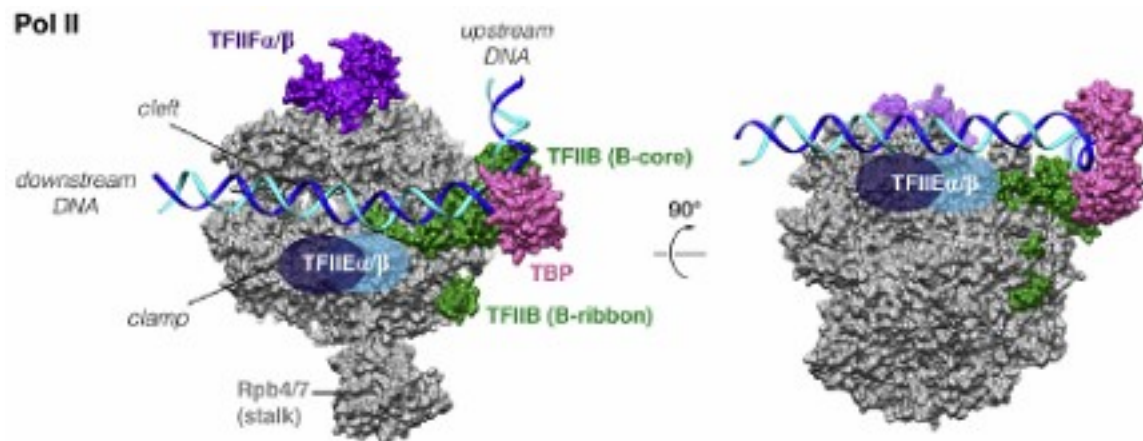


CEITEC semináře (3. čtvrtěk v měsíci)

Patrick Cramer – Transcription complexes

18.4. ve 14.00 – A11, 132



SYLICa přednášky

Johanne Murray – SMC5/6 complex and replication stress

22.4. v 10.00 – A11, 205

Přednáška PK

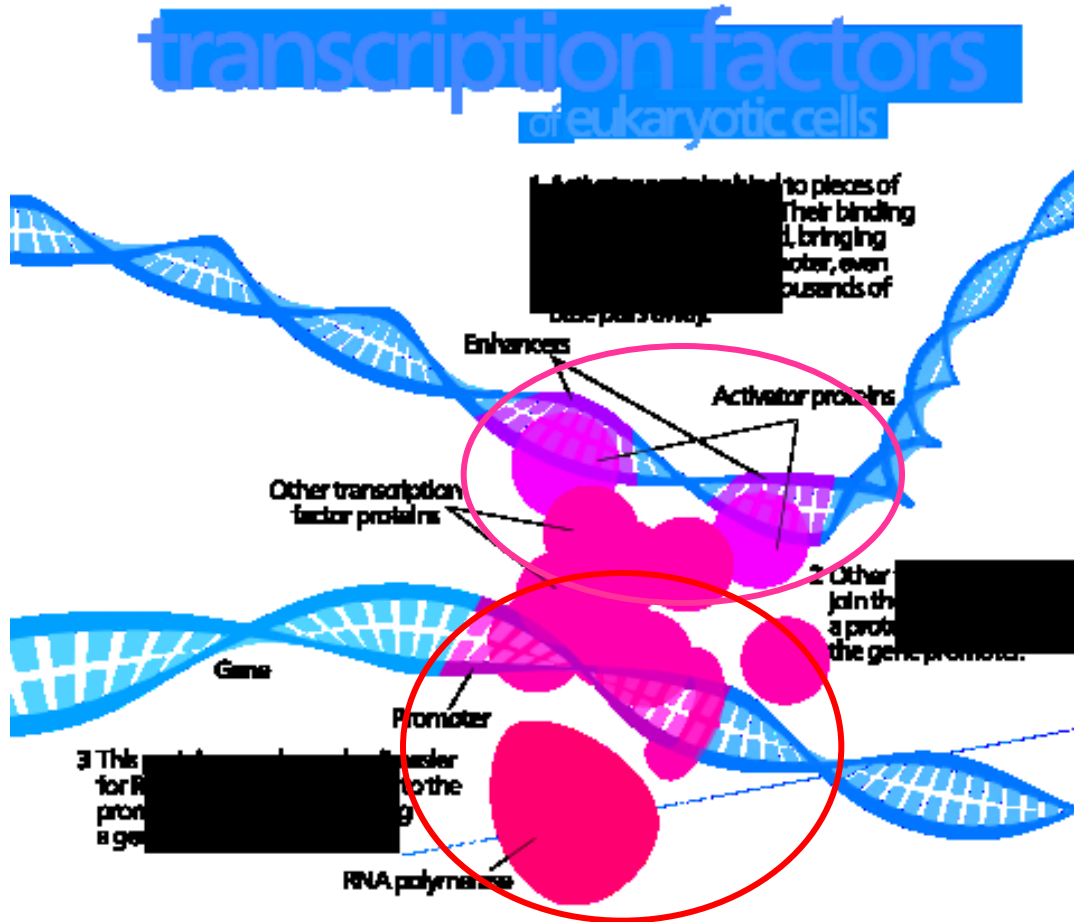
Dalibor Blažek – CDK/cyclin komplexy

9.4. ve 12.00 – A2

Komplexy spojené s transkripcí

DNA-vazebné motivy specifických transkripčr (sekvenčně specifické – α -šroubovice ve VŽ)

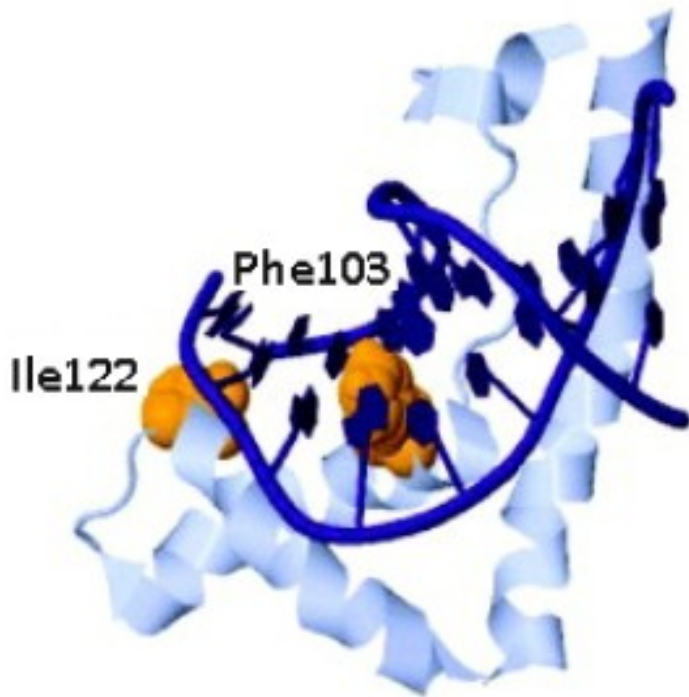
Obecné TFII komplexu a proces transkripcie



- **Zipper typ**
 - Leucinový zip (**GCN4**)
 - Helix-loop-helix (**MyoD**)
- **Helix-turn-helix** (**mat α**)
 - Winged helix (**TFIIE+F, H1**)
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger (**CTCF**)
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix (**p53**)
 - Gal4 (**Gal4**)
- **Histon, HMG-box**
- **β -sheet**
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy**

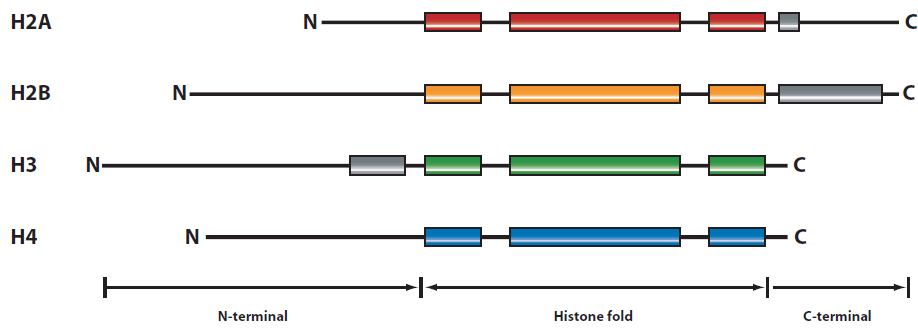
- HMG obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L (A- a B-box)
- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace Phe (aromatický kruh) způsobuje ohnutí DNA

HMG box B domény proteinu HMGB1 v interakci s DNA



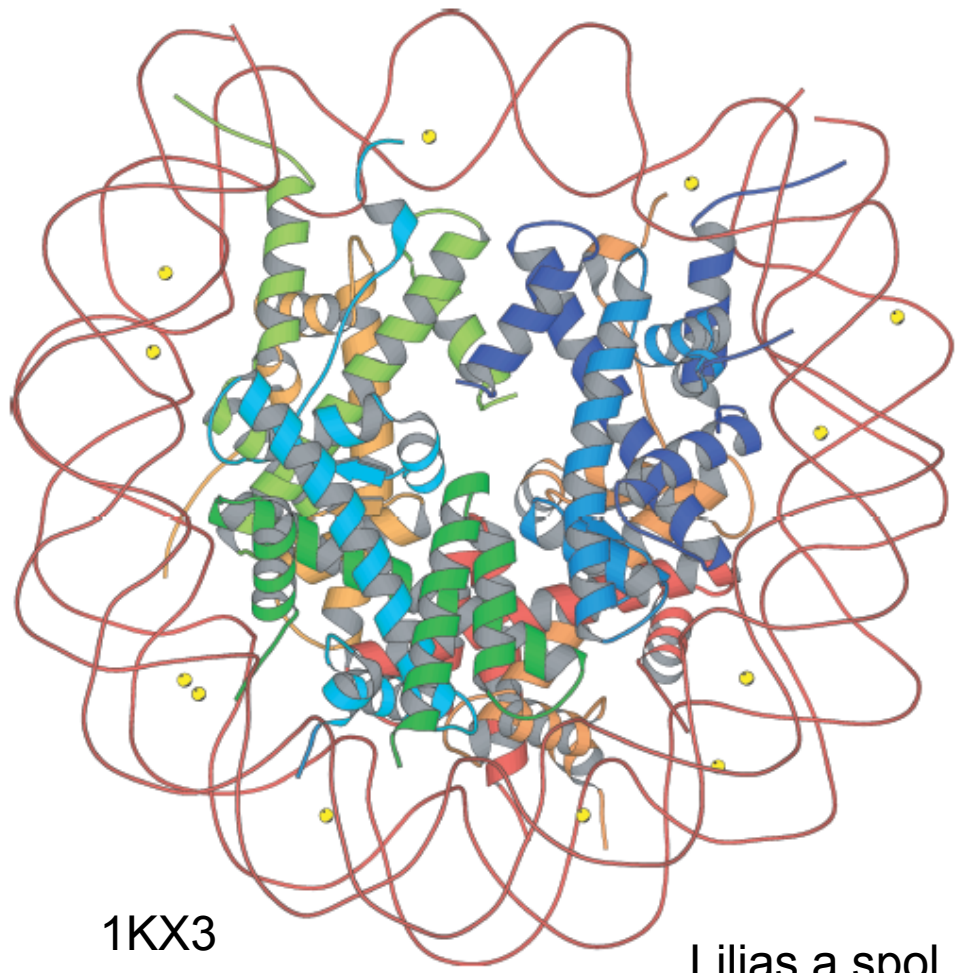
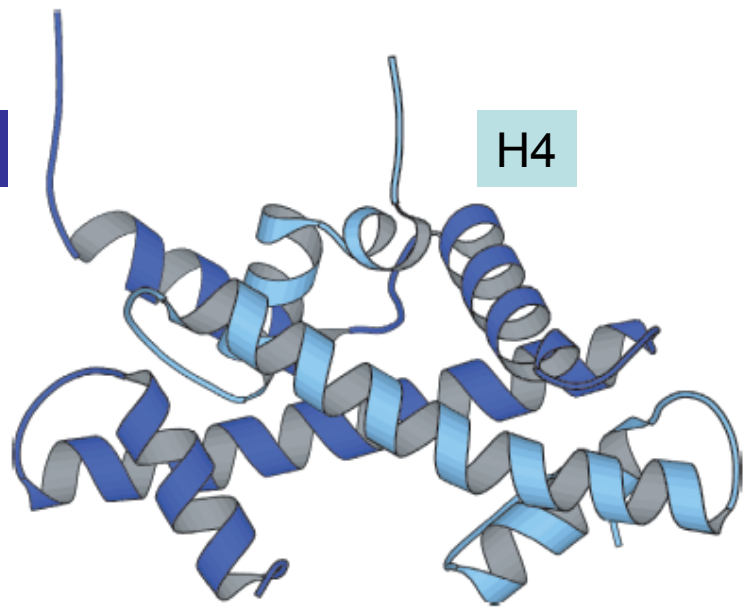
- ohyb a rozvolnění párování dsDNA může napomáhat procesům replikace, transkripce a rekombinace/opravy poškozené DNA
- ohyb napomáhá přiblížení vzdálených míst nebo zpřístupňuje DNA pro transkripční faktory
- HMG má vysokou afinitu k neobvyklým strukturám DNA (four-way junctions ...)

- Histony a HMG vážou DNA sekvenčně nespecificky
- histonové podjednotky (H2A, H2B, H3, H4) obsahují svazky 3-4 šroubovic skládaných proti sobě (histon fold)
- DNA se obtáčí kolem válcovitého oktameru (2x4 histony)
- šroubovice se vážou na cukrfosfátovou kostru DNA



H3

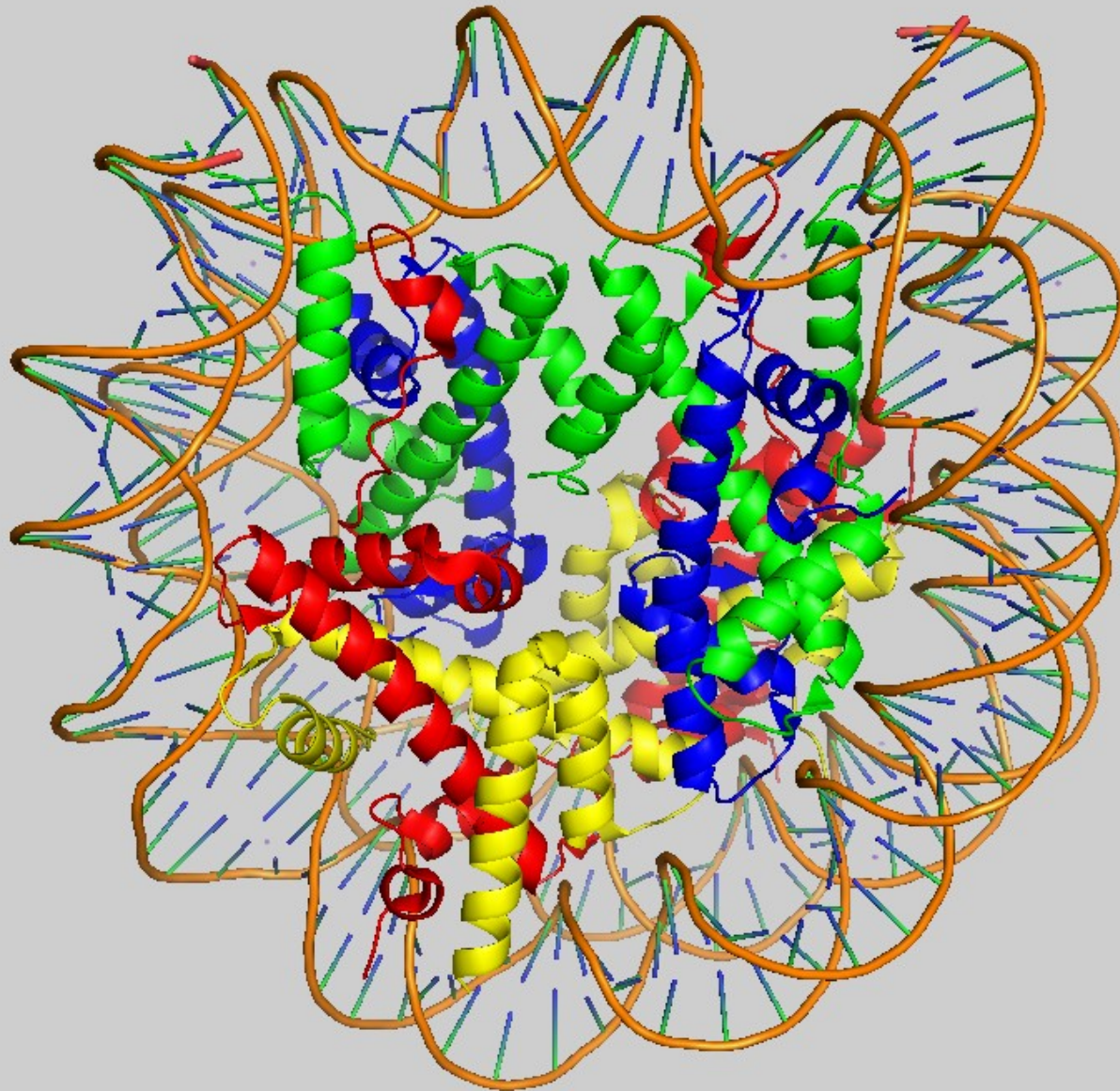
H4



1KX3

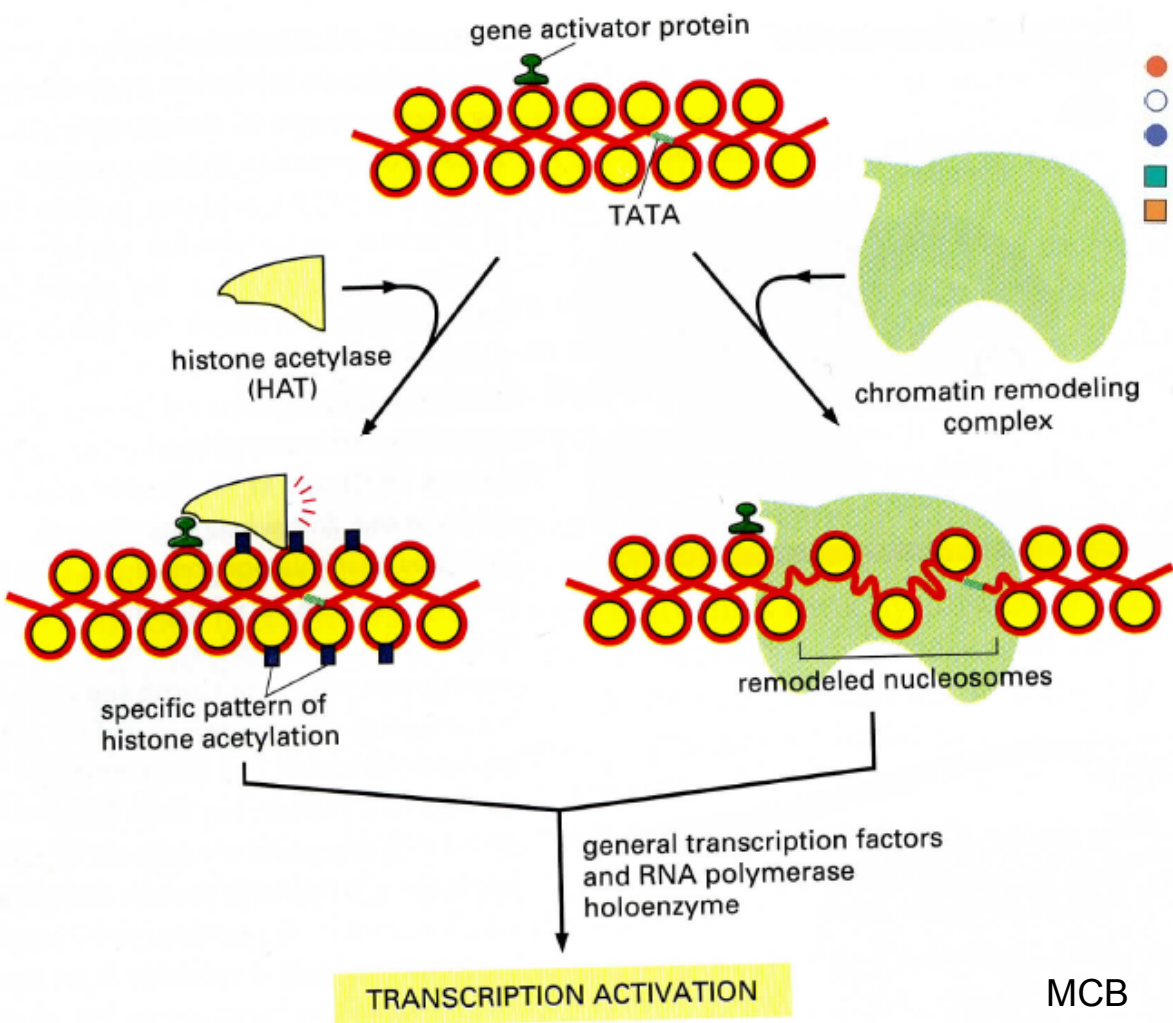
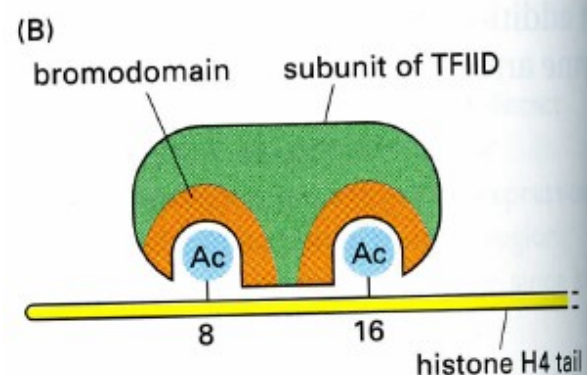
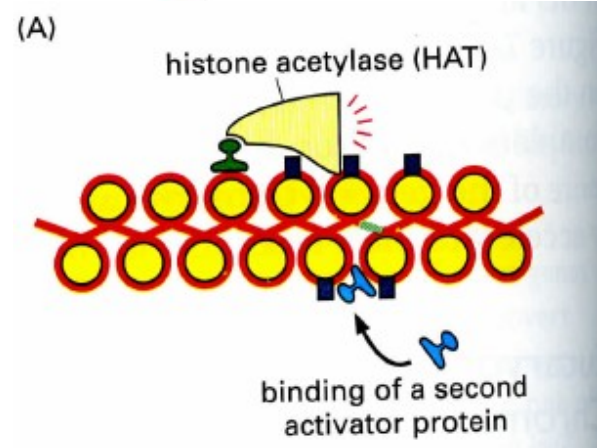
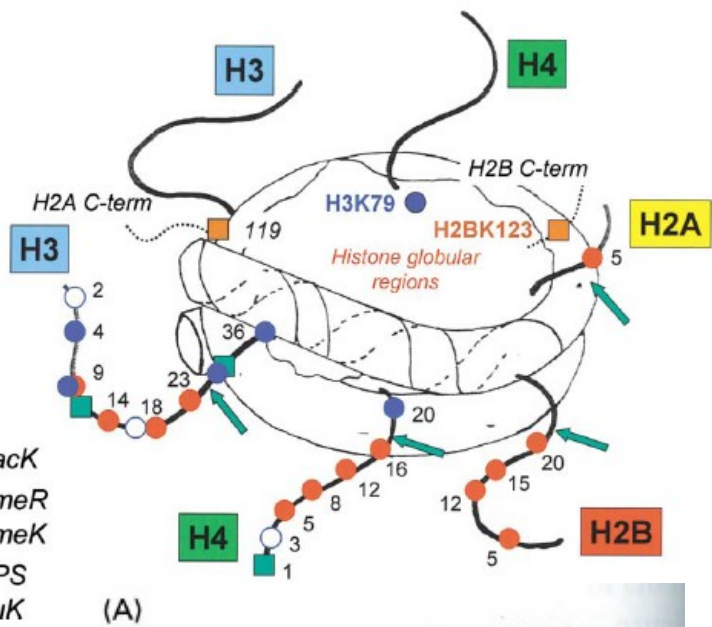
Liljas a spol.

H3/H4 interagují s oběma vlákny – silnější vazba



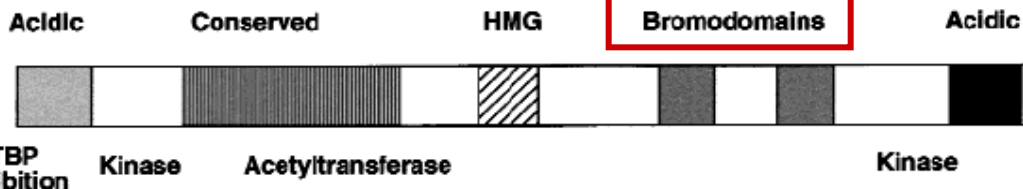
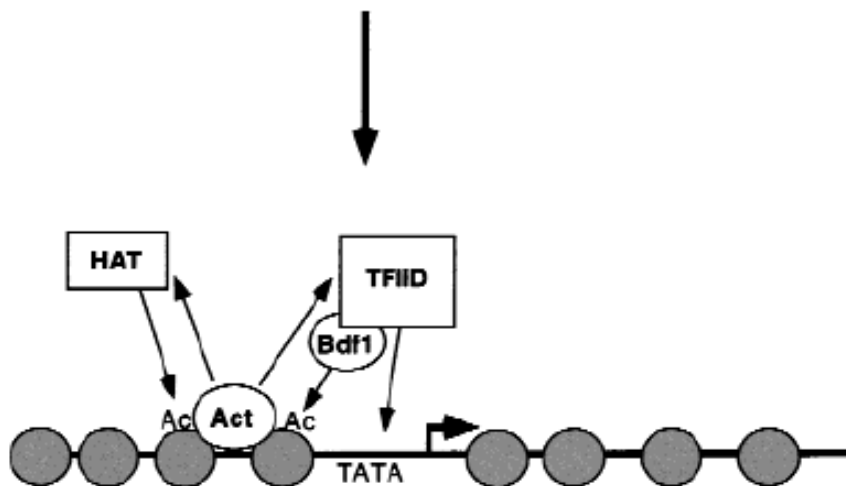
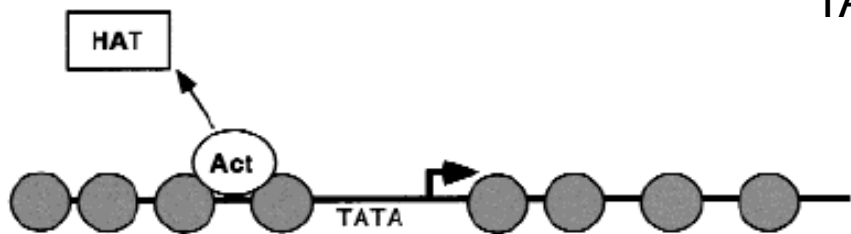
Modifikace histonů

Acetylace rozvolňuje vazbu oktameru a zpřístupňuje sekvence DNA pro vazbu transkripčních faktorů – TFIID se váže na Ac-H4 prostřednictvím TAF1 proteinu

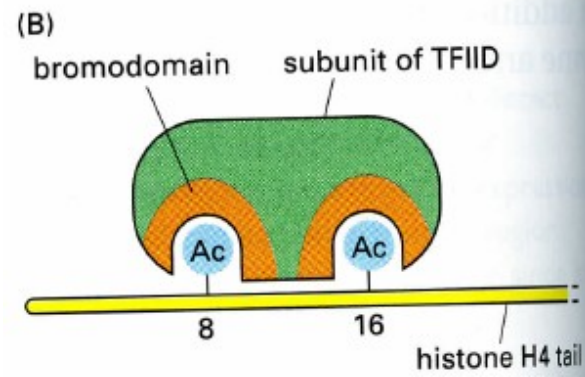
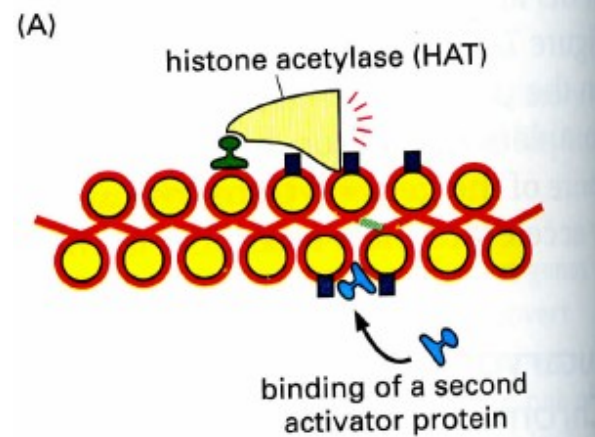
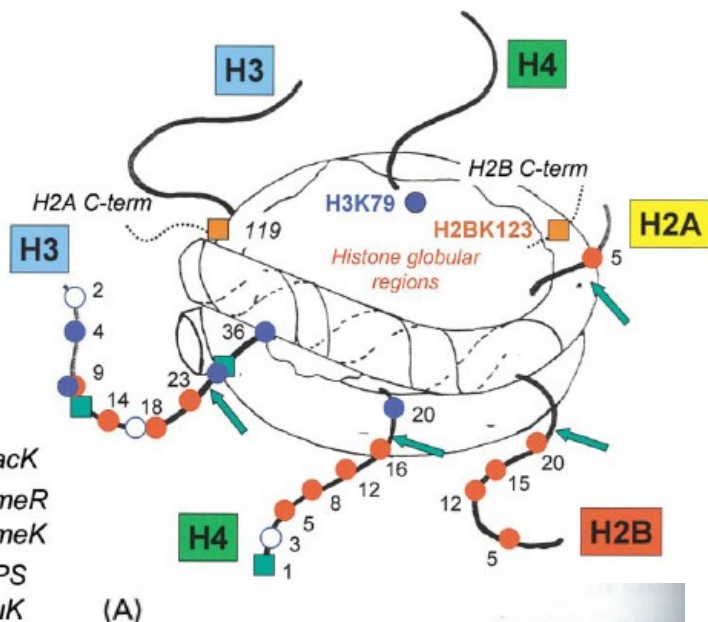


Modifikace histonů

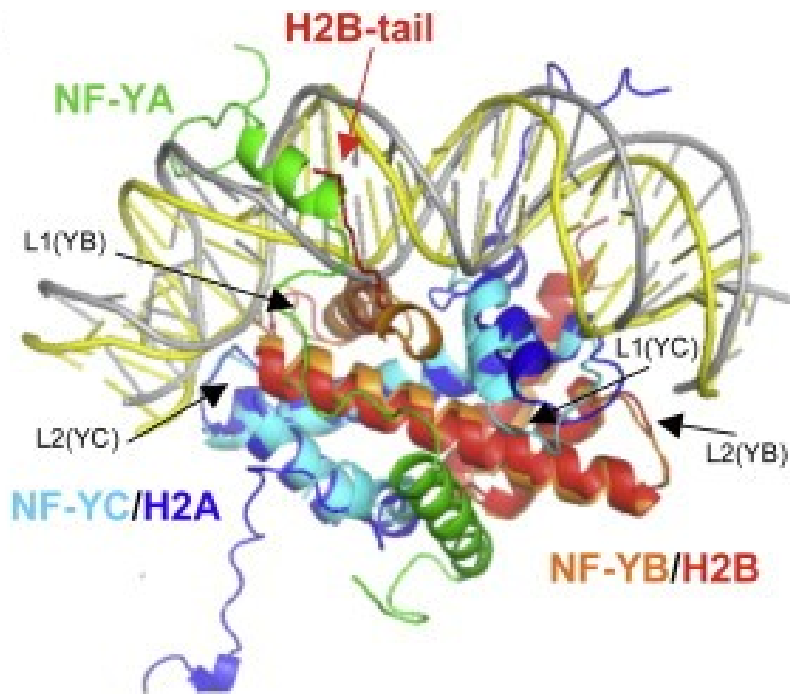
Acetylace rozvolňuje vazbu oktameru a zpřístupňuje sekvence DNA pro vazbu transkripčních faktorů – TFIIID se váže na Ac-H4 prostřednictvím bromodomén TAF1 proteinu



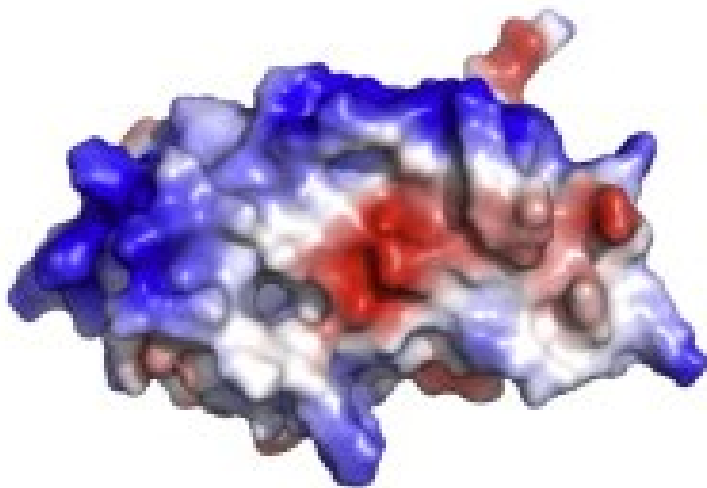
TAF1



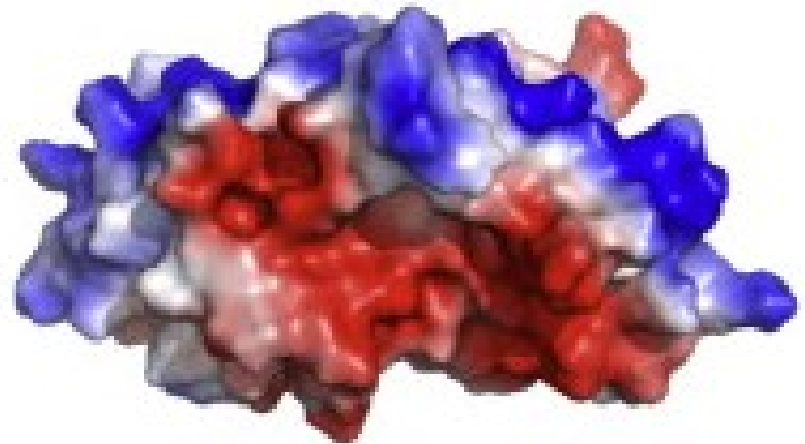
A



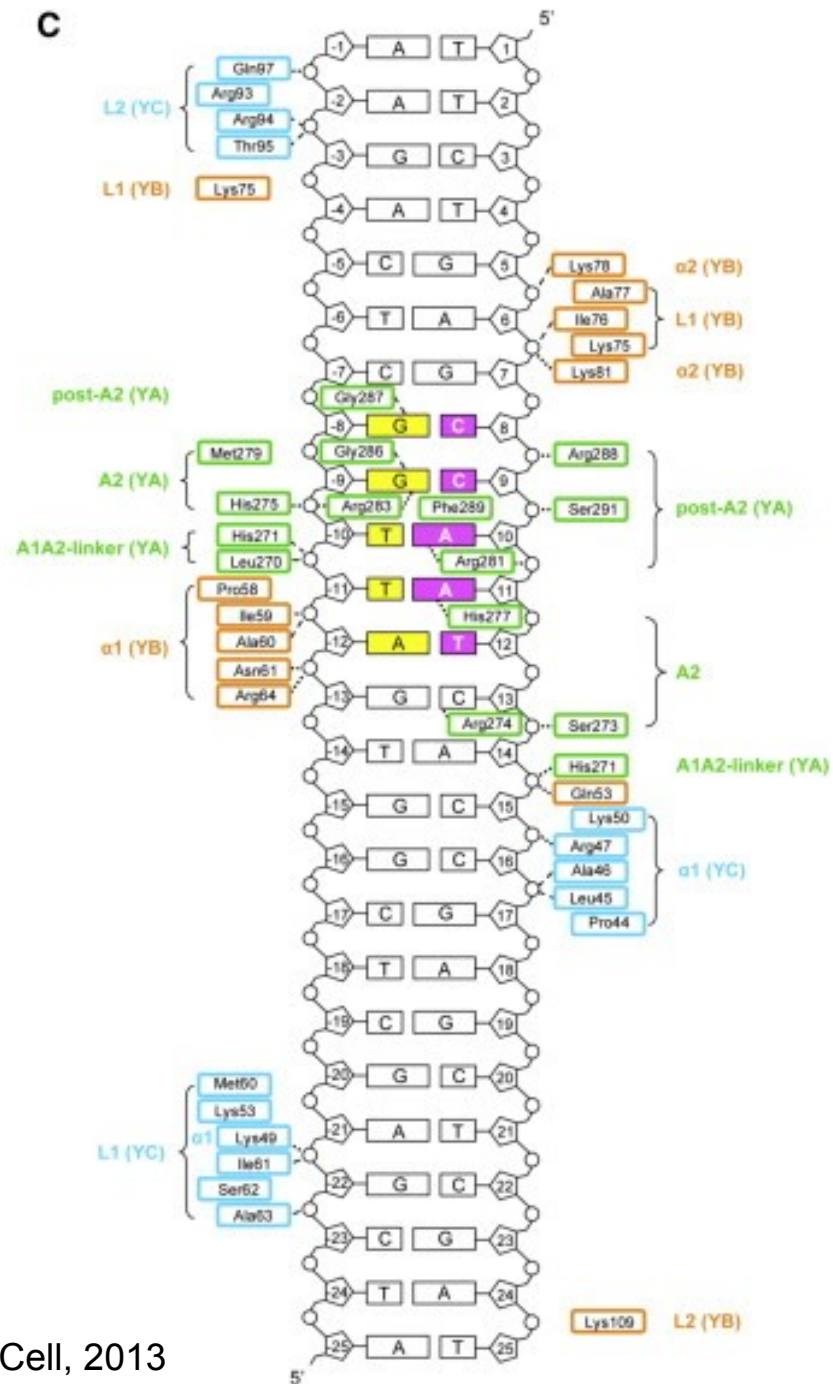
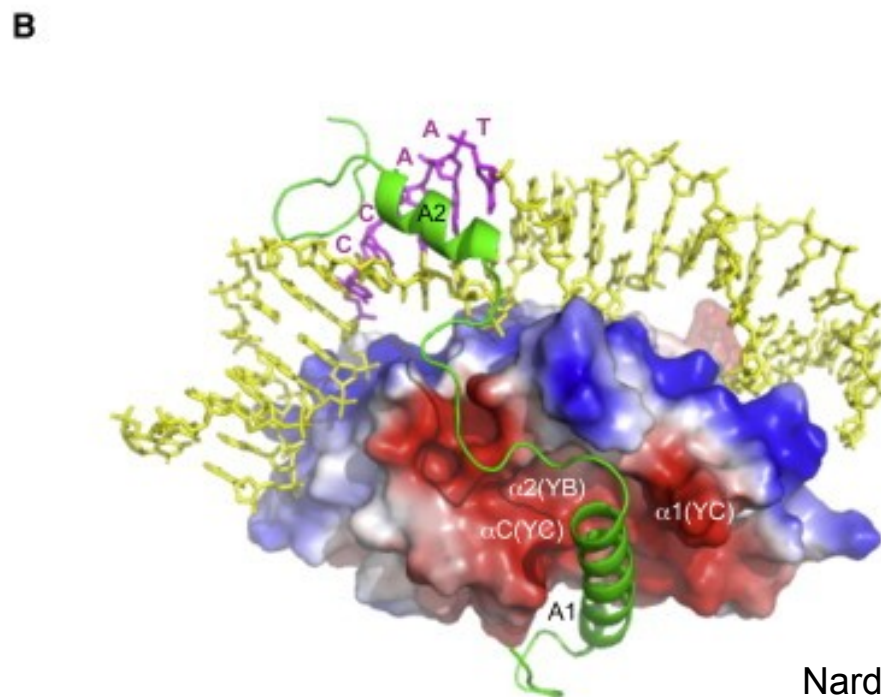
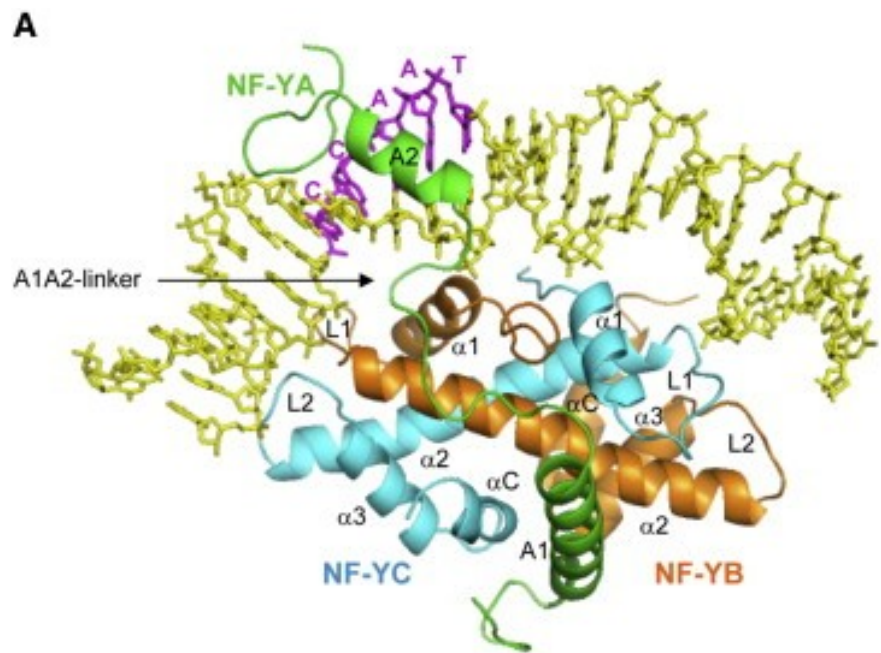
- Transkripční faktory NF-Y (podjednotky B a C) obsahují histon-fold a vážou se sekvenčně nespecificky na cukrfosfátovou kostru jako histony
- DNA se v důsledku vazby ohýbá podobně jako v nukleosomech
- NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -šroubovice (interkalace do MŽ)



H2B/H2A



NF-YB/NF-YC



CCAAT-box
Promoter

Inactive

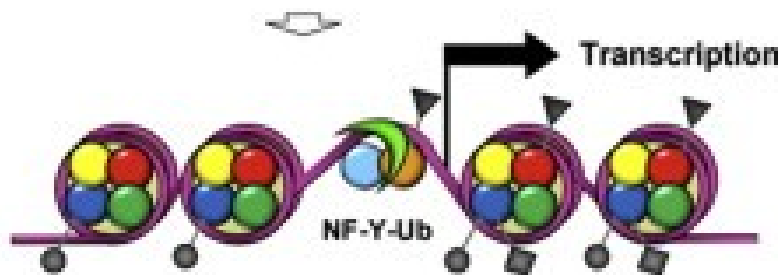
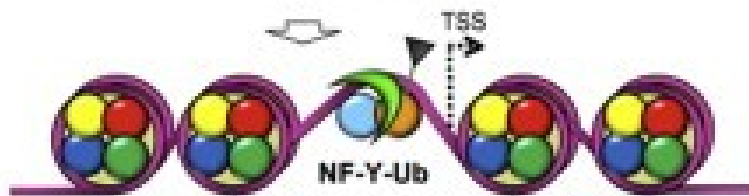


Poised



NF-Y / DNA complex

Active



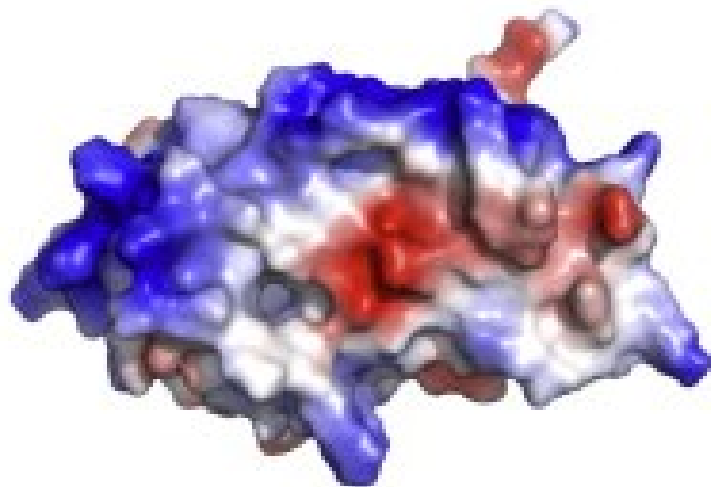
▼ MonoUb

● H3K4me3

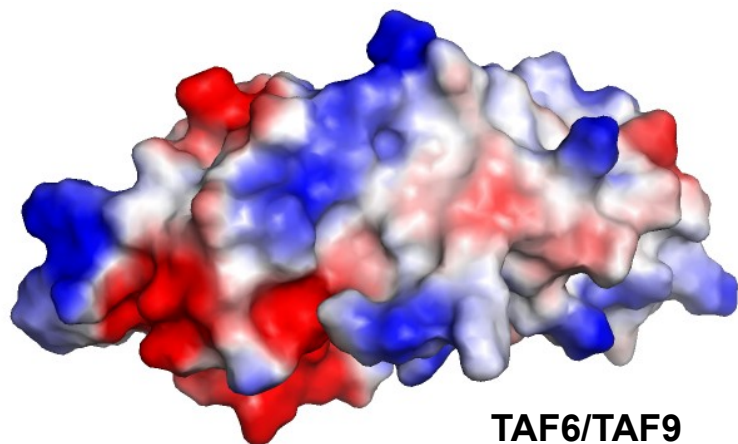
◆ H3K79me2

- NF-Y se váže přes histon-fold a nahrazuje nukleosom
- podobně jako ubiquitince histonu i ubiquitinace NF-Y aktivuje transkripci

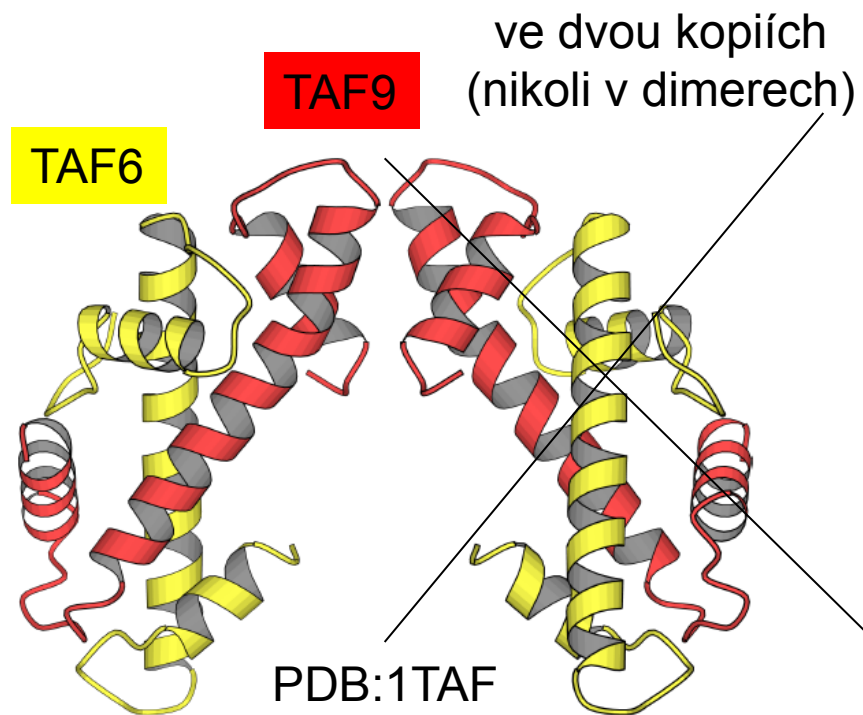
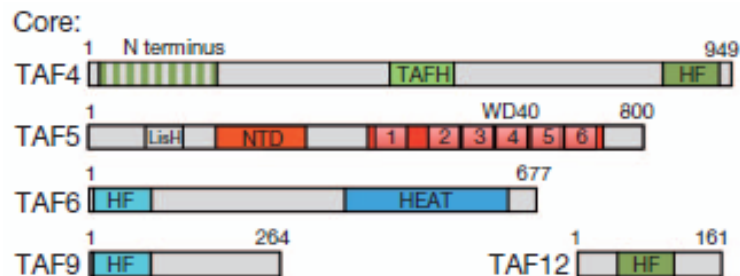
TBP-associated factors (9 z 13 podjednotek TFIID komplexu mají histon-fold, ale nevytváří oktamery)



H2B/H2A



TAF6/TAF9

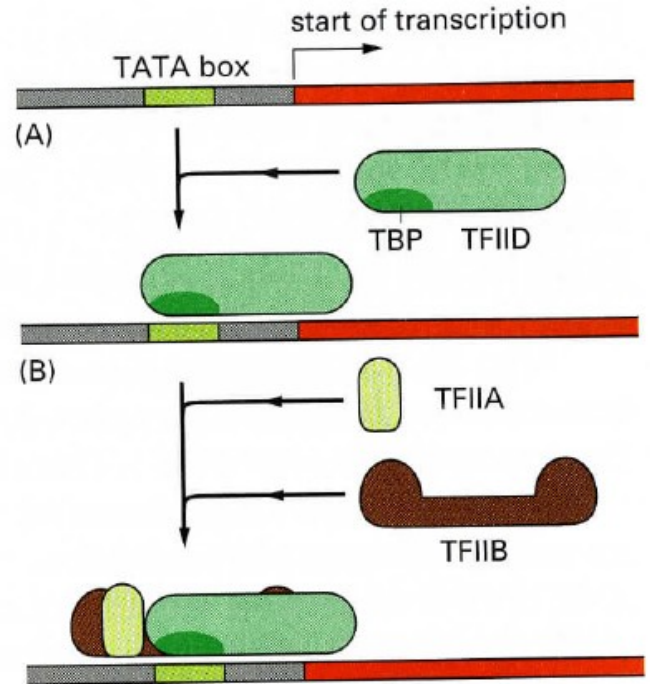
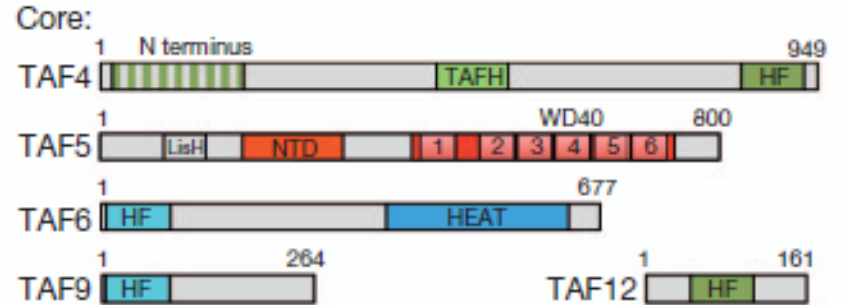
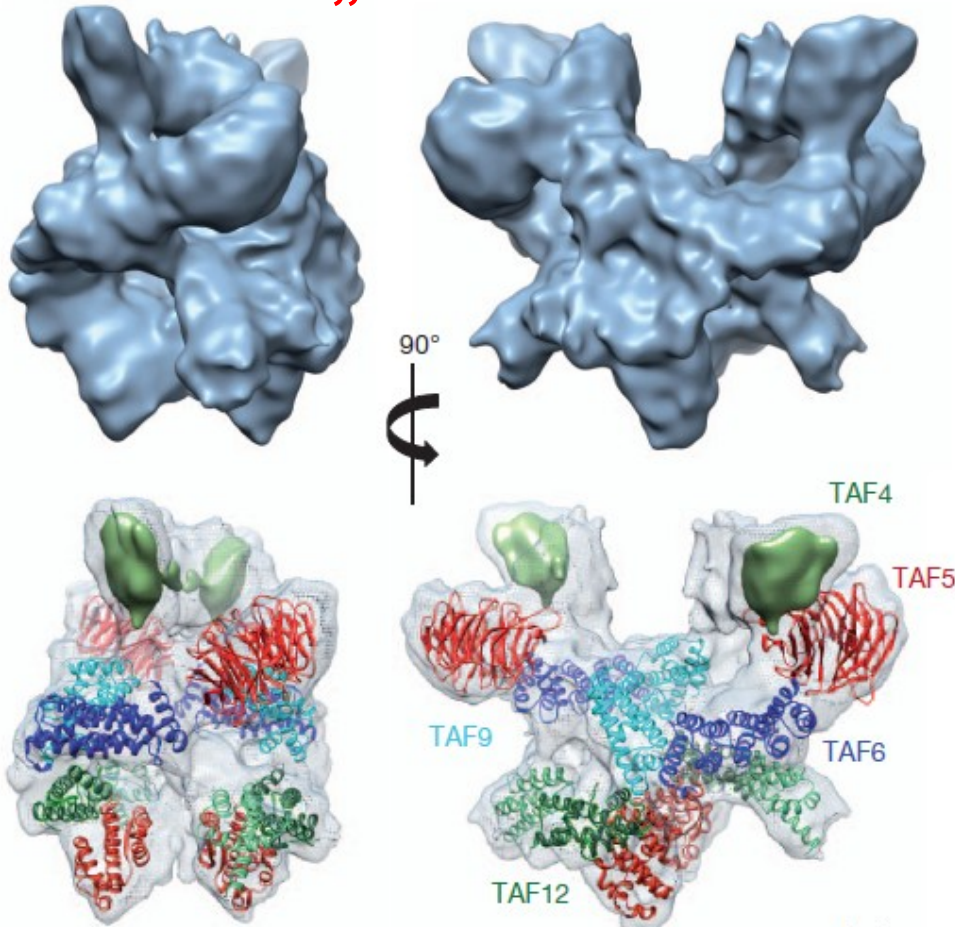


Histon-fold doména se neváže na DNA (podílí se C-konec)

Shao et al, MCB, 2005

- TAF4, 6, 9 a 12 obsahují histon-fold a jsou ve dvou kopiích (nikoli v dimerech) v „core“ části TFIID komplexu
- TFIID komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému

„core“



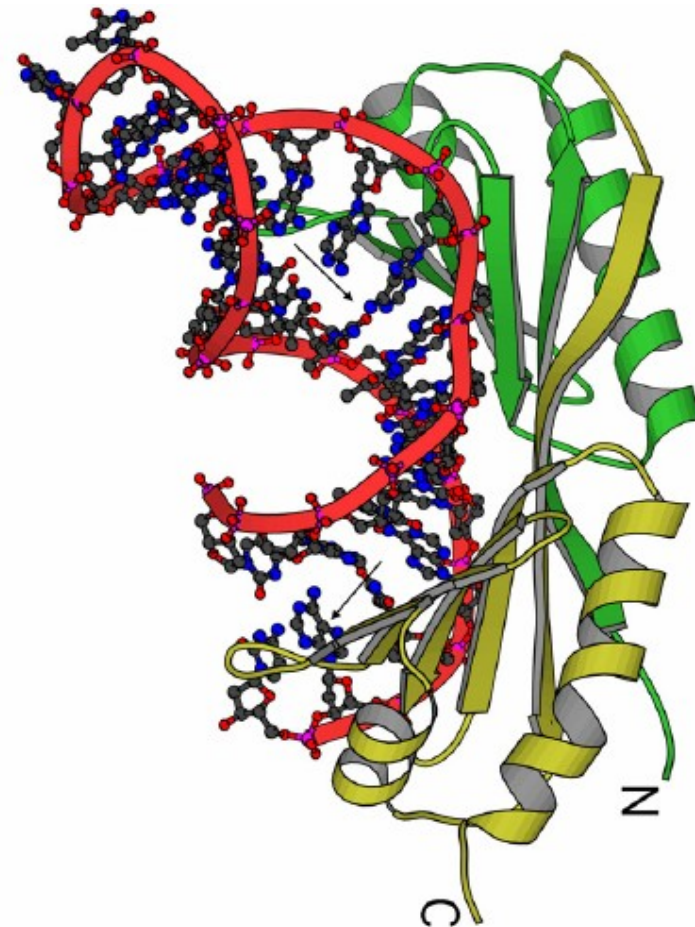
video

Motivy DNA vazebných domén

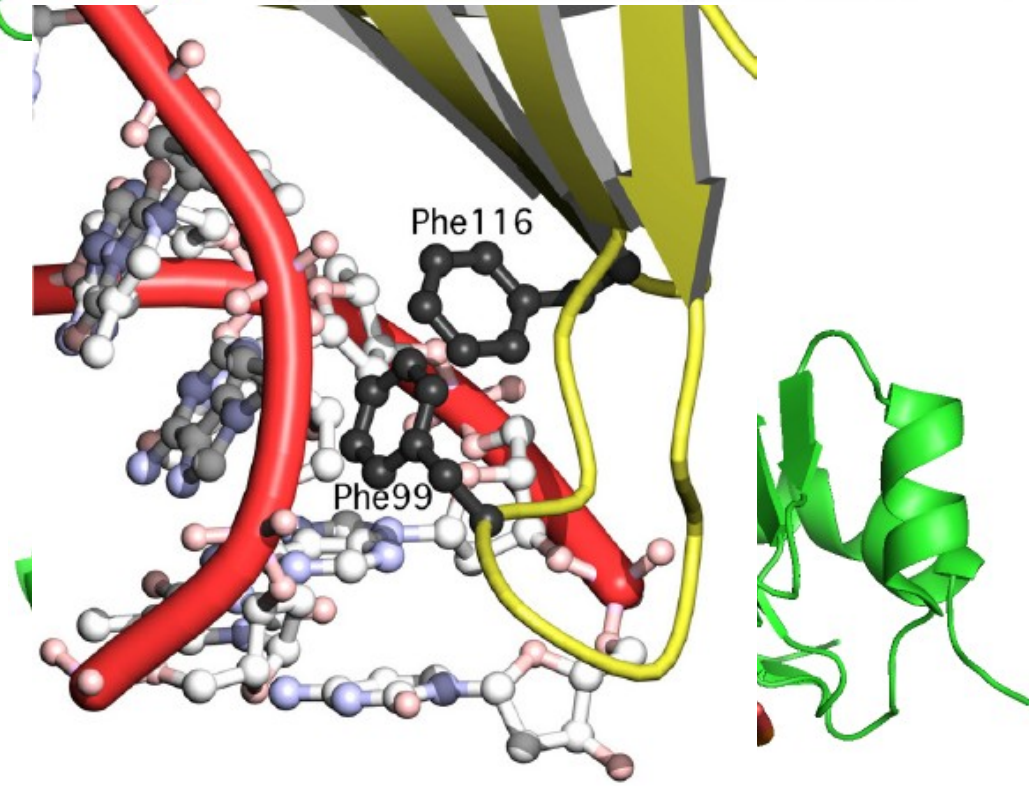
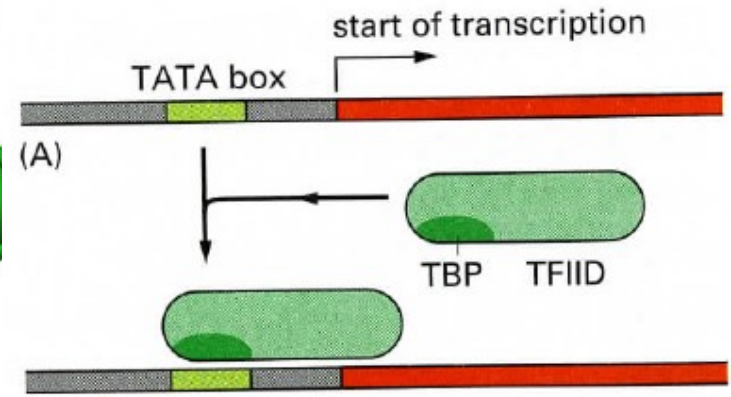
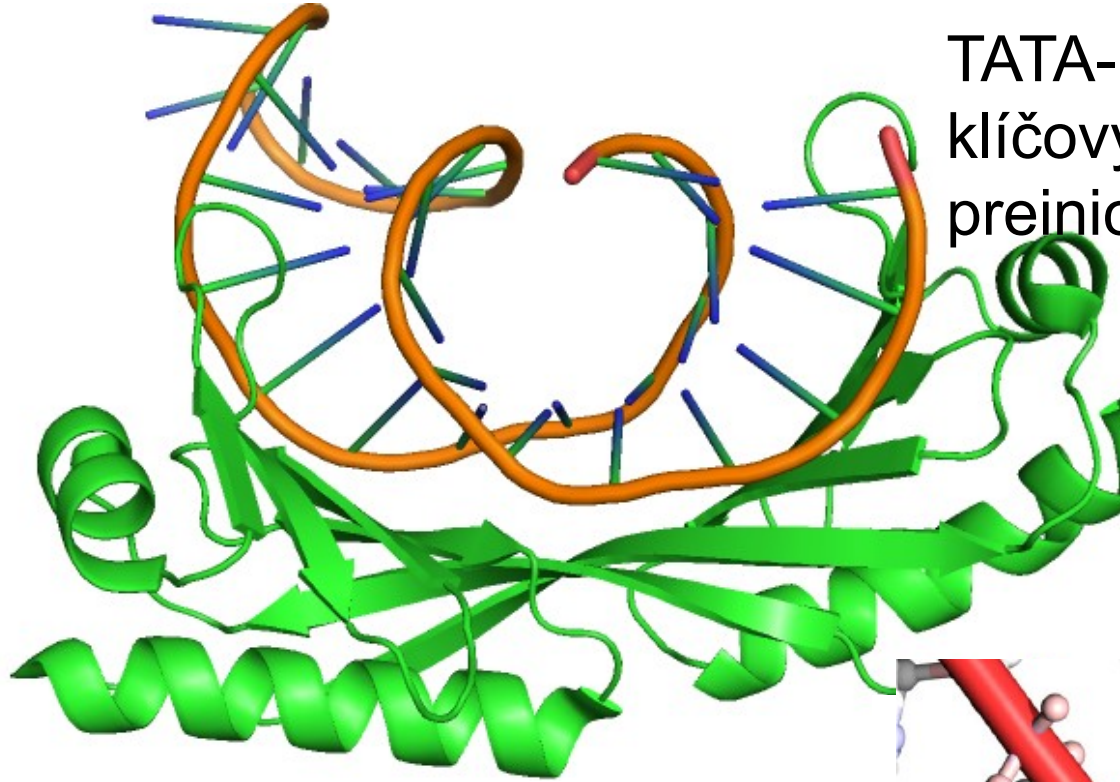
- **Zipper typ**
 - Leucinový zip
 - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
 - Winged helix
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix
 - Gal4
- **Histon, HMG-box**
- **β -sheet**
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy**

α -šroubovice

β -listy

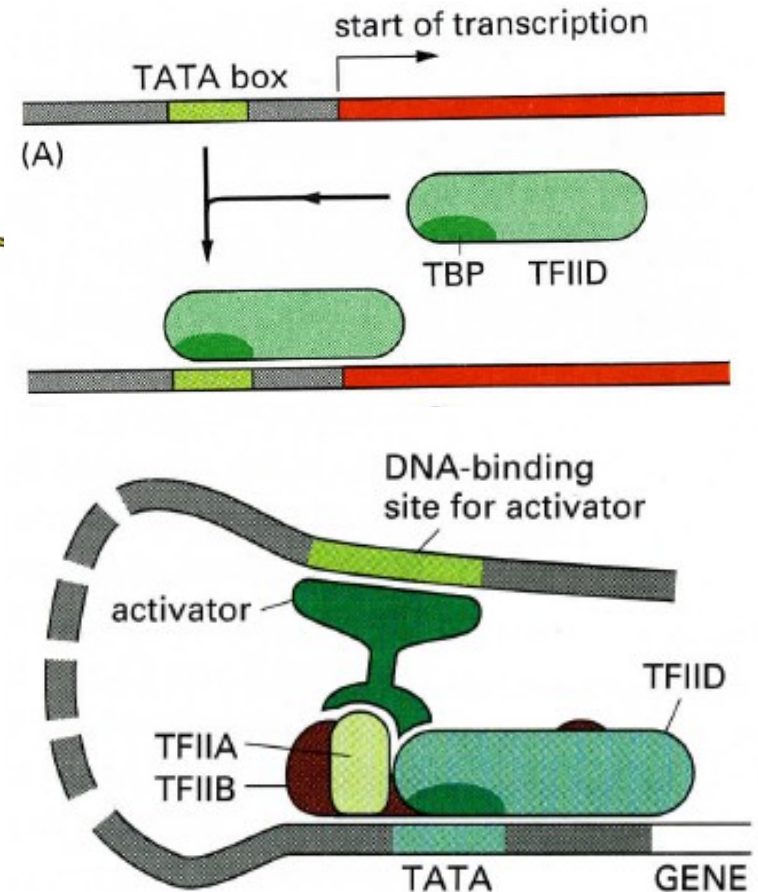
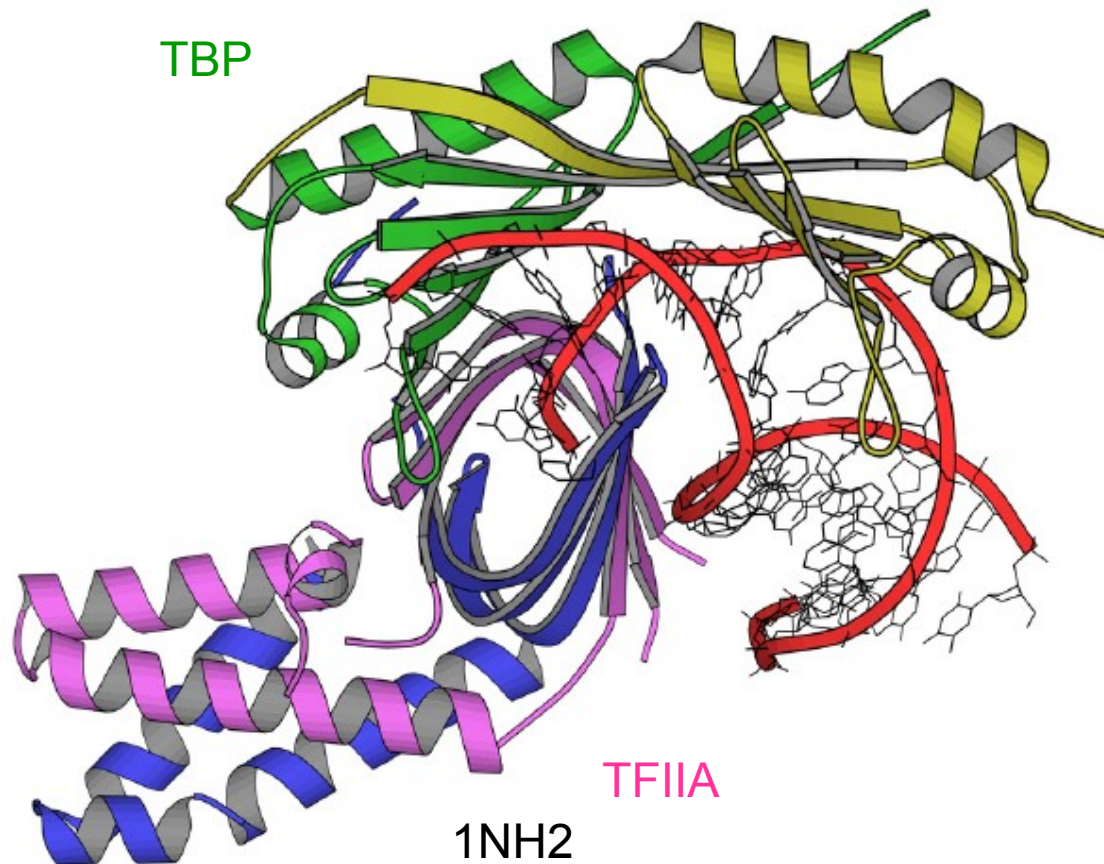


TATA-box vážící protein (TBP) – klíčový pro sestavení preiniciačního komplexu



- 10 anti-paralelních β -listů pokrývá MŽ
- Interkalují se postranní řetězce Phe (hydrofobní v.)
- vytváří **ohyb (kink)** a **rozplétá dsDNA**
- Konsensní sekvence: TATA(A/T)A(A/T)(A/G)

- TFIIA (2 podjednotky) komplex interaguje s TBP a DNA
- brání represorům v inhibici vazby TBP na TATA-box (koaktivátor některých sekvenčně specifických trans. faktorů) – není esenciální
- β -barrel váže DNA (neovlivňuje strukturu)



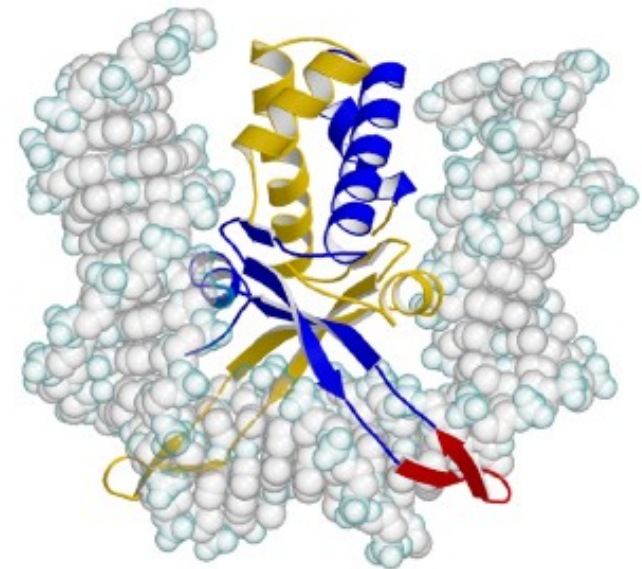
TBP ohýbá a rozplétá dsDNA



Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ**
 - Leucinový zip
 - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
 - Winged helix
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix
 - Gal4
- **Histon, HMG-box**
- **β -sheet**
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy**

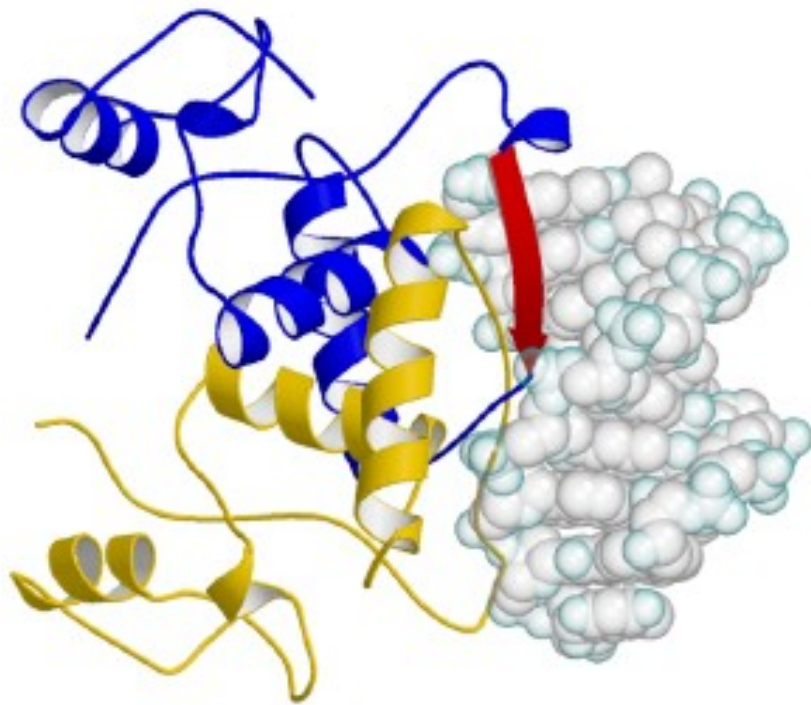
α -šroubovice



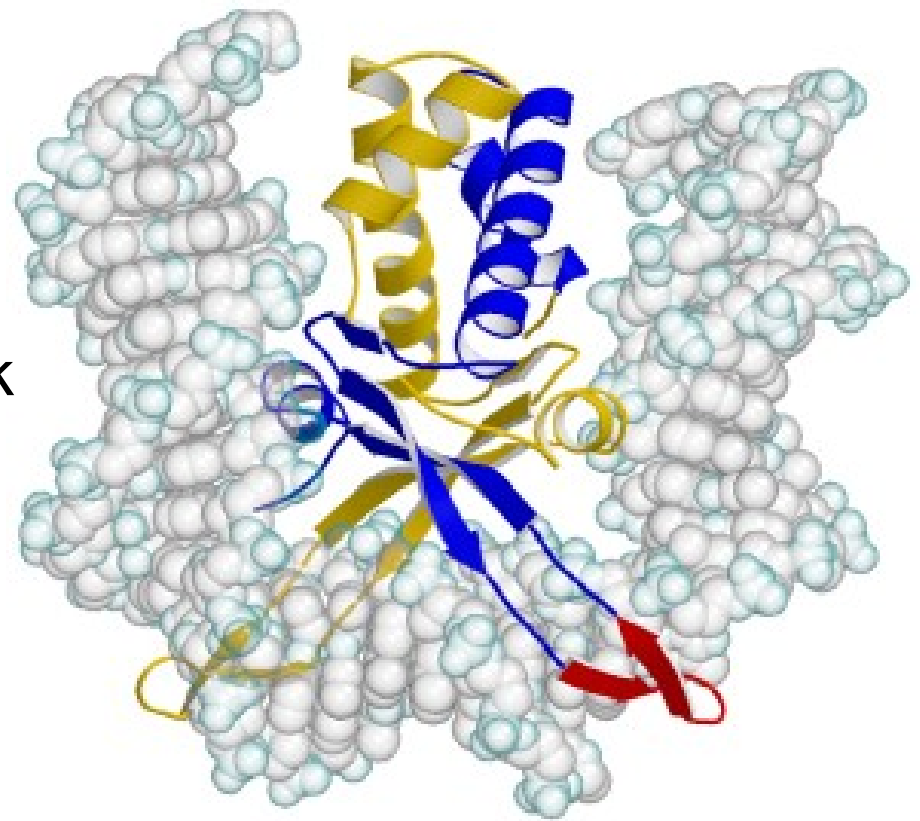
33. Integration host factor (1ihf)

β -listy

- pouze 2-3 β -listy nebo hairpin
- represory, chromosomální proteiny (lešení pro strukturu DNA)
- vážou velký nebo malý žlábek



31. Met repressor (1cma)



33. Integration host factor (1ihf)

- β -hairpins lokalizovány podél malého žlábků
- Inzerce Pro mezi baze a ohyb DNA

Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ**
 - Leucinový zip
 - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
 - Winged helix
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix
 - Gal4
- **Histon, HMG-box**
- **β -sheet**
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy**

α -šroubovice

β -listy

- Různé motivy – kombinace α -šroubovic, β -listů a smyček
- Obvykle DNA-rozpoznávací doména („čte“ DNA), katalytická doména (enzymová aktivita) a dimerizační doména
- Často je DNA proteinem deformována
- např. restriktázy rozeznávají 4-8 bp

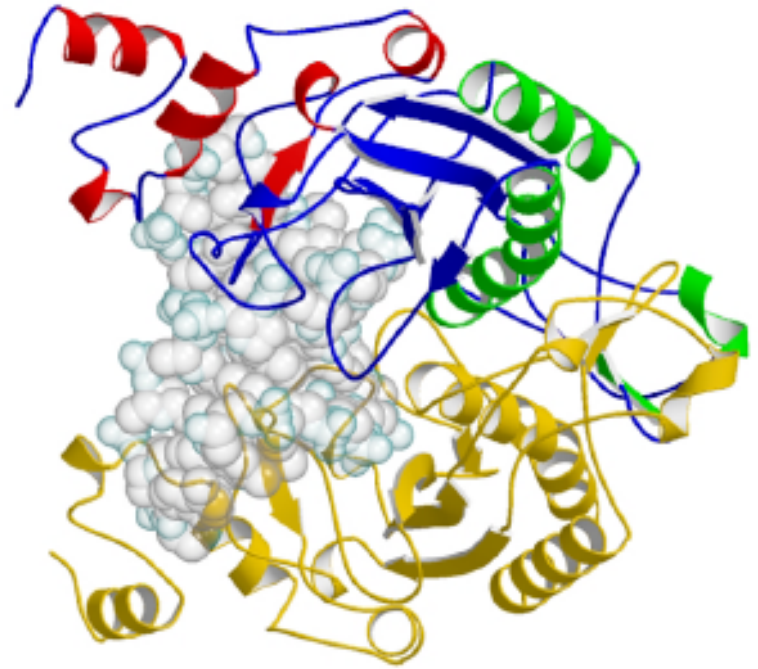
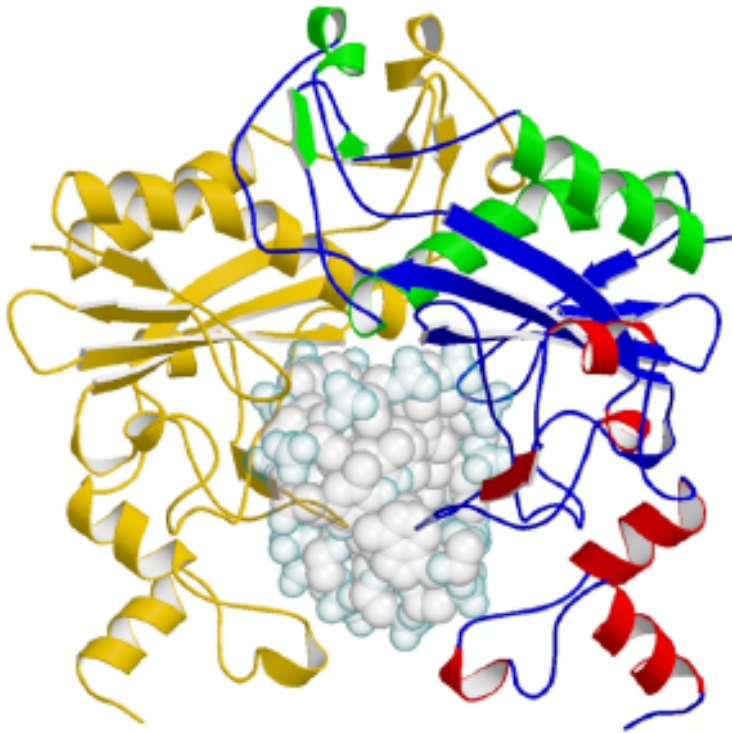


Table 1: Description of protein features classes and types

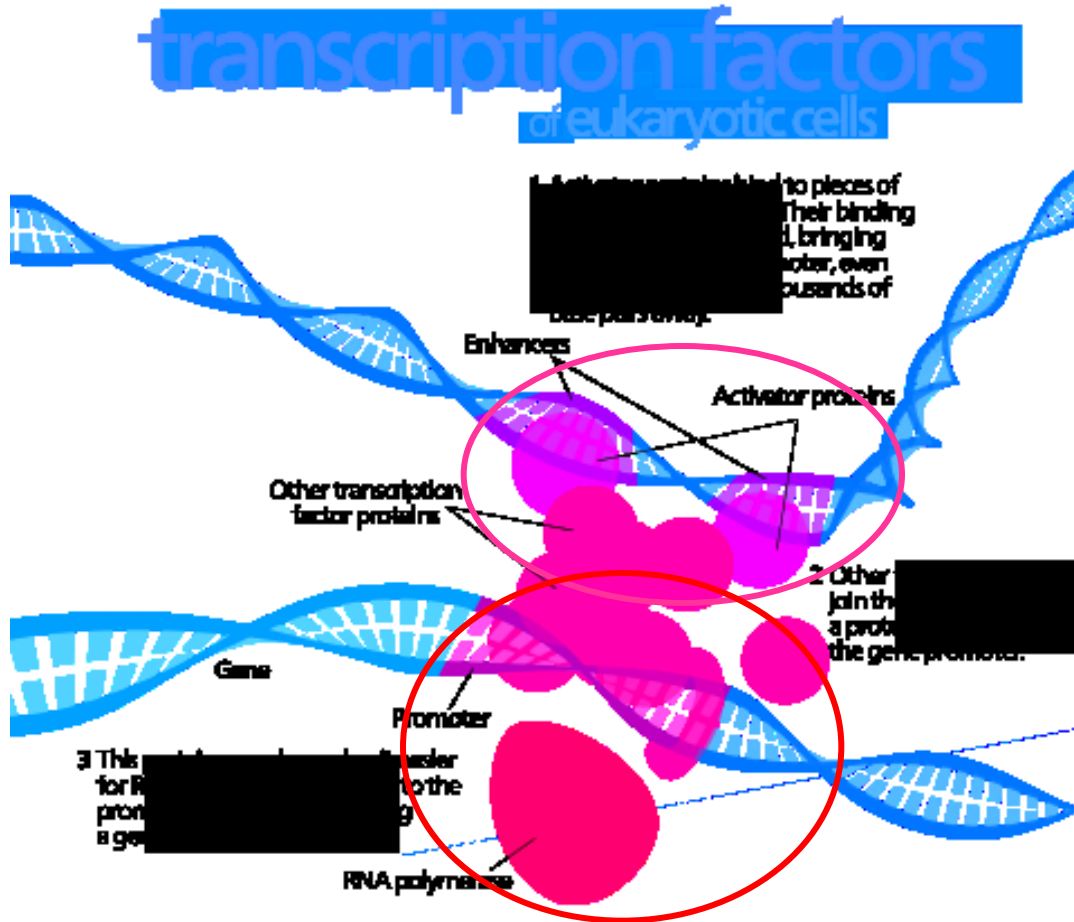
Class	Type	Description
Enzyme	Dioxygenase	Enzyme that repairs DNA base lesions by using a direct oxidative dealkylation mechanism [25].
	Endonuclease	Restriction enzyme that cleaves DNA at specific sites [26].
	Excisionase	Enzyme that controls integrase-mediated DNA rearrangement [27].
	Glucosyltransferase	Enzyme that binds DNA in abasic site and flips it. Glucosylation is on a 5-hydroxymethylcytosine in duplex DNA using UDP-glucose [28].
	Glycosylase	Enzyme involved in base excision repair, a mechanism by which, damaged nucleotides in DNA are removed and replaced. It catalyses the first step in the process [29].
	Helicase	Enzyme that unwinds double helices using ATP hydrolysis [30].
	Ligase	Enzyme that recognizes nicks and states for strand closure [31].
	Methyltransferase	Enzyme responsible for the generation of the genome methylation patterns leading to gene silencing [32].
	Nuclease	Enzyme that cleaves DNA, but that are not classified as Endonuclease.
	Photolyase	Enzyme that uses light to repair DNA having UV-induced lesions [33].
	Polymerase	Enzyme that takes nucleotides from solvent, and catalyses the synthesis of a polynucleotide sequence against a nucleotide template strand using base-pairing interactions [34].
	Recombinase	Enzyme that catalyses the reciprocal exchange of DNA strands in the direct site-specific DNA recombination process [35].
	Topoisomerase	Enzyme that promotes the relaxation of DNA superhelical lesions by introducing a transient single stranded break in duplex DNA [36].
	Translocase	Enzyme that segregates dimeric circular chromosomes, formed by recombination of monomer sisters [37].
Transposase	Enzyme that mediates transposition, a process whereby defined DNA segments move freely about the genome [38].	

Helikásy rozplétají dsDNA řetězce – nutné pro **replikaci** (MCM2-7), **transkripci** (XPB) **rekombinaci** (WRN, BLM, FANCM)

Komplexy spojené s transkripcí

DNA-vazebné motivy specifických transkripčr (sekvenčně specifické – α -šroubovice ve VŽ)

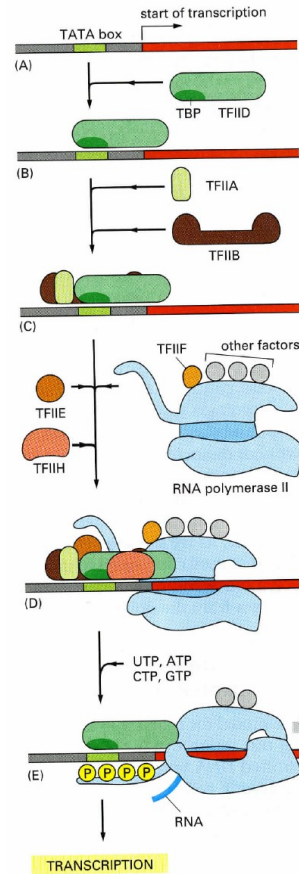
Obecné TFII komplexy a proces transkripce



- **Zipper typ**
 - Leucinový zip (**GCN4**)
 - Helix-loop-helix (**MyoD**)
- **Helix-turn-helix** (**mat α 2**)
 - Winged helix (**TFIIE+F, H1**)
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger (**CTCF**)
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix (**p53**)
 - Gal4 (**Gal4**)
- **Histon, HMG-box** (**H2A-4 NB-Y, TFIID**)
- **β -sheet** (**TBP, TFIIA**)
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy** (XPB helikása)

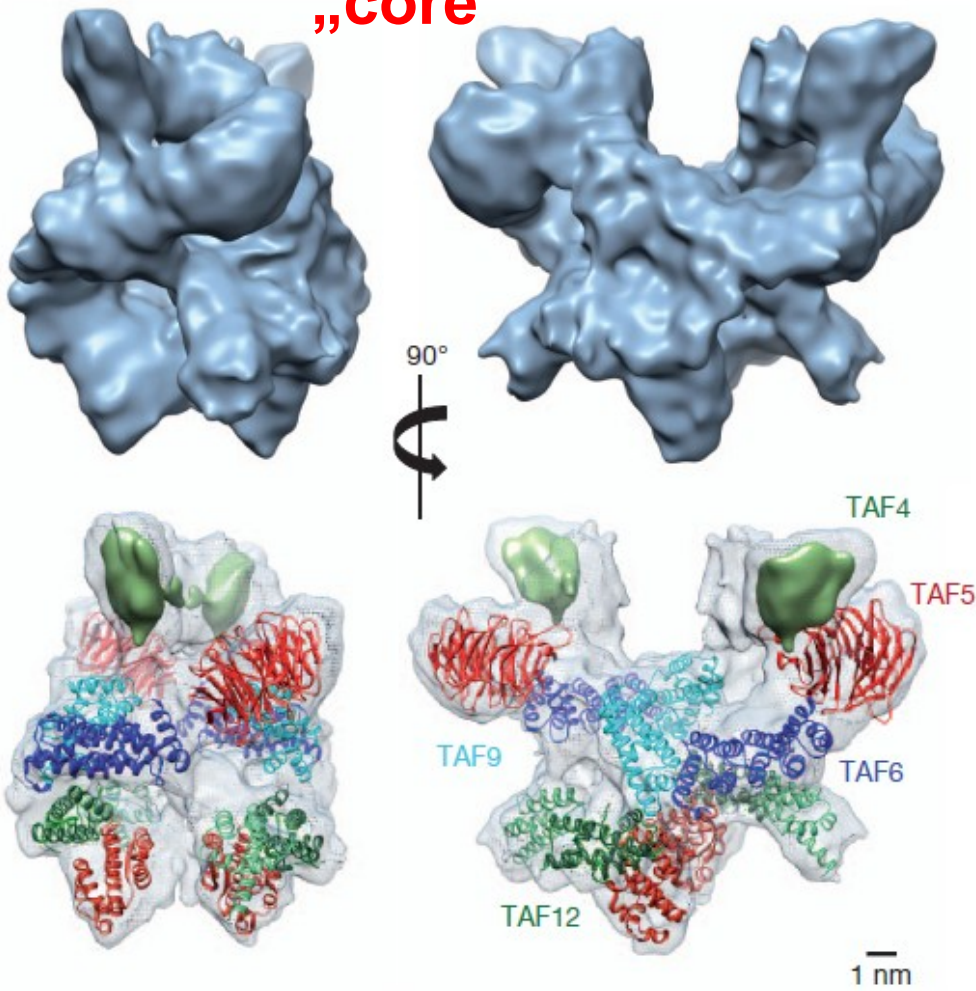
TABLE 1 Components of the human general transcription machinery

Factor	Protein composition	Function
TFIIA	p35 (α), p19 (β), and p12 (γ)	Antirepressor; stabilizes TBP-TATA complex; coactivator
TFIIB	p33	Start site selection; stabilize TBP-TATA complex; pol II/TFIIF recruitment
TFIID	TBP + TAFs (TAF1-TAF14)	Core promoter-binding factor Coactivator Protein kinase Ubiquitin-activating/conjugating activity Histone acetyltransferase
TFIIE	p56 (α) and p34 (β)	Recruits TFIIH Facilitates formation of an initiation-competent pol II Involved in promoter clearance
TFIIF	RAP30 and RAP74	Binds pol II and facilitates pol II recruitment to the promoter Recruits TFIIE and TFIIH Functions with TFIIB and pol II in start site selection Facilitates pol II promoter escape Enhances the efficiency of pol II elongation
TFIIH	P89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cyclin H, p34, p32/MAT1, and p8/TFB5	ATPase activity for transcription initiation and promoter clearance Helicase activity for promoter opening Transcription-coupled nucleotide excision repair Kinase activity for phosphorylating pol II CTD E3 ubiquitin ligase activity
pol II	RPB1-RPB12	Transcription initiation, elongation, termination Recruitment of mRNA capping enzymes Transcription-coupled recruitment of splicing and 3' end processing factors CTD phosphorylation, glycosylation, and ubiquitination

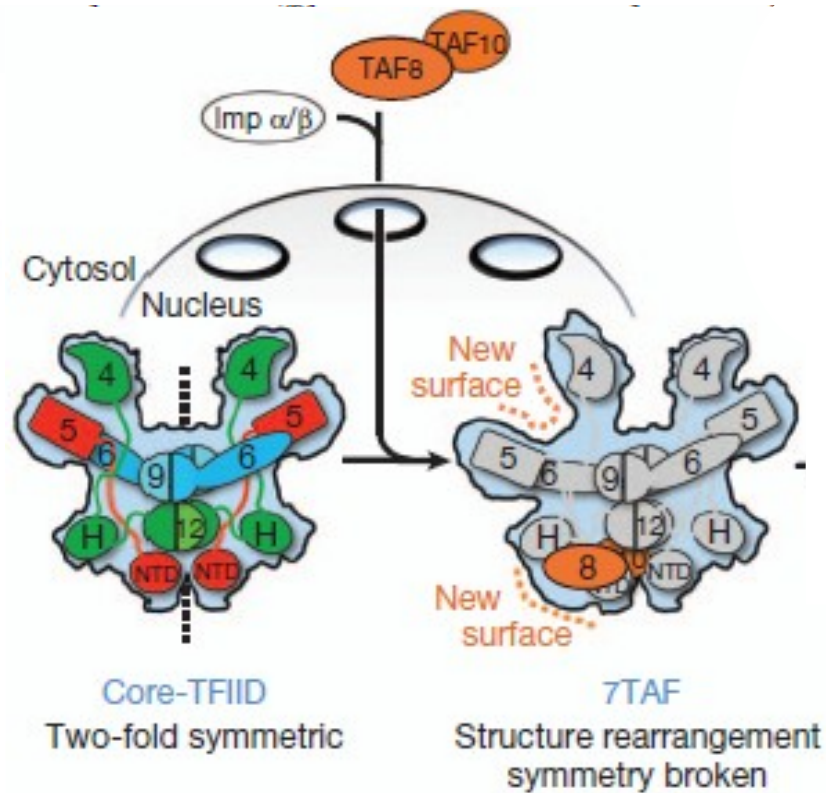


- TFIID komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému

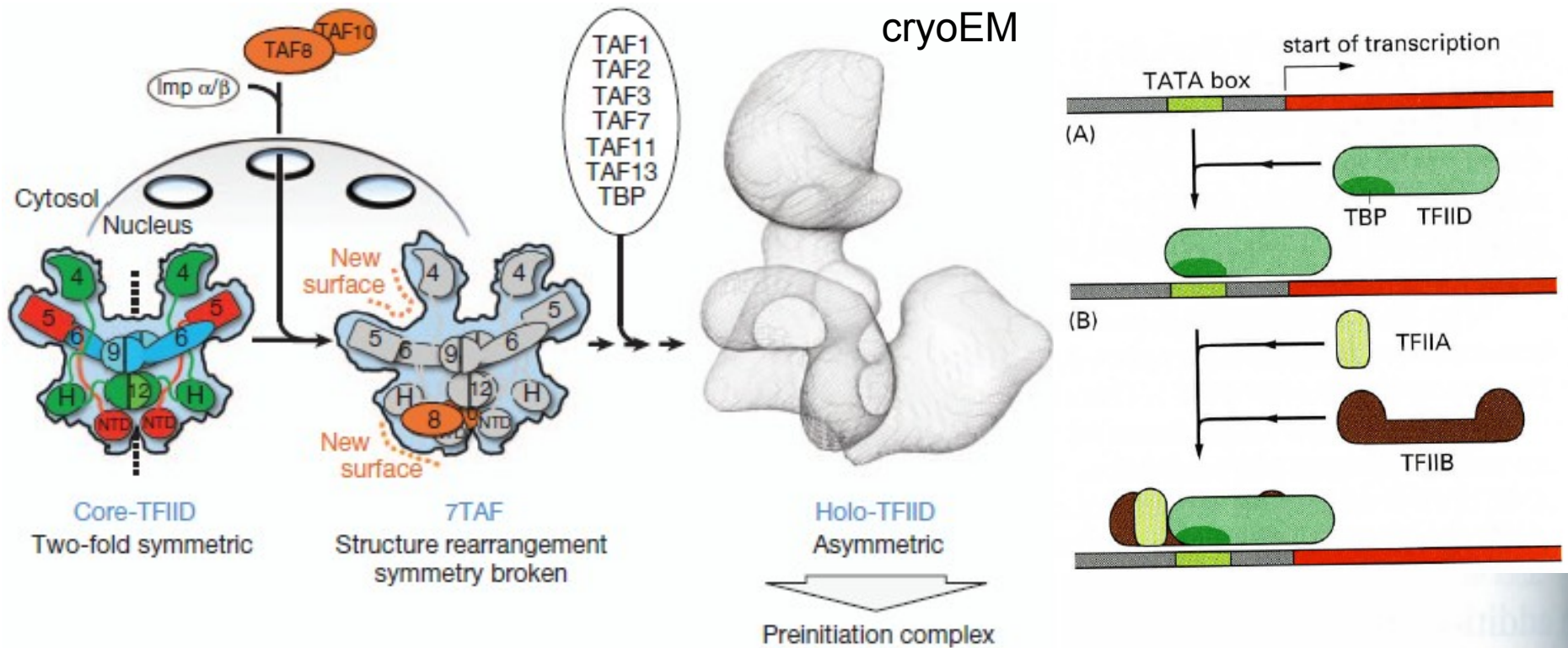
„core“



Připojením TAF8+9 na „core“ část dochází ke konformační změně a vzniku asymetrického komplexu

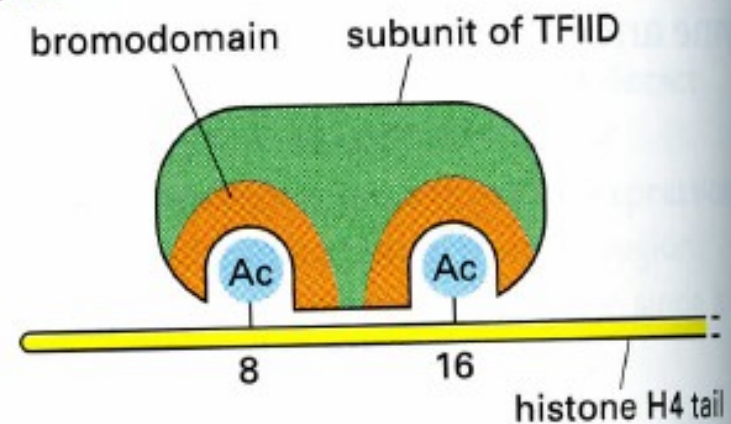


- TFIID komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému

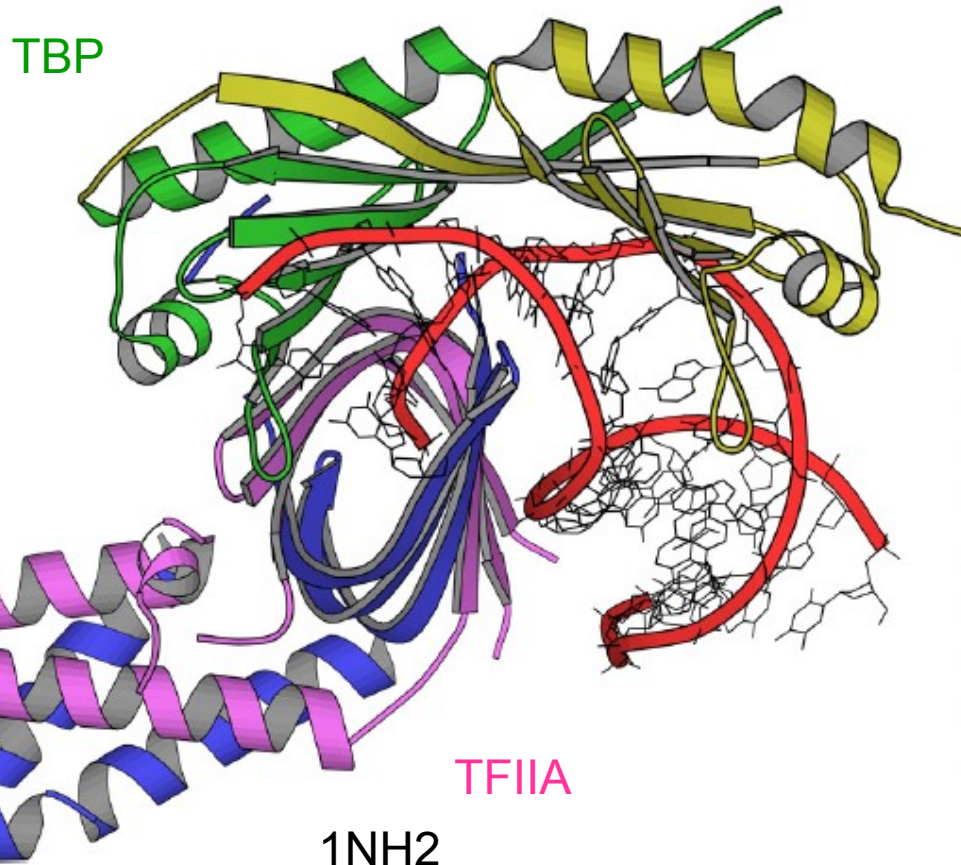


- Po připojení zbývajících podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční holokomplex – TBP se váže na TATA-box ... TAF1 se váže na Ac-H4

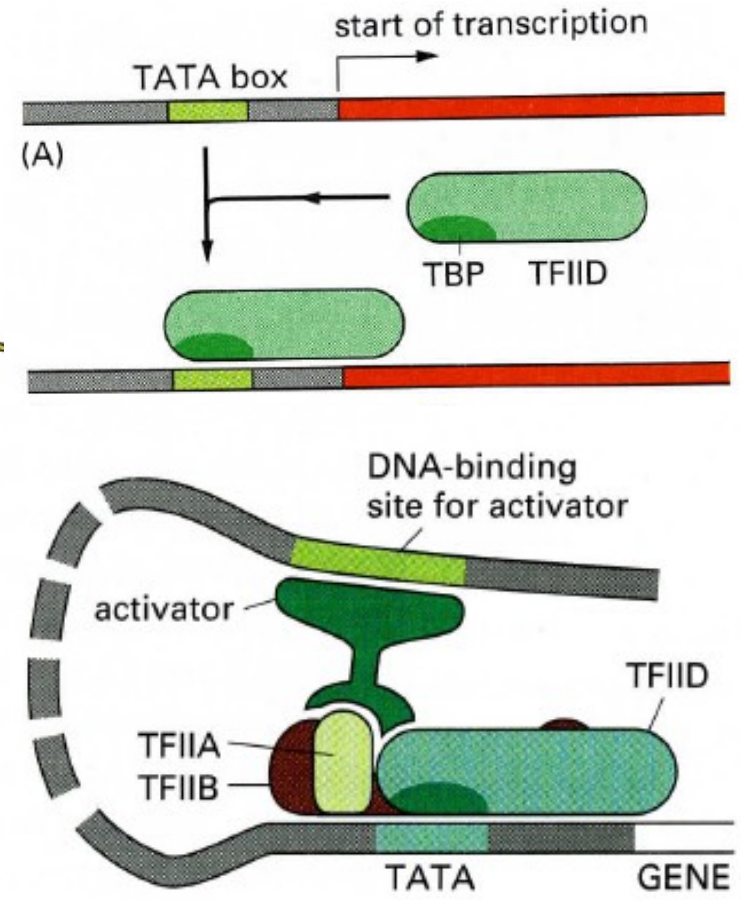
Bieniossek et al., Nature, 2013



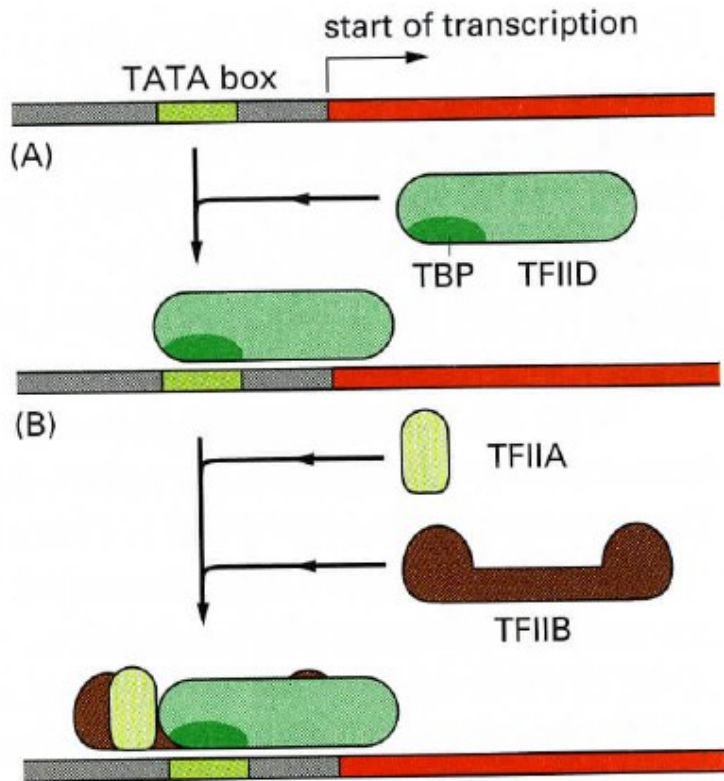
- TFIIA (2 podjednotky) komplex interaguje s TBP a DNA
- brání represorům v inhibici vazby TBP na TATA-box (**ko-aktivátor** některých sekvenčně specifických trans. faktorů)
- β -barrel váže DNA (neovlivňuje strukturu)



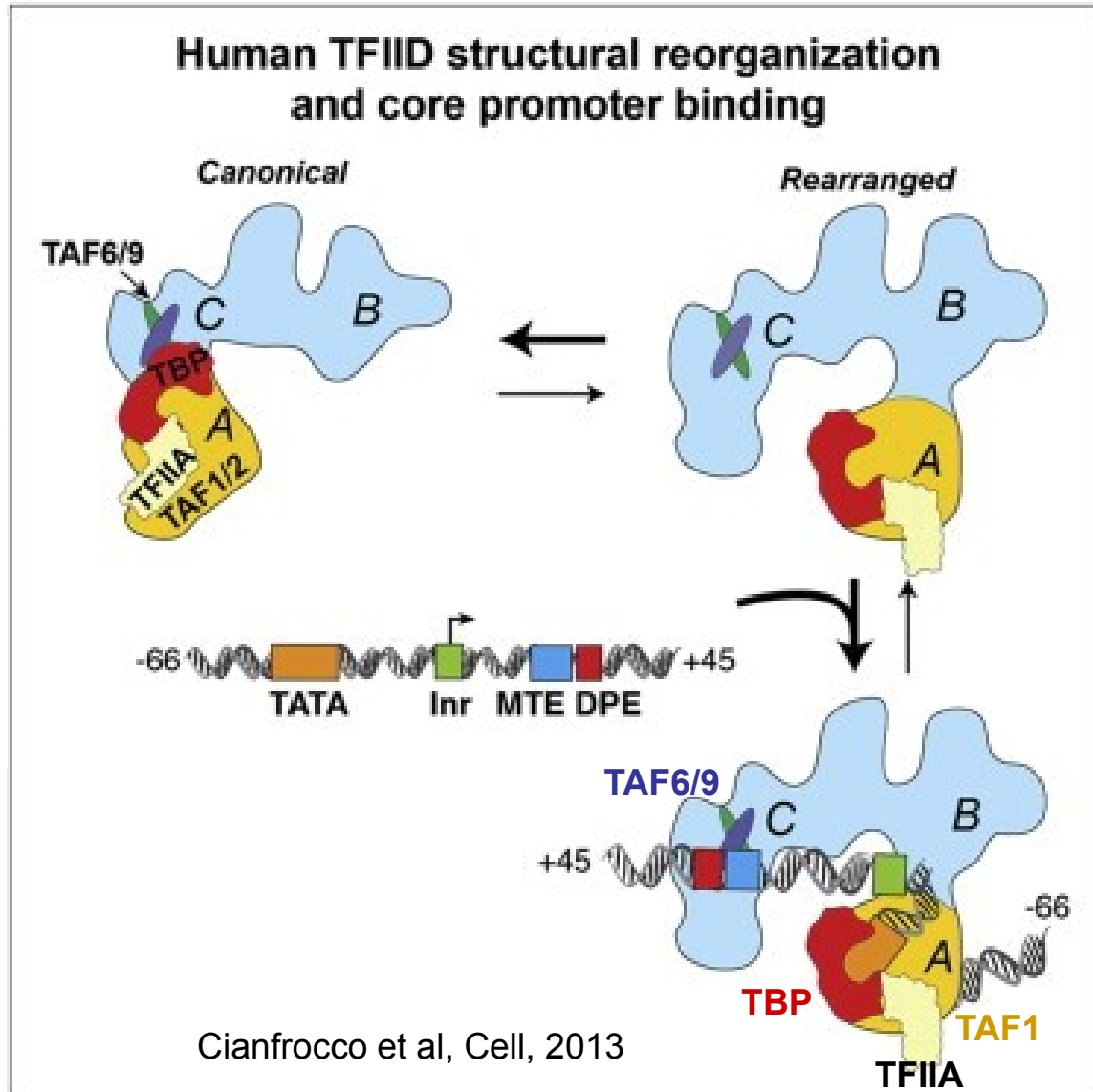
Bleichenbacher et al, JMB, 2003



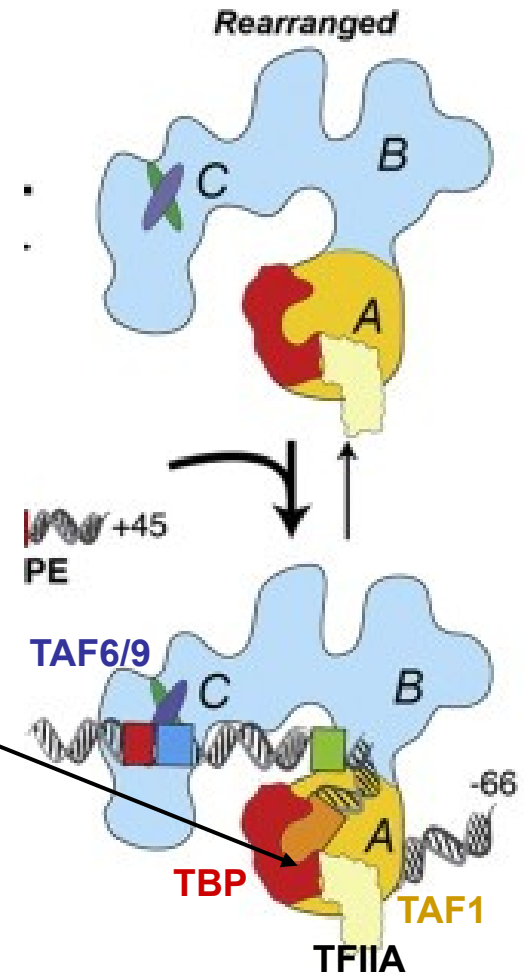
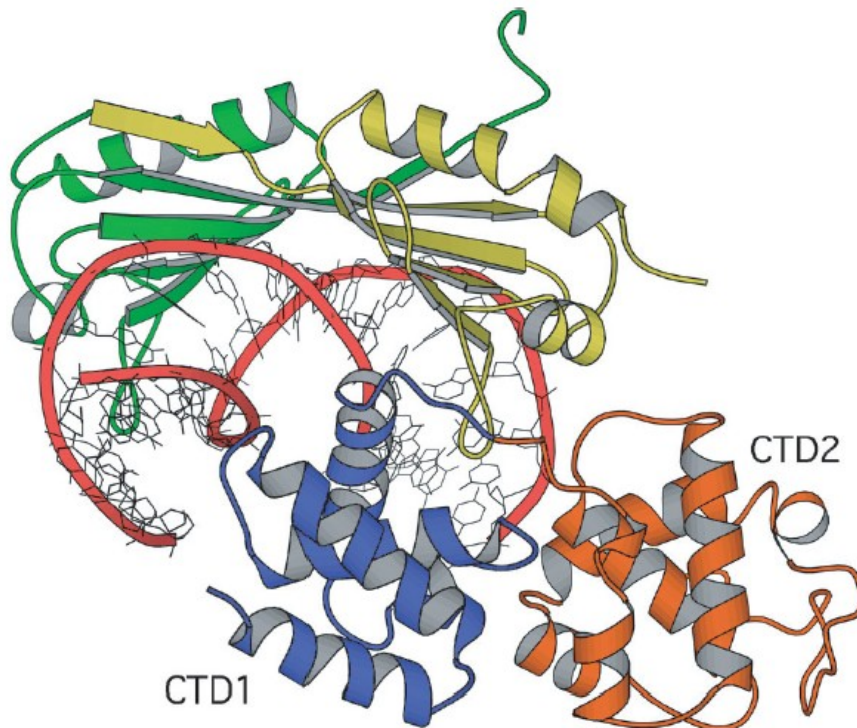
- Footprint analýza – ukázala jak se TFIIA-TFIID-TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)
- cryoEM ukázaly, že dochází k reorganizaci TFIID



TFIIB je klíčový pro další postup transkripce – propojuje TFIID-TFIIA s RNA pol II



- TFIIB (C-konec) váže TBP a 6-7bp up- a downstream od ohybu DNA přes cukrfosfátovou kostru (kolem TATA boxu)

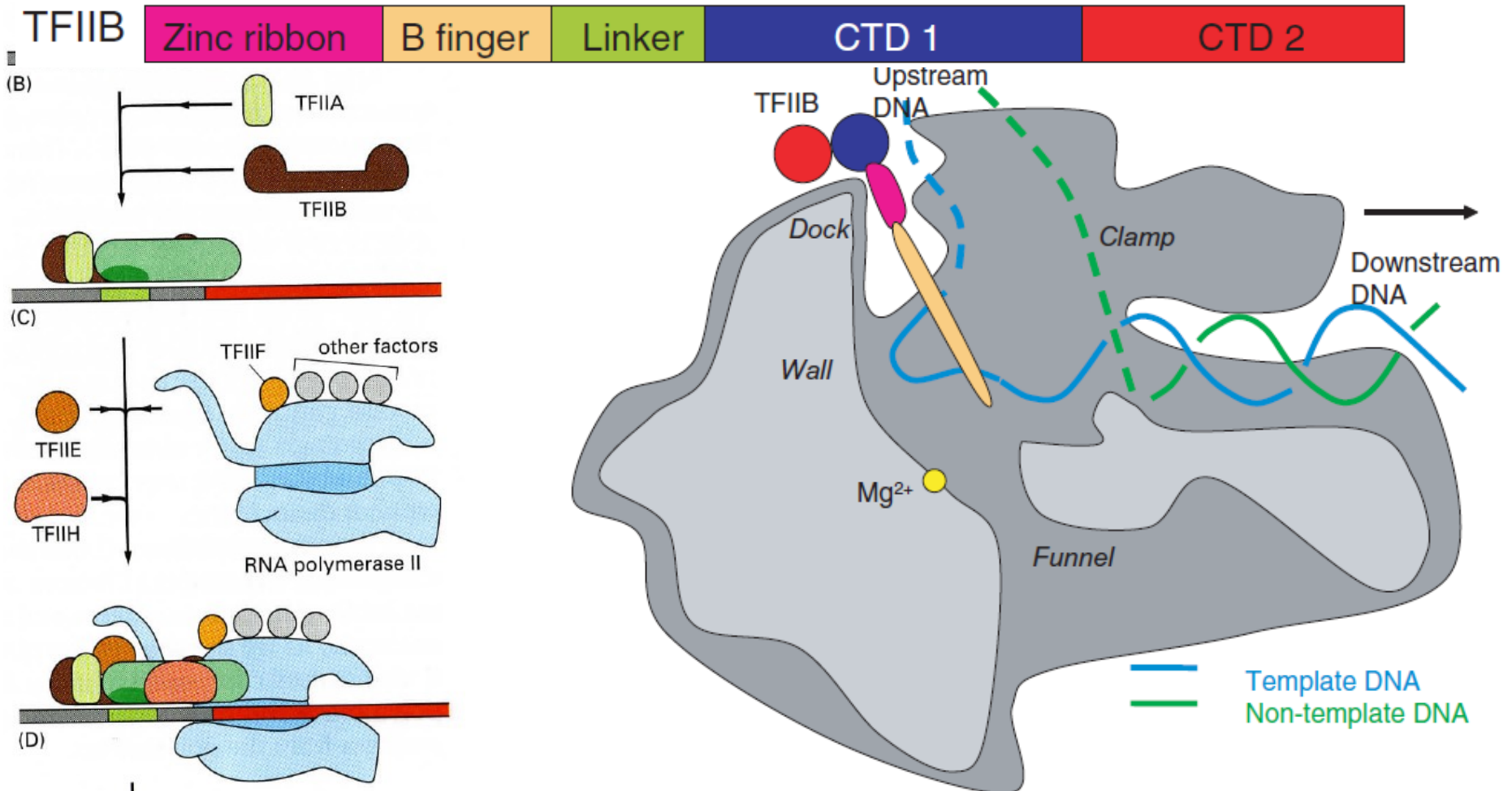


1VOL

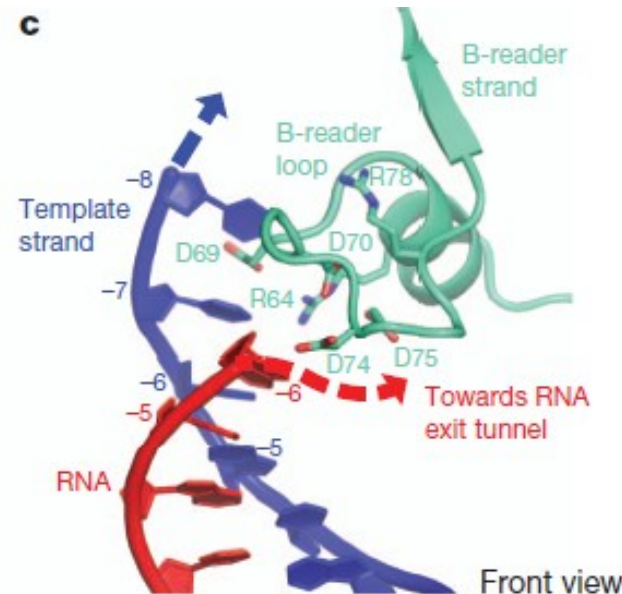
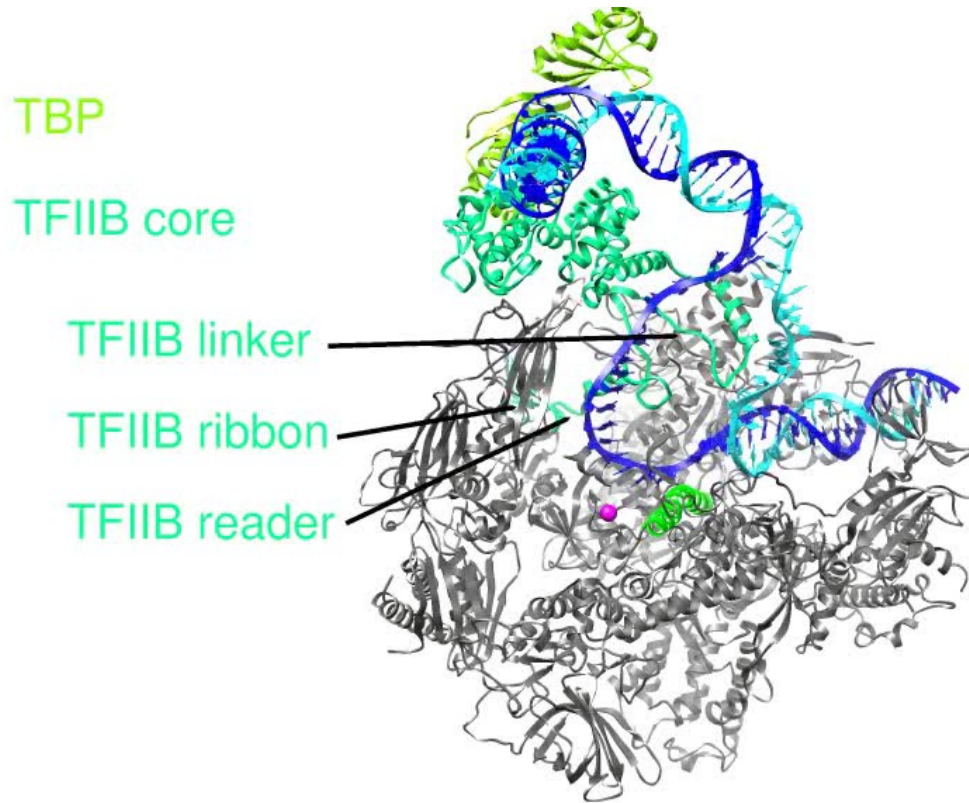
Nikolov et al, Nature, 1995

TFIIB stéricky nevádí TFIIA
(viz později)

- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje TFIID-TFIIA-DNA komplex na pol II (do jeho aktivního centra/cleft)
- B-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp

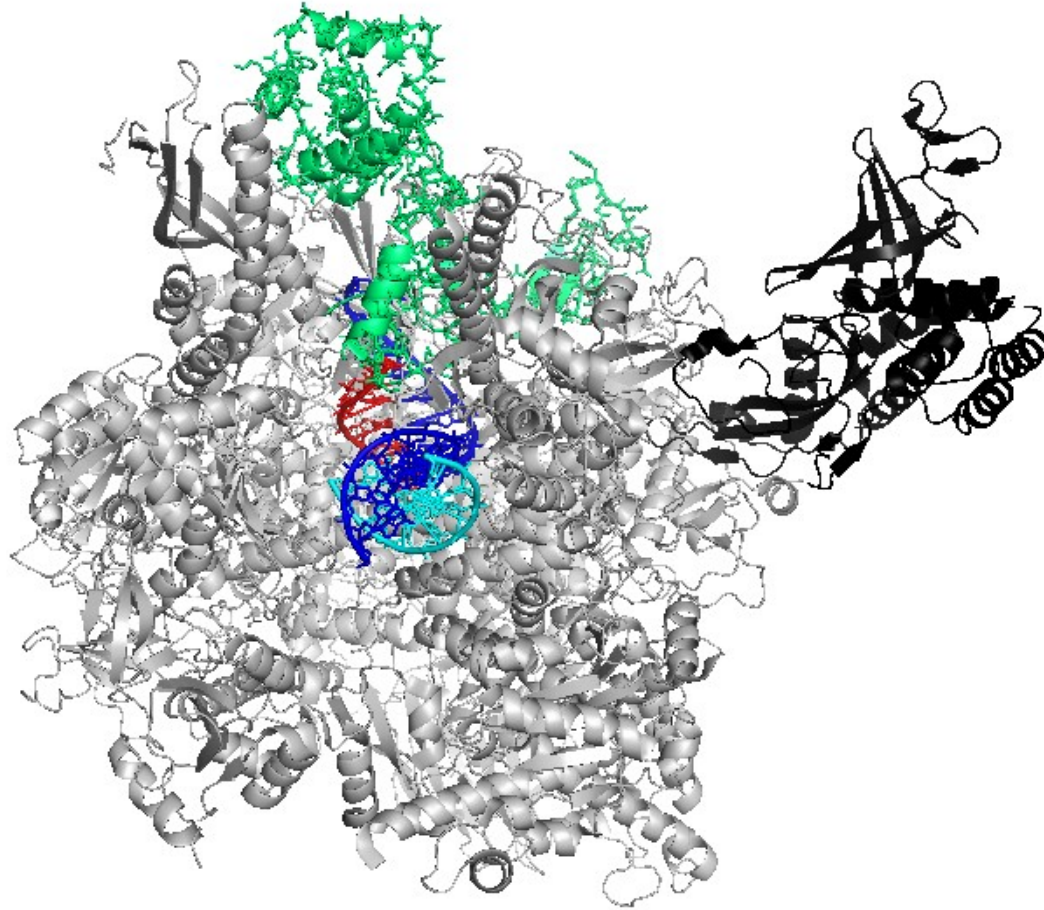


- B-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp
- umístění TFIIB determinuje pozici počátku transkripce
- pozice B-reader (v RNA tunelu) limituje iniciační krok (12nt RNA)
- po dosažení 12nt RNA dochází k disociaci TFIIB



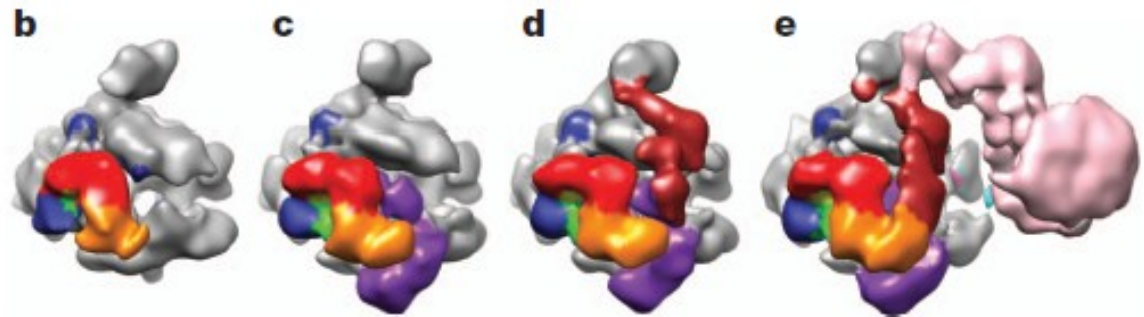
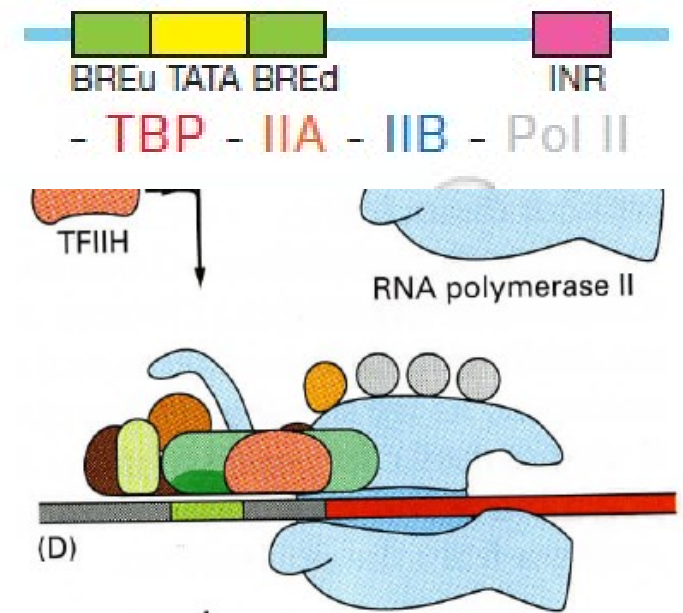
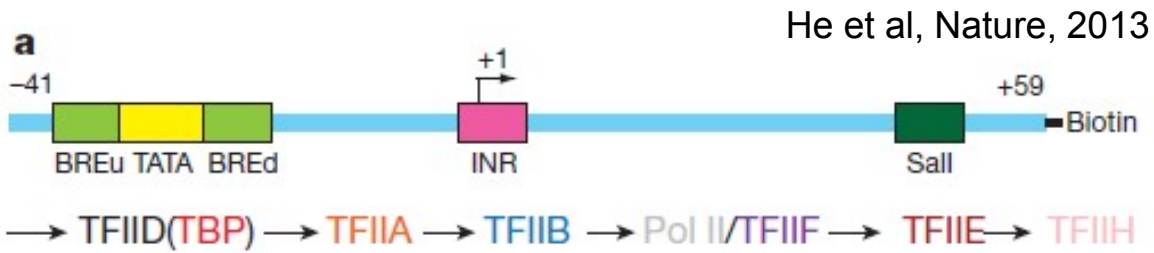
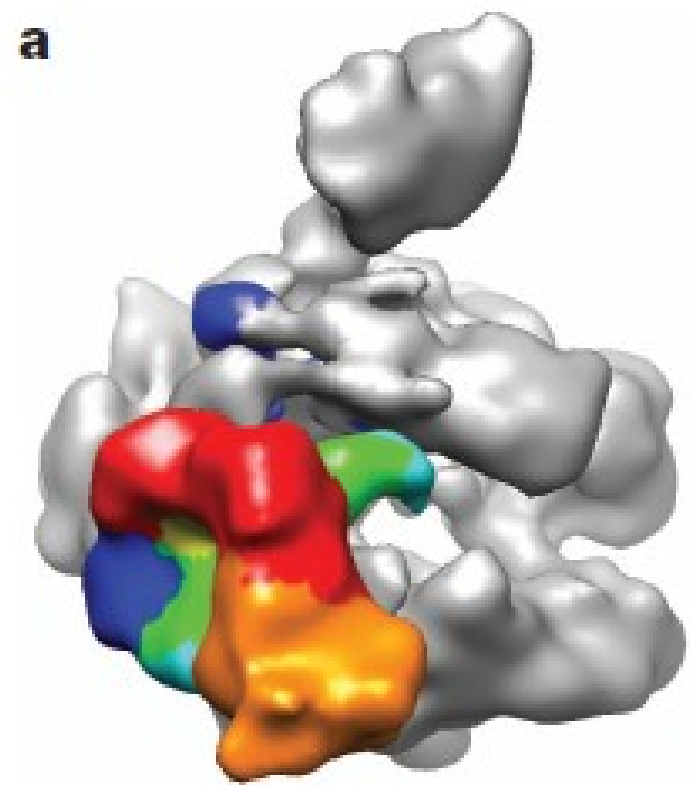
RNA pol II s TFIIB krystal s částí DNA a krátkým řetězcem RNA

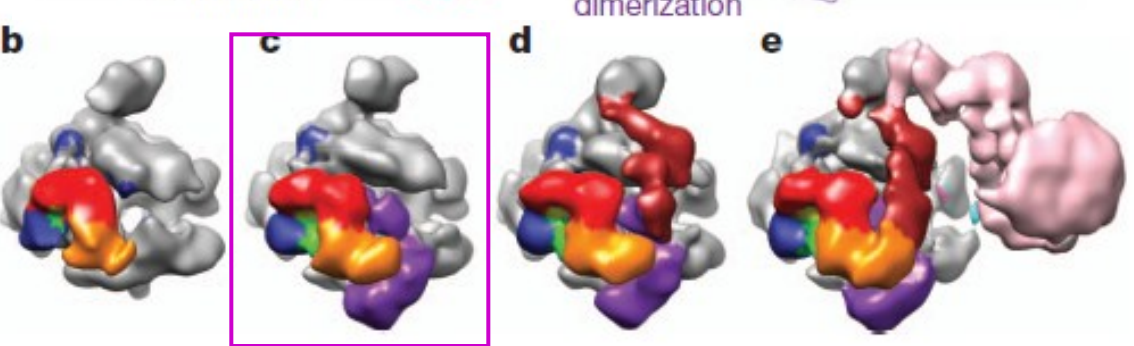
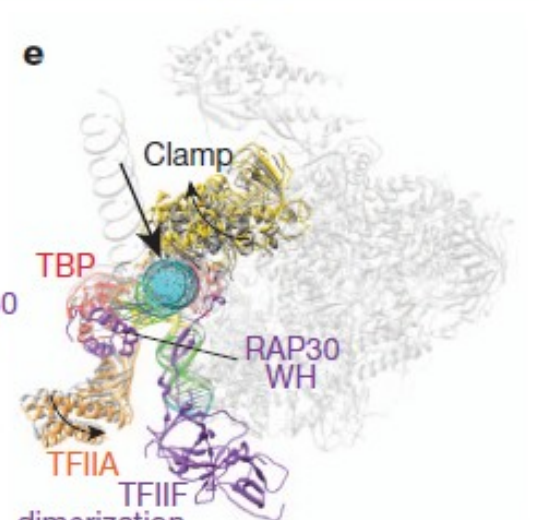
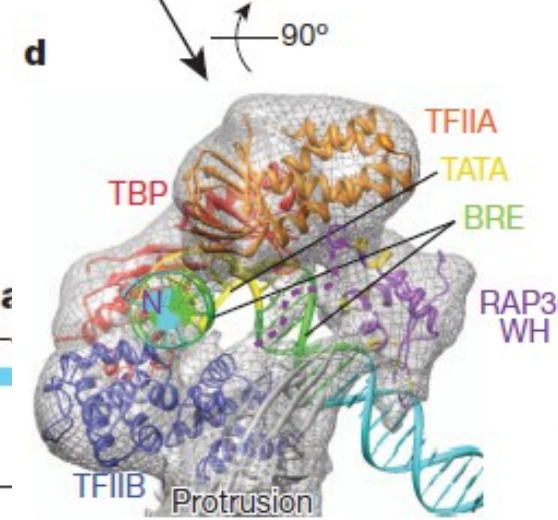
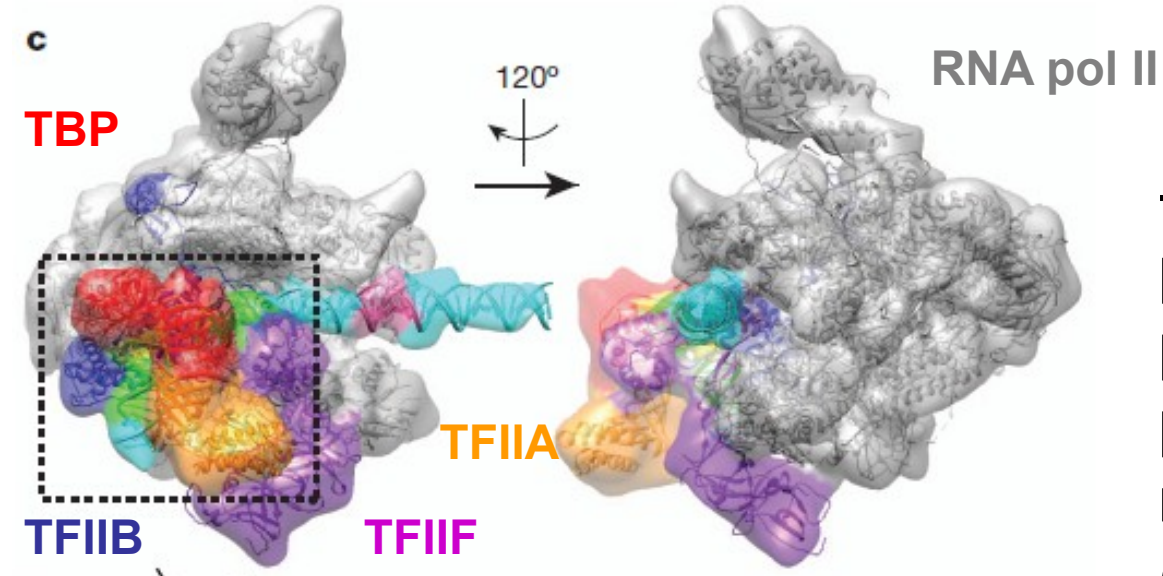
4BBS, Sainsbury et al, Nature, 2013



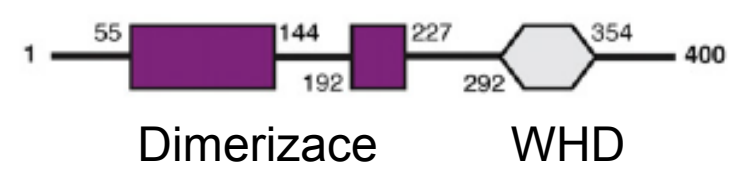
- postupným odhalováním detailů struktur, mutagenézí podjednotek, funkčními testy (*in vitro* a *in vivo*) byly identifikovány všechny TFII a určeno pořadí jejich působení

-biotin-DNA navázána na streptavidinové kuličky – na DNA nachytány *in vitro* sestavené komplexy – odštěpeno *Sall* a cryoEM - postupně rekonstruován celý PIC



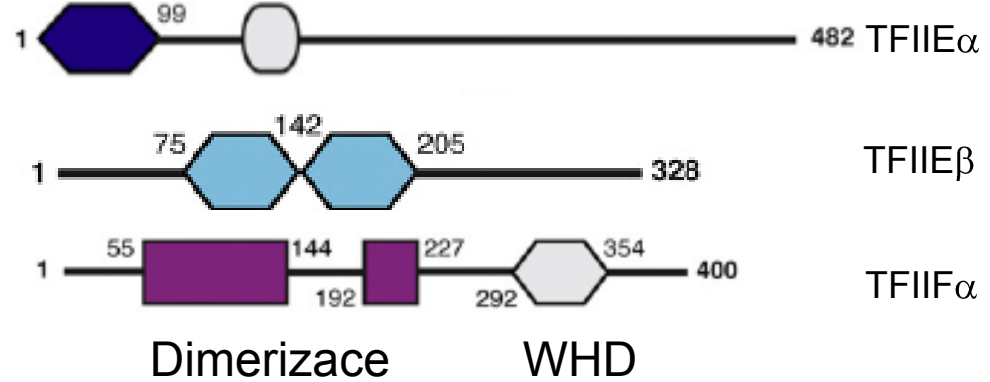
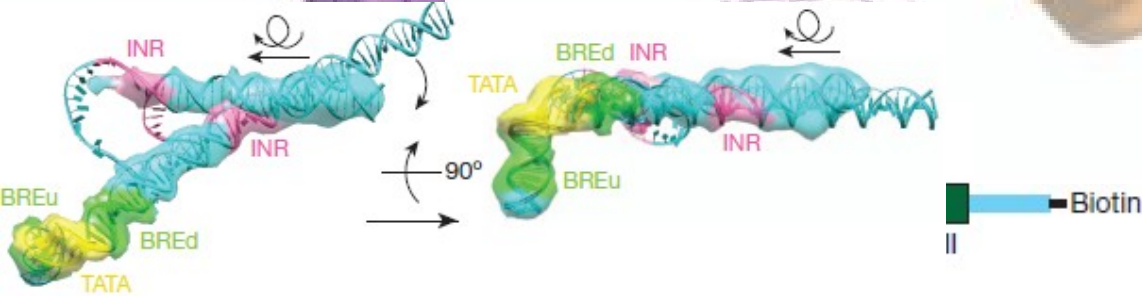
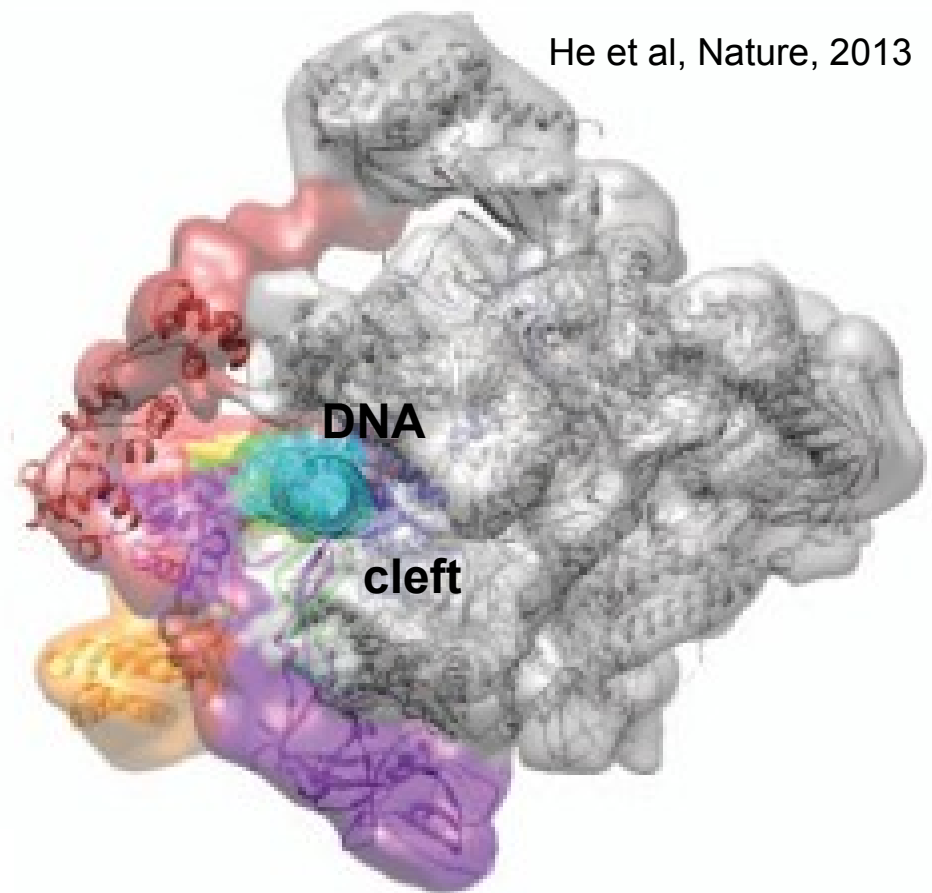
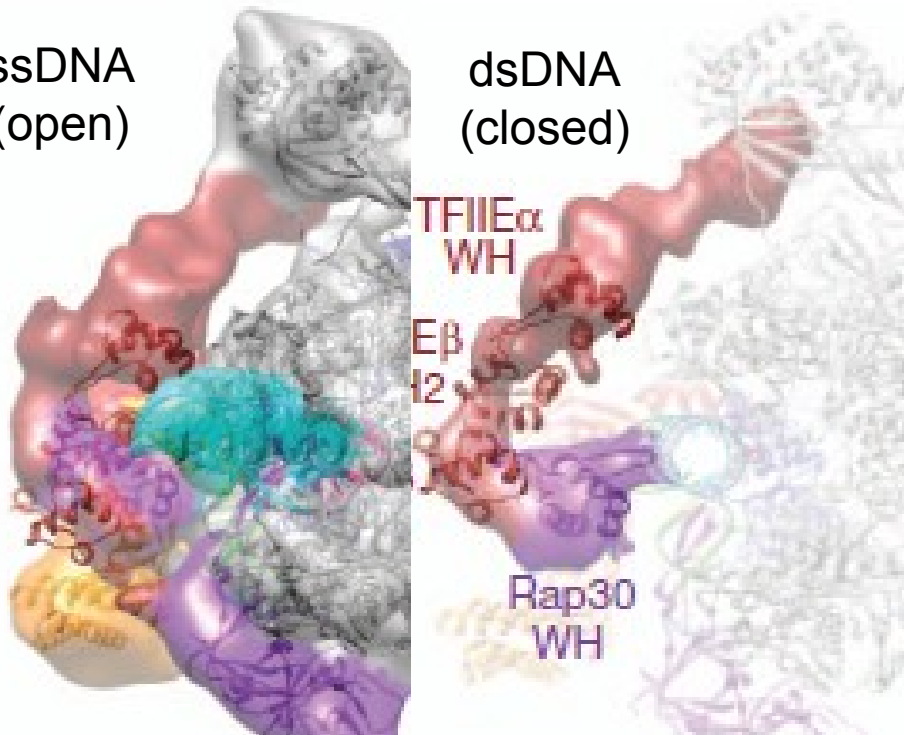


- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})
- změna natočení
- 3 TFIIA-TFIIB-TBP-pol II
- n - váže TFIIE a TFIIH a pomáhá tak stabilizaci komplexu

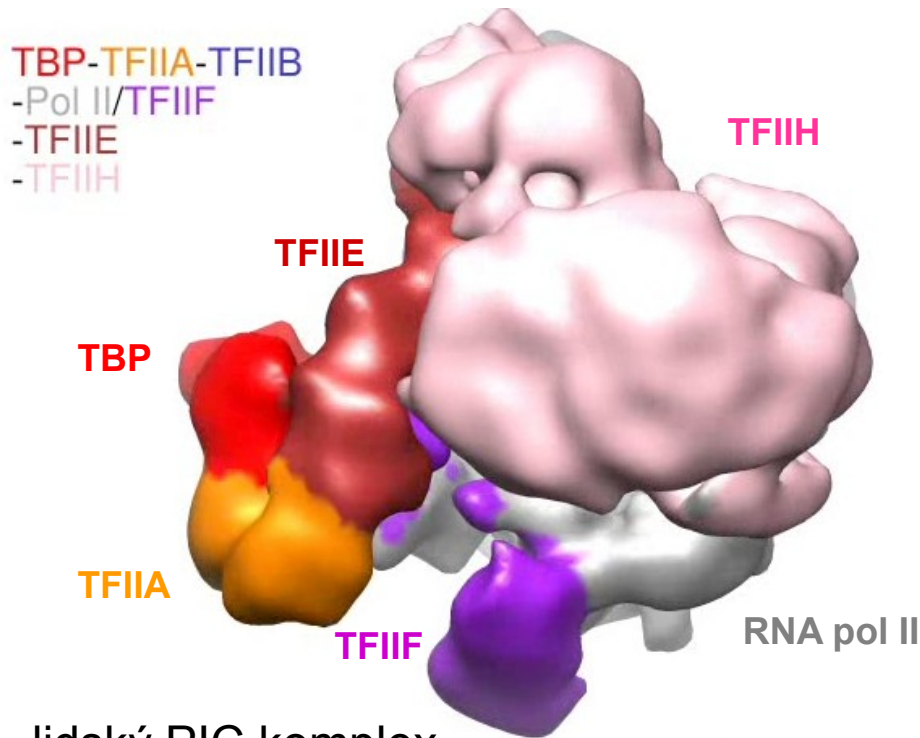


ssDNA (open)

dsDNA (closed)

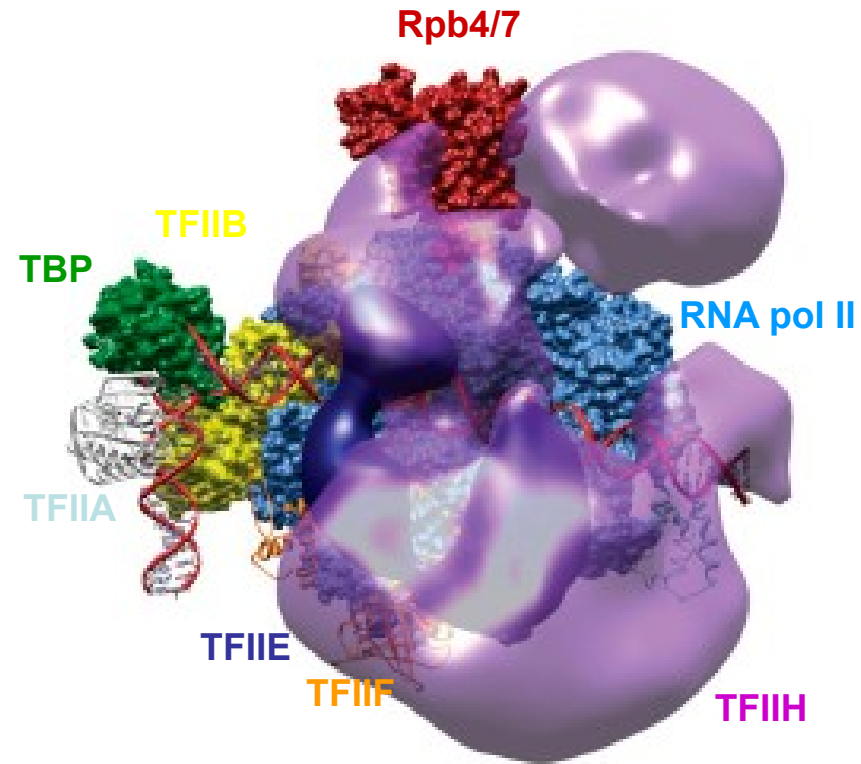
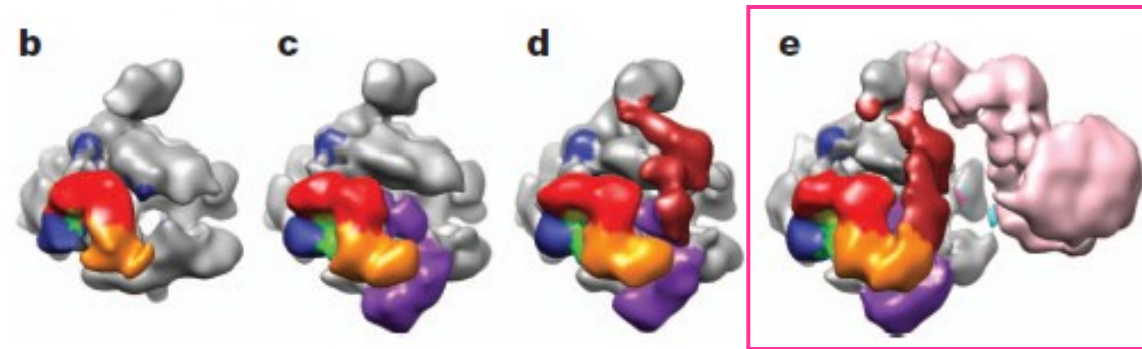
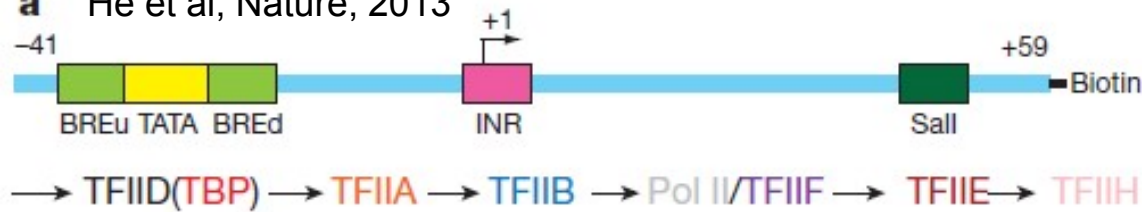


-váže TFIIIE a TFIIH a pomáhá tak stabilizaci komplexu (vidí DNA)
 - tandem 4x WHD
 uzamyká DNA v pol II prohlubni



lidský PIC komplex

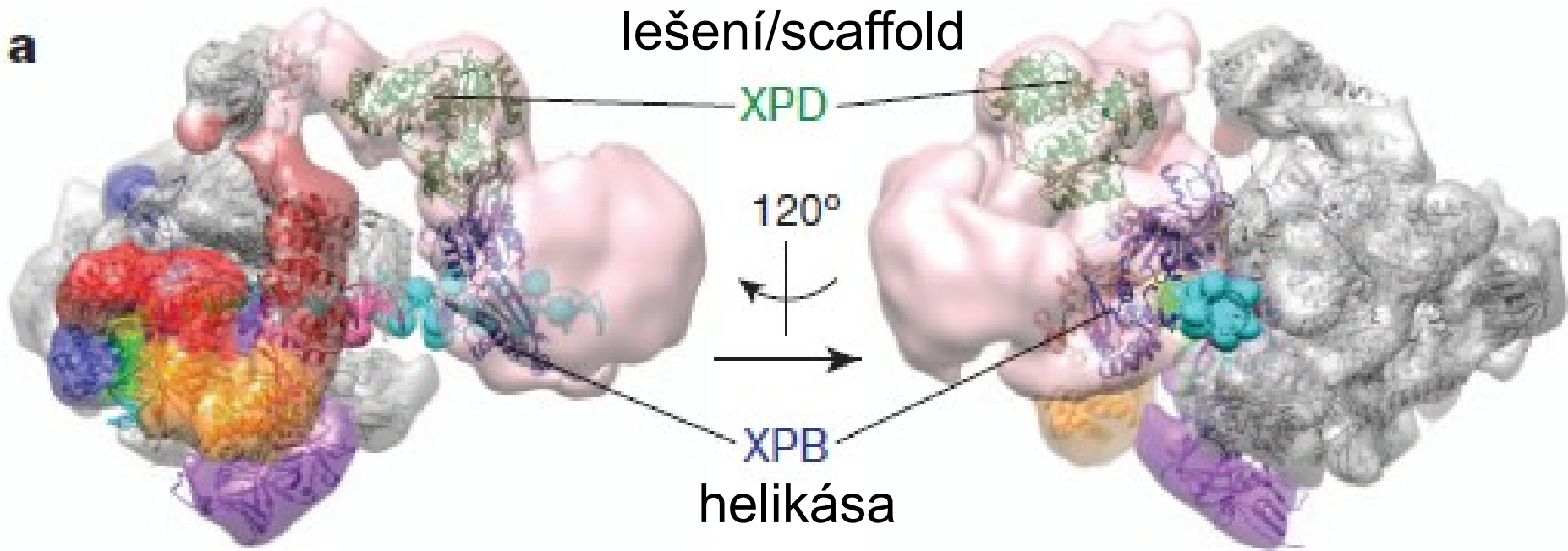
He et al, Nature, 2013



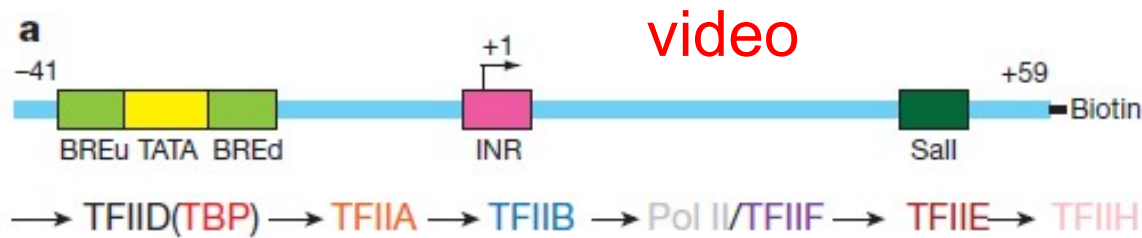
kvasinkový PIC komplex

Gibbons et al, PNAS, 2012

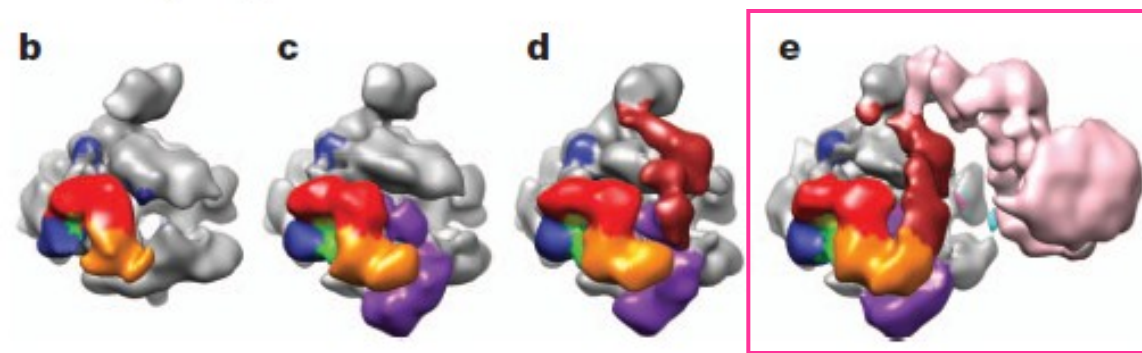
- **TFIIH** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)
- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvoušroubovici



- XPB a XPD regulují transkripci vs opravu DNA (NER)



lidský PIC komplex
He et al, Nature, 2013



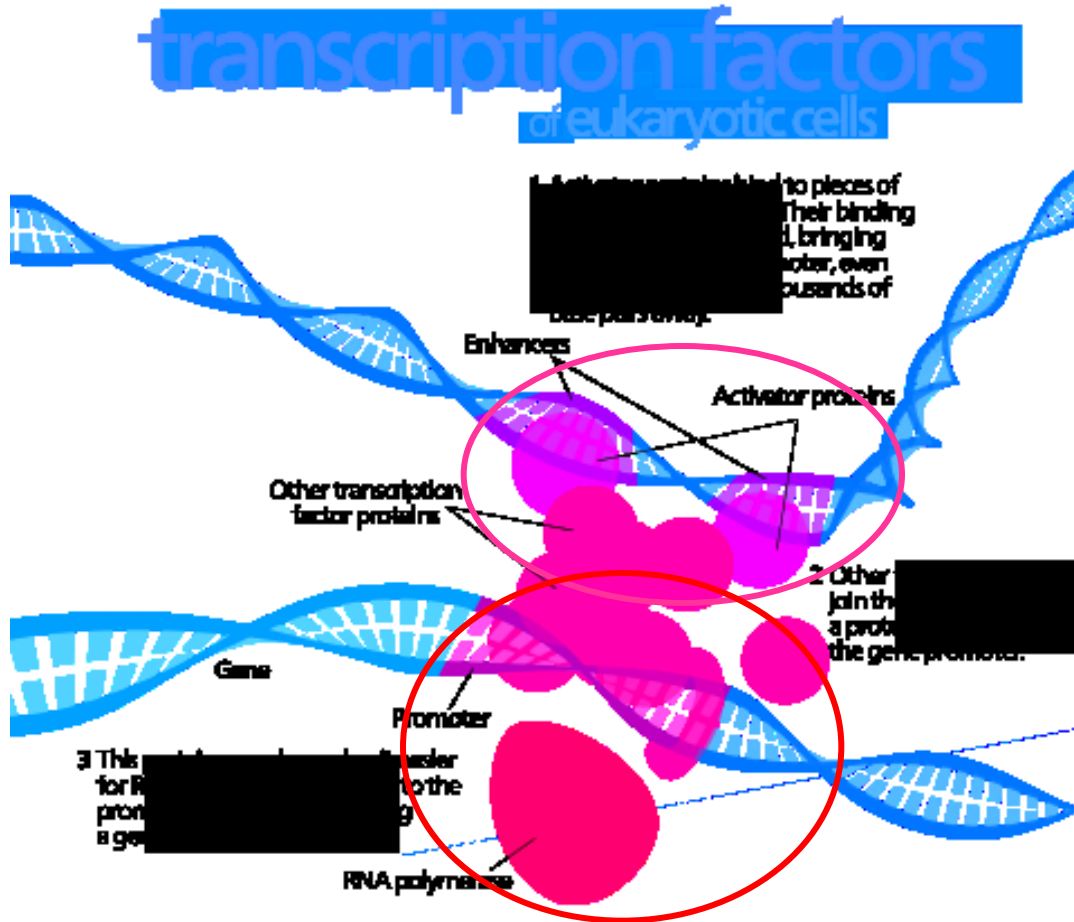
- **TFIIF** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)

- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvoušroubovici

Komplexy spojené s transkripcí

DNA-vazebné motivy specifických transkripčr (sekvenčně specifické – α -šroubovice ve VŽ)

Obecné TFII komplexy a proces transkripce



- **Zipper typ**
 - Leucinový zip (**GCN4**)
 - Helix-loop-helix (**MyoD**)
- **Helix-turn-helix** (**mat α 2**)
 - Winged helix (**TFIIE+F, H1**)
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger (**CTCF**)
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix (**p53**)
 - Gal4 (**Gal4**)
- **Histon, HMG-box** (**H2A-4 NB-Y, TFIID**)
- **β -sheet** (**TBP, TFIIA**)
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy** (XPB helikása)