



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

- **Proteinové interakce – 24.10.**
  - jak spolu proteiny interagují?
  - interaktom
- **Proteinové komplexy – 31.10.**
  - protein-proteinové interakce a komplexy
  - komplexom, architektura a funkce komplexů

doc. Jan Paleček  
jpalecek@sci.muni.cz

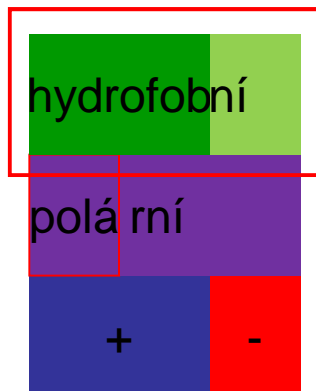
**CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů**

**CG031 – cvičení z modelování proteinových komplexů  
(jarní semestr)**

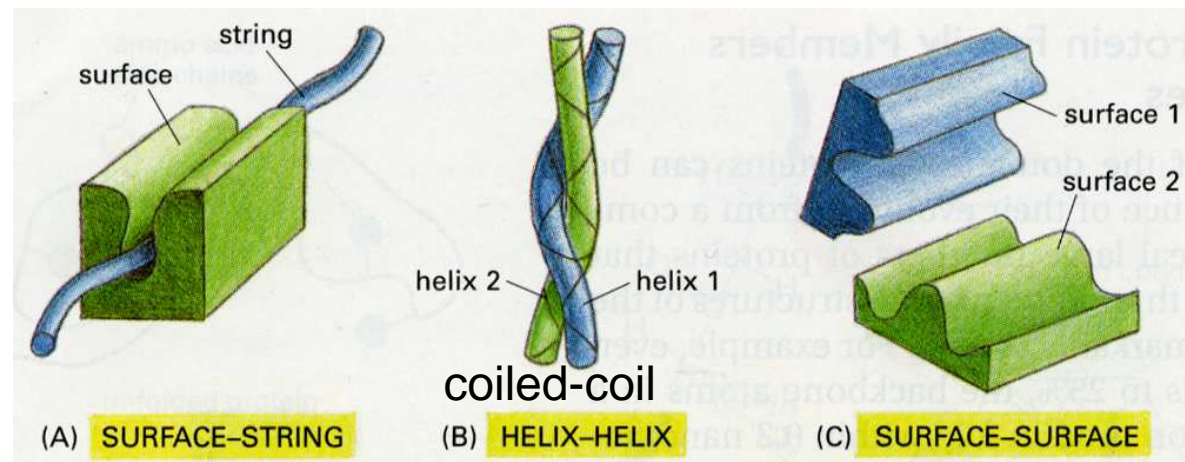
# Souhrn - protein-proteinové interakce

- proteiny jsou troj-rozměrné - mají různé tvary a více domén => mají více vazebných míst na povrchu => komplexy a "sítě"
- části proteinů/domény/motivy interagují s partnery
  - 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: ...)

primární struktura

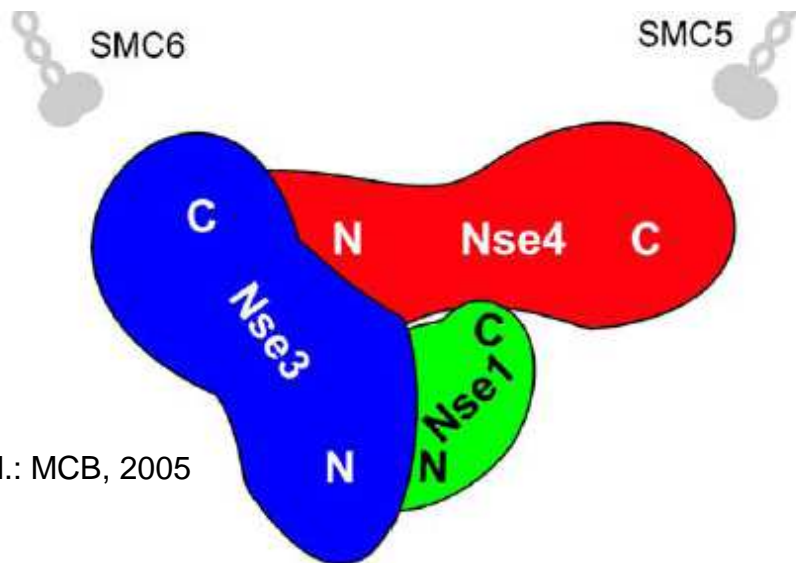


sekundární a terciární struktura

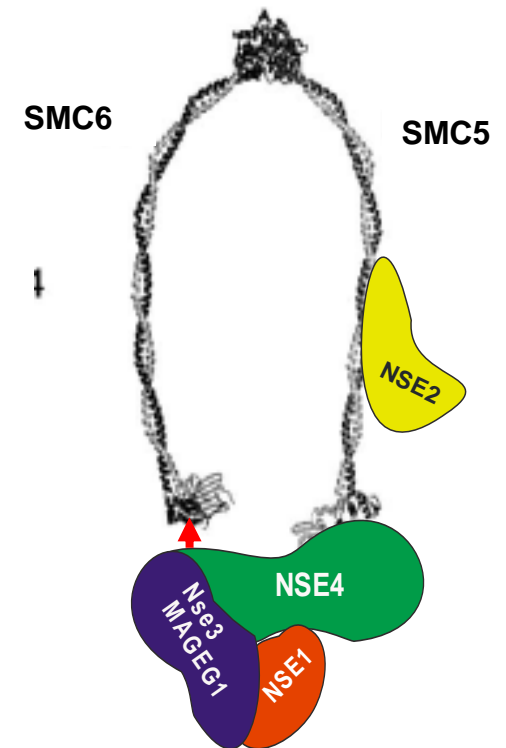


## ... kvarterní struktura

- více povrchů jednoho proteinu interaguje s více partnery
- vzájemné interakce více proteinů vytváří větší povrchy a vzájemně se stabilizují – vzniká pevný (kvarterní) komplex

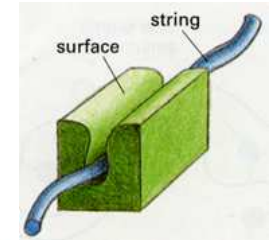
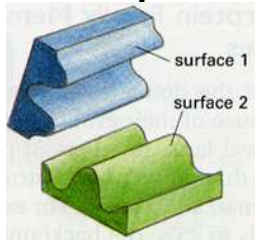


Sergeant et al.: MCB, 2005



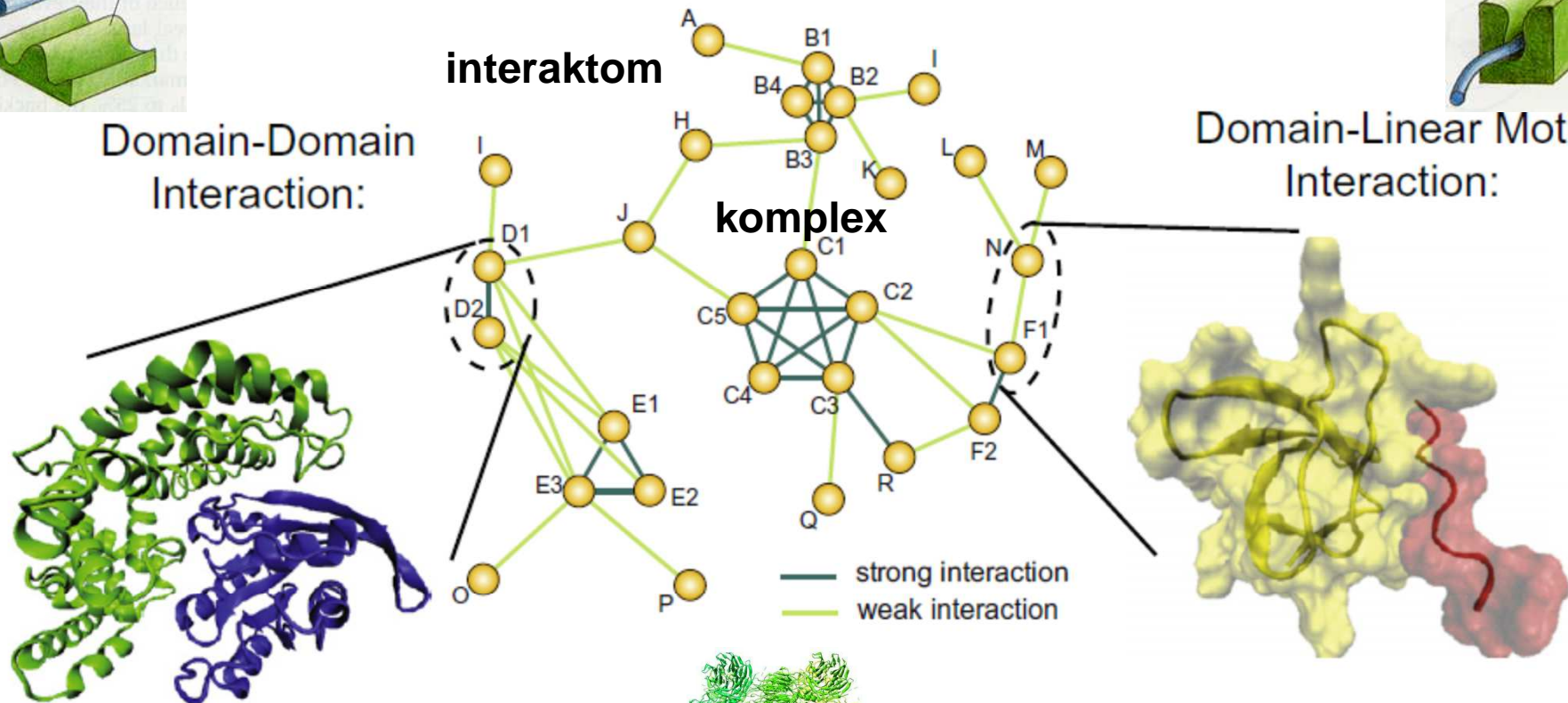
# Protein-proteinové interakce

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

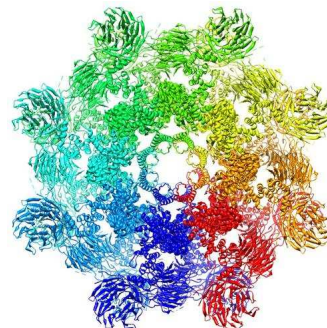


Domain-Domain Interaction:

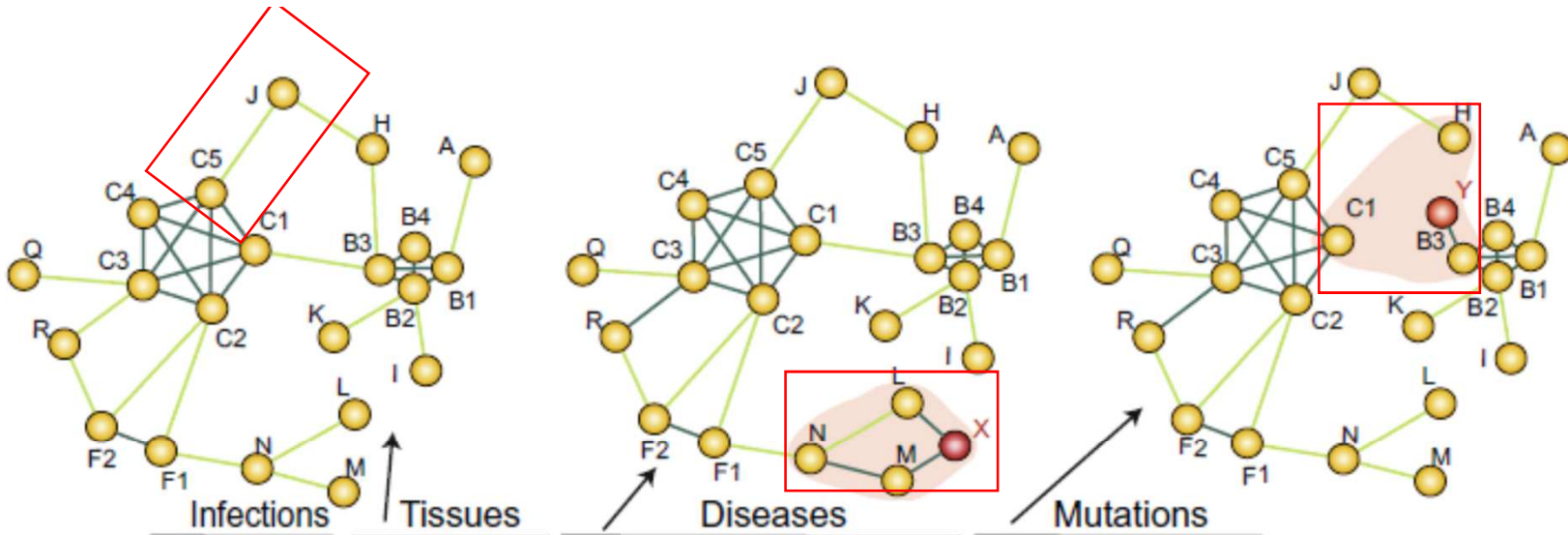
Domain-Linear Motif Interaction:



- 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



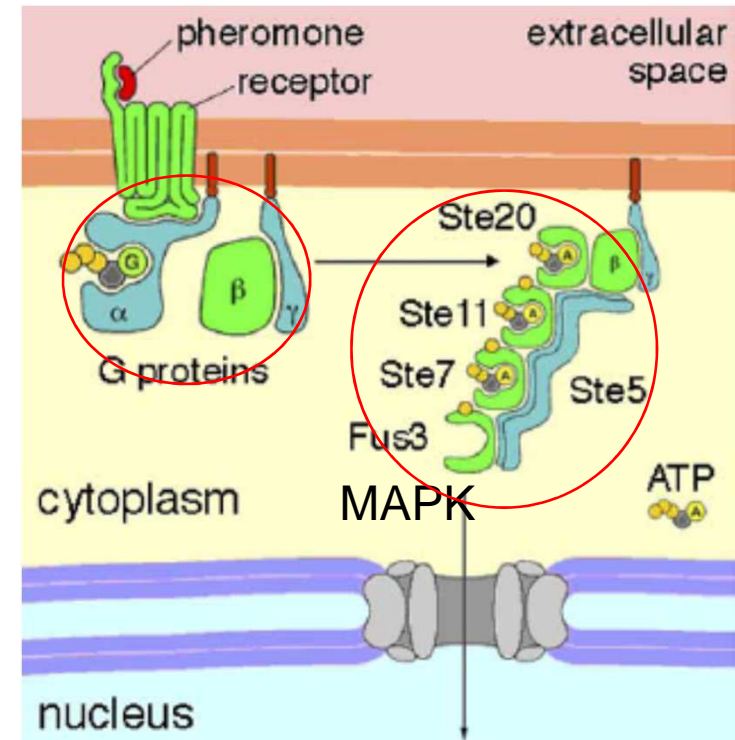
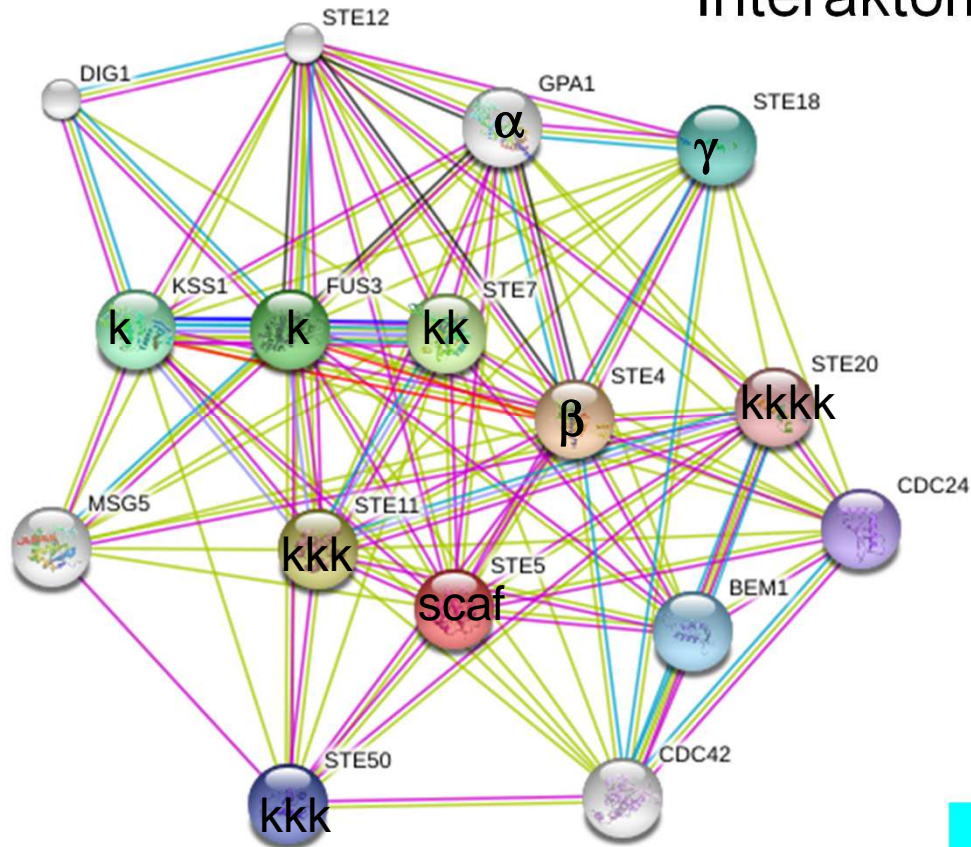
Protein interaction pairs	Infections	Tissues	Diseases	Mutations
B1-A	strong	strong	strong	strong
B1-B2	strong	strong	strong	strong
B1-B2	strong	strong	strong	strong
B1-B4	strong	strong	strong	strong
B2-B3	strong	strong	strong	strong
B2-B4	strong	strong	strong	strong
B3-B4	strong	strong	strong	strong
B2-I	strong	strong	strong	strong
B2-K	strong	strong	strong	strong
B3-C1	strong	strong	strong	strong
B3-H	strong	strong	strong	strong
H-J	strong	strong	strong	strong
C5-J	strong	strong	strong	strong
C2-F1	strong	strong	strong	strong
C2-F2	strong	strong	strong	strong
C3-R	strong	strong	strong	strong
C3-Q	strong	strong	strong	strong
F1-F2	strong	strong	strong	strong
F1-N	strong	strong	strong	strong
N-L	strong	strong	strong	strong
N-M	strong	strong	strong	strong
X-M	strong	strong	strong	strong
X-L	strong	strong	strong	strong
B3-Y	strong	strong	strong	strong
F2-R	strong	strong	strong	strong
C1-C2	strong	strong	strong	strong
C1-C3	strong	strong	strong	strong

Sít' neznamená komplex (hůře popisuje stabilní komplexy, ale lépe popisuje vztahy)

**modulování interakcí** – inhibice (virovými proteiny, mutacemi) vs nové interakce  
 Srovnání interaktomů => konzerv. interakcí (=> evoluce komplexů => evoluce organismů)

# Regulace/modulace interakcí

Interaktom x komplexom

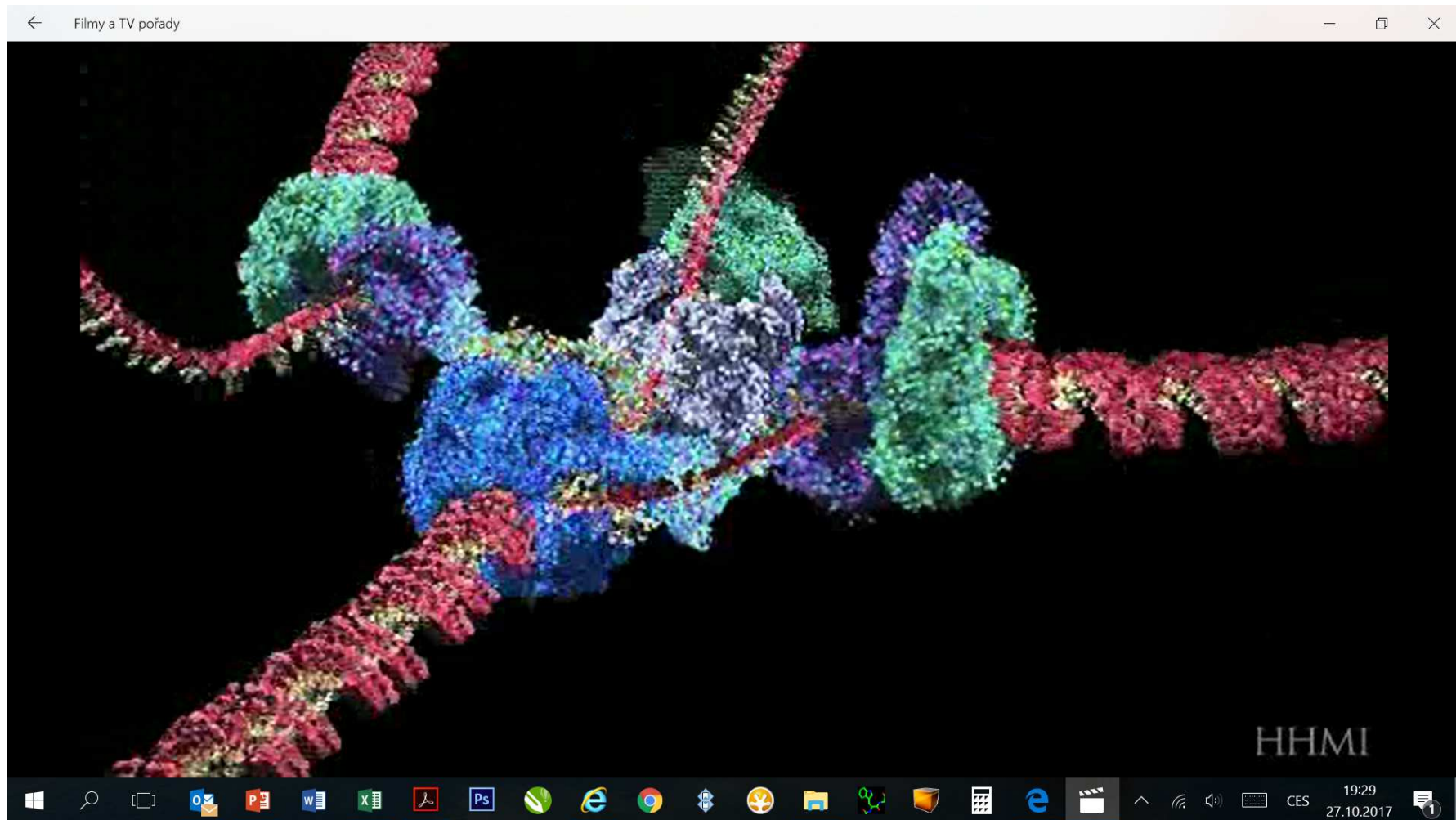


G-proteiny ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) disociují a následně interagují ( $\beta$ ) se scaffold proteinem Ste5 ... Fus3 relokalizuje do jádra a aktivuje Ste12

Síť neznamená komplex (hůře popisuje stabilní komplexy, ale lépe popisuje vztahy)

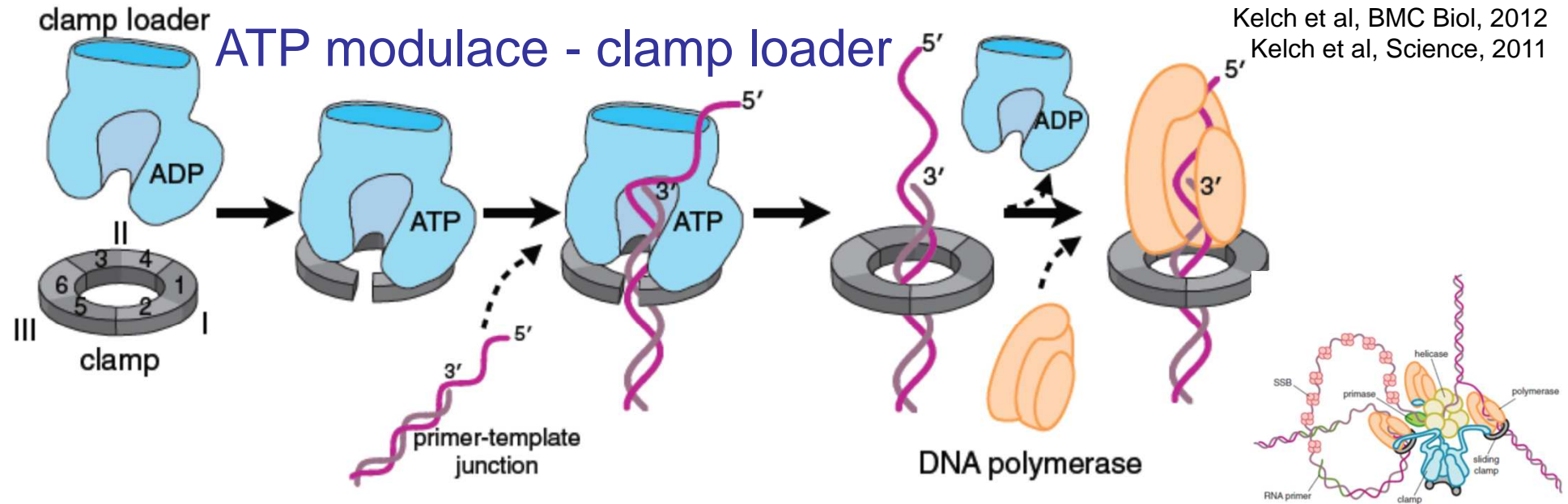
- PPI „přiblíží“ proteiny vs difuze
- koordinované předávání signálů, substrátů ...
- ligandy, PTM ... **modulují** PPI ... procesy

# Dynamika komplexů - PPI

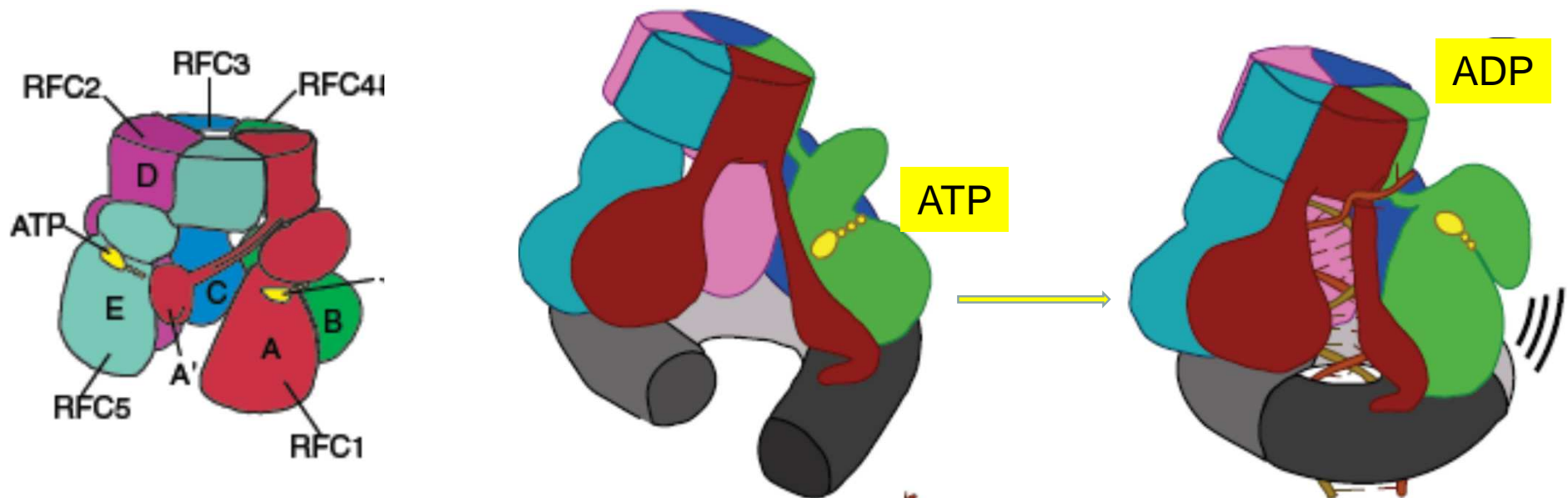


Replikace DNA (video): DNA helikasa “denaturuje” dvoušroubovici (modrá) – připojen je „clamp loader“ (šedá tlapka) - 2 raménka drží DNA polymerázy (fialové) spojené s **PCNA** („sliding clamp“, zelená). „Leading strand“ je syntetizován kontinuálně zatímco „lagging strand“ musí být primásou (žluto-zelená)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

DNAi\_replication\_vo2-lg

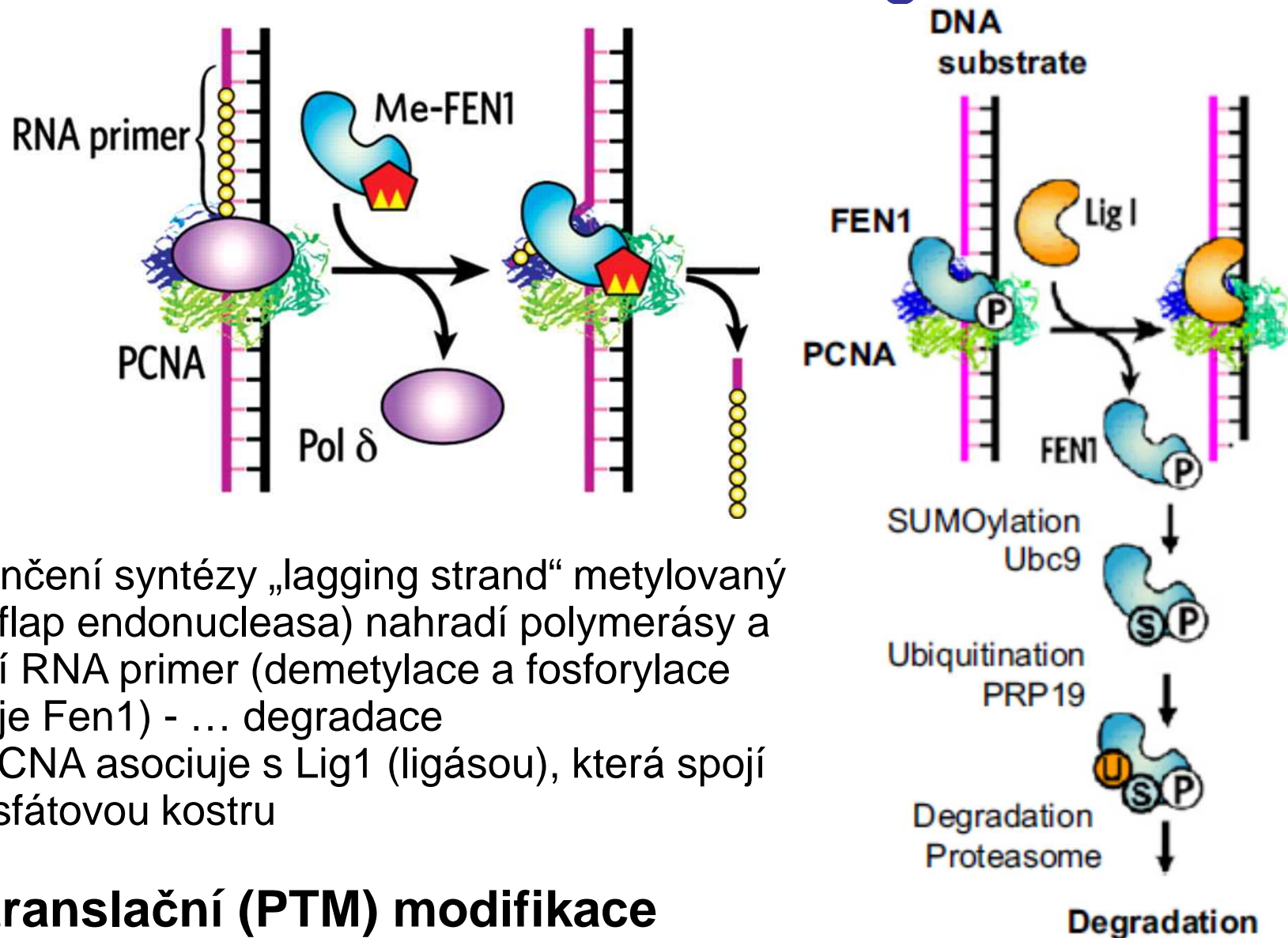


Aktivovaný (ATP) clamp loader interaguje s PCNA a otevírá ji pro DNA. Vazba DNA stimuluje hydrolýzu ATP a uvolnění clamp loader (uzavřeného s DNA).





# PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1

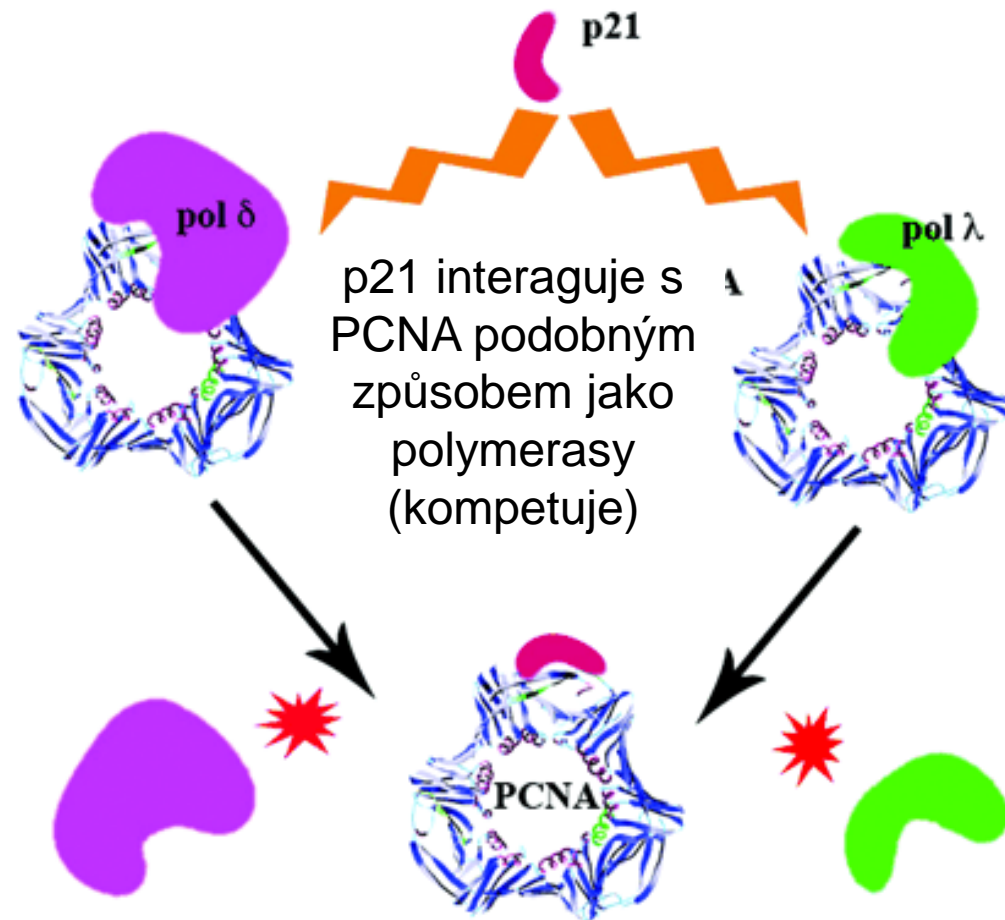
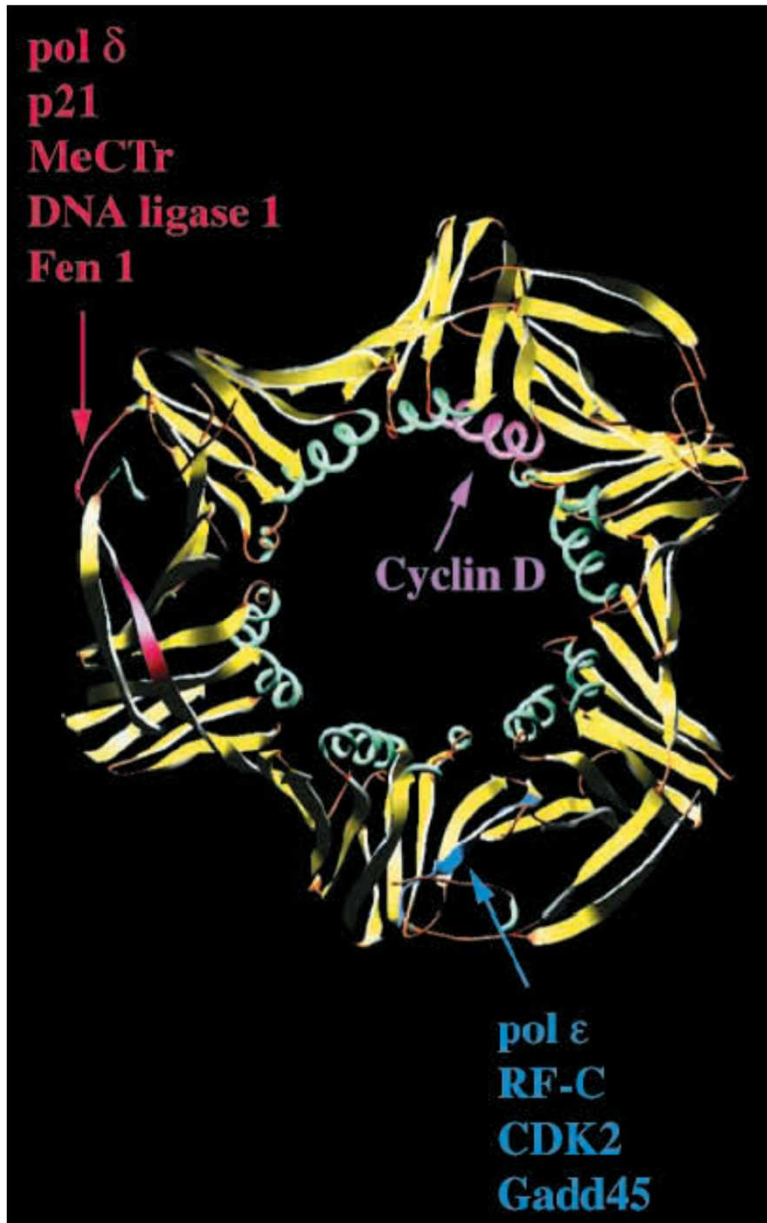


po skončení syntézy „lagging strand“ metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) nahradí polymerázy a vyštěpí RNA primer (demetylace a fosforylace disociuje Fen1) - ... degradace poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru

**Posttranslační (PTM) modifikace moduluje složení komplexu**

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

# PCNA – regulace buněčného cyklu



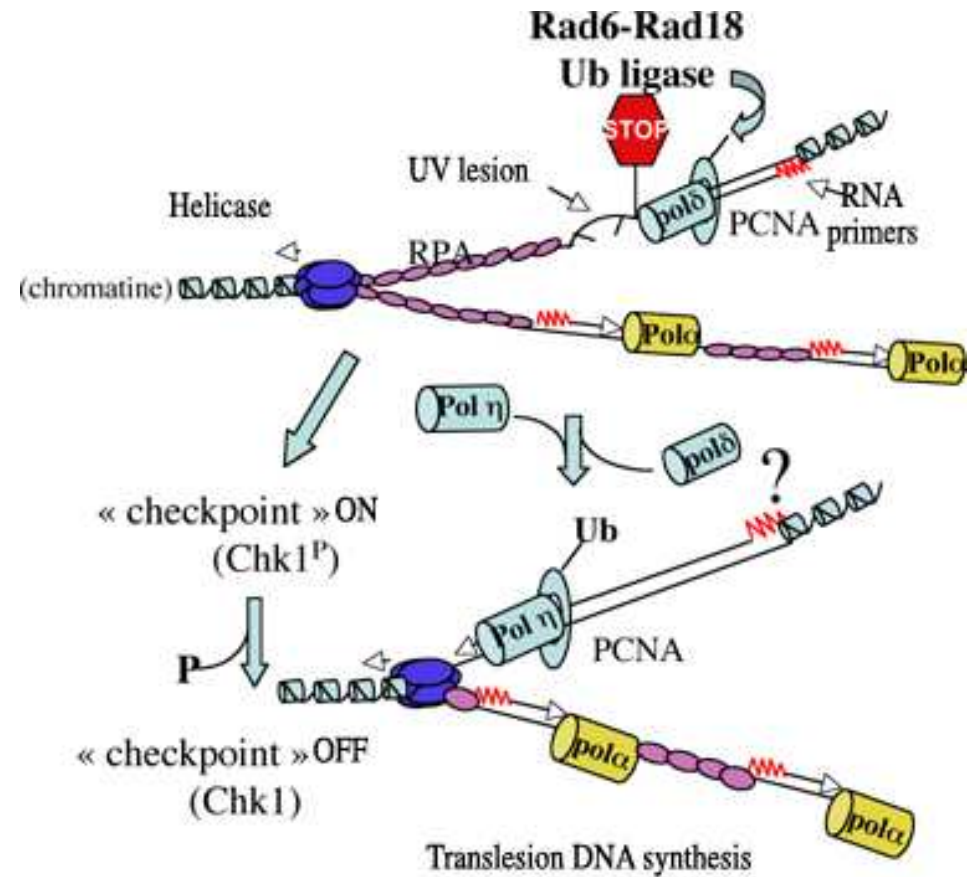
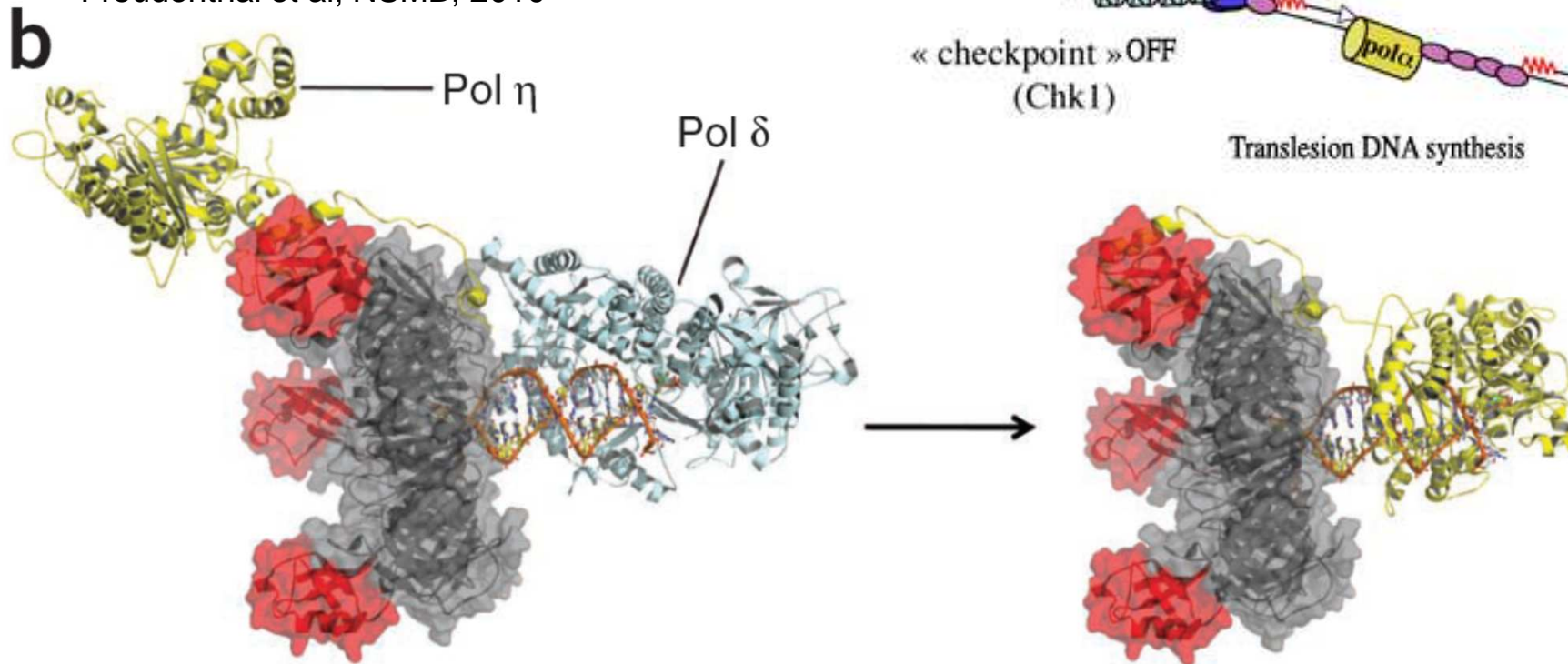
Maga et al, FASEB J, 2004

p21 blokuje přístup polymerás – zastaví se replikace a buněčný cyklus v S fázi

p21 je upregulován nádorovým supresorem p53 (v případě poškození DNA ...)

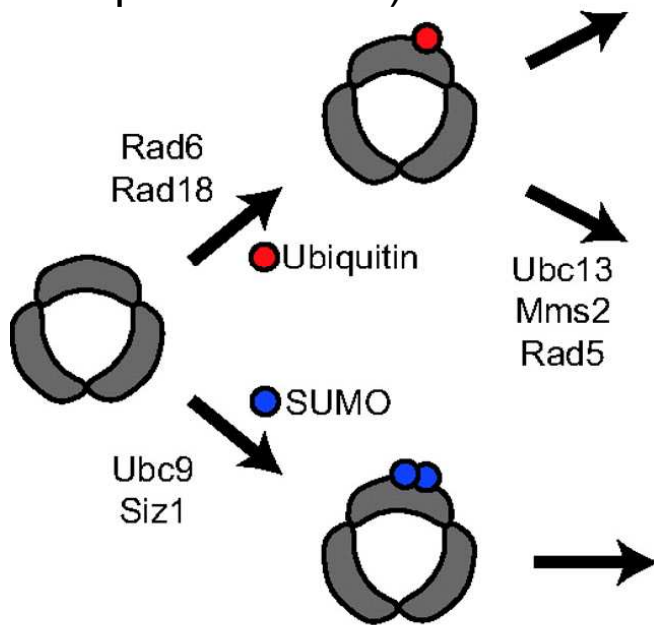
pokud je **DNA poškozená**, pol $\delta$  se zastaví a je třeba poškození nejdříve opravit – jednou z možností je „zastoupení“ jinou polymerásou, která poškozené místo „toleruje“ a překopíruje (translesion synthesis) – přepíná se ubiquitylací PCNA (na „zadní straně“) - TLS polymerasy ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ) obsahují PIP a UBM motivy pro interakce s Ubi-PCNA

Freudenthal et al, NSMB, 2010



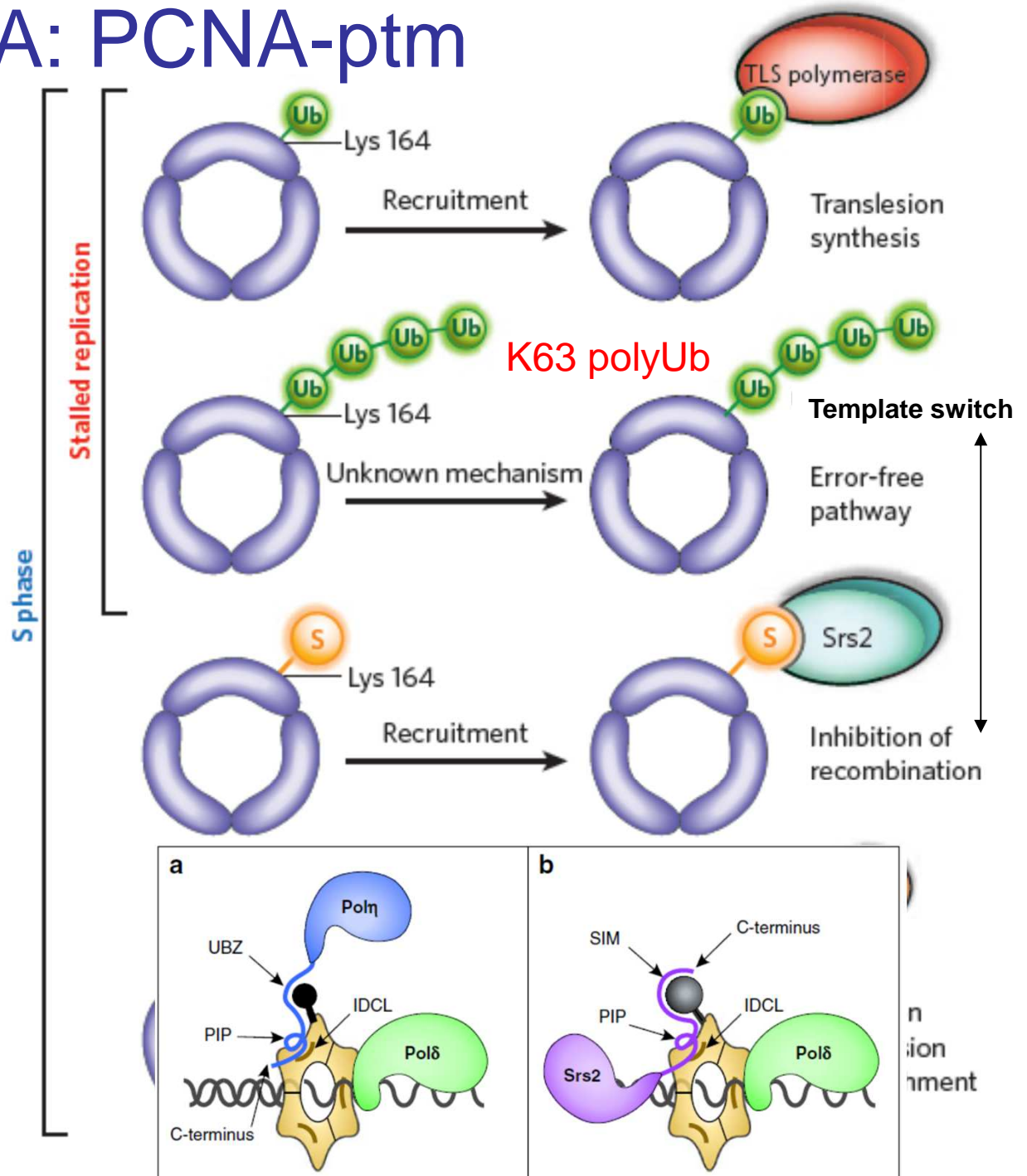
# Oprava DNA: PCNA-ptm

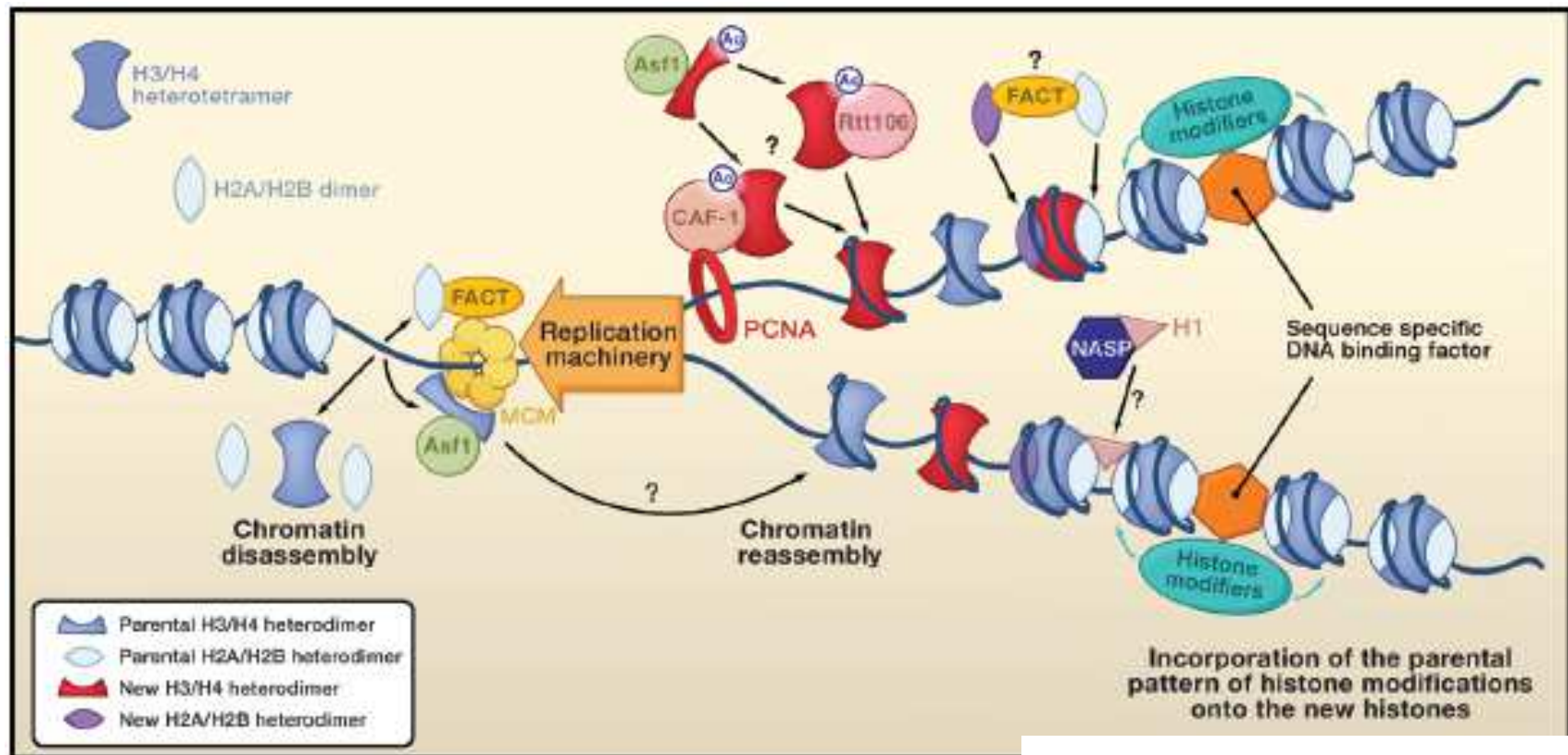
TLS polymerasy ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ) obsahují UBM (správně přečtou chybu a zařadí správnou bázi)



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

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



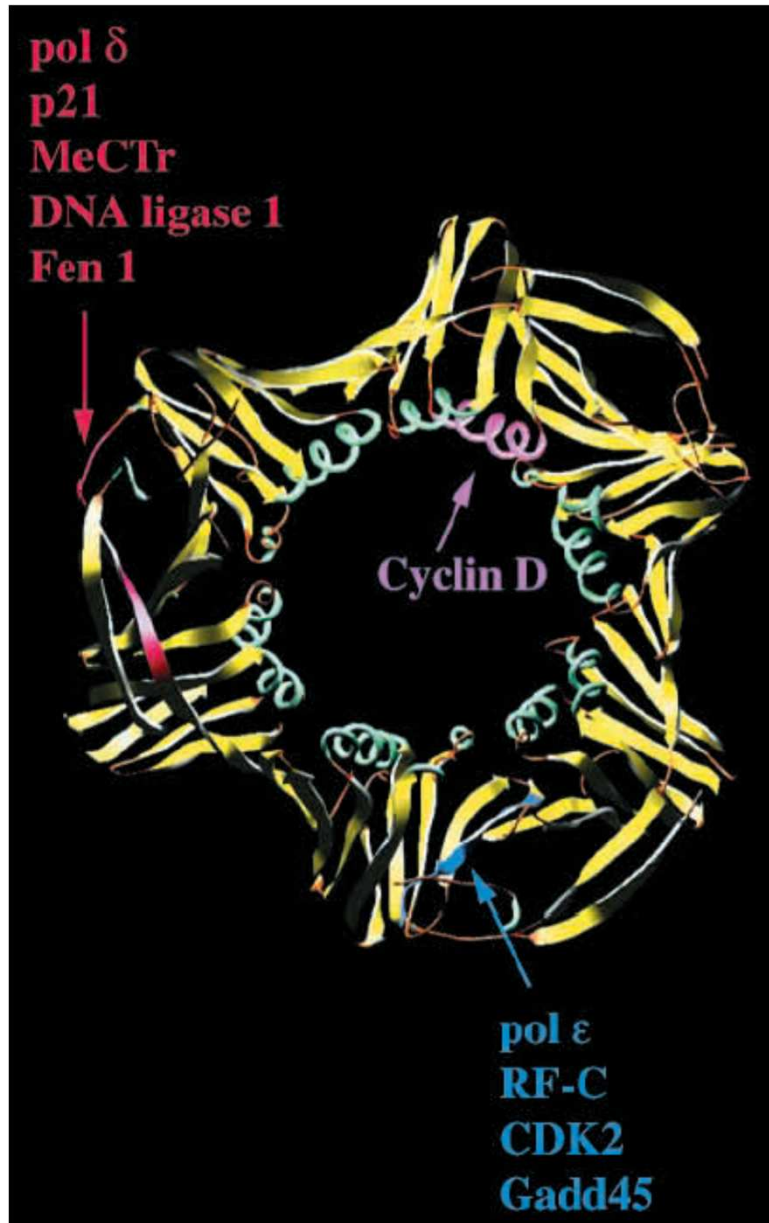


PCNA asociuje s CAF1 (chromatin assembly factor) a pomáhá znovunavázání histonů (nukleosomů) a vzniku chromatinu

PCNA je “swiss-army knife”  
(PCNA je „core – jádro“ komplexů)



# PCNA – moduly



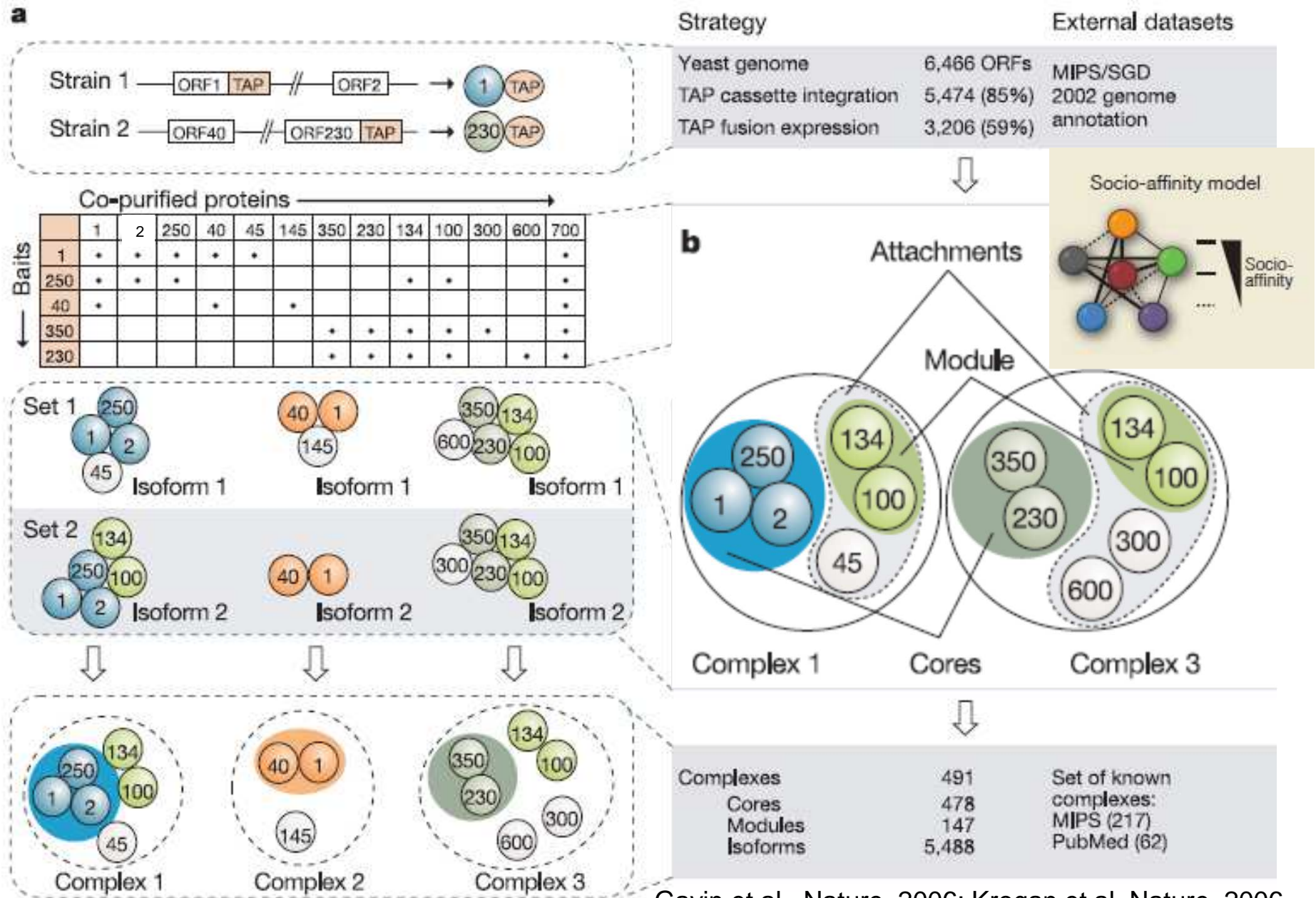
PCNA je „jádrem“ pro mnoho „attachments“  
tj. s mnoha funkčními moduly

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

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

PIP	Function
Pol $\delta$	DNA replication and repair
Pol $\epsilon$	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 $\alpha$	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 $\beta$	Base excision repair
Pol $\eta$	Translesion synthesis; linked to the XP-V disease
Pol $\iota$	Translesion synthesis
Pol $\kappa$	Translesion synthesis
Pol $\lambda$	Translesion synthesis
Cyclin/CDKs	Cell cycle control
p21	Cell cycle control

# Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

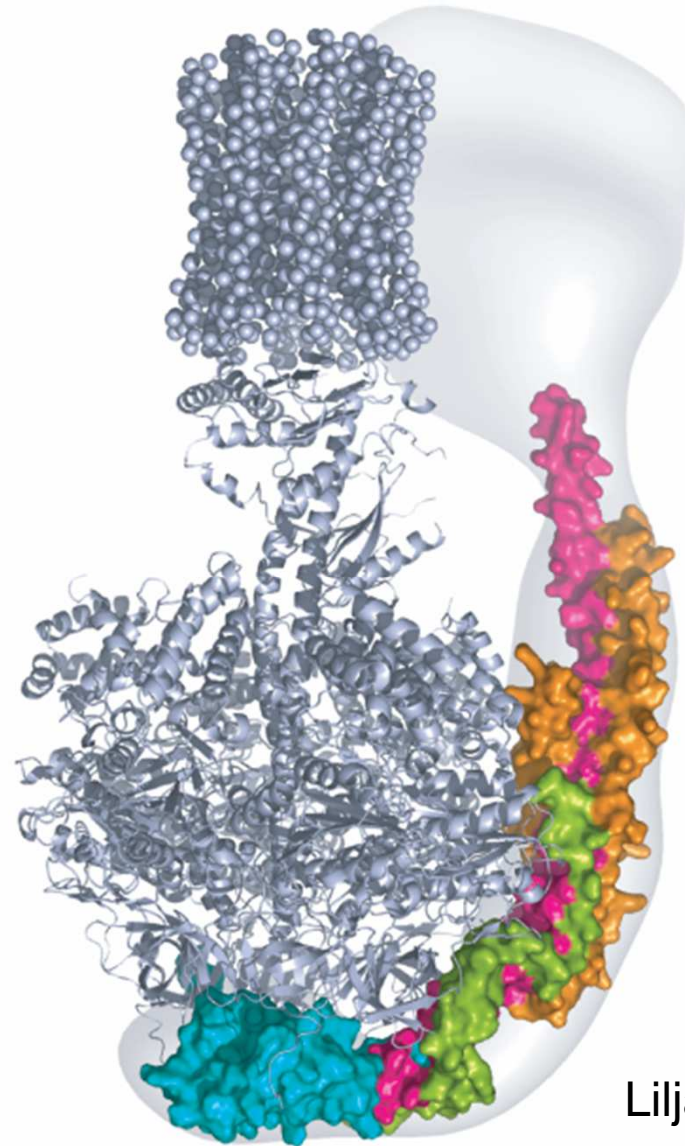


Gavin et al., Nature, 2006; Krogan et al., Nature, 2006

# Stabilní komplex – molekulární stroj



**ATPasová pumpa -**  
komplex se stálým  
složením/poměrem  
podjednotek („neměnný“)



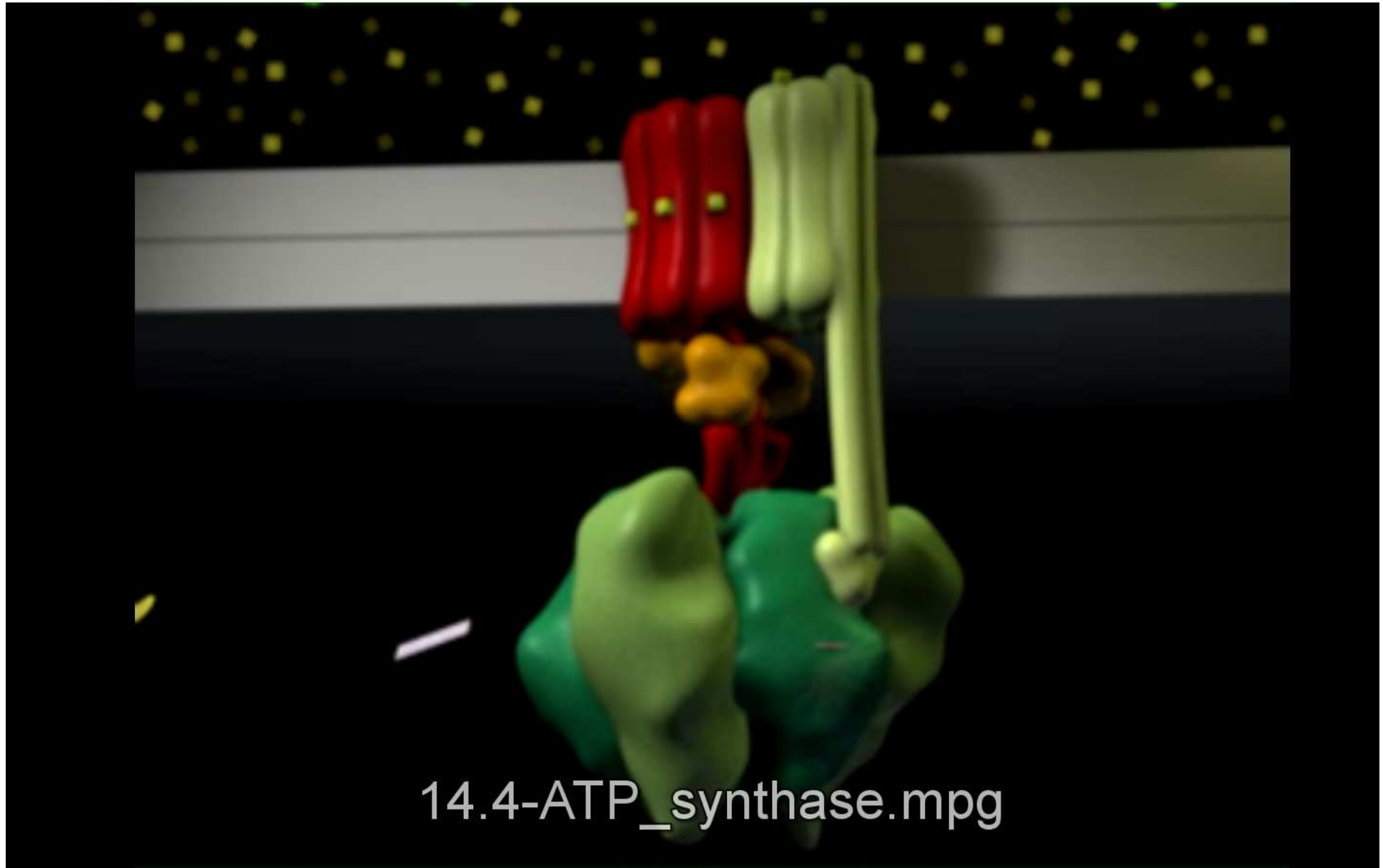
Liljas a spol.

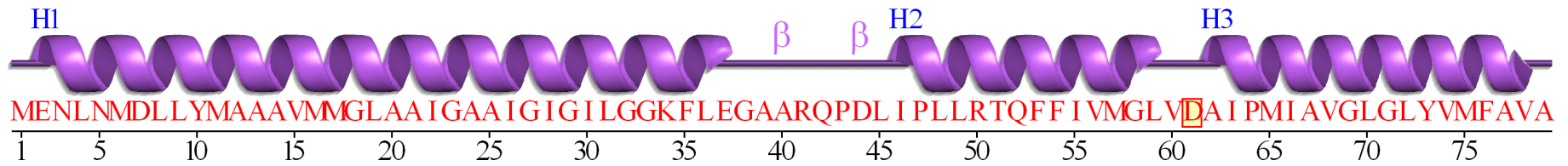


## 14.4-ATP\_synthase

- Multimediální přehrávač VLC

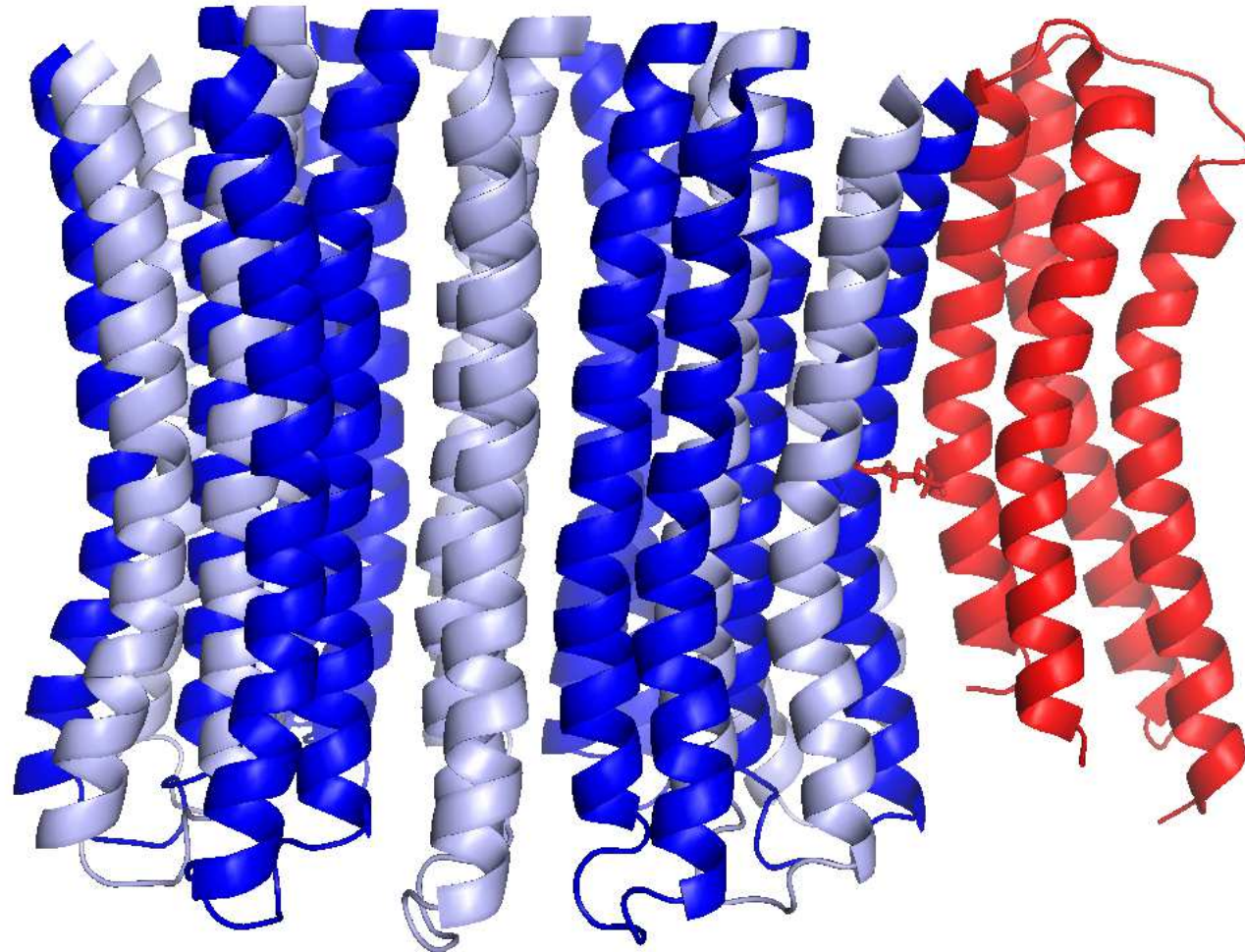
Video Titulky Nástroje Zobrazit Nápověda

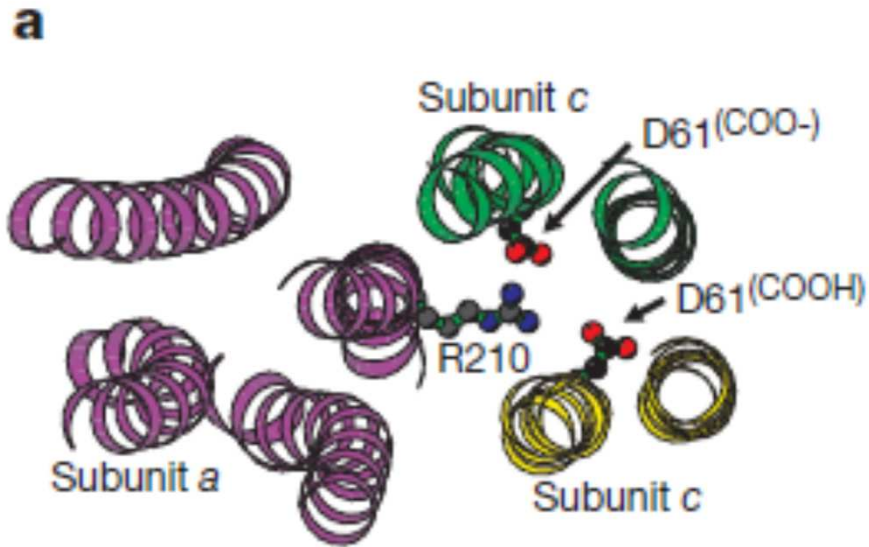




pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu

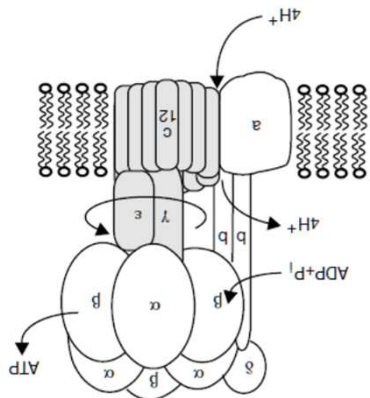
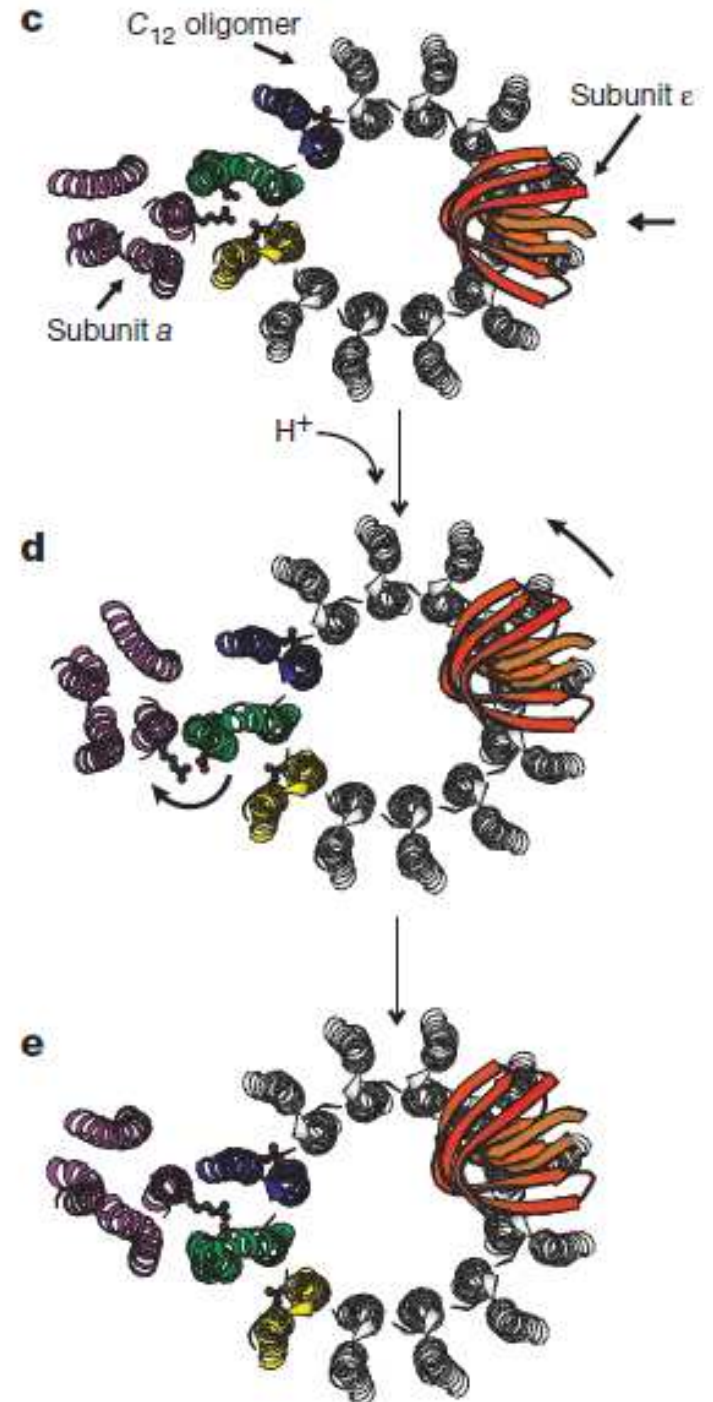
PDB: 1C17:A



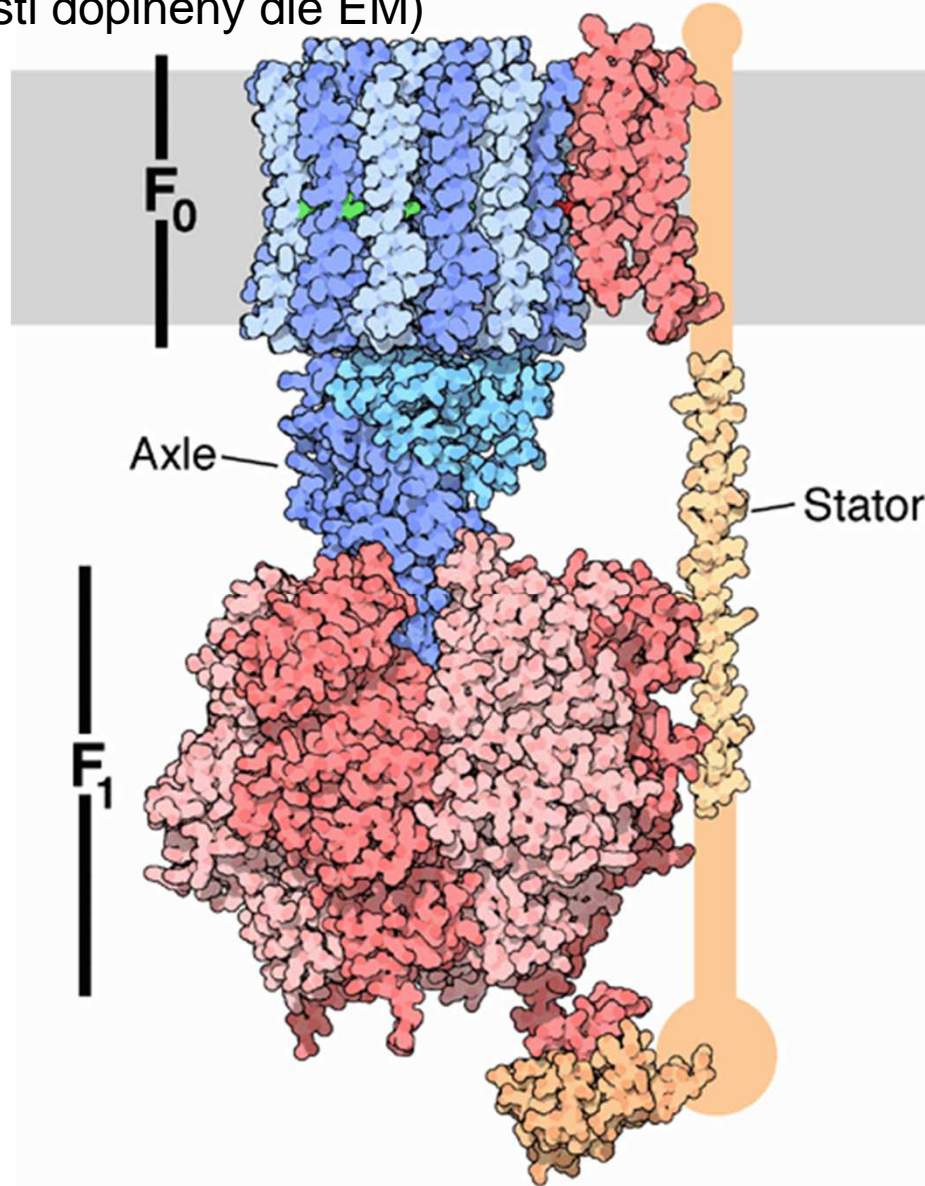


Rastogi & Girvin, Nature, 1999

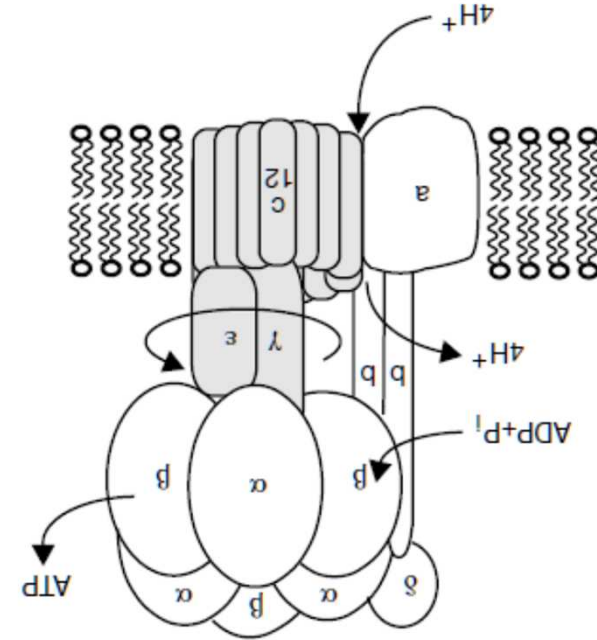
pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu (ve vodném prostředí by byl negativně nabitý, ale v prostředí lipidické membrány nikoli). Dochází k neutralizaci náboje – otočka.



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

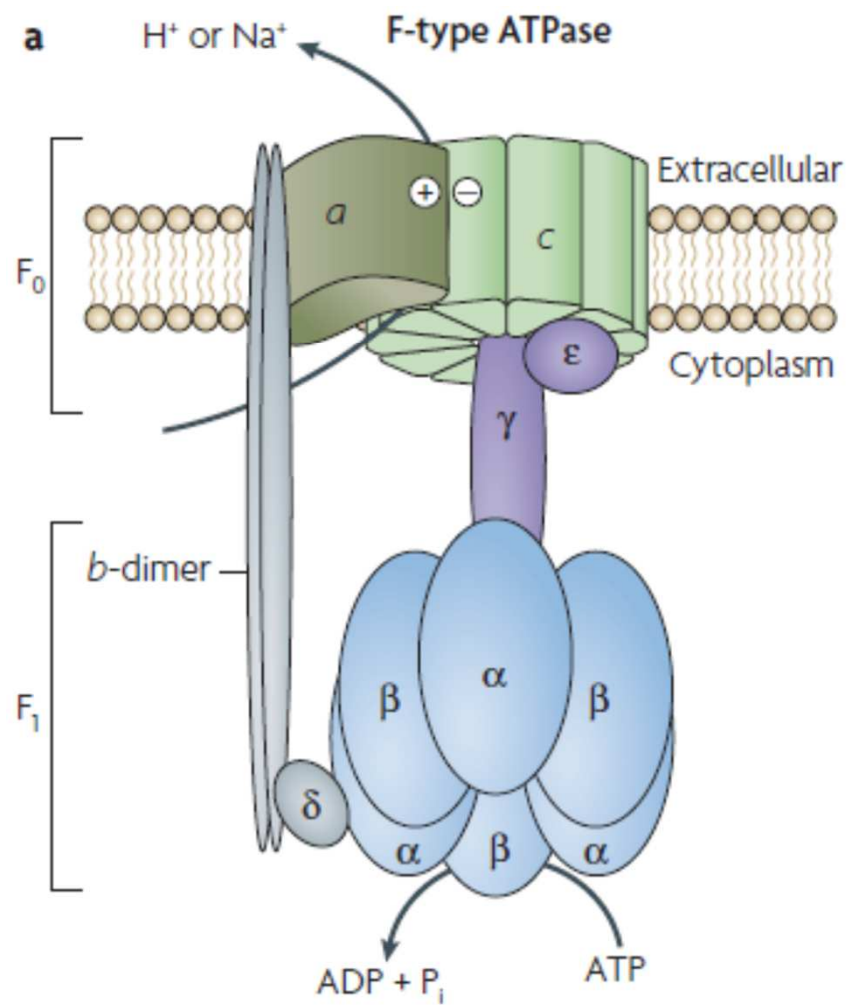


Molekula měsíce v prosinci 2005  
Rastogi & Girvin, Nature, 1999

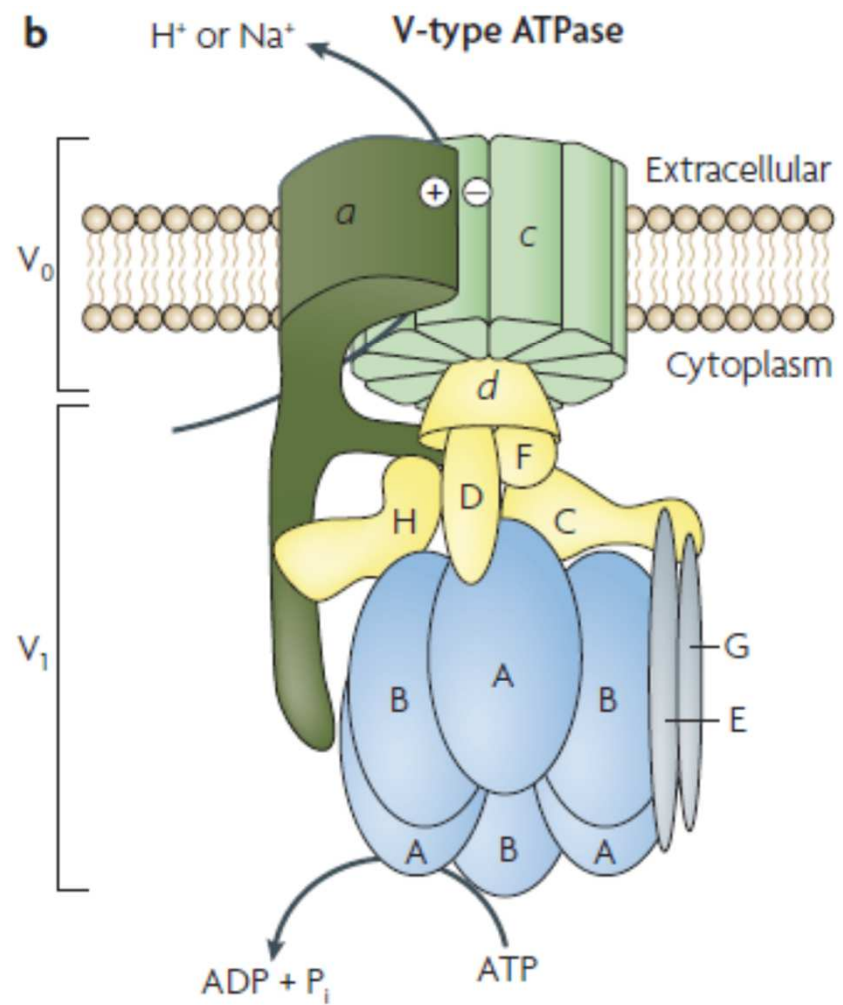


F<sub>0</sub> je protonový rotor (uložen v membráně) poháněný tokem vodíkových iontů (z dýchacího řetězce) přes membránu. Tento rotor je spojen s druhým F<sub>1</sub> chemickým motorem poháněným ATP (nebo vyrábějícím ATP). Oba rotory jsou spojeny statorem.

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

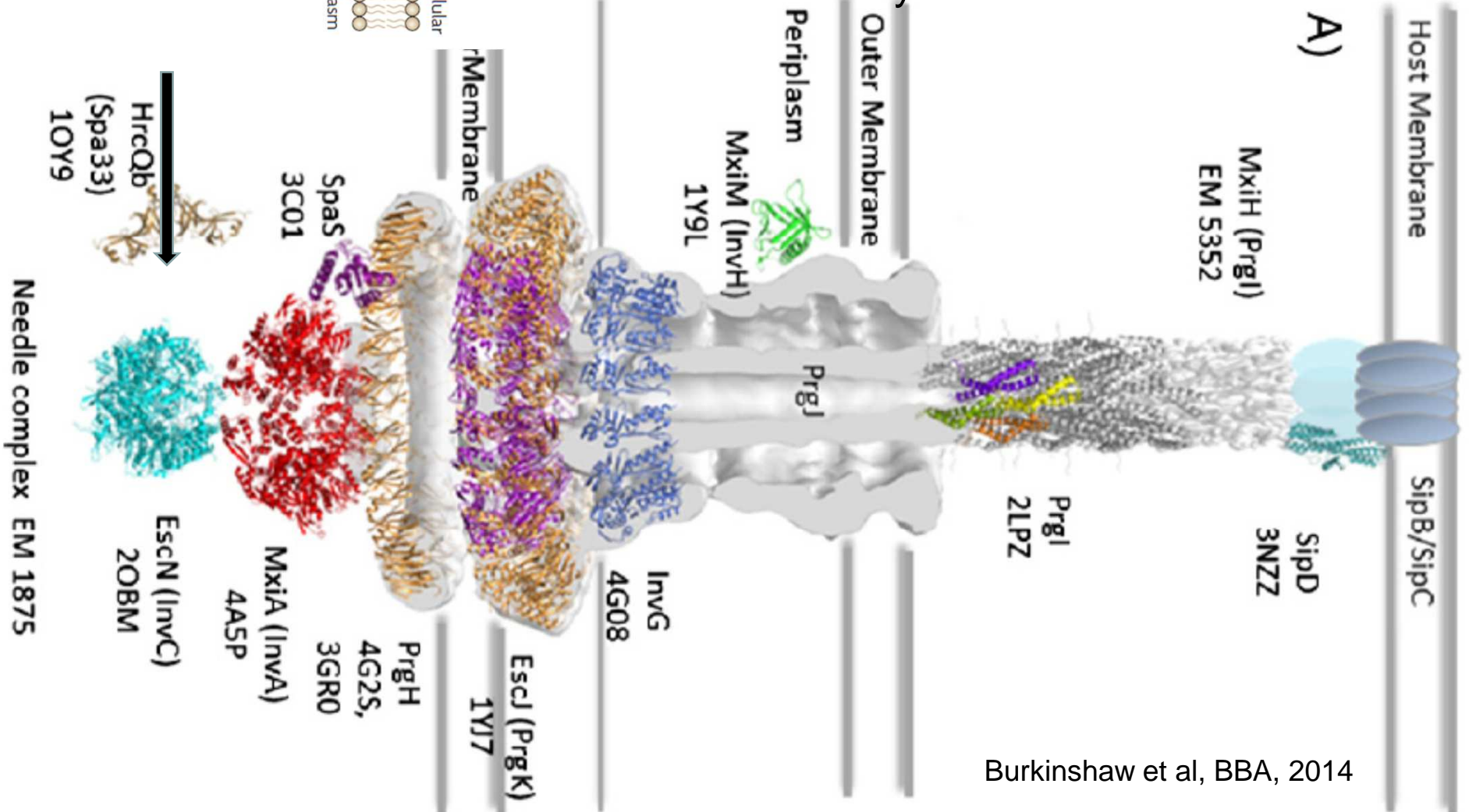
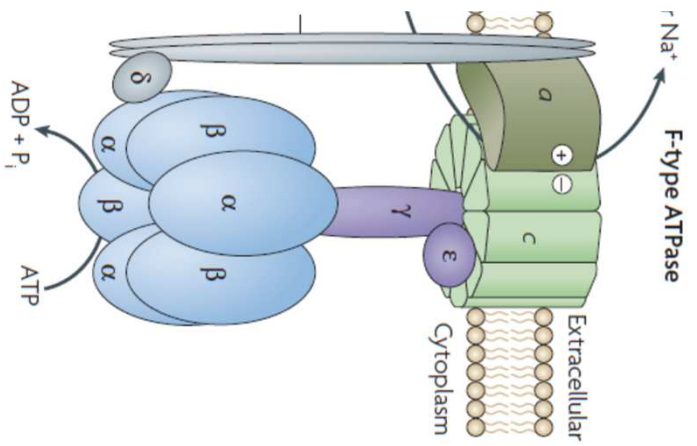


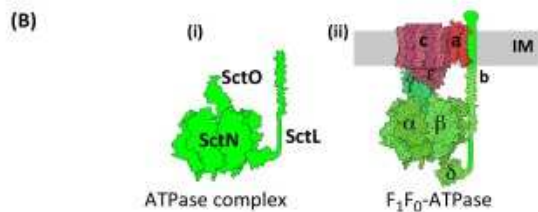
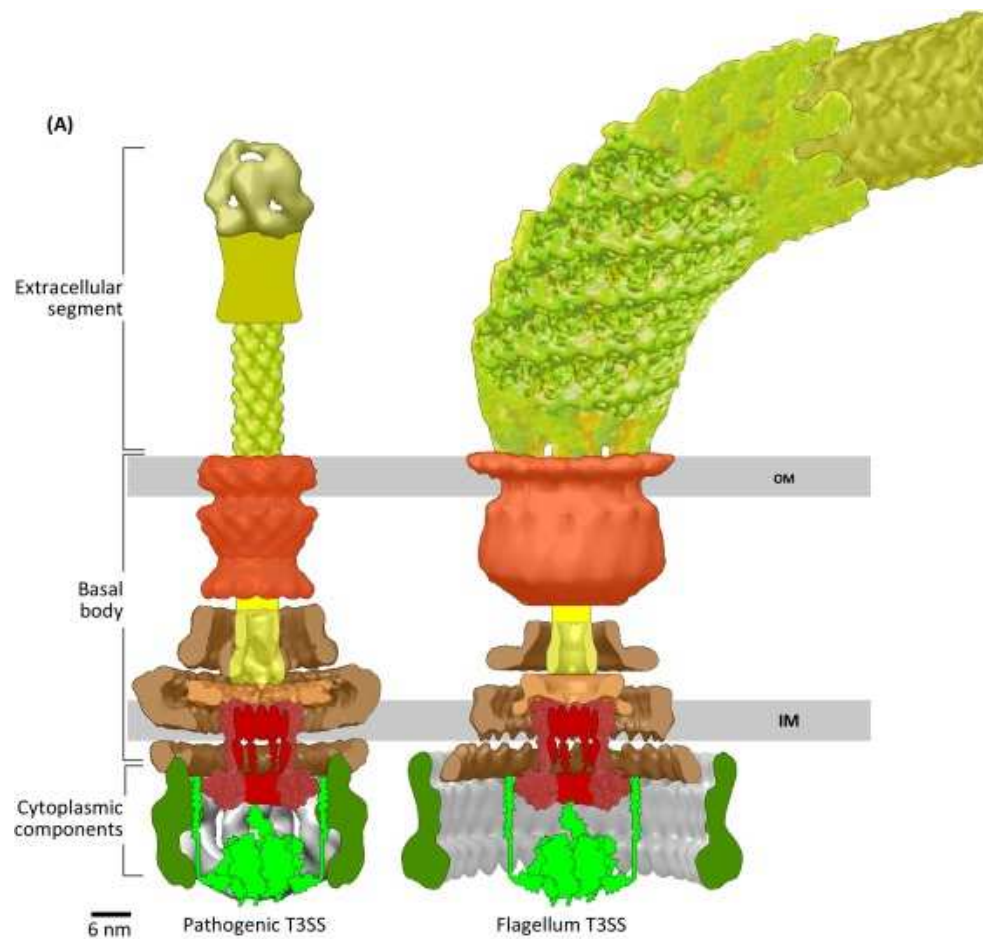
mitochondriální



vakuolární

Type III secretion system (T3SS - injectisome) – bakteriální patogeny injikují (efektorové) proteiny skrze „jehlu“ do hostitelské buňky – ATPasová část pomáhá „protlačit“ efektorové proteiny z patogení bakterie skrze „jehlu“ do hostitelské buňky





Trends in Biochemical Sciences

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

Mulkiđjanian et al, NRM, 2007

Více CG030

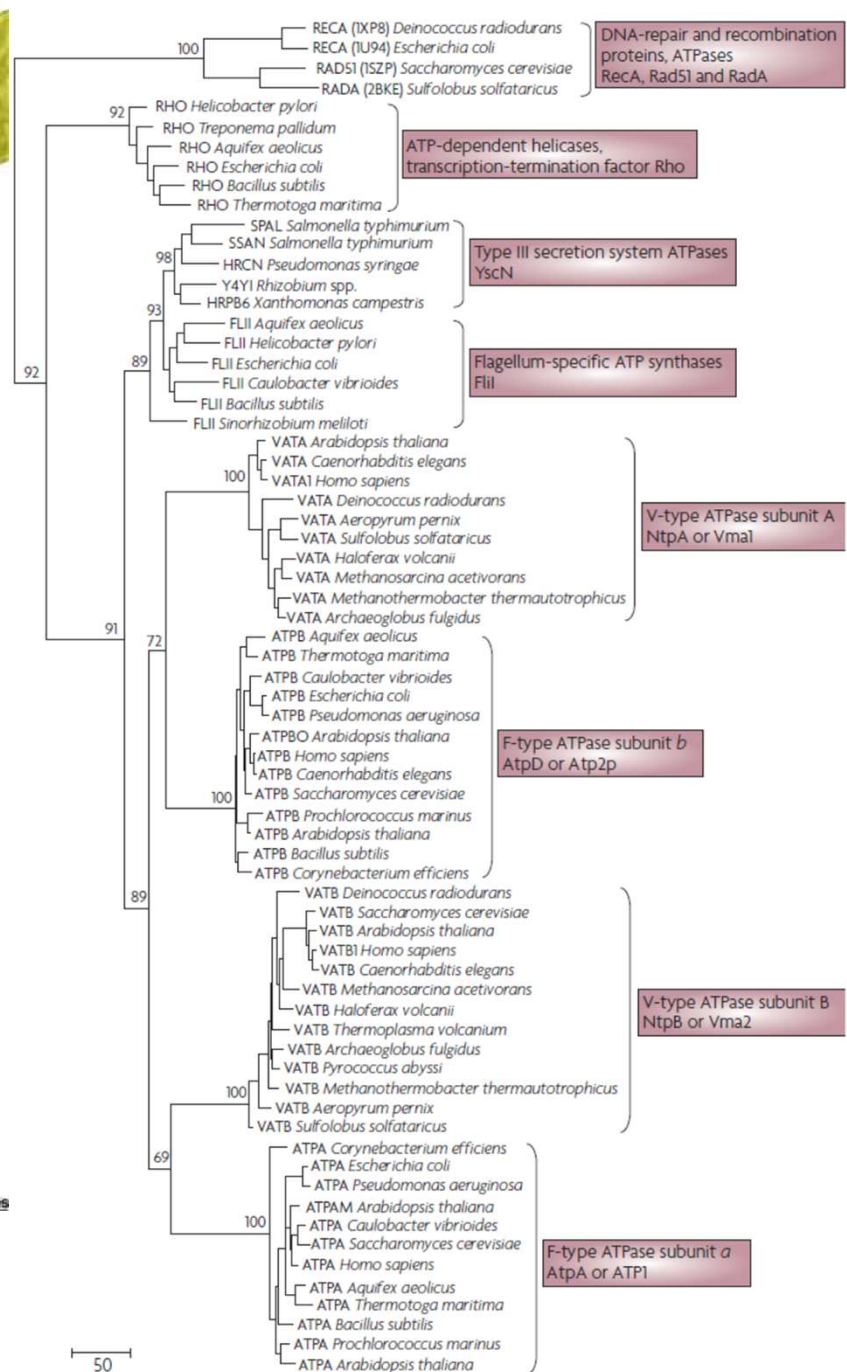
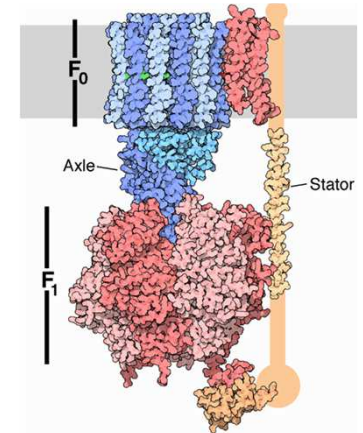


Figure 3 | Phylogenetic tree of the catalytic subunits of the F- and V-type ATPases and related P-loop ATPases. The protein sequences were retrieved from [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (for the RecA family, four

# Molekulární motory



## •Cytoskeletální motory

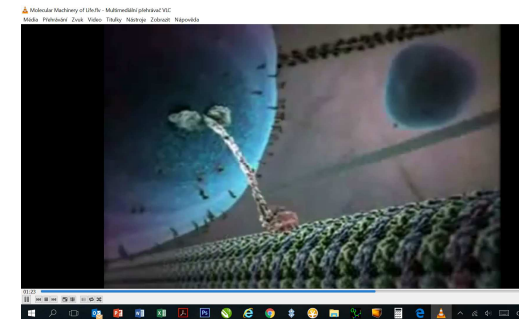
- [Myosin](#) – svalová kontrakce, transport váčků
- [Kinesin](#) - transport váčků po mikrotubulech od jádra
- [Dynein](#) - transport váčků po mikrotubulech k jádru, pohyb bičíků

## •Rotační motory:

- [F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP syntáza/ATPasa](#) – přeměna energie ATP na elektrochemický potenciál nebo naopak ([mitochondrie](#)) – pumpování protonů přes membránu ([vakuoly](#))
- rotace bakteriálních bičíků

## •Motory nukleových kyselin:

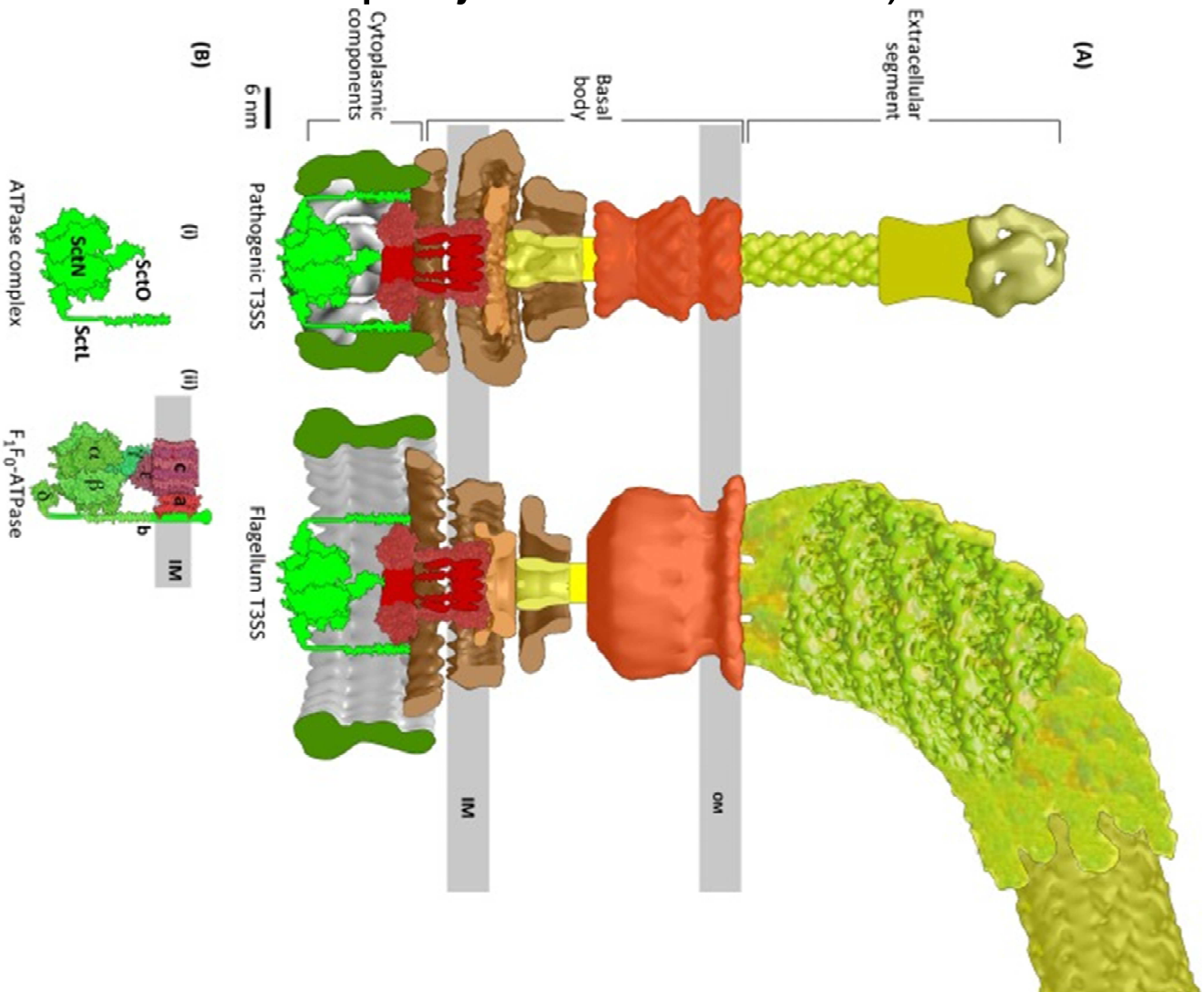
- [RNA polymerase](#) – přepisuje DNA do RNA
- [DNA polymerase](#) – syntetizuje druhý řetězec na ssDNA
- [Helicases](#) – odděluje řetězce DNA (transkripce, replikace)
- [Topoisomerases](#) - redukce supercoiling DNA
- [RSC](#) a [SWI/SNF](#) komplexy remodelují chromatin
- [SMC proteins](#) – zodpovědné za vytváření smyček na chromatinu





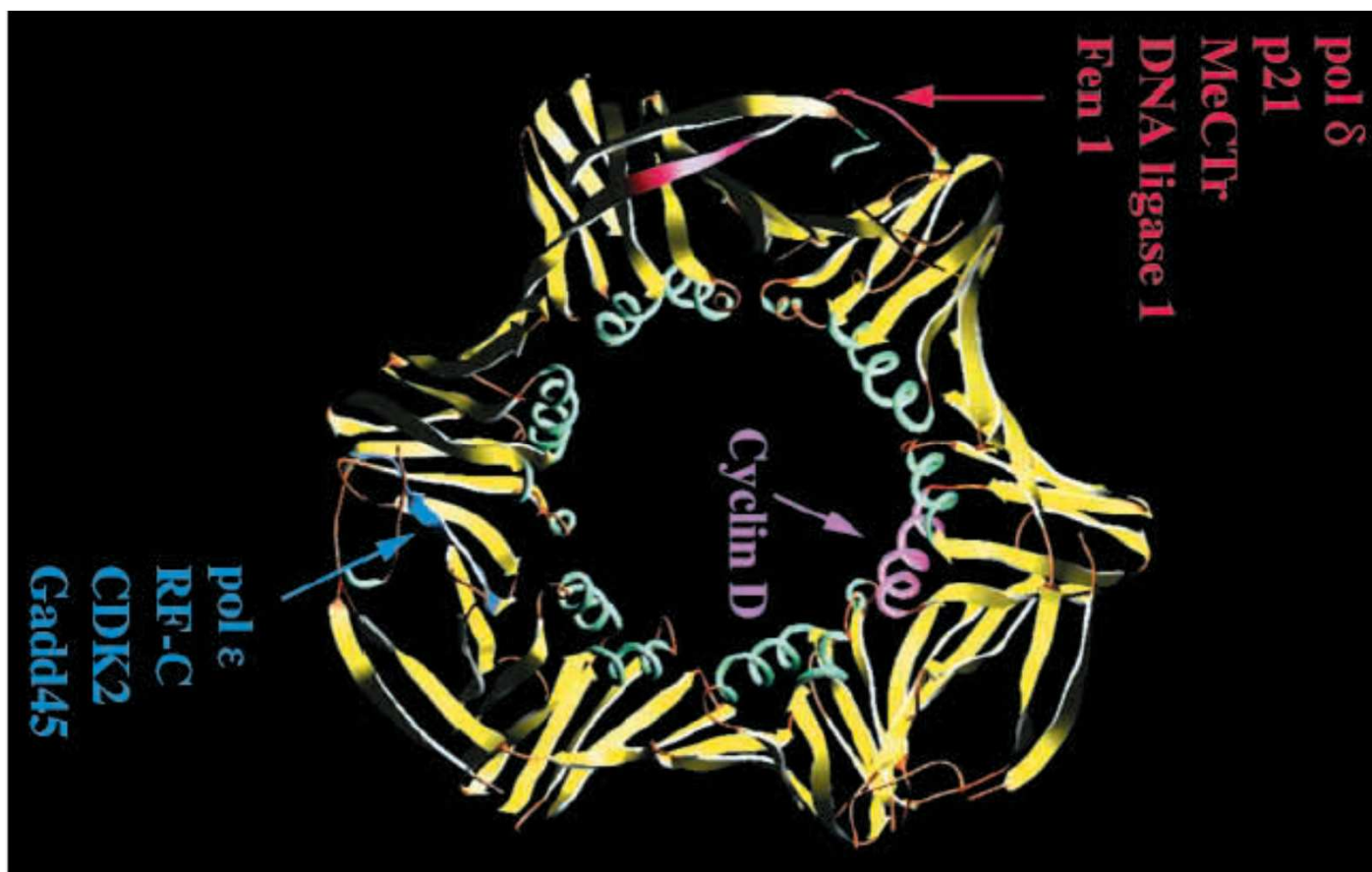
# Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)



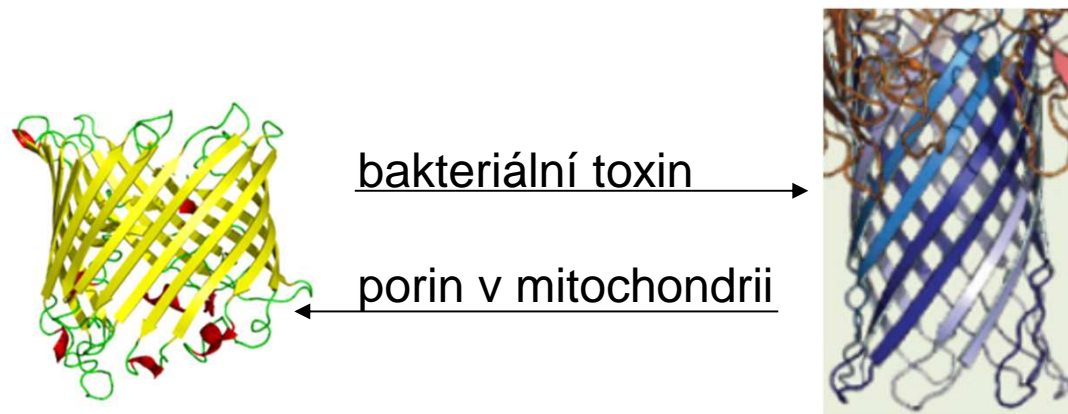
## Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...



# Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

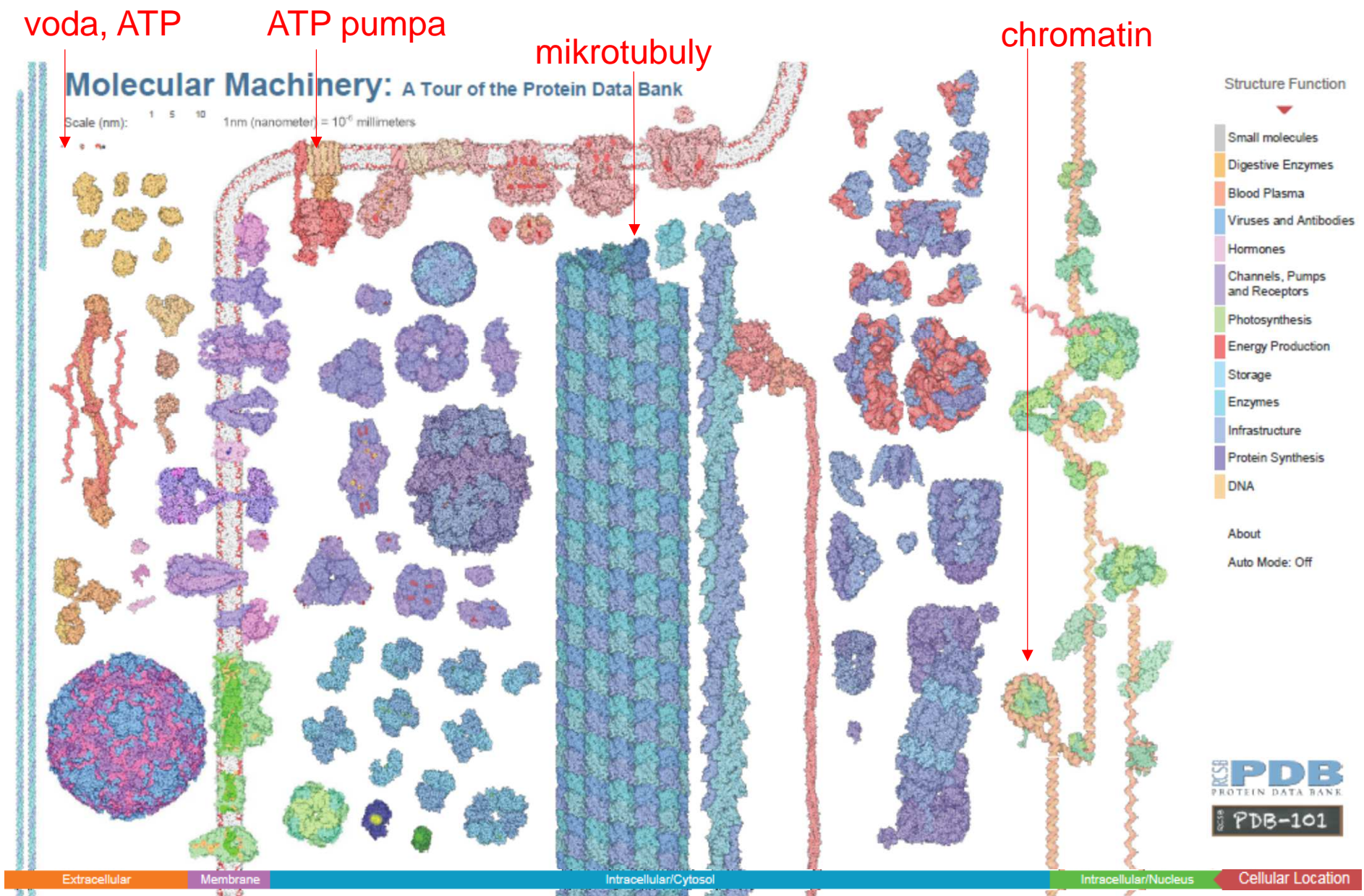
- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)
- 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?

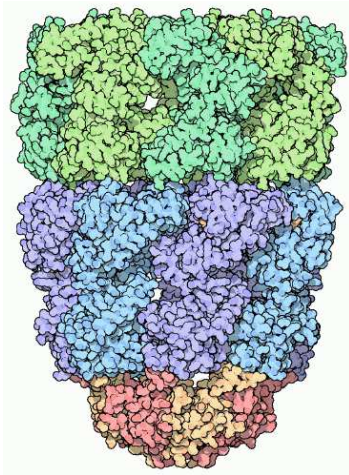
- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)
- skládání funkčního komplexu na specifickém místě (toxin je transportován jako rozpustný monomer a poté se skládá => stává se toxickým až mimo původní buňku)
- 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)

# Kde najít více proteinových komplexů = PDB

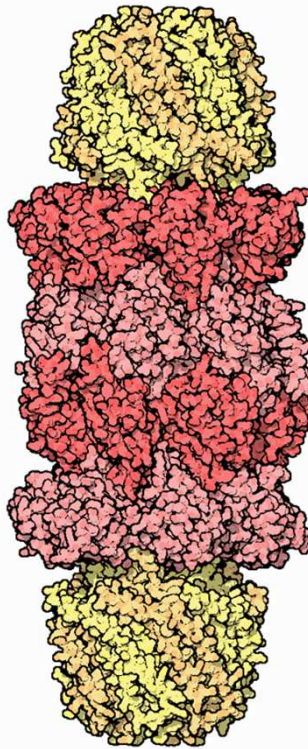


Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

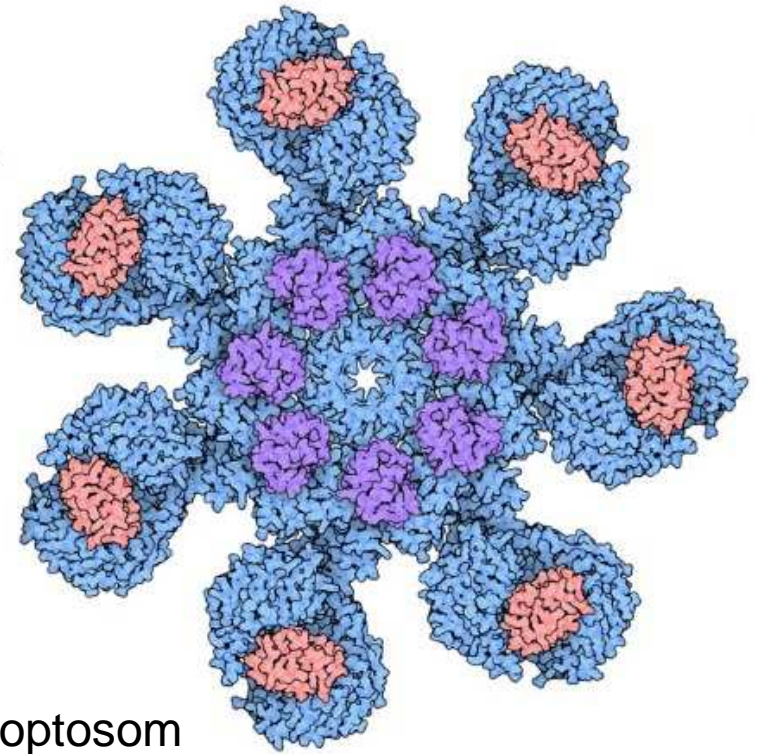
# Příklady komplexů



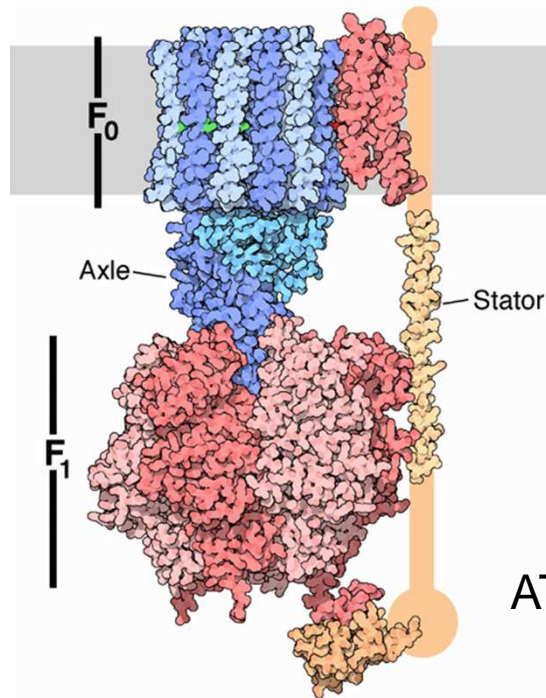
chaperon



proteasom

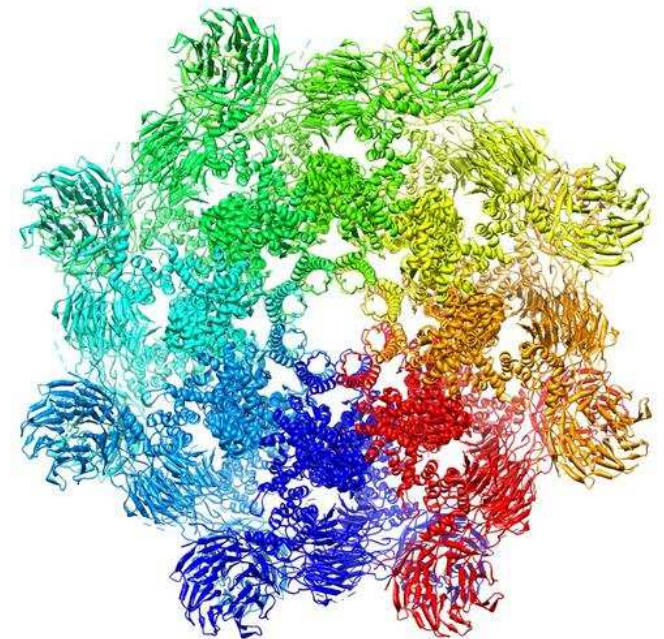


apoptosom



ATP pumpa

Více CG030



# Shrnutí

- Proteiny mohou být součástí jednoho (stabilní) nebo více komplexů (dynamické/modulární)
- **Dynamické/modulární komplexy (PCNA)**
  - množství podjednotky determinuje složení komplexu
  - Interakce/složení podjednotek dynamických komplexů jsou modulovány např. posttranslačními modifikacemi
- **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

CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů

CG031 – Cvičení z modelování proteinových komplexů

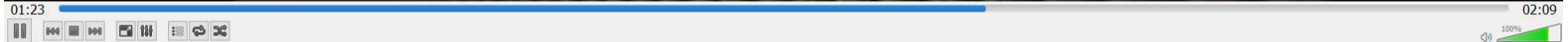
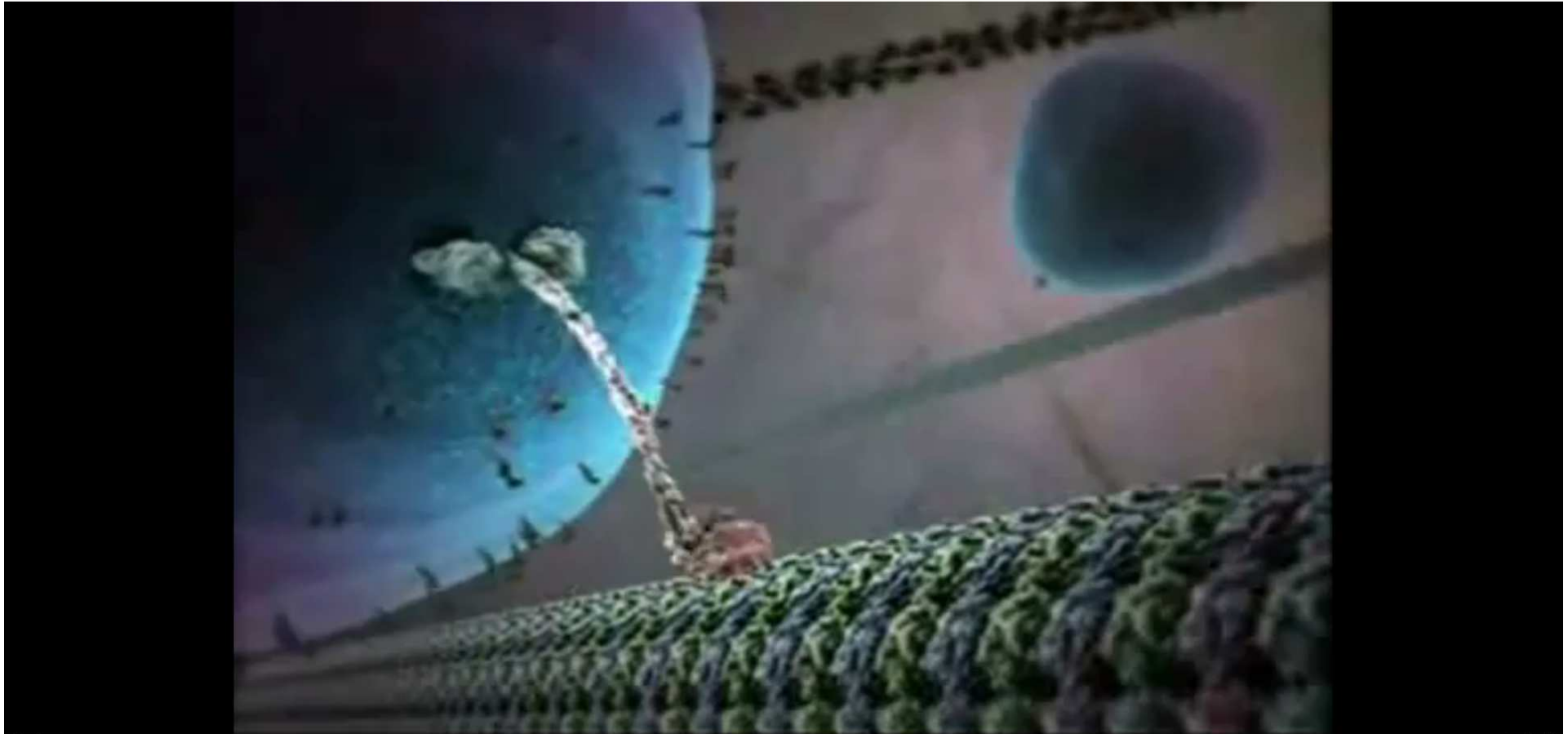
jarní semestr - doc. Jan Paleček

# Molecular machinery of life:

<https://www.youtube.com/watch?v=FJ4N0iSeR8U>

Molecular Machinery of Life.flv - Multimediální přehrávač VLC

Média Přehrávání Zvuk Video Titulky Nástroje Zobrazit Nápověda





# Test 1

- **testy předat příště přednášejícímu**
- **1. Jaké typy AMK se nejčastěji podílejí na protein-proteinových interakcích?**
  - a. plární
  - b. nabité
  - c. hydrofobní
  - d. aromatické
- **2. Jaké sekundární struktury se podílí na *coiled-coil* vazbě?**
  - a. beta-listy
  - b. beta-listy a šroubovice
  - c. smyčky
  - d. vzájemně se obtáčející šroubovice
- **3. interaktom je:**
  - a. interakční síť proteinů (pro daný organismus)
  - b. soubor všech interakcí jednoho proteinu
  - c. databáze všech interakcí biomakromolekul
  - d. interakce podílející se na vzniku komplexů
- **4. Jaké charakteristiky musí splňovat povrchy vzájemně interagujících proteinů?**
  - a. stačí, když mají opačné náboje
  - b. stačí, když mají komplementární tvary
  - c. musí mít komplementární charakter (tvar, polaritu)
  - d. stačí, když jsou hydrofobní
- **5. napište aspoň 2 příklady proteinů s coiled-coil doménou:**

# Test 2

- **testy předat příště přednášejícímu**
- **6. Co je to komplexom?**
  - a. interakční síť proteinů v buňce
  - b. soubor všech interakcí jednoho proteinu
  - c. soubor proteinových komplexů v buňce
  - d. síť silných interakcí
- **7. Jak může post-translační modifikace proteinu přímým způsobem ovlivnit protein-proteinovou interakci?**
  - a. nemůže ji ovlivnit
  - b. ovlivní pouze konformaci proteinu
  - c. blokuje nebo posílí vazbu
  - d. degraduje protein
- **8. Jaké hlavní výhody skýtá proteinový komplex složený z podjednotek (oproti stejně velké makromolekule obsahující pouze jeden protein)?**
  - a. lepší dynamika, modularita, regulace
  - b. větší stabilita proteinů
  - c. lepší přístup k proteinům
  - d. účinnější převod regulačních signálů
- **9. Jak pracuje mitochondriální ATP pumpa při konverzi ADP na ATP?**
  - a. transportuje přes membránu  $\text{Na}^+$
  - b. využívá molekulu cGMP
  - c. transportuje  $\text{K}^+$  přes membránu
  - d. generuje rotační pohyb při transportu  $\text{H}^+$  přes membránu
- **10. napište aspoň 3 příklady molekulárních strojů:**
  - 
  - 
  -