



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

obecně

chromatin

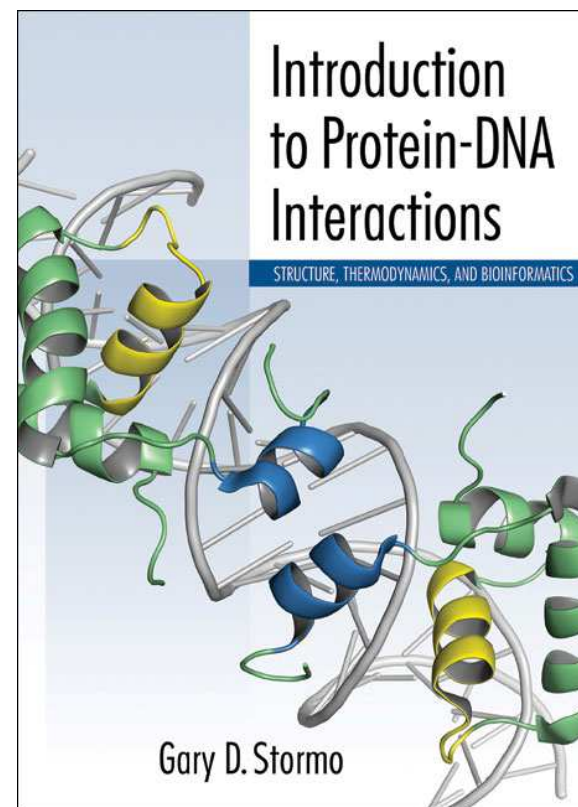
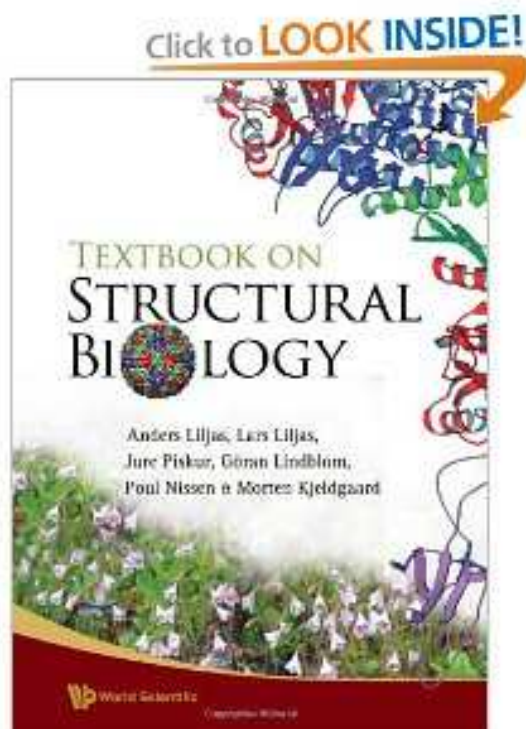
závěrečná

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

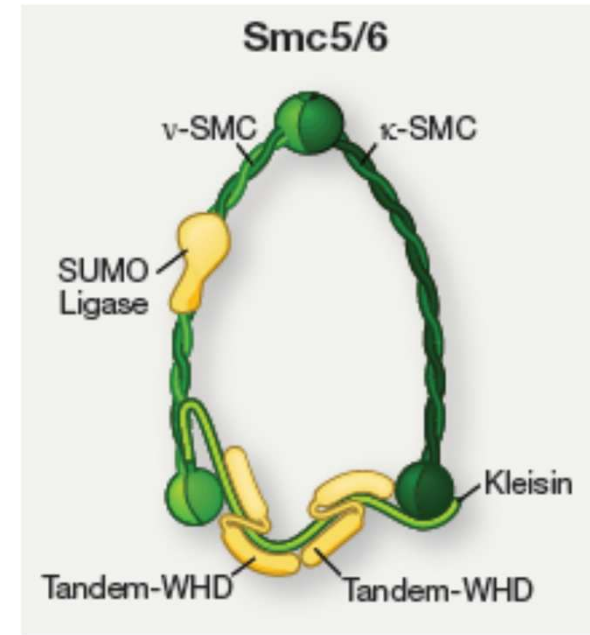
08.03.2018	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, metody, skládání komplexů	
15.03.2017	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Muller	Chaperony	
22.03.2018	11-12.50hod	A2-2.11	Mgr. Adamus	Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom	obecné
29.03.2017	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, vazebné motivy	chromatin
05.04.2017	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy	
12.04.2017	11-12.50hod	A2-2.11	Mgr. Balkoová	replikace DNA	
19.04.2017	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Blažek	Cyclin/CDK komplexy v buněčném cyklu a transkripci	
26.04.2017	11-12.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesár	Oprava DNA, homologní rekombinace	
03.05.2017	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Chromatinové komplexy	
10.05.2017	11-12.50hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce proteinových komplexů	obecné
17.05.2017	9-12hod	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

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 ...

Primárním zdrojem strukturních informací = PDB

voda, ATP ATP pumpa mikrotubuly chromatin

Molecular Machinery: A Tour of the Protein Data Bank

Scale (nm): 1 5 10 1nm (nanometer) = 10⁻⁹ millimeters

ATP Synthase

PDB ID: 1e79, 1e17, 1l2p, 2a7u

Four 3D structures show different parts of this large protein complex.

Learn more from the *Molecule of the Month* article [ATP Synthase](#)

3D Structure for 1e79

Spin
Spin y-axis
Spin x-axis
Spin off

Style
Cartoon
Spheres
Trace
Ball and Stick

Color
Rainbow
Chain
Secondary Structure

Zoom
Zoom In
Zoom Out
Zoom Off

Structure Function

- Small molecules
- Digestive Enzymes
- Blood Plasma
- Viruses and Antibodies
- Hormones
- Channels, Pumps and Receptors
- Photosynthesis
- Energy Production
- Storage
- Enzymes
- Infrastructure
- Protein Synthesis
- DNA

About
Auto Mode: Off

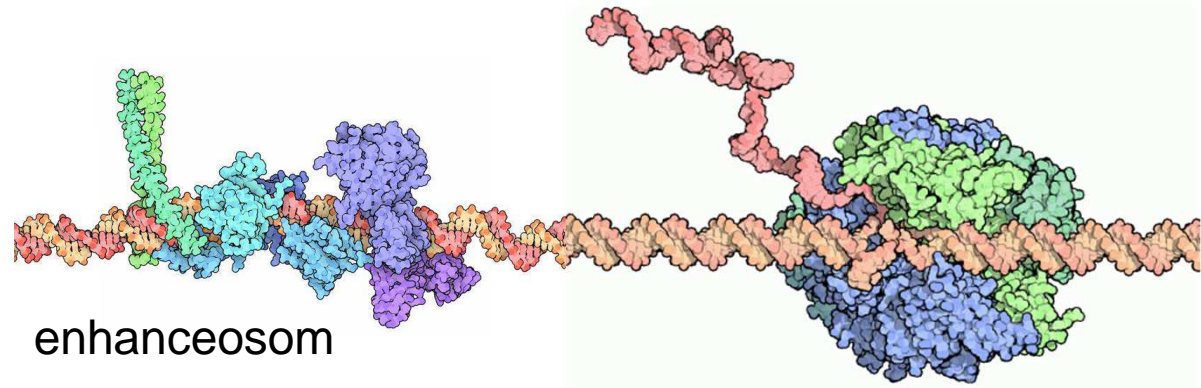
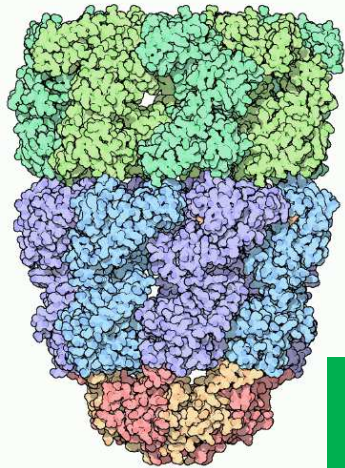
Extracellular Membrane Intracellular/Cytosol Intracellular/Nucleus Cellular Location

RCSB PDB PROTEIN DATA BANK
PDB-101

Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

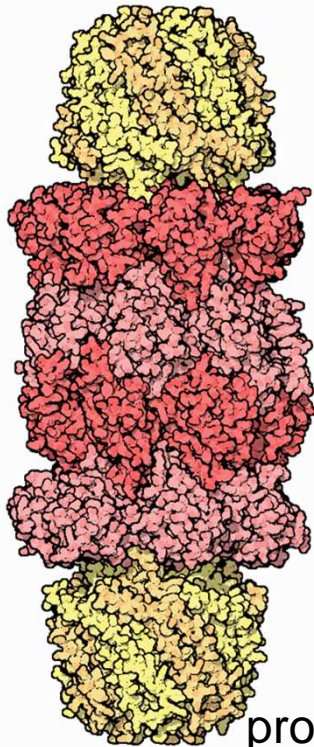
chaperon



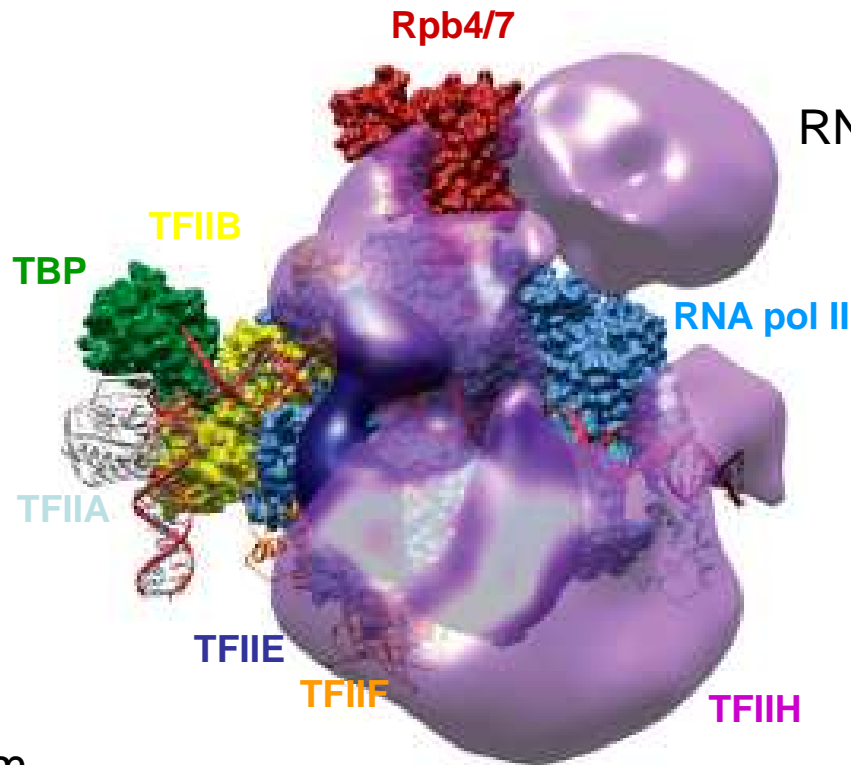
enhanceosom

RNA polymeráza

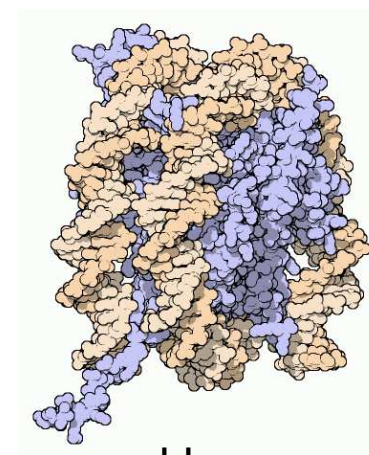
obecně



proteasom



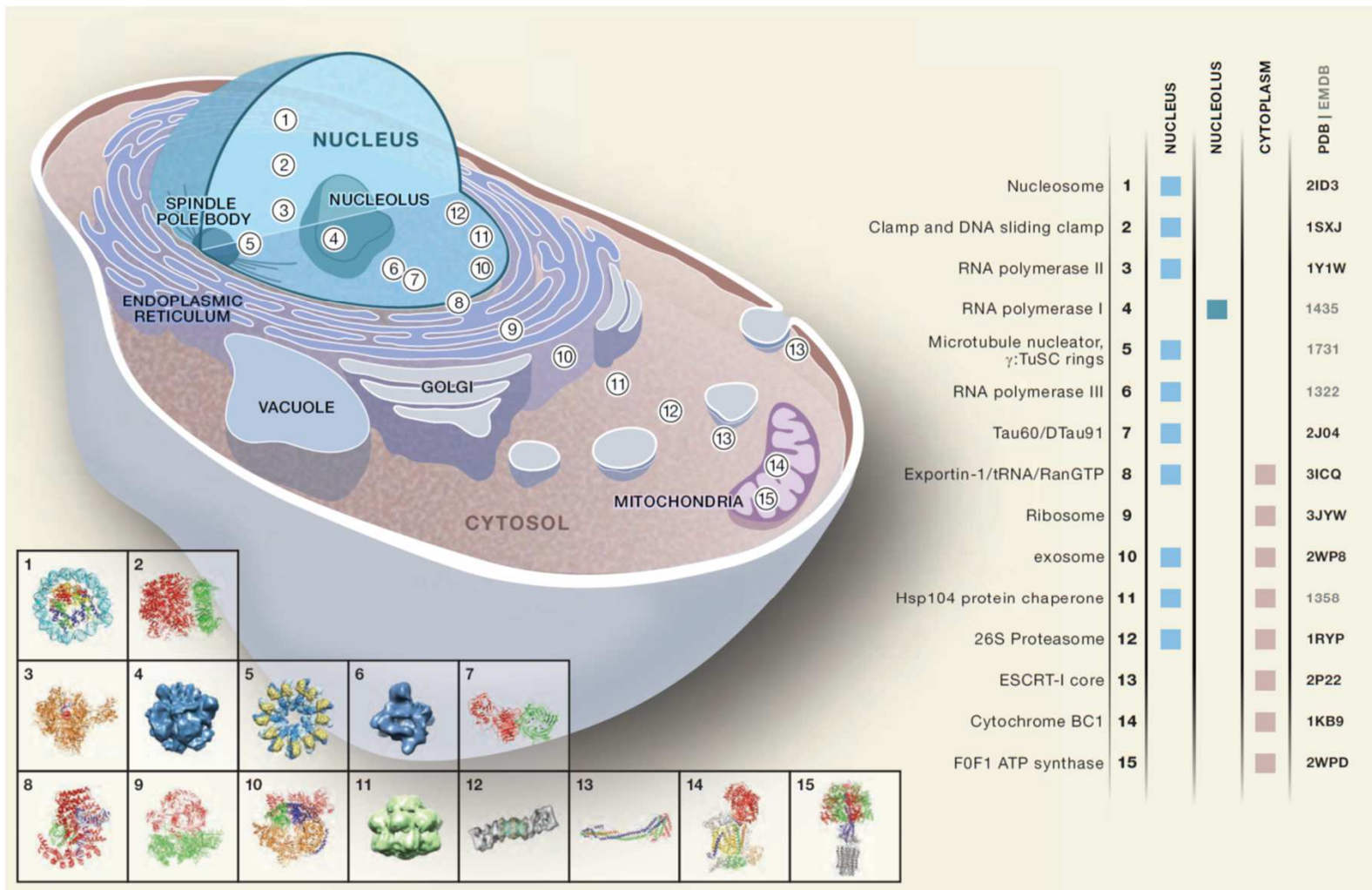
RNA polymeráza + TFII...



nukleosom

chromatin

Molekula měsíce (PDB 101)

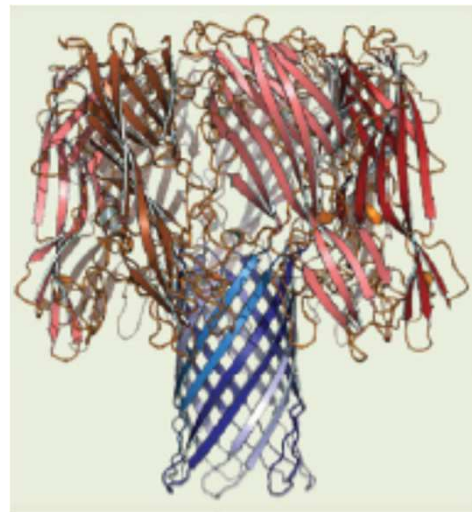


~800 komplexů v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*

Bertero et al, Cell, 2010

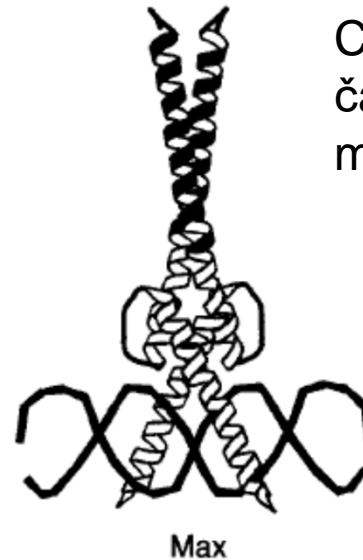
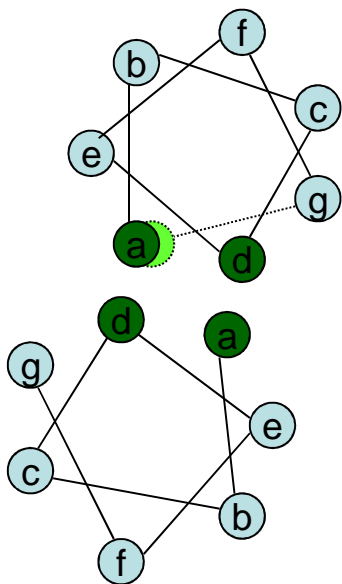
Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím protein-proteinových interakcí

- Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> kvarterní tj. komplexy (stejně typy **nekovalentních** vazeb, kritérium minimální energie) (šroubovice a listy se k sobě skládají podobným způsobem)
- iontové, vodíkové, **hydrofobní síly** (kovalentní vazby - disulfidické můstky především u extracelulárních proteinů)
- **vodíkové můstky** především u β -listů

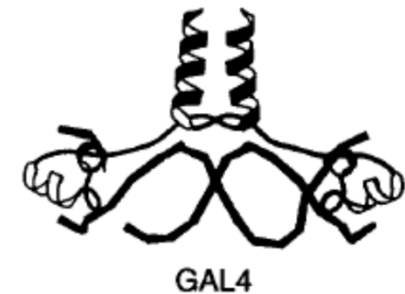


Komplexy se utvářejí (převážně) prostřednictvím hydrofobních protein-proteinových interakcí

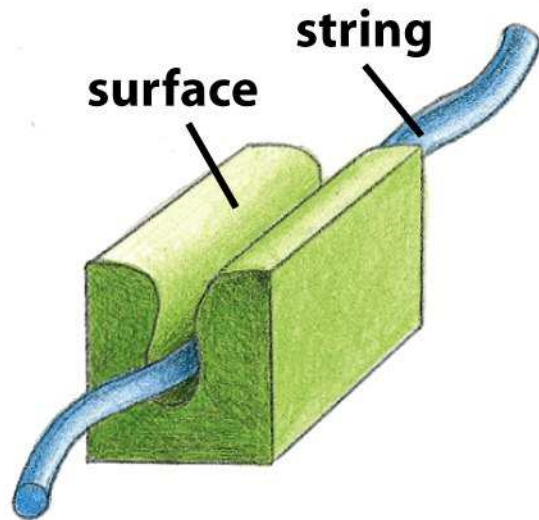
- **hydrofobní zbytky** jsou tlačeny dovnitř proteinu (nikoli do solventu) nebo do interakce (nejčastější způsob vazby)
 - součet hydrofobních sil je značný (převažuje u většiny interakcí)
 - hydrofobní povrchy se podílí na vytváření coiled-coil vláken



Coiled-coil doména je častým **dimerizačním** modulem proteinů

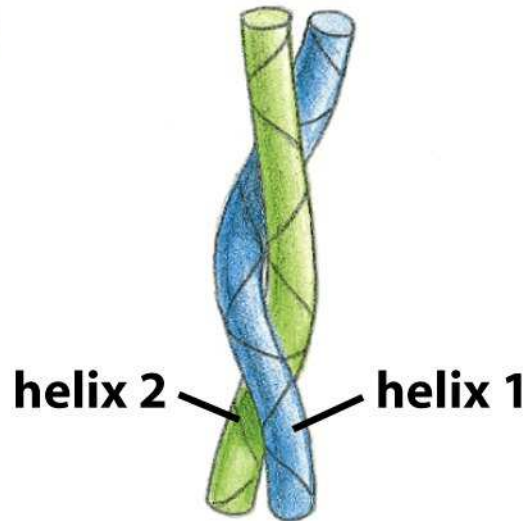


Typy protein-proteinových interakcí

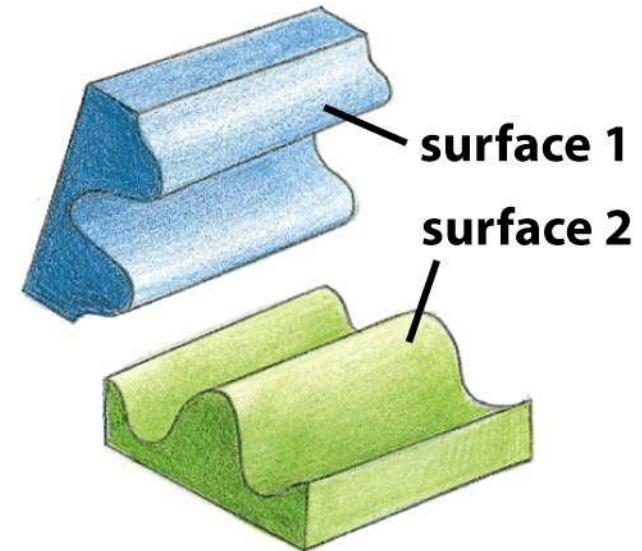


(A) SURFACE-STRING

doména-motif



(B) HELIX-HELIX



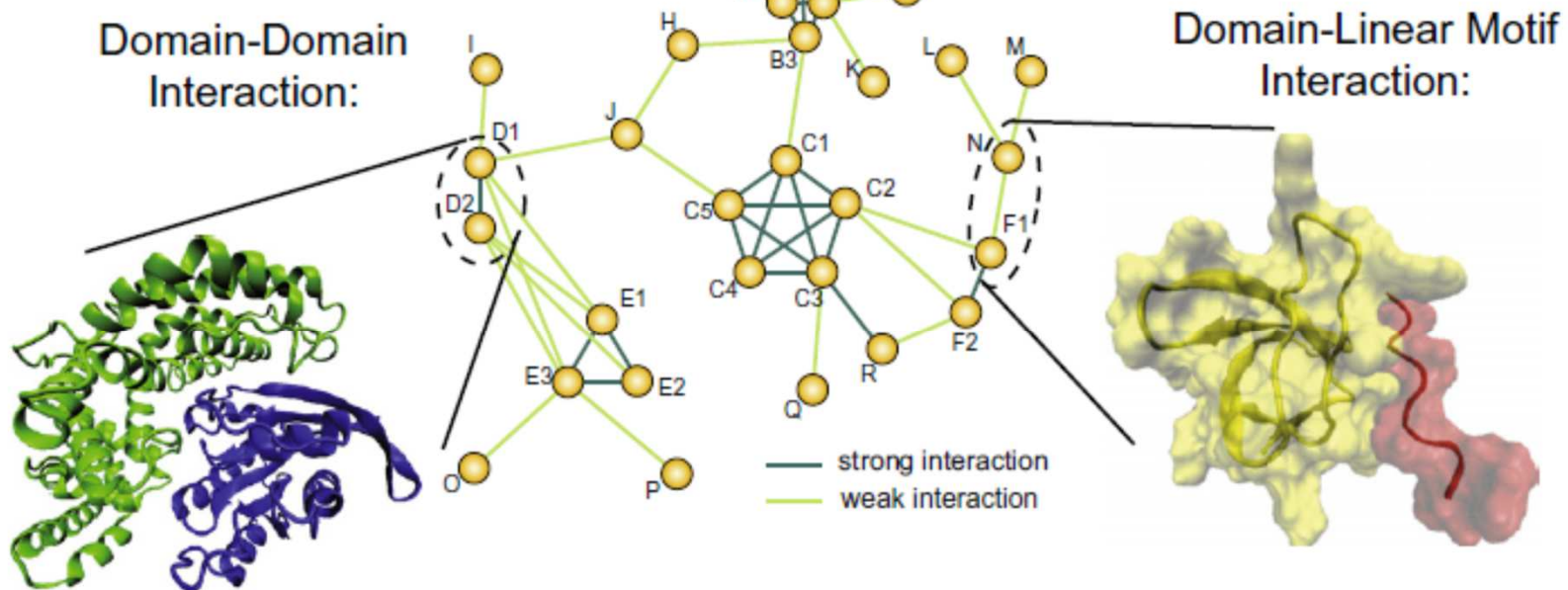
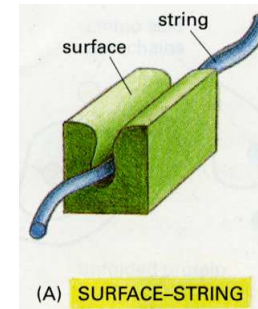
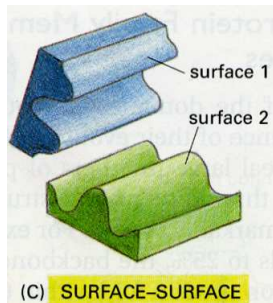
(C) SURFACE-SURFACE

doména-doména

- Ostatní domény/moduly lze definovat pouze obecně: proteiny musí mít **komplementární tvar i charakter**

- Variabilita je velká – nelze je jednoduše definovat - obtížná **predikce** (modelovat lze komplexy pro něž existují již vyřešené struktury – KBDock, cvičení **CG031**)

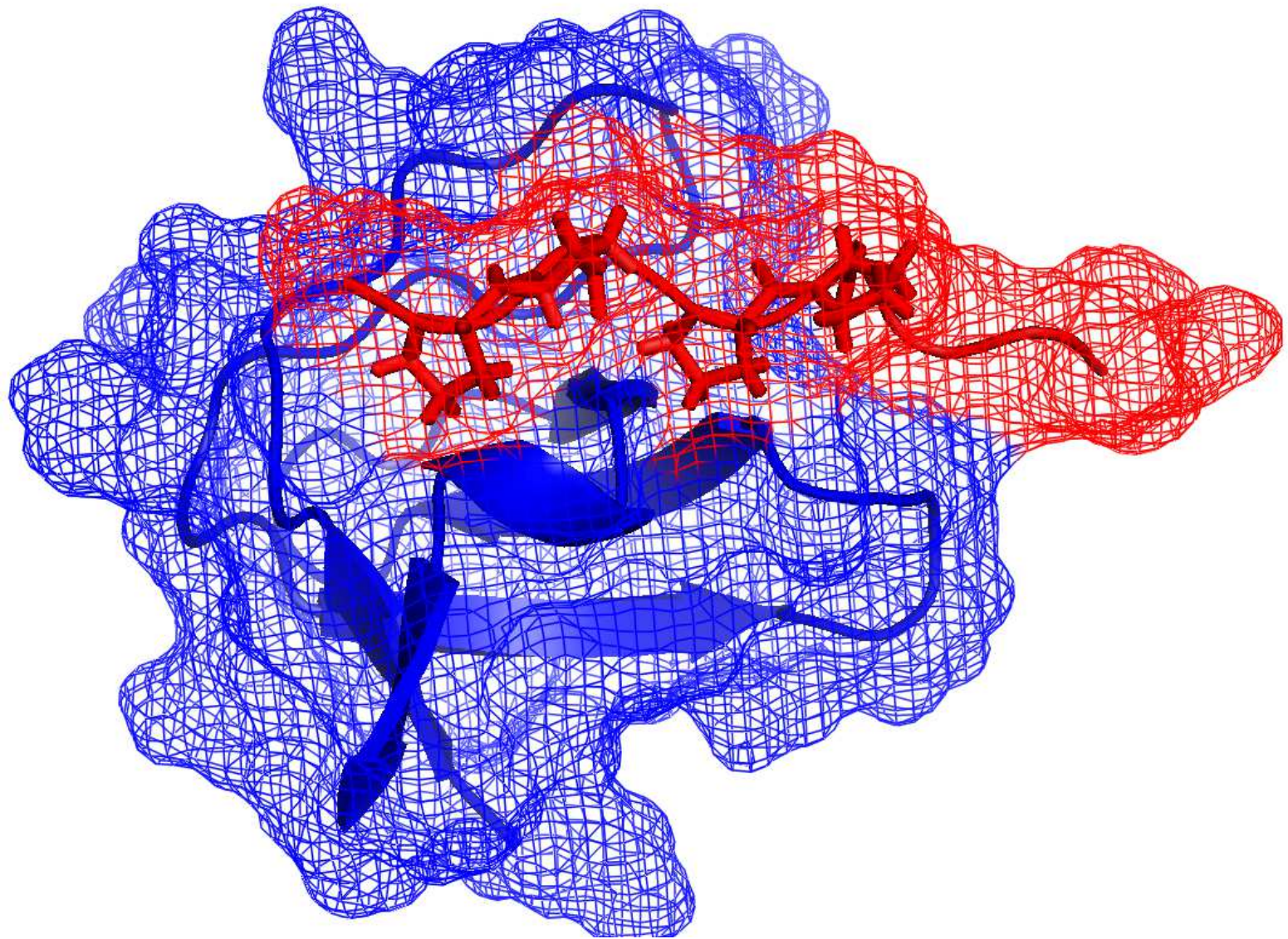
Dva příklady „vyřešených“ komplexů



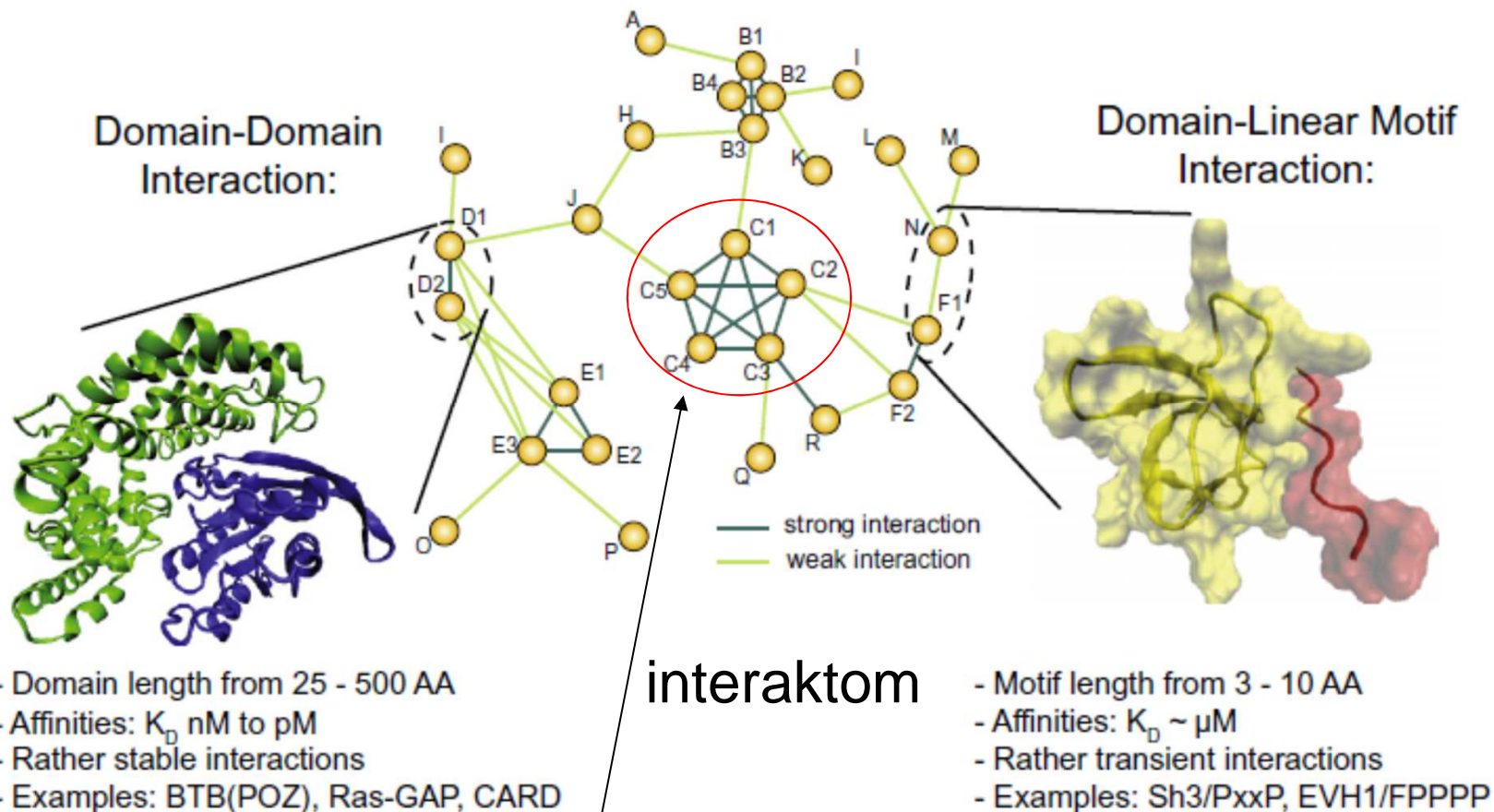
- Domain length from 25 - 500 AA
- Affinities: K_D nM to pM - stabilní/komplexy
- Rather stable interactions
- Examples: BTB(POZ), Ras-GAP, CARD

- Motif length from 3 - 10 AA $\sim 350\text{Å}^2$
- Affinities: $K_D \sim \mu\text{M}$ - přechodné interakce
- Rather transient interactions
- Examples: Sh3/PxxP, EVH1/FPPPP
- regulace PTM - vazba na fosfo-, acetyl ...

- Interakční plocha/oblast $500-10000\text{Å}^2$ (vs pro ligandy $100-600\text{Å}^2$)



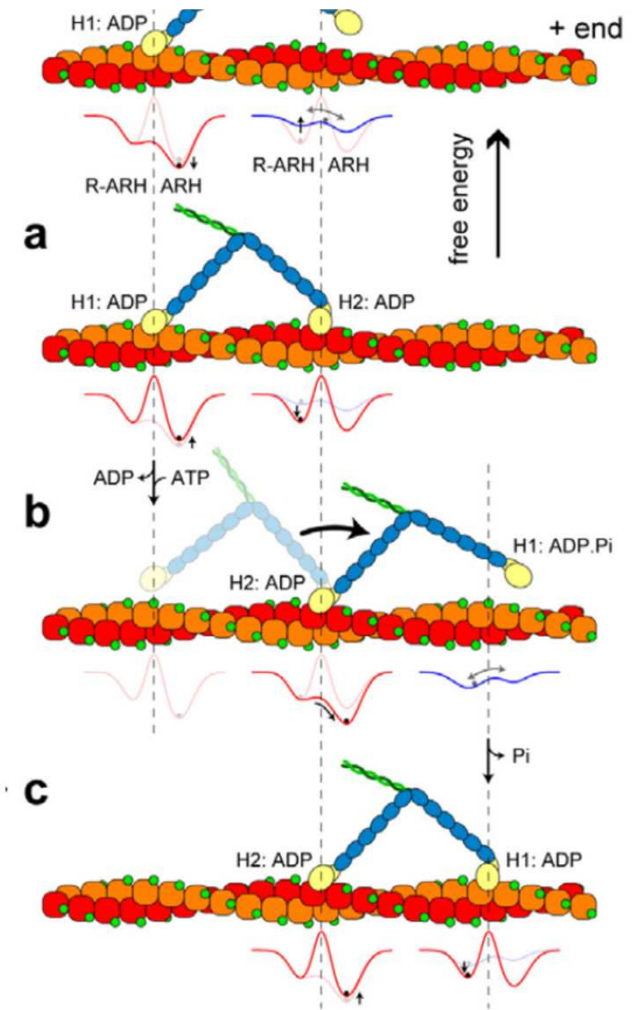
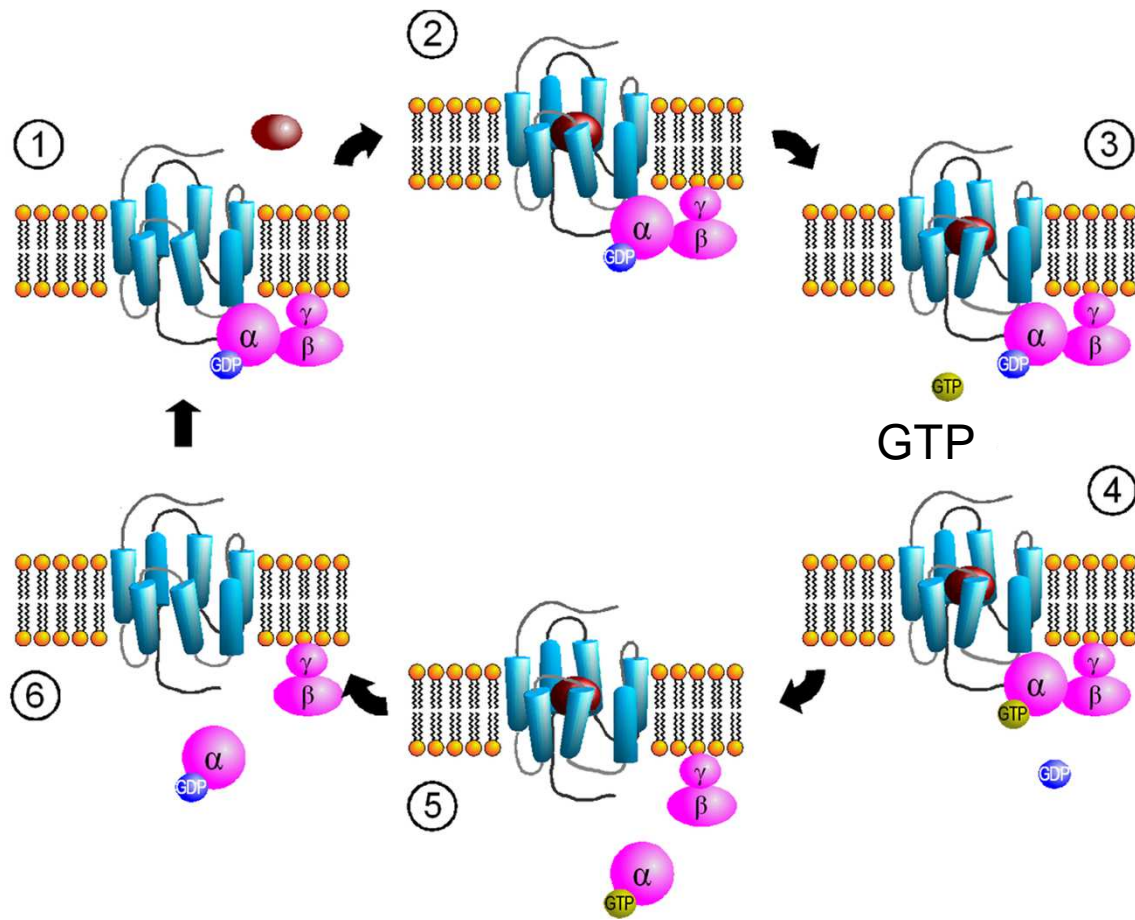
SH3 domény váží **prolin-rich** peptidy PDB: 4RTV



Bader et al, FEBS Lett, 2008

- z analýzy protein-proteinových interakcí lze usuzovat na potenciální **stabilní komplexy** vs **přechodné interakce**
- variabilita interakčních povrchů je velká => variabilita PPI (nelze je jednoduše definovat)

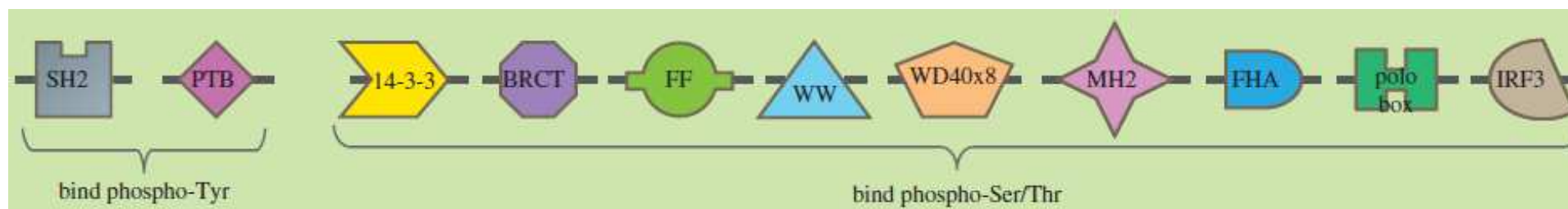
*S jakými partnery a jak silně interagují vaše proteiny?
Jaké domény obsahují?*

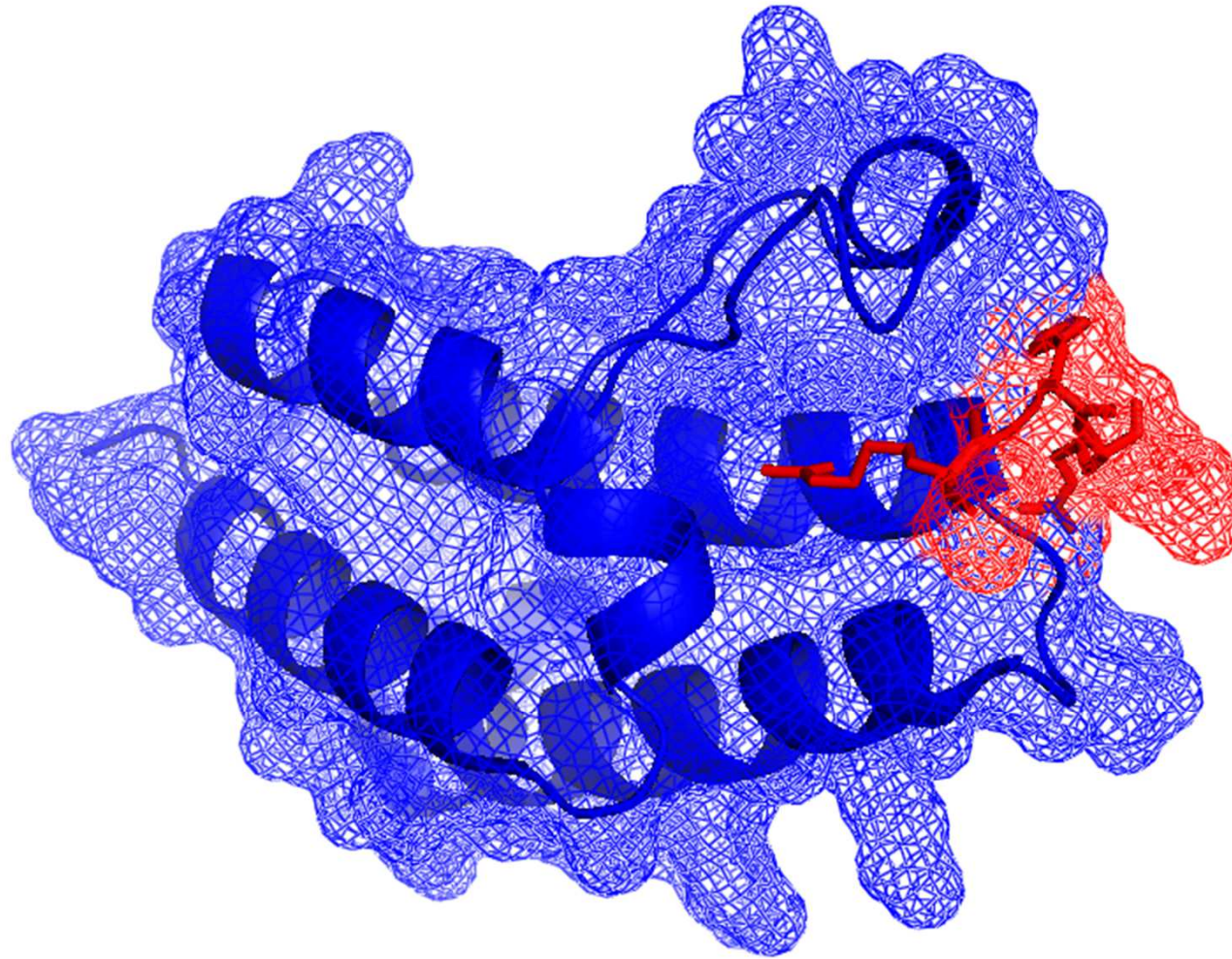


Protein-proteinové interakce moduluji velmi často GTP/GDP, ATP/ADP ... G-proteiny spolu interagují s 1000x vyšší afinitou za přítomnosti GDP než pokud je na $G\alpha$ navázané GTP (viz Ras) – dochází ke konformační změně (doc. Marek) – „přenáší“ signál

Post-translační modifikace značně mění povrch (tvar, náboj) – vytváří specifický nový povrch – mohou interagovat specifické vazebné domény - např. SH2 domény váží fosfopeptidy – dvě vazebná místa (fosfoTyr a peptid – peptid určuje vazebnou specifitu)

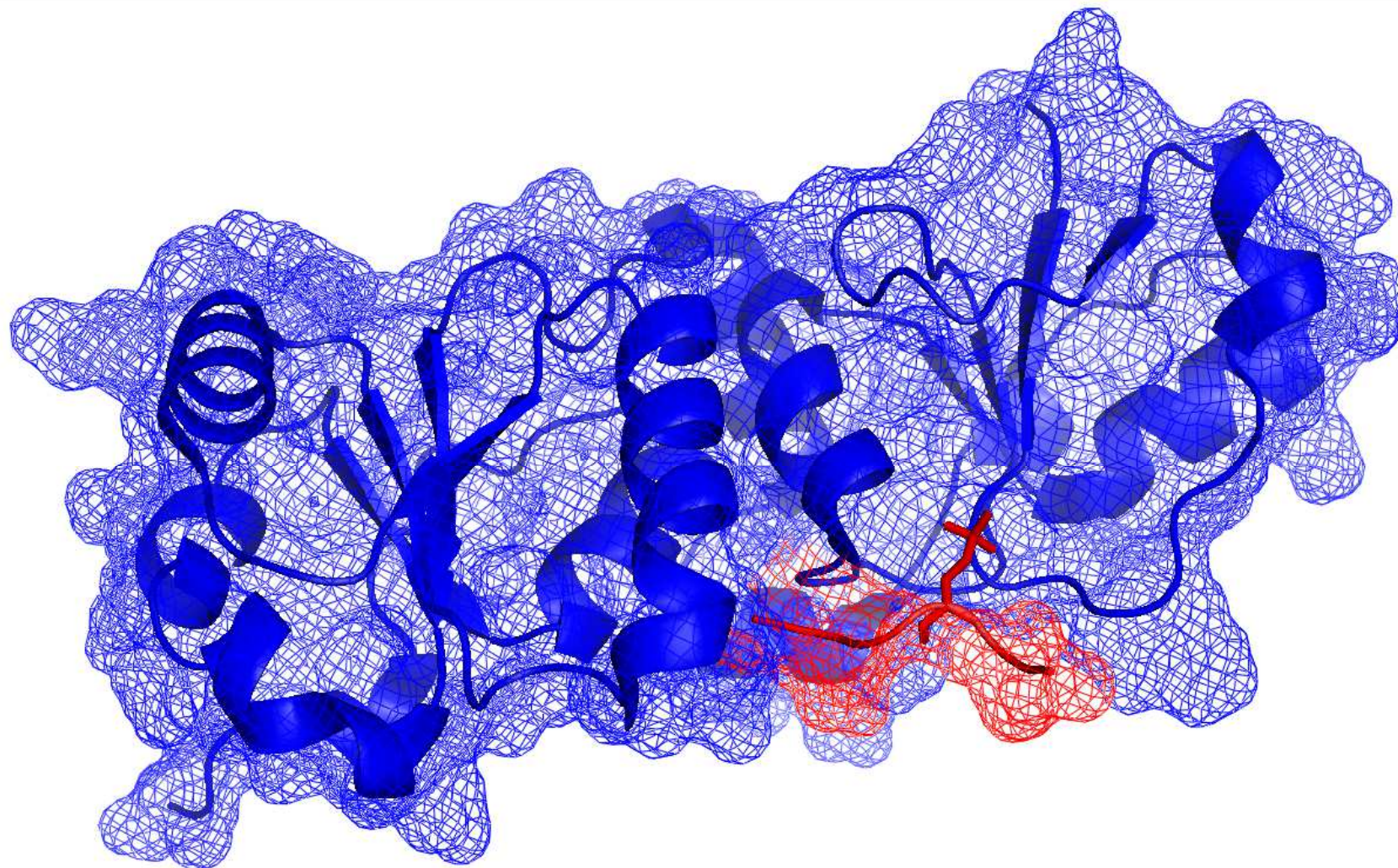
Modifikace	AMK zbytek	interakční doména
Fosforylace	tyrosin	SH2, PTB
	serin/threonin	14-3-3, WD40, WW, BRCT...
acetylace	lysin	bromodoména
metylace	lysin	chromodoména
hydroxylace	prolin	VHL β
ubiquitinace	lysin	UIM, UBA, CUE
SUMOylace	lysin	SIM



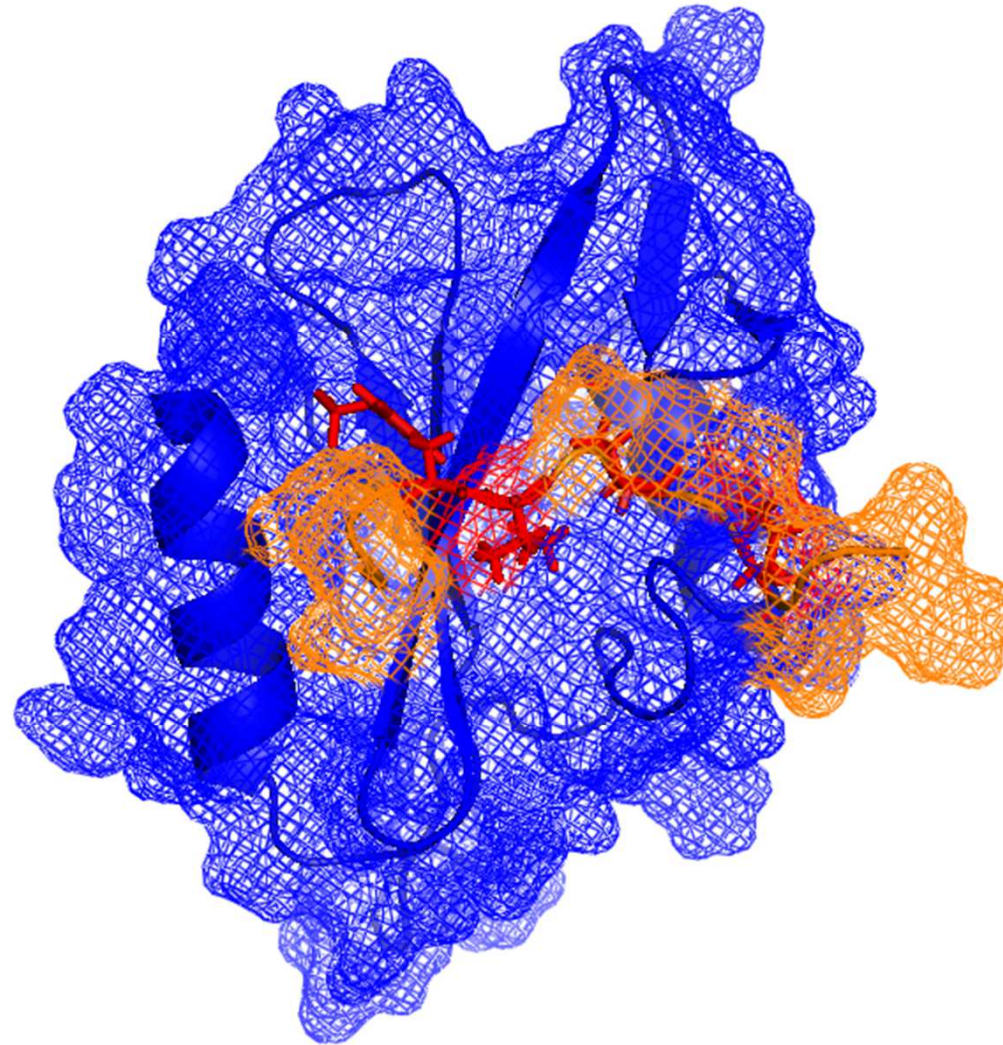


Modifikace histonů ovlivňují složení a přístupnost chromatinu – bromodoména
GCN5 (HAT) navázaná na acetylovaný H4 lysin – PDB: 1E6I

Bottomley, EMBO Rep., 2004



Např. **BRCT** doména váže **fosforylovaný histon** – fosforylace v místě poškození DNA – PDB: 3141



Např. **SH2** domény váží **fosfopeptidy** – dvě vazebná místa (fosfoTyr a peptid – peptid určuje vazebnou specificitu) – PDB: 2PLD

SH2 (a jiné) domény jsou často (jako moduly) součástí proteinů rozmanitých funkcí – provazují proteiny mezi sebou (přechodně, kondicionálně – regulace buněčných procesů)

Small GTPase Signaling

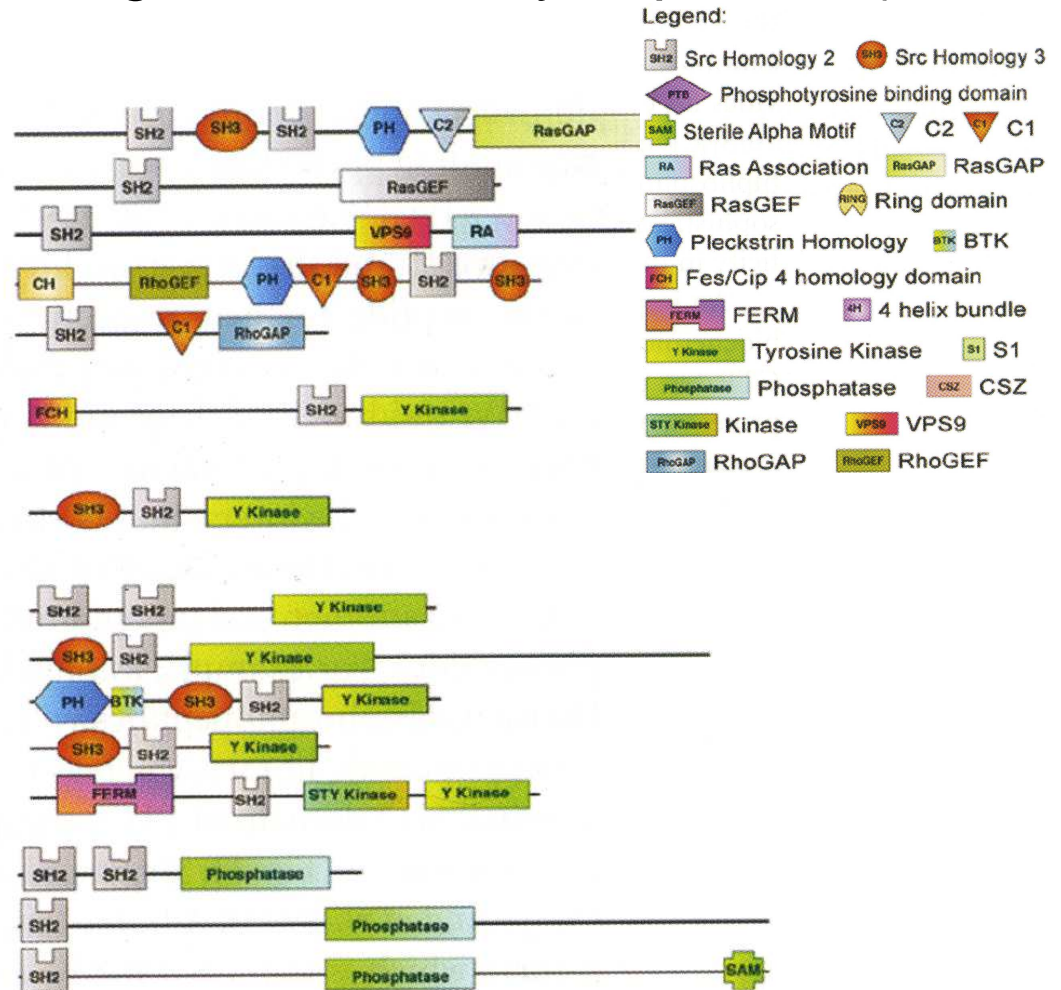
- Ras-GAP
- Nsp1,2,3
- Rin1
- Vav1,2,3
- Chimerin

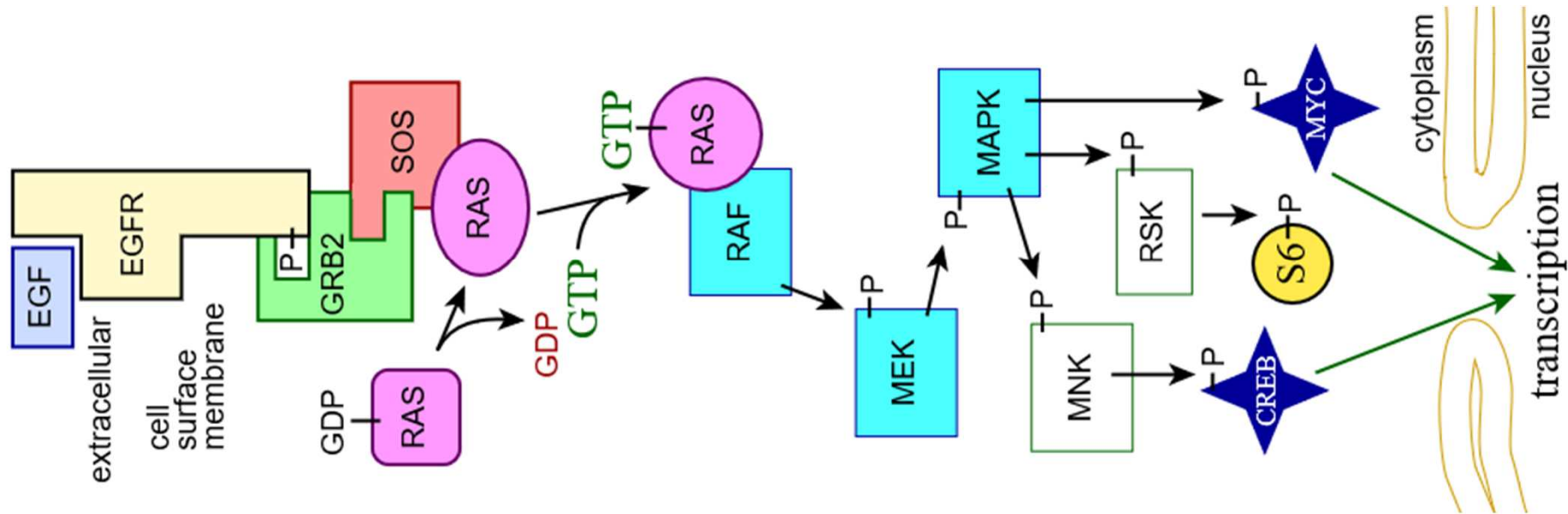
Kinases

- Fps, Fer
- Src, Csk, Ctk/Hyl, Fgr, Fyn, Yes, Hck, Lck, Lyn, Blk, Frk, Brk, DJ697K14.1
- Zap70, Syk
- c-Abl, Arg/Abl2
- Btk, Tec, Itk, Bmx
- Txk
- Jak1,2,3, Tyk2

Phosphatases

- Shp1, Shp2
- Ship
- Ship2





Signální Ras dráha – EGF váže EGFR (aktivuje cytoplasmatickou kinasovou doménu = autofosforylace) – SH2 v GRB2 interaguje s EGFR - SH3 domény GRB2 dimerizují s prolin-rich doménou SOS – EGFR-GRB2-SOS je aktivní (SOS = guanin nukleotid exchange faktor) a odstraní GDP z Ras – Ras může navázat GTP (podobný $G\alpha$, ale monomer) a interagovat s RAF kinasou - aktivuje se MAPK dráha

rakovina – Ras mutace stabilizující vazbu GTP mají za následek konstitutivní aktivaci (aktivace i bez EGF stimulu)

některé viry využívají buněčné PPI moduly k invazi do buněk (přesměrování ve prospěch viru – vazba HPV-E6 na p53)
 některé onkogeny jsou výsledkem fúze modulů (permanentní PPI)

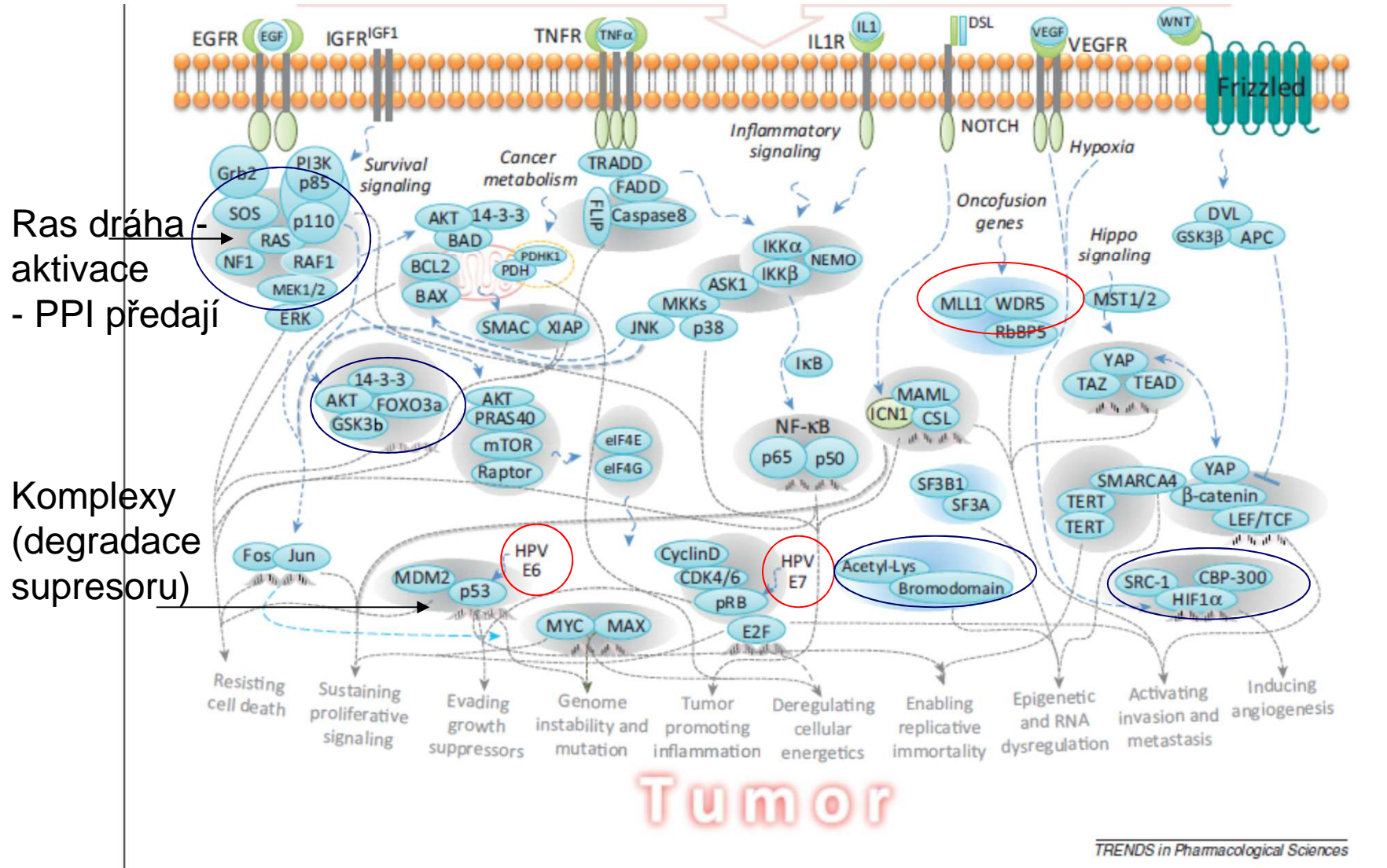


Figure 2. Representative PPIs in oncogenic signaling networks that drive the acquisition and development of hallmarks of cancer. Grey broken arrows connect PPIs to corresponding cancer hallmarks. Some PPIs contribute to multiple features of cancer. It should be noted that some PPIs may impact global processes of cell growth and their precise connections to cancer remain to be established.

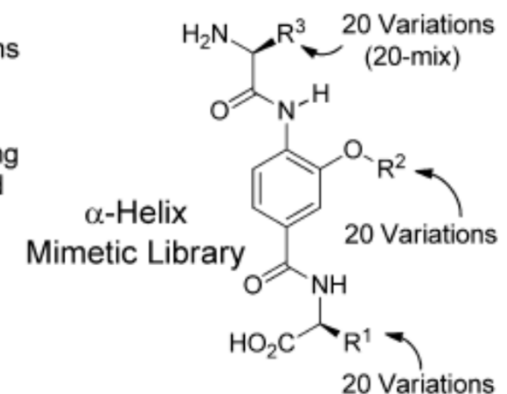
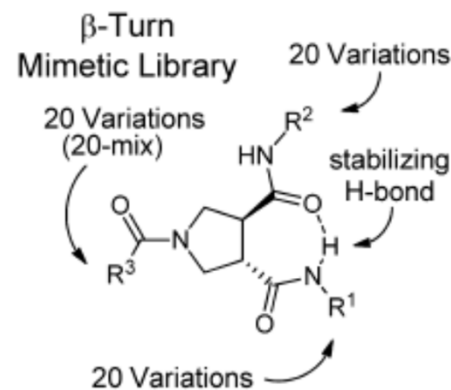
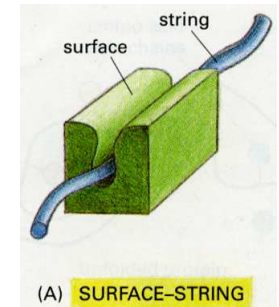
Inhibice PPI

Problémy inhibice (vývoje léků) ...

- interakční plocha 1150-10000Å² (větší než kapsy enzymů pro malé ligandy)
- ploché bez hlubokých kapes (jako pro ligandy)
- hydrofobní charakter PPI (nerozpustnost léku)
- nelze vycházet z přirozených ligandů (jako u enzymů)

... ale

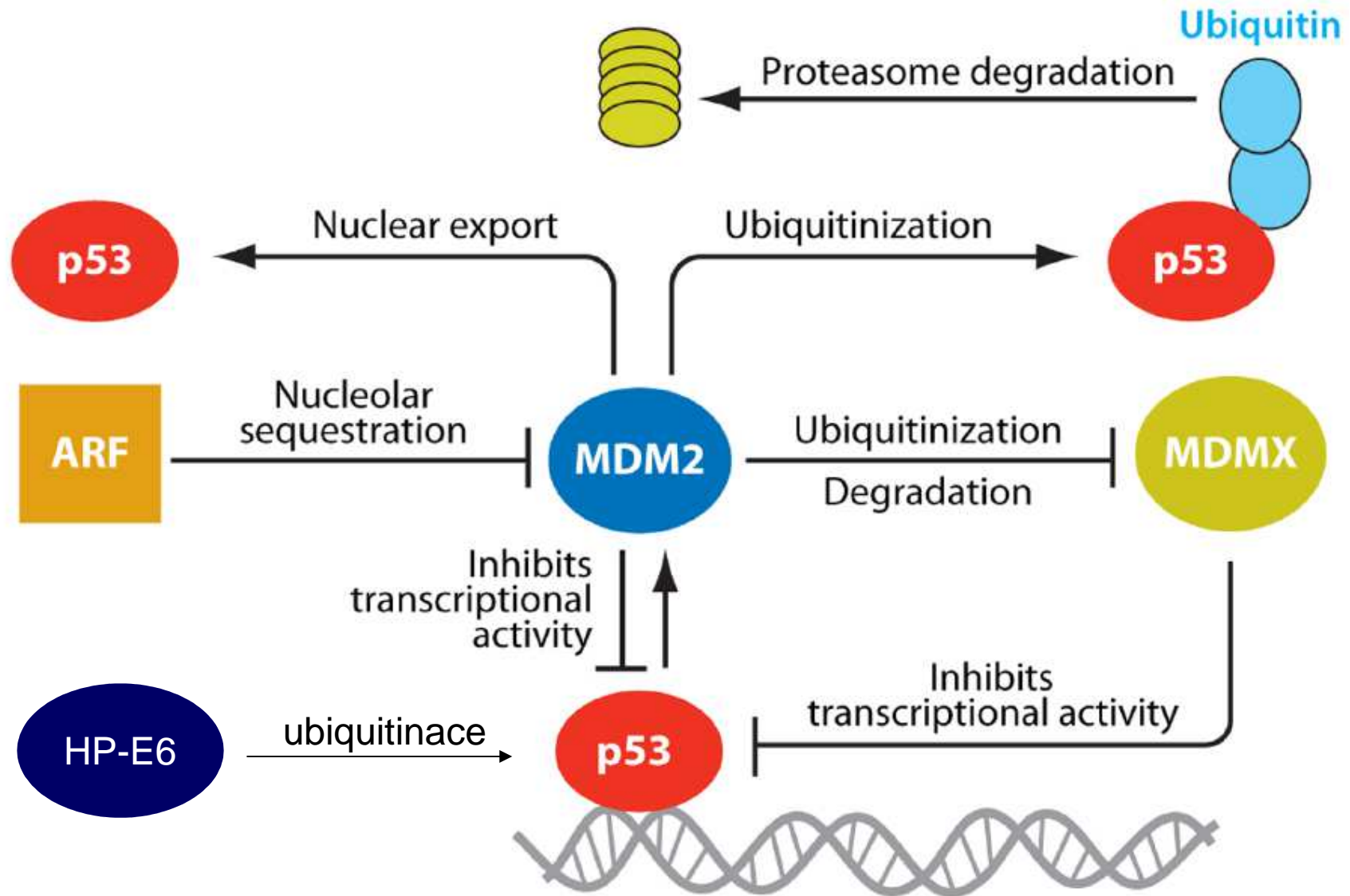
- interakce „peptid ve žlábků“ jsou relativně malé
- lze inhibovat interakci i relativně malou molekulou (hot-spot)
- vhodné je cílení na interakce regulované post-translační modifikací (viz fosfopeptidy)
- mimikování peptidů (α , β)



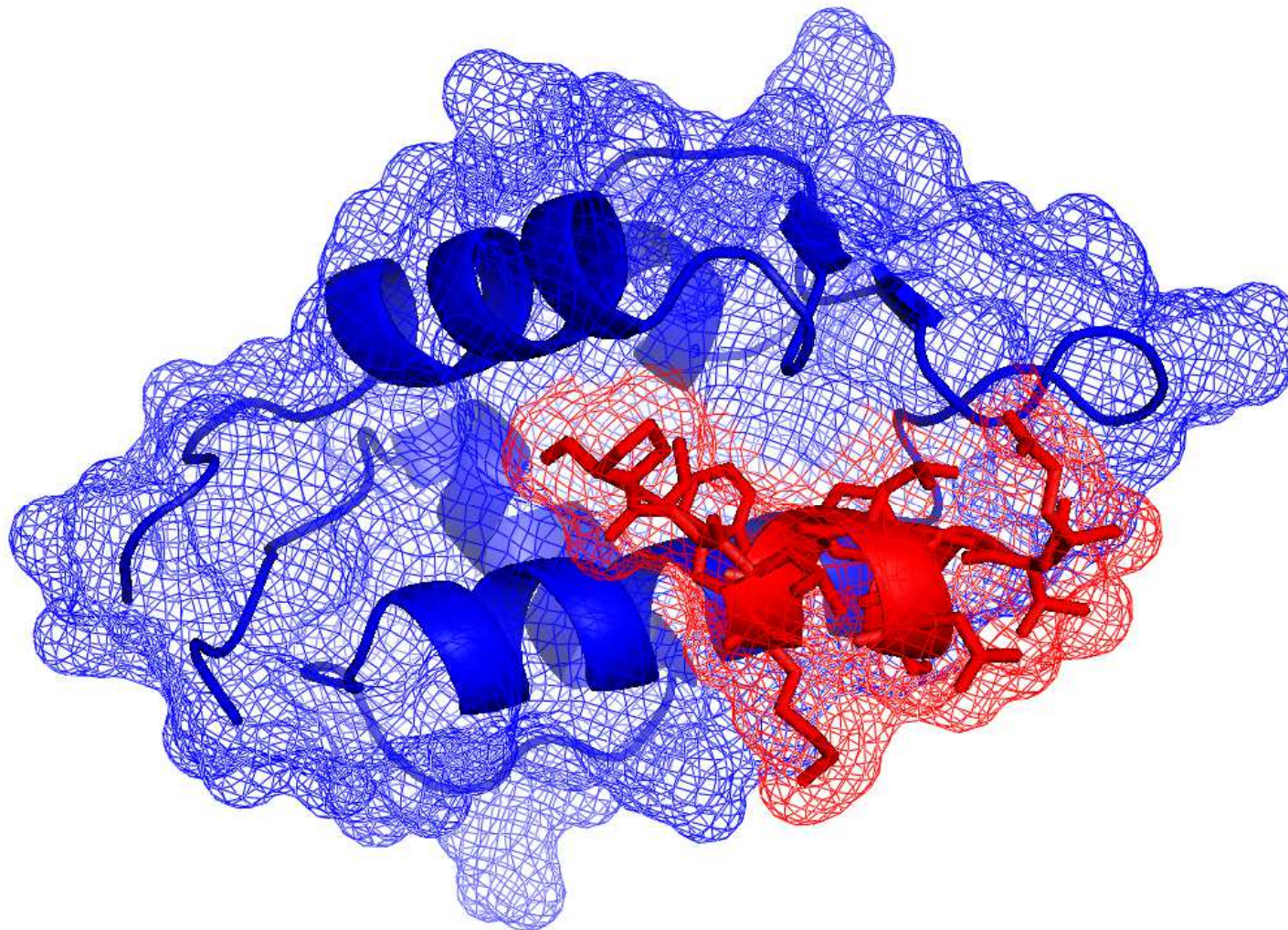
Ivanov et al, TiPS, 2013

Whitby a Boger, ACR, 2012

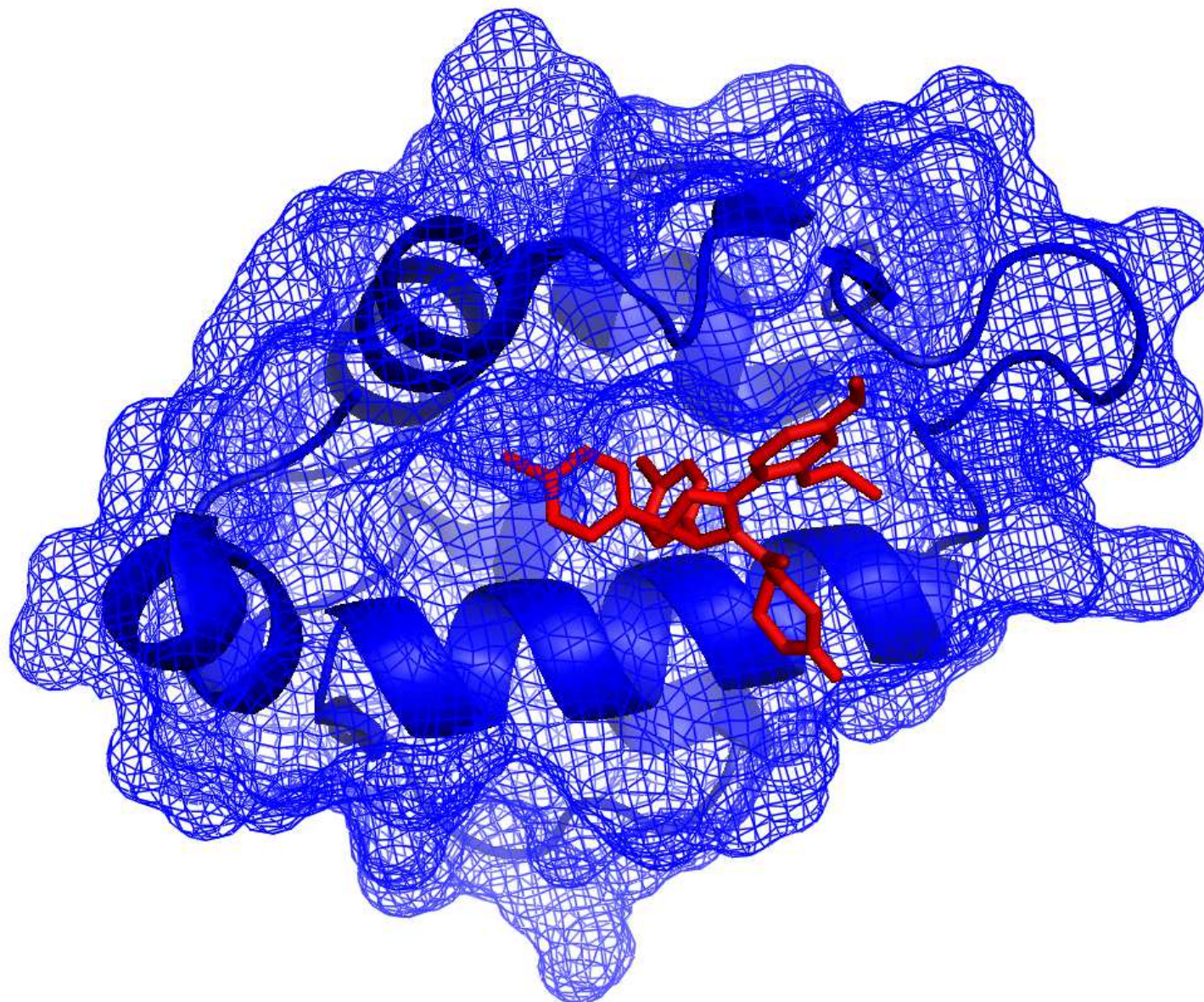
Inhibite PPI: p53-MDM2



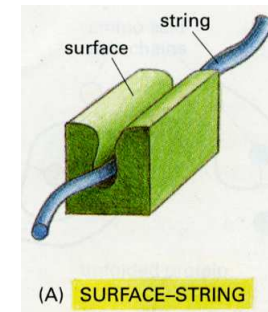
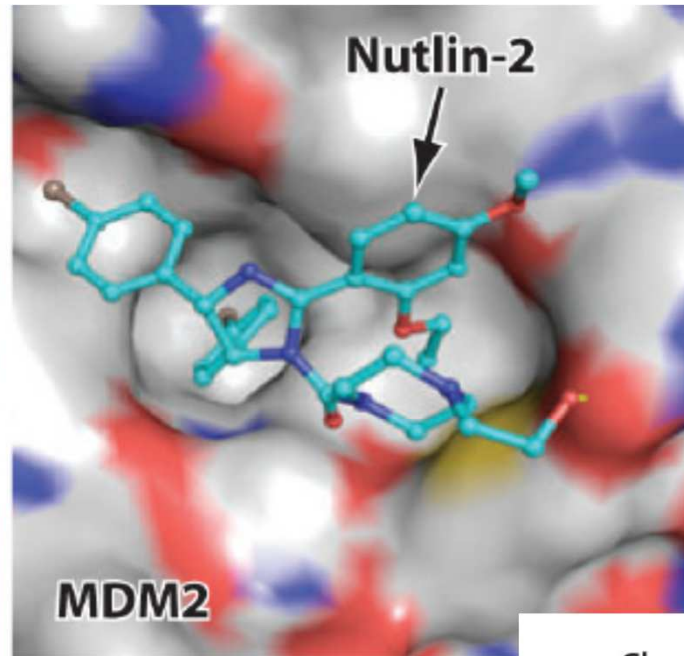
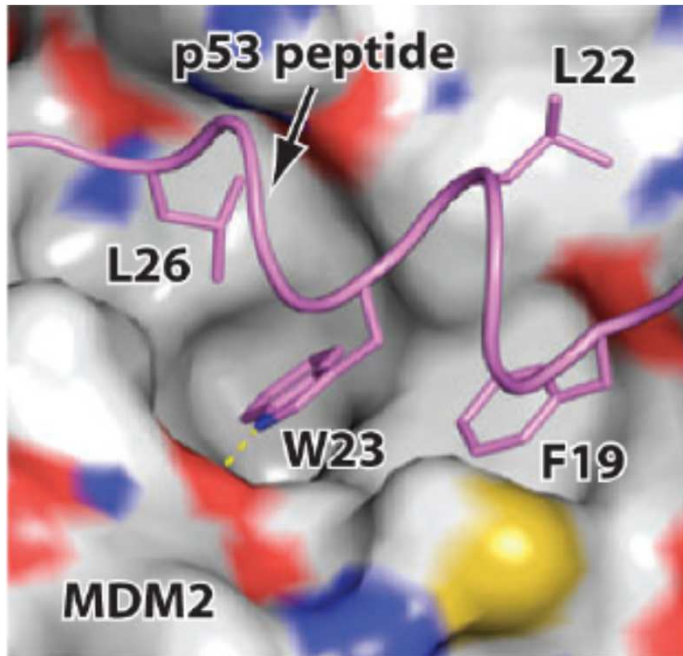
MDM2-p53 (dimer, PDB: 1YCQ)



MDM2-nutlin (PDB: 4HG7)

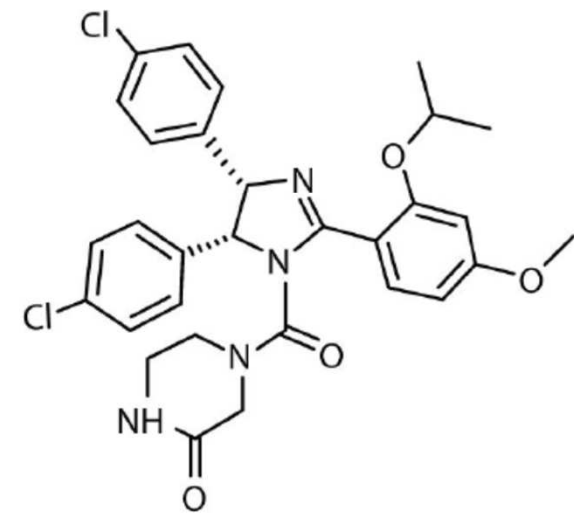


Inhibice PPI: p53-MDM2



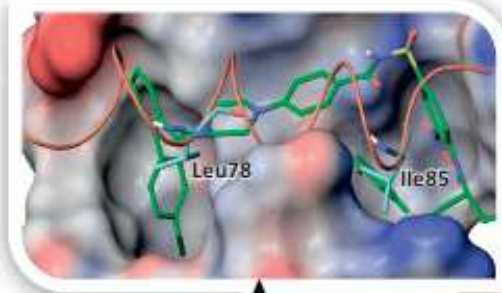
jeden z prvních

- Inhibice interakce MDM2 stabilizuje p53 –
podpora nádorové suprese

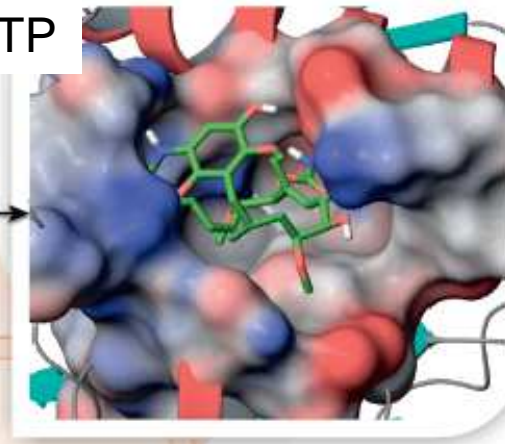


Nutlin-3a

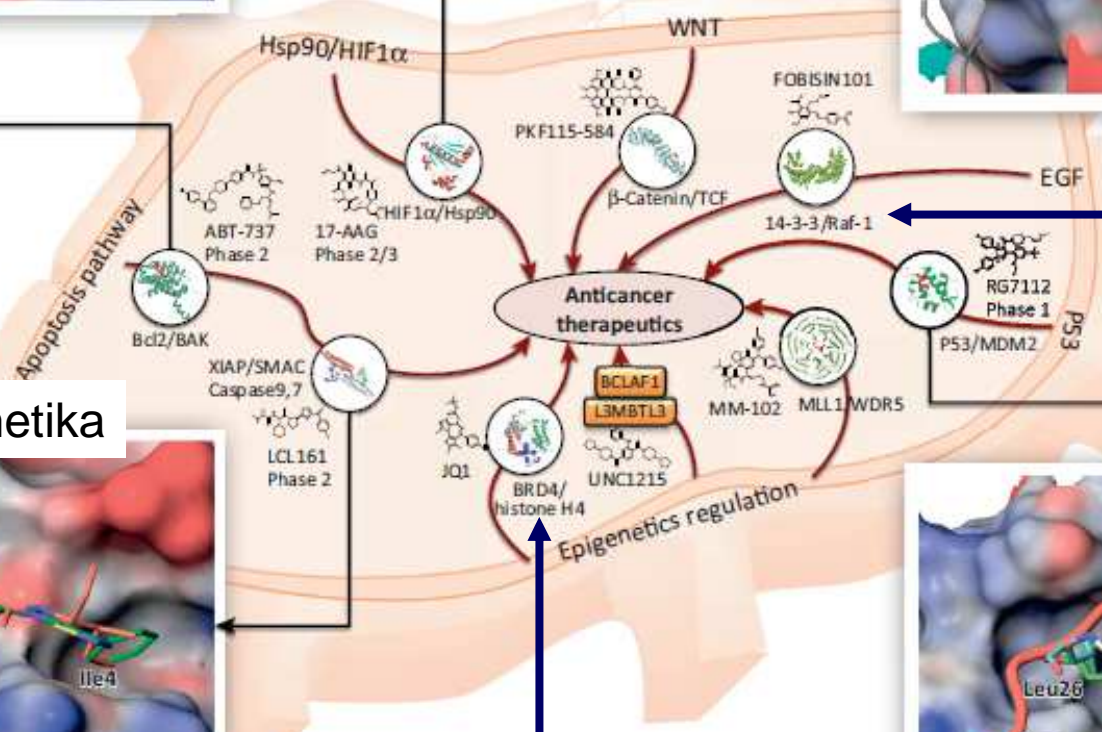
peptidomimetika



kapsa pro ATP

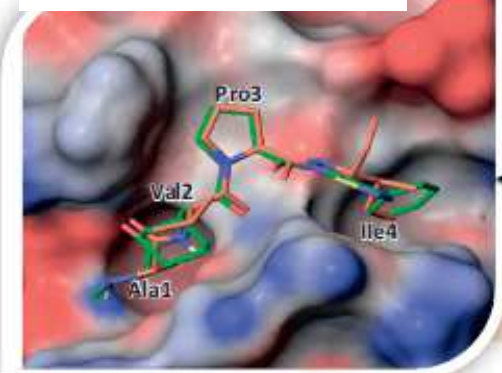


Ivanov et al, TIPS, 2013

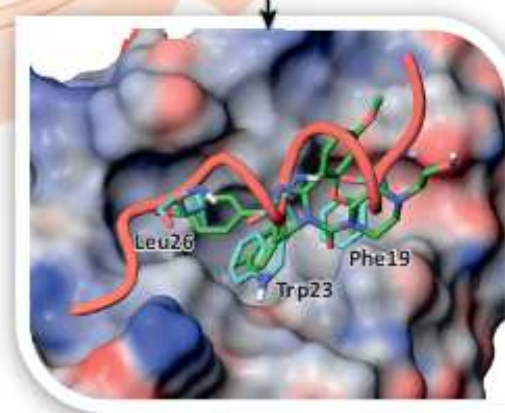


fosfopeptidová vazba

peptidomimetika



acetyl-peptidová vazba



větší komplexy jsou stabilizovány více

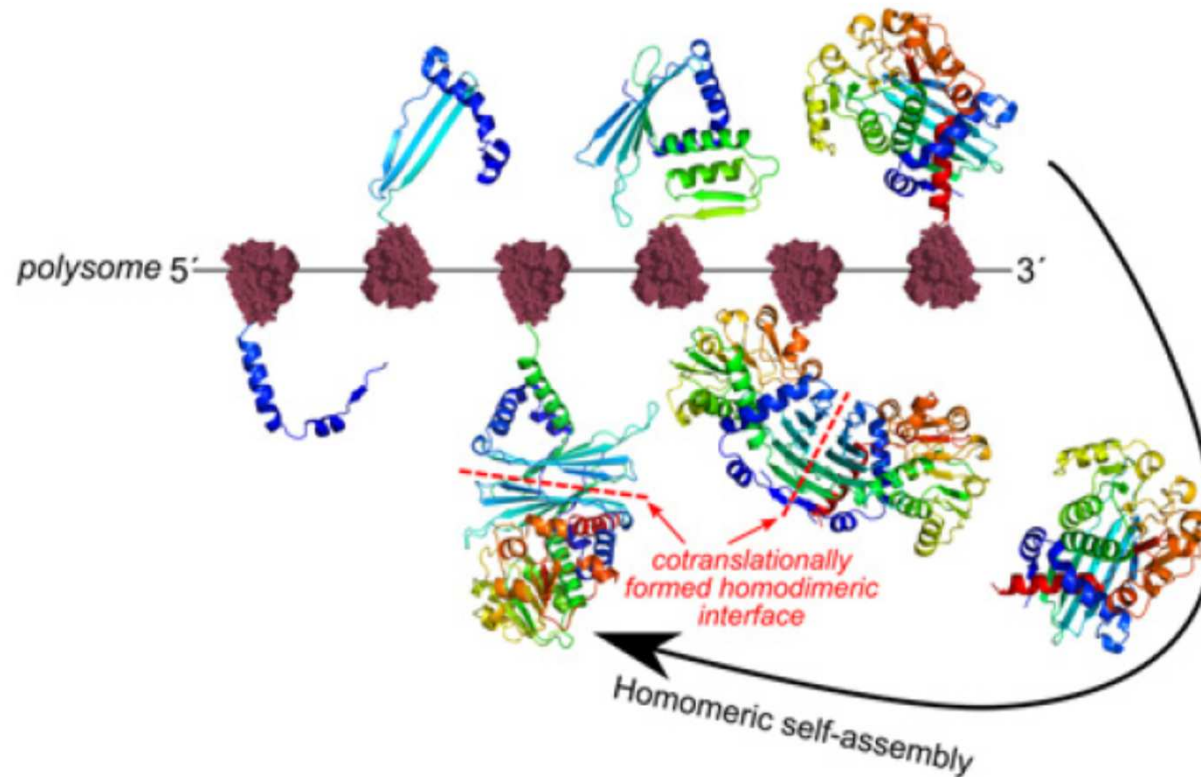
nová peptidomimetika

interakcemi, ale může se rozpadnout i celý komplex

Jak se komplexy sestavují - homomery?

nejjednodušší (běžné) je sestavování homooligomerů (homodimerů), ke kterému dochází (většinou) při translaci

Wells a spol, BST , 2015



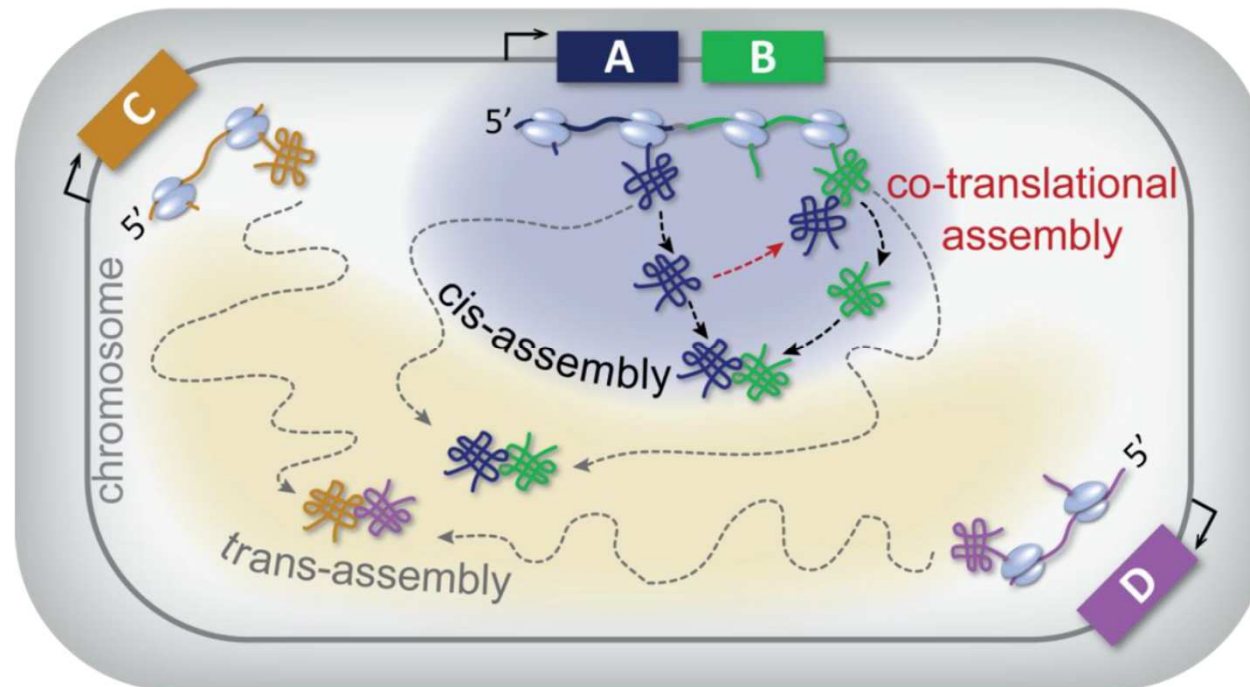
tento toxin je spíš vyjímka



Polypeptidový řetězec má tendenci vytvářet sekundární struktury -> terciární struktury -> kvarterní tj. komplexy (šroubovice a listy se k sobě skládají podobným způsobem)

Jak se komplexy sestavují - heteromery?

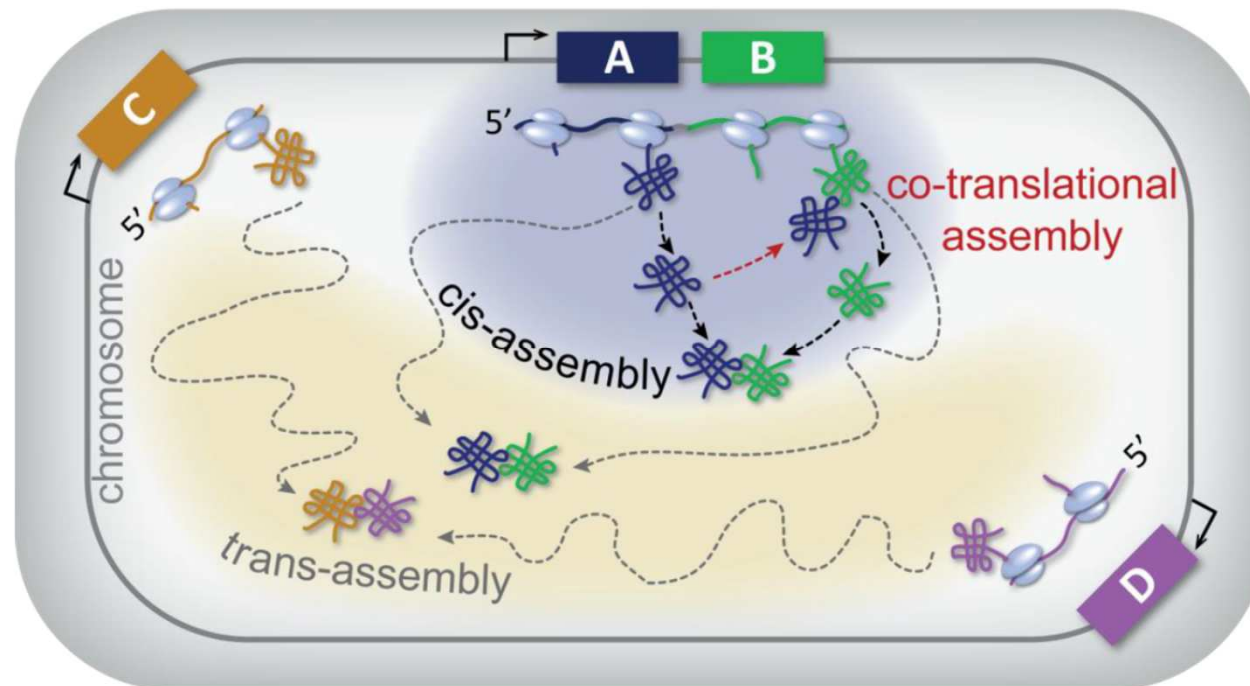
podjednotky se exprimují „nezávisle“ a pak se musí „potkat“ (trans-assembly model) – problém s nespecifickými interakcemi, proteasami, chaotické prostředí buňky ...



... samostatně by se proteiny neposkládaly, byly by nestabilní (degradace), toxické nebo by agregovaly (proteiny s hydrofobními povrchy – interakce je skryje před solventem)

Jak se komplexy sestavují - heteromery?

podjednotky se exprimují „nezávisle“ a pak se musí „potkat“ - trans-assembly model ...

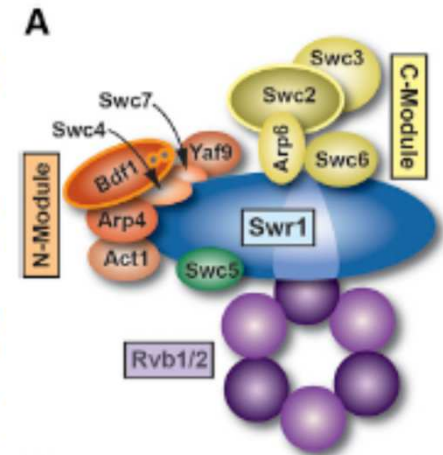


transkripce genů u prokaryot je regulována operony: funkčně vztažené geny/proteiny (komplexy) se transkribují z jednoho operonu (tandemově uspořádané) – polycistronic mRNA – ko-translace a ko-skládání (koordinované v prostoru i čase)

Podjednotky komplexů koexprimovány (ko-translace)

Table 1. Proteins analysed by Rlp-chip and mRNAs associated with them.

Bait	Bait function/protein complex	Enriched mRNAs	Function of proteins encoded by interacting mRNAs
Tea2p	Kinesin motor protein [32]	<i>tip1</i>	CLIP170 family, binds
Cdc2p	cyclin-dependent protein kinase [33]	<i>rum1</i> <i>cdc18</i>	CDK (cyclin-dependent protein kinase), DNA replication factor
Sty1p (Spc1p)	MAP kinase; stress-responses [14,34]	<i>pyp2</i> <i>cip2</i>	Tyrosine phosphatase RNA-binding protein
Rpt2p (Mts2p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ubp6</i> <i>rhp23</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase Rad23 homolog * [35]
Rpn12p (Mts3p)	19S proteasome regulatory subunit * [35]	<i>ecm29</i> <i>rpn1301</i> <i>rpn1302</i>	Proteasome component 19S proteasome regulatory subunit 19S proteasome regulatory subunit
Atf1p	Transcription factor; stress response [36]	<i>pcr1</i>	Transcription factor, inhibits
Mnh1p	Mago nashi homolog; splicing * [35]	<i>mni1</i>	Protein with Mago nashi domain
Arp6p	SWR1 complex; chromatin remodelling [18]	<i>alp5 = Arp4</i>	INO80 and SWR1 chromatin remodelling complexes [18]
Arp9p	SWI/SNF and RSC complex; chromatin remodelling [17]	<i>snf21</i> <i>snf22</i>	DNA helicase, RSC complex [17] DNA helicase, SWI/SNF complex [17]
Arp42p	SWI/SNF and RSC complex; chromatin remodelling [17]	<i>snf21</i> <i>snf22</i>	DNA helicase, RSC complex [17] DNA helicase, SWI/SNF complex [17]
Arp8p	Ino80 complex; chromatin remodelling [18]	<i>ino80</i>	INO80 chromatin remodelling complex [18]
Arp2p	Arp2/3 complex; actin polymerization [37]	<i>arp8</i> <i>arp9</i>	INO80 chromatin remodelling complex [18] SWI/SNF and RSC complexes [18]



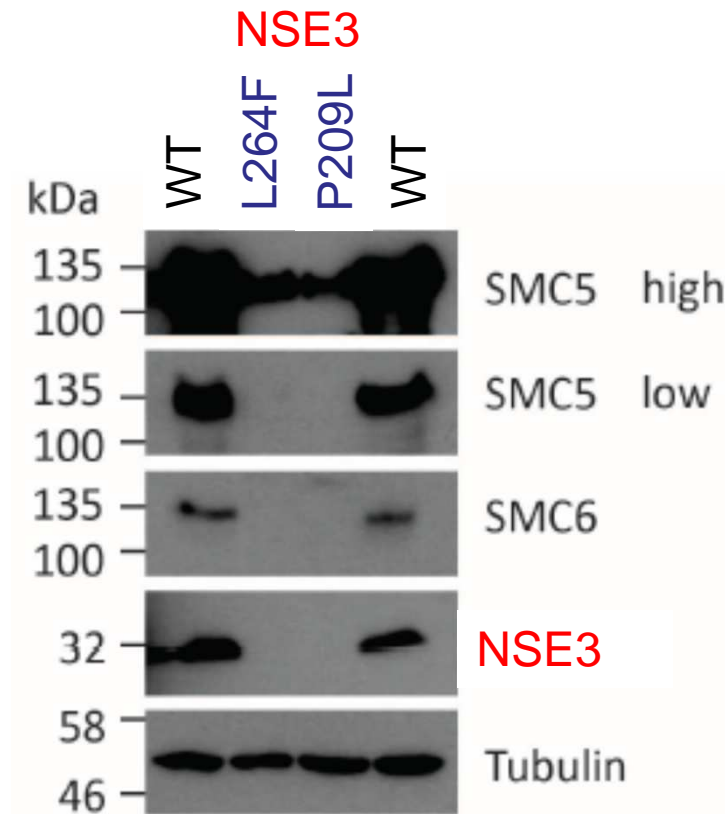
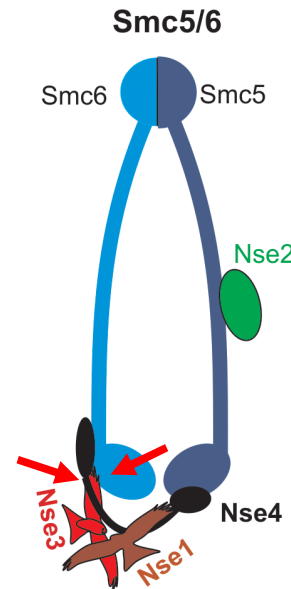
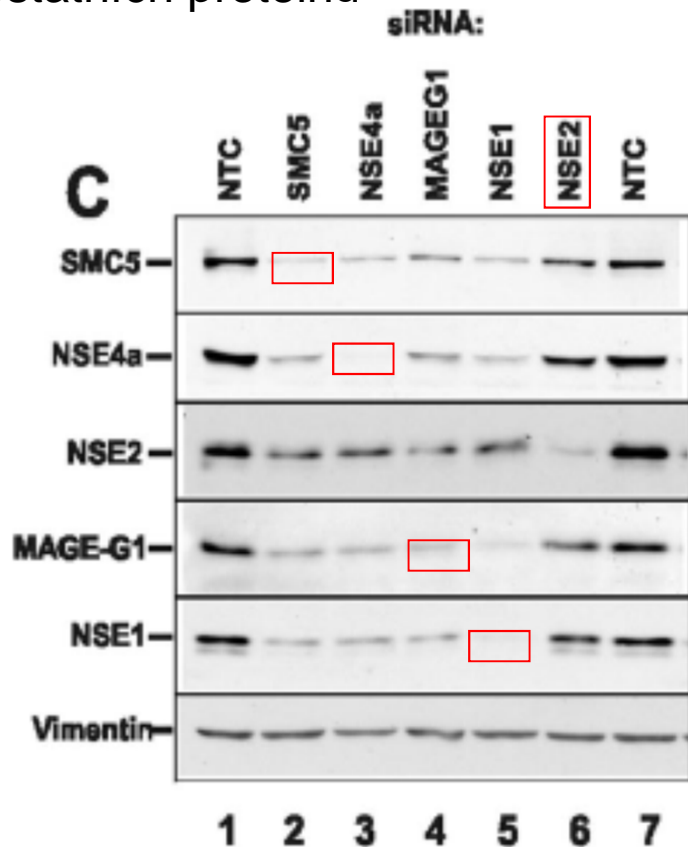
Only proteins that copurified with mRNAs other than their own are shown. Proteins that have not been characterised in *S. pombe*, and for which the information is a prediction based on the behaviour of orthologous proteins are marked with a star.

Podobně u eukaryot – mRNA podjednotek komplexů ko-precipitovaly (ikdyž nejsou na jedné mRNA – ale jsou ko-translatovány)

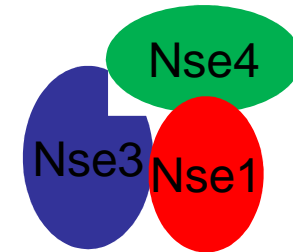
Stabilní proteinové komplexy jsou složeny z jednotlivých proteinů/**podjednotek** které spolu interagují - pokud schází podjednotka, tak nefunguje celý komplex – komplex se nesestaví nebo rozpadá (nestabilní – degradace ...)

Deplece kterékoli podjednotky lidského komplexu má za následek pokles hladiny ostatních proteinů

mutace podjednotky držící pohromadě komplex (narušila Nse3-Nse4 i Nse3-Smc6) může mít podobný efekt ale ...



... **Stabilita** komplexu je zpravidla větší než pouhý součet jednotlivých protein-proteinových interakcí mezi podjednotkami (větší povrch, efekt přiblížení a zorientování partnera ...)



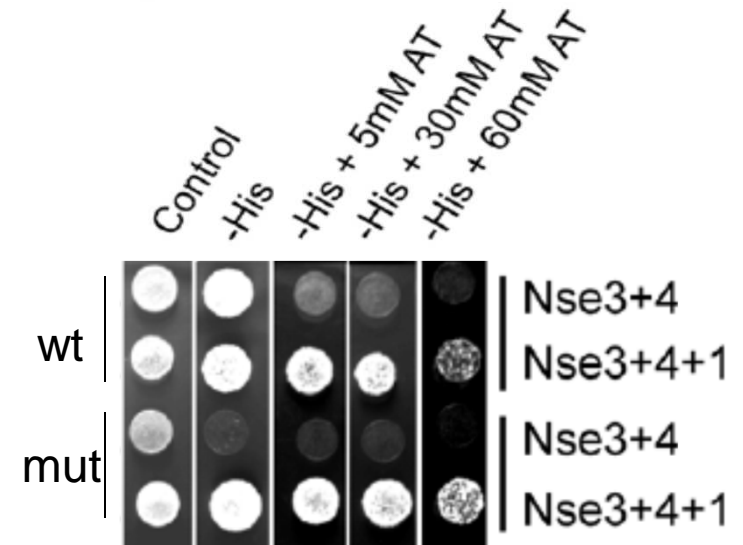
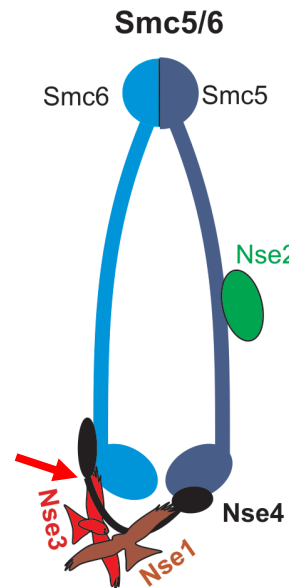
Proteinový komplex

Pull-down



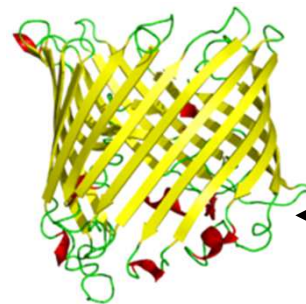
kvasinkový 2-hybridní systém

... přerušení protein-proteinové interakce je relativně snadné u slabých dimerů – větší komplexy jsou většinou stabilizovány více interakcemi a je tedy obtížnější je narušit (mutací či inhibátorem)



Proč skládat komplexy z menších podjednotek?

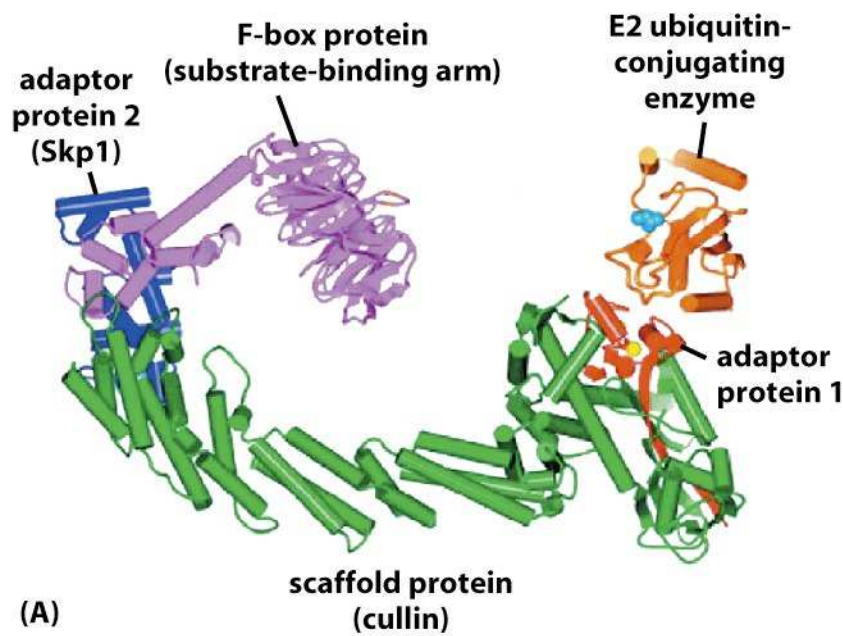
- skládání funkčního komplexu na specifickém místě (toxin je transportován jako rozpustný monomer a poté se skládá => stává se toxickým až mimo původní buňku)
- skládání i rozpad komplexů jsou snadněji kontrolovatelné, reversibilní (protože podjednotky asociují skrze množství relativně slabých interakcí - nízká energie)
- velký komplex (homo-oligomer) může být kódován relativně krátkou genetickou informací (skládá se menší protein – větší je méně stabilní a hůře se skládá)
- menší pravděpodobnost defektní makromolekuly (menší gen => méně mutací + dá se relativně snadno vyhnout chybám – odstraní/degraduje se pouze jedna poškozená menší podjednotka => méně energie než pro nápravu celé struktury)
- komplexy mohou být dynamičtější (flexibilnější)
- evoluční výhoda modulů (nový komplex vzniká záměnou podjednotek)



bakteriální toxin →

← porin v mitochondrii

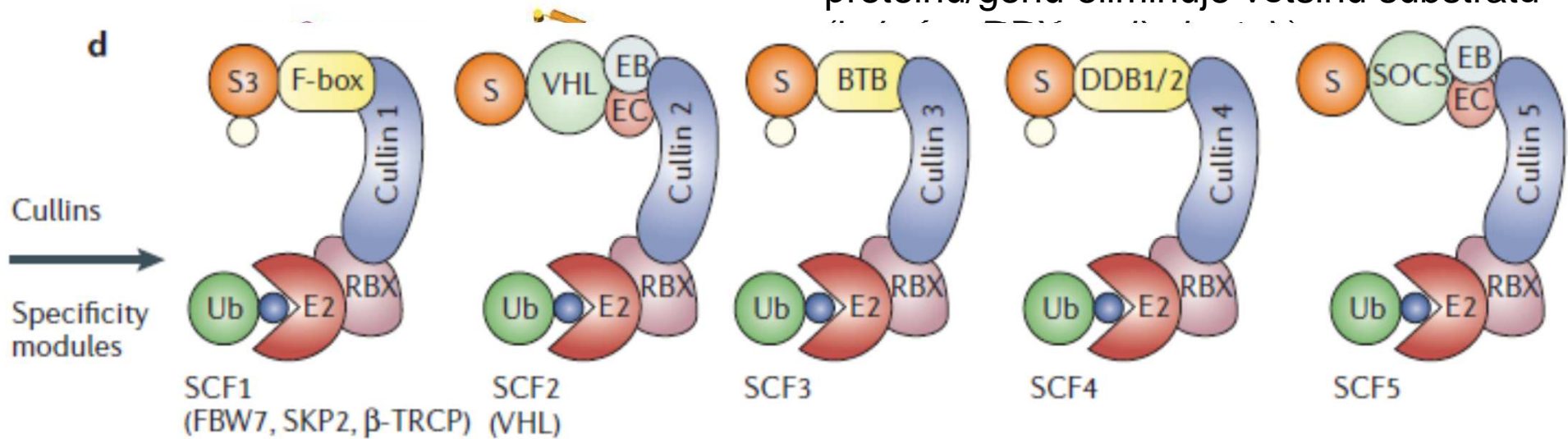




(A)

Některé komplexy jsou modulární – např. SCF (Skp-cullin-Fbox) různé cullin (scaffold) nebo Fbox (adaptor) molekuly

- různé komplexy rozeznávají různé substráty (ubikvitinace)
- delece jednoho F-box proteinu/genu eliminuje pouze subset substrátů
- delece jednoho cullin proteinu/genu eliminuje větší spektrum substrátů
- delece jednoho RBX (RING-finger) proteinu/genu eliminuje většinu substrátů



Uetz and Finley, FEBS Lett. 2005

Figure 3-79 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Network/interaktom SCF komplexů a jejich substrátů

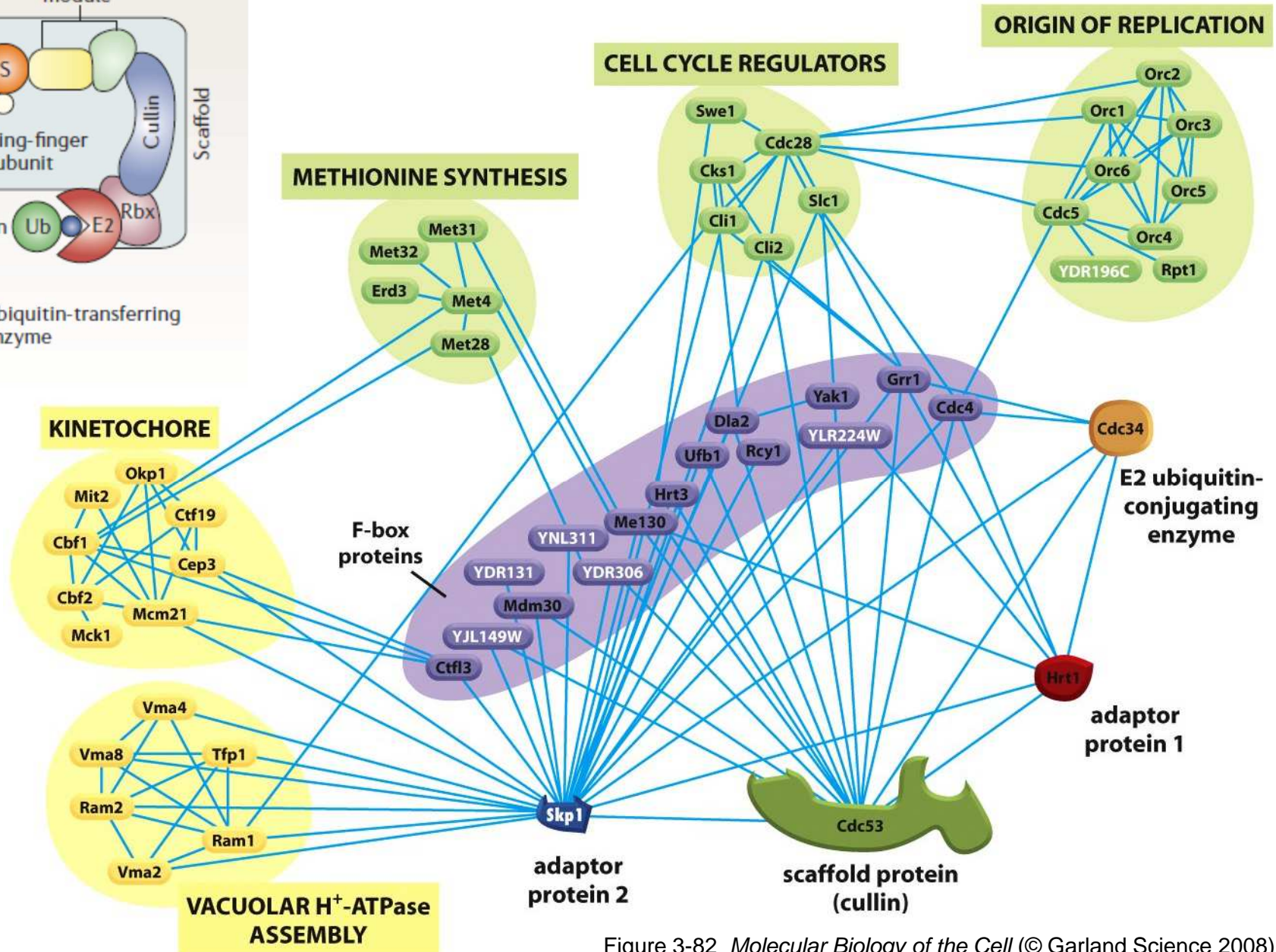
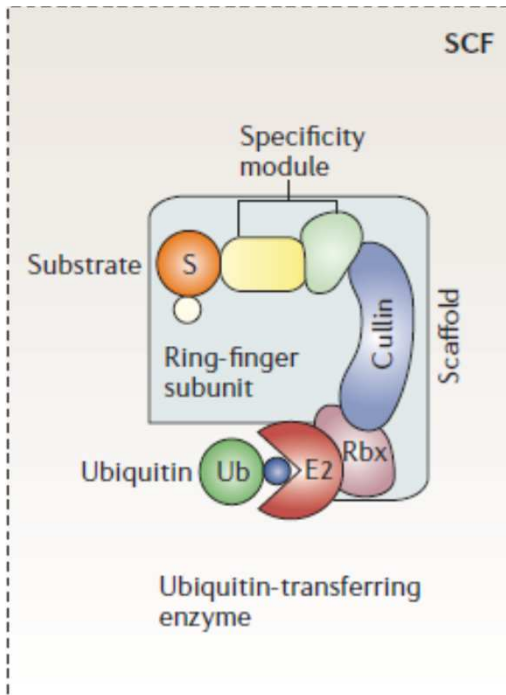
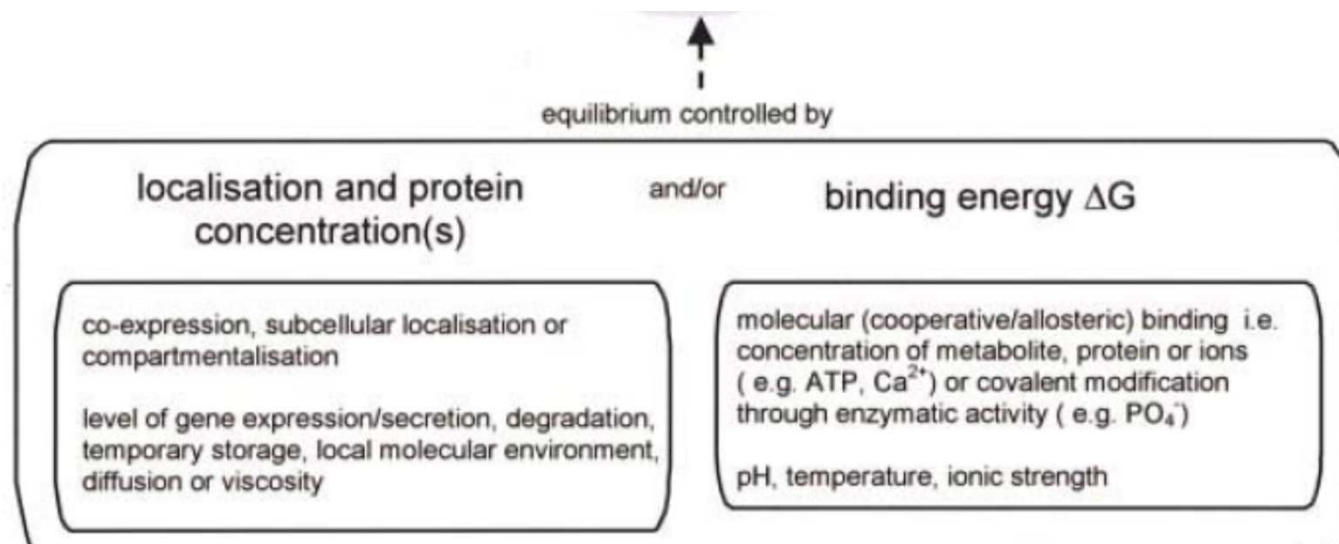


Figure 3-82 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Závěry

- Stabilita komplexu je zpravidla větší než pouhý součet jednotlivých protein-proteinových interakcí
- funkce celého komplexu je závislá na každé podjednotce (komplex se nesestaví nebo rozpadne bez všech podjednotek)
- některé podjednotky mohou plnit funkci adaptérů či lešení (scaffold)
- proteiny jsou spojeny prostřednictvím interakcí mezi doménami – interakce mohou být modulovány posttranslačními modifikacemi (dynamické komplexy)



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 – 17.4.2018*
 - vzájemné PPI podjednotek - architektura/struktura komplexu
 - funkce podjednotek (genetická analýza, lokalizace v buňce ...)
3. - rekonstrukce a analýza aktivit celého komplexu *in vitro*

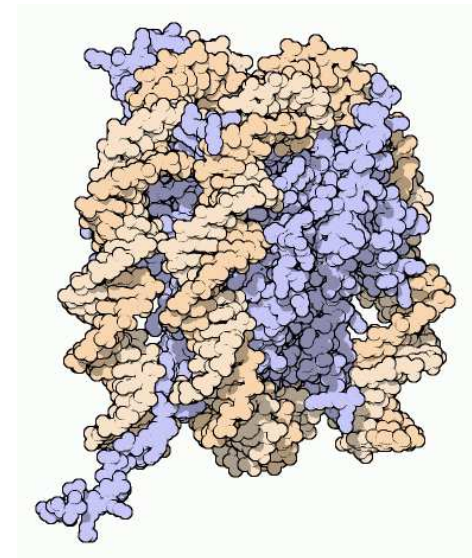
Metody izolace a analýzy proteinových komplexů

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 ...

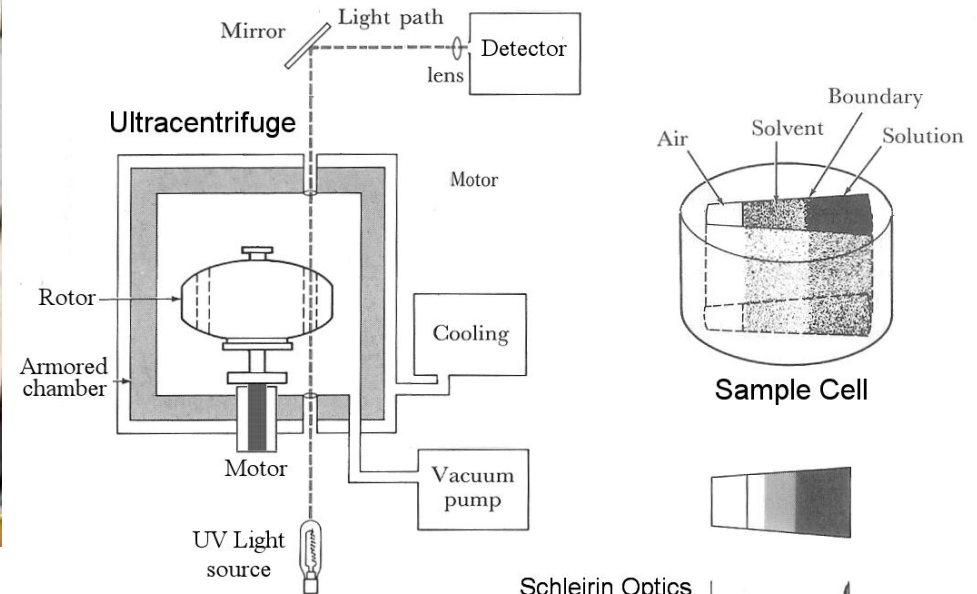
(Prolínají se i metody pro komplexy a PPI - *viz MGP – 17.4.2018*)

... vizualizační metody

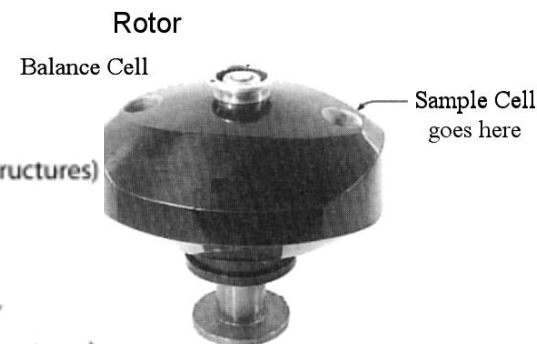
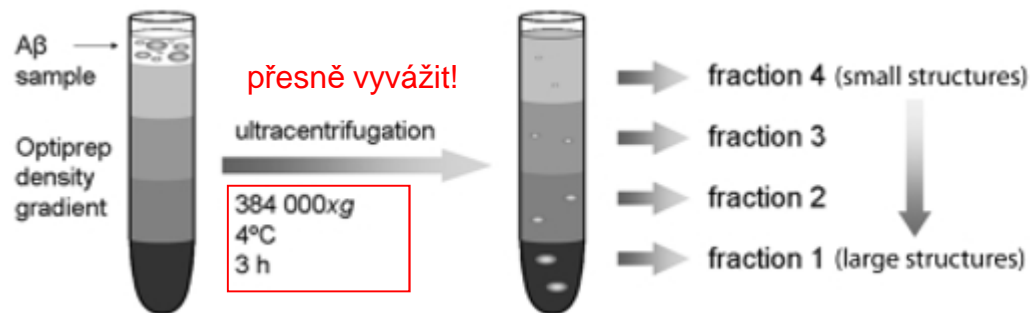


Metody analýzy a izolace PKxů

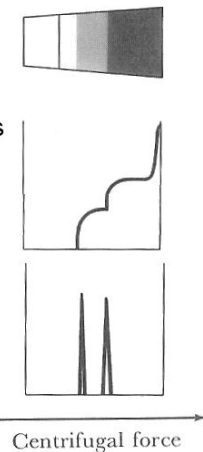
Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



Cukerný/hustotní gradient



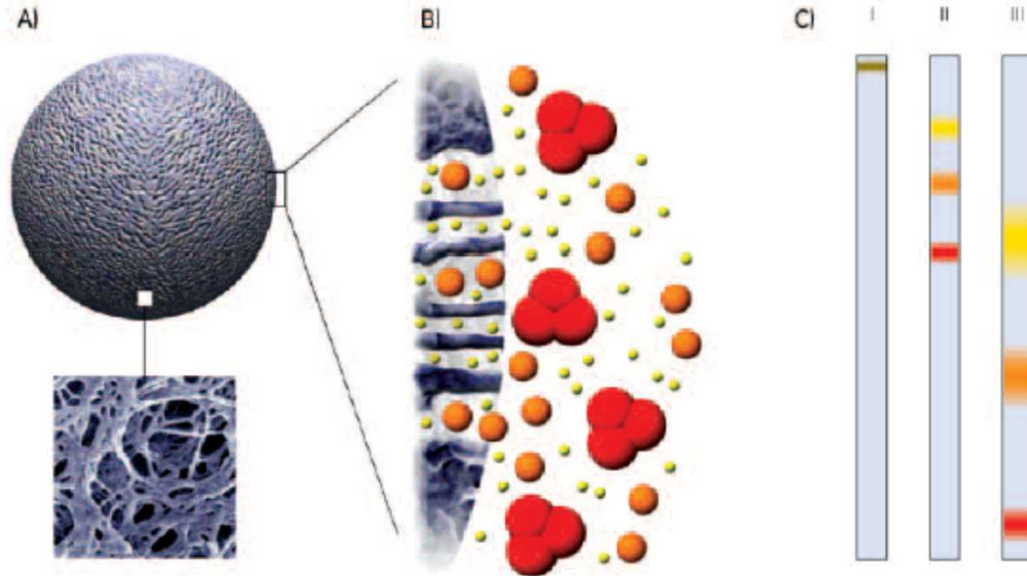
Schleirin Optics (schematic)



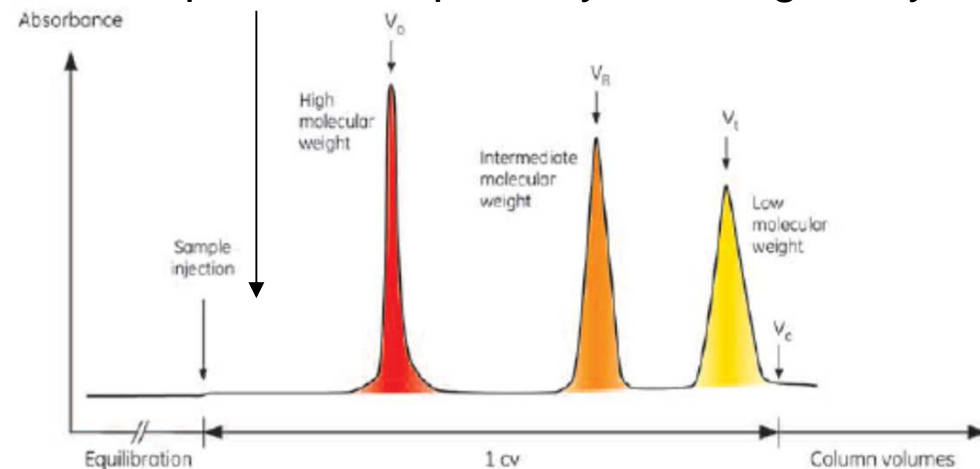
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

Metody izolace a analýzy PKxů

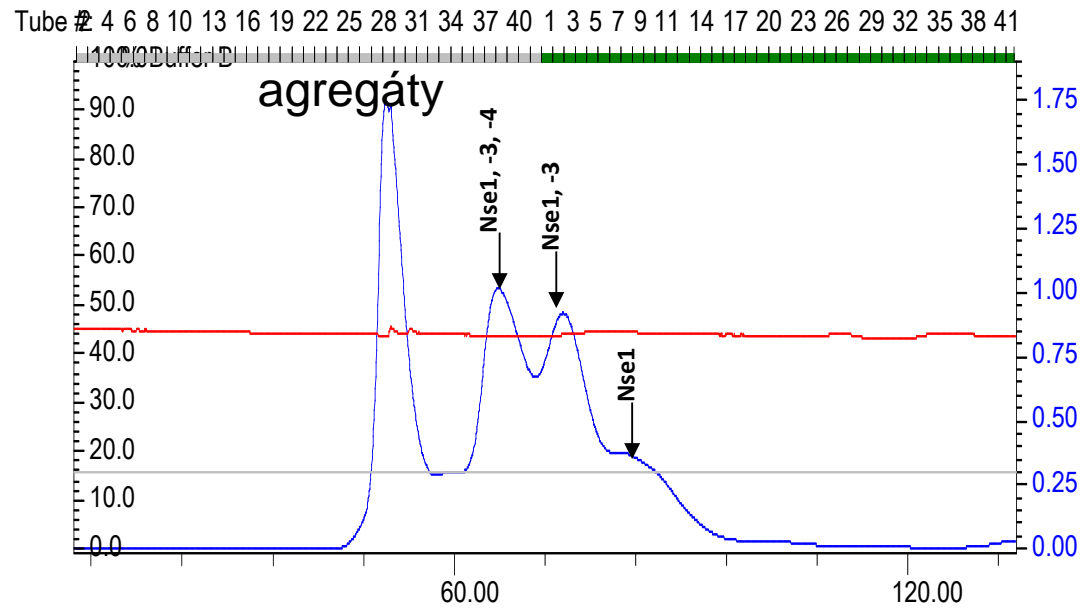
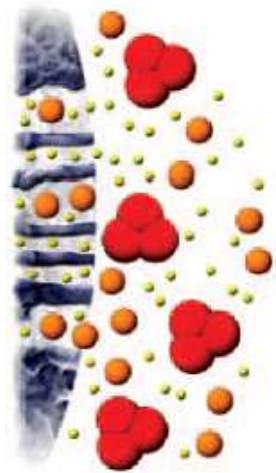
- **Gelová filtrace (size exclusion chromatography)**
- Za nativních podmínek (komplexy zůstávají pohromadě)



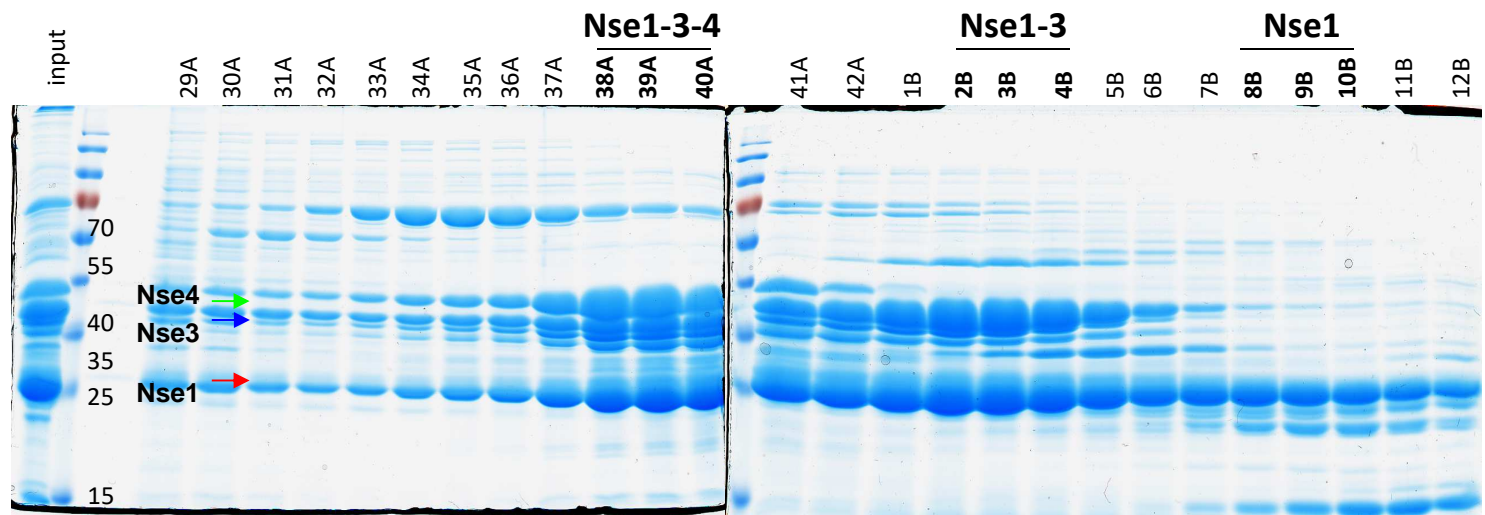
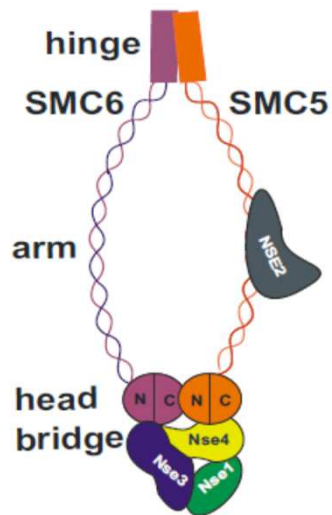
D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty



Ko-purifikace



3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů



Metody izolace a analýzy PKxů

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



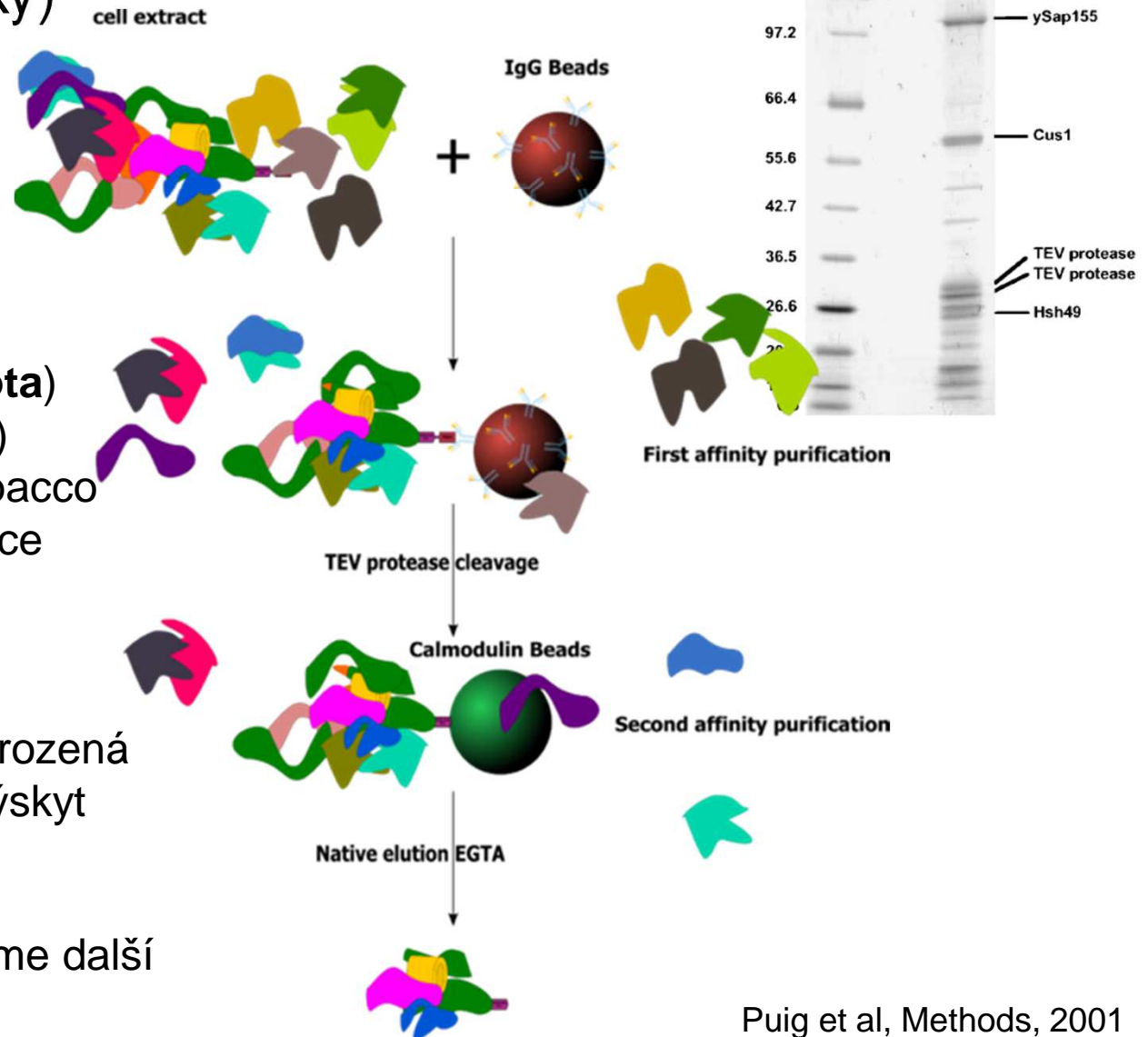
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

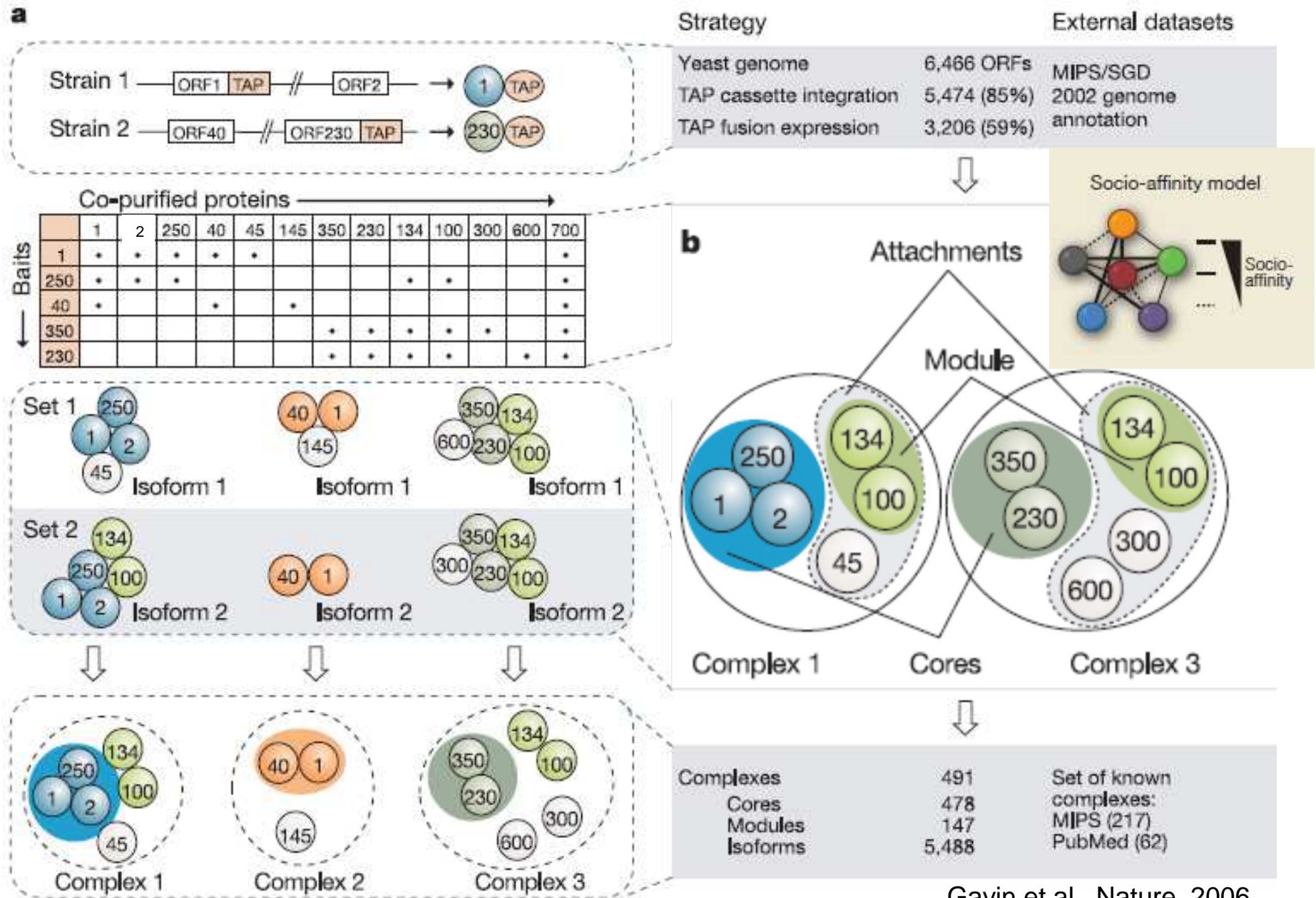
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

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

známe jeden protein – hledáme další podjednotky



Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



Různé přístupy charakterizace komplexů

klasický

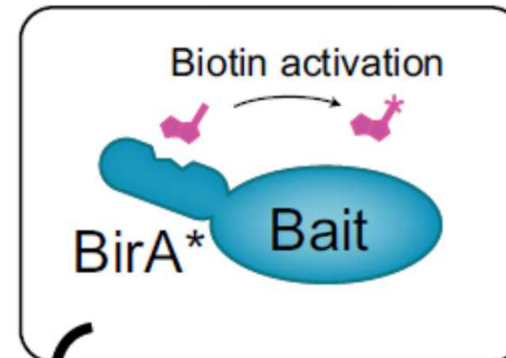
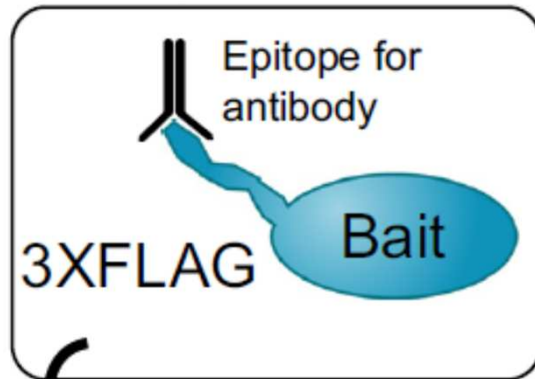
alternativní

Affinity Purification

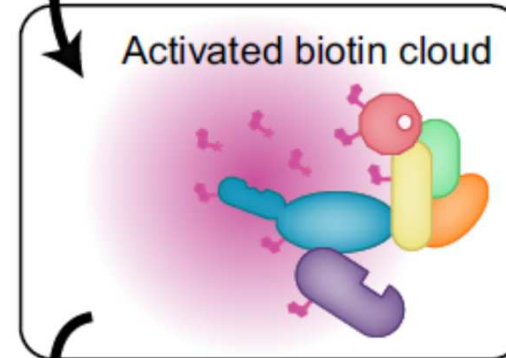
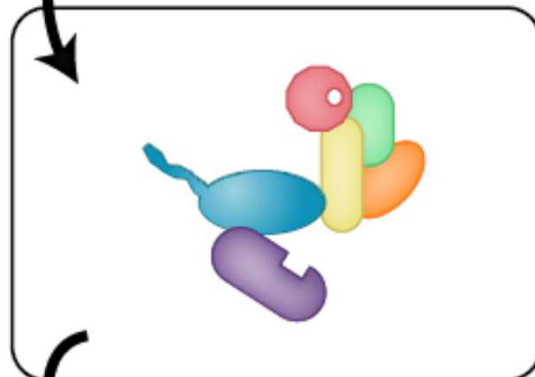
BioID

(Proximity Biotinylation)

Tagging system

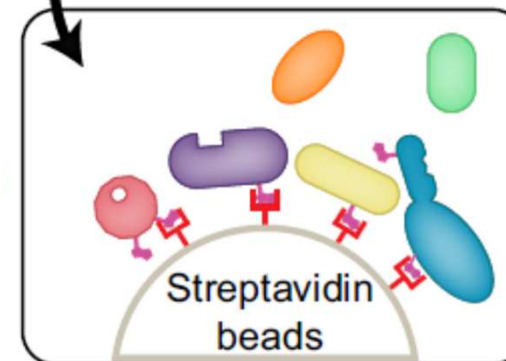
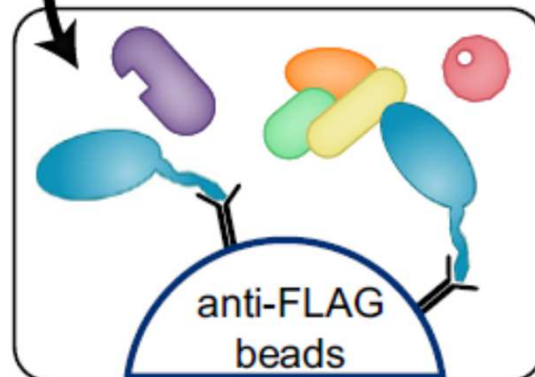


in vivo function



Biotinylace na vzdálenost <20nm

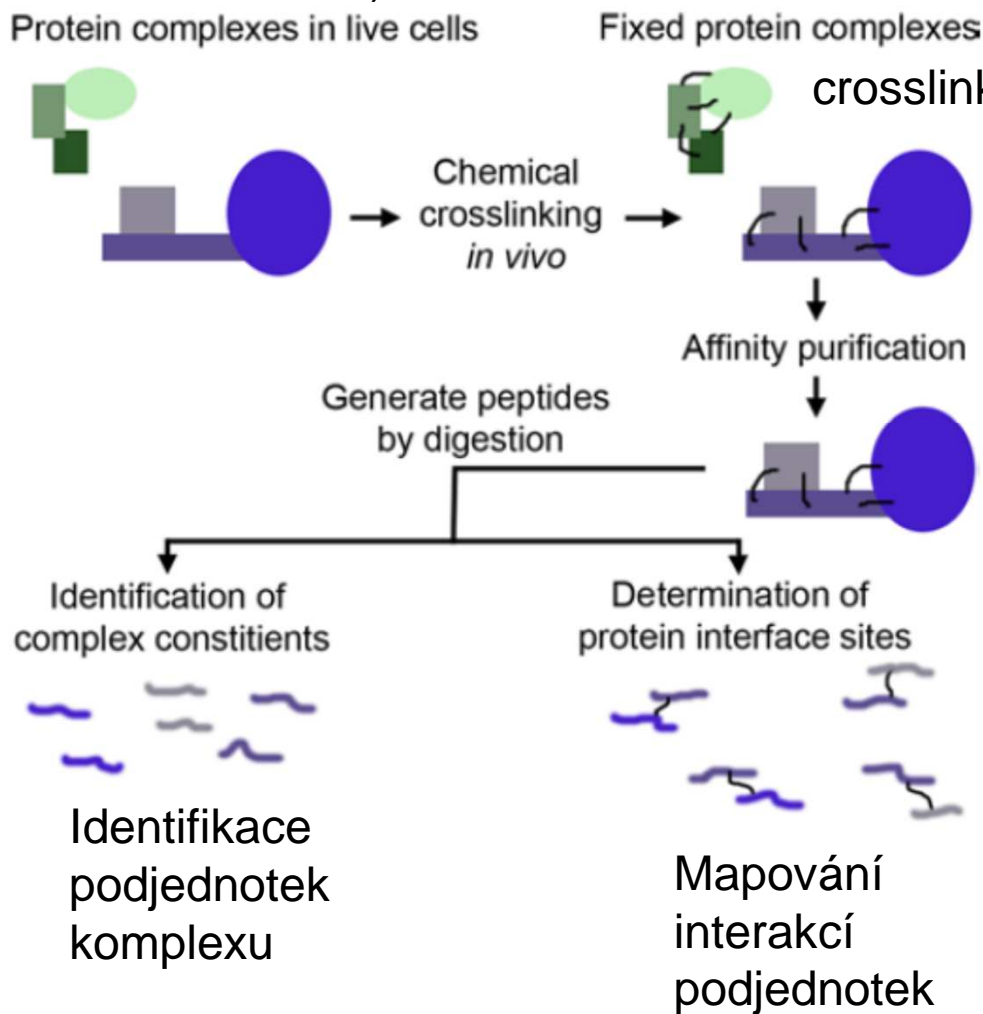
Purified interaction partners



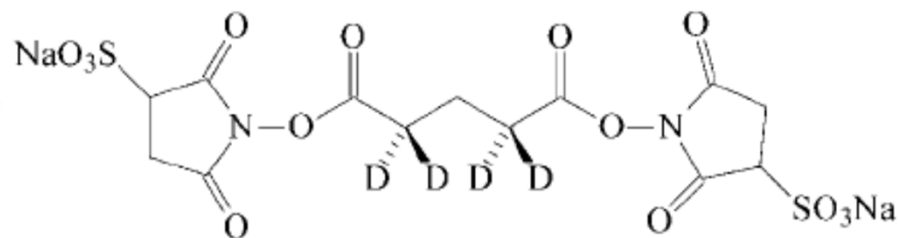
MS identifikace biotinylovaných proteinů

Mapování komplexů - crosslinking

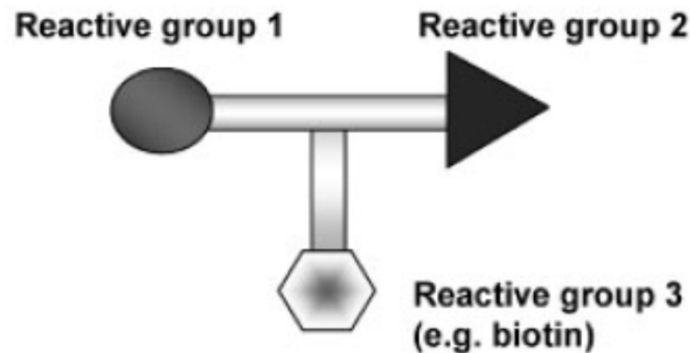
Po crosslinku komplexu lze provádět purifikaci za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu – např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovně)





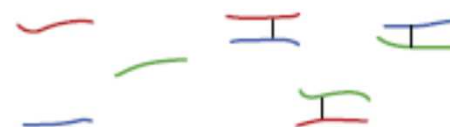



crosslink propojí podjednotky - stabilizuje komplex



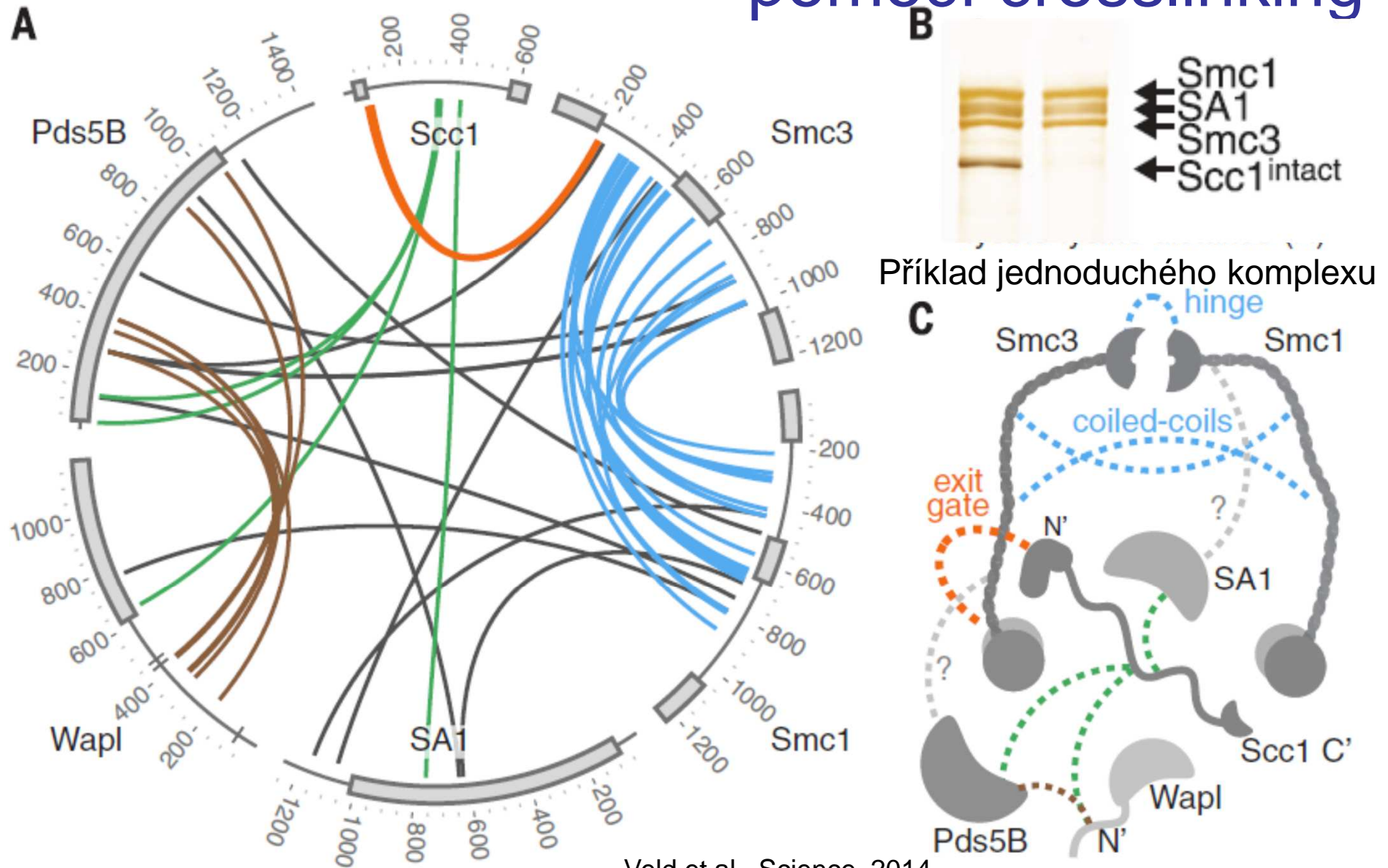
- estery reagují s Lys (ϵ -amin) a aminokoncem (homofunkční - spojí proteiny dohromady v jednom kroku; heterofunkčních - postupná aktivace)
- s tagem – přečistit (vzorek není tak komplexní pro MS analýzu)

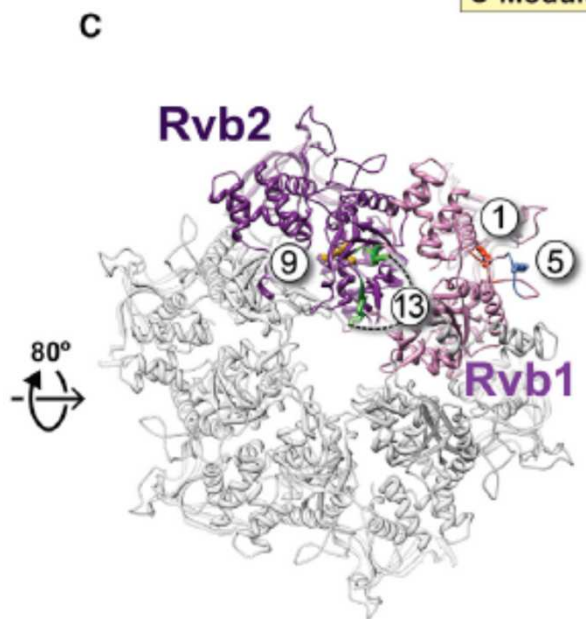
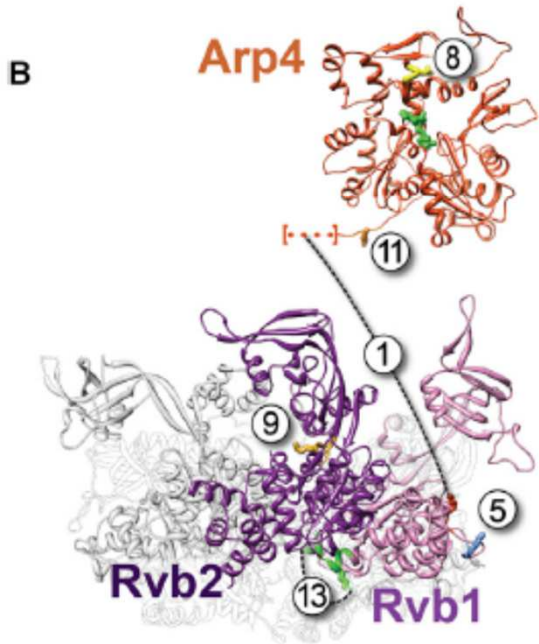
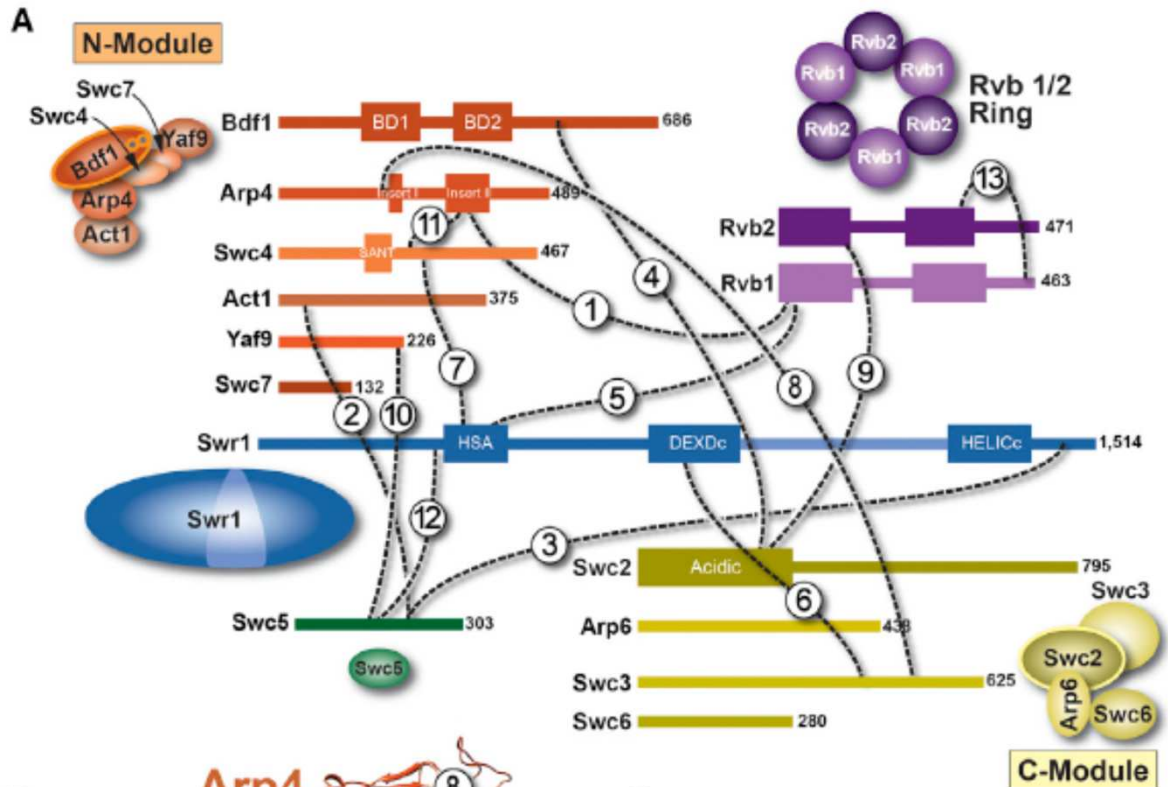


An Overview of the Crosslinking Mass Spectrometry (XL-MS) Workflow

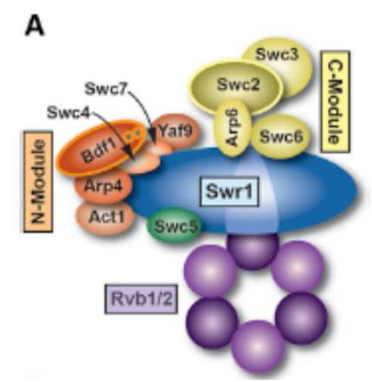
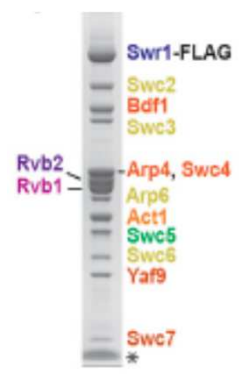
Sample type		Complexes with up to 100 subunits Pull-downs, <i>in vivo</i> applications
Crosslinking reaction		Complementary chemistry targeting acidic residues Affinity-tagged and cleavable reagents
Fractionation, enrichment		Increased use of size exclusion, ion exchange, and affinity chromatography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

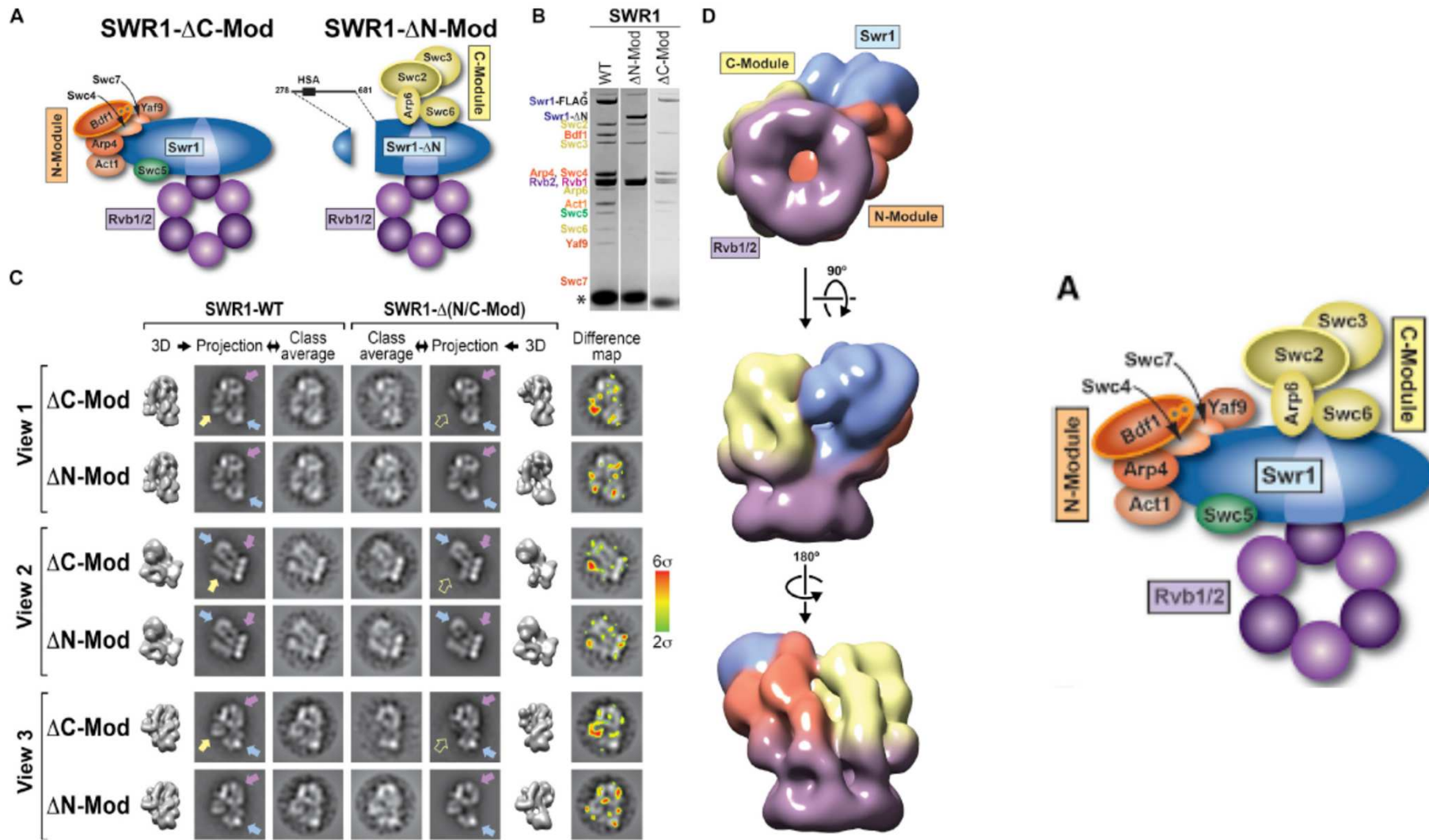




příklad velkého komplexu (zjednodušené schéma – jak jsou podjednotky „prosítovány“ – jak jsou v prostoru blízko sebe)



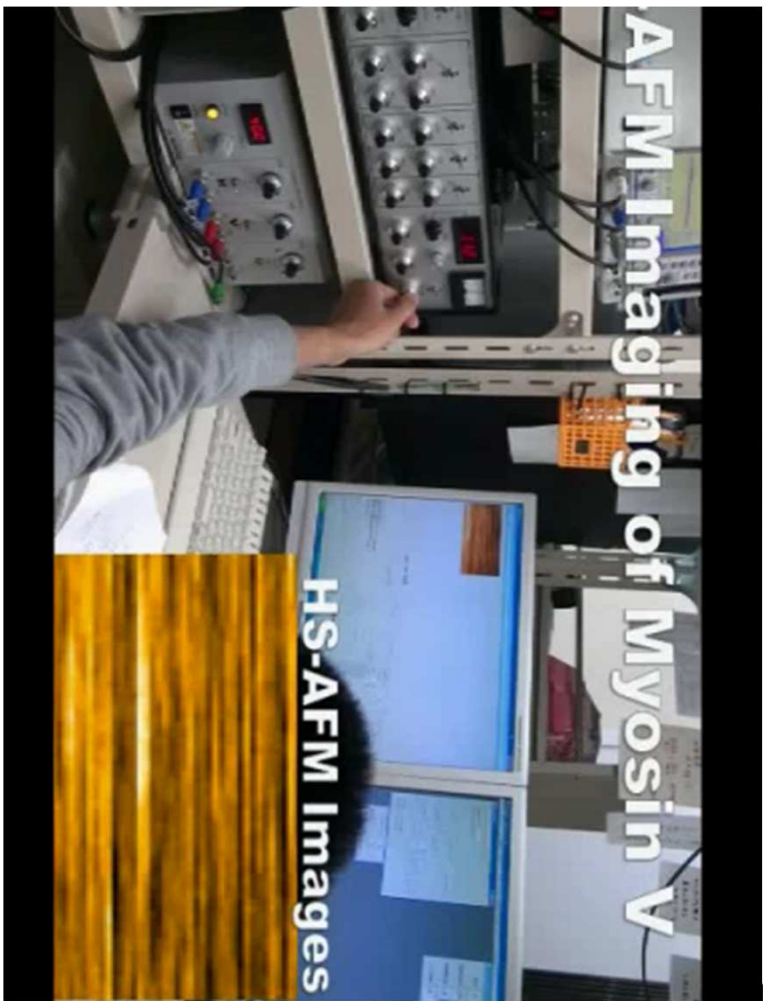
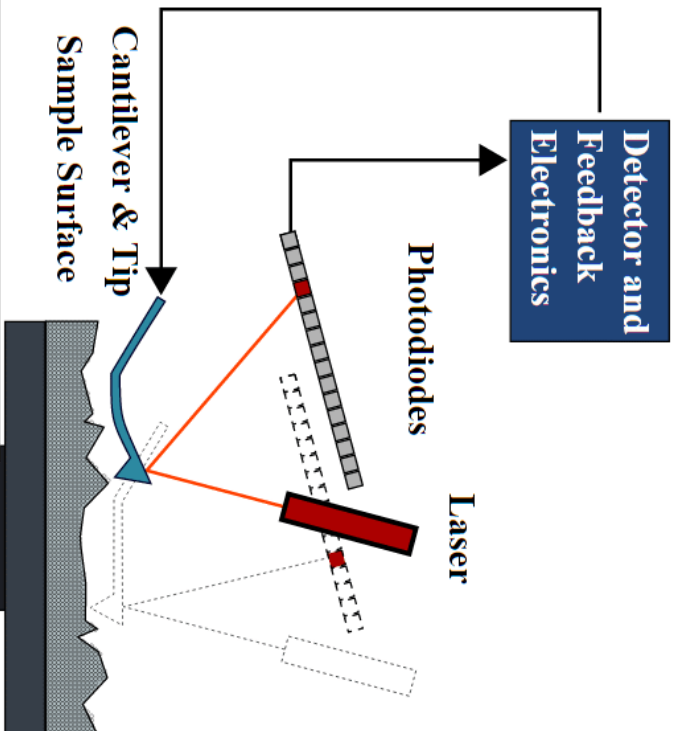
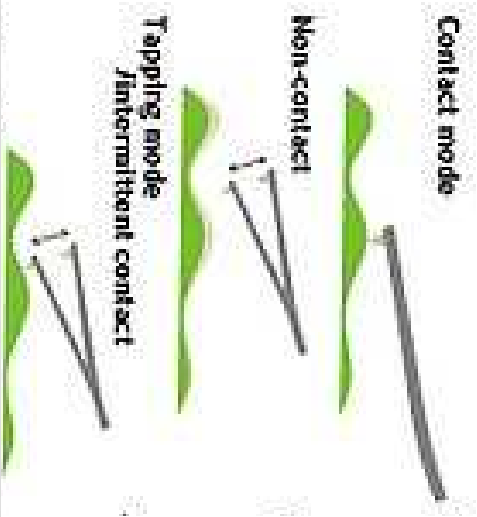
Integrace dalších dat:
 - krystalové struktury
 - cryoEM data



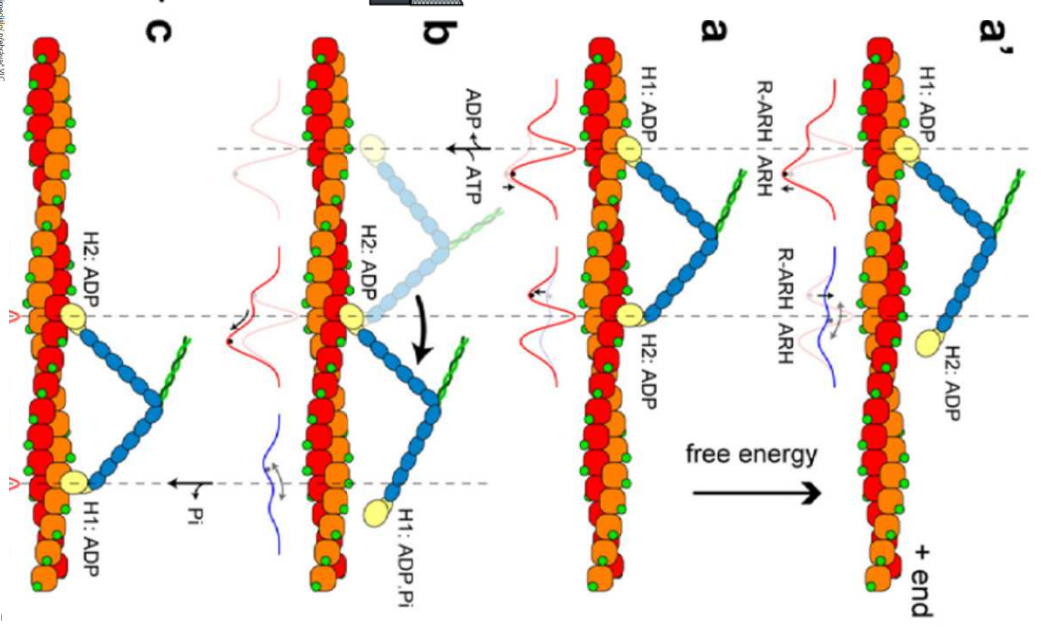
Analýza architektury komplexů (SWR = remodelovací)

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

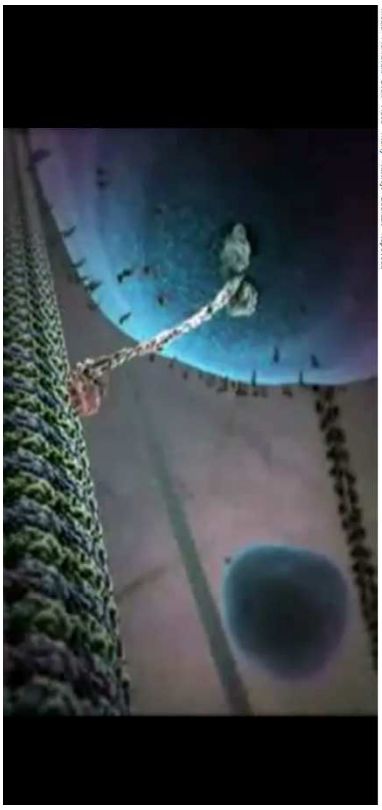
AFM atomic force microscopy



Uchihashi et al, Nat Prot, 2012



Molecular Biology of the Cell, 6th edition, published by Garland Science, © 2015



Analýza proteinových komplexů

více Metody GP

