



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 proteinový komplex = chromosom

- DNA-vazebné komplexy
- Komplexy v transkripci
- Komplexy opravující poškozenou DNA
- Komplexy chromatinu

- Evoluce proteinů a komplexů

obecně

chromatin

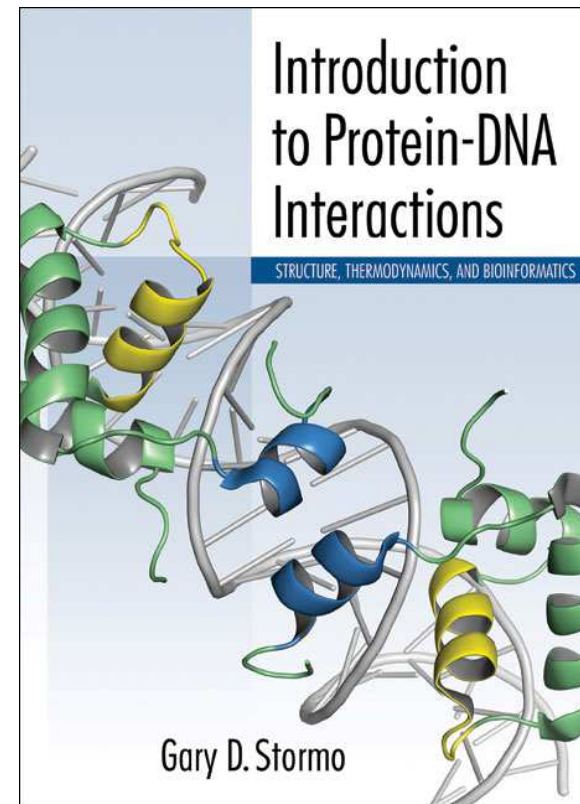
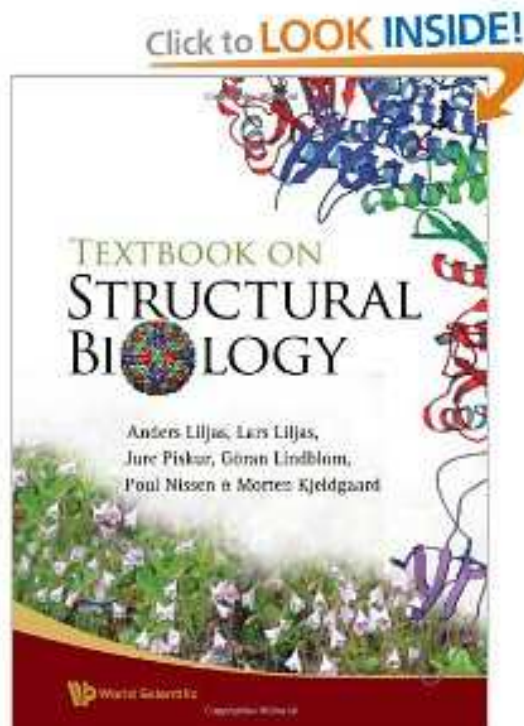
závěrečná

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/>

Program přednášek 2017

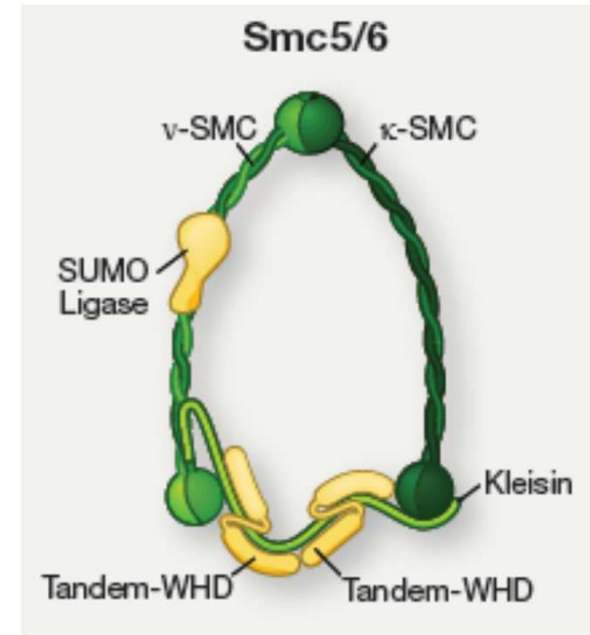
23.02.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, analýza komplexů	obecné chromatin
02.03.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Protein-proteinové interakce, skládání komplexů, A. Yonath!!!!!!!!!!	
09.03.2017				
16.03.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Marek	Signální dráhy, GPCR	
23.03.2017 11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Muller	Chaperony	
30.03.2017 11-12.50hod	A2-2.11	Mgr. Adamus	Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom	
06.04.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, vazebné motivy	
13.04.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy	
20.04.2017 11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Blažek	Cyclin/CDK komplexy v buněčném cyklu a transkripci	
27.04.2017 11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Špirek	Oprava DNA, homologní rekombinace	
04.05.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Chromatinové komplexy	
11.05.2017 11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce proteinových komplexů	
18.05.2017 9-12hod	A2-2.11	doc. Paleček	Zkouška - test, P. Modrich!!!!!!	

- 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)

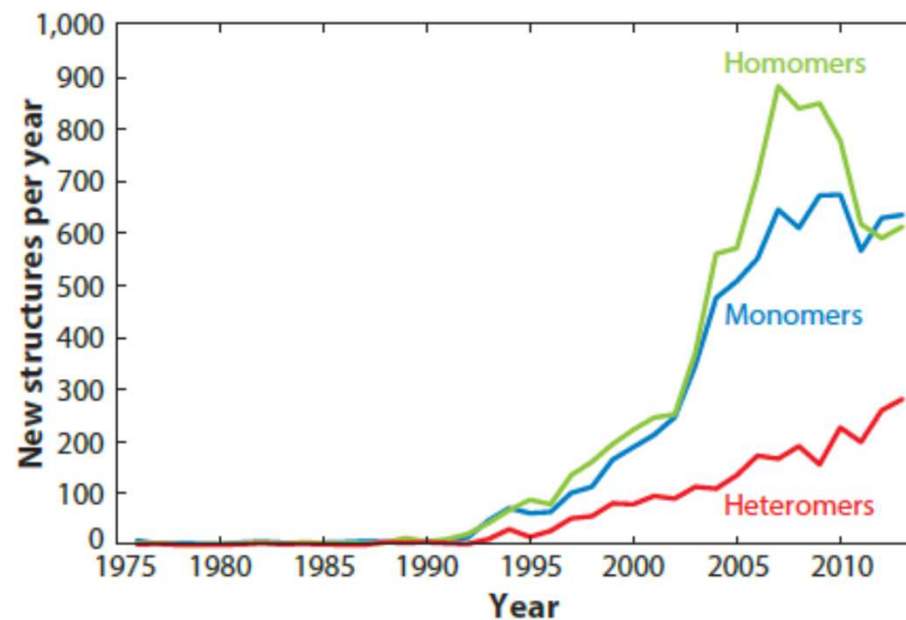


Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

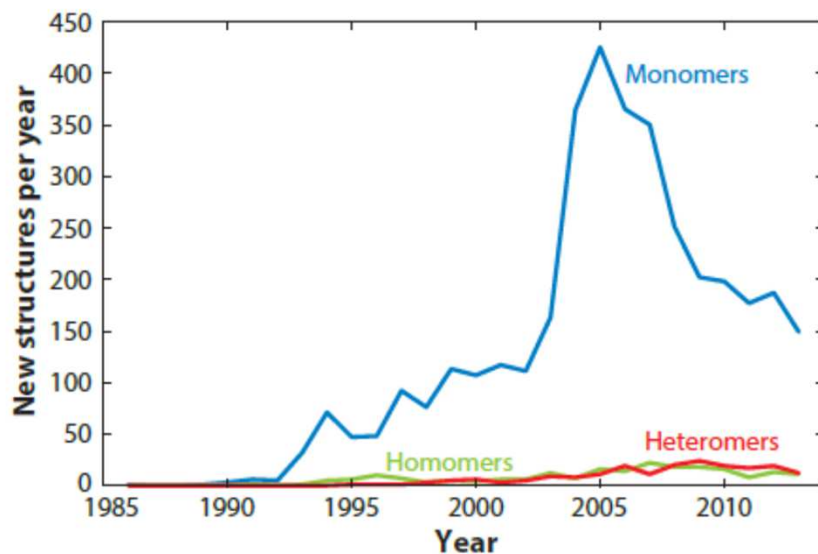
Použití metod strukturní biologie pro studium proteinových komplexů

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

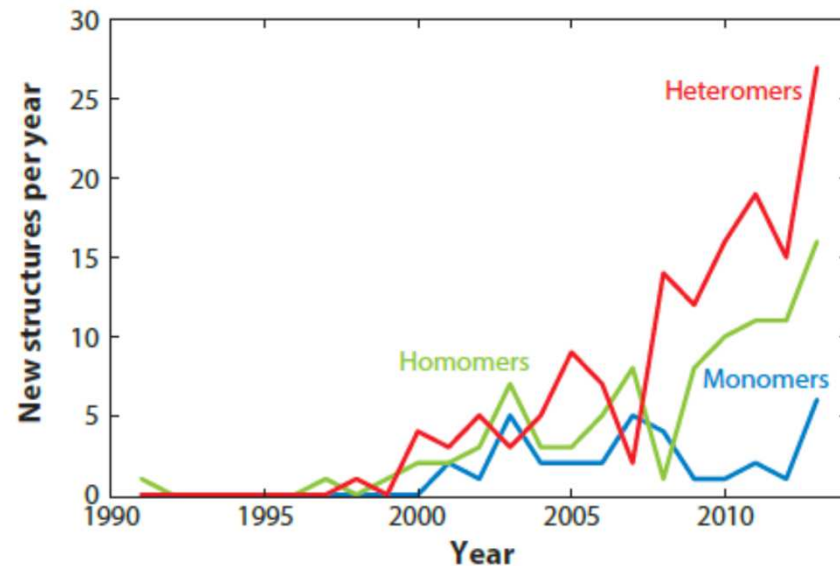
a X-ray crystallography



b NMR

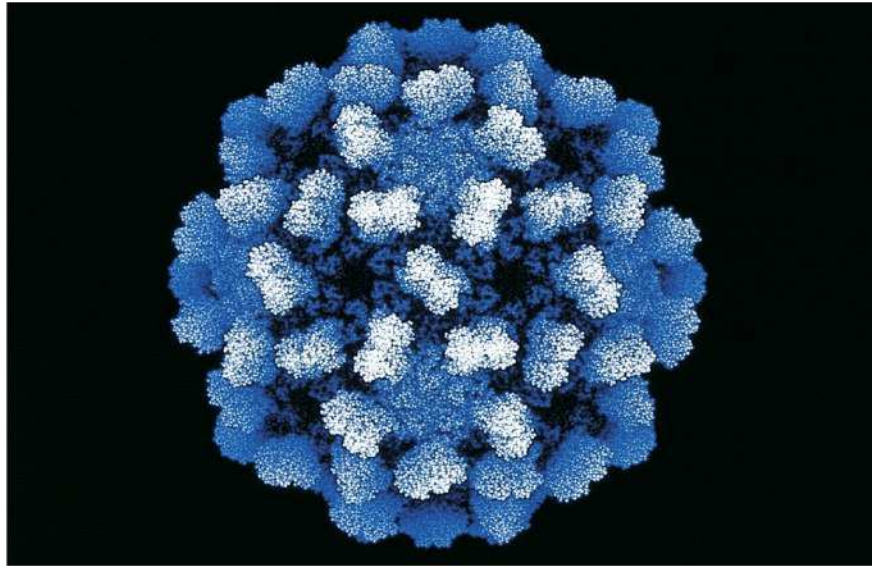


c Electron microscopy

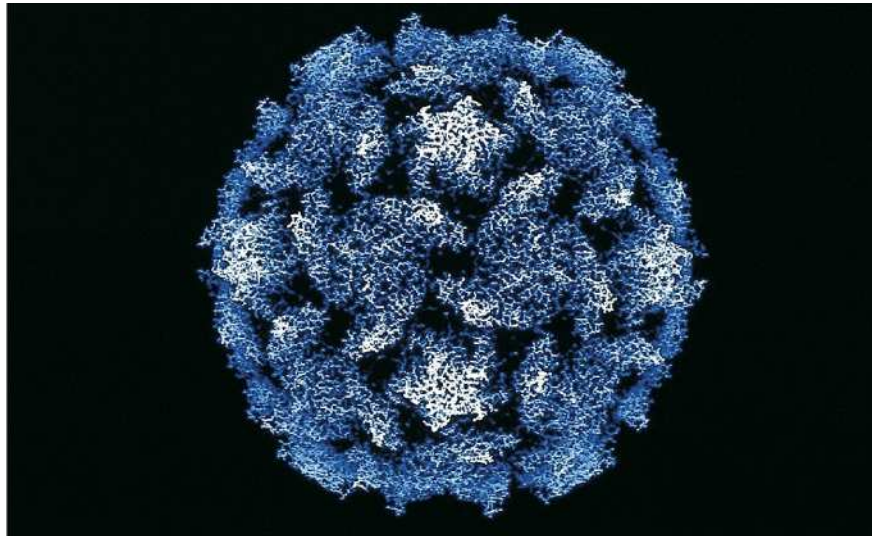


Studium virových částic (P. Plevka)

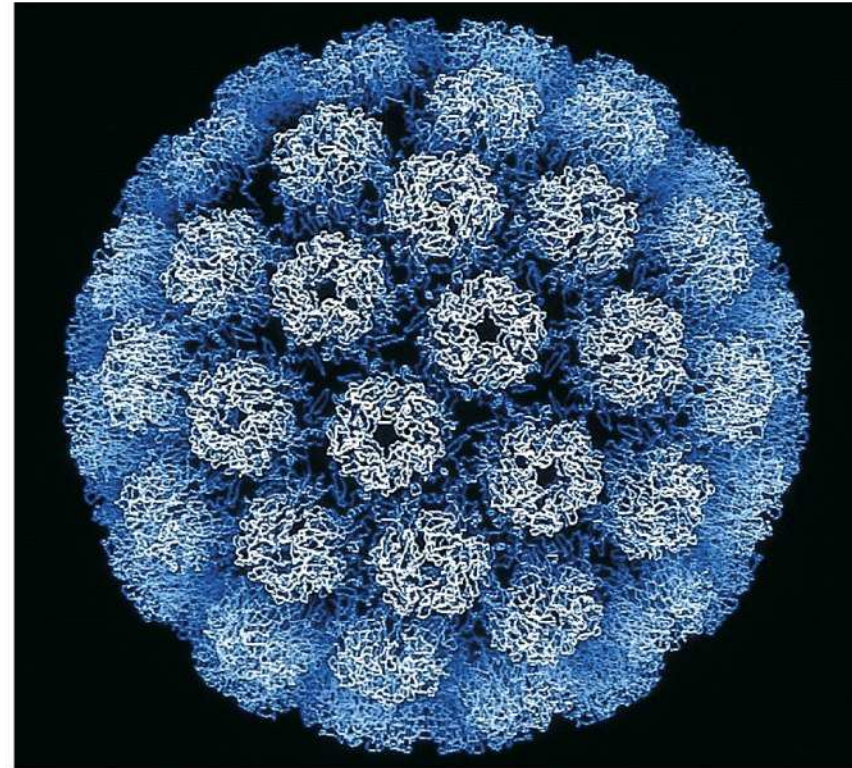
- živý organismus nebo velký proteinový komplex?



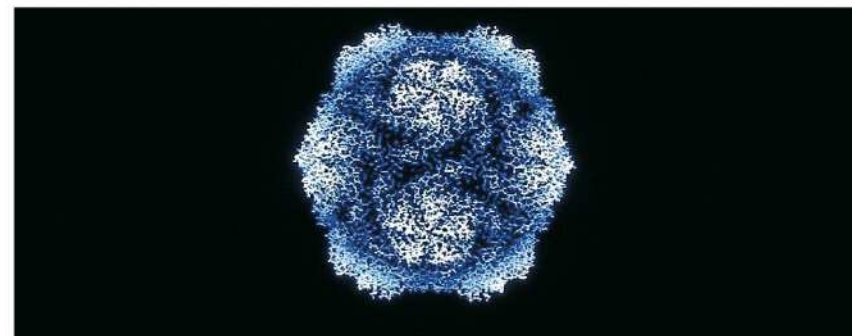
(A)



(B)



(C)



(D)



20 nm

Figure 3-30 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

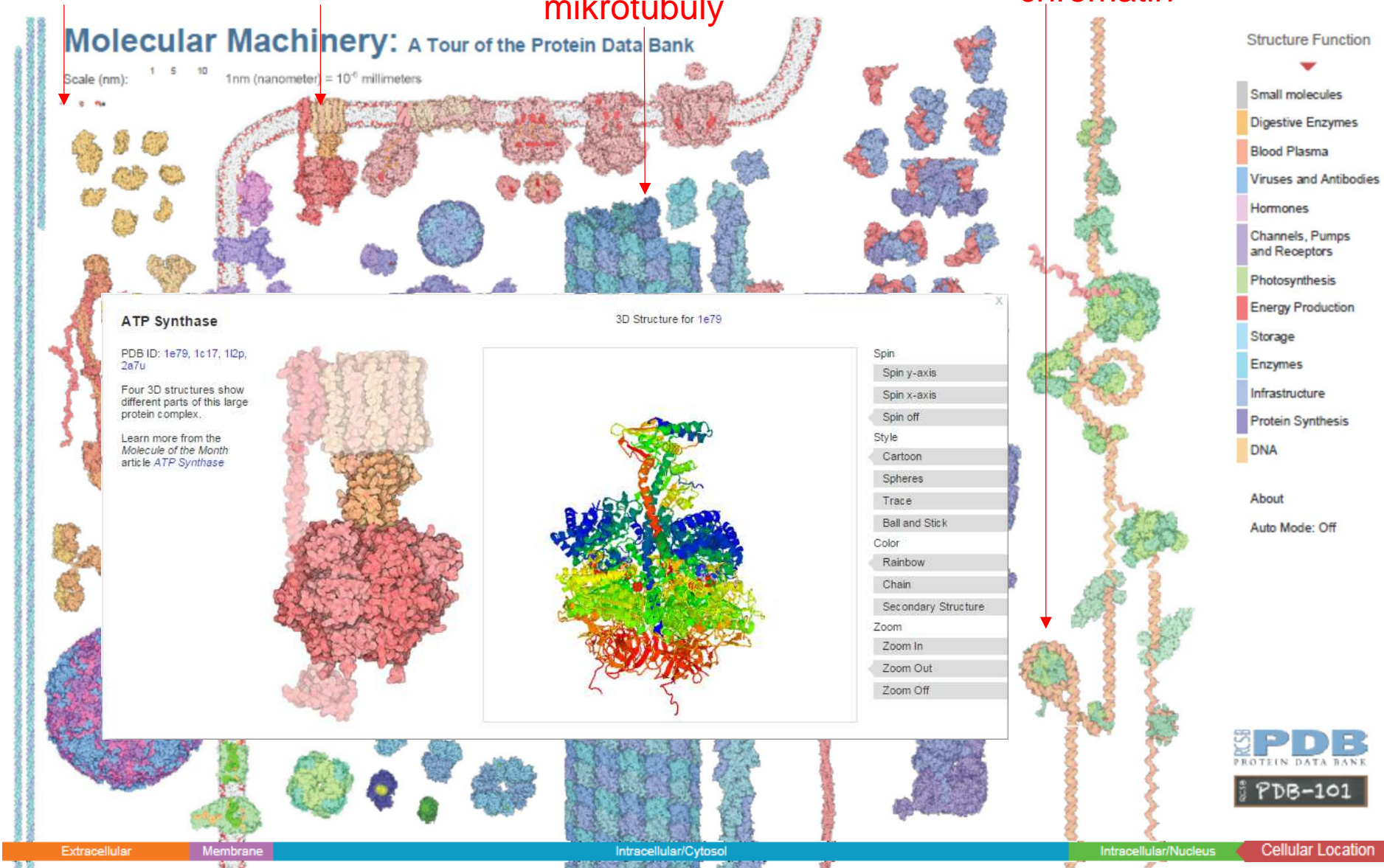
Primárním zdrojem strukturních informací = PDB

voda, ATP

ATP pumpa

mikrotubuly

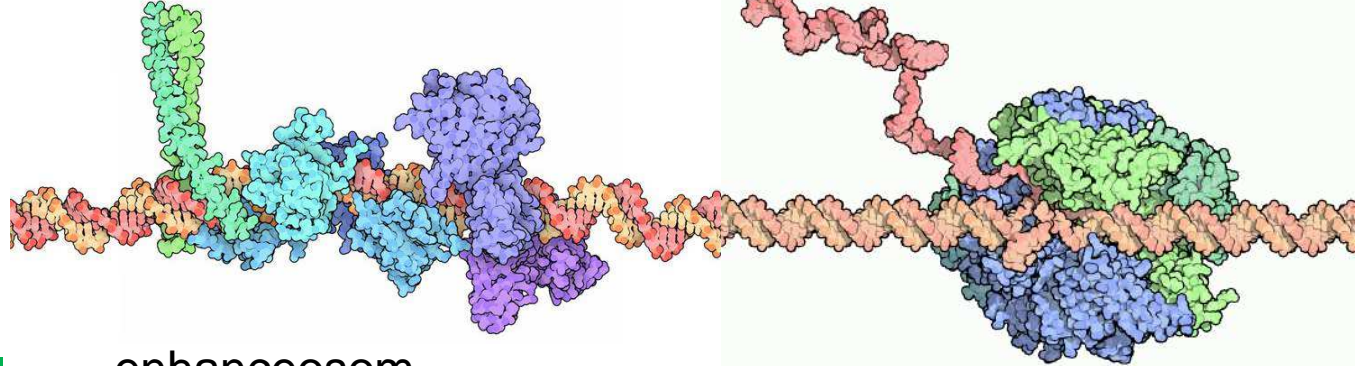
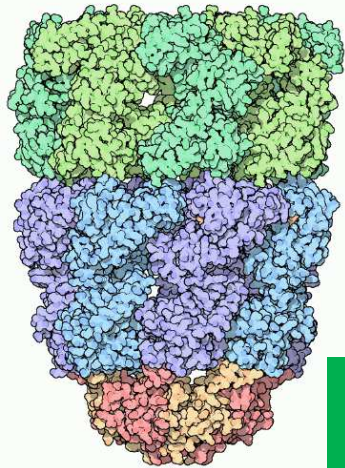
chromatin



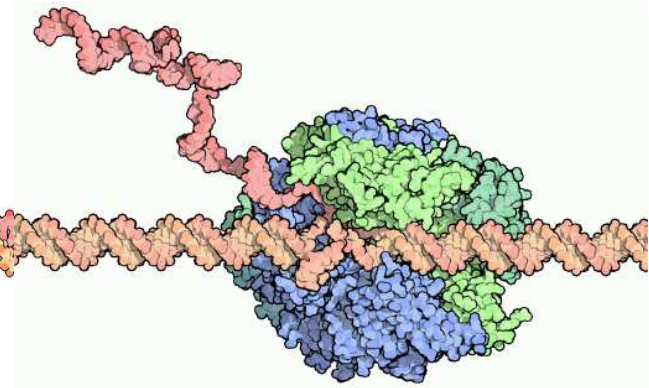
Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

chaperon

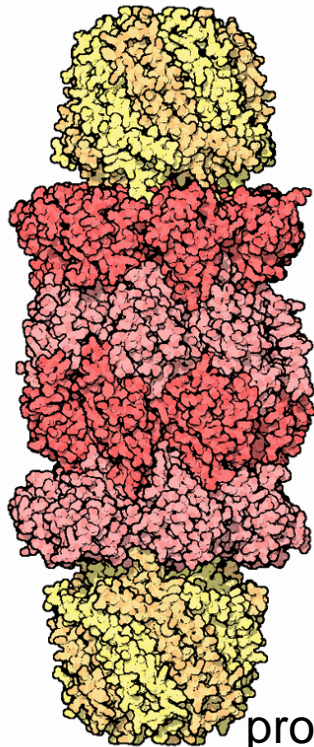


enhanceosom

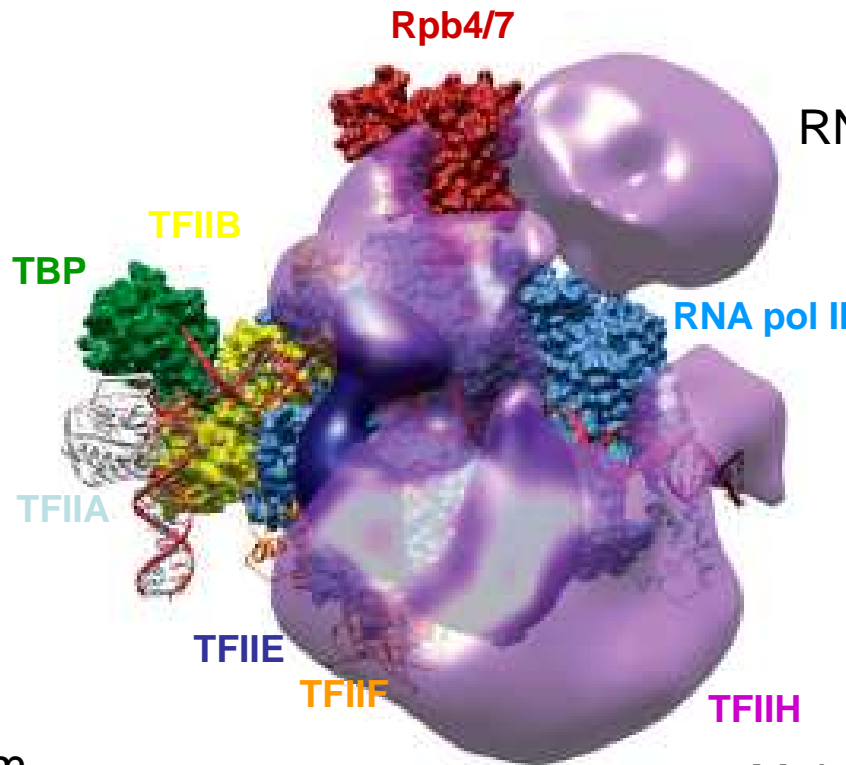


RNA polymeráza

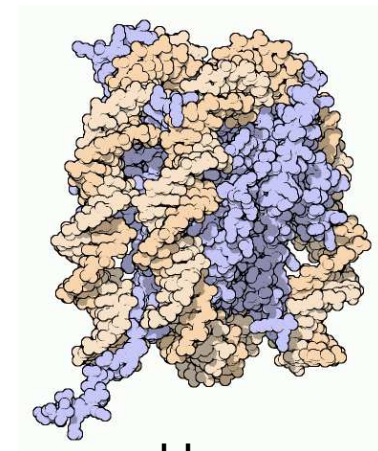
obecně



proteasom



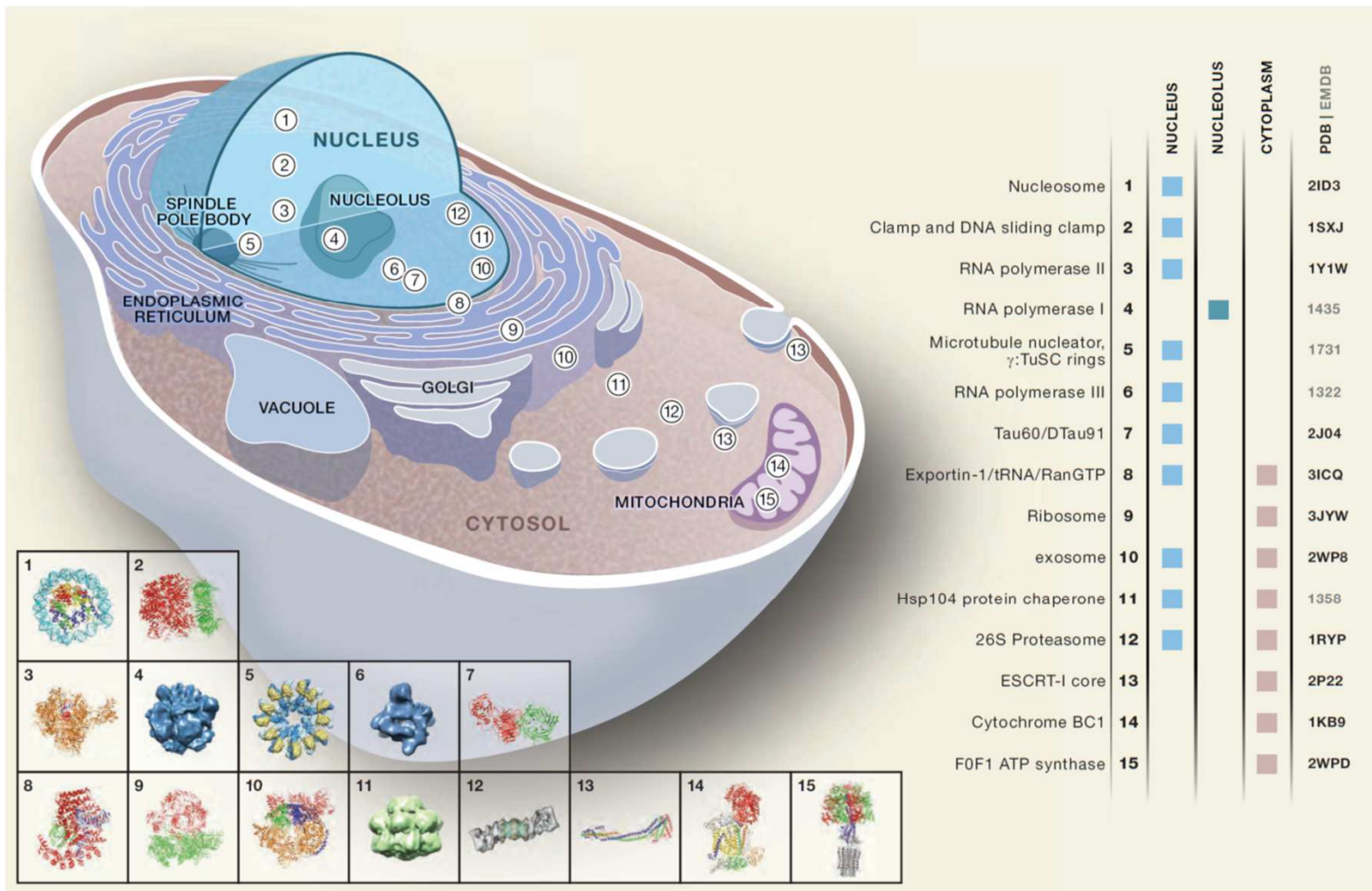
RNA polymeráza + TFIID...



nukleosom

chromatin

Molekula měsíce (PDB 101)



~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 – 25.4.2017*
 - vzájemné PPI podjednotek - architektura/struktura komplexu
 - funkce podjednotek (genetická analýza, lokalizace v buňce ...)
3. - rekonstrukce a analýza aktivit celého komplexu *in vitro*

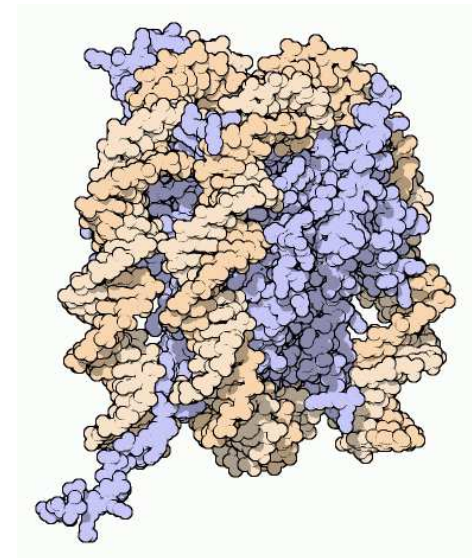
Metody izolace a analýzy proteinových komplexů

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, (cryo) elektronová mikroskopie ...

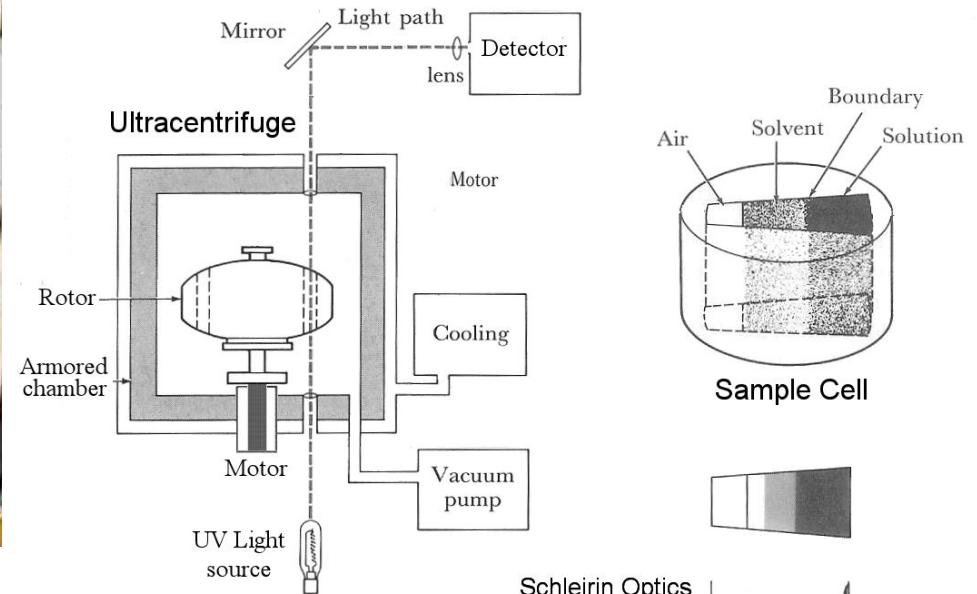
(Prolínají se i metody pro komplexy a PPI - *viz MGP – 25.4.2017*)

... vizualizační metody

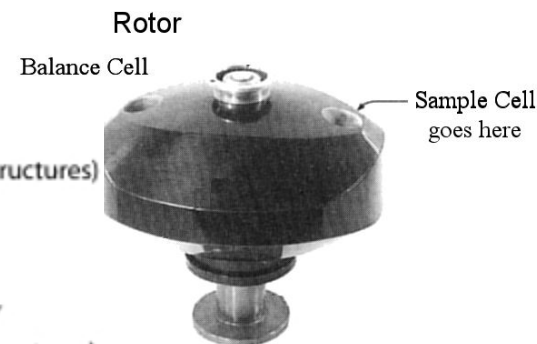
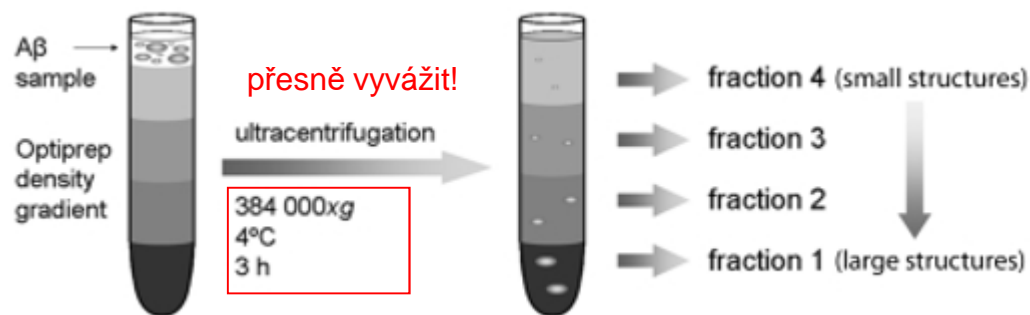


Metody analýzy a izolace PKxů

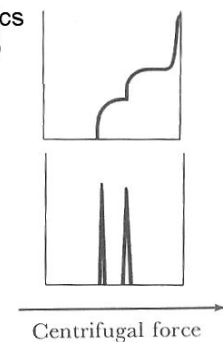
Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



Cukerný/hustotní gradient



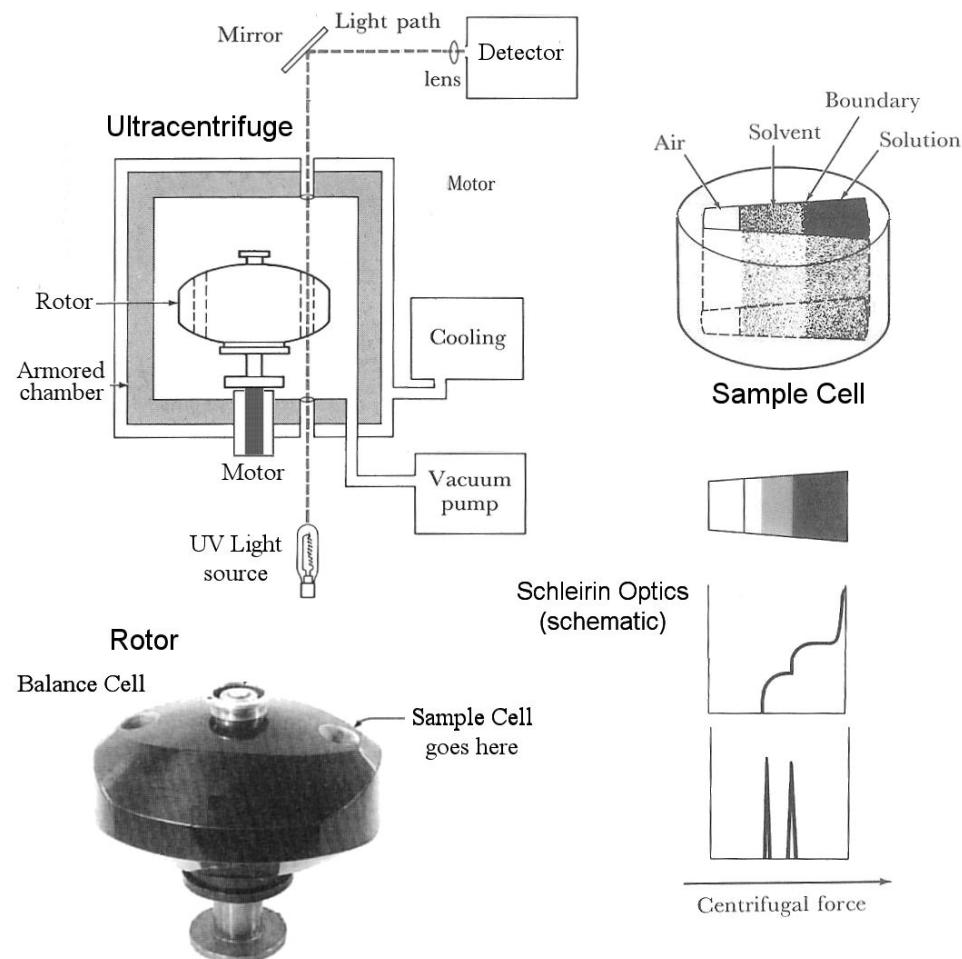
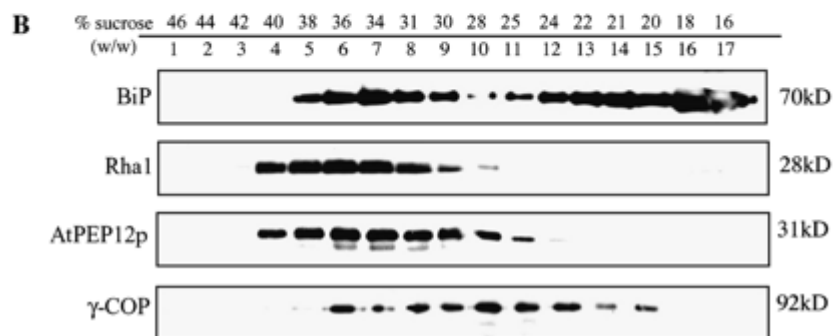
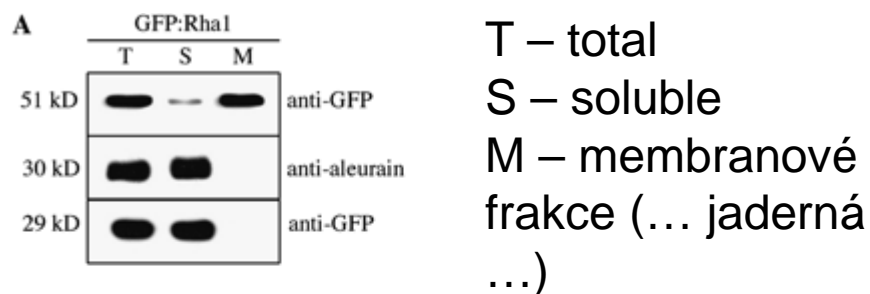
Schlein Optics (schematic)



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

Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



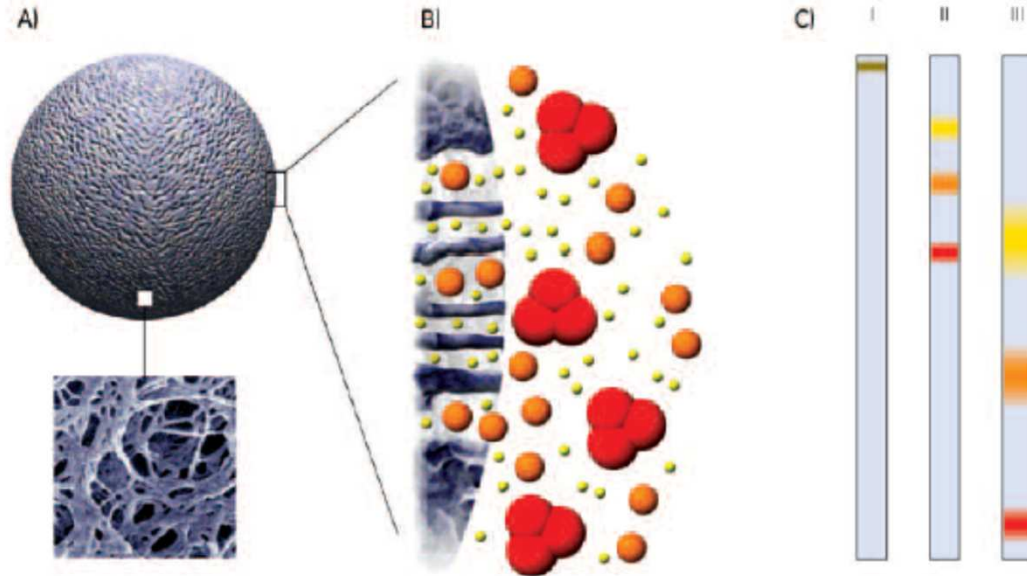
- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely - lokalizace
- B. Jemný - cukerný gradient - izolace

Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

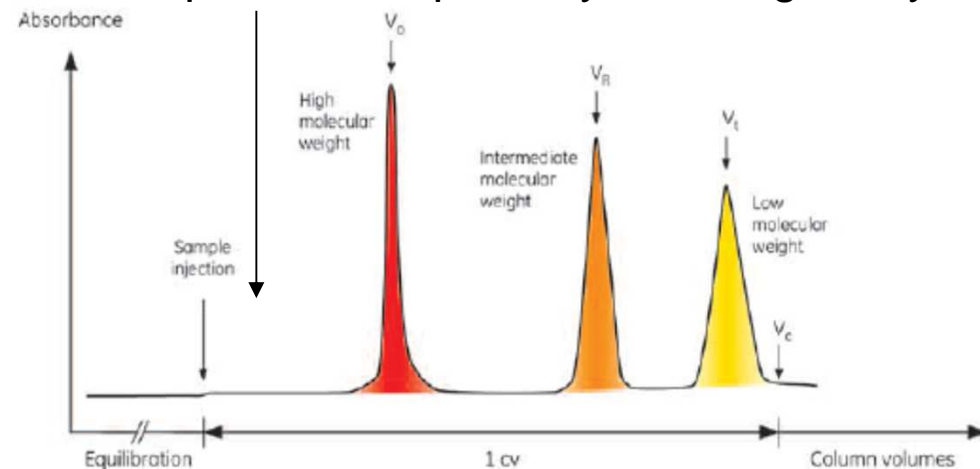
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

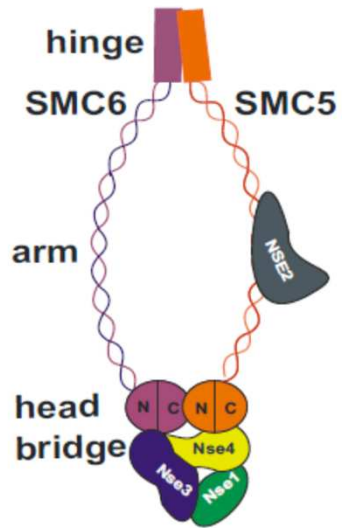
Metody izolace a analýzy PKxů

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

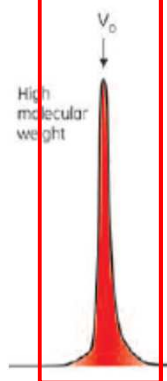
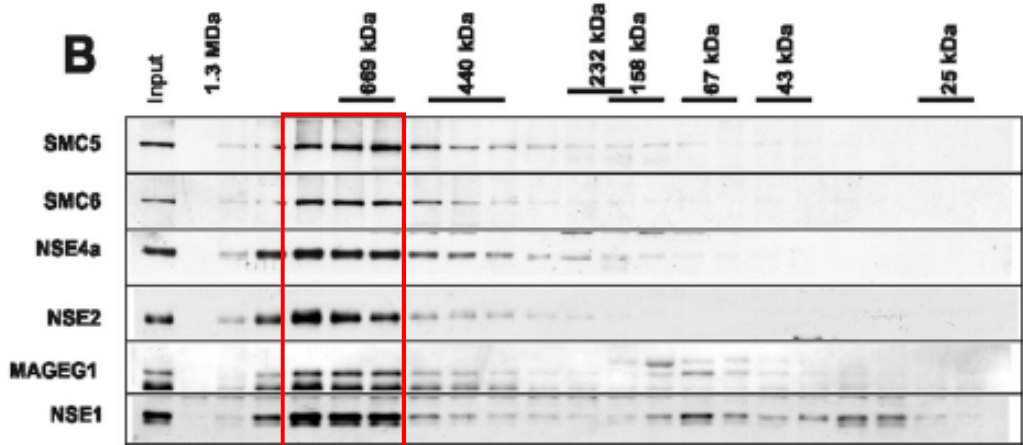
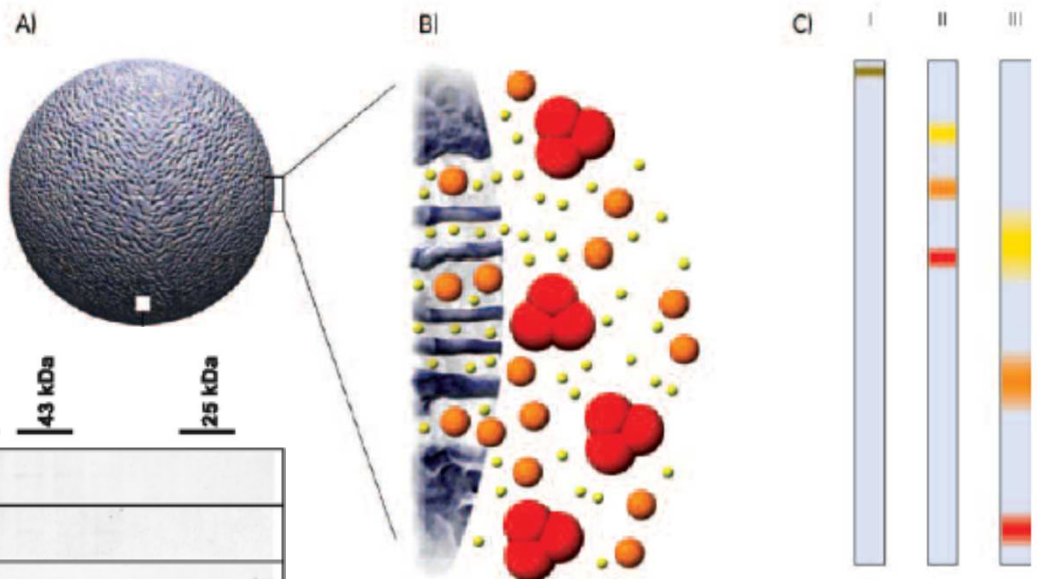


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty

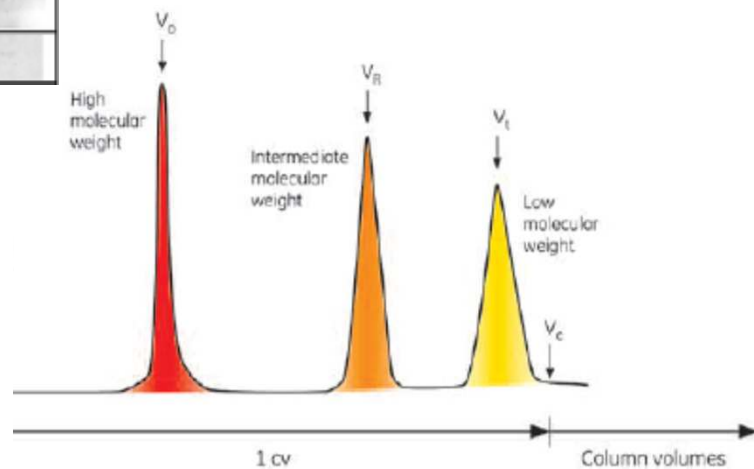




Příklad: SMC5/6 komplex – v buněčném lyzátu (nebo purifikované proteiny)



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



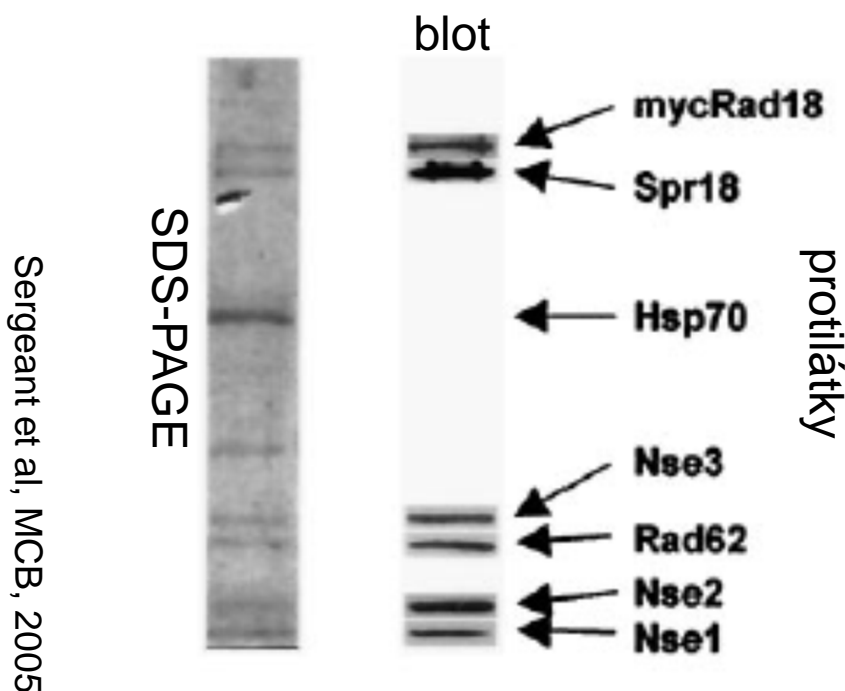
Metody izolace a analýzy PKxů

Jednoduché tagy/značky:

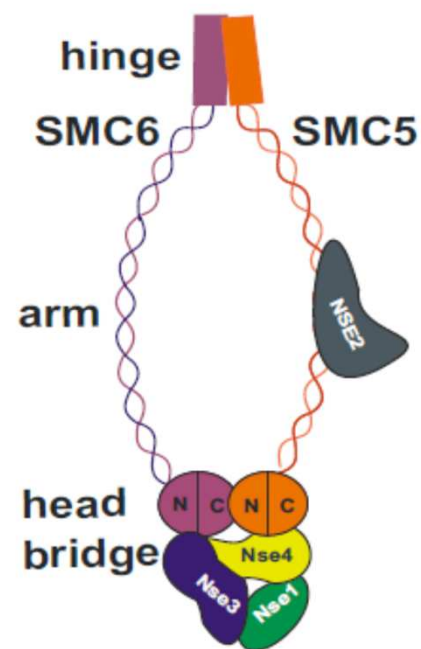
Myc, FLAG, V5, S-tag, GFP (vazba přes protilátky)

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

Kompetiční eluce (peptidy nebo ligandy)



Sergeant et al, MCB, 2005



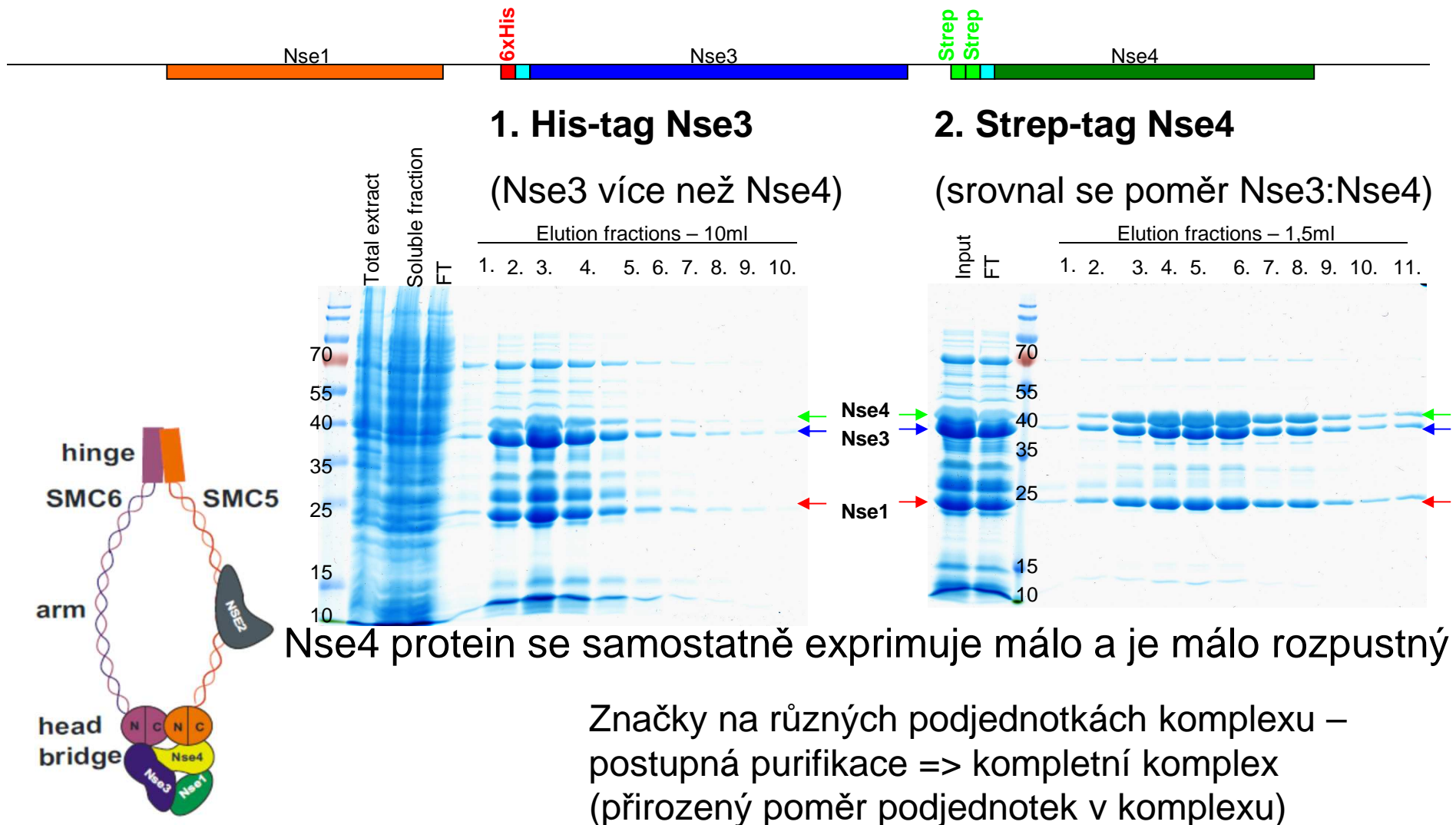
Pozor na kontaminace
(např. chaperony)

MS analýza SDS-PAGE
nebo roztoku

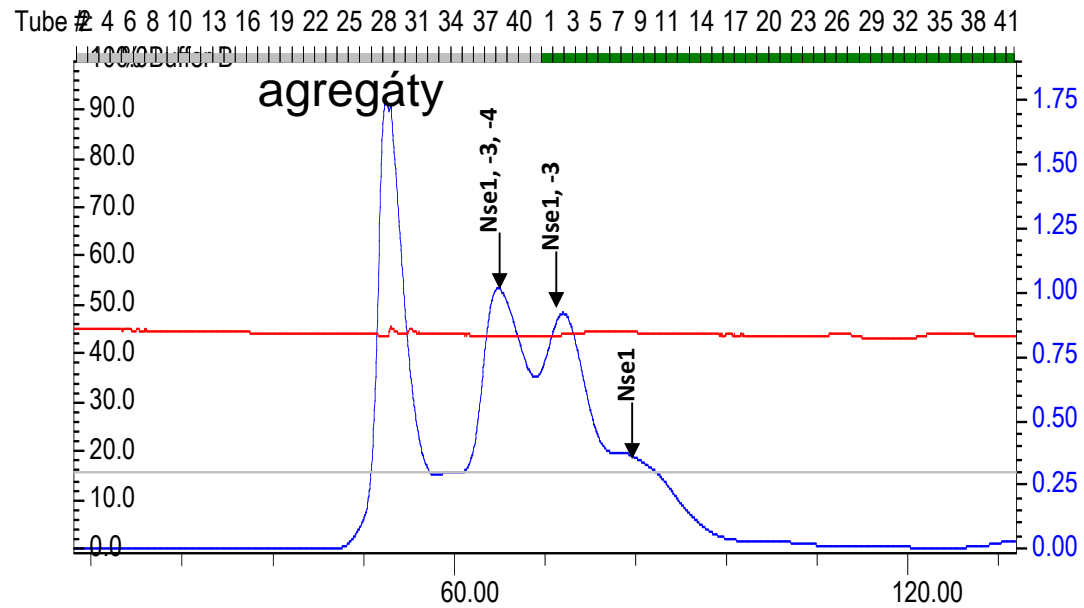
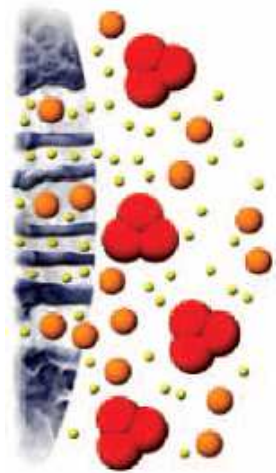
Známe-li více podjednotek - značky na různé podjednotky komplexu (vs TAP na jedné podjednotce) – postupná purifikace => kompletní komplex (vychytaný přes různé podjednotky)

Ko-purifikace

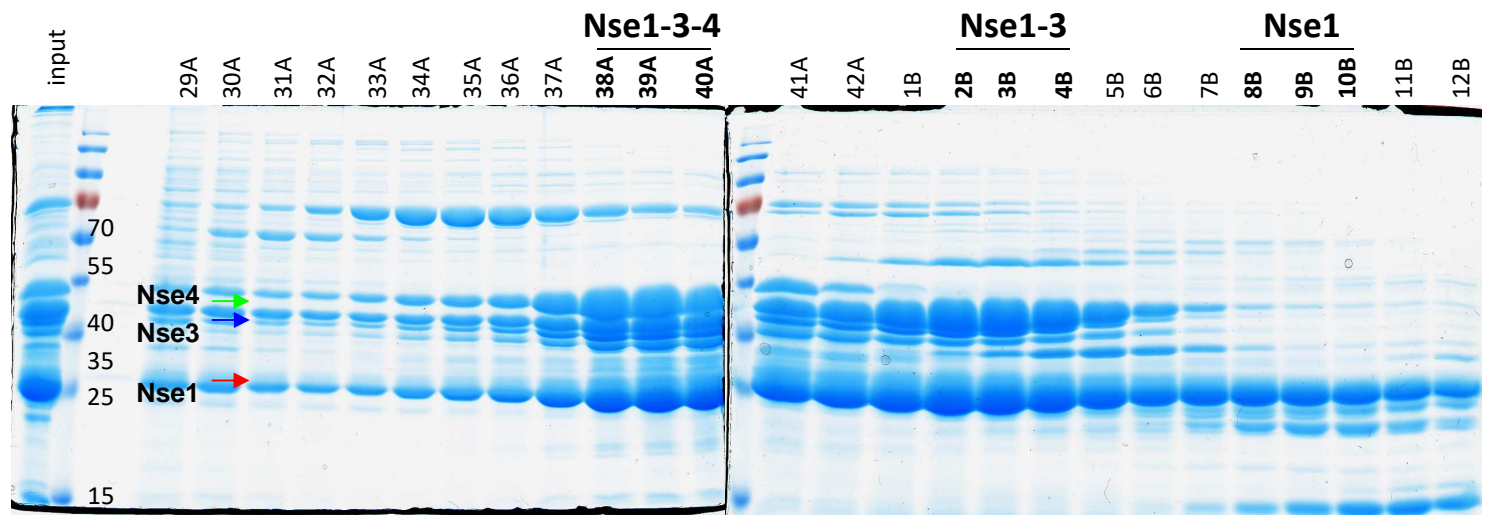
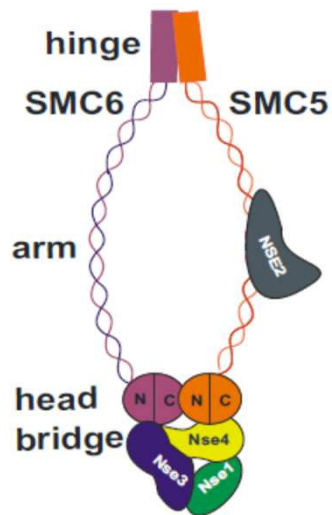
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**



Ko-purifikace



3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů



Metody izolace a analýzy PKxů

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



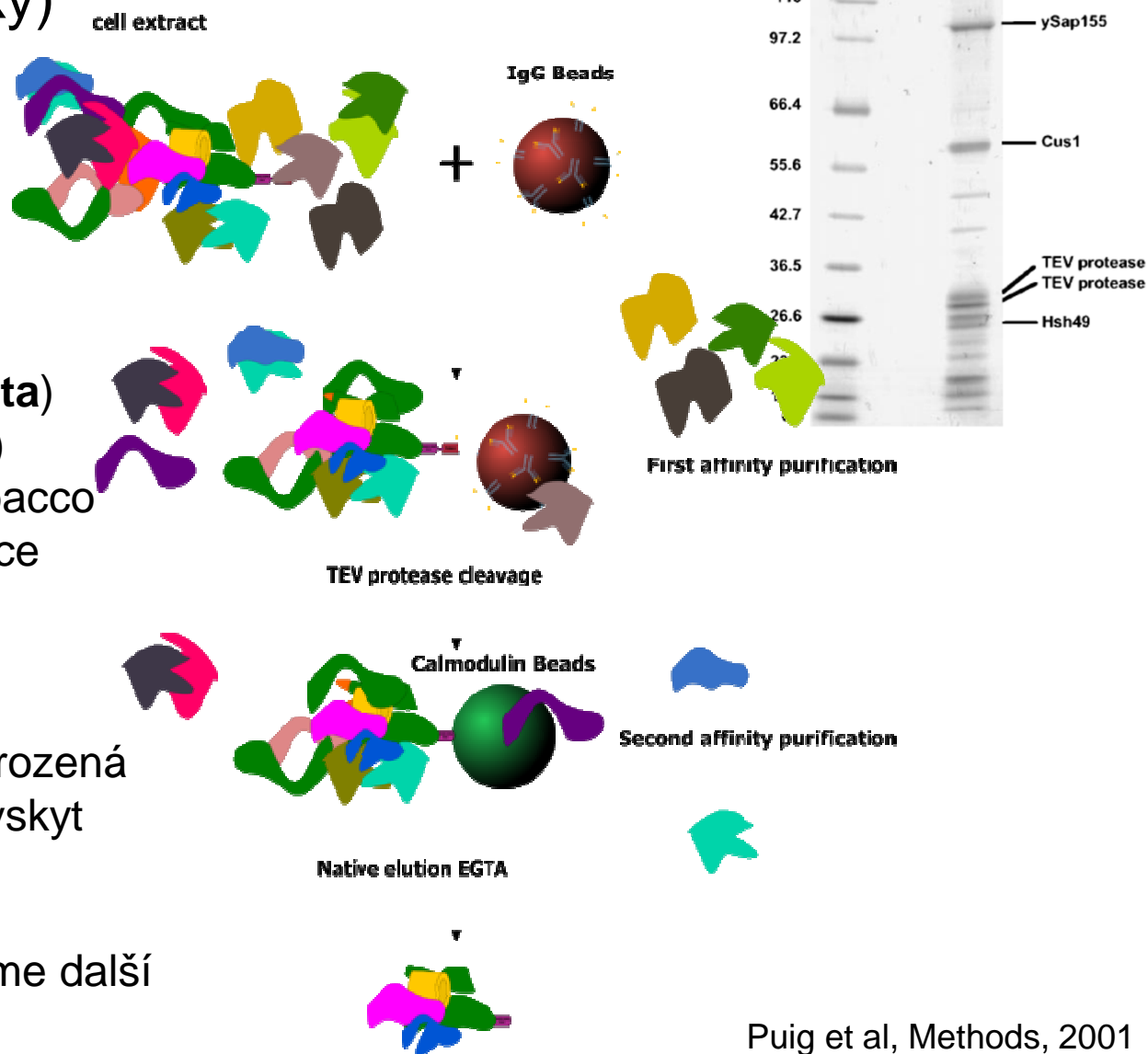
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

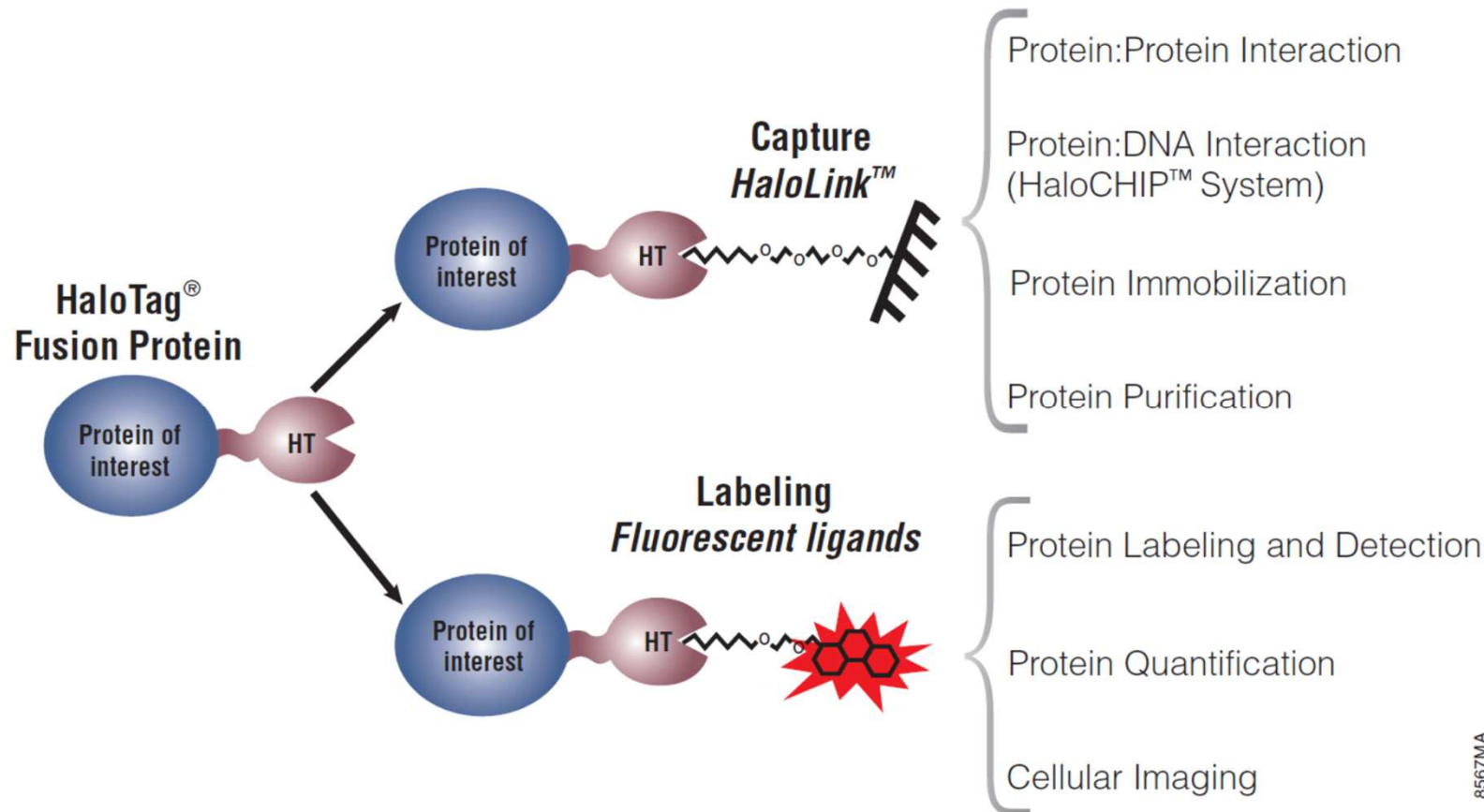
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

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

známe jeden protein – hledáme další podjednotky



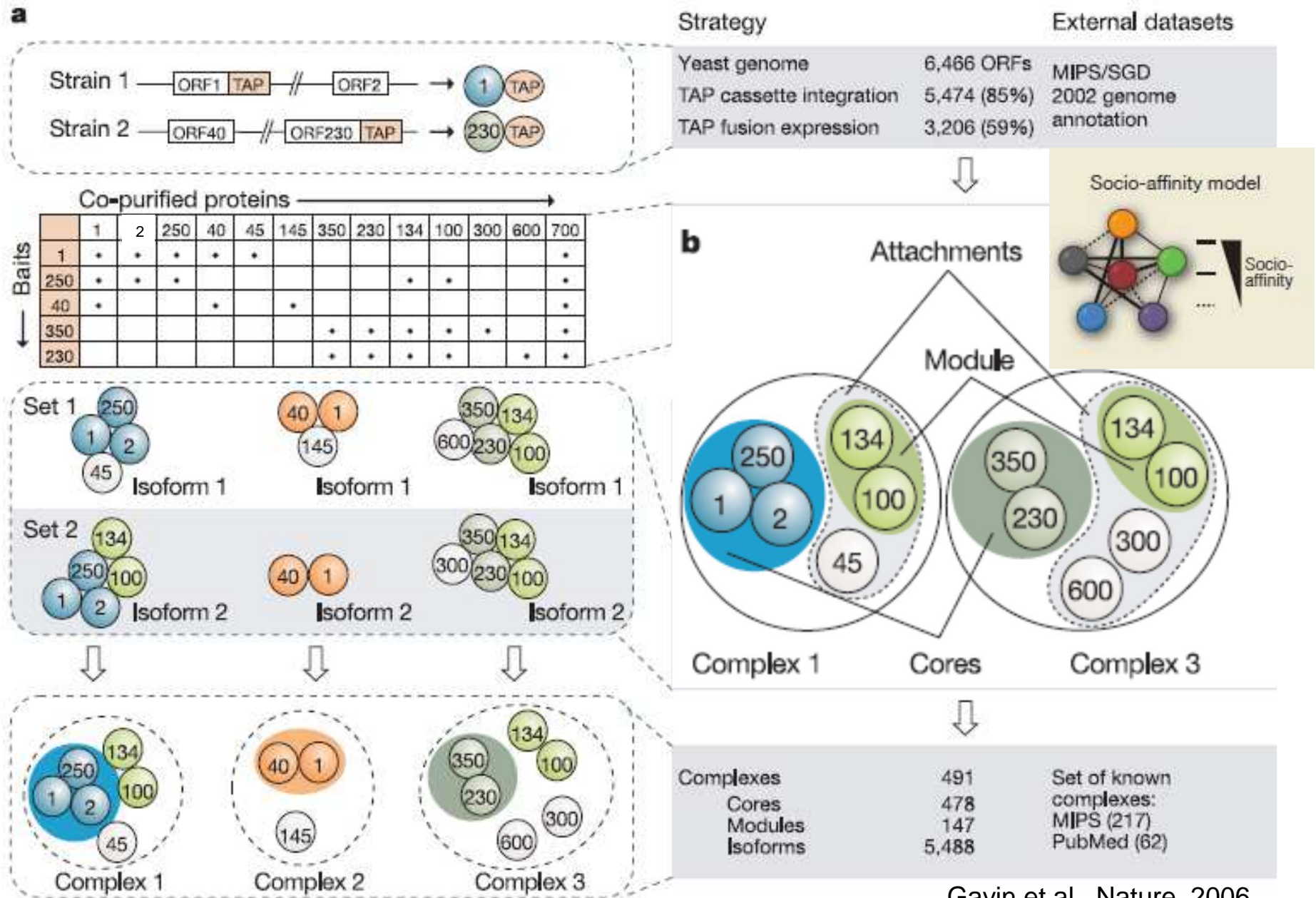
Metody izolace a analýzy PKxů



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 izolace komplexů

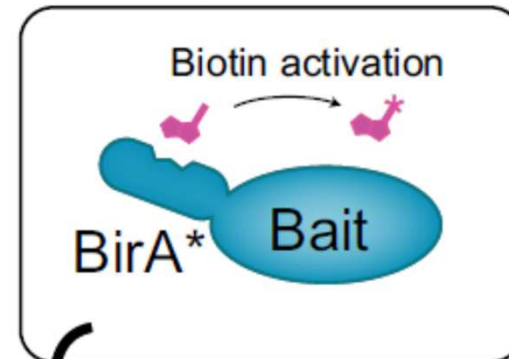
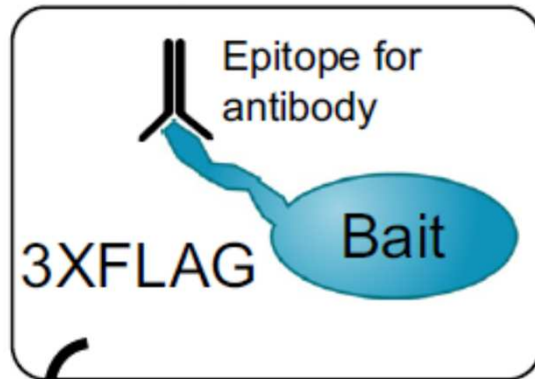
klasický

alternativní

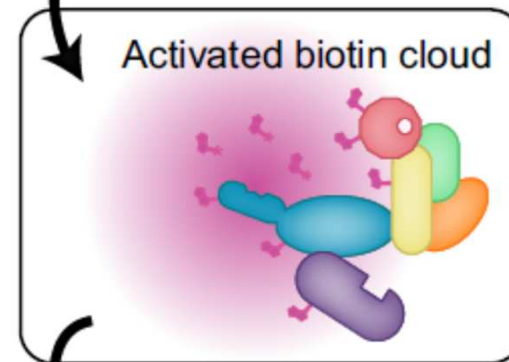
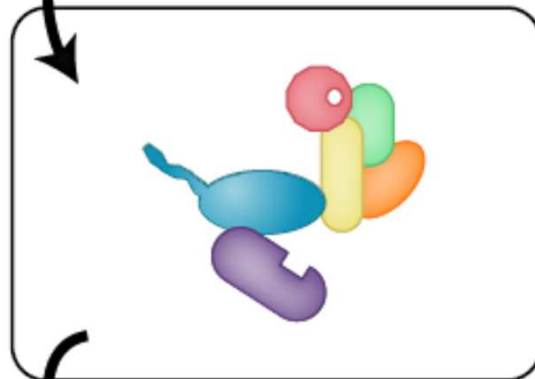
Affinity Purification

BioID (Proximity Biotinylation)

Tagging system

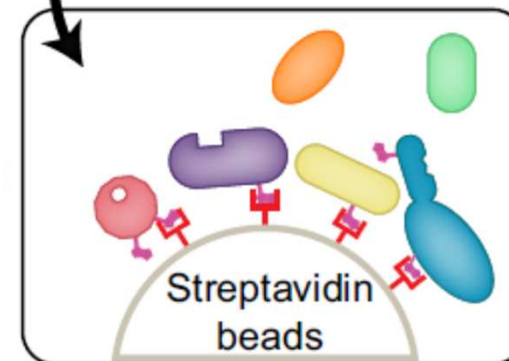
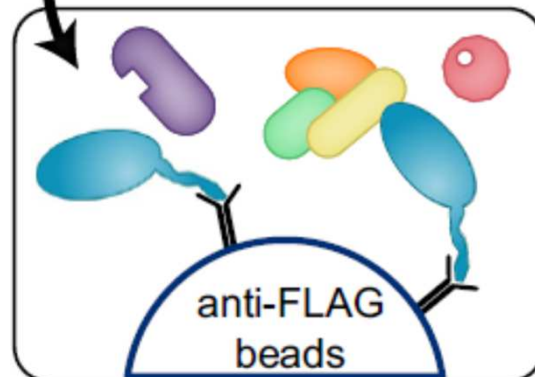


in vivo
function



Biotinylace na
vzdálenost
<20nm

Purified
interaction
partners



MS identifikace
biotinylovaných
proteinů

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



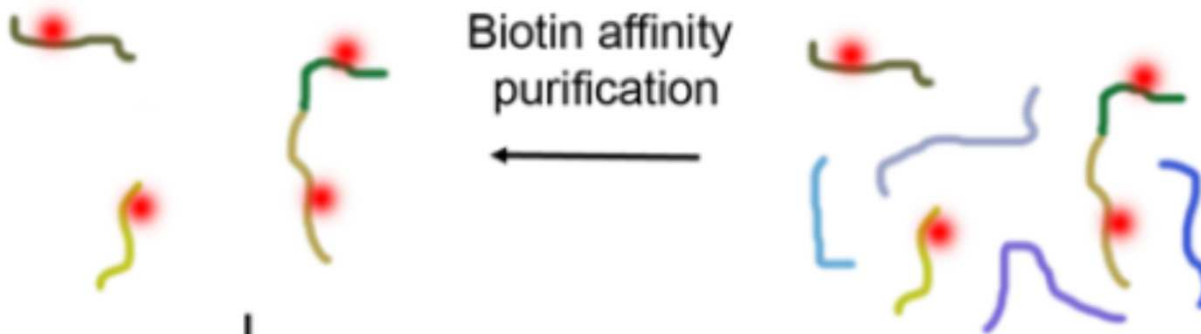
BirA biotin ligáza (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells



Lyse cells

Denature proteins



Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

Mass spectrometry
to identify candidates

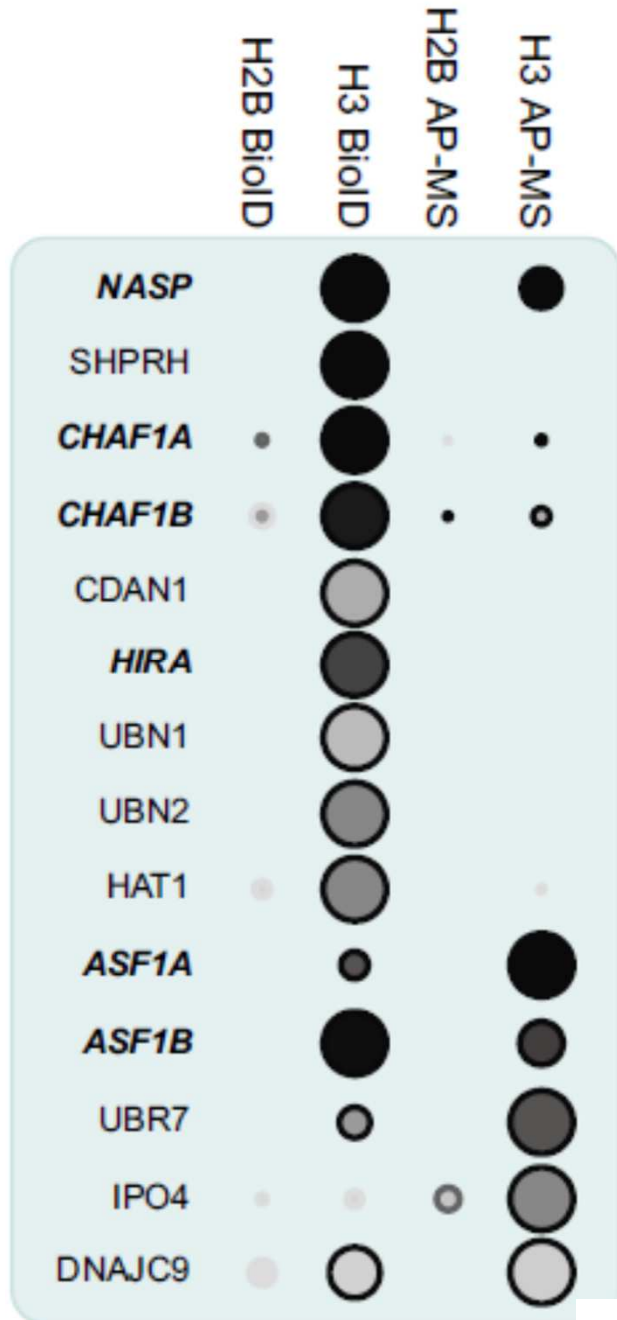
Přidání biotinu v určitém čase (rychlé připojení) – pulse-chase – lze sledovat interakce v čase (např. buněčný cyklus)

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

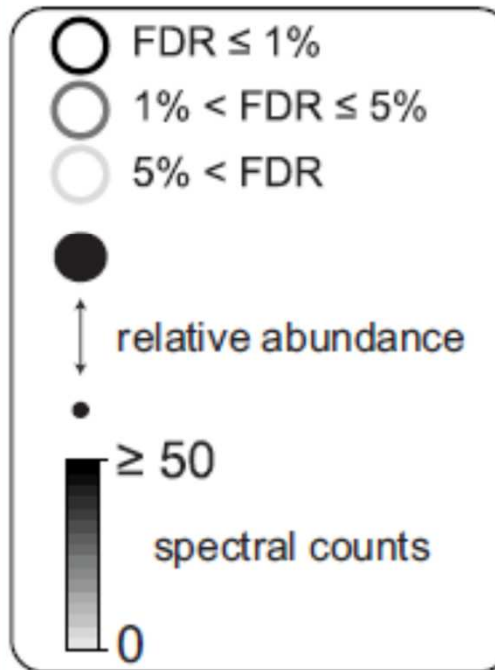
Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „sousedící“ proteiny <20nm))

Metoda BioID

PPI v čase



Histon chaperony
(4.5.2017)



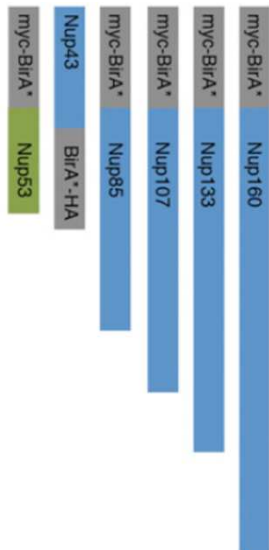
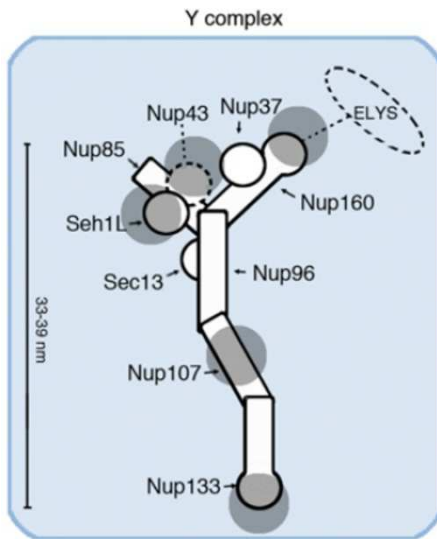
Přidání biotinu v určitém čase (rychlé připojení) – pulse-chase – lze sledovat interakce v čase (např. buněčný cyklus)

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

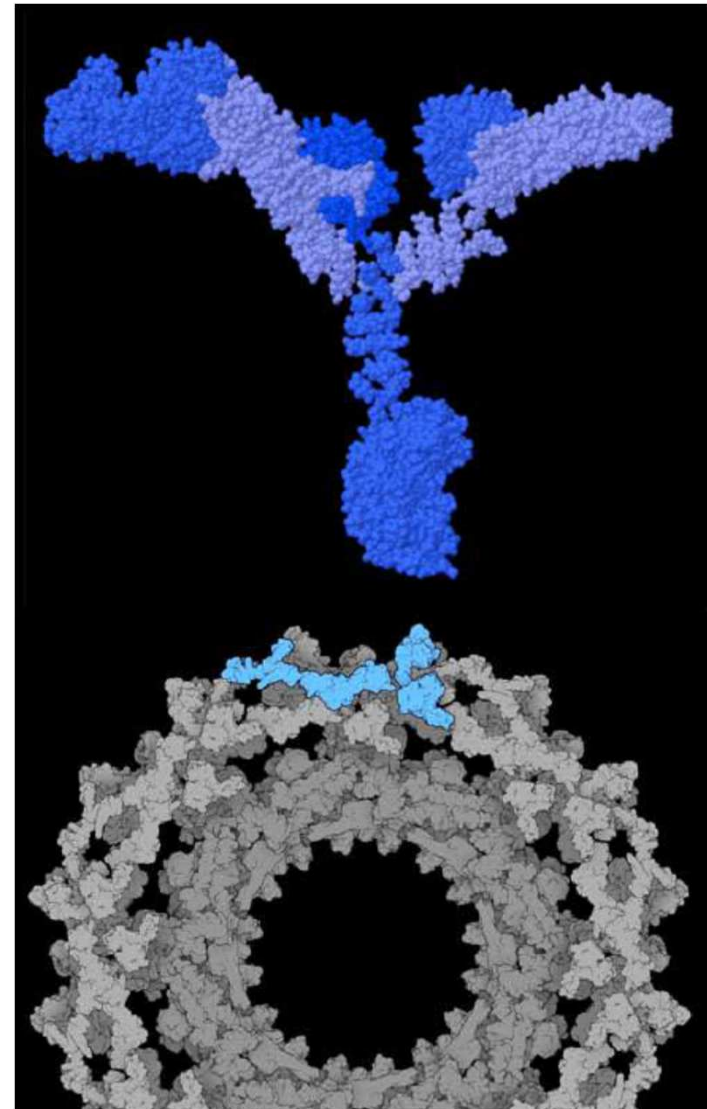
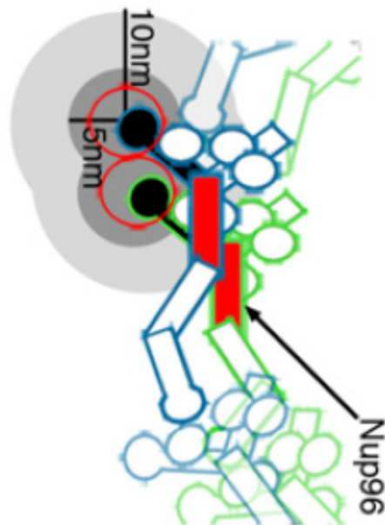
Dosah biotinylace je 10nm – lze využít k mapování „blízkých“ proteinových sousedů ve velkých komplexech



Nup160

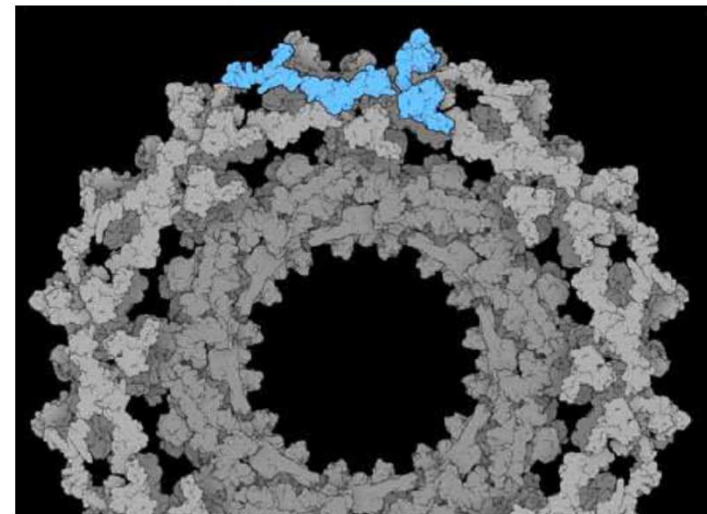
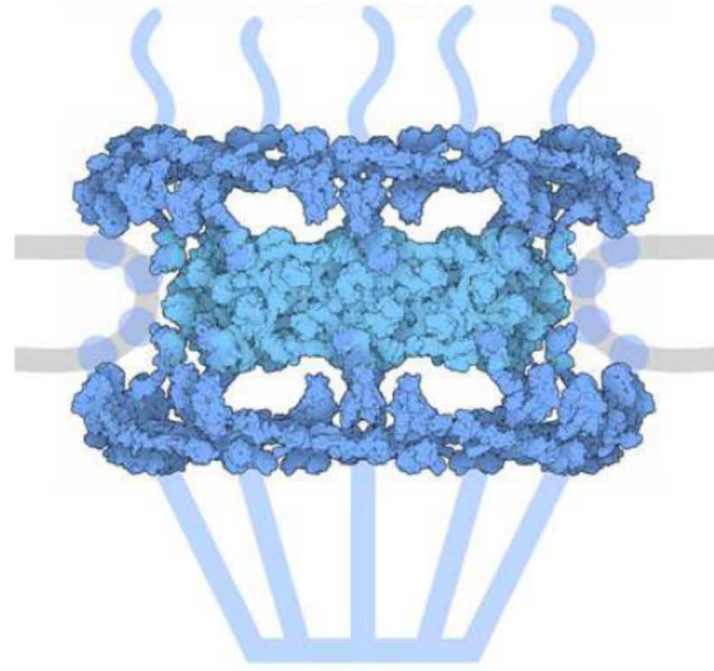
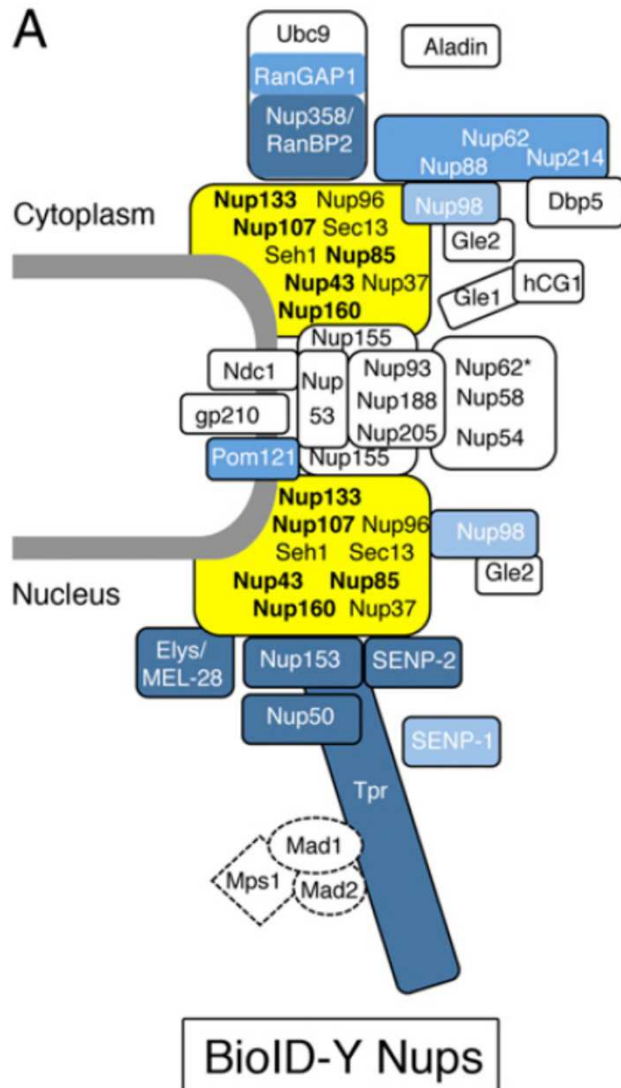


Nup160



Metoda BioID – organizace komplexů

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

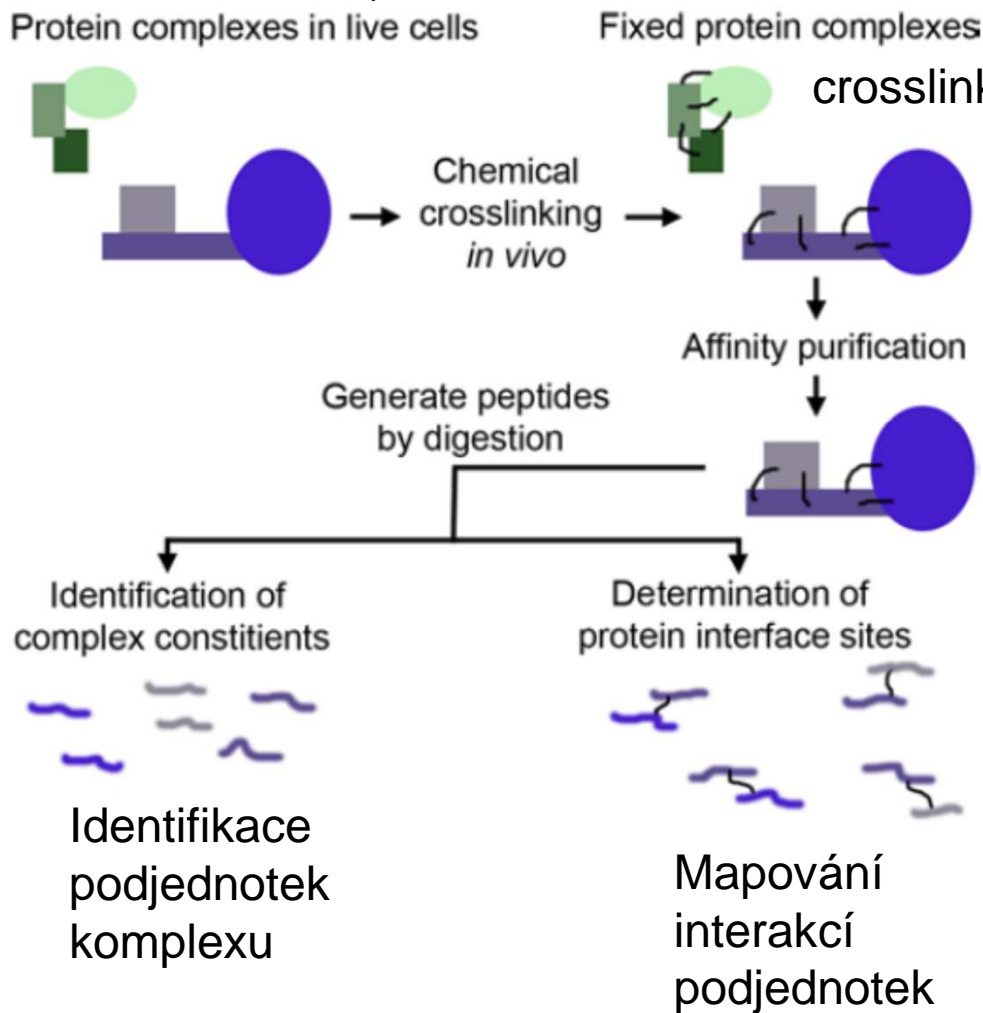


Molekula měsíce, leden 2017

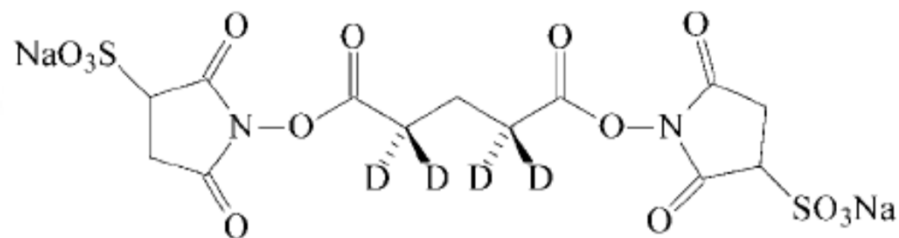
Kim et al, PNAS, 2014

Mapování komplexů - crosslinking

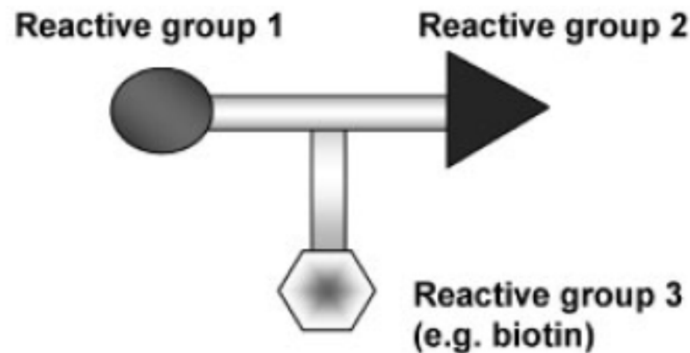
Po crosslinku komplexu lze provádět purifikaci za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu – např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovně)





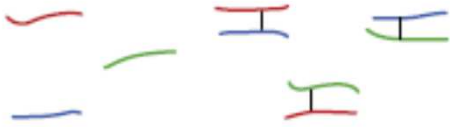



crosslink propojí podjednotky - stabilizuje komplex



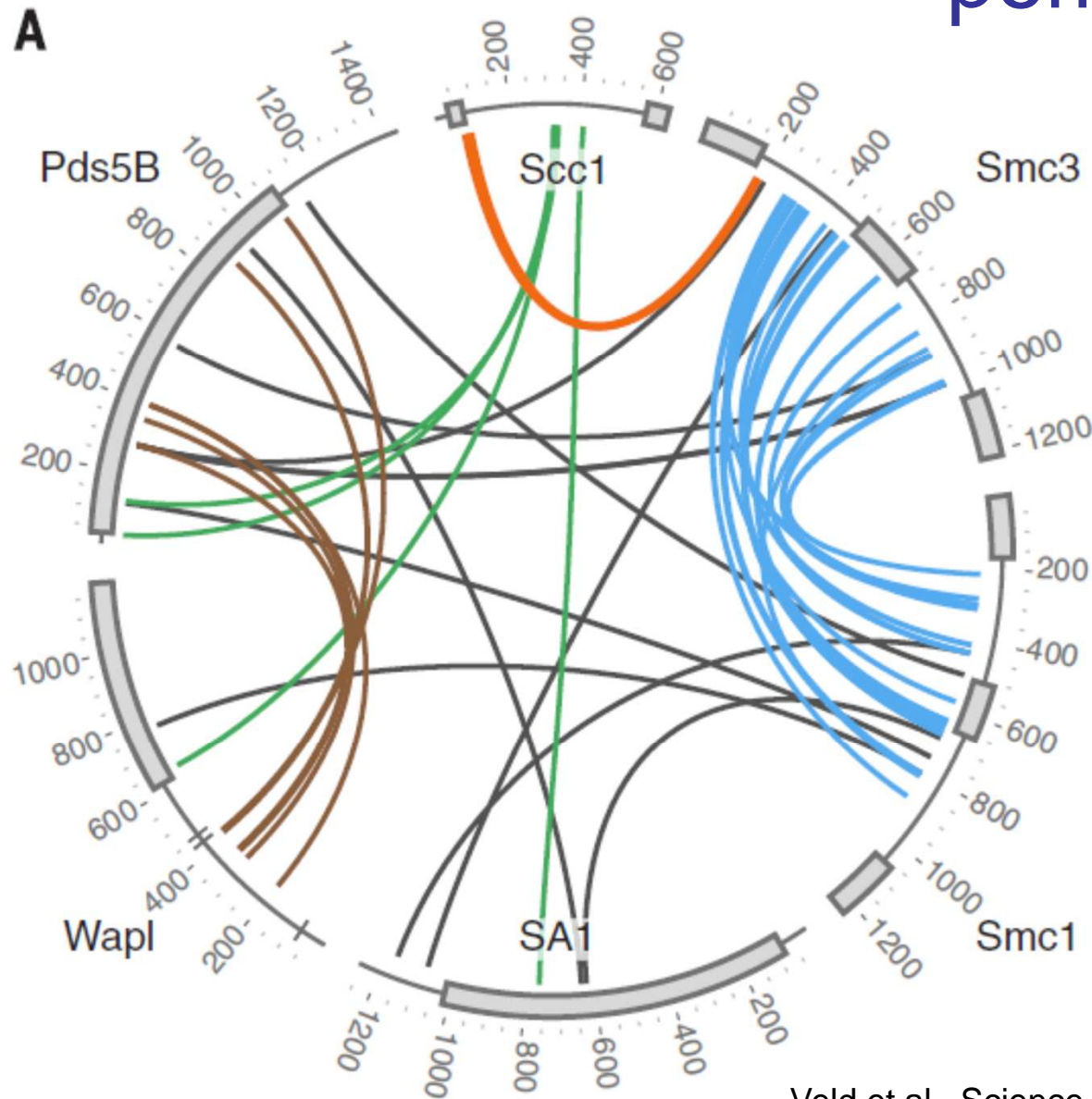
- estery reagují s Lys (ϵ -amin) a aminokoncem (homofunkční - spojí proteiny dohromady v jednom kroku; heterofunkčních - postupná aktivace)
- s tagem – přečistit (vzorek není tak komplexní pro MS analýzu)



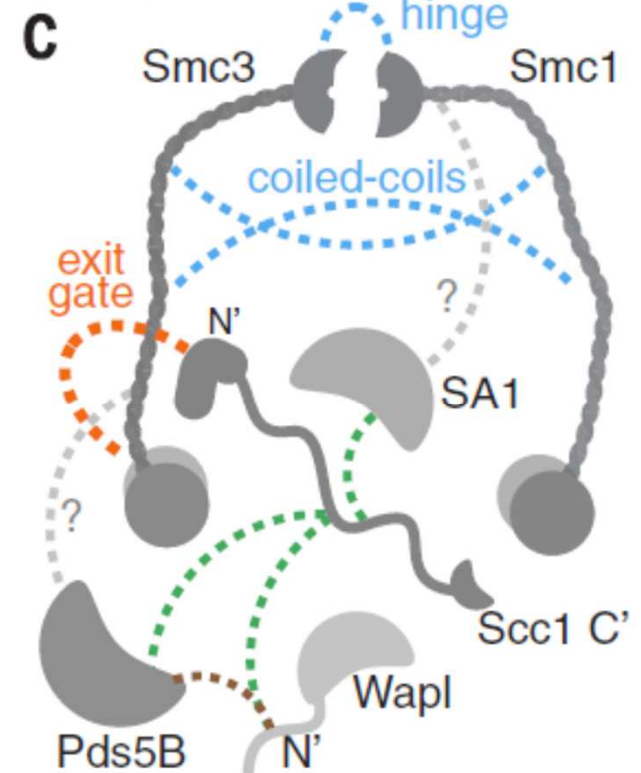
An Overview of the Crosslinking Mass Spectrometry (XL-MS) Workflow

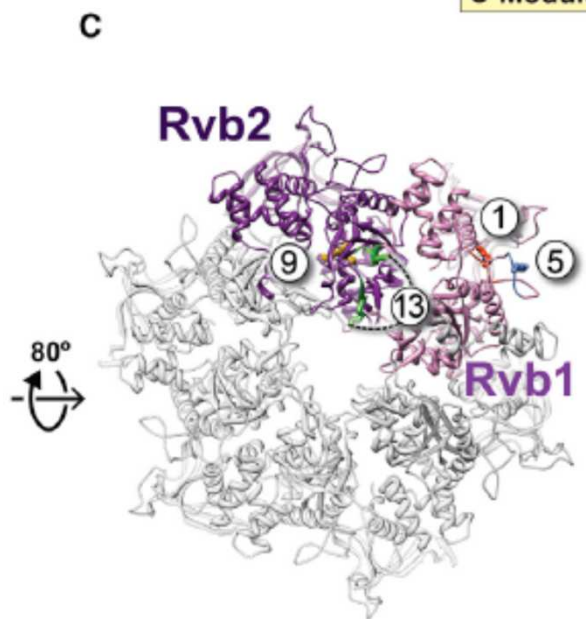
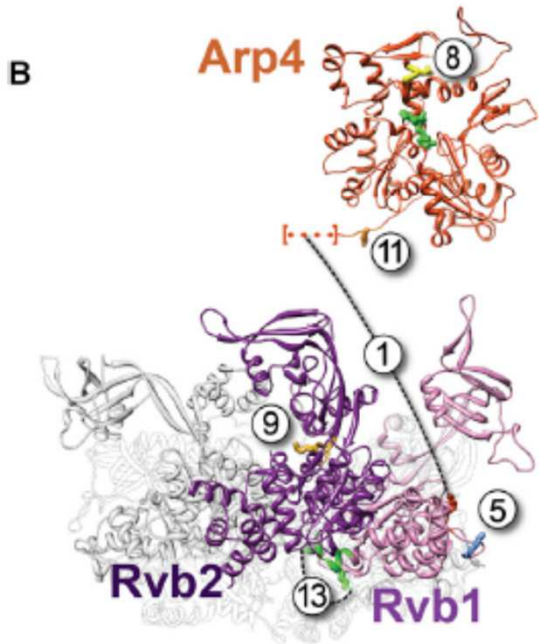
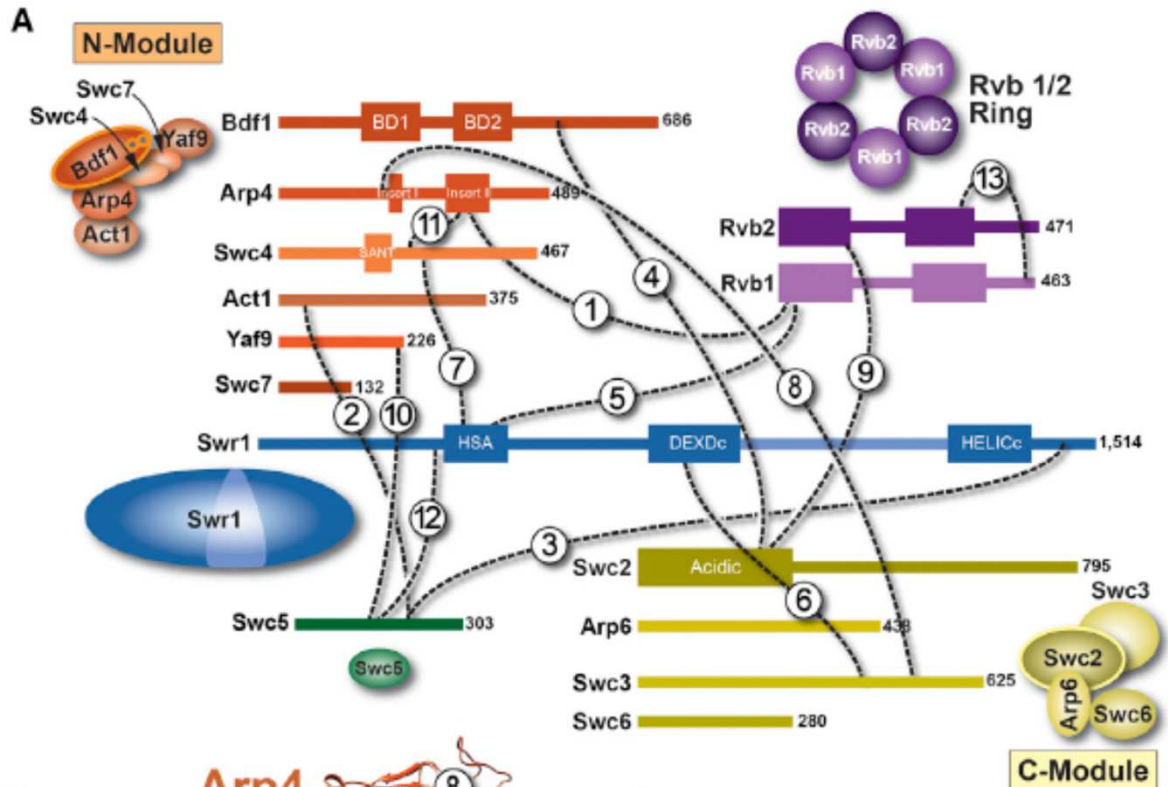
Sample type		Complexes with up to 100 subunits Pull-downs, <i>in vivo</i> applications
Crosslinking reaction		Complementary chemistry targeting acidic residues Affinity-tagged and cleavable reagents
Fractionation, enrichment		Increased use of size exclusion, ion exchange, and affinity chromatography 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

Mapování interakcí mezi podjednotkami pomocí crosslinking

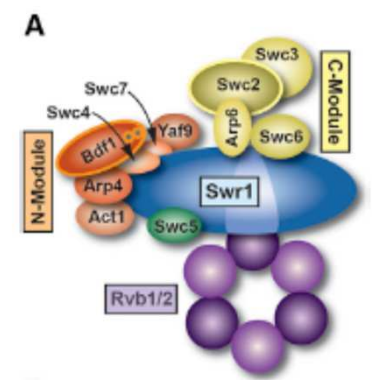
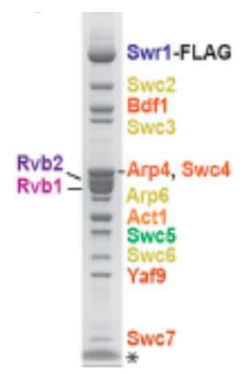


Příklad jednoduchého komplexu

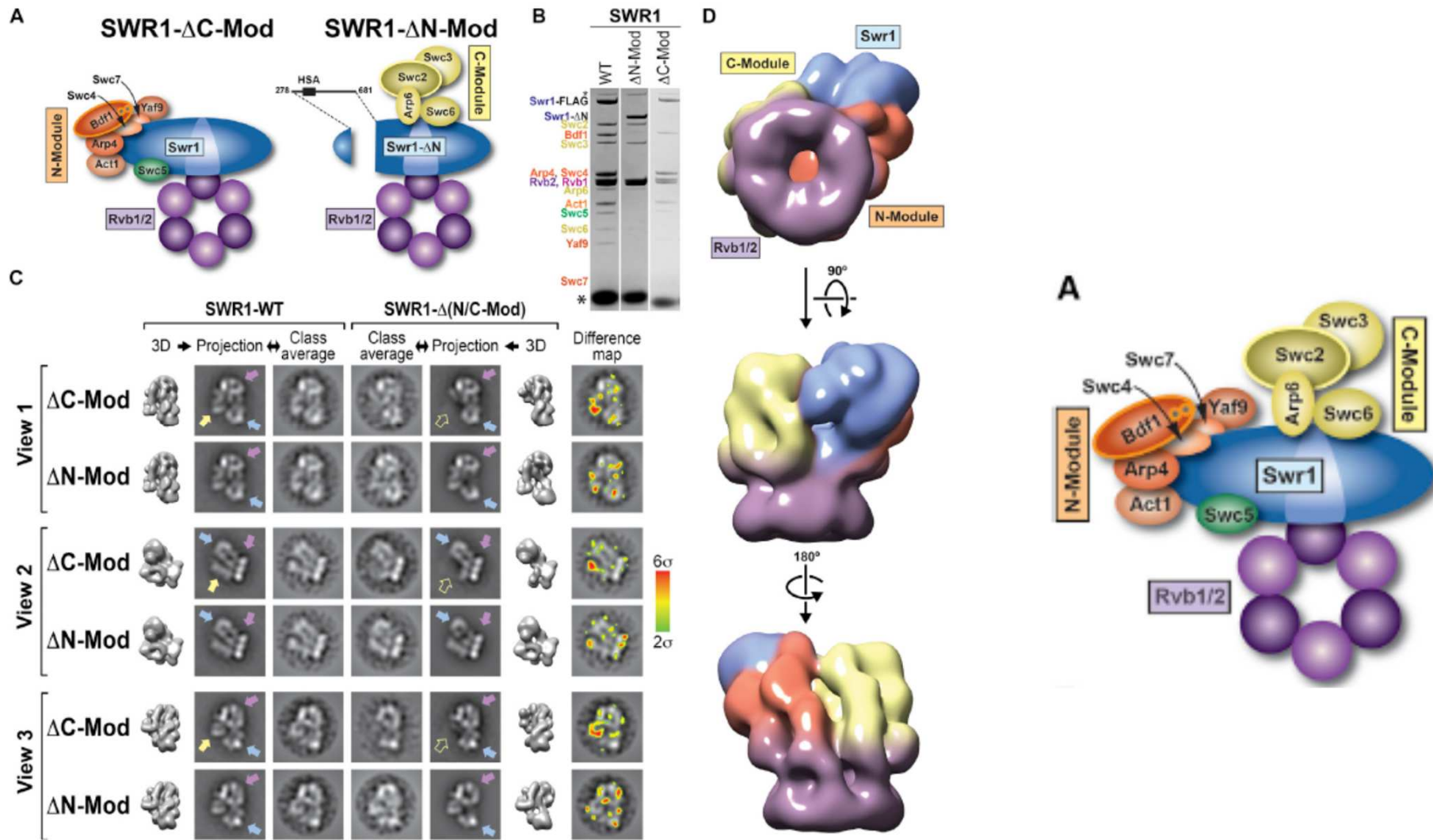




příklad velkého komplexu (zjednodušené schéma – jak jsou podjednotky „prosítovány“ – jak jsou v prostoru blízko sebe)

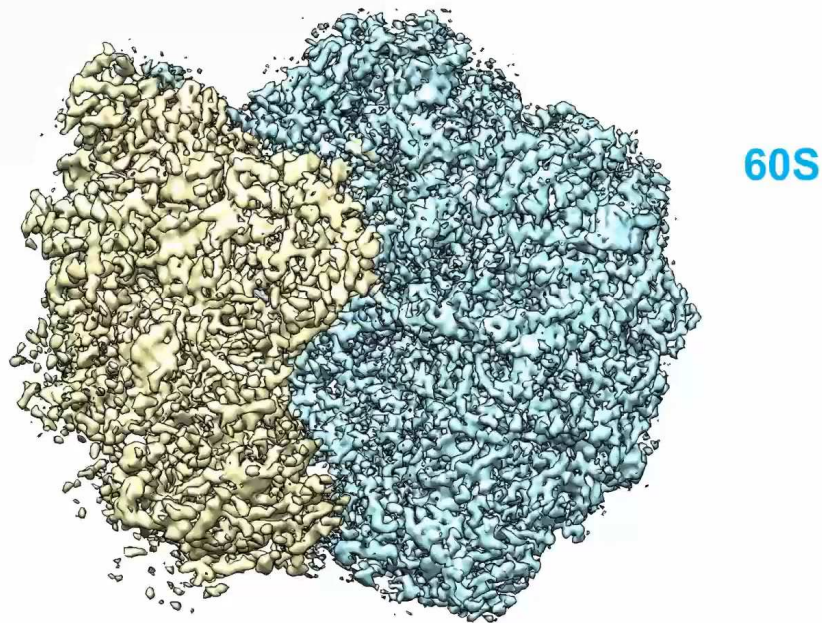
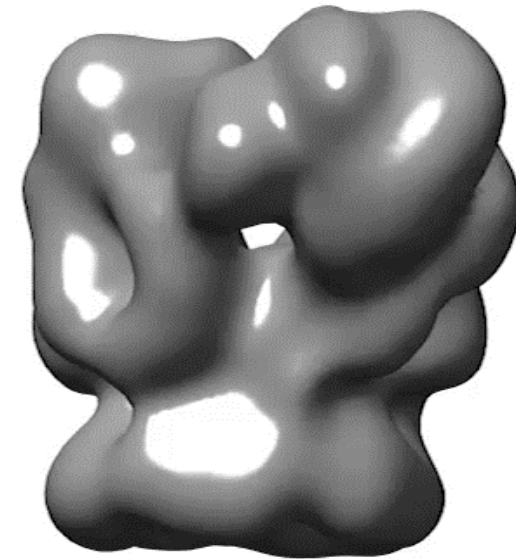
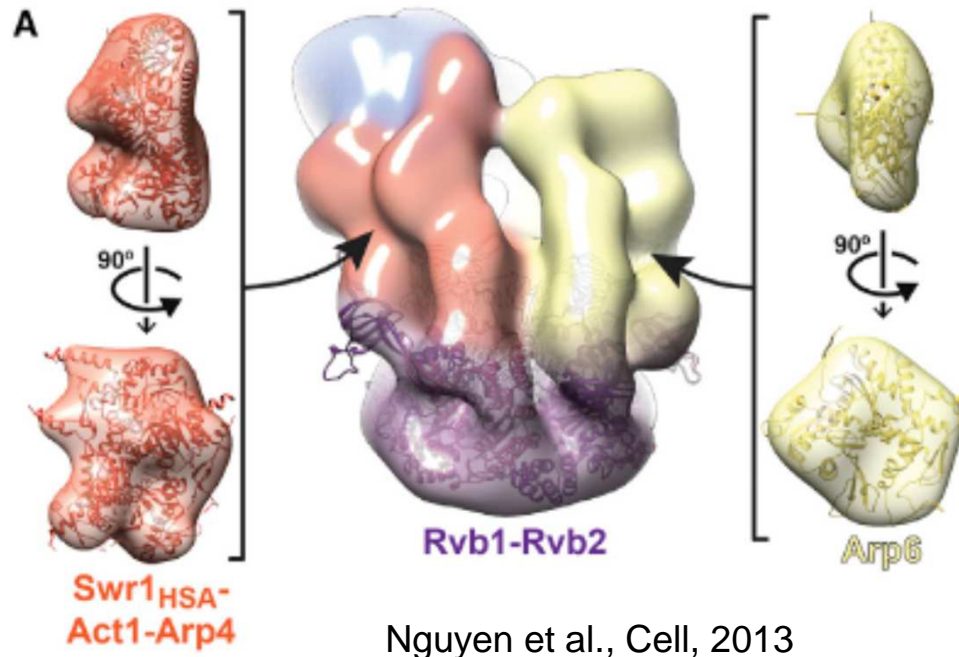


Integrace dalších dat:
- krystalové struktury
- cryoEM data



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)

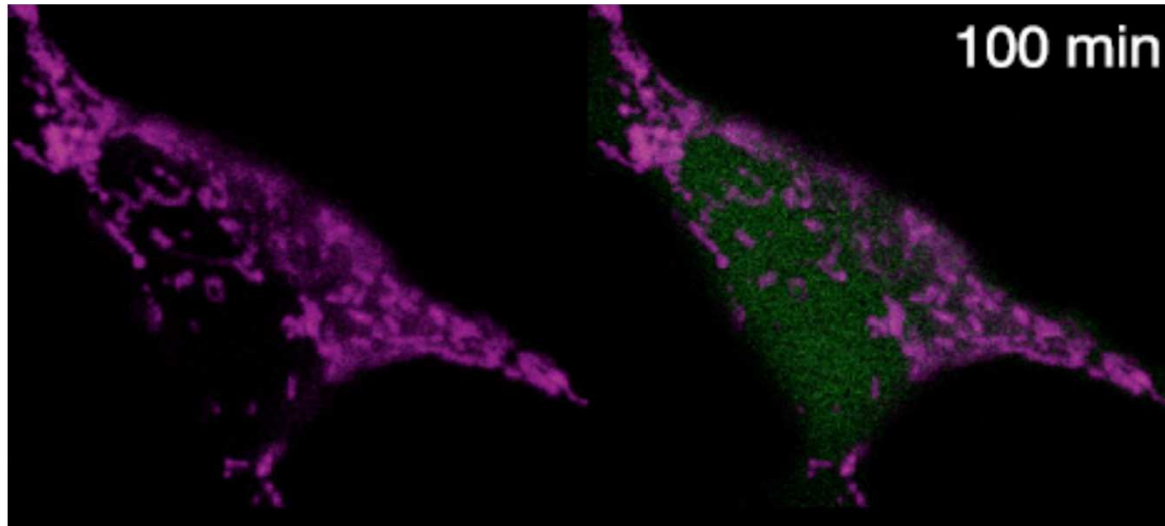


Analýza architektury proteinových komplexů

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

Nejlepší cryoEM mají rozlišení až 4Å

Bai et al, eLife, 2013



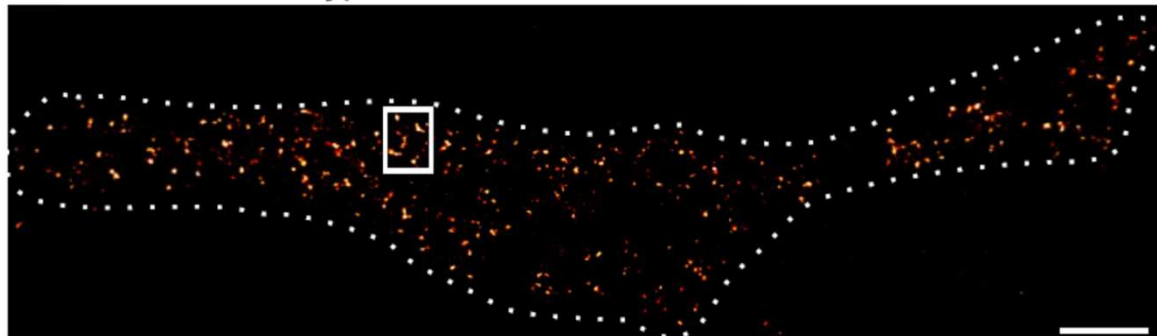
100 min

Lokalizace proteinových komplexů

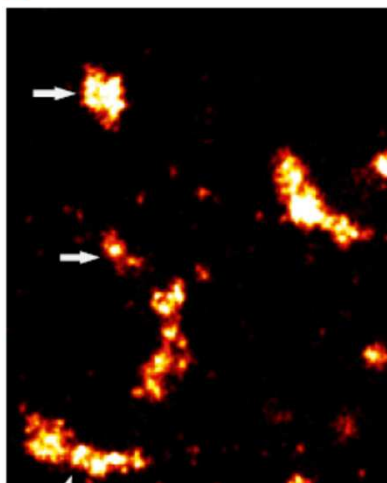
Konfokální mikroskopie vs super-resolution mikroskopie (STED=stimulated emission depletion microscopy – rozlišení 60nm)

+ AFM (atomic force microscopy)

A GFP-Bax wild type

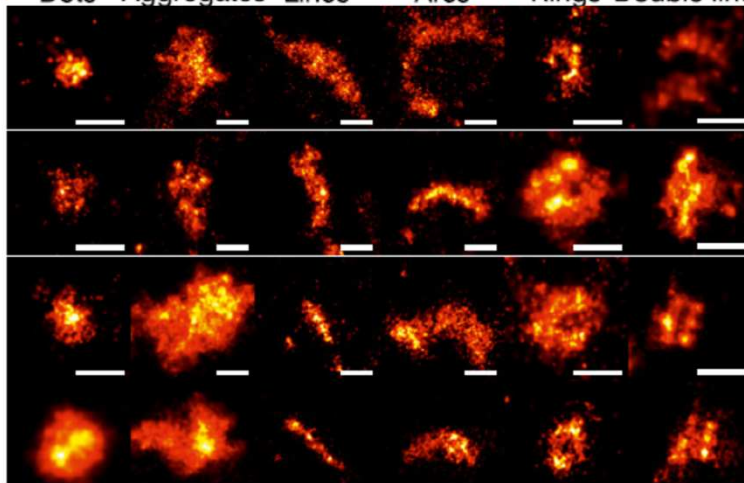


B

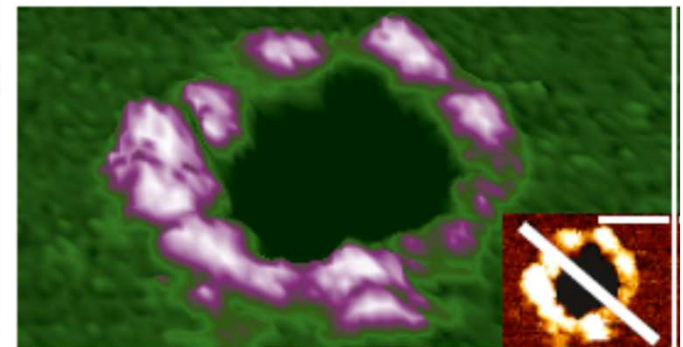


C

Dots Aggregates Lines Arcs Rings Double lines



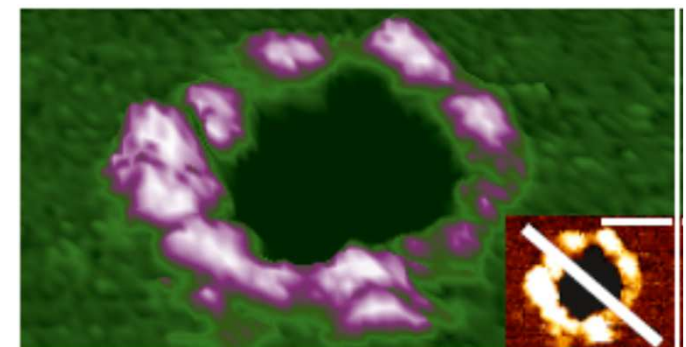
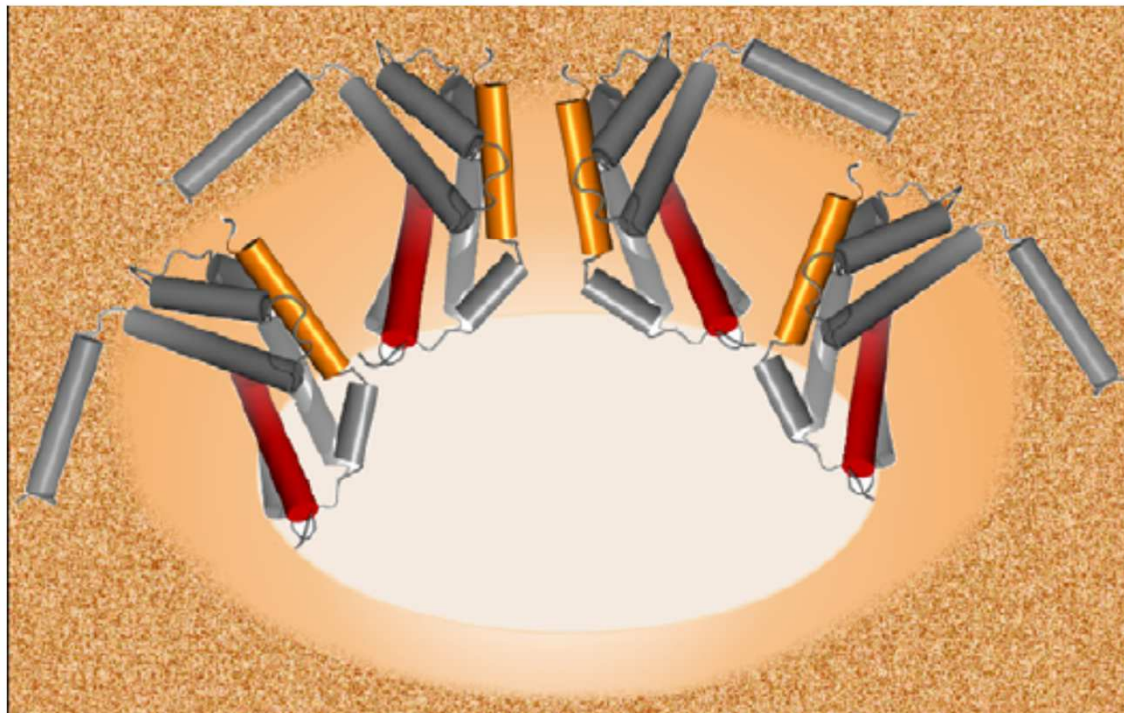
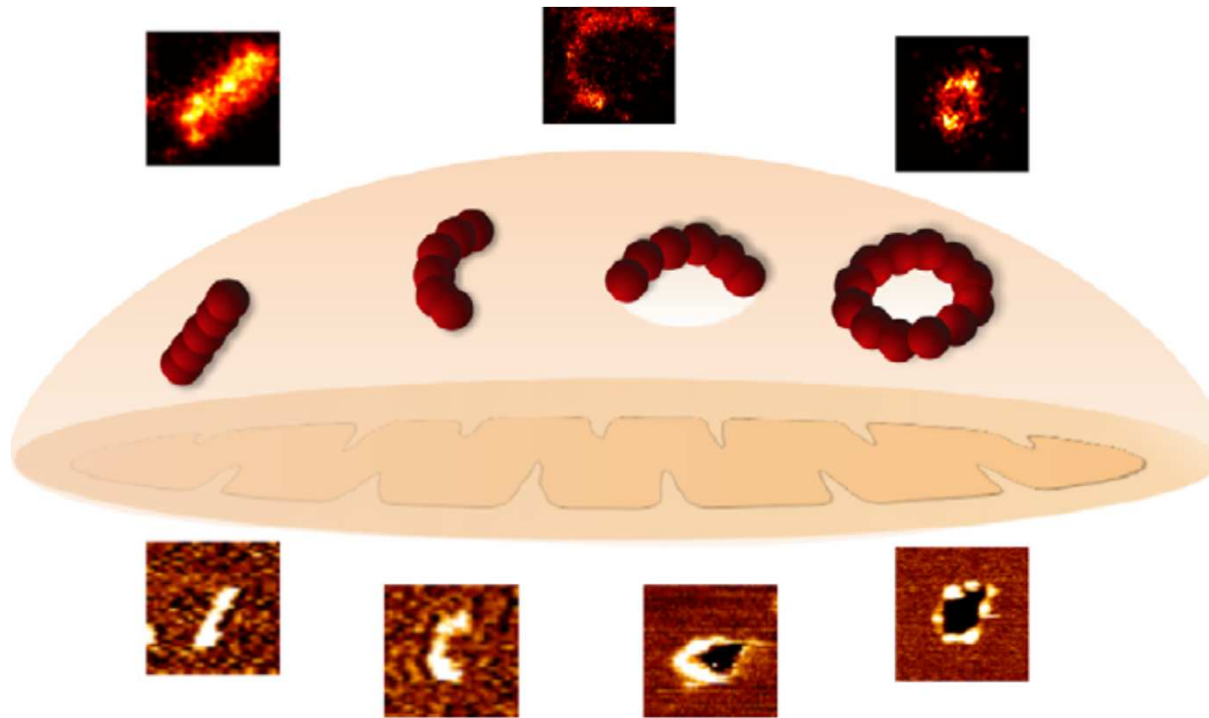
Gallego et al, EMBO J, 2016



Lokalizace proteinových komplexů

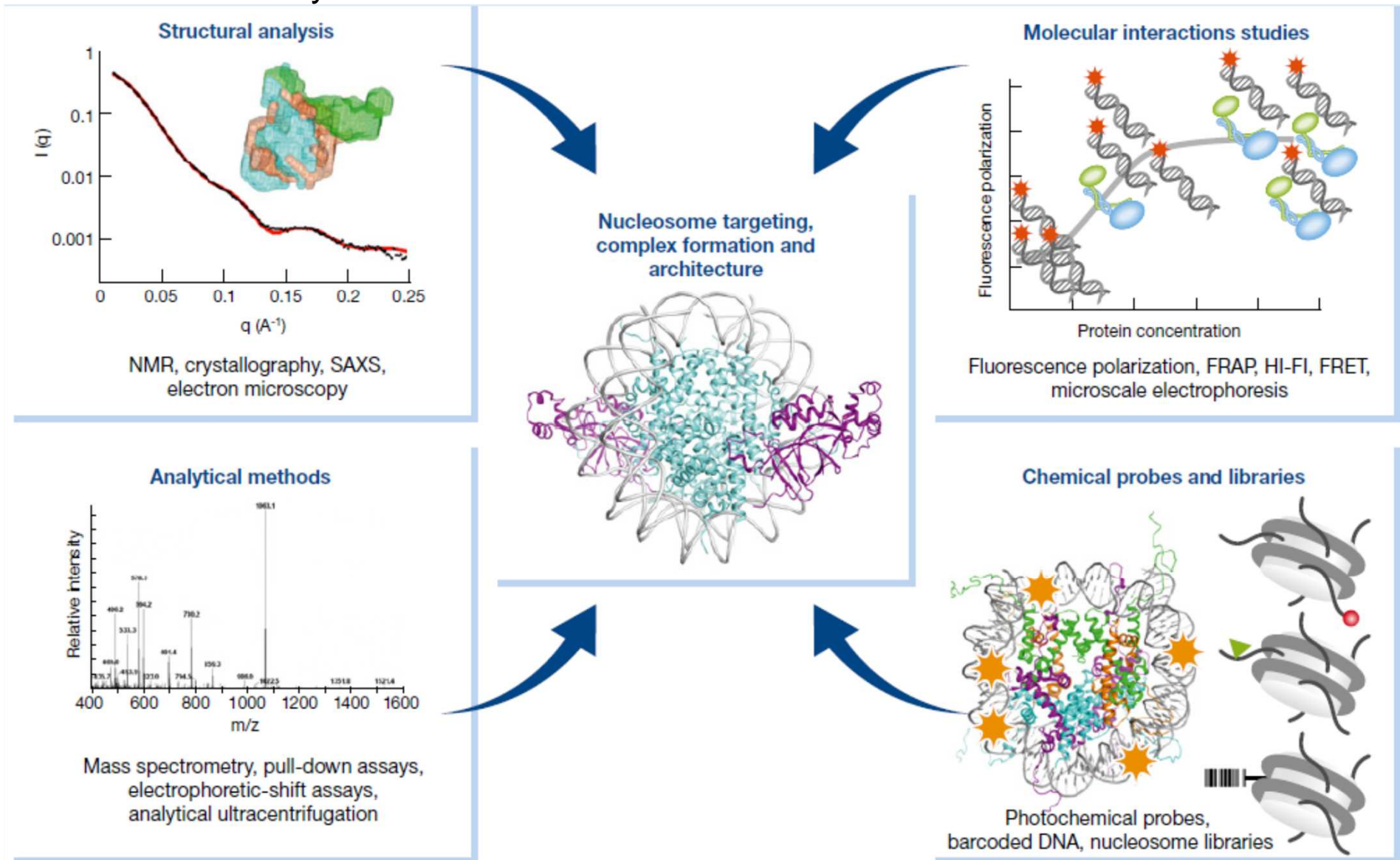
Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptósa)

Gallego et al, EMBO J, 2016



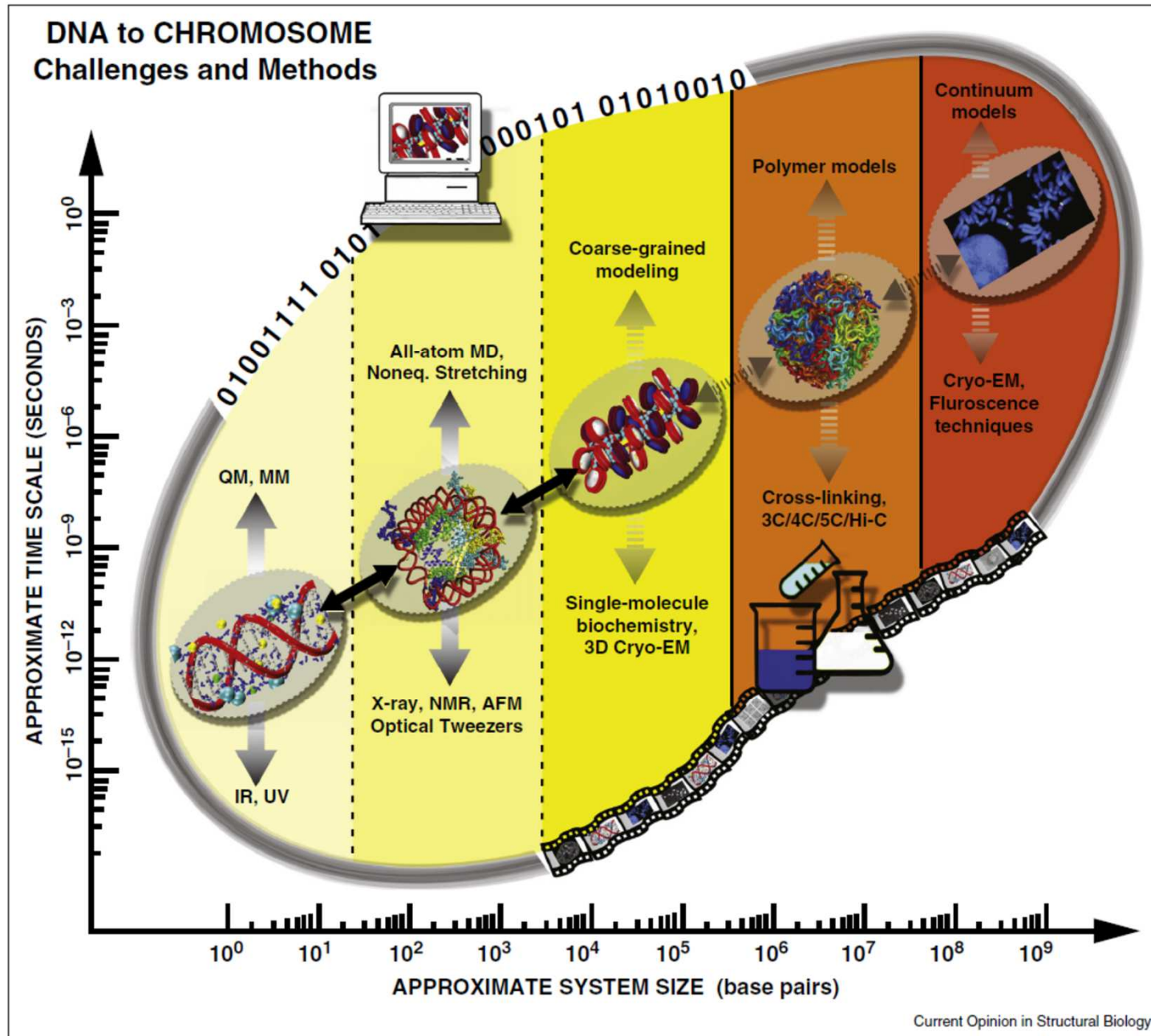
Analýza proteinových komplexů

více Metody GP

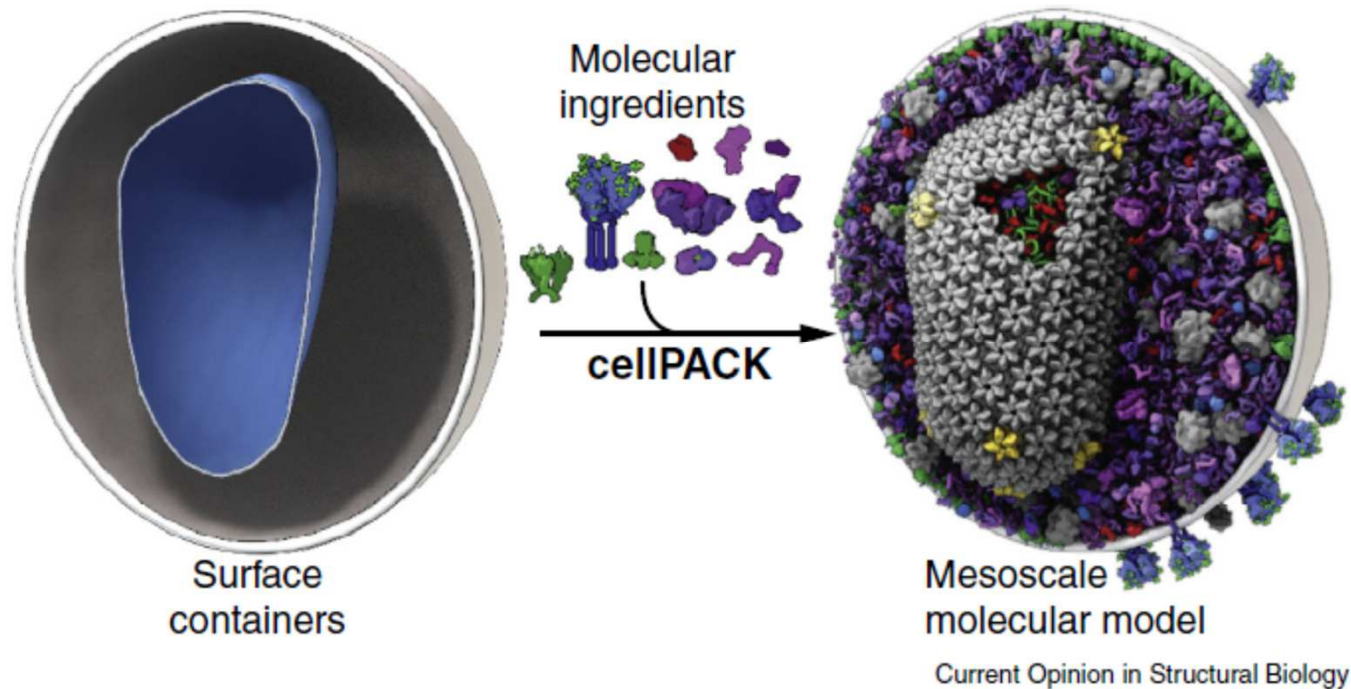


Analyza proteinovych komplexu

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)

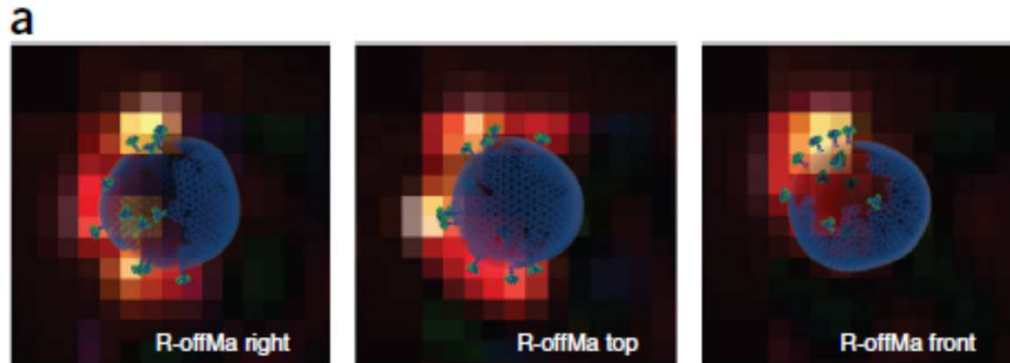
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur

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

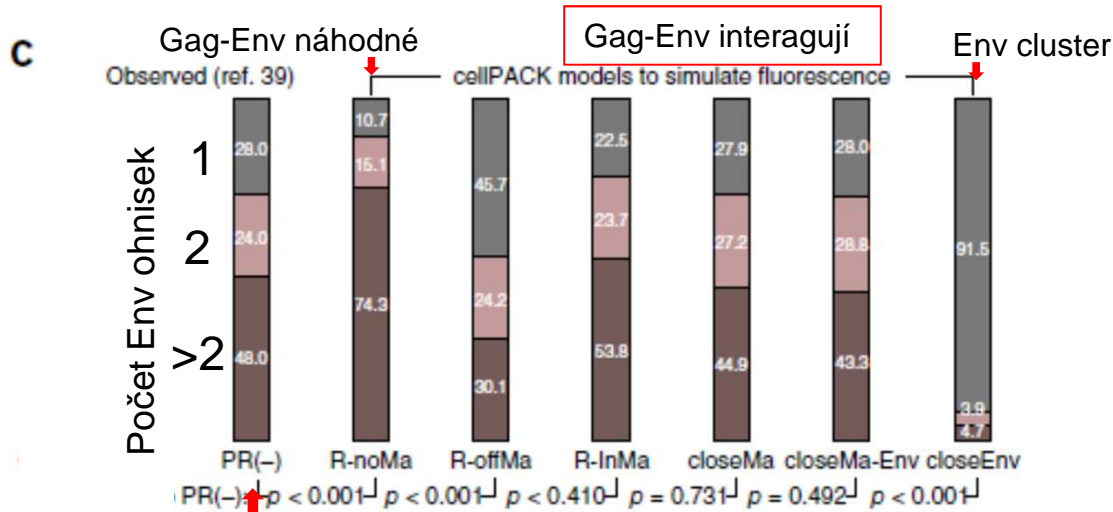
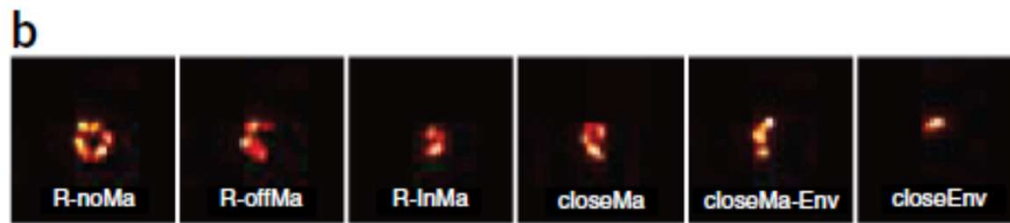
... vychází z herních a animačních algoritmu ...

Johnson et al., Nat Meth, 2015; Iwasa, CO in SB, 2015

Visualizace proteinových komplexů - CellPACK



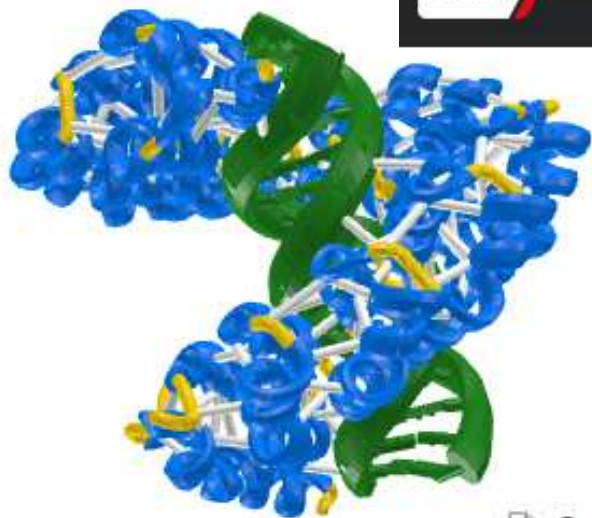
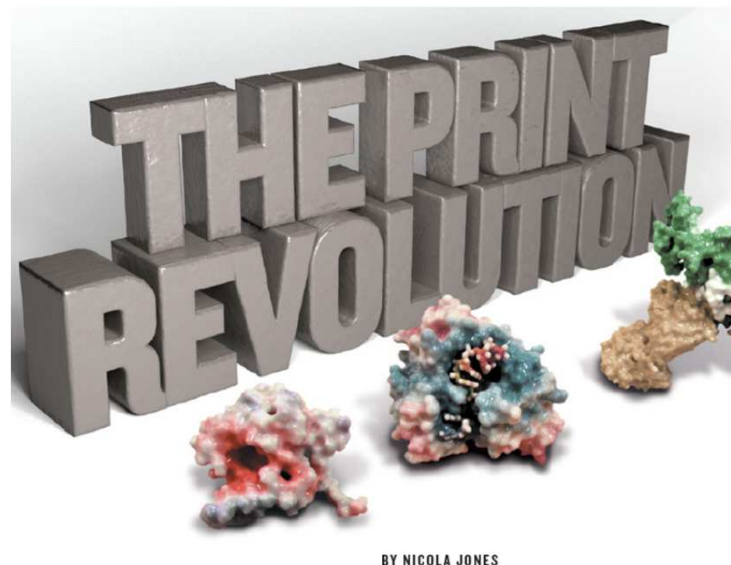
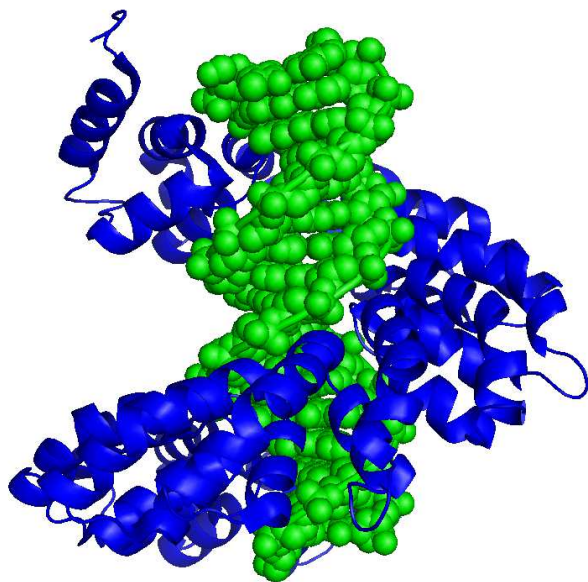
CellPACK poskytuje vzhled do buněčných procesů – použit na simulaci distribuce proteinů virové částice (např. R-noMa: random-bez interakcí)



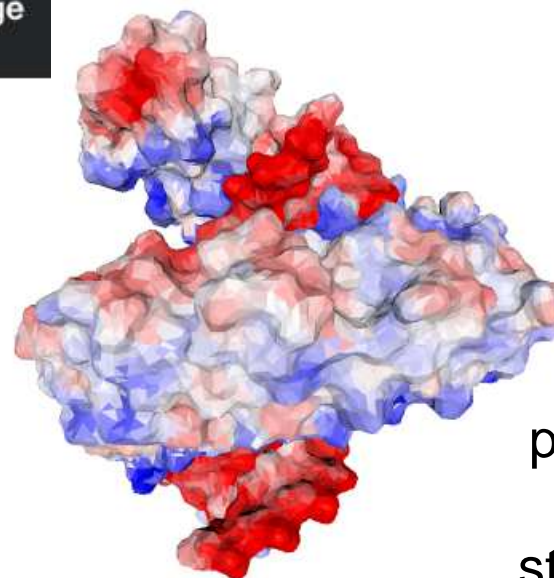
Experimentální výsledek

Johnson et al., Nat Meth, 2015

Visualizace proteinových komplexů



 3dprint.nih.gov/



Existuje mnoho nástrojů na vizualizaci komplexů

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