

Test 1

- testy předat příště přednášejícímu nebo zaslat na E-mail: jpalecek@sci.muni.cz
- **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 obtáčeující šroubovice
 -
- **3. interaktom je:**
 - a. interakční síť proteinů (pro daný organismus)
 - b. soubor všech interakcí jednoho proteinu
 - c. databáze všech interakcí molekul
 - 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

- **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 2 příklady molekulárních strojů:**
 -
 -
 -

PROTEOMIKA

doc. Jan Paleček
jpalecek@sci.muni.cz

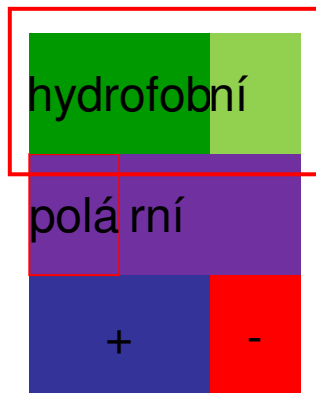
- Proteinové interakce – 29.10.
 - jak spolu proteiny interagují?
 - interaktom
- Proteinové komplexy – 5.11.
 - protein-proteinové interakce a komplexy
 - příklady komplexů (ATPase, PCNA ...)
 - komplexom, skládání komplexů

CG030 – Struktura a funkce proteinových komplexů

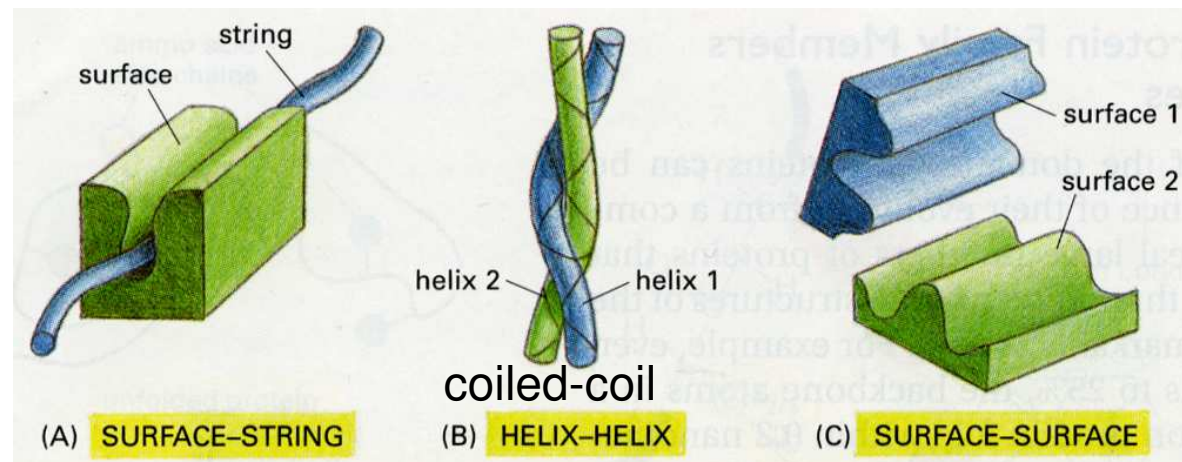
Připomenutí - protein-proteinové interakce

- 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 postranní řetězce aminokyselin směřujících do solventu ...
 - interakce proteinu je determinována povrchem, který musí mít tvar i charakter komplementární s interakčním partnerem (typy interakcí: ...)

primární struktura



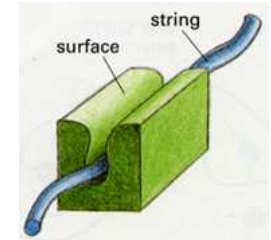
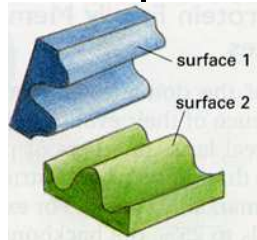
sekundární a terciární struktura



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

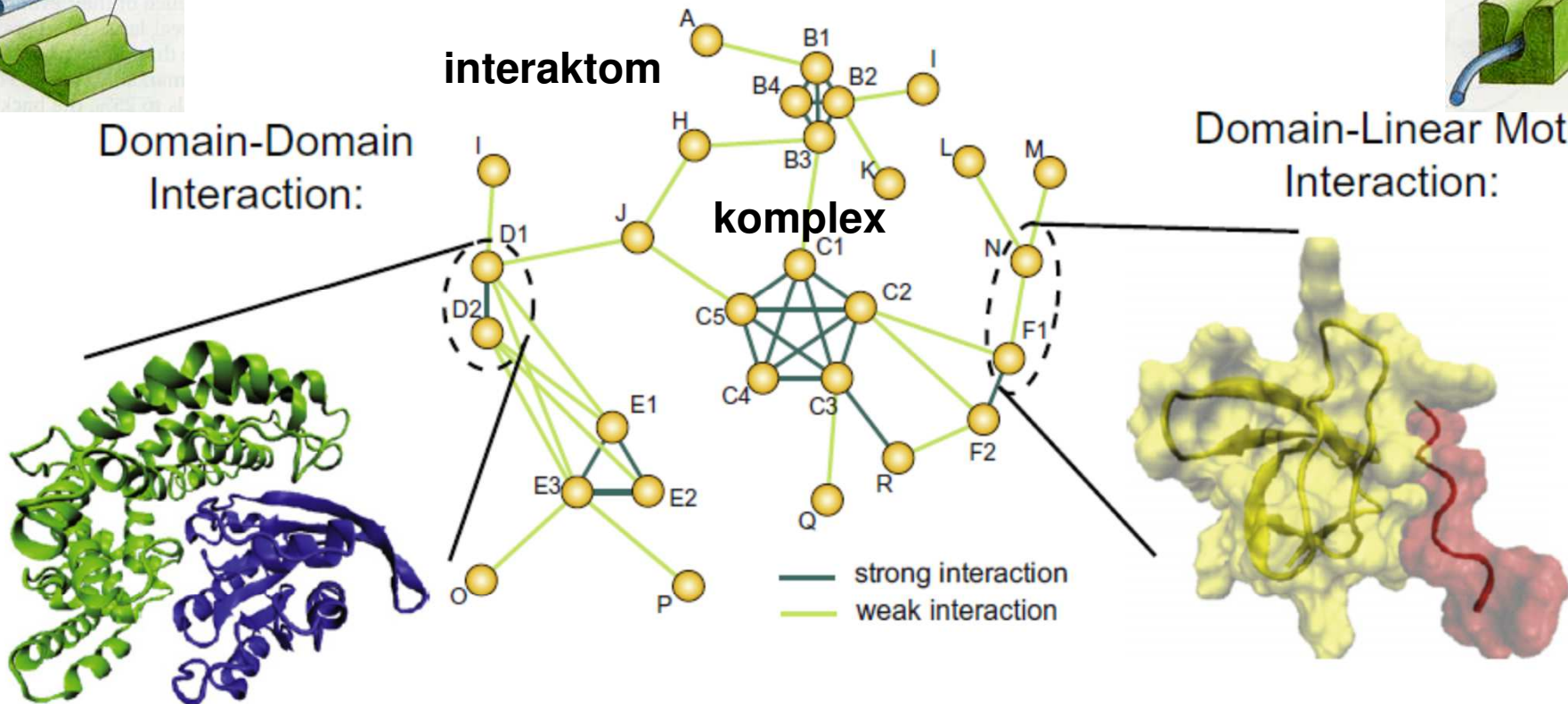
Protein-proteinové interakce

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



Domain-Domain Interaction:

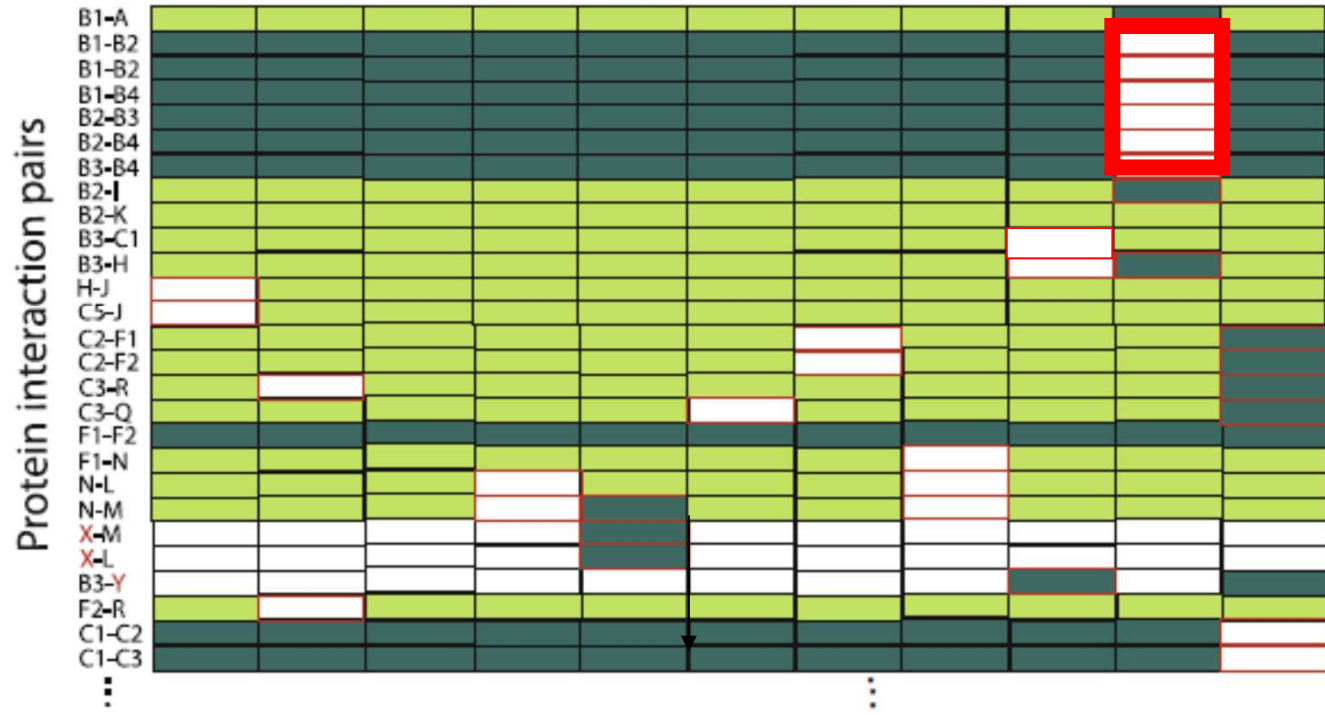
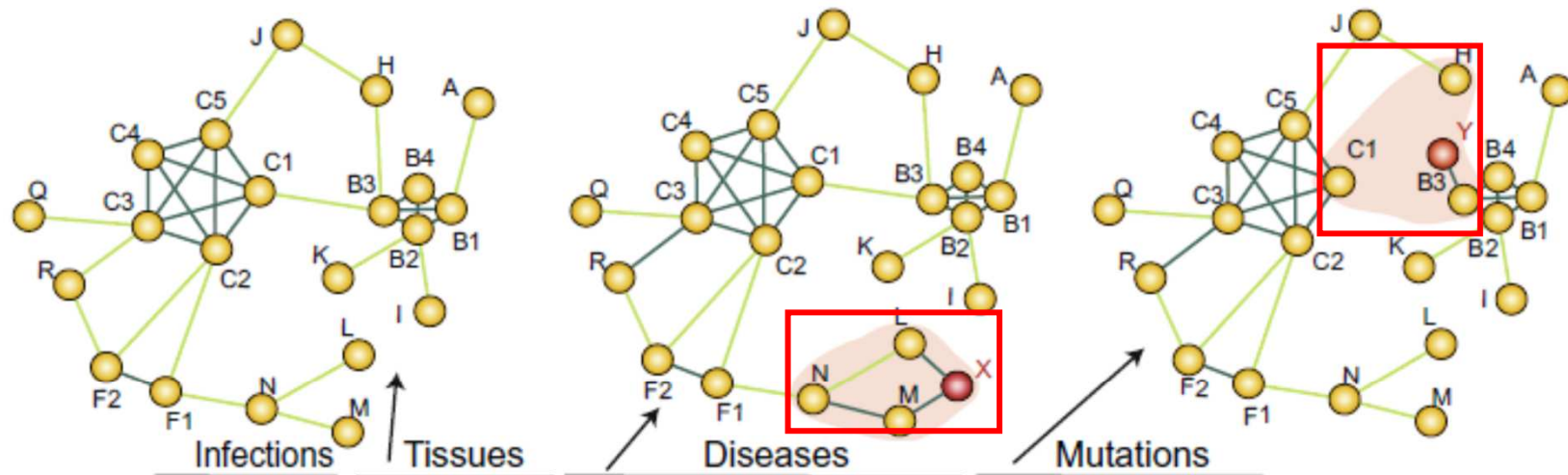
Domain-Linear Motif Interaction:



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

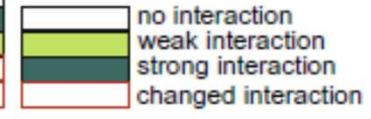
- Motif length from 3 - 10 AA
- Affinities: $K_D \sim \mu\text{M}$
- Rather transient interactions
- Examples: Sh3/PxxP, EVH1/FPPPP



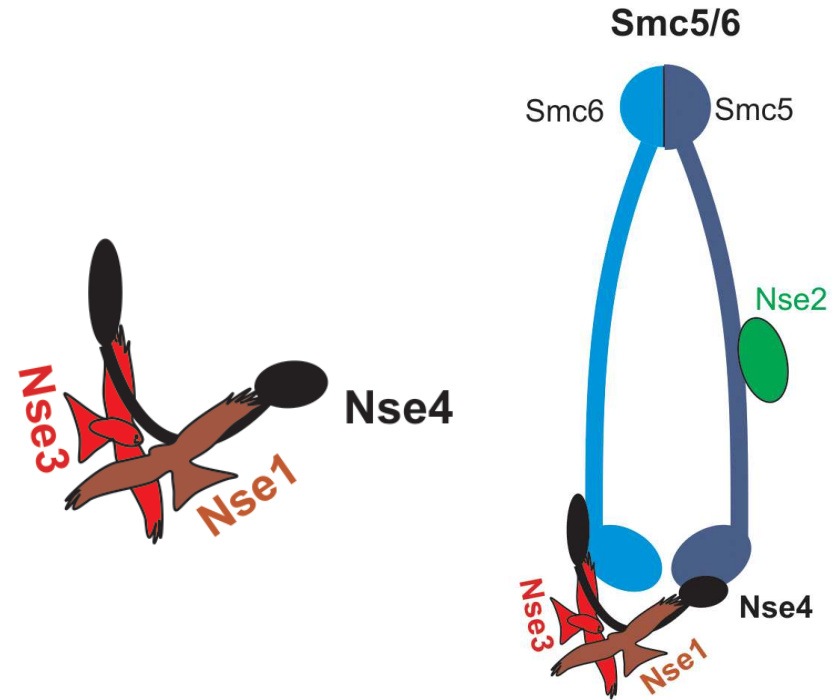
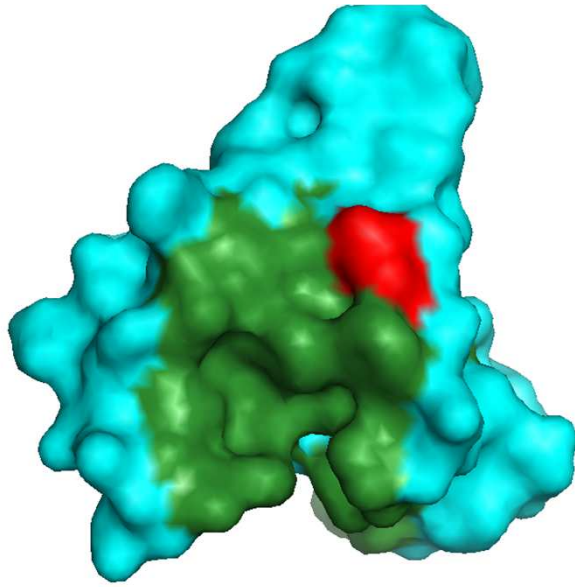
Síť neznamená komplex (hůře popisuje stabilní komplexy, ale lépe popisuje vztahy)

protein X posílí vazby = komplex

protein Y inhibuje vazbu (C1-B3, H-B3)

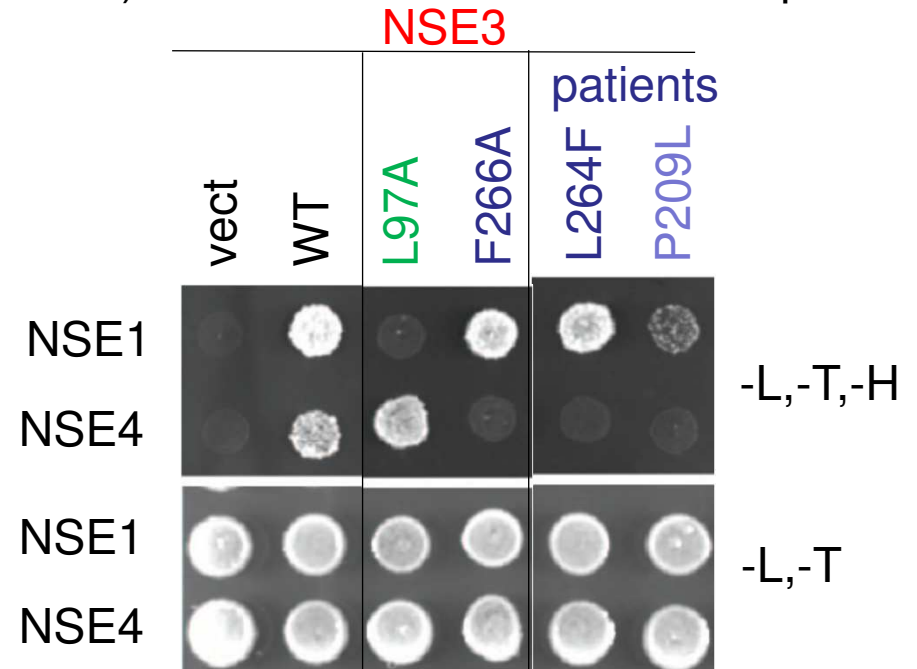
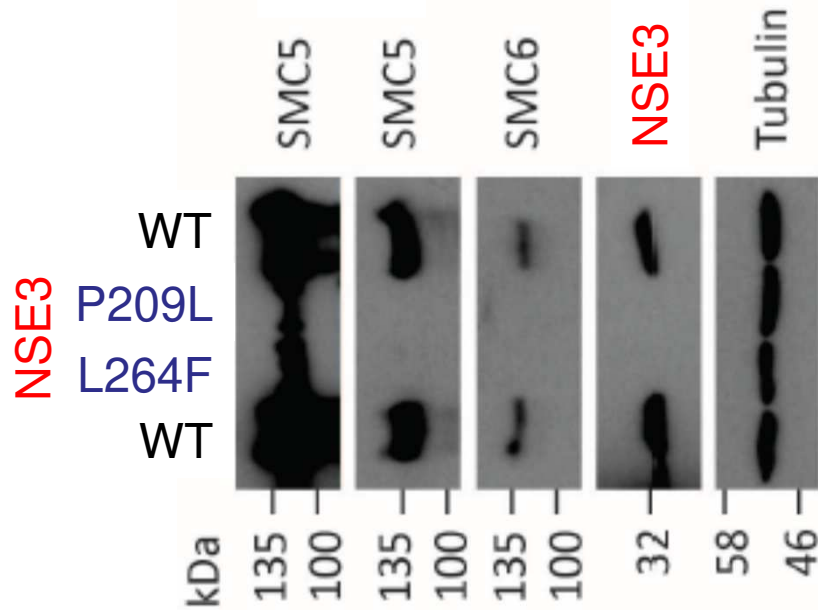


modulace interakcí – inhibice vs nové interakce (virovými proteiny, mutacemi)
 Srovnání interaktomů => konzerv. interakcí (=> evoluce komplexů => evoluce organismů)



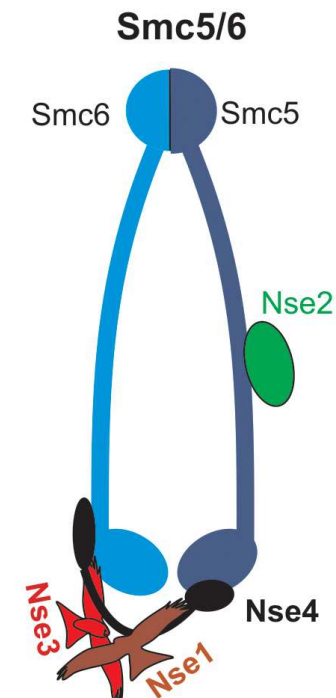
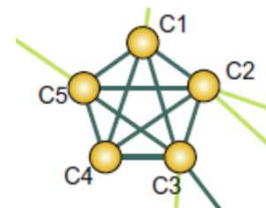
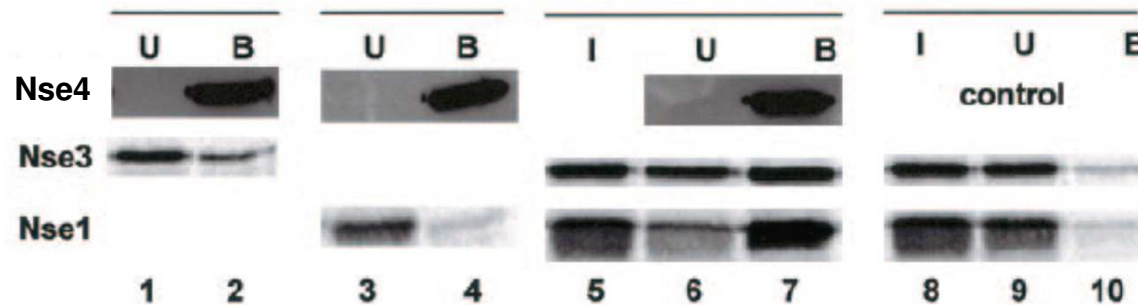
van Crabben et al, J Clin Invest, 2016

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



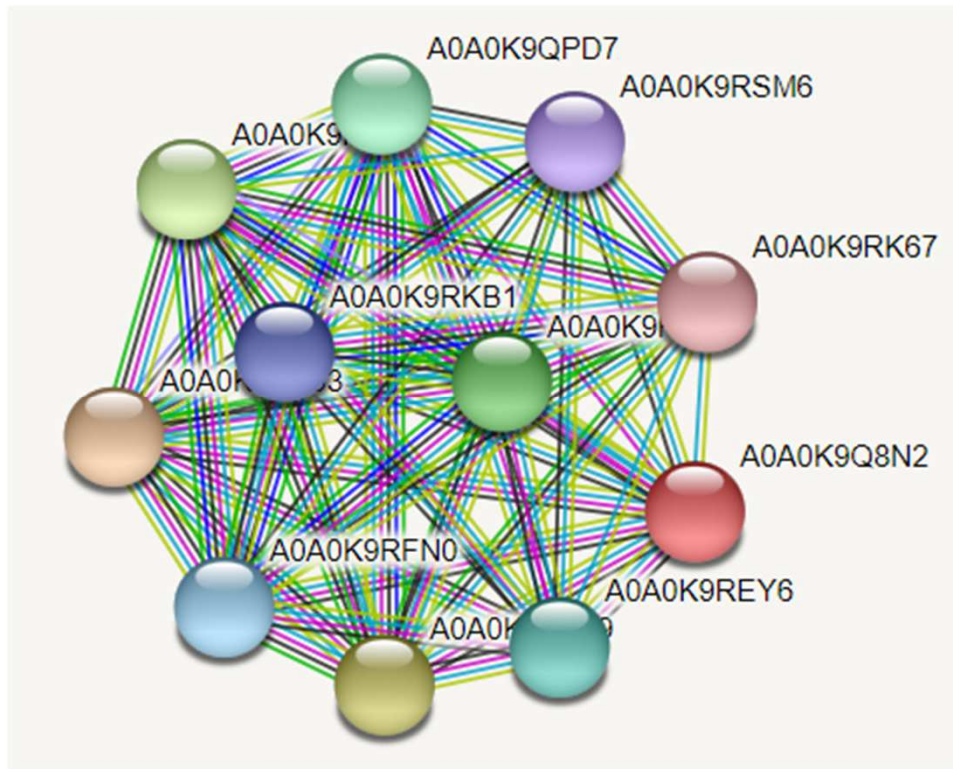
... kvarterní struktura

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

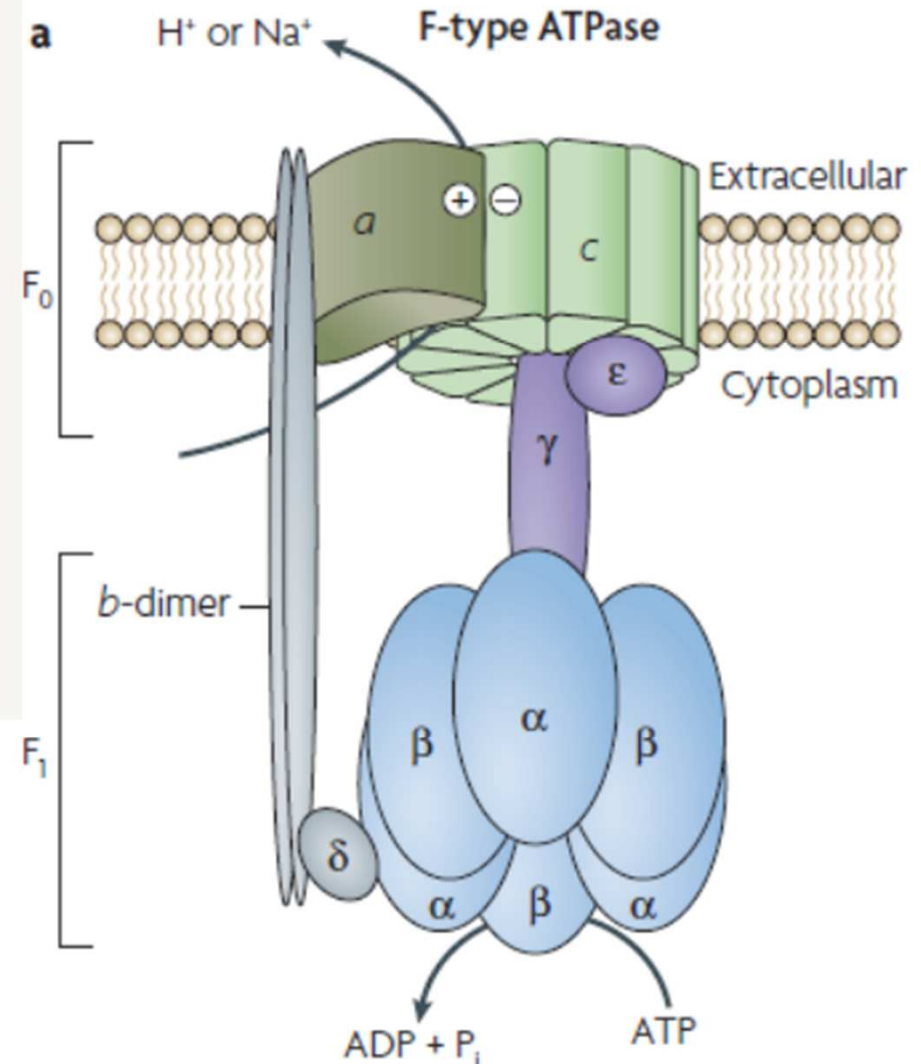


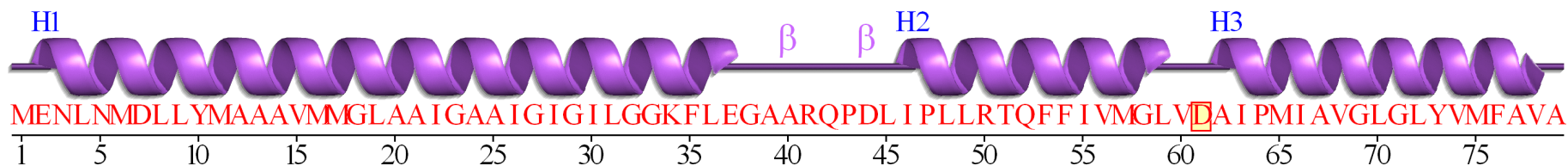
- vazba NSE3-NSE4 pomáhá navázání NSE1 na NSE4

Stabilní komplex – molekulární stroj



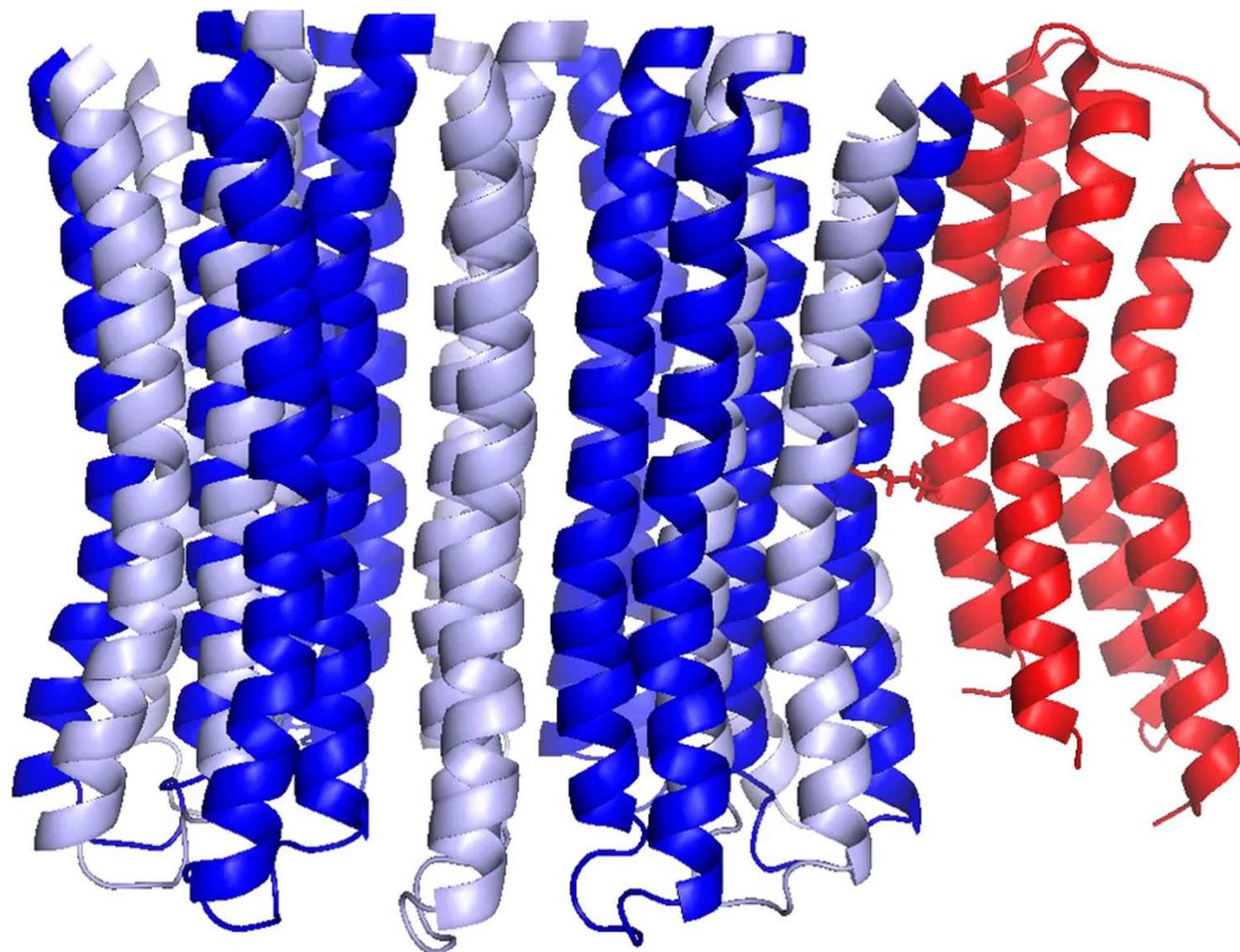
ATPasová pumpa -
komplex se stálým
složením/poměrem
podjednotek („neměnný“)

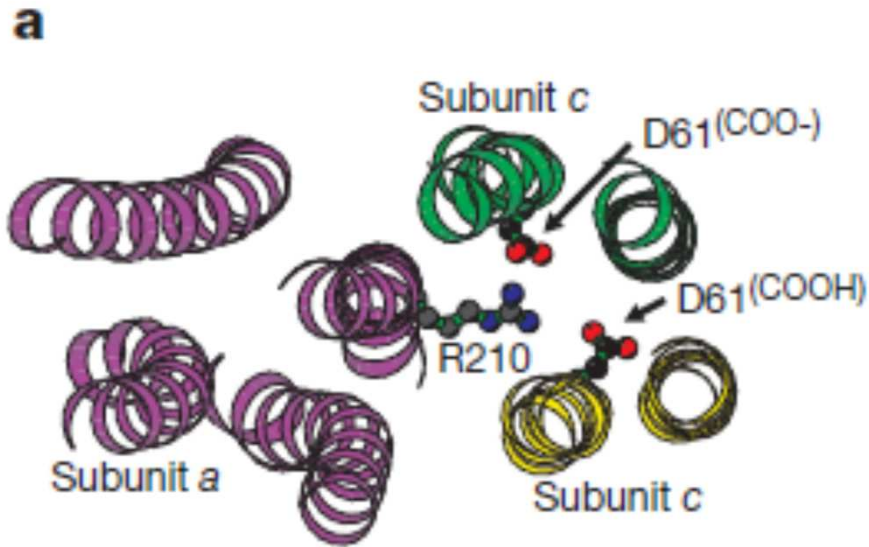




pumpa obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu

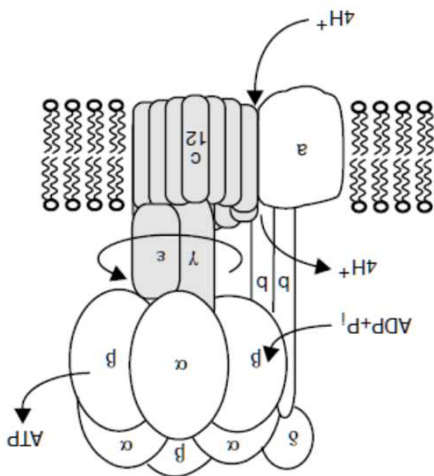
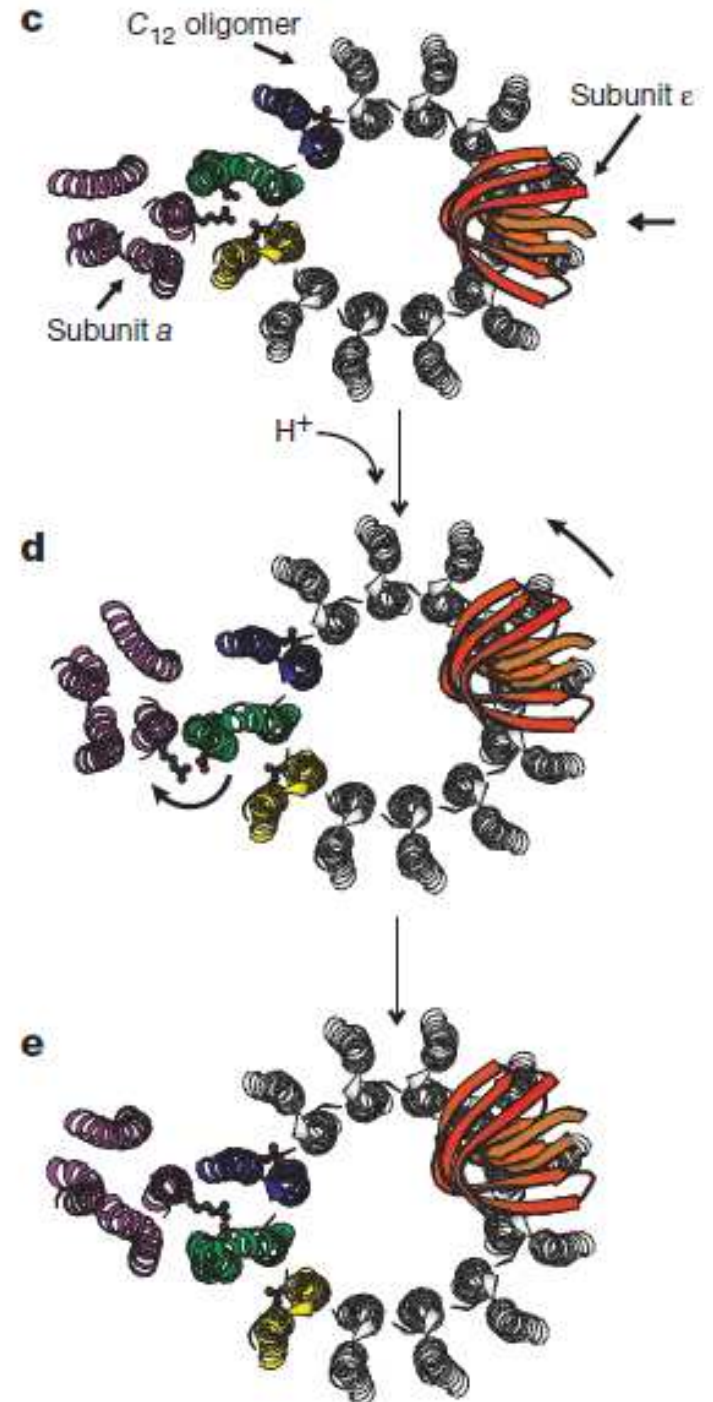
PDB: 1C17:A

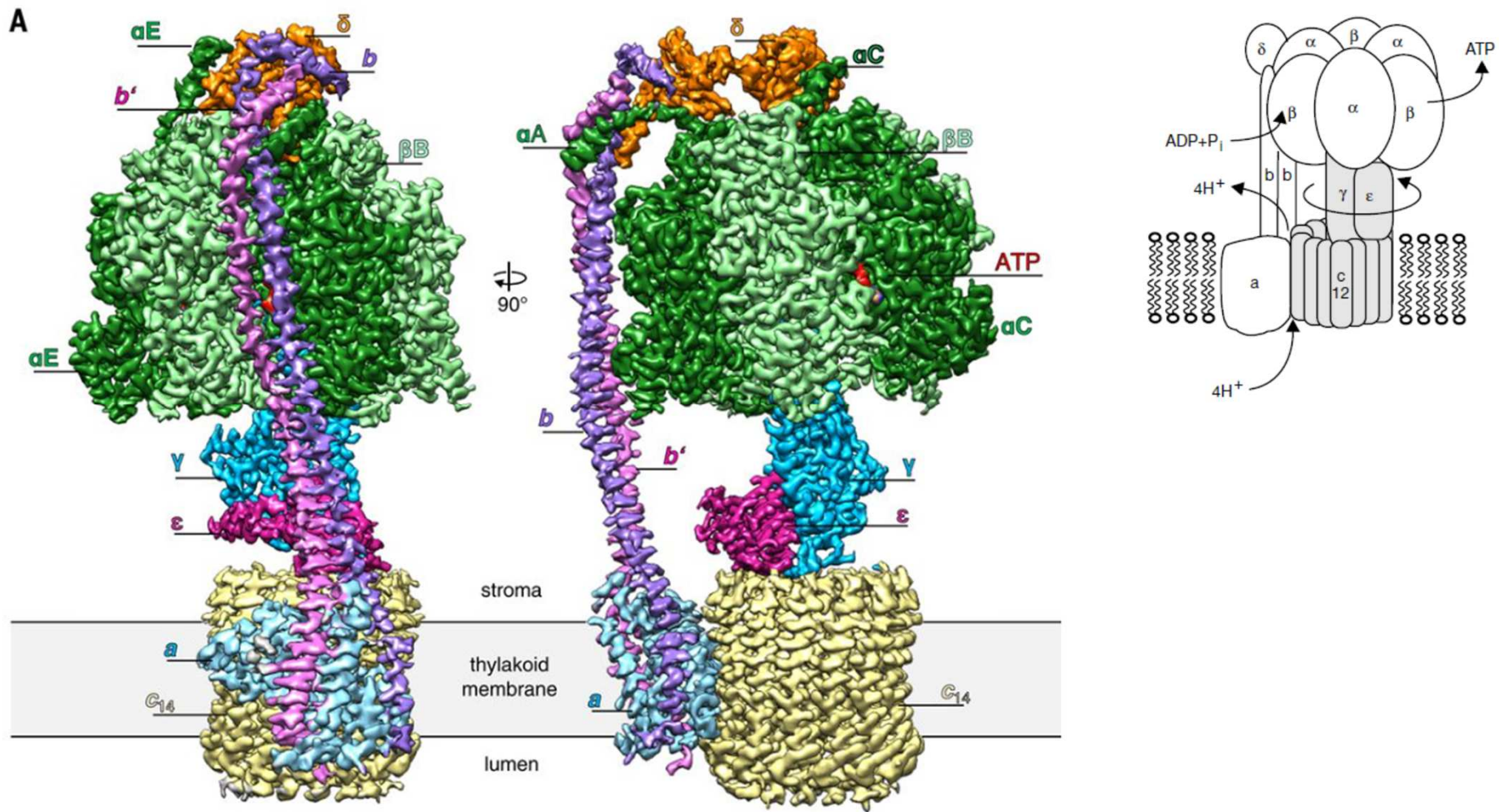




Rastogi & Girvin, Nature, 1999

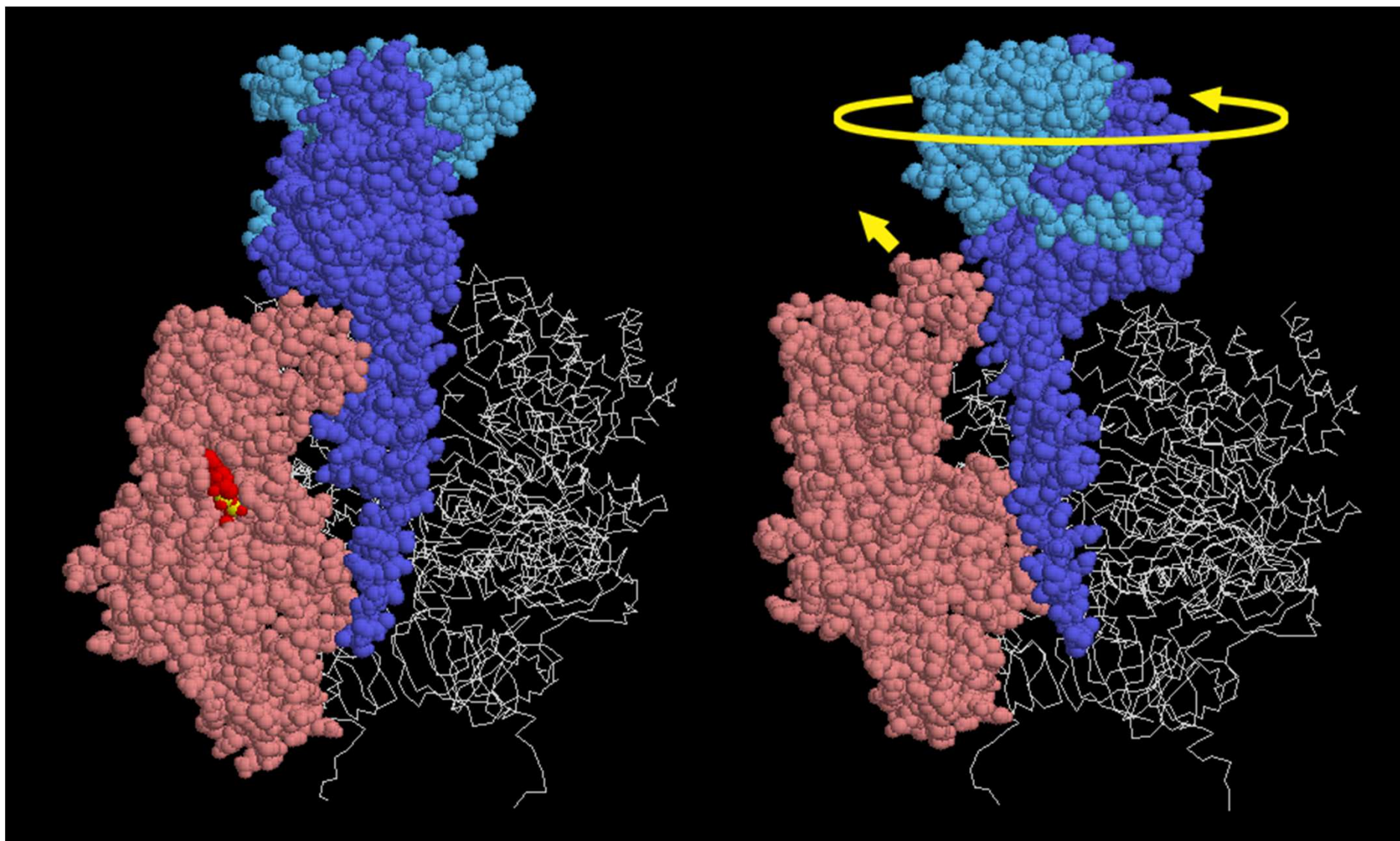
podjednotka **a** obsahuje arginin, který předává proton/vodík aspartátu - dochází k neutralizaci náboje – otočka.



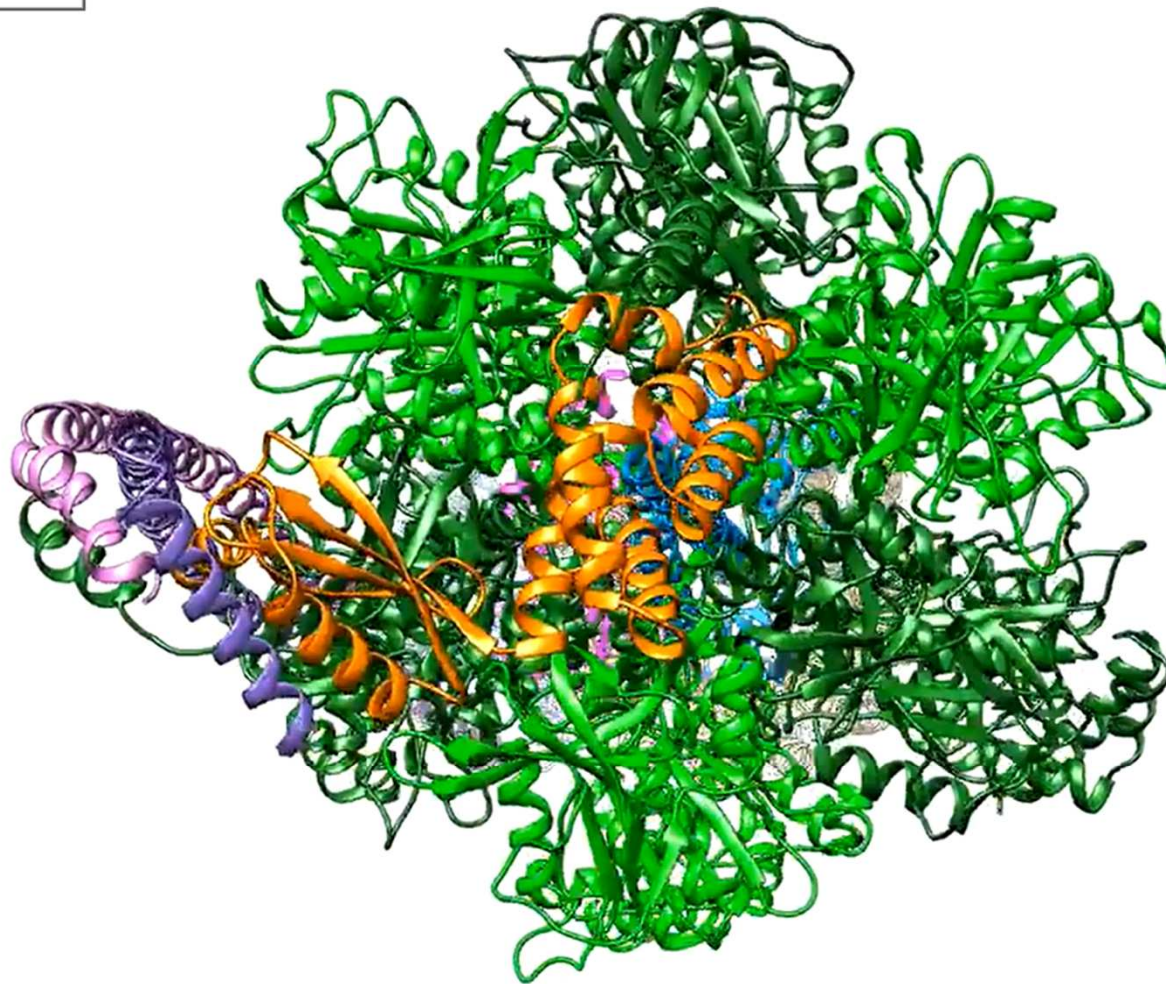


Hahn et al., Science, 2018

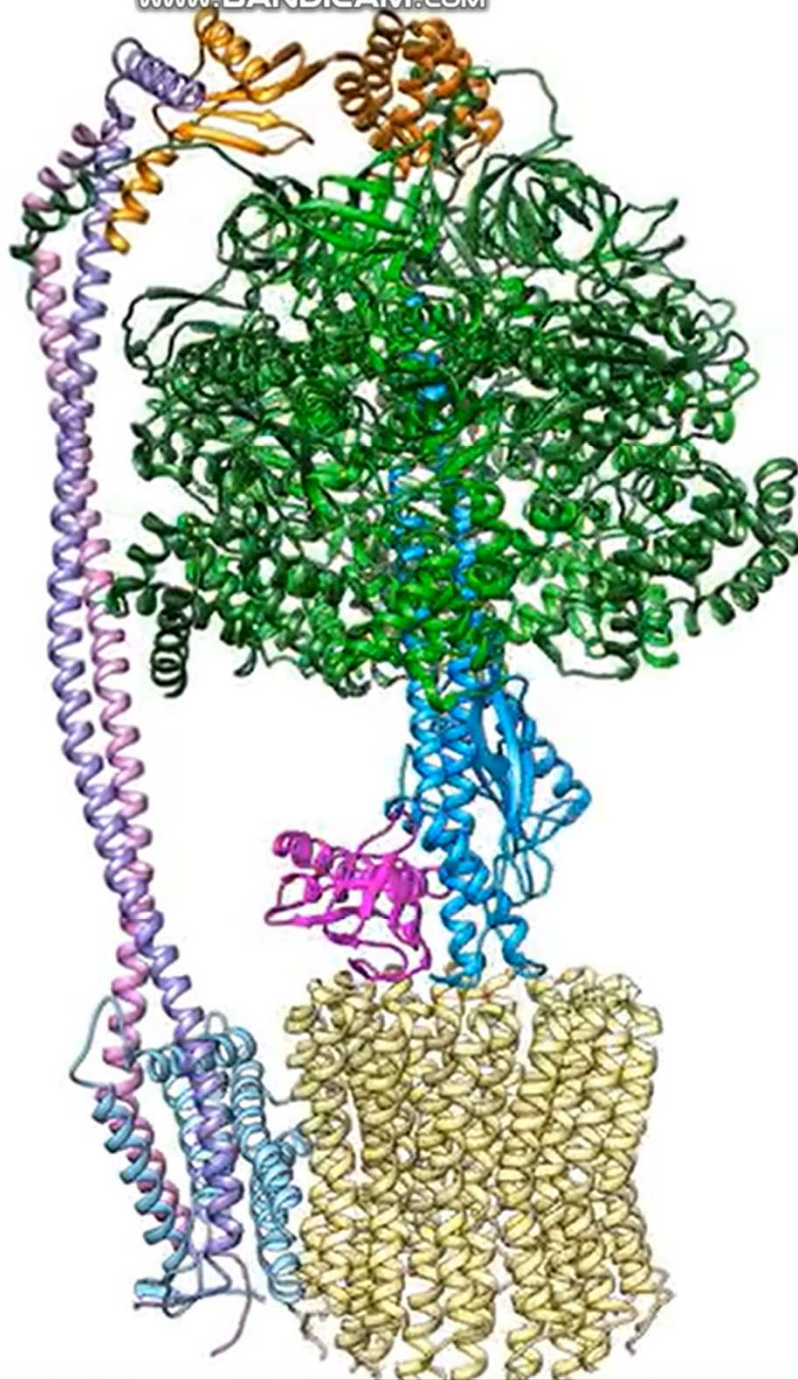
F₀ je protonový rotor (uložen v membráně) poháněný tokem vodíkových iontů (z dýchacího řetězce) přes membránu – dva tunely v podjednotce **a** (přivádí a odvádí protony)



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



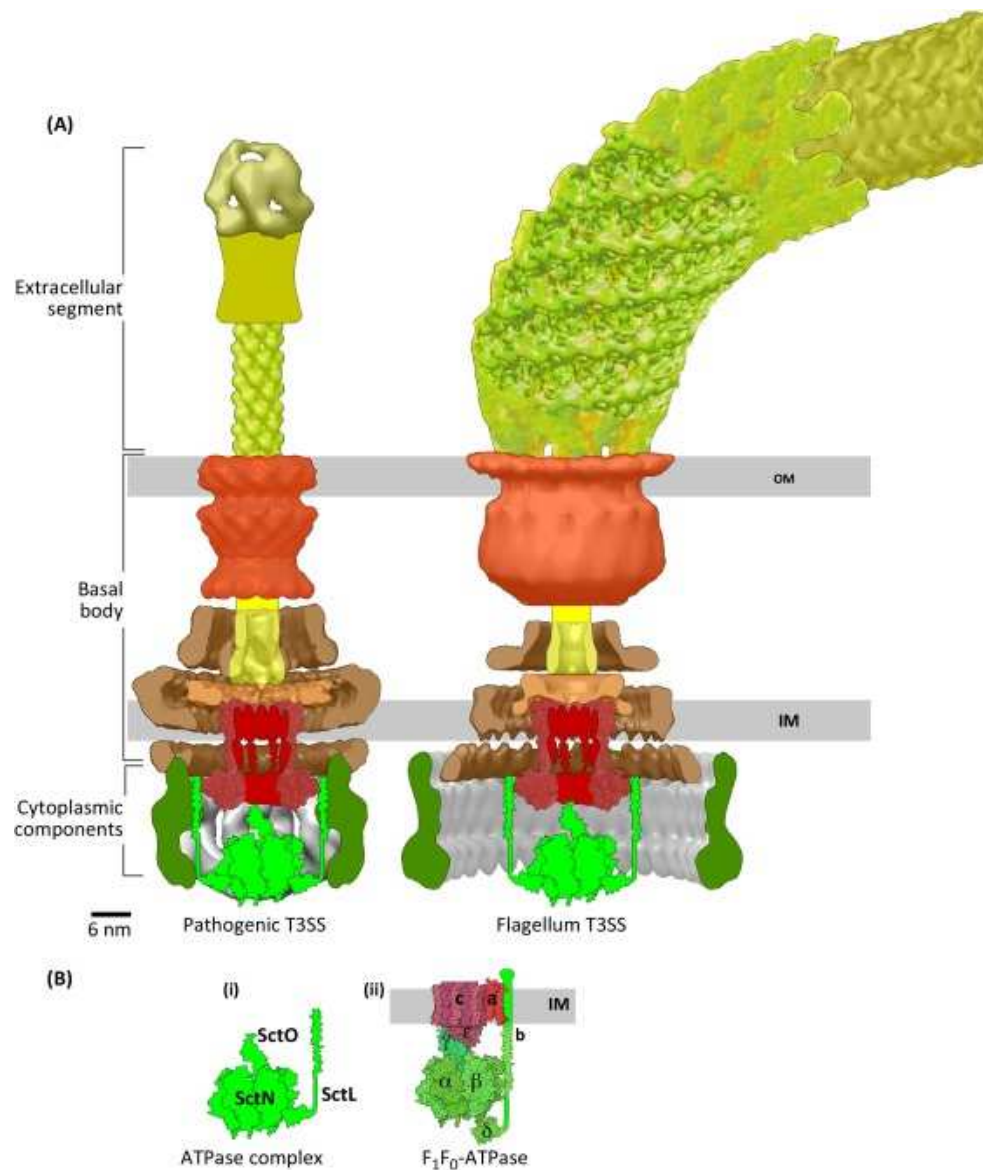
rotor je osou spojen se statorem vyrábějícím ATP (nebo poháněným ATP).



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). **ATP moduluje interakce proteinů**
https://www.youtube.com/watch?v=CN2XOe_c0iM



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

Mulkiđjanian et al, NRM, 2007

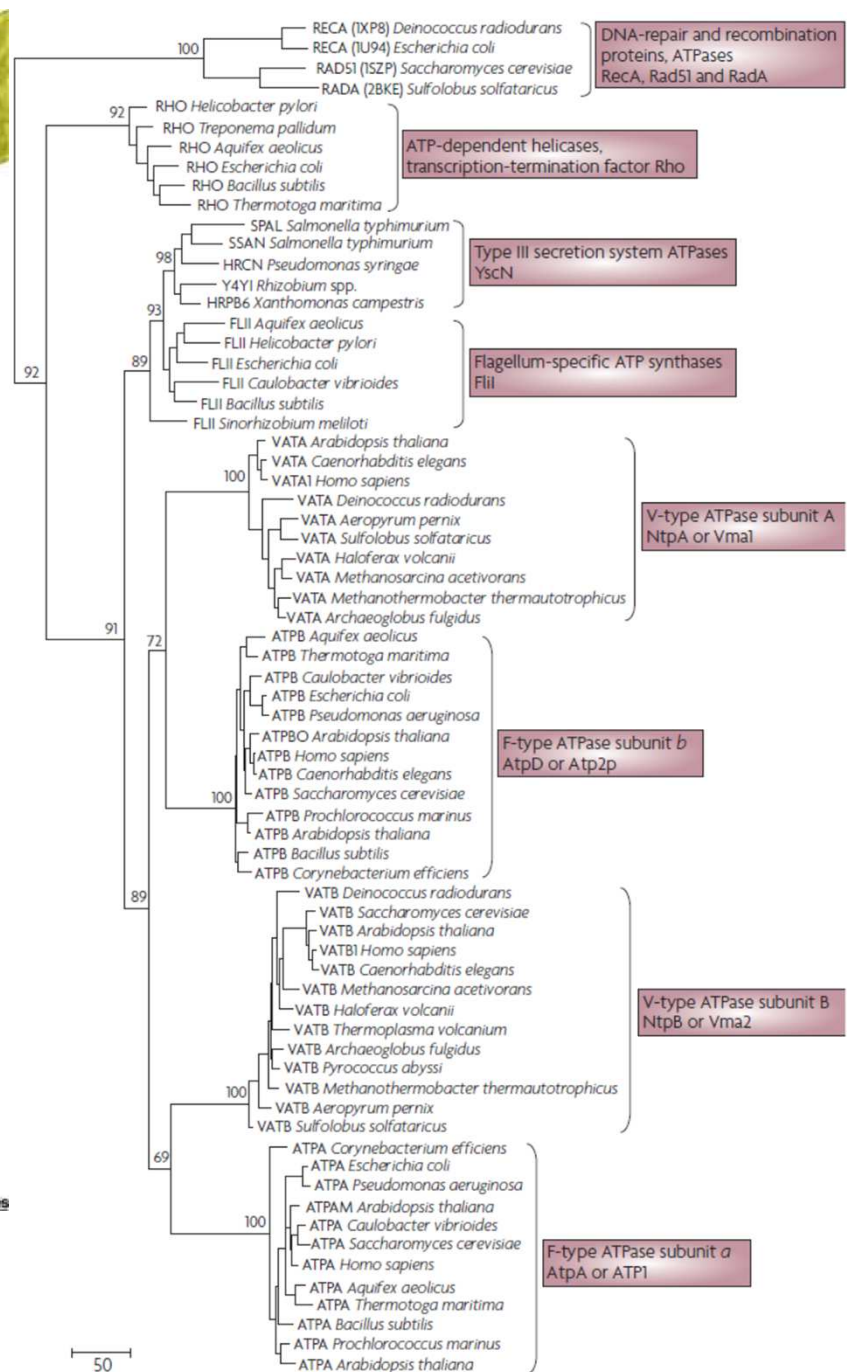
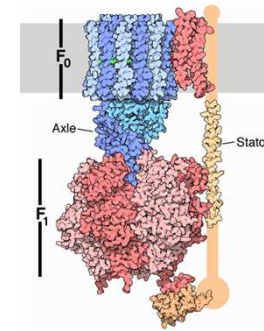


Figure 3 | Phylogenetic tree of the catalytic subunits of the F- and V-type ATPases and related P-loop ATPases. The protein sequences were retrieved from [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (for the RecA family, four

Molekulární motory

•Rotační motory:

- [F₀F₁-ATP syntáza/ATPasa](#) – přeměna elektrochemického potenciálu na energii ATP ([mitochondrie](#)) – nebo naopak energie ATP k pumpování protonů přes membránu ([vakuoly](#))
- rotace bakteriálních bičičků



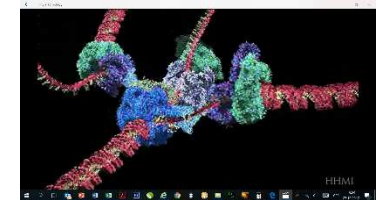
•Cytoskeletální motory

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

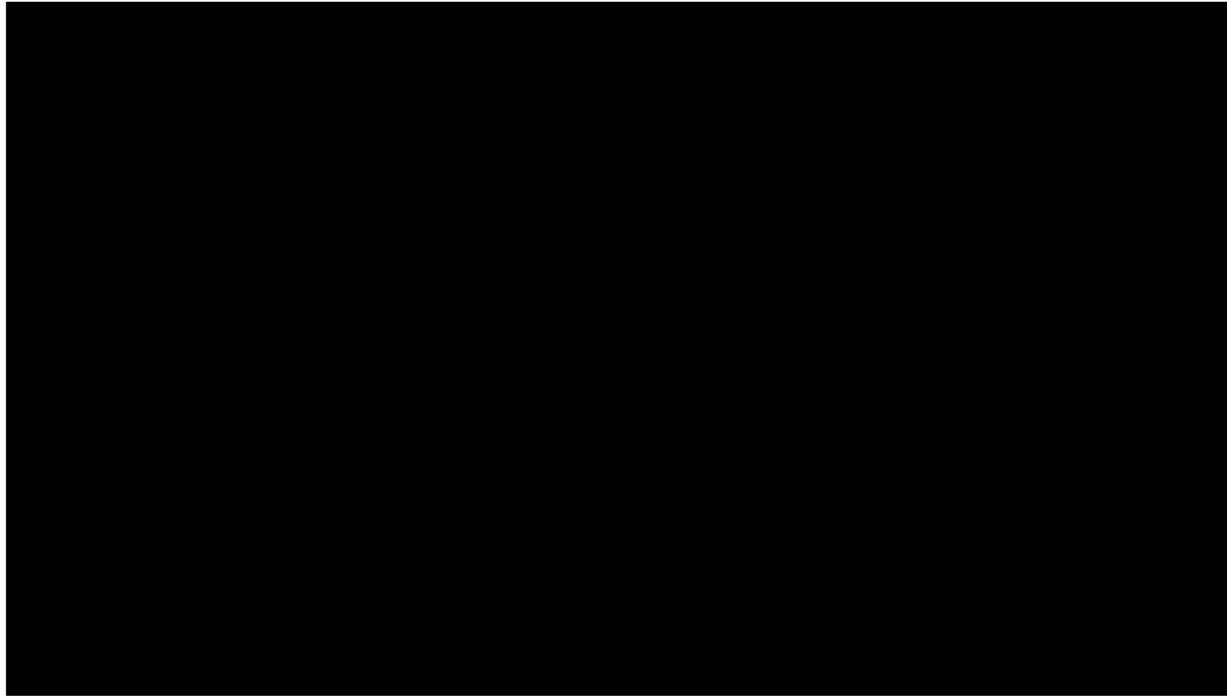
•„Motory“ nukleových kyselin:

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

viz dále ...



Dynamika komplexů - PPI



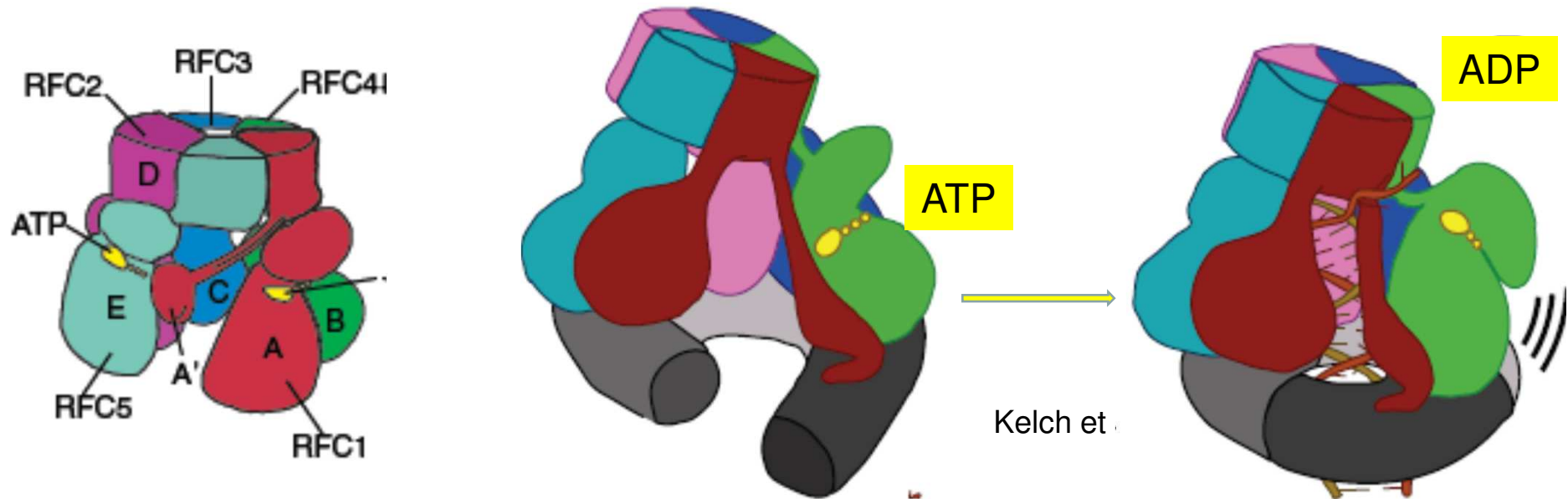
ATP, DNA ... moduluje interakce

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).

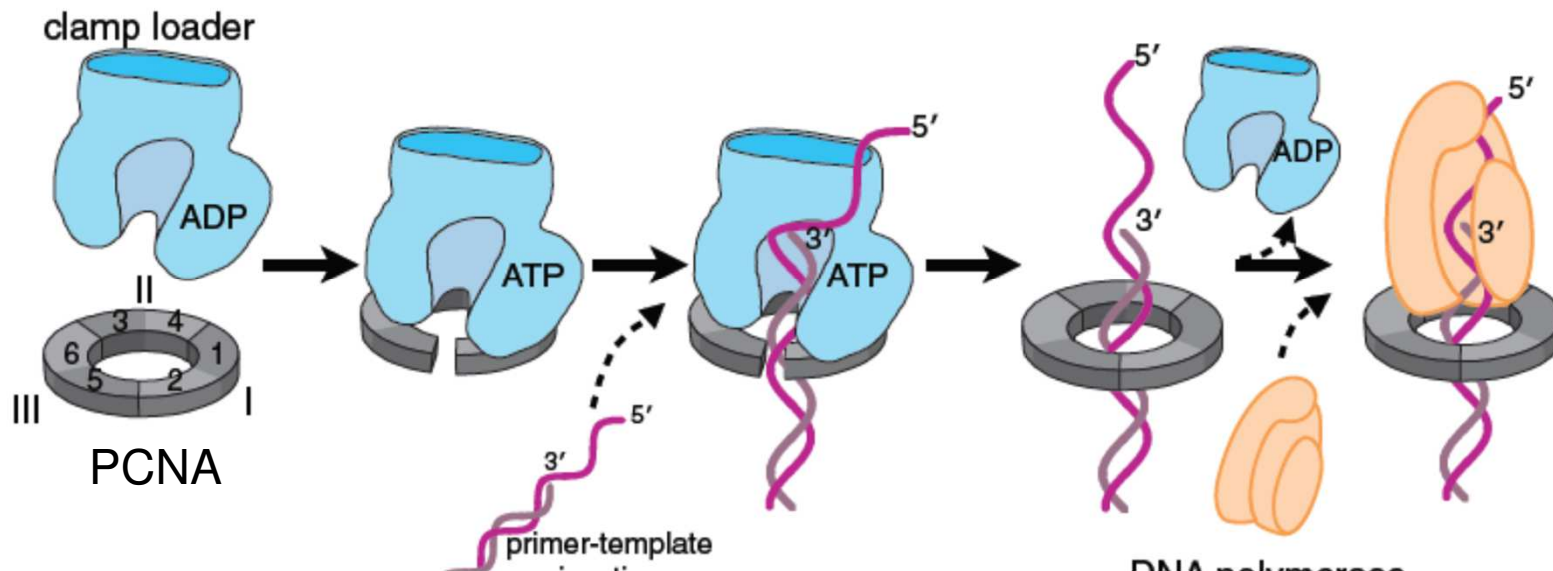
<https://www.biointeractive.org/classroom-resources/dna-replication-advanced-detail>

ATP modulace - clamp loader

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

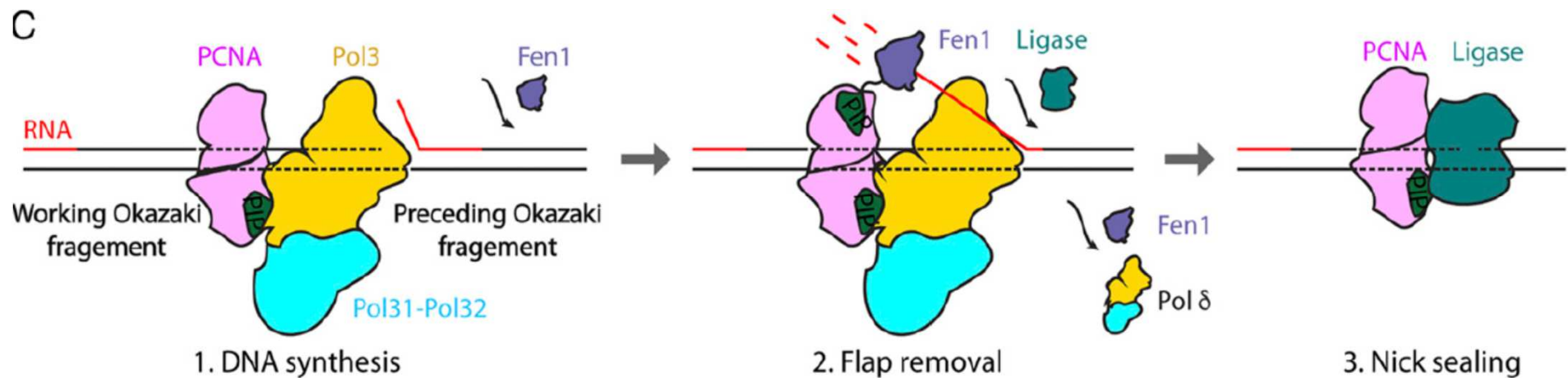


Aktivovaný (ATP) clamp loader interaguje s PCNA a otevírá ji pro DNA. Vazba DNA stimuluje hydrolýzu ATP a uvolnění clamp loader (uzavřeného s DNA).

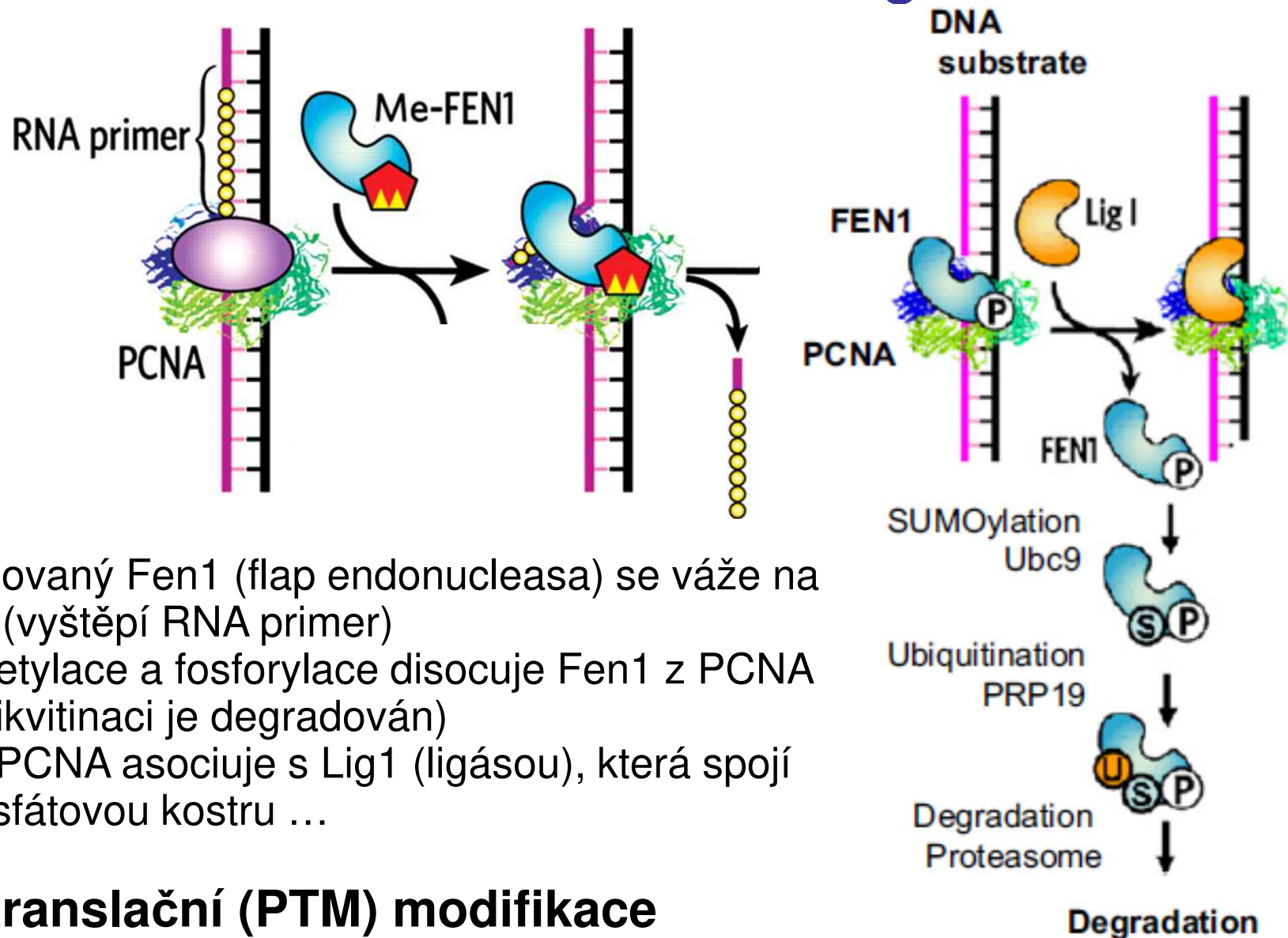


interakce PCNA

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

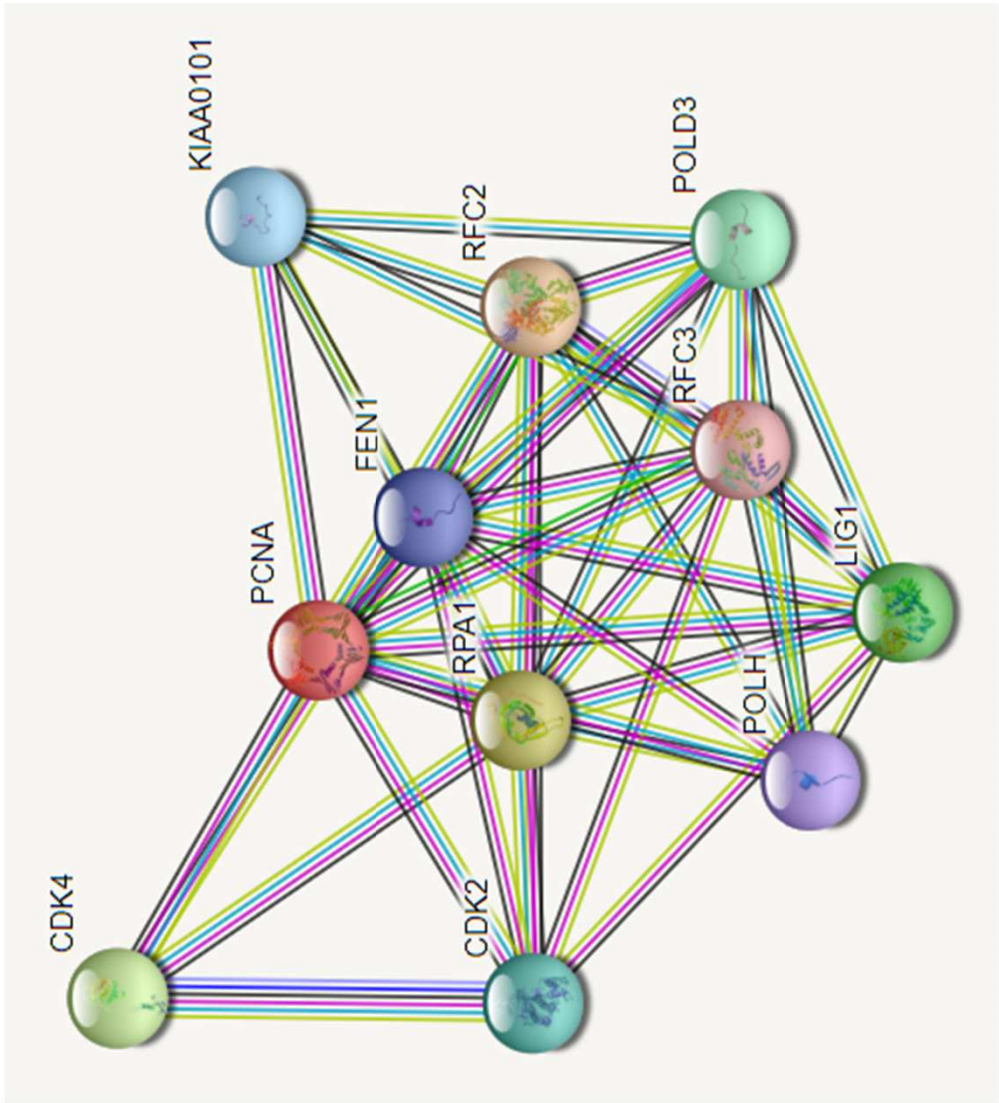
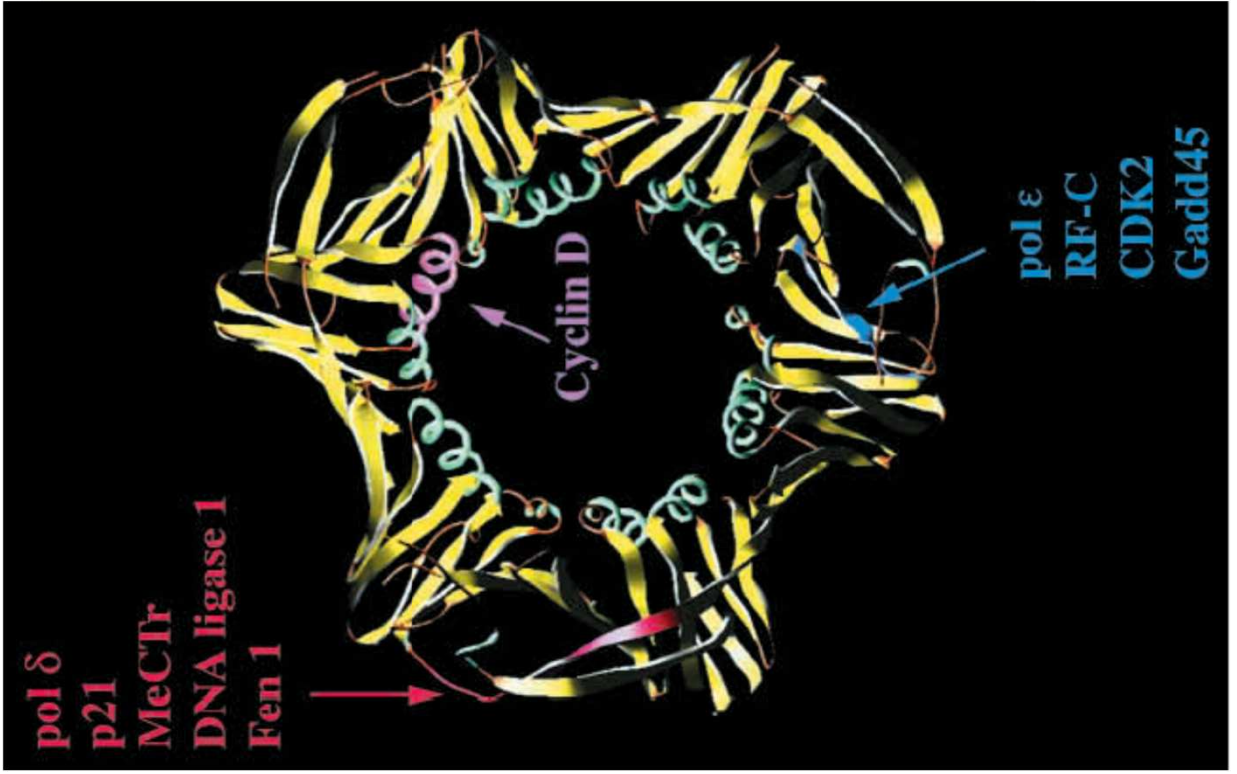


PCNA-Fen1 -> PCNA-Lig1

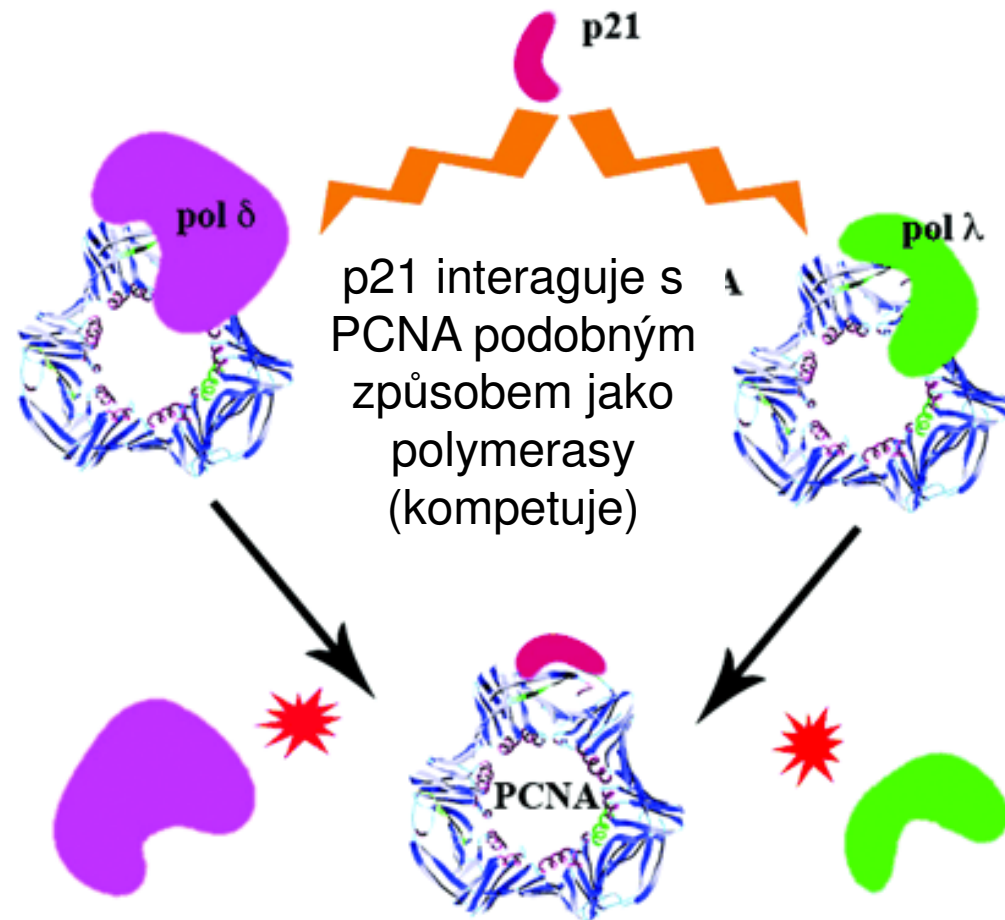
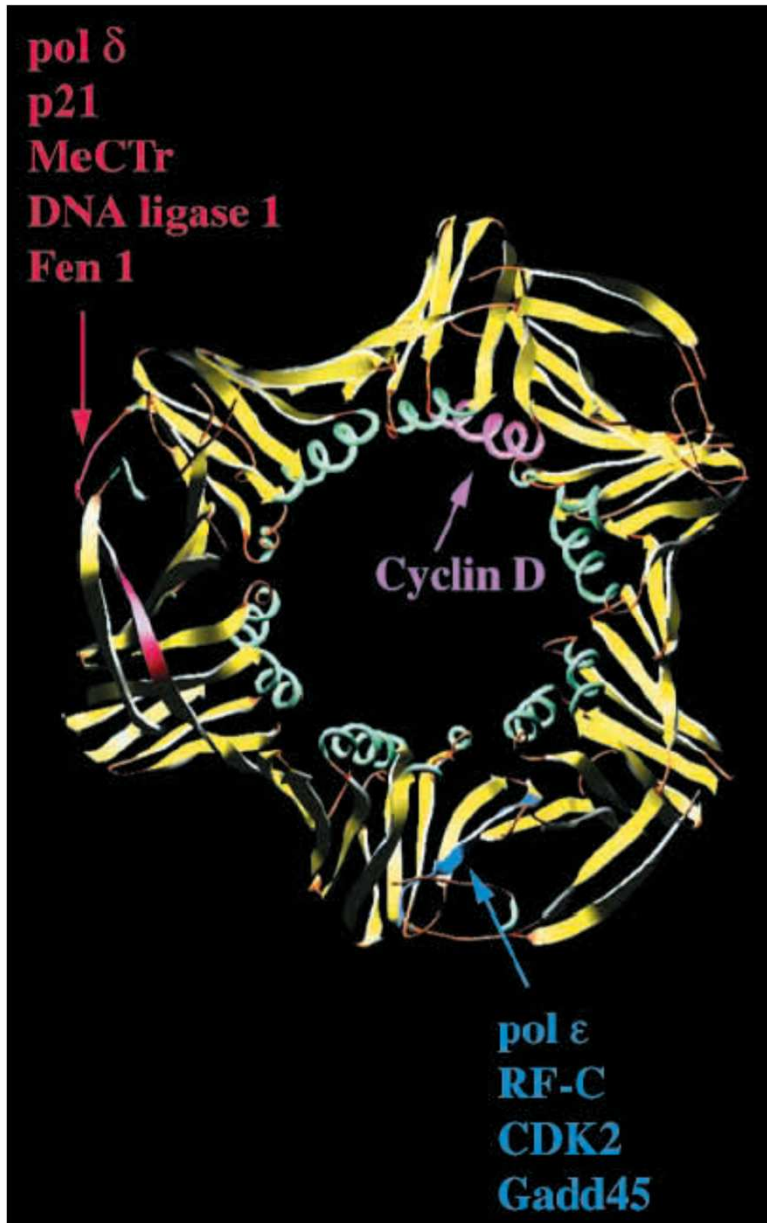


- metylovaný Fen1 (flap endonucleasa) se váže na PCNA (vyštěpí RNA primer)
- demetylace a fosforylace disociuje Fen1 z PCNA (po ubikvitinaci je degradován)
- poté PCNA asociuje s Lig1 (ligásou), která spojí cukrfosfátovou kostru ...

Posttranslační (PTM) modifikace modulují interkce (složení komplexu)



PCNA – regulace buněčného cyklu

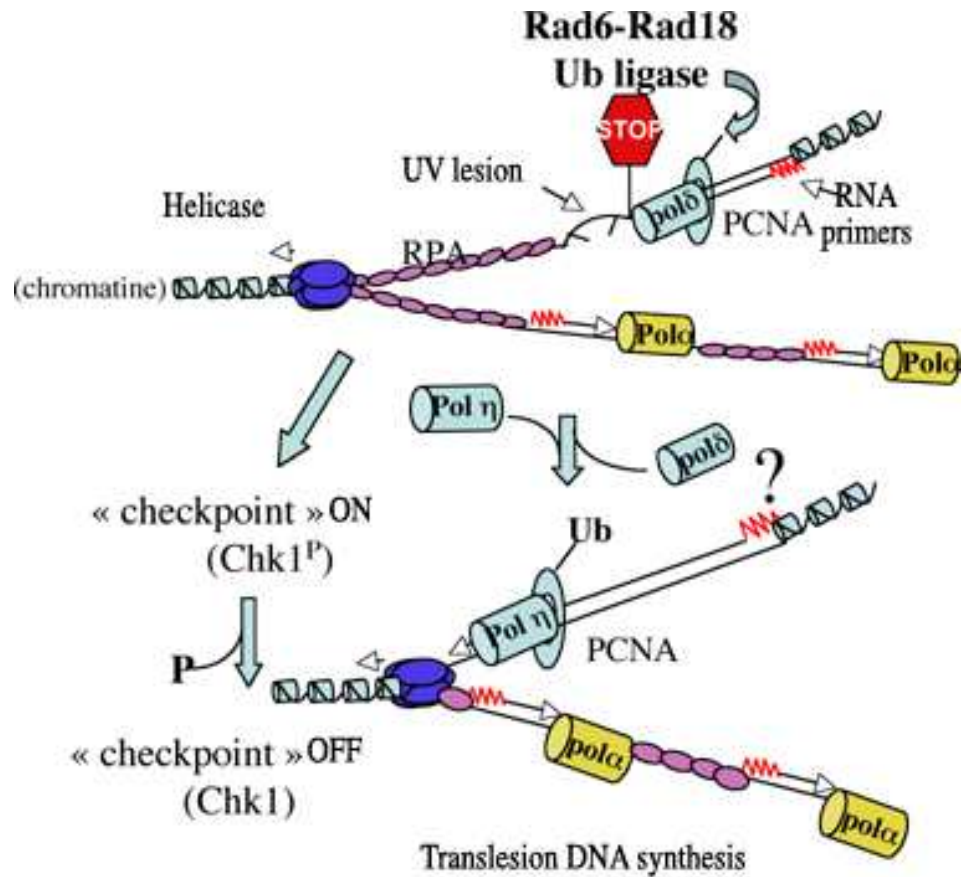


Maga et al, FASEB J, 2004

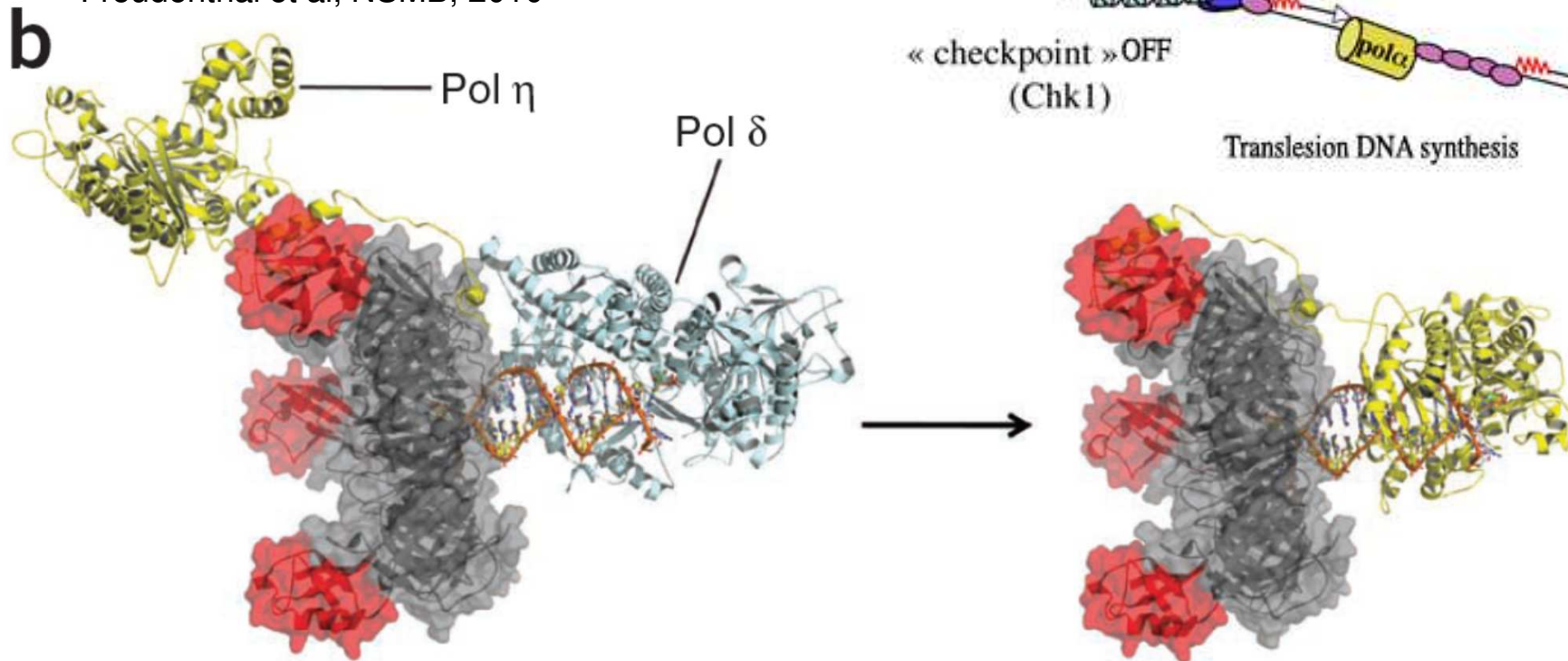
p21 blokuje přístup polymerás – zastaví se replikace a buněčný cyklus v S fázi

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

pokud je **DNA poškozená**, pol δ se zastaví a je třeba poškození nejdříve opravit nebo ji „zastoupit“ 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

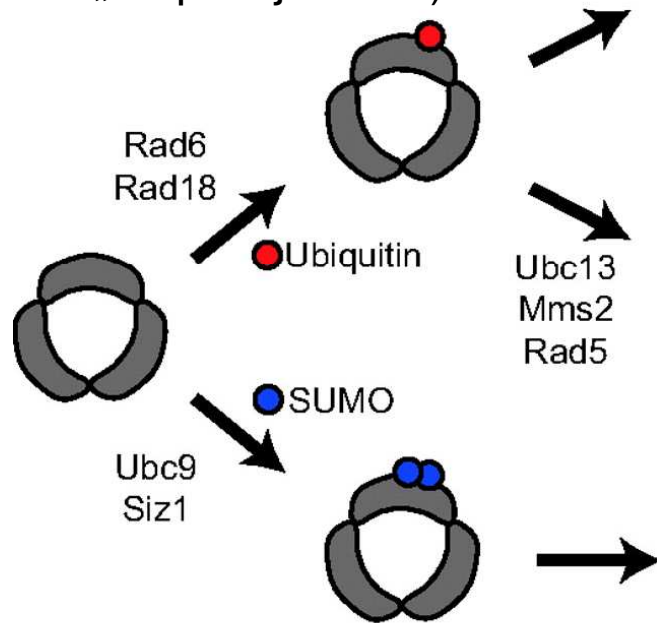


Freudenthal et al, NSMB, 2010



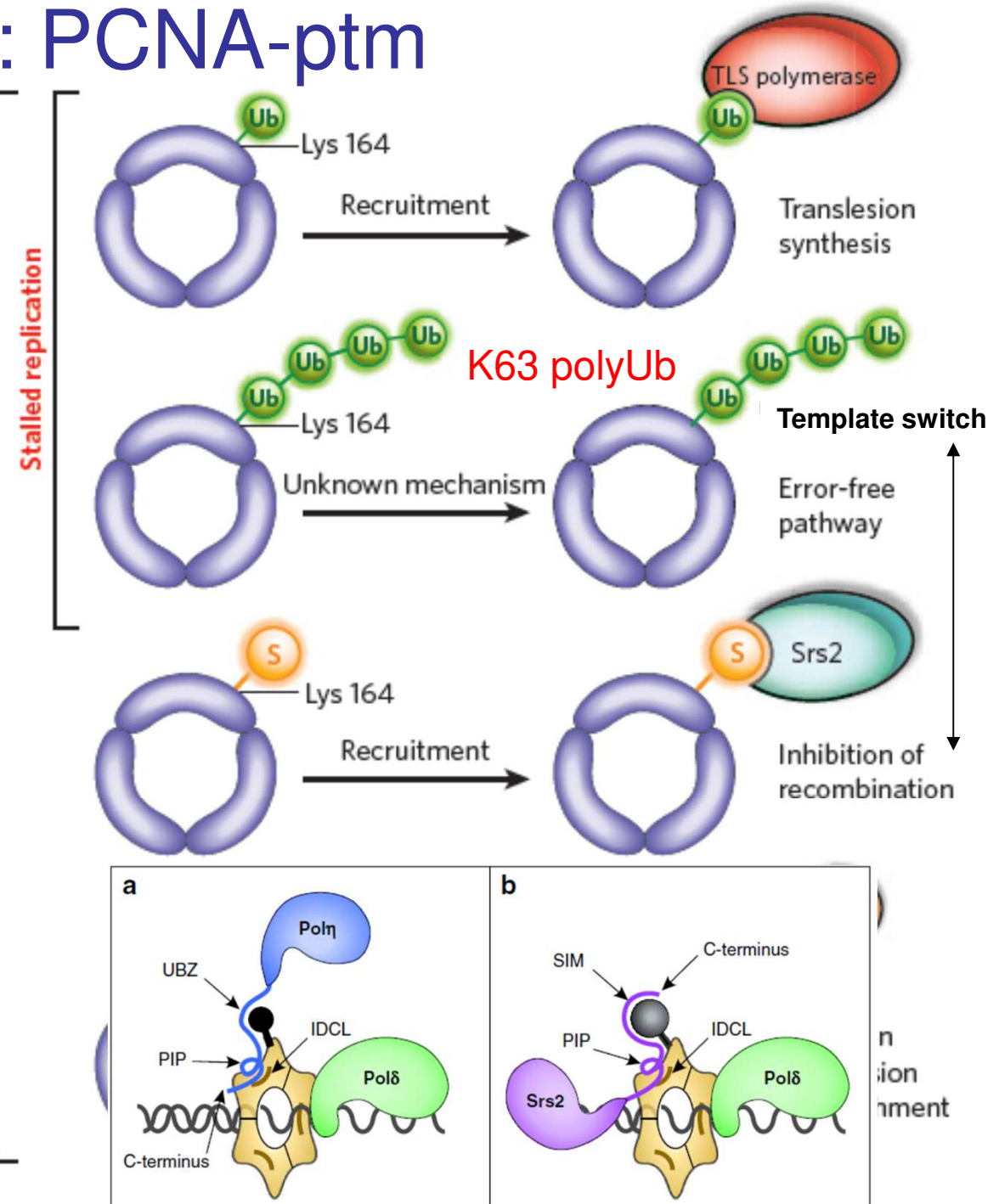
Oprava DNA: PCNA-ptm

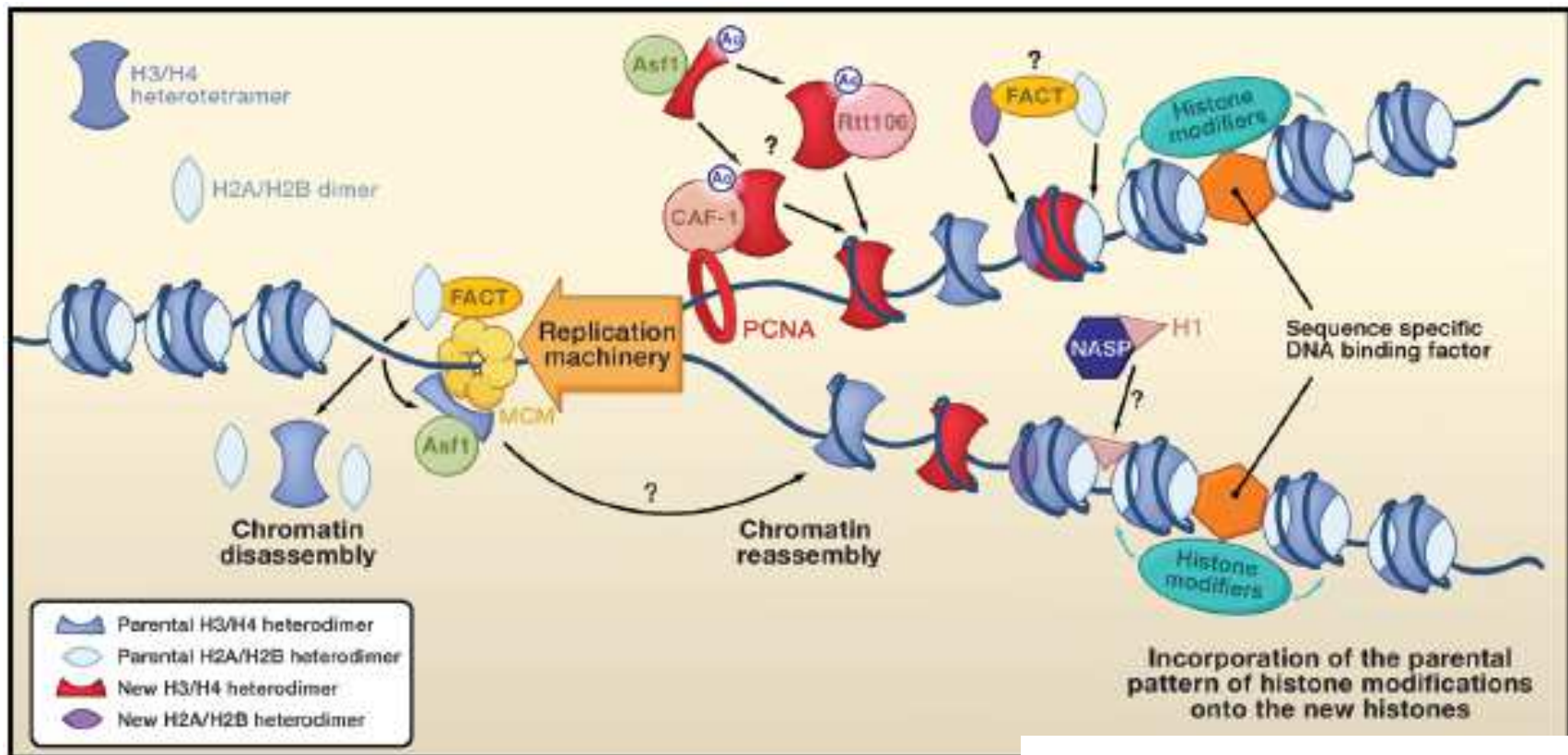
TLS polymerasy (η , ι , κ) obsahují UBM (tolerují poškozené báze a „zreplikují“ DNA)



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)



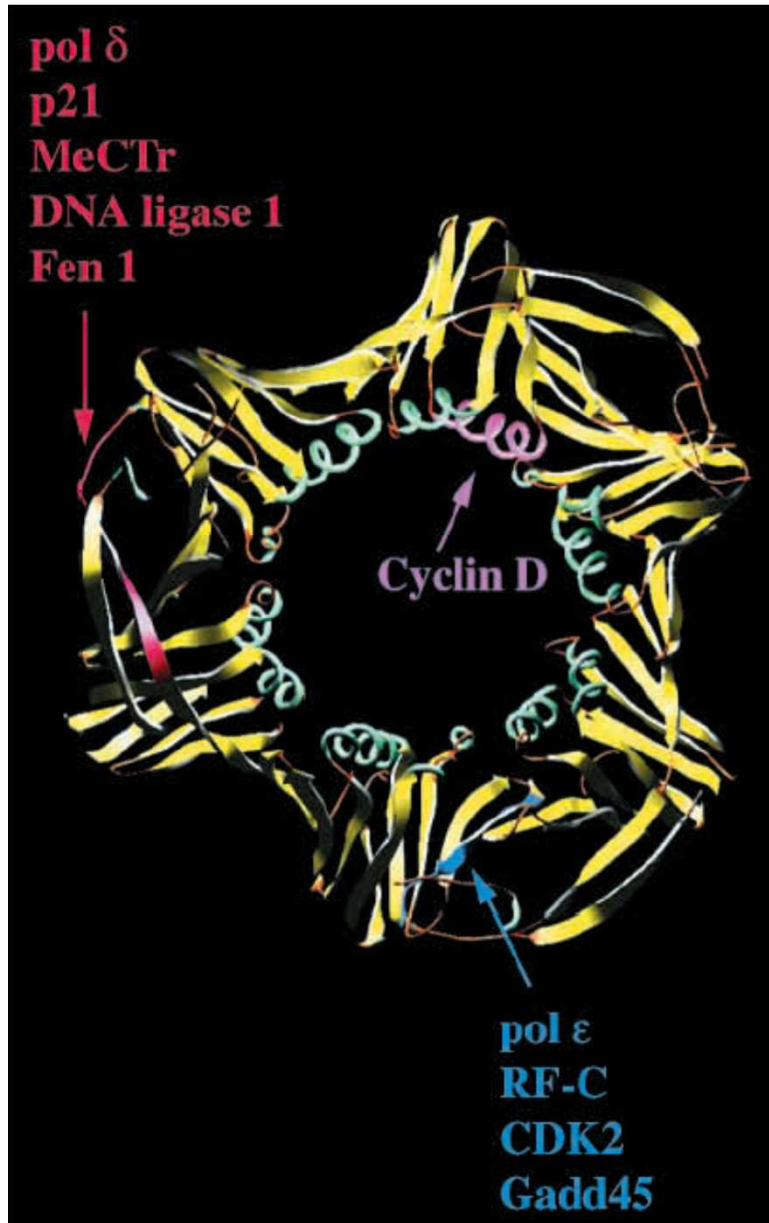
PCNA – moduly

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

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

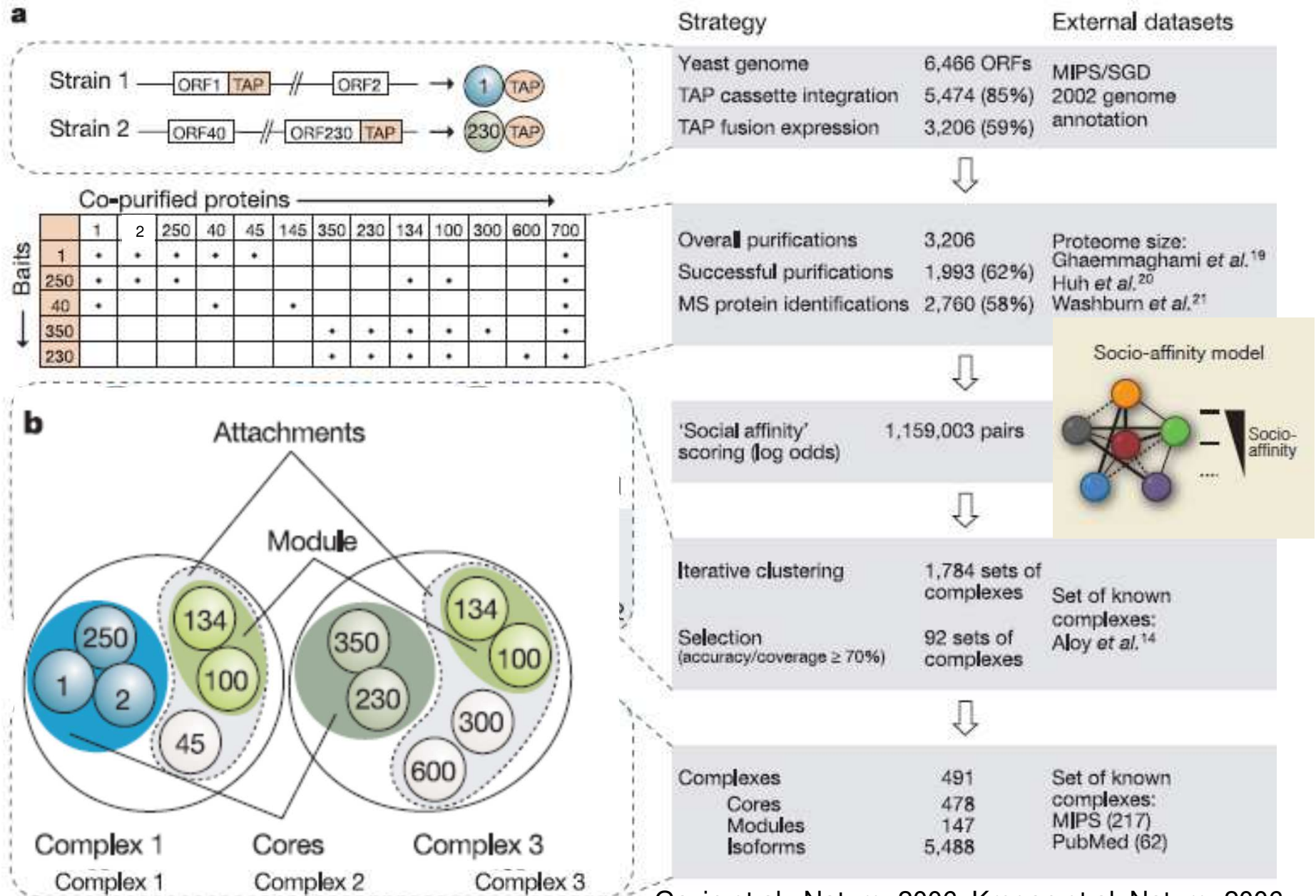


Moldovan et al., Cell, 2007



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

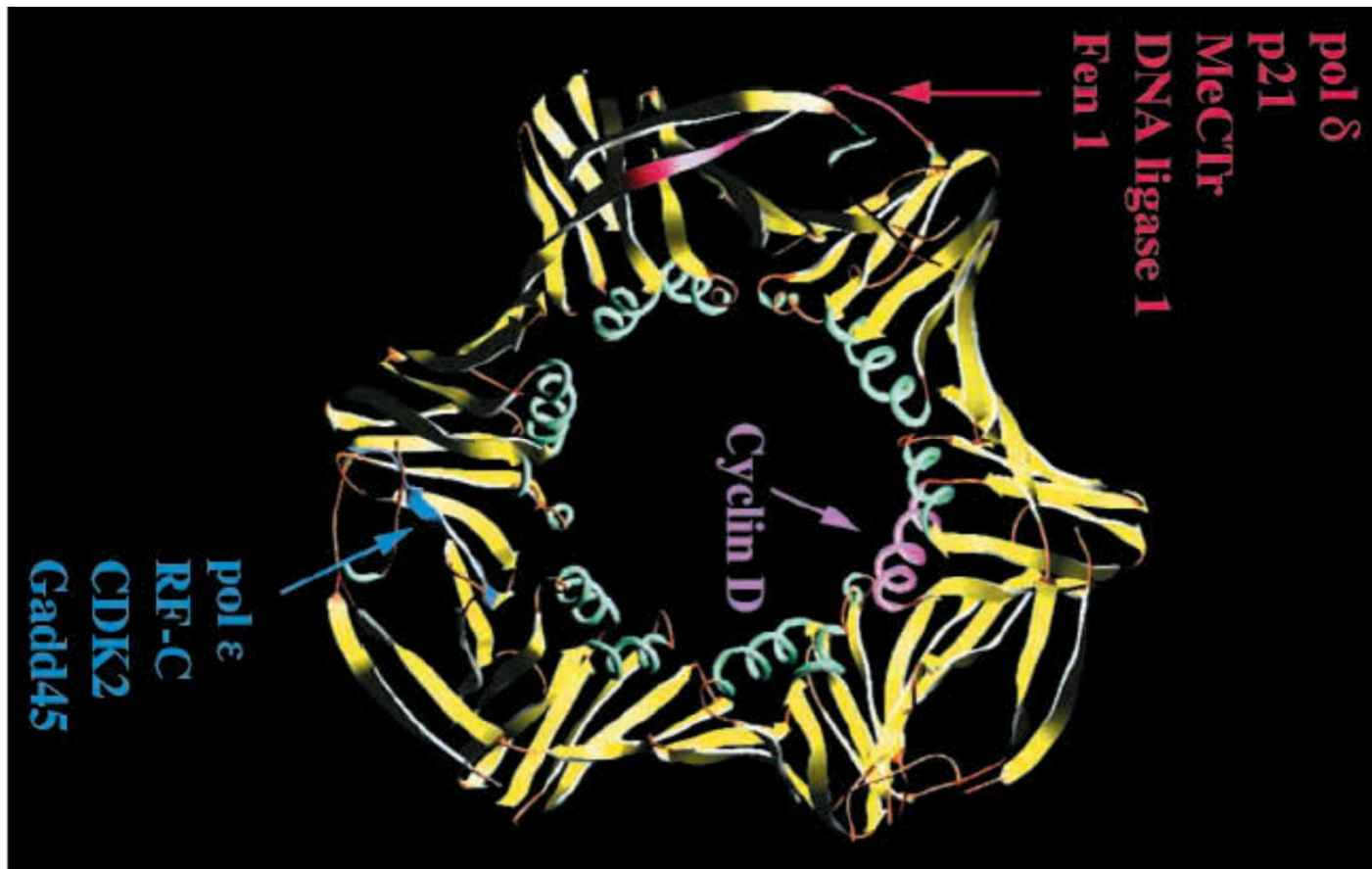
komplexom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



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

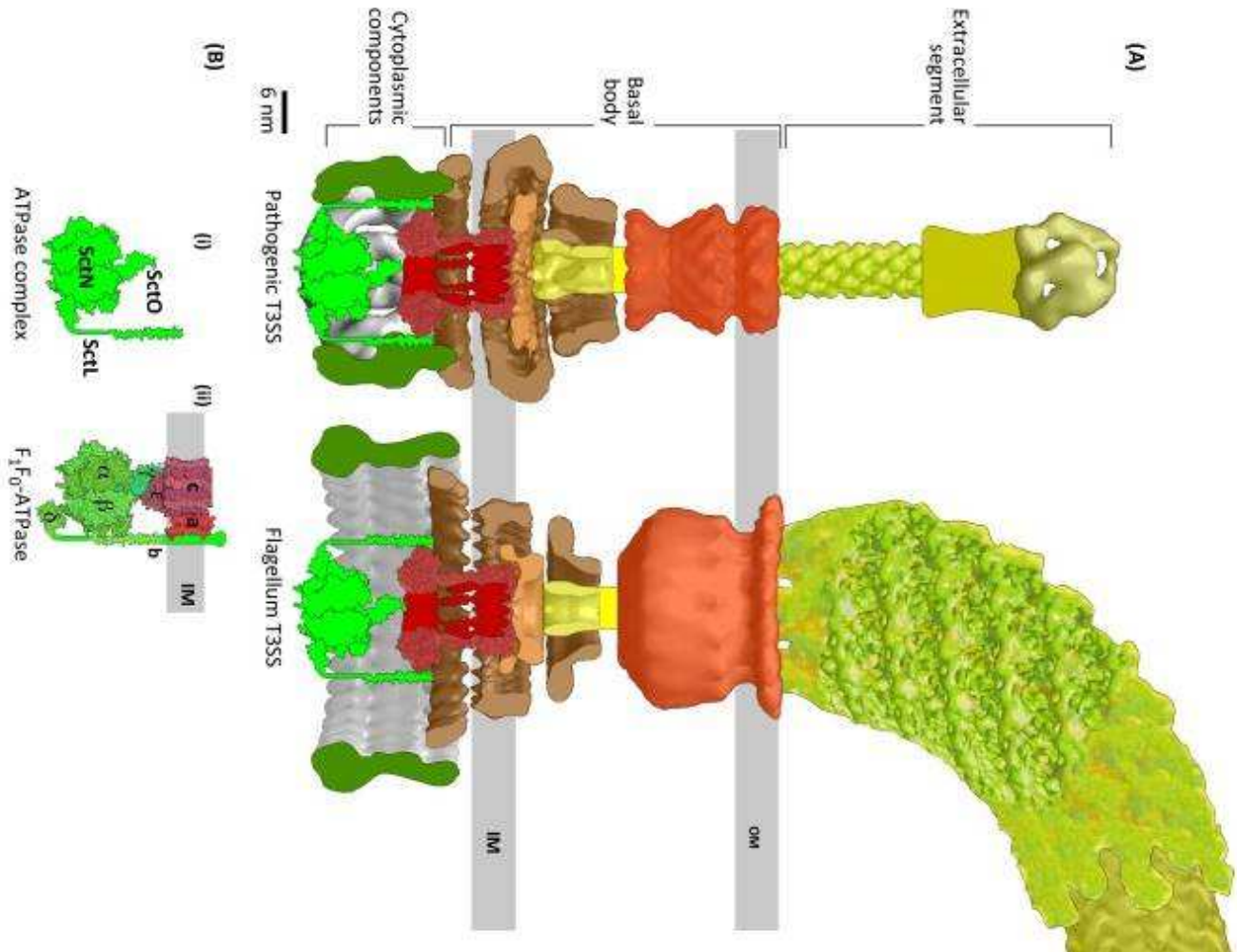
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...



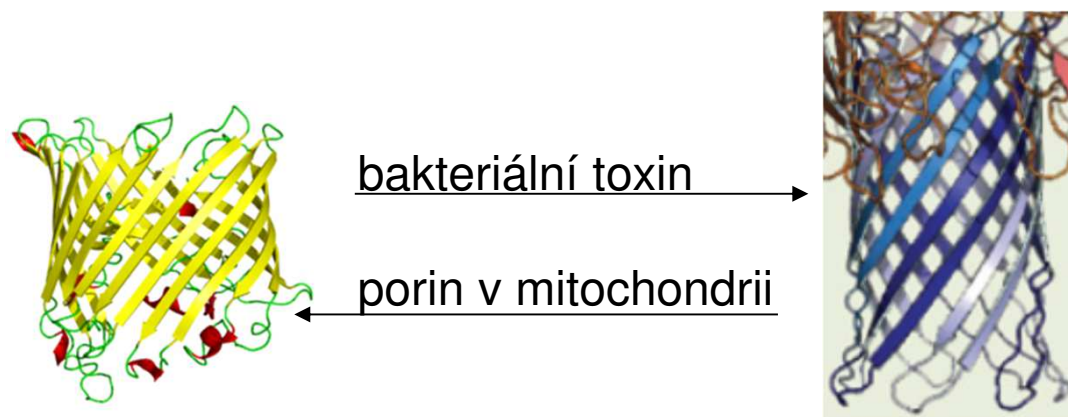
Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

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



Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

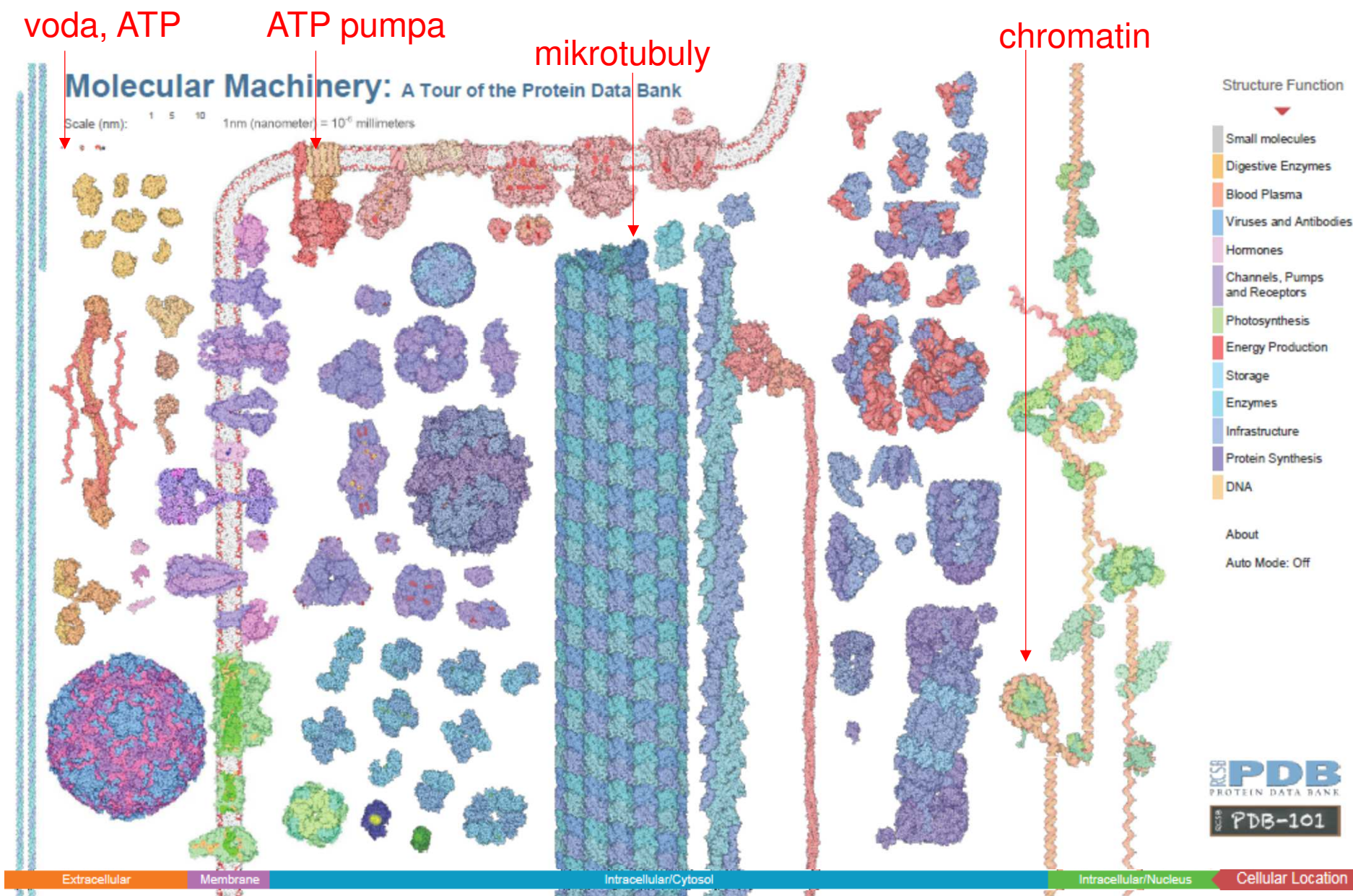
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...
- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká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

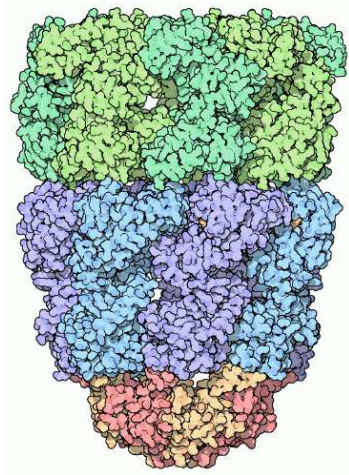
- komplexy mohou být dynamičtější - modulárnější ...
- evoluční výhoda podjednotek (nový komplex vzniká duplikací a novou kombinací podjednotek/modulů)
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká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

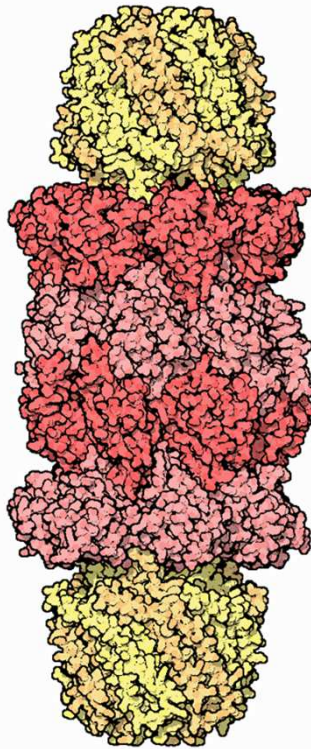


Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

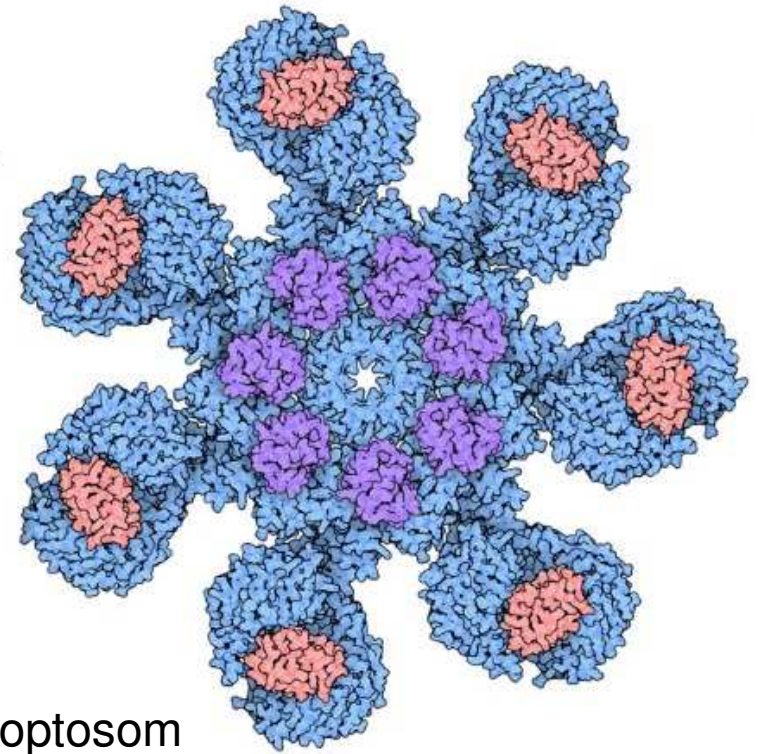
Příklady komplexů



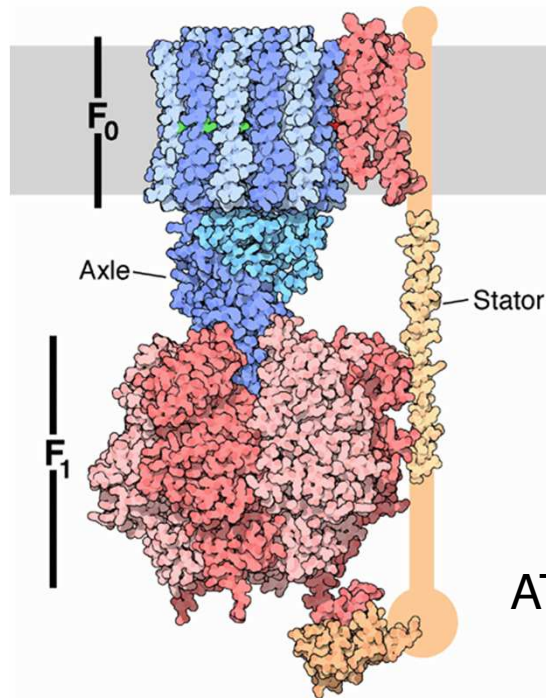
chaperon



proteasom

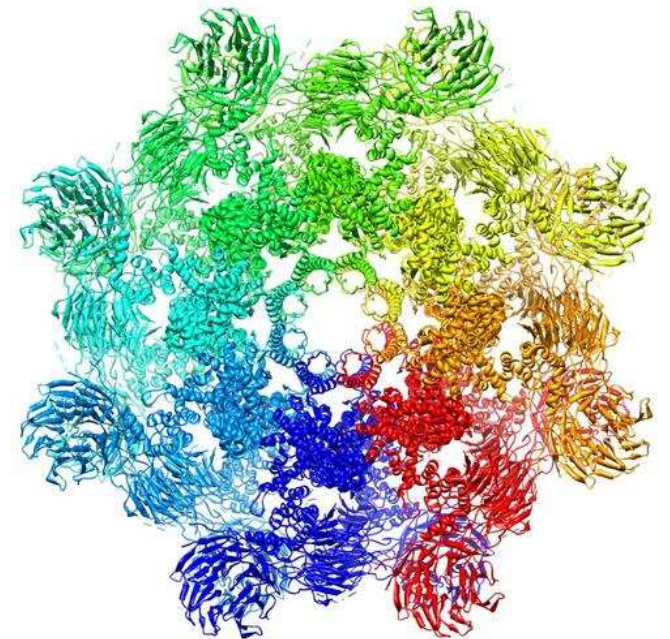


apoptosom



ATP pumpa

Více CG030

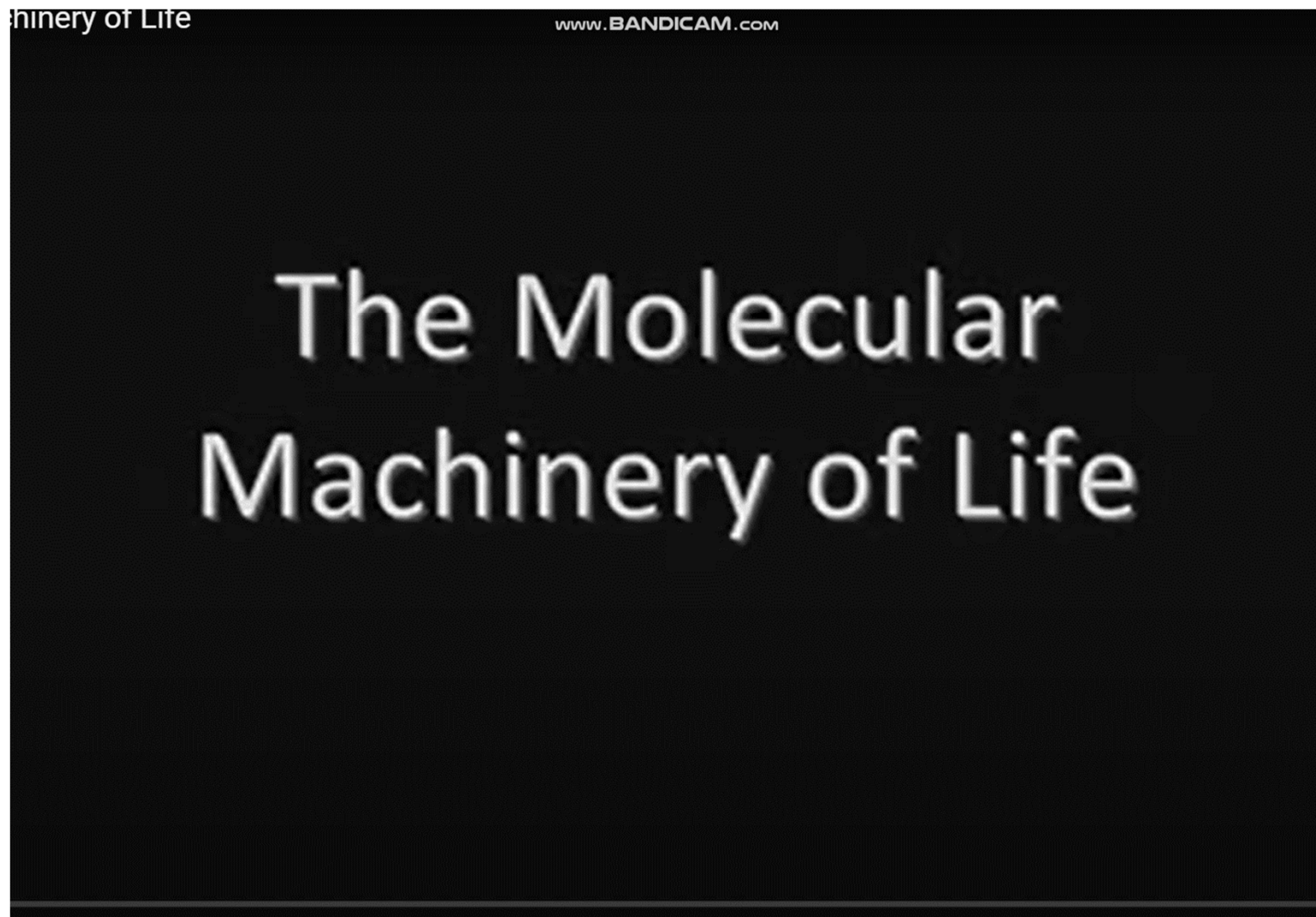


Shrnutí

- Proteiny spolu interagují a takto se mohou stát 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

Molecular machinery of life:

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



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