



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

CG030 . Struktura (architektura) a funkce proteinových komplex



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

UKB A2, 214

Osnova kurzu

- “ úvod . metody analýzy proteinových komplex , strukturní biologie
- “ funkce protein (chaperony, PTM, PPI, signální dráhy) a komplex (proteasom)
největší proteinový komplex = chromosom
- “ DNA-vazebné komplexy
- “ Komplexy iniciace transkripce
- “ Komplexy opravující poškozenou DNA
- “ Komplexy chromatinu
- “ Evoluce protein a komplex

obecně

chromatin

závěrečná

Program přednášek 2015

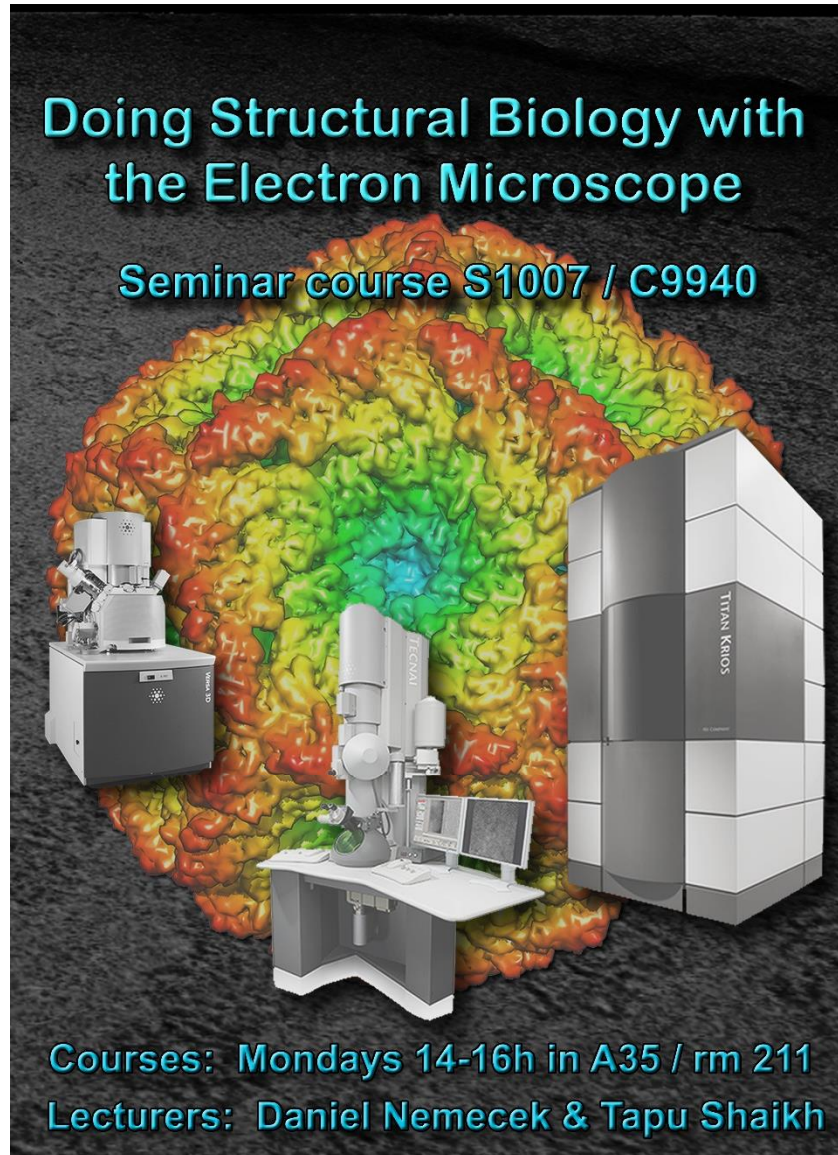
| | | | | |
|-----------------------|---------|--------------|--|-----------|
| 25.2.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | Úvod, analýza komplex | obecné |
| 3.3.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Marek | Úvod do strukturní biologie | |
| 10.3.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | Protein-proteinové interakce, skládání komplex | |
| 17.3.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | Dr. Muller | Chaperony | chromatin |
| 24.3.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | Mgr. Adamus | Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom | |
| 31.3.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Marek | Signální dráhy, GPCR | |
| 7.4.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | DNA-proteinové interakce, vazebné motivy | |
| 14.4.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy | |
| 21.4.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | Dr. Blažek | Cyclin/CDK komplexy v buněčném cyklu a transkripci | |
| 28.4.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | Dr. Špiček | Oprava DNA, homologní rekombinace | |
| 5.5.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | Chromatinové komplexy | |
| 12.5.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | Evoluce proteinových komplex | |
| 19.5.2016 10-11.50hod | A2-2.11 | doc. Pale ek | Zkouška - test | |

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

- doporučení p ednázek: Struktura a funkce eukaryotických chromozom (C9041, prof. J. Fajkus) ō

**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

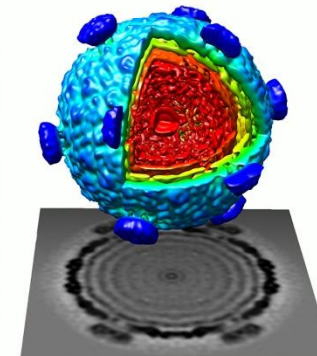
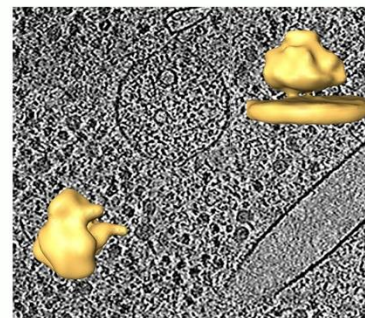
Modern electron microscopy in structural biology on the cellular and molecular level is performed by cryo-electron microscopy (cryo-EM) and cryo-electron tomography (cryo-ET).

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.

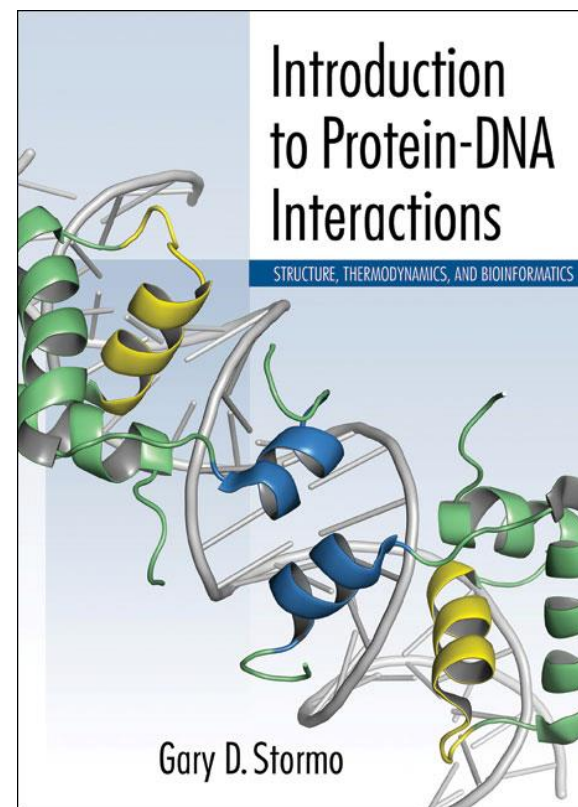
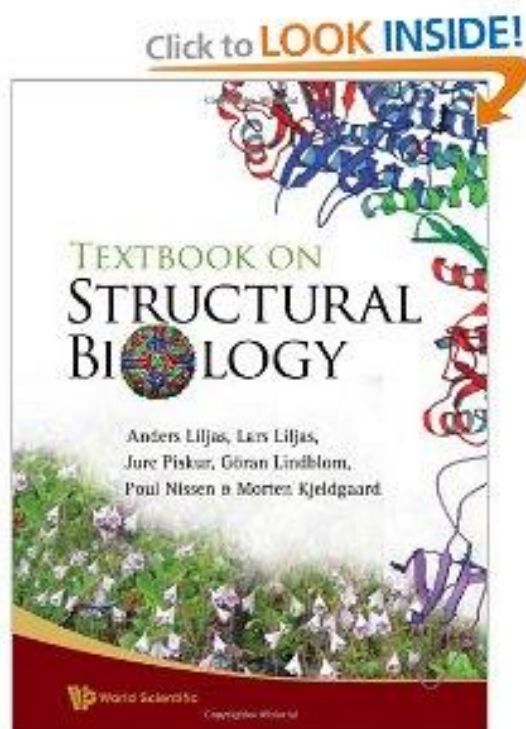


Informa ní zdroje

Alberts a spol: Molecular biology of the Cell

Liljas a spol: Structural biology (2009) ò

Å nejnov jší lánky z asopis Cell, Nature, Science, PLoS Å



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

Zkouzka: - test + p ednázka

” Úvod - Analýza proteinu

. Domény

- ” fold-struktura (ss, PDB)
- ” v PyMolu p ipavit 3D strukturu
- ” Interakce (IntAct)

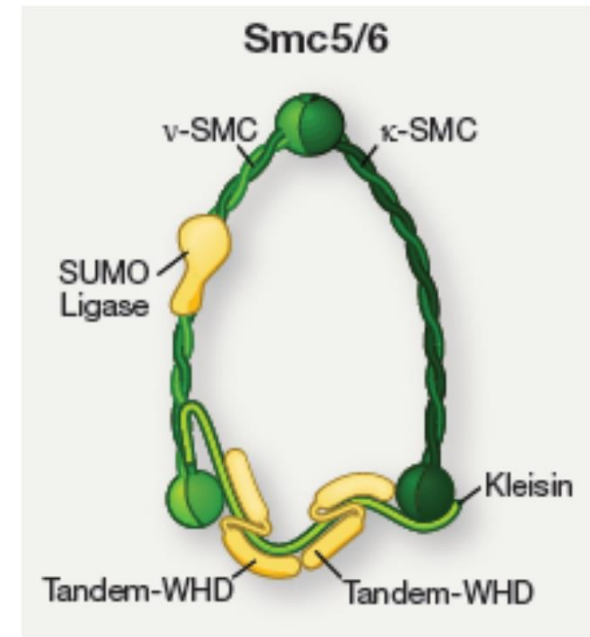
. Komplexy

- ” Funkce
- ” Lokalizace

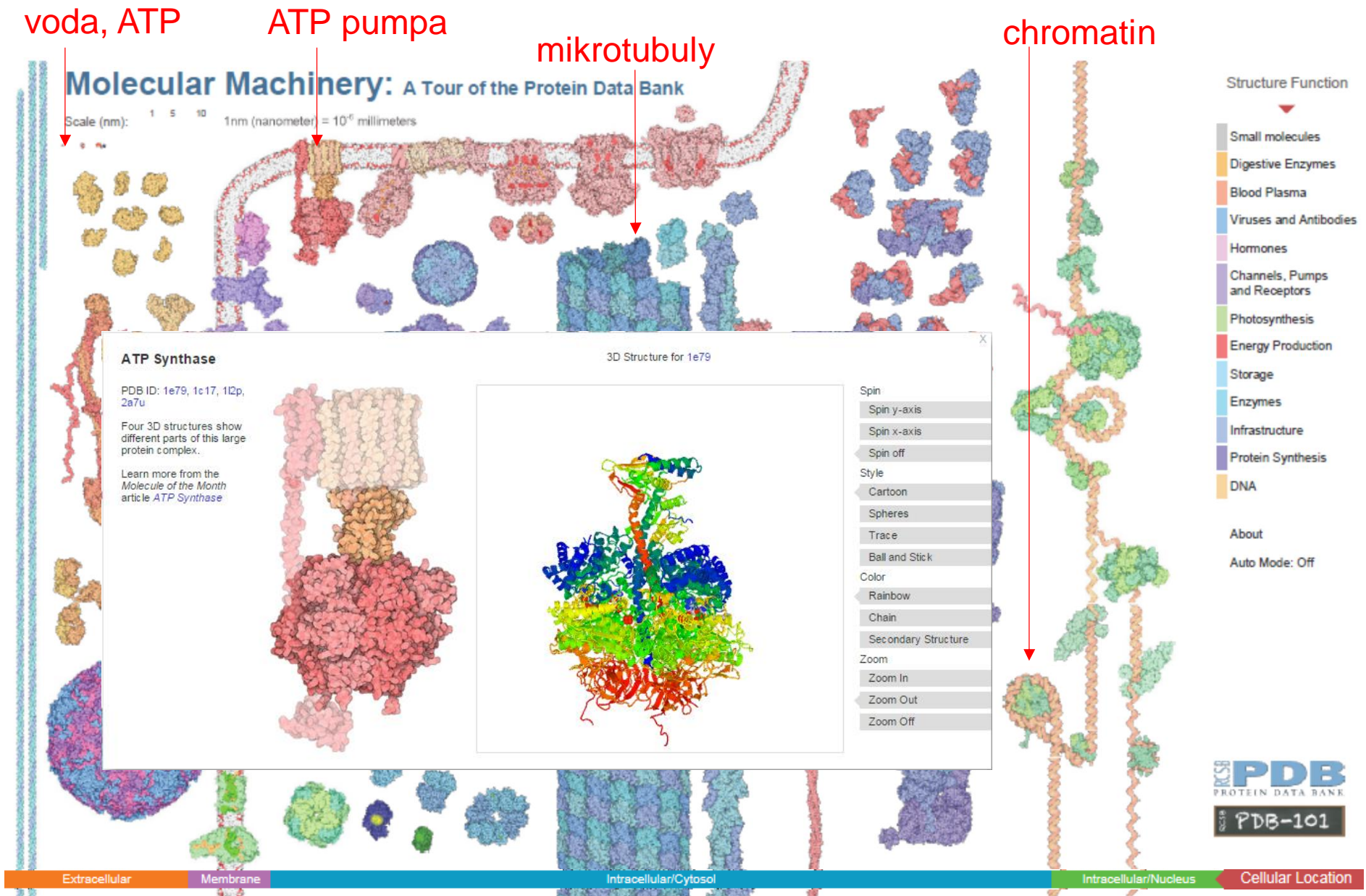
. evoluce

” Konkrétní nová data . lánek (< 5 let)

Ujasnit si souvislosti, rozzít si znalosti, aplikovat poznatky z p ednázek ò



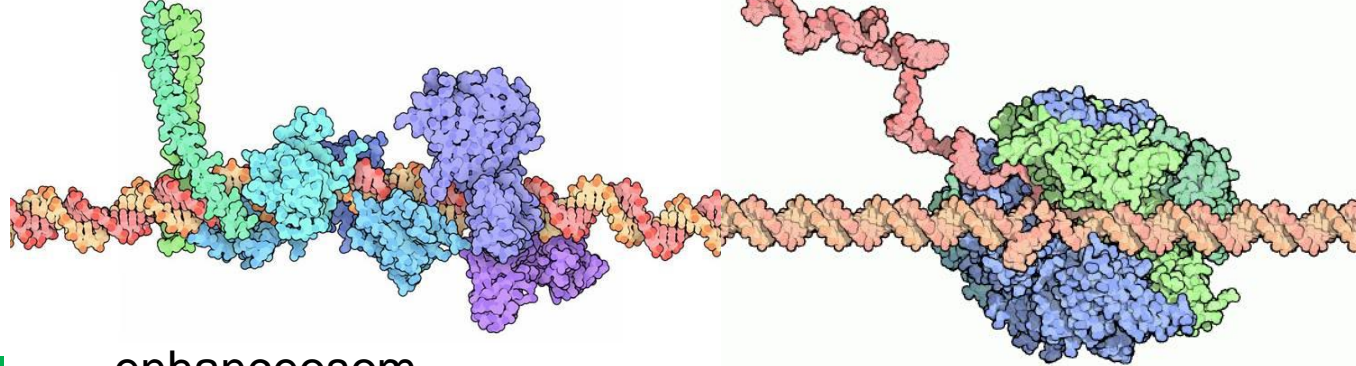
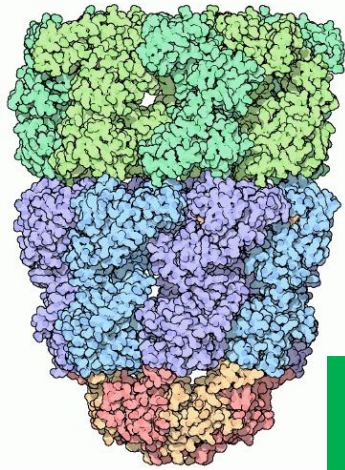
Primárním zdrojem strukturních informací = PDB



Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplex

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

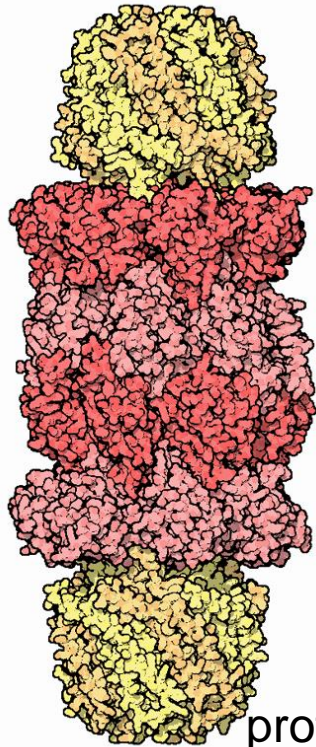
chaperon



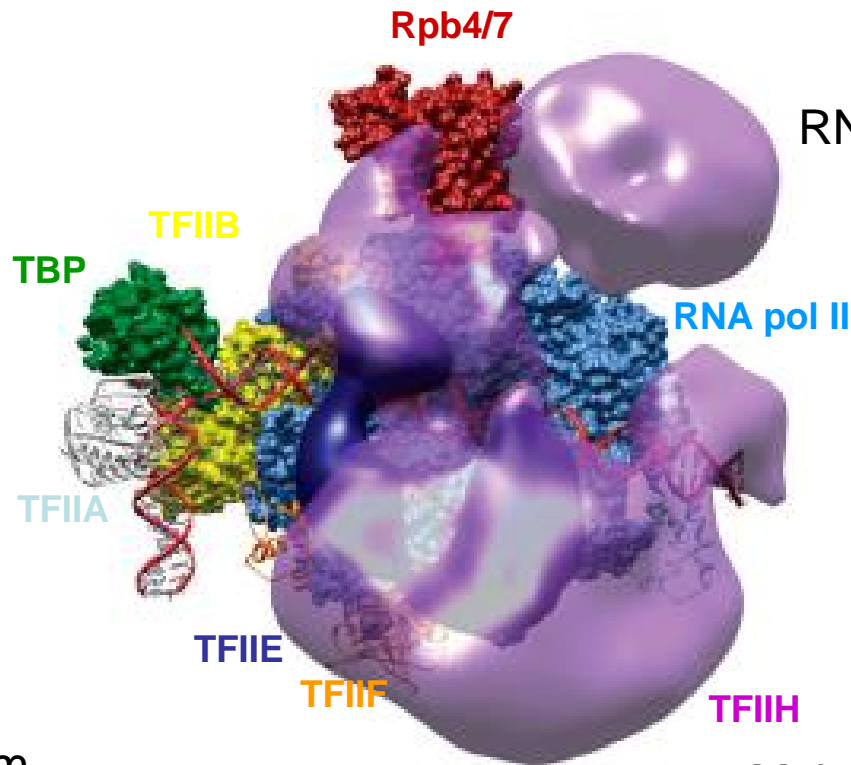
enhanceosom

RNA polymeráza

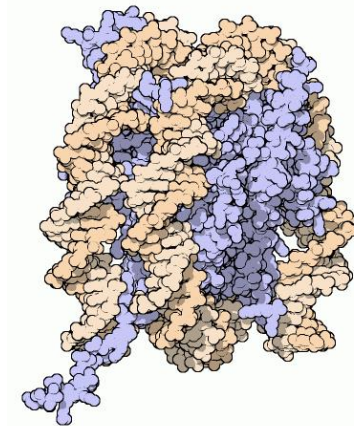
obecně



proteasom



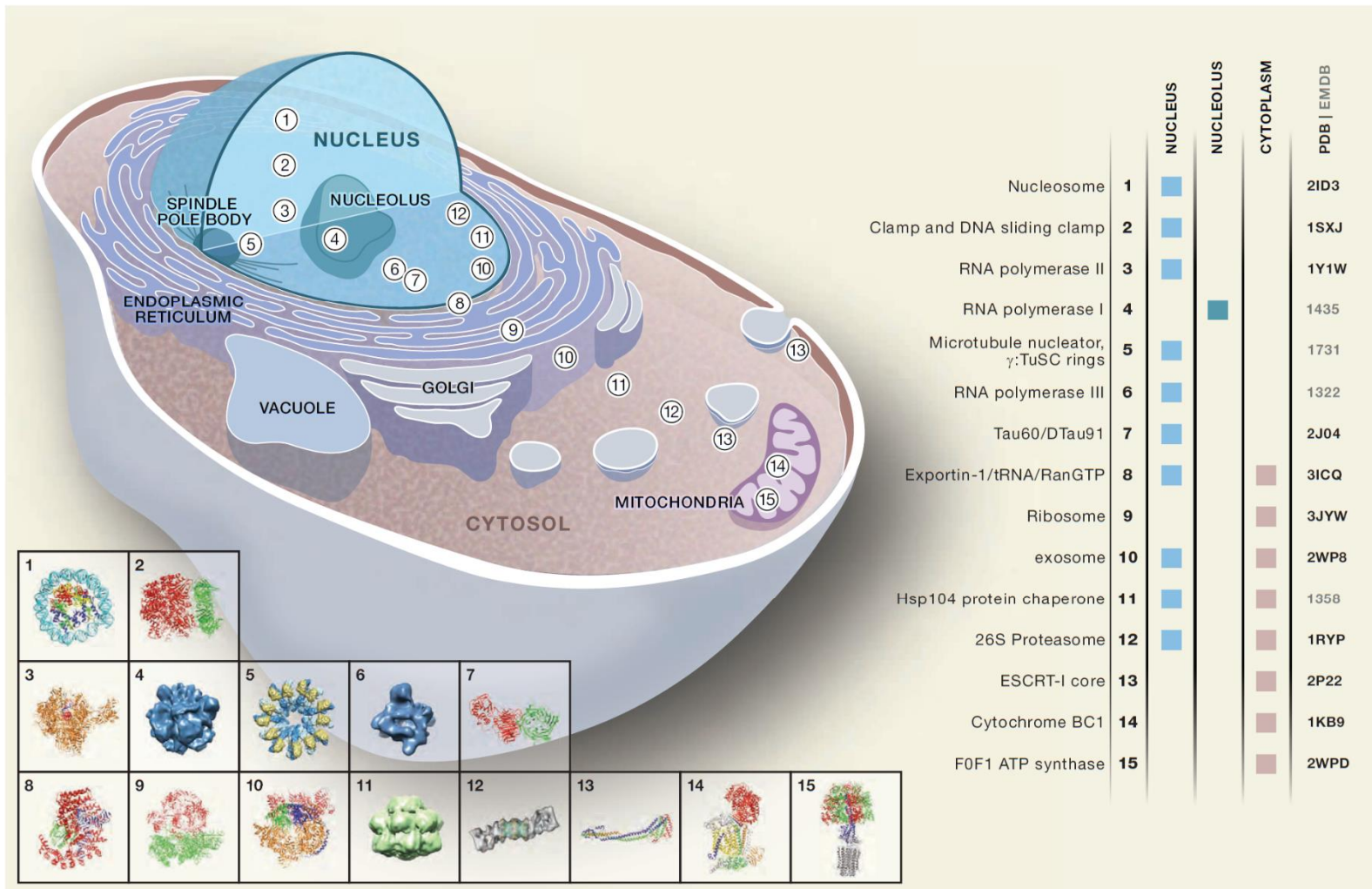
RNA polymeráza + TFIIO



nukleosom

Molekula m síce (PDB 101)

chromatin



~800 komplex v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*

Bertero et al, Cell, 2010

Nejast jzí postup charakterizace proteinových komplex

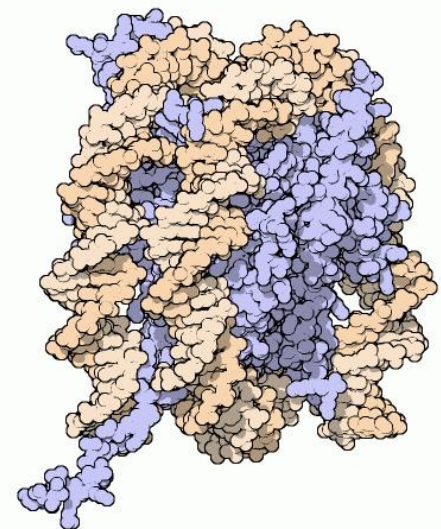
Nový gen/protein . charakterizace funkce a funk ního kontextu =>

1. - identifikace partner tzn. PPI respektive izolace komplexu
2. - charakterizace komplexu *viz MGP . 3.5.2016*
 - vzájemné PPI podjednotek - architektura/struktura komplexu
 - funkce podjednotek (genetická analýza, lokalizace v bu ce ò)
3. - rekonstituce a analýza aktivit celého komplexu *in vitro*

Metody izolace a analýzy proteinových komplex

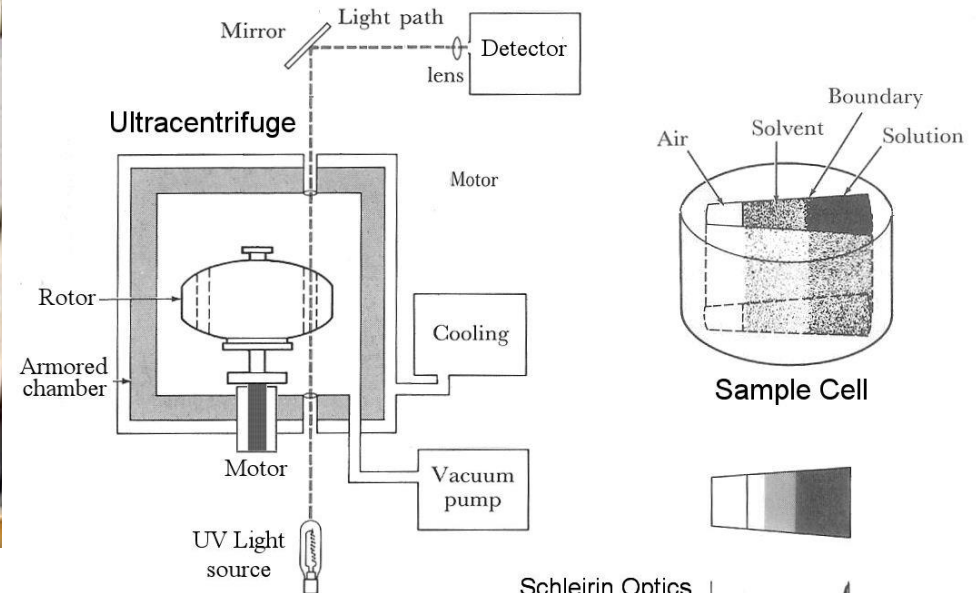
Prolínají se analytické a izola ní:

- ultracentrifugace, gelová filtrace
 - TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
 - ko-imunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ò
 - crosslink MS, (cryo) elektronová mikroskopie ò
- (Prolínají se i metody pro komplexy a PPI - *viz MGP . 3.5.2016*)
- ò visualiza ní metody

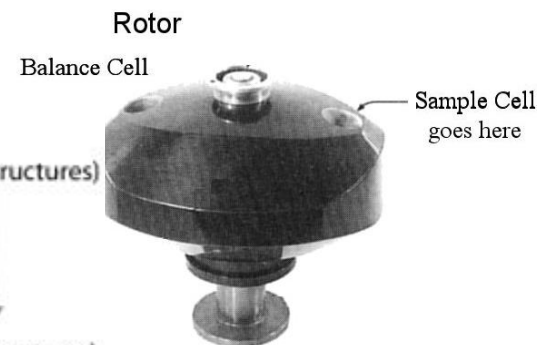
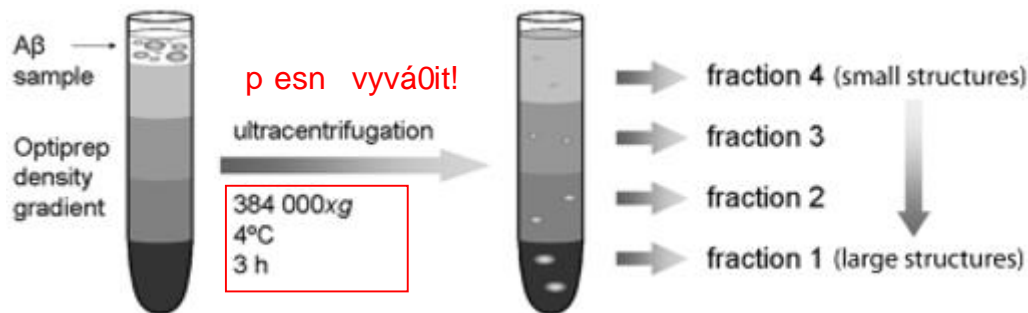


Metody analýzy a izolace PKx

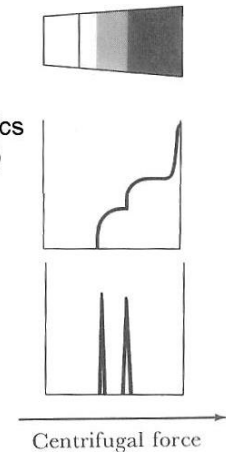
Ultracentrifugace . analytická (preparativní . malé objemy)



Cukerný/hustotní gradient



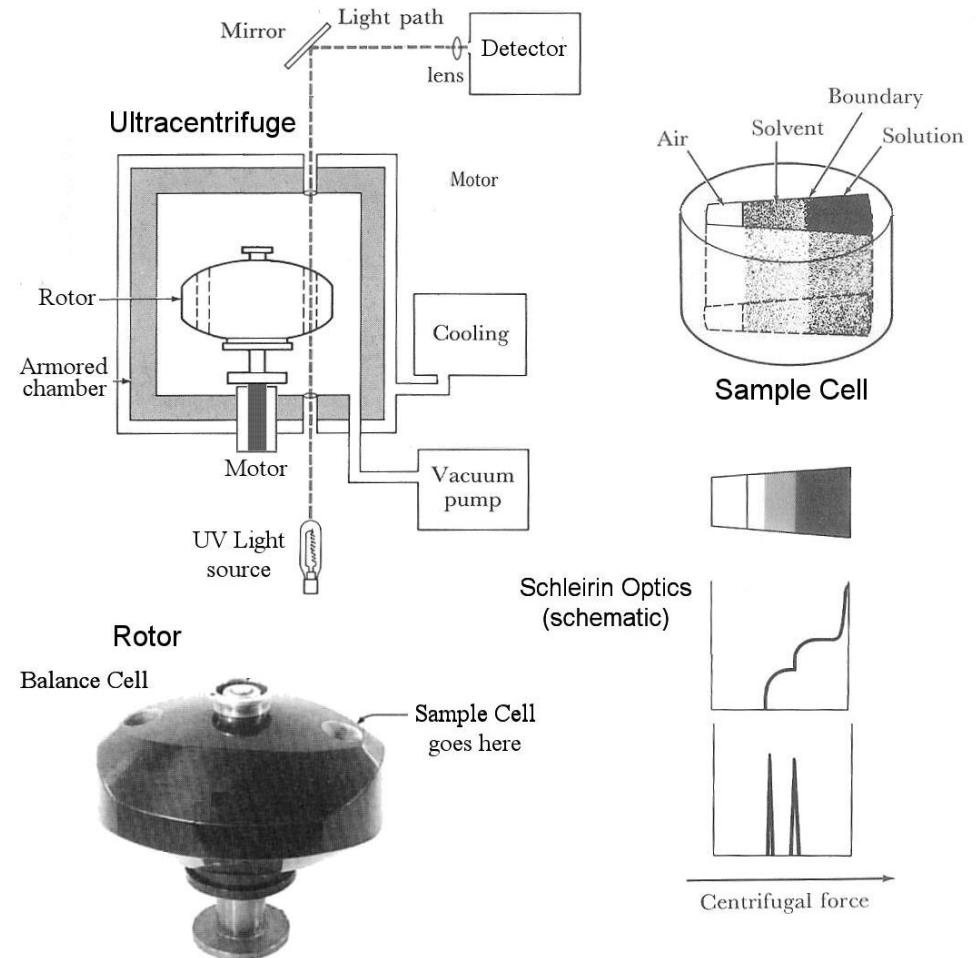
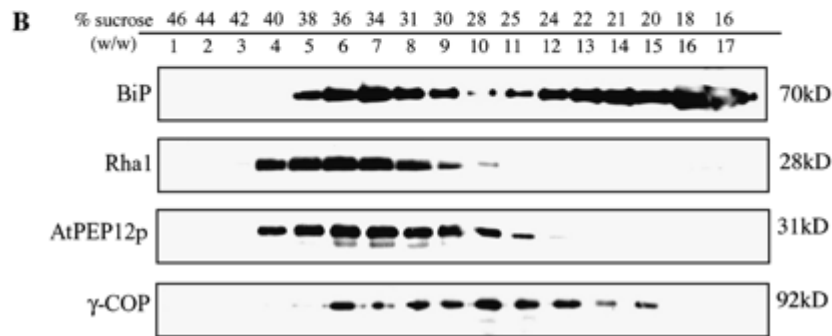
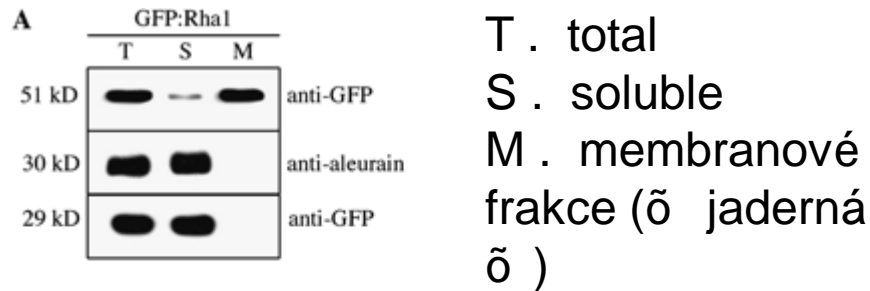
Schleirin Optics (schematic)



ím hustší je roztok tím více sbrzdí%o částice => t 0zí částice projdou dál

Metody analýzy a izolace PKx

Ultracentrifugace . analytická (preparativní . malé objemy)



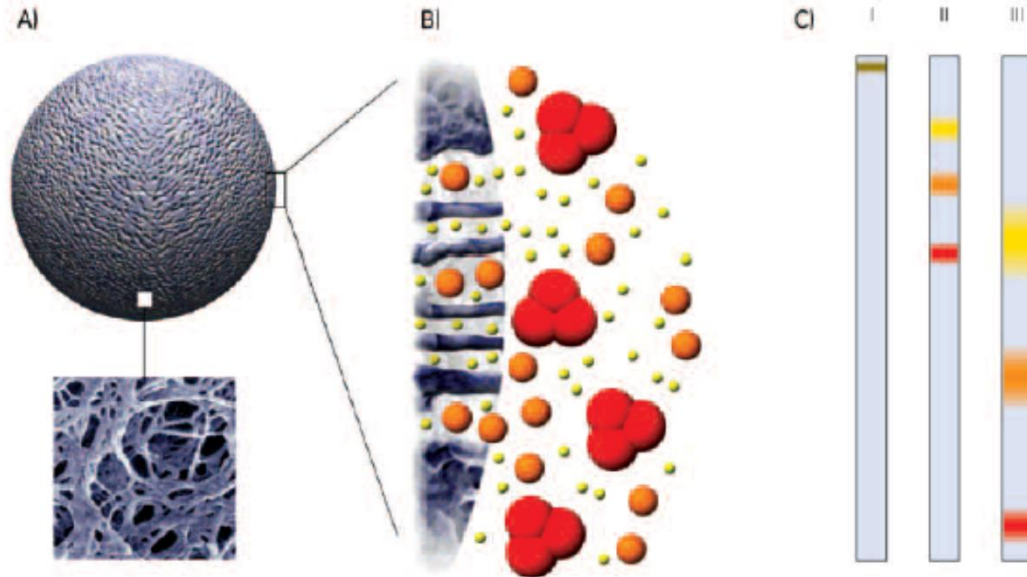
- A. Hrubzí pouze rozdíl na kompartmenty/organely
B. Jemný - cukerný gradient

Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

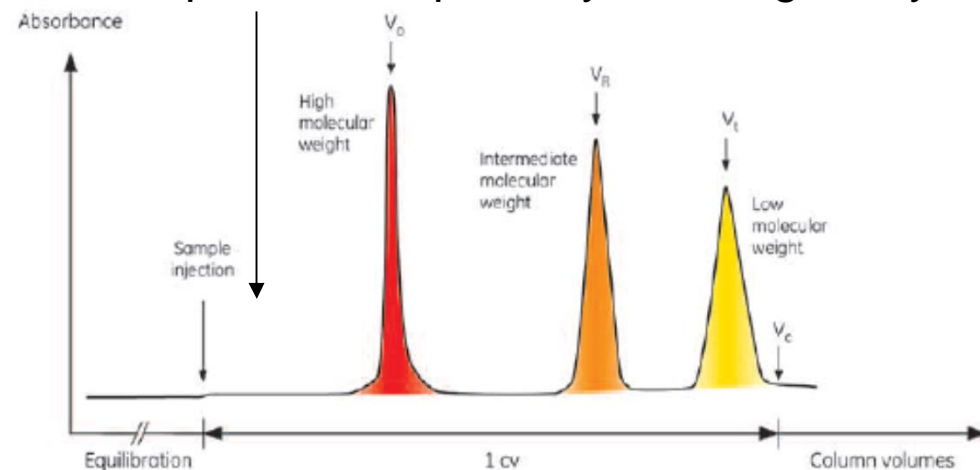
ím hustší je roztok tím více sbrzdí%o částice => t 0zí částice projdou dál

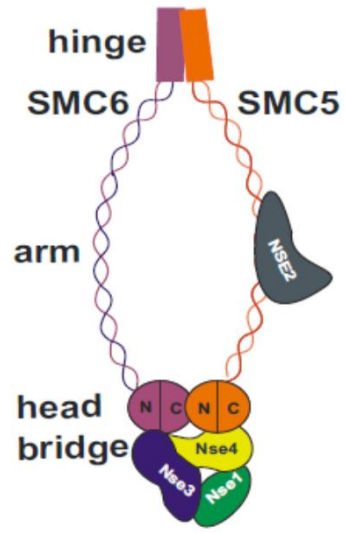
Metody izolace a analýzy PKx

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

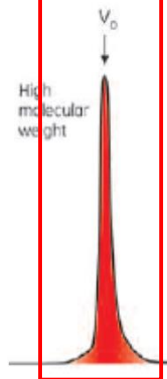
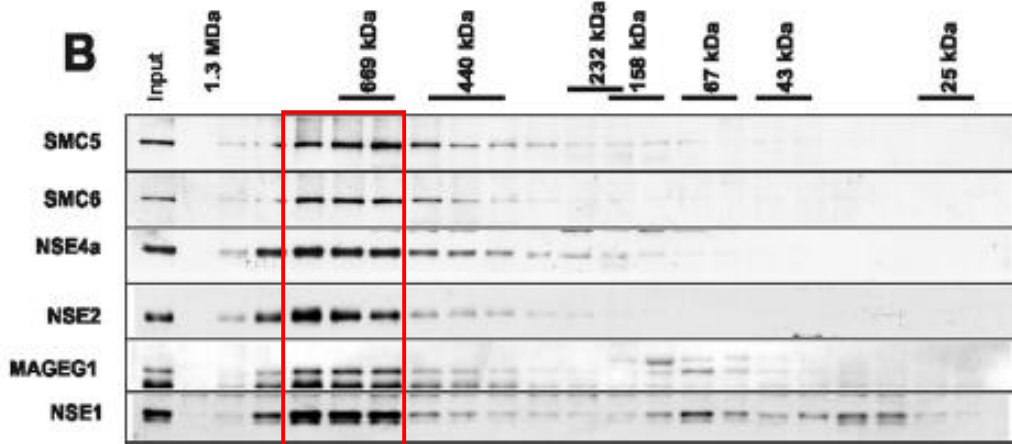
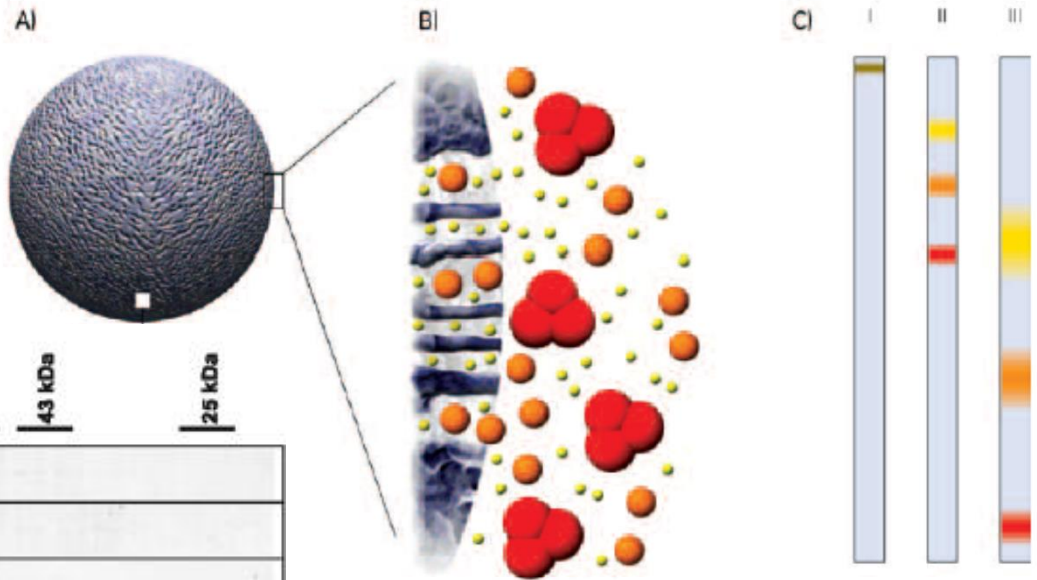


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty

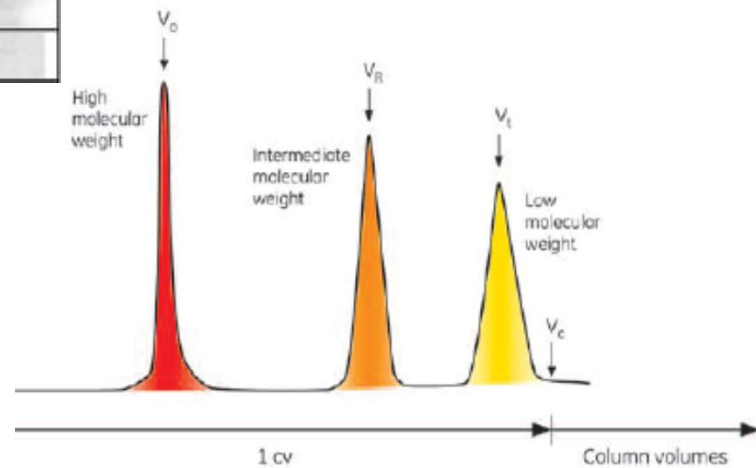




P íklad: SMC5/6 komplex . v bun ném lyzátu (nebo purifikované proteiny viz dále)



GF: frakce lyzátu lidských bun k . podjednotky SMC5-6 komplexu identifikovány pomocí protilátek



Metody izolace a analýzy PKx

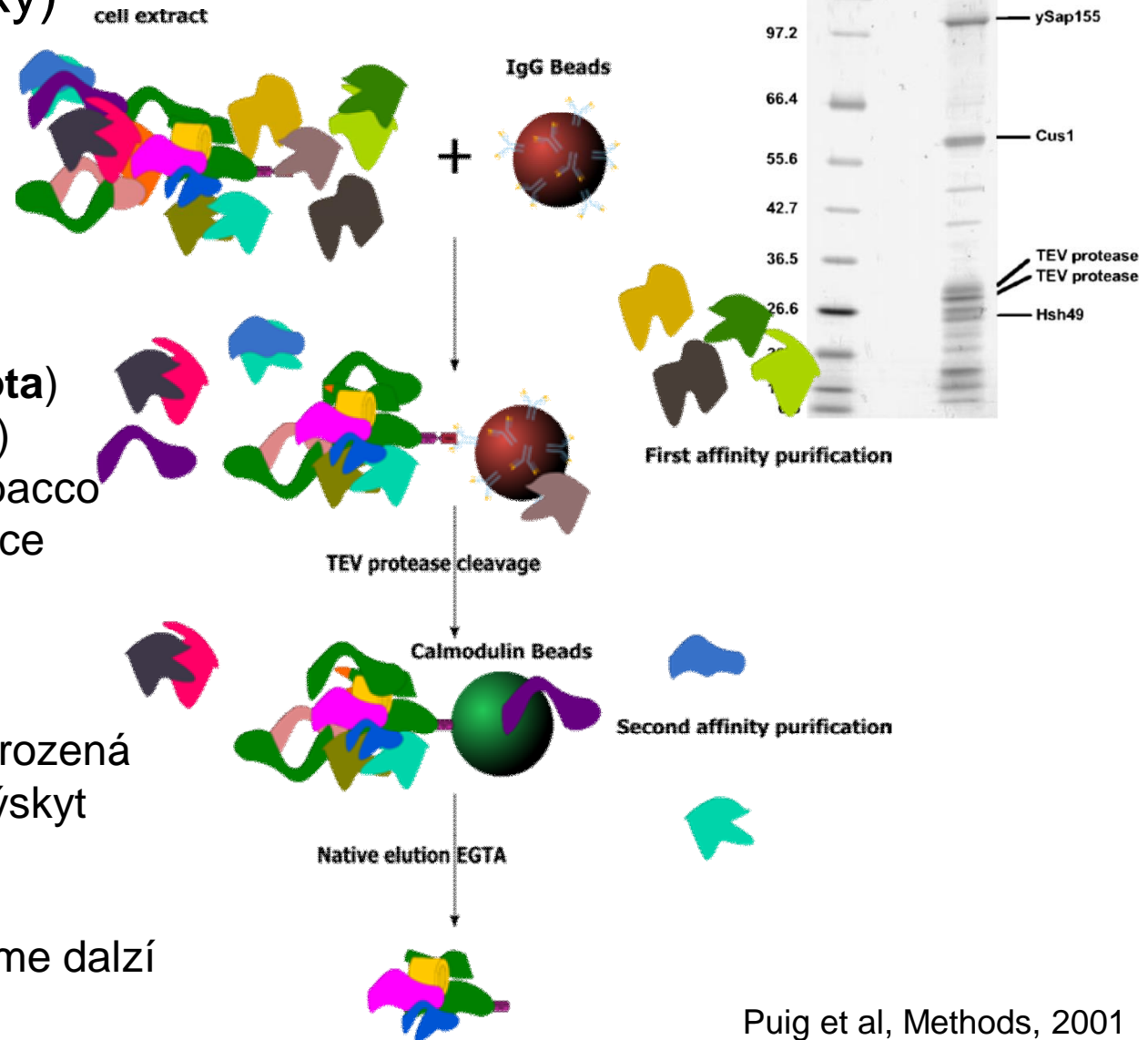
- TAP-tag (sTandem-affinity purification%₀
jiné tagy a protilátky)

Protein CBP A
I jiné kombinace
(HBH . His-biotin-His)

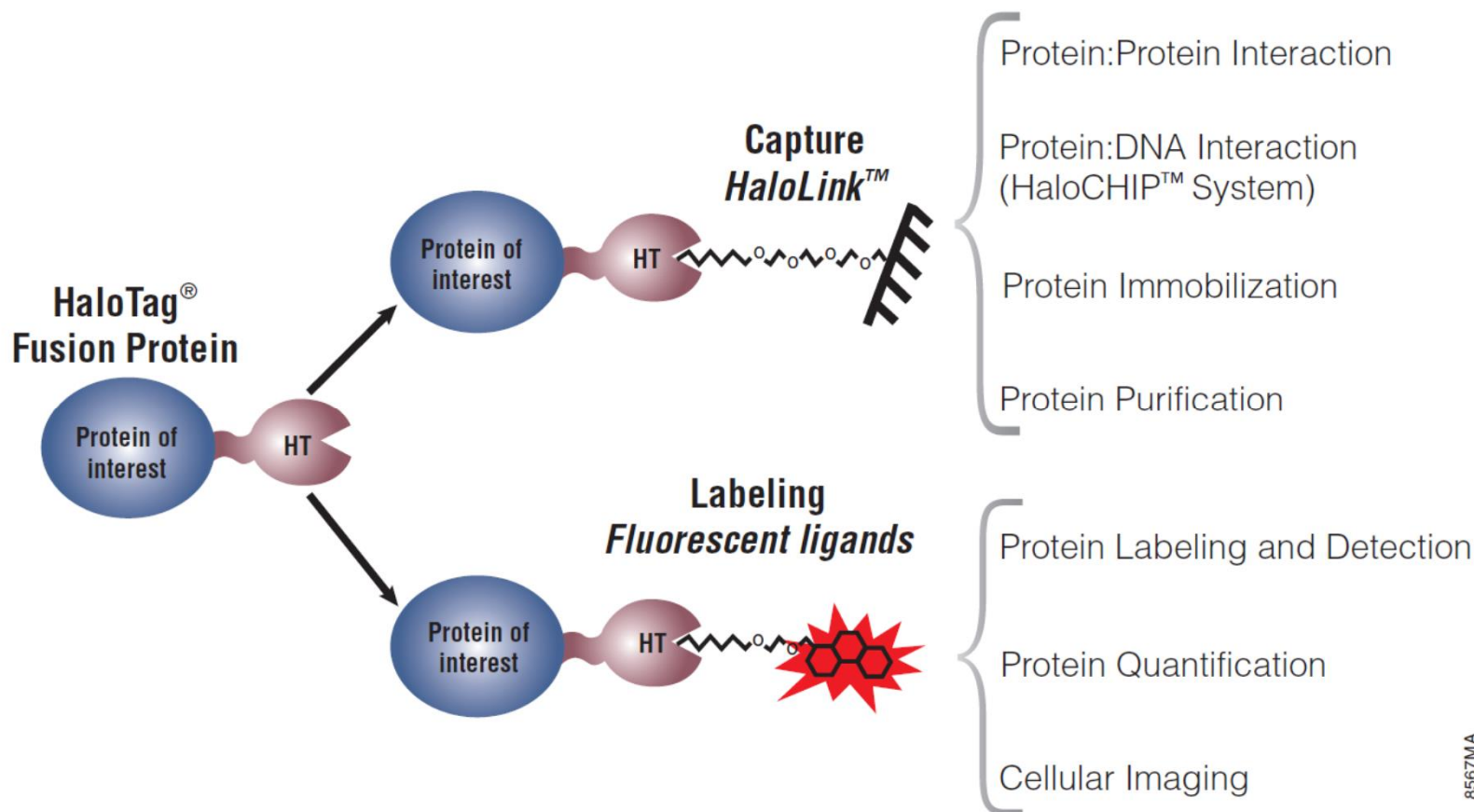
Tandem-affinity purification
(vícestup ové Ě vyýí istota)
1. Protein A (vá0e IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) . uvoln ní z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) . eluce EDTA

Zaintegrované v genomu (p irozená hladina proteinu, p irozený výskyt partner /komplexu õ)

známe jeden protein . hledáme další podjednotky



Metody izolace a analýzy PKx



Velmi vhodný HALO tag pro izolaci komplex : kovalentn vázaný ligand (siln jzí vazba, více oplach)

Uvolnit lze pouze proteolytickým ztepením (nevýhoda) . vs zt pení specificky uvolní pouze komplex z matrice (nespecificky navázané proteiny z stanou na matrici)

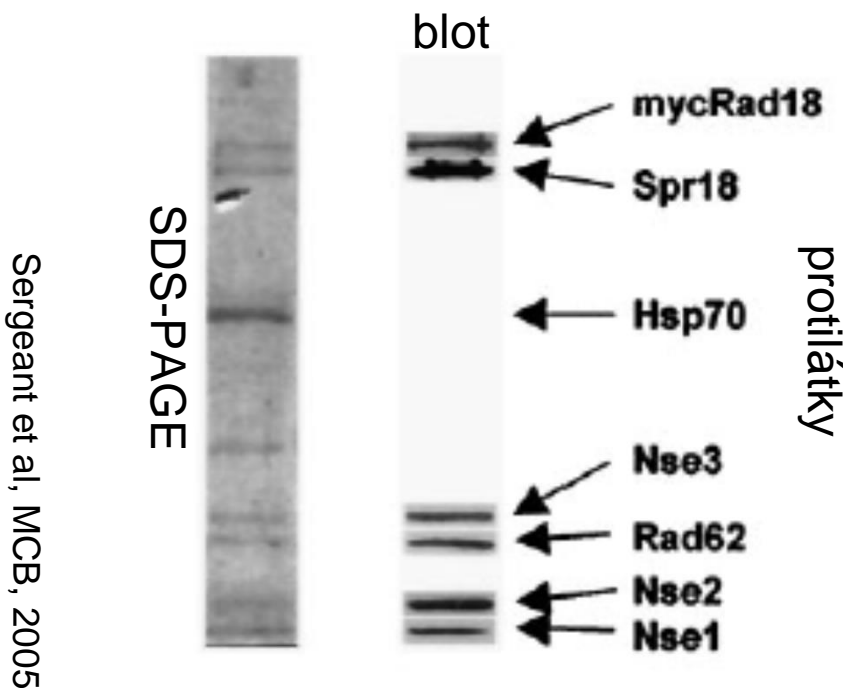
Metody izolace a analýzy PKx

Jednoduché tagy/značky:

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

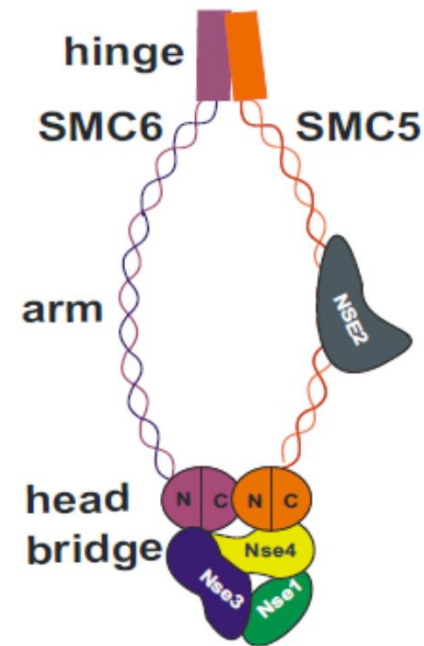
GST, Streptactin (biotin-streptavidin), MBP ϕ (vazba přes ligandy)

Kompetitivní eluce (peptidy nebo ligandy)



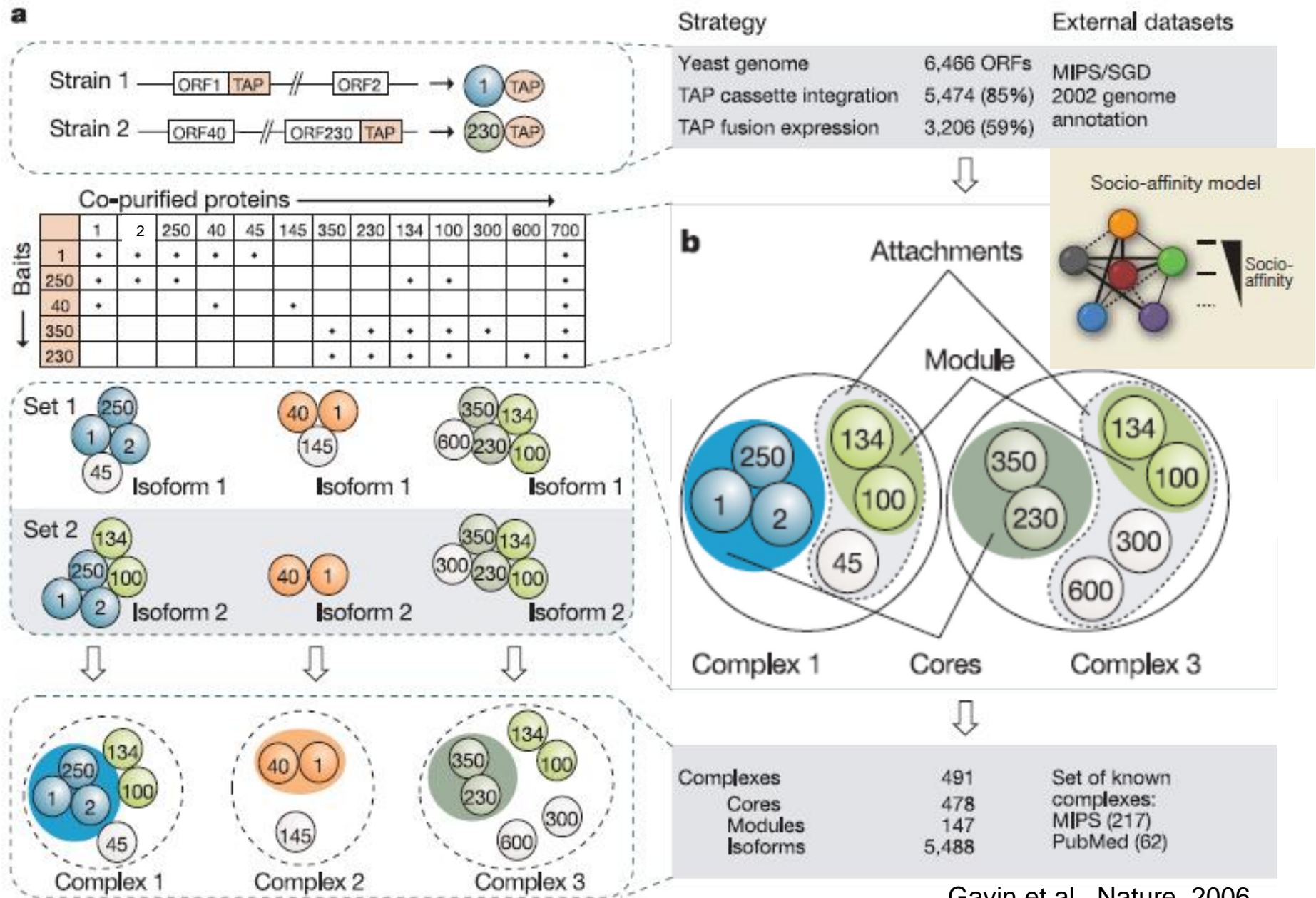
Pozor na kontaminace (např. chaperony)

MS analýza SDS-PAGE nebo roztoku



Známe-li více podjednotek - značka na r zné podjednotky komplexu (vs TAP na jedné podjednotce) . postupná purifikace => kompletní komplex (vychytaný přes r zné podjednotky)

Izolace komplex z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



Různé přístupy izolace komplexů

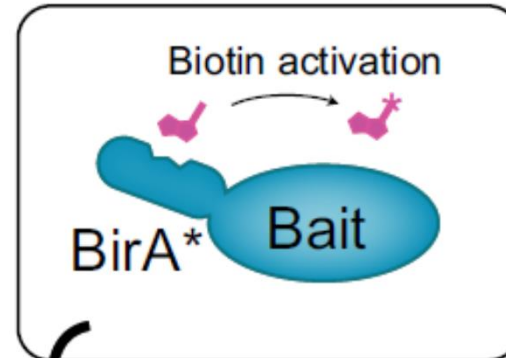
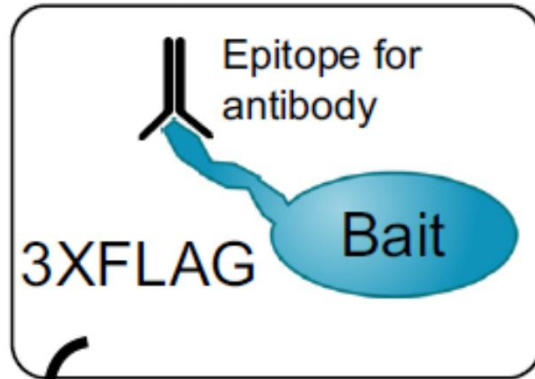
klasický

alternativní

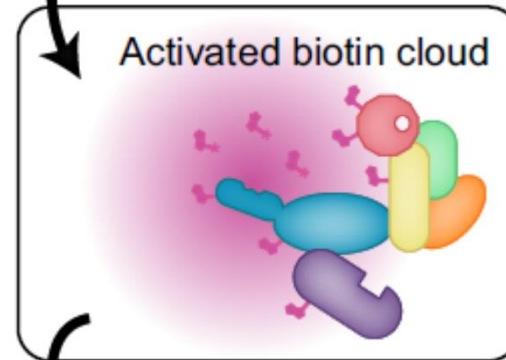
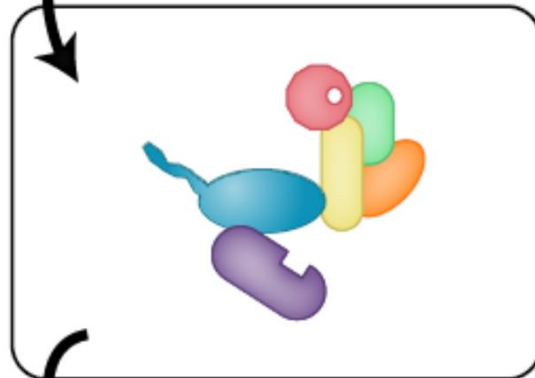
Affinity Purification

BioID (Proximity Biotinylation)

Tagging system

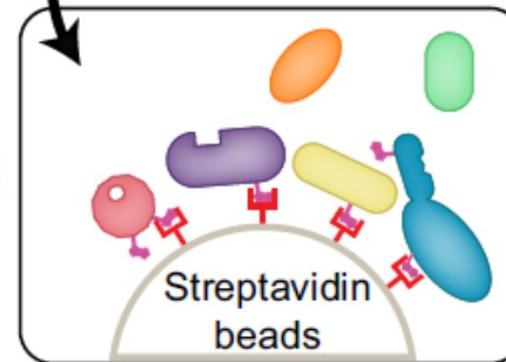
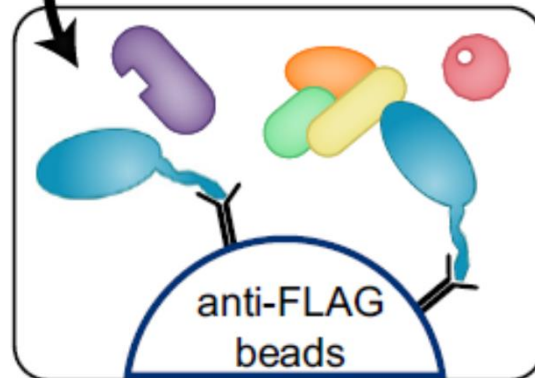


in vivo
function



Biotinylace na
vzdálenost
<20nm

Purified
interaction
partners



MS identifikace
biotinylovaných
protein

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



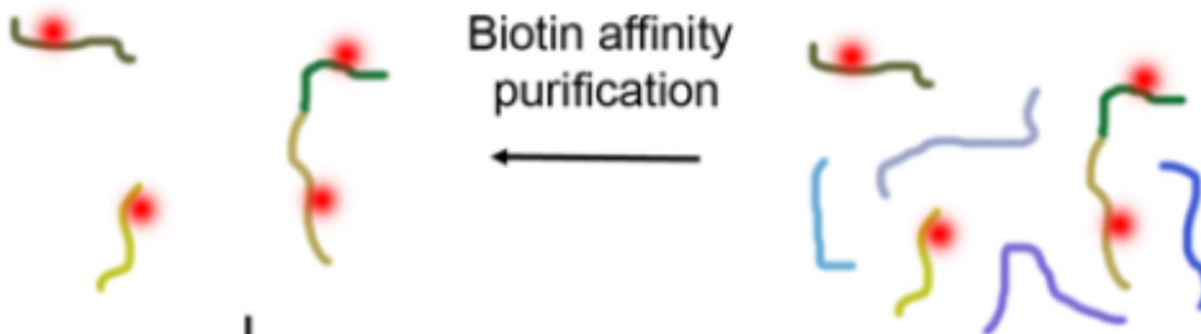
BirA biotin ligáza (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells



Lyse cells

Denature proteins



Biotin affinity purification

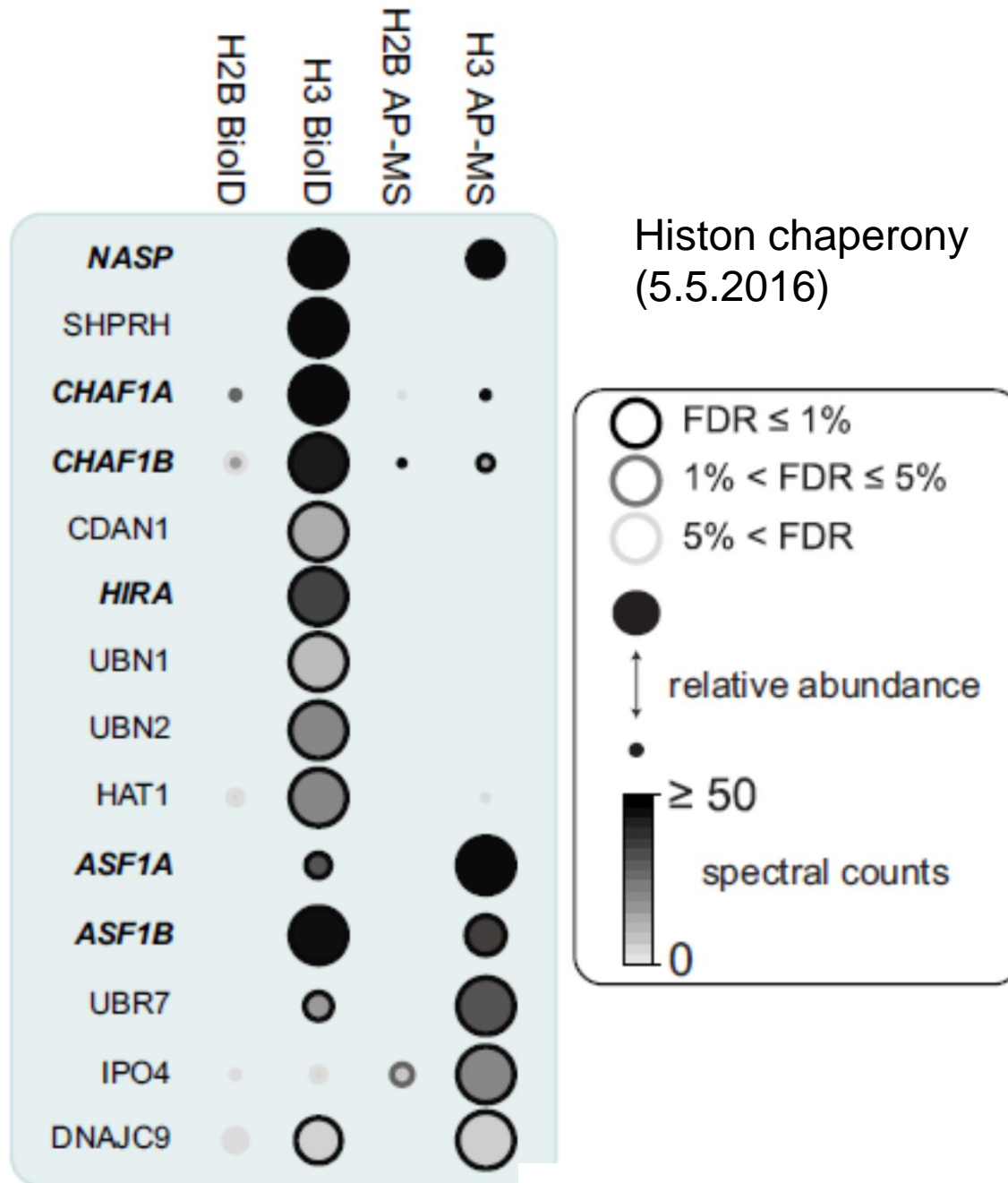
Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

Mass spectrometry to identify candidates

Přidání biotinu v určitém časovém intervalu (rychlé připojení) . pulse-chase . lze sledovat interakce v čase (nap . bun . ný cyklus)

Nap . chromatin-asociované komplexy jsou nerozpustné . izolace za denaturačních podmínek

Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera . slabé/transientní interakce (ne celý komplex . pouze sousedící proteiny <20nm)



Lambert et al, J Prot, 2015

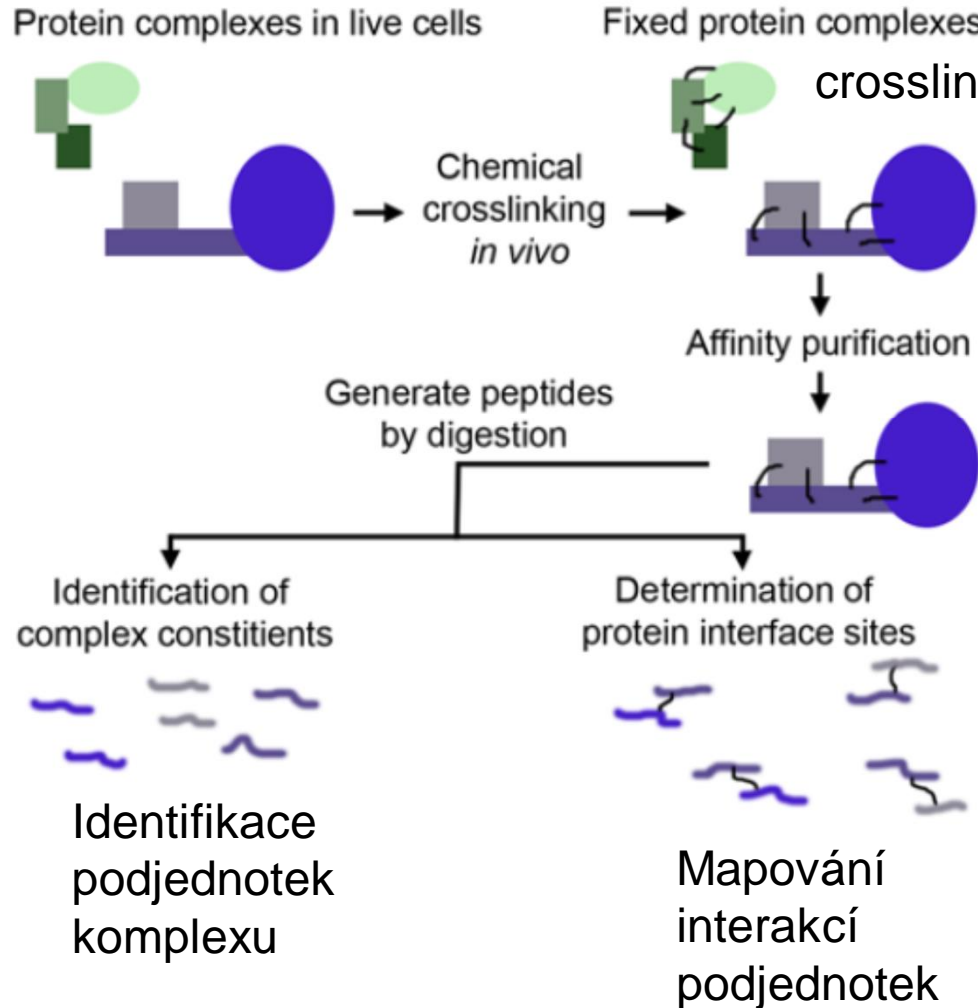
Přidání biotinu v určitém časě (rychlé připojení) . pulse-chase . lze sledovat interakce v časě (např. bun. cyklus)

Např. chromatin-asociované komplexy jsou nerozpustné . izolace za denaturačních podmínek

Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera . slabé/transientní interakce (ne celý komplex . pouze sousedící proteiny <20nm)

Mapování komplex - crosslinking

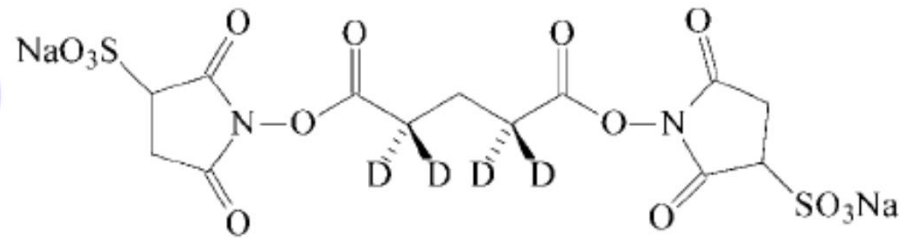
Po crosslinku komplexu lze provádět purifikaci za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu, např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovinu)



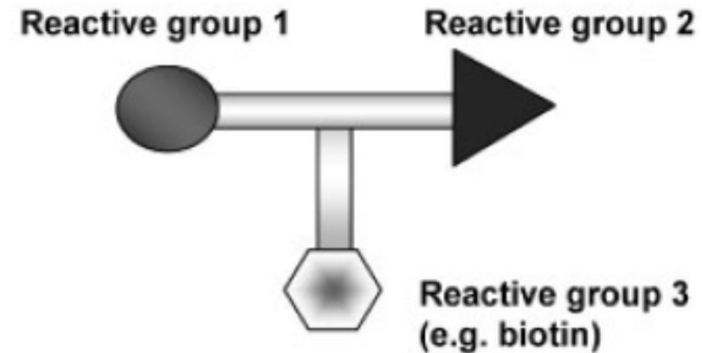
Identifikace podjednotek komplexu

Mapování interakcí podjednotek

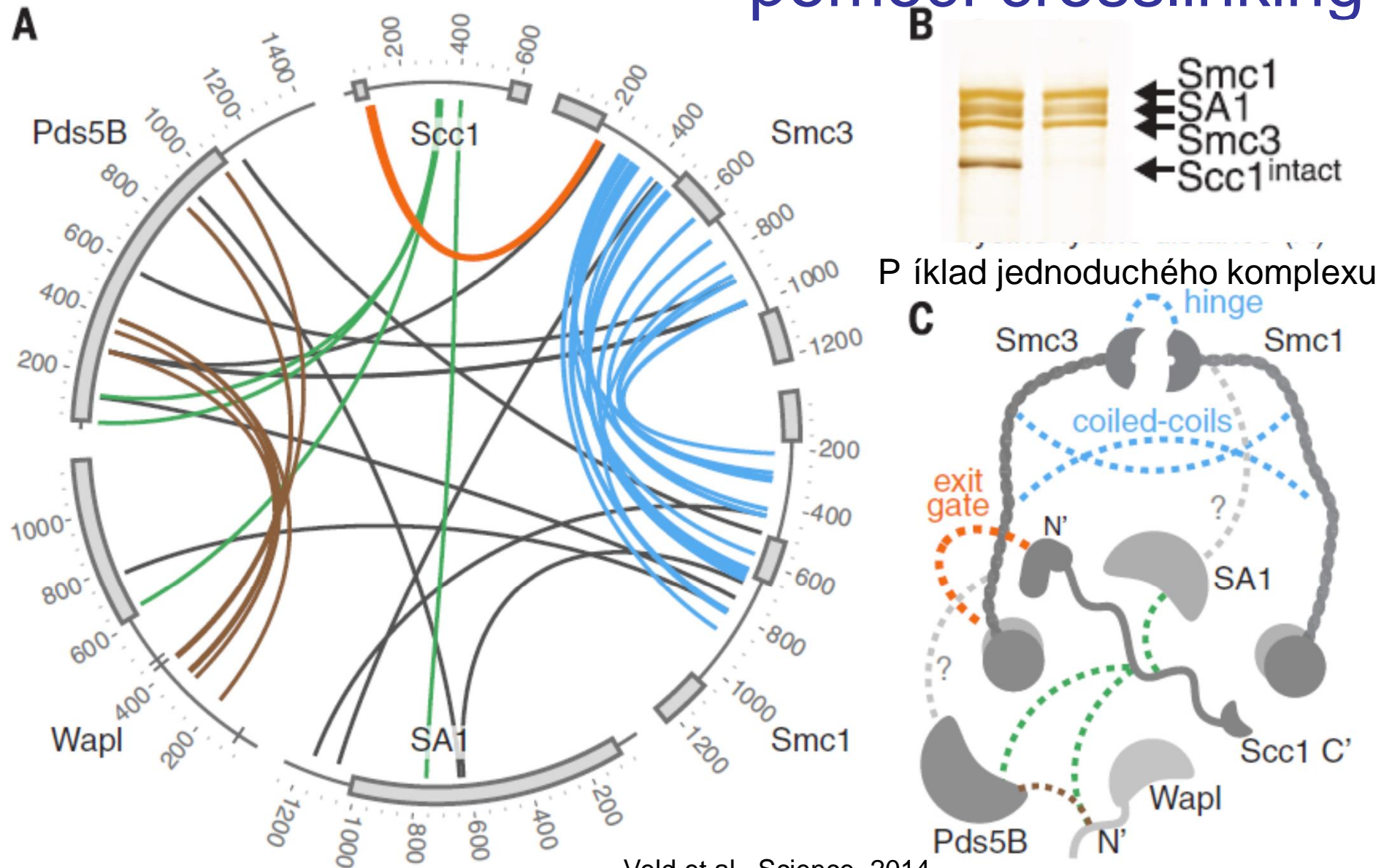
crosslink propojí podjednotky - stabilizuje komplex

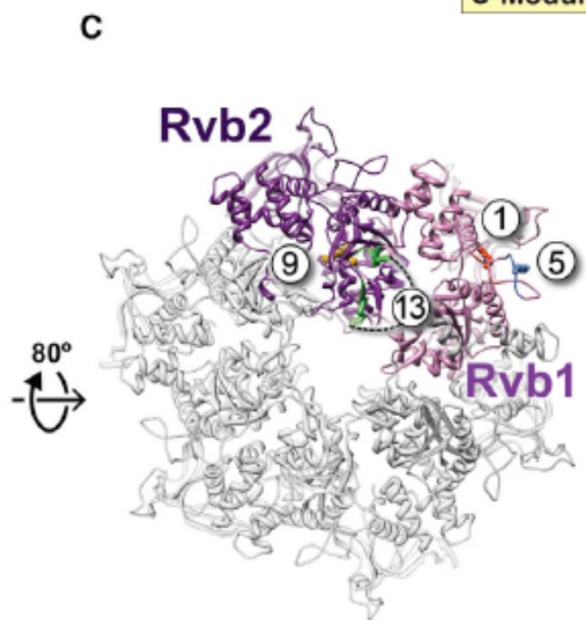
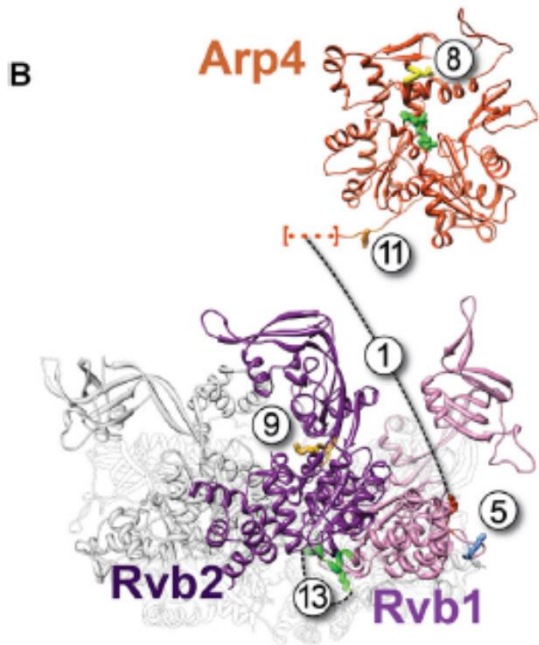
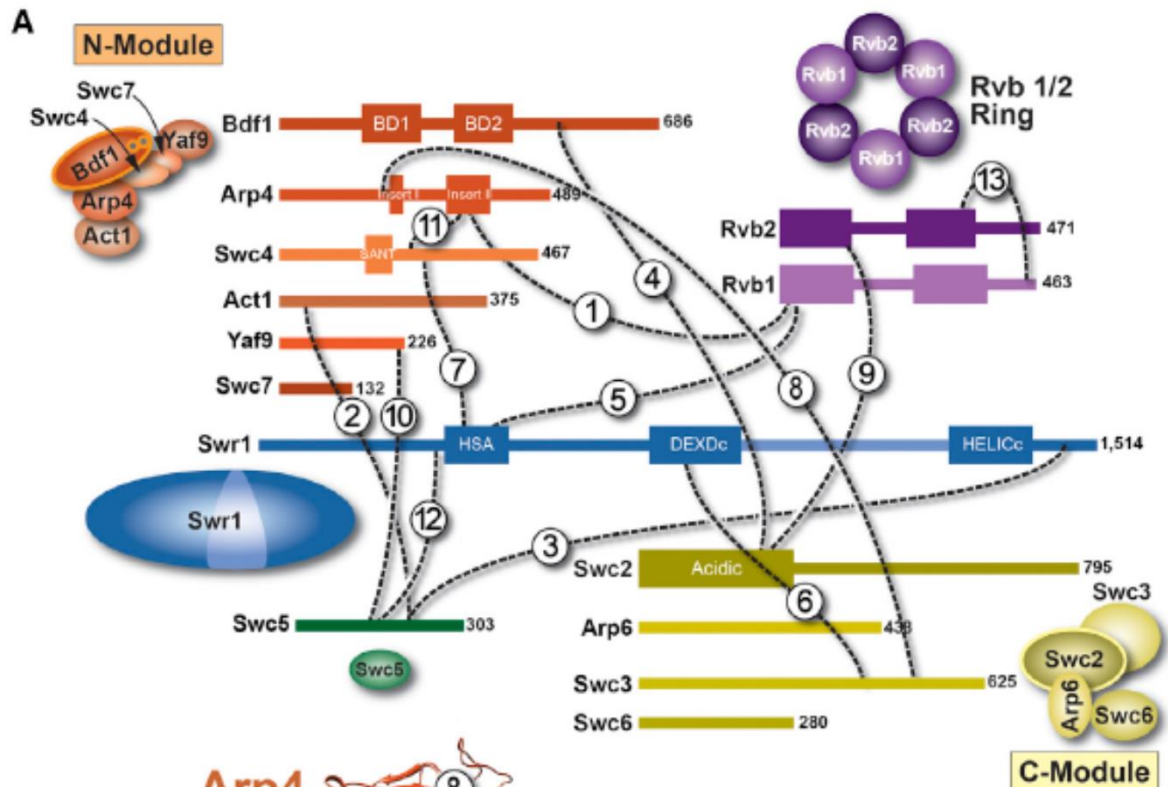


- estery reagují s Lys (ϵ -amin) a aminokoncem (homofunkční - spojí proteiny dohromady v jednom kroku; heterofunkčních - postupná aktivace)
- s tagem. peštit (vzorek není tak komplexní pro MS analýzu)

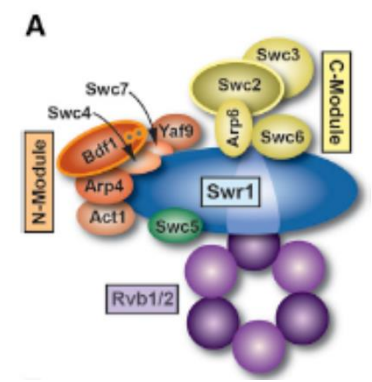


Mapování interakcí mezi podjednotkami pomocí crosslinking

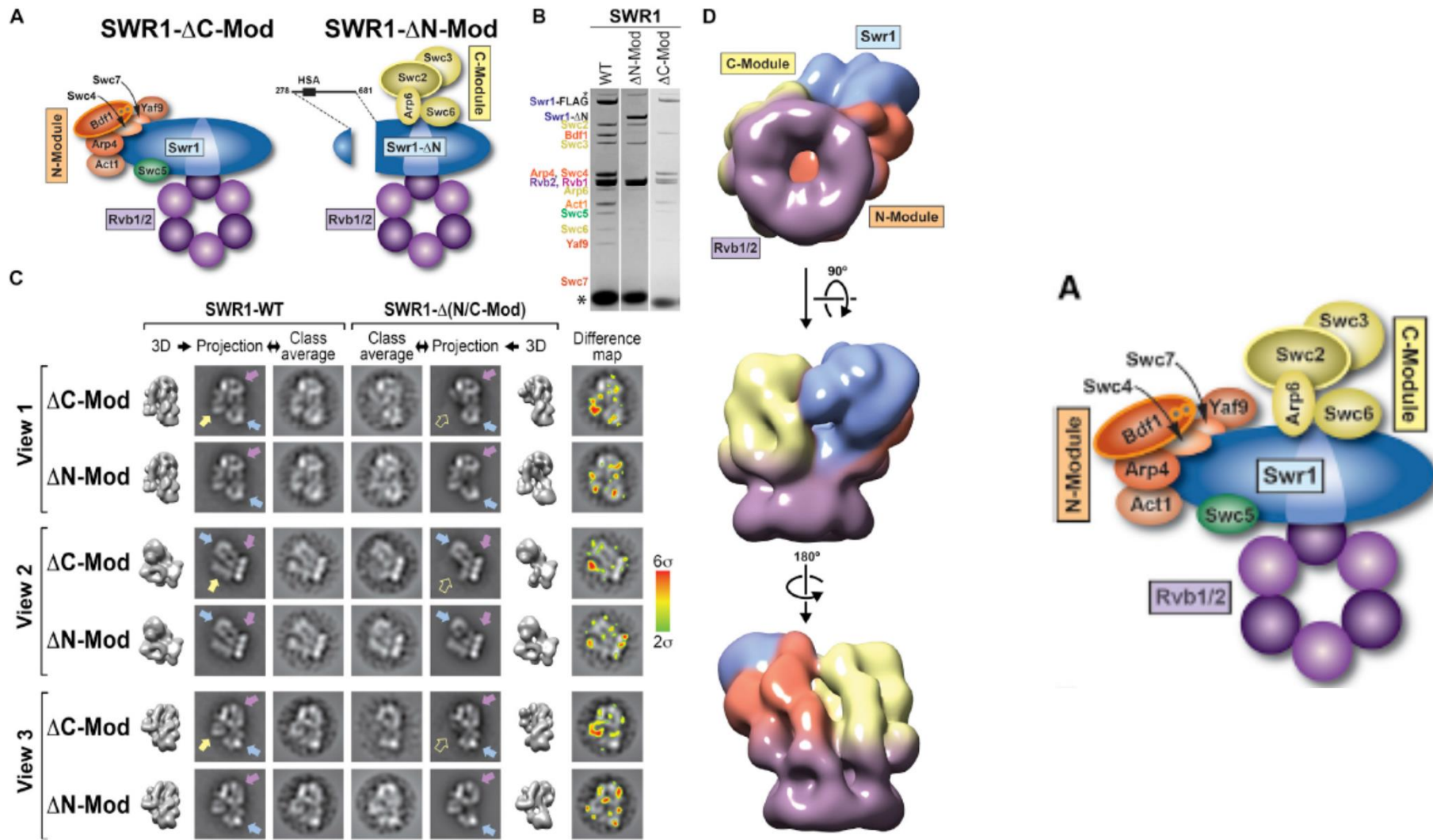




p íklad velkého komplexu (zjednodužené schéma . jak jsou podjednotky sprosí ovány%o jak jsou v prostoru blízko sebe)

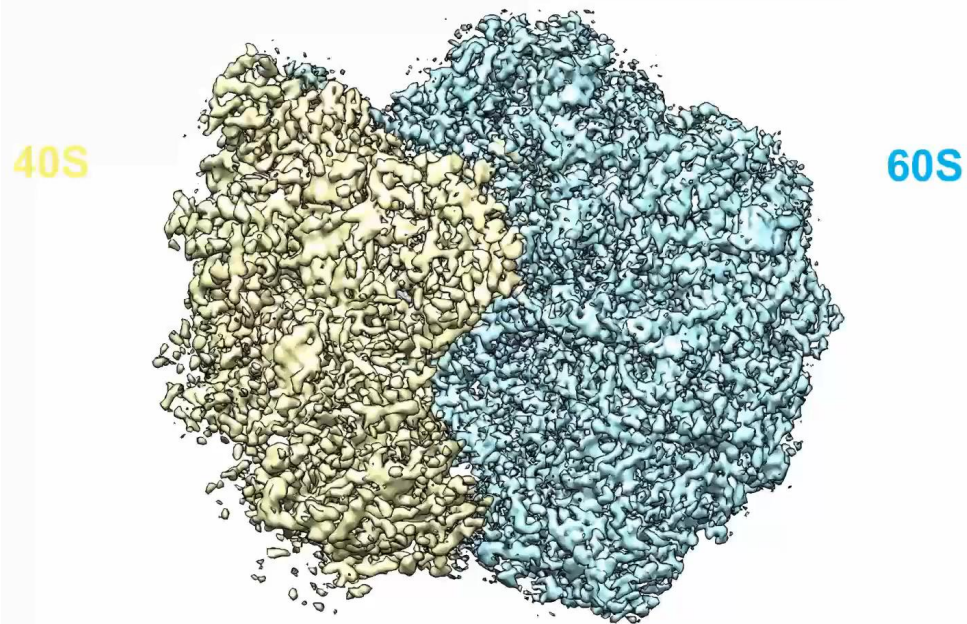
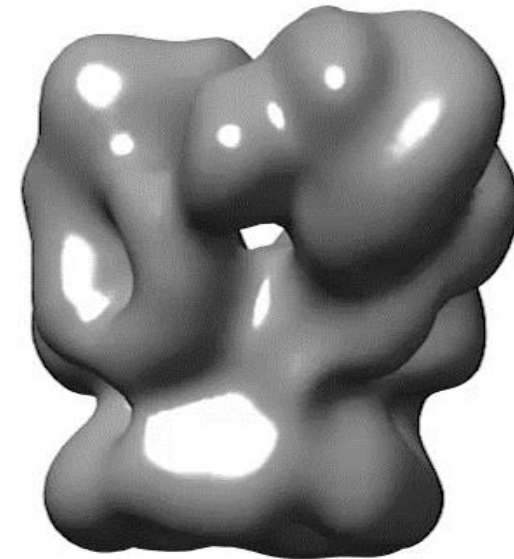
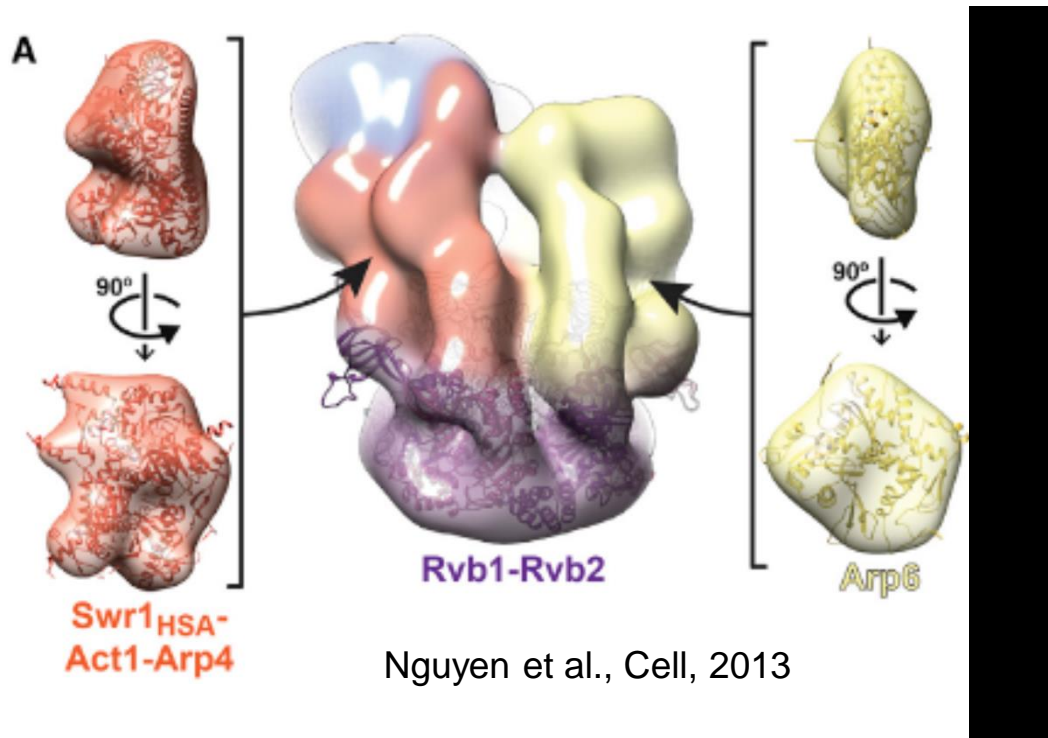


Integrace dalších dat:
- krystalové struktury
- cryoEM data



Analýza architektury komplex (SWR = remodelovací)

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

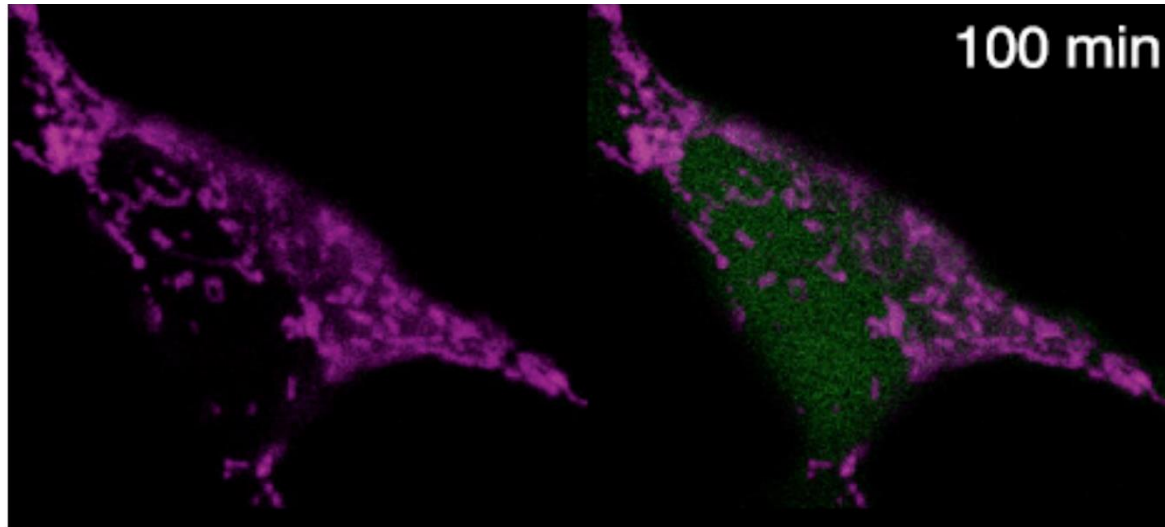


Analýza architektury proteinových komplex

- krystalové (a NMR) struktury lze následně sdokovat do tvaru z EM

Nejllepší cryoEM mají rozlišení až 4 Å

Bai et al., eLife, 2013



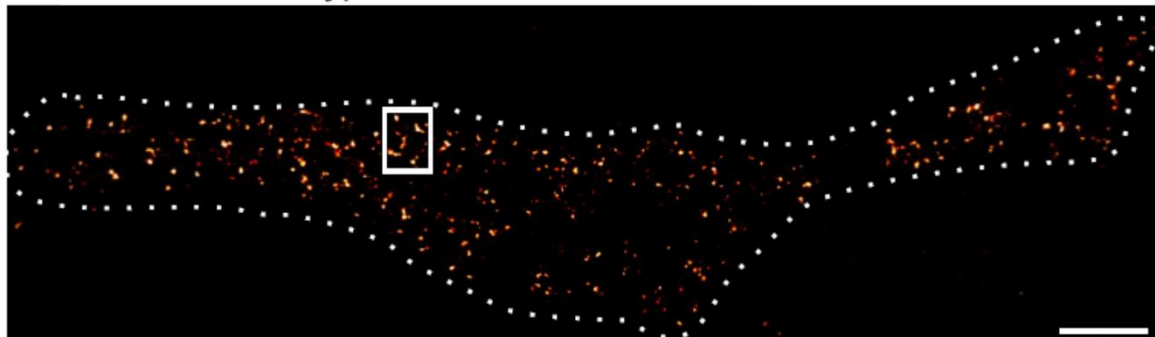
100 min

Lokalizace proteinových komplex

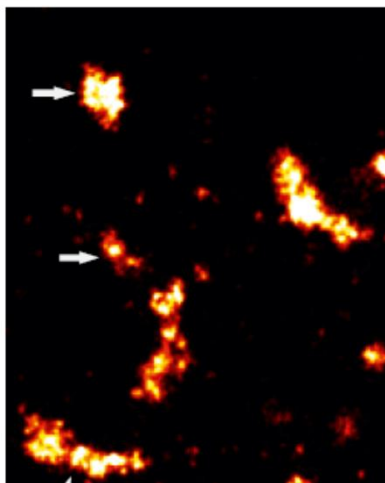
Konfokální mikroskopie vs super-resolution mikroskopie (STED=stimulated emission depletion microscopy . rozlizení 60nm)

+ AFM (atomic force microscopy)

A GFP-Bax wild type

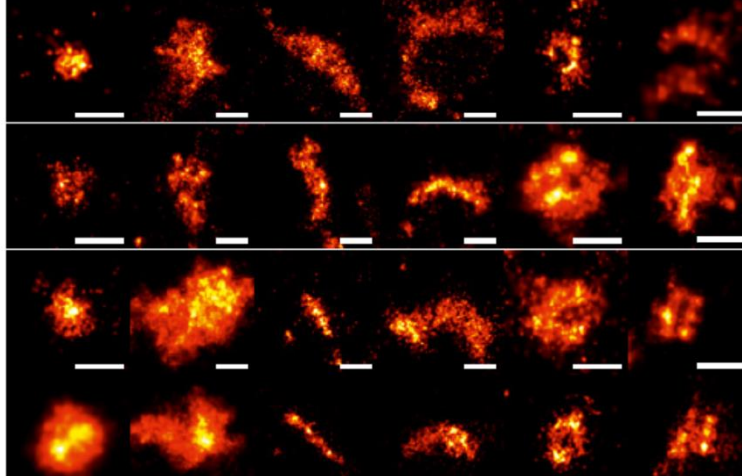


B

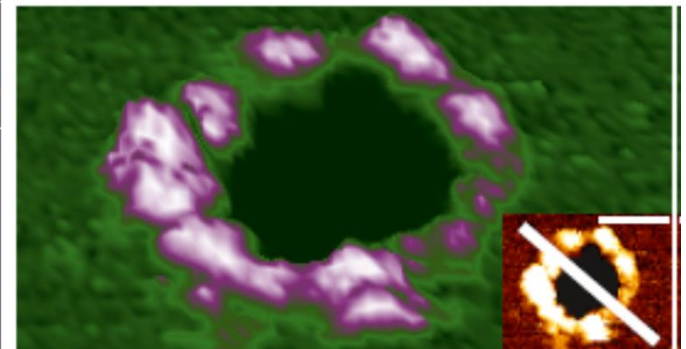


C

Dots Aggregates Lines Arcs Rings Double lines



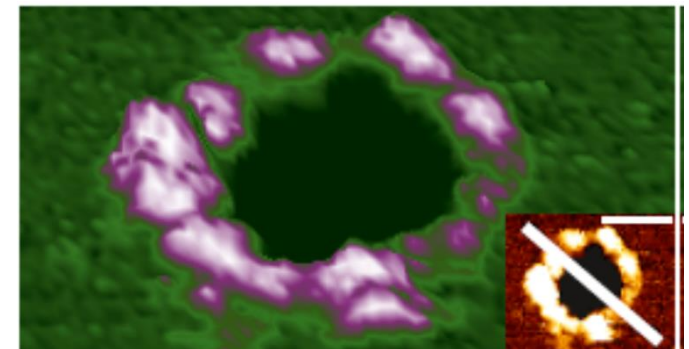
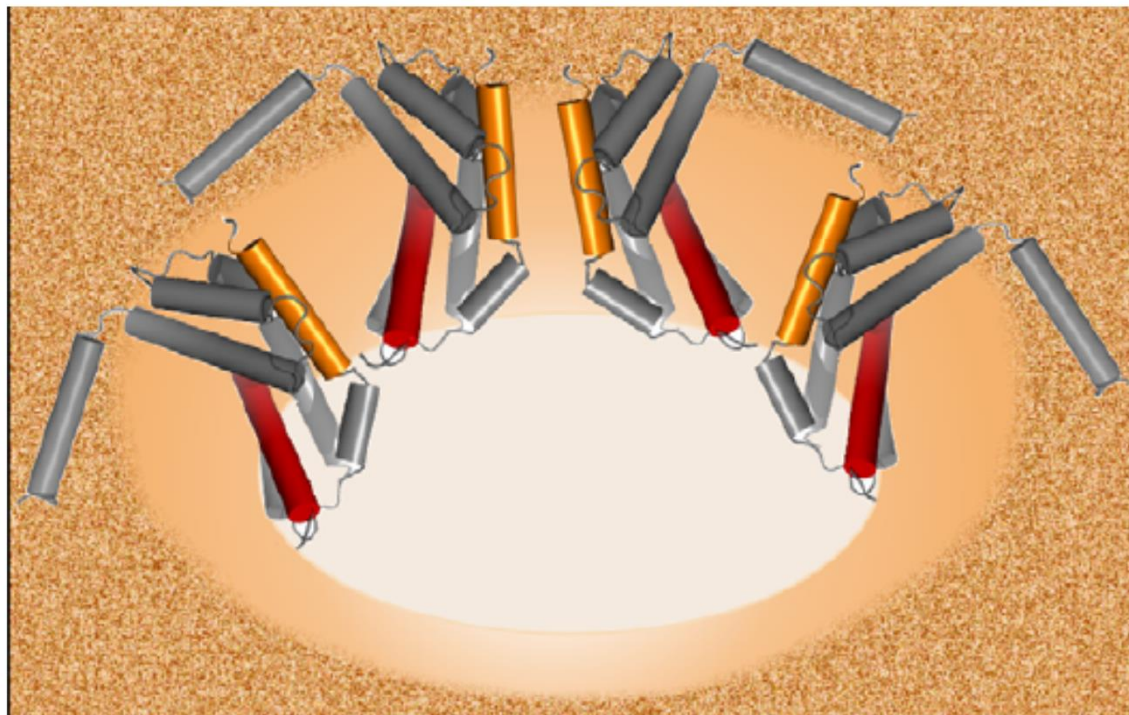
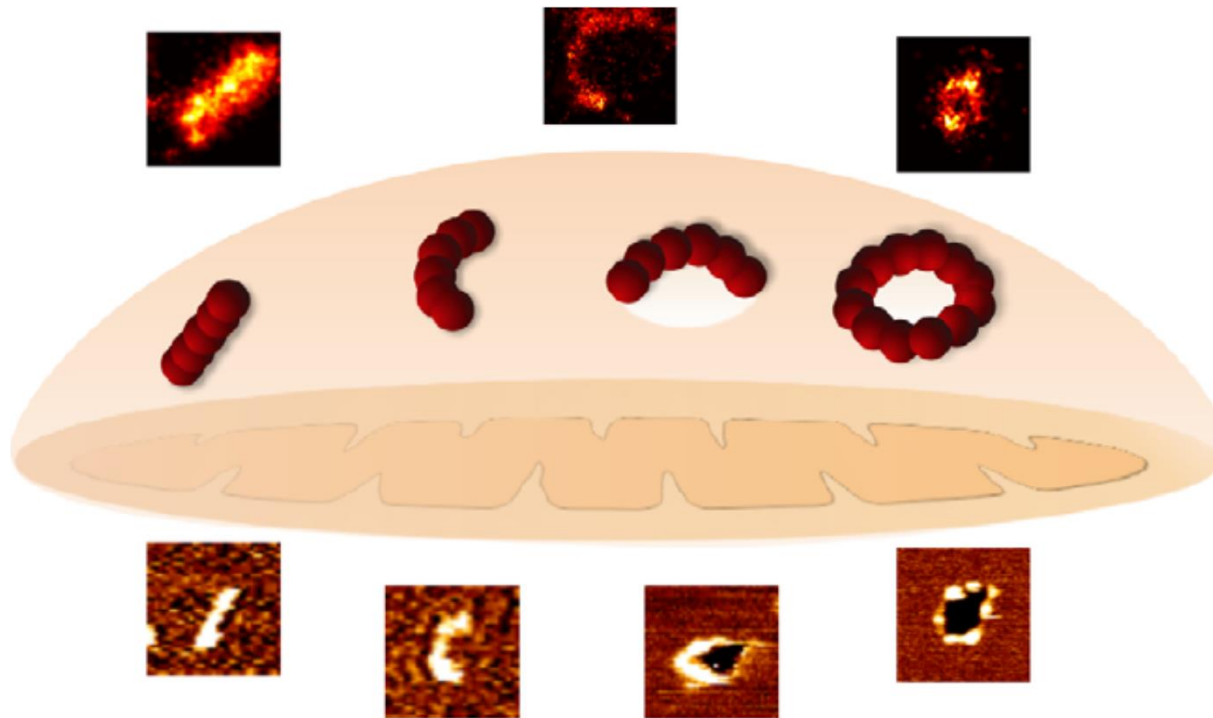
Gallego et al, EMBO J, 2016



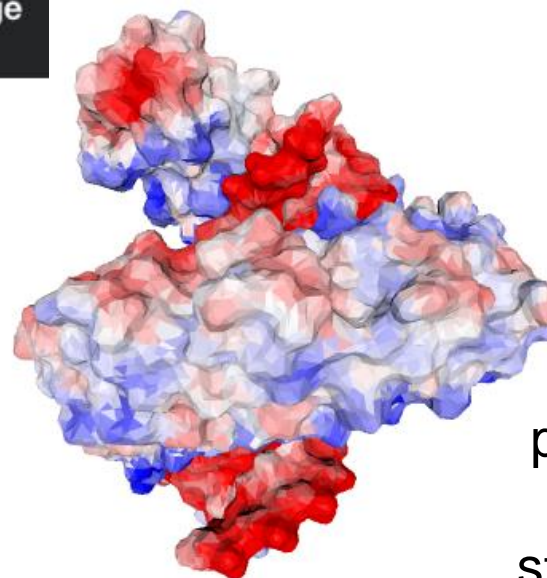
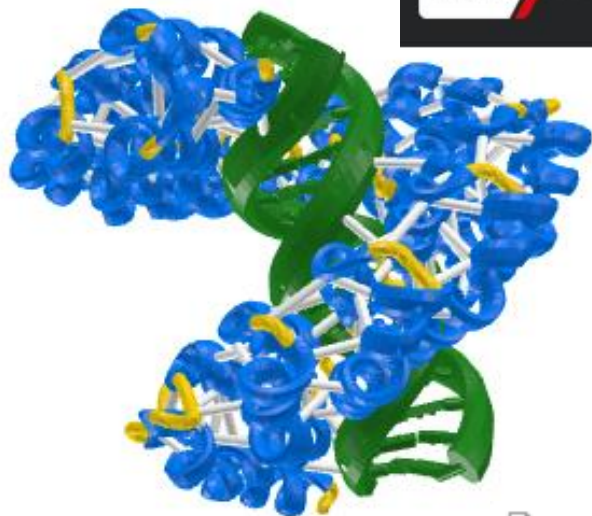
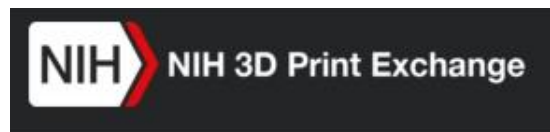
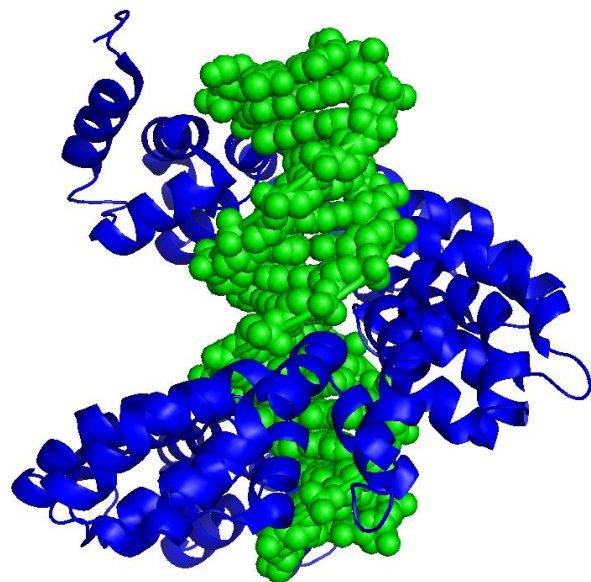
Lokalizace proteinových komplex


Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptóza)

Gallego et al, EMBO J, 2016



Visualizace proteinových komplex

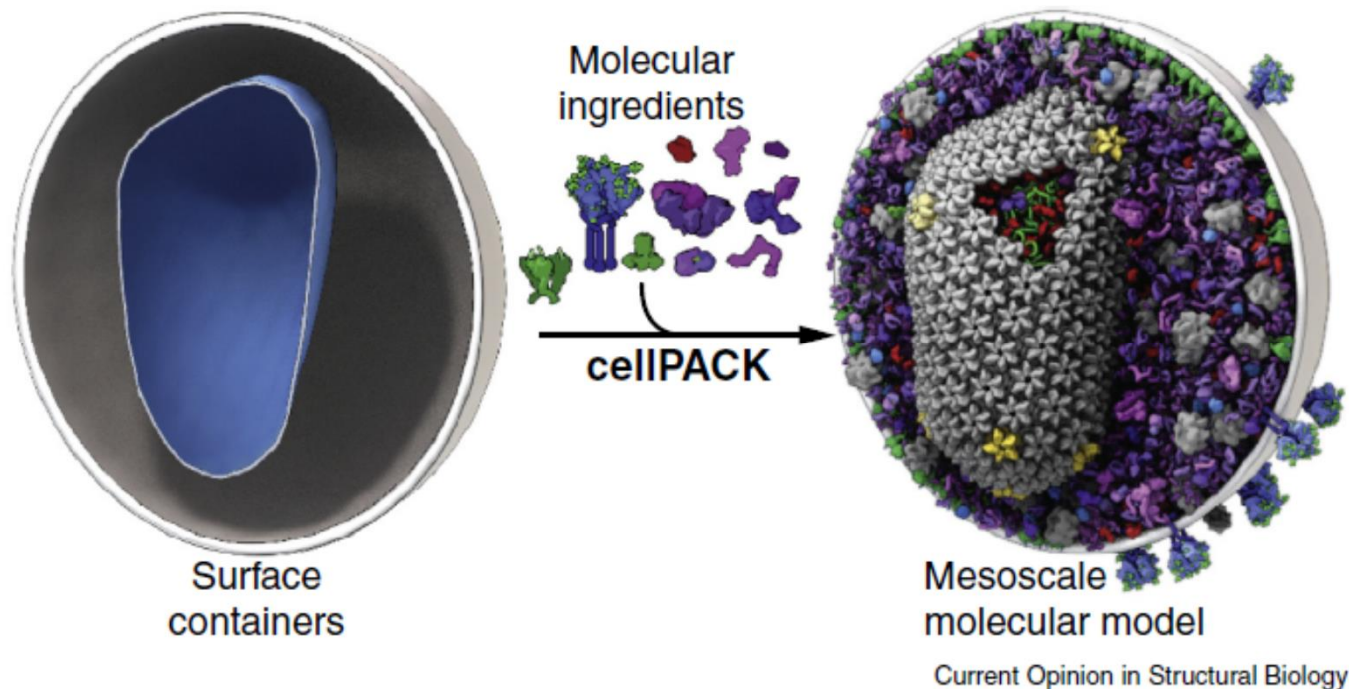


 3dprint.nih.gov/

Existuje mnoho nástroj na vizualizaci komplex

od **PyMOL** pro p ímou vizualizaci krystalových struktur ů **3D tisk**

Visualizace proteinových komplex



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

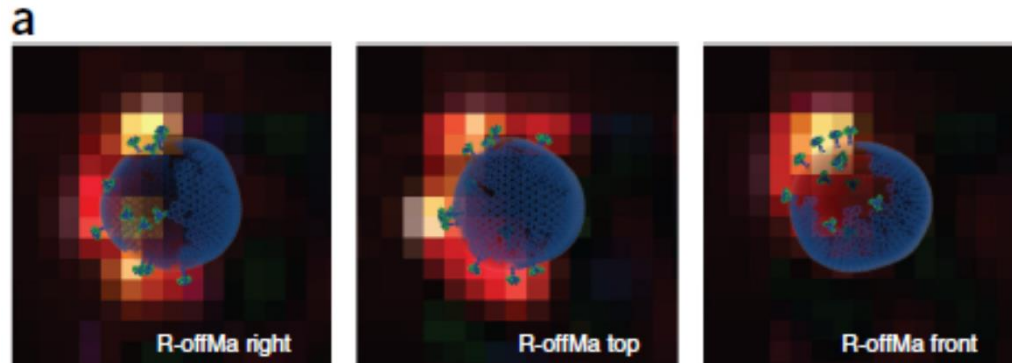
Lze použít k testování modelů

Existuje mnoho nástroj na vizualizaci komplex (i v buněčném prostředí)

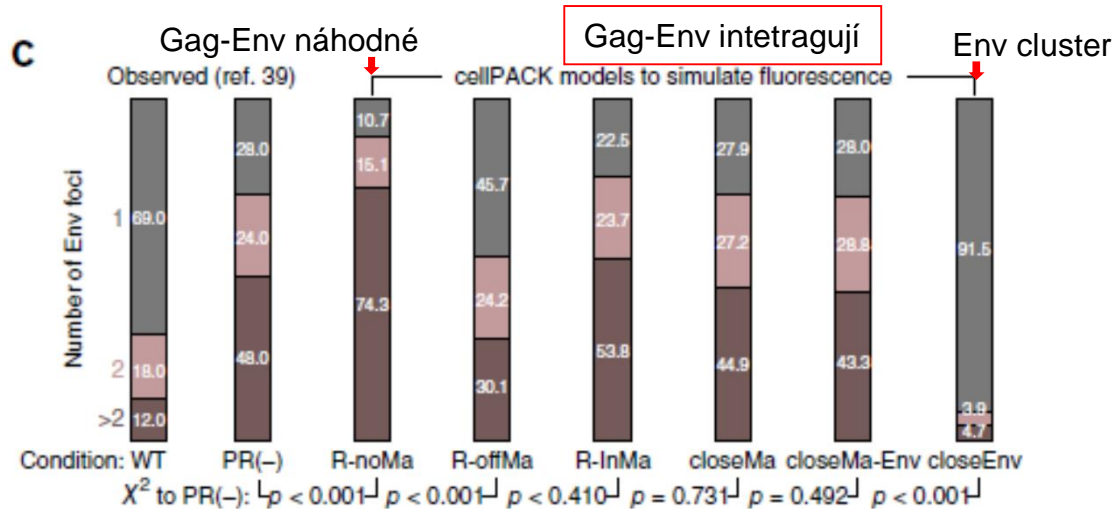
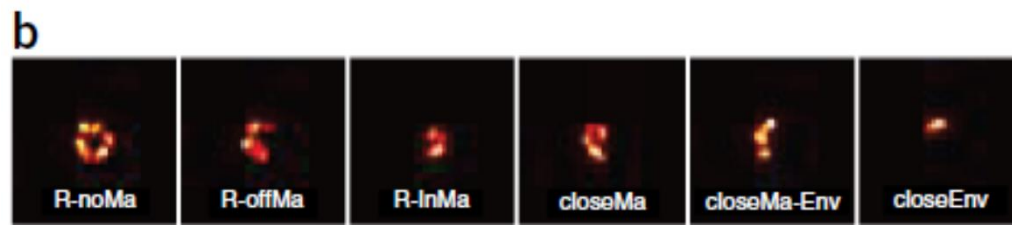
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur
až po **CellPACK** pro interaktivní náhled do buňky a jejích proces

to vychází z herních a animačních algoritmu

Visualizace proteinových komplex - CellPACK



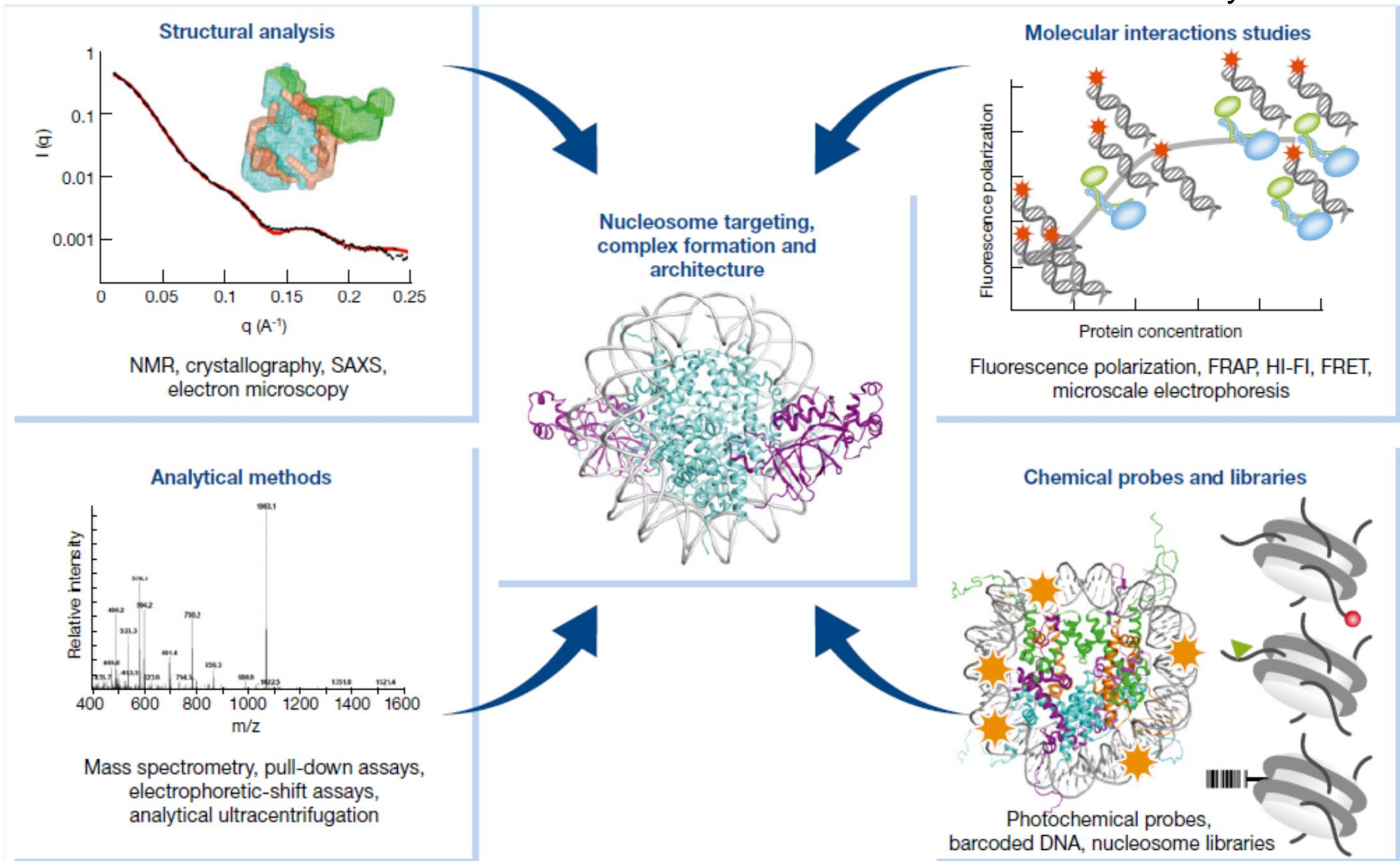
CellPACK poskytuje vzhled do bun ných proces . pou0it na simulaci distribuce protein virové ástice (nap . R-noMa: random-bez interakcí)



Analyza proteinovych komplex

více doc. Marek

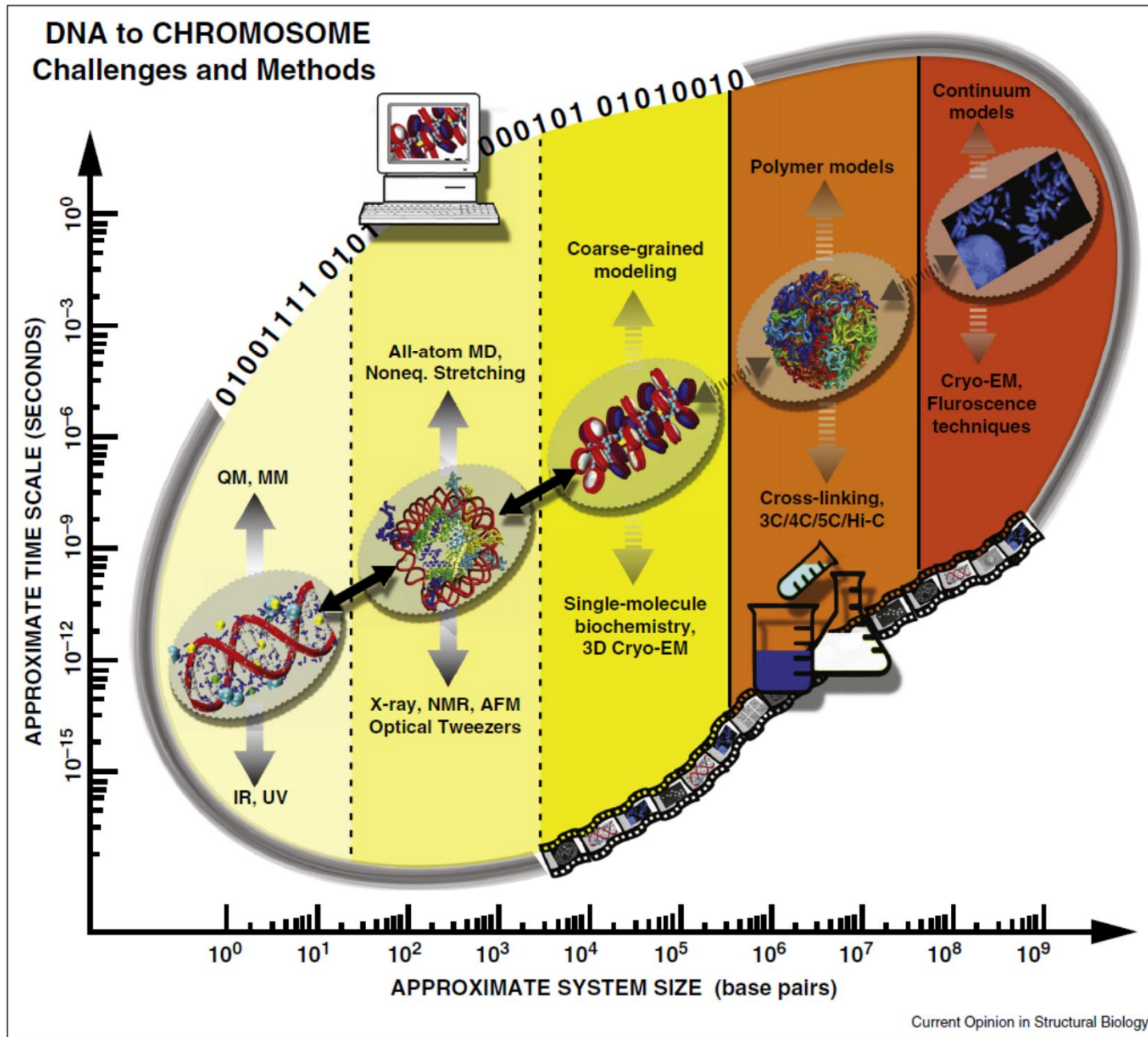
více Metody GP



Speranzini et al, EMBO J, 2016

více C7230 doc. Hofr

Analyza proteinovych komplex



Ozer et al, CO in SB, 2015