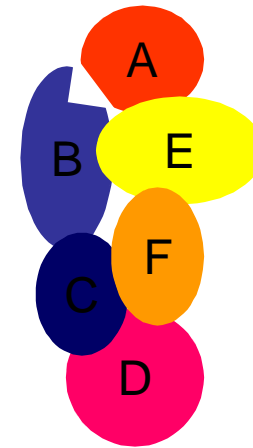


Osnova

- . charakteristika proteinových komplex
- . protein-proteinové interakce
- . vliv post-translačních modifikací na PPI
- . komplexy jako adaptéry a lezení
- . inhibice PPI

Stabilita komplexu je zpravidla v tzi ne0 pouhý sou et jednotlivých protein-proteinových interakcí mezi podjednotkami (v tzi povrch, efekt p iblí0ení a zorientování partnera ò)

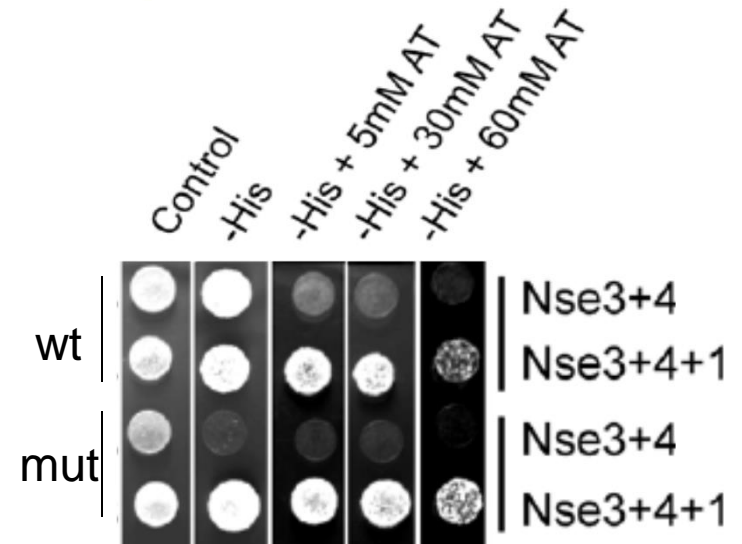


Proteinový komplex

kvasinkový 2 a 3-hybridní systém



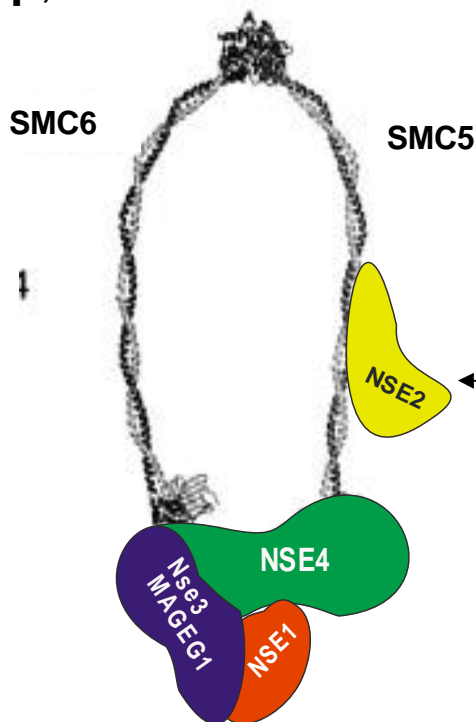
p eruzení protein-proteinové interakce je relativně snadné u slabých dimerů. v tzi komplexy jsou v tzinou stabilizovány více interakcemi a je tedy obtížnější je narazit



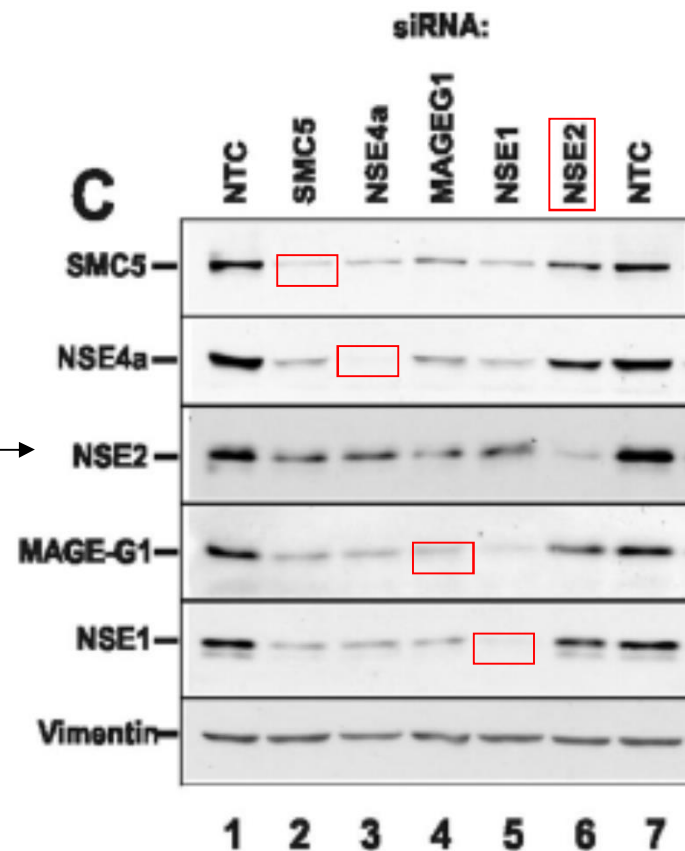
ale (záleží na typu komplexu . viz adaptory) pokud schází podjednotka, tak nefunguje celý komplex (nebo jeho specifická funkce) . komplex se nesestaví/rozpadá

Delece kterékoli podjednotky je pro kvasinkovou buňku letální - Mutace mají relativně podobný fenotyp, ale

Delece kterékoli podjednotky lidského komplexu má za následek pokles hladiny ostatních proteinů



Sergeant et al., MCB, 2005



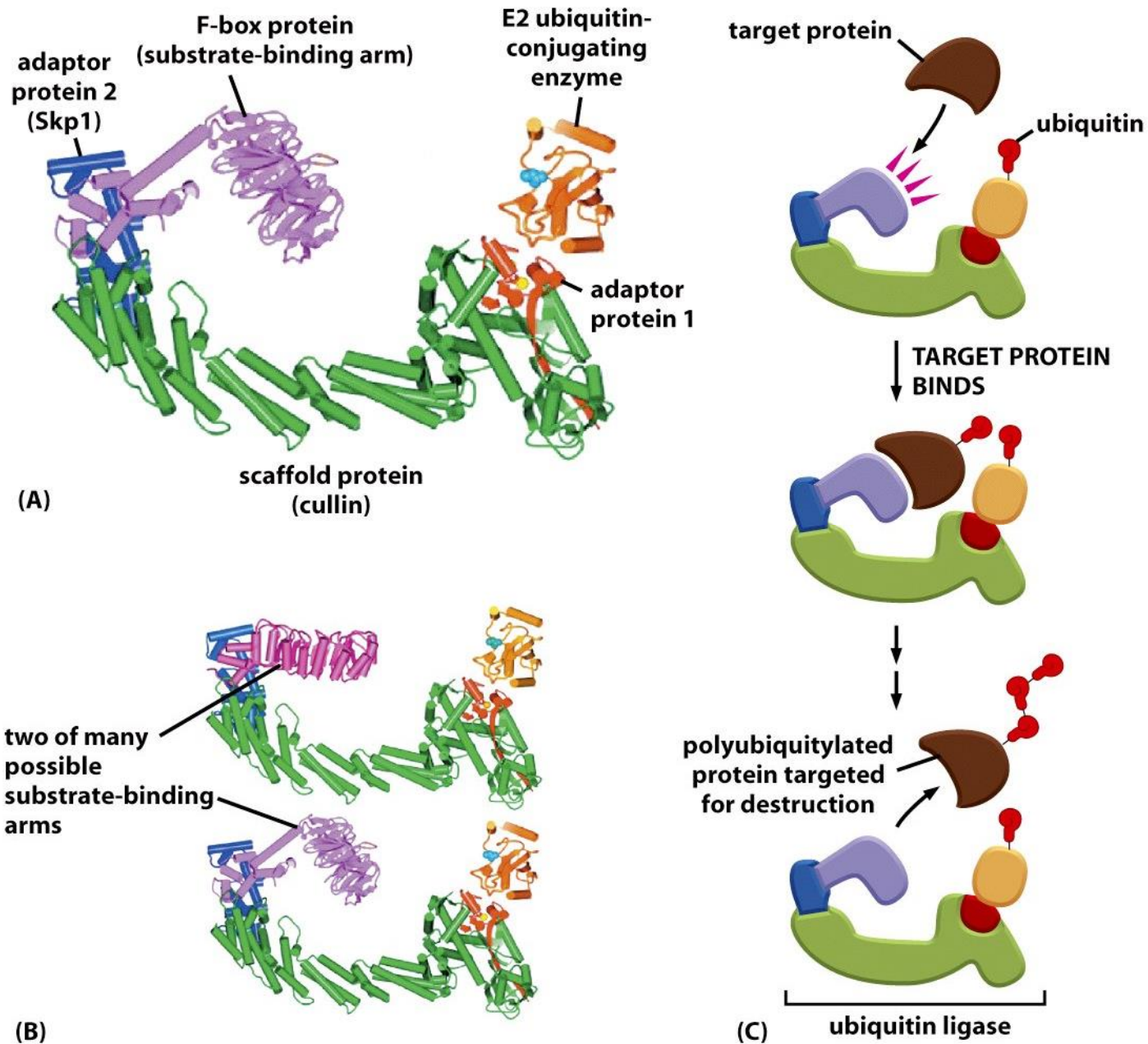


Figure 3-79 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

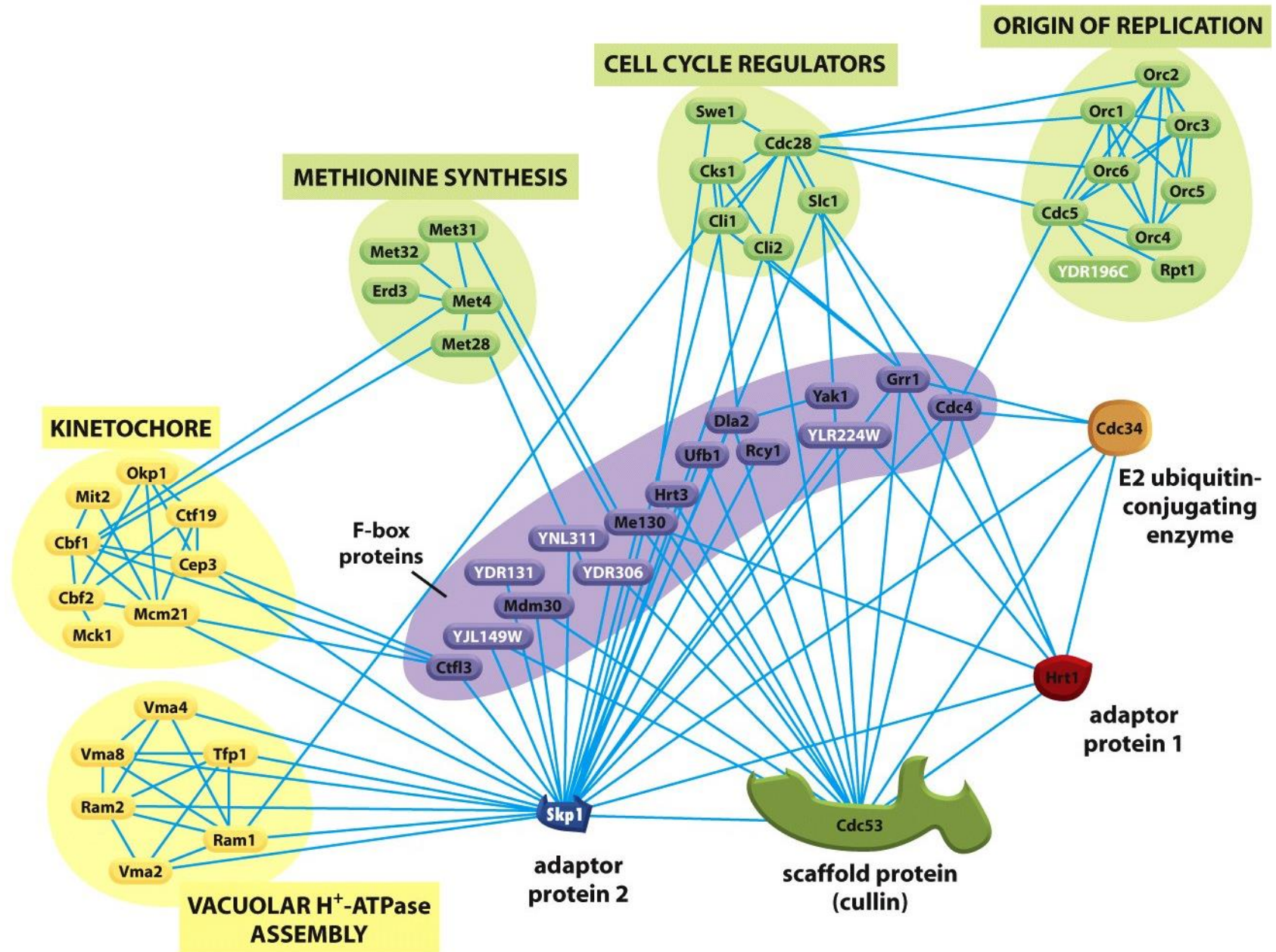
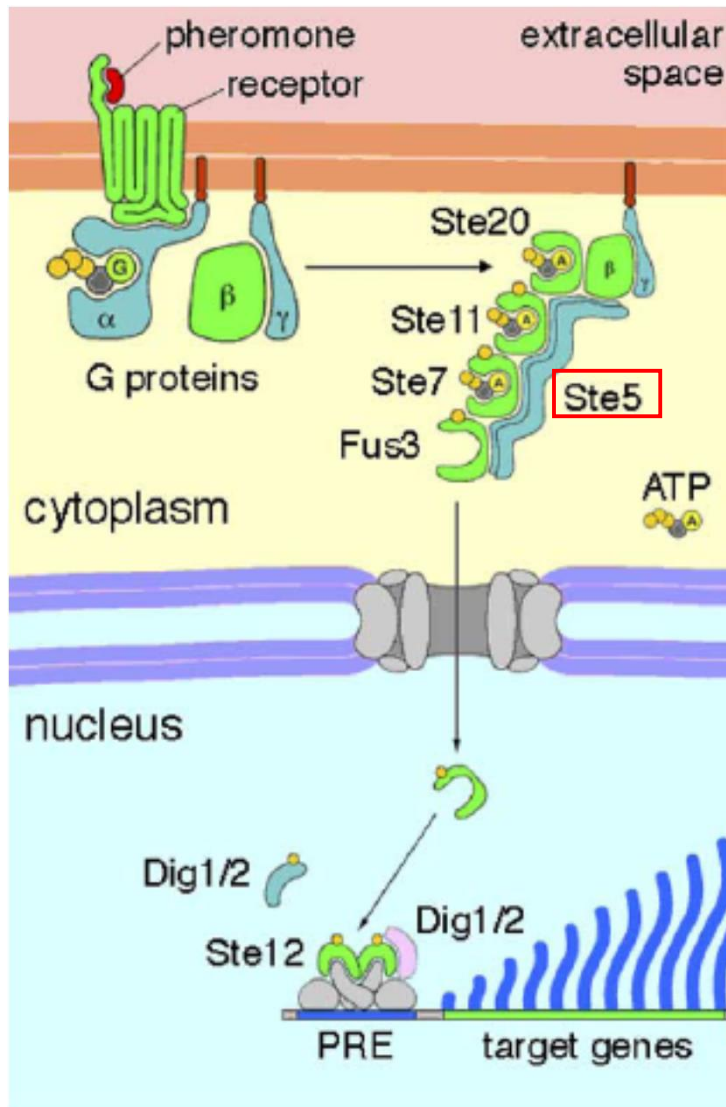


Figure 3-82 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

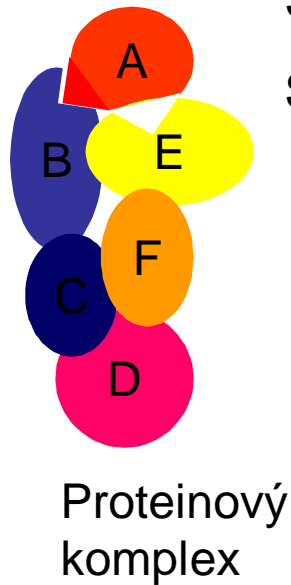


Protein-proteinové interakce modulují velmi často GDP-GTP konverze. konformací změn (doc. Marek). signál

Mnoho protein obsahuje pouze interakční domény a mají jediný úkol: nukleace multiproteinových komplexů. **scaffold** (lezení, STE5)

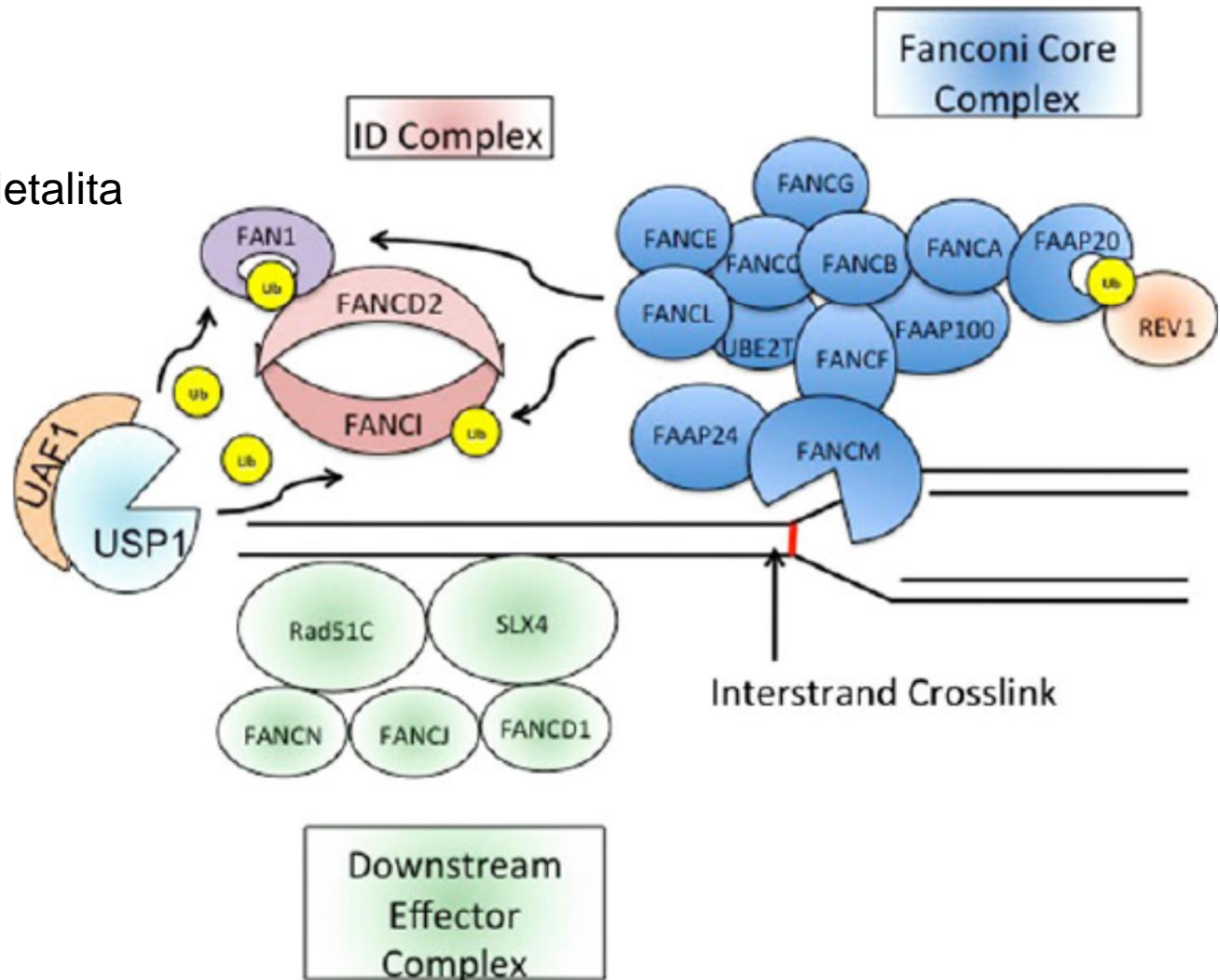
Fanconi anemia komplementa ní skupiny% geny/proteiny jejich0 mutace zp sobují FA syndrom . ukázalo se, 0e v tzina z nich tvo í jádro FANC komplexu

Co mohou zp sobit mutace: genetická analýza



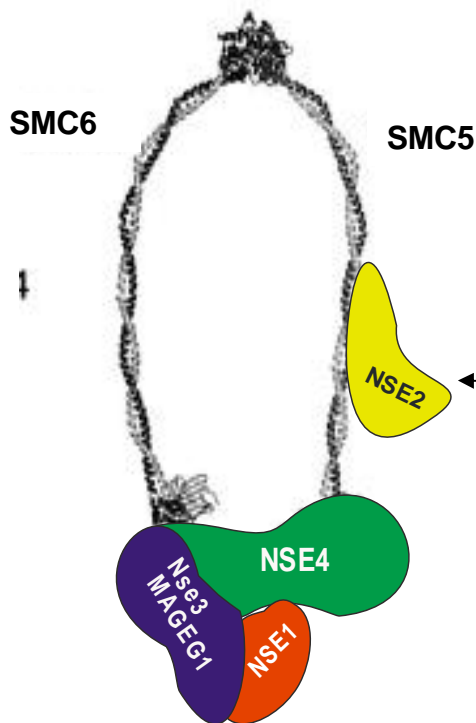
Syntetická letalita

Suprese

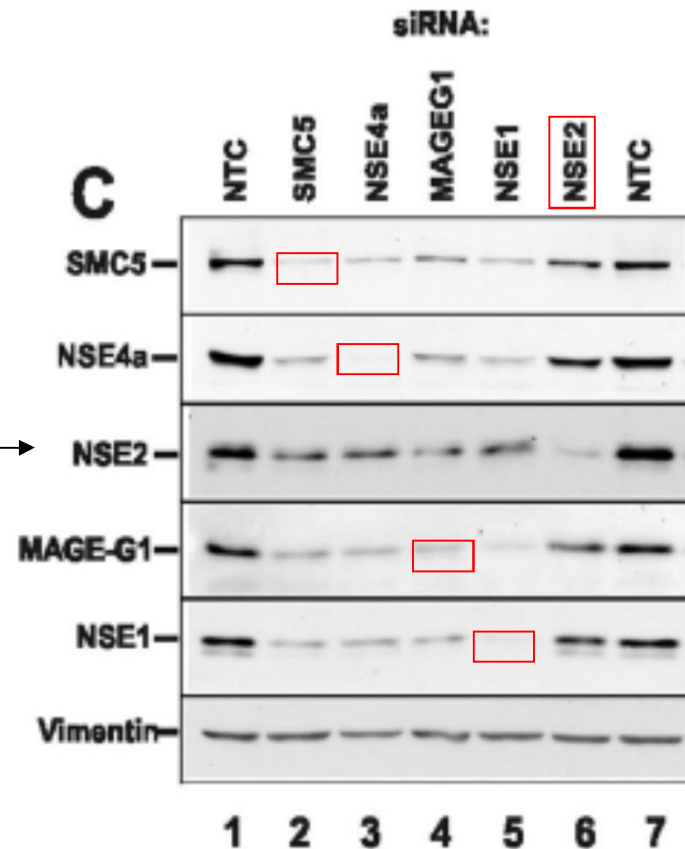


Stabilní proteinové komplexy jsou složené z jednotlivých protein /**podjednotek** které spolu interagují - pokud schází podjednotka, tak nefunguje celý komplex . komplex se nesestaví/rozpadá

Deplece kterékoli podjednotky lidského komplexu má za následek pokles **hladiny** ostatních protein



Sergeant et al., MCB, 2005



Taylor E.M. et al., MCB, 2008

Podjednotky komplex koexprimovány (ko-translace)

Table 1. Proteins analysed by Rlp-chip and mRNAs associated with them.

Bait	Bait function/protein complex	Enriched mRNAs	Function of proteins encoded by interacting mRNAs
Tea2p	Kinesin motor protein [32]	<i>tip1</i>	CLIP170 family, binds to Tea2p [9]
Cdc2p	cyclin-dependent protein kinase [33]	<i>rum1</i> <i>cdc18</i>	CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor [12] DNA replication factor [13]
Sty1p (Spc1p)	MAP kinase; stress-responses [14,34]	<i>pyp2</i> <i>cip2</i>	Tyrosine phosphatase, acts on Sty1p [14] RNA-binding protein [15]
Rpt2p (Mts2p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ubp6</i> <i>rhp23</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase * [35] Rad23 homolog * [35]
Rpn12p (Mts3p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ecm29</i> <i>rpn1301</i> <i>rpn1302</i>	Proteasome component * [35] 19S proteasome regulatory subunit * [35] 19S proteasome regulatory subunit * [35]
Atf1p	Transcription factor; stress response [36]	<i>pcr1</i>	Transcription factor, interacts with Atf1p [16]
Mnh1p	Mago nashi homolog; splicing * [35]	<i>mni1</i>	Protein with Mago nashi interacting domain * [35]
Arp6p	SWR1 complex; chromatin remodelling [18]	<i>alp5</i>	INO80 and SWR1 chromatin remodelling complexes [18]
Arp9p	SWI/SNF and RSC complex; chromatin remodelling [17]	<i>snf21</i> <i>snf22</i>	DNA helicase, RSC complex [17] DNA helicase, SWI/SNF complex [17]
Arp42p	SWI/SNF and RSC complex; chromatin remodelling [17]	<i>snf21</i> <i>snf22</i>	DNA helicase, RSC complex [17] DNA helicase, SWI/SNF complex [17]
Arp8p	Ino80 complex; chromatin remodelling [18]	<i>ino80</i>	INO80 chromatin remodelling complex [18]
Arp2p	Arp2/3 complex; actin polymerization [37]	<i>arp8</i> <i>arp9</i>	INO80 chromatin remodelling complex [18] SWI/SNF and RSC complexes [18]

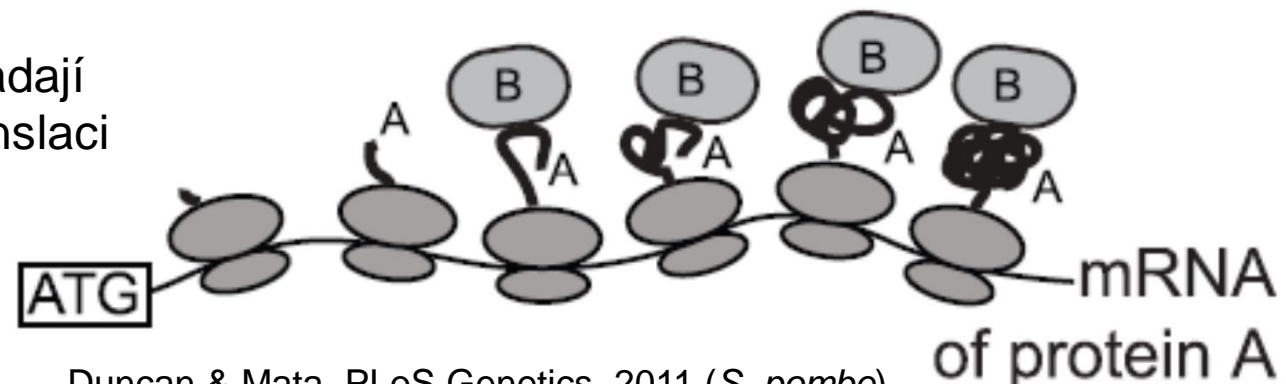
Only proteins that copurified with mRNAs other than their own are shown. Proteins that have not been characterised in *S. pombe*, and for which the information is a prediction based on the behaviour of orthologous proteins are marked with a star.

Proteiny s nimi0 ko-purifikovala jiná ne0 jenom vlastní mRNA

Proteiny se skládají hned po translaci, nebo za pomoci chaperon , nebo a0 v ur ítém míst (nap . v mitochondrii po odz t pení signální sekvence ò) - asto jsou podjednotky komplex **koexprimovány** (podobná regulace transkripce + ko-translace)

3. Cotranslational Assembly

nebo se proteiny skládají a interagují již p i translaci

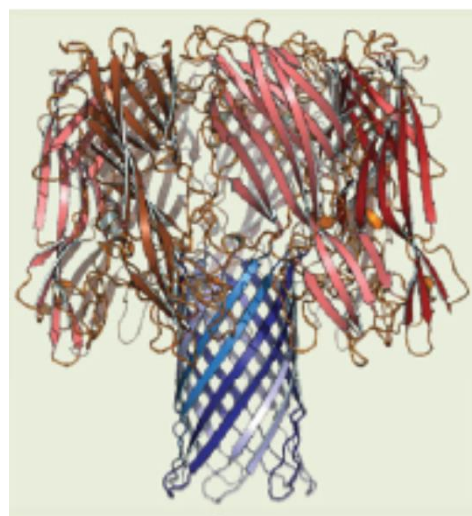


Duncan & Mata, PLoS Genetics, 2011 (*S. pombe*)

samostatn by se neposkládaly, byly by nestabilní, toxické nebo by agregovaly (filamenta; protein-proteinové interakce asto p es hydrofobní povrchy a je t eba je vytvo it co nejd ív)
- **koexprese a kopurifikace protein** (*kdo purifikuje proteiny?*)

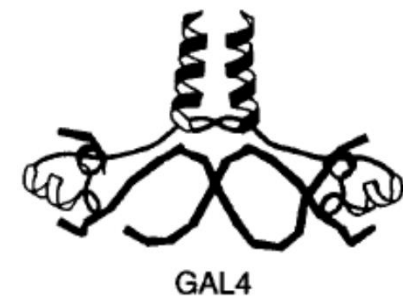
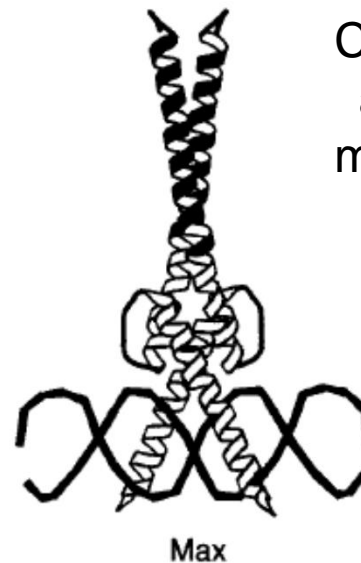
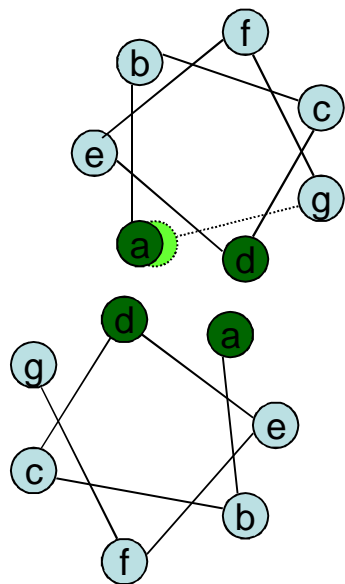
Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím protein-proteinových interakcí

- “ Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> quaternární tj. komplexy (stejně typy **nekovalentních** vazeb, kritérium minimální energie) (zroubovice a listy se k sobě skládají podobným způsobem)
- “ iontové, vodíkové, hydrofobní síly (kovalentní vazby - disulfidické můstky především u extracelulárních proteinů)
- “ **vodíkové můstky** především u β -listů

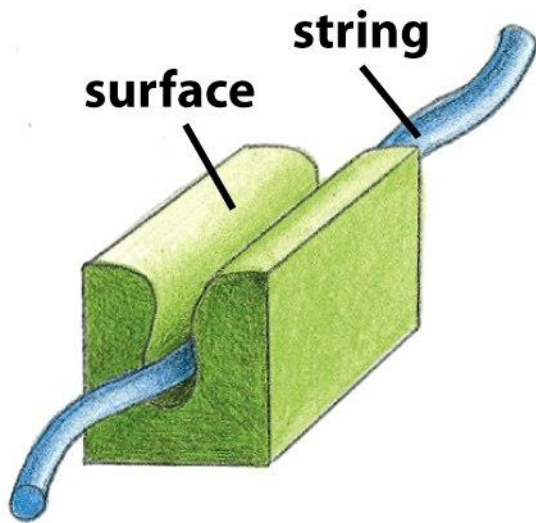


Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím hydrofobních protein-proteinových interakcí

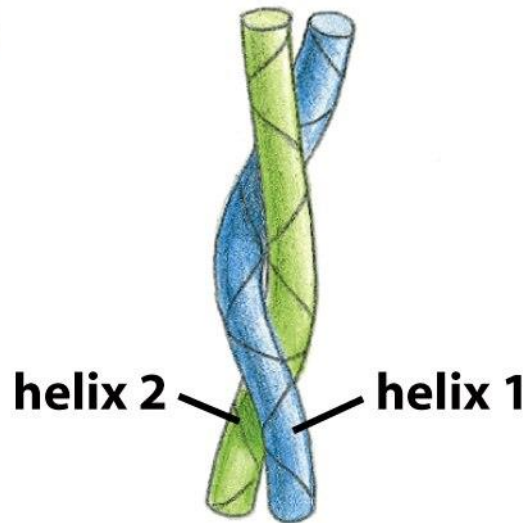
- **hydrofobní zbytky** jsou tlačeny dovnitř proteinu (nikoli do solventu) nebo do interakce (nejčastěji způsob vazby)
 - součet hydrofobních sil je značný (převládá u většiny interakcí)
 - hydrofobní povrchy se podílí na vytváření coiled-coil vláken



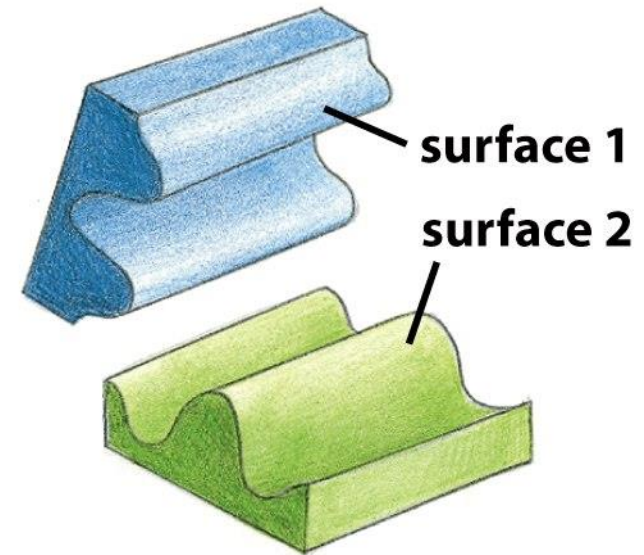
Coiled-coil doména je
častým **dimerizačním**
modulem protein



(A) SURFACE-STRING



(B) HELIX-HELIX



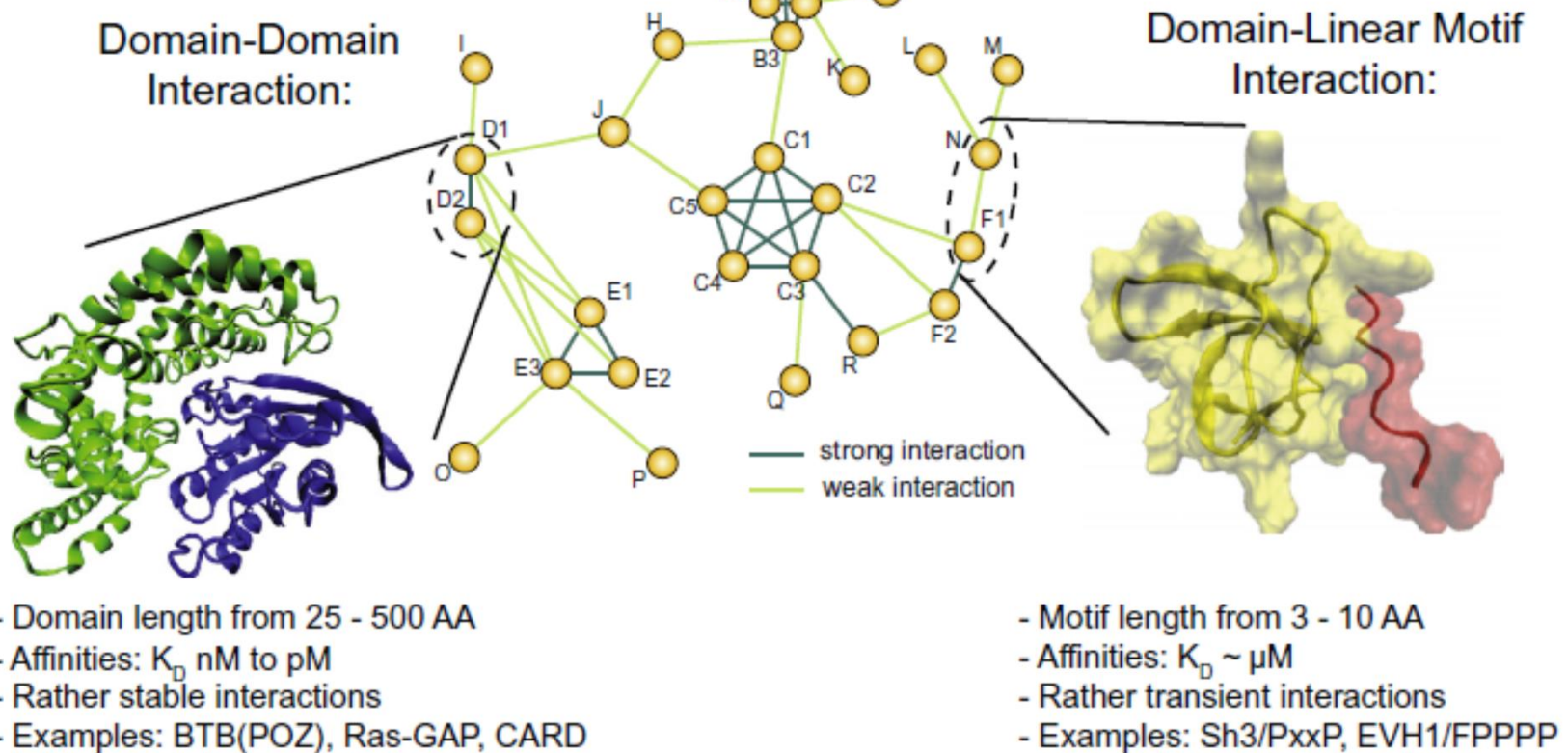
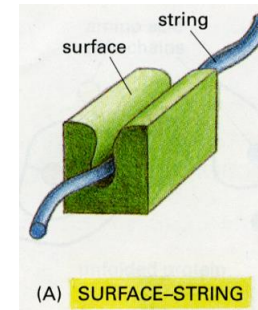
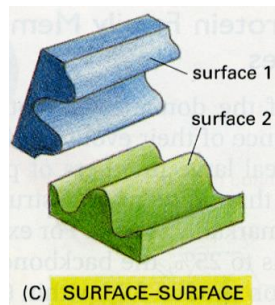
(C) SURFACE-SURFACE

- Ostatní domény/moduly lze definovat pouze obecně :
 proteiny musí mít **komplementární tvar i charakter**

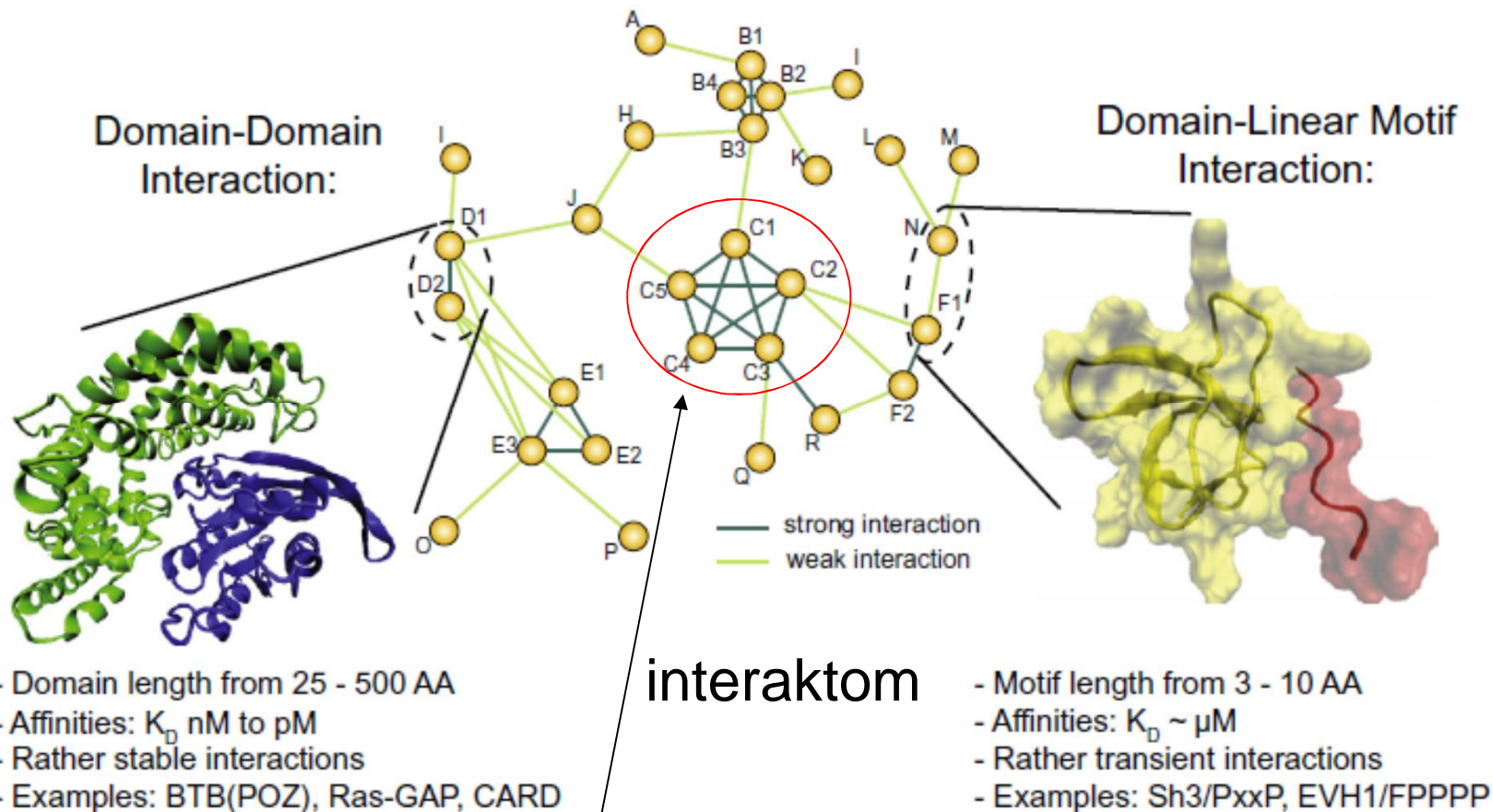
- Variabilita je velká . nelze je jednoduše definovat -
 obtížná **predikce** (záložená na struktuře s vyřazených%
 komplex , v roce 2010 pouze 300 struktur s partnery z
 celkem desítek tisíc PDB dat)

3D tisk

Dva p íklady svy ezených%komplex



- Interak ní plocha/oblast $1150-10000\text{\AA}^2$ (vs pro ligandy $100-600\text{\AA}^2$)



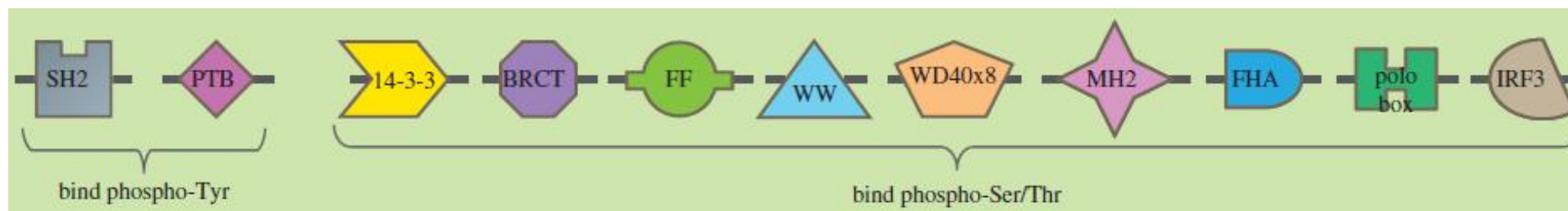
Bader et al, FEBS Lett, 2008

- z analýzy protein-proteinových interakcí lze usuzovat na potenciální **stabilní komplexy** vs **p echodné interakce**
- variabilita interakčních povrchů je velká => variabilita PPI (nelze je jednoduše definovat)

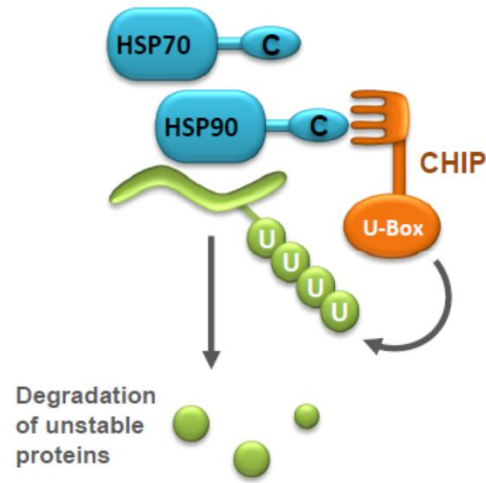
*S jakými partnery a jak silně interagují vazby proteiny?
Jaké domény obsahují?*

Post-translační modifikace značí změny povrch (tvar, náboj) .
 vytváří specifický nový povrch . mohou interagovat specifické
 vazebné domény - nap . SH2 domény váží fosfopeptidy . dvě vazebná místa
 (fosfoTyr a peptid . peptid určuje vazebnou specificitu)

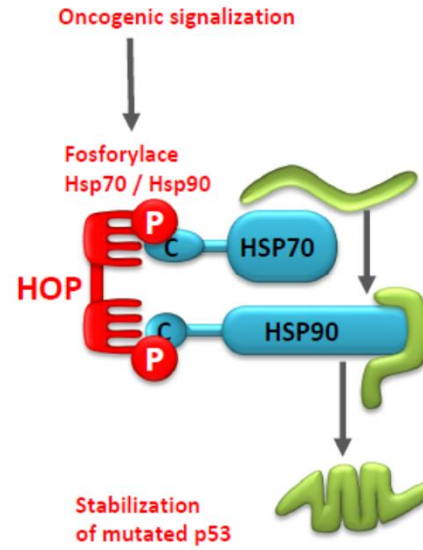
Modifikace	AMK zbytek	interakční doména
Fosforylace	tyrosin	SH2, PTB
	serin/threonin	14-3-3, WD40, WW, BRCT
acetylace	lysin	bromodoména
metylace	lysin	chromodoména
hydroxylace	prolin	VHL β
ubiquitinace	lysin	UIM, UBA, CUE
SUMOylace	lysin	SIM



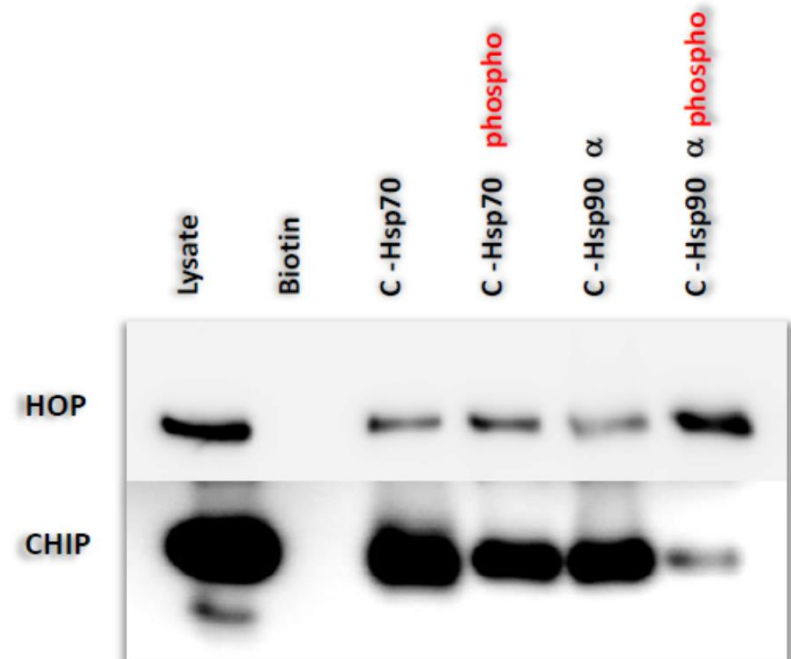
Normal differentiated cell



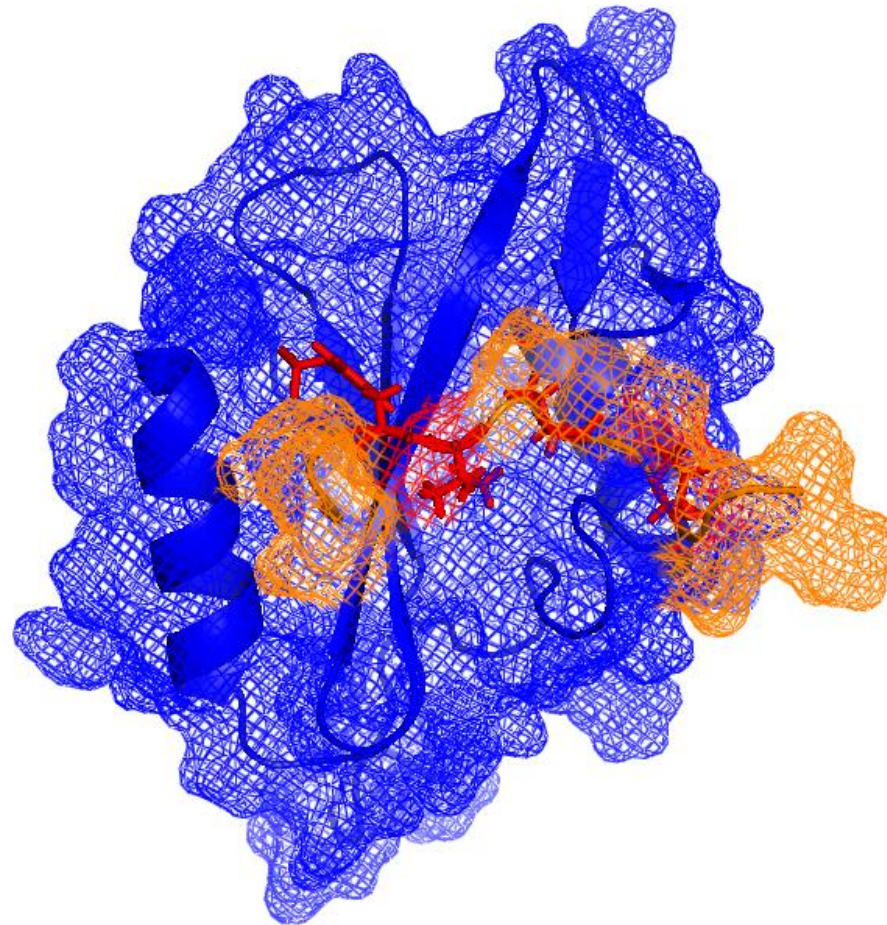
Cancer cell



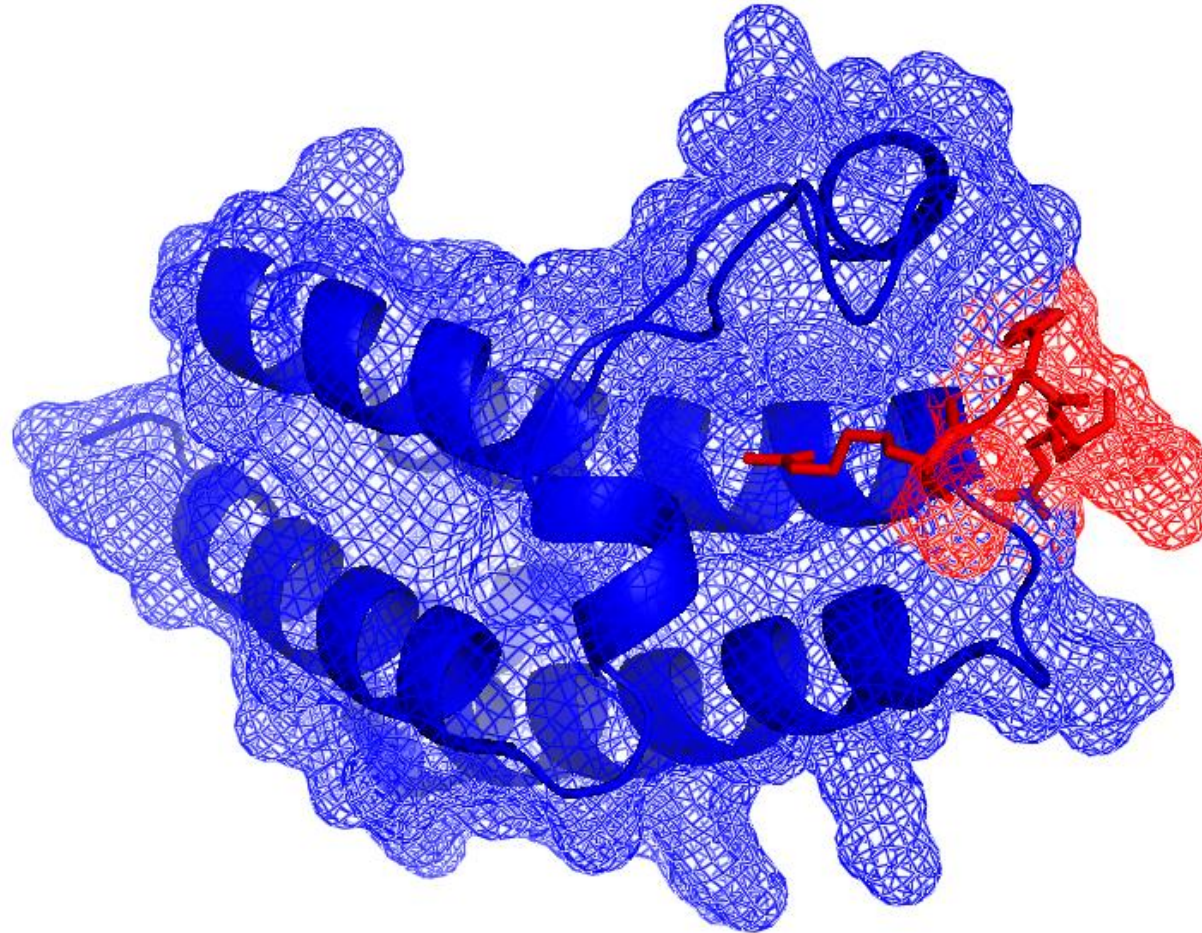
Normal differentiated cell	Cancer cell
C-terminus Hsp70/90 non phosphorylated	Phosphorylated Hsp90 Hsp70
Hsp bind preferentially CHIP	Hsps bind preferentially HOP
Designed to degrade unfolded protein	High folding capacity of Hsp90
Higher expression of CHIP	Increased level of HOP
Lower sensitivity to Hsp90 inhibitors	High sensitivity to Hsp90 inhibitors



Dr. P. Muller



Nap . SH2 domény vá0í fosfopeptidy . dv vazebná místa (fosfoTyr a peptid . peptid ur uje vazebnou specificitu) . PDB: 2PLD



Modifikace histon ovlivují složení a p ístupnost chromatinu . bromodoména
GCN5 (HAT) navázaná na acetylovaný H4 lysin . PDB: 1E6I
Bottomley, EMBO Rep., 2004

SH2 (a jiné) domény jsou často jako moduly součástí proteinů rozmanitých funkcí. Provazují proteiny mezi sebou (přechodně, kondicionálně, regulace buněčných procesů)

Small GTPase Signaling

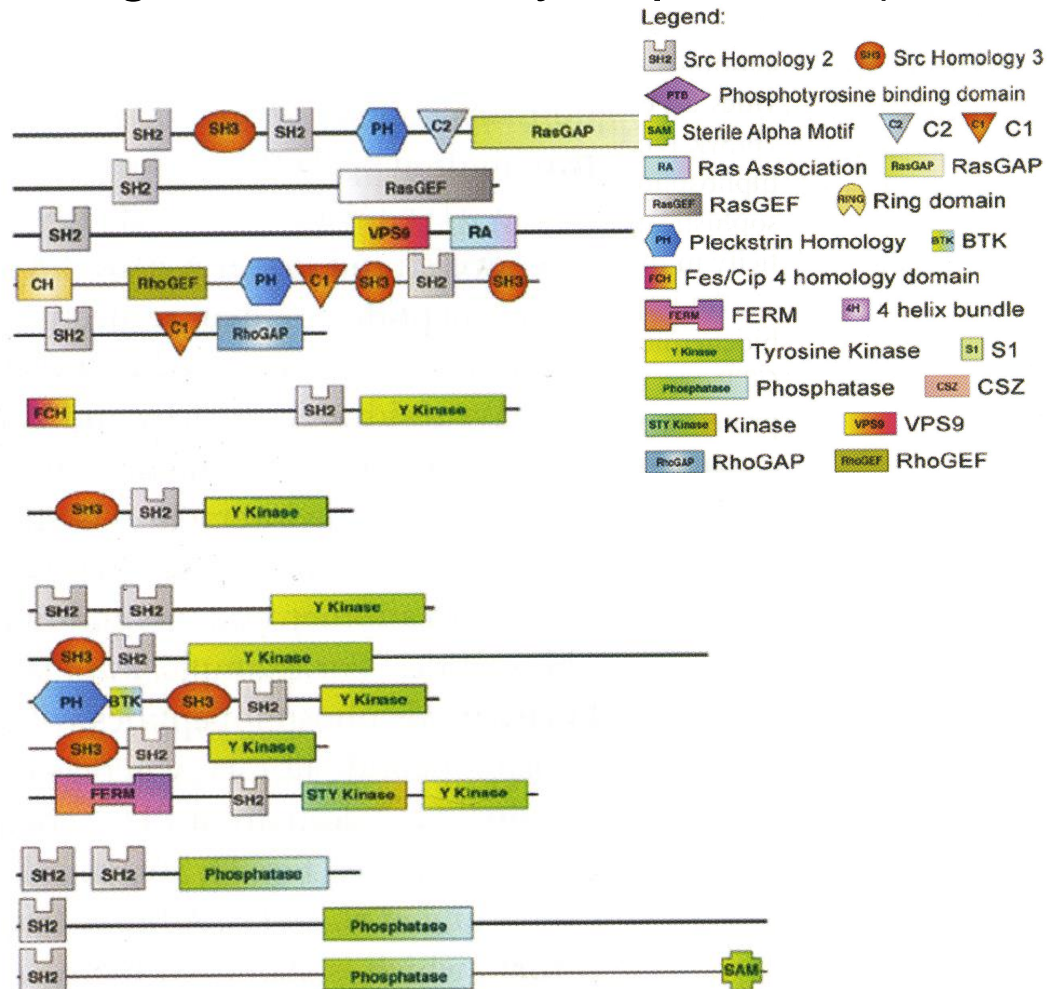
- Ras-GAP
- Nsp1,2,3
- Rin1
- Vav1,2,3
- Chimerin

Kinases

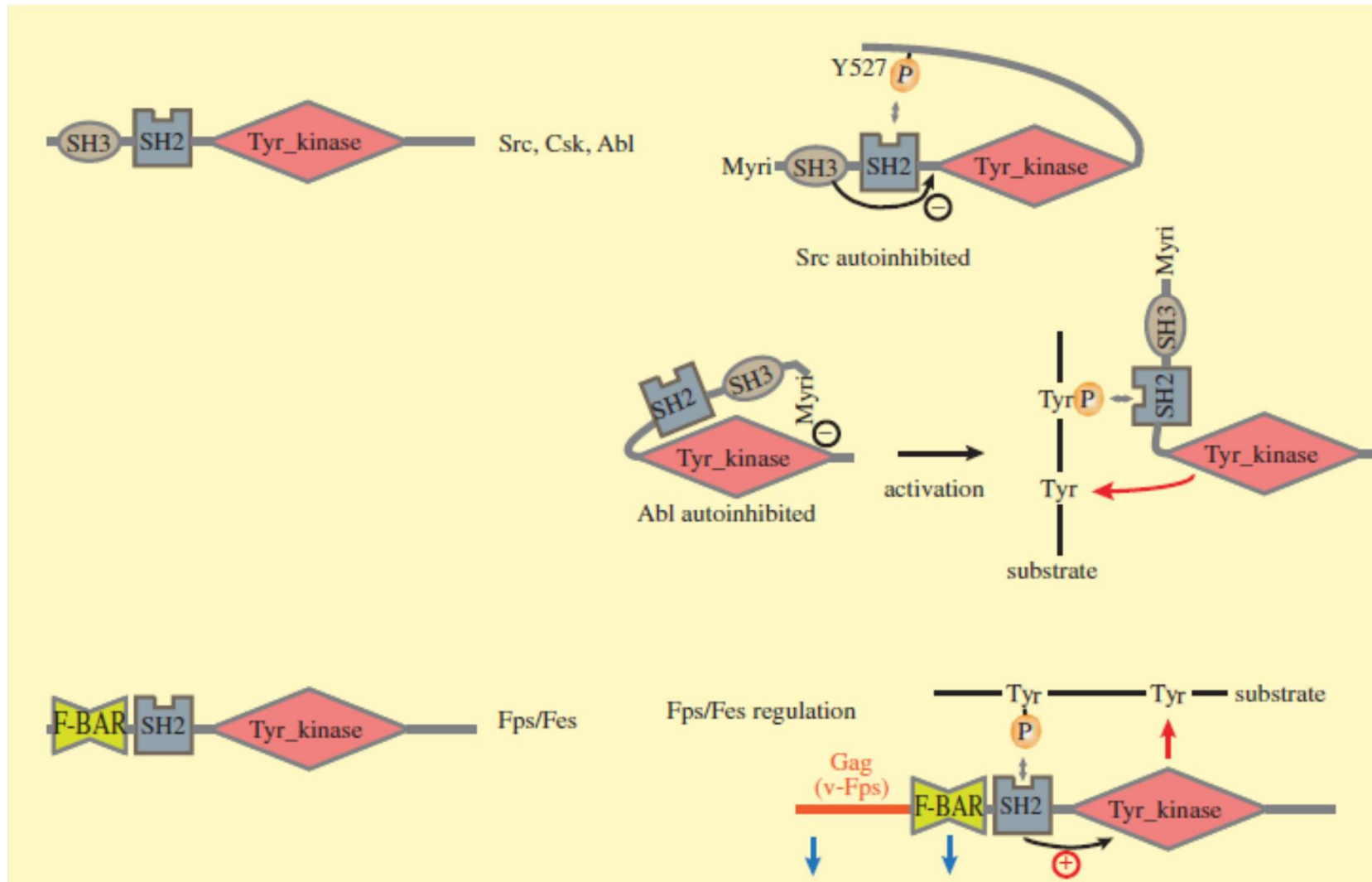
- Fps, Fer
- Src, Csk, Ctk/Hyl, Fgr, Fyn, Yes, Hck, Lck, Lyn, Blk, Frk, Brk, DJ697K14.1
- Zap70, Syk
- c-Abl, Arg/Abl2
- Btk, Tec, Itk, Bmx
- Txk
- Jak1,2,3, Tyk2

Phosphatases

- Shp1, Shp2
- Ship
- Ship2



SH2 (a jiné) domény jsou často jako moduly součástí proteinů různých funkcí. Provazují inter- a intramolekulárně



Jin a Pawson, PTRS, 2012

- kináza se váže na fosforylovaný substrát a dále ho fosforyluje (MAPKKK signální dráhy)

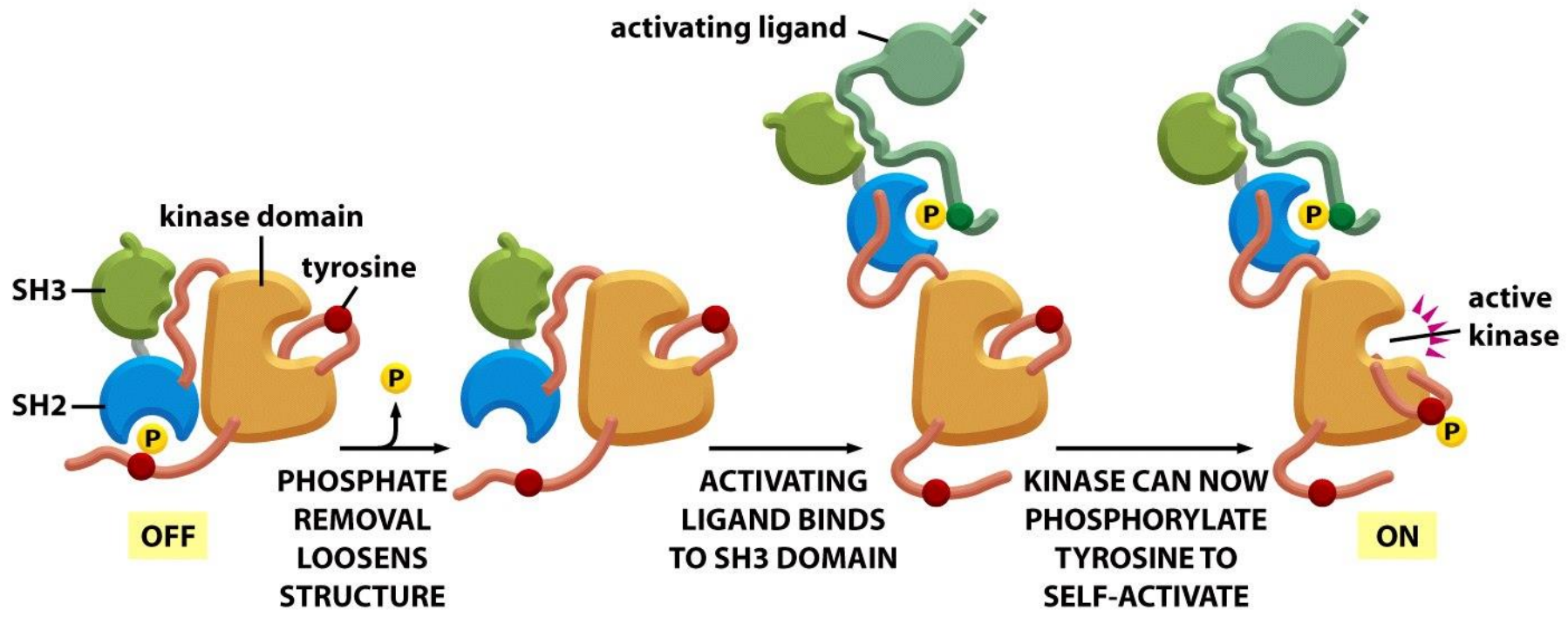
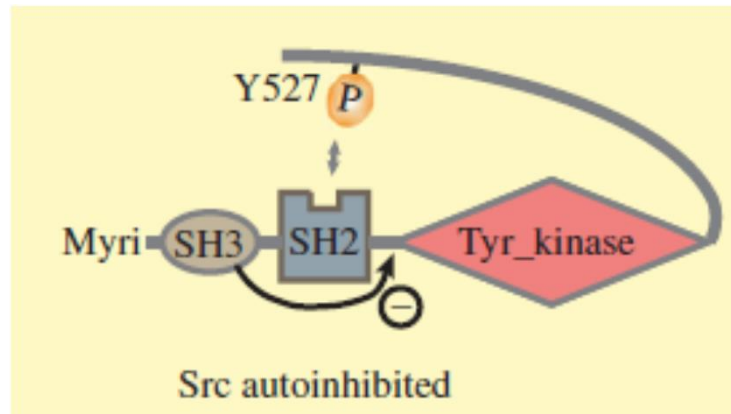
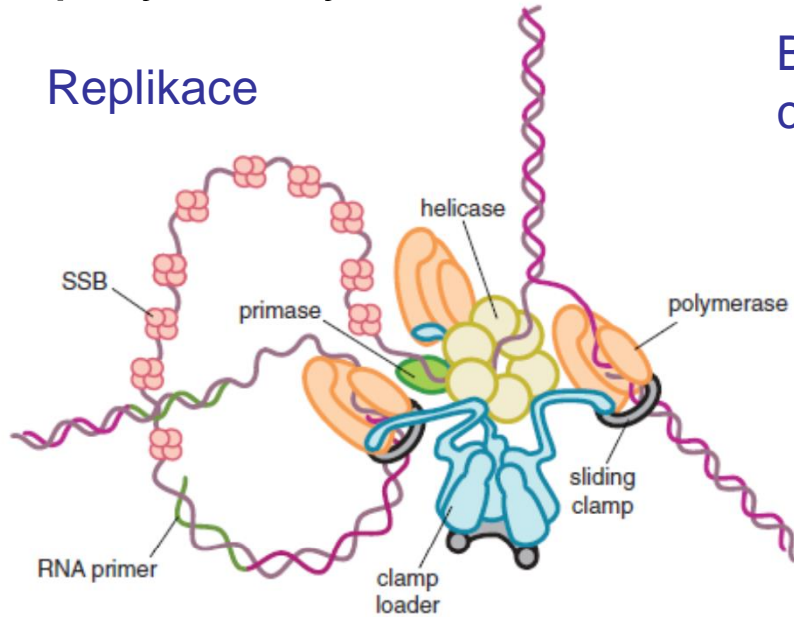


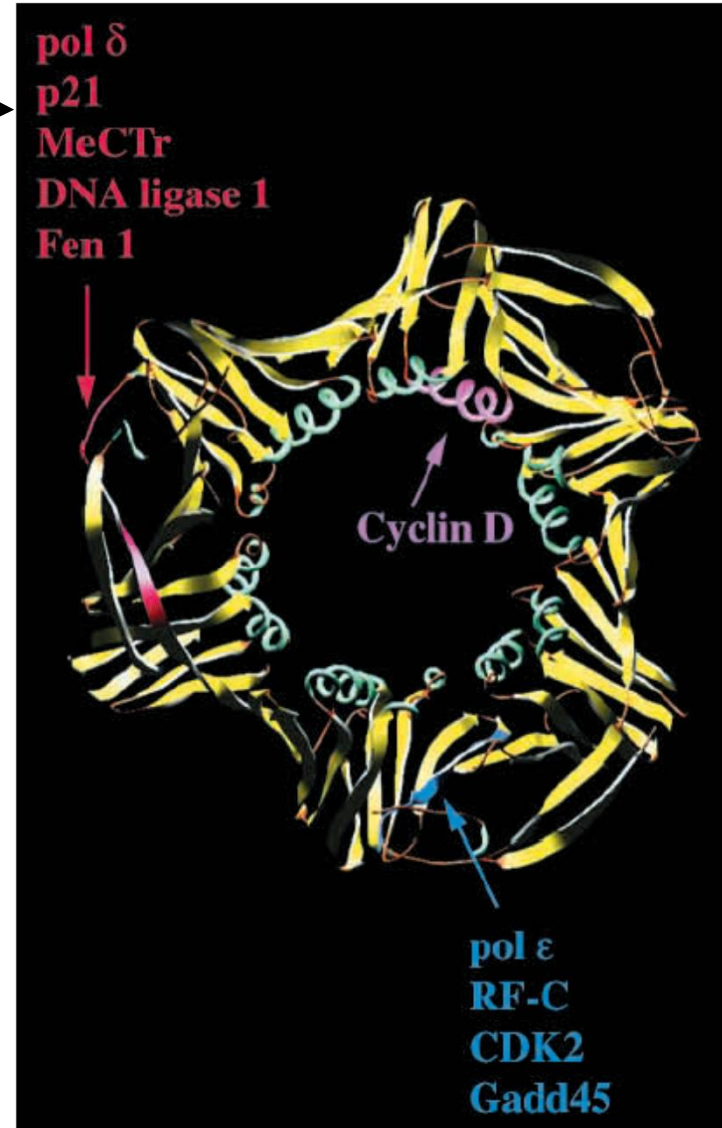
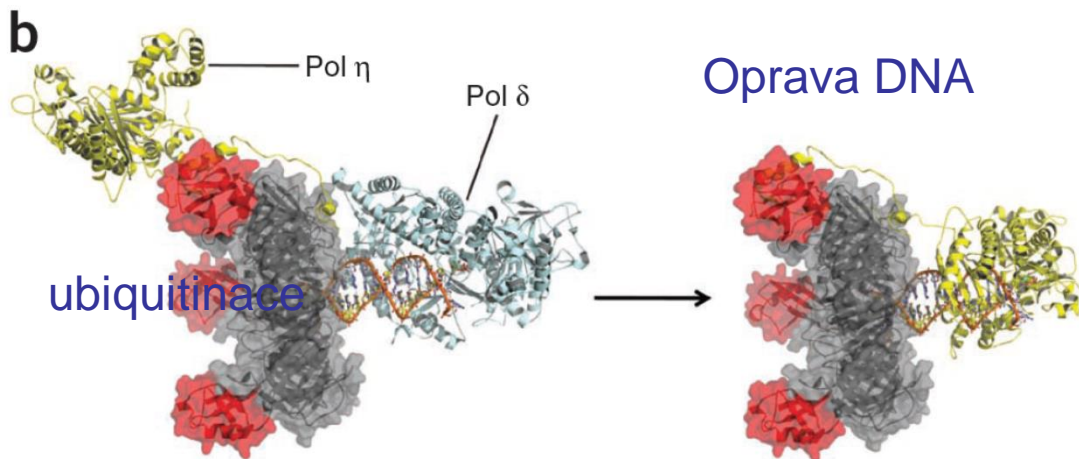
Figure 3-69 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

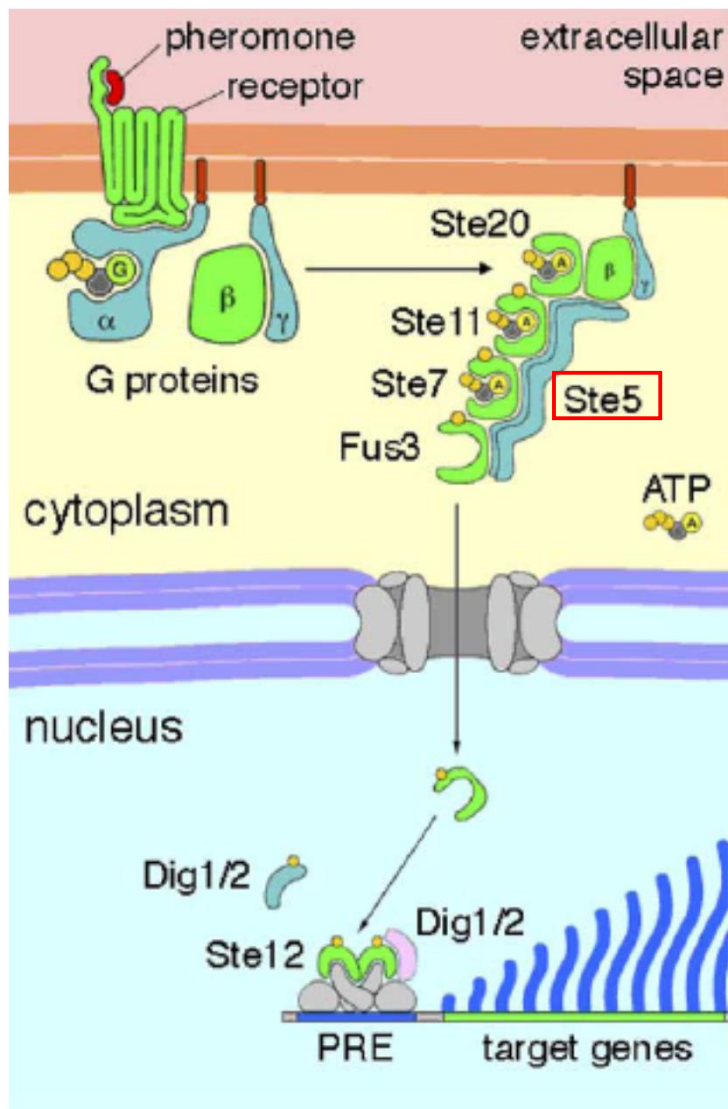
v tznou jsou vlastnosti protein /komplex kontrolovány a modifikovány prost ednictvím jejich interakcí a **modifikací** se sousedními proteiny a dalzími komponentami bun k (DNA, RNA, fosfolipidy, cukry a sekundárními posly)

Replikace



Bun ňý →
cyklus





Uetz and Finley, FEBS Lett. 2005

Proces skládání modulů lze vytvářet komplexní biologické systémy

- záměrně na nich které kinázy přenesou signál do jiného cíle
- v průběhu evoluce na které moduly fungovaly
- na které viry využívají buněčné moduly k invazi do buněk (přesměrování ve prospěch viru)
- na které onkogeny jsou výsledkem fungování modulů

- n které viry využívají bun né moduly k invazi do bun k (p esm rování ve prosp ch viru)

- n které onkogeny jsou výsledkem f ze modul

Signální dráha (aktivace) - PPI předají

Komplexy (blok supresoru)

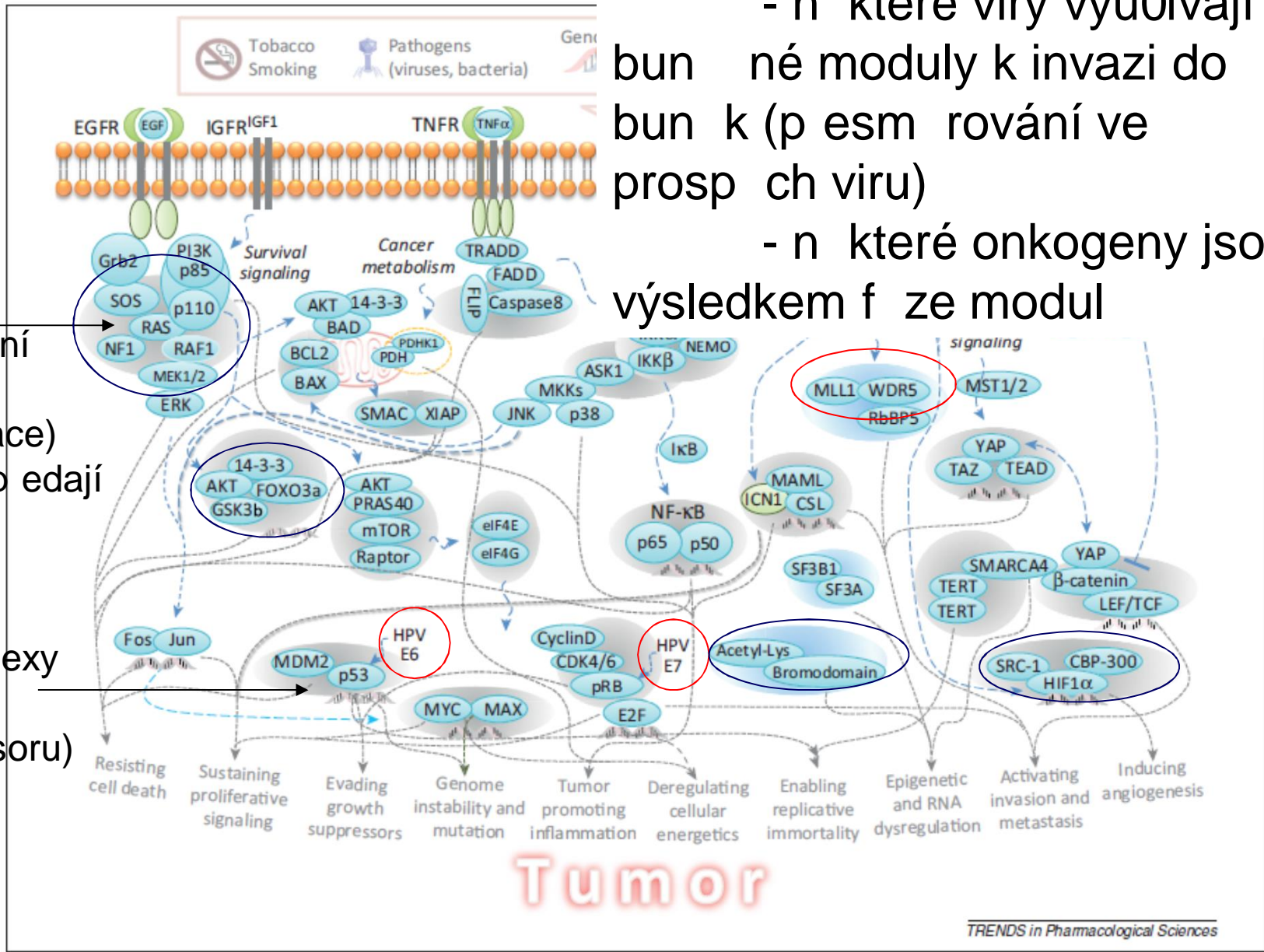
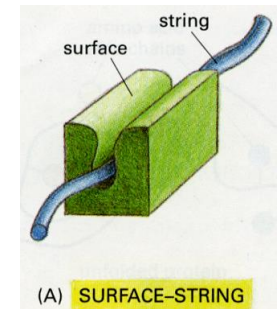


Figure 2. Representative PPIs in oncogenic signaling networks that drive the acquisition and development of hallmarks of cancer. Grey broken arrows connect PPIs to corresponding cancer hallmarks. Some PPIs contribute to multiple features of cancer. It should be noted that some PPIs may impact global processes of cell growth and their precise connections to cancer remain to be established.

Inhibice PPI

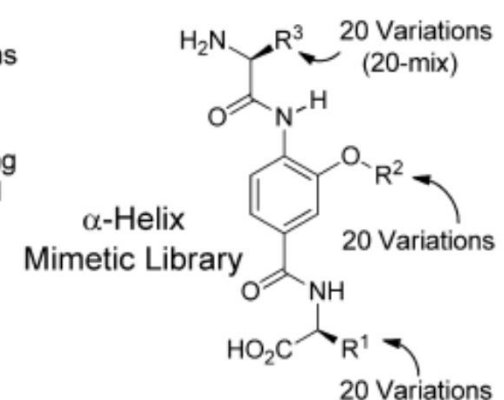
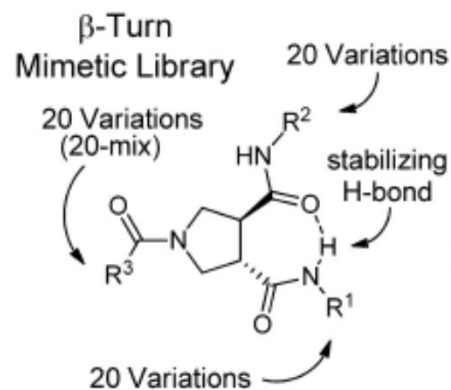
Problémy inhibice (vývoje léků)

- interakční plocha 1150-10000Å² (včetně kapsy enzymu pro malé ligandy)
- ploché bez hlubokých kapes (jako pro ligandy)
- hydrofobní charakter PPI (nerozpustnost léku)
- nelze vycházet z proložených ligandů (jako u enzymů)



ale

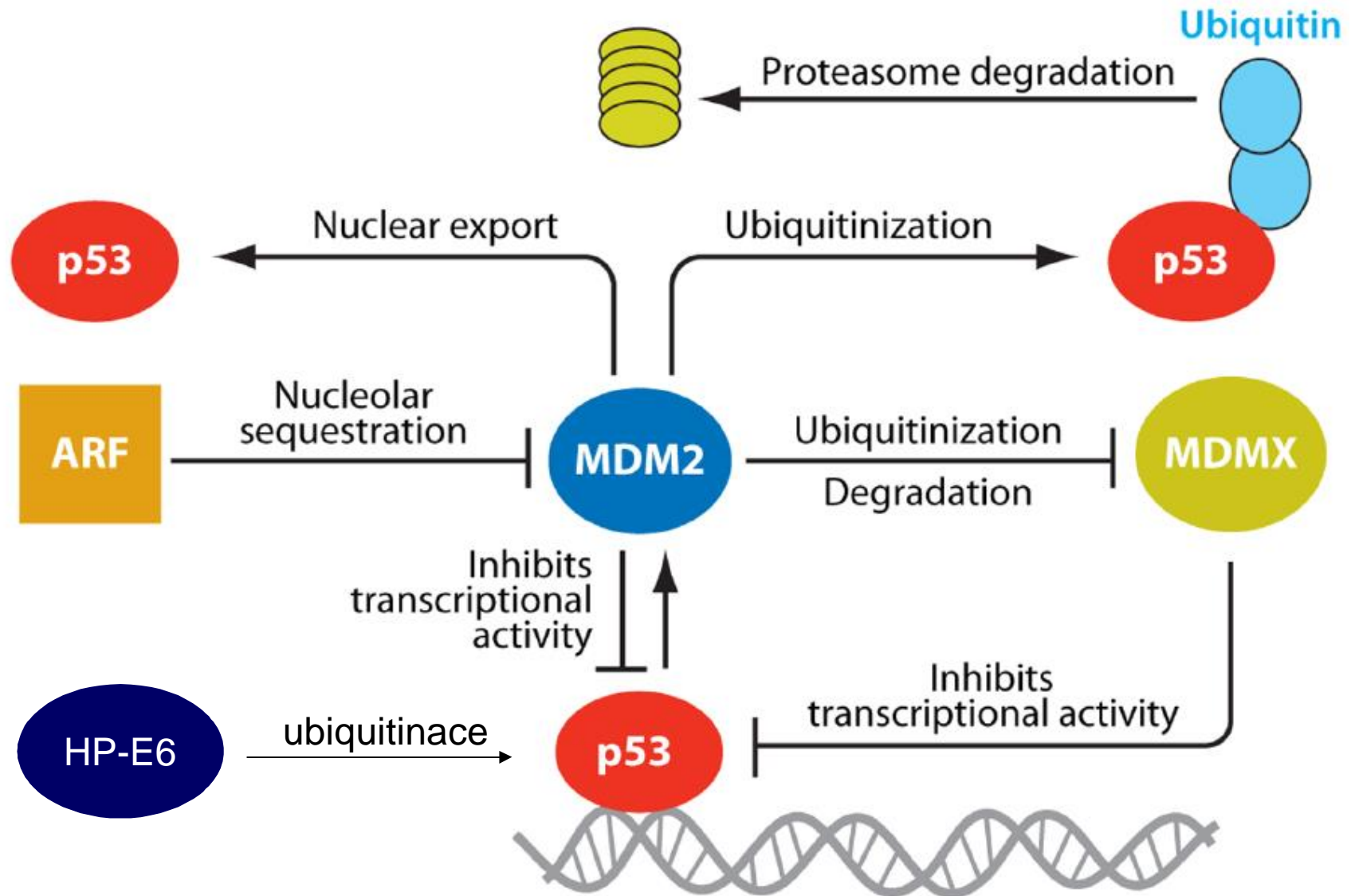
- interakce s peptidy ve vlákně jsou relativně malé
- lze inhibovat interakci i relativně malou molekulou (hot-spot)
- vhodné je cílení na interakce regulované post-translační modifikací (viz fosfopeptidy)
- mimikování peptidů



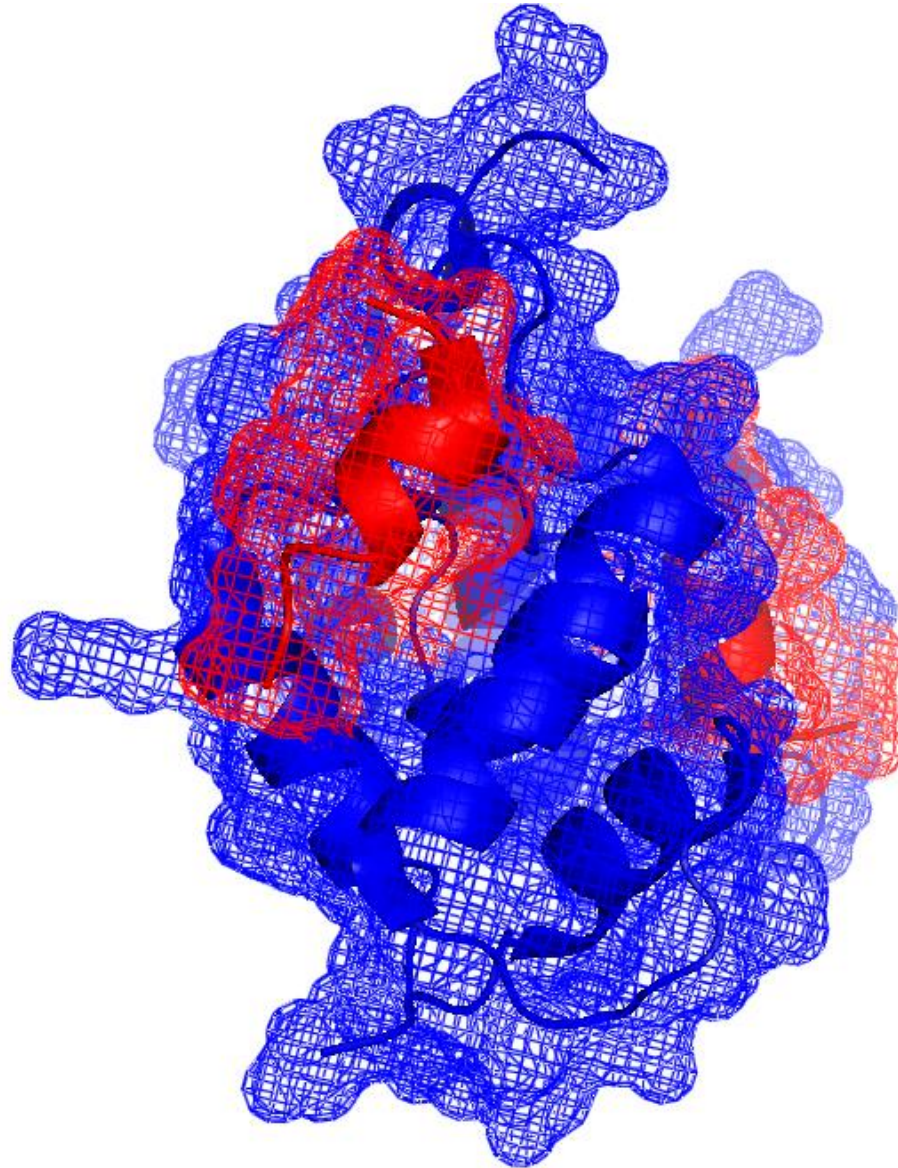
Ivanov et al, TiPS, 2013

Whitby a Boger, ACR, 2012

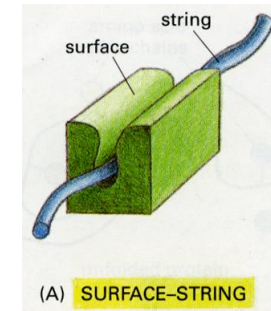
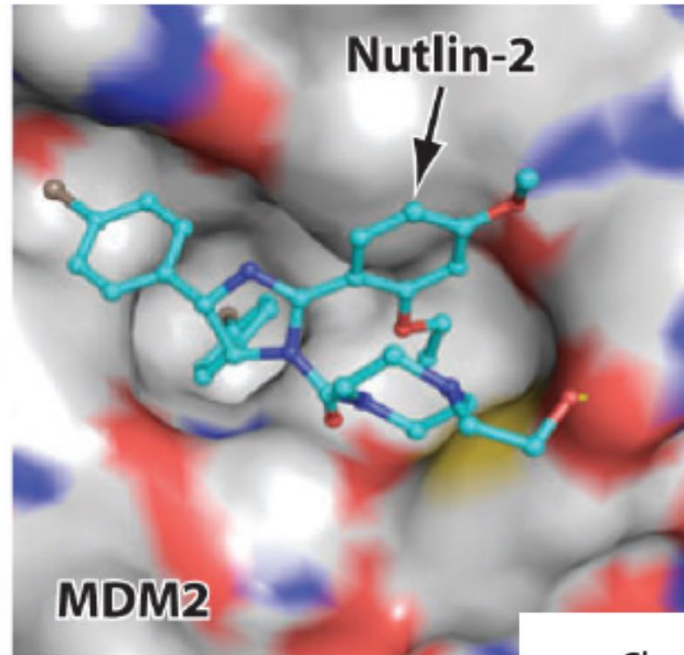
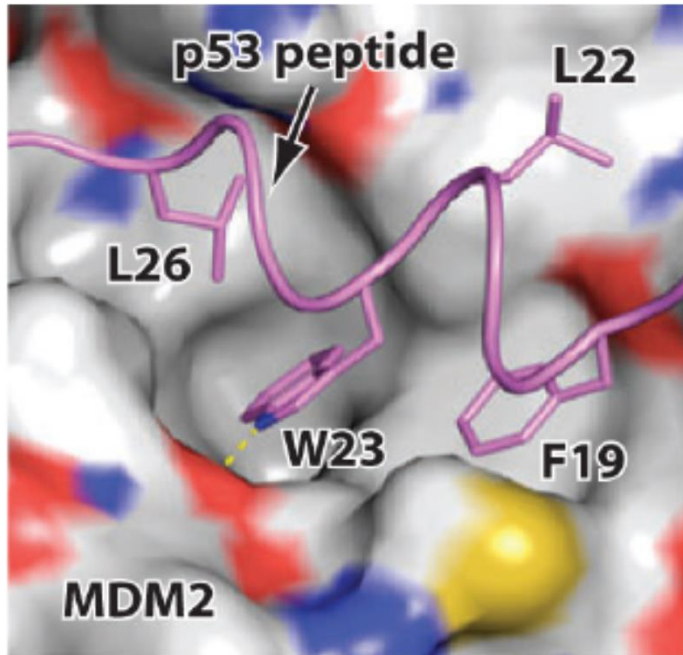
Inhibite PPI: p53-MDM2



p53-MDM2 (4HFZ)

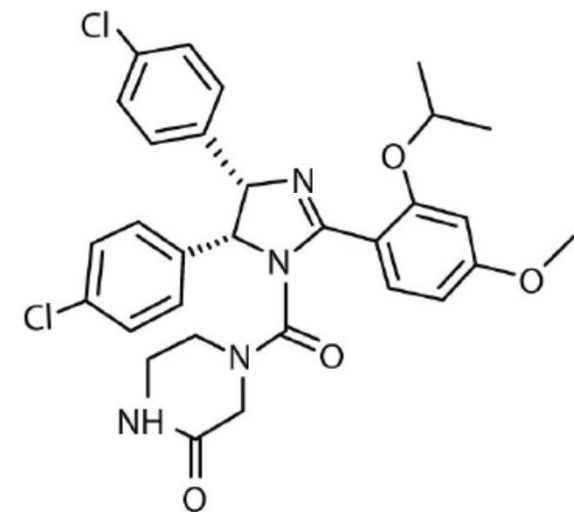


Inhibice PPI: p53-MDM2



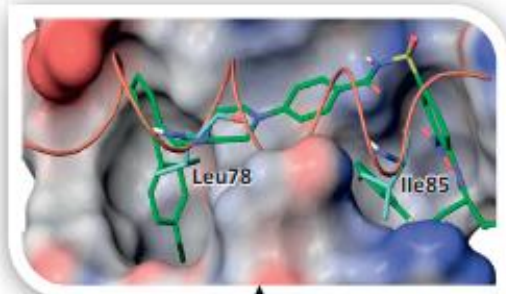
jeden z prvních

- Inhibice interakce MDM2 stabilizuje p53 .
podpora nádorové suprese

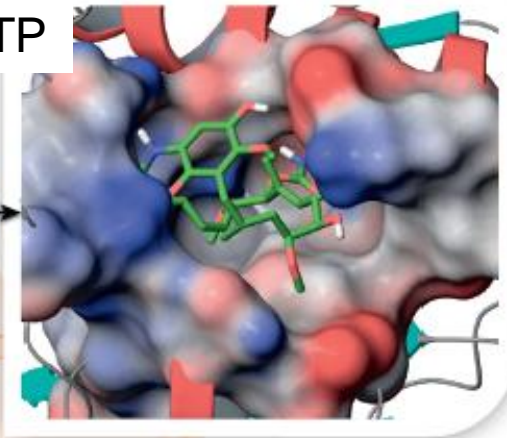


Nutlin-3a

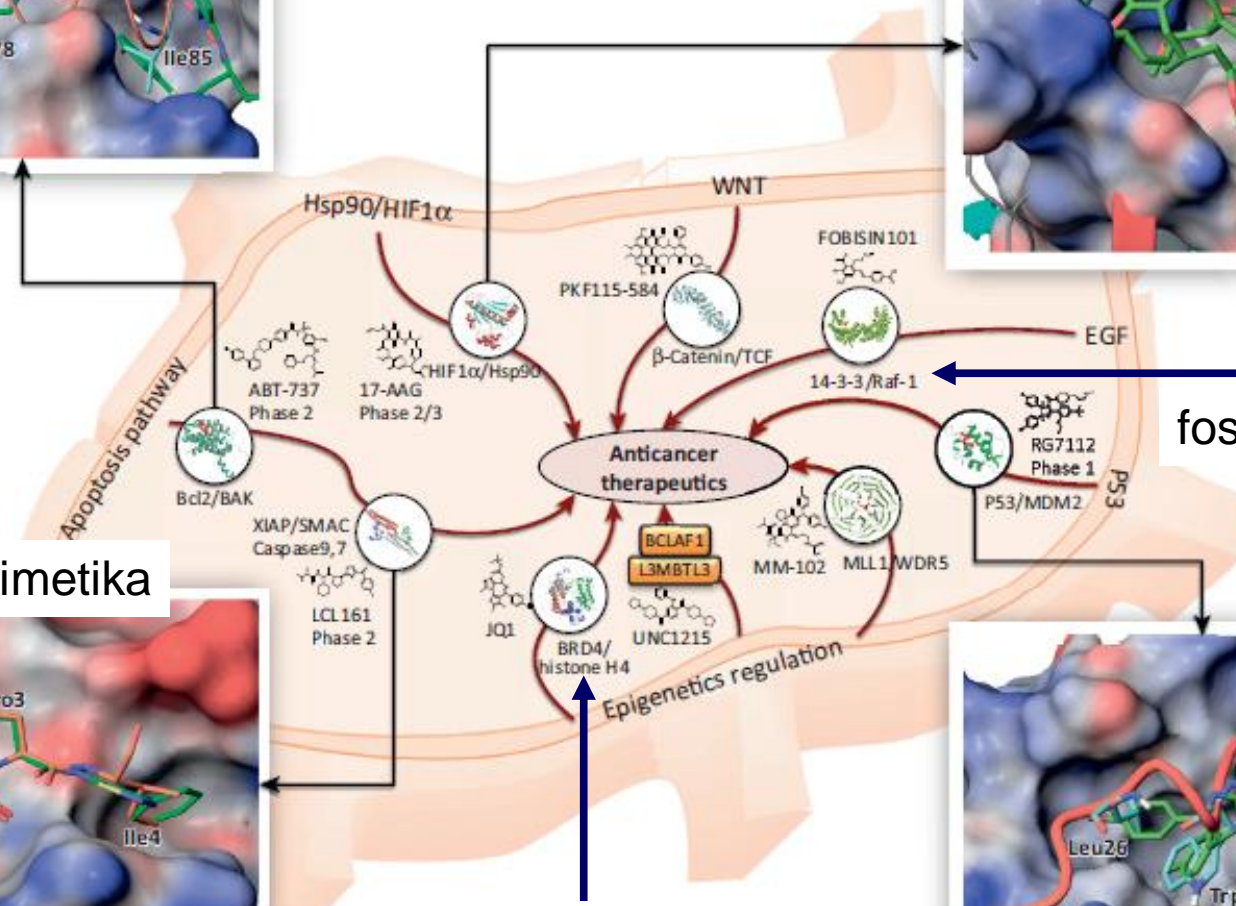
peptidomimetika



kapsa pro ATP

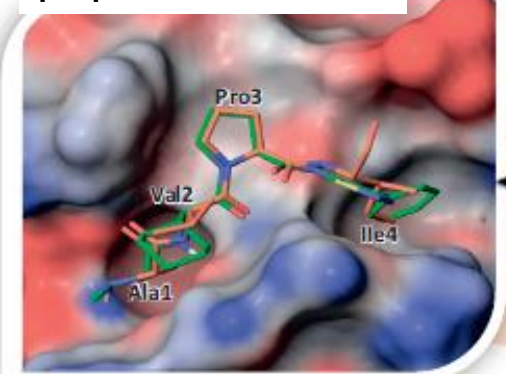


Ivanov et al, TIPS, 2013

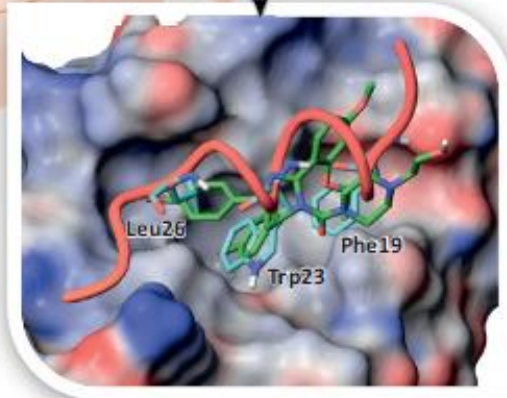


fosfopeptidová vazba

peptidomimetika



acetyl-peptidová vazba



nová peptidomimetika

v tzi komplexy jsou stabilizovány více interakcemi, ale mohou se rozpadnout i celý

Záv ry

- “ Stabilita komplexu je zpravidla větší než pouhý součet jednotlivých protein-proteinových interakcí
- “ funkce celého komplexu je závislá na každé podjednotce (komplex se nesestaví nebo rozpadne bez všech podjednotek)
- “ některé podjednotky mohou plnit funkci adaptérů a řízení (scaffold)
- “ proteiny jsou spojeny prostřednictvím interakcí mezi doménami. interakce mohou být modulovány posttranslačními modifikacemi (dynamické komplexy)