

Strukturní biologie + signalizace

Jaromír MAREK,
Centrum strukturní biologie,
CEITEC MU

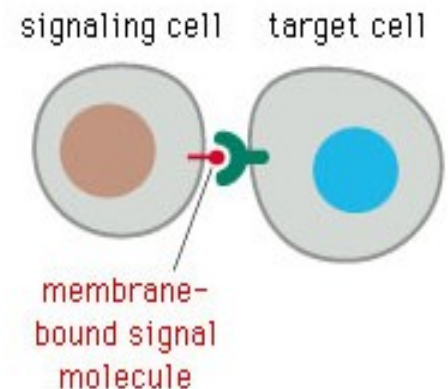
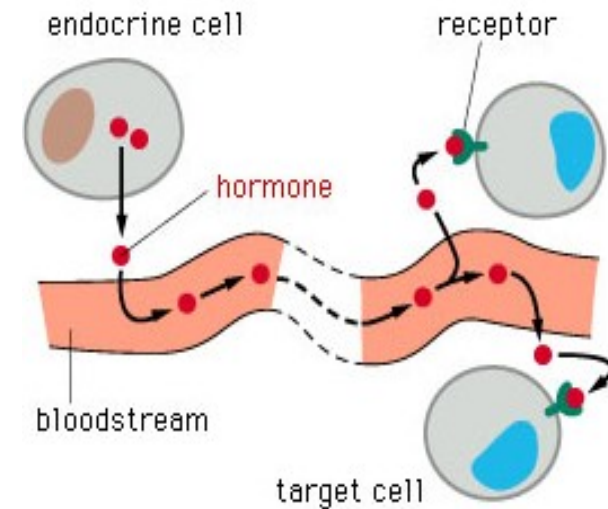
Obsah

- Přenos signálu
- G-proteiny a GPCR
- Fosforylace
- Signální dráhy



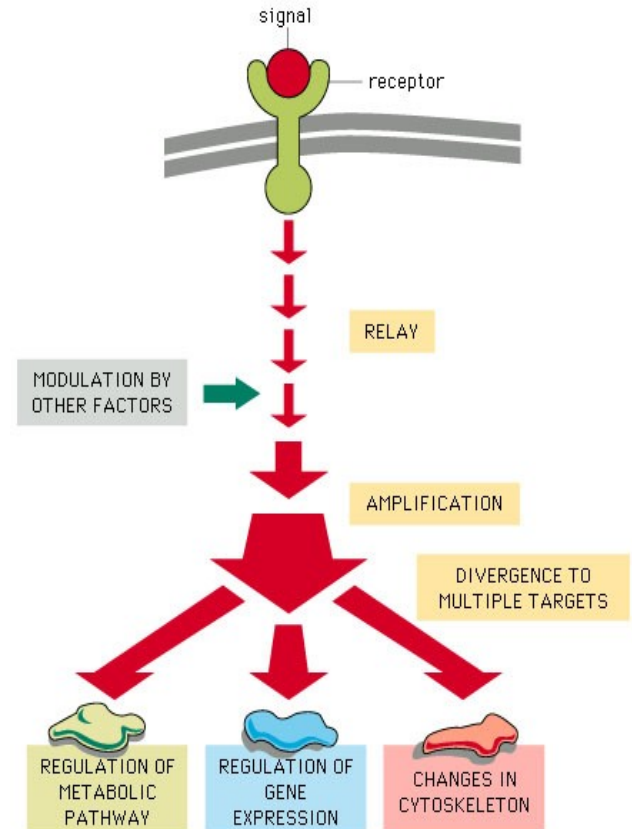
Přenos signálu

- Strukturovaný a diferencovaný systém
 - Přenos informace „na dálku“
 - Přenos „přes rozhraní“
 - Konverze signálu
 - Specifický/modulovaný přenos
-
- Nosič signálu (molekula)
 - Vysílač + přijímač, vypínač/přepínač



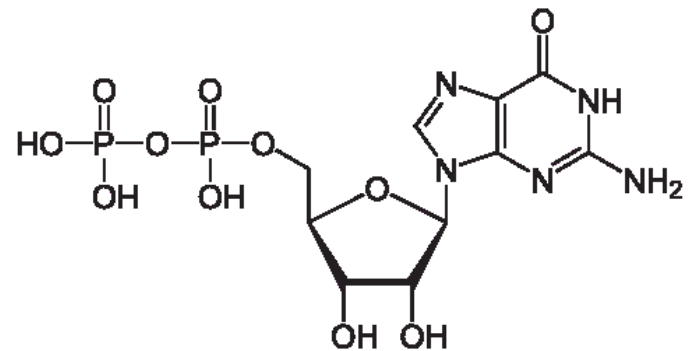
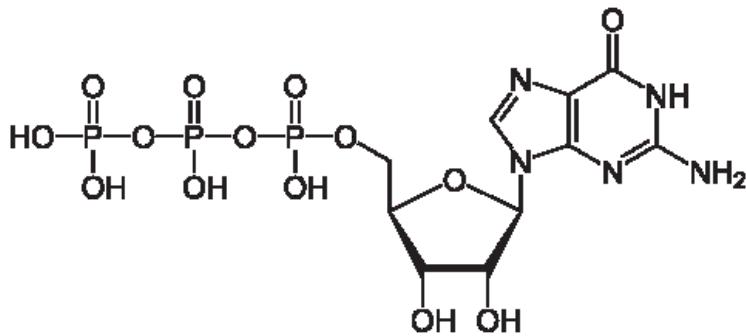
Receptory signálu

- Přenos informace přes membránu
- Receptory spojené s G proteiny
- Receptory-membránové kanály
- Katalytické receptory



Přenos signálu GPCR

- G-proteiny (guanine nucleotide-binding proteins) – molekulární přepínače
- Alfred G. Gilman + Martin Rodbell (N.C. – fyziologie - 1994)
- Externí signál řídí funkci = konverzi GTP na GDP



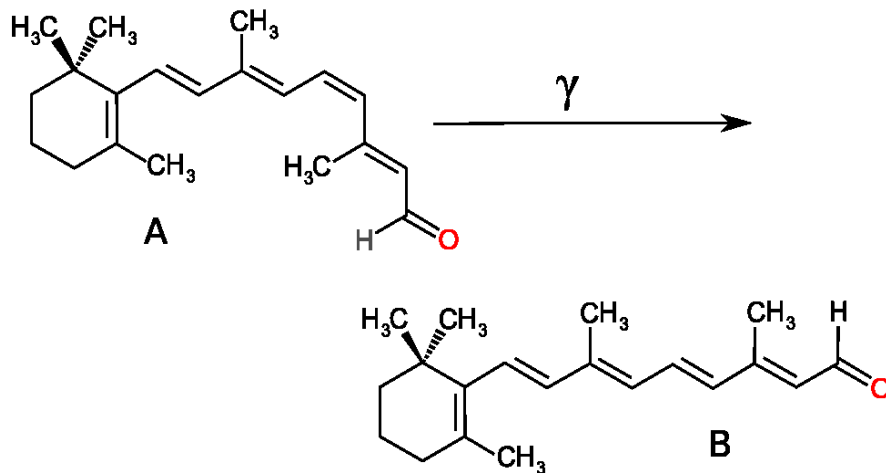
- Aktivace G-proteinů – pomocí integrálních membránových receptorů GPCR (G protein-coupled receptor)
- Brian Kobilka + Robert Lefkowitz (N.C. – chemie - 2012)

GPCR signální dráhy

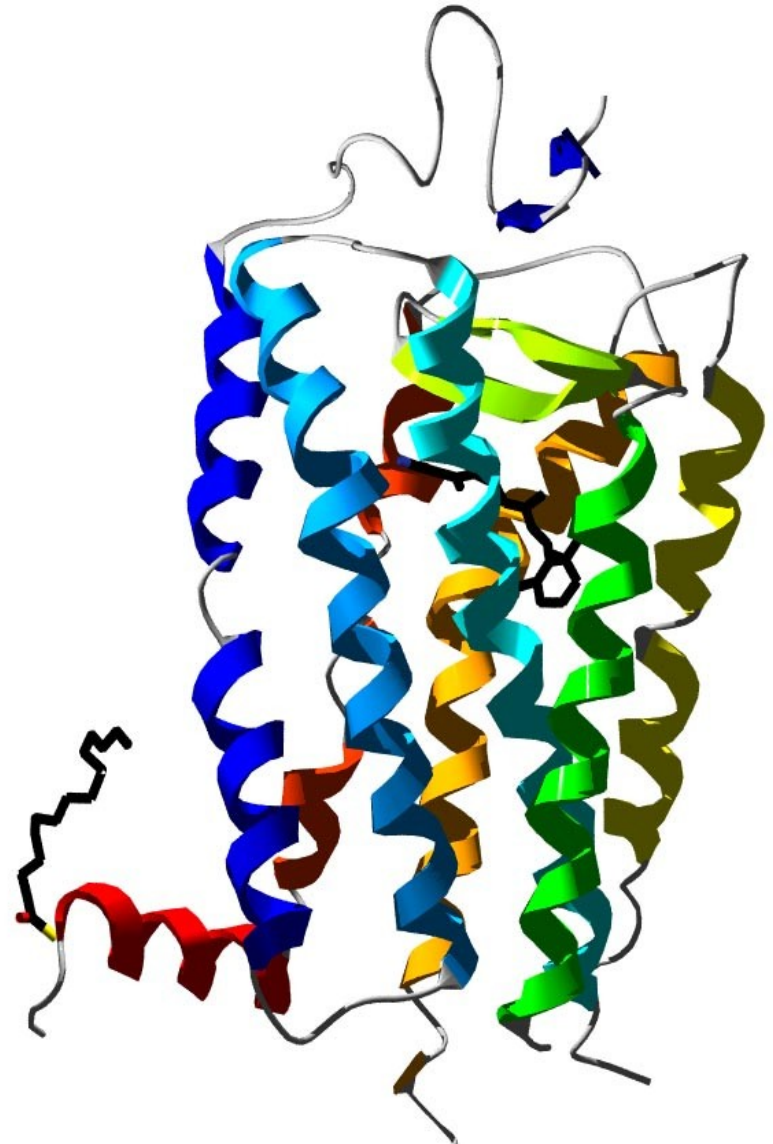
- Široké spektrum přenášených signálů (sensorické dráhy, hormony, neurotransmitery, ...)
- Receptor serotoninu (přenašeč nervových vzruchů), opinoidů, histaminu, ...
- Vlastní objev G-Proteinů – reakční dráha adrenalinu
- Hád'átko (*Caenorhabditis elegans*) – 5% DNA jsou GPCR
- Lidský genom - přinejmenším 800 GPCR (~ 4% DNA kódující proteiny), +200 (2012) se známou funkcí

GPCR - struktura

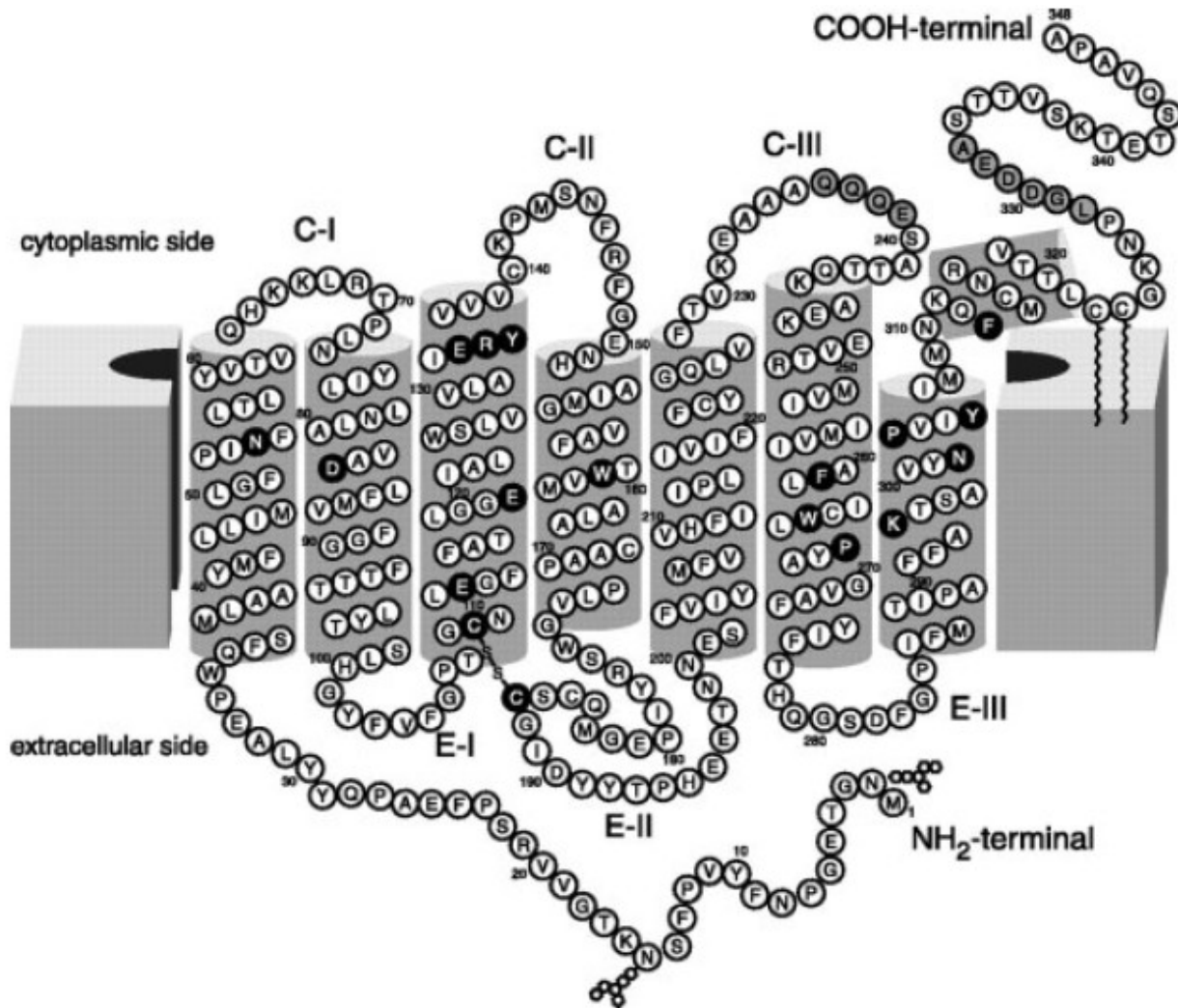
- Rhodopsin (oční pigment, objev Franz Christian Boll - 1876)
- Vzruch = fotony \rightarrow strukturní změna (cis \rightarrow trans) v retinalu (vitamín A)



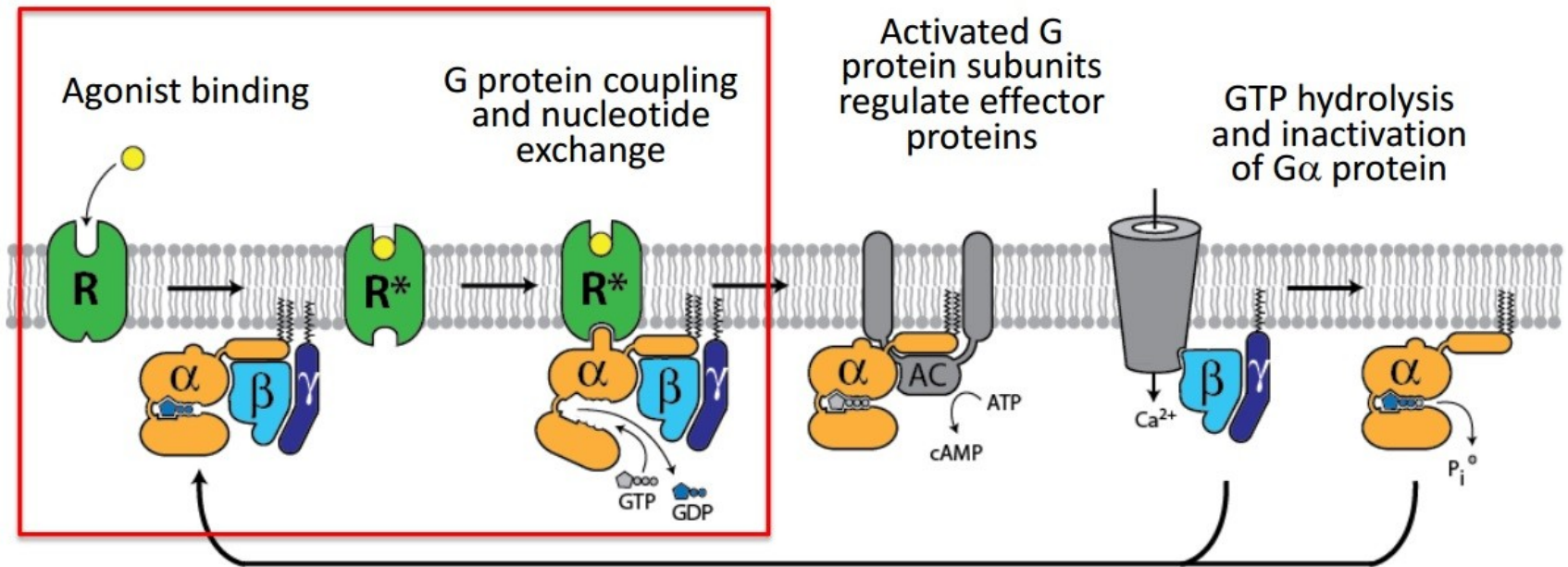
- George Wald (N.C. – fyziologie - 1967)



Sekundární struktura GPCR

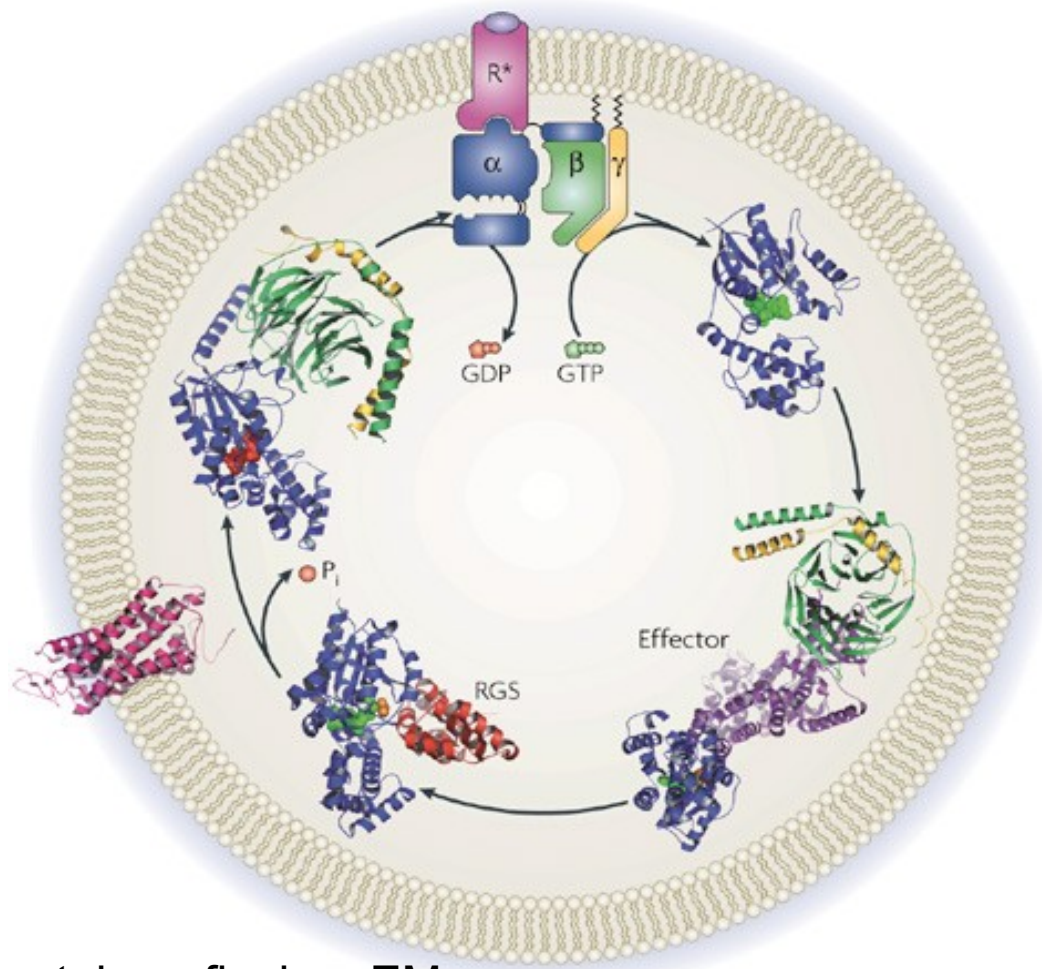


G-proteiny a strukturní biologie



GPCR-G Protein Cycle

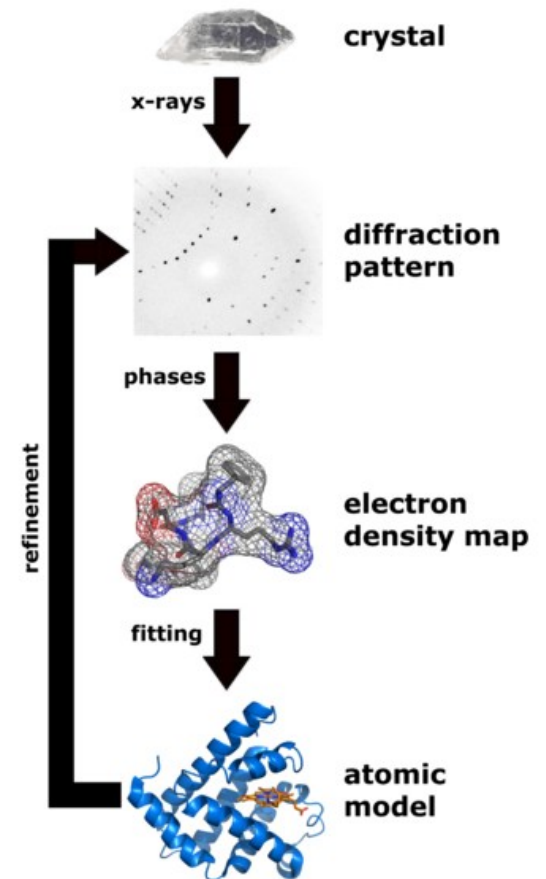
G-proteiny a strukturní biologie



Popis atomárních detailů GPCR – krystalografie, kryoEM

Etapy určování (bio)struktur

1. Výběr genu
2. Příprava rekombinantního proteinu, čištění, zahušťování...
3. Krystalizace
4. Difrakční experiment
5. Fázový problém + příprava modelu
6. Zpřesňování modelu
7. Publikace/užití výsledku



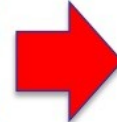
1. Výběr genu

Approaches to characterizing β_2 AR structure:

- Sequence analysis
 - secondary structure (transmembrane domains)

Cloned DNA Sequence (1986)

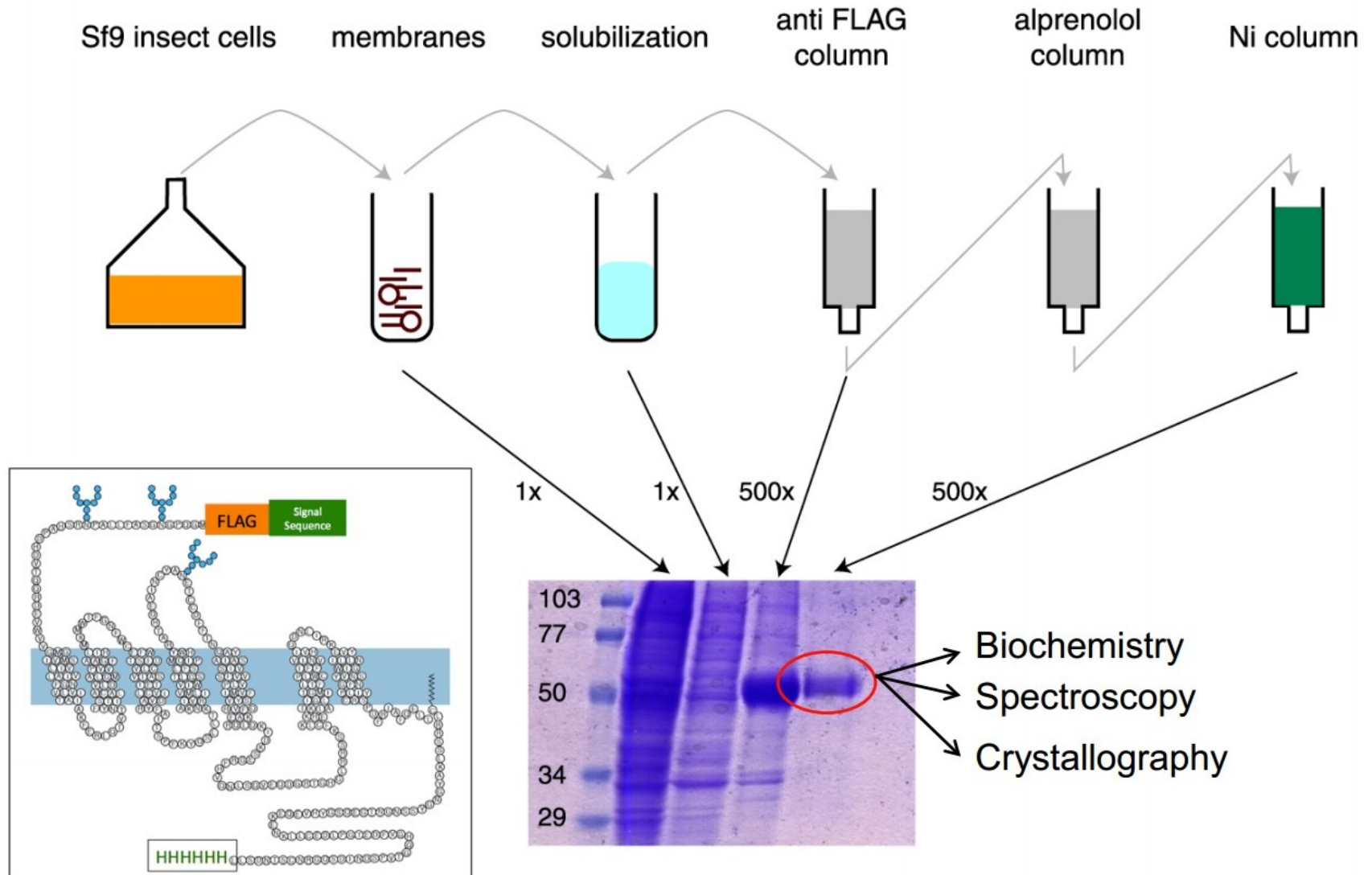
```
GAATTCATGCCGCGTTTCTGTGTTGGACAGGGGTGACTTTGTGCC
GGATGGCTTCTGTGTGAGAGCGCGCGAGTGTGCATGTCGGTGA
GCTGGGAGGGTGTGTCTCAGTGTCTATGGCTGTGGTTCGGTATAAG
TCTAAGCATGTCTGCCAGGGTGTATTGTGCCTGTATGTGCGTGCCT
CGGTGGGCACTCTCGTTTCTTCCGAATGTGGGGCAGTGCCGGTG
TGCTGCCCTCTGCCTTGAGACCTCAAGCCGCGCAGGCGCCAGGG
CAGGCAGGTAGCGGCCACAGAAGAGCCAAAAGCTCCCGGGTTGG
CTGGTAAGCACACCACCTCCAGCTTAGCCCTCTGGGGCCAGCCA
GGGTAGCCGGGAAGCAGTGGTGGCCCGCCCTCCAGGGAGCAGTT
GGGCCCCGCGGGCCAGCCTCAGGAGAAGGAGGGGCGAGGGGA
GGGGAGGGAAAGGGGAGGAGTGCTCGCCCTTCGCGGCTGCC
GGCGTGCCATTGGCCGAAAGTTCCCGTACGTACGGCGAGGGCA
GTTCCCCTAAAGTCTGTGCACATAACGGGCAGAACGCACTGCGA
AGCGGCTTCTCAGAGCACGGGCTGGAAGTGGCAGGCACCGCGA
GCCCCTAGCACCCGACAAGCTGAGTGTGCAGGACGAGTCCCACC
ACACCCACACCACAGCCGCTGAATGAGGCTTCCAGGCGTCCGCTC
GCGGCCCCGAGAGCCCCGCGTGGGTCCGCTGCTGAGGCGCCC
CCAGCCAGTGCCTTACCTGCCAGACTGCGCGCATGGGGCAACC
CGGGAACGGCAGCGCCTTCTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGC
GCCGGACCACGACGTCACGCAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTG
GTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCTGGCCATCGTGT
TGGCAATGTGCTGGTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTG
CAGACGGTCACCAAC
```



Amino Acid Sequence

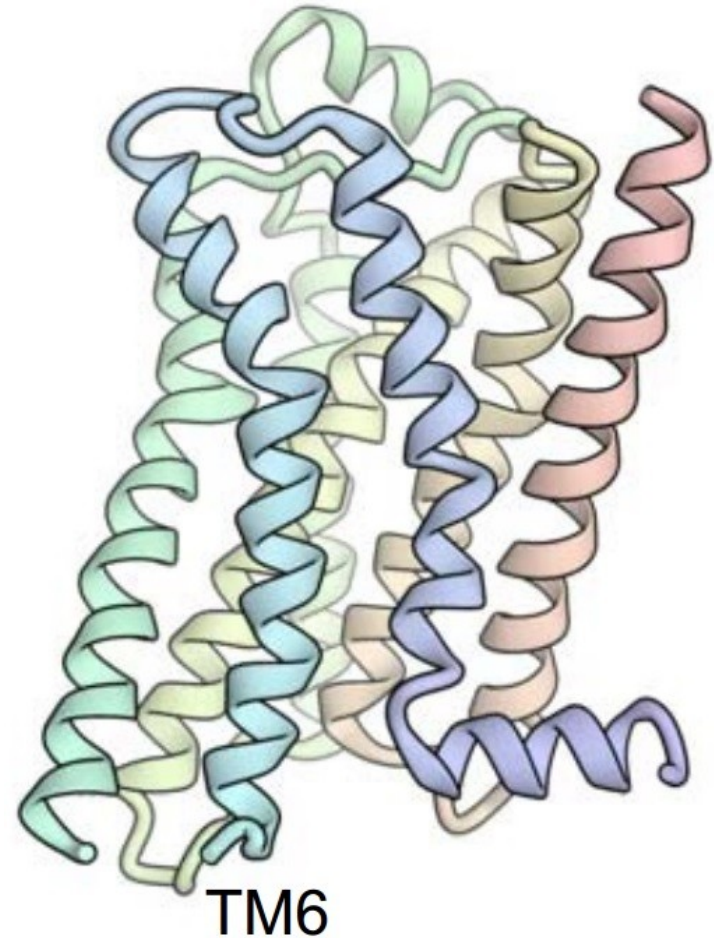
```
MGQPGNGSAFLLAPNRSHAPDHDVT
QQRDEVWVVGMGIVMSLIVLAIVFGN
VLVITAIKFERLQVTNYFITSLACADLV
MGLAVVPFGAHILMKMWTFGNFWCE
FWTSIDVLCVTASIELCVIAVDRYFAITS
PFKYQSLTKNKARVIILMVWIVSGLTSF
LPIQMHWYRATHQEAINCYANETCCDF
FTNQAYAIASSIVSFYVPLVIMVFVYSRV
FQEAKRQLQKIDKSEGRFHVQNLSQVE
QDGRTGHLRRSSKFCLKEHKALKTLGII
MGTFTLCWLPFFIVNIVHVIQDNLIRKE
VYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIA
FQELLLRRSSLKAYGNGYSSNGNTGEQ
SGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGH
QGTVPSDNIDSQGRNCSTNDSLL
```

2. Příprava studovaného materiálu

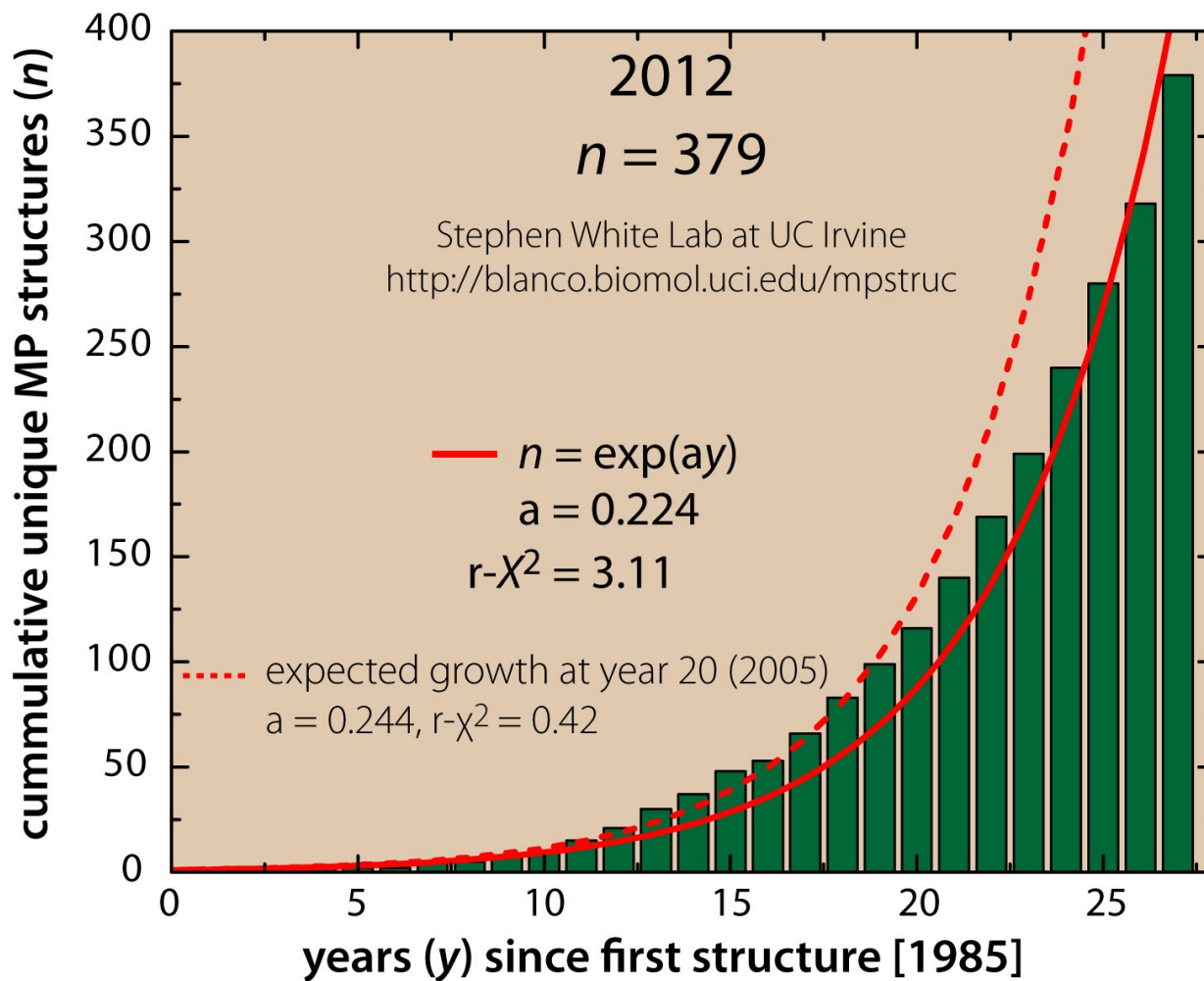


2.a Nekrystalografické výzkumy (integrovaná strukturní biologie)

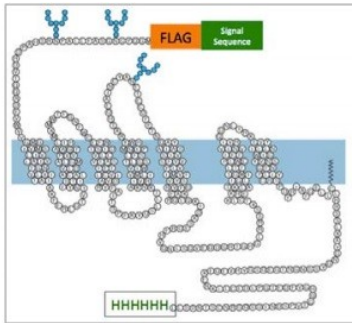
- NMR
- EPR
- Fluorescence
- Metody výpočetní chemie
- ...



3. Krystalografie membránových proteinů



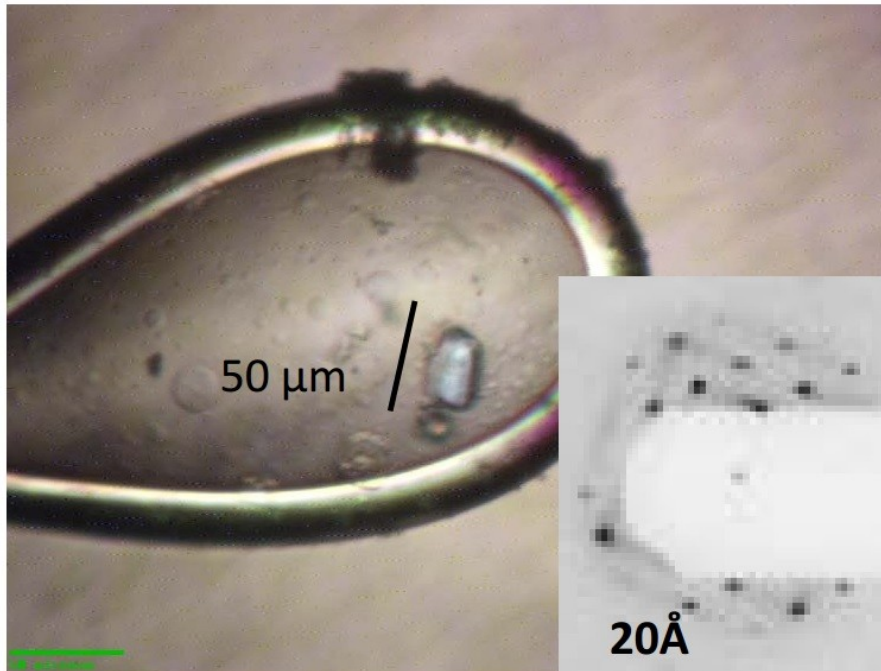
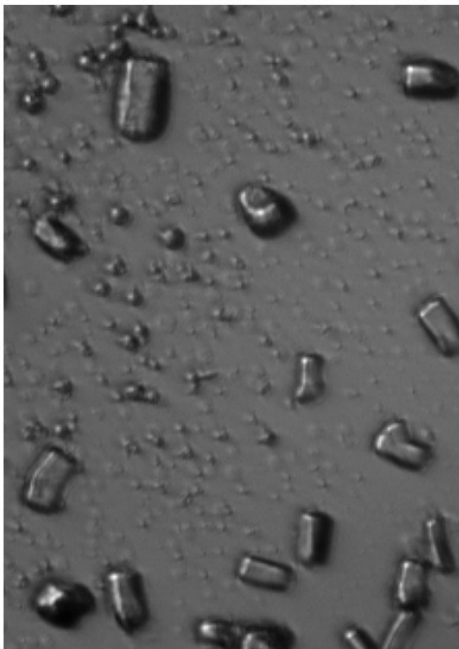
3-4. Krystalizace + difrakční experiment



Nov 2004

Crystals of wild-type β_2 AR

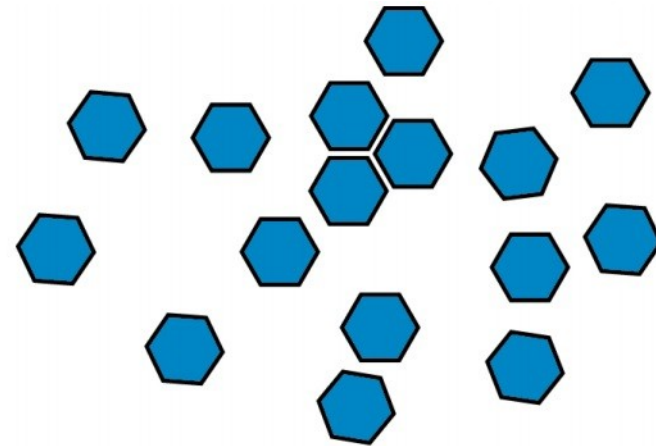
ESRF microfocus beamline ID13, July 2005



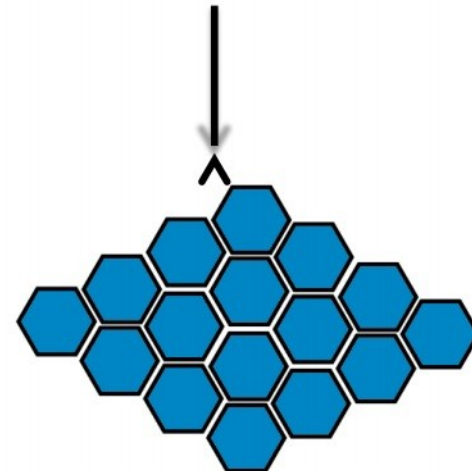
3. Krystalizace ideálního protein. komplexu



Conformationally
uniform GPCR

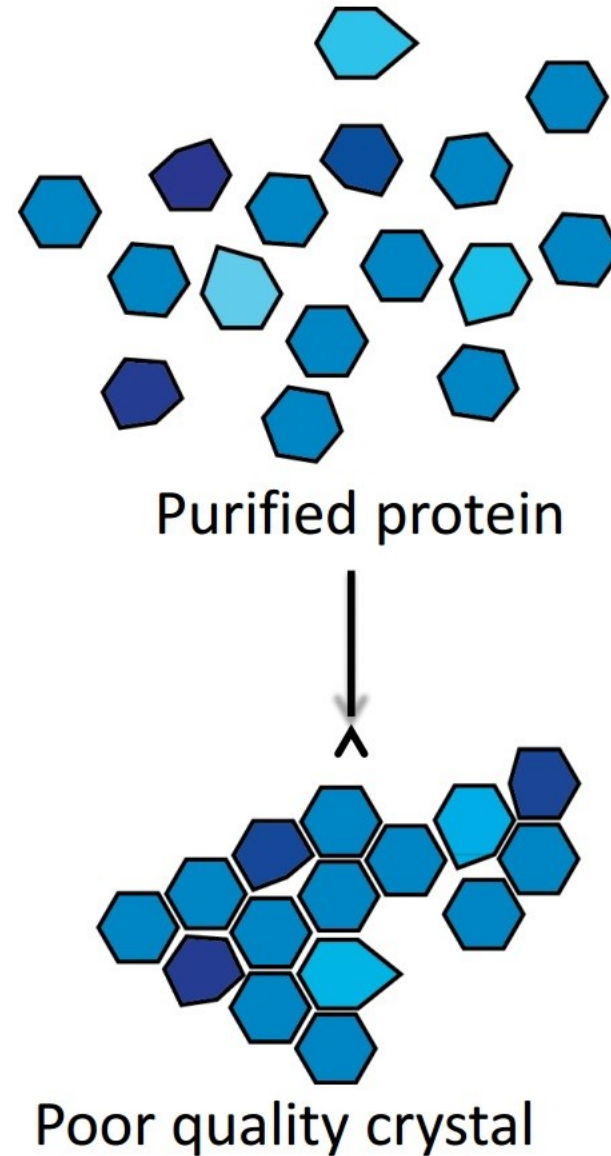
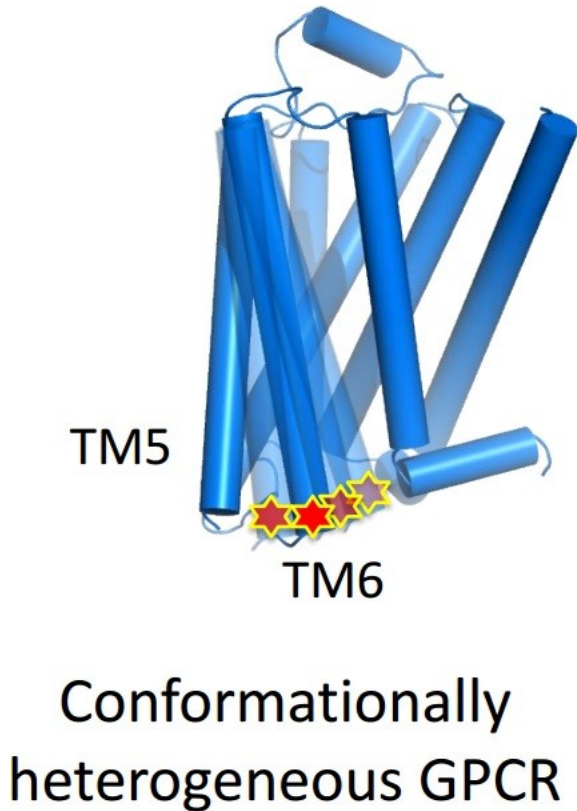


Purified protein



High-quality crystal

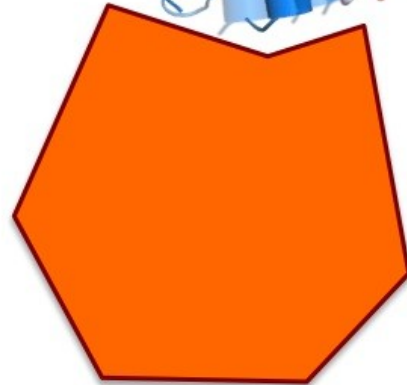
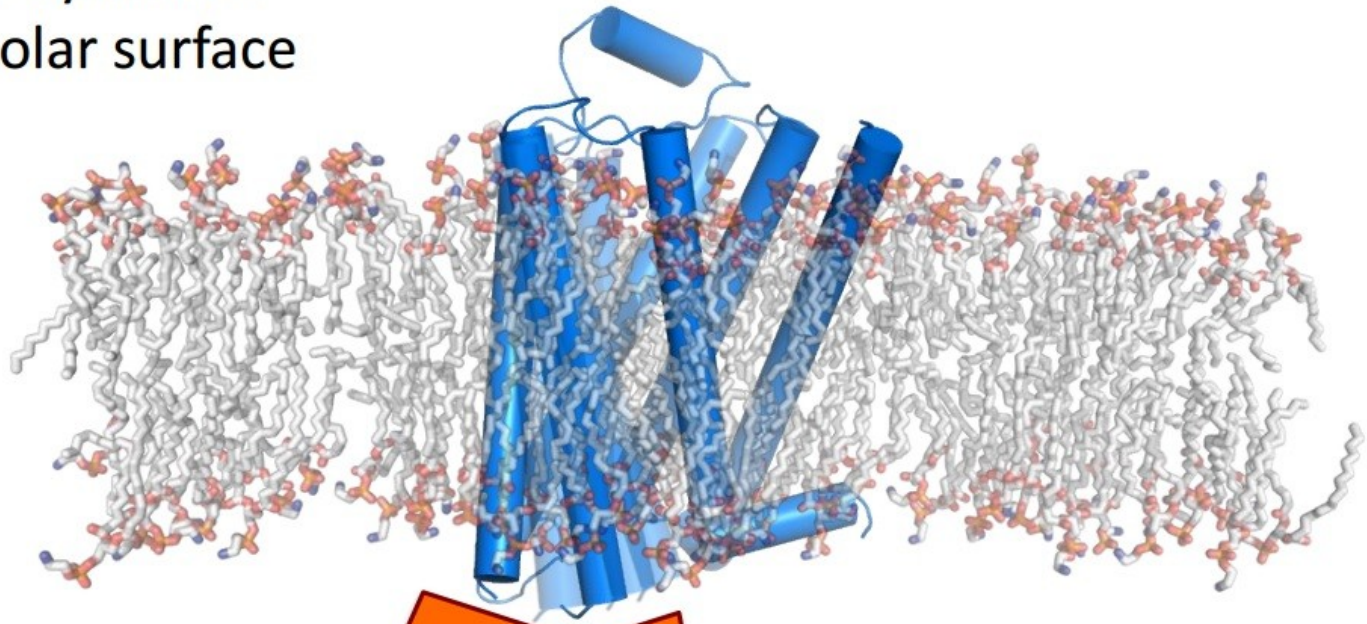
3. Krystalizace reálného protein. komplexu



3. Krystalizace membránového komplexu

Challenges for crystallography

- Protein dynamics
- Little polar surface



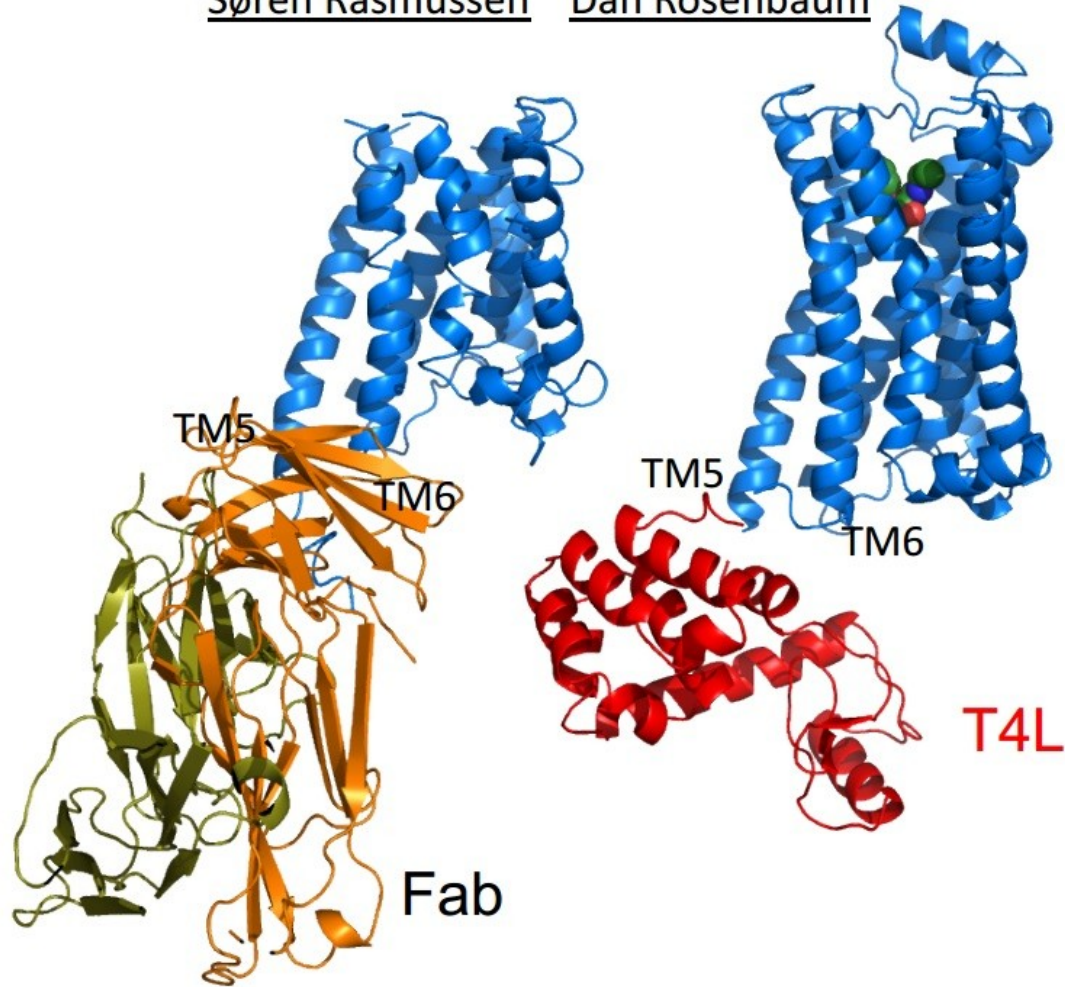
Stabilize and increase
polar surface

- Antibodies
- Protein Engineering

První RTG struktury GPCR

2007

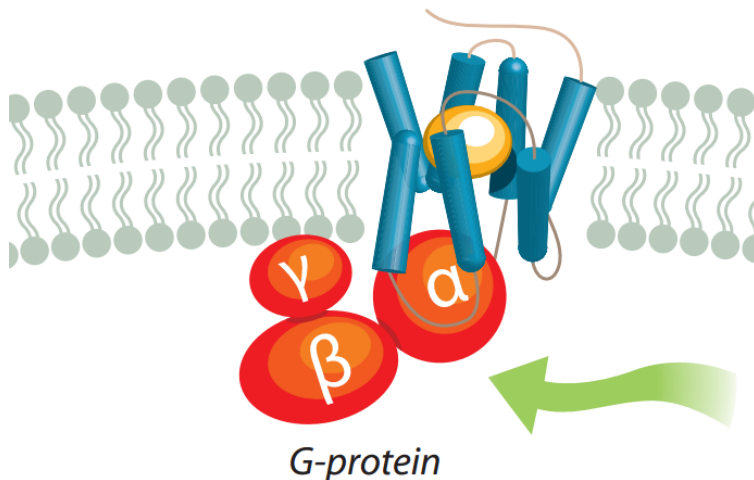
Søren Rasmussen Dan Rosenbaum



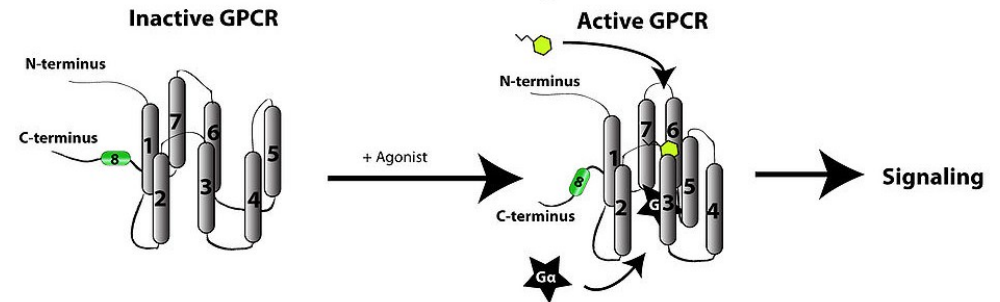
Sekundární struktura GPCR

- 7 α -šroubovic
- nízká 1D homogie
- Flexibilní struktura

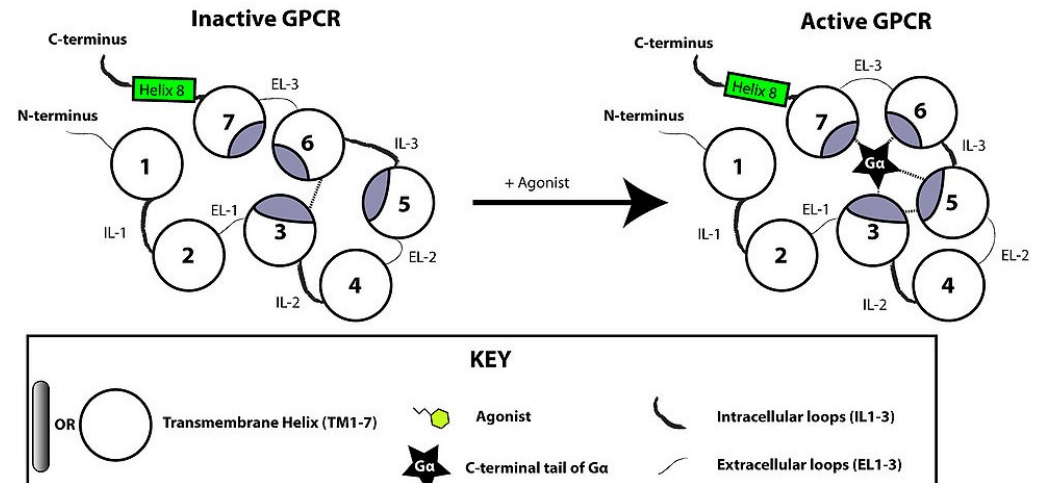
The receptor alters shape.
Inside the cell, the G-protein binds and is activated.



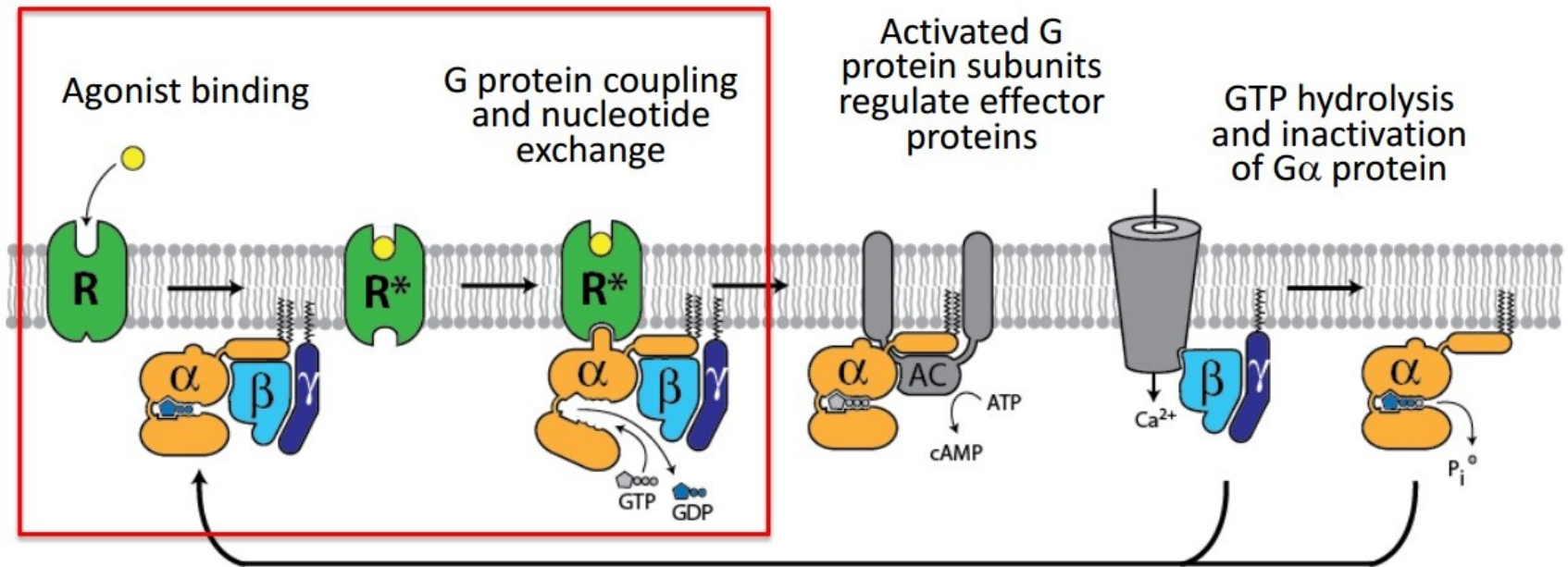
Side Perspective



Intracellular Perspective



G-proteiny a strukturní biologie



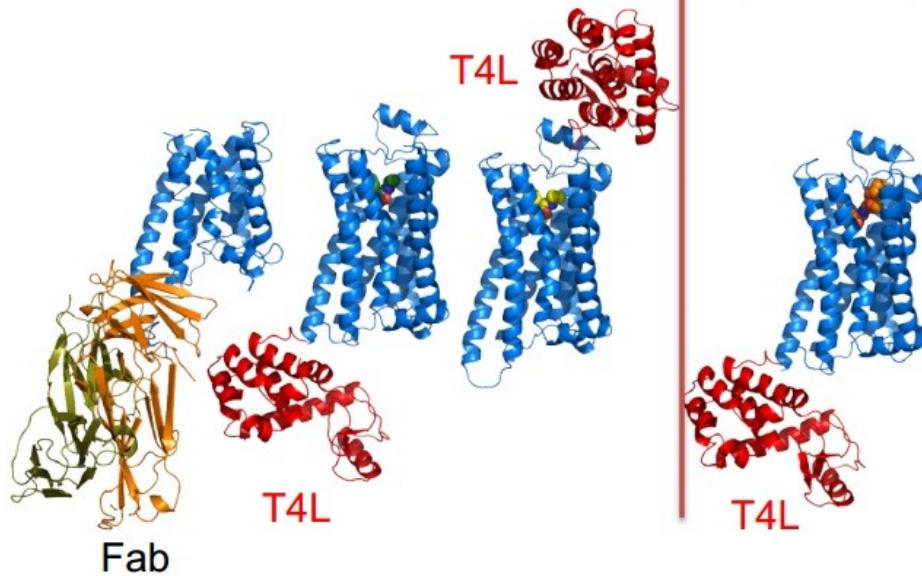
GPCR-G Protein Cycle

G-proteiny a strukturní biologie

β_2 AR INACTIVE

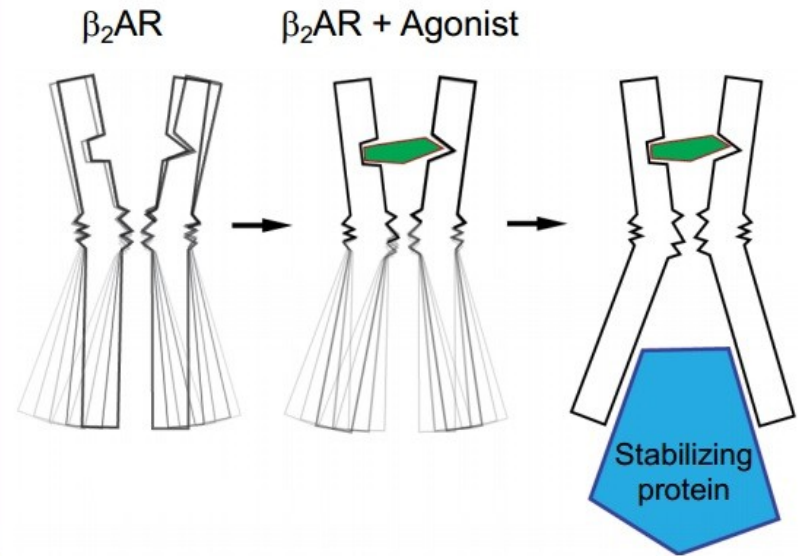
Inverse Agonist

Agonist
(covalent)



β_2 AR ACTIVE ?

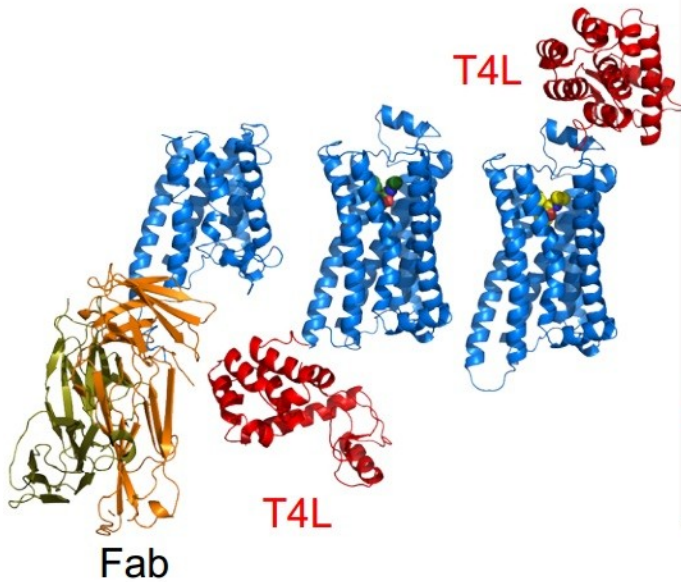
Agonist alone does not fully stabilize active state



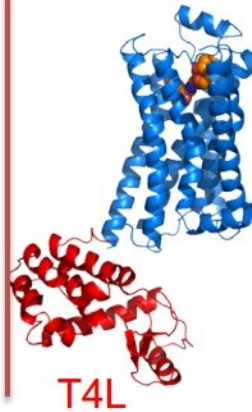
G-proteiny a strukturní biologie

β_2 AR INACTIVE

Inverse Agonist



Agonist
(covalent)

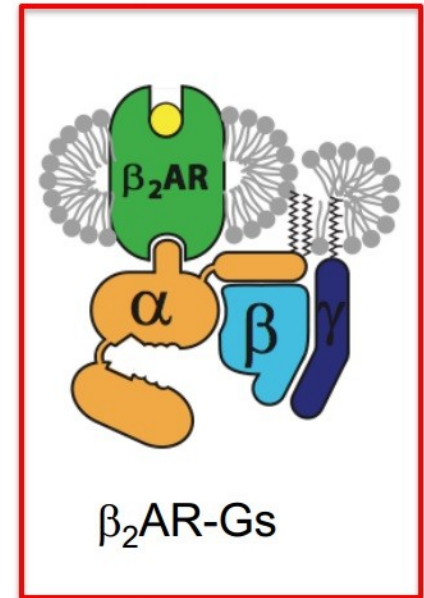


β_2 AR ACTIVE

Partial
Agonist

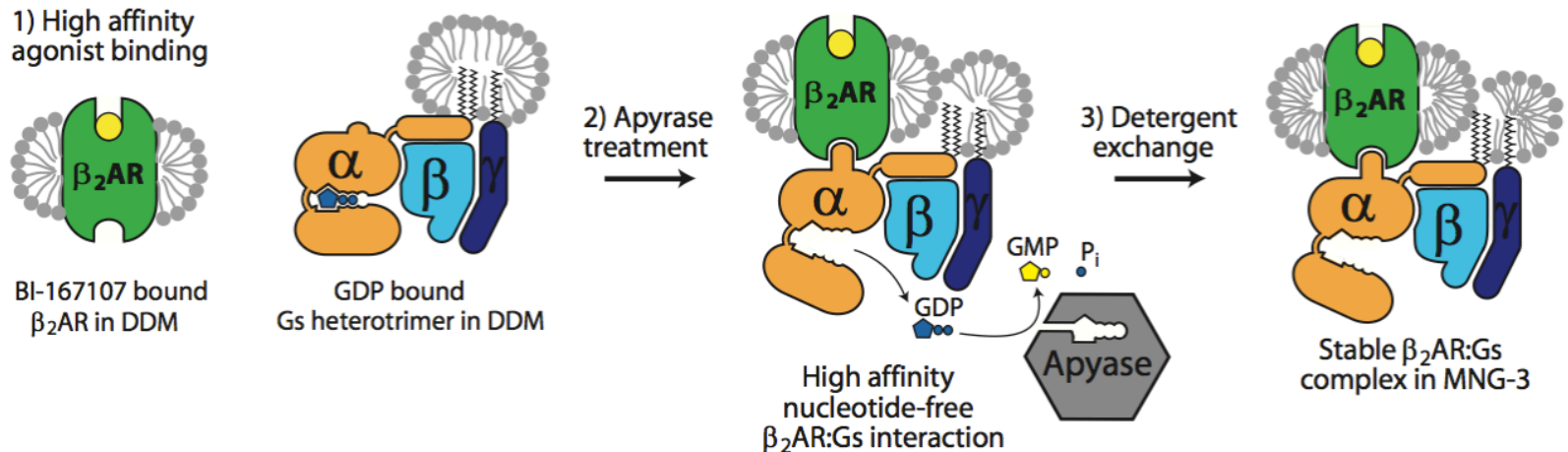


Agonist

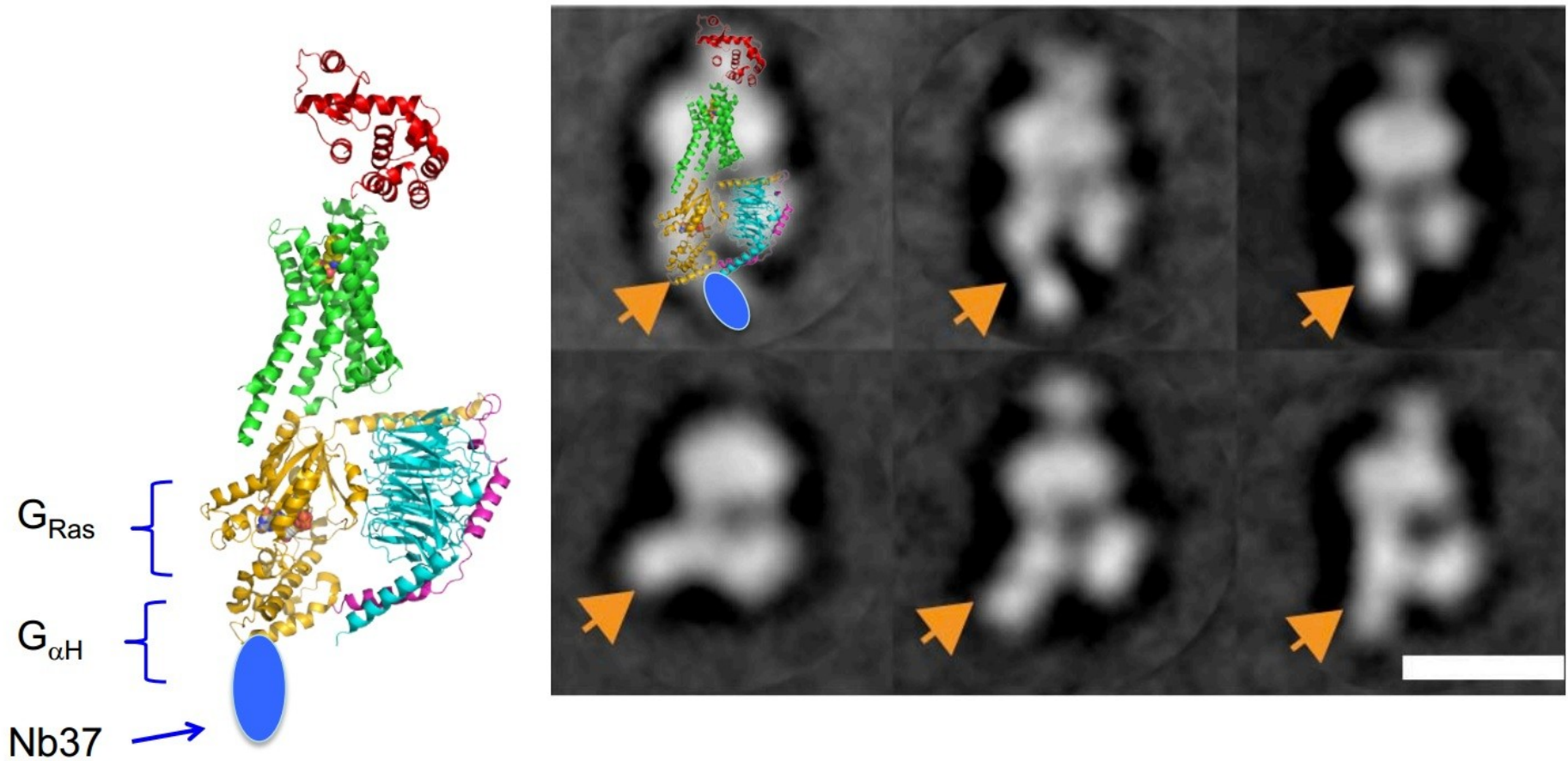


Strukturní charakterizace flexibilního komplexu – problémy/řešení

- High-affinity agonist BI-167107 (1 of ~ 60 screened)
- Removal of GDP – Apyrase
- Detergent: MNG-3 (long-term storage, aids transition into LCP)
- New mesophase lipid (7.7 MAG) to accommodate G protein (provided by Martin Caffrey)
- Nanobody to stabilize G protein complex (Jan Steyaert)
- Amino Terminal T4 Lysozyme
- Project guided by data from negative stain single particle EM (Georgios Skiniotis)

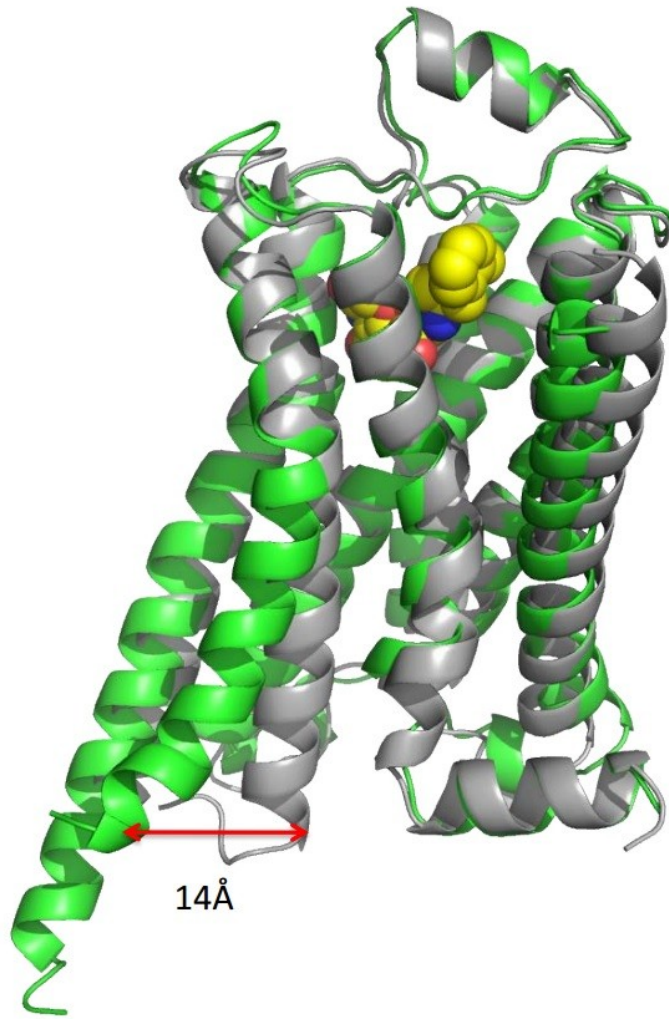


Strukturní charakterizace flexibilního komplexu – kryoEM

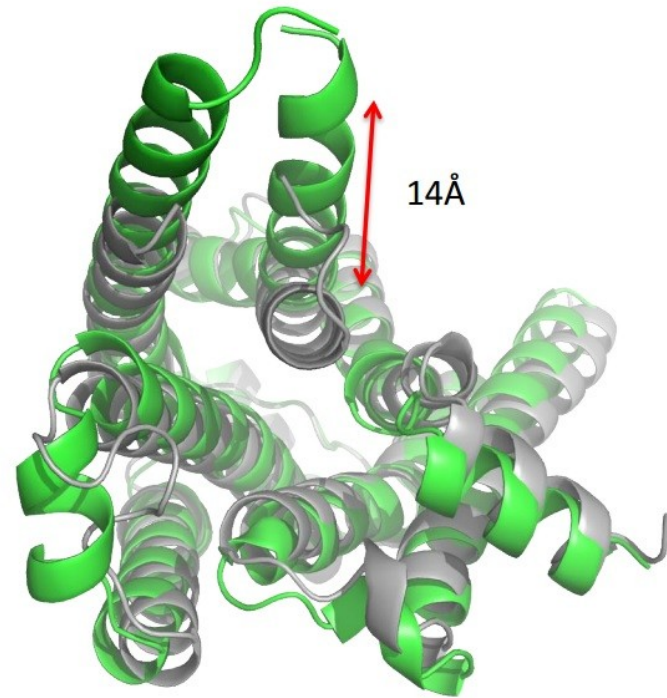


Strukturní charakterizace flexibilního komplexu – RTG /atom. rozlišení

Active state of β_2 AR



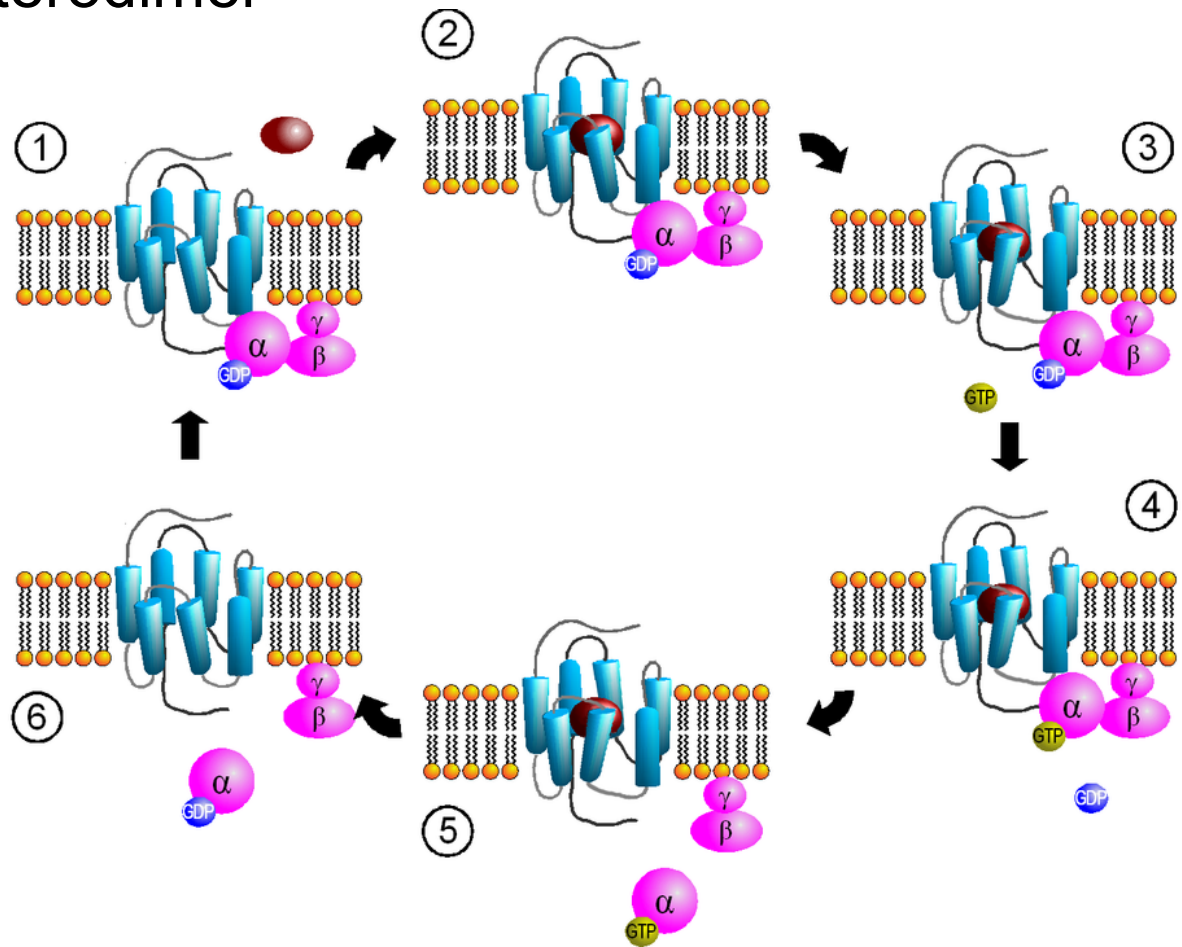
Cytoplasmic View



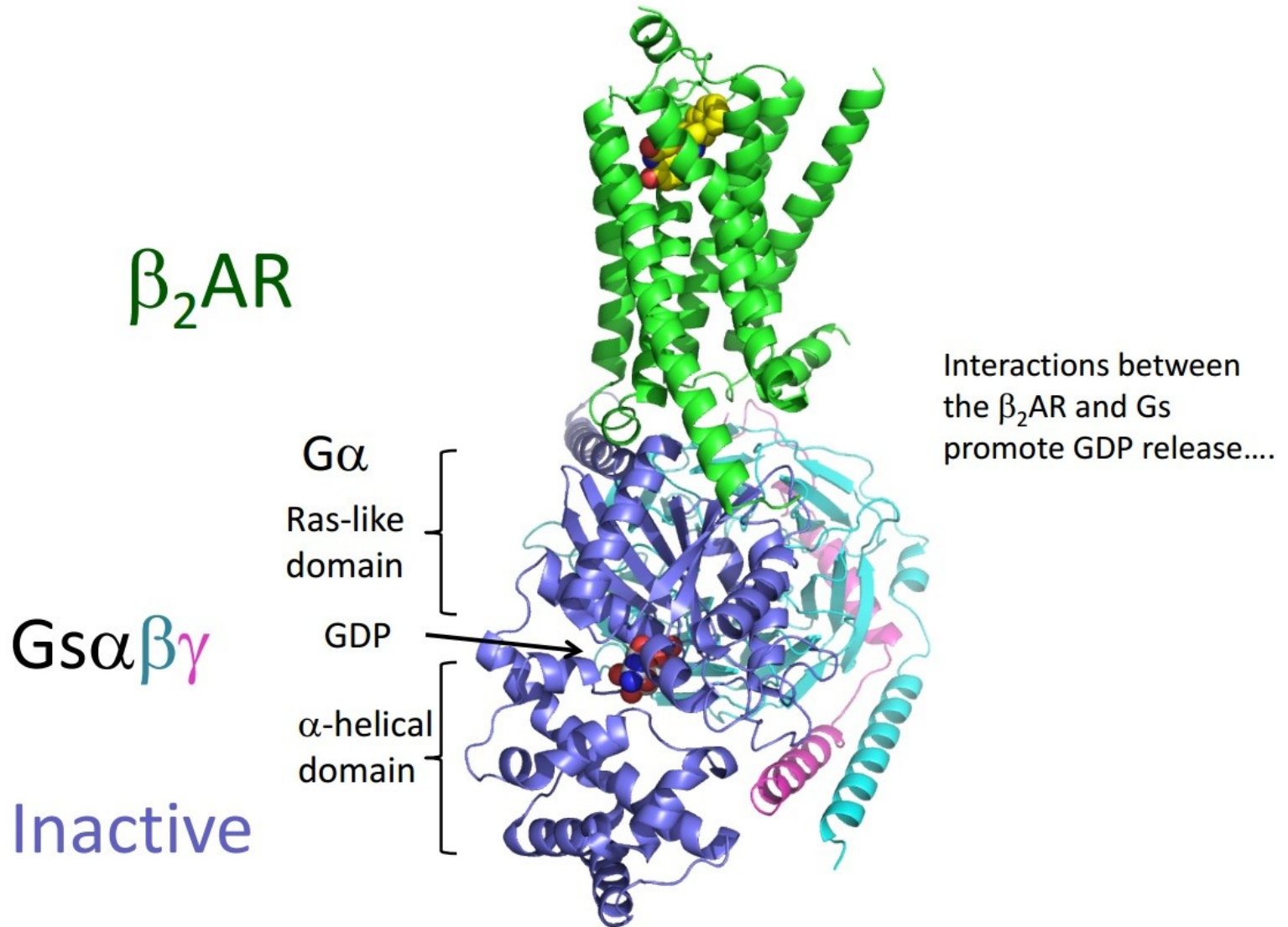
β_2 AR - Inactive
 β_2 AR-Gs

G-proteiny

- GTP fosfohydrolázy
- Heterotrimer/heterodimer
 $\alpha\beta\gamma$, $\beta\gamma$ komplex



Strukturní charakterizace flexibilního komplexu – RTG /atom. rozlišení

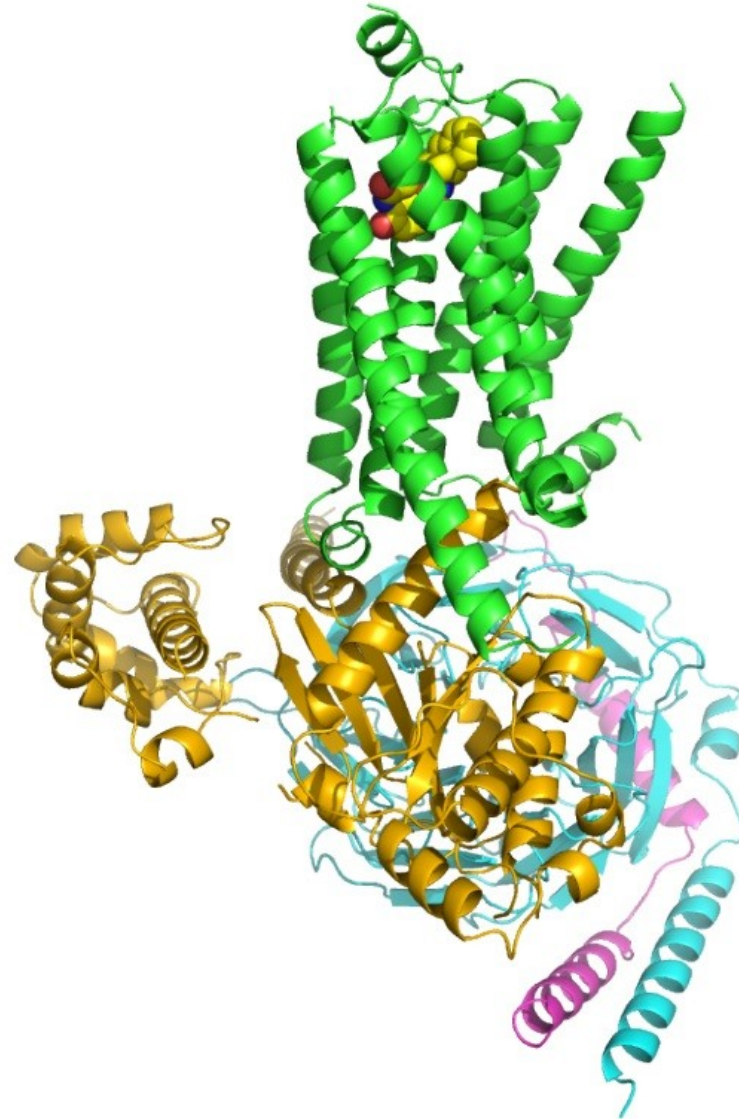


Strukturní charakterizace flexibilního komplexu – RTG /atom. rozlišení

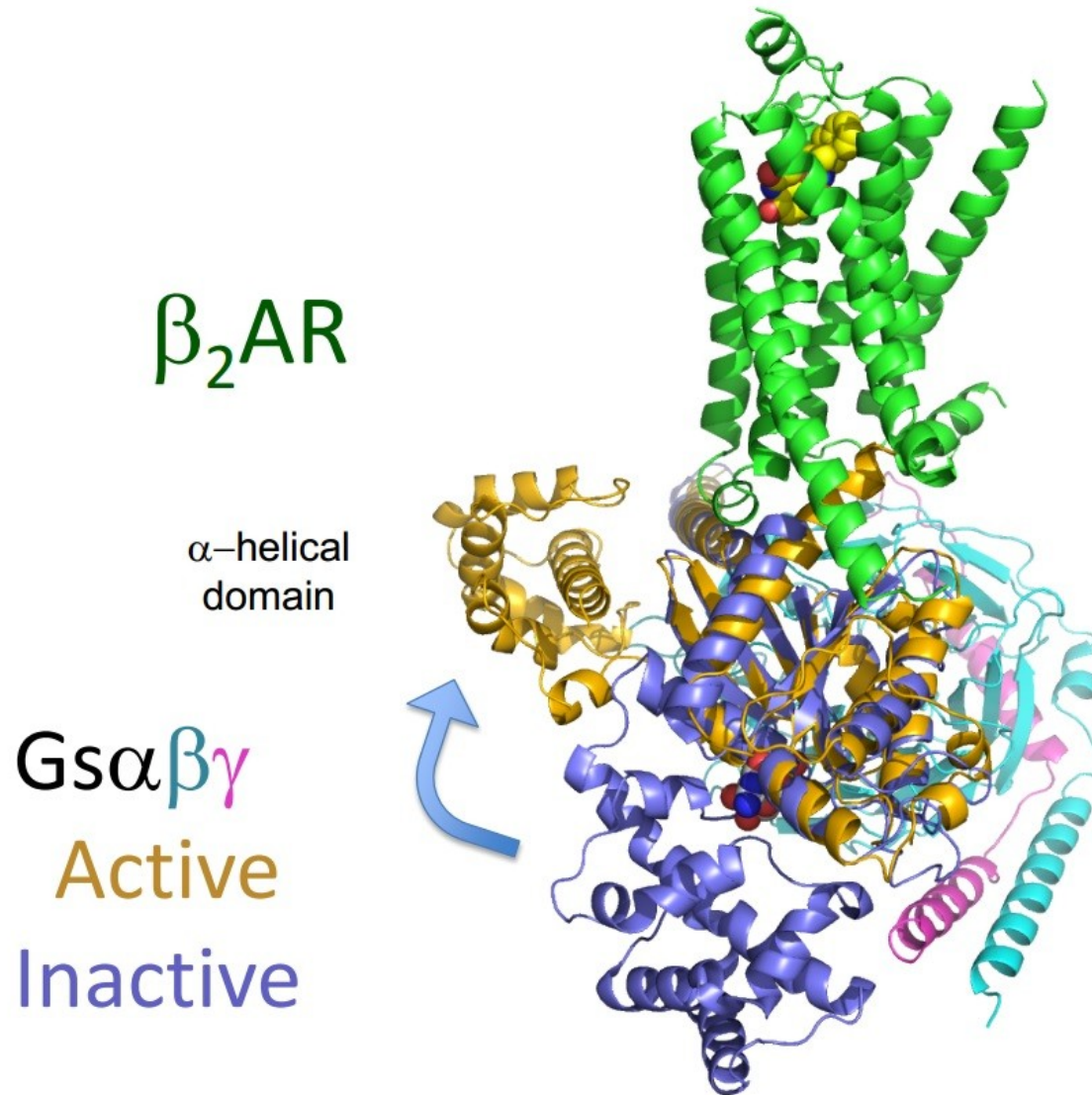
β_2 AR

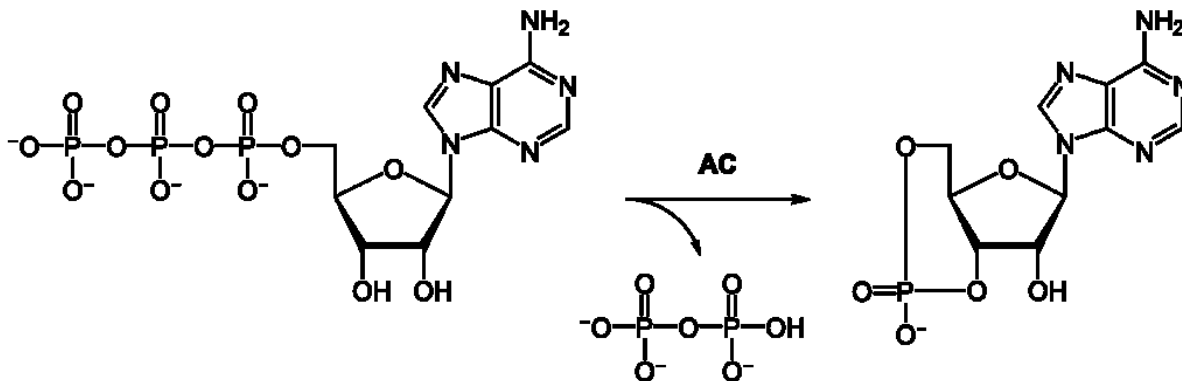
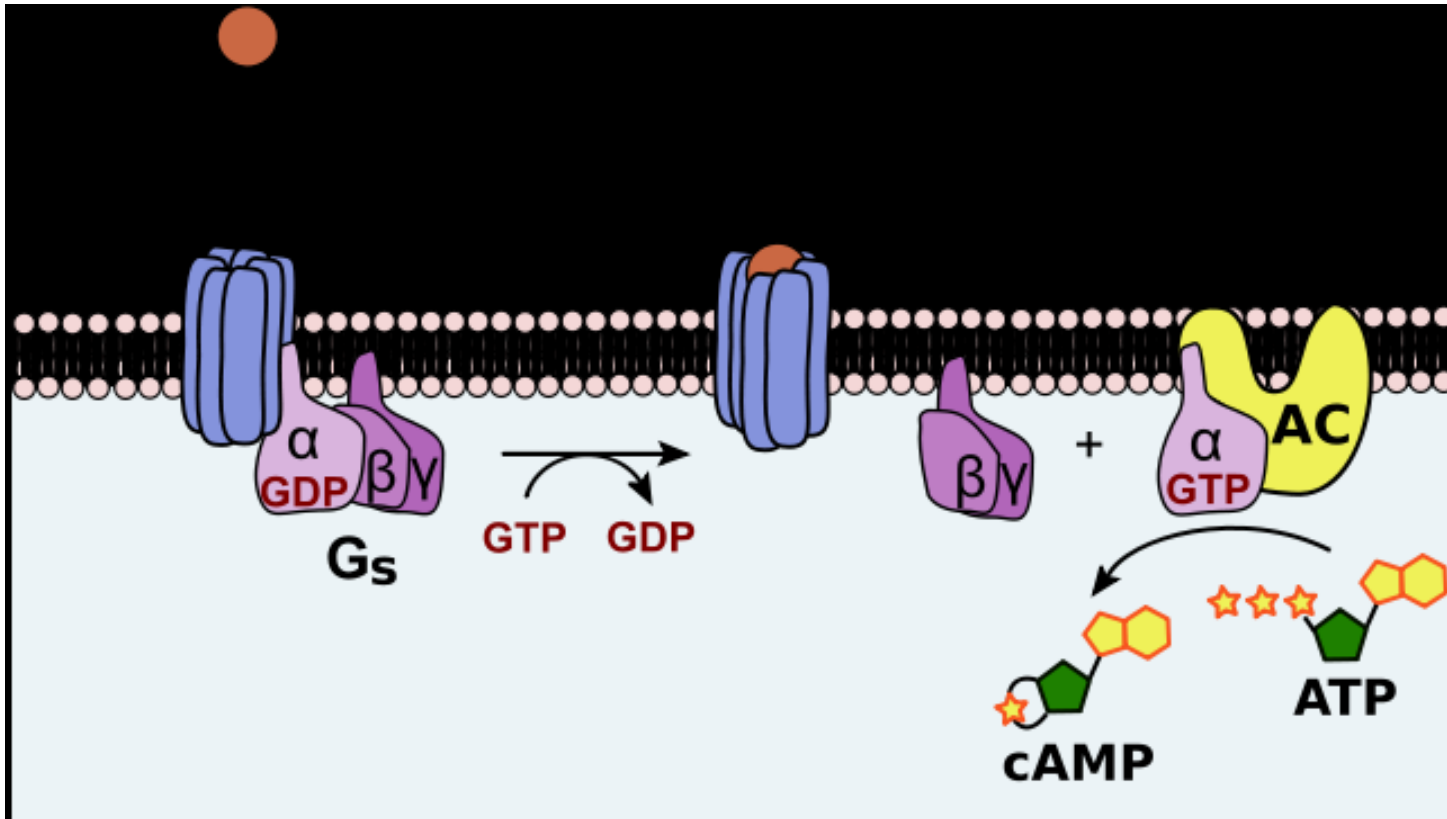
Gs $\alpha\beta\gamma$

Active



Strukturní charakterizace flexibilního komplexu – RTG /atom. rozlišení

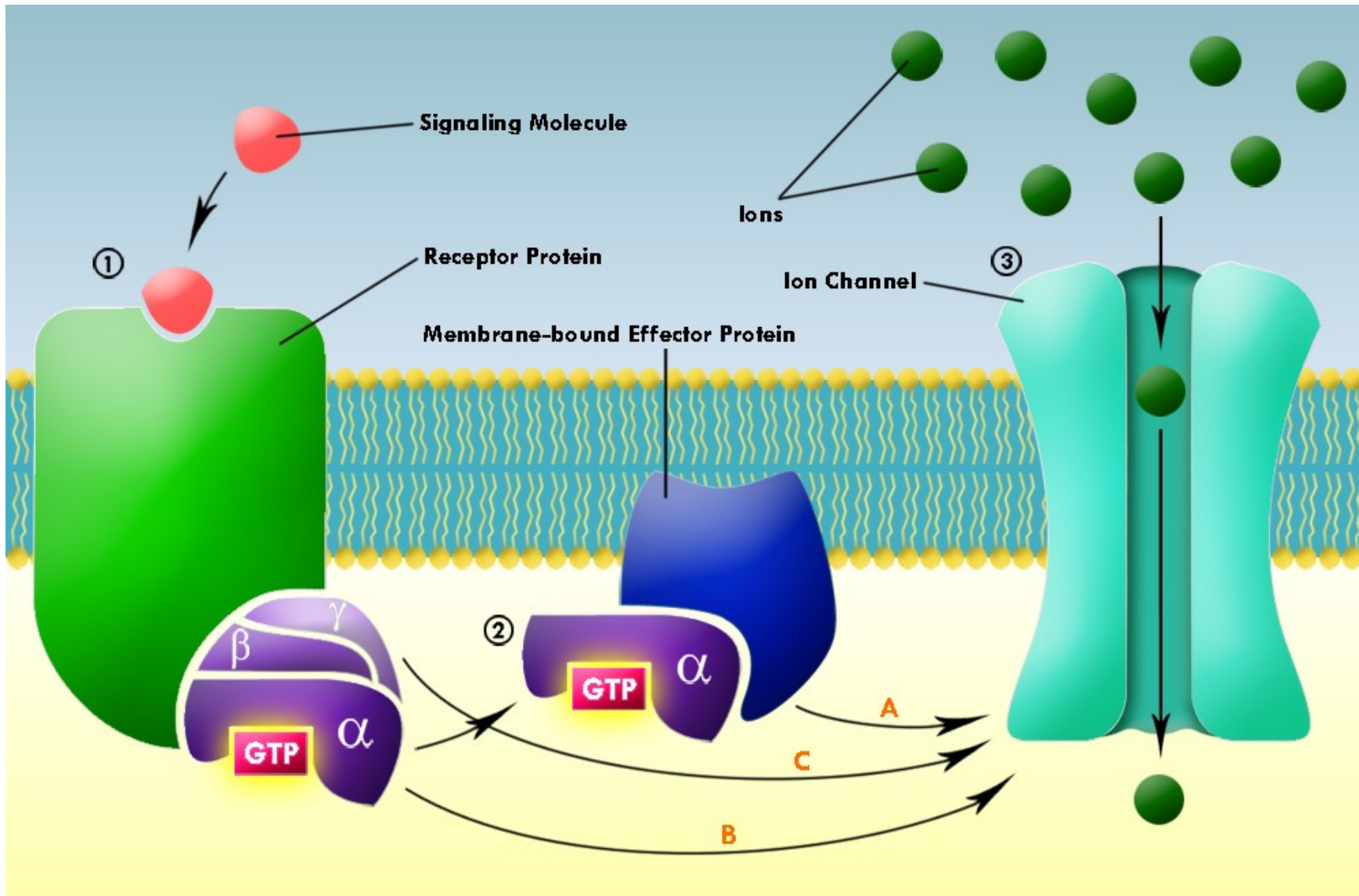




AC –adenyl cykláza
cAMP – cyklický AMP

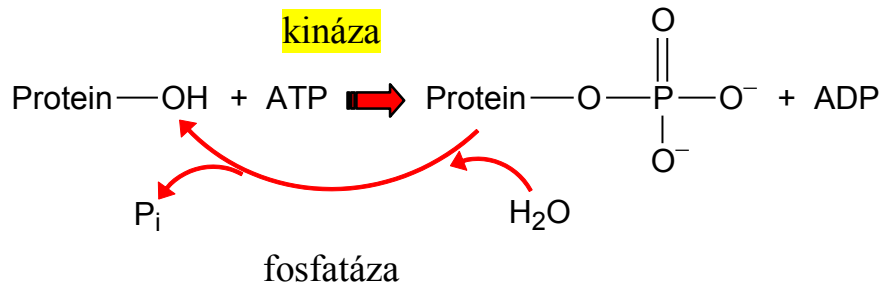
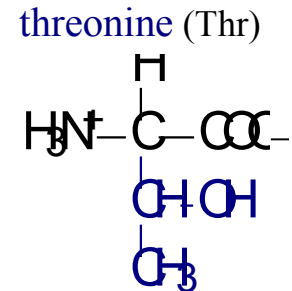
(+vypnutí = PDE,
fosfodiesteráza)

Regulace iontových kanálů

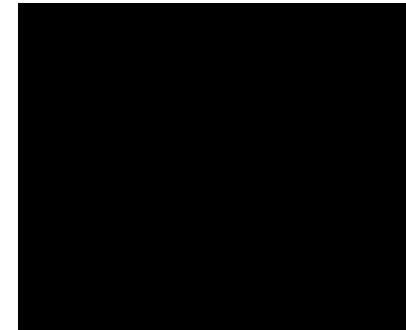


Fosforylace

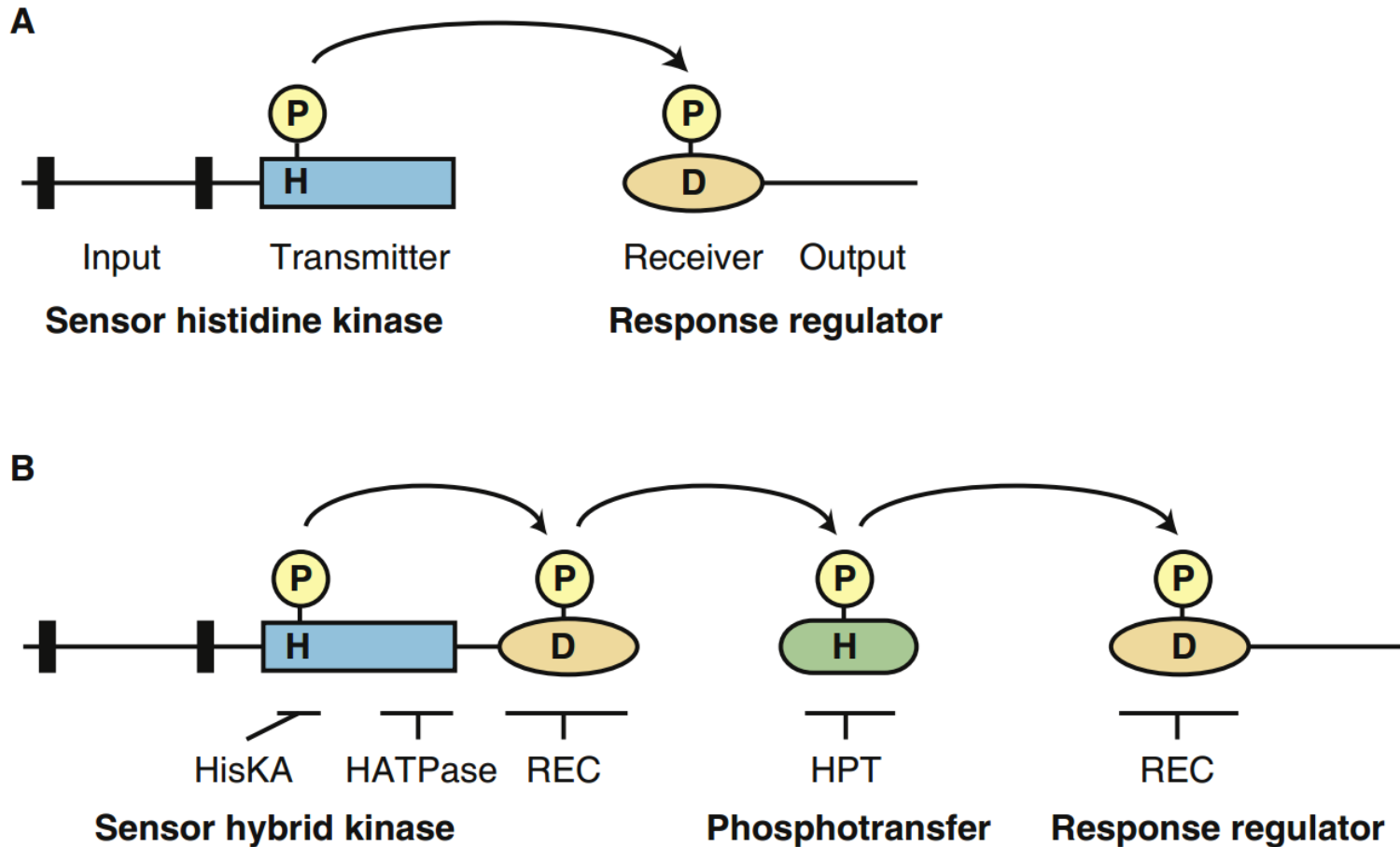
- Posttranslační modifikace proteinové struktury
- 30% proteinů může být modifikováno
- Reverzibilní fosforylace - Edmond Fischer and Edwin Krebs (N.C. – fyziologie - 1994)
- Kovalentní vazba fosfátu na O-H (Ser, Thr, Tyr)
- Kovalentní vazba fosfátu na N-H (His)
- Kinázy/fosfatázy



- Lidský genom ~ 500 kináz

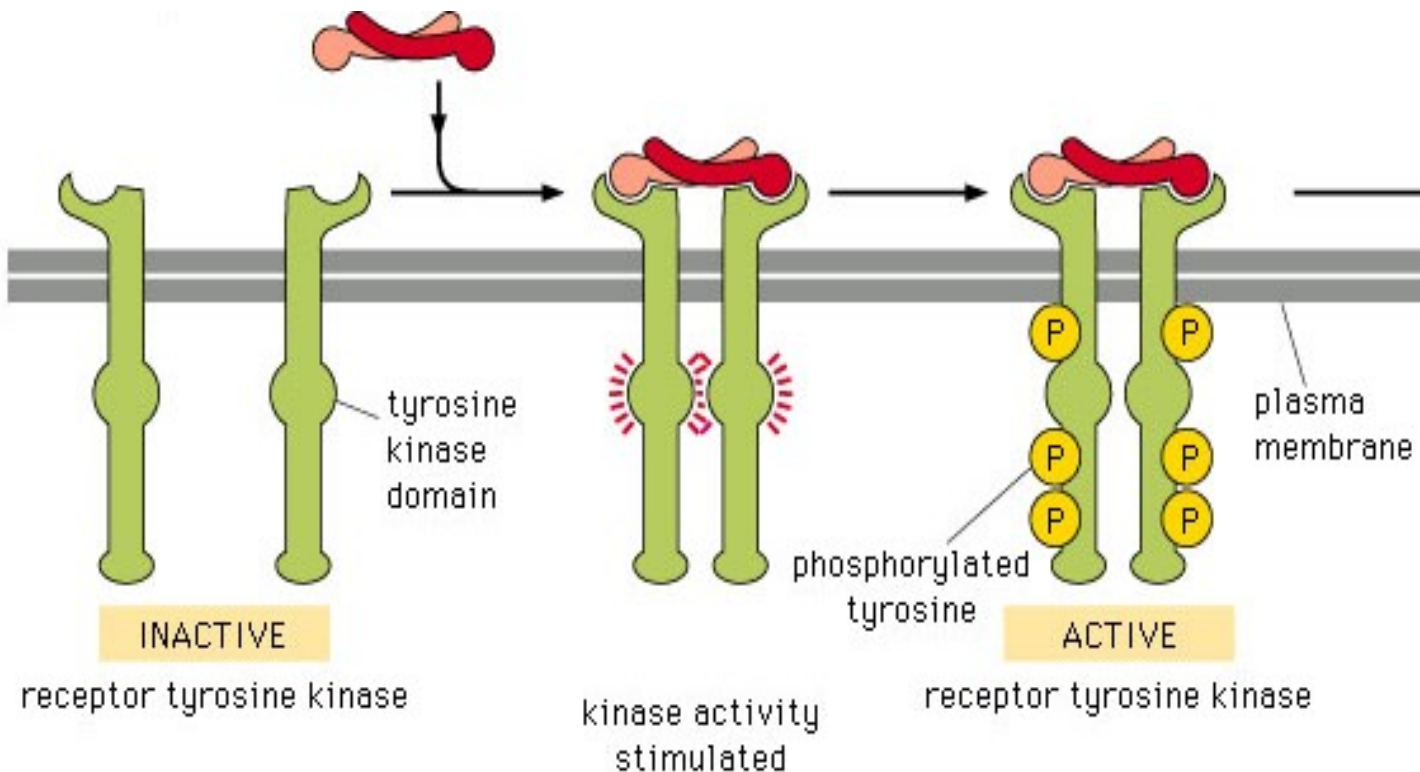


Dvoustupňová fosforylace

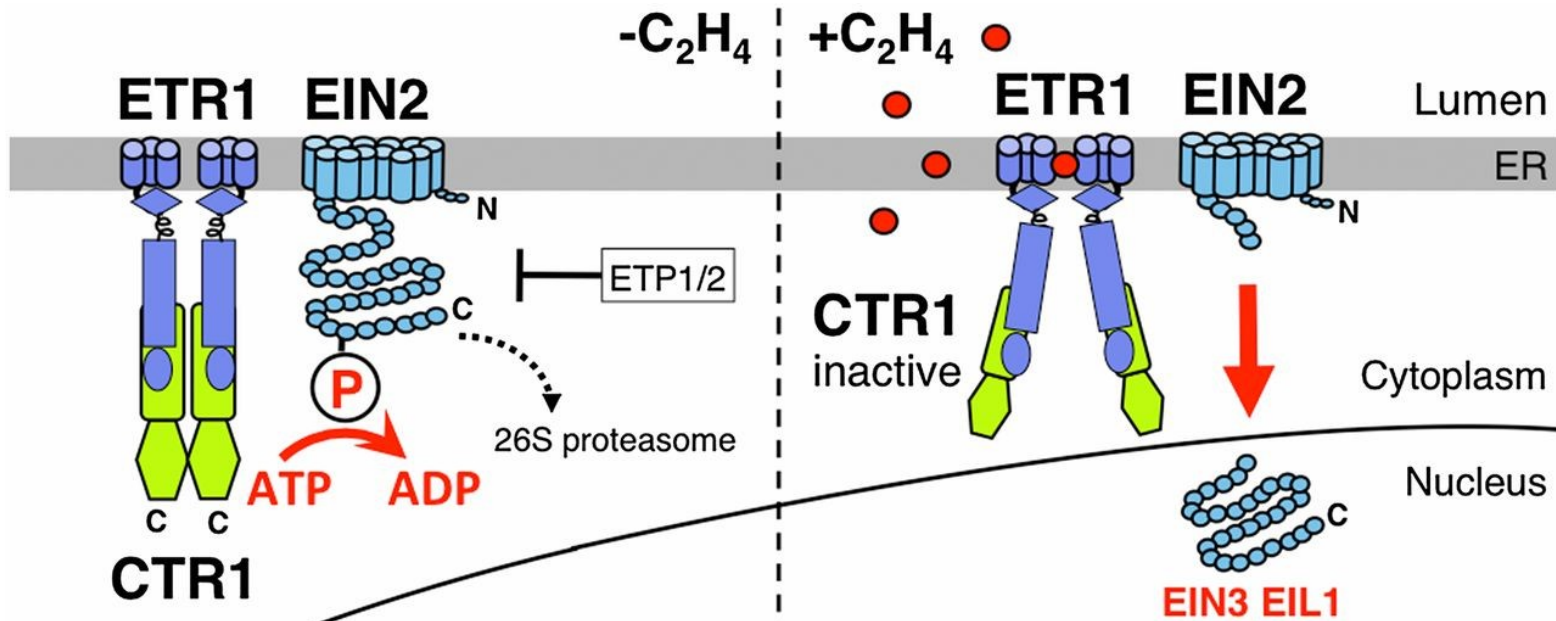


Kinázy

- Modifikace (doménové/dimerické) struktury
- Enzym – změna aktivity katalytické domény
- Vazebné místo pro přenos signálu
- Dimerní struktura



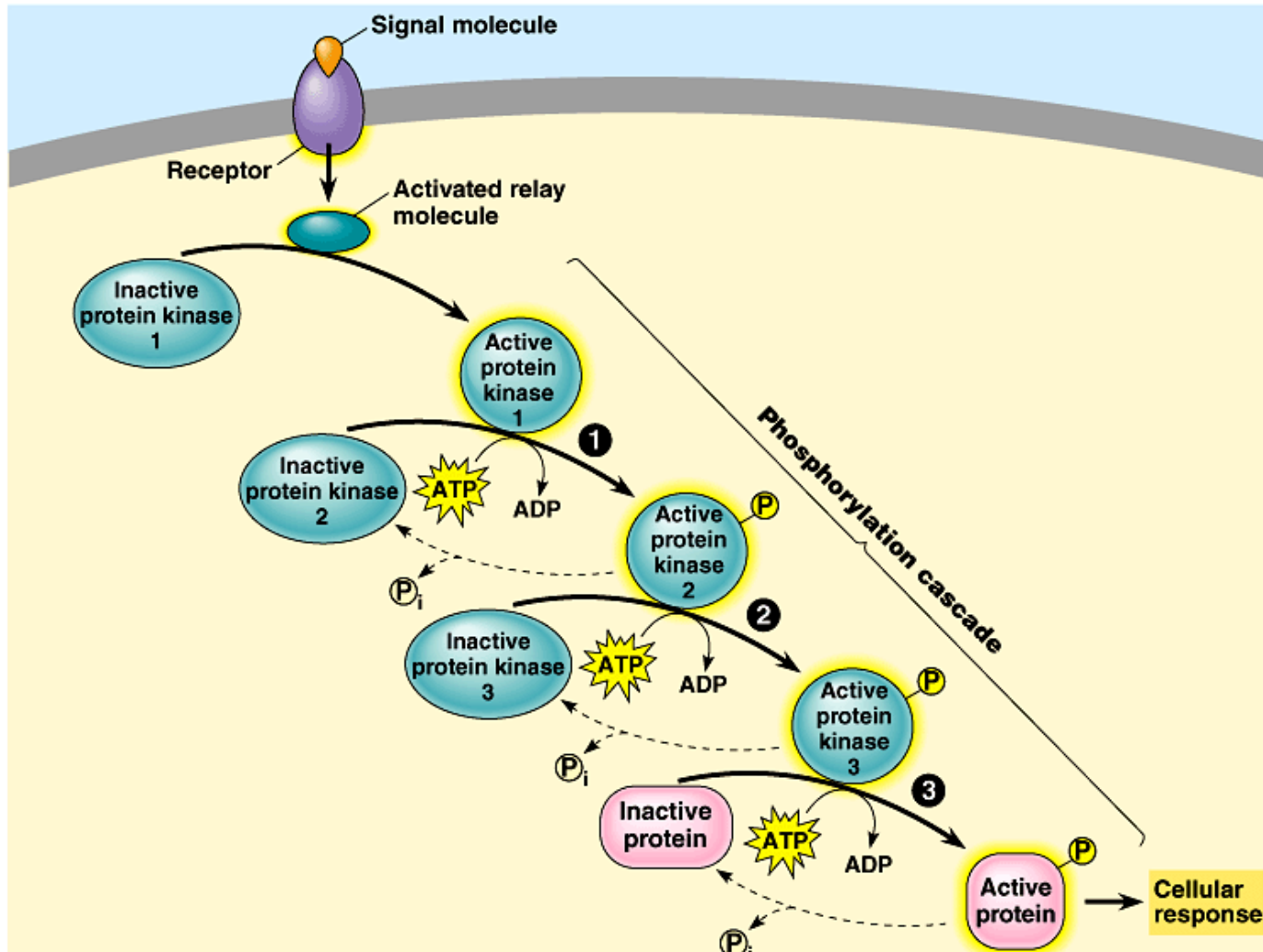
Transmembránové kinázy



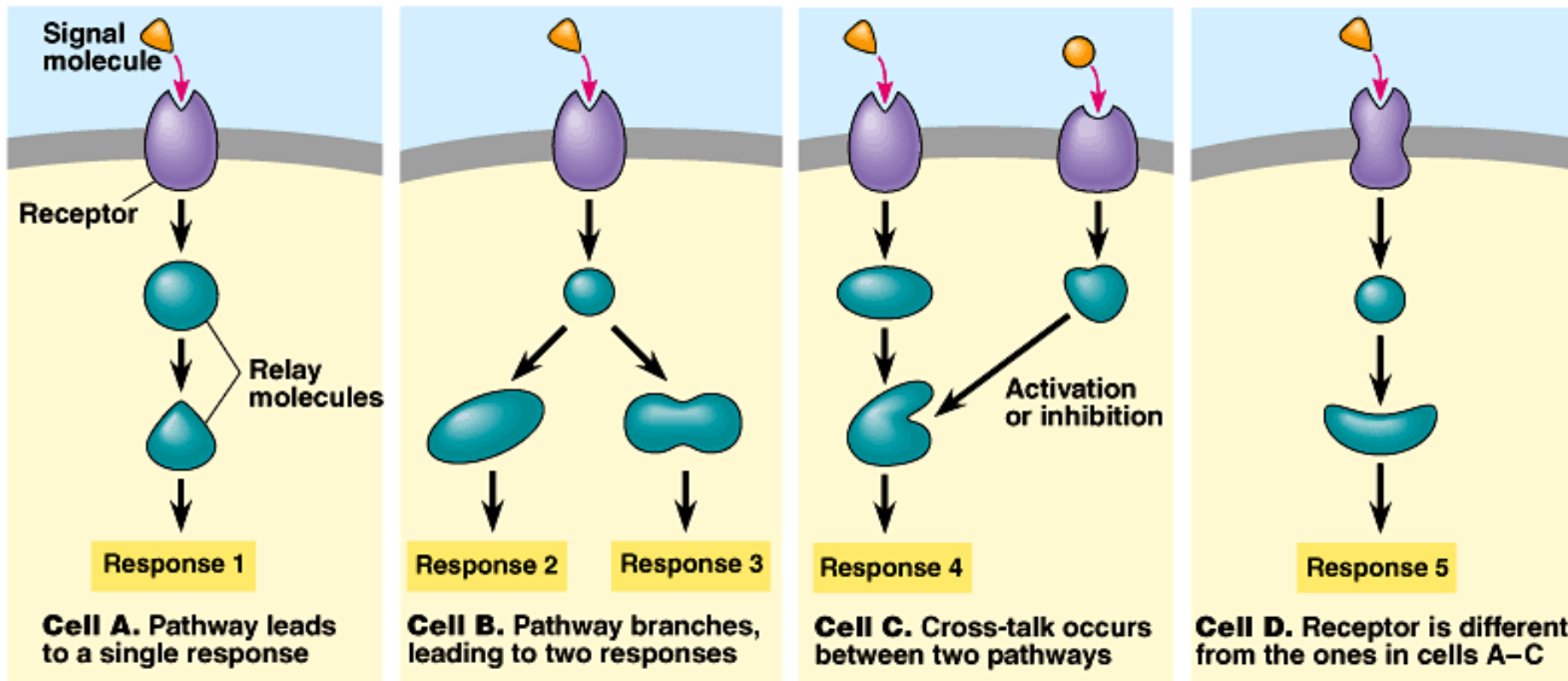
Model – nerealistické poměry velikostí protein:přenašeč,
nerealisticky velké změny struktury (pákový přenos)

Fosforylační kaskády

- modifikace + zesílení signálu
- „Druhý posel“- Earl Wilbur Sutherland (N.C. – fyziologie - 1971)

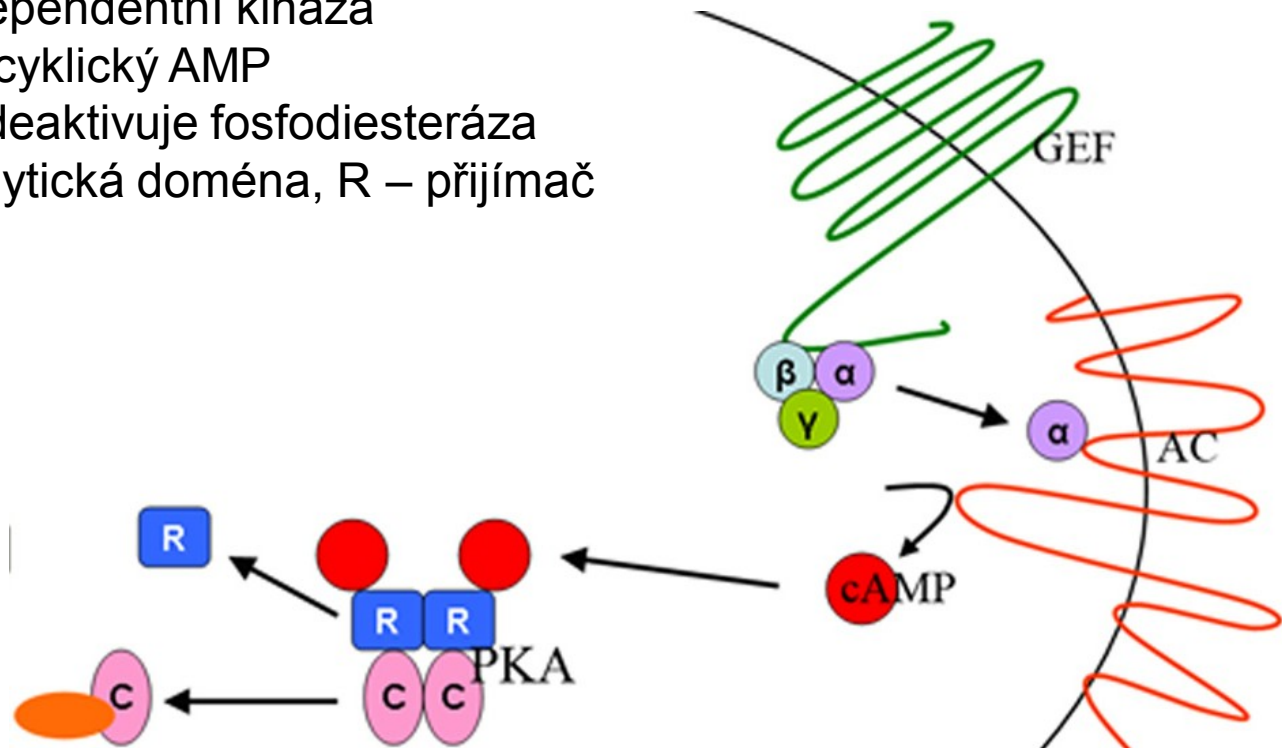


Směšování a ovlivňování signál. drah



2 signály: kinázy a G-proteiny

- „Druhý posel“
- cAMP-dependentní kináza
- cAMP – cyklický AMP
- cAMP - deaktivuje fosfodiesteráza
- C – katalytická doména, R – přijímač



Přenos signálu a centrální dogma

