



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 proteinové komplexy = chromosomy

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

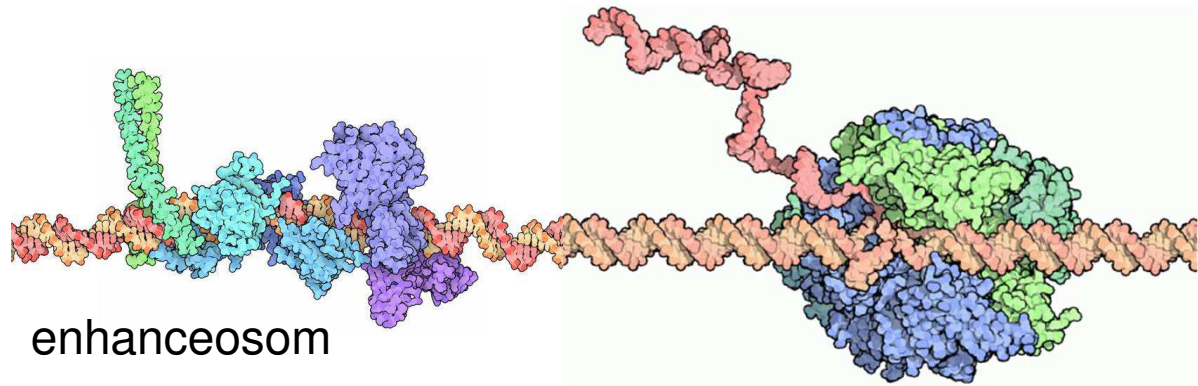
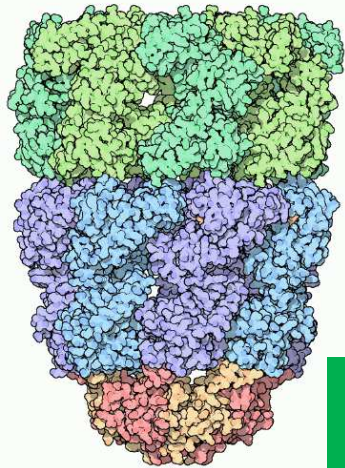
obecně

GENOM

závěrečná

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

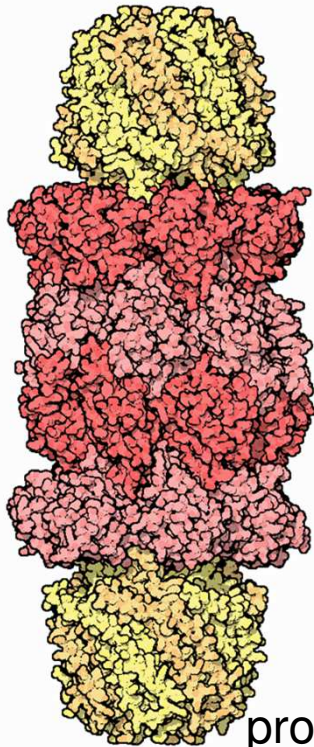
chaperon



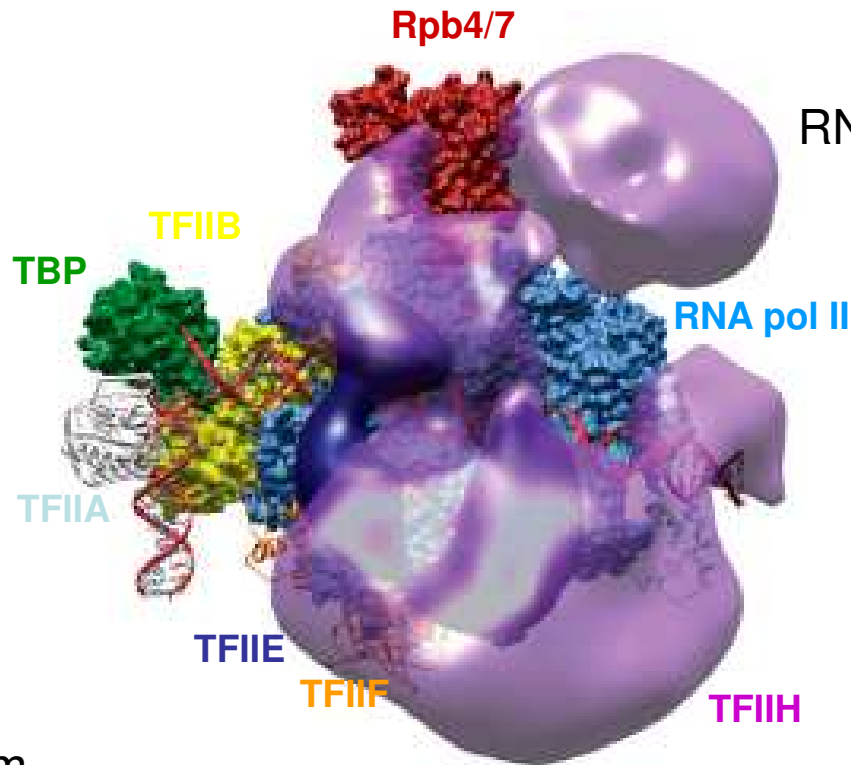
enhanceosom

RNA polymeráza

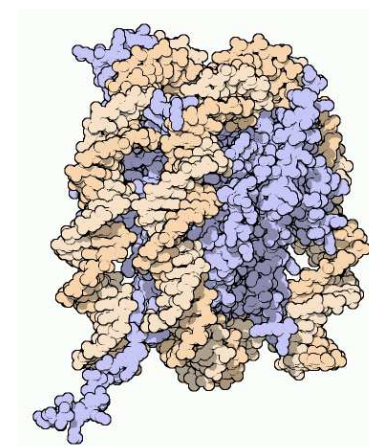
obecně



proteasom



RNA polymeráza + TFII...



nukleosom

chromatin

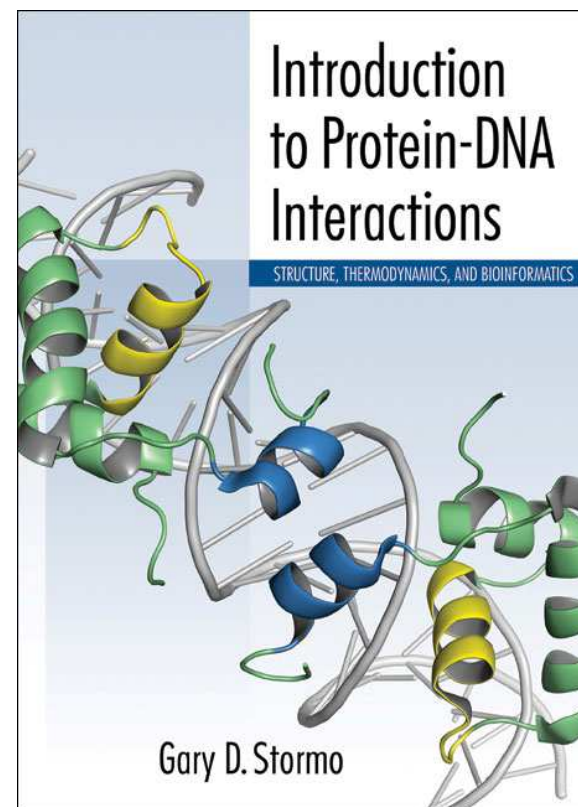
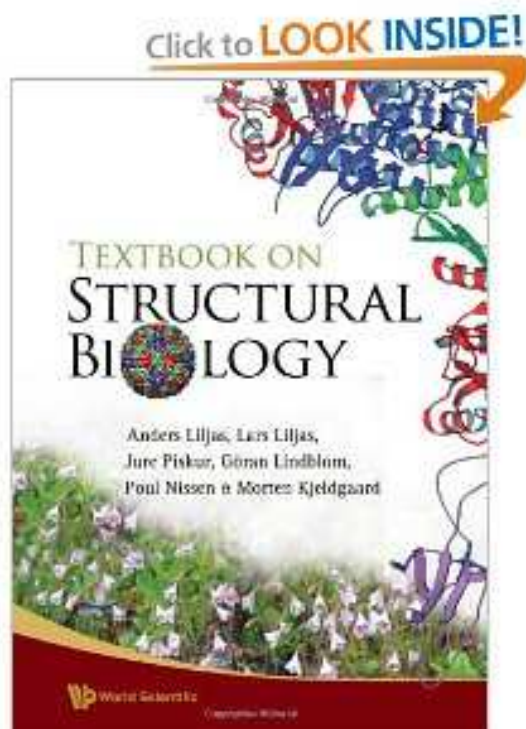
Molekula měsíce (PDB 101)

Informační zdroje

Alberts a spol: Molecular biology of the Cell

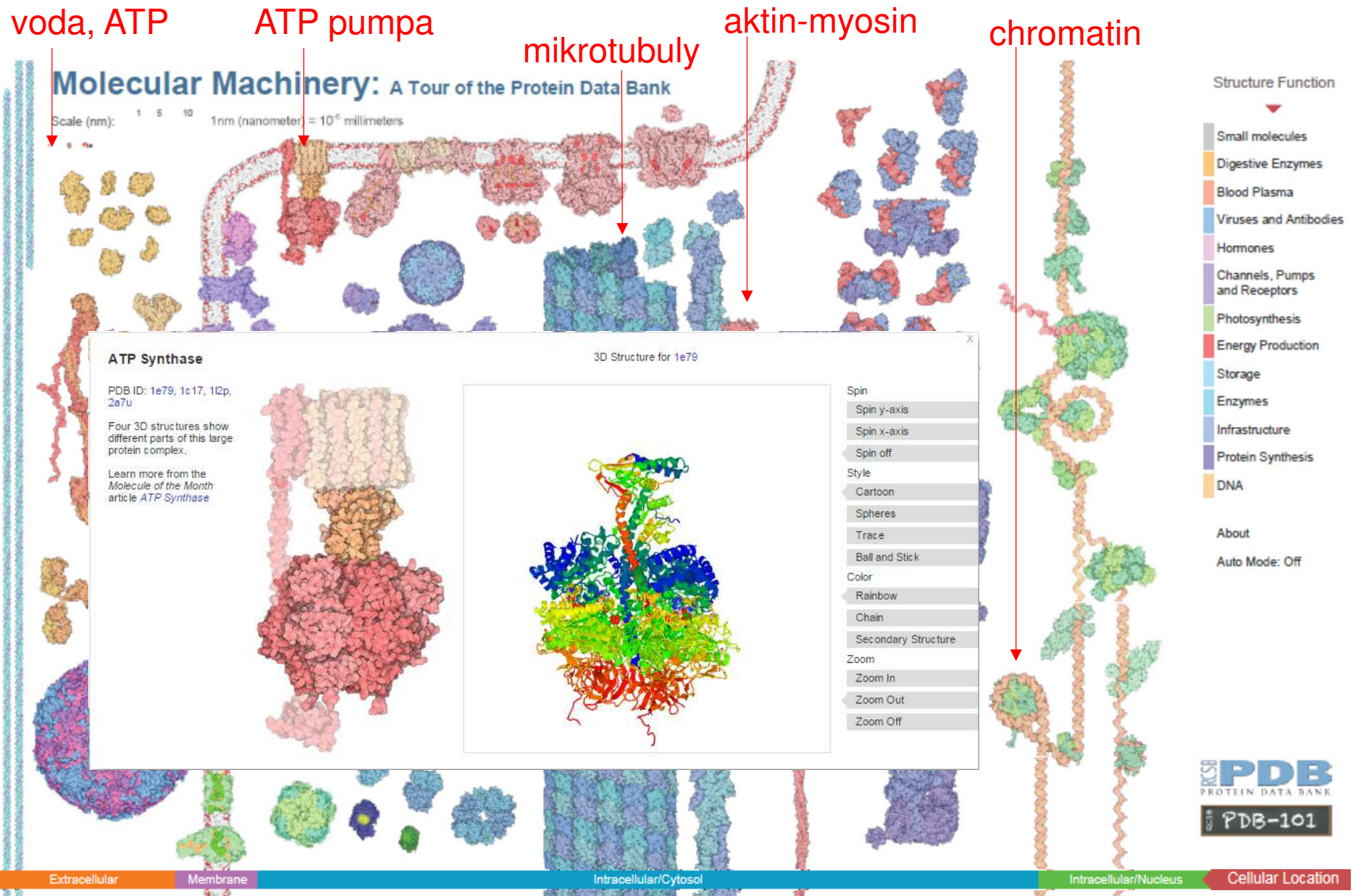
Liljas a spol: Structural biology (2009) ...

... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science ...



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

Primárním zdrojem strukturních informací = PDB



Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

Program přednášek 2017

27.02.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, analýza komplexů
05.03.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	doc. Paleček	Úvod, PPI, skládání komplexů
12.03.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	Dr. Muller	Chaperony
19.03.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	Mgr. Adamus	Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom
26.03.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, vazebné motivy
02.04.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	Mgr. Balkoová	replikace DNA
09.04.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy
16.04.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	doc. Paleček	Chromatinové komplexy
23.04.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	Dr. Šebesta	Oprava DNA, homologní rekombinace
30.04.2020	10-11.30 hod	A2-2.11	doc. Paleček	Evoluce proteinových komplexů
07.05.2020	9-12 hod	A2-2.11	doc. Paleček	Zkouška - test
14.05.2020				Dies academicus

obecně

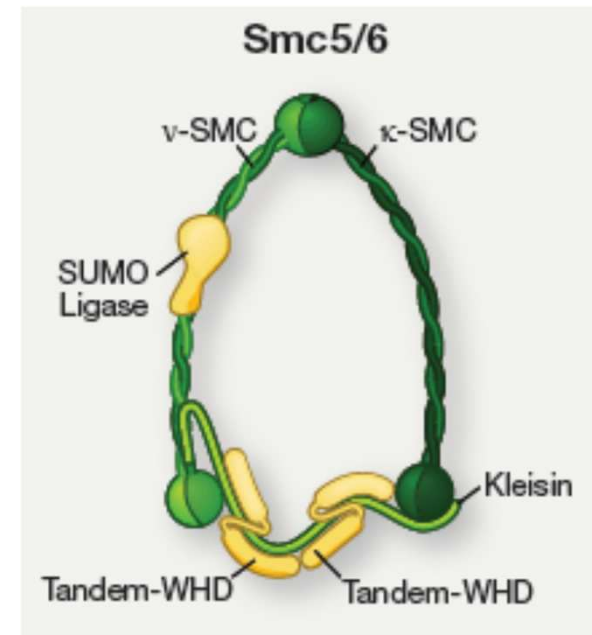
GENOM

- 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

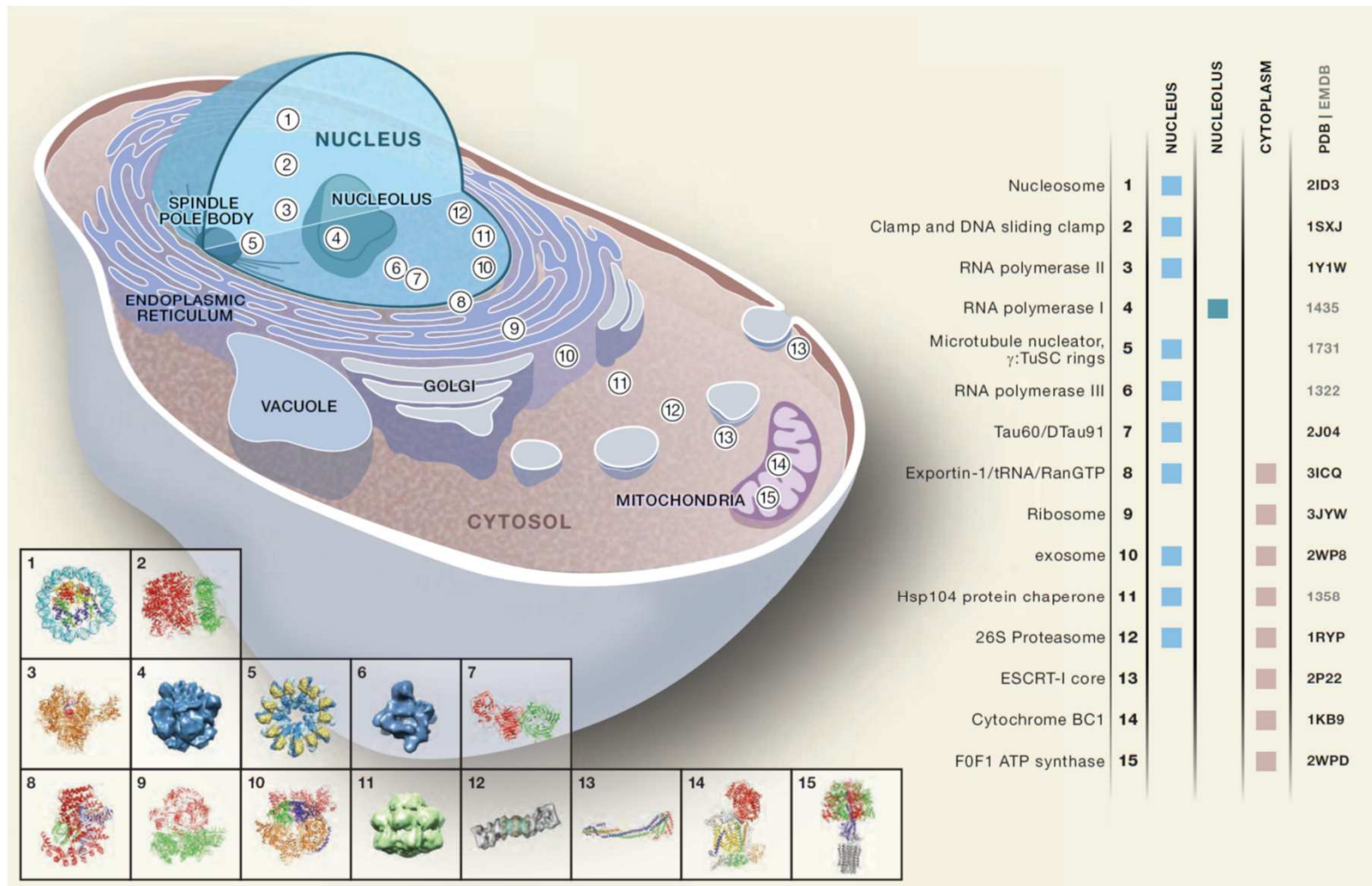
Související: Cvičení z modelování proteinových komplexů (CG031),
Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041, prof. J. Fajkus),
Metody proteomiky (CG090) ...

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 ...



~1000 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**
 - vzájemné PPI podjednotek - architektura/struktura komplexu
 - funkce podjednotek (genetická analýza, lokalizace v buňce)
- 3. - rekonstituce a analýza aktivit celého komplexu *in vitro***

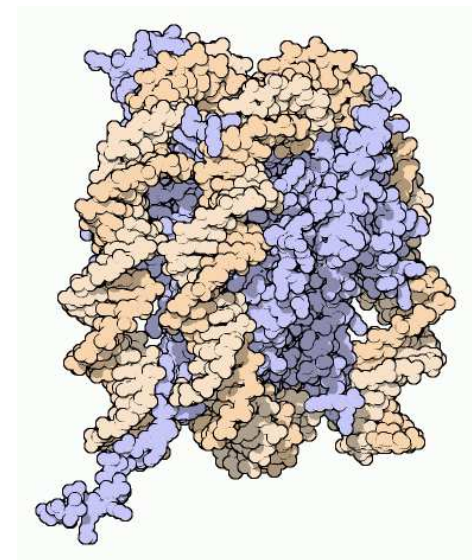
Metody izolace a analýzy proteinových komplexů

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, X-ray, (cryo) elektronová mikroskopie

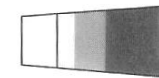
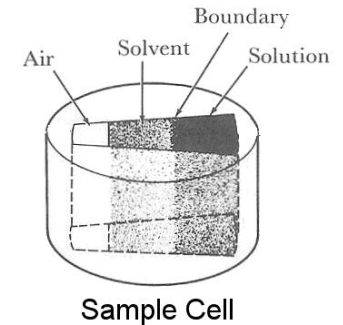
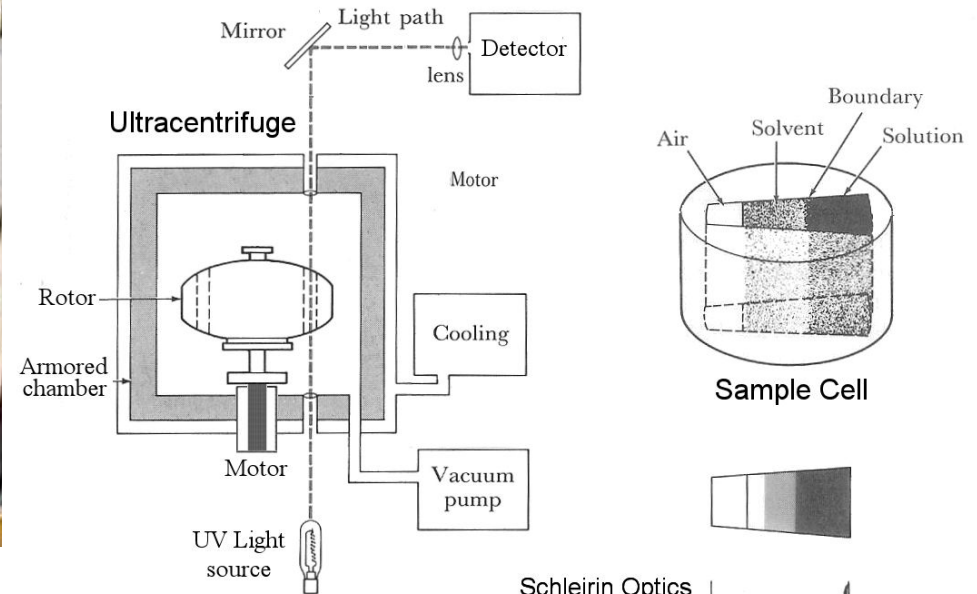
(Prolínají se i metody pro komplexy a PPI - viz *MePro* – **30.3.2020**)

... vizualizační metody

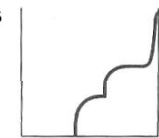


Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)

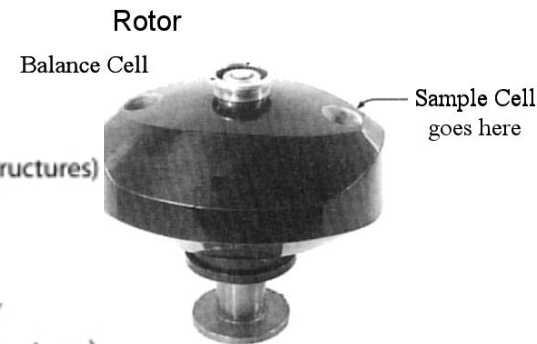
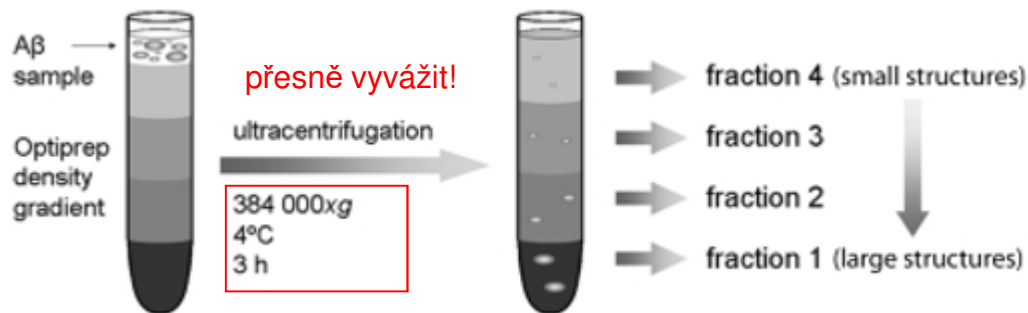


Schleirin Optics (schematic)



Centrifugal force

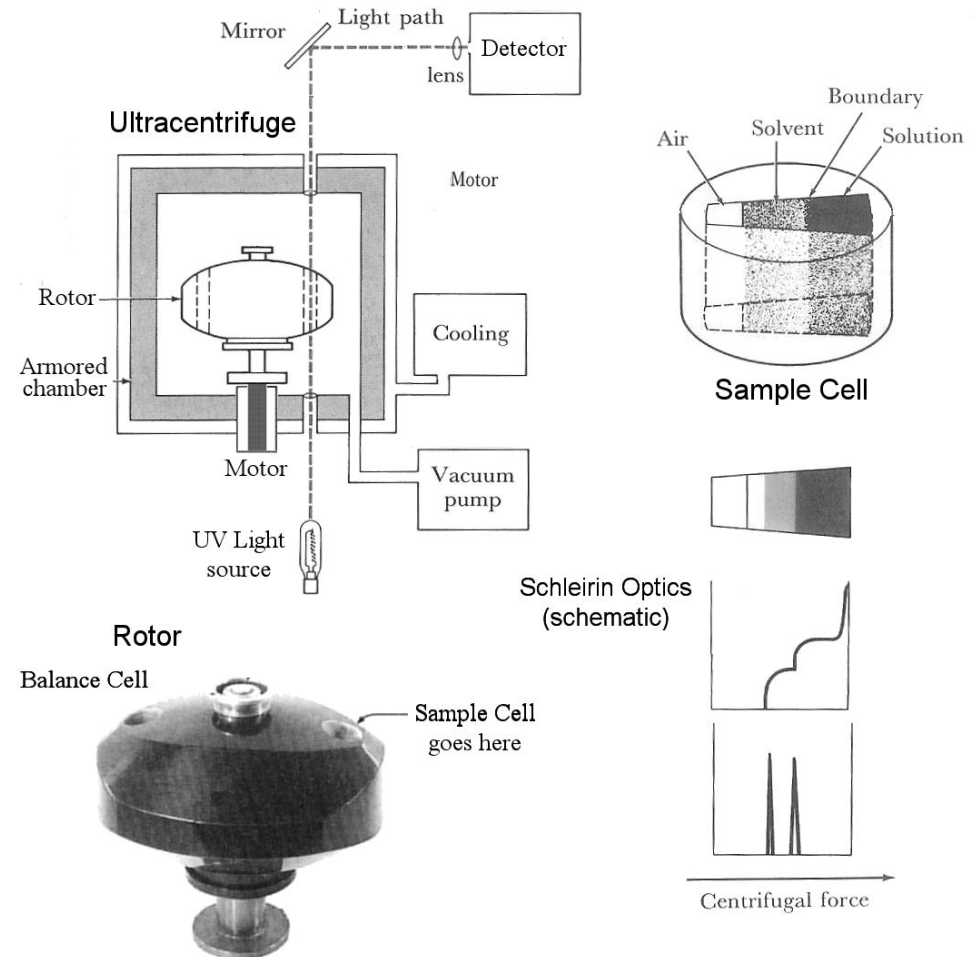
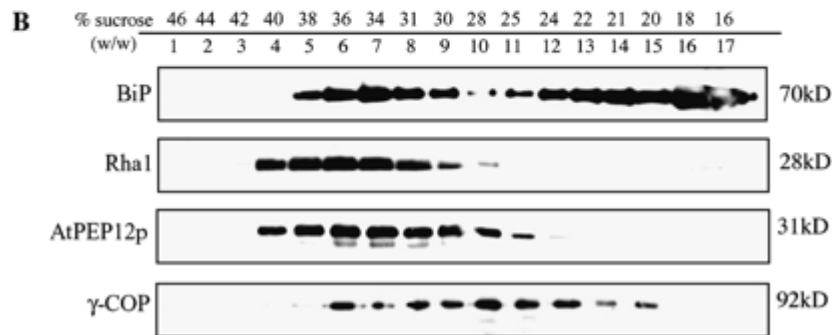
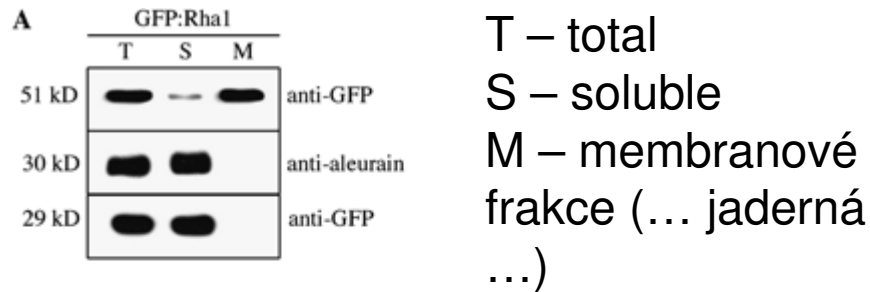
Cukerný/hustotní gradient



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

Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



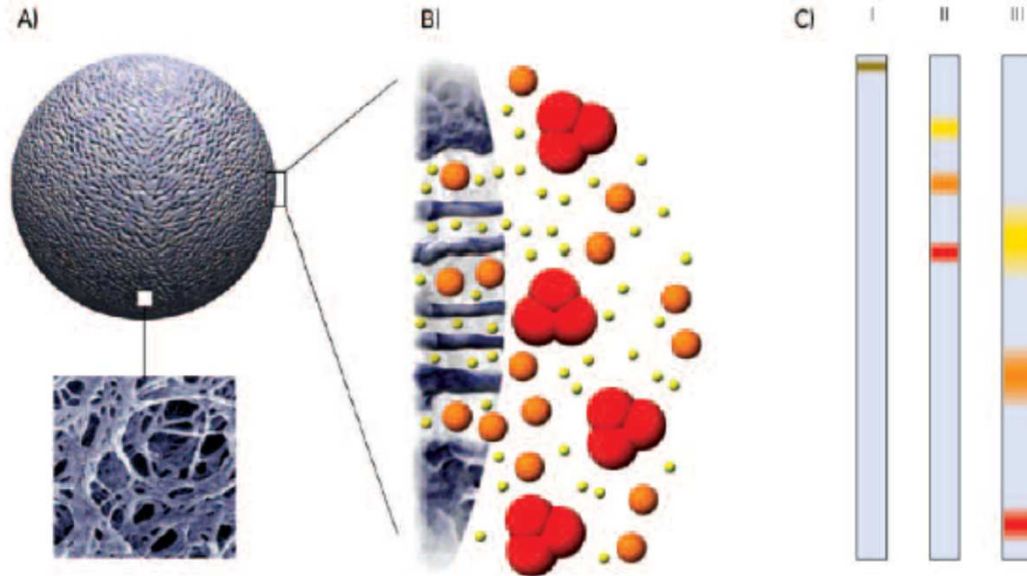
- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely - lokalizace
- B. Jemný - cukerný gradient - izolace

Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

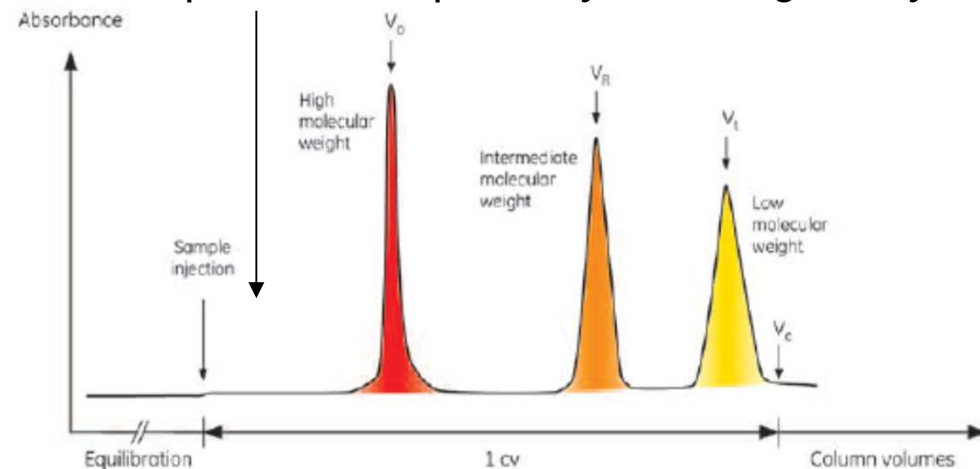
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

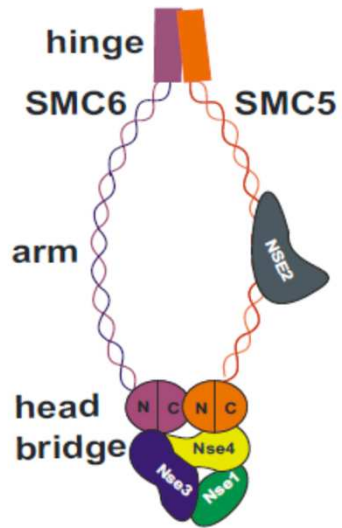
Metody izolace a analýzy PKxů

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

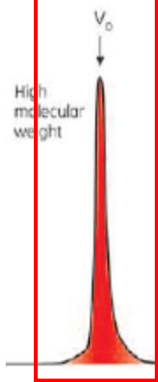
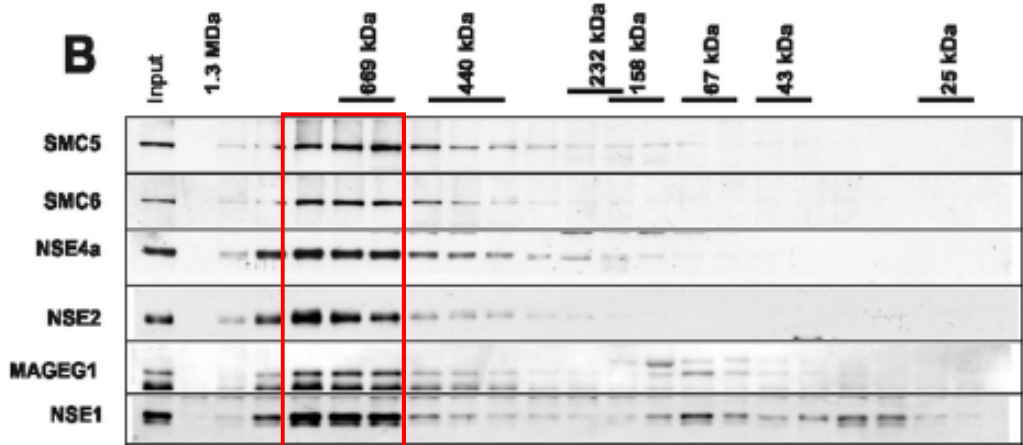
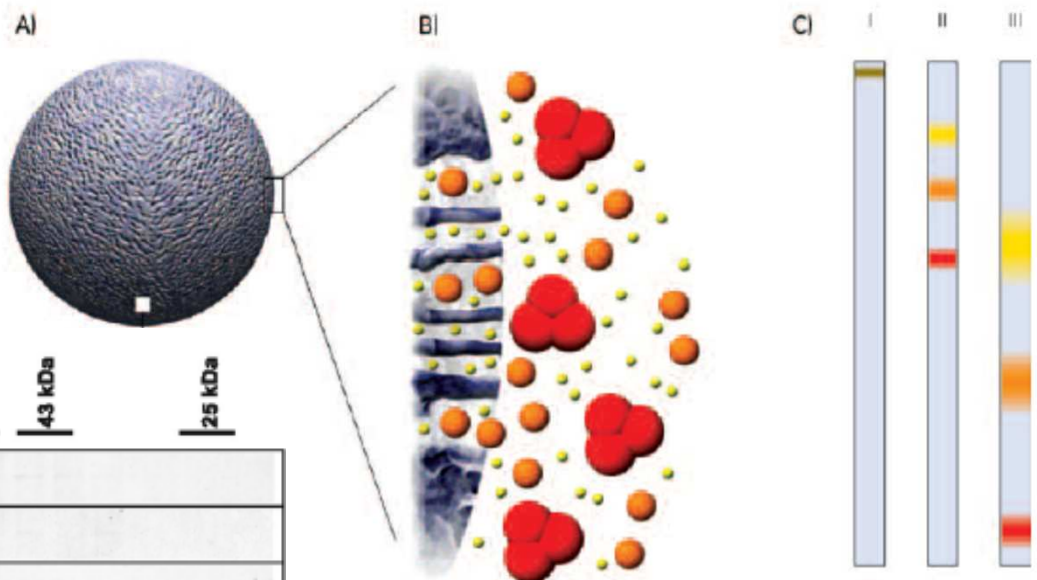


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty

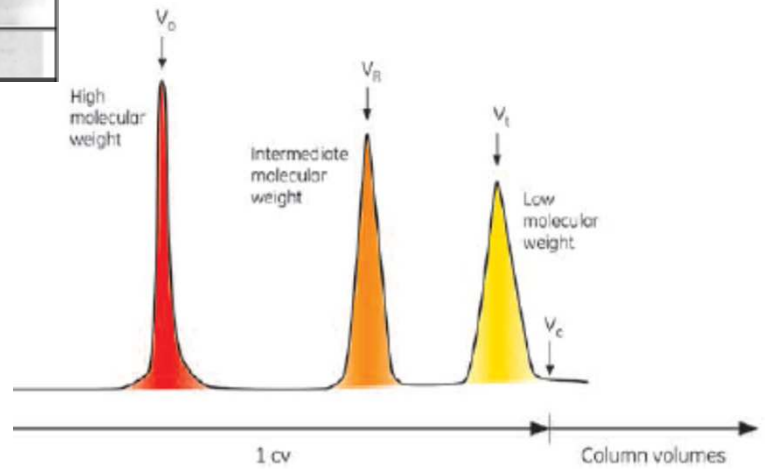




Příklad: SMC5/6 komplex – v buněčném lyzátu (nebo purifikované proteiny)



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



Taylor et al, MCB, 2008

Metody izolace a analýzy PKxů

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



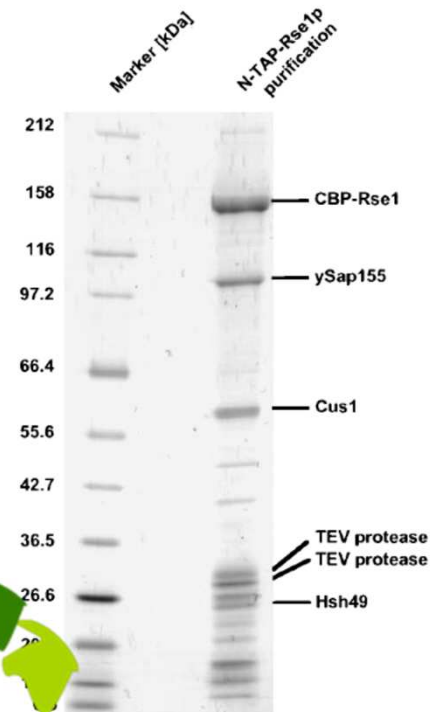
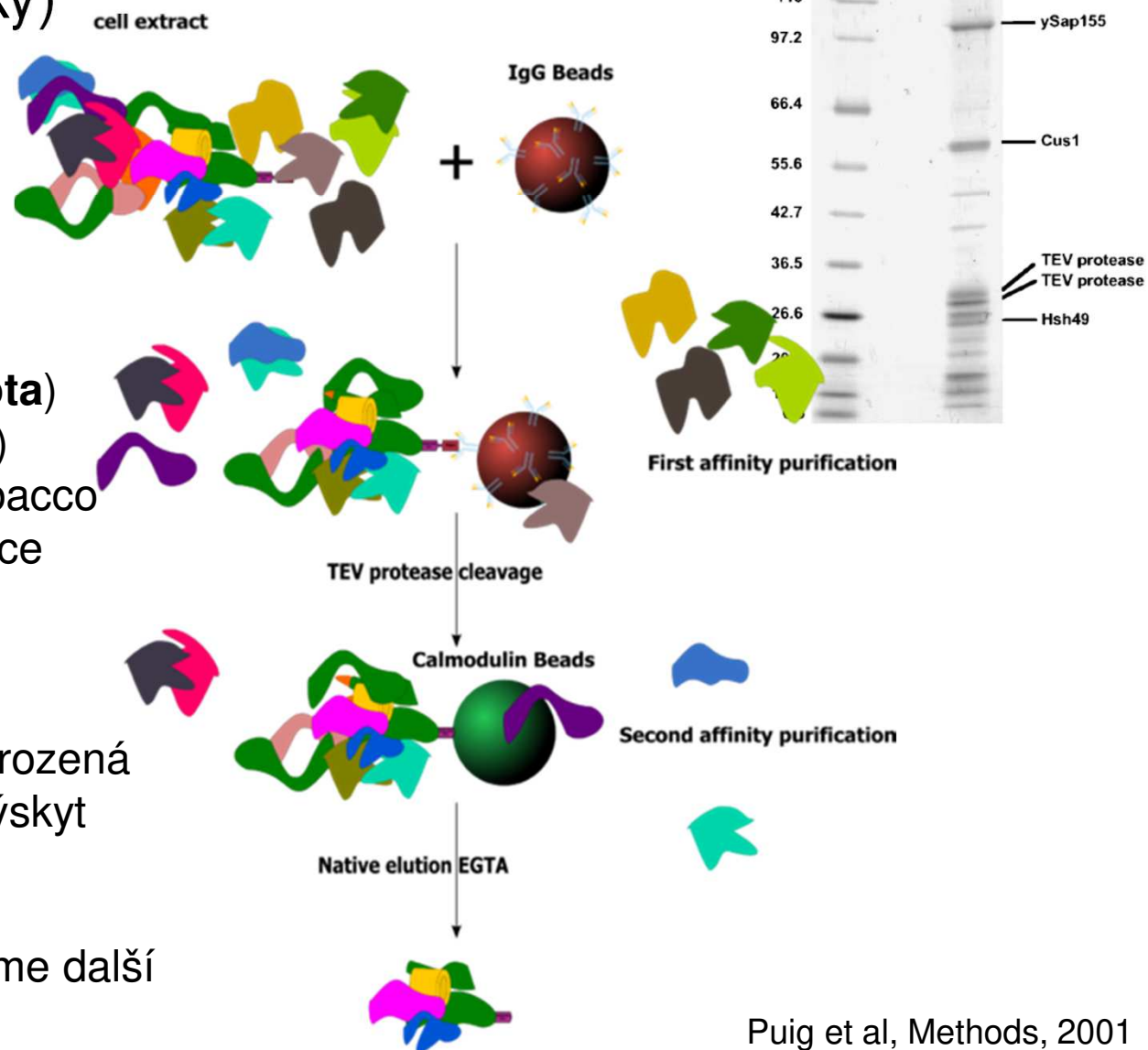
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

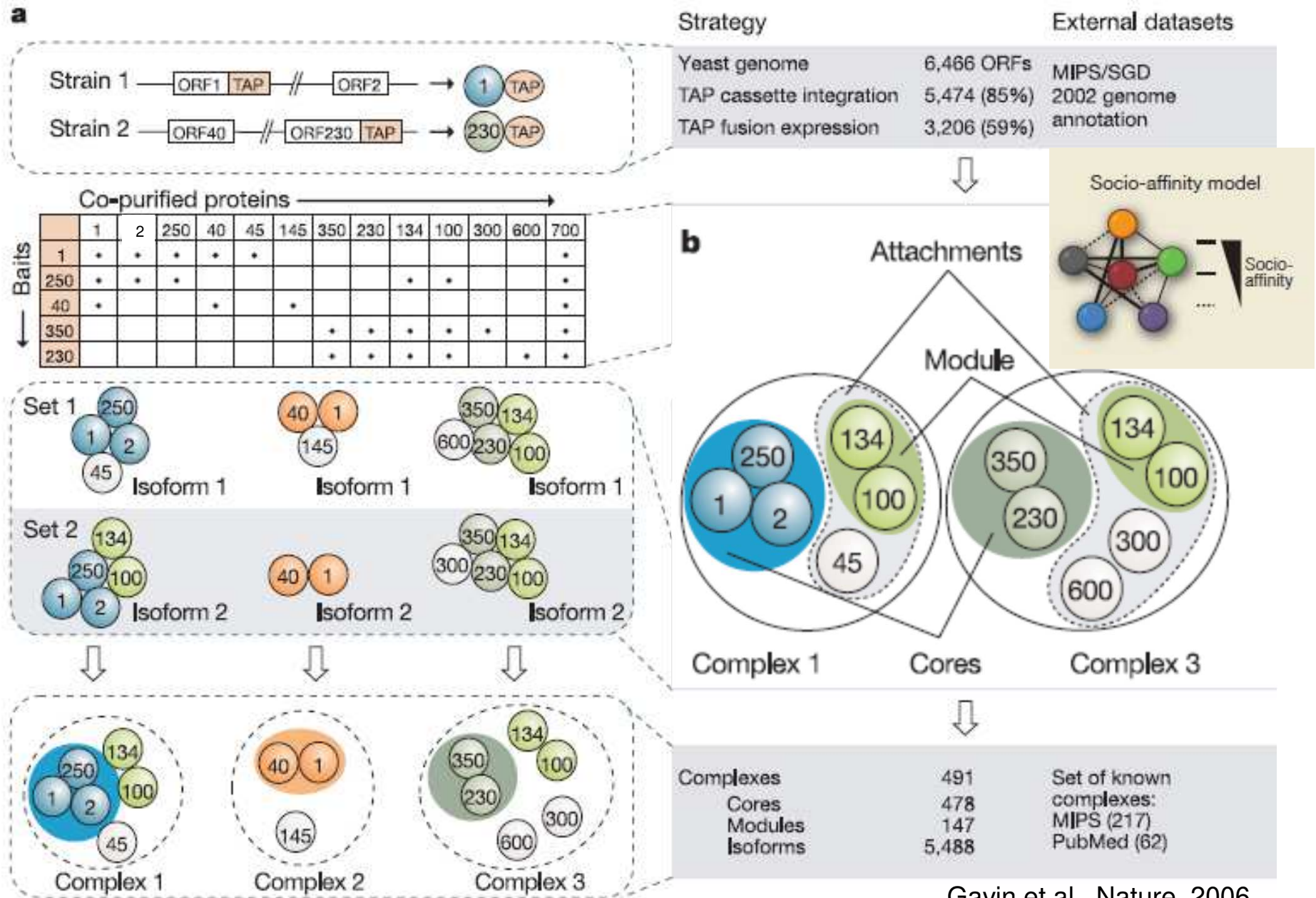
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

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

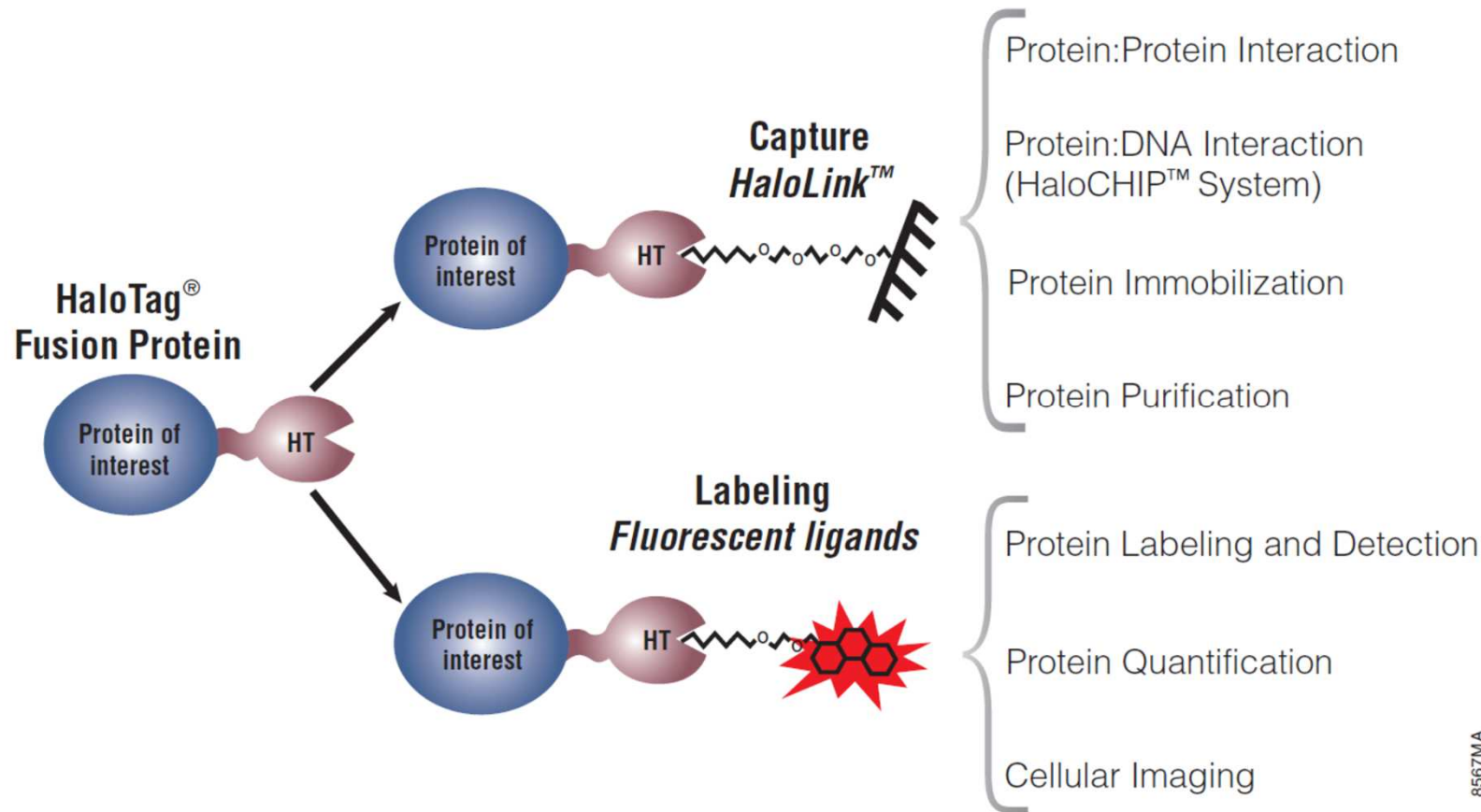
známe jeden protein – hledáme další podjednotky



Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



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)

Různé přístupy charakterizace komplexů

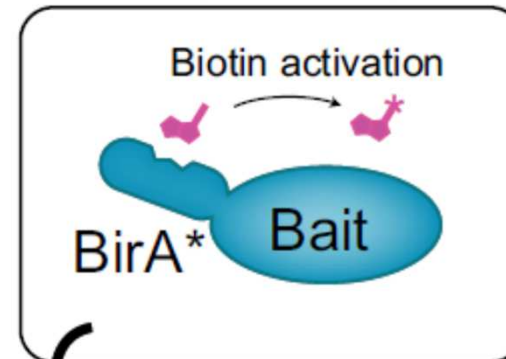
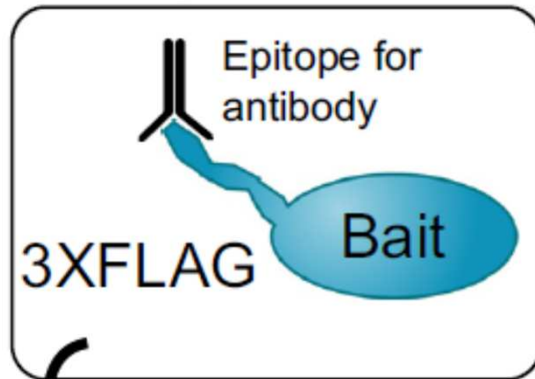
klasický

alternativní

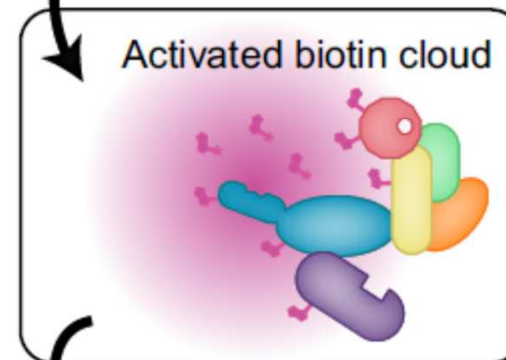
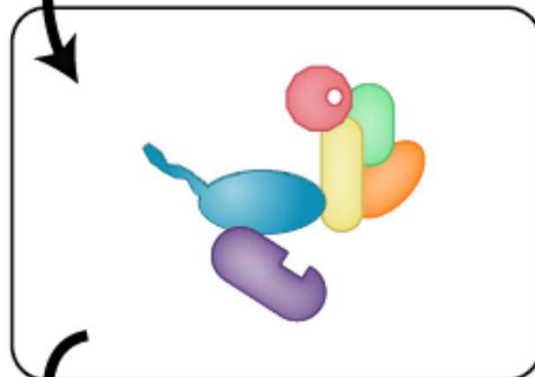
Affinity Purification

BioID (Proximity Biotinylation)

Tagging system

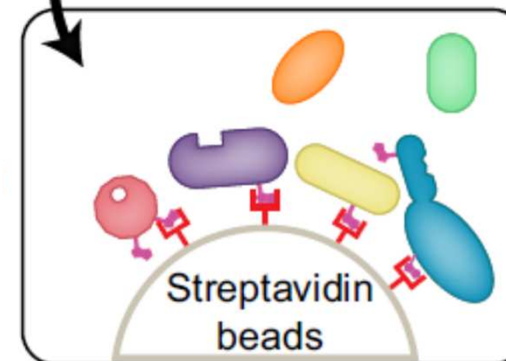
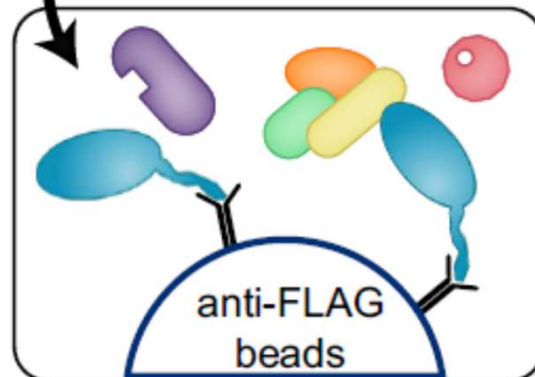


in vivo
function



Biotinylace na
vzdálenost
<20nm

Purified
interaction
partners



MS identifikace
biotinylovaných
proteinů

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



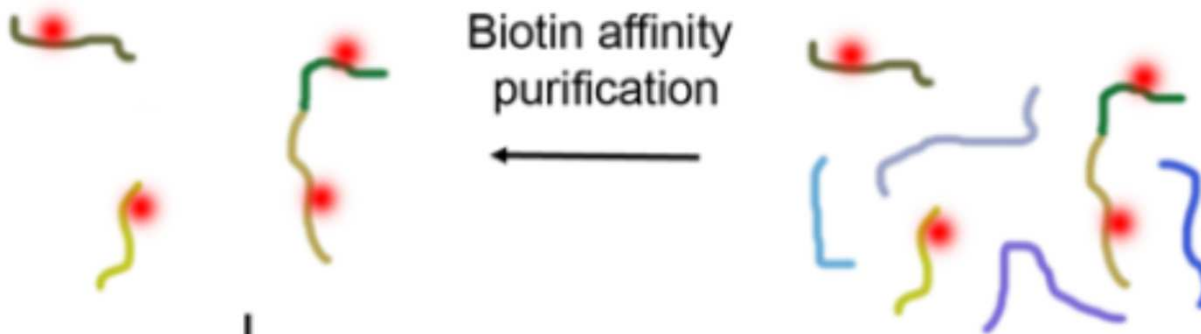
BirA biotin ligáza (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells



Lyse cells

Denature proteins



Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

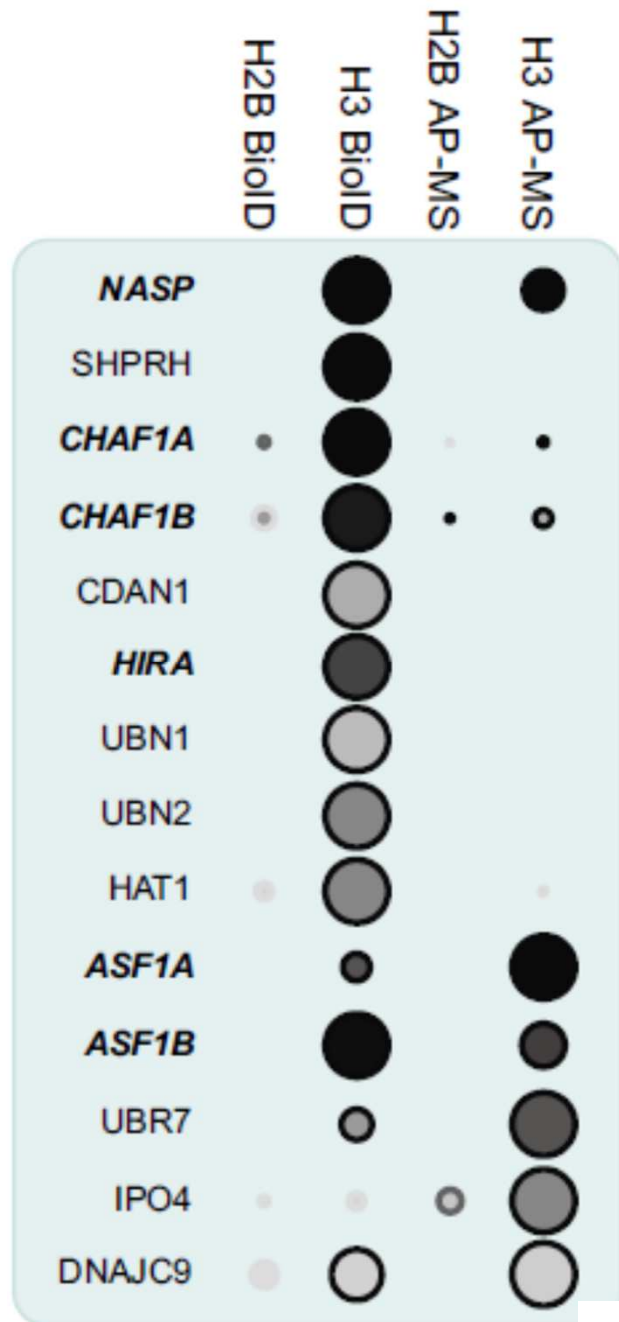
Mass spectrometry
to identify candidates

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

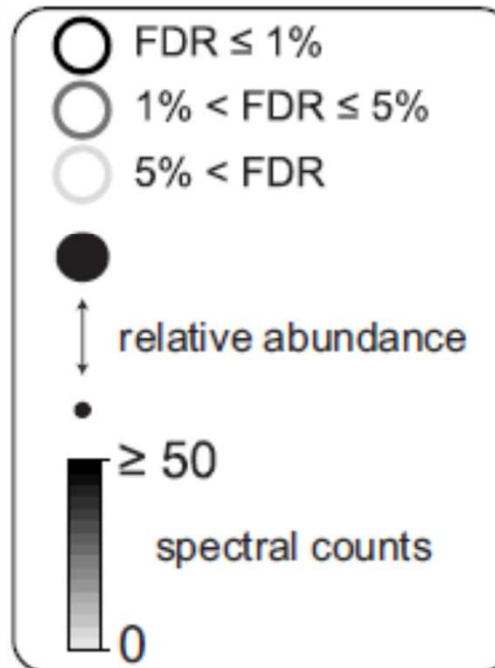
Např. chromatin-asociované komplexy jsou hůř rozpustné – izolace za denaturačních podmínek

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
(16.4.2020)



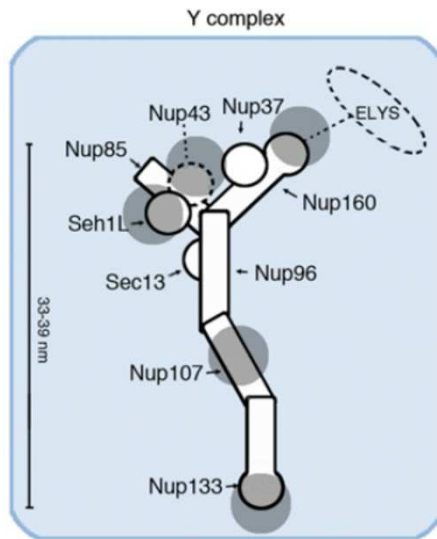
Přidání biotinu v určitém čase (rychlé připojení) – pulse-chase – lze sledovat interakce v čase (např. buněčný cyklus)

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

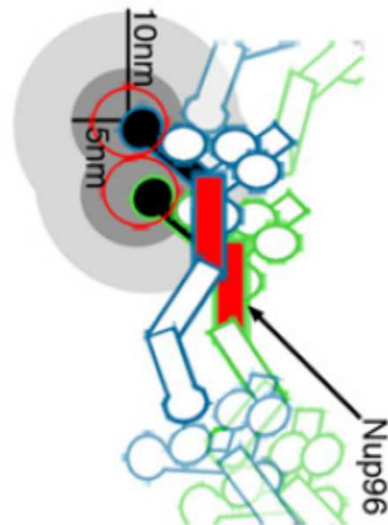
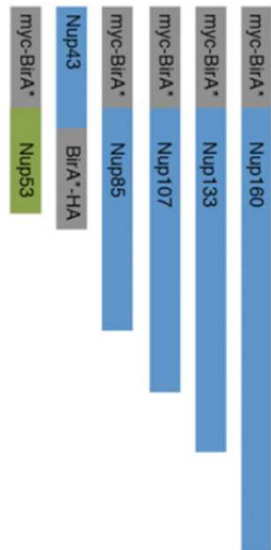
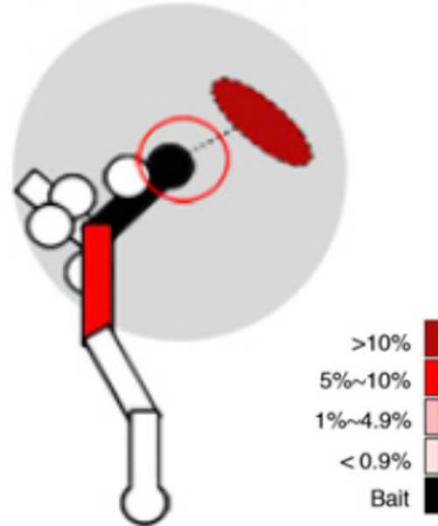
Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „sousedící“ proteiny <20nm))

Metoda BioID – organizace komplexů

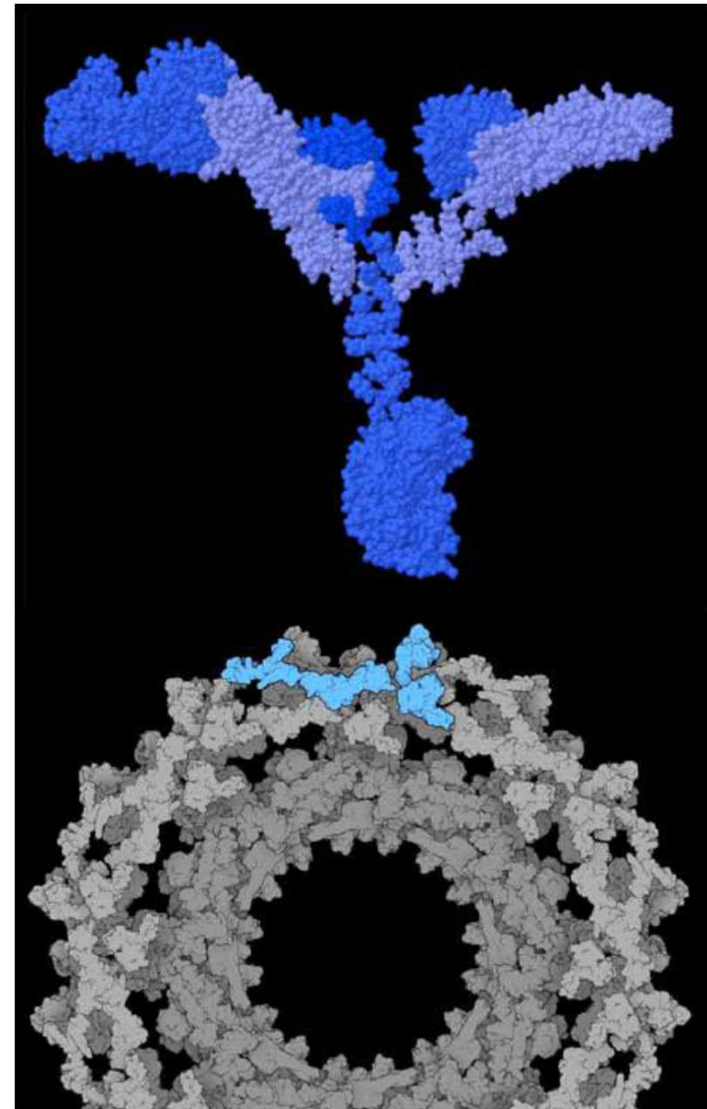
Dosah biotinylace je 10-20nm – lze využít k mapování „blízkých“ proteinových sousedů ve velkých komplexech



Nup160



Nup160



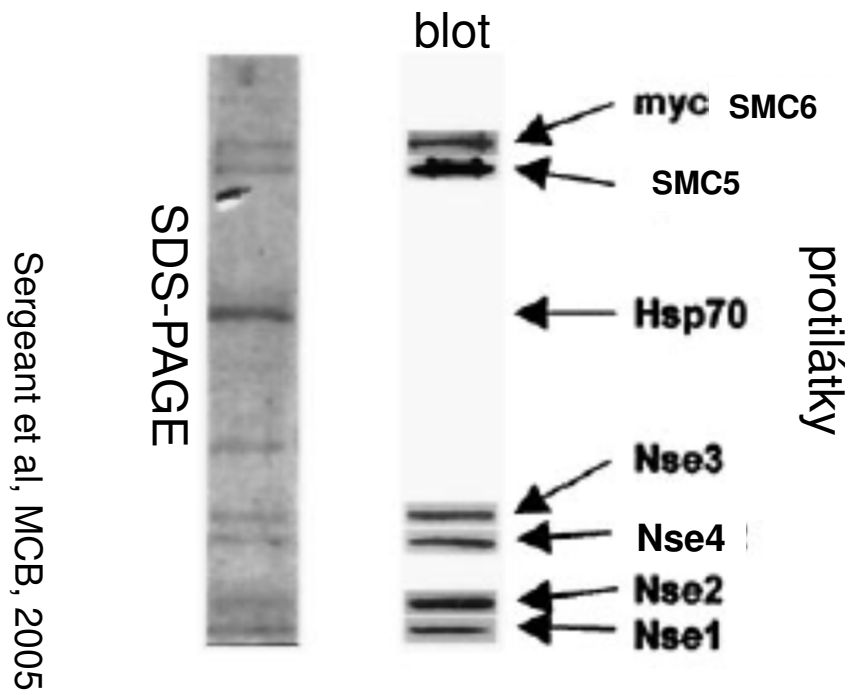
Ko-imunoprecipitace

Jednoduché tagy/značky:

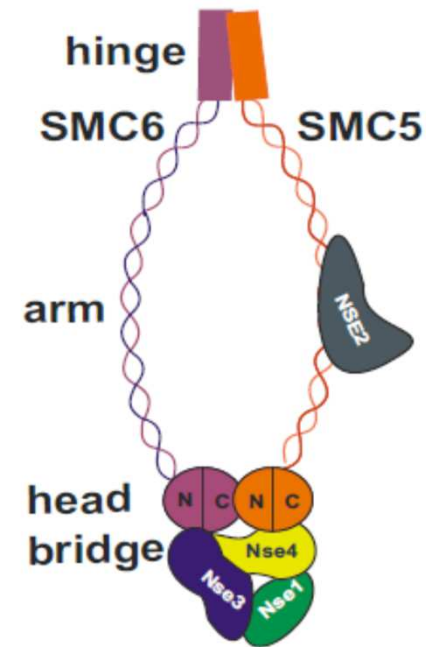
Myc, FLAG, V5, S-tag, GFP (vazba přes protilátky)

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

Kompetiční eluce (peptidy nebo ligandy)



Sergeant et al, MCB, 2005



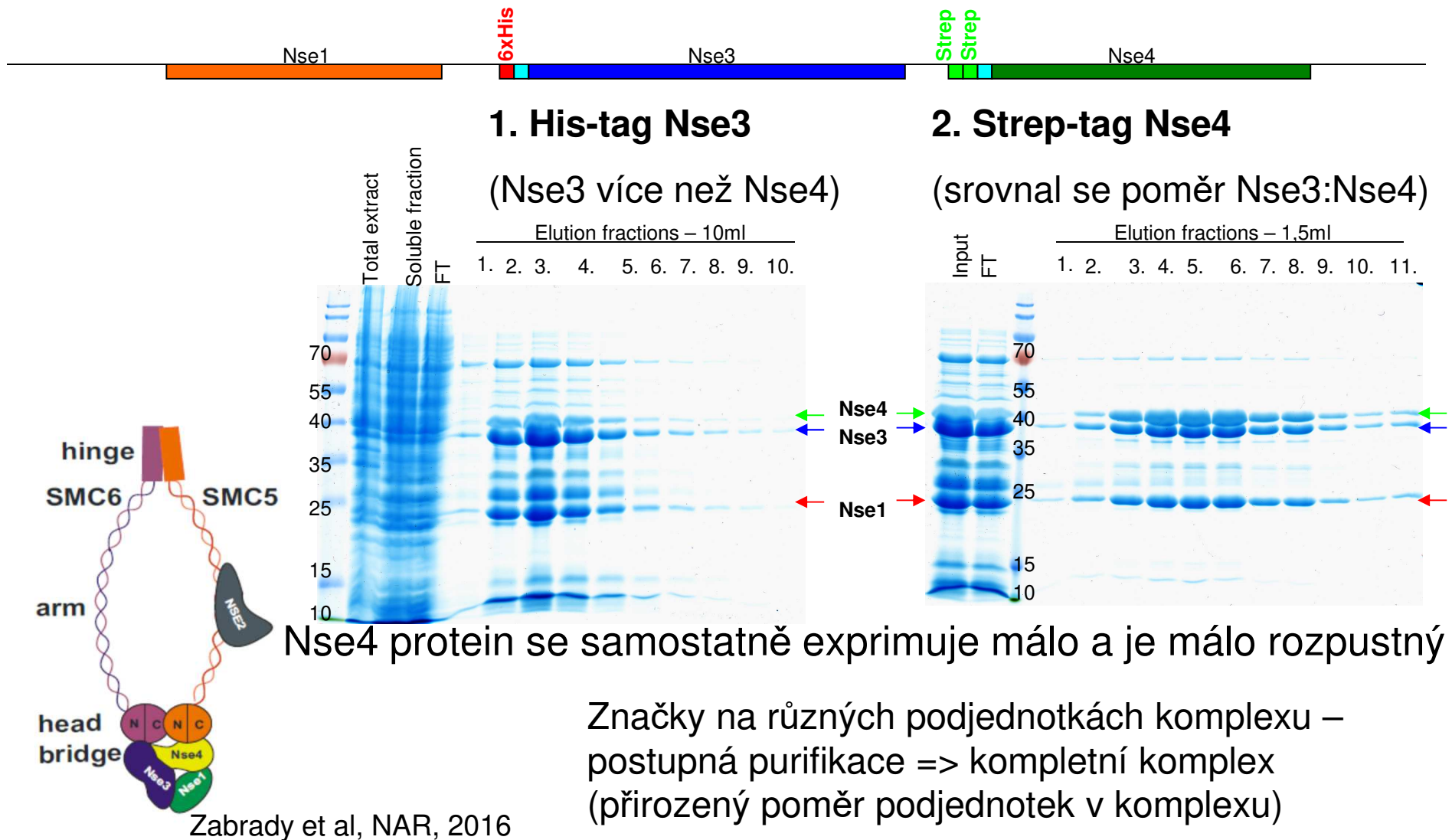
Pozor na kontaminace
(např. chaperony)

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

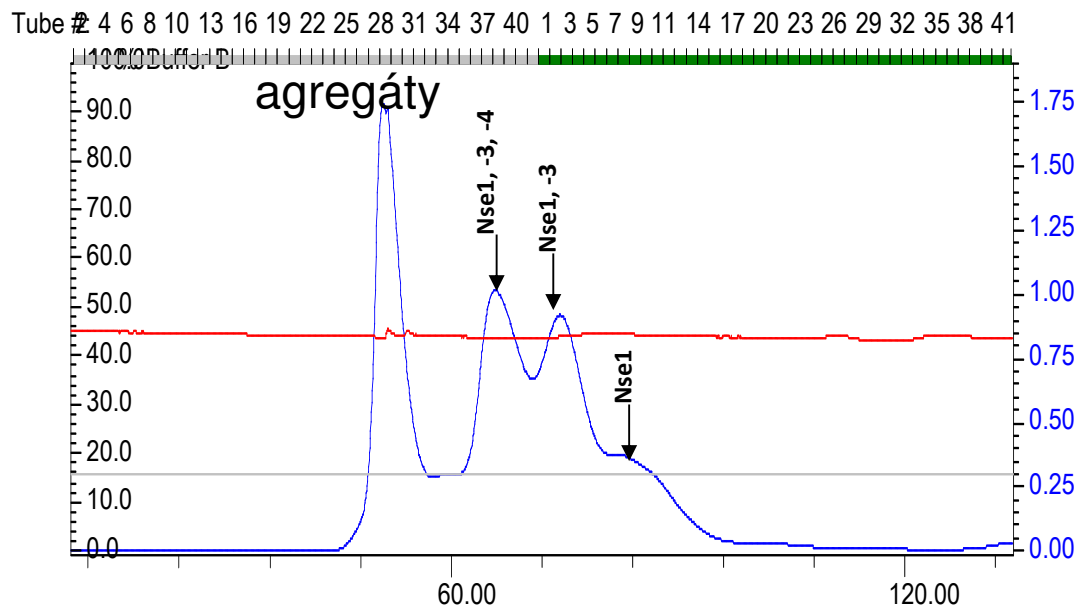
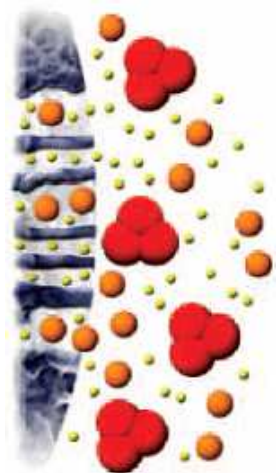
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**



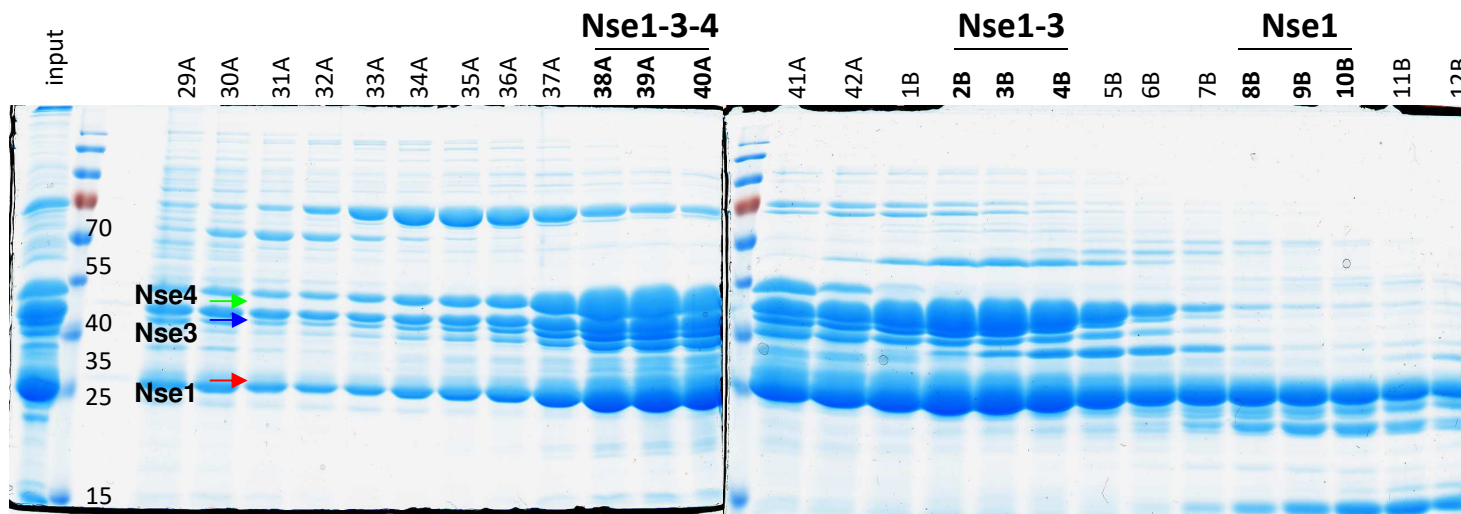
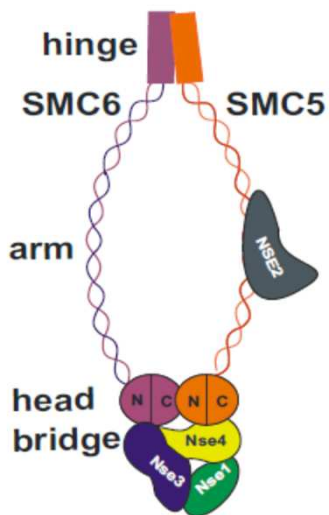
Nse4 protein se samostatně exprimuje málo a je málo rozpustný

Značky na různých podjednotkách komplexu –
postupná purifikace => kompletní komplex
(přirozený poměr podjednotek v komplexu)

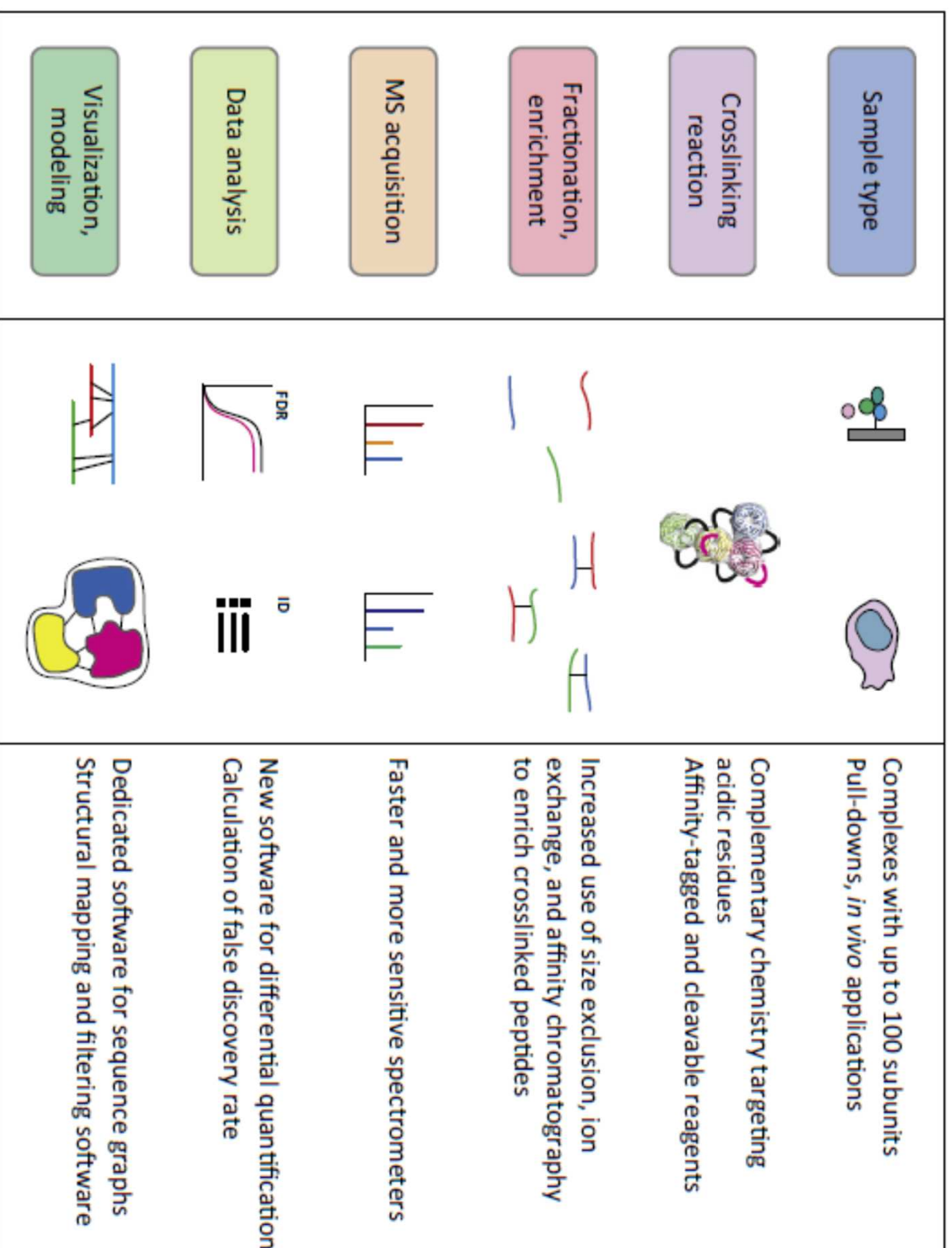
Ko-purifikace



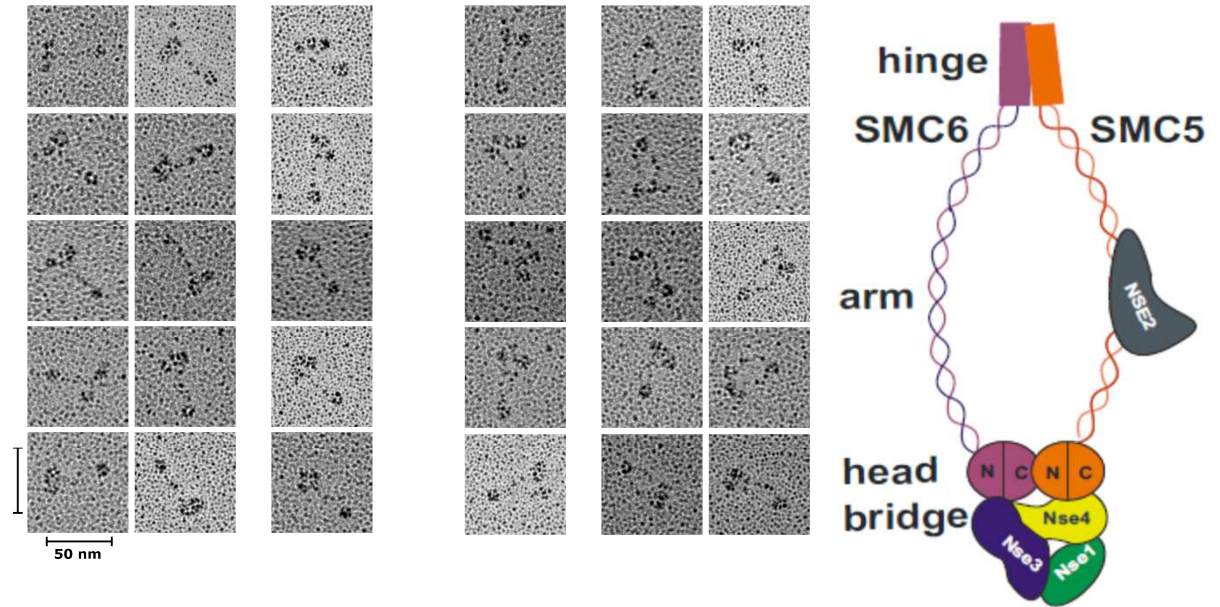
3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů



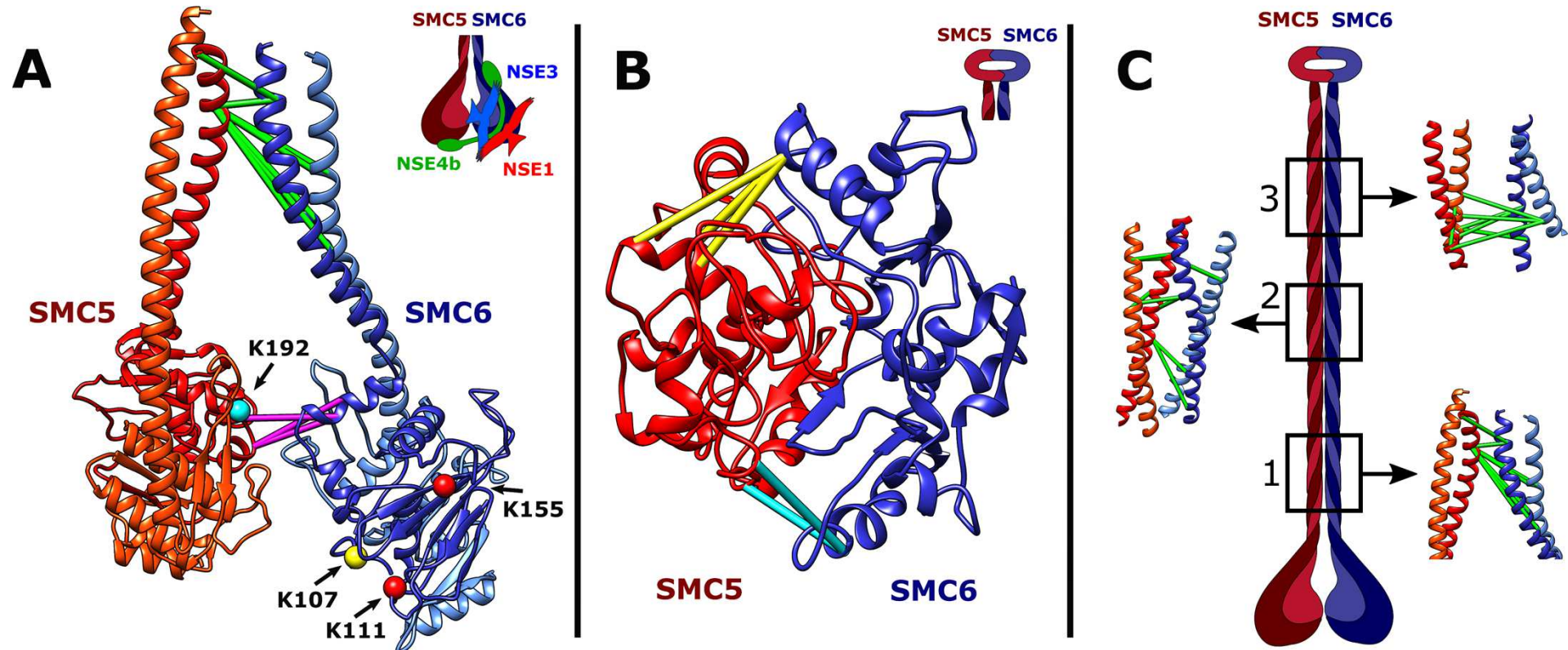
An Overview of the Crosslinking Mass Spectrometry (XL-MS) Workflow

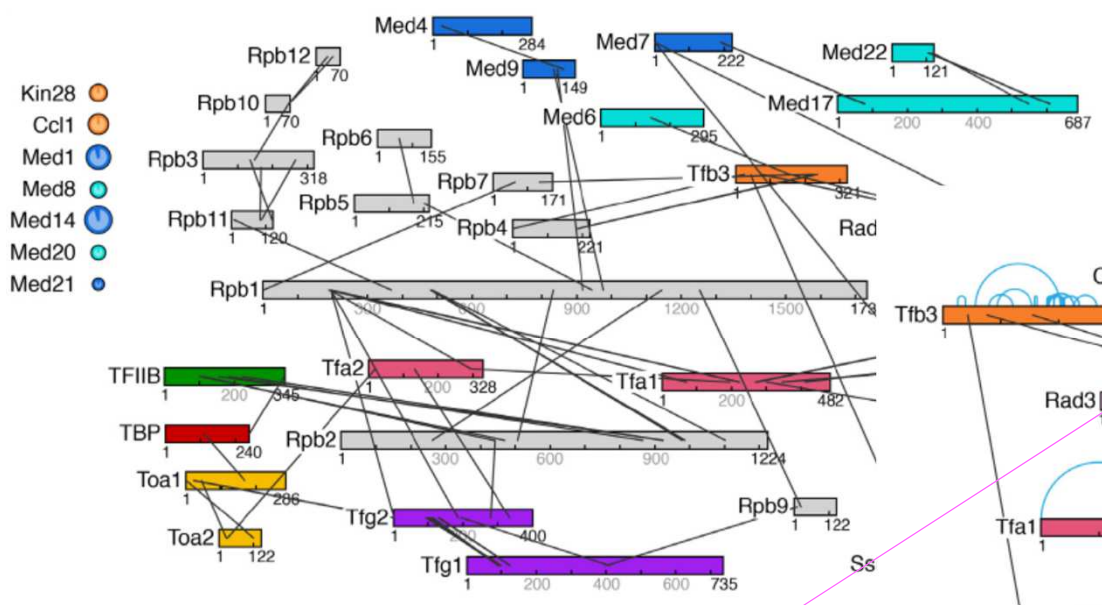


- krosslink vypurifikovaných částí komplexu SMC5/6
- 3 hotspots silně prokrosslinkované – ramena proteinů SMC5-SMC6 jsou vedle sebe (nikoli kroužek)

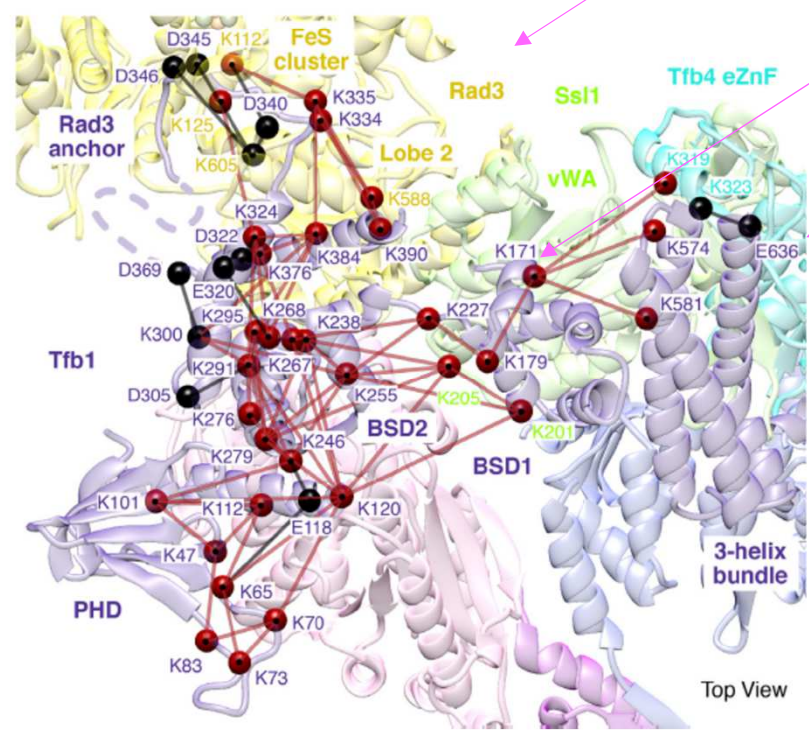
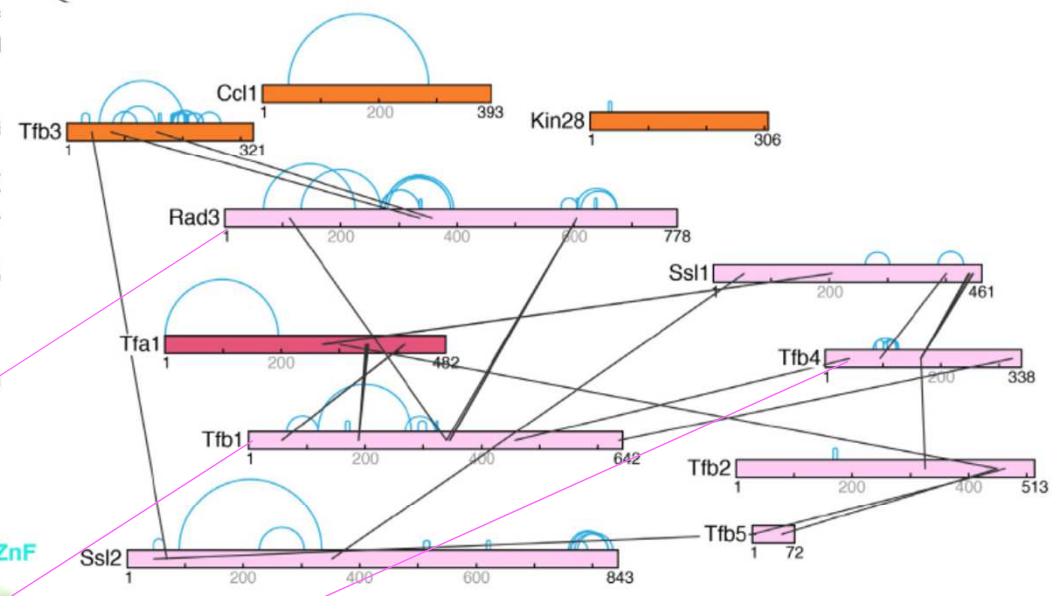


Adamus et al, JMB, in revision



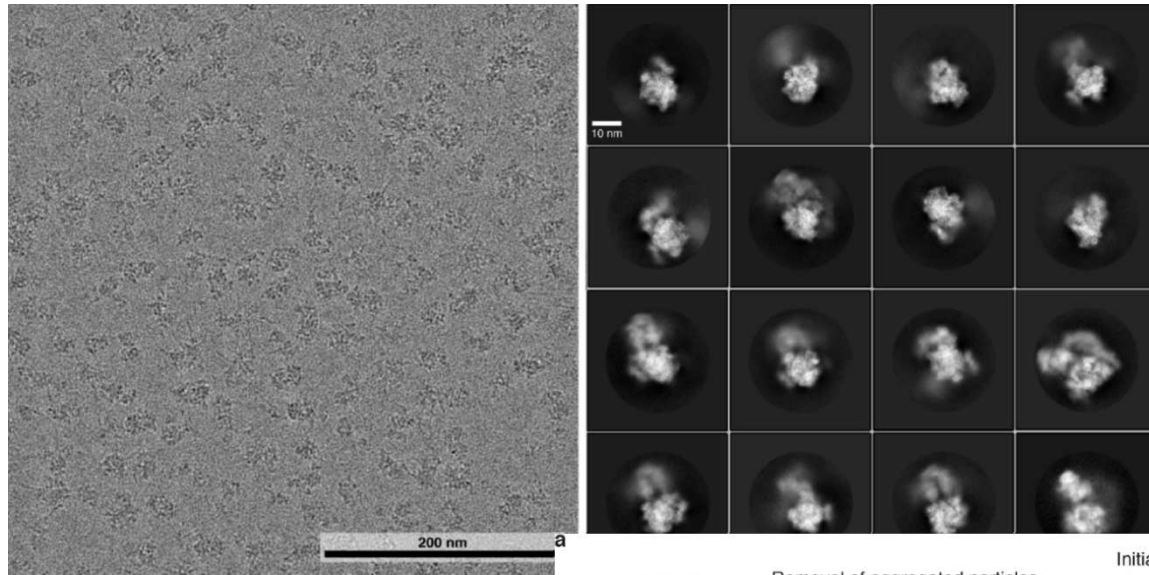


crosslink uvnitř a mezi proteiny



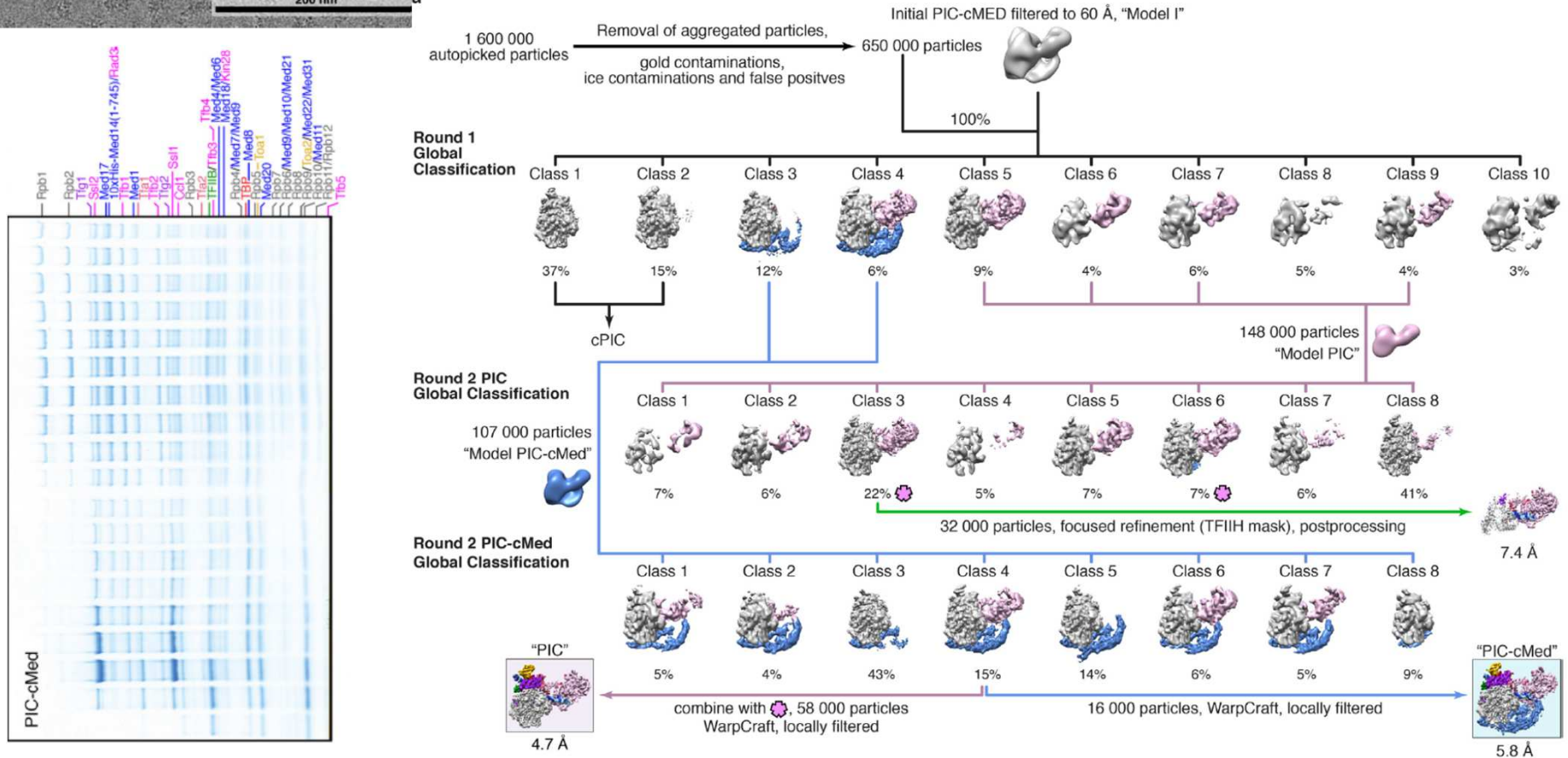
- crosslink data podpoří/doplní strukturální informace z krystalografie nebo kryoEM

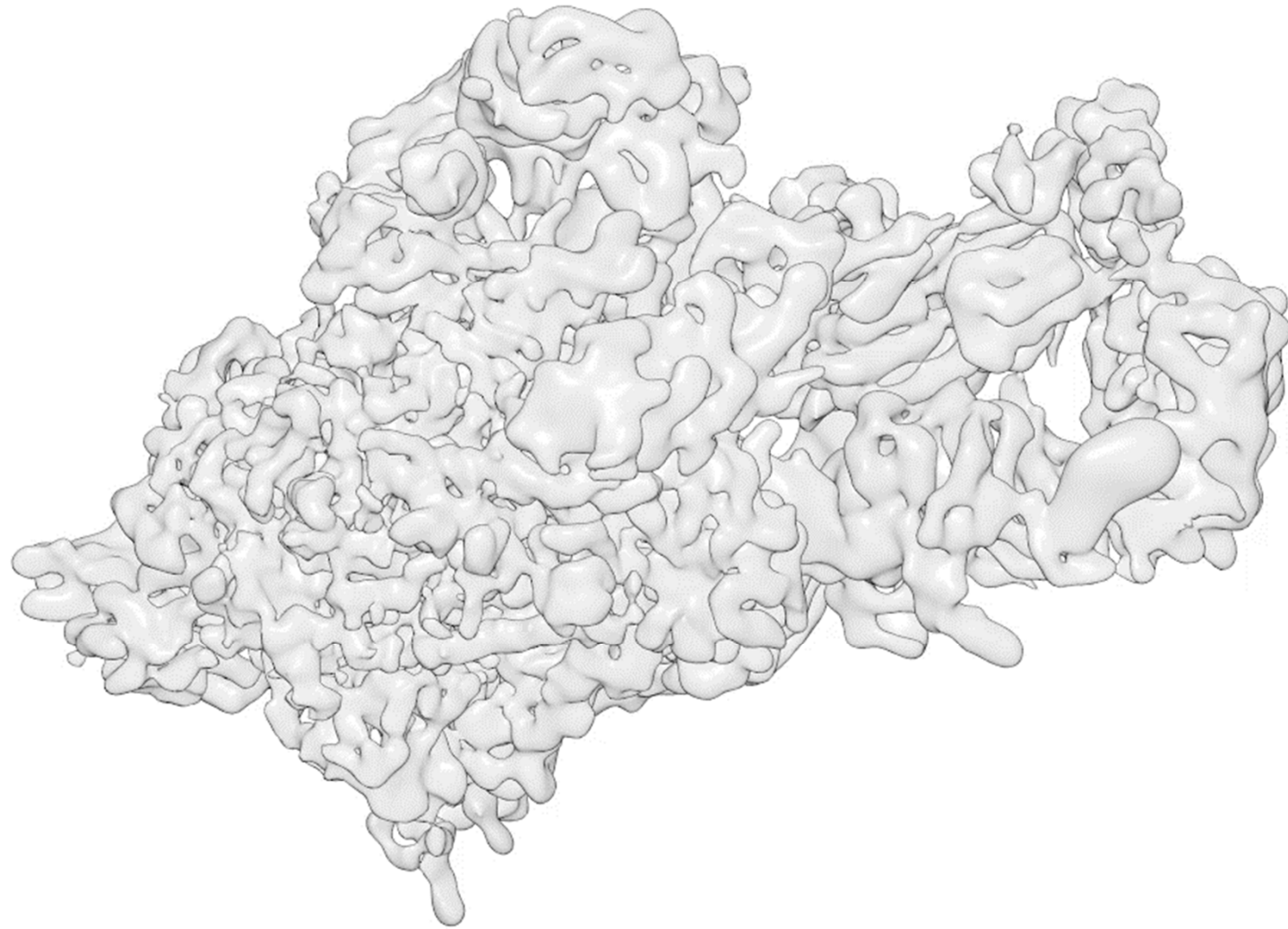
analýza PIC-MED komplexu (~50 podjednotek - ~2MDa)



analýza PIC-MED komplexu
(~50 podjednotek - ~2MDa)

- způsob sběru dat, klasifikace
a rekonstrukce struktury
komplexu pomocí kryoEM





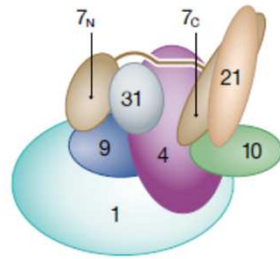
Schilbach et al, Nature, 2017

■ cMed, middle module
■ cMed, head module

■ TFIIA	■ TFII E	■ TBP
■ TFIIB	■ TFIIF	■ Pol II

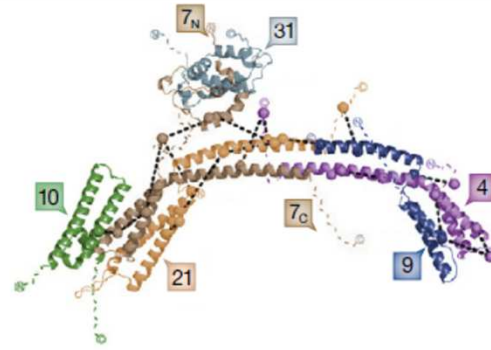
_____ cPIC

MEDIATOR MIDDLE MODULE



Topology of the Mediator middle module
Koschubs *et al*, 2010

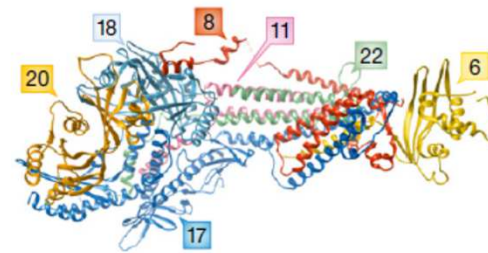
- Native MS
- IMS-MS
- Limited proteolysis
- Light scattering
- SAXS
- Pull-down assays



Architectural model of the Mediator middle module
Larivière *et al*, 2013

- Crosslinking-MS
- Homology modeling
- X-ray crystallography

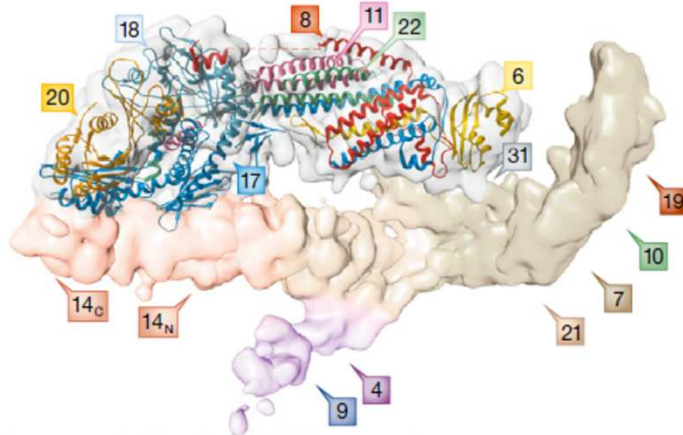
MEDIATOR HEAD MODULE



Structure of the Mediator head module
Robinson *et al*, 2012

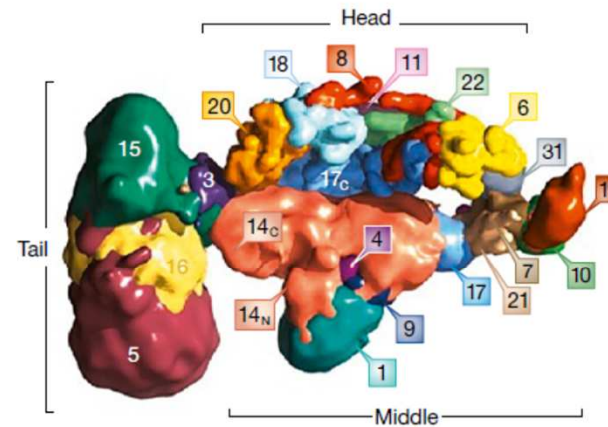
- Crosslinking-MS
- X-ray crystallography

CORE MEDIATOR (cMED) COMPLEX



Structure of a 15-subunit Mediator complex
Plaschka *et al*, 2015

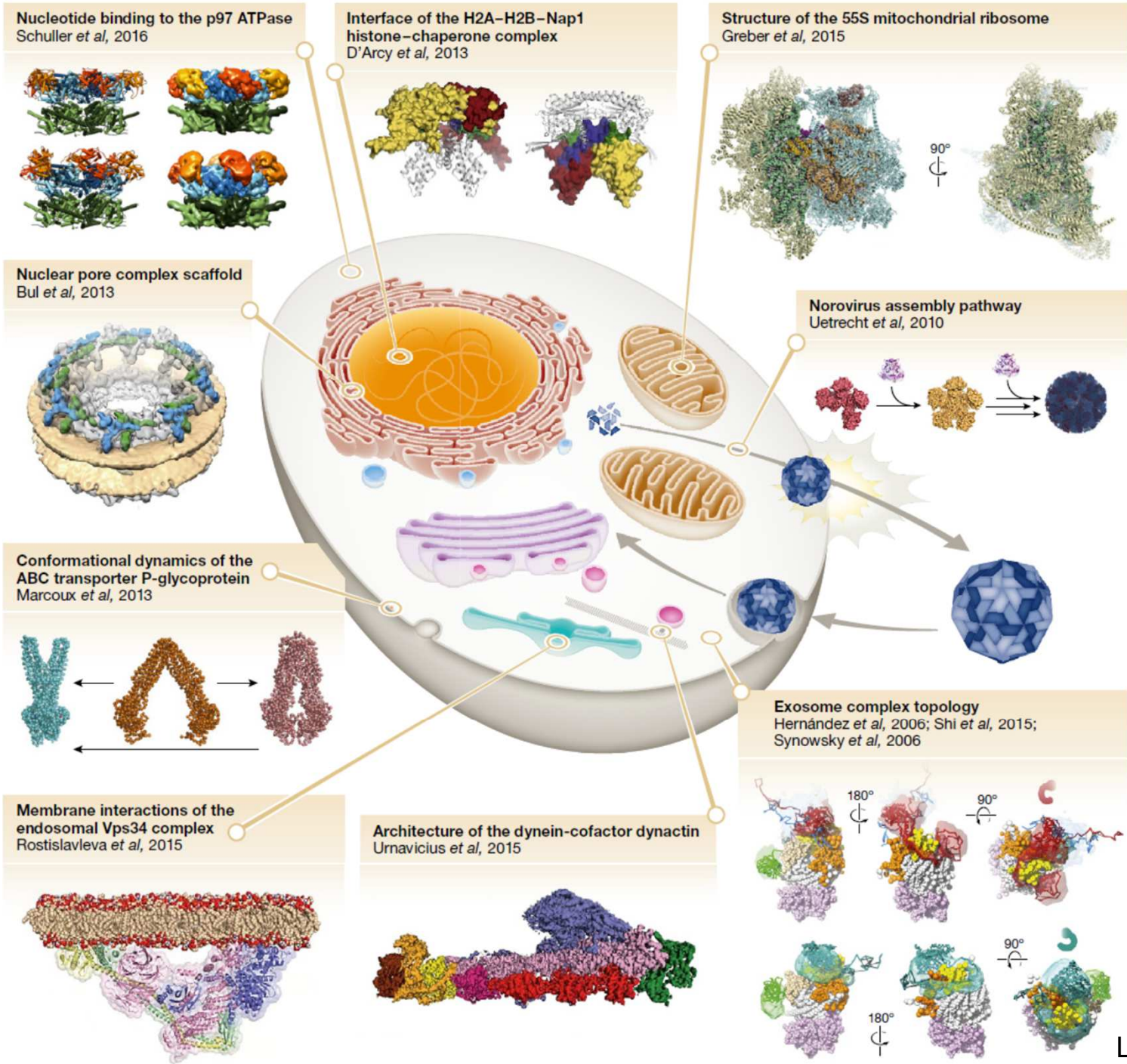
- Crosslinking-MS
- Cryo-EM
- Homology modeling
- X-ray crystallography



Architecture of a 21-subunit Mediator complex
Robinson *et al*, 2015

- Integrative modeling
- Crosslinking-MS
- Cryo-EM
- X-ray crystallography
- Homology modeling

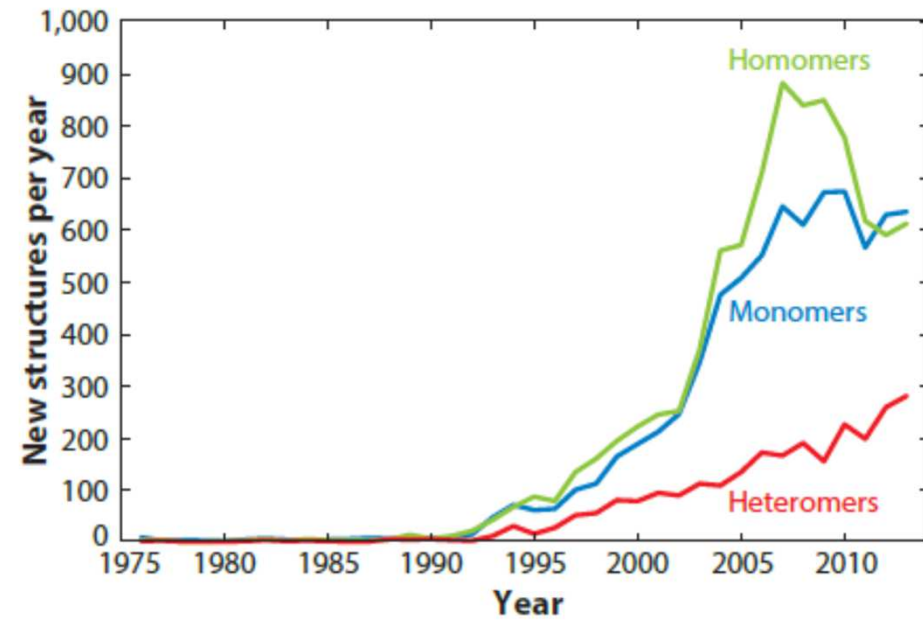
- Original data
- Integrated data from other studies



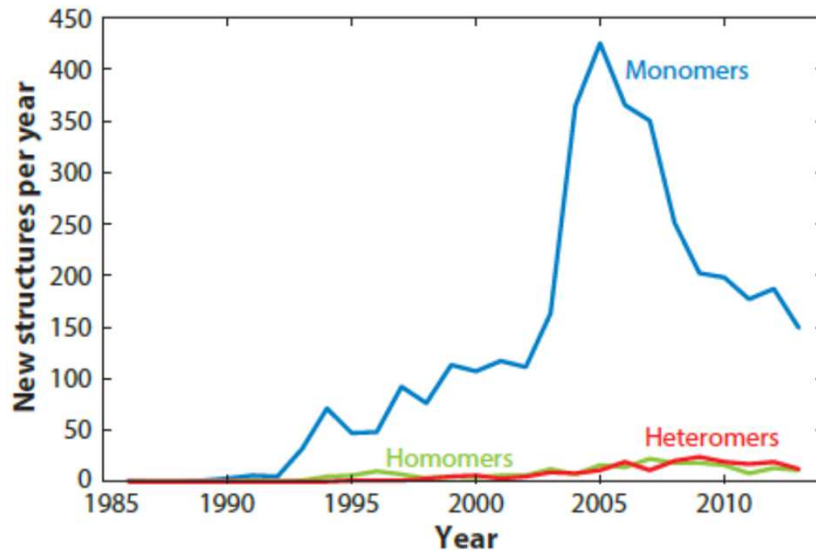
Použití metod **strukturní biologie** pro studium proteinových komplexů

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

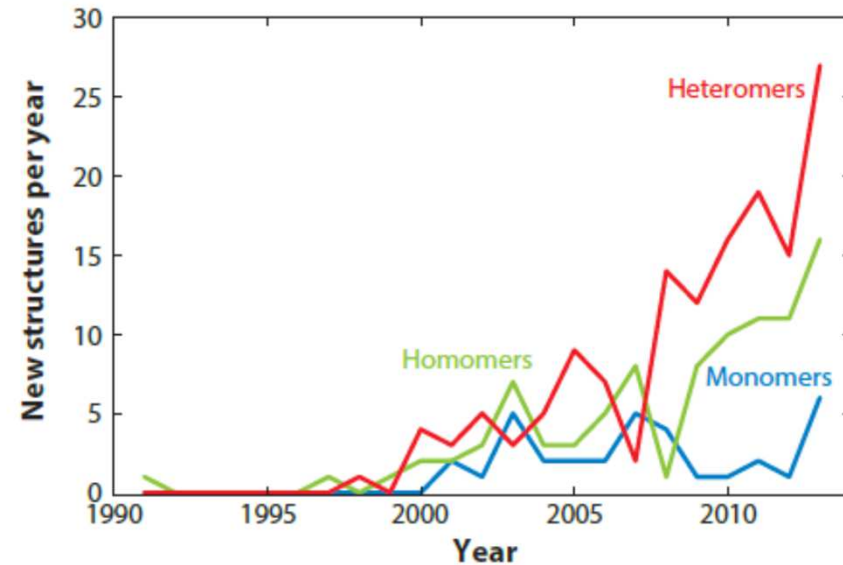
a X-ray crystallography



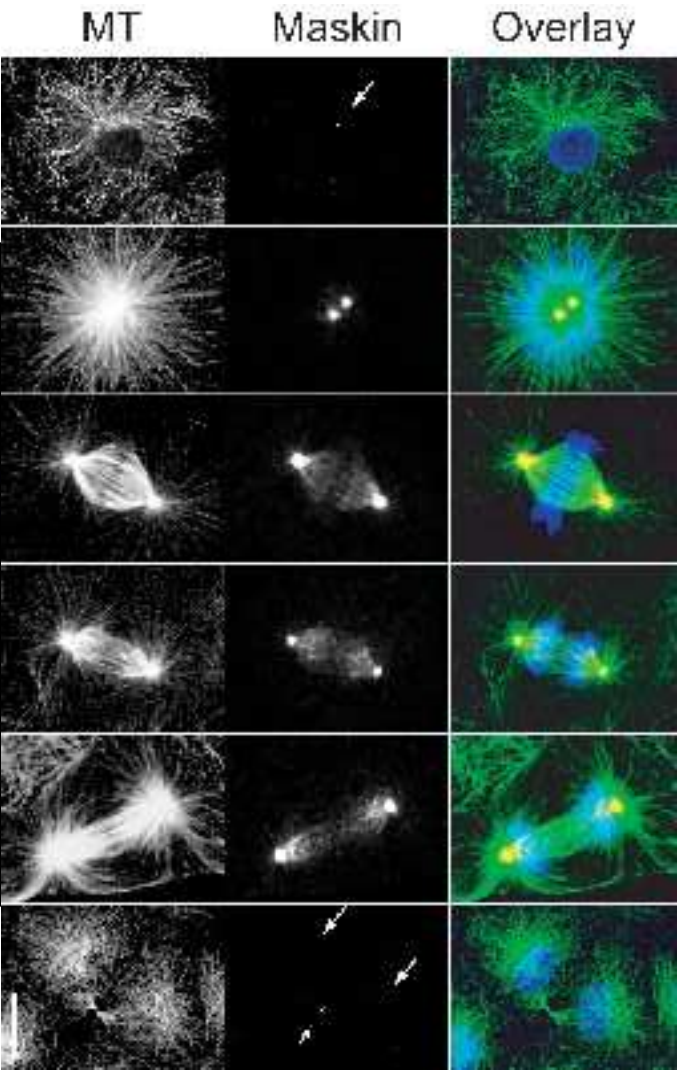
b NMR



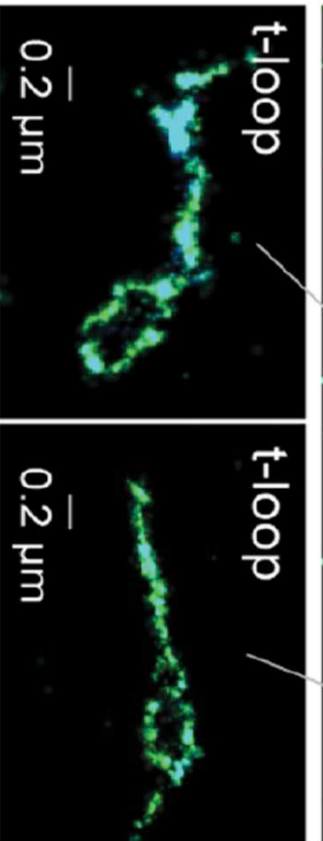
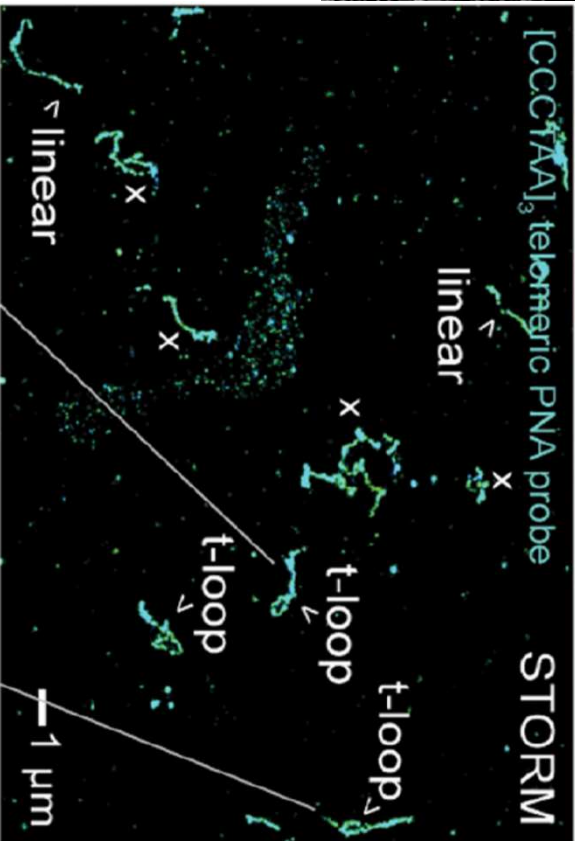
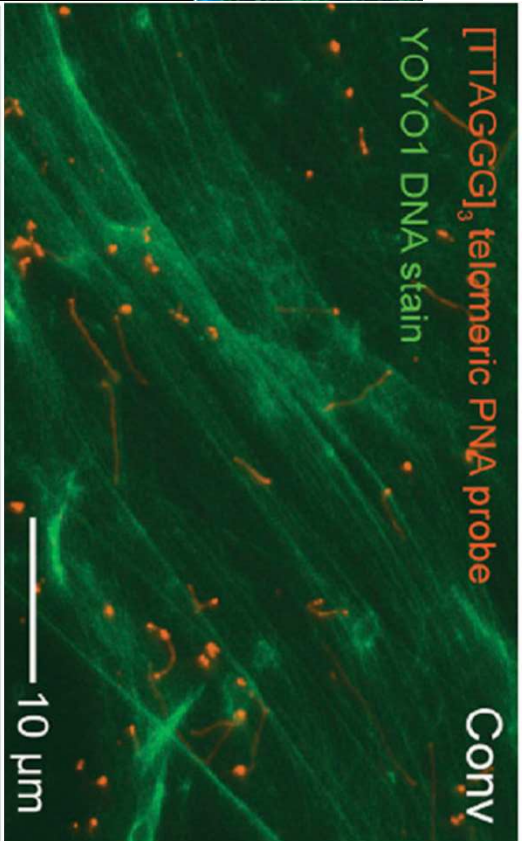
c Electron microscopy

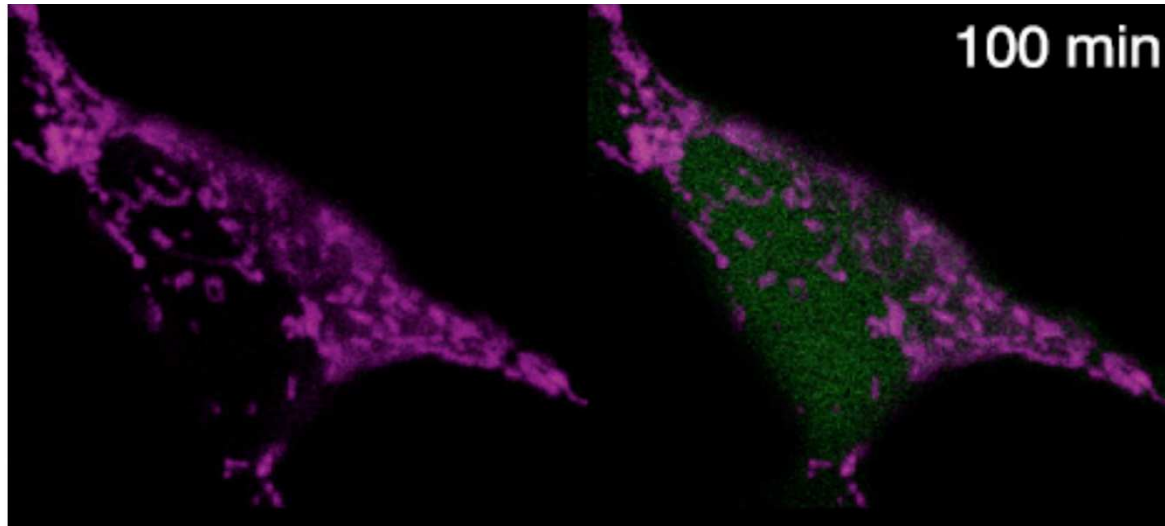


Mikroskopie



Doksani et al, Cell, 2013





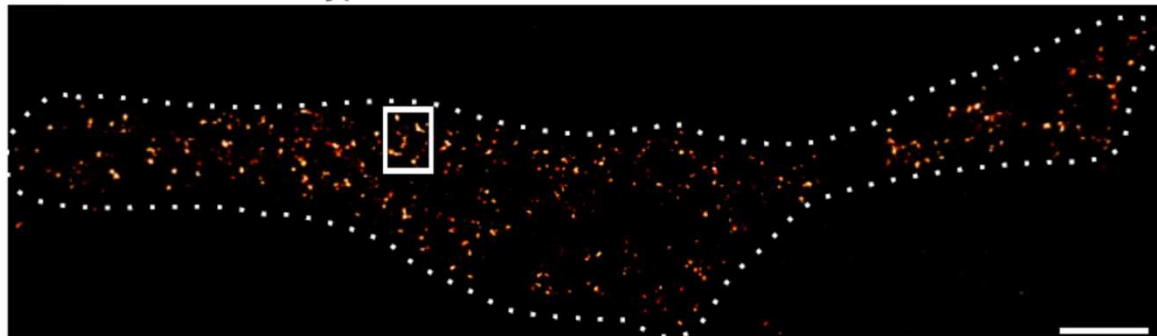
100 min

Lokalizace proteinových komplexů

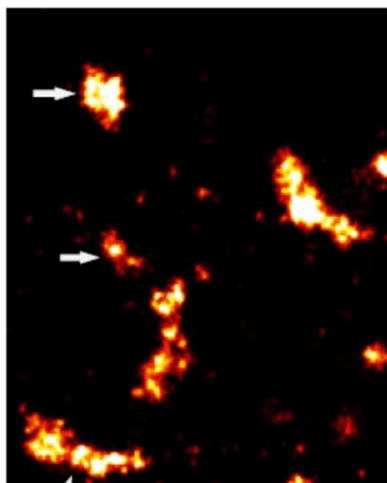
Konfokální mikroskopie vs super-resolution mikroskopie (STED=stimulated emission depletion microscopy – rozlišení 60nm)

+ AFM (atomic force microscopy)

A GFP-Bax wild type

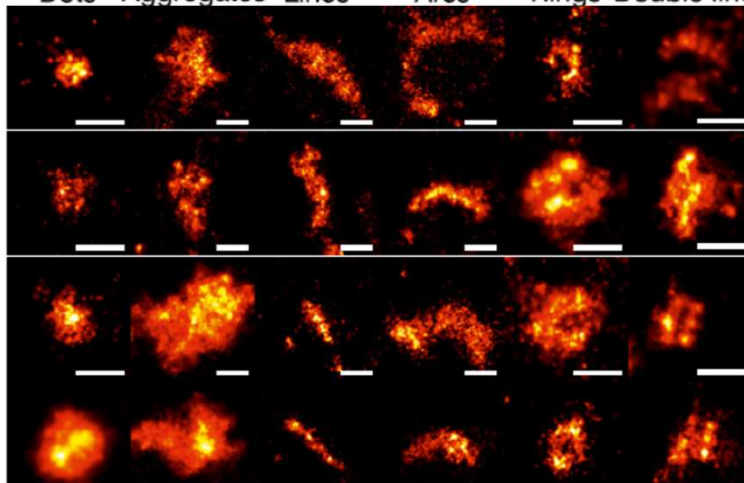


B

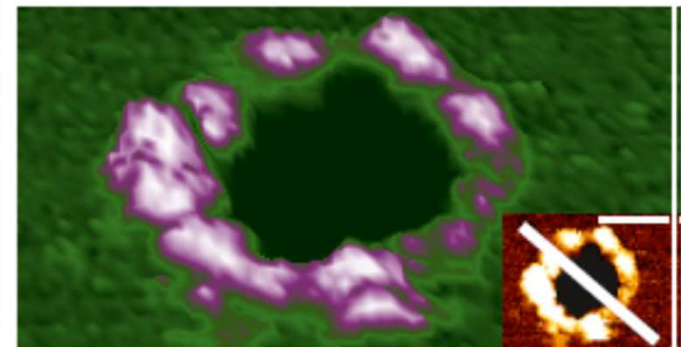


C

Dots Aggregates Lines Arcs Rings Double lines



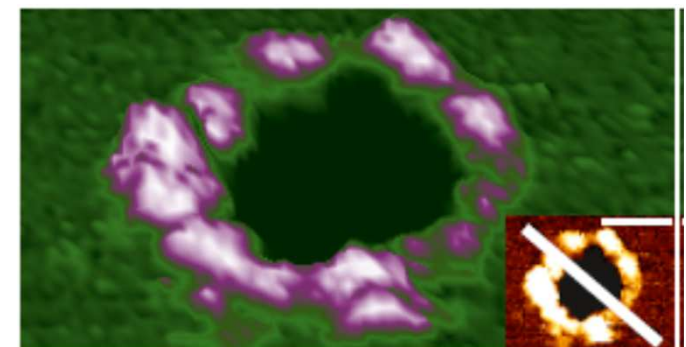
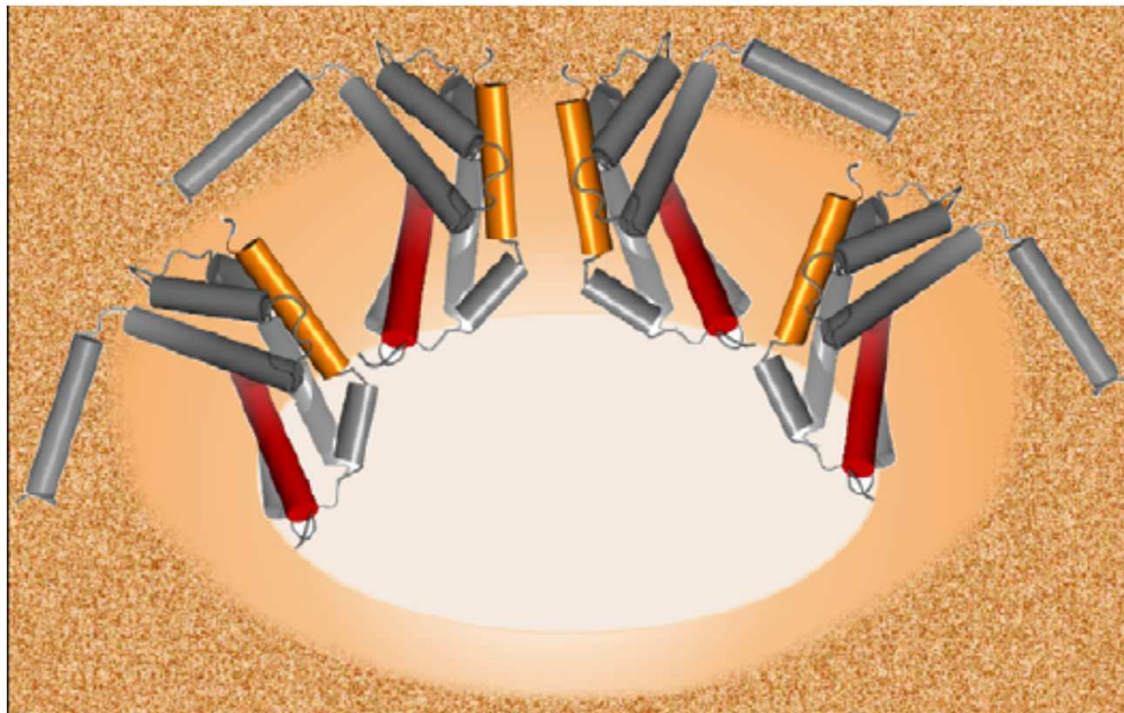
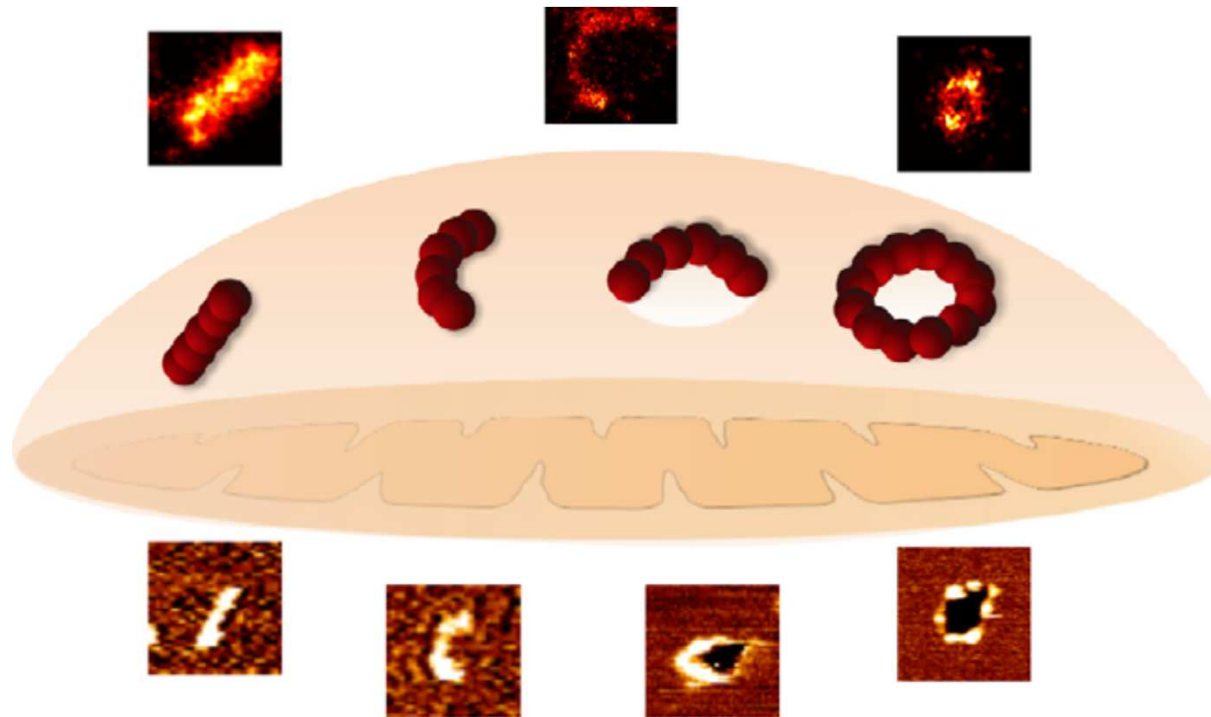
Gallego et al, EMBO J, 2016



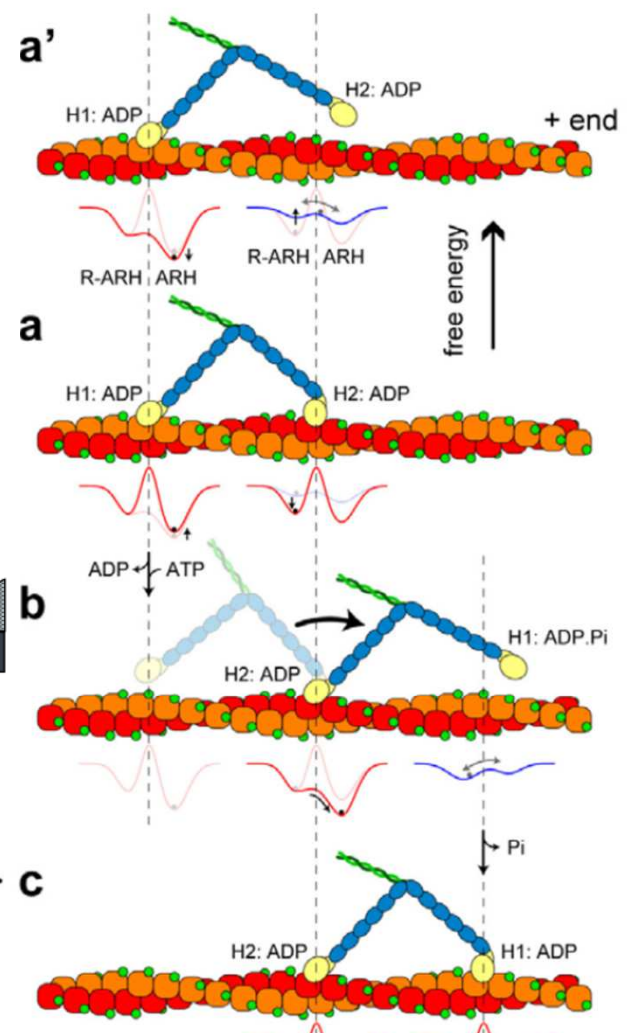
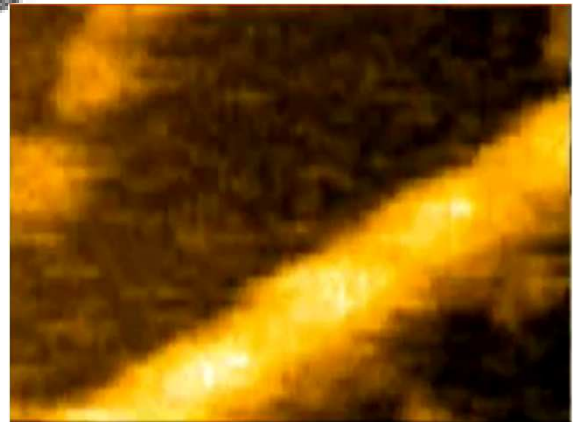
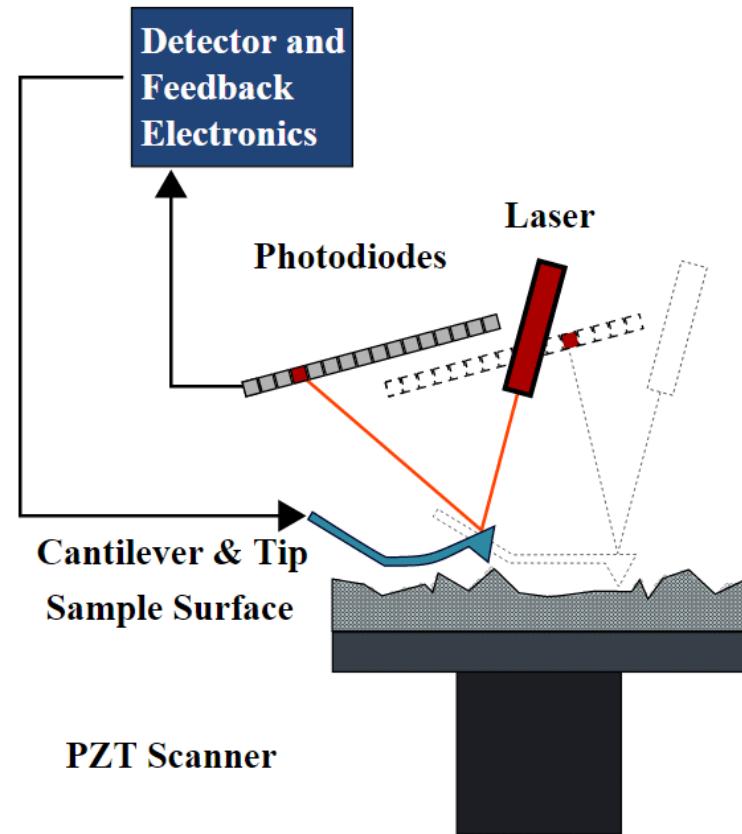
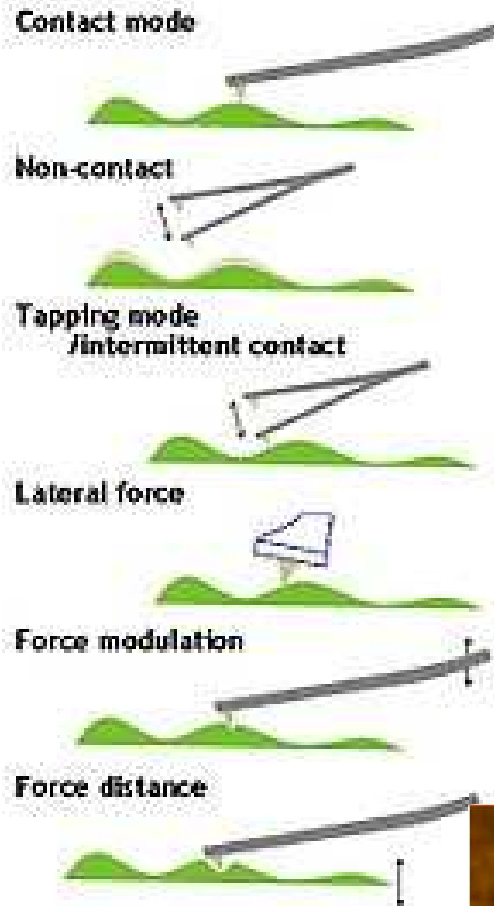
Lokalizace proteinových komplexů

Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptósa)

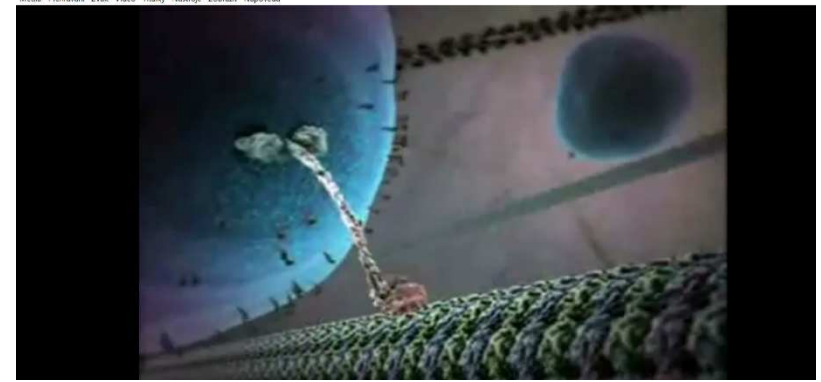
Gallego et al, EMBO J, 2016



AFM atomic force microscopy



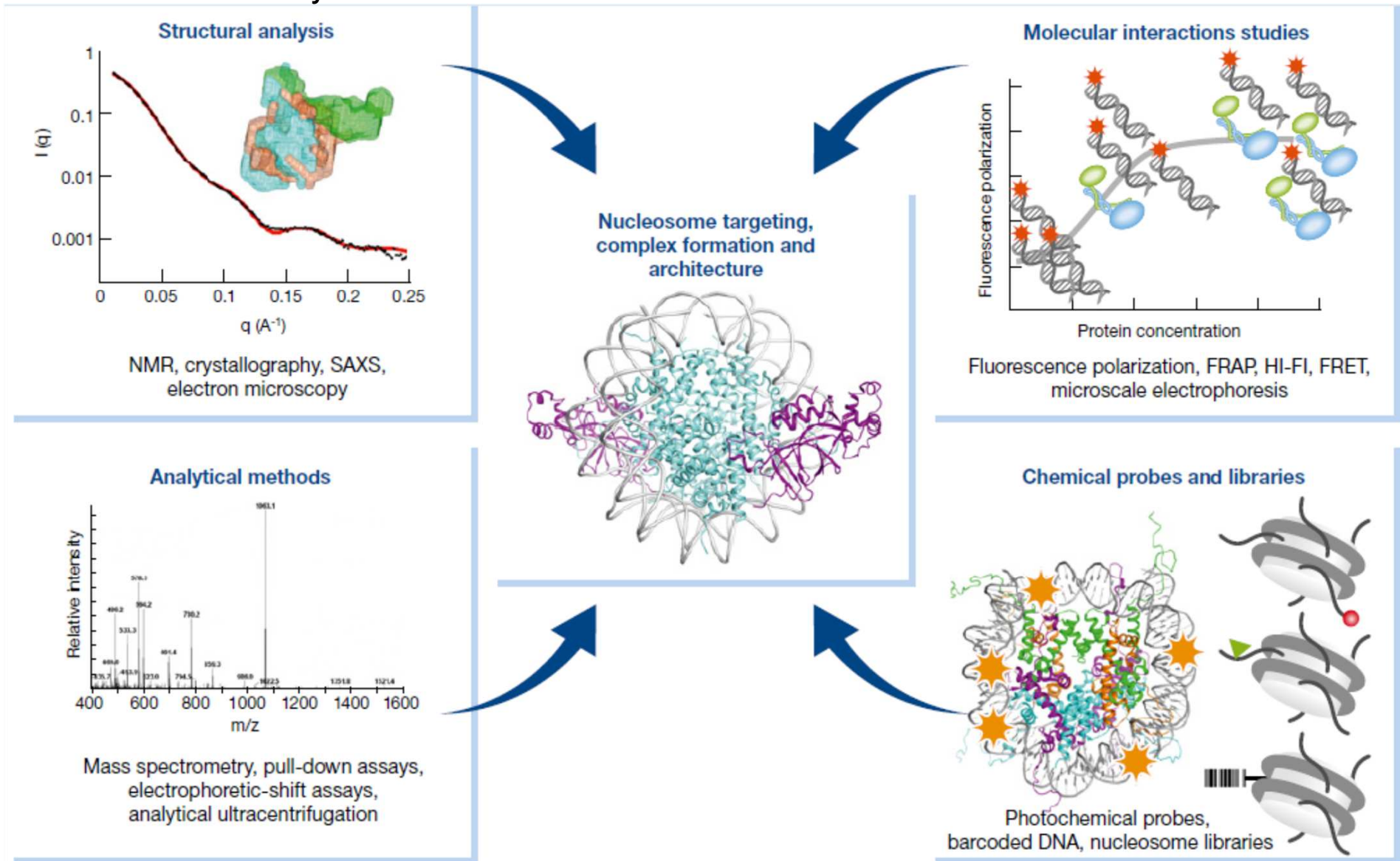
Molecular Machinery of Life 5v - Multimediální prehrávač VLC
 Média: Prehrávač Zvuk Video Tržby Nástroje Zobrazit Napověda



Uchihashi et al, Nat Prot, 2012

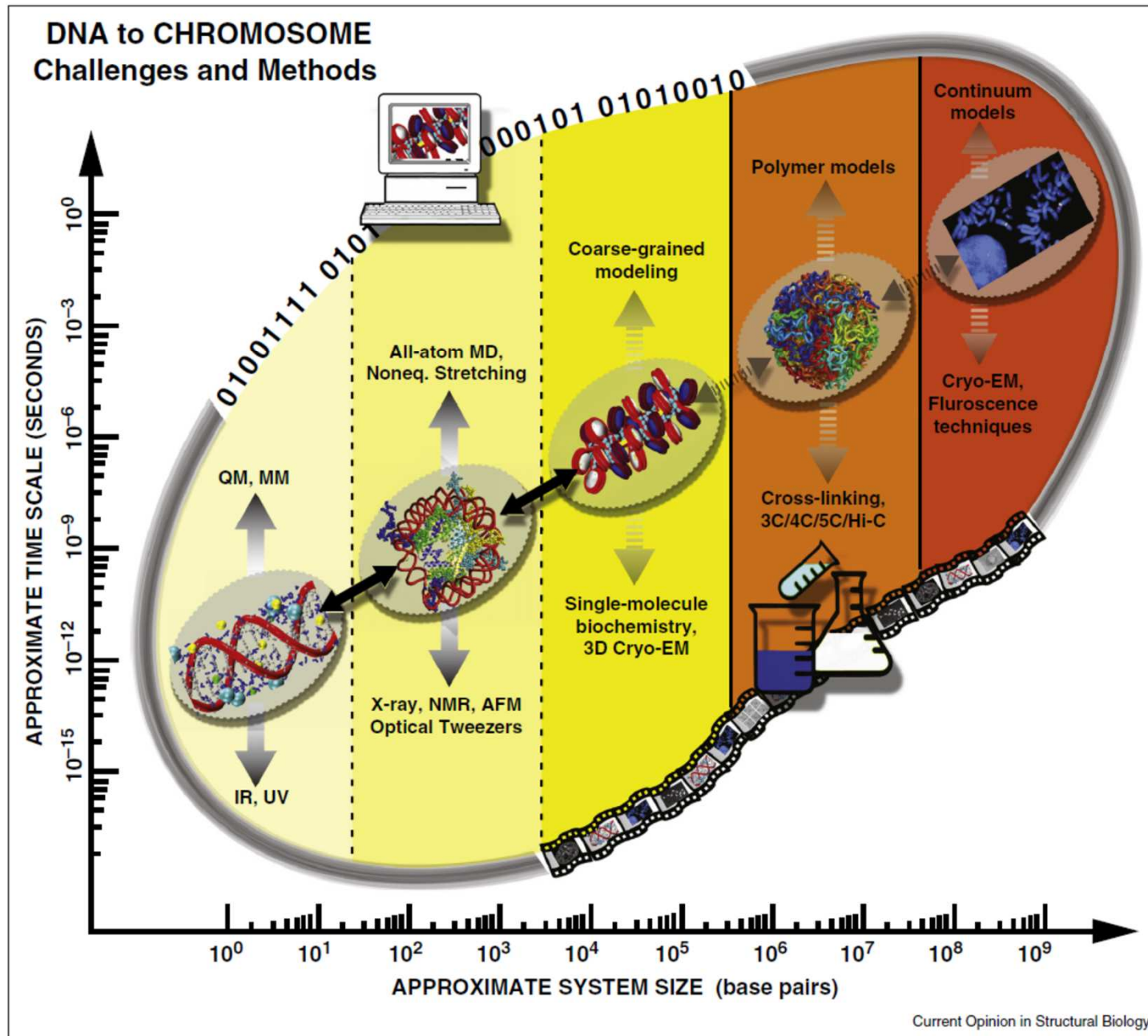
Analýza proteinových komplexů

více Metody GP

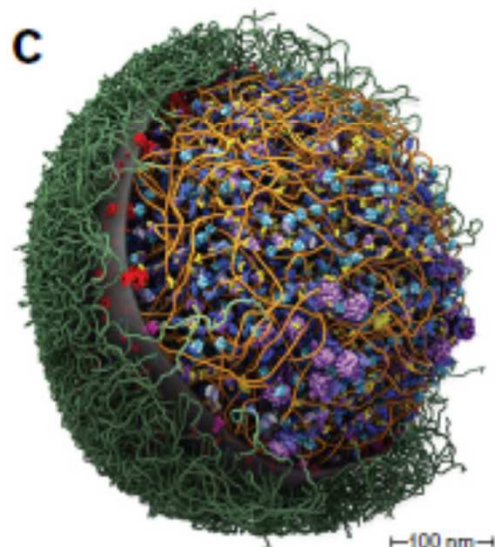
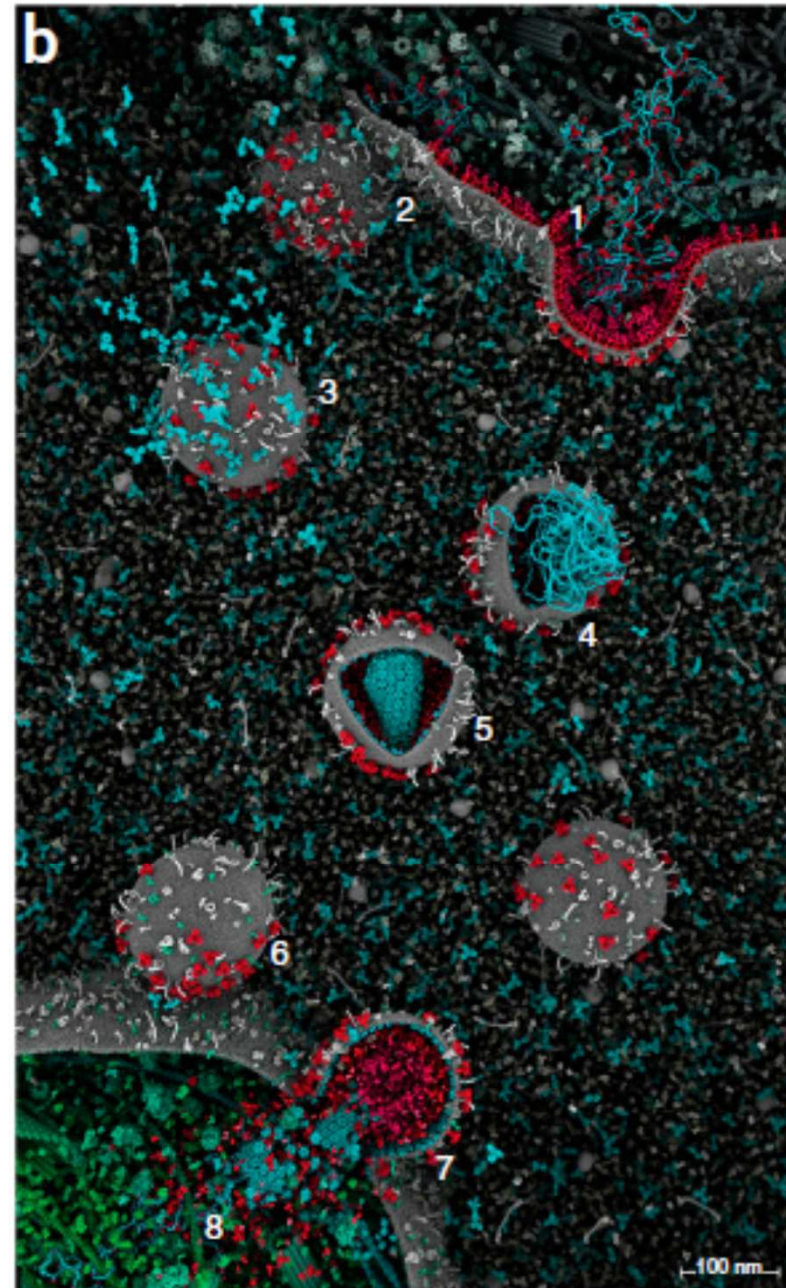
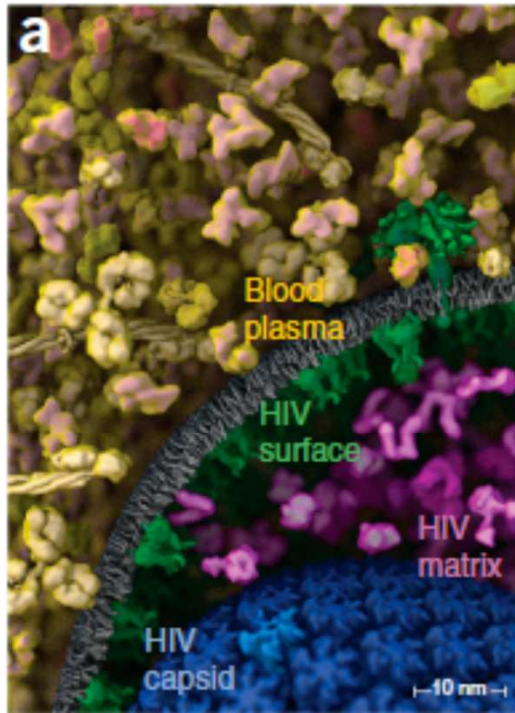


Analyza proteinových komplexů

Ozer et al, CO in SB, 2015



Visualizace proteinových komplexů



Existuje mnoho nástrojů na vizualizaci komplexů (i v buněčném prostředí)

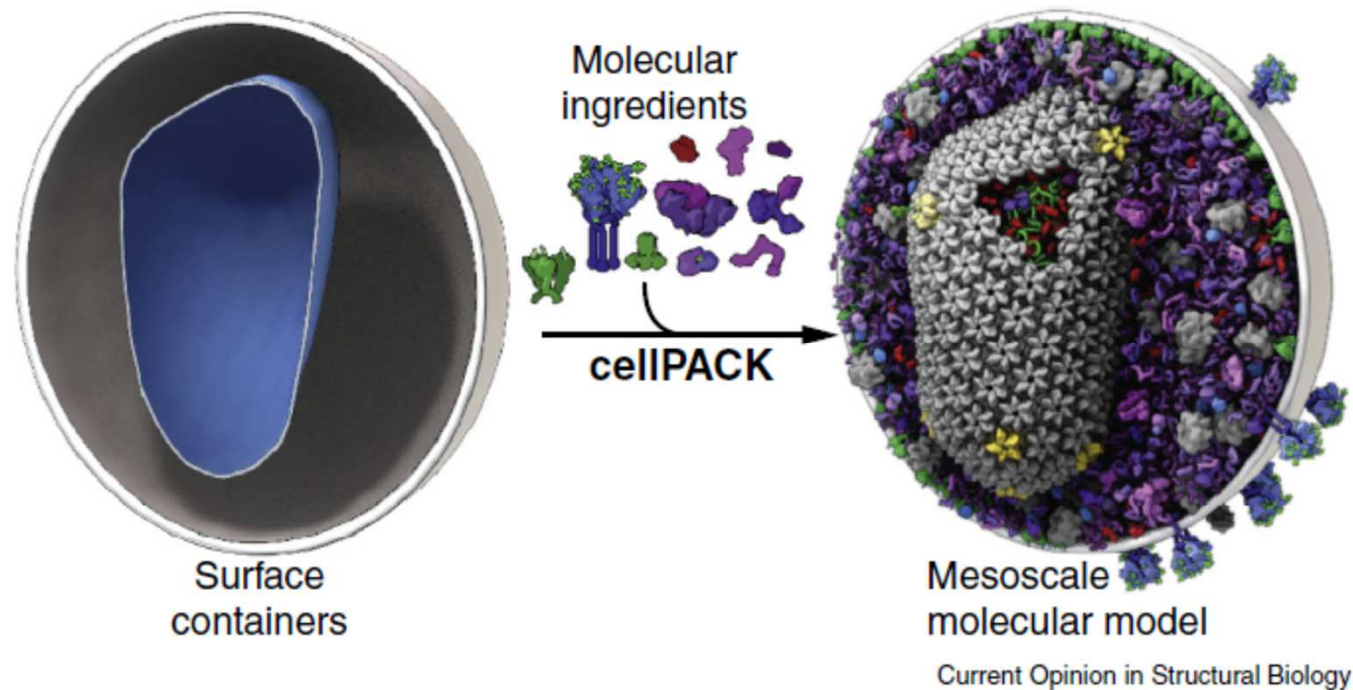
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur

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

...vychází z herních a animačních algoritmů ...

Johnson et al., Nat Meth, 2015

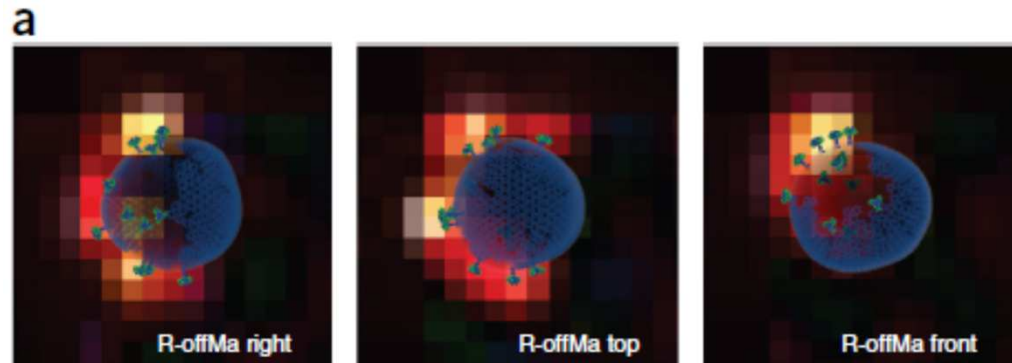
Visualizace proteinových komplexů



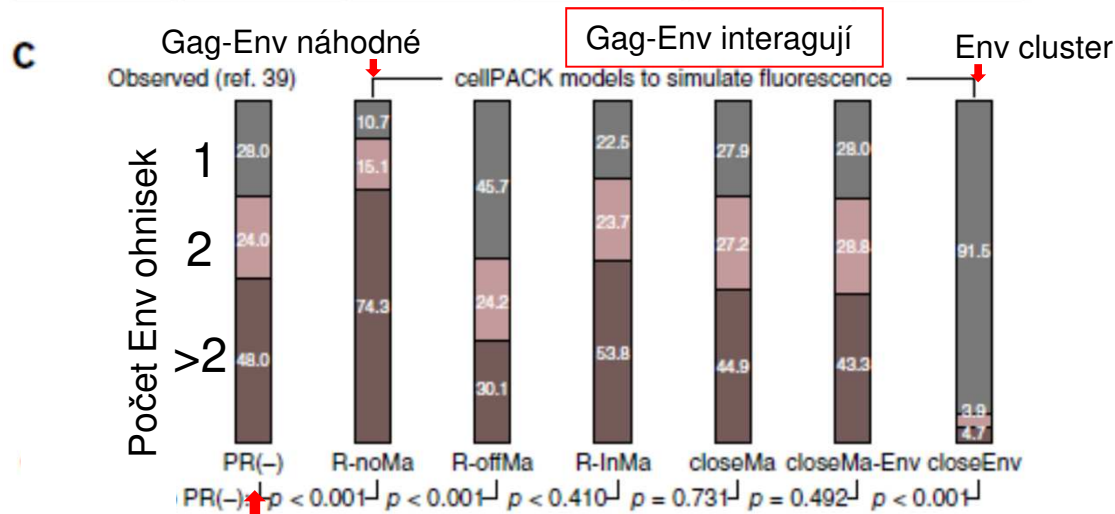
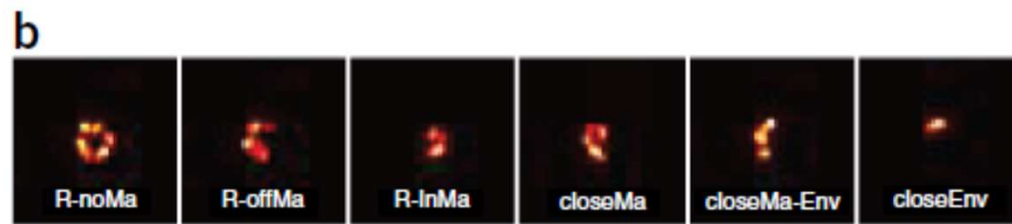
Pro lepší představu (virové částice) se integrují ... (nakopírované) struktury, data z molekulární dynamiky (simulací), koordináty pohybu „objektu“ ve světelném mikroskopu ... animovat i buněčný kontext – namíchat v „reálných“ poměrech do „organel“ a na „membrány“ – CellPack ...

Lze použít k testování modelů ...

Visualizace proteinových komplexů - CellPACK



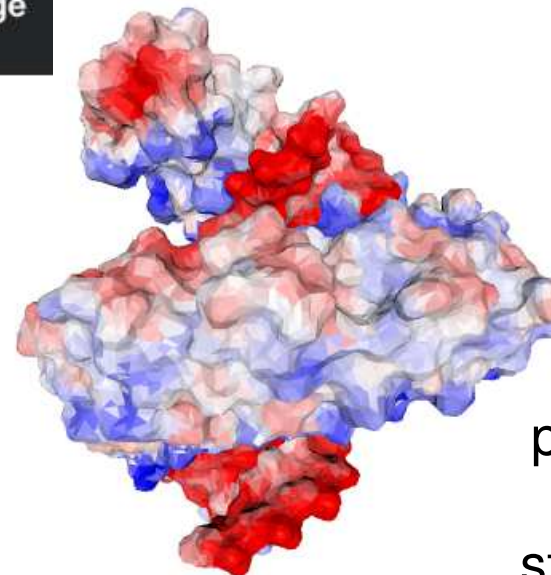
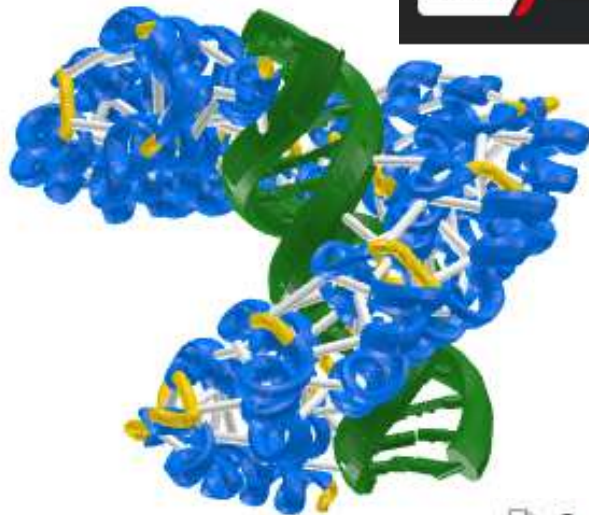
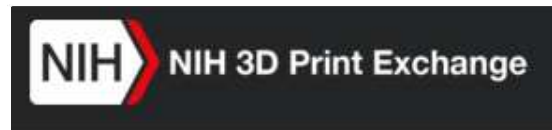
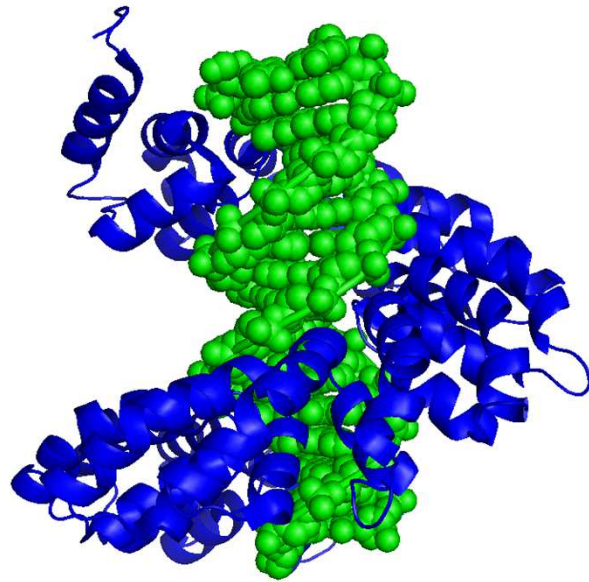
CellPACK poskytuje vzhled do buněčných procesů – použit na simulaci distribuce proteinů virové částice (např. R-noMa: random-bez interakcí)




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**