



National Centre for Biomolecular Research



CG030 – Struktura (architektura) a funkce proteinových komplexů

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

UKB C2, 214

laboratoř Strukturních proteinů eukaryotních chromosomů
(<http://www.ncbr.muni.cz/SPEC/>)



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

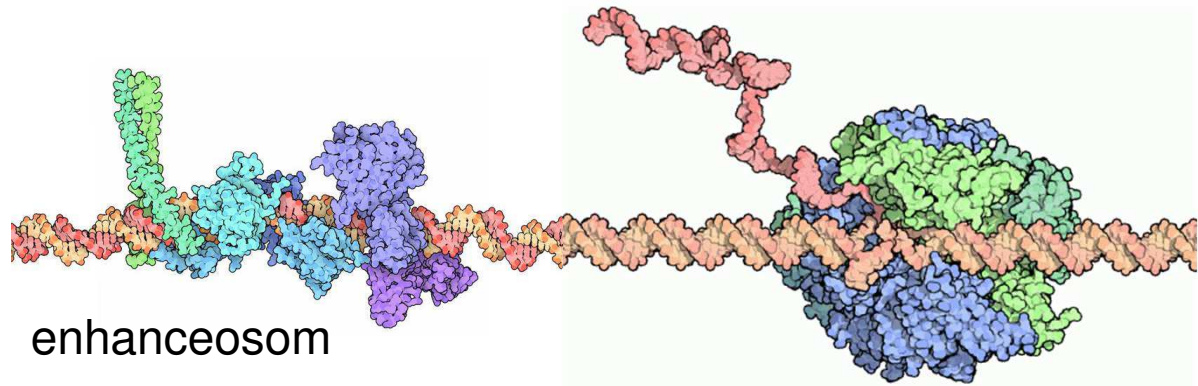
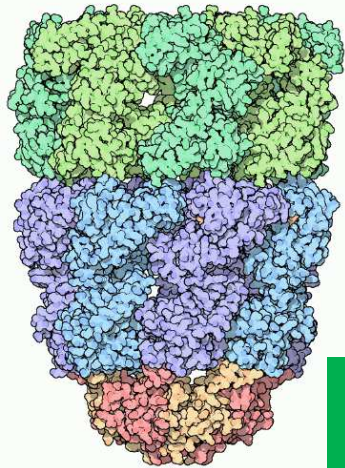
obecně

GENOM

závěrečná

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

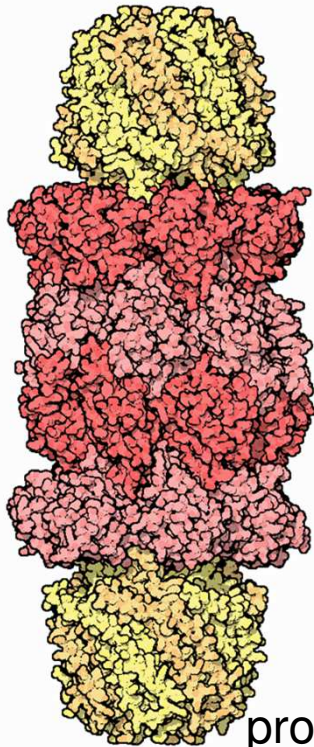
chaperon



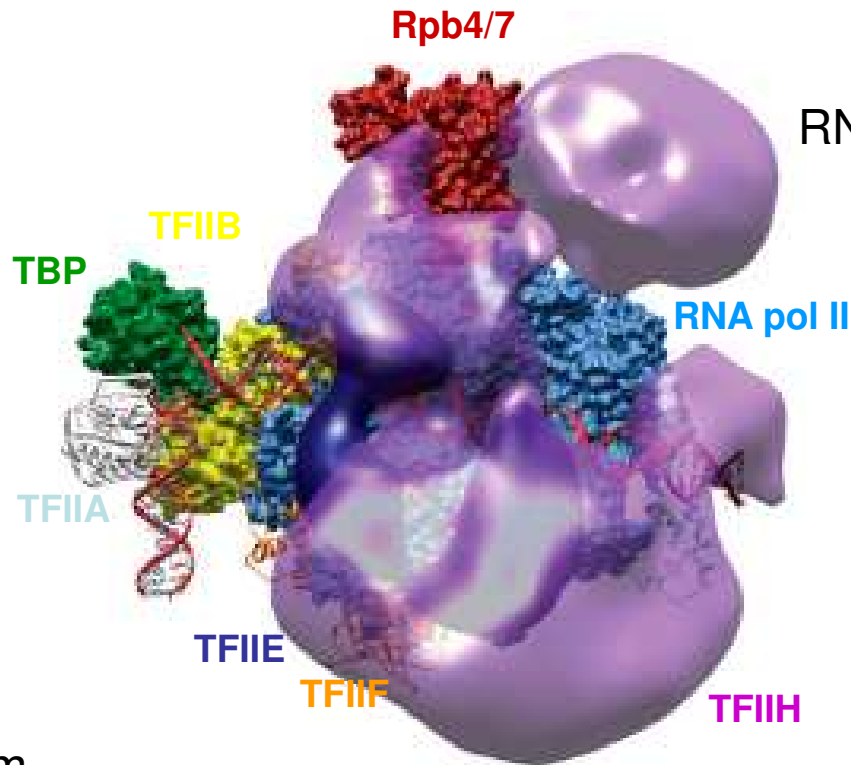
enhanceosom

RNA polymeráza

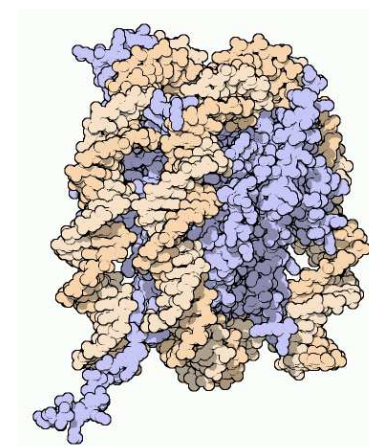
obecně



proteasom



RNA polymeráza + TFII...



nukleosom

Molekula měsíce (PDB 101)

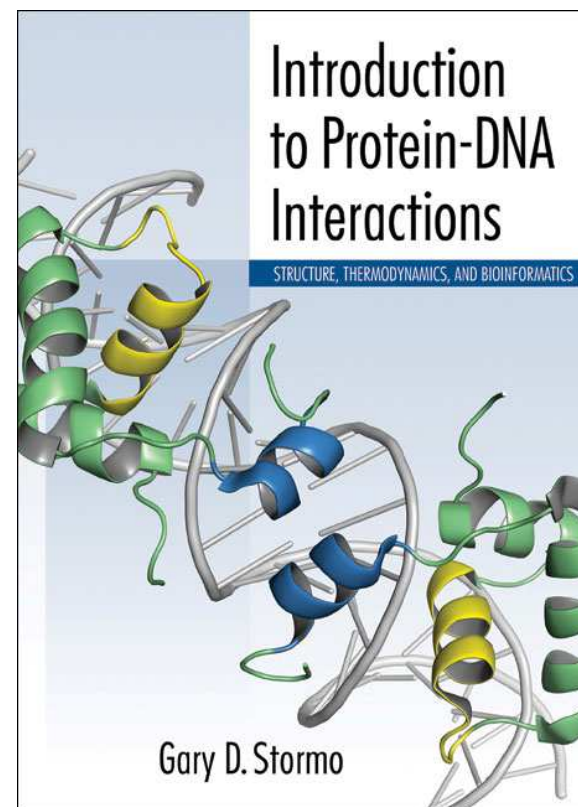
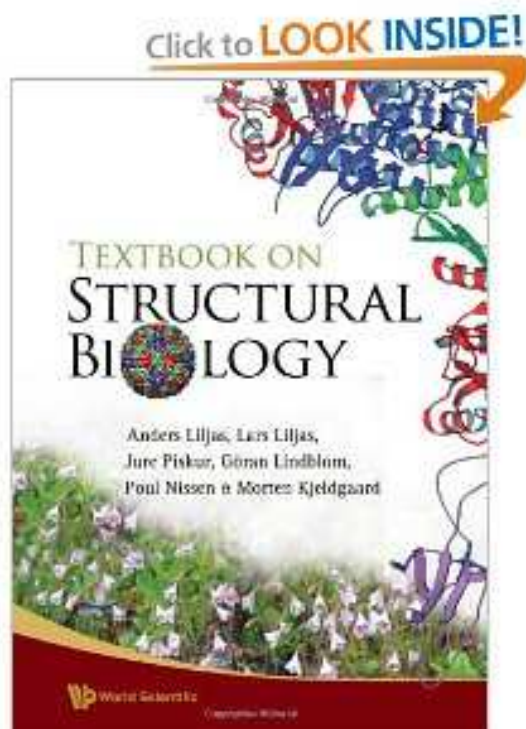
chromatin

Informační zdroje

Alberts a spol: Molecular biology of the Cell

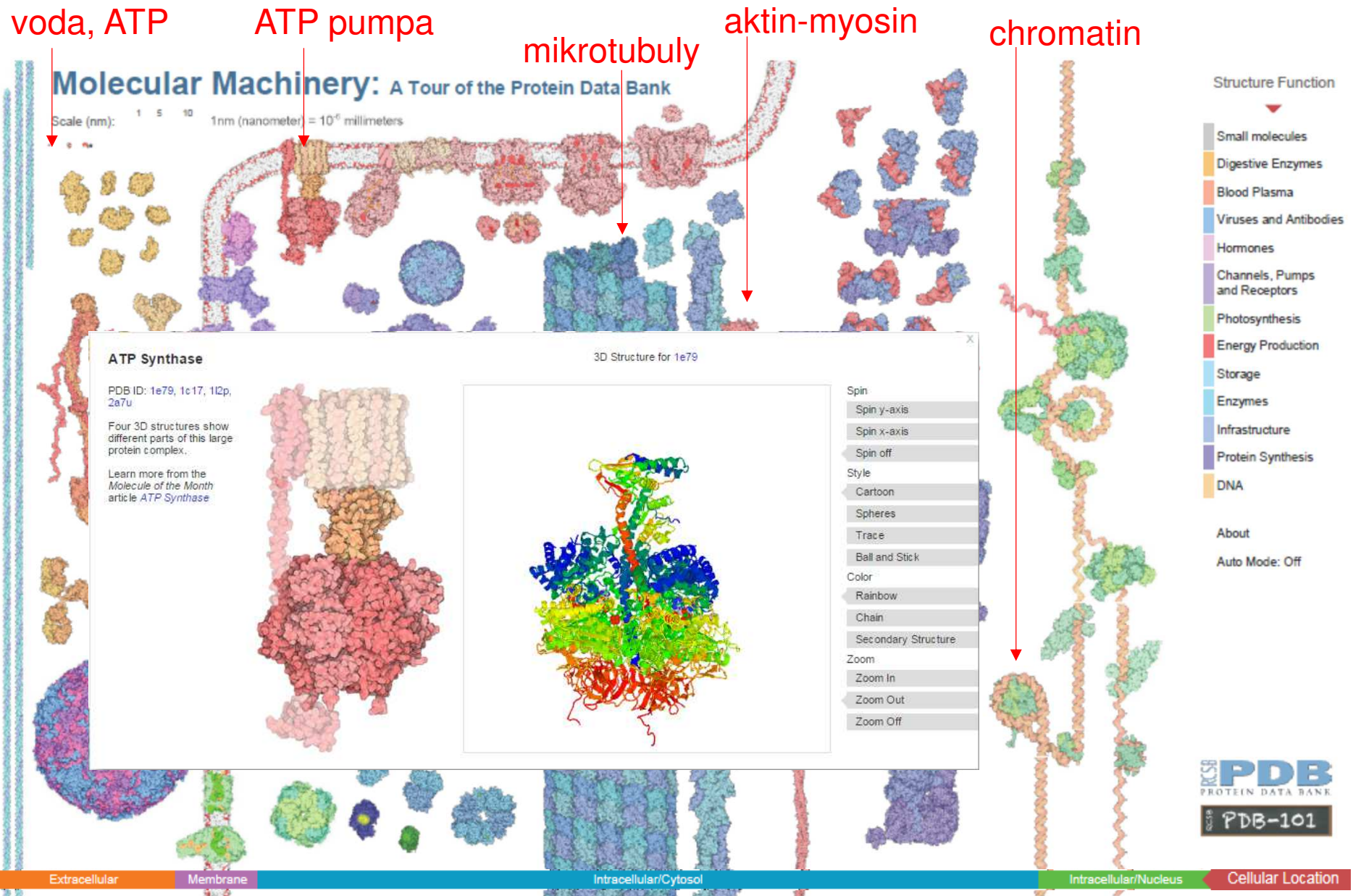
Liljas a spol: Structural biology (2009) ...

... 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 2021

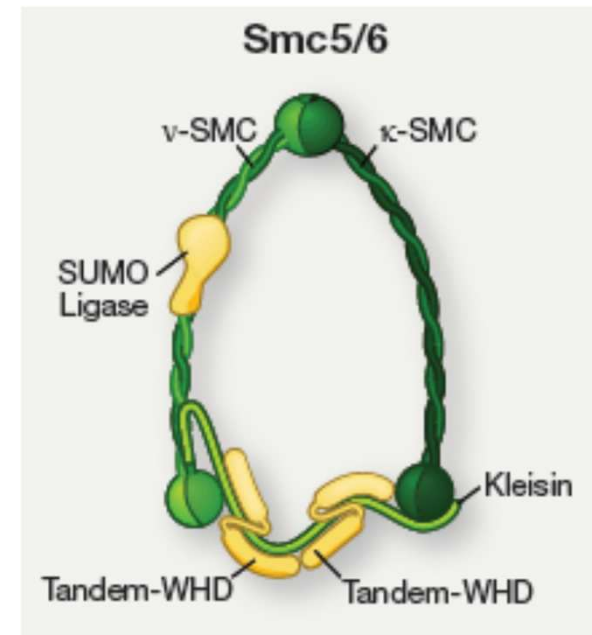
| | | | | | | |
|------------|--------------|---------|--------------|---|--------|-------|
| 04.03.2021 | 10-11.30 hod | MST | doc. Paleček | Úvod, analýza komplexů | obecně | |
| 11.03.2021 | 10-11.30 hod | MST | doc. Paleček | Úvod, PPI, skládání komplexů | | |
| 18.03.2021 | 10-11.30 hod | MST | Dr. Muller | Chaperony | | |
| 25.03.2021 | 10-11.30 hod | MST | Dr. Kolesár | Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom | | |
| 01.04.2021 | 10-11.30 hod | MST | Mgr. Lelkeš | replikace DNA | | GENOM |
| 08.04.2021 | 10-11.30 hod | MST | doc. Paleček | DNA-proteinové interakce, vazebné motivy | | |
| 15.04.2021 | 10-11.30 hod | MST | doc. Paleček | DNA-proteinové interakce, transkripční komplexy | | |
| 22.04.2021 | 10-11.30 hod | MST | Dr. Šebesta | Oprava DNA, homologní rekombinace | | |
| 29.04.2021 | 10-11.30 hod | MST | doc. Paleček | Chromatinové komplexy | | |
| 06.05.2021 | 10-11.30 hod | MST | doc. Paleček | Evoluce proteinových komplexů | | |
| 13.05.2021 | 10-11.30 hod | C2-2.11 | doc. Paleček | zkouška (test + prezentace)? | | |

- 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 proteinů
 - 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 ...

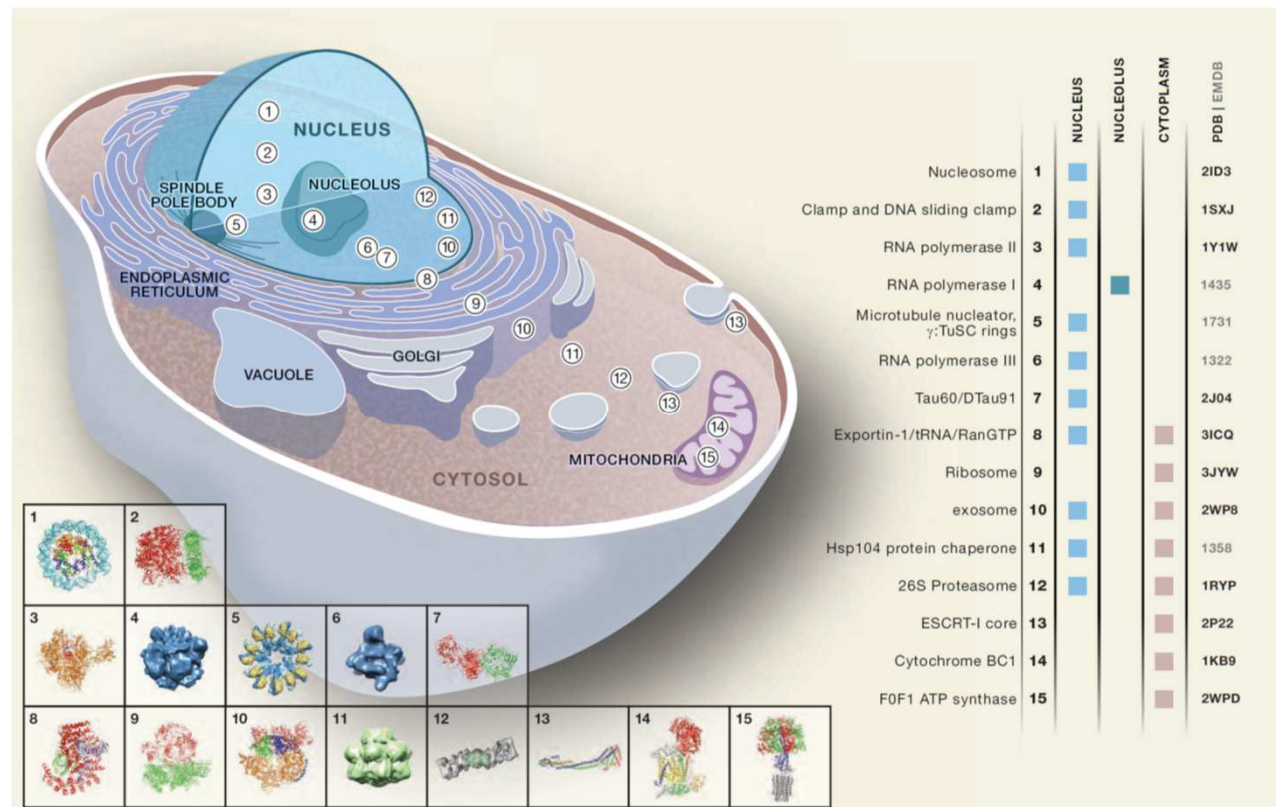
Analýza proteinových komplexů

- Separační metody
- MS přístupy
- Strukturní analýzy
- Mikroskopické metody
- Vizualizace ...

Bertero et al, Cell, 2010

~1000 komplexů v
kvasince
*Saccharomyces
cerevisiae*

Co o nich víme ...
jak jsme to zjistili ...
jak zjistit víc ...?



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***

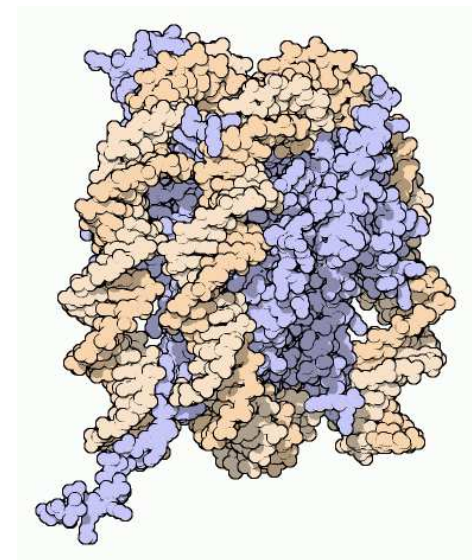
Metody izolace a analýzy proteinových komplexů

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

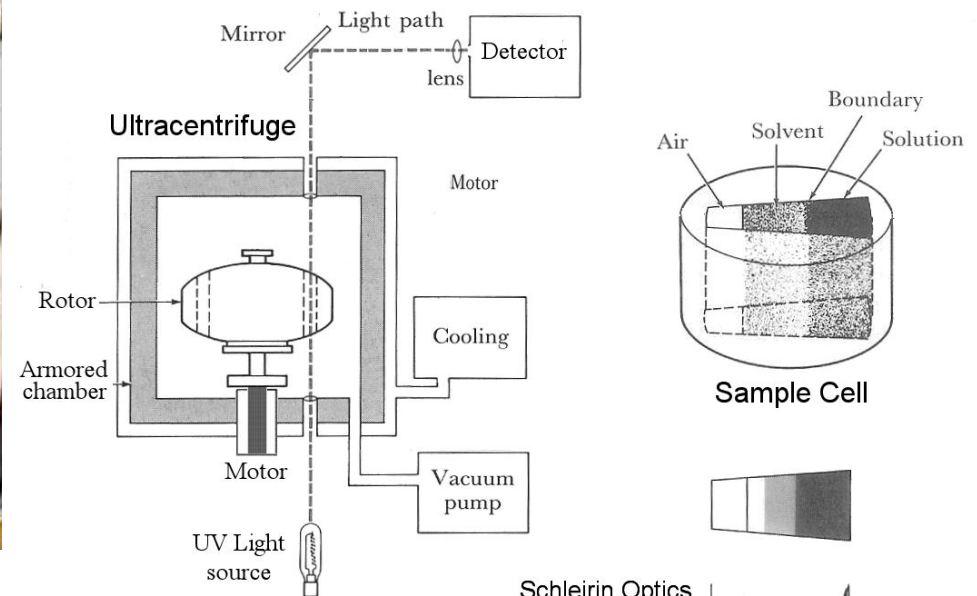
(Prolínají se i metody pro komplexy a PPI - viz *MePro* – **12.4.2021**)

... vizualizační metody

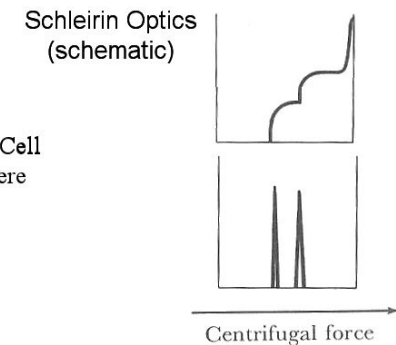
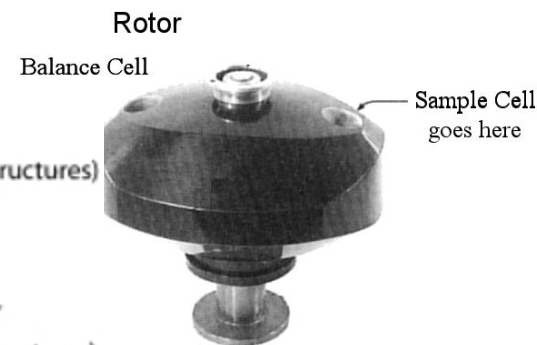
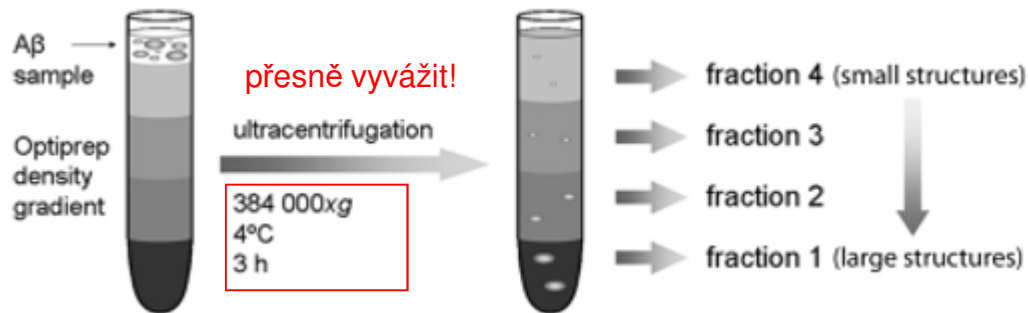


Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



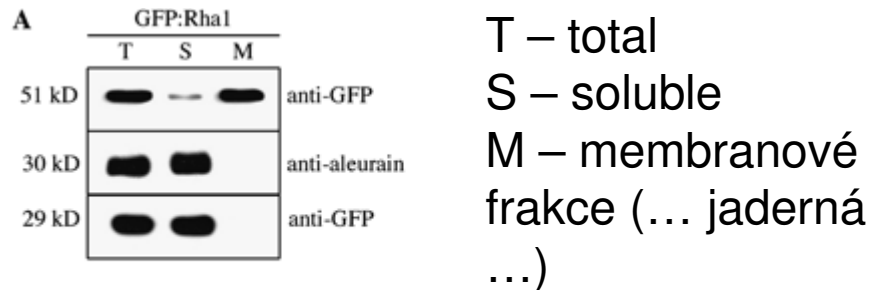
Cukerný/hustotní gradient



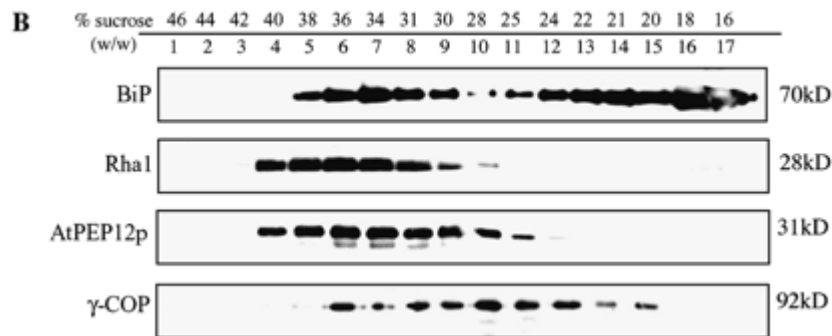
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)

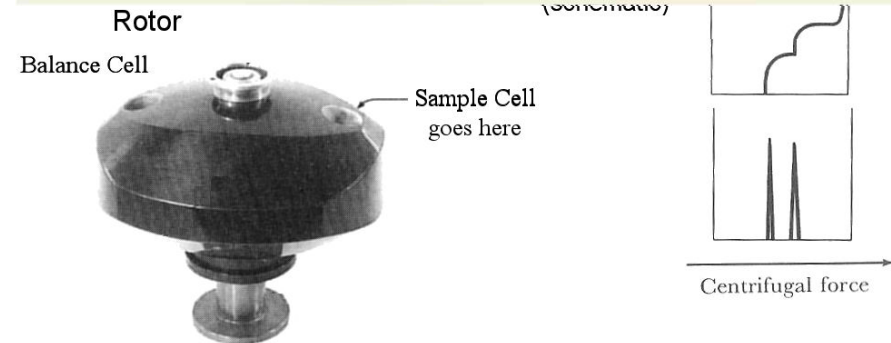
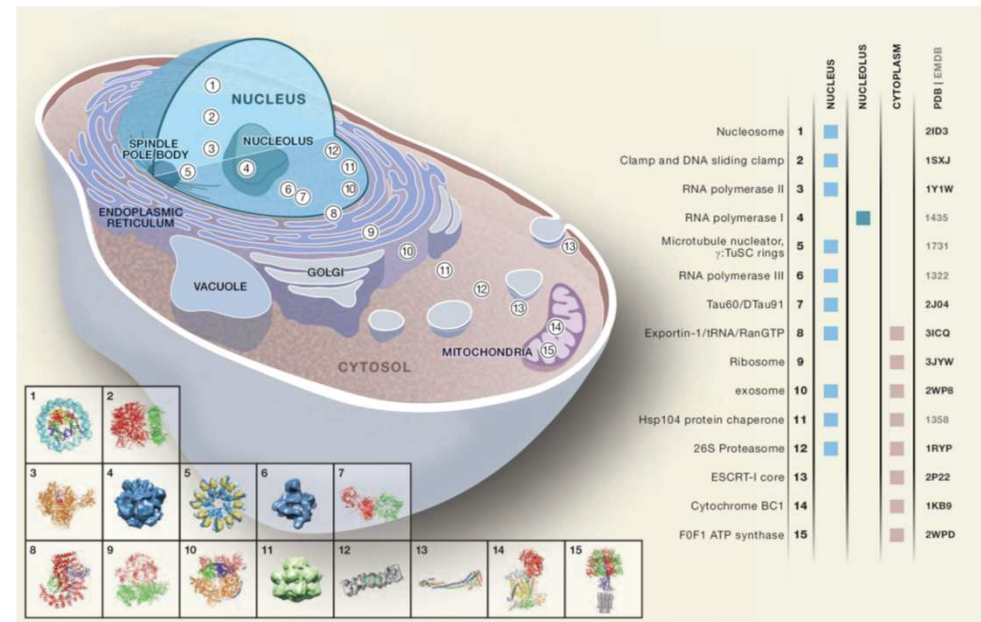


Jaké další metody by se daly použít?



Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

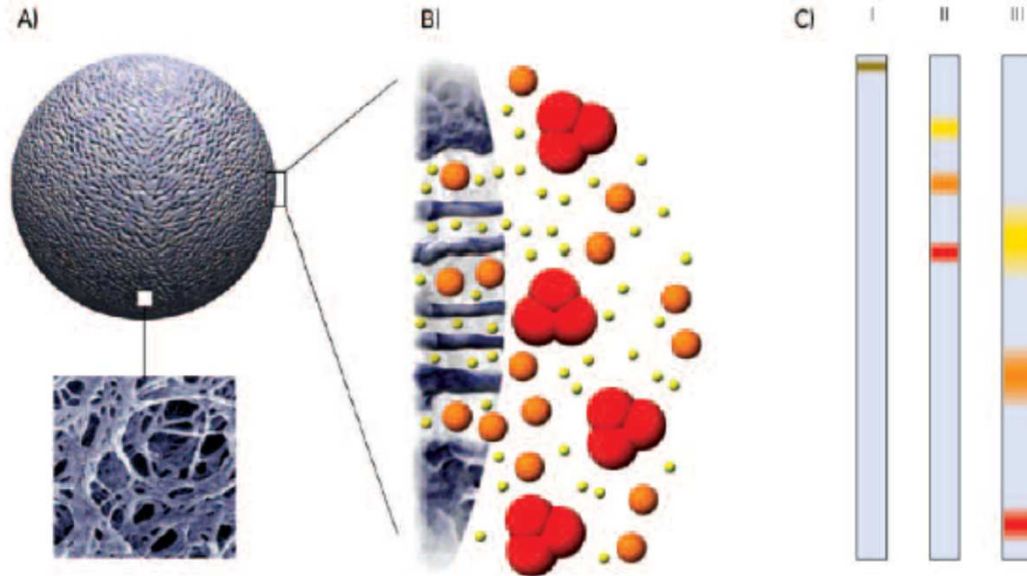
- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely - lokalizace
- B. Jemný - cukerný gradient - izolace



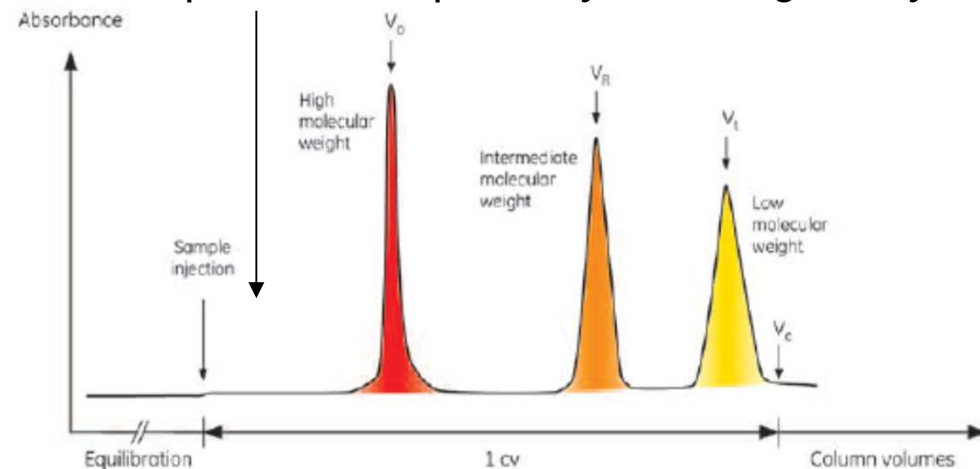
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

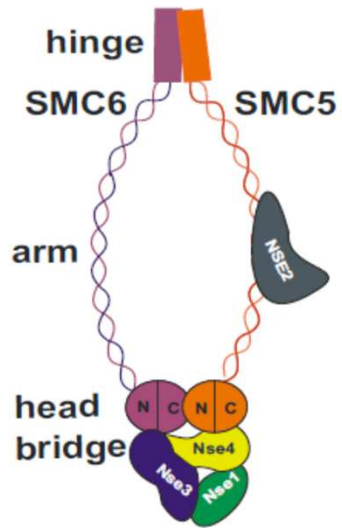
Metody izolace a analýzy PKxů

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

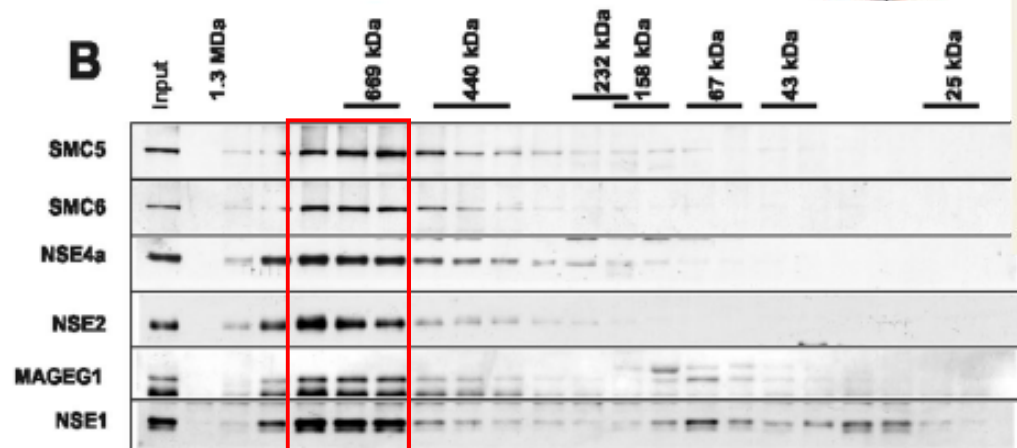
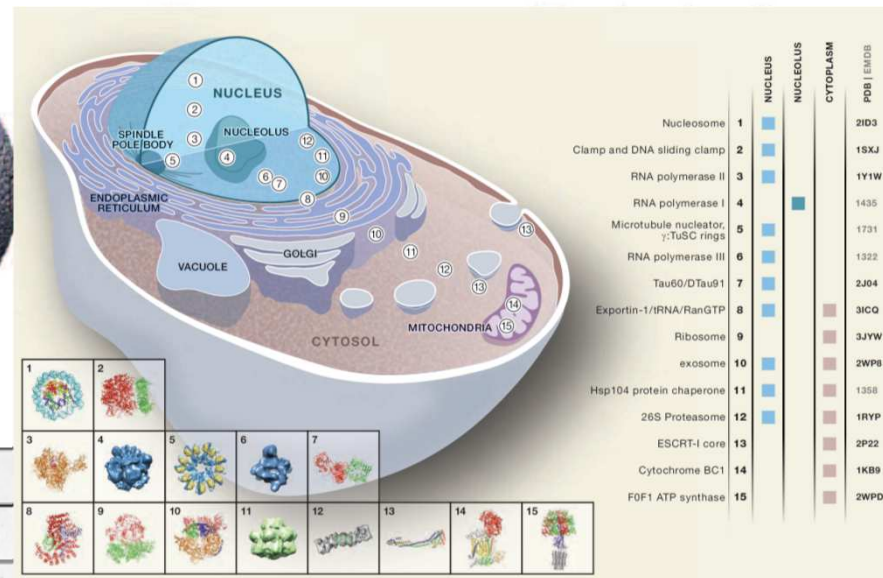


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty

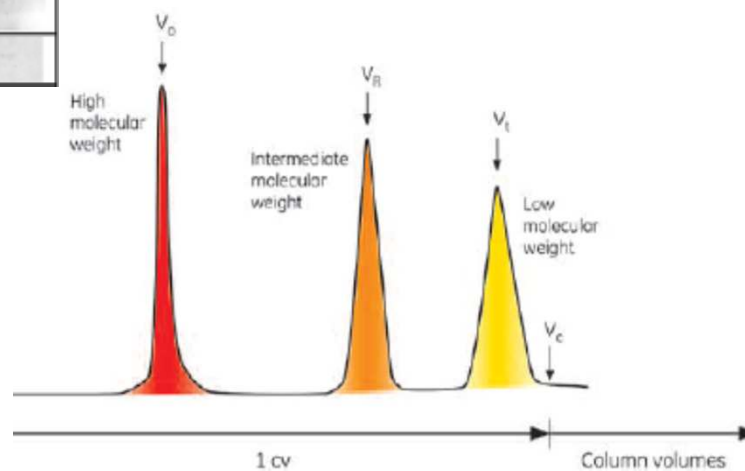




Příklad: SMC5/6 komplex – v buněčném lyzátu (nebo purifikované proteiny)



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



Metody izolace a analýzy PKxů

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



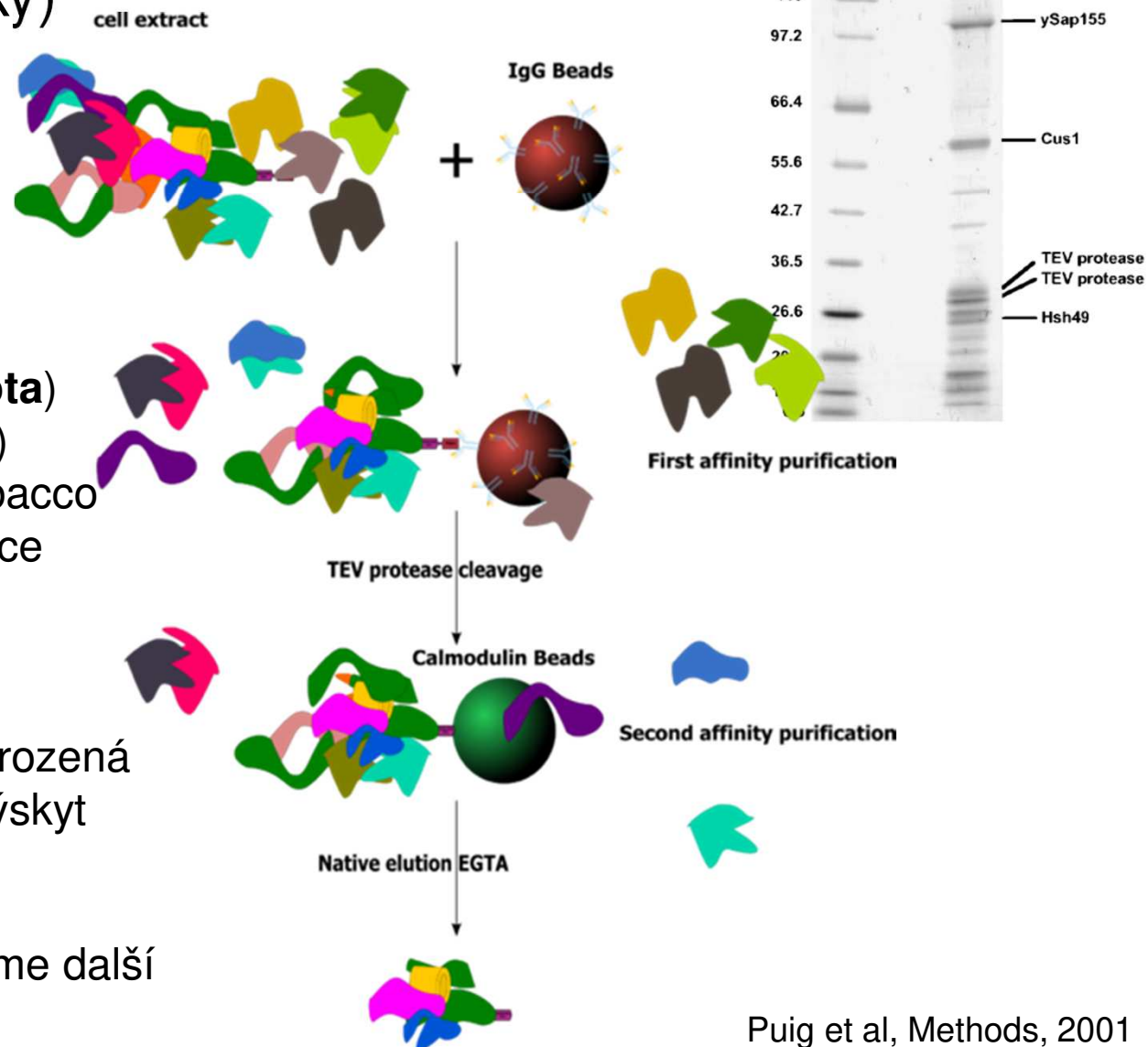
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

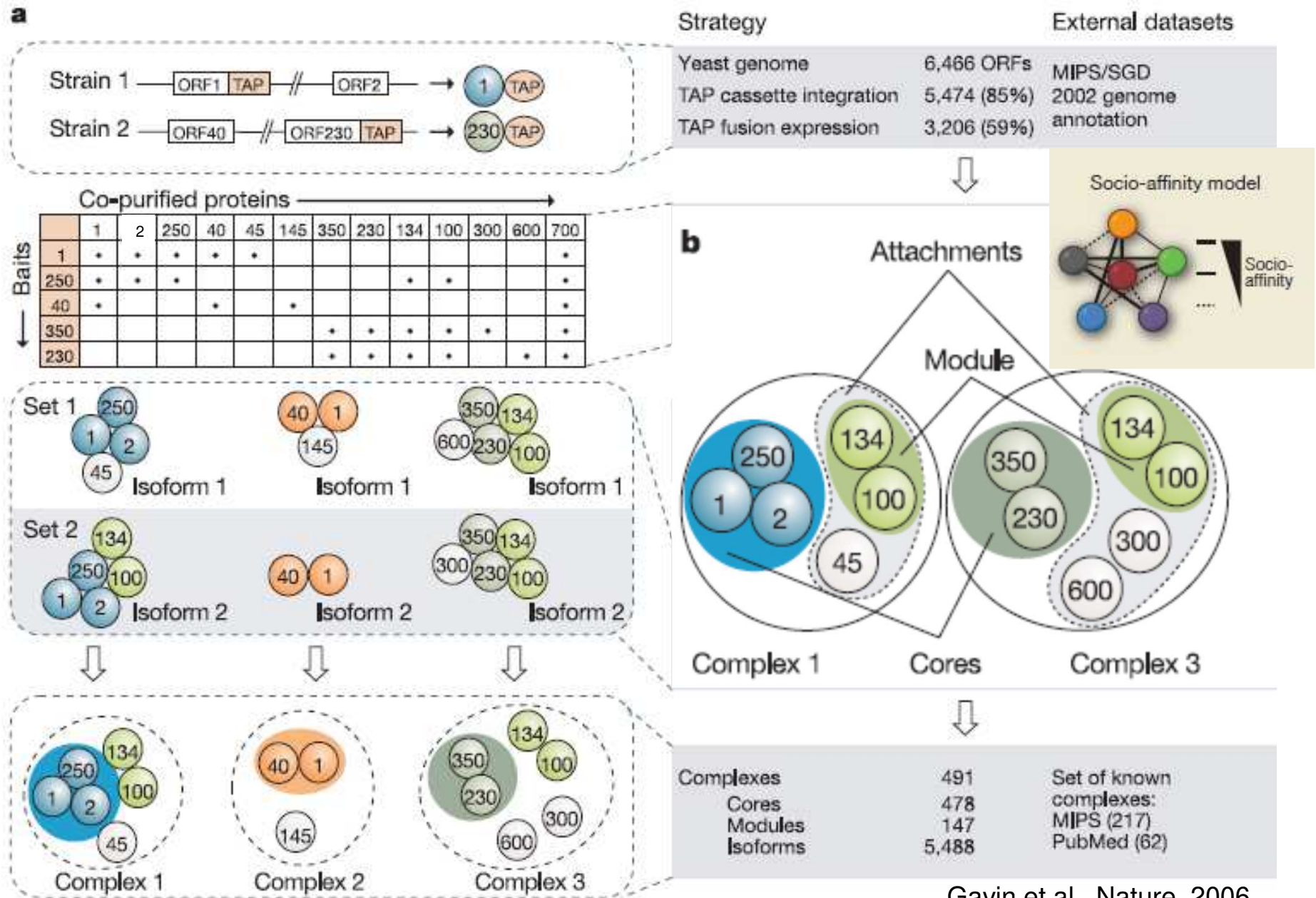
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

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

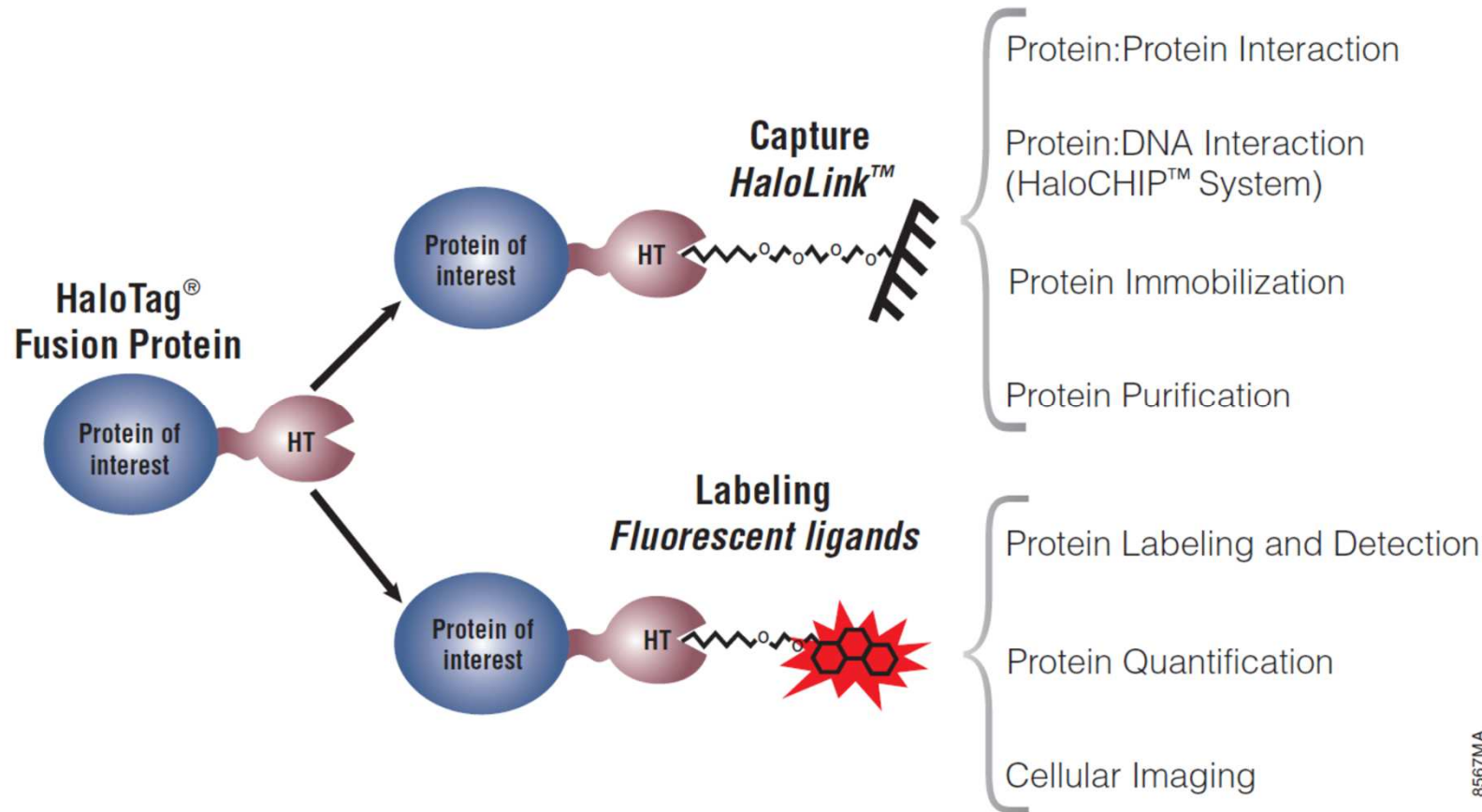
známe jeden protein – hledáme další podjednotky



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

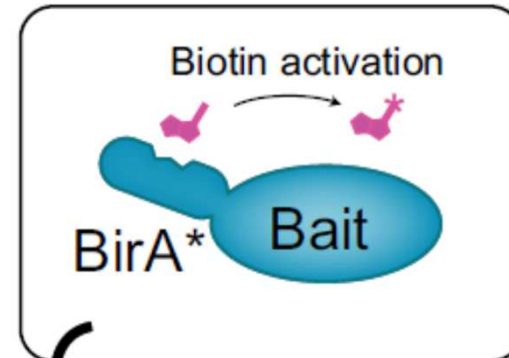
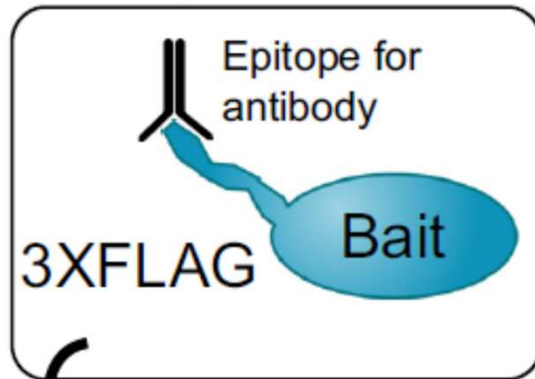
alternativní

Affinity Purification

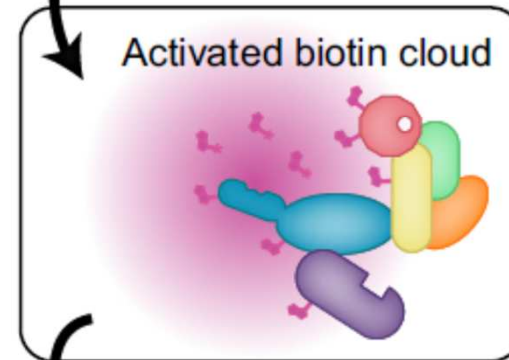
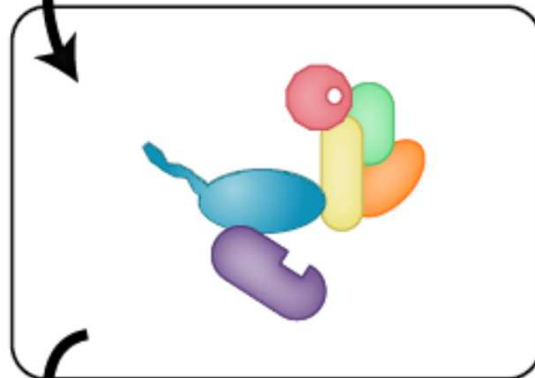
BioID

(Proximity Biotinylation)

Tagging system

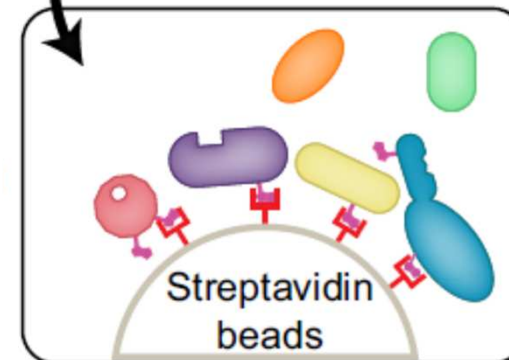
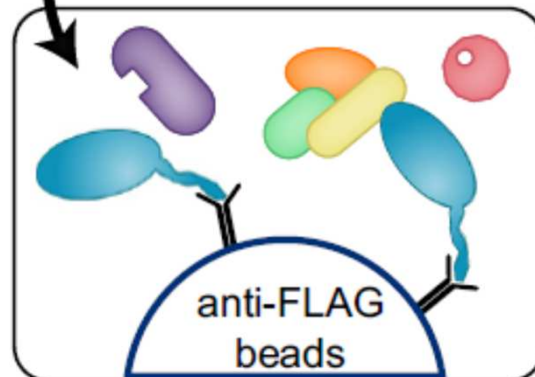


in vivo function



Biotinylace na vzdálenost <20nm

Purified interaction partners



MS identifikace biotinylovaných proteinů

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



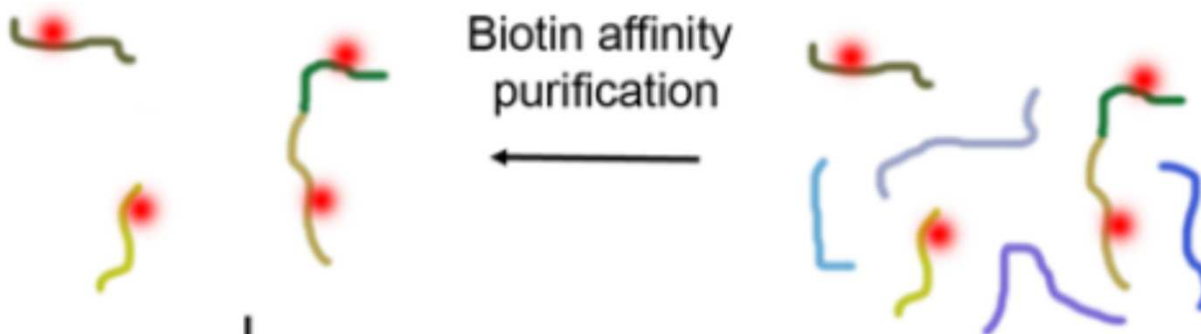
BirA biotin ligása (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells



Lyse cells

Denature proteins



Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

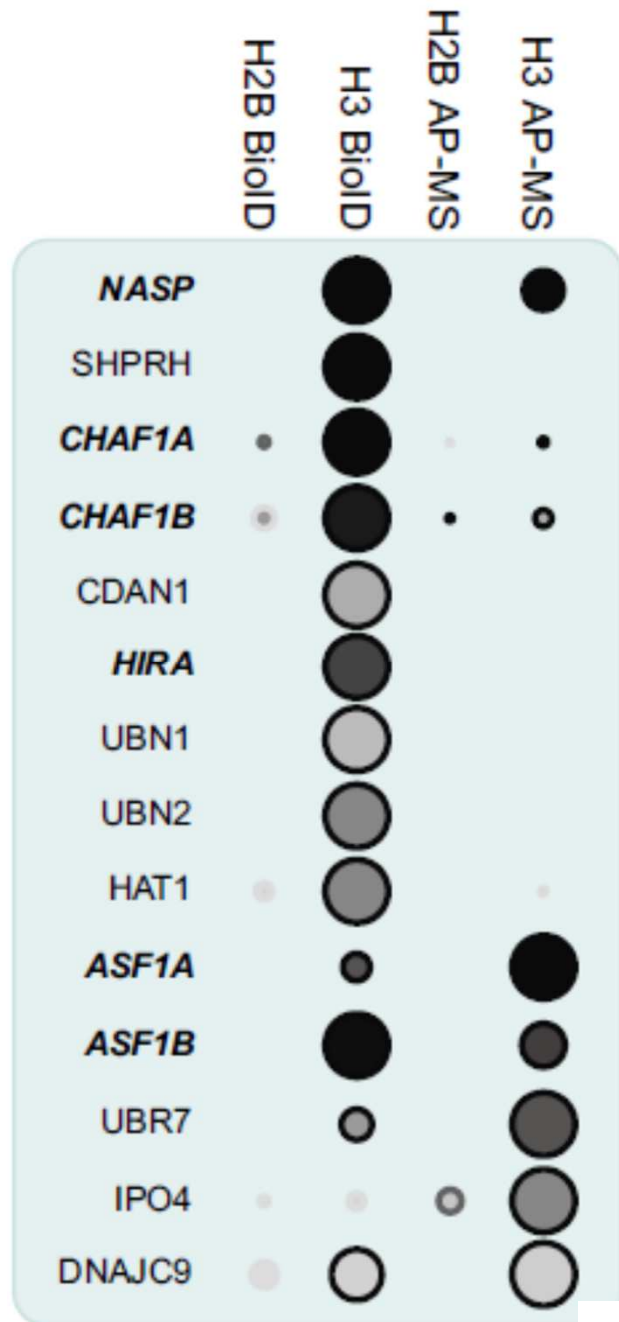
Mass spectrometry
to identify candidates

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

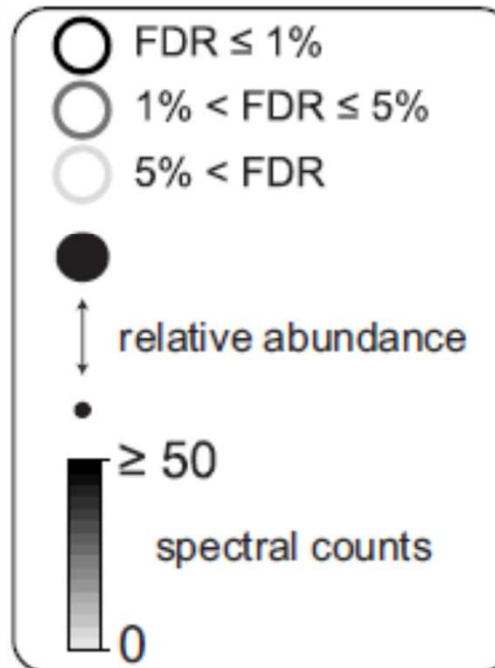
Např. chromatin-asociované komplexy jsou hůř rozpustné – izolace za denaturačních podmínek

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)



Lambert et al, J Prot, 2015

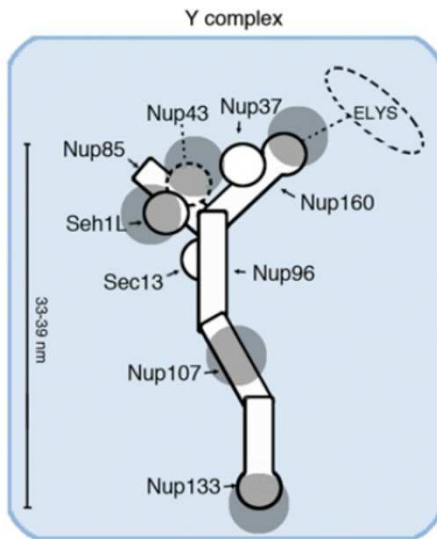
Přidání biotinu v určitém čase (rychlé připojení) – pulse-chase – lze sledovat interakce v čase (např. buněčný cyklus)

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

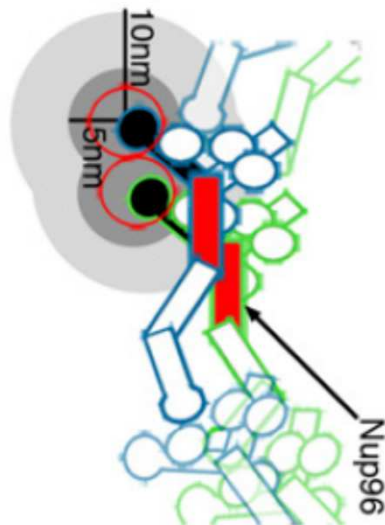
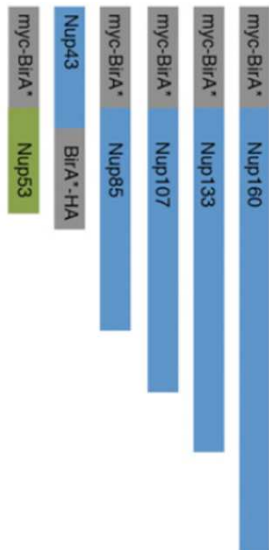
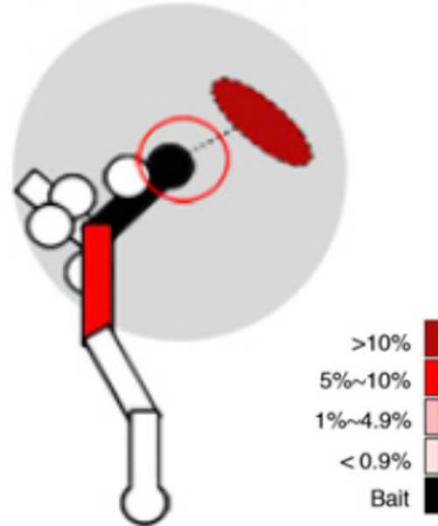
Citlivá metoda (kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „sousedící“ proteiny <20nm))

Metoda BioID – organizace komplexů

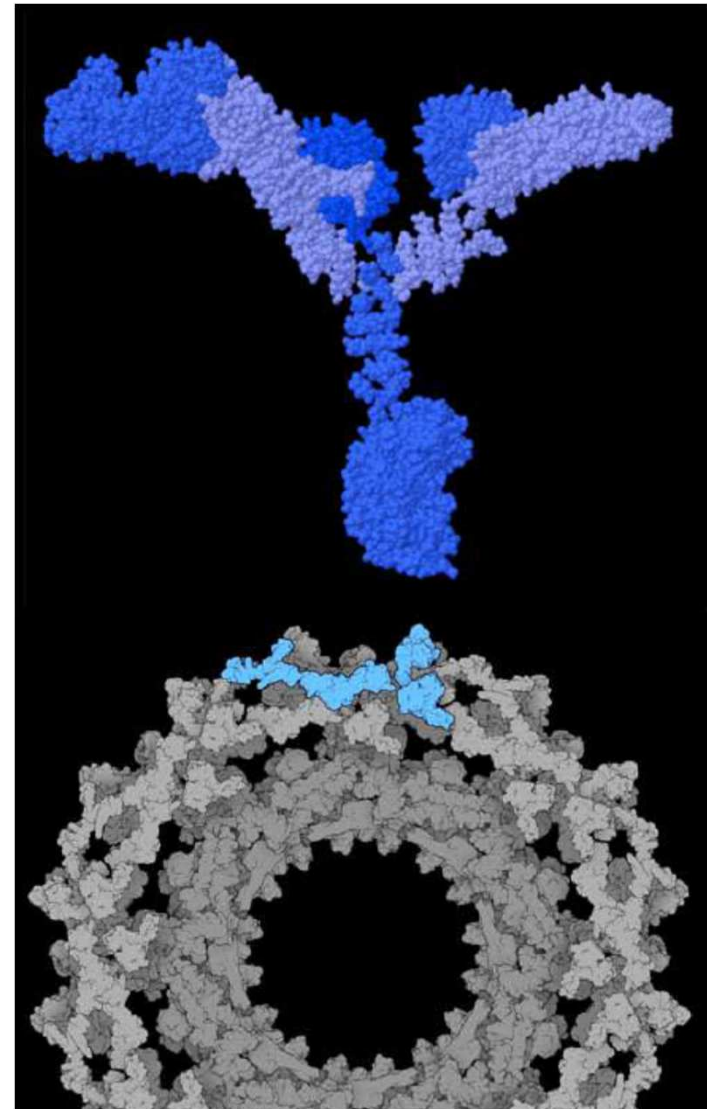
Dosah biotinylace je 10-20nm – lze využít k mapování „blízkých“ proteinových sousedů ve velkých komplexech



Nup160



Nup160



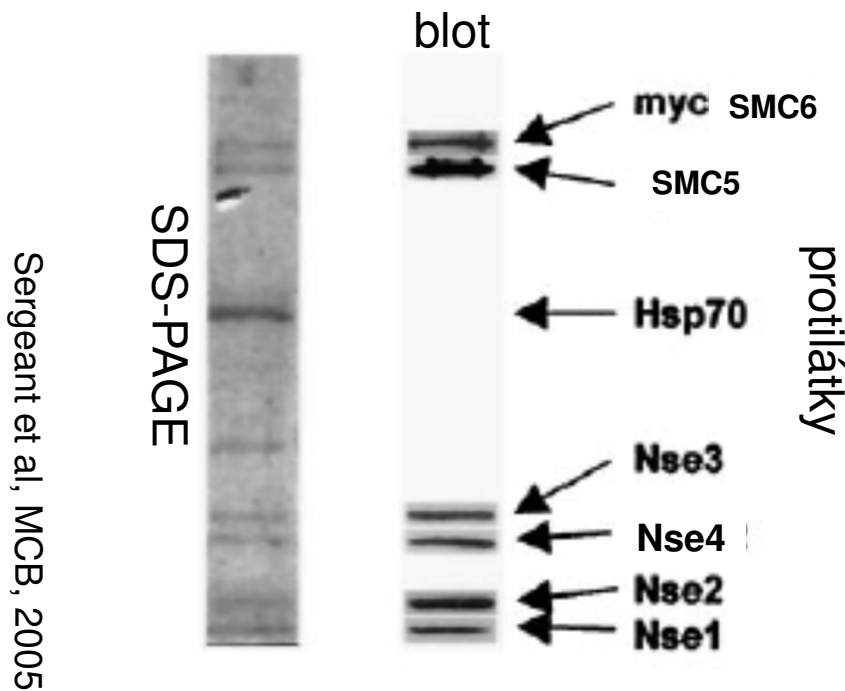
Ko-imunoprecipitace

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)



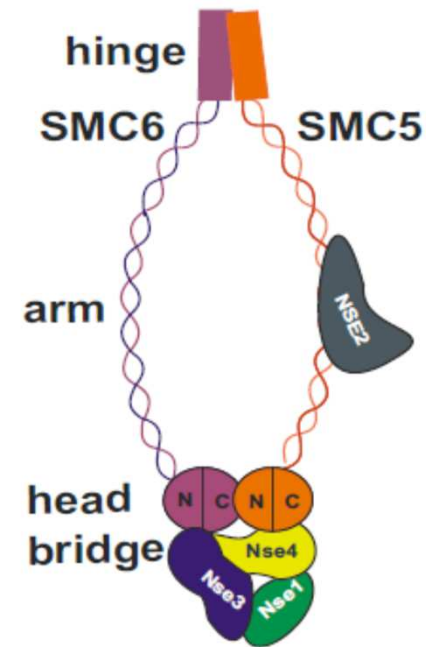
Sergeant et al, MCB, 2005

SDS-PAGE

Pozor na kontaminace
(např. chaperony)

MS analýza SDS-PAGE
nebo roztoku

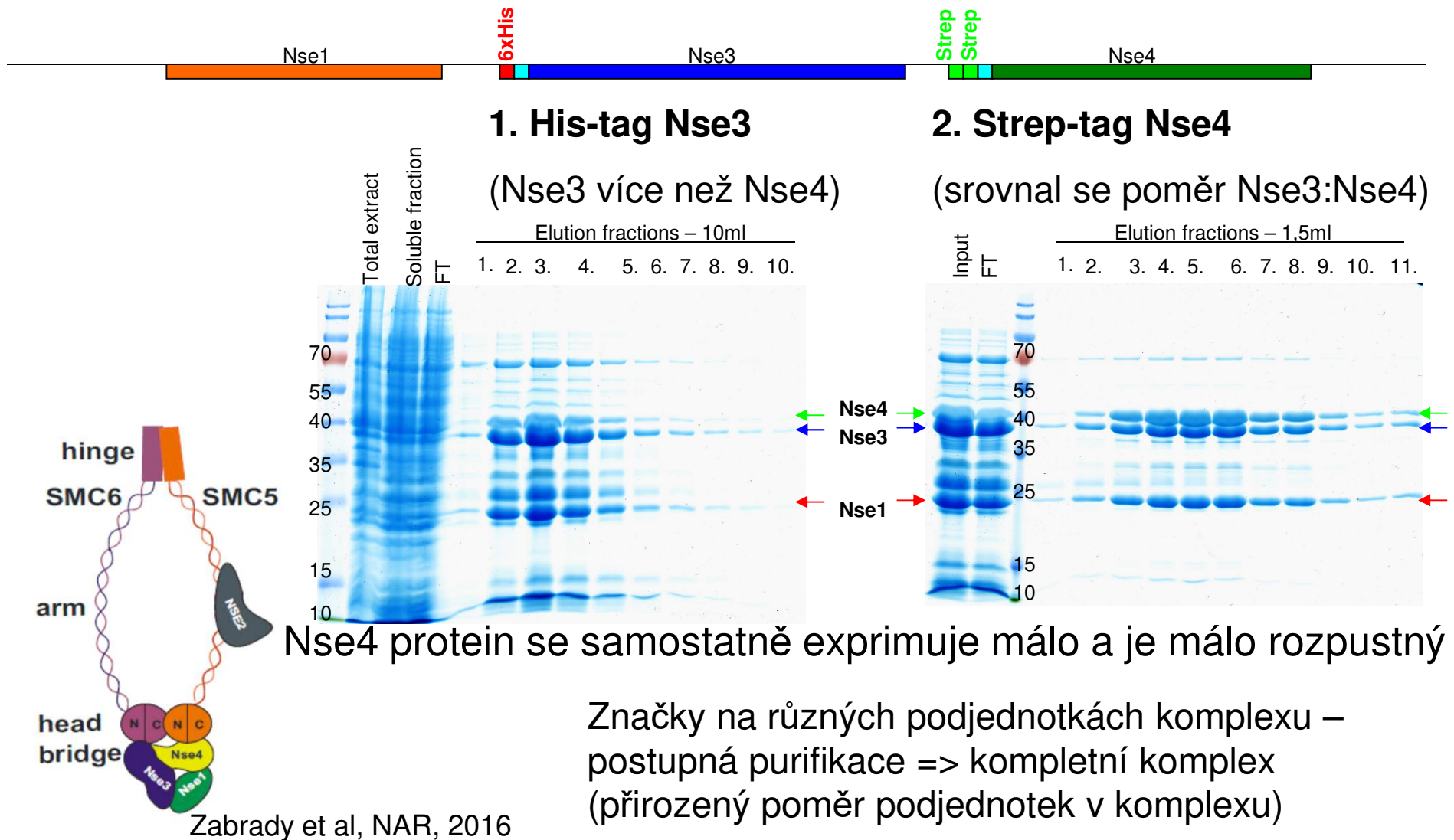
protilátky



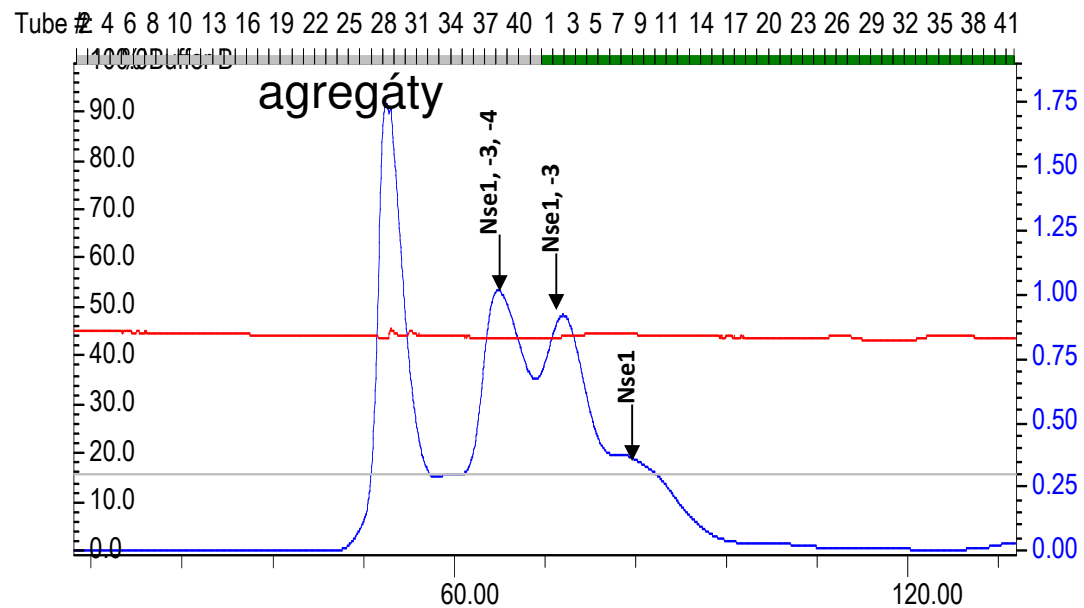
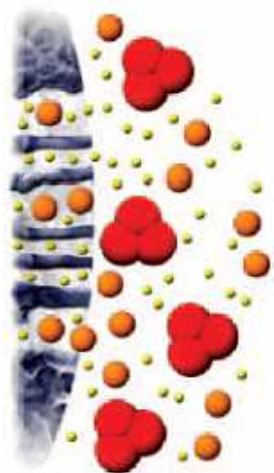
Známe-li více podjednotek - značky na různé podjednotky komplexu (vs TAP na jedné podjednotce) – postupná purifikace => kompletní komplex (vychytaný přes různé podjednotky)

Ko-purifikace

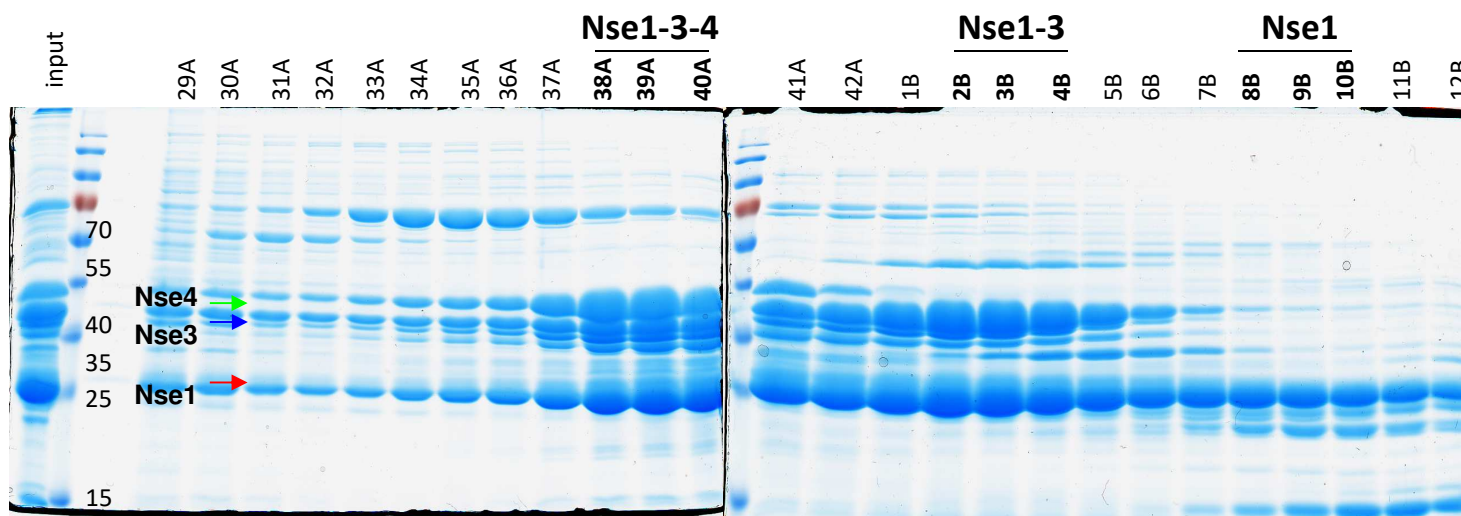
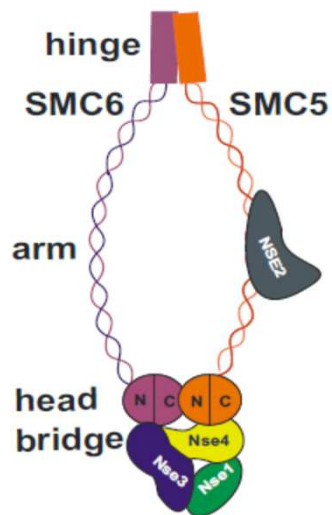
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**



Ko-purifikace



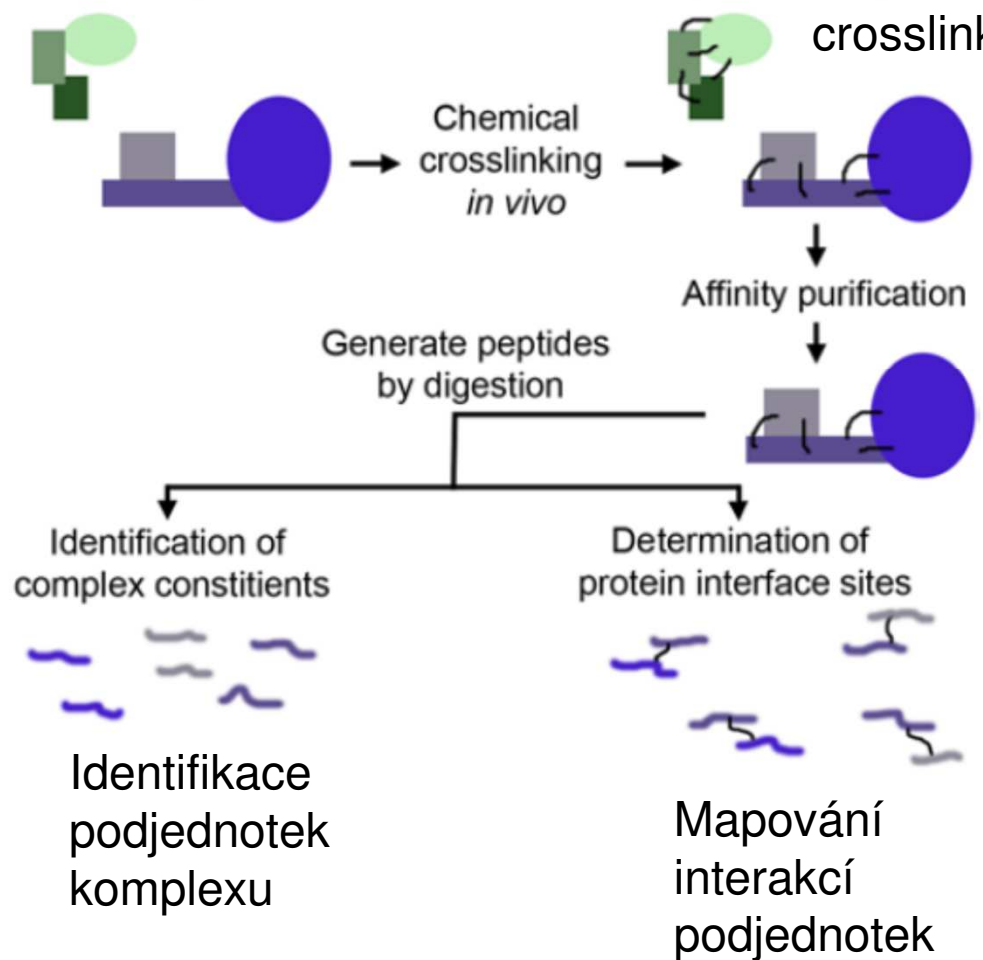
3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů



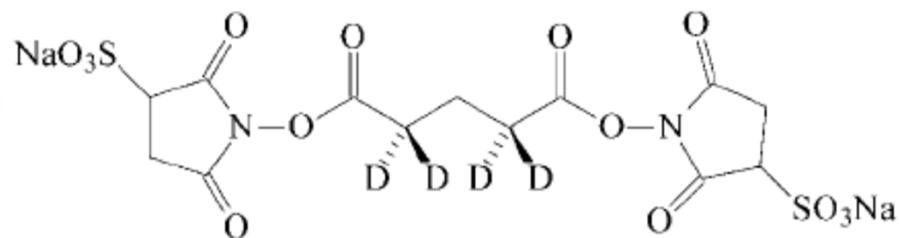
Mapování komplexů - crosslinking

Na purifikovaných komplexech nebo komplexu XL v buňce a poté purifikace za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu – např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovíně nebo HALO-tag)

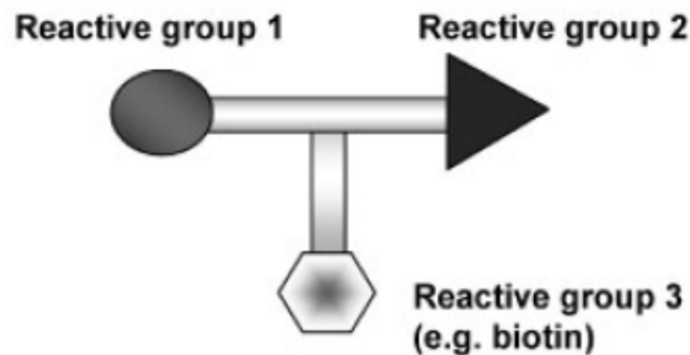
Protein complexes in live cells Fixed protein complexes



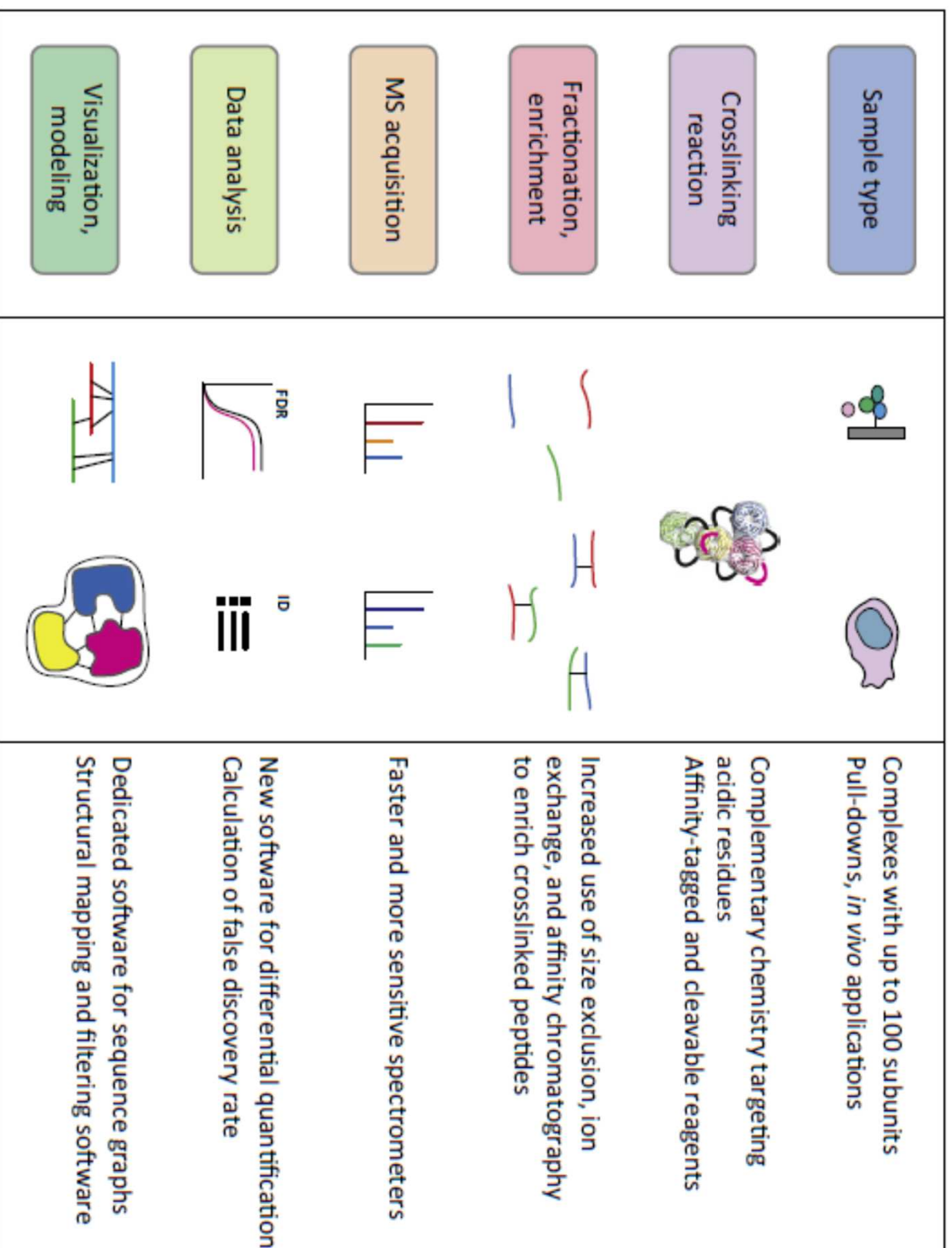
crosslink propojí podjednotky - stabilizuje komplex



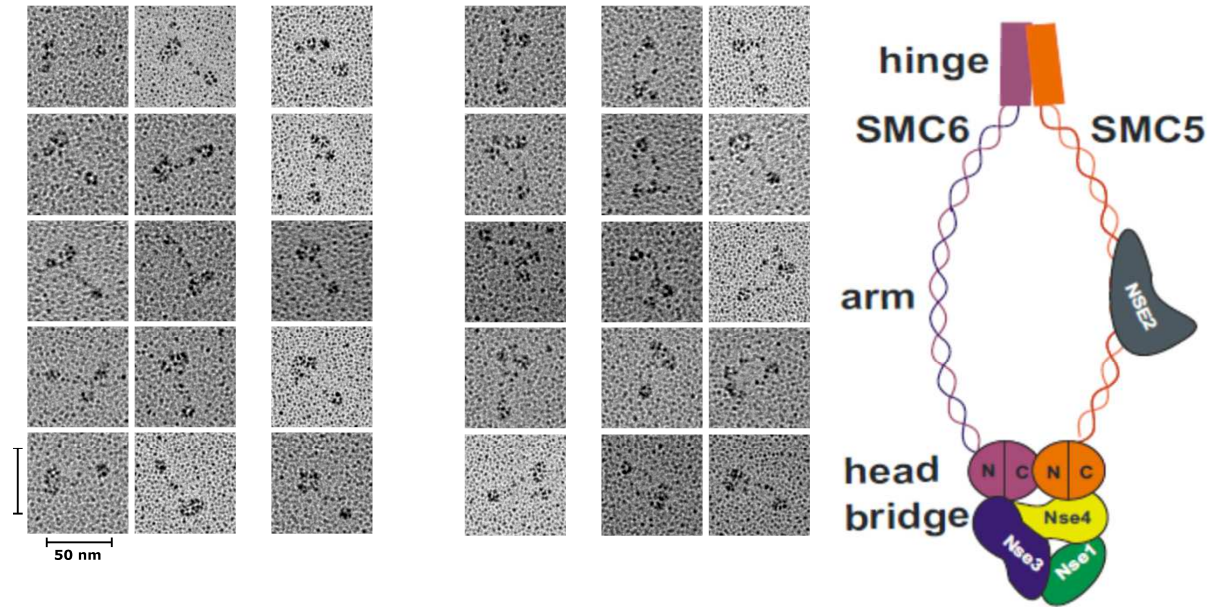
- estery reagují s Lys (ϵ -amin)
- homofunkční - spojí proteiny dohromady v jednom kroku
- heterofunkčních - postupná aktivace



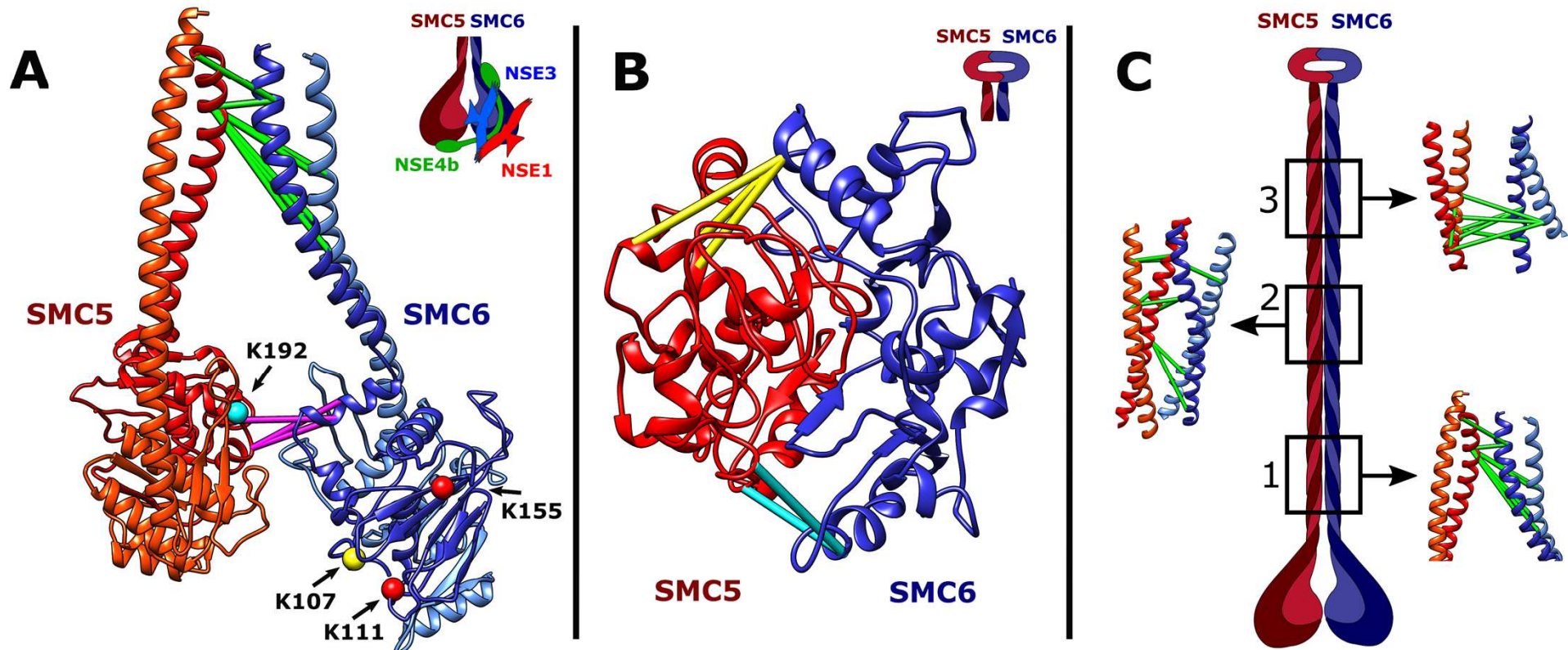
An Overview of the Crosslinking Mass Spectrometry (XL-MS) Workflow

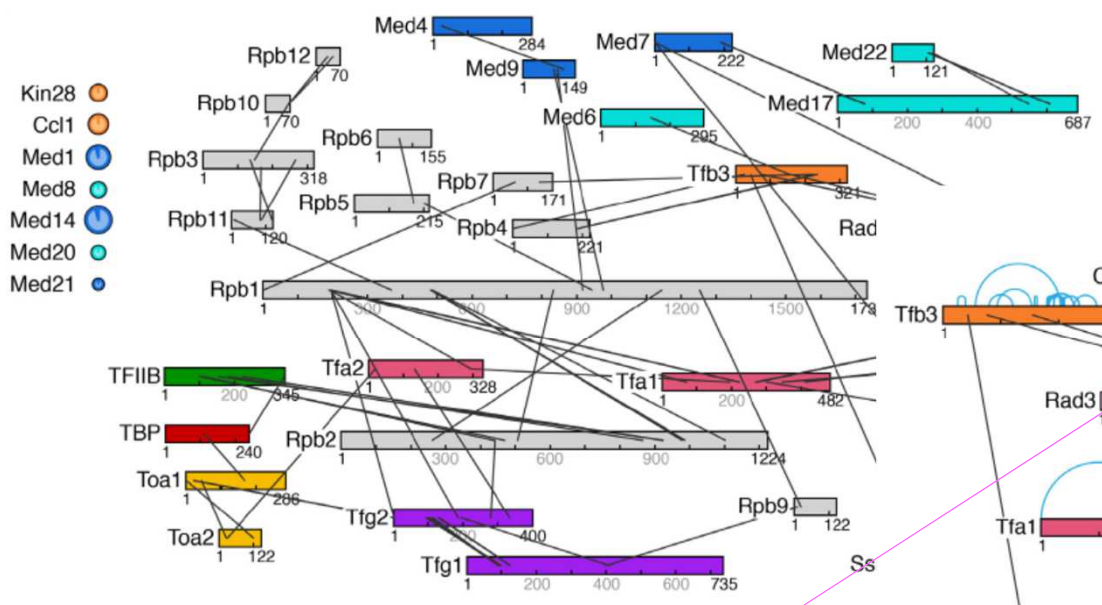


- krosslink vypurifikovaných částí komplexu SMC5/6
- 3 hotspots silně prokrosslinkované – ramena proteinů SMC5-SMC6 jsou vedle sebe (nikoli kroužek)

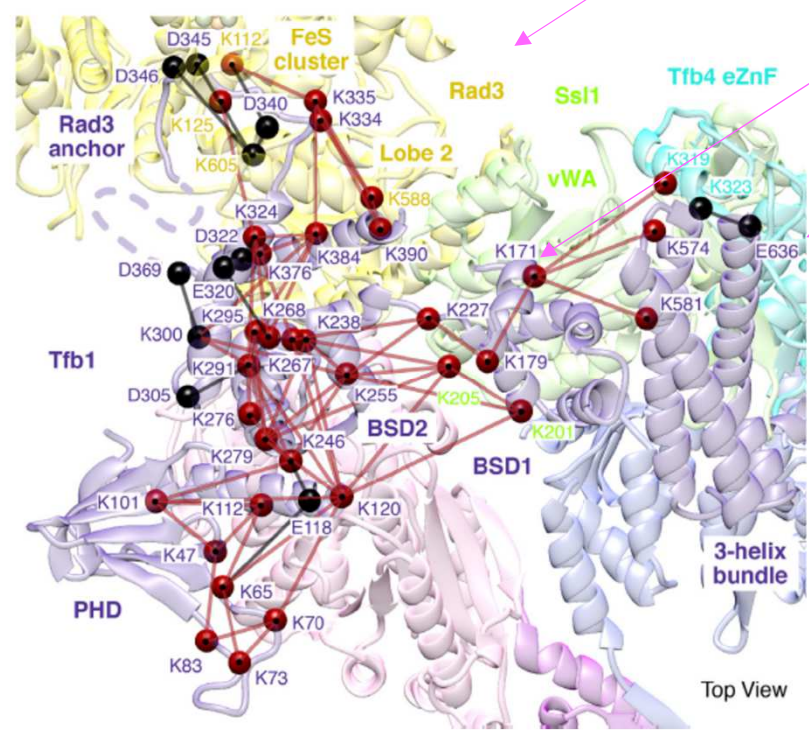
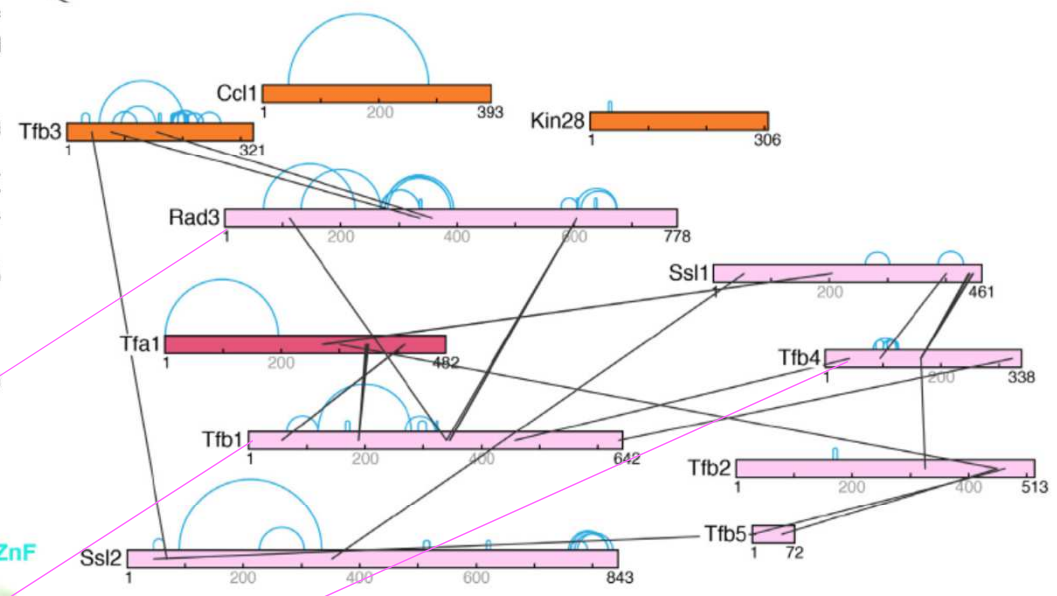


Adamus et al, JMB, 2020



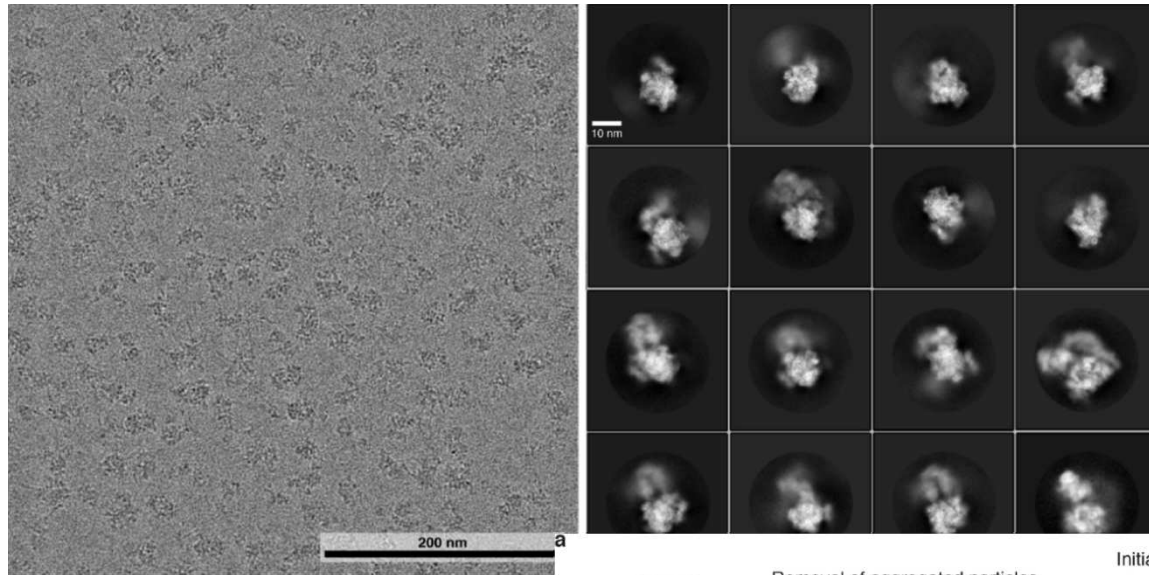


crosslink uvnitř a mezi proteiny



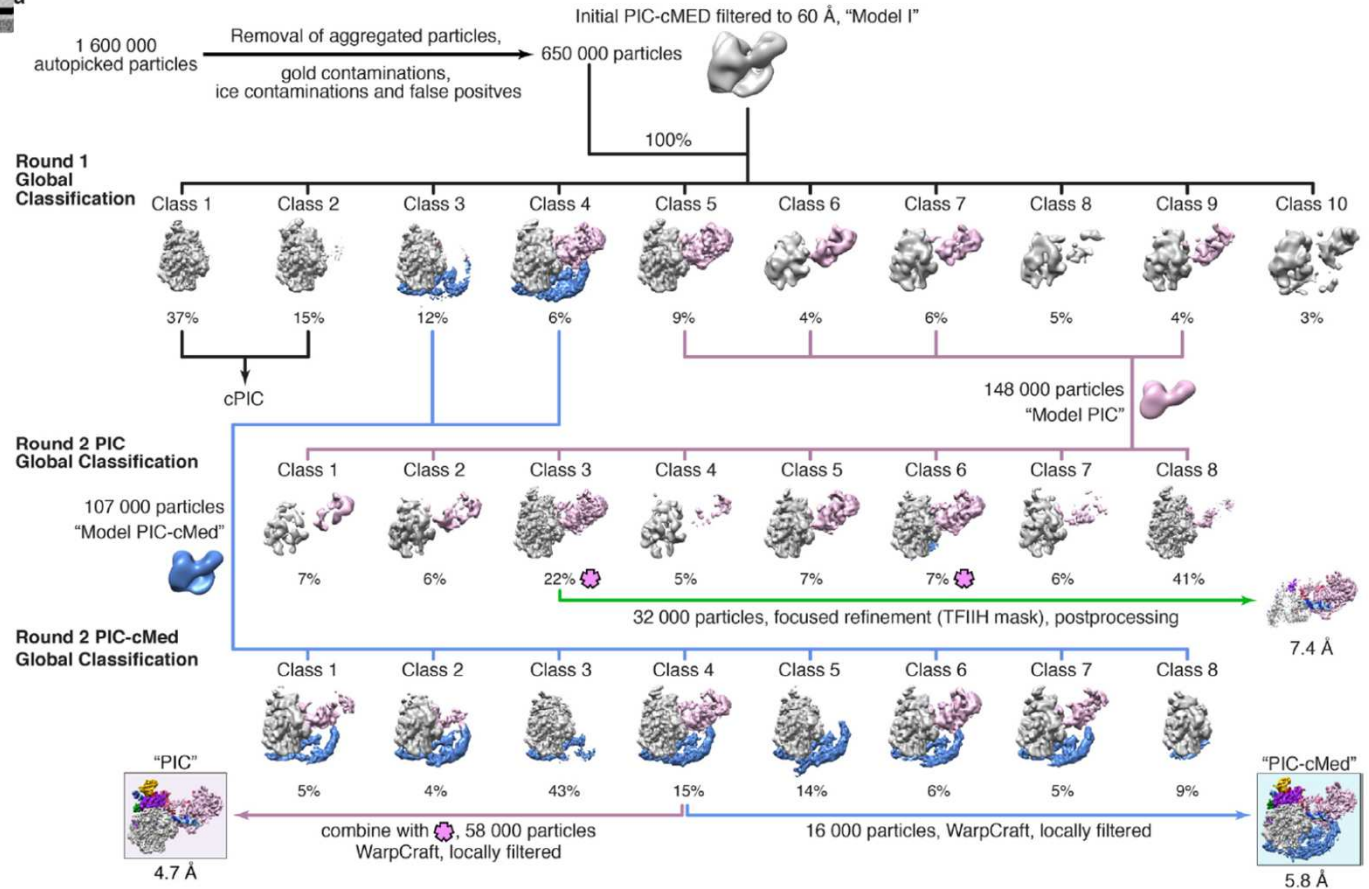
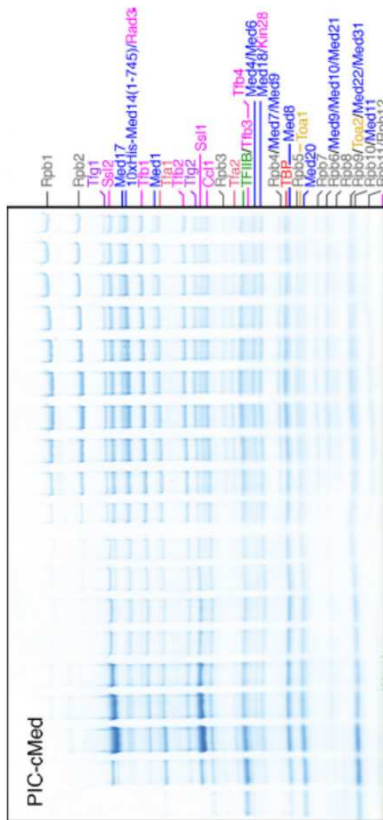
- crosslink data podpoří/doplní strukturální informace z krystalografie nebo kryoEM

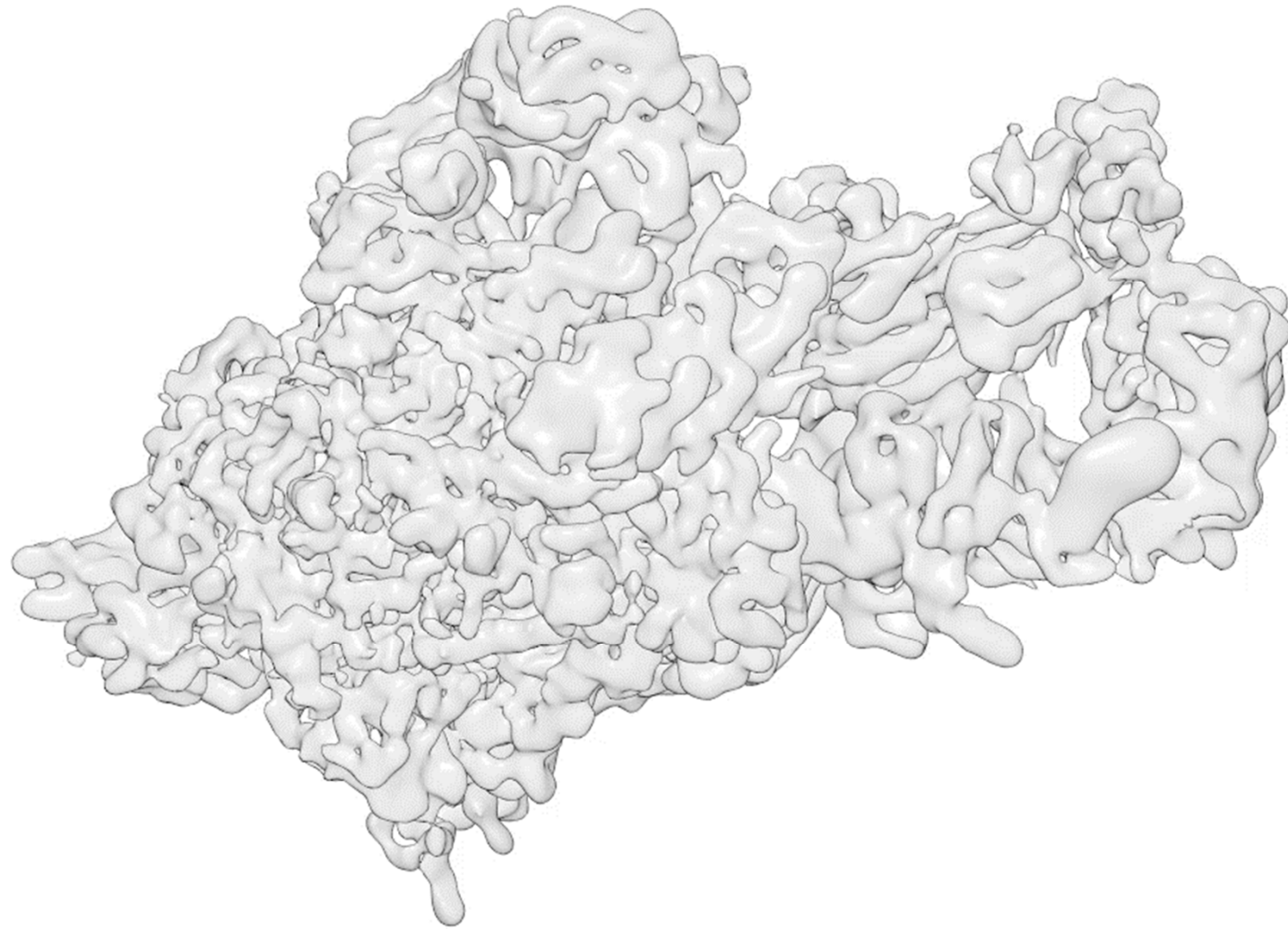
analýza PIC-MED komplexu (~50 podjednotek - ~2MDa)



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

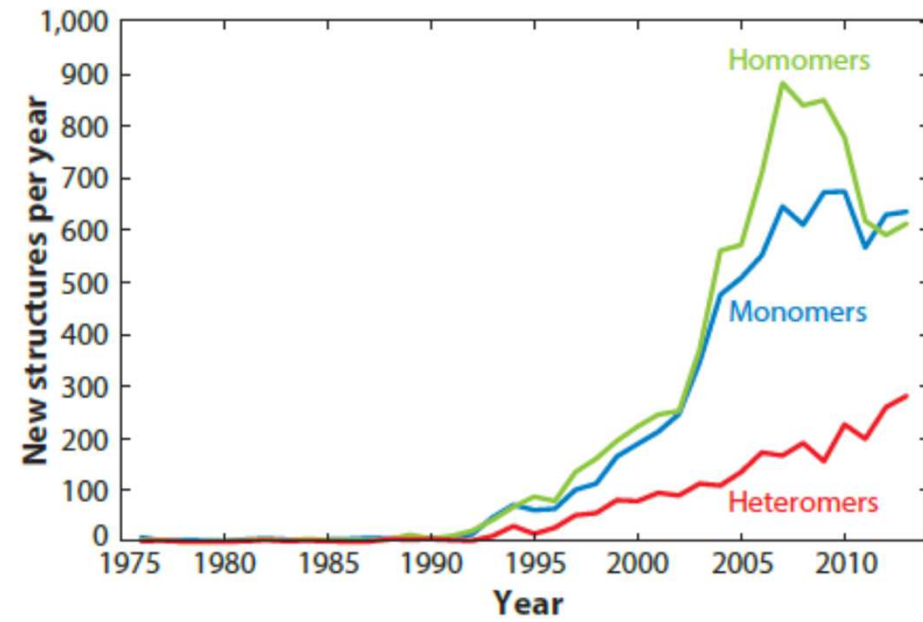
| | | |
|---------|----------|----------|
| ■ TFIIA | ■ TFII E | ■ TBP |
| ■ TFIIB | ■ TFIIF | ■ Pol II |

_____ cPIC

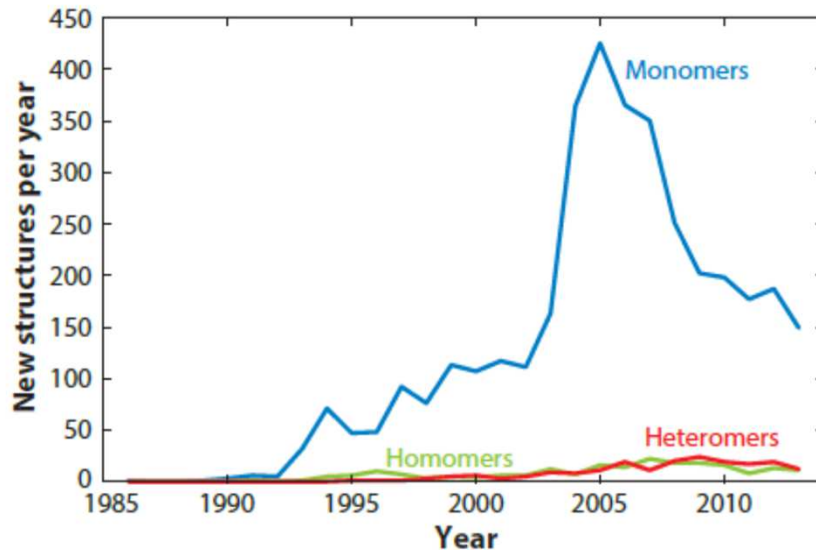
Použití metod **strukturní biologie** pro studium proteinových komplexů

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

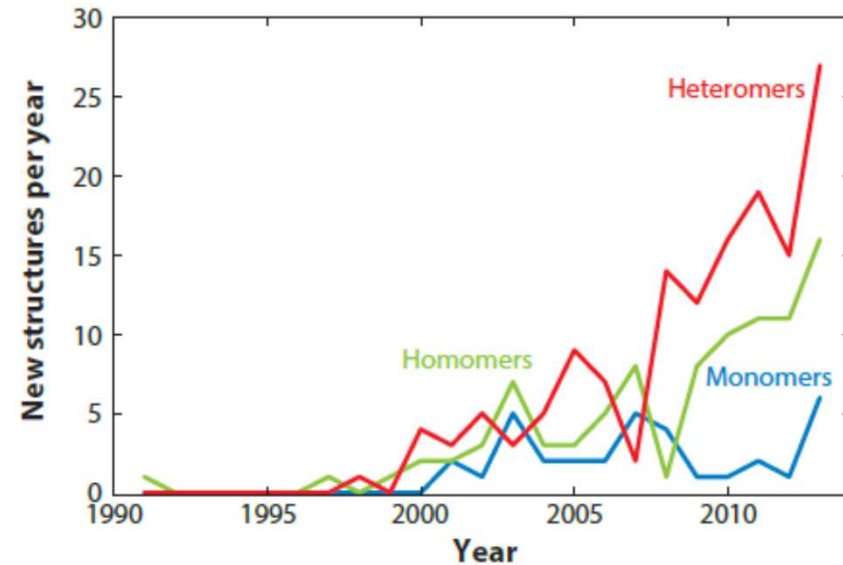
a X-ray crystallography



b NMR

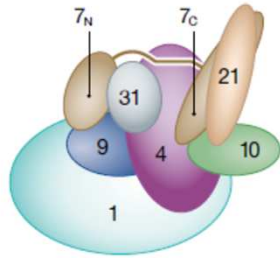


c Electron microscopy



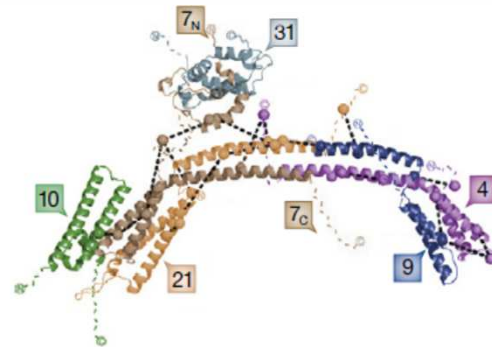
Integrativní modelování

MEDIATOR MIDDLE MODULE



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

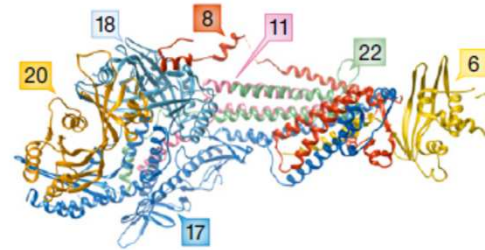
- Native MS
- IMS-MS
- Limited proteolysis
- Light scattering
- SAXS
- Pull-down assays



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

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

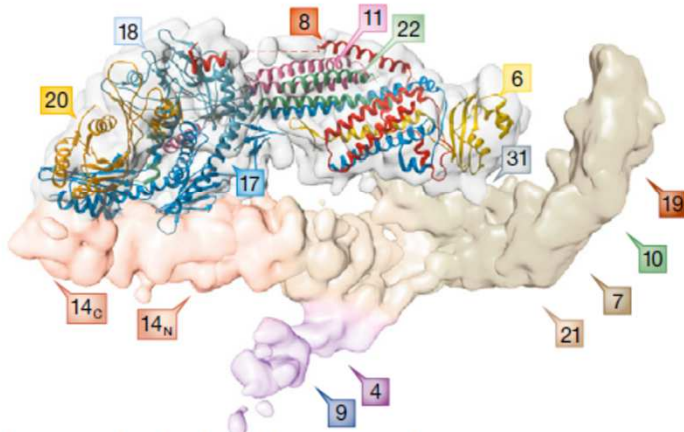
MEDIATOR HEAD MODULE



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

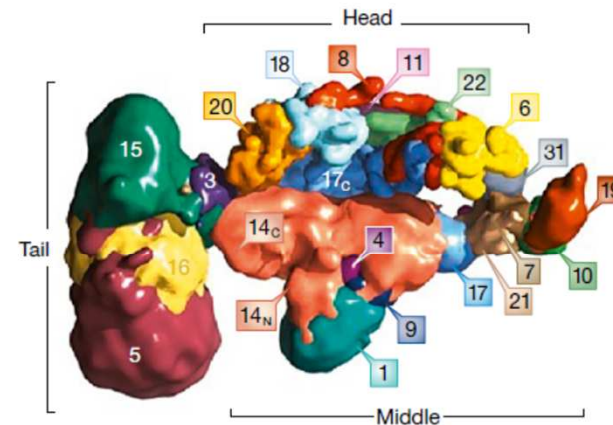
- Crosslinking-MS
- X-ray crystallography

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

Lossl *et al*, EMBO J, 2016

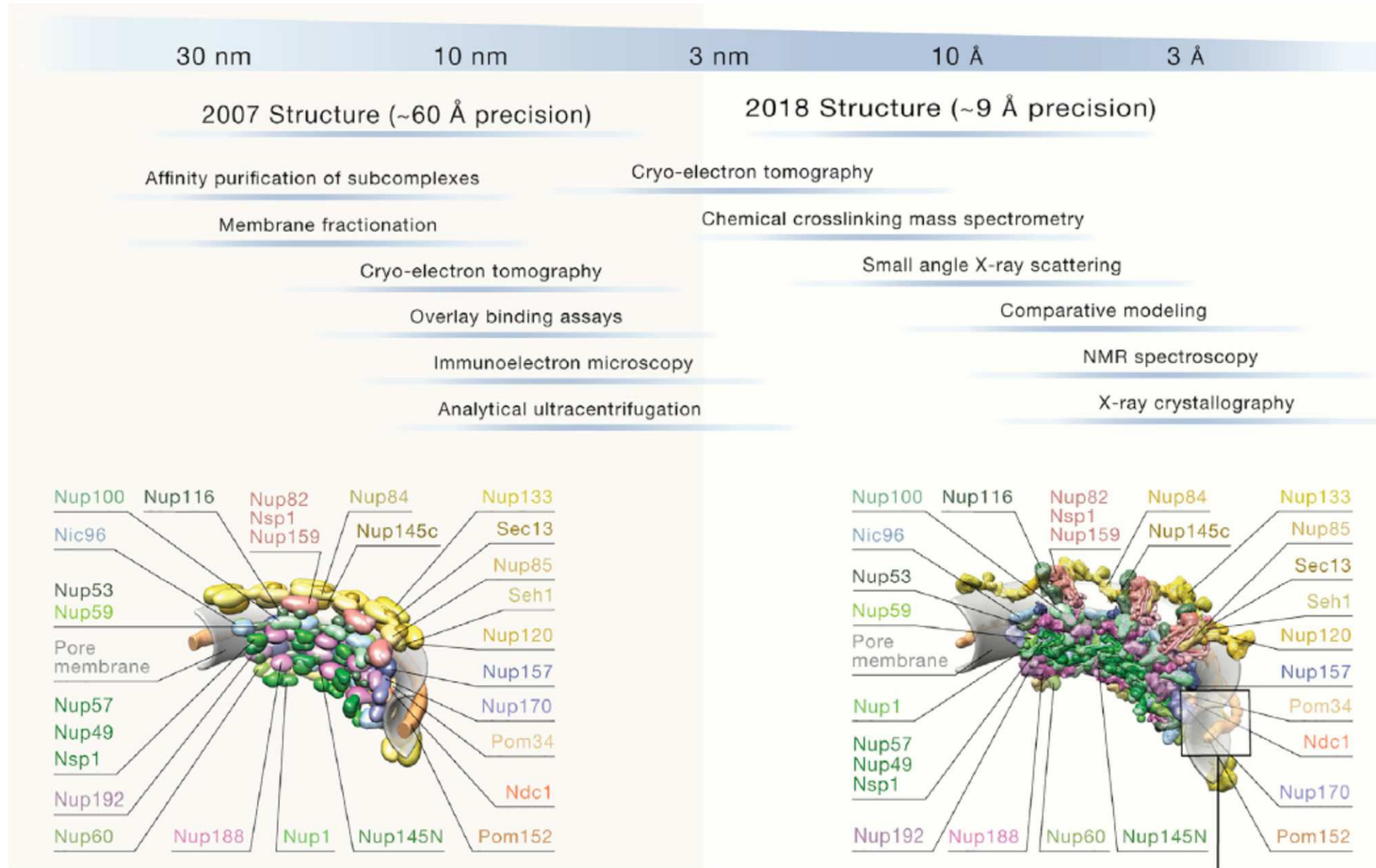
Integrativní modelování

Table 1. Example Methods that Are Informative about a Variety of Structural Aspects of Biomolecular Systems

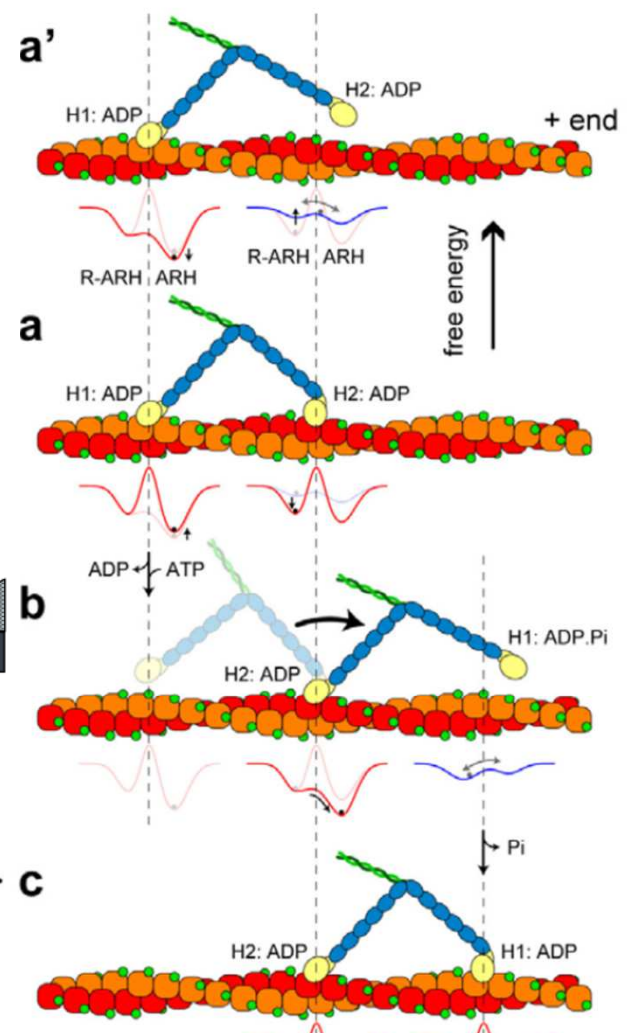
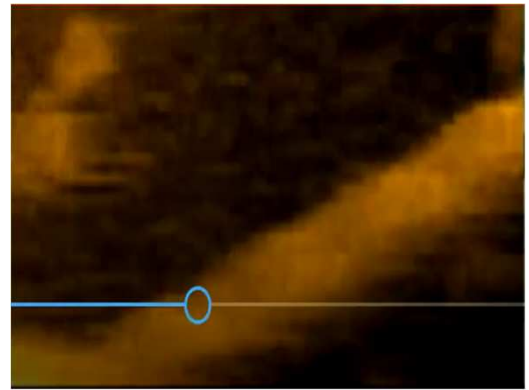
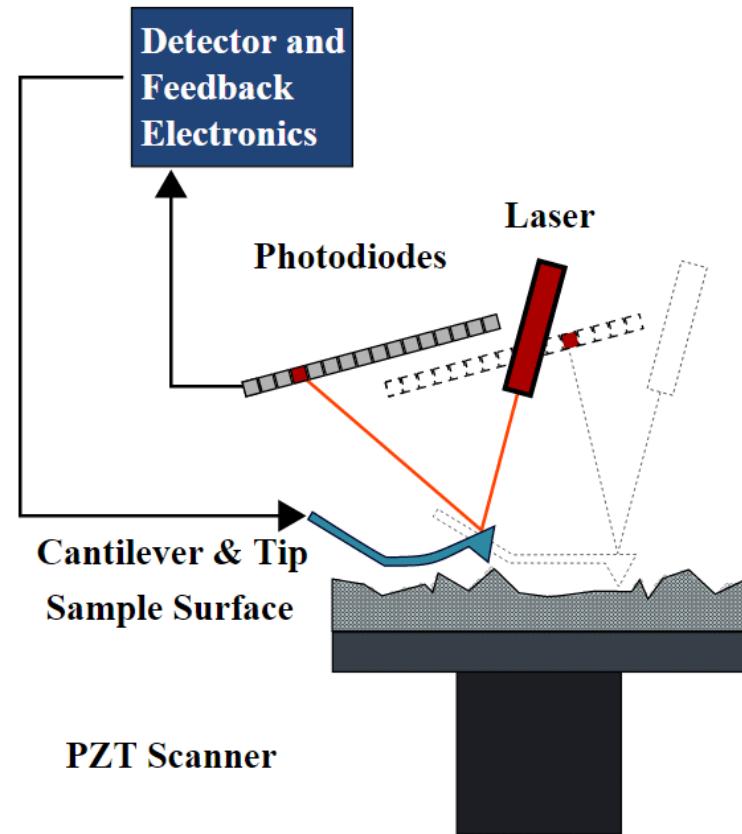
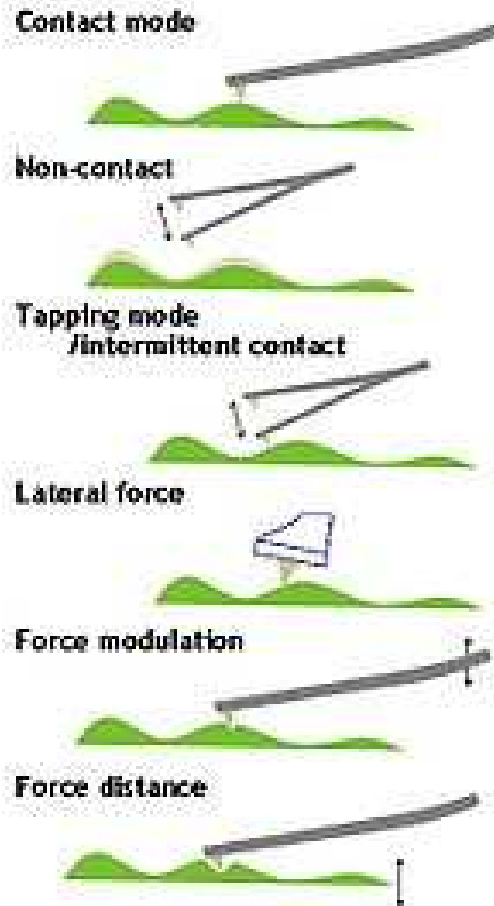
| Structural information | Method |
|---|---|
| Stoichiometry | MS, quantitative fluorescence imaging |
| Atomic structures of parts of the studied system | X-ray and neutron crystallography, NMR spectroscopy, 3DEM, comparative modeling, and molecular docking |
| 3D maps and 2D images | Electron microscopy and tomography |
| Atomic and protein distances | NMR, FRET, and other fluorescence techniques; DEER, EPR, and other spectroscopic techniques; and XL-MS and disulfide bonds detected by gel electrophoresis |
| Binding site mapping | NMR spectroscopy, mutagenesis, FRET, and XL-MS |
| Size, shape, and distributions of pairwise atomic distances | SAS |
| Shape and size | Atomic force microscopy, ion mobility mass spectrometry, fluorescence correlation spectroscopy, fluorescence anisotropy, and analytical ultracentrifugation |
| Component positions | Super-resolution optical microscopy, FRET imaging, and immuno-electron microscopy |
| Physical proximity | Co-purification, native mass spectrometry, XL-MS, molecular genetic methods, and gene/protein sequence covariance |
| Solvent accessibility | Footprinting methods, including HDex assessed by MS or NMR, and even functional consequences of point mutations |
| Proximity between different genome segments | chromosome conformation capture |
| Propensities for different interaction modes | Molecular mechanics force fields, potentials of mean force, statistical potentials, and sequence co-variation |

Abbreviation are as follows: 3DEM, 3D electron microscopy; DEER, double electron-electron resonance; EPR, electron paramagnetic resonance; FRET, Foerster resonance energy transfer; HDex, hydrogen/deuterium exchange; NMR, nuclear magnetic resonance; SAS, small-angle scattering; XL-MS, cross-linking mass spectrometry.

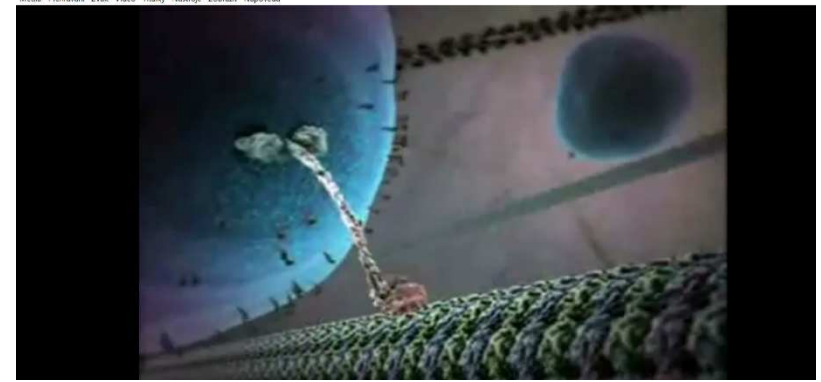
Integrativní modelování



AFM atomic force microscopy

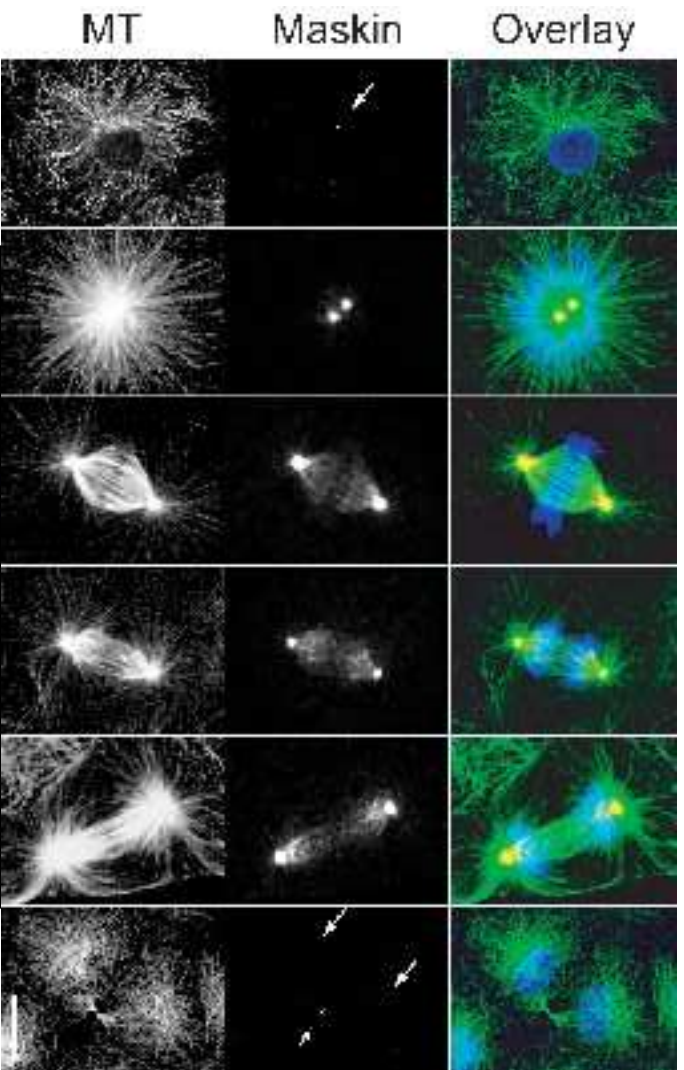


Molecular Machinery of Life 5v - Multimediální prehrávač VLC
 Média: Prehrávač, Zvuk, Video, Tituly, Nástroje, Zobrazit, Napověda

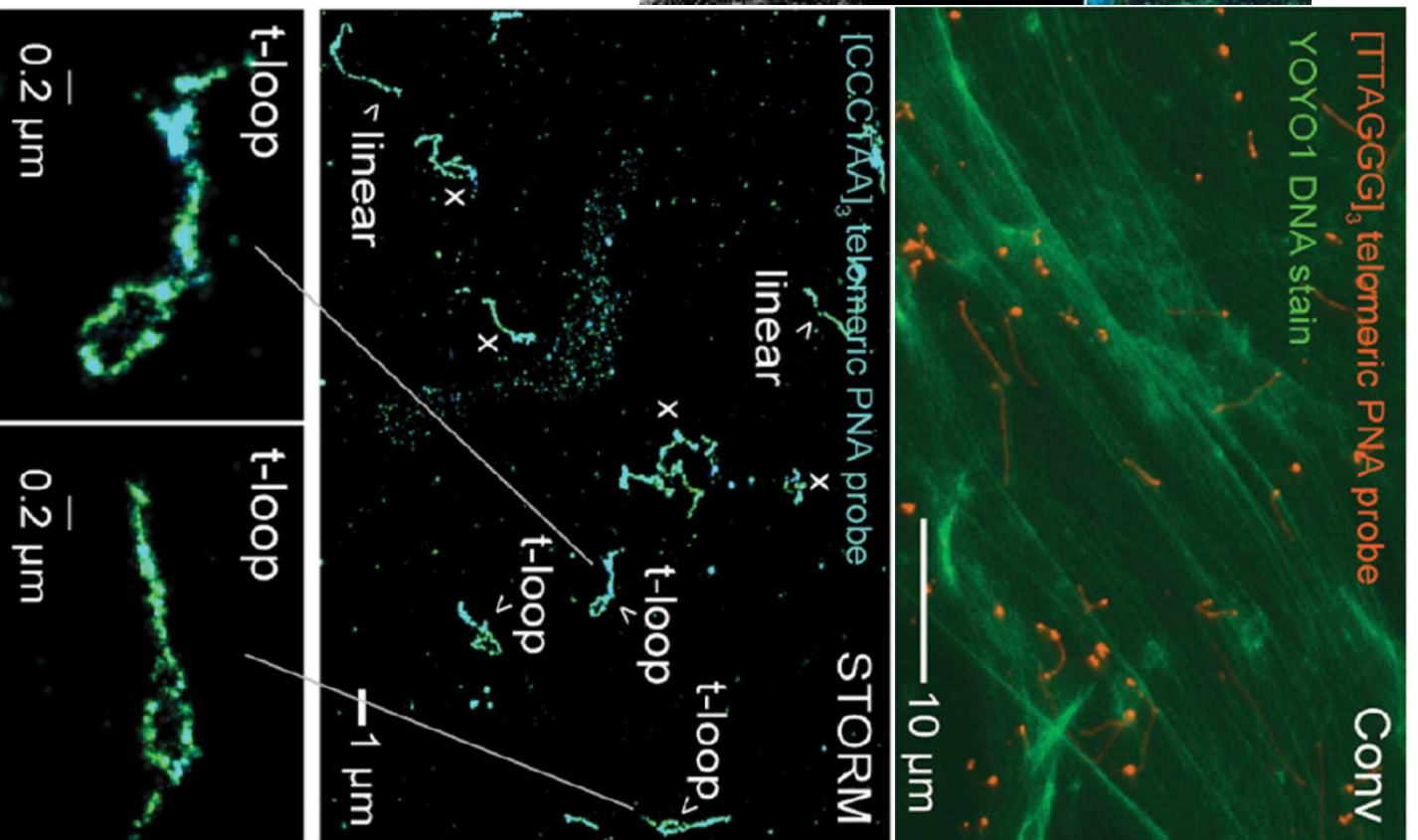


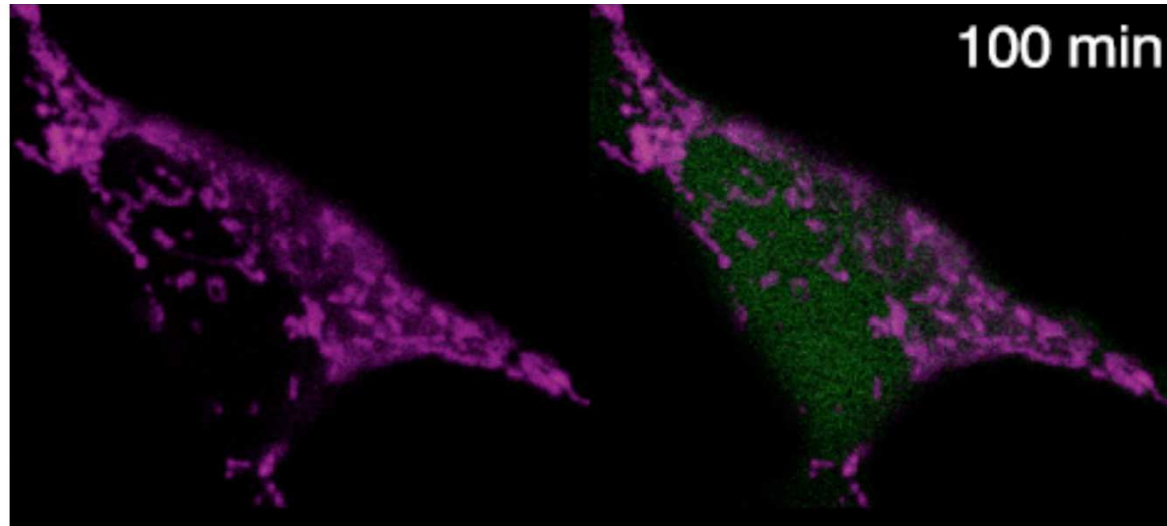
Uchihashi et al,
 Nat Prot, 2012

Mikroskopie



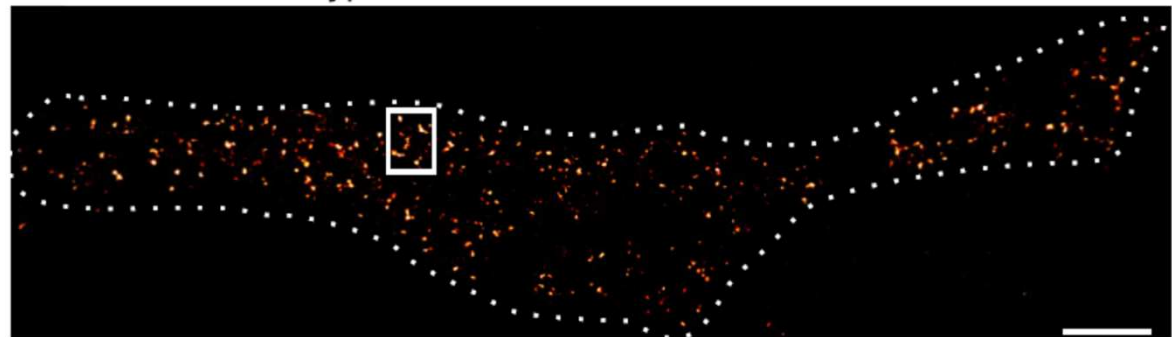
Doksani et al, Cell, 2013



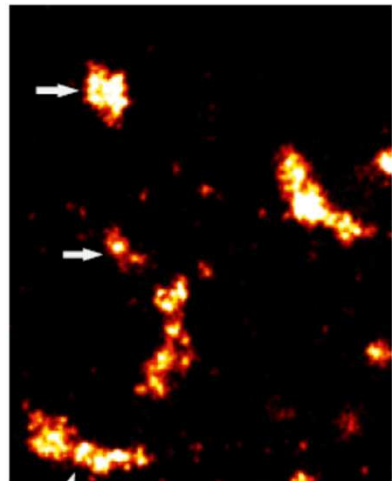


100 min

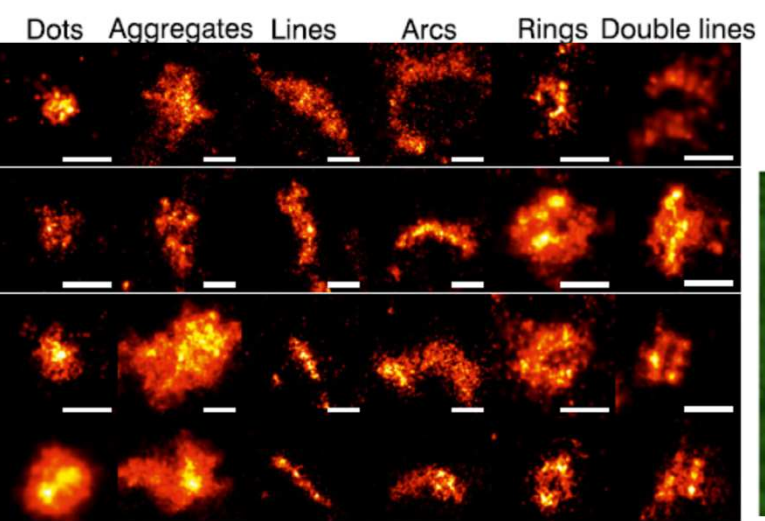
A GFP-Bax wild type



B



C

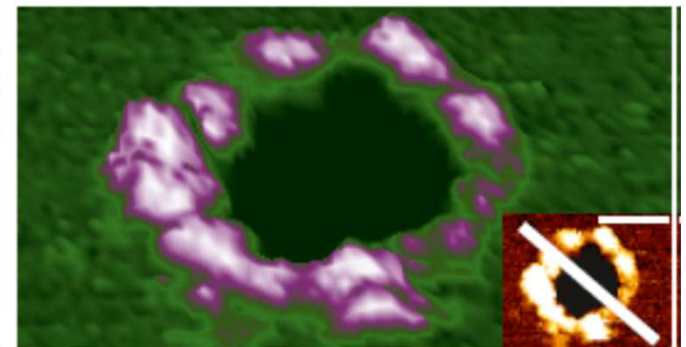


Lokalizace proteinových komplexů

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

+ AFM (atomic force microscopy)

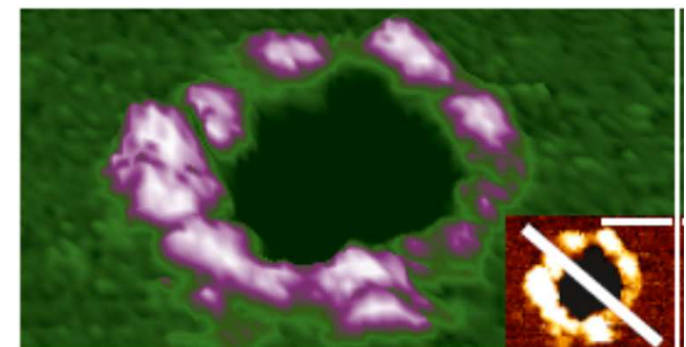
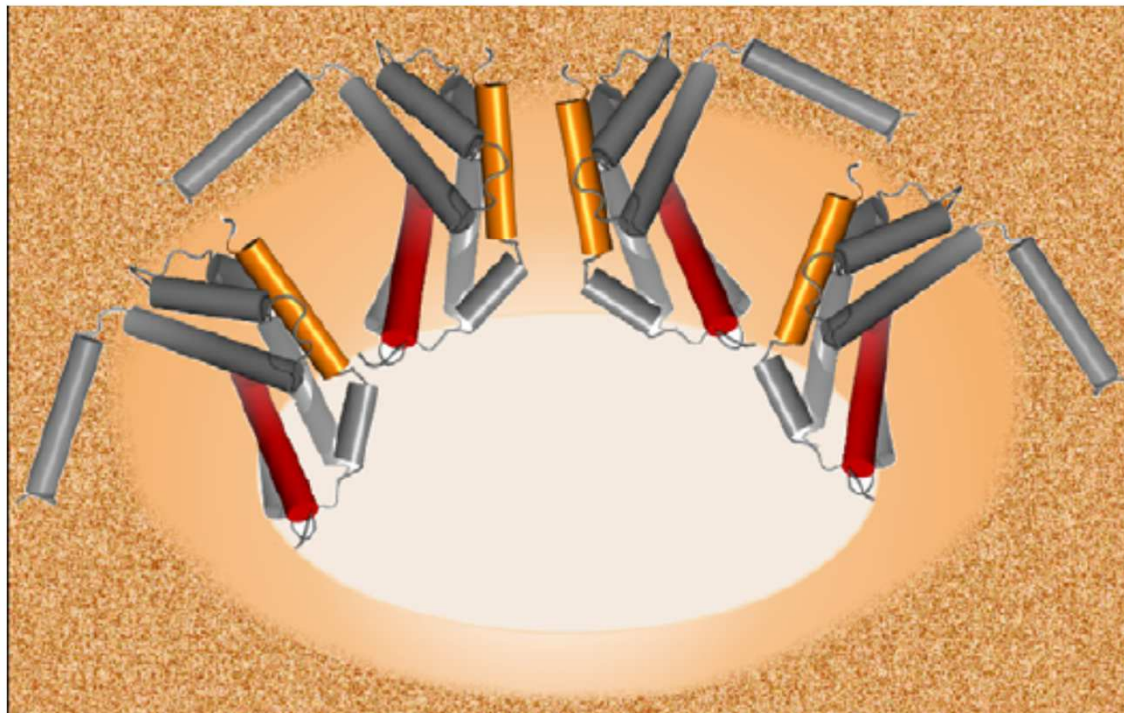
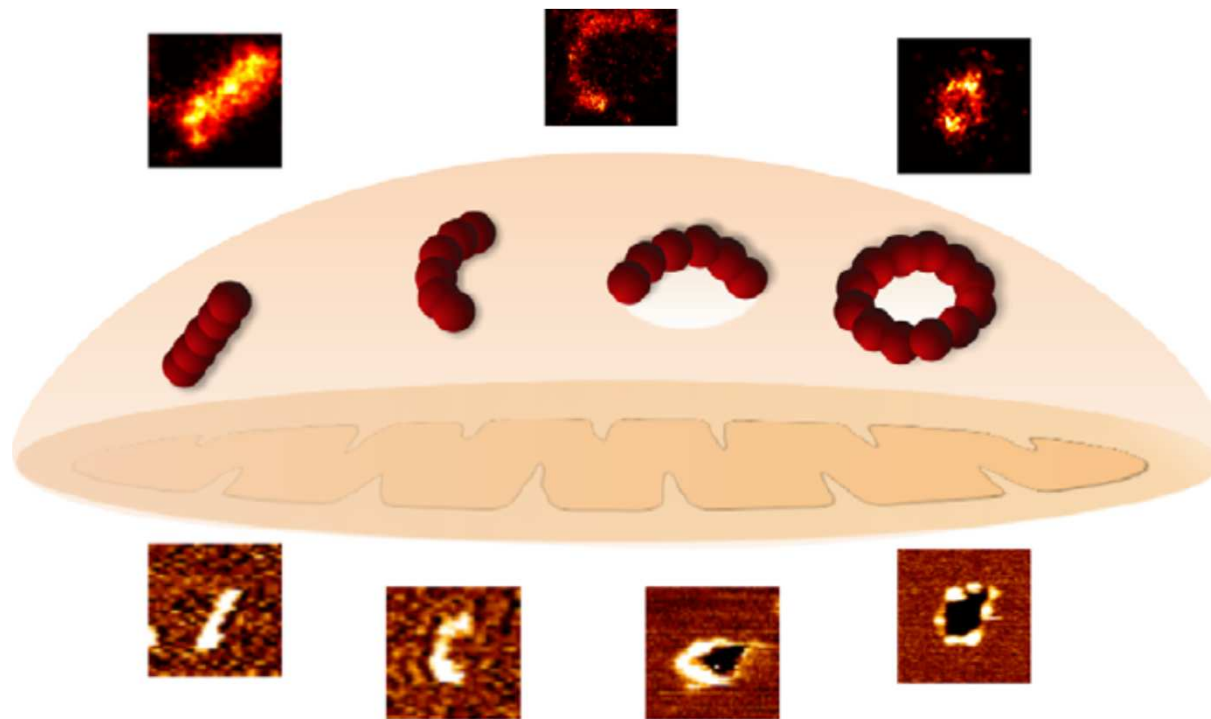
Gallego et al, EMBO J, 2016



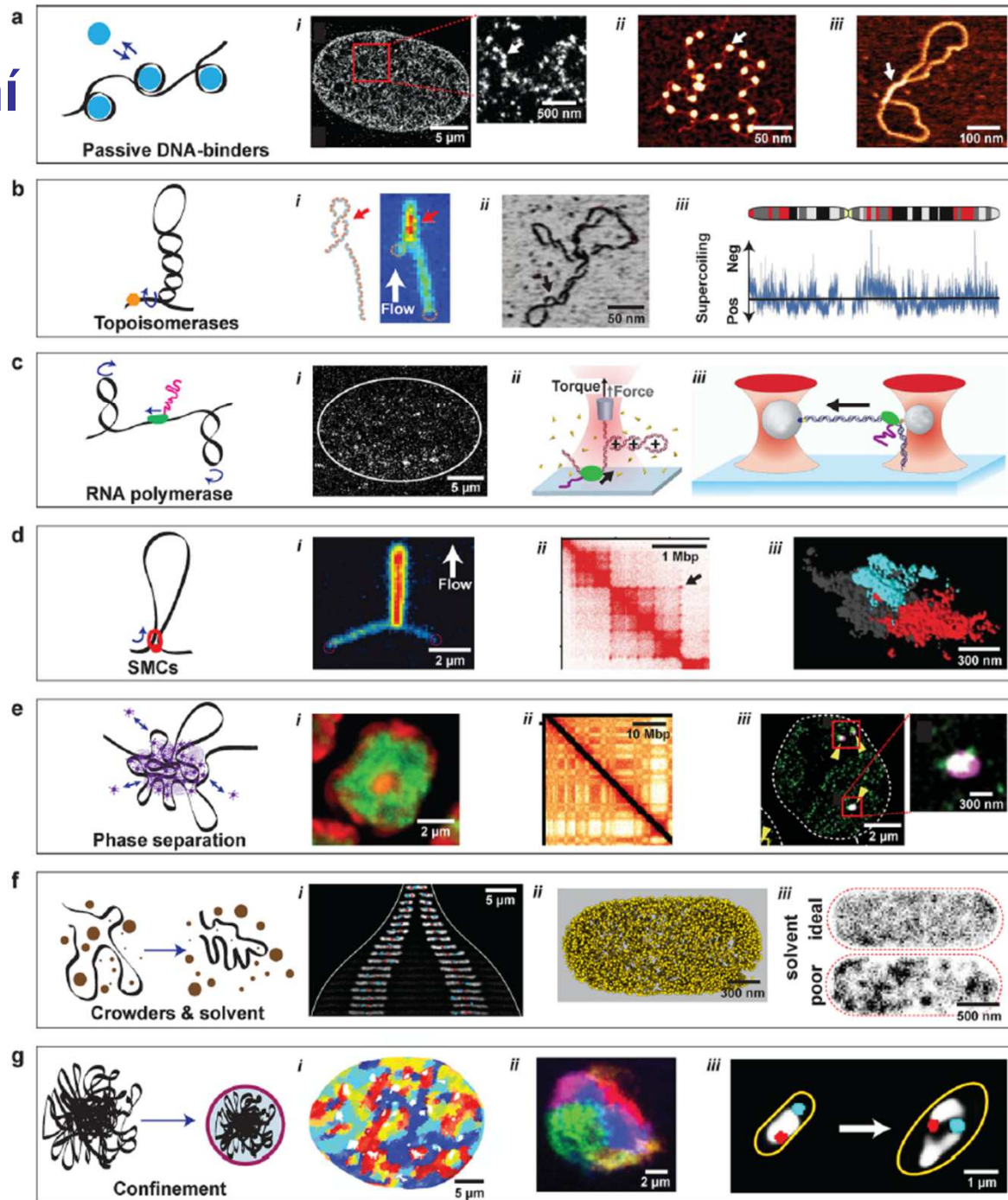
Lokalizace proteinových komplexů

Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptósa)

Gallego et al, EMBO J, 2016

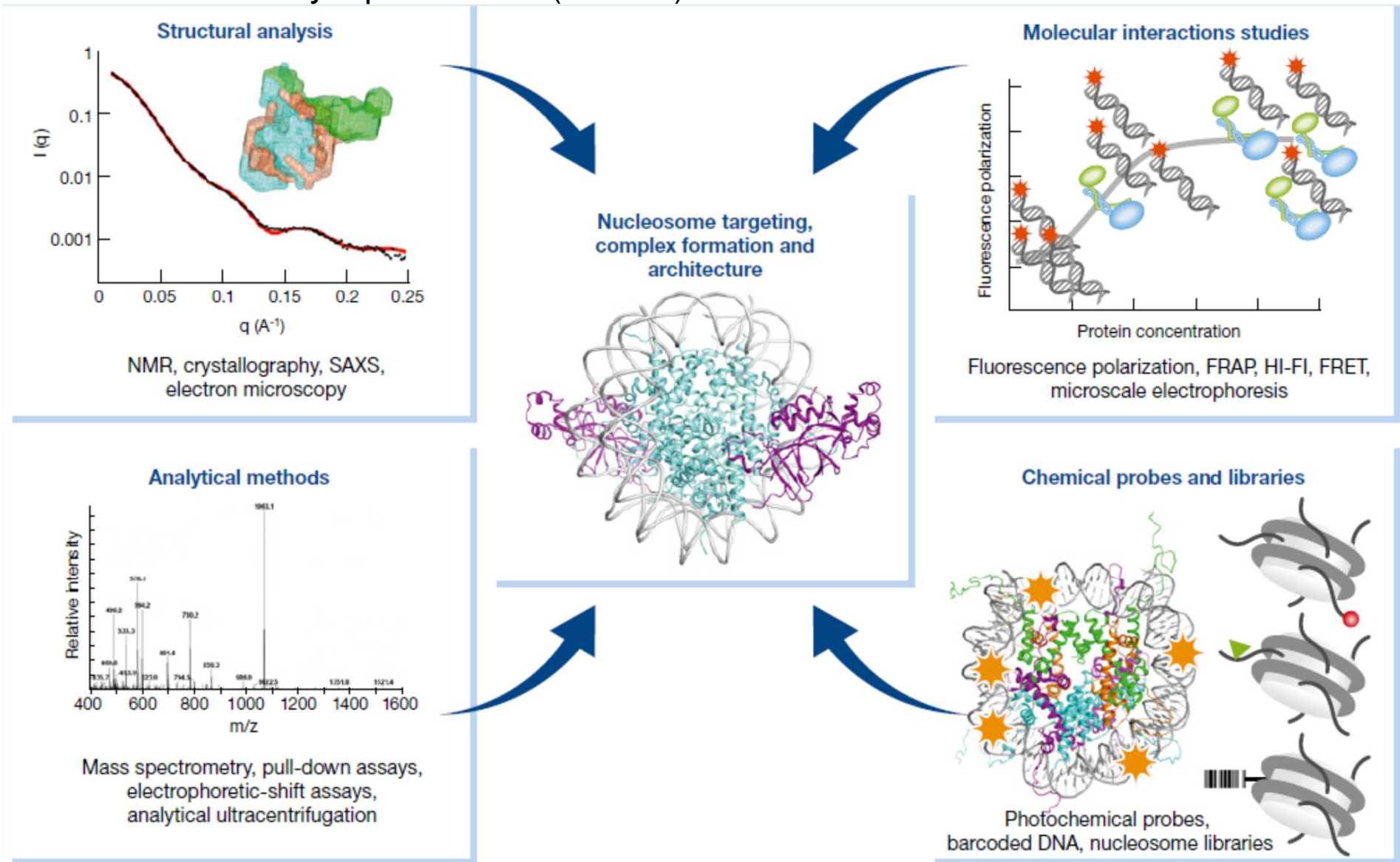


... fluorescenční metody ...



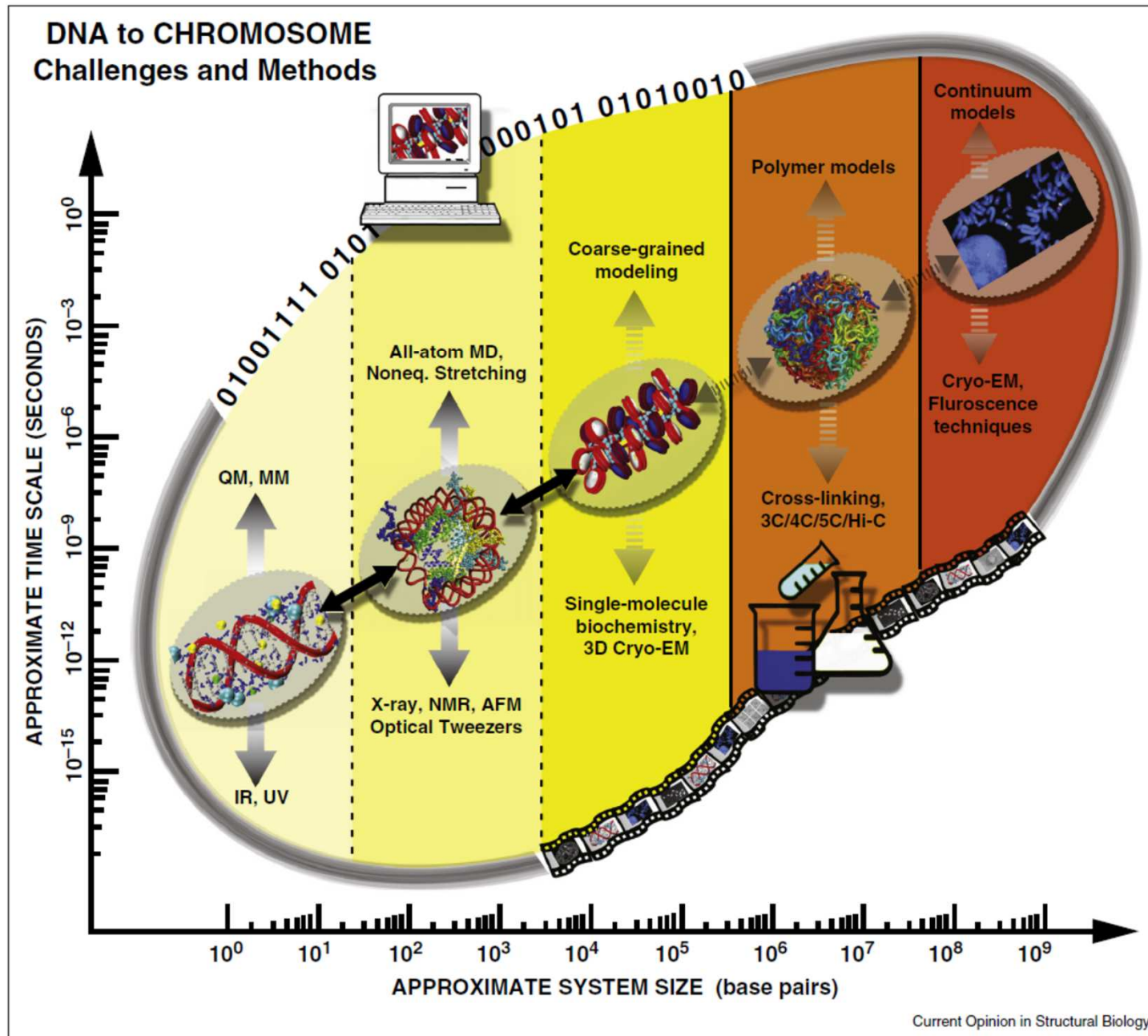
Analyza proteinovych komplexu

více Metody v proteomice (CG090)

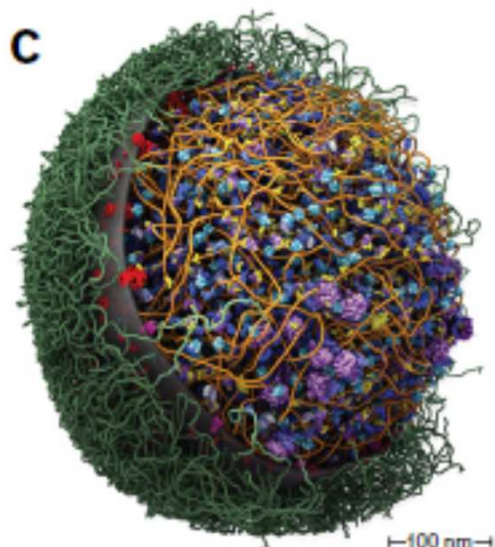
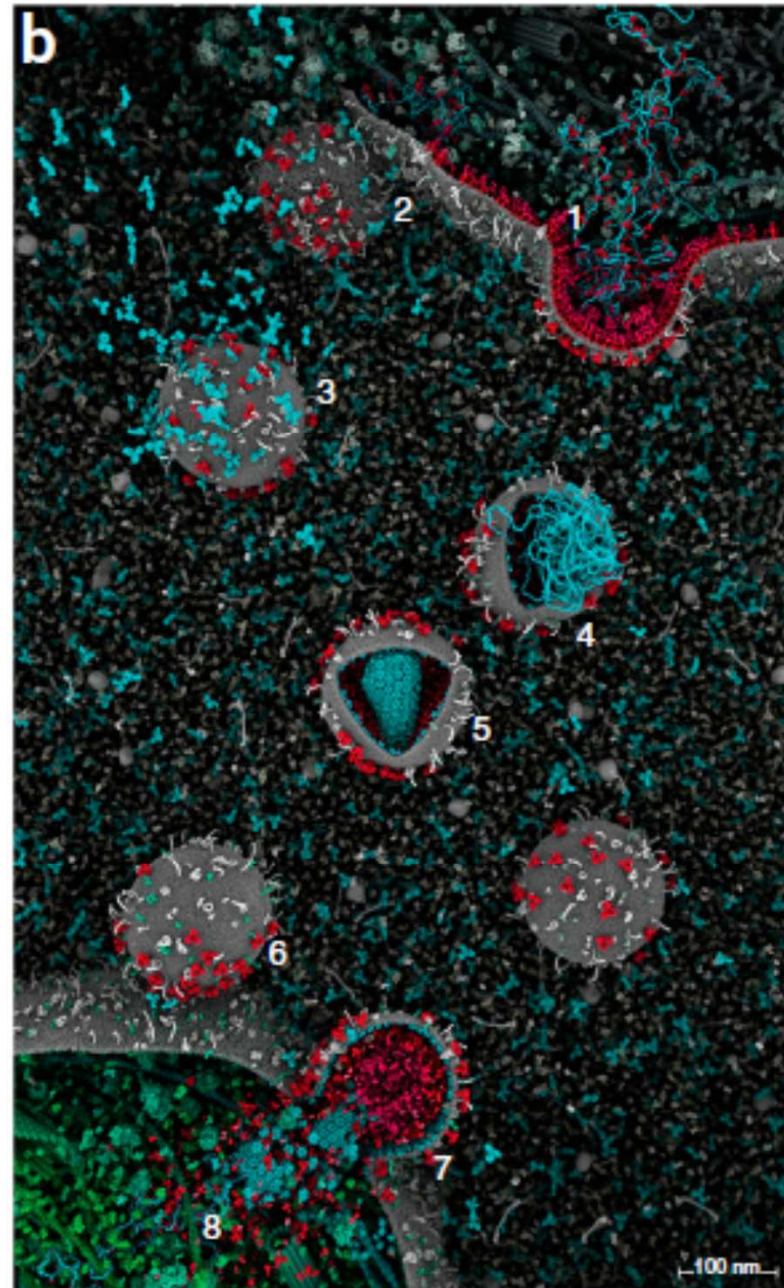
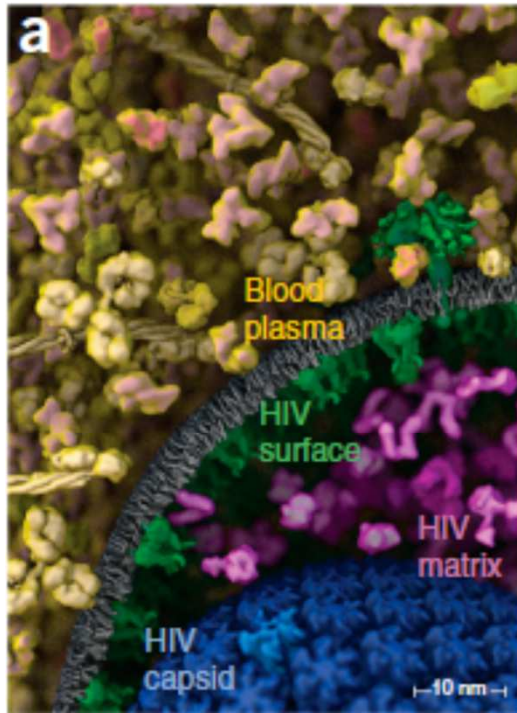


Analyza proteinovych komplexu

Ozer et al, CO in SB, 2015



Visualizace proteinových komplexů



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

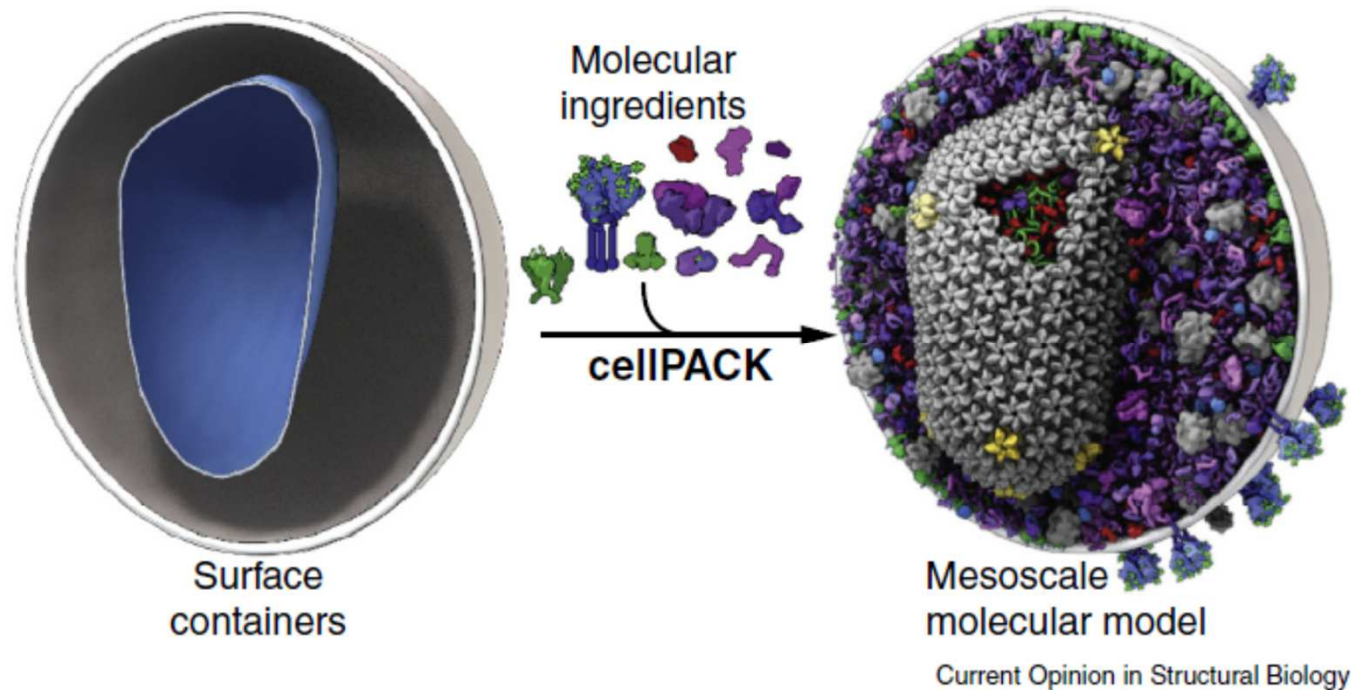
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur

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

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

Johnson et al., Nat Meth, 2015

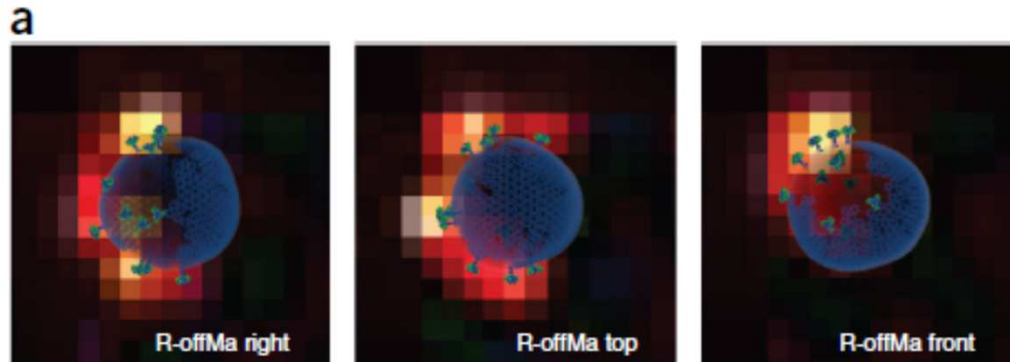
Visualizace proteinových komplexů



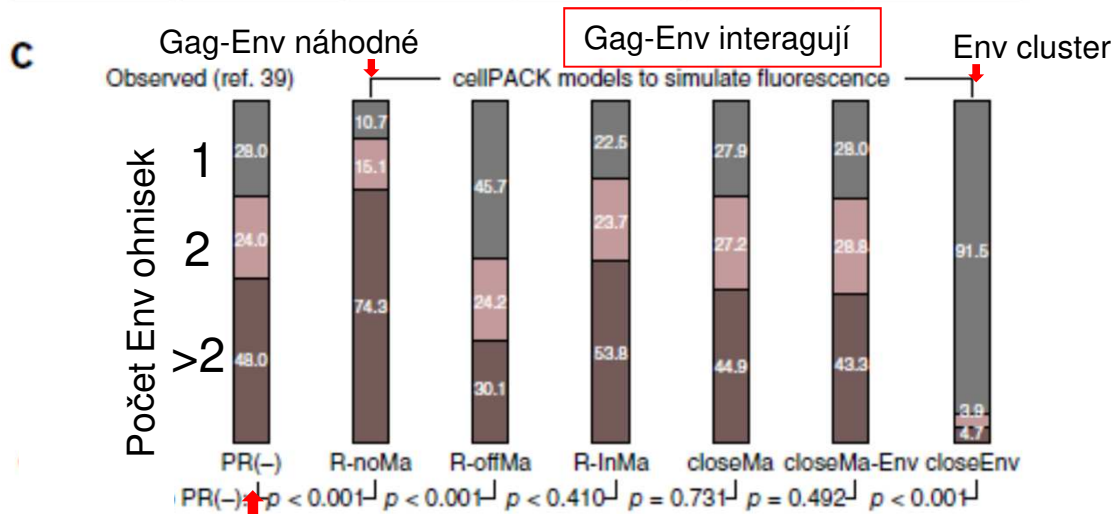
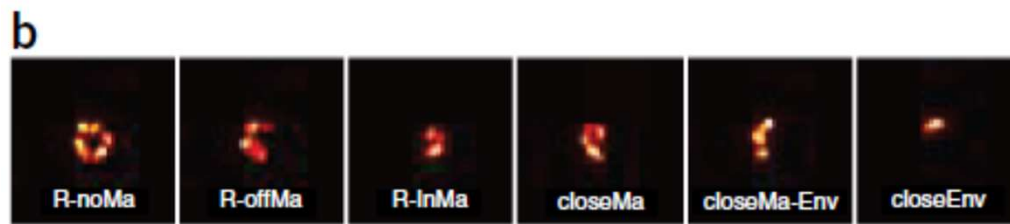
Pro lepší představu (virové částice) se integrují ... (nakopírované) struktury, data z molekulární dynamiky (simulací), koordináty pohybu „objektu“ ve světelném mikroskopu ... animovat i buněčný kontext – namíchat v „reálných“ poměrech do „organel“ a na „membrány“ – CellPack ...

Lze použít k testování modelů ...

Visualizace proteinových komplexů - CellPACK

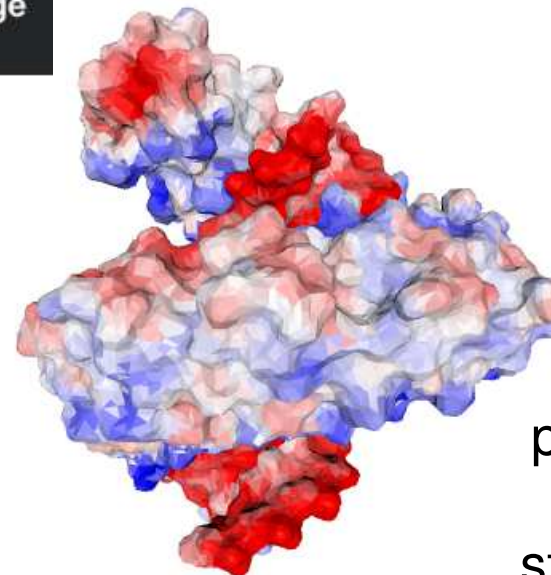
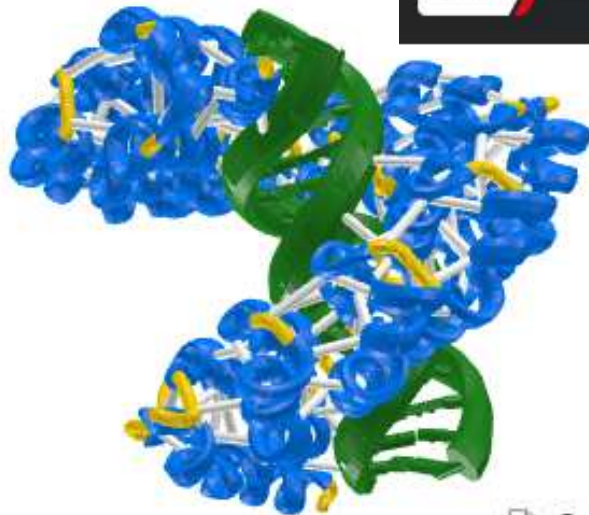
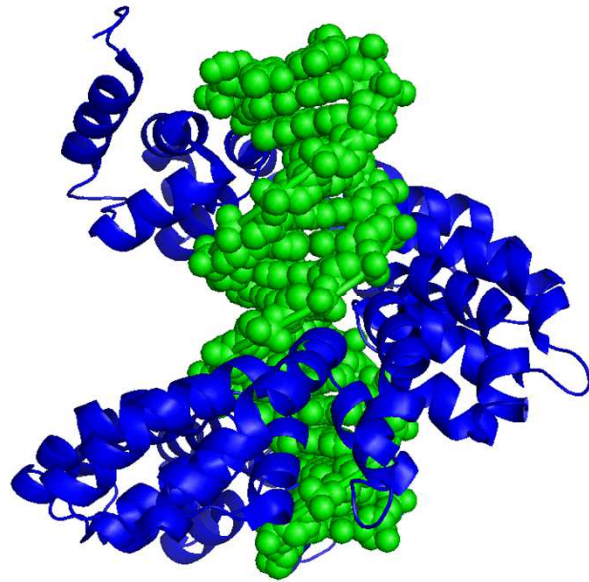



CellPACK poskytuje vzhled do buněčných procesů – použit na simulaci distribuce proteinů virové částice (např. R-noMa: random-bez interakcí)



Experimentální výsledek

Visualizace proteinových komplexů



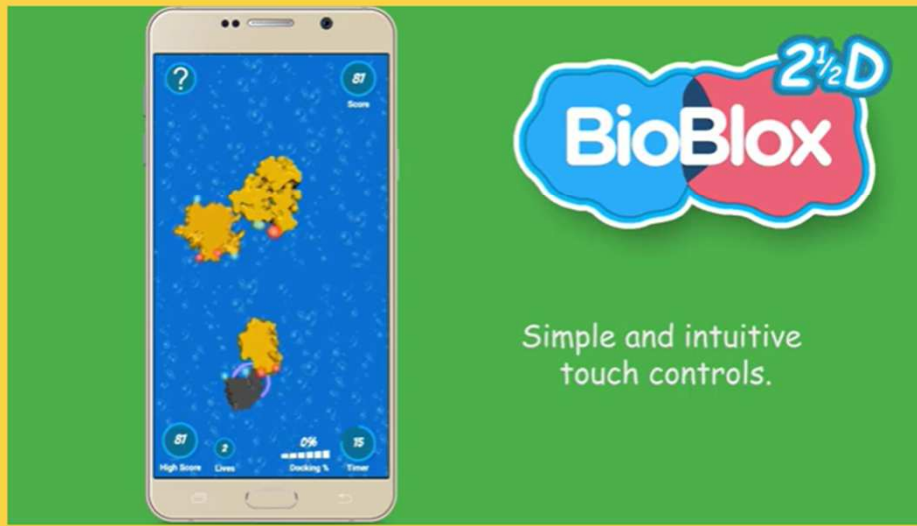
 3dprint.nih.gov/

Existuje mnoho nástrojů na vizualizaci komplexů

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

Docking - hra

Bioblox 2½D Game on the Topic of Protein Docking



Bioblox 2½D is a free mobile game on the Topic of Protein Docking. Play the Proteins Docking game. Learn about the fascinating world of bio-molecules and their interactions. Drag, Rotate, Swipe and fit the chains together like the components of a mechanism.

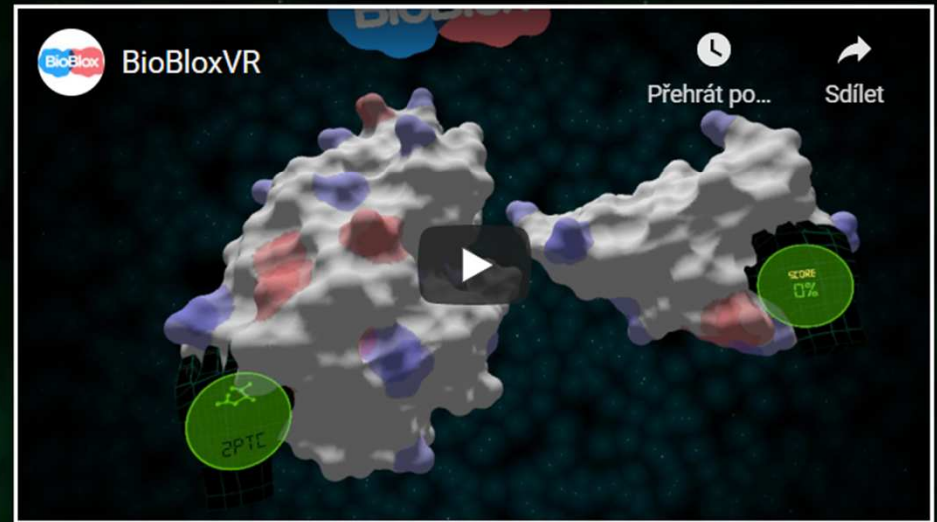


<https://www.doc.gold.ac.uk/bioblox/>

BioBloxVR

BioBloxVR Feel the docking experience!

BioBloxVR is a visualization tool for the docking of proteins using virtual reality. It is still under development if you want to have a try contact us!



Docking – VR ...



<https://www.doc.gold.ac.uk/bioblox/>

<https://www.youtube.com/watch?v=G6gSuTTXsM4&t=12s>

<https://www.youtube.com/watch?v=2z8y7rUWOos>