

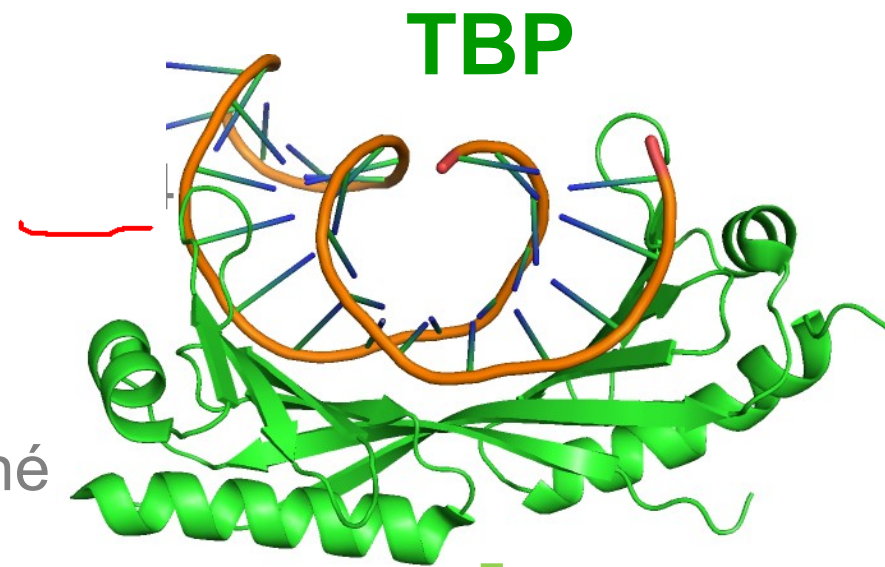
- Zipper typ – Jun-Fos

- Helix-turn-he

- Zinkový prst

- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny

- Nejčastěji interaguje **Arg** (pozitivní náboj + vodíkové vazby)

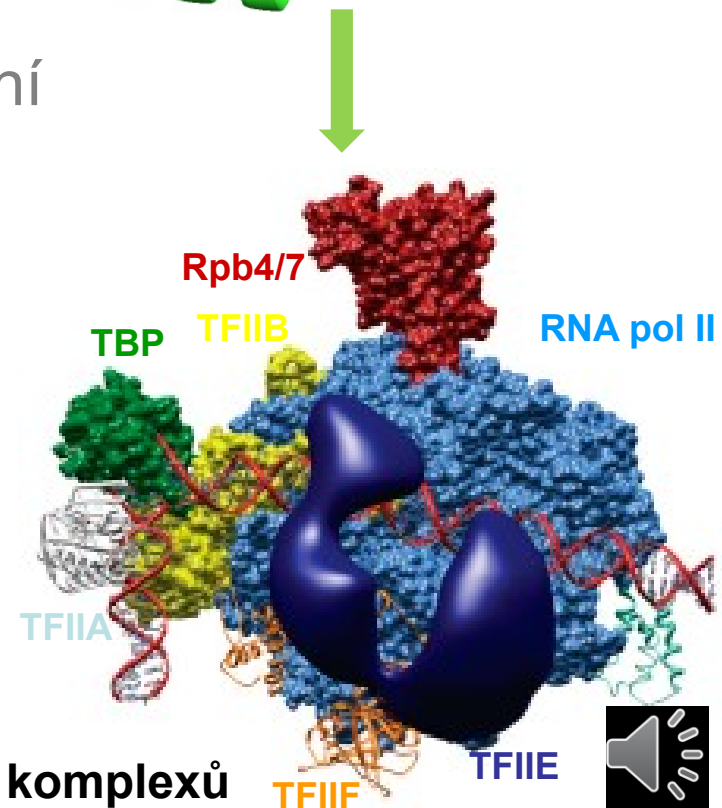


- **Histon, HMG-box**

- β -barrel

- β -hairpin/ribbon

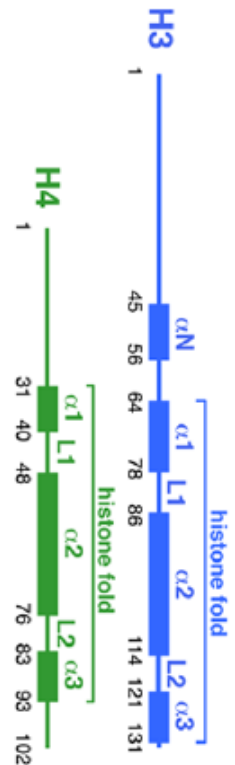
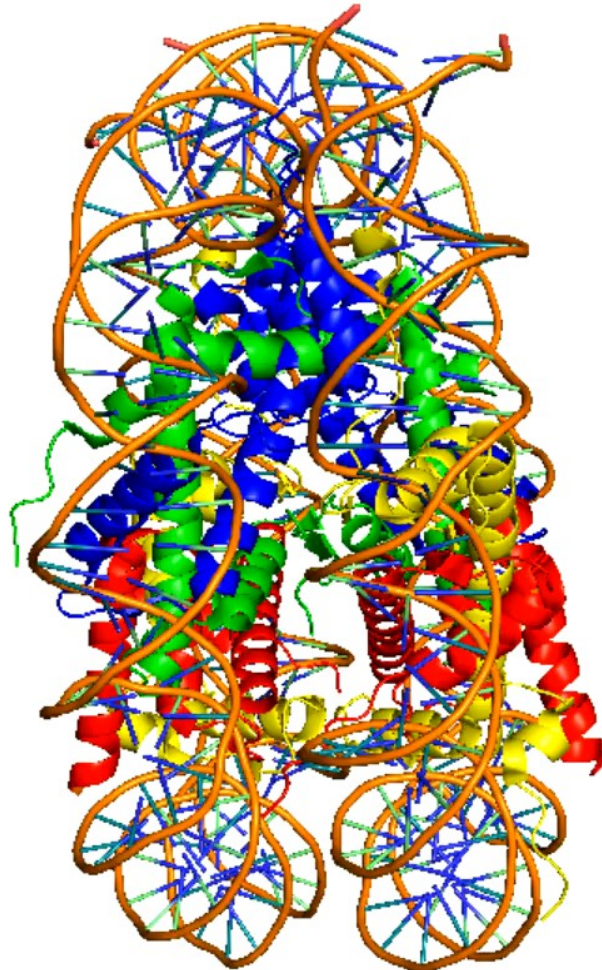
- Smíšené α/β



Průběh transkripce → enhanceosom → skládání komplexů

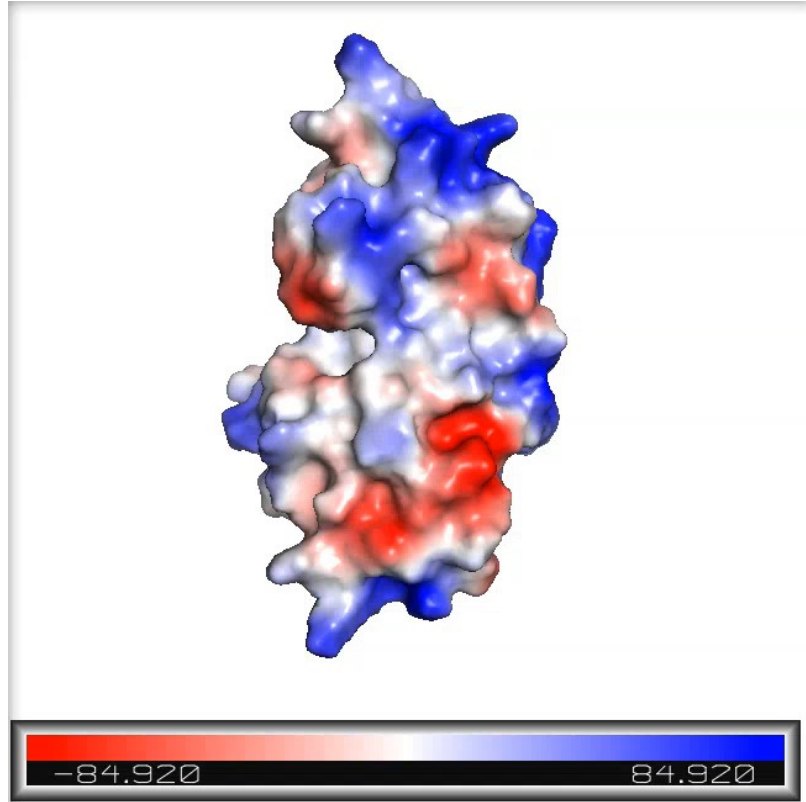
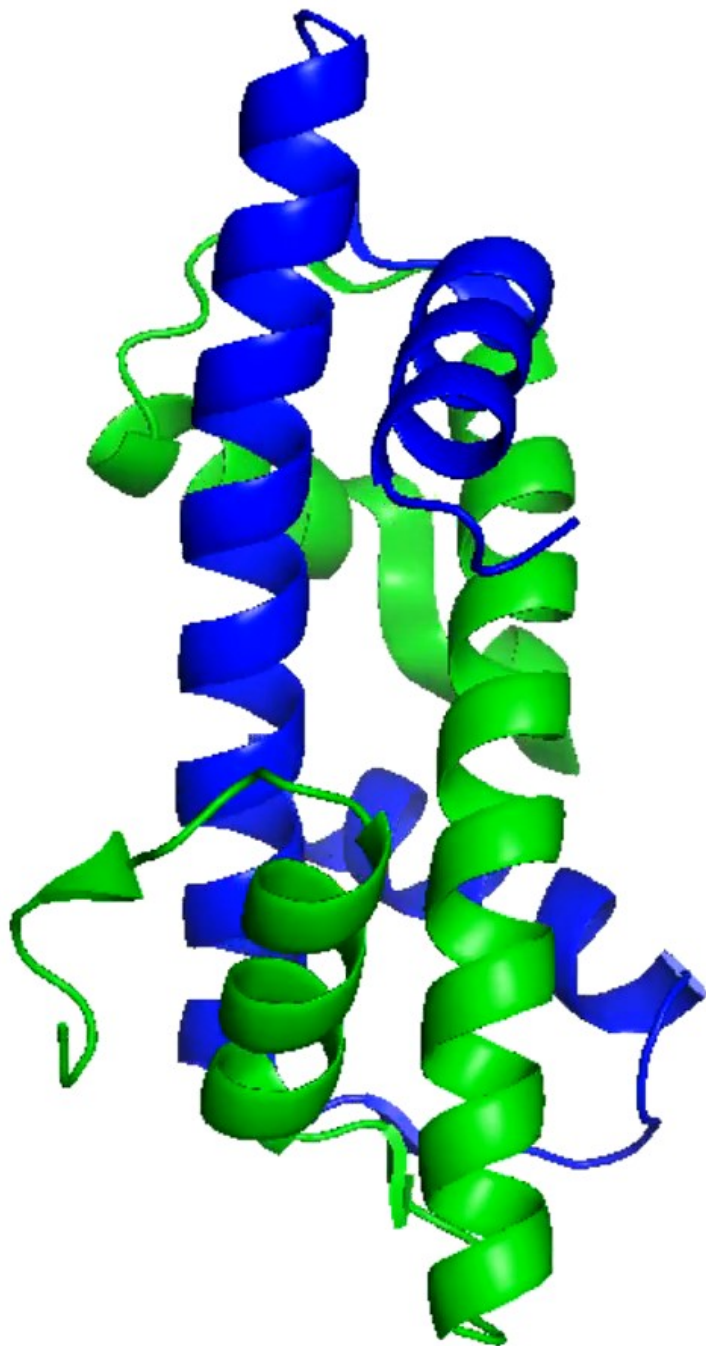


- **histony** vážou DNA sekvenčně nespecificky
- histonové podjednotky (**H2A**, **H2B**, **H3**, **H4**) obsahují svazky 3-4 šroubovic skládaných proti sobě (**histon fold**)
- DNA se obtáčí kolem válcovitého oktameru (2x4 histony)
- šroubovice se vážou na cukrfosfátovou kostru DNA

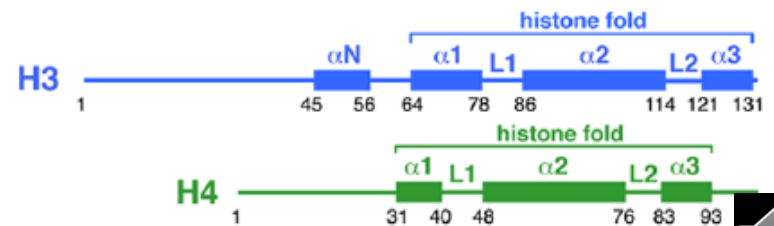


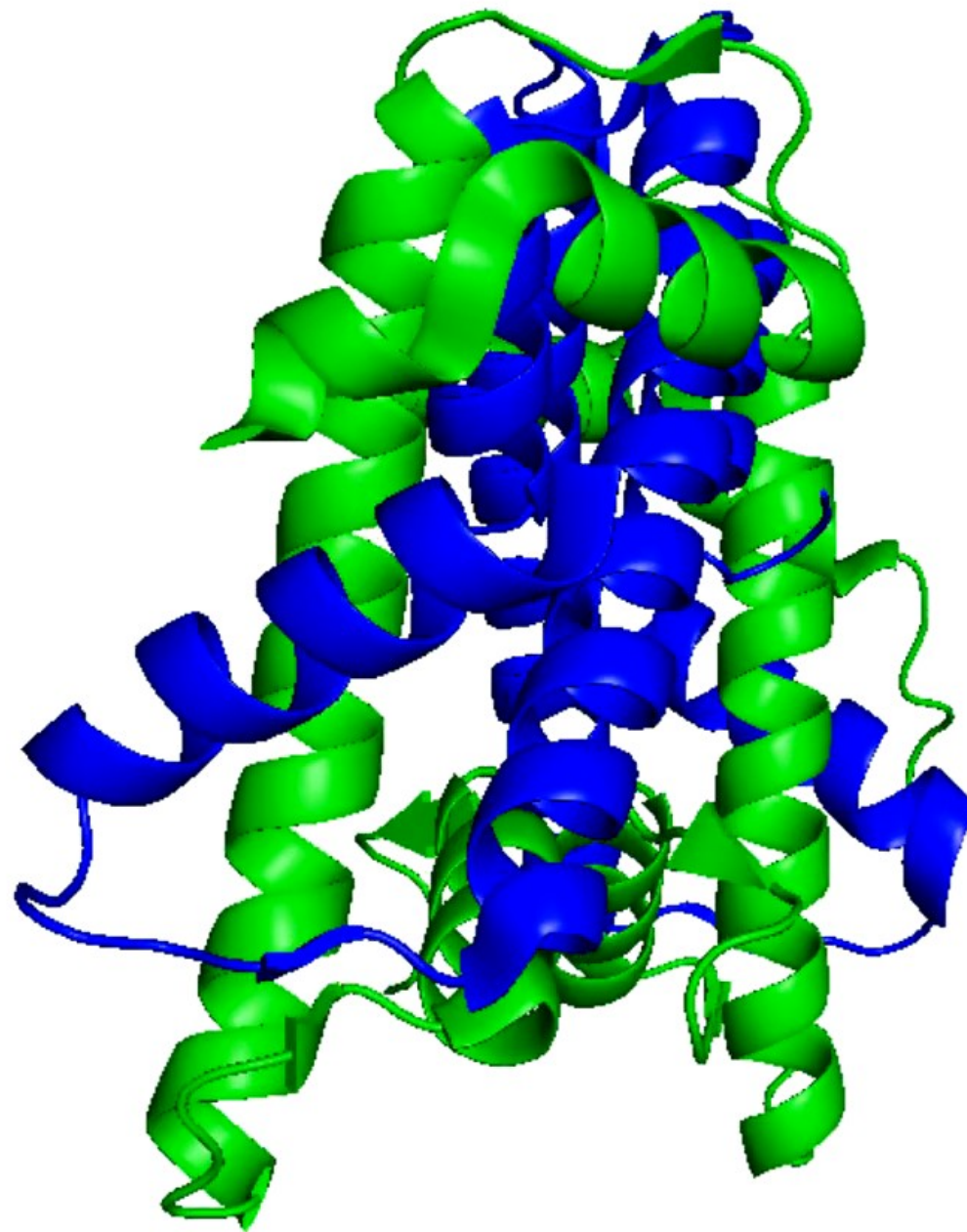
Histon fold

H3-H4 dimer



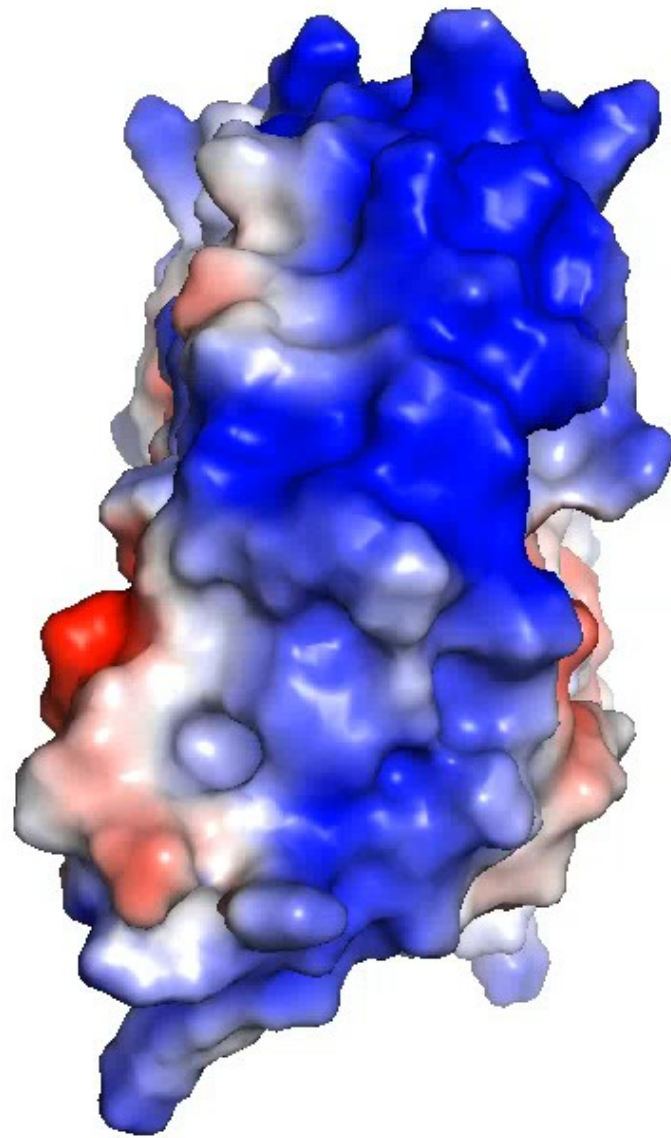
Povrch/kontakt tvoří lysiny a argininy

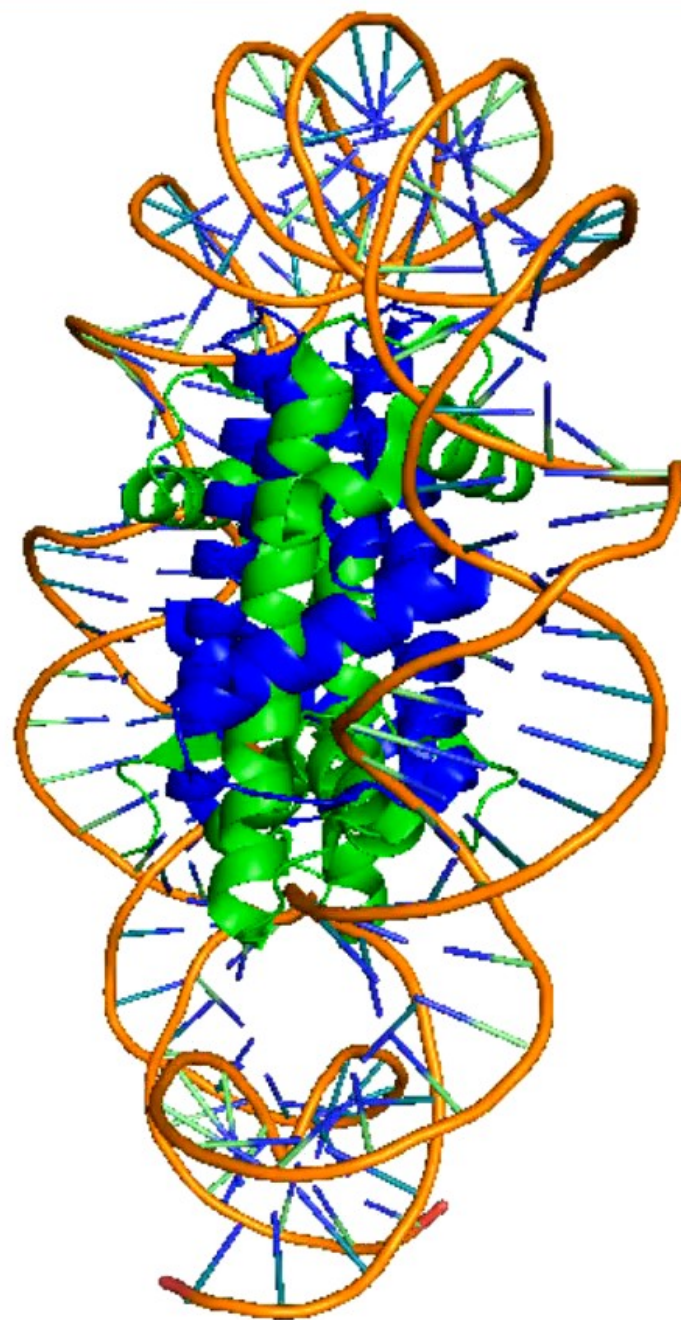




- H3-H3 interakce = $(\text{H3-H4})_2$ tetramer

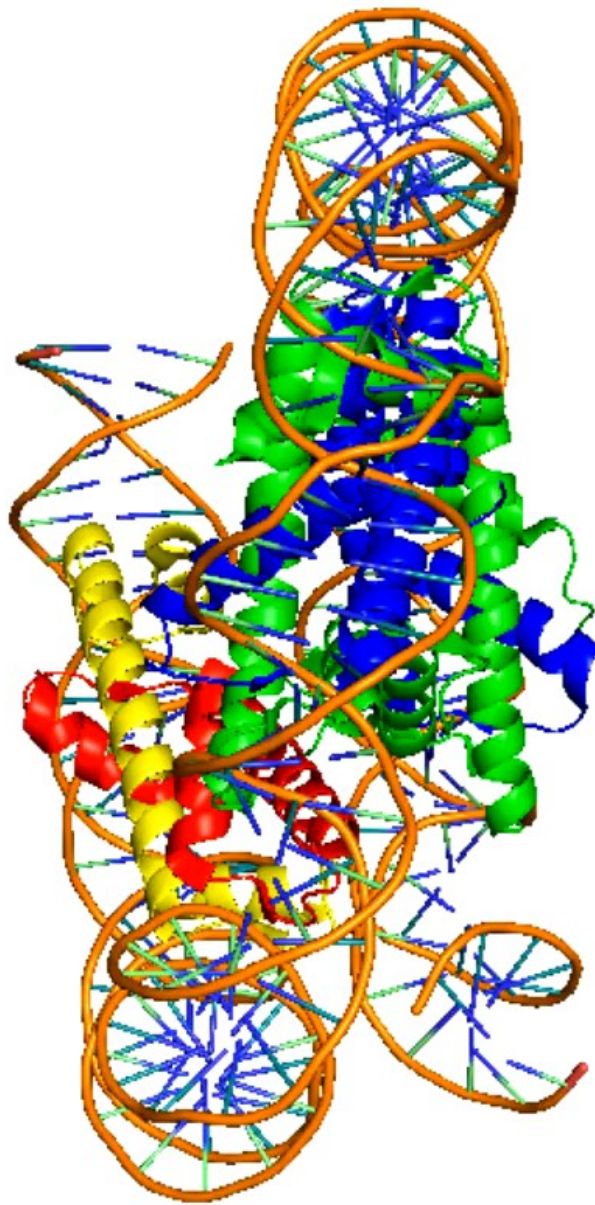






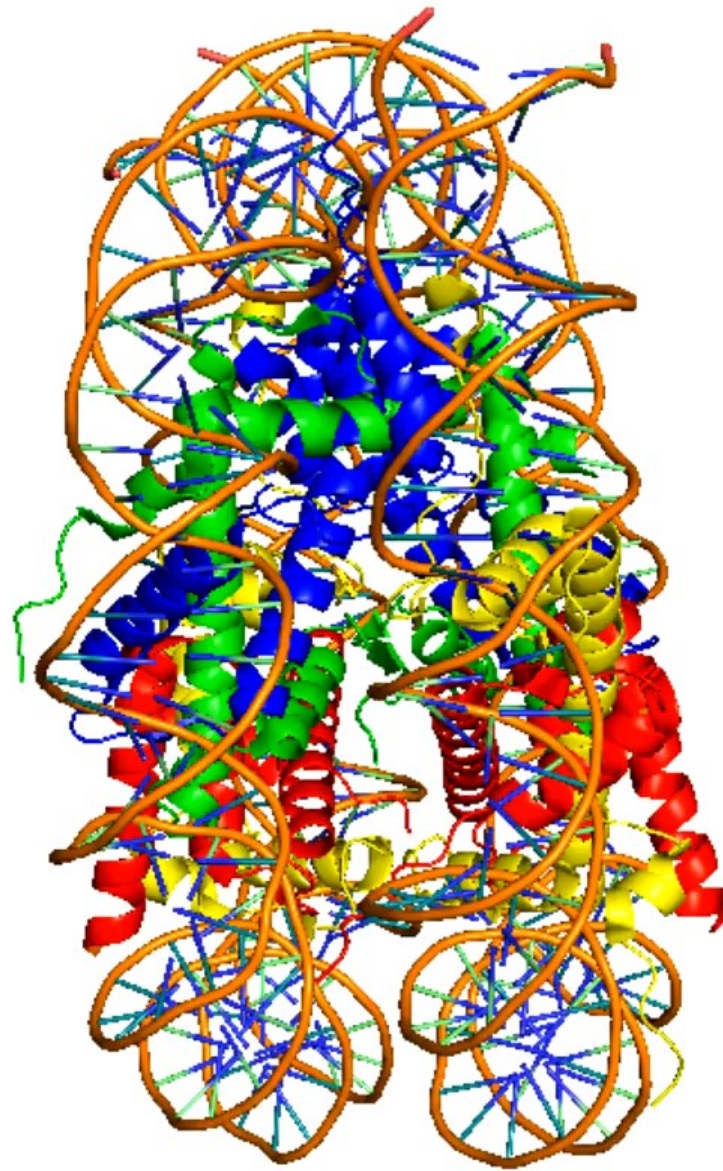
- H3-H3 interakce = $(\text{H3-H4})_2$ tetramer – vazba na DNA





- H3-H3 interakce = (H3-H4)₂ tetramer
- dimery H2A-H2B (H2A – váže H3)



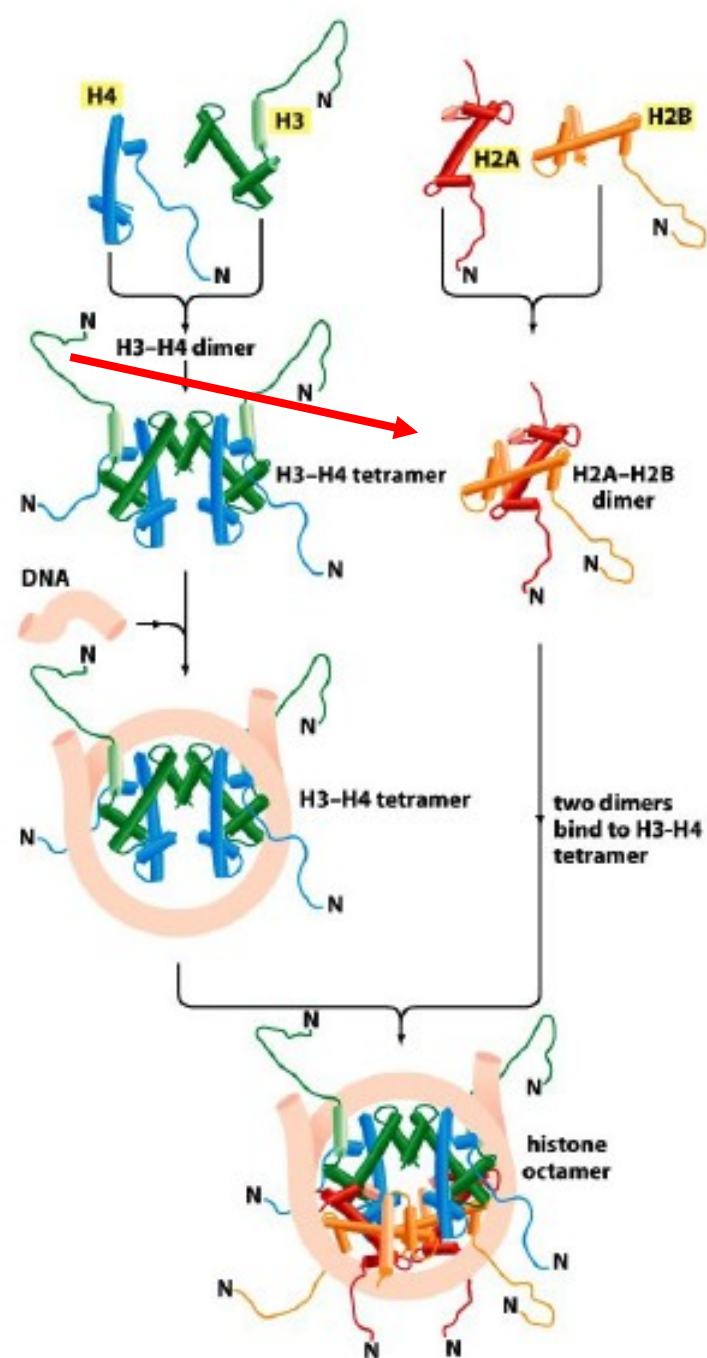


- H3-H3 interakce = $(\text{H3-H4})_2$ tetramer
- dimery H2A-H2B (H2A – váže H3)

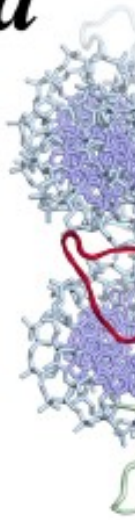
Sestavování nukleozomu:

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

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



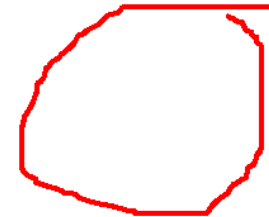
a



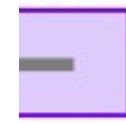
H3



H2A/H2B



DNA



lvě vlákn
o vlákno, ale
rá – větší
)

b



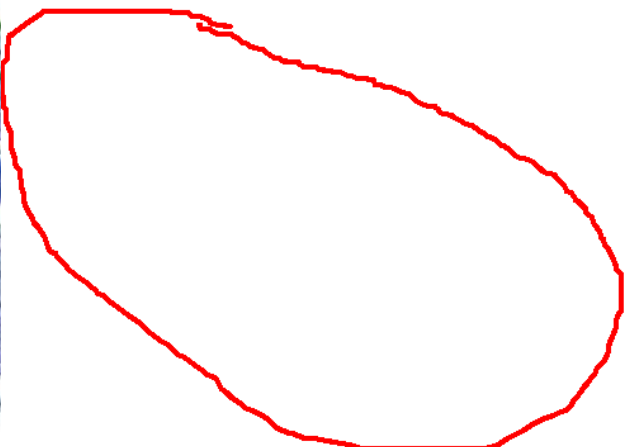
H3

H4

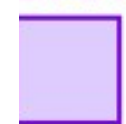
H2A

H2B

DNA

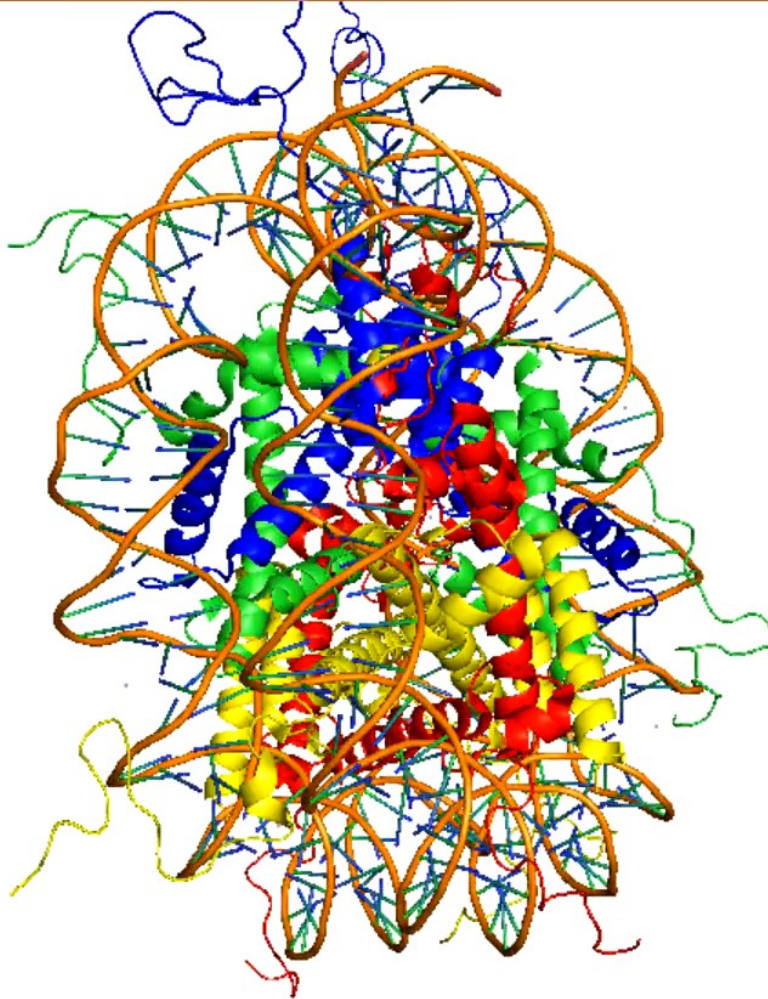


DNA



Konce histonů

- N- a C-konce histonů vybíhají z jádra nukleosomu a ovlivňují jeho vazbu
- modifikace (např. acetylace) mohou oslabit interakce s DNA a rozvolnit nukleosom – mohou vázat jiné proteiny (např. bromodoména)



F

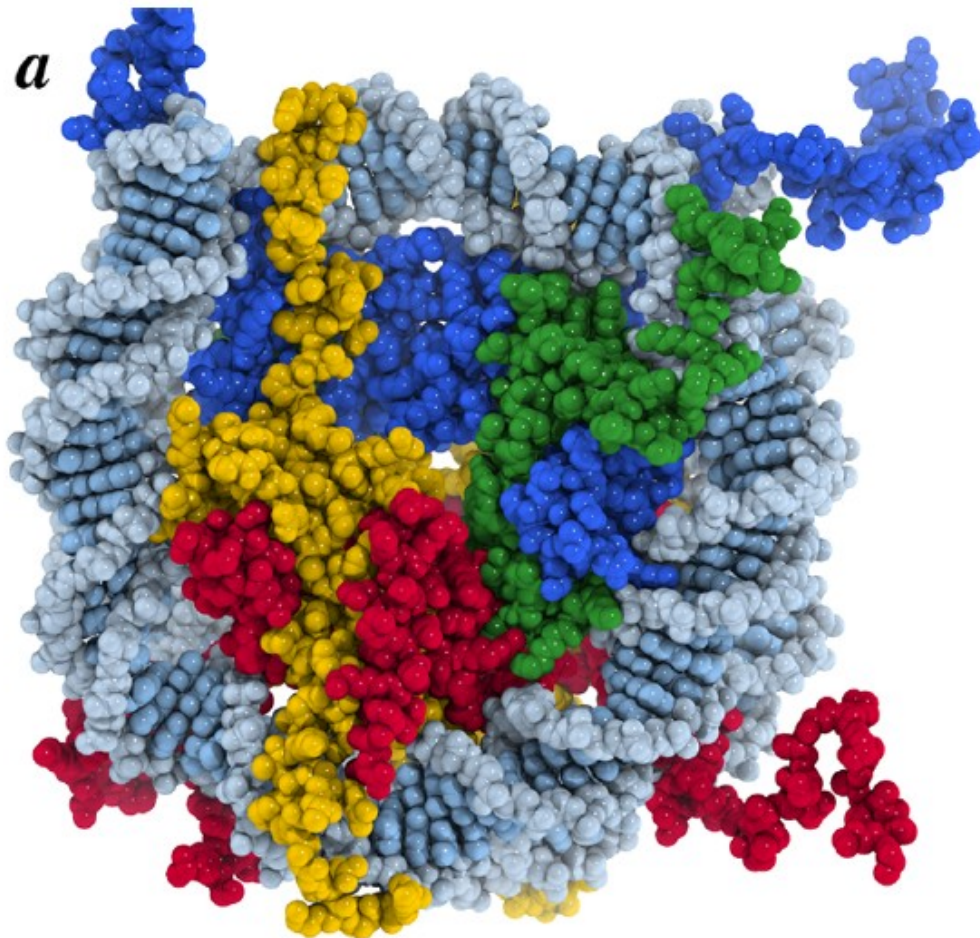


2

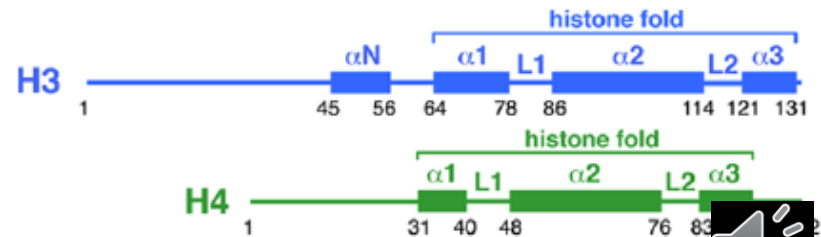
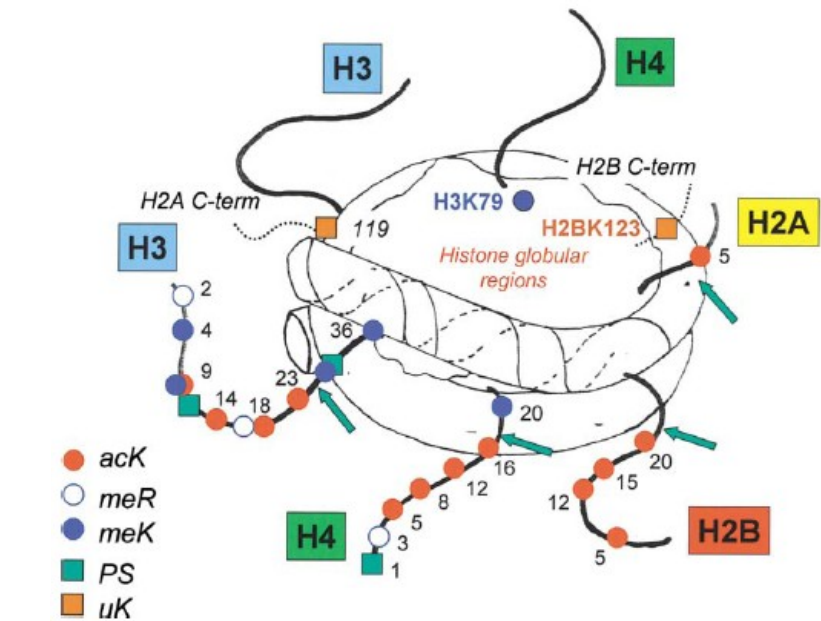


Konce histonů

- N- a C-konce histonů vybíhají z jádra nukleosomu a ovlivňují jeho vazbu
- modifikace (např. acetylace) mohou oslabit interakce s DNA a rozvolnit nukleosom – mohou vázat jiné proteiny (např. bromodoména)

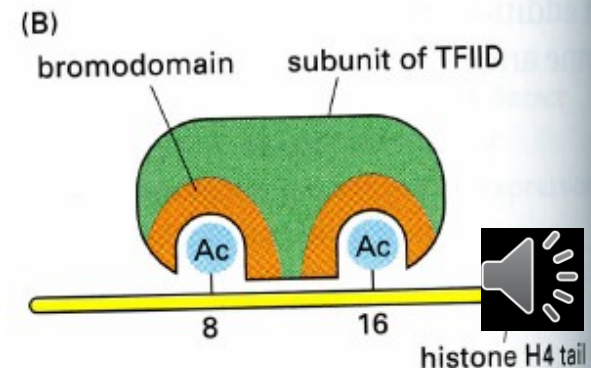
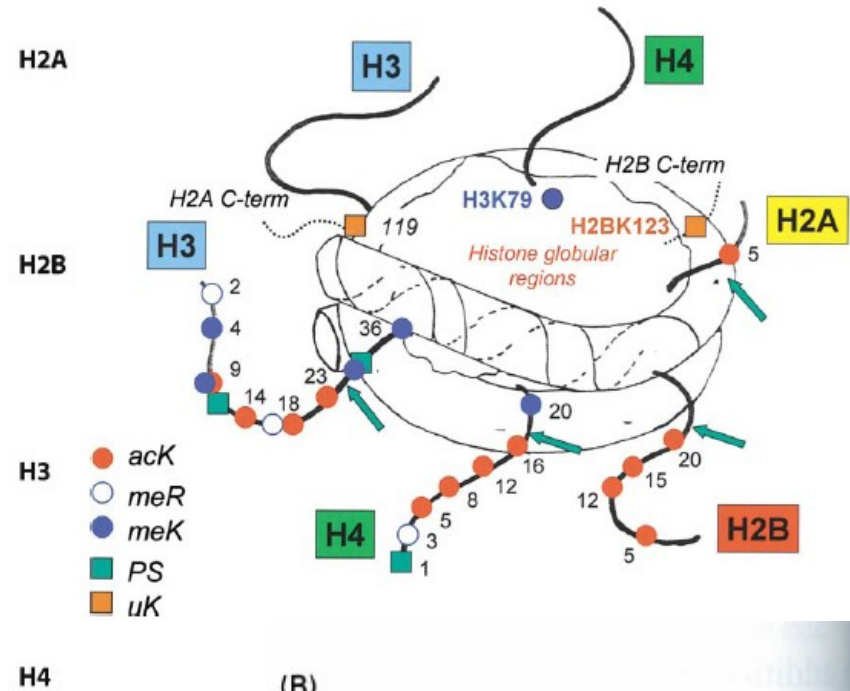
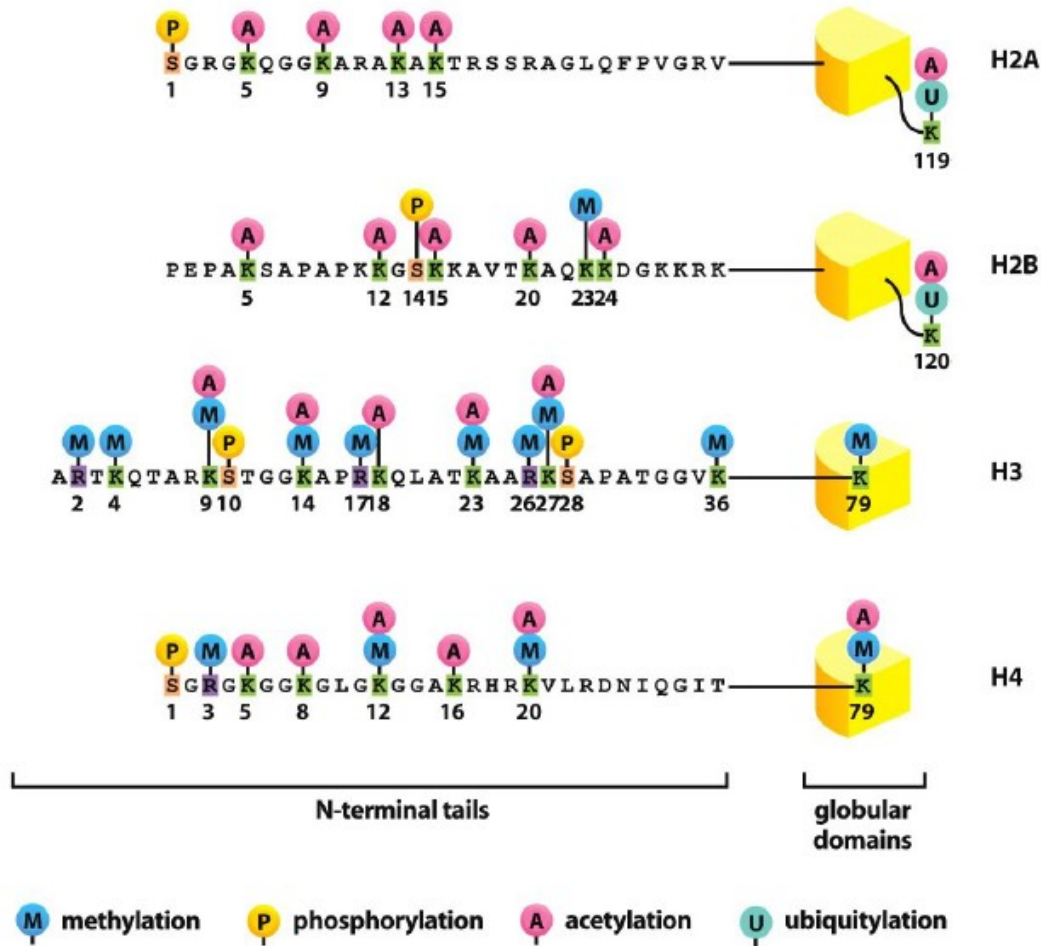


■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA



Modifikace histonů

- např. acetylace lysinů (změna náboje) oslabí interakci s DNA a rozvolní vazbu oktameru (zpřístupní DNA pro TBP)
- následně se TFIID váže na Ac-H4 (K8, K16) prostřednictvím bromodomény TAF1 proteinu (**reader/writer/eraser**)

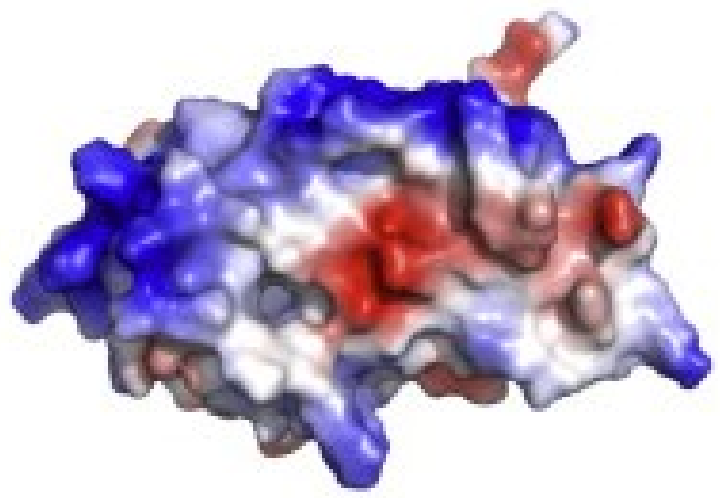


A

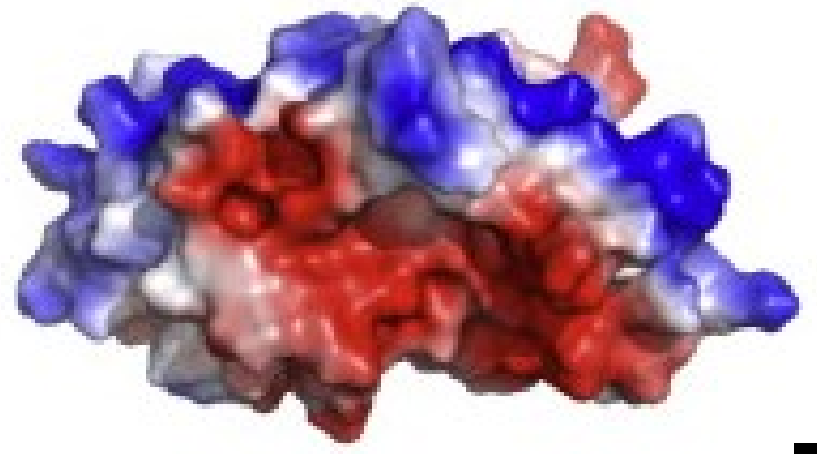


Transkripční faktory NF-Y

(notky B a C) obsahují
 fold a vážou se sekvenčně
 specificky na cukrfosfátovou
 jako histony
 se v důsledku vazby ohýbá
 stejně jako v nukleosomech
 A podjednotka rozeznává
 sekvensi pomocí α -
 šroubovice (interkalace do MŽ)

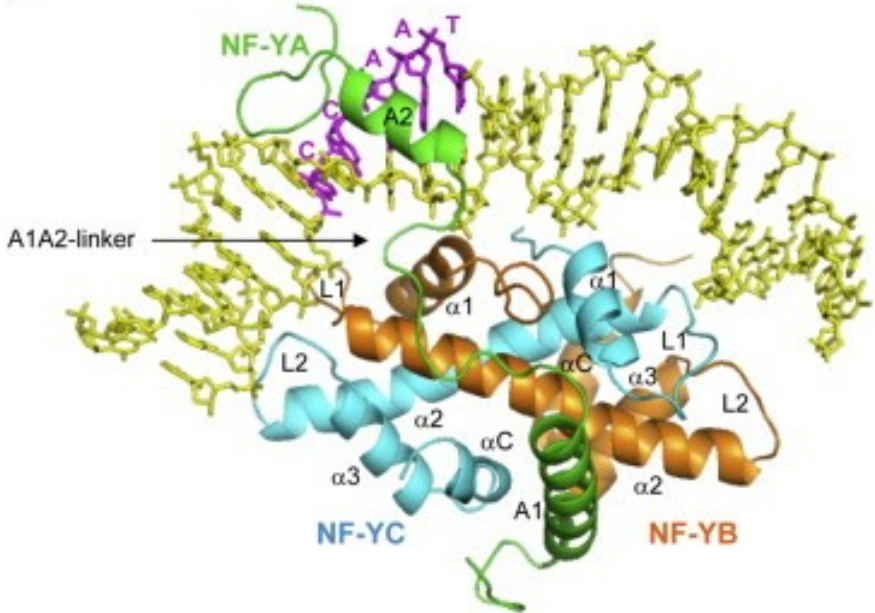


H2B/H2A

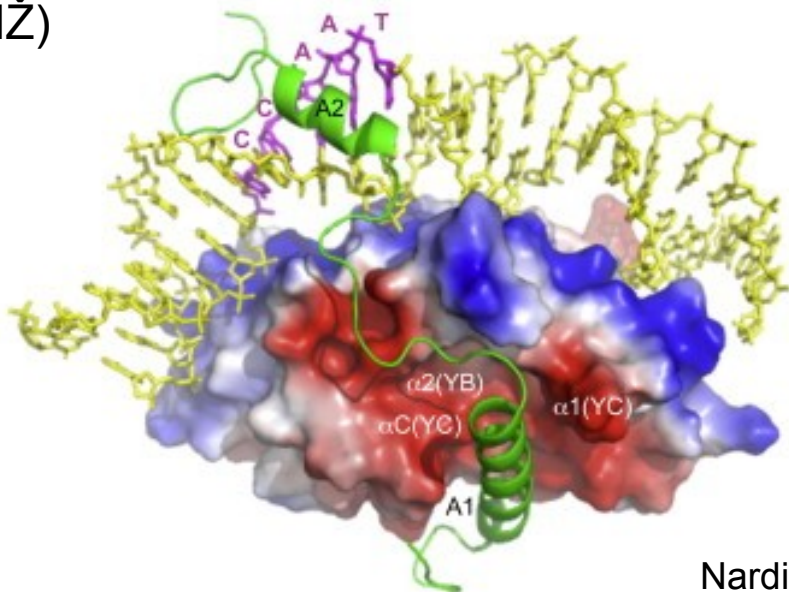


NF-YB/NF-YC

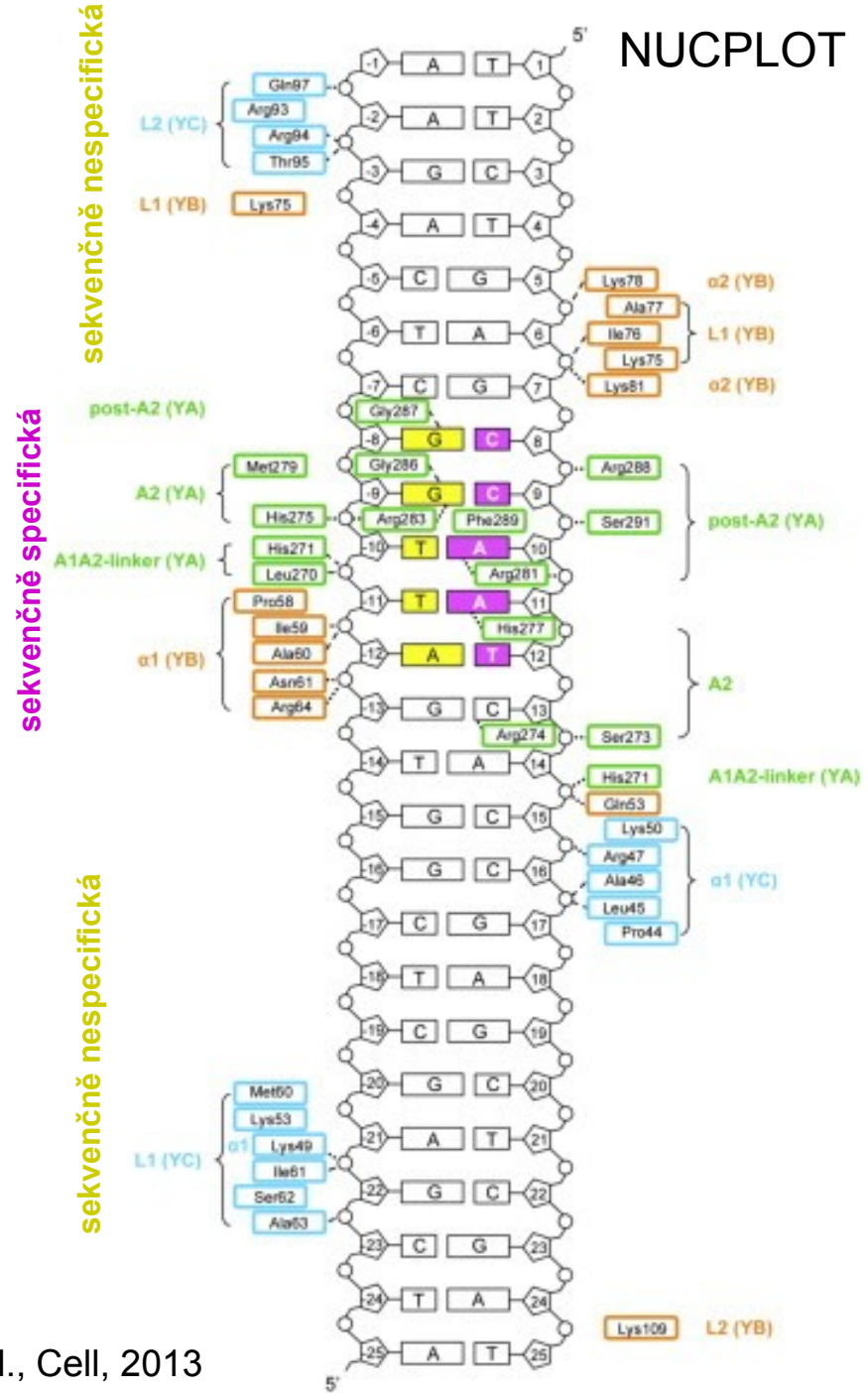


A

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



Nardini et al., Cell, 2013



TI



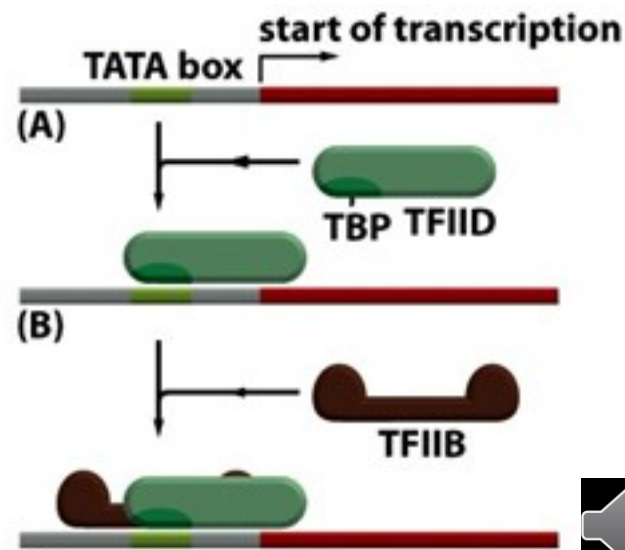
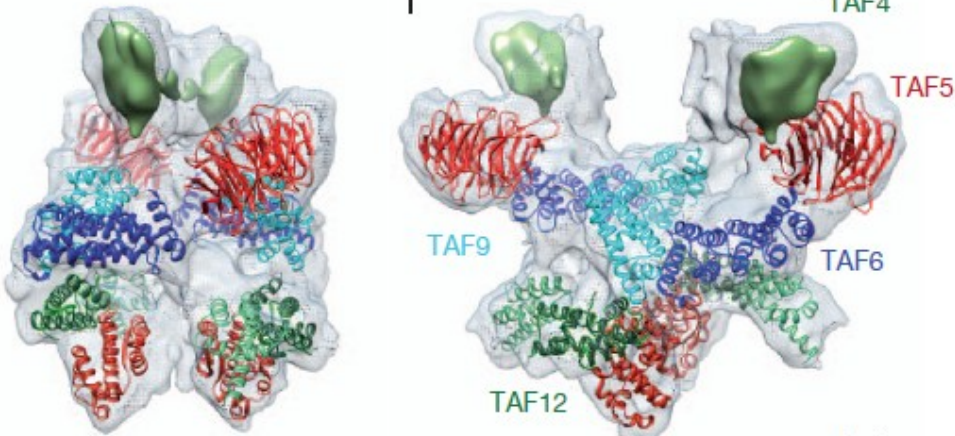
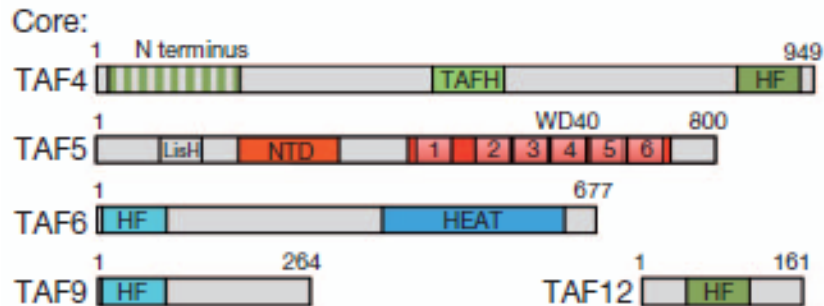
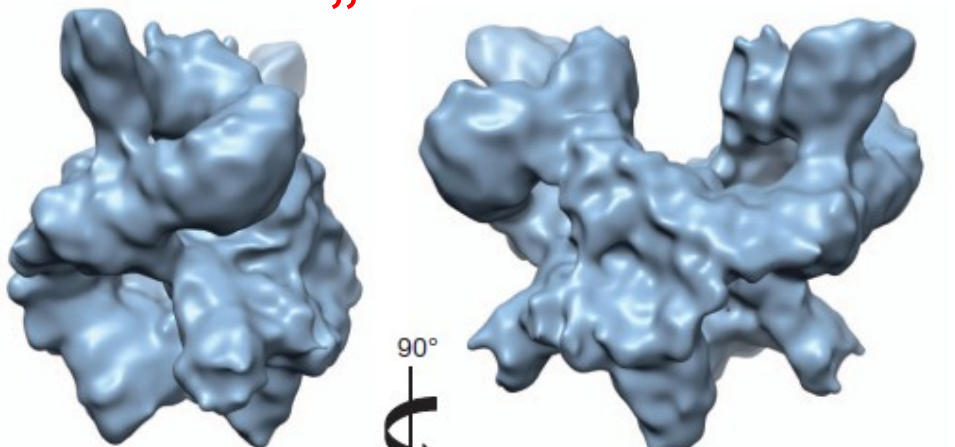
Histon-fold doména se neváže na DNA

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

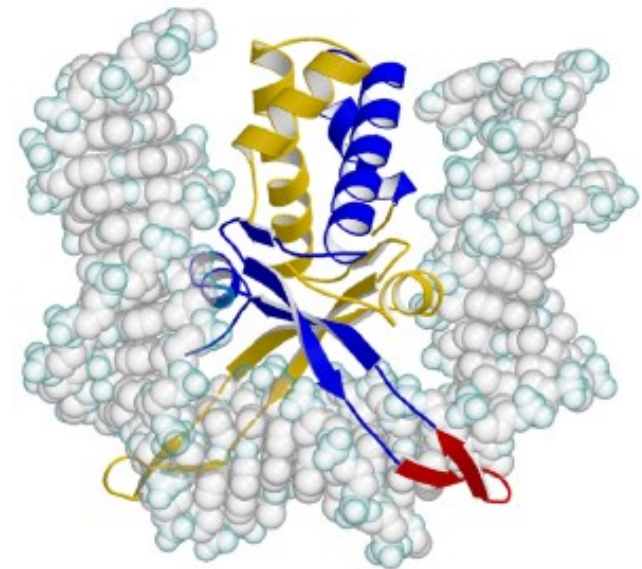
„core“



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**

α -šroubovice

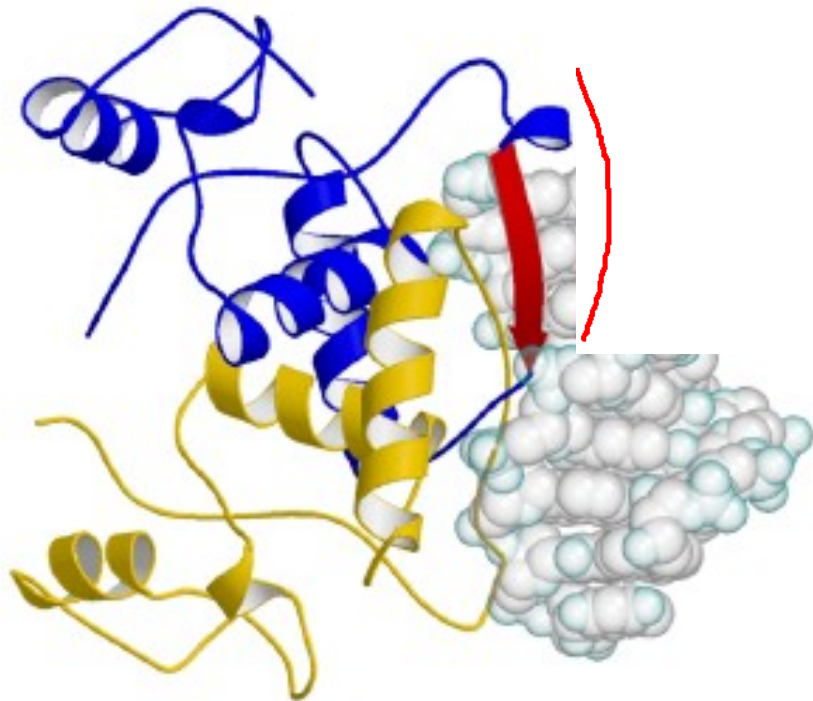
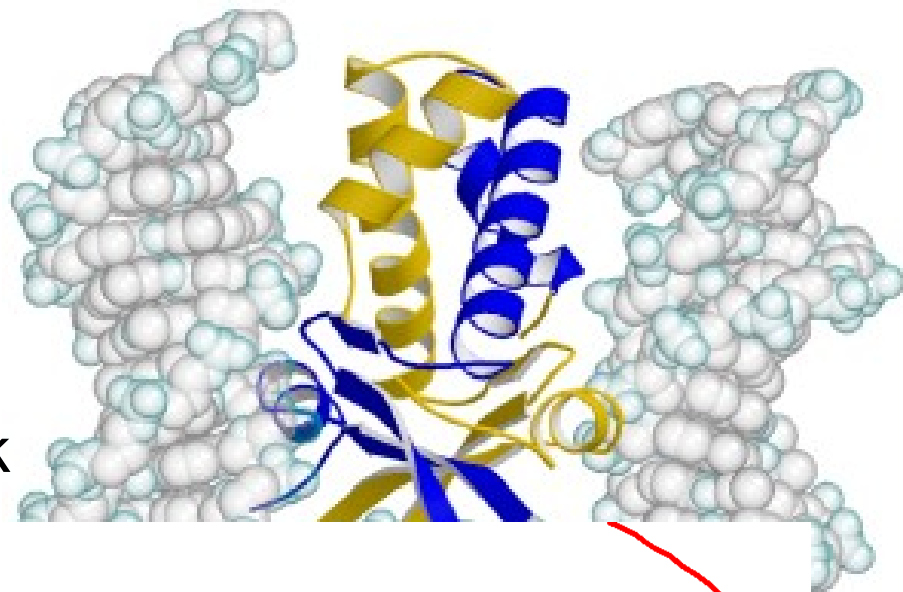


33. Integration host factor (1ihf)

β -listy



- pouze β -list nebo hairpin (vlásenka)
- 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

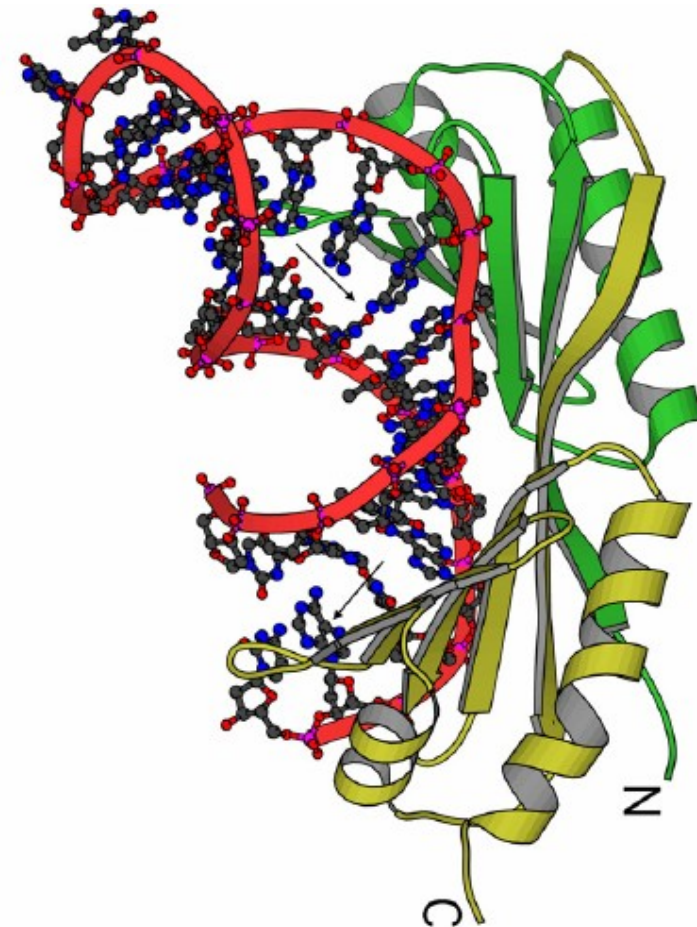


Motivy DNA vazebných domén

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

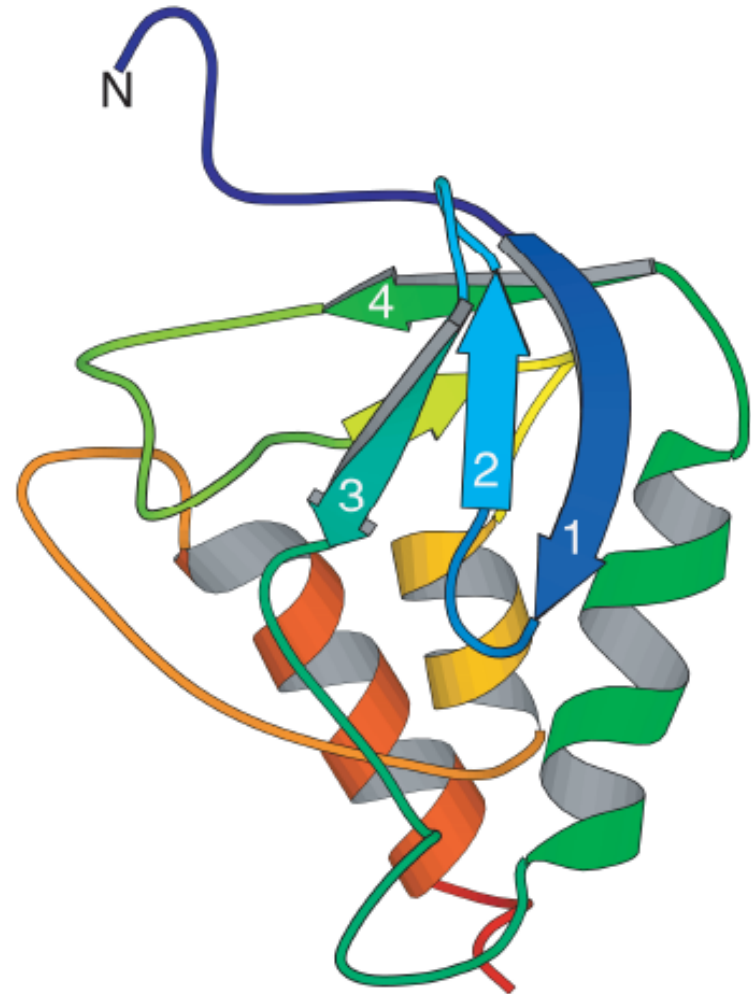
α -šroubovice

β -listy

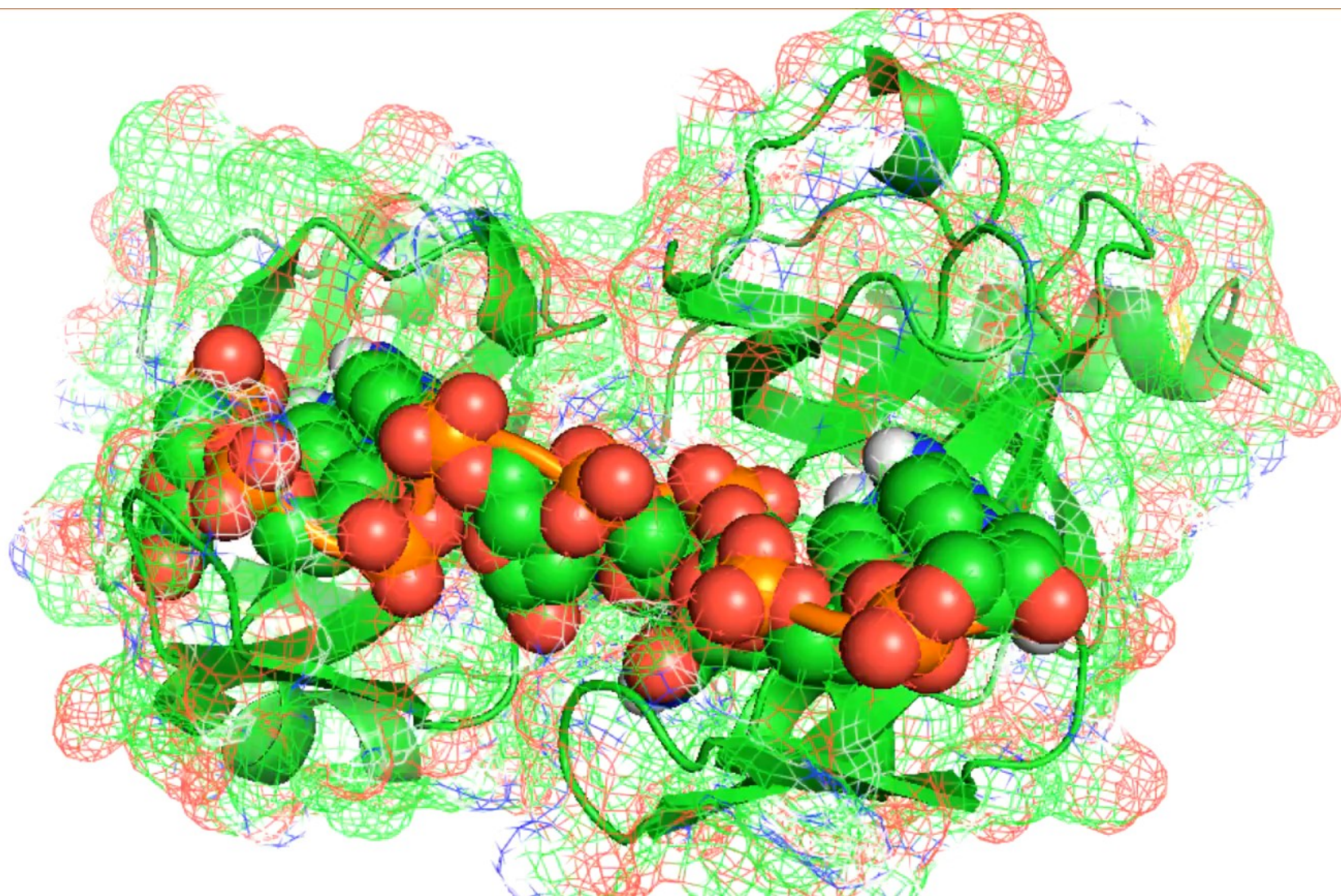


OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide binding)

- 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. Šebesta)



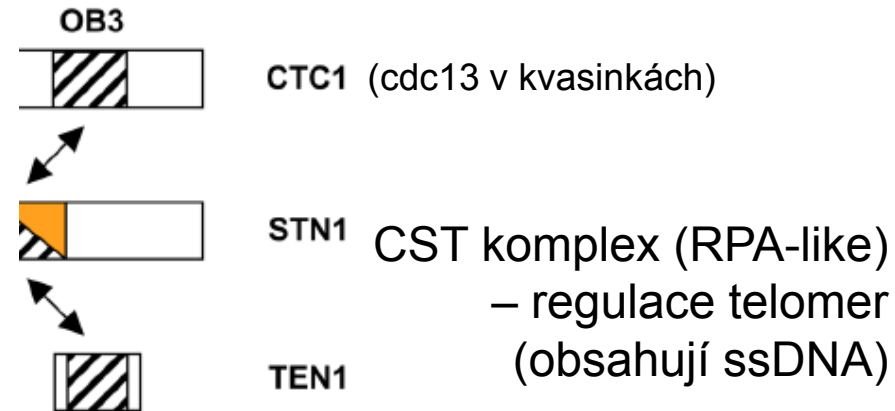
OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide binding, 1JMC)



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



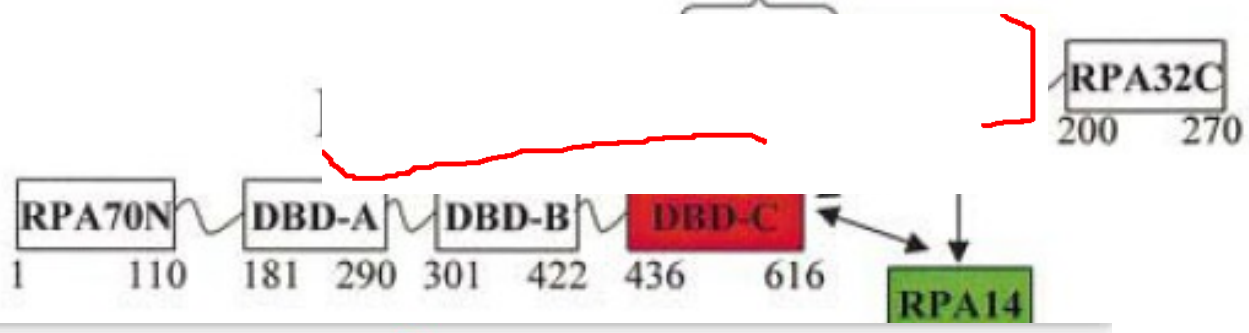
- protein-proteinové interakce (integrita komplexu + interakce s dalšími proteiny/komplexy)



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

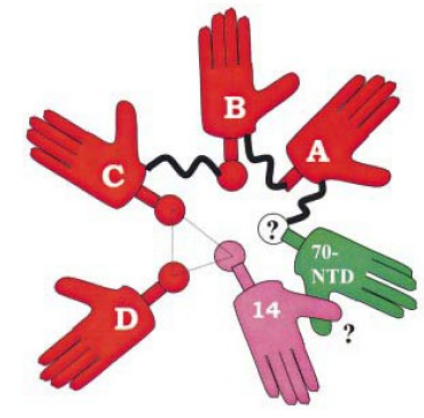
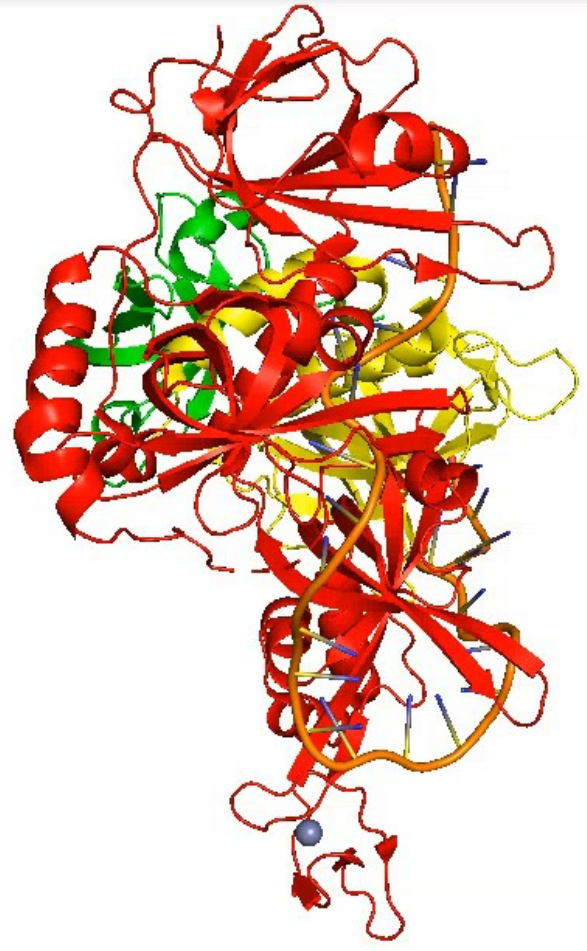


RPA32N RPA32



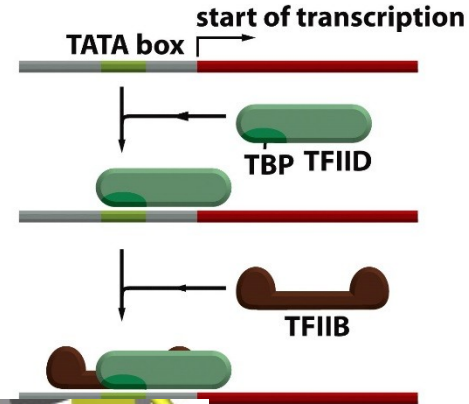
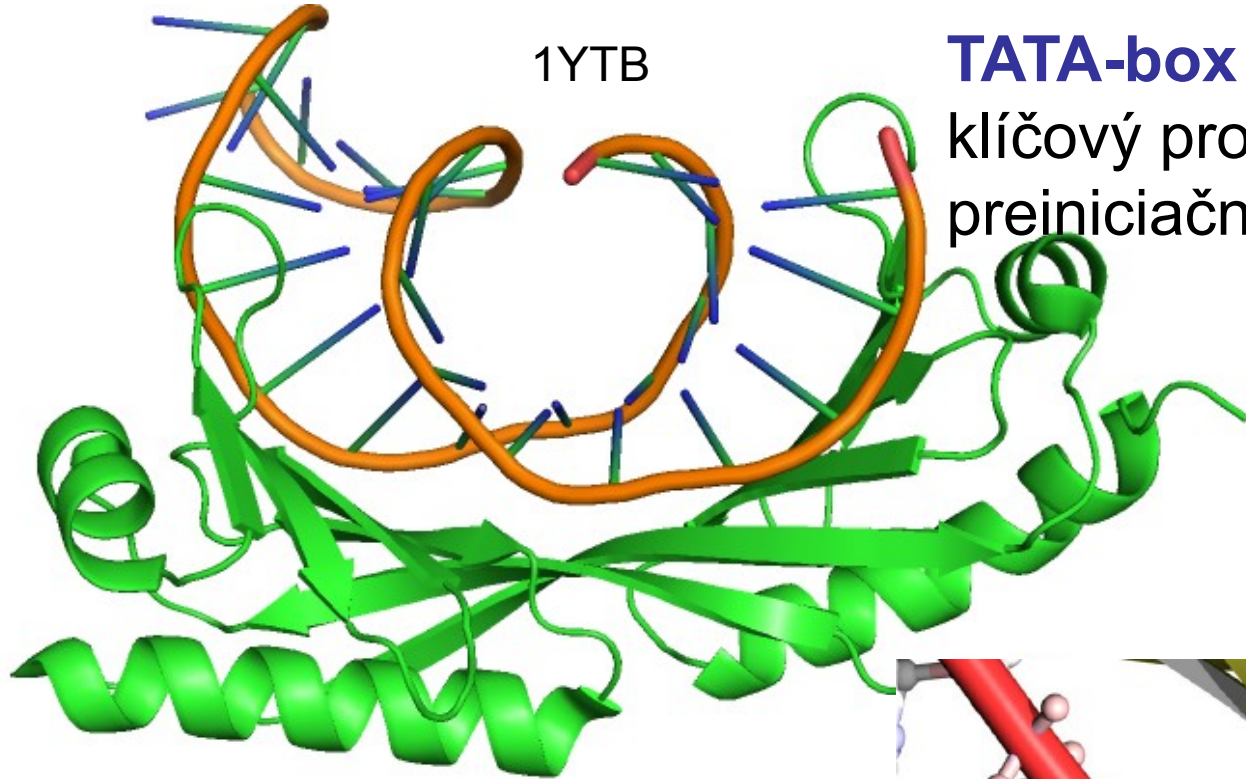
- protein-proteinové interakce (integrita komplexu)
- celý komplex ~30nt

RPA komplex
ssDNA: 4GNX

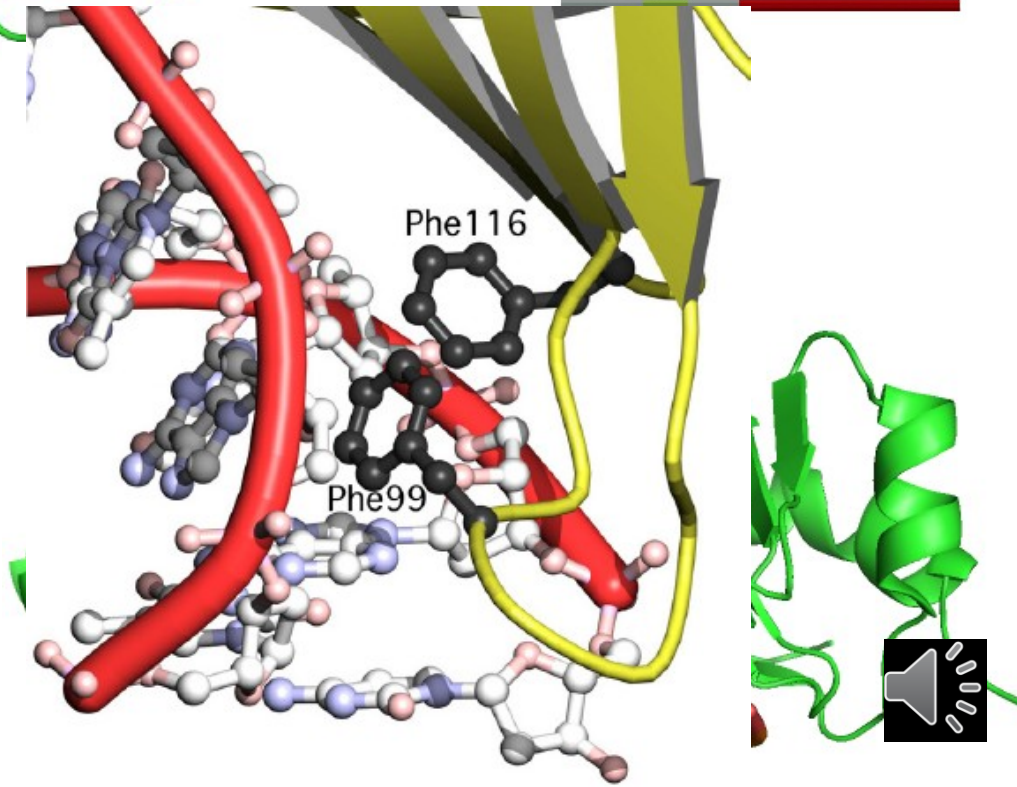


1YTB

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)



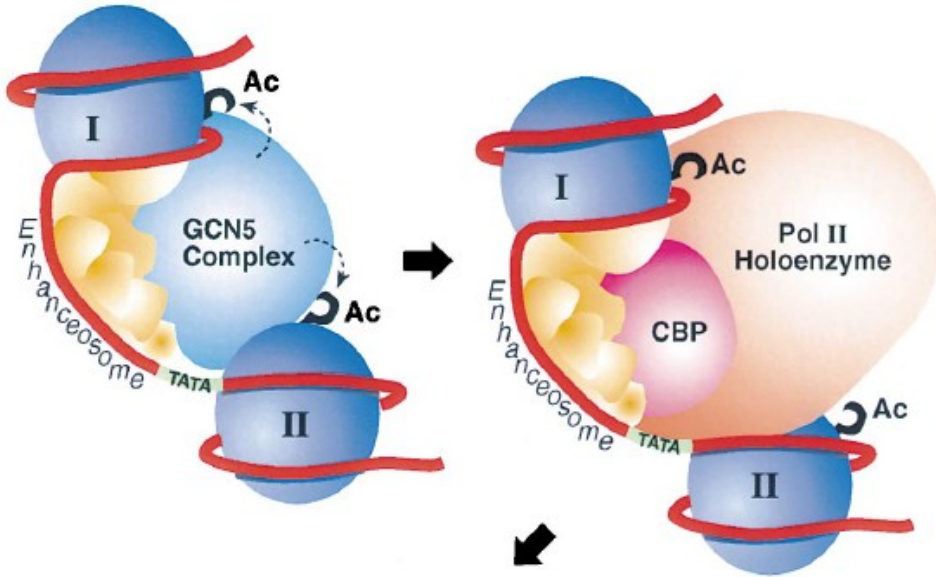
TBP a TFIIA (β -barrel TFIIA – neovlivní DNA strukturu)

PDB:
1NH2

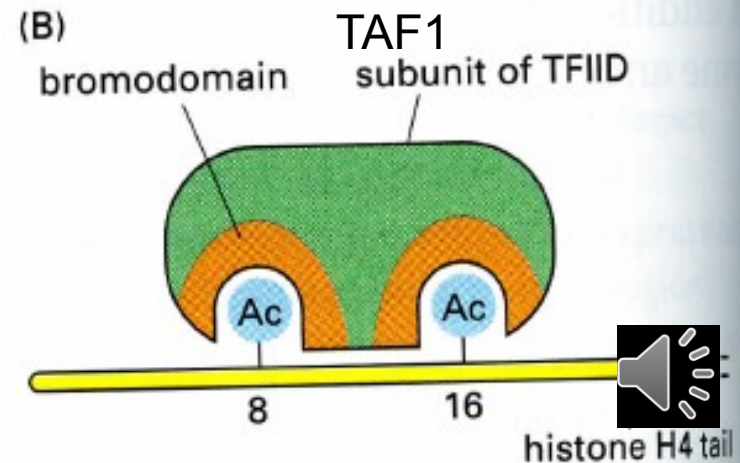
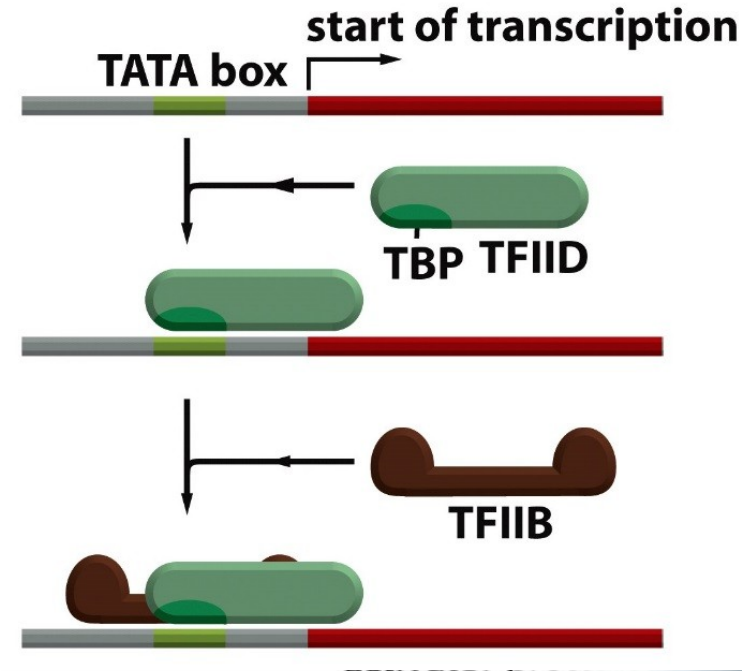


Transkripce

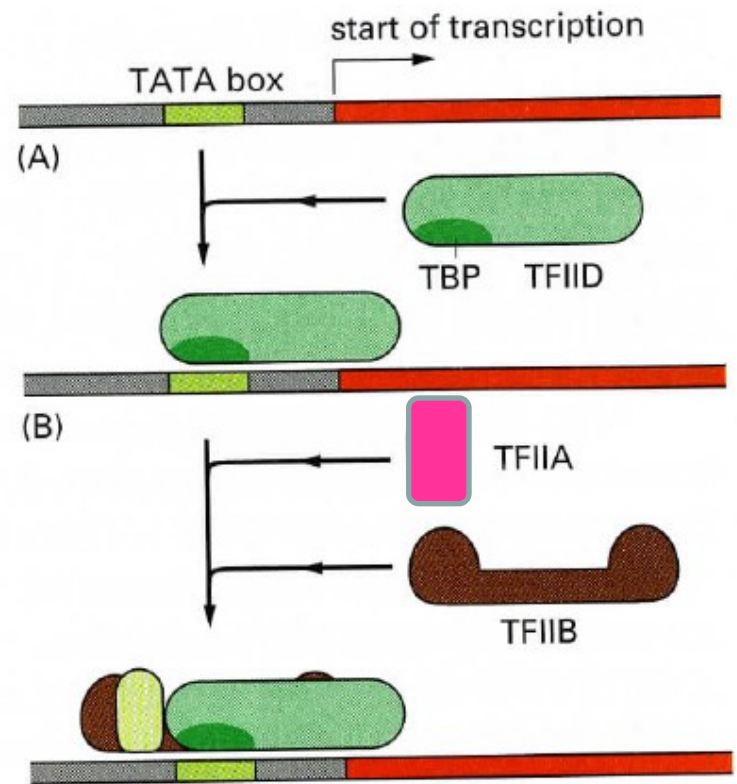
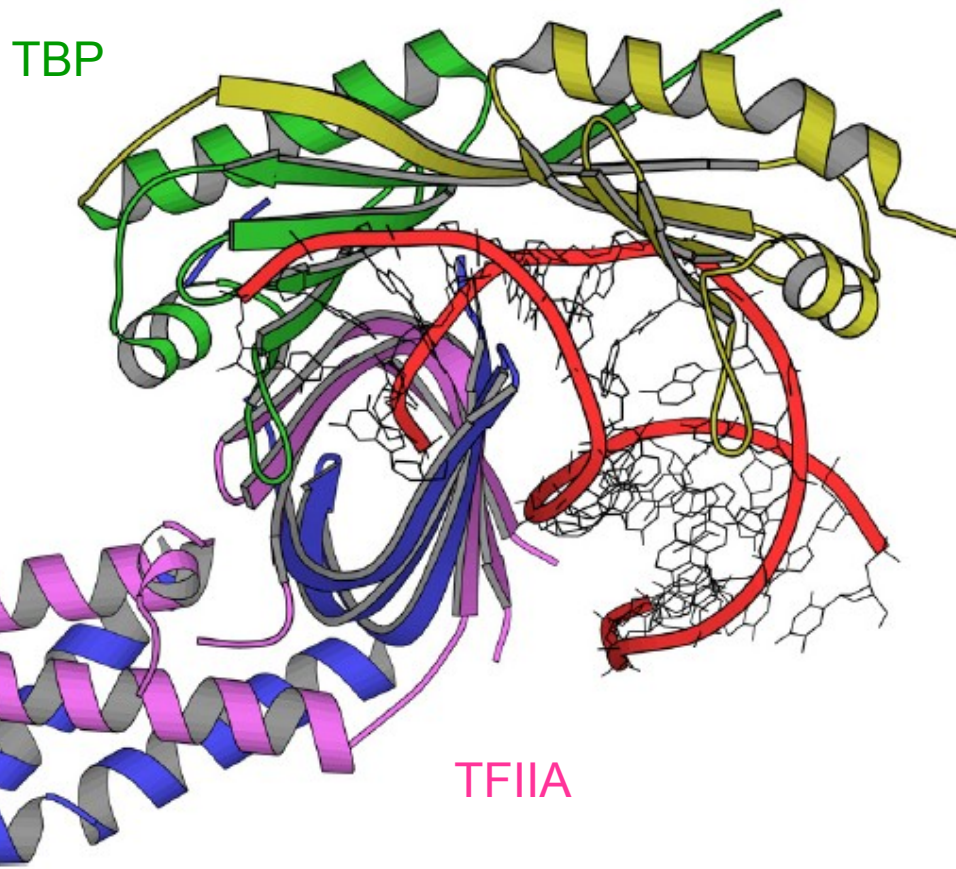
- Aktivace – specifické TF
- Iniclace – základní TF



- aktivace (viz enhanceosom) – modulace chromatinu – iniclace (sestavení PIC)

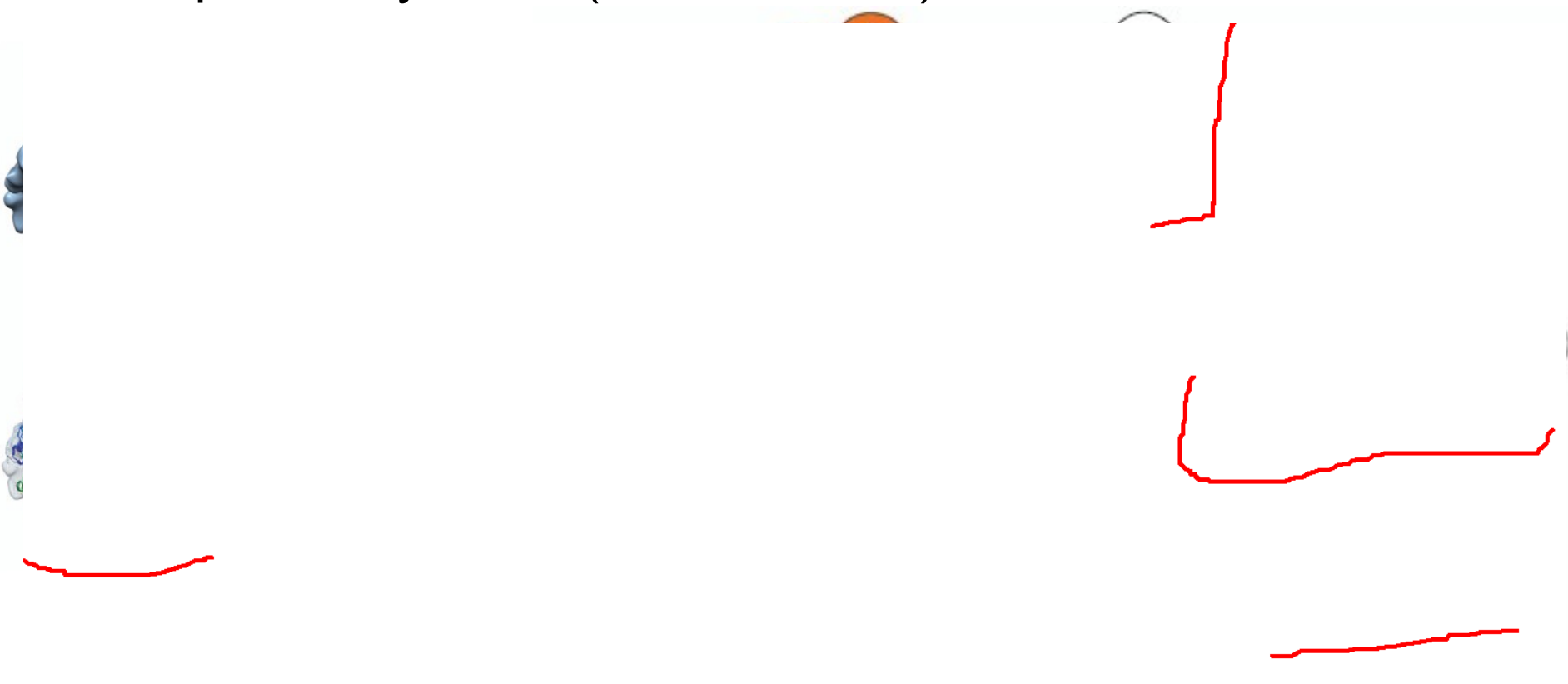


- TBP (v rámci TFIID) nastavuje začátek transkripce na molekule DNA (zajišťuje správnou pozici TFIID)

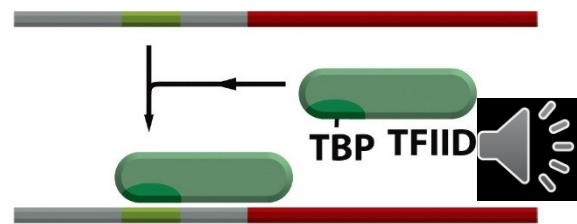


- TFIID (1MDa, TAFs) komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému (nukleace PIC)

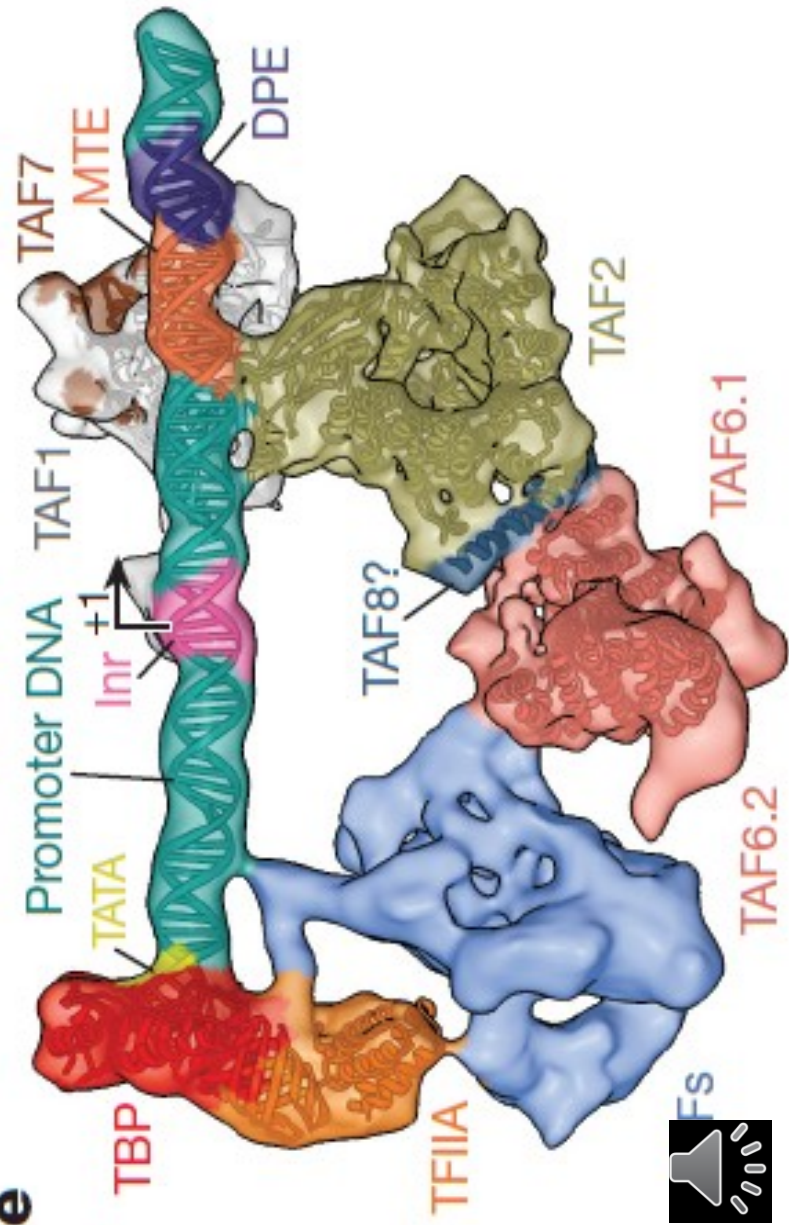
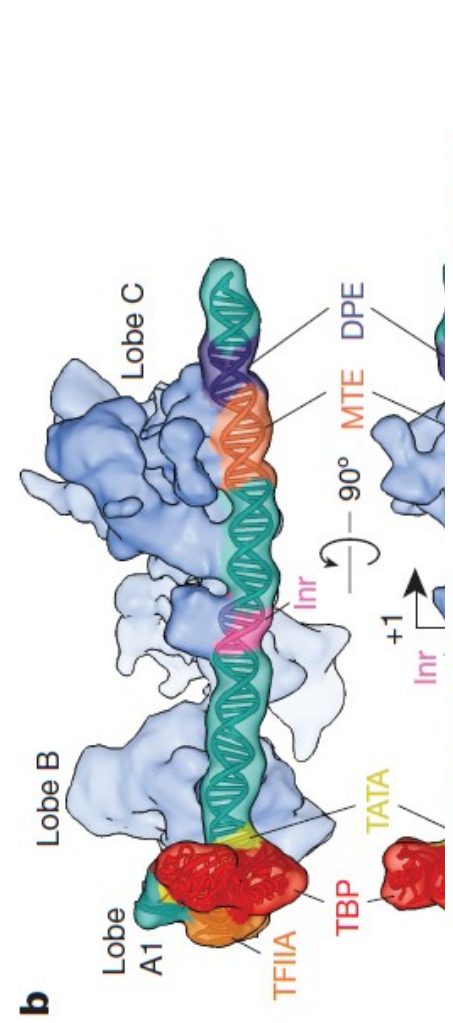
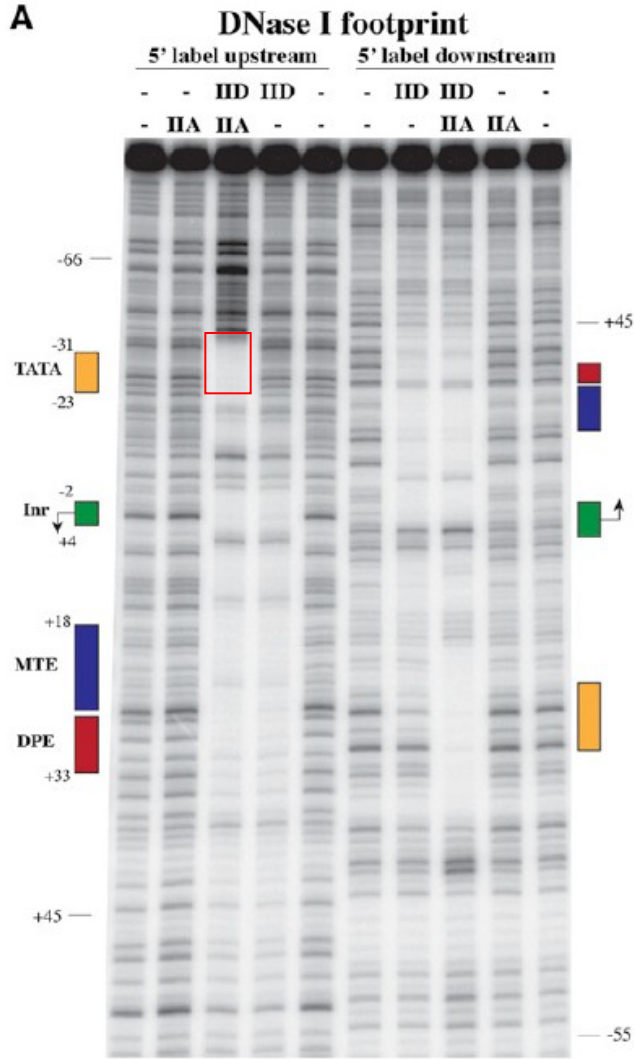
Bieniossek et al., Nature, 2013



podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční (asymetrický) holokomplex (PIC)



- footprint analýza ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)

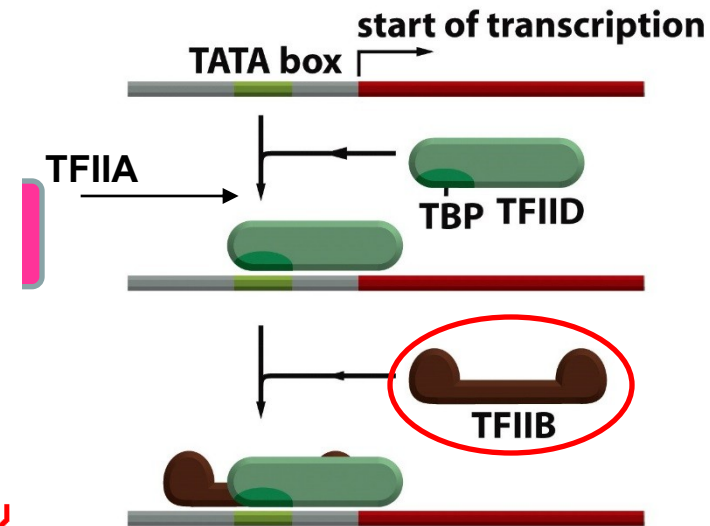
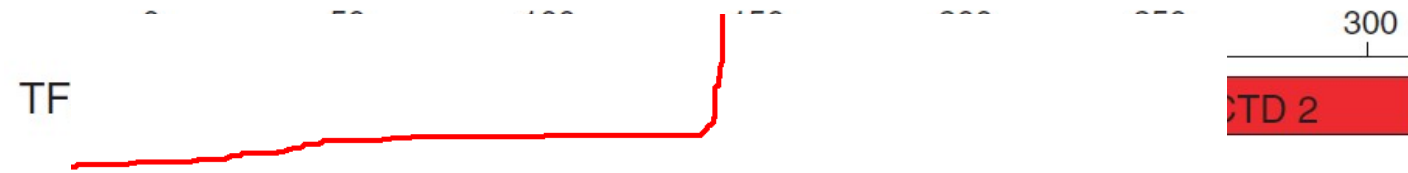


Cianfrocco et al, Cell, 2013

Louder et al, Nature, 2016



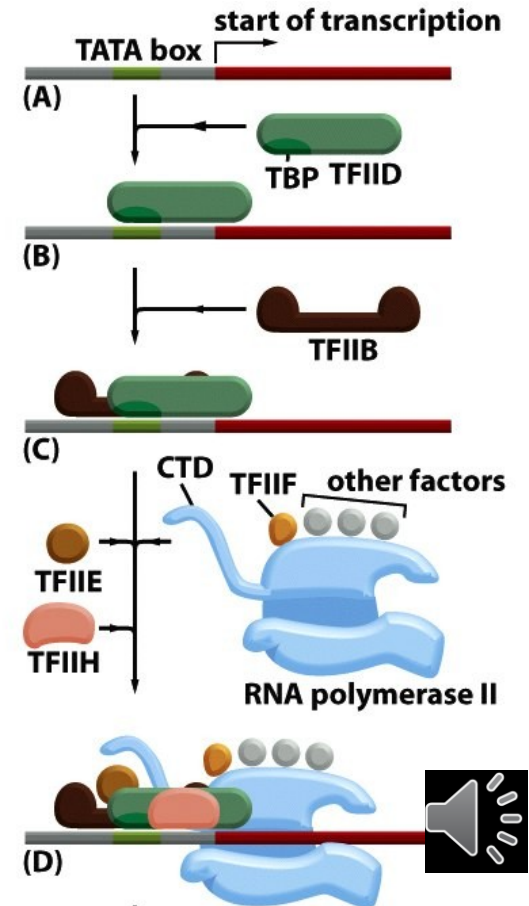
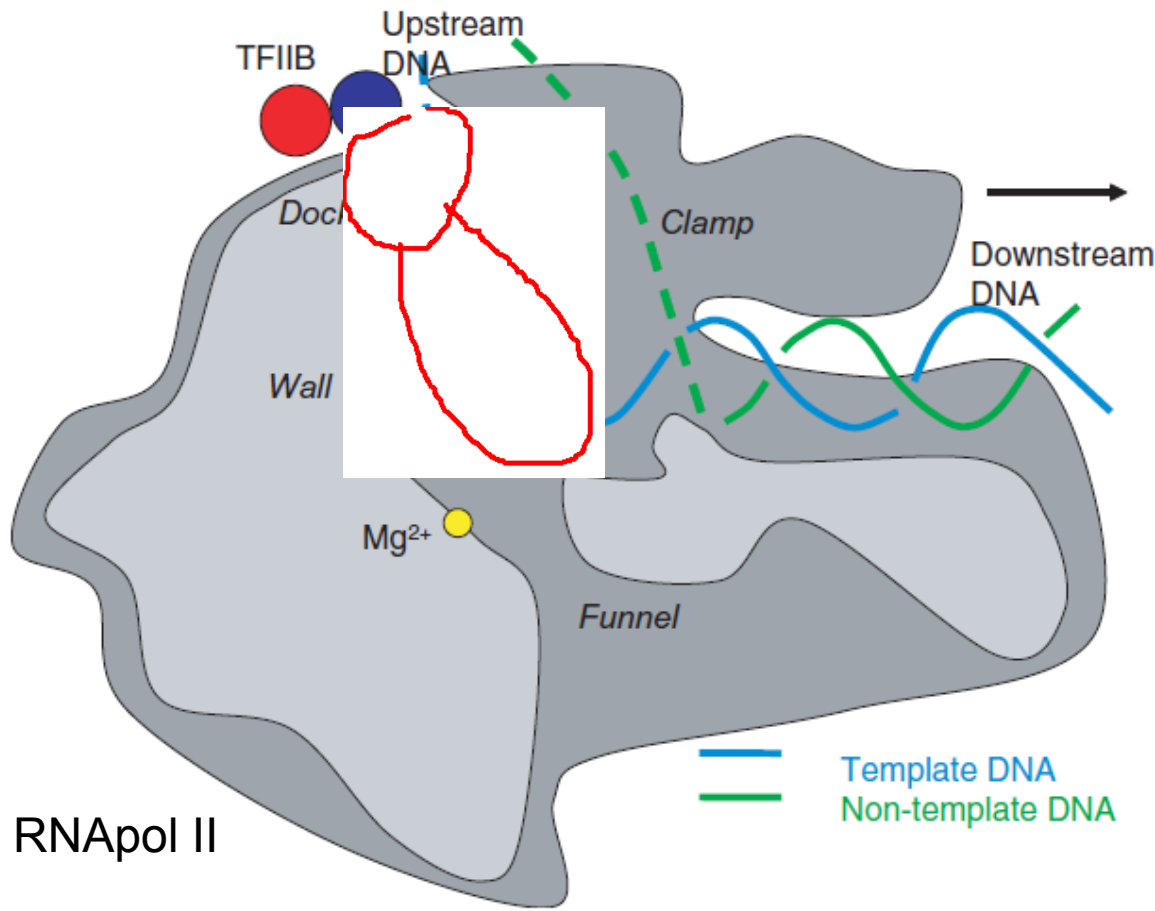
pro další postup transkripce je klíčový TFIIB – propojuje TFIID-TFIIA s RNApol II



- TFIIB (C-konec = CTD1 a CTD2) váže TBP a 6-7bp up- a downstream od ohybu DNA přes cukrfofátovou kostru (blízko TATA boxu)



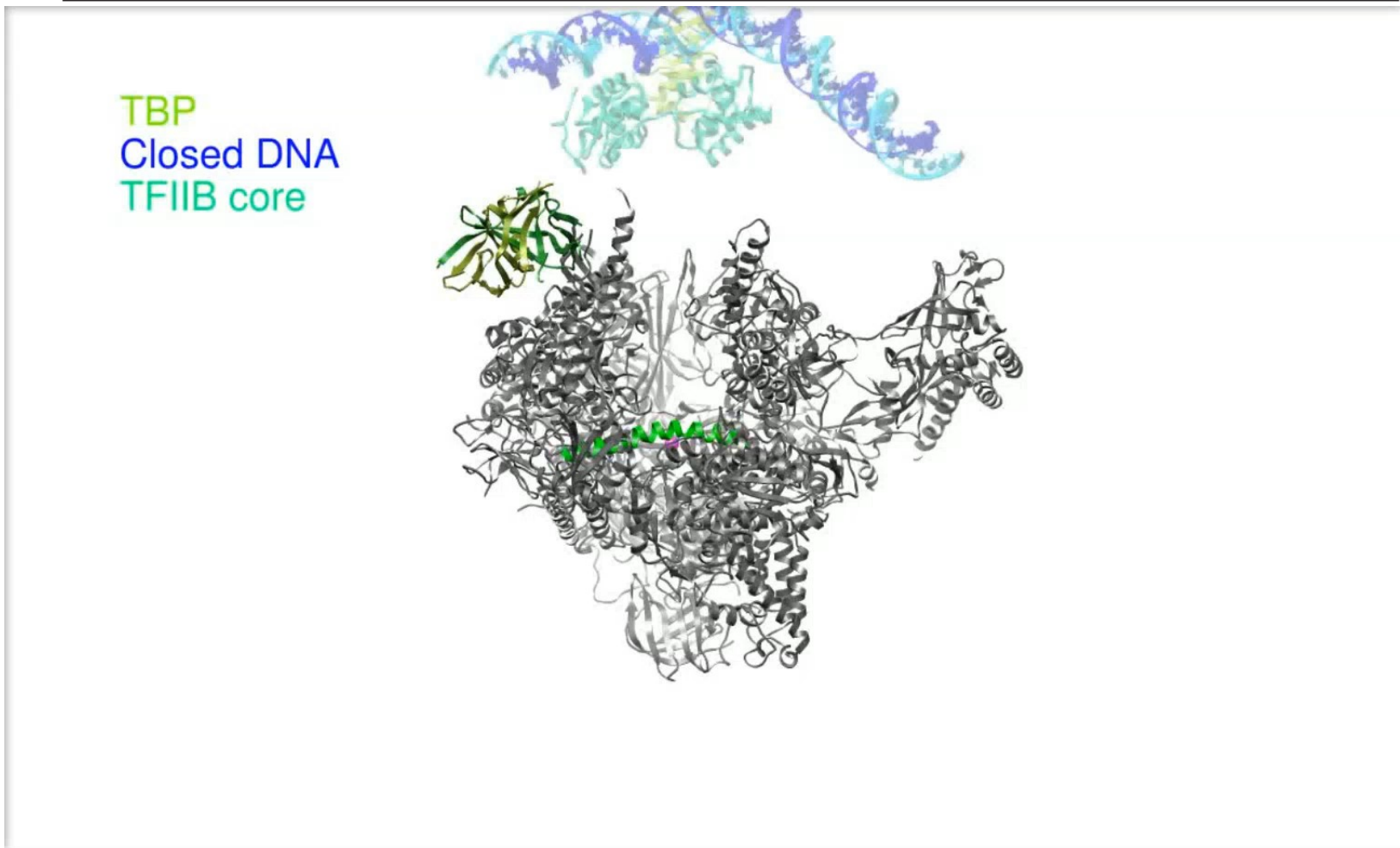
- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje ji vůči TFIID/TBP-DNA komplexu
- umístí DNA do aktivního centra/cleft RNA polymerázy
- vazba Zn-ribbon na Dock, B-finger/reader do RNA tunelu



- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje ji vůči TFIID/TBP-DNA komplexu
- umístí DNA do aktivního centra/cleft RNA polymerázy
- vazba Zn-ribbon na Dock, B-finger/reader do RNA tunelu

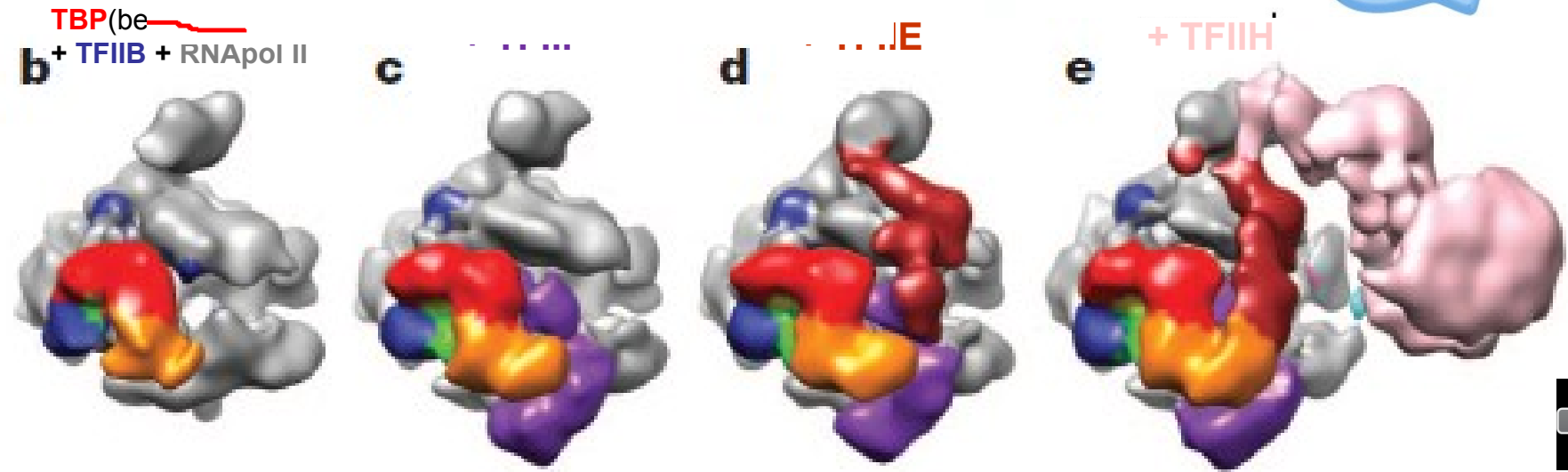
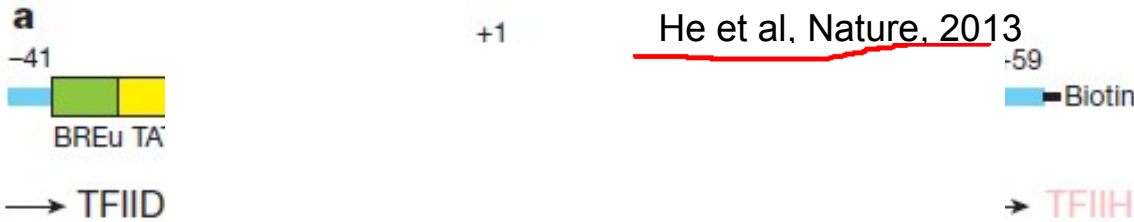
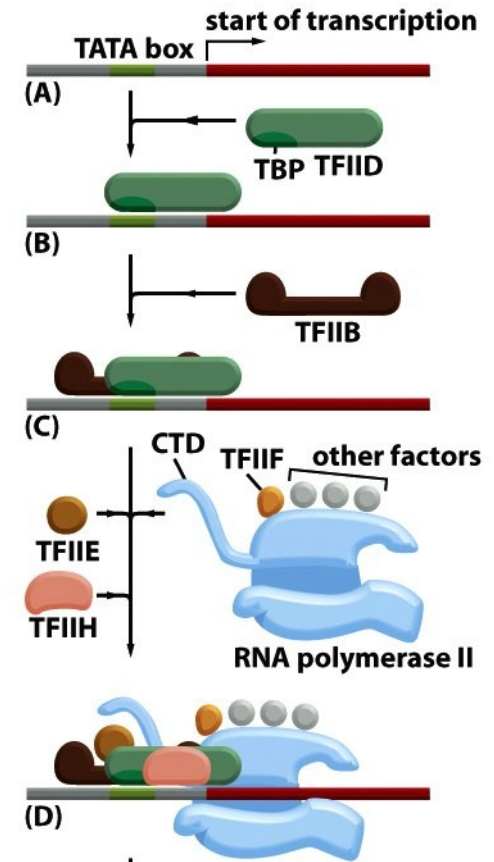
TFIIB

Zinc ribbon	B finger	Linker	CTD 1	CTD 2
-------------	----------	--------	-------	-------

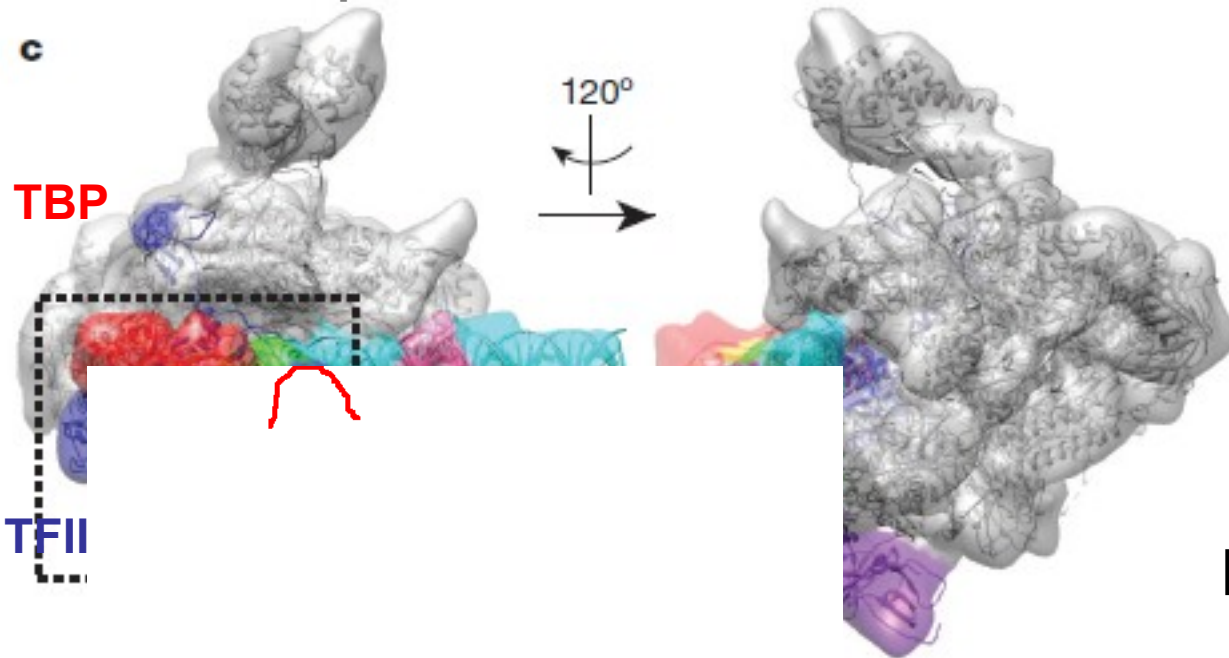


Rekonstrukce celého PIC

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



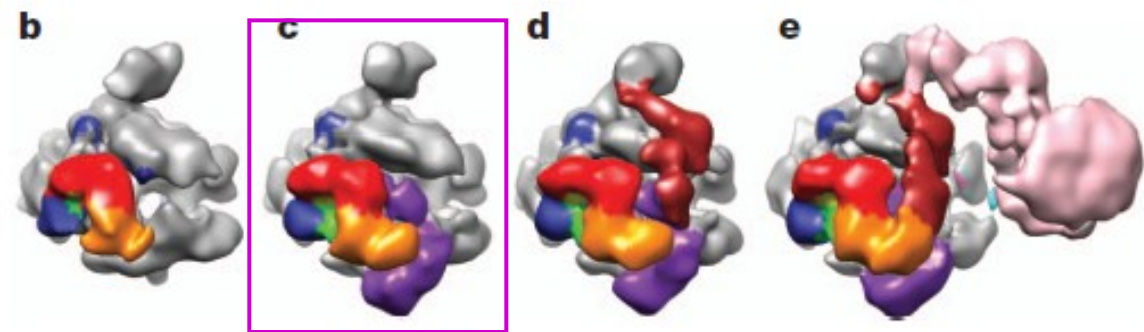
RNA pol II

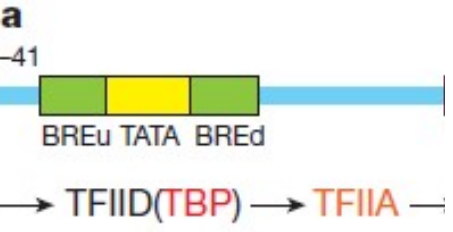
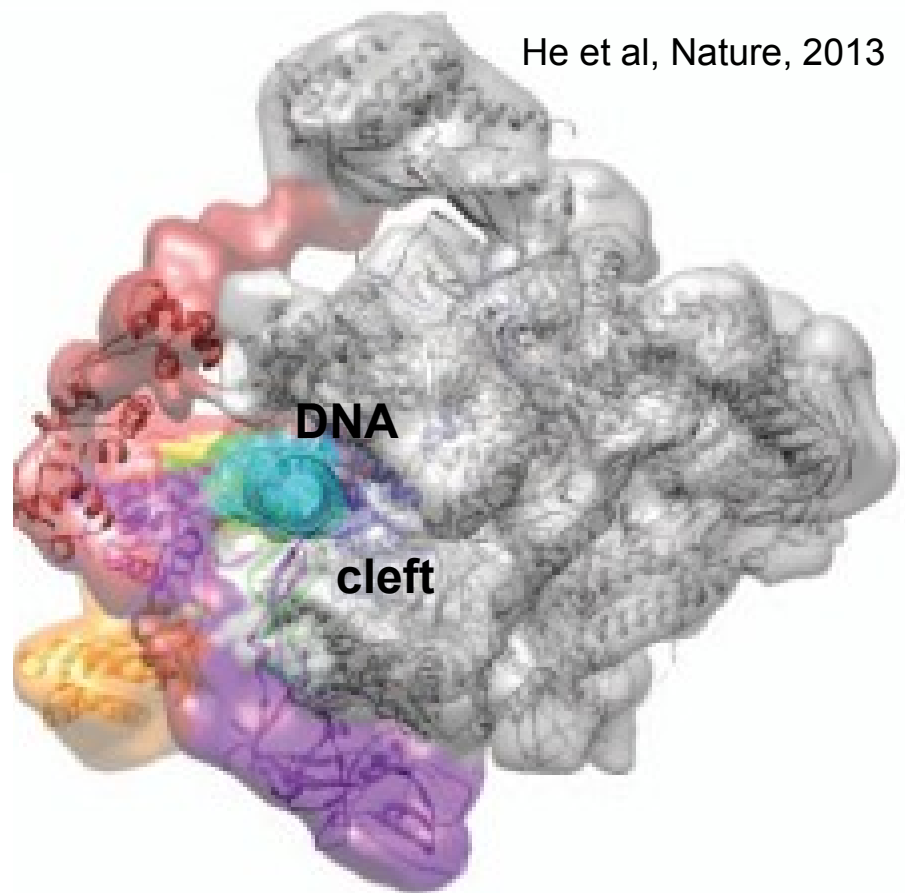
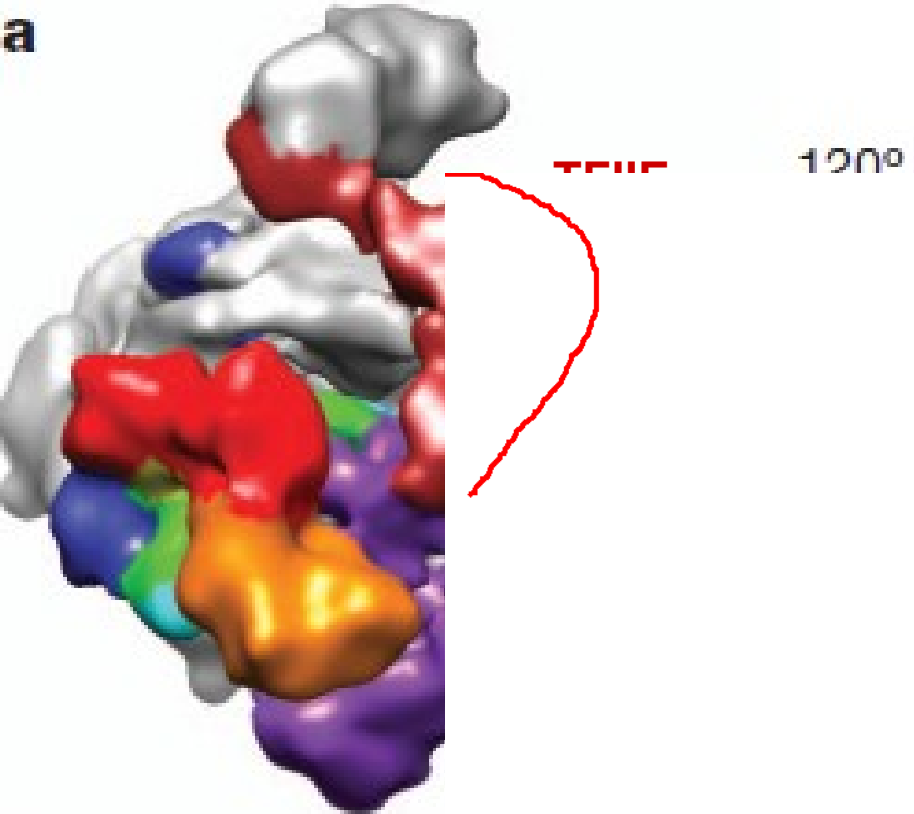


- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})

- váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu

et al, Nature, 2013



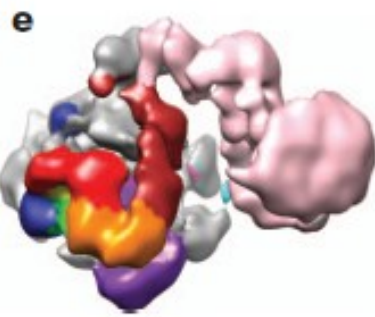
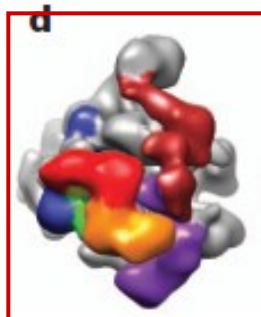
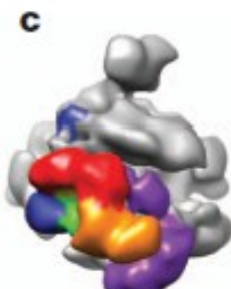
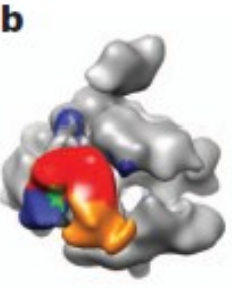


— Biotin

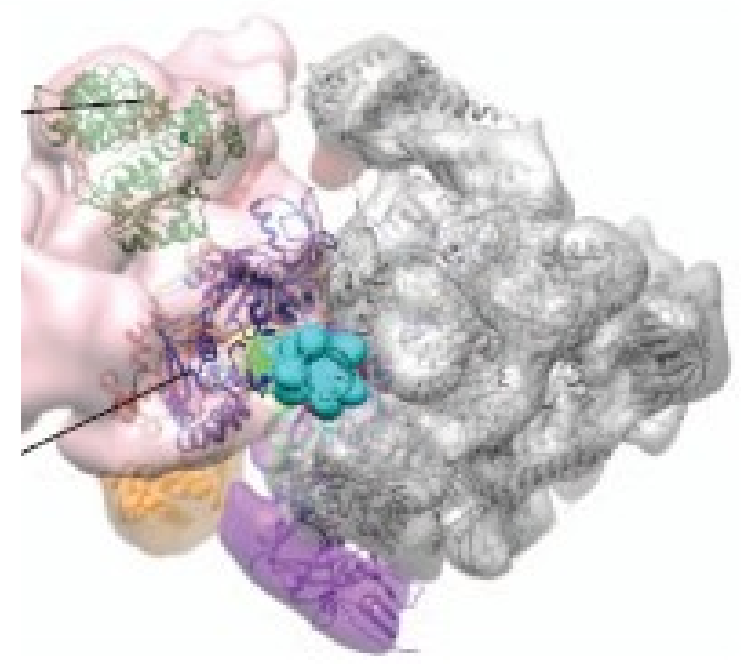
→ TFIIF

- TFIIF váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu

- tandem 4x WHD uzamyká DNA v RNAPol II prohlubni



a



opravu DNA (NER)

lidský PIC komplex
He et al, Nature, 2013

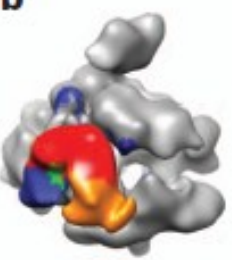
a

-41

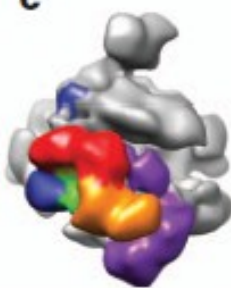


→ TFII

b



c



d



e



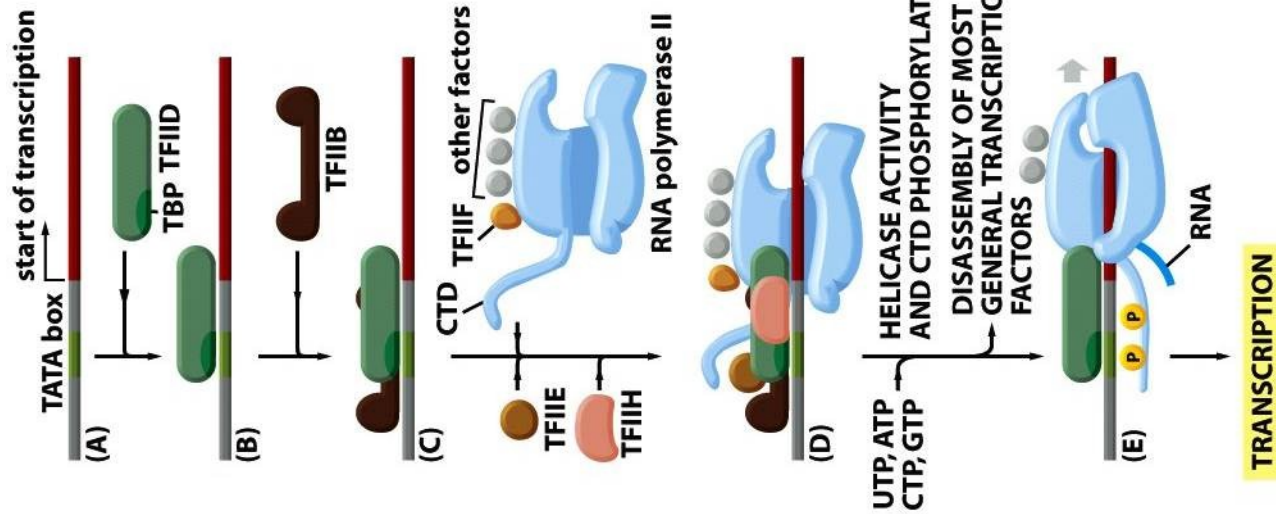
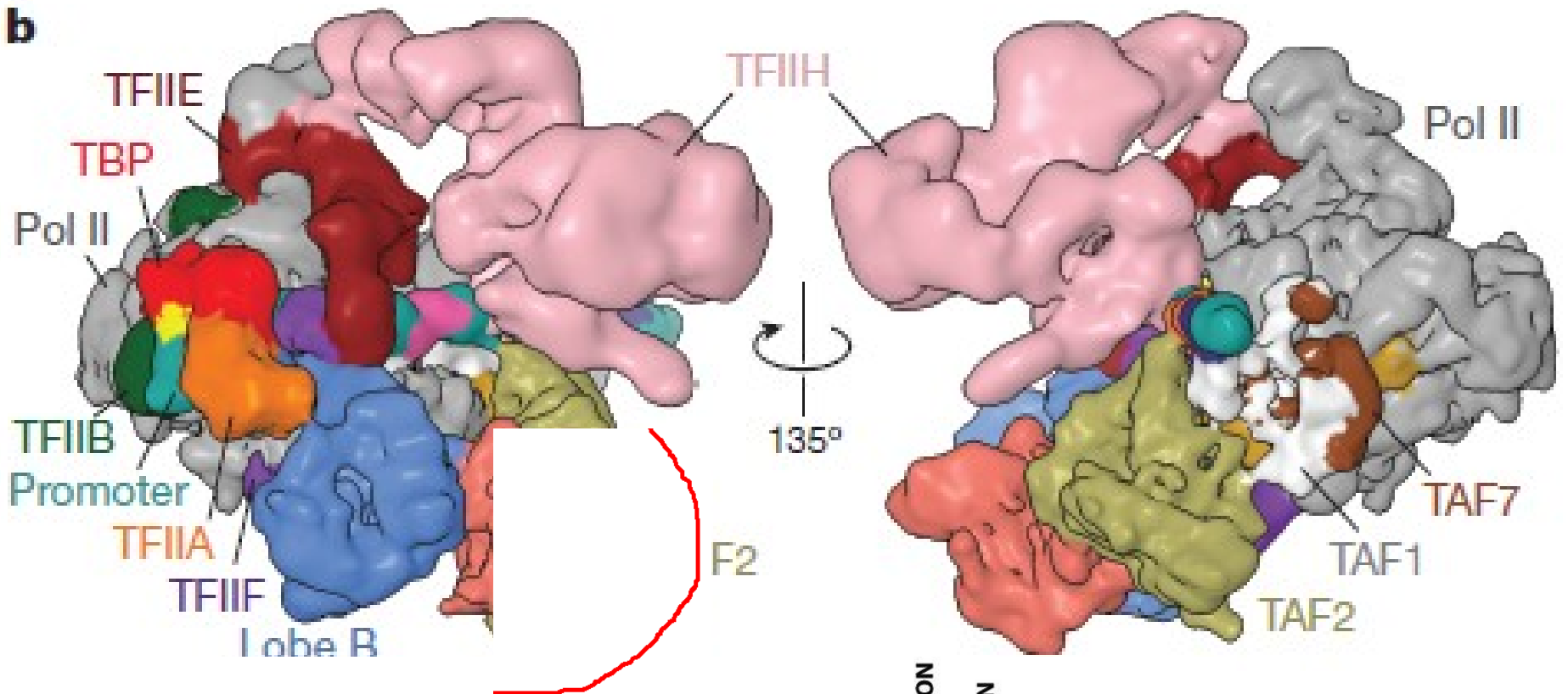
- **TFIIH** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)
- XPB v kontaktu s D
- rozvíjí dvoušroubovici

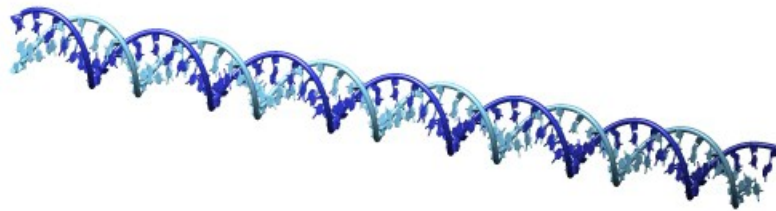


Kompletní PIC i s částí TFIID

Louder et al, Nature, 2016

b





Plaschke et al, Nature, 2016

<https://www.mpibpc.mpg.de/15370105/initiation.mp4>

TBP(bez TFIIID) + **TFIIA**
+ **TFIIB** + RNAPol II
+ **TFIIF** + **TFIIE**



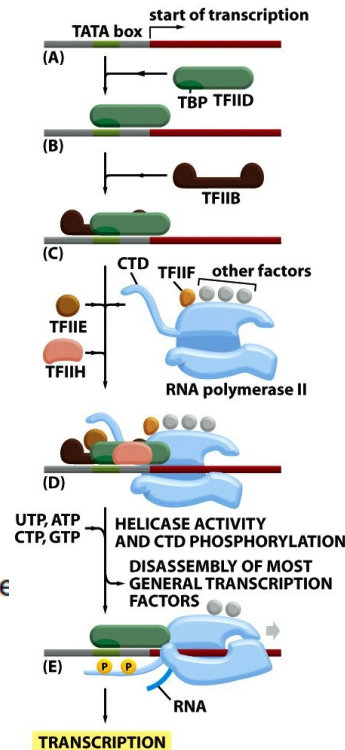
začátek transkripce - faktory

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

Dr. Šebesta

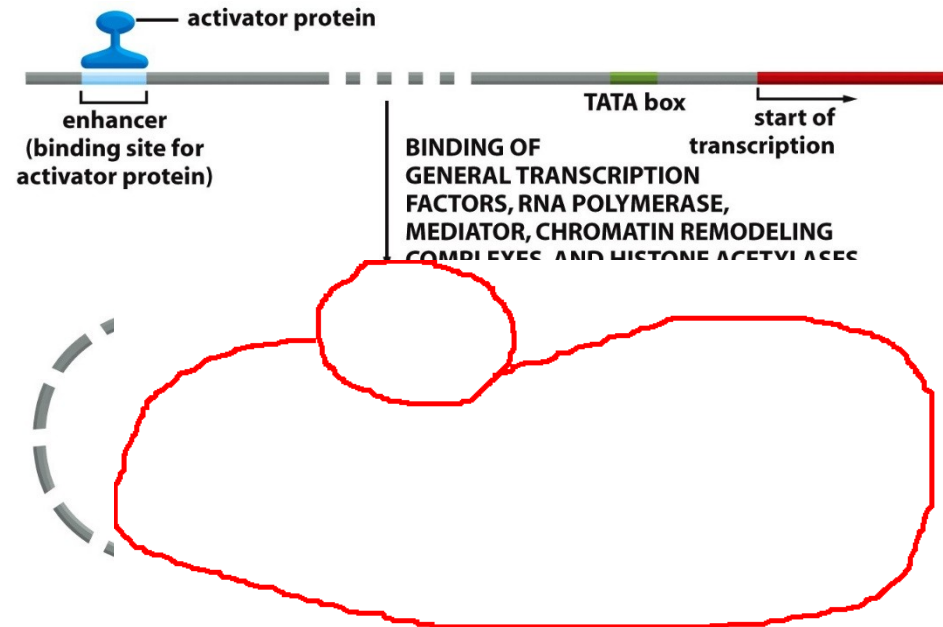
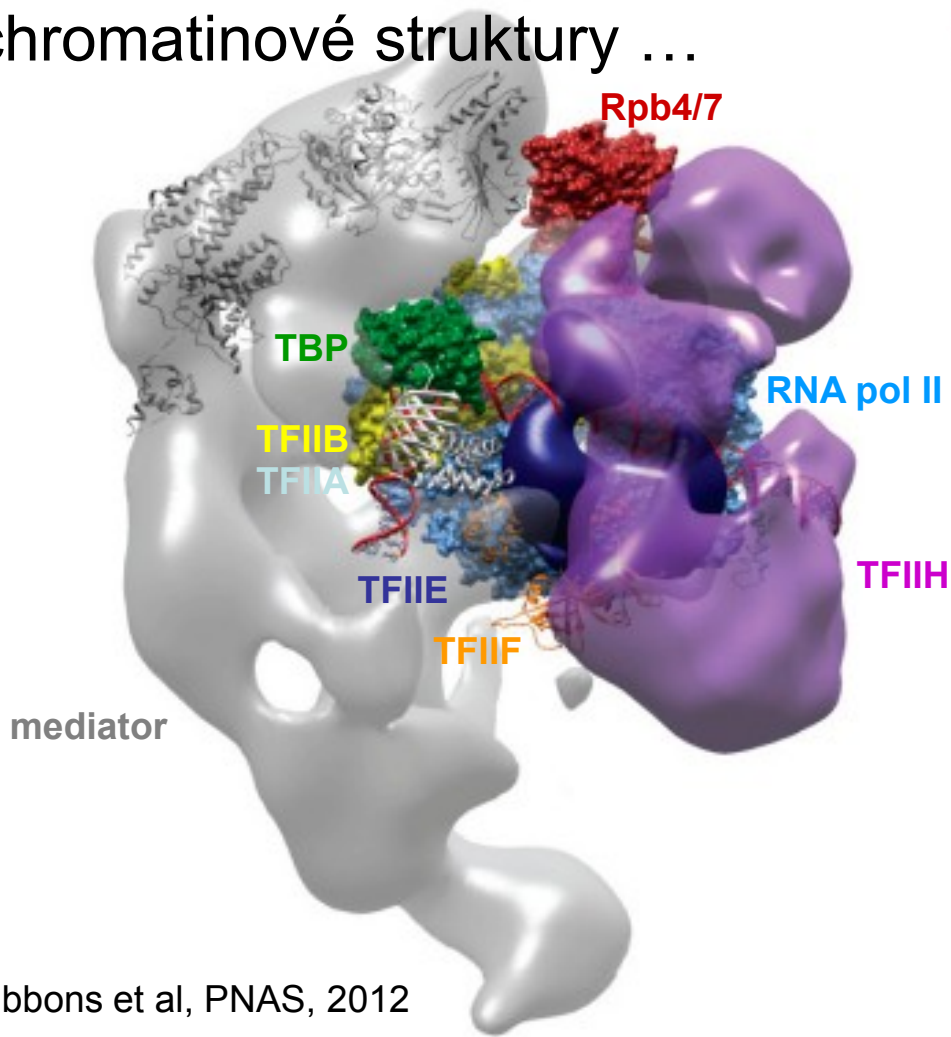
Dr. Blažek



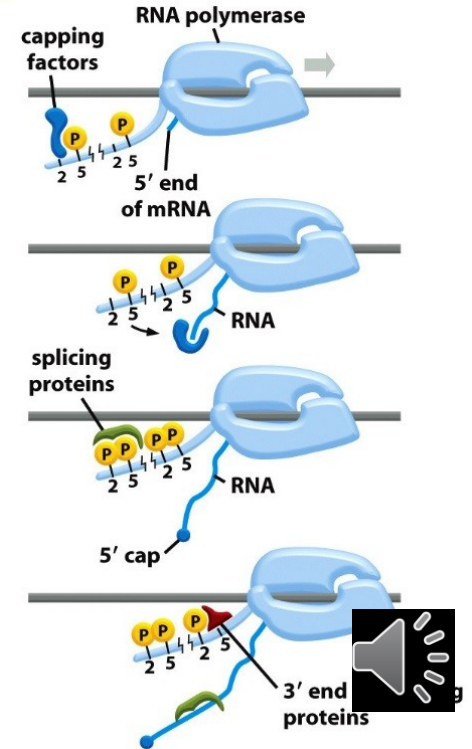
RPB1 CTD (heptapeptide YSPTSPS repeat) fosforylace



- mechanismus aktivace transkripce zahrnuje vazbu transkripčních aktivátorů, mediátoru (vytvoření transkripční smyčky) ... uvolnění chromatinové struktury ...



TRANSCRIPTION BEGINS



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

