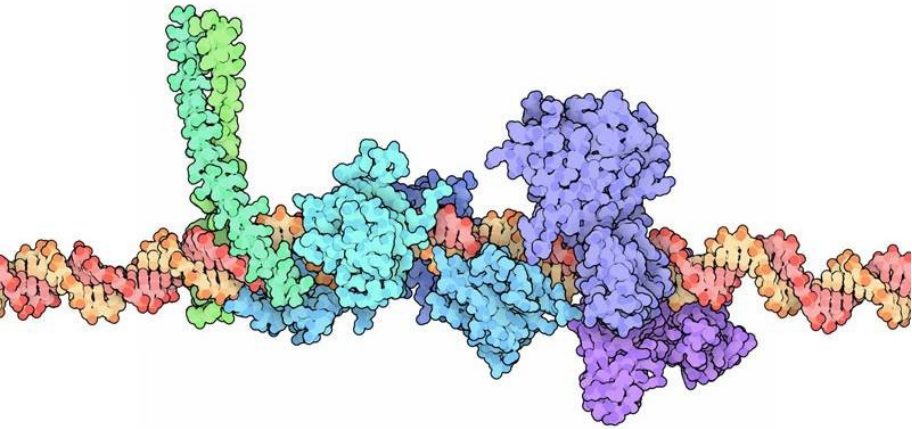
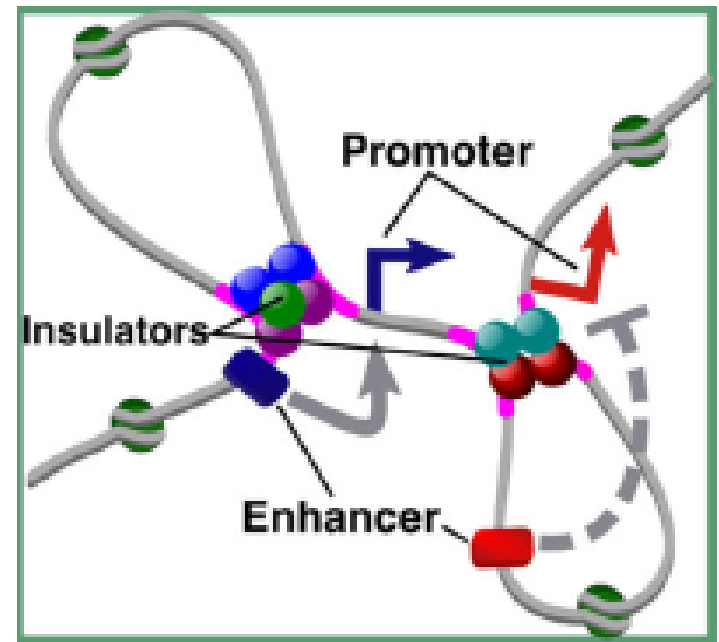
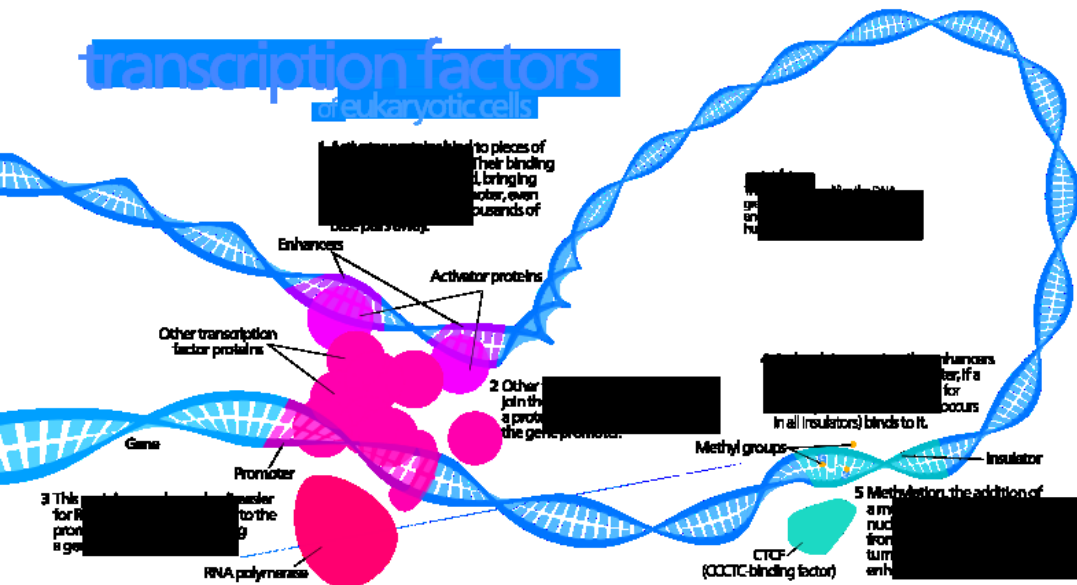


Komplexy spojené s transkripcí

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

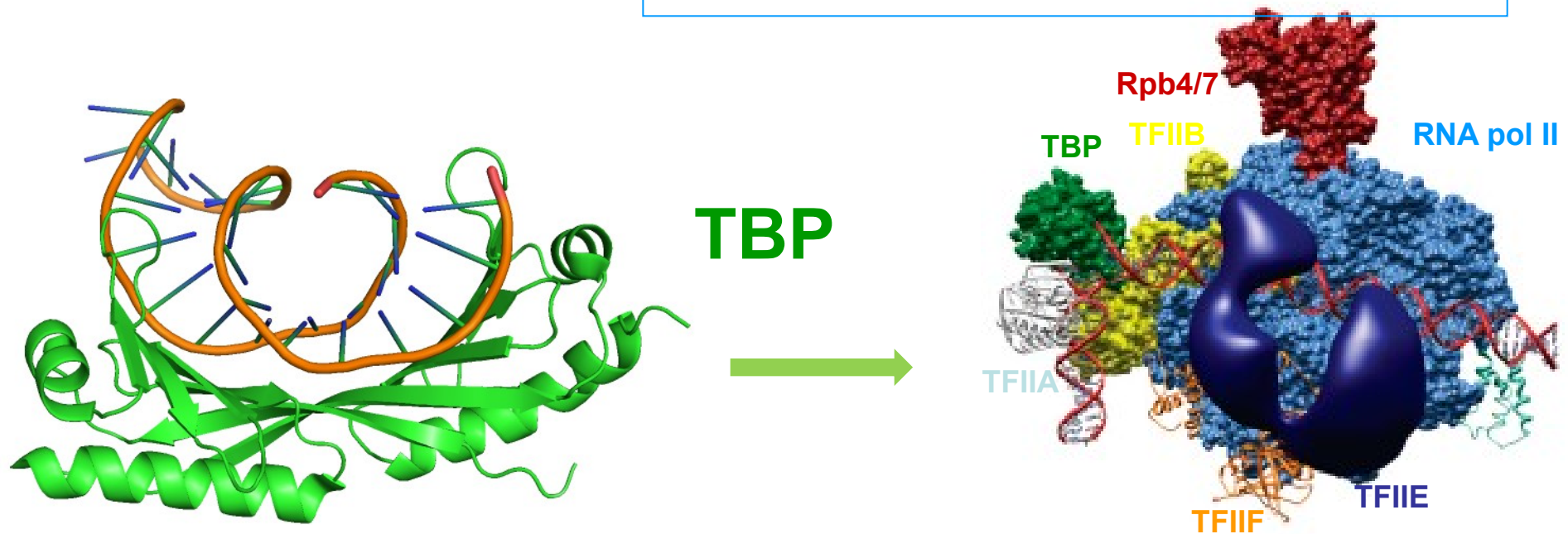


- velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- nejčastěji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)

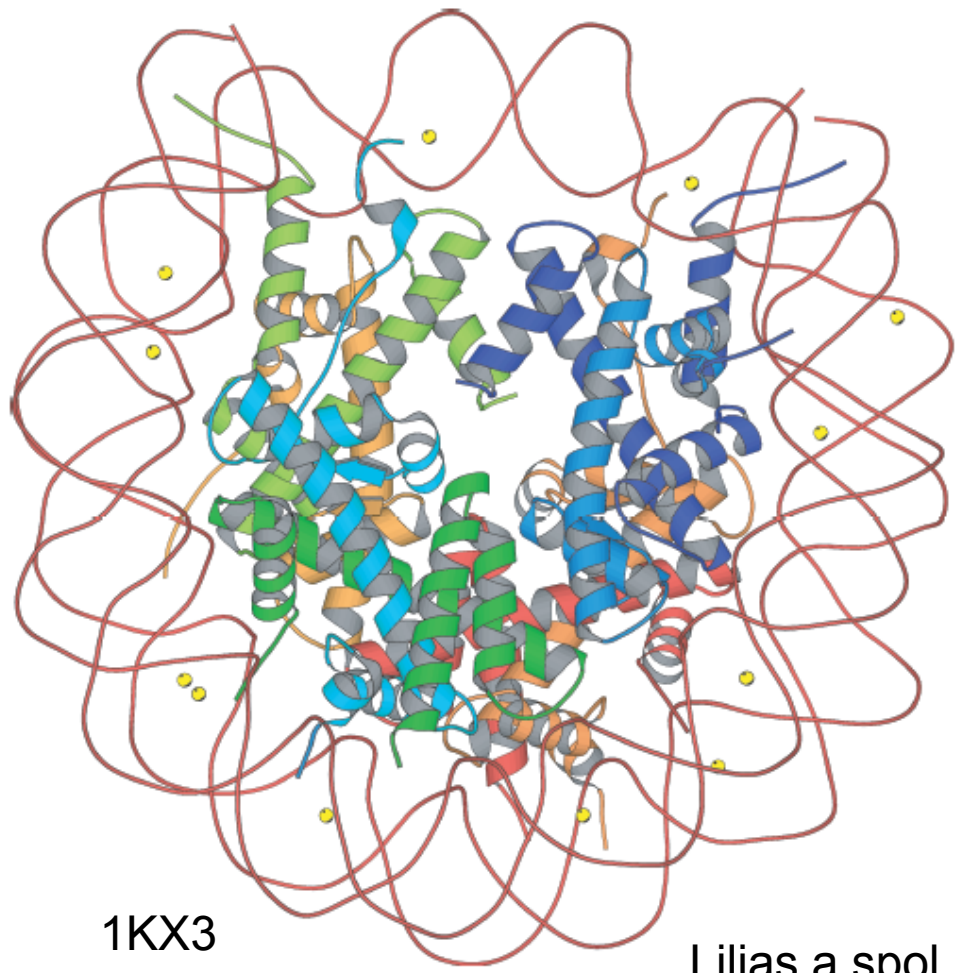
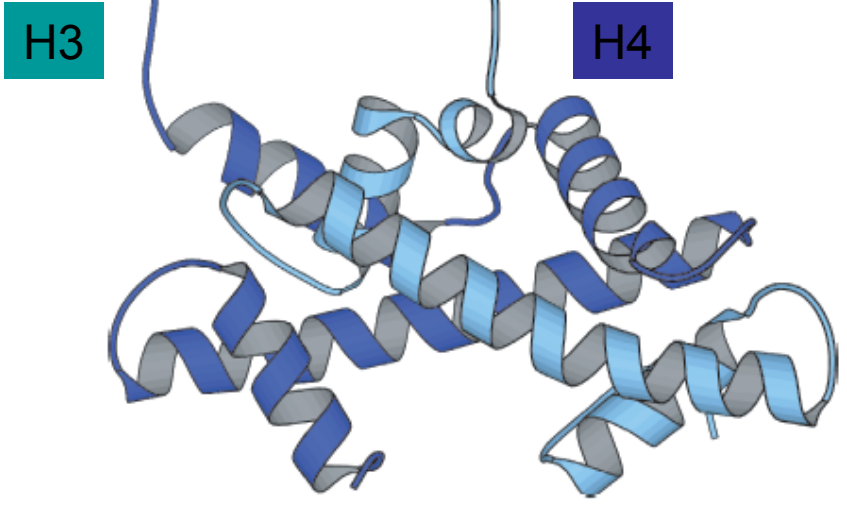
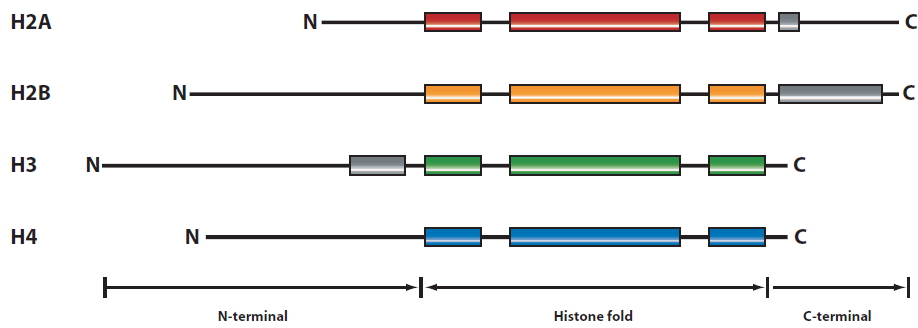


- Zipper typ
- Helix-turn-helix
- Zinkový prst
- **Histon, HMG-box**
- β -barrel
- β -hairpin/ribbon
- Smíšené α/β

- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- Nejčastěji interaguje **Arg** (pozitivní náboj + vodíkové vazby)
- **Průběh transkripce – skládání komplexů**



- **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



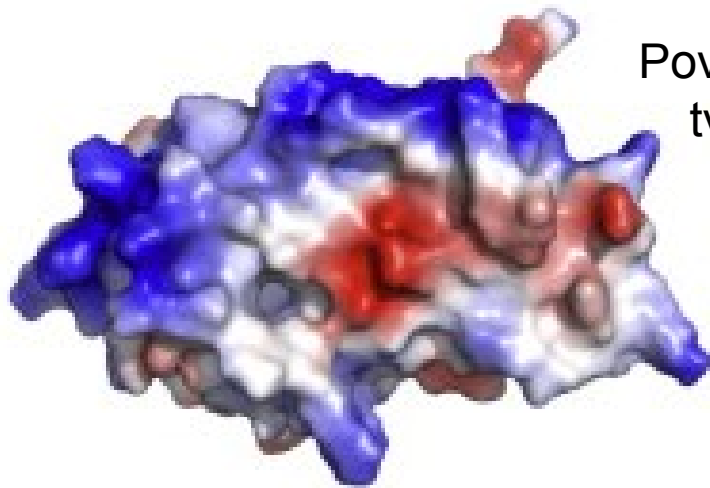
Liljas a spol.

Sestavování nukleozomu:

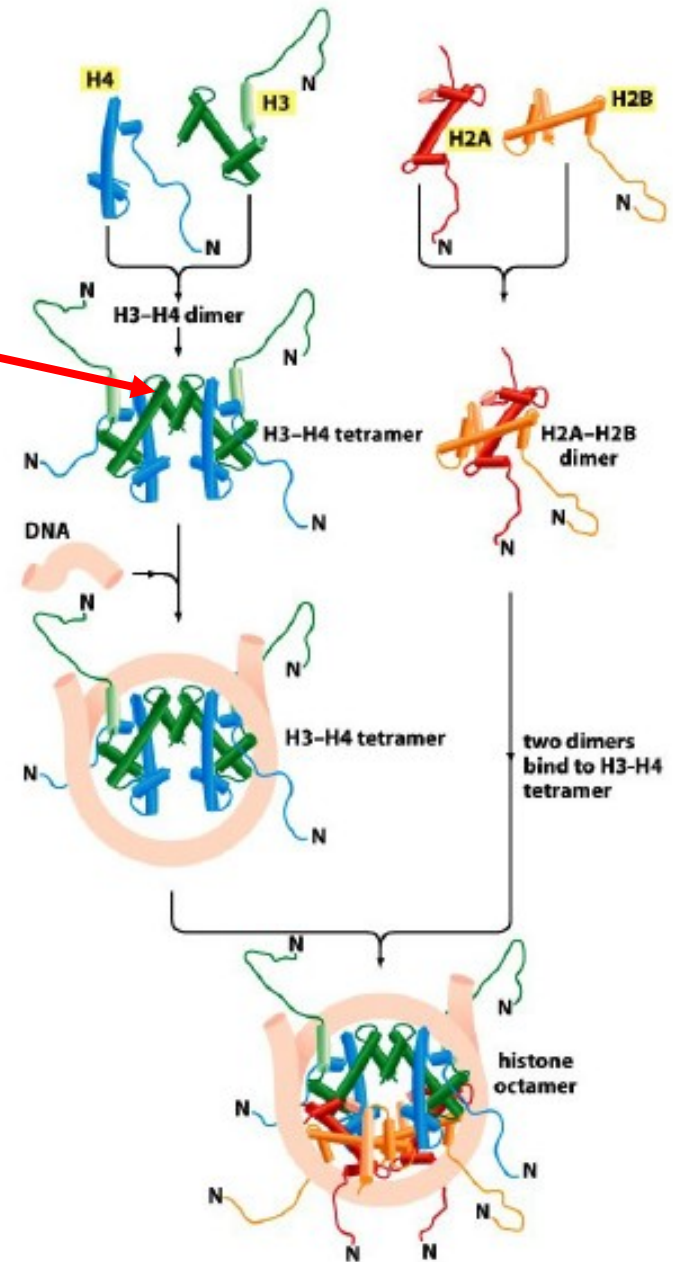
klíčová interakce mezi dvěma H3-H4 dimery je zprostředkována histonem H3

Dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru (H3-H4)₂

Povrch/kontakt tvoří lysiny a argininy

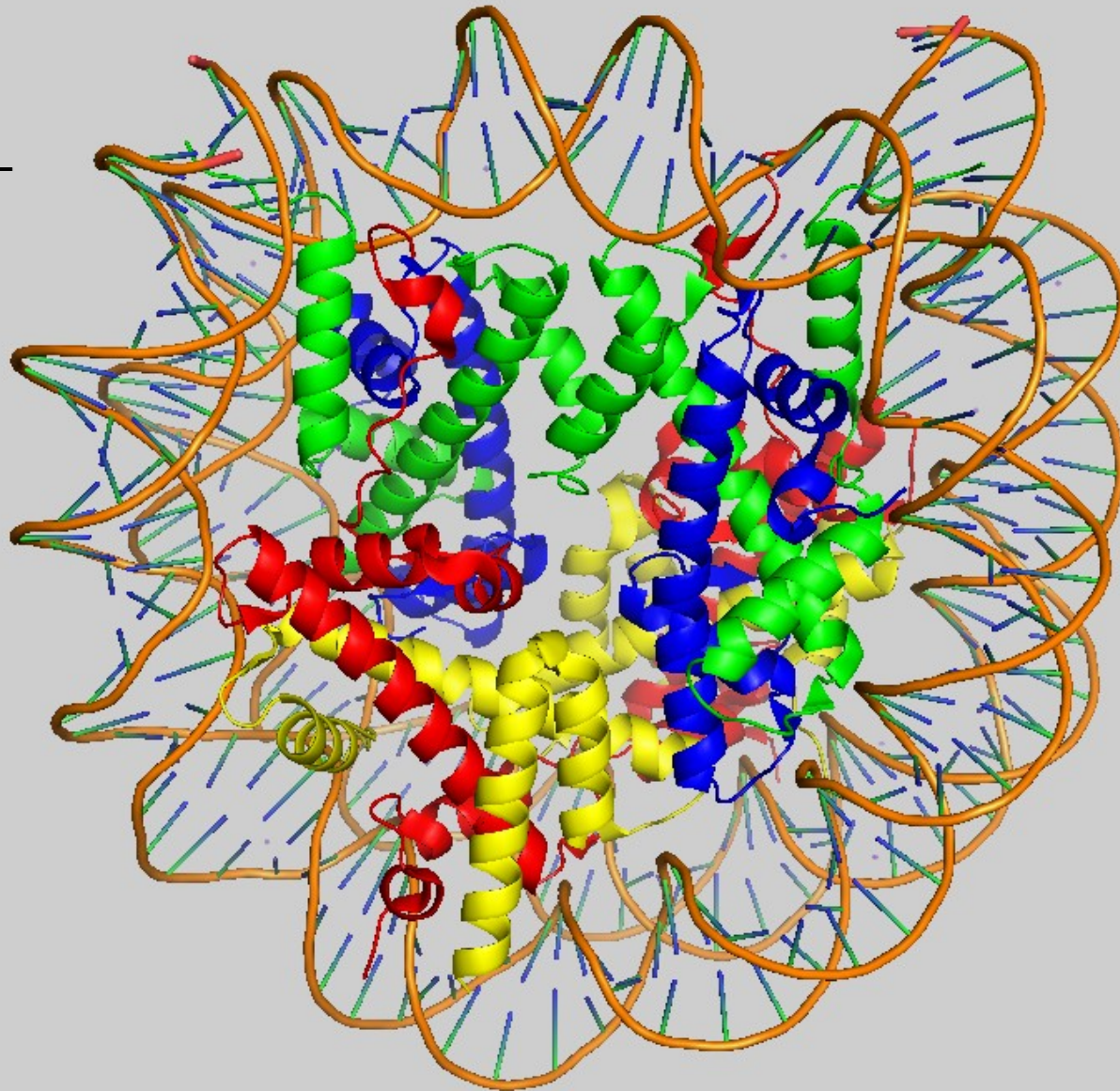


H2B/H2A

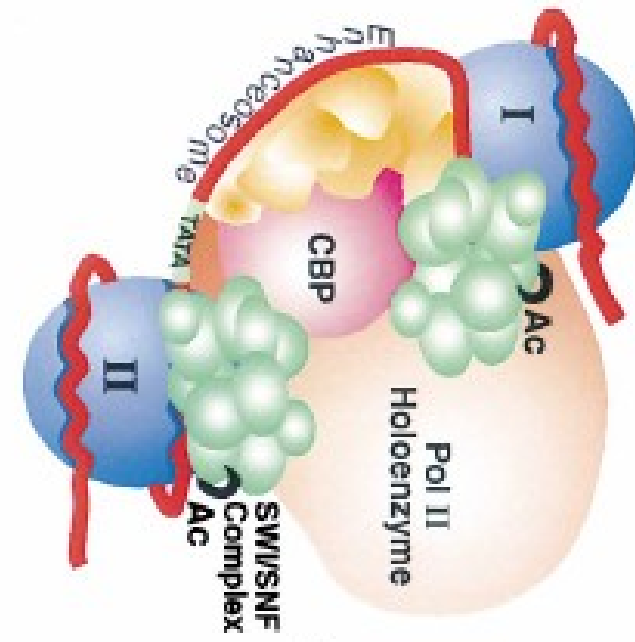


H3/H4 interagují s oběma vlákny – silnější vazba

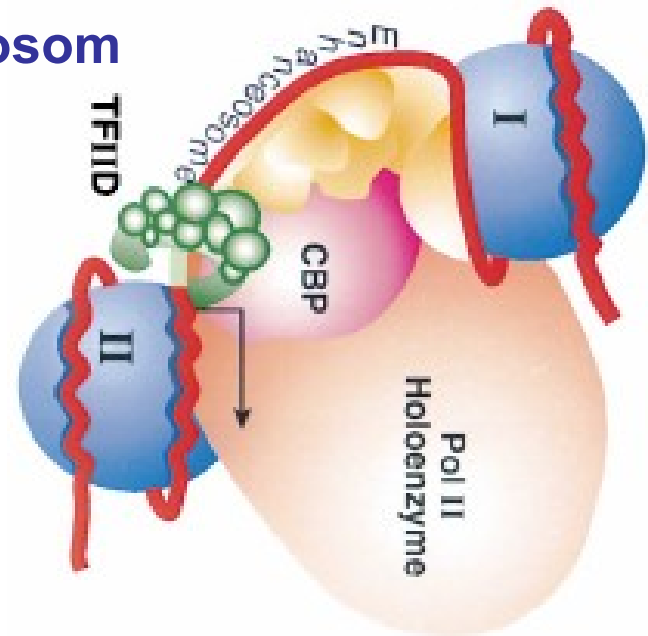
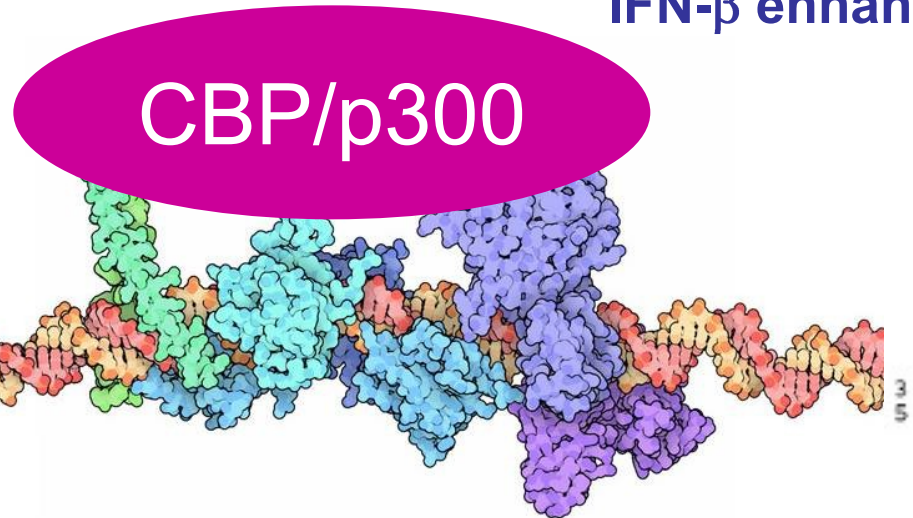
PYMOL



- 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

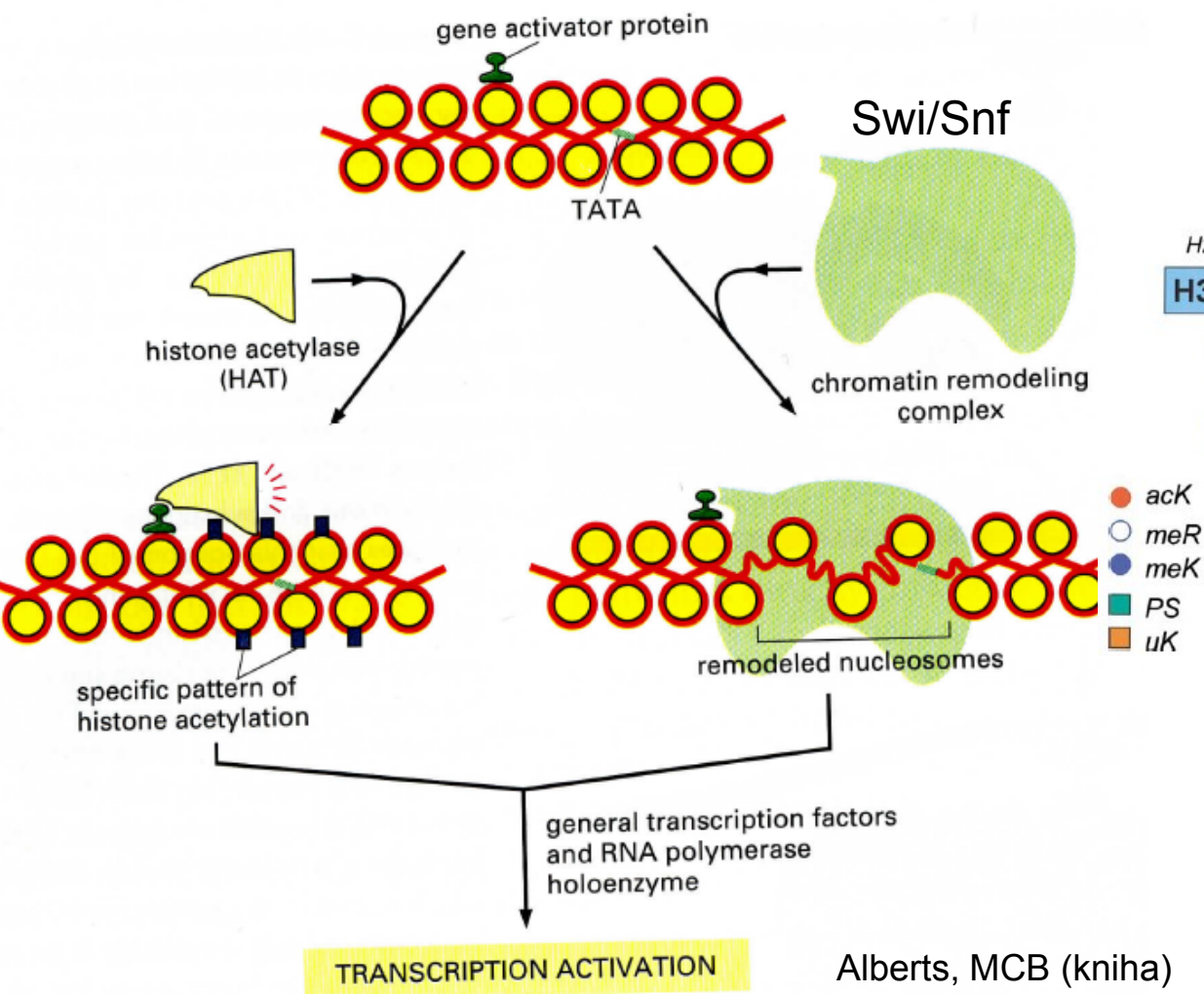


IFN- β enhanceosom

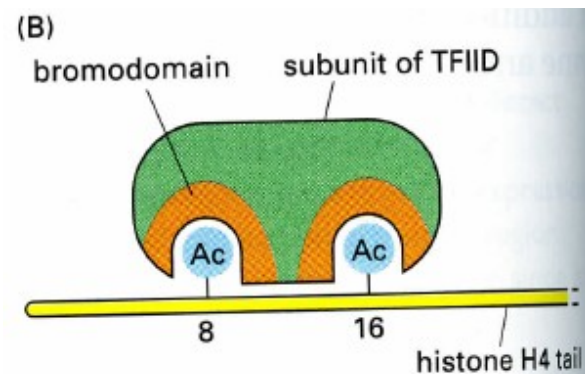
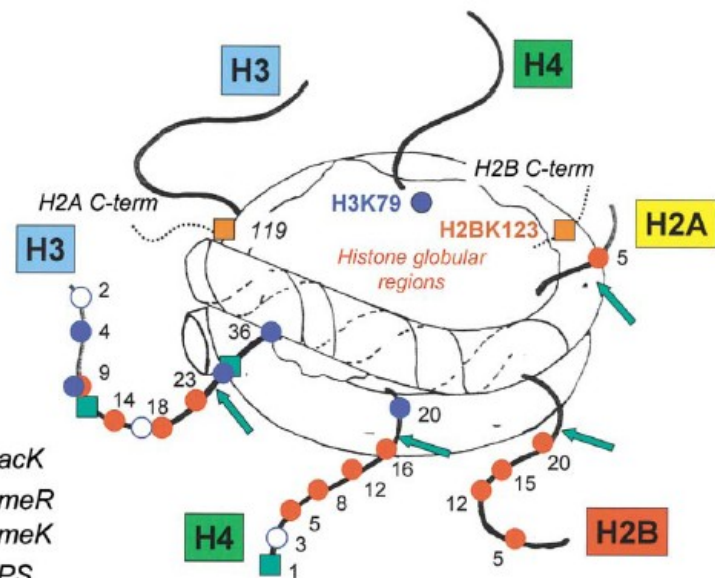


Modifikace histonů

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

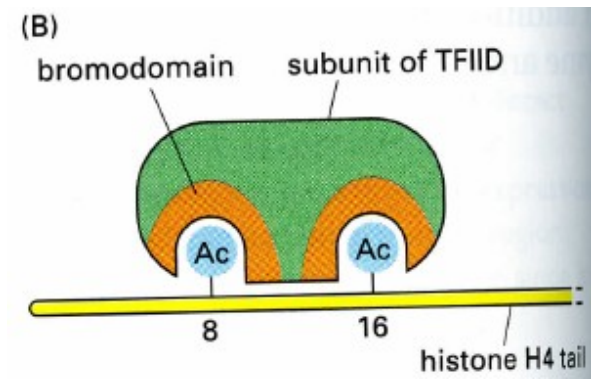
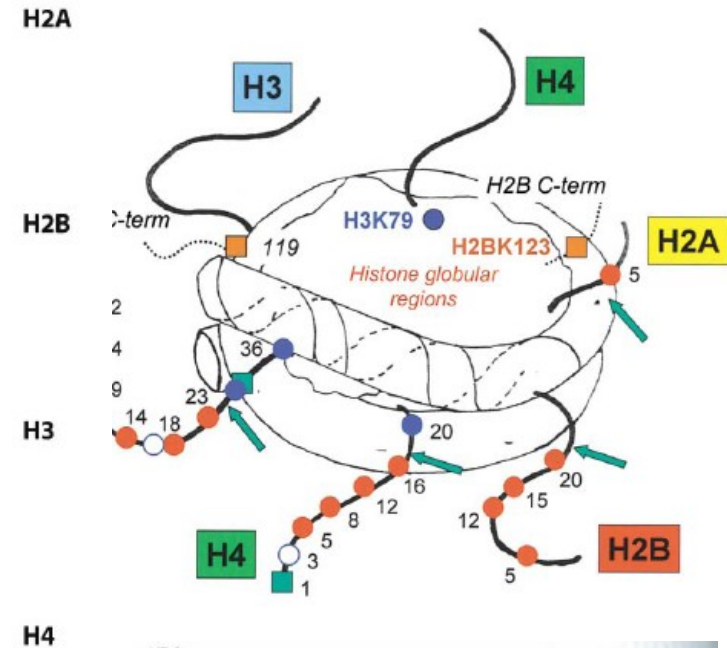
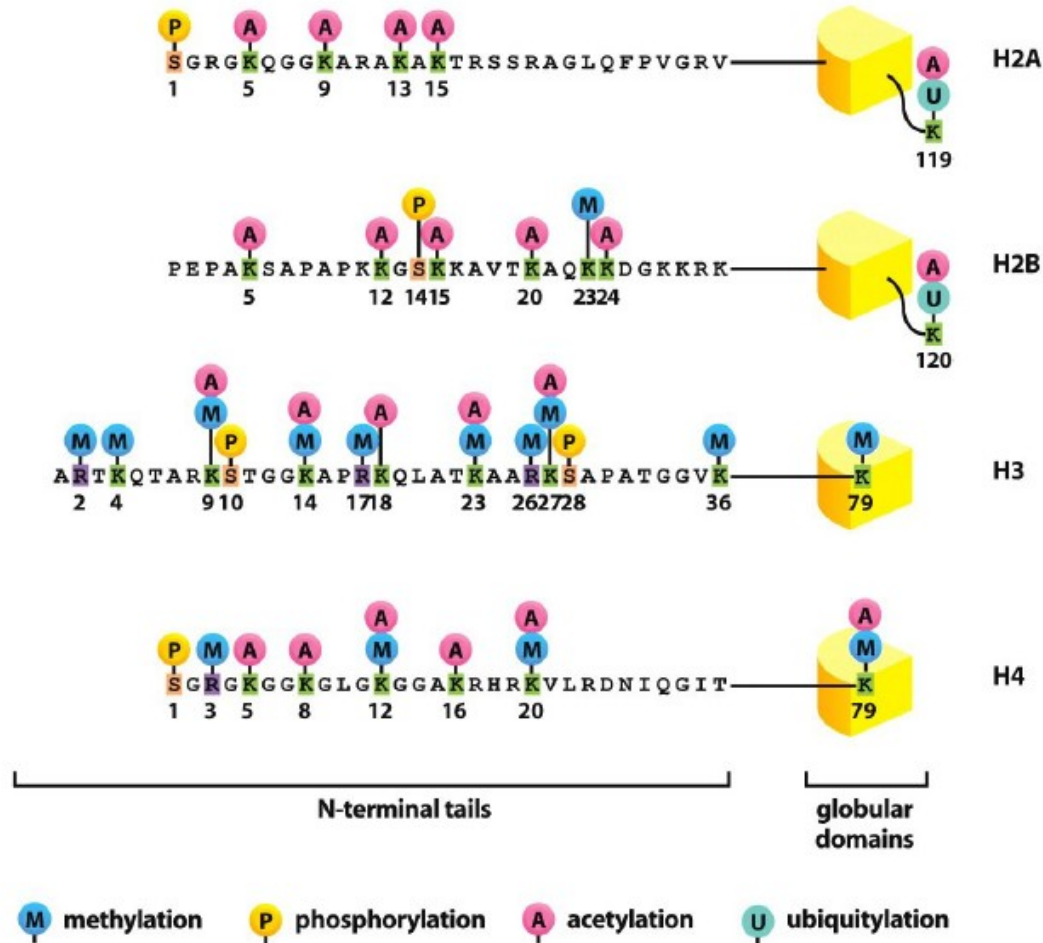


Alberts, MCB (kniha)

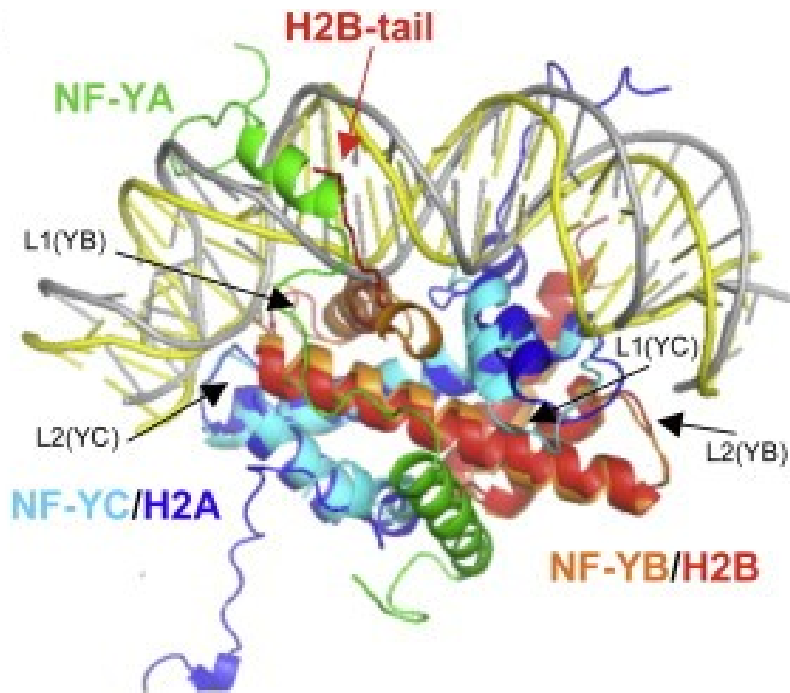


Modifikace histonů

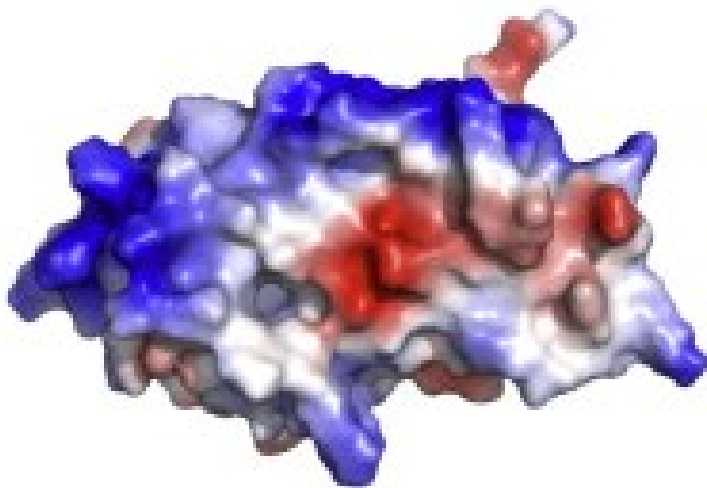
- acetylace rozvolňuje vazbu oktameru a zpřístupňuje sekvence DNA pro TBP
- TFIID se váže na Ac-H4 (K8, K16) prostřednictvím bromodomény TAF1 proteinu



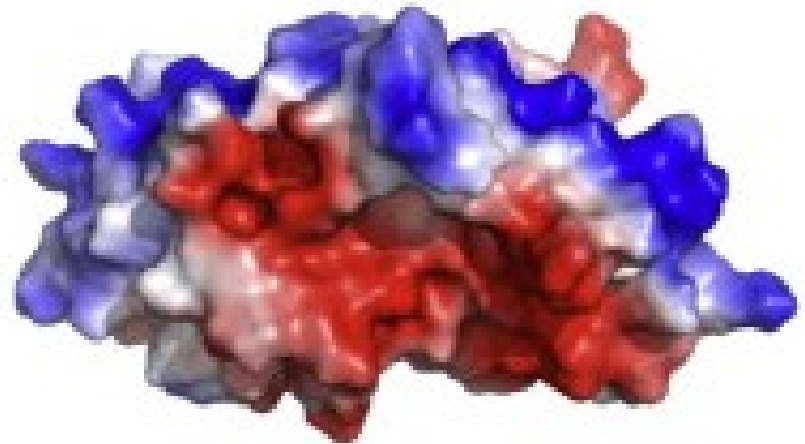
A



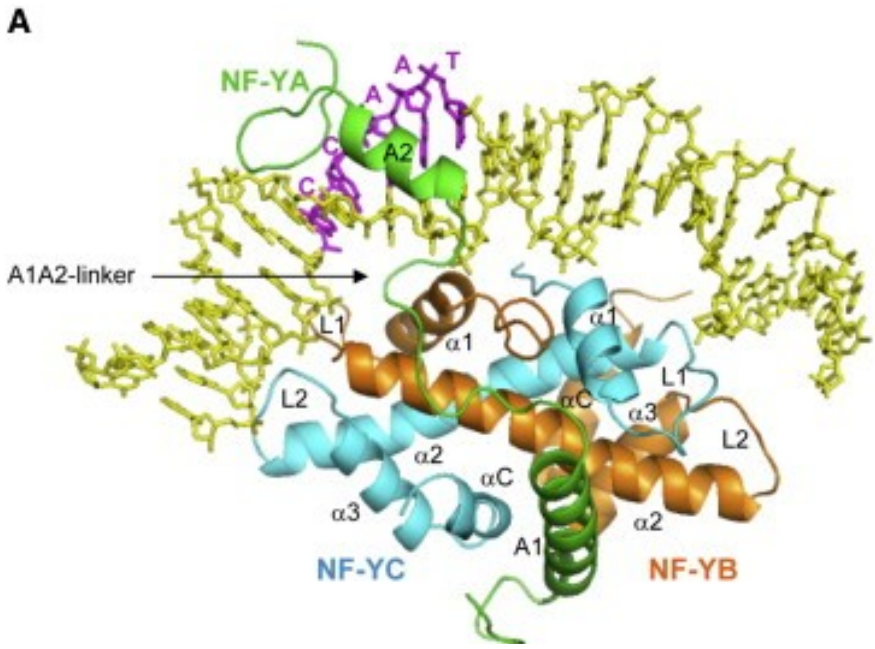
- **Transkripční faktory NF-Y** (podjednotky B a C) obsahují histon-fold a vážou se sekvenčně nespecificky na cukrfosfátovou kostru jako histony
- DNA se v důsledku vazby ohýbá podobně jako v nukleosomech
- NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -šroubovice (interkalace do MŽ)



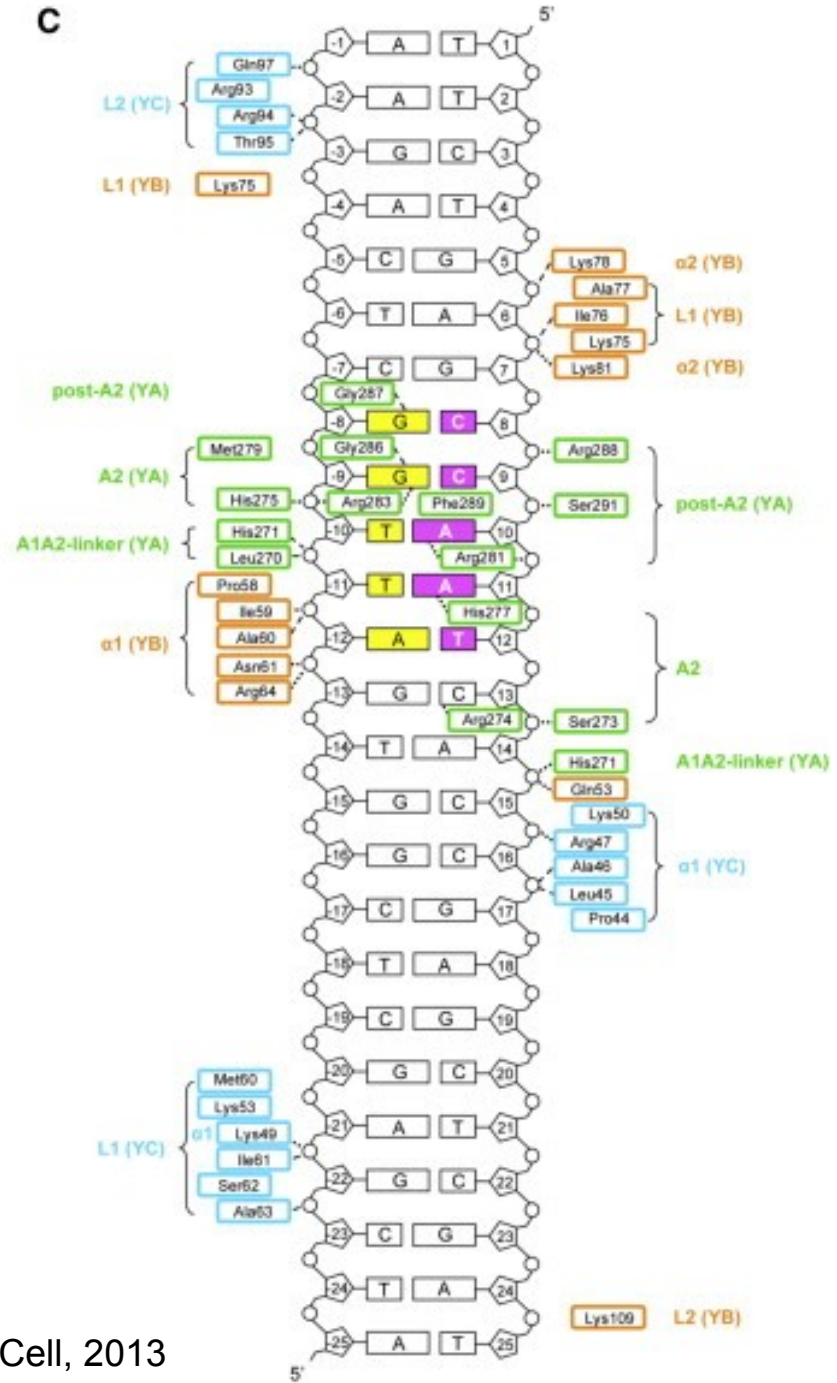
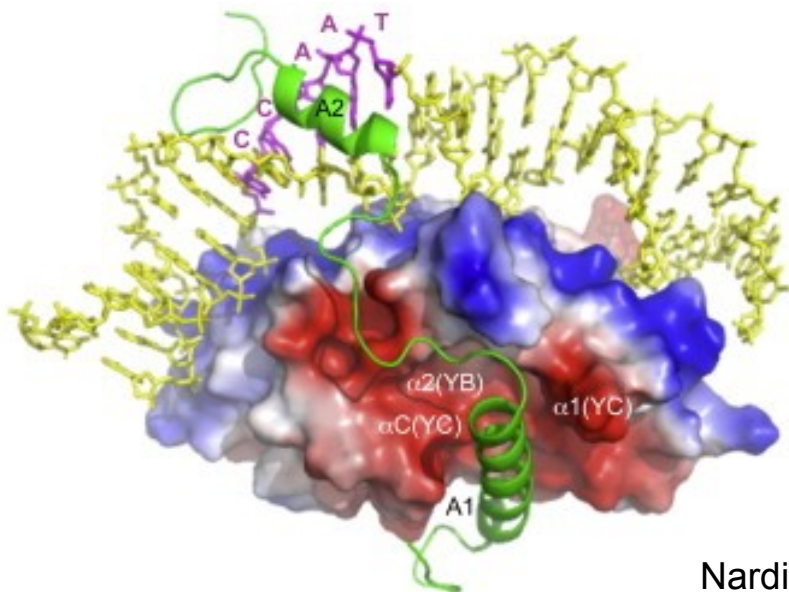
H2B/H2A



NF-YB/NF-YC



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



CCAAT-box
Promoter

Inactive



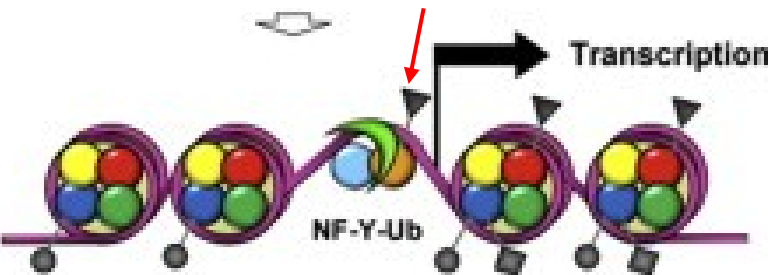
Poised



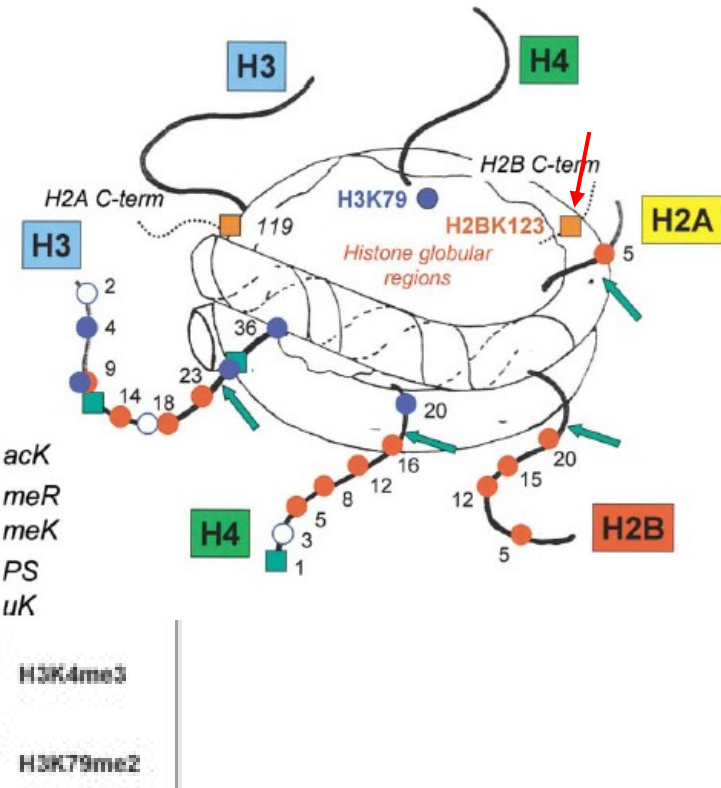
NF-Y / DNA complex



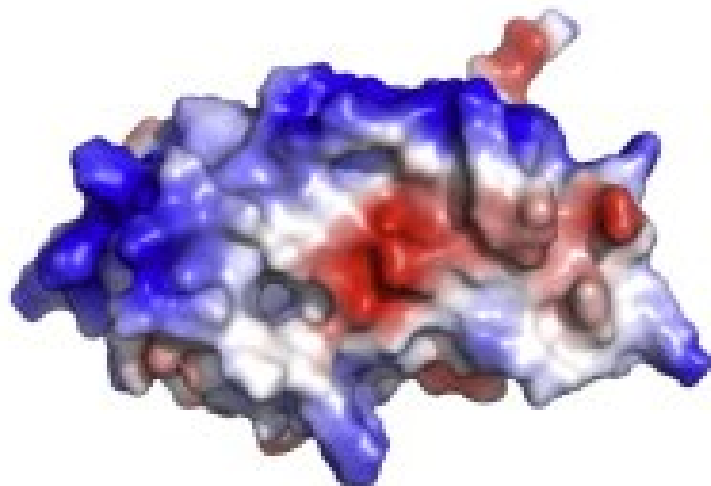
Active



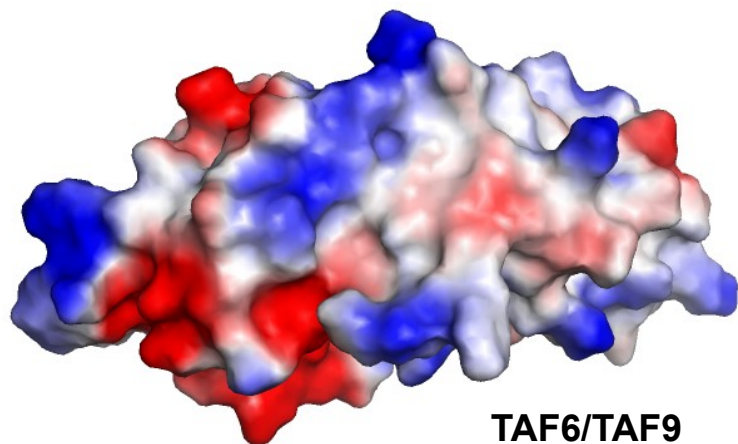
- NF-Y se váže přes histon-fold a nahrazuje nukleosom
- podobně jako ubiquitince histonu (H2B) i ubiquitinace NF-YB aktivuje transkripci



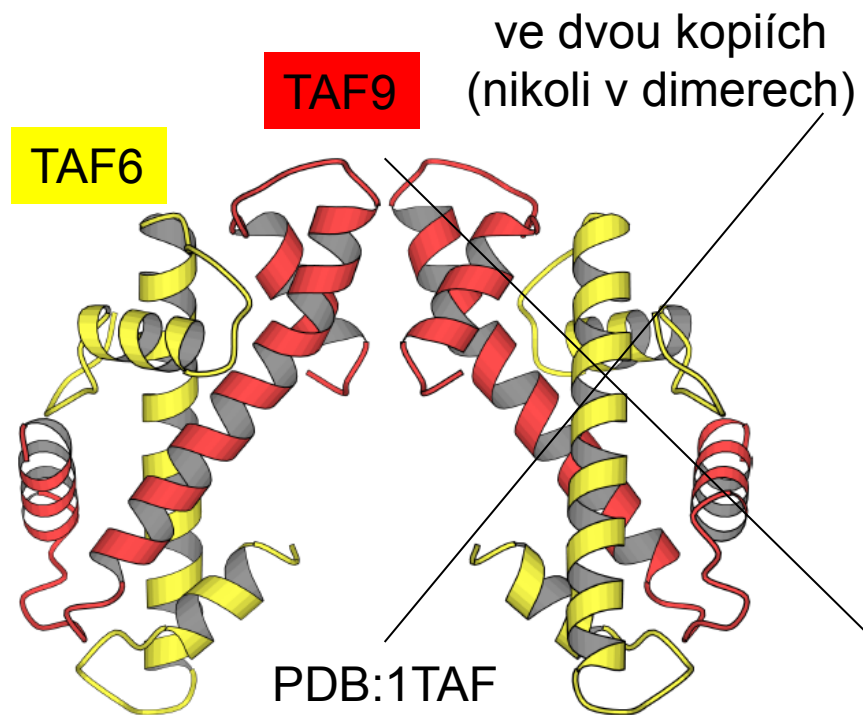
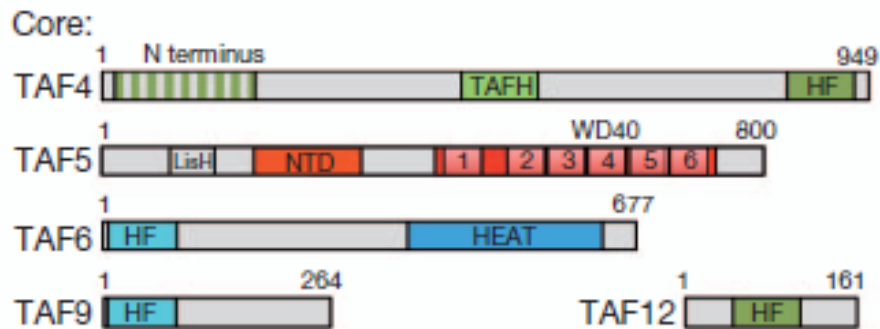
TBP-associated factors (9 z 13 podjednotek TFIID komplexu mají histon-fold, ale nevytváří oktamery)



H2B/H2A



TAF6/TAF9

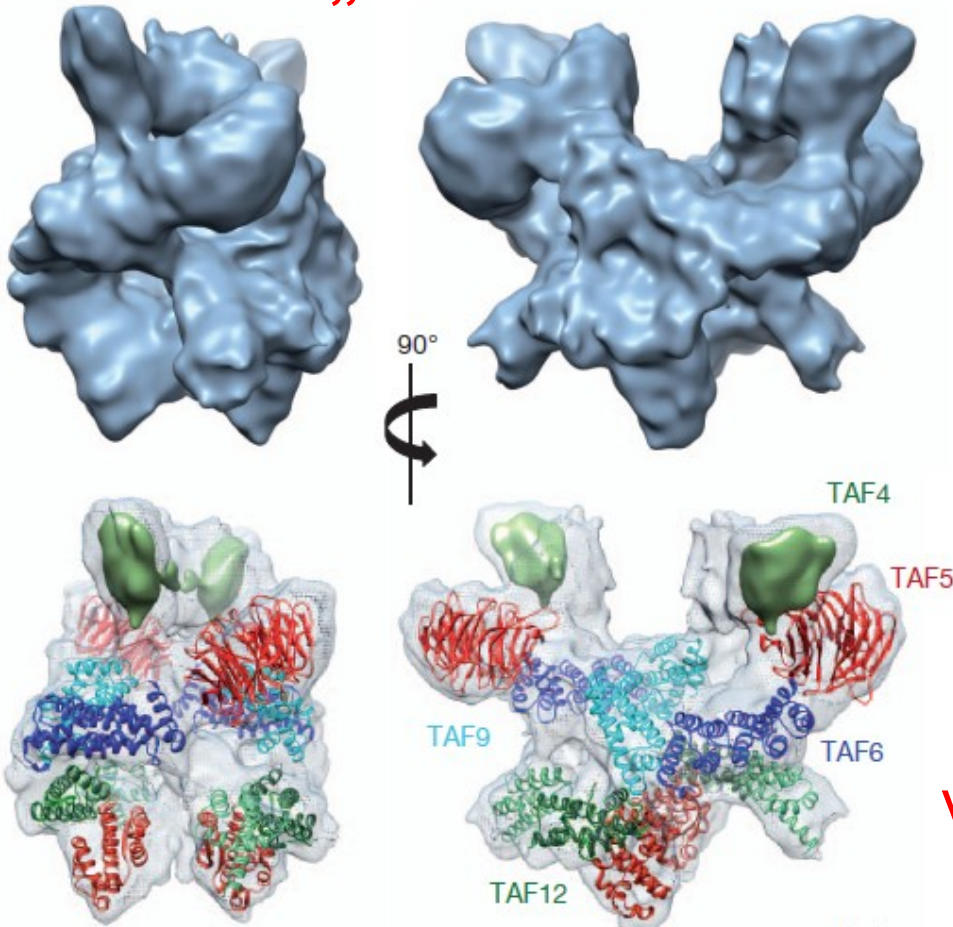
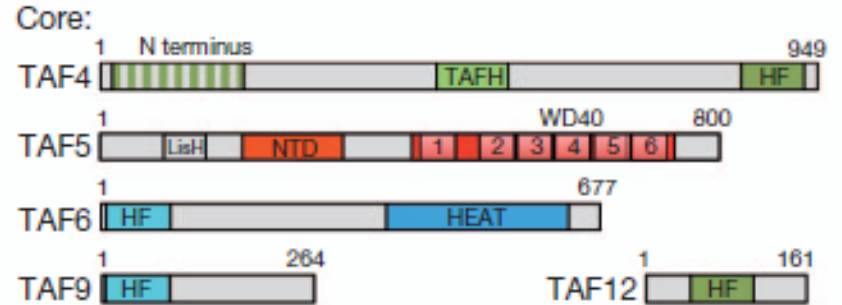


Histon-fold doména se neváže na DNA (podílí se C-konec)

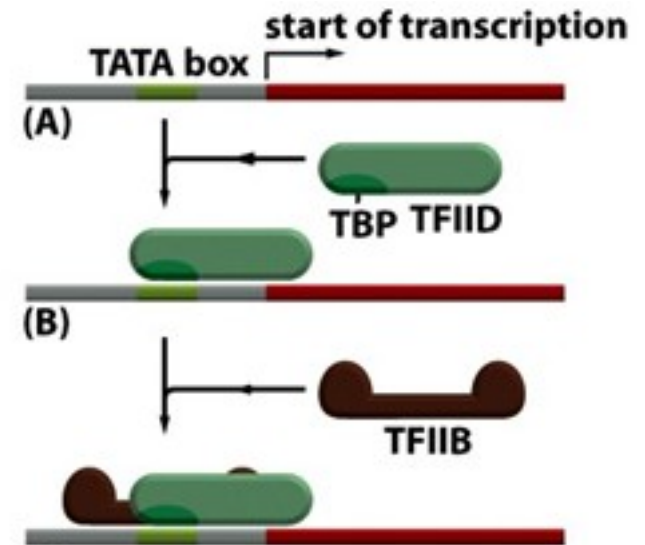
Shao et al, MCB, 2005

- 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“

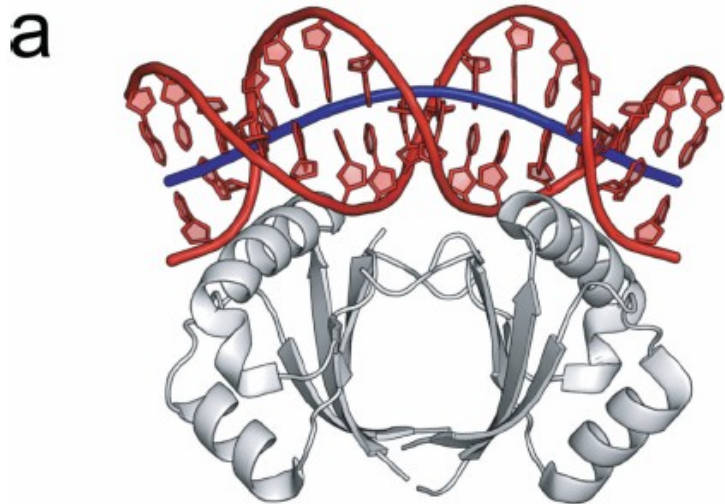


video



- 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)

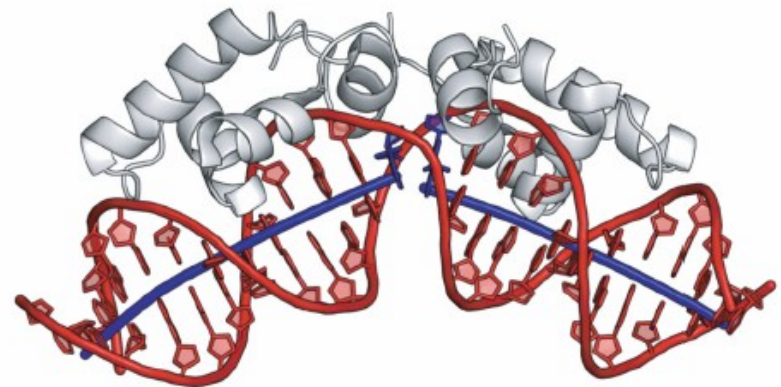
- Zipper typ
- Helix-turn-helix
- Zinkový prst
- **Histon, HMG-box**
- β -barrel
- β -hairpin/ribbon
- Smíšené α/β



histon

Bend

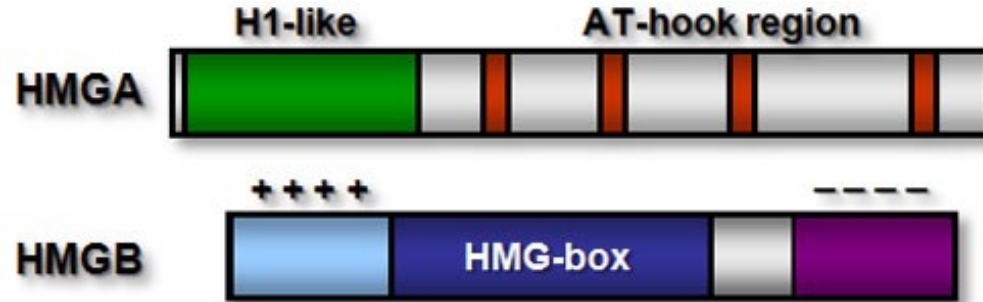
b



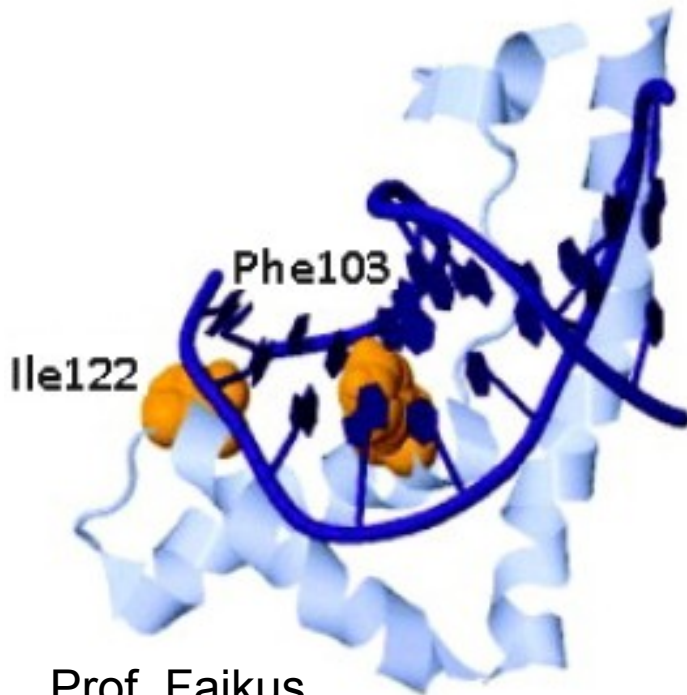
HMG

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

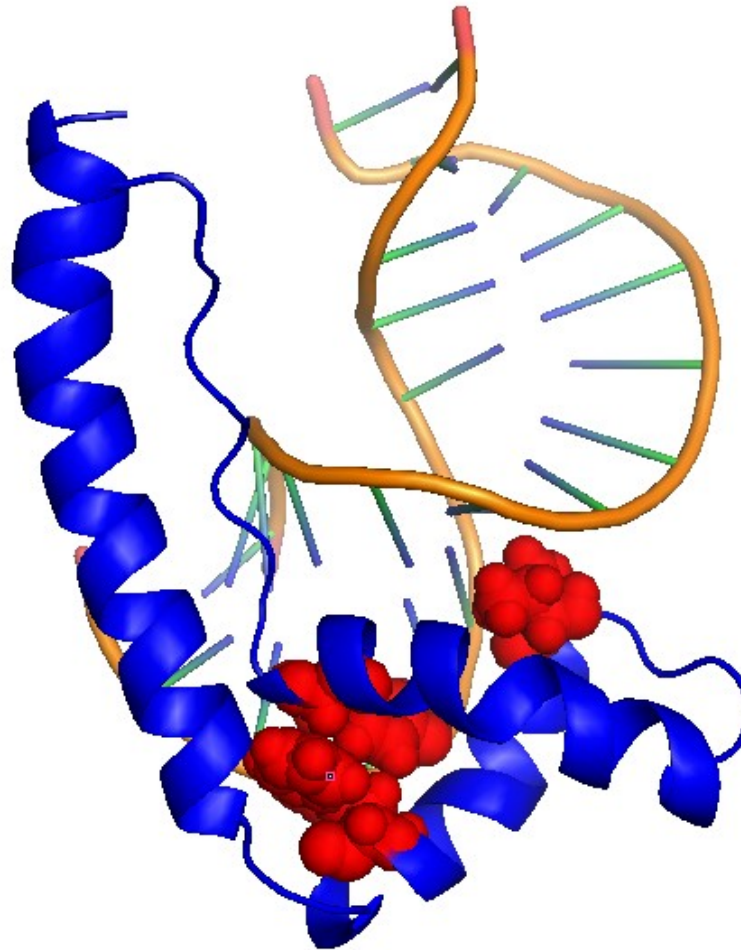


- ohyb a rozvolnění párování dsDNA může napomáhat procesům replikace, transkripce a rekombinace/opravy poškozené DNA
- ohyb napomáhá přiblížení vzdálených míst nebo zpřístupňuje DNA pro transkripční faktory



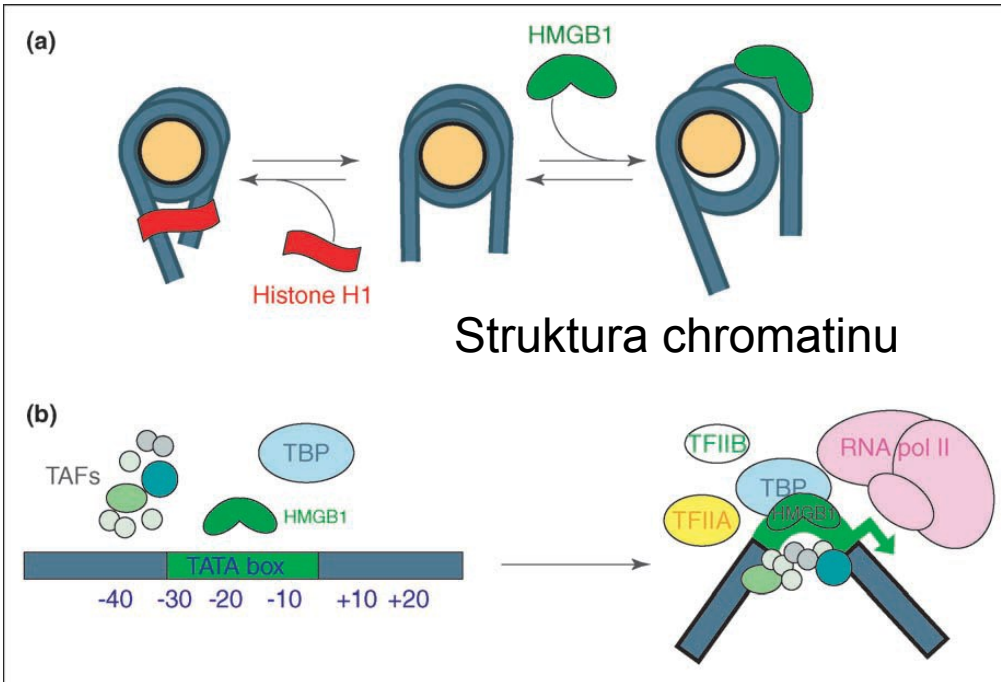
HMG-D (1E7J)

PYMOL

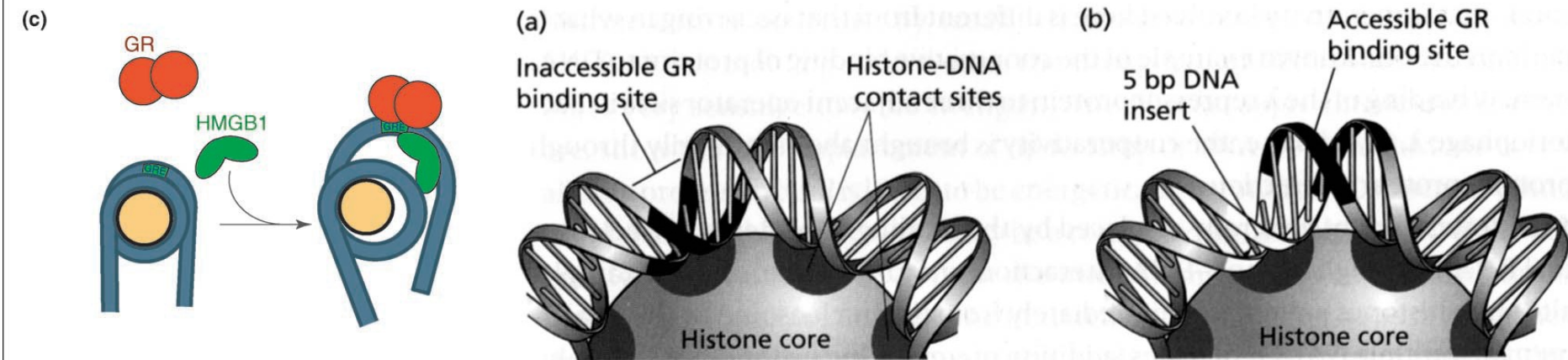


Aromatické aminokyseliny se interkalují do MŽ a vytváří kink

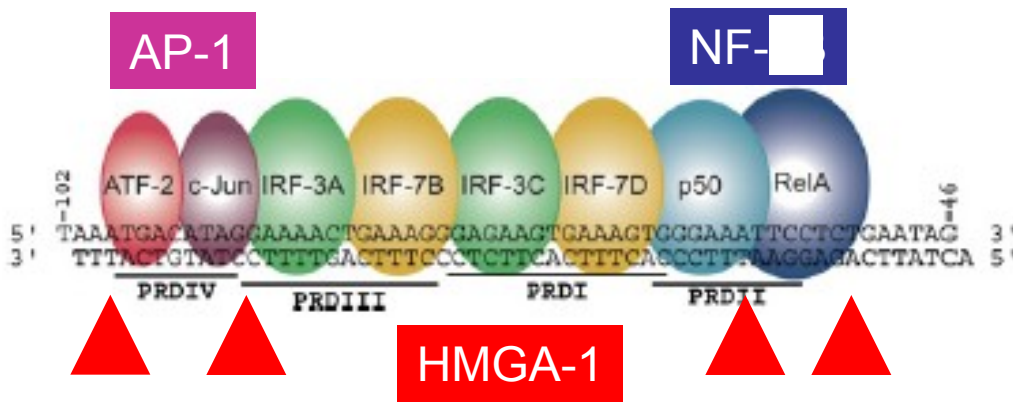
- HMGB (B-box) obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. šroubovice váže cukr-fosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace Phe (aromatický kruh) způsobuje ohnutí DNA



- ohyb napomáhá rozvolnění struktury chromatinu tj. moduluje pozici nukleosomů
- ohyb může pomáhat TBP a iniciaci transkripce
- pomáhá zpřístupnit DNA pro transkripční regulátory

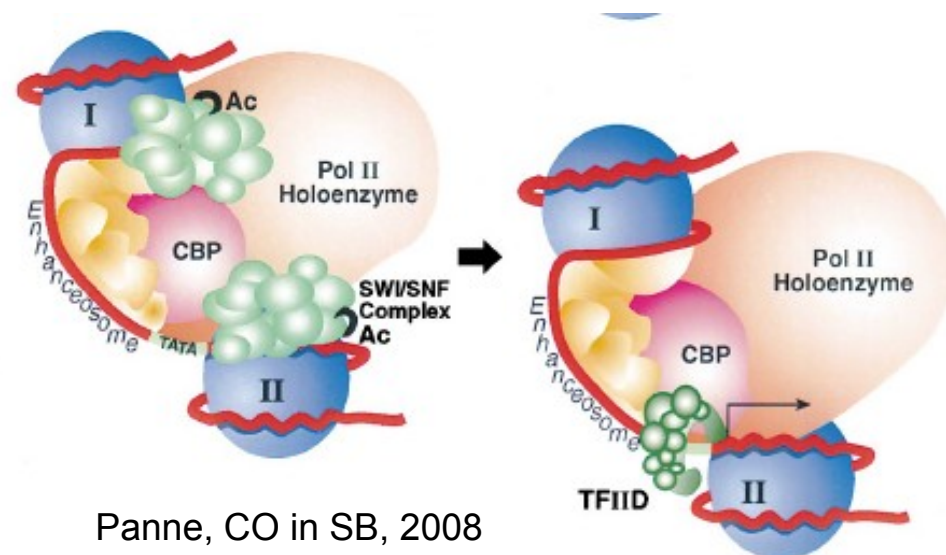
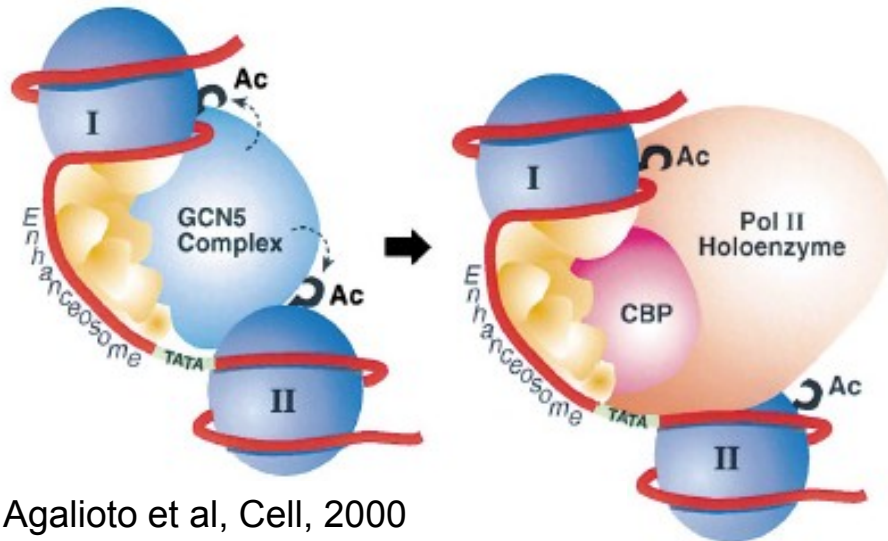


IFN- β enhanceosom



transkripce

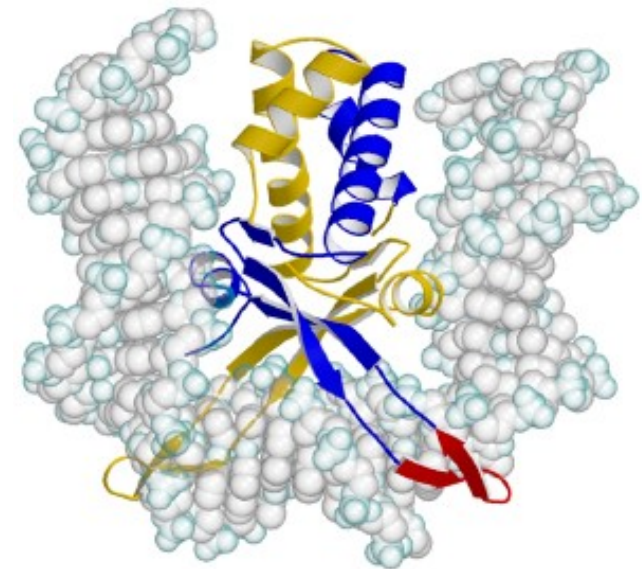
- HMGA1a se váže na 4 místa a (ohýbá DNA) napomáhá sestavení enhanceosomu
- není ale součástí finálního komplexu - AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- κ B
- nukleosom-free oblast (nukleosom downstream zakrývá TATA-box)
- všechny podjednotky (TA domény) enhanceosomu interagují s CBP/p300 acetylásou
- acetylace nukleosomu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



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**

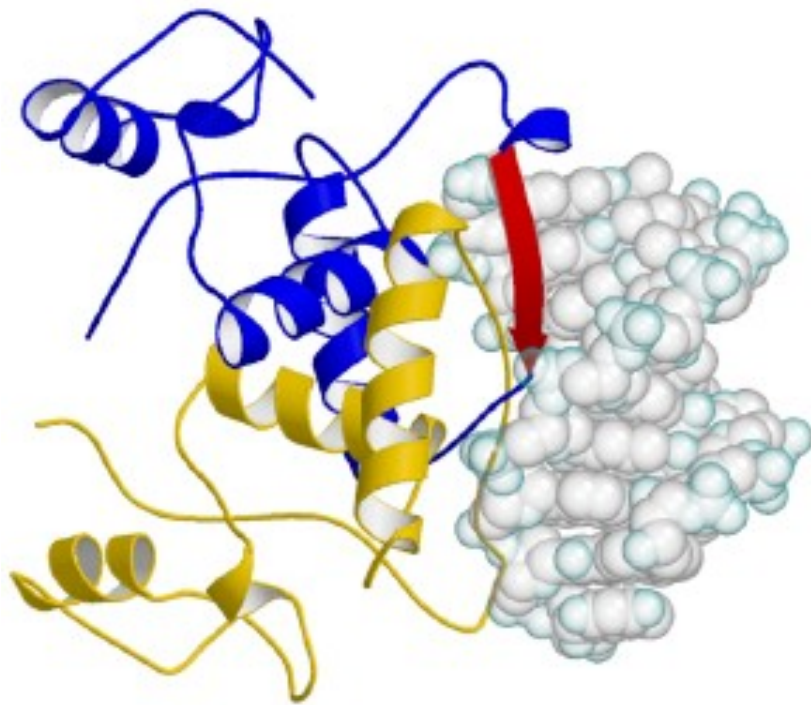
α -šroubovice



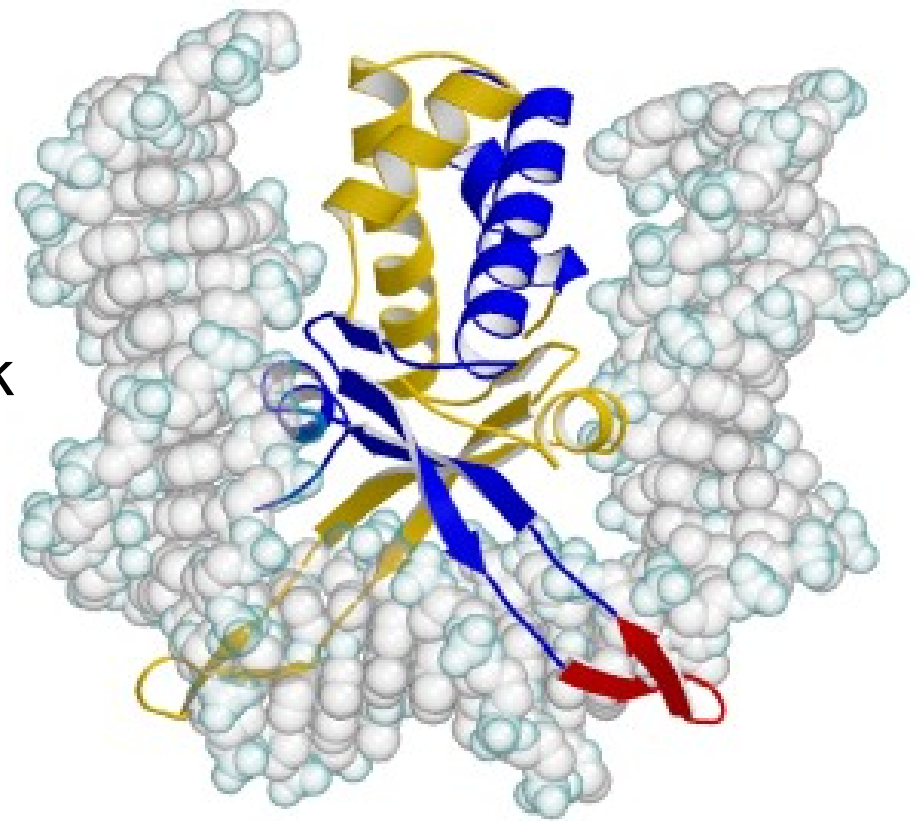
33. Integration host factor (1ihf)

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)

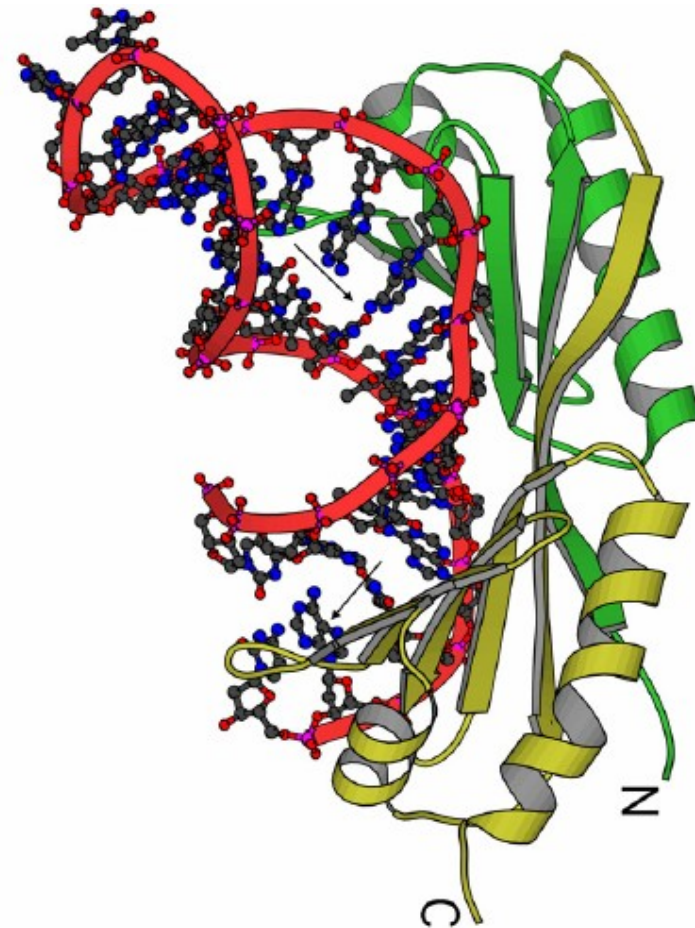
- β -hairpins lokalizovány podél malého žlábku
- Inzerce Pro mezi baze a ohyb DNA

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

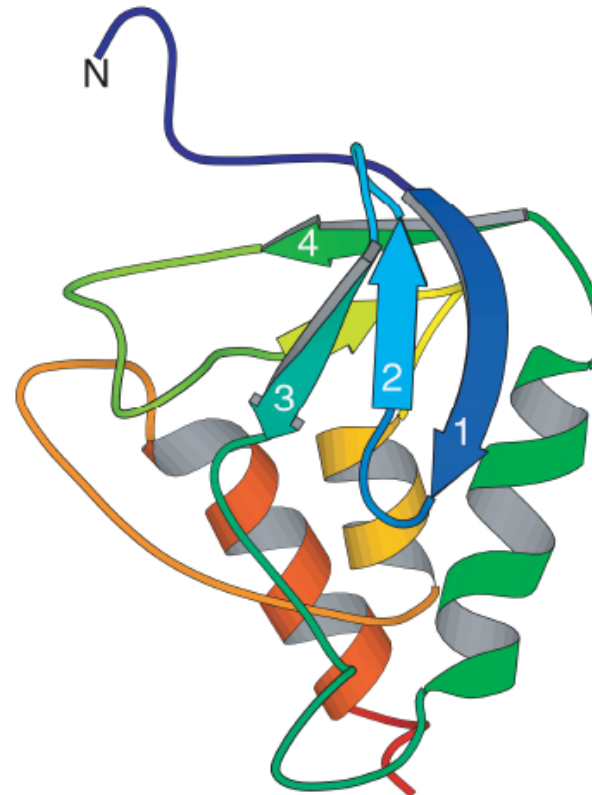
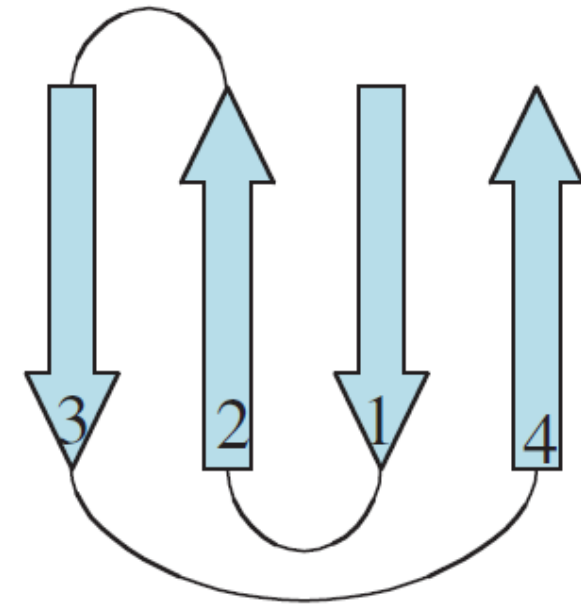
β -listy



OB-fold

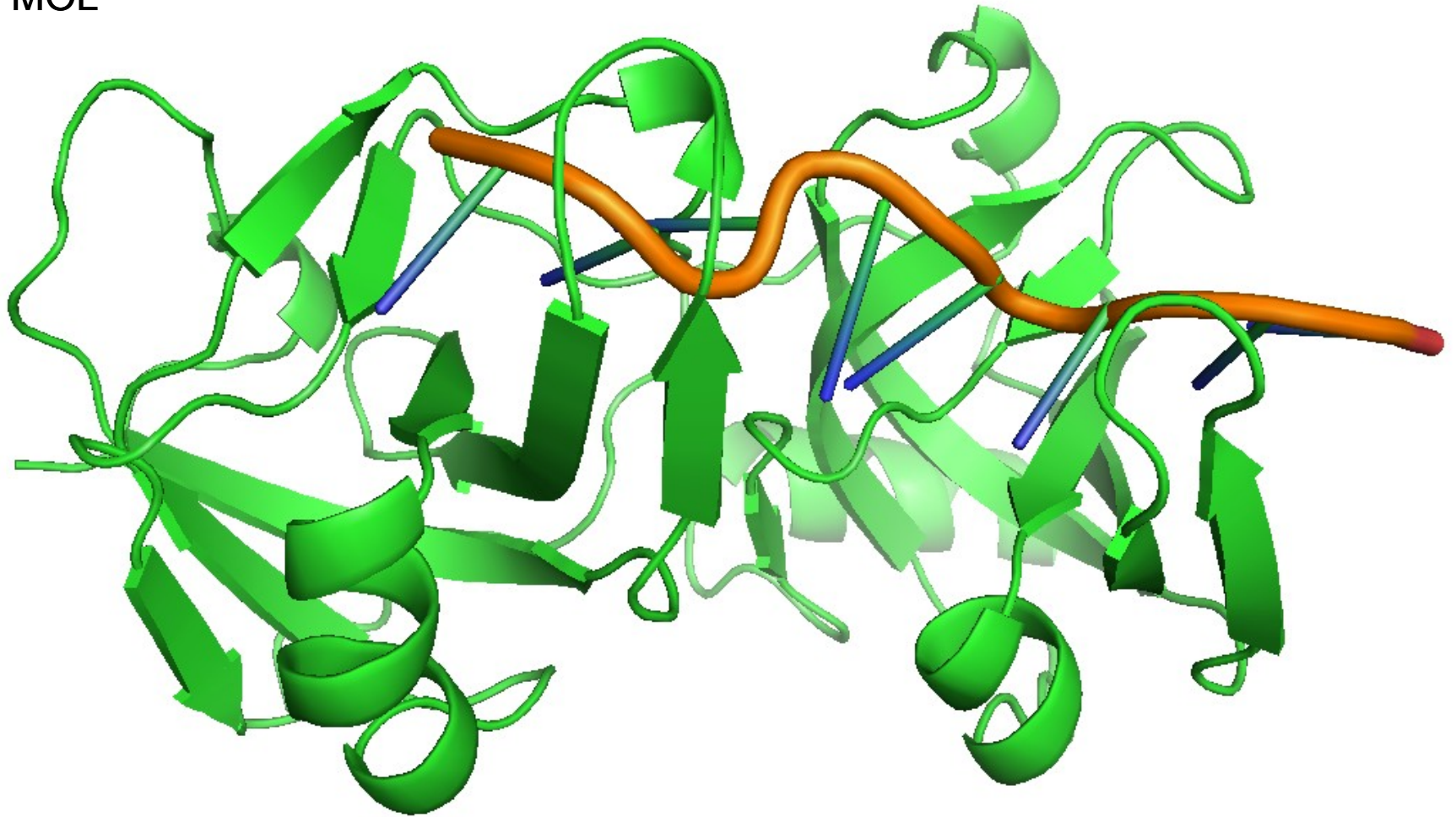
(oligonucleotide/oligosaccharide binding)

- 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 ... (Dr. Kolesár)

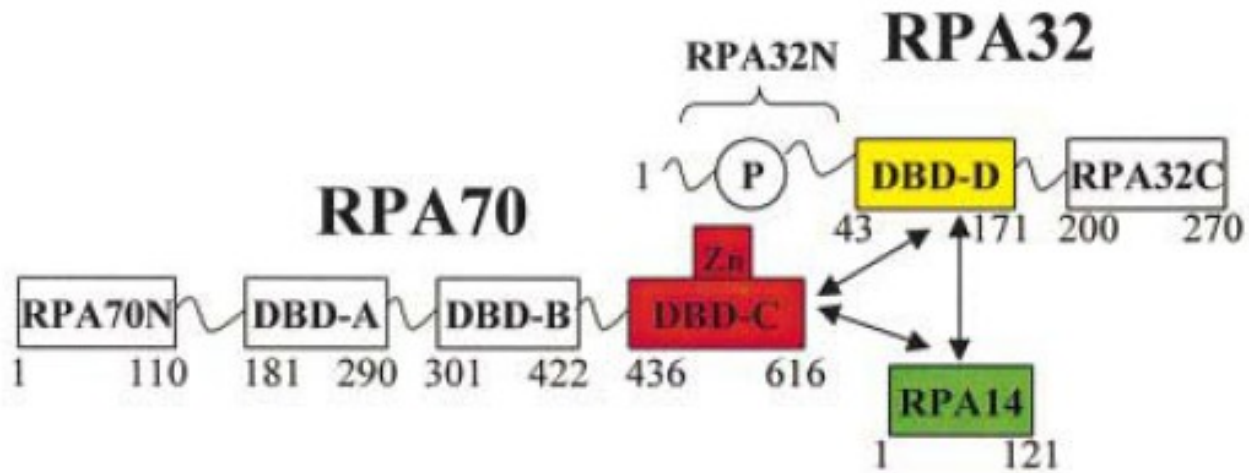


OB-fold (oligonucleotide/oligosachcaride binding, 1JMC)

PYMOL

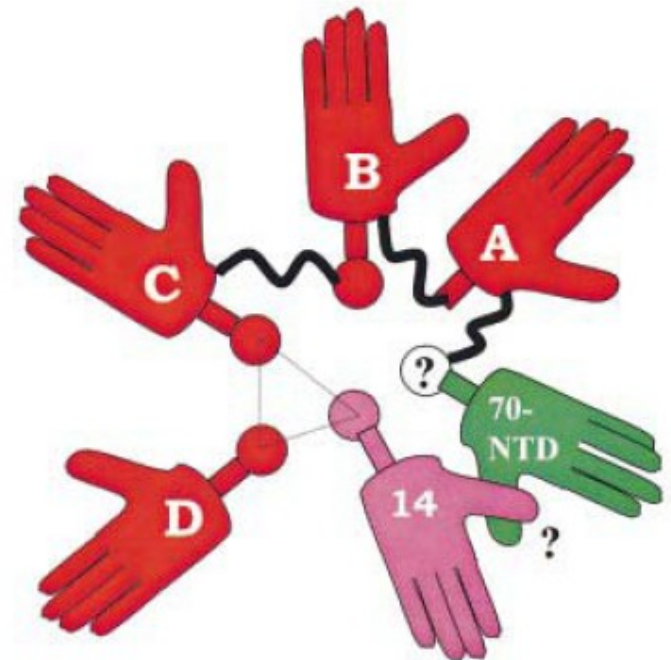
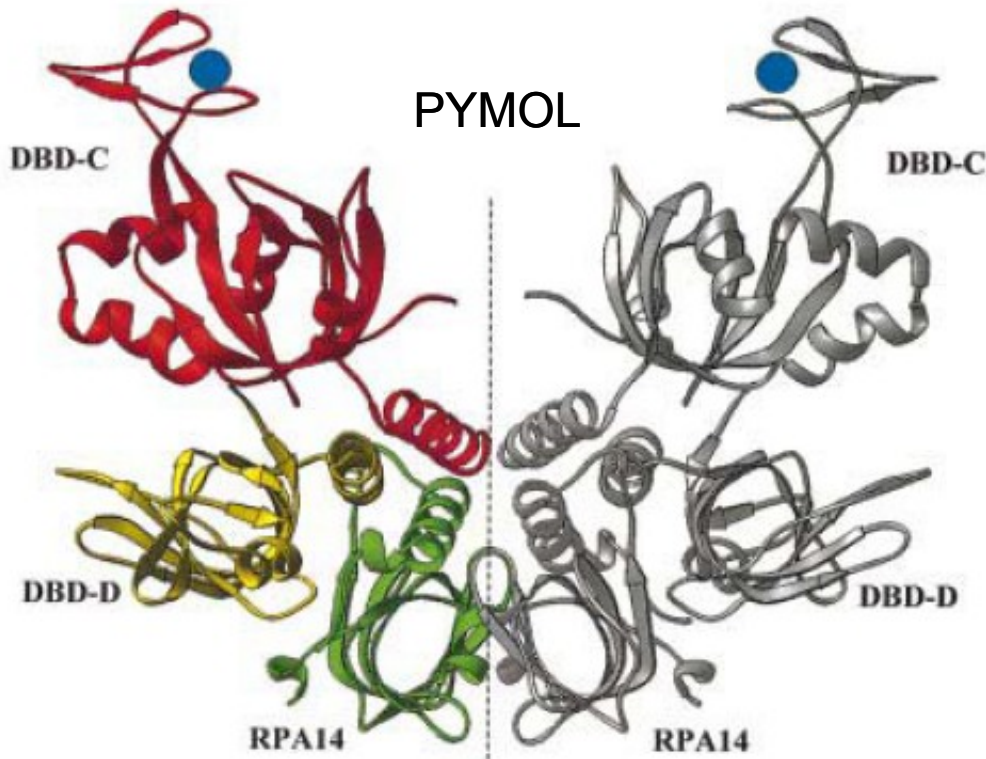


Více OB – RPA70 (A+B) vytváří prodlouženou lineární kapsu

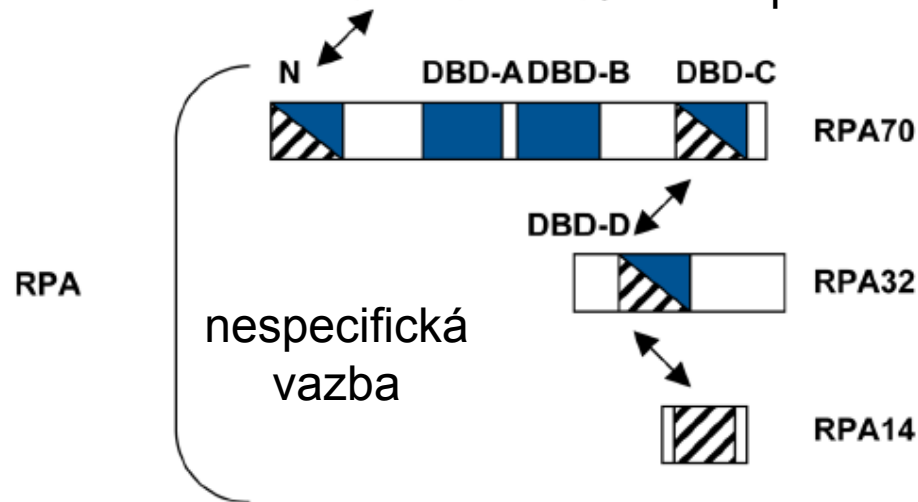


- protein-proteinové interakce (integrita komplexu)
- celý komplex ~30nt

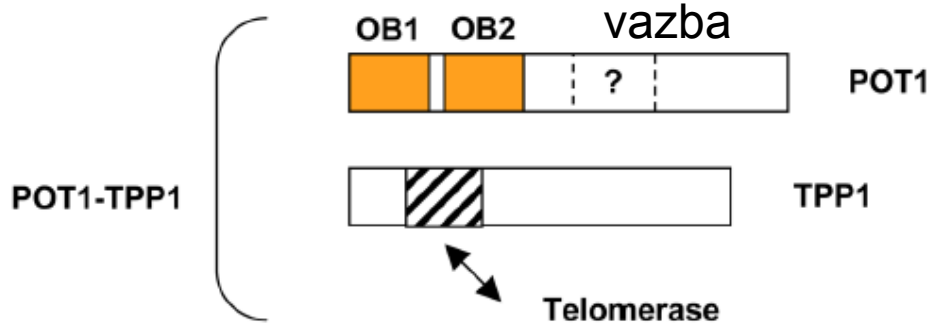
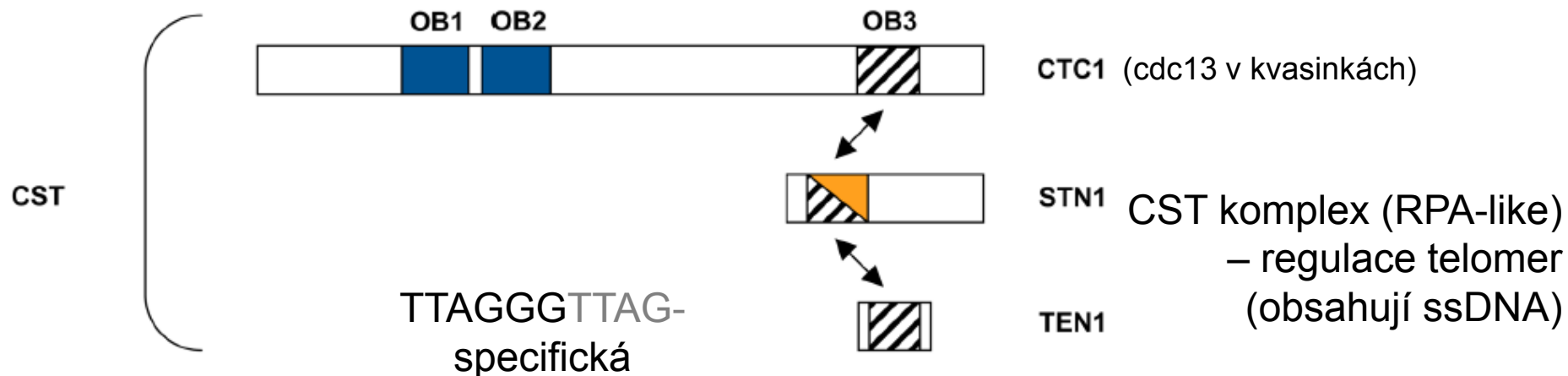
Centrální část RPA komplexu (1L10) a model celého komplexu



ATRIP, RAD9, MRE11, p53 - oprava DNA



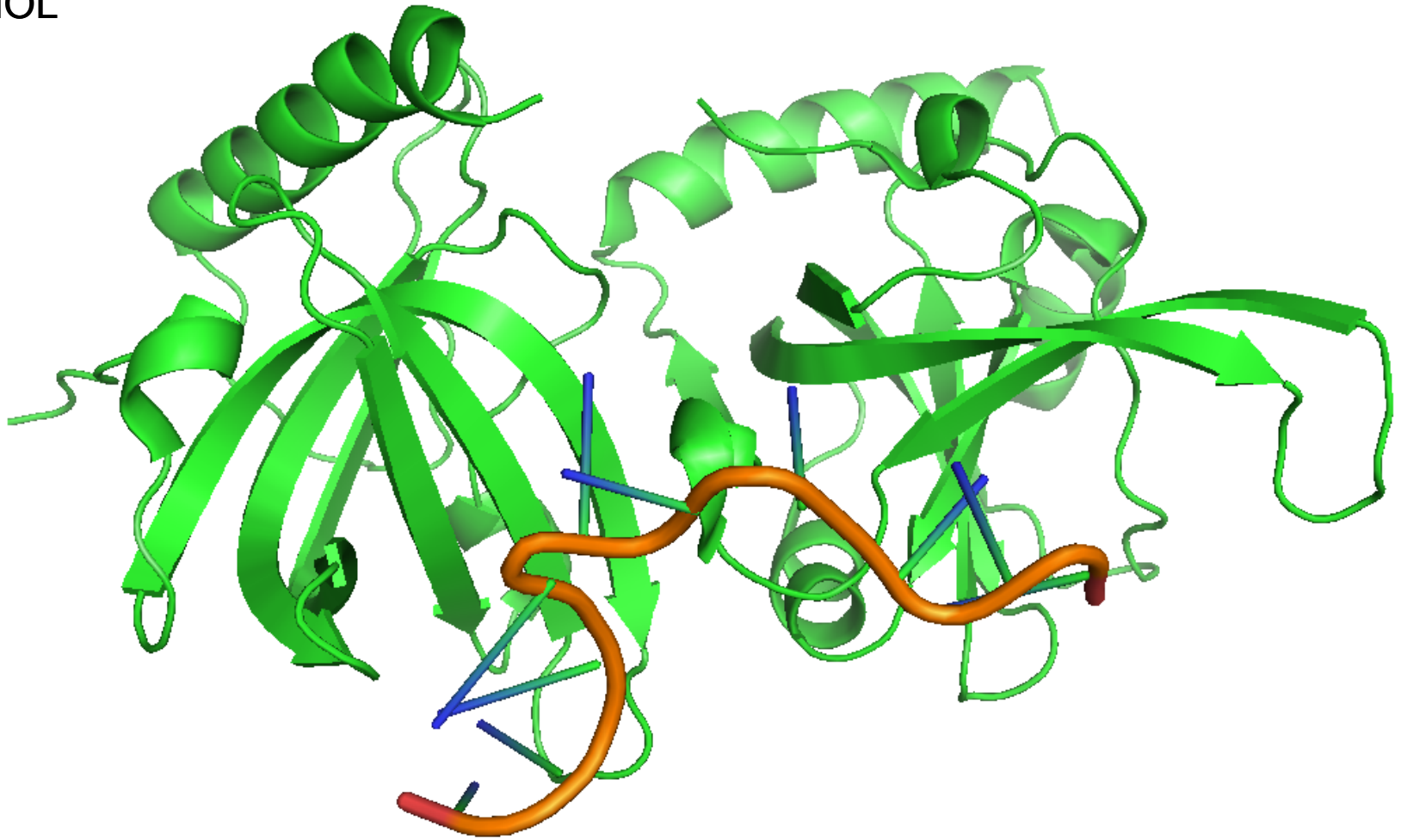
- protein-proteinové interakce (integrita komplexu + interakce s dalšími proteiny/komplexy)
- Dr. Kolesár



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

OB-fold (POT1)

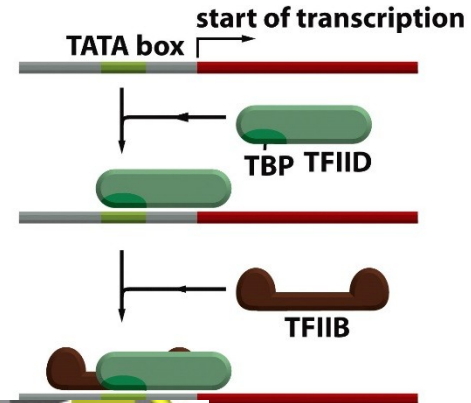
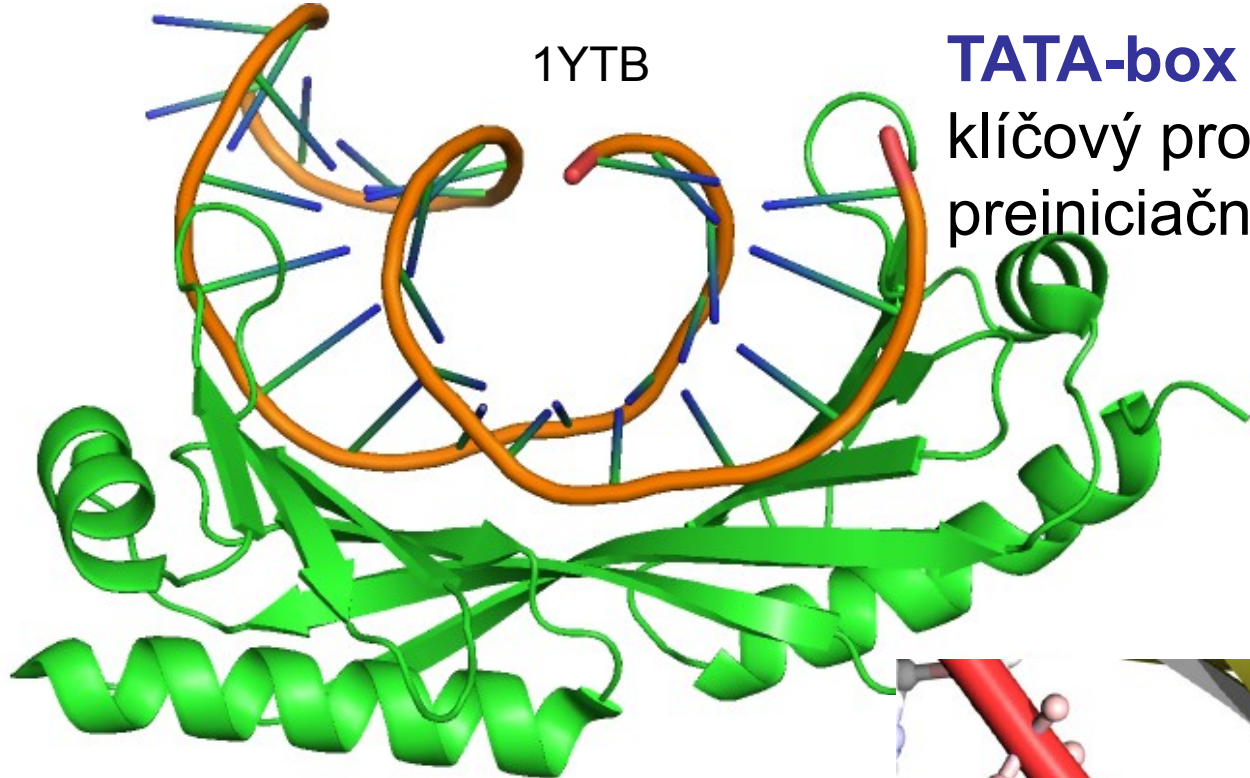
PYMOL



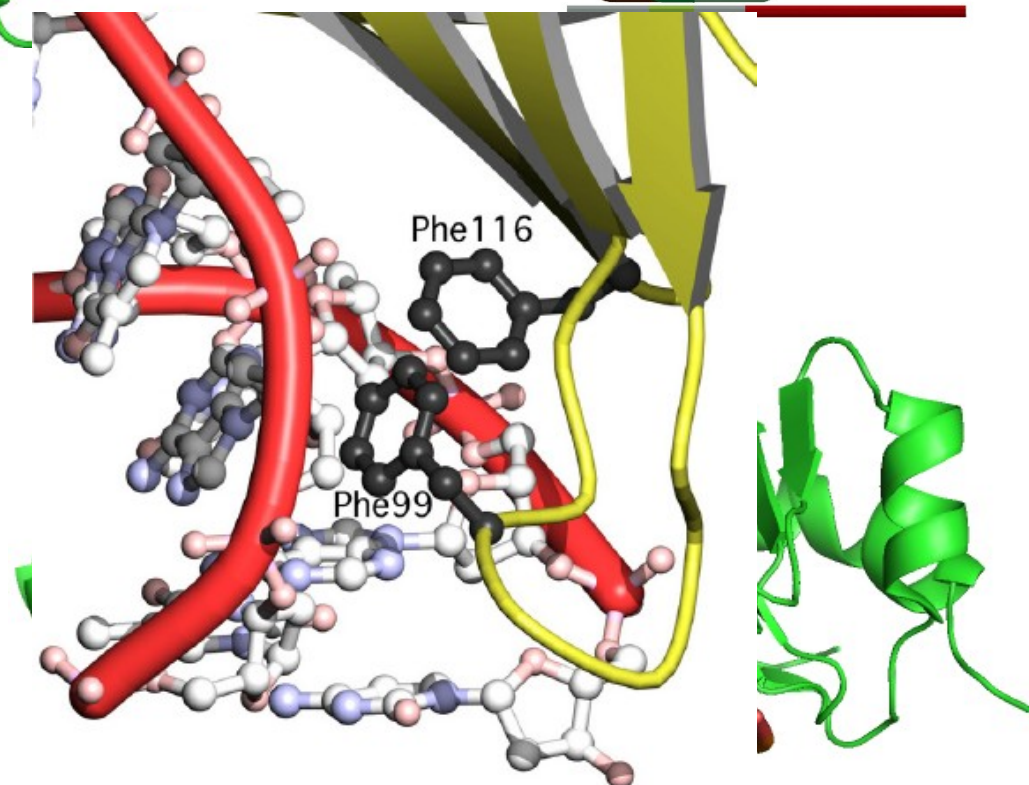
domény jsou vůči sobě pootočený – ohyb/kink na ssDNA (1XJB)

1YTB

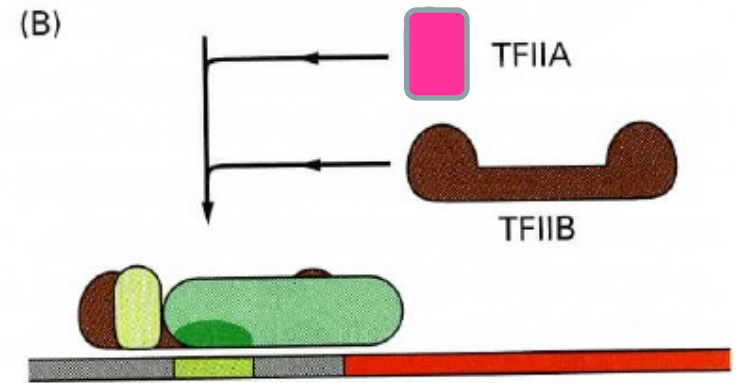
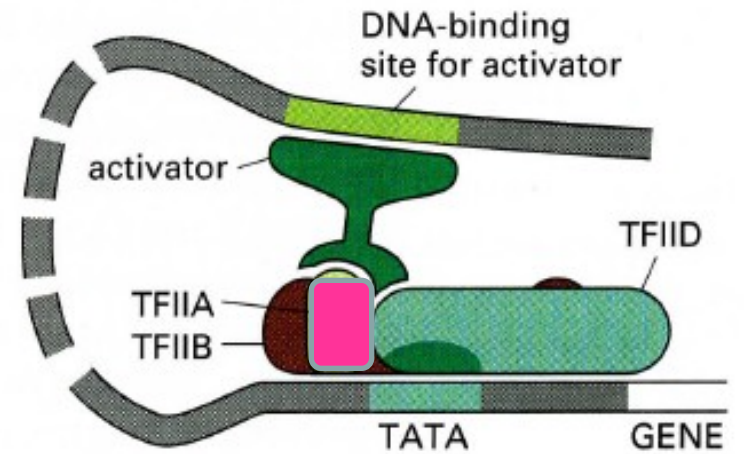
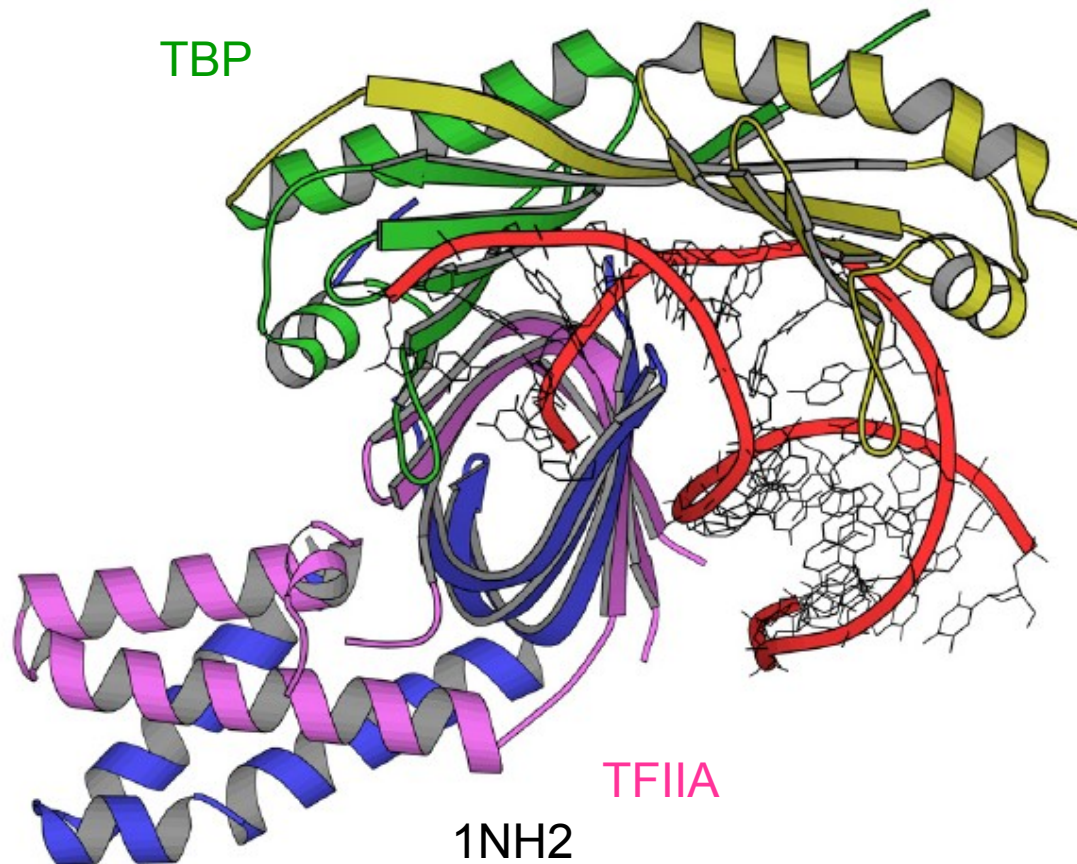
TATA-box vážící protein (TBP) – klíčový pro sestavení preiniciačního komplexu (PIC)



- 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)

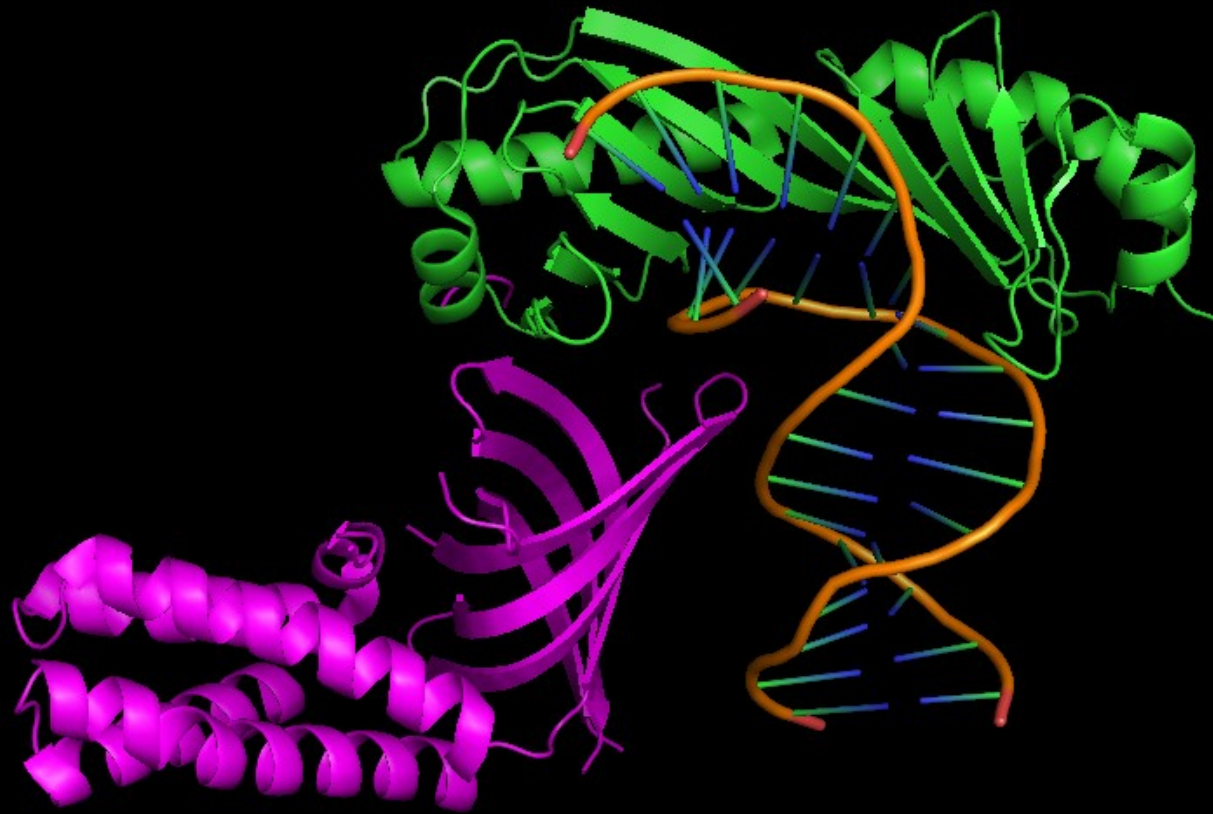


- TFIIA (2 podjednotky) komplex interaguje s TBP a DNA
- brání represorům v inhibici vazby TBP na TATA-box (koaktivátor některých sekvenčně specifických trans. faktorů) – není esenciální
- β -barrel váže DNA (neovlivňuje strukturu)

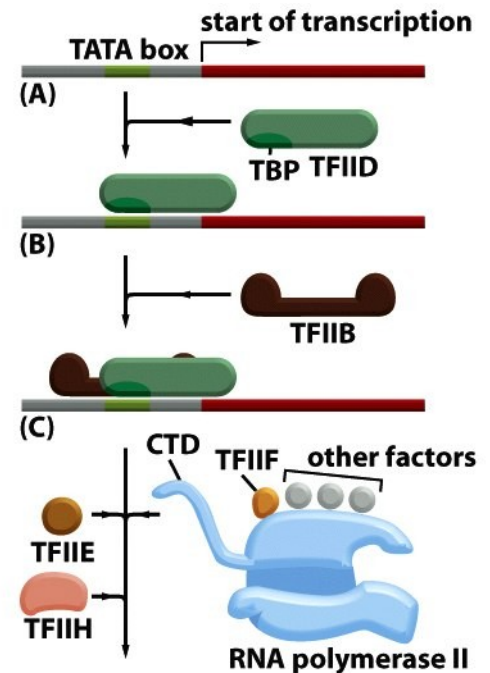
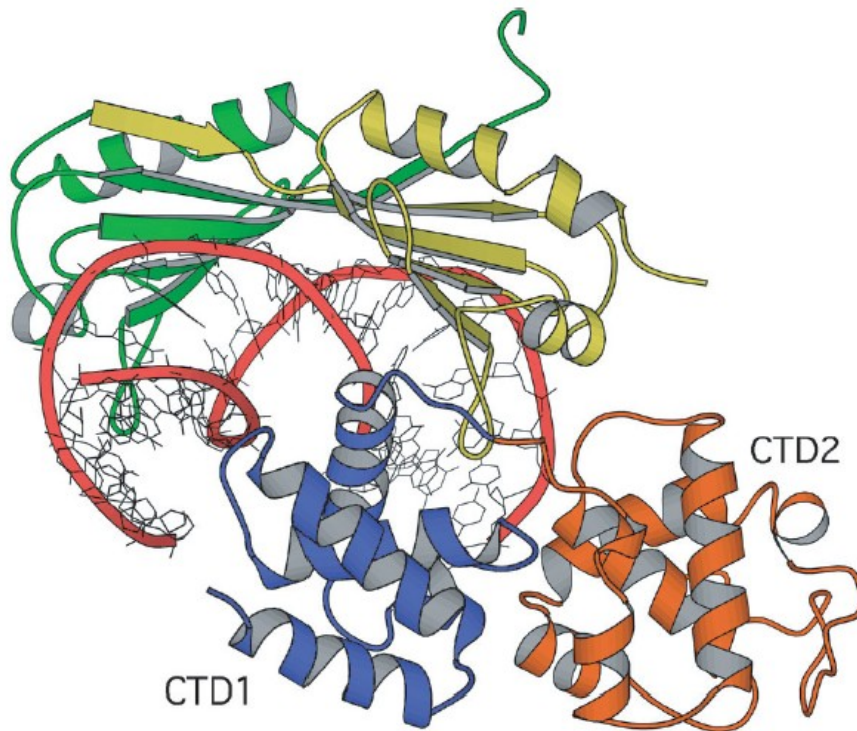


PYMOL

TBP ohýbá a rozplétá dsDNA



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



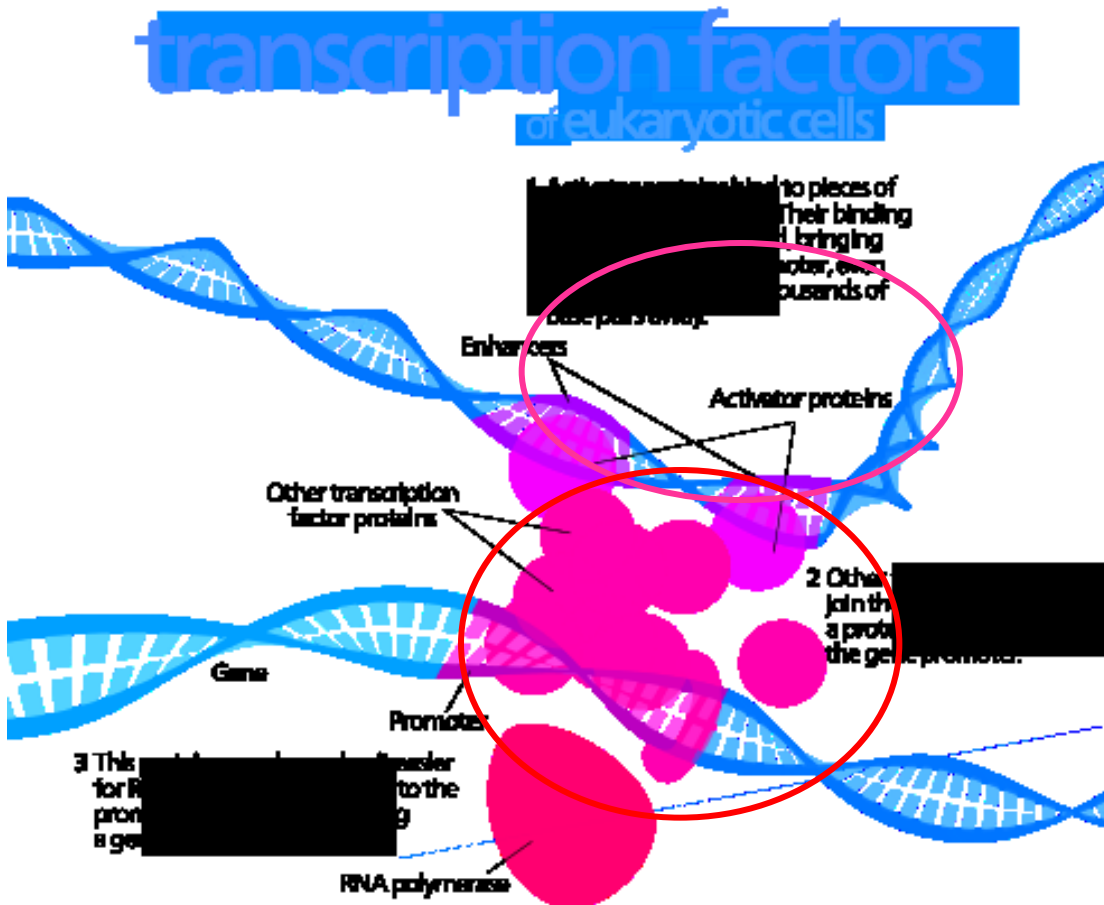
1VOL

Nikolov et al, Nature, 1995

TFIIB stéricky nevadí TFIIA
Sestavuje se postupně PIC

DNA vazebné motivy spojené s transkripcí

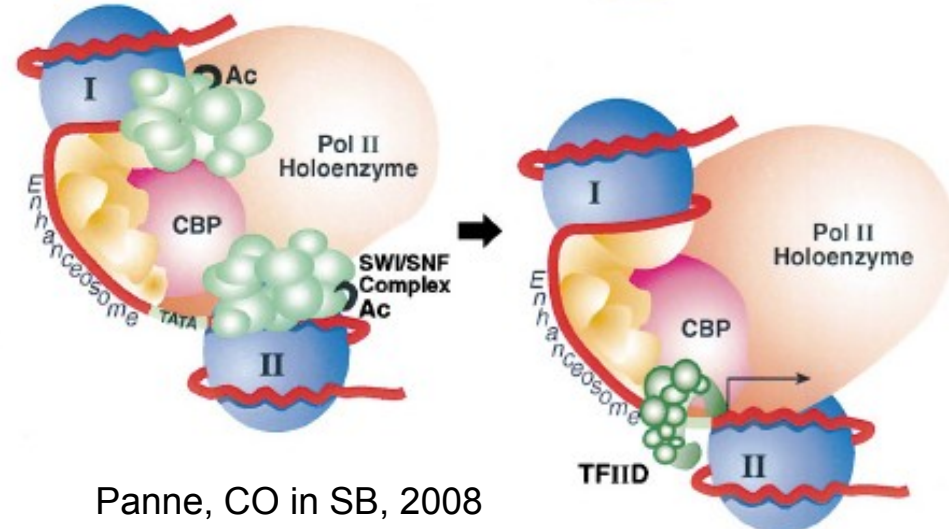
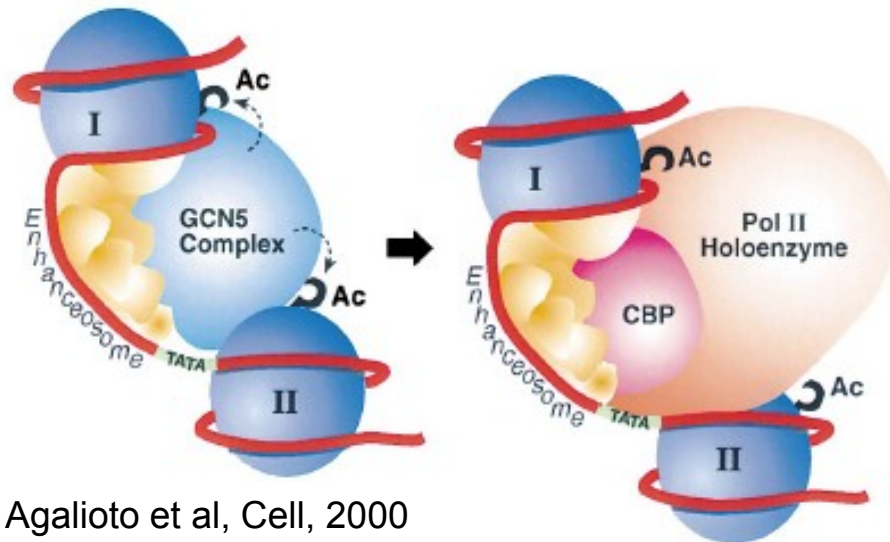
- DNA-vazebné motivy specifických transkripčních faktorů (enhanceosom)
- sekvenčně specifické – α -šroubovice ve VŽ
- obecné TFIID komplexy a proces transkripce



- **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, TAFy v TFIID, HMG**)
- **β -sheet** (**TBP, TFIIA, TFIIB**)
- **β -hairpin/ribbon**
- **Enzymy** (XPB helikása)

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 remodelaci/přemístění
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP a TFIID



Agalioto et al, Cell, 2000

Panne, CO in SB, 2008

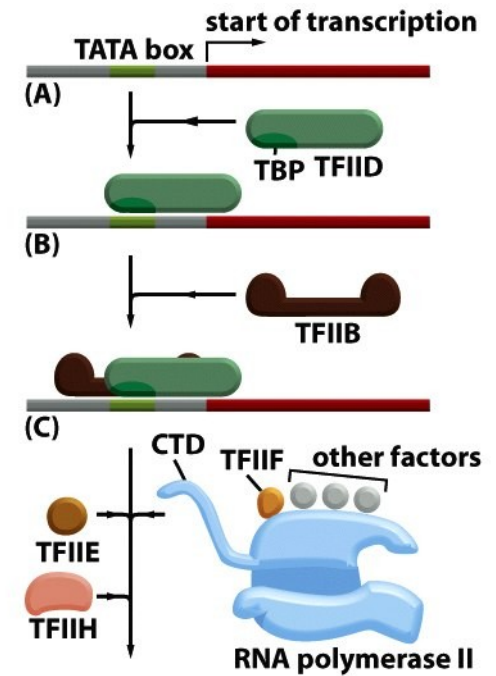
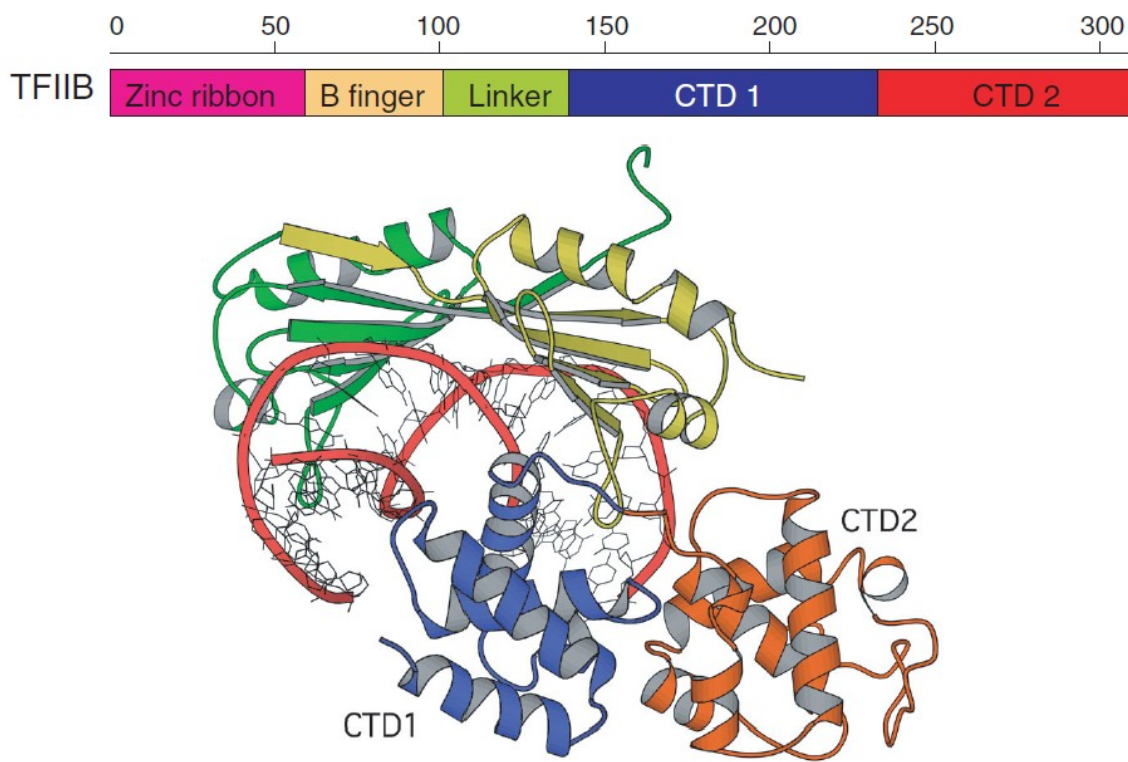


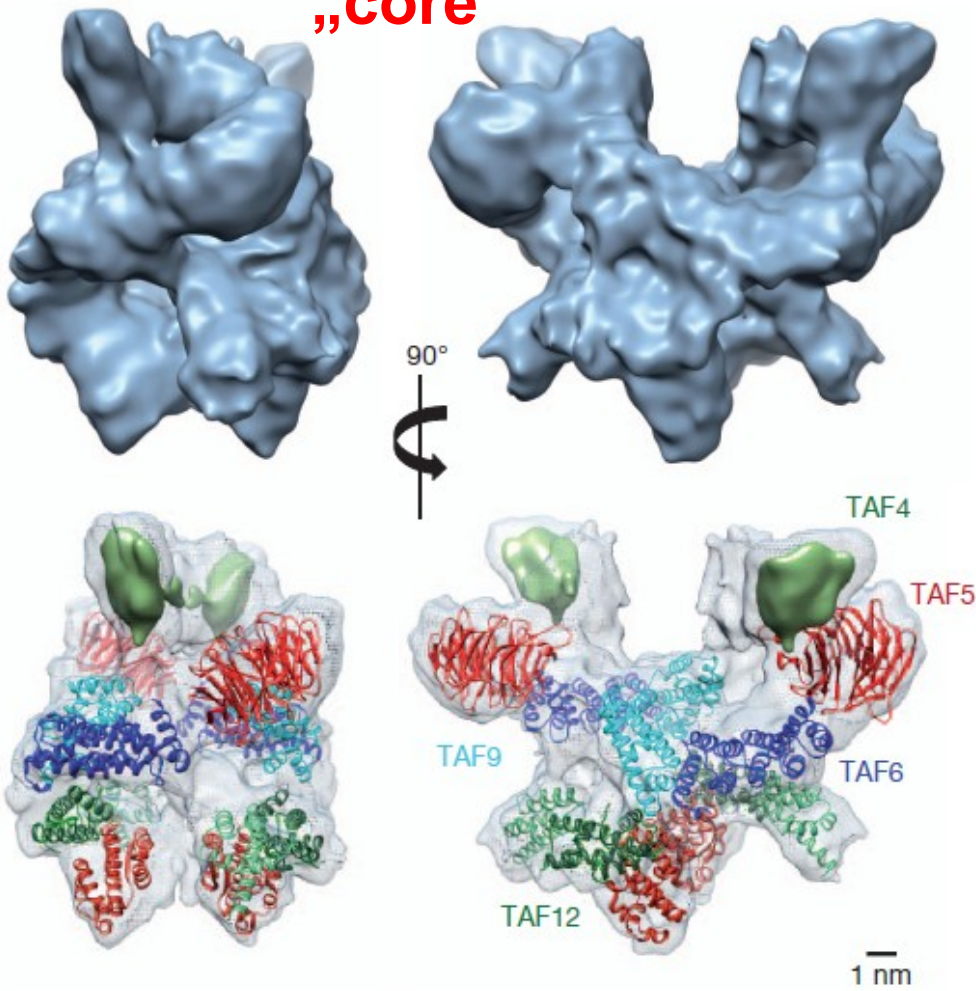
Table 6-3 The General Transcription Factors Needed for Transcription Initiation by Eucaryotic RNA Polymerase II

NAME	NUMBER OF SUBUNITS	ROLES IN TRANSITION INITIATION
TFIID		
TBP subunit	1	recognizes TATA box
TAF subunits	~11	recognizes other DNA sequences near the transcription start point; regulates DNA-binding by TBP
TFIIB	1	recognizes BRE element in promoters; accurately positions RNA polymerase at the start site of transcription
TFIIF	3	stabilizes RNA polymerase interaction with TBP and TFIIB; helps attract TFIIIE and TFIIH
TFIIIE	2	attracts and regulates TFIIH
TFIIH	9	unwinds DNA at the transcription start point, phosphorylates Ser5 of the RNA polymerase CTD; releases RNA polymerase from the promoter

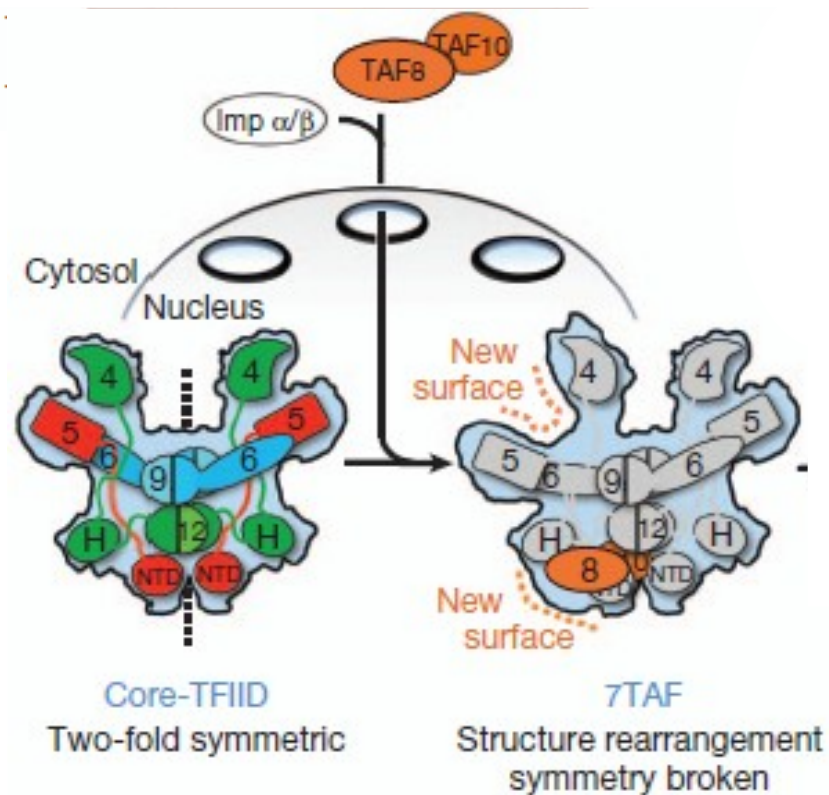
TFIID is composed of TBP and ~11 additional subunits called TAFs (TBP-associated factors); CTD, C-terminal domain.

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

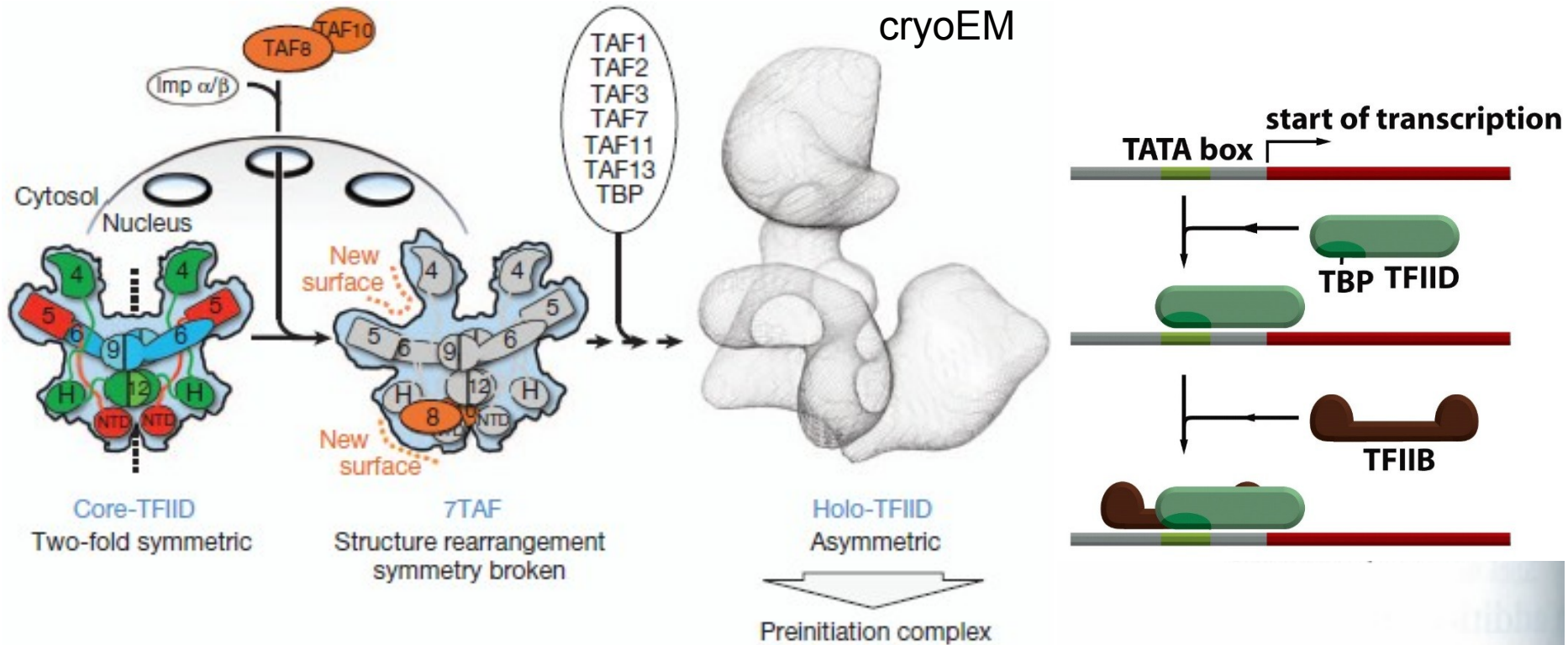
„core“



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

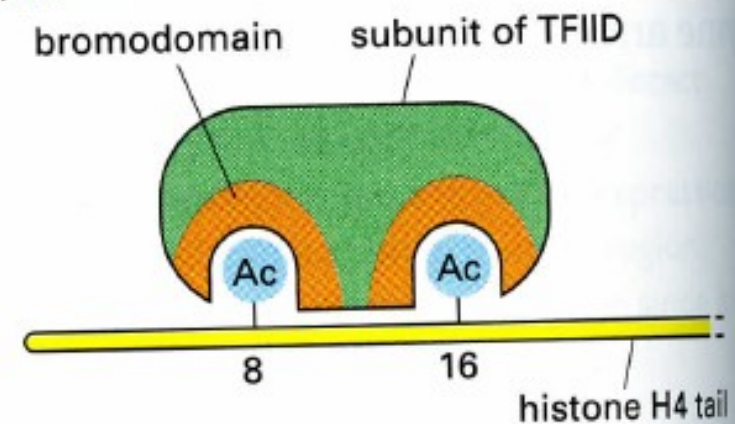


- TFIID komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému

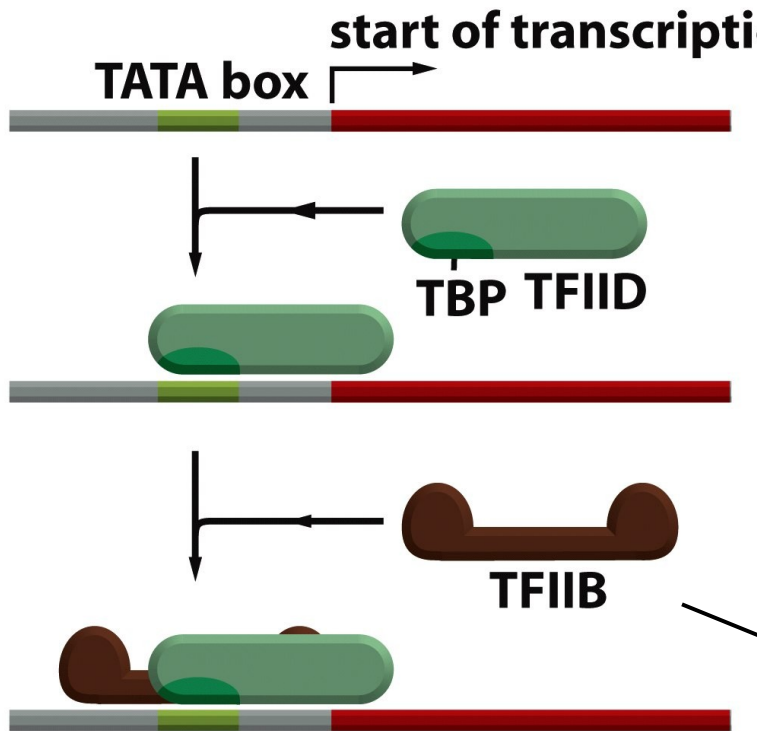


- Po připojení zbývajících podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční holokomplex – TBP se váže na TATA-box ... TAF1 se váže na Ac-H4

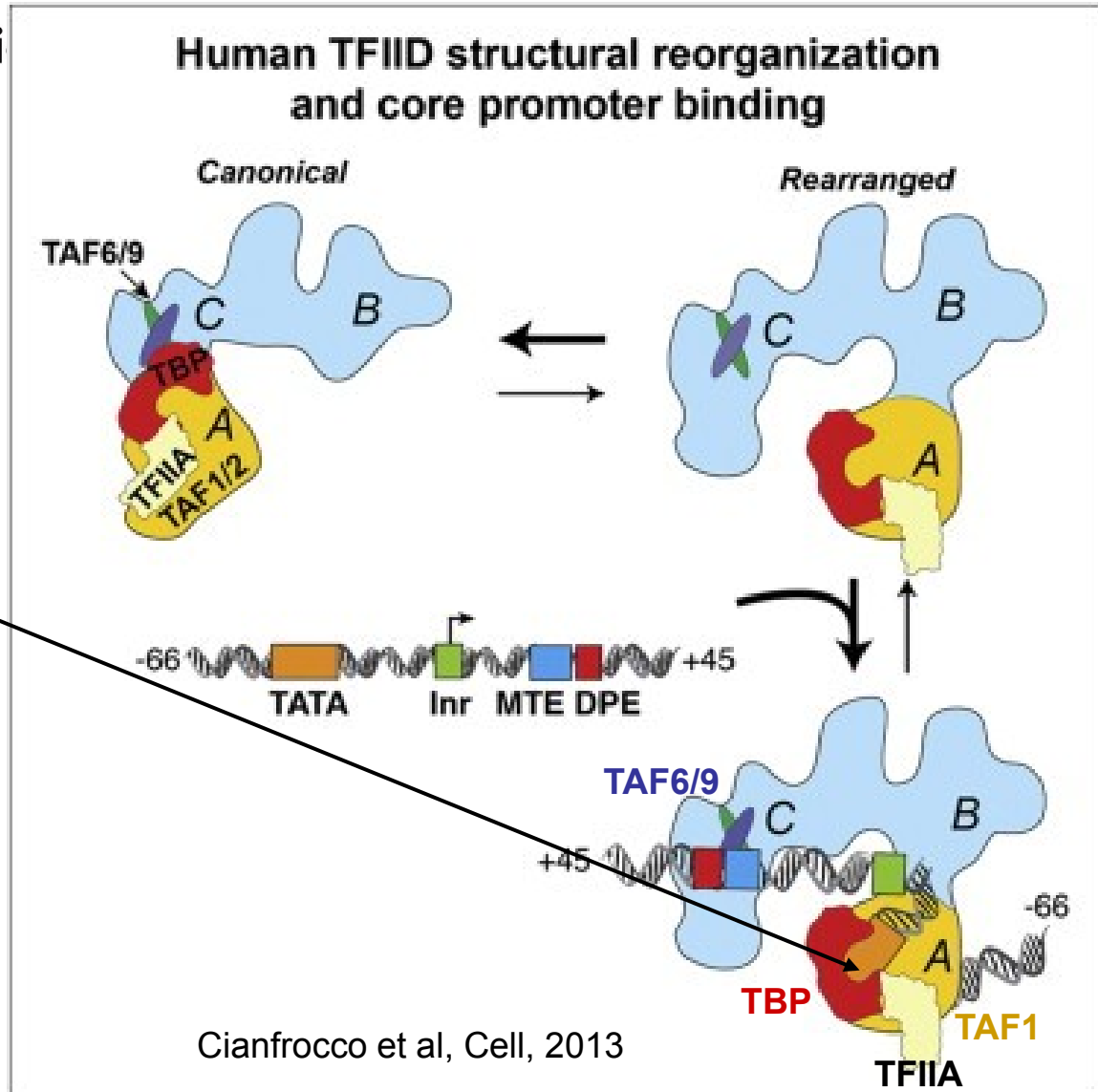
Bieniossek et al., Nature, 2013



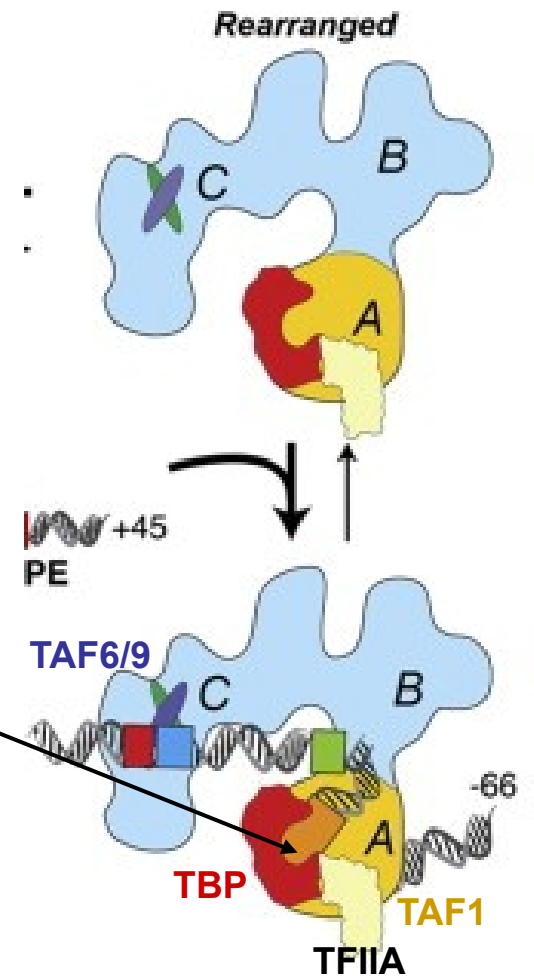
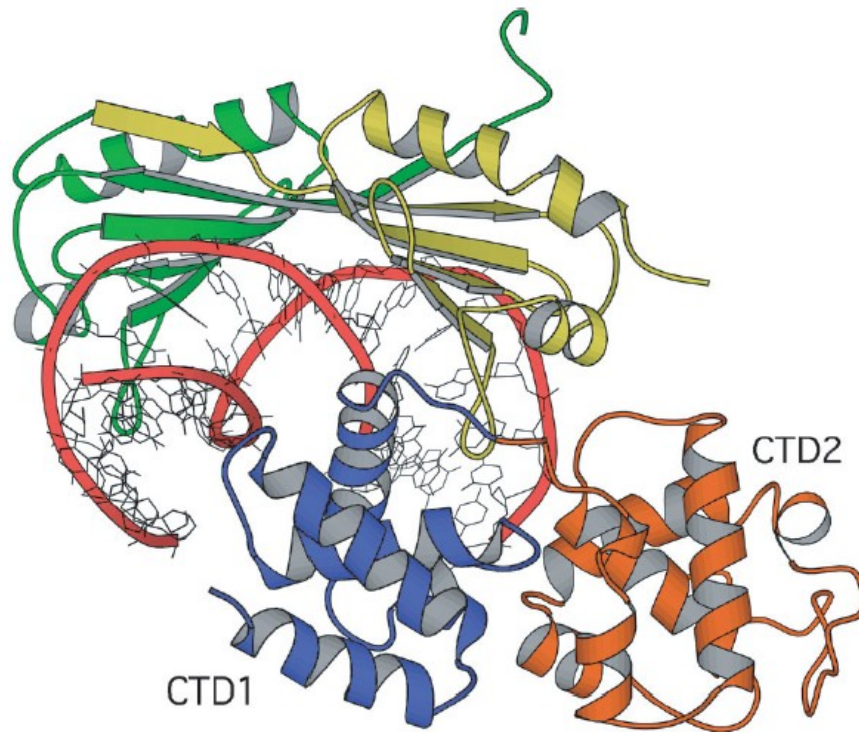
- Footprint anlyza – ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)
- cryoEM ukázaly, že dochází k reorganizaci TFIID



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



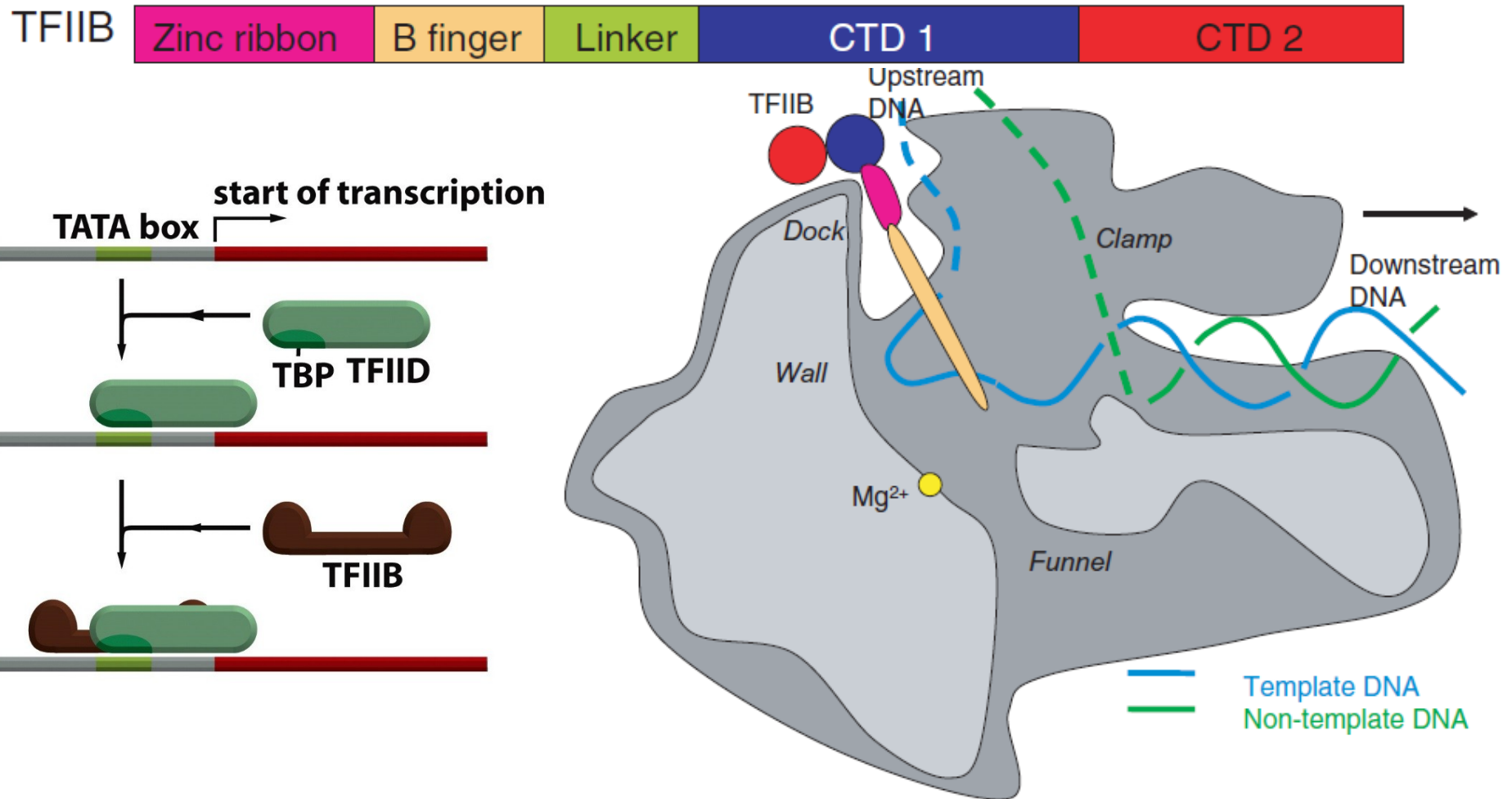
- TFIIB (C-konec) váže TBP a 6-7bp up- a downstream od ohybu DNA přes cukrfosfátovou kostru (blízko TATA boxu)



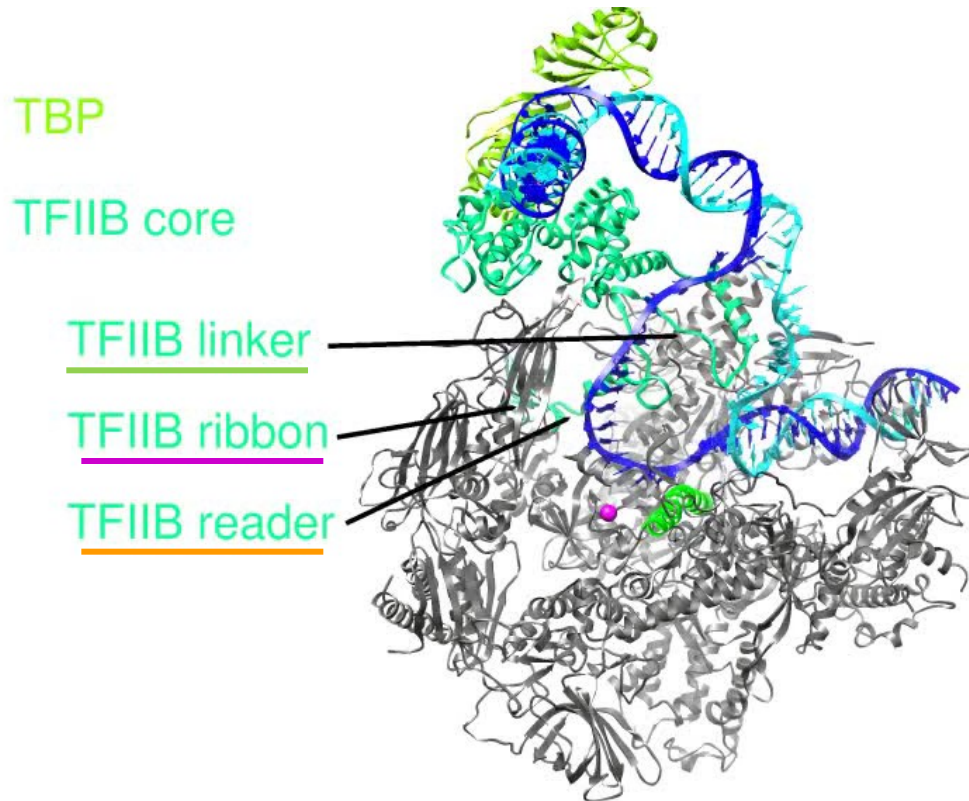
1VOL

Nikolov et al, Nature, 1995

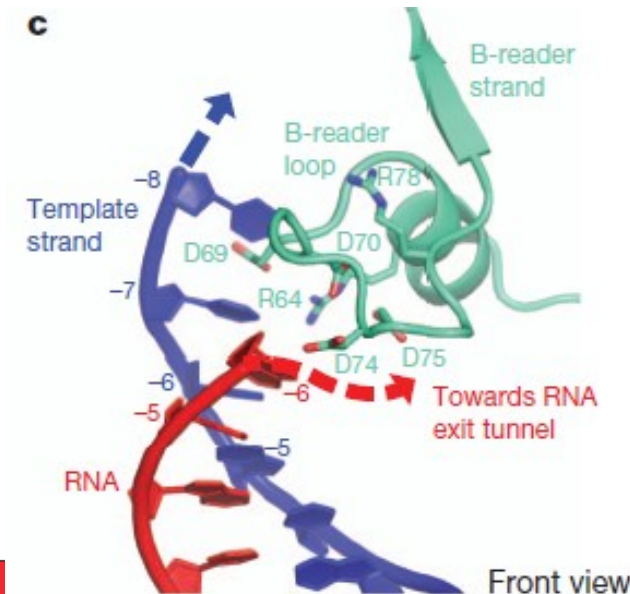
- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje TFIID-TFIIA-DNA komplex na pol II (do jeho aktivního centra/cleft)
- Zn-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp



- 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...)

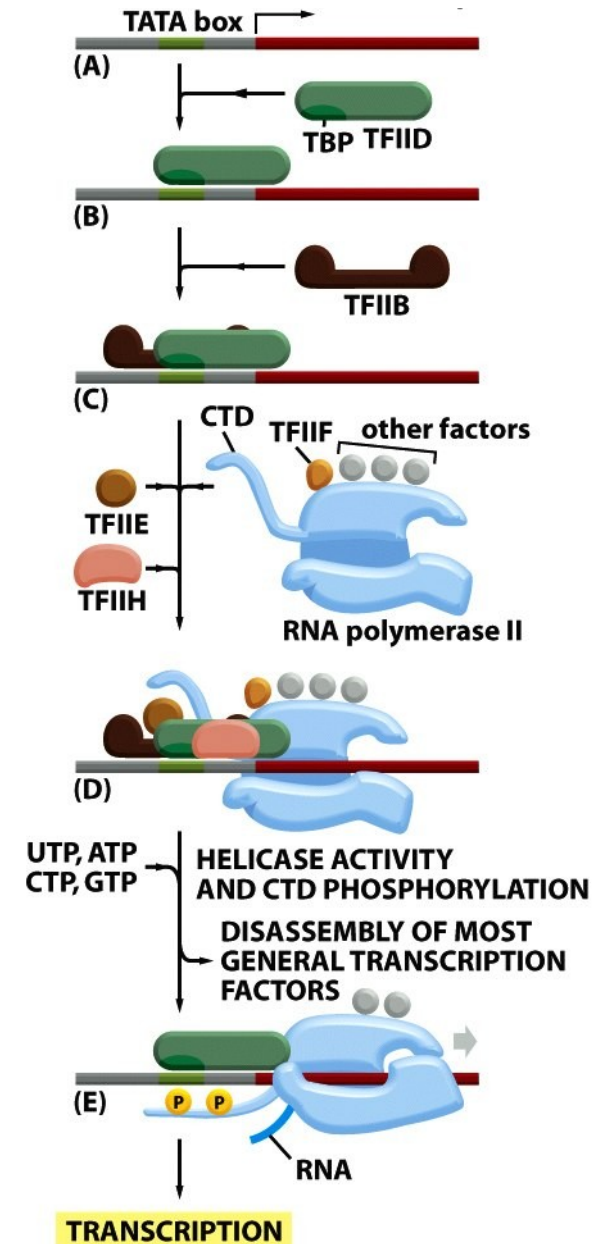
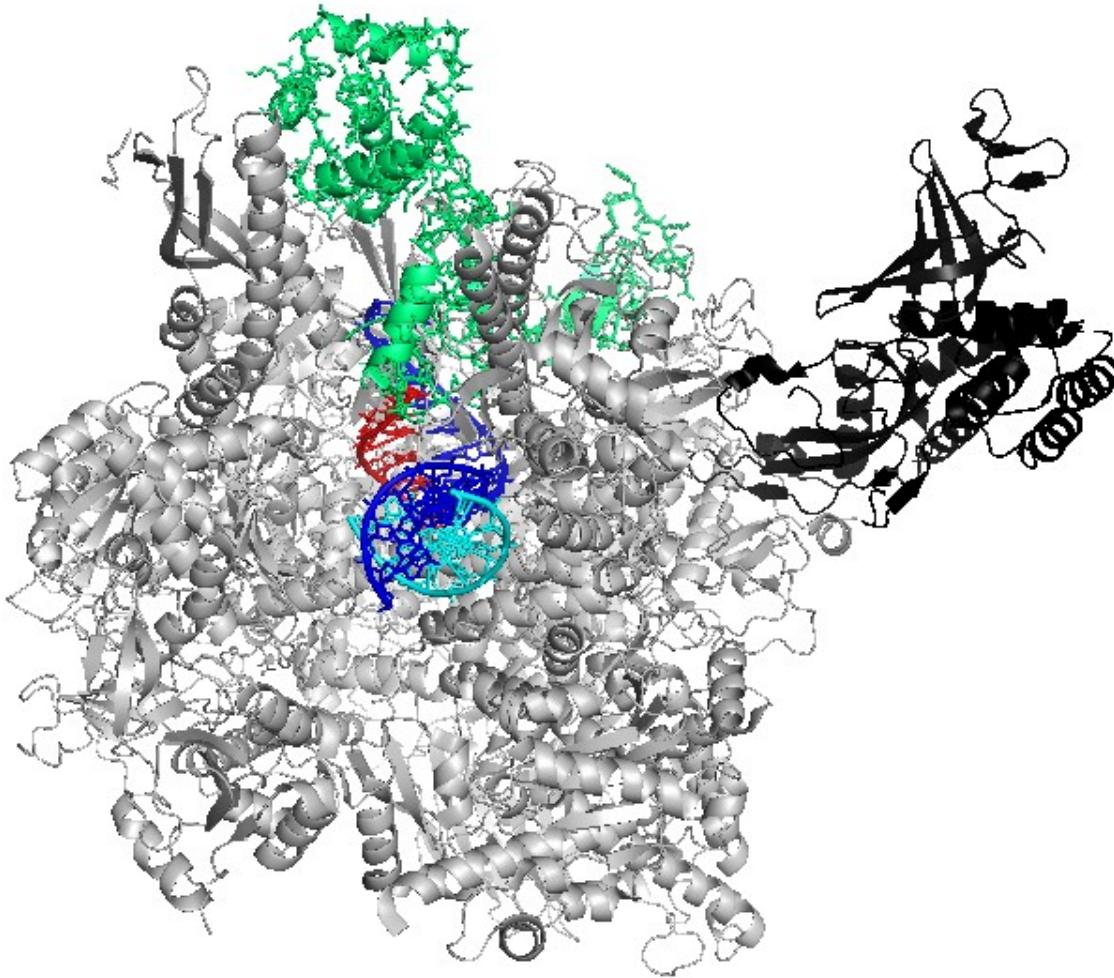


Video
ukázka RNA polymerázy



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

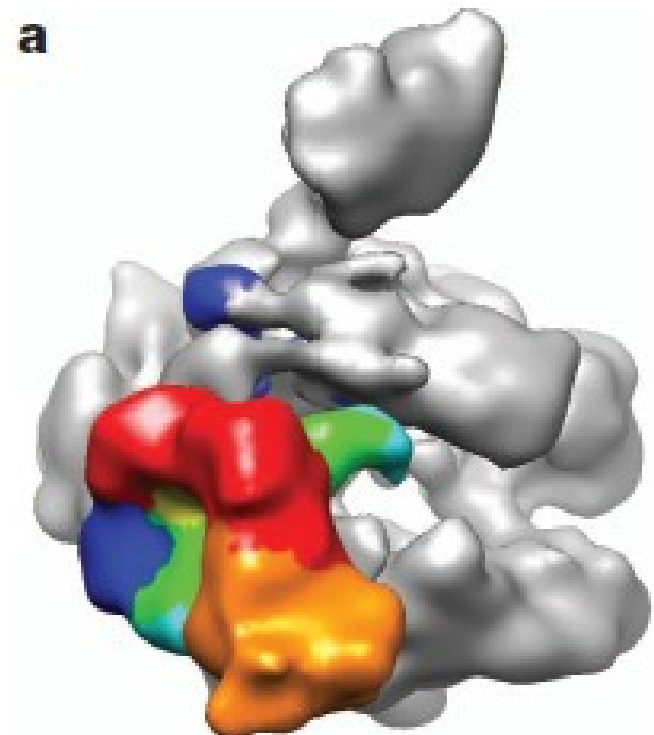
4BBS, Sainsbury et al, Nature, 2013



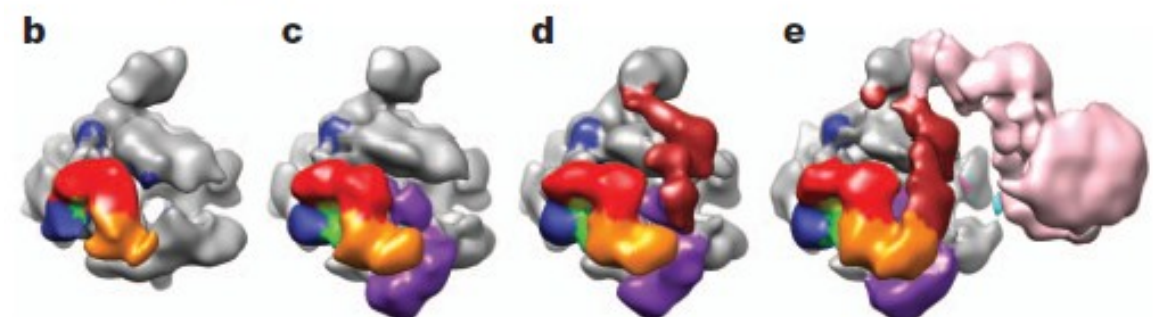
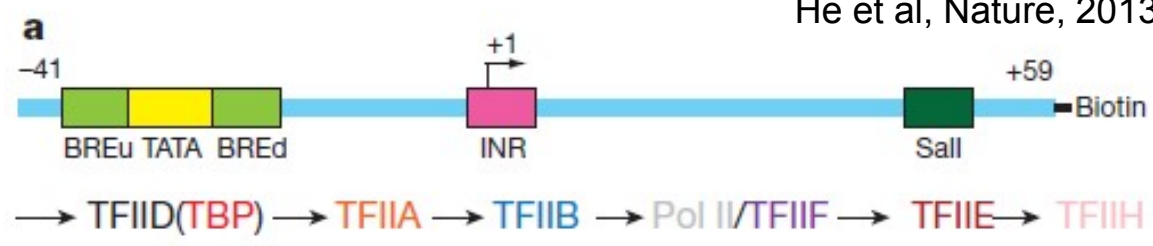
... než RNA polymeráza začne musí se sestavit celý PIC...

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

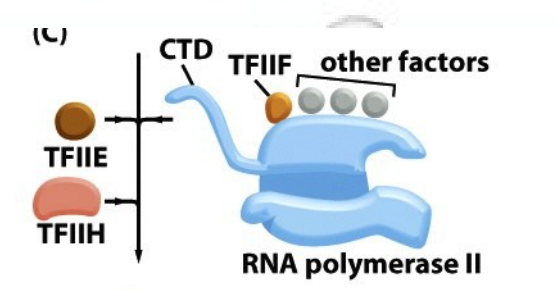
-biotin-DNA navázána na streptavidinové kuličky – na DNA nachytány *in vitro* sestavené komplexy – odštěpeno *Sall* a cryoEM - postupně rekonstruován celý PIC



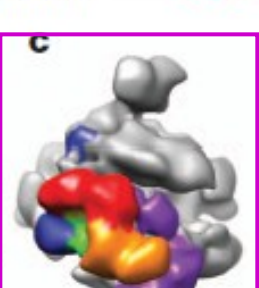
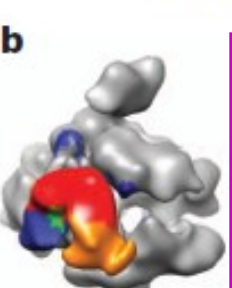
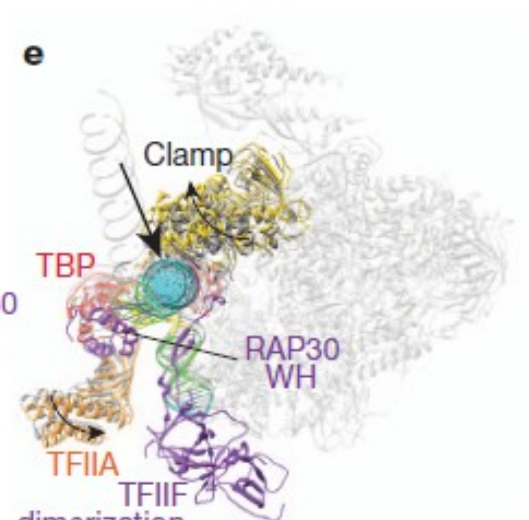
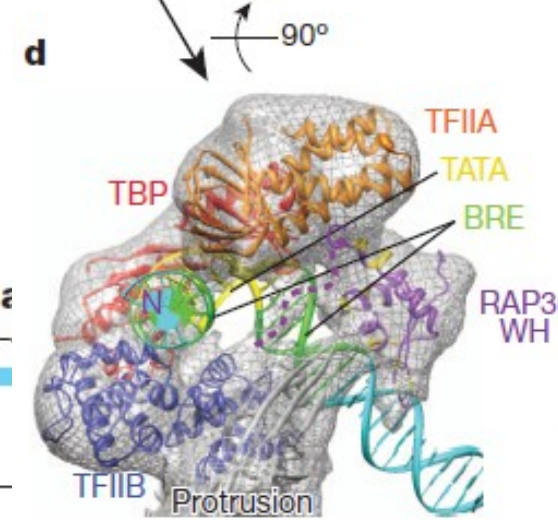
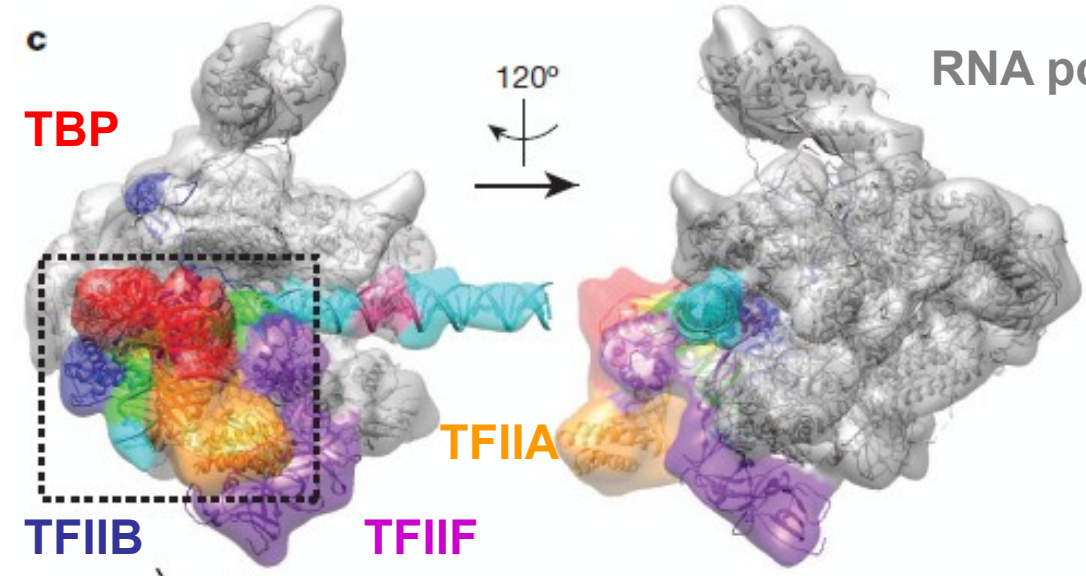
He et al, Nature, 2013



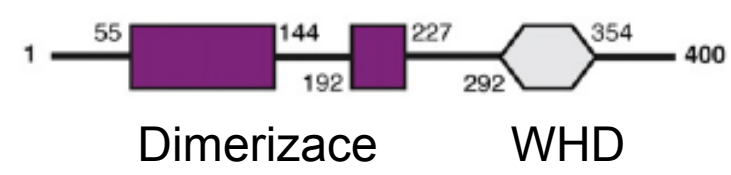
realita

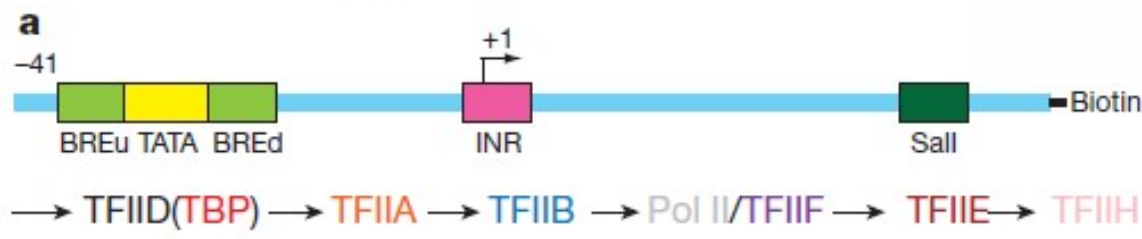
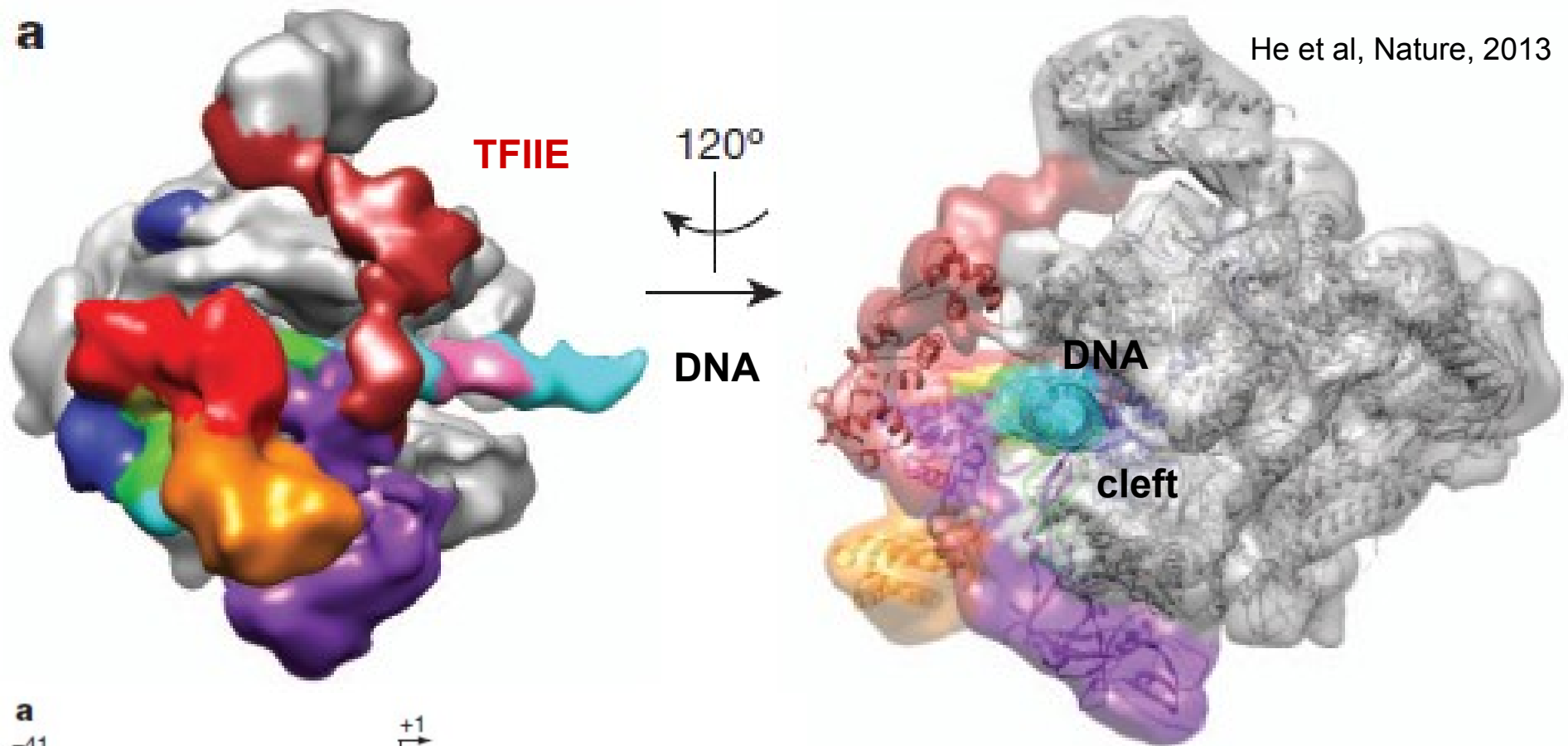


UTP, ATP
CTP, GTP
HELICASE ACTIVITY
AND CTD PHOSPHORYLATION



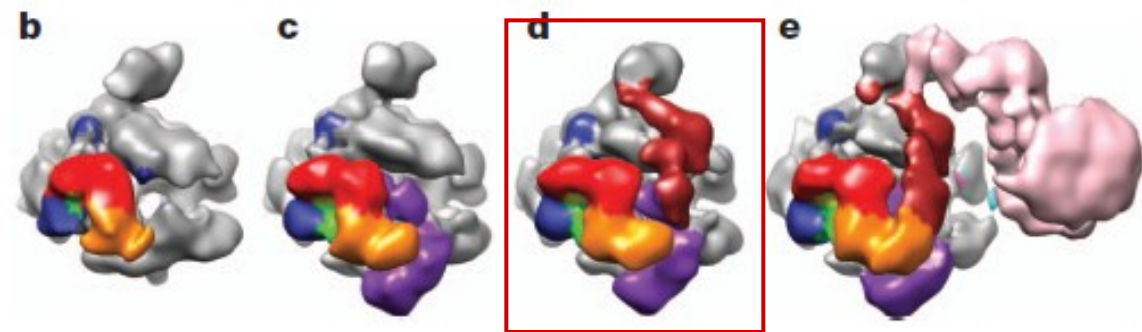
- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})
- změna natočení TFIIA+TFIIB+TBP/TFIIF + RNA pol II
- váže TFIIF a pomáhá tak stabilizaci komplexu





-váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu (vidí DNA)

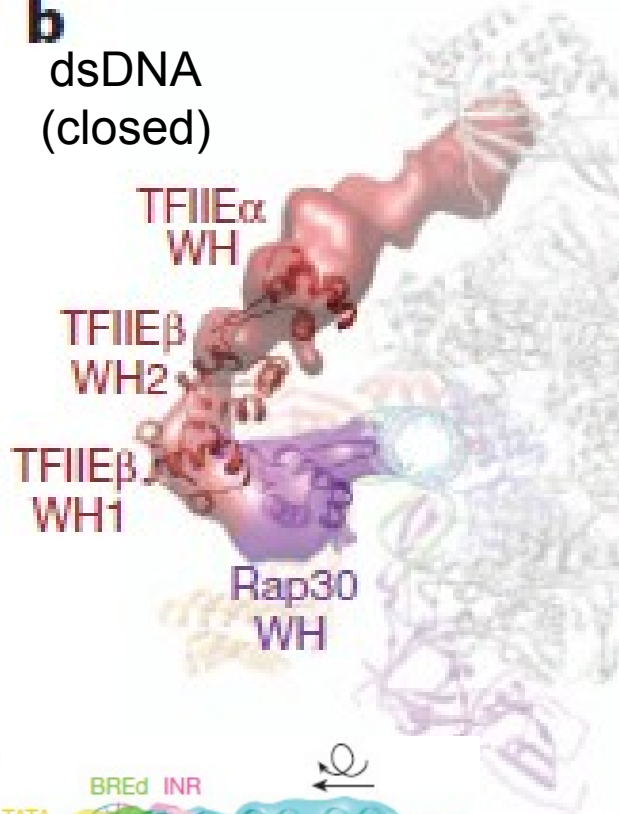
- tandem 4x WHD uzamyká DNA v pol II prohlubni



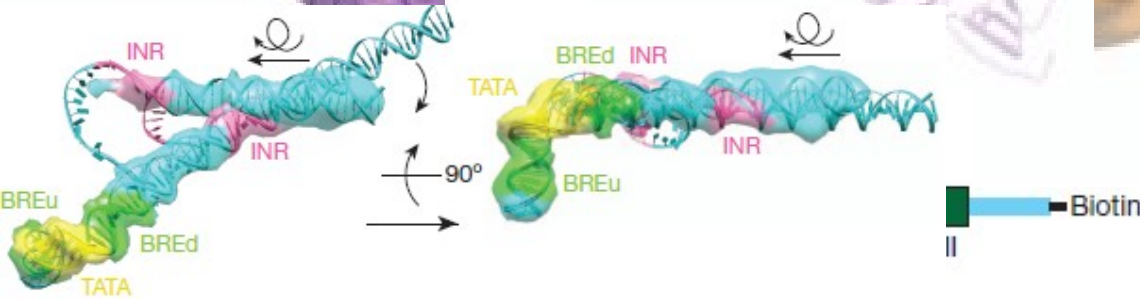
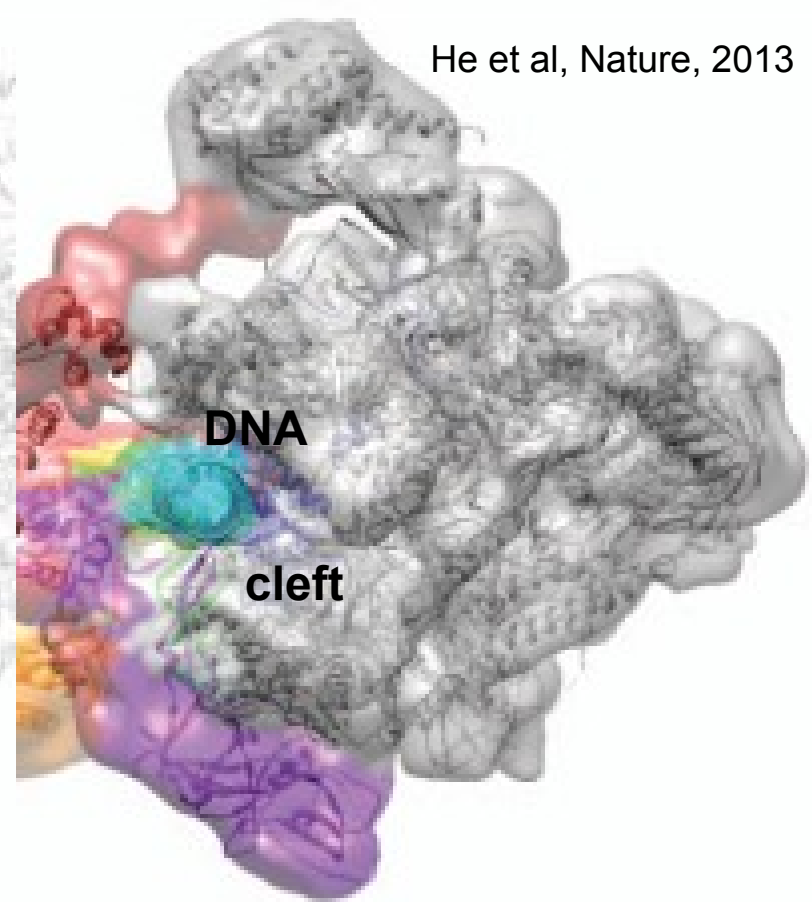
ssDNA
(open)



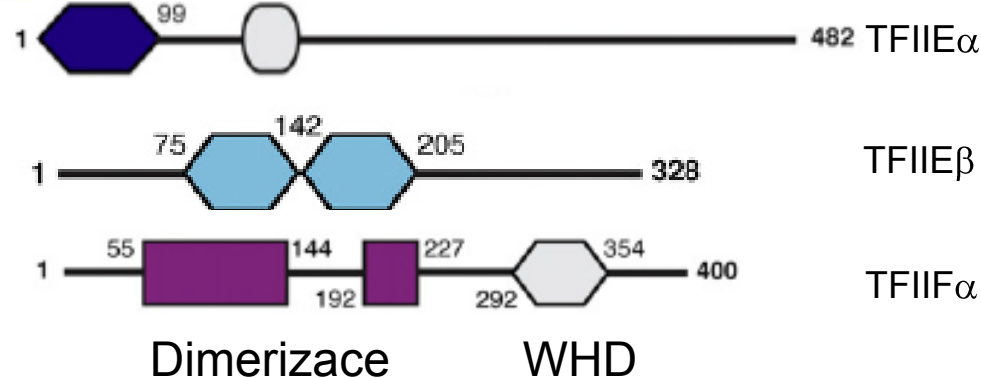
b
dsDNA
(closed)



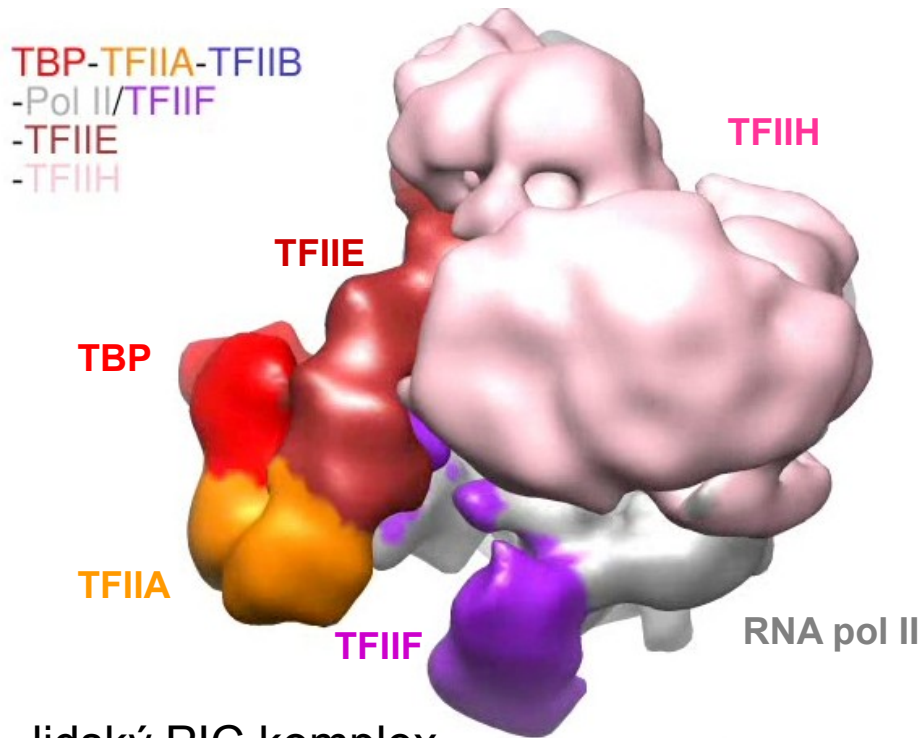
He et al, Nature, 2013



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

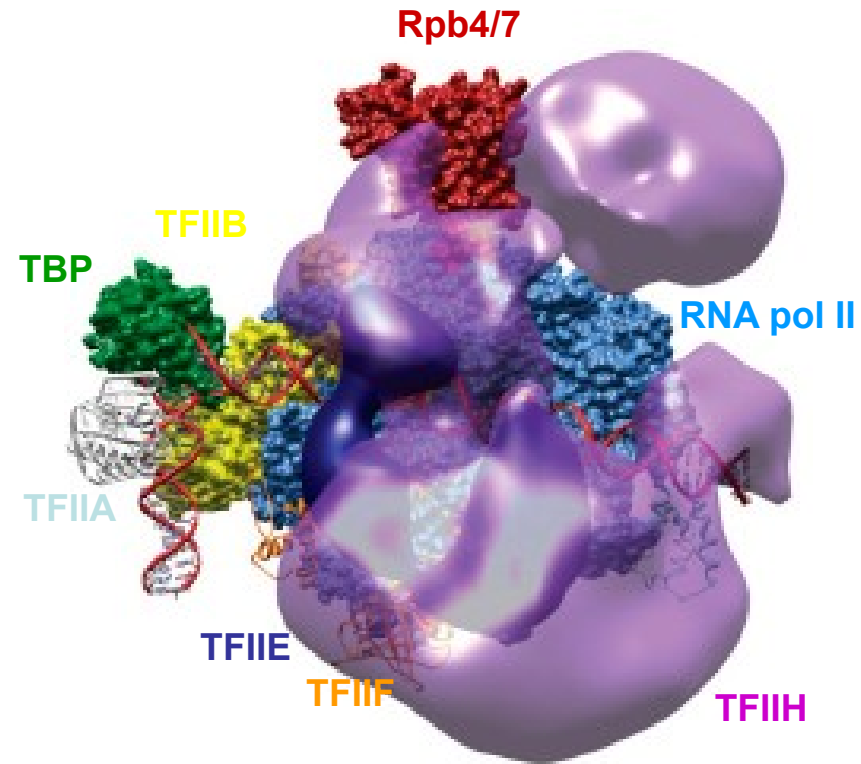
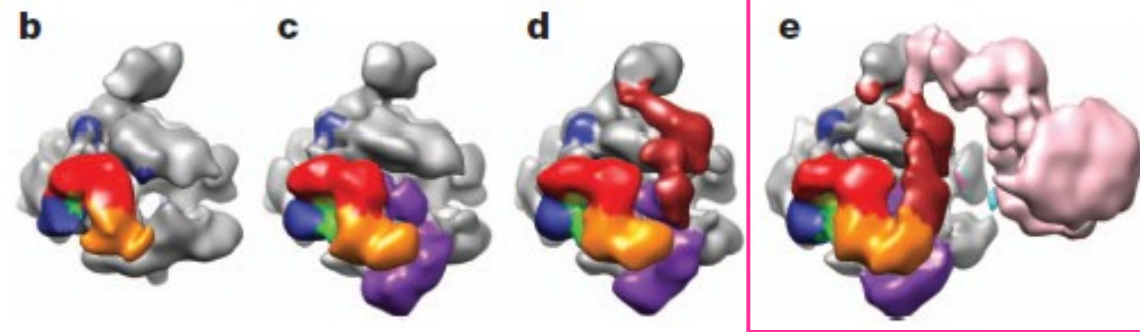
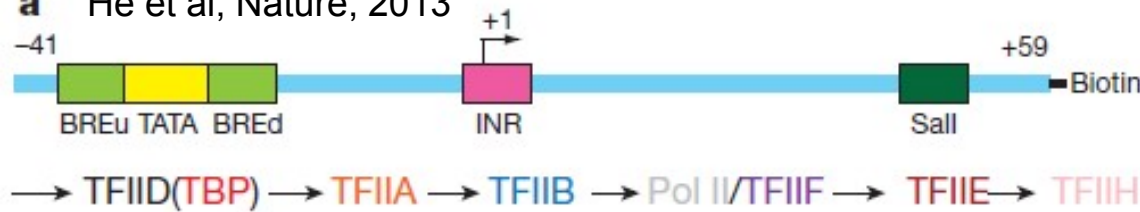


Vanini & Cramer, Mol Cell, 2012



lidský PIC komplex

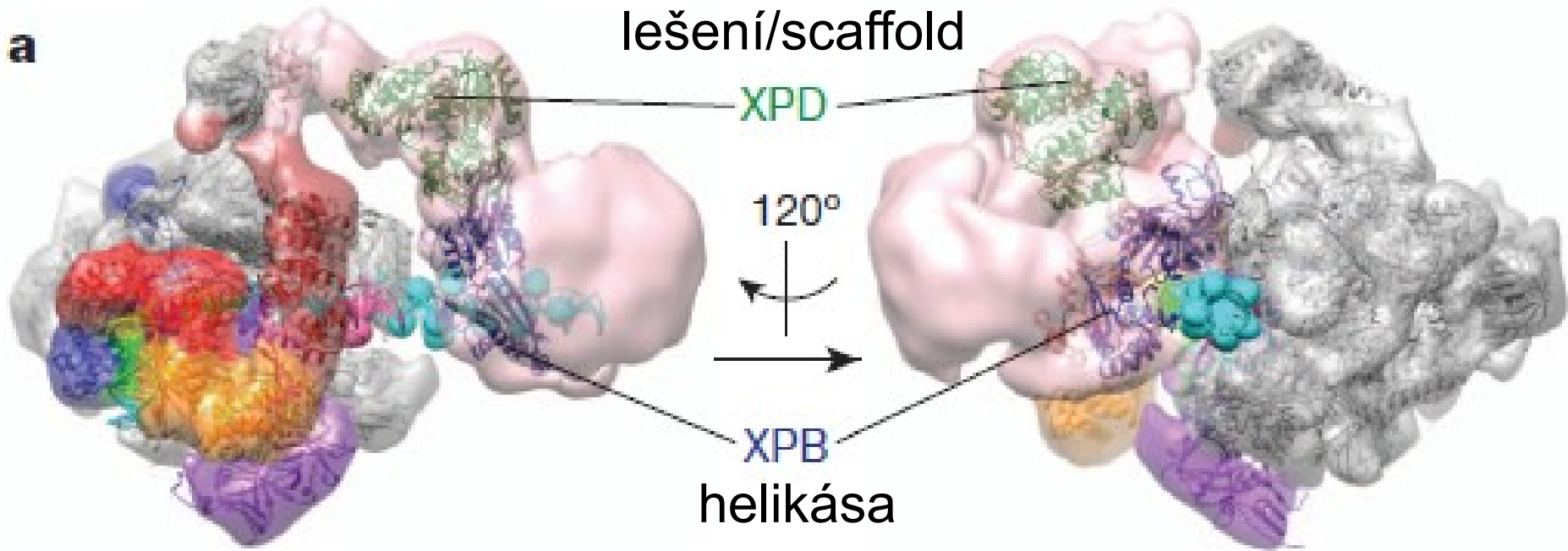
He et al, Nature, 2013



kvasinkový PIC komplex

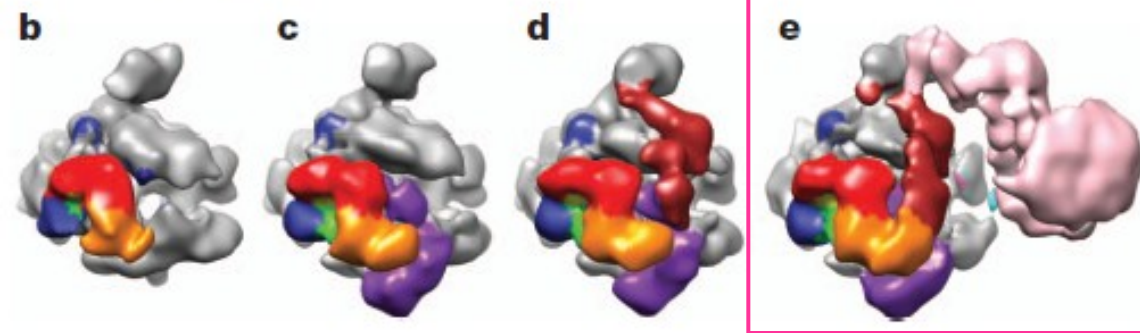
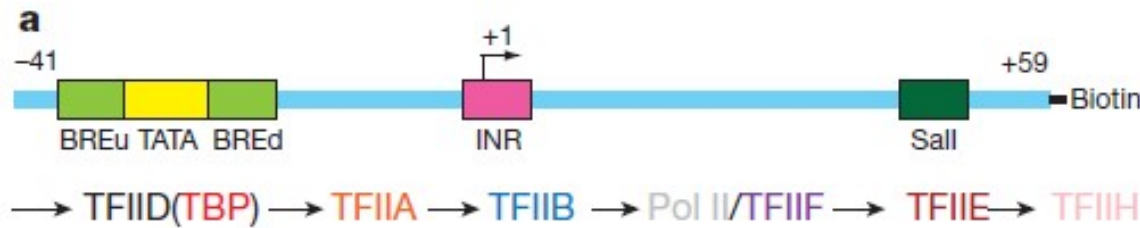
Gibbons et al, PNAS, 2012

- **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



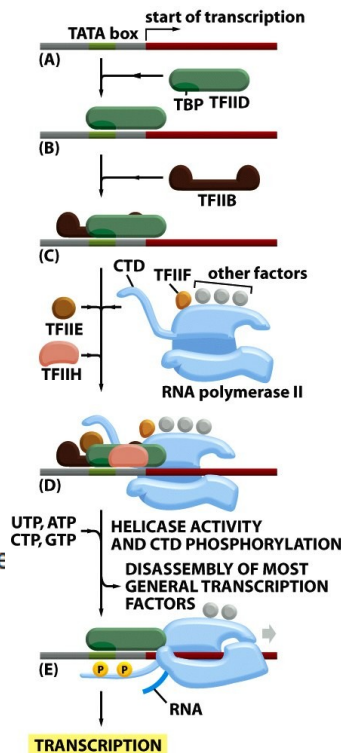
- **TFIIH** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)

- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvoušroubovici

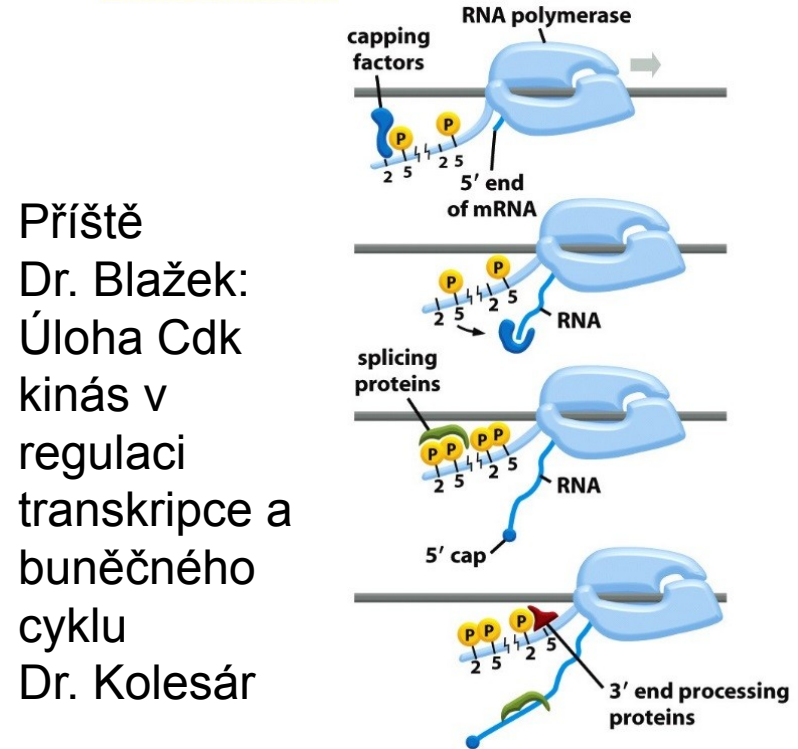
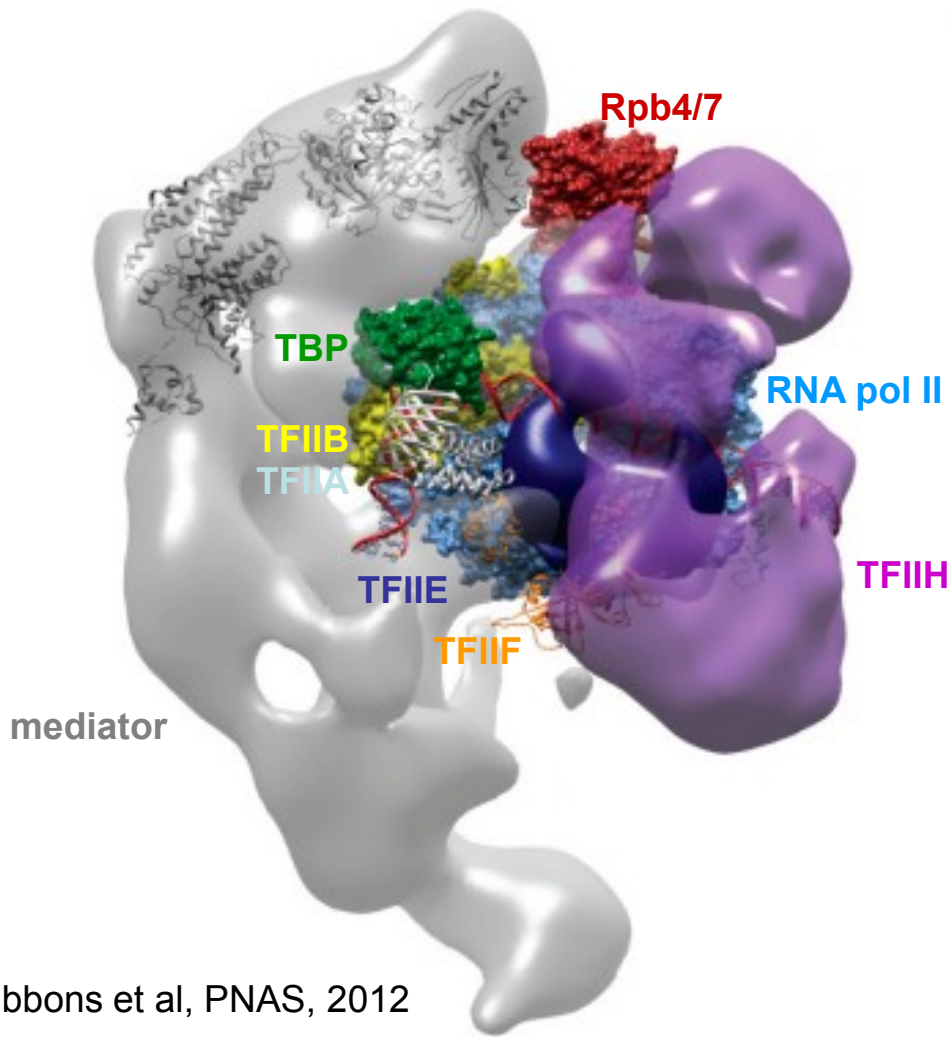
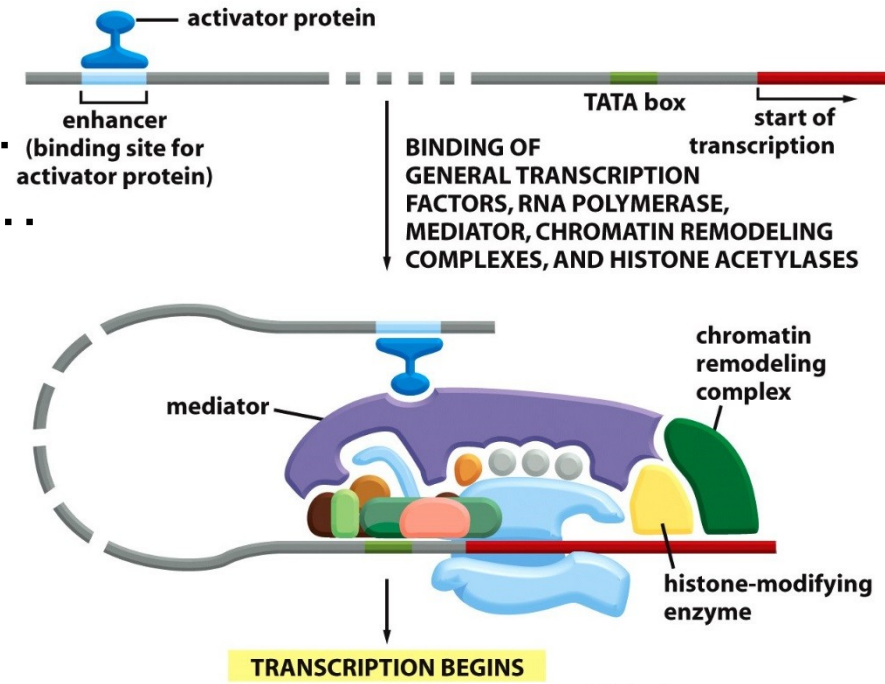
začátek transkripce - faktory

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 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



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



Příště
 Dr. Blažek:
 Úloha Cdk
 kinás v
 regulaci
 transkripce a
 buněčného
 cyklu
 Dr. Kolesár