

CG030 – Struktura (architektura) a funkce proteinových komplexů

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

UKB C02-214

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 (cytoskelet ...)

- DNA-vazebné komplexy
- Komplexy v transkripci
- Komplexy v replikaci
- Komplexy opravující poškozenou DNA
- Komplexy chromatinu
- Evoluce + info nástroje

obecně

GENOM

závěrečná

Program přednášek 2023

23.02.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Úvod, metody analýzy proteinových komplexů
02.03.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Úvod, PPI, skládání komplexů
09.03.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Muller	Chaperony
16.03.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Kolesár	Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom
23.03.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce I, vazebné motivy
30.03.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce II, transkripční komplexy
06.04.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Štefanovie	Replikace DNA
13.04.2023	10-11.30 hod	C2-2.11??	Dr. Šebesta	Oprava DNA, homologní rekombinace
20.04.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Chromatinové komplexy
27.04.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Evoluce proteinových komplexů
04.05.2023	10-11.30 hod	C2-2.11	Mgr. Jemelková	Přehled nástrojů pro bioinformatickou analýzu komplexů
11.05.2023	9-12.00 hod	C2-2.11	doc. Paleček	zkouška (test + prezentace)?

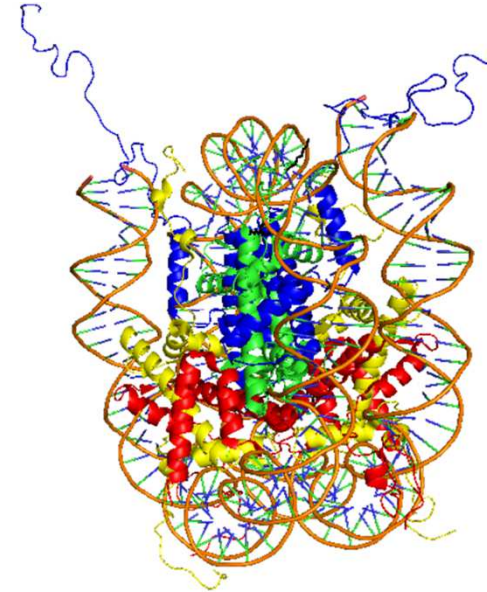
obecně
GENOM

- 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 (sekundární, PDB)
 - v PyMolu připravit 3D strukturu
 - Interakce (IntAct...)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - Evoluce (sekvenční zarovnání)
- Konkrétní nová data – článek (< 5 let) o komplexu (nebo proteinu) - *konzultace*



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

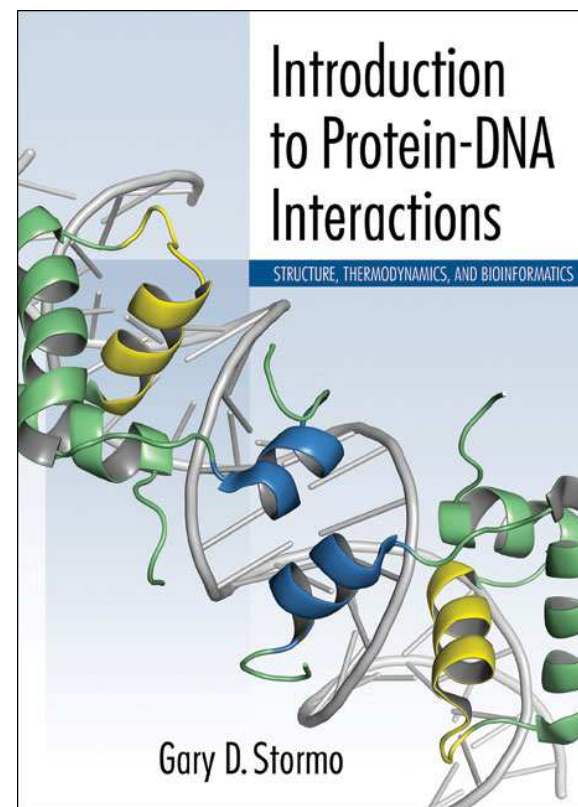
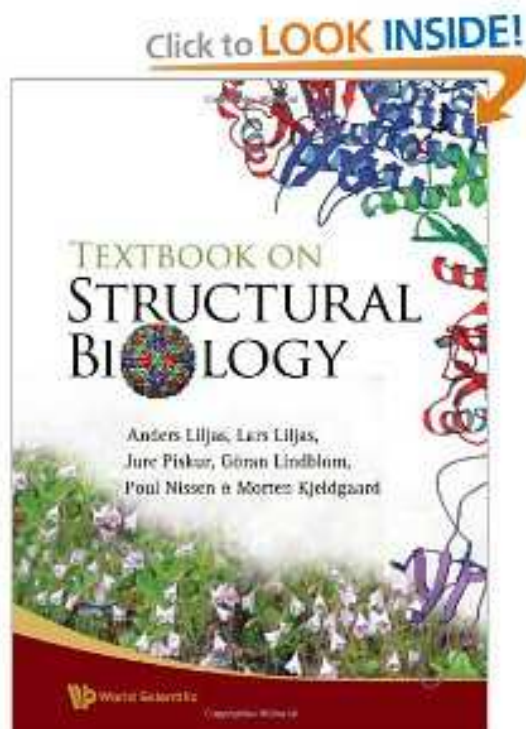
11.05.2023 9.00 hod C2-2.11 zkouška (test + prezentace)

Informační zdroje

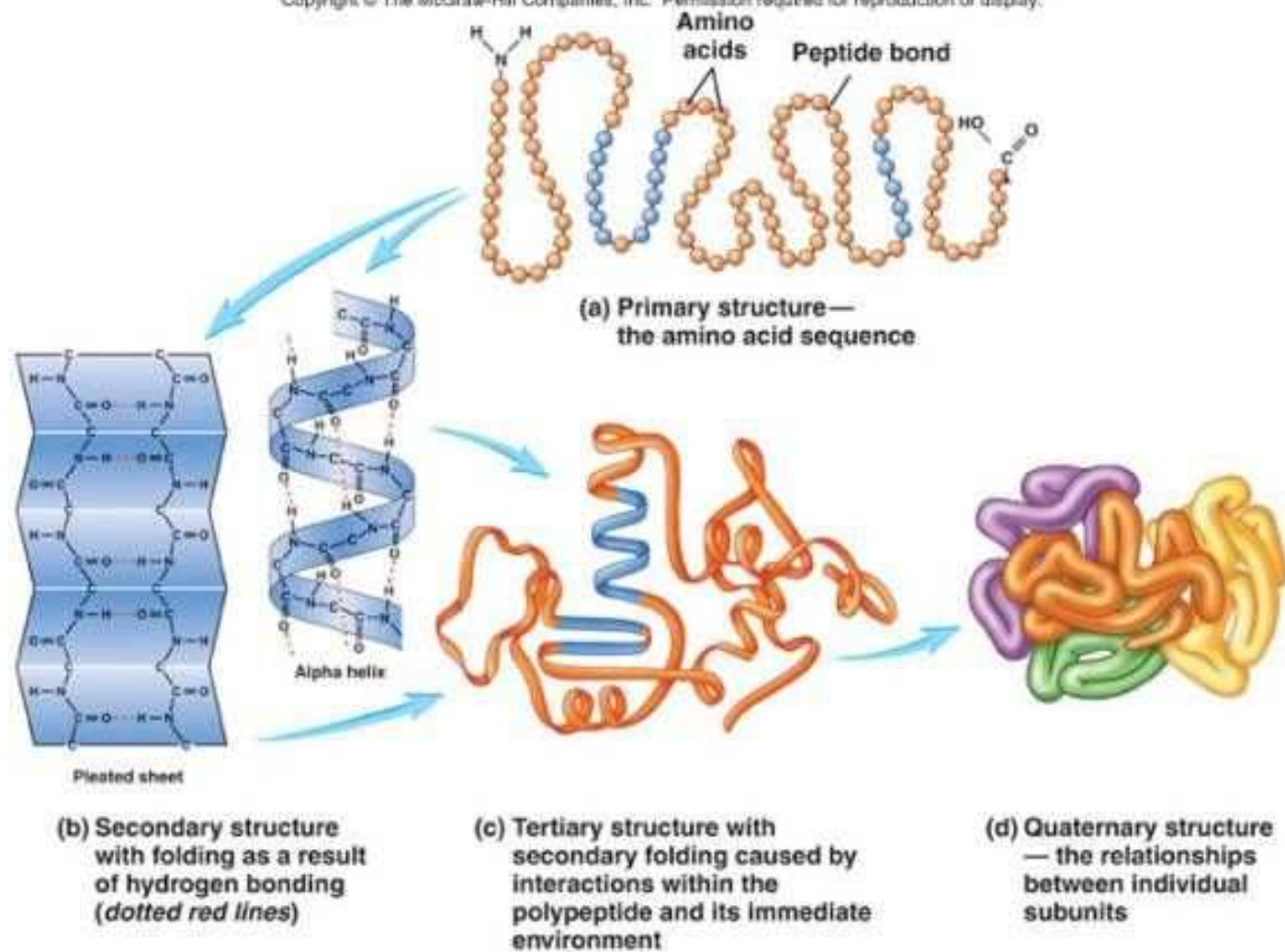
Alberts a spol: Molecular biology of the Cell

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

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



Databáze: <http://www.rcsb.org> , <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>, <http://dip.doe-mbi.ucla.edu>, <https://www.ebi.ac.uk/intact/home>



Primární

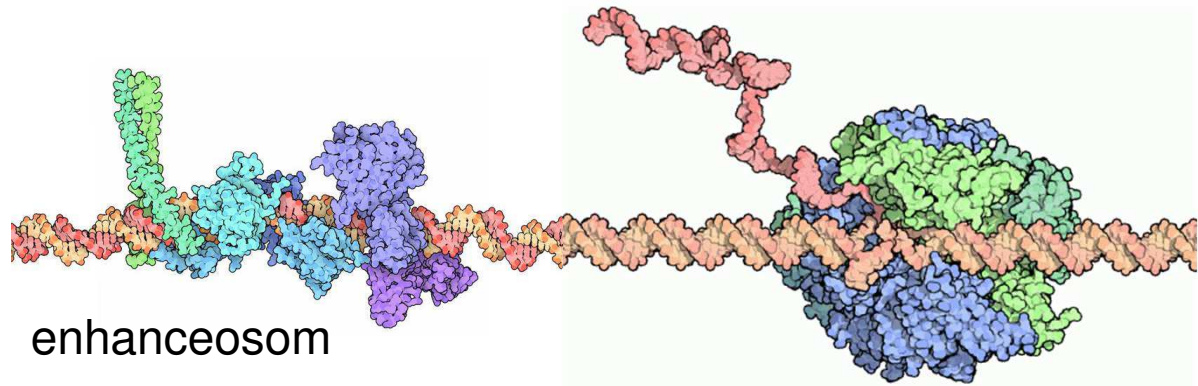
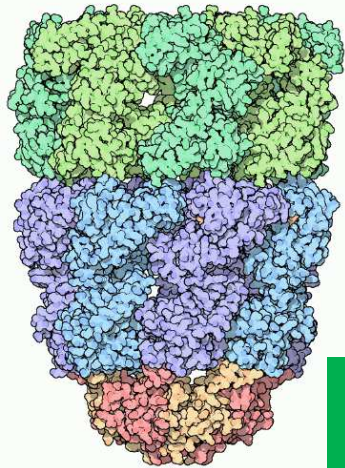
Sekundární

Terciární

Kvarterní – dva proteiny a více ... proteinové komplexy

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

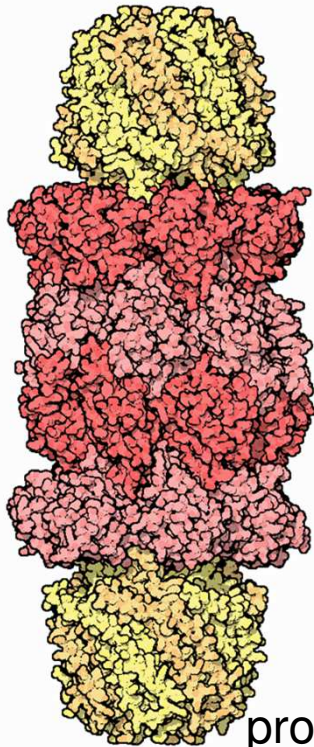
chaperon



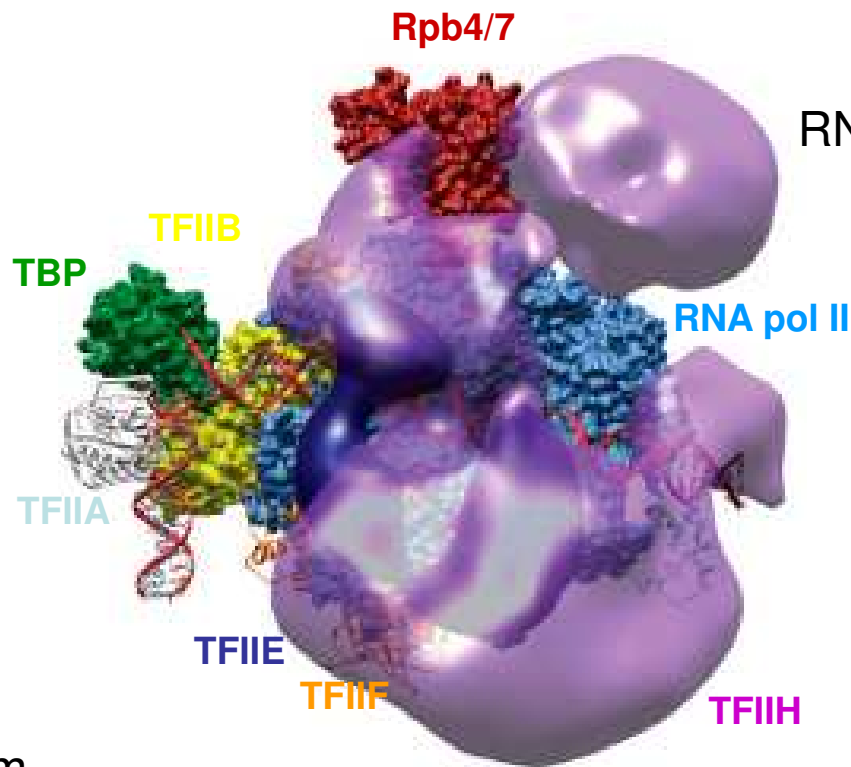
enhanceosom

RNA polymeráza

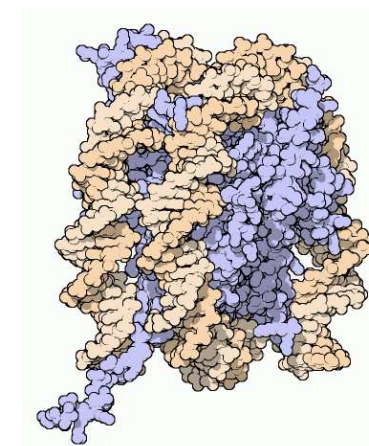
obecně



proteasom



RNA polymeráza + TFII...

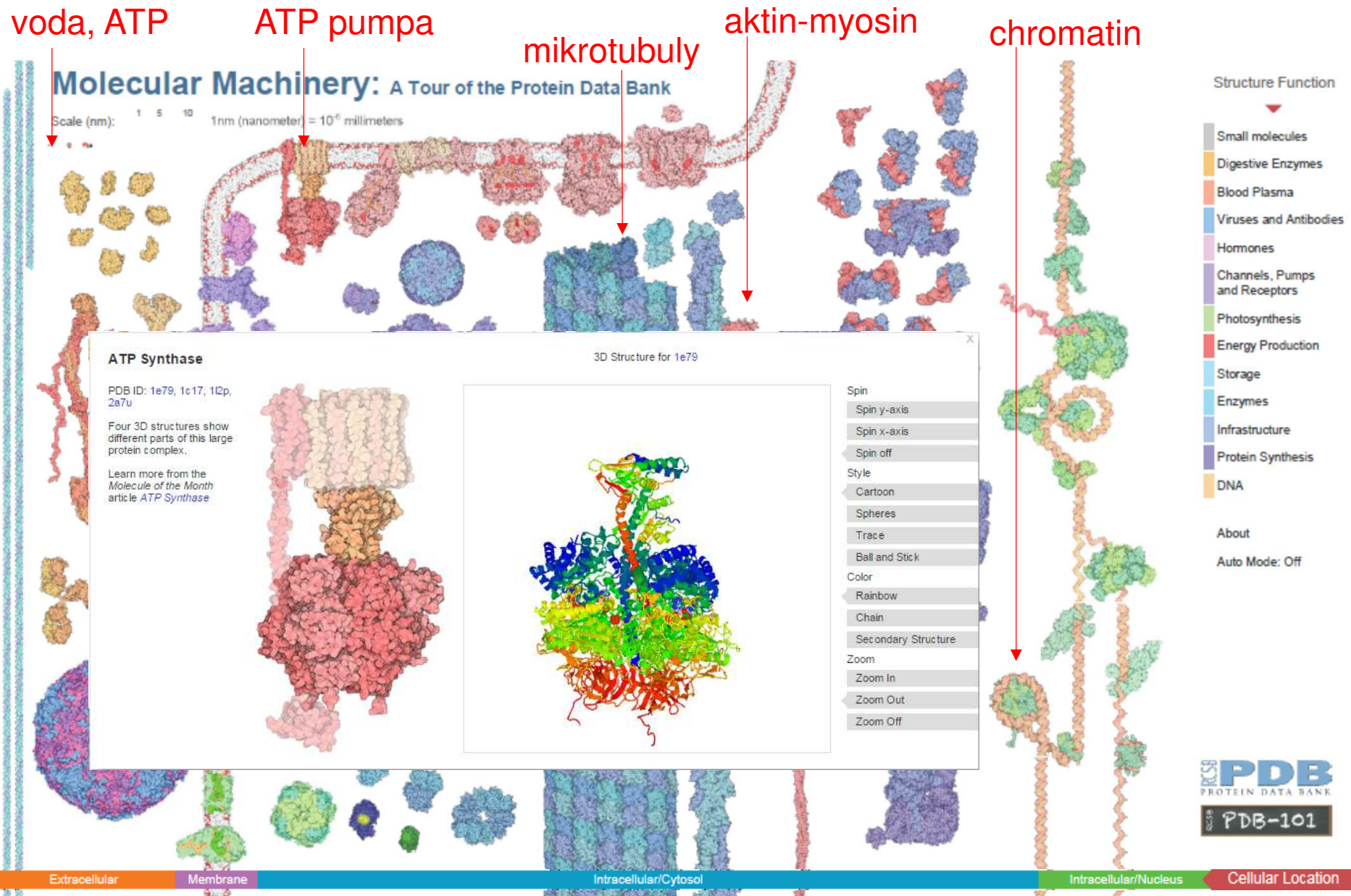


nukleosom

chromatin

Molekula měsíce (PDB 101)

Primárním zdrojem strukturních informací = PDB



Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

7SDE

Cryo-EM structure of Nse5/6 heterodimer

<http://www.rcsb.org>

Display Files Download Files

Help

Sequence of 7SDE | Cyto-E... Chain 1: Non-structu... A


```

MDGALINSVLYVSPRNGAVYFVETLTERHLLAFENLNSKCLLENVDHVLFLFCQFGSHNLAVIPFDIIVLFTLSISEYKRPPIRANDPYNTSRETISSRAIRLQRYIA
11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111
IIRFDSDEQHNIVDELIRKCGFFAIDILITFRKQWNGEPRFRKRSQGVTVRQNASVDPELDQAKTFRNFRSRYICLQKQNTILGNRLNLKLNKPEGFNINMILSNSE
121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221
QESTFLTSRHTMWFLEIILIDILVSRQDVIQGHKQVNSRSLVRLSRSESLAVIFESLNTKRNFRSRYVFLNCDYRIPADNIALFVHVPVNSMENTIYDQVITTRKCS
231 241 251 261 271 281 291 301 311 321 331
                    
```

Structure

7SDE | Cryo-EM structure of Nse5/6 ...

Type	Assembly
Asm Id	1: Author Defined Asse...
Dynamic Bonds	X Off
Nothing Focused	
Measurements	
Structure Motif Search	
Components	
Preset	+ Add
Polymer	Cartoon
Density	
Quality Assessment	
Assembly Symmetry	
Export Models	
Export Geometry	
Export Animation	

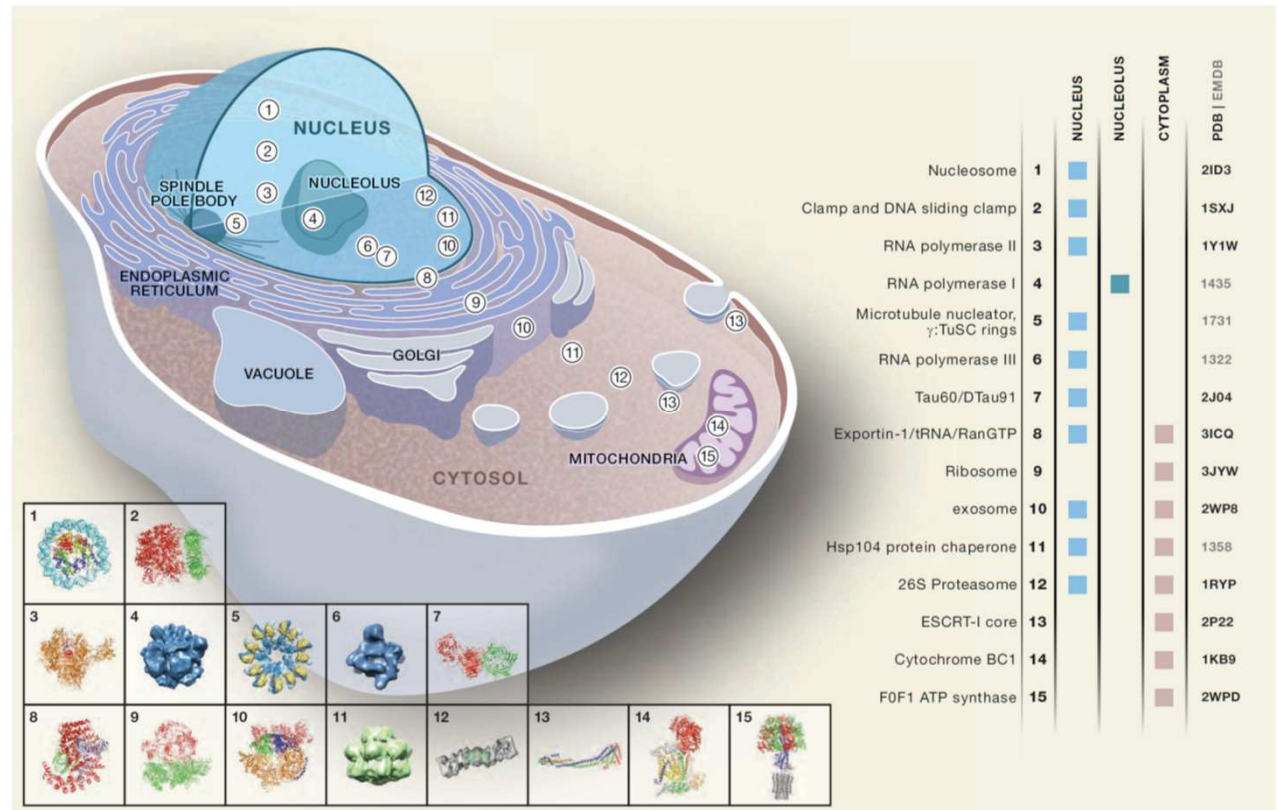


MOL
Sehna et al, NAR, 2021
NCBR

Analýza proteinových komplexů

~1000 komplexů v
kvasince
*Saccharomyces
cerevisiae*

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



Bertero et al, Cell, 2010

- Separační metody
- Detekční (MS) přístupy
- Strukturní analýzy
- Mikroskopické metody
- Vizualizace ...

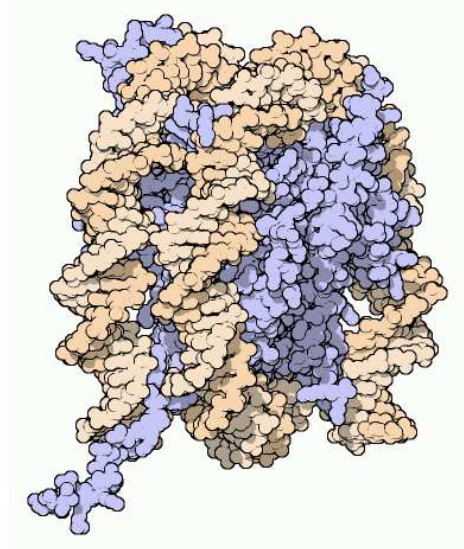
Nejčastější postup charakterizace proteinových komplexů

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*

top-down ... bottom-up

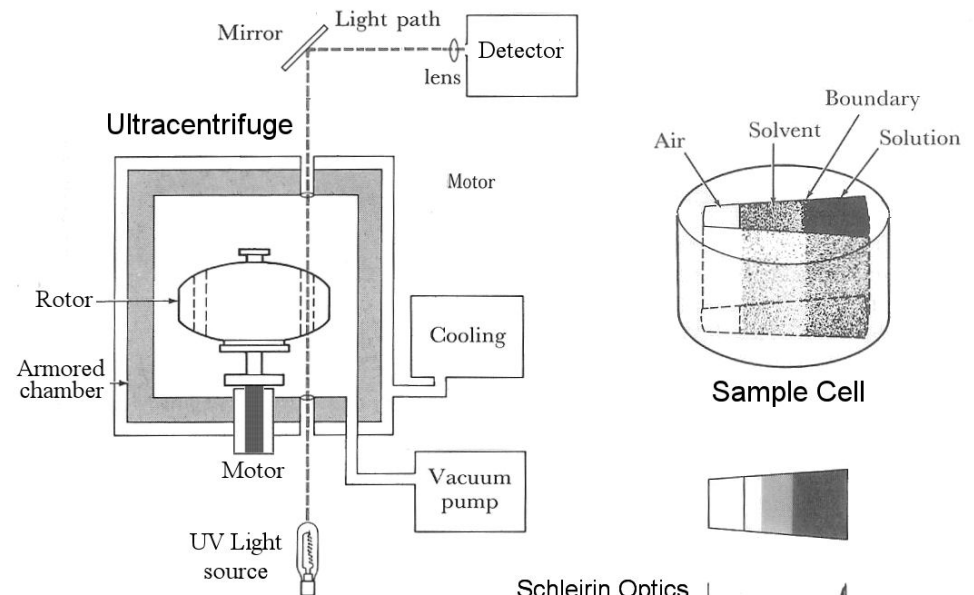
Prolínají se analytické a izolační:

- 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* – **27.3.2023**)
- ... vizualizační metody

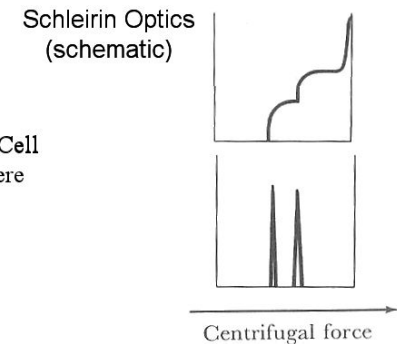
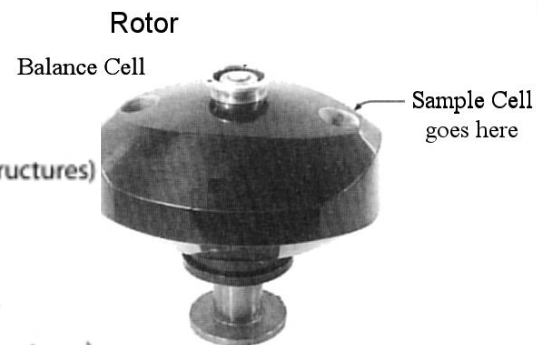
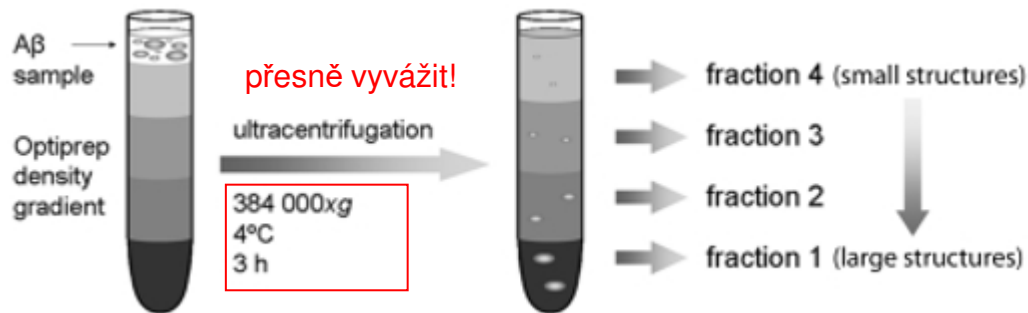


Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



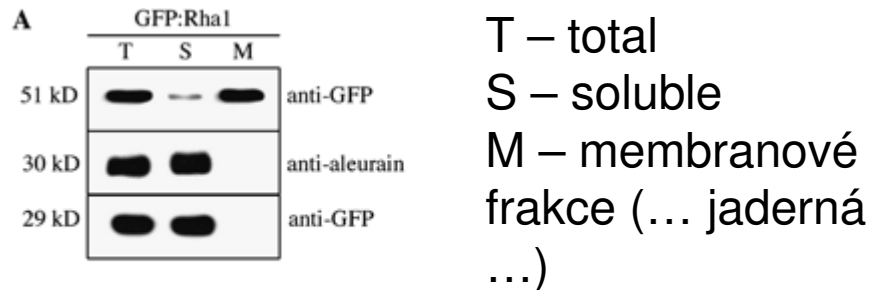
Cukerný/hustotní gradient



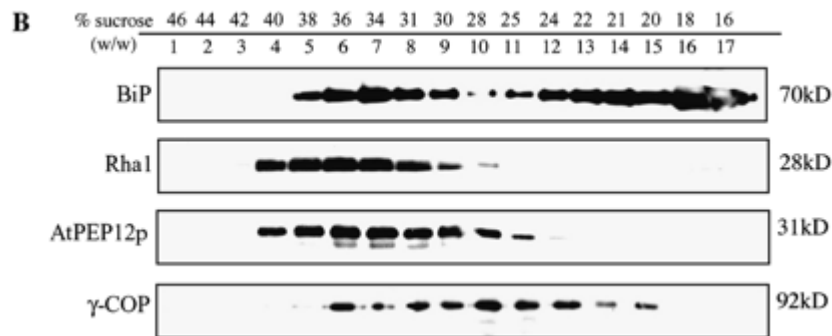
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – separační/izolační

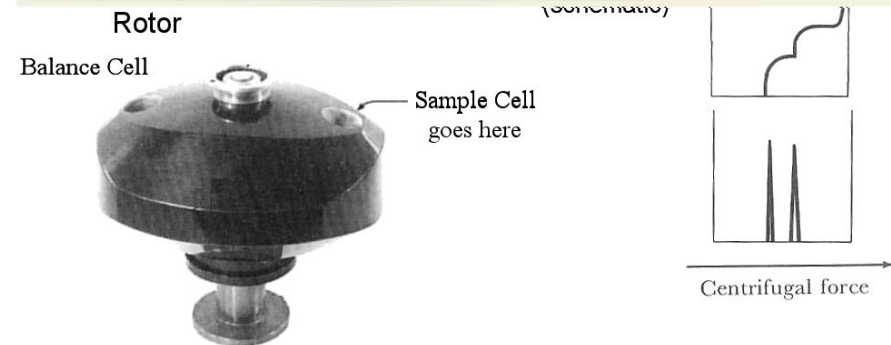
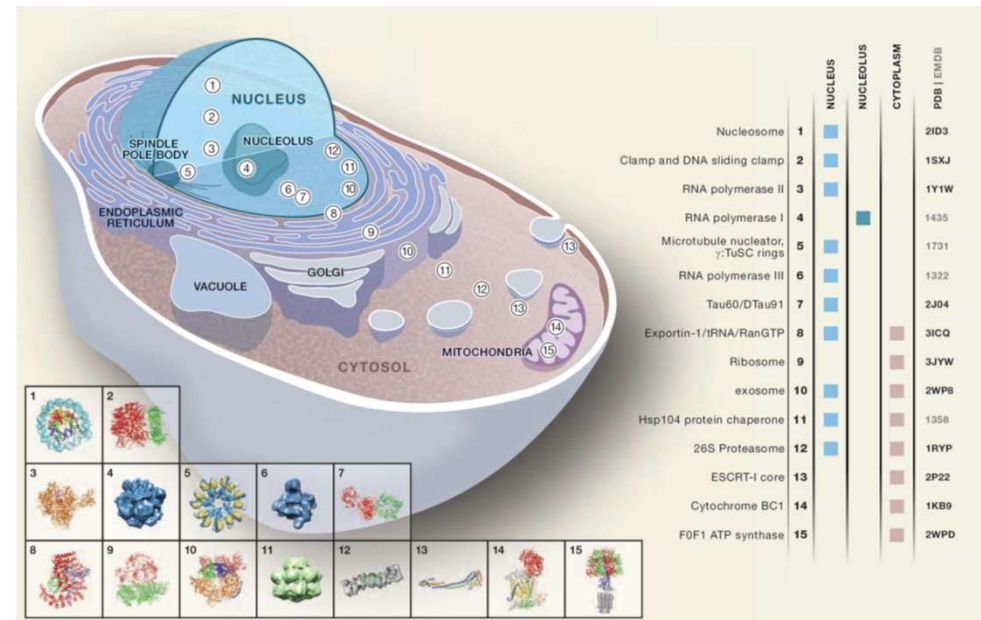


Jaké další metody by se daly použít?



Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

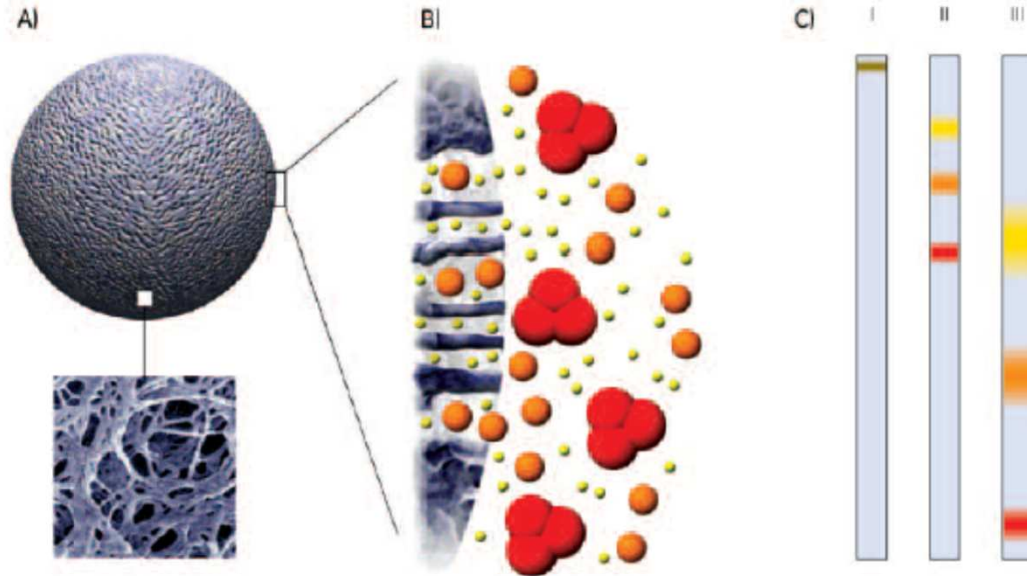
- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely - lokalizace
- B. Jemný - cukerný gradient - izolace



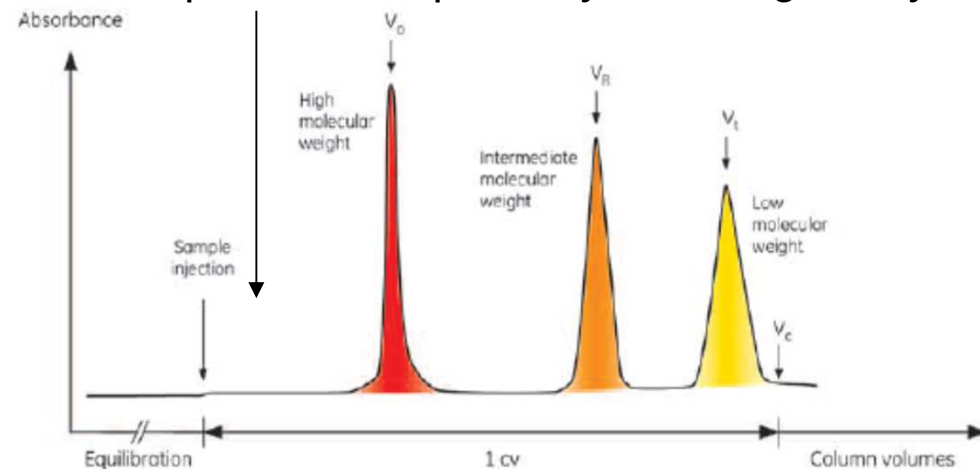
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

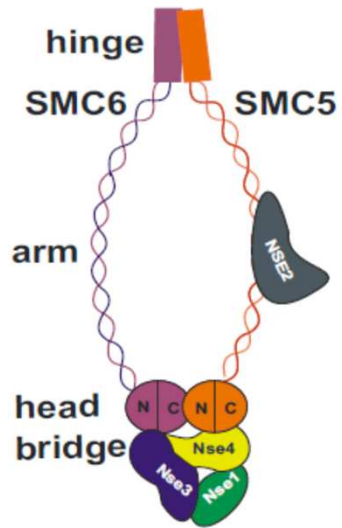
Metody izolace a analýzy PKxů

- **Gelová filtrace (size exclusion chromatography, SEC)**
- za nativních podmínek (komplexy zůstávají pohromadě)

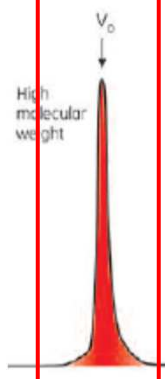
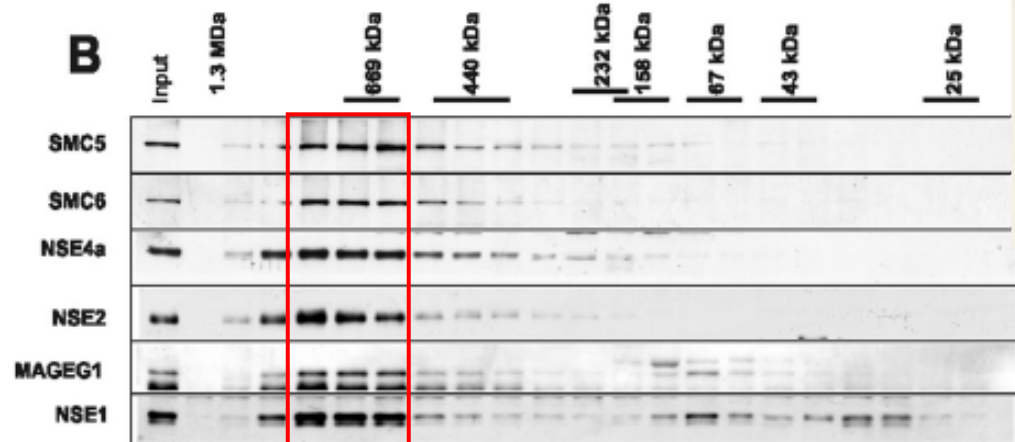
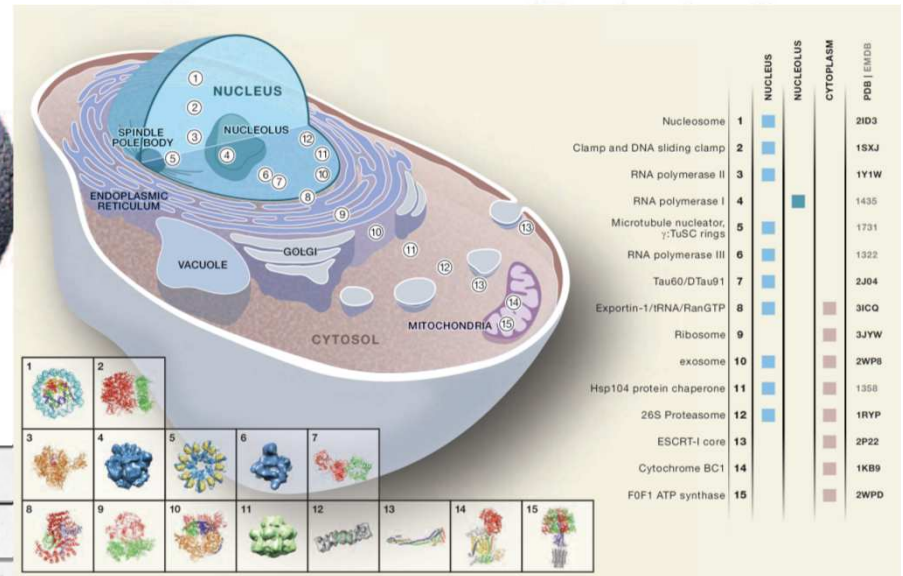


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty

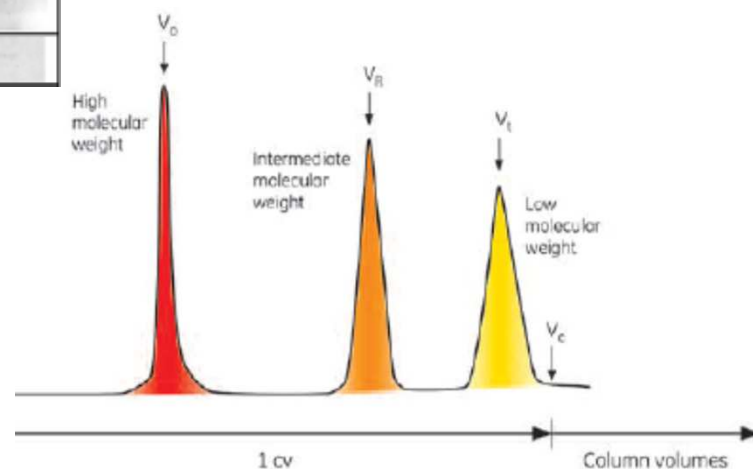




Příklad: SMC5/6 komplex – v buněčném lyzátu (nebo purifikovaný komplex)



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)



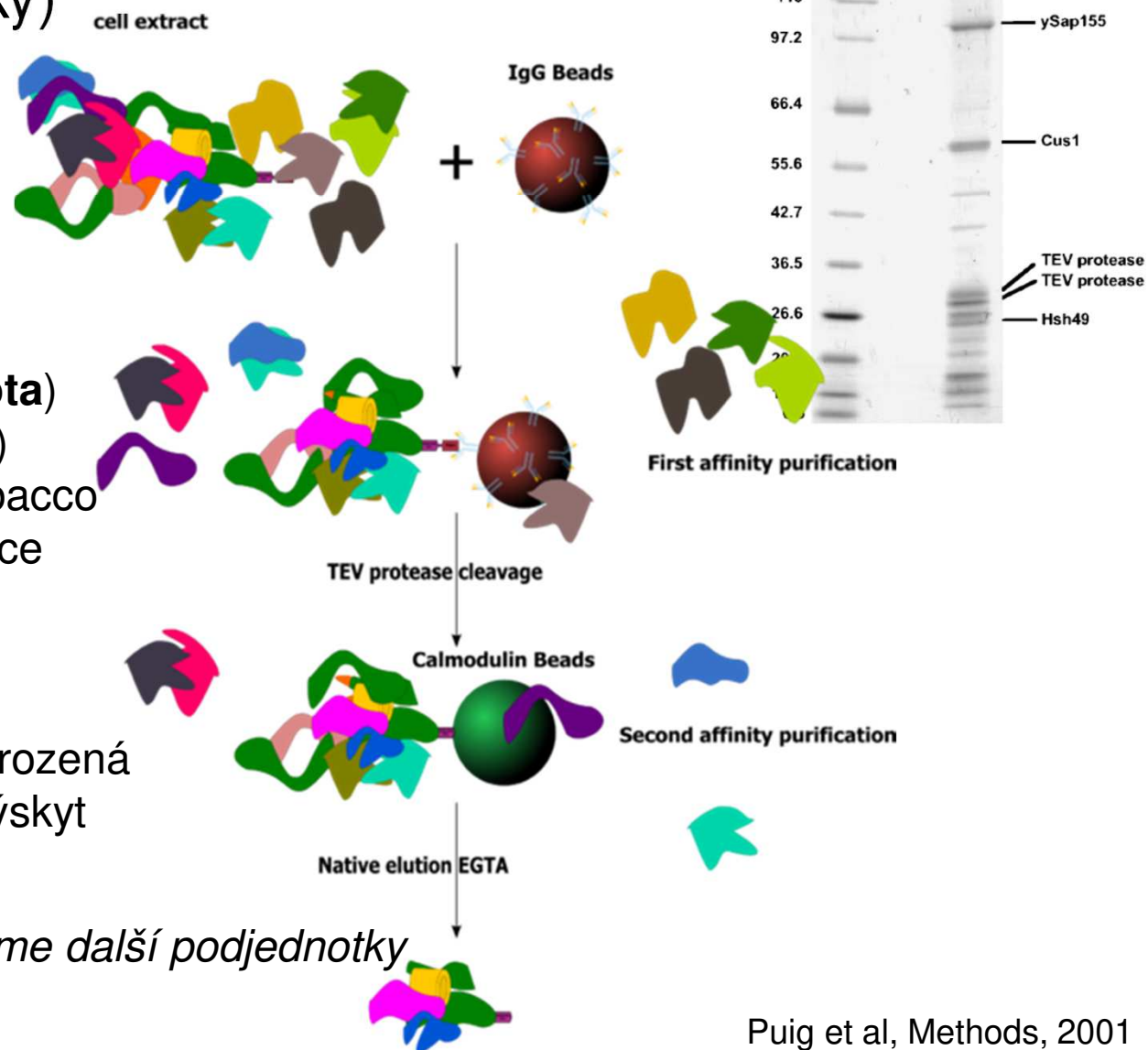
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

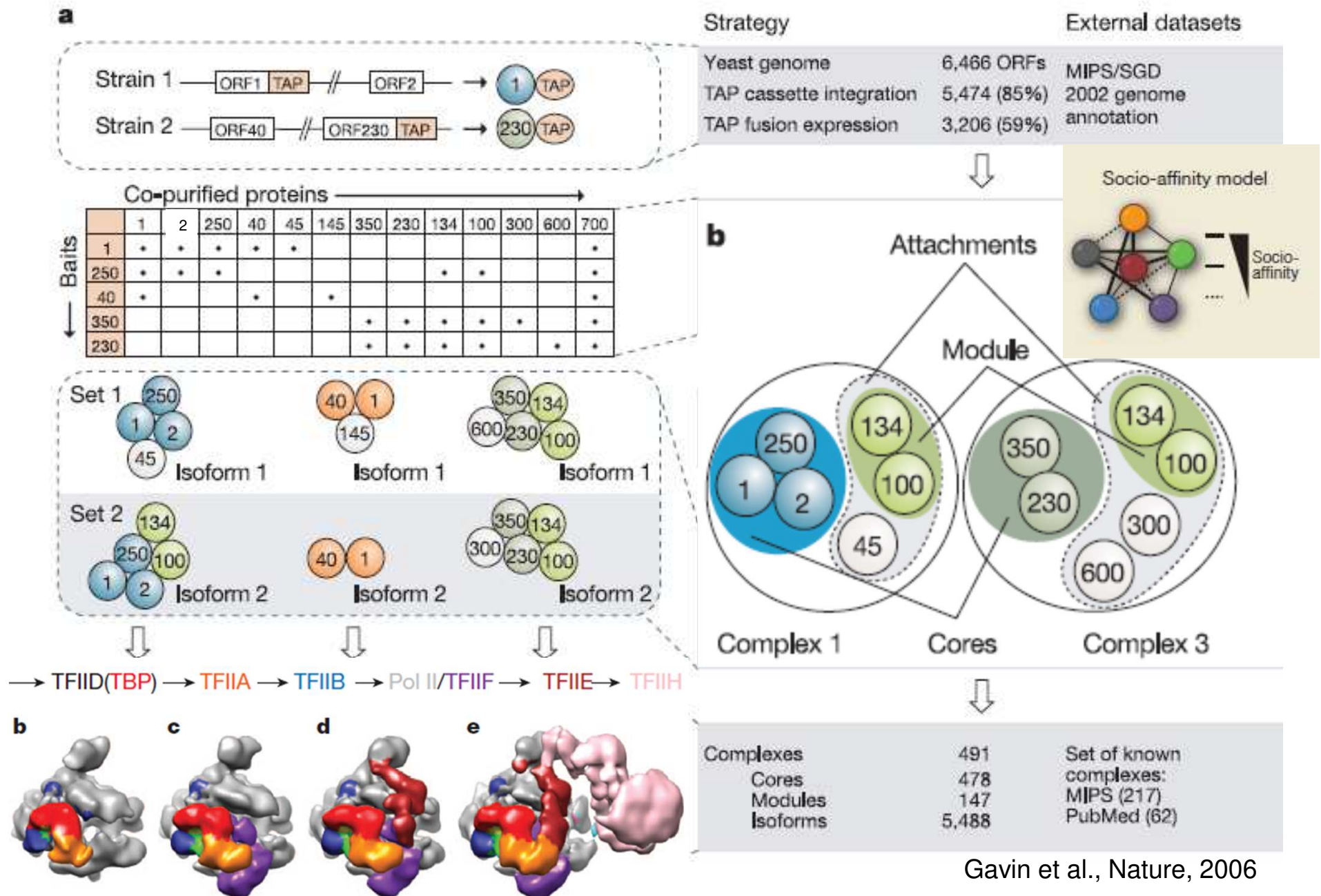
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

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

známe jeden protein – hledáme další podjednotky



Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



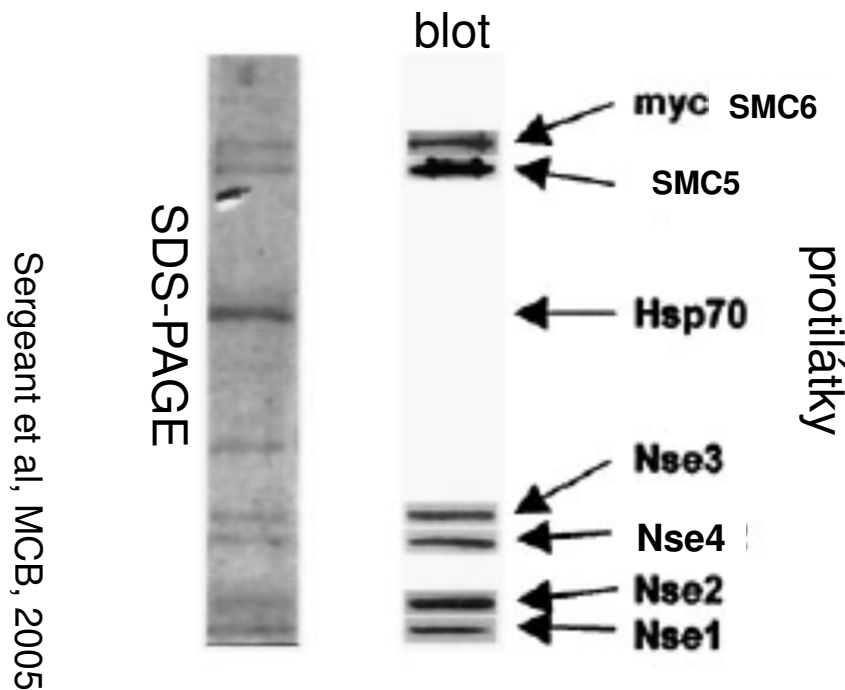
Ko-imunoprecipitace

Jednoduché tagy/značky:

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

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

Kompetiční eluce (peptidy nebo ligandy)



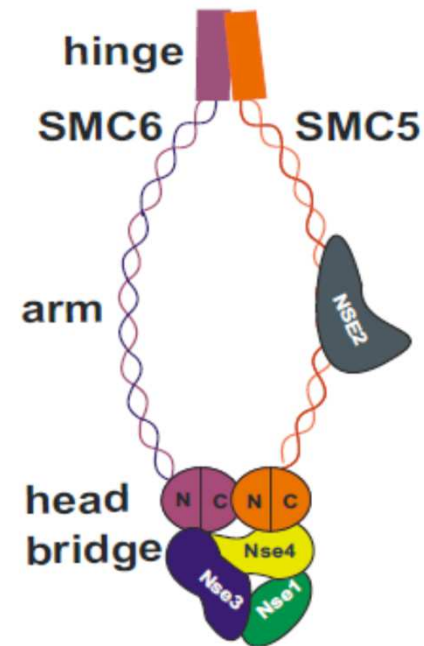
Sergeant et al, MCB, 2005

SDS-PAGE

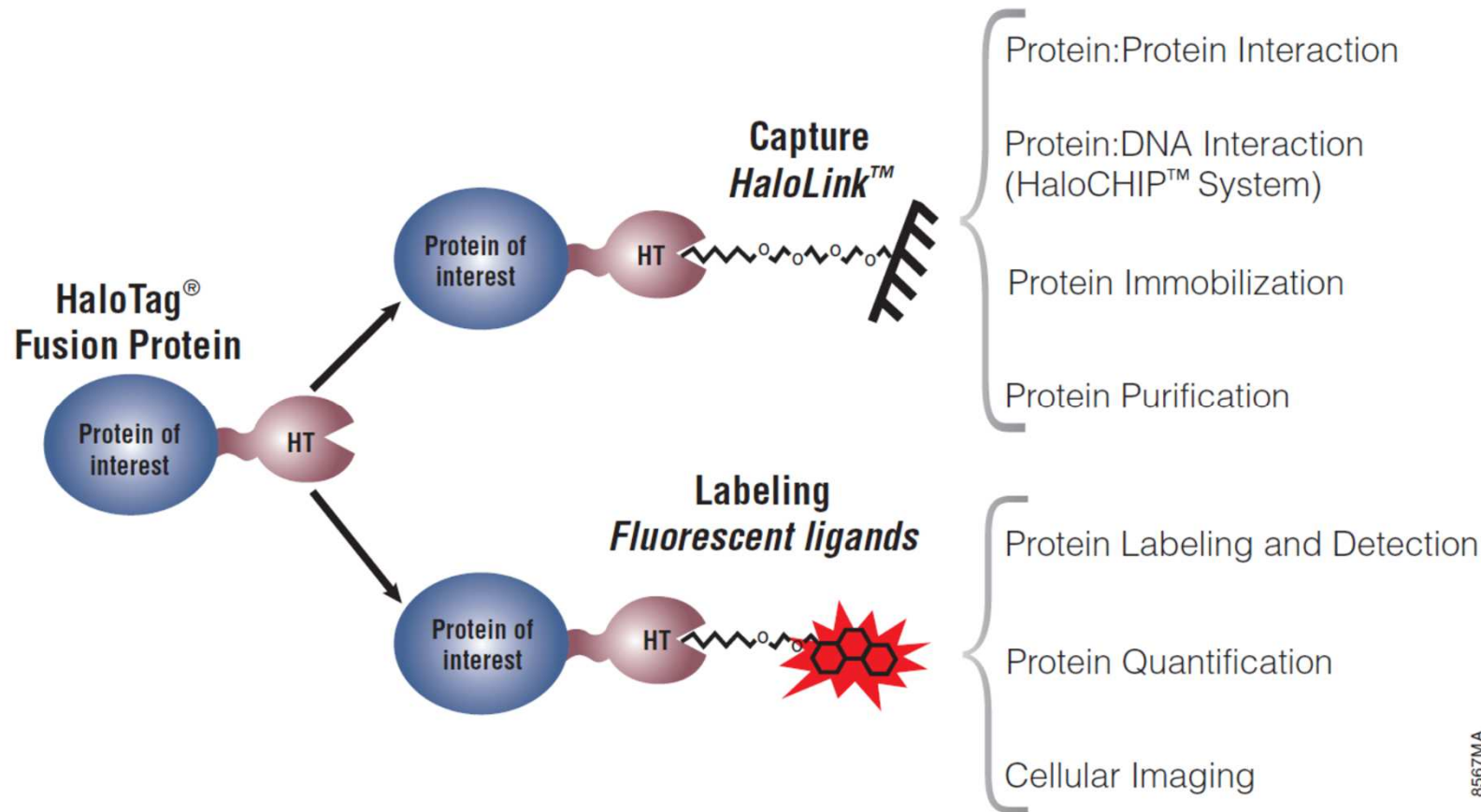
Pozor na kontaminace
(např. chaperony)

MS analýza SDS-PAGE
nebo roztoku

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



Metody izolace a analýzy PKxů



Velmi vhodný HALO tag pro izolaci komplexů: kovalentně vázaný ligand (silnější vazba, více oplachů)

Uvolnit lze pouze proteolytickým štěpením (nevýhoda) – vs štěpení specificky uvolní pouze komplex z matrice (nespecificky navázané proteiny zůstanou na matrici)

Různé přístupy charakterizace komplexů

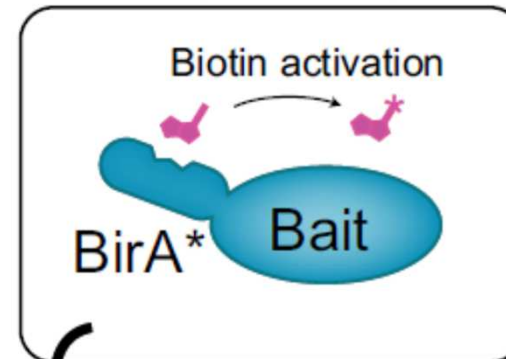
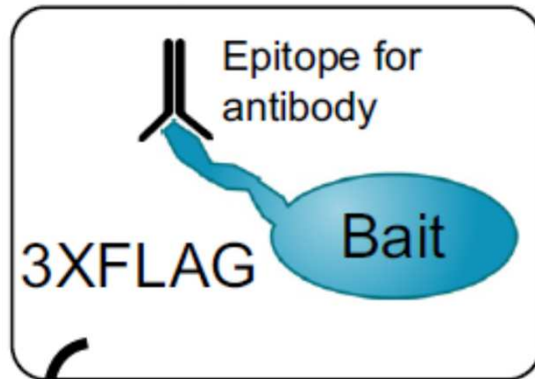
klasický

alternativní

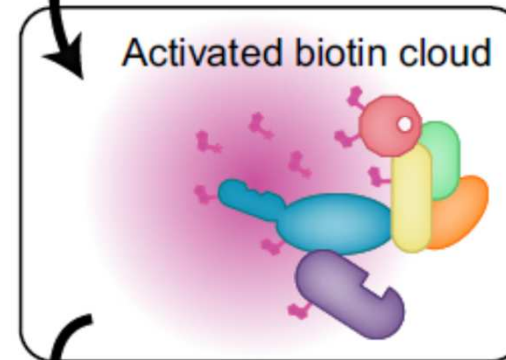
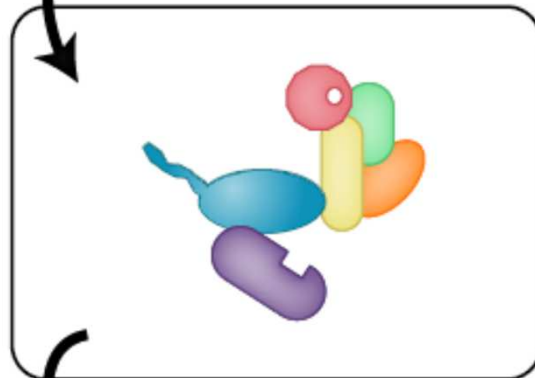
Affinity Purification

BioID (Proximity Biotinylation)

Tagging system

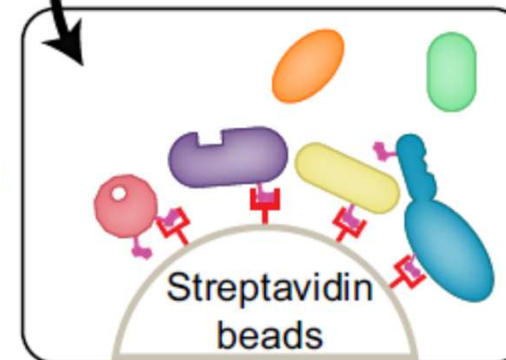
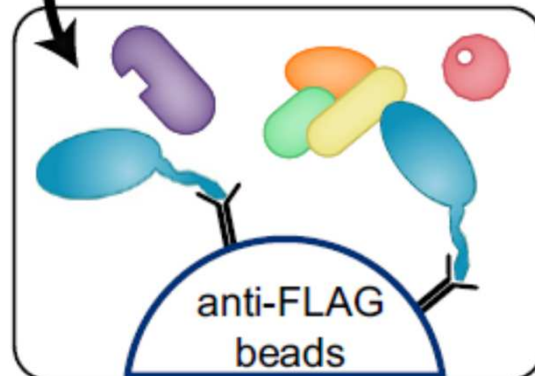


in vivo
function



Biotinylace na
vzdálenost
<20nm

Purified
interaction
partners



MS identifikace
biotinylovaných
proteinů

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



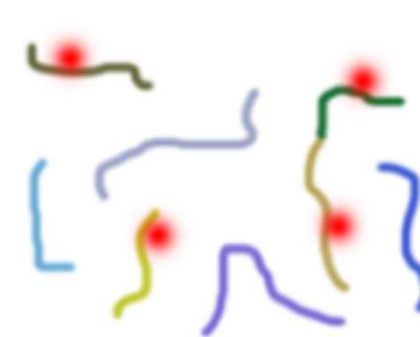
BirA biotin ligáza (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells



Lyse cells

Denature proteins



Biotin affinity purification

Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

Mass spectrometry to identify candidates

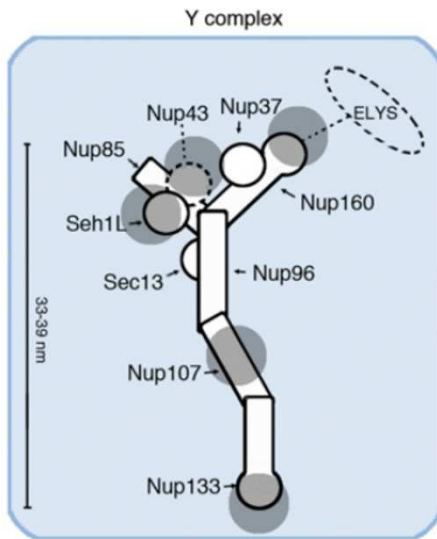
Citlivá metoda
(kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „**sousedící**“ proteiny do 20nm)

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

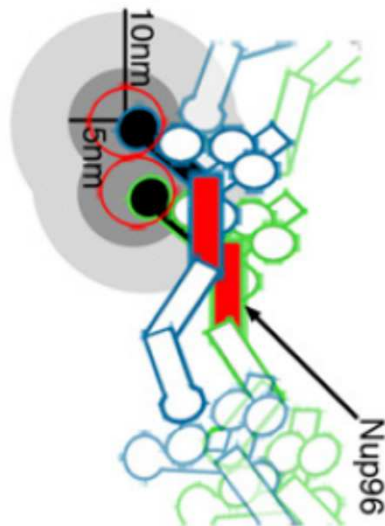
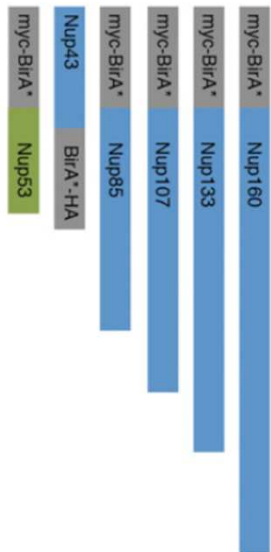
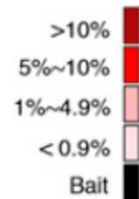
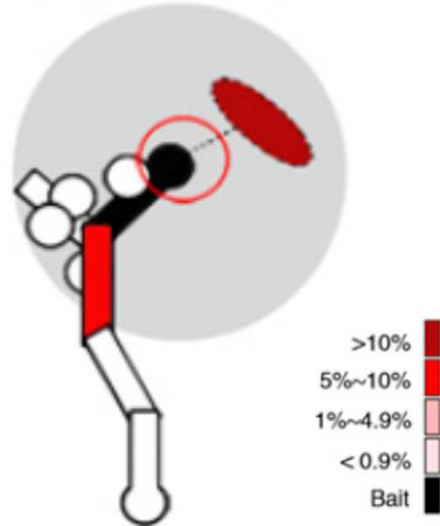
Např. chromatin-asociované komplexy jsou hůř rozpustné – izolace za **denaturačních** podmínek

Metoda BioID – organizace komplexů

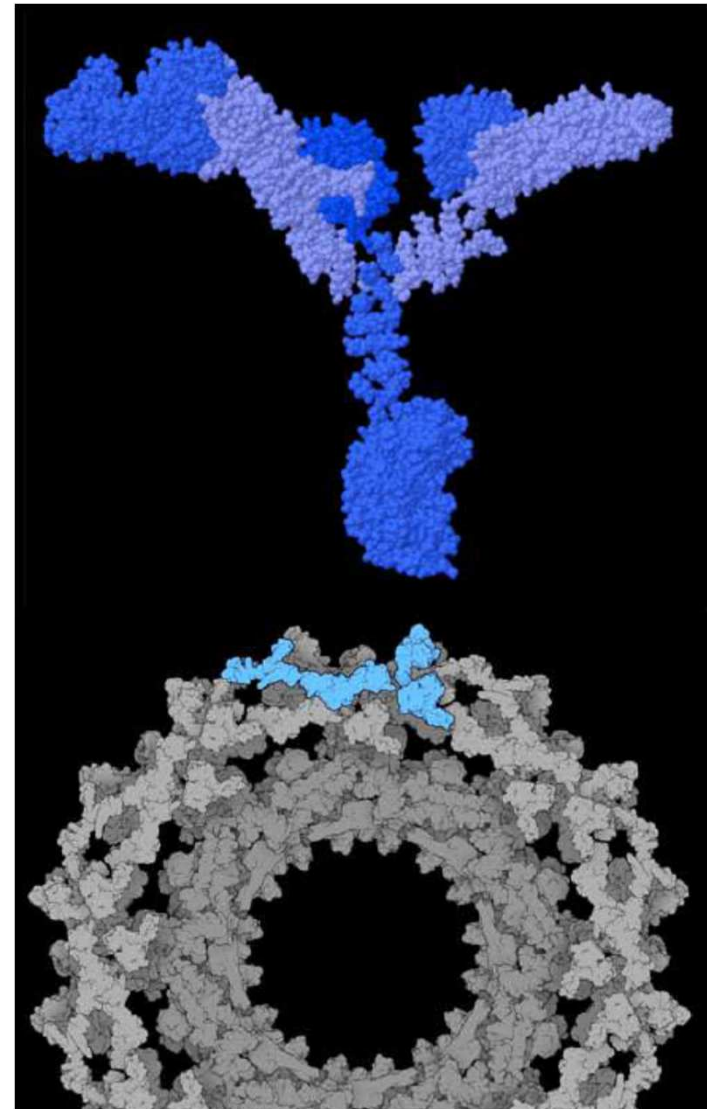
Dosah biotinylace je 10-20nm – lze využít k mapování „blízkých“ proteinových sousedů ve velkých komplexech



Nup160

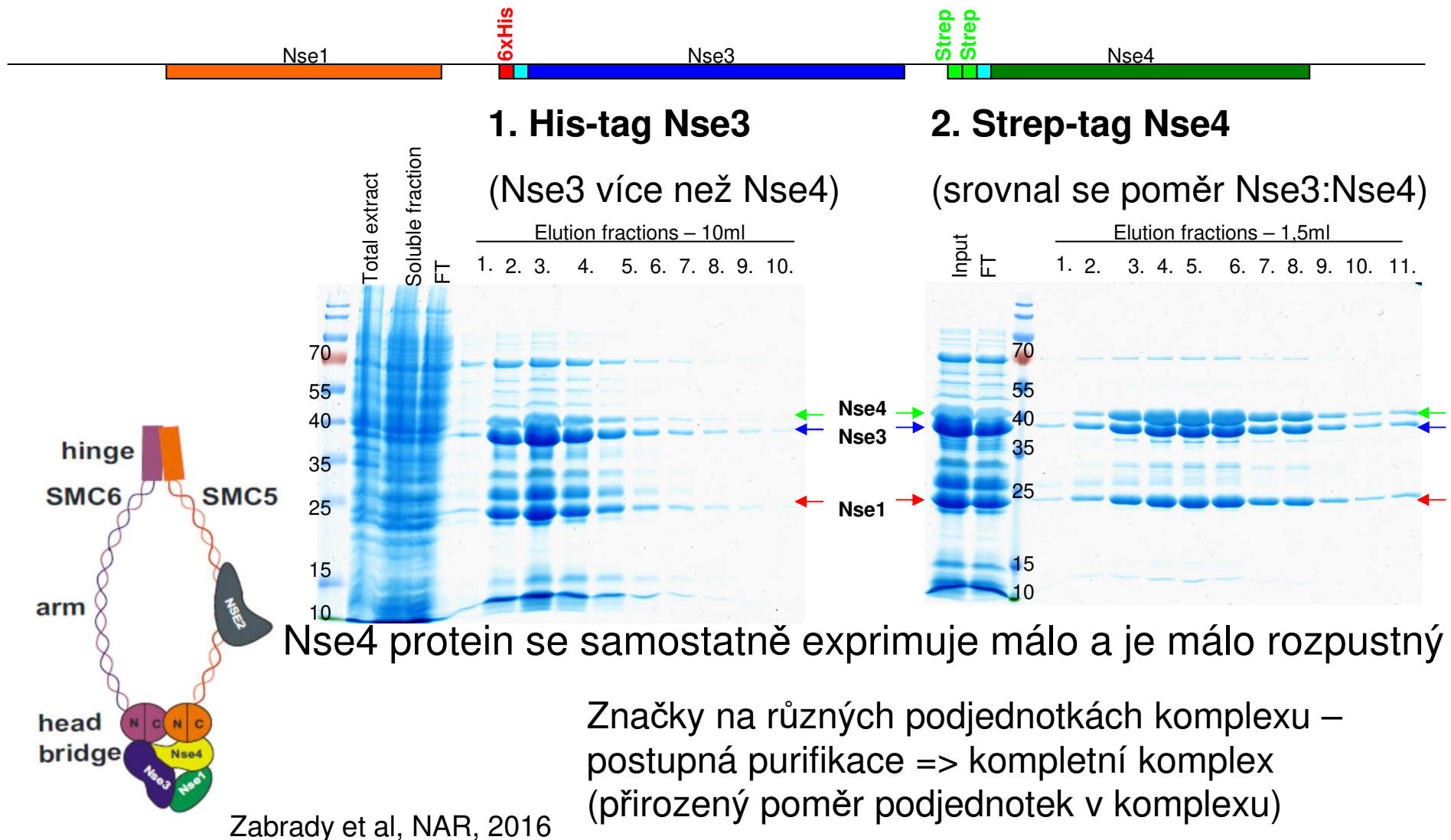


Nup160

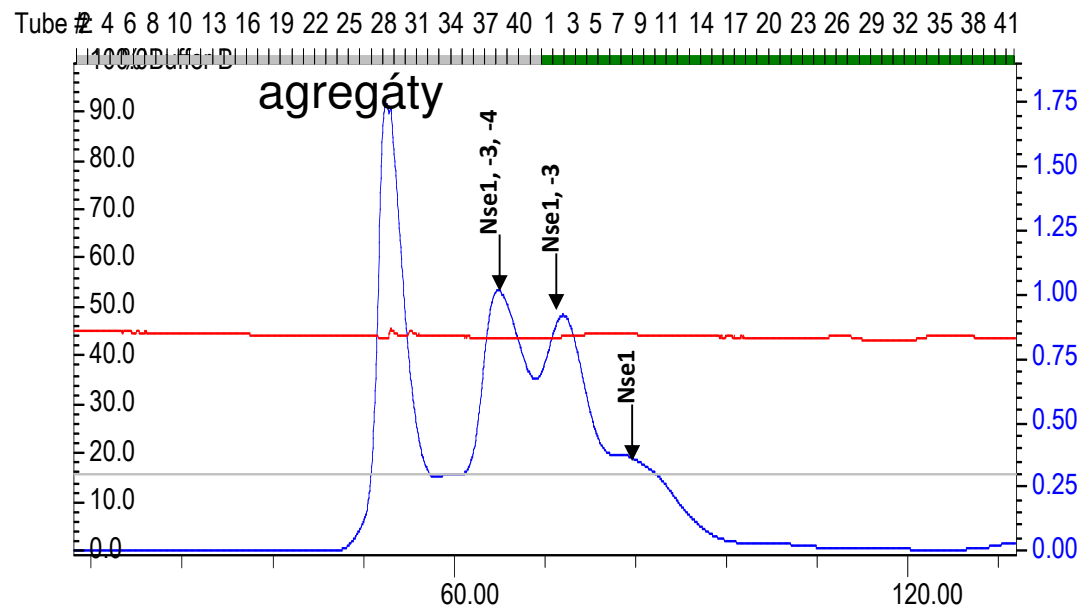
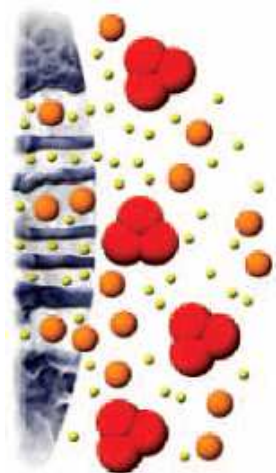


Ko-purifikace - ověření

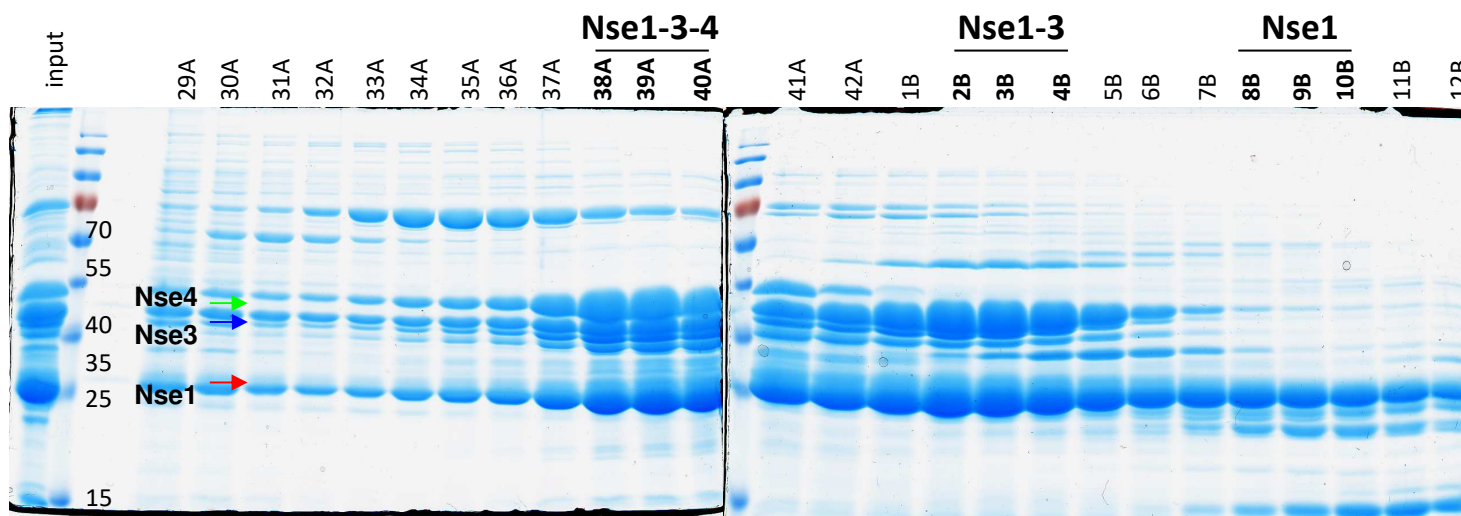
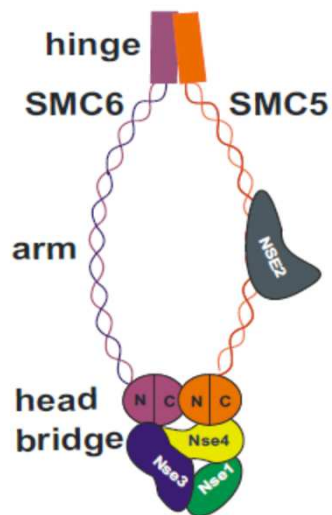
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**



Ko-purifikace

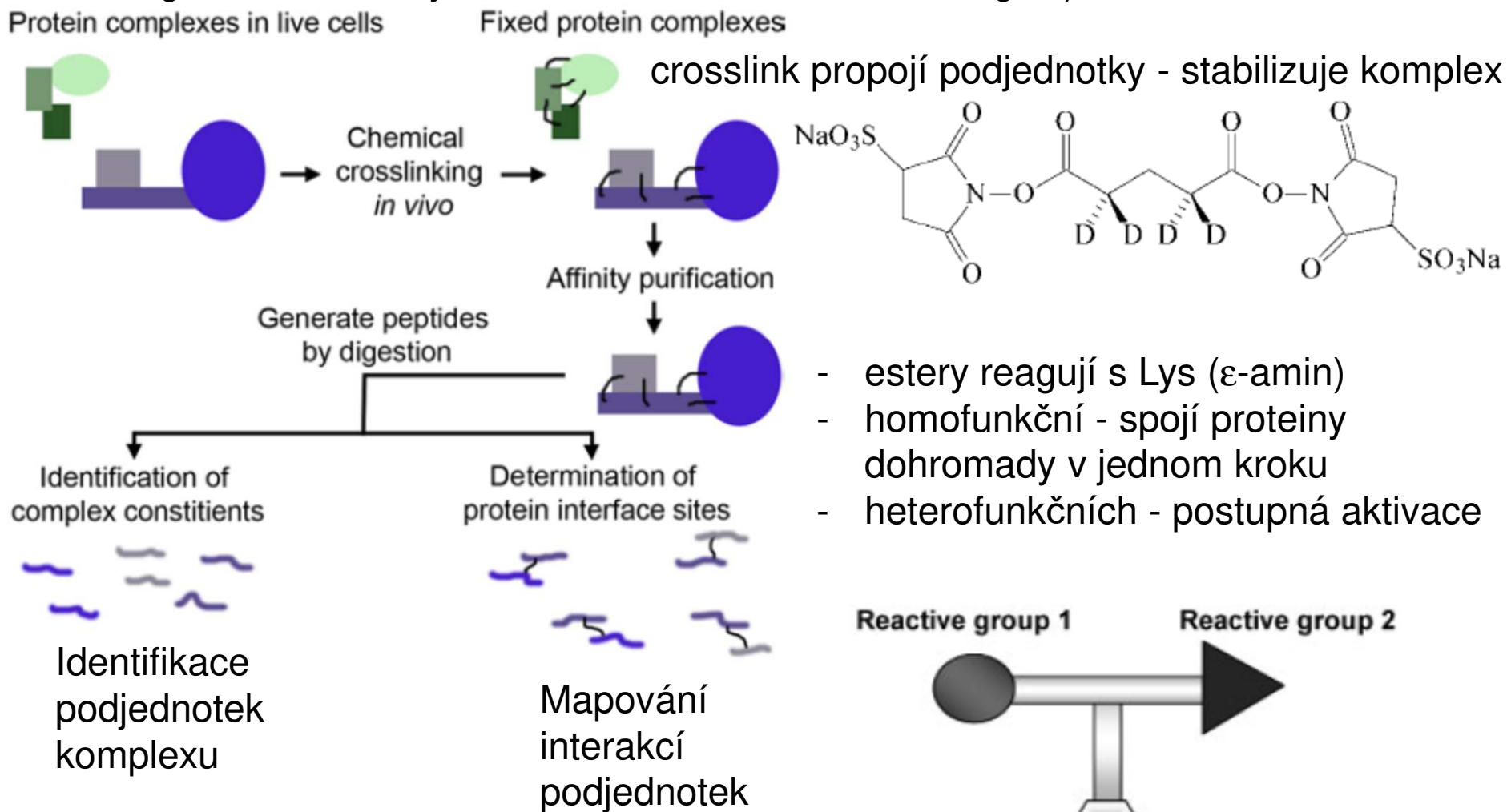


3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů

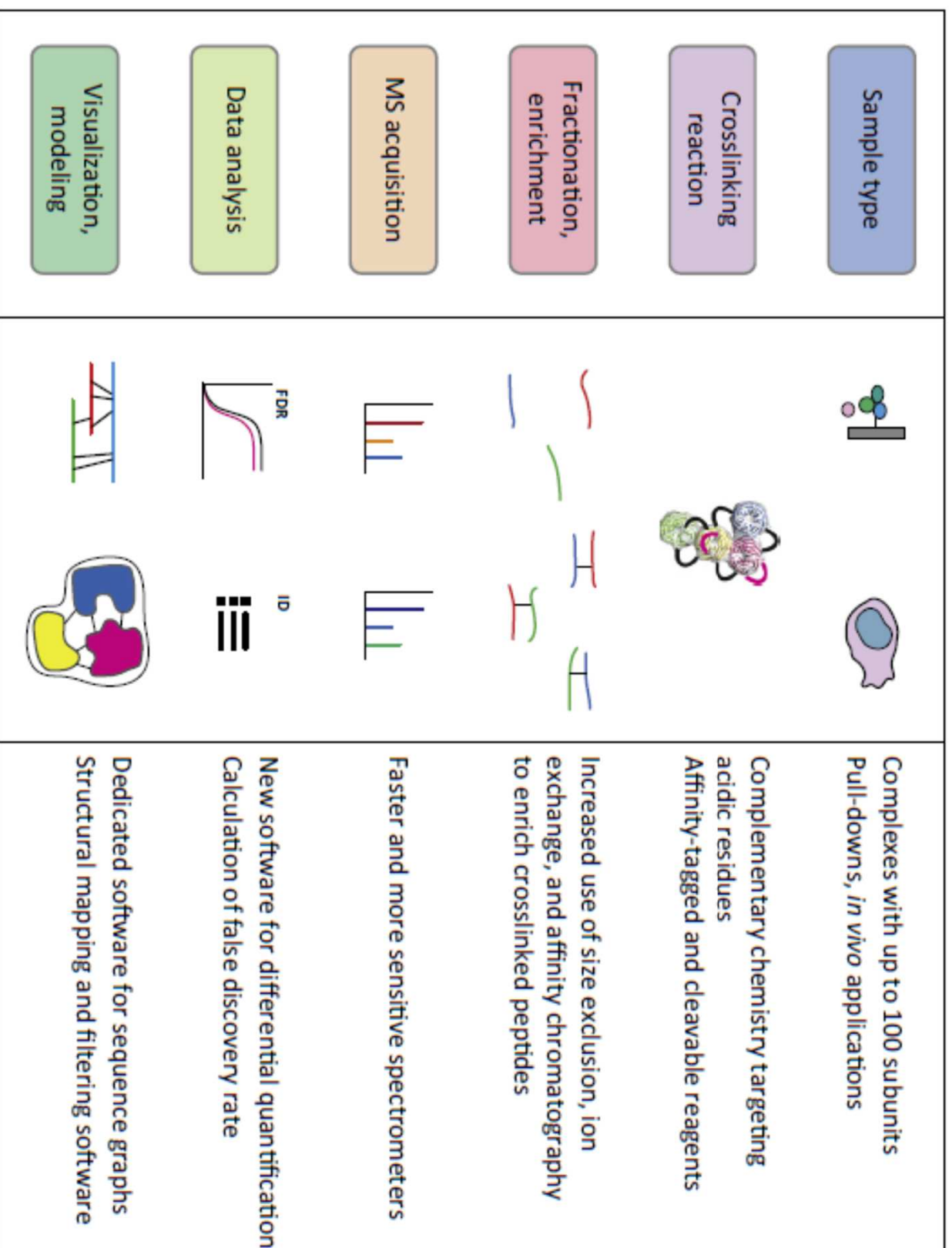


Detailní mapování komplexů - crosslinking

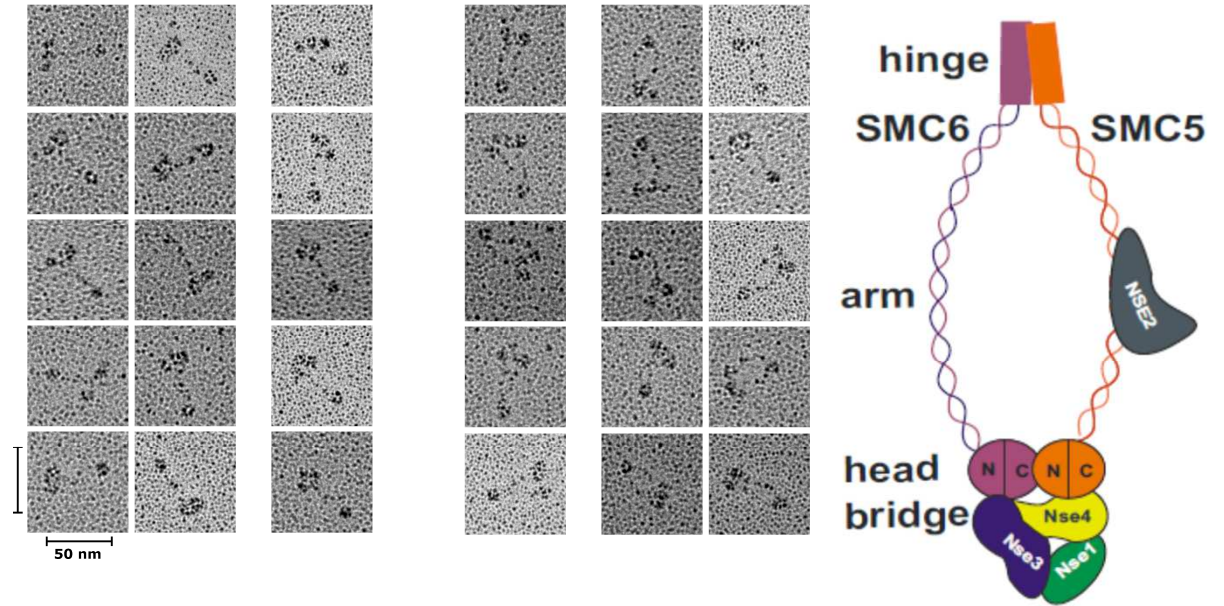
XL na purifikovaných komplexech nebo v buňce a poté purifikace za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu – např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovíně nebo HALO-tag ...)



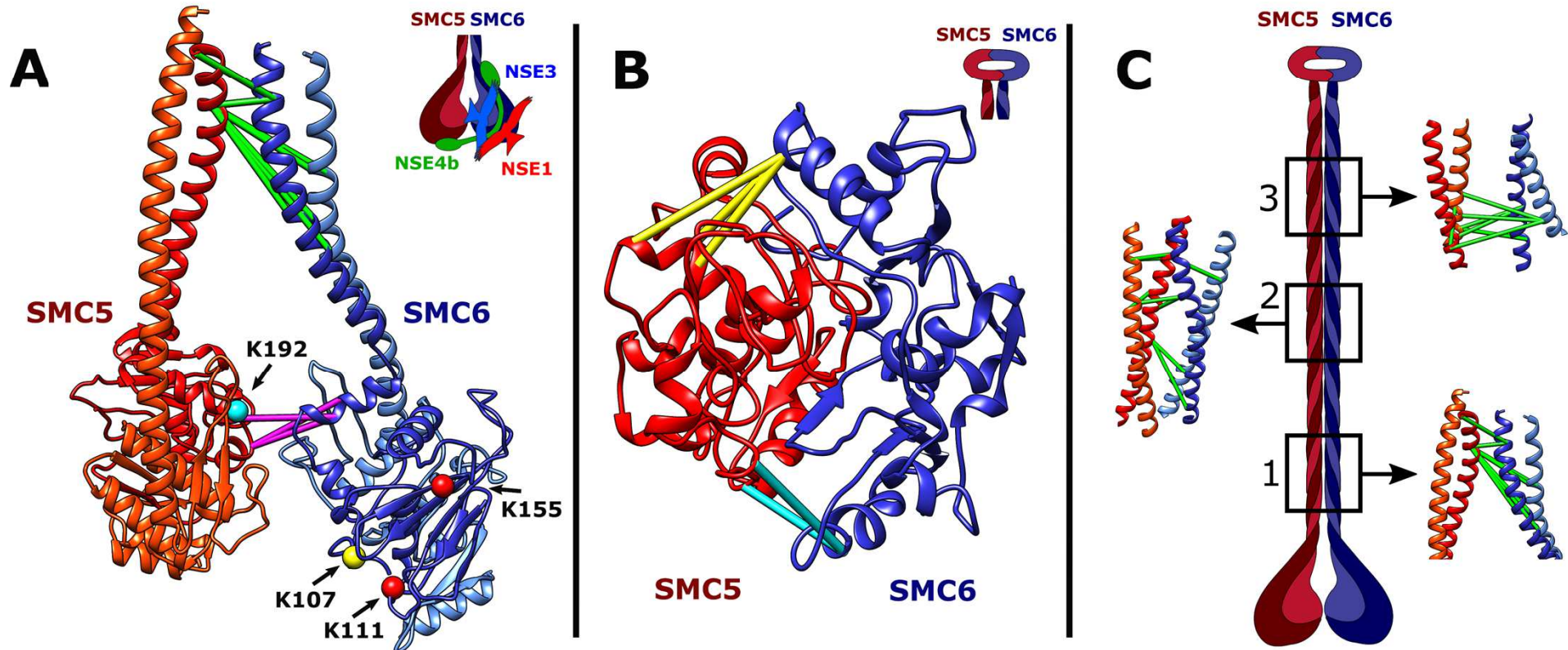
An Overview of the Crosslinking Mass Spectrometry (XL-MS) Workflow

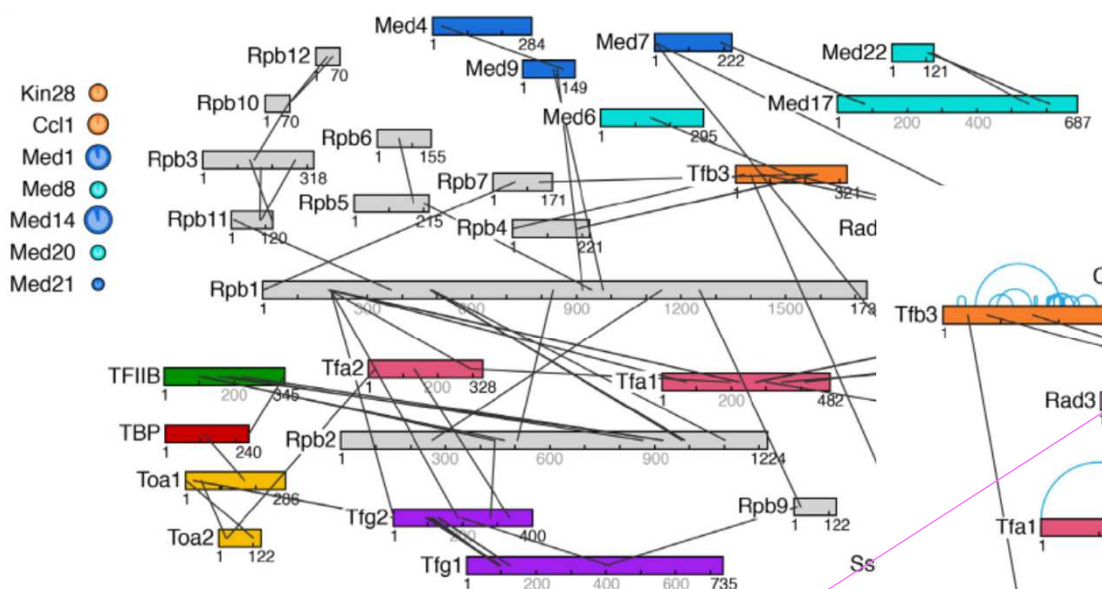


- krosslink vypurifikovaných částí komplexu SMC5/6
- 3 hotspots silně prokrosslinkované – ramena proteinů SMC5-SMC6 jsou vedle sebe (nikoli kroužek)

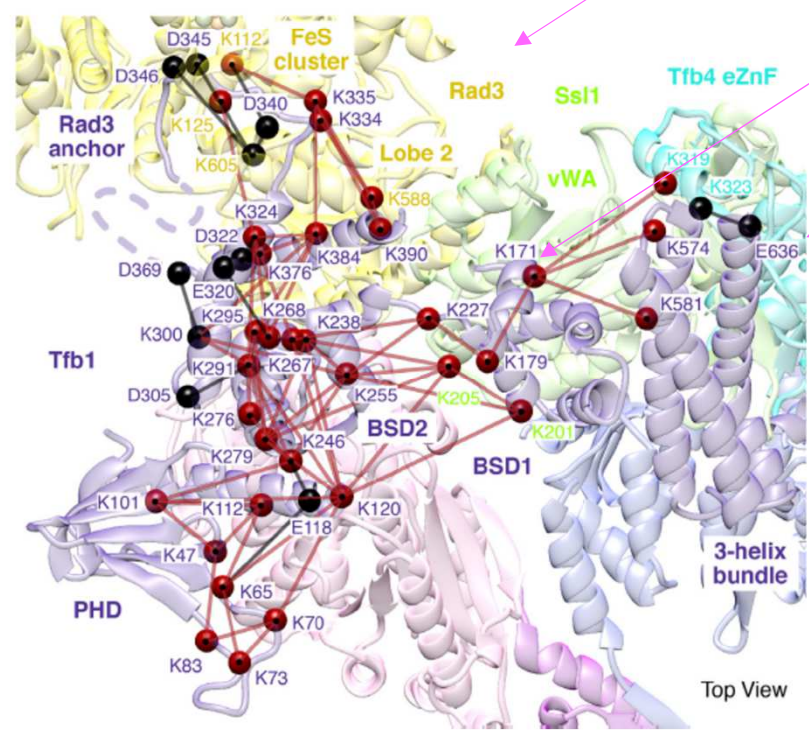
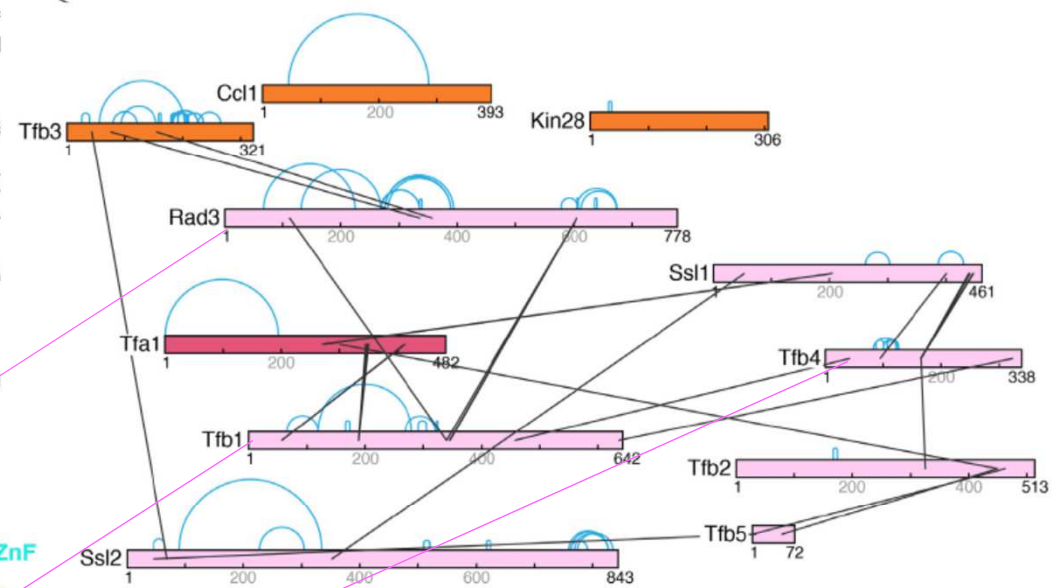


Adamus et al, JMB, 2020



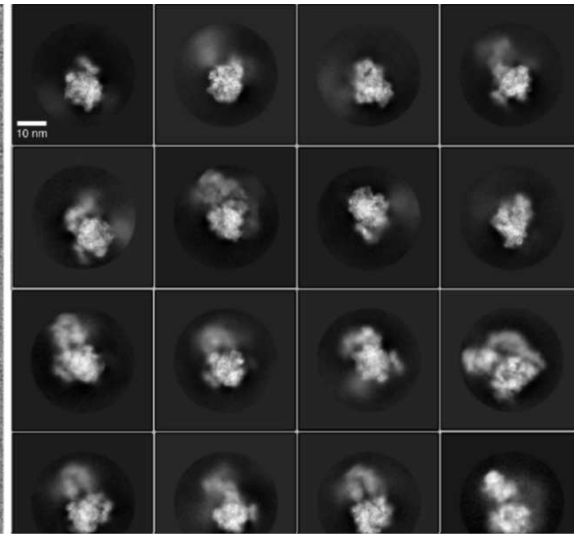
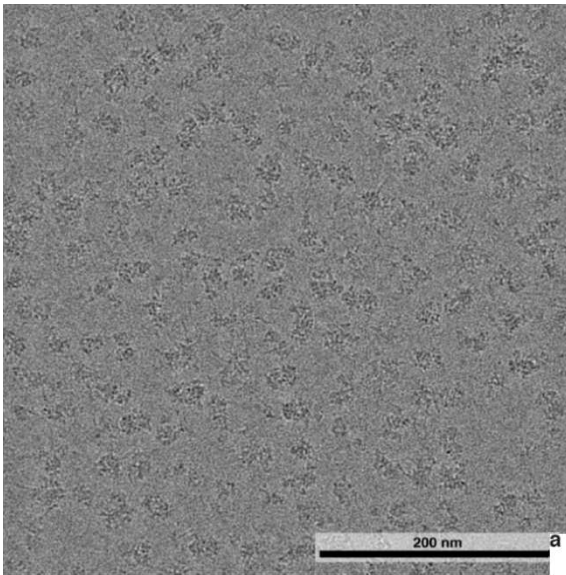


crosslink uvnitř a mezi proteiny



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

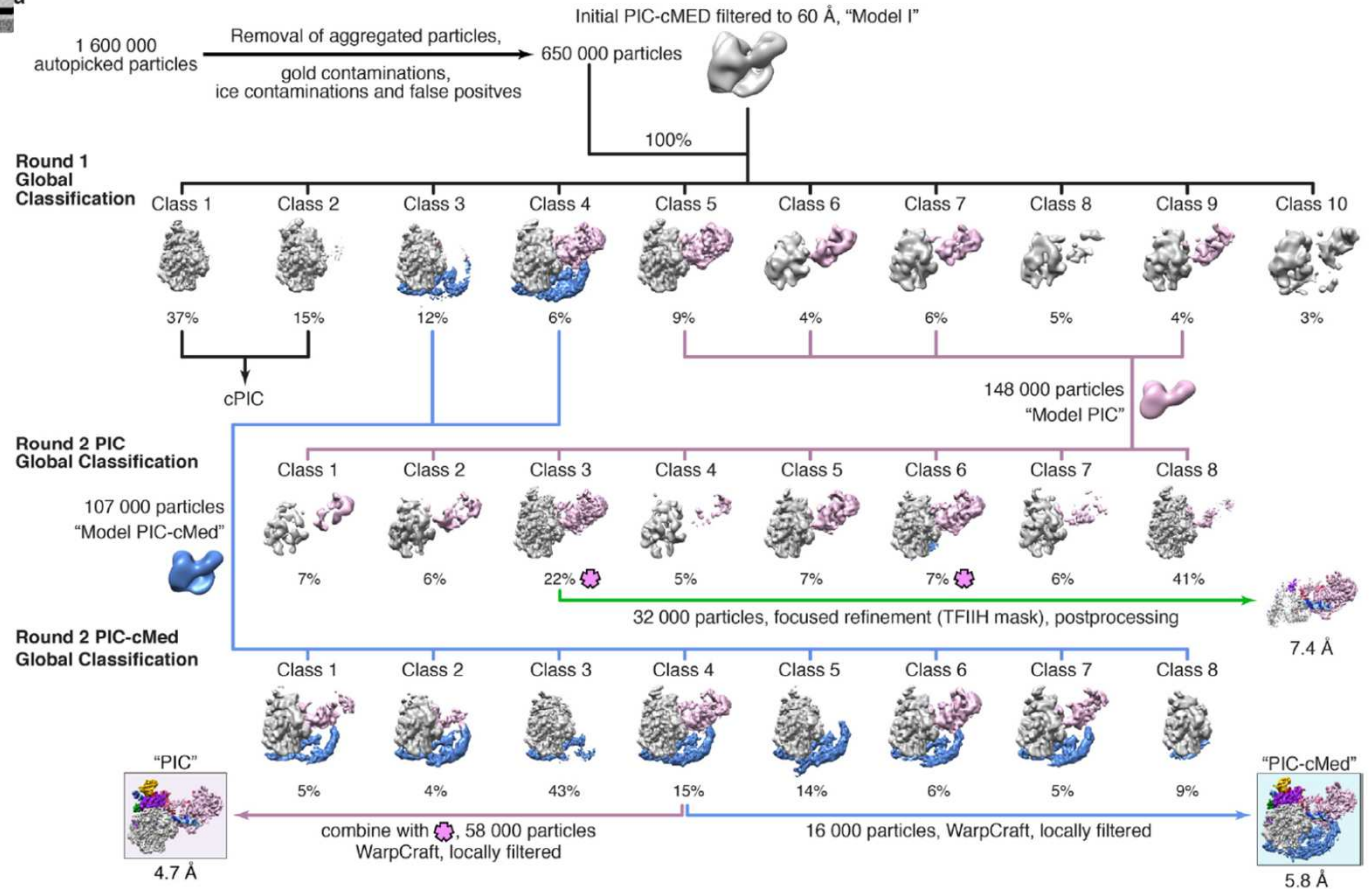
analýza PIC-MED komplexu (~50 podjednotek - ~2MDa)

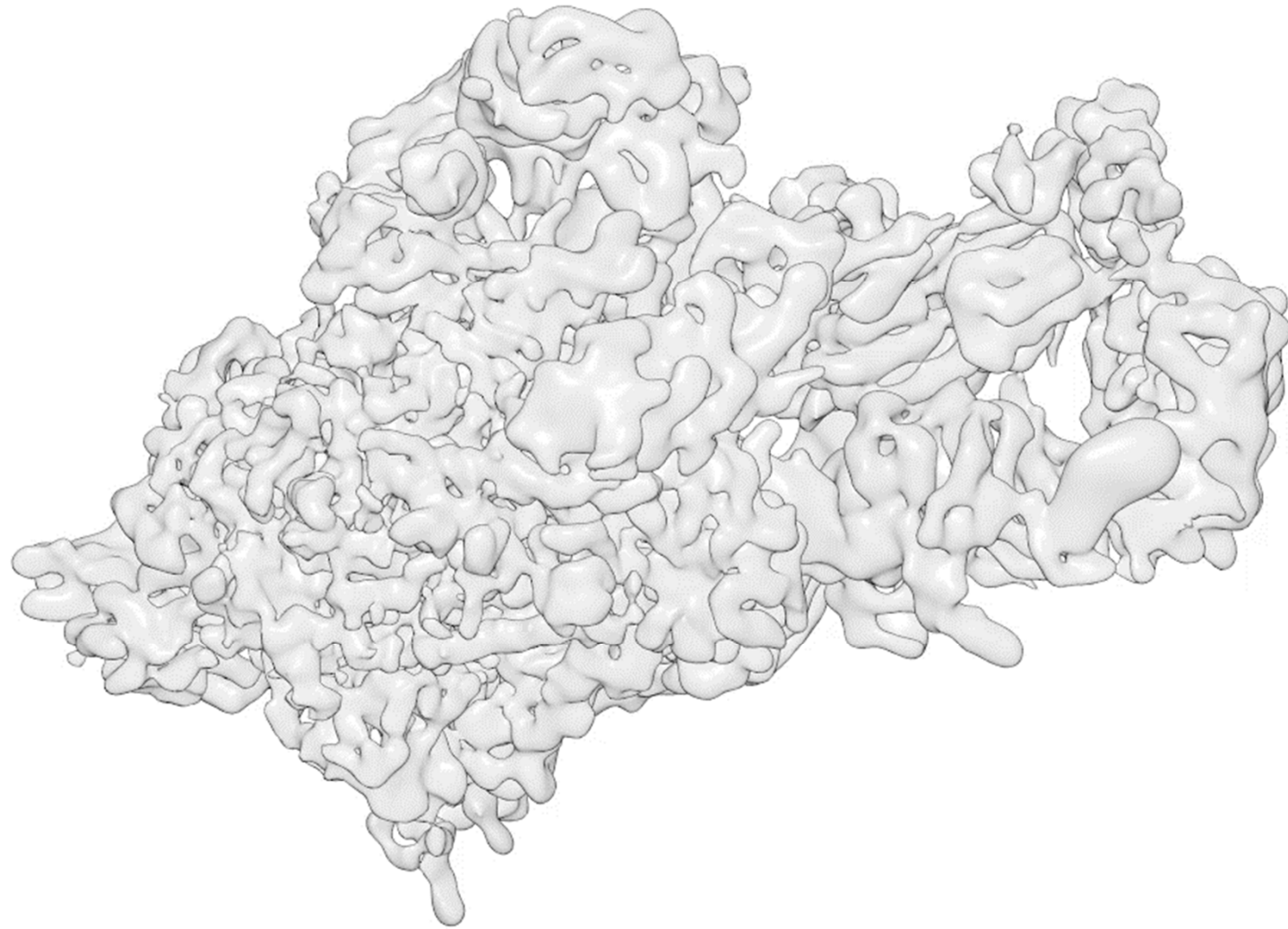


analýza PIC-MED komplexu
(~50 podjednotek - ~2MDa)

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

Schilbach et al, Nature, 2017





Schilbach et al, Nature, 2017

■ cMed, middle module
■ cMed, head module

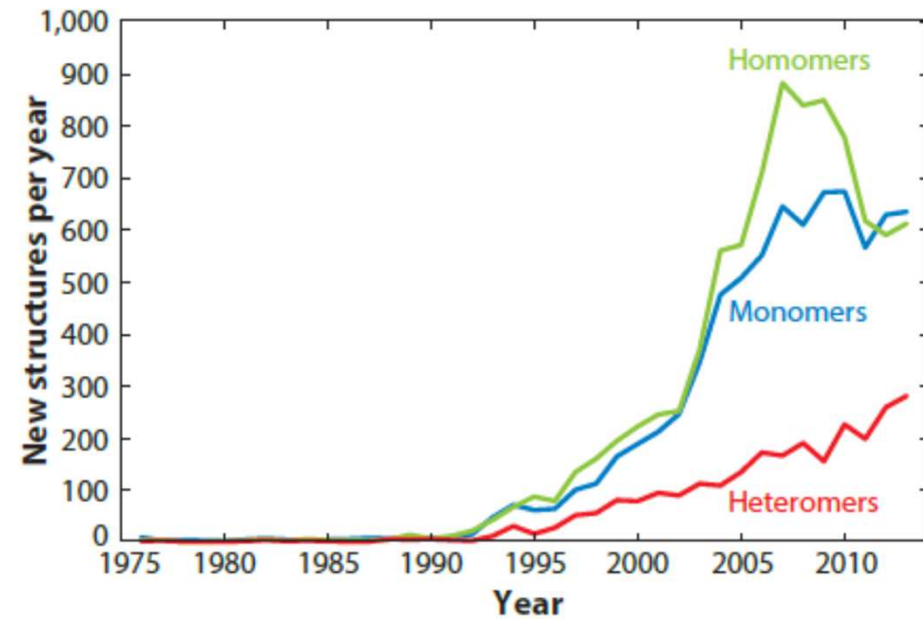
■ TFIIA	■ TFII E	■ TBP
■ TFIIB	■ TFIIF	■ Pol II

_____ cPIC

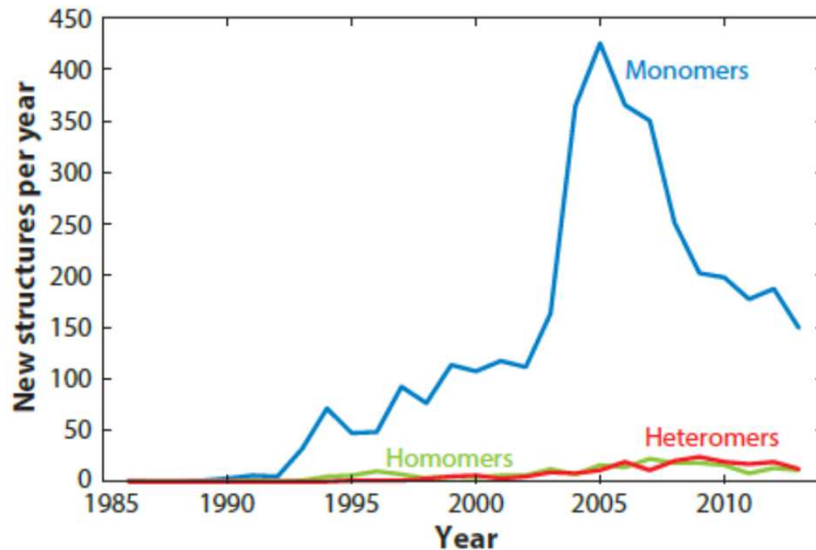
Použití metod **strukturní biologie** pro studium proteinových komplexů

- krystalografie – nejvhodnější (boom v 1. dekádě díky sekvenačním projektům)
- NMR je limitována velikostí
- cryoEM je vhodná pro velké komplexy (boom v současnosti)

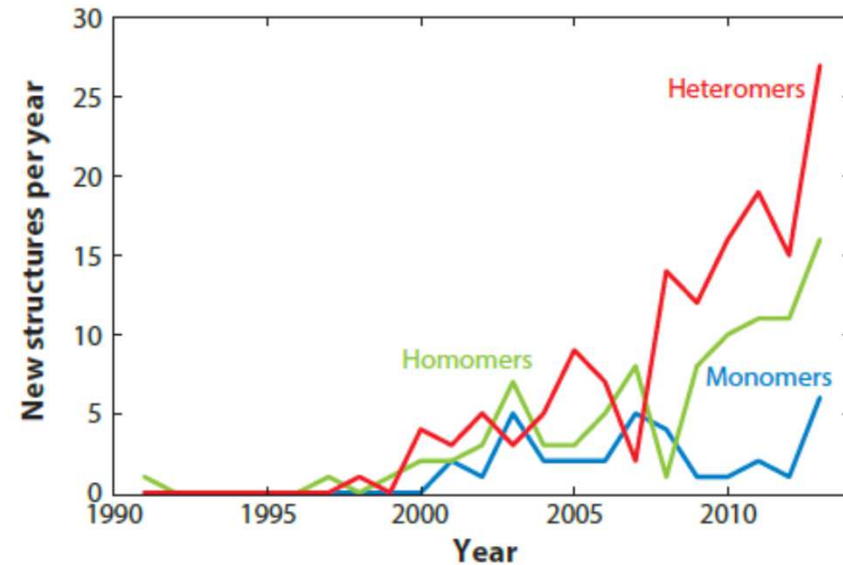
a X-ray crystallography



b NMR

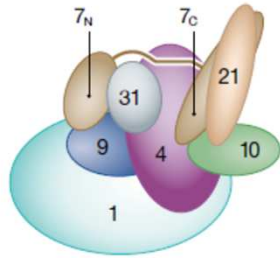


c Electron microscopy



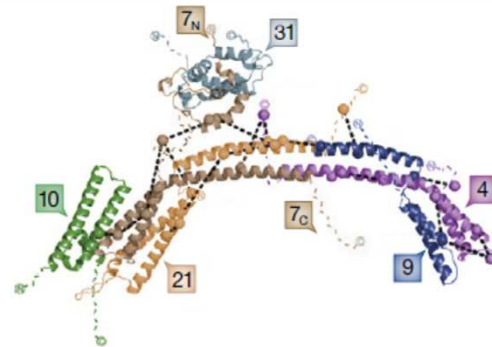
Integrativní modelování

MEDIATOR MIDDLE MODULE



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

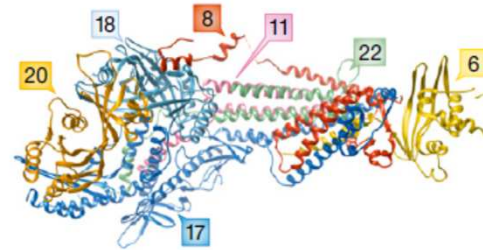
- Native MS
- IMS-MS
- Limited proteolysis
- Light scattering
- SAXS
- Pull-down assays



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

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

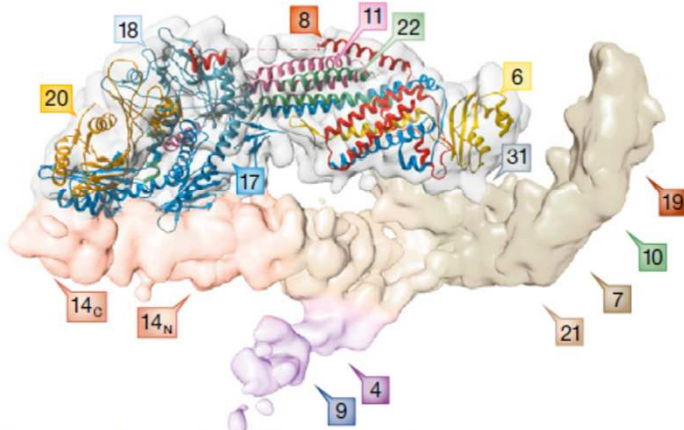
MEDIATOR HEAD MODULE



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

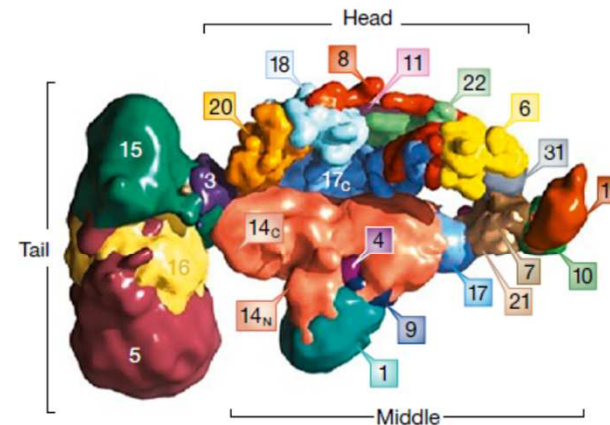
- Crosslinking-MS
- X-ray crystallography

CORE MEDIATOR (cMED) COMPLEX



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

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



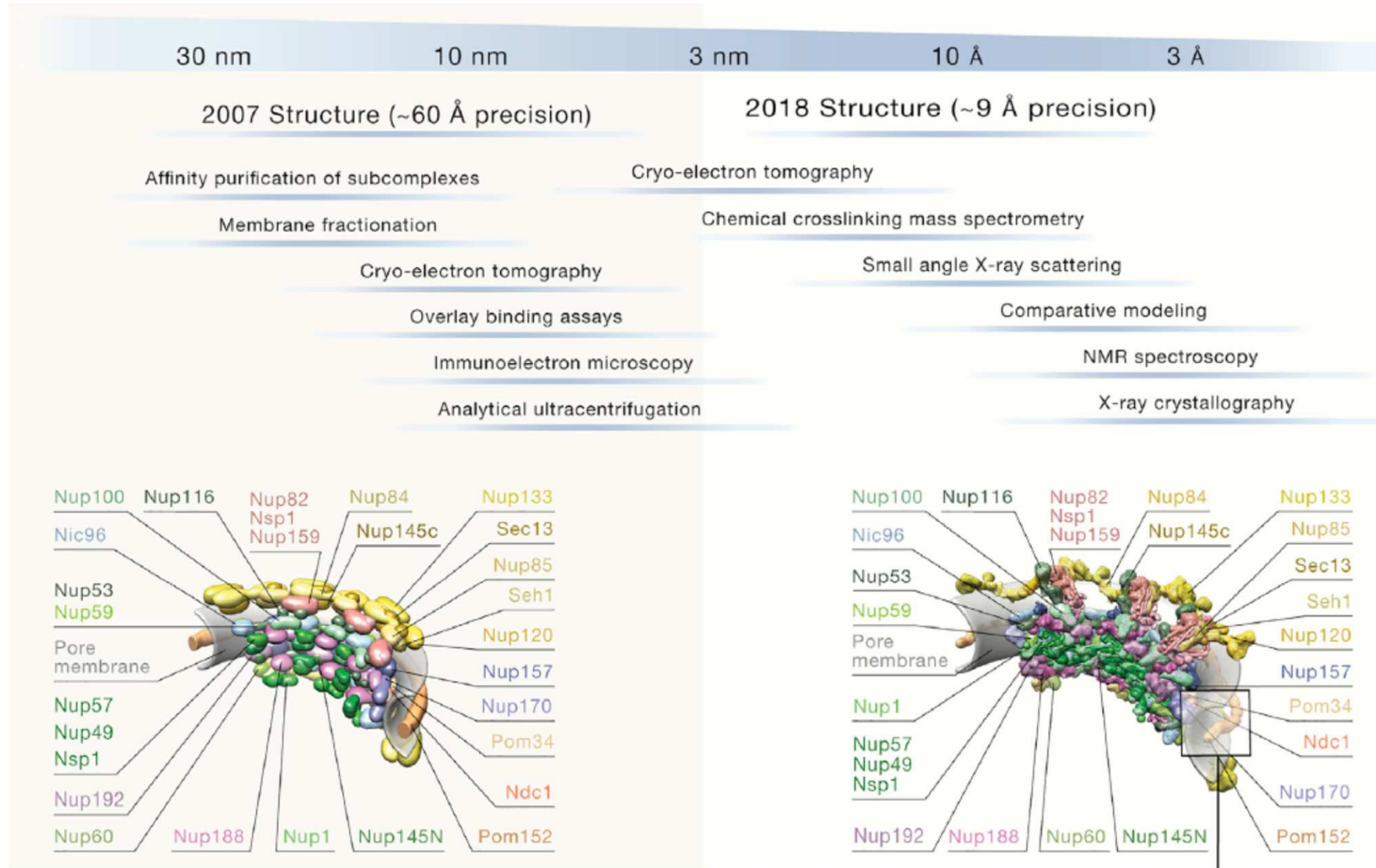
Architecture of a 21-subunit Mediator complex
Robinson *et al*, 2015

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

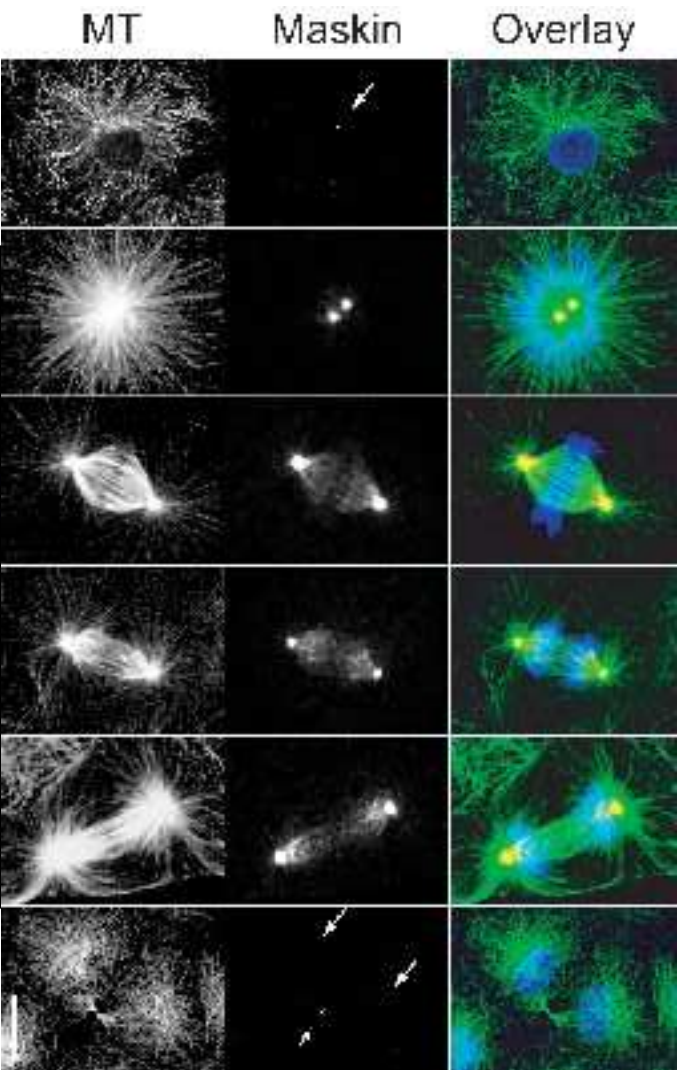
- Original data
- Integrated data from other studies

Lossl *et al*, EMBO J, 2016

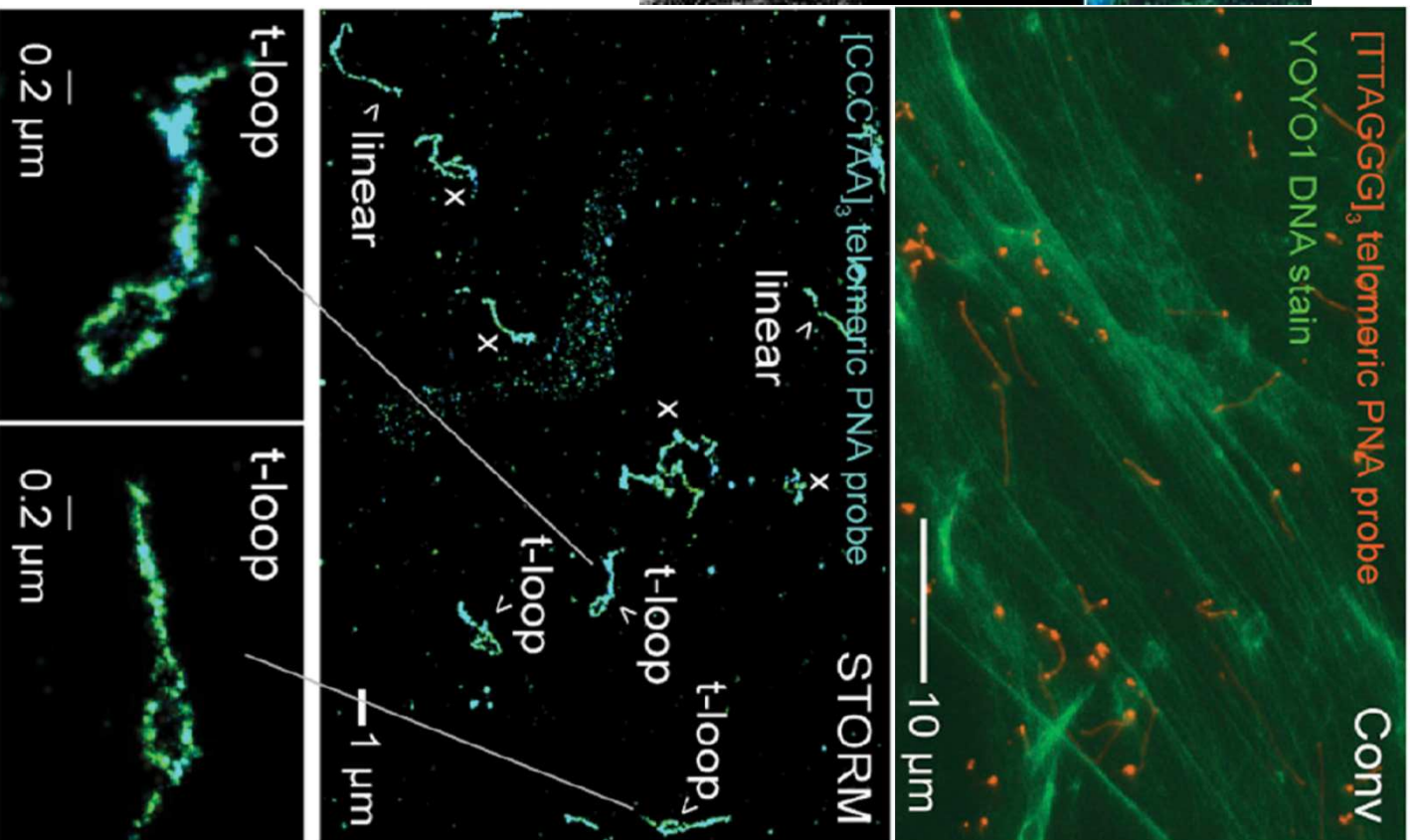
Integrativní modelování

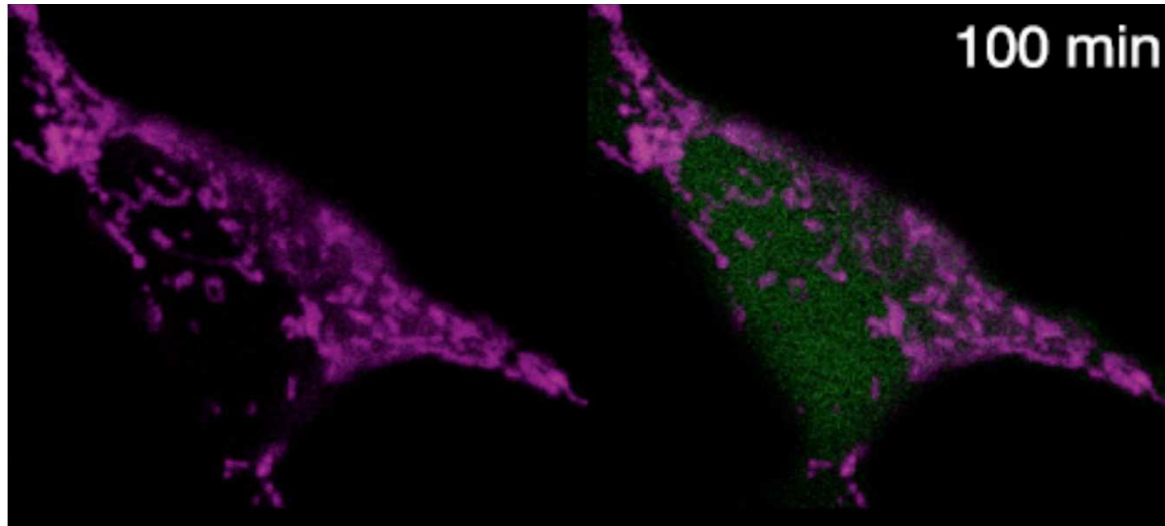


Mikroskopie

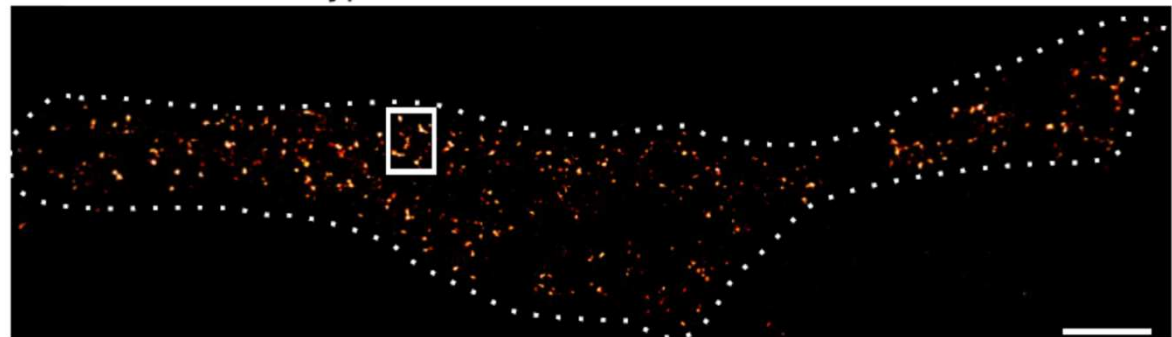


Doksani et al, Cell, 2013

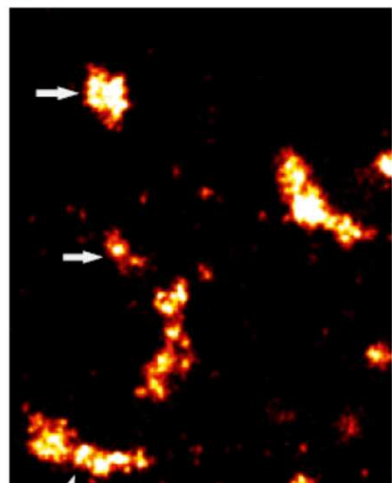




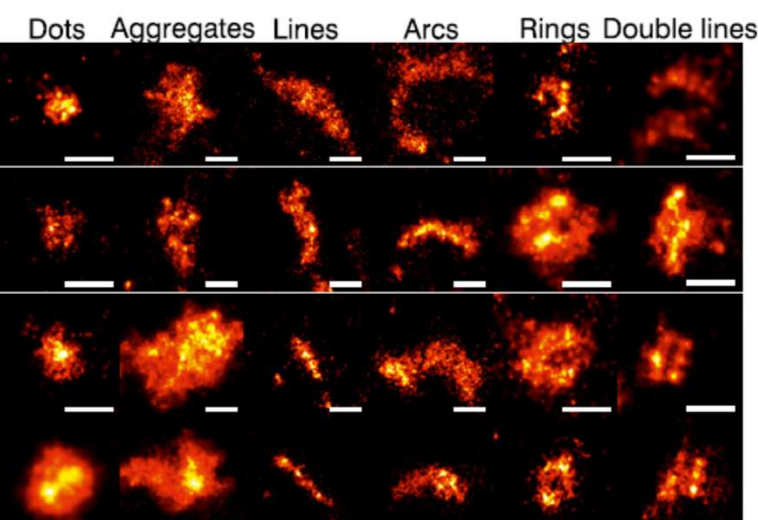
A GFP-Bax wild type



B



C

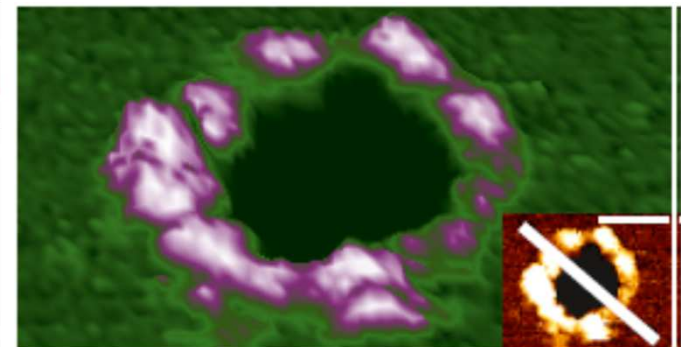


Lokalizace proteinových komplexů

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

+ AFM (atomic force microscopy)

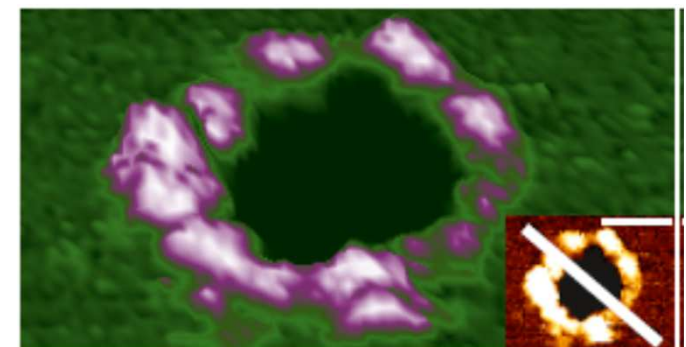
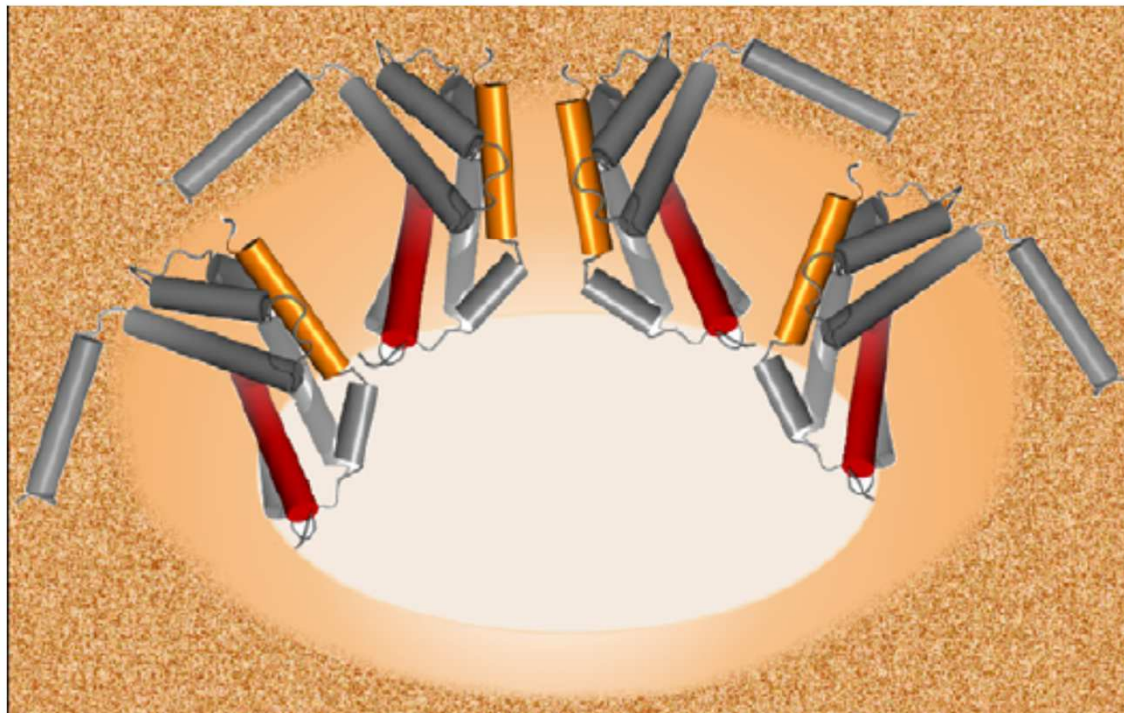
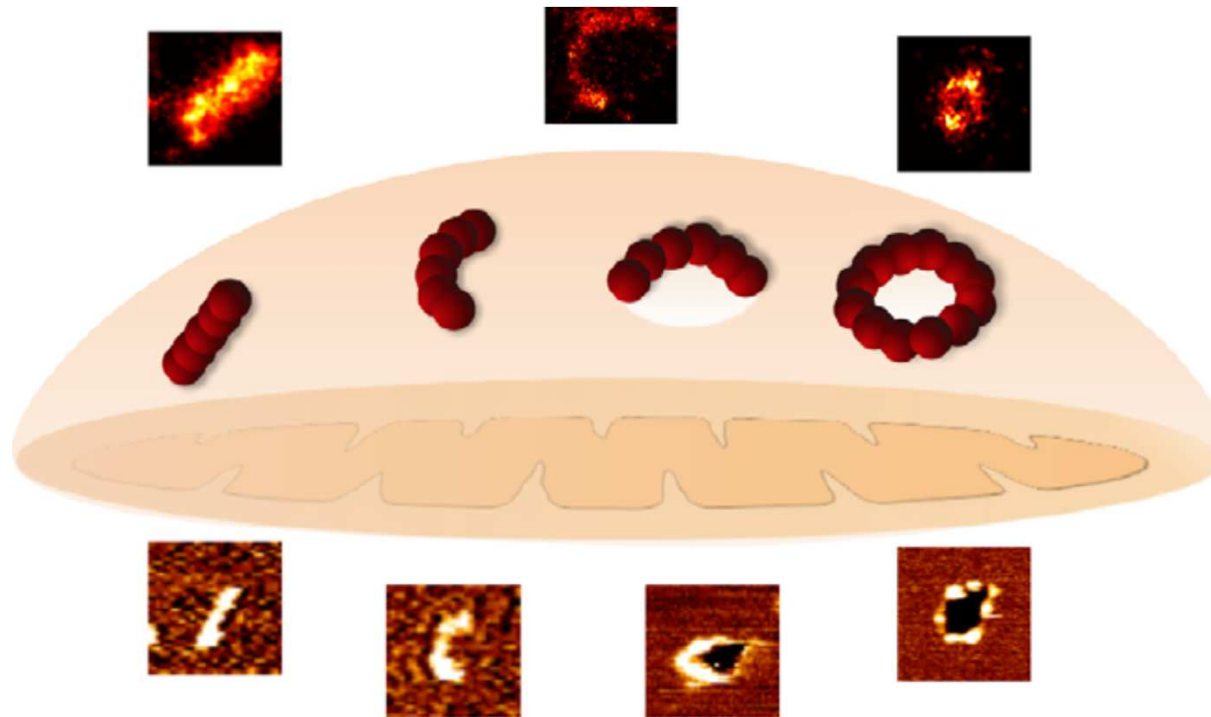
Gallego et al, EMBO J, 2016



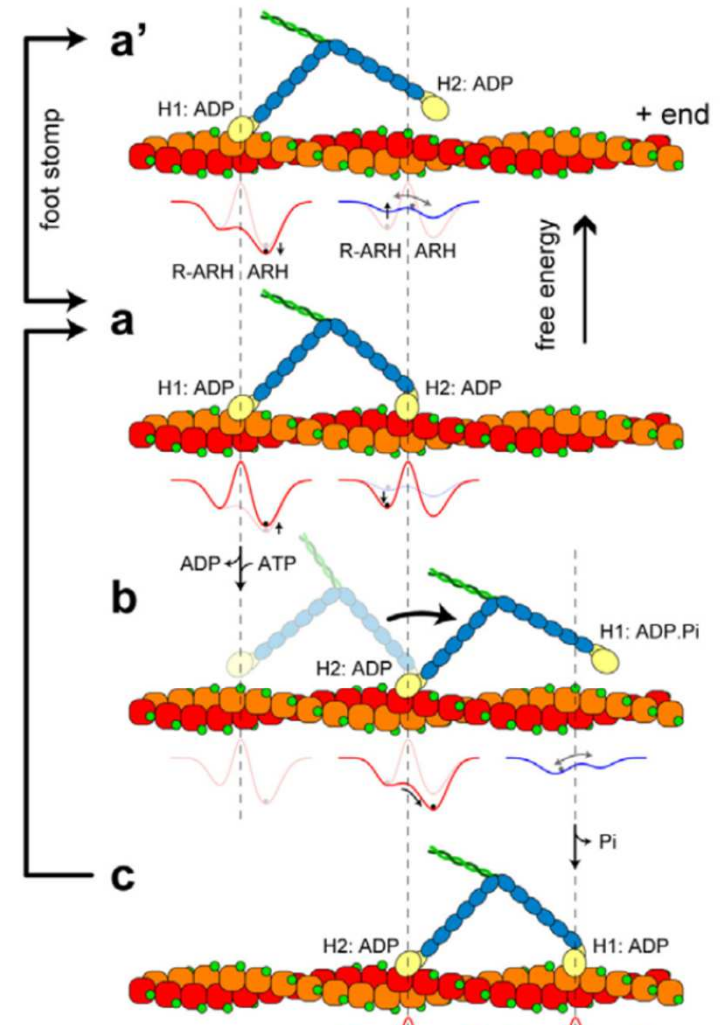
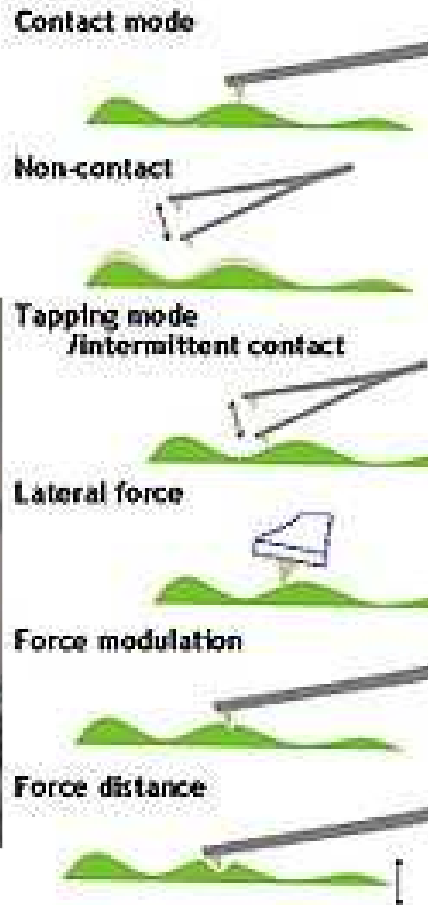
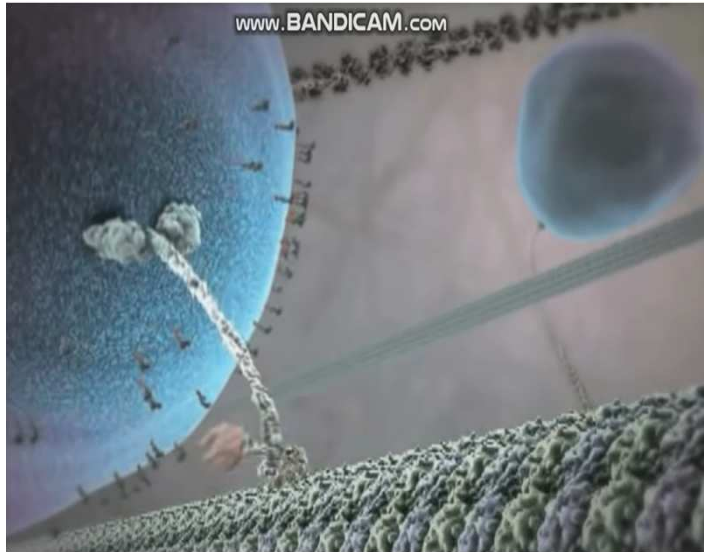
Lokalizace proteinových komplexů

Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptósa)

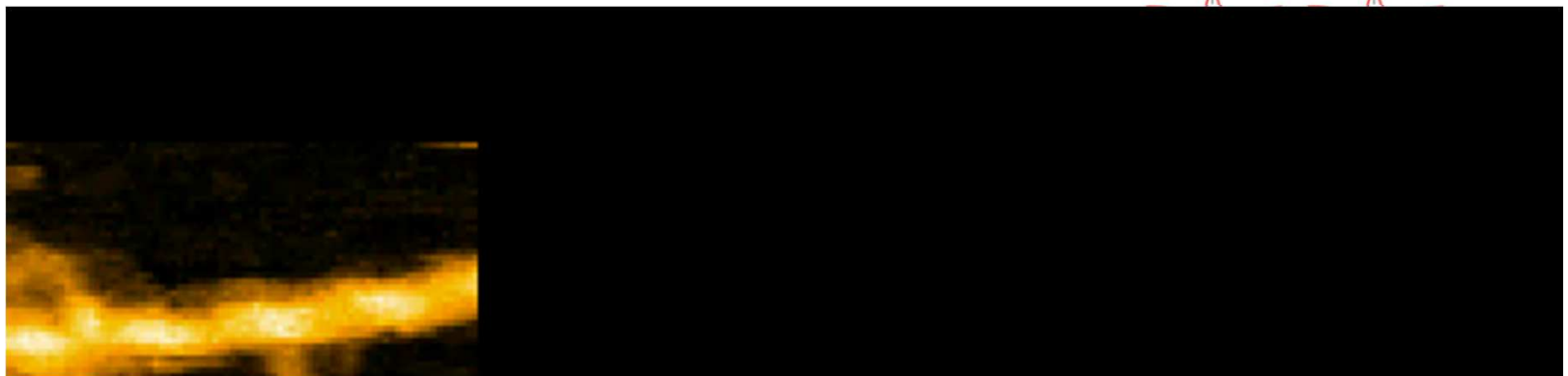
Gallego et al, EMBO J, 2016



AFM atomic force microscopy



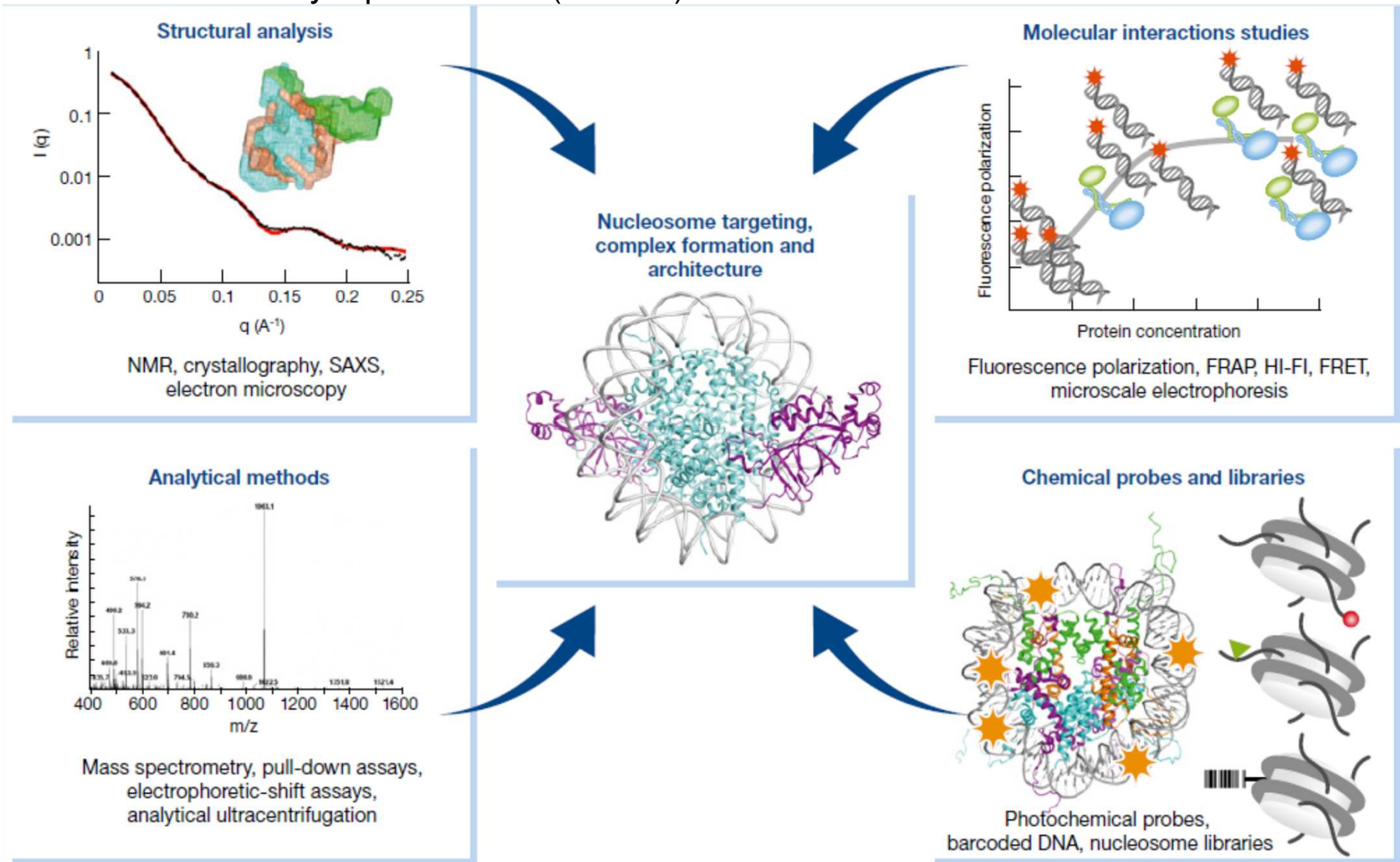
Ando et al, Annu



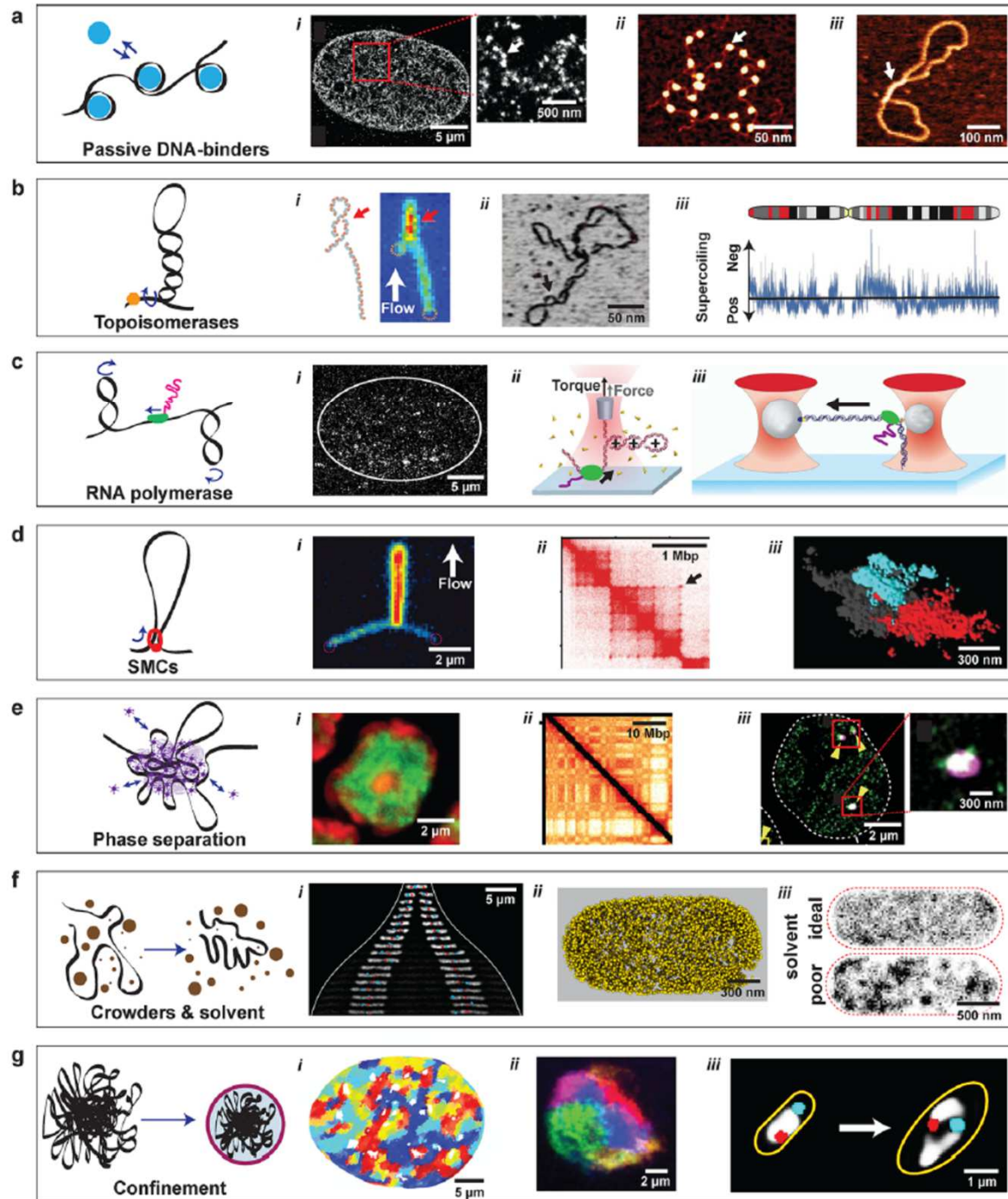
Analýza proteinových komplexů

více Metody v proteomice (CG090)

více doc. Hofr C7230



... speciální biofyzikální metody ...



Integrativní modelování

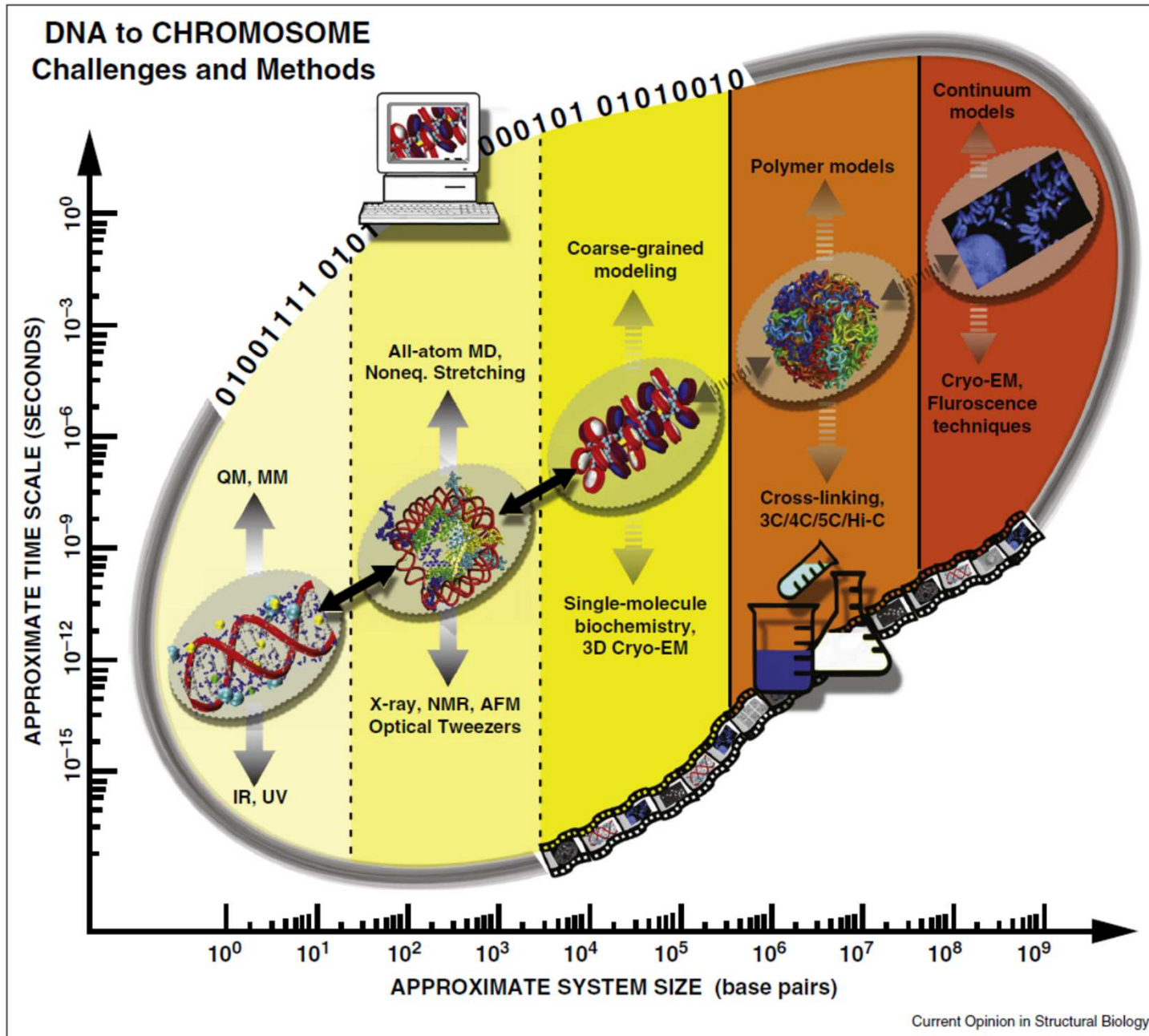
Table 1. Example Methods that Are Informative about a Variety of Structural Aspects of Biomolecular Systems

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

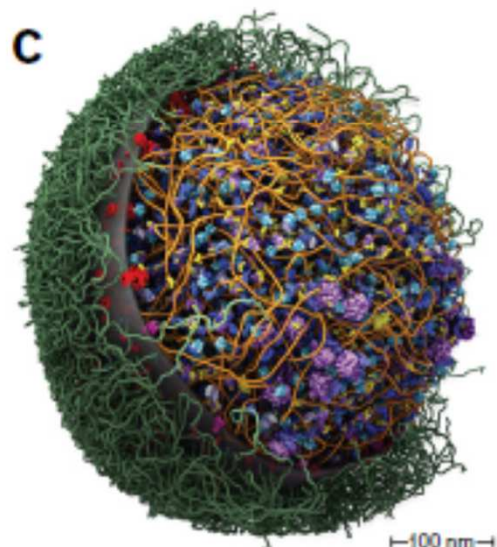
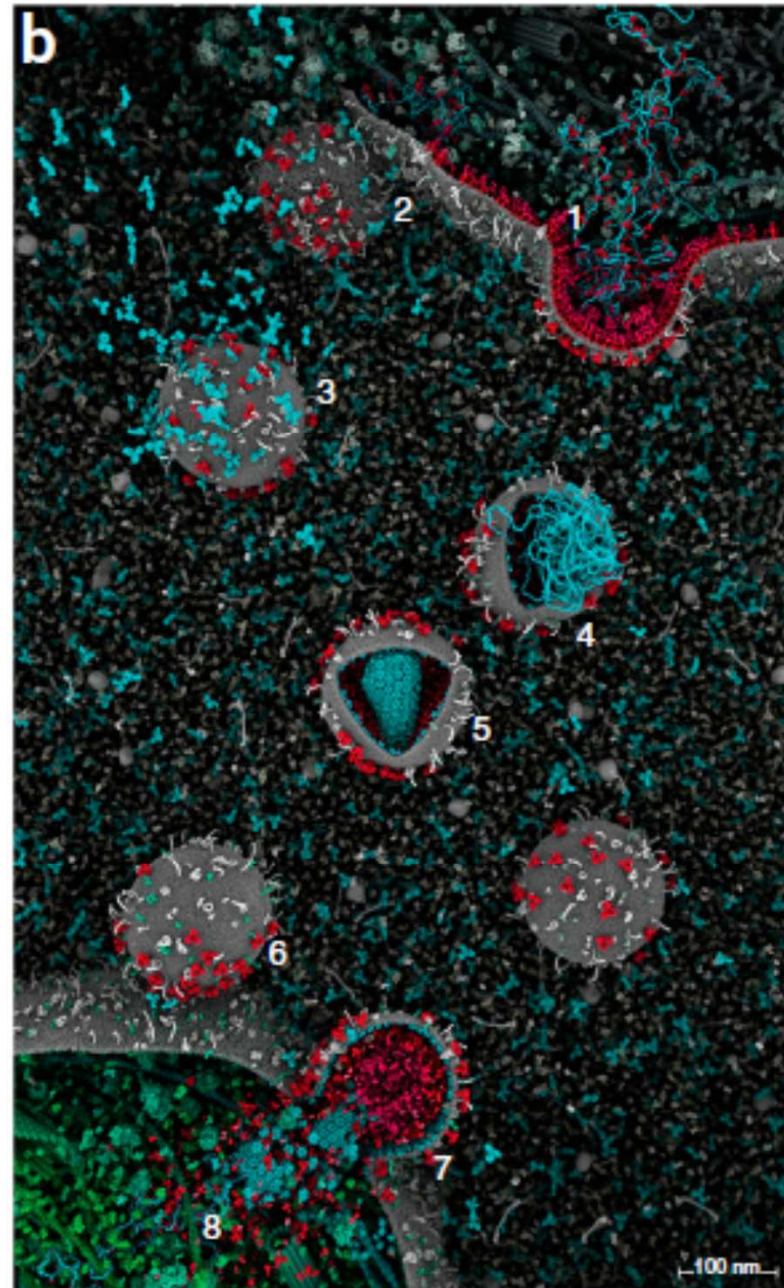
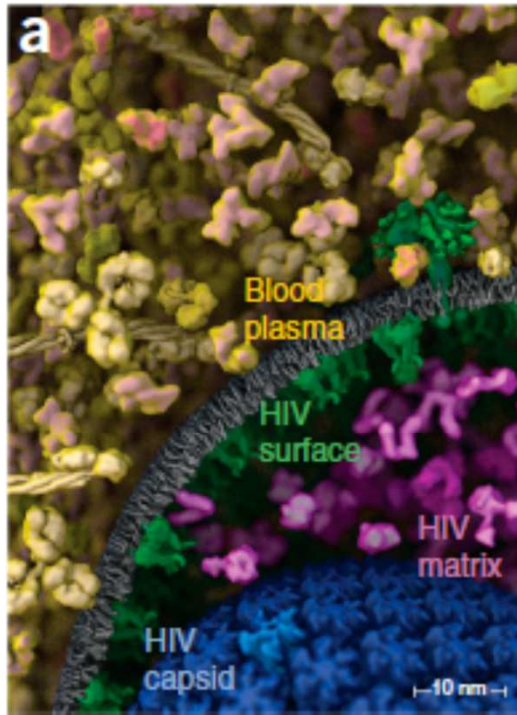
Abbreviation are as follows: 3DEM, 3D electron microscopy; DEER, double electron-electron resonance; EPR, electron paramagnetic resonance; FRET, Foerster resonance energy transfer; HDex, hydrogen/deuterium exchange; NMR, nuclear magnetic resonance; SAS, small-angle scattering; XL-MS, cross-linking mass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

In silico analýza proteinových komplexů

Ozer et al, CO in SB, 2015



Visualizace proteinových komplexů



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

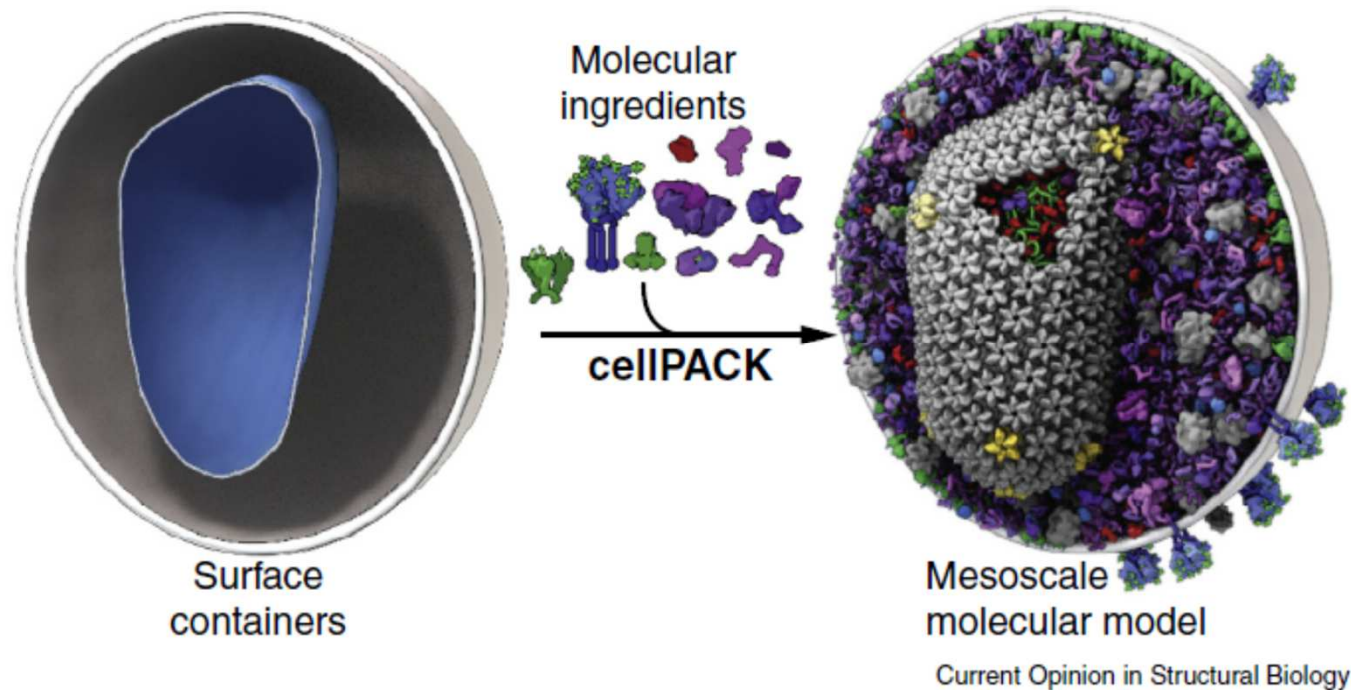
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur

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

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

Johnson et al., Nat Meth, 2015

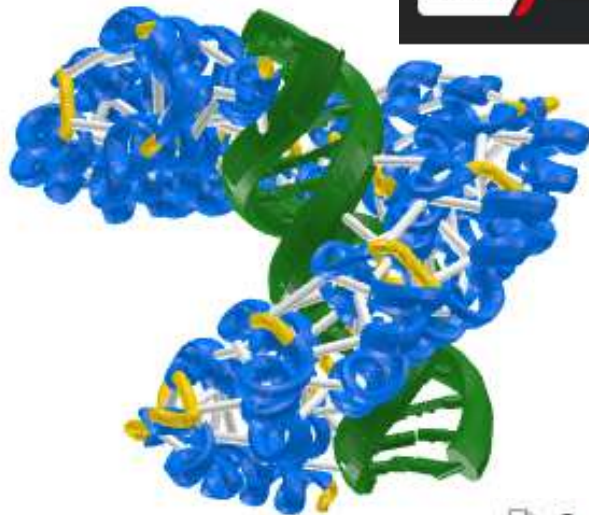
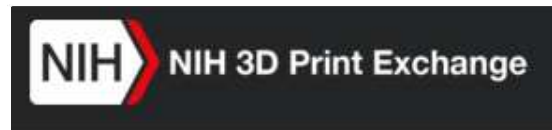
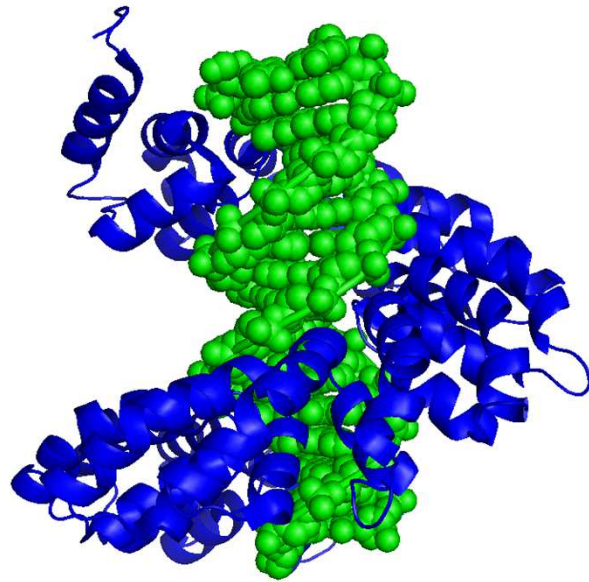
Visualizace proteinových komplexů




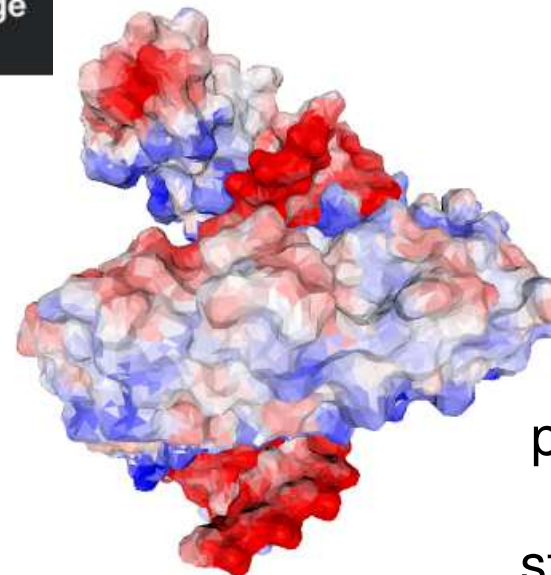
Pro lepší představu (virové částice) se integrují ... (nakopírované) struktury, data z molekulární dynamiky (simulací), koordináty pohybu „objektu“ ve světelném mikroskopu ... animovat i buněčný kontext – namíchat v „reálných“ poměrech do „organel“ a na „membrány“ – CellPack ...

Lze použít k testování modelů ...

Visualizace proteinových komplexů



 3dprint.nih.gov/

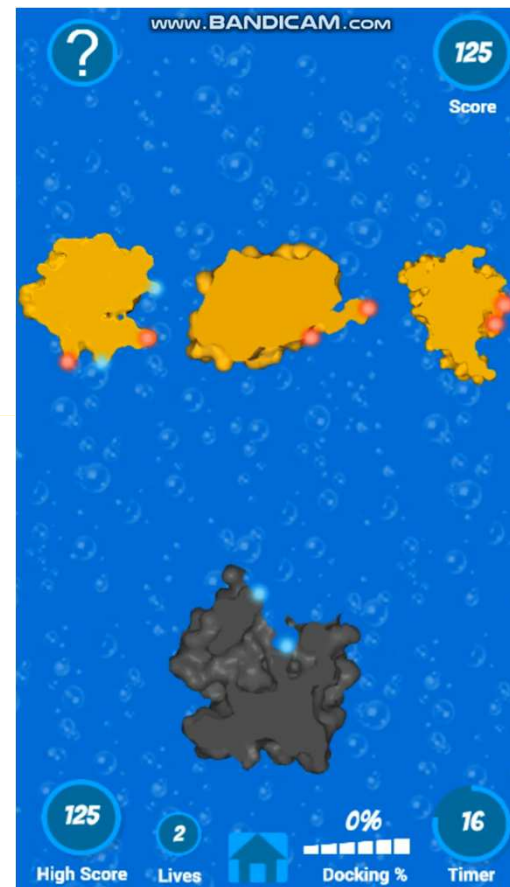


Existuje mnoho nástrojů na vizualizaci komplexů

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.

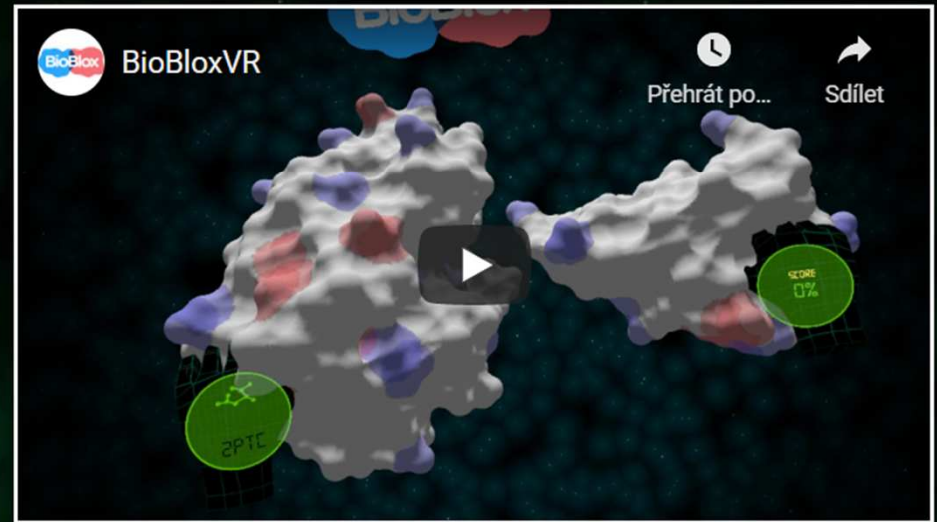


<https://www.doc.gold.ac.uk/bioblox/>

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>