

Mendel lecture

Dnes od 17.00

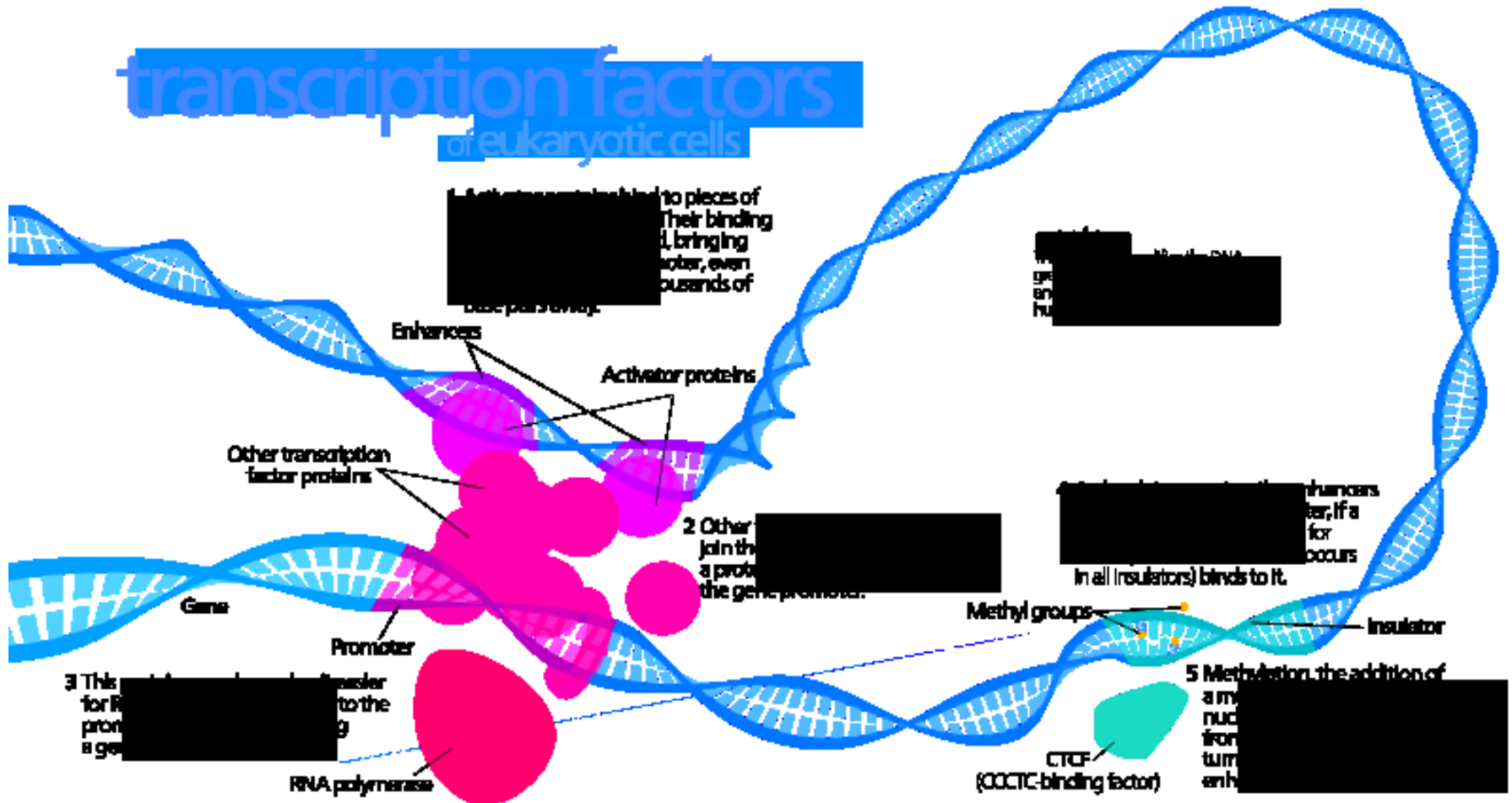
„Defensive RNA Silencing in plants and animals“

Olivier VOINNET

Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Switzerland

Komplexy spojené s transkripcí

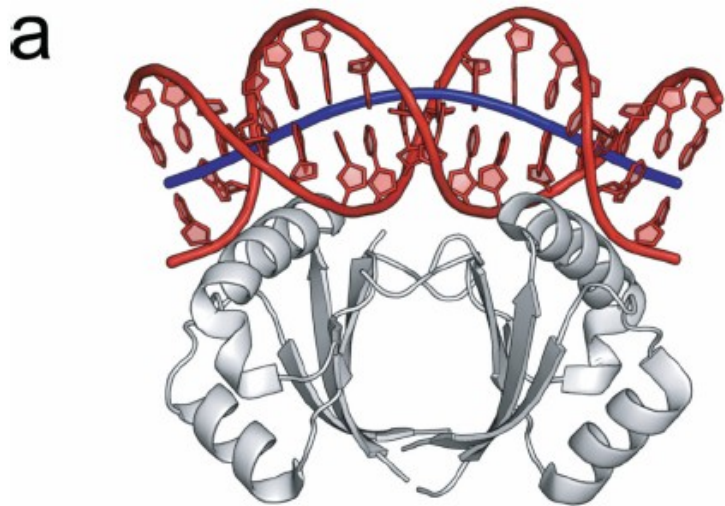
DNA-vazebné motivy specifických transkripčných faktorů
 Obecné TFII komplexy, histon ... a proces transkripce



- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované H-vazebné skupiny
- Nejčastěji interaguje **Arg** (pozitivní náboj + vodíkové vazby)
- **Další vazebné motivy (β -listy, hydrofobní AMK, malý žlábek)**

- **Zipper typ**
- **Helix-turn-helix**
- **Zinkový prst**
- **Histon, HMG-box**

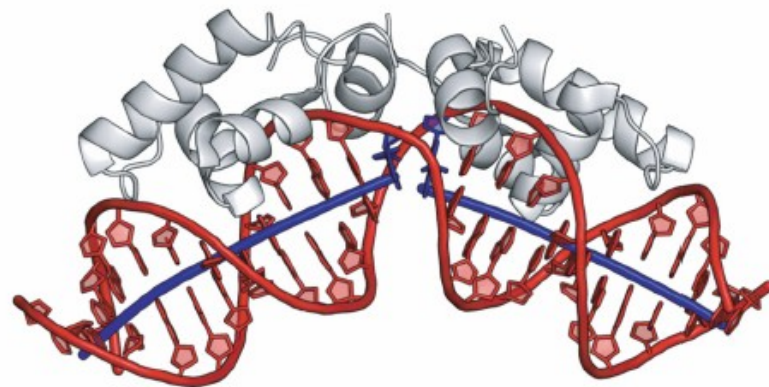
- **β -barrel**
- **β -hairpin/ribbon**
- **Smíšené α/β**



histon

Bend

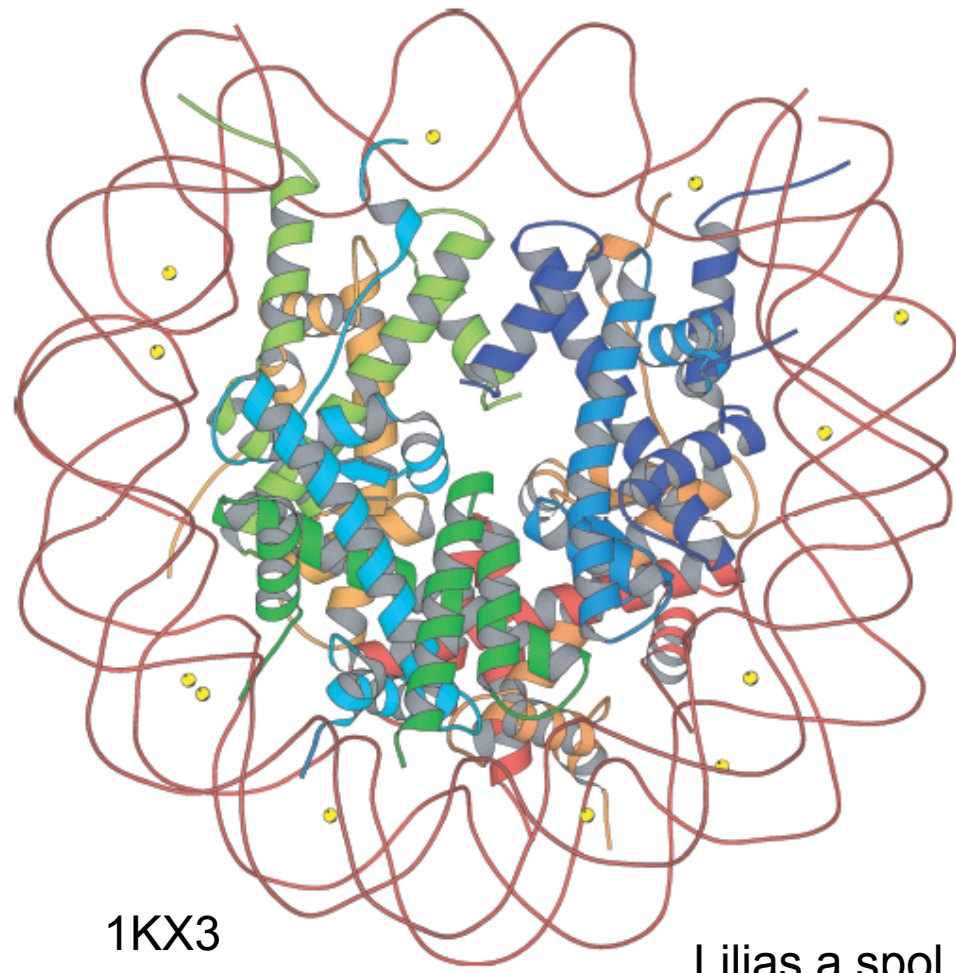
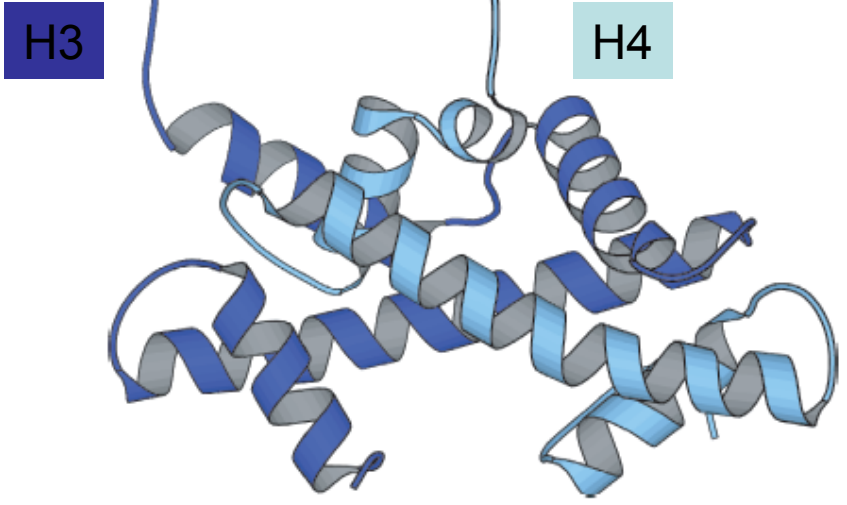
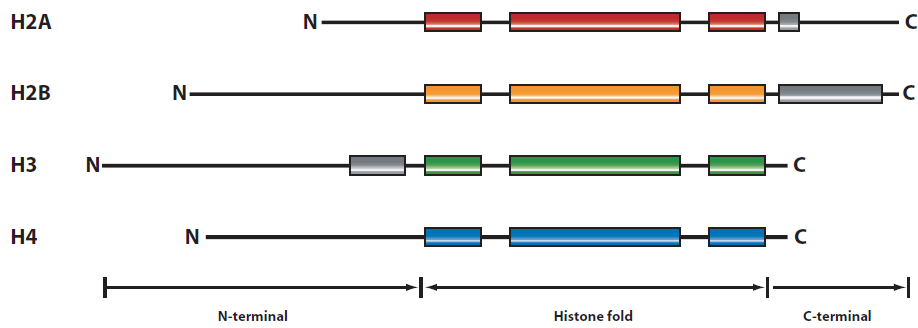
b



HMG

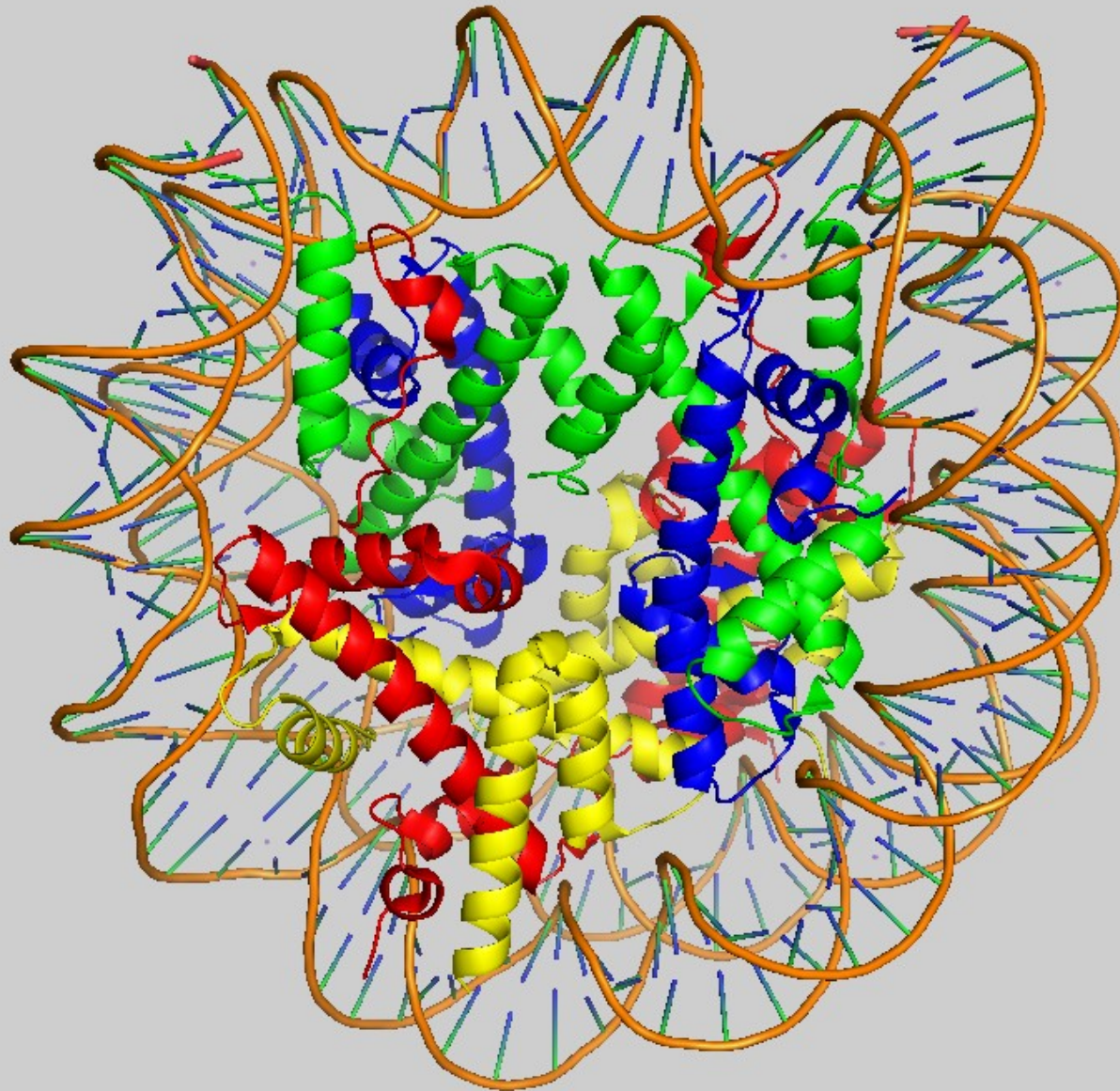
Kink

- histony 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

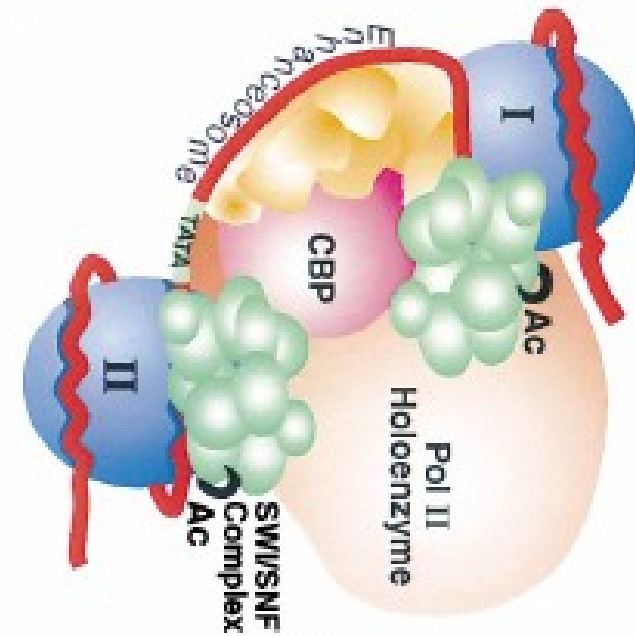


Liljas a spol.

H3/H4 interagují s oběma vlákny – silnější vazba

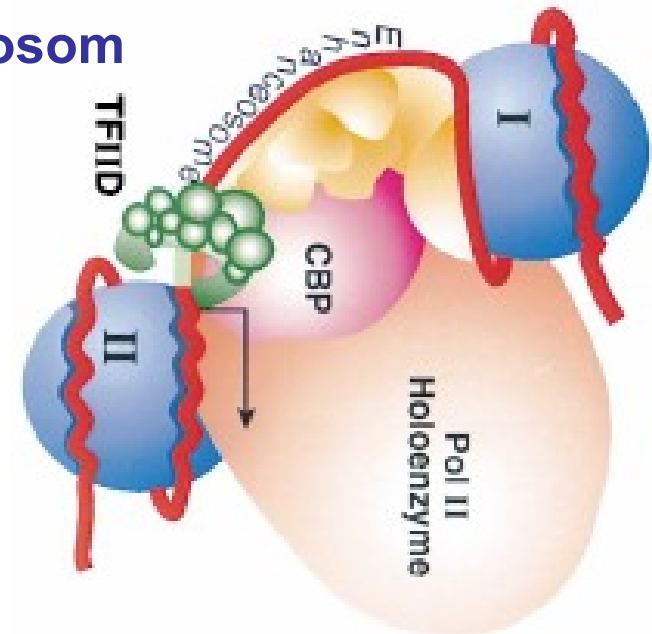
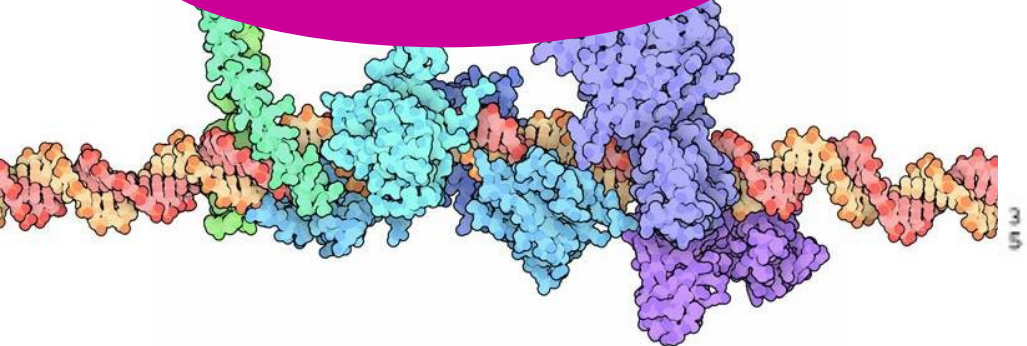


- AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- κ B pokrývá sekvenci -102 až -47 básí upstream od počátku transkripce
- nukleosom-free oblast (nukleosom downstream zakrývá TATA-box)
- všechny podjednotky (TA domény) enhanceosomu interagují s CBP/p300 acetylásou
- acetylace nukleosomu vede k jeho remodelingu/přemístění
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP/TFIID a RNA polymerasy II



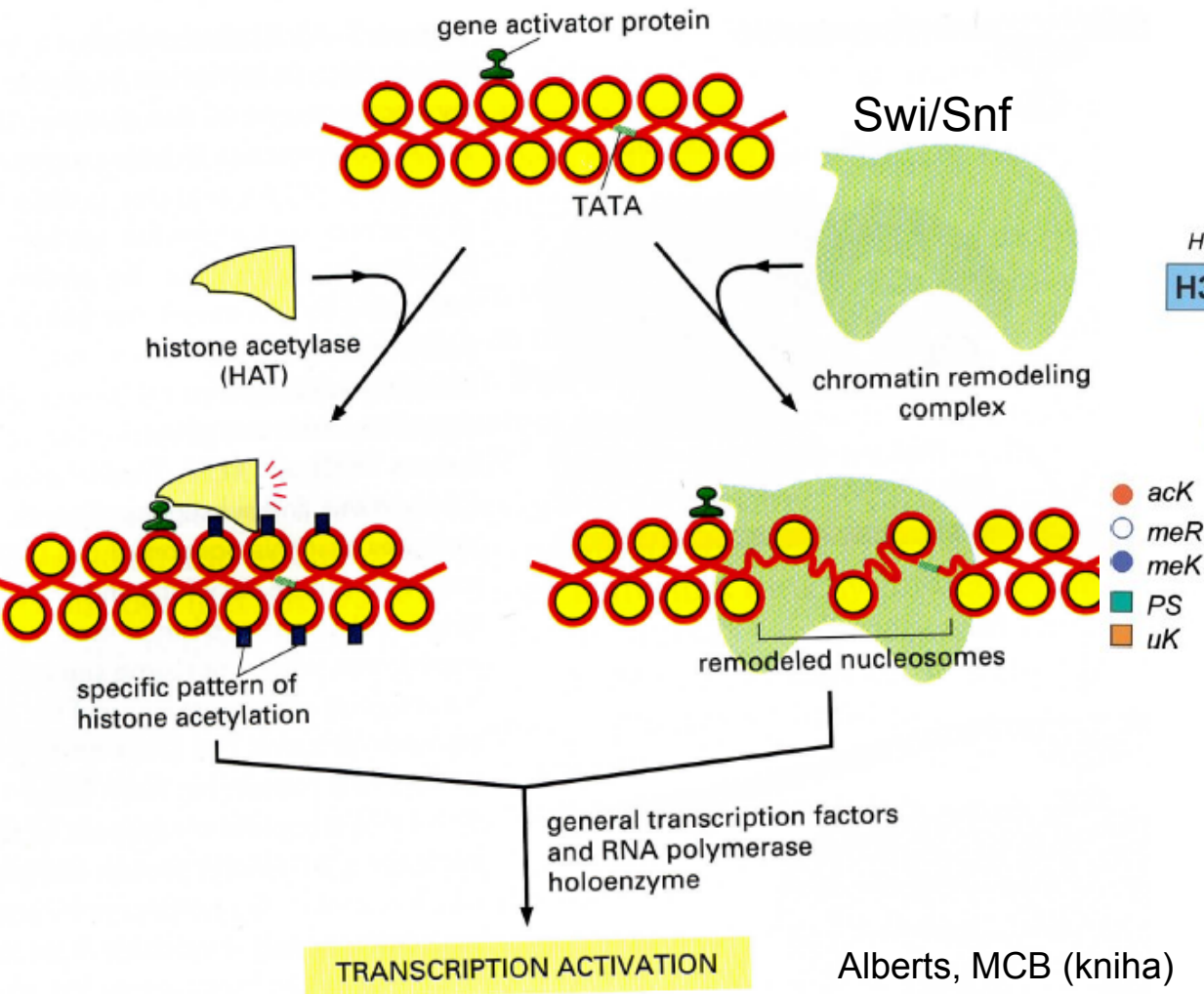
IFN- β enhanceosom

CBP/p300

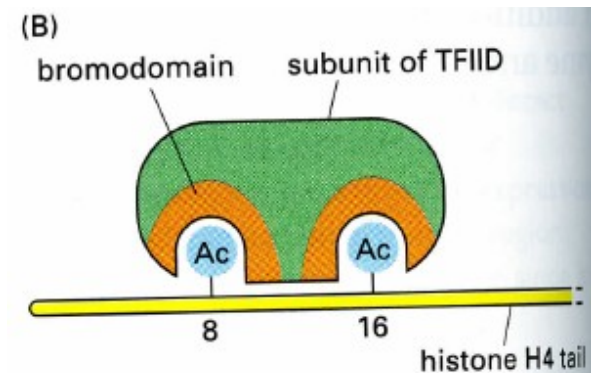
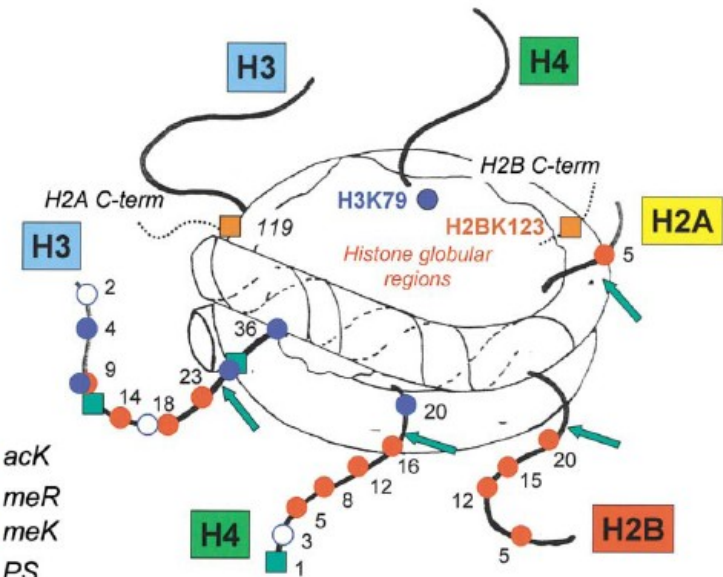


Modifikace histonů

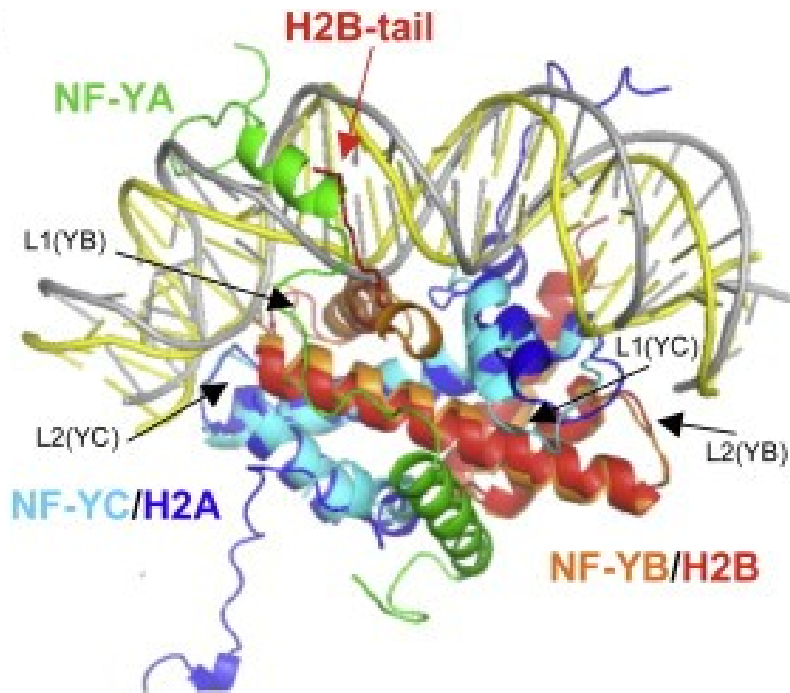
- acetylace rozvolňuje vazbu oktameru a zpřístupňuje sekvence DNA pro TBP
- TFIID se váže na Ac-H4 prostřednictvím bromodomény TAF1 proteinu



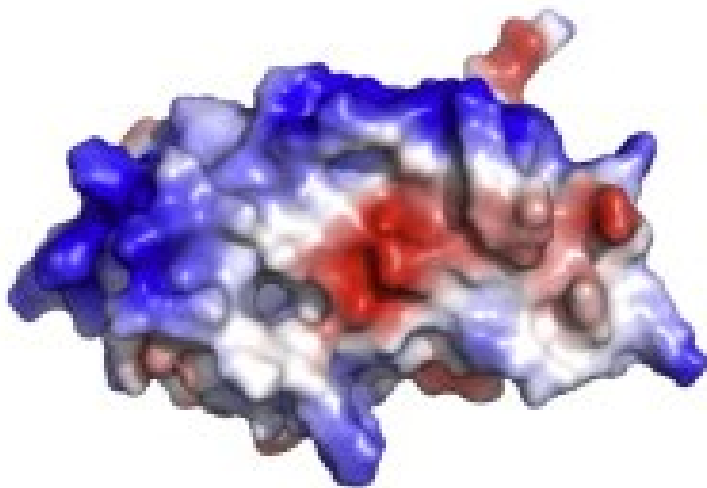
Alberts, MCB (kniha)



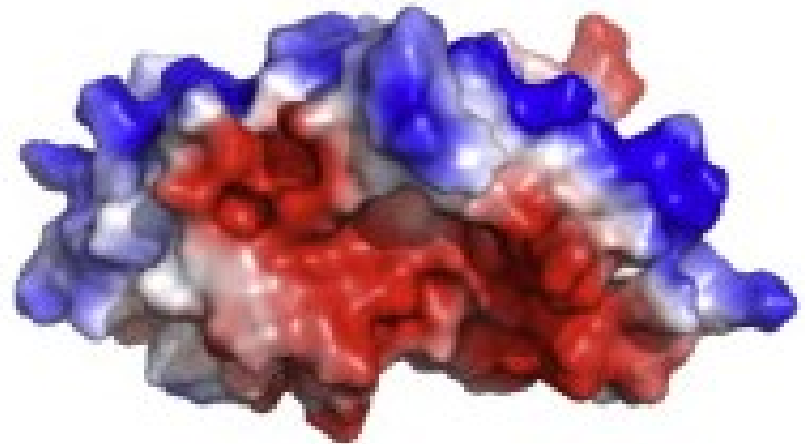
A



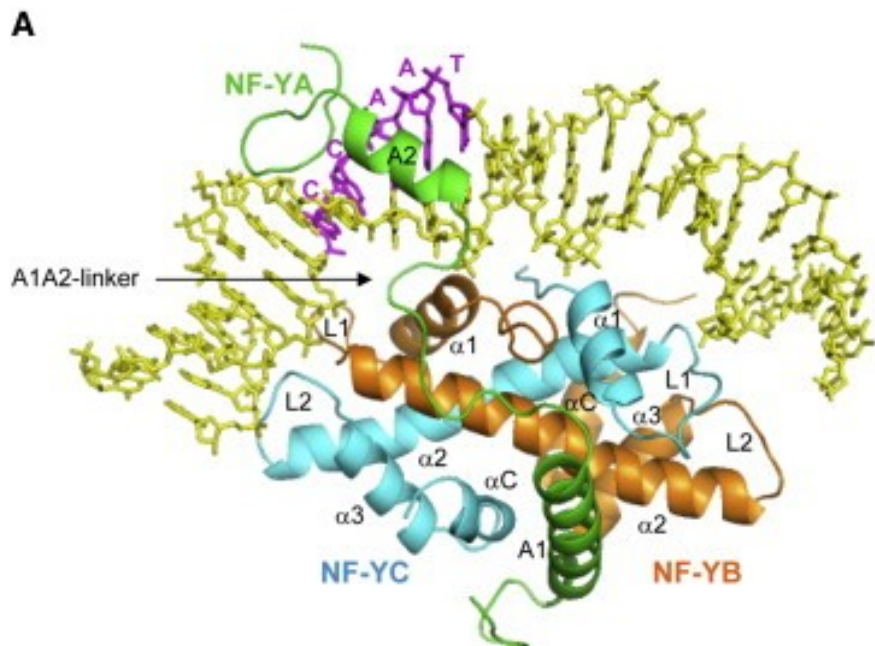
- **Transkripční faktory NF-Y** (podjednotky B a C) obsahují histon-fold a vážou se sekvenčně nespecificky na cukrfosfátovou kostru jako histony
- DNA se v důsledku vazby ohýbá podobně jako v nukleosomech
- NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -šroubovice (interkalace do MŽ)



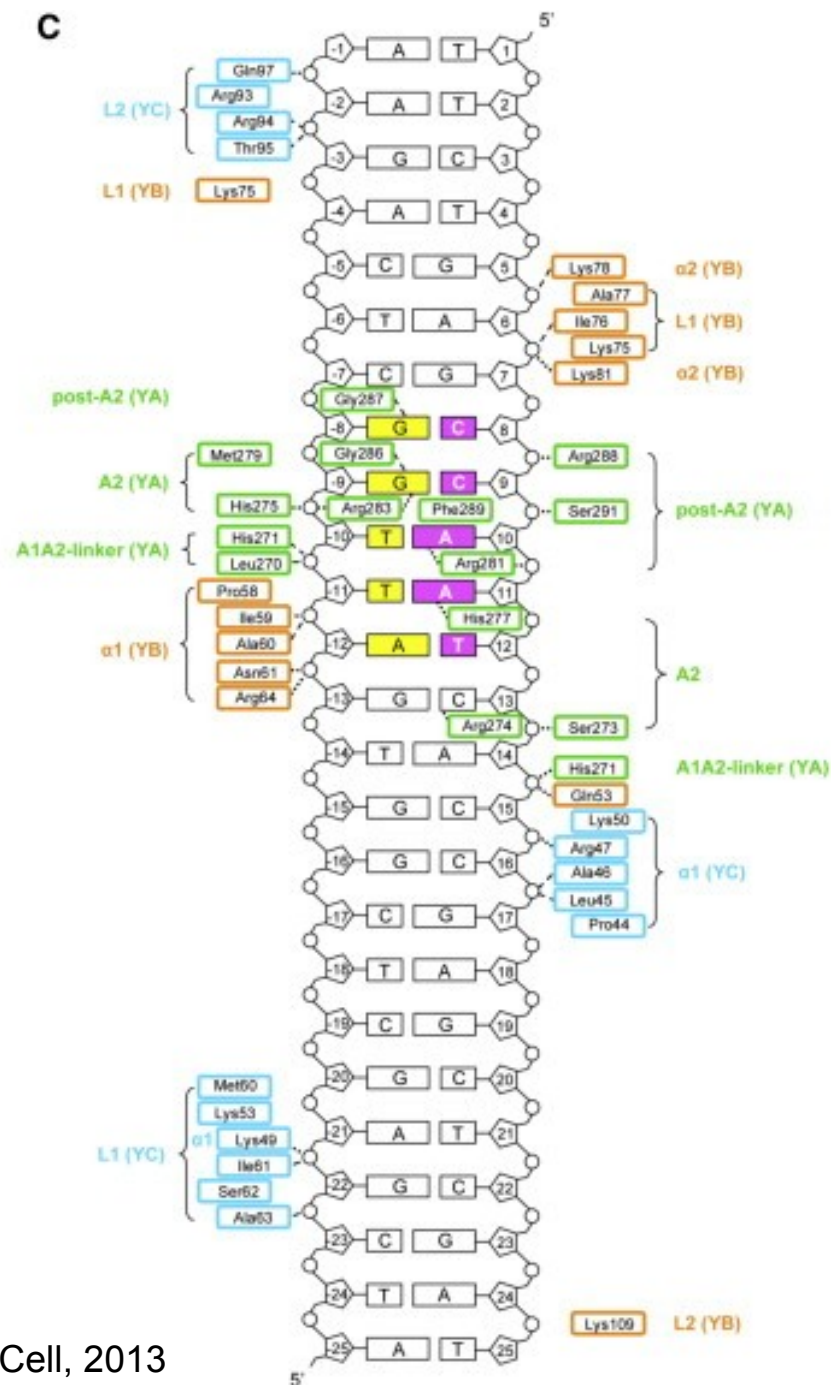
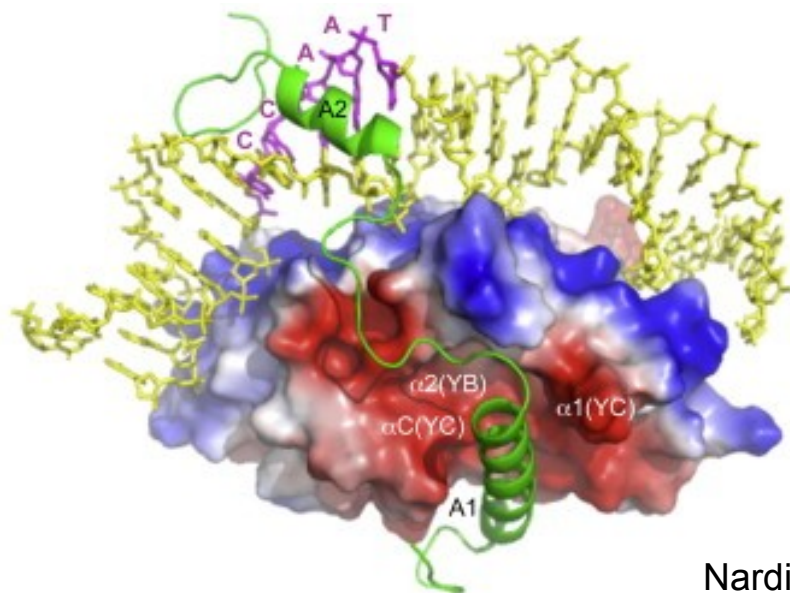
H2B/H2A



NF-YB/NF-YC



NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -šroubovice (interkalace do MŽ)



CCAAT-box
Promoter

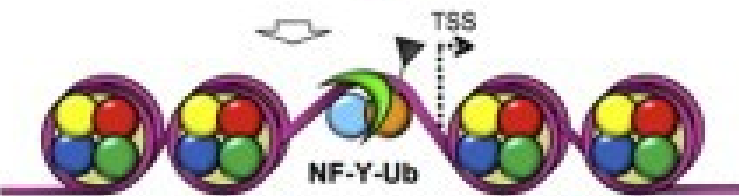
Inactive



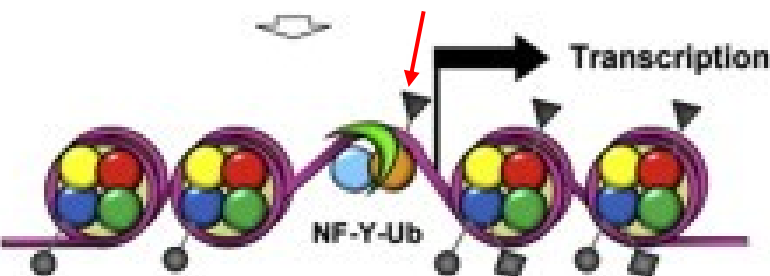
Poised



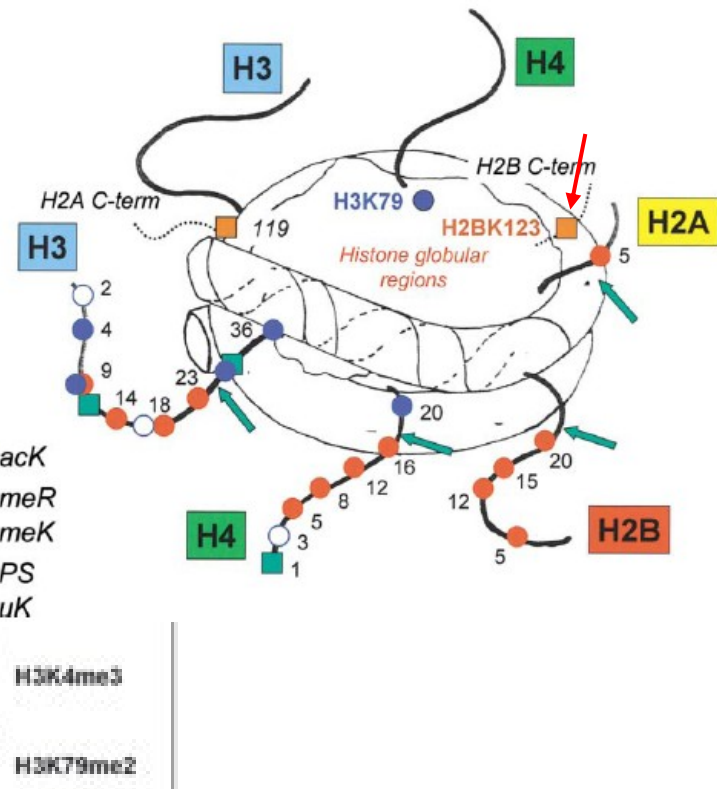
NF-Y / DNA complex



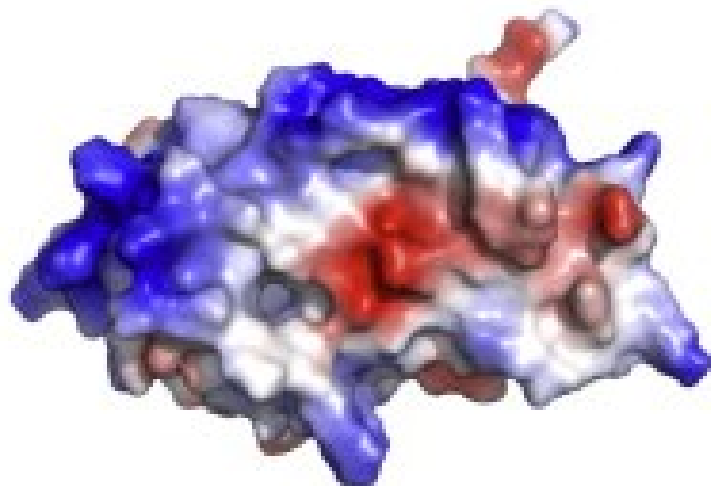
Active



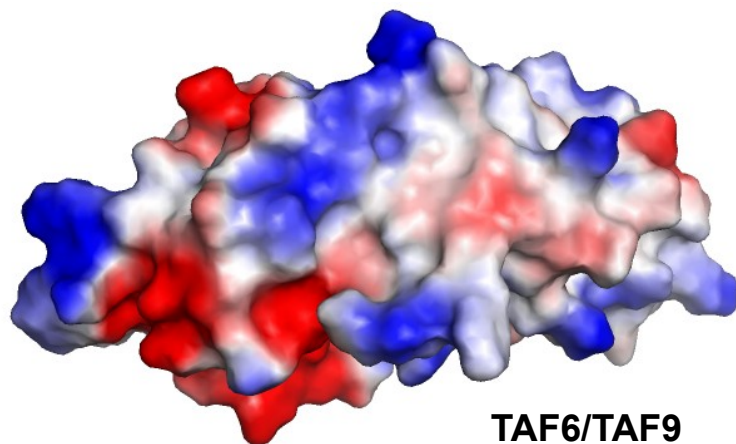
- NF-Y se váže přes histon-
fold a nahrazuje nukleosom
- podobně jako ubiquitince
histonu (H2B) i ubiquitinace
NF-YB aktivuje transkripci



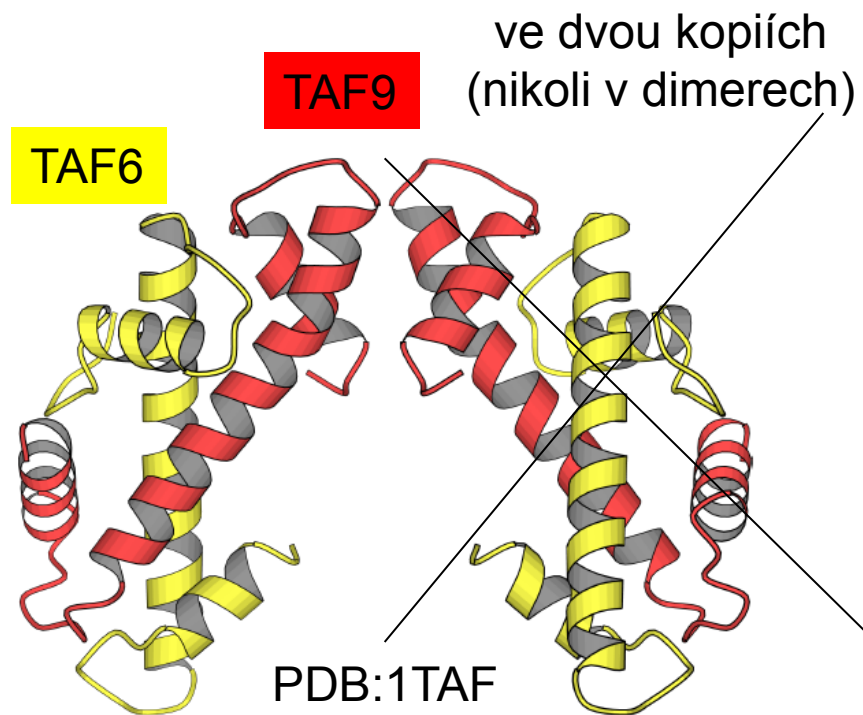
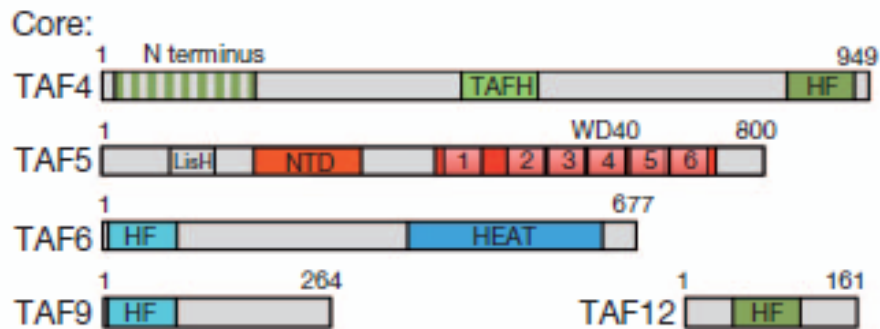
TBP-associated factors (9 z 13 podjednotek TFIID komplexu mají histon-fold, ale nevytváří oktamery)



H2B/H2A



TAF6/TAF9

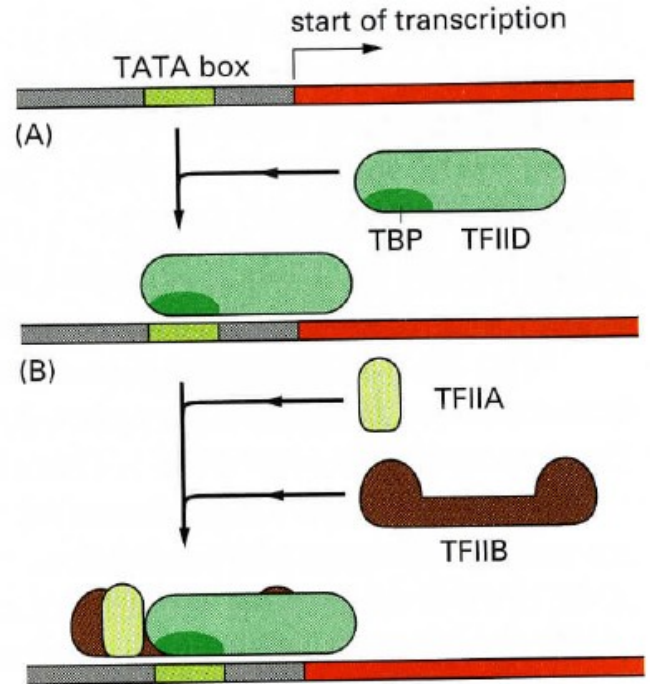
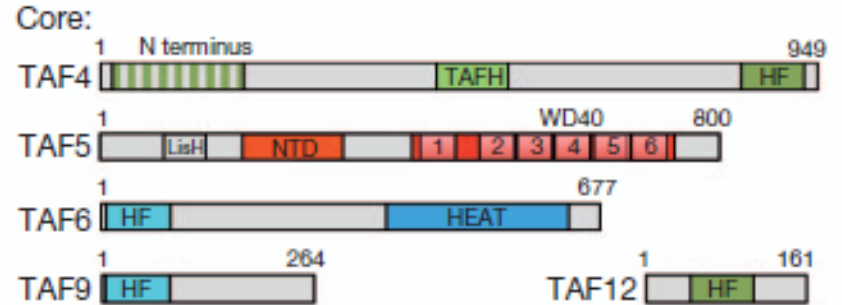
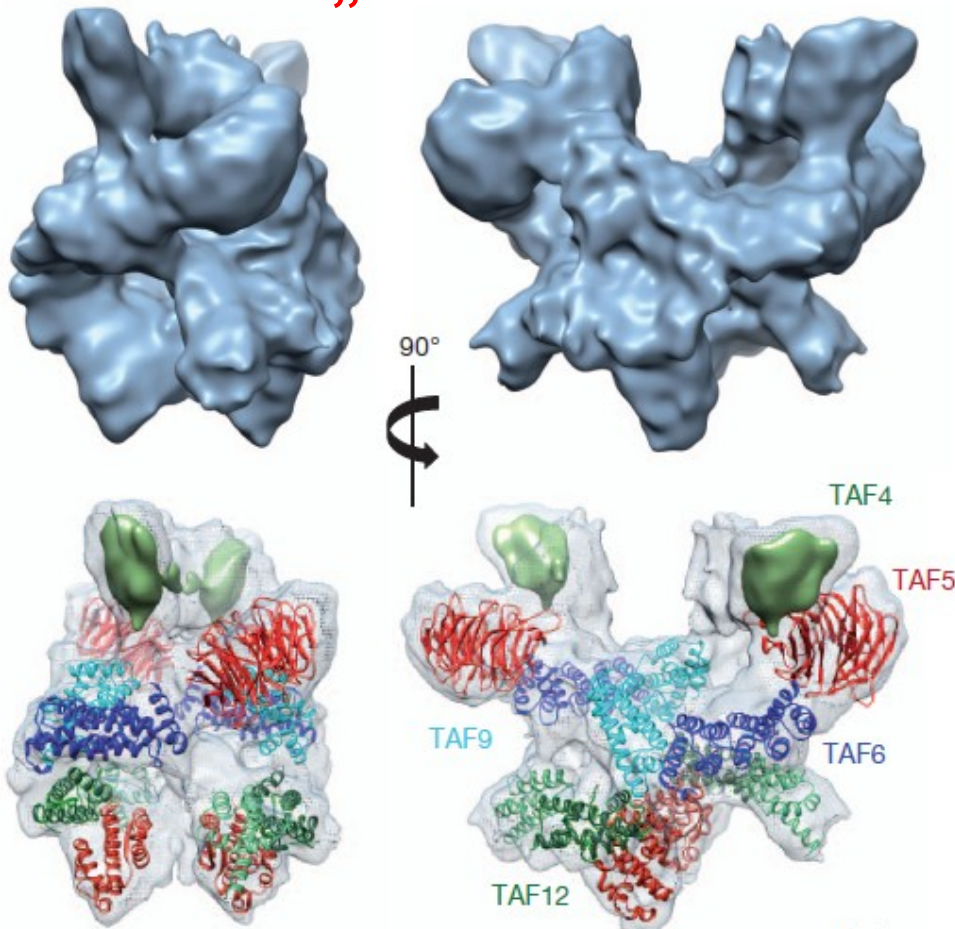


Histon-fold doména se neváže na DNA (podílí se C-konec)

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

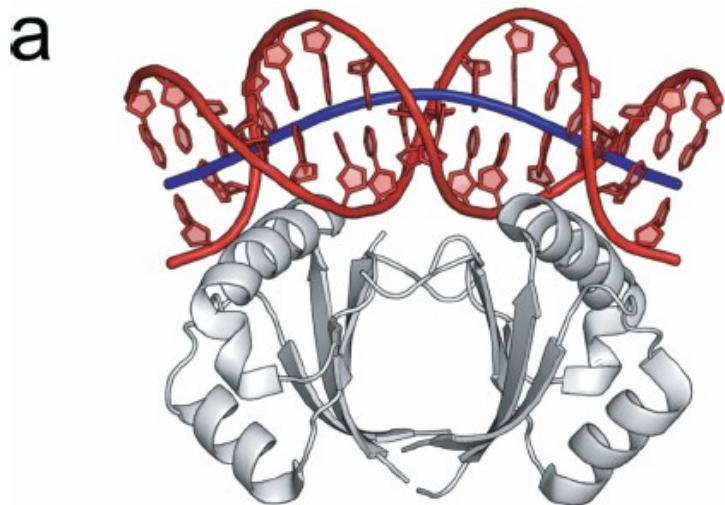
„core“



video

- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované H-vazebné skupiny
- Nejčastěji interaguje **Arg** (pozitivní náboj + vodíkové vazby)
- Další vazebné motivy (β -listy, hydrofobní AMK, malý žlábek)

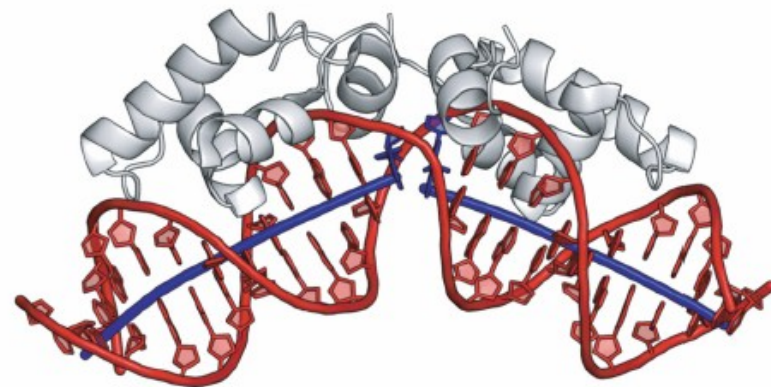
- Zipper typ
- Helix-turn-helix
- Zinkový prst
- **Histon, HMG-box**
- β -barrel
- β -hairpin/ribbon
- Smíšené α/β



histon

Bend

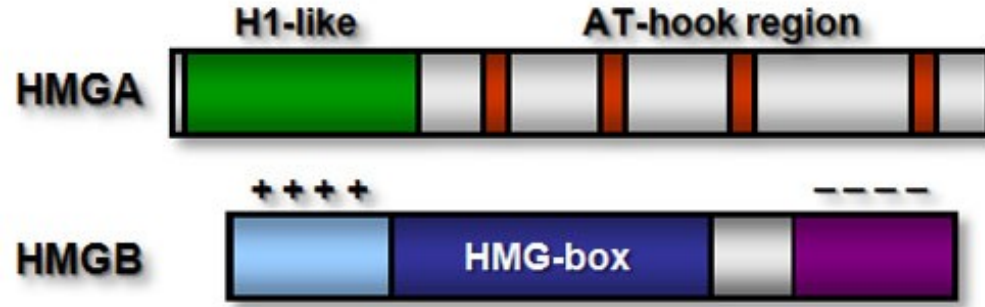
b



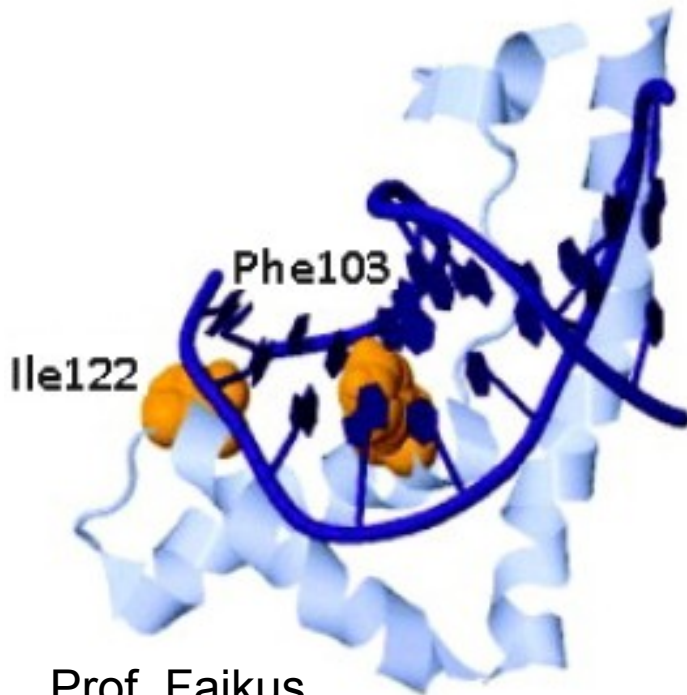
HMG

Kink

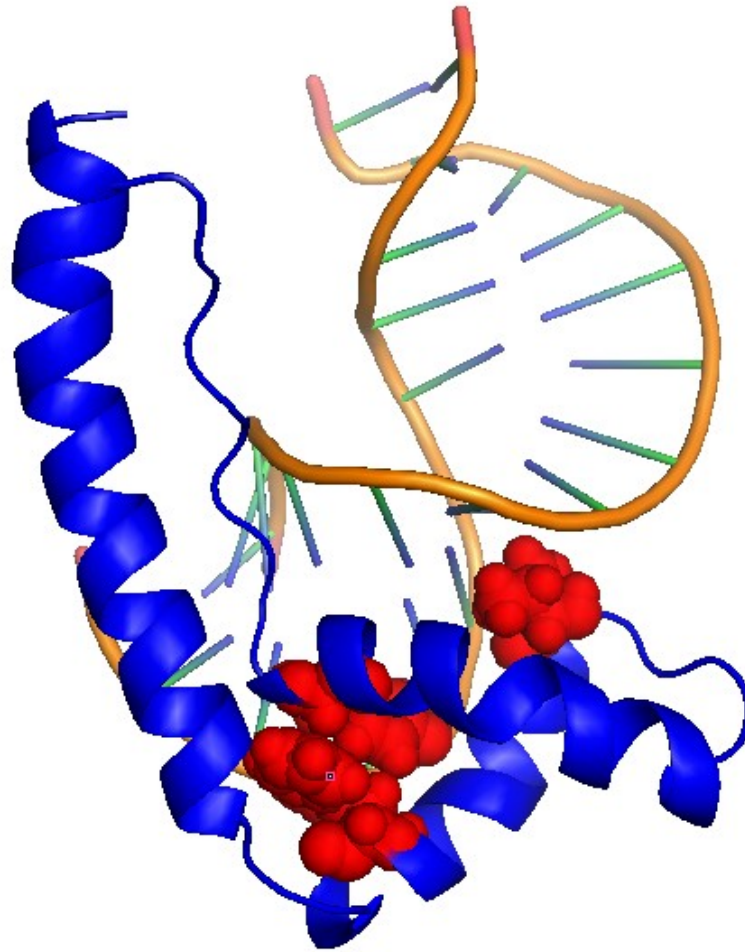
- **HMGB (HMG-box)** obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace aromatických AMK způsobuje ohnutí DNA



- 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

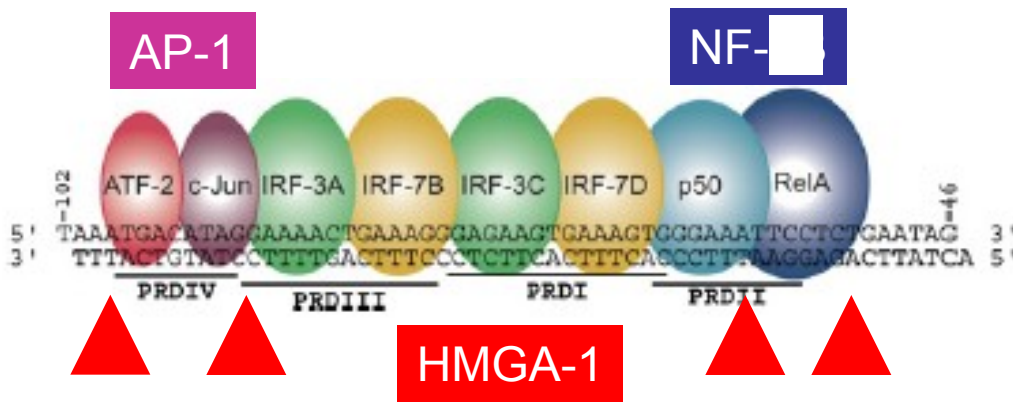


HMG-D (1E7J)



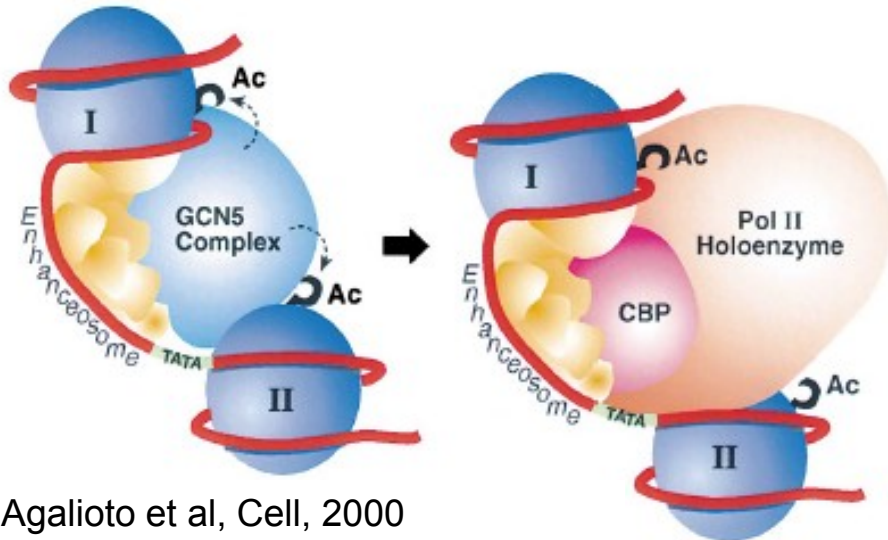
Aromatické aminokyseliny se interkalují do MŽ a vytváří kink

IFN- β enhanceosom

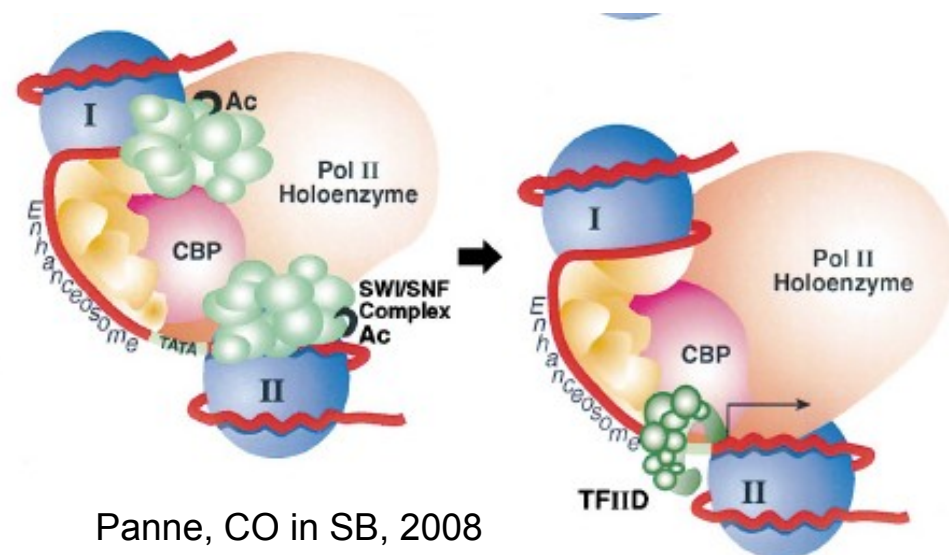


transkripce

- HMGA1a se váže na 4 místa a (ohýbá DNA) napomáhá sestavení enhanceosomu
- není ale součástí finálního komplexu - AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- κ B
- nukleosom-free oblast (nukleosom downstream zakrývá TATA-box)
- všechny podjednotky (TA domény) enhanceosomu interagují s CBP/p300 acetylásou
- acetylace nukleosomu vede k jeho remodelingu/přemístění
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP/TFIID a RNA polymerasy II



Agalioto et al, Cell, 2000

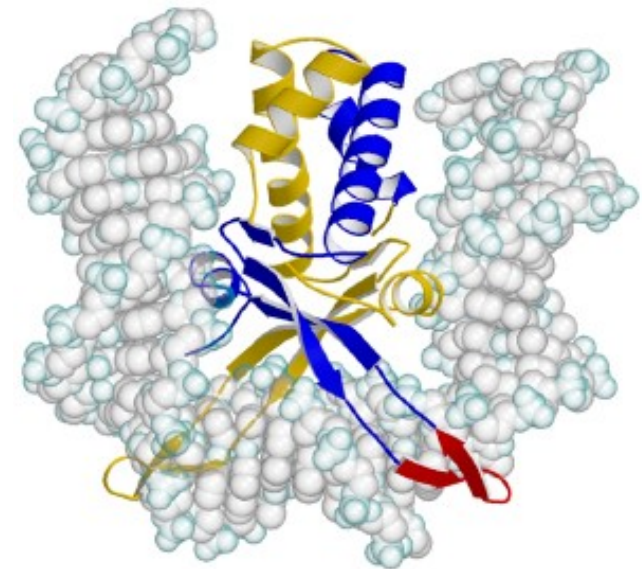


Panne, CO in SB, 2008

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 -hairpin/ribbon**
- **β - barrel**
- **Enzymy**

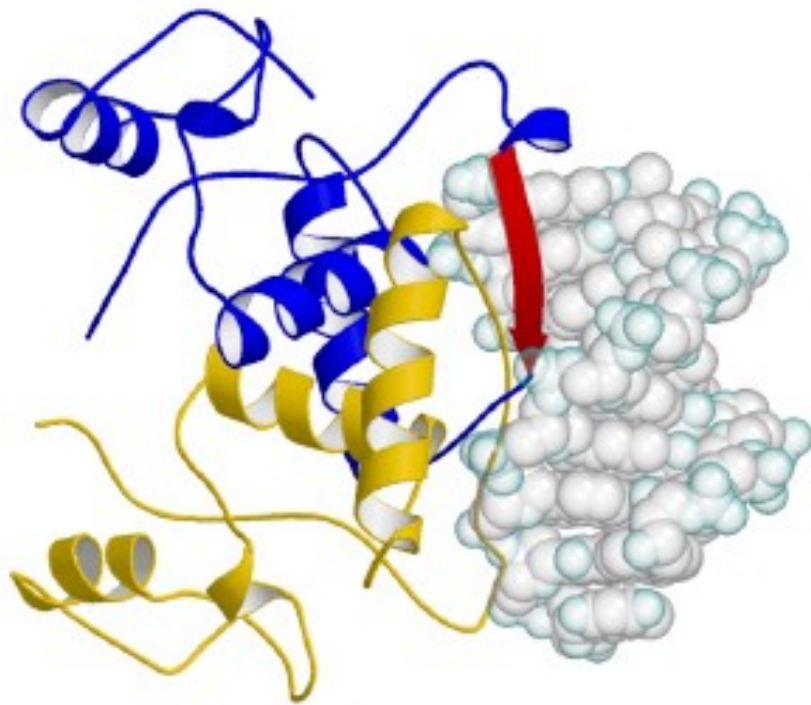
α -šroubovice



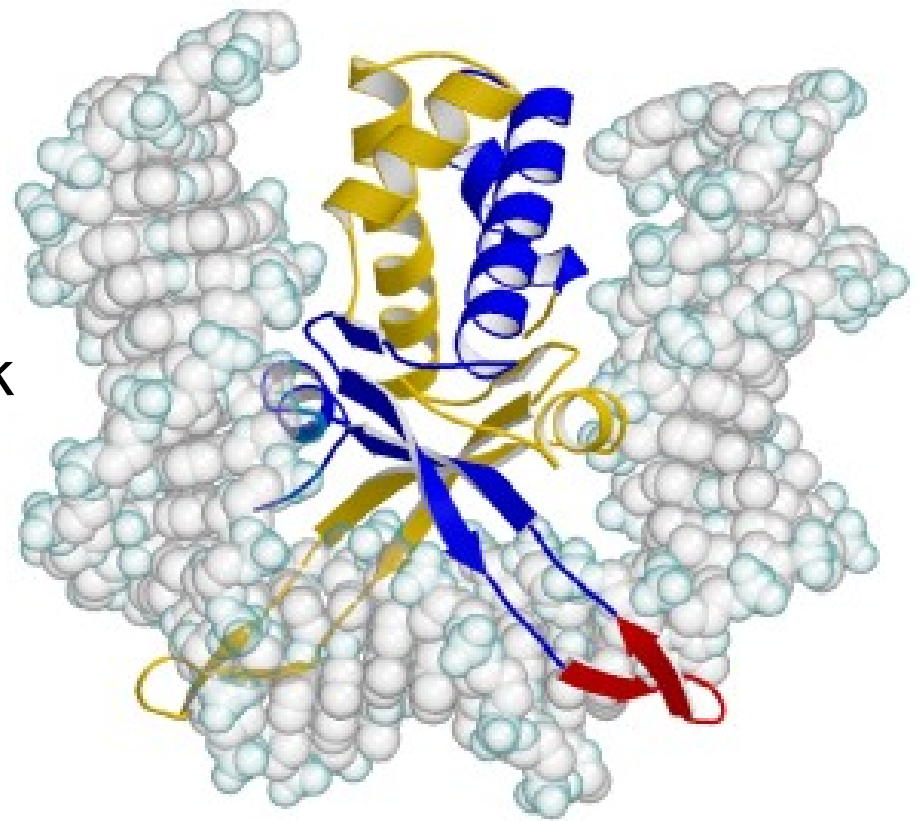
33. Integration host factor (1ihf)

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)

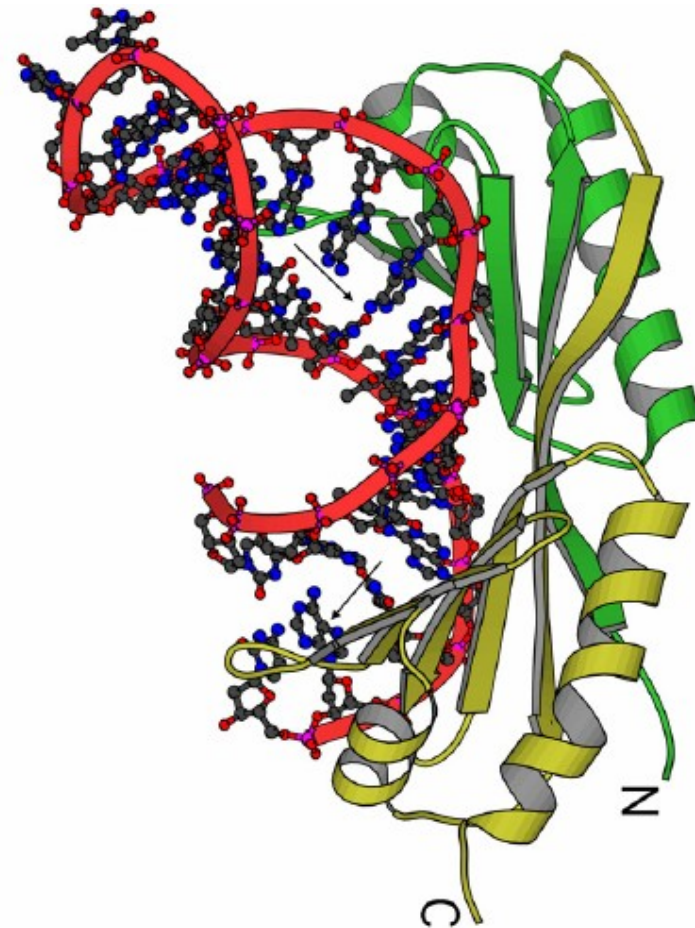
- β -hairpins lokalizovány podél malého žlábku
- Inzerce Pro mezi baze a ohyb DNA

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 -hairpin/ribbon**
- **β -barrel**
- **Enzymy**

α -šroubovice

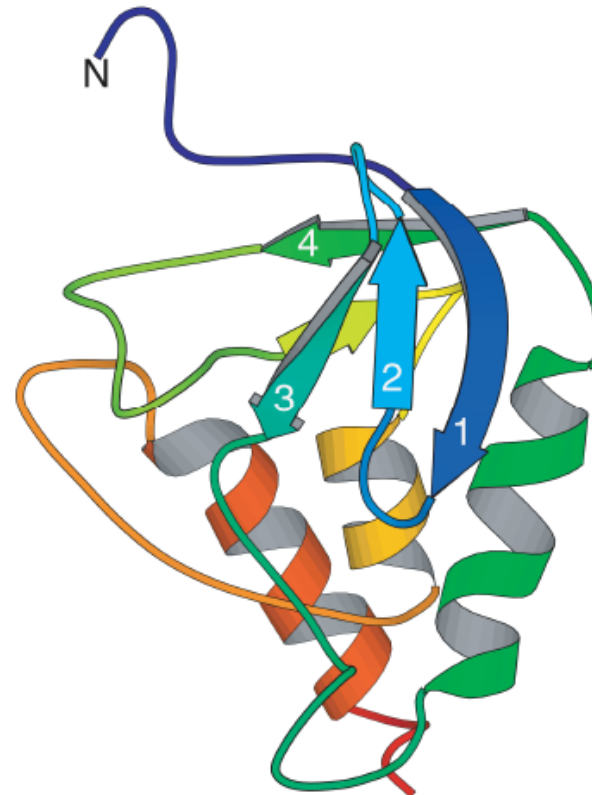
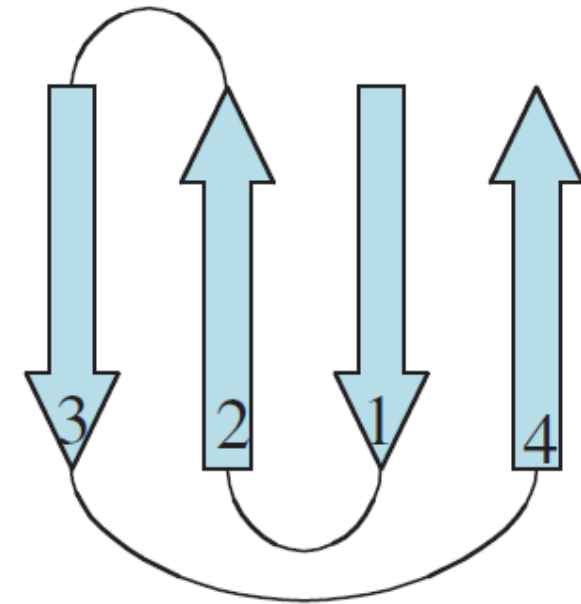
β -listy



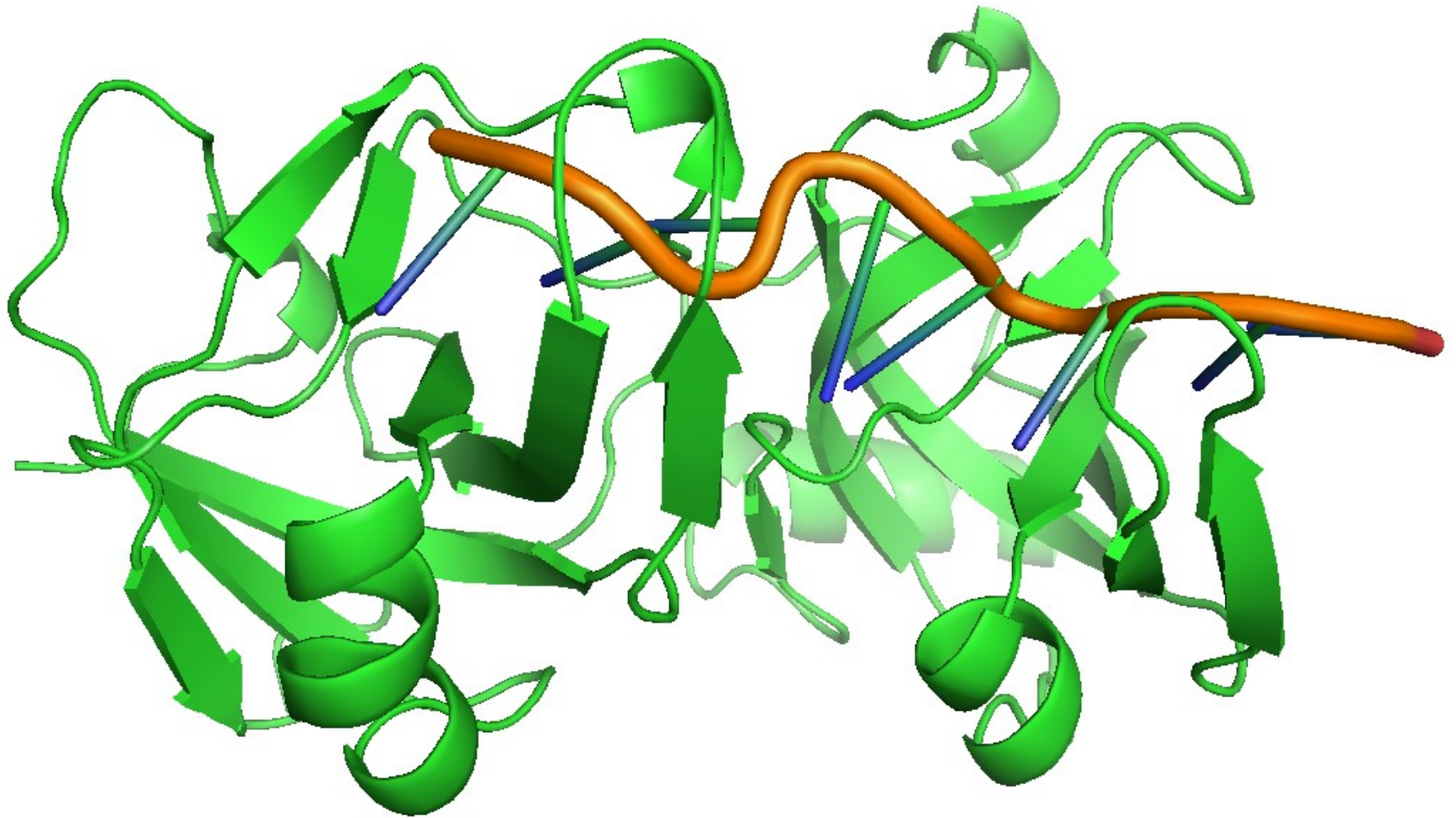
OB-fold

(oligonucleotide/oligosaccharide binding)

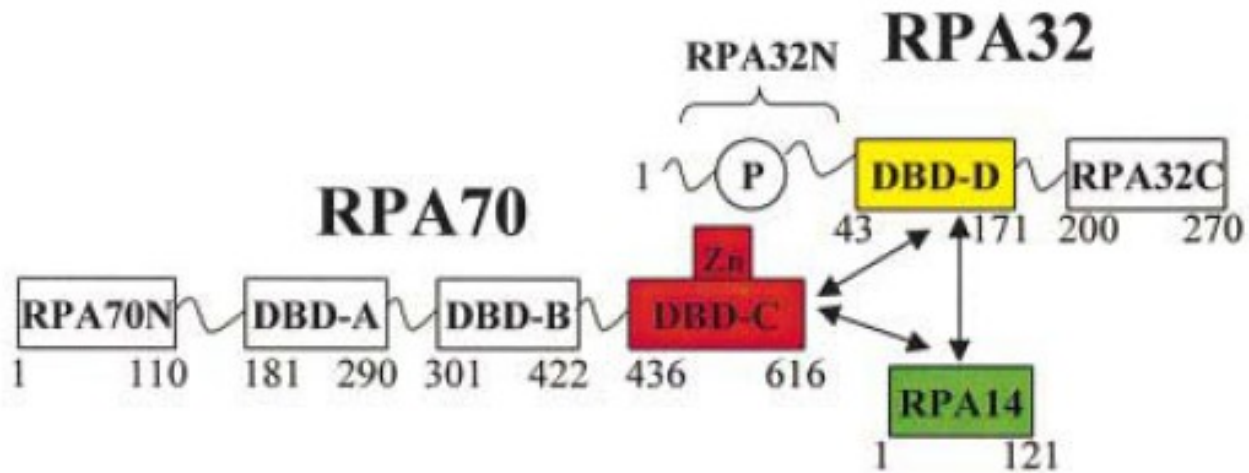
- 4-5 anti-paralelních β -listů (β -barel) zakončeno α -šroubovicí (kompaktní)
- vytváří úzkou jamku pro jednořetězcovou ssDNA (RNA, oligosacharidy)
- váže 2-5 nukleotidů (báze, cukry i fosfáty)
- SSB/RP-A a TRF proteiny
- replikace, HR, telomery
...(příští přednáška + Dr. Kolesár)



OB-fold (oligonucleotide/oligosachcaride binding, 1JMC)

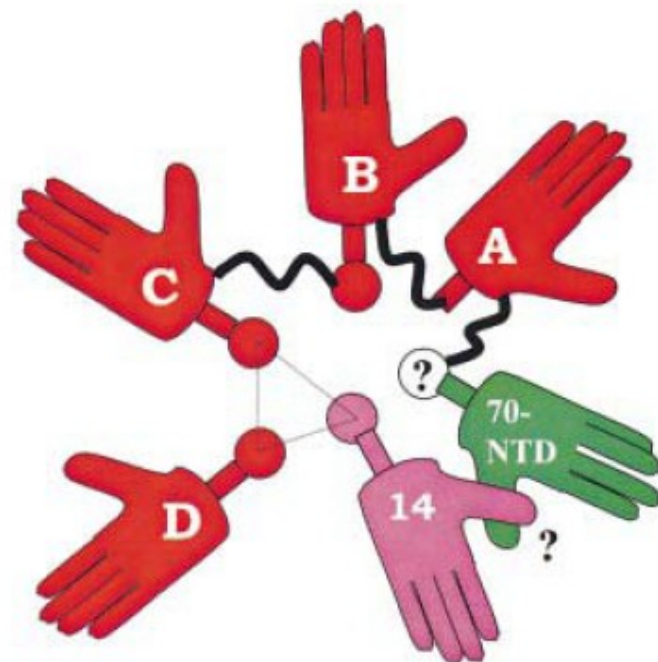
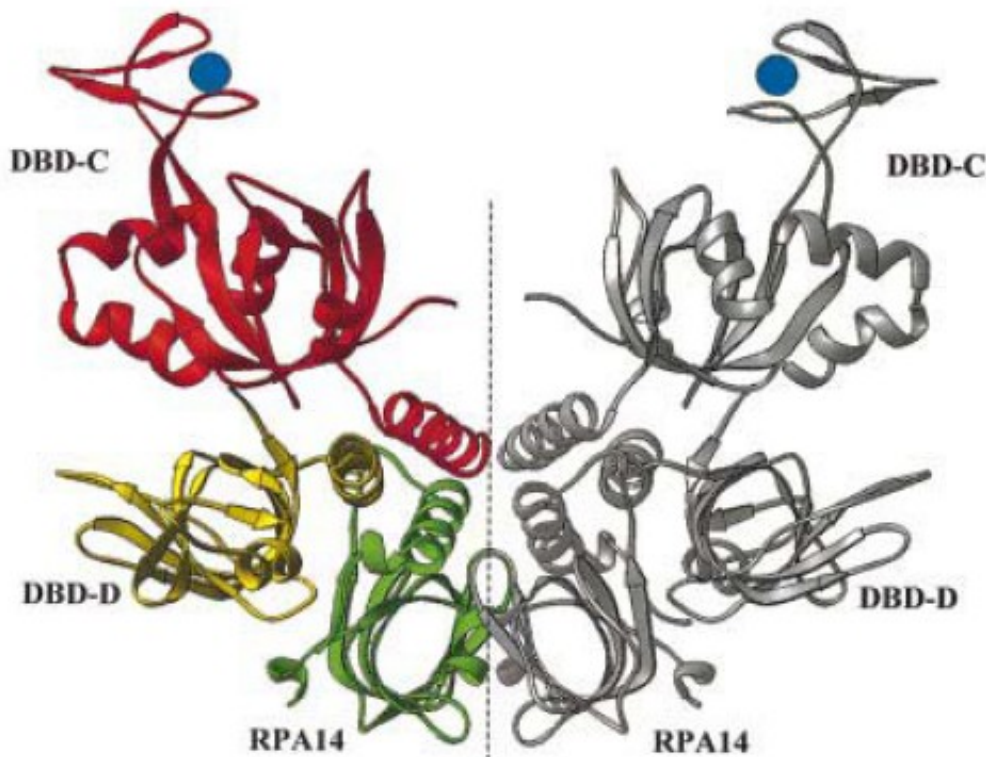


Více OB – RPA70 (A+B) vytváří prodlouženou lineární kapsu

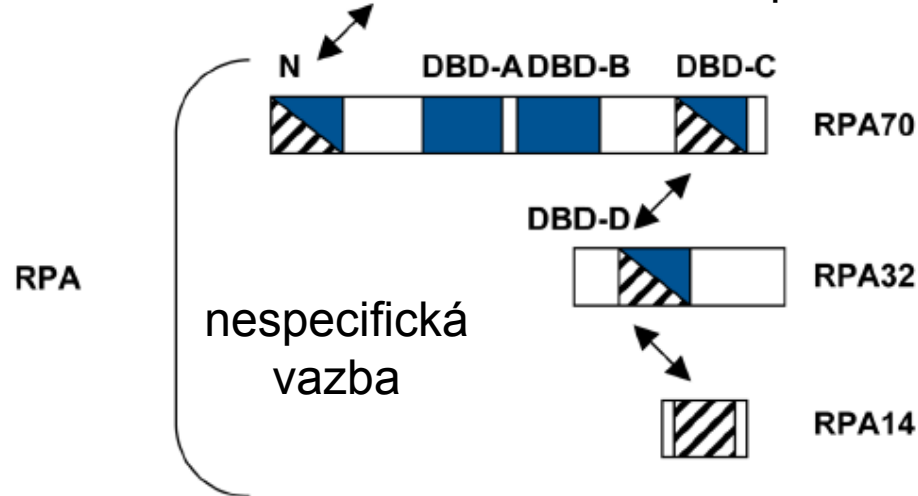


- protein-proteinové interakce (integrita komplexu)
- celý komplex ~30nt

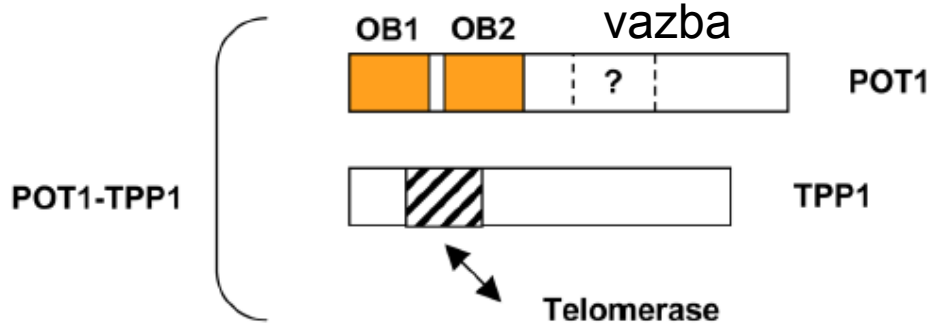
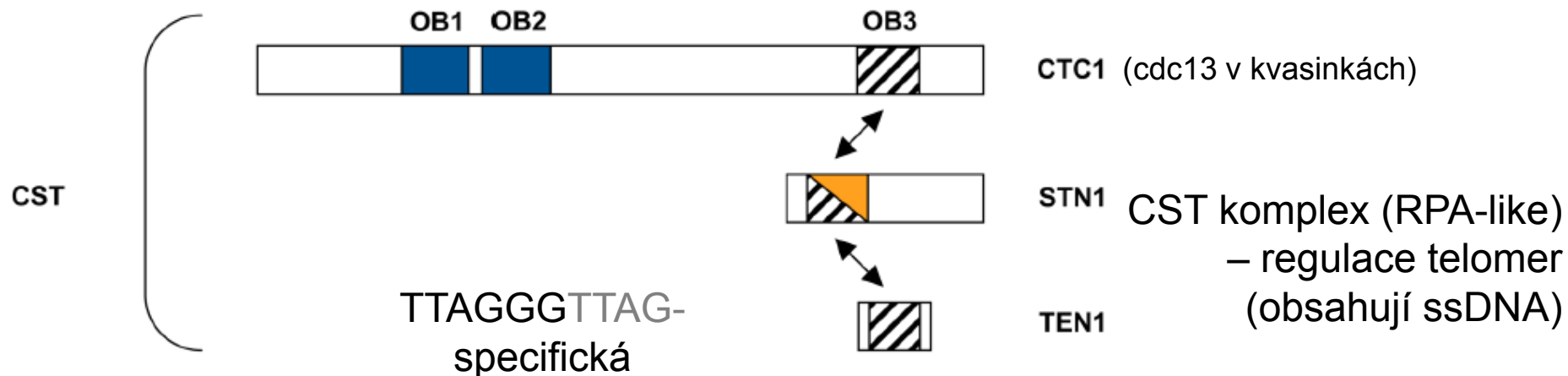
Centrální část RPA komplexu (1L10) a model celého komplexu



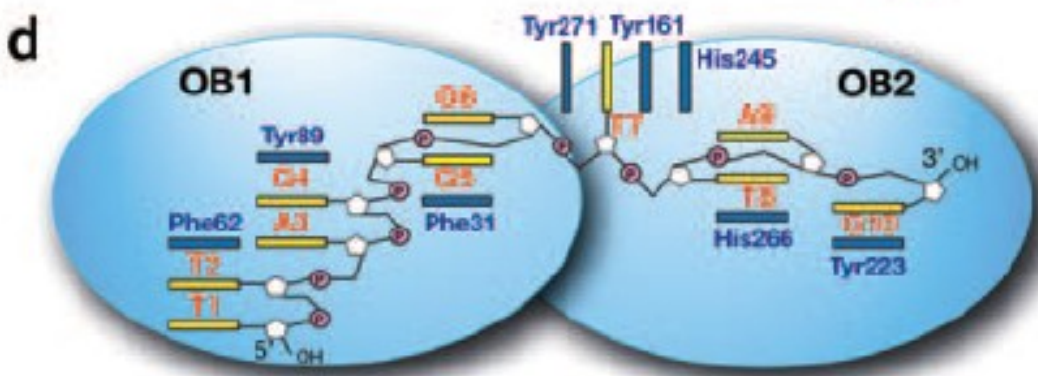
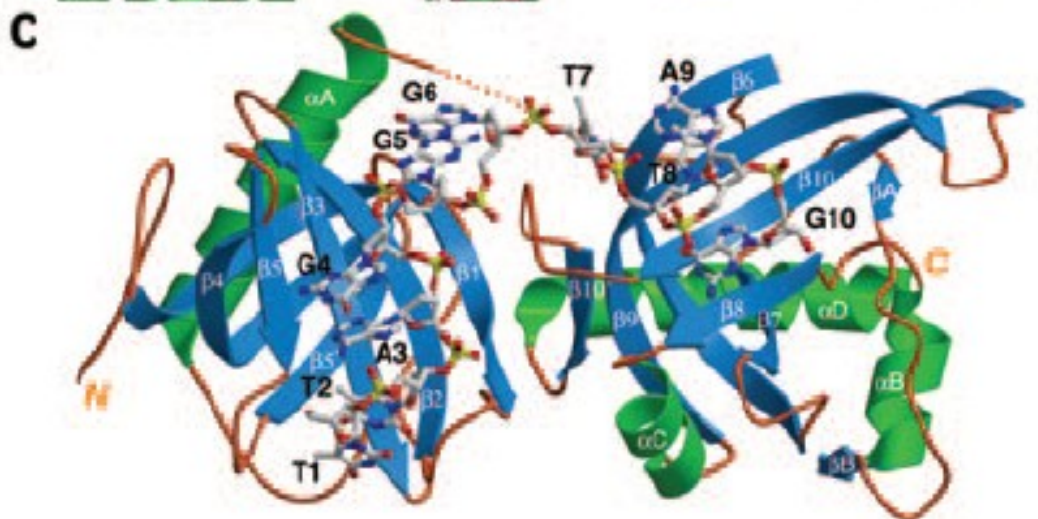
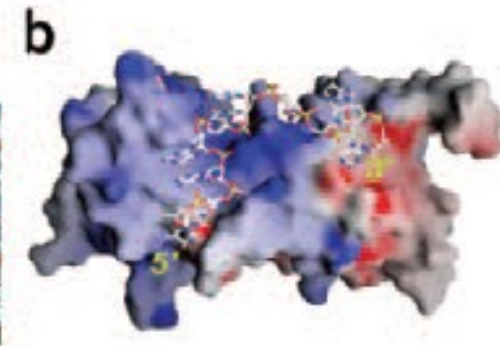
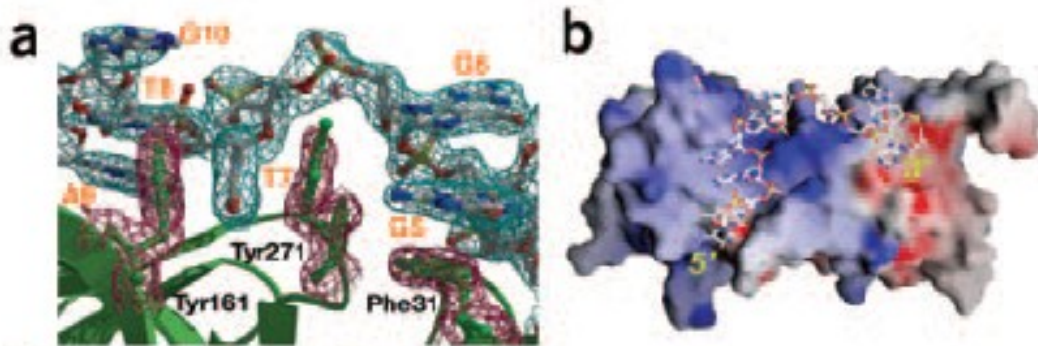
ATRIP, RAD9, MRE11, p53 - oprava DNA



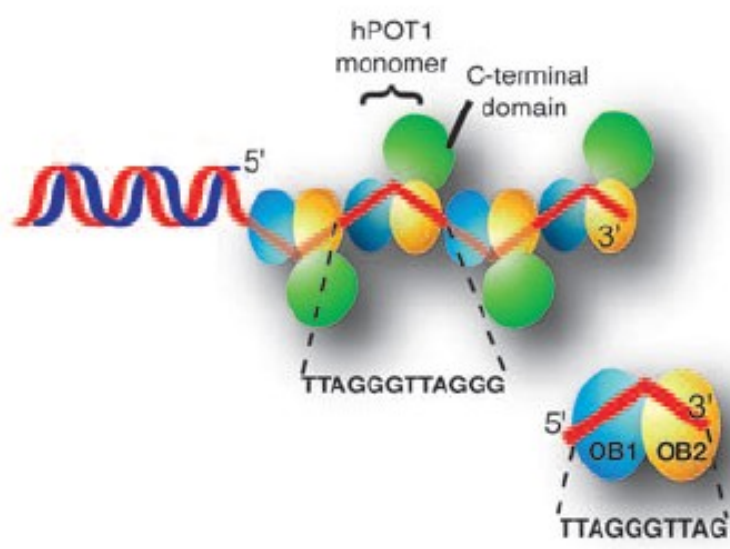
- protein-proteinové interakce (integrita komplexu + interakce s dalšími proteiny/komplexy)
- příští přednáška + Dr. Kolesár



- část komplexu SHELTERIN
- chrání telomery (aby nebyly považovány za DSB, reguluje přístup telomerázy)



Telomerase template 3'-GUCAAUCCCAAUCUG-5'
 Telomere sequence 5'-TTAGGGTTAG-3'
 hPOT1-binding sequence 5'-TTAGGGTTAG-3'

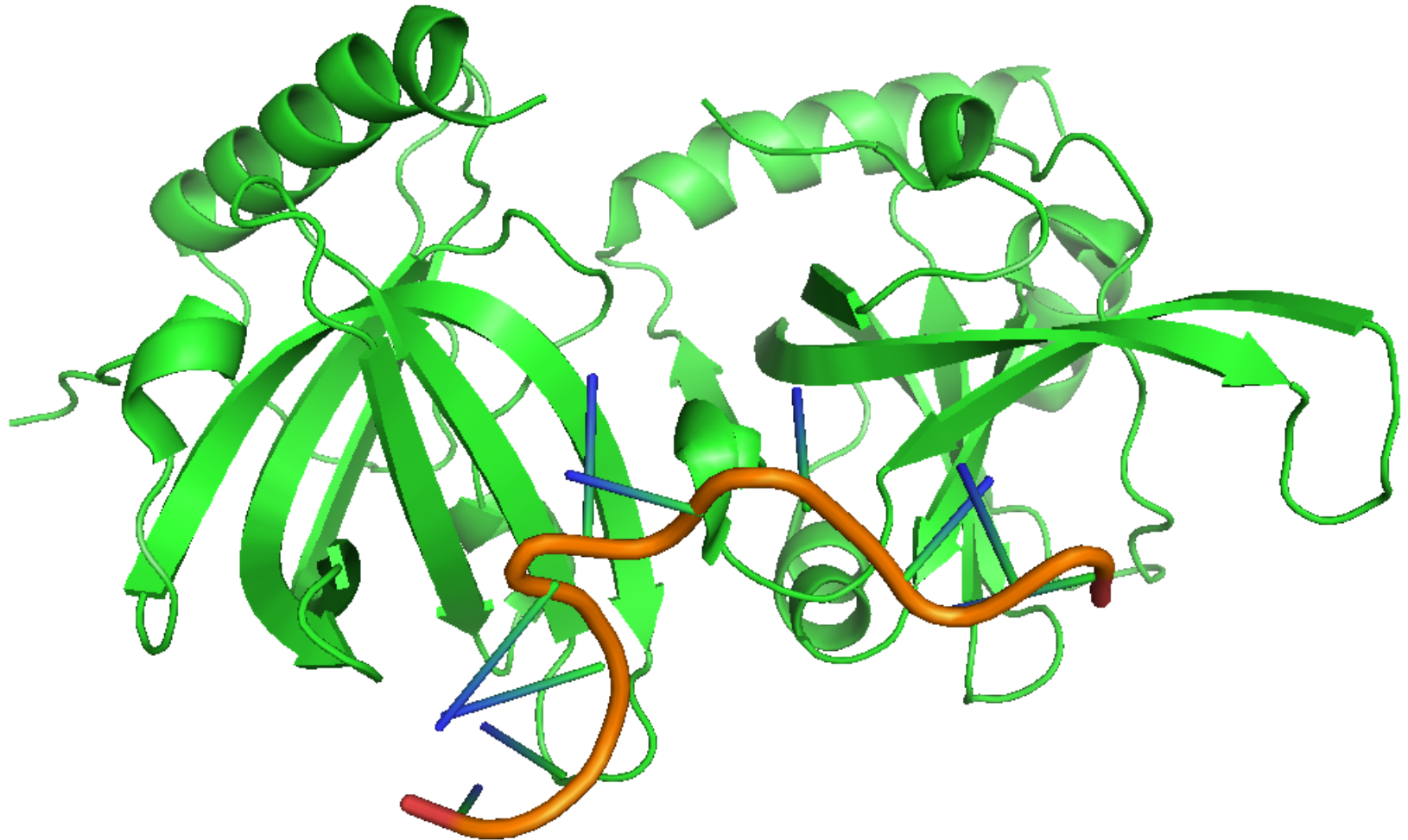


- část komplexu SHELTERIN – chrání telomery (aby nebyly považovány za DSB, reguluje přístup telomerázy)

Lei et al, NSMB, 2004

domény jsou vůči sobě pootočený – ohyb/kink na ssDNA (1XJB)

OB-fold (POT1)

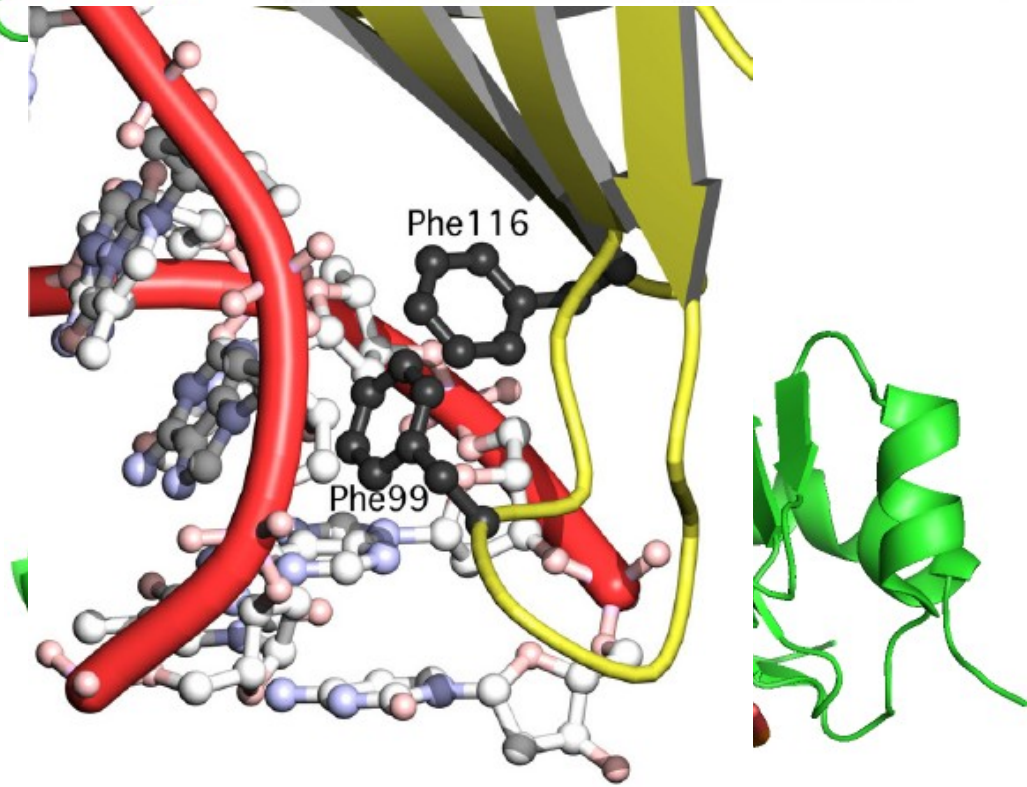
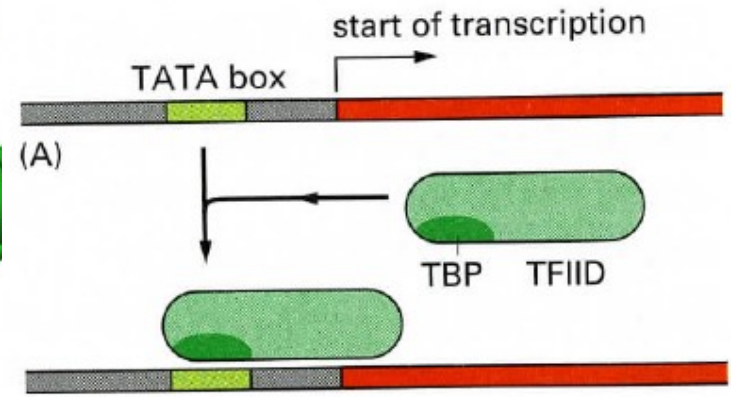
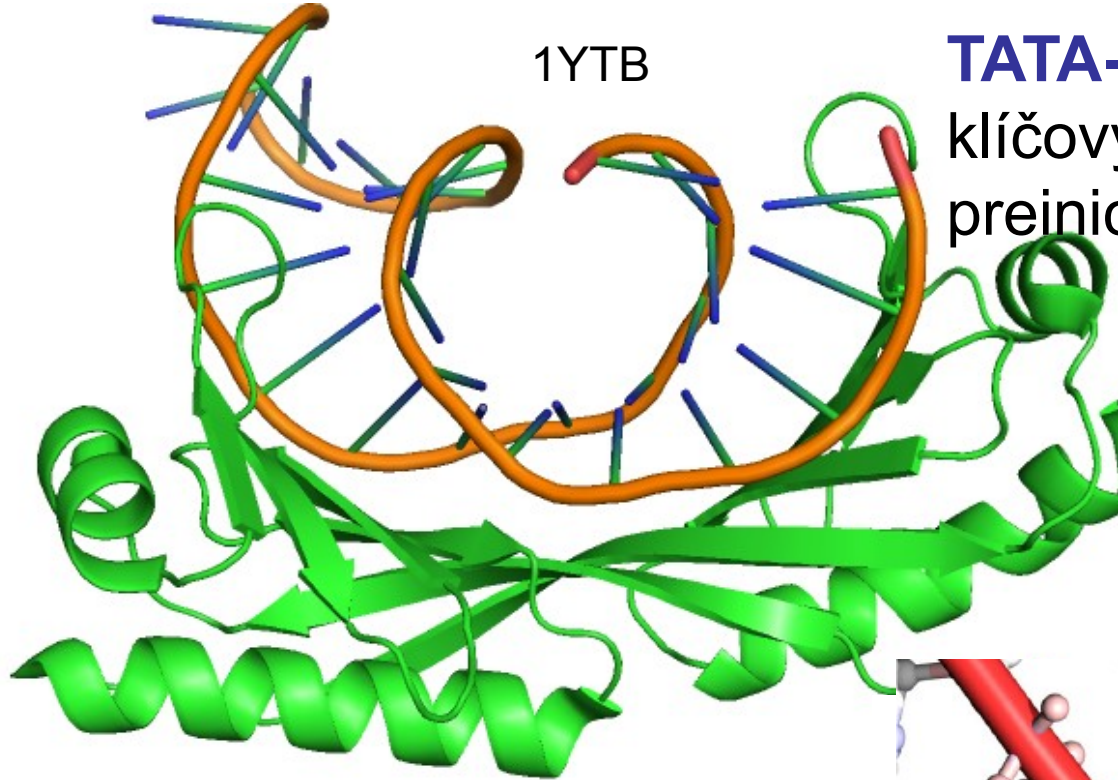


domény jsou vůči sobě pootočený – ohyb/kink na ssDNA (1XJB)

1YTB

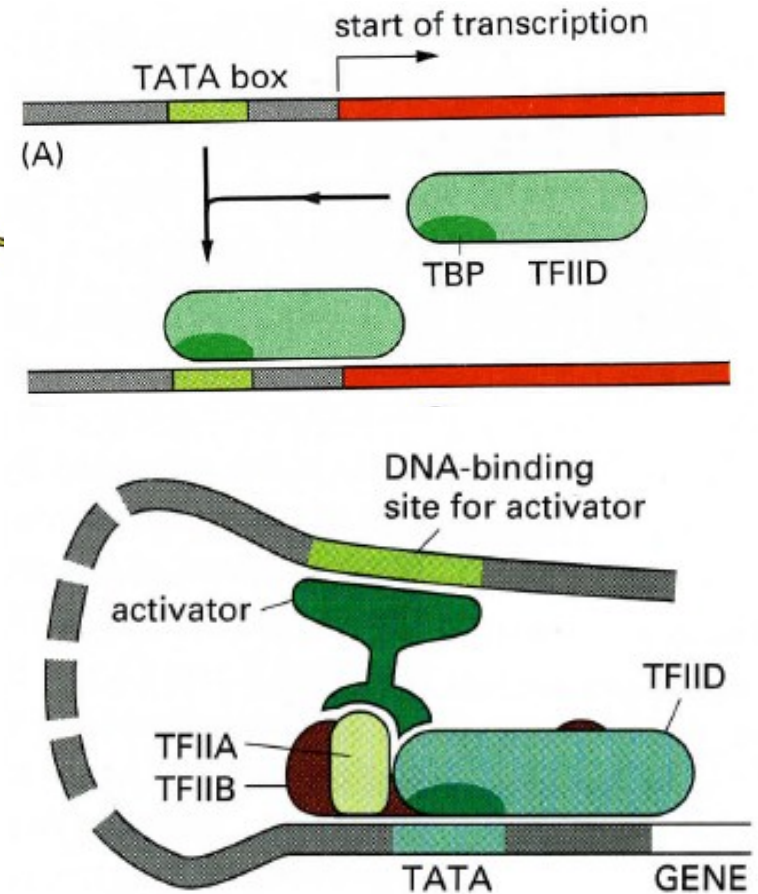
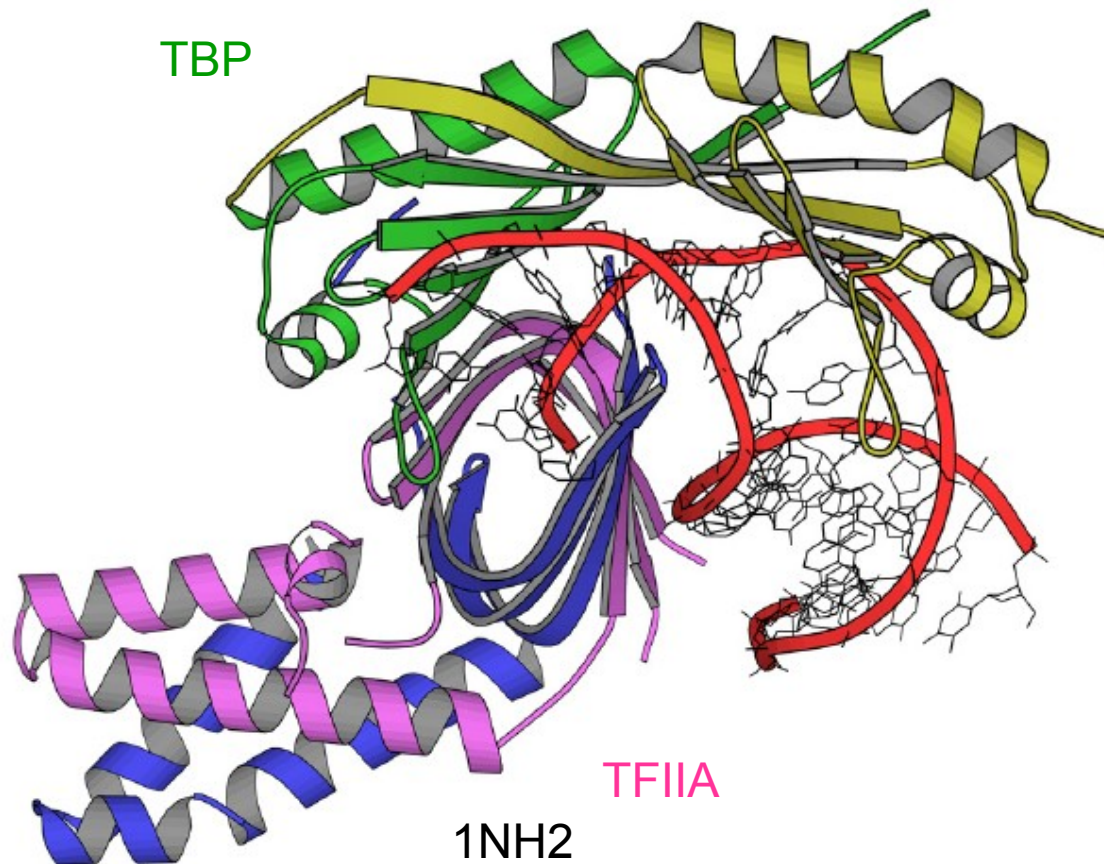
TATA-box vážící protein (TBP) –

klíčový pro sestavení
preiniciačního komplexu

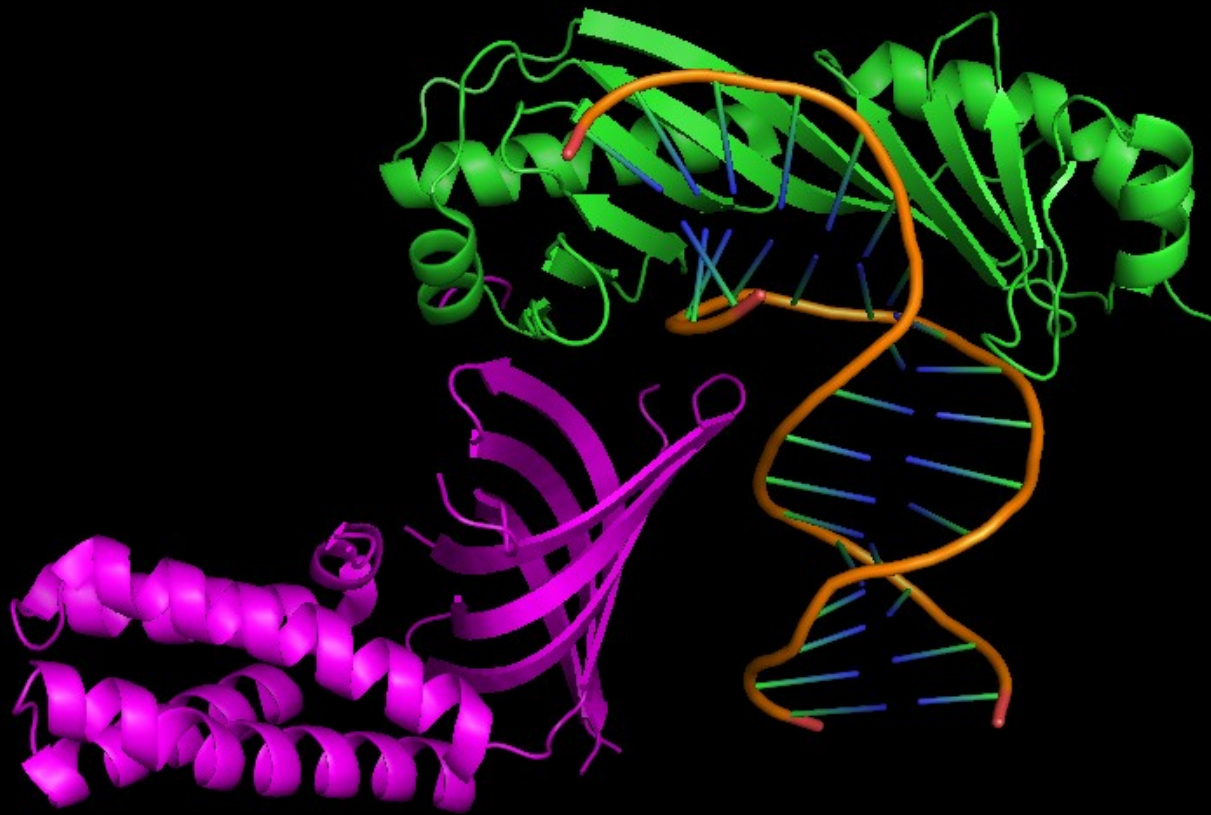


- 10 anti-paralelních β -listů pokrývá MŽ
- Interkalují se postranní řetězce **Phe** (hydrofobní v.)
- vytváří **ohyb (kink)** a **rozplétá dsDNA**
- Konsensní sekvence: TATA(A/T)A(A/T)(A/G)

- 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)

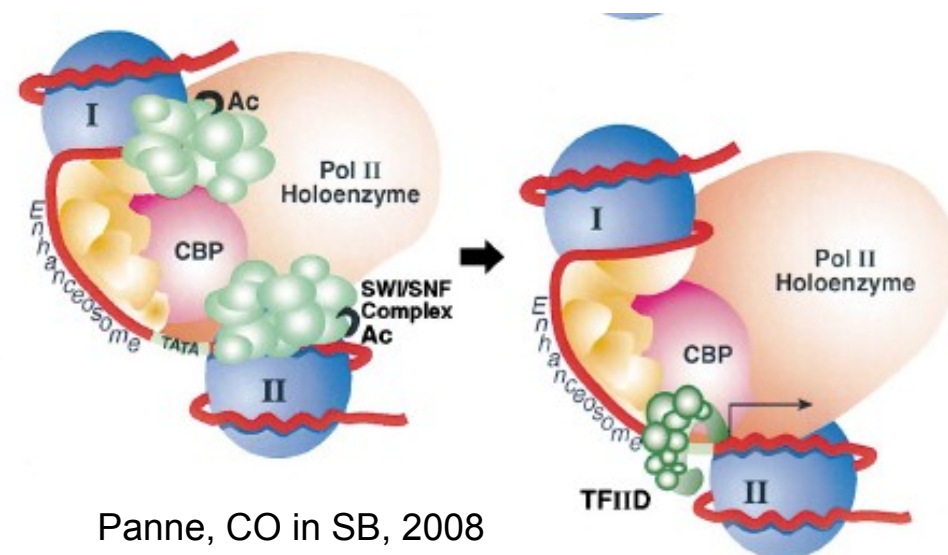
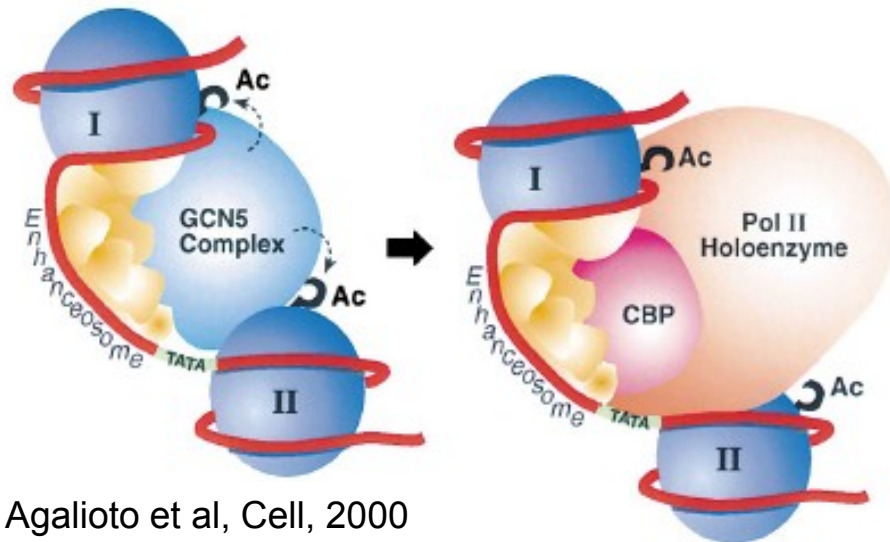


TBP ohýbá a rozplétá dsDNA



IFN- β enhanceosom – začátek transkripce

- HMGA1a se váže na 4 místa a (ohýbá DNA) napomáhá sestavení enhanceosomu
- není ale součástí finálního komplexu - AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- κ B
- nukleosom-free oblast (nukleosom downstream zakrývá TATA-box)
- všechny podjednotky enhanceosomu interagují s CBP/p300 acetylásou
- acetylace nukleosomu vede k jeho remodelingu/přemístění
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP a TFIID/RNA polymerasy II



začátek transkripce - faktory

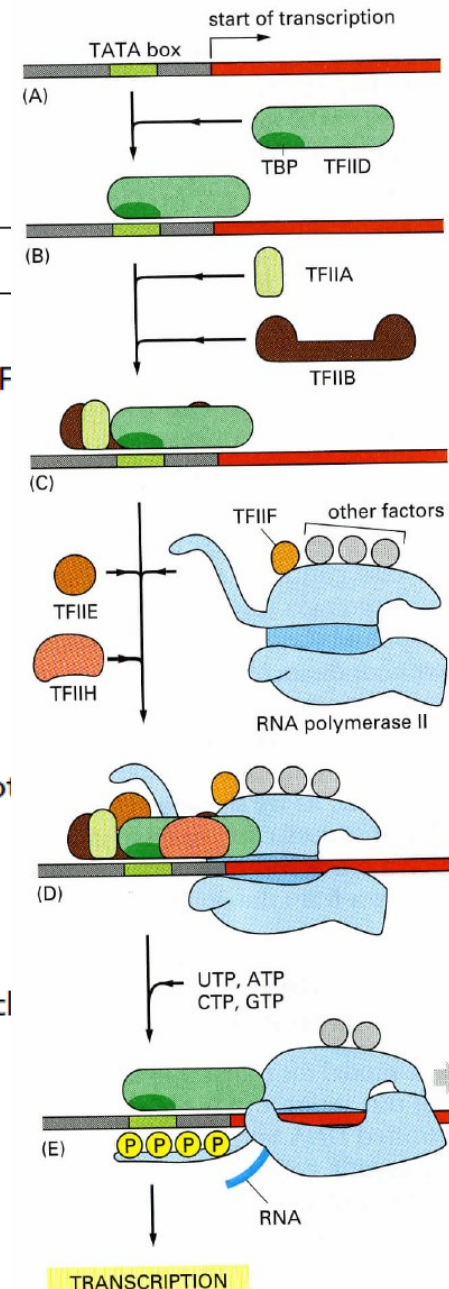
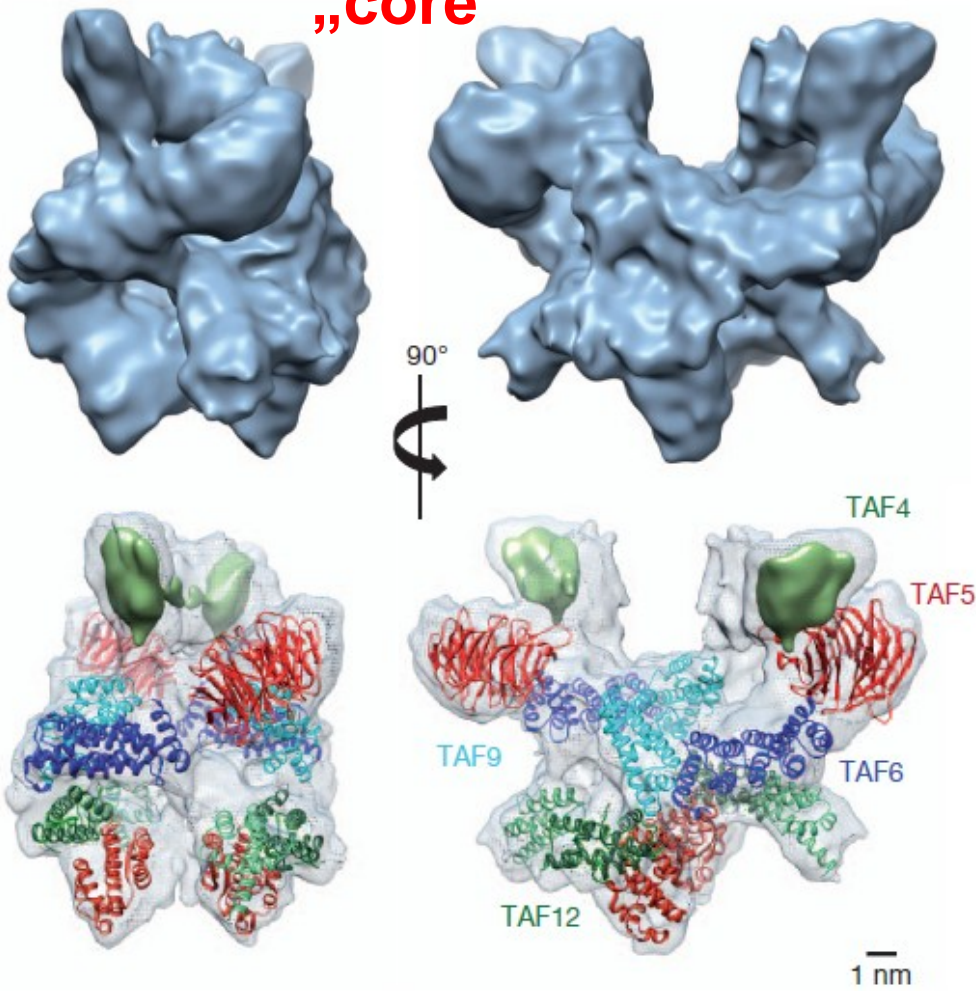


TABLE 1 Components of the human general transcription machinery

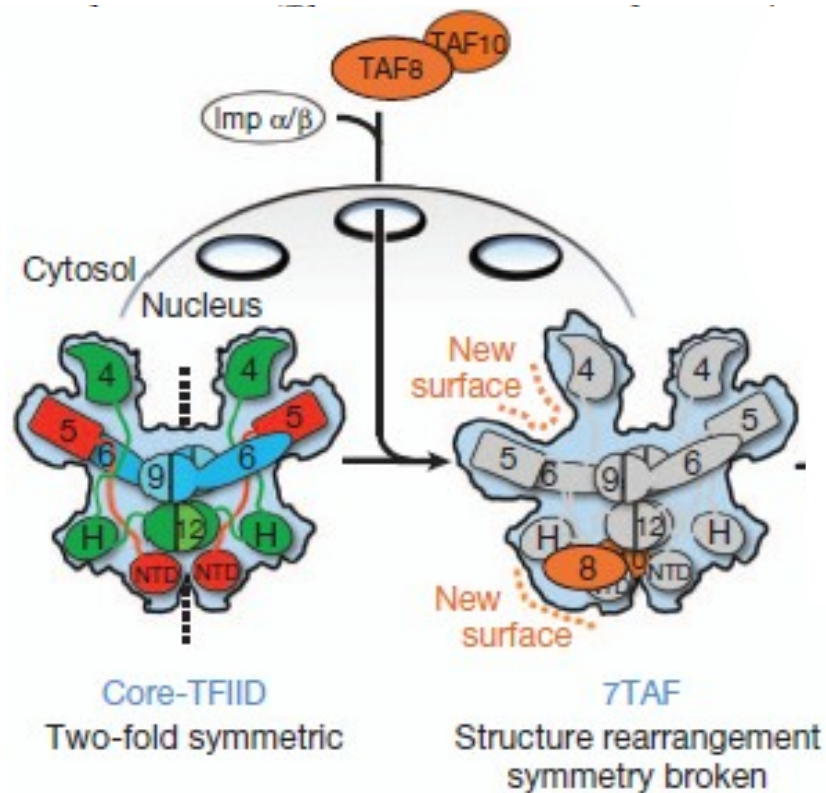
Factor	Protein composition	Function
TFIIA	p35 (α), p19 (β), and p12 (γ)	Antirepressor; stabilizes TBP-TATA complex; coactivator
TFIIB	p33	Start site selection; stabilize TBP-TATA complex; pol II/TFIIF
TFIID	TBP + TAFs (TAF1-TAF14)	Core promoter-binding factor Coactivator Protein kinase Ubiquitin-activating/conjugating 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

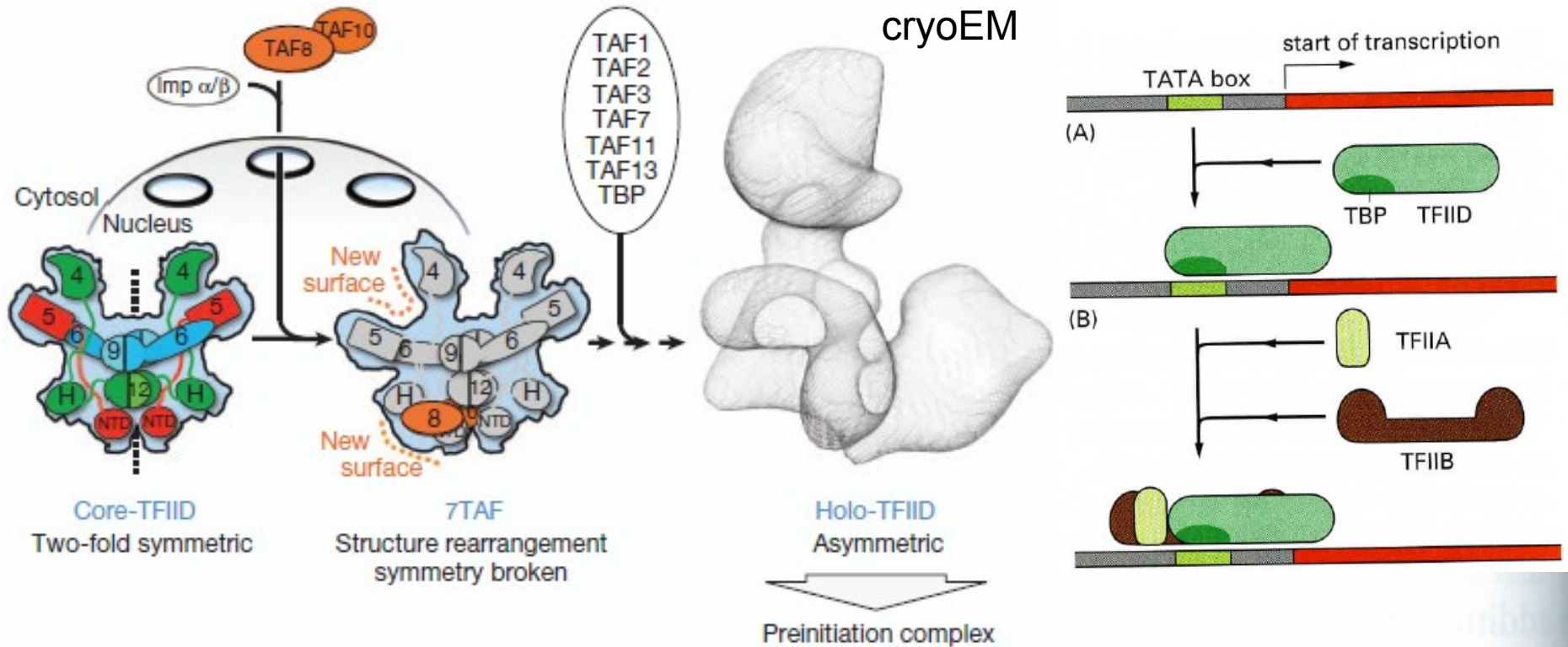
„core“



Připojením TAF8+10 na „core“ část dochází ke konformační změně a vzniku asymetrického komplexu

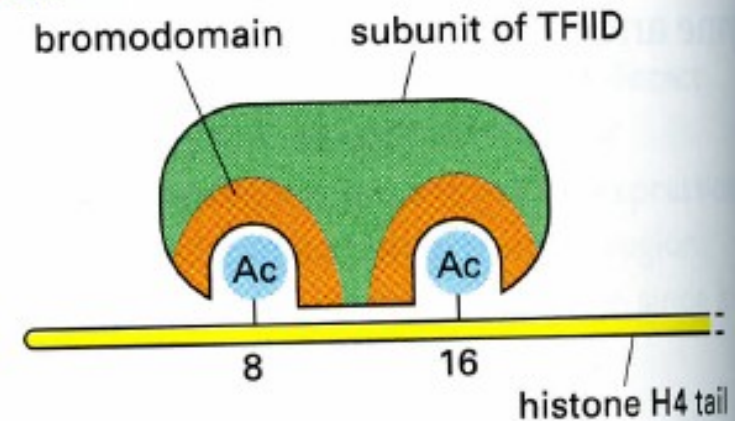


- TFIIID komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému

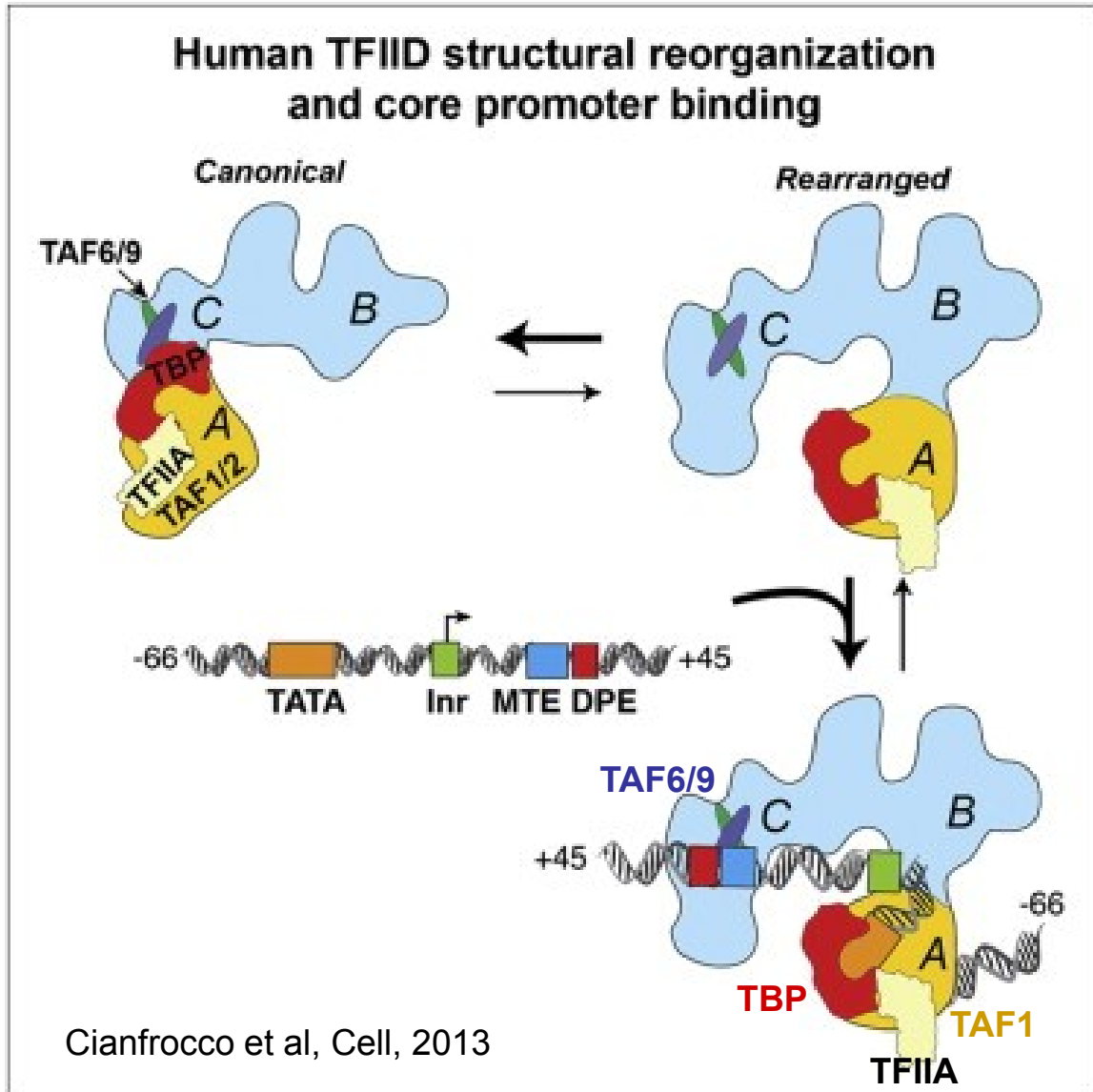
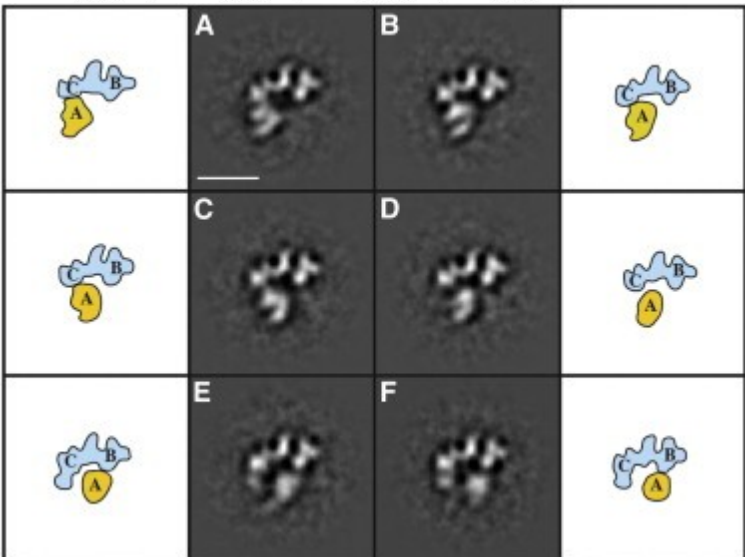
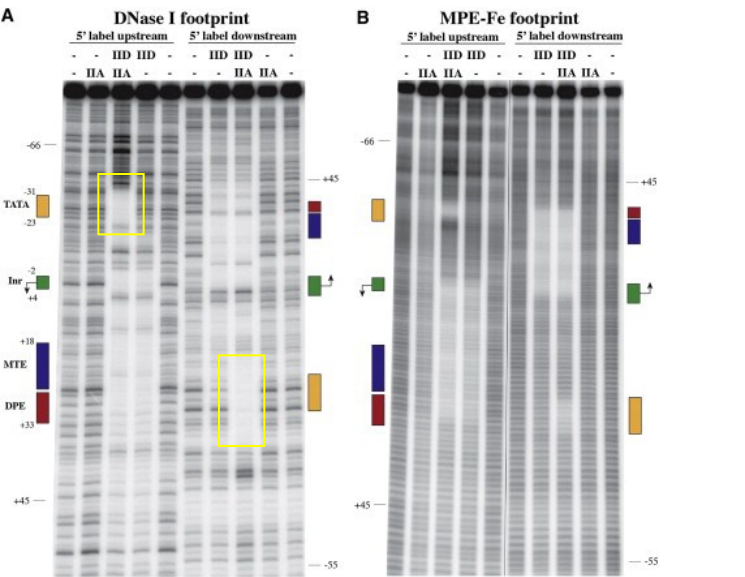


- Po připojení zbývajících podjednotek TFIIID komplexu včetně TBP vzniká funkční holokomplex – TBP se váže na TATA-box ... TAF1 se váže na Ac-H4

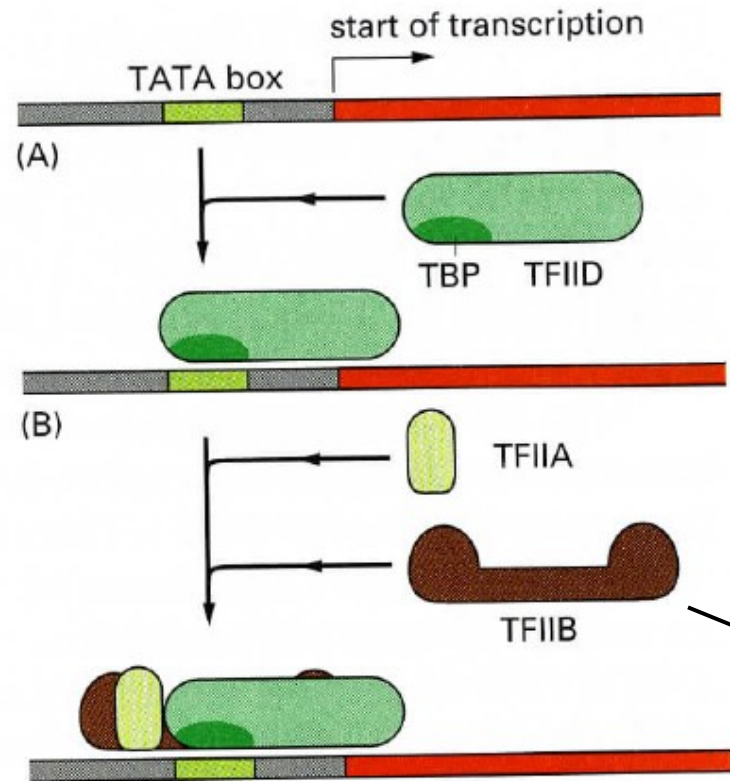
Bieniossek et al., Nature, 2013



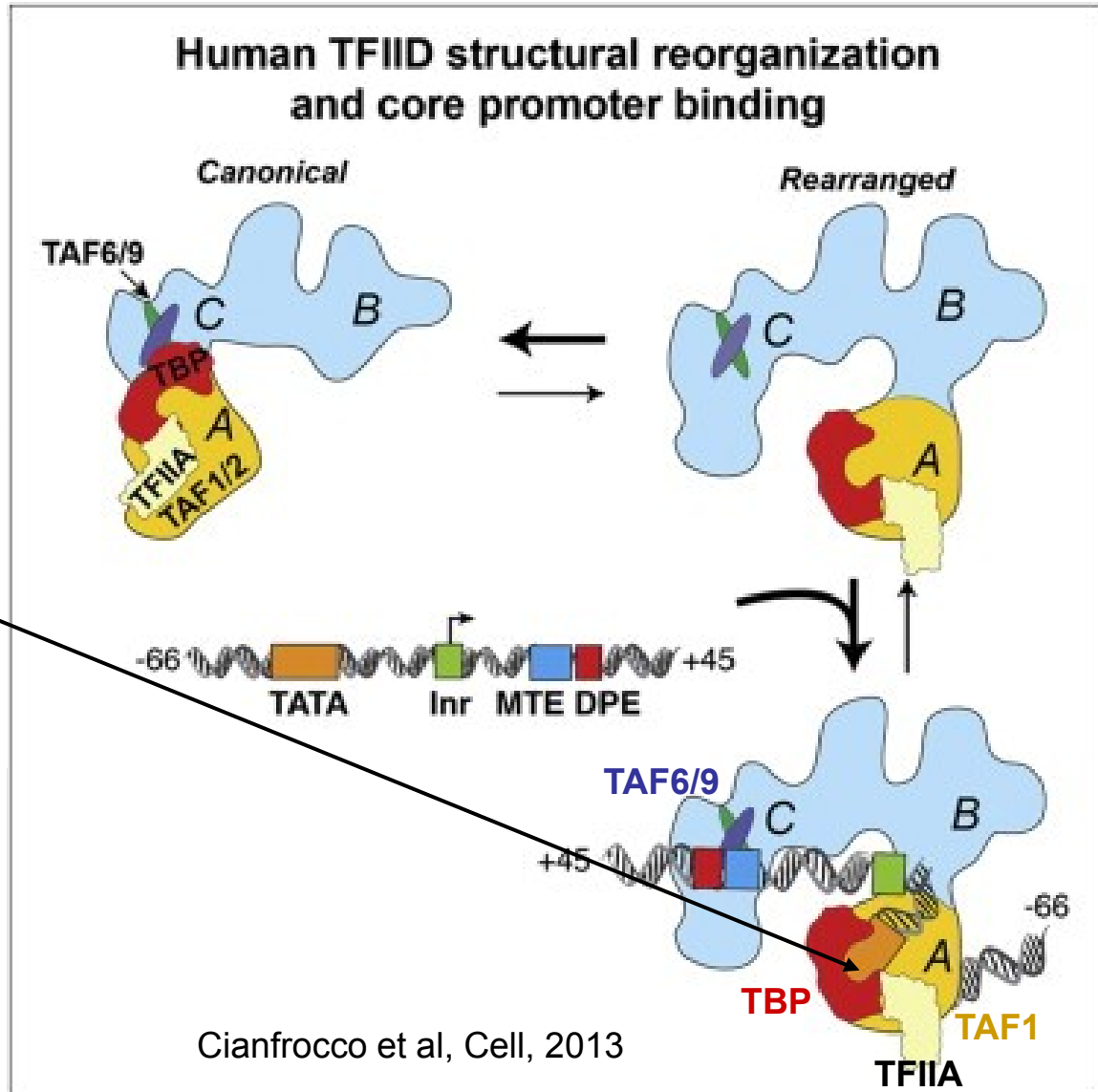
- Footprint anlyza – ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)
- cryoEM ukázaly, že dochází k reorganizaci TFIID



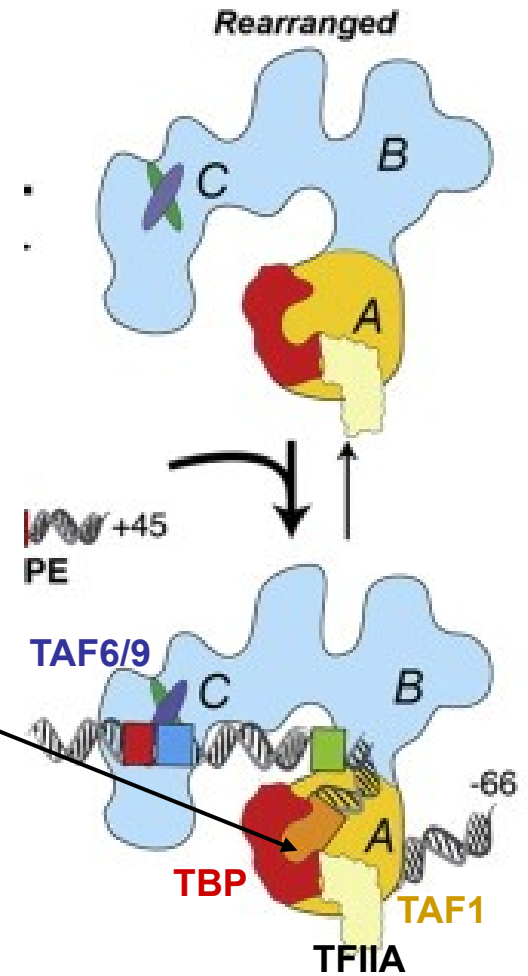
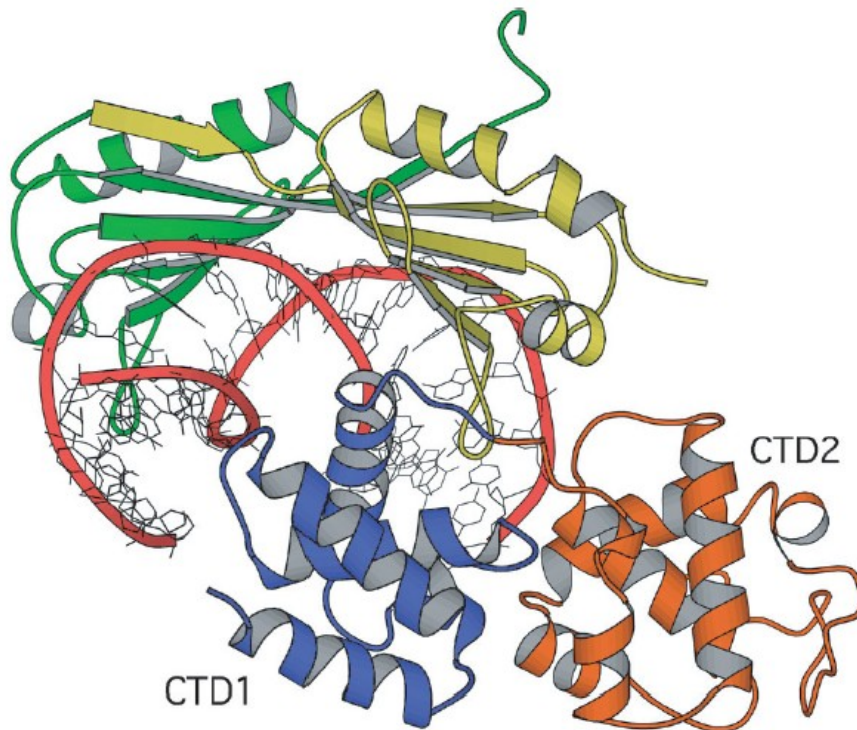
- Footprint analýza – ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)
- cryoEM ukázaly, že dochází k reorganizaci TFIID



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)

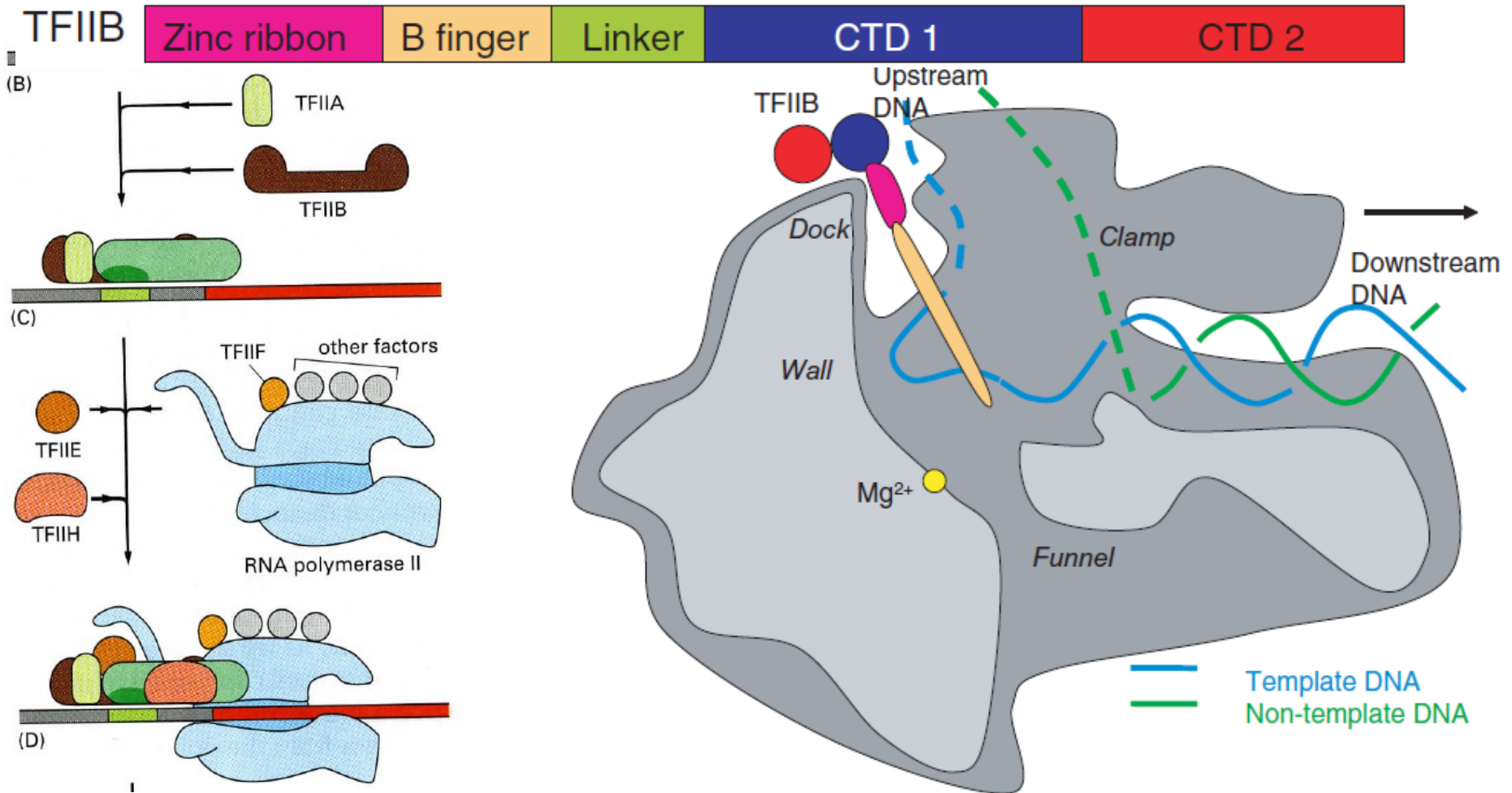


1VOL

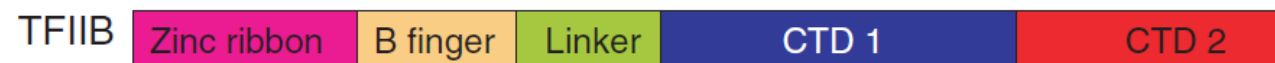
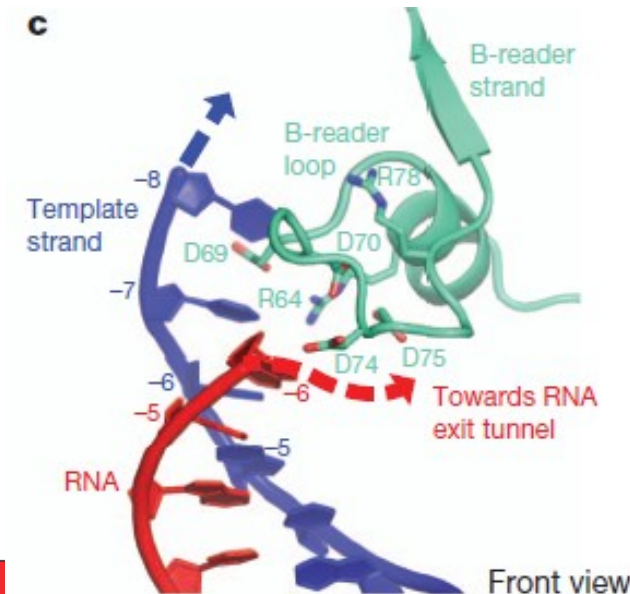
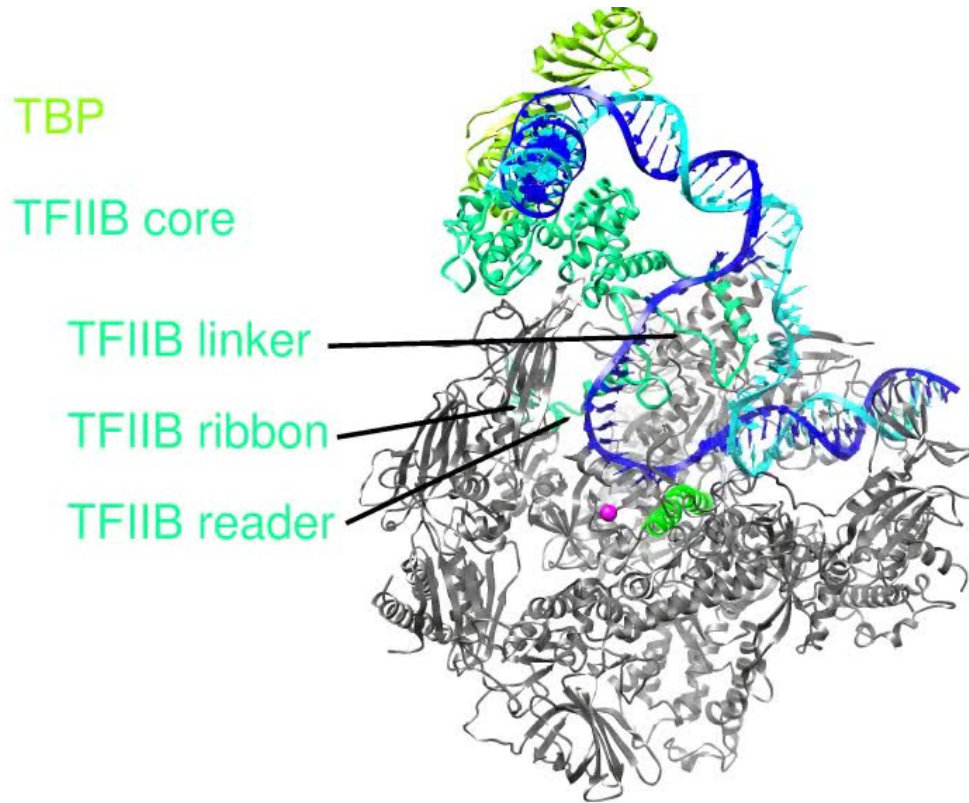
Nikolov et al, Nature, 1995

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)
- Zn-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp

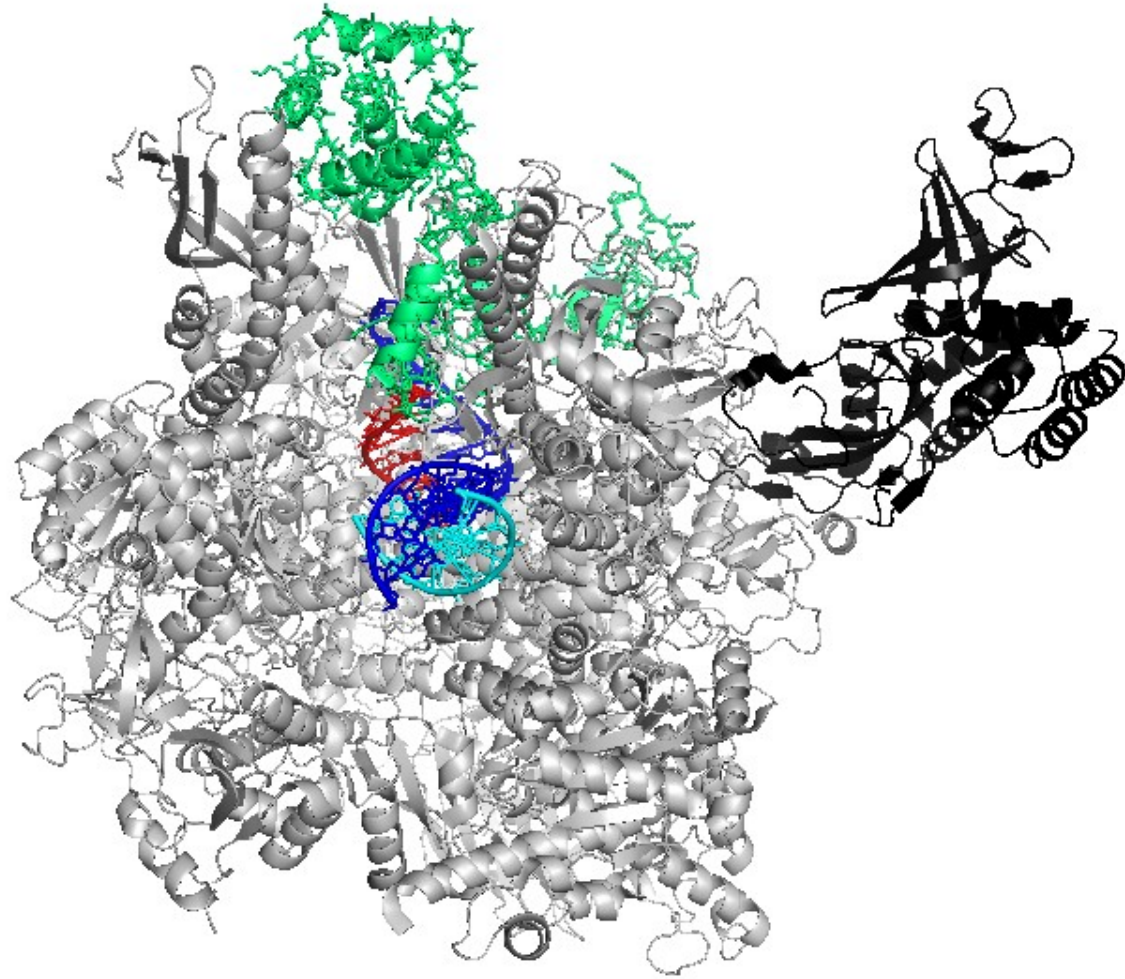


- B-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp
- umístění TFIIB determinuje pozici počátku transkripce
- pozice B-reader (v RNA tunelu) limituje iniciační krok (12nt RNA)
- po dosažení 12nt RNA dochází k disociaci TFIIB (elongace...)



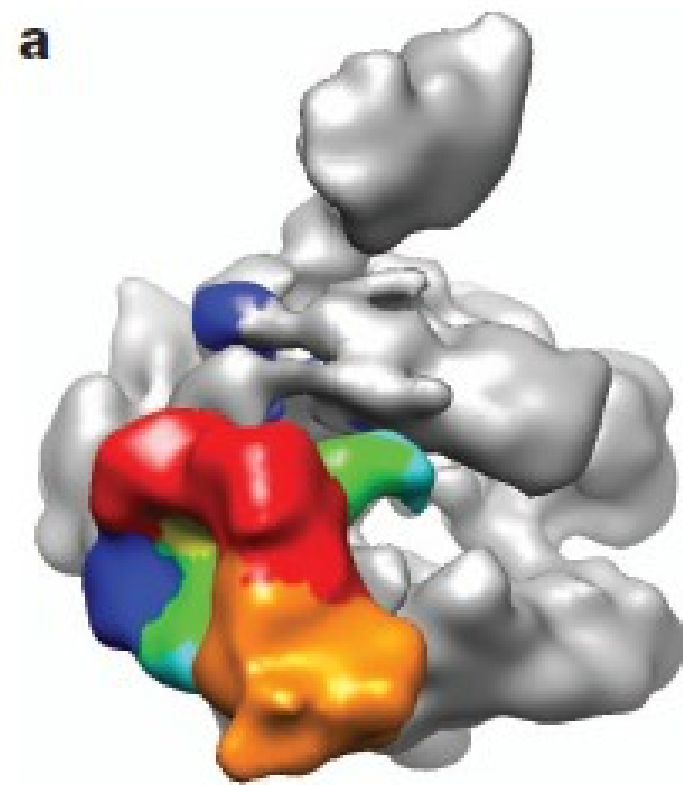
RNA pol II s TFIIB krystal s částí DNA a krátkým řetězcem RNA

4BBS, Sainsbury et al, Nature, 2013

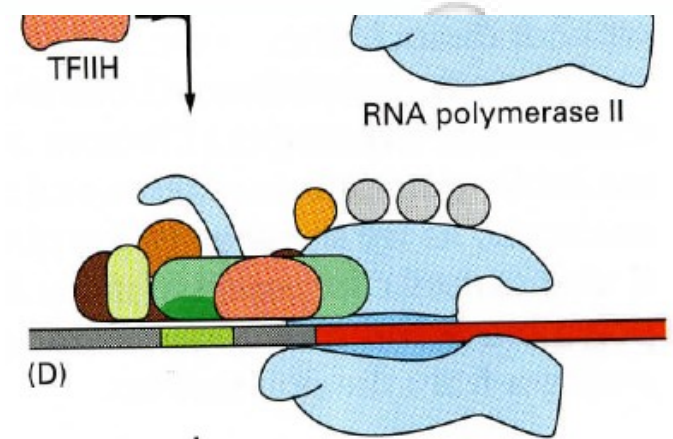
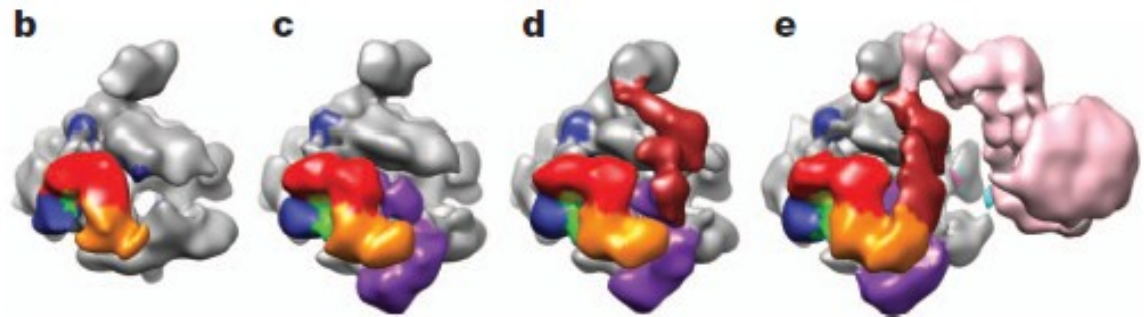
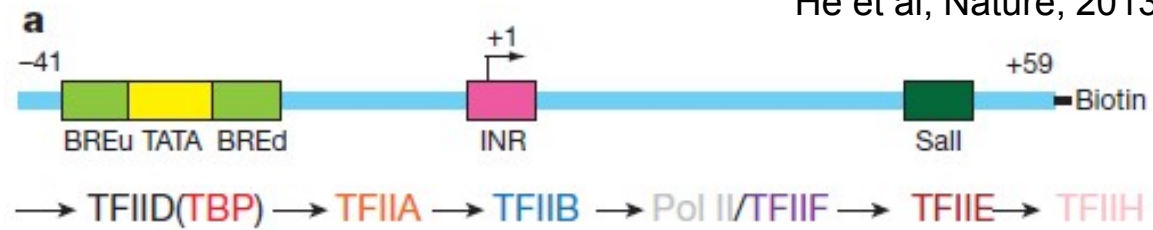


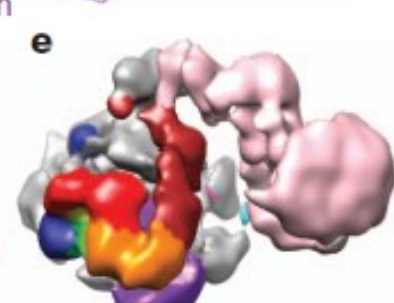
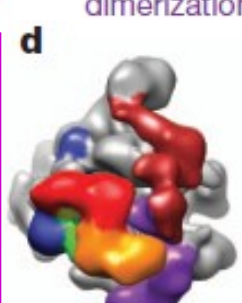
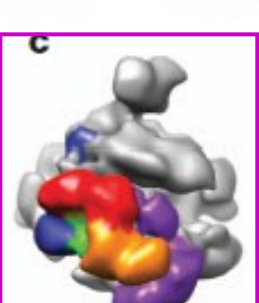
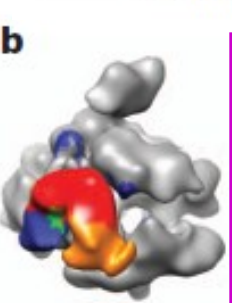
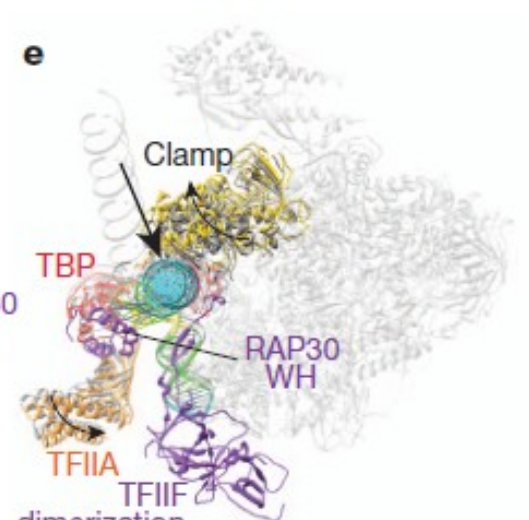
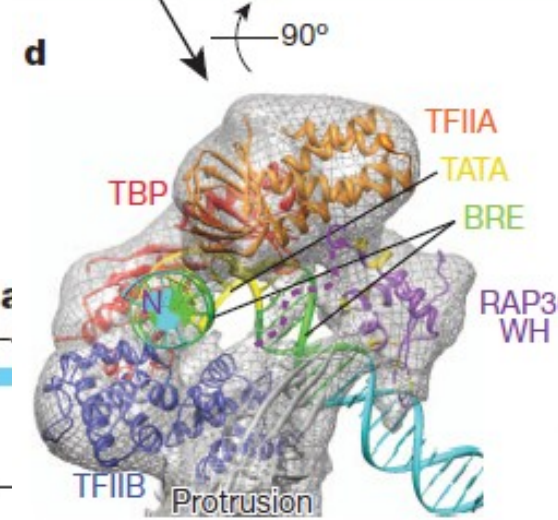
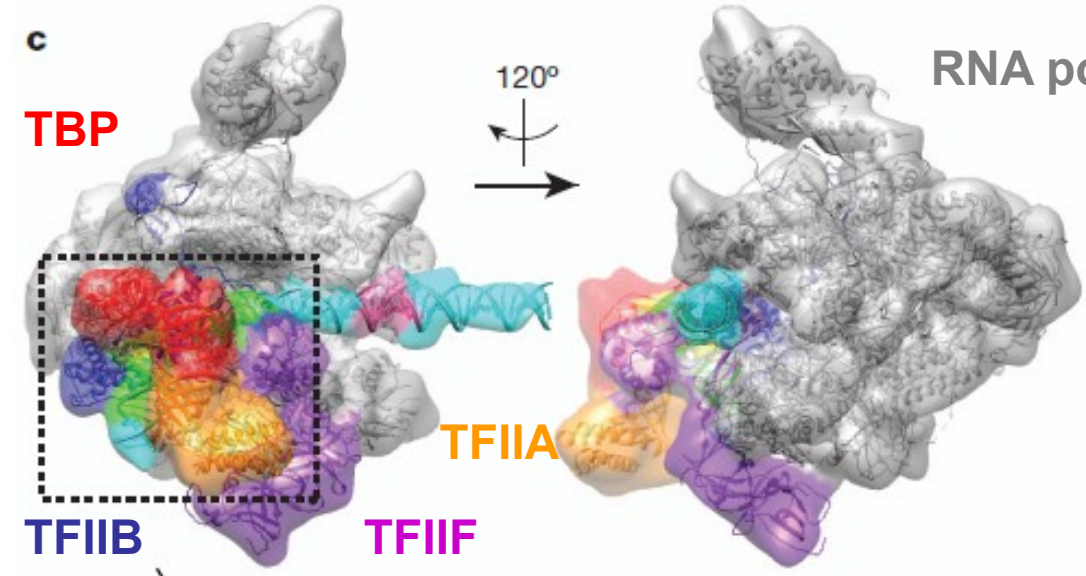
- postupným odhalováním detailů struktur, mutagenézí podjednotek, funkčními testy (*in vitro* a *in vivo*) byly identifikovány všechny TFII a určeno pořadí jejich působení

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

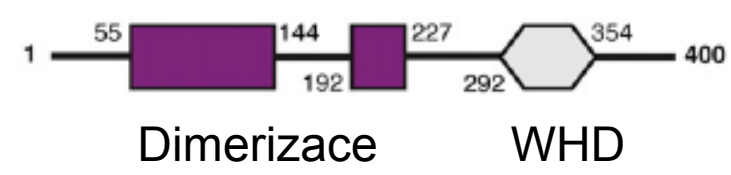


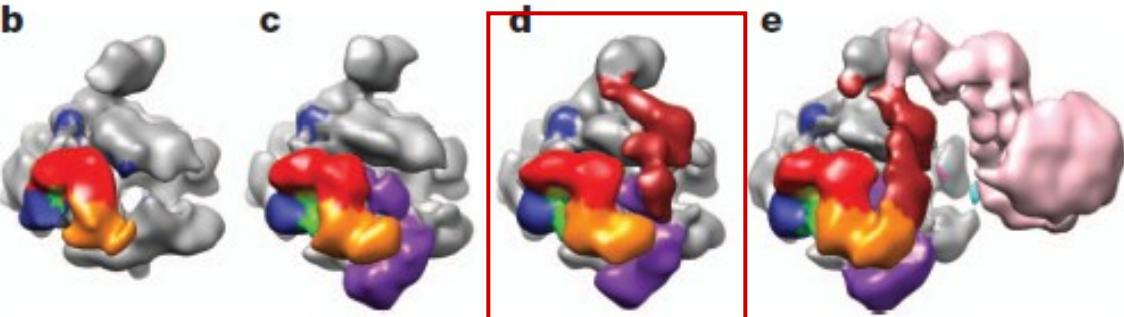
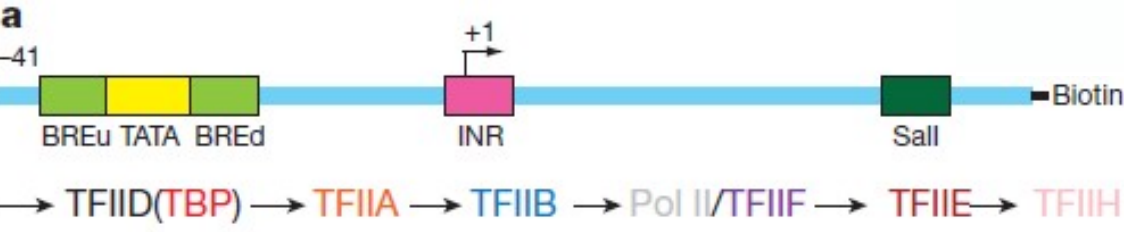
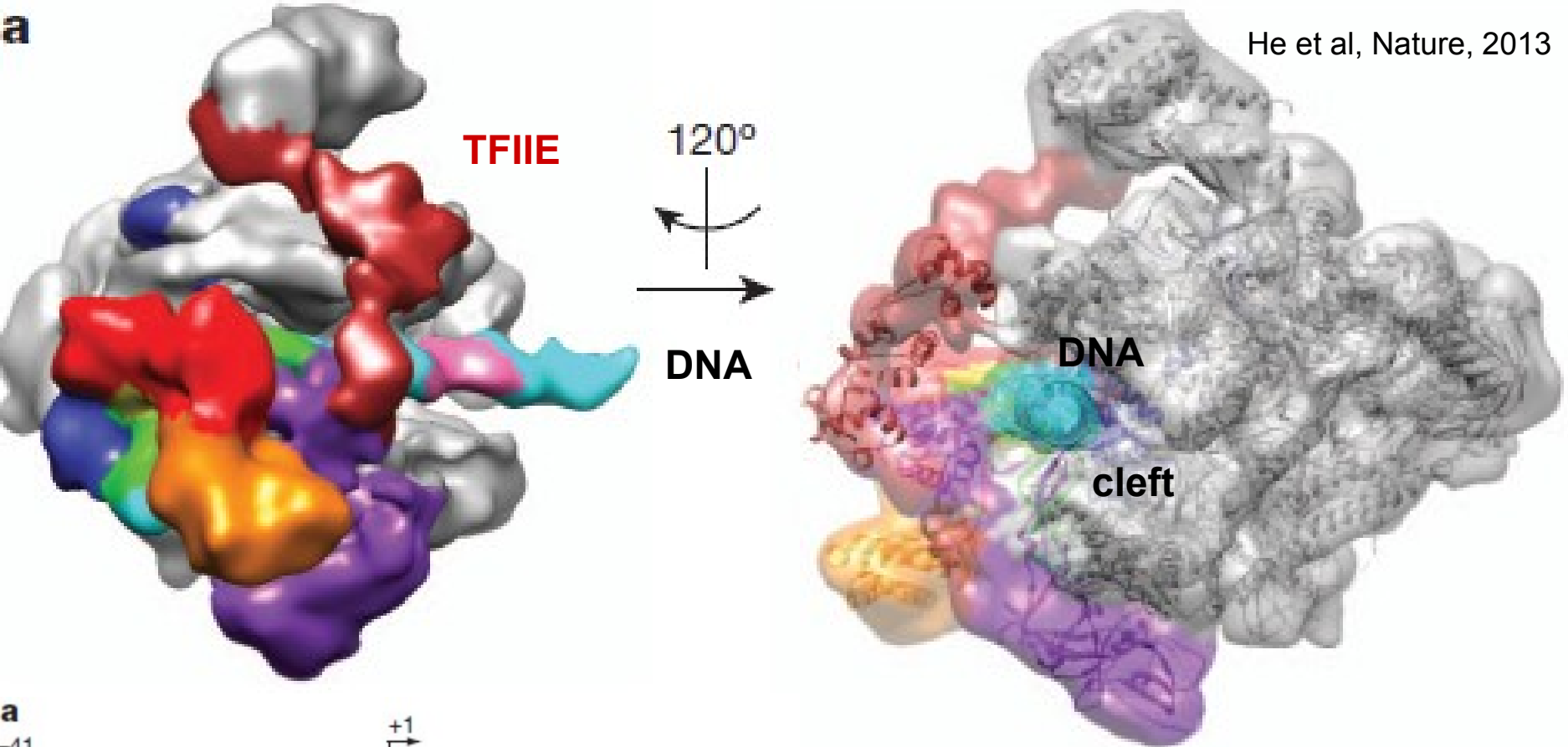
He et al, Nature, 2013



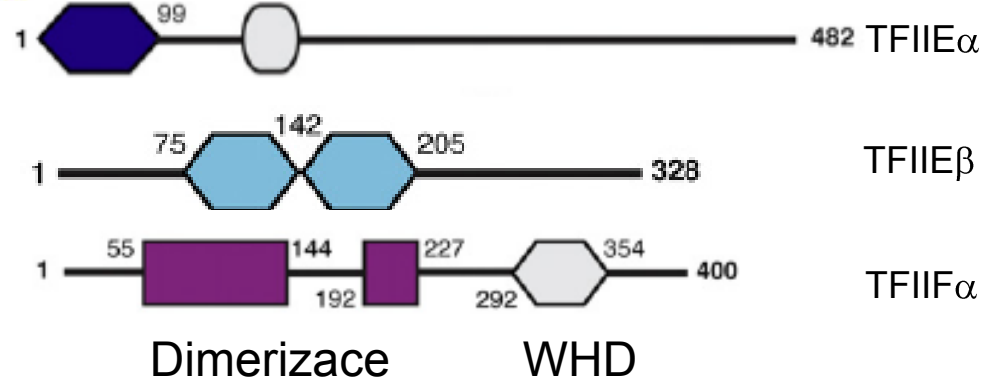
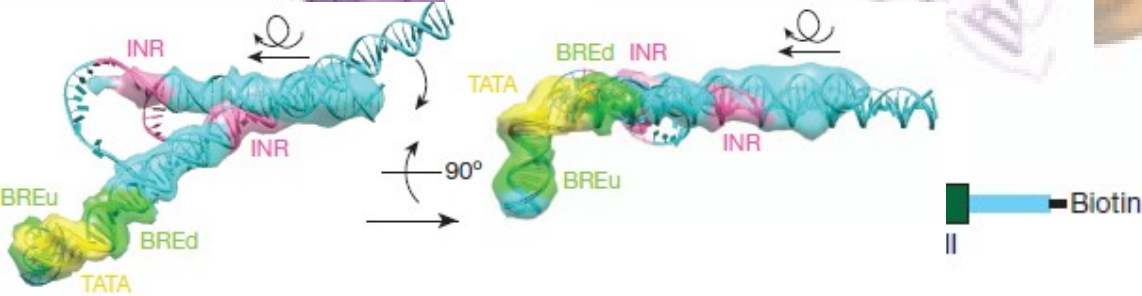
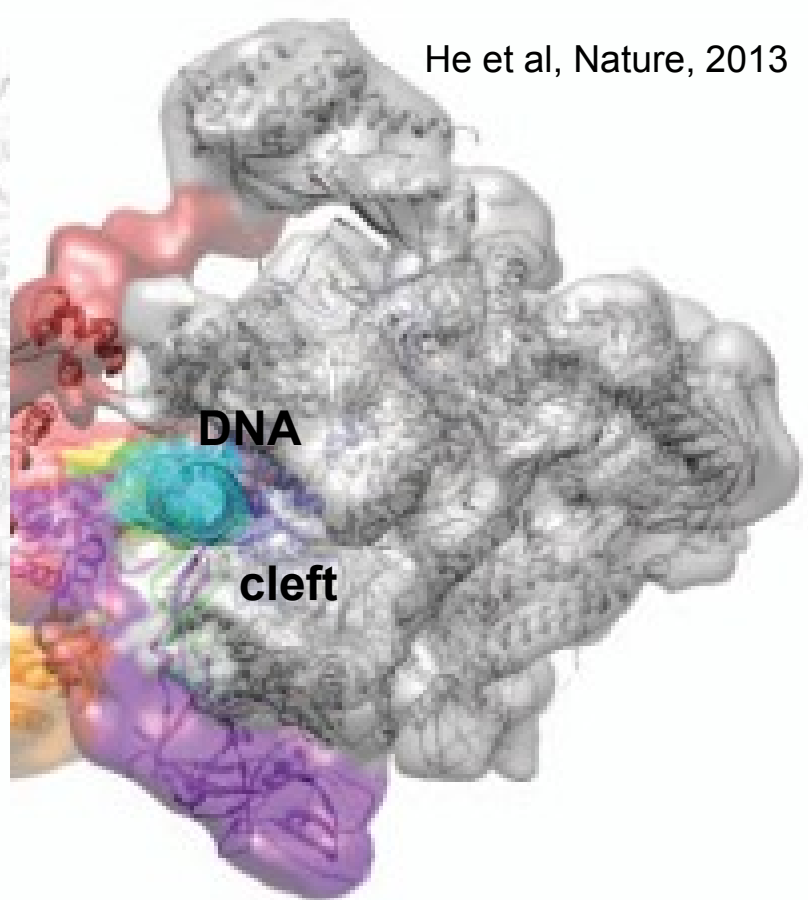
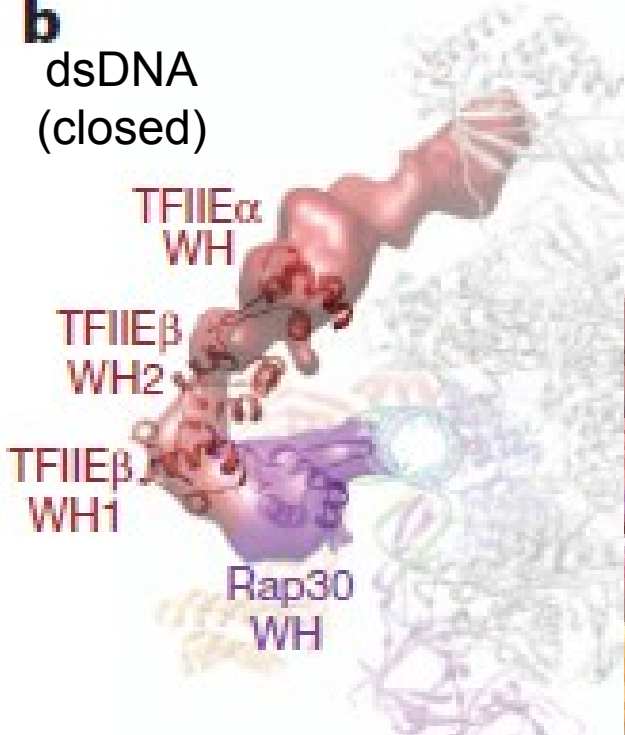
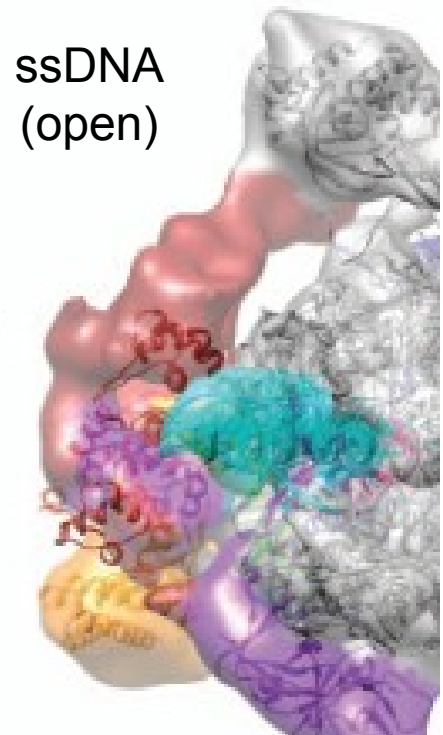


- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})
- změna natočení TFIIA+TFIIB+TBP/TFIIF + RNA pol II
- váže TFIIE a TFIIH a pomáhá tak stabilizaci komplexu

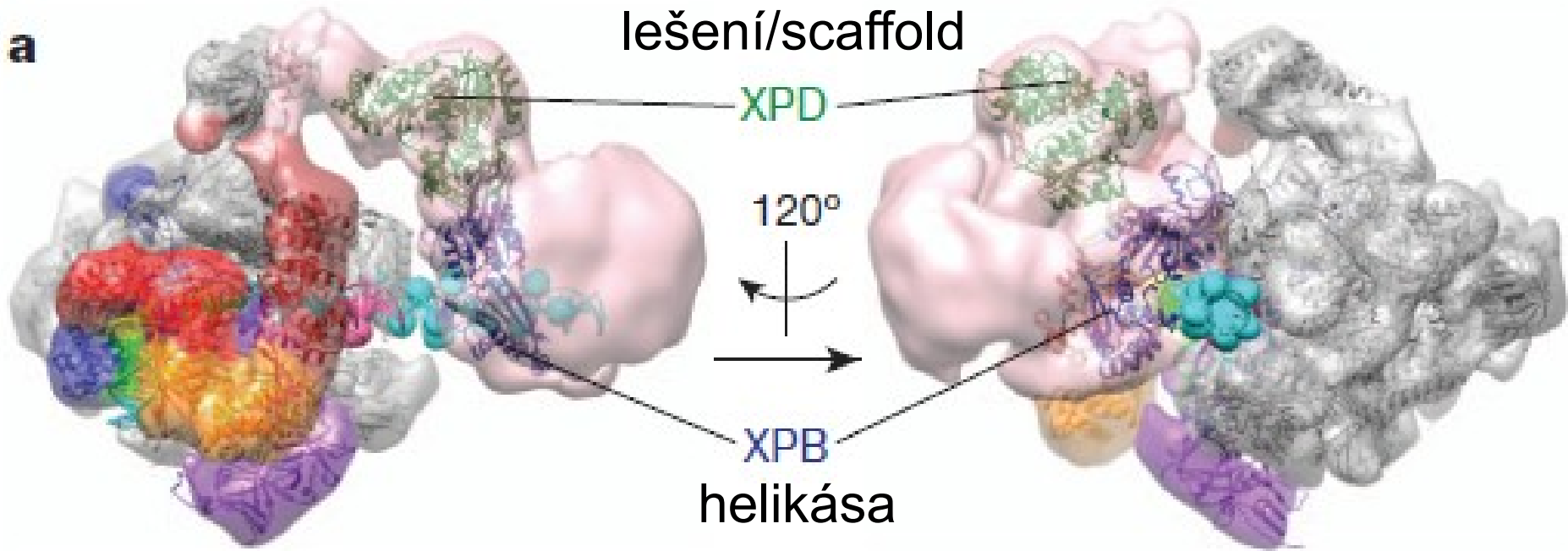




-váže TFIIE a TFIIH a pomáhá tak stabilizaci komplexu (vidí DNA)
 - tandem 4x WHD uzamyká DNA v pol II prohlubni

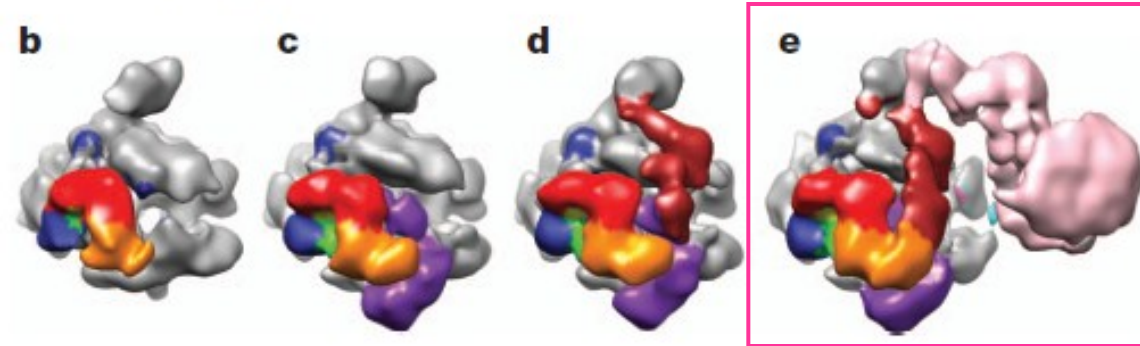
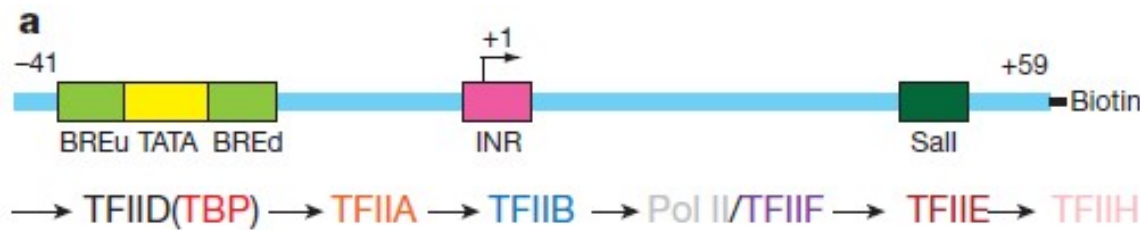


-váže TFIIIE a TFIIH a pomáhá tak stabilizaci komplexu (vidí DNA)
 - tandem 4x WHD
 uzamyká DNA v pol II prohlubni



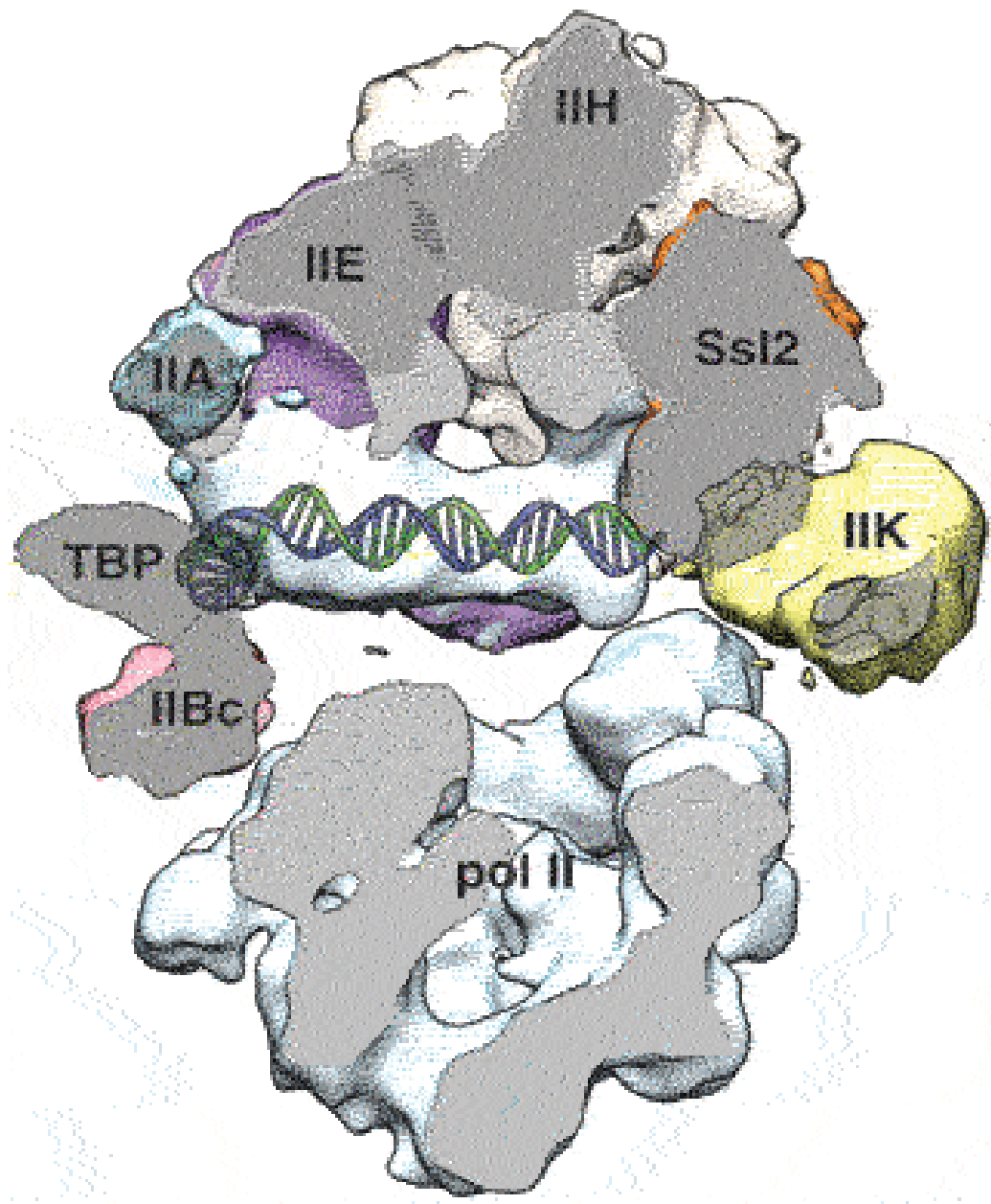
- XPB a XPD regulují transkripci vs opravu DNA (NER)

lidský PIC komplex
He et al, Nature, 2013



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

- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvoušroubovici



- pohled z jiného úhlu
- TBP-TFIIA-TFIIA-RNA-pol II (tunýlek kde se syntetizuje nový RNA řetězec)

video

- celý mechanismus aktivace transkripce od vazby aktivátoru ...
 uvolnění chromatinové struktury ...
 zahrnuje ještě další podkomplexy (jako např. mediator)

