

# PROTEOMIKA

doc. Jan Paleček  
jpalecek@sci.muni.cz

- Proteinové interakce – 10.11.
  - jak spolu proteiny interagují?
  - interaktom
- Proteinové komplexy – 24.11.
  - protein-proteinové interakce a komplexy
  - komplexom, architektura a funkce komplexů

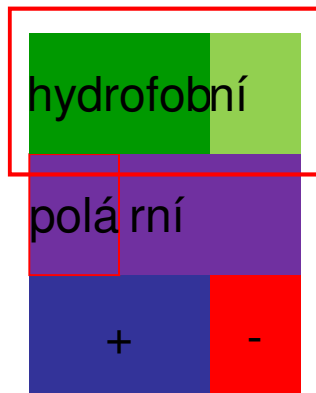
**CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů**

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

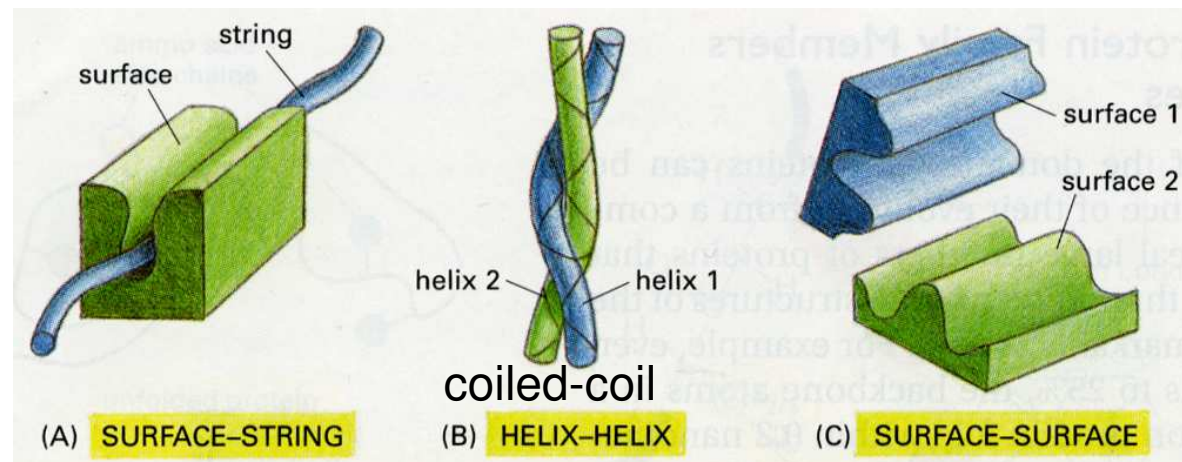
# Souhrn - protein-proteinové interakce

- proteiny/**domény**/motivy interagují s proteinovými 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



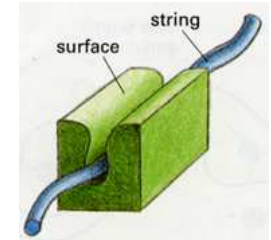
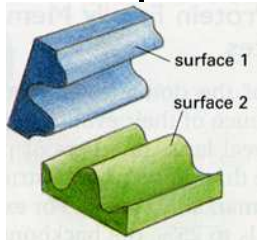
sekundární a terciární struktura



- proteiny jsou troj-rozměrné - mají různé tvary a více domén => mají více vazebných míst na povrchu => **komplexy** a "sítě"

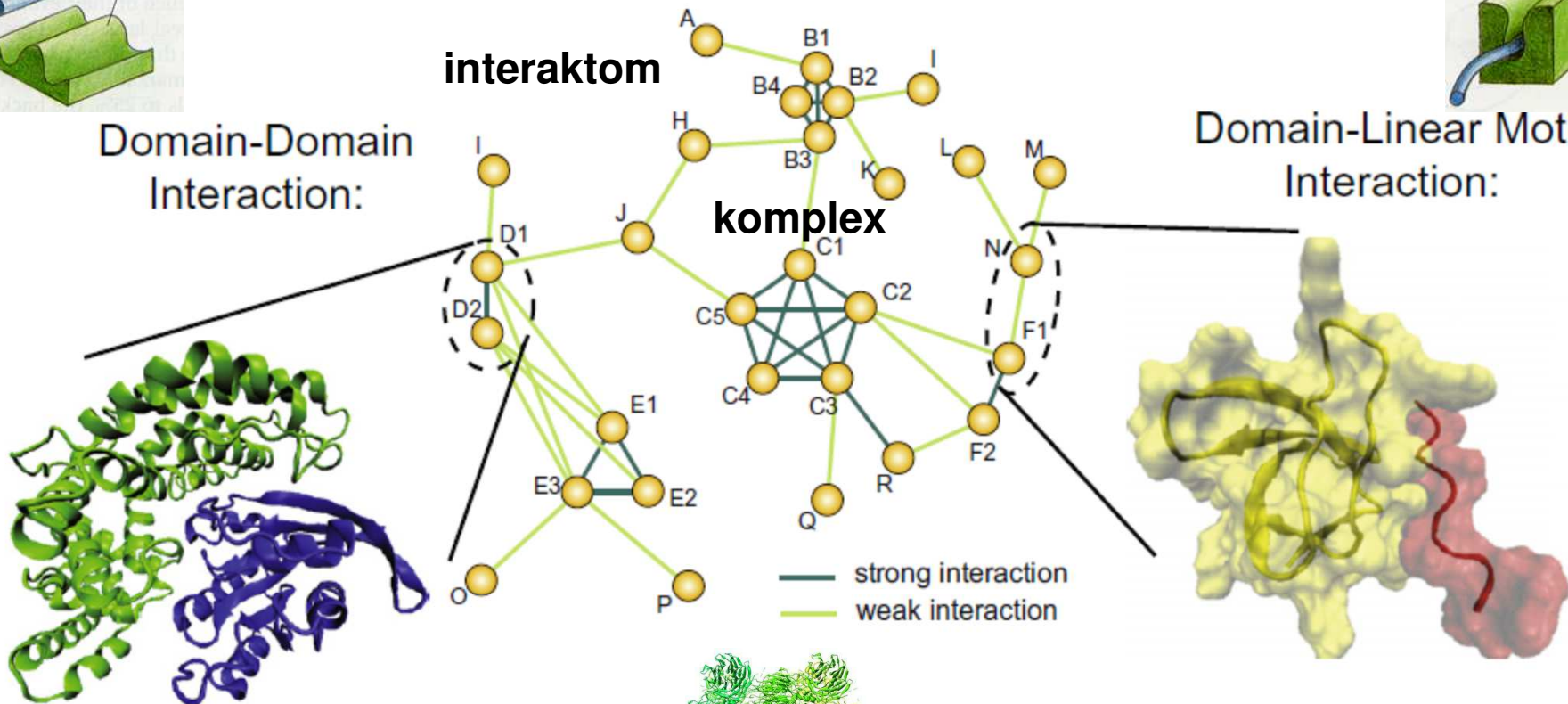
# Protein-proteinové interakce

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



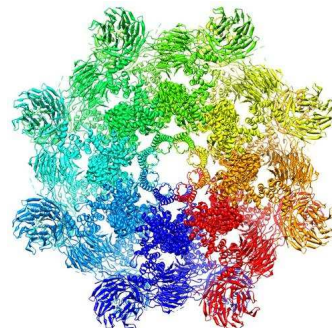
Domain-Domain Interaction:

Domain-Linear Motif Interaction:

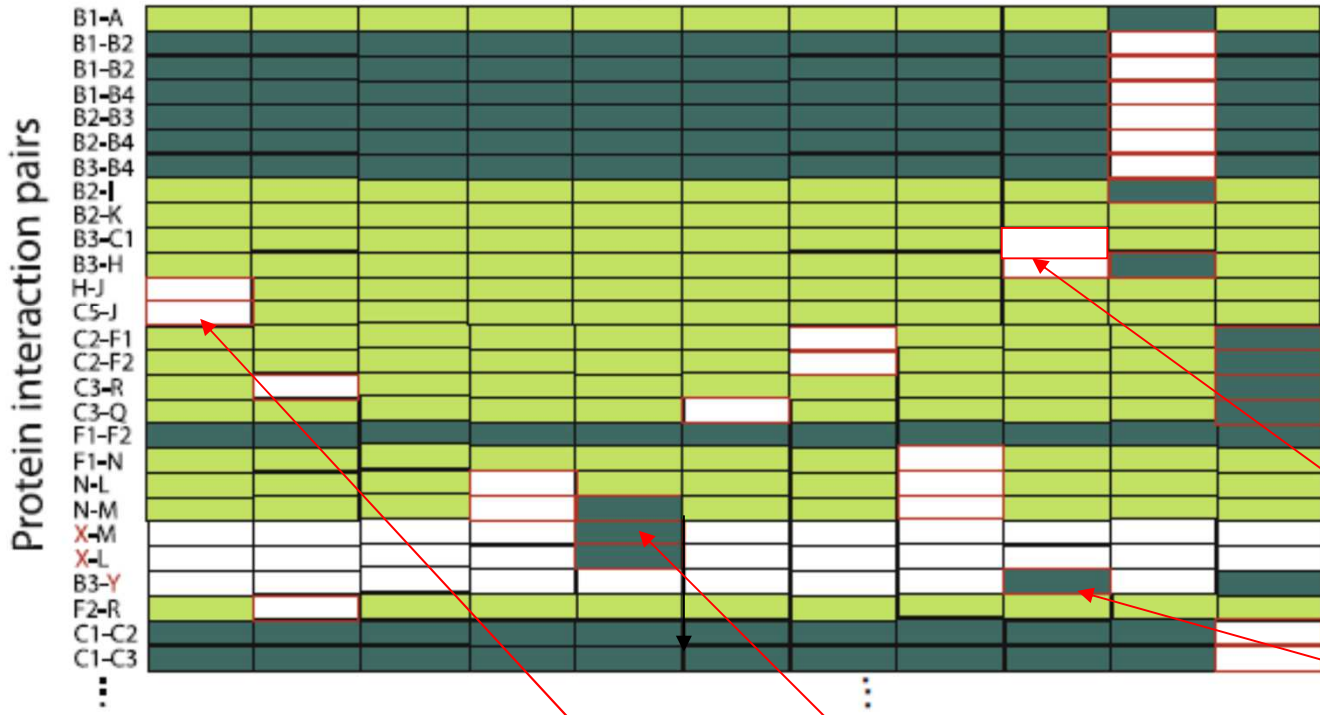
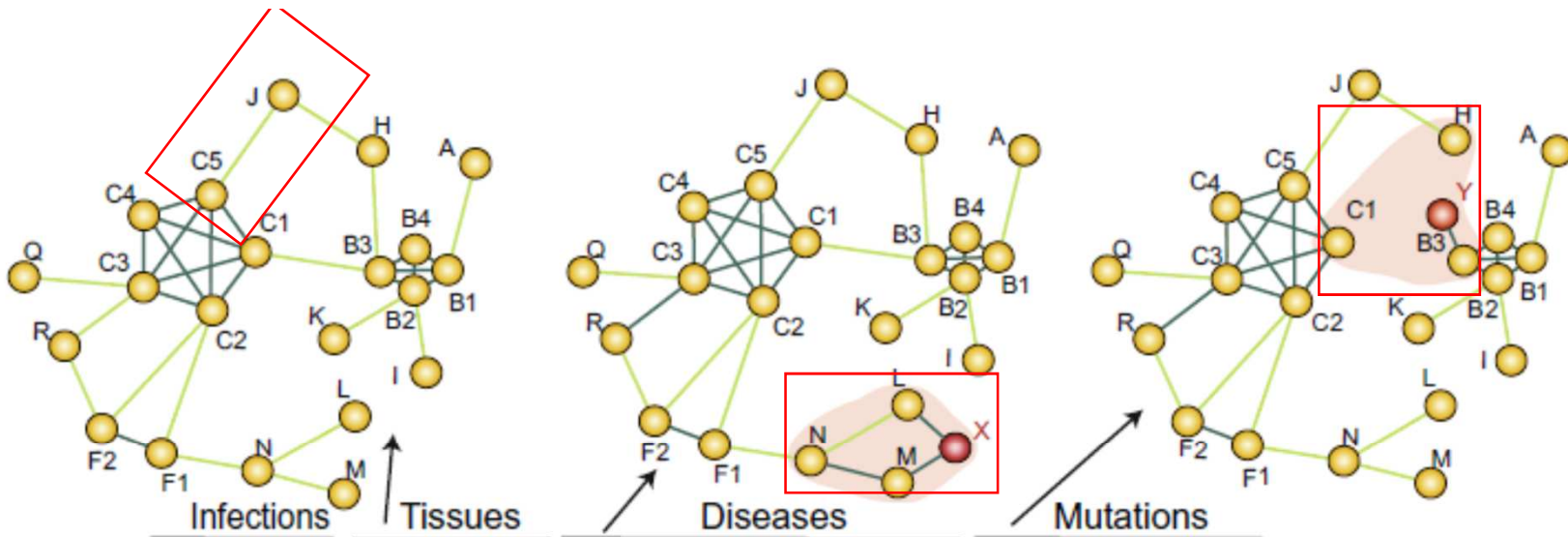


Bader et al, FEBS Lett, 2008

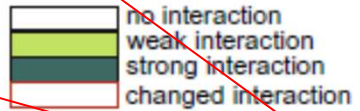
- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities:  $K_D$  nM to pM
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD



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



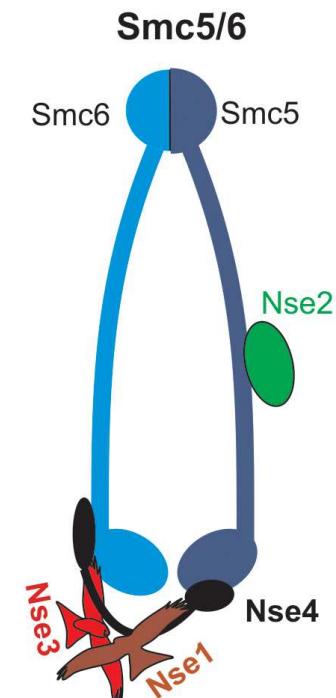
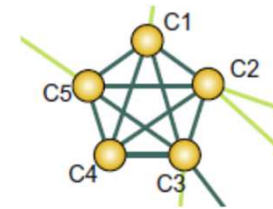
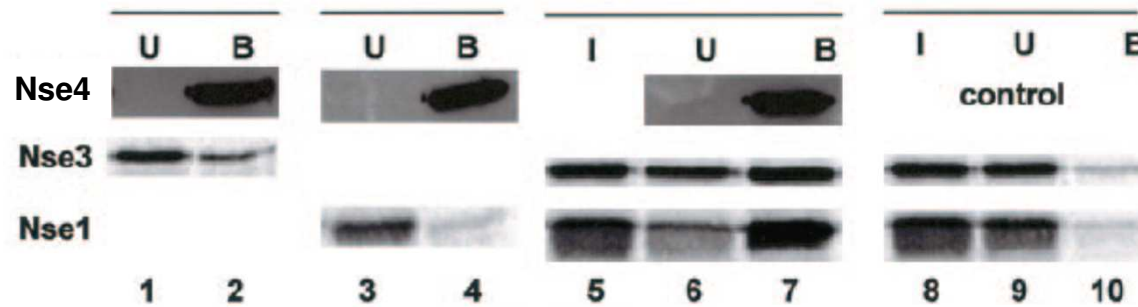
Sít' neznamená komplex (hůře popisuje stabilní komplexy, ale lépe popisuje vztahy)

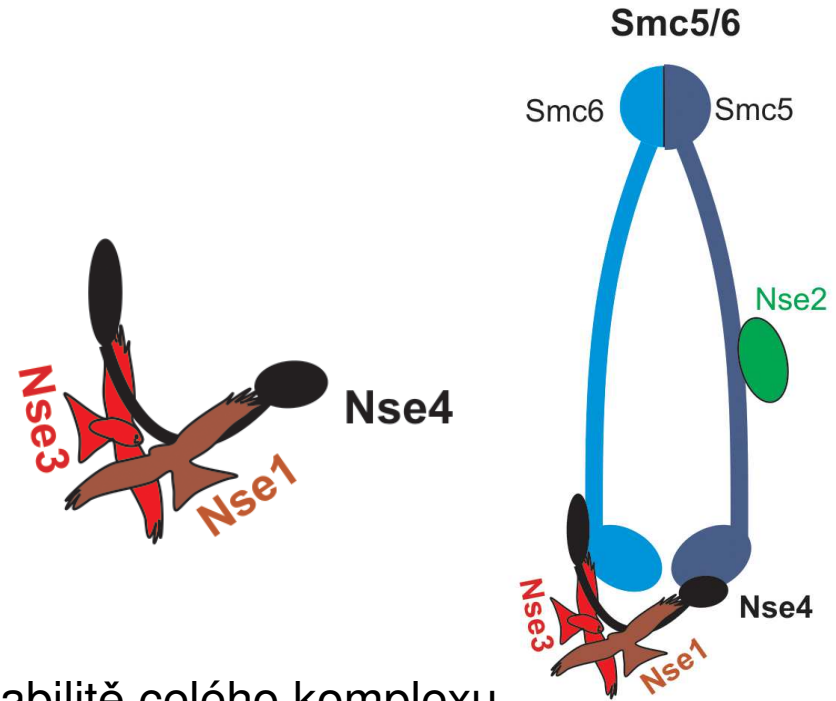
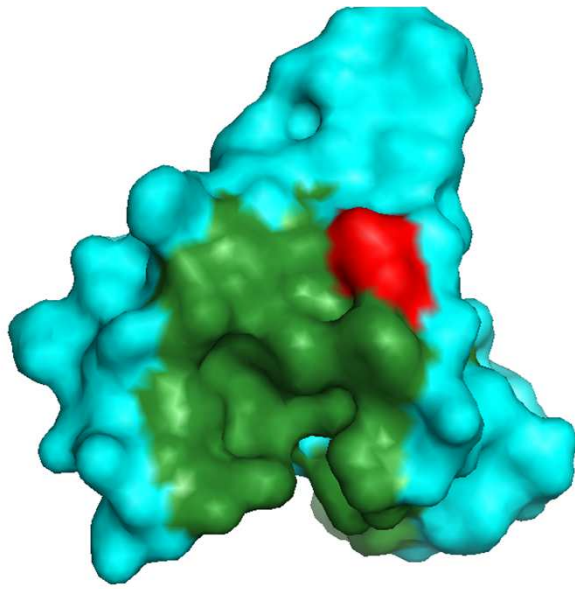


**modulace interakcí** – inhibice vs nové interakce (virovými proteiny, mutacemi)  
 Srovnání interaktomů => konzerv. interakcí (=> evoluce komplexů => evoluce organismů )

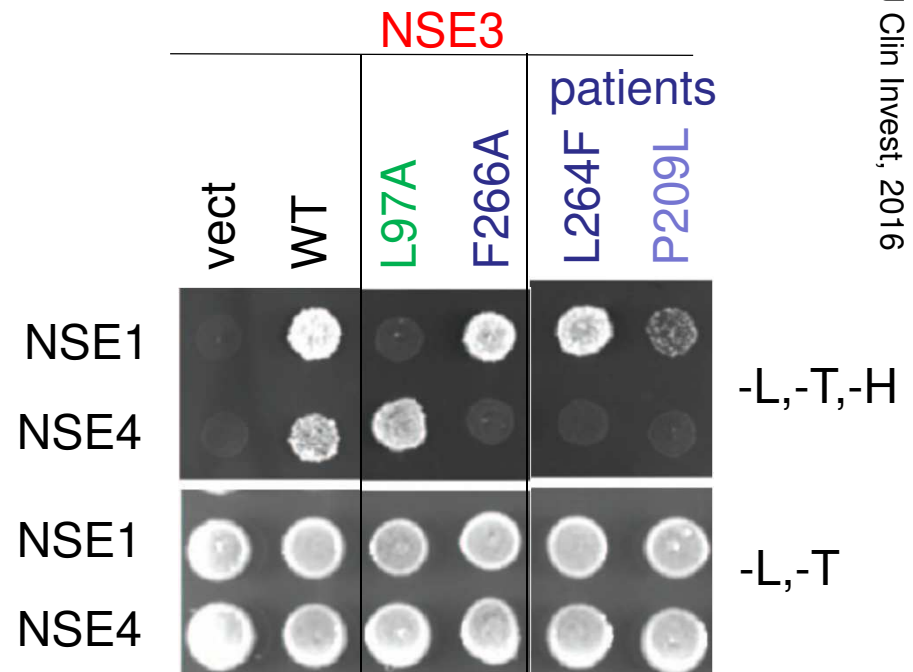
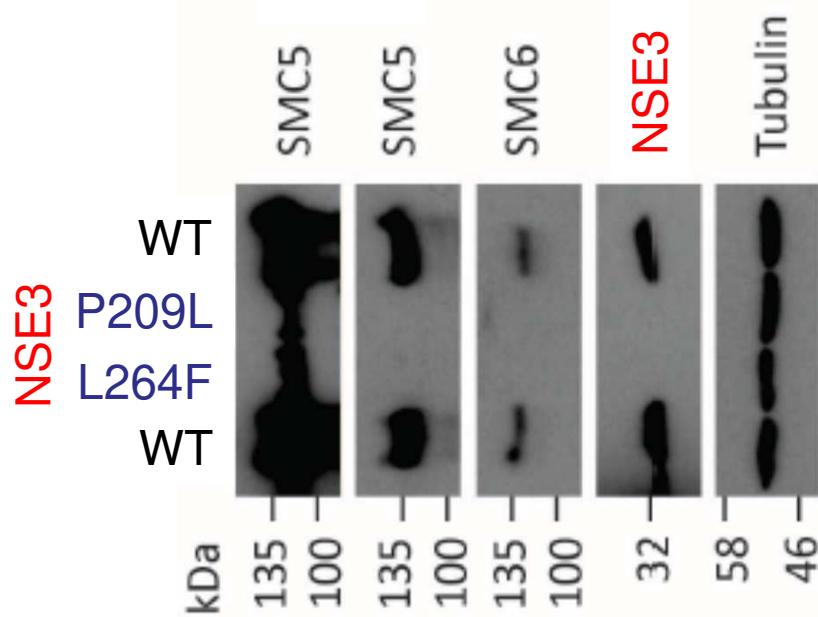
## ... kvarterní struktura

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



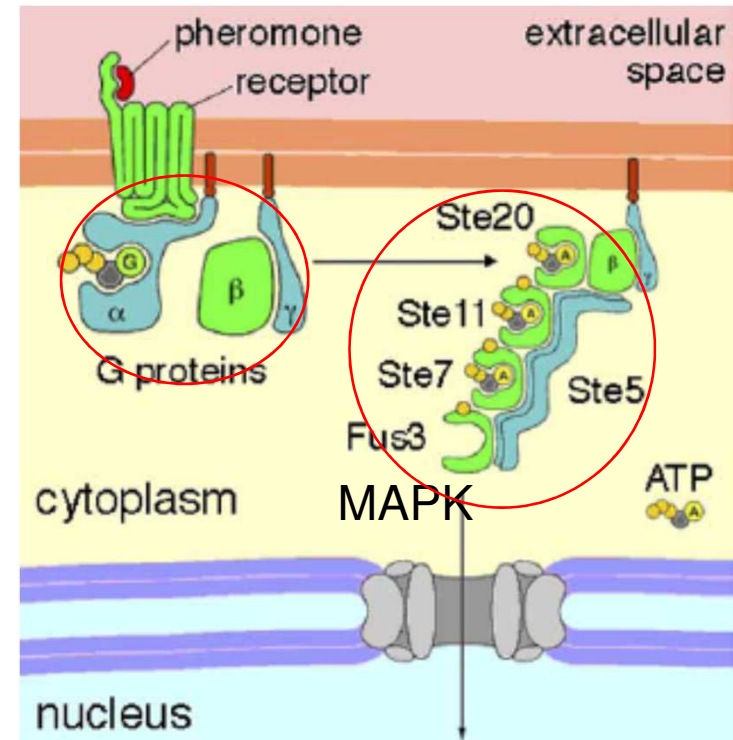
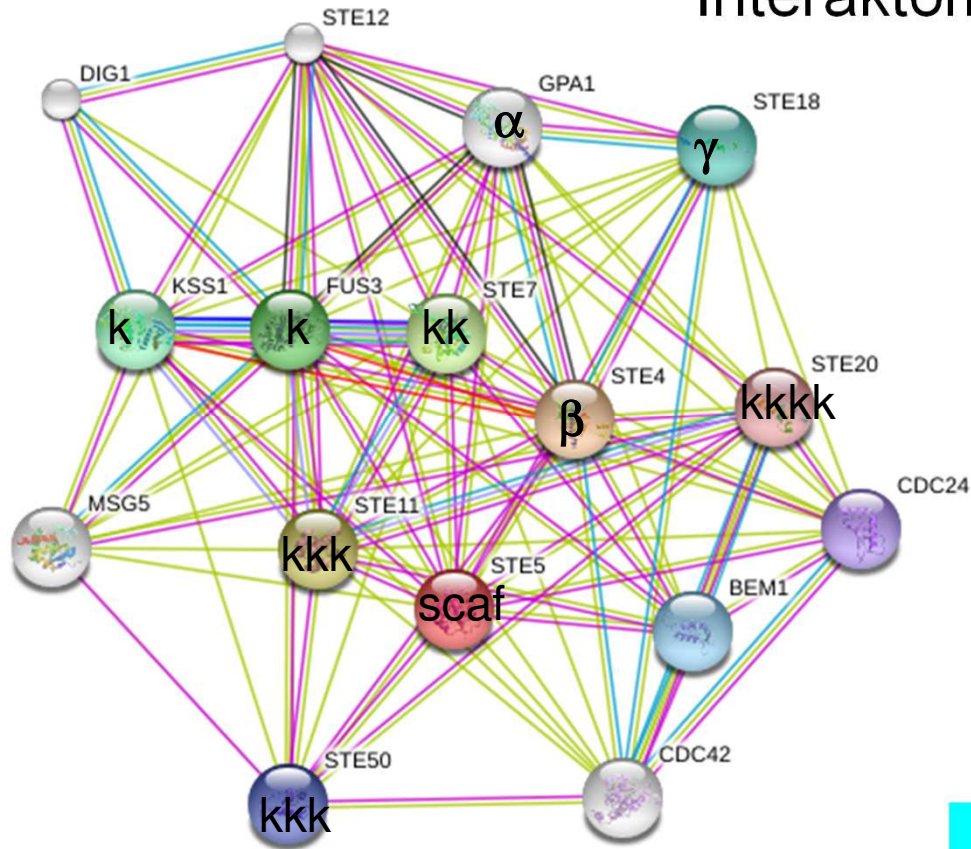


narušení interakce (Nse3-Nse4) vede k nestabilitě celého komplexu



# Regulace/modulace interakcí

Interaktom x komplexom

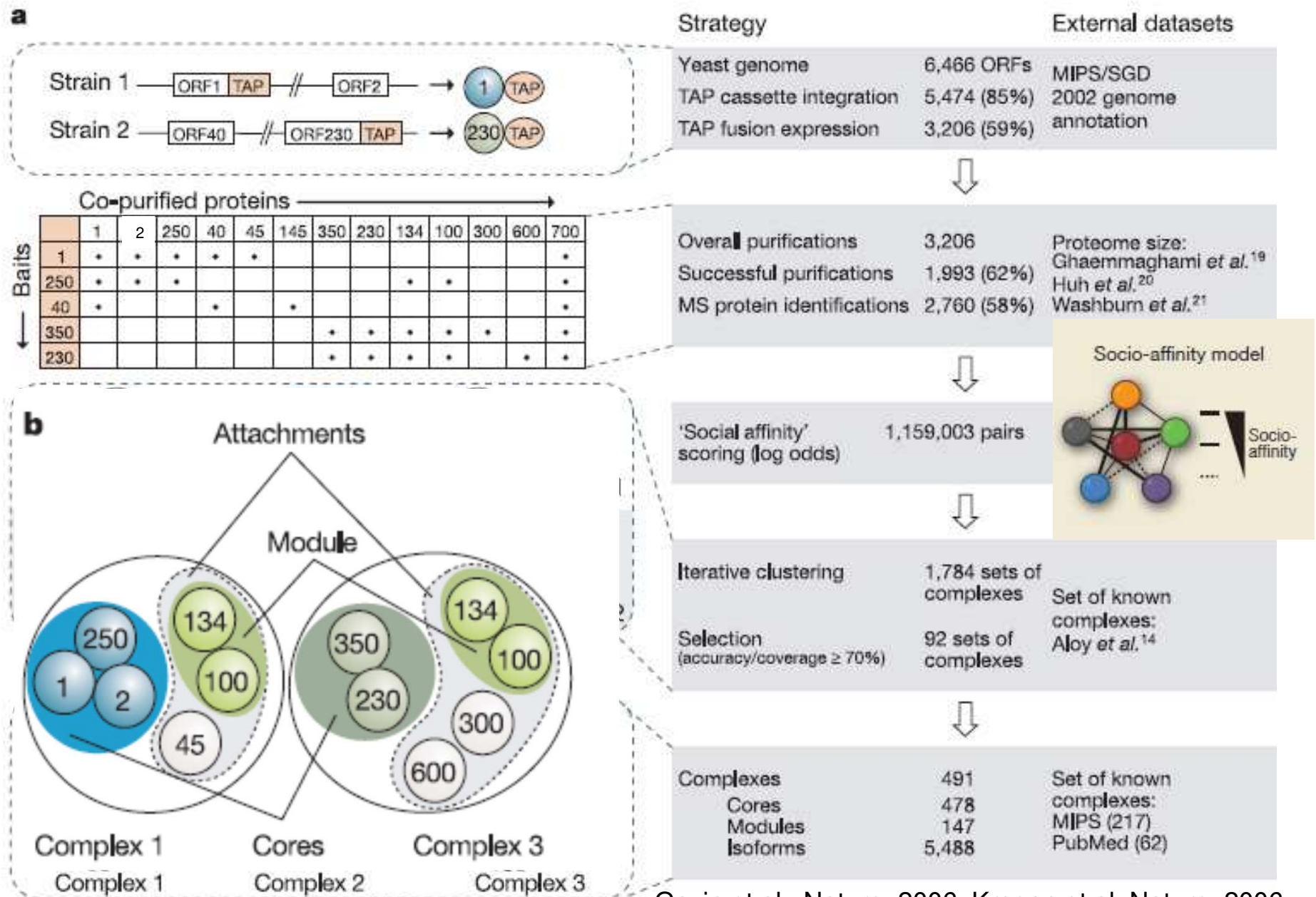


G-proteiny ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) disociují a následně interagují ( $\beta$ ) se scaffold proteinem Ste5 ... Fus3 relokalizuje do jádra a aktivuje Ste12

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

# Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



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



# Dynamika komplexů - PPI

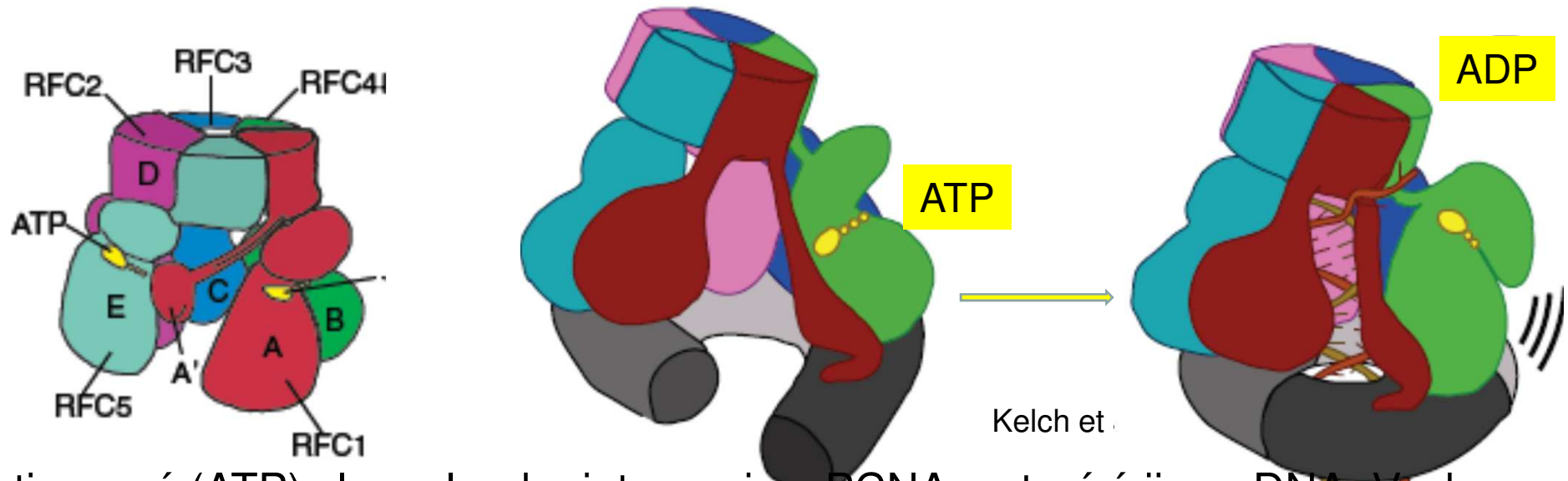


## ATP moduluje interakce

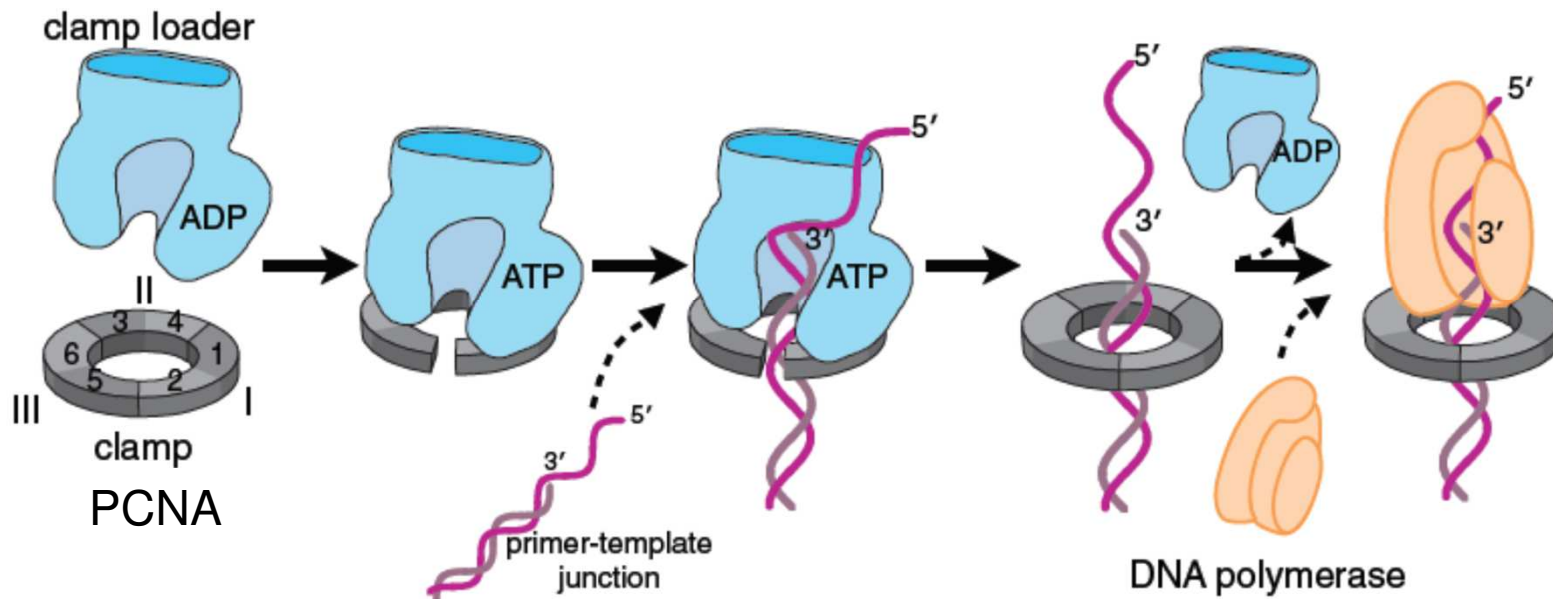
Replikace DNA (video): DNA helikasa (modrá) “denaturuje” dvoušroubovici—připojen je „clamp loader“ (šedá tlapka) - 2 raménka drží DNA polymerázy (fialové) spojené s **PCNA** („sliding clamp“, zelená). „Leading strand“ je syntetizován kontinuálně zatímco „lagging strand“ musí být primásou (žluto-zelená)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

# ATP modulace - clamp loader

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

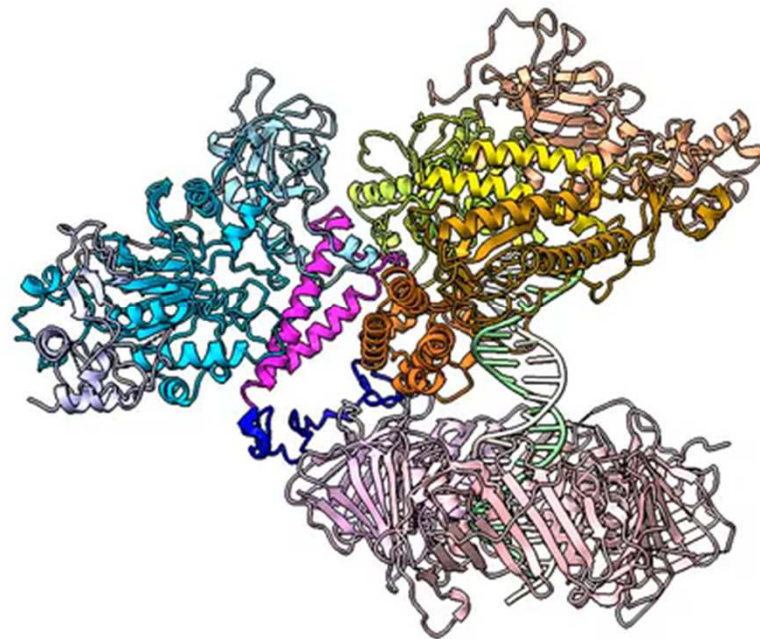


Aktivovaný (ATP) clamp loader interaguje s PCNA a otevírá ji pro DNA. Vazba DNA stimuluje hydrolyzu ATP a uvolnění clamp loader (uzavřeného s DNA).



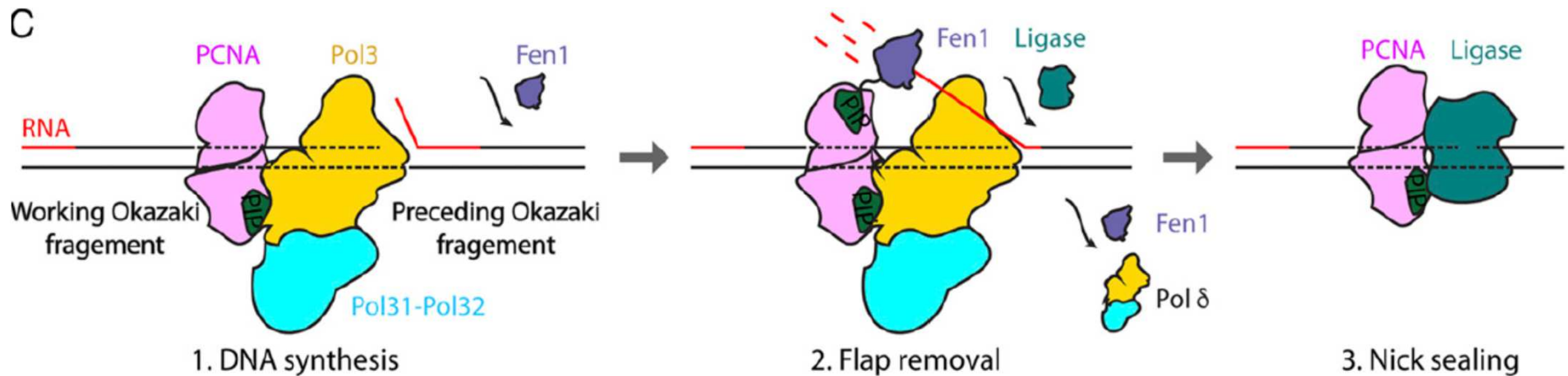
## pol $\delta$ –PCNA-DNA komplex

- pol $\delta$  váže 1 protomer PCNA
- PCNA je kolmo k DNA
- DNA (2nm) „waterskates“ skrze PCNA tunel (3nm)

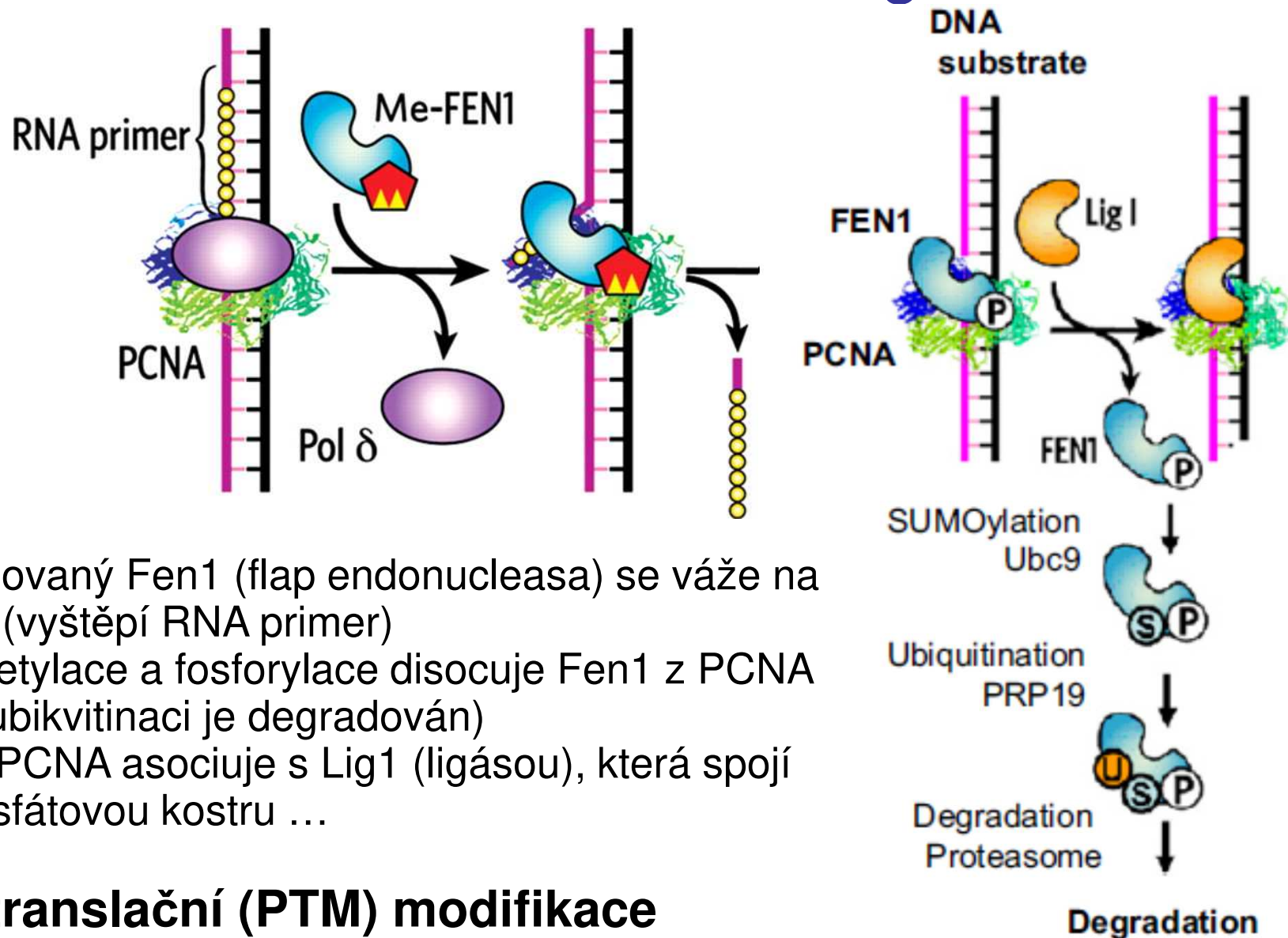


# interakce PCNA

- pol $\delta$ -PCNA „dojede“ k RNA primeru (zastaví)
- Fen1 (nucleasa) se naváže na vedlejší PCNA protomer (PIP místo) a rozštěpí RNA
- ligasa kompetuje/nahradí pol/Fen1 a spojí konce DNA



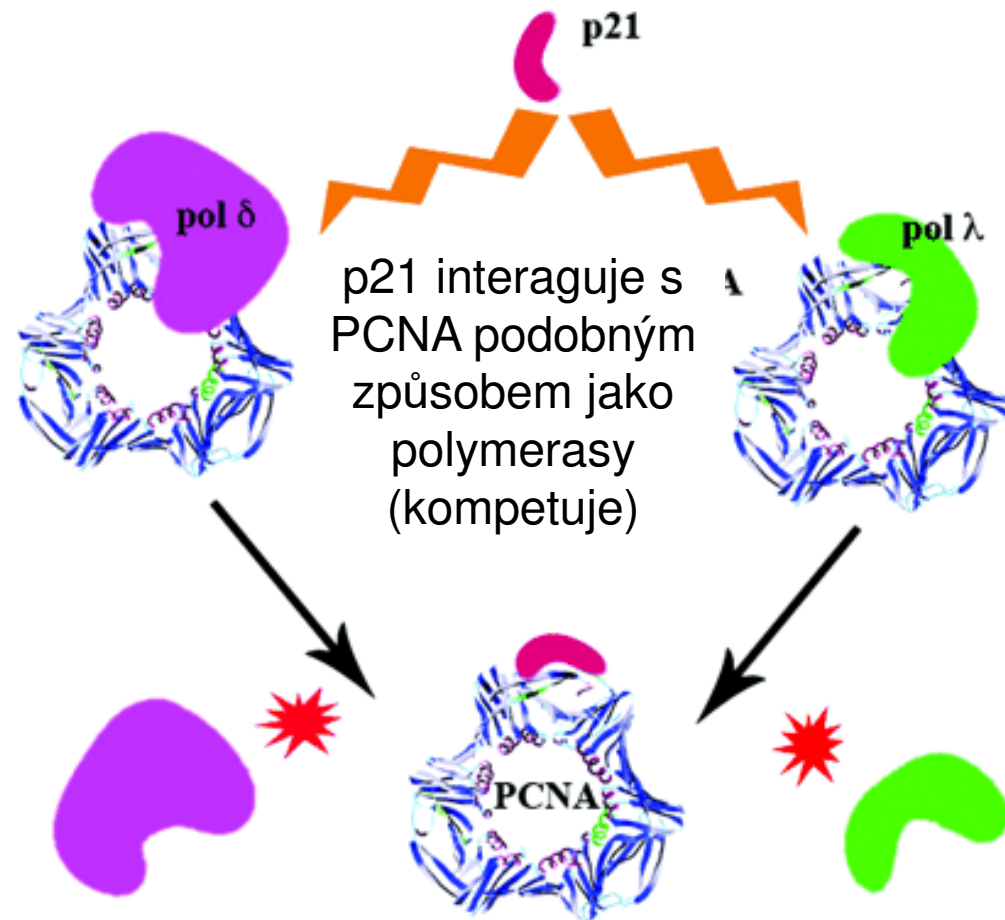
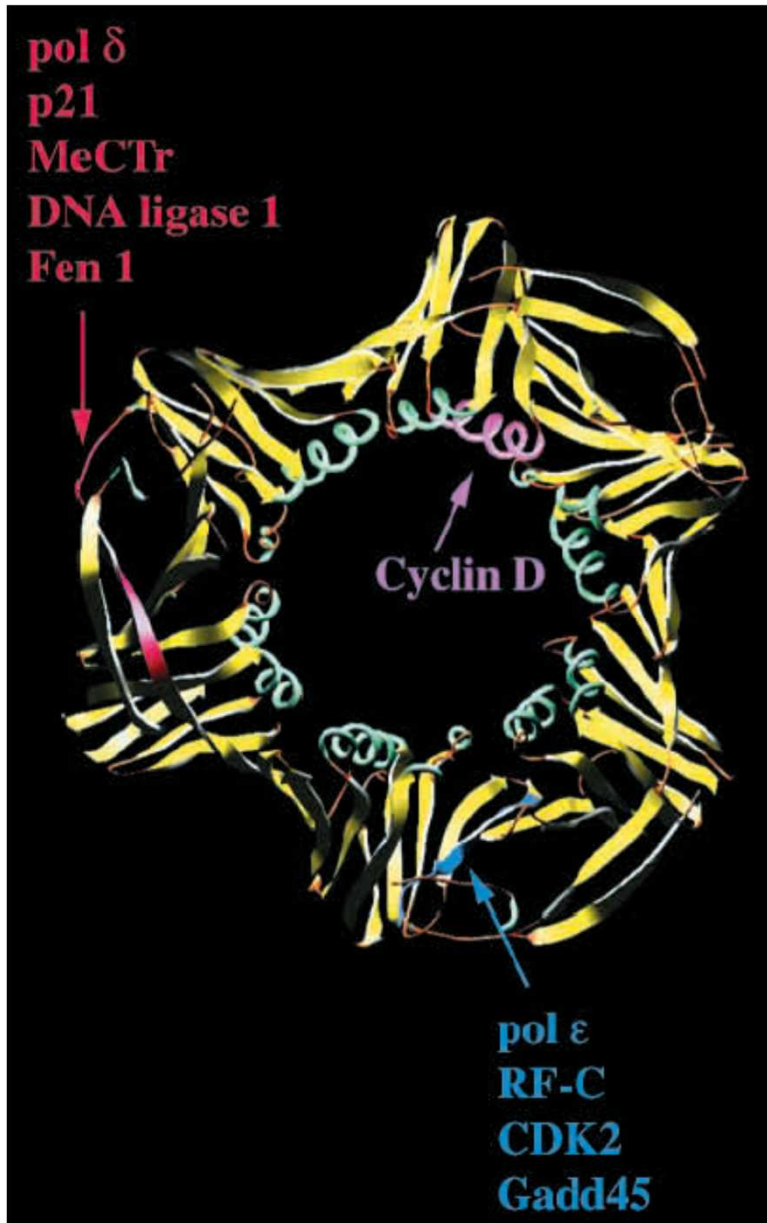
# PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1



- metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) se váže na PCNA (vyštěpí RNA primer)
- demetylace a fosforylace disociuje Fen1 z PCNA ( - po ubikvitinaci je degradován)
- poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru ...

**Posttranslační (PTM) modifikace  
modulují interkce (složení komplexu)**

# PCNA – regulace buněčného cyklu

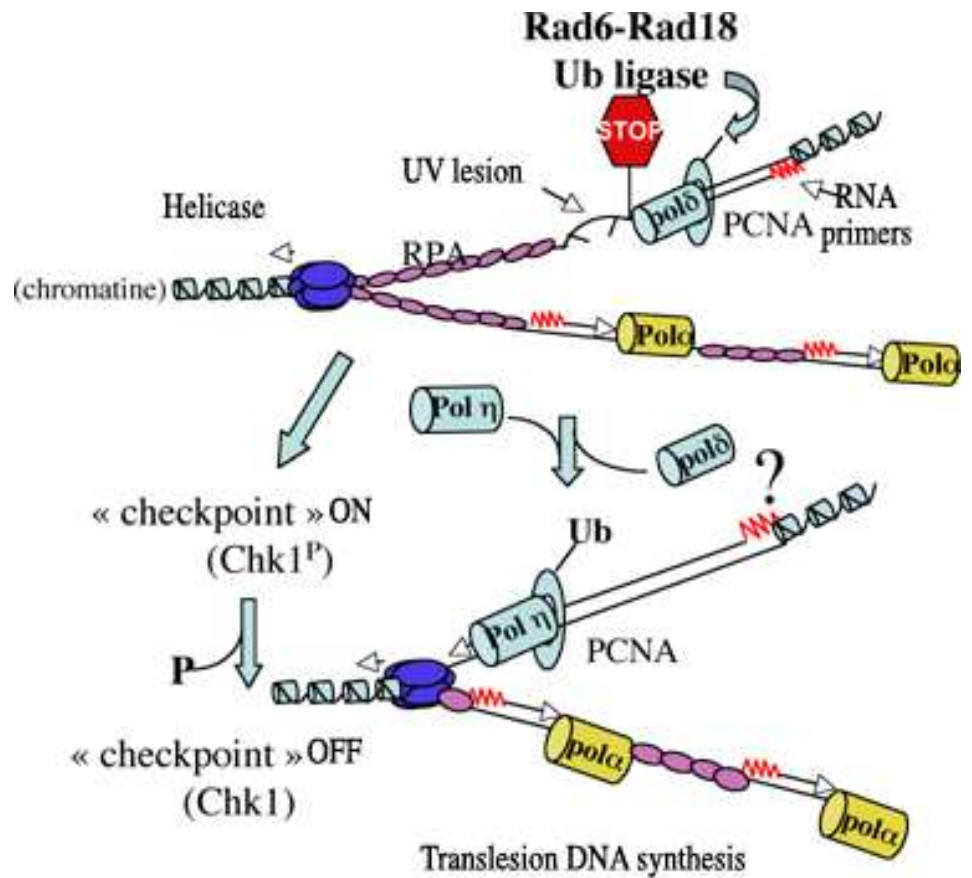


Maga et al, FASEB J, 2004

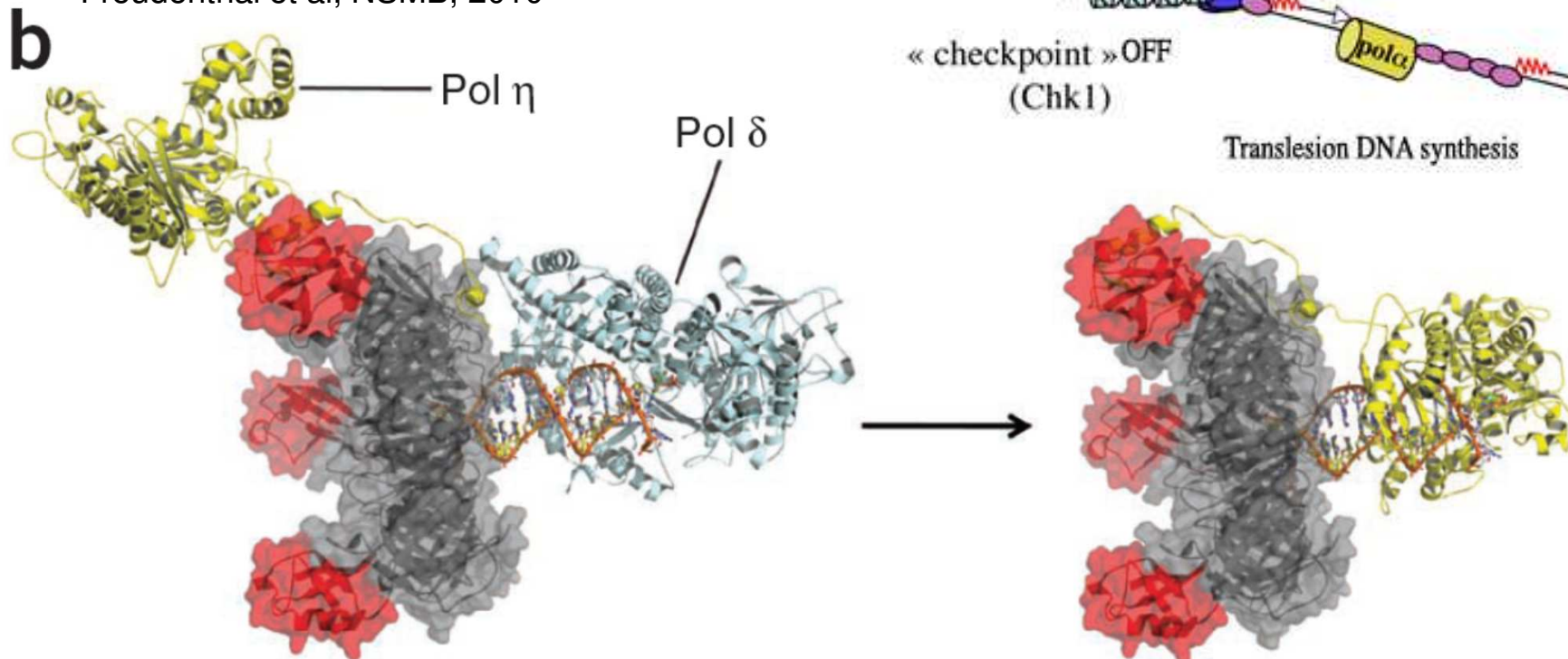
p21 blokuje přístup polymerás – zastaví se replikace a buněčný cyklus v S fázi

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

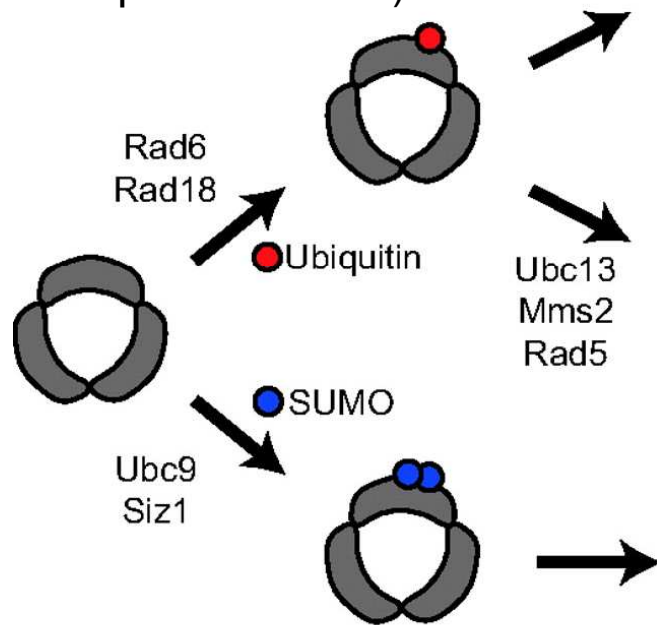


Freudenthal et al, NSMB, 2010



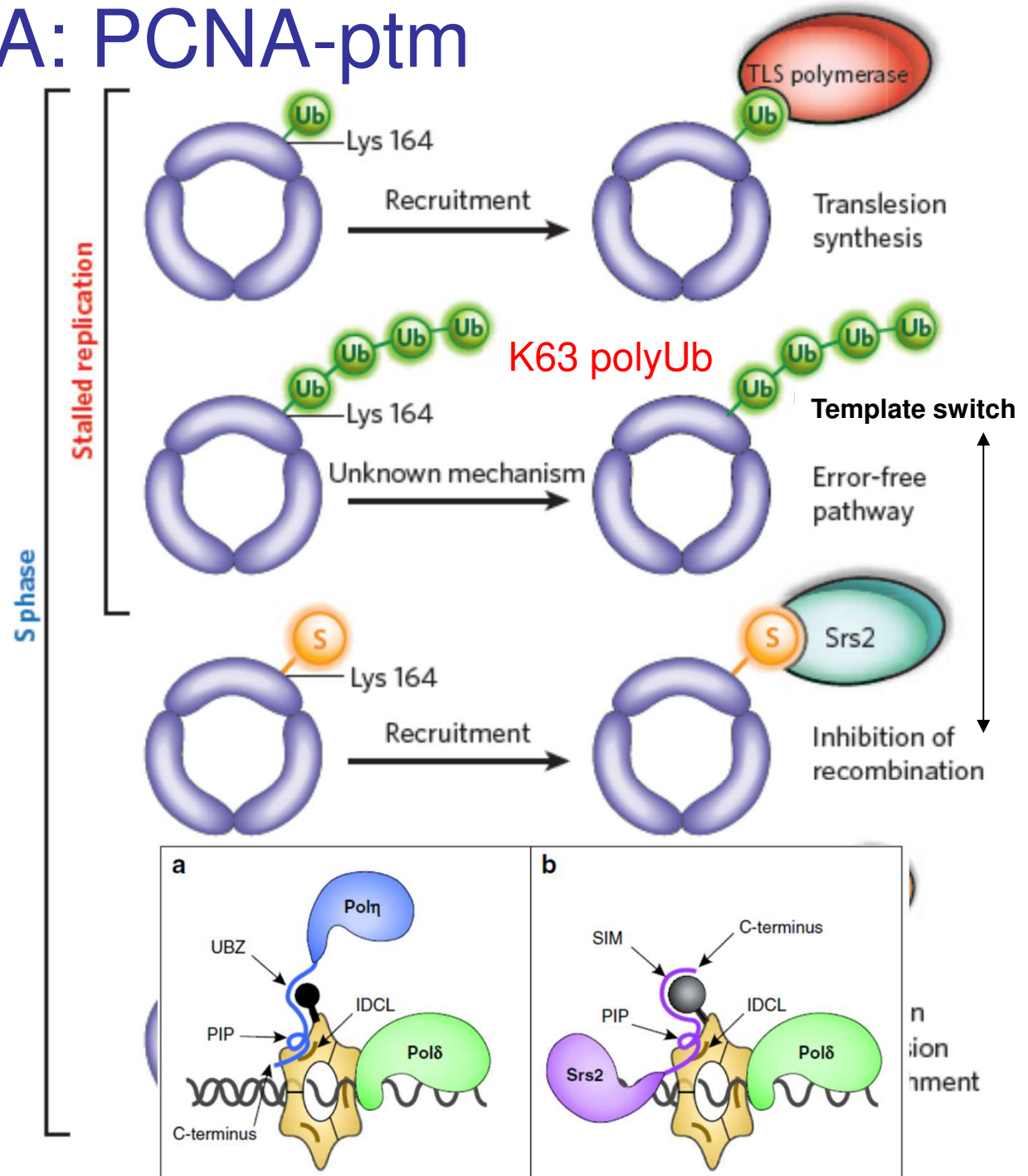
# Oprava DNA: PCNA-ptm

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

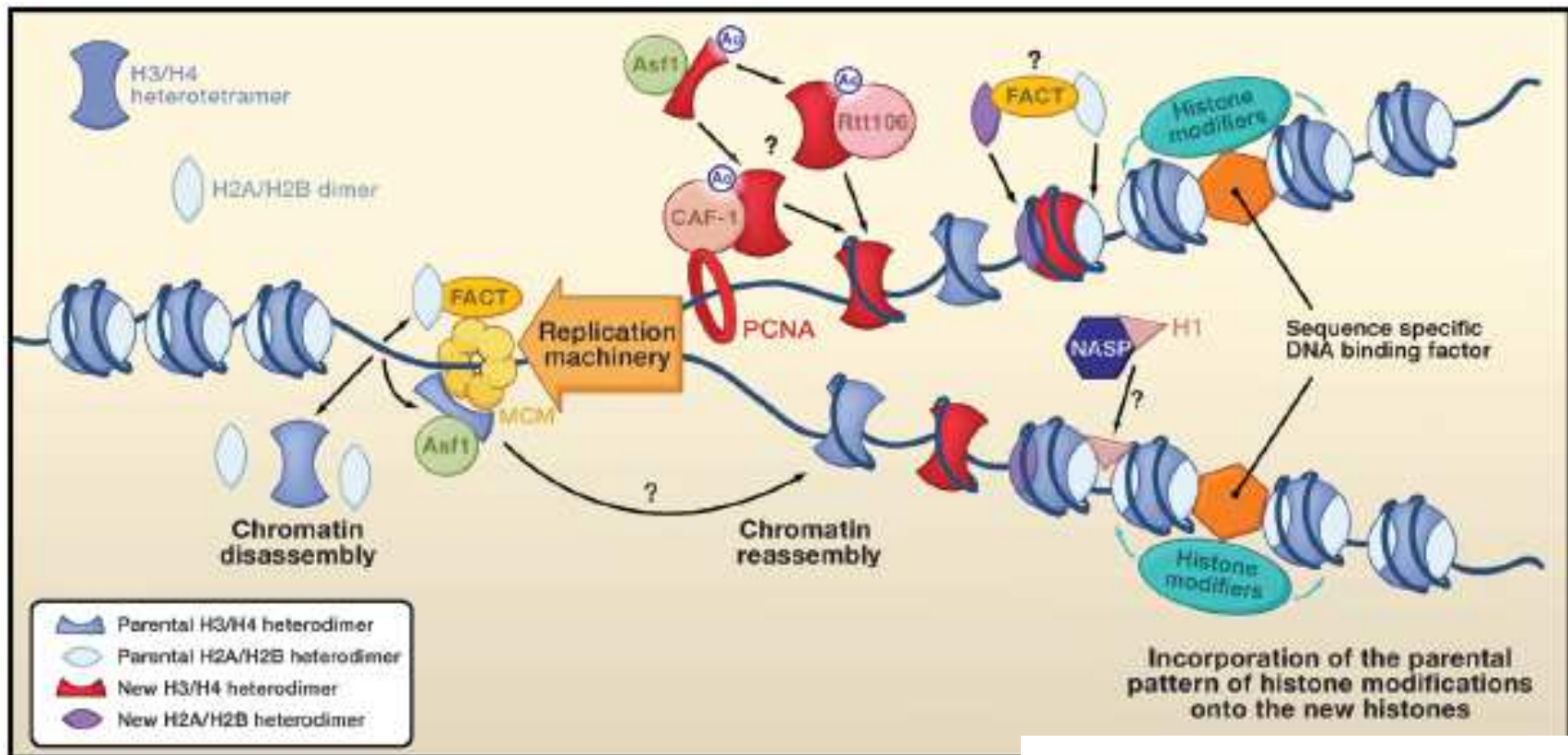


Srs2 (antirekombinása) obsahuje SIM (nedovolí rekombinaci na zastavených replikačních vidličkách)

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)

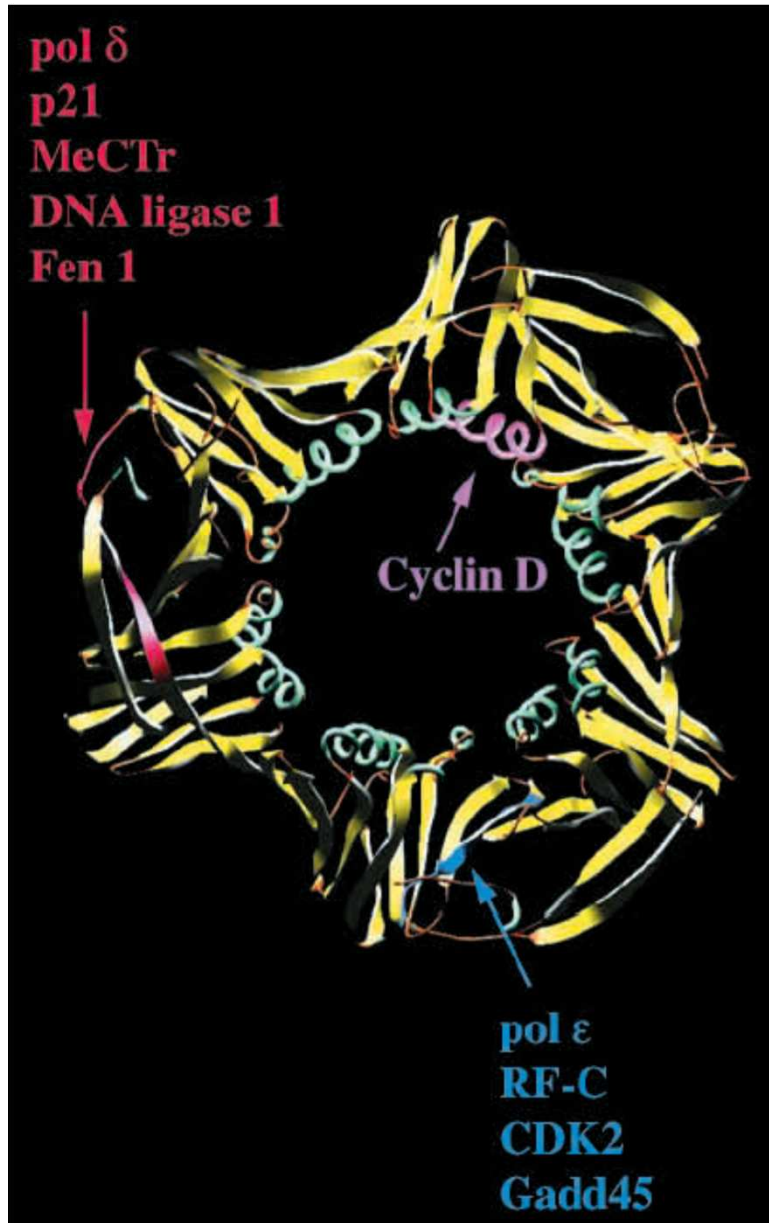


# PCNA – moduly

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 ...

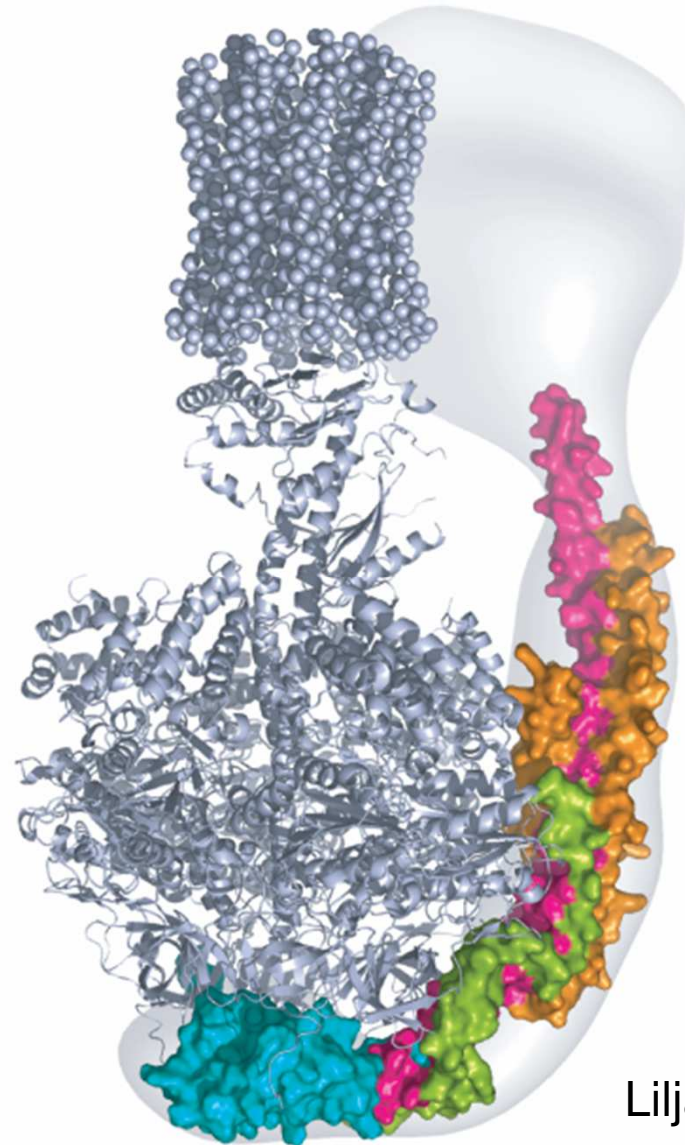


Activities	Proteins
DNA polymerases	Polδ, Polε, Polη, Polι, Polκ, Polζ, Polλ, Polβ, Rev1
Clamp loader	Rfc1, Rfc3, Rfc4
Flap-endonuclease	FEN-1
DNA ligase	DNA Ligase 1
Topoisomerase	Topo IIα
Replication licensing factor	Cdt1
E3 ubiquitin ligases	Rad18, Rad5
E2 SUMO-conjugating enzyme	Ubc9
Helicases, ATPases	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

# Stabilní komplex – molekulární stroj



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

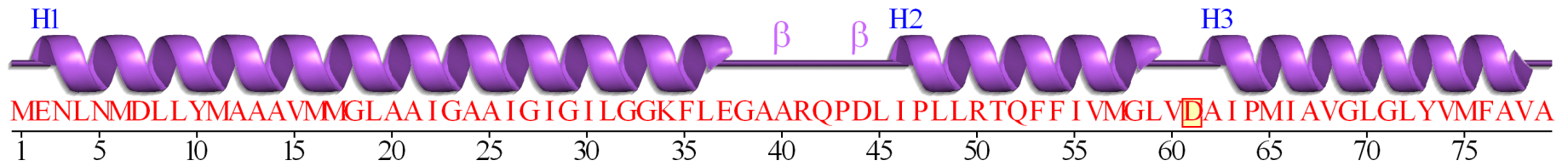


Liljas a spol.

## 14.4-ATP\_synthase – učebnice: Alberts a spol, Molekulární biologie buňky.

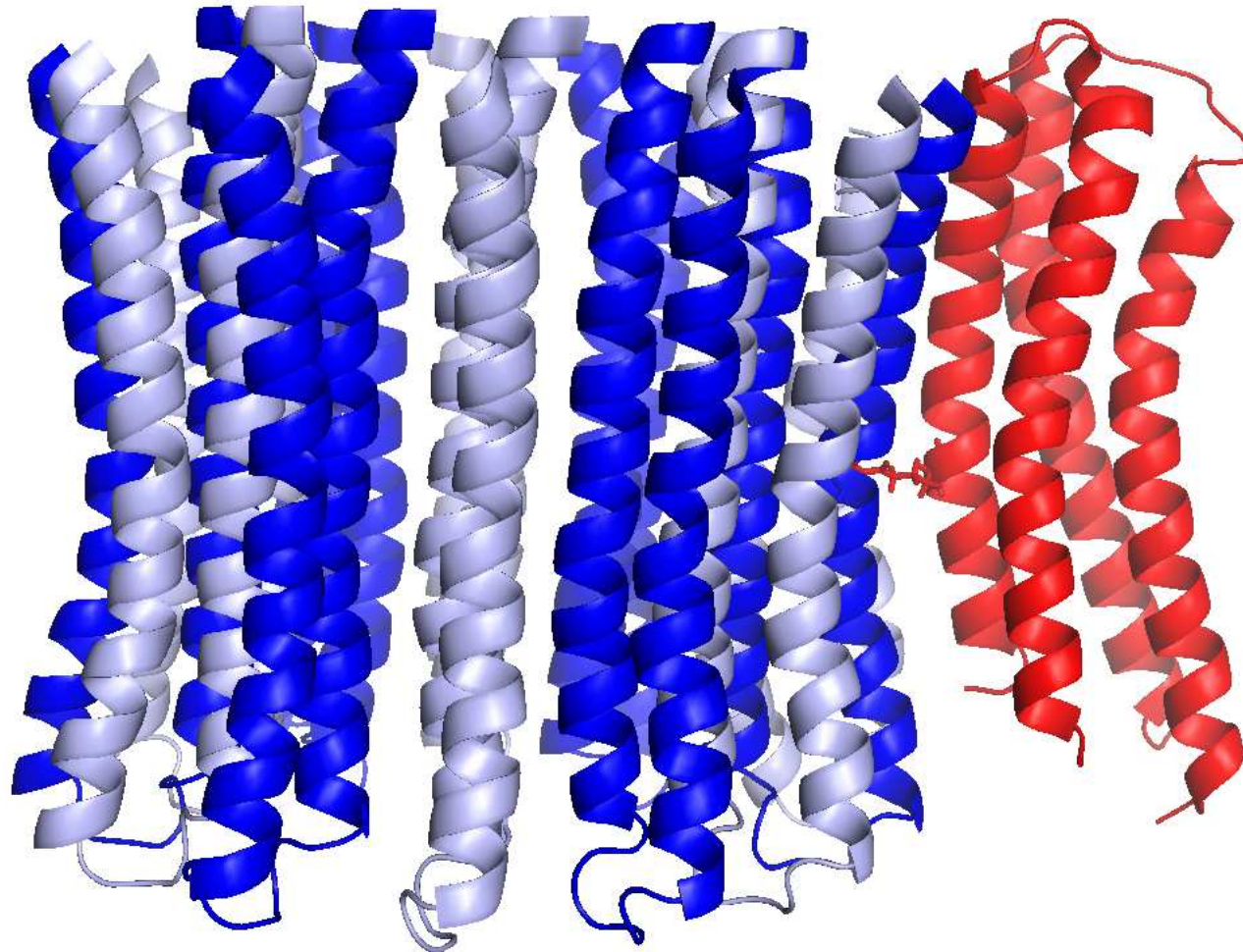


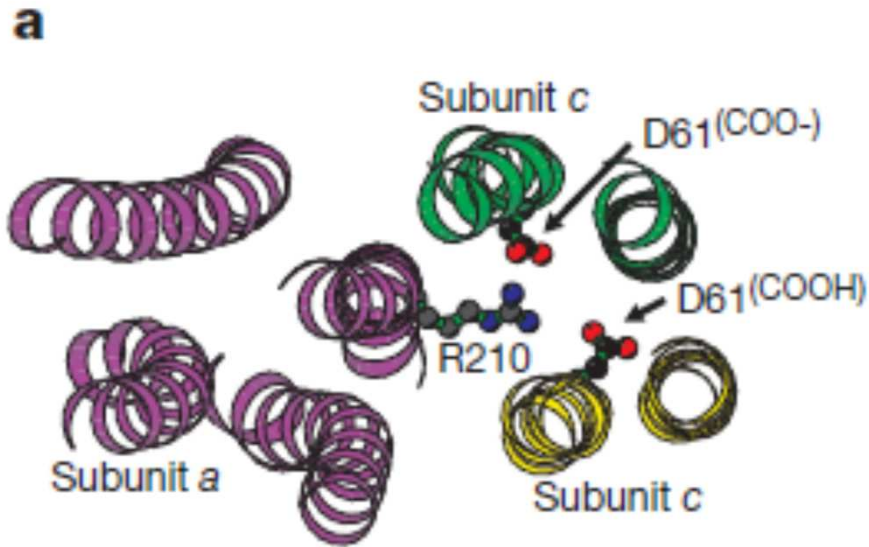
„ATP syntasa je jedním z divů molekulárního světa“. Je to molekulární motor – „nanostroj“ – vyrábějící většinu ATP (energie).



pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu

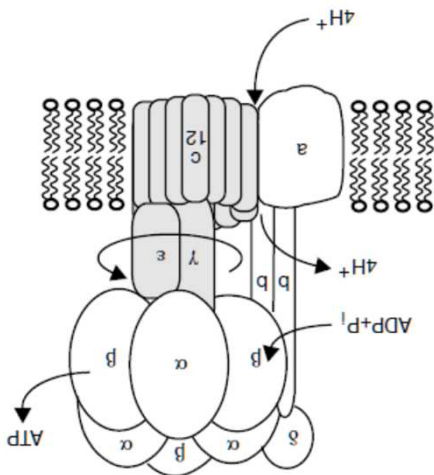
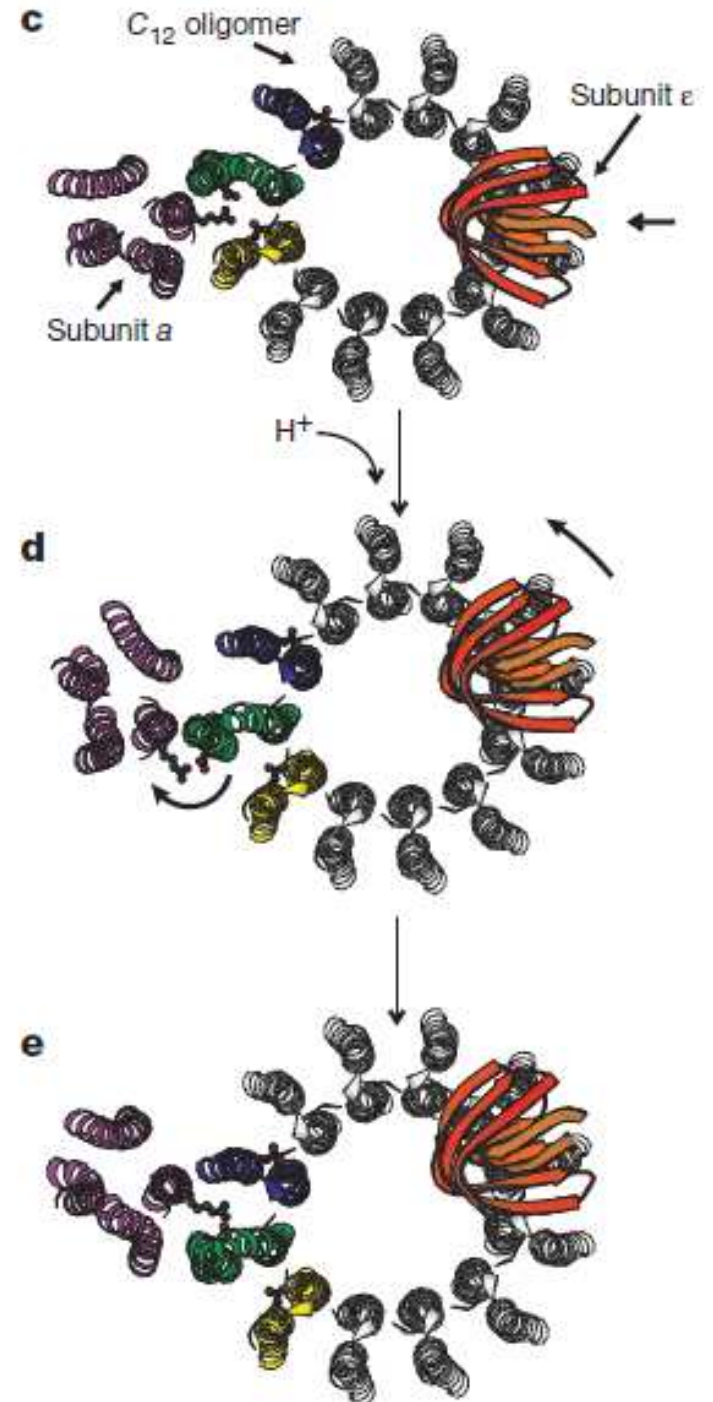
PDB: 1C17:A

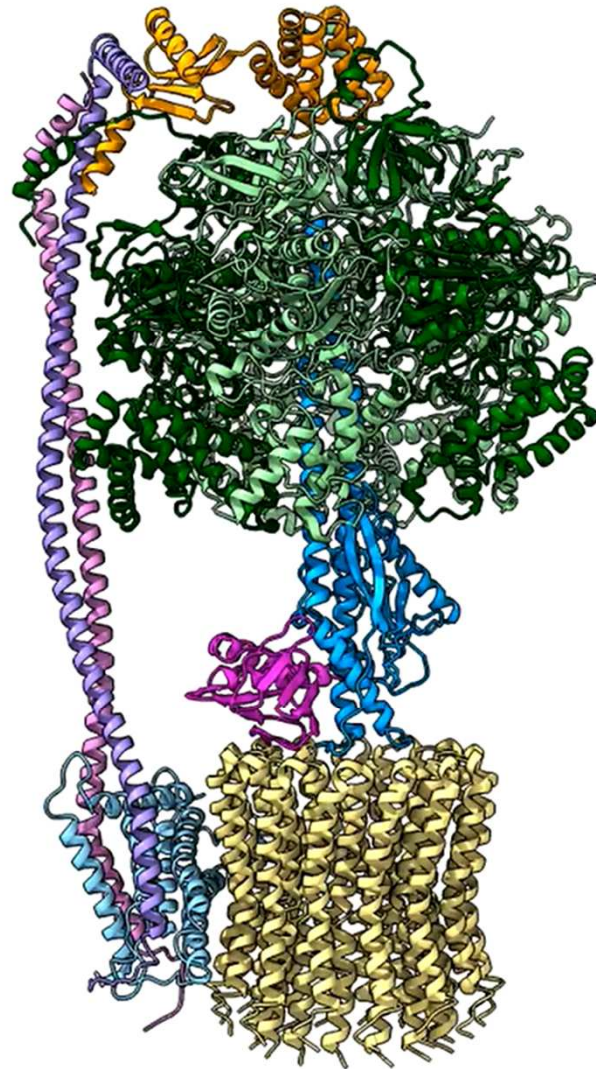




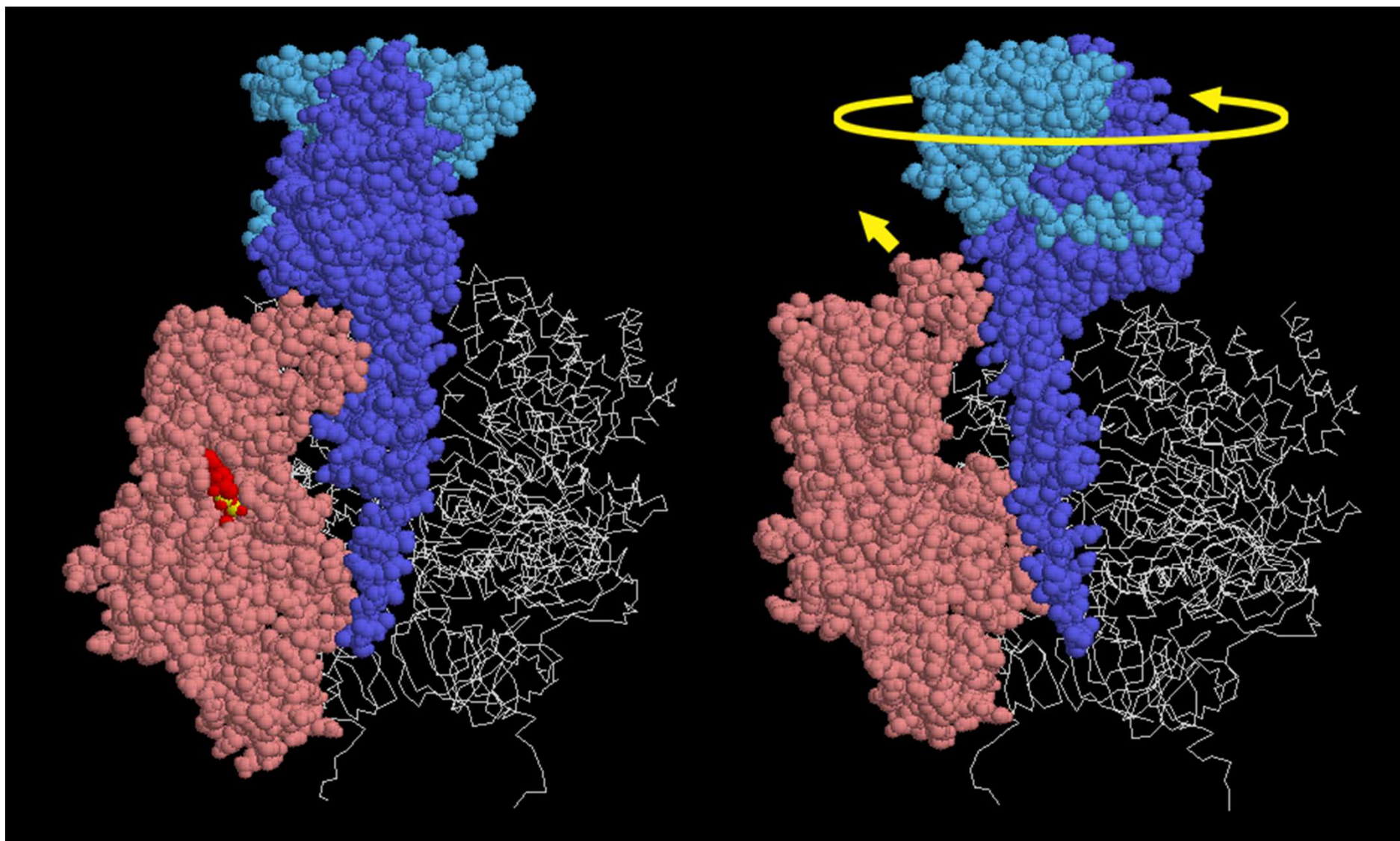
Rastogi & Girvin, Nature, 1999

podjednotka **a** obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu - dochází k neutralizaci náboje – otočka.



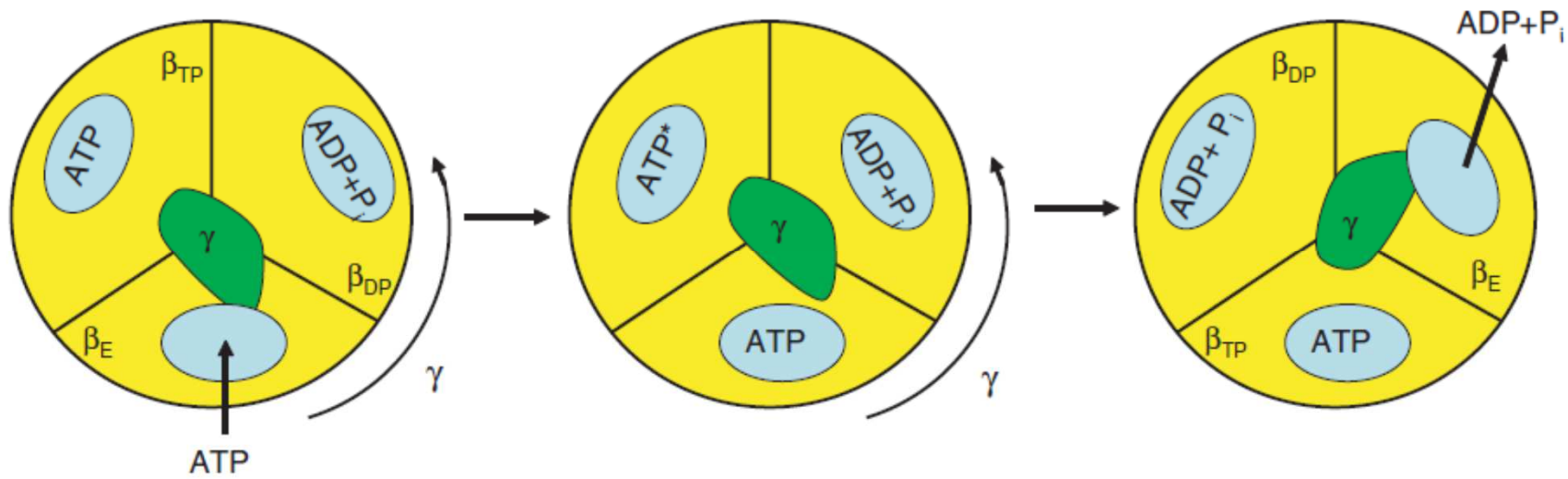


F0 je protonový rotor (uložen v membráně) poháněný tokem vodíkových iontů (z dýchacího řetězce) přes membránu – dva tunely v podjednotce a (přivádí a odvádí protony)



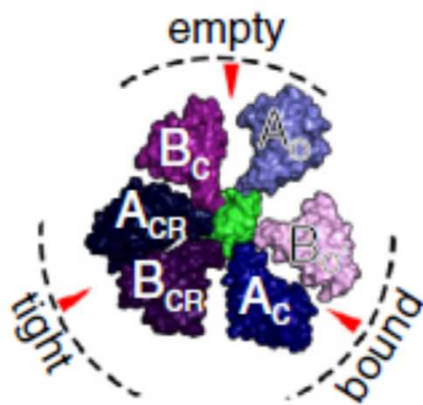
Při otočce osa tlačí na F1 stator (3 různé konformace)  
– levý panel = konformace vhodná pro vazbu ADP  
- pravý panel = ATP molekula byla vytlačena





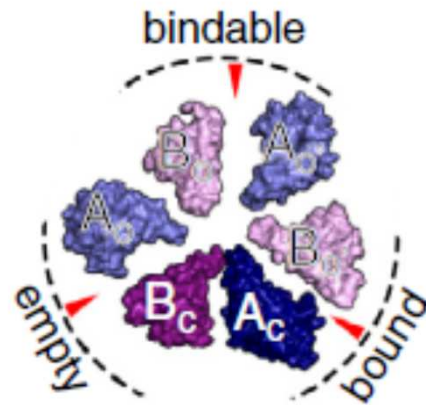
**State 1**

$A_3B_3DF$   
(+ AMPPNP)



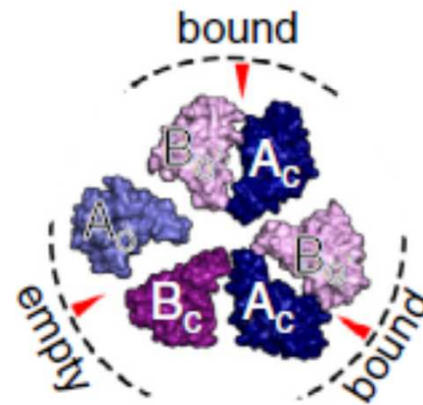
**State 2**

$A_3B_3$



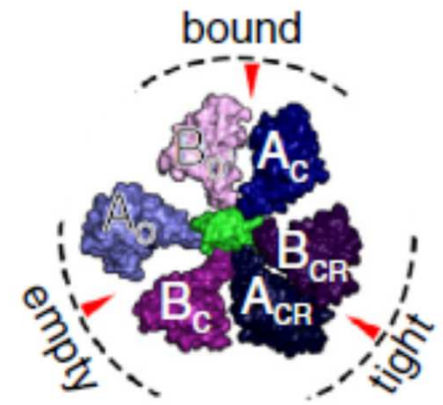
**State 3**

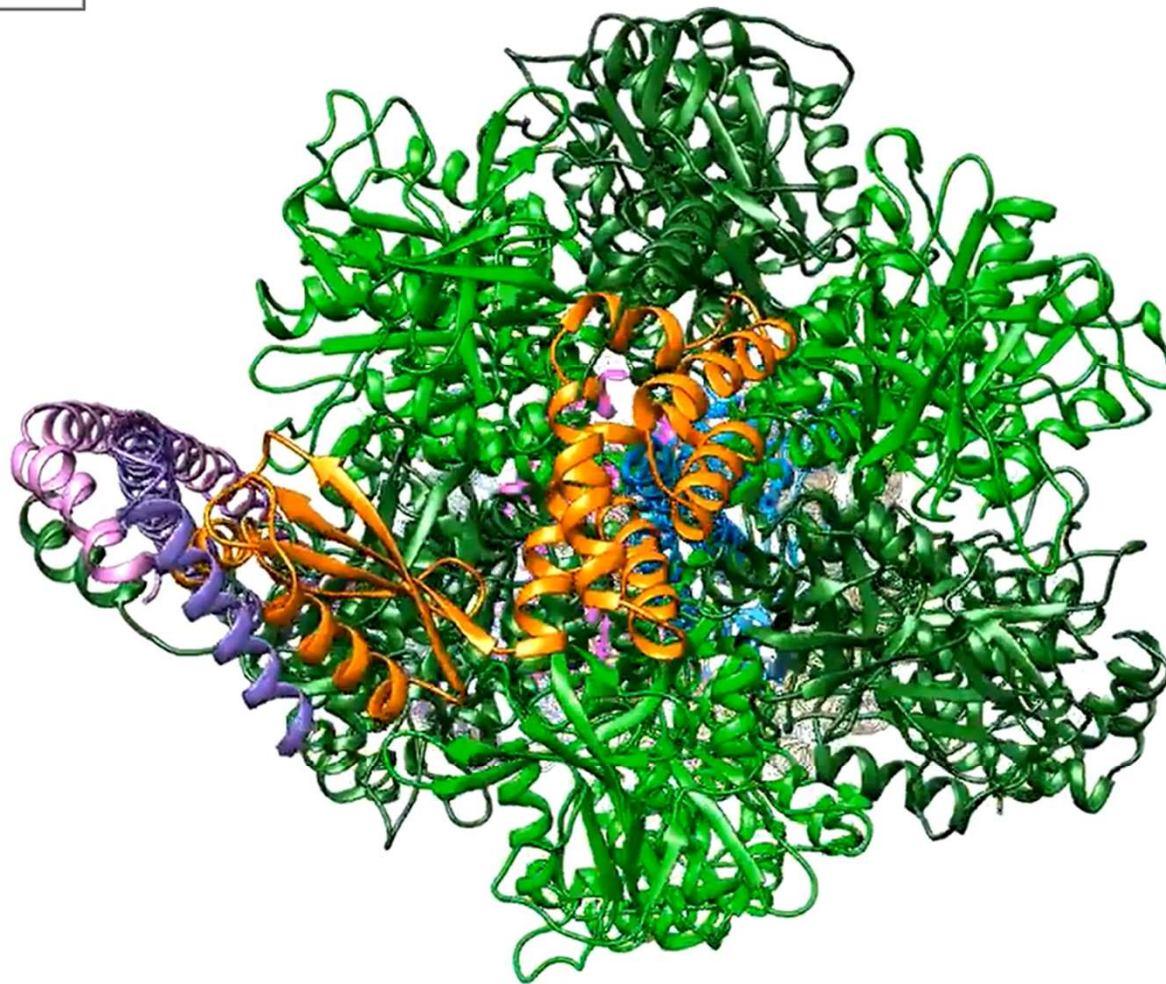
$A_3B_3$   
+ AMPPNP



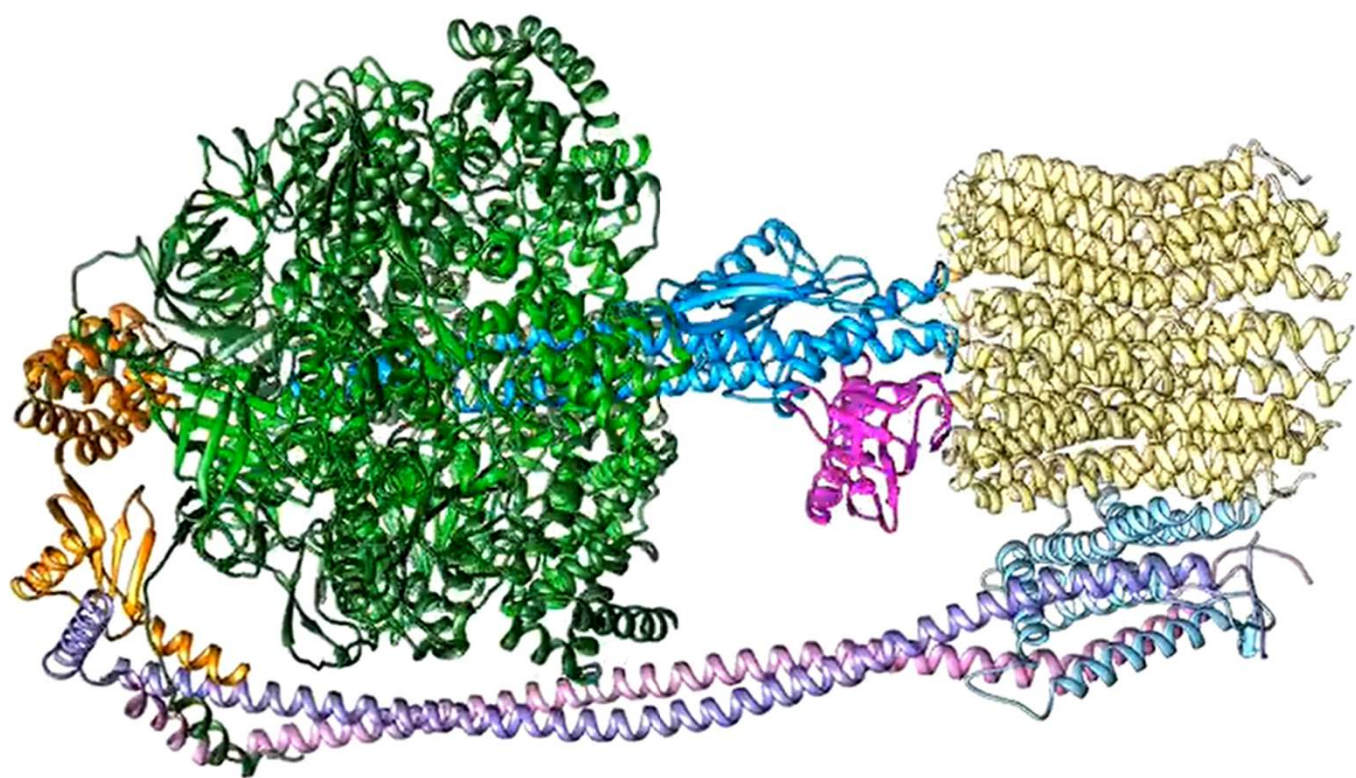
**State 4 (=1)**

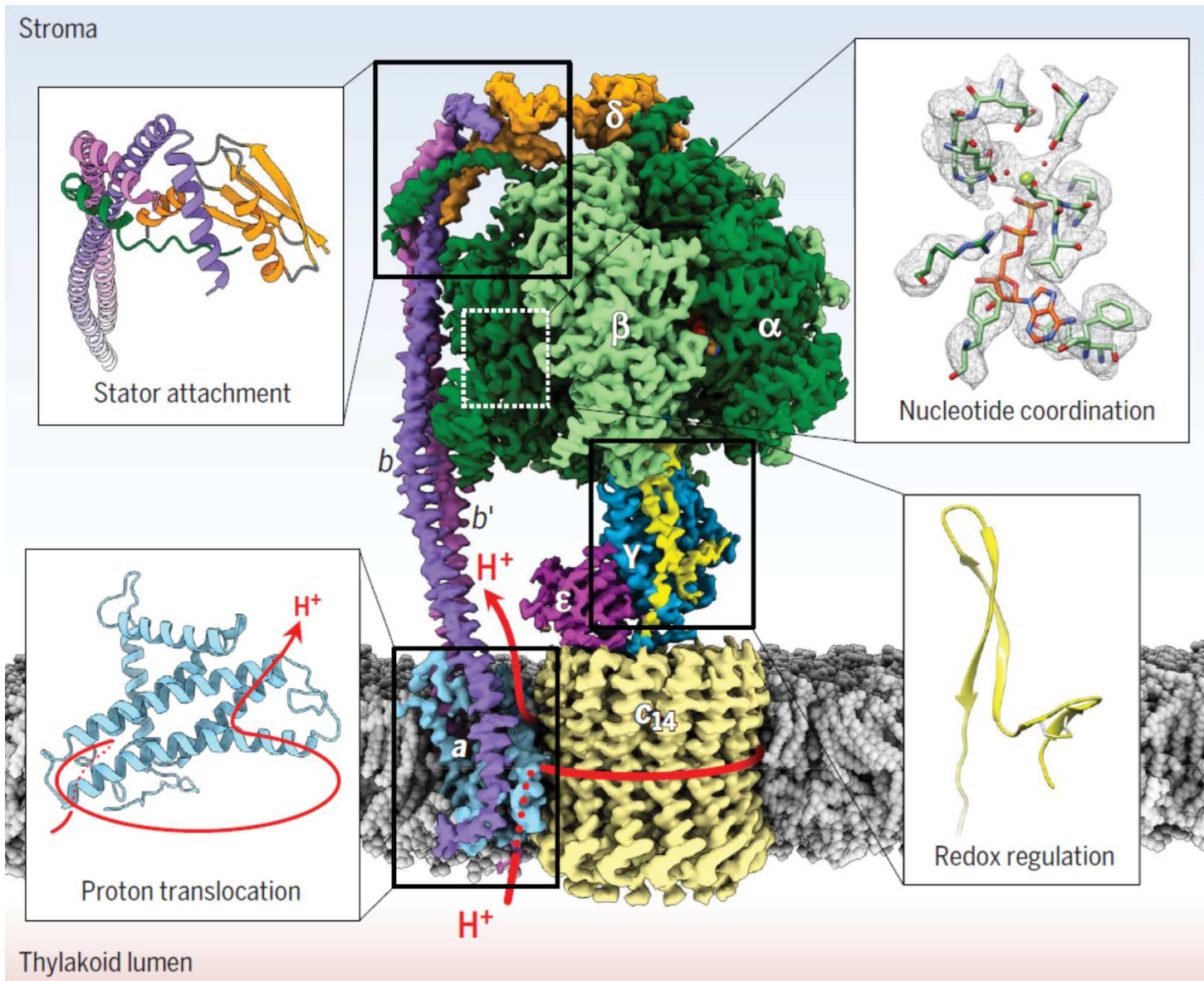
$A_3B_3DF$   
(+ AMPPNP)





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

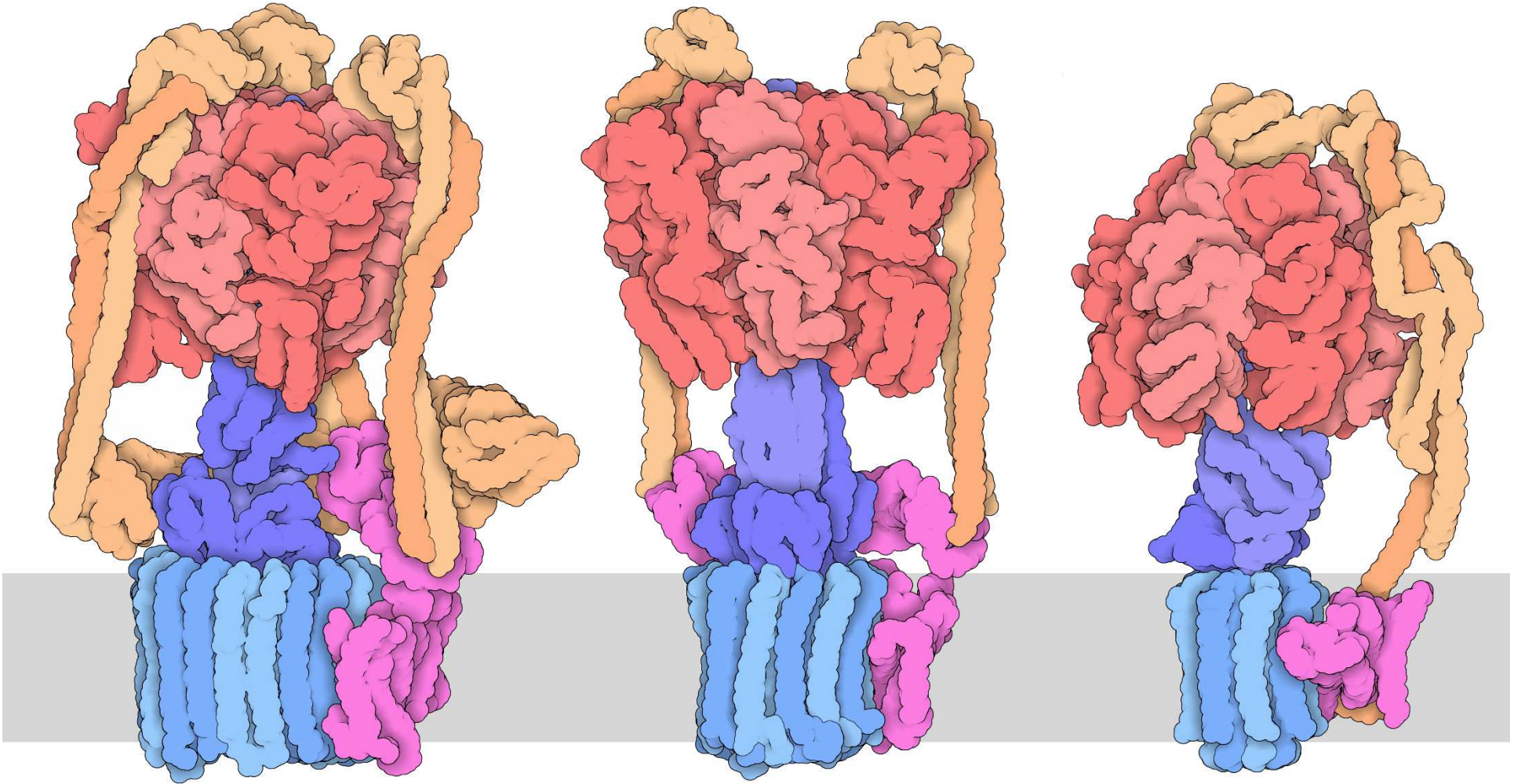




Hahn et al., Science, 2018

26 podjednotek:  
 a – vstup  $H^+$ ;  
 b, b' – spojka; stator  
 $3\alpha+3\beta$  – motor;  
 $\delta$  – uchycení  
 $\gamma, \epsilon$  – osa rotor  
 $c_{14}$  – rotor

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



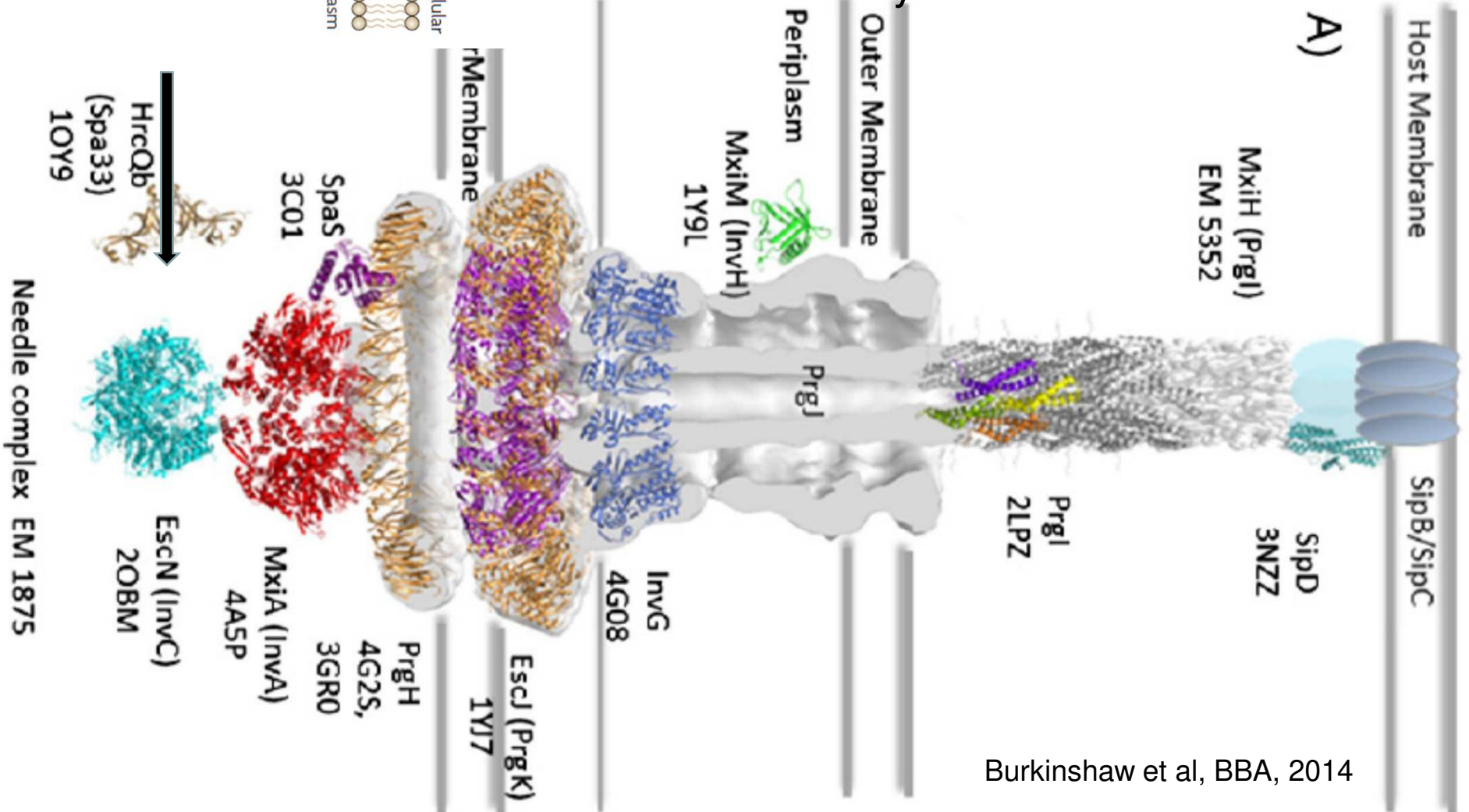
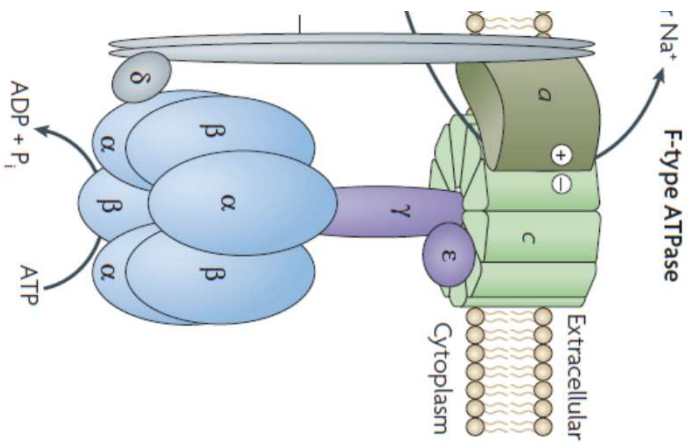
V-ATPase

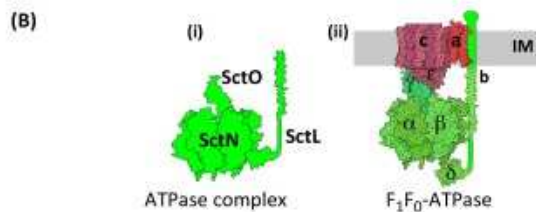
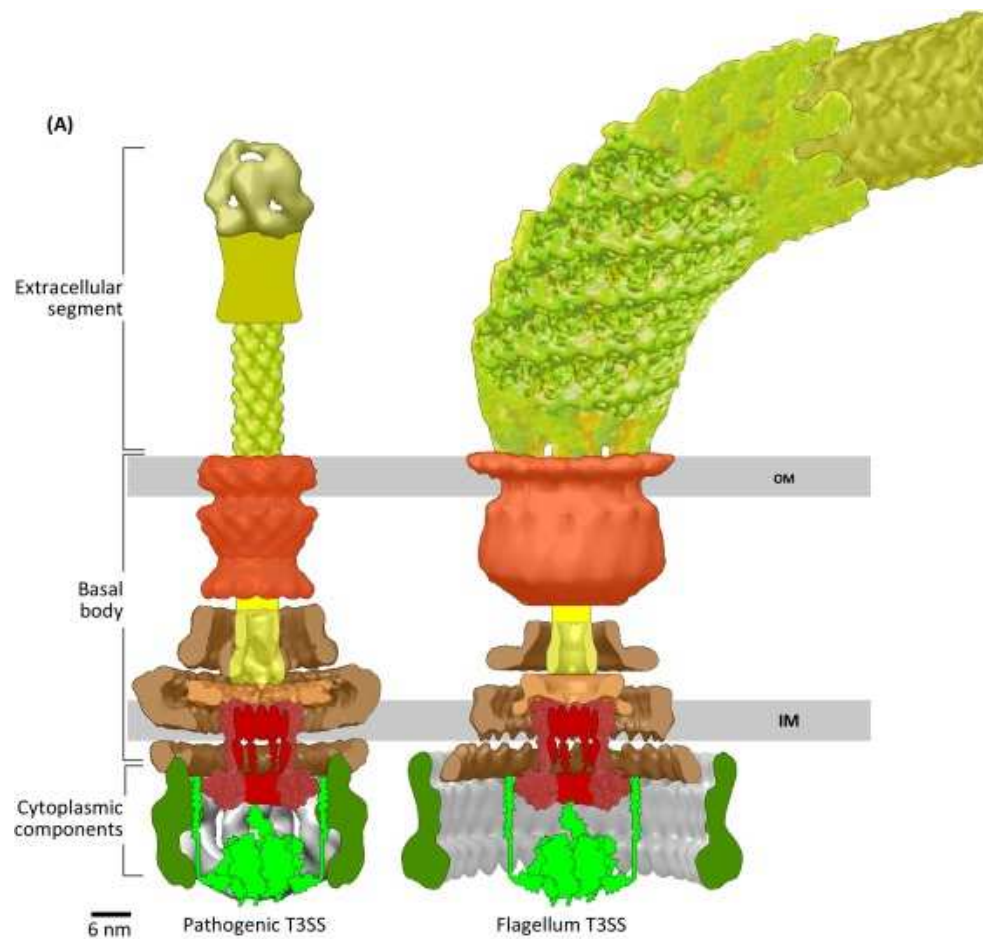
V/A-ATPase

ATP Synthase

MoM ... 5ARA, 5GAR

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

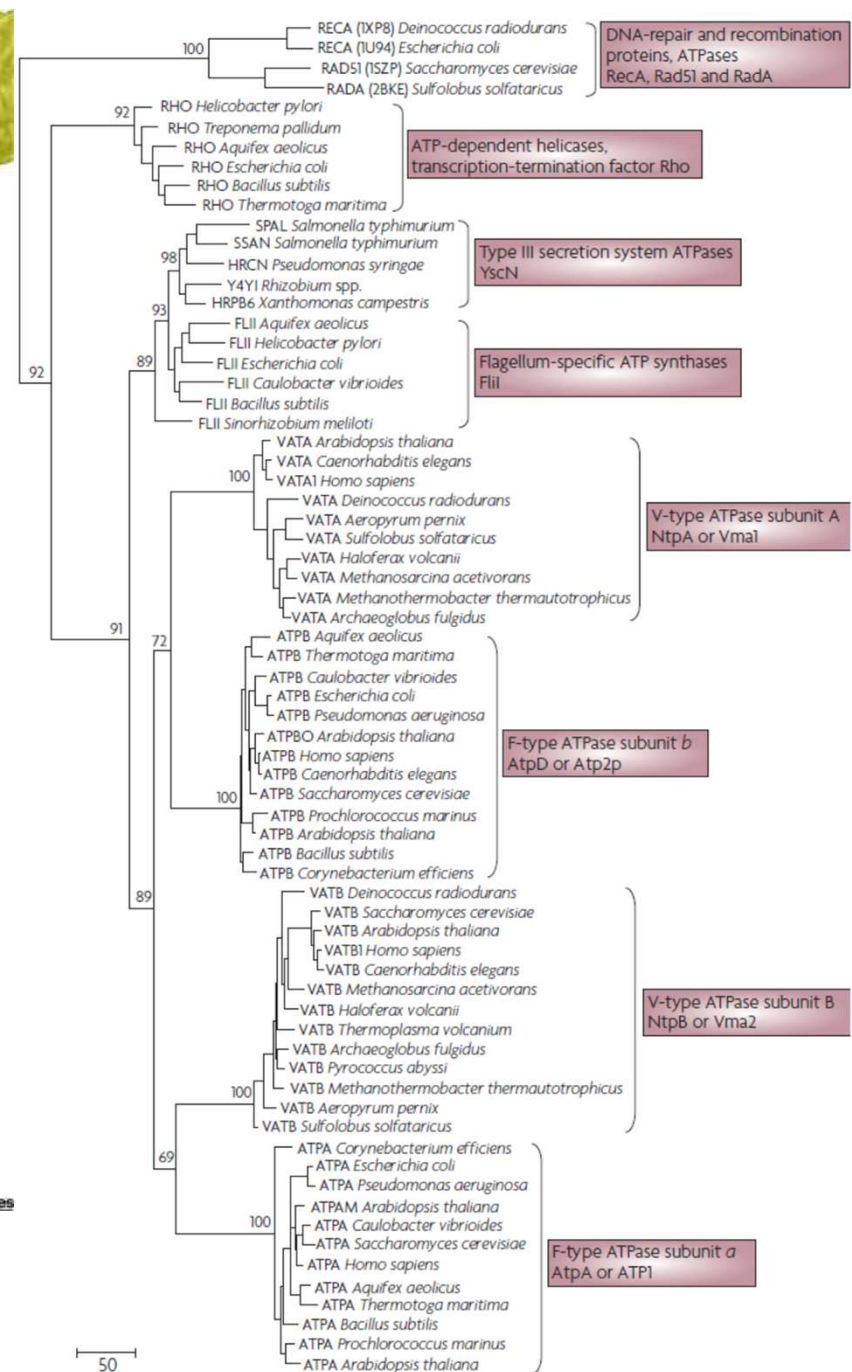
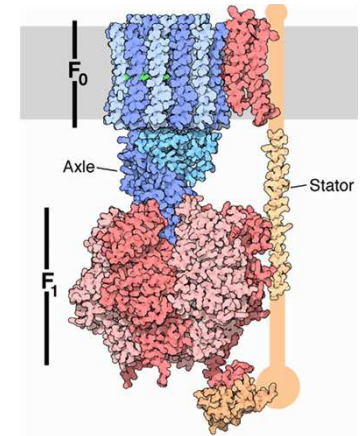


Figure 3 | Phylogenetic tree of the catalytic subunits of the F- and V-type ATPases and related P-loop ATPases. The protein sequences were retrieved from [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (for the RecA family, four

# 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

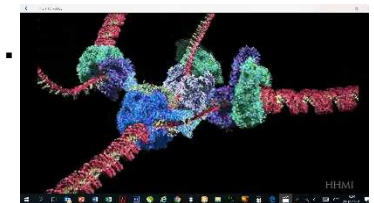
## •Rotační motory:

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

Více CG030

## •Motory nukleových kyselin:

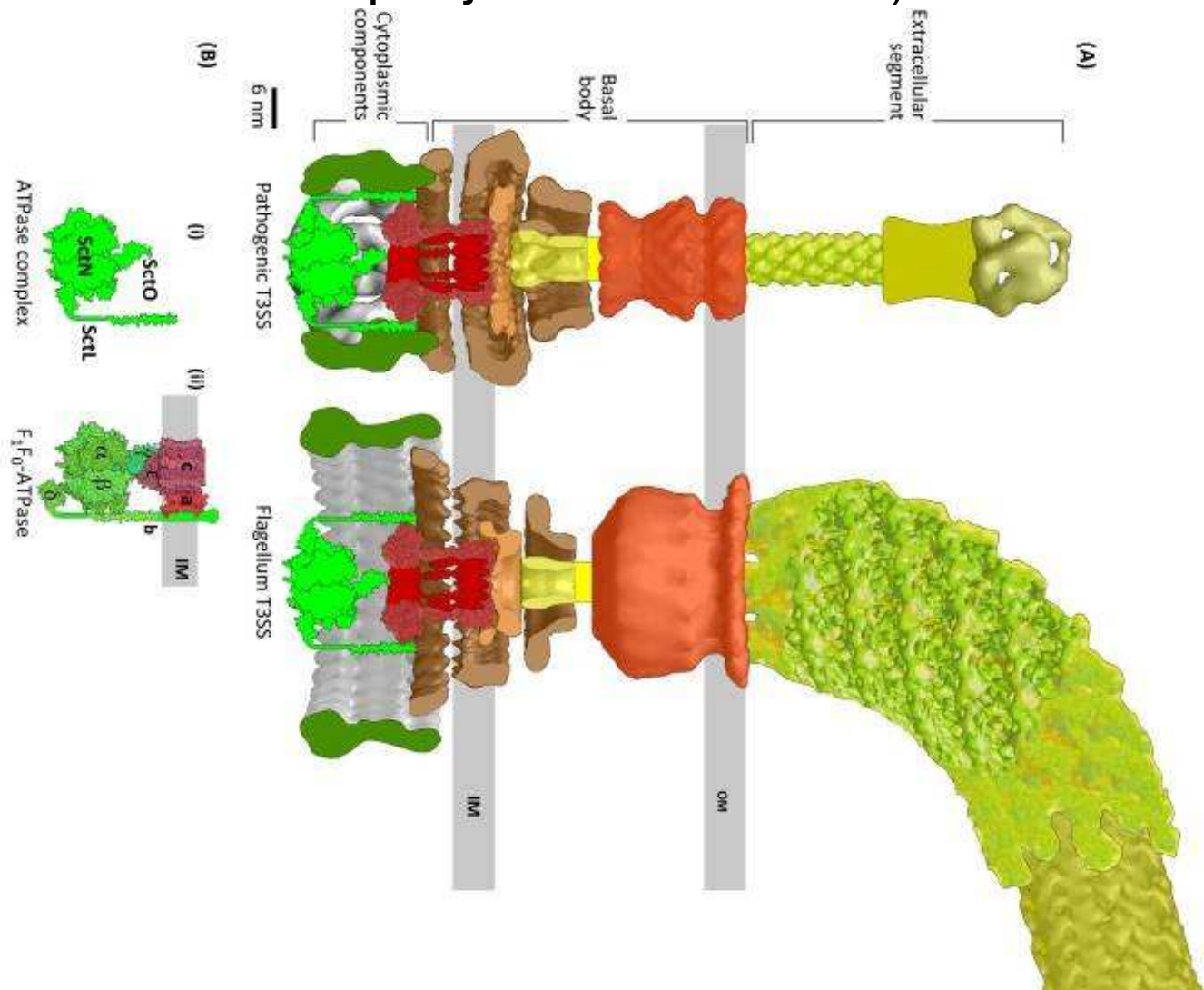
- [RNA polymerasa](#) – přepisuje DNA do RNA
- [DNA polymerasa](#) – syntetizuje druhý řetězec na ssDNA
- [Helikasa](#) – odděluje řetězce DNA (transkripce, replikace)
- [Topoisomerasa](#) - redukce supercoiling DNA
- [RSC](#) a [SWI/SNF](#) komplexy remodelují chromatin
- [SMC proteins](#) – zodpovědné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





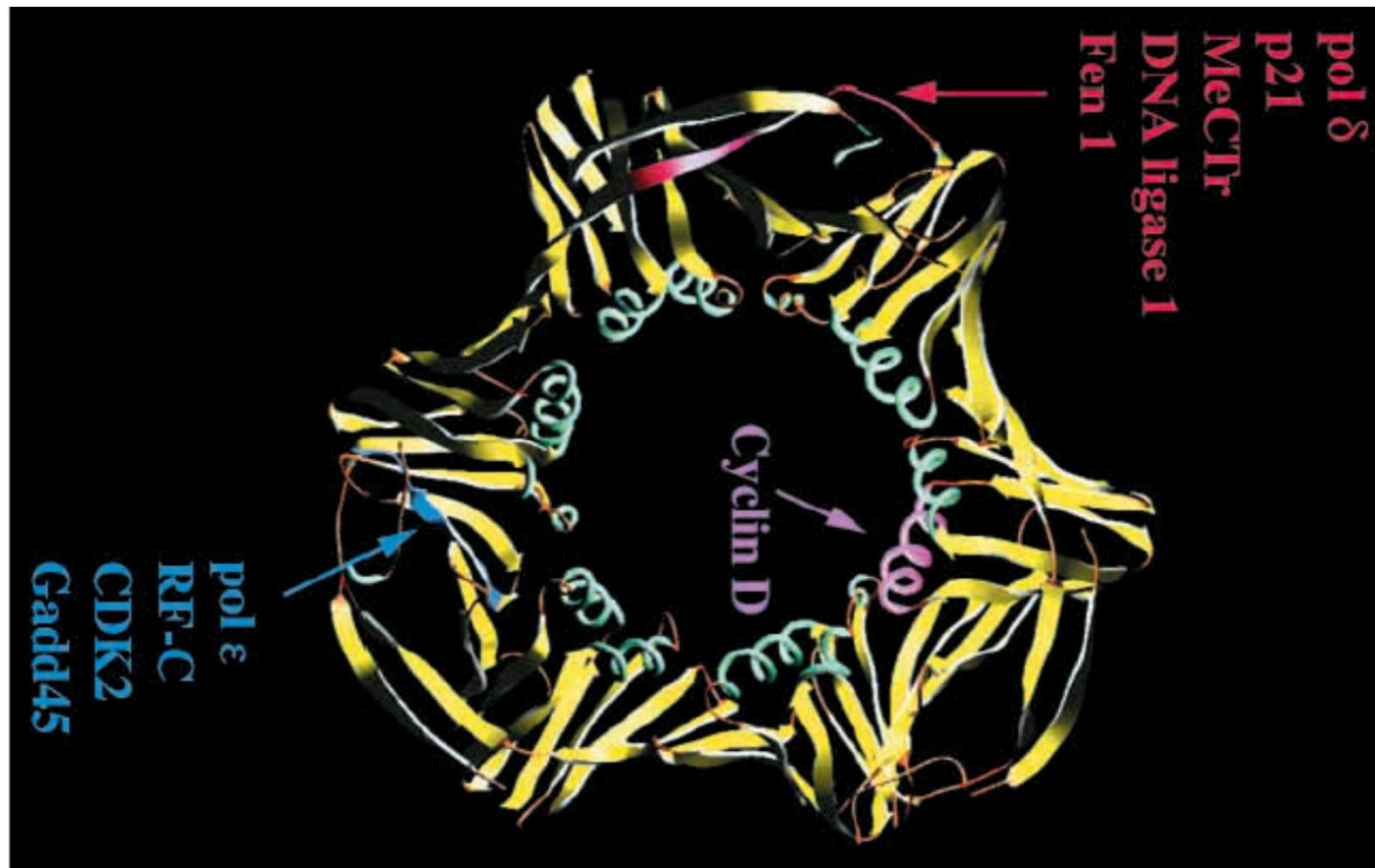
# Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



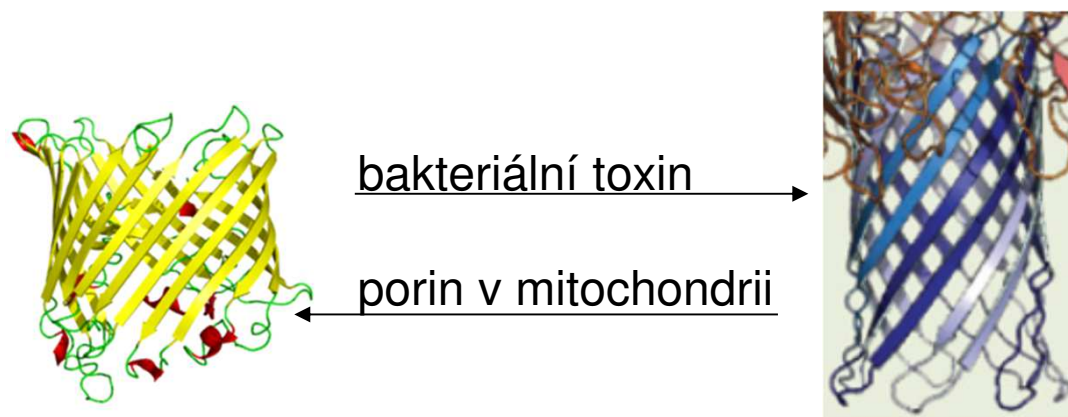
## Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



## Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

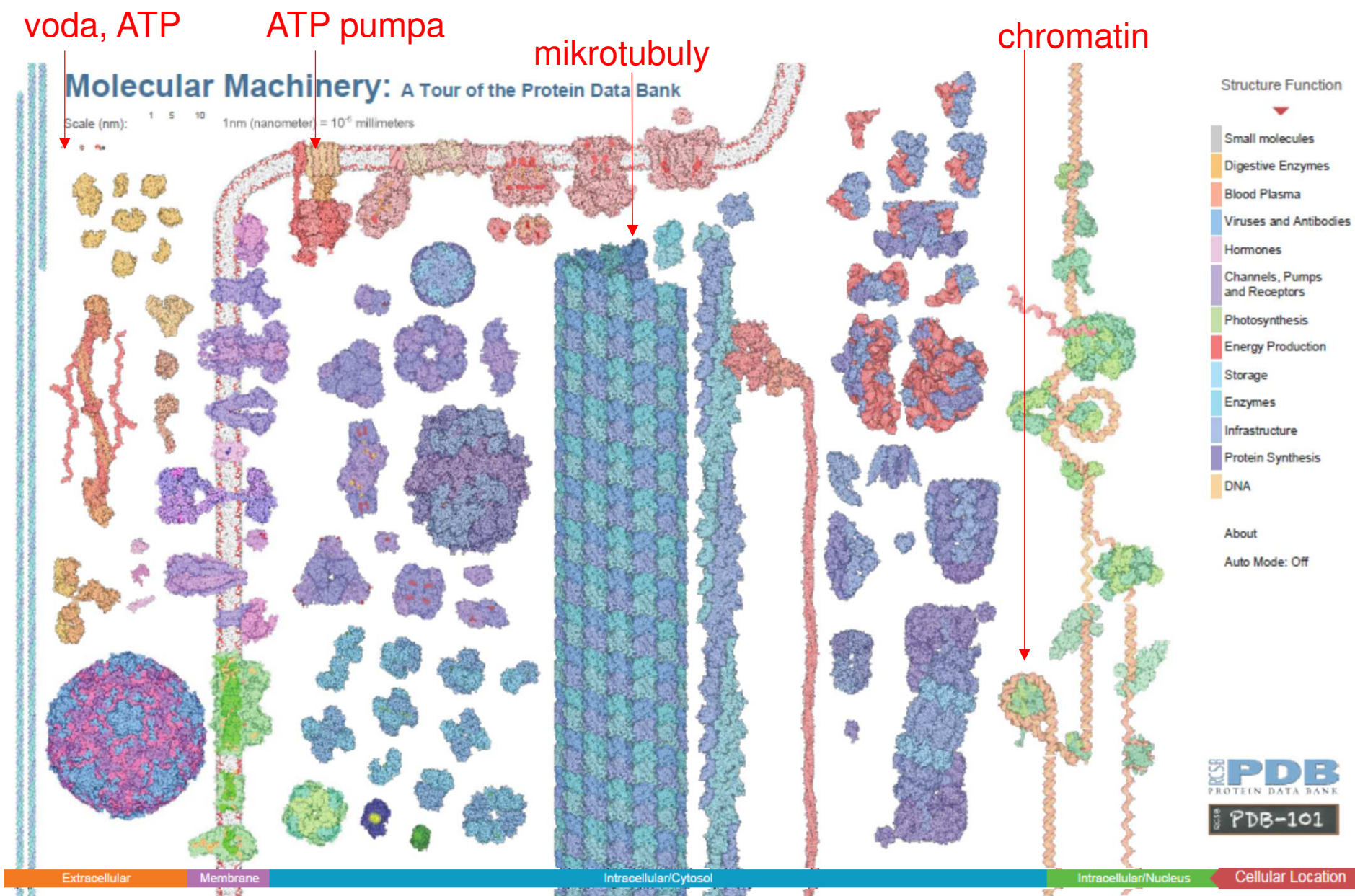
- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká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

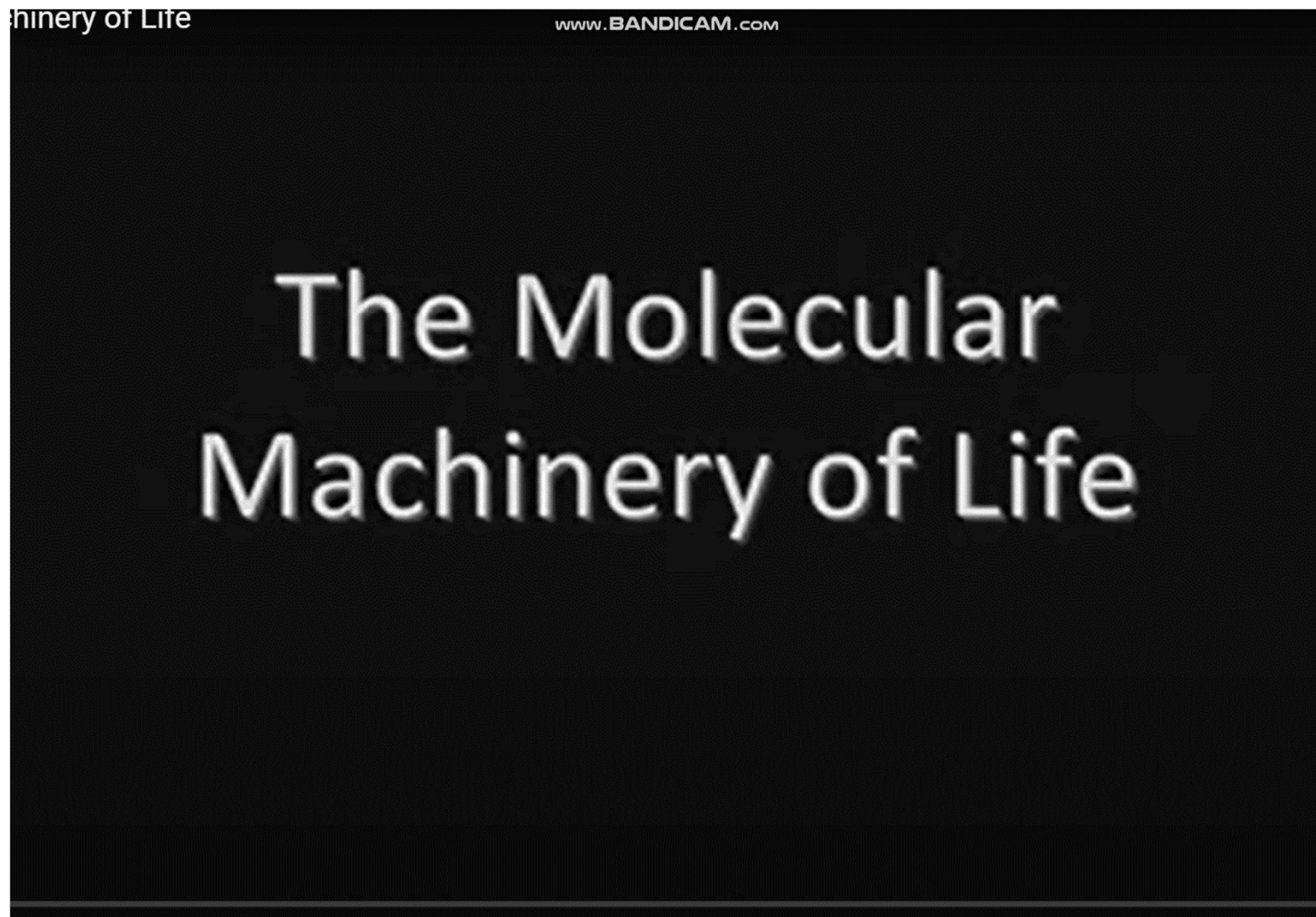
CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů

CG031 – Cvičení z modelování proteinových komplexů

jarní semestr - doc. Jan Paleček

Molecular machinery of life:

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



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