

Test 1

- **testy předat příště přednášejícímu**
- **1. Jaké typy AMK se nejčastěji podílejí na protein-proteinových interakcích?**
- a. polární
- 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 Na^+
 - b. využívá molekulu cGMP
 - c. transportuje K^+ přes membránu
 - d. generuje rotační pohyb při transportu H^+ přes membránu
- **10. napište aspoň 3 příklady molekulárních strojů:**
 -
 -
 -



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

- **Proteinové interakce – 22.10.**
 - jak spolu proteiny interagují?
 - interaktom
- **Proteinové komplexy – 29.10.**
 - protein-proteinové interakce a komplexy
 - komplexom, architektura a funkce komplexů

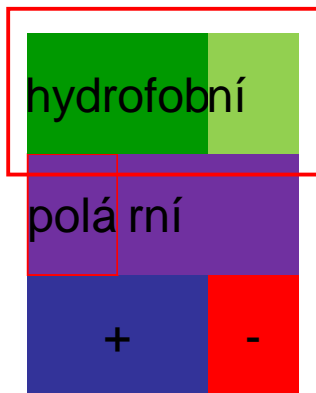
doc. Jan Paleček
jpalecek@sci.muni.cz

CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů
CG031 – cvičení z modelování proteinových komplexů
(jarní semestr)

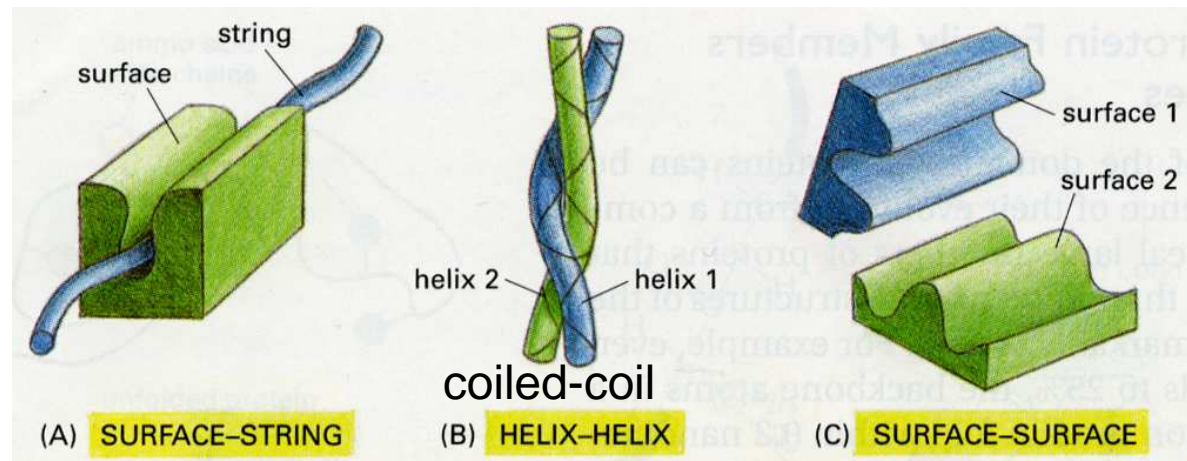
Souhrn - protein-proteinové interakce

- 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

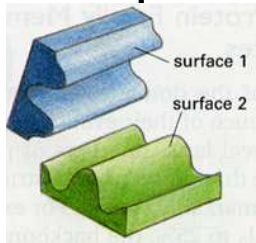


sekundární a terciární struktura

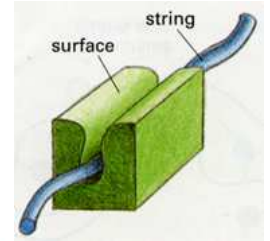


Protein-proteinové interakce

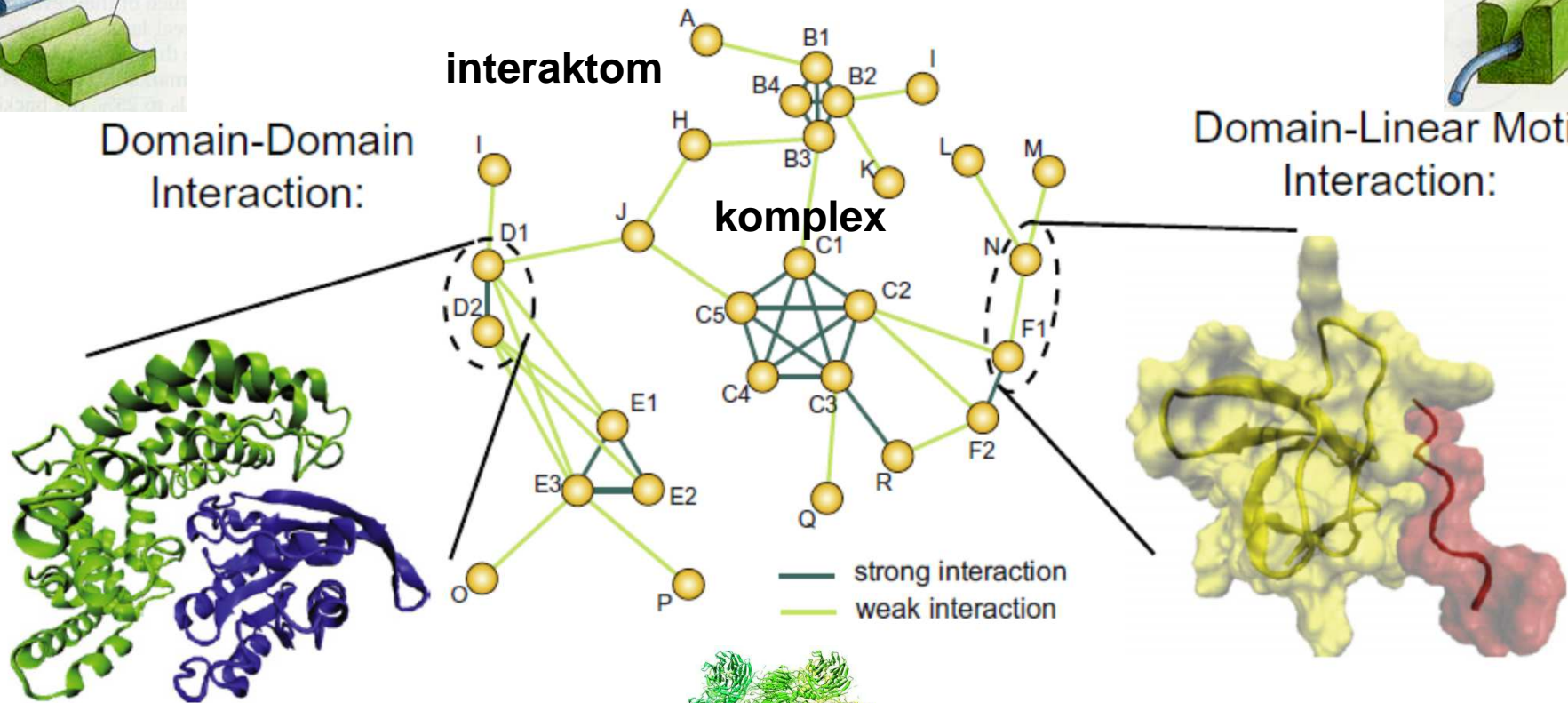
- stabilní (velké plochy, většinou součástí komplexů)
- přechodné/slabé (součást dynamických procesů – předávání signálů, modifikace)



Domain-Domain Interaction:

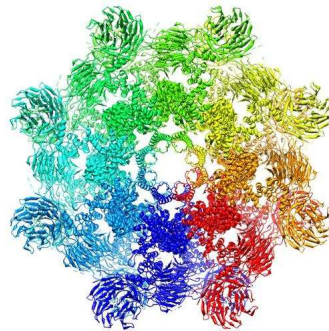


Domain-Linear Motif Interaction:

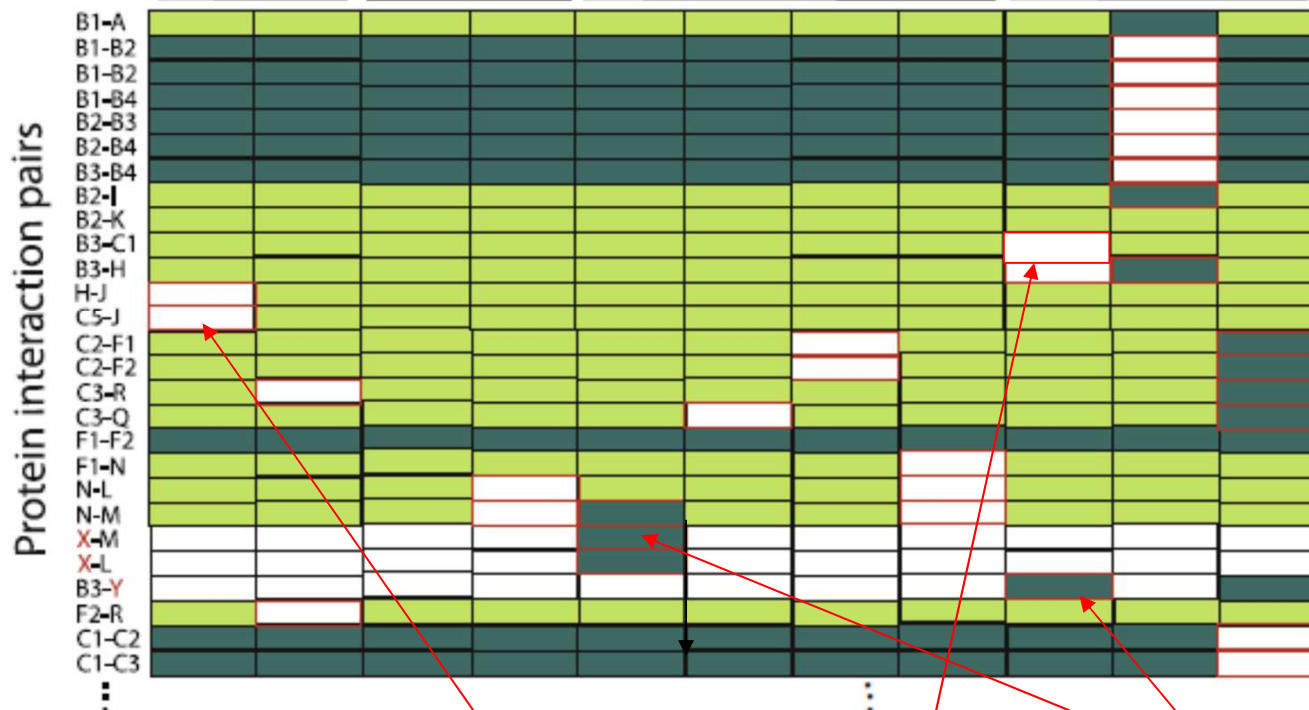
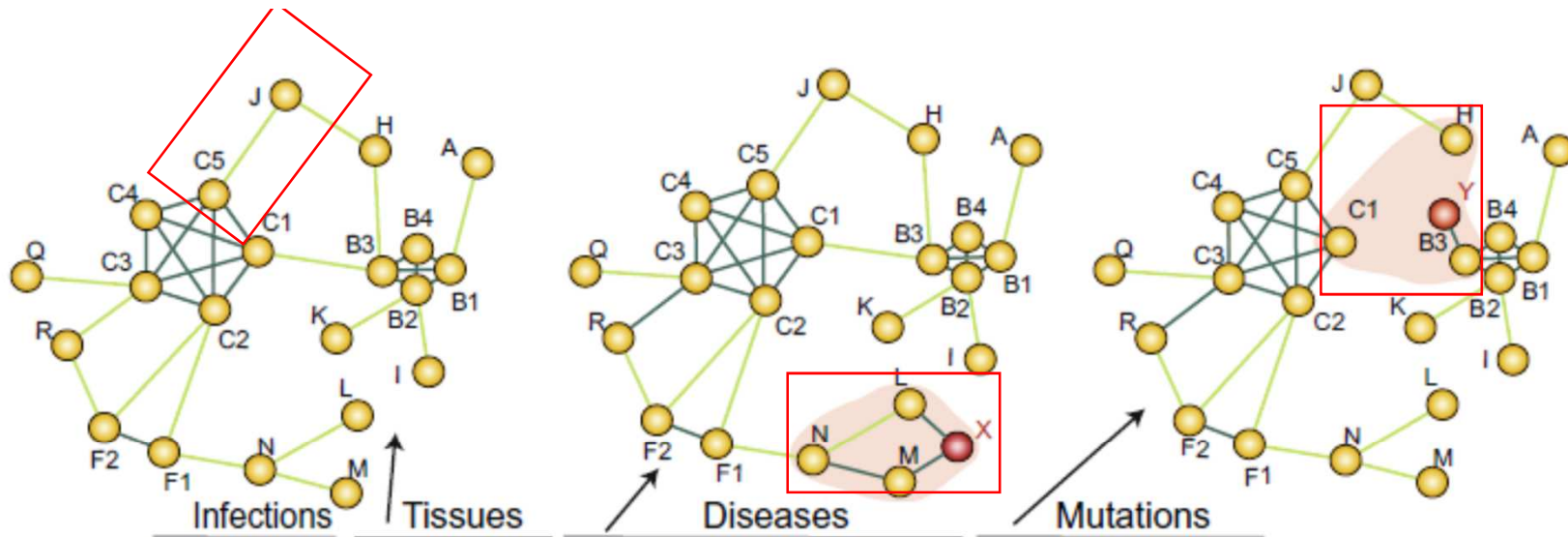


— strong interaction
— weak interaction

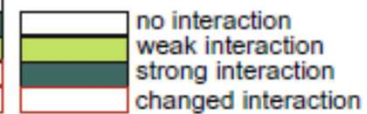
- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities: K_D nM to pM
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD



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



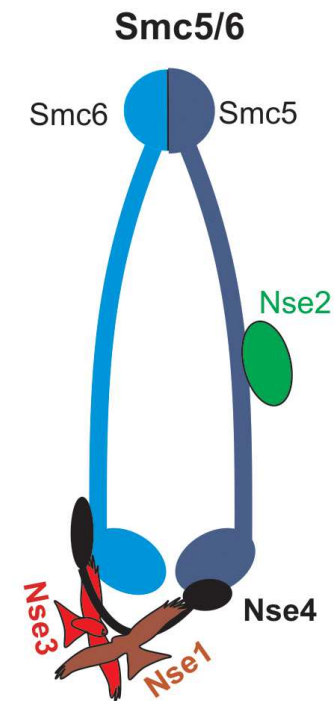
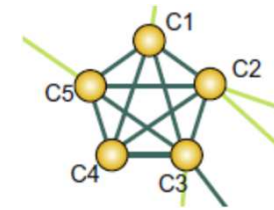
Sít' neznamená komplex (hůře popisuje stabilní komplexy, ale lépe popisuje vztahy)



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

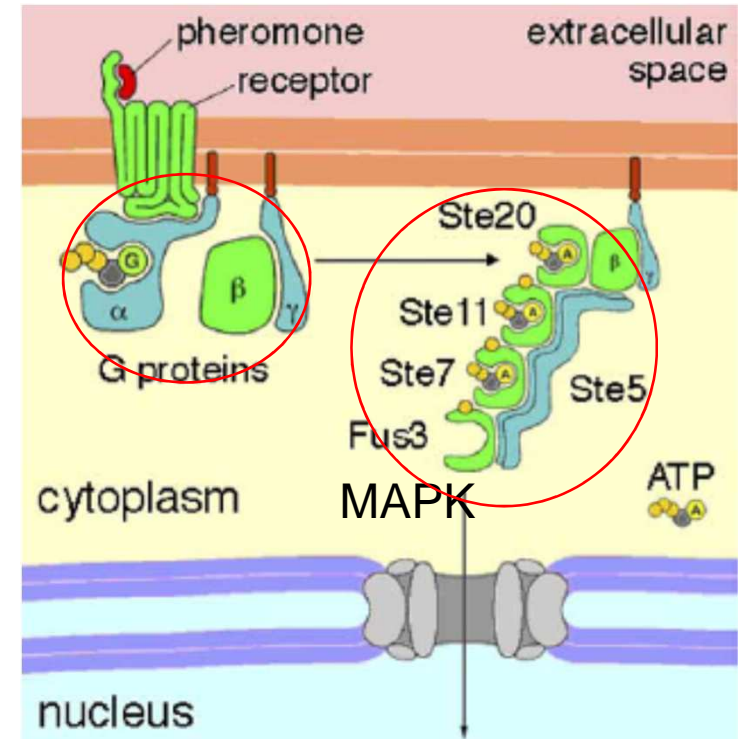
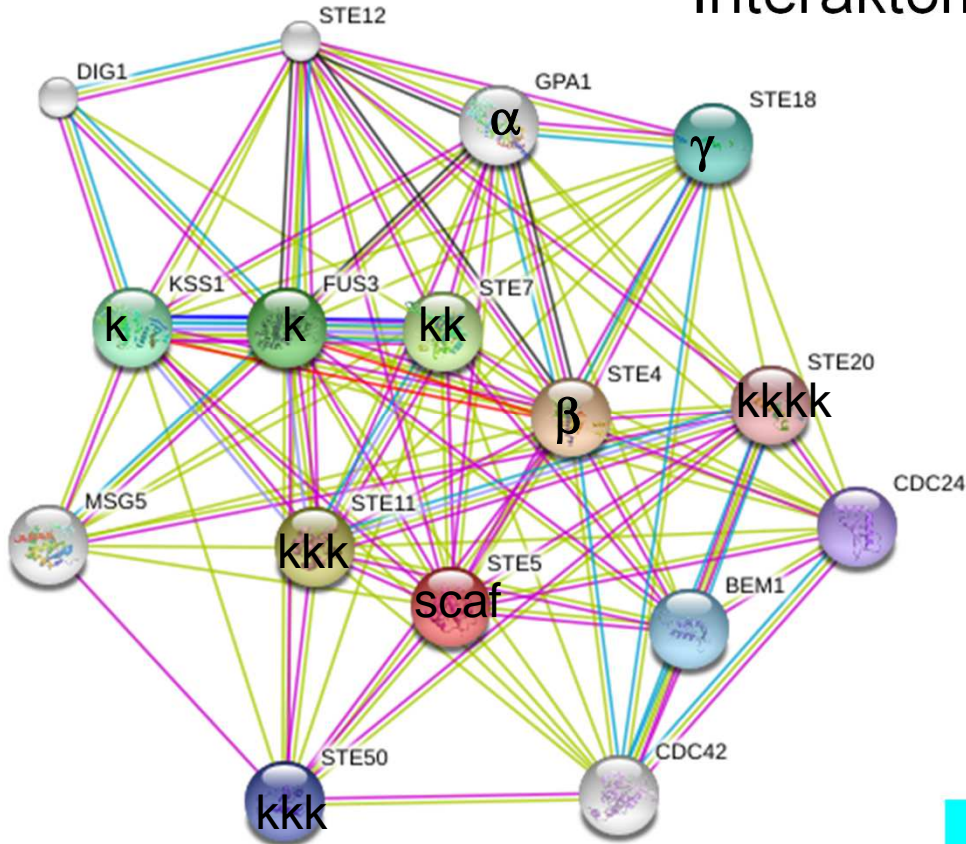
... kvarterní struktura

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



Regulace/modulace interakcí

Interaktom x komplexom

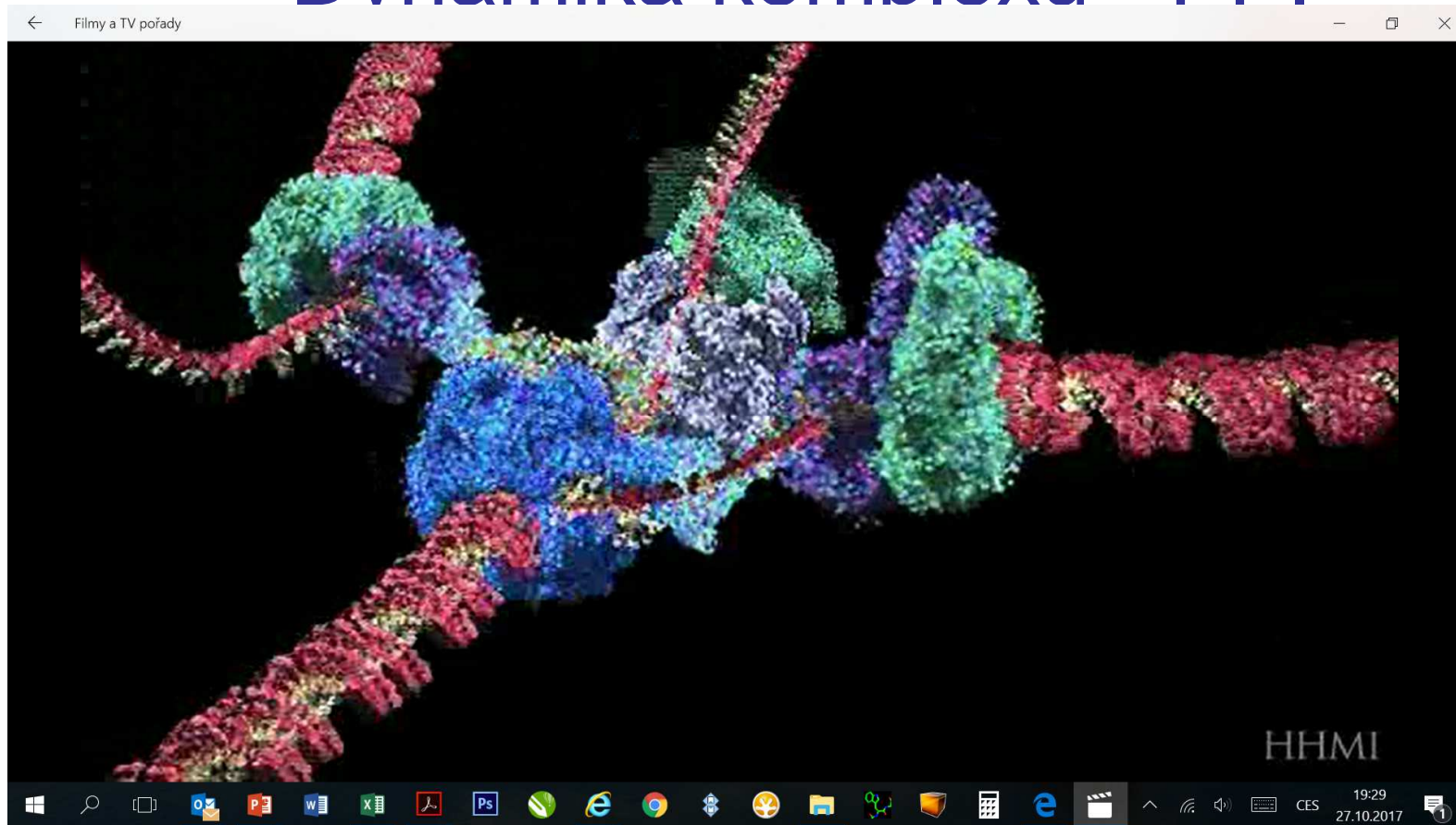


G-proteiny (β , γ) disociují a následně interagují (β) se scaffold proteinem Ste5 ... Fus3 relokalizuje do jádra a aktivuje Ste12

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

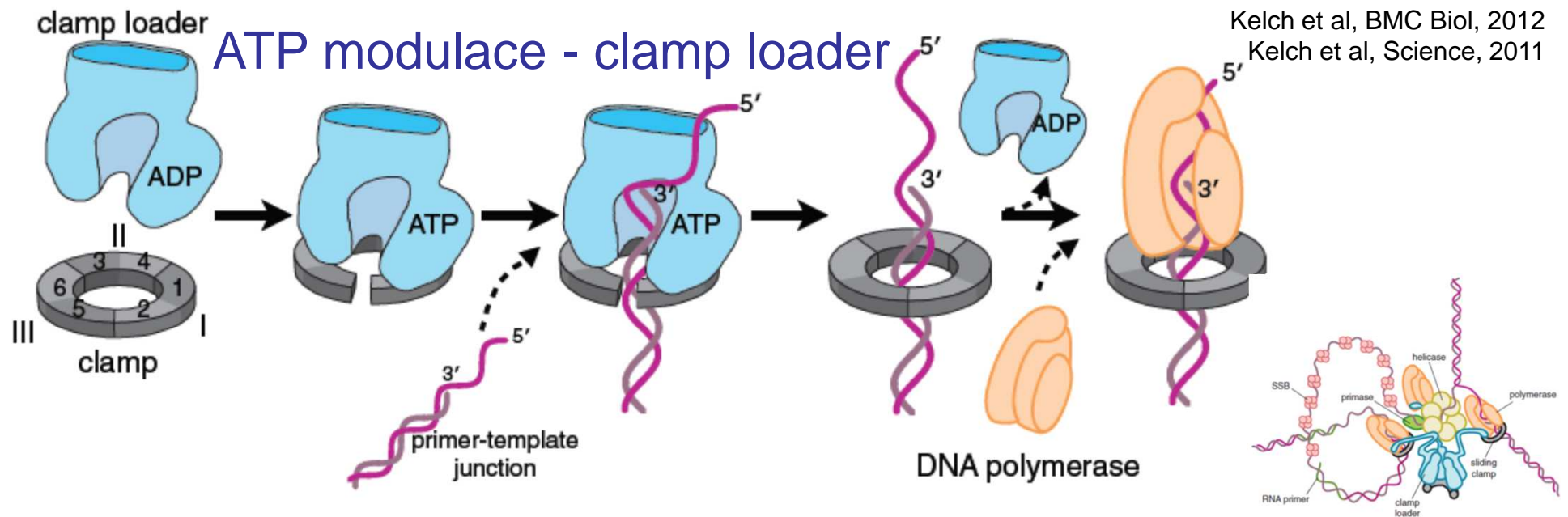
- PPI „přiblíží“ proteiny vs difuze
- koordinované předávání signálů, substrátů ...
- ligandy, PTM ... **modulují PPI** ... procesy

Dynamika komplexů - PPI

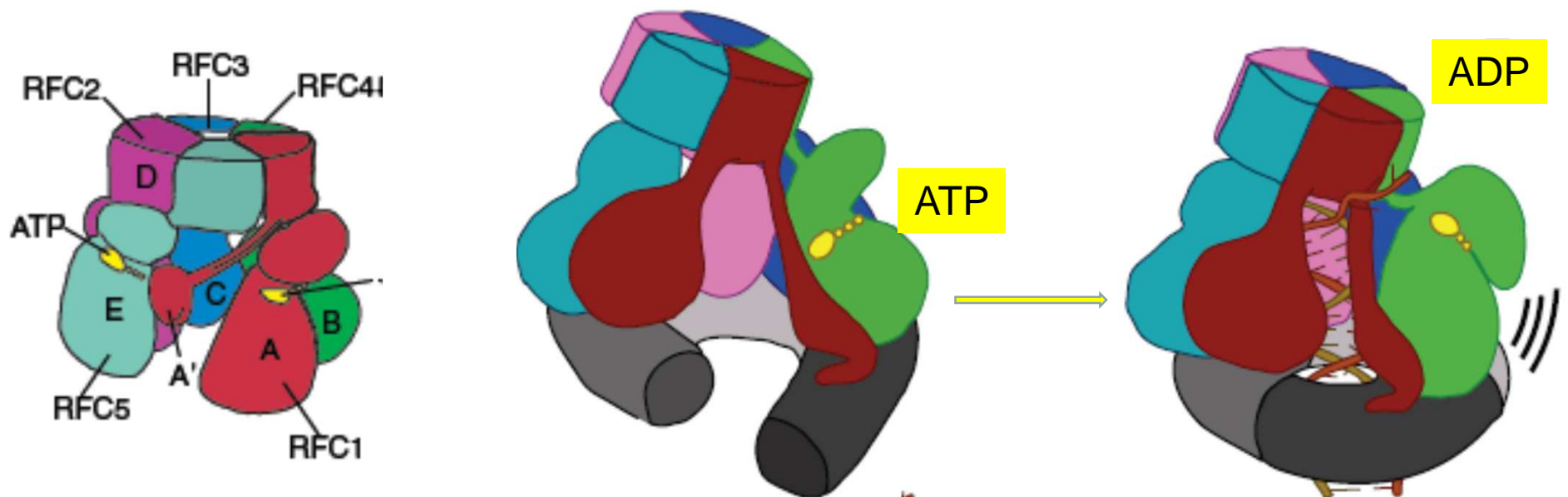


DNAi_replication_vo2-Ig

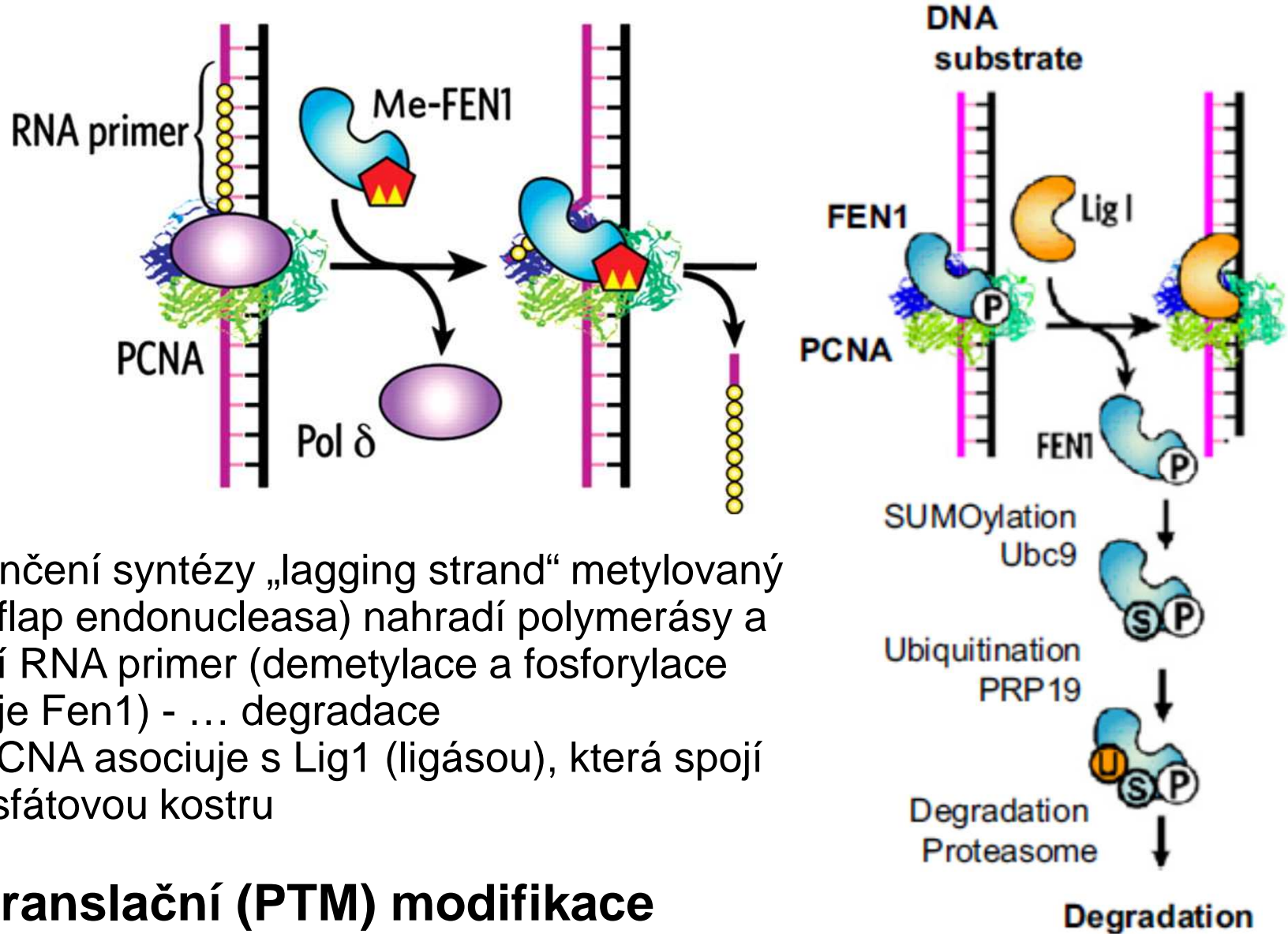
Replikace DNA (video): DNA helikasa (modrá) “denaturuje” dvoušroubovici–připojen je „clamp loader“ (šedá tlapka) - 2 raménka drží DNA polymerázy (fialové) spojené s **PCNA** („sliding clamp“, zelená). „Leading strand“ je syntetizován kontinuálně zatímco „lagging strand“ musí být primásou (žluto-zelená)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



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

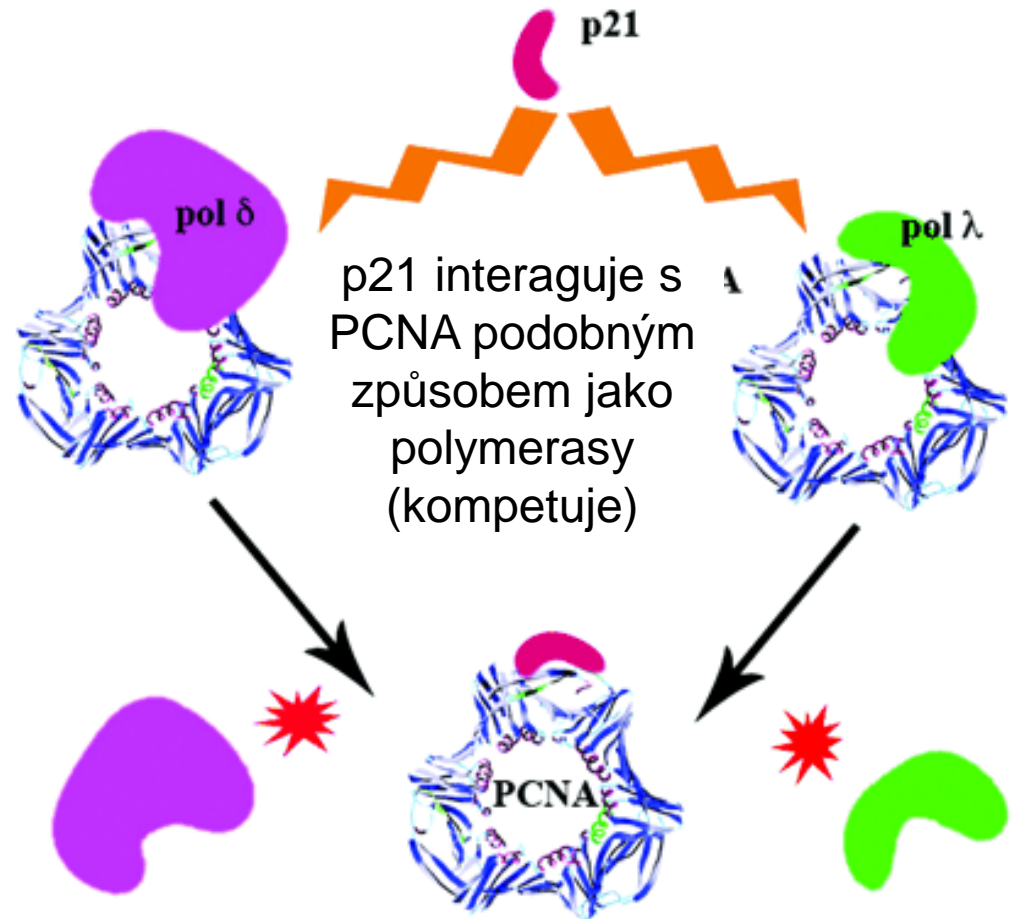
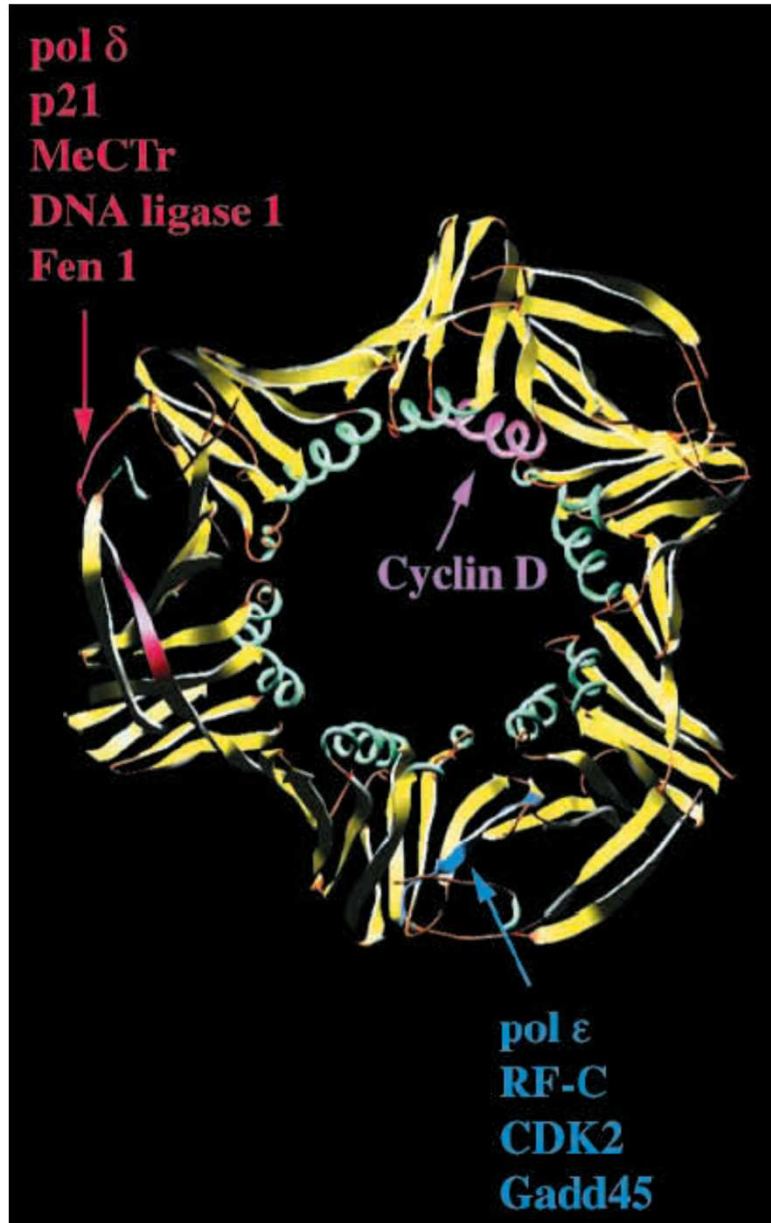


po skončení syntézy „lagging strand“ metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) nahradí polymerázy a vyštěpí RNA primer (demethylace a fosforylace disociuje Fen1) - ... degradace poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru

Posttranslační (PTM) modifikace modulují složení komplexu

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

PCNA – regulace buněčného cyklu



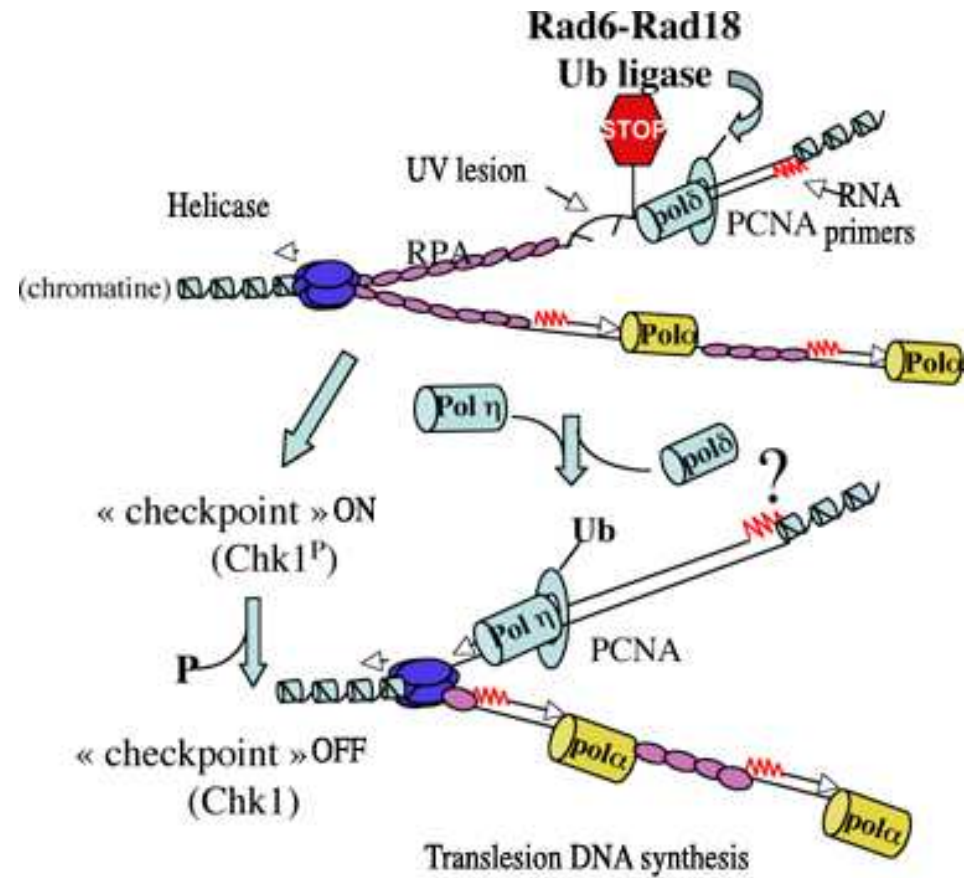
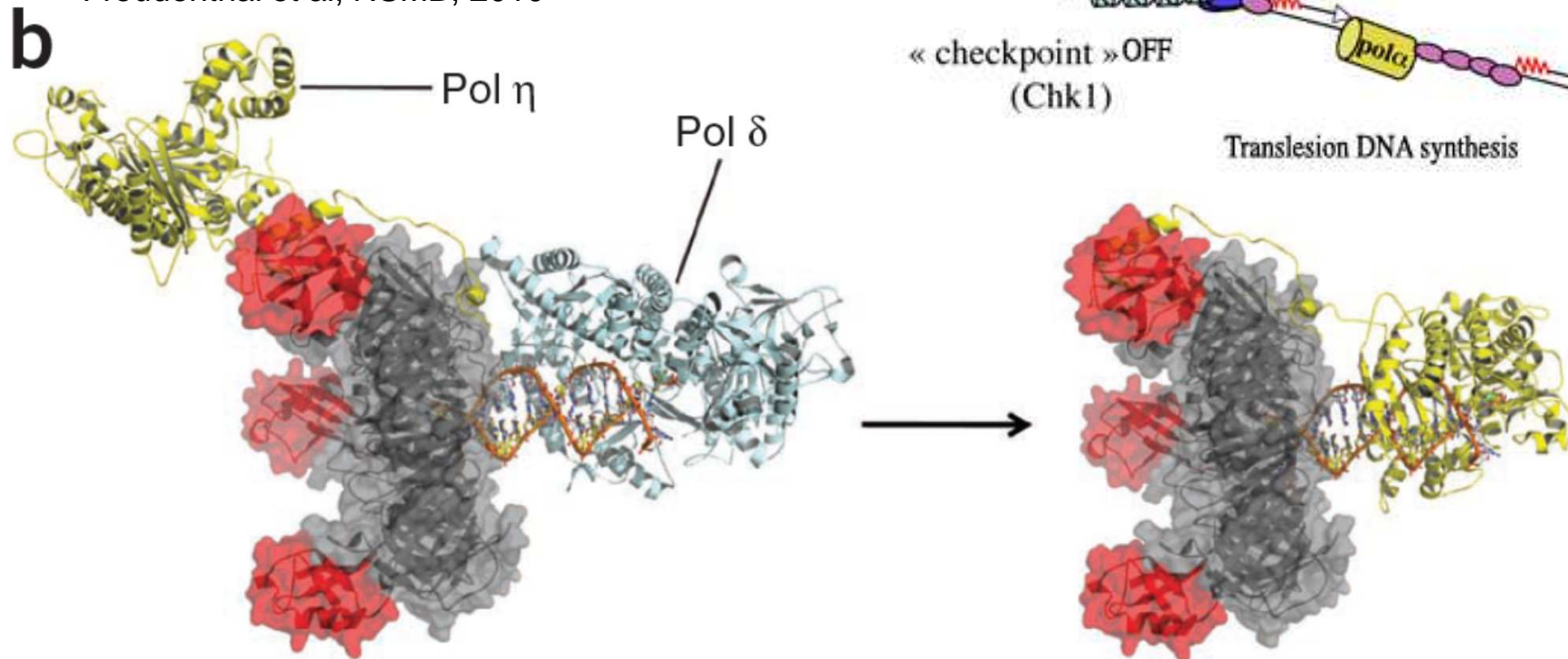
Maga et al, FASEB J, 2004

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

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

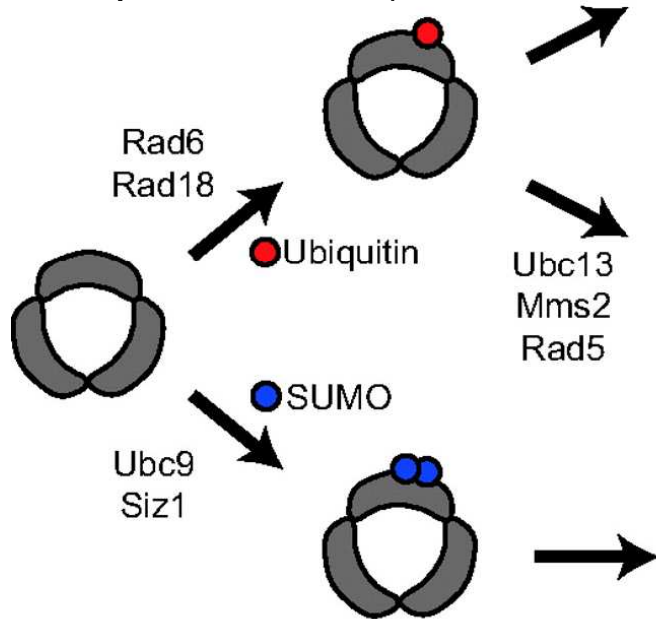
pokud je **DNA poškozená**, pol δ se zastaví a je třeba poškození nejdříve opravit – jednou z možností je „zastoupení“ jinou polymerásou, která poškozené místo „toleruje“ a překopíruje (translesion synthesis) – přepíná se ubiquitylací PCNA (na „zadní straně“) - TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují PIP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

Freudenthal et al, NSMB, 2010



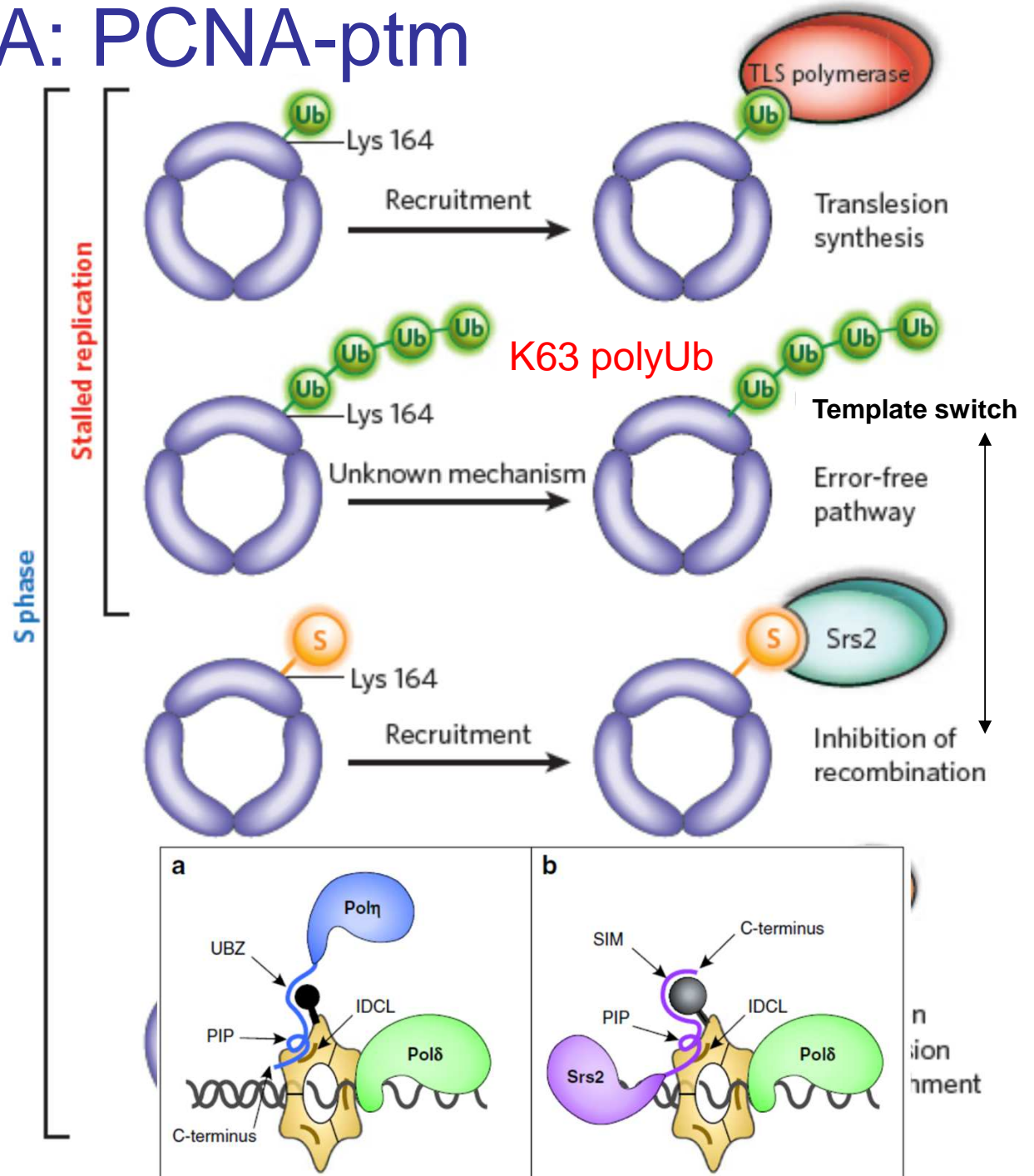
Oprava DNA: PCNA-ptm

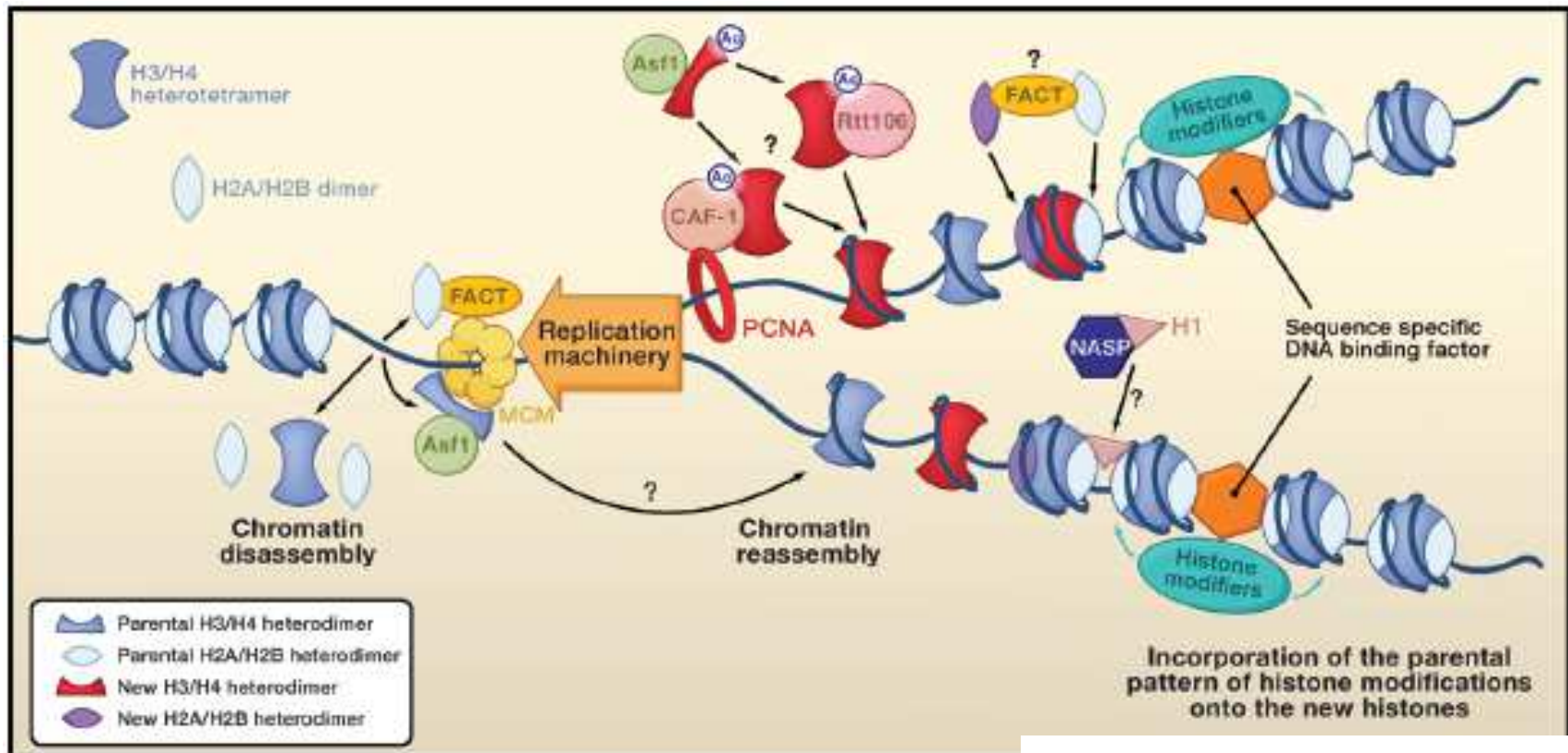
TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují UBM (správně přečtou chybu a zařadí správnou bázi)



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

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





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

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

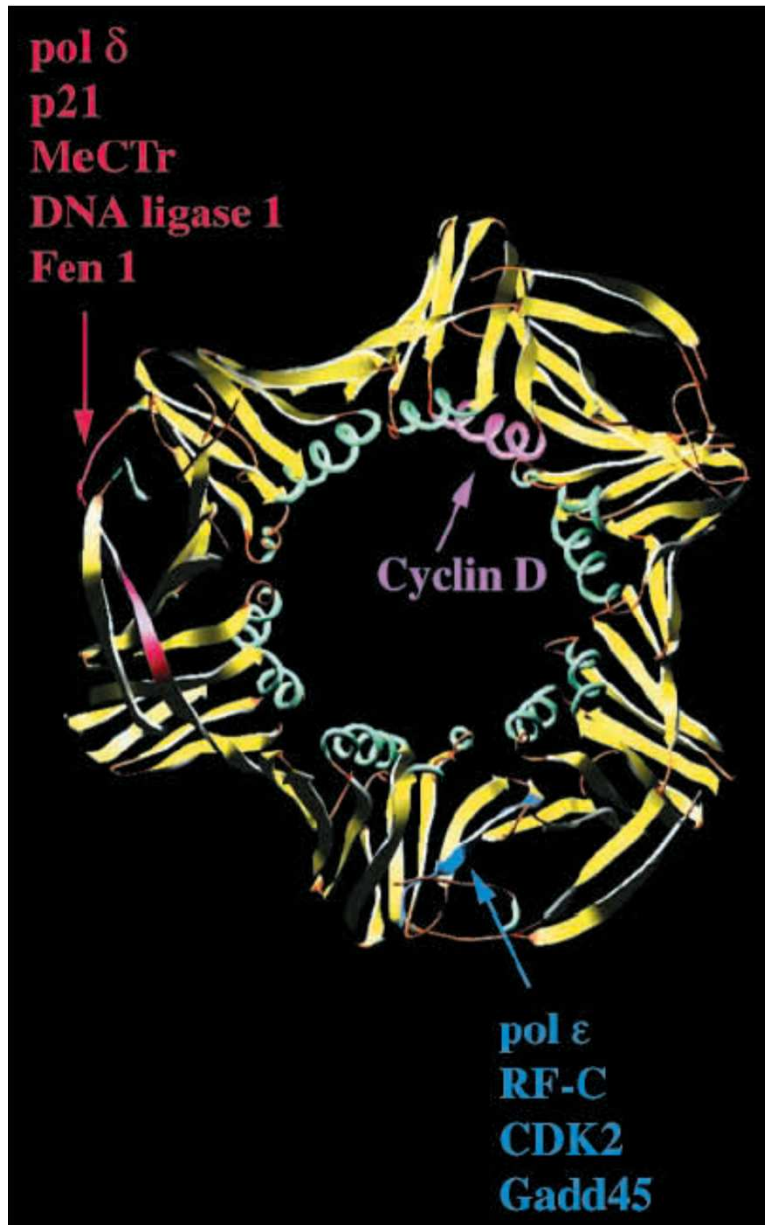


PCNA – moduly

Moldovan et al., Cell, 2007

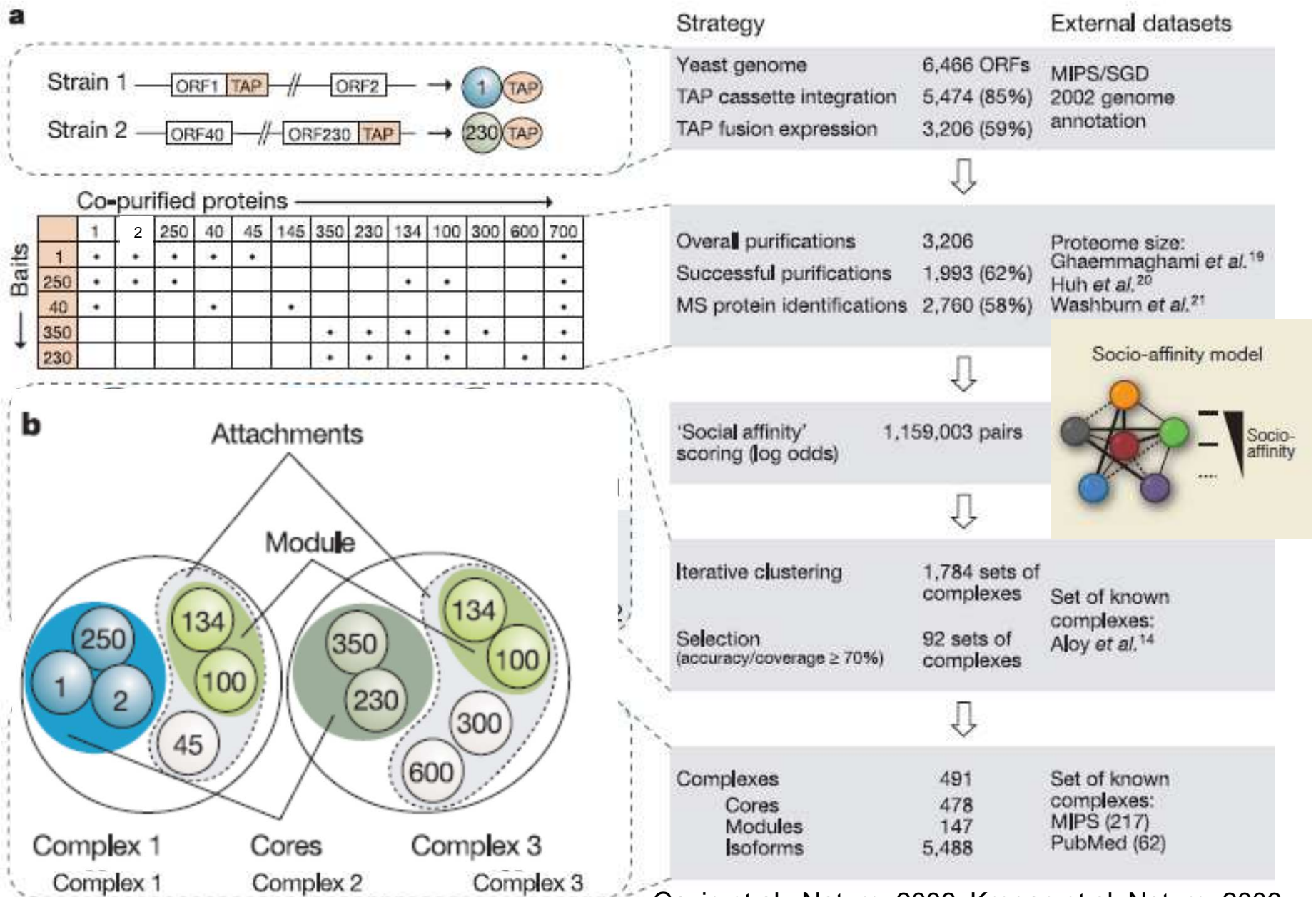
PCNA je „jádrem“ pro mnoho „attachments“
tj. s mnoha funkčními moduly

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



| Activities | Proteins |
|-----------------------------------|--|
| DNA polymerases | Pol δ , Pol ϵ , Pol η , Pol ι , Pol κ , Pol ζ , Pol λ , Pol β , Rev1 |
| Clamp loader | Rfc1, Rfc3, Rfc4 |
| Flap-endonuclease | FEN-1 |
| DNA ligase | DNA Ligase 1 |
| Topoisomerase | Topo II α |
| Replication licensing factor | Cdt1 |
| E3 ubiquitin ligases | Rad18, Rad5 |
| E2 SUMO-conjugating enzyme | Ubc9 |
| Helicases, ATPases | Srs2, Rrm3, Mgs1, WRN, RECQ5 |
| Mismatch repair enzymes | Msh3, Msh6, Mlh1, EXO1 |
| Base excision repair enzymes | UNG2, MPG, NTH1, hMYH, APE1, APE2, XRCC1 |
| Nucleotide excision repair enzyme | XPG |
| Poly (ADP-ribose) polymerase | PARP-1 |
| Histone chaperone | CAF-1 |
| Chromatin remodeling factor | WSTF |
| Histone acetyltransferase | p300 |
| Histone deacetyltransferase | HDAC1 |
| DNA methyltransferase | DNMT1 |
| Sister-chromatid cohesion factors | Eco1, Chl1, Ctf18 |
| Protein kinases | CDK2, EGF Receptor |
| Cell-cycle regulators | p21, p57, Cyclin D1 |
| Apoptotic factors | Gadd45, ING1b, p53 |

Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

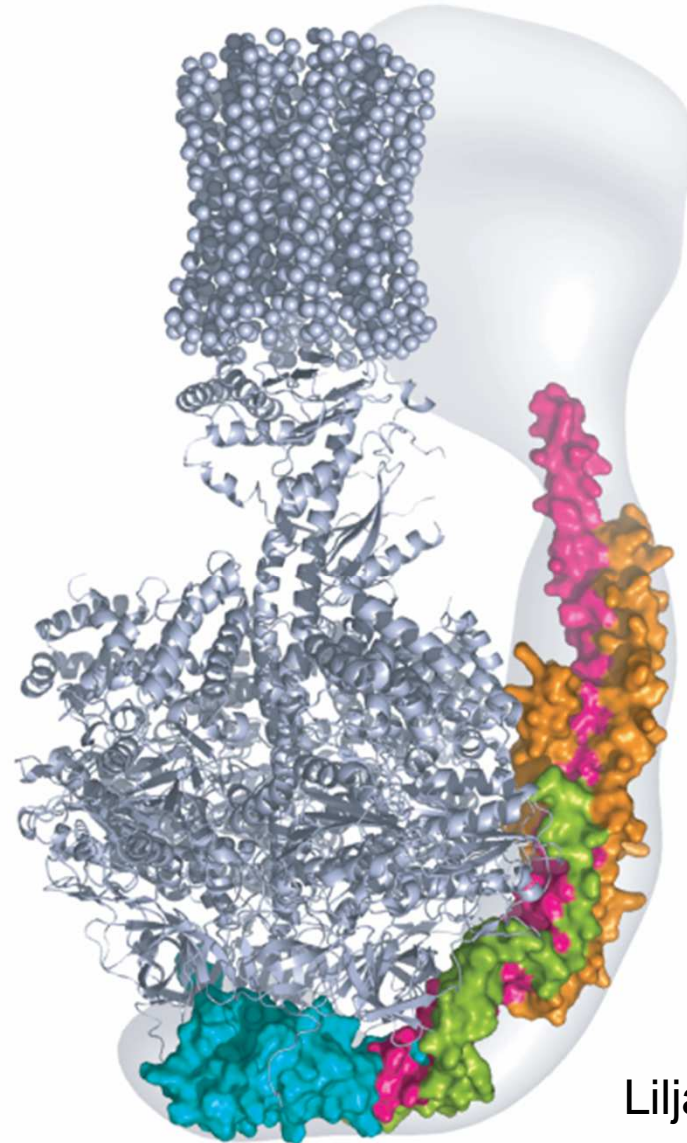


Gavin *et al.*, Nature, 2006; Krogan *et al.*, Nature, 2006

Stabilní komplex – molekulární stroj

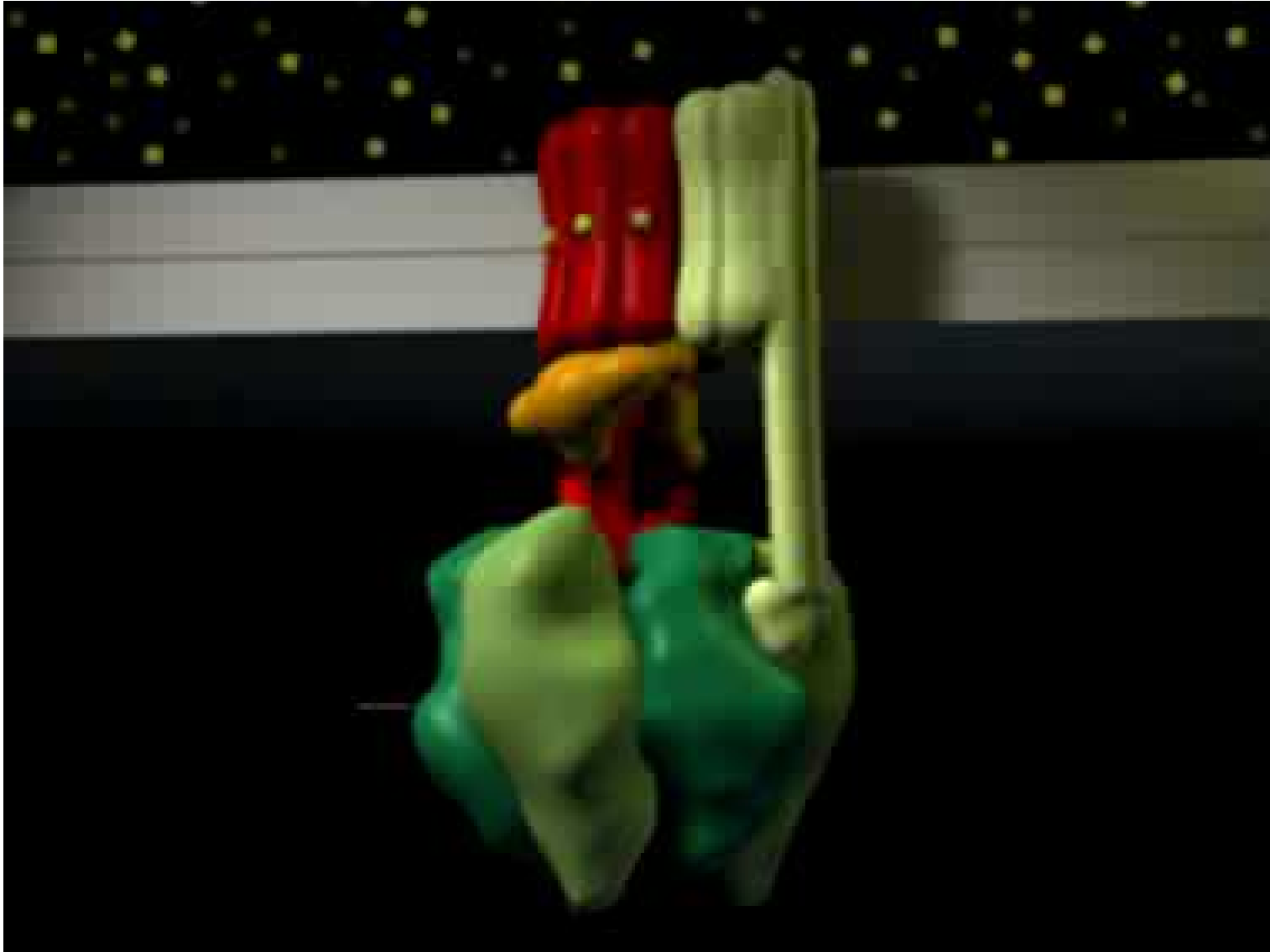


ATPasová pumpa -
komplex se stálým
složením/poměrem
podjednotek („neměnný“)

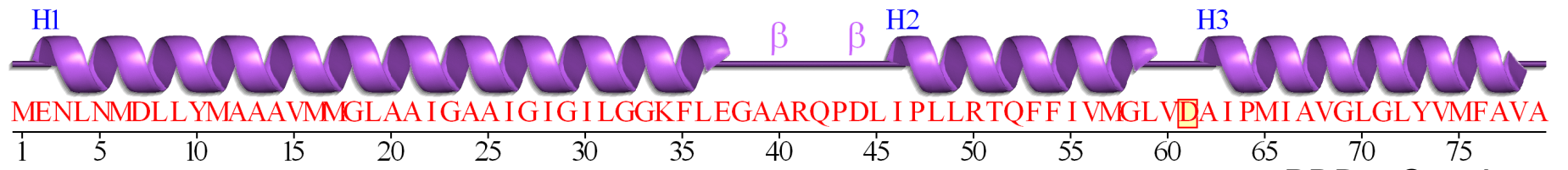


Liljas a spol.

14.4-ATP_synthase – učebnice: Alberts a spol, Molekulární biologie buňky.

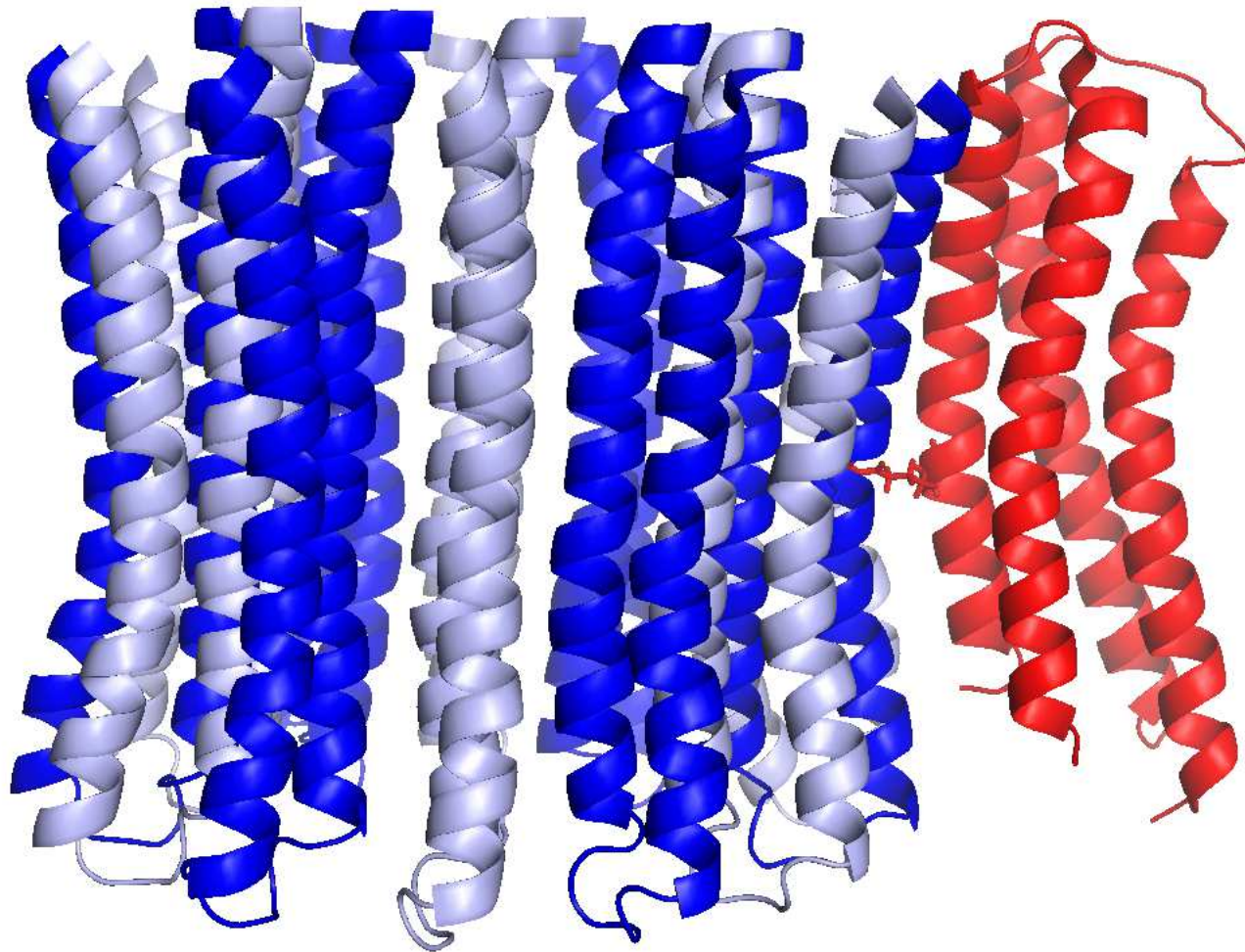


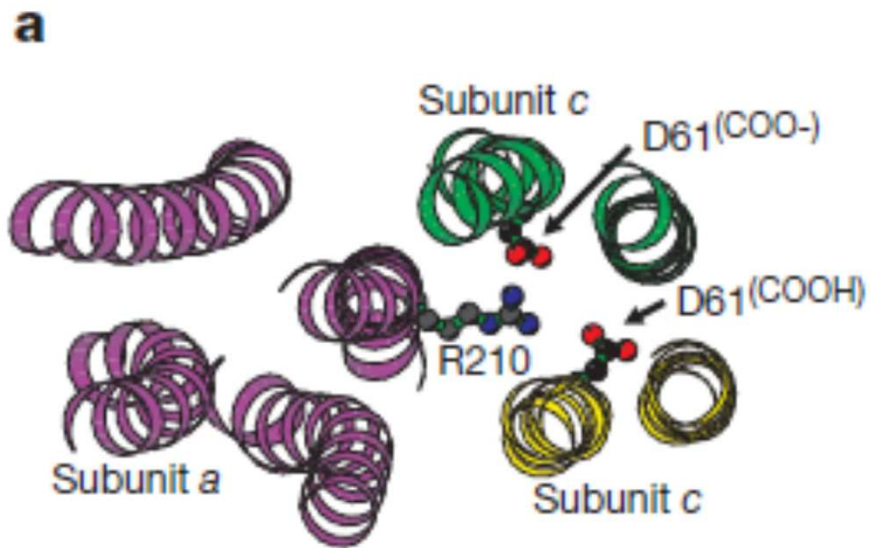
„ATP syntasa je jedním z divů molekulárního světa“. Je to molekulární motor – „nanostroj“ – vyrábějící většinu ATP (energie).



pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu

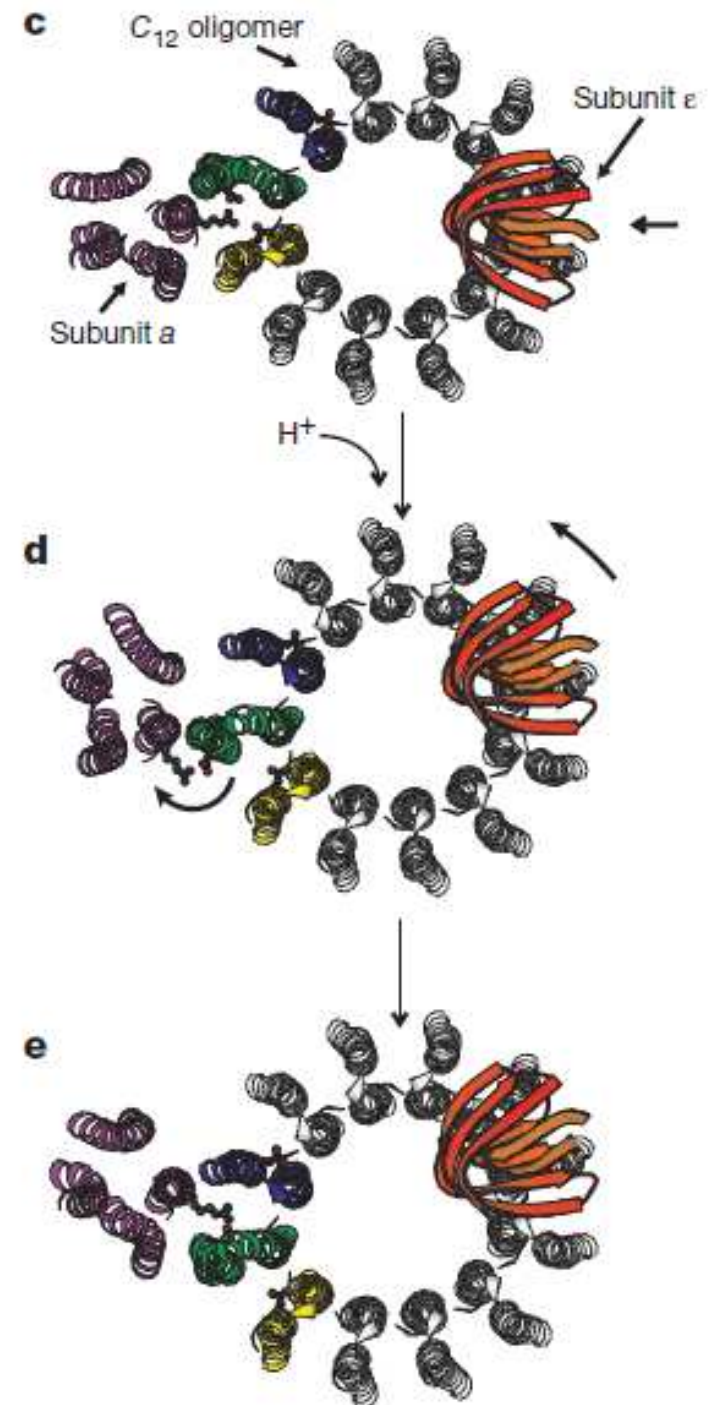
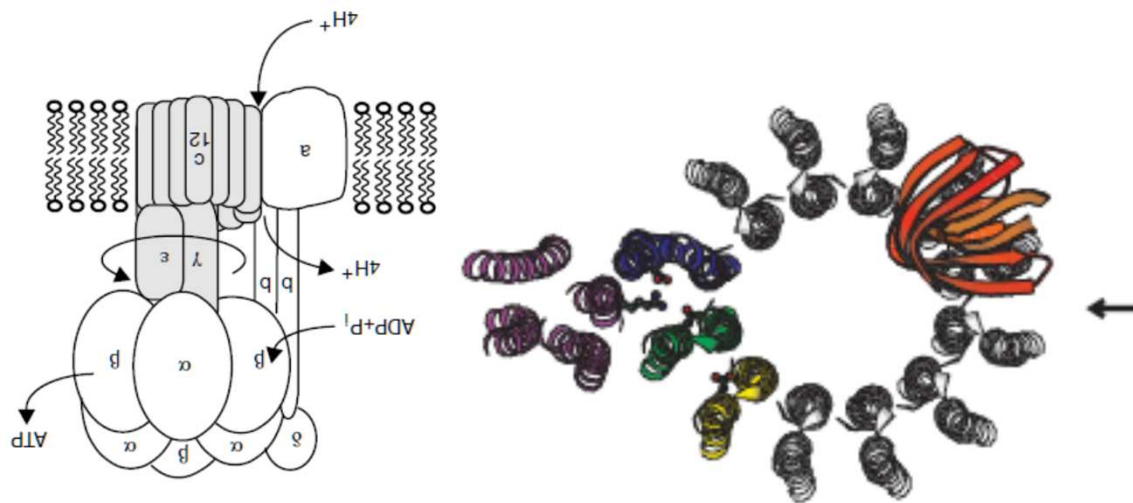
PDB: 1C17:A

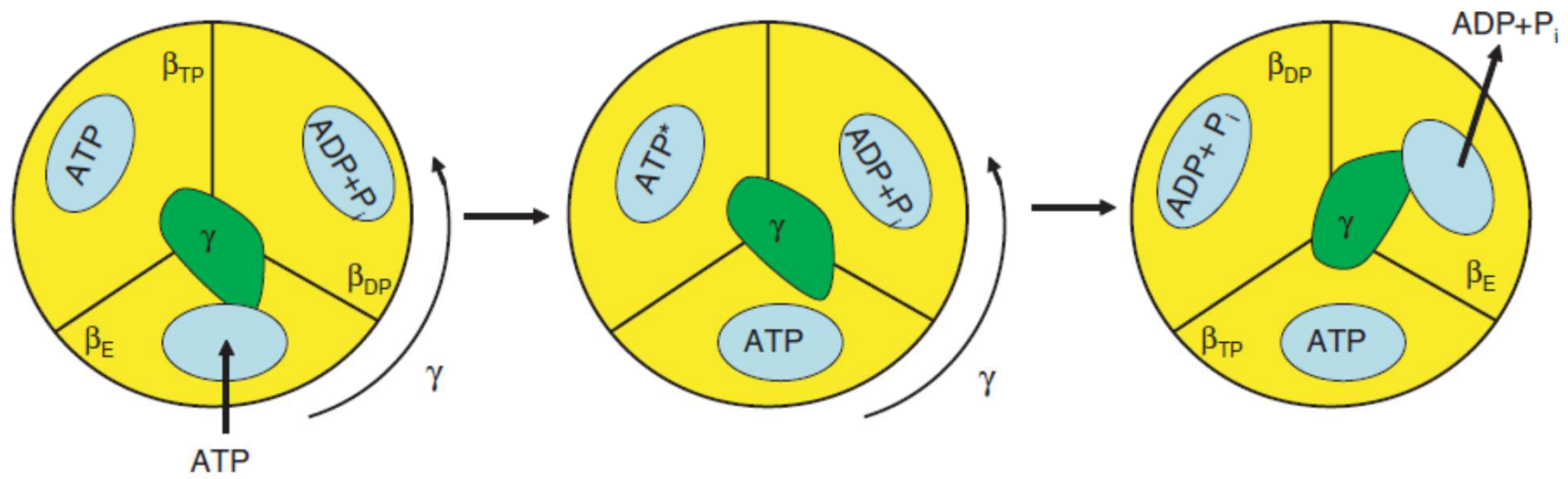




Rastogi & Girvin, Nature, 1999

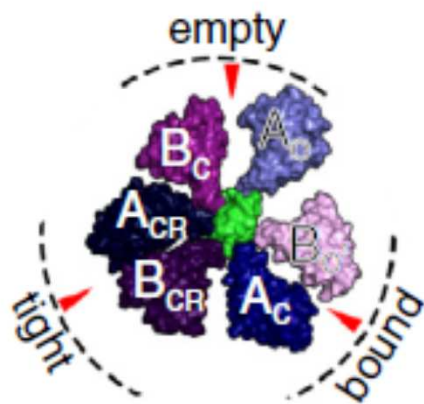
podjednotka a obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu - dochází k neutralizaci náboje tzn. posun do hydrofobní části – otočka.





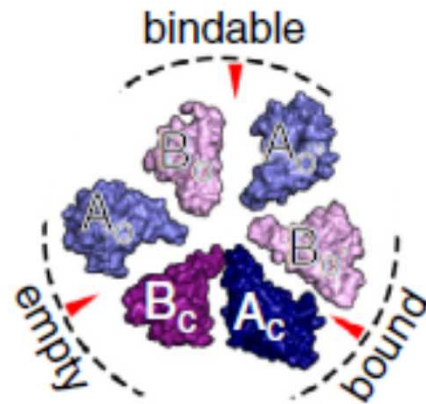
State 1

A_3B_3DF
(+ AMPPNP)



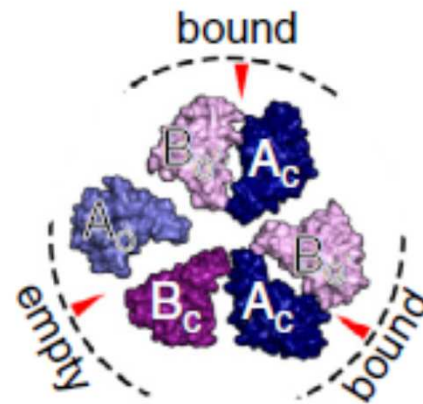
State 2

A_3B_3



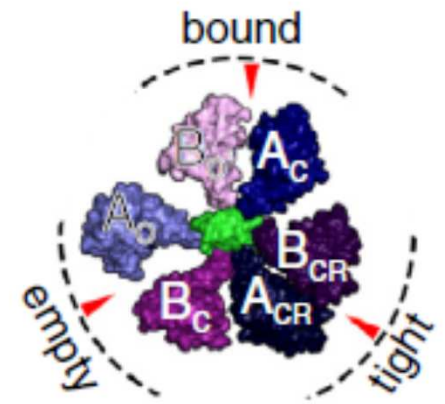
State 3

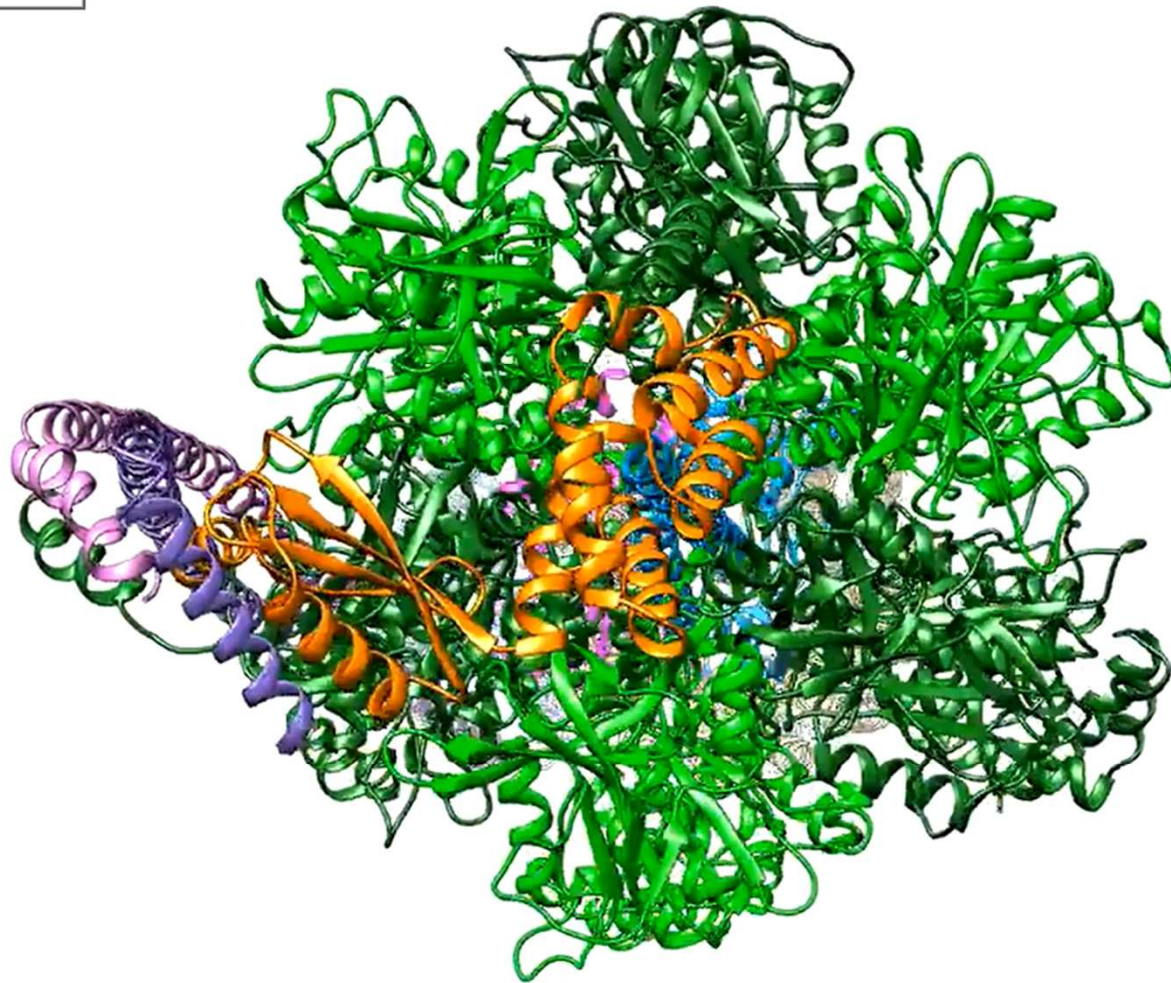
A_3B_3
+ AMPPNP



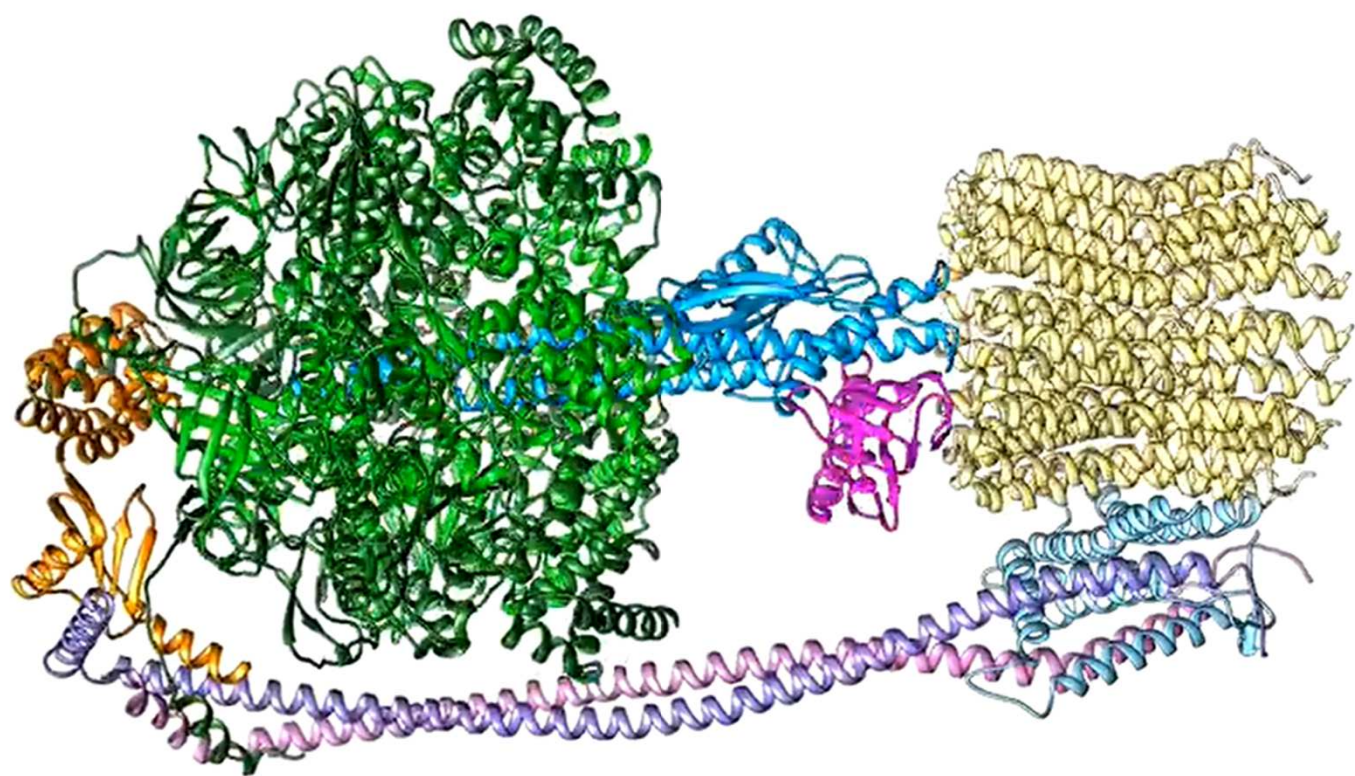
State 4 (=1)

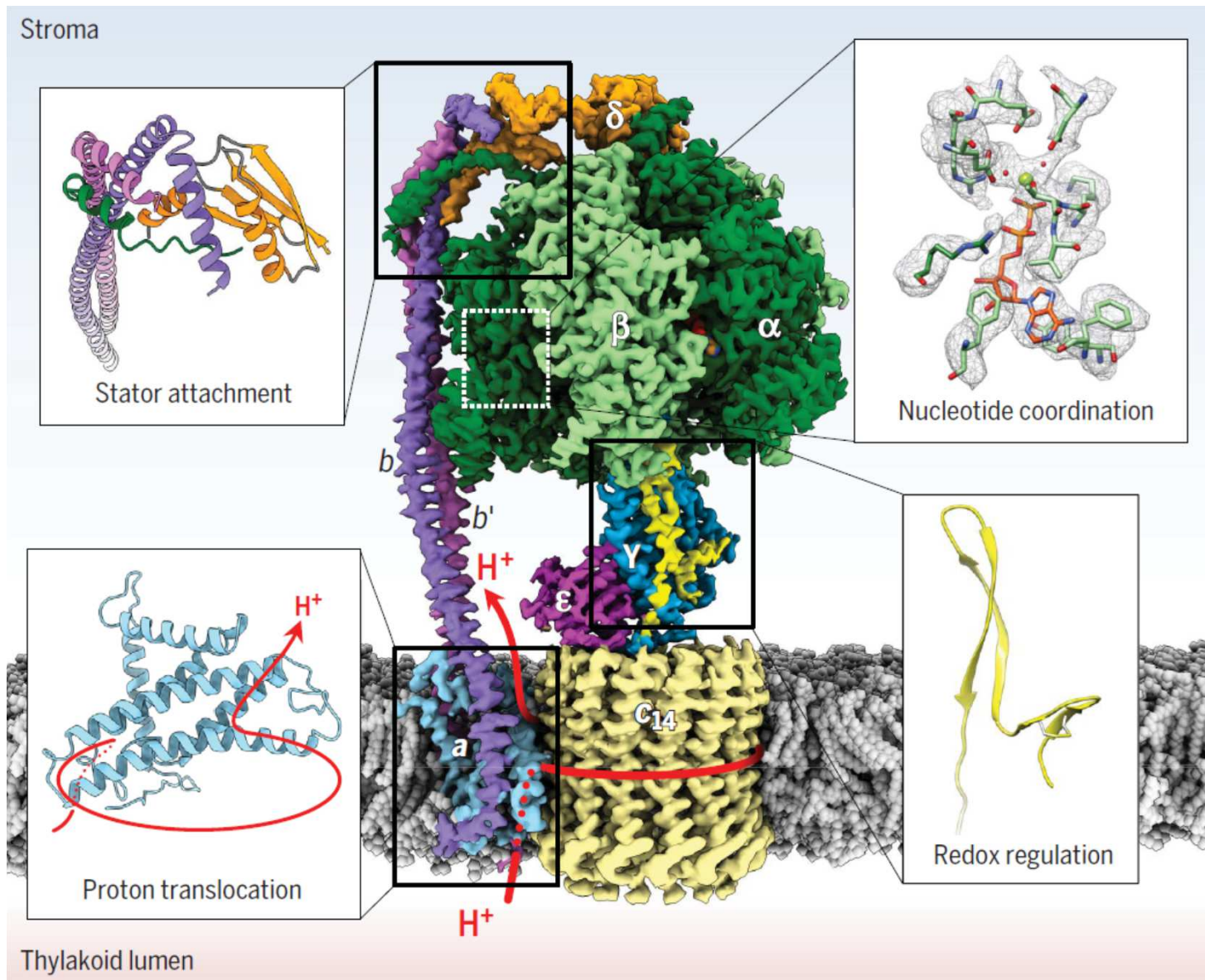
A_3B_3DF
(+ AMPPNP)





rotor je osou spojen s chemickým statorem vyrábějícím ATP (nebo poháněným ATP).



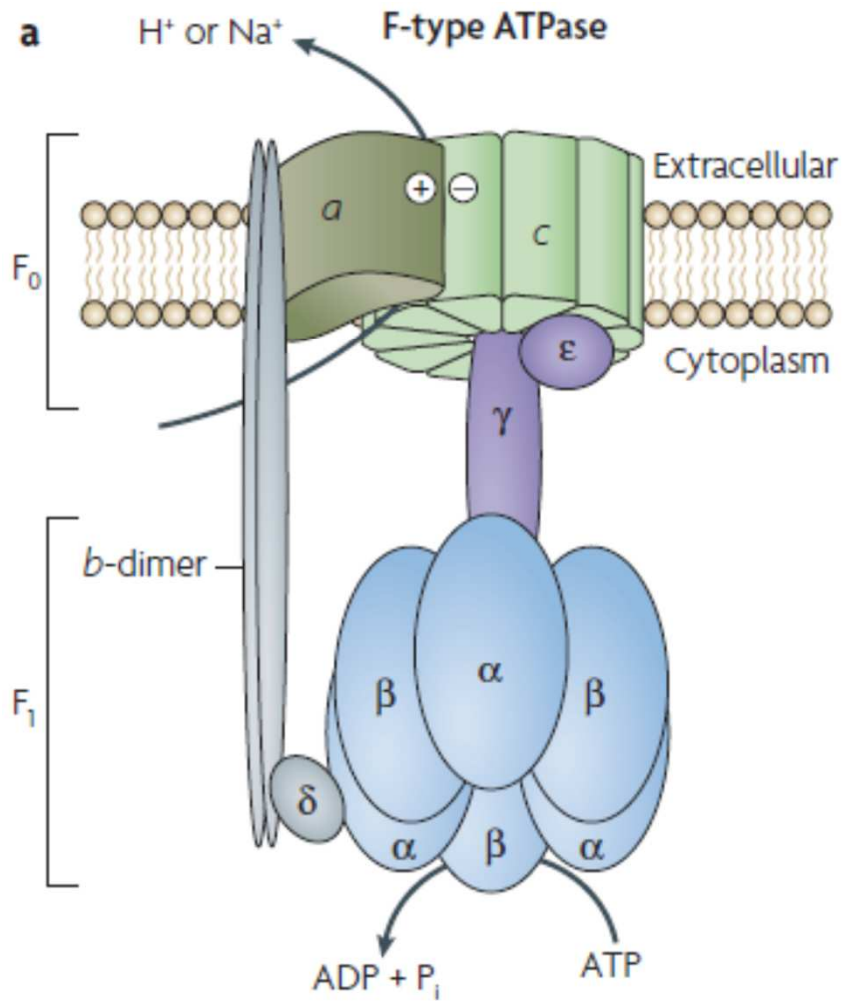


Hahn et al., Science, 2018

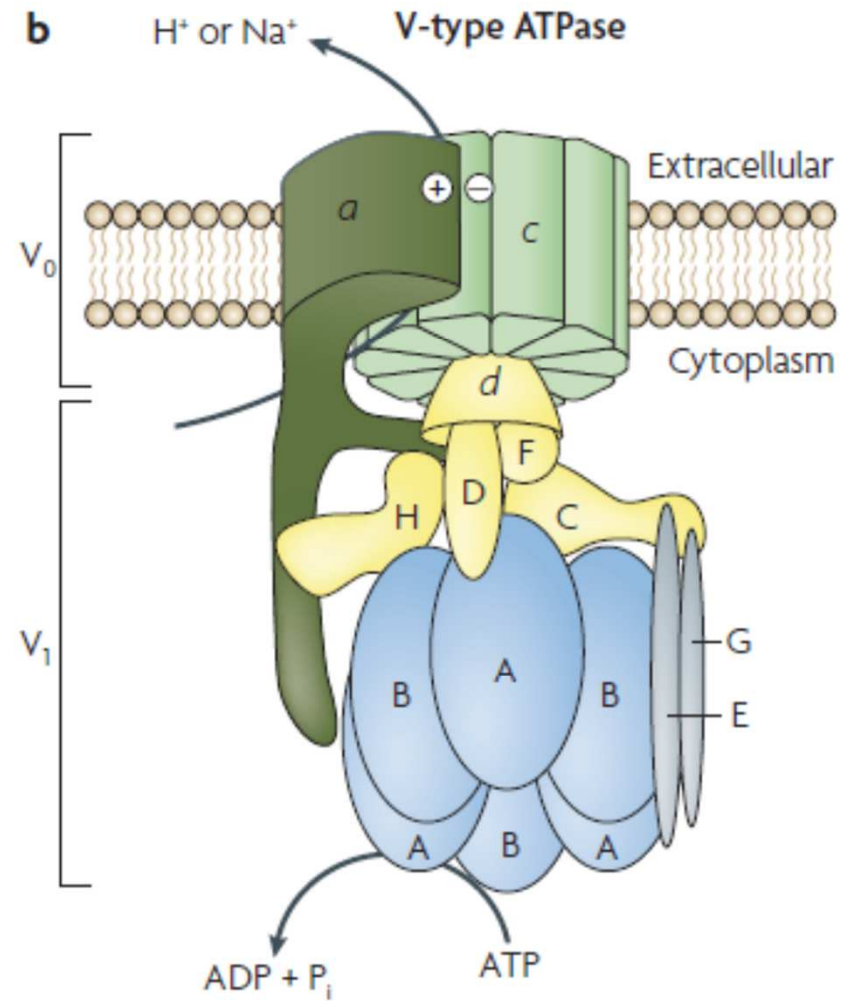
26 podjednotek:
 a – vstup H^+ ;
 b, b' – spojka;
 $3\alpha+3\beta$ – motor;
 δ – uchycení
 γ, ϵ – osa
 $14xc$ – rotor

stator
rotor

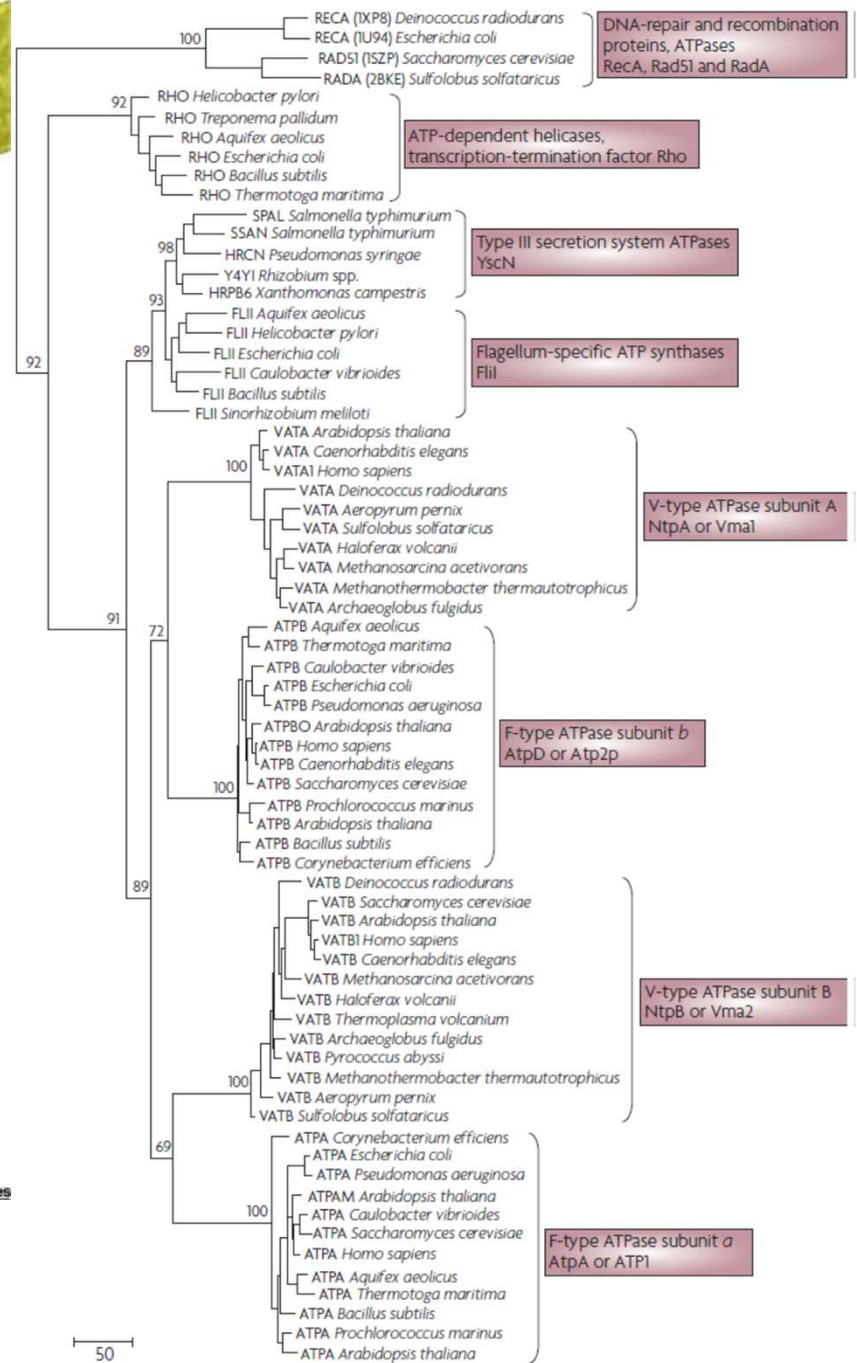
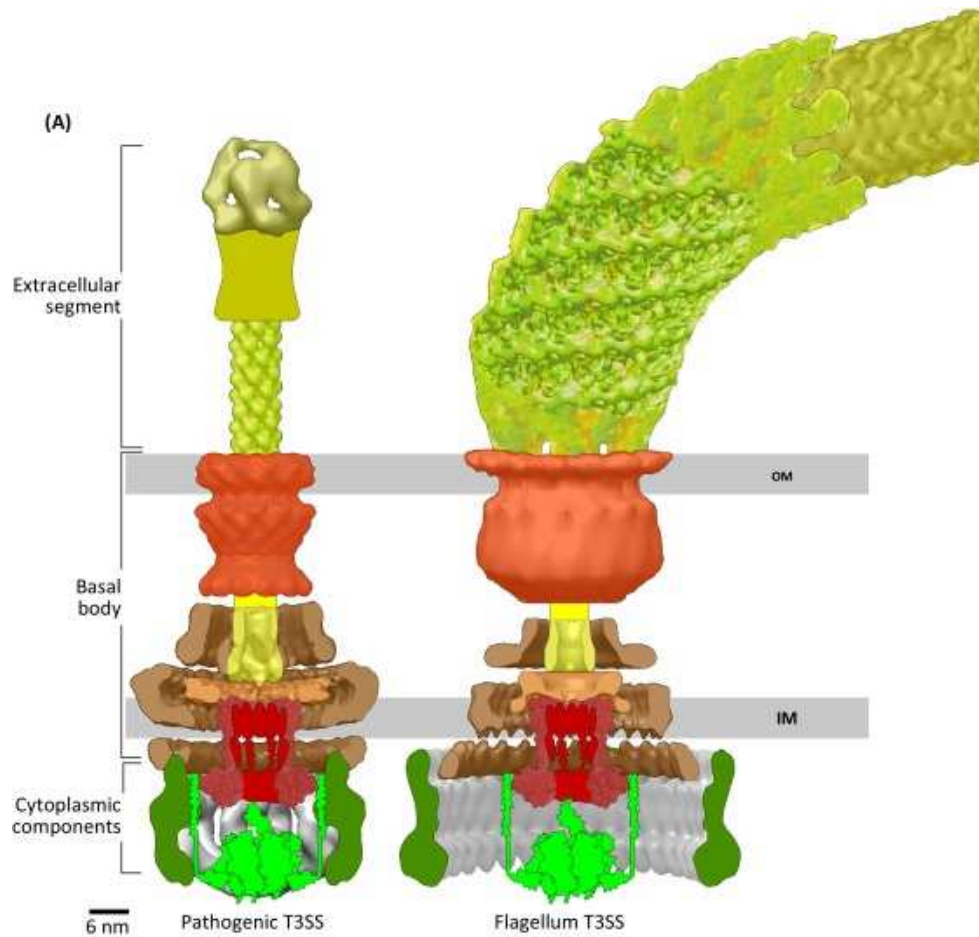
ATP syntáza z chloroplastu (špenát) – 6FKF - cryoEM



mitochondriální



vakuolární



Trends in Biochemical Sciences

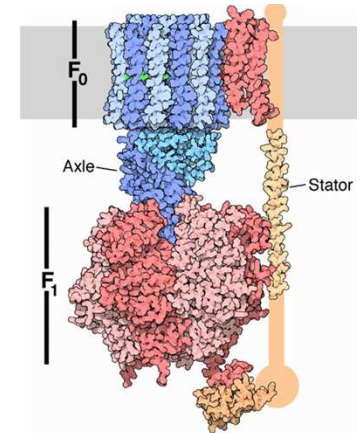
- ATPasové pumpy ...
- sekreční systém (T3SS injectisom)
- pohon bičičů ...

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](#) (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 bičků

•Rotační motory:

- [F₀F₁-ATP syntáza/ATPasa](#) – přeměna energie ATP na elektrochemický potenciál ([mitochondrie](#)) – nebo naopak pumpování protonů přes membránu ([vakuoly](#))
- rotace bakteriálních bičků

Více CG030

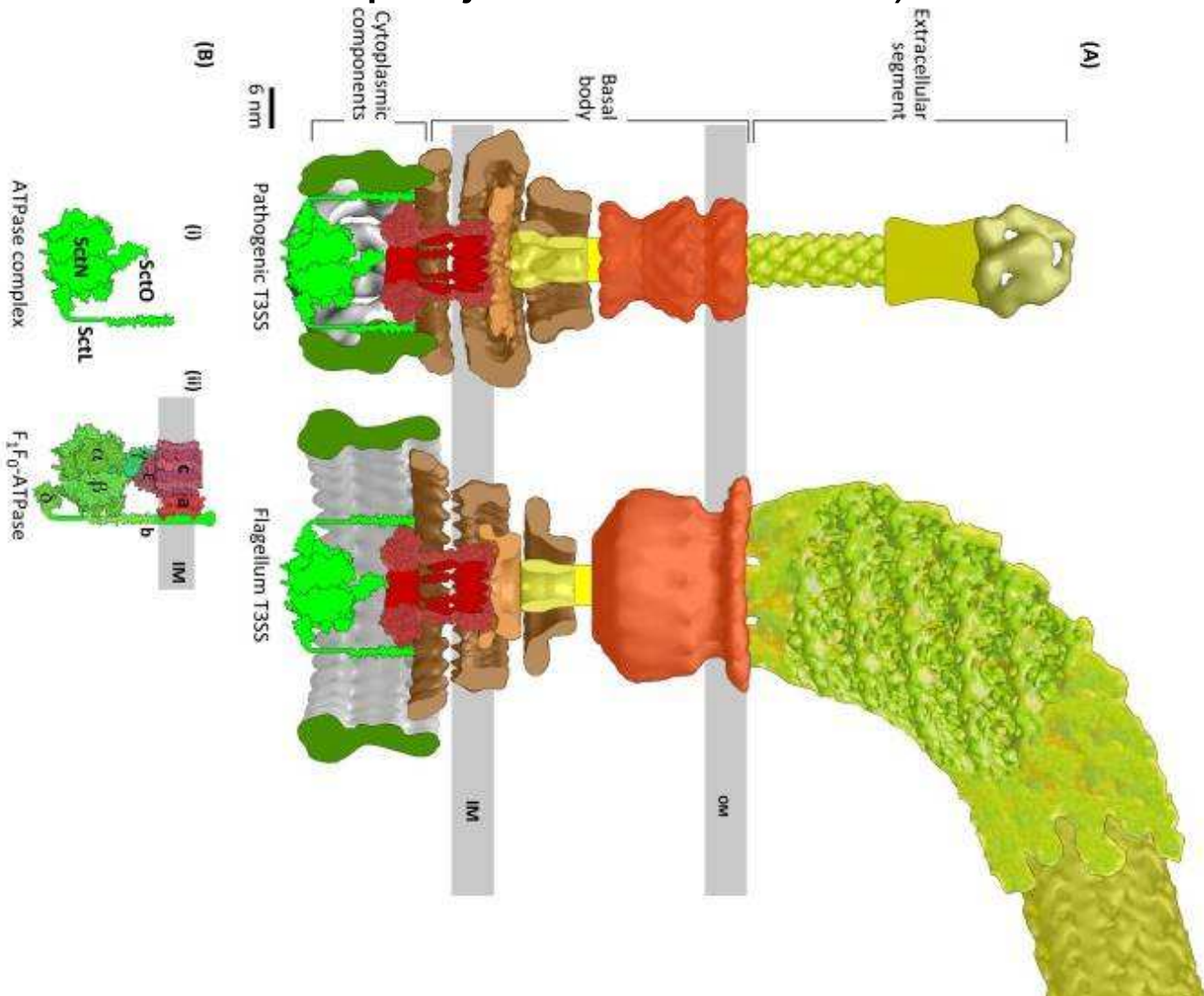
•Motory nukleových kyselin:

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



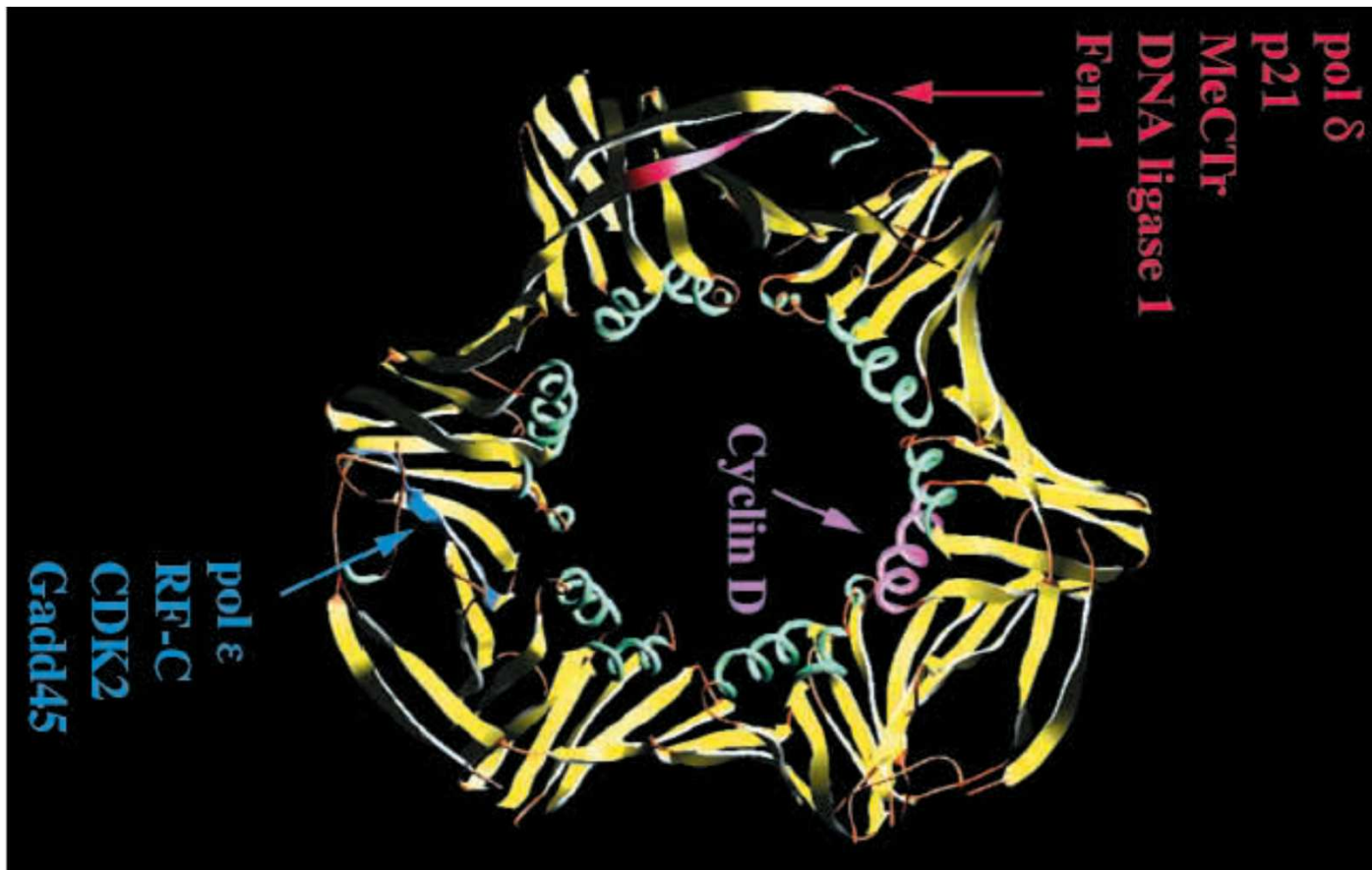
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



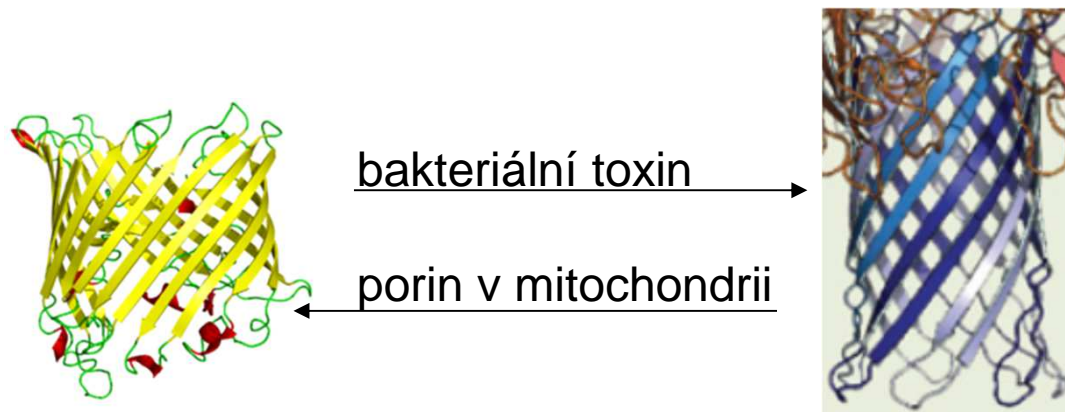
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

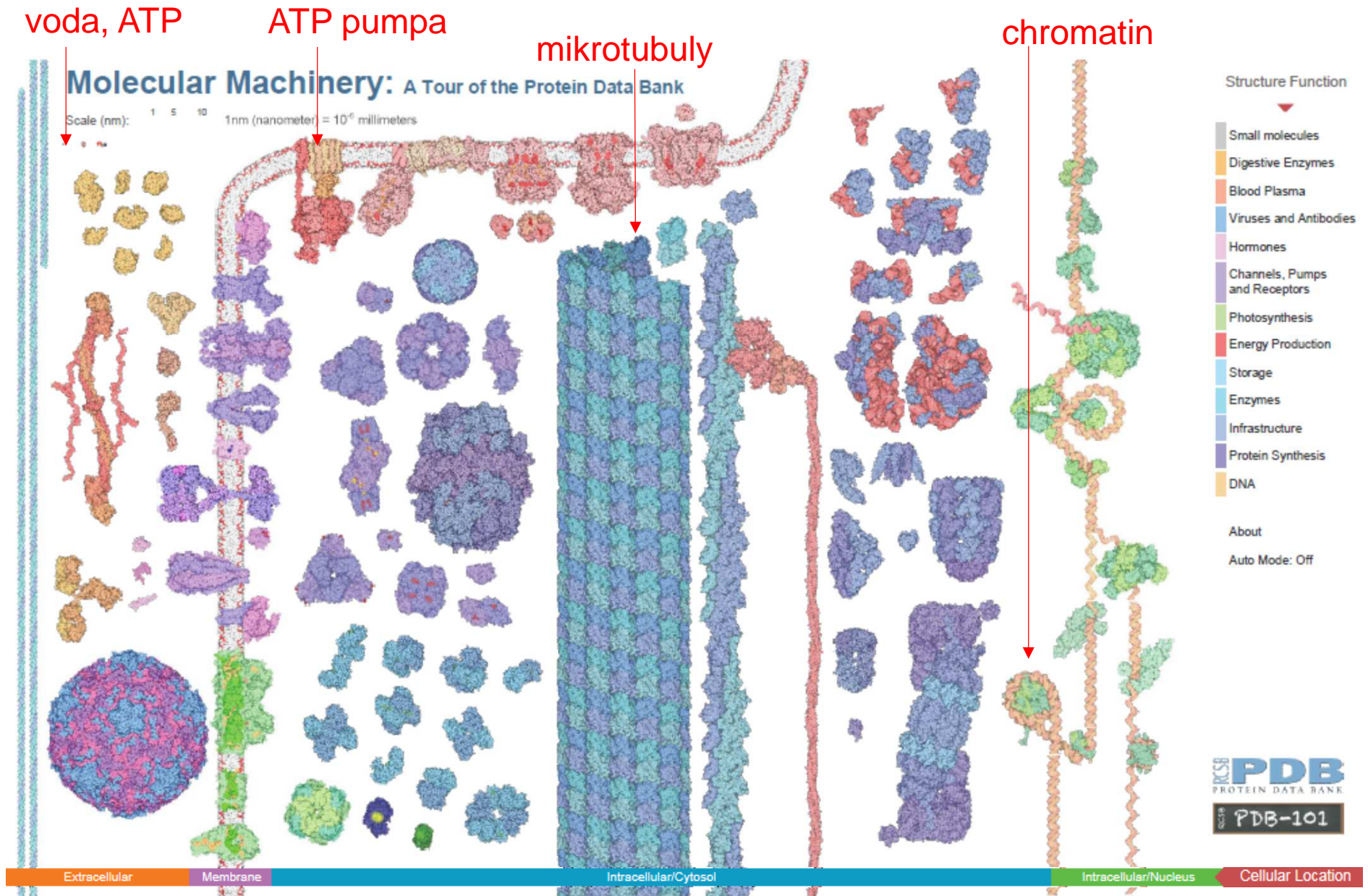
- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká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

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

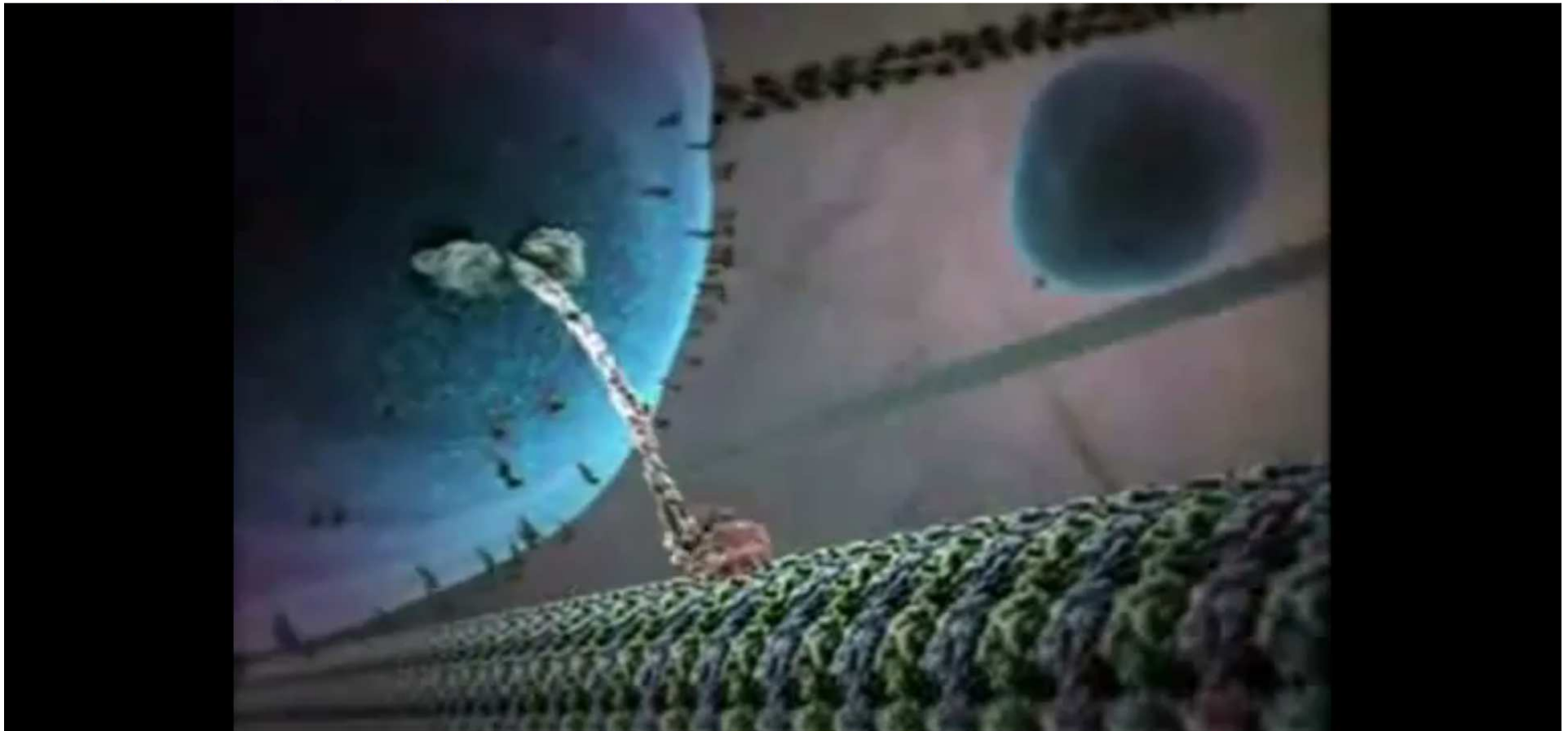
jarní semestr - doc. Jan Paleček

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



01:23 02:09

100%

Windows taskbar icons: Start, Search, Task View, Mail, PowerPoint, Word, Excel, PDF, Photoshop, Firefox, Chrome, Edge, File Explorer, Calculator, VLC, Network, Sound, Keyboard, CES, 19:24, 27.10.2017, 1 notification.

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