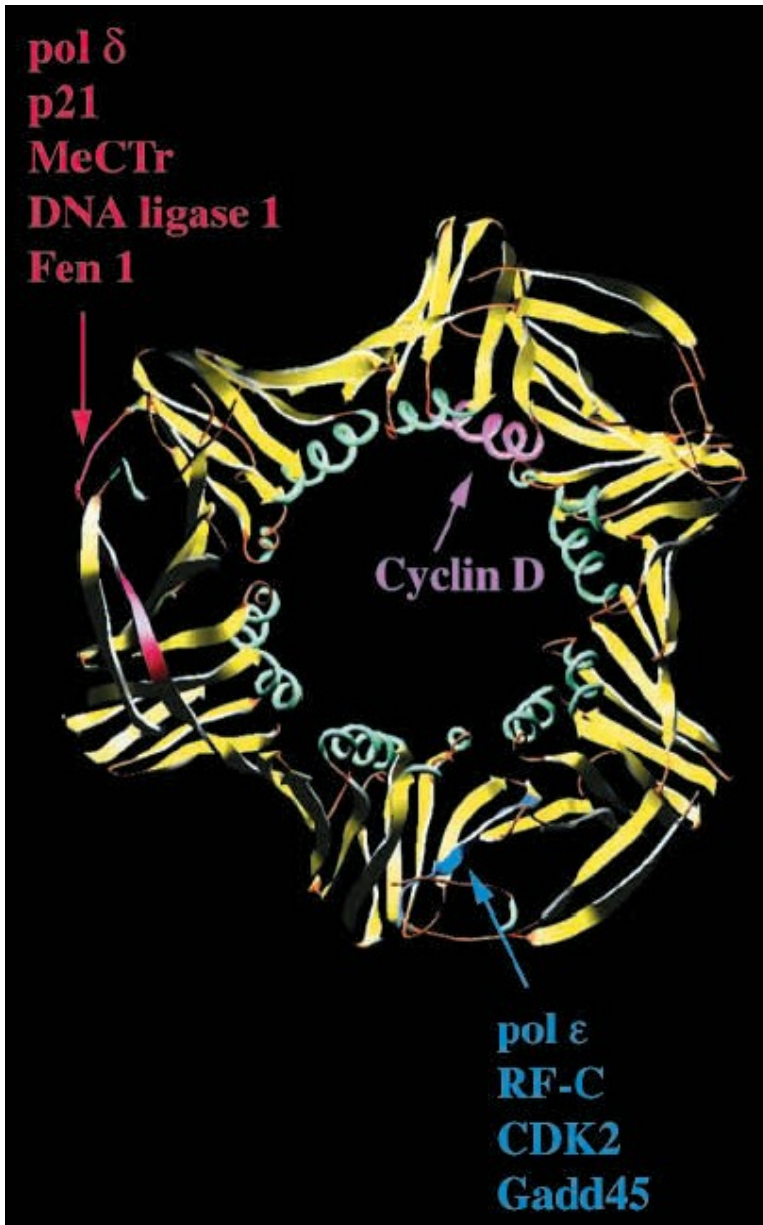


Po skončení syntézy „lagging strand“ metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) odštěpí RNA primer (demetylace a fosforylace disociuje Fen1)
Poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru

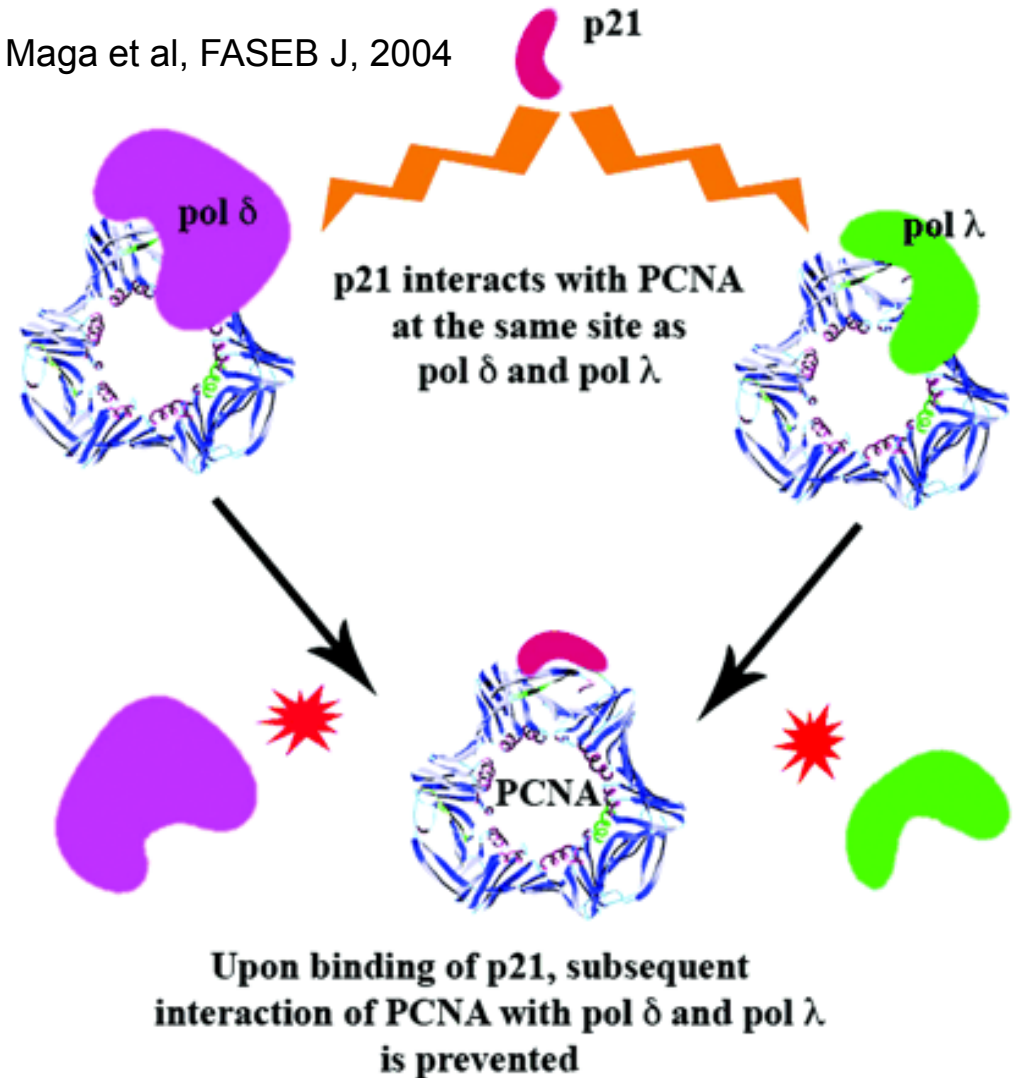


PCNA asociuje s CAF1 (chromatin assembly factor) a pomáhá znovunavázání histonů (nukleosomů) a vzniku chromatinu

PCNA – regulace buněčného cyklu

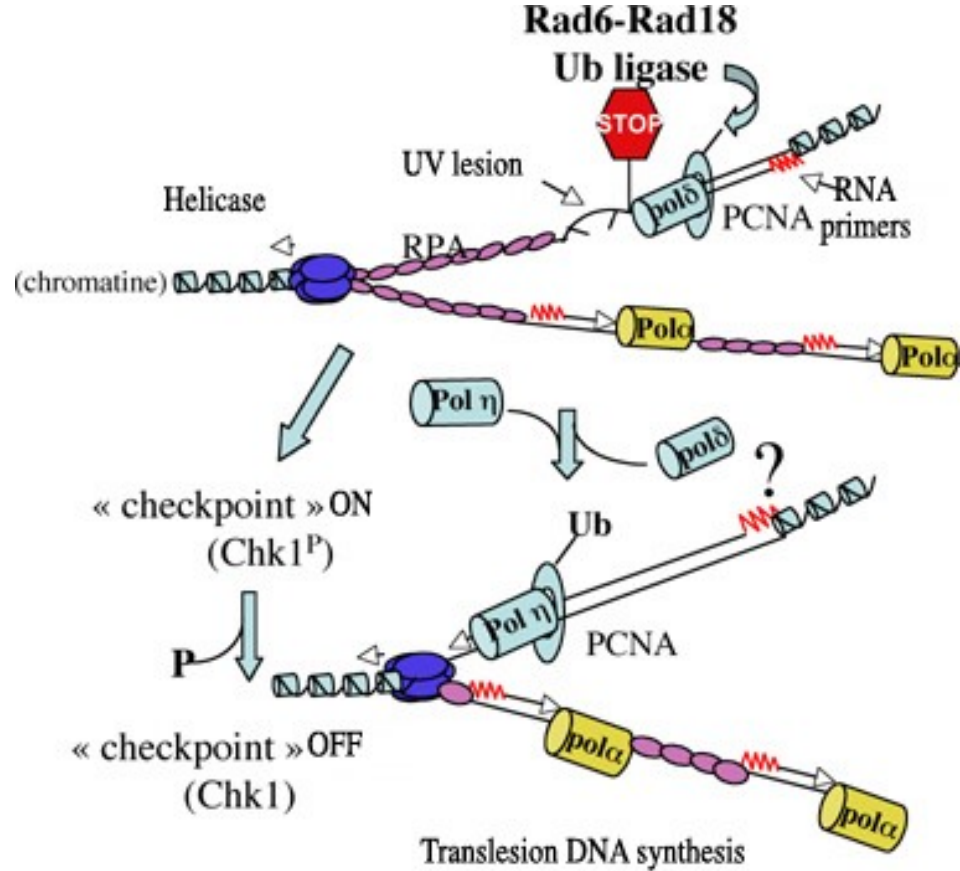


Maga et al, FASEB J, 2004

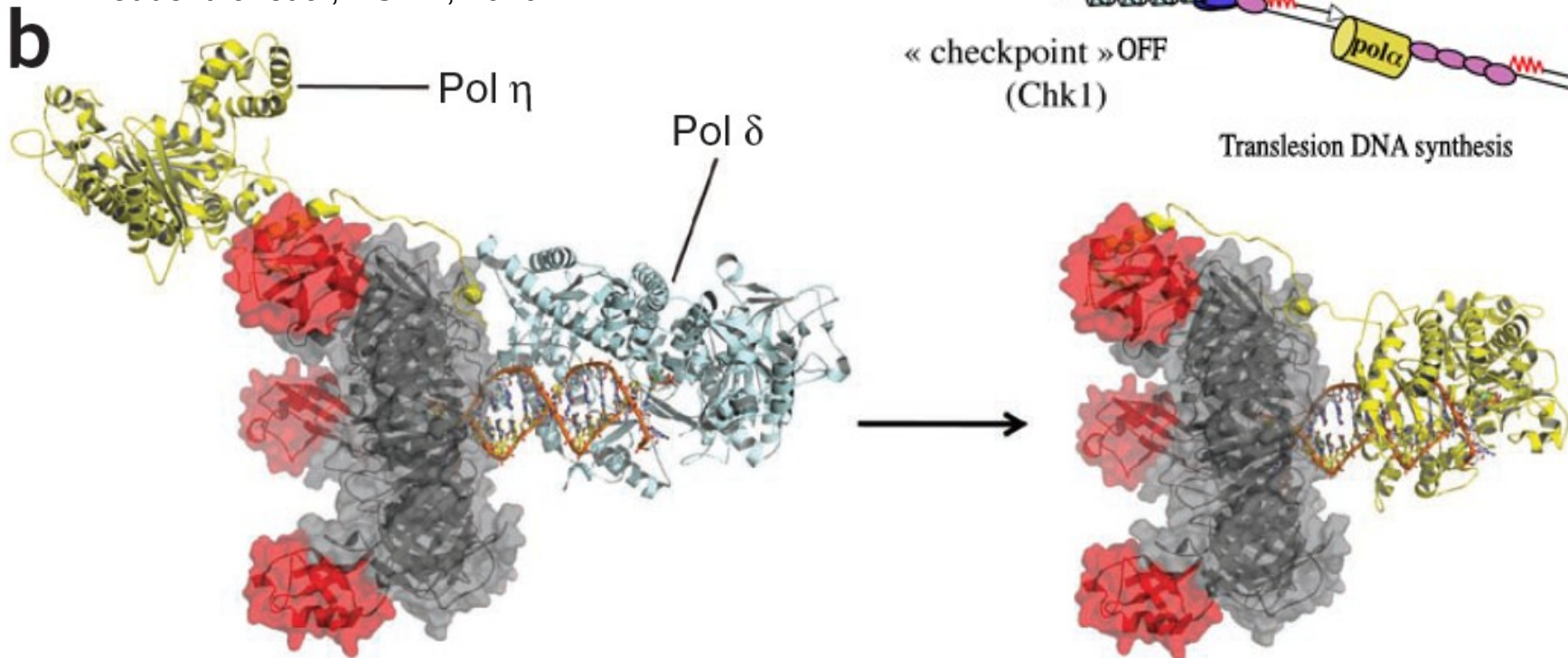


Analýza PPI PCNA naznačila mechanismus ...
p21 je upregulován nádorovým supresorem p53

Pokud je DNA poškozená, pol 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

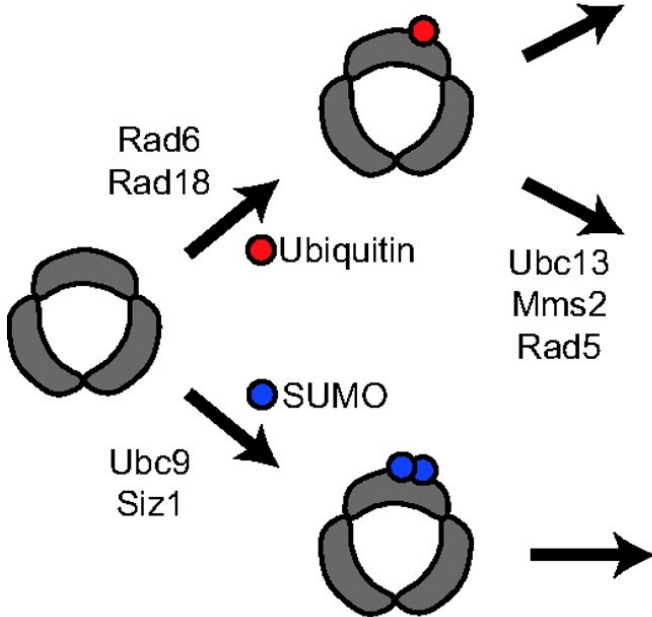


Freudenthal et al, NSMB, 2010



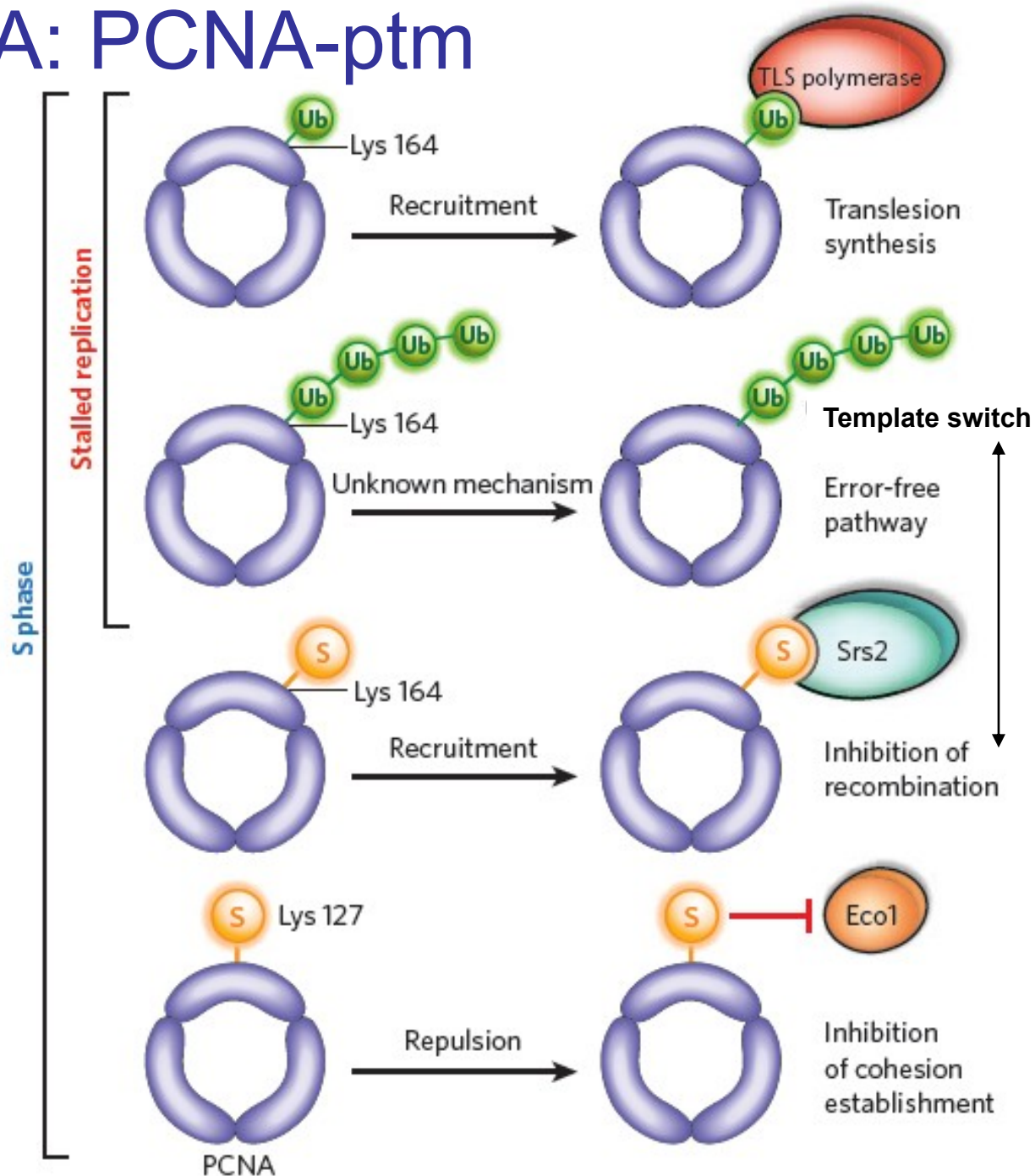
Oprava DNA: PCNA-ptm

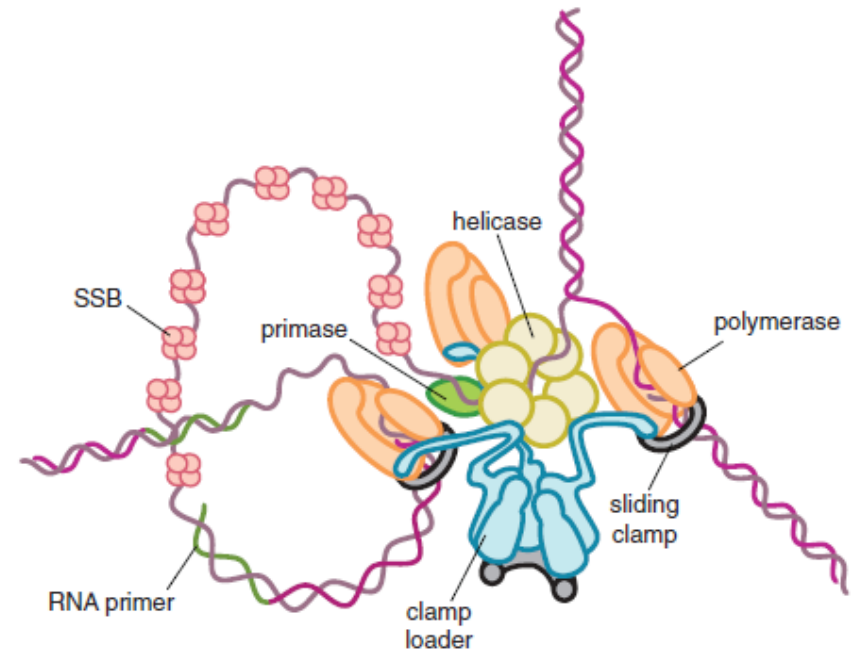
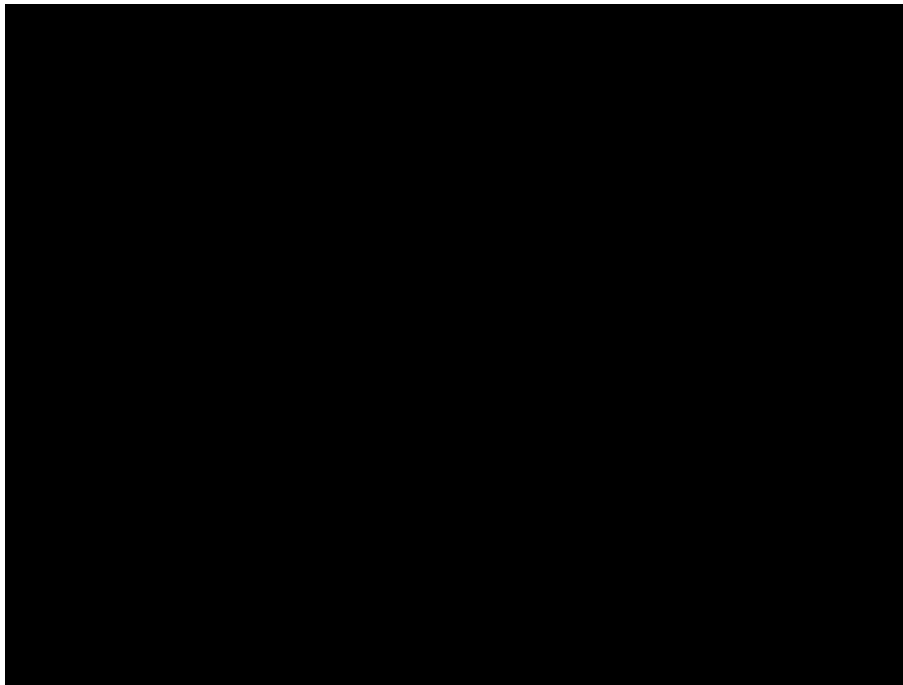
TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují UBM (správně přečtou chybu a zařadí správnou bázi)



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

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





Kelch et al, BMC Biol, 2012

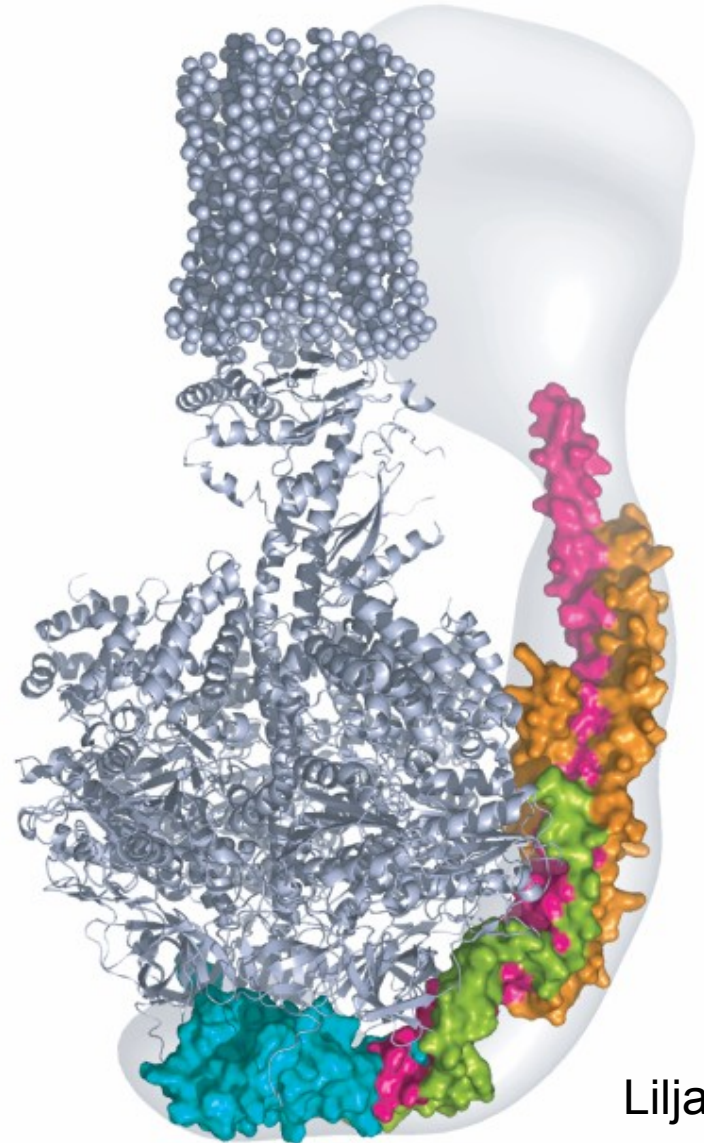
Replikace DNA (video): DNA helikasa “denaturuje” dvoušroubovici (modrá) – připojen je „clamp loader“ (šedá tlapka) - 2 raménka drží DNA polymerázy (fialové) spojené s PCNA („sliding clamp“, zelená). „Leading strand“ je syntetizován kontinuálně zatímco „lagging strand“ musí být primásou (žluto-zelená)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

PCNA zvyšuje procesivitu DNA polymerás

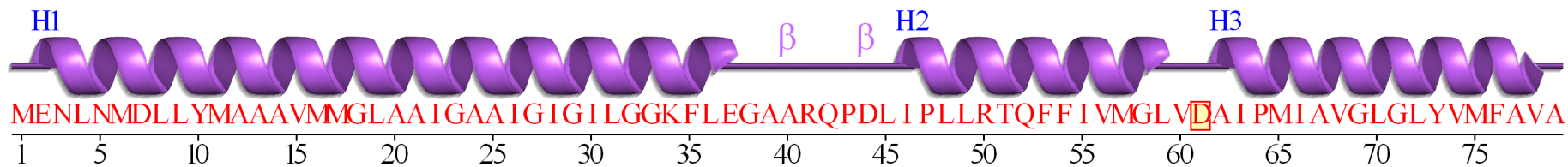
Jak funguje ATPasová pumpa?



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

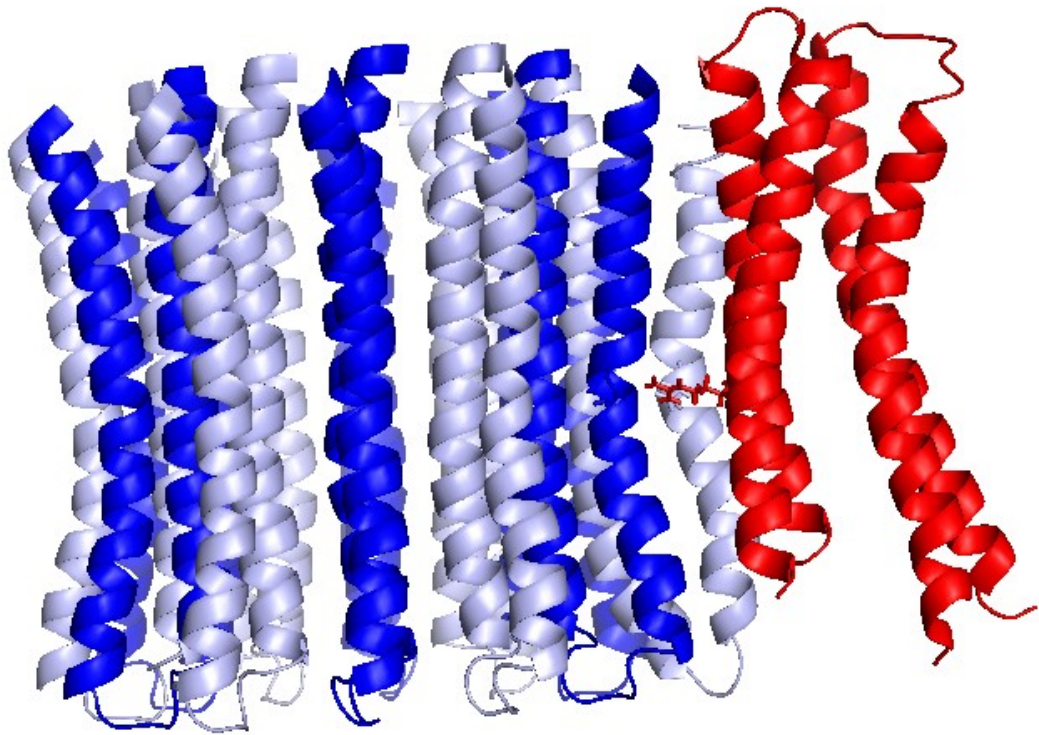


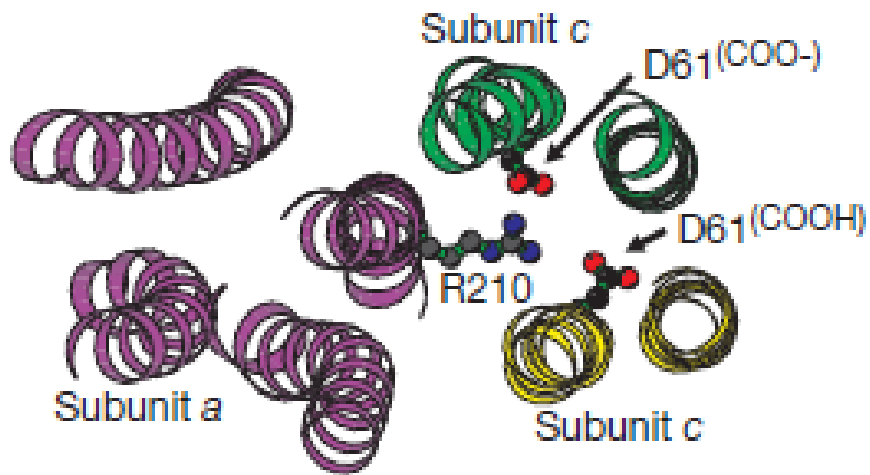
Liljas a spol.



PDB: 1C17:A

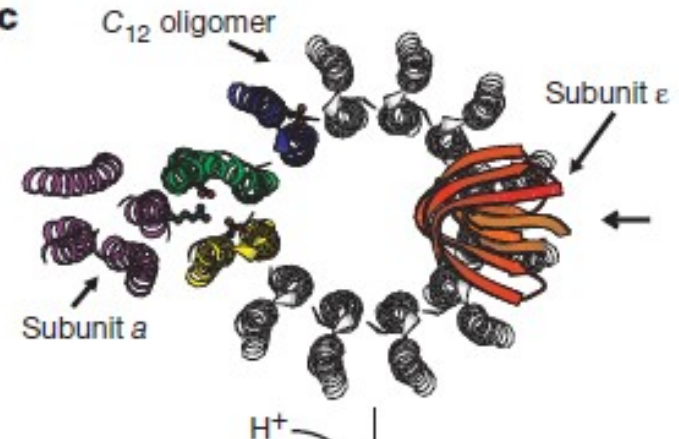
pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu



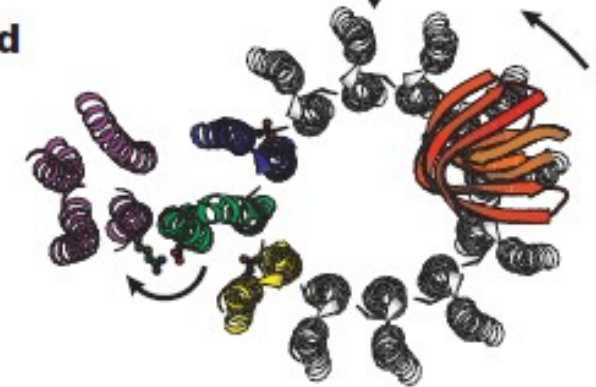
a

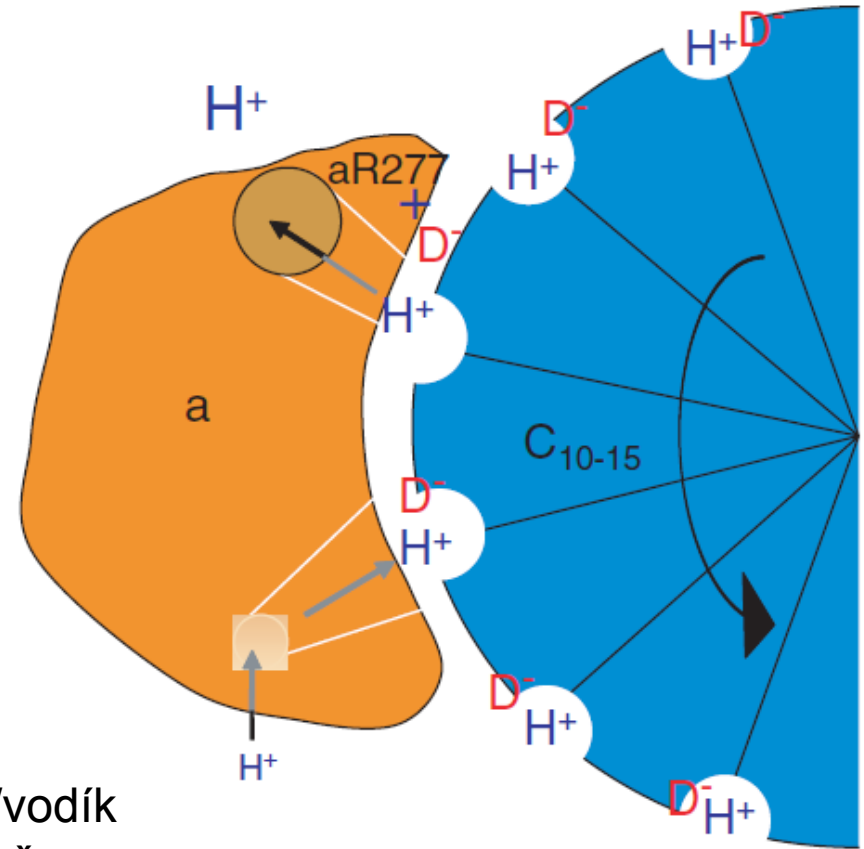
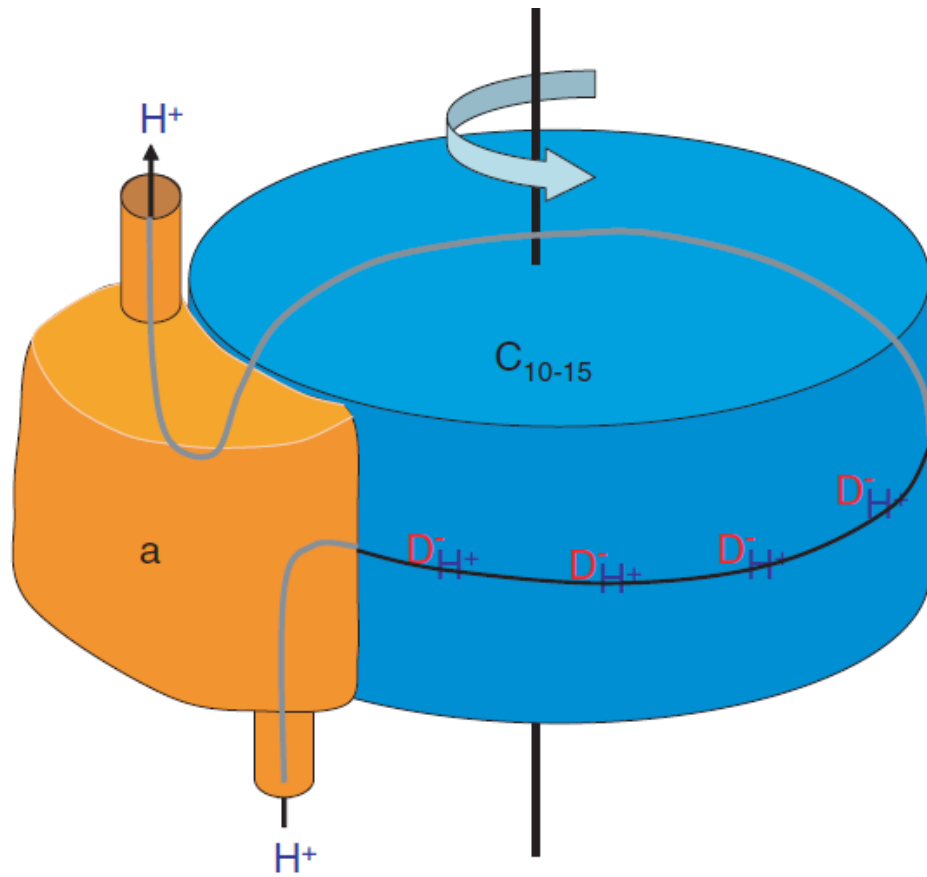
Rastogi & Girvin, Nature, 1999

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.

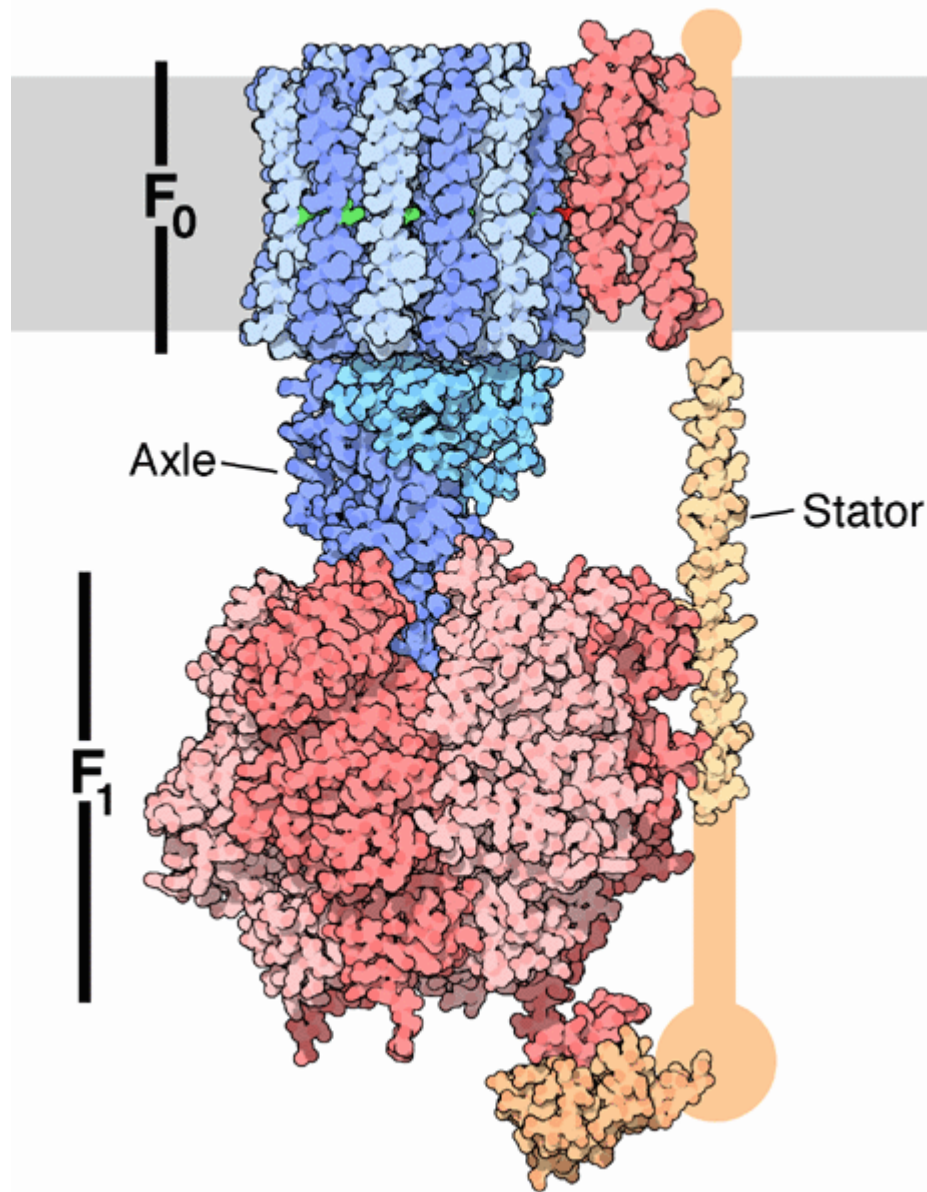
c

H⁺

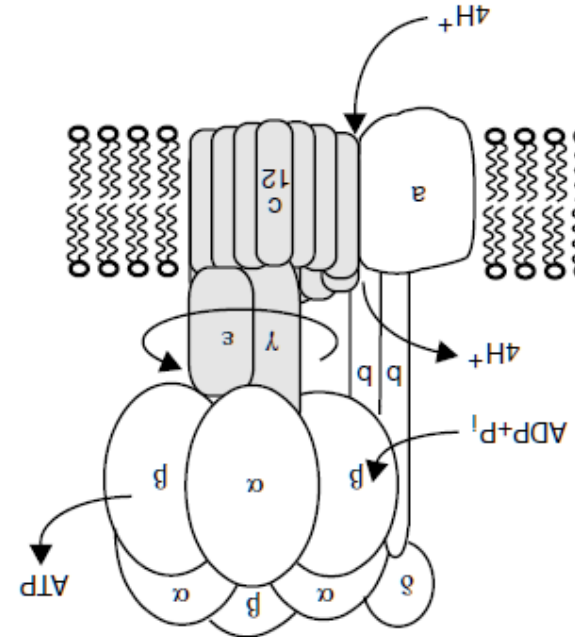
d**e****f**



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.



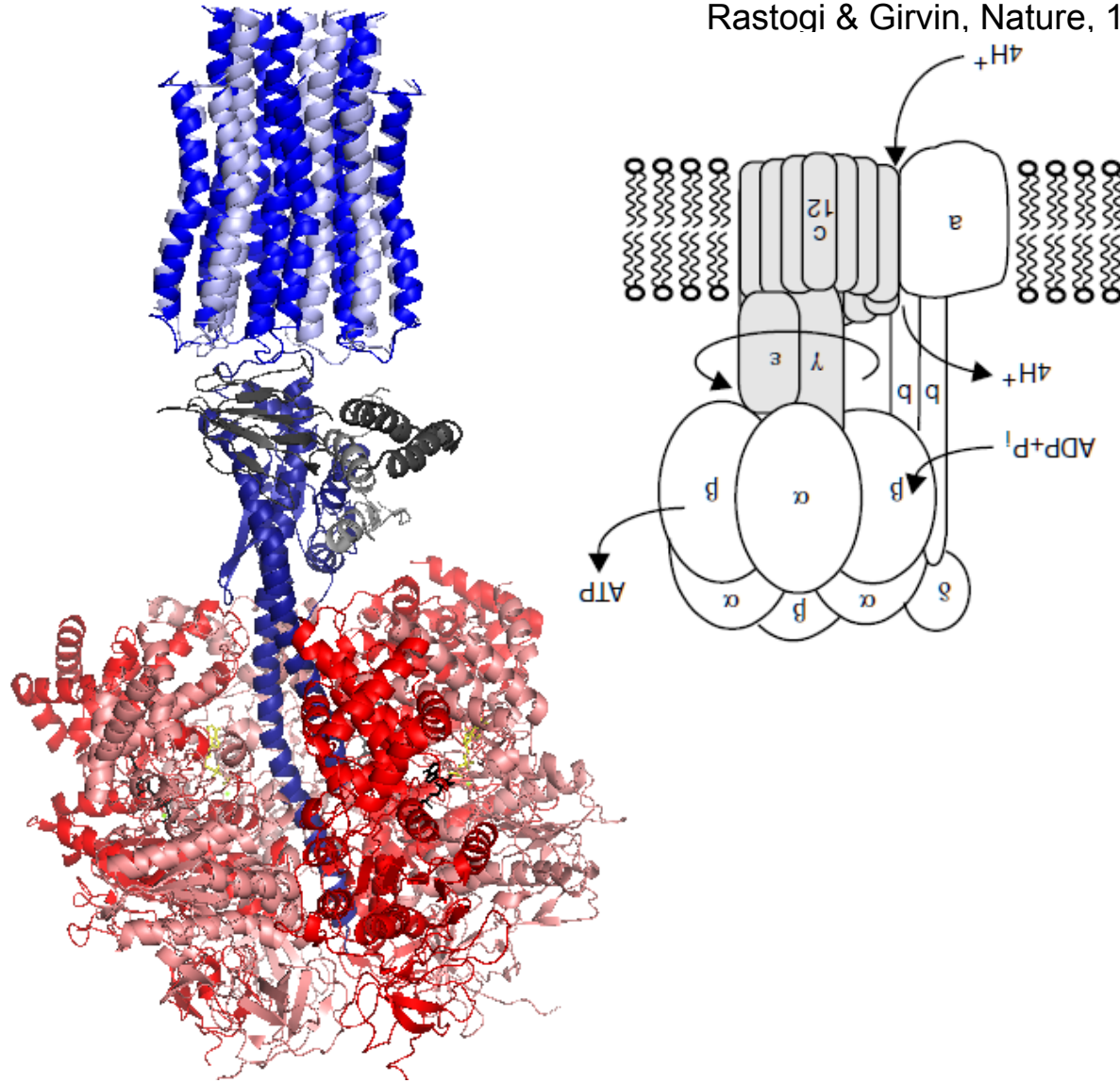
Molekula měsíce v prosinci 2005
Rastogi & Girvin, Nature, 1999



F₀ je protonový rotor (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 rotory jsou spojeny státorem.

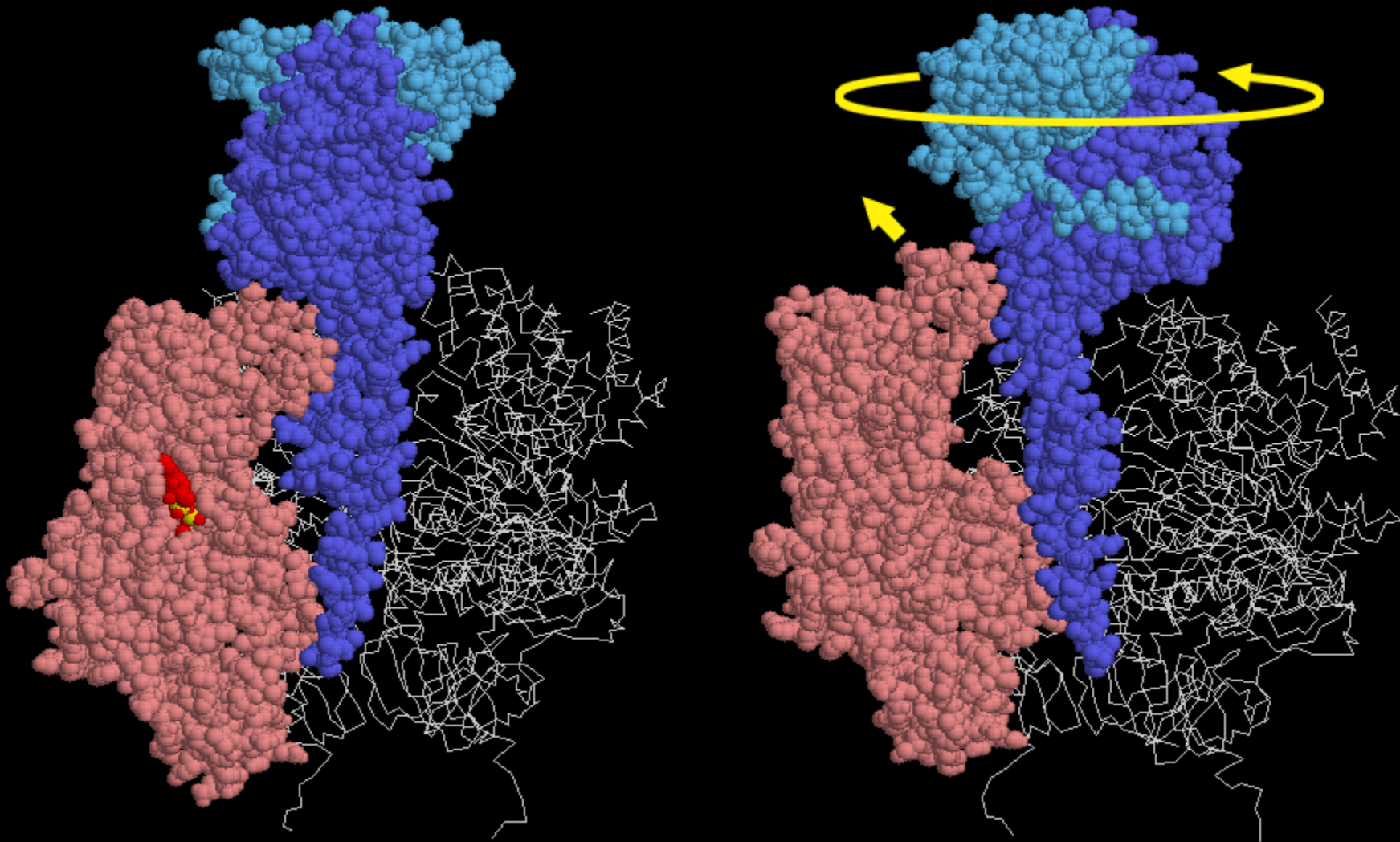
„ATP syntasa je jedním z divů molekulárního světa“. Je to dvojitý molekulární motor – „nanostroj“ – vyrábějící většinu ATP (energie).

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

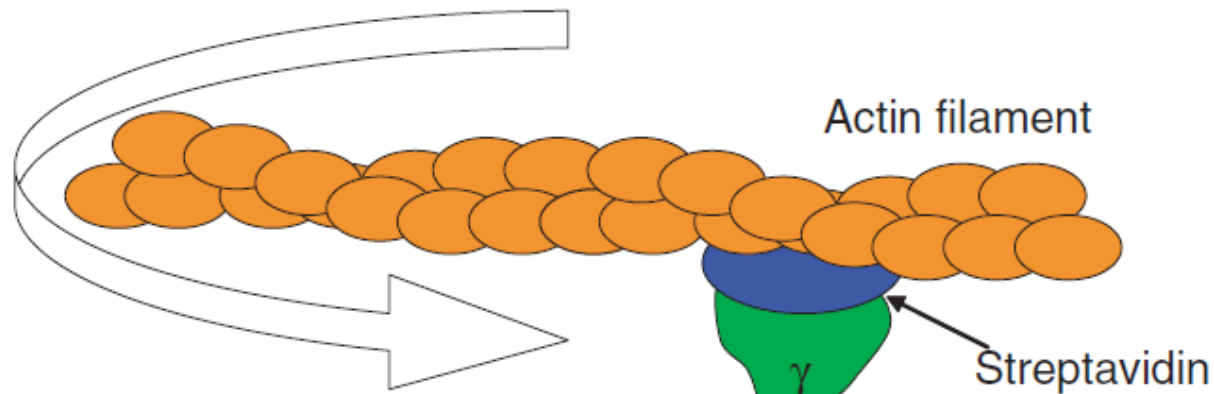
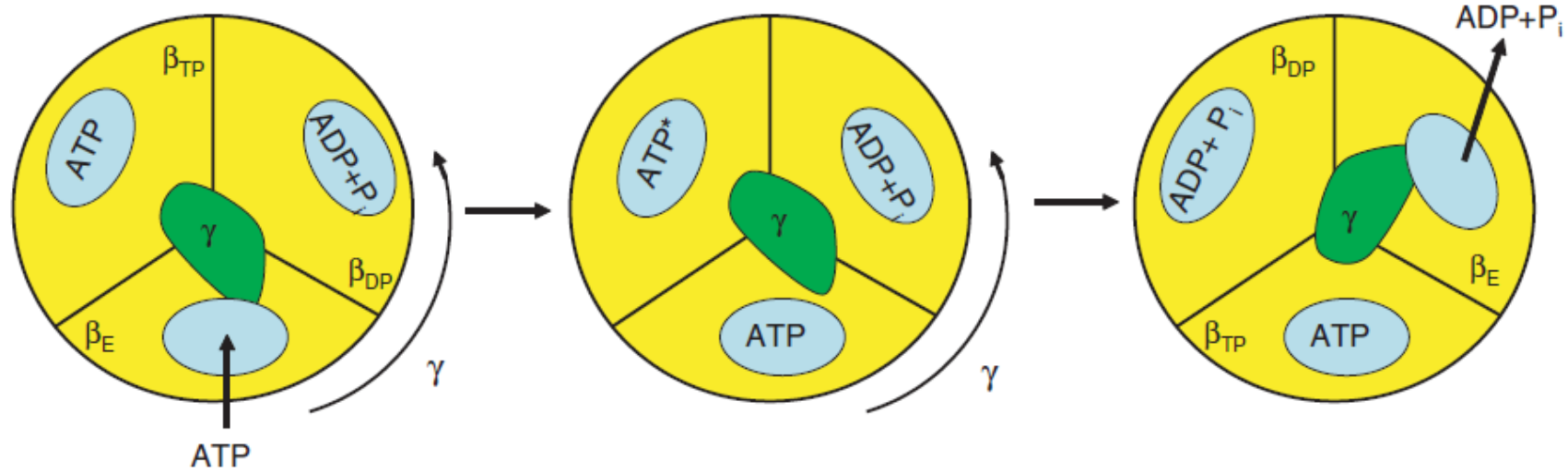


PDB: 2WPD

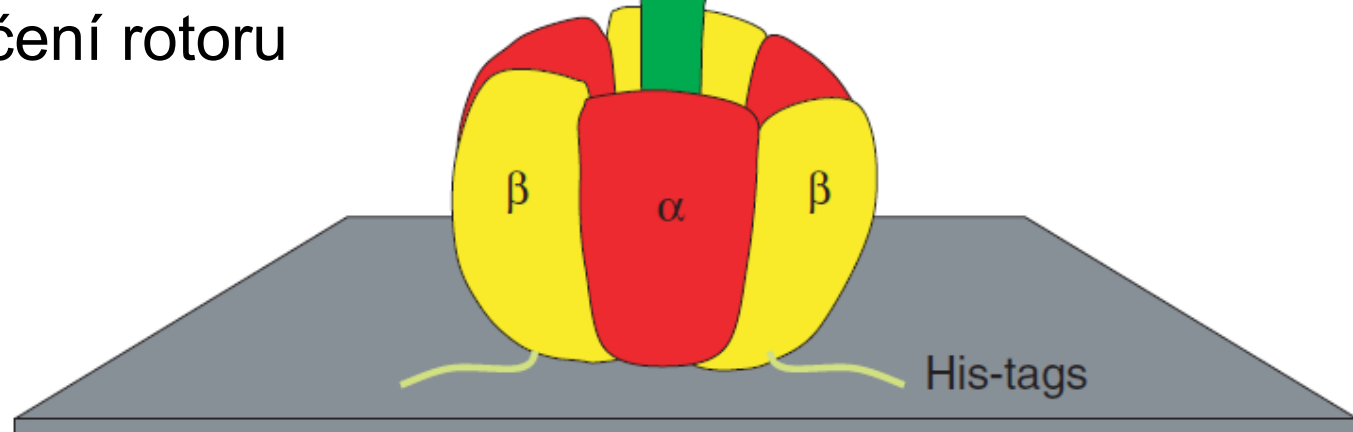
ATP syntasa – ukázka kompletní struktury – ve skutečnosti se točí „modré“ části a modulují „červený“ generátor

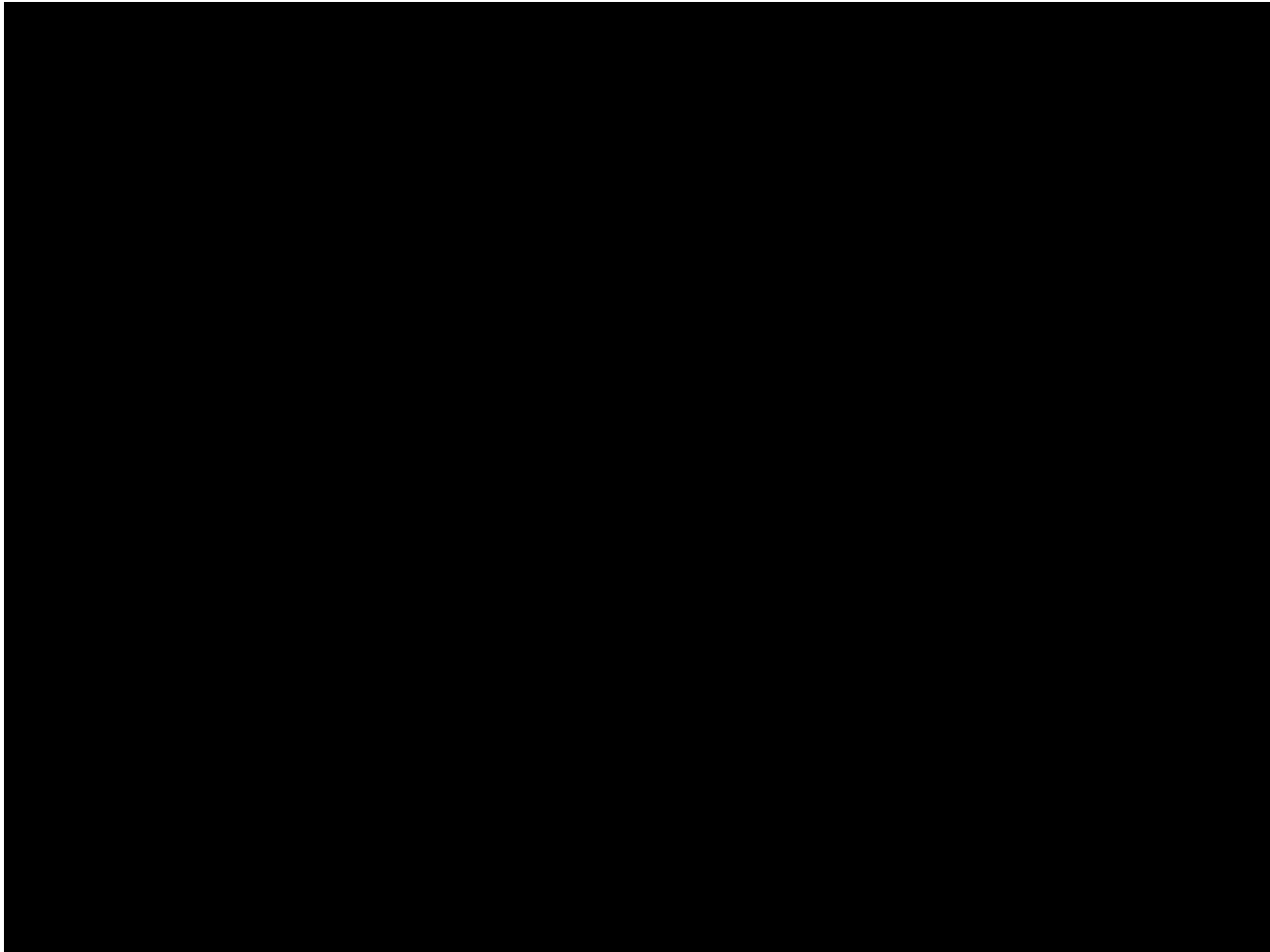


Při otočce osa tlačí na F1 motor (3 různé konformace)
– levý panel = konformace vhodná pro vazbu ADP
- pravý panel = ATP molekula byla vytlačena



in vitro průkaz otáčení rotoru



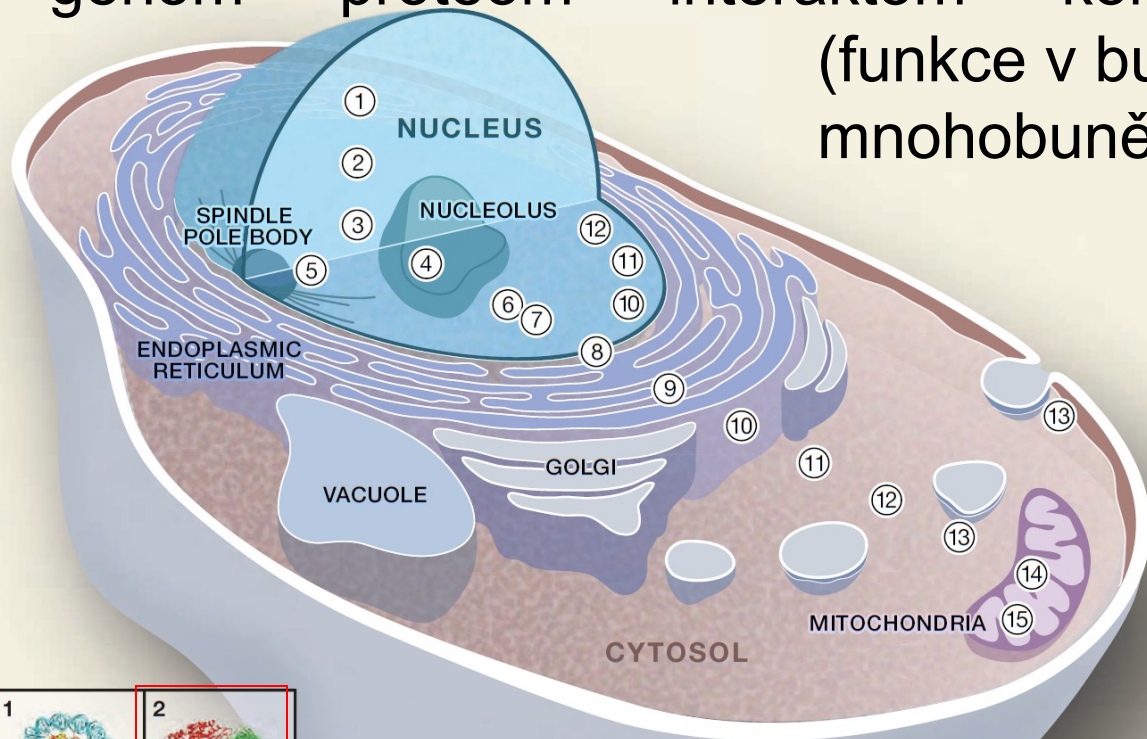


Shrnutí

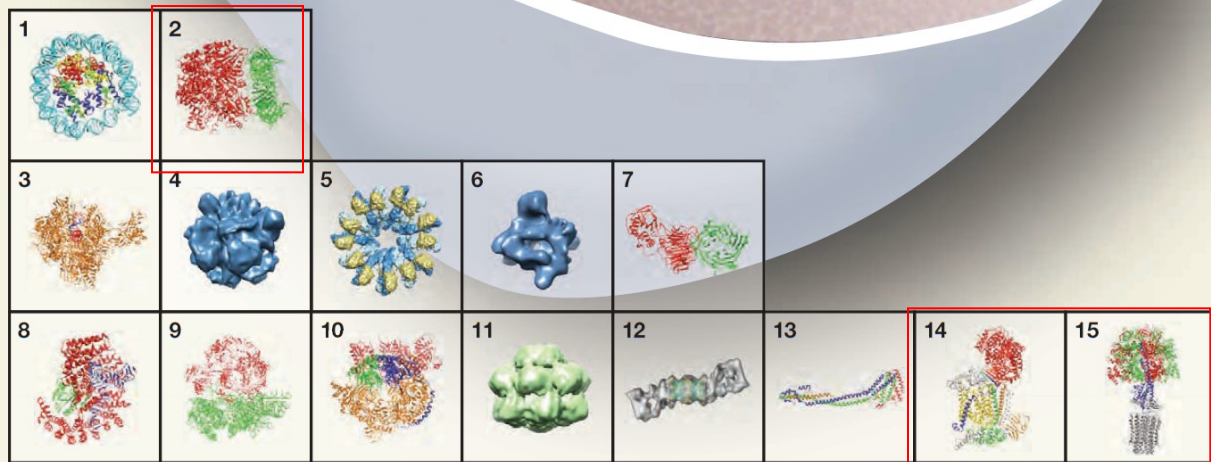
- Proteiny interagují silně (stabilní komplexy) nebo slabě (přechodné/dynamické komplexy)
- Stabilní komplexy (ATPasová pumpa)
 - Podjednotky jsou často koexprimovány (koexprese je vzájemně stabilizuje, lepší rozpustnost)
 - stabilní komplexy disociují proteolyticky
 - pokles hladiny jednoho proteinu má za následek pokles hladiny ostatních podjednotek
- Dynamické komplexy (PCNA)
 - Interakce podjednotek dynamických komplexů jsou modulovány např. posttranslačními modifikacemi

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

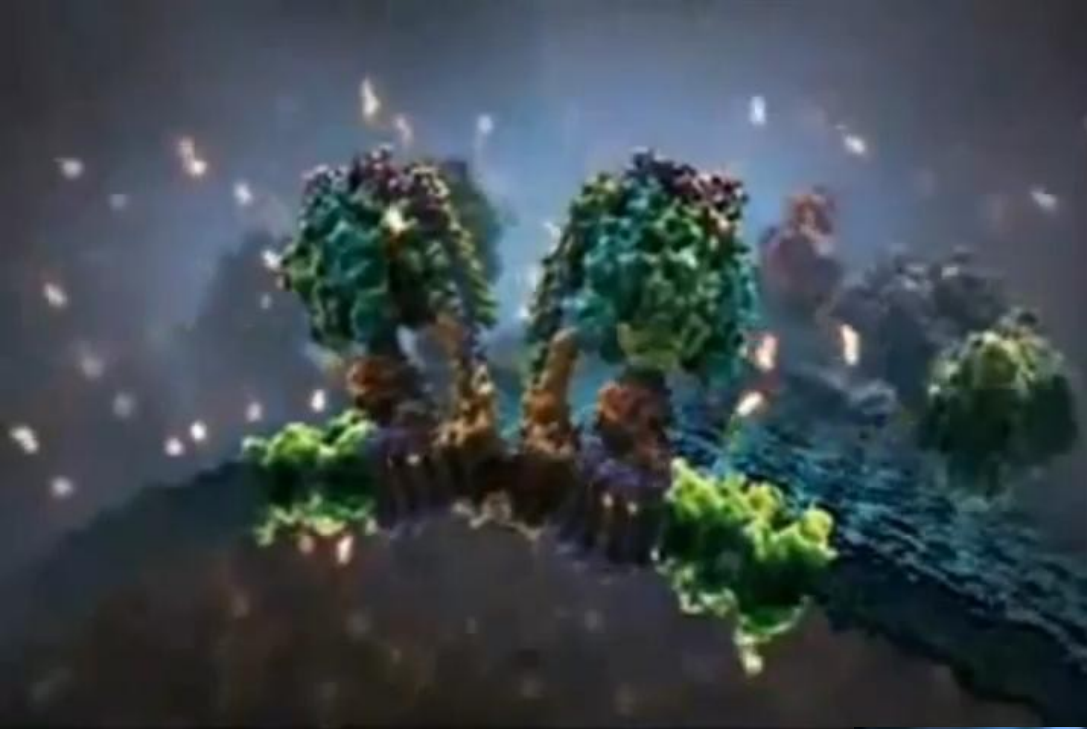


~800 komplexů v S.c.
 Bertero et al, Cell, 2010

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

Molecular machinery of life:

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



ATPasová pumpa

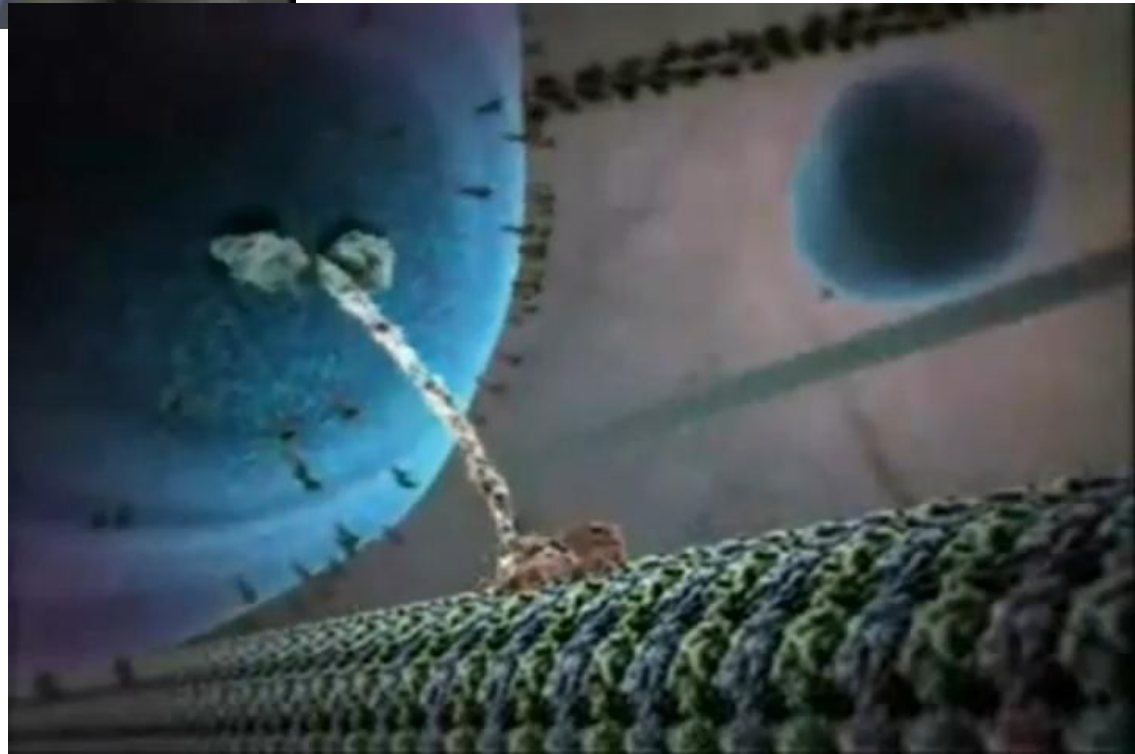
Jaderný pór

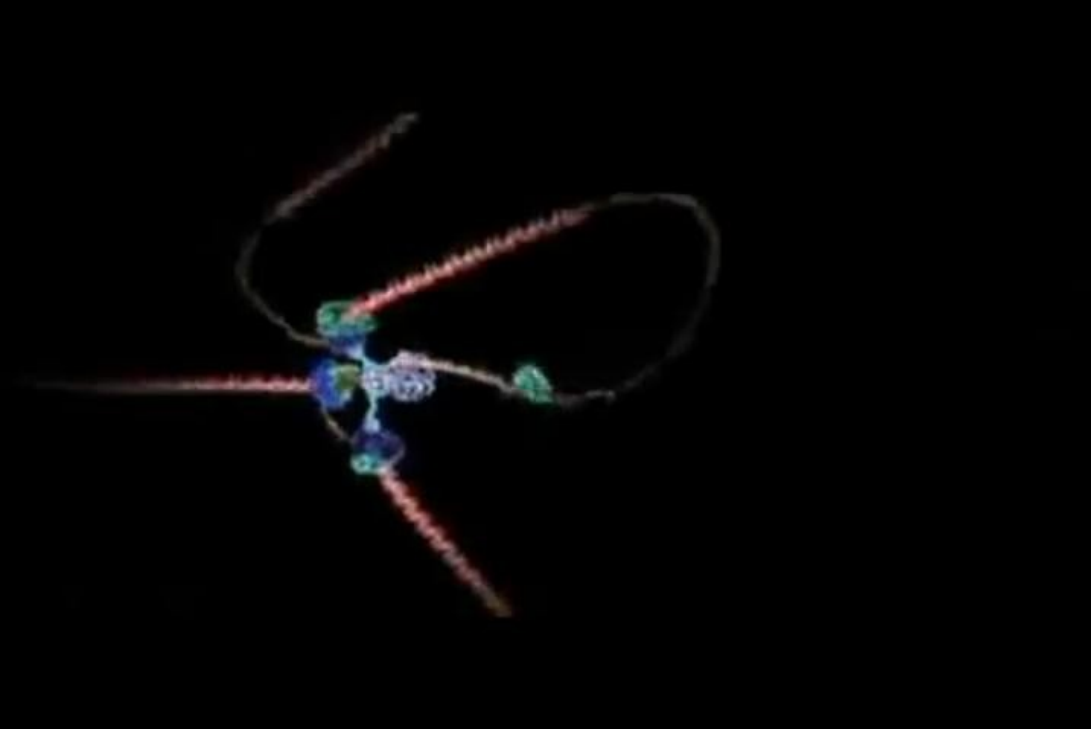




proteosyntéza
ribosom (mRNA, tRNA)

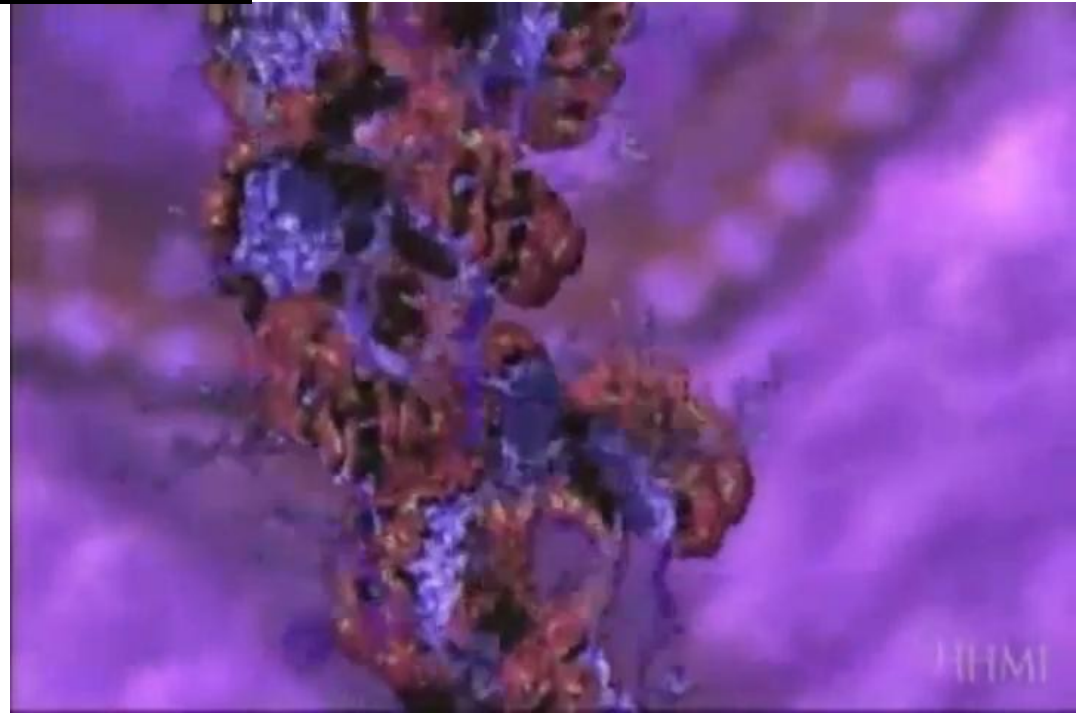
transport váčku po cytoskeletu
(mikrotubuly, kinesin/dynein)

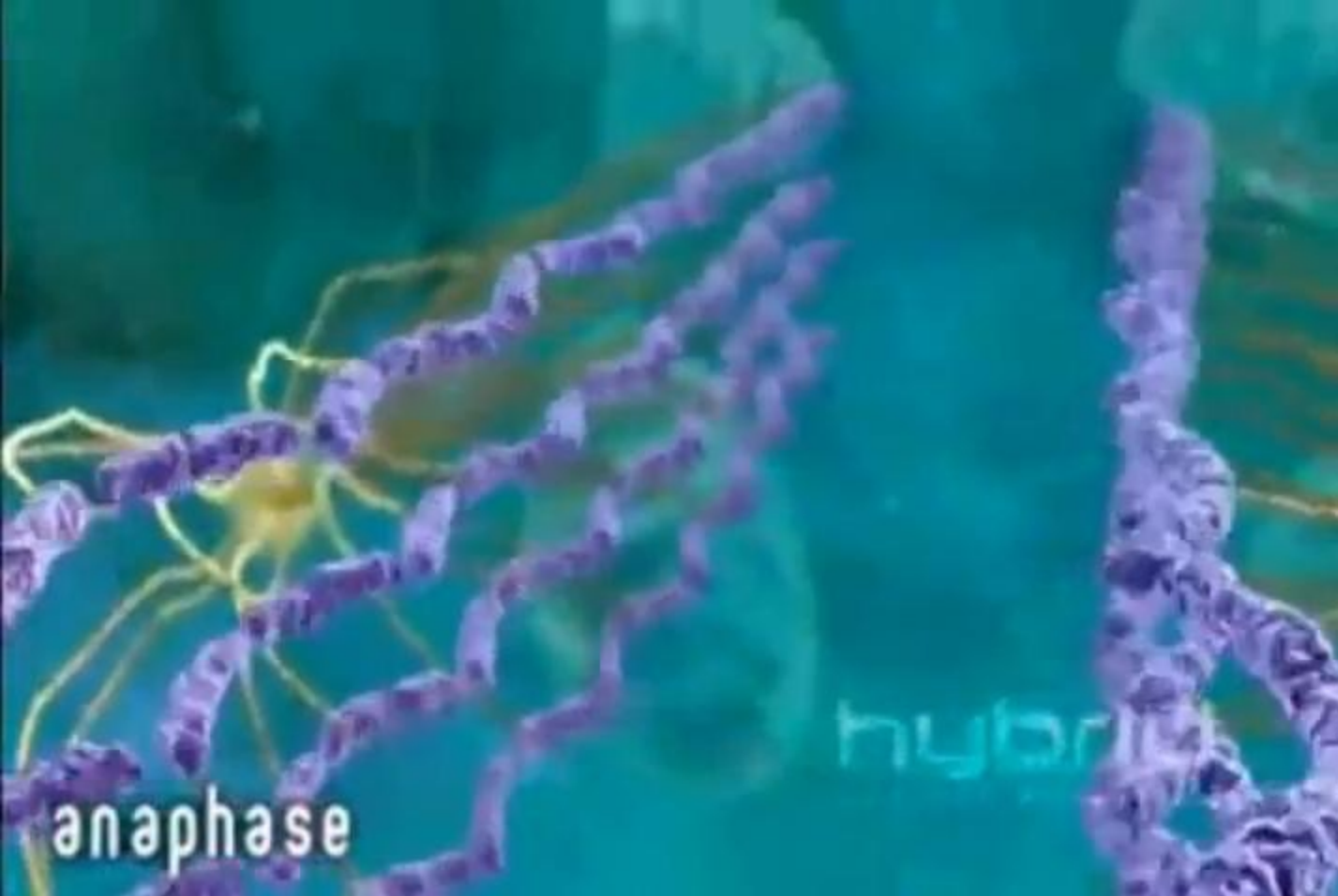




replikace (helikása,
primáza, DNA polymeráza,
PCNA)

nukleosomy





Průběh mitózy (mikrotubuly, chromosomy)

C9041 – Struktura a funkce eukaryotických chromosomů

Prof. Jiří Fajkus

CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů

Doc. Jan Paleček

O kterých komplexech se dozvíte v přednášce ...

- Více o komplexech – metody analýzy ...
- DNA-proteinové komplexy
 - enhanceosom
 - nukleosom
 - ...
- Proteasom, ubikvitinace ...
- Evoluce komplexů ...