

# Přednáška-zkouška

- Úvod - Analýza proteinu
  - Domény
    - fold-struktura (ss, PDB)
    - Interakce (IntAct)
  - Komplexy
    - Funkce
    - Lokalizace
  - evoluce
- Konkrétní nová data – článek

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

# DNA-proteinové komplexy

Komplexy spojené s transkripcí

Komplexy podílející se na opravě DNA

Chromatinové strukturní komplexy

*"The Smc5/6 complex and replication stress"*

**Johanne M. Murray**

Genome Damage and Stability Centre  
Sussex University, Brighton, UK

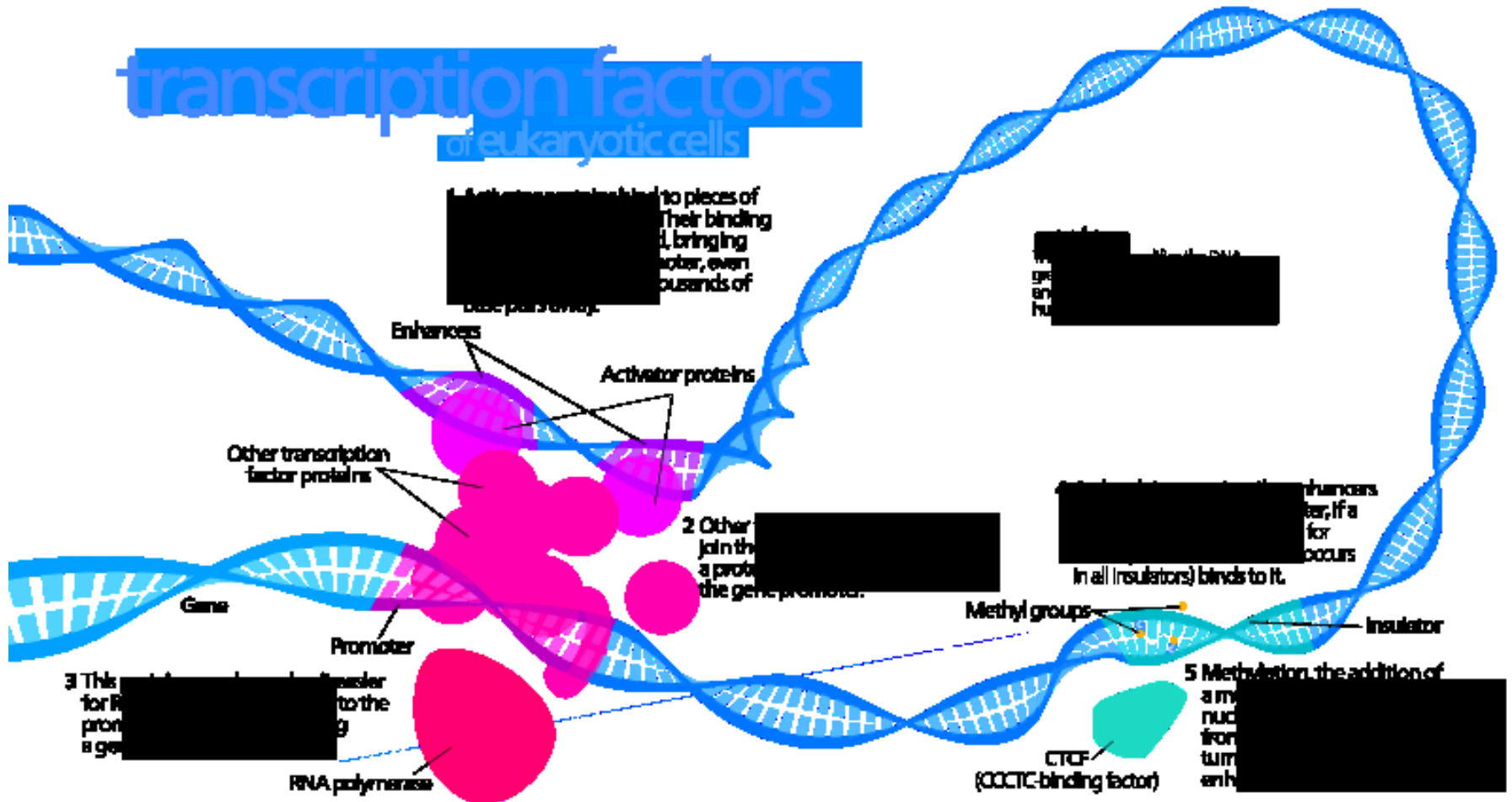
**Wednesday, April 24, 10:00 am.**

**Conference room A11, 2.05,**

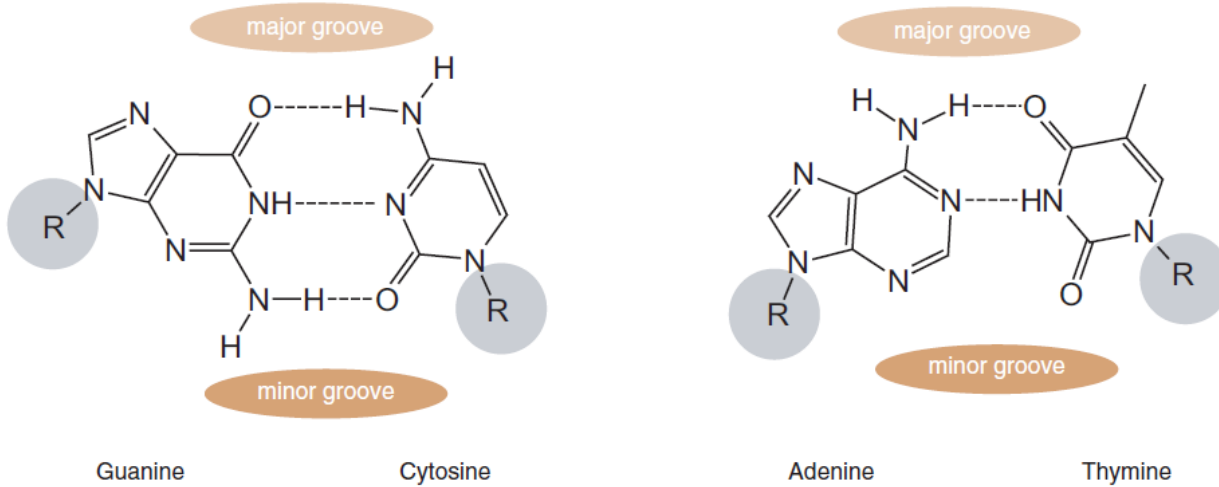
**Masaryk University Campus, Kamenice 5, Brno**

# Komplexy spojené s transkripcí

DNA-vazebné motivy specifických transkripčních faktorů  
Obecné TFII komplexy a proces transkripce

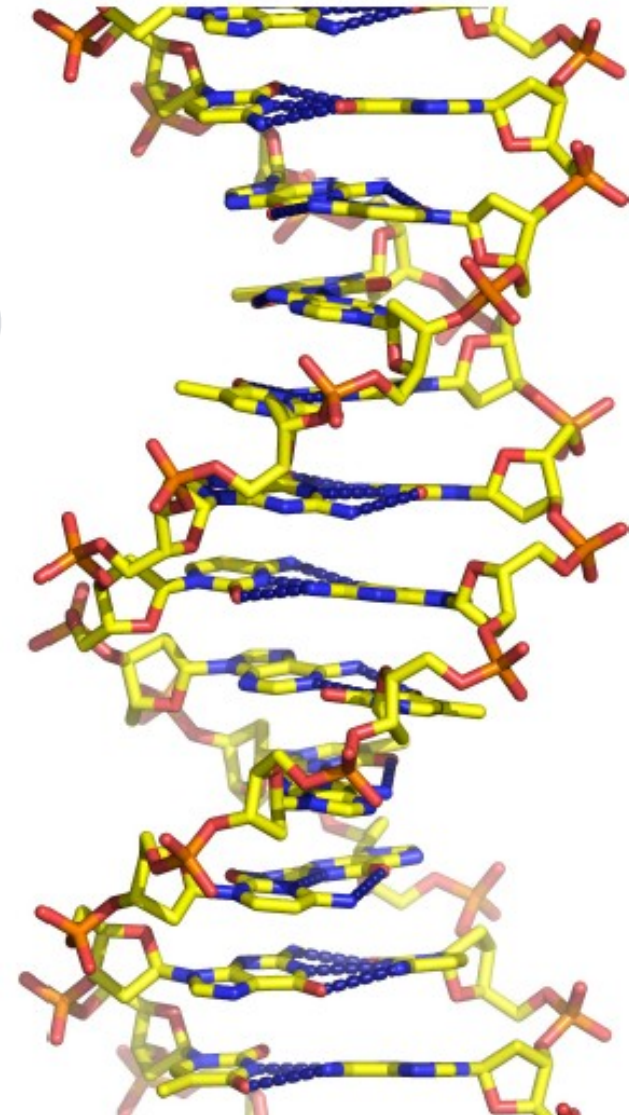


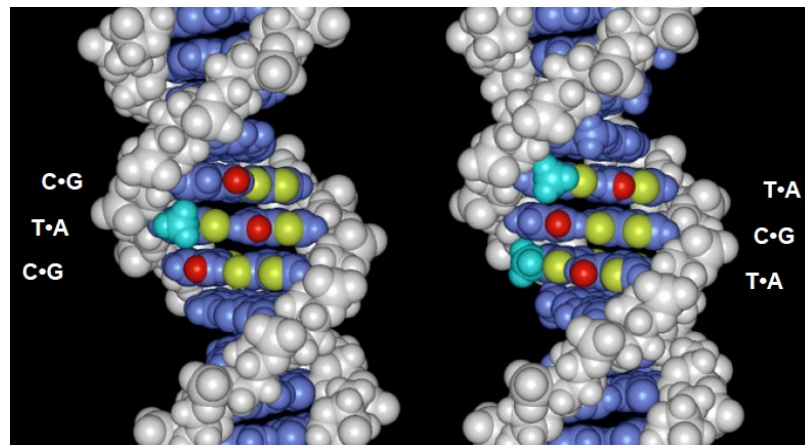
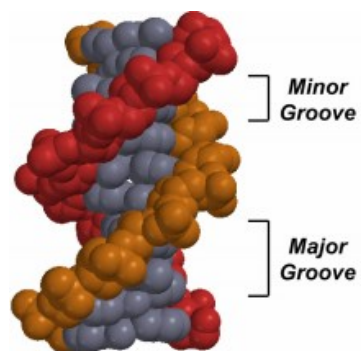
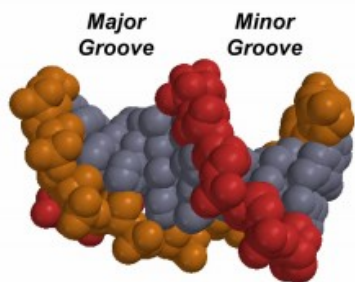
Tvarová a nábojová specifita DNA determinuje typy DNA-vazebných domén (oproti velké rozmanitosti protein-proteinových interakčních domén)



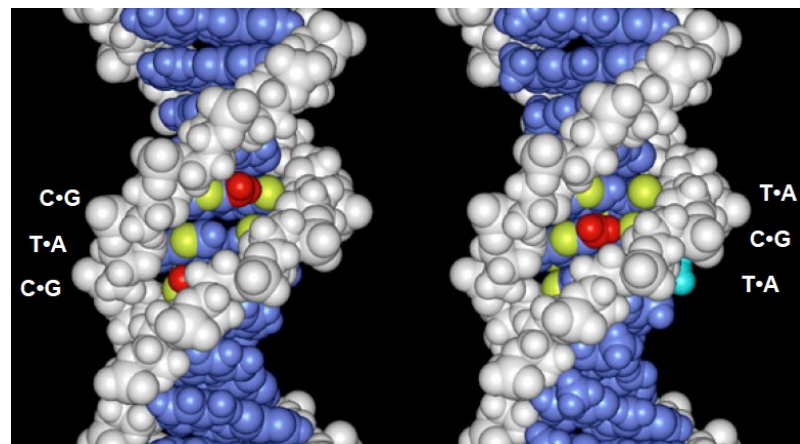
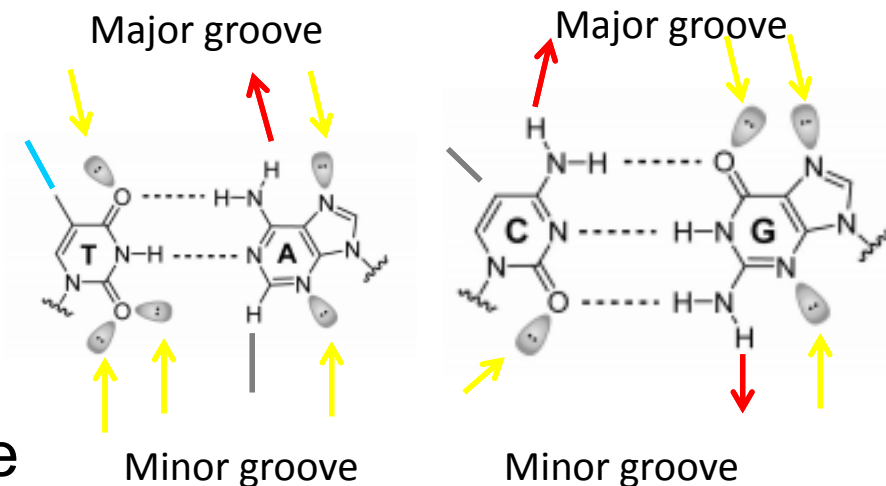
- sekvenčně specifická (např. transkripční faktory) nebo nespecifická (např. histony, HMG proteiny) vazba

Bi7015 - Chemické vlastnosti, struktura a interakce nukleových kyselin (doc. Fojta a prof. Paleček)





většina **sekvenčně-**  
specifických DNA-vazebných  
domén se váže do tzv. velkého  
žlábku B-DNA – **velký žlábek** je  
lépe přístupný => lze rozpoznat  
páry bází



# Vazba proteinů s DNA prostřednictvím vodíkových vazeb

- Gln a Asn mohou tvořit specifické vodíkové vazby s Ade zbytky N-6 a H-7
- Arg může tvořit specifické vodíkové vazby s Cyt-Gua párem
- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům  $\alpha$ -šroubovice a má exponované H-vazebné skupiny

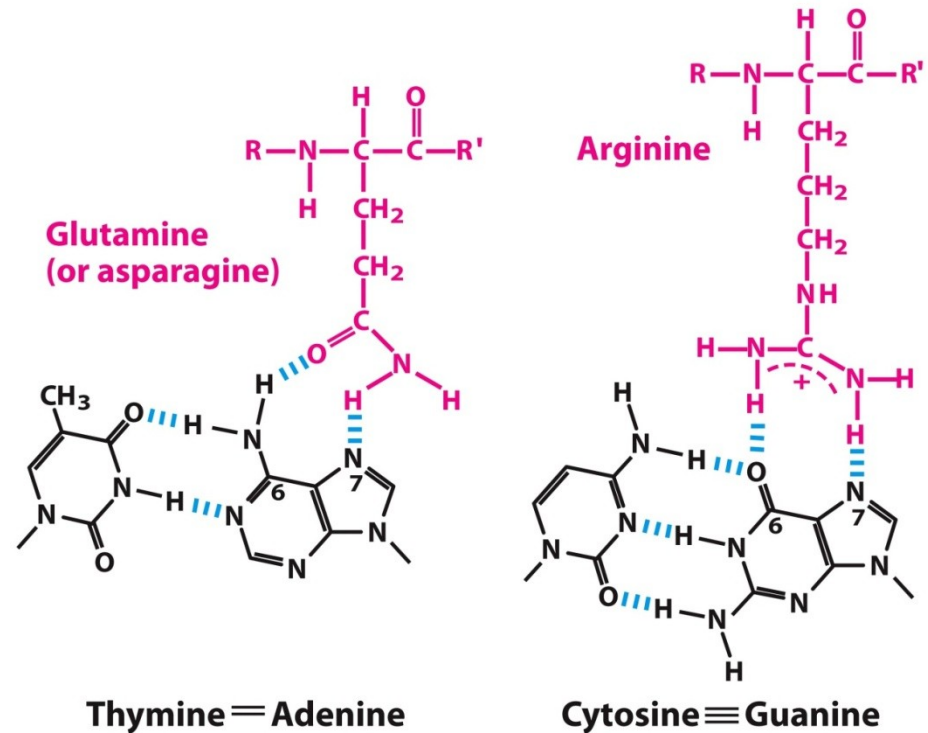


Figure 28-10  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

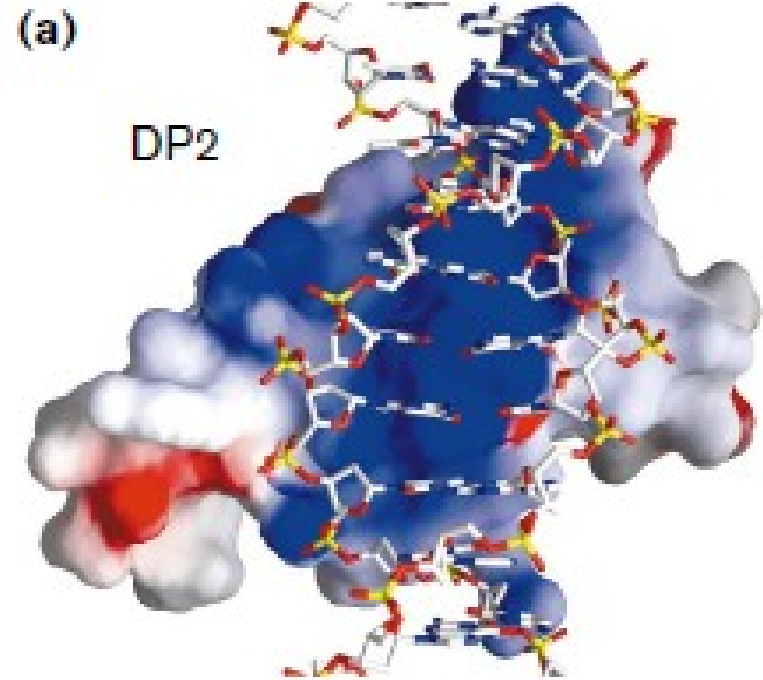
Silná vazba, sekvenčně specifická - afinita nM –  $\mu$ M  
Slabá vazba, strukturně specifická - afinita  $\mu$ M – mM

# Vazba proteinů s DNA prostřednictvím solných můstků

- Arg a Lys mohou interagovat s fosfáty – solné můstky/salt bridges (pozitivní náboje Arg a Lys vytváří vazbu s negativním nábojem fosfátové skupiny)
- Elektrostatický náboj/povrch naznačuje vazebné schopnosti proteinu

Table 2. The simplified relative charge set defined from CHARMM (10) used in the calculation of the electrostatic potential of atoms in the DNA-binding proteins

Atom type (PDB entry)	Residue	Relative charge
NZ	Lys	1.00
NH1	Arg	0.50
NH2	Arg	0.50
OE1	Glu	-0.50
OE2	Glu	-0.50
OD1	Asp	-0.50
OD2	Asp	-0.50
OXT	All residues	-1.00
N	All residues	-0.10
CA	All residues	0.10
C	All residues	0.55
O	All residues	-0.55



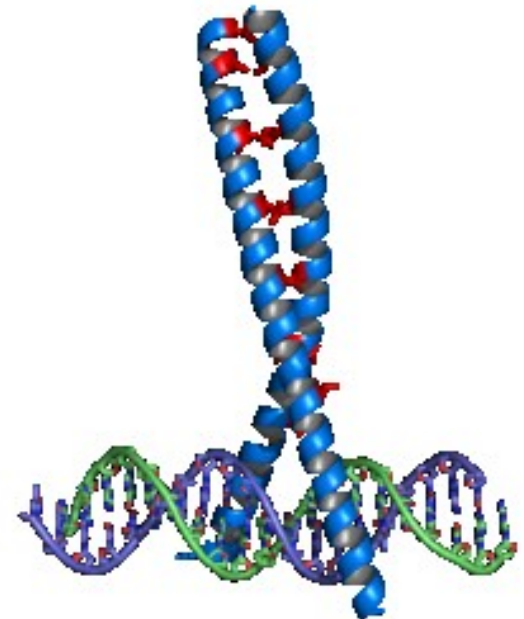
Gajiwala & Burley, COiSB, 2000

... vazba DNA na protein často indukuje změny v jeho struktuře (a naopak, vazba do MŽ) případně u nestrukturovaným proteinů strukturu indukuje

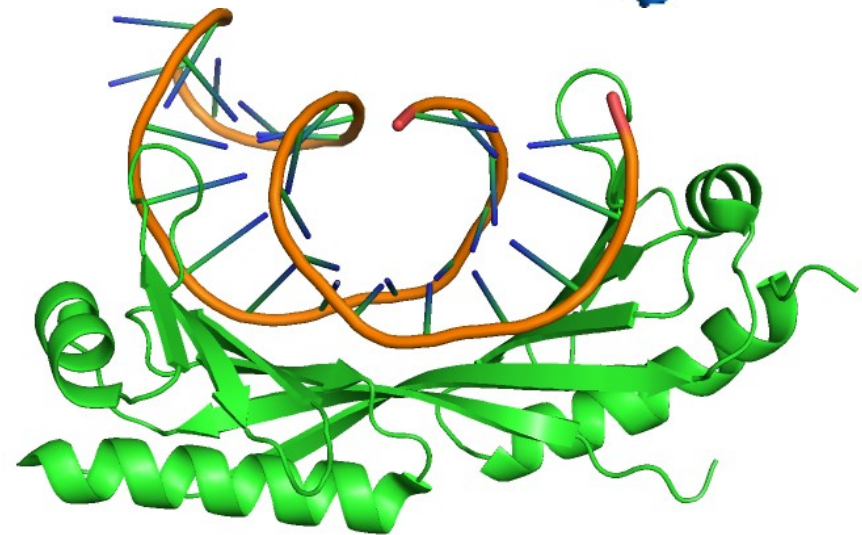
# Motivy DNA vazebných domén

- **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**
- **$\beta$ -sheet**
- **$\beta$ -hairpin/ribbon**
- **Enzymy**

$\alpha$ -šroubovice



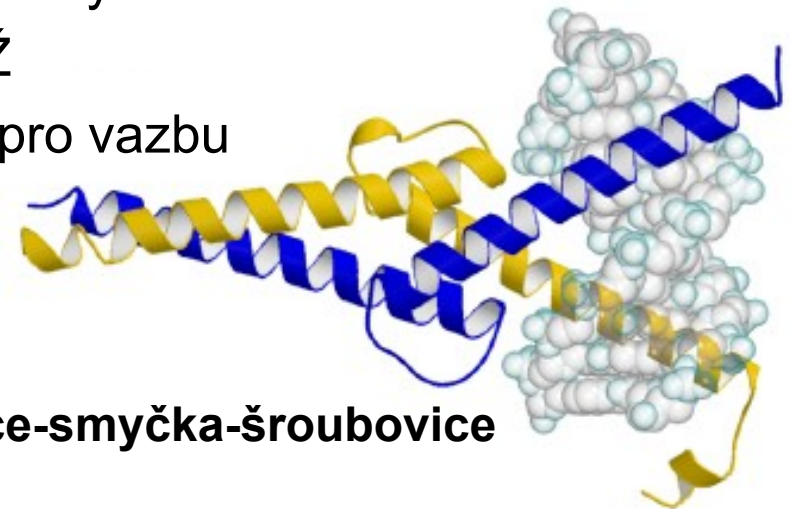
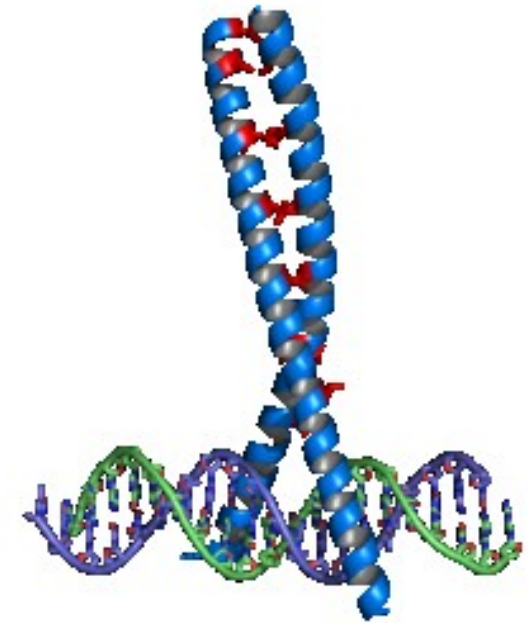
$\beta$ -listy



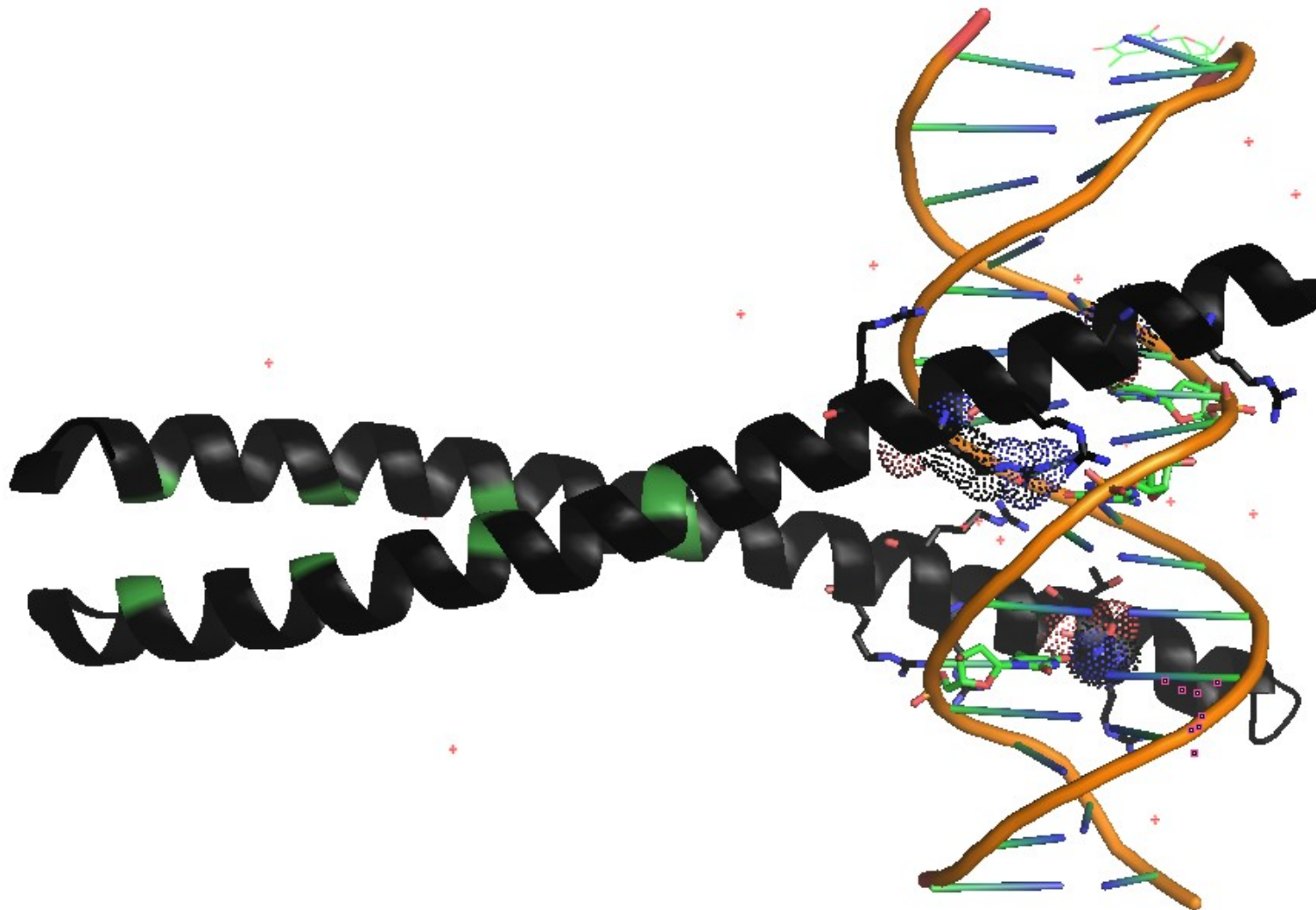


# Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ** (dle způsobu dimerizace)
  - **Leucinový zip** (GCN4 – 2dgc)
    - 2  $\alpha$ -helixy (2 x 60 AMK)
    - coiled-coil (30AMK, Leu, C-term)
    - basická část (N-terminus, navazuje na CC)
    - bazická šroubovice vázána do VŽ
  - **Helix-loop-helix** (MyoD)
    - CC a bazické části jsou odděleny smyčkou
    - bazická šroubovice vázána do VŽ
    - smyčka poskytuje větší flexibilitu pro vazbu



šroubovice-smyčka-šroubovice



Interakce bazických Arg(243)=Gua(32), Asn(235)-Cyt(29),

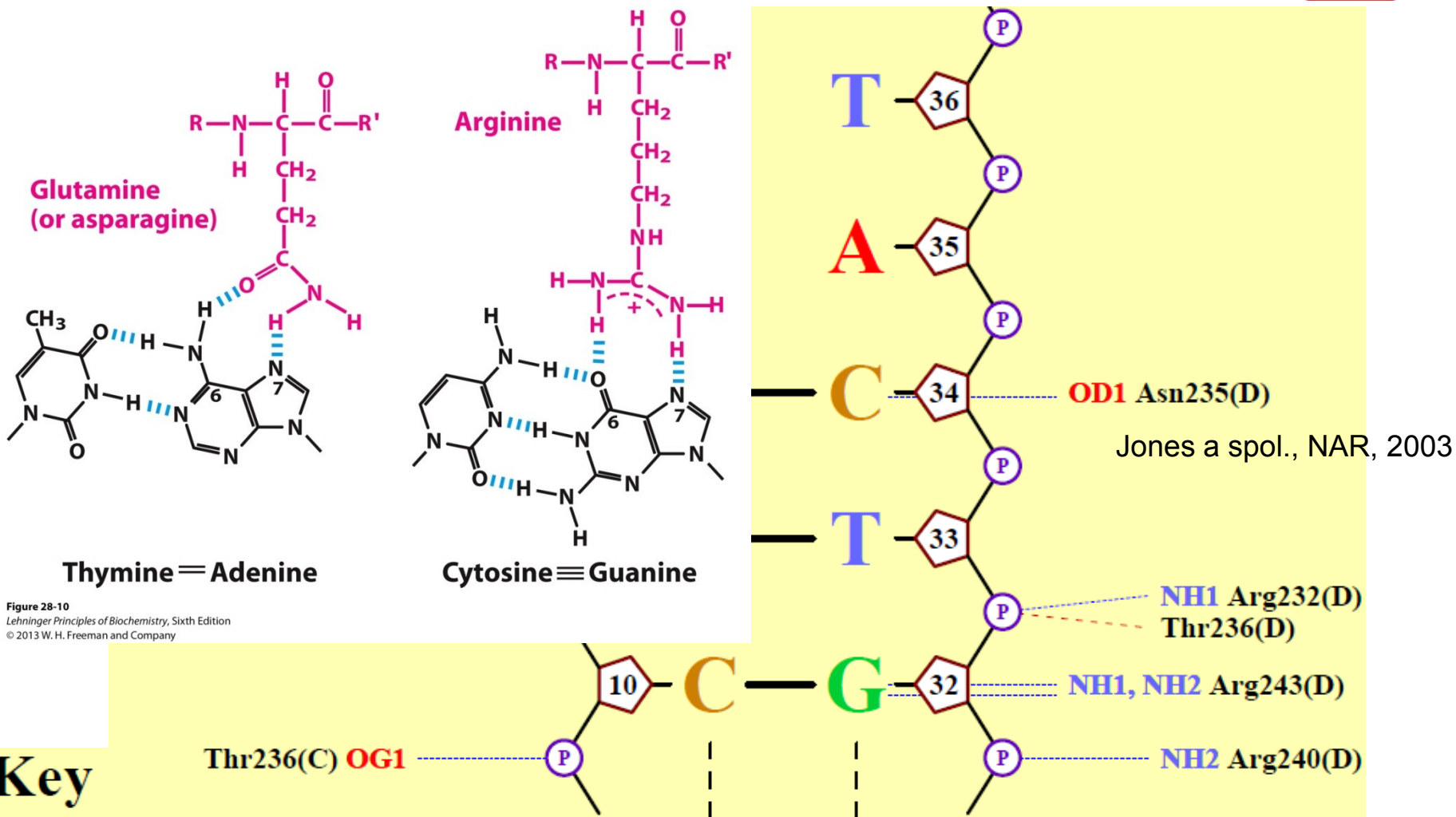


Figure 28-10  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

**Key**

- 3** Backbone sugar and base-number
- P** Phosphate group

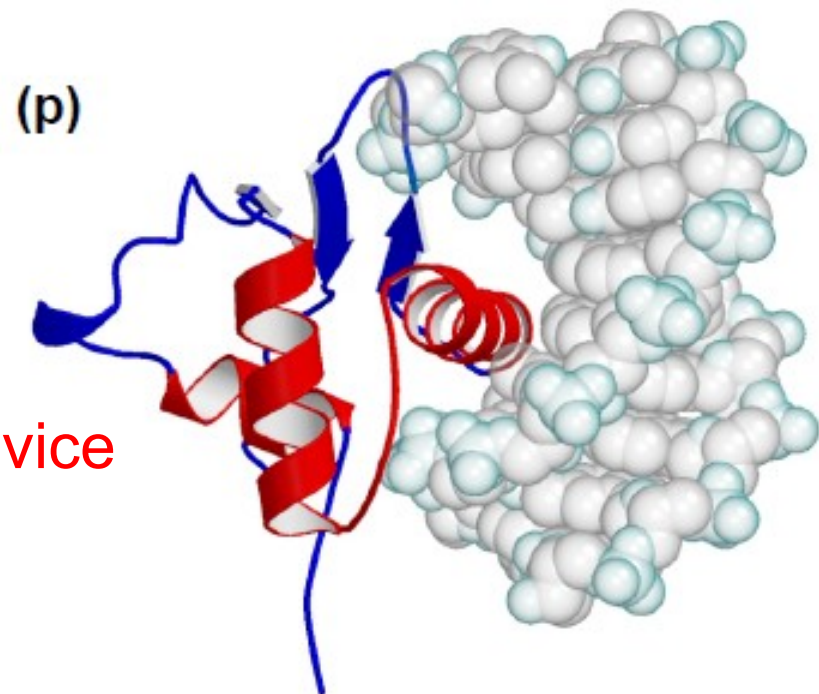
- ..... Hydrogen bond to DNA
- - - - Nonbonded contact to DNA (< 3.35Å)
- 88 W** Water molecule and number

# 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**
- **$\beta$ -sheet**
- **$\beta$ -hairpin/ribbon**
- **Enzymy**

$\alpha$ -šroubovice

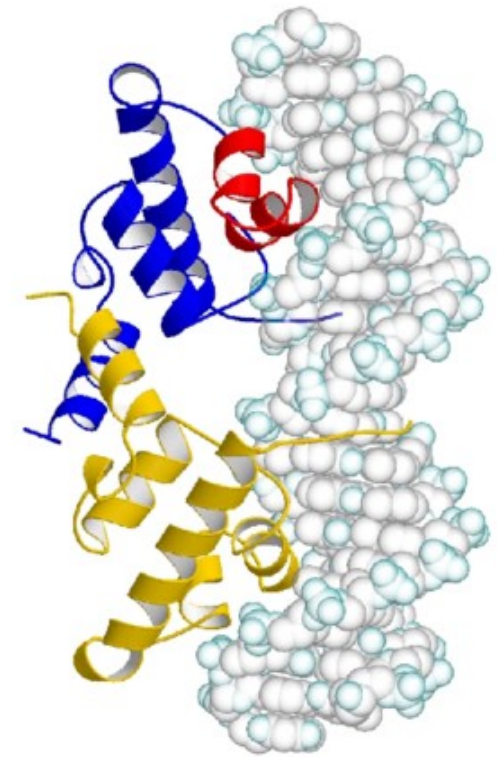
$\beta$ -listy



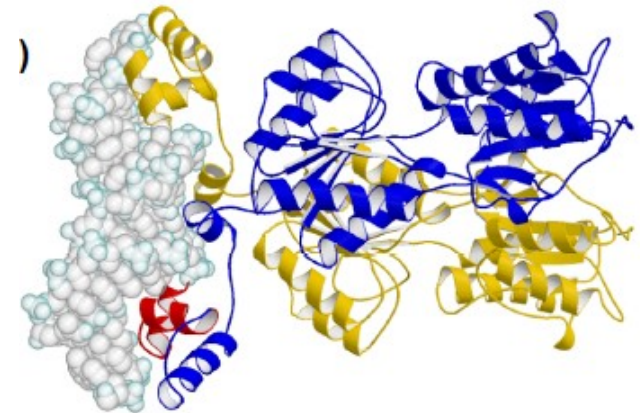
16. Ets domain (1bc8)

# Helix-turn-helix motif

- Obsahuje ~ 20 AMK ve dvou šroubovicích vzájemně kolmých
  - $\alpha$ -helix pro vazbu na DNA („recognition“) -  $\beta$ -obrátka – druhá šroubovice
  - Sekvenčně-specifická vazba prostřednictvím „recognition“ šroubovice a velkého žlábků
  - nejčastější motiv u prokaryot - homodimery vážou palindrom. sekvence
  - HTH motiv se obvykle vyskytuje ve svazku 3-6 šroubovic (stabilizovaných hydrofobním jádrem)
  - motiv může být buď součástí hlavního proteinu (Cro) nebo z něj může pouze vybíhat (LacI)



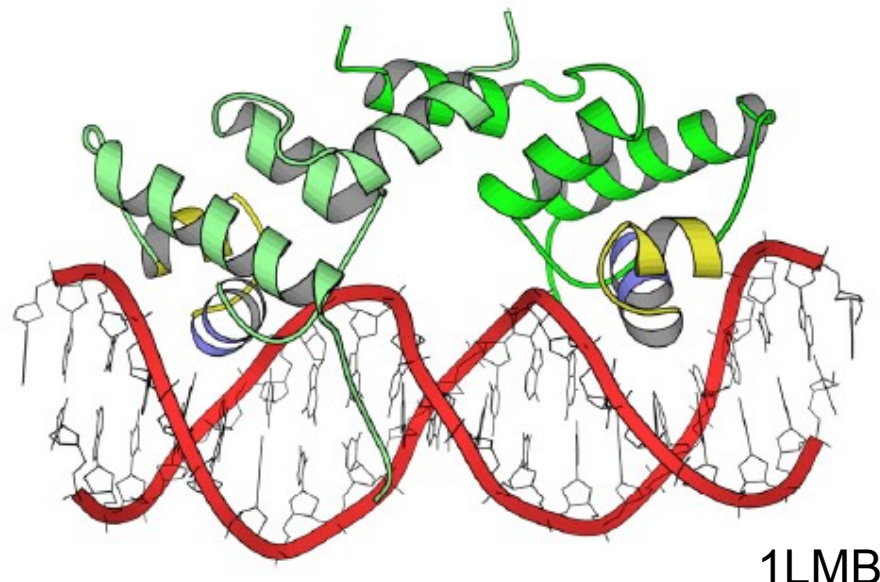
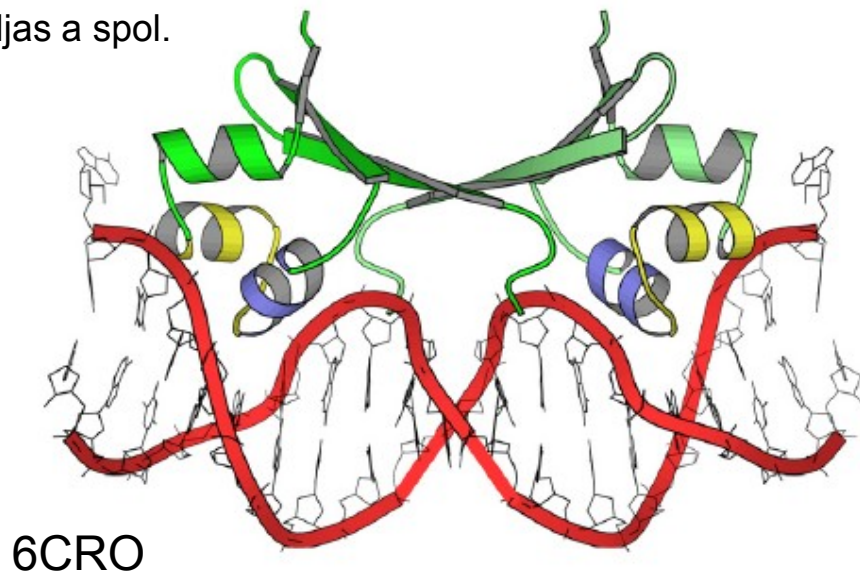
1. Cro and Repressor (1lmb)



Luscombe et al, Genome Biology, 2000

3. LacI repressor (1wet)

Liljas a spol.

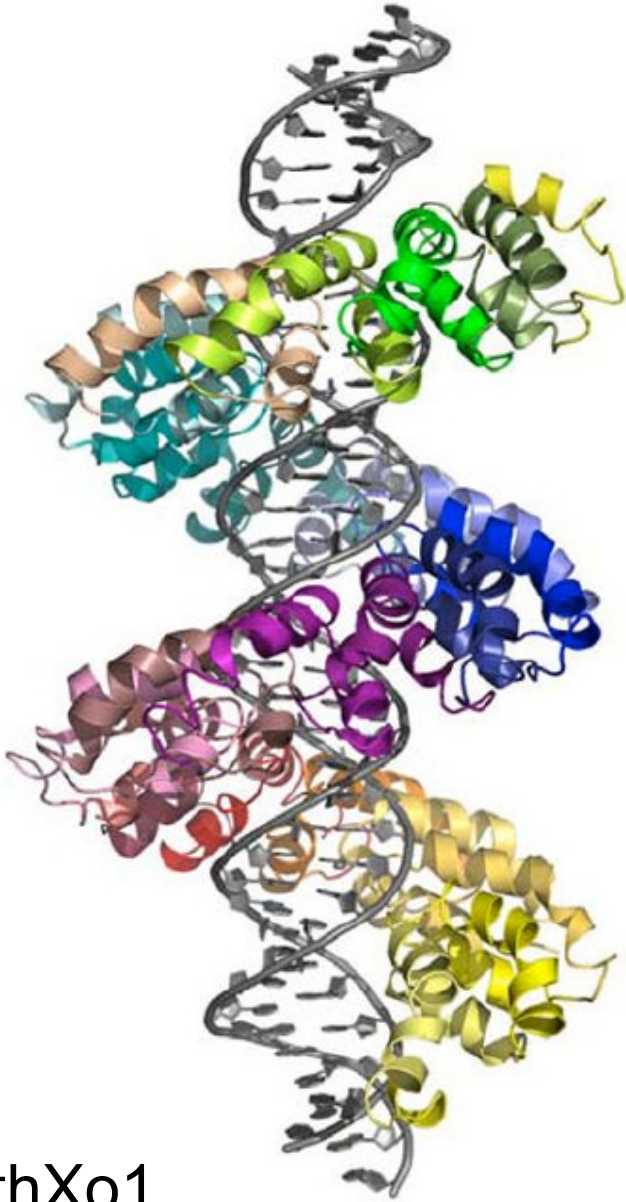


Helix-turn-helix motivy (spojené listy nebo šroubovicemi) –  
odstup HTH (34Å) odpovídá jedné otáčce B-DNA

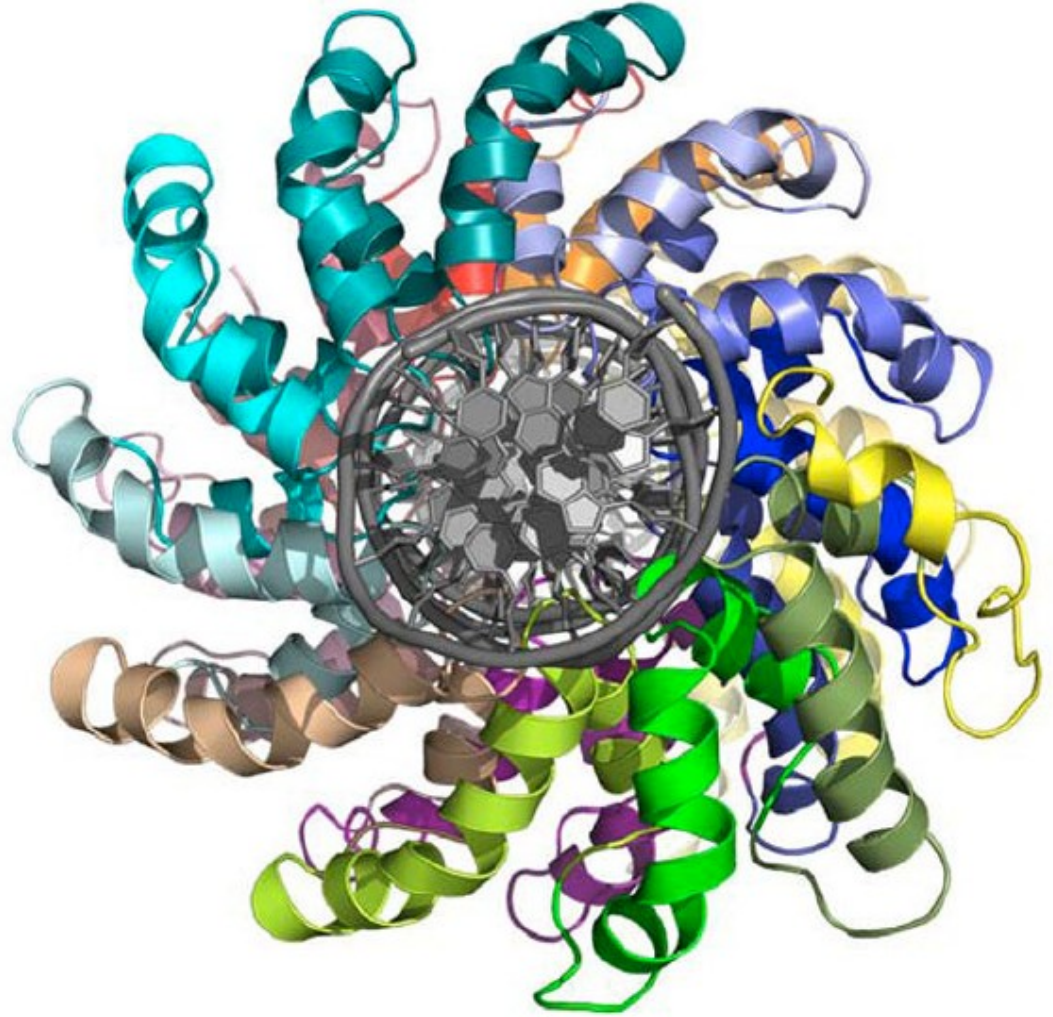
Sekvenčně se různé HTH příliš nepodobají

1. variabilita v rozpoznávaných sekvencích DNA
2. variabilita v pozici „recognition“ šroubovice ve velkém žlábků (paralelně k rovině bazí nebo delší šroubovice jsou paralelně k cukr-fosfátové kostře)

Transcription activator-like effectors  
Patogenní bakterie injikují do rostlinných buněk  
ovlivňují transkripci rostlinných promotorů

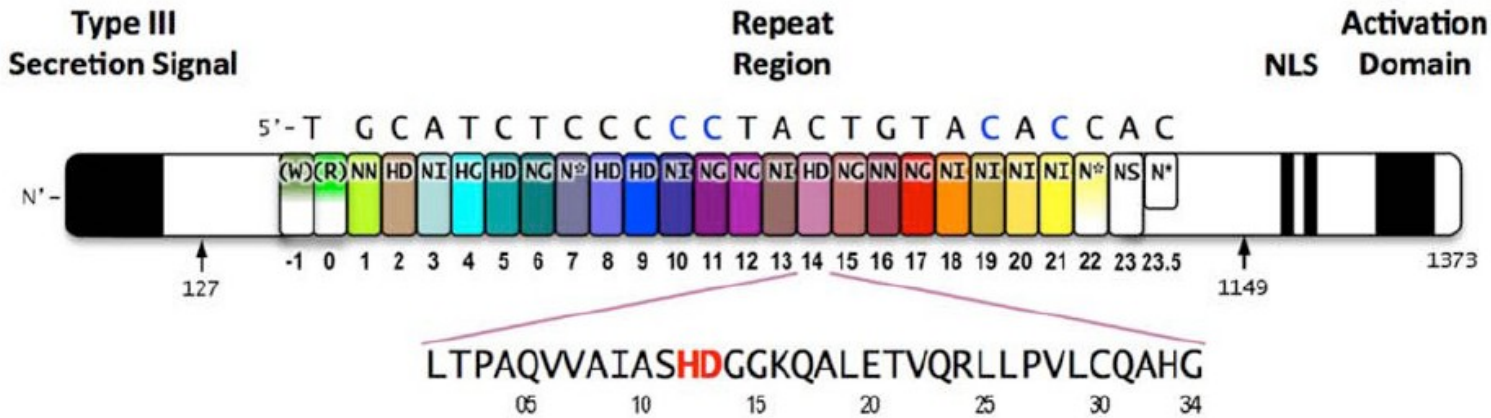


PthXo1  
23 repetitivních obtáčků DNA ve VŽ



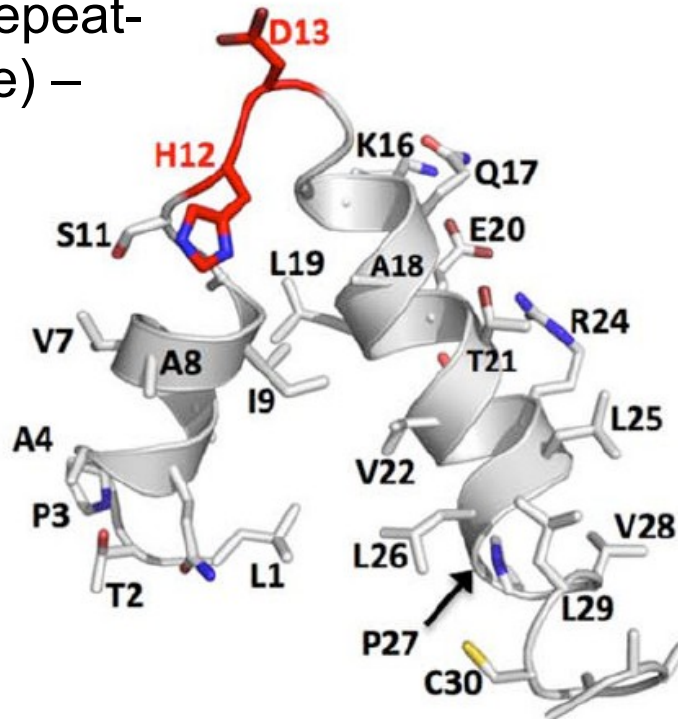
TALEN technologie

Mak et al, Science, 2012



Tandemové repetice (34)  
 AMK v pozicích 12 a 13  
 určují specifitu (repeat-  
 variable diresidue) –  
 hlavní:

HD, NG, NI, NN,  
 NS, HG, N\*

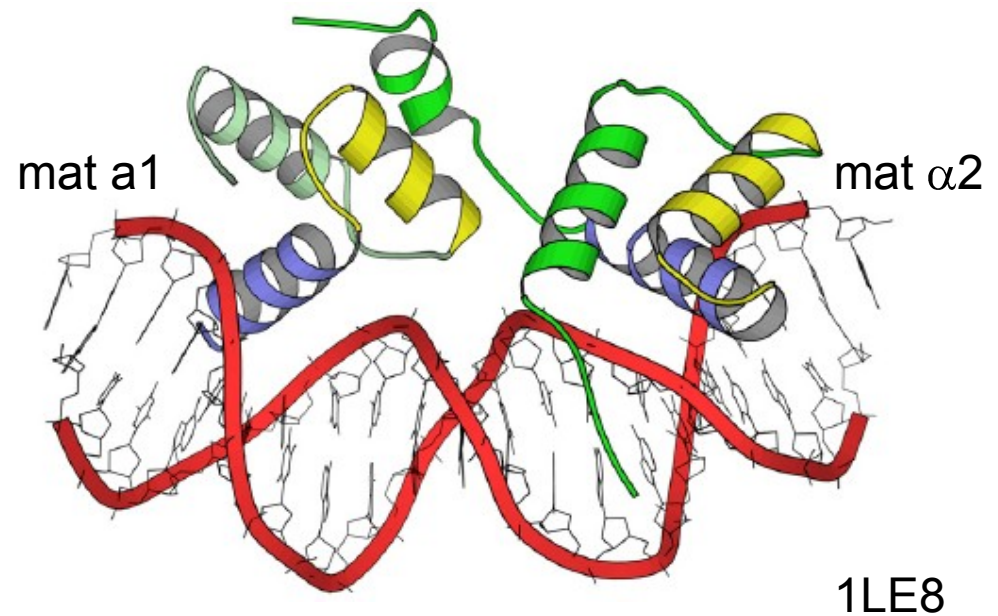






Interaguje otáčka/turn  
 spíše než šroubovice



# Regulace transkripce v kvasinkových buňkách

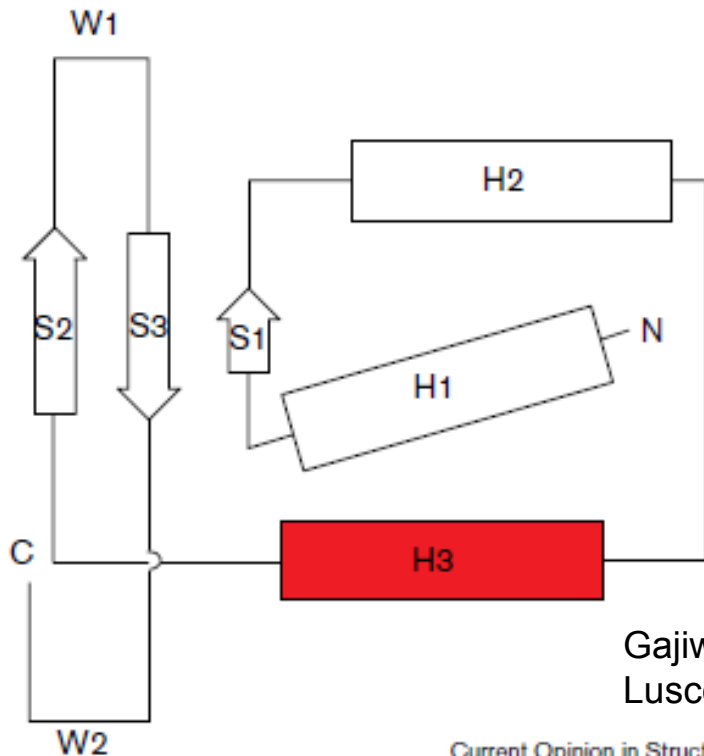
Eukaryontní heterodimery vážou nesymetrické cílové sekvence (větší variabilita sekvencí)



Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem	
$\alpha$ haploid	 aSG	OFF
	 haploid SG	ON
diploid	 aSG	OFF
	 haploid SG	OFF

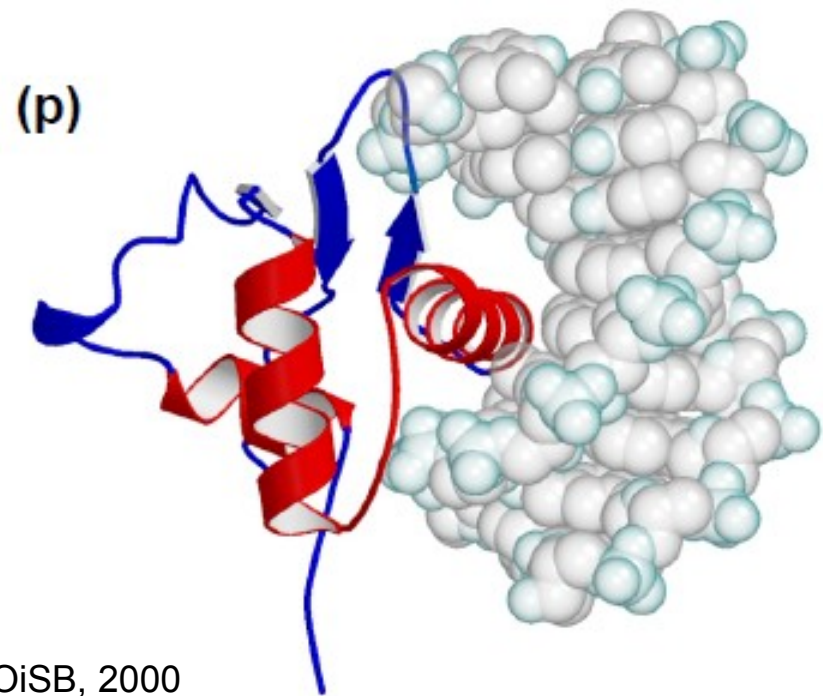
# „Winged“ helix (okřídlená šroubovice)

- „winged“ HTH obsahuje „recognition“ šroubovici (**H3**) a  $\beta$ -listy, které poskytují další kontakty s DNA



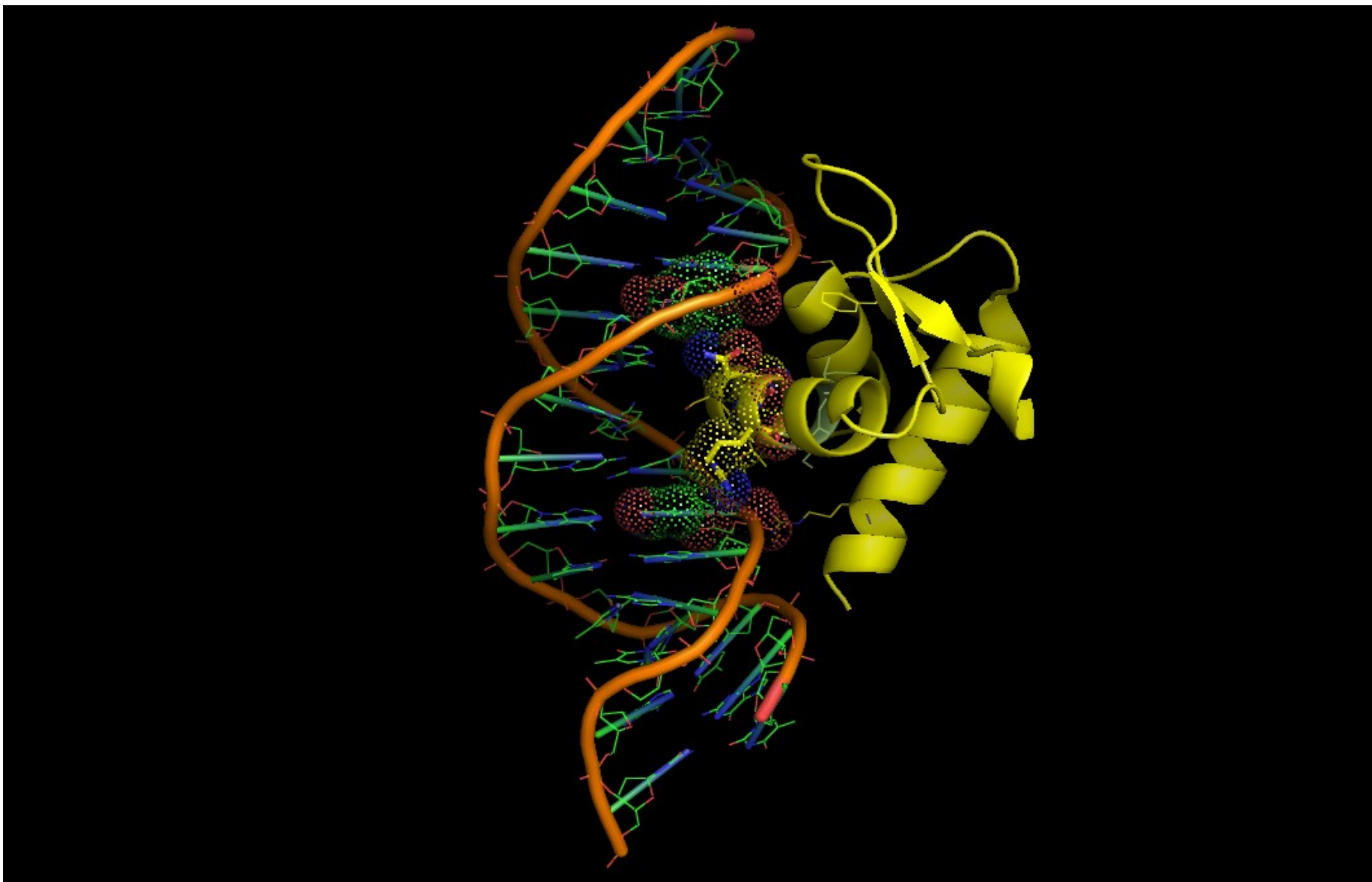
Gajiwala & Burley, COiSB, 2000  
Luscombe et al, Genome Biology, 2000

Current Opinion in Structural Biology

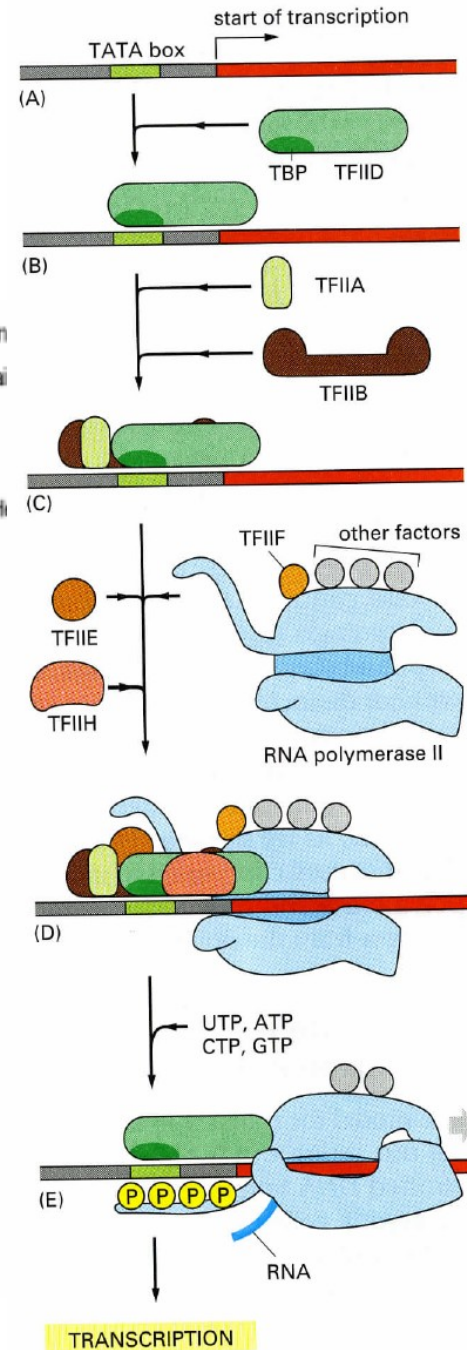
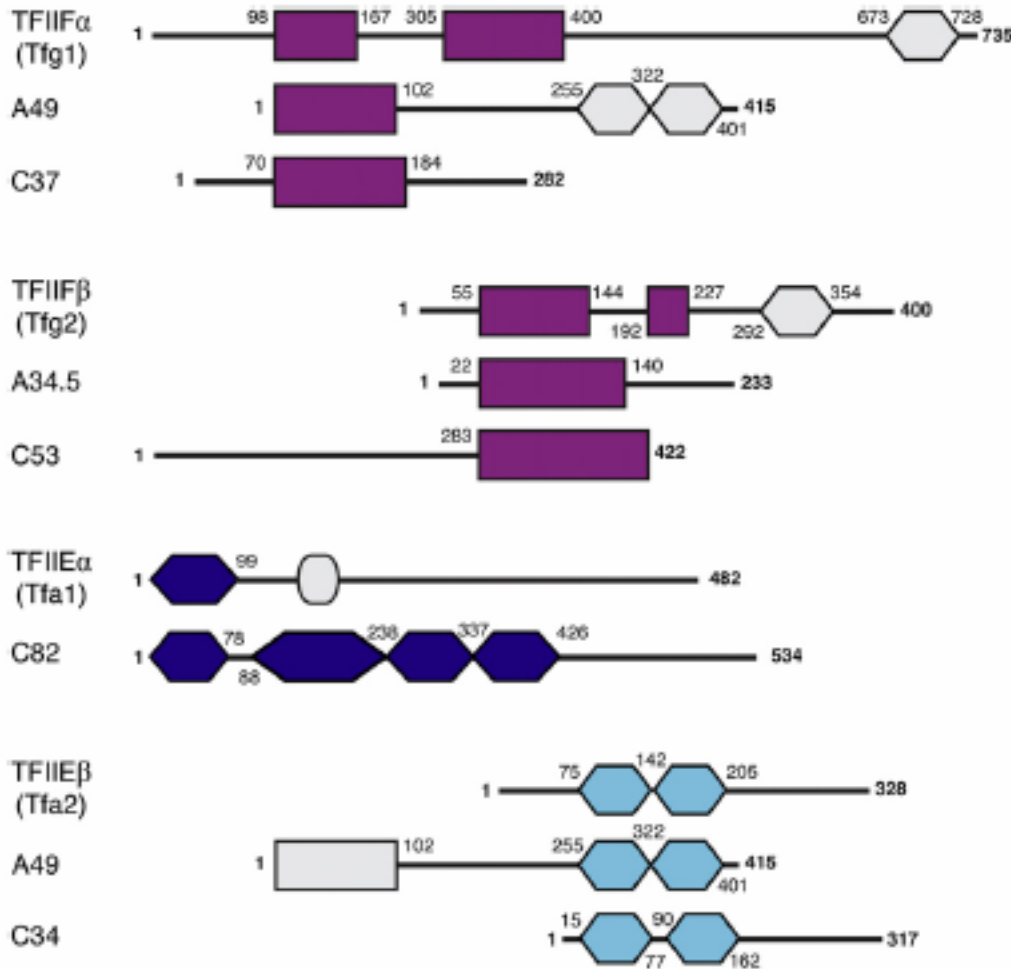


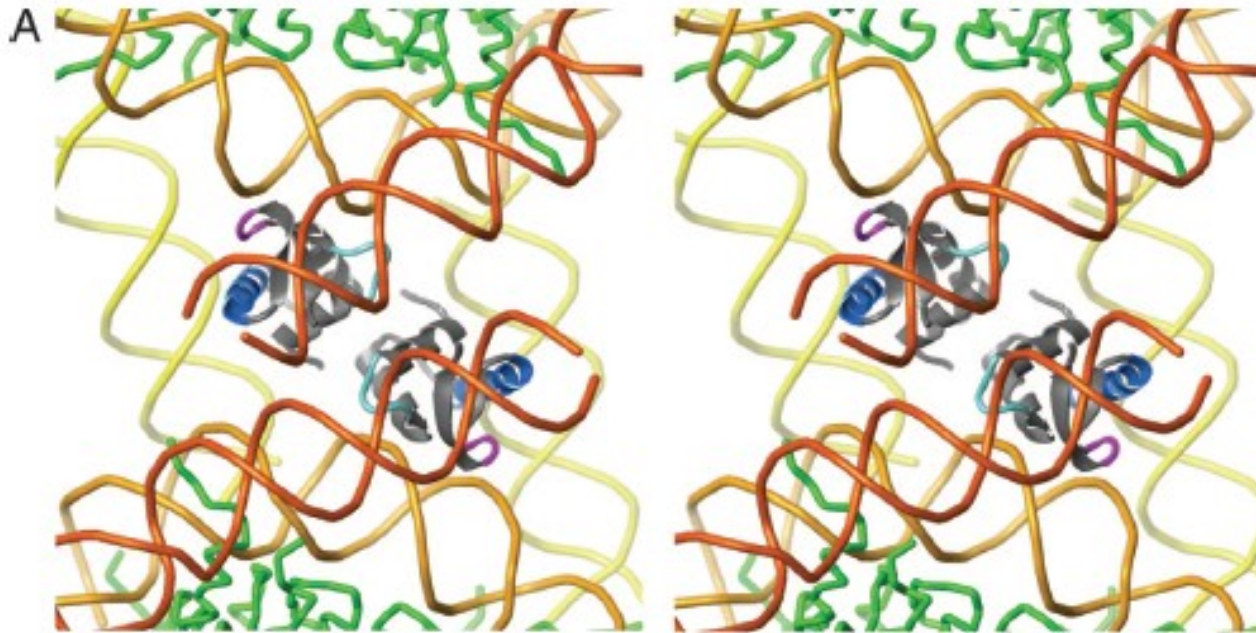
16. Ets domain (1bc8)

# Interakce bazí a cukr-fosfátové kostry se šroubovicí (H3)



- „winged“ HTH v mnoha specifických transkripčních faktorech ale také v „general“ TFII faktorech

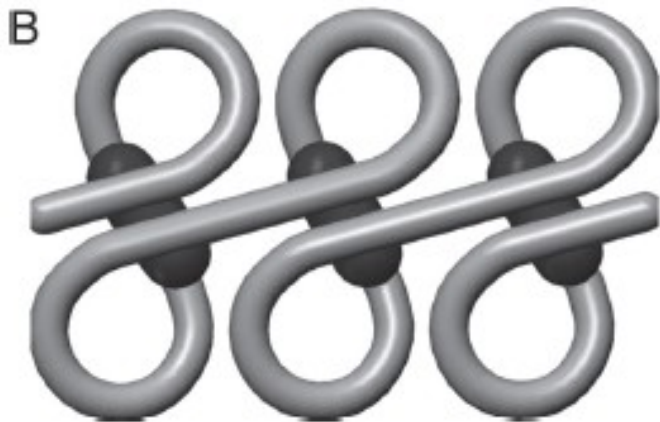




stereoskopický obrázek  
docking (pouze model)

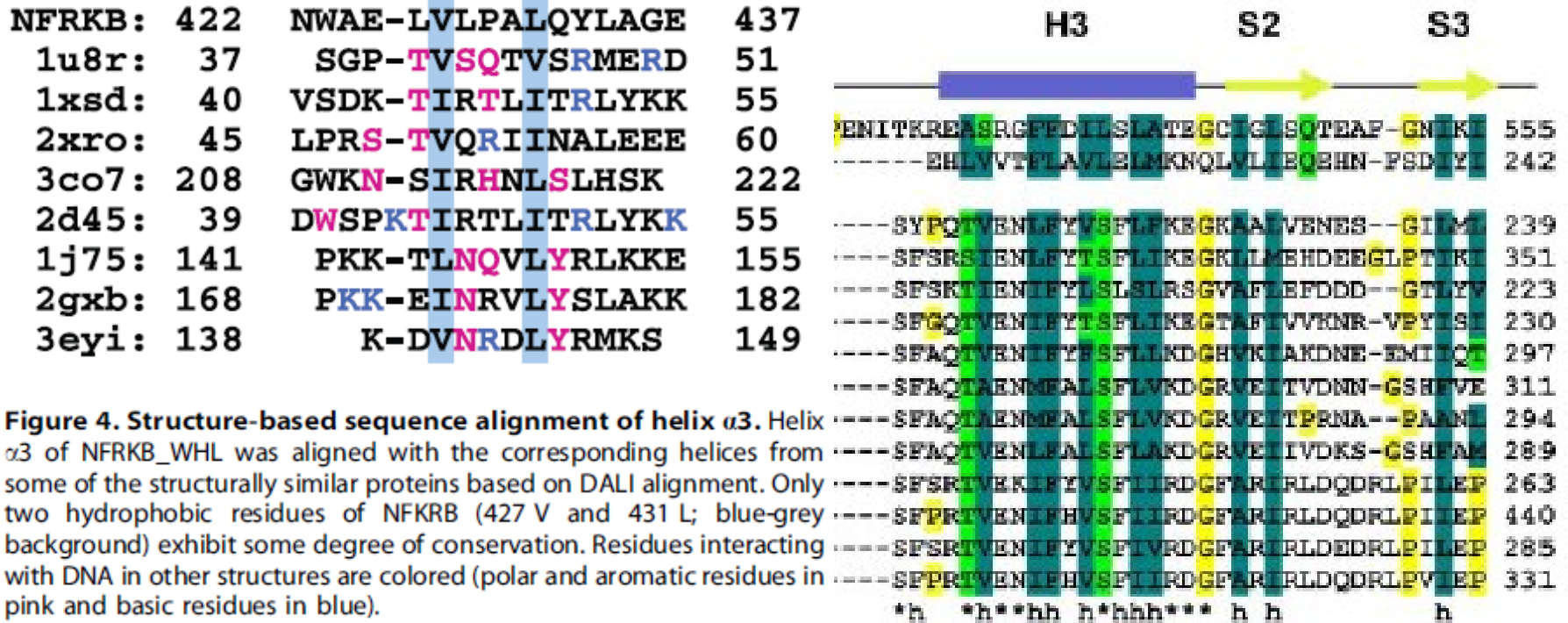
Skládání nukleosomů  
do kompaktnějších  
struktur

Fan & Roberts, PNAS, 2006



Histon H1/H5 interaguje s DNA (nukleosomem) a vytváří dimery (nukl. diady) – WHD doména může vytvářet více kontaktů (H3 šroubovice-MŽ, wing-cukrfosfátová kostra, protein-protein int.)

- „winged“ HTH obsahuje „recognition“ šroubovici (**H3**) a  $\beta$ -listy, které poskytují další kontakty s DNA
- WHD (i další struktury) poskytují pouze „kostru“ a záleží na postraních řetězcích jaká DNA nebo protein se naváže



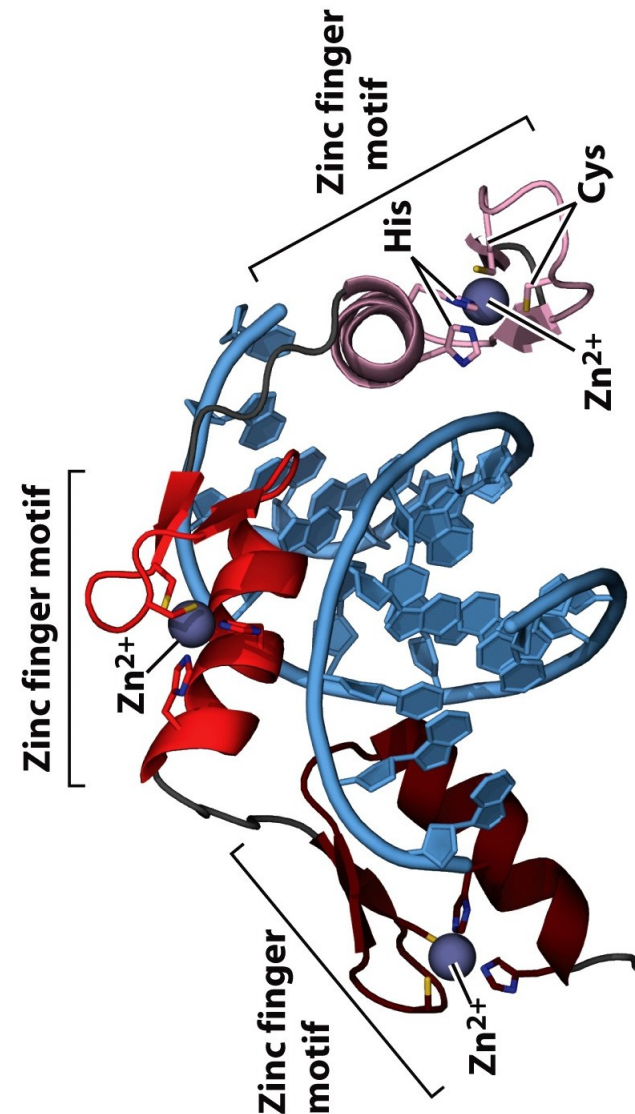
Nse4 kleisin interaguje s SMC5 proteinem prostřednictvím hydrofobních vazeb

# 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**
- $\beta$ -sheet
- $\beta$ -hairpin/ribbon
- **Enzymy**

$\alpha$ -šroubovice

$\beta$ -listy

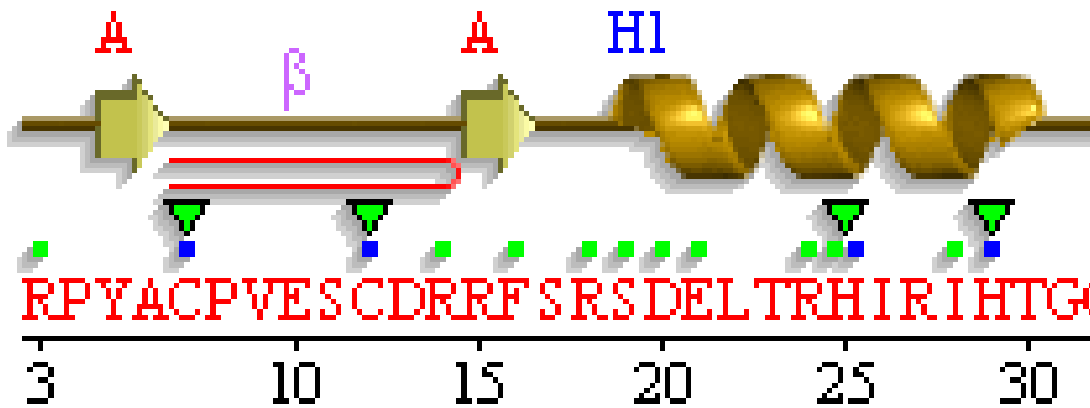
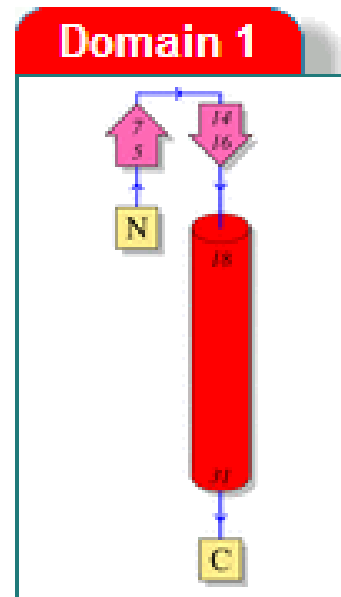


# Zinc-finger/Zinkový prst

- cca 30 AMK ve dvou krátkých antiparalelních  $\beta$ -listech a  $\alpha$ -šroubovici
- smyčka („hairpin“) stabilizovaná („crosslinked“)  $Zn^{2+}$  - koordinovaný 4xCys nebo 2xCys + 2xHis (tetraedrická struktura)

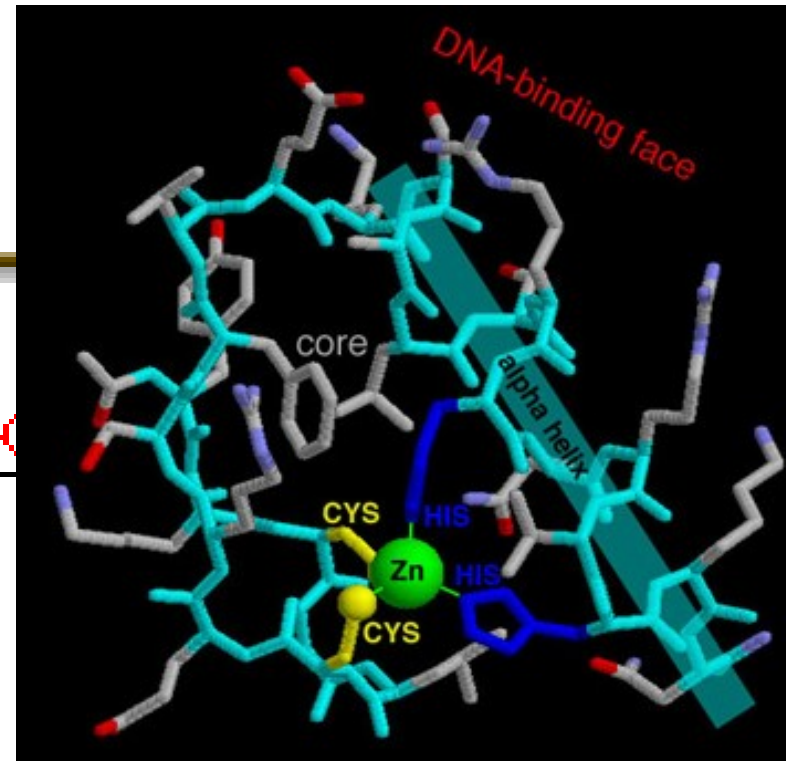
C2H2 motiv:

Cys-X<sub>2-4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-Phe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3</sub>-His



Motifs:  $\beta$  beta turn beta hairpin

Residue contacts: to DNA/RNA to metal



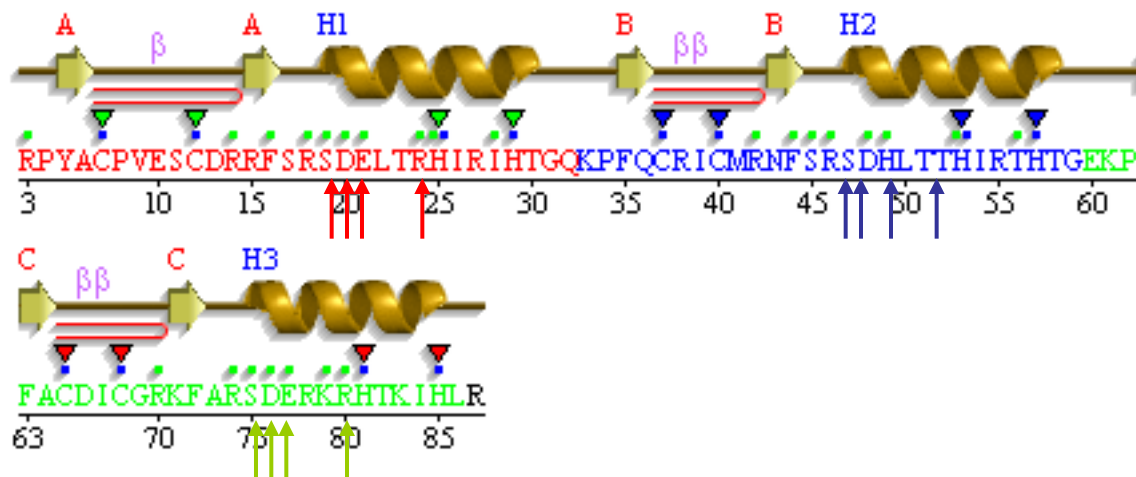


- vazba na DNA je relativně slabá, takže se typicky vyskytuje tandemově několik domén za sebou (3x v Zif268)
- $\alpha$ -šroubovice se váže do VŽ – v tandemu obtáčí VŽ

- $\alpha$ -šroubovice váže 3 sousední páry bazí (AMK na pozici -1,2,3,6)
- variancemi AMK v těchto pozicích lze dosáhnout různé sekvenční specifity



Protein chain C highlighted  
(click to view)

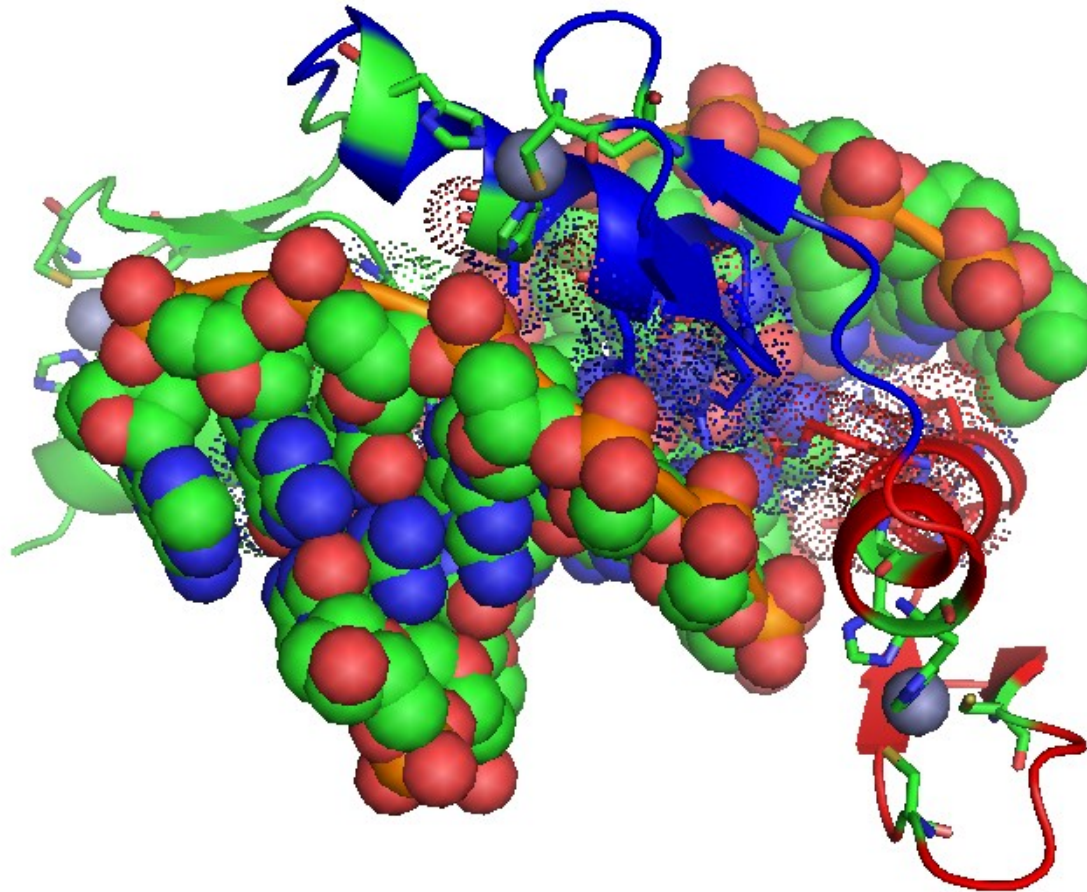


Motifs

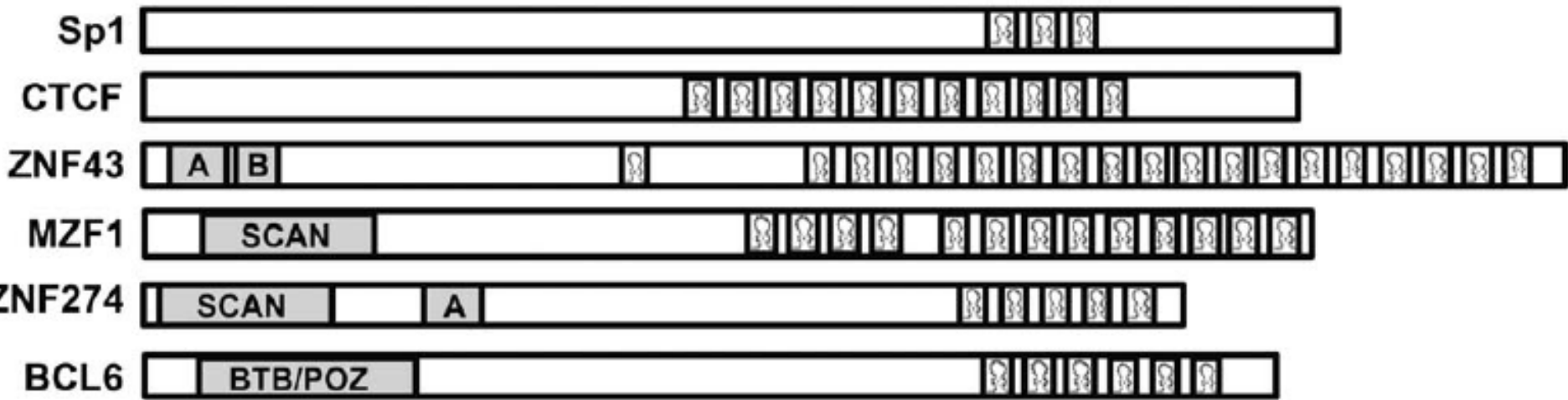
Secondary structure

Wiring diagram

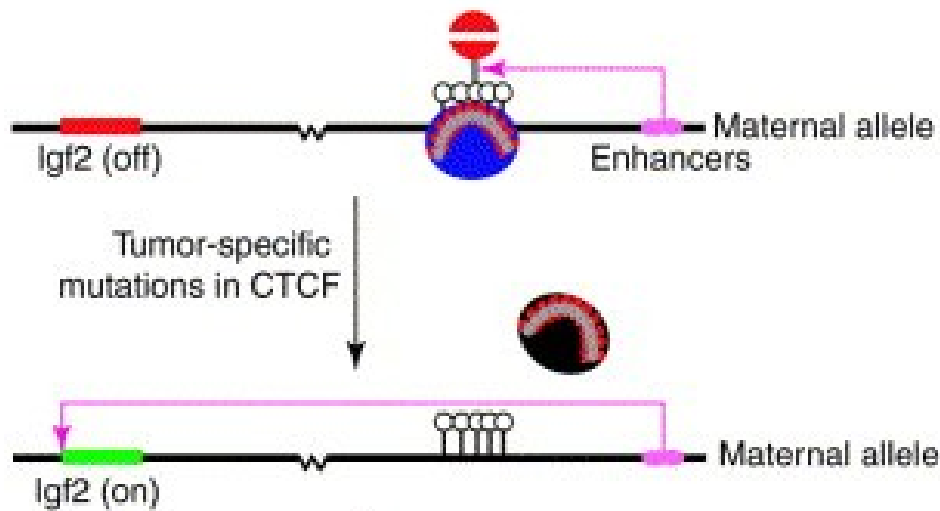
- $\alpha$ -šroubovice váže 3 sousední páry bází (AMK na pozici -1,2,3,6)
- $\alpha$ -šroubovice se váže do VŽ – v tandemu obtáčí VŽ



1ZAA, Zif268



The *H19* ICR insulator

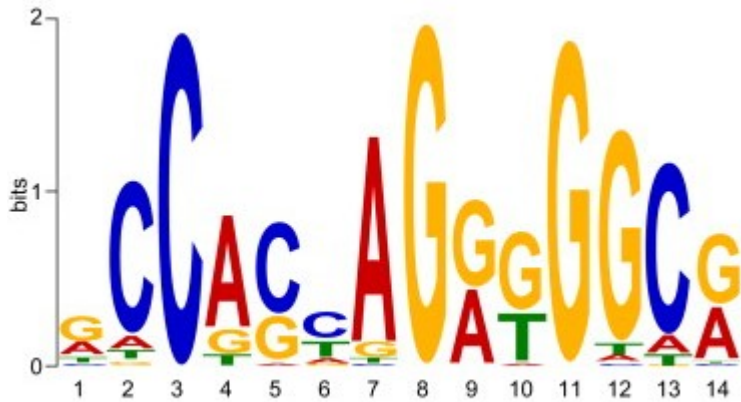


Razin a spol., Biochemistry, 2012

		-1	2	3	6	
ZF5	Ts	YHCPHC	SYASPD	TYKLRH	HLRVHTG	KPKP
	Hs	FOCSL	CSYASRD	TYKLRH	MRTHSG	KPKP
	Dm	YQCPHC	TYASQD	MFKLRH	HMVIHT	GKKP
ZF6	Ts	YQCEV	CNORFT	OSNSLKA	HKL.IH	SG.SRPV
	Hs	YECYI	CHARPT	OSGMTKM	HILQK	TENVAK.
	Dm	YQCDI	CKSRFT	OSNSLKA	HKL.IH	SVVDKPV
ZF7	Ts	FOCKF	CPSSCG	RKTDLR	IHVQKL	HTA.SAP
	Hs	FHCPH	CDTVIAR	KSDLVG	HLRKO	HSYIEQG
	Dm	FOCNY	CPTTCGR	KADLRV	HIKHM	HTS.DVP
ZF8	Ts	IKCKK	CDRTFT	DRYTFK	LHCKEH	DGERC
	Hs	KKCRY	CAVEHER	YALIQ	HQKSH	KNEKR
	Dm	MTCRRC	GGQLP	DRYQYK	LHVKSH	HEGKC
ZF9	Ts	YQCHL	CPYSAMA	QRHLEA	HHTLLH	HSDKP
	Hs	FKCDQ	CDYACR	QERHMI	MHKRT	HTGKPK
	Dm	YSCKL	CSYASV	TQRHLS	HMLIH	LDEKP
ZF10	Ts	YKVD	CNLSFK	OVSLLR	KHVEST	HAANO
	Hs	YACSH	CDKTFR	KQLLDM	HFKRY	HPNFV
	Dm	FHC	DQCPQAF	RQRLLR	HMNLV	HNEEYQ
ZF11	Ts	LNDNL	ASPST	SGVSVAS	ASSSSS	FSSTSPNS
	Hs	PA...	AFV	CGKTF	TRRNTMA	RHADNCA
	Dm	PPEPRE	KLHK	PS	CPREF	THKGNLMRHMETHD

insertion

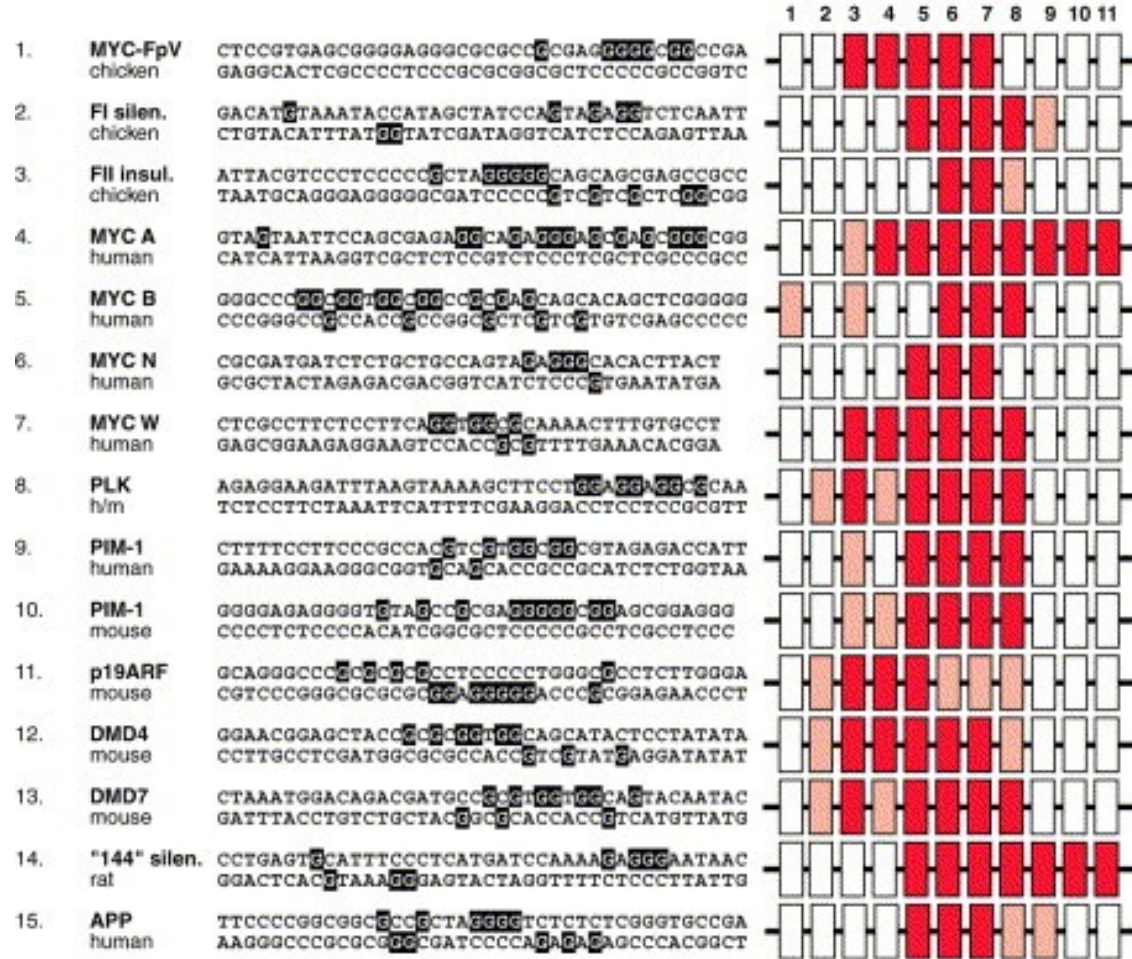
- obsahuje 11 zinkových prstů – k vazbě na DNA používá různé kombinace ZF



Stitzel a spol., Cell Metabolism, 2010

- CTCF funguje též jako kotva pro nukleosomy  
 - interaguje s kohesinem a podílí se na utváření vyšších chromatinových struktur

### Variant CTS-Cores Displaying Critical CTCF-Contacting Guanines

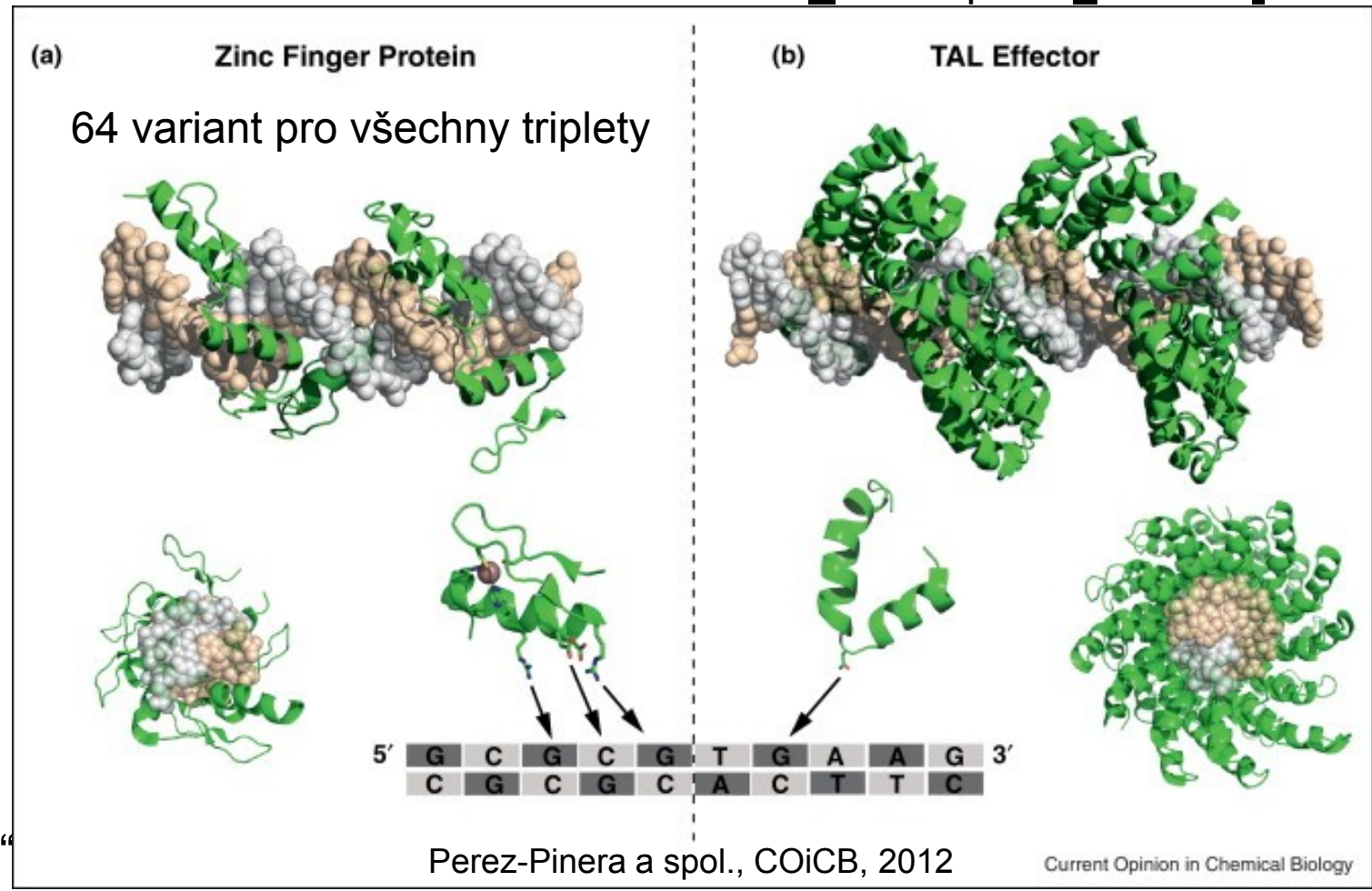
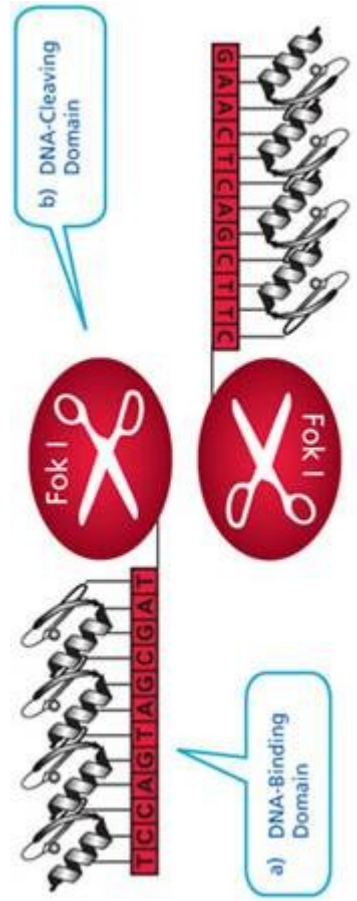


TRENDS in Genetics

Ohlsson a spol., TiG, 2001

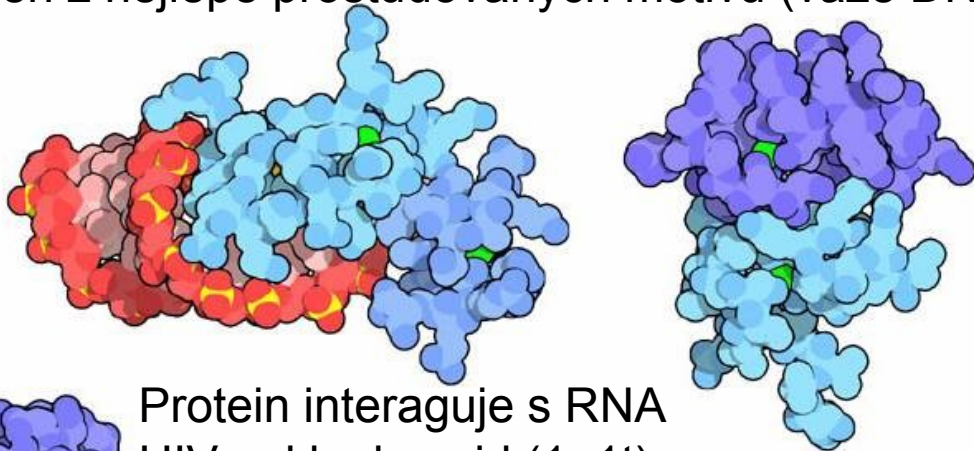
- $\alpha$ -šroubovice váže 3 sousední páry bazí (AMK na pozici -1,2,3,6)
- variancemi AMK v těchto pozicích lze dosáhnout různé sekvenční specifity (vazba do VŽ)
- proteiny obsahují několik zinkových prstů obtočených kolem DNA ve spirále

Transcription activator-like



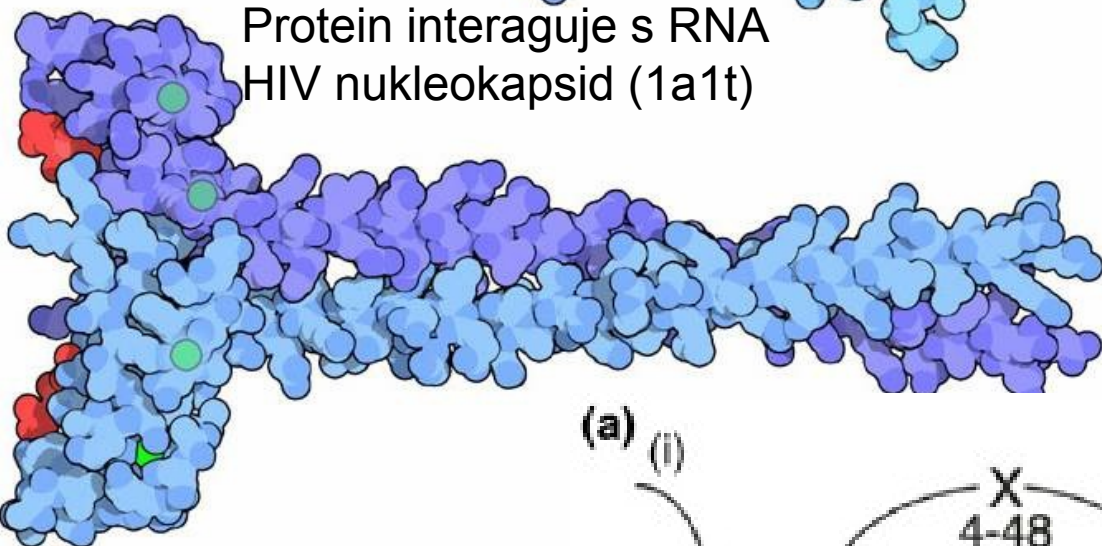
„genome editing“

- jeden z nejlépe prostudovaných motivů (váže DNA, RNA i v jiných typech proteinů)



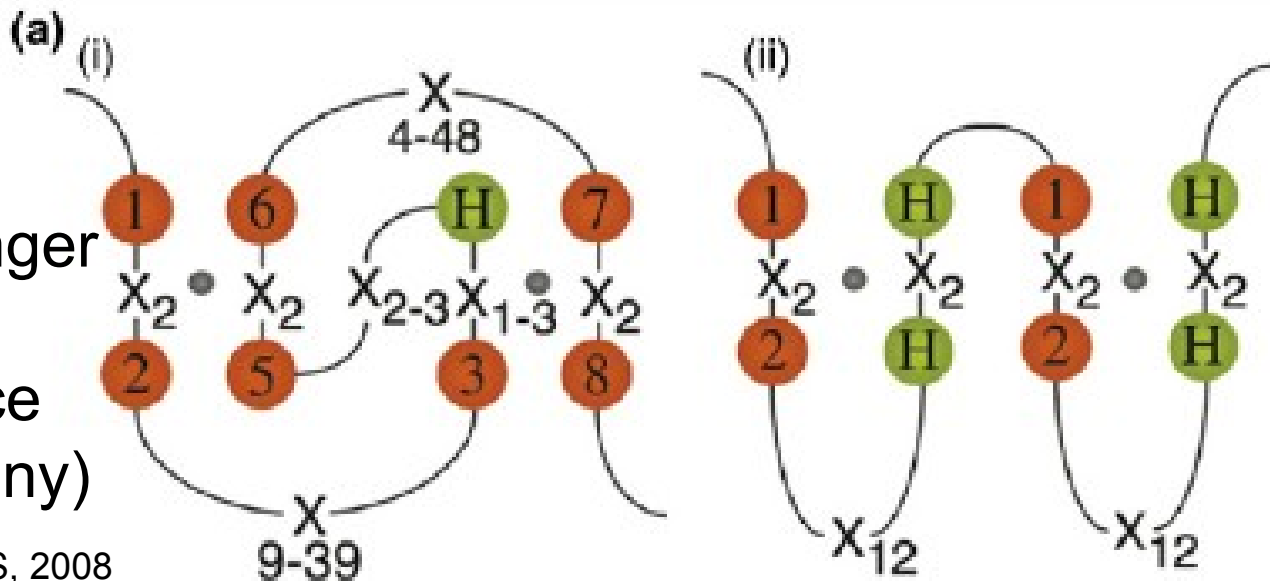
Vazba 2 zinkových prstů –  
spojuje 2 transkripční faktory  
(další ZnF vážou DNA): 1y0j

Protein interaguje s RNA  
HIV nukleokapsid (1a1t)



EEA1 protein se váže na  
specifický lipid obsažený v  
endosomech – esenciální pro  
transport molekul do buněčných  
kompartentů (1ioc)

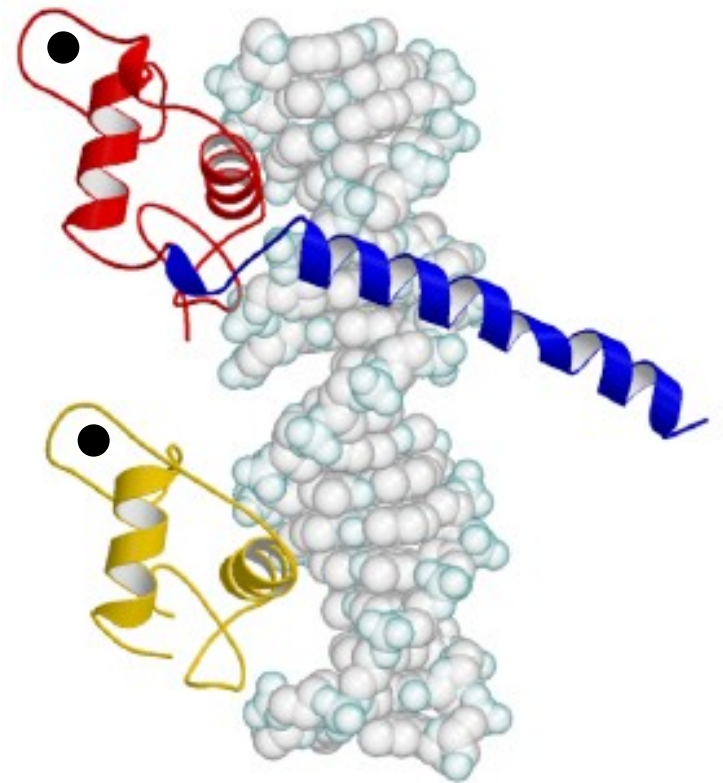
Rozdíl mezi Zinc-finger  
a RING-finger  
doménami (interakce  
mezi E2 a E3 proteiny)



# Hormon receptor family

Jaderné receptory – steroidní hormony, thyroïdní hormony a retinoidy – navázání ligandu stimuluje translokaci receptoru z cytoplasmy do jádra a vazbu na HRE (*hormon response element* - regulaci transkripce)

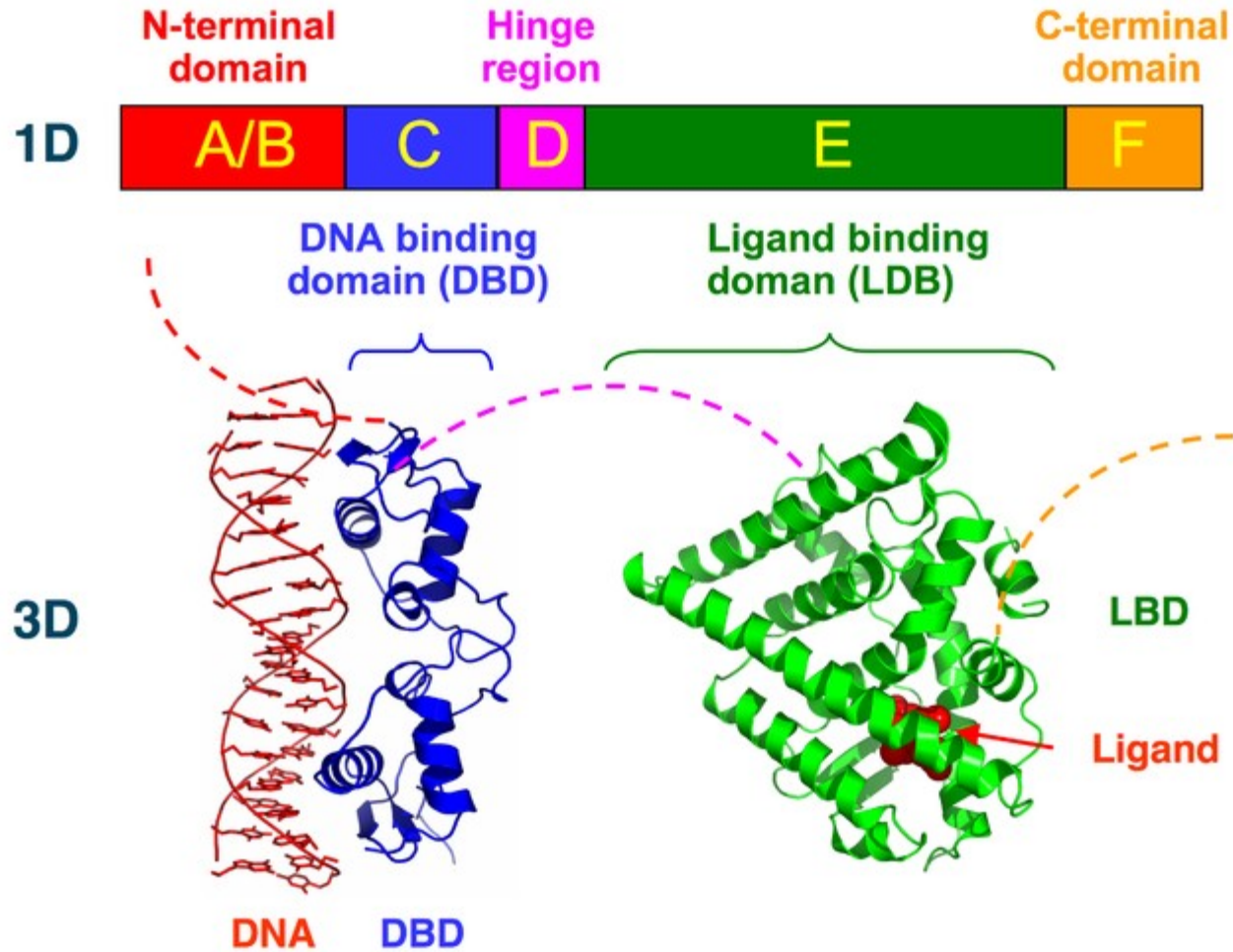
- $\alpha$ -šroubovice-smyčka(loop)- $\alpha$ -šroubovice (kolmé)
- 4 Cys koordinují Zn
- 1. helix ve velkém žlábků a smyčka s druhým helixem kontaktují cukr-fosfátovou kostru
- doména dimerizuje (přes smyčku)



18. Hormone receptor (2nll)

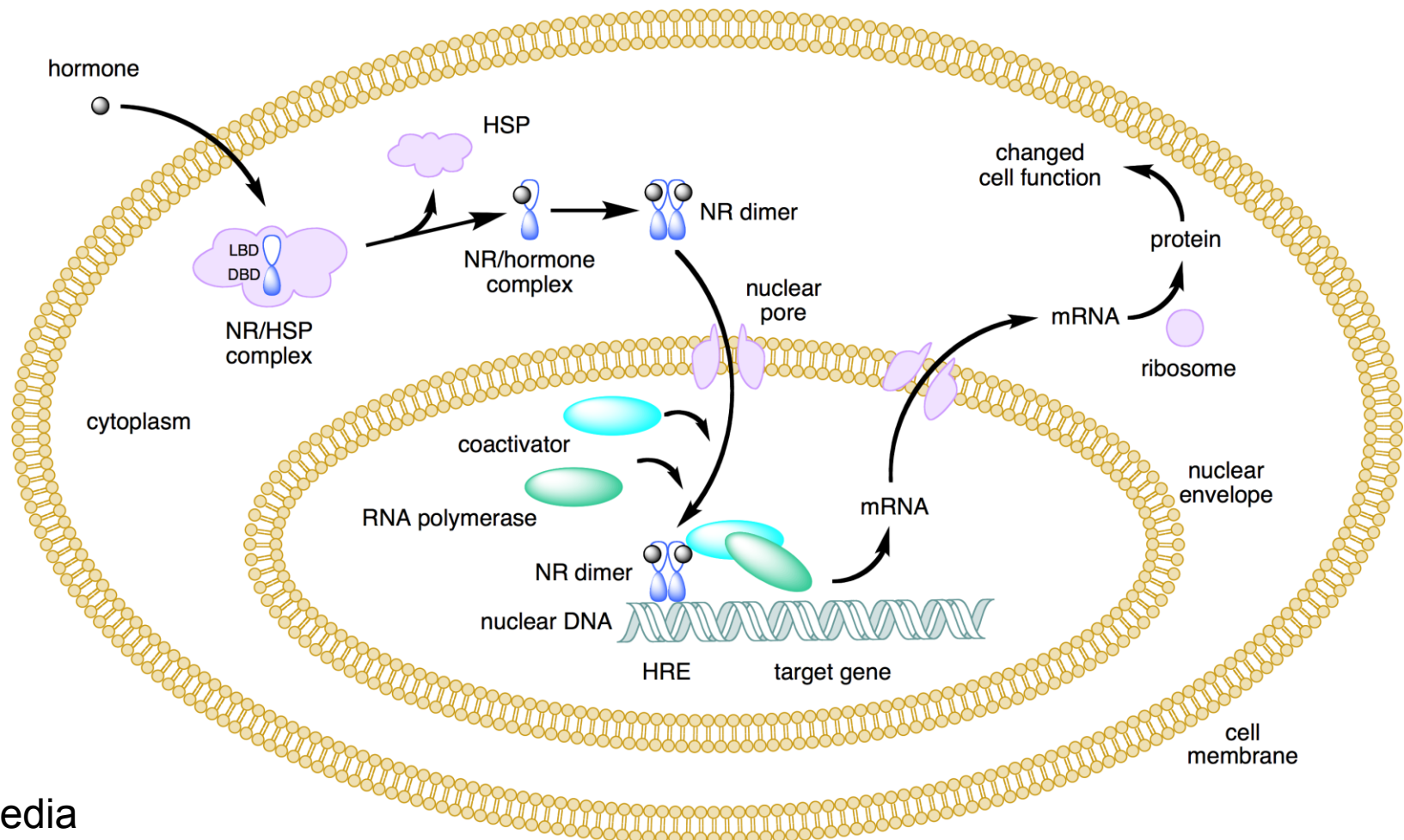
navázání ligandu stimuluje vazbu k DNA

## Structural Organization of Nuclear Receptors



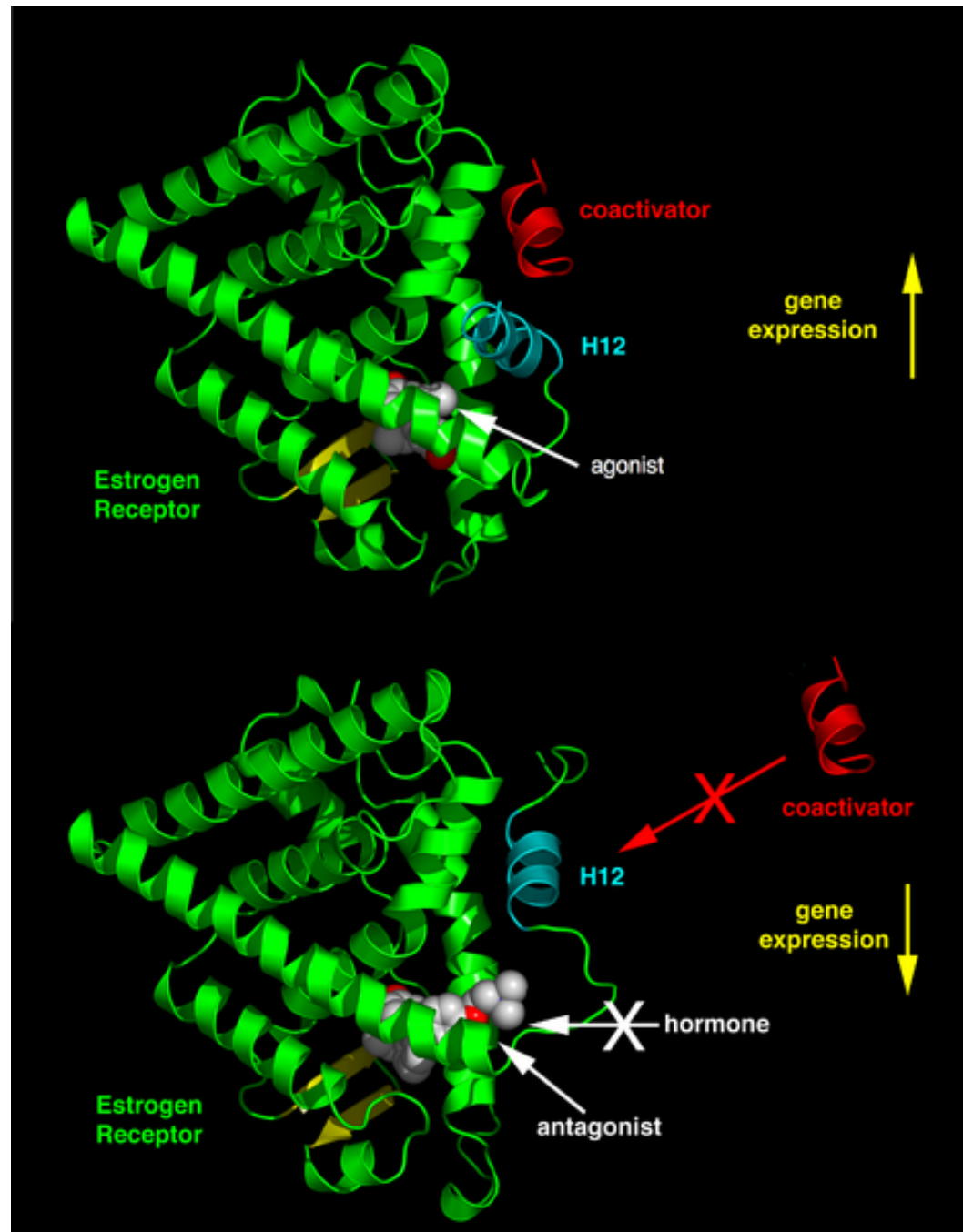


třída I (homodimery, cytoplasma) a třída II (heterodimery, jádro) – vazba ligandu také moduluje vazbu ko-aktivátorů (dalších transkripčních faktorů nebo chromatinových remodelátorů/např. histon acetylasy – acetylace uvolní histon)



- Hormony (estrogen) nebo syntetické látky (diethylstilbestrol) působí jako agonisté a stimulují vazbu koaktivátorů
- antagonisté (synt., hydroxytamoxifen) brání vazbě agonistů a koaktivátorů a stimuluje vazbu s korepresorem

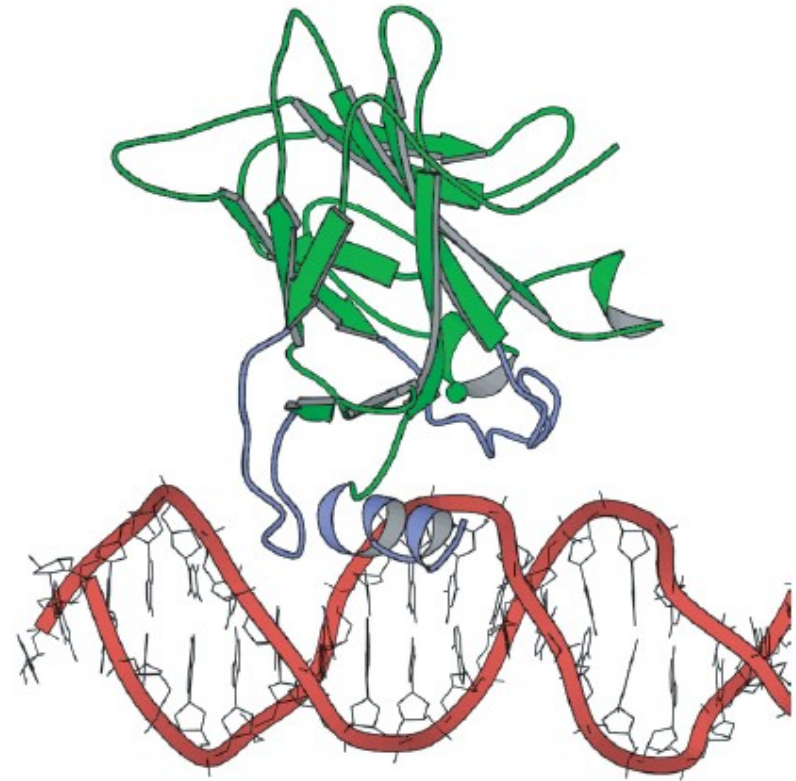
[http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor) - seznam receptorů a jejich ligandů



# Loop-sheet-helix

- core/DNA-vazebná doména p53 – transkripční faktor důležitý pro regulaci buněčného cyklu, apoptozy a opravy poškozené DNA (nádorový supresor)

- smyčky vycházející mimo hlavní core doménu – vyčnívá  $\beta$ -list a  $\alpha$ -šroubovice
- 3 Cys a 1His koordinují Zn
- helix ve velkém žlábkku a smyčka v malém žlábkku
- Aktivace transkripce skrze kyselou TA doménu



TFIID,TFIIH - transkripce



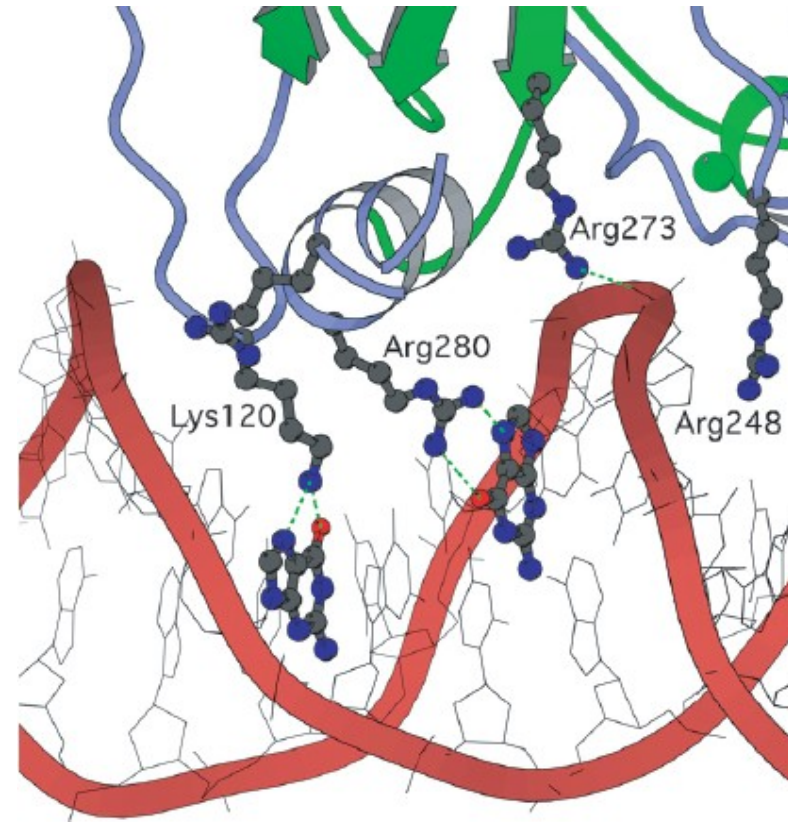
MDM2/MDM4 - ubi

# Loop-sheet-helix

- core/DNA-vazebná doména p53 – transkripční faktor důležitý pro regulaci buněčného cyklu, apoptozy a opravy poškozené DNA (nádorový supresor)

- Konsensus sekvence  
PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy  
(v promotorech p21, PUMA)
- 95% “nádorových” mutací je v „core“ doméně (R273H)
- Regulace/aktivace modifikací C-koncové domény

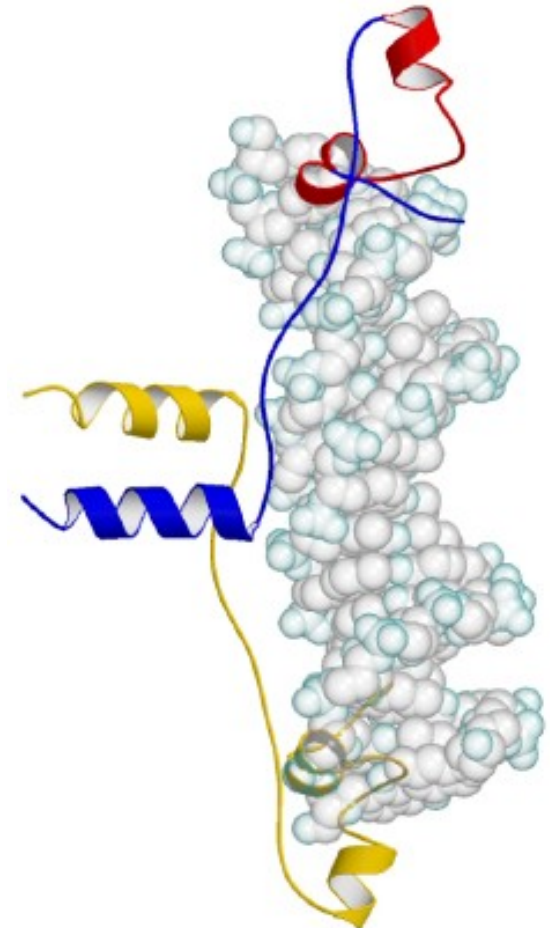
Protein se váže jako tetramer  
(C-koncová doména)



# Gal4

- transkripční faktor reguluje v kvasinkách metabolismus galaktosy (kvasinkový dvou-hybridní systém)

- 2  $\alpha$ -šroubovice
- 6 Cys koordinuje 2 Zn (2 Cys sdílené 2 Zn)
- 1. helix ve velkém žlábků a 2. kontakt s cukr-fosfátovou kostrou
- Dimerizuje přes krátký CC segment



# Gal4

