

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)

obecně

největší proteinové komplexy = chromosomy (cytoskelet ...)

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

GENOM

závěrečná

Program přednášek 2024

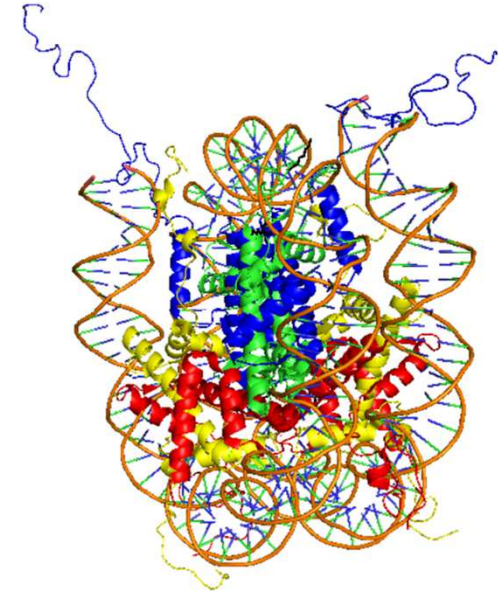
- Pohled na vybrané procesy probírané v biochemii a molekulární biologii z hlediska proteomiky a především z hlediska proteinových komplexů
- výběr komplexů majících vztah k tématům studovaným v laboratořích „chromatinových molekulárních komplexů“, NCBR a dalších skupin z MU

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

22.02.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Úvod, metody analýzy proteinových komplexů
29.02.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Úvod, PPI, skládání komplexů
07.03.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Muller	Chaperony
14.03.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Kolesár	Ubiquitinace, ligasy (cullin, APC), proteasom
21.03.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce I, vazebné motivy
28.03.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	DNA-proteinové interakce II, transkripční komplexy
04.04.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Štefanovie	Replikace DNA
11.04.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	Dr. Šebesta	Oprava DNA, homologní rekombinace
18.04.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Chromatinové komplexy
25.04.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	doc. Paleček	Evoluce proteinových komplexů
02.05.2024	10-11.30 hod	C2-2.11	Mgr. Jemelková	Přehled nástrojů pro bioinformatickou analýzu komplexů
09.05.2024	9-12.00 hod	C2-2.11	doc. Paleček	zkouška (test + prezentace)?

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 ...

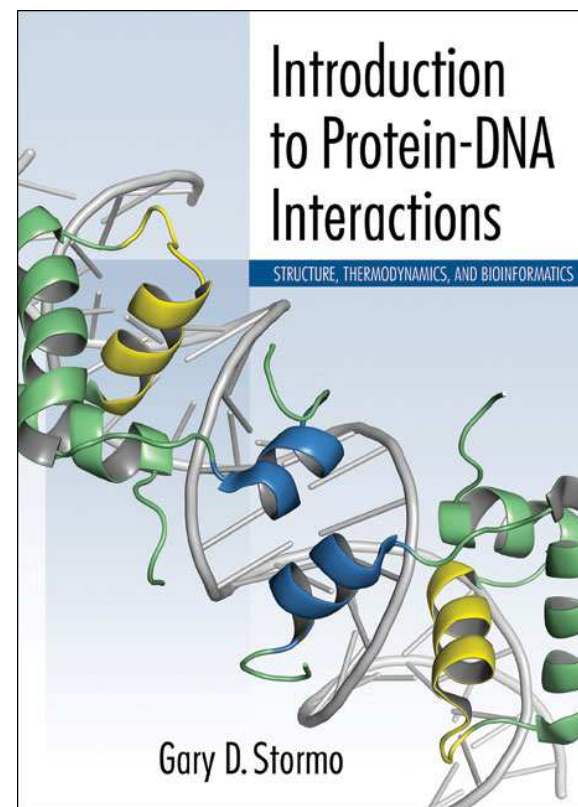
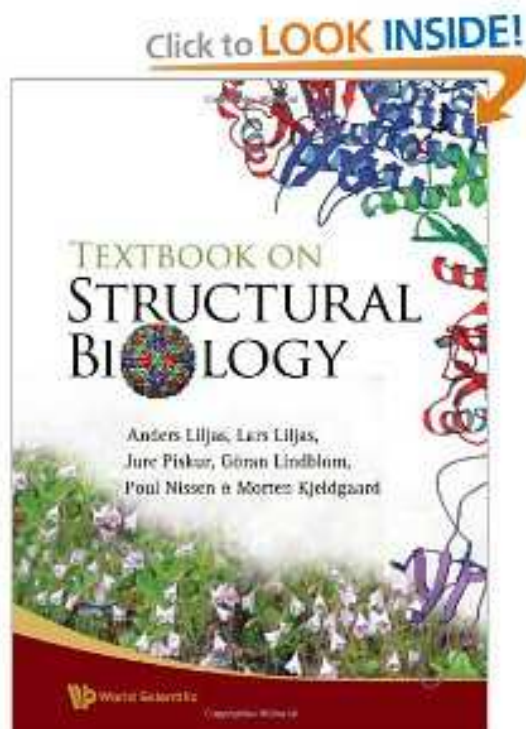
9.05.2024 od 9.00 hod C2-2.11 zkouška (test + prezentace)

Informační zdroje

Alberts a spol: Molecular biology of the cell

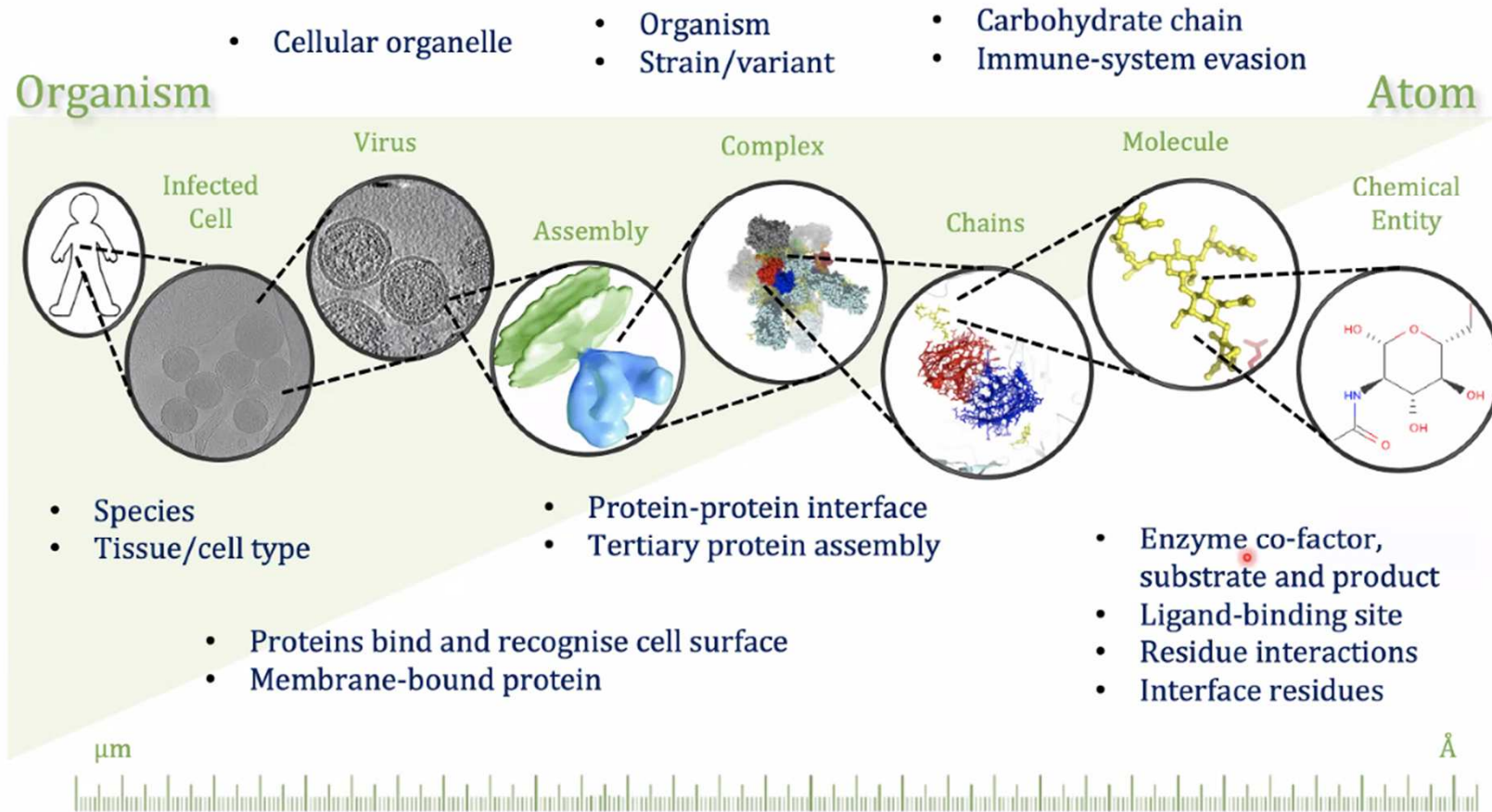
Liljas a spol: Structural biology (2009) ...

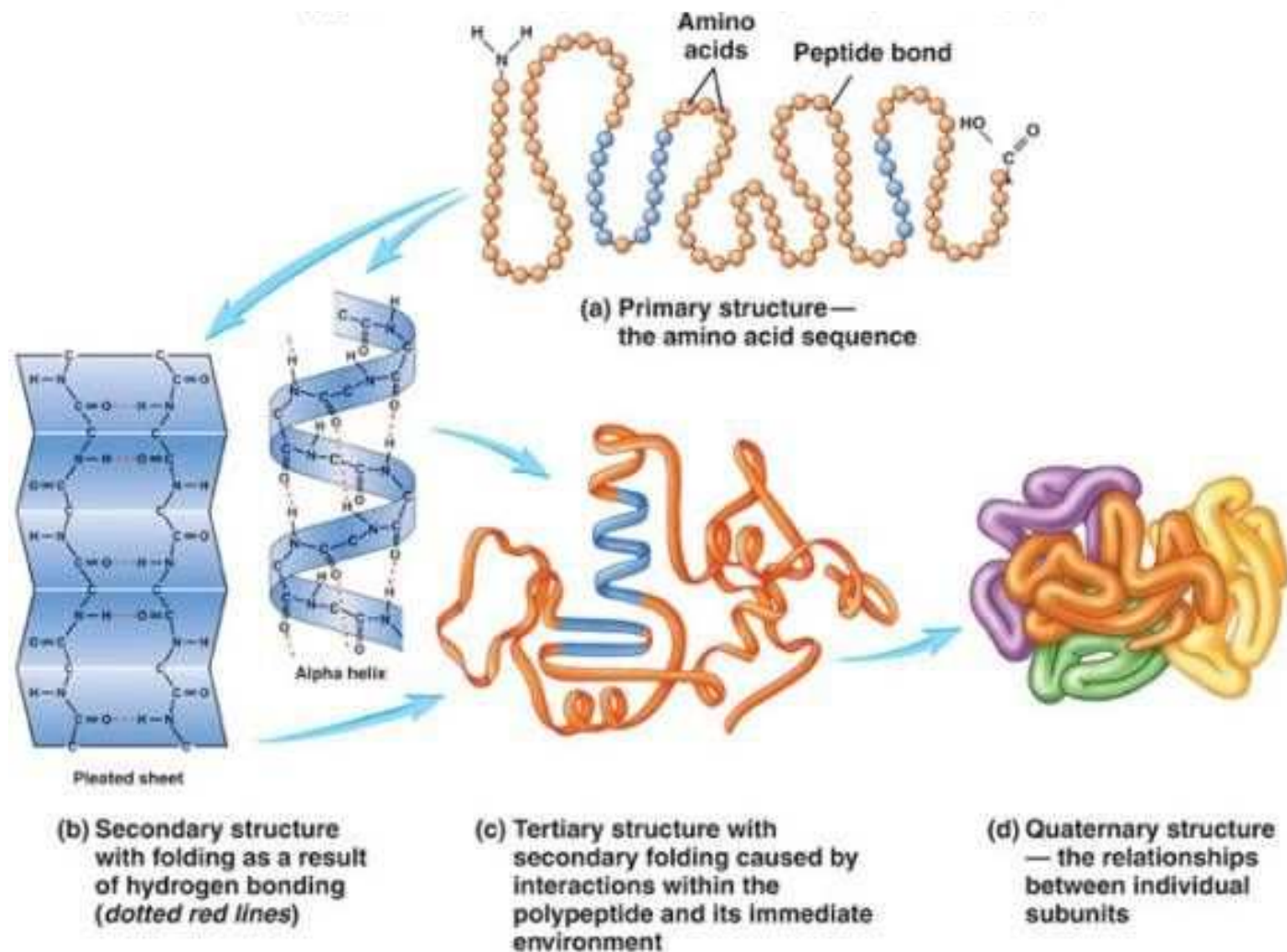
... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science ...



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

Komplexy ...





Primární

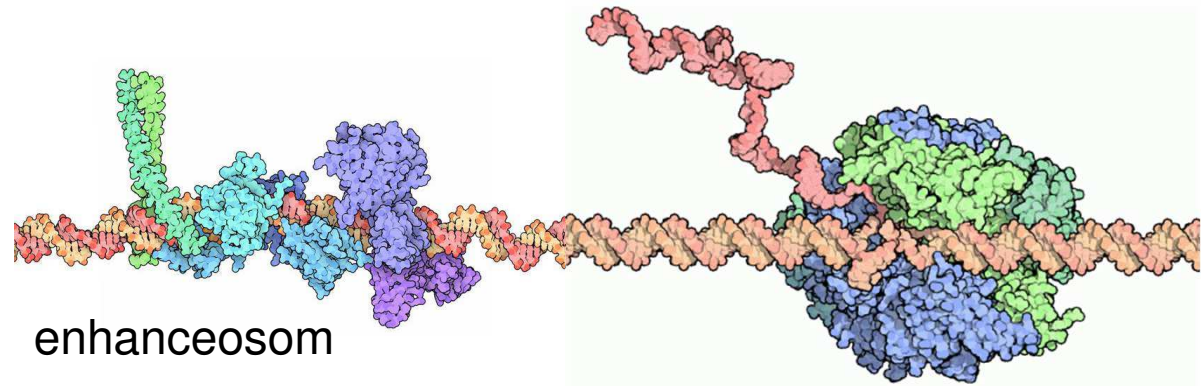
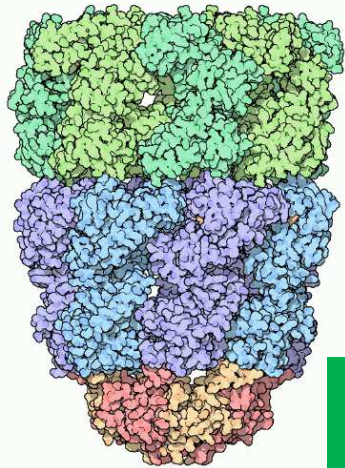
Sekundární

Terciární

Kvarterní – dva proteiny a více ... proteinové komplexy

Příklady komplexů o kterých uslyšíte v tomto kurzu

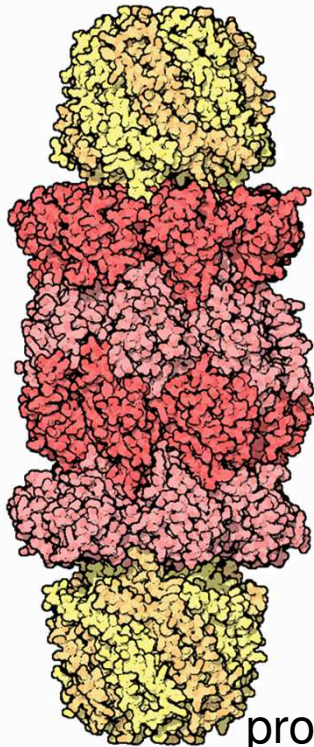
chaperon



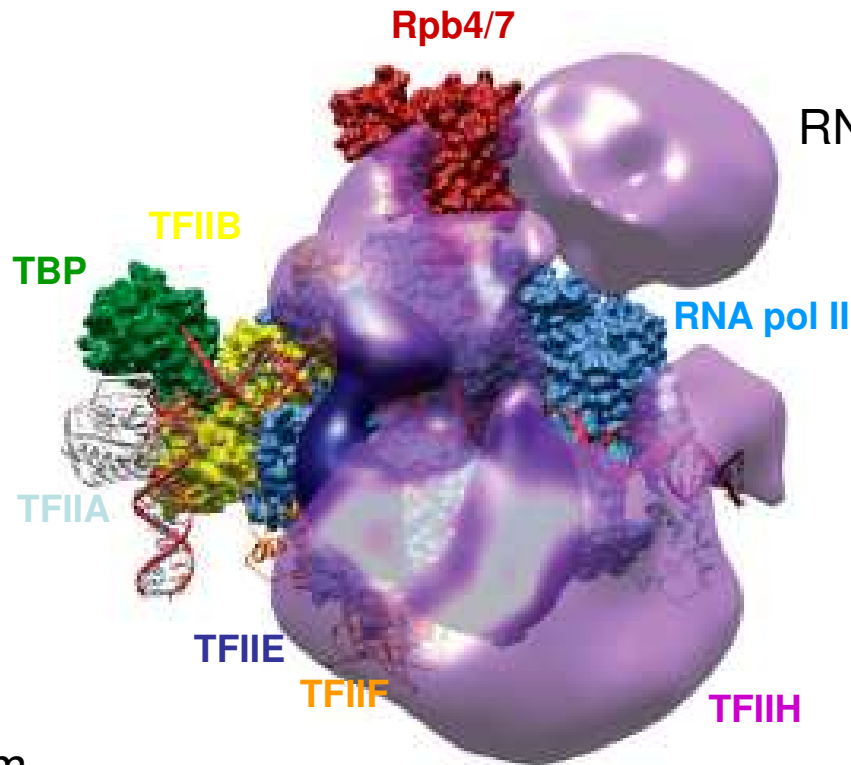
enhanceosom

RNA polymeráza

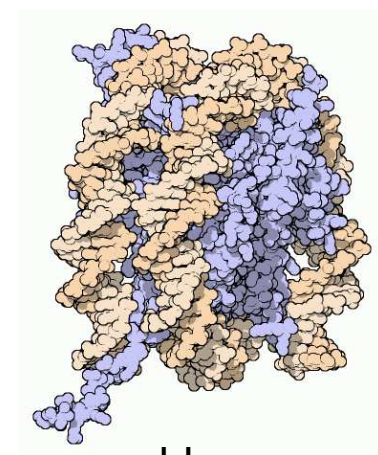
obecně



proteasom



RNA polymeráza + TFII...



nukleosom

genom

„Molekuly měsíce“ (PDB 101)

Primárním zdrojem strukturních informací = PDB

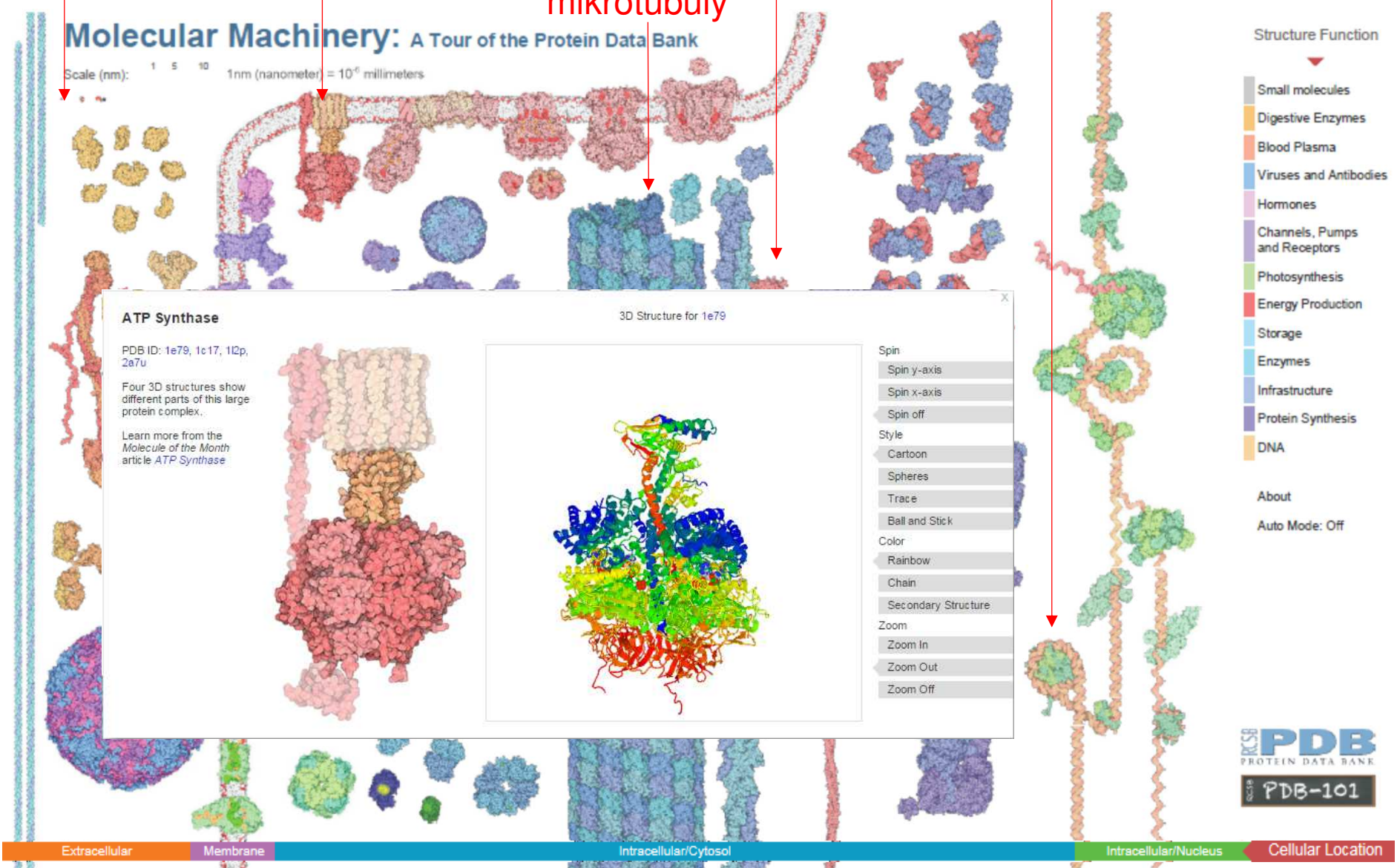
voda, ATP

ATP pumpa

mikrotubuly

aktin-myosin

chromatin



Interaktivní web PDB-101 - relativní velikost komplexů

7SDE

Cryo-EM structure of Nse5/6 heterodimer

Display Files Download Files

zdroje strukturních informací

assembly = komplex

Scientific Name	Unique Assemblies
<i>Homo sapiens</i>	16,645
<i>Escherichia coli</i>	3,721
<i>Mus musculus</i>	2,940
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,778
<i>Thermus thermophilus</i>	1,154
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,086
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1,050
<i>Arabidopsis thaliana</i>	995
<i>Mus norvegicus</i>	989
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	900

Appasamy et al, Sci Data, 2023

Experimental Method	Unique Assemblies
X-ray diffraction	77,984
Electron microscopy	9,369
Nuclear magnetic resonance	7,902

- Genetické, mikroskopické ...
- Separační metody
- Detekční (MS) přístupy
- Strukturní analýzy

<http://www.rcsb.org>
<https://www.ebi.ac.uk/complexportal>

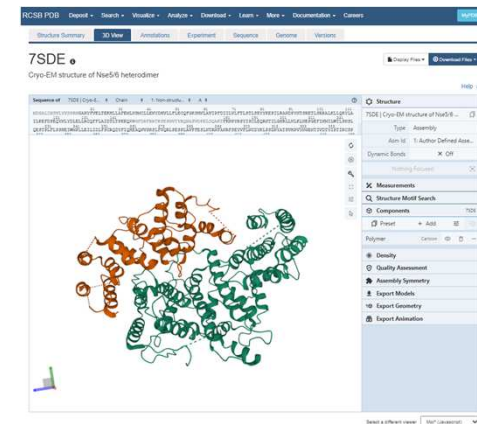
Nejčastější postup charakterizace proteinových komplexů

1. - **identifikace podjednotek komplexu** (partnerů tzn. PPI, izolace komplexu)
2. - **charakterizace komplexu**
 - **vzájemné PPI podjednotek** - architektura/struktura komplexu
 - **funkce podjednotek** (genetická analýza, lokalizace v buňce ...)
3. - **rekonstrukce a analýza aktivit celého komplexu *in vitro***

top-down ... bottom-up

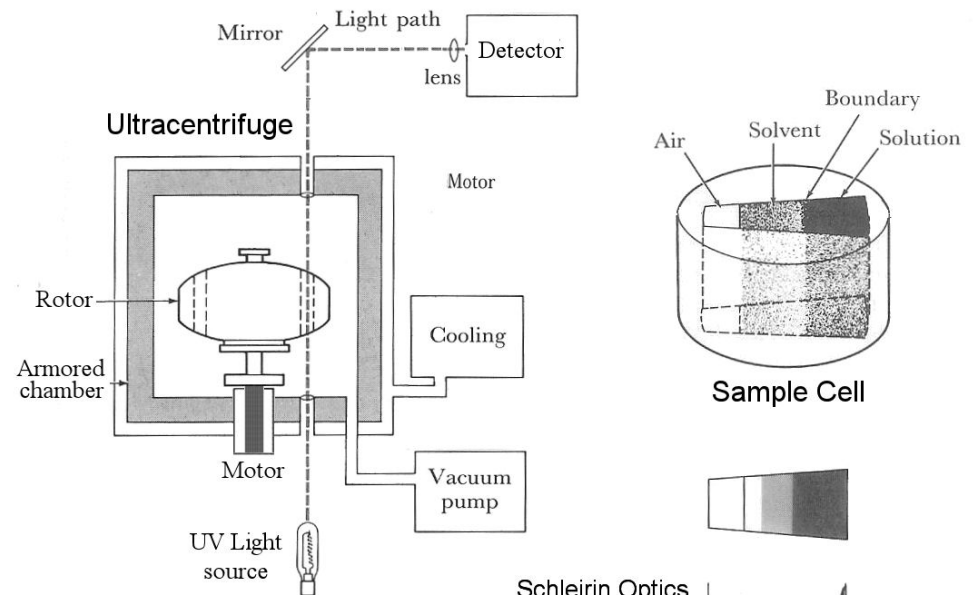
Prolínají se analytické a izolační:

- ultracentrifugace, gelová filtrace ...
 - TAP-tag (a jiné tagy) purifikace a MS analýza
 - ko-immunoprecipitace, pull-down, ko-purifikace ...
 - crosslink MS, X-ray, (cryo) elektronová mikroskopie ...
- (Prolínají se metody pro komplexy a PPI - viz *MePro* – **8.4.2024**)
- ... modelování, vizualizační metody

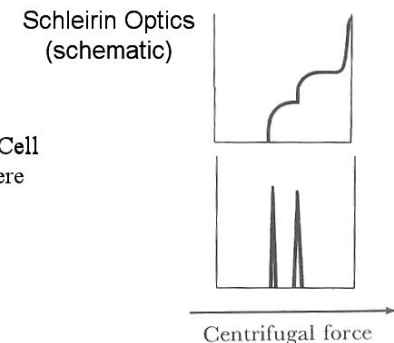
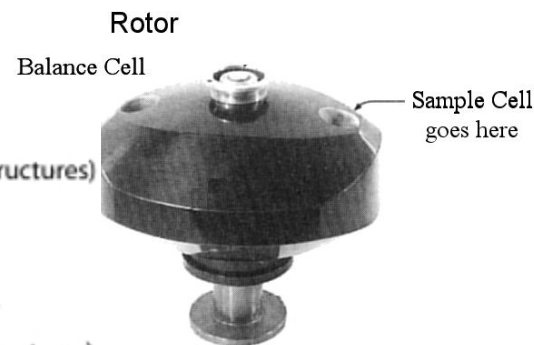
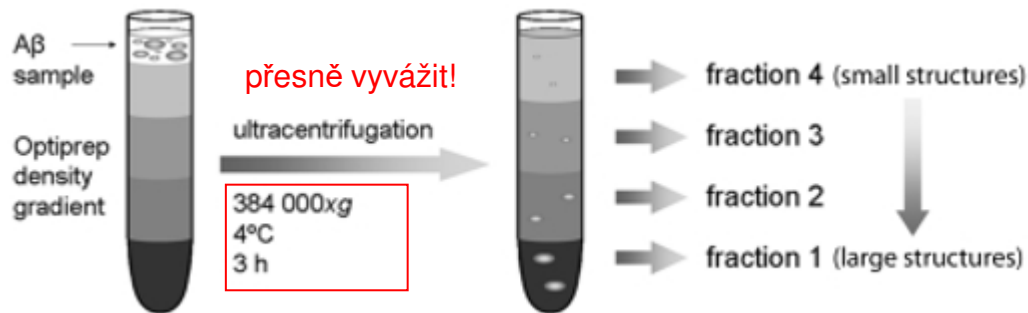


Metody analýzy a izolace PKxů

Ultracentrifugace – analytická (preparativní – malé objemy)



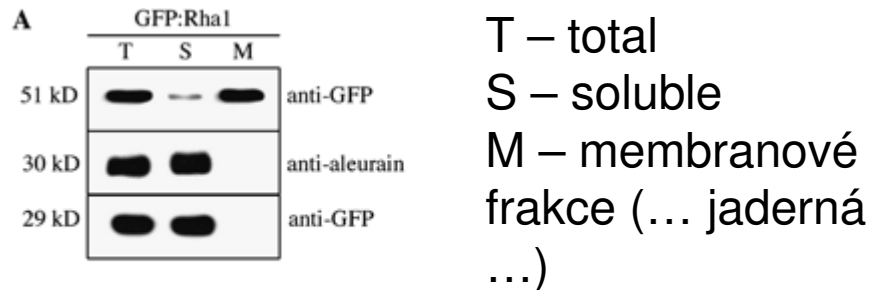
Cukerný/hustotní gradient



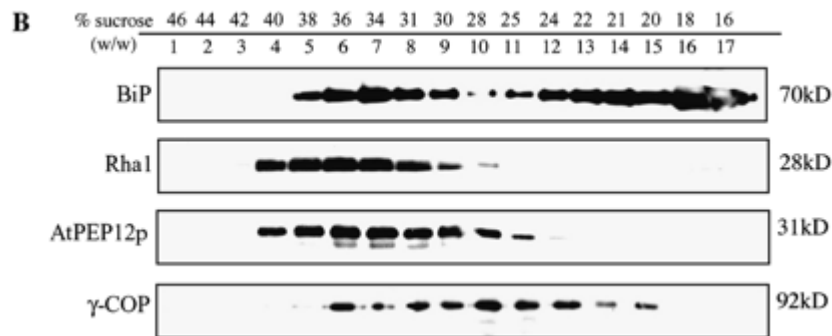
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

Metody analýzy a izolace komplexů

Ultracentrifugace – separační/izolační

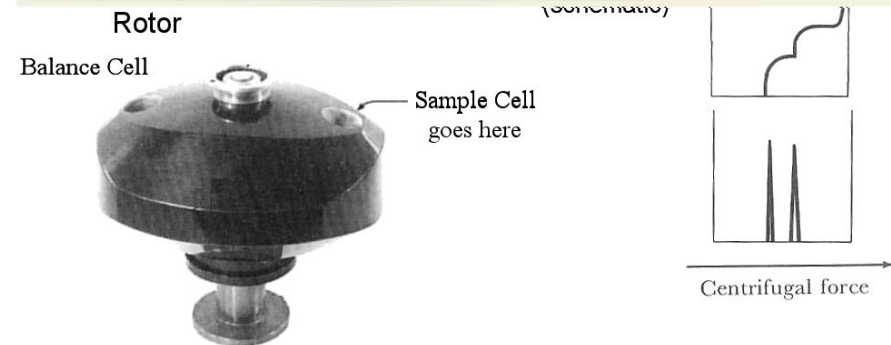
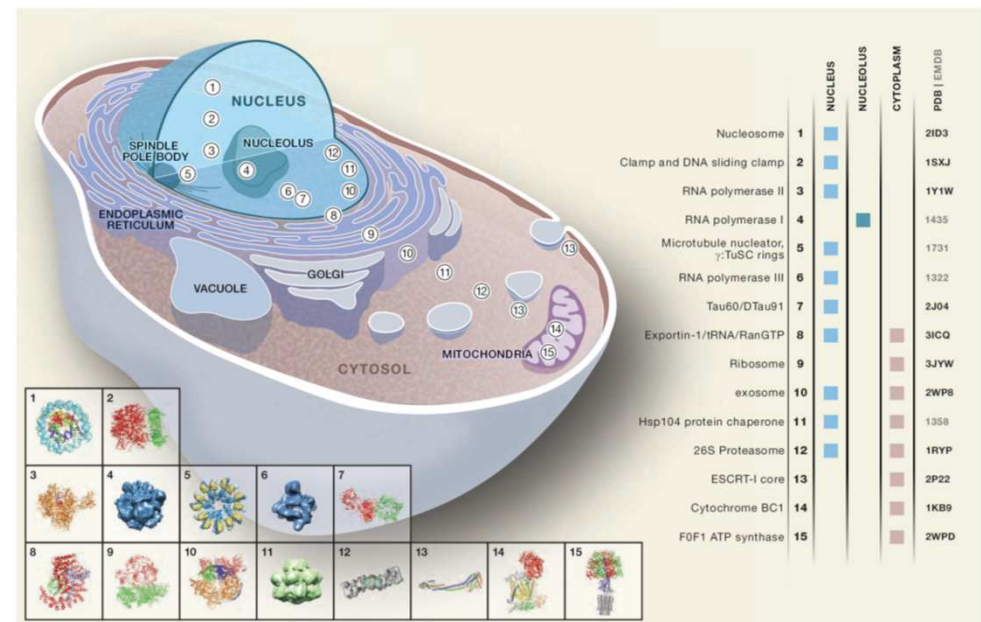


Jaké další metody by se daly použít?



Lee et al, Plant Cell Phys, 2004

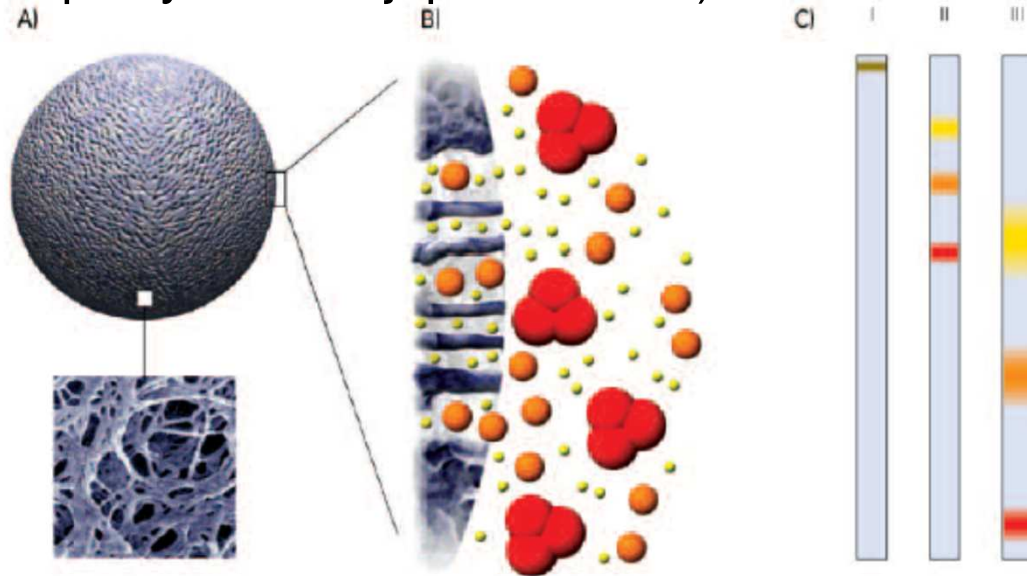
- A. Hrubší pouze rozdělí na kompartmenty/organely - lokalizace
- B. Jemný - cukerný gradient - izolace



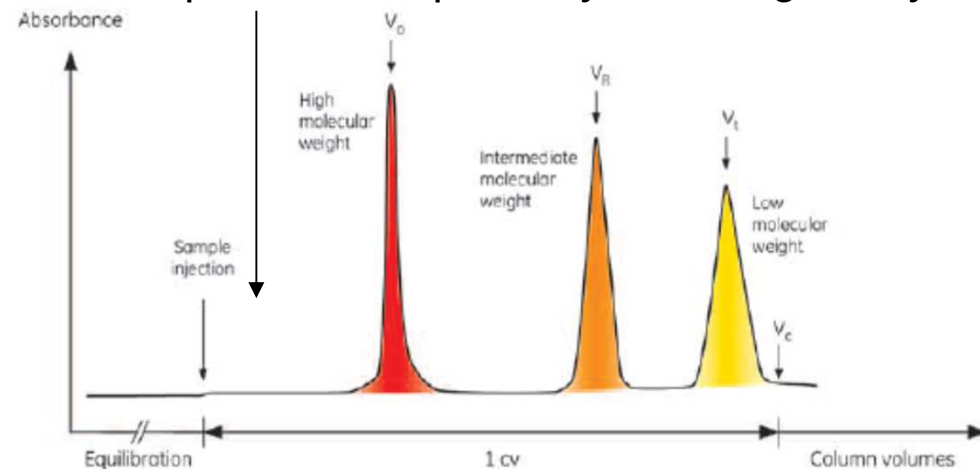
Čím hustší je roztok tím více „brzdí“ částice => těžší („hustější“) částice projdou dál

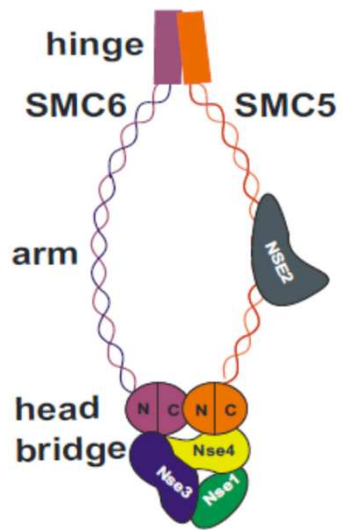
Metody analýzy a izolace komplexů

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

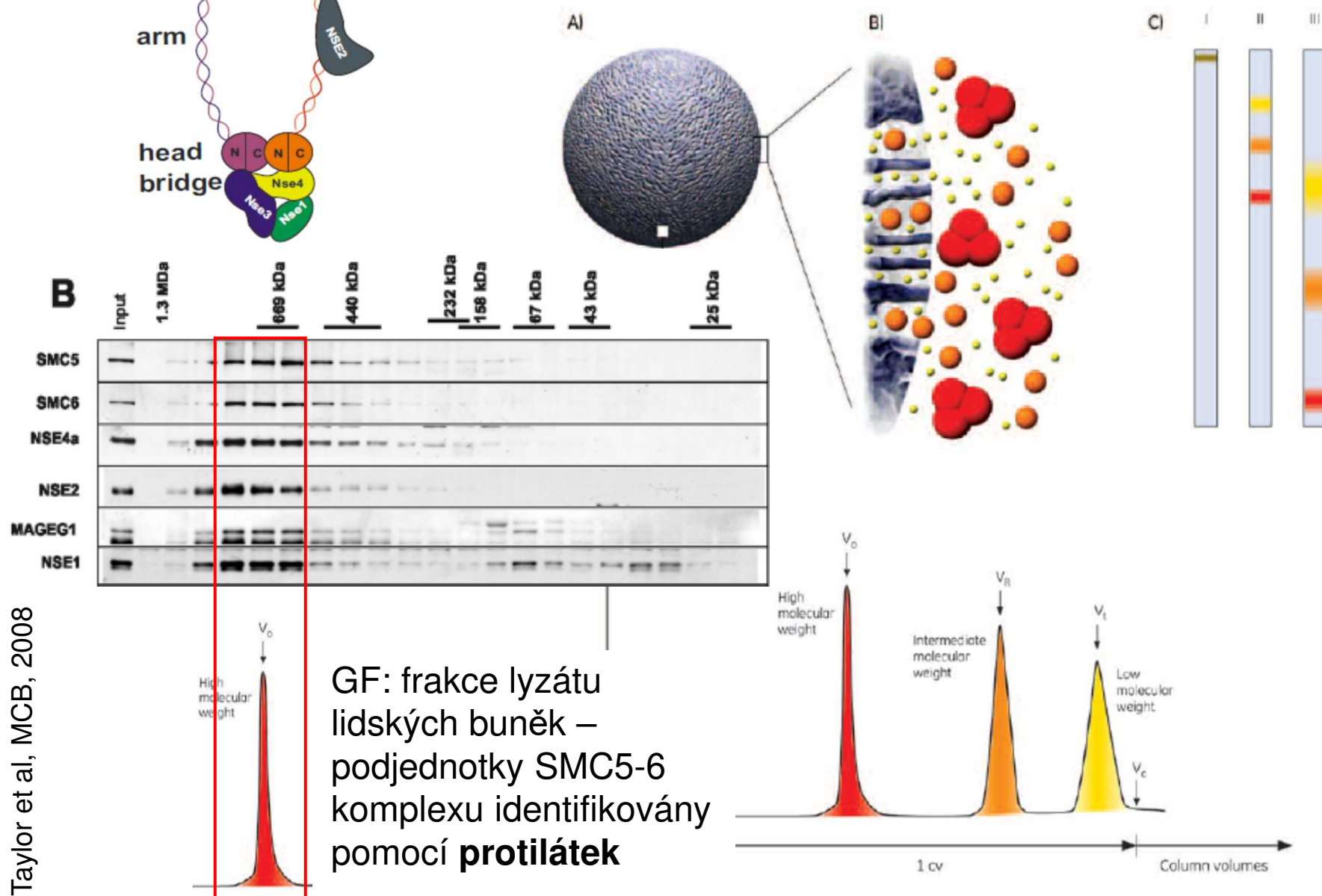


D) Lze poznat zda proteiny tvoří oligomery, agregáty





Velikost komplexu (buněčný lyzát, purifikovaný komplex)
aniž byste znali všechny podjednotky



Metody izolace

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



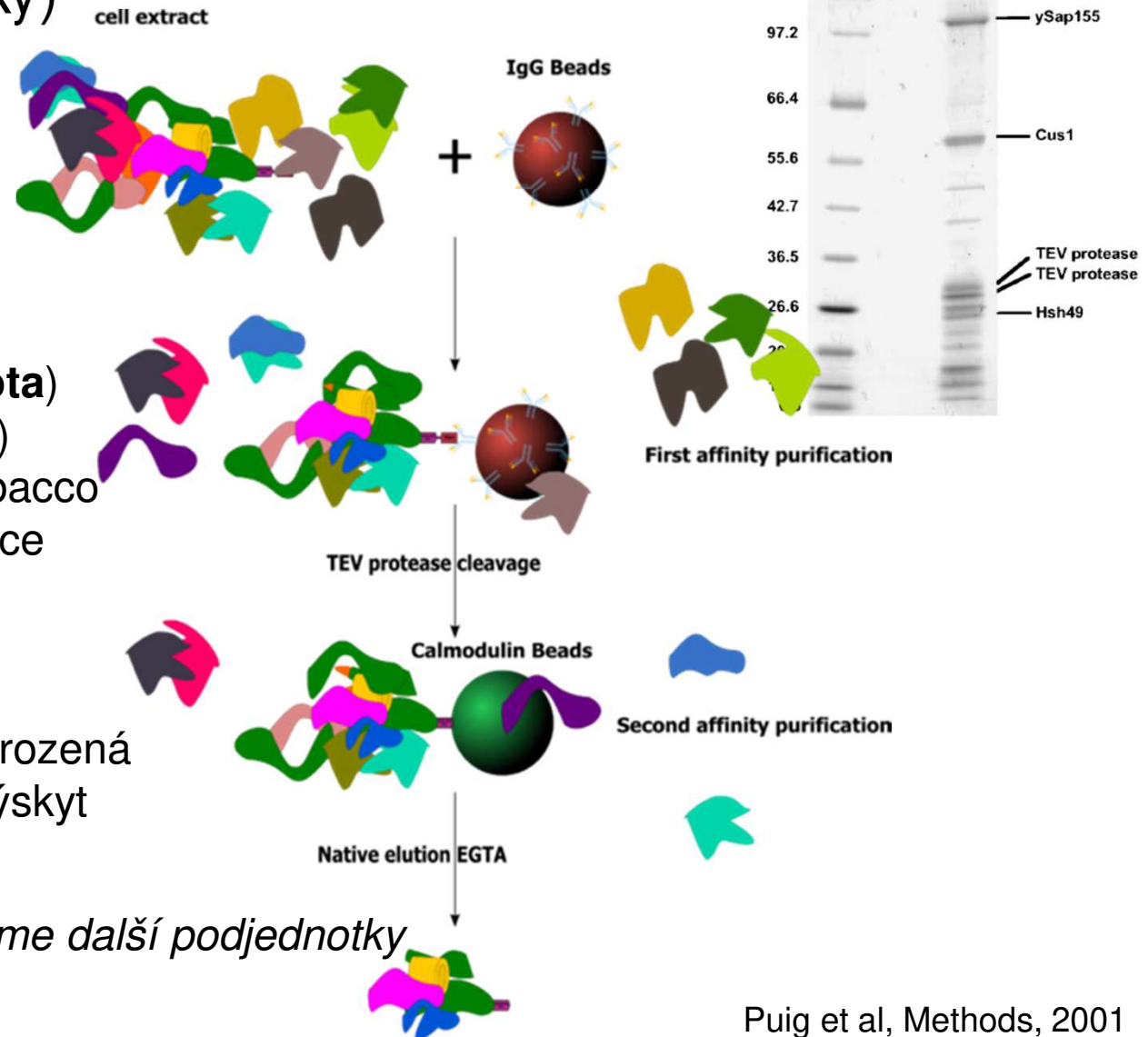
I jiné kombinace (HBH – His-biotin-His)

Tandem-affinity purification (vícestupňové – vyšší čistota)

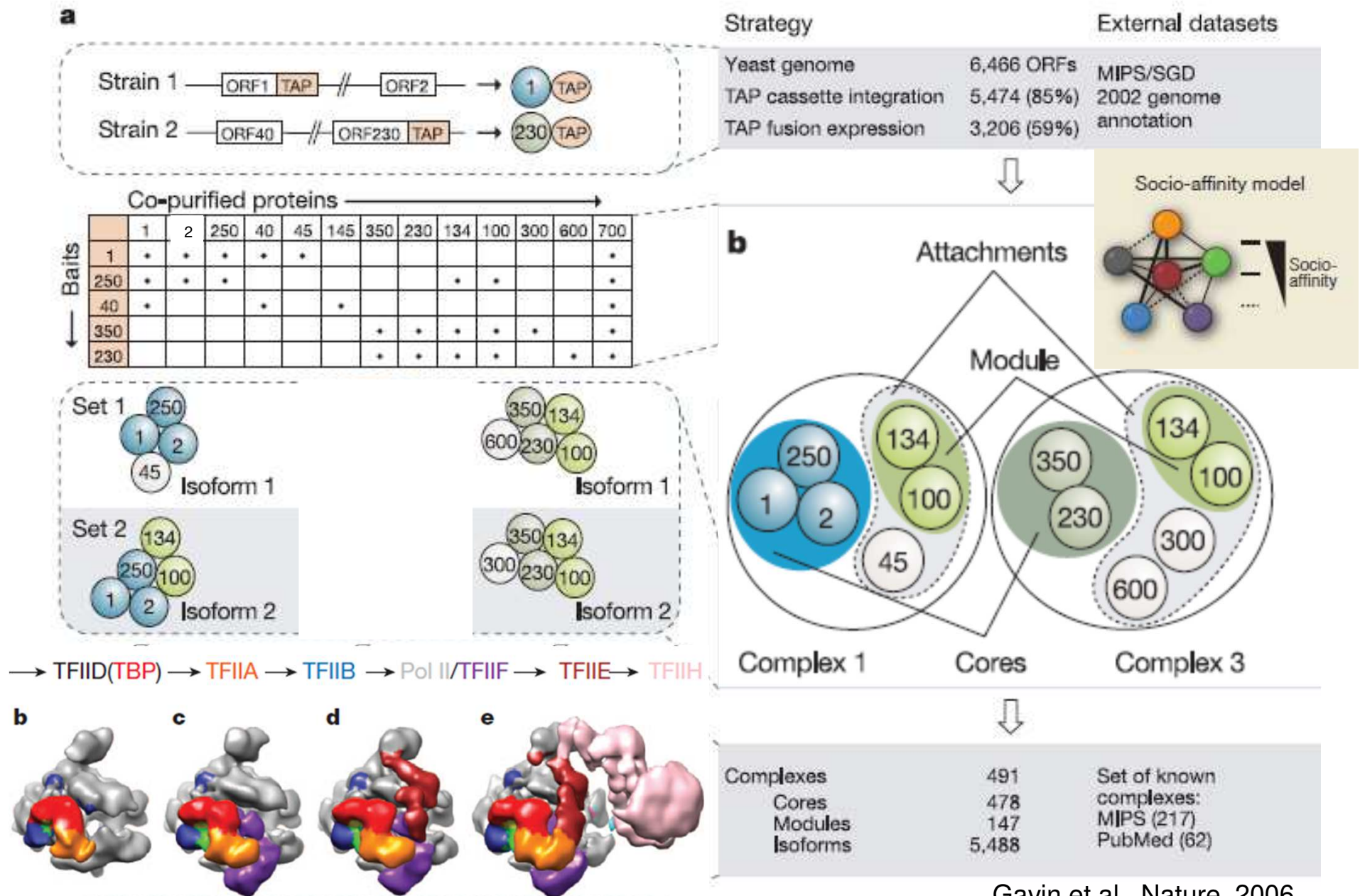
1. Protein A (váže IgG beads)
2. TEV-proteasové místo (tobacco etch virus) – uvolnění z matrice
3. calmodulin-binding (CBP) – eluce EDTA

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

známe jeden protein – hledáme další podjednotky



Izolace komplexů z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



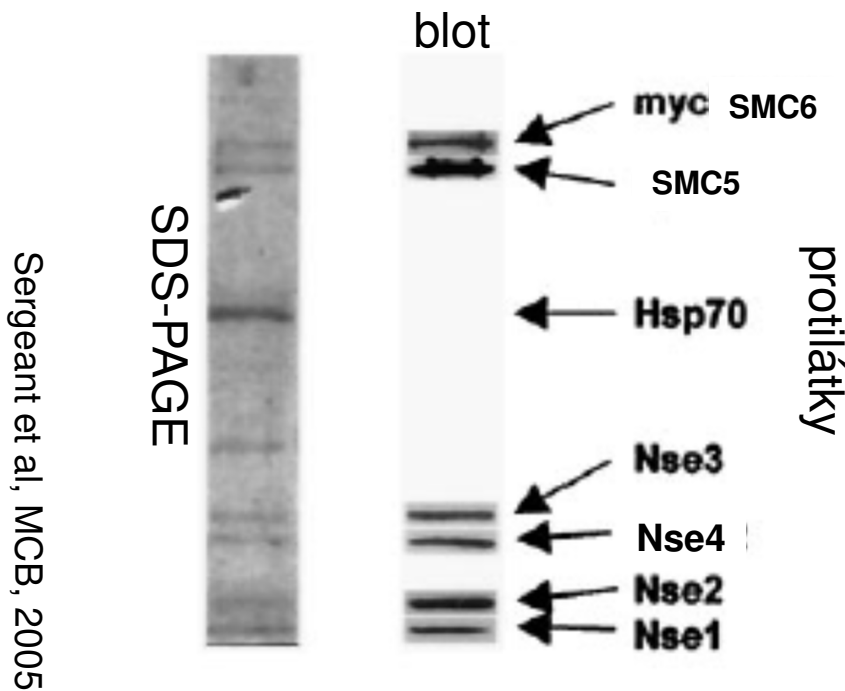
Ko-imunoprecipitace

Jednoduché tagy/značky:

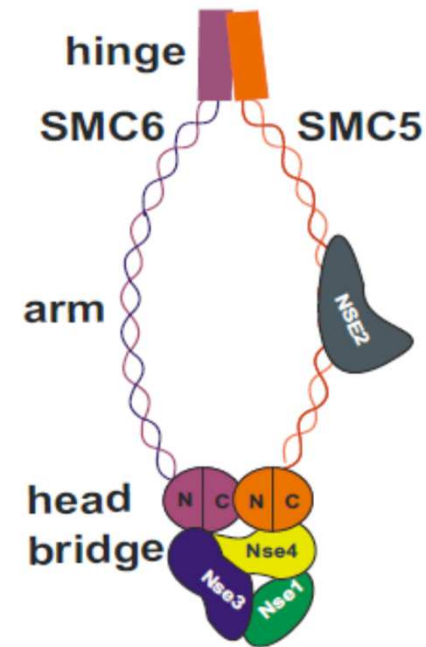
Myc, FLAG, V5, S-tag, GFP (vazba přes proteiny/protilátky)

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

Kompetiční eluce (peptidy nebo ligandy)



Sergeant et al, MCB, 2005

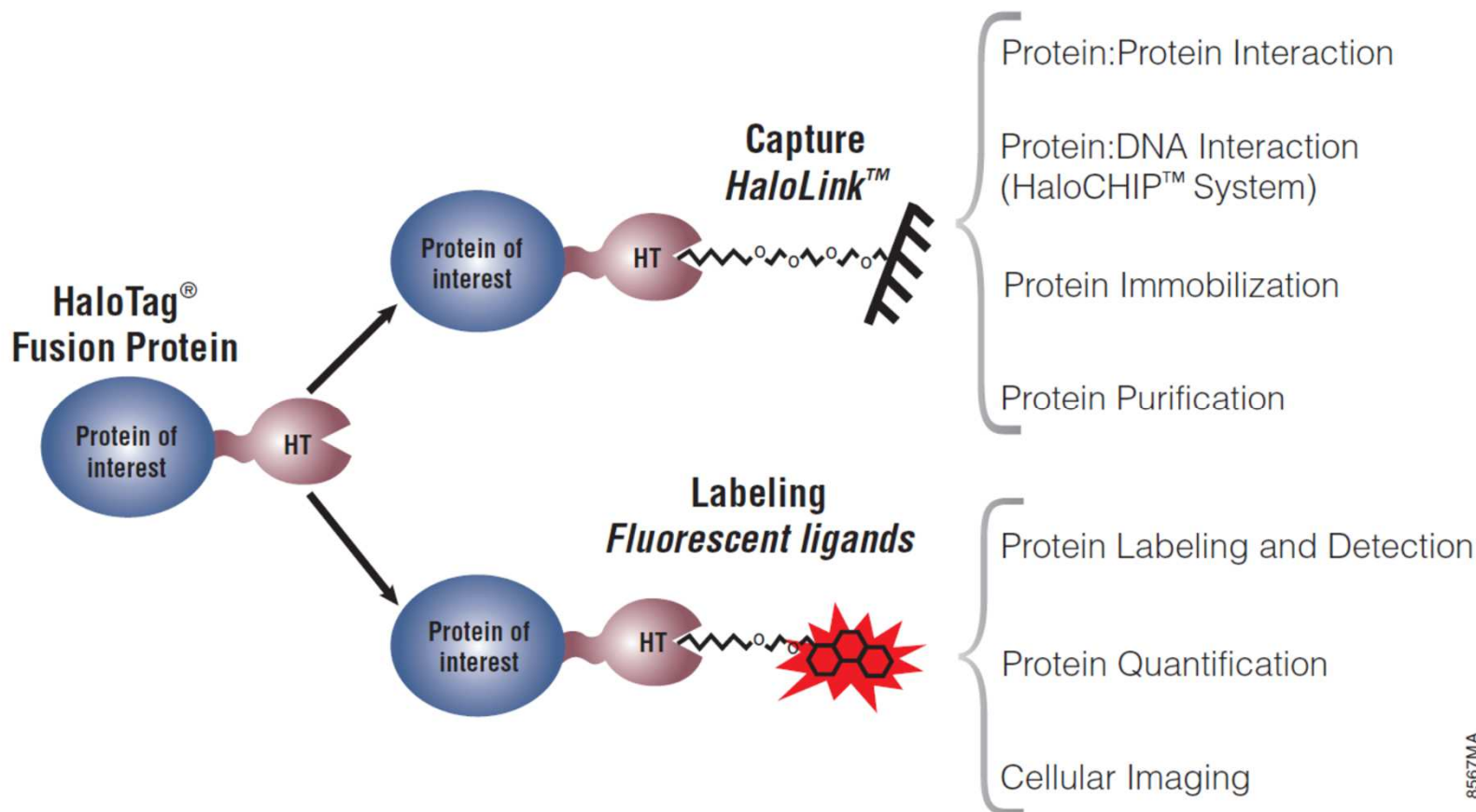


Pozor na kontaminace
(např. chaperony)

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)

HaloTag



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

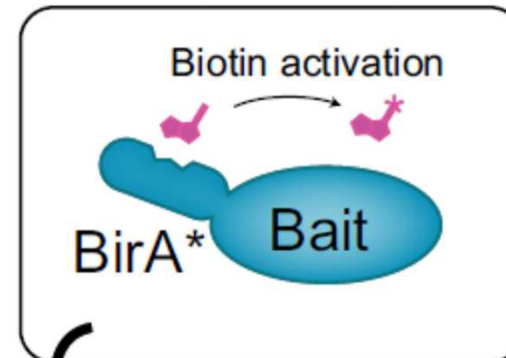
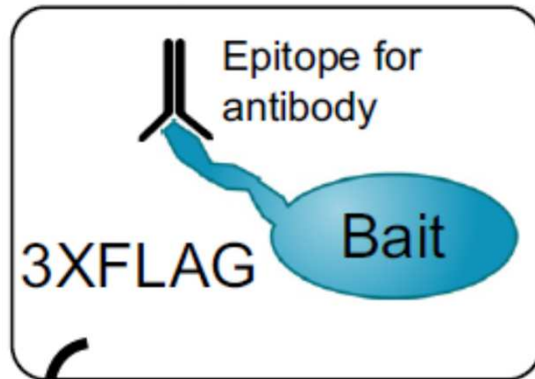
alternativní

Affinity Purification

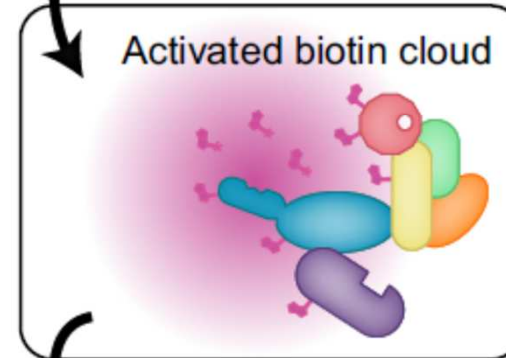
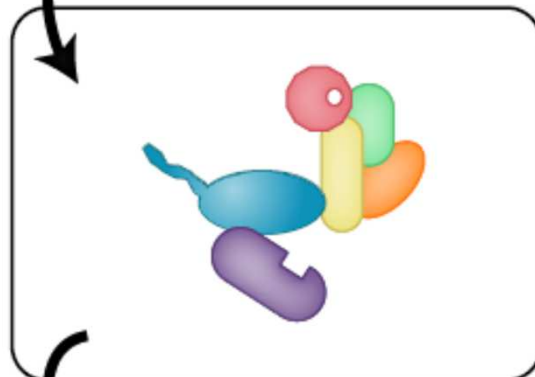
BioID

(Proximity Biotinylation)

Tagging system

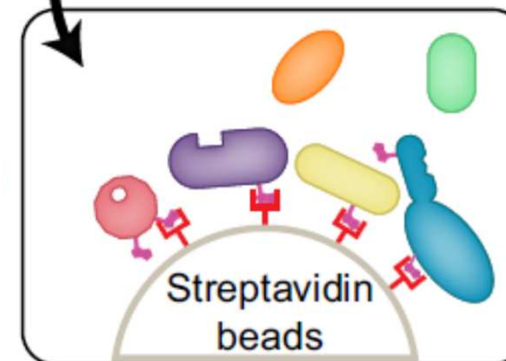
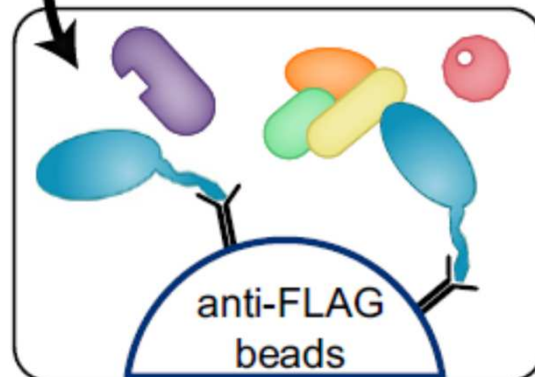


in vivo function



Biotinylace na vzdálenost <20nm

Purified interaction partners



MS identifikace biotinylovaných proteinů

Metoda BioID

Express BioID-fusion protein



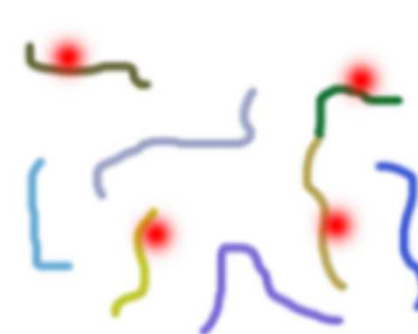
BirA biotin ligáza (fusovaná k proteinu)

Add biotin to cells

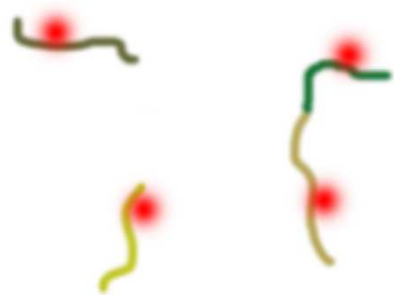


Lyse cells

Denature proteins



Biotin affinity purification



Biotinylované proteiny jsou purifikovány pomocí streptavidinu

Mass spectrometry to identify candidates

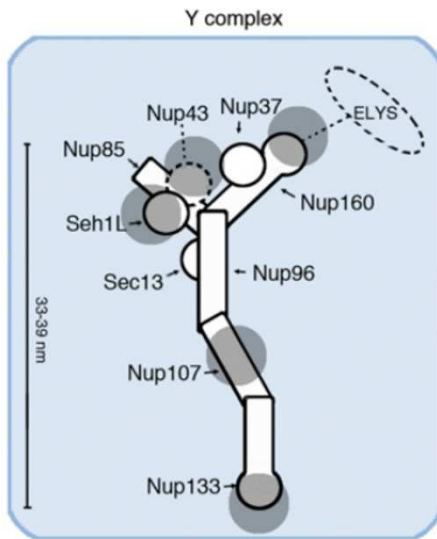
Citlivá metoda
(kovalentní značka zůstává i po oddálení interakčního partnera – slabé/transientní interakce (více než komplex – „**sousedící**“ proteiny do 20nm))

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

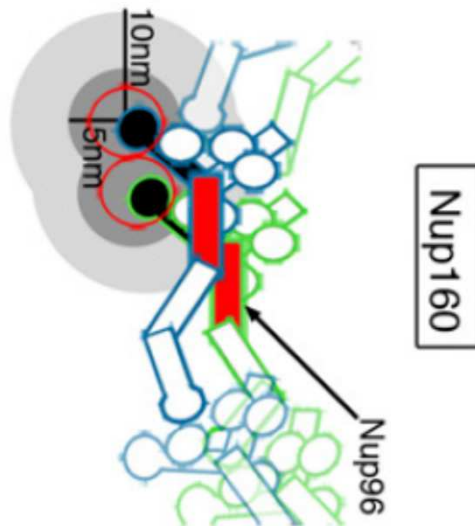
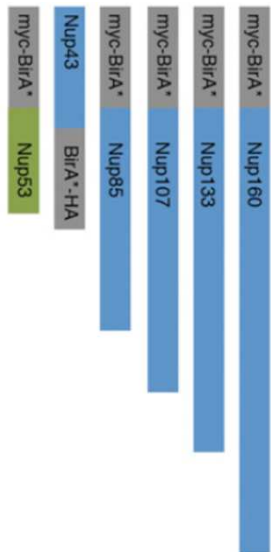
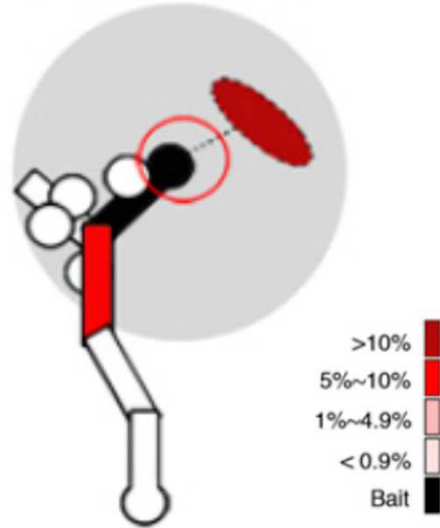
Např. chromatin-asociované komplexy jsou hůř rozpustné – izolace za **denaturačních** podmínek

Metoda BioID – organizace komplexů

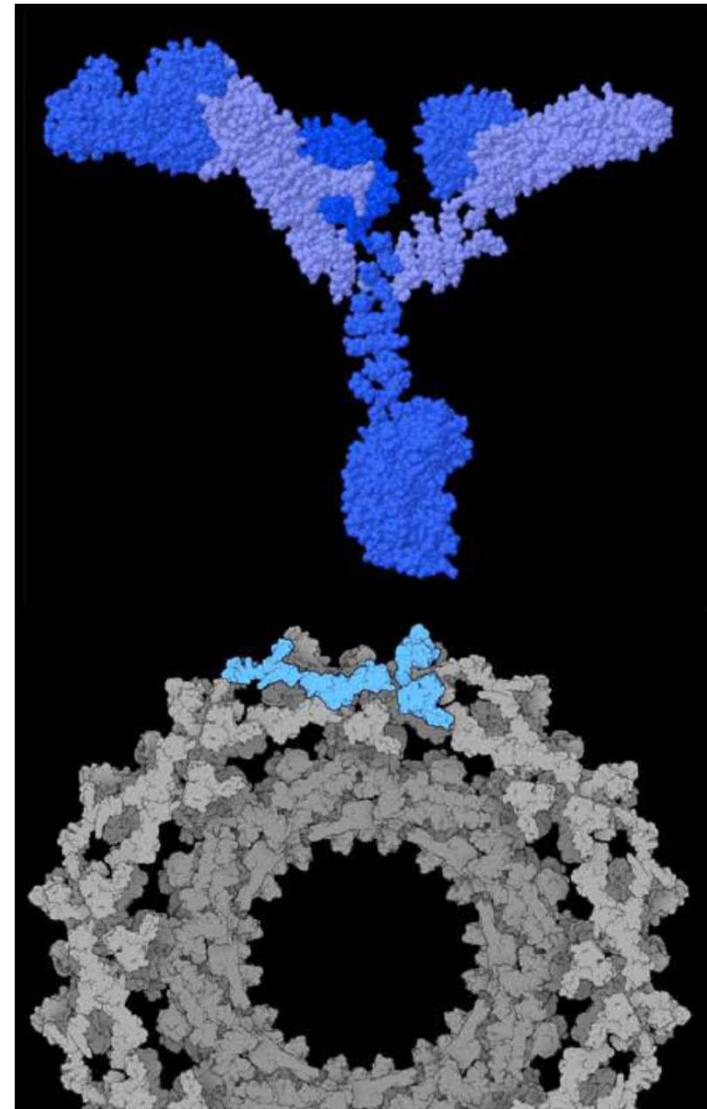
Dosah biotinylace je 10-20nm – lze využít k mapování „blízkých“ proteinových sousedů ve velkých komplexech



Nup160

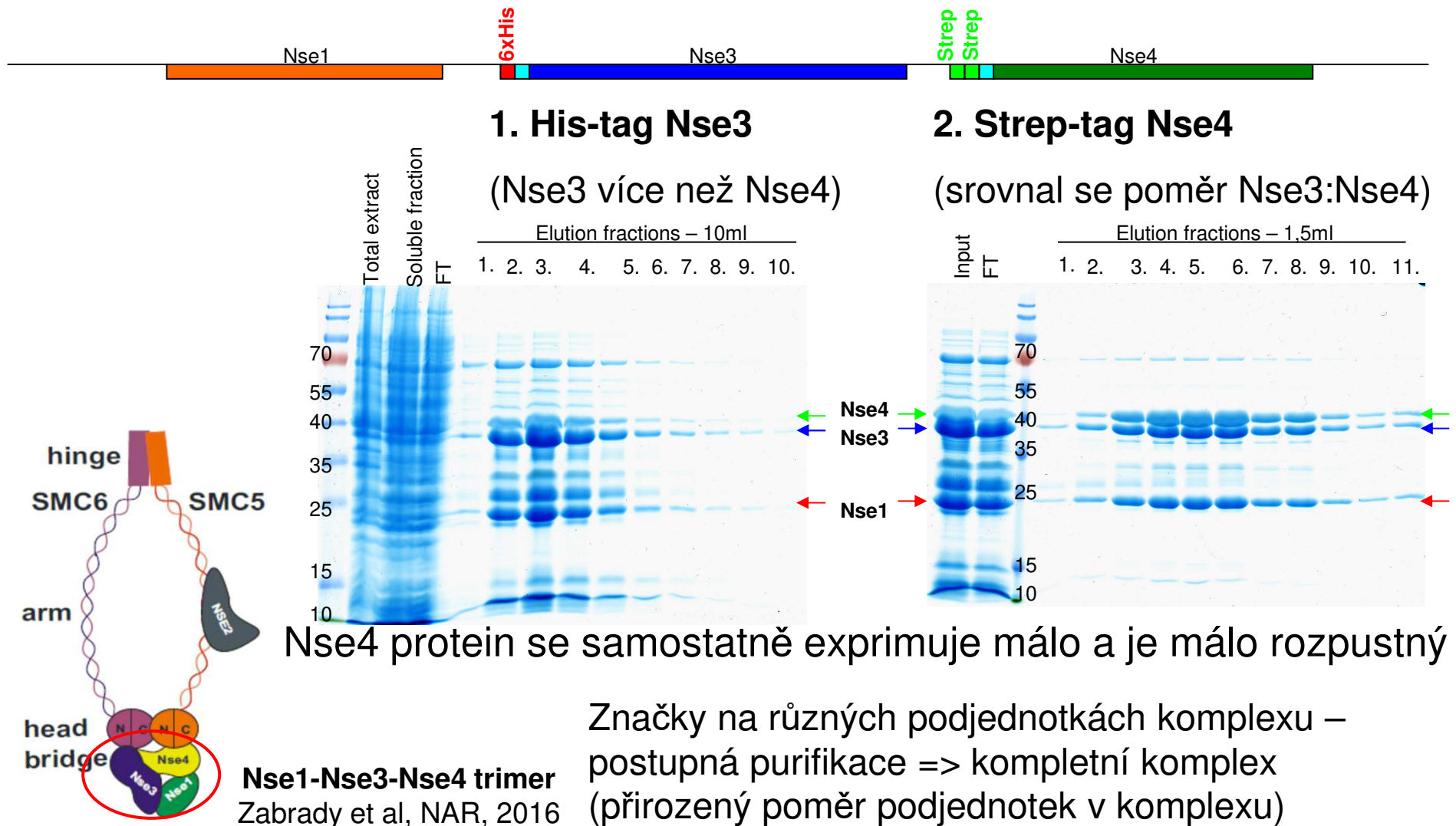


Nup160

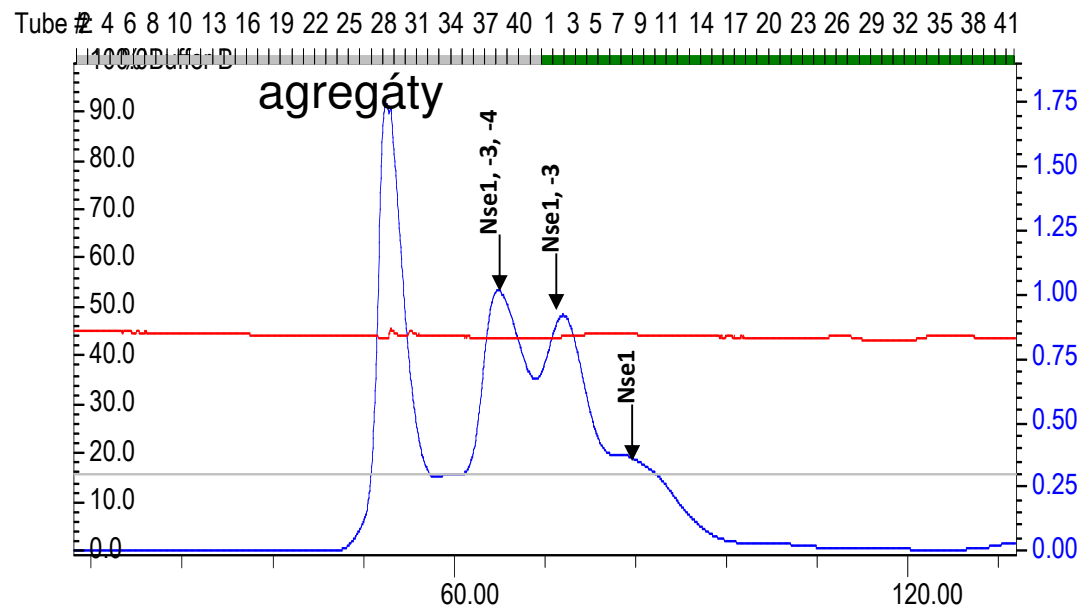
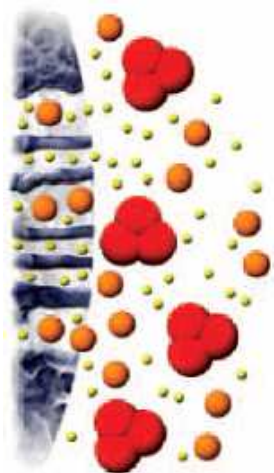


Ko-purifikace - ověření

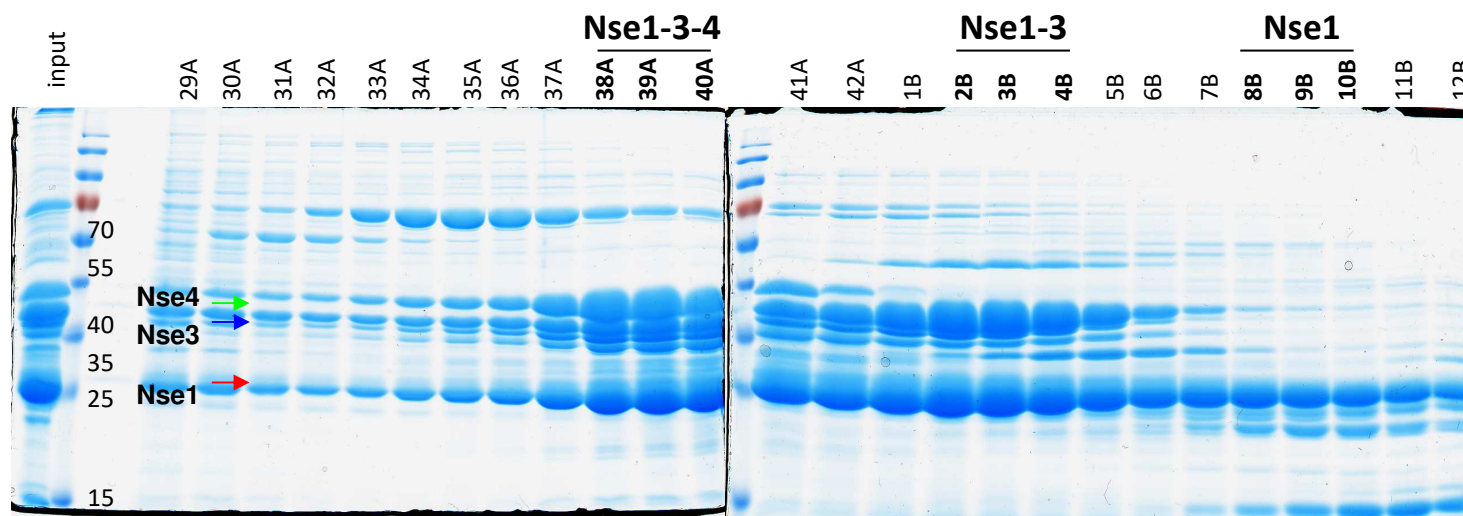
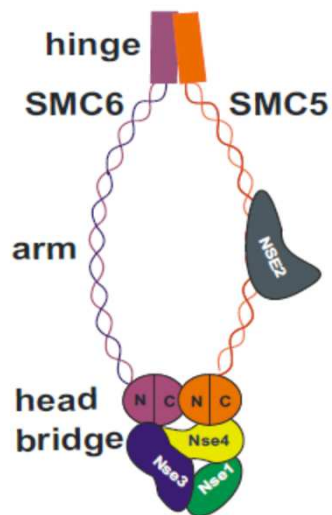
Silné interakce/komplexy – proteiny lze **ko-exprimovat** (může pomoci s jejich rozpustností) a následně **ko-purifikovat**



Ko-purifikace

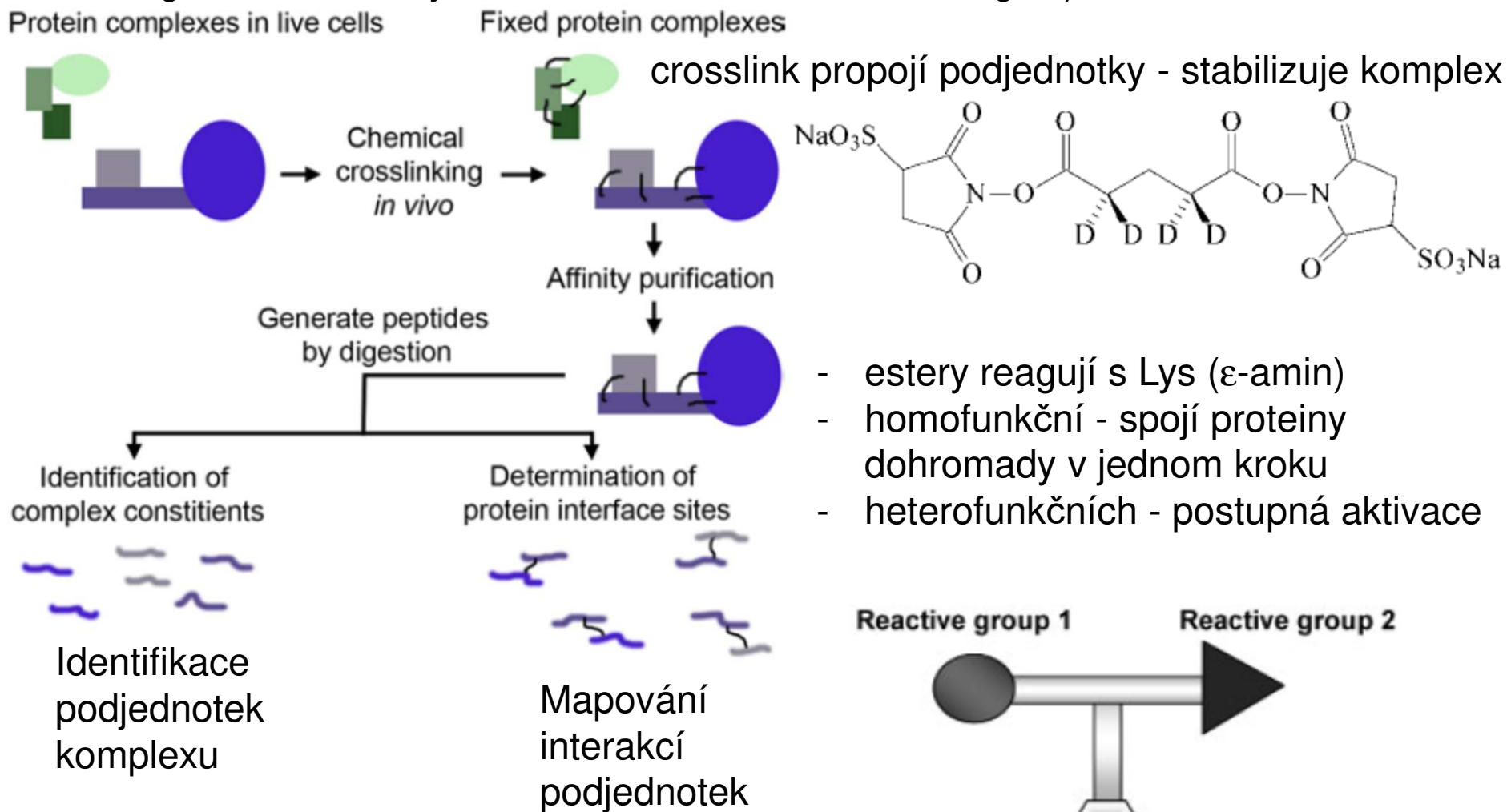


3. Gelová filtrace – lze ještě dočistit subpopulace komplexů

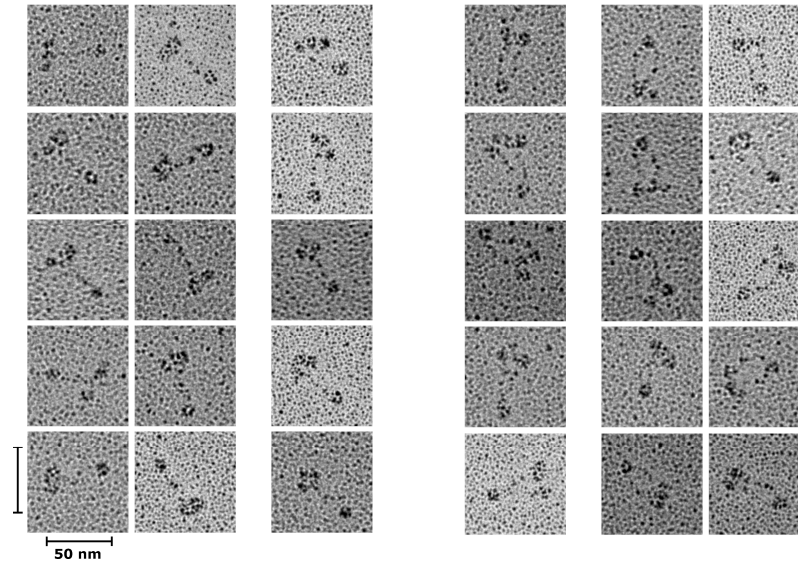


Detailní mapování komplexů - crosslinking

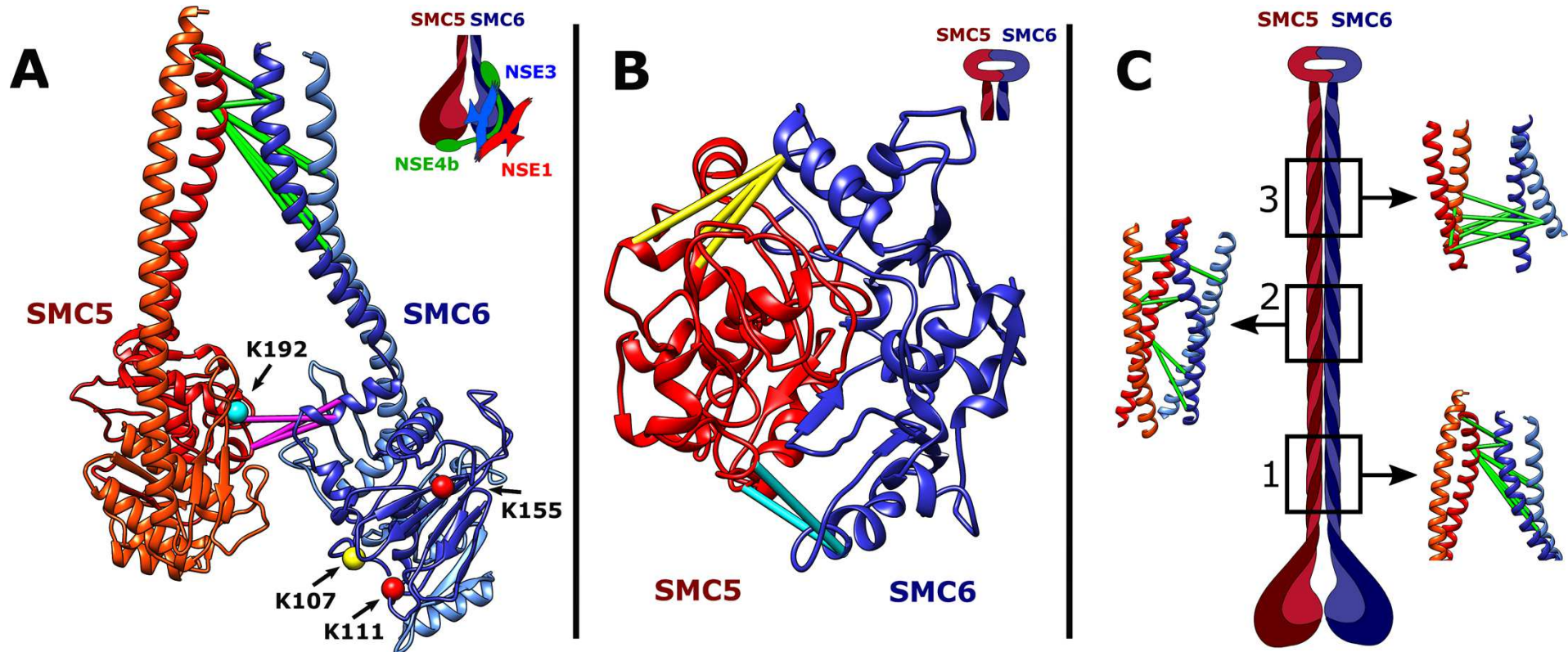
XL na purifikovaných komplexech nebo v buňce a poté purifikace za denaturačních podmínek (tag-ligand interakce musí být odolná vůči denaturačnímu činidlu – např. 6xHis-tag váže Ni-kuličky i v 8M močovíně nebo HALO-tag ...)

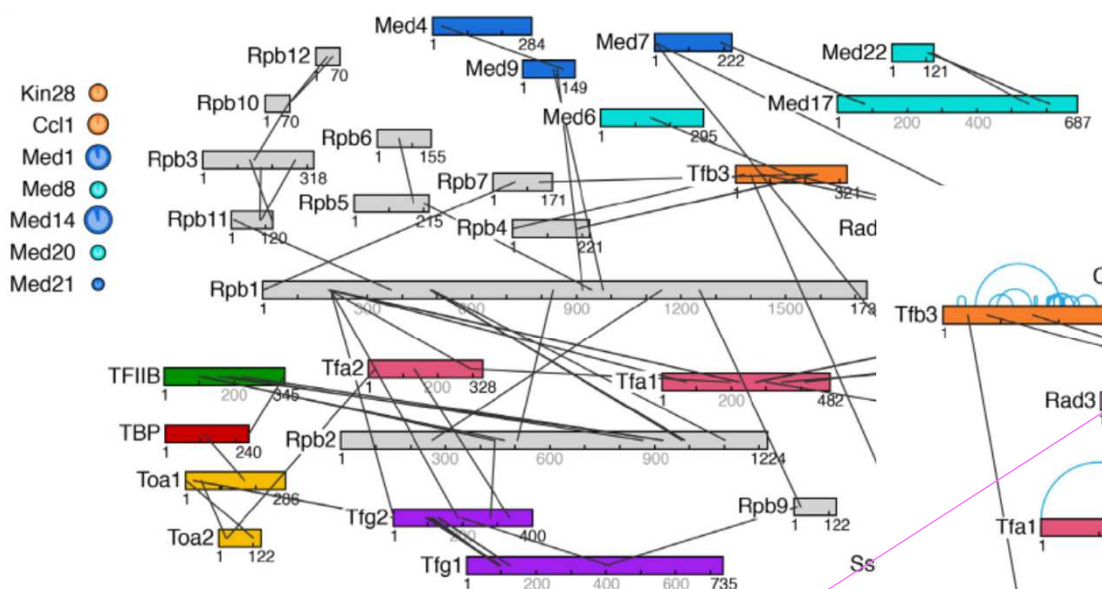


- krosslink vypurifikovaných částí komplexu SMC5/6
- 3 hotspots silně prokrosslinkované – ramena proteinů SMC5-SMC6 jsou vedle sebe (nikoli kroužek)

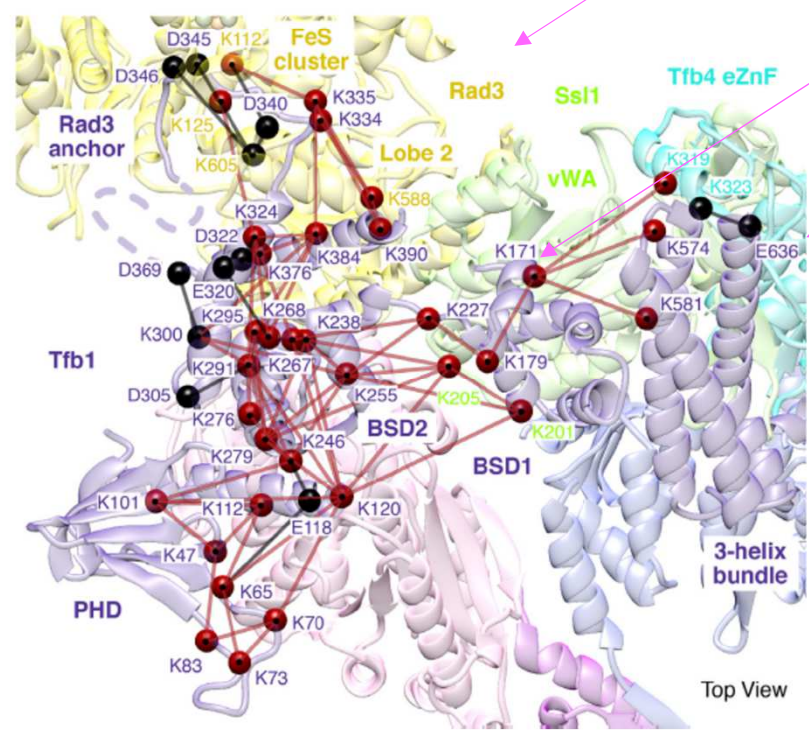
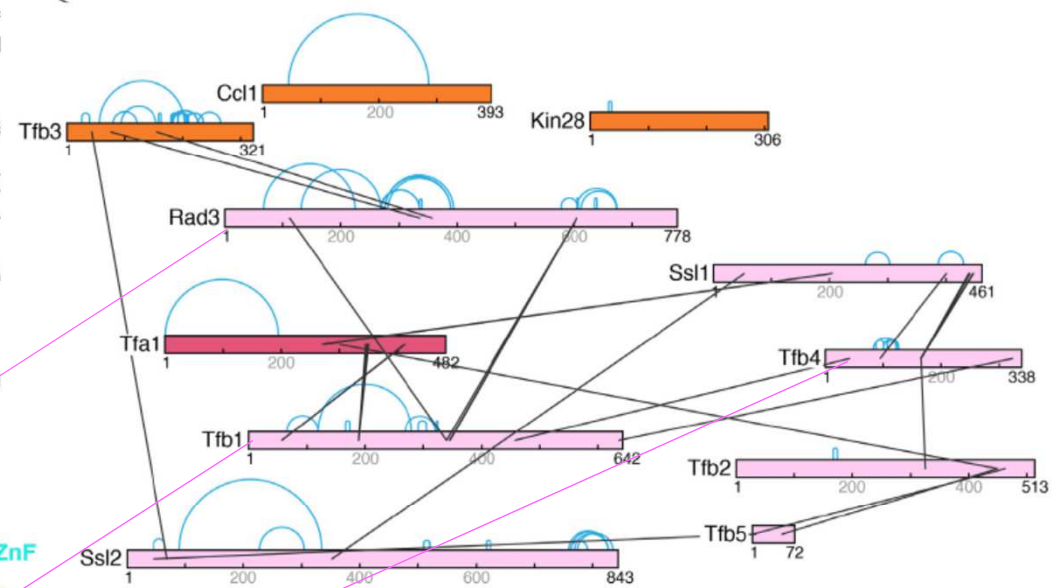


Adamus et al, JMB, 2020





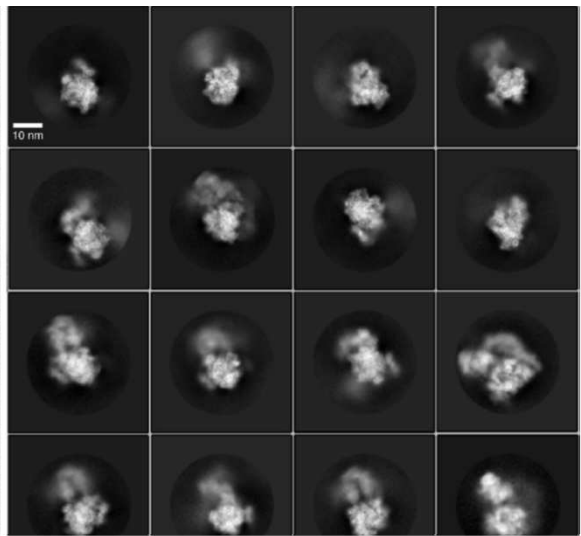
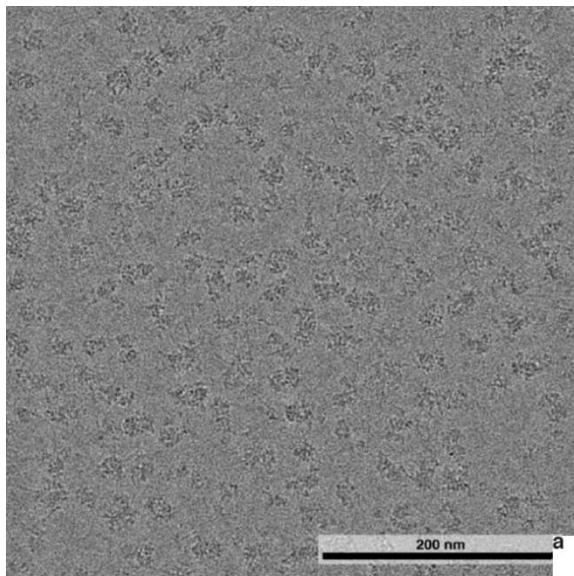
crosslink uvnitř a mezi proteiny



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

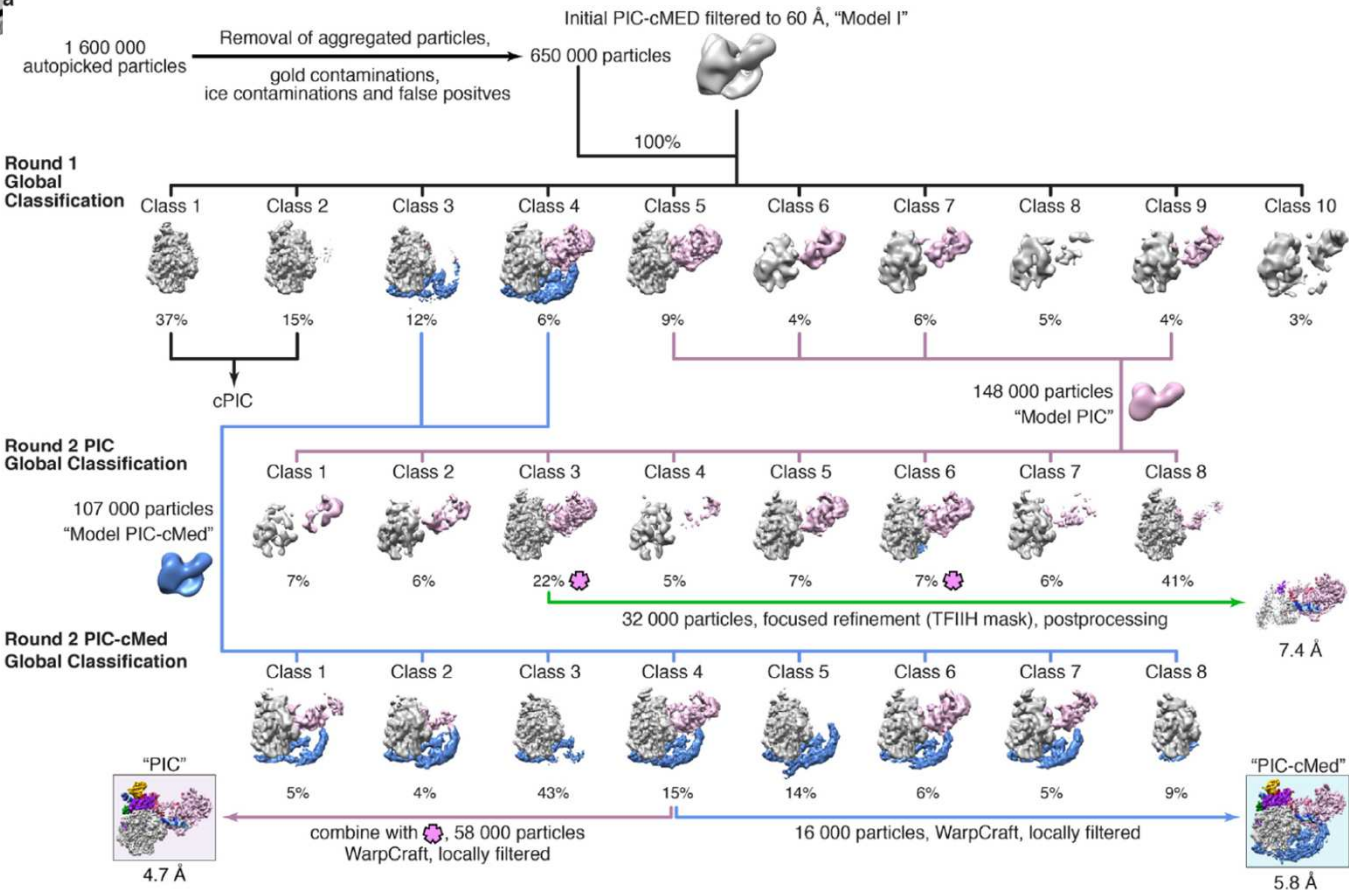
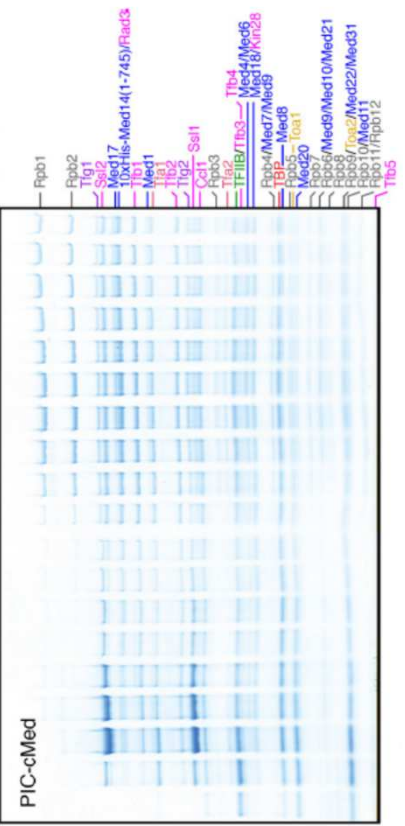
analýza PIC-mediator komplexu (~50 podjednotek - ~2MDa)

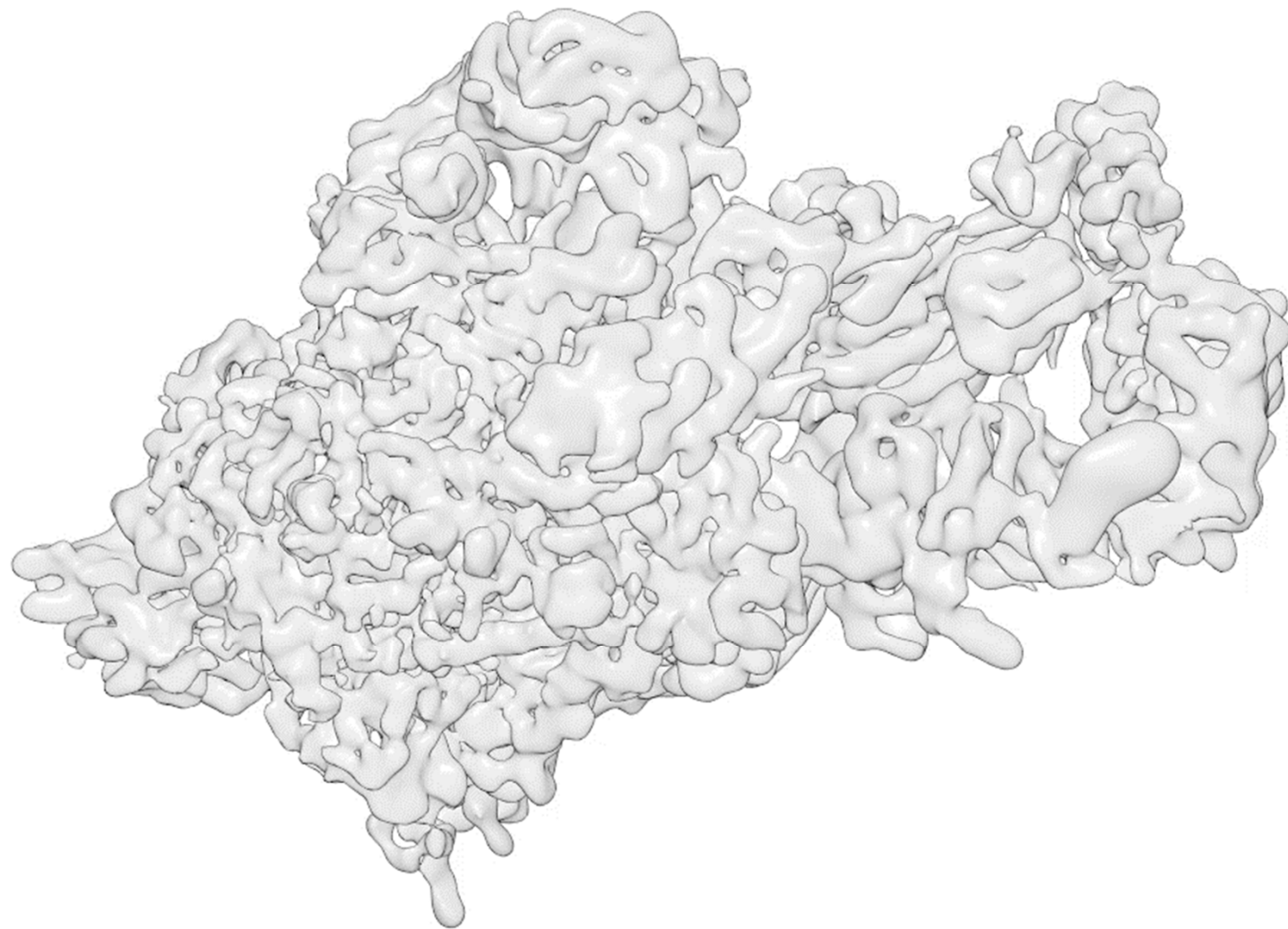
Schilbach et al, Nature, 2017



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

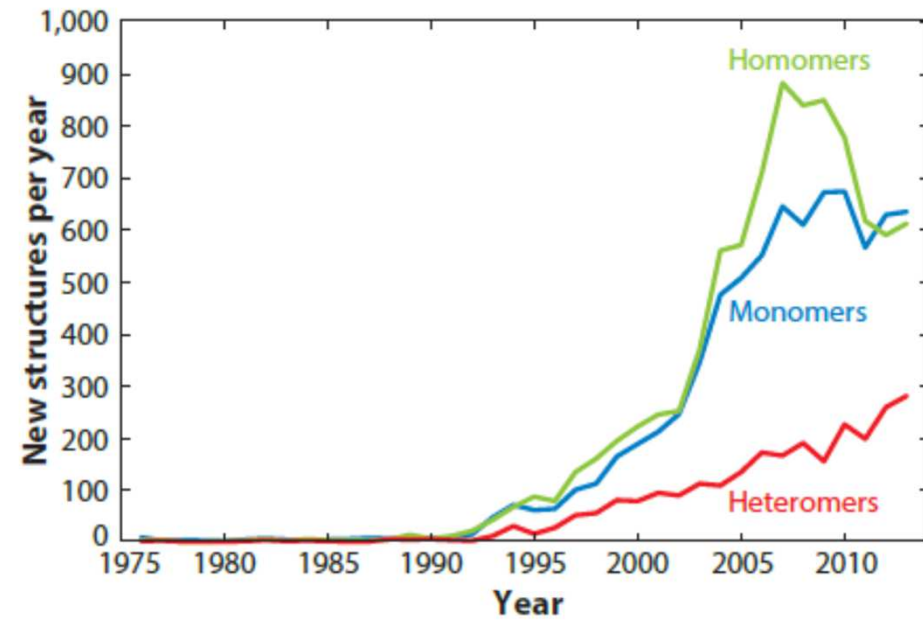
■ TFIIA	■ TFII E	■ TBP
■ TFIIB	■ TFIIF	■ Pol II

_____ cPIC

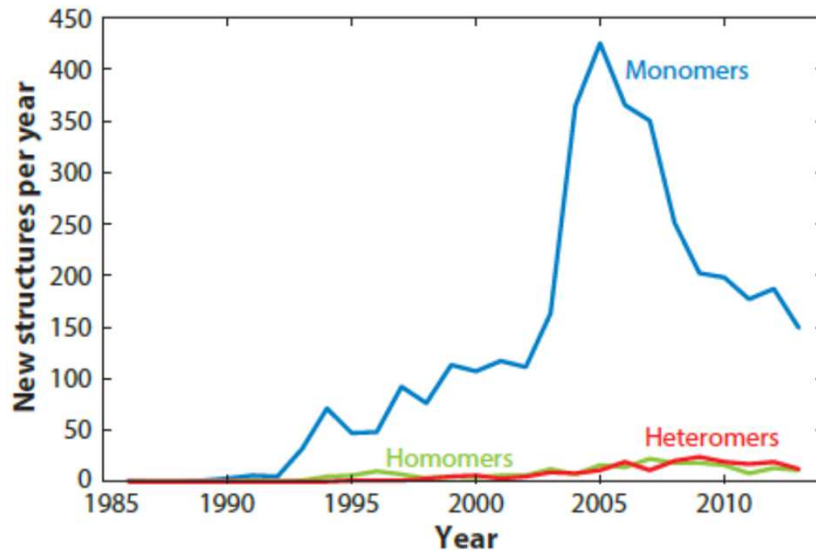
Použití metod **strukturní biologie** pro studium proteinových komplexů

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

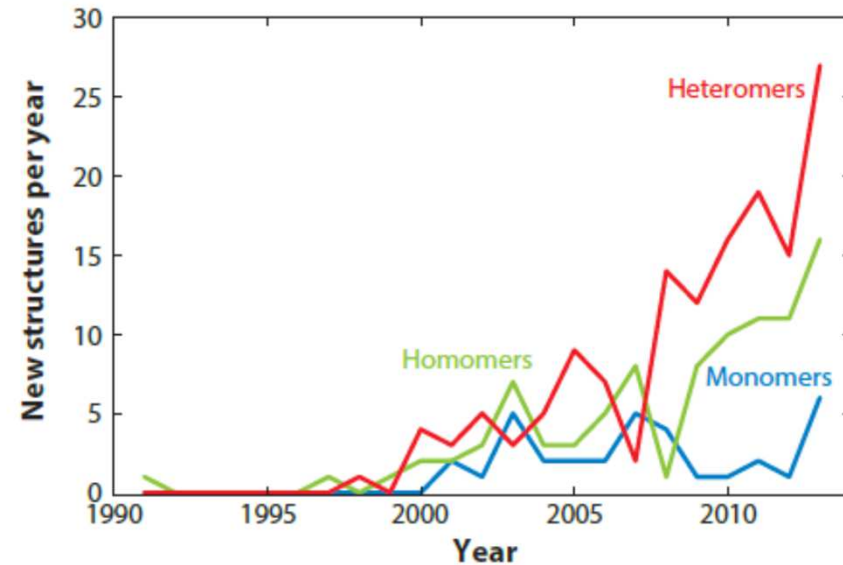
a X-ray crystallography



b NMR

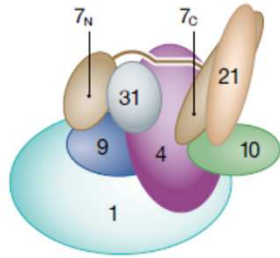


c Electron microscopy



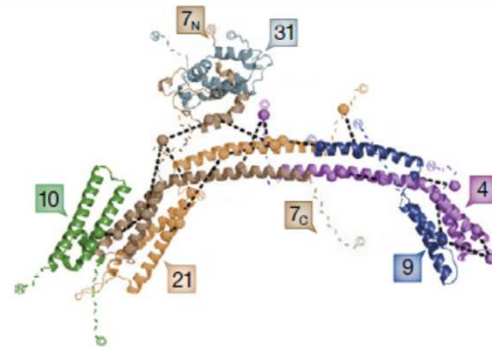
Integrativní modelování

MEDIATOR MIDDLE MODULE



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

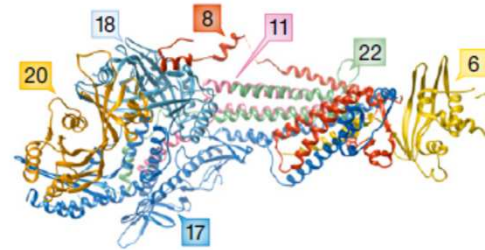
- Native MS
- IMS-MS
- Limited proteolysis
- Light scattering
- SAXS
- Pull-down assays



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

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

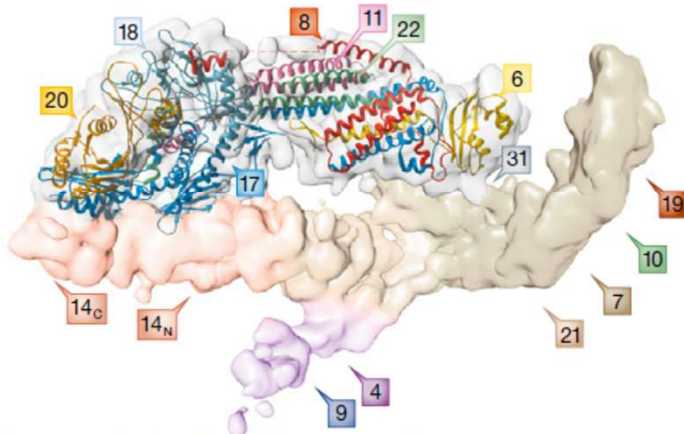
MEDIATOR HEAD MODULE



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

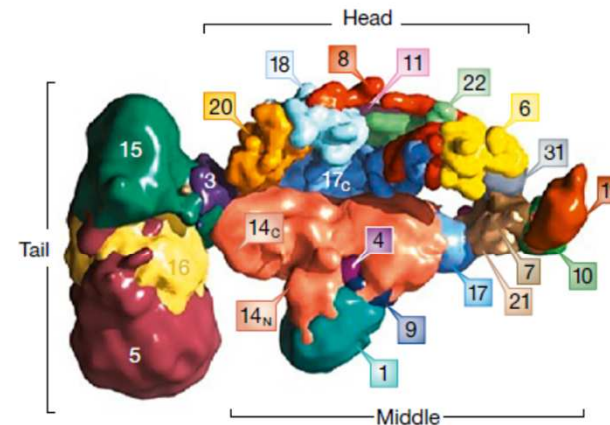
- Crosslinking-MS
- X-ray crystallography

CORE MEDIATOR (cMED) COMPLEX



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

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



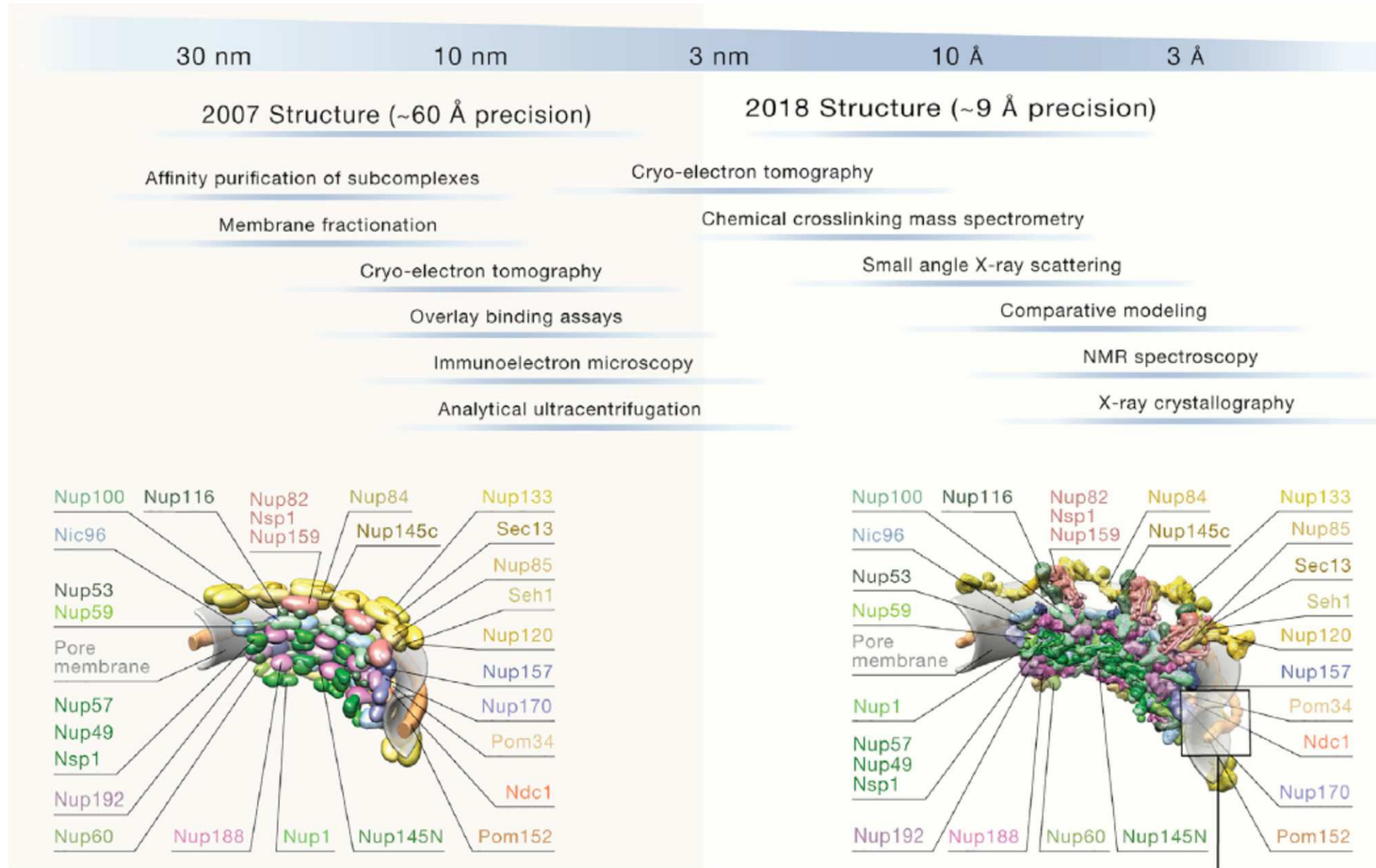
Architecture of a 21-subunit Mediator complex
Robinson *et al*, 2015

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

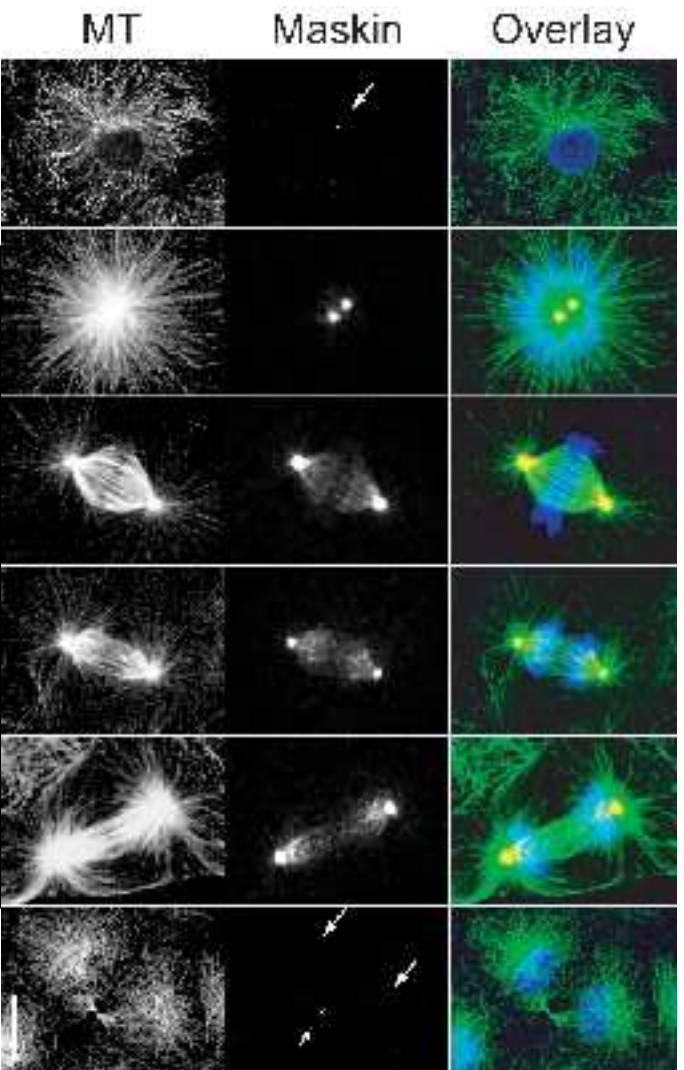
- Original data
- Integrated data from other studies

Lossl *et al*, EMBO J, 2016

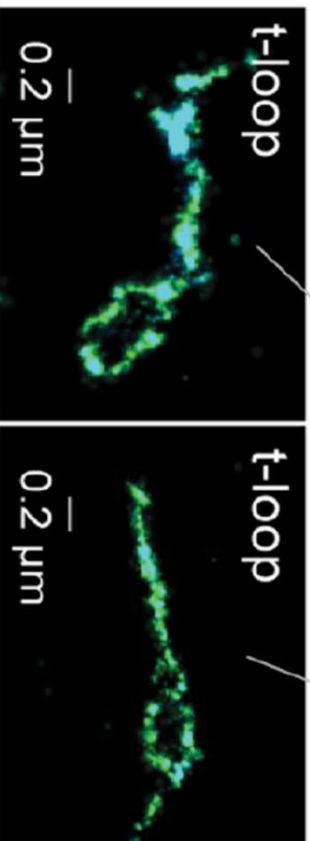
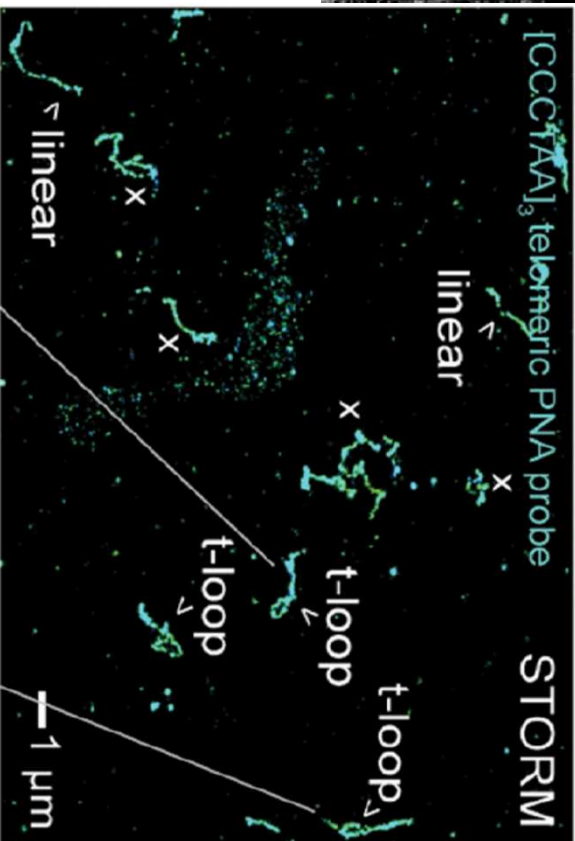
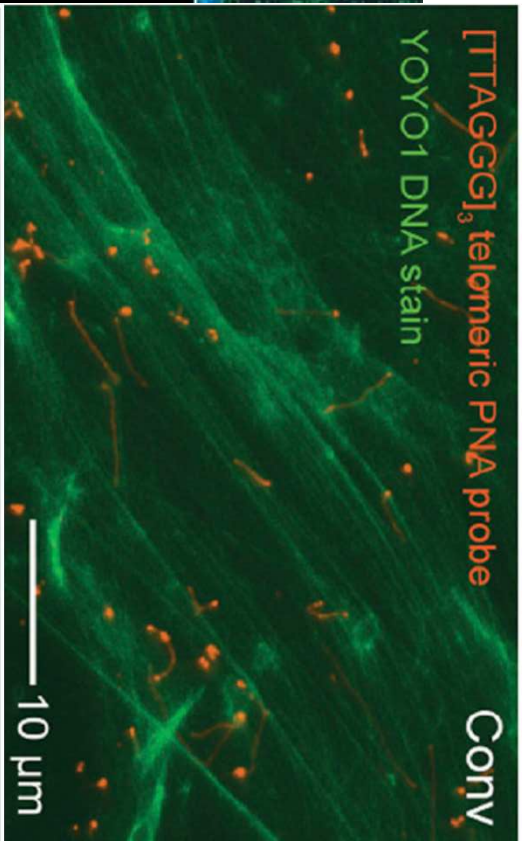
Integrativní modelování

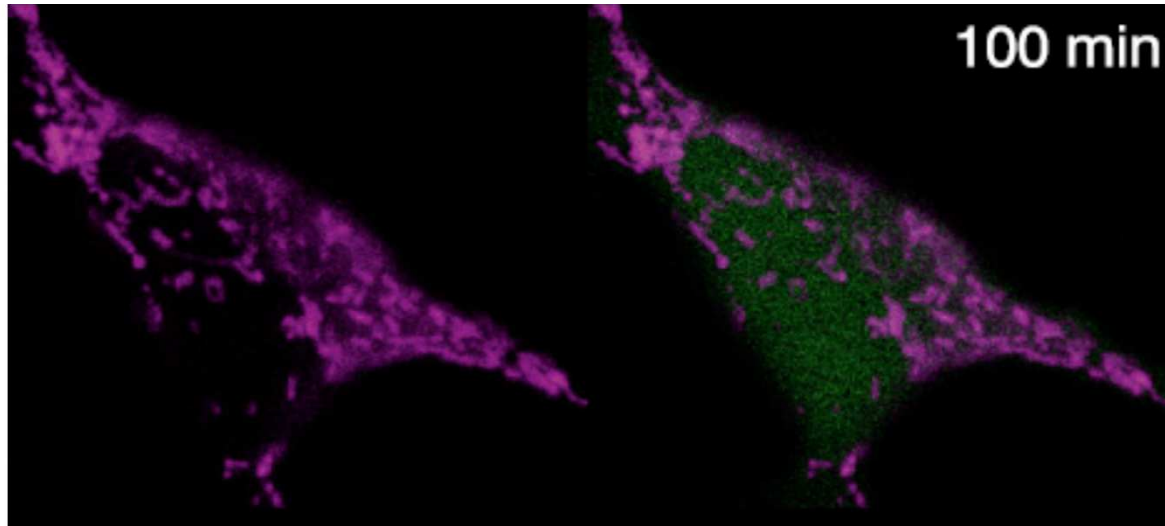


Mikroskopie



Doksani et al, Cell, 2013





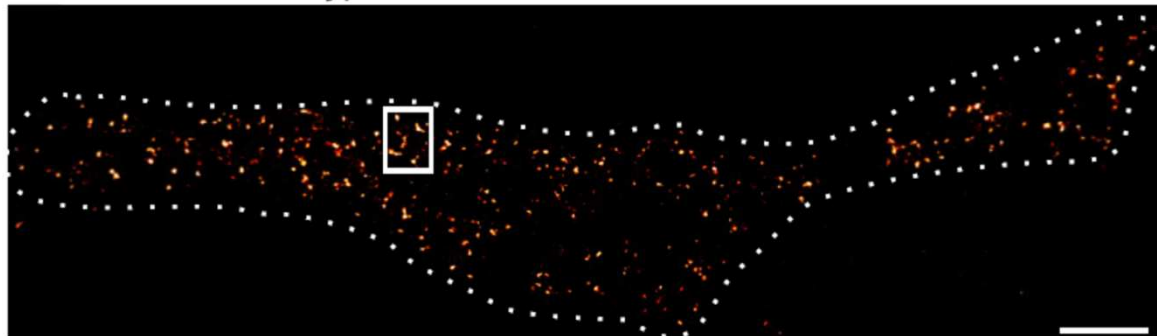
100 min

Lokalizace proteinových komplexů

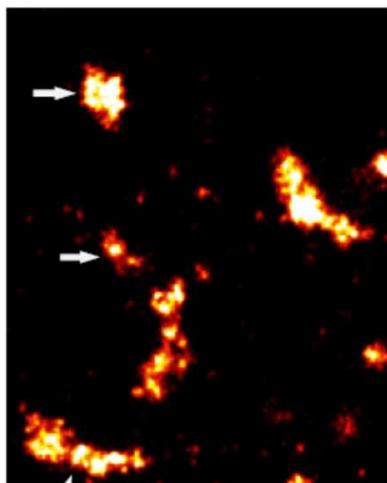
Konfokální mikroskopie vs super-resolution mikroskopie (STED=stimulated emission depletion microscopy – rozlišení 60nm)

+ AFM (atomic force microscopy)

A GFP-Bax wild type

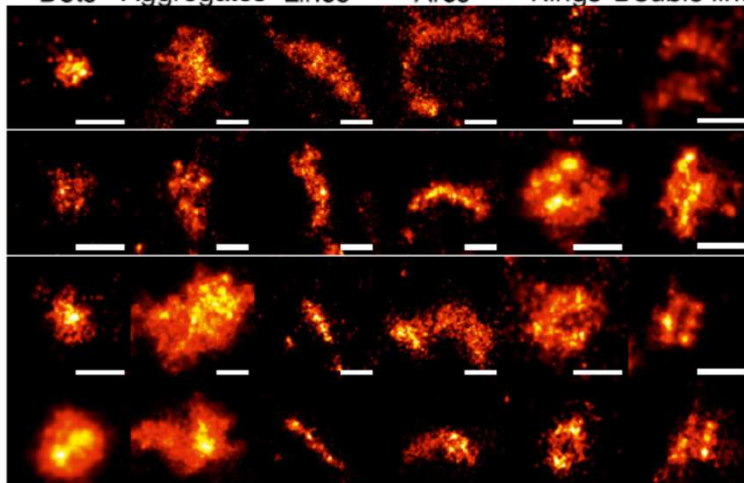


B

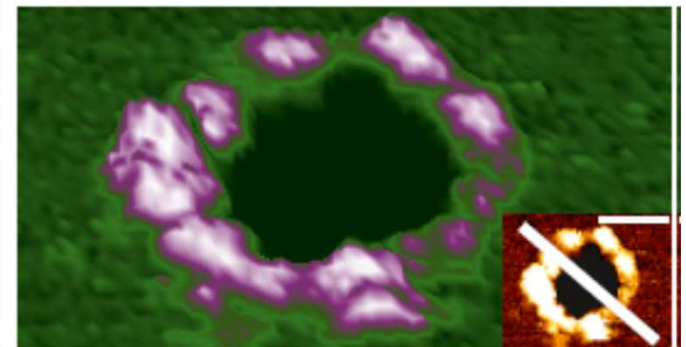


C

Dots Aggregates Lines Arcs Rings Double lines



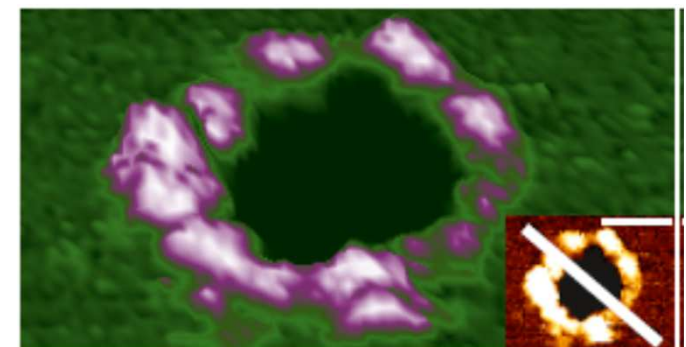
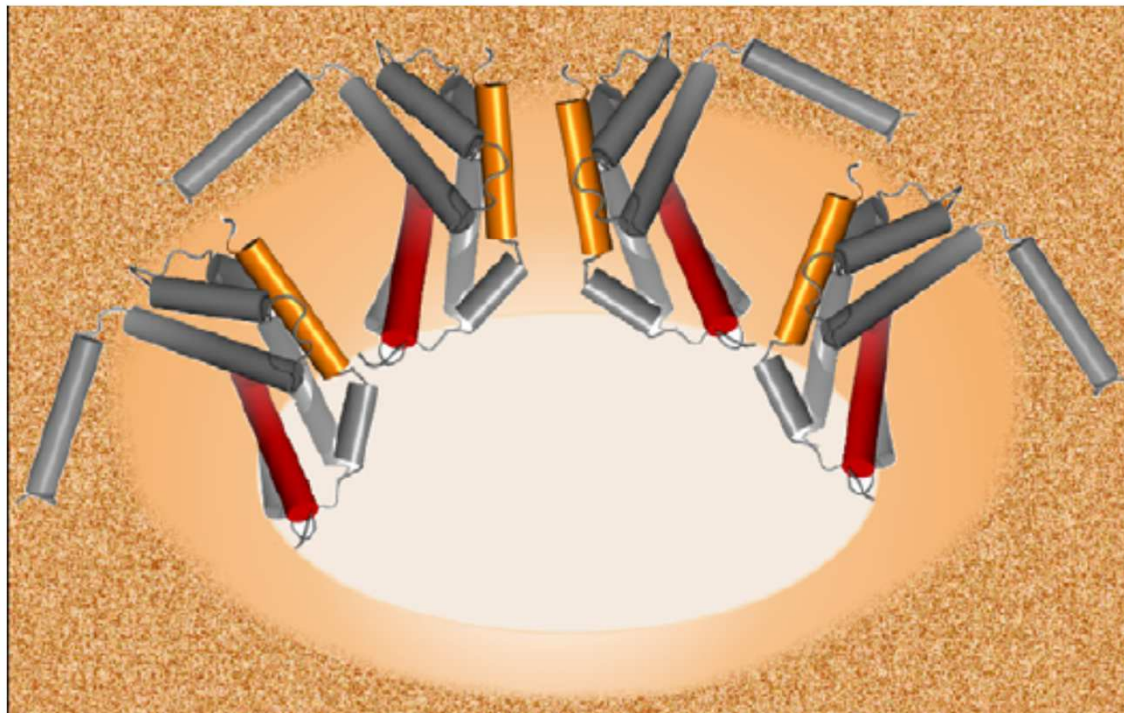
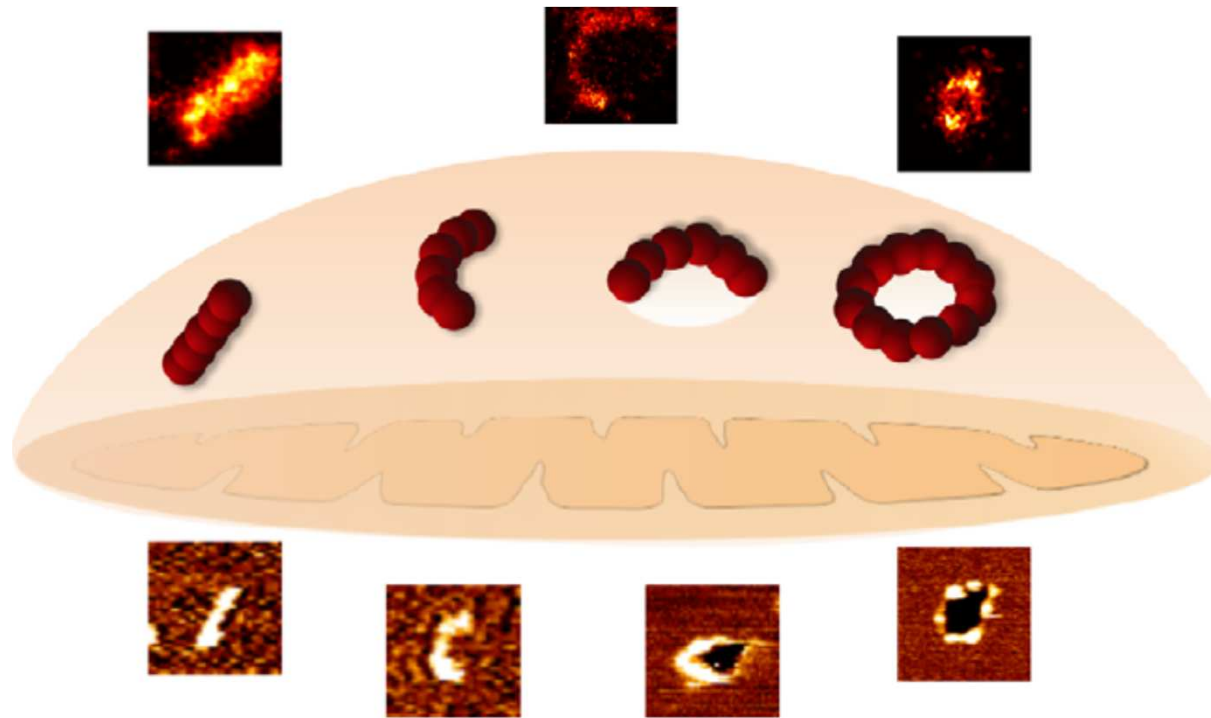
Gallego et al, EMBO J, 2016



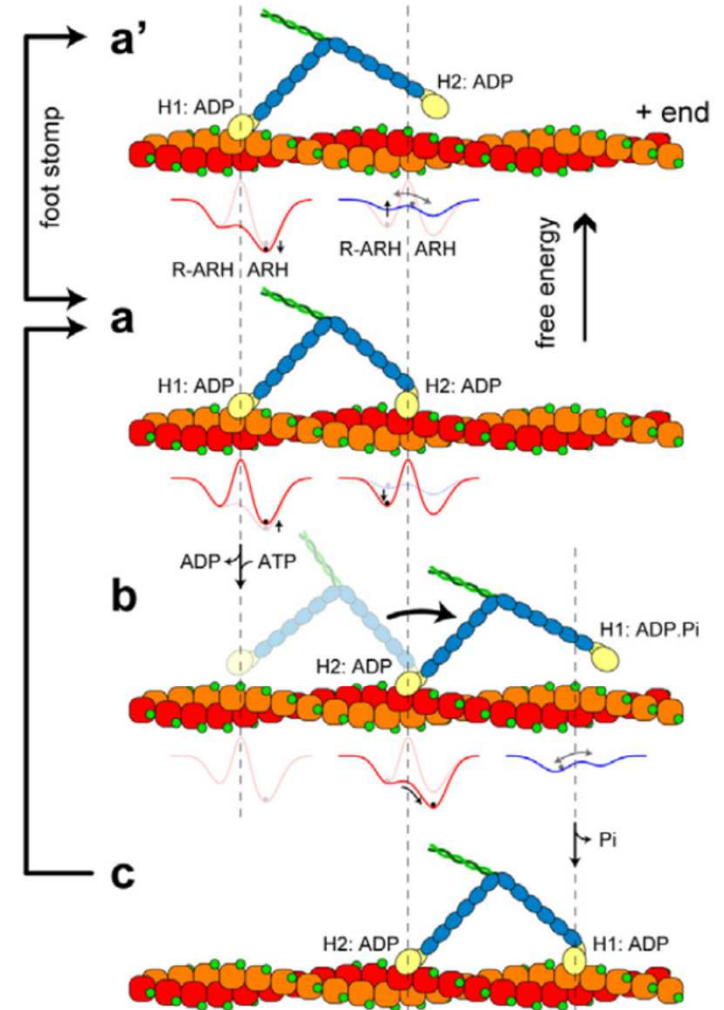
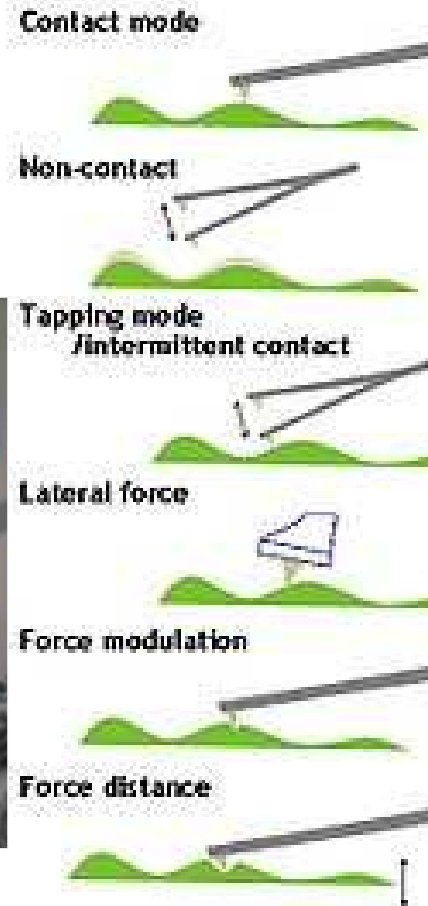
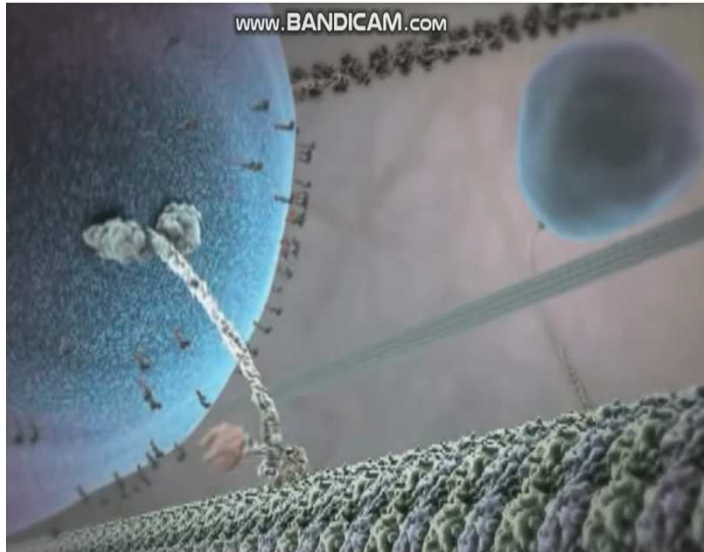
Lokalizace proteinových komplexů

Bax protein vytváří póry v mitochondriální membráně (apoptósa)

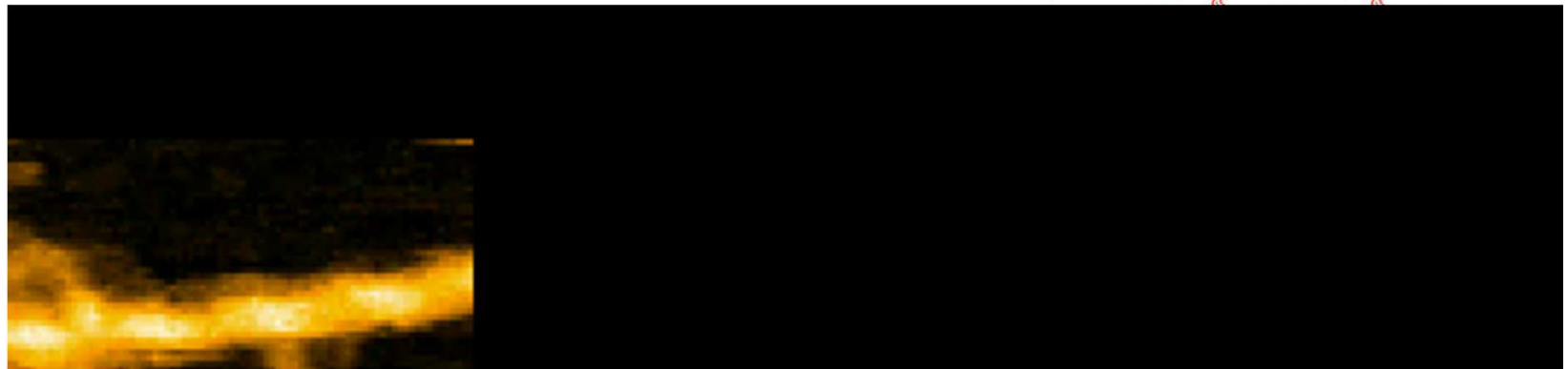
Gallego et al, EMBO J, 2016



AFM atomic force microscopy



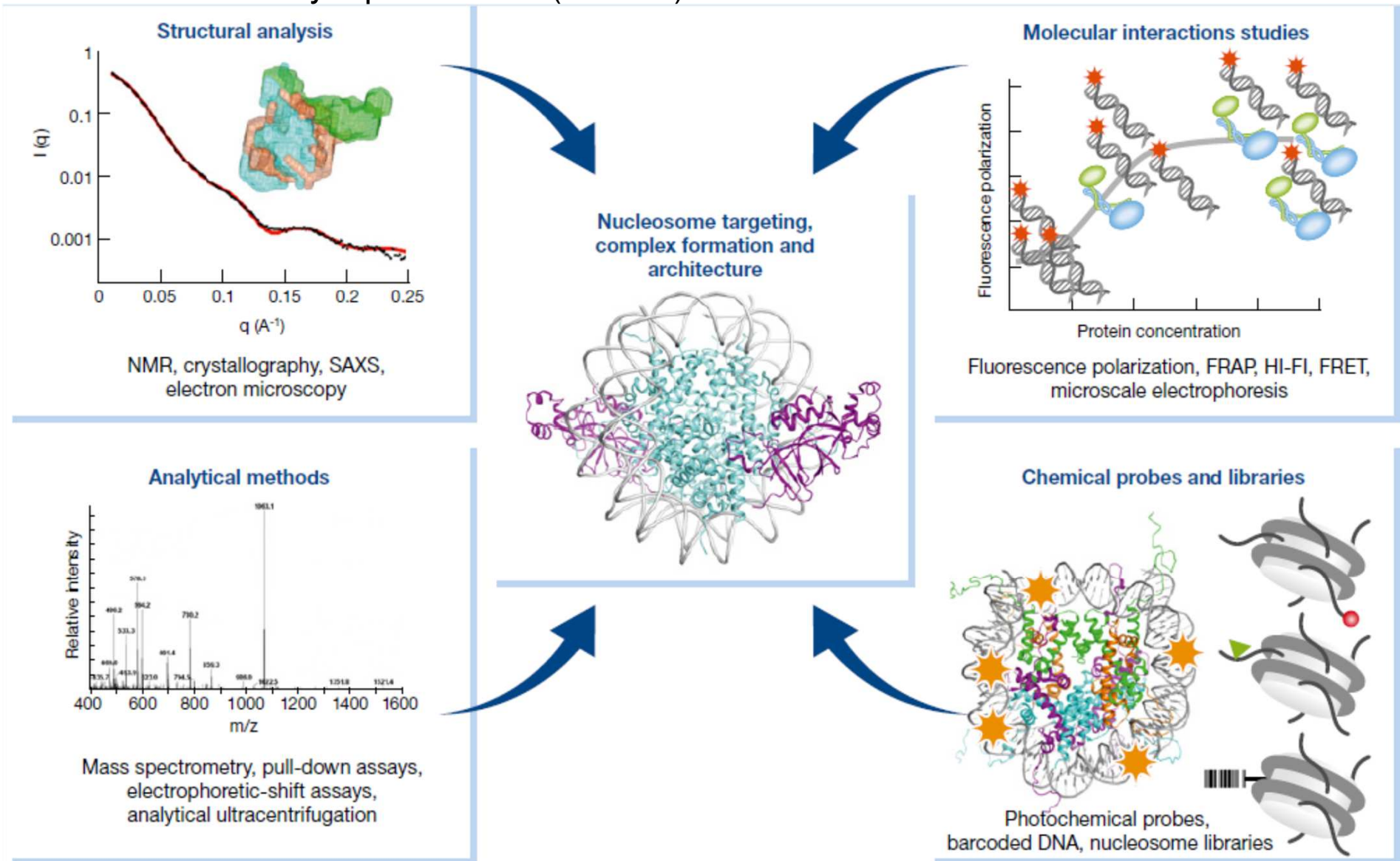
Ando et al, Annu Rev BioPhys, 2013



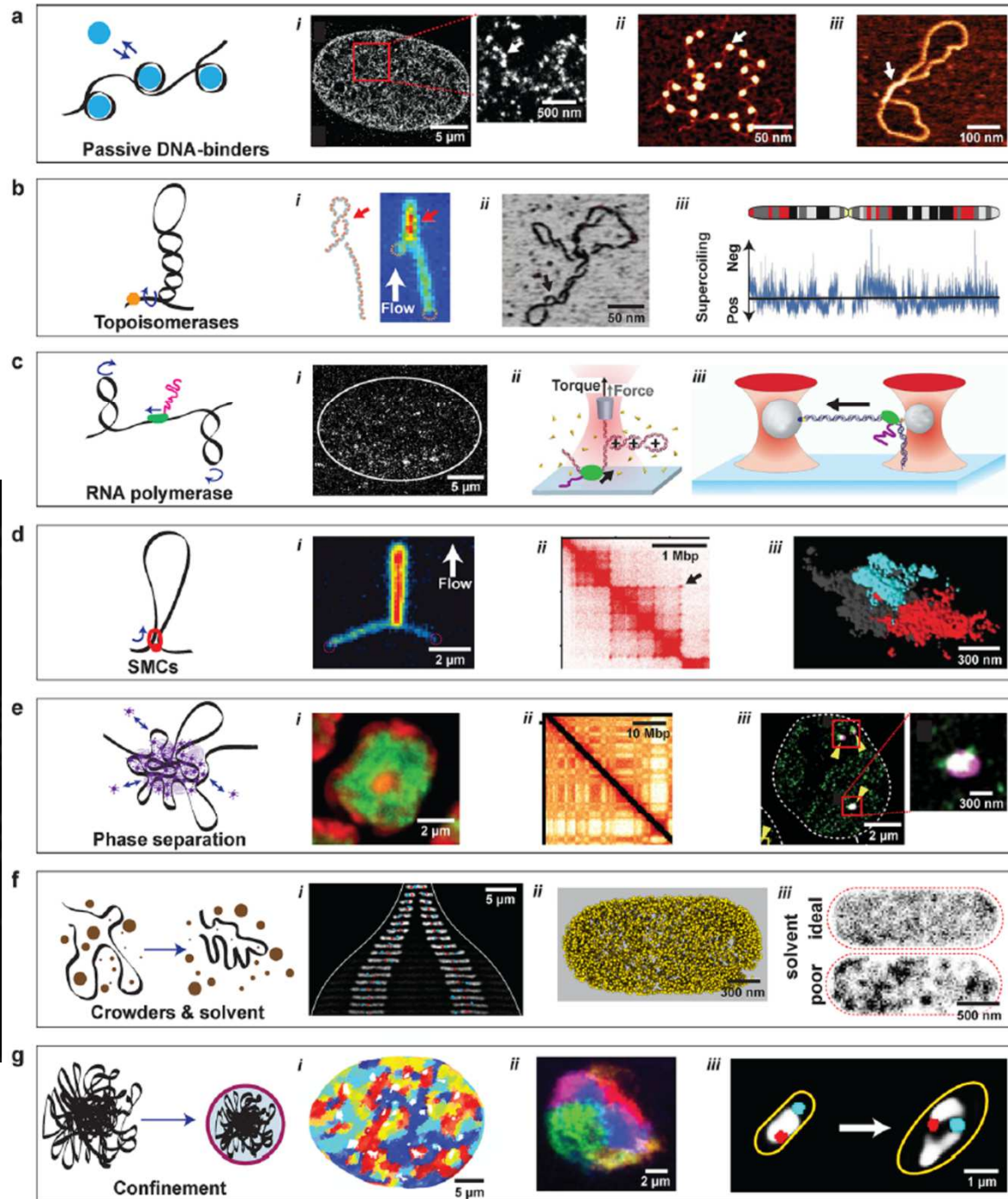
Analýza proteinových komplexů

více Metody v proteomice (CG090)

více doc. Hofr C7230



... speciální biofyzikální metody ...



Ganji et al, Science, 2018

Integrativní modelování - chromatin

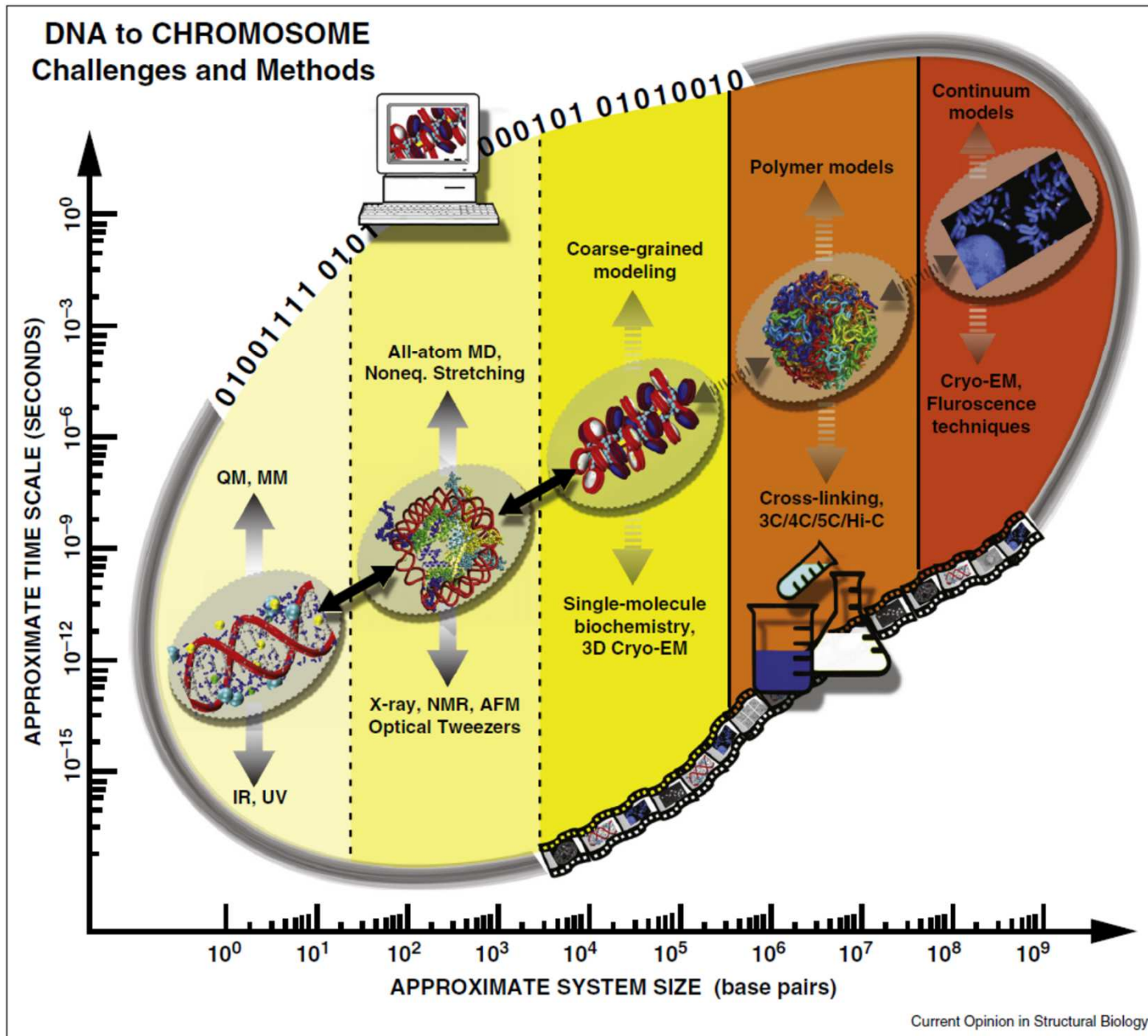
Table 1. Example Methods that Are Informative about a Variety of Structural Aspects of Biomolecular Systems

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

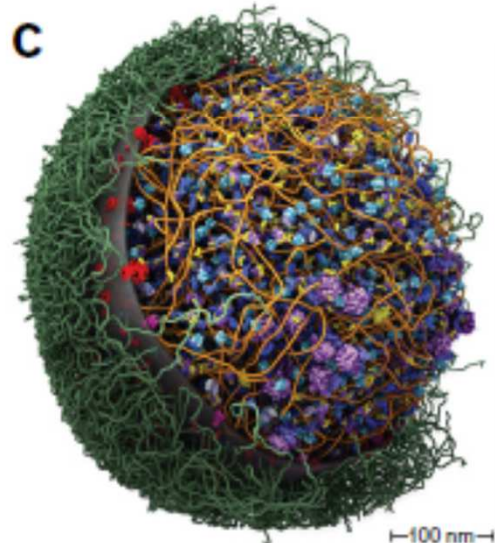
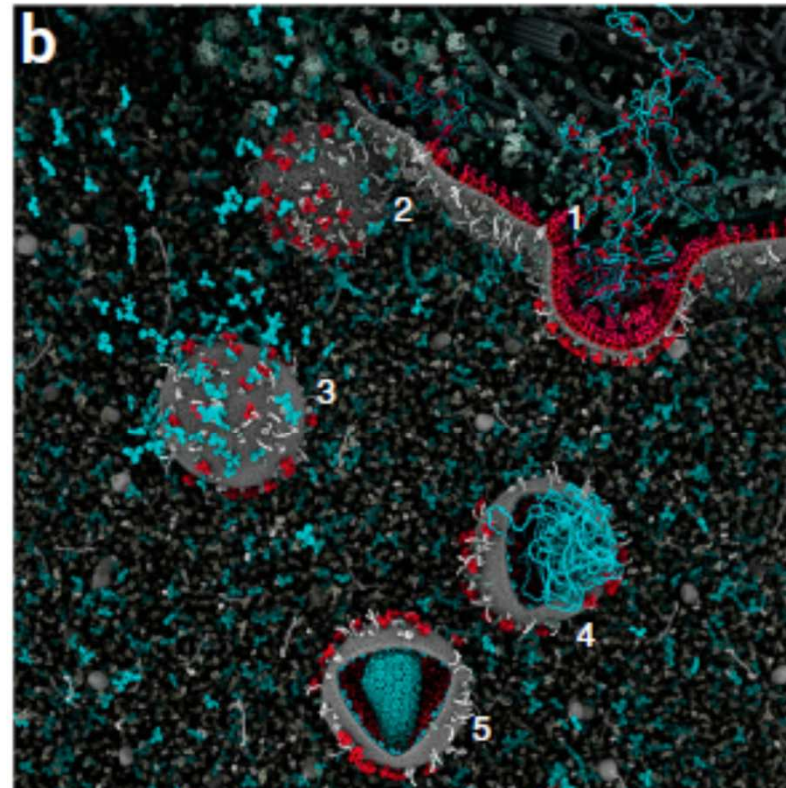
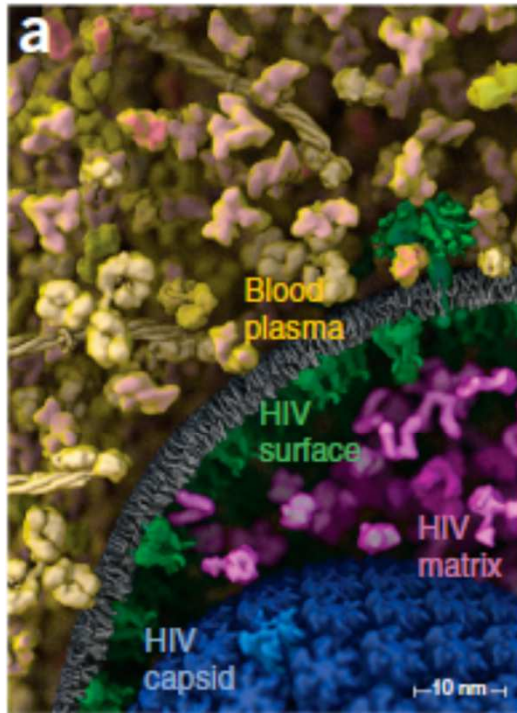
Abbreviation are as follows: 3DEM, 3D electron microscopy; DEER, double electron-electron resonance; EPR, electron paramagnetic resonance; FRET, Foerster resonance energy transfer; HDex, hydrogen/deuterium exchange; NMR, nuclear magnetic resonance; SAS, small-angle scattering; XL-MS, cross-linking mass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

In silico analýza proteinových komplexů

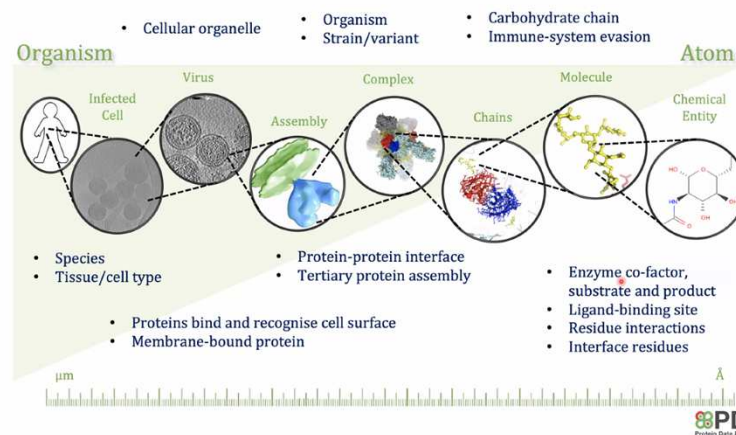
Ozer et al, CO in SB, 2015



Visualizace proteinových komplexů



Enriching structure data



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

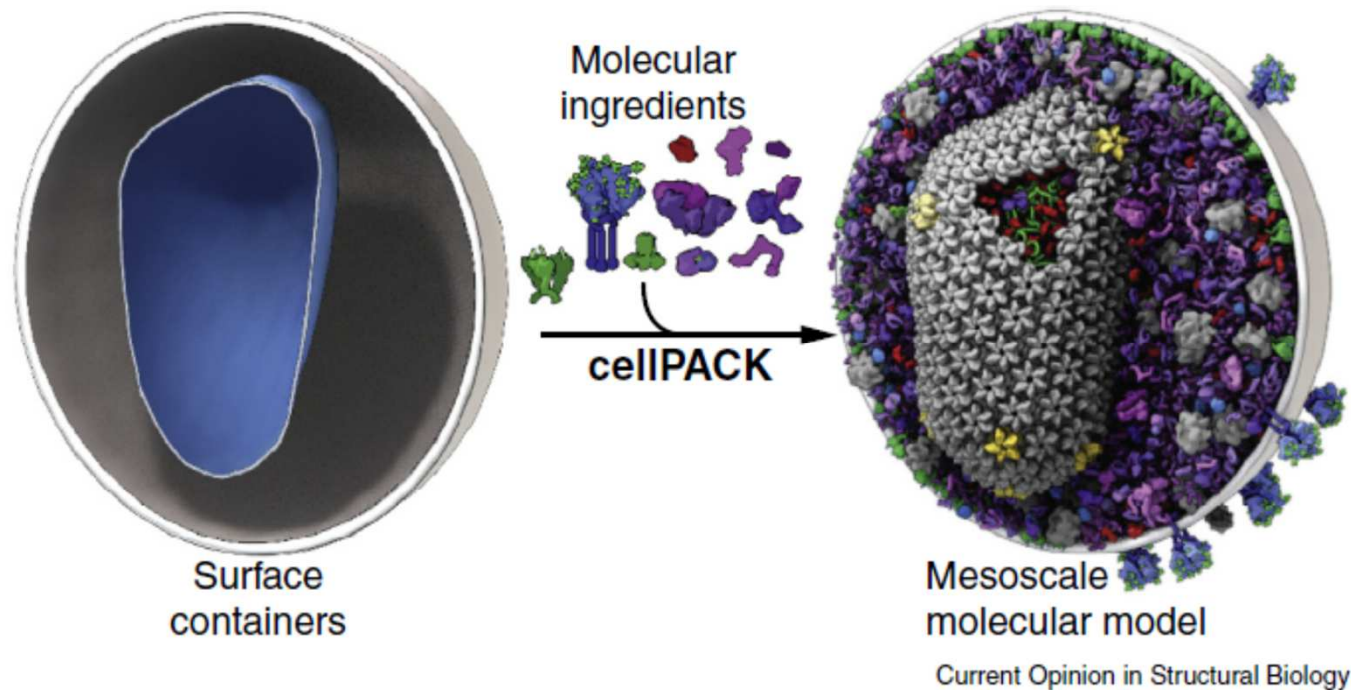
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur

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

...vychází z herních a animačních algoritmu ...

Johnson et al., Nat Meth, 2015

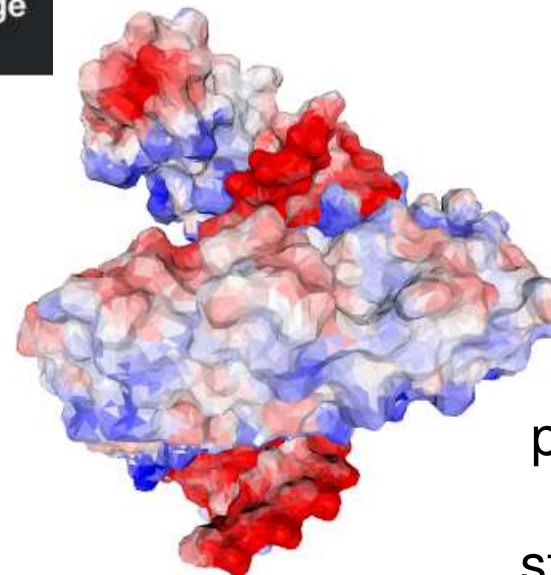
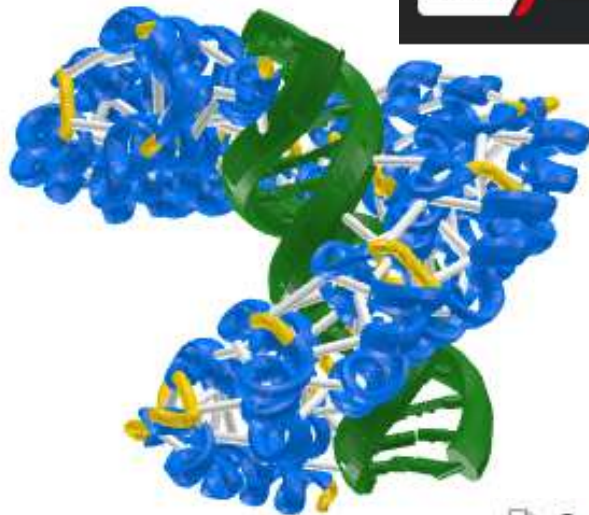
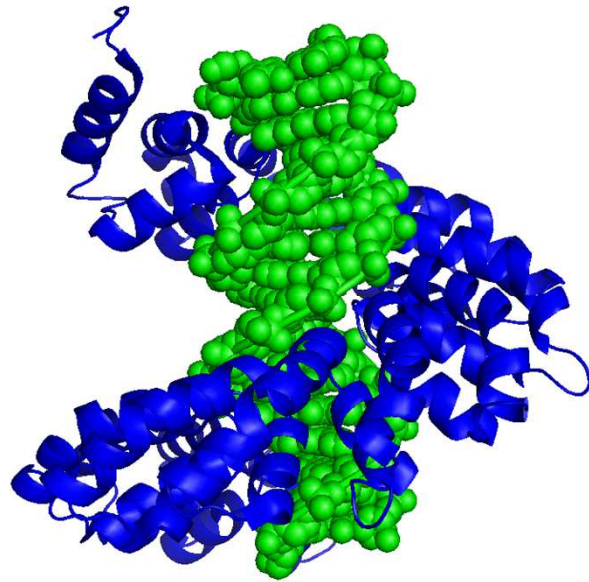
Visualizace proteinových komplexů




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

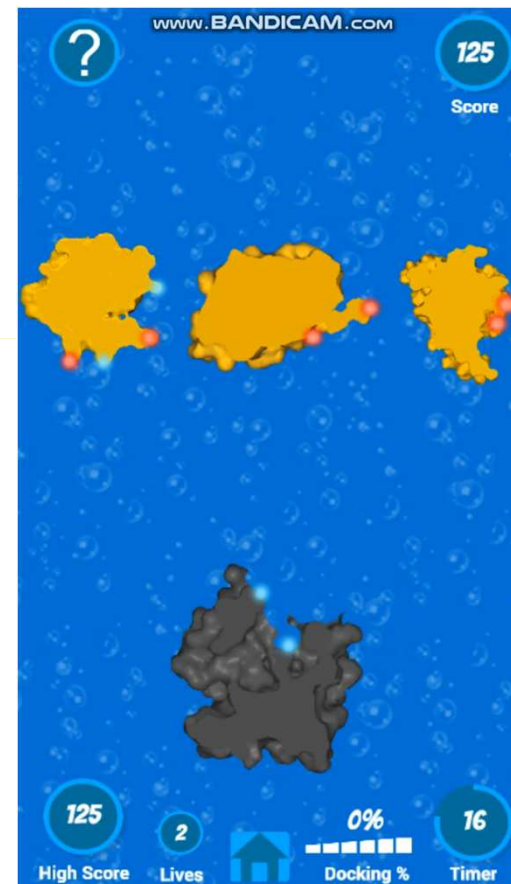
od **PyMOL** pro přímou vizualizaci krystalových struktur ... **3D tisk**

Docking - hra

Bioblox 2½D Game on the Topic of Protein Docking



https://www.youtube.com/watch?v=u_-8JyCWpEQ&t=7s



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/>