



National Centre for Biomolecular Research



laboratoř Strukturních proteinů eukaryotních chromosomů

CG030 – Struktura (architektura) a funkce proteinových komplexů

doc. Jan Paleček
jpalecek@sci.muni.cz
(garant)

UKB A2, 214

Osnova kurzu

- úvod – metody analýzy proteinových komplexů, strukturní biologie
- funkce proteinů (chaperony, PTM, PPI, signální dráhy ...) a komplexů (proteasom)

největší proteinové komplexy = chromosomy

- DNA-vazebné komplexy
- Komplexy v transkripci
- Komplexy v replikaci
- Komplexy opravující poškozenou DNA
- Komplexy chromatinu
- Evoluce proteinů a komplexů

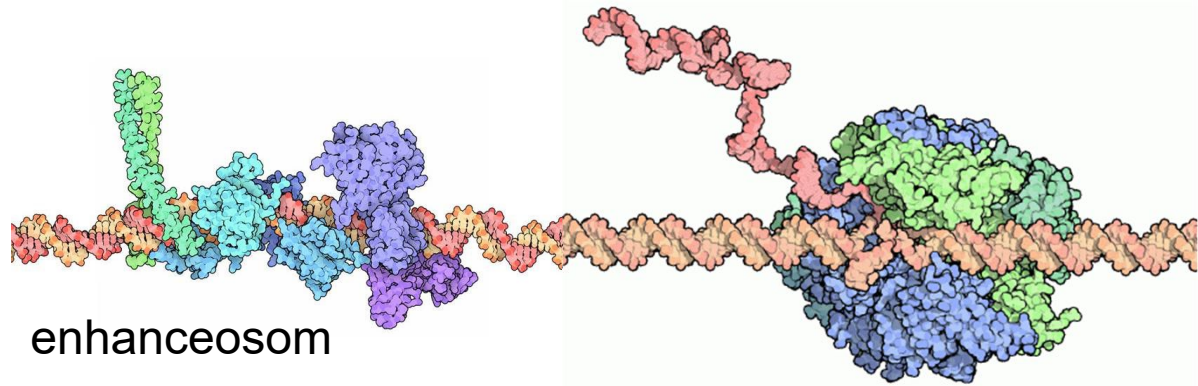
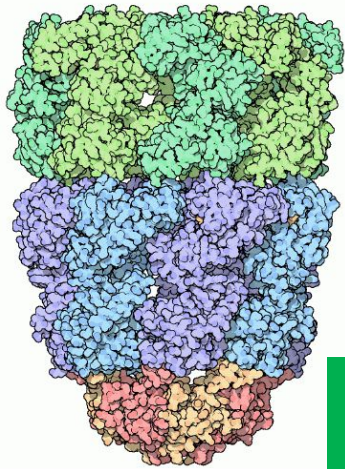
obecně

chromatin

závěrečná

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

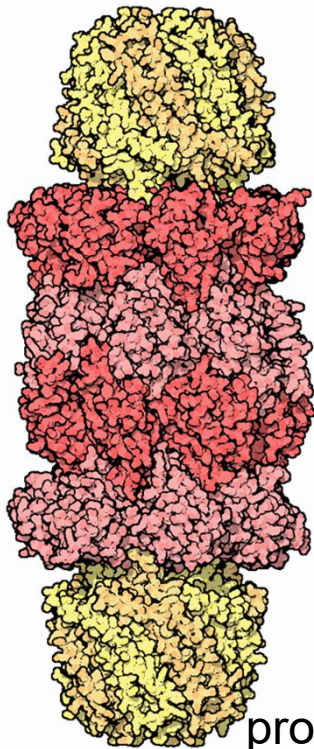
chaperon



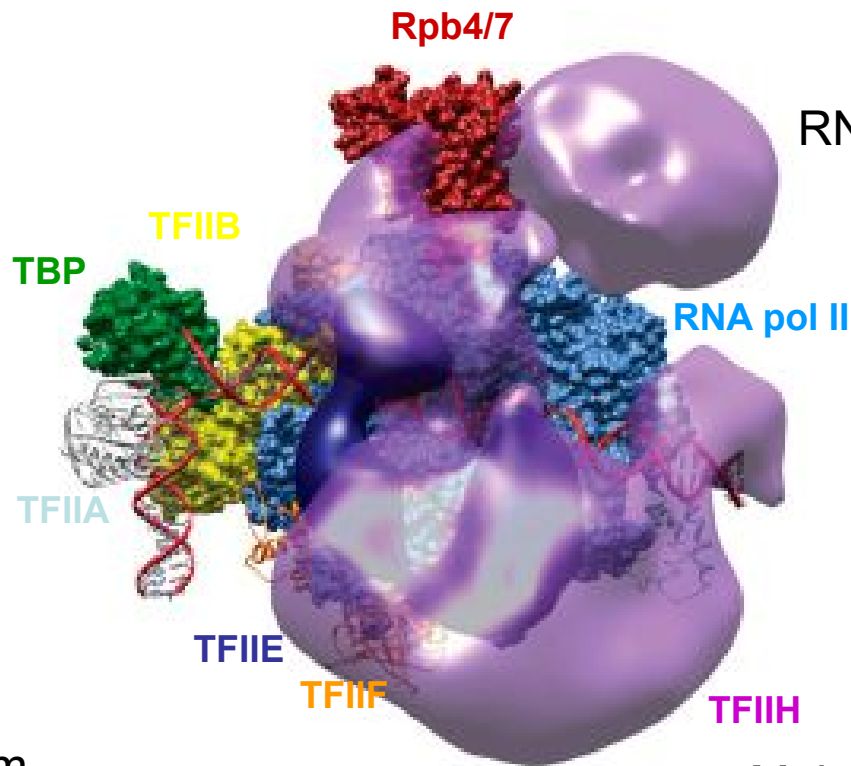
enhanceosom

RNA polymeráza

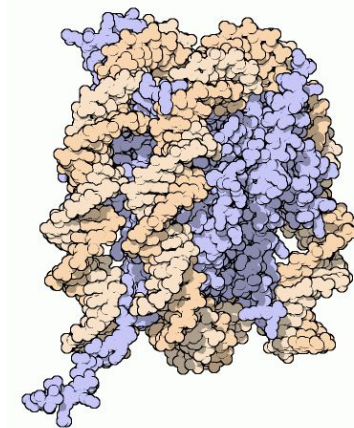
obecně



proteasom



RNA polymeráza + TFII...



nukleosom

chromatin

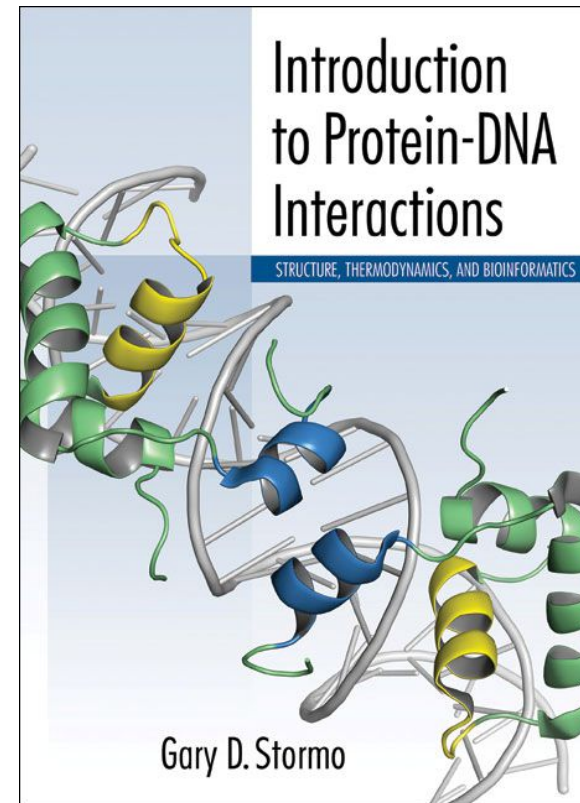
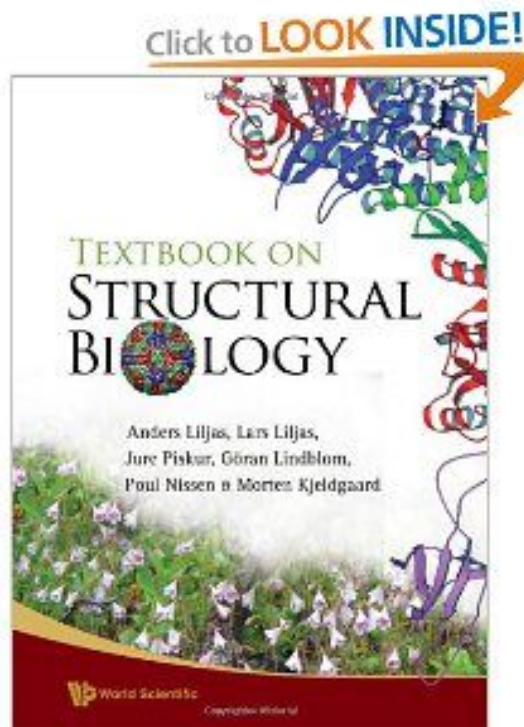
Molekula měsíce (PDB 101)

Informační zdroje

Alberts a spol: Molecular biology of the Cell

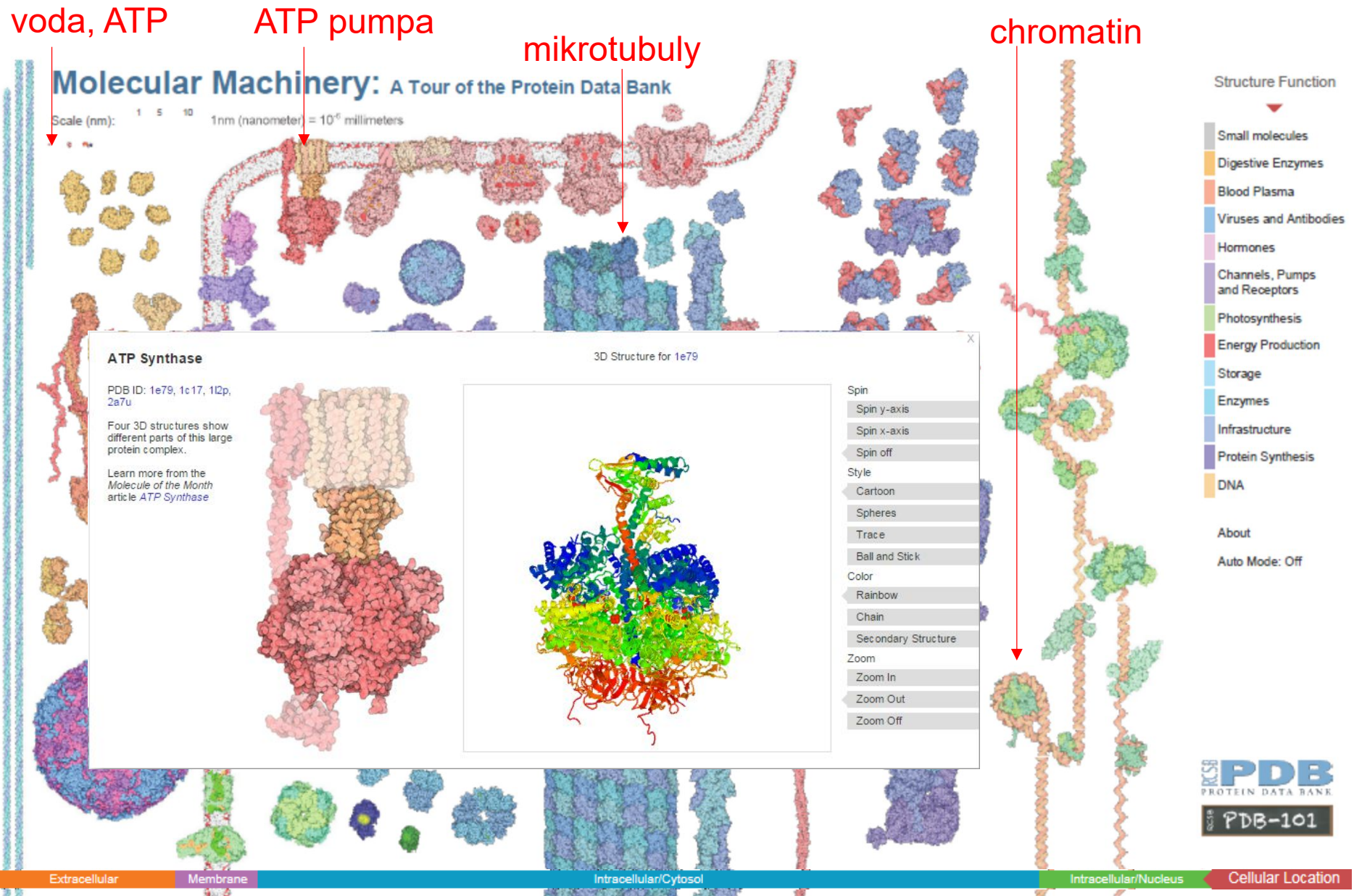
Liljas a spol: Structural biology (2009) ...

... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science, PLoS ...



Databáze proteinových struktur: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>,
<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>

Primárním zdrojem strukturních informací = PDB



Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

Program přednášek 2017

21.02.2019 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, analýza komplexů
28.02.2019 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, PPI, skládání komplexů
07.03.2019 11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Muller	Chaperony
14.03.2019 11-12.50hod	A2-2.11	Mgr. Adamus	Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom
21.03.2019 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, vazebné motivy
28.03.2019 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy
04.04.2019 11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Blažek	Cyclin/CDK komplexy v buněčném cyklu a transkripci
11.04.2019 11-12.50hod	A2-2.11	Mgr. Balkoová	replikace DNA
18.04.2019 11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Šebesta	Oprava DNA, homologní rekombinace
25.04.2019 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Chromatinové komplexy
02.05.2019 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce proteinových komplexů
09.05.2019 9-12hod	A2-2.11	doc. Paleček	Zkouška - test

obecně

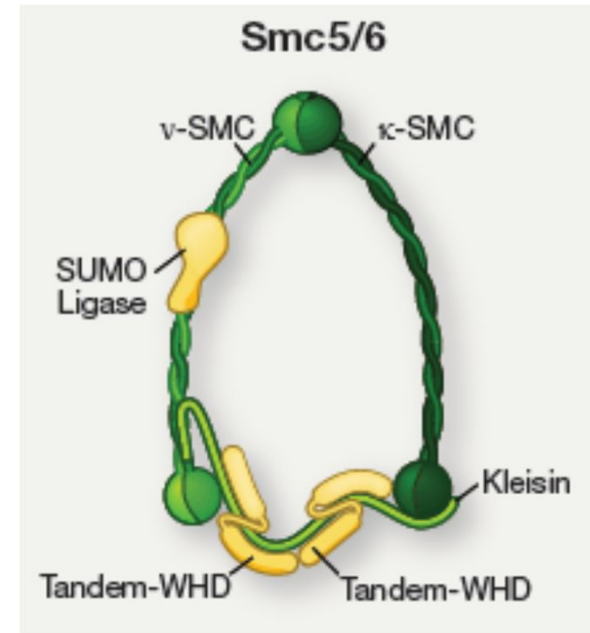
chromatin

- Pohled na vybrané procesy probírané v biochemii a molekulární biologii z hlediska proteomiky a především z hlediska proteinových komplexů
- výběr komplexů majících vztah k tématům studovaným v laboratořích „chromatinových molekulárních komplexů“, NCBR a dalších skupin z MU

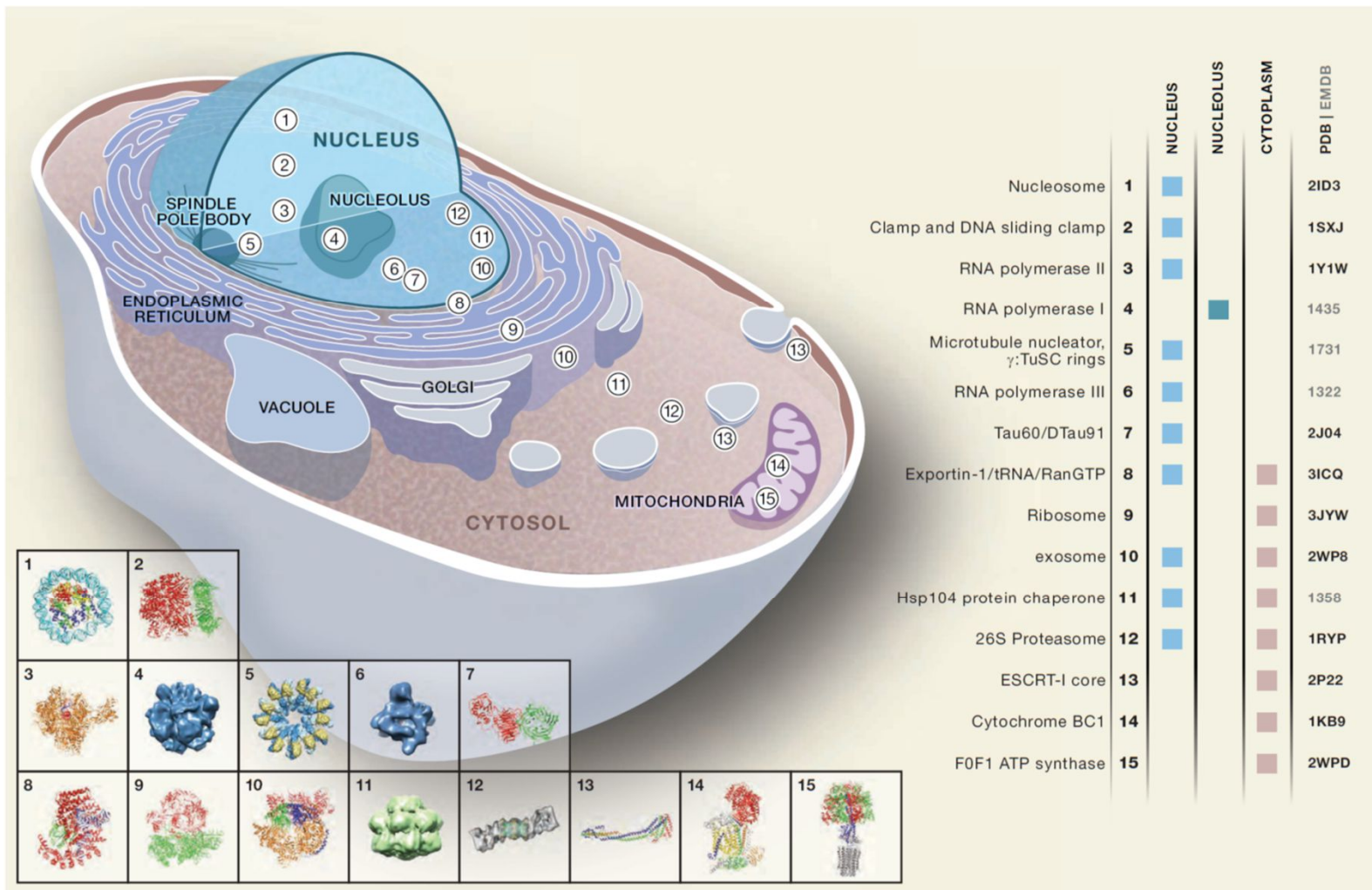
Související: Cvičení z modelování proteinových komplexů (CG031), Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041, prof. J. Fajkus), Metody GenPro (CG080) ...

Zkouška: - test + přednáška

- Úvod - Analýza proteinu
 - Domény
 - fold-struktura (ss, PDB)
 - v PyMolu připravit 3D strukturu
 - Interakce (IntAct)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - evoluce
- Konkrétní nová data – článek (< 5 let)



Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...



~800 komplexů v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*

Bertero et al, Cell, 2010

Nejčastější postup charakterizace proteinových komplexů

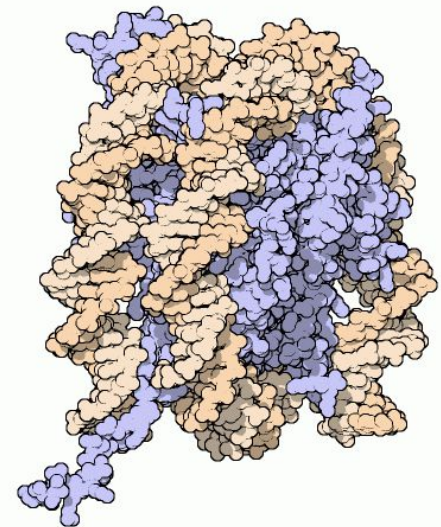
Nový gen/protein – charakterizace funkce a funkčního kontextu =>

1. - identifikace partnerů tzn. PPI, respektive izolace komplexu
2. - charakterizace komplexu *viz MGP – 16.4.2019*
 - vzájemné PPI podjednotek - architektura/struktura komplexu
 - funkce podjednotek (genetická analýza, lokalizace v buňce ...)
3. - rekonstrukce a analýza aktivit celého komplexu *in vitro*

Metody izolace a analýzy proteinových komplexů

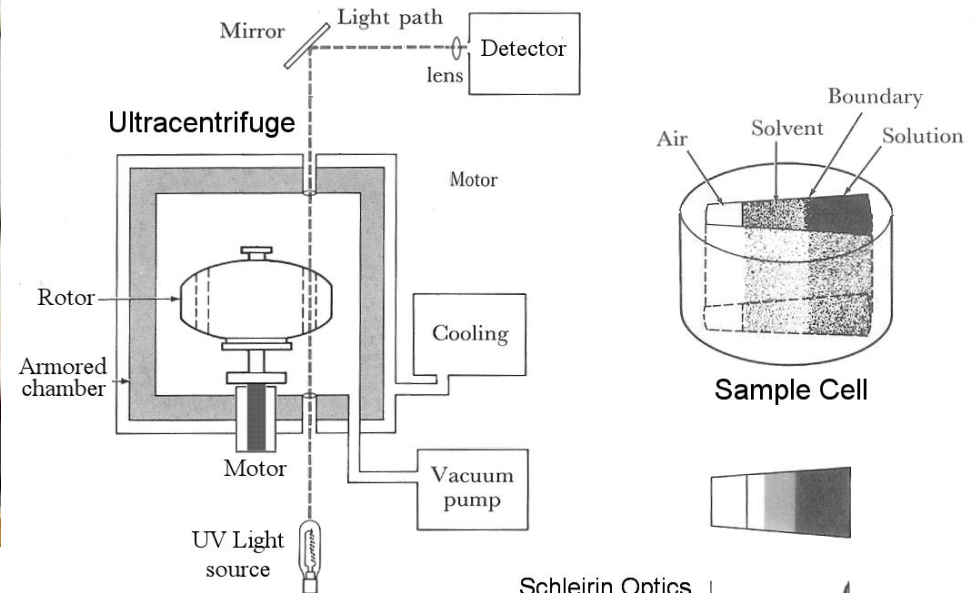
Prolínají se analytické a izolační:

- ultracentrifugace, gelová filtrace
 - TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
 - ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...
 - crosslink MS, X-ray, (cryo) elektronová mikroskopie
(Prolínají se i metody pro komplexy a PPI - *viz MGP – 16.4.2019*)
- ... vizualizační metody

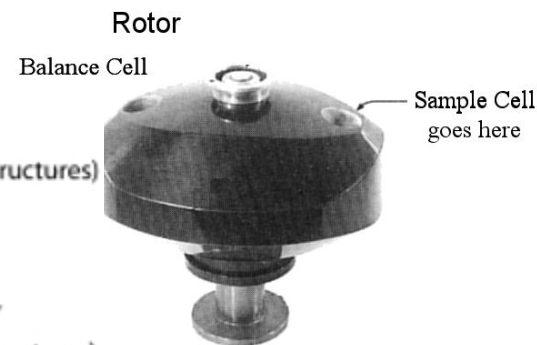
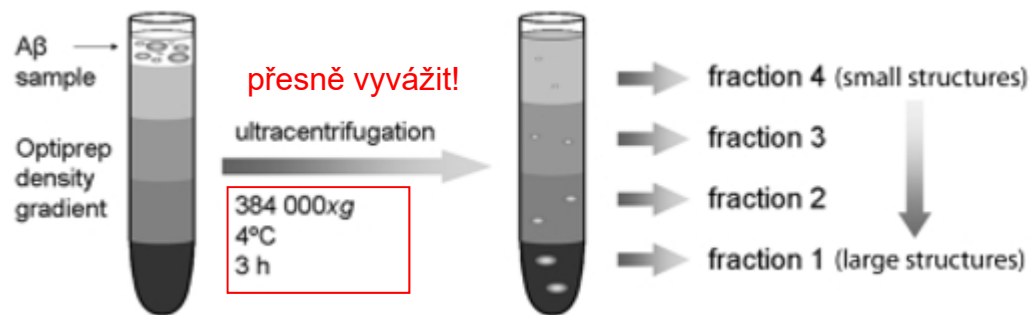


Metody analýzy a izolace PKxů

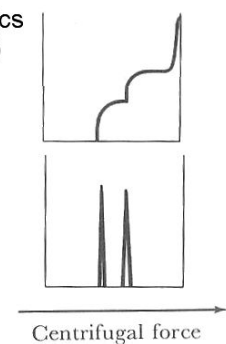
Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



Cukerný/hustotní gradient



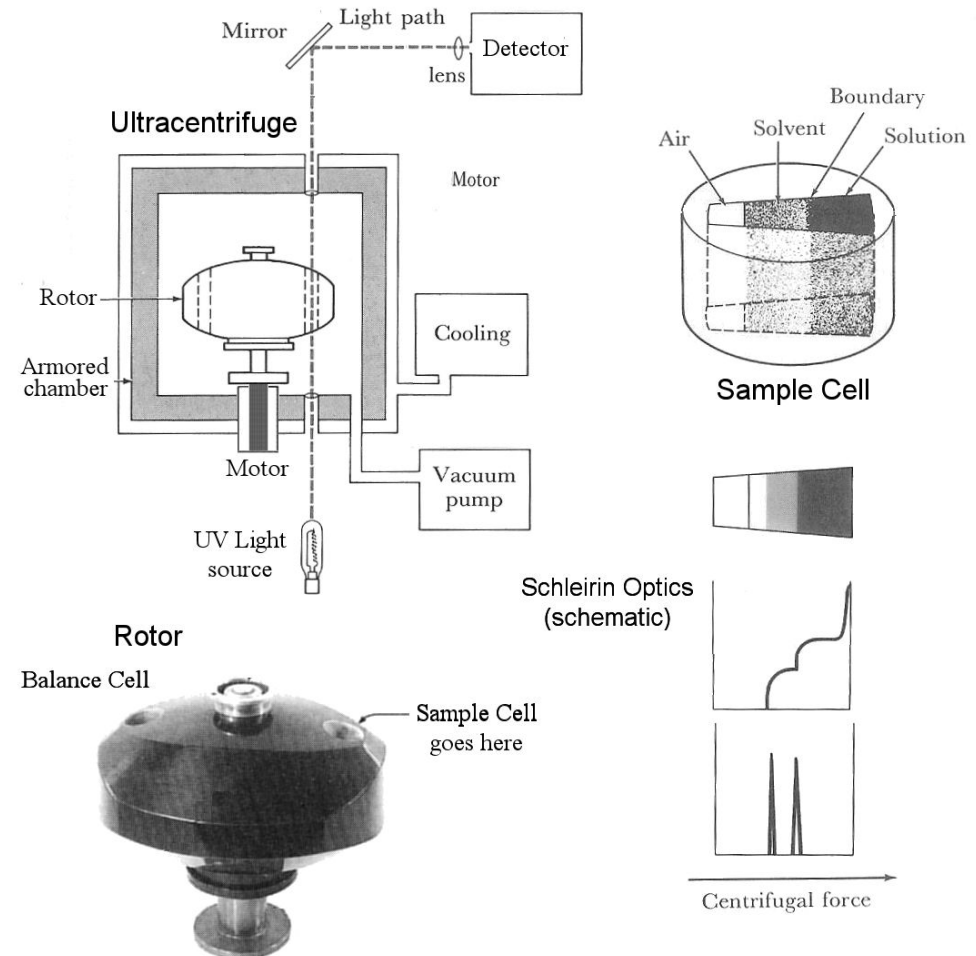
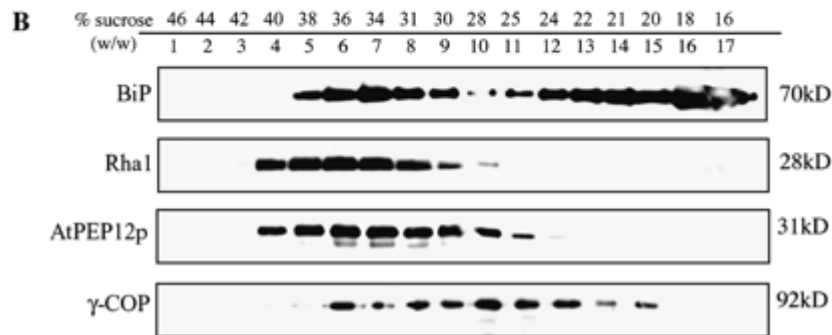
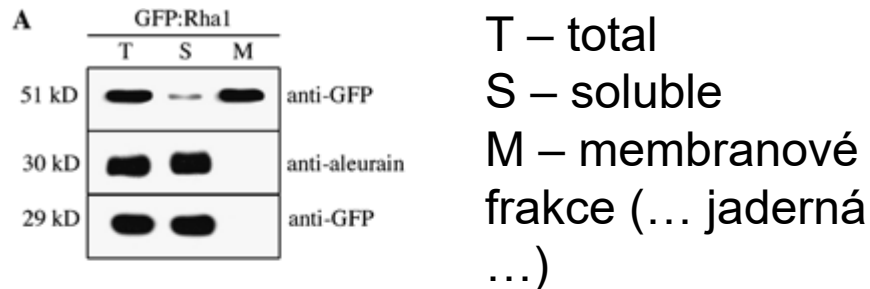
Schlein Optics (schematic)



Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



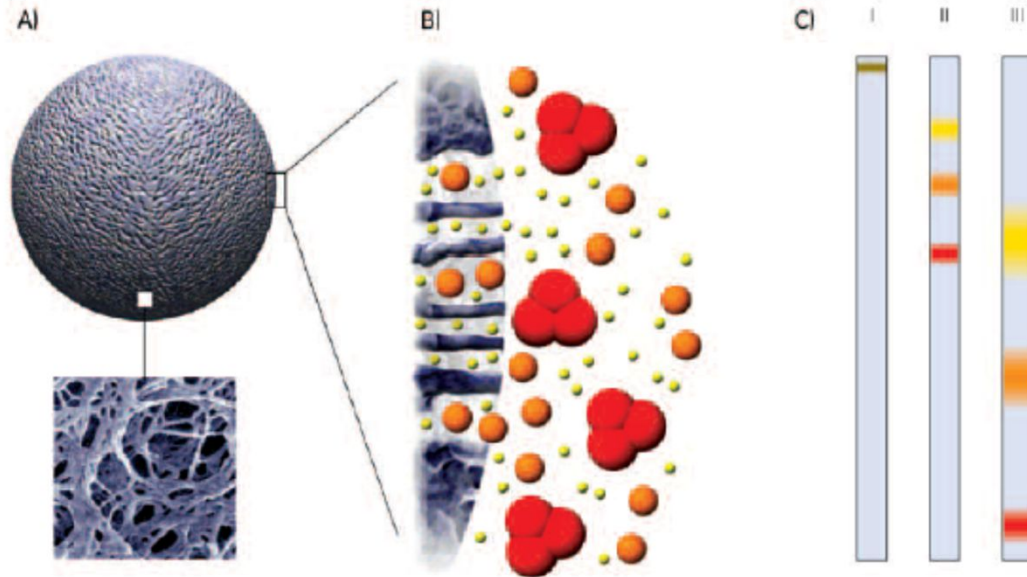
- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely - lokalizace
- B. Jemný - cukerný gradient - izolace

Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

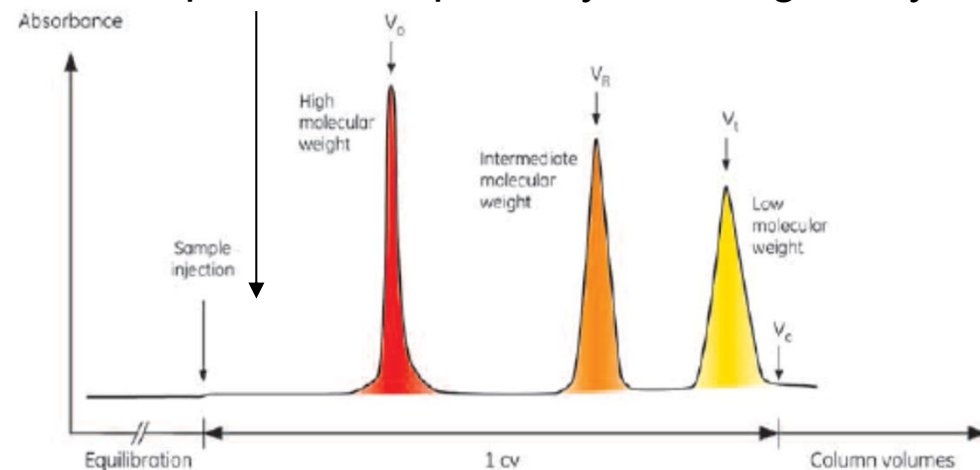
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

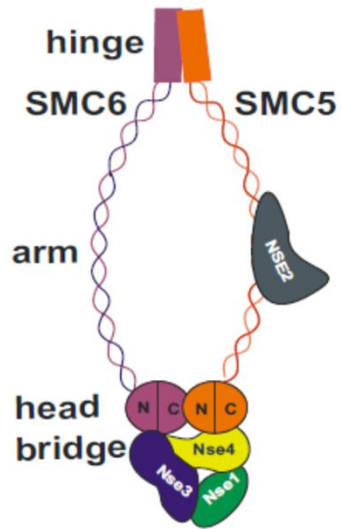
Metody izolace a analýzy PKxů

- **Gelová filtrace (size exclusion chromatography)**
- Za nativních podmínek (komplexy zůstávají pohromadě)

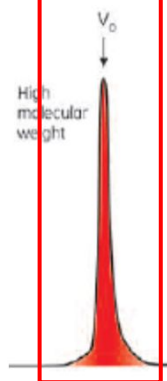
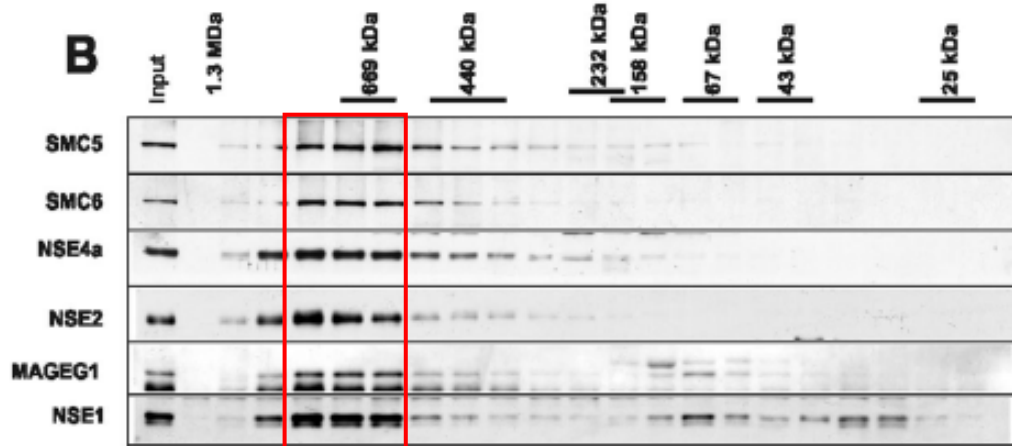
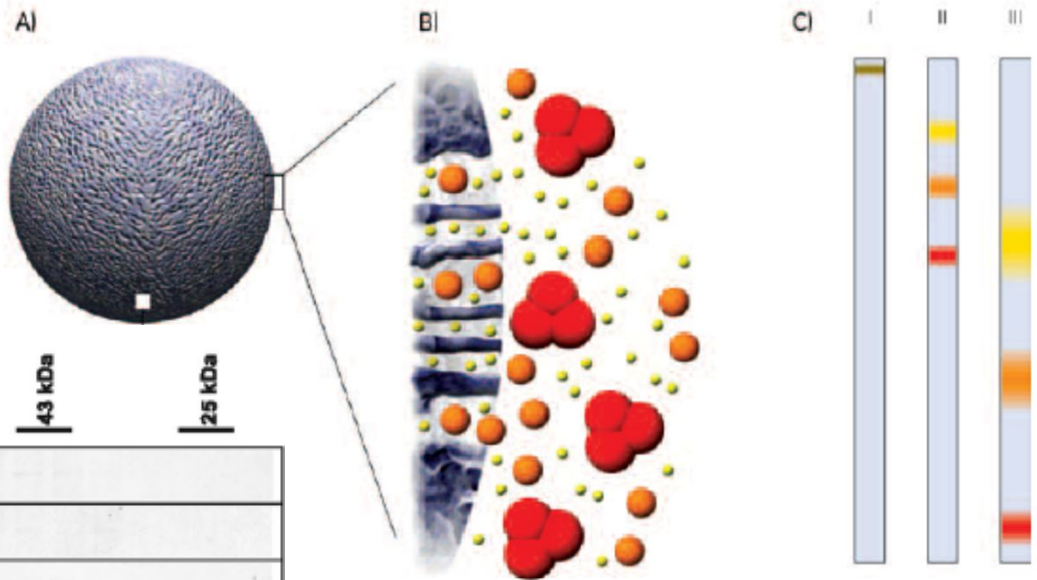


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty

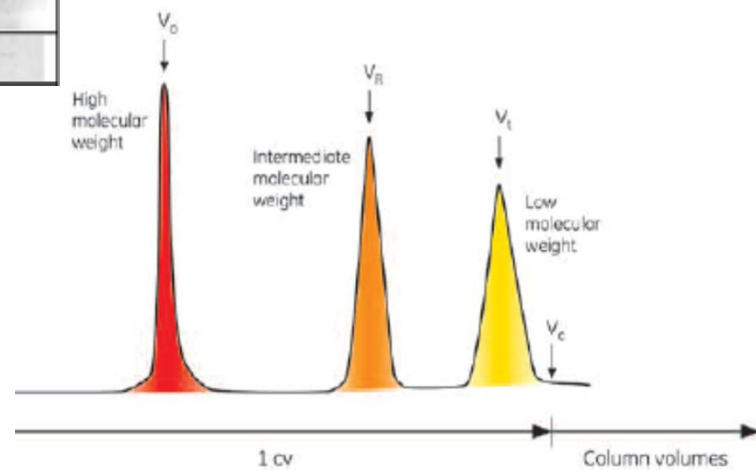




Příklad: SMC5/6 komplex – v buněčném lyzátu (nebo purifikované proteiny)



GF: frakce lyzátu lidských buněk – podjednotky SMC5-6 komplexu identifikovány pomocí protilátek



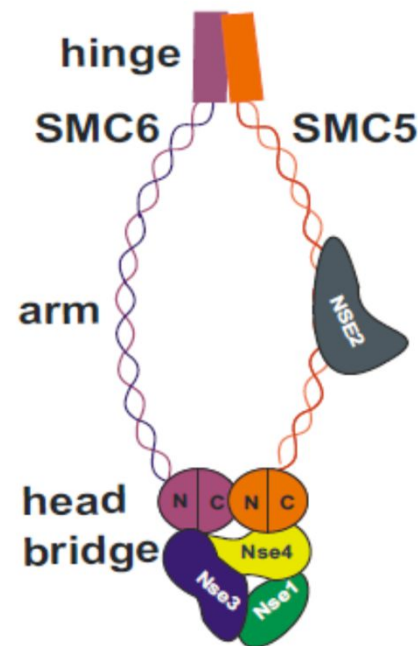
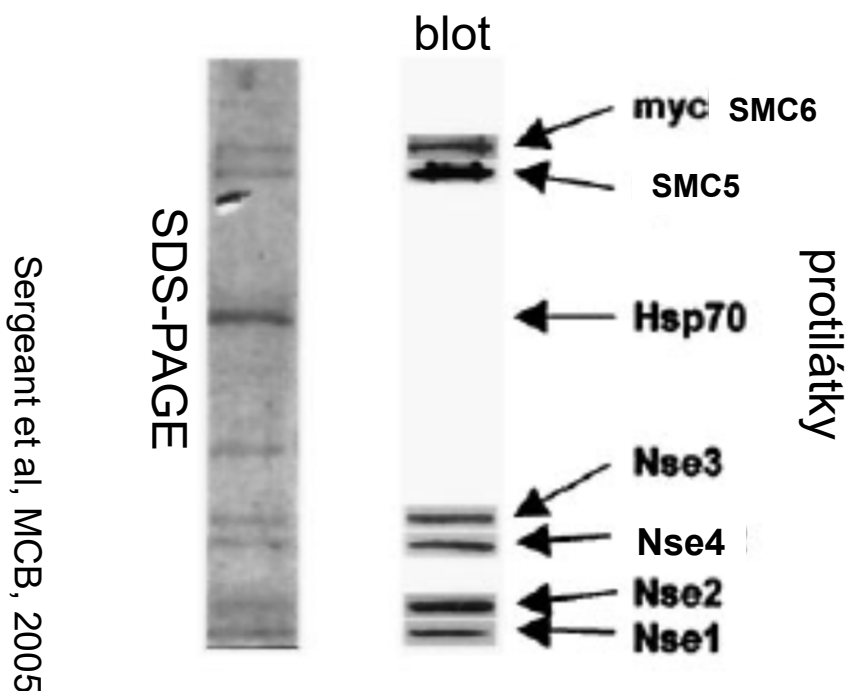
Metody izolace a analýzy PKxů

Jednoduché tagy/značky:

Myc, FLAG, V5, S-tag, GFP (vazba přes protilátky)

GST, Streptactin (biotin-streptavidin), MBP ... (vazba přes ligandy)

Kompetiční eluce (peptidy nebo ligandy)



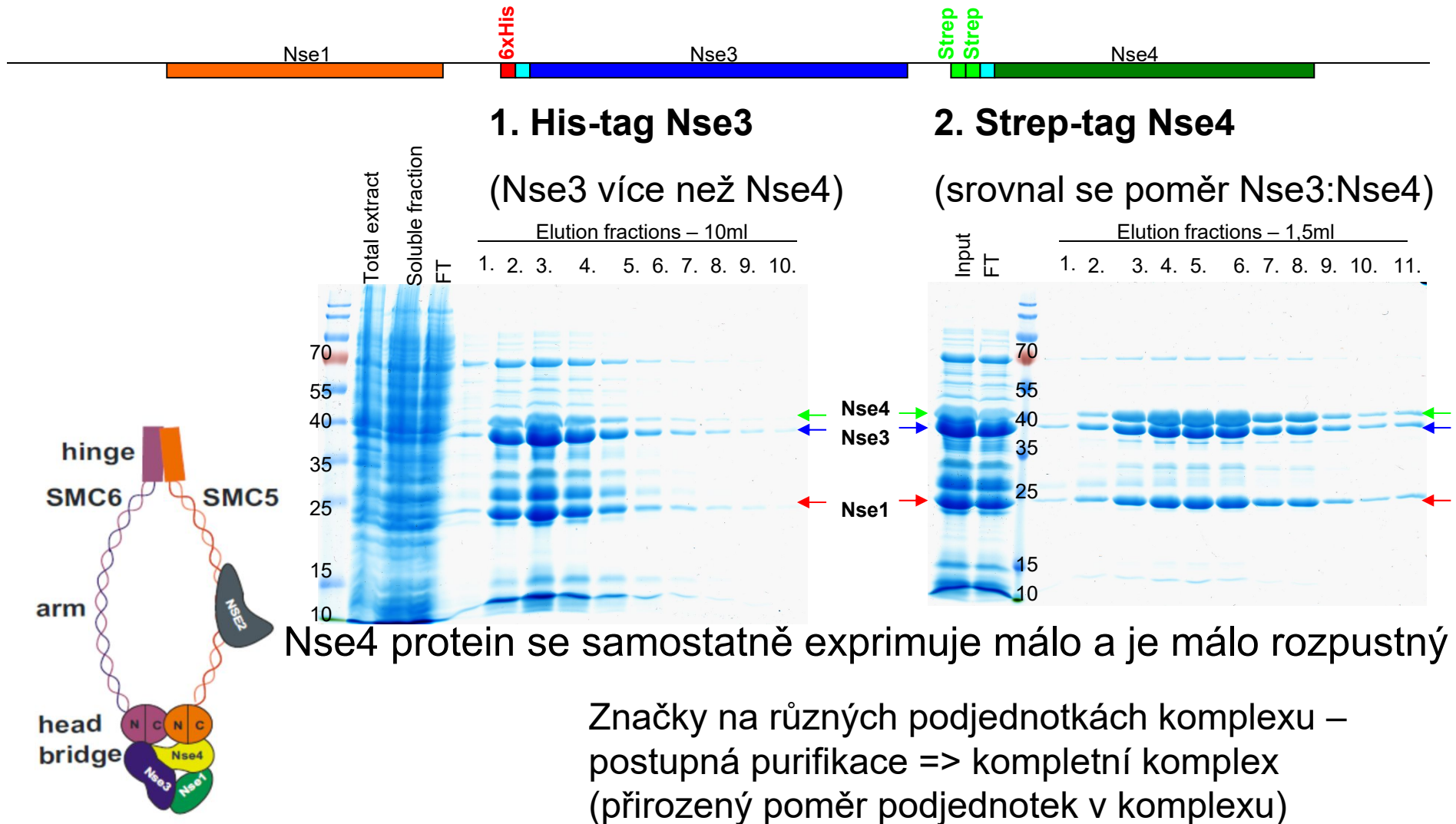
Pozor na kontaminace
(např. chaperony)

MS analýza SDS-PAGE
nebo roztoku

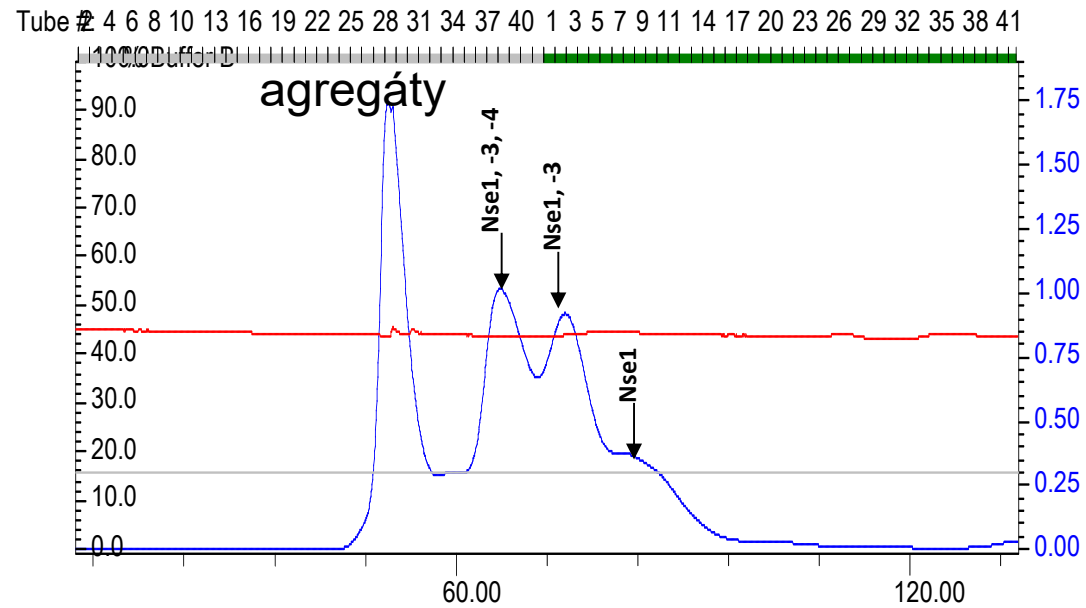
Známe-li více podjednotek - značky na různé podjednotky komplexu (vs TAP na jedné podjednotce) – postupná purifikace => kompletní komplex (vychytaný přes různé podjednotky)

Ko-purifikace

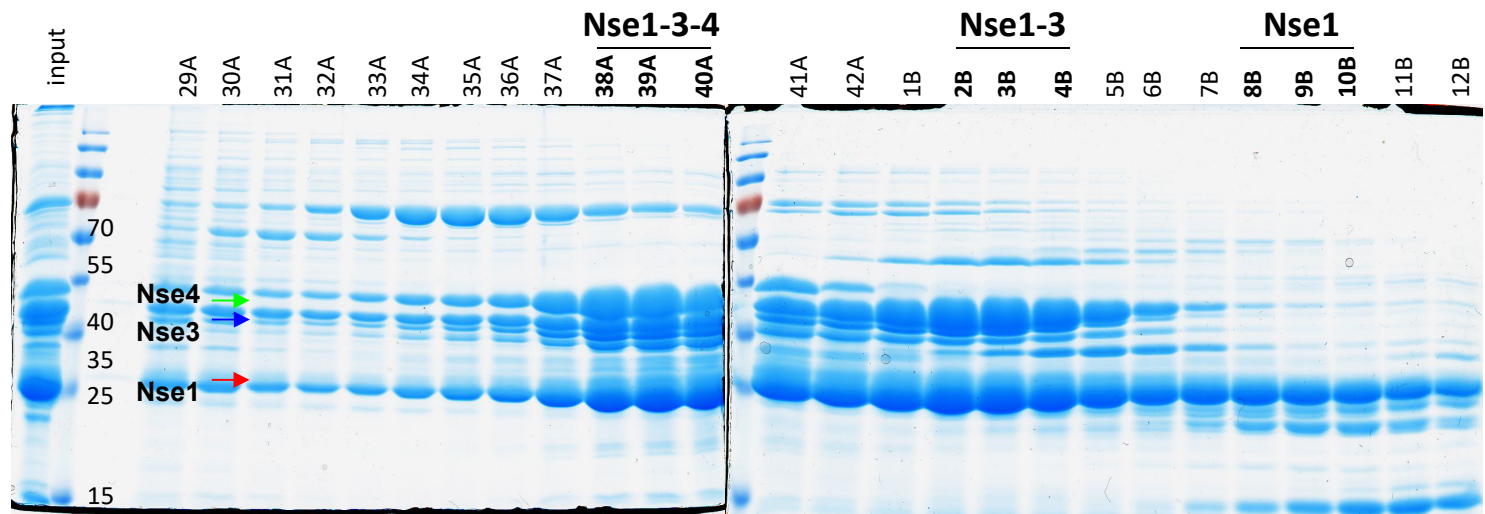
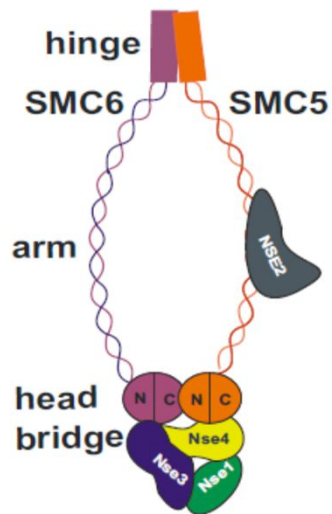
Silné interakce/komplexy – proteiny lze ko-exprimovat (může pomoci s jejich rozpustností) a následně ko-purifikovat



Ko-purifikace



3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů



Metody izolace a analýzy PKxů

- TAP-tag („Tandem-affinity purification“, jiné tagy a protilátky)



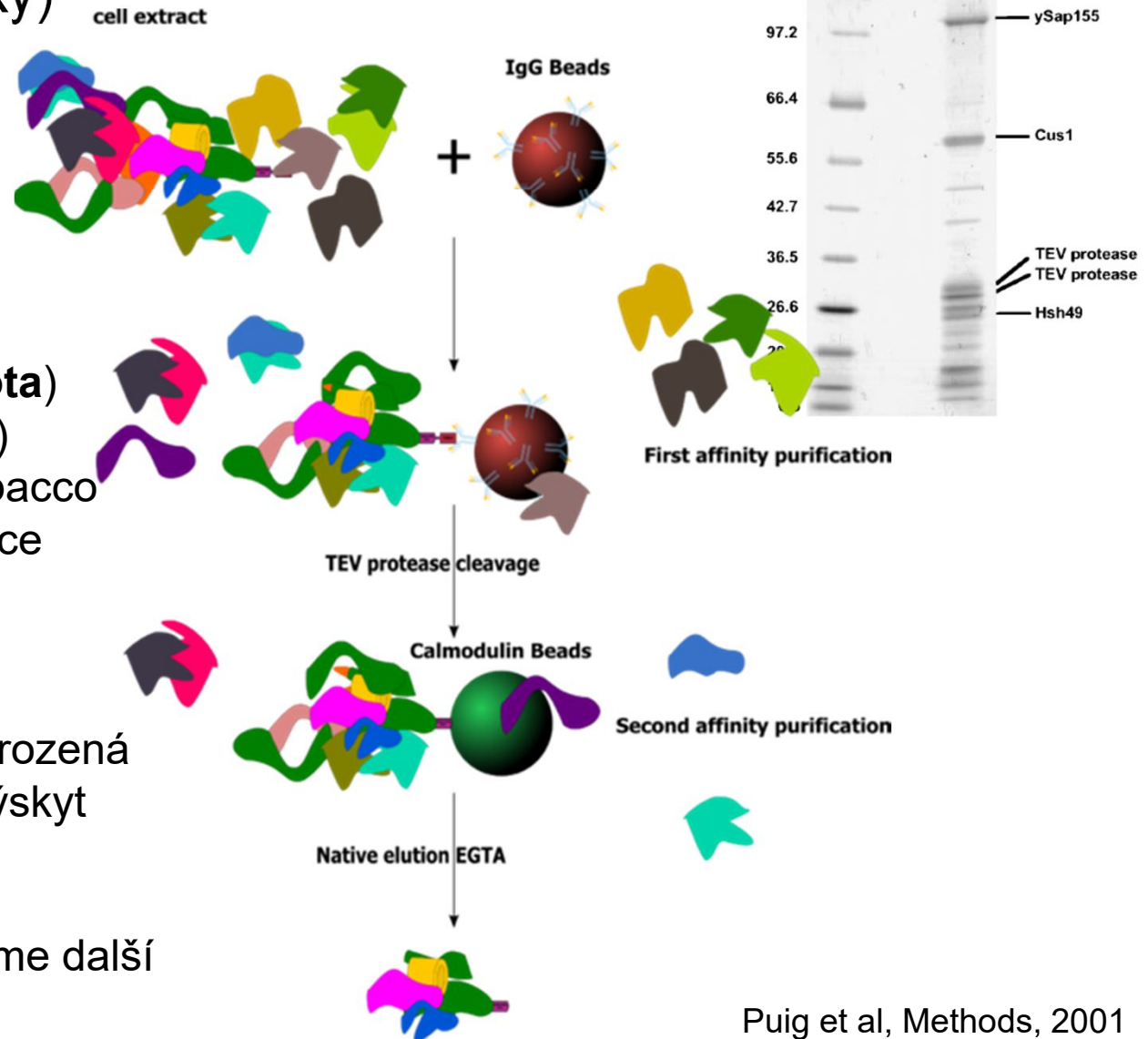
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

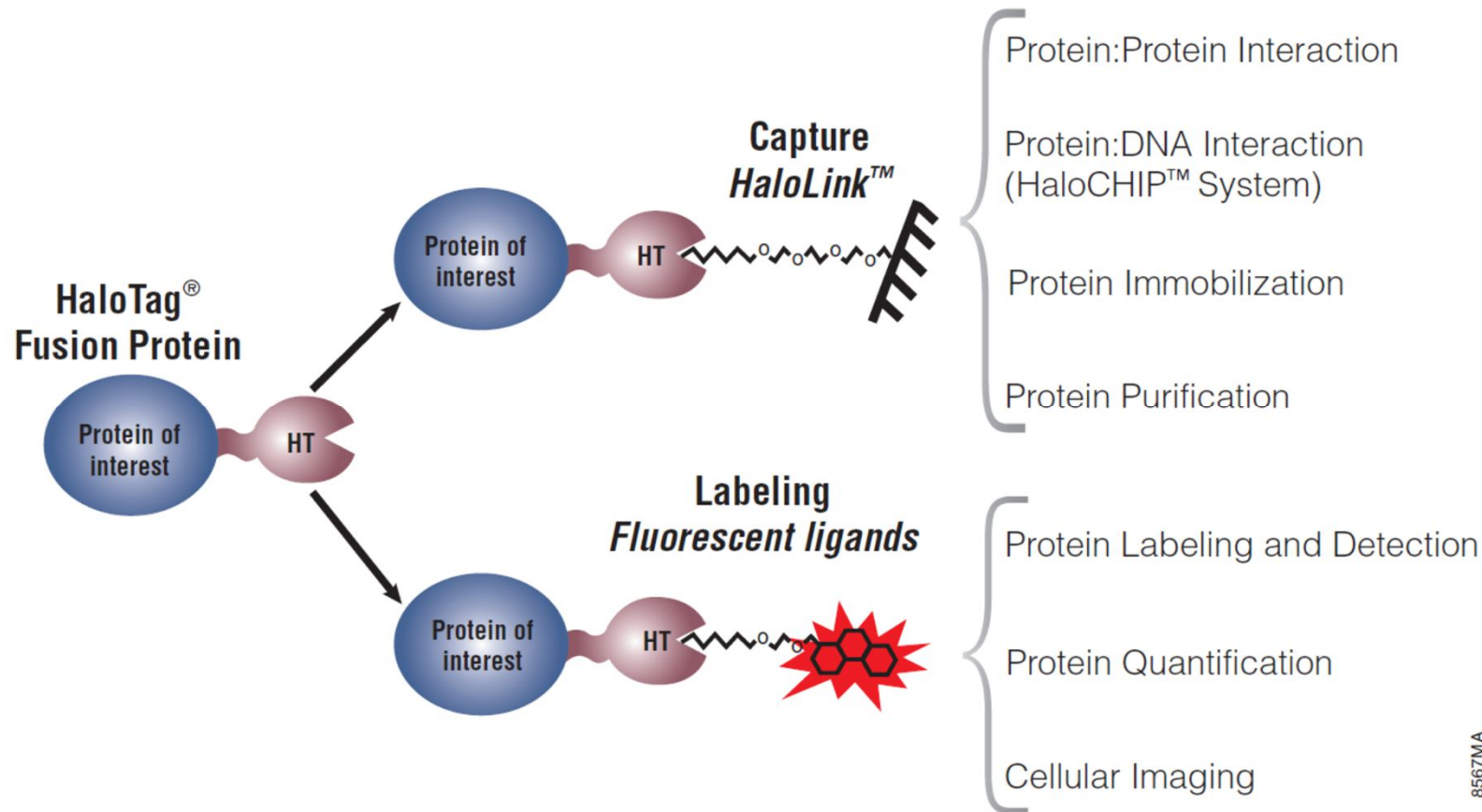
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

Zaintegrované v genomu (přirozená hladina proteinu, přirozený výskyt partnerů/komplexu ...)

známe jeden protein – hledáme další podjednotky



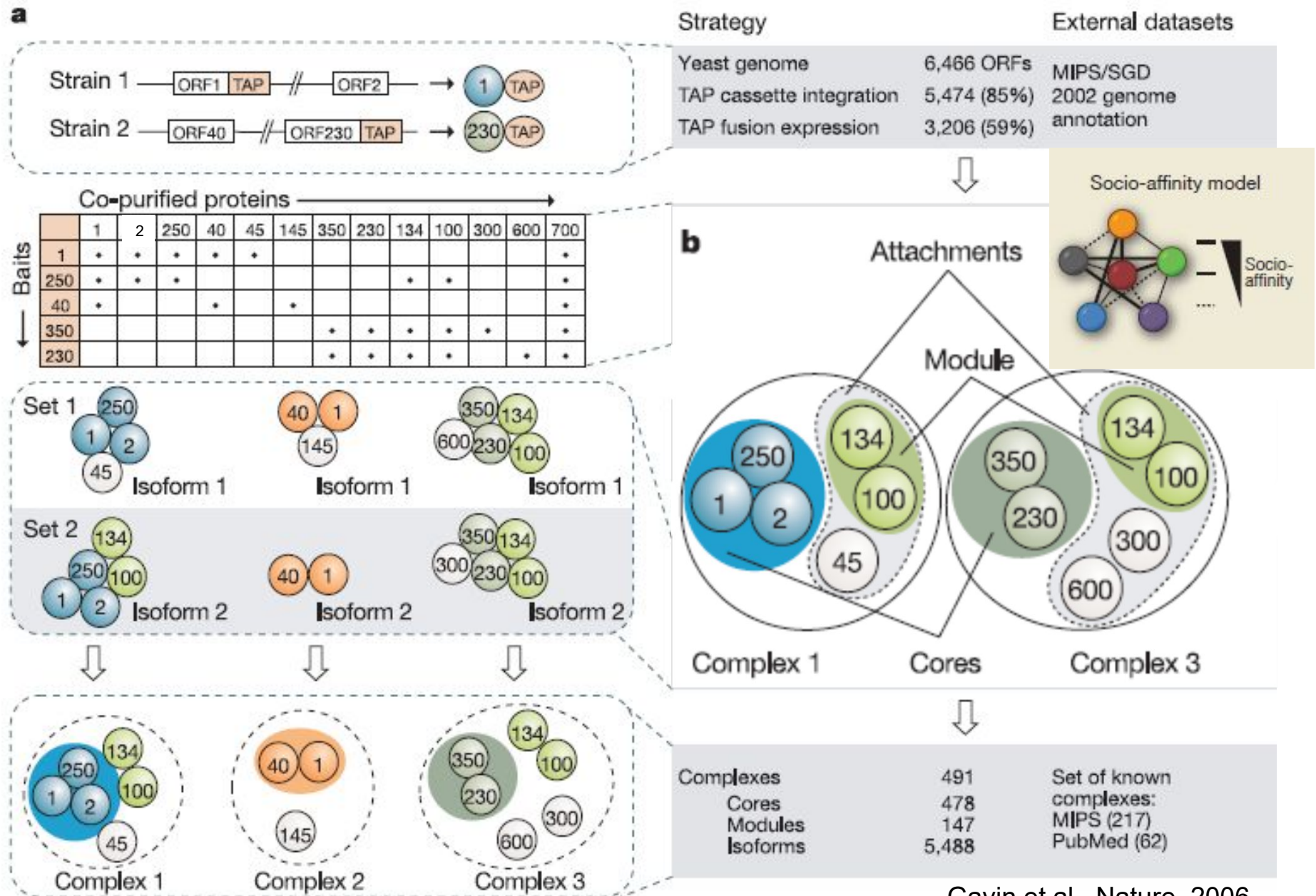
Metody izolace a analýzy PKxů



Velmi vhodný HALO tag pro izolaci komplexů: kovalentně vázaný ligand (silnější vazba, více oplachů)

Uvolnit lze pouze proteolytickým štěpením (nevýhoda) – vs štěpení specificky uvolní pouze komplex z matrice (nespecificky navázané proteiny zůstanou na matrici)

Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



Různé přístupy charakterizace komplexů

klasický

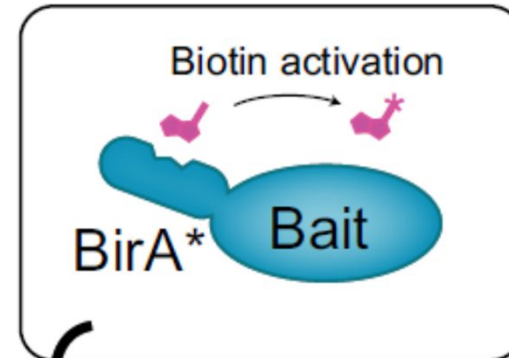
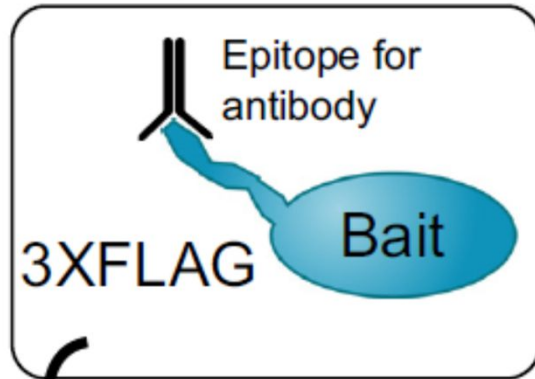
alternativní

Affinity Purification

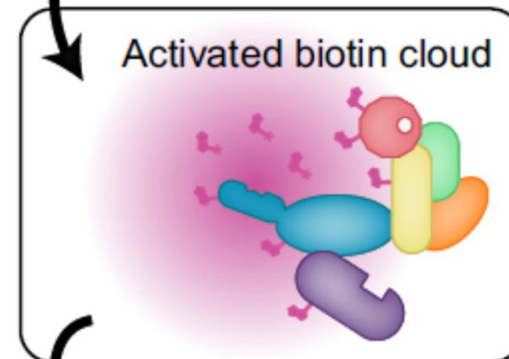
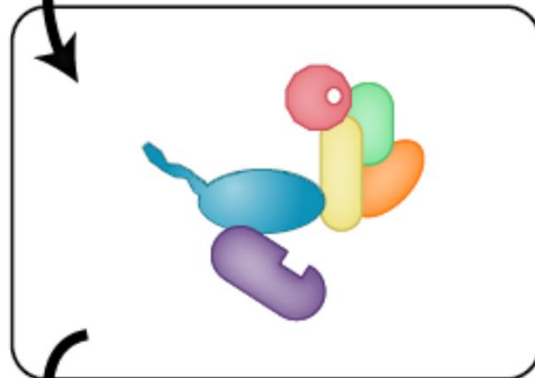
BioID

(Proximity Biotinylation)

Tagging system

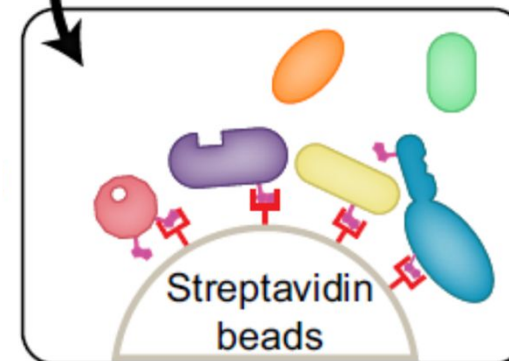
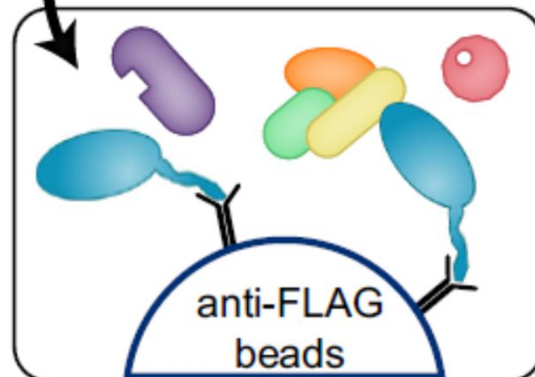


in vivo function



Biotinylace na vzdálenost <20nm

Purified interaction partners



MS identifikace biotinylovaných proteinů

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



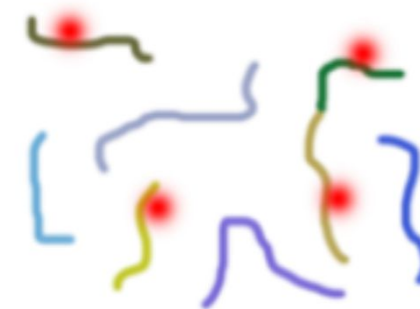
BirA biotin ligáza (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells

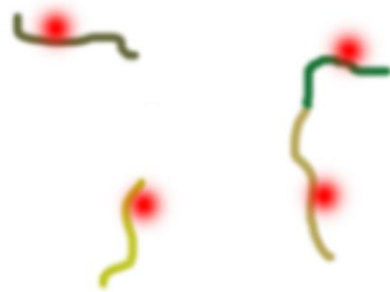


Lyse cells

Denature proteins



Biotin affinity purification



Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

Mass spectrometry to identify candidates

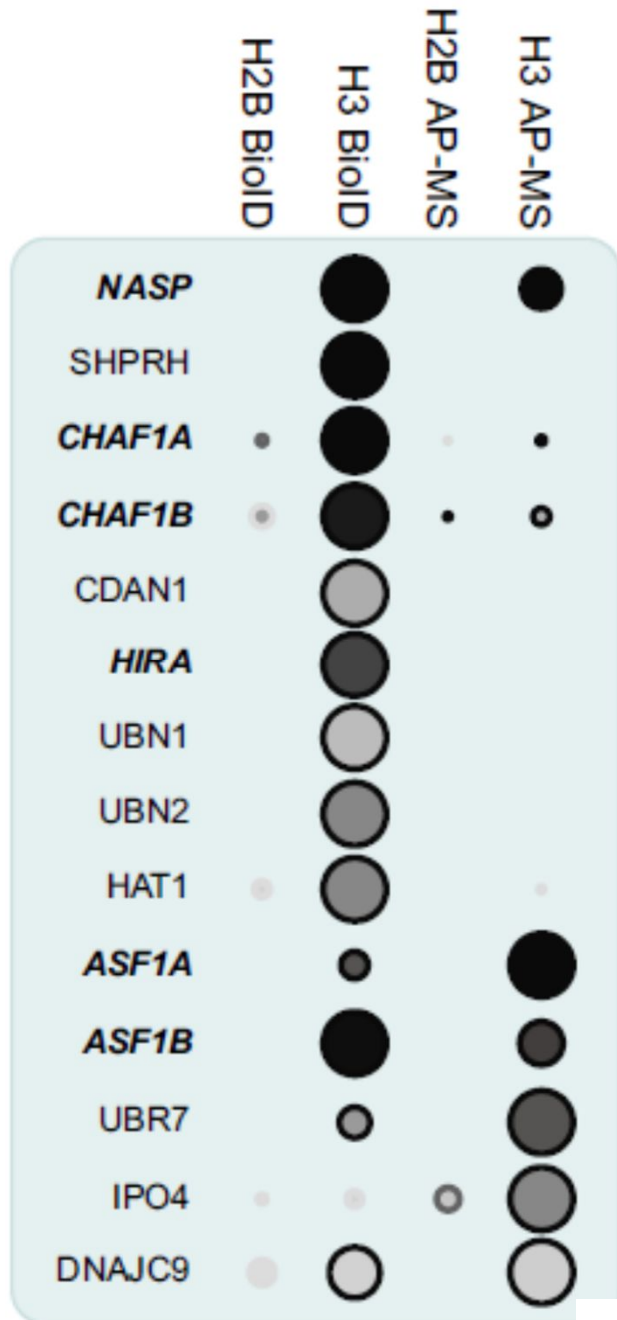
Přidání biotinu v určitém čase (rychlé připojení) – pulse-chase – lze sledovat interakce v čase (např. buněčný cyklus)

Např. chromatin-asociované komplexy jsou hůř rozpustné – izolace za denaturačních podmínek

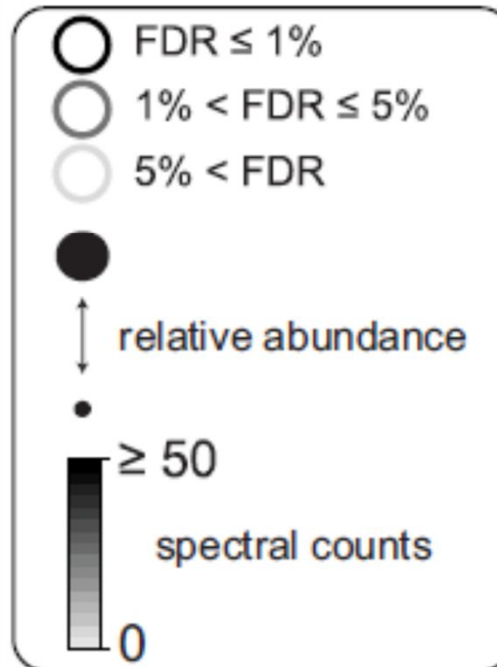
Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „sousedící“ proteiny <20nm))

Metoda BioID

PPI v čase



Histon chaperony
(25.4.2019)



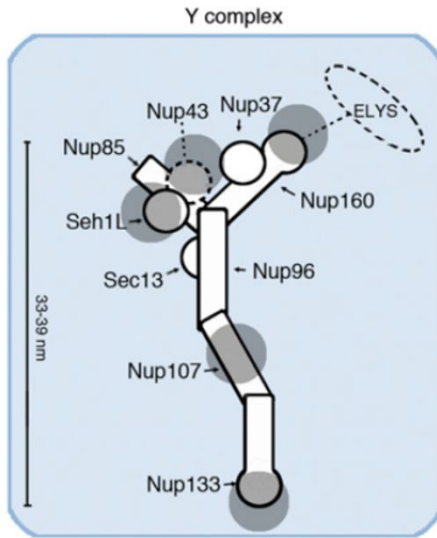
Přidání biotinu v určitém čase (rychlé připojení) – pulse-chase – lze sledovat interakce v čase (např. buněčný cyklus)

Např. chromatin-asociované komplexy jsou hůř rozpustné – izolace za denaturačních podmínek

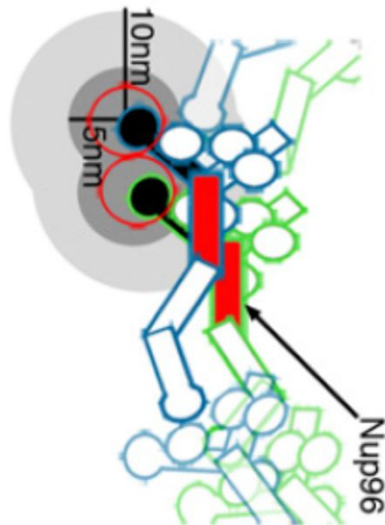
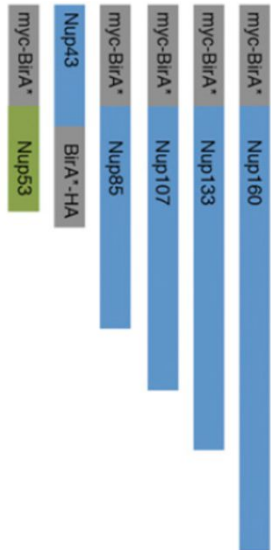
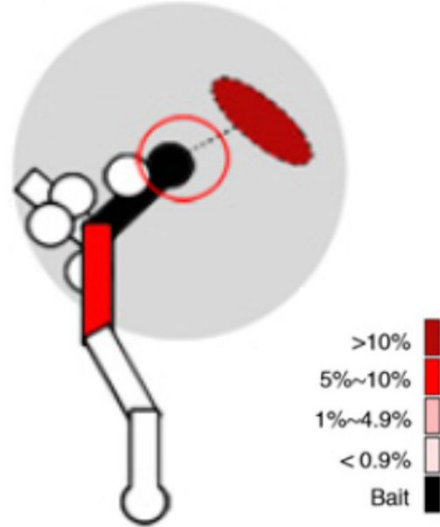
Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „sousedící“ proteiny <20nm))

Metoda BioID – organizace komplexů

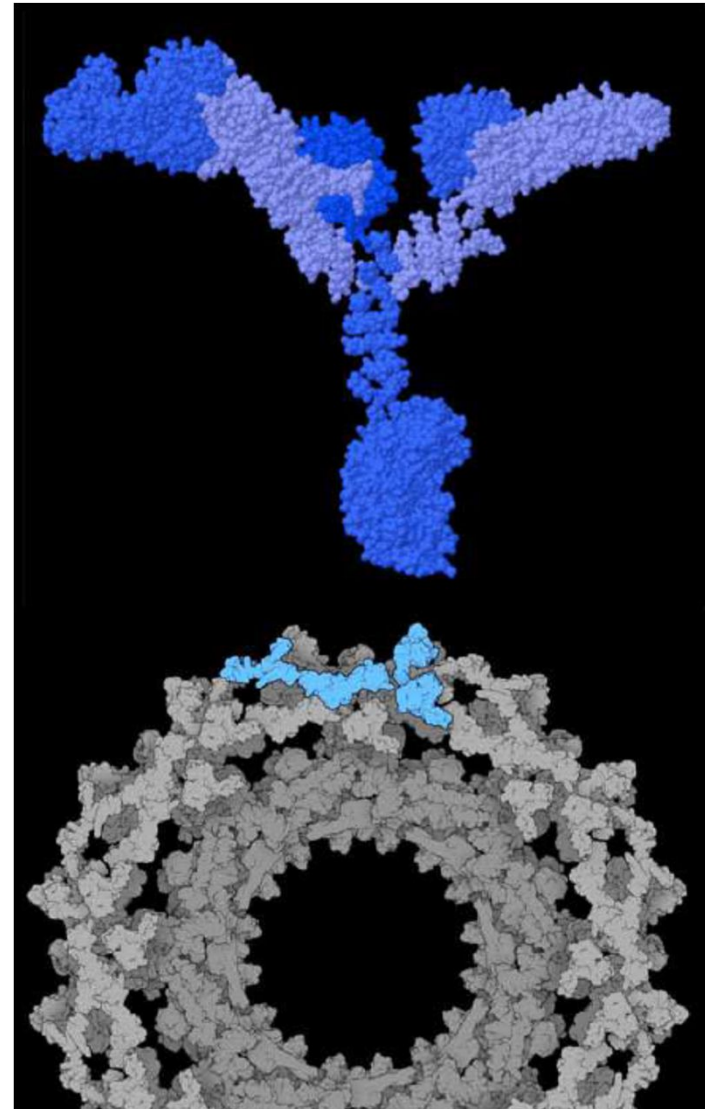
Dosah biotinylace je 10-20nm – lze využít k mapování „blízkých“ proteinových sousedů ve velkých komplexech



Nup160

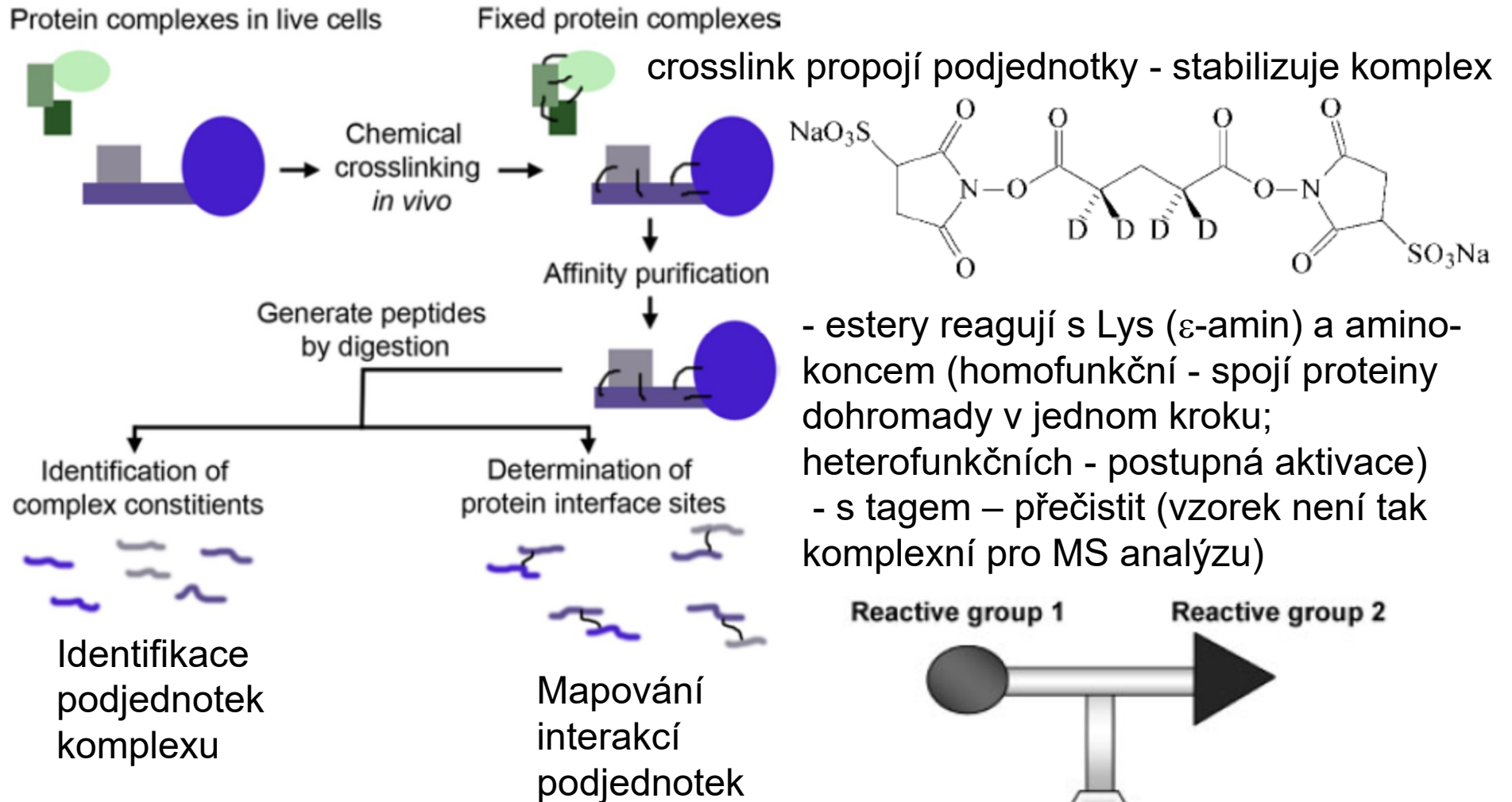


Nup160





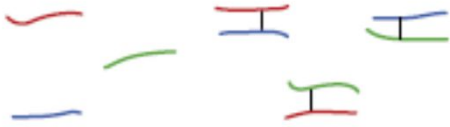



Mapování komplexů - crosslinking

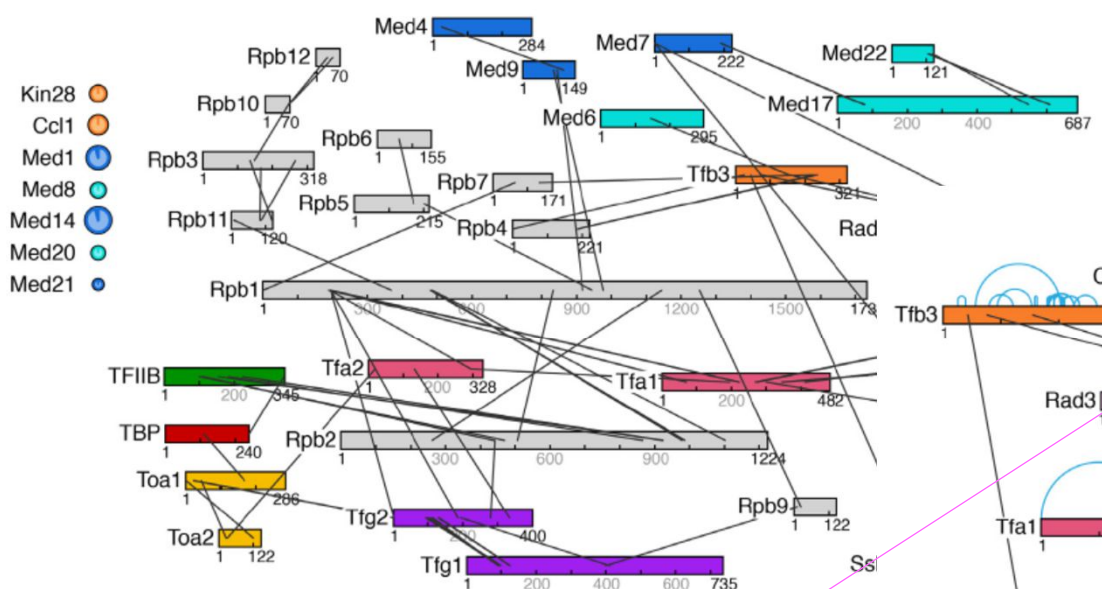
Po crosslinku komplexu lze provádět purifikaci za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu – např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovně)



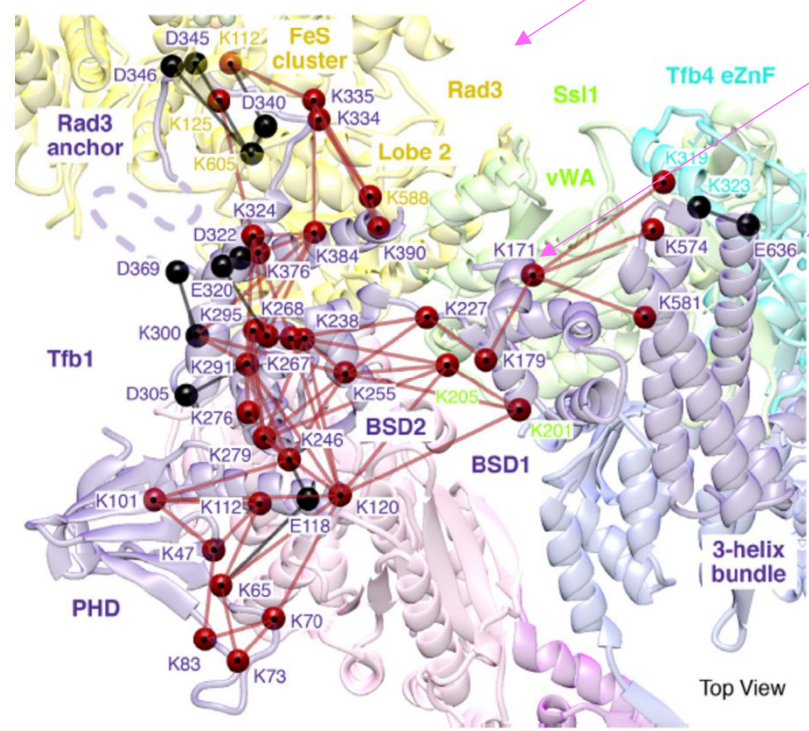
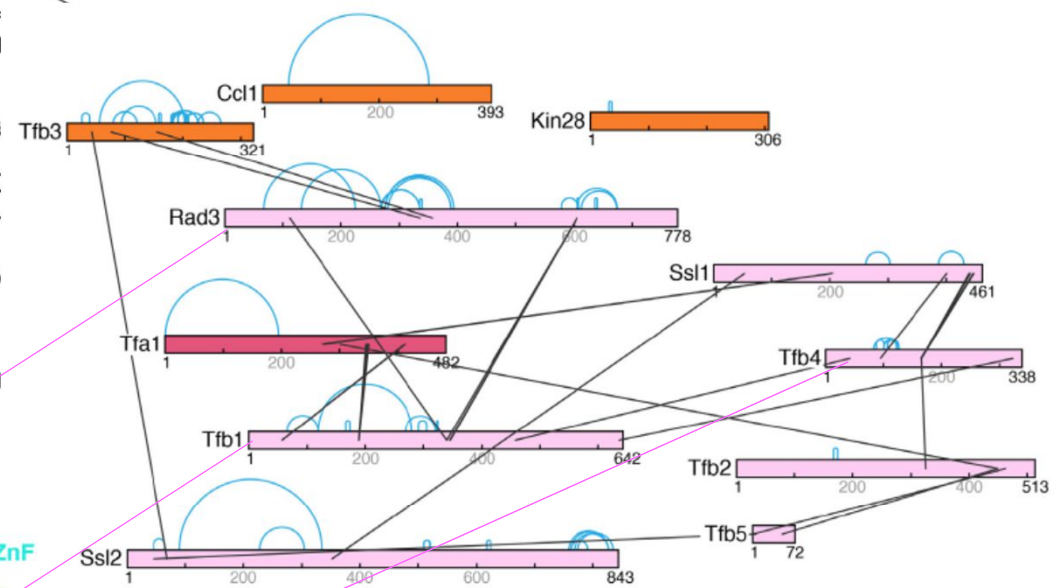
- estery reagují s Lys (ϵ -amin) a aminokoncem (homofunkční - spojí proteiny dohromady v jednom kroku; heterofunkčních - postupná aktivace)
- s tagem – přečistit (vzorek není tak komplexní pro MS analýzu)

An Overview of the Crosslinking Mass Spectrometry (XL-MS) Workflow

Sample type		Complexes with up to 100 subunits Pull-downs, <i>in vivo</i> applications
Crosslinking reaction		Complementary chemistry targeting acidic residues Affinity-tagged and cleavable reagents
Fractionation, enrichment		Increased use of size exclusion, ion exchange, and affinity chromatography to enrich crosslinked peptides
MS acquisition		Faster and more sensitive spectrometers
Data analysis		New software for differential quantification Calculation of false discovery rate
Visualization, modeling		Dedicated software for sequence graphs Structural mapping and filtering software

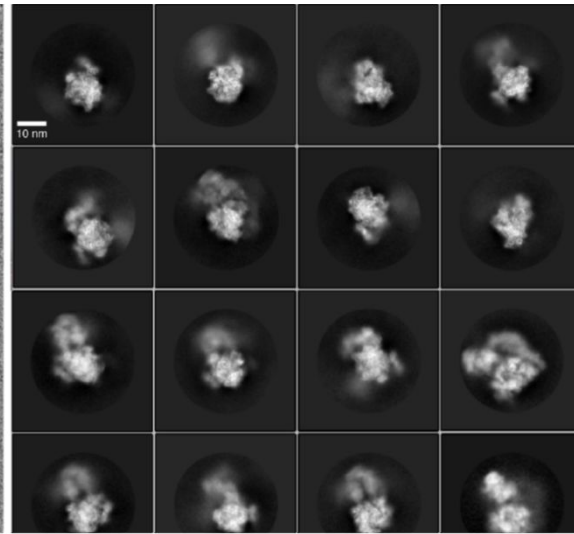
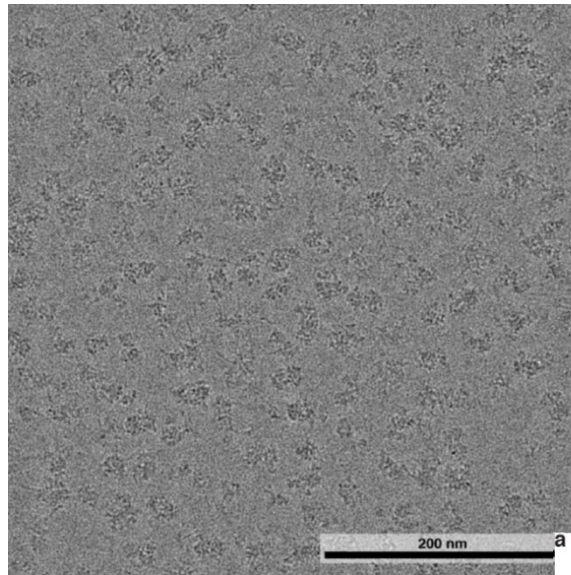


crosslink uvnitř a mezi proteiny



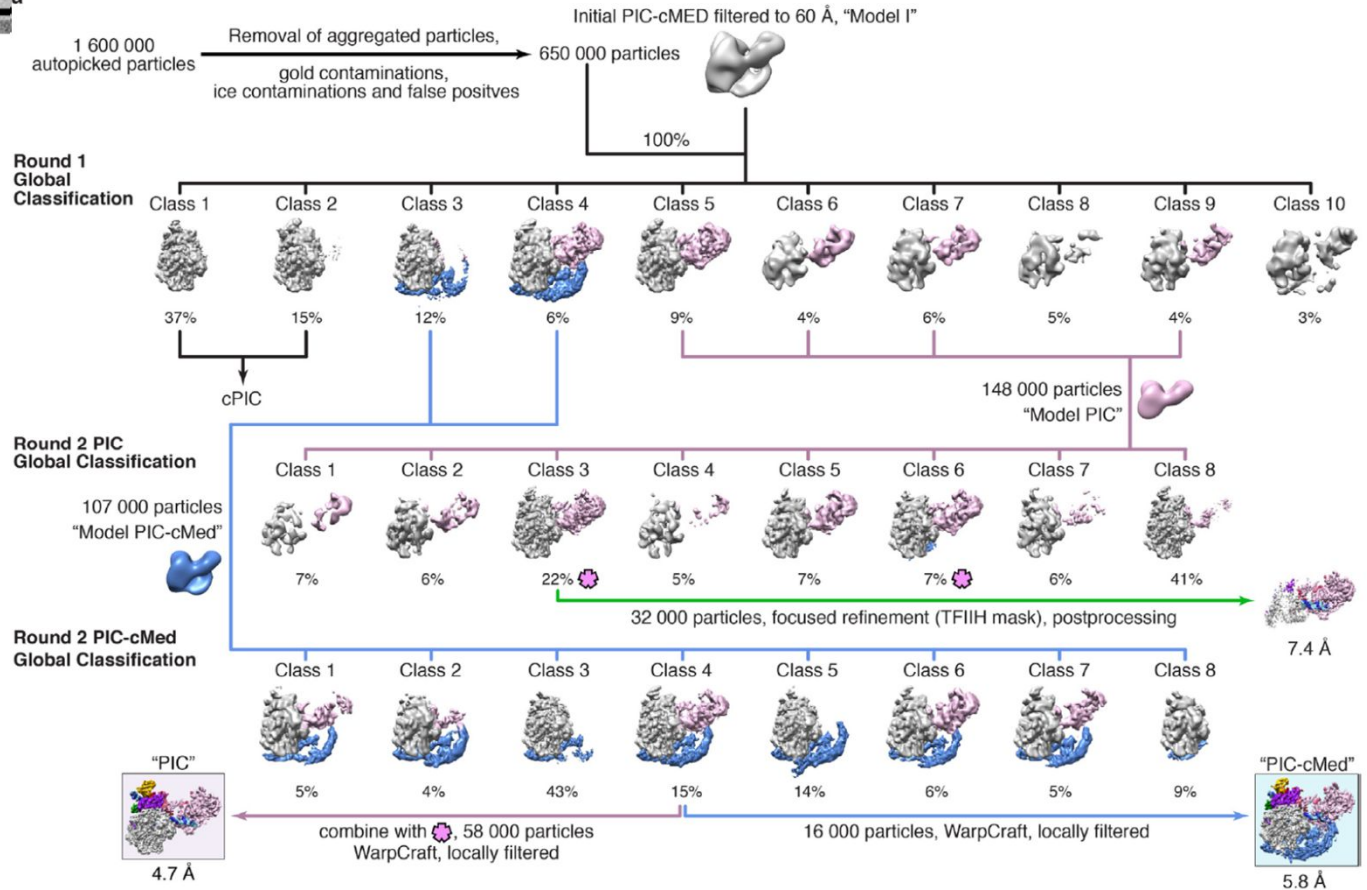
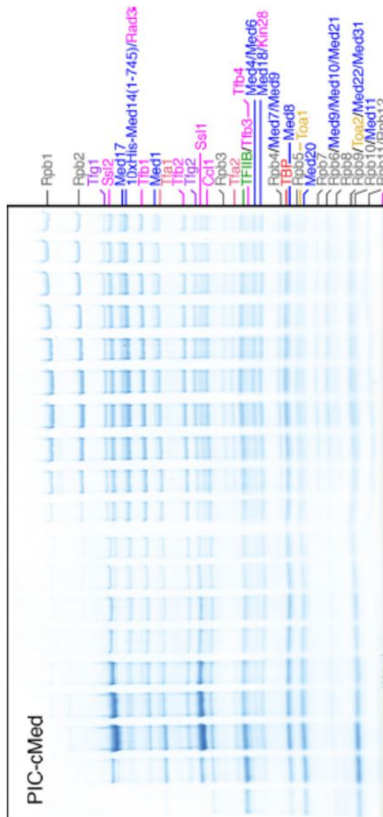
- crosslink data podpoří/doplní strukturní informace z krystalografie nebo kryoEM

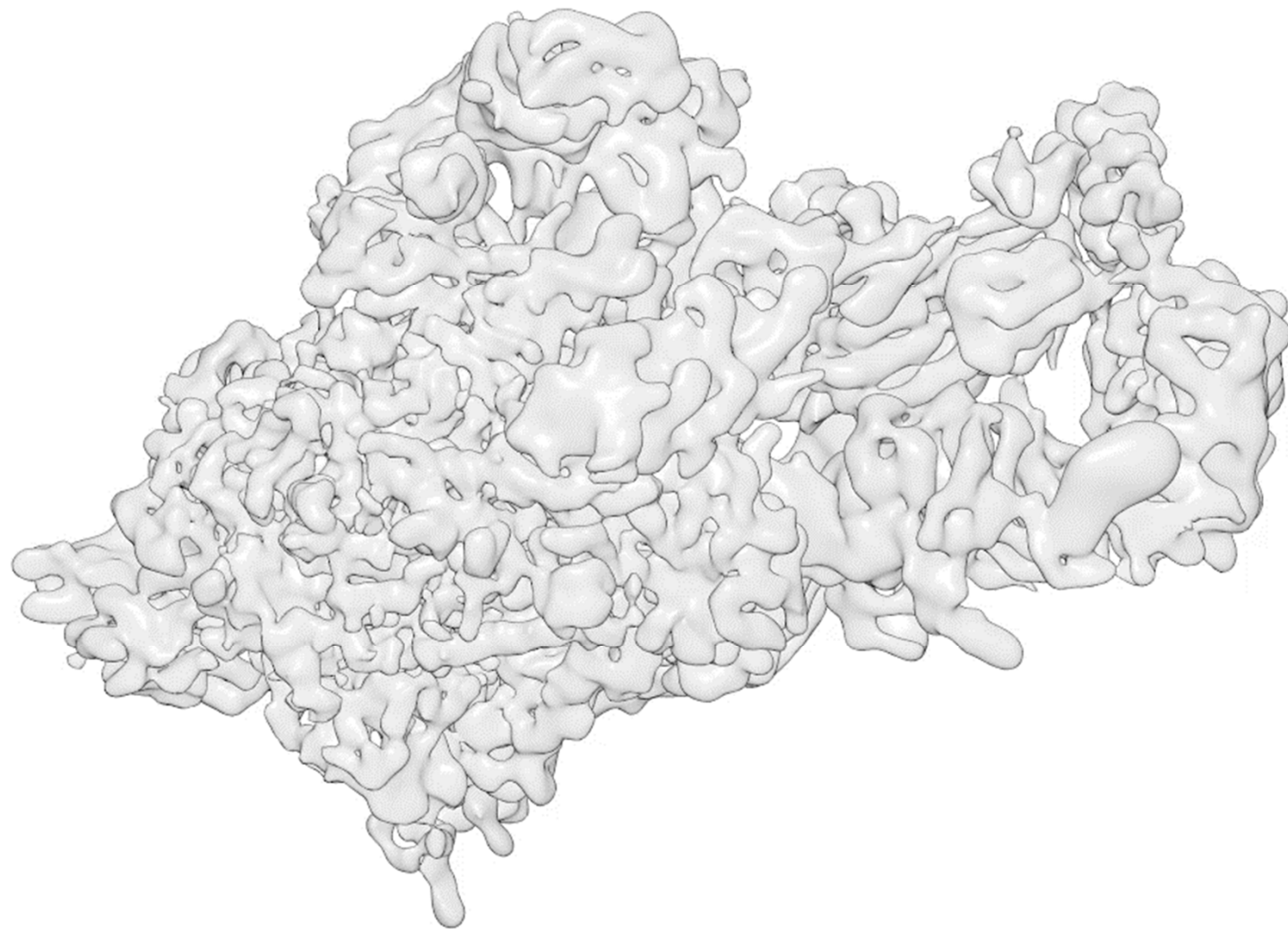
analýza PIC-MED komplexu (~50 podjednotek - ~2MDa)



analýza PIC-MED komplexu
(~50 podjednotek - ~2MDa)

- způsob sběru dat, klasifikace
a rekonstrukce struktury
komplexu pomocí kryoEM





Schilbach et al, Nature, 2017

■ cMed, middle module
■ cMed, head module

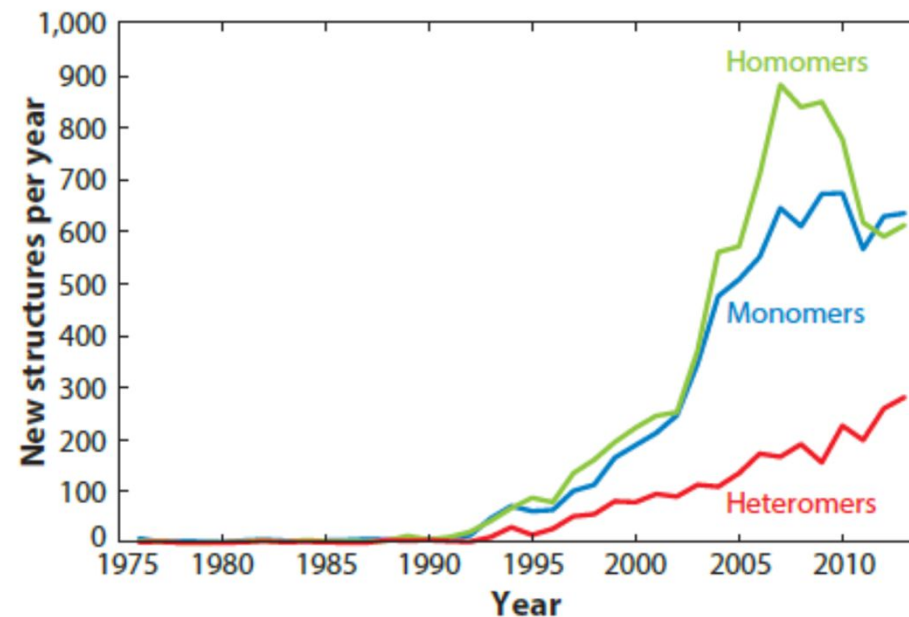
■ TFIIA	■ TFII E	■ TBP
■ TFIIB	■ TFIIF	■ Pol II

_____ cPIC

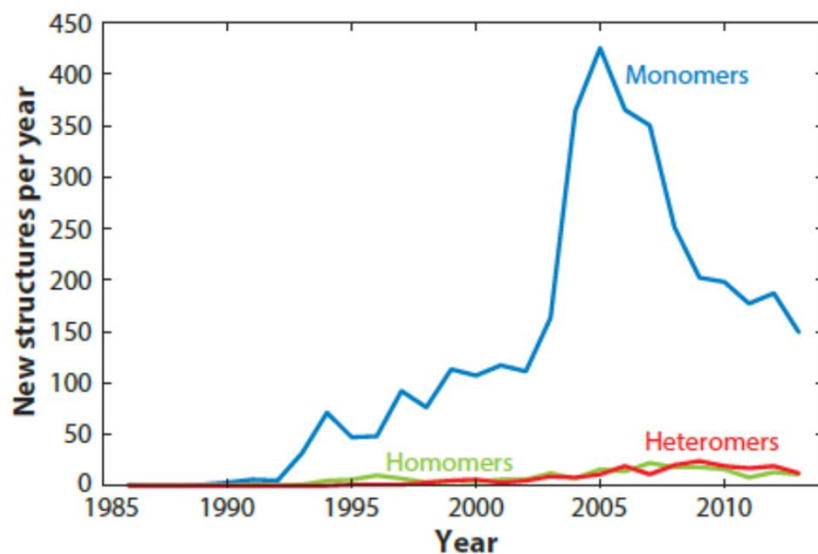
Použití metod **strukturní biologie** pro studium proteinových komplexů

- krystalografie – nejvhodnější (boom v minulé dekádě díky sekvenačním projektům)
- NMR je limitována velikostí
- cryoEM je vhodná pro velké komplexy (boom v současnosti)

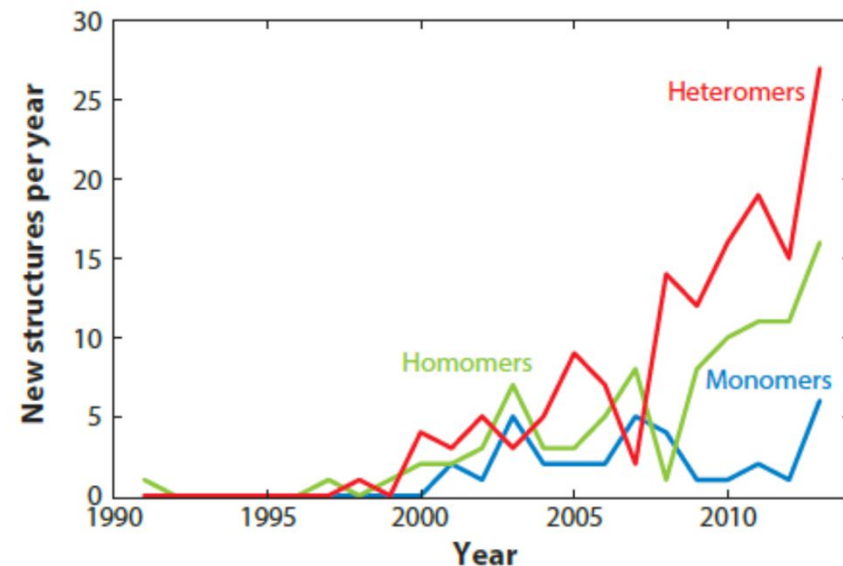
a X-ray crystallography



b NMR



c Electron microscopy



AFM atomic force microscopy

Contact mode



Non-contact



Tapping mode / intermittent contact



Lateral force



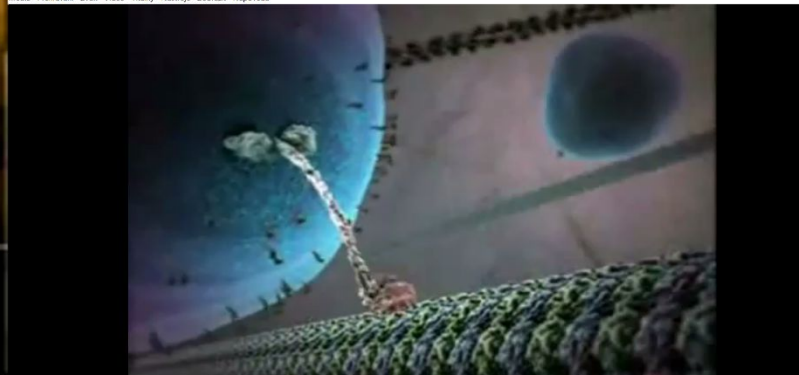
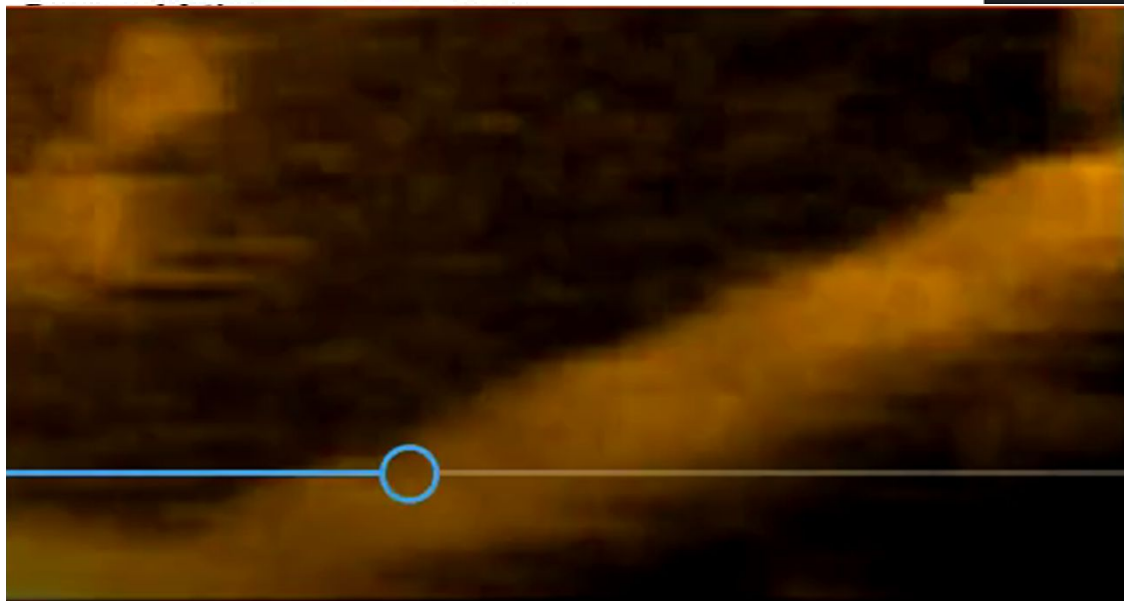
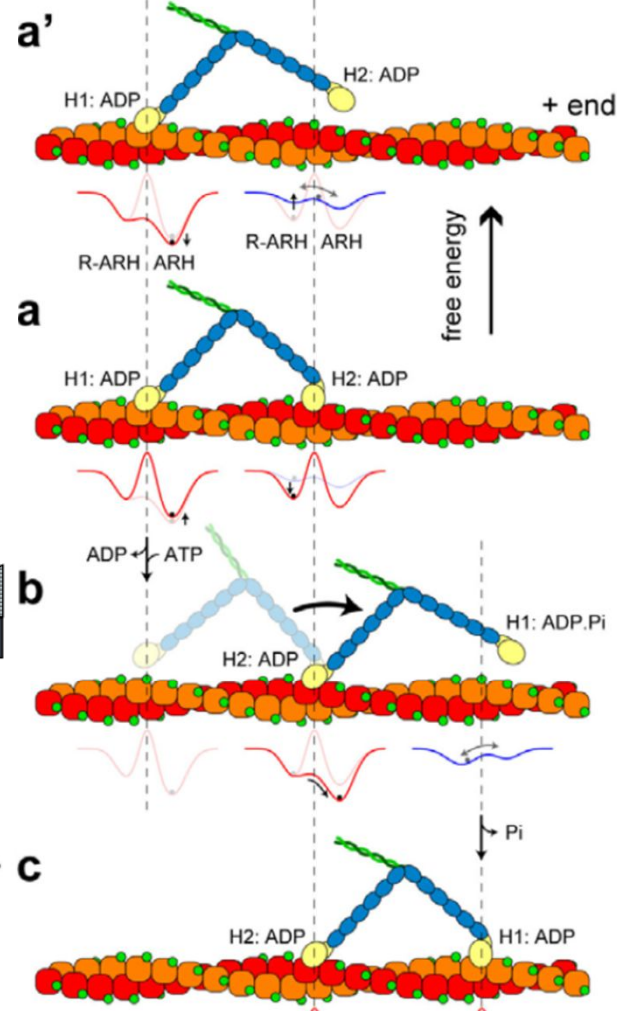
Detector and Feedback Electronics

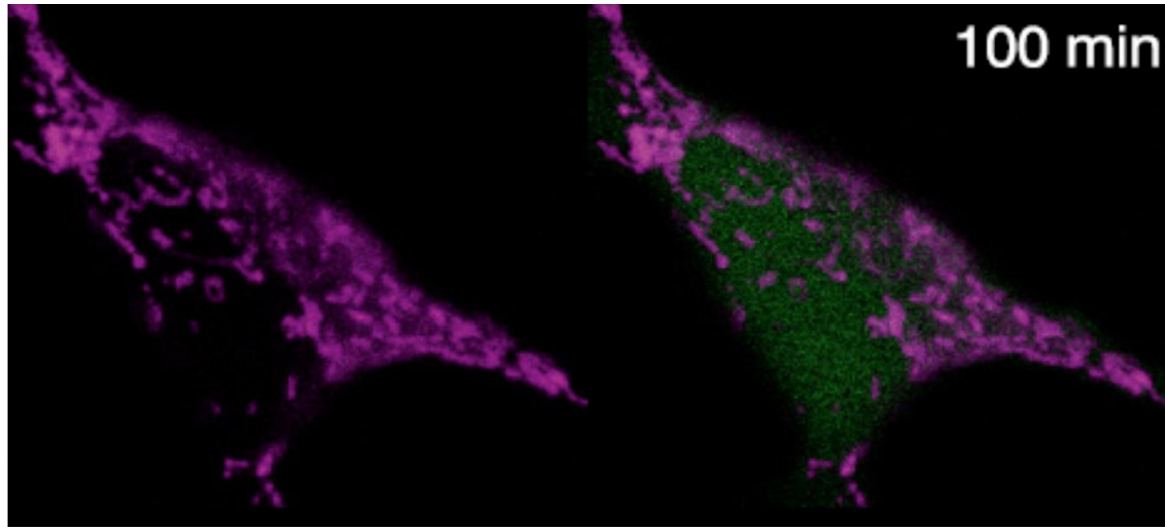
Photodiodes

Laser

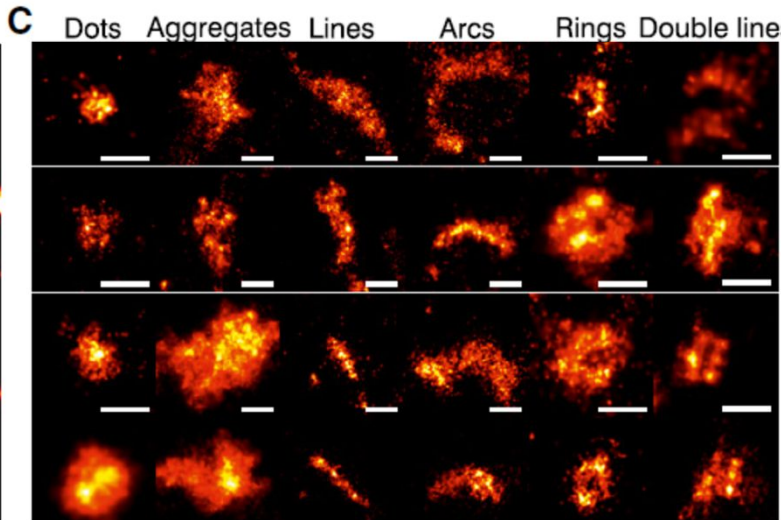
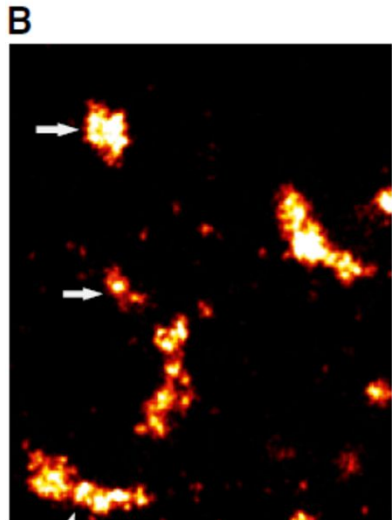
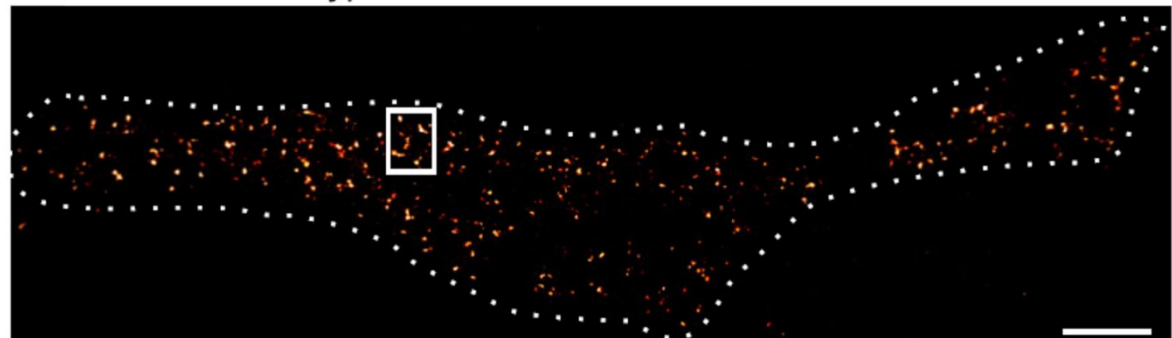
Cantilever & Tip
Sample Surface

Uchihashi et al, Nat Prot, 2012





A GFP-Bax wild type

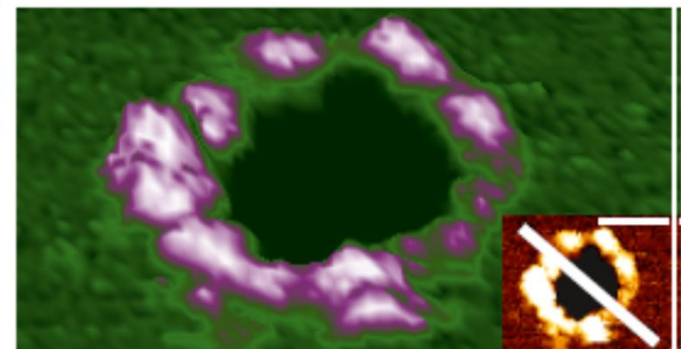


Lokalizace proteinových komplexů

Konfokální mikroskopie vs super-resolution mikroskopie (STED=stimulated emission depletion microscopy – rozlišení 60nm)

+ AFM (atomic force microscopy)

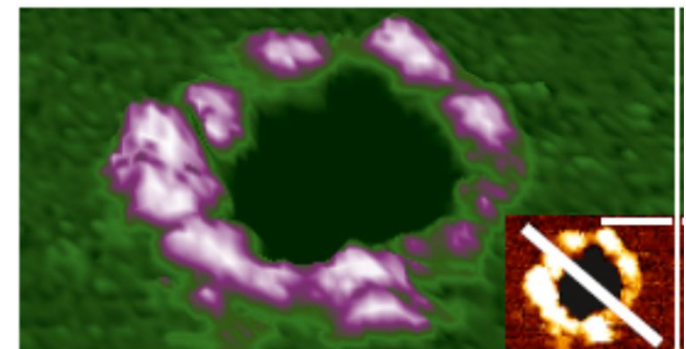
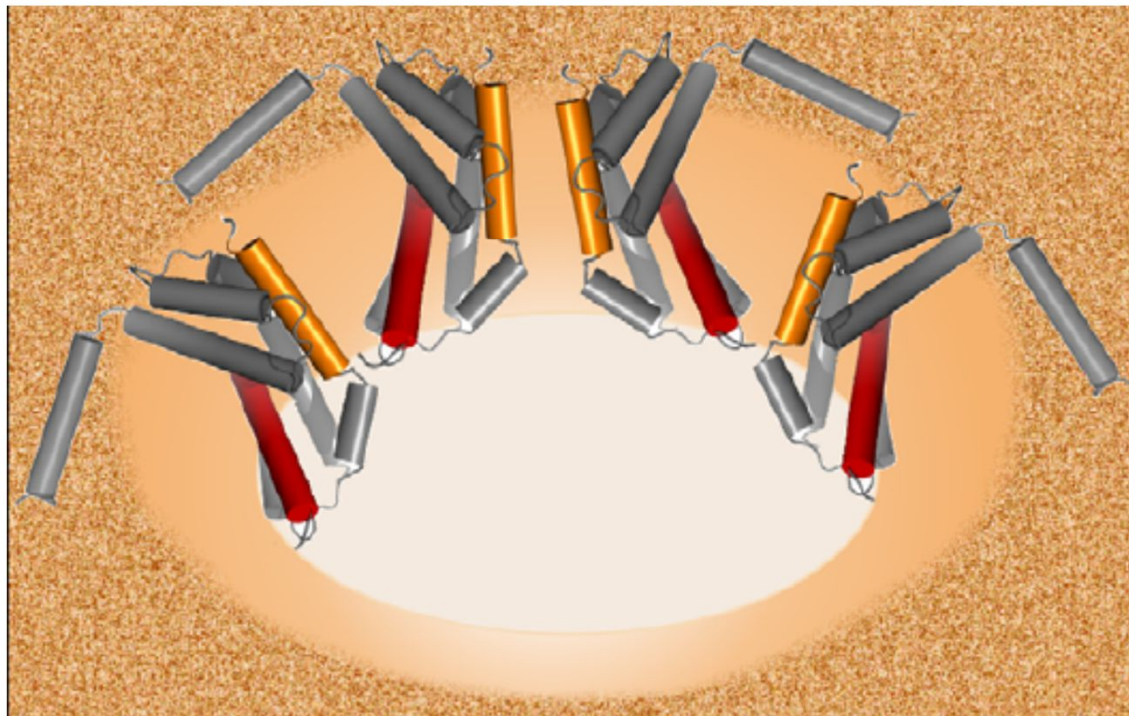
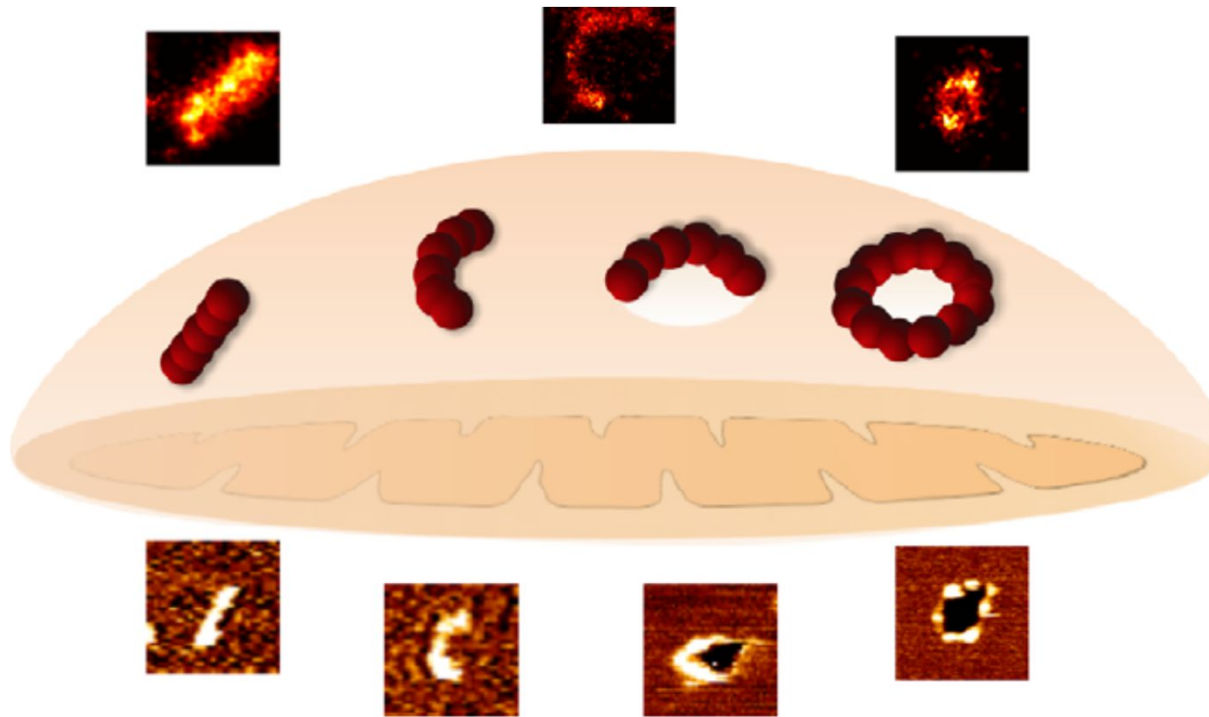
Gallego et al, EMBO J, 2016



Lokalizace proteinových komplexů

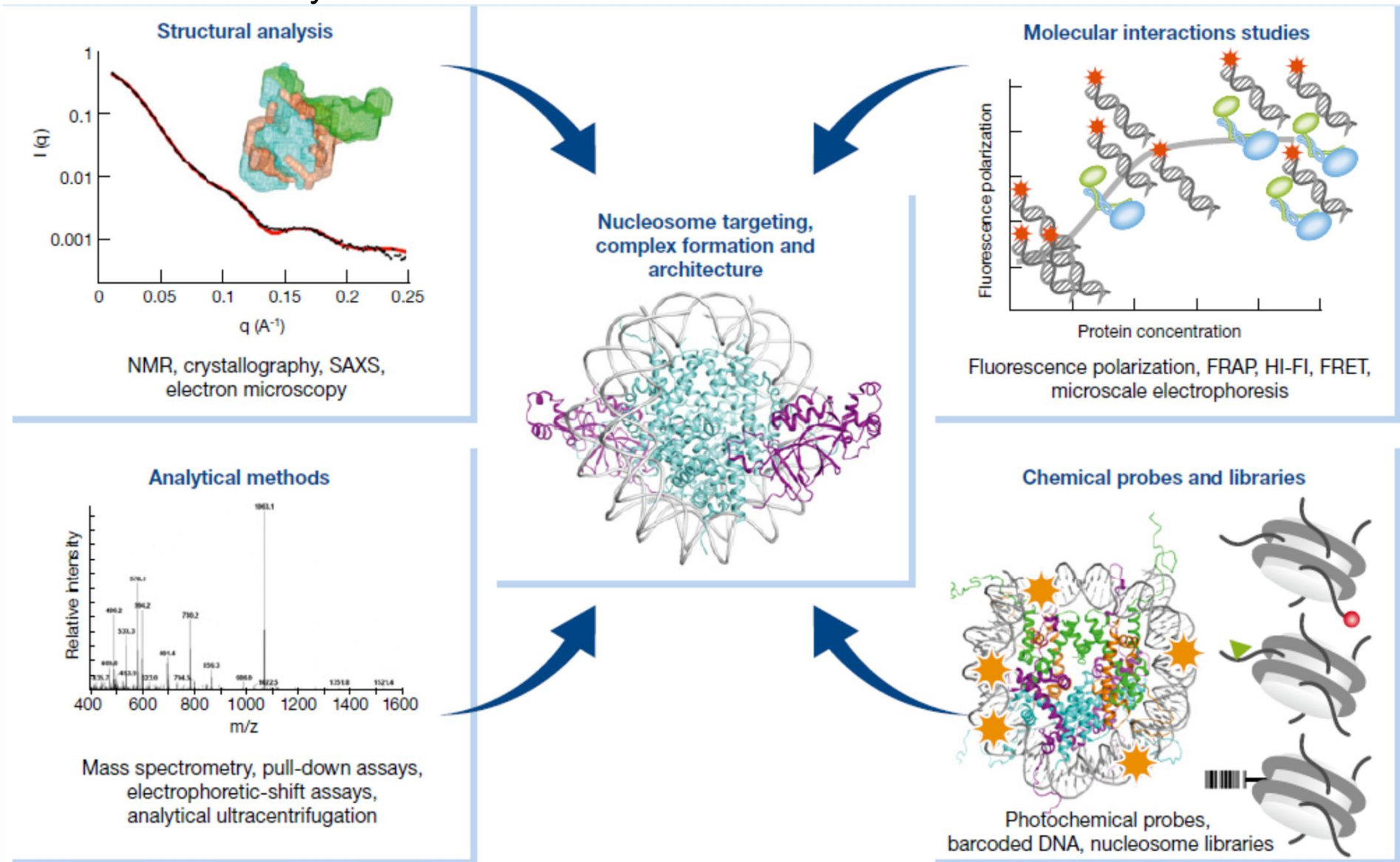
Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptósa)

Gallego et al, EMBO J, 2016



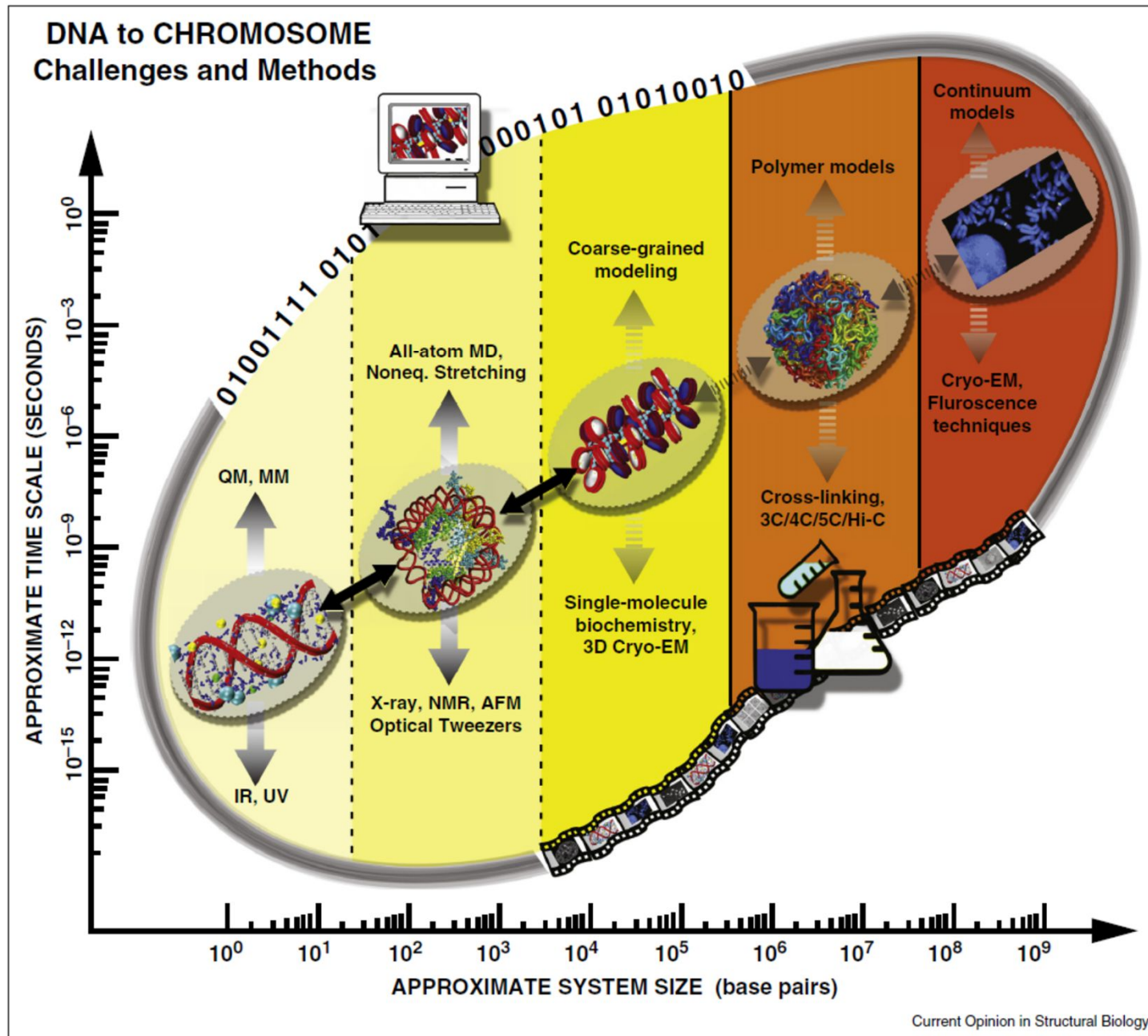
Analyza proteinových komplexů

více Metody GP

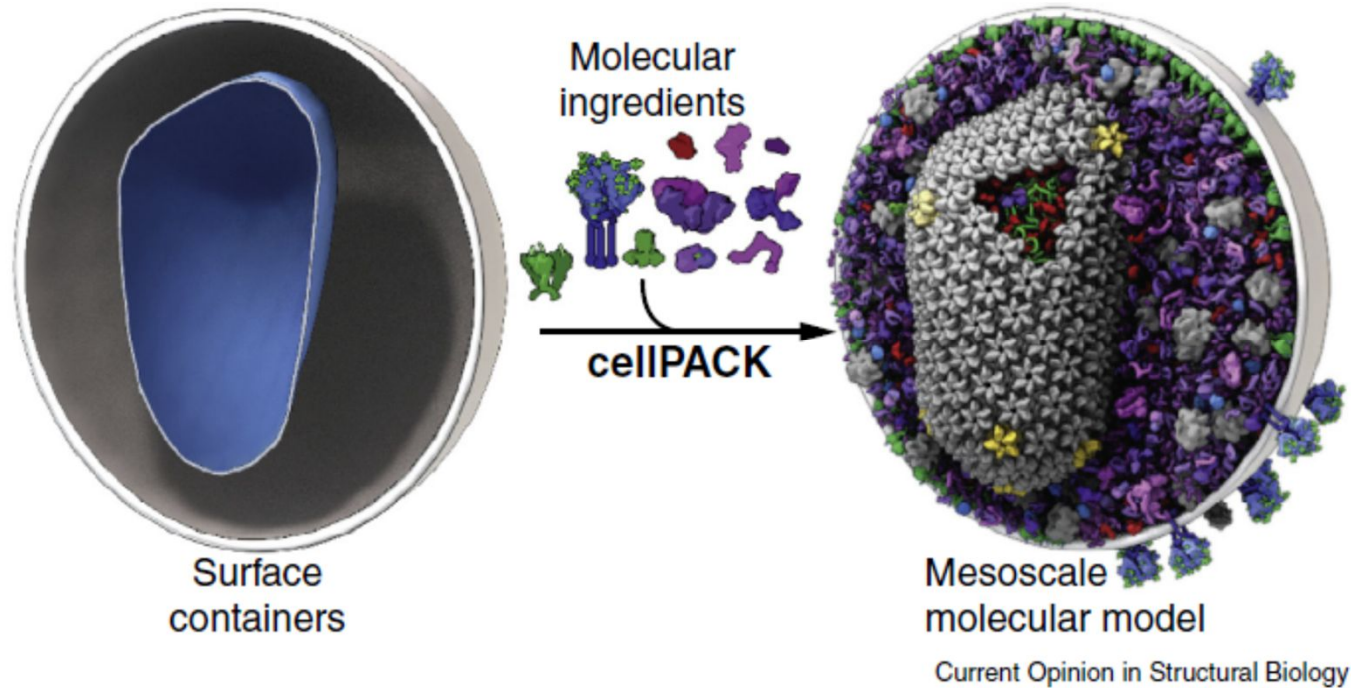


Analyza proteinových komplexů

Ozer et al, CO in SB, 2015



Visualizace proteinových komplexů



Pro lepší představu (virové částice) se integrují ... (nakopírované) struktury, data z molekulární dynamiky (simulací), koordináty pohybu „objektu“ ve světelném mikroskopu ... animovat i buněčný kontext – namíchat v „reálných“ poměrech do „organel“ a na „membrány“ – CellPack ...

Lze použít k testování modelů ...

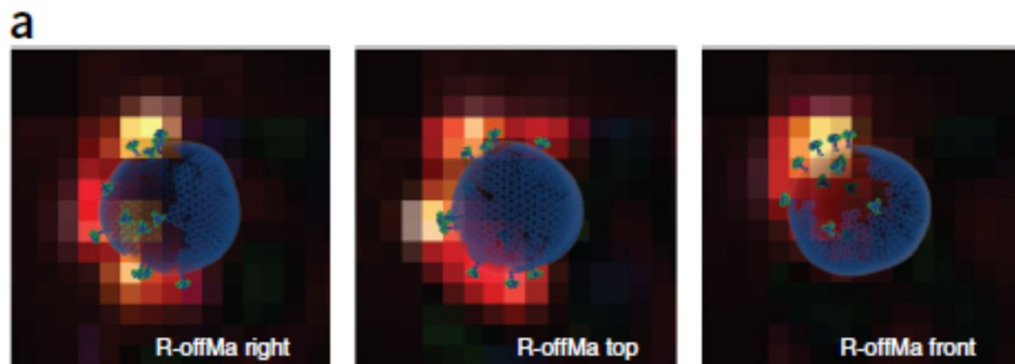
Existuje mnoho nástrojů na vizualizaci komplexů (i v buněčném prostředí)

od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur

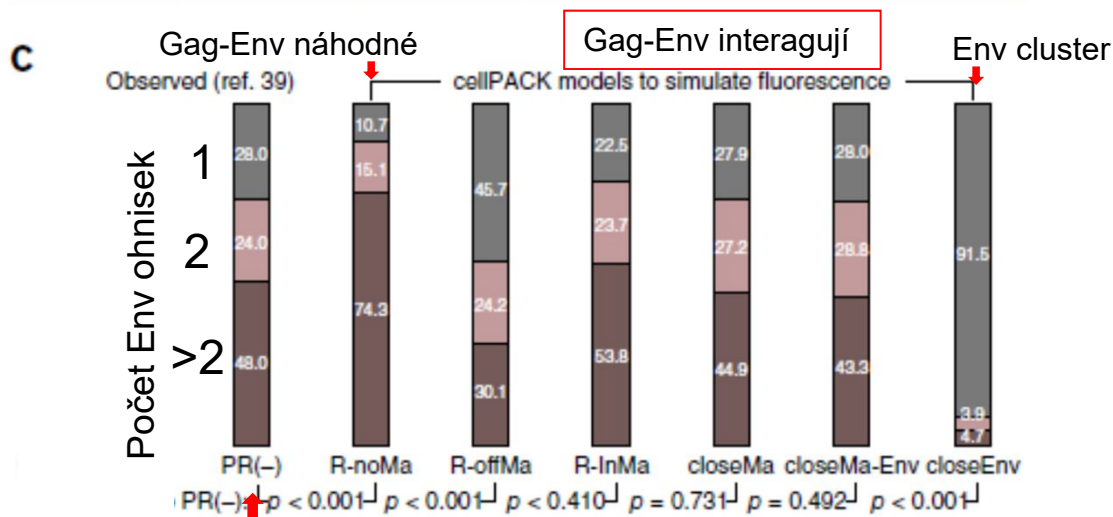
... až po **CellPACK** pro interaktivní náhled do buňky a jejích procesů

... vychází z herních a animačních algoritmu ...

Visualizace proteinových komplexů - CellPACK

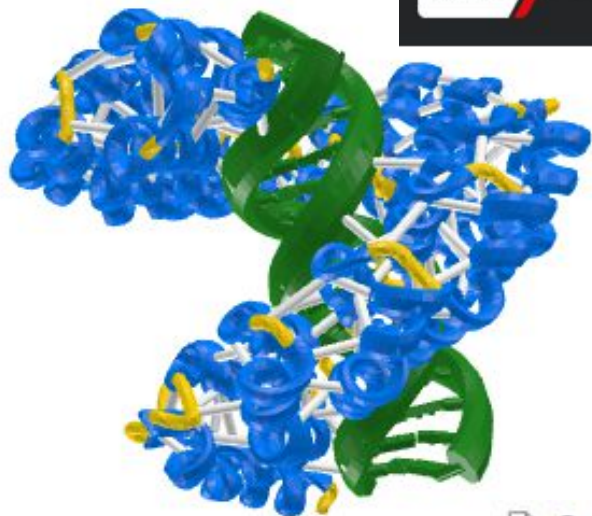
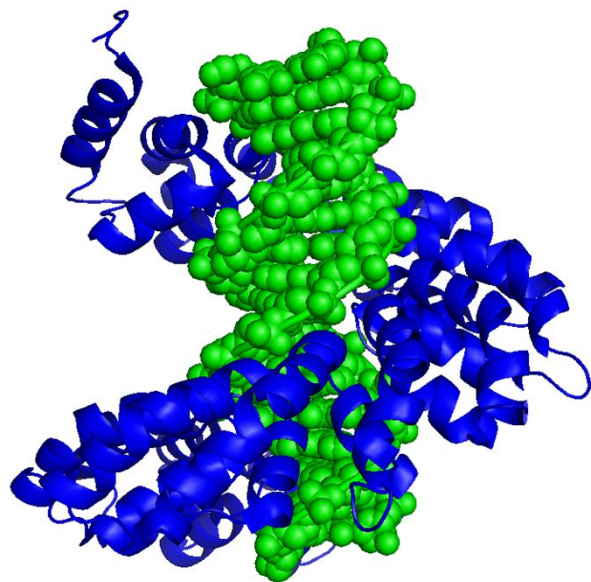



CellPACK poskytuje vzhled do buněčných procesů – použit na simulaci distribuce proteinů virové částice (např. R-noMa: random-bez interakcí)

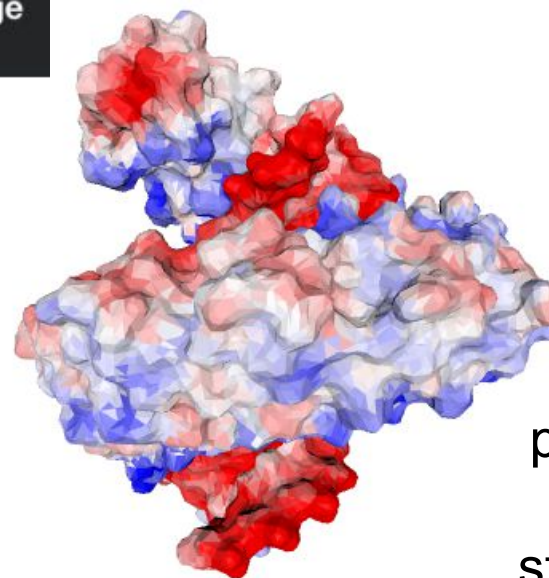


Experimentální výsledek

Visualizace proteinových komplexů



 3dprint.nih.gov/



Existuje mnoho nástrojů na vizualizaci komplexů

od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur ... **3D tisk**