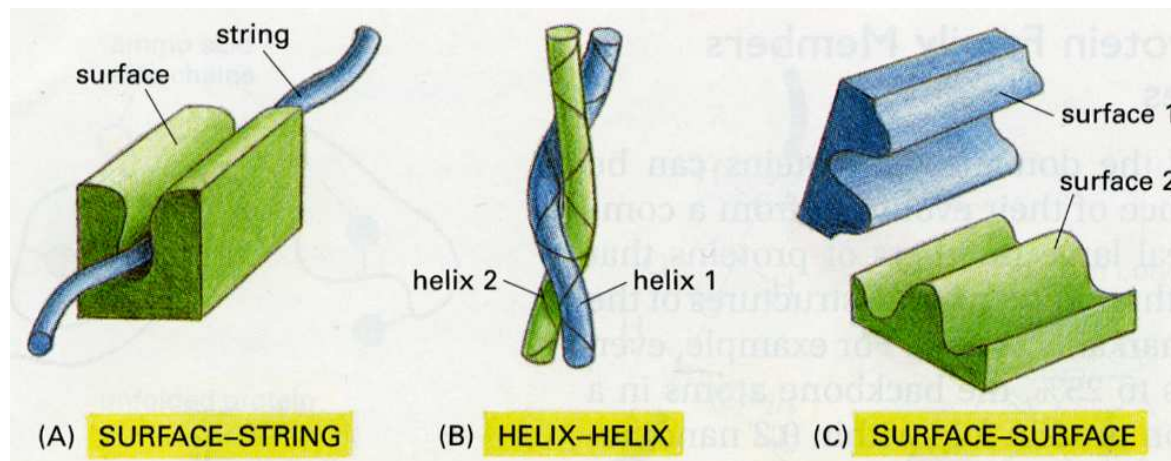


Souhrn - protein-proteinové interakce

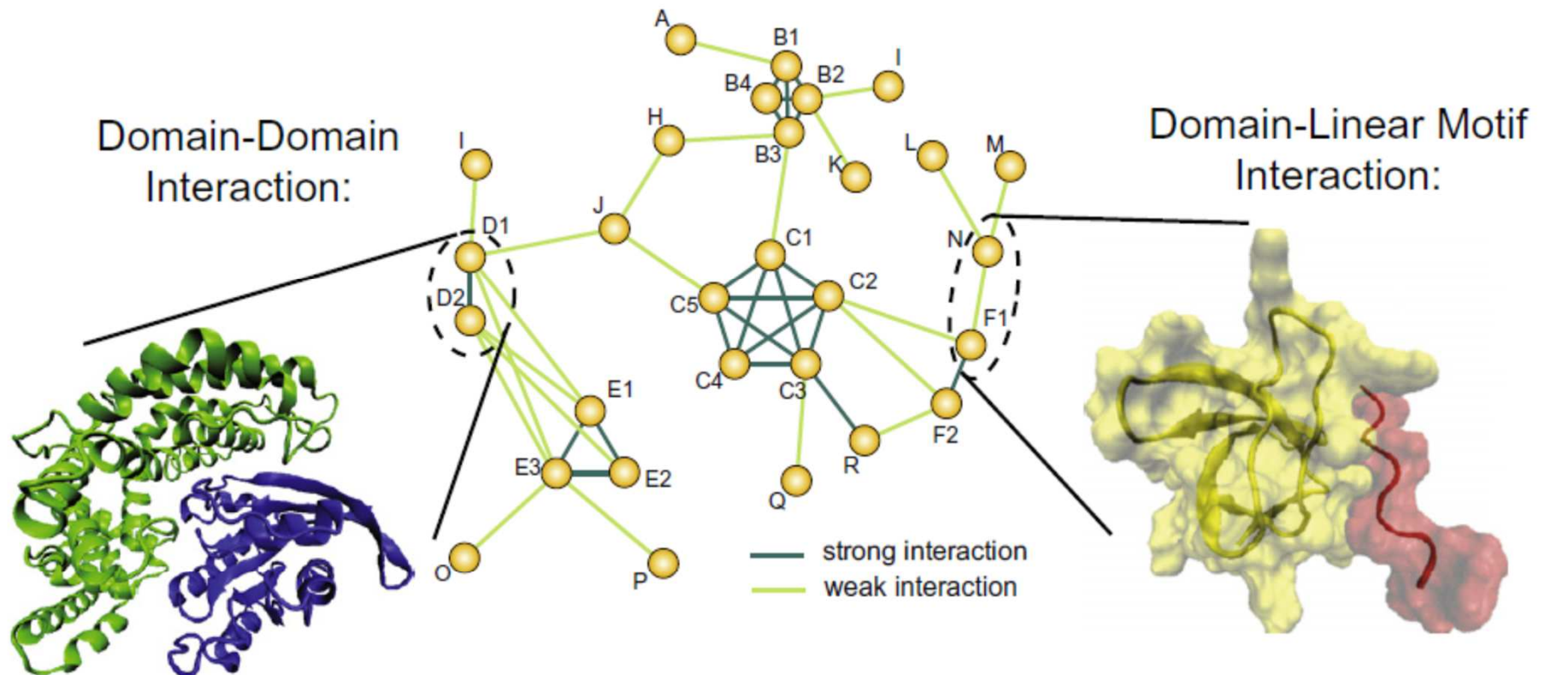
- proteiny jsou troj-rozměrné - mají různé tvary a více domén => mají mnoho vazebných míst na povrchu => komplexy a "sítě"
- části proteinů/domény interagují s doménami partnerů
 - domény mají určitou strukturu, která do značné míry determinuje tvar jejího povrchu, ale ...
 - charakter (hydrofobicitu, 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: ...)



hydrofobní	
polární	polární
+	-

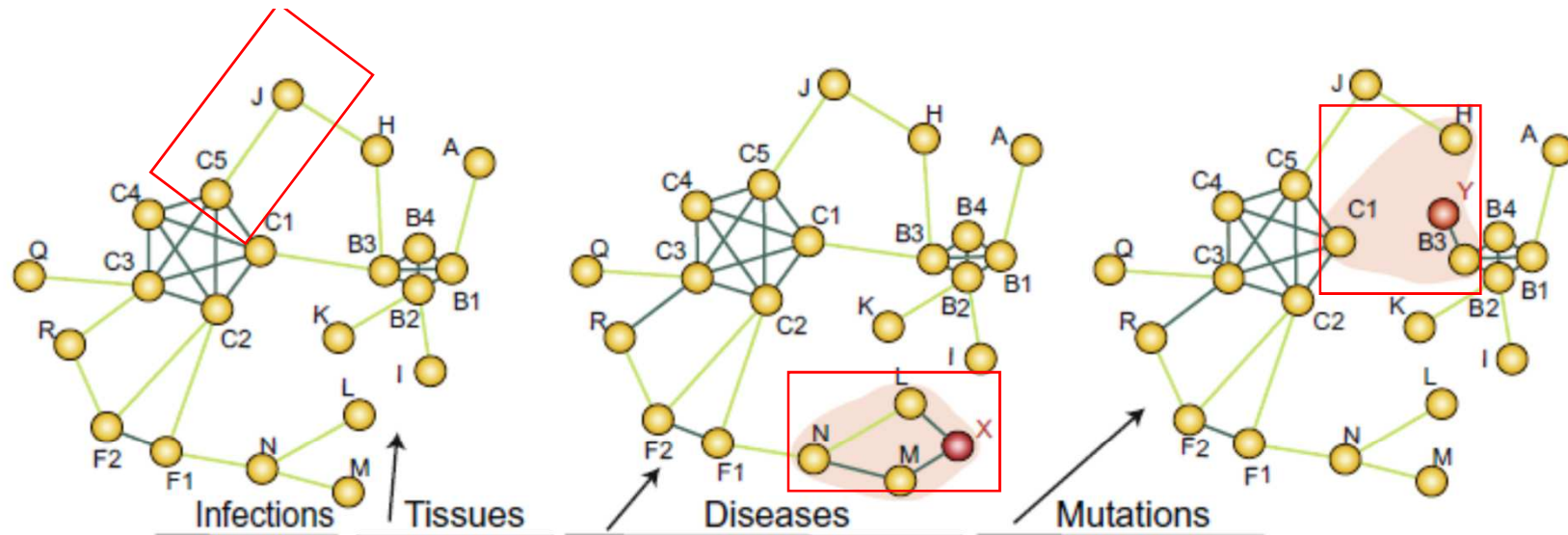
Protein-proteinové interakce

- stabilní (velké plochy, většinou součástí komplexů)
- přechodné/slabe (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

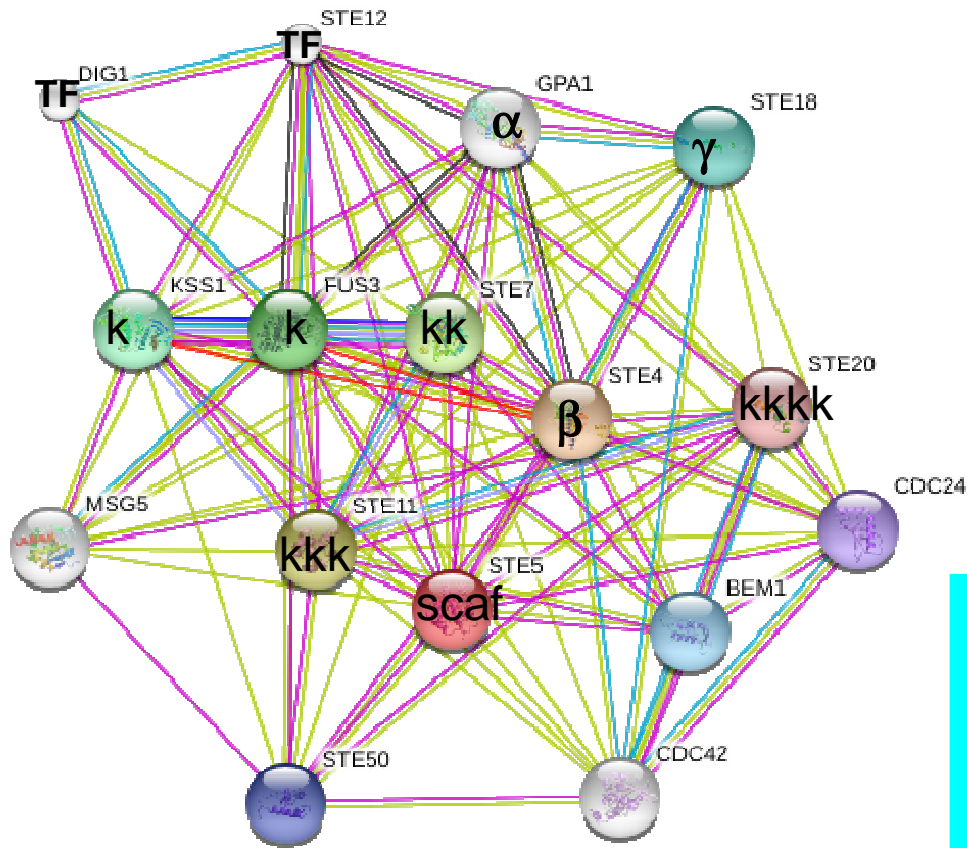


Bader et al, FEBS Lett, 2008

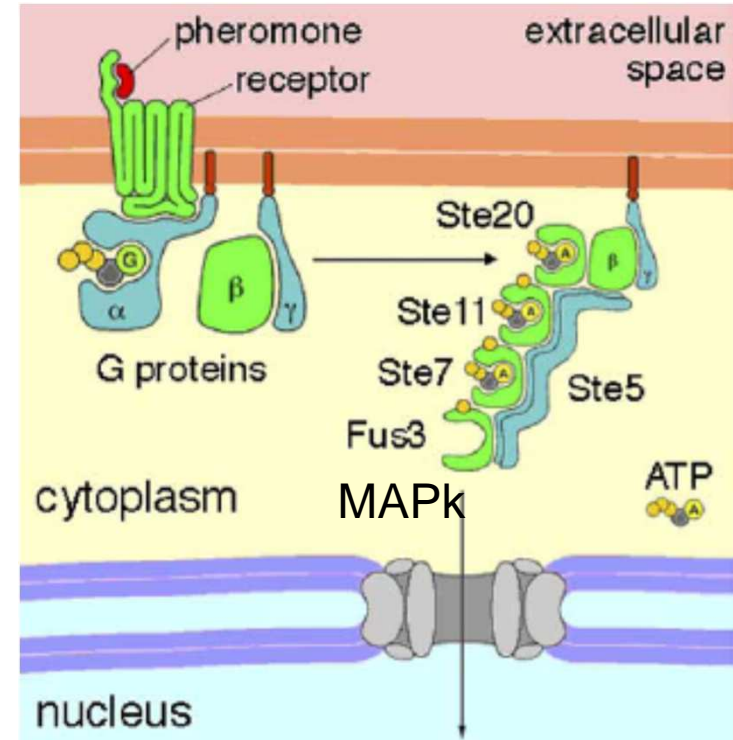
Inhibice interakcí (virovými proteiny, mutacemi) vs. nové interakce
 Srovnání interaktomů => konzerv. interakcí (=> evoluce komplexů => evoluce organismů)

Jaké jsou výhody komplexů?

Interakce x komplexem



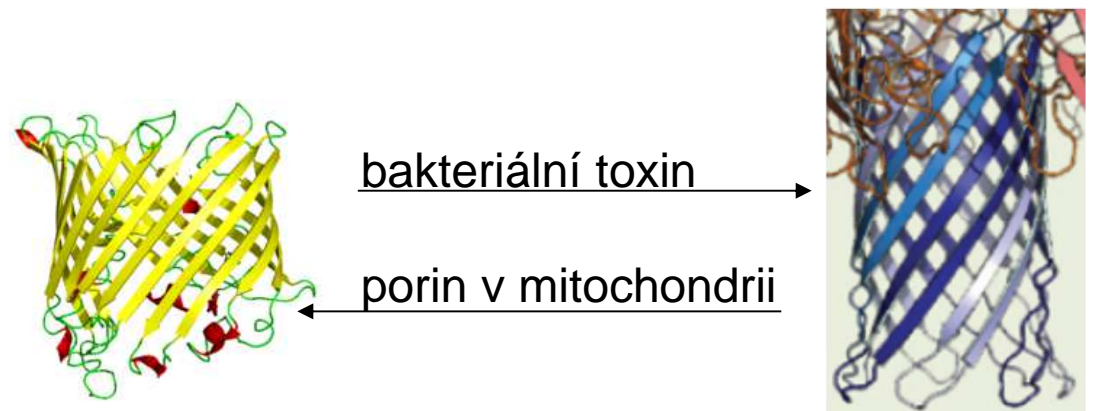
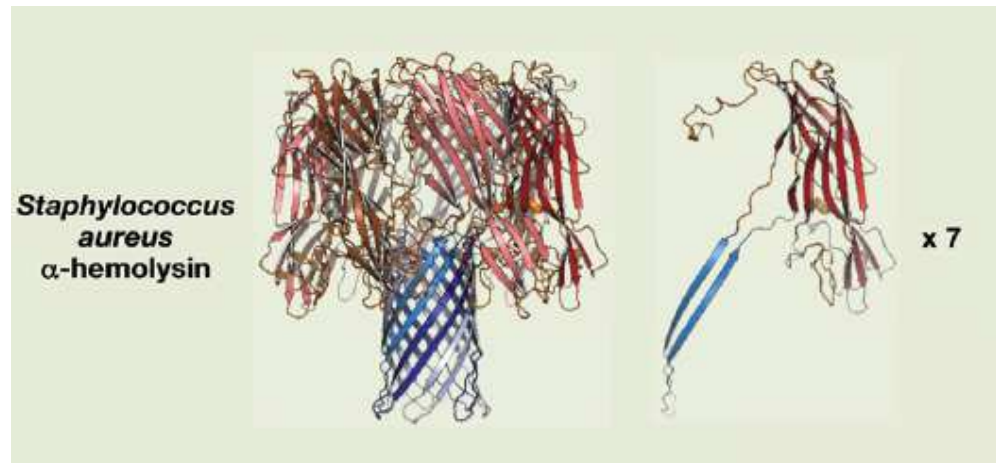
Síť neznamená komplex, ale vztah



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

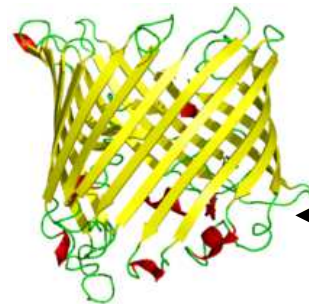
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

- 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 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)

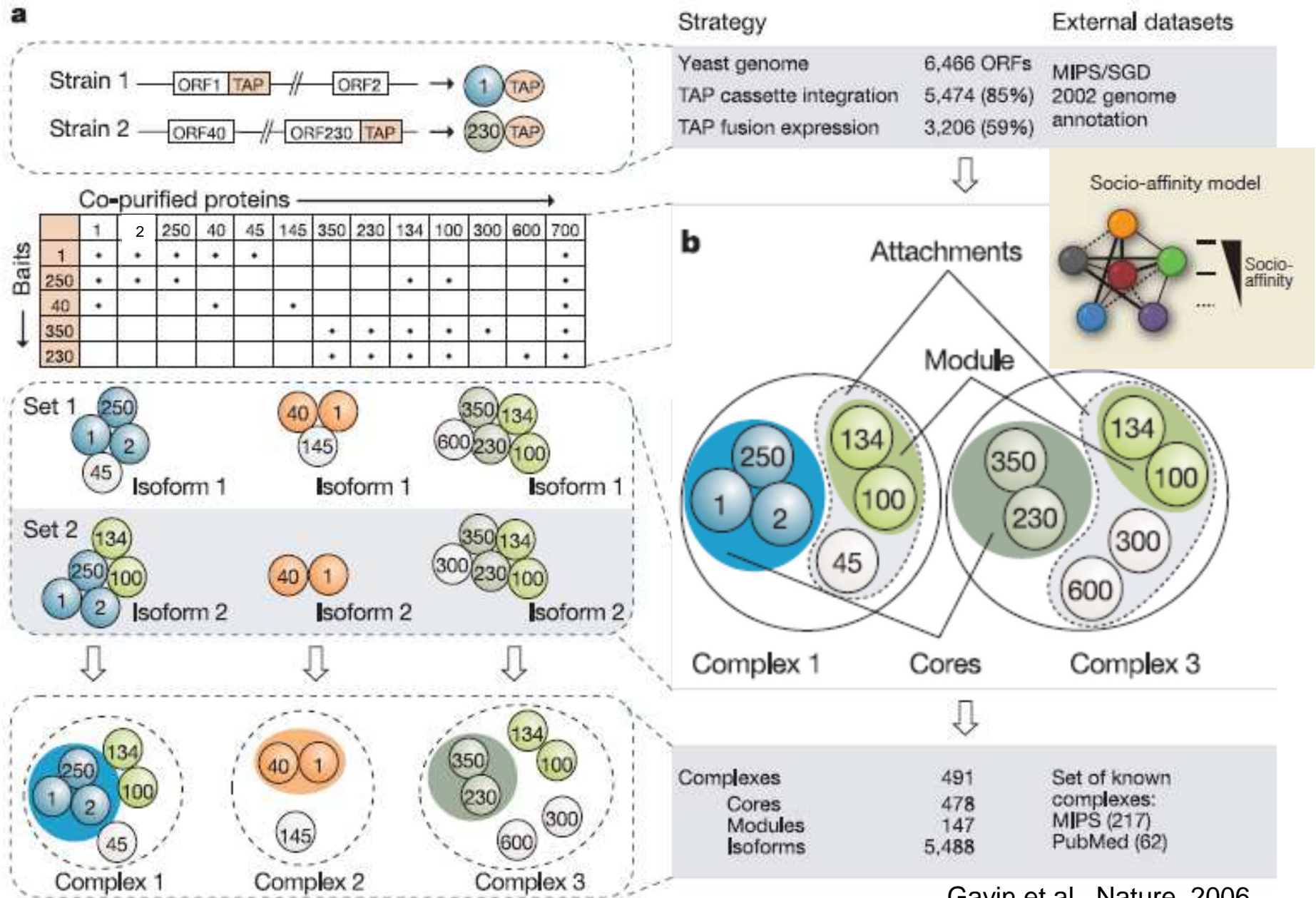


bakteriální toxin →

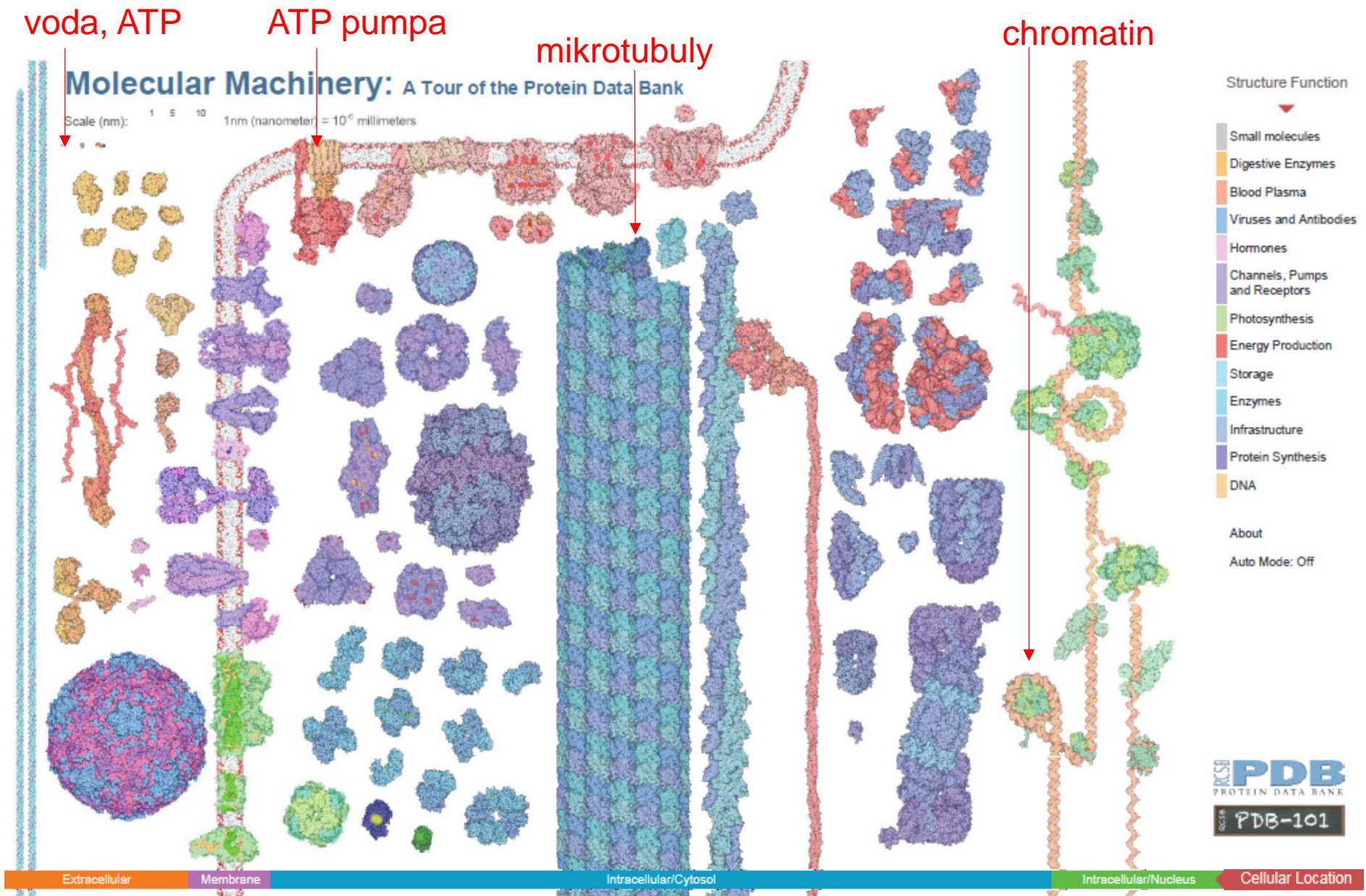
← porin v mitochondrii



Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

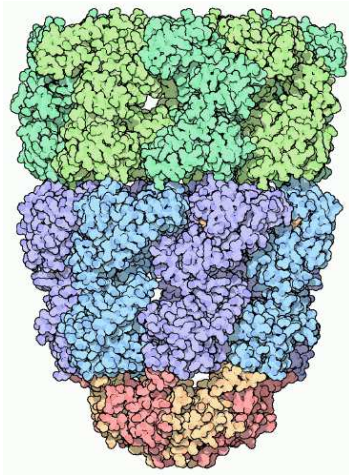


Primárním zdrojem strukturních informací = PDB

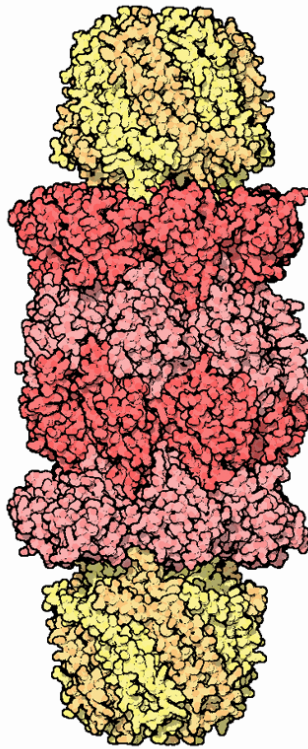


Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

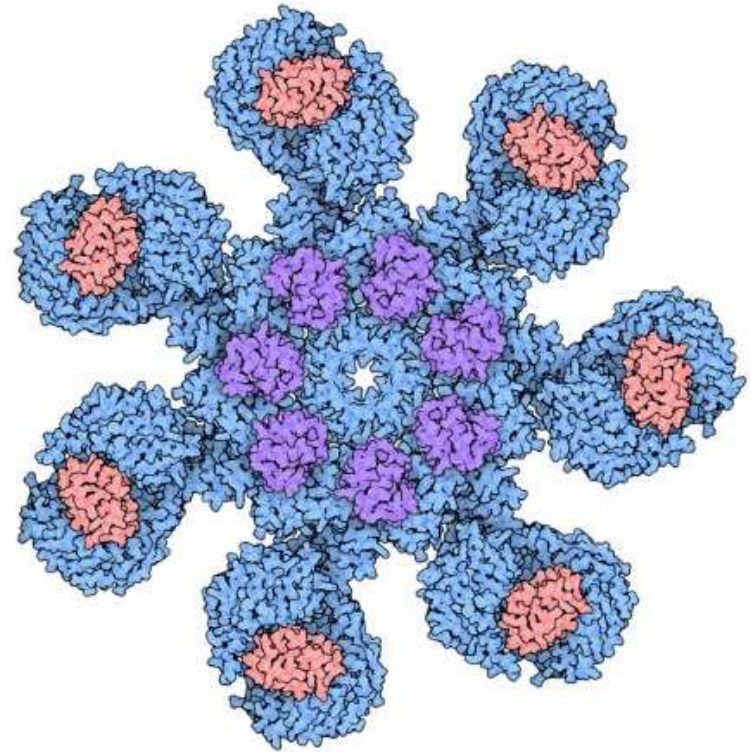
Příklady komplexů



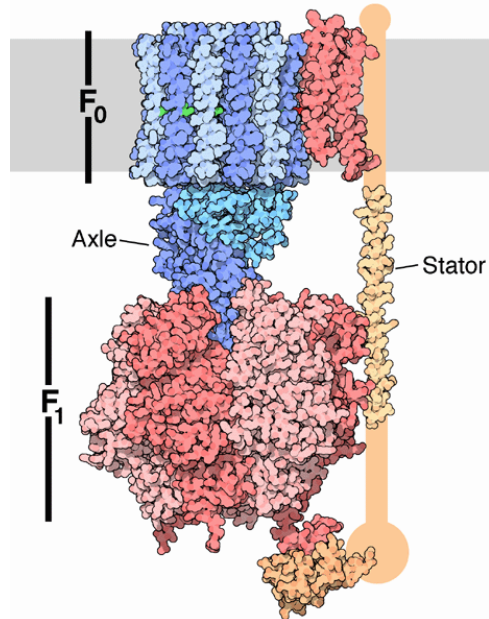
chaperon



proteasom

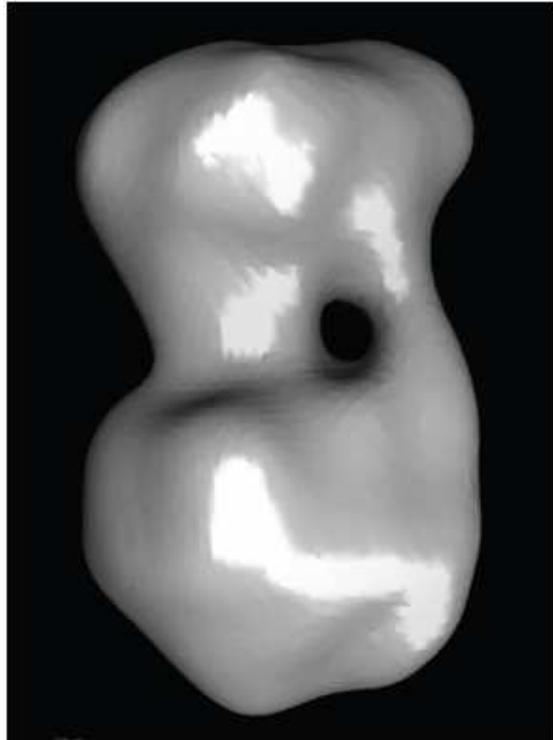


apoptosom

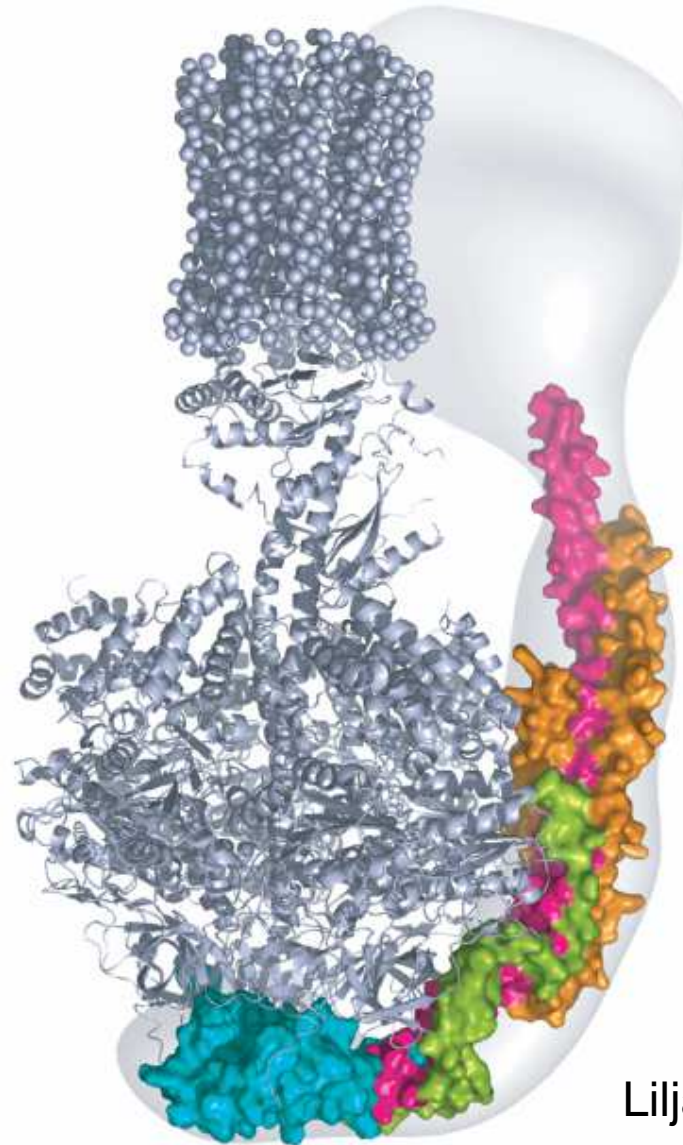


ATP pumpa

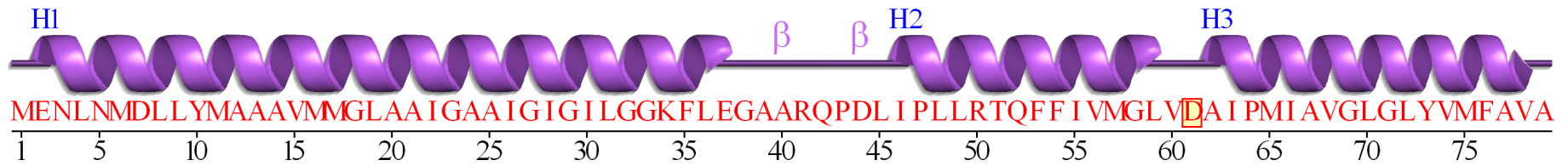
Jak funguje ATPasová pumpa?



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

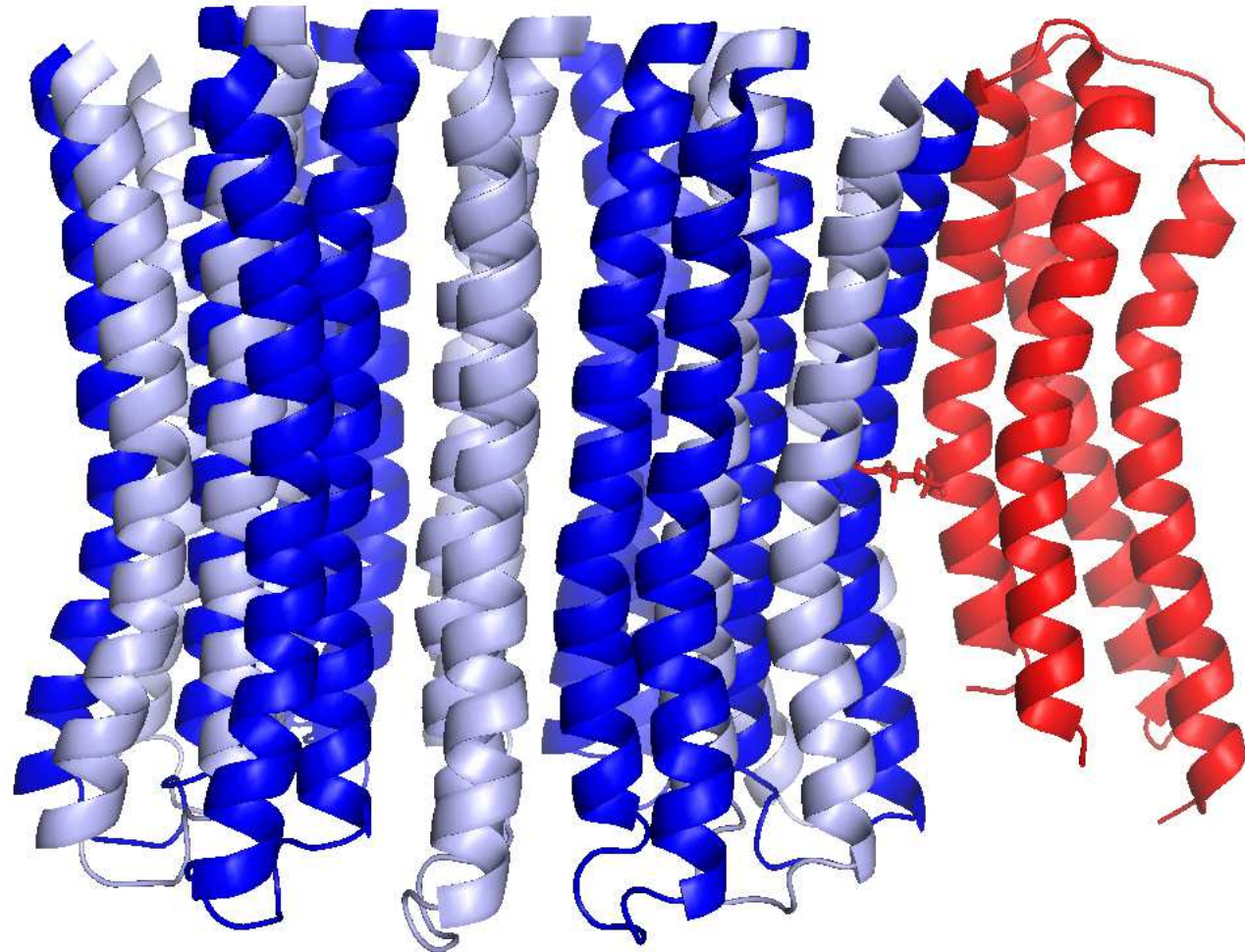


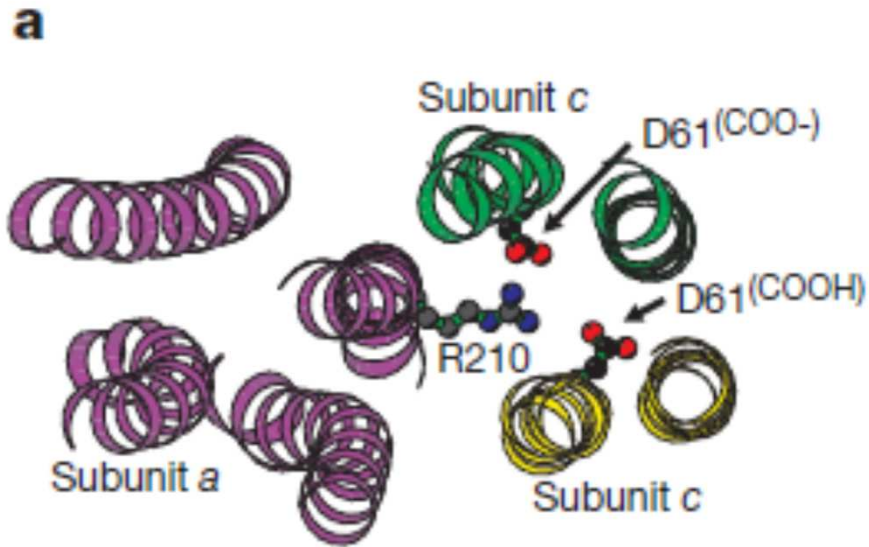
Liljas a spol.



pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu

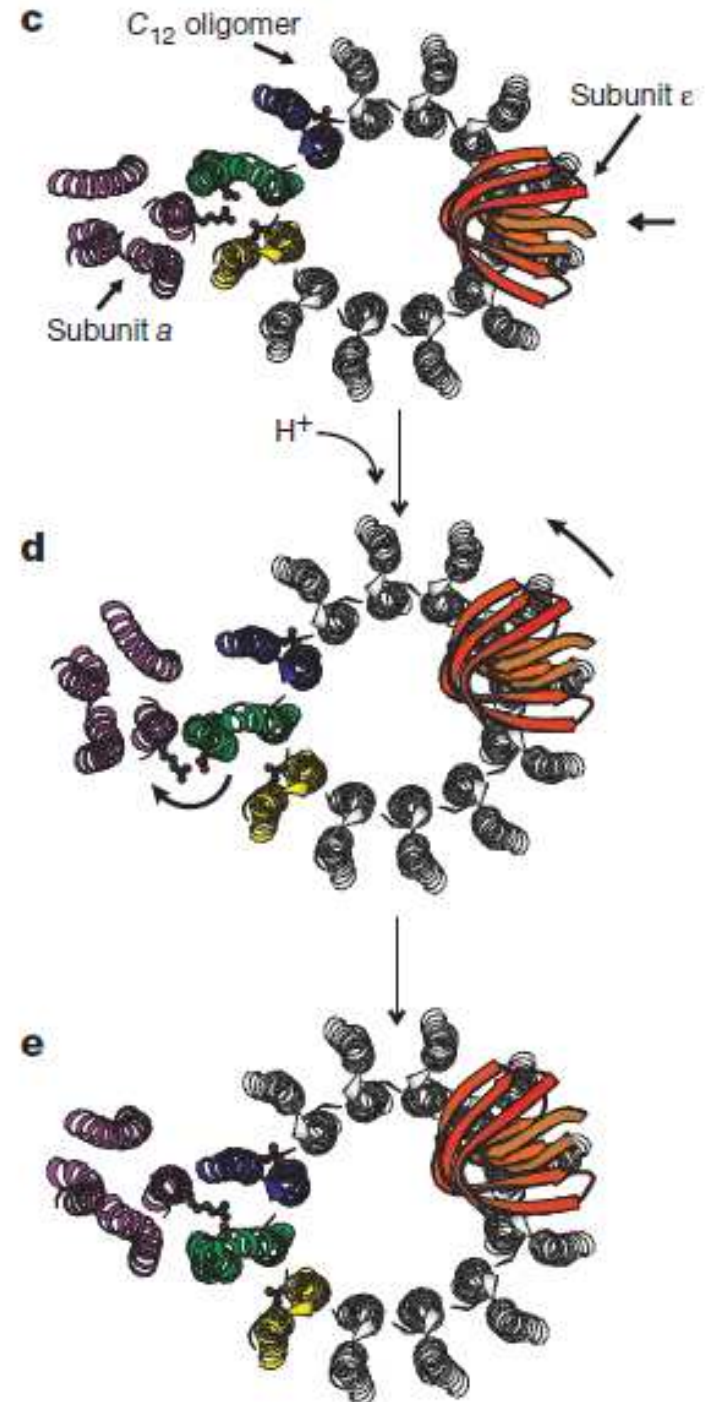
PDB: 1C17:A

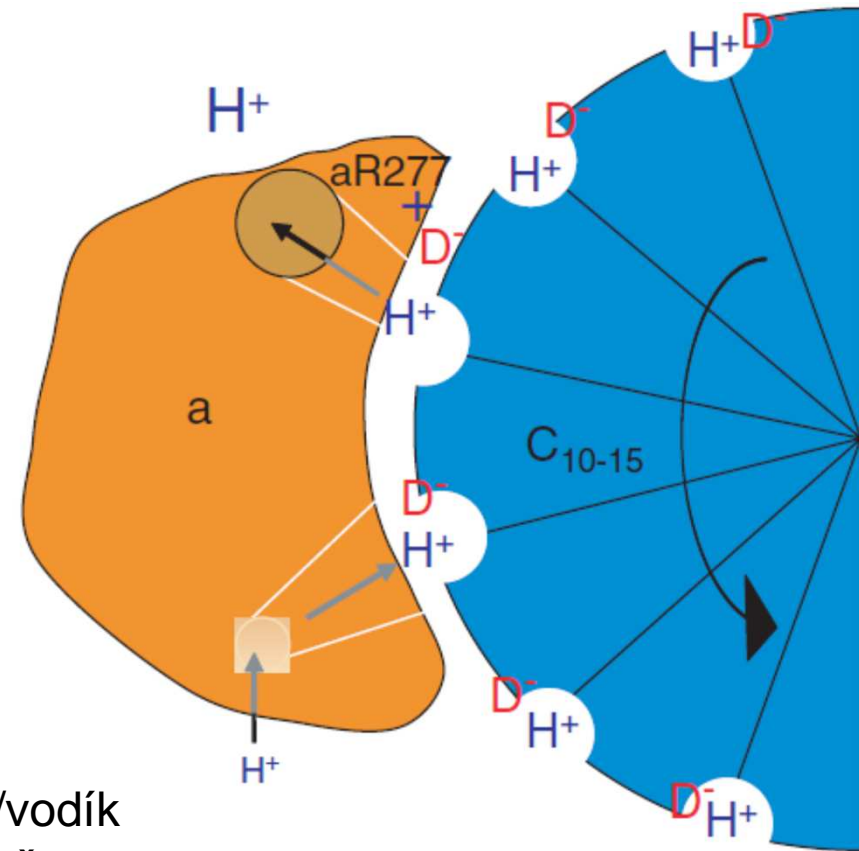
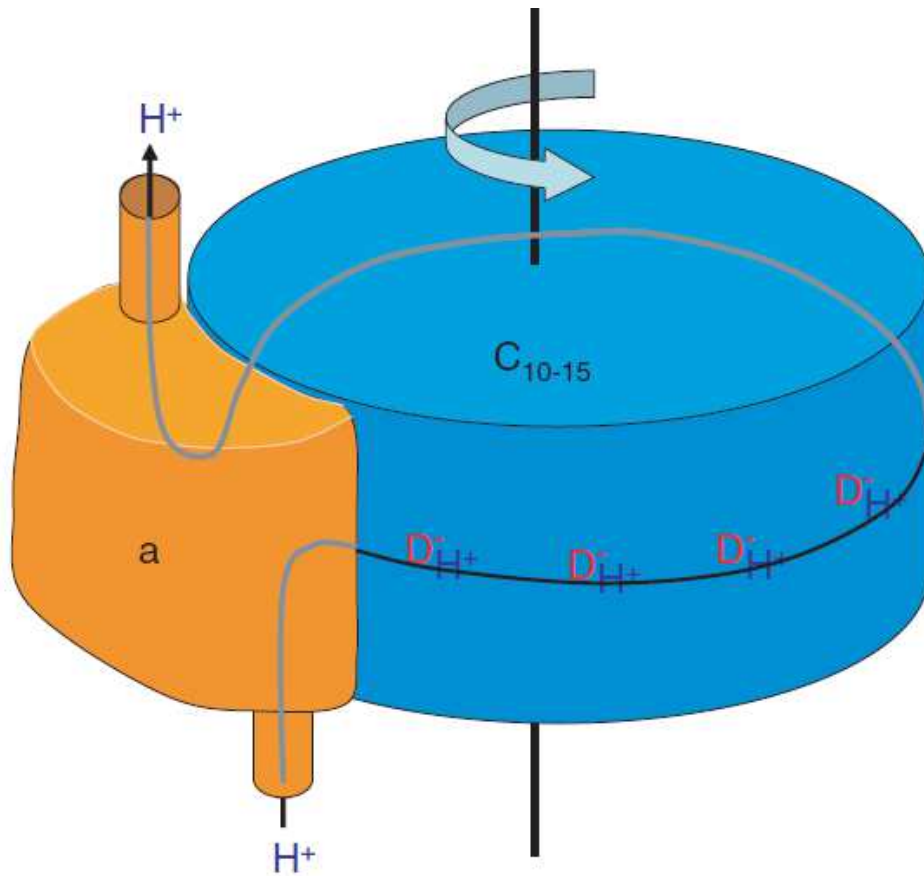




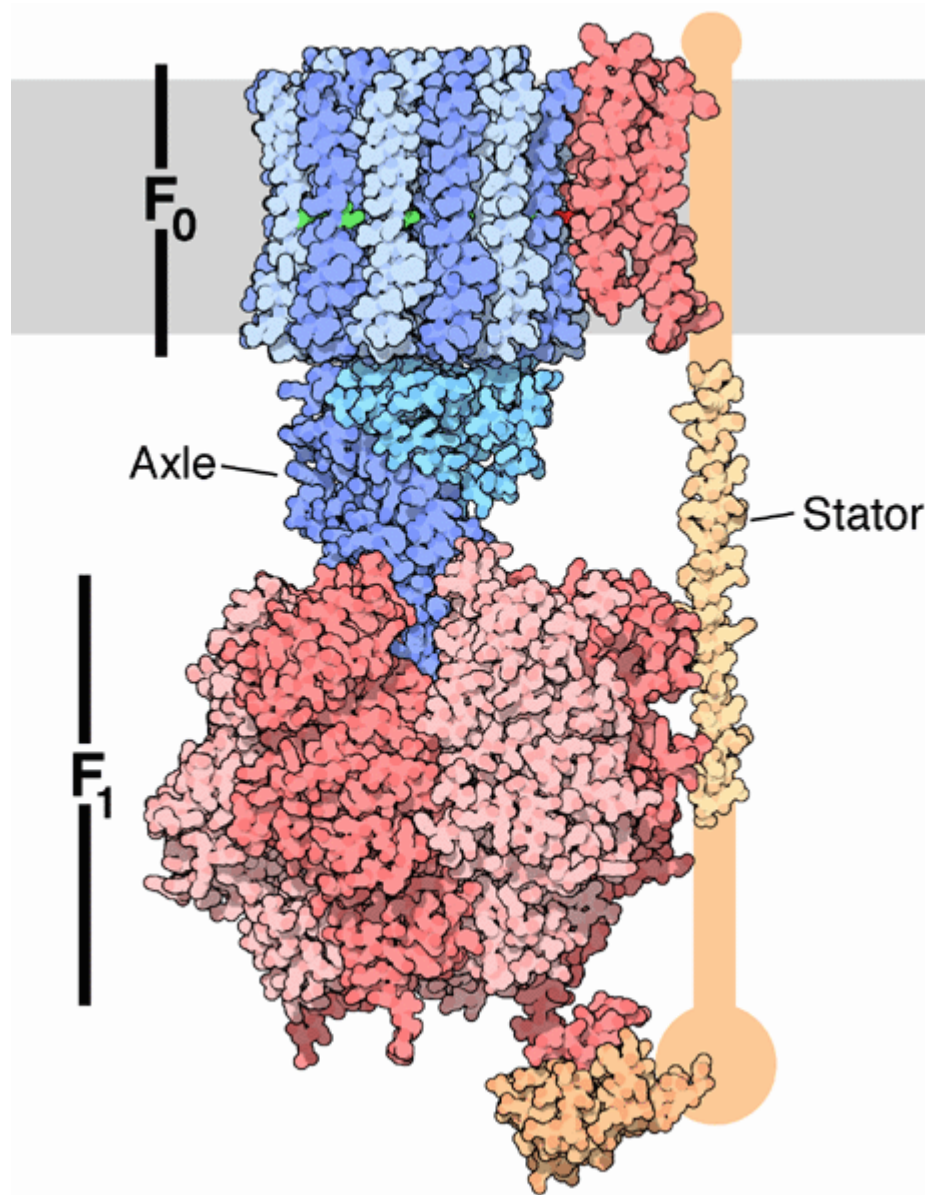
Rastogi & Girvin, Nature, 1999

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.

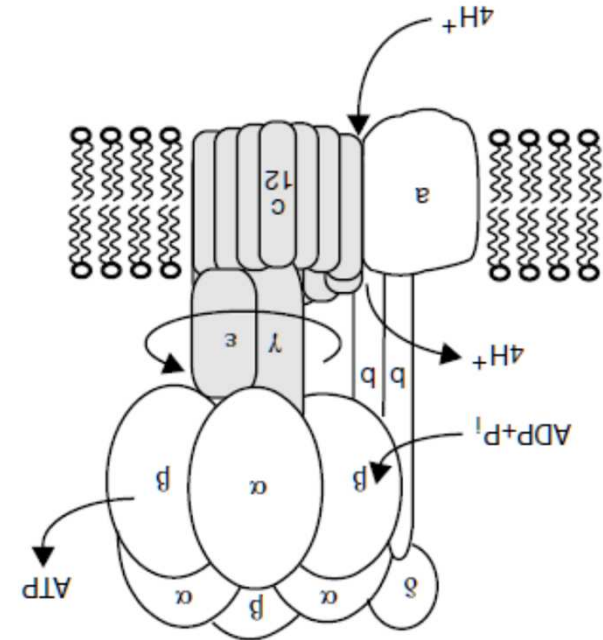




pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu (ve vodném prostředí by byl negativně nabitý, ale v prostředí lipidické membrány nikoli). Dochází k neutralizaci náboje – otočka.

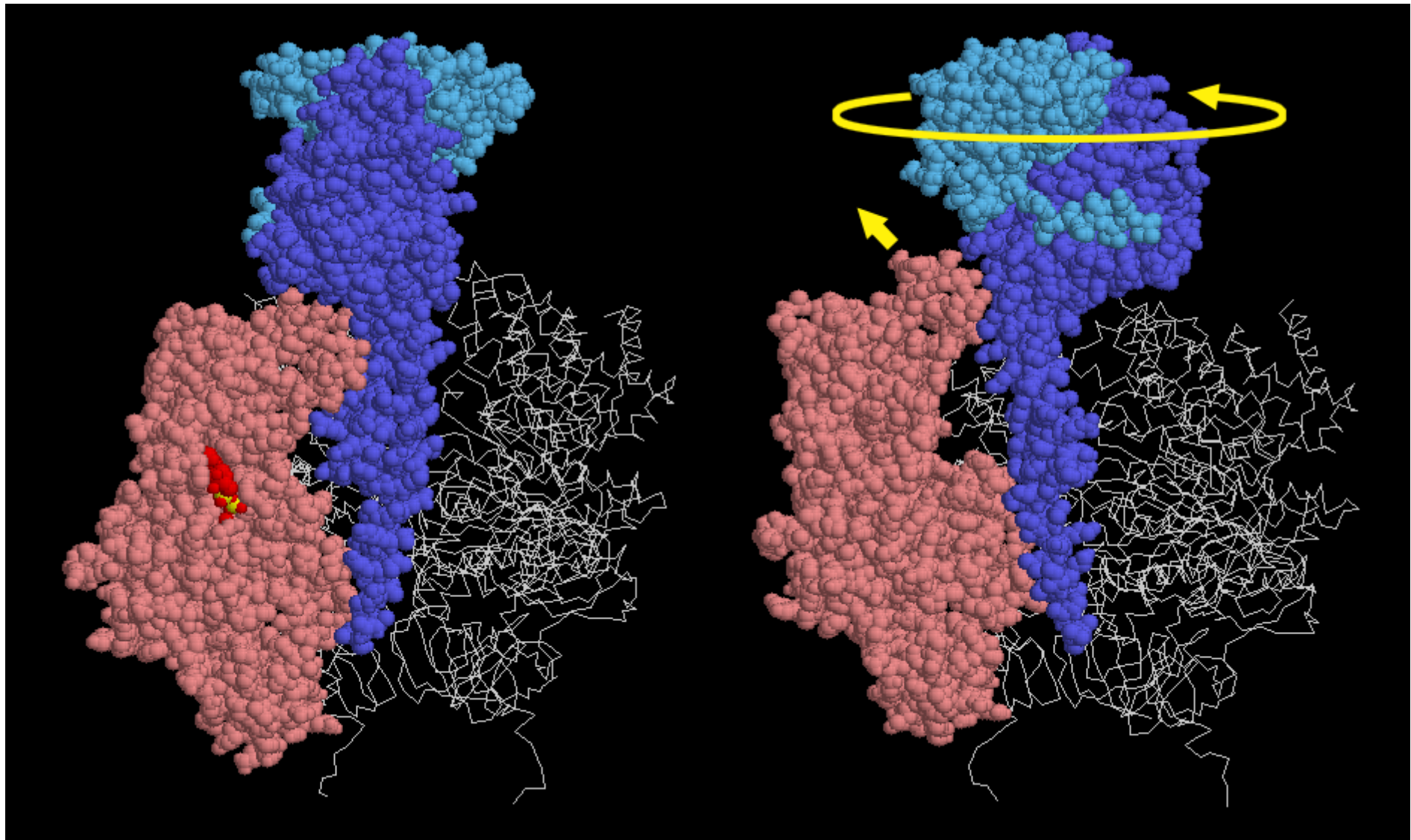


Molekula měsíce v prosinci 2005
Rastogi & Girvin, Nature, 1999



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 statorem.

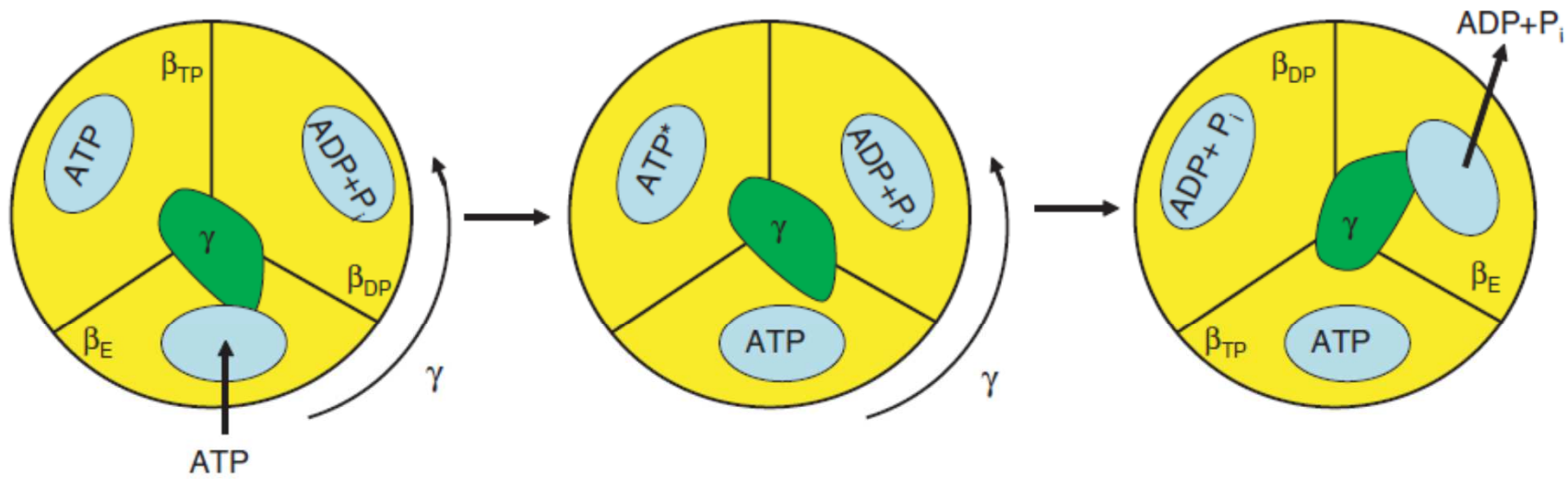
„ATP syntasa je jedním z divů molekulárního světa“. Je to dvojitý molekulární motor – „nanostroj“ – vyrábějící většinu ATP (energie).



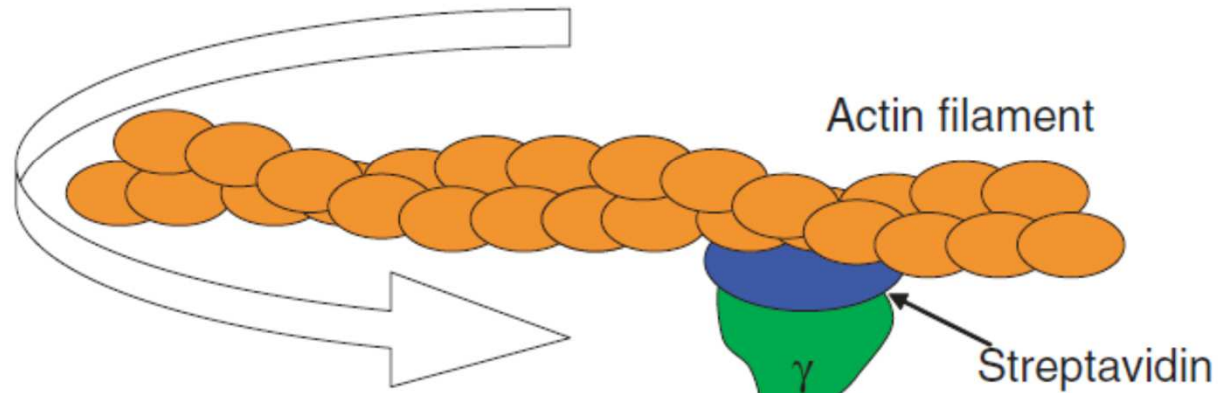
Při otočce osa tlačí na F1 motor (3 různé konformace)

– levý panel = konformace vhodná pro vazbu ADP

- pravý panel = ATP molekula byla vytlačena

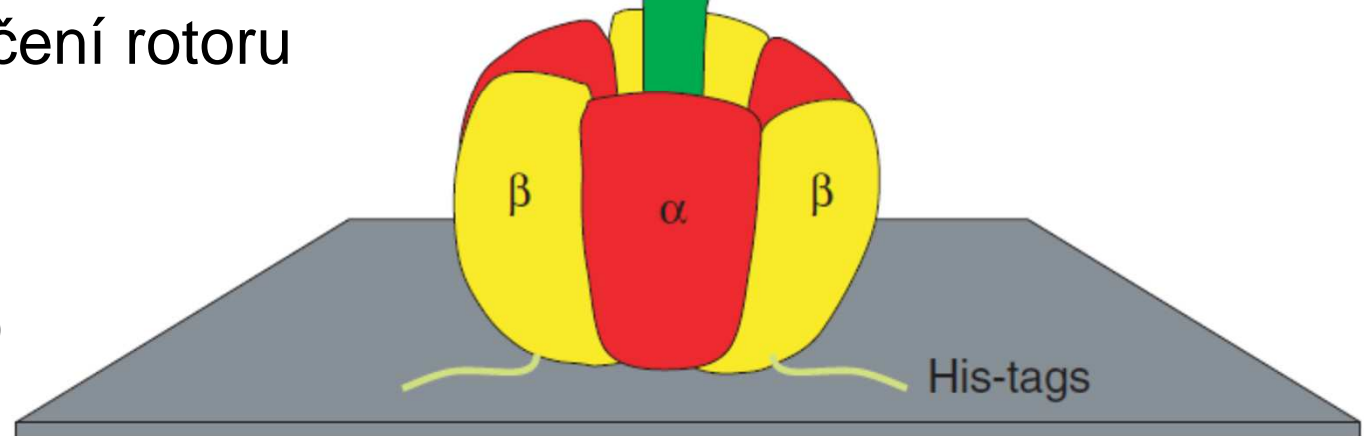


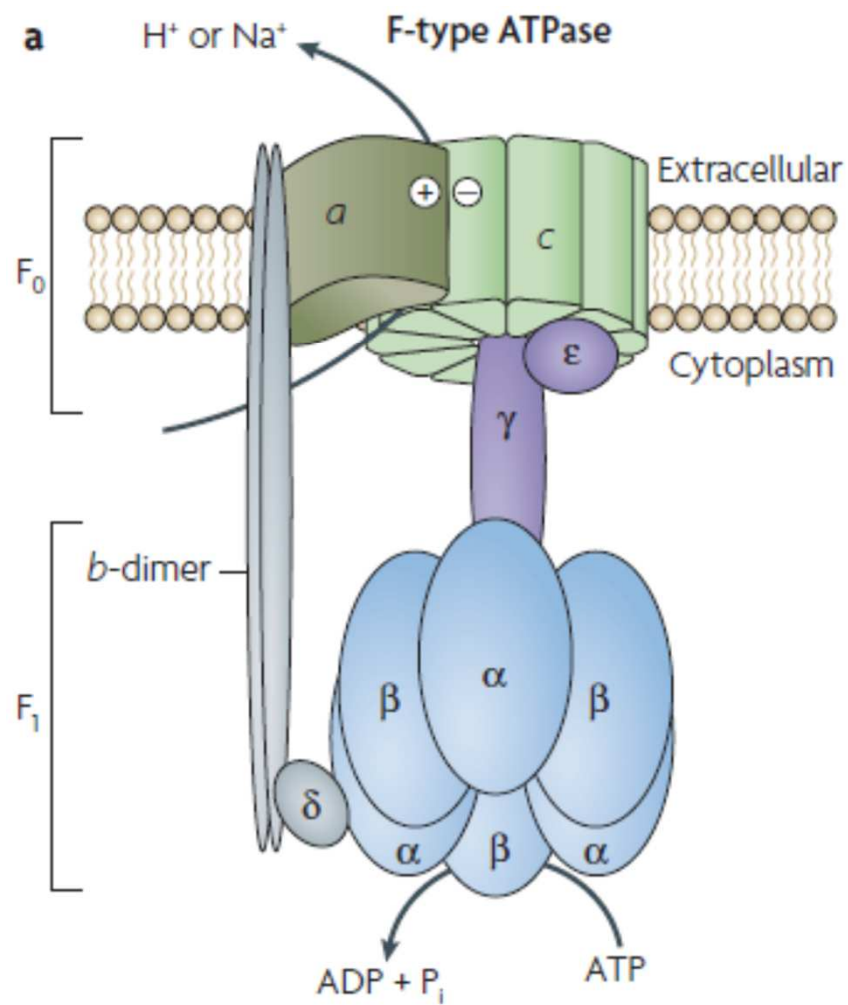
VIDEO



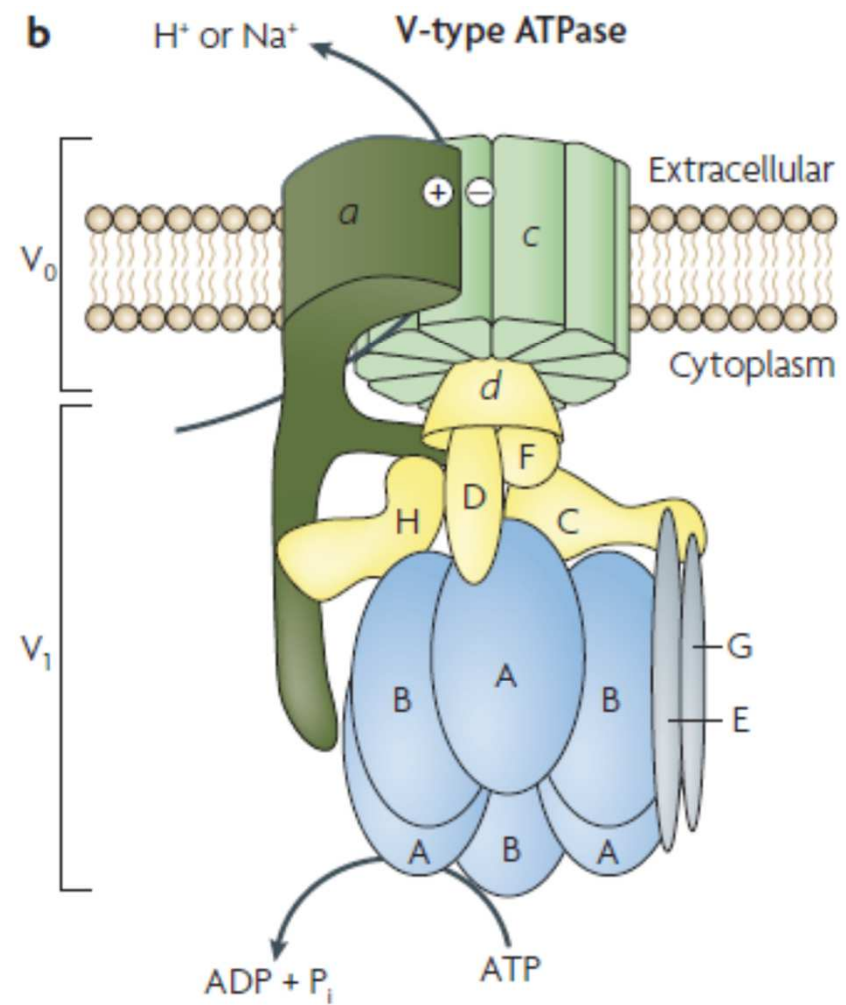
in vitro průkaz otáčení rotoru

Liljas, Structural Biology (kniha)

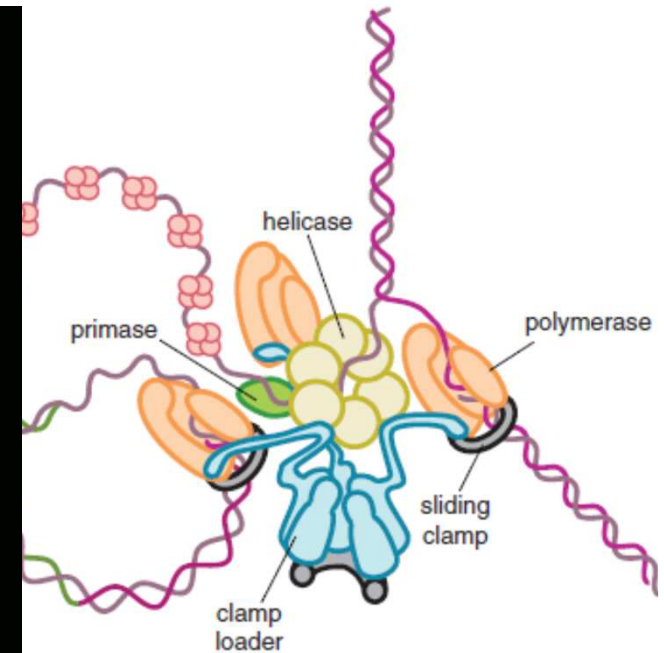




mitochondriální



vakuolární



Kelch et al, BMC Biol, 2012

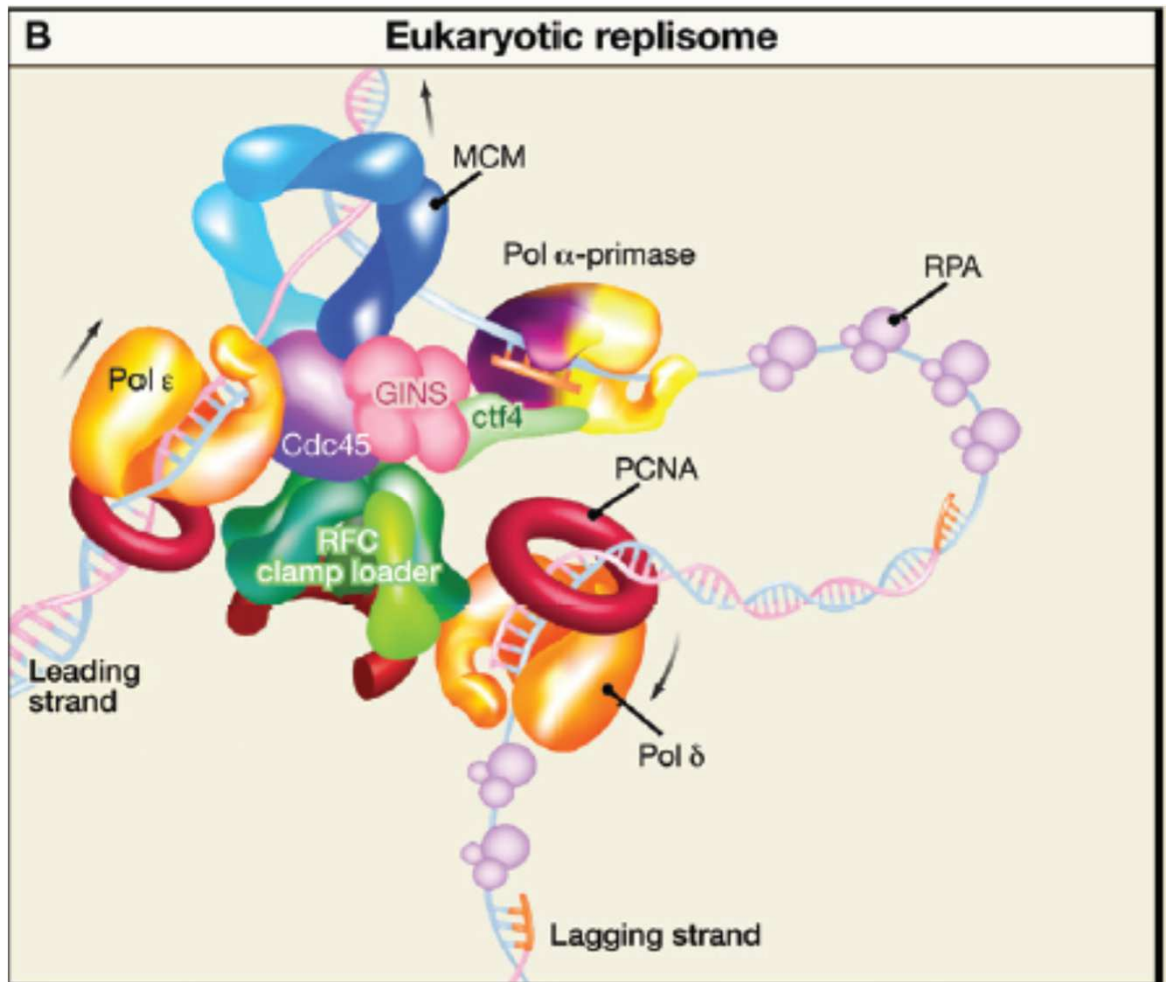
Replikace DNA (video): DNA helikasa “denaturuje” dvoušroubovici (modrá) – připojen je „clamp loader“ (šedá tlapka) - 2 raménka drží DNA polymerázy (fialové) spojené s PCNA („sliding clamp“, zelená). „Leading strand“ je syntetizován kontinuálně zatímco „lagging strand“ musí být primásou (žluto-zelená)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

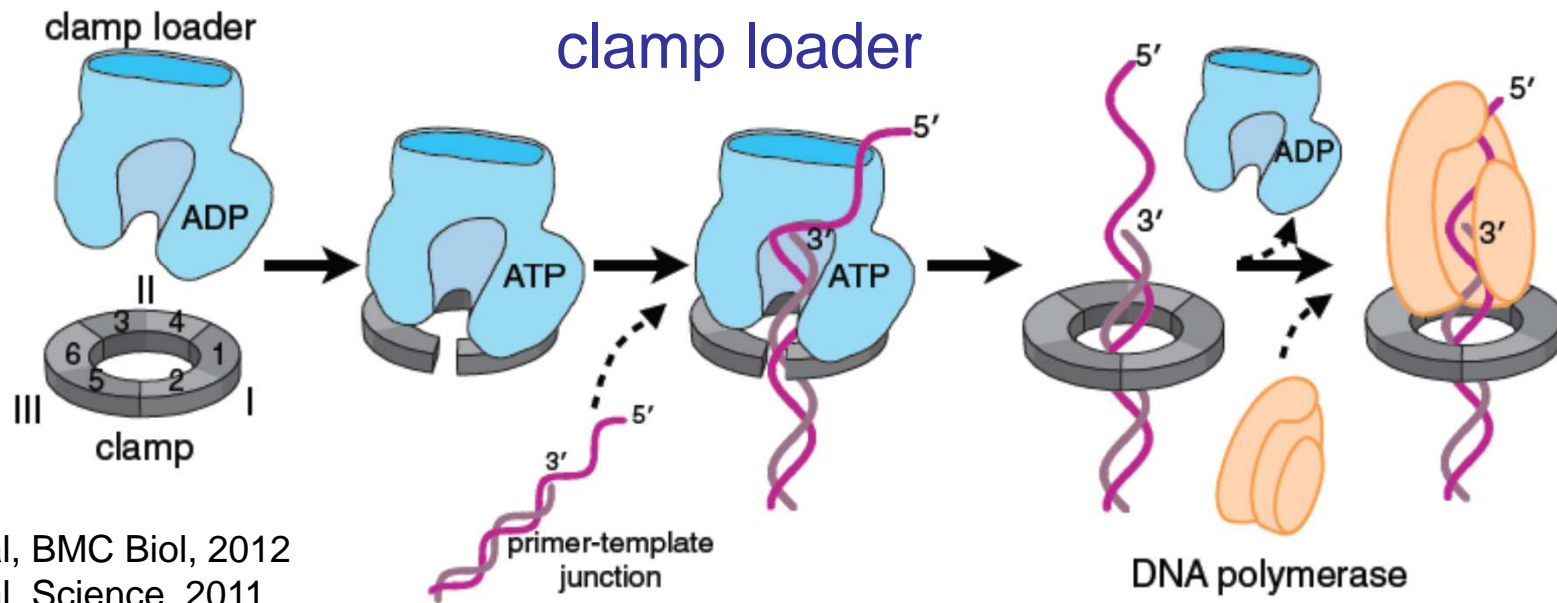
PCNA zvyšuje procesivitu DNA polymerás

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

PCNA zvyšuje procesivitu DNA polymerás

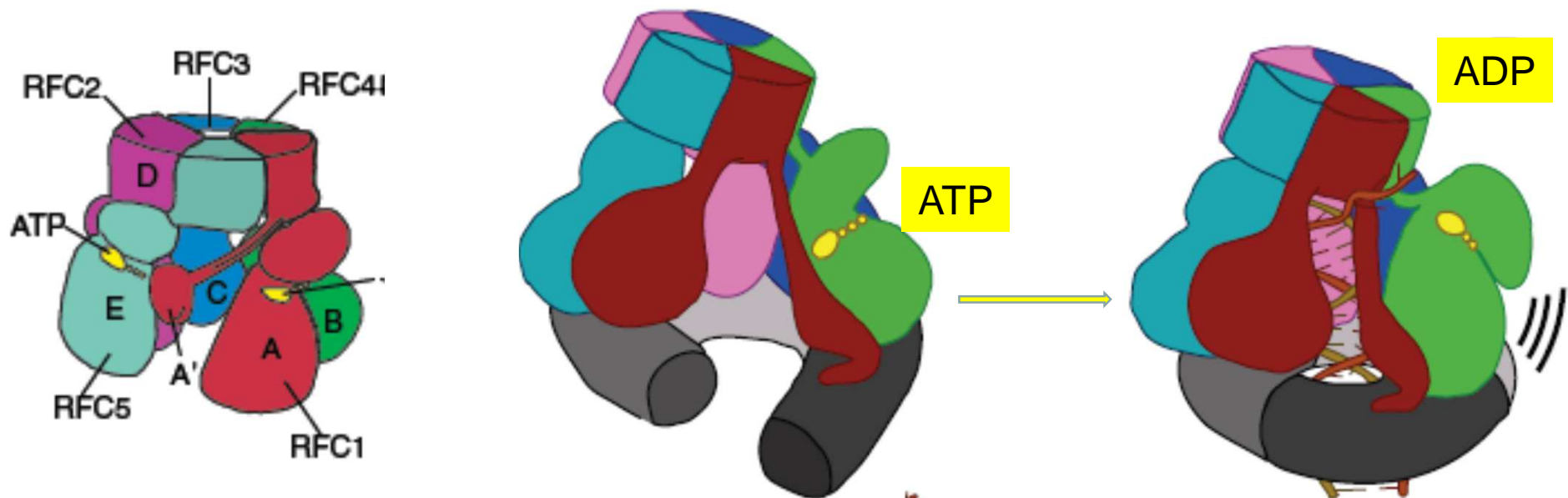
Replisome Components of Different Systems					
Component	T7 phage	T4 phage	<i>E. coli</i>	Eukaryotes	Archaea
Polymerase	gp5/ TRX	gp43	Pol III	Pol $\alpha/\delta/\epsilon$	Pol
Clamp	-	gp45	β	PCNA	PCNA
Clamp Loader	-	gp44/02	γ/δ complex	RFC	RFC
SSB	gp2.5	gp32	SSB	RPA	RPA
Primase	gp4	gp61	DnaG	Pol α -primase	Primase
Helicase	gp4	gp41	DnaB	MCM2-7/CMG	MCM
Other	?	gp59	?	GINS, Cdc45	?



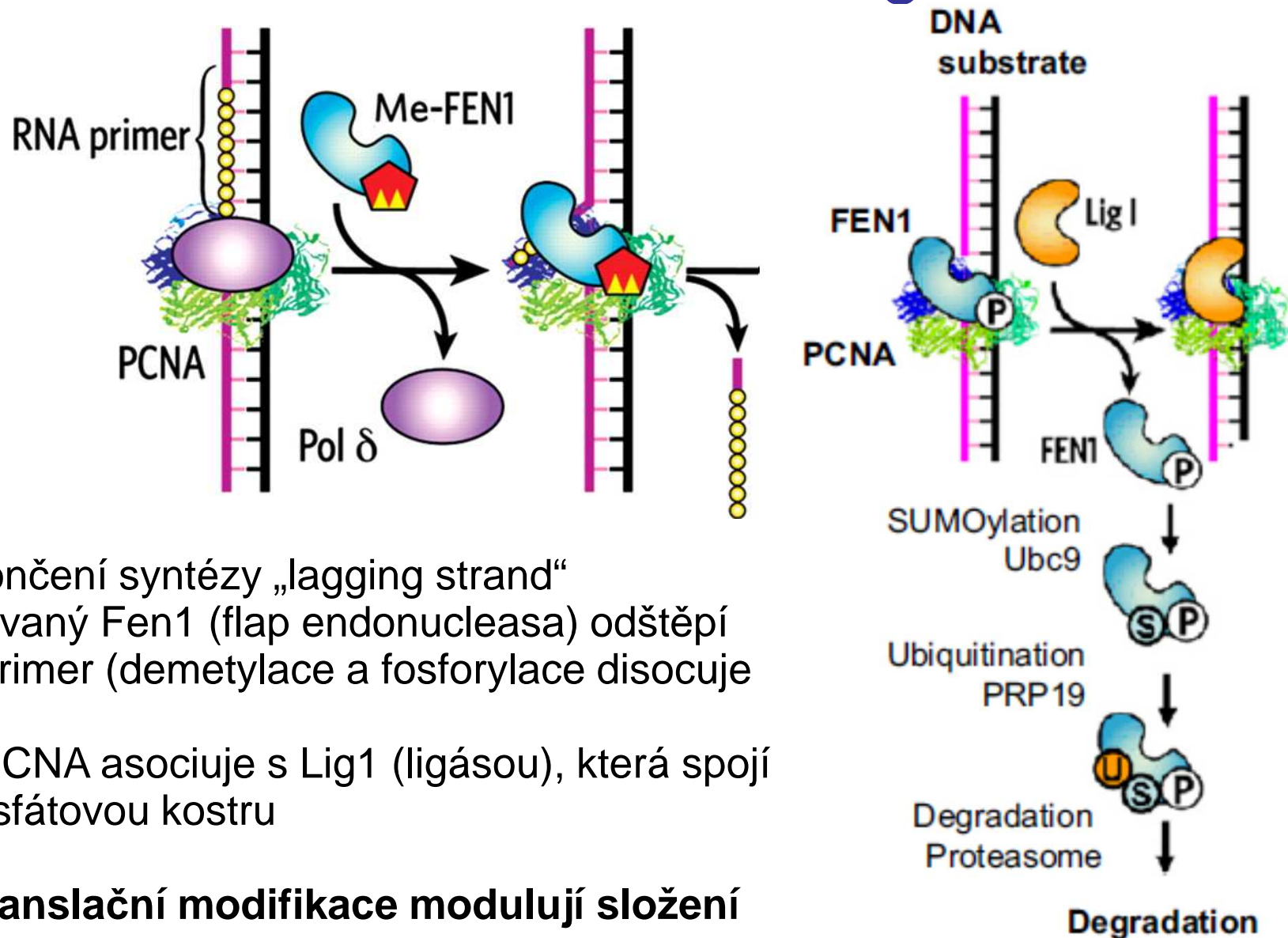


Kelch et al, BMC Biol, 2012
 Kelch et al, Science, 2011

Aktivovaný (ATP) clamp loader interaguje s PCNA a otevírá ji pro DNA. Vazba DNA stimuluje hydrolýzu ATP a uvolnění clamp loader (uzavřeného s DNA).



PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1

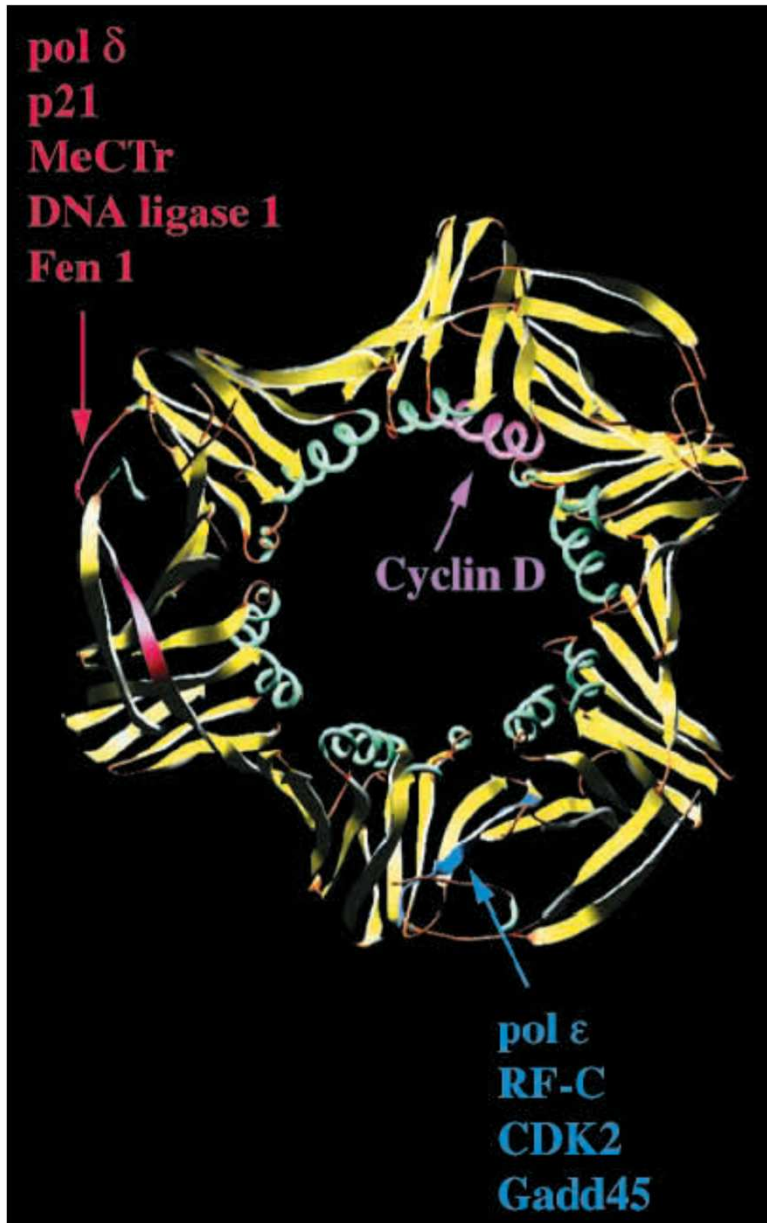


Po skončení syntézy „lagging strand“ metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) odštěpí RNA primer (demetylace a fosforylace disociuje Fen1)
Poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru

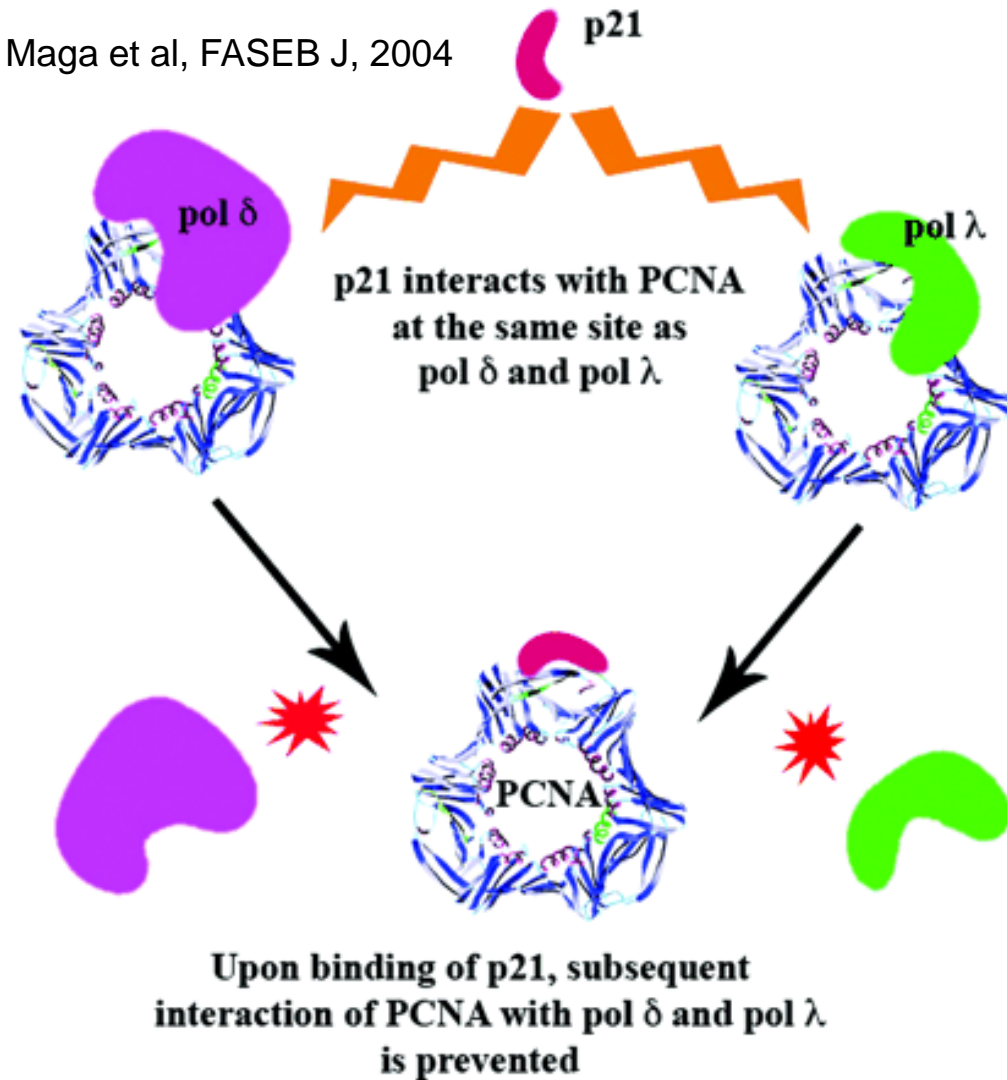
Posttranslační modifikace moduluje složení komplexu

Zheng a Shen, J Mol Cell Biol, 2011
Gao a spol, Mol Cell, 2012

PCNA – regulace buněčného cyklu



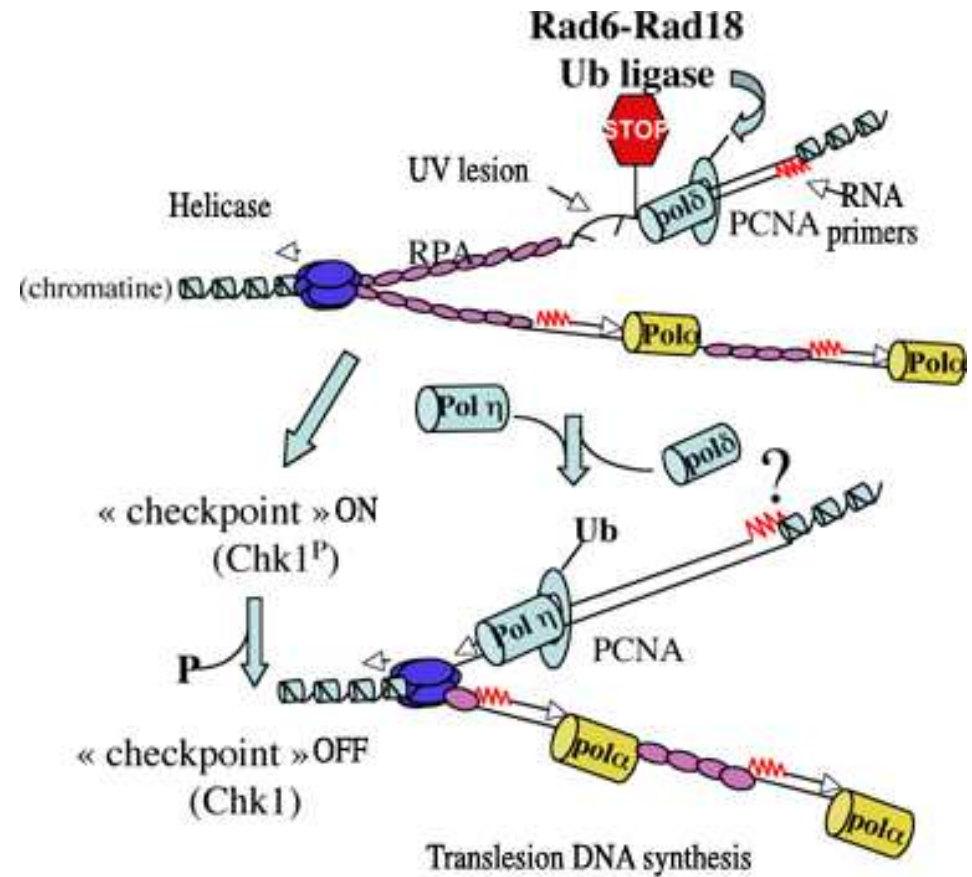
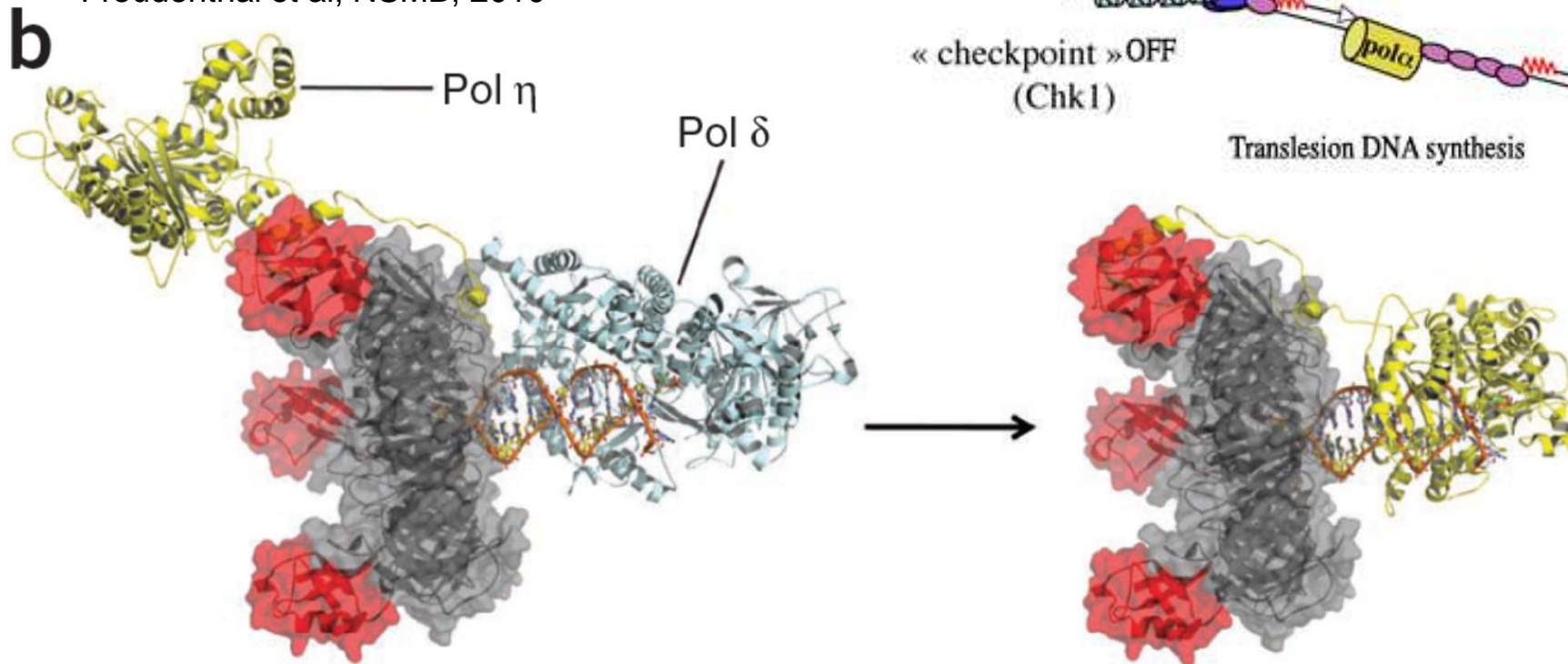
Maga et al, FASEB J, 2004



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

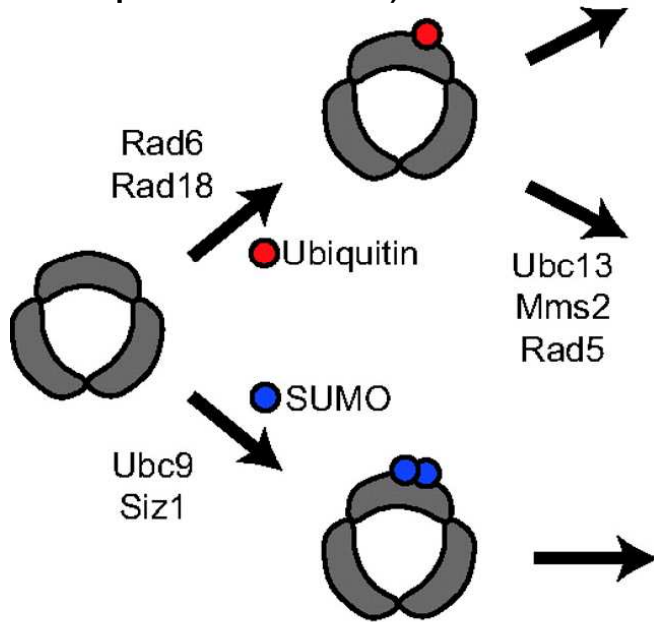
Pokud je DNA poškozená, pol δ se zastaví a je třeba poškození nejdříve opravit – jednou z možností je „zastoupení“ jinou polymerásou, která poškozené místo „toleruje“ a překopíruje (translesion synthesis) – přepíná se ubiquitylací PCNA (na „zadní straně“) - TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují PIP a UBM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

Freudenthal et al, NSMB, 2010



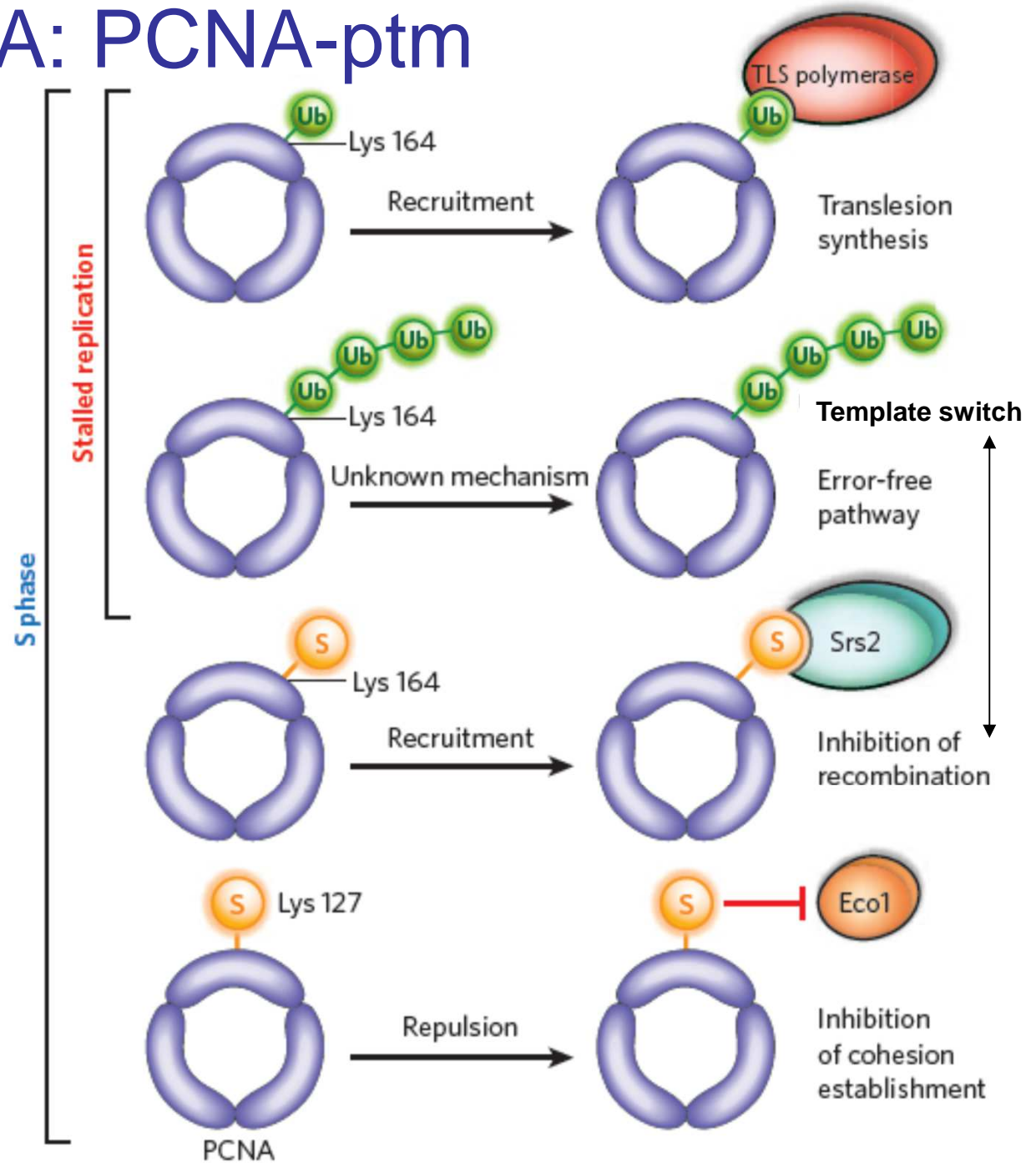
Oprava DNA: PCNA-ptm

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

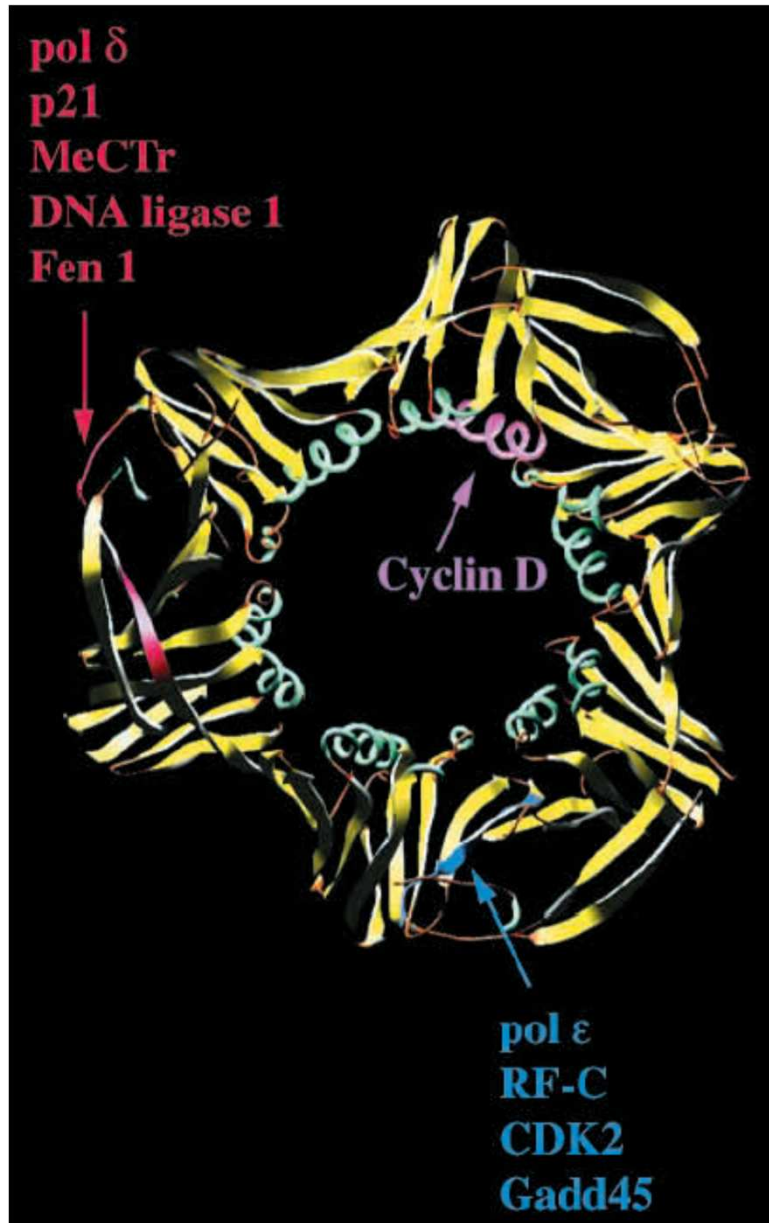


Srs2 (antirekombinása) obsahuje SIM (nedovolí rekombinaci v průběhu replikace)

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



PCNA – moduly

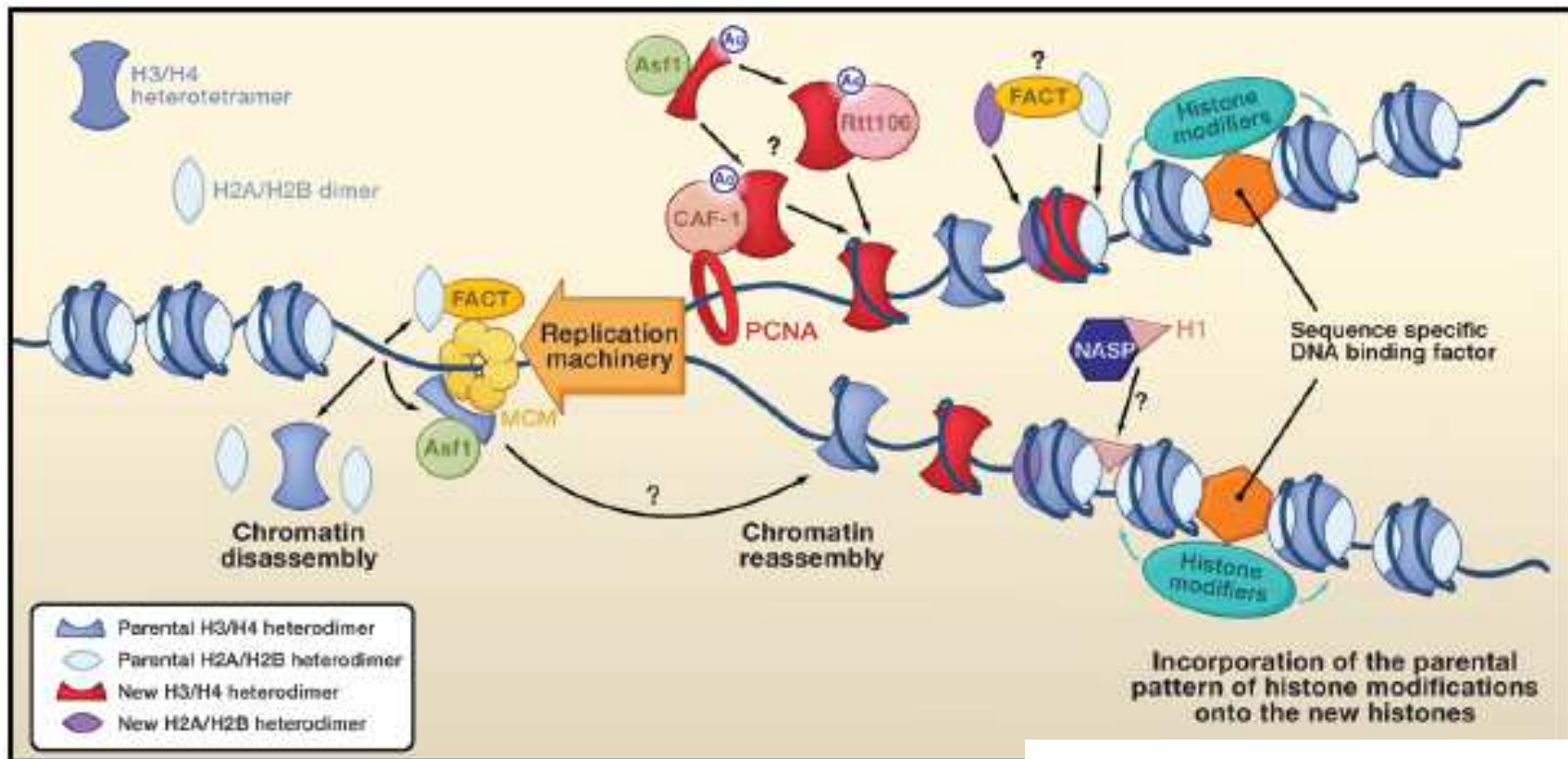


PCNA je „jádrem“ pro mnoho „attachments“
tj. s mnoha funkčními moduly

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

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

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



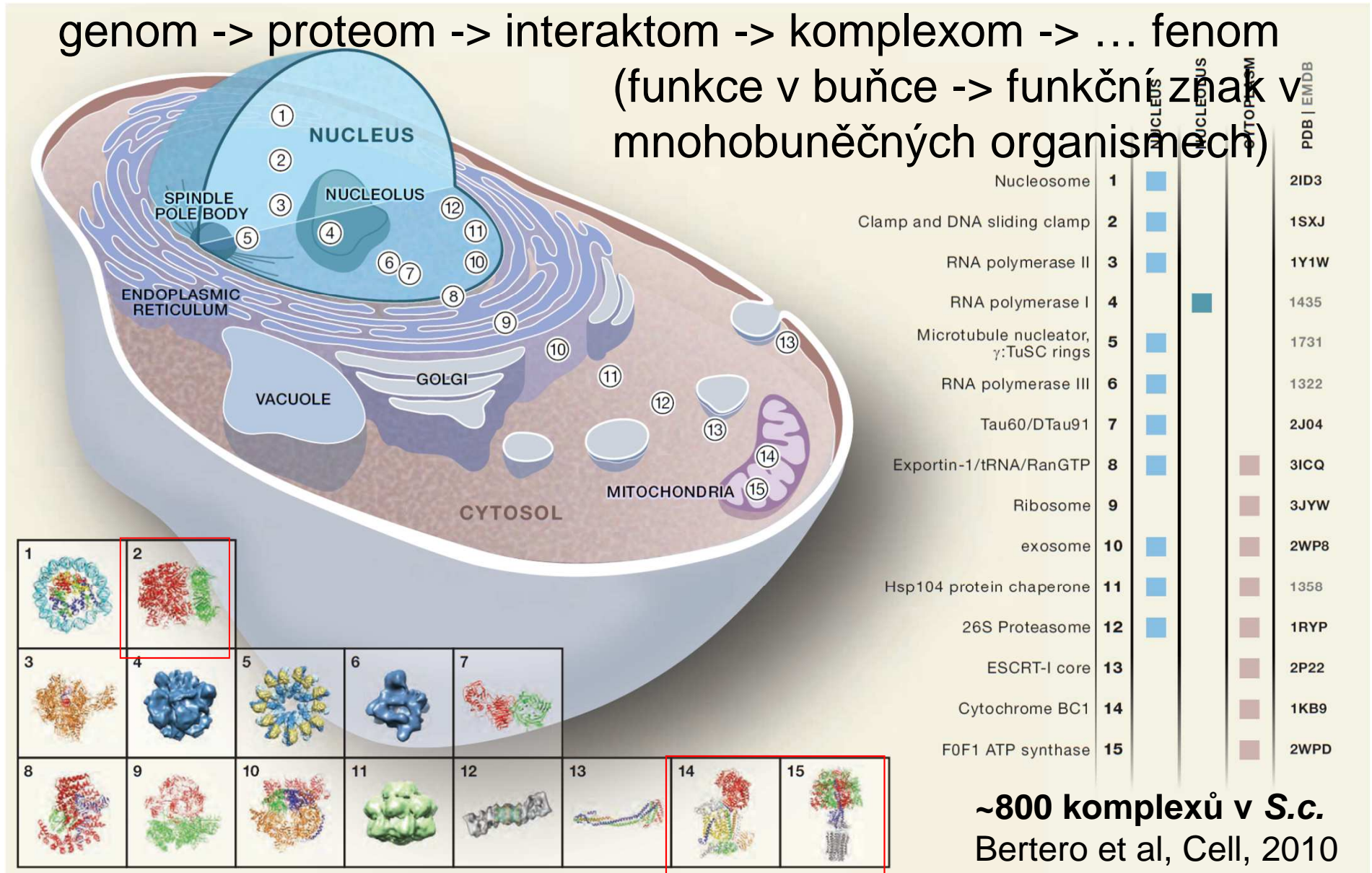
PCNA asociuje s CAF1 (chromatin assembly factor) a pomáhá znovunavázání histonů (nukleosomů) a vzniku chromatinu

PCNA je “swiss-army knife” typ proteinového komplexu



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

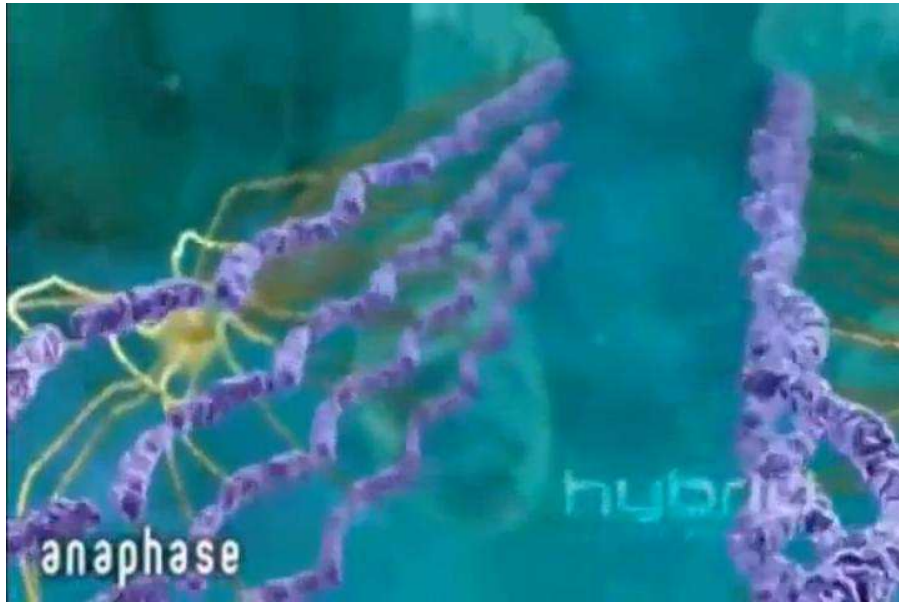
genom -> proteom -> interaktom -> komplexom -> ... fenom
 (funkce v buňce -> funkční znak v
 mnohobuněčných organismech)



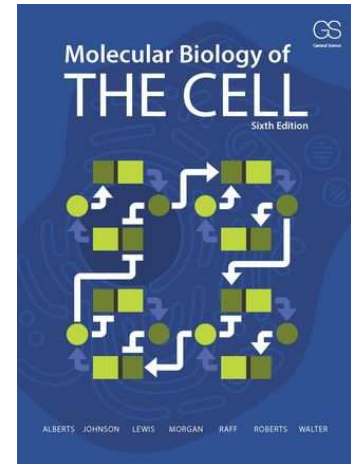
~800 komplexů v S.c.
 Bertero et al, Cell, 2010

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



Průběh mitózy
(mikrotubuly,
chromosomy)



You can find many more examples of protein complexes in this book: Alberts et al, Molecular biology of the cell, 2014 (6th edition)

Více: <http://www.molecularmovies.com/learning/>
<http://www.hhmi.org/biointeractive/explore-animations>

C9041 – Struktura a funkce eukaryotických chromosomů
Prof. Jiří Fajkus
CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů
Doc. Jan Paleček