



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# CG030 – Struktura (architektura) a funkce proteinových komplexů



doc. Jan Paleček  
[jpalecek@sci.muni.cz](mailto:jpalecek@sci.muni.cz)  
(garant)

# Osnova kurzu

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

největší proteinový komplex = chromosom

- DNA-vazebné komplexy
- Komplexy iniciace transkripce
- Komplexy chromatinu
- Evoluce proteinů a komplexů

obecně

chromatin

# Program přednášek 2015

19.2.2014	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, analýza komplexů	o
26.2.2014	10-11.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesár	ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom	b
5.3.2014	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Marek	úvod do strukturní biologie	e
12.3.2015	10-11.50hod	A2-2.11	Dr. Muller	Chaperony	c
19.3.2014	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Marek	signální dráhy, GPCR	n
26.3.2014	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	<u>protein-proteinové interakce, komplexy</u>	<u>e</u>
2.4.2014	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, vazebné motivy	ch
9.4.2014	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy	r
16.4.2014	10-11.50hod	A2-2.11	Dr. Blažek	cyclin/CDK komplexy v buněčném cyklu a transkripci	o
23.4.2014	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesar	Oprava DNA, homologní rekombinace	m
30.4.2014	10-11.50hod	A2-2.11	prof. Lehmann		a
7.5.2014				SMC konference????	t
14.5.2013	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	chromatinové komplexy	i
21.5.2013	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce komplexů	n
28.5.2013	10-11.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Zkouška - test	

- 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
- kdo na čem pracuje (zapsat) – přednášky o komplexech, na kterých pracují studenti – prohloubení znalostí s novým úhlem pohledu

# Zkouška: - test + přednáška

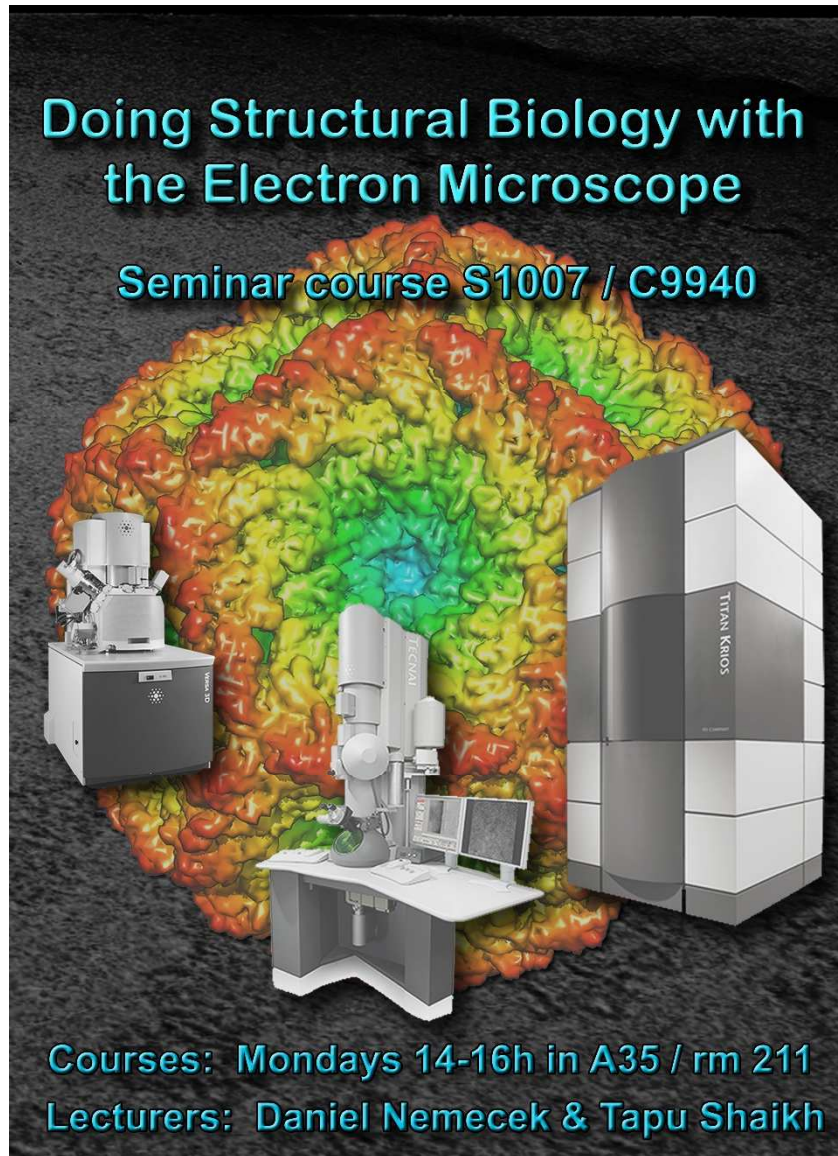
- Úvod - Analýza proteinu
  - Domény
    - fold-struktura (ss, PDB)
    - v PyMolu připravit 3D strukturu
    - Interakce (IntAct)
  - Komplexy
    - Funkce
    - Lokalizace
  - evoluce
- Konkrétní nová data – článek (< 5 let)

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

- doporučení přednášek: Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041), Proteomické metody (CG080)

**Doing Structural Biology with  
the Electron Microscope**

**Seminar course S1007 / C9940**



**Courses: Mondays 14-16h in A35 / rm 211**  
**Lecturers: Daniel Nemecek & Tapu Shaikh**

### Seminar course S1007 / C9940

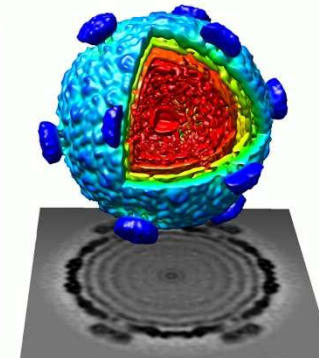
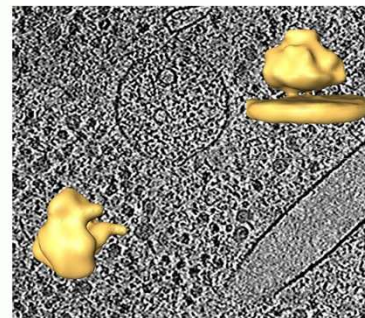
Modern electron microscopy in structural biology on the cellular and molecular level is performed by cryo-electron microscopy (cryo-EM) and cryo-electron tomography (cryo-ET).

Both methodologies provide information on the cellular and molecular level and are therefore ideal for in-depth structural functional analysis in combination with complementary state of the art biochemical characterisation.

Cryo-EM is applied to study larger macromolecular complexes in vitro as whole functional units, which have been isolated and purified by biochemical methods.

Cryo-ET is the only method to address pleiomorphic structures like cells, organelles and complexes in a native state in situ.

The students will gain knowledge and should understand the principles of structural analysis by transmission electron microscopy, its application in chemistry, biochemistry, structural biology, biophysics and materials science.



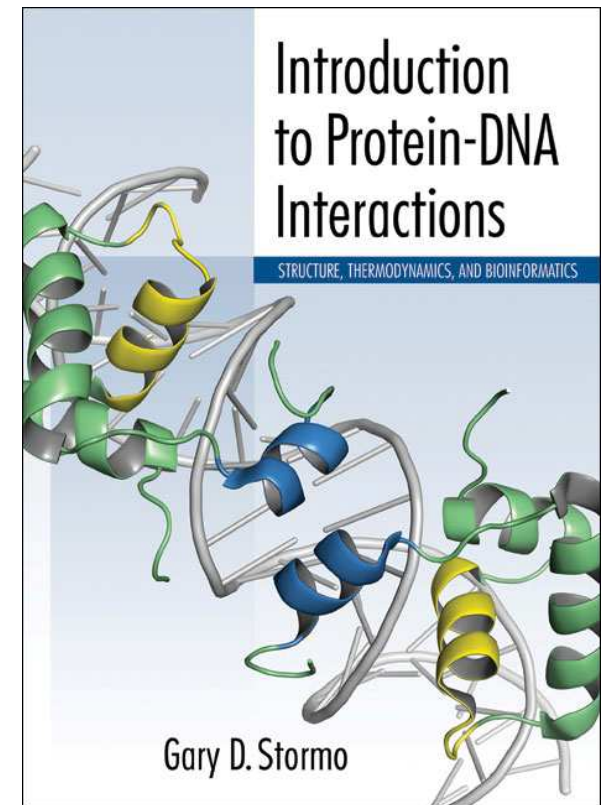
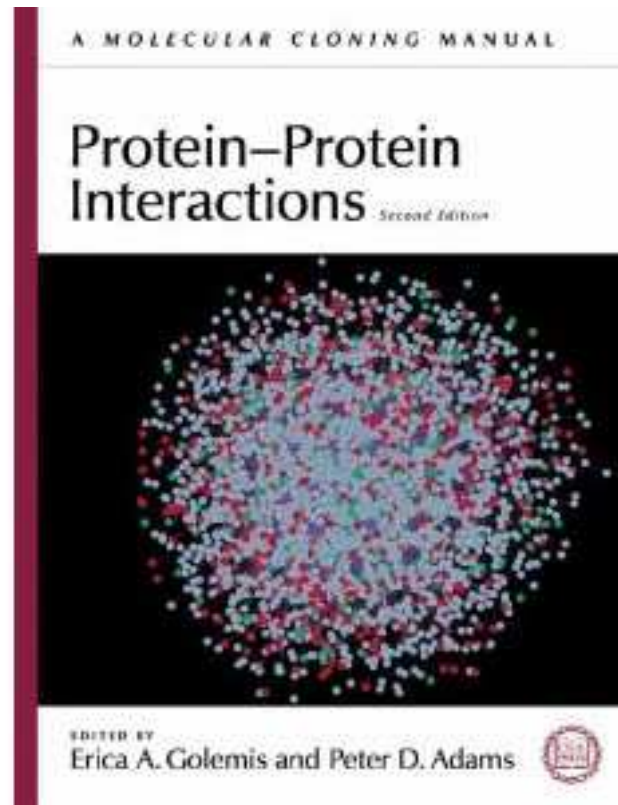
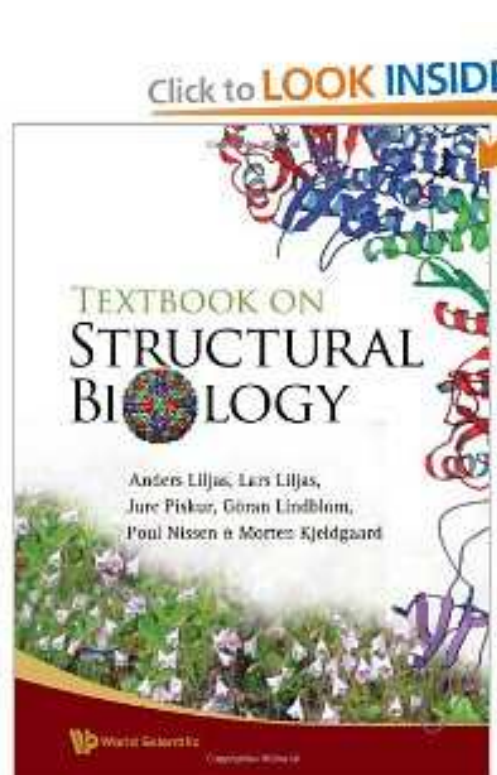


# Informační zdroje

Alberts a spol: Molecular biology of the Cell (2008)

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/>

Database protein-proteinových interakcí: <http://string-db.org/newstring.cgi> ...  
<http://www.ebi.ac.uk/intact/?conversationContext=1>

# Science or fiction: way to imagine life processes – komplexy a „molekulární stroje“

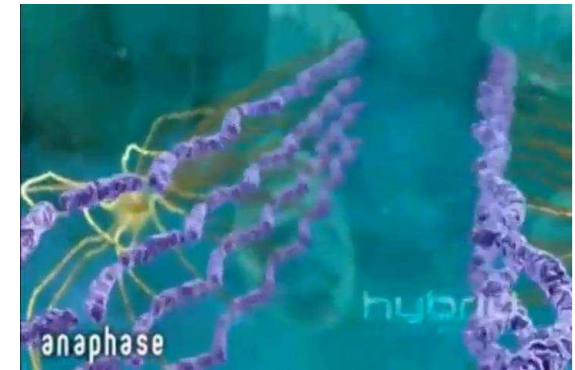
Molecular machinery of life:

<http://multimedia.mcb.harvard.edu/>

<http://www.youtube.com/watch?v=ztXiU3c3poM>

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

[http://multimedia.mcb.harvard.edu/anim\\_proteinpacking.html](http://multimedia.mcb.harvard.edu/anim_proteinpacking.html)



[http://www.youtube.com/watch?feature=player\\_detailpage&v=FJ4N0iSeR8U](http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=FJ4N0iSeR8U)

Jak vědci došli k takovýmto představám?

Studiem různých proteinových komplexů – 1. krokem je izolace a charakterizace takovýchto komplexů

# Metody analýzy proteinových komplexů

- ultracentrifugace, gelová filtrace,
- TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
- ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...
- cross-linking MS, (cryo) elektronová mikroskopie ...

## Metody analýzy protein-proteinových interakcí

- pull-down (*in vitro*)
- (kvasinkový) dvou-hybridní systém
- BiFC, FRET, ko-lokalizace, ko-exprese
- Flourescenční anisotropie, SPR, ITC ...
- ko-krystalizace
  
- genetické metody (syntetická letalita, suprese)
- databáze (interactom a komplexy ...)

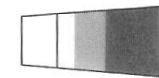
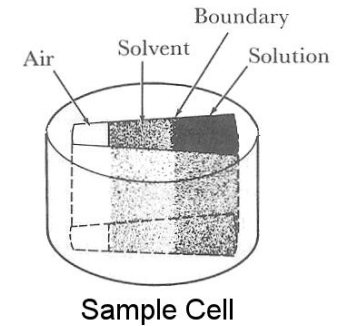
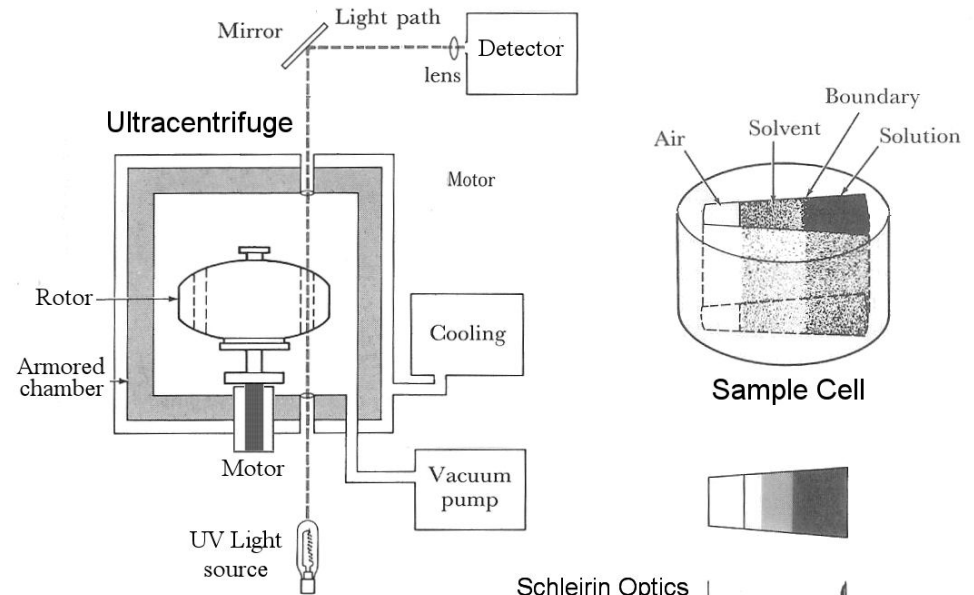
Od komplexů k interakcím AMK

Literatura: Protein-protein interactions, Golemis & Adams, CSHL Press, 2005

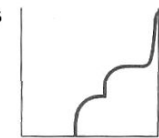


# Metody izolace a analýzy PKxů

## ultracentrifugace

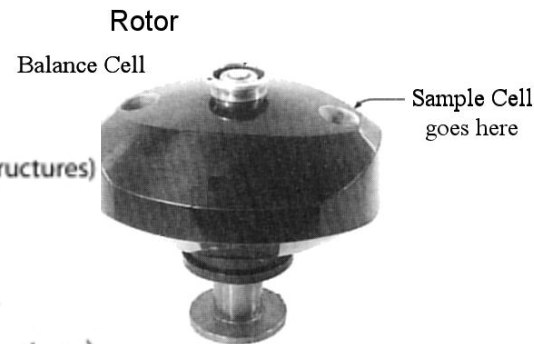
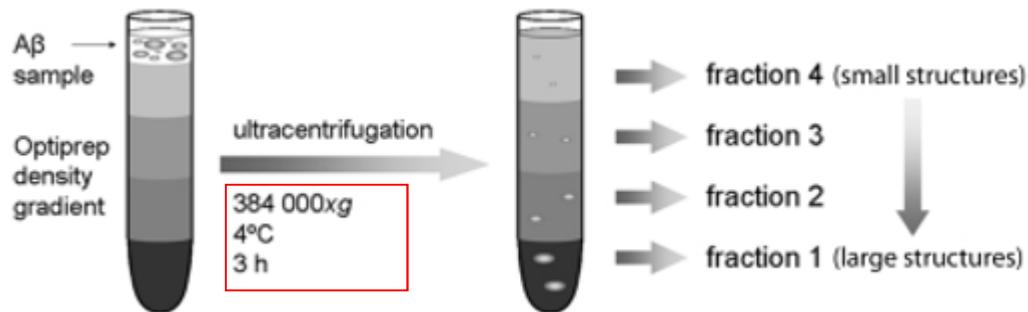


Schleirin Optics (schematic)



Centrifugal force

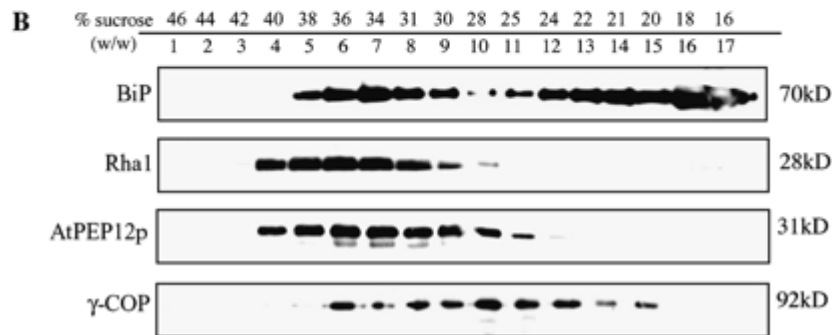
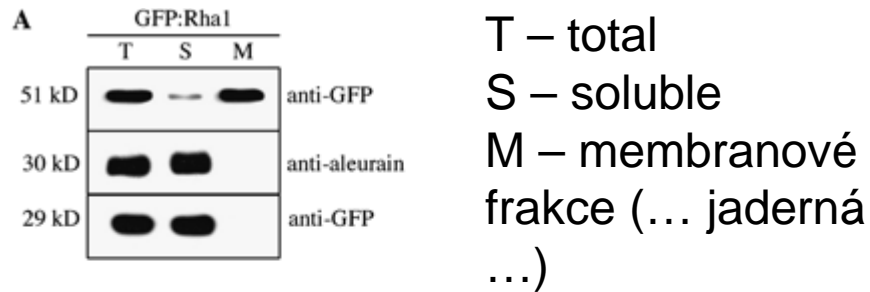
### Cukerný/hustotní gradient



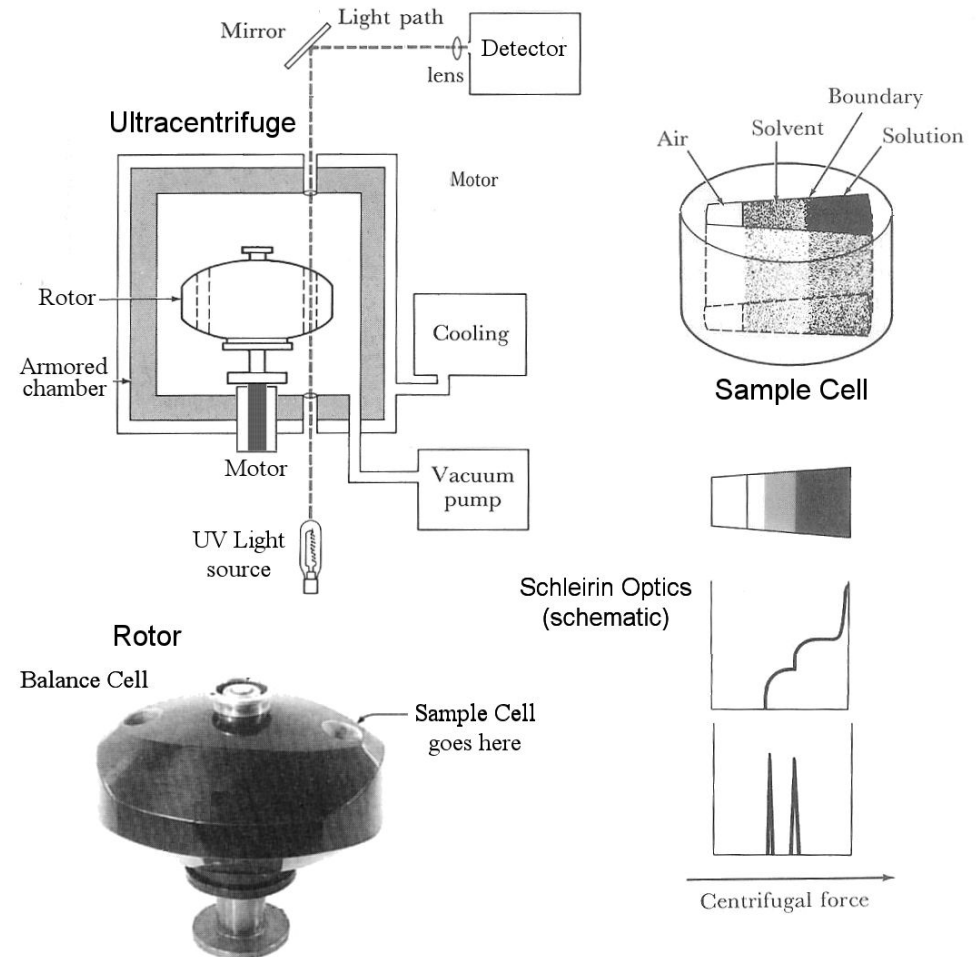
Je třeba přesně vyvážit!

# Metody izolace a analýzy PKxů

## ultracentrifugace

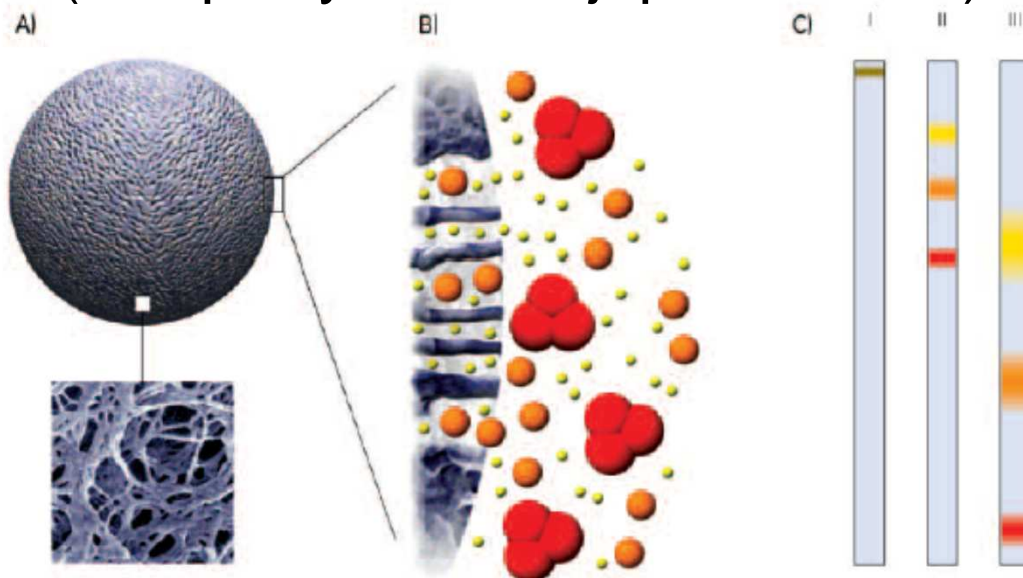


- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely  
B. Jemný - cukerný gradient

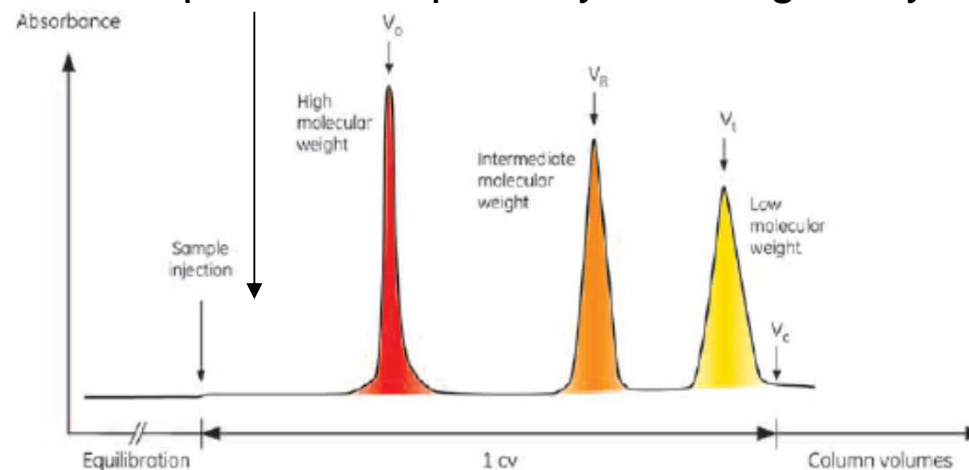


# Metody izolace a analýzy PKxů

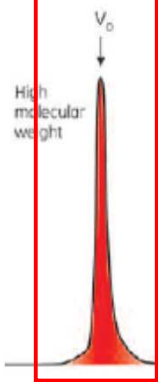
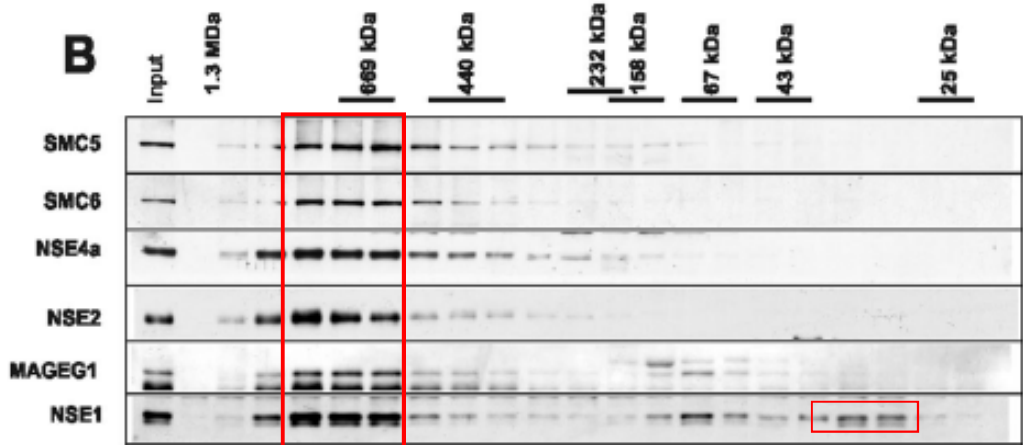
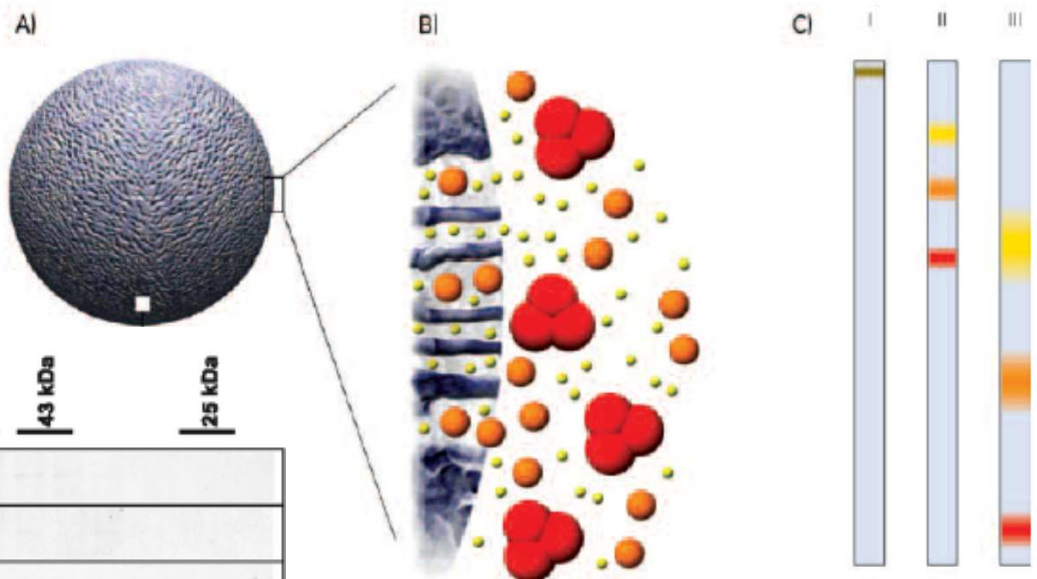
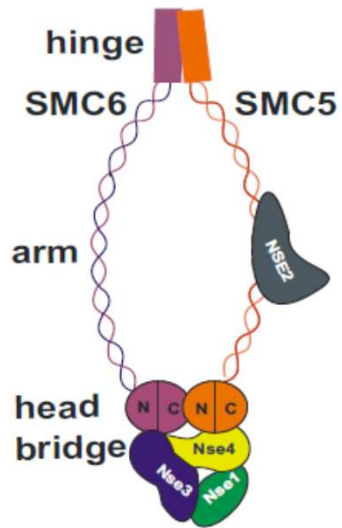
- **Gelová filtrace (size exclusion chromatography)**
- Za nativních podmínek (komplexy zůstávají pohromadě)



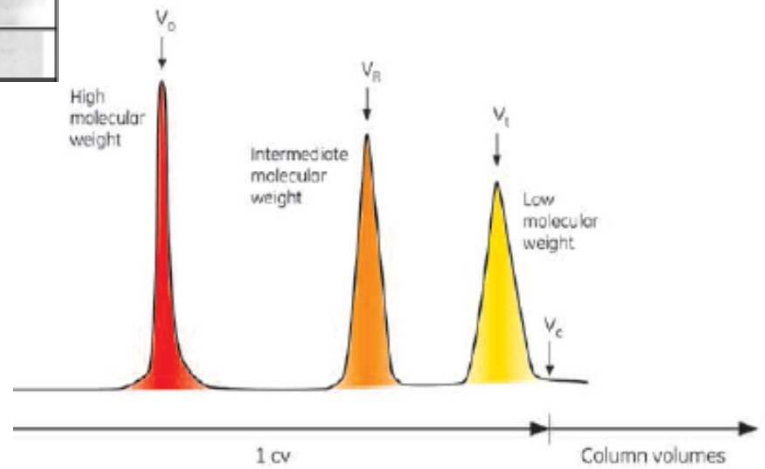
D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty



# Příklad: SMC5/6 komplex



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



# Metody izolace a analýzy PKxů

- TAP-tag (tagy a protilátky) purifikace a MS identifikace

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

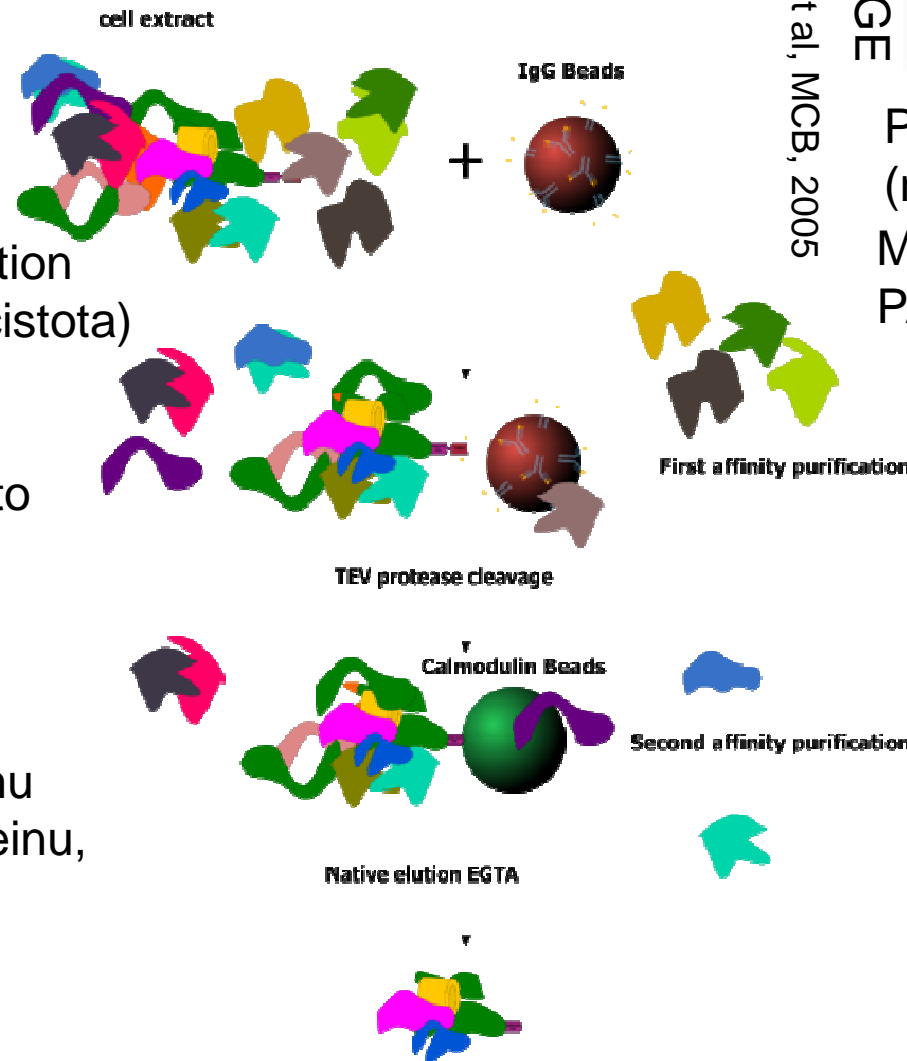


Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

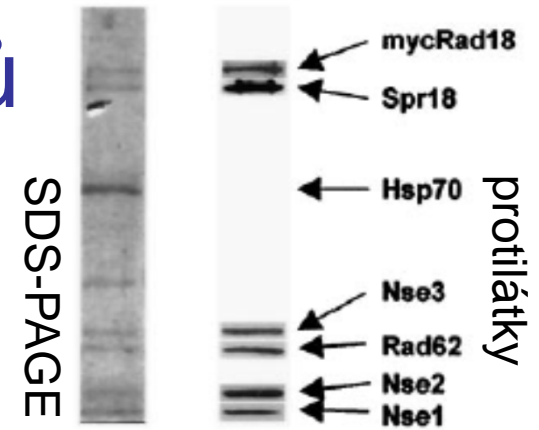
1. calmodulin-binding (CBP)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus)
3. Protein A (váže IgG)

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

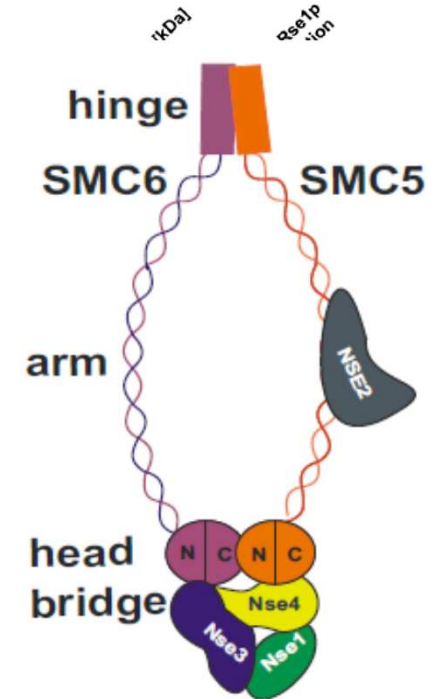
Puig et al, Methods, 2001



Sergeant et al, MCB, 2005



Pozor na kontaminace (např. chaperony)  
MS analýza SDS-PAGE nebo roztoku

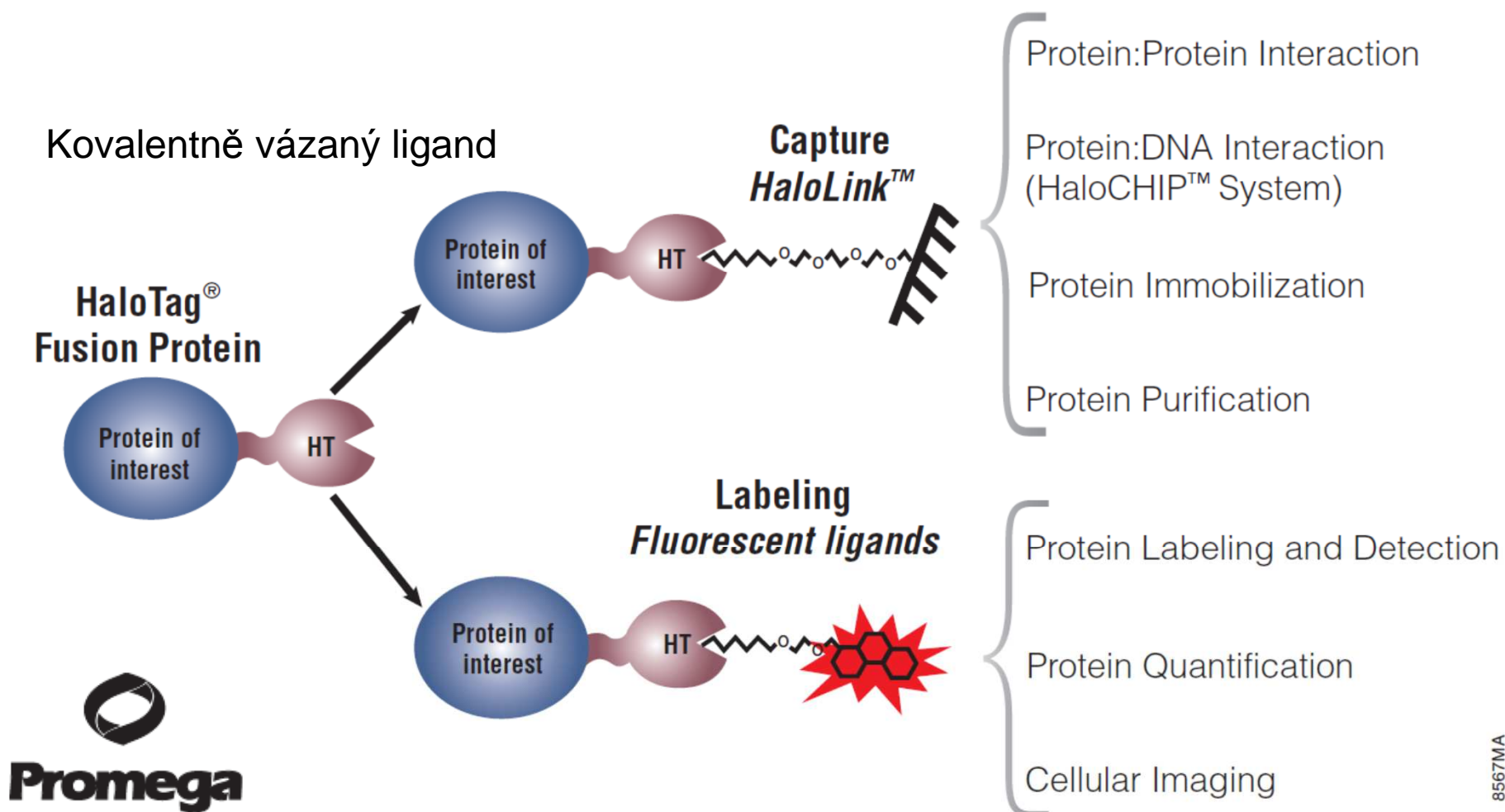




## Tagy (a protilátky):

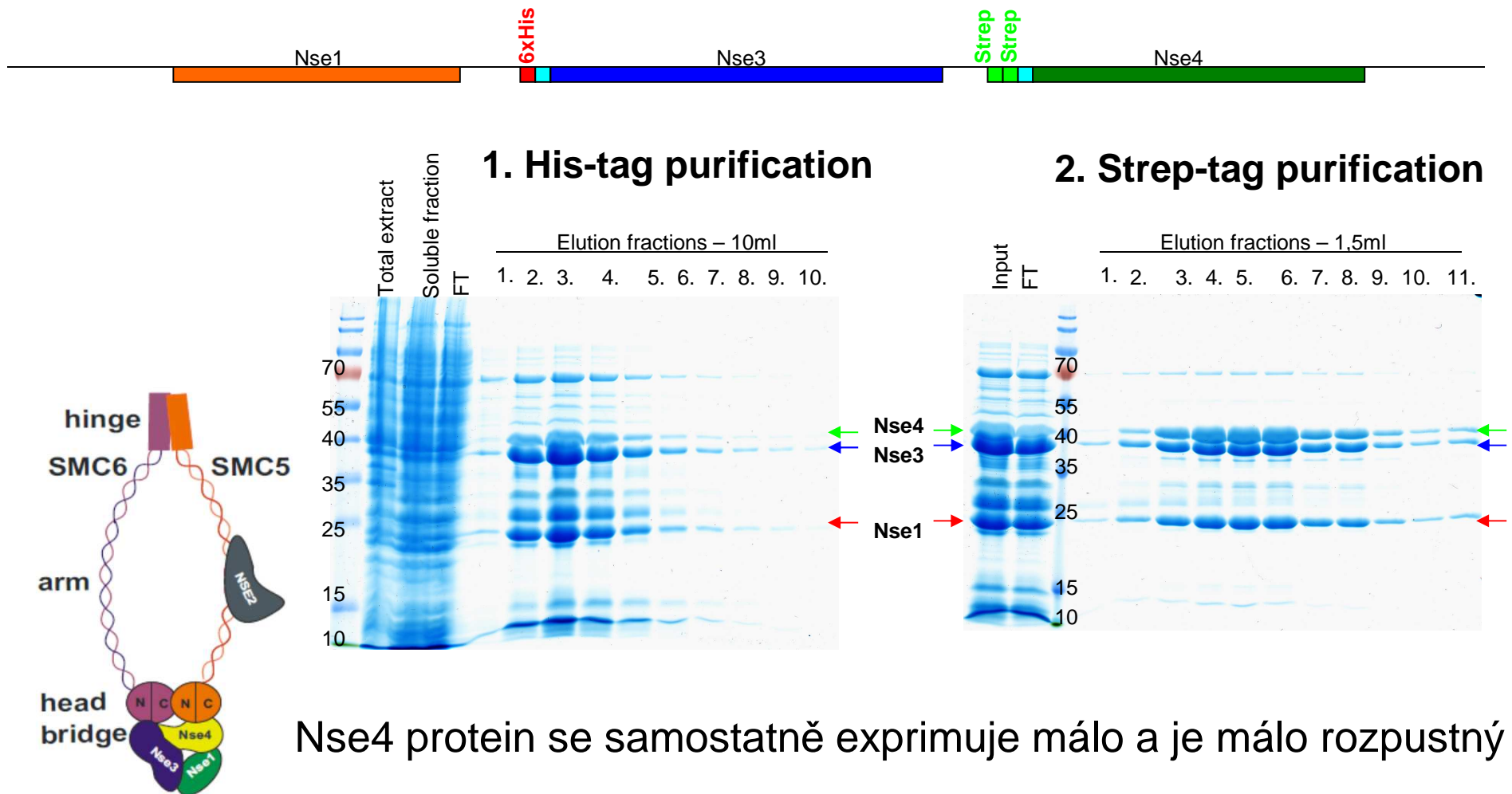
Myc, FLAG, V5, S-tag, GFP (vazba přes protilátky)

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



# Ko-purifikace

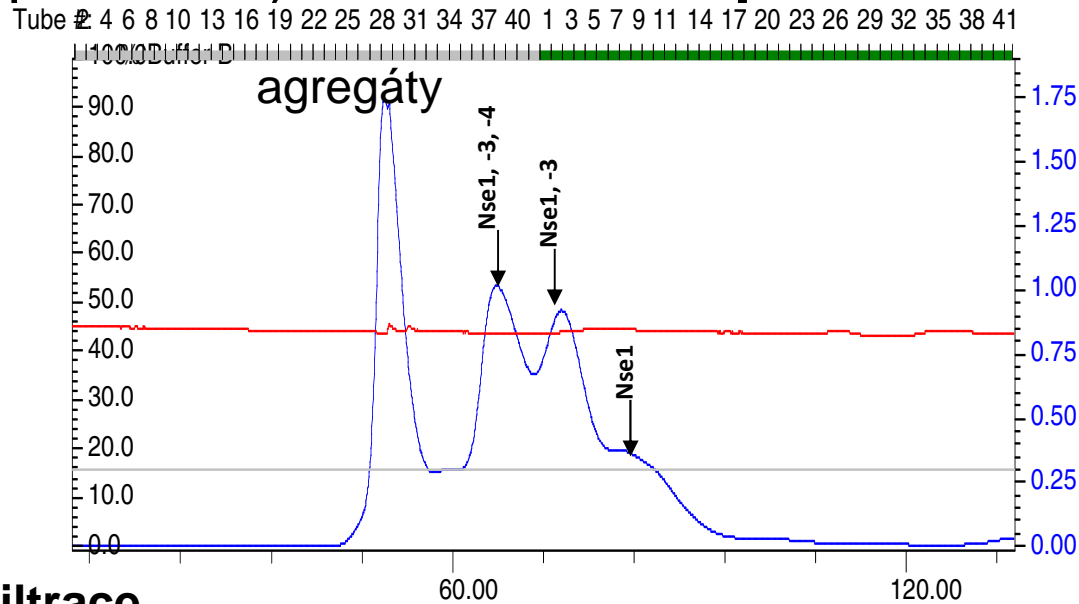
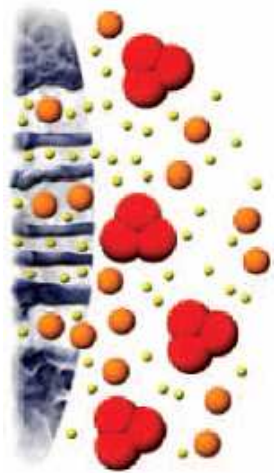
**Silné interakce/komplexy** – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat** (více Dr. R. Dopitová)



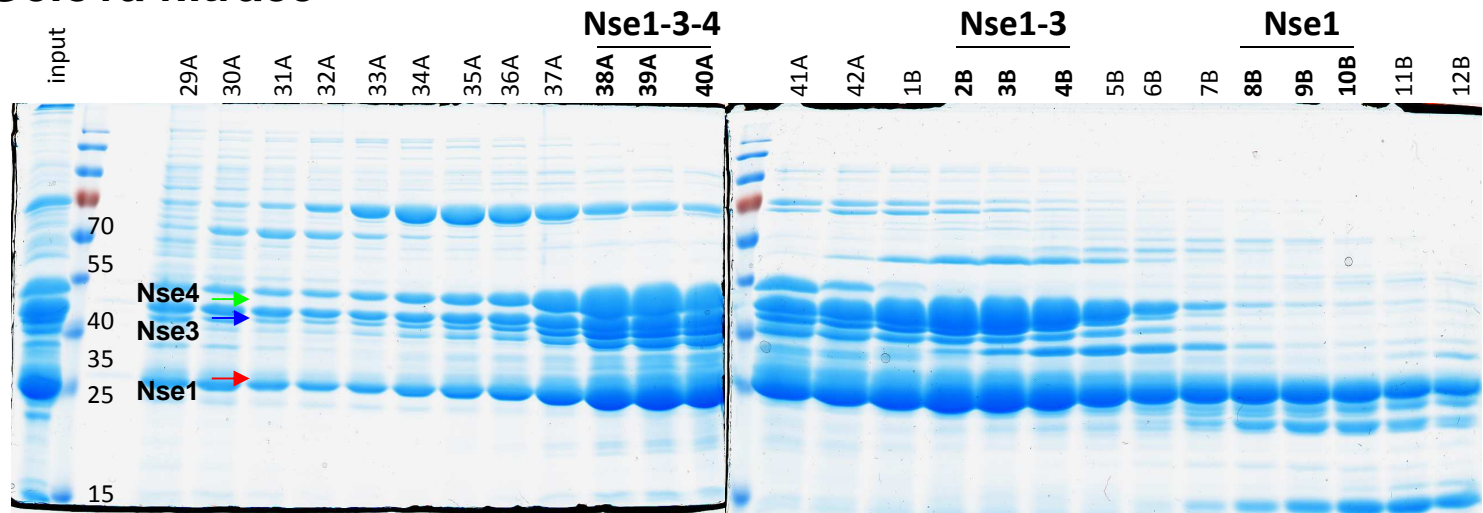
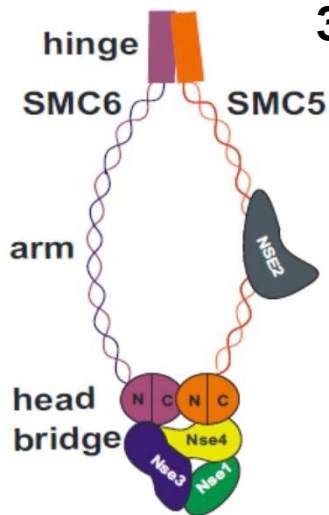
Nse4 protein se samostatně exprimuje málo a je málo rozpustný

# Ko-purifikace

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



## 3. Gelová filtrace

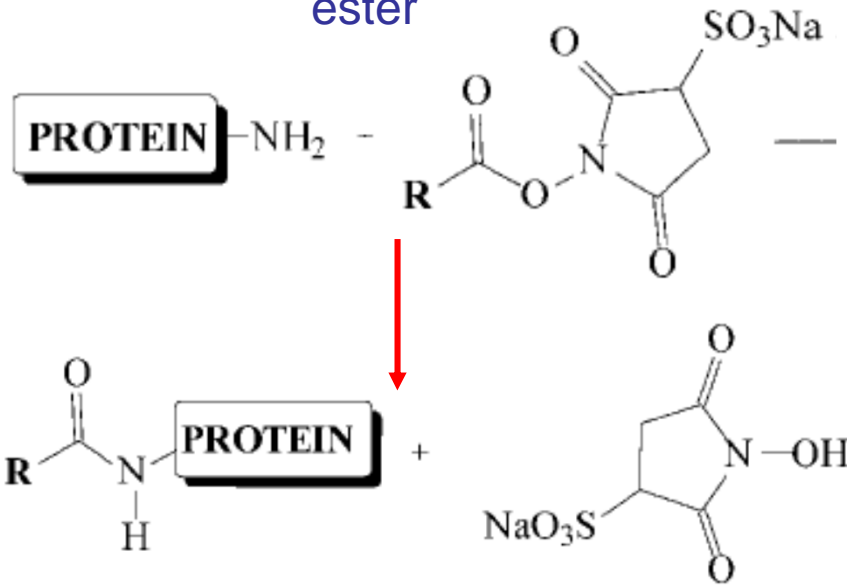


# Crosslinking

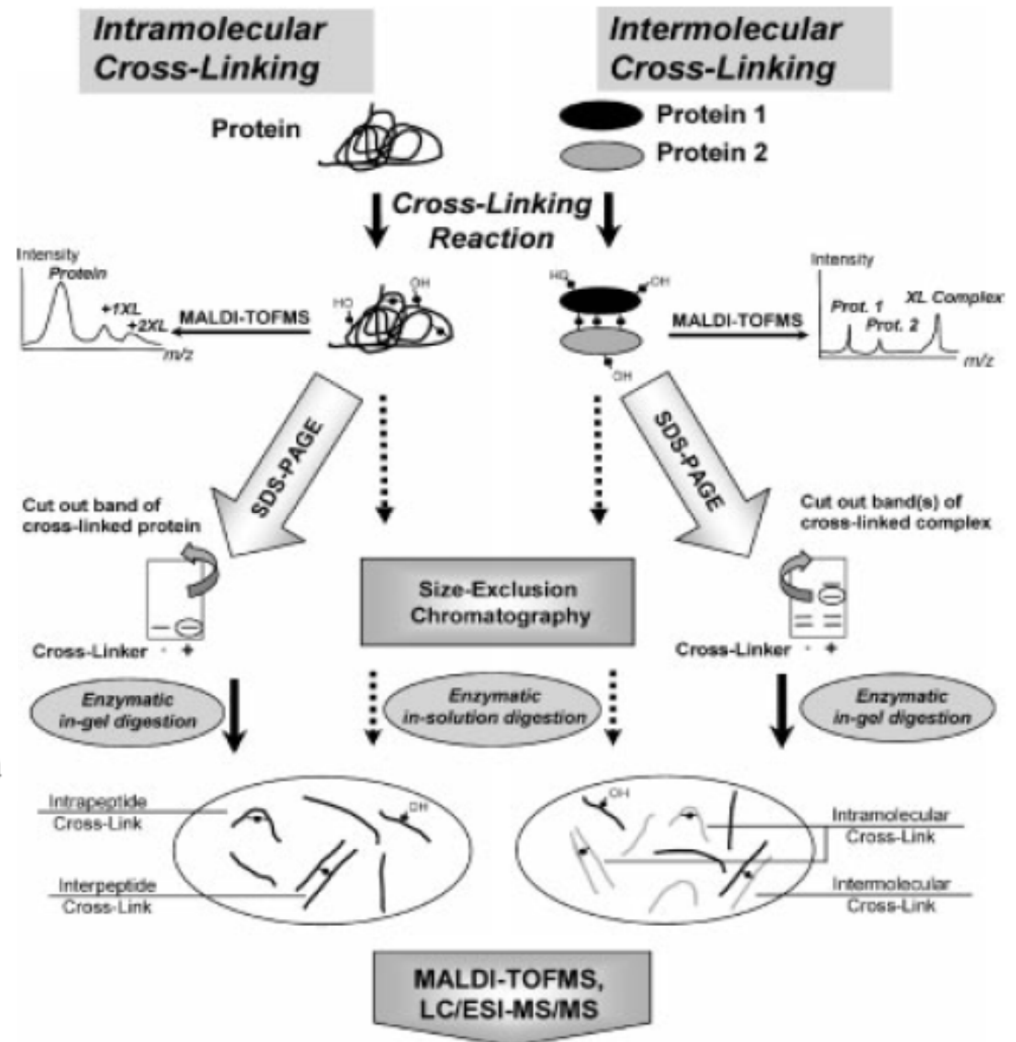
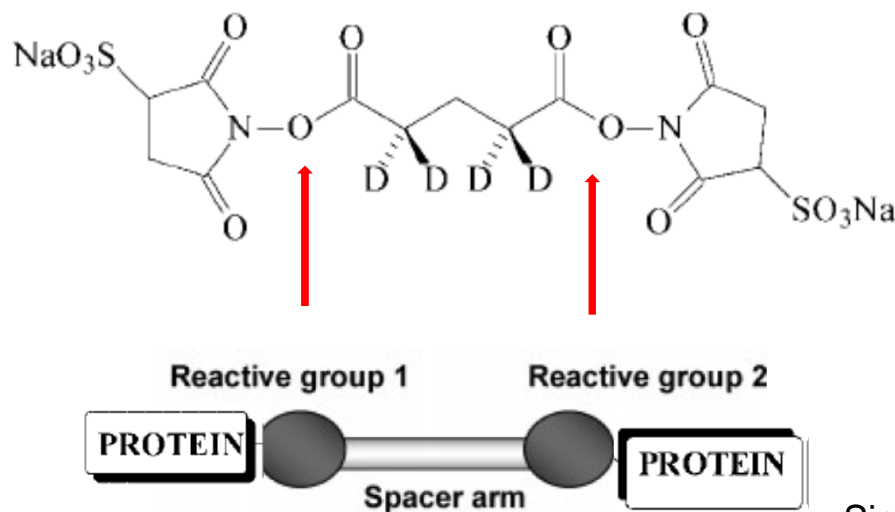
- estery reagují s Lys ( $\epsilon$ -amin) a amino-koncem
- homofunkční spojí proteiny dohromady v jednom kroku (velmi komplexní vzorky pro MS)
- intra- (struktura) nebo intermolekulární (PPI)

**A.**

ester



**B.**

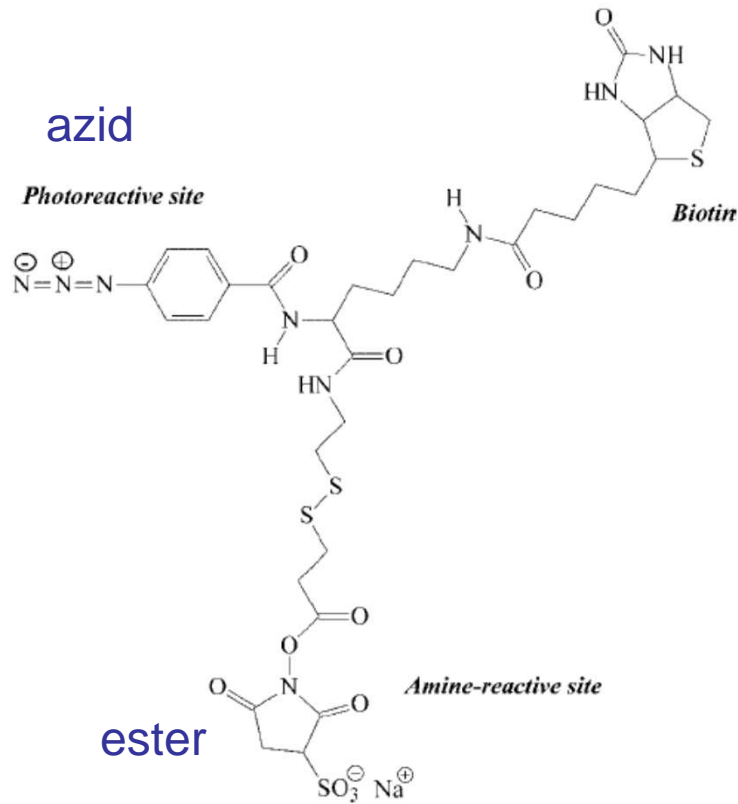


# Crosslinking

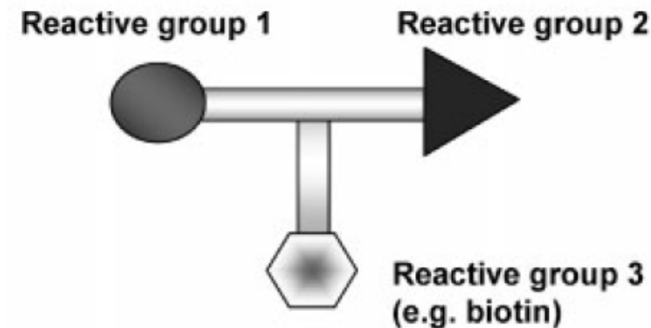
- estery reagují s Lys ( $\epsilon$ -amin) a amino-koncem
- imidy reagují s Cys (SH-), azidy (fotoaktivace)
- homofunkční spojí proteiny dohromady v jednom kroku (velmi komplexní vzorky)

## heterofunkční

- u heterofunkčních postupná aktivace
- možnost přečistit crosslinkované peptidy (vzorek není tak komplexní)

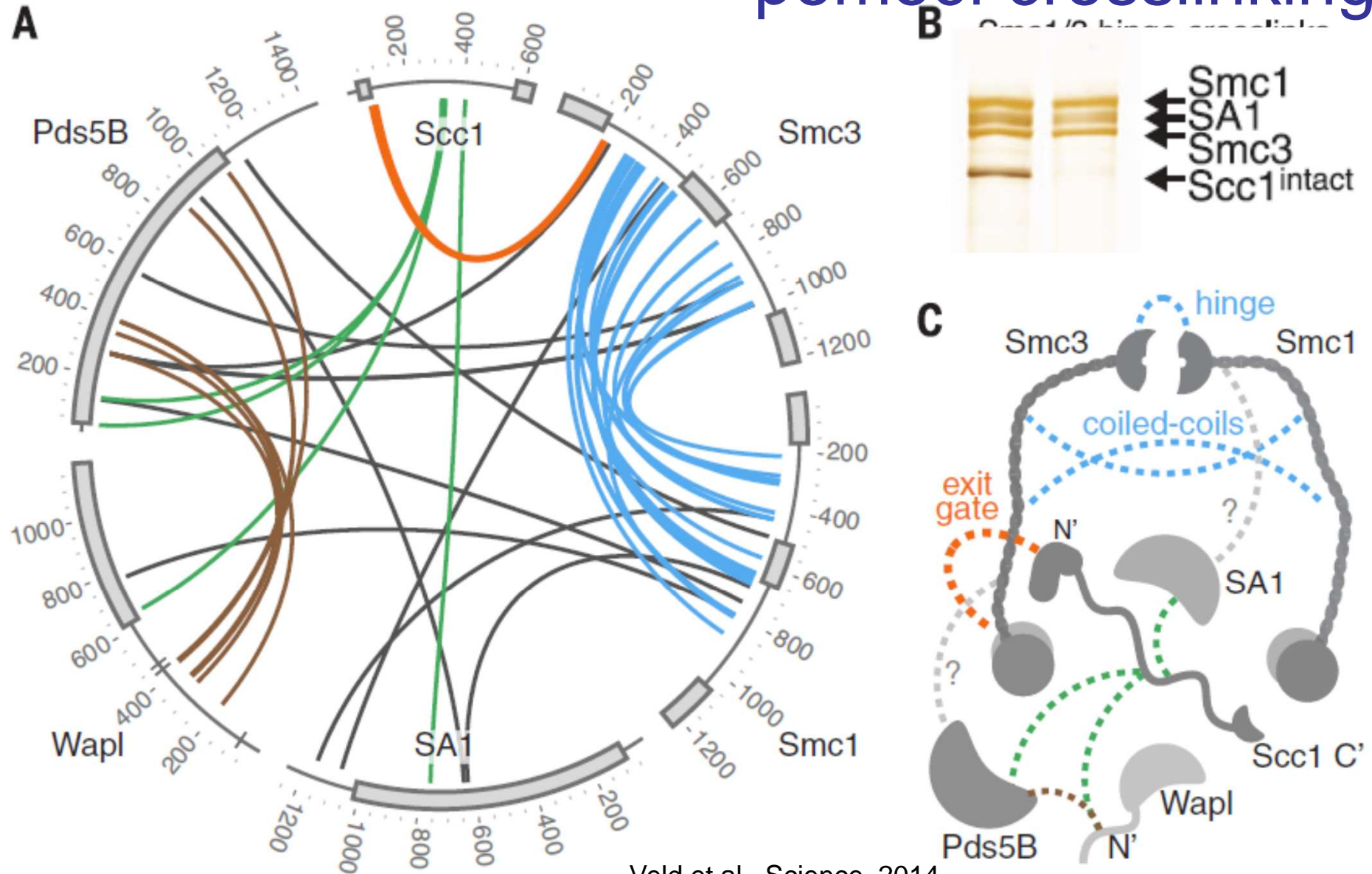


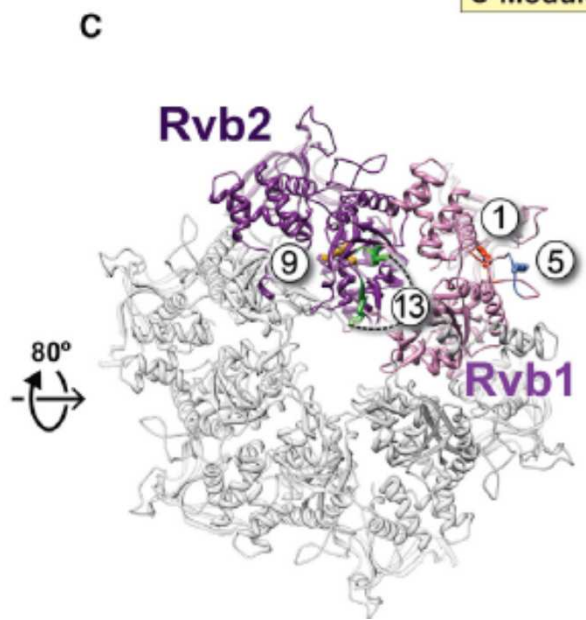
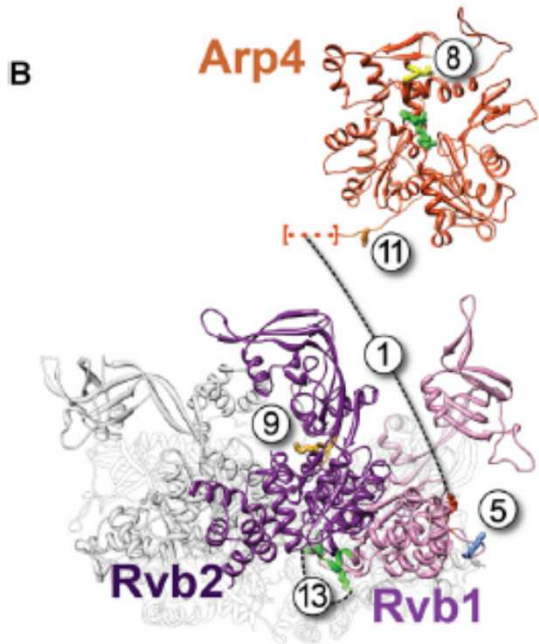
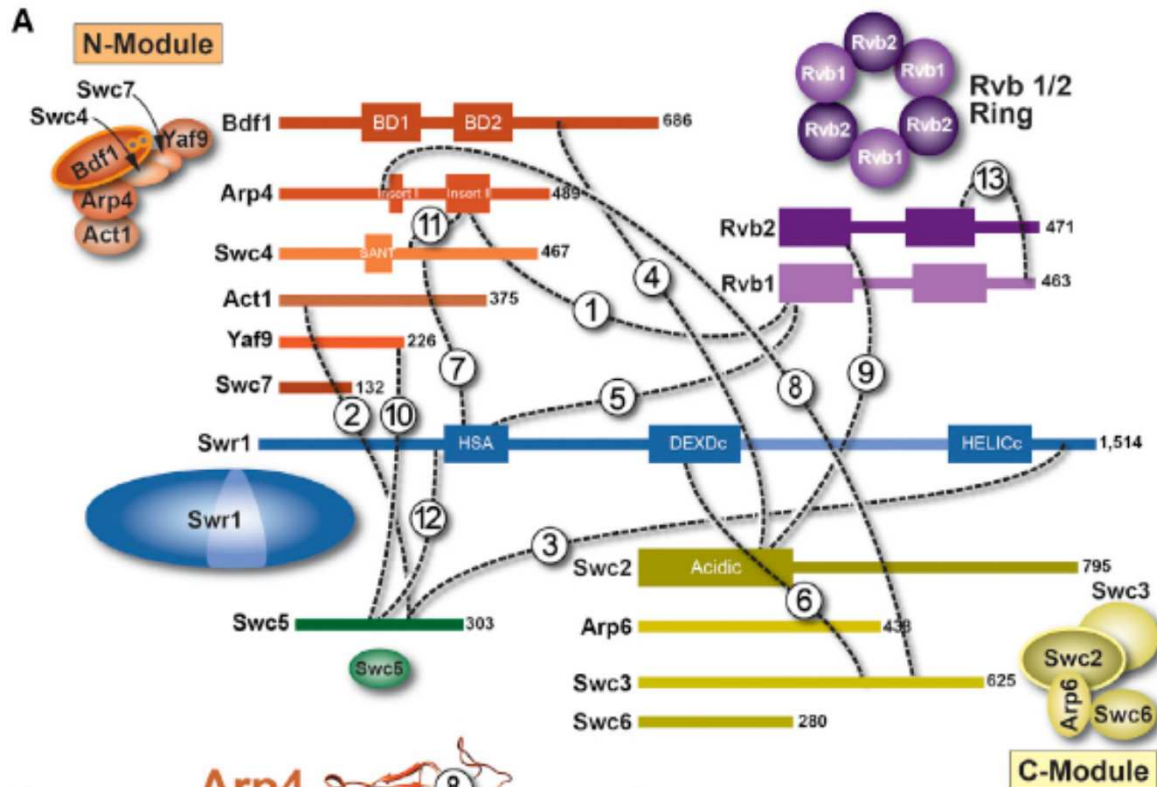
**SCHEME 2.** Chemical structure of the trifunctional cross-linker sulfo-BED.





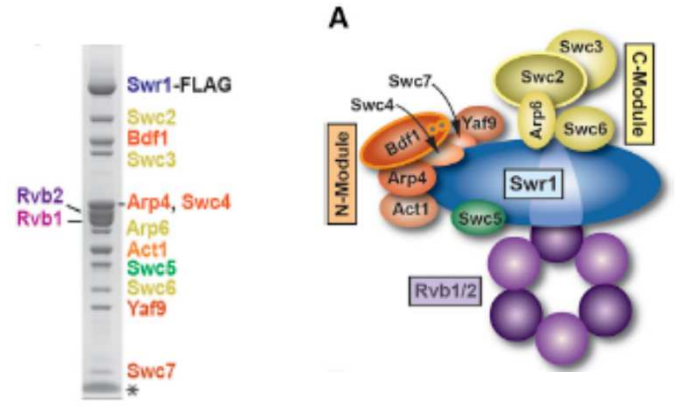
# Mapování interakcí mezi podjednotkami pomocí crosslinking

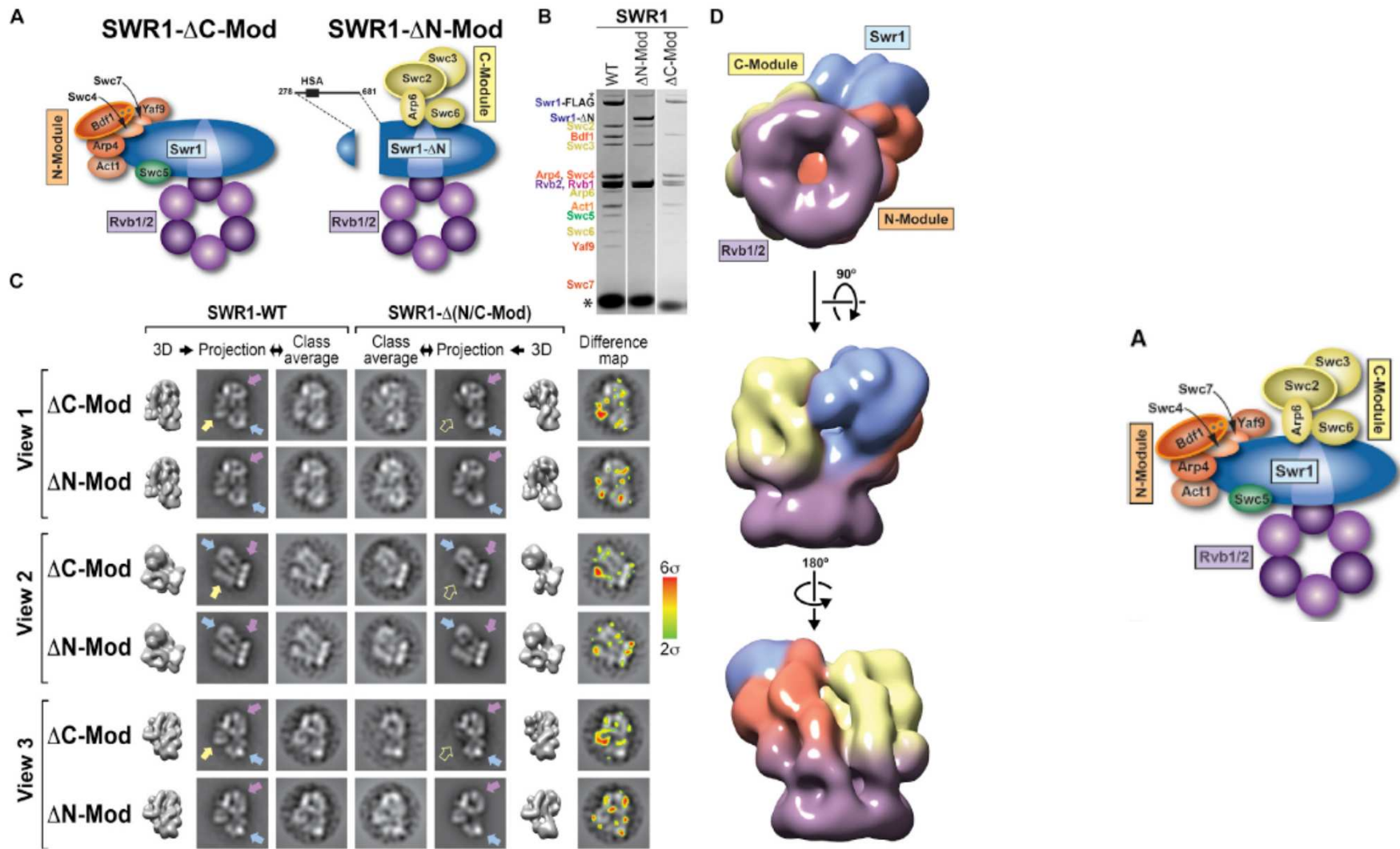




## Mapování interakcí v komplexech

- (ko-)purifikovaný komplex
- crosslinkovali disuccinimid suberátem (D10/D12) –
- gelová filtrace (oddělili necrosslinkované komplexy)
- LC-MS/MS analýza

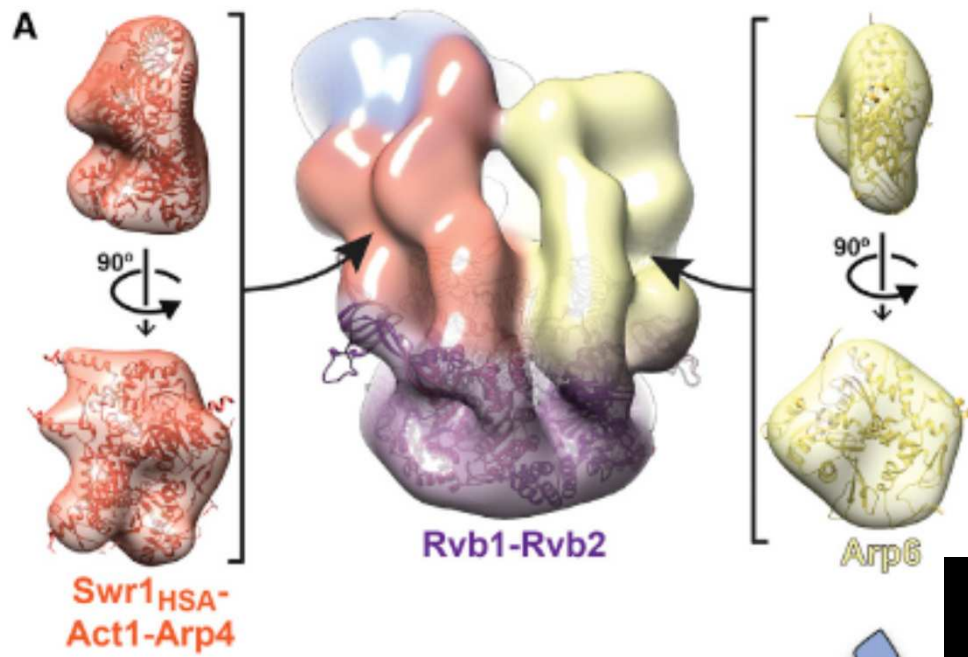




## Analýza architektury komplexů (SWR = remodelovací)

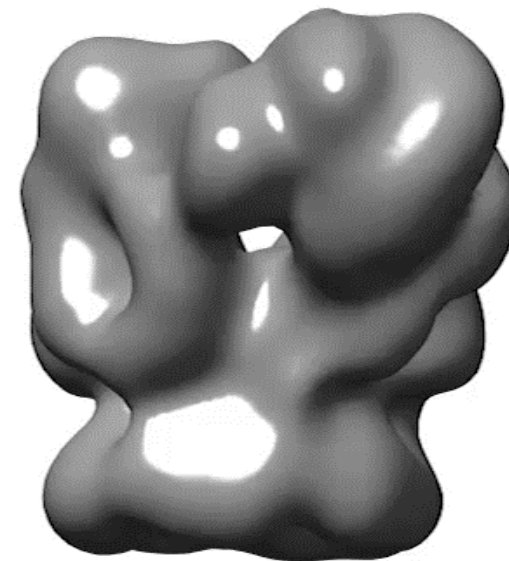
- (ko-)purifikované komplexy lze dále analyzovat pomocí elektronové mikroskopie (cryoEM)
- srovnat tvar různých komplexů (bez spec. podjednotky nebo s protilátkou proti specifické podjednotce)

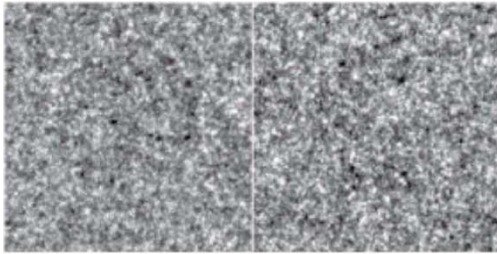




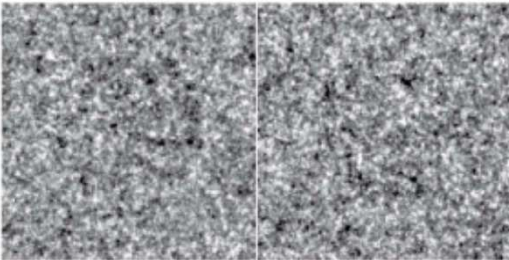
## Analýza architektury proteinových komplexů

- krystalové (a NMR) struktury lze následně „dokovat“ do tvarů z EM

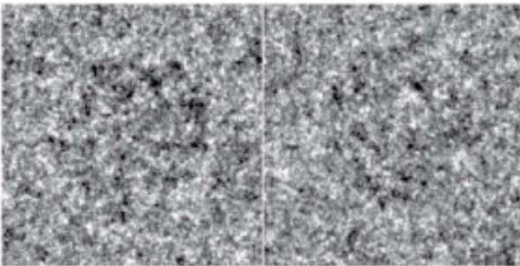




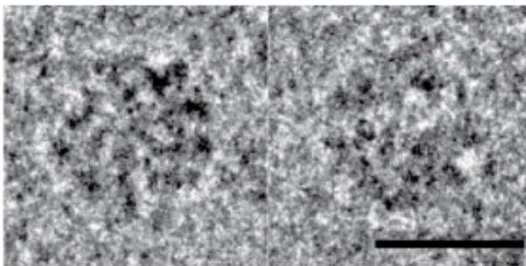
1 frame



Average from 2 frames



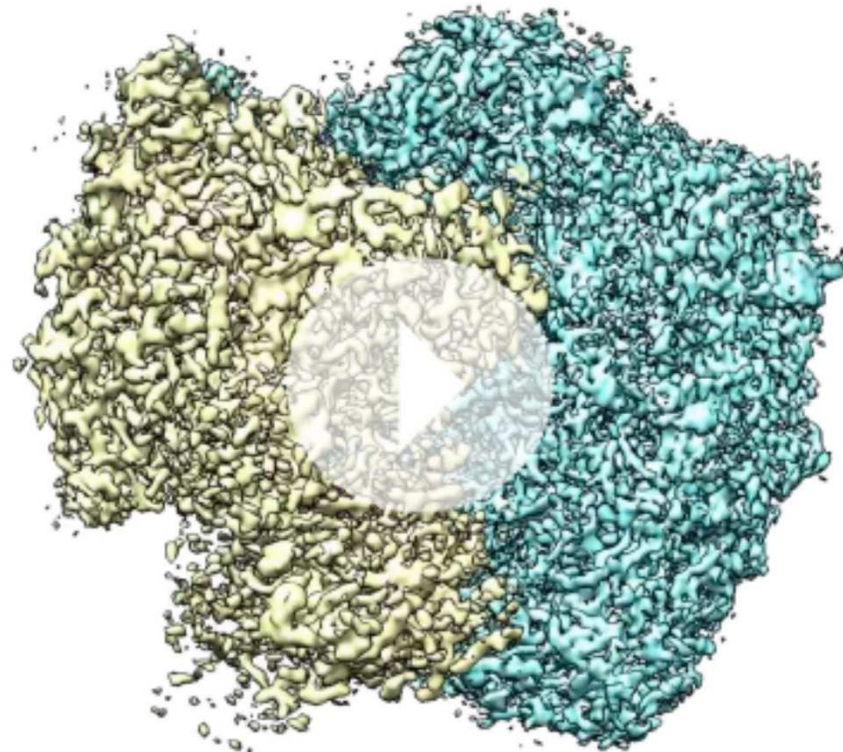
Average from 4 frames



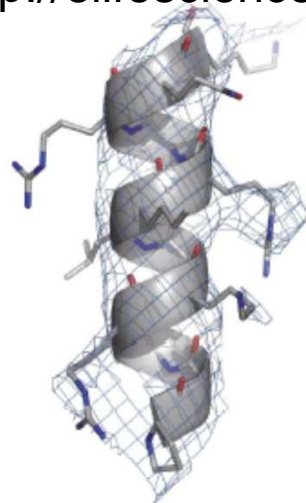
Average from 16 frames

40S

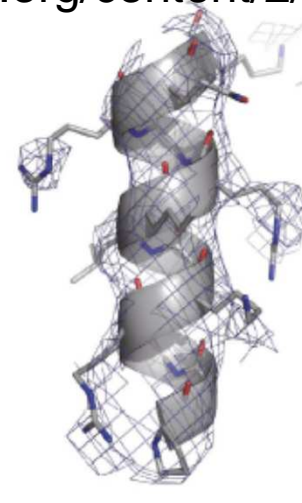
60S



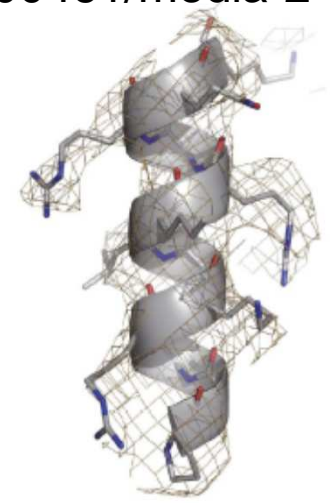
<http://elifesciences.org/content/2/e00461/media-2>



1-16



1-4, 5-8, 9-12, 13-16



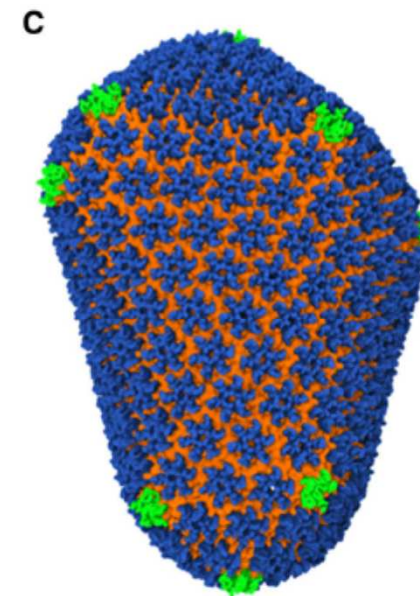
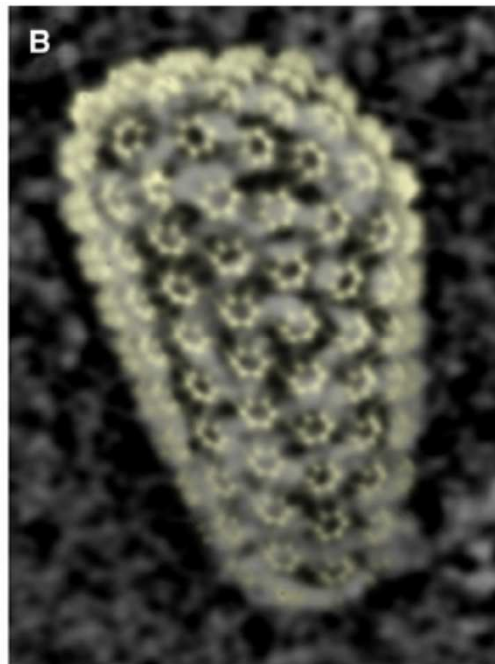
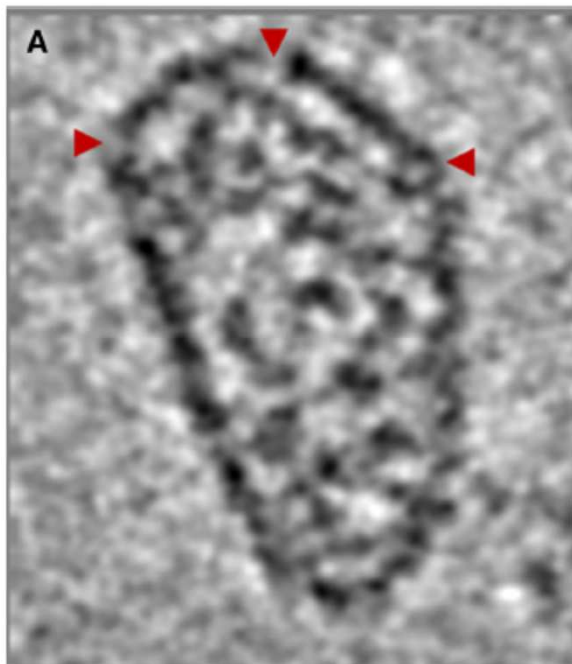
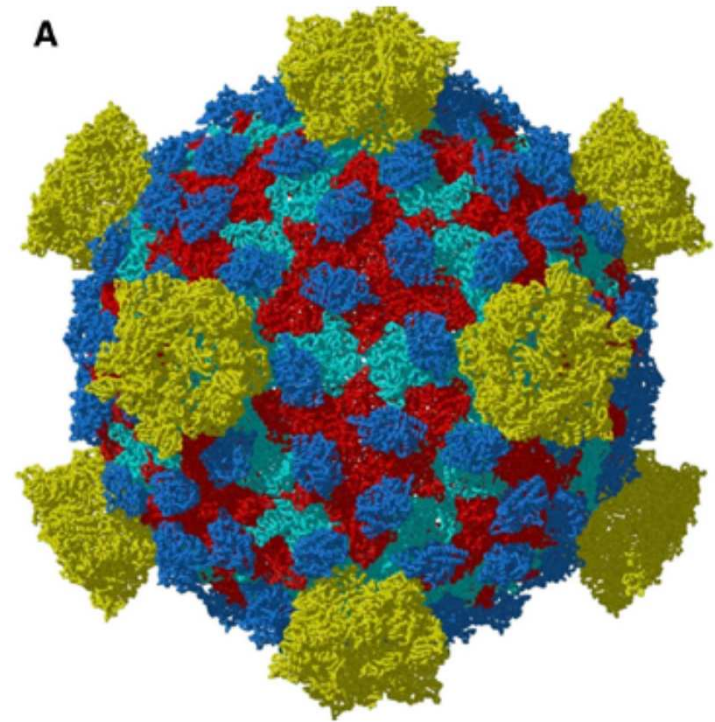
Statistical

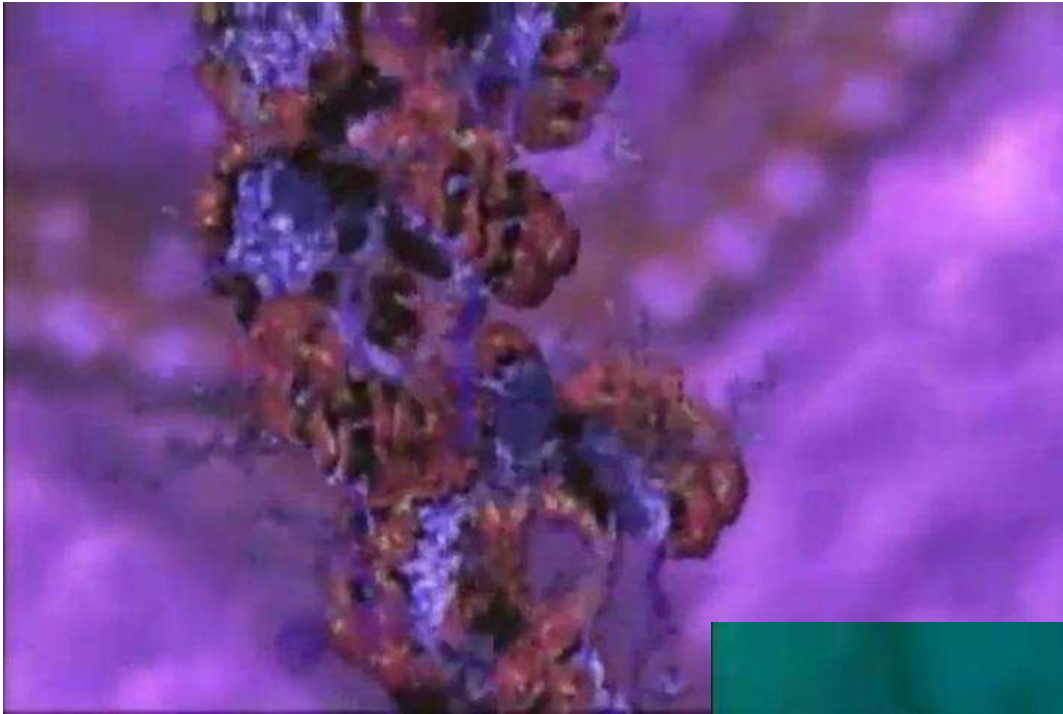


# Studium virových částic

- živý organismus nebo velký proteinový komplex?

Lengyel et al, JSFG, 2014





Metody analýzy proteinových komplexů  
(od izolace po detailní analýzu podjednotek)

- DNA-vazebné komplexy
- Komplexy iniciace transkripce
- Komplexy chromatinu

