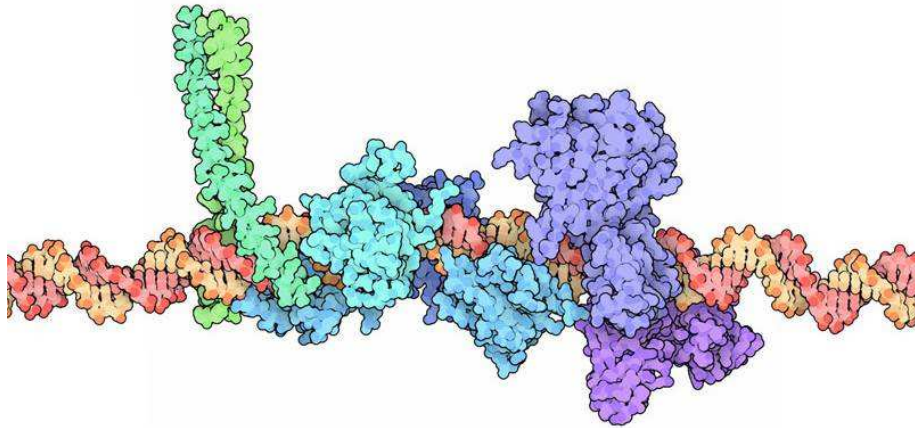
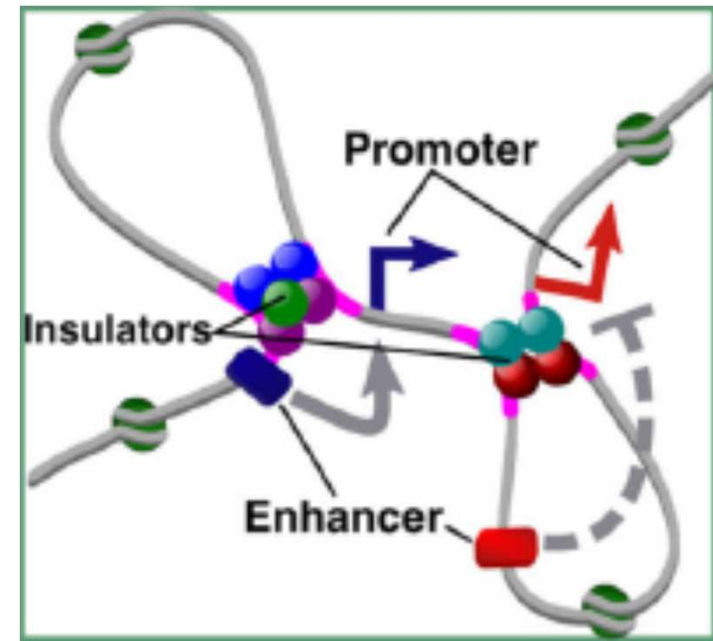
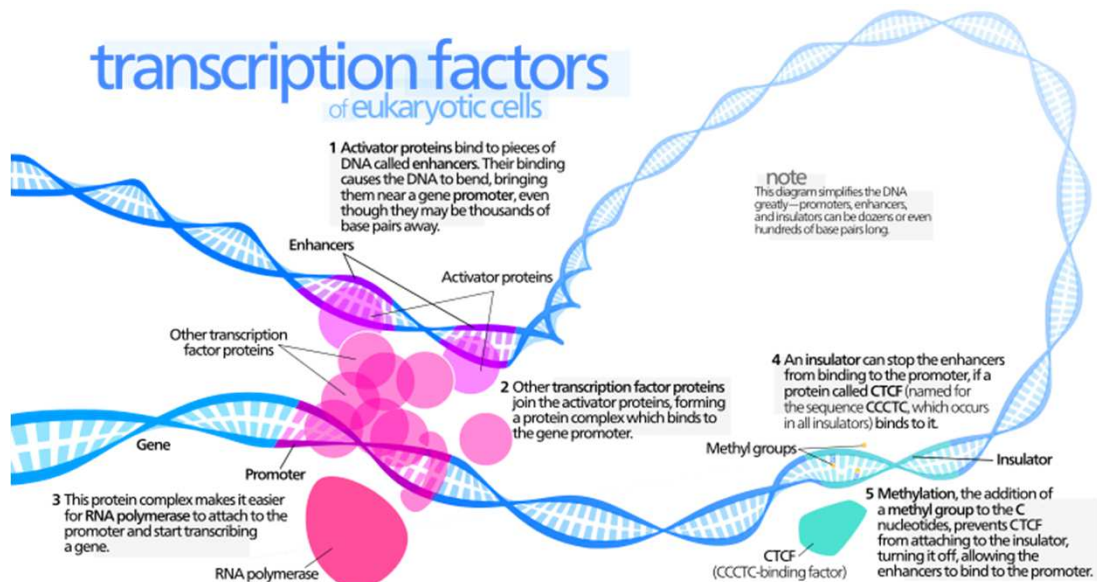


Komplexy spojené s transkripcí

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

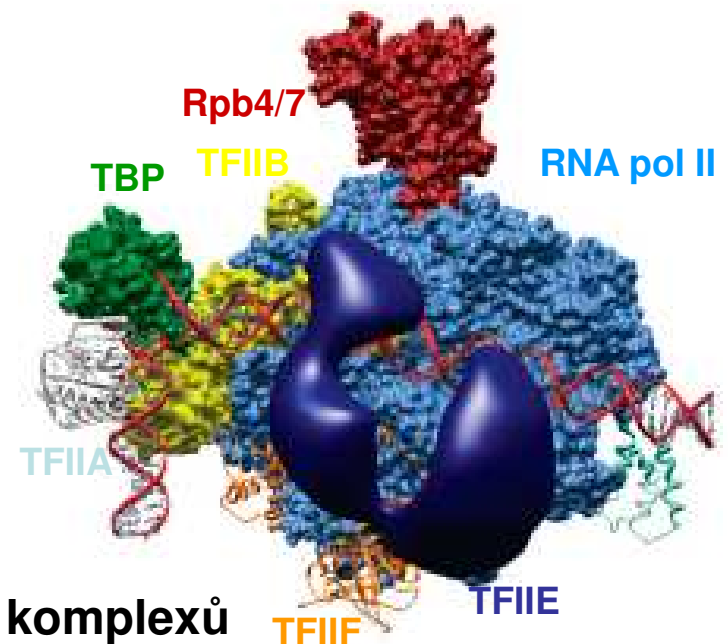
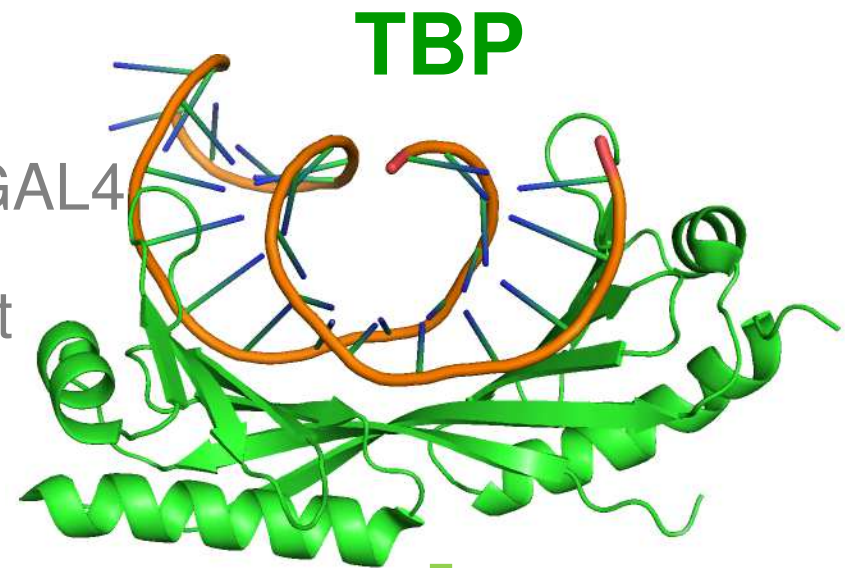


- velký žlábek DNA má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- nejčastěji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)



- Zipper typ – Jun-Fos
- Helix-turn-helix – H1, TALEN
- Zinkový prst – genome editing, GAL4

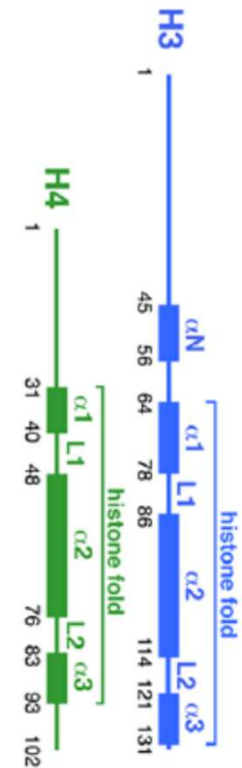
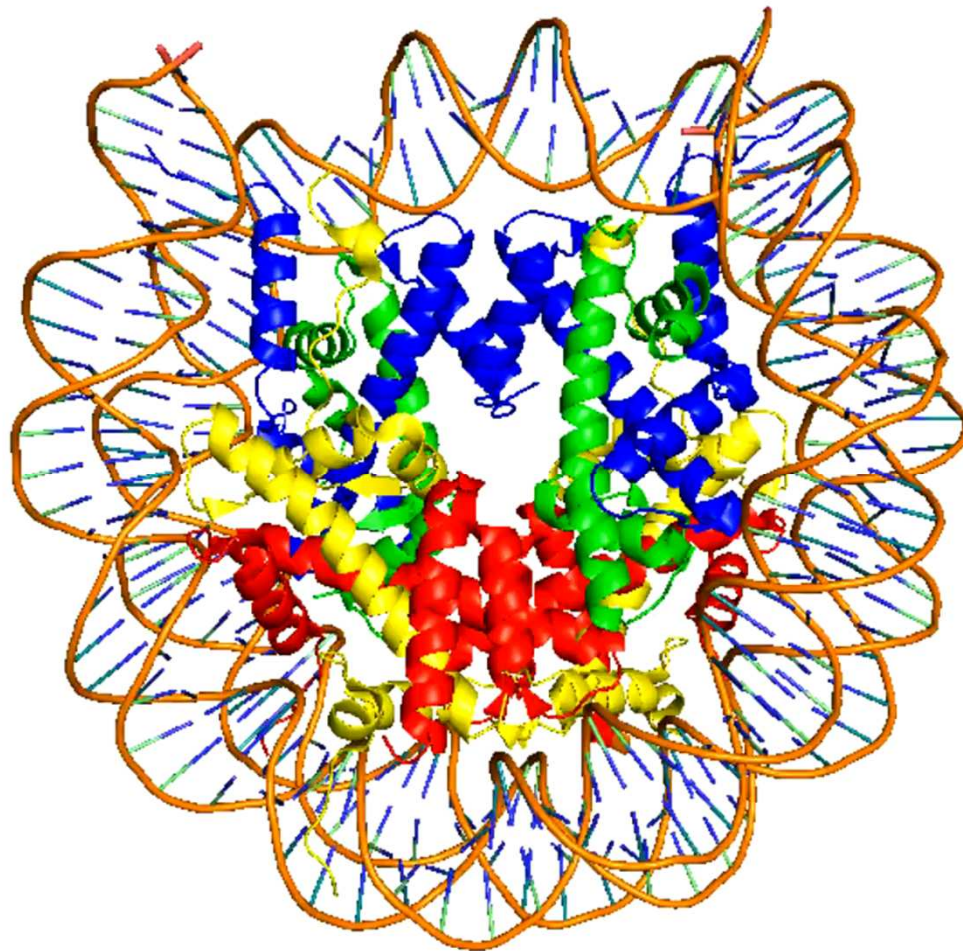
- Velký žlábek DNA má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- Nejčastěji interaguje **Arg** (pozitivní náboj + vodíkové vazby)



- **Histon, HMG-box**
- β -barrel
- β -hairpin/ribbon
- Smíšené α/β

Průběh transkripce → enhanceosom → skládání komplexů

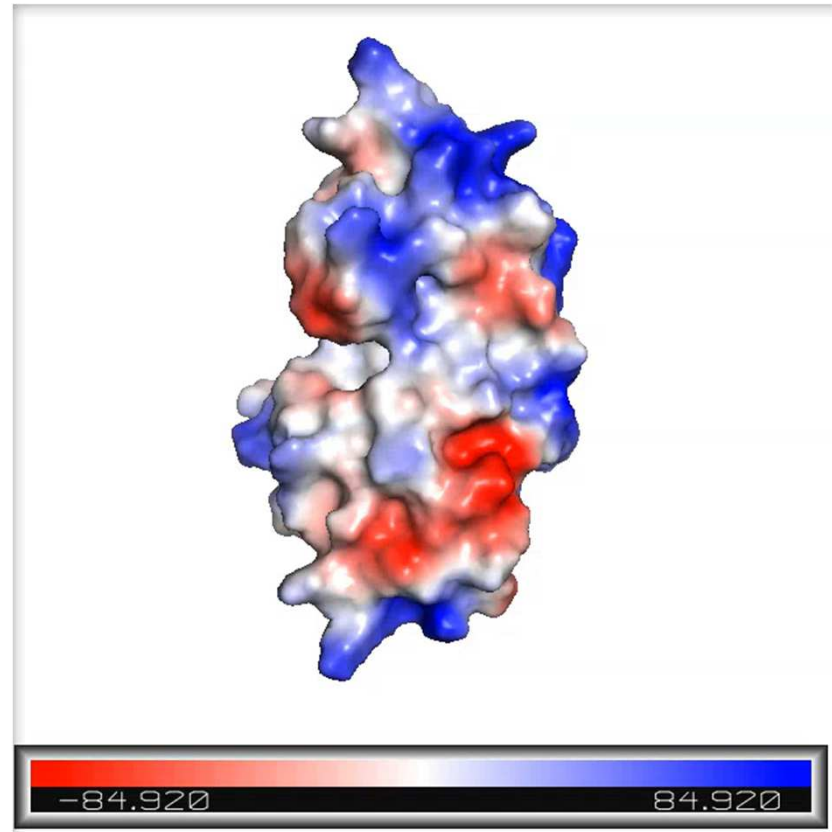
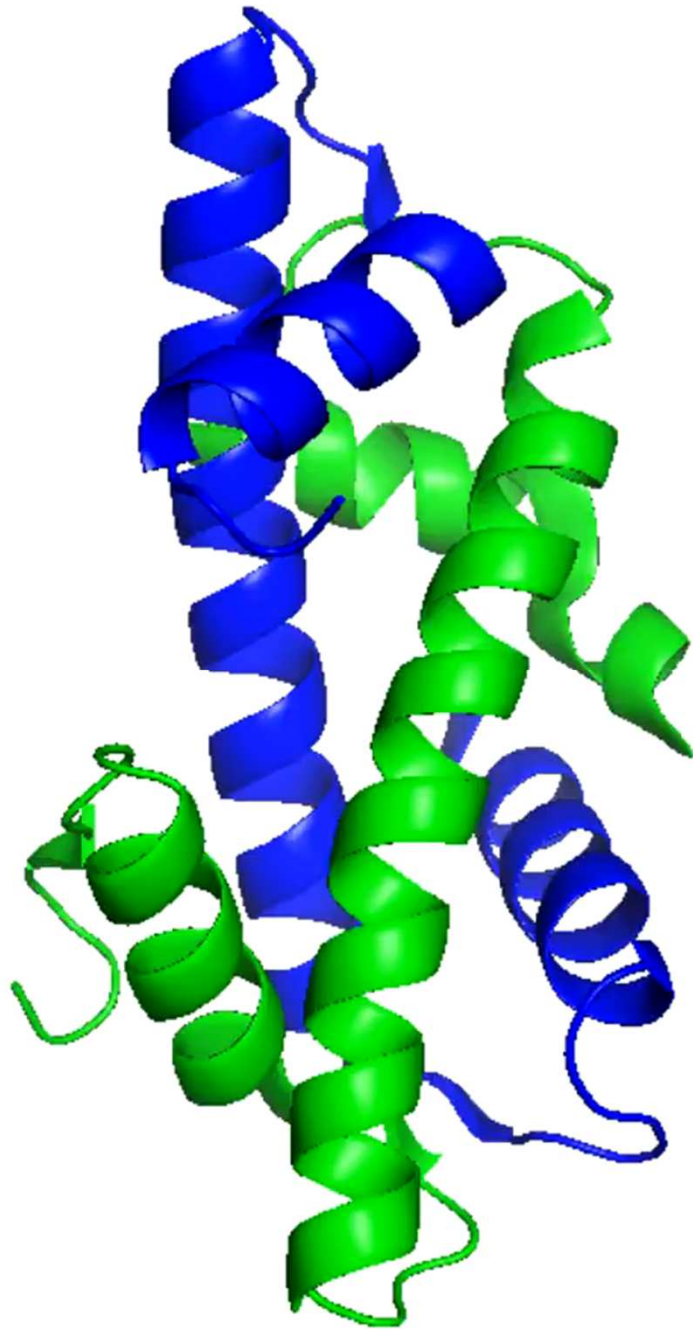
- **histony** vážou DNA sekvenčně nespecificky
- histonové podjednotky (**H2A**, **H2B**, **H3**, **H4**) obsahují svazky 3-4 šroubovic skládaných proti sobě (**histon fold**)
- DNA se obtáčí kolem válcovitého oktameru (2x4 histony)
- šroubovice se vážou na cukrfosfátovou kostru DNA



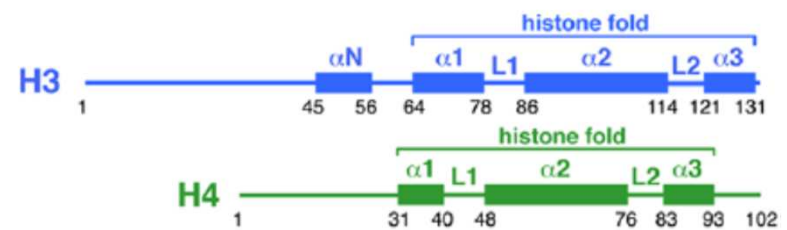
PDB: 3AFA

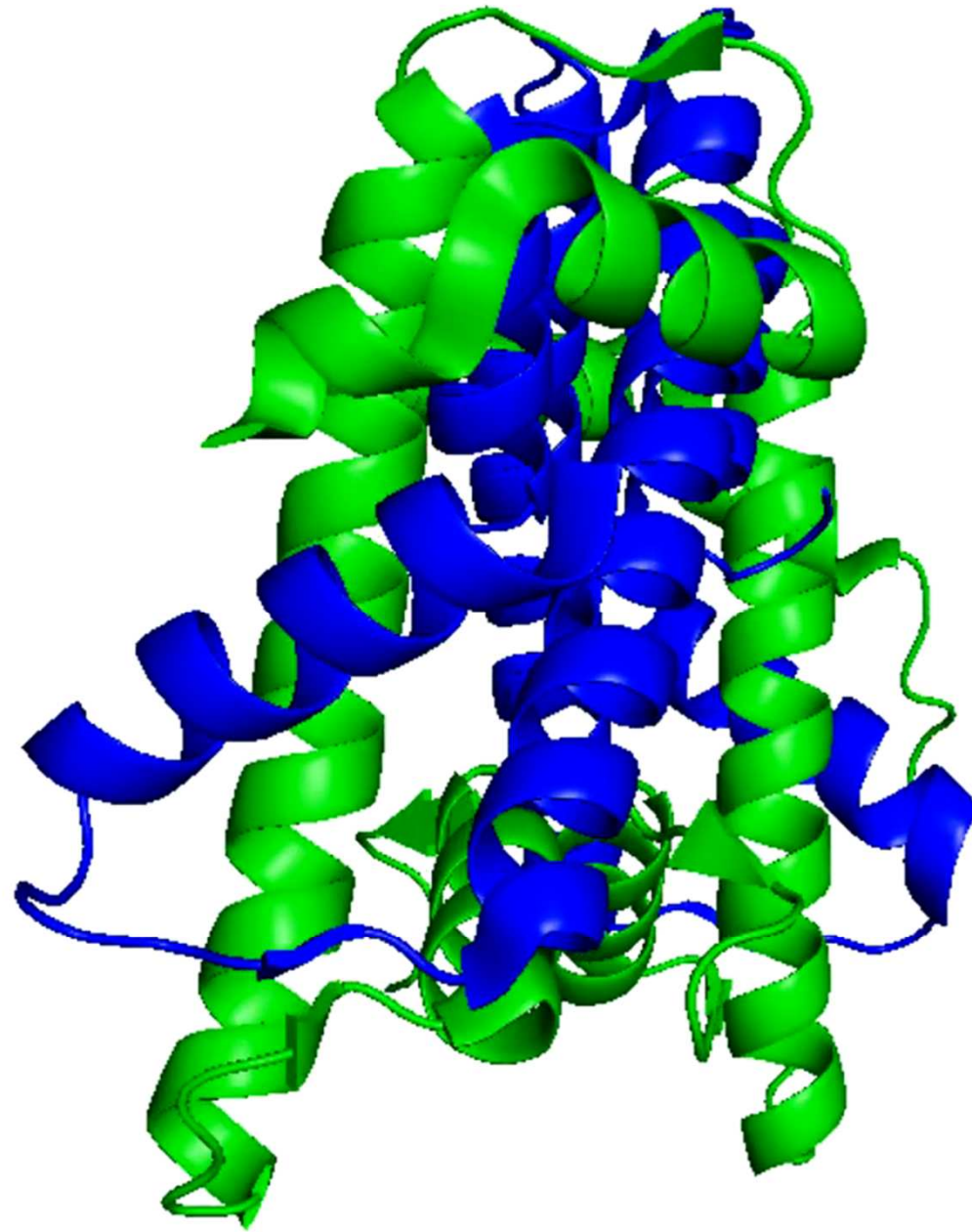
Histon fold

H3-H4 dimer

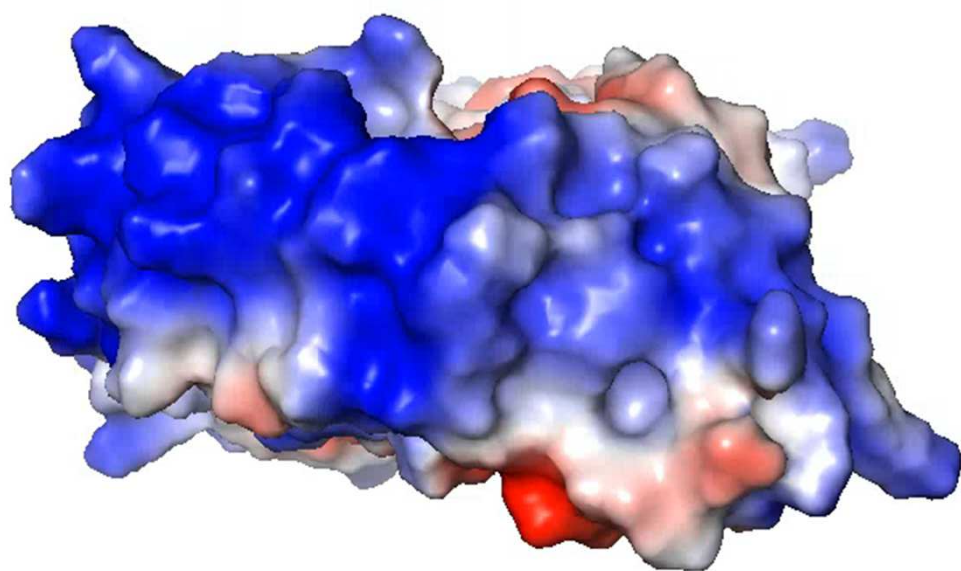


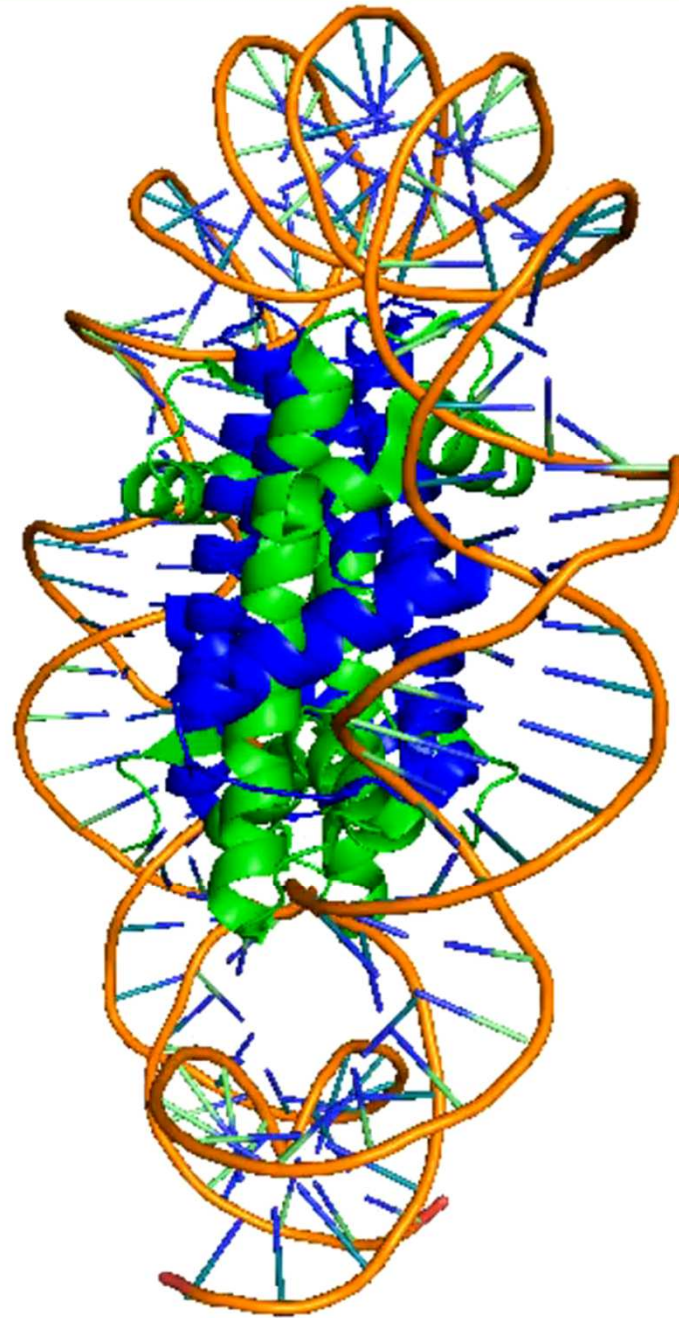
Povrch/kontakt tvoří lysiny a argininy



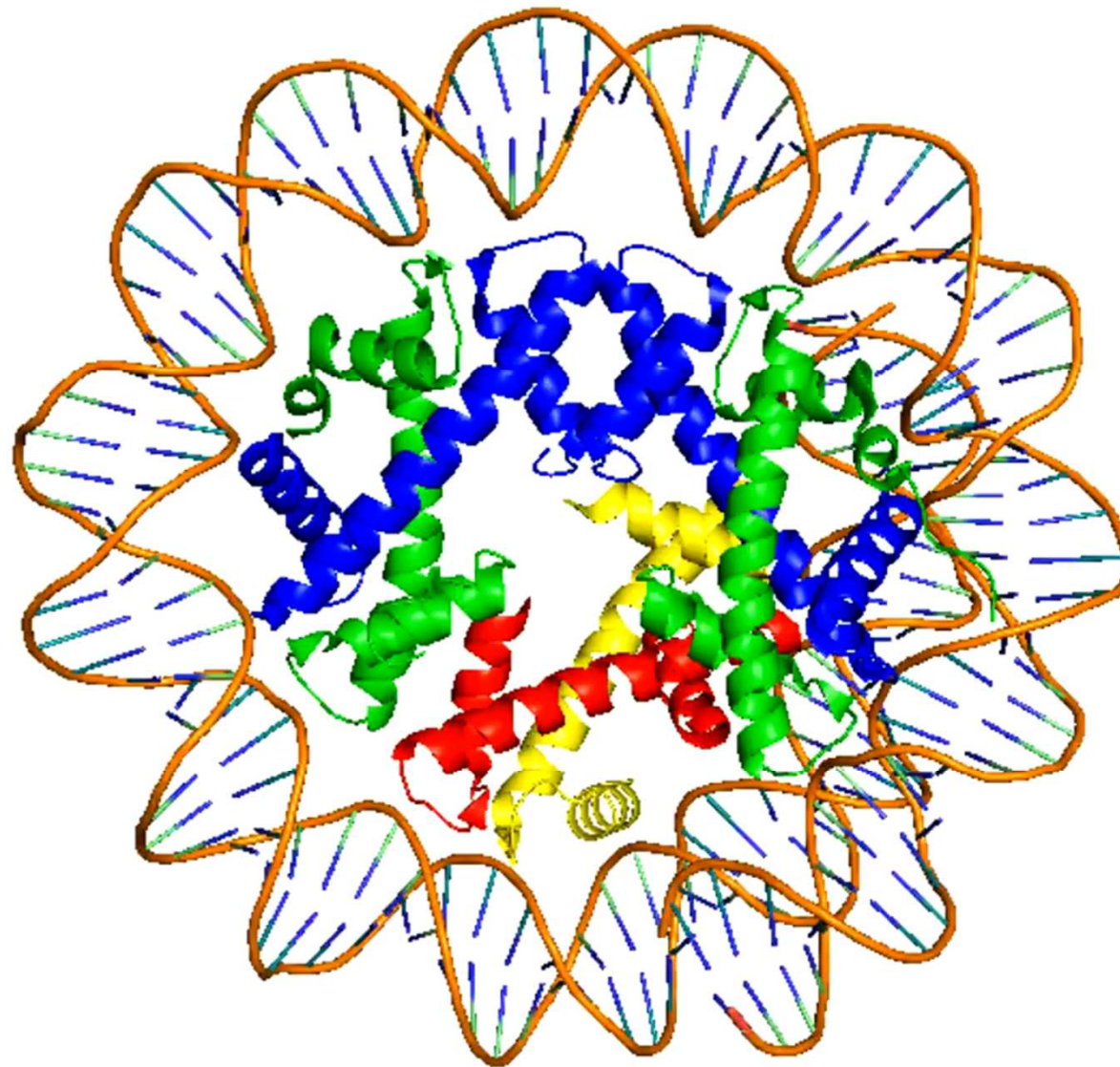


- H3-H3 interakce = (H3-H4)₂ tetramer

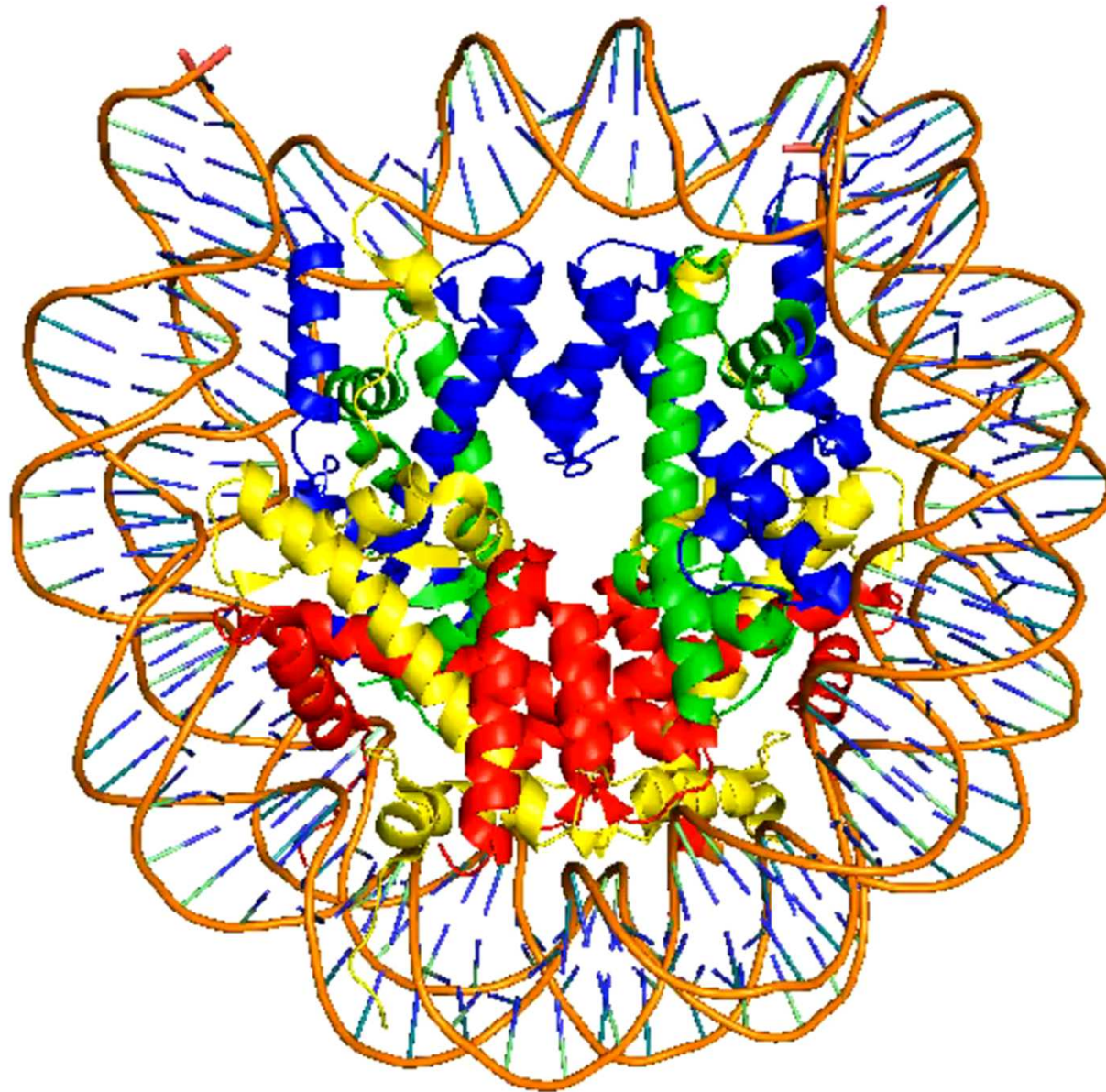




- H3-H3 interakce = (H3-H4)₂ tetramer – vazba na DNA



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



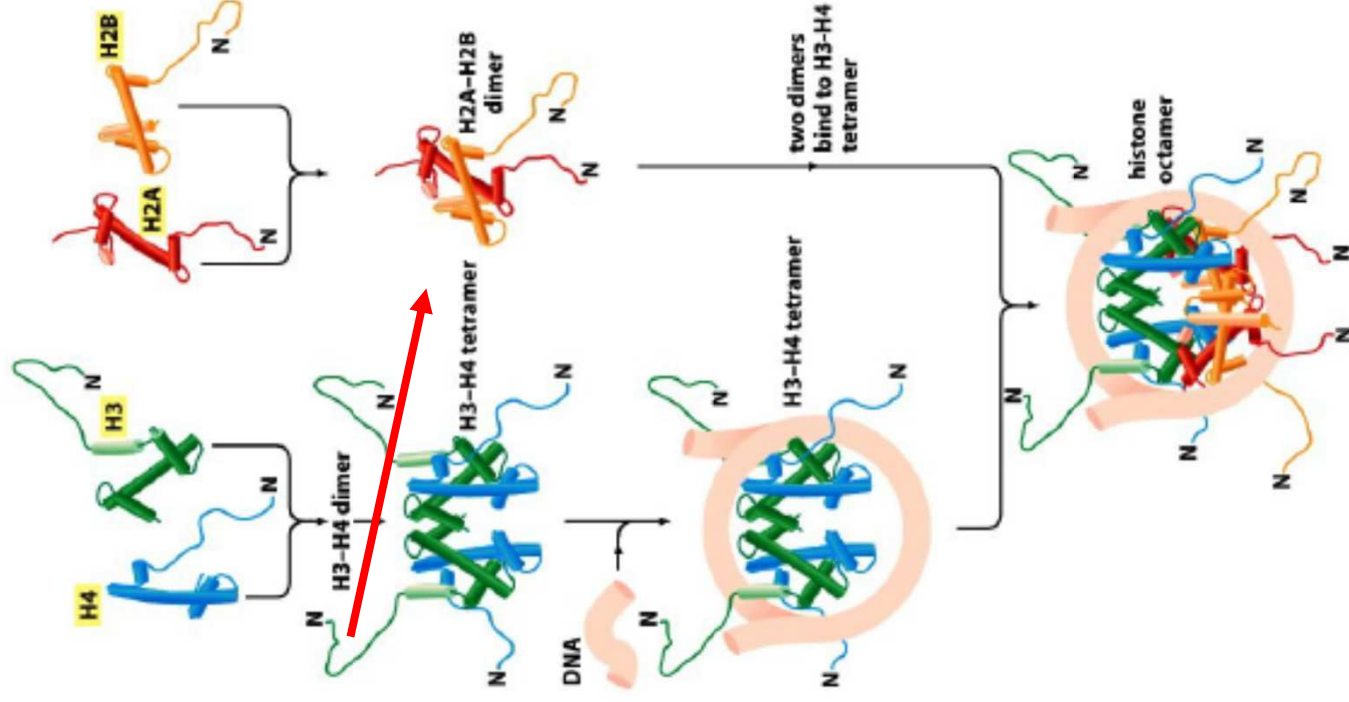
- H3-H3 interakce = (H3-H4)₂ tetramer
- dimery H2A-H2B (H2A – váže H4)

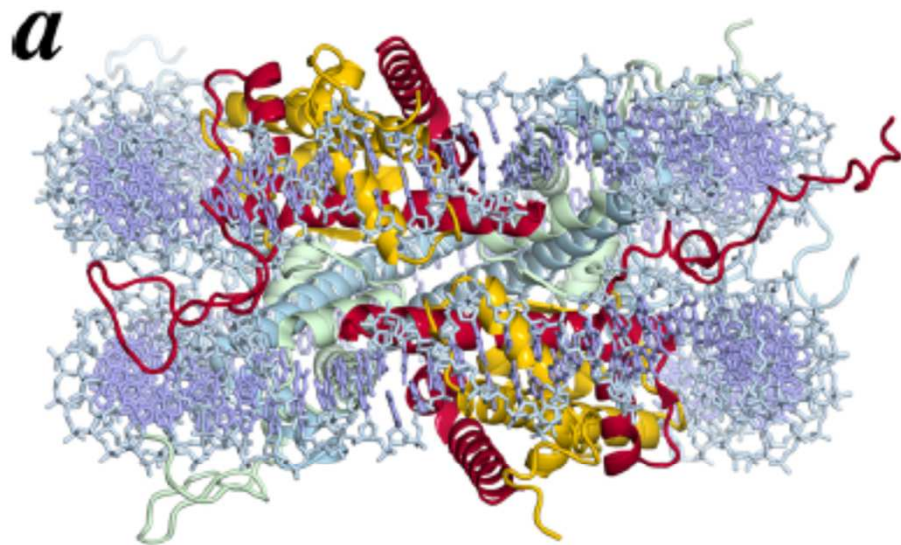
3AFA

Sestavování nukleozomu:

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

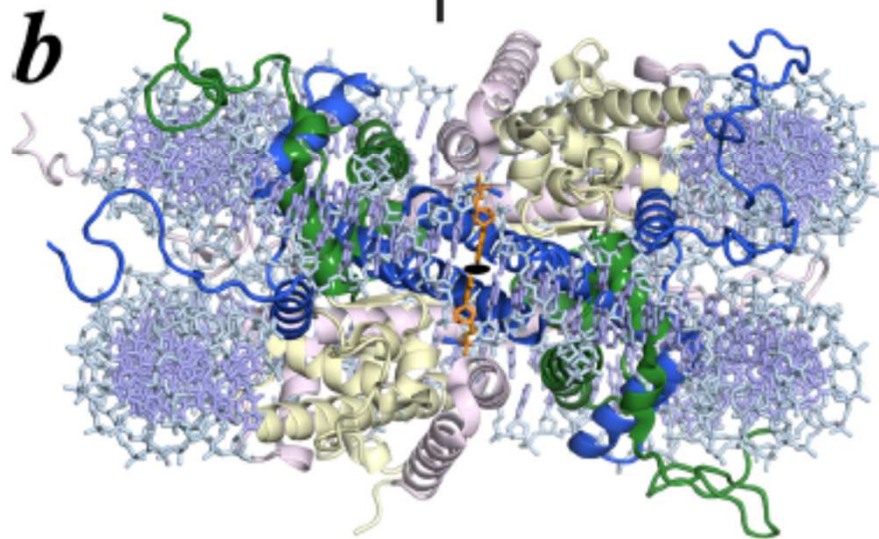
Dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru $(H3-H4)_2$



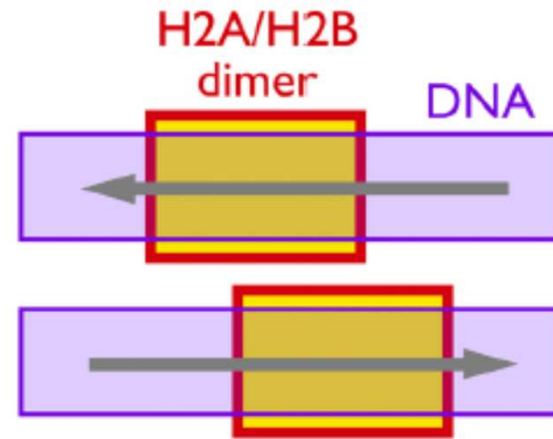


■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA

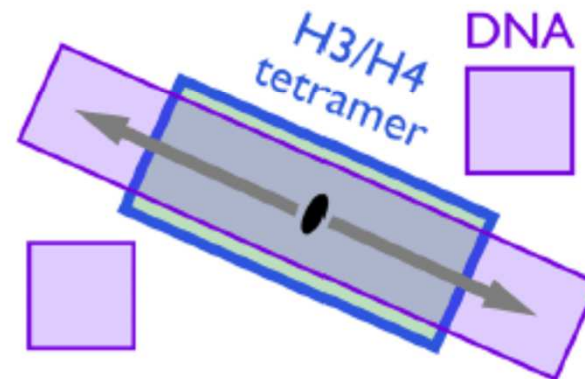
↻ 180°



■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA



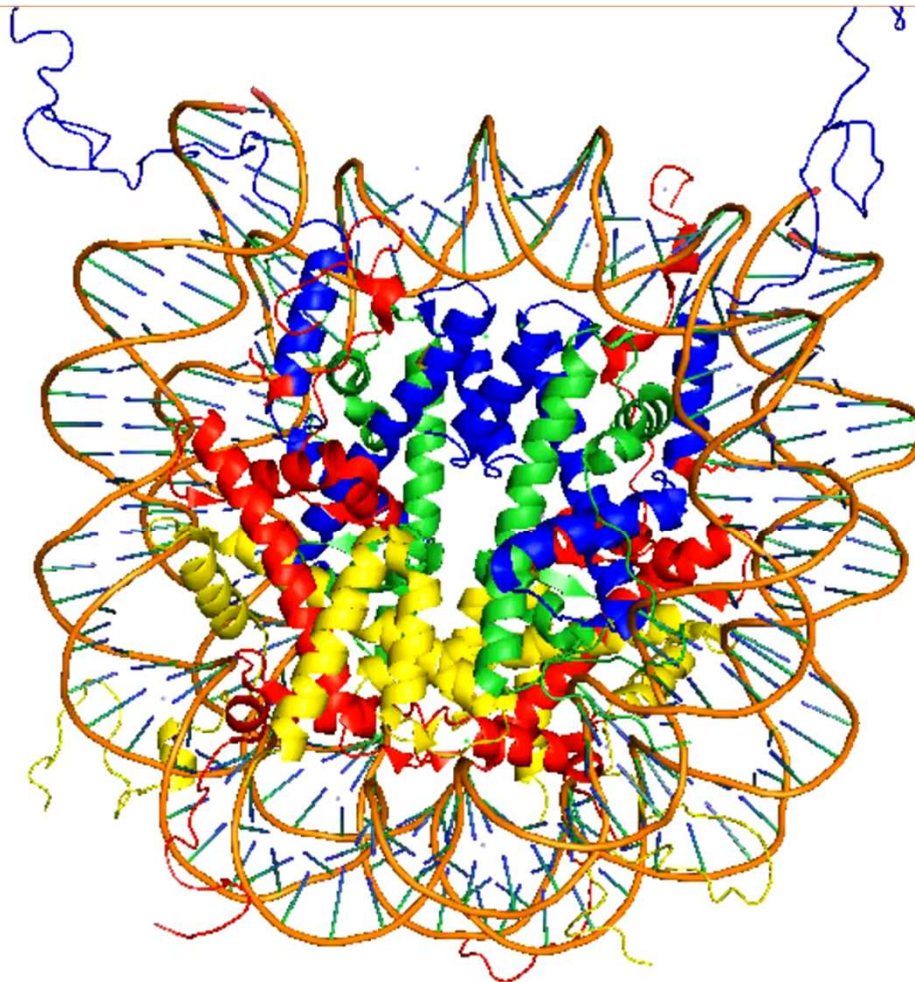
H2A/H2B váže dvě vlákna
H3/H4 váže jedno vlákno, ale
 silněji (více objímá – větší
 kontaktní povrch)



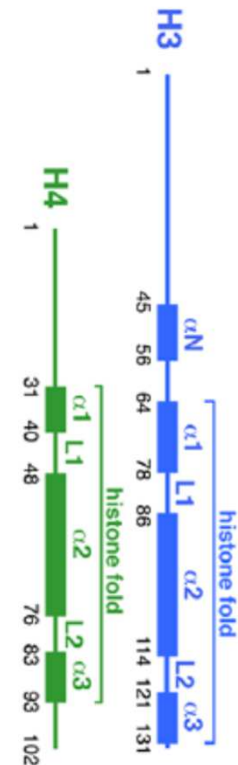
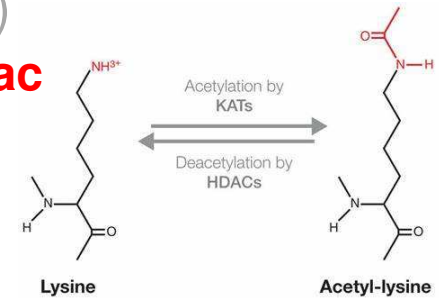
Konce histonů

- 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)

Only



H3K56ac



1KX5

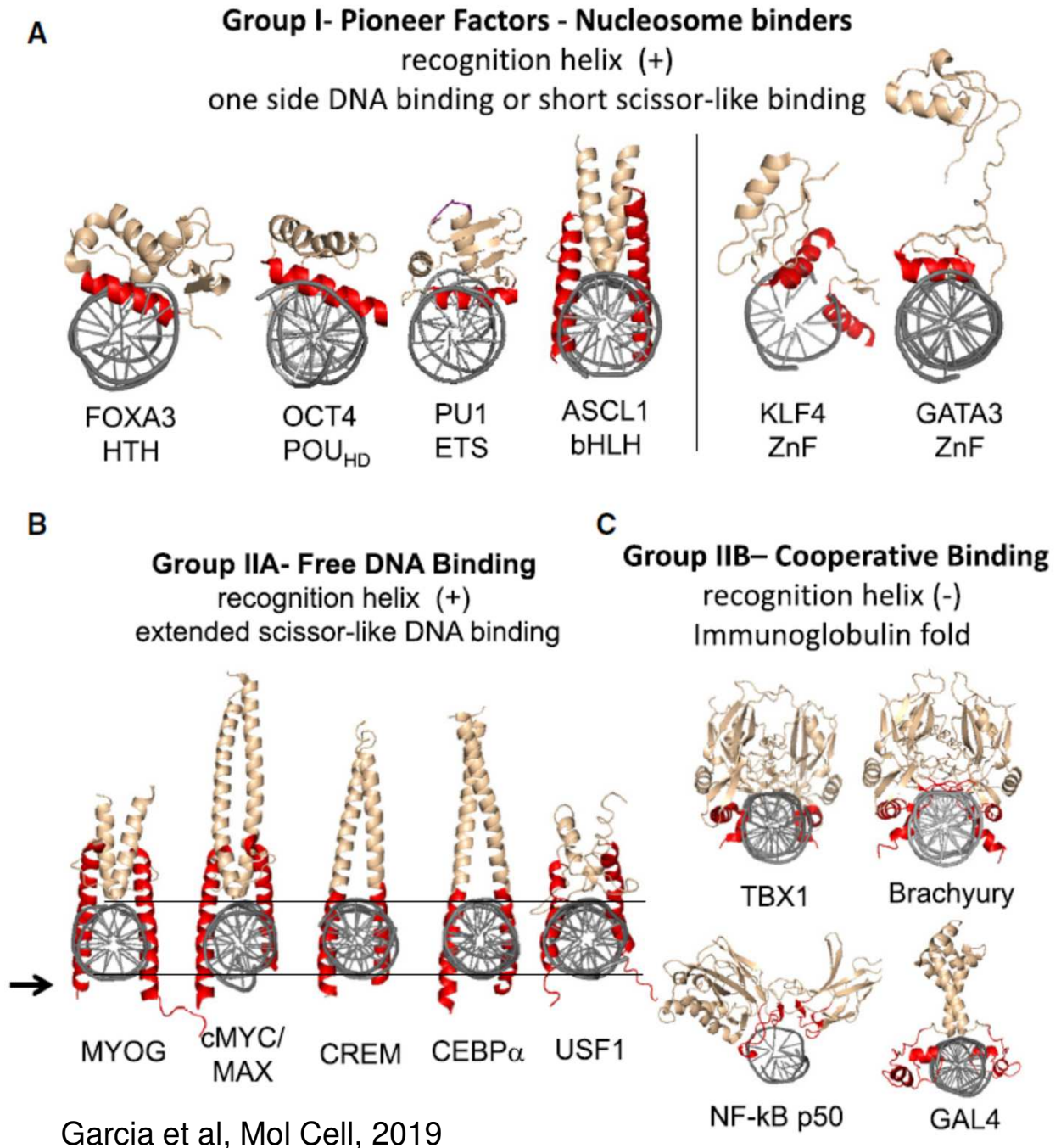
Pioneer TF

- přístupnost DNA v nukleosomu je zásadní pro aktivaci transkripce ...

- pioneer TF se váže silně i v přítomnosti histonového oktameru (Group I) – krátké šroubovice

- Group II TF se vážou slaběji v přítomnosti histonového oktameru (ze sterických důvodů) – delší šroubovice a složitější vazebné motivy

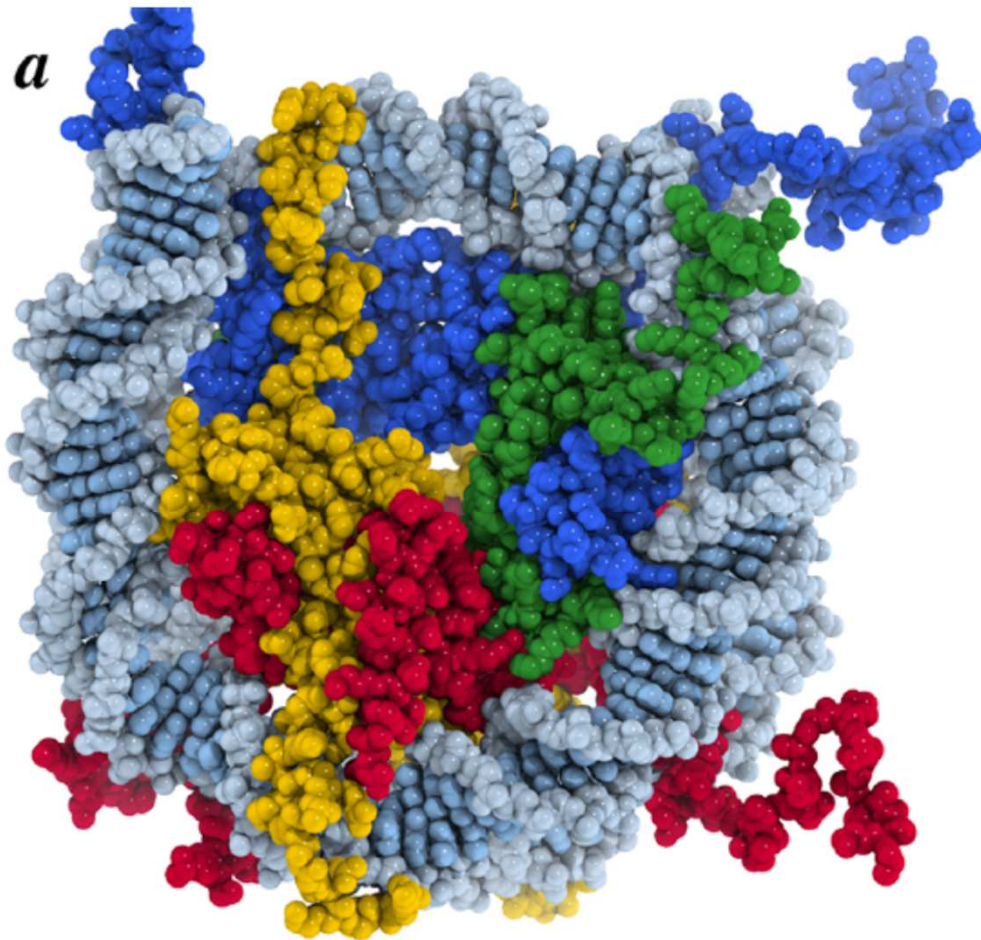
Pioneer TF se váže první a pomáhá dalším TF s vazbou ...



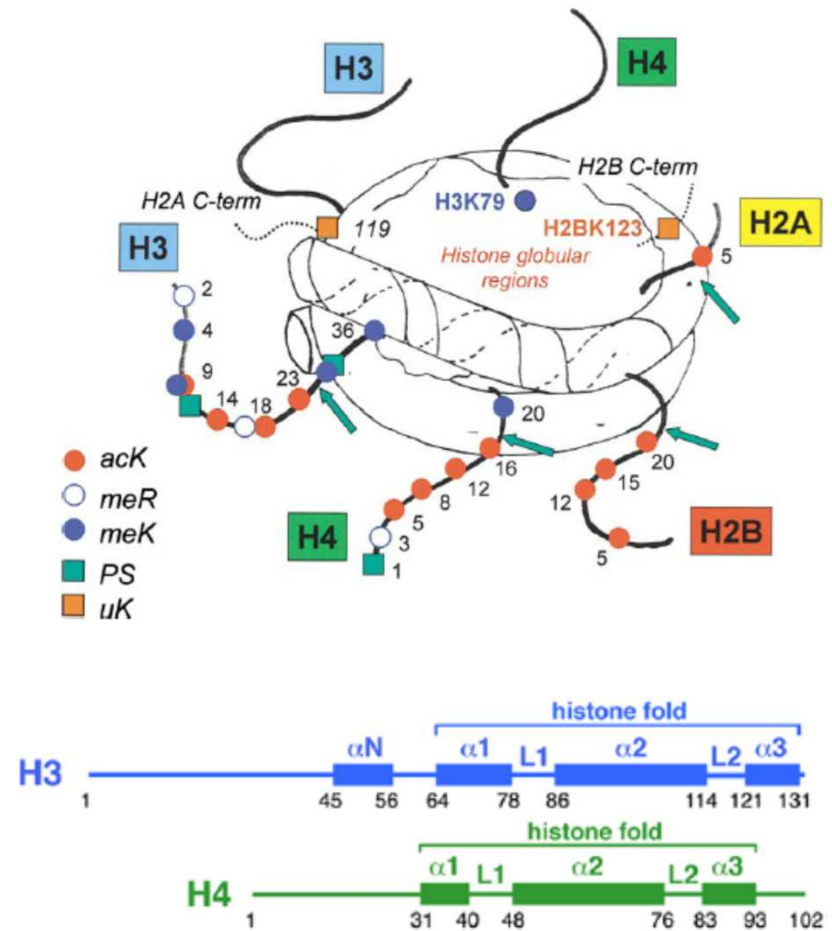
Konce histonů

- 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, chromodoména)

H3K56ac



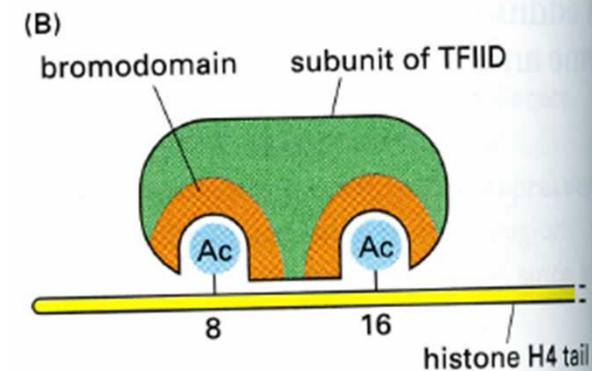
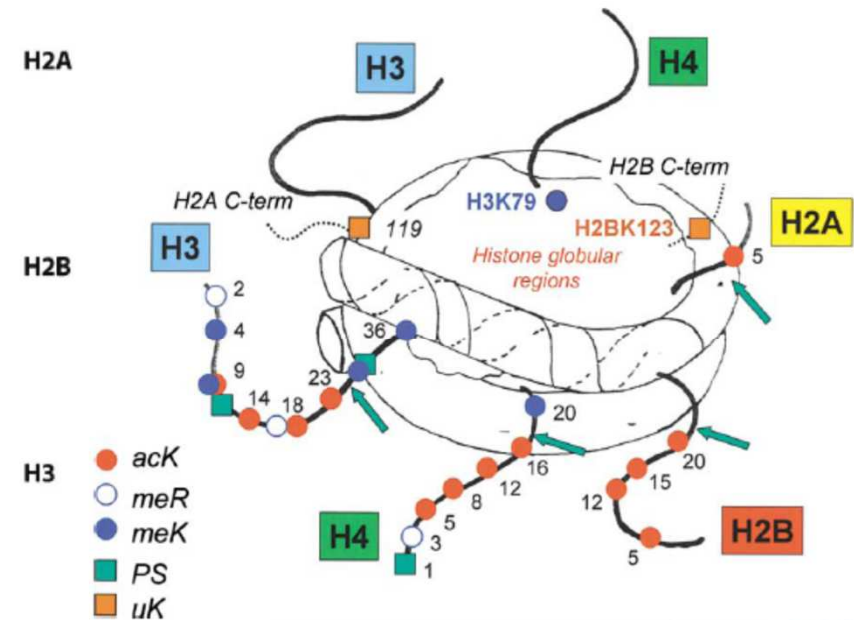
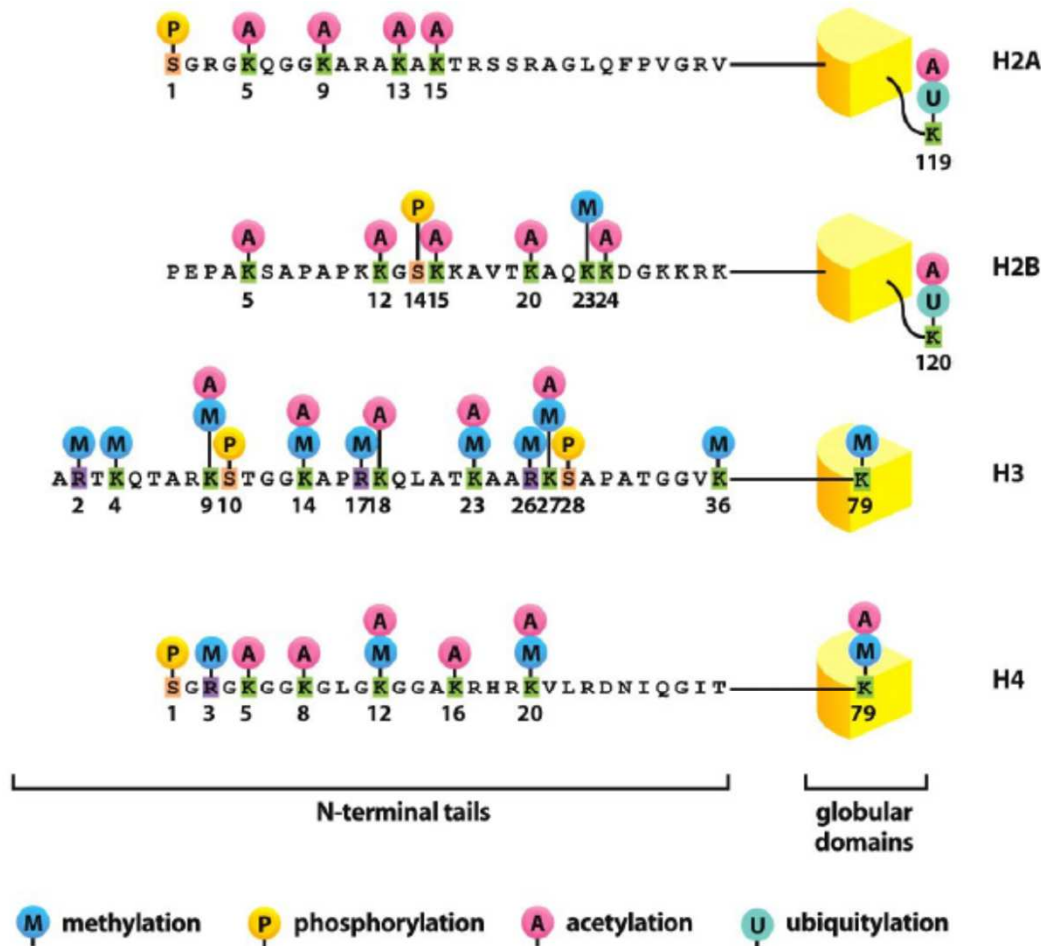
■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA

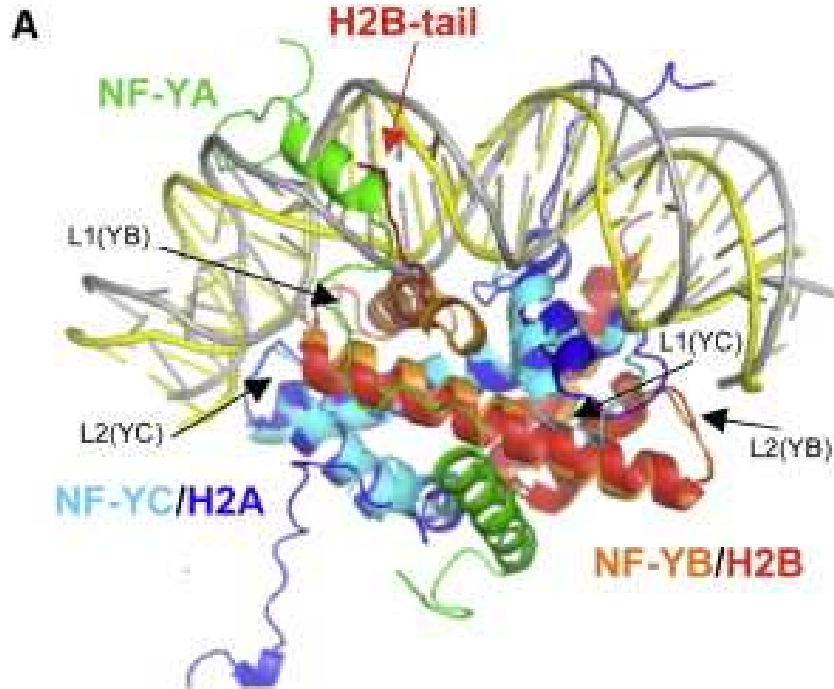


Modifikace histonů

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

H3K56ac

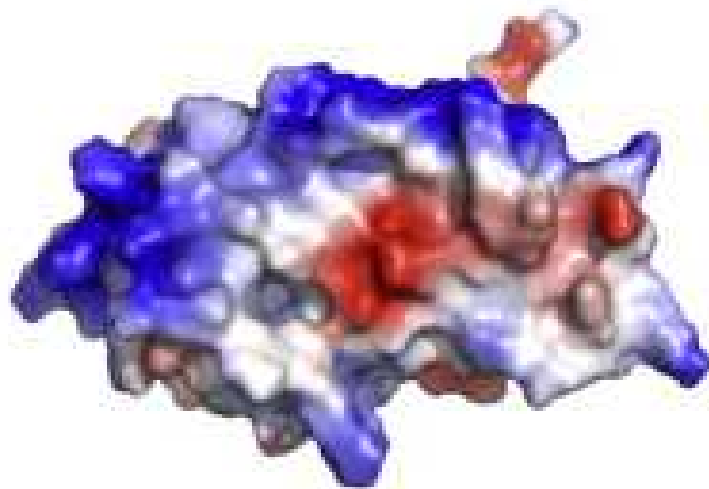




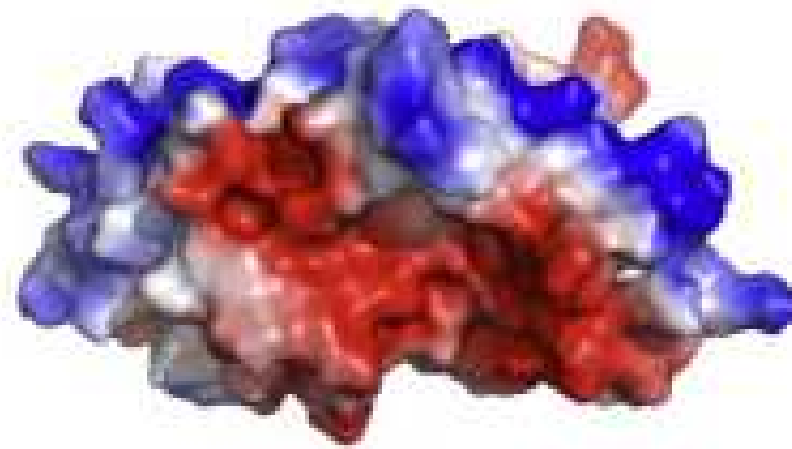
Transkripční faktory NF-Y

(podjednotky B a C) obsahují histon-fold a vážou se sekvenčně nespecificky na cukrfosfátovou kostru jako histony

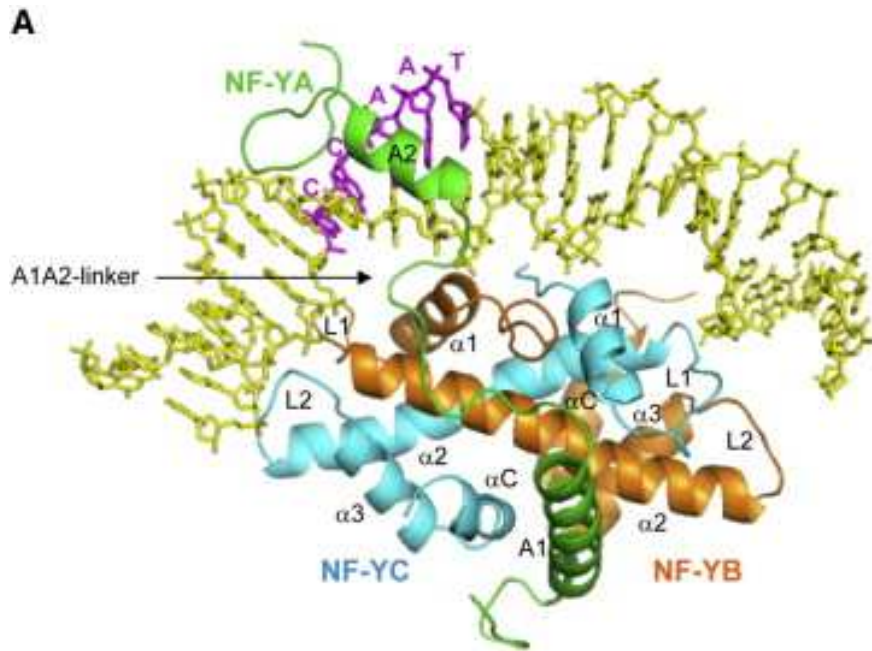
- DNA se v důsledku vazby ohýbá podobně jako v nukleosomech
- NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -šroubovice (interkalace do MŽ)



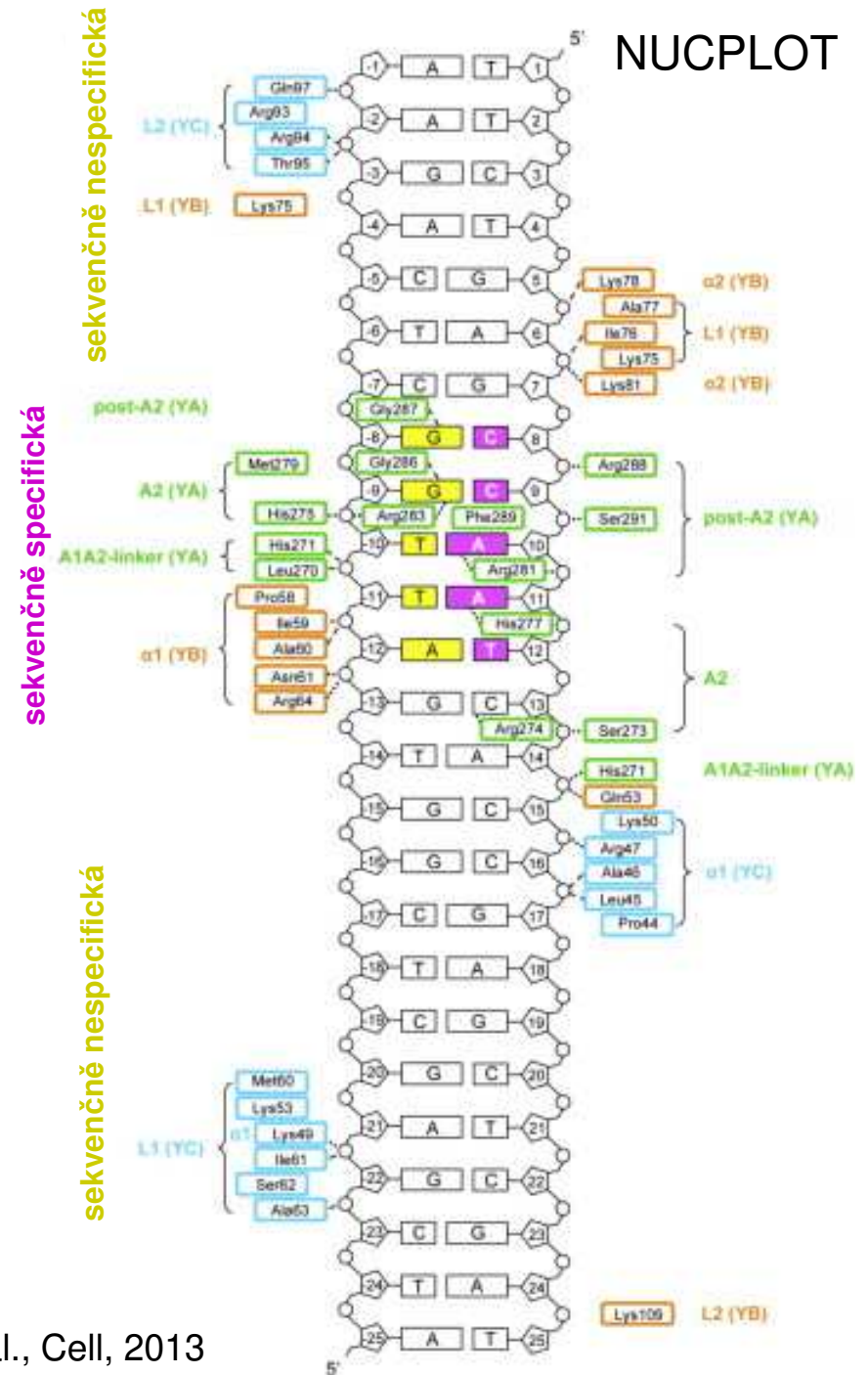
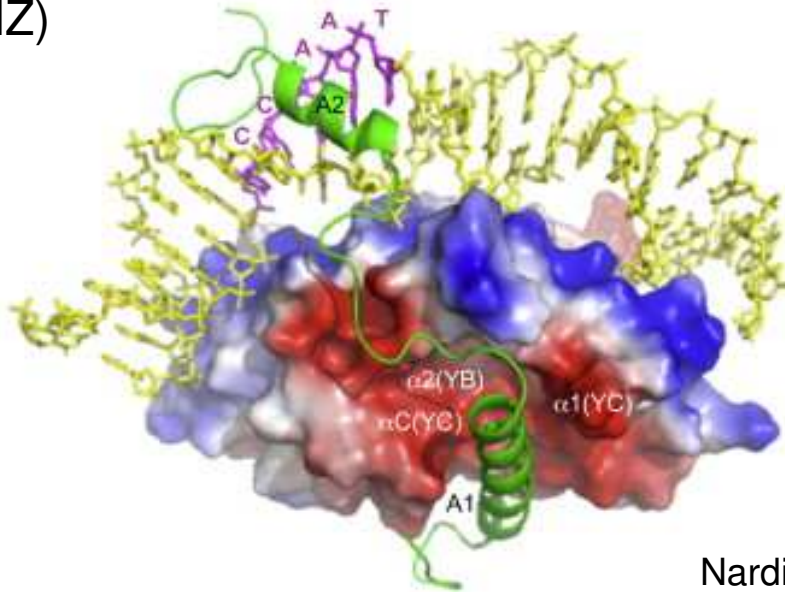
H2B/H2A



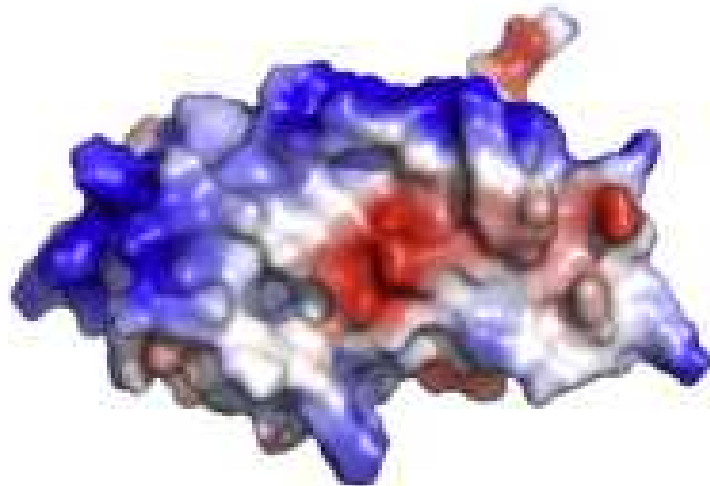
NF-YB/NF-YC



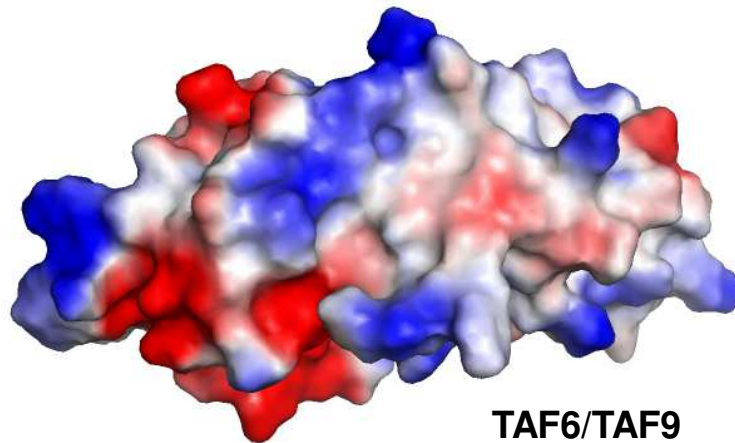
NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT
sekvenci pomocí α -šroubovice (interkalace
do MŽ)



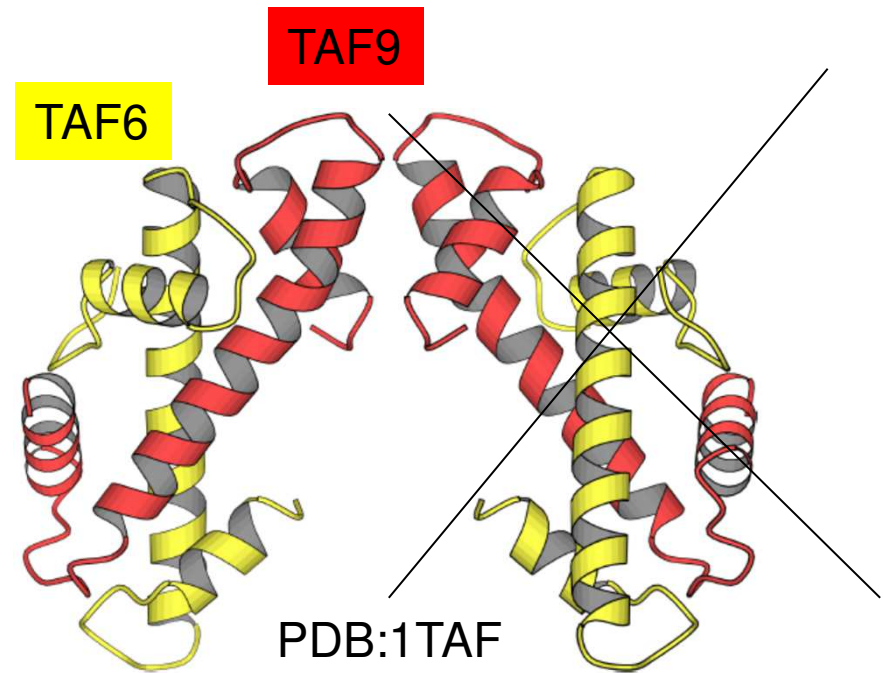
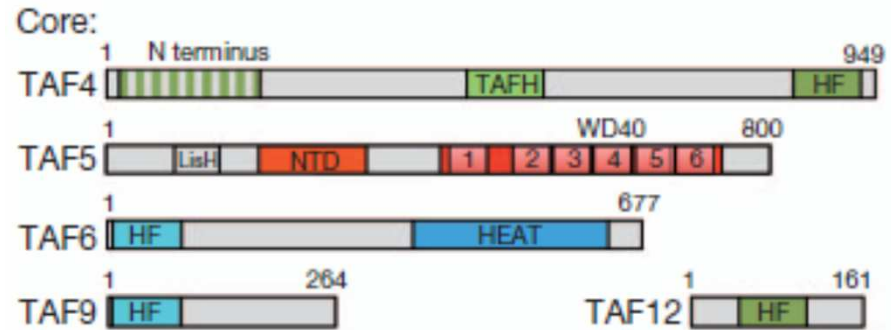
TBP-associated factors = TAF (podjednotky TFIID komplexu mají histon-fold (HF), ale nevytváří oktamery)



H2B/H2A



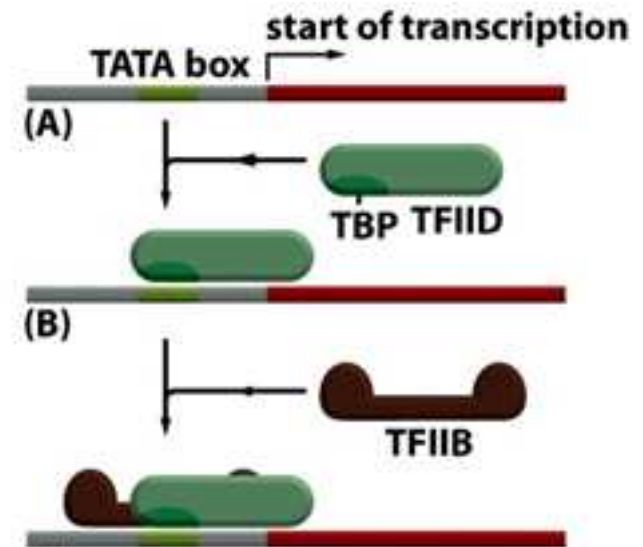
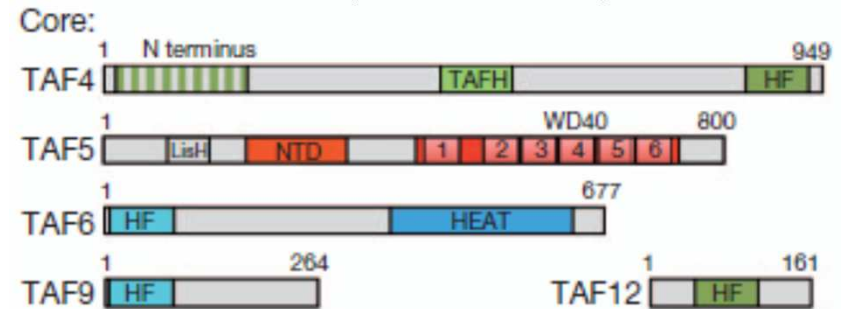
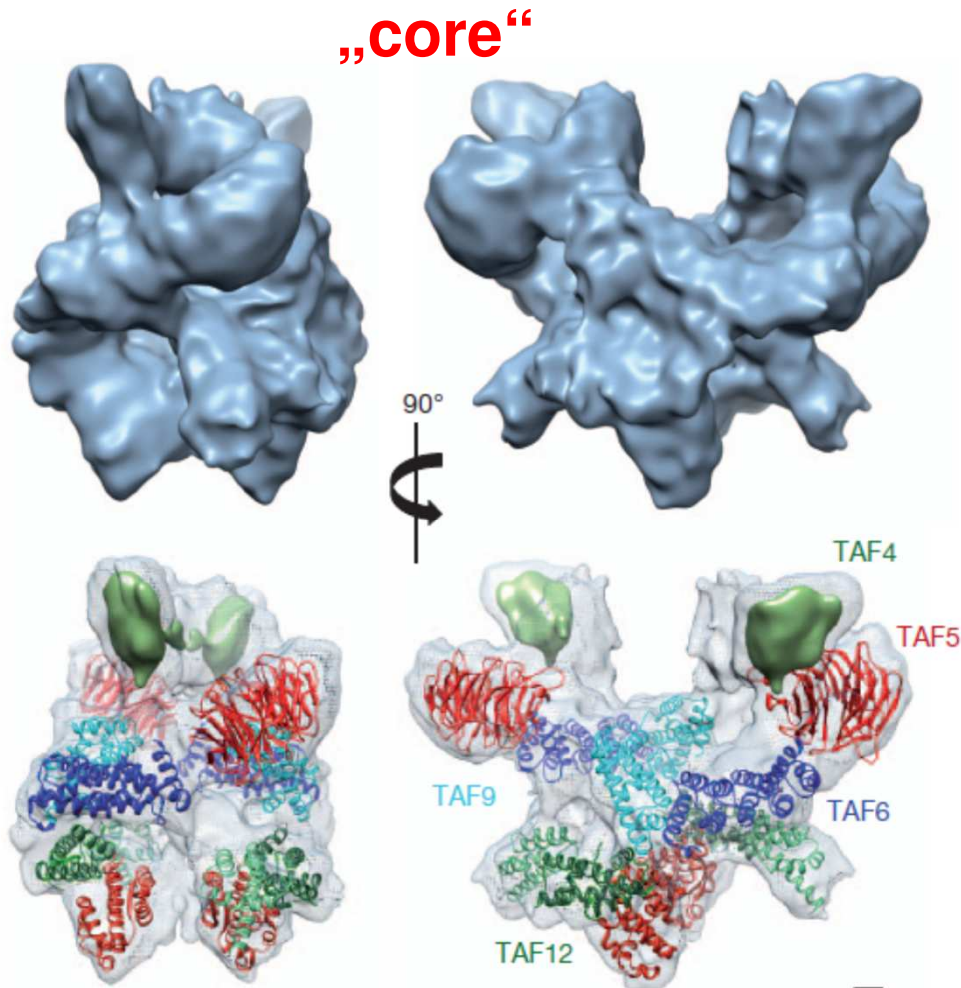
TAF6/TAF9



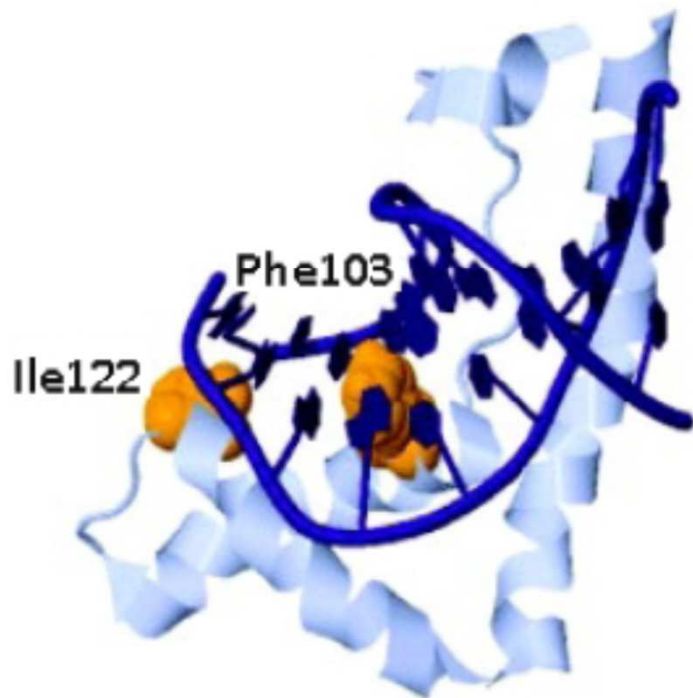
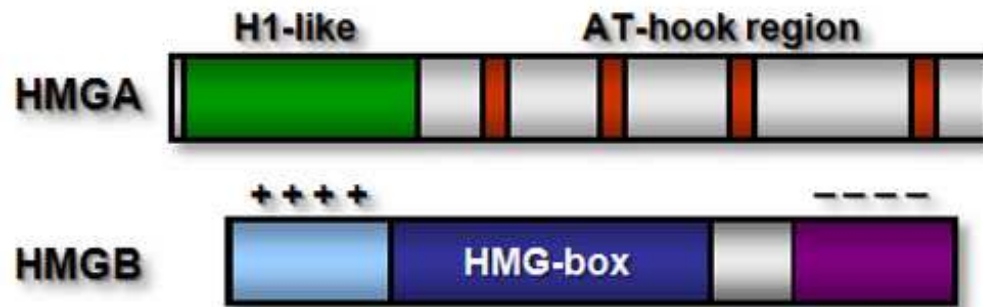
Histon-fold doména se neváže na DNA

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

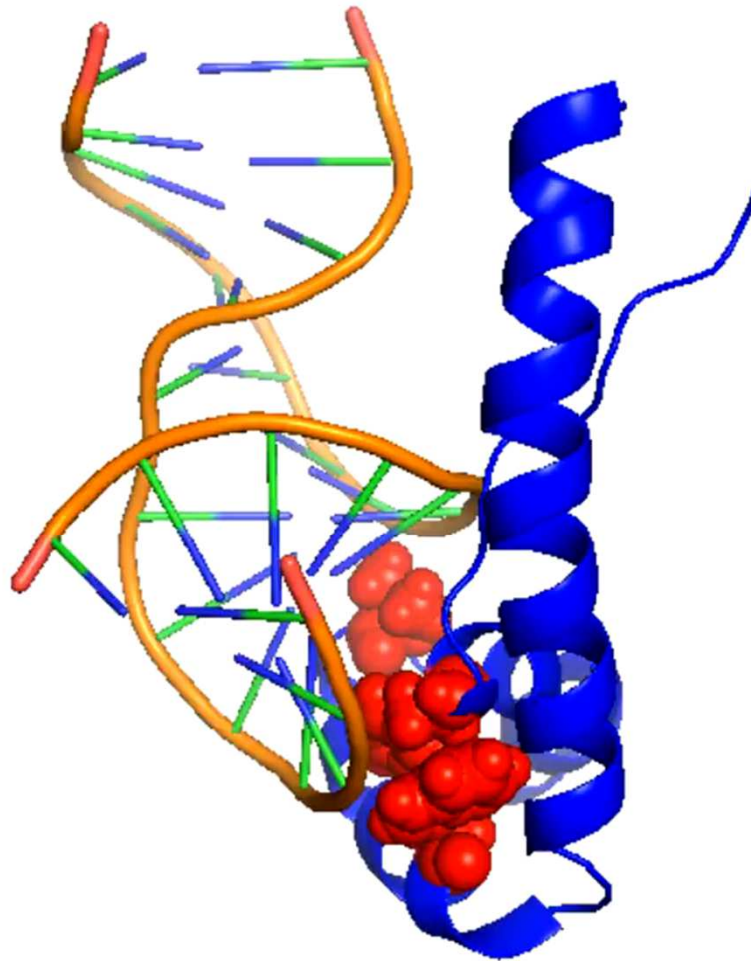


- **HMGB (HMG-box)** obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace aromatických AMK způsobuje ohnutí DNA



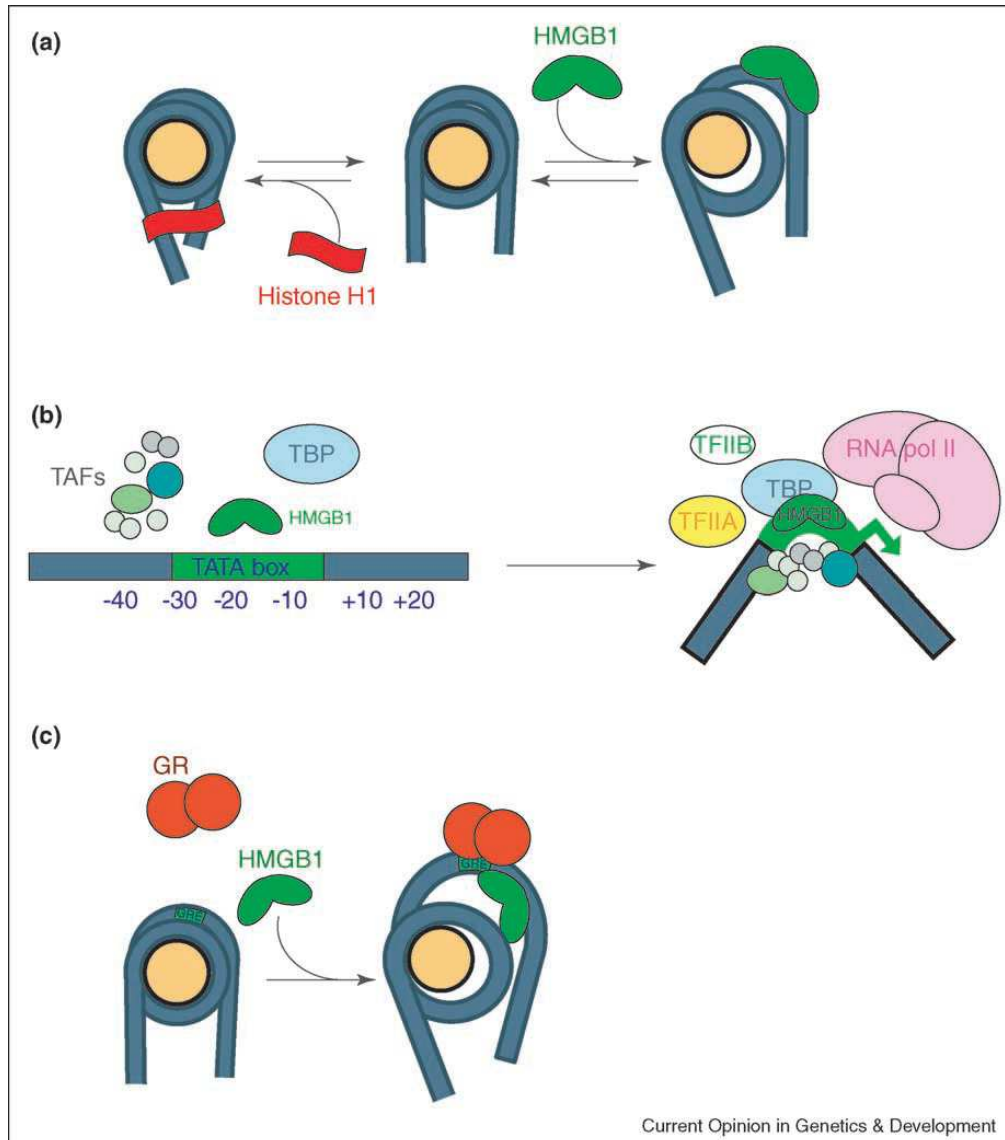
- ohyb a rozvolnění párování dsDNA může napomáhat procesům replikace, transkripce a rekombinace/opravy poškozené DNA
- ohyb napomáhá přiblížení vzdálených míst nebo zpřístupňuje DNA pro transkripční faktory

HMG-D (1E7J)



Aromatické aminokyseliny se interkalují do MŽ a vytváří kink

- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace Phe (aromatický kruh) způsobuje ohnutí DNA

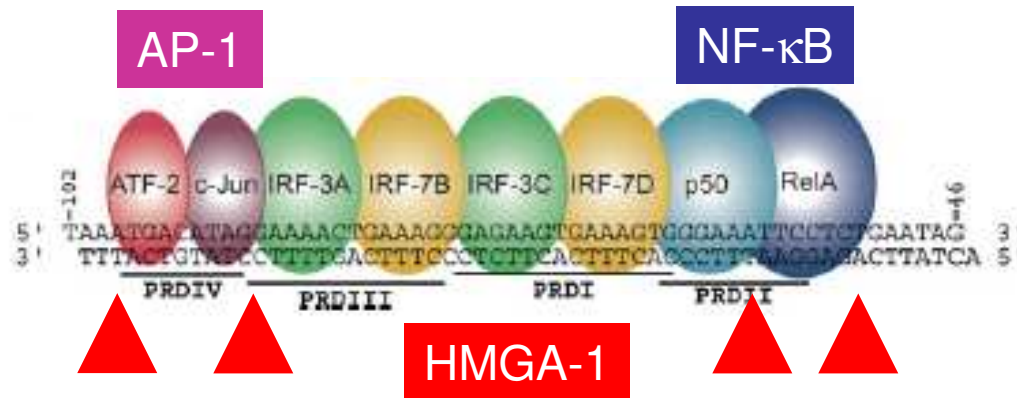


- ohyb napomáhá rozvolnění struktury chromatinu tj. moduluje pozici nukleosomů

- ohyb může pomáhat TBP a iniciaci transkripce

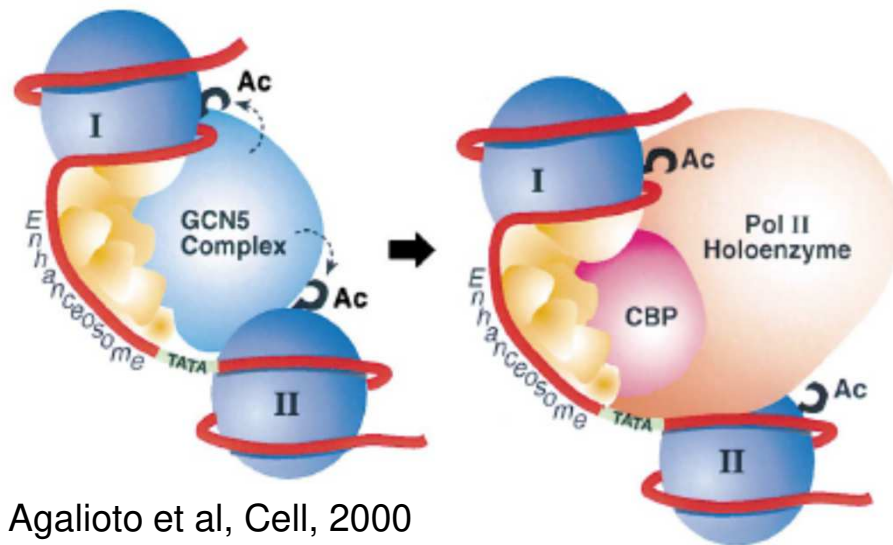
- pomáhá zpřístupnit DNA pro transkripční regulátory

IFN- β enhanceosom

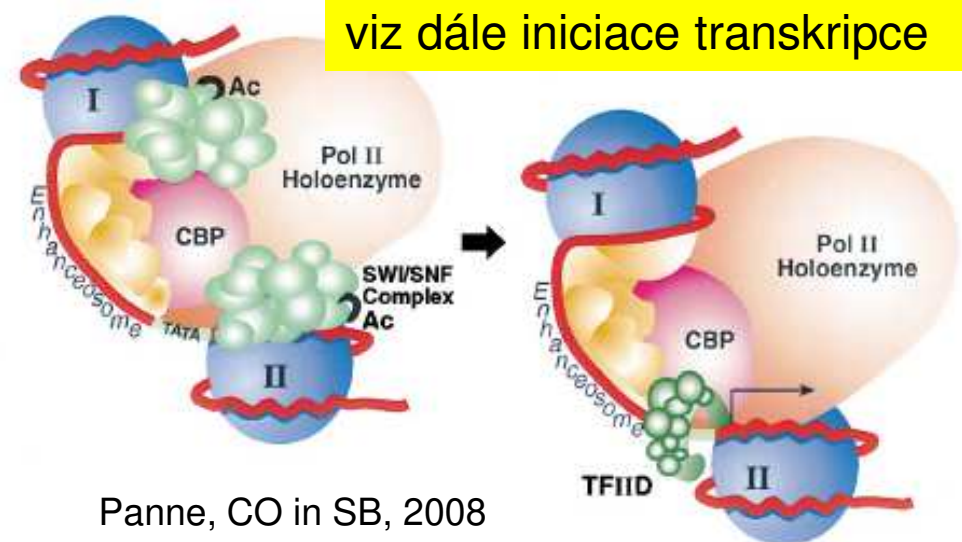


transkripce

- 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, který se váže na nukleosom-free oblast
- podjednotky enhanceosomu interagují se SAGA (obsahuje acetyltransferázu a TFIID – sestavení komplexu iniciace transkripce) a CBP/p300 acetyltransferásami, které acetylují sousední nukleosomy - jejich remodeling/přemístění uvolní TATA-box pro vazbu TBP/TFIID a RNA polymerasy II a iniciuje transkripci



Agalioto et al, Cell, 2000

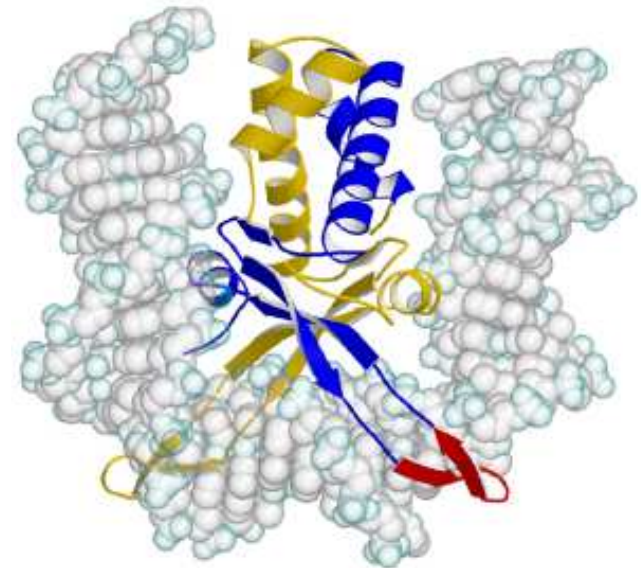


Panne, CO in SB, 2008

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**

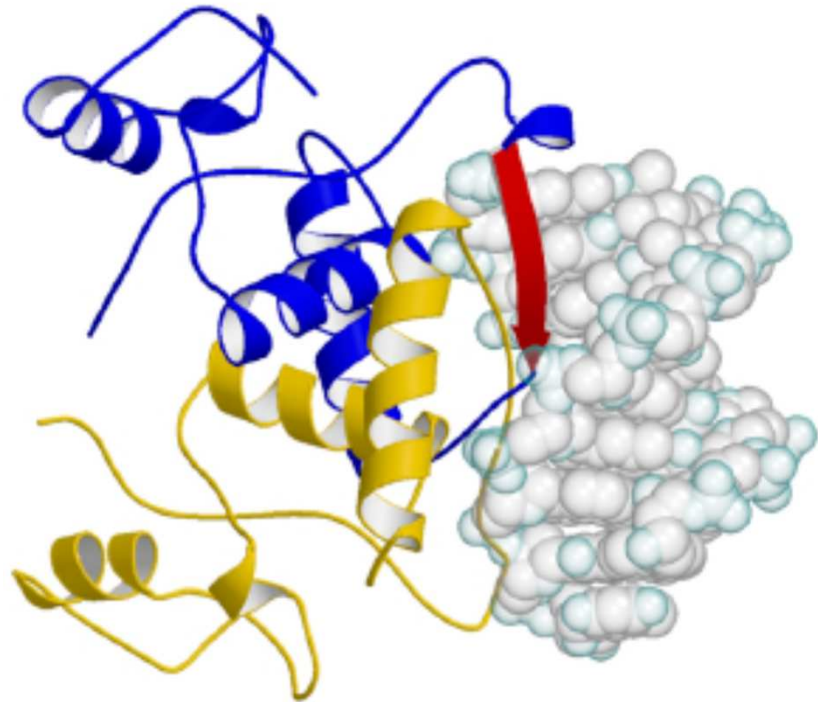
α -šroubovice



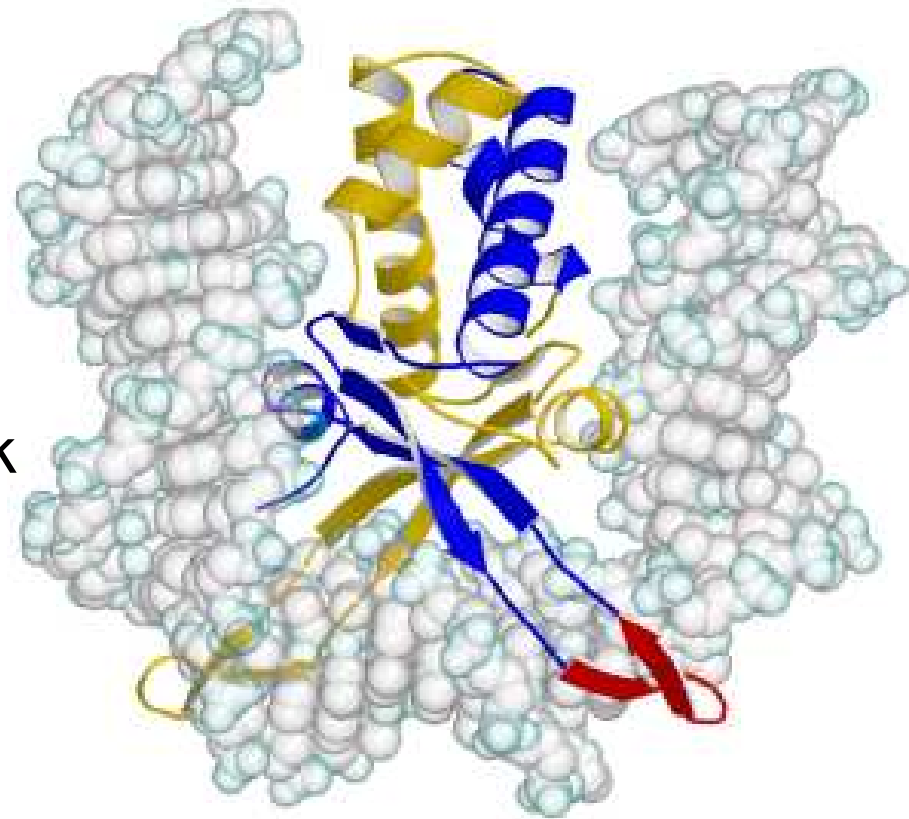
33. Integration host factor (1ihf)

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)

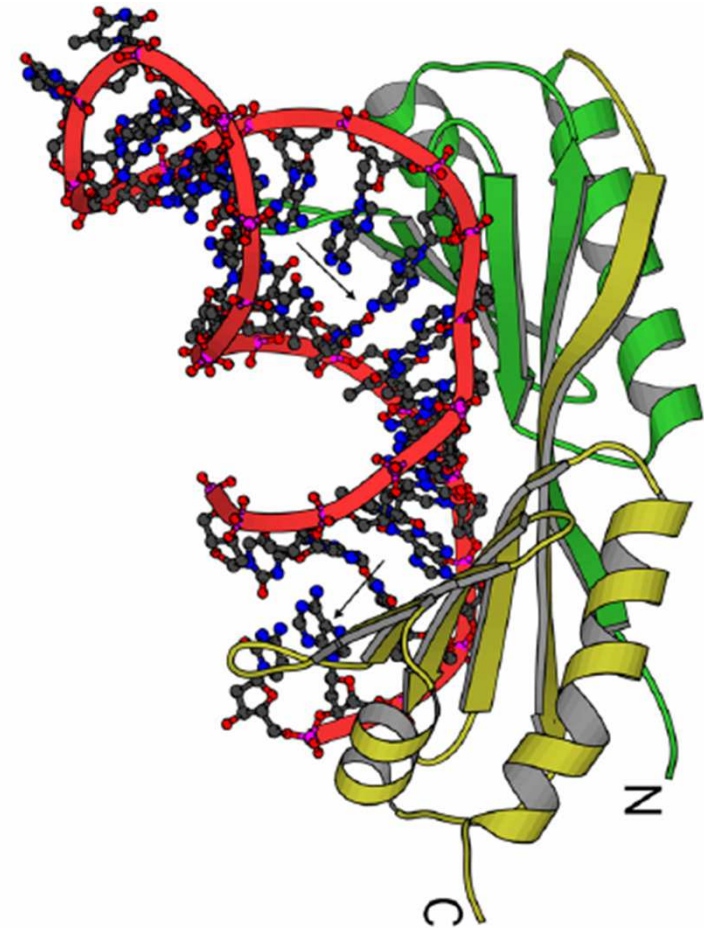
- β -hairpins lokalizovány podél malého žlábků
- Inzerce Pro mezi baze a ohyb DNA

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**

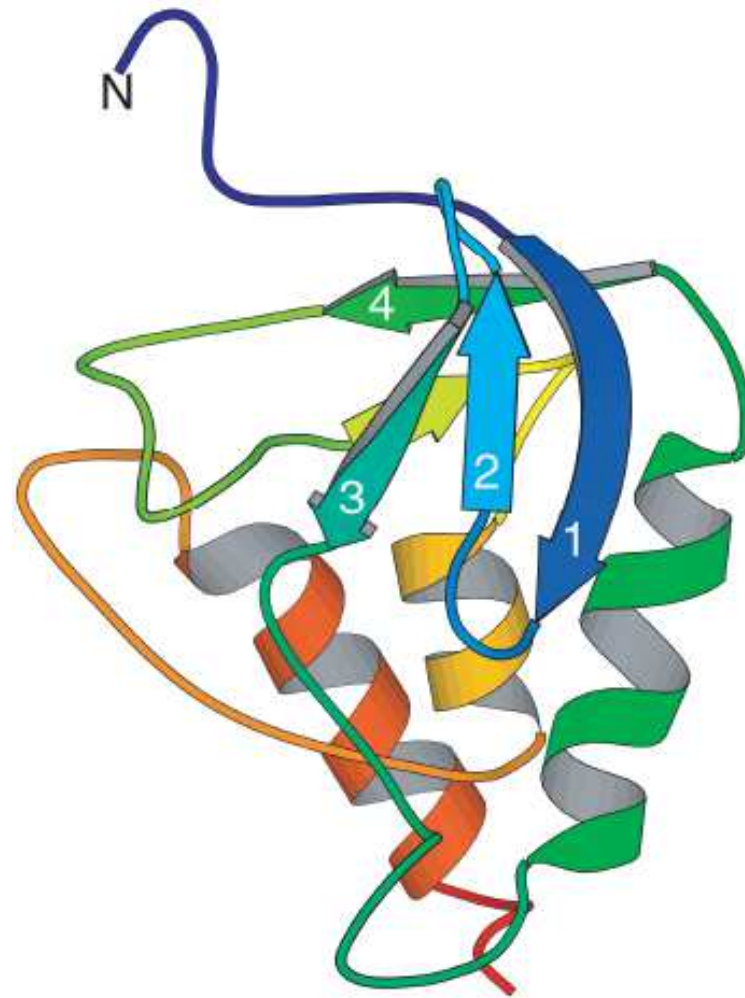
α -šroubovice

β -listy

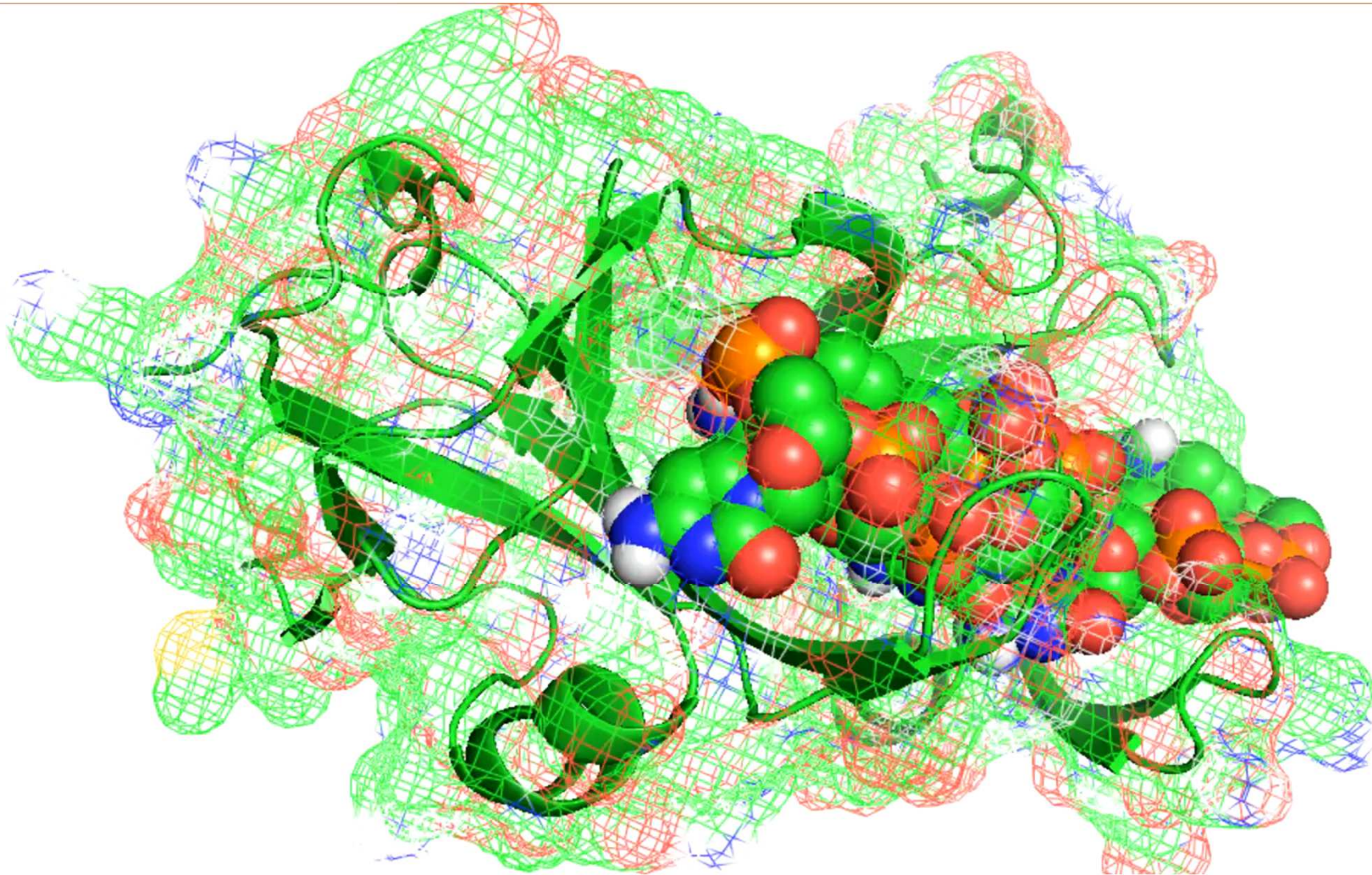


OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide binding)

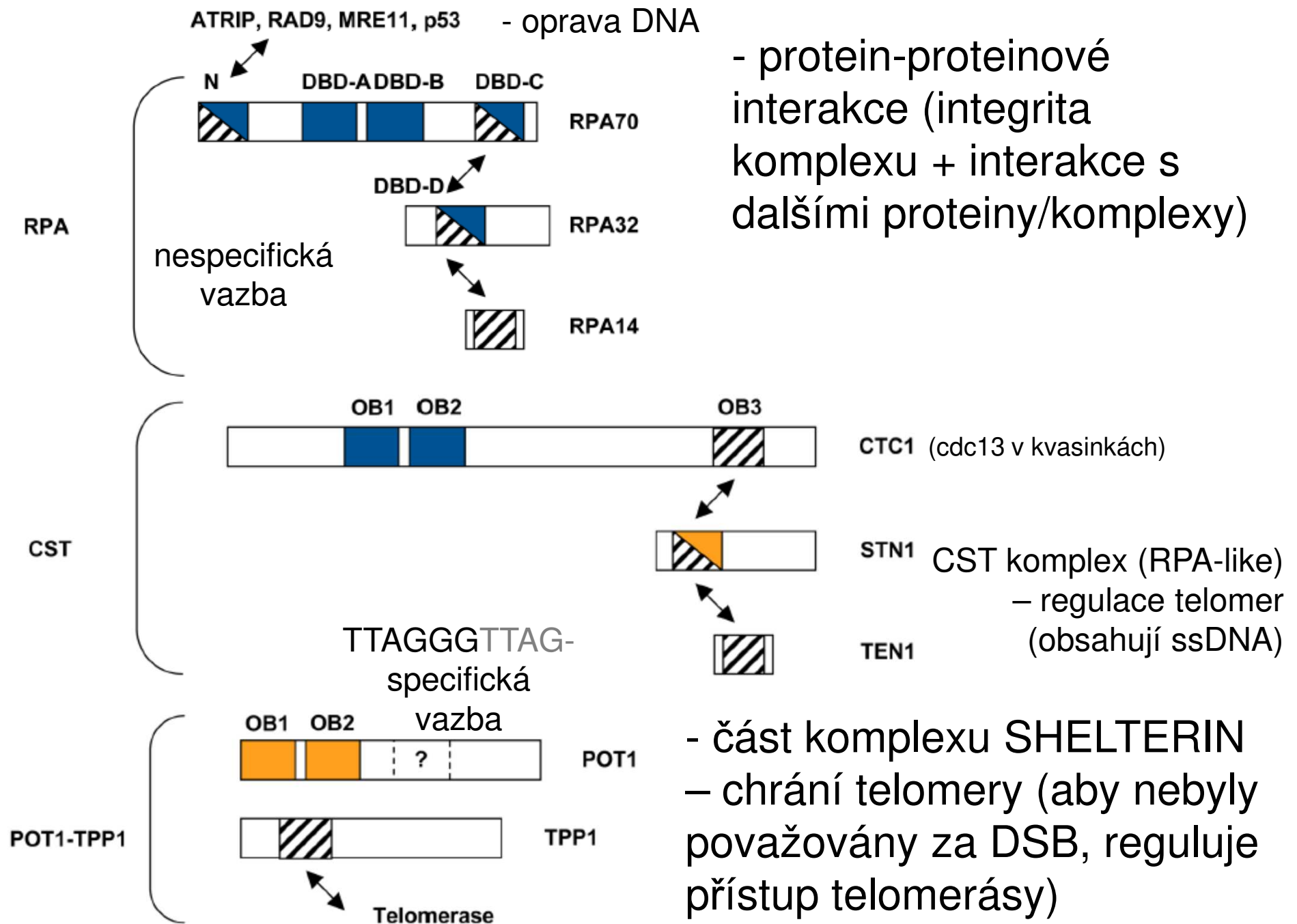
- 4-5 anti-paralelních β -listů (β -barel) zakončeno α -šroubovicí (kompaktní)
- vytváří úzkou jamku pro jednořetězcovou ssDNA (RNA, oligosacharidy)
- váže 2-5 nukleotidů (**báze, cukry i fosfáty**)
- SSB/RP-A a TRF proteiny (replikace, HR, telomery ...
Dr. Šebesta)

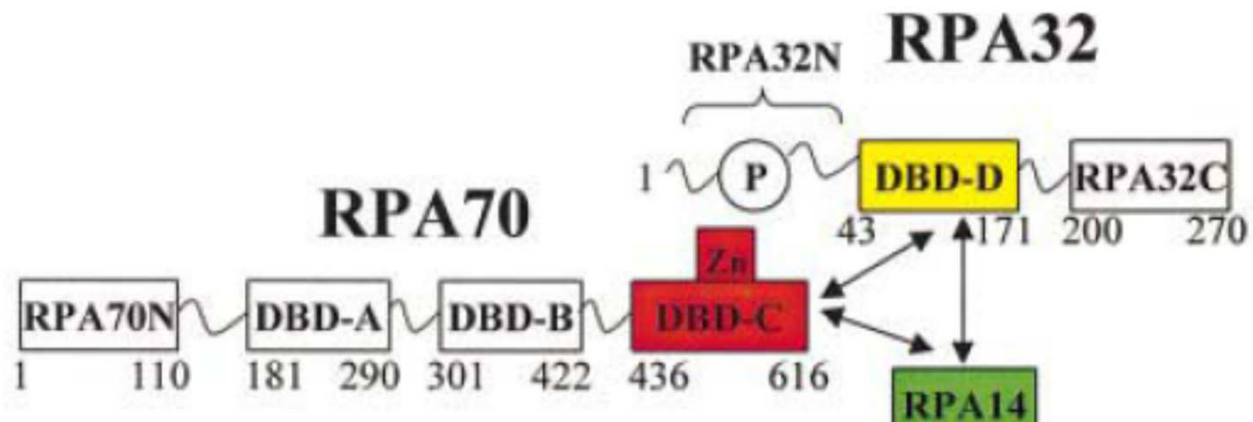


OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide binding, 1JMC)



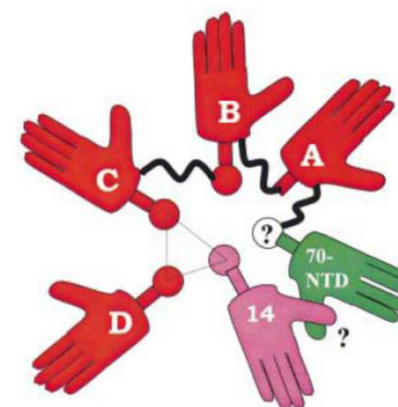
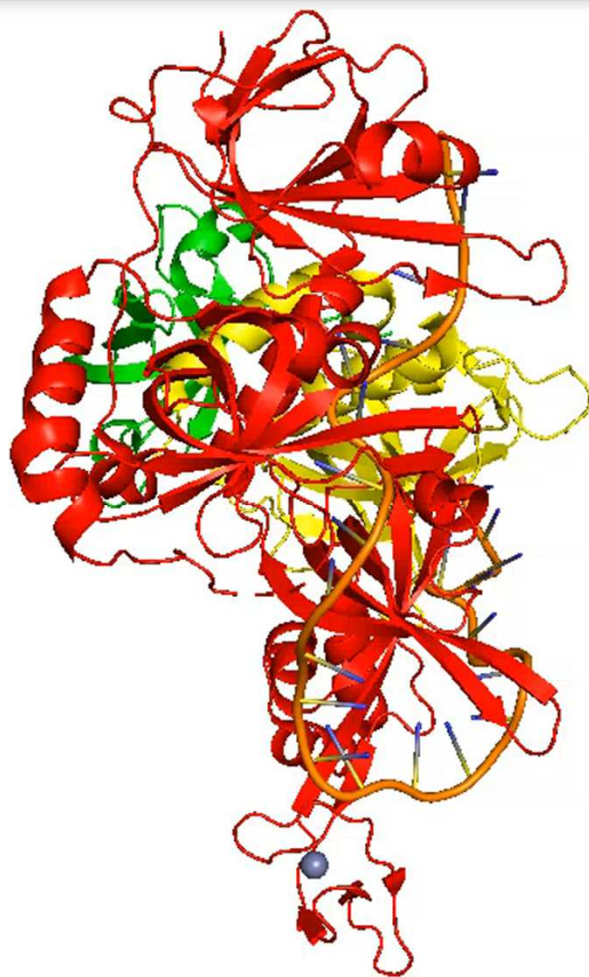
Více OB – RPA70 (A+B) vytváří prodlouženou lineární kapsu





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

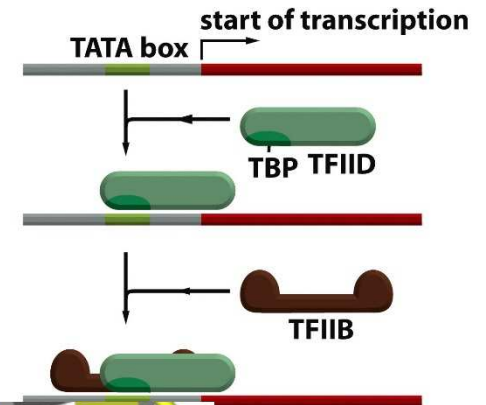
RPA komplex
ssDNA: 4GNX



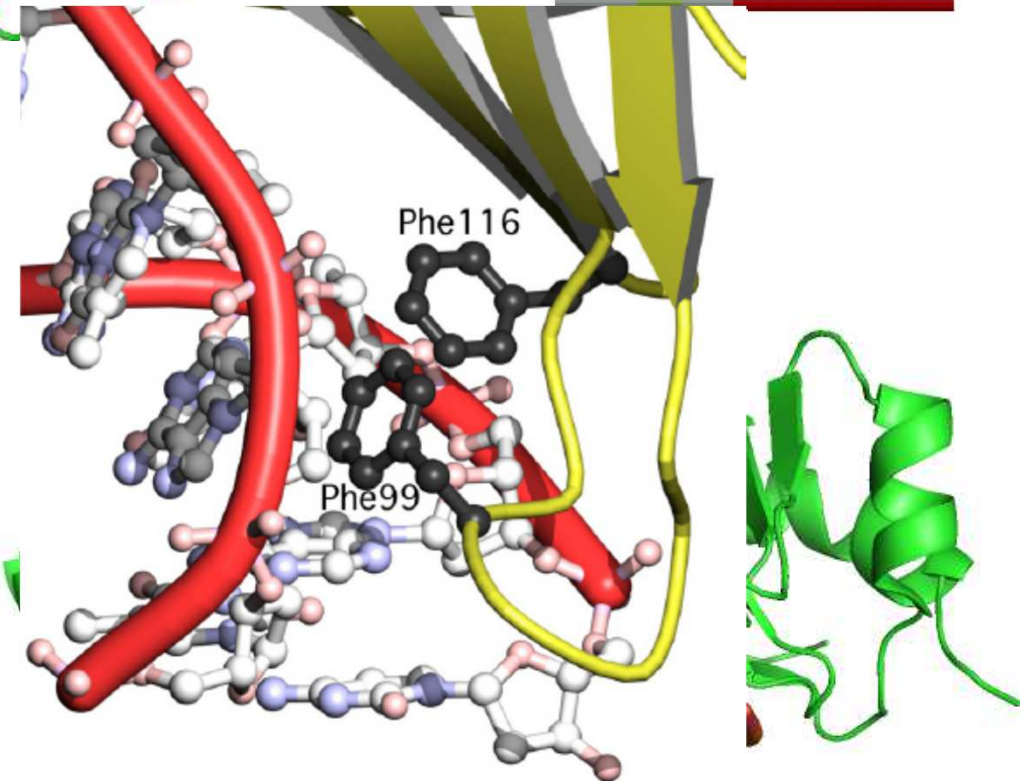
Bochkareva et al, EMBO J, 2002
Flynn a Zou, CR in BMB, 2010

1YTB

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

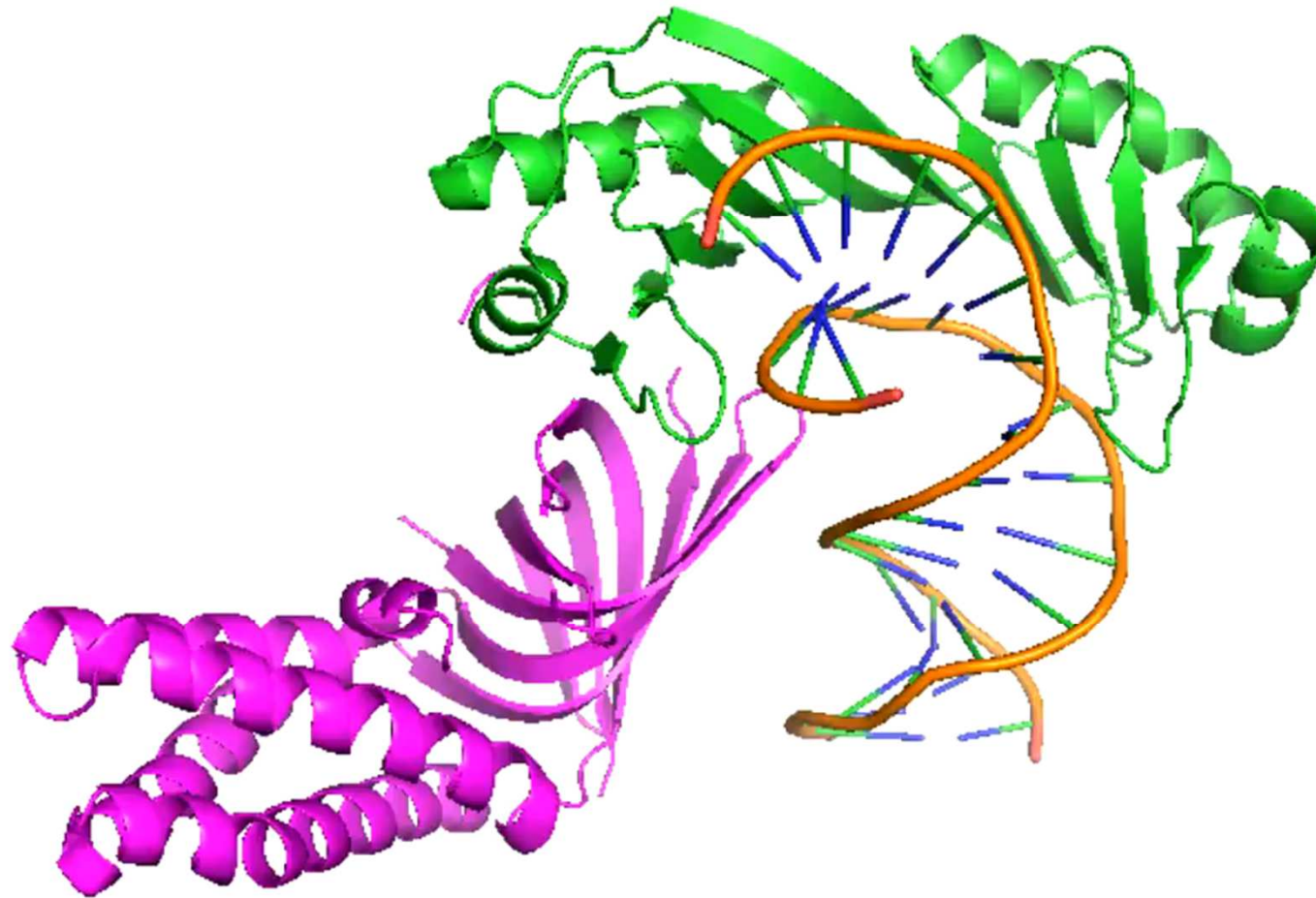


- 10 anti-paralelních β -listů pokrývá MŽ
- interkalují se mezi base postranní řetězce **Phe** (hydrofobní v.)
- vytváří zlom (**kink**) a částečně rozplétá dsDNA



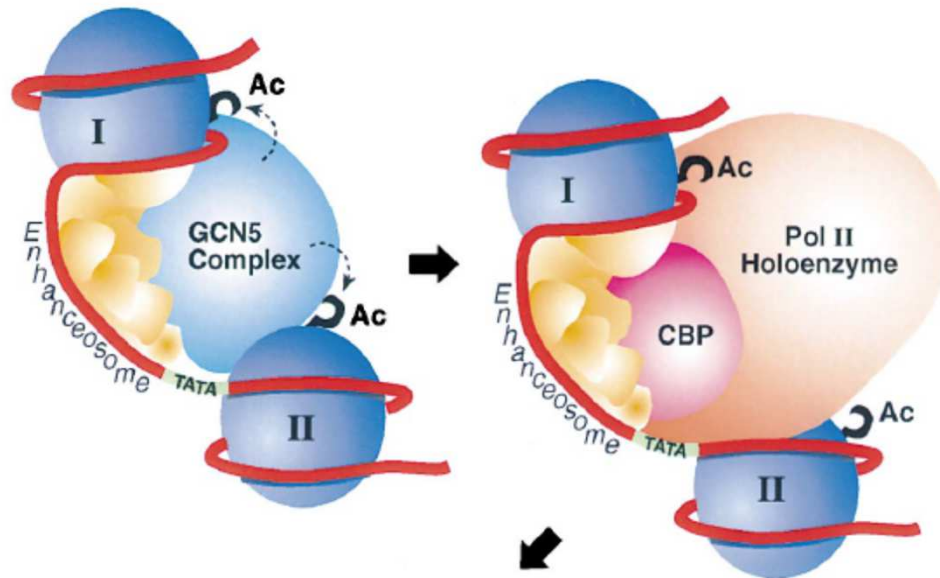
TBP a TFIIA (β -barrel – neovlivní DNA strukturu)

1NH2

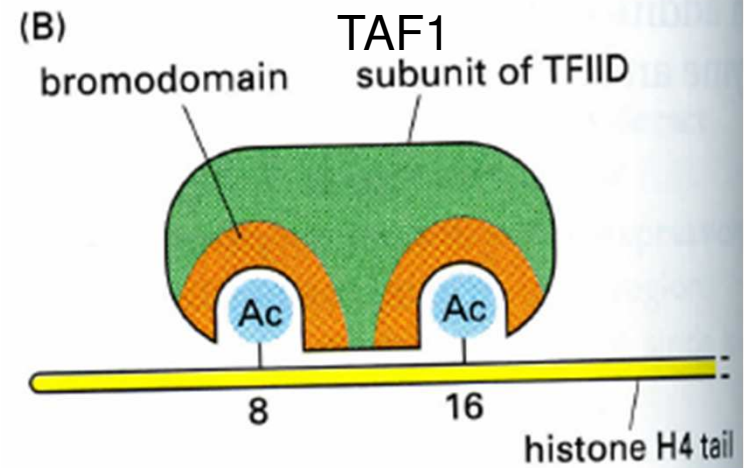
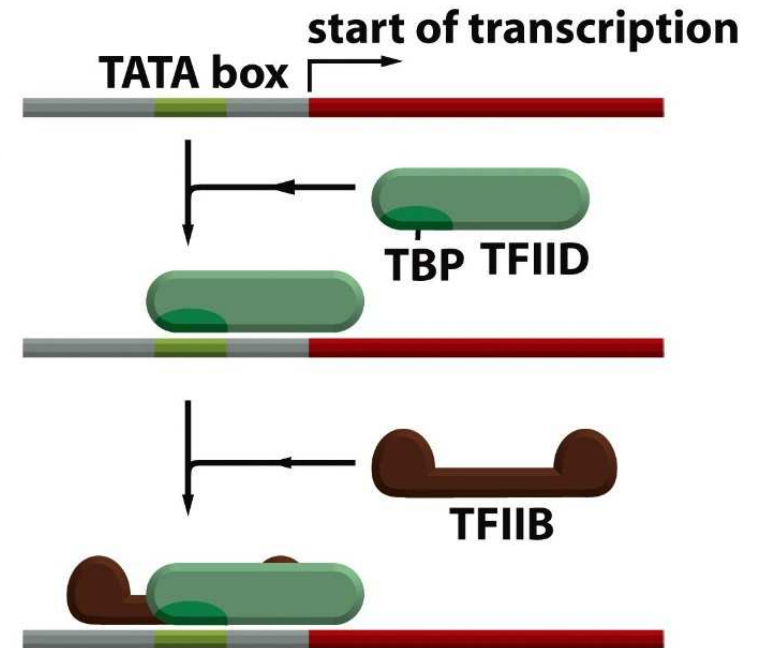


Transkripce

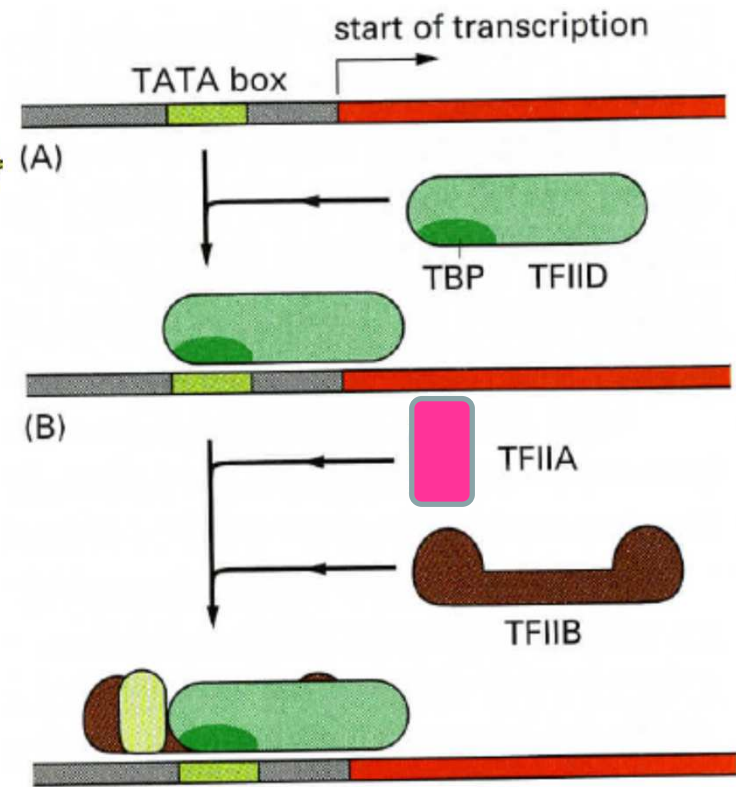
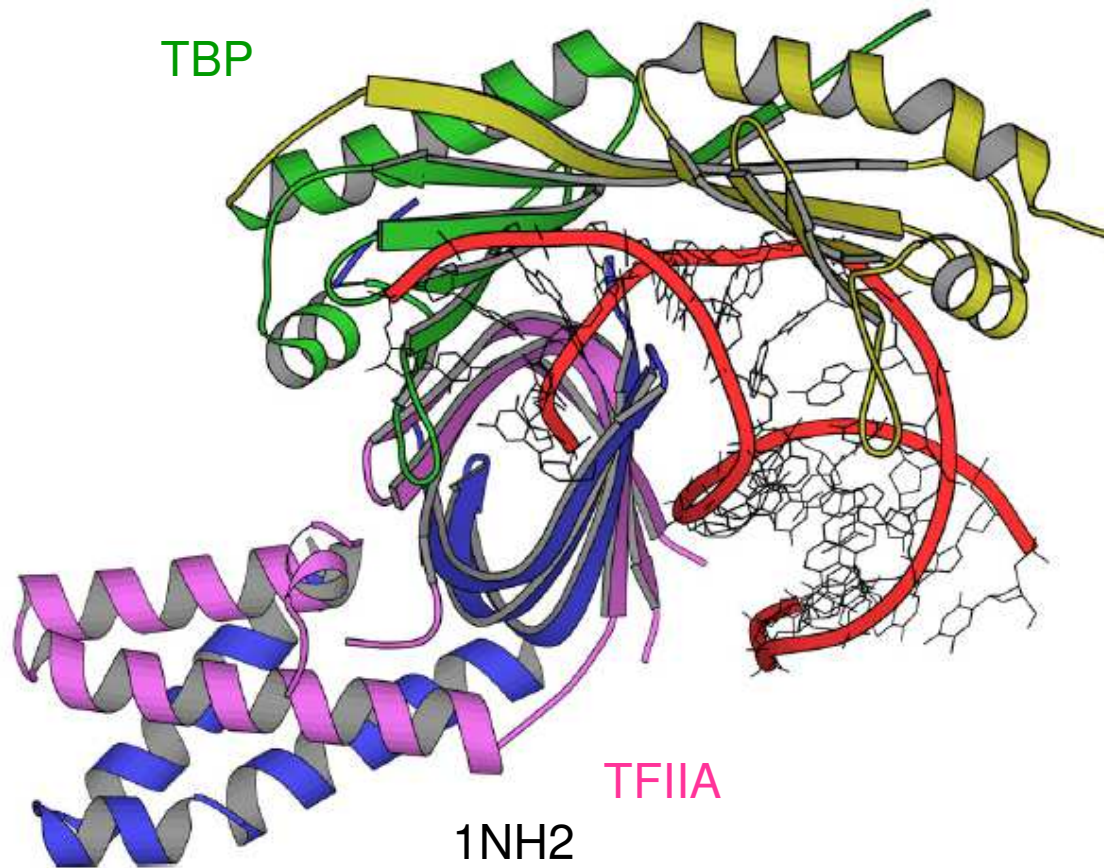
- Aktivace – specifické TF
- Iniclace – základní TF



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

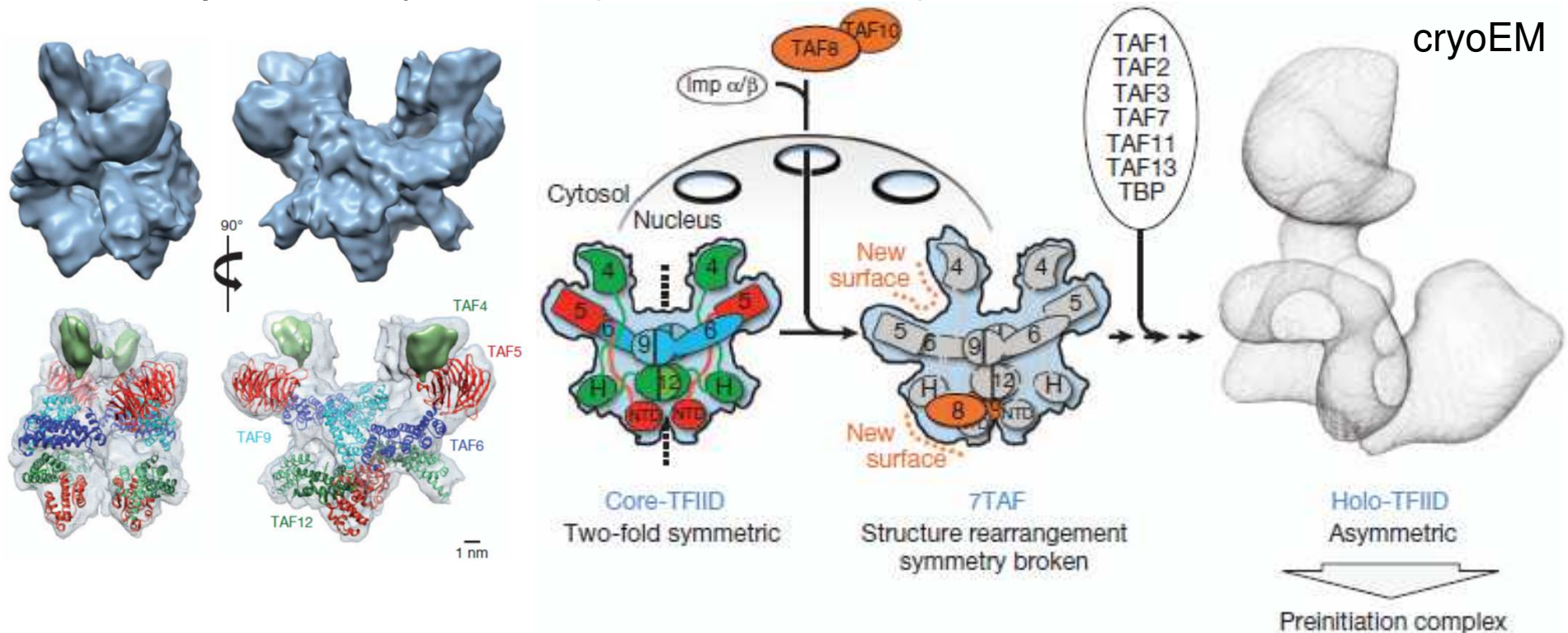


- TBP (v rámci TFIID) nastavuje začátek transkripce na molekule DNA (zajišťuje správnou pozici TFIID)

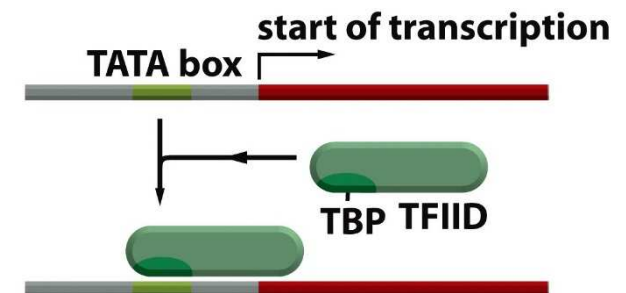


Liljas a spol.

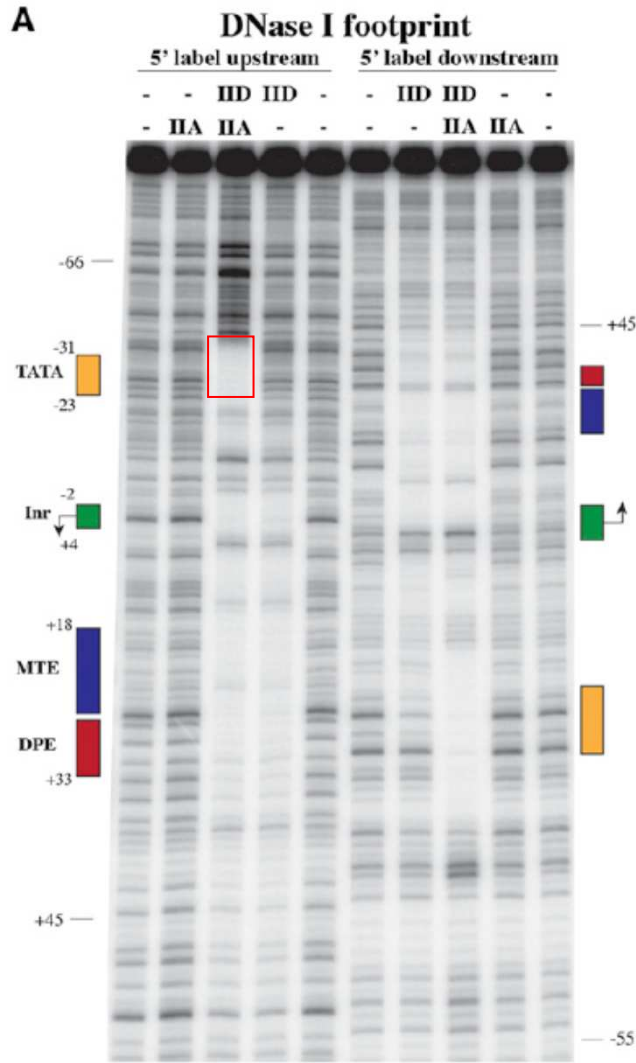
- TFIID (1MDa, TAFs) komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému (nukleace PIC) Bieniossek et al., Nature, 2013



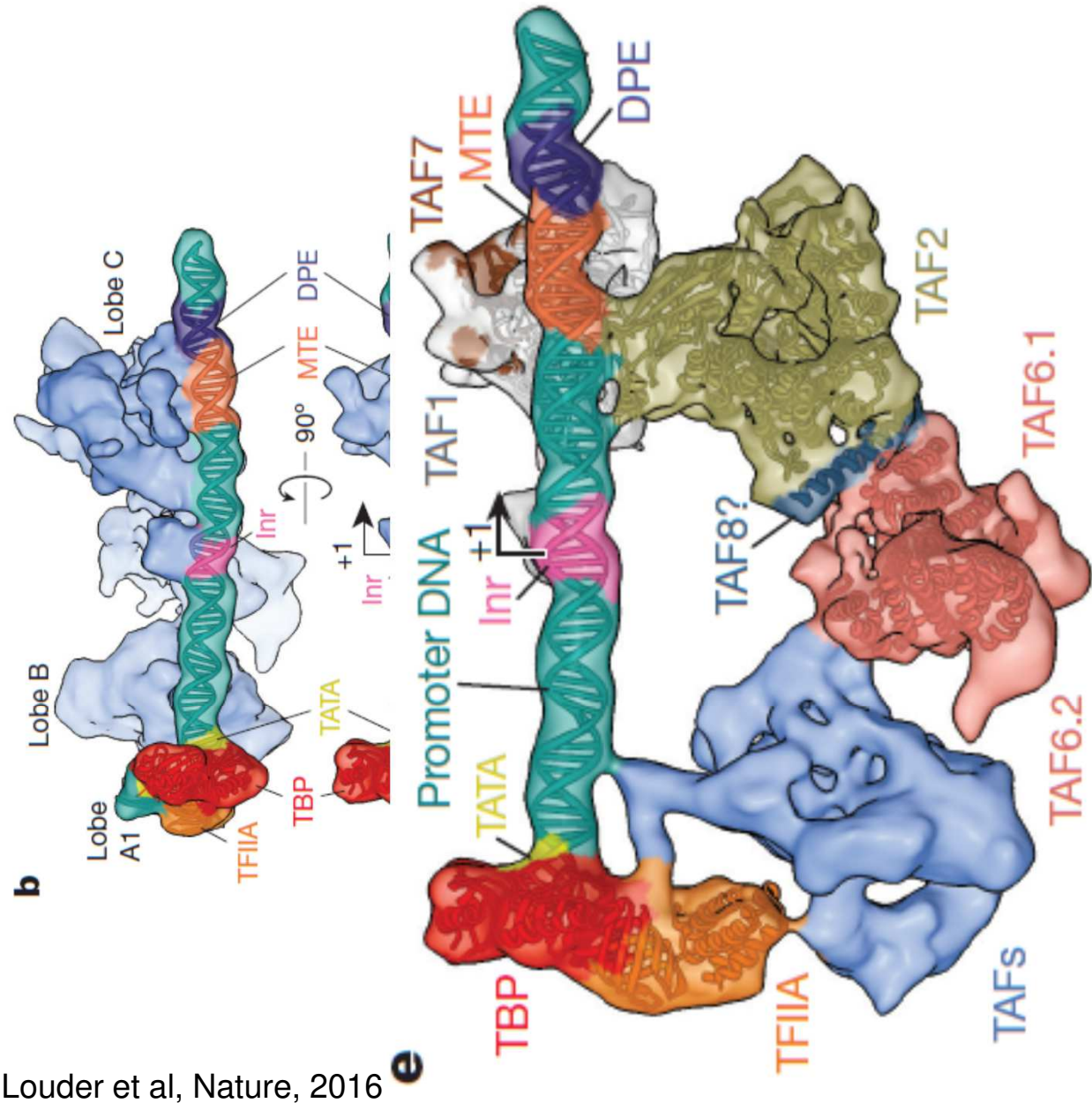
- jádro komplexu (symetrické) tvoří TAF4, 5, 6, 9 a 12 - po připojení všech podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční (asymetrický) holokomplex (PIC)



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

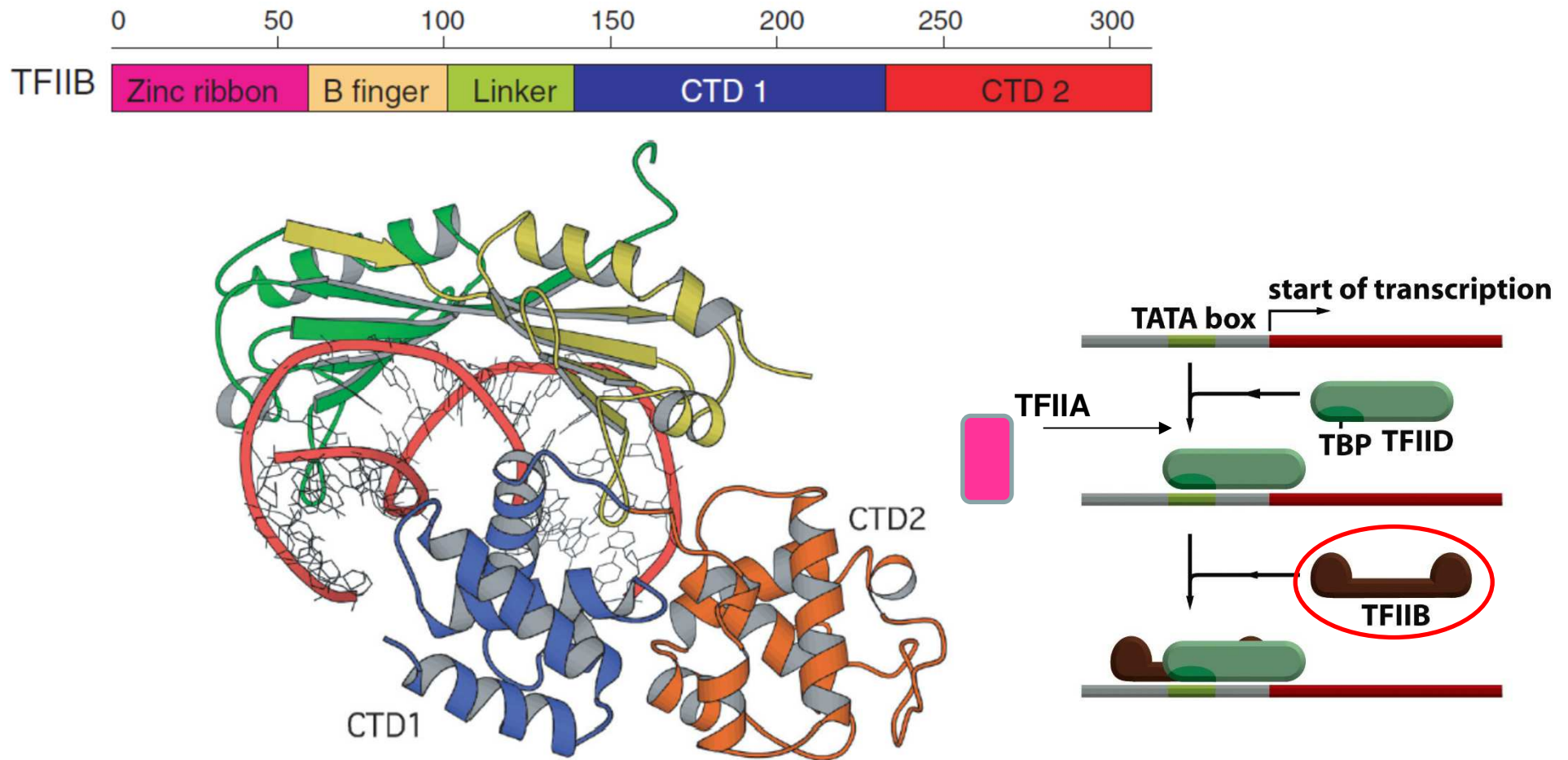


Cianfrocco et al, Cell, 2013



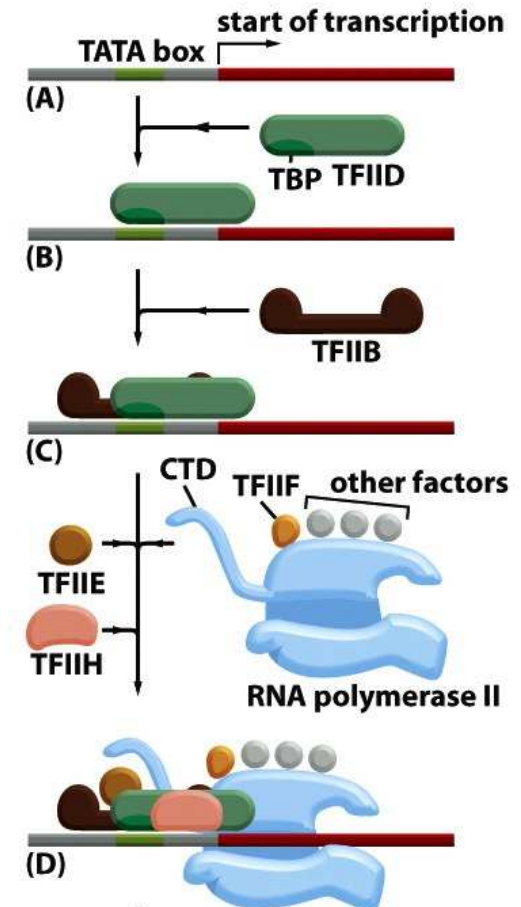
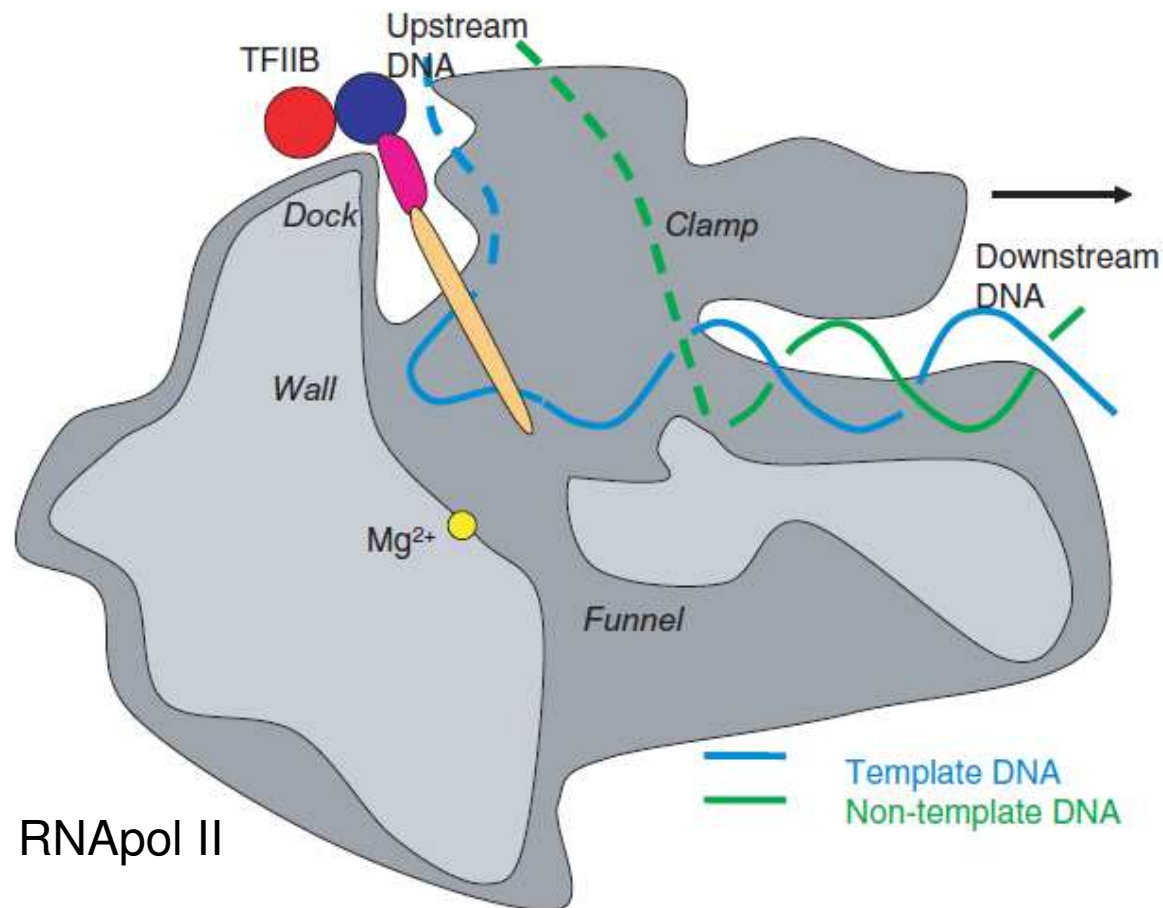
Louder et al, Nature, 2016

pro další postup transkripce je klíčový TFIIIB – propojuje TFIIID-TFIIA s RNAPol II



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

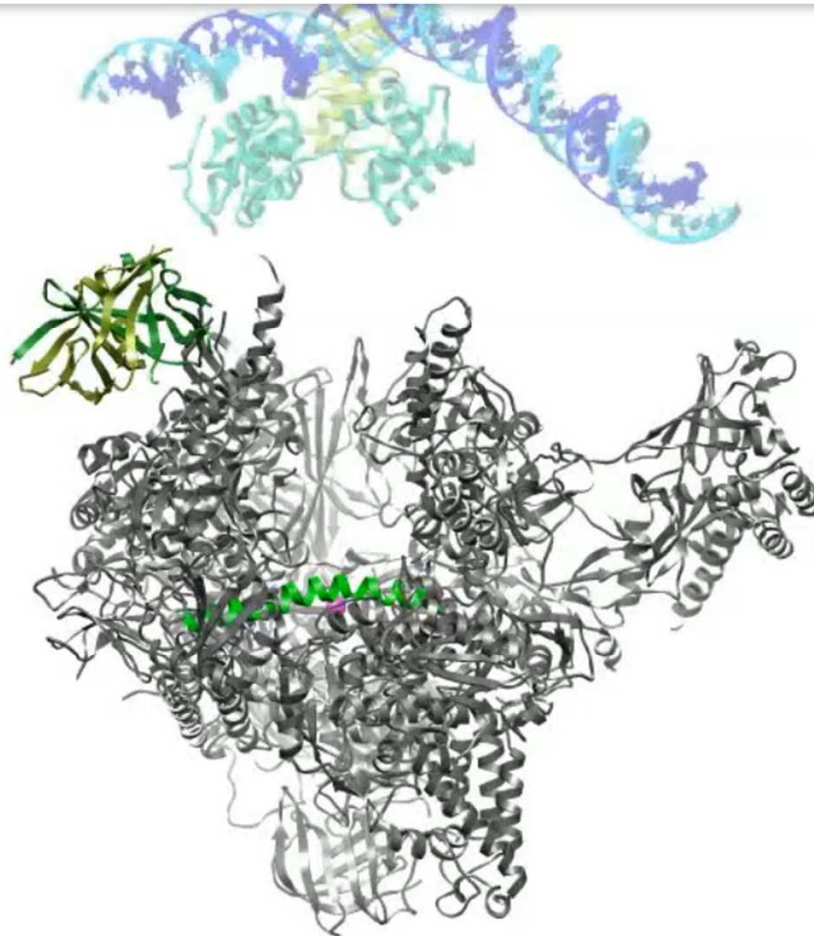
- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje ji vůči TFIID/TBP-DNA komplexu
- umístí DNA do aktivního centra/cleft RNA polymerázy
- vazba Zn-ribbon na Dock, B-finger/reader do RNA tunelu



- 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

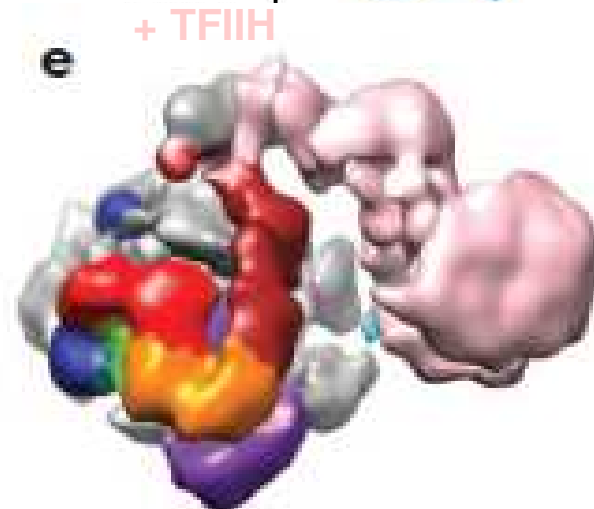
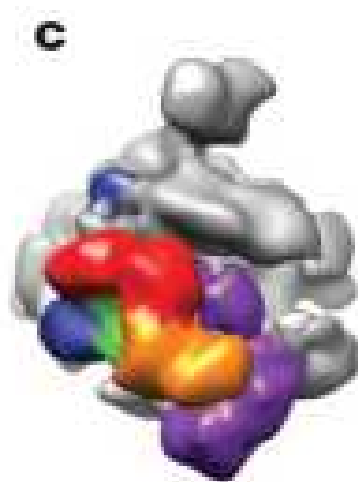
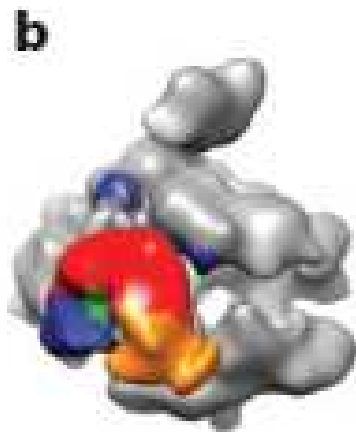
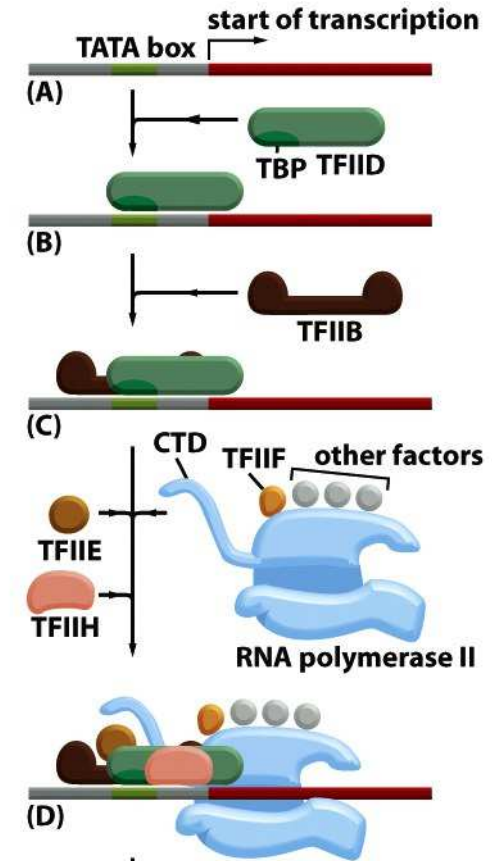
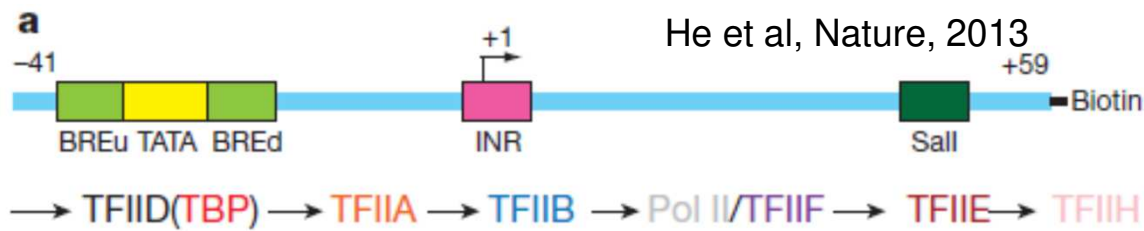


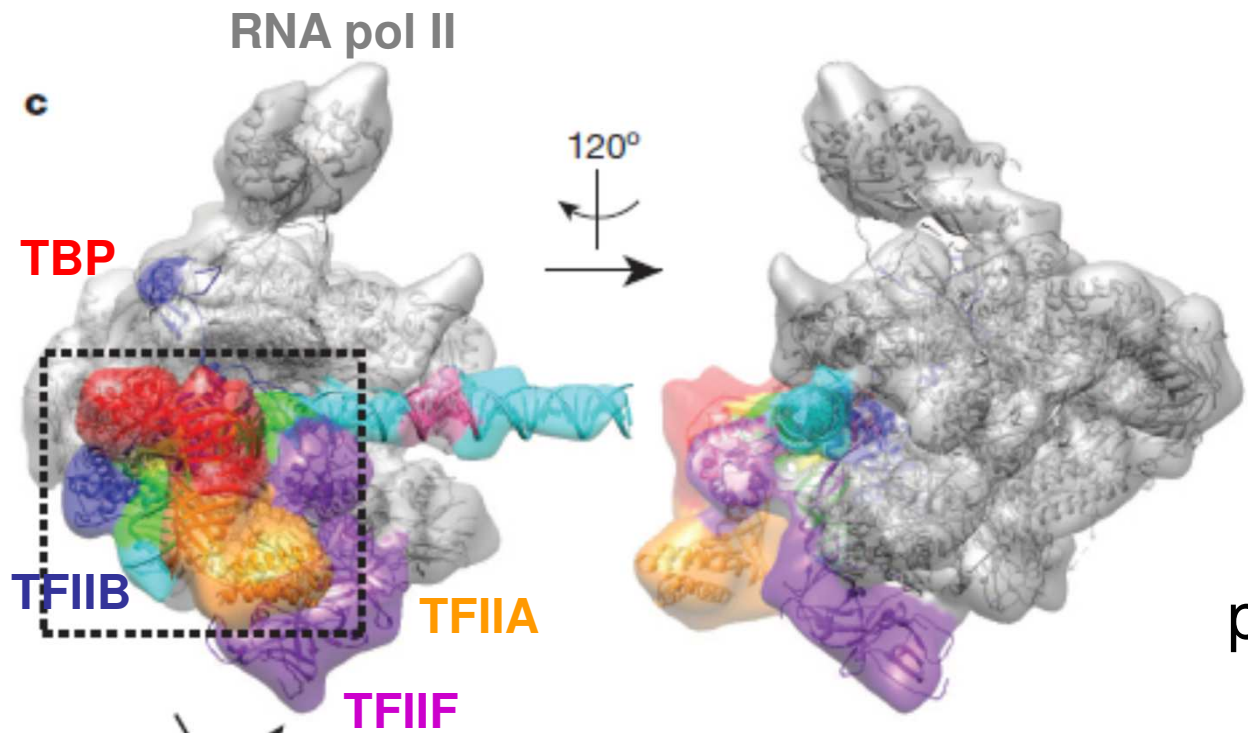
TBP
Closed DNA
TFIIB core



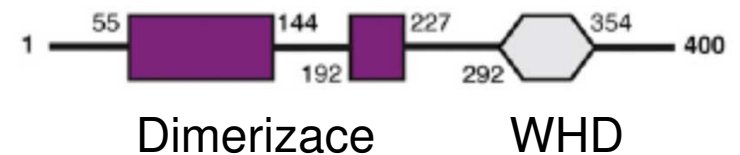
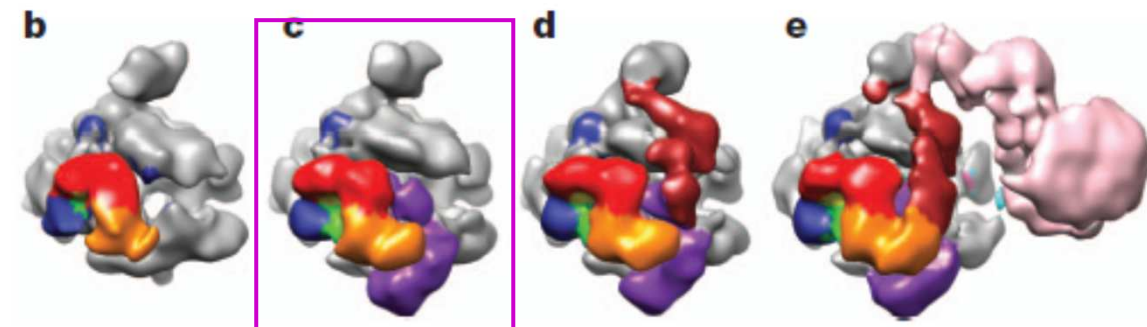
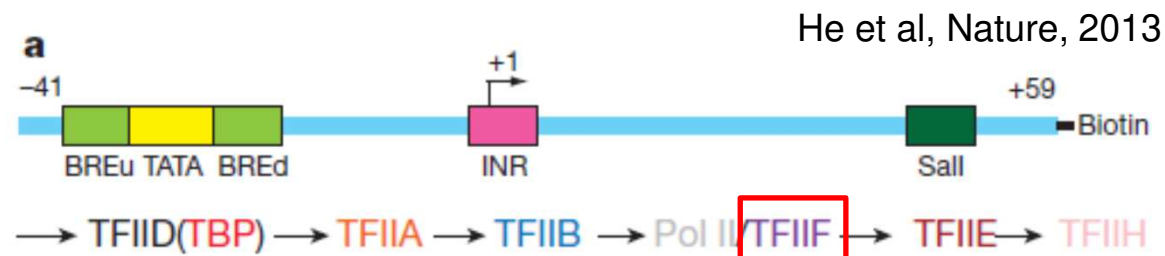
Rekonstrukce celého PIC

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

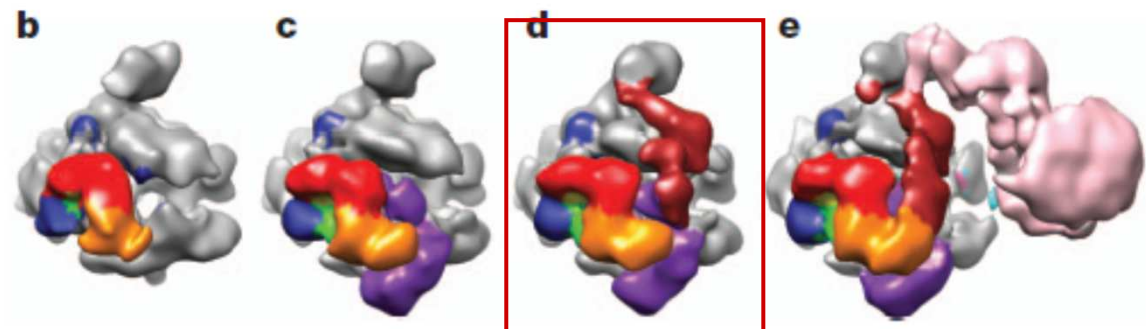
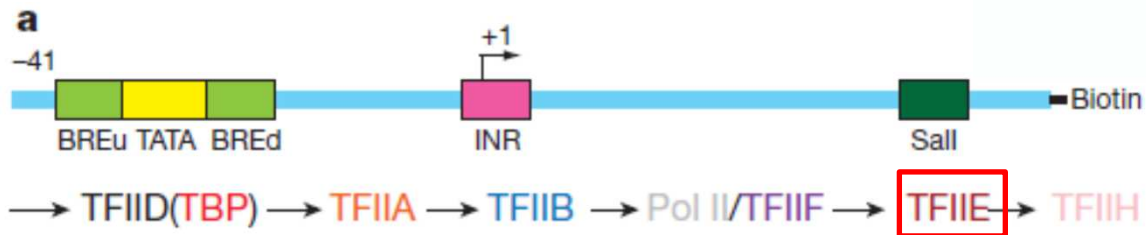
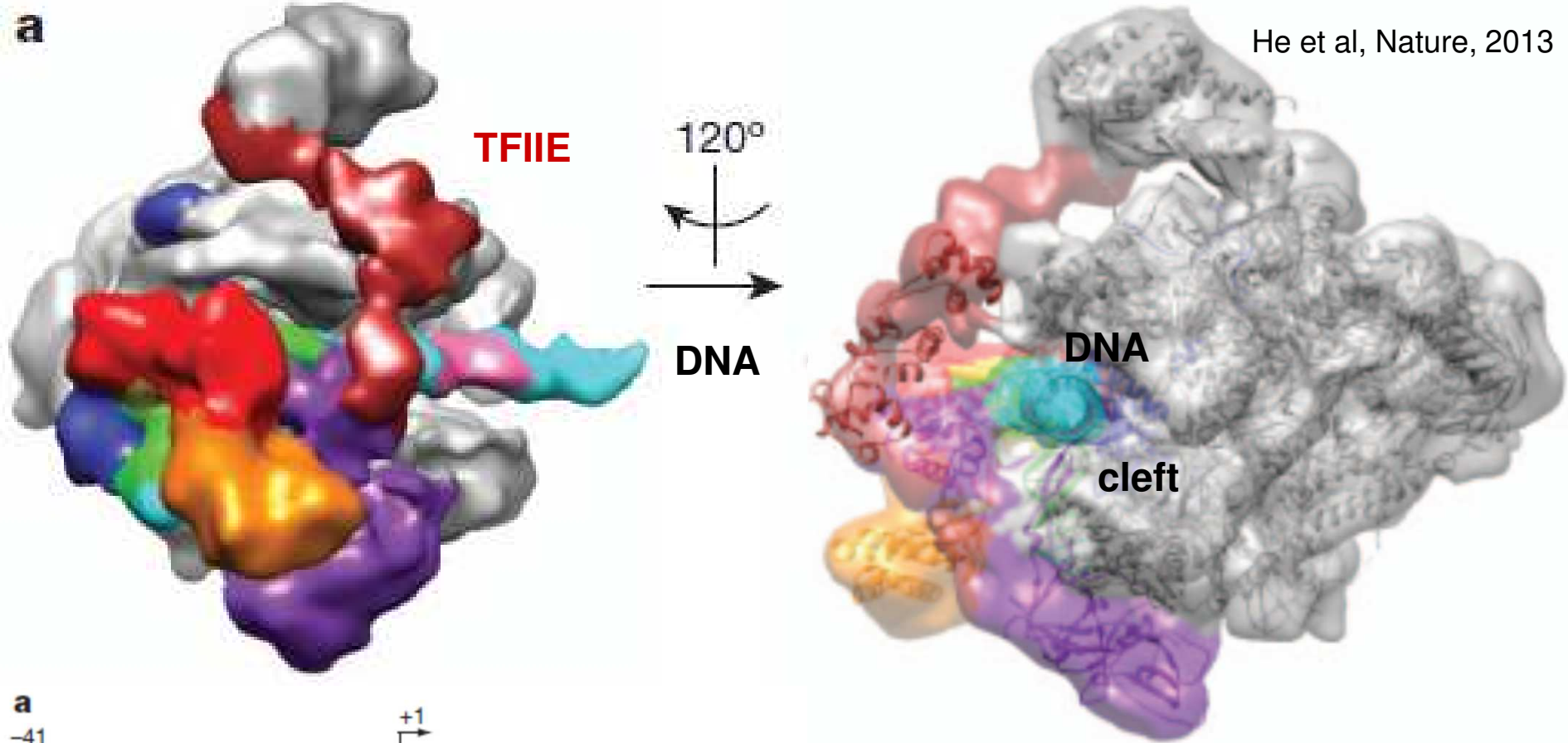




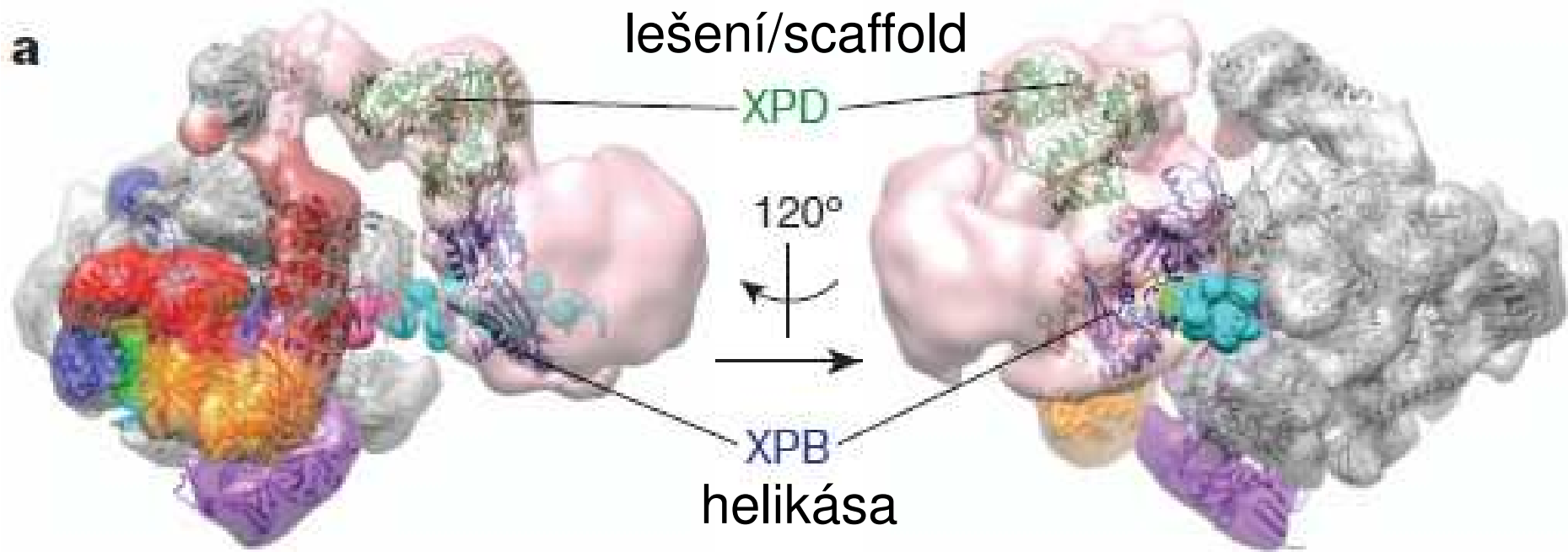
- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})
- váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu



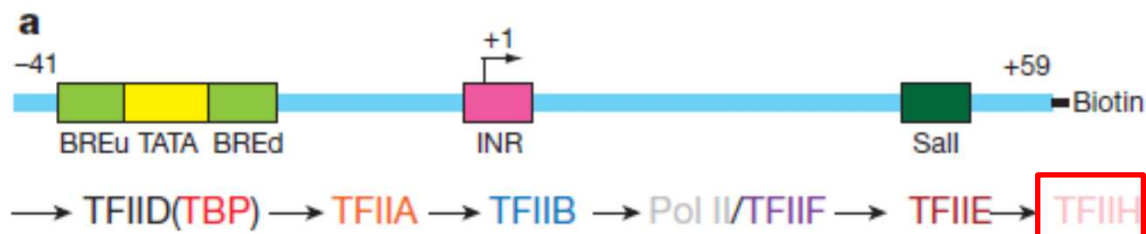
Vanini & Cramer, Mol Cell, 2012



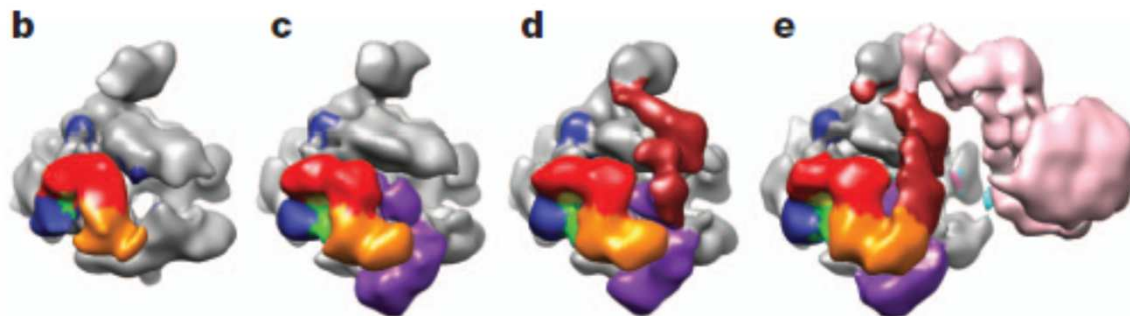
- TFIIF váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu
- tandem 4x WHD uzamyká DNA v RNAPol II prohlubni



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



lidský PIC komplex
He et al, Nature, 2013

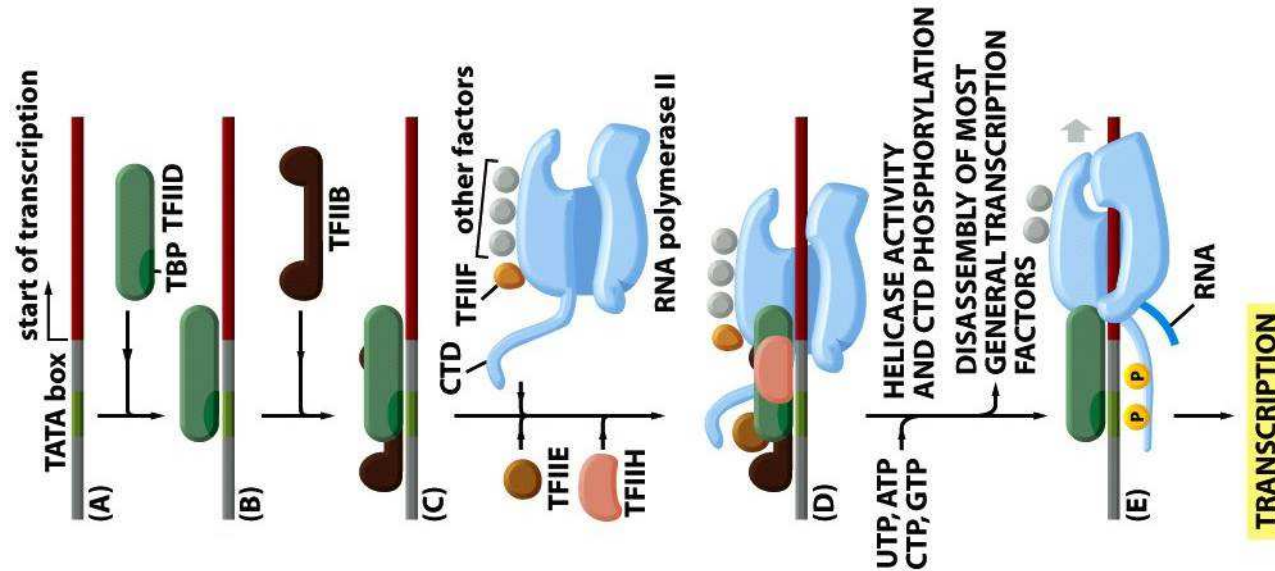
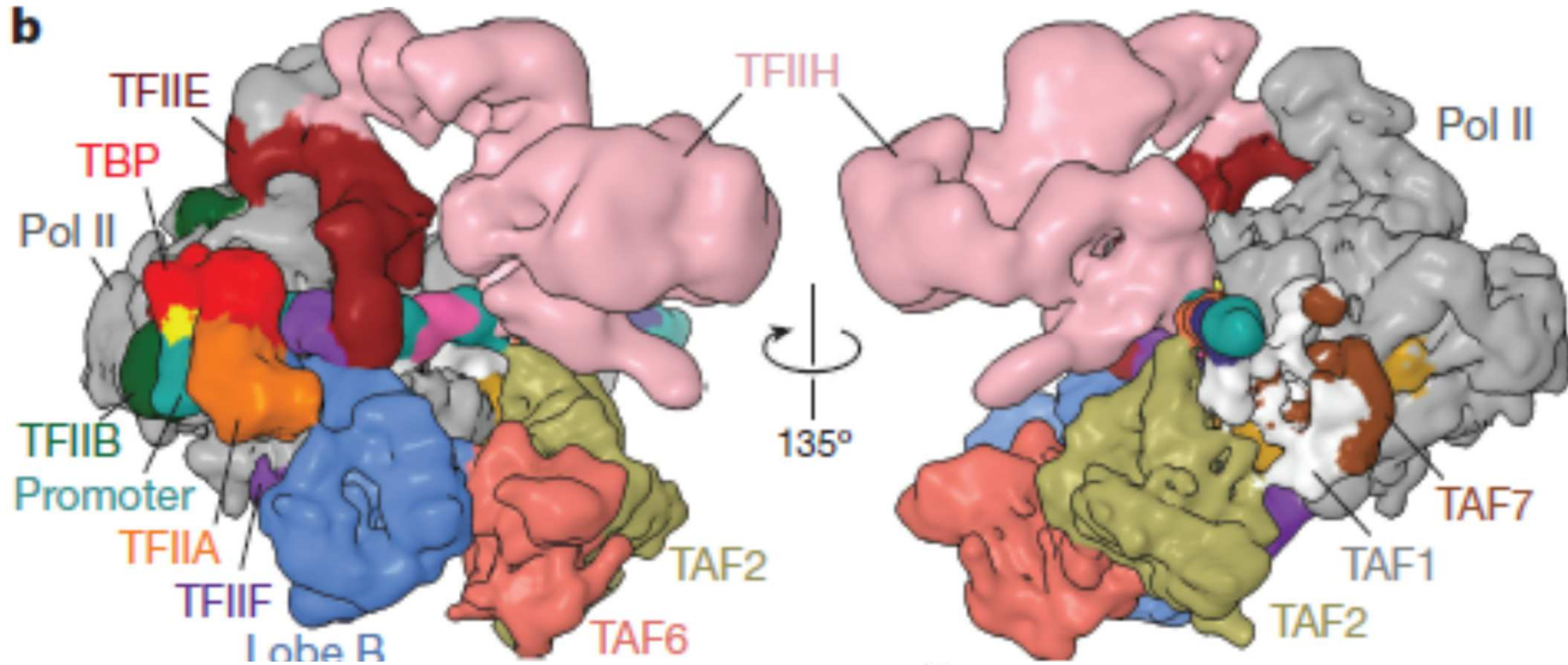


- **TFIIF** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)

- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvoušroubovici

Kompletní PIC i s částí TFIIID

Louder et al, Nature, 2016





Plaschke et al, Nature, 2016

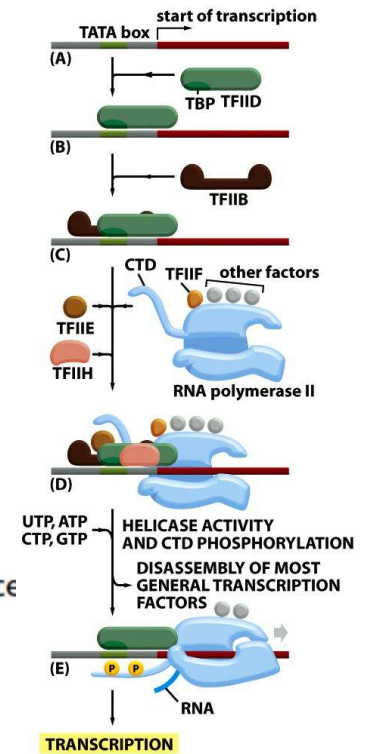
<https://www.mpibpc.mpg.de/15370105/initiation.mp4>

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



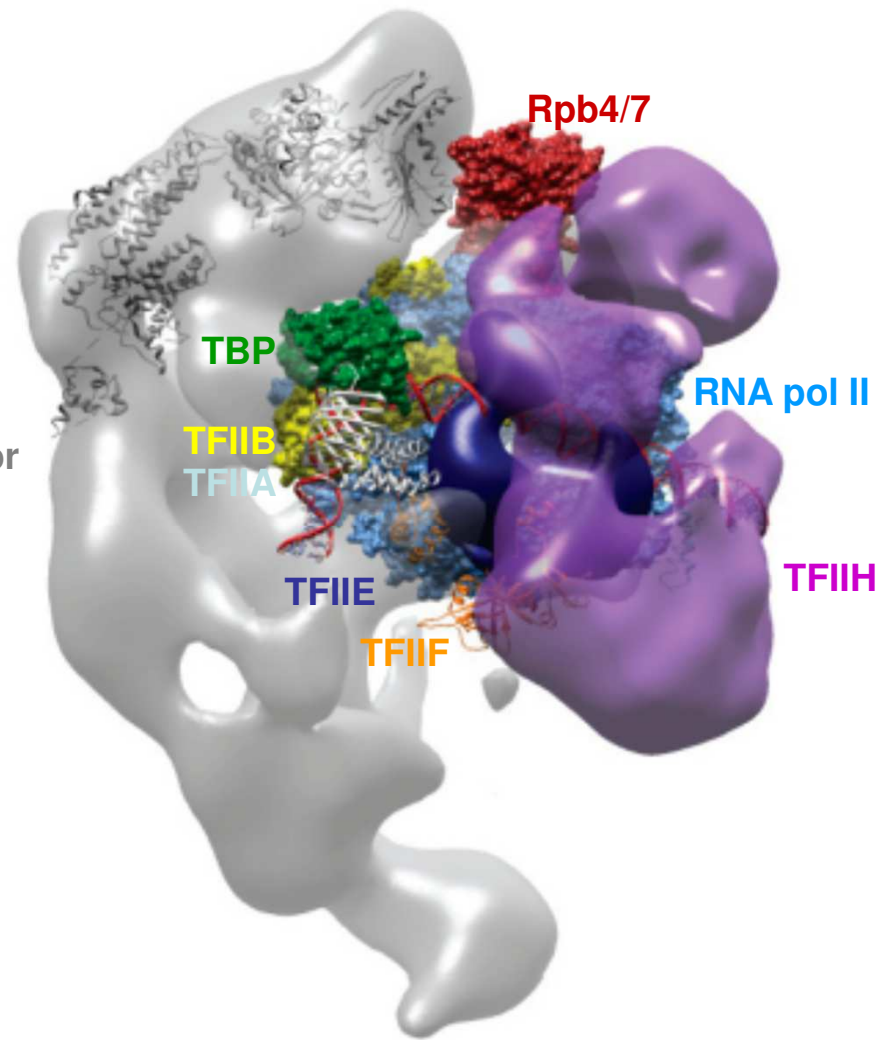
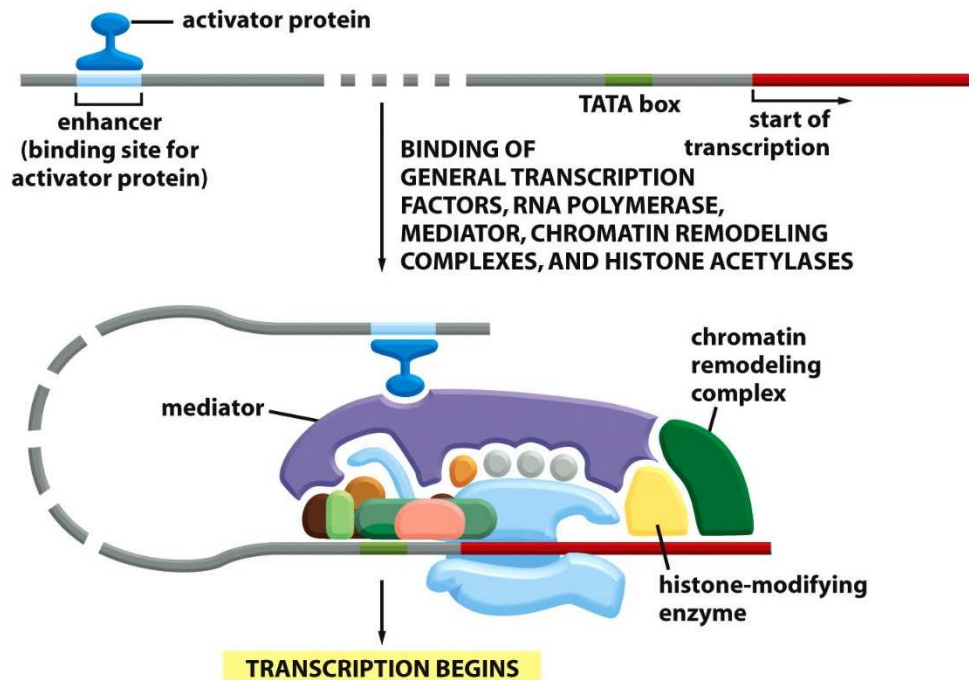
Thomas et al., CRiBMB, 2006

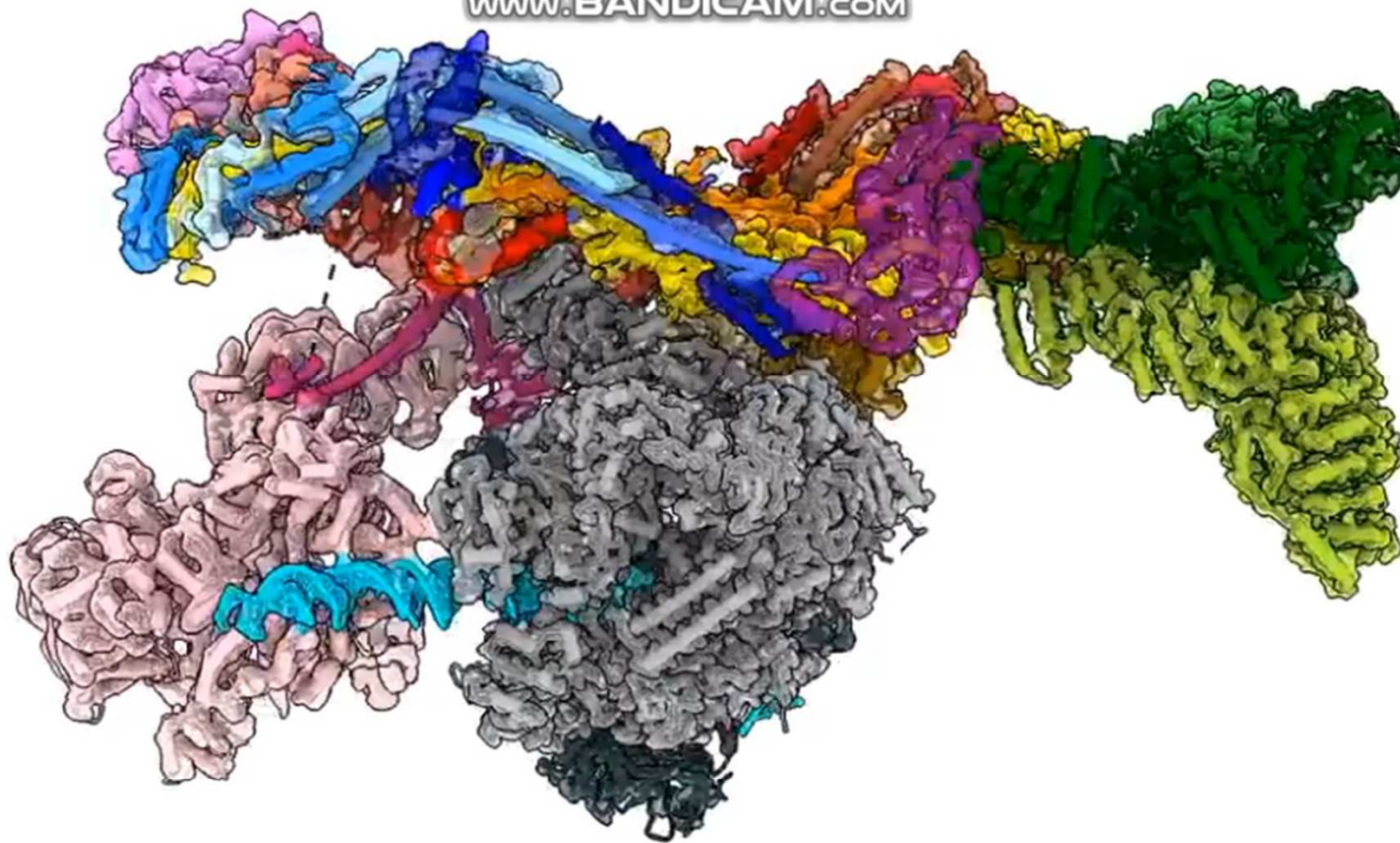
RPB1 CTD (heptapeptide YSPTSPS repeat) fosforylace

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

...

mediator





cPIC: RNA Pol II GTFs DNA

TFIIF: cTFIIH Mat1 cyclin-H CDK7

MedHead: Med6 Med8 Med11 Med17 Med18 Med20 Med22 Med27 Med28 Med29 Med30

MedMiddle: Med1 Med4 Med7 Med9 Med10 Med19 Med21 Med26 Med31

MedTail: Med15 Med16 Med23 Med24 Med25 Scaffold: Med14

0:07

32,1 tis. zobrazení