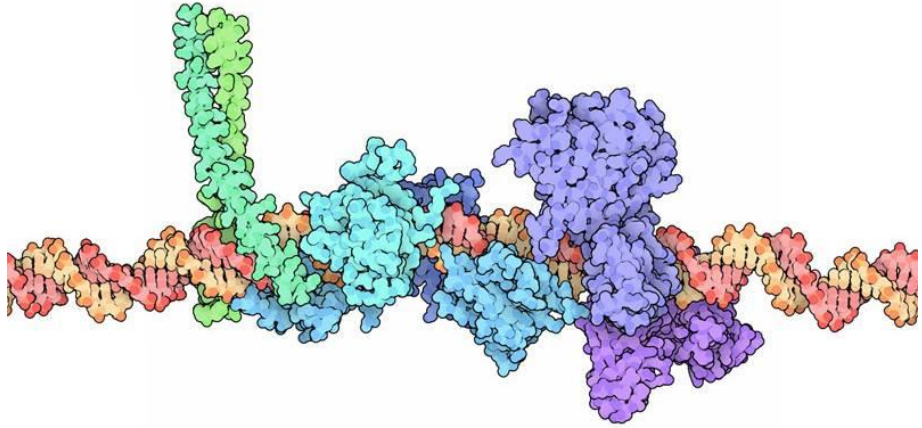
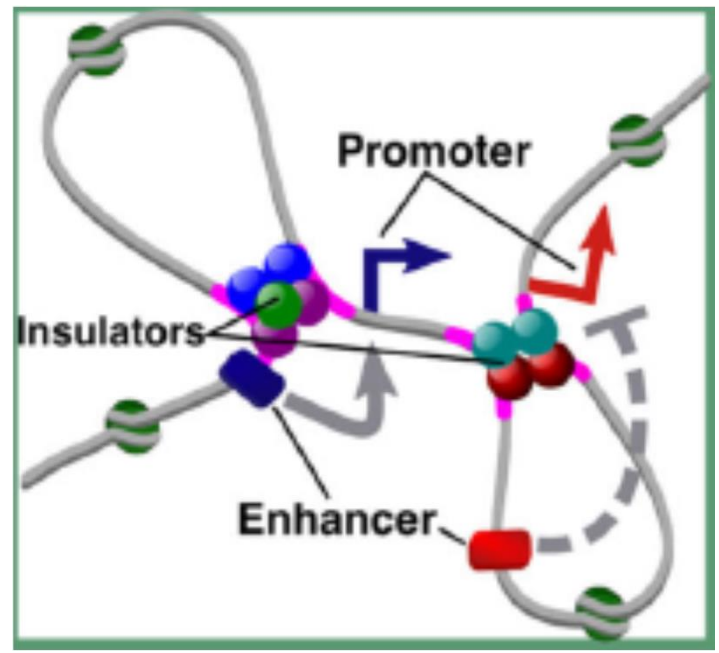
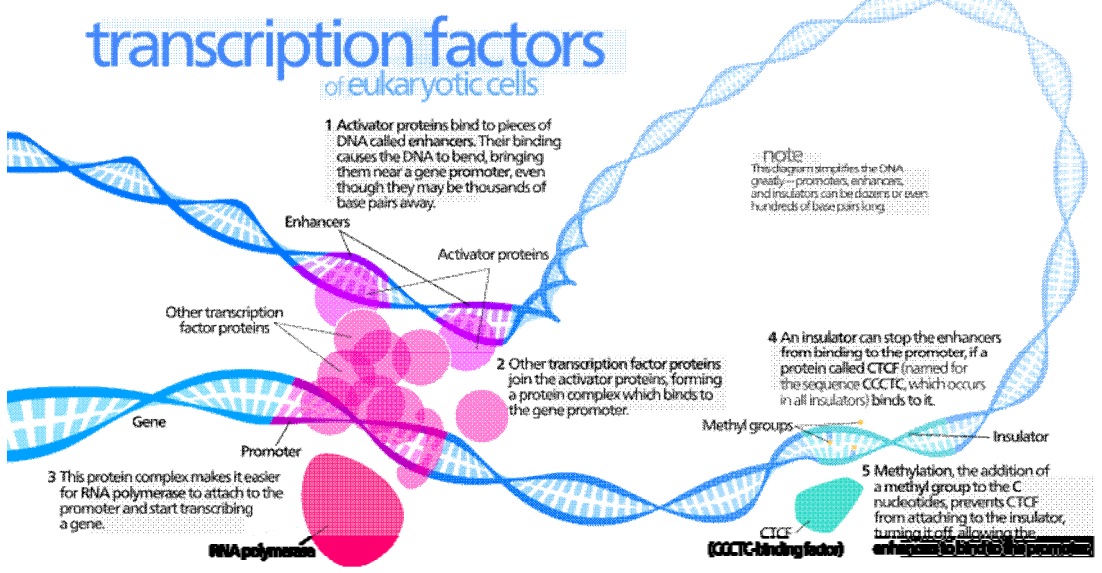


Komplexy spojené s transkripcí

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

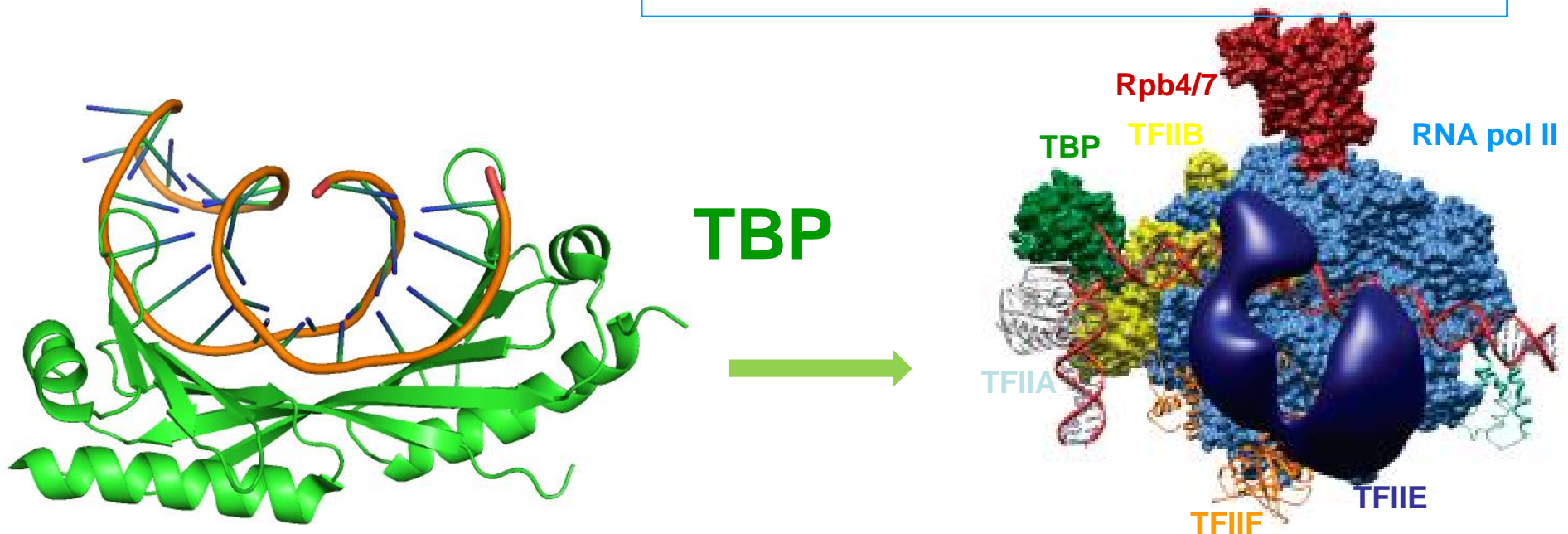


- velký Olábek má velikost odpovídající rozměru α -zrůbvice a má exponované vazebné skupiny
- nejčastěji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)

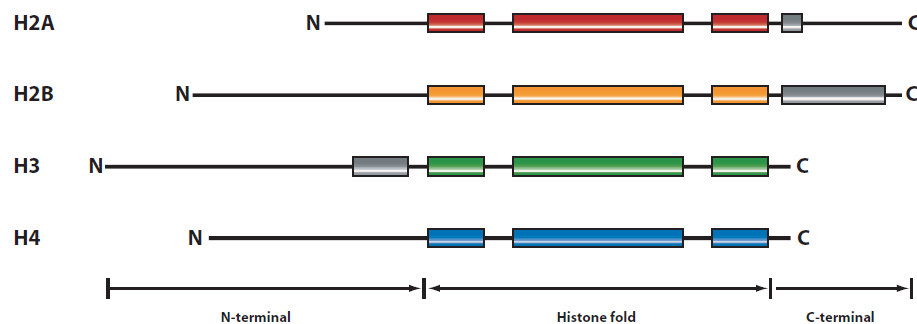


- “ Zipper typ
- “ Helix-turn-helix
- “ Zinkový prst
- “ **Histon, HMG-box**
- “ β -barrel
- “ β -hairpin/ribbon
- “ Smíšené α/β

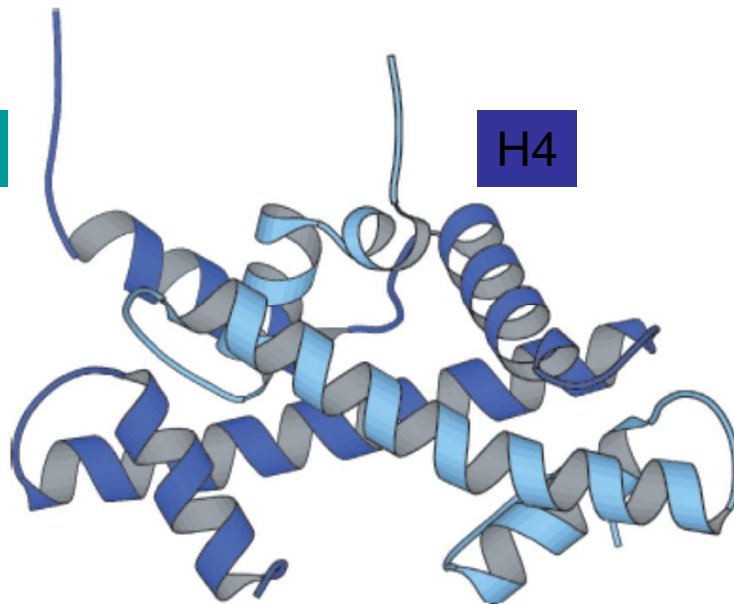
- “ Velký Olábek má velikost odpovídající rozměrům α -zroubovice a má exponované vazebné skupiny
- “ Nejčastěji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)
- “ **Průběh transkripce je skládání komplex**



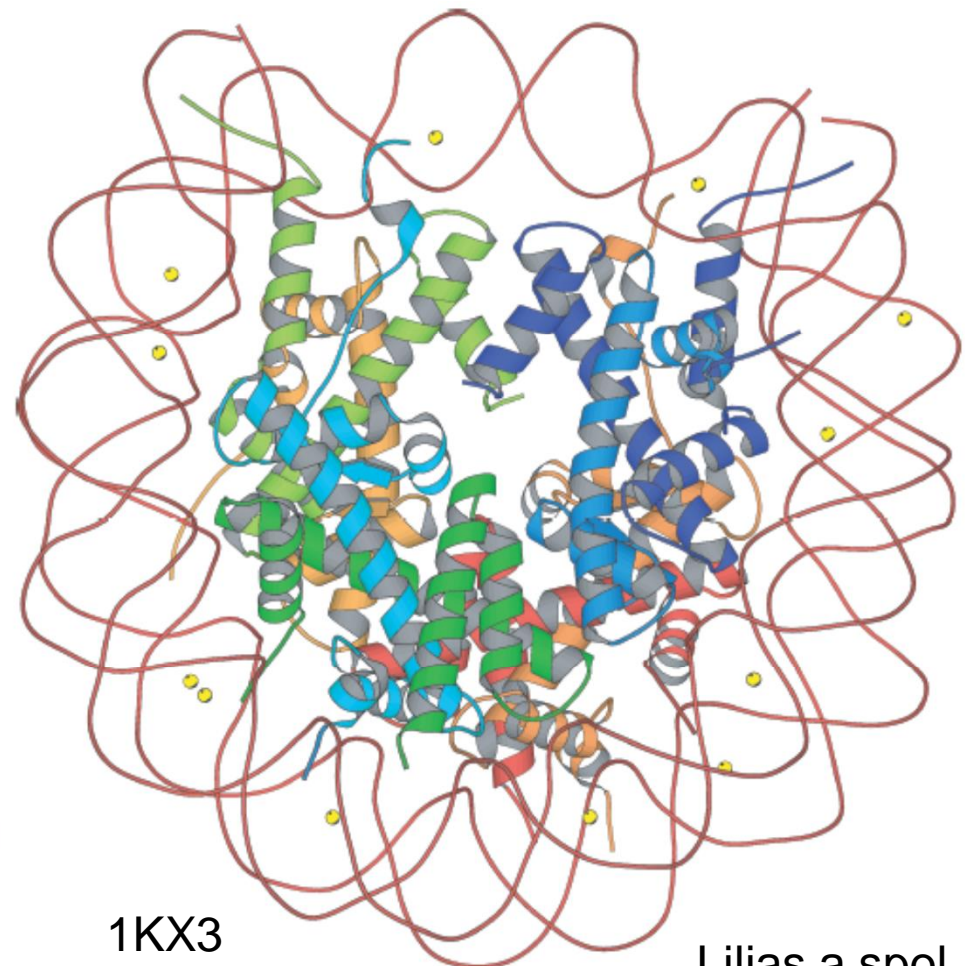
- **histony** vá0ou DNA sekven n nespecificky
- histonové podjednotky (H2A, H2B, H3, H4) obsahují svazky 3-4 zroubovic skládaných proti sob (histon fold)
- DNA se obtá í kolem válcovitého oktameru (2x4 histony)
- zroubovice se vá0ou na cukrfosfátovou kostru DNA



H3



H4



1KX3

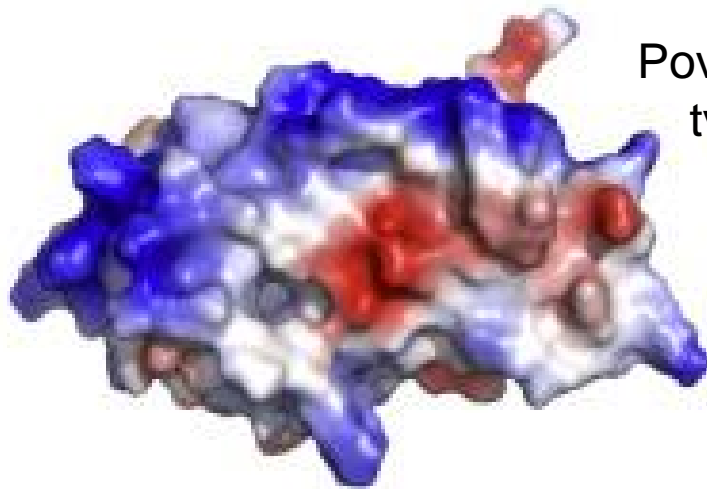
Liljas a spol.

Sestavování nukleozomu:

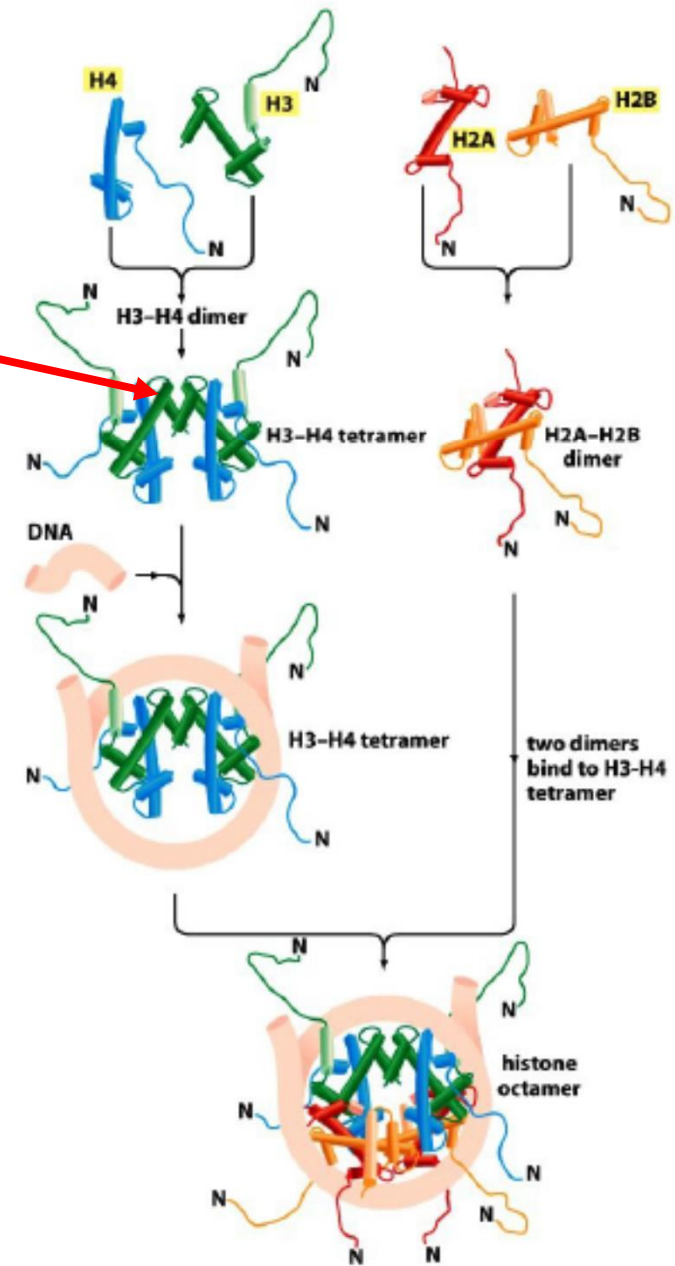
klíčová interakce mezi dvěma H3-H4 dimery je zprostředkována histonem H3

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

Povrch/kontakt tvoří lysiny a argininy

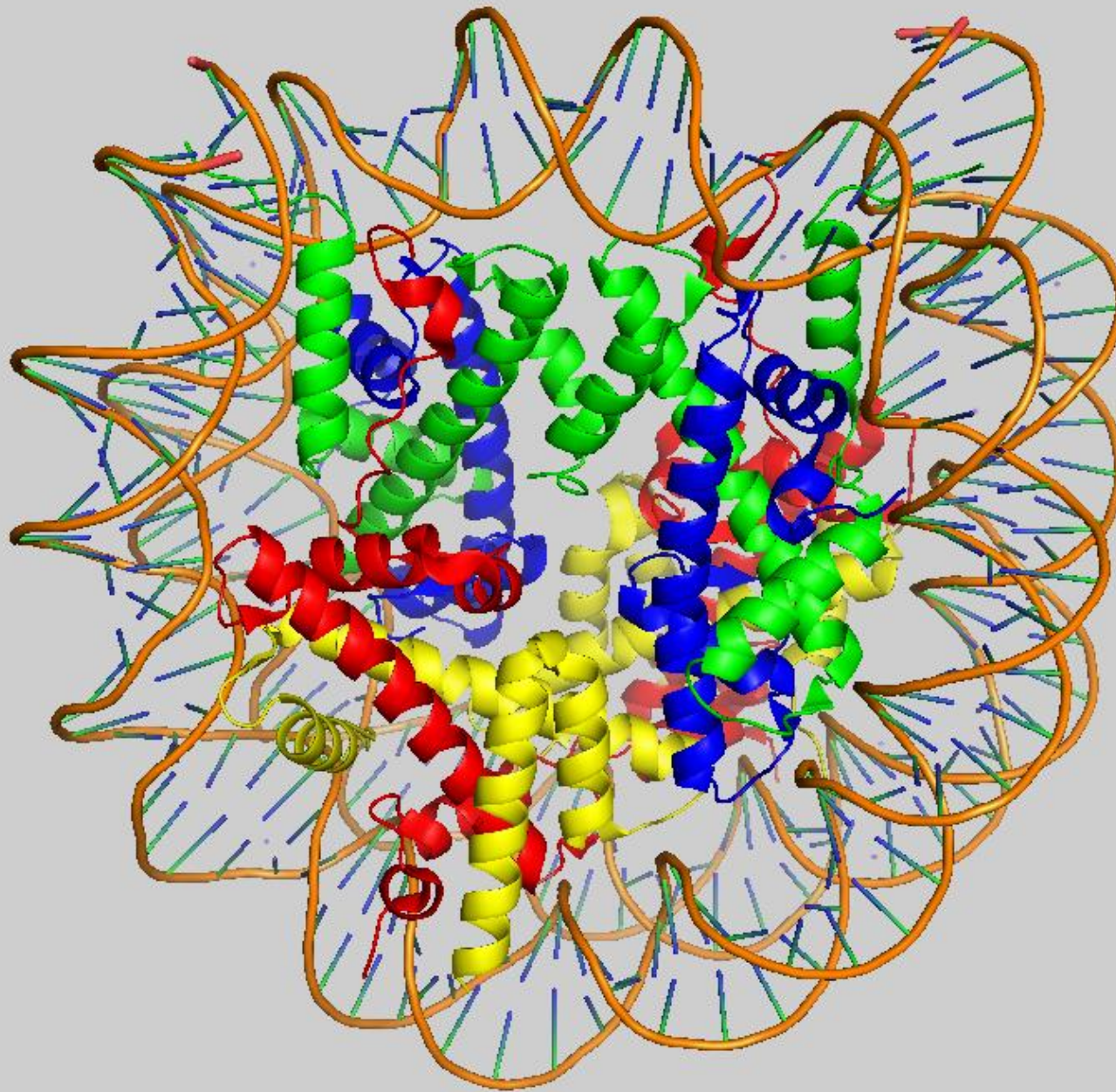


H2B/H2A

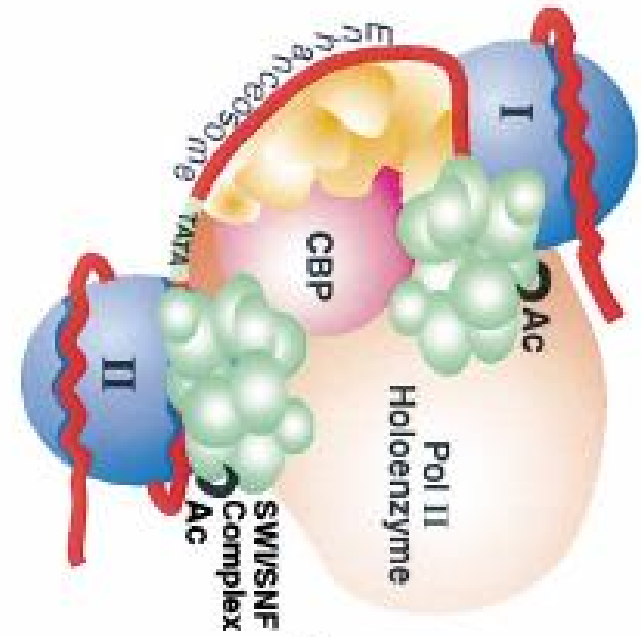


H3/H4 interagují s obma vlákny . silnější vazba

1KX3

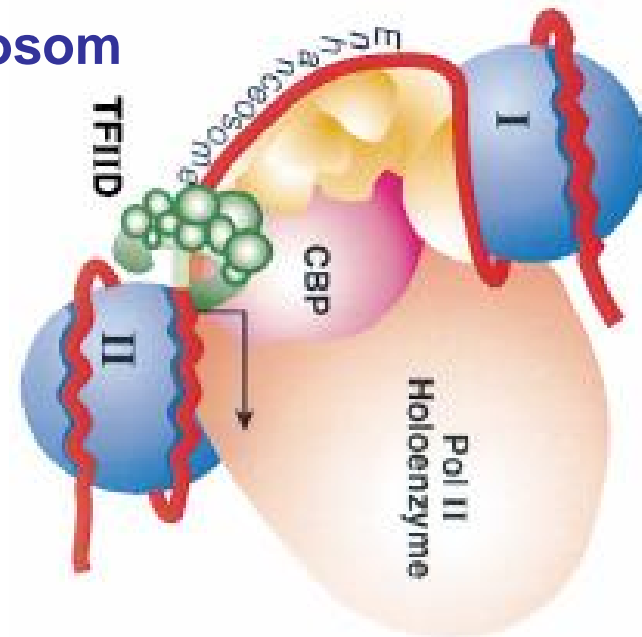
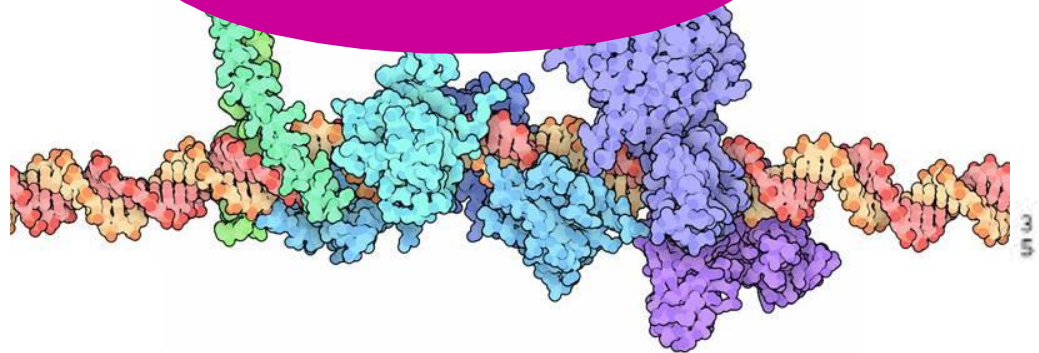


- AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- κ B pokrývá sekvenci -102 a 0-47 bází upstream od počátku transkripce
- nukleosom-free oblast (nukleosom downstream zakrývá TATA-box)
- všechny podjednotky (TA domény) enhanceosomu interagují s CBP/p300 acetylásou
- acetylace nukleosomu vede k jeho remodelingu/přemístění
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP/TFIID a RNA polymerasy II



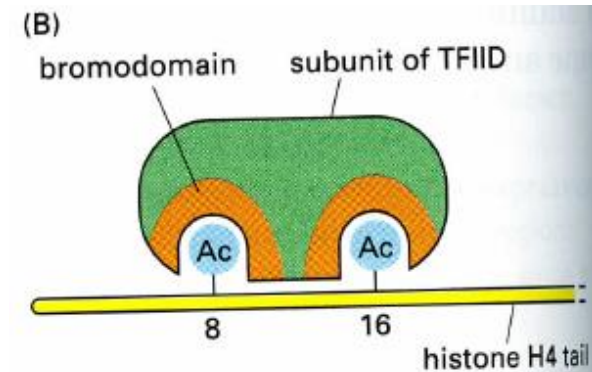
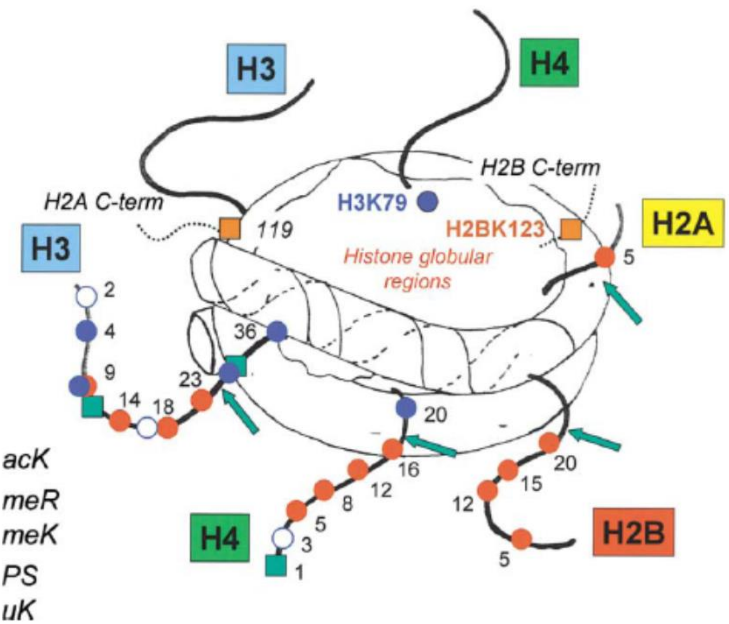
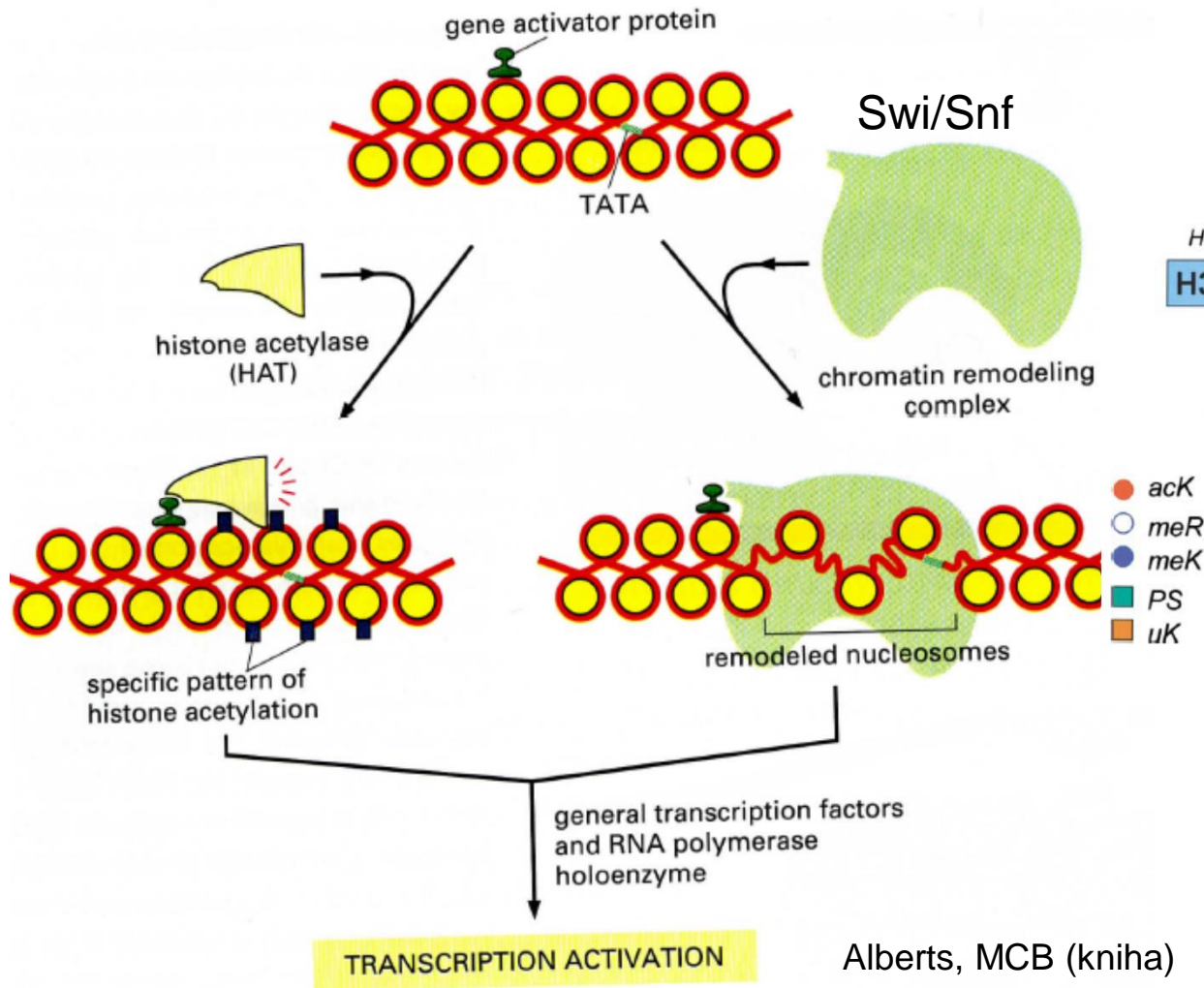
IFN- β enhanceosom

CBP/p300



Modifikace histon

- acetylace rozvol uje vazbu oktameru a zp ístup uje sekvence DNA pro TBP
- TFIID se vá0e na Ac-H4 prost ednictvím bromodomény TAF1 proteinu



Alberts, MCB (kniha)

Modifikace histon

- acetylace rozvol uje vazbu oktameru a zp ístup uje sekvence DNA pro TBP
- TFIID se vá0e na Ac-H4 (K8, K16) prost ednictvím bromodomény TAF1 proteinu

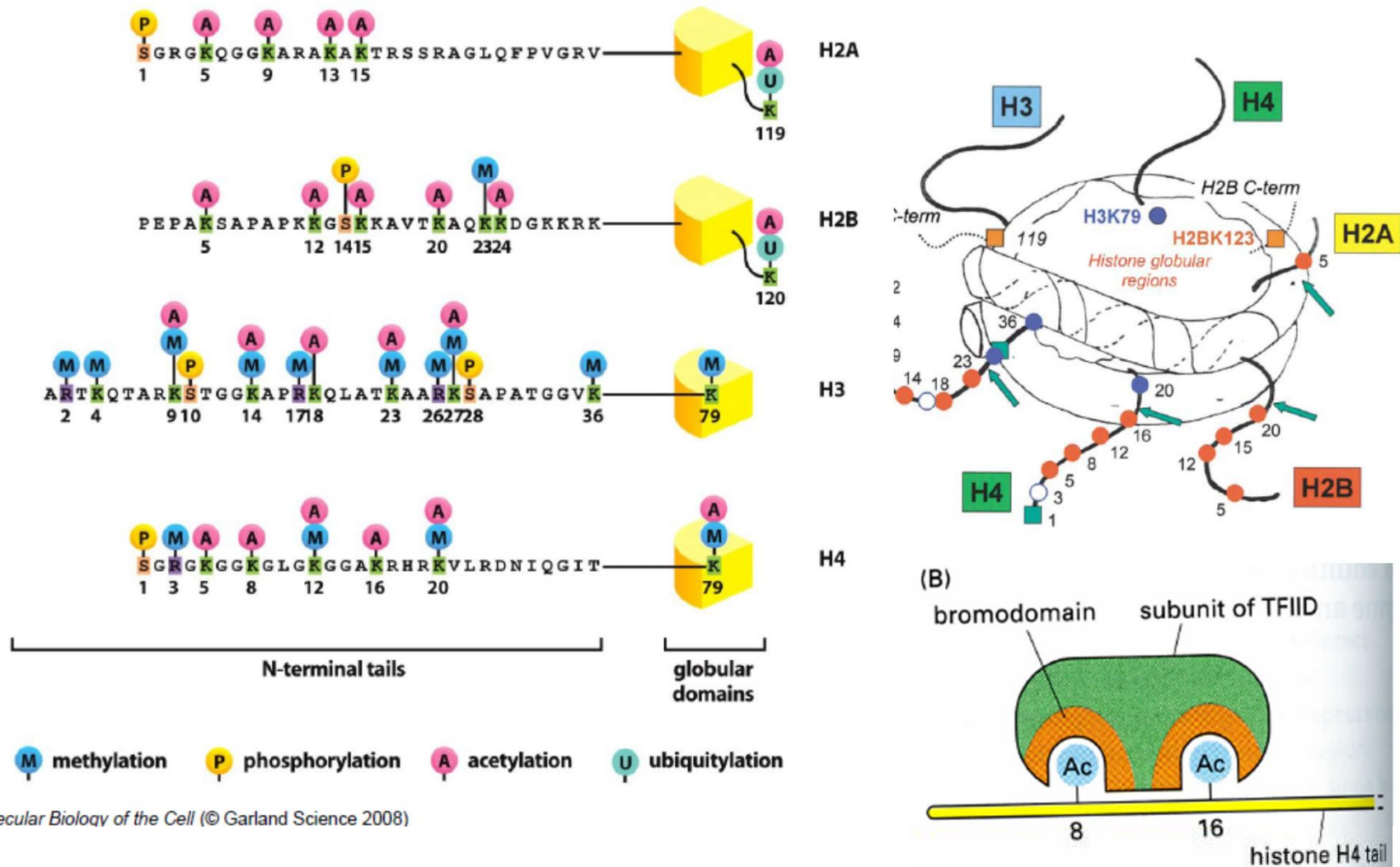
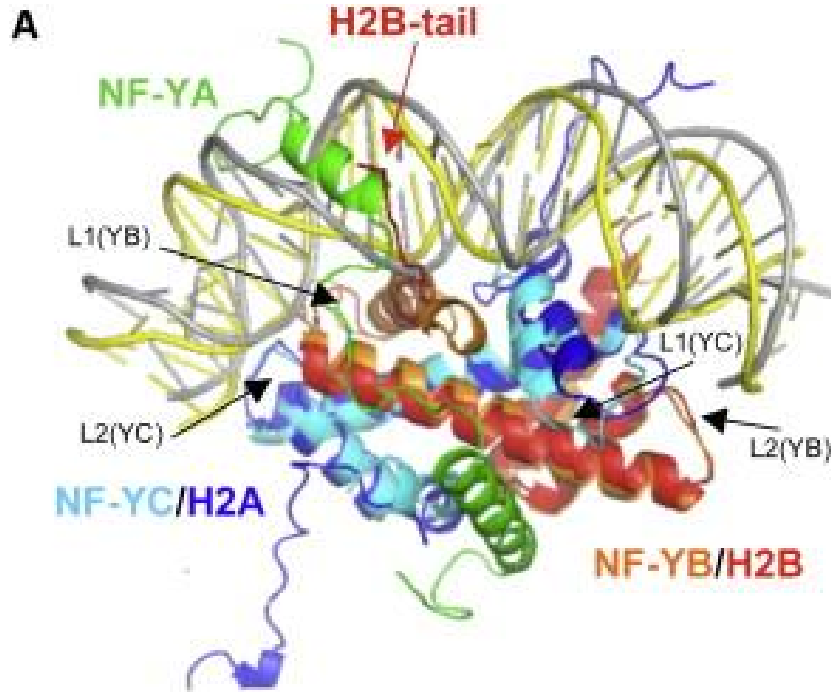
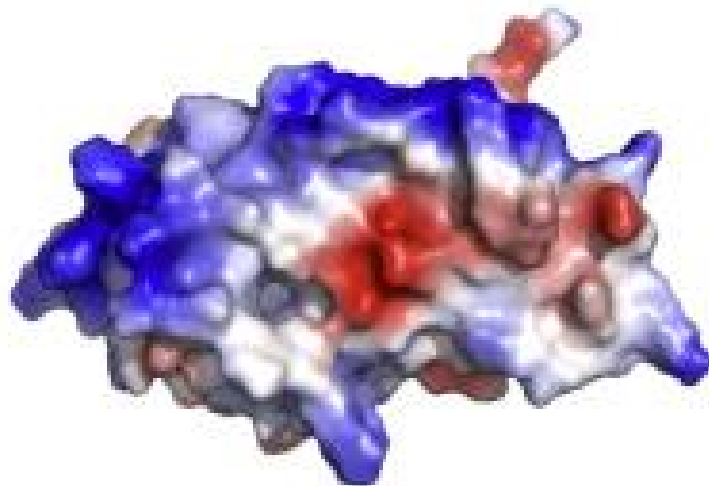


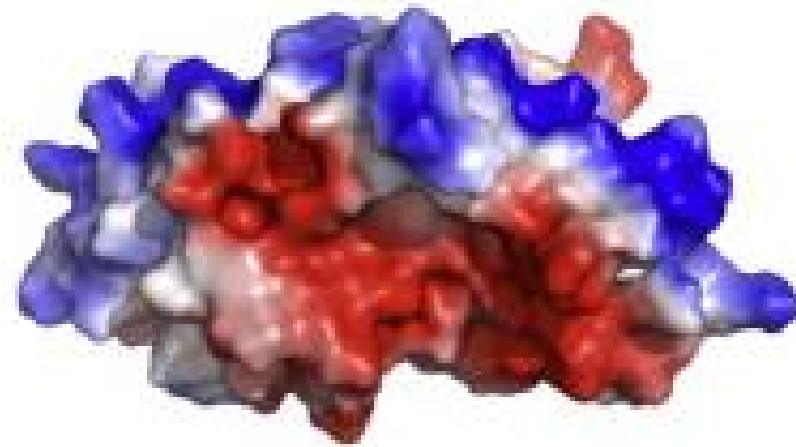
Figure 4-39b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



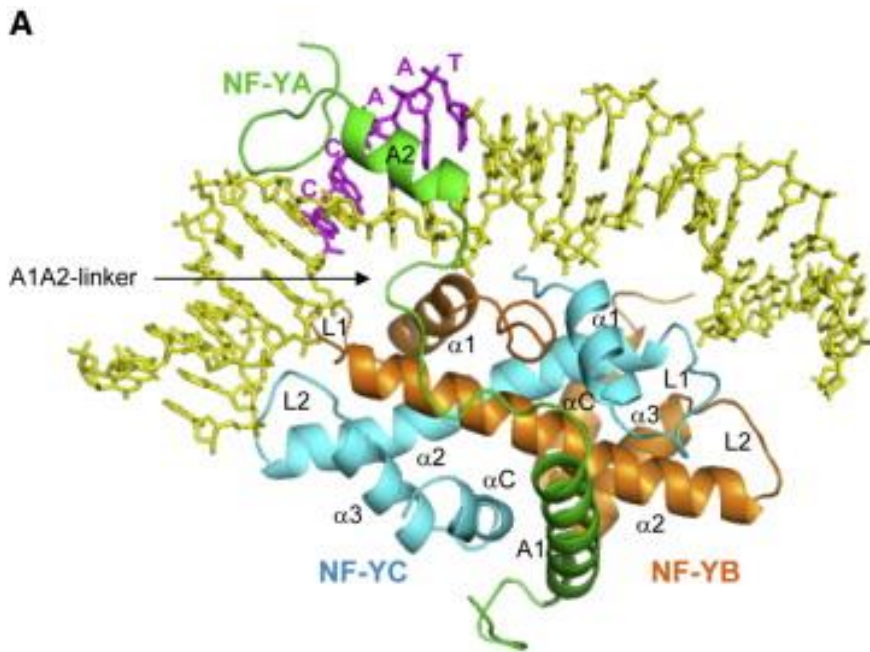
- **Transkripční faktory NF-Y** (podjednotky B a C) obsahují histon-fold a vázou se sekvencí n nespecificky na cukrfofátovou kostru jako histony
- DNA se v důsledku vazby ohýbá podobně jako v nukleosomech
- NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -zroubovice (interkalace do MŽ)



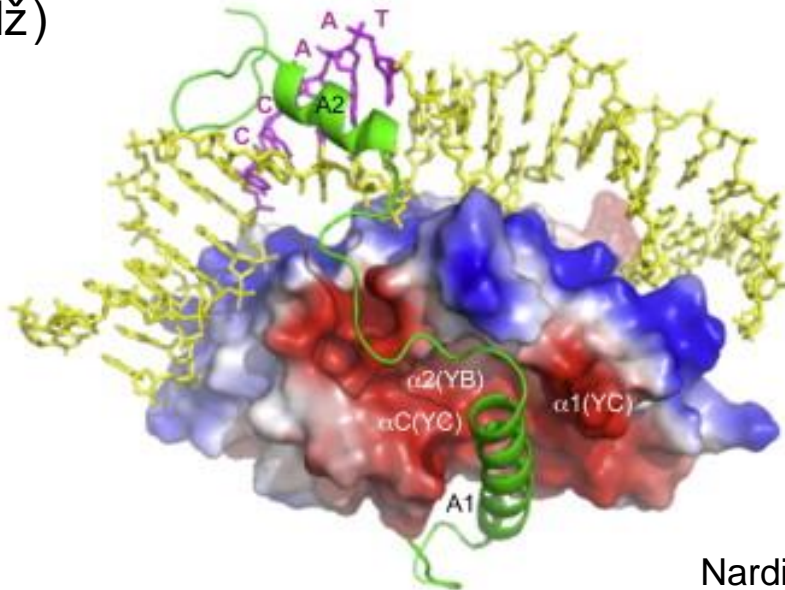
H2B/H2A



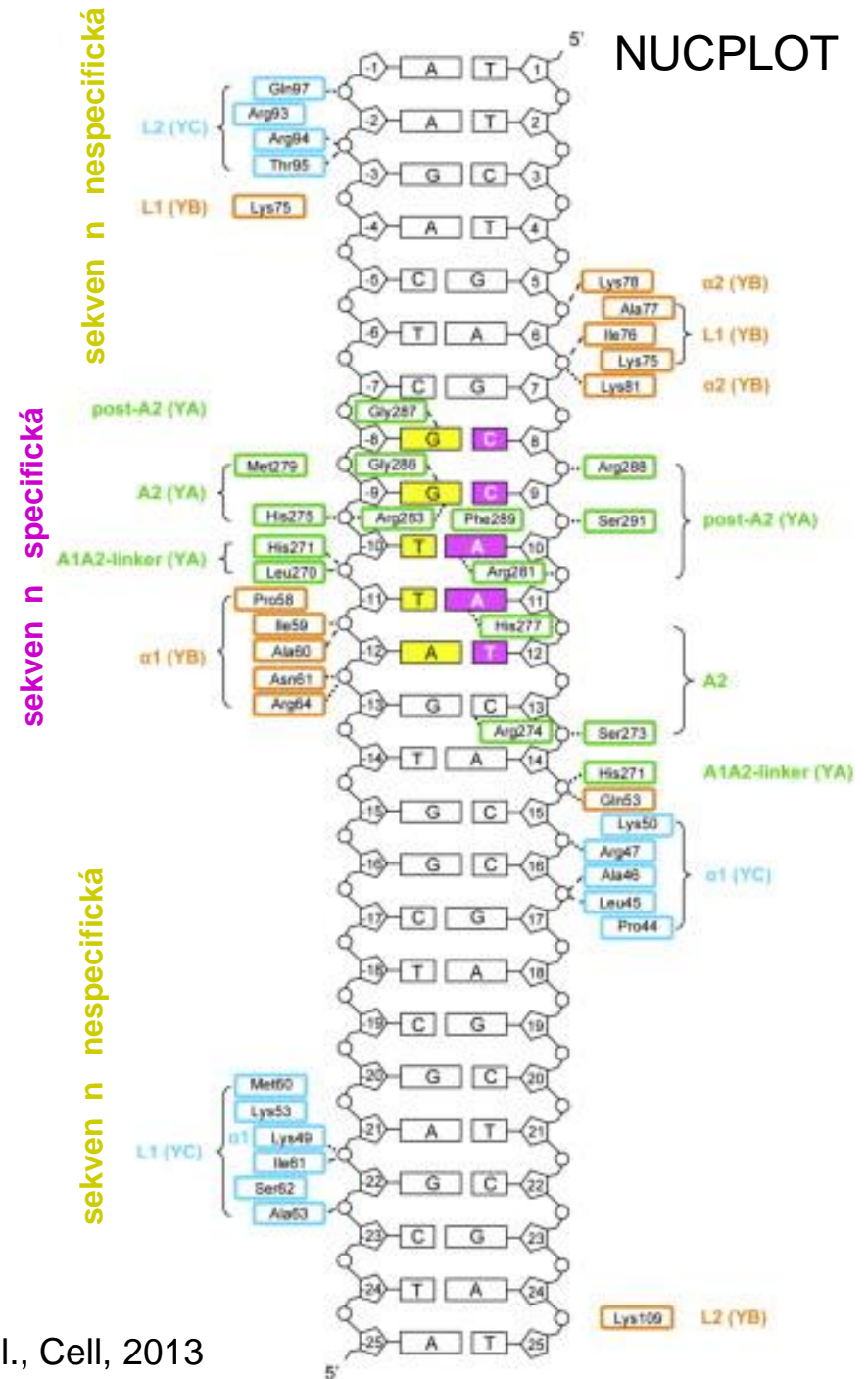
NF-YB/NF-YC

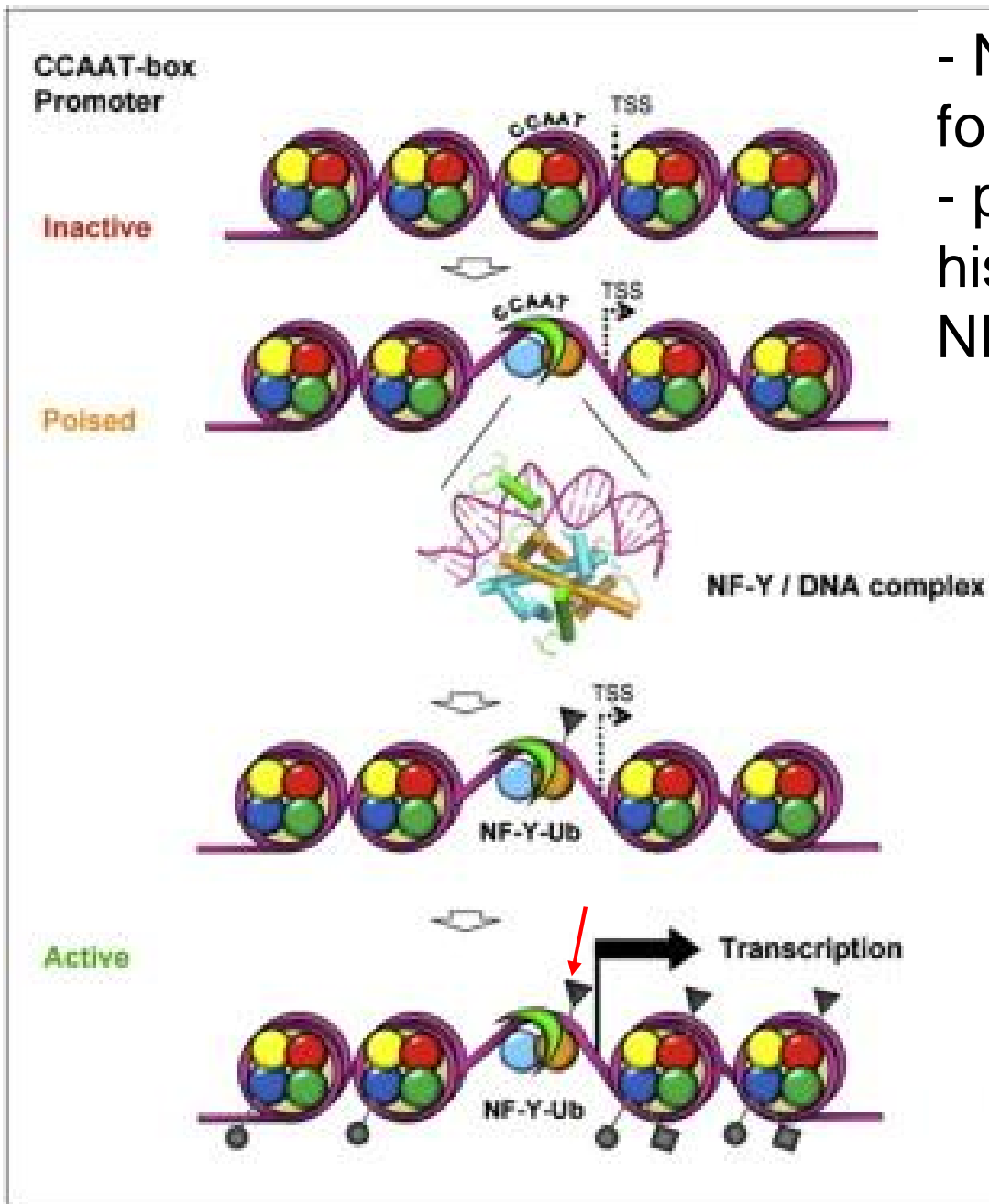


B NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT sekvenci pomocí α -zroubovice (interkalace do Mž)

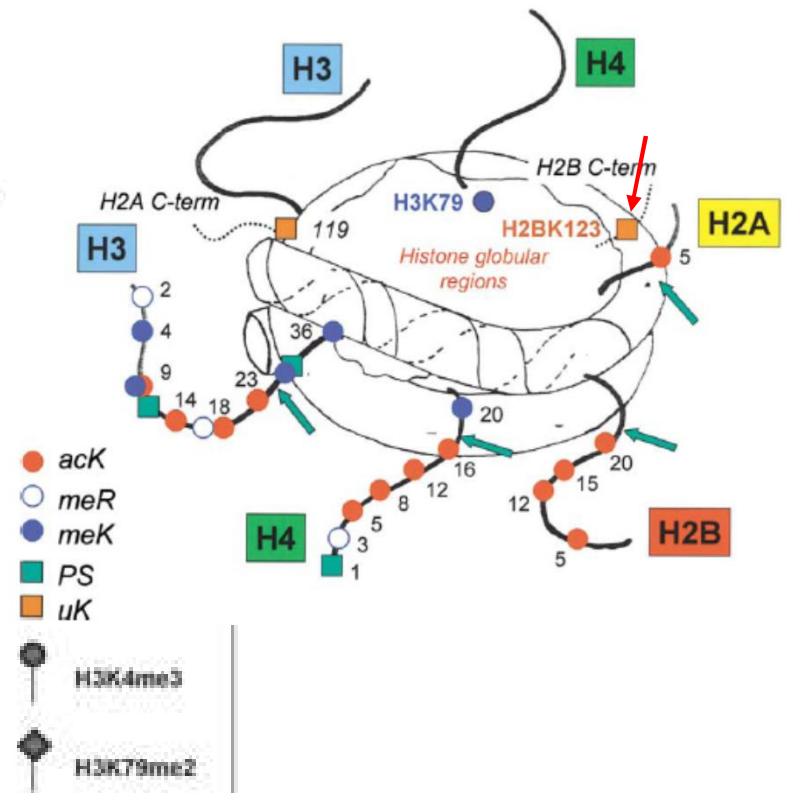


Nardini et al., Cell, 2013

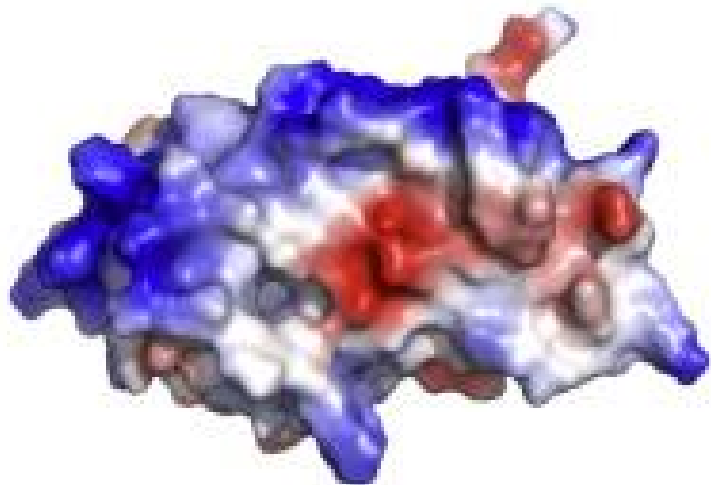




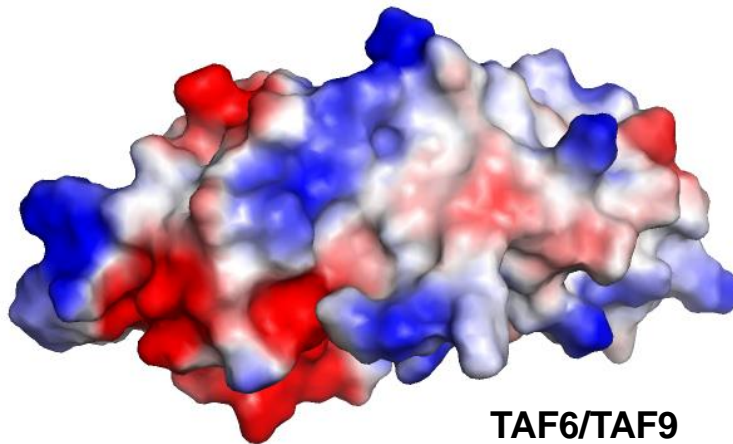
- NF-Y se vá0e p es histon-
fold a nahrazuje nukleosom
- podobn jako ubiquitince
histonu (H2B) i ubiquitinace
NF-YB aktivuje transkripci



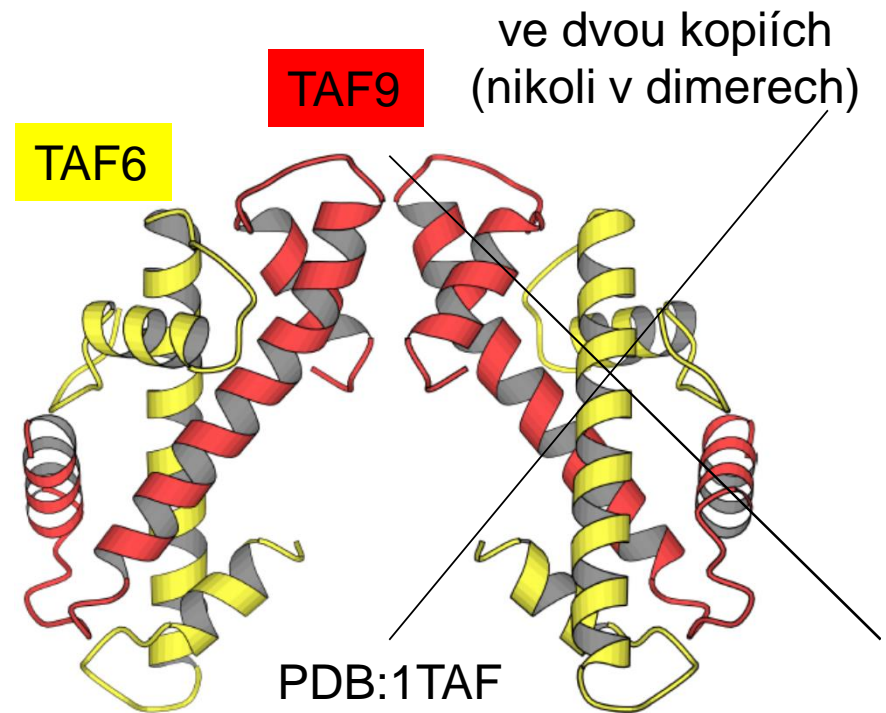
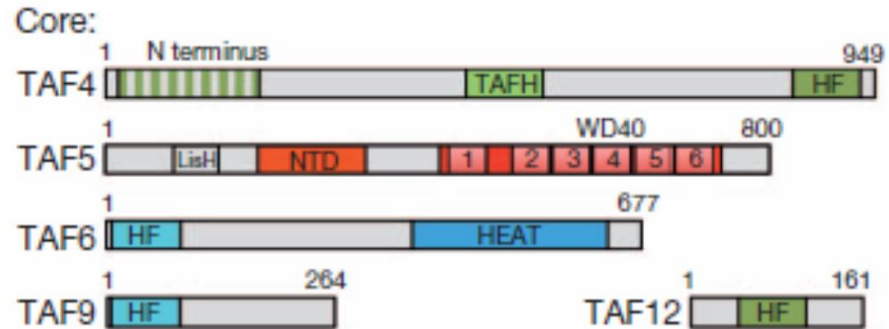
TBP. associated factors = TAF (podjednotky TFIID komplexu mají histon-fold, ale nevytváří oktamery)



H2B/H2A



TAF6/TAF9

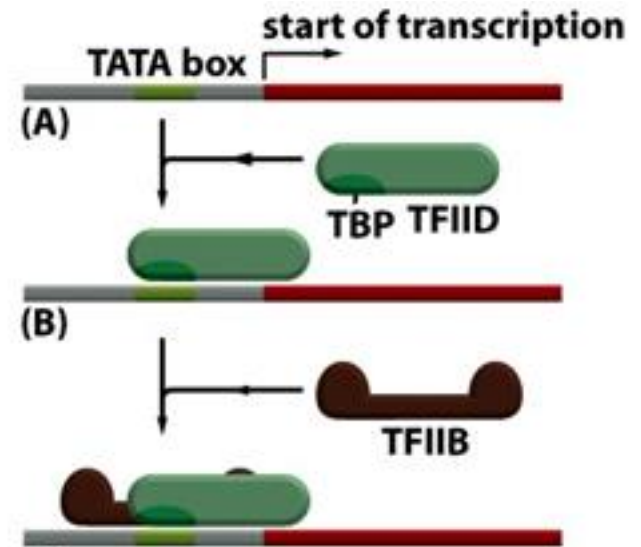
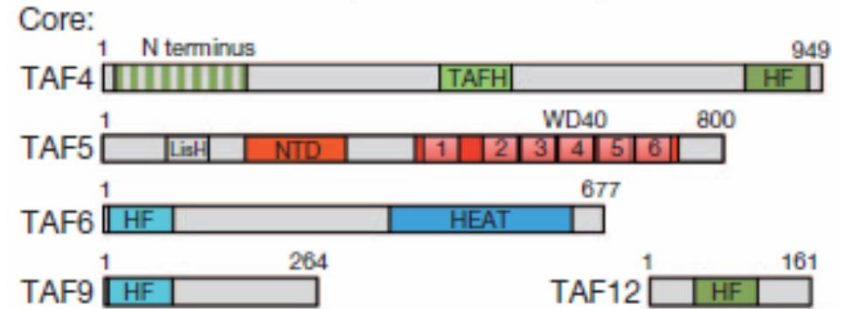
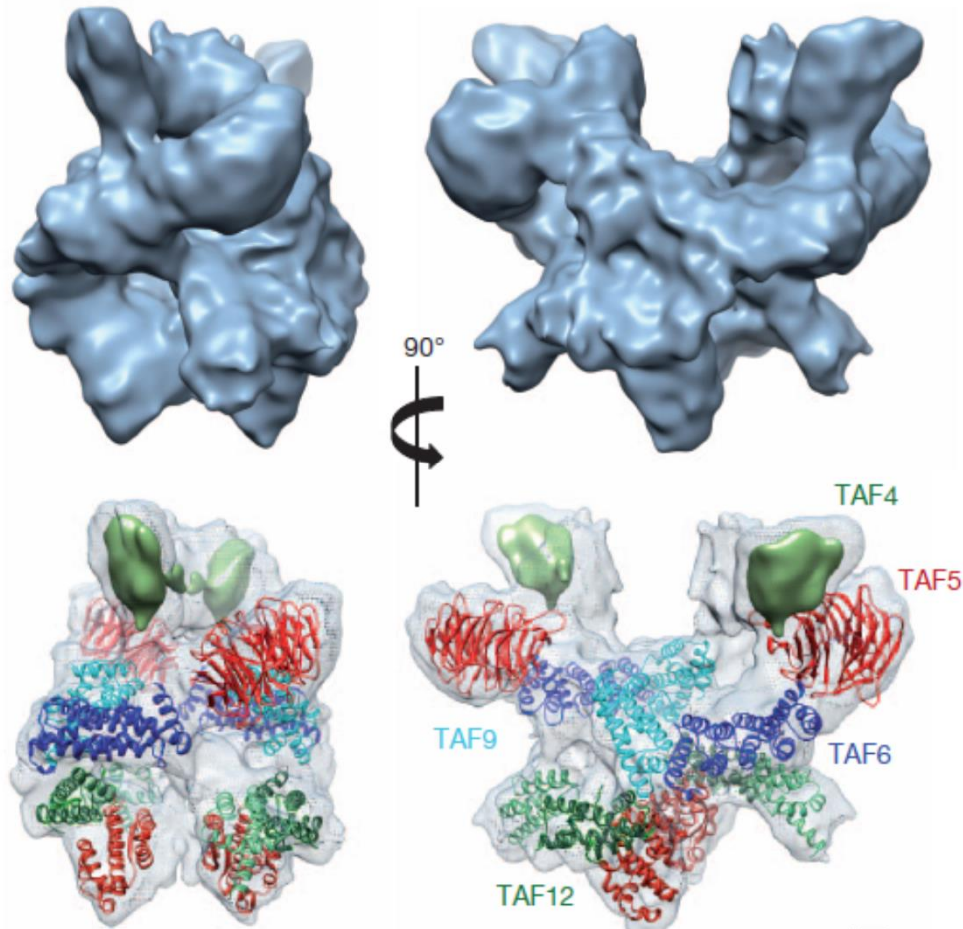


Histon-fold doména se neváže na DNA (podílí se C-konec)

Shao et al, MCB, 2005

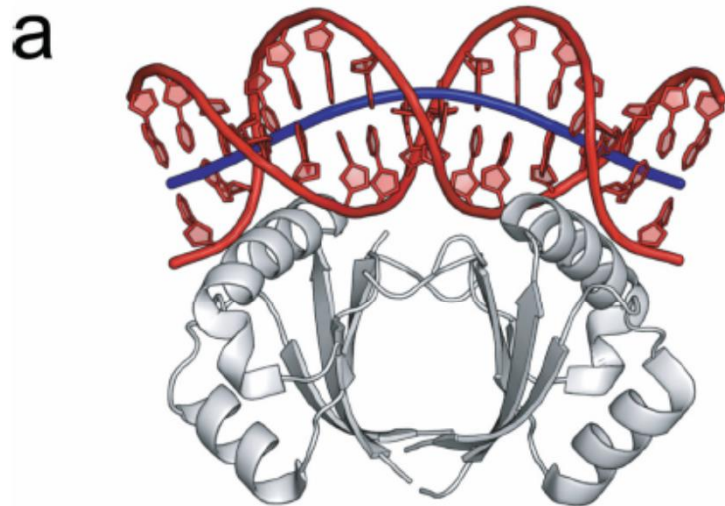
- TAF4, 6, 9 a 12 obsahují histon-fold a jsou ve dvou kopiích (nikoli v dimerech) v score%o části TFIID komplexu
- TFIID komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotoru a poskytují scaffold/lezení pro sestavení transkripčního systému

Core



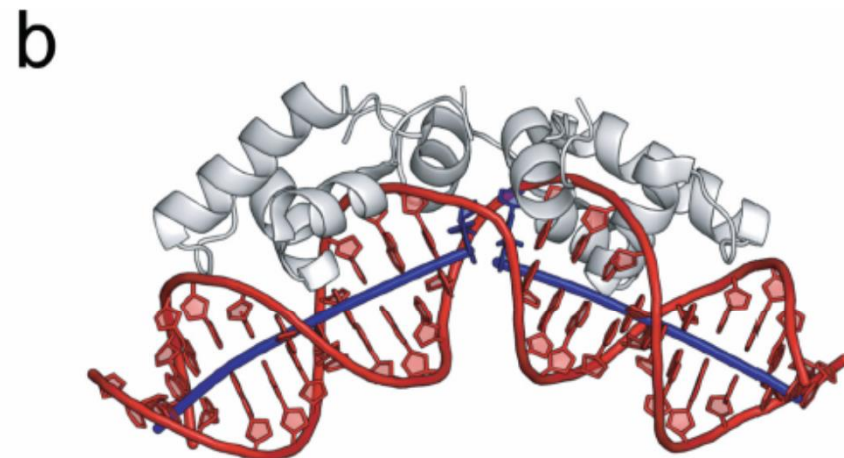
- “ Velký Olábek má velikost odpovídající rozměrům α -zroubovice a má exponované H-vazebné skupiny
- “ Nejčastěji ji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)
- “ Další vazebné motivy (β -listy, hydrofobní AMK, malý žlábek)

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



histon

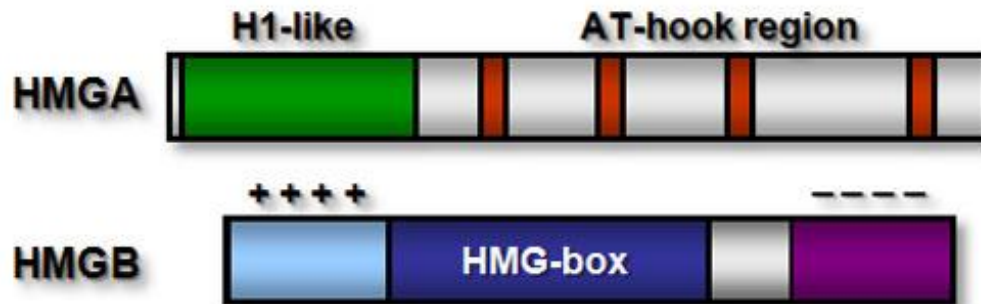
Bend



HMG

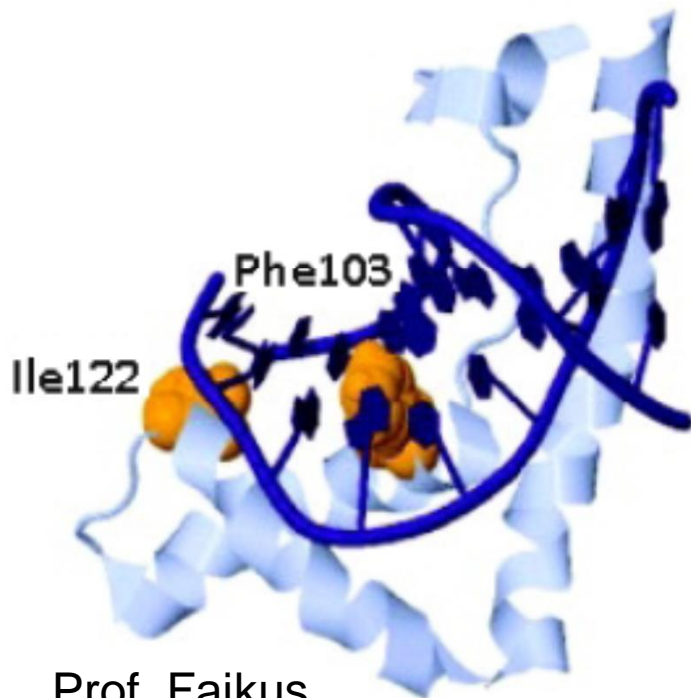
Kink

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

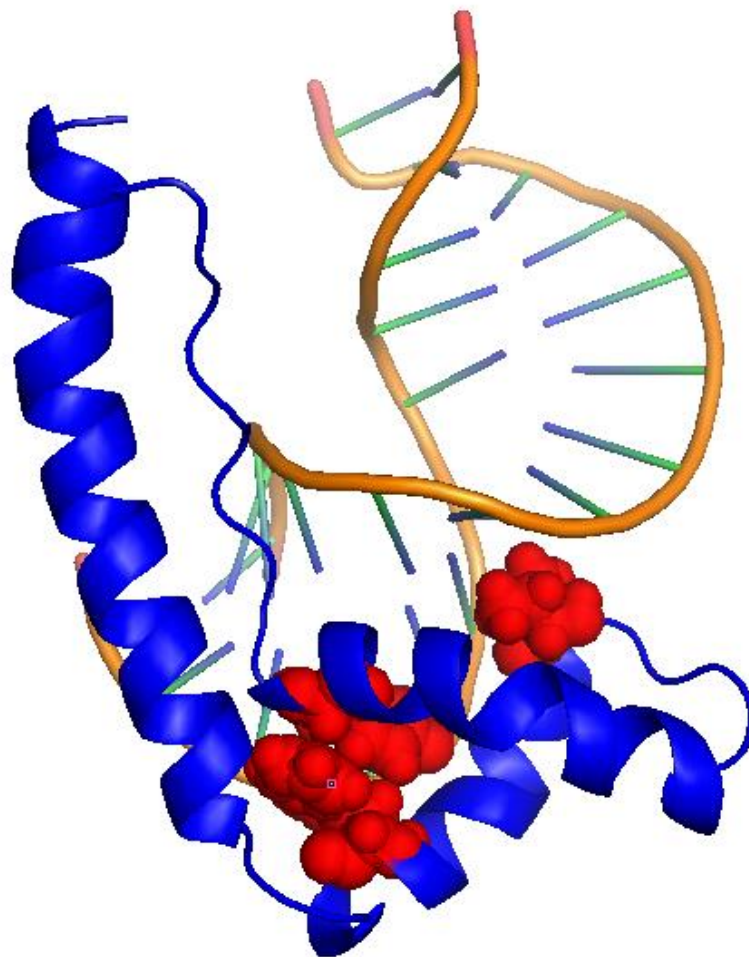


- ohyb a rozvolnění párování dsDNA může napomáhat procesům replikace, transkripce a rekombinace/opravy poškozené DNA

- ohyb napomáhá přiblížení vzdálených míst nebo způsobuje DNA pro transkripční faktory

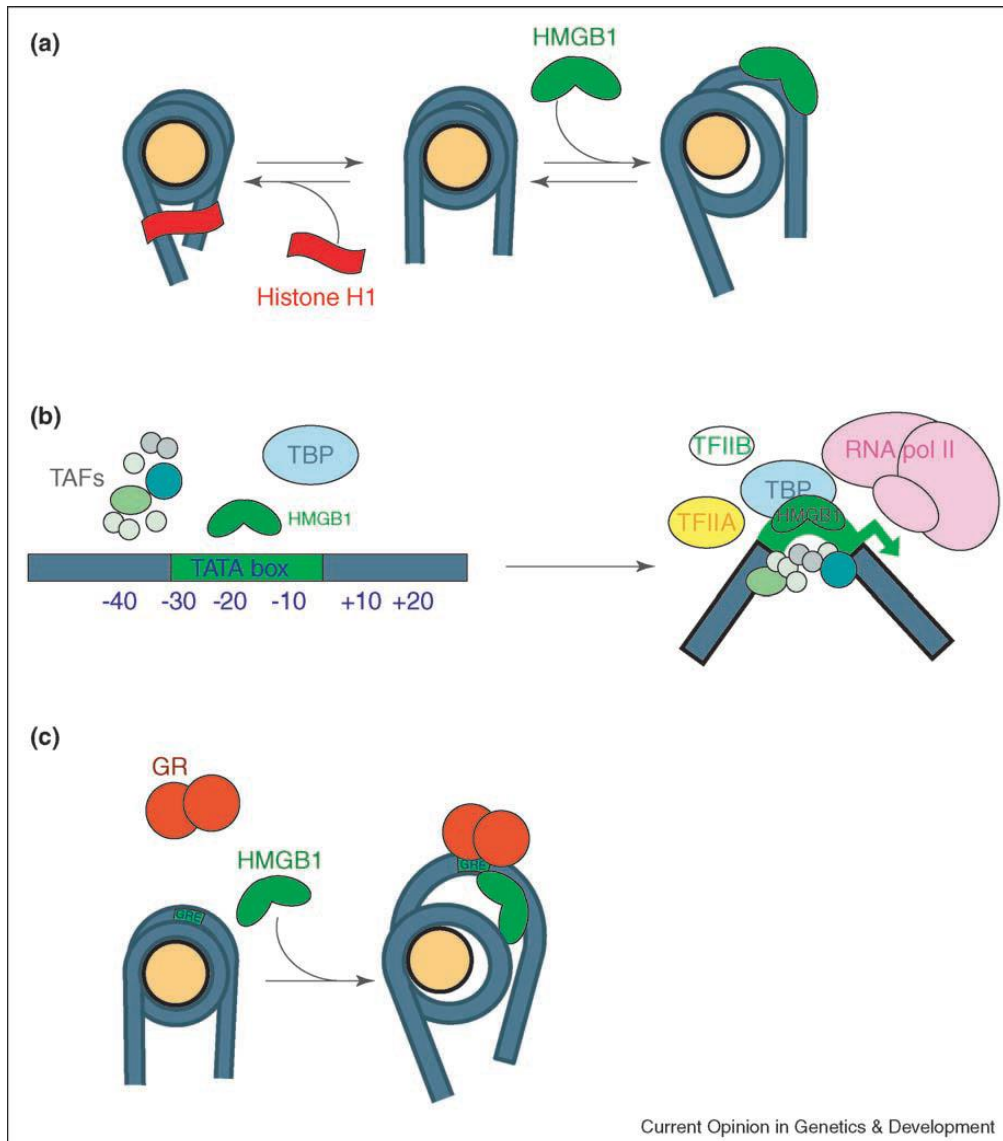


HMG-D (1E7J)



Aromatické aminokyseliny se interkalují do MŽ a vytváří kink

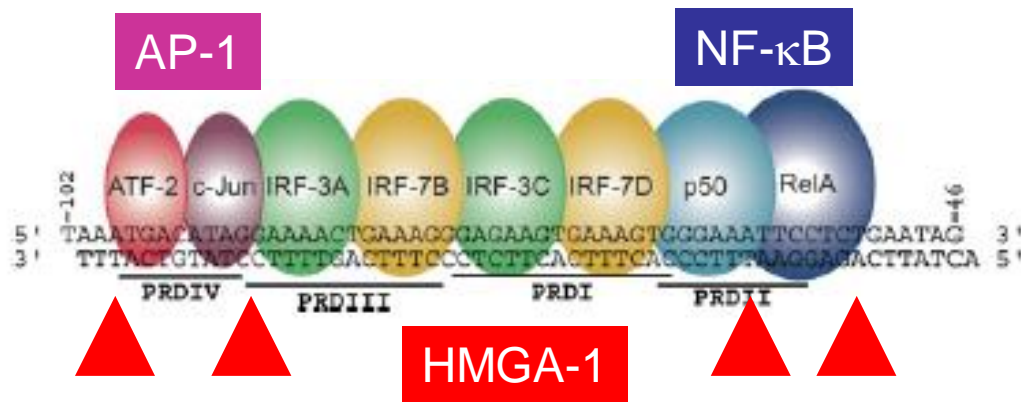
- HMGB (B-box) obsahuje 3 zroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. zroubovice váže cukr-fosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace Phe (aromatický kruh) způsobuje ohnutí DNA



- ohyb napomáhá rozvolnění struktury chromatinu tj. moduluje pozici nukleosom

- ohyb může pomáhat TBP a iniciaci transkripce

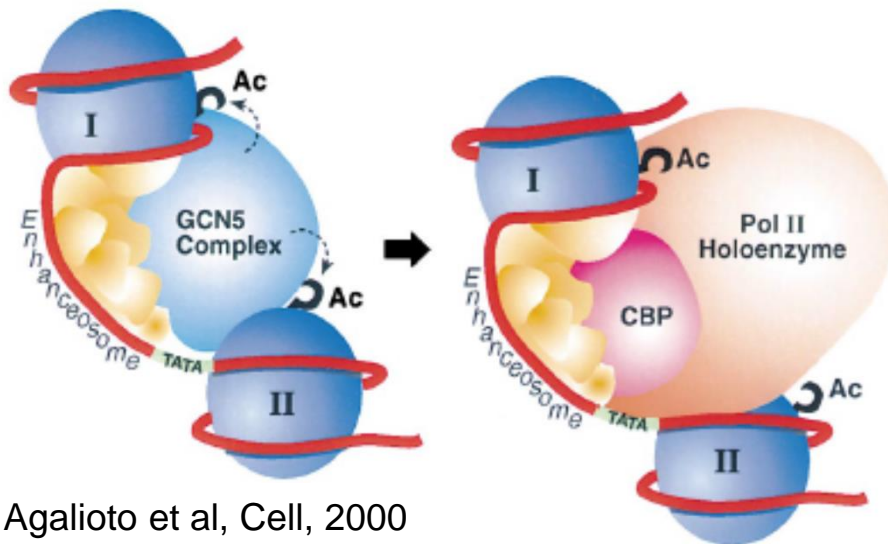
- pomáhá způsobit ohnutí DNA pro transkripční regulátory



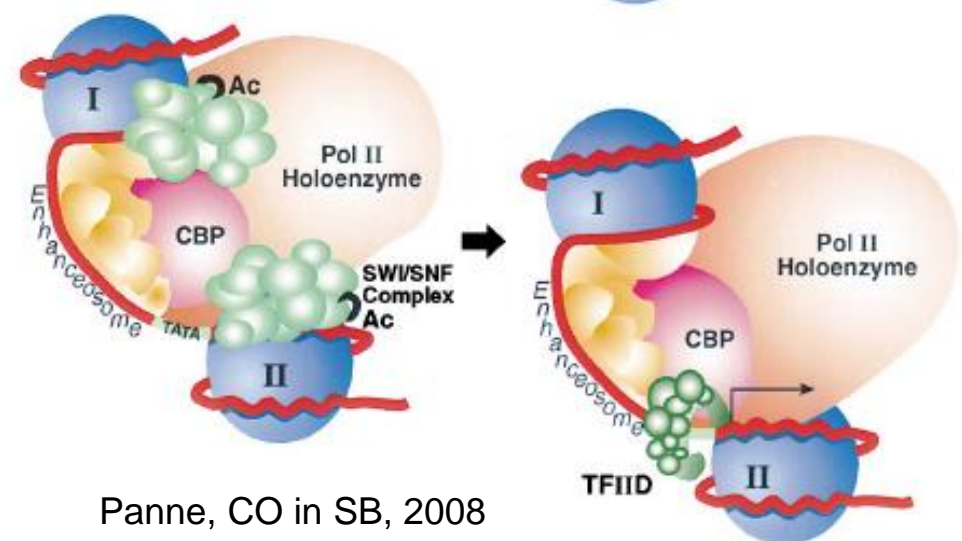
IFN- β enhanceosom

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/pemístění
- 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-otá ka-helix

- . Winged helix

“ Zinkový prst

- . $\beta\beta\alpha$ zinc-finger
- . Hormon-receptor
- . Loop-sheet-helix
- . Gal4

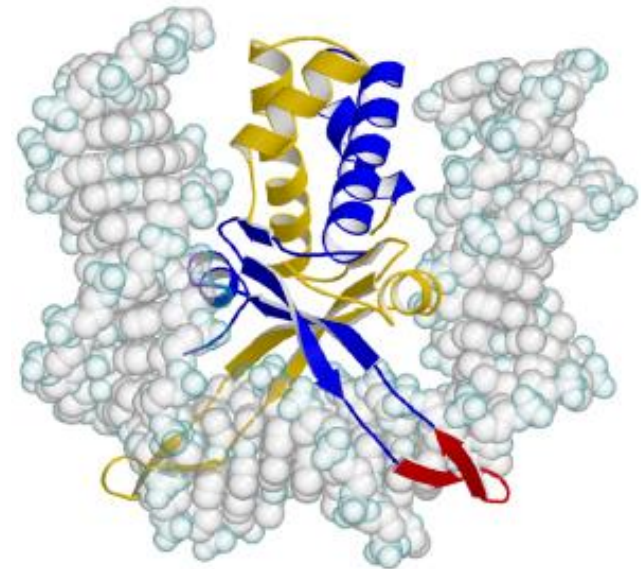
“ Histon, HMG-box

“ β -hairpin/ribbon

“ β - barrel

“ Enzymy

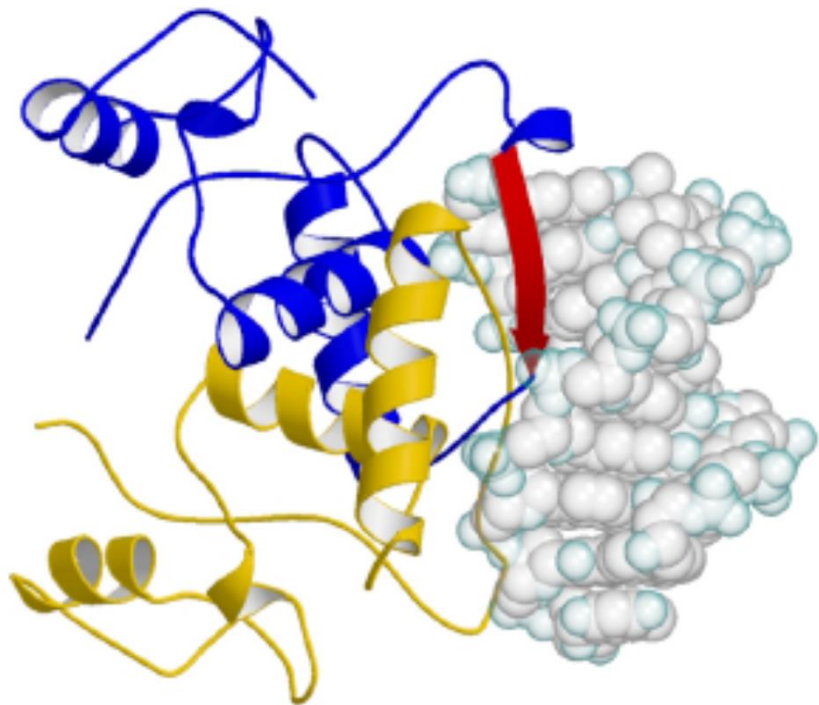
α -zroubovice



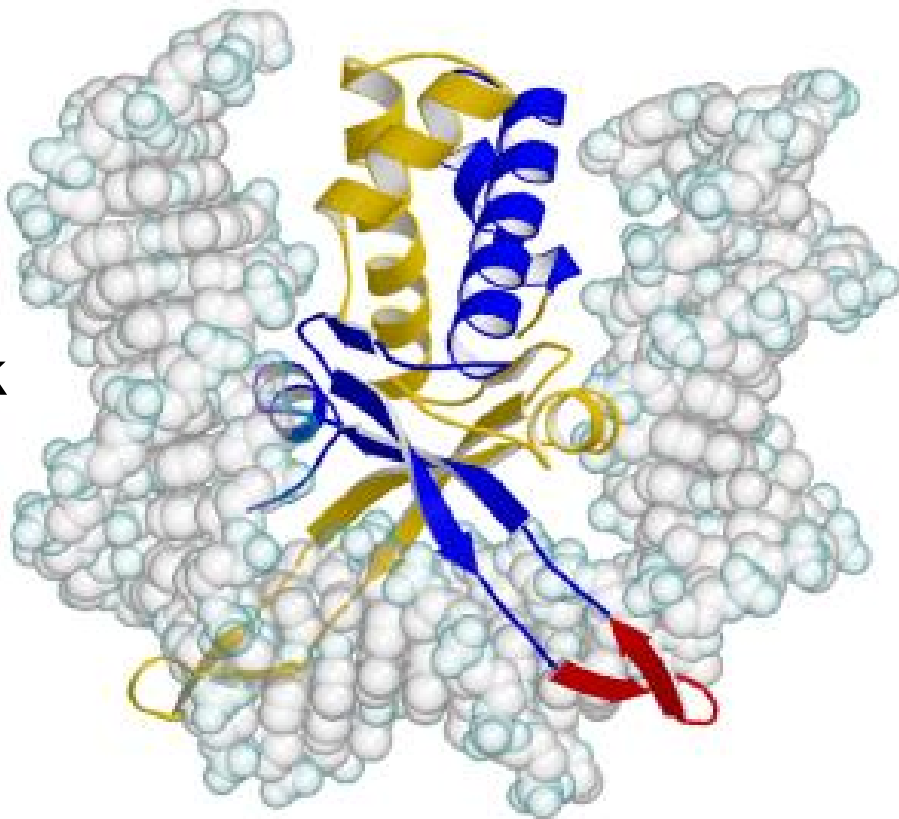
33. Integration host factor (1ihf)

β -listy

- pouze 2-3 β -listy nebo hairpin
- represory, chromosomální proteiny (lezení pro strukturu DNA)
- vá0ou velký nebo malý 0lábek



31. Met repressor (1cma)



33. Integration host factor (1ihf)

- β -hairpins lokalizovány podél malého 0lábku
- Inzerce Pro mezi baze a ohyb DNA

Motivy DNA vazebných domén

“ Zipper typ

- . Leucinový zip
- . Helix-loop-helix

“ Helix-otá ka-helix

- . Winged helix

“ Zinkový prst

- . $\beta\beta\alpha$ zinc-finger
- . Hormon-receptor
- . Loop-sheet-helix
- . Gal4

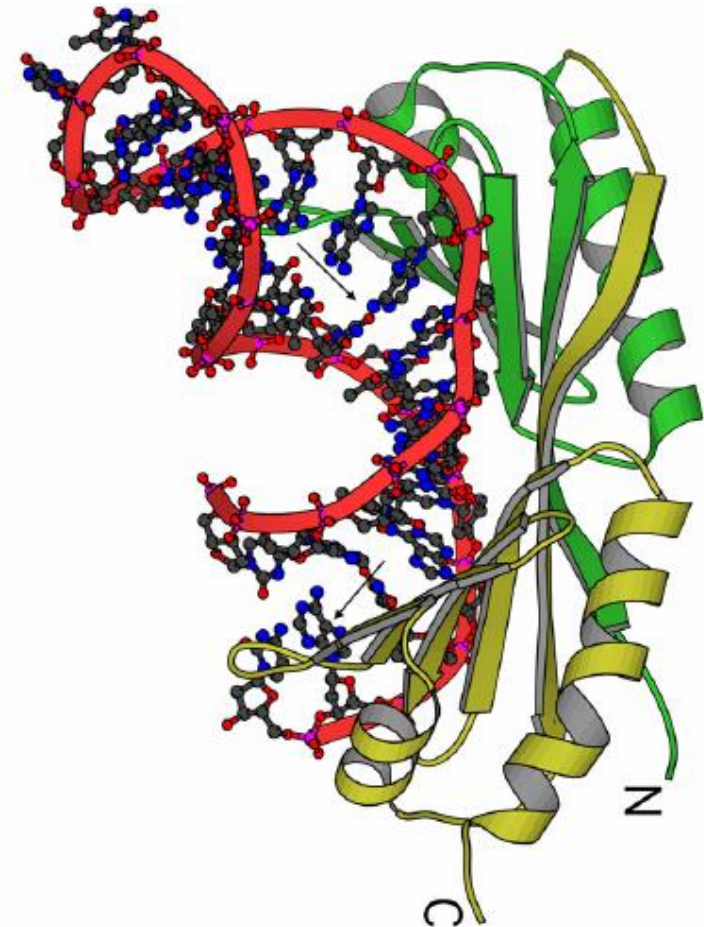
“ Histon, HMG-box

“ β -hairpin/ribbon

“ β - barrel

α -zroubovice

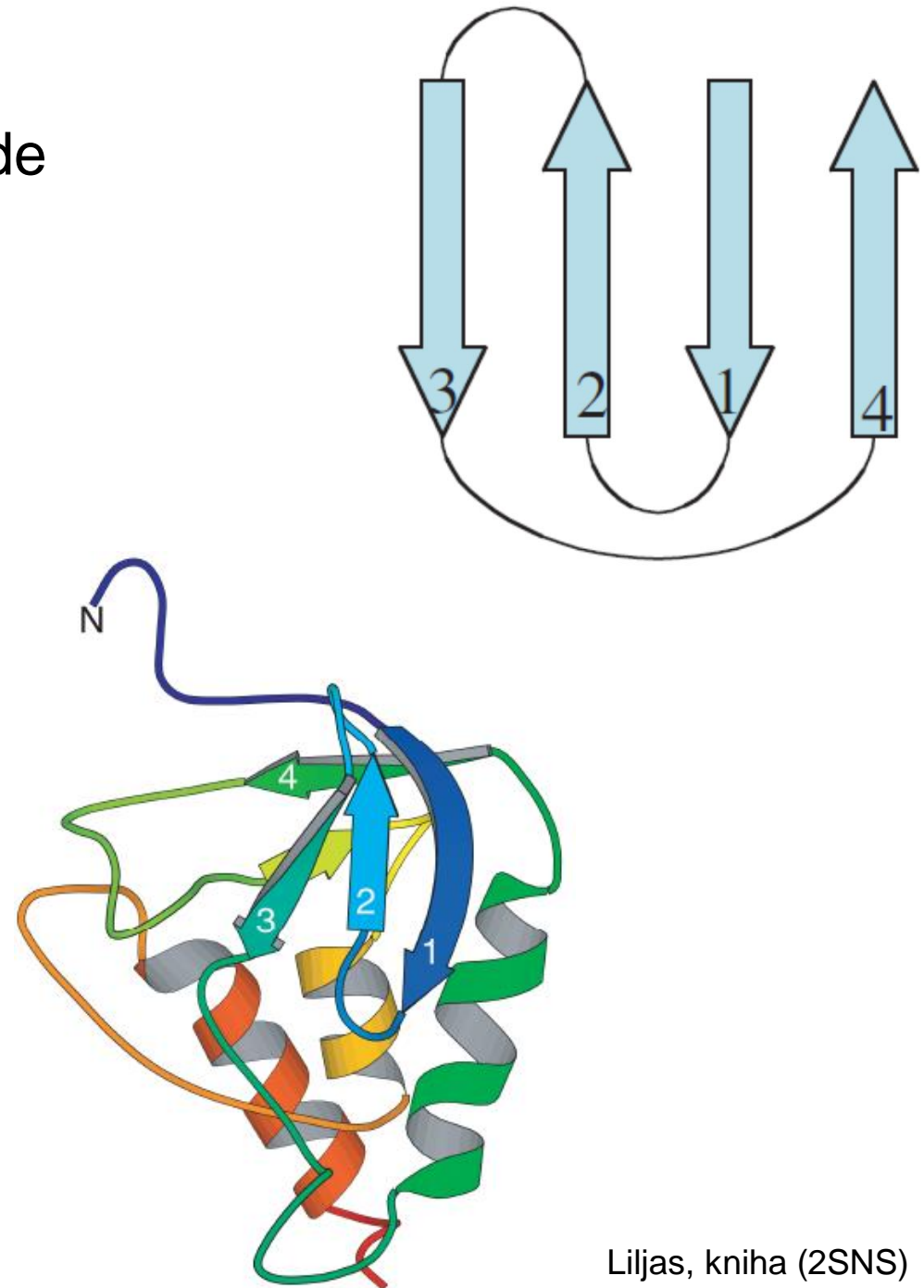
β -listy



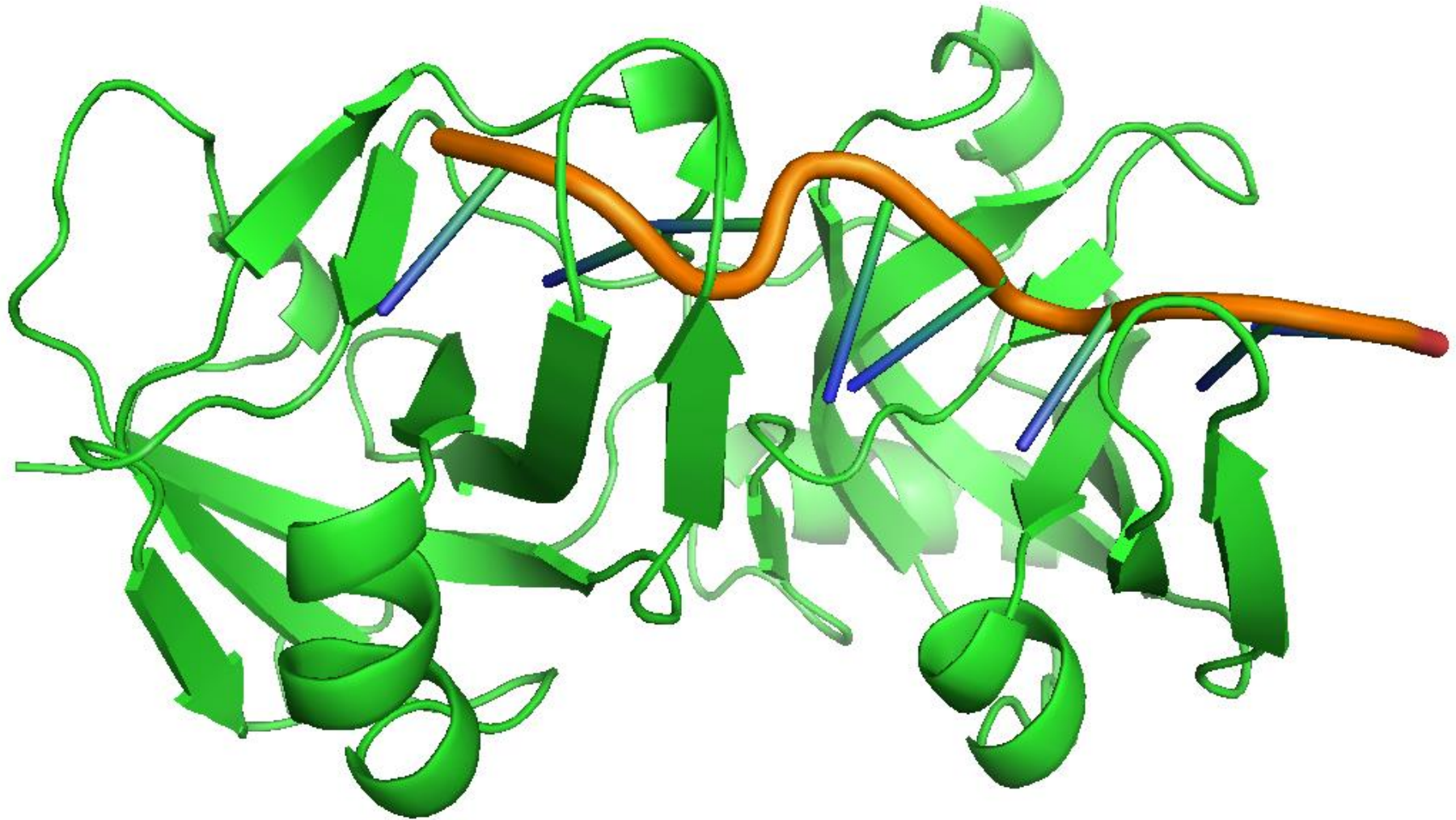
OB-fold

(oligonucleotide/oligosaccharide binding)

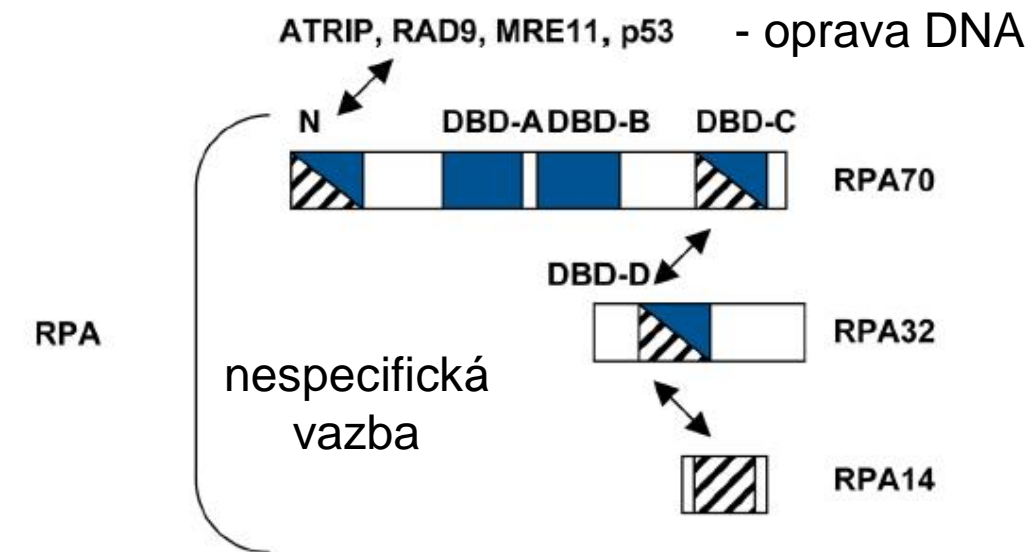
- 4-5 anti-paralelních β -list (β -barel) zakon eno α -zroubovicí (kompaktní)
- vytvá í úzkou jamku pro jedno et zcovou ssDNA (RNA, oligosacharidy)
- vá0e 2-5 nukleotid (báze, cukry i fosfáty)
- SSB/RP-A a TRF proteiny
- replikace, HR, telomery ... (Dr. Ťpirek)



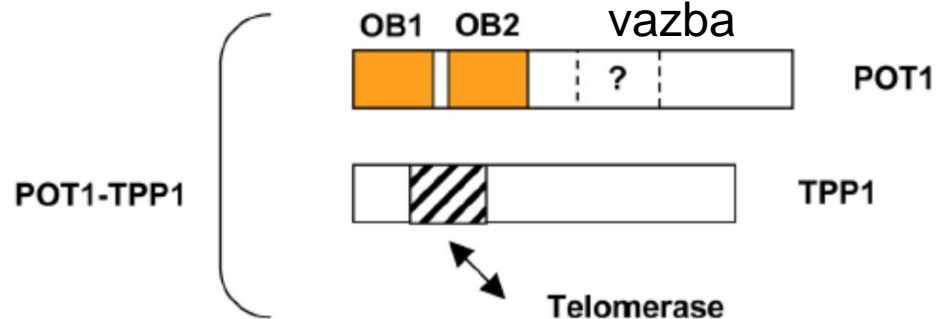
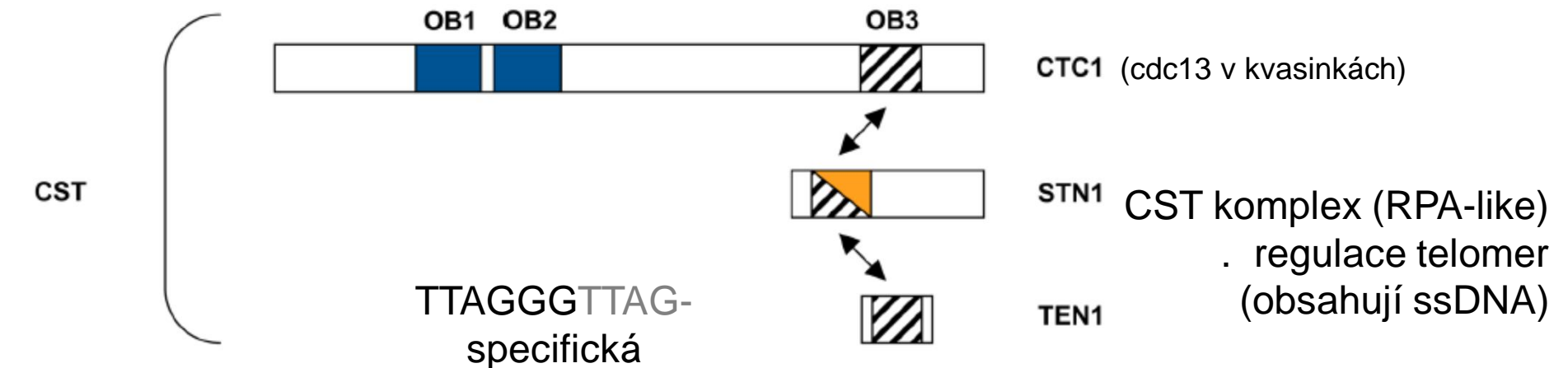
OB-fold (oligonucleotide/oligosachcaride binding, 1JMC)



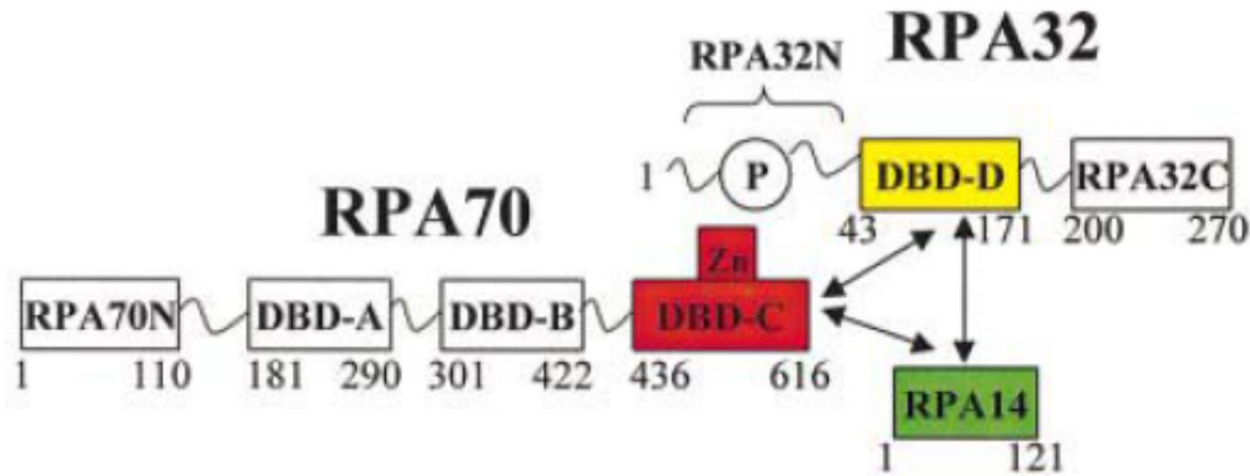
Více OB . RPA70 (A+B) vytváří prodlouženou lineární kapsu



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

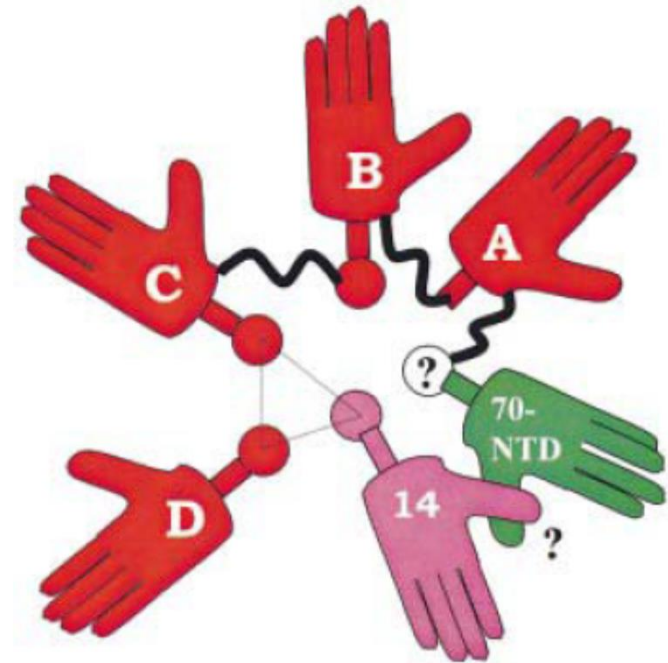
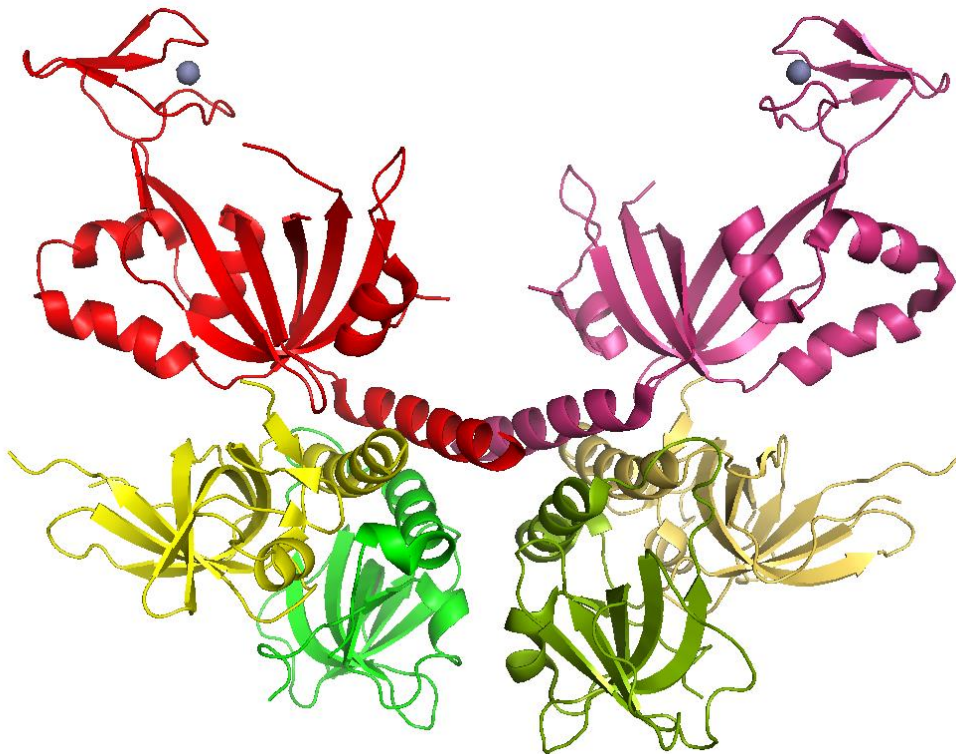


- část komplexu SHELTERIN
. chrání telomery (aby nebyly považovány za DSB, reguluje přístup telomerázy)



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

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

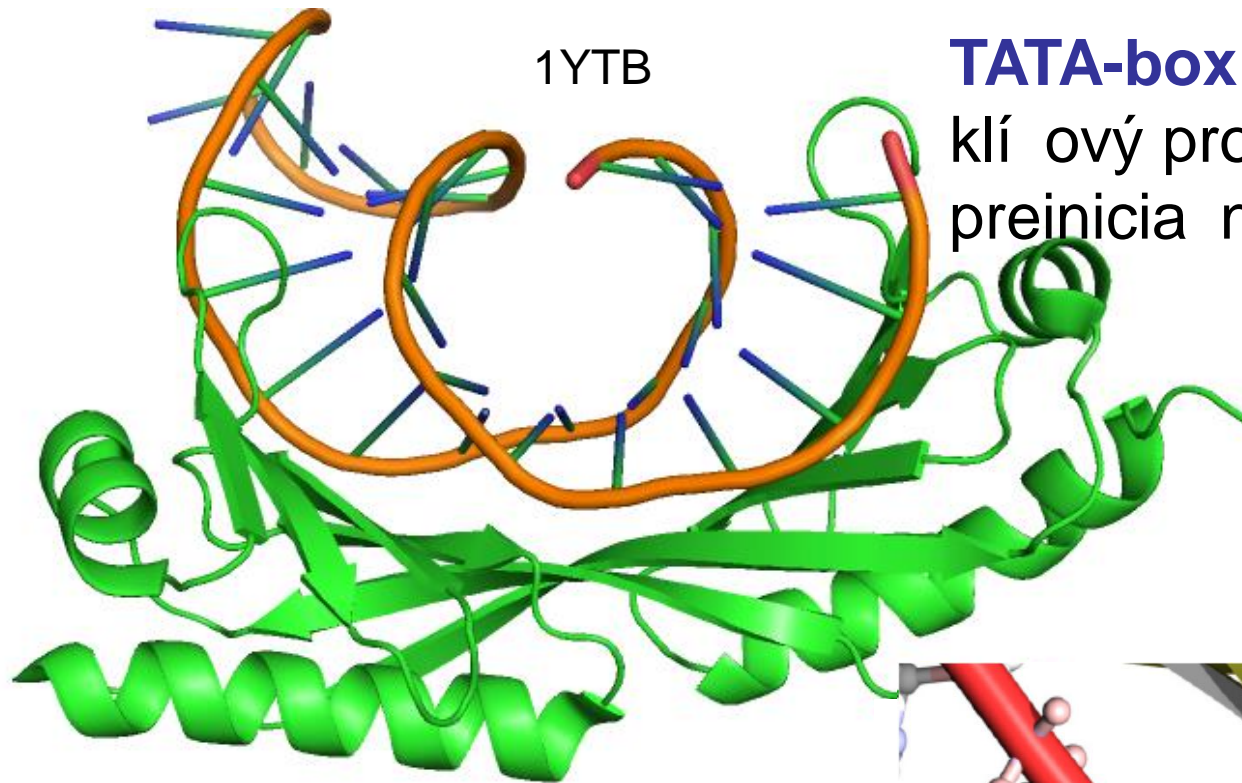
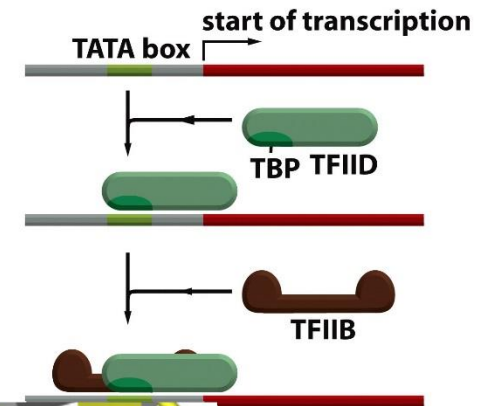


Bochkareva et al, EMBO J, 2002
 Flynn a Zou, CR in BMB, 2010

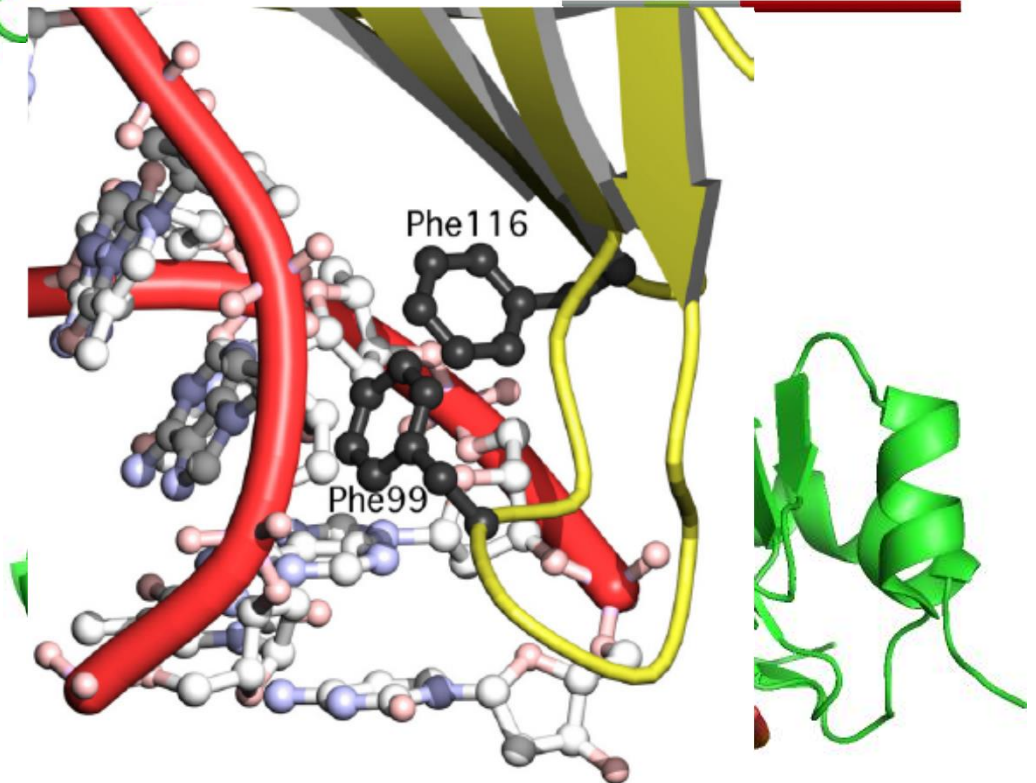
1YTB

TATA-box vájící protein (TBP) .

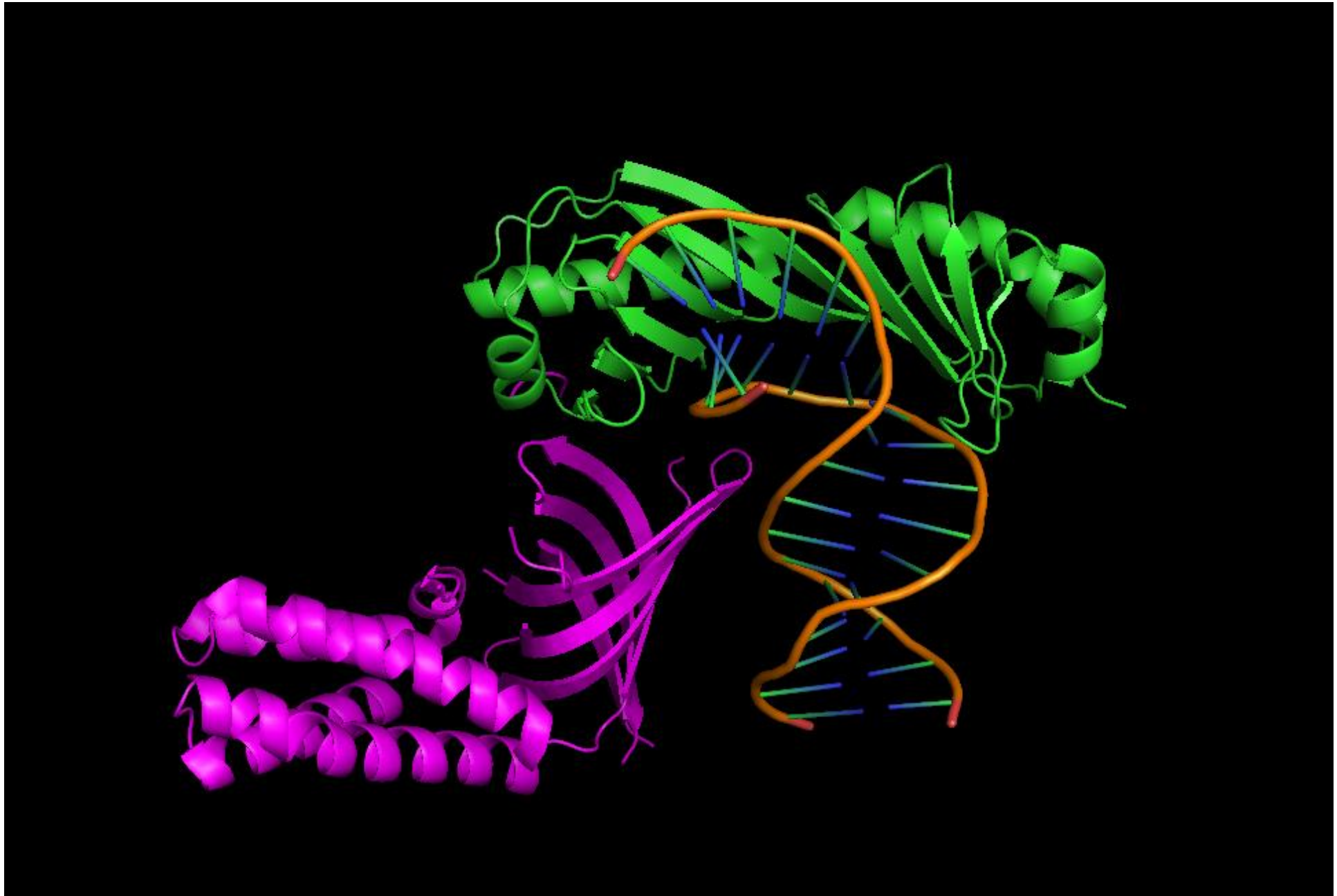
klíčový pro sestavení
preiniciačního komplexu (PIC)



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



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



Za átek/iniciace transkripce . TFIID (nukleace komplex)

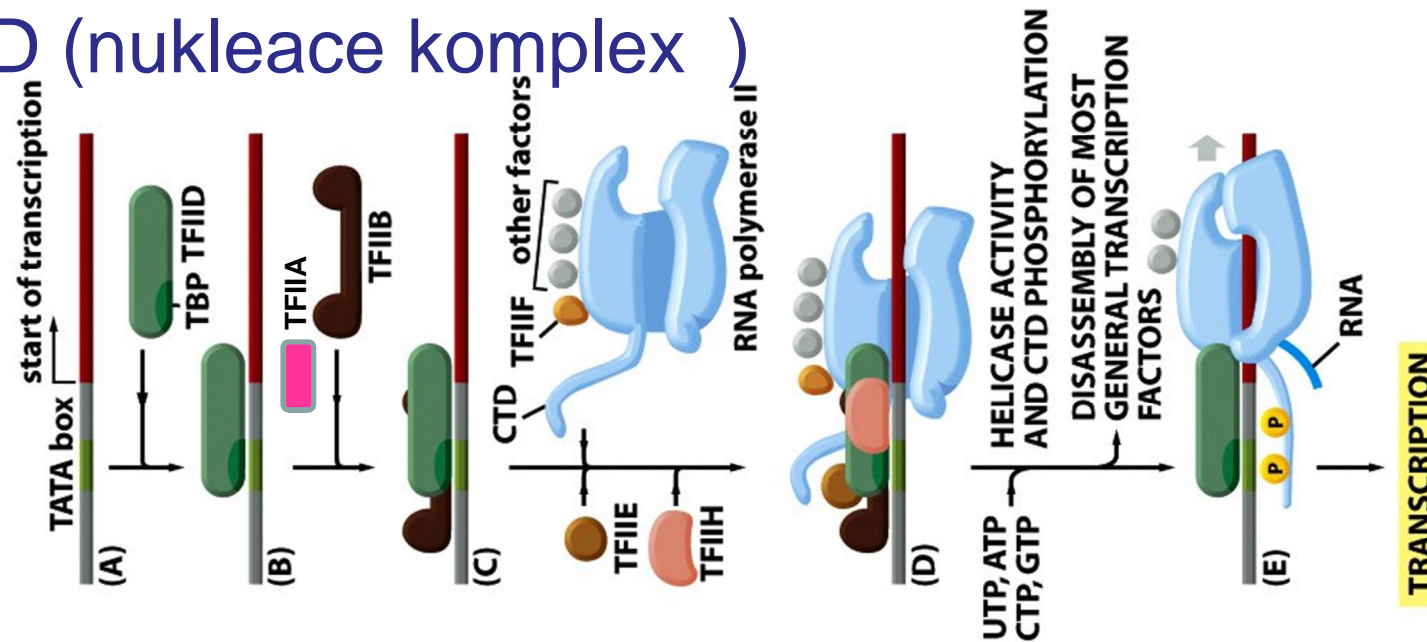


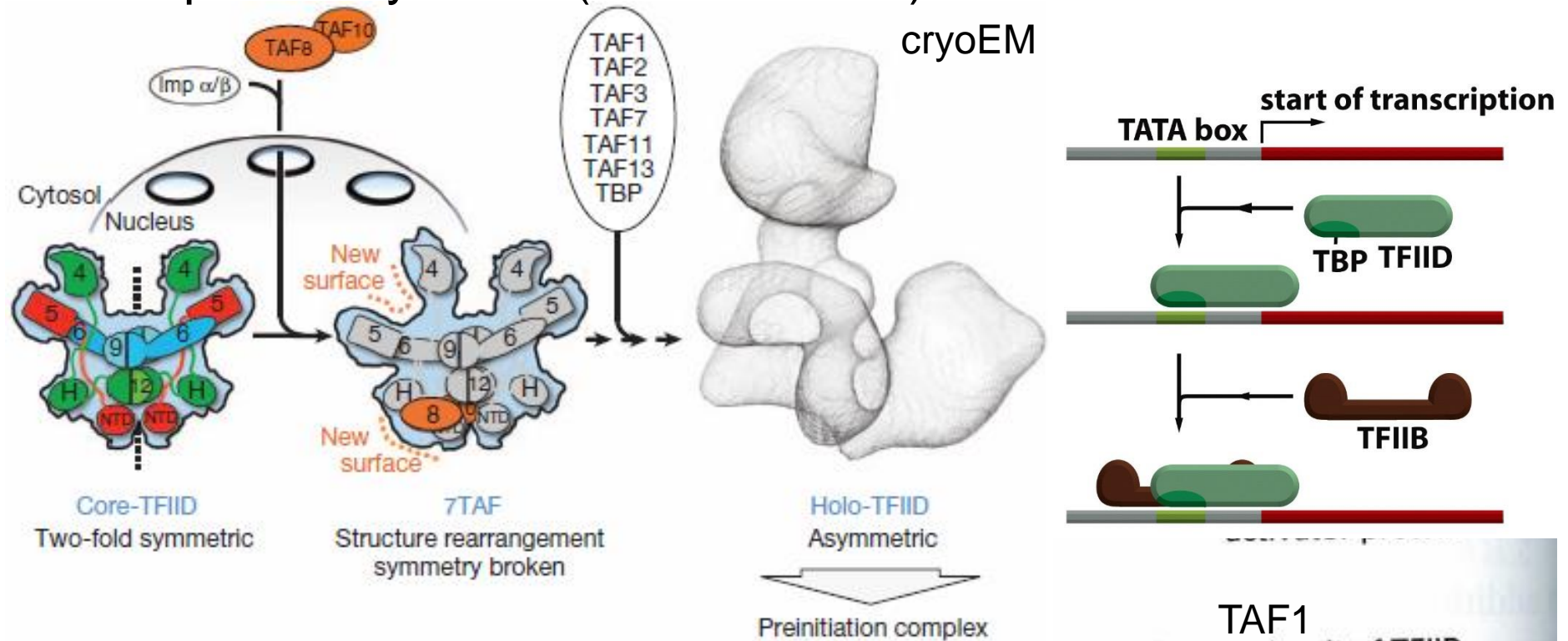
Table 6-3 The General Transcription Factors Needed for Transcription Initiation by Eucaryotic RNA Polymerase II

NAME	NUMBER OF SUBUNITS	ROLES IN TRANSITION INITIATION
TFIID		
TBP subunit	1	recognizes TATA box
TAF subunits	13	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 TFIIE and TFIIH
TFIIE	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

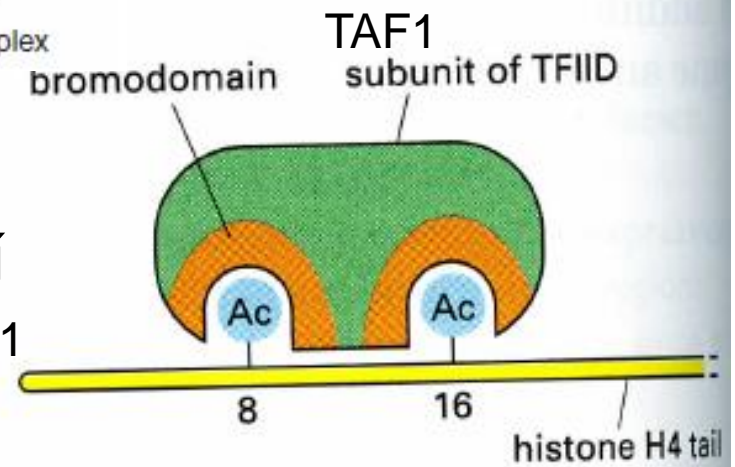
TFIID is composed of TBP and ~11 additional subunits called TAFs (TBP-associated factors); CTD, C-terminal domain.

Plus TFIIA . viz nová data

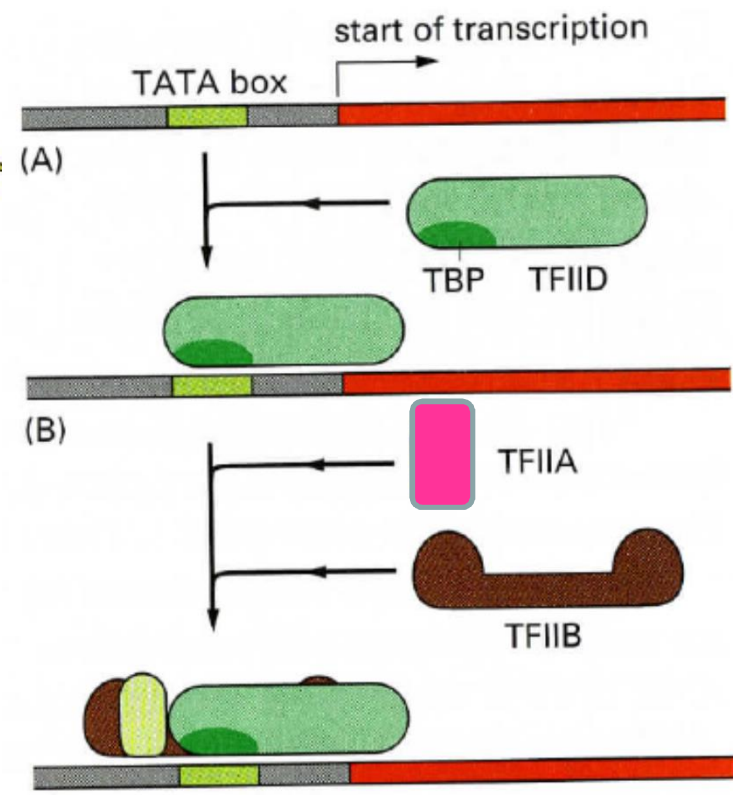
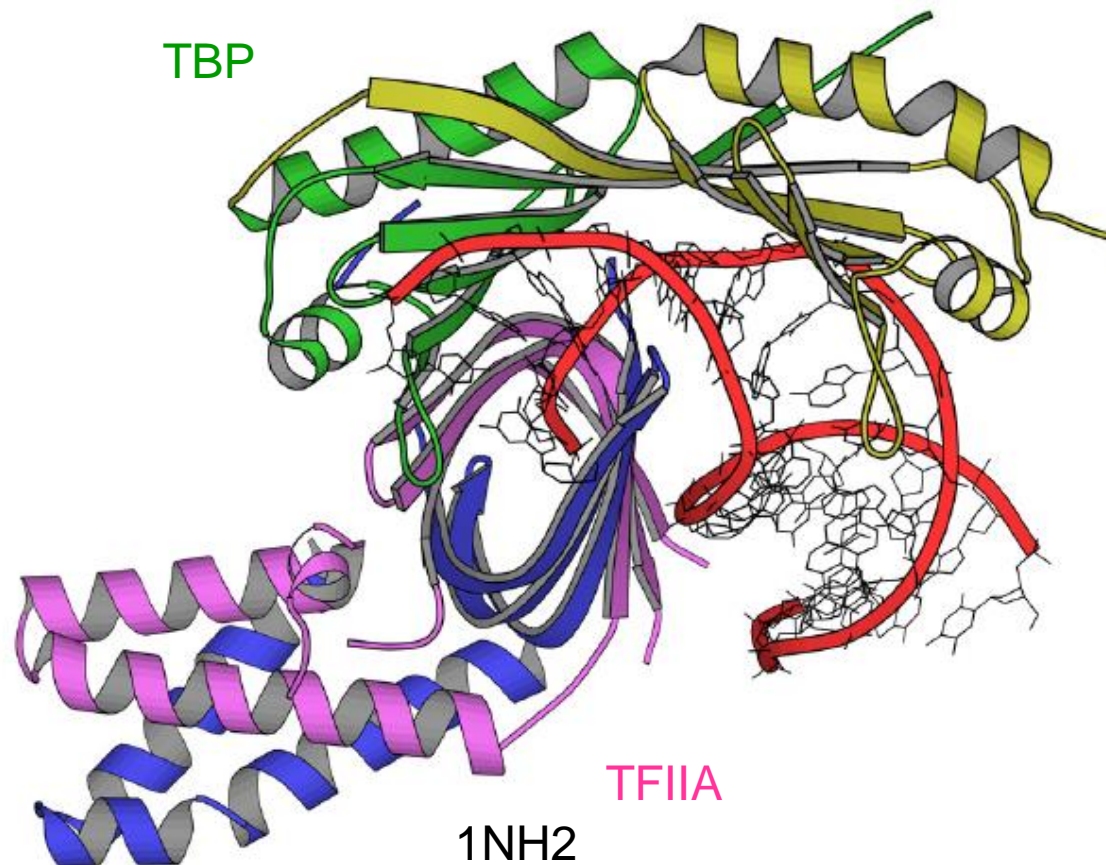
- TFIID (1MDa, TAFs) komplex a TBP jsou klíčovými pro rozpoznání promotoru a poskytují scaffold/lezení pro sestavení transkripčního systému (nukleace PIC) Bieniossek et al., Nature, 2013



- po spojení všech podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční holokomplex. TAFs vázou transkripční faktory, epigenetické značky např. TAF1 se váže na Ac-H4



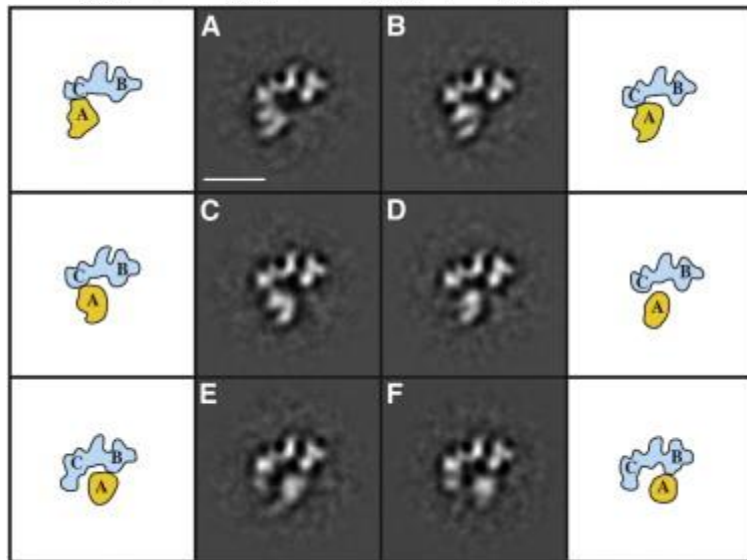
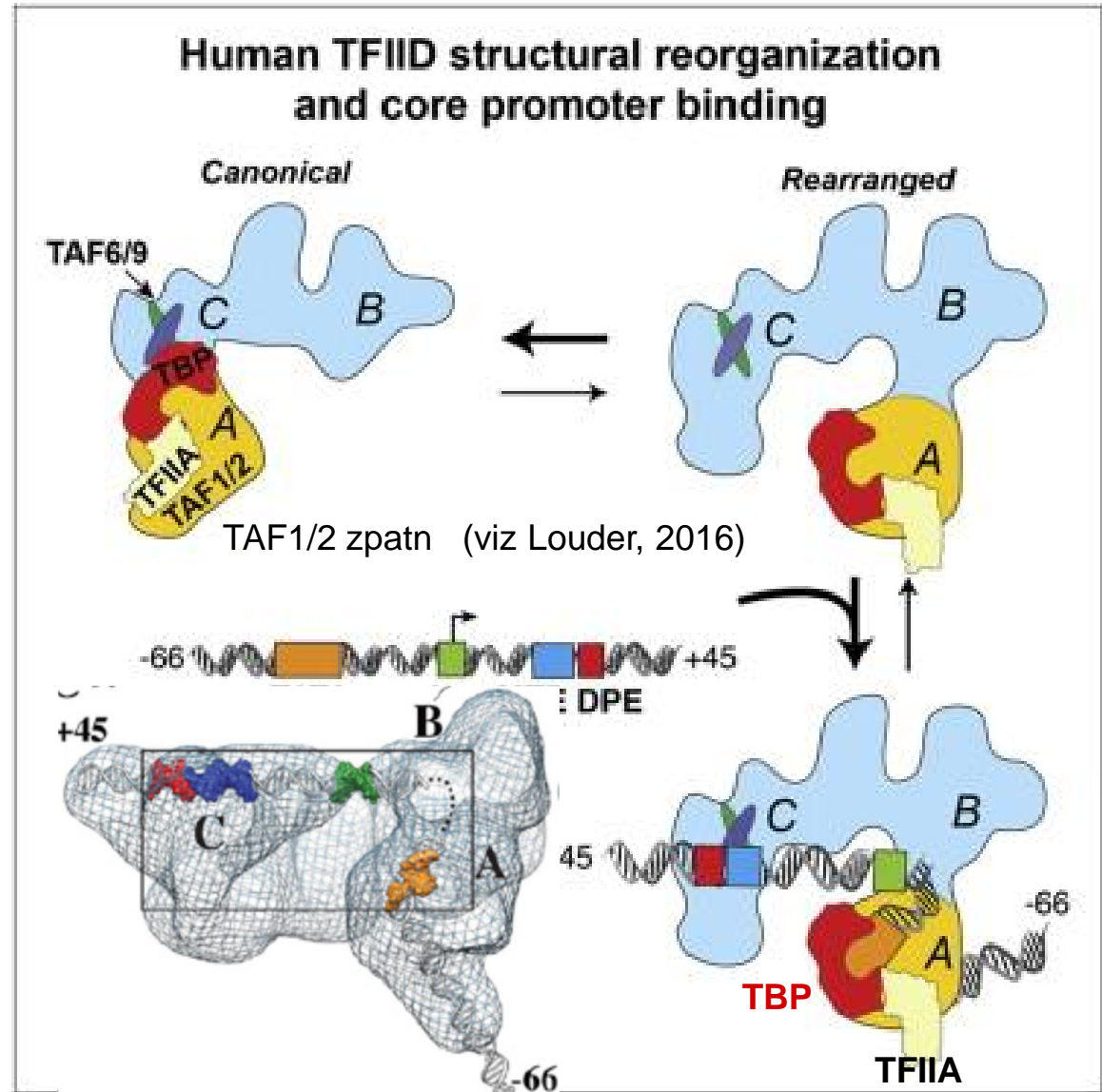
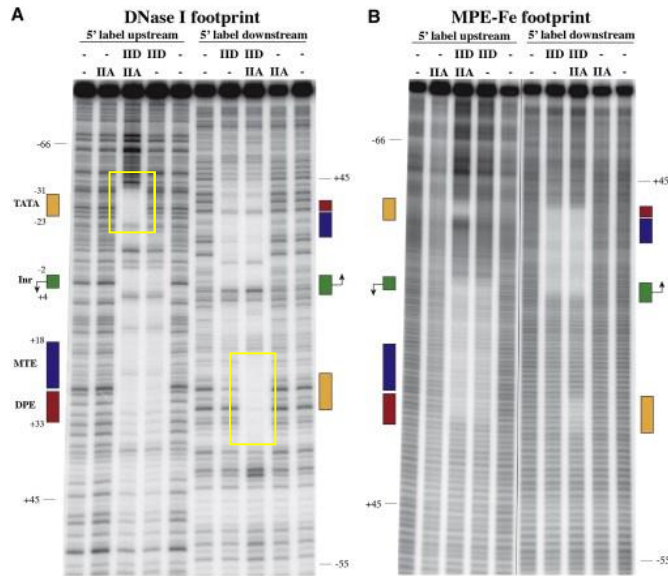
- TFIIA (2 podjednotky) komplex interaguje s TBP a DNA a zajistí jeho správnou pozici
- brání represorům v inhibici vazby TBP na TATA-box (koaktivátory některých specifických trans. faktorů)
- β -barrel váže DNA (neovlivňuje strukturu)

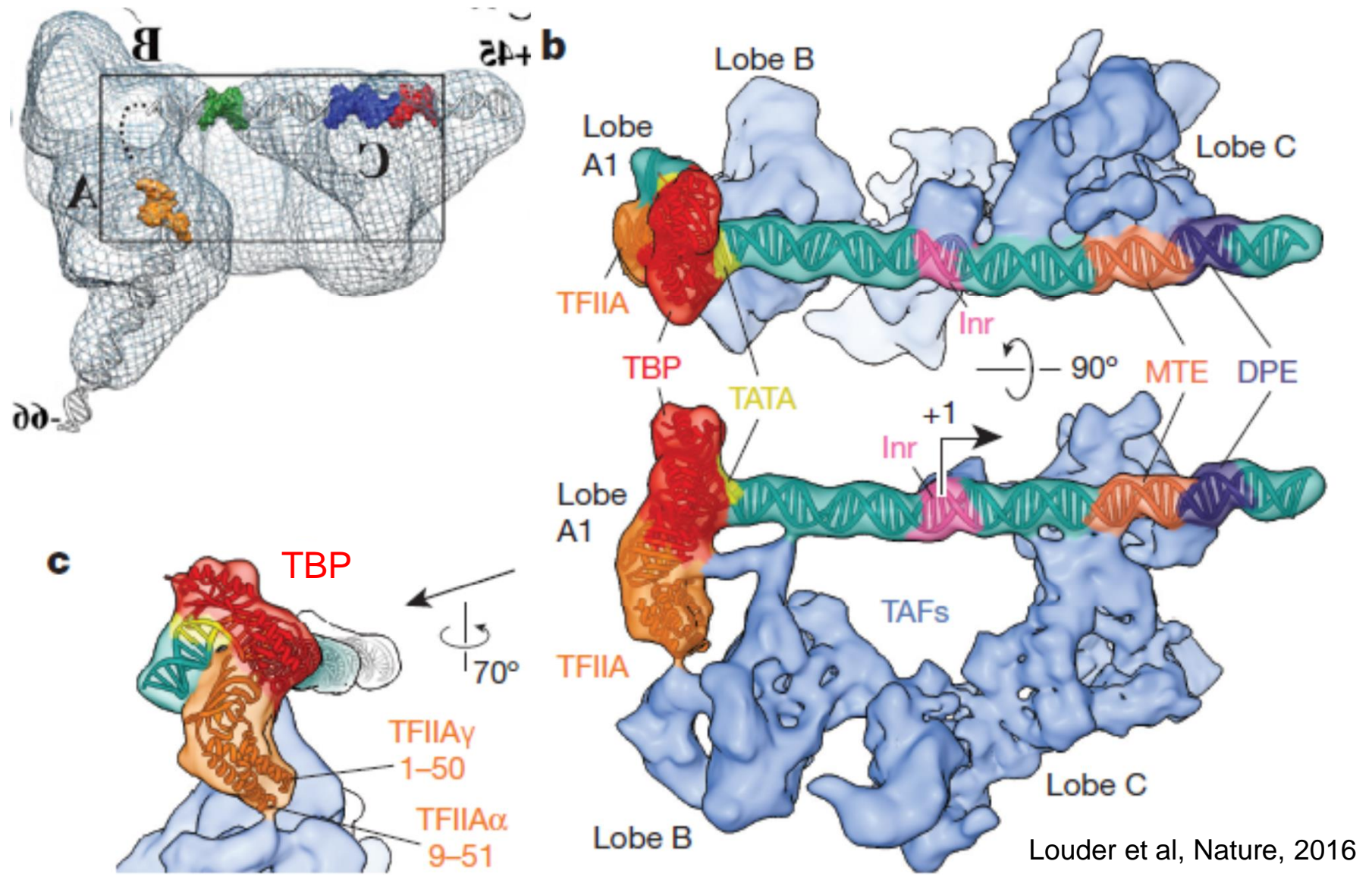


Liljas a spol.

- Footprint anlyza . ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex spole n vá0e na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)
- dochází k reorganizaci TFIID

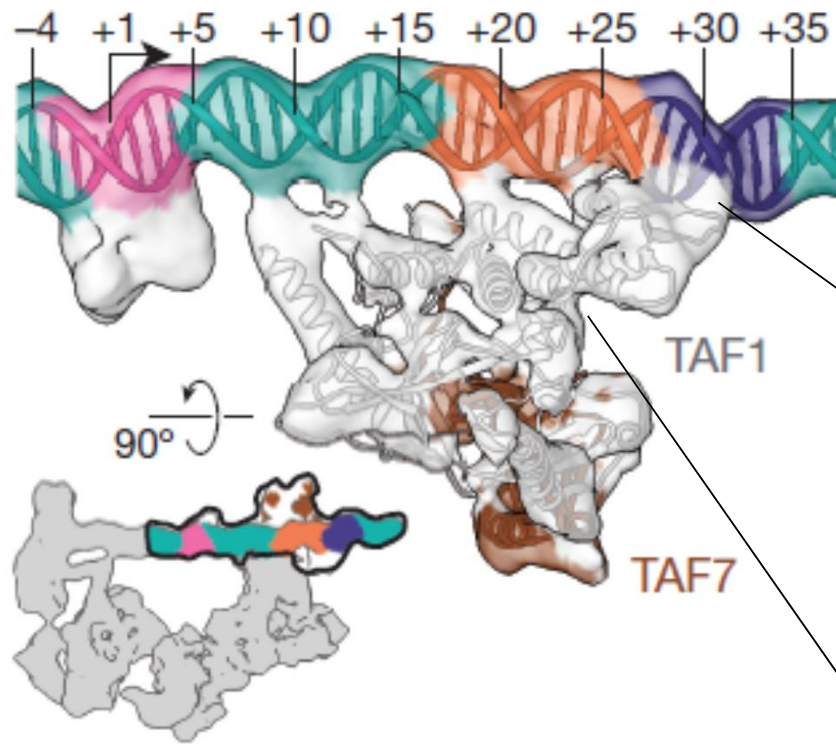
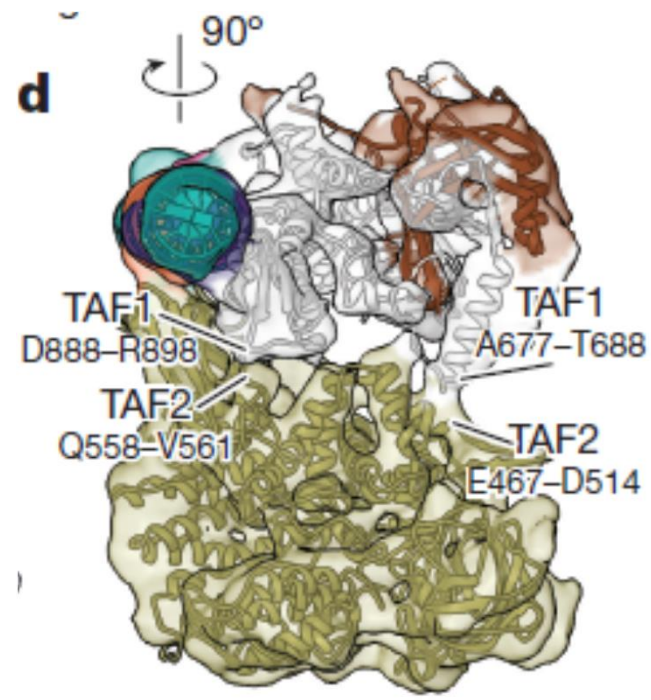
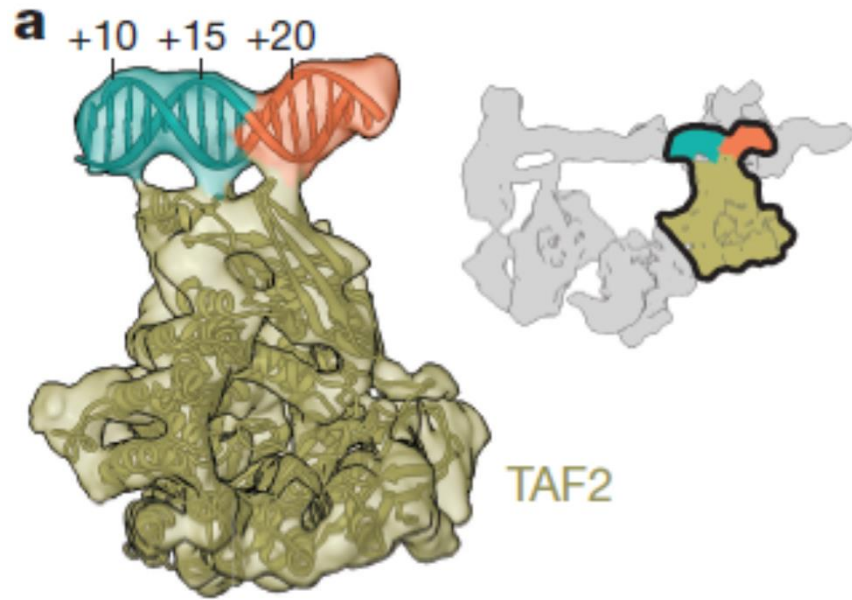
Cianfrocco et al, Cell, 2013



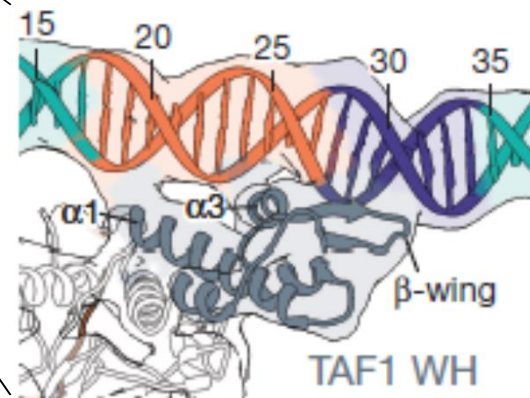


- TBP+TFIIA tvoří lobe A1 (reorganizace TBP po vazbě TFIIA)
- TFIIA přemostuje/propojuje TBP s lobe B částí TFIID

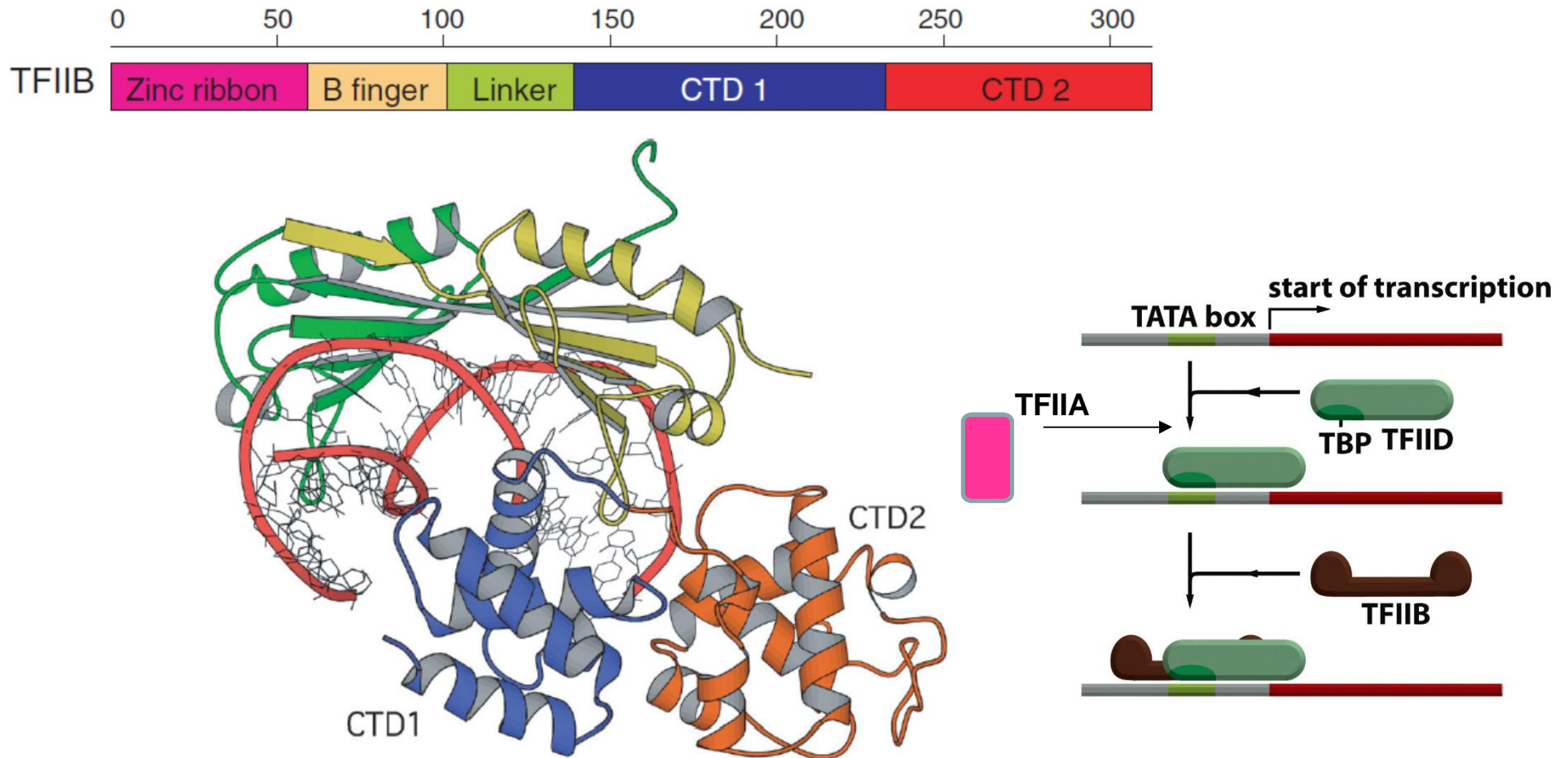
TAF1/TAF2 vytváří lobe C



- TAF1 váže DNA přes WHD

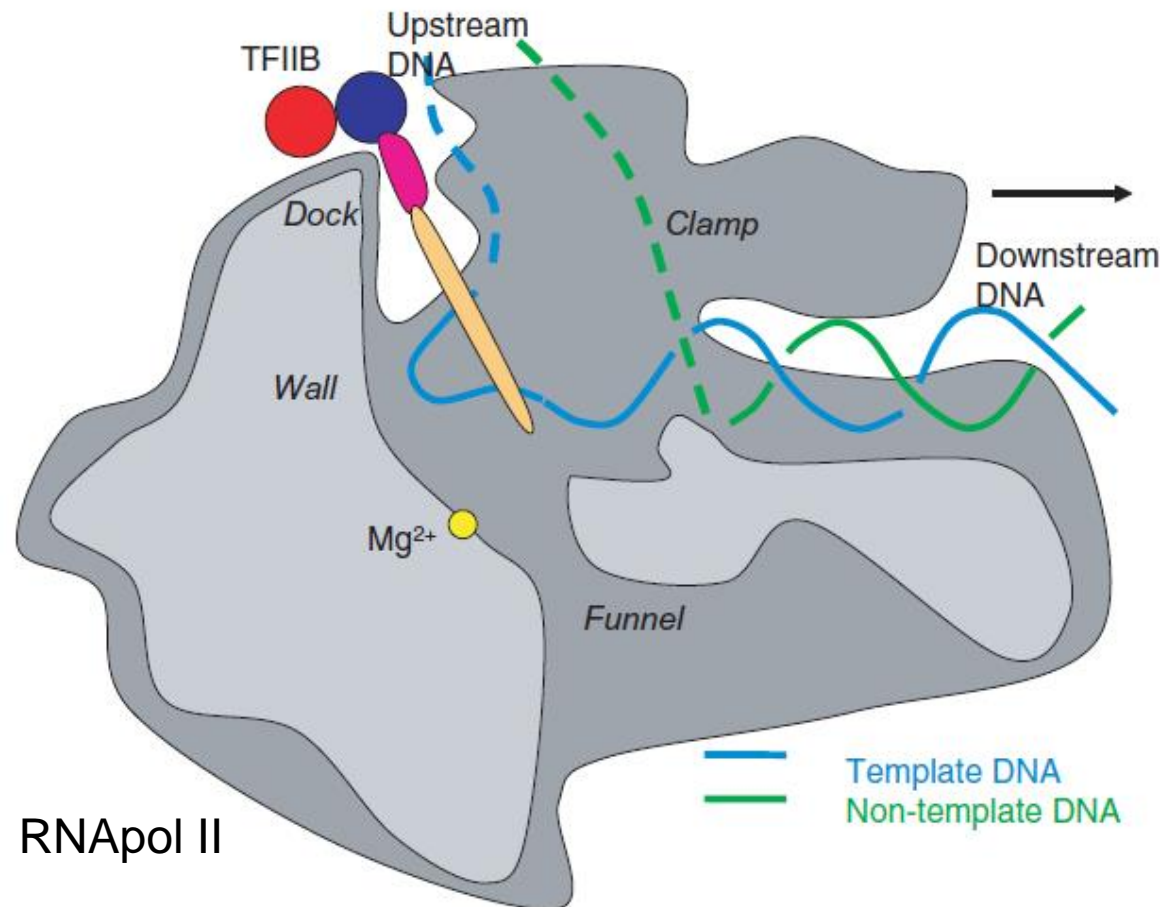


pro další postup transkripce je klíčový TFIIB . propojuje TFIID-TFIIA s RNAPol II

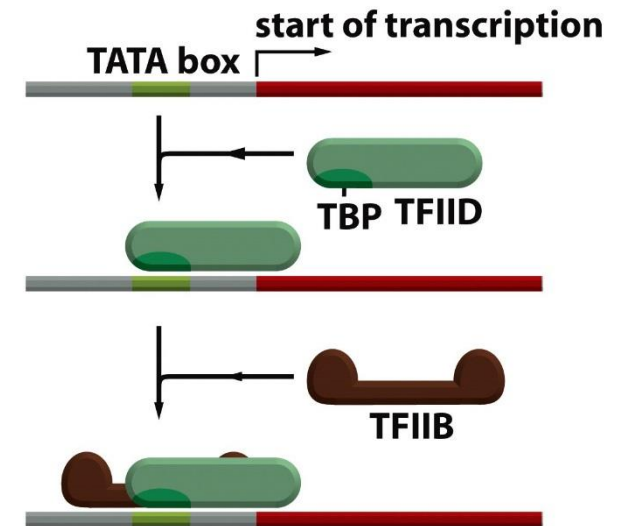


- TFIIB (C-konec) váže TBP a 6-7bp up- a downstream od ohybu DNA přes cukrfofátovou kostru (blízko TATA boxu)

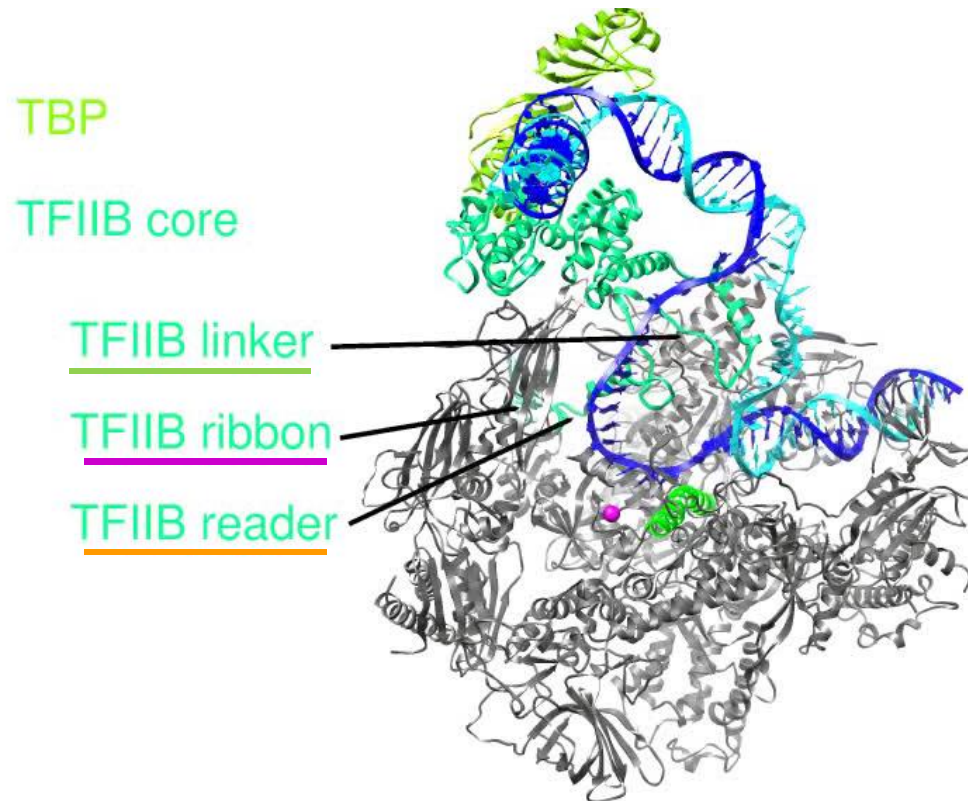
- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje TFIID-TFIIA-DNA komplex na pol II (do jeho aktivního centra/cleft)
- Zn-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp



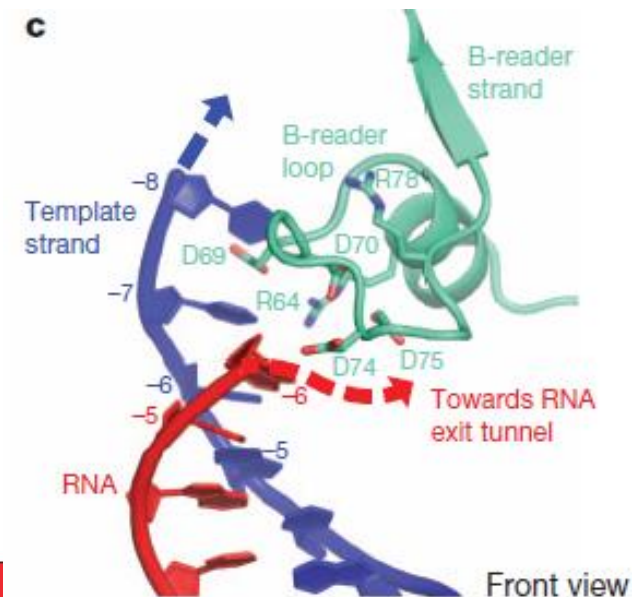
RNApol II



- 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)

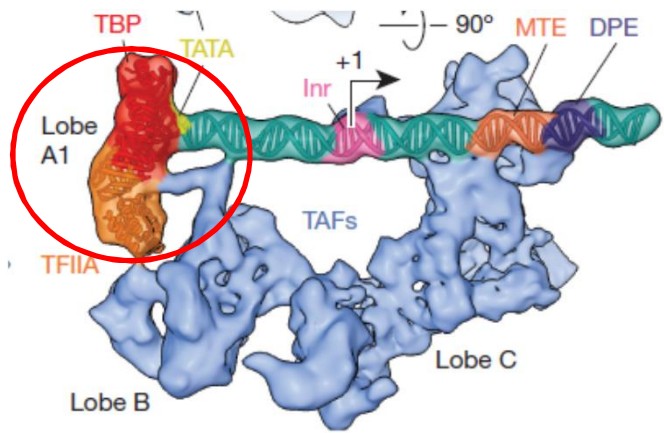


Video
ukázka RNA polymerázy

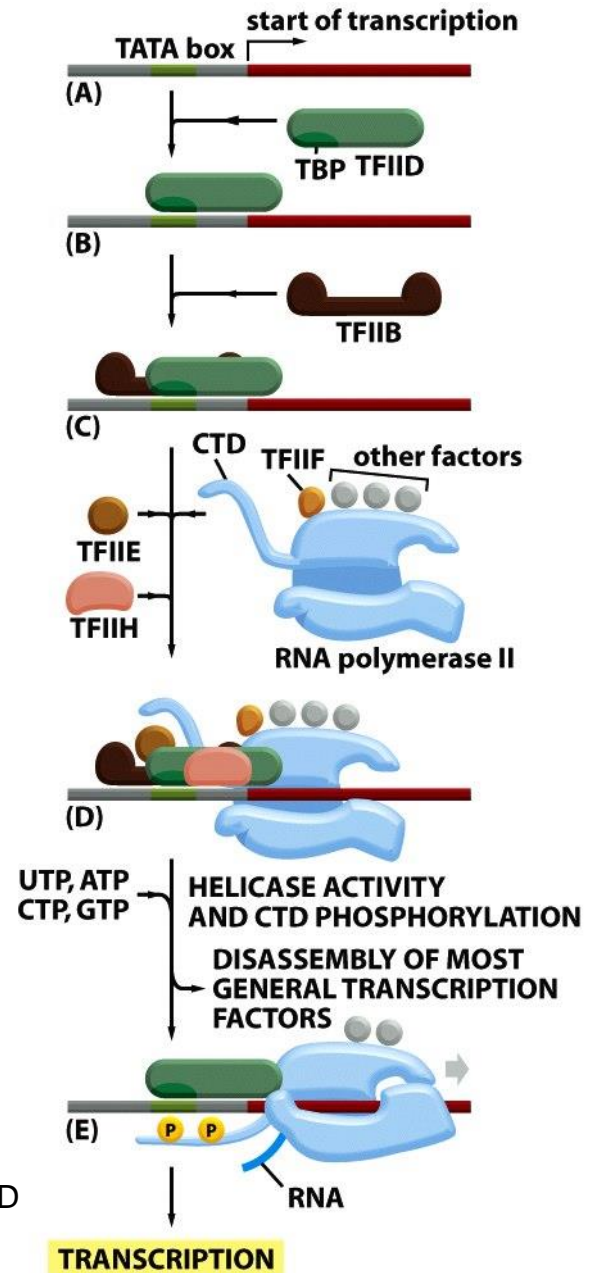
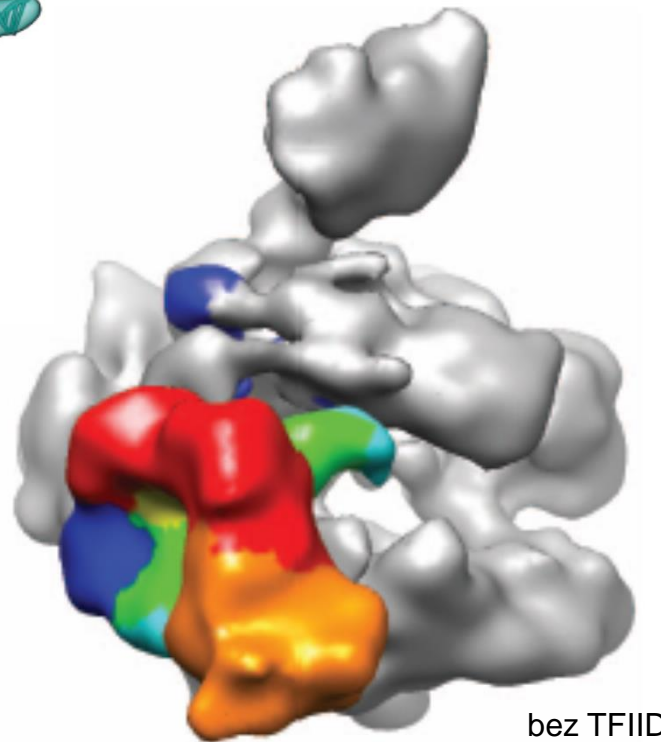


TFIIB propojuje RNAPol II s již sestaveným TBP/TFIID+TFIIA

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

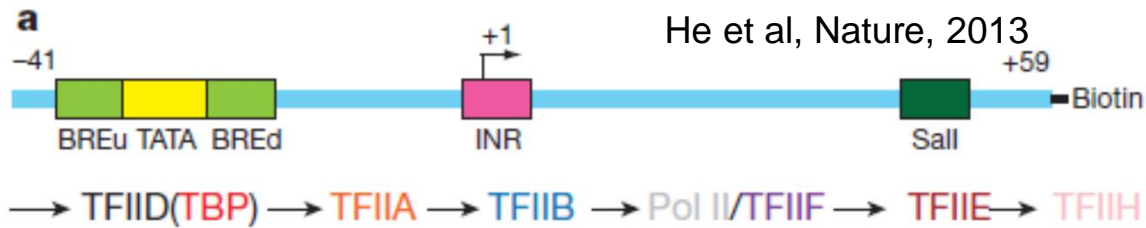
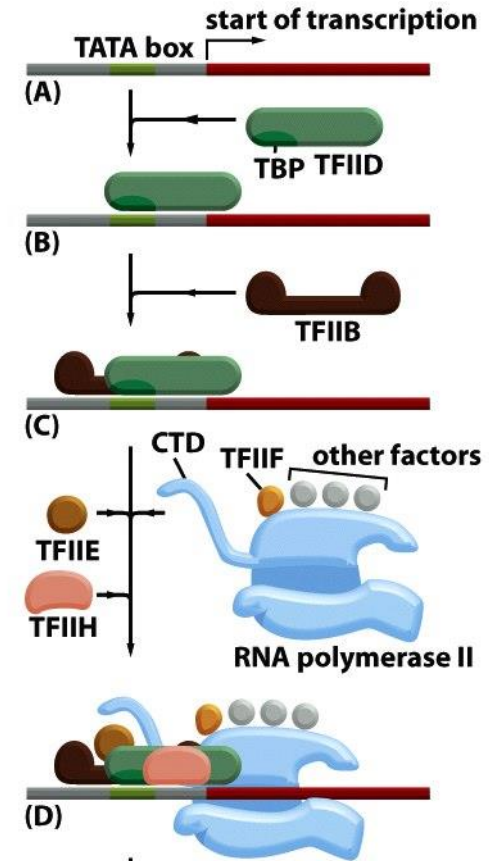


- cryoEM komplexu
TBP (bez TFIID) + **TFIIA**
 + **TFIIB** + RNAPol II

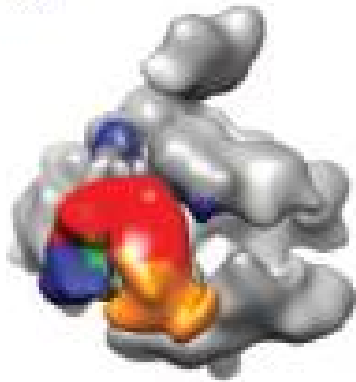


Rekonstrukce celého PIC

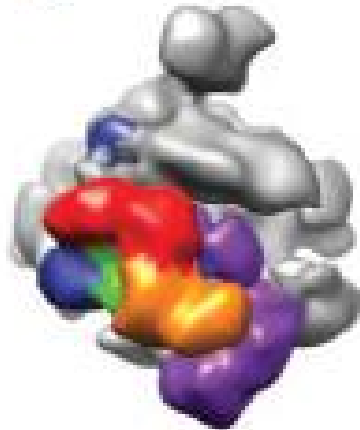
- biotin-DNA navázána na streptavidinové kuličky . na DNA nachytány *in vitro* sestavené komplexy . odzít peno *SalI* a cryoEM - postupn rekonstituován celý PIC



b TBP (bez TFIID) + TFIIA
+ TFIIB + RNApol II



c + TFIIF

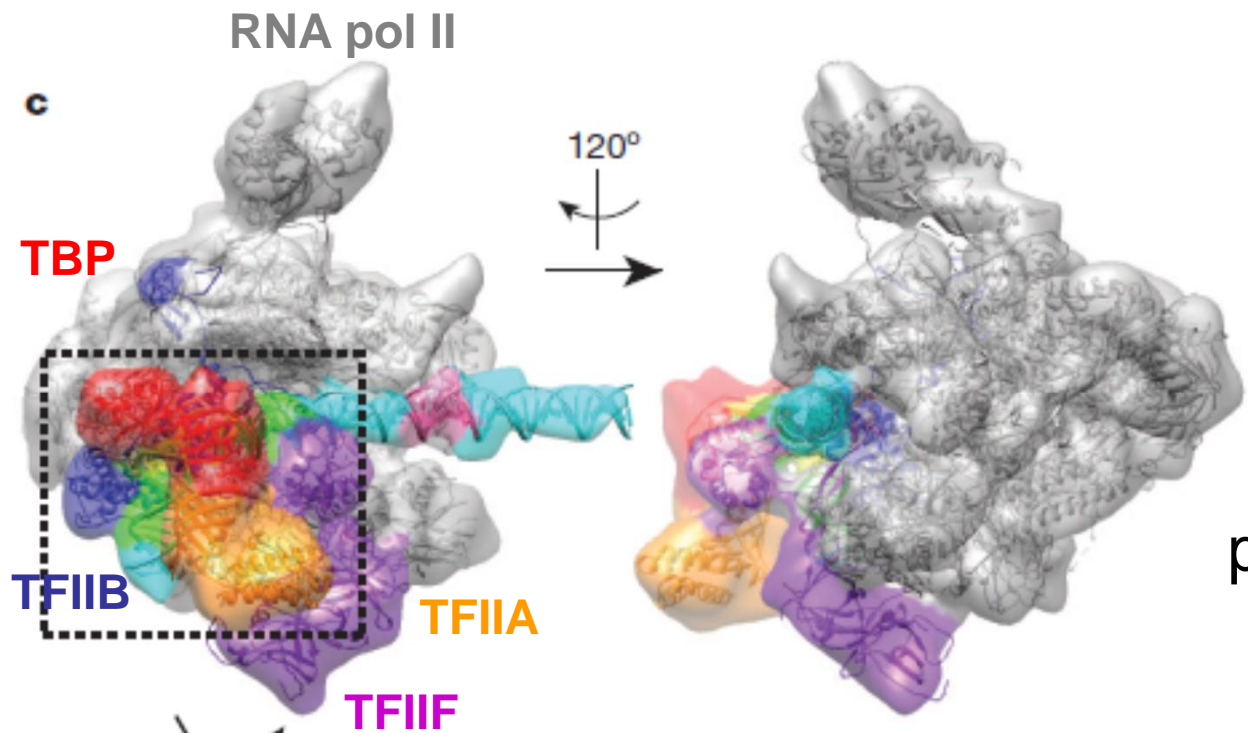


d + TFIIE

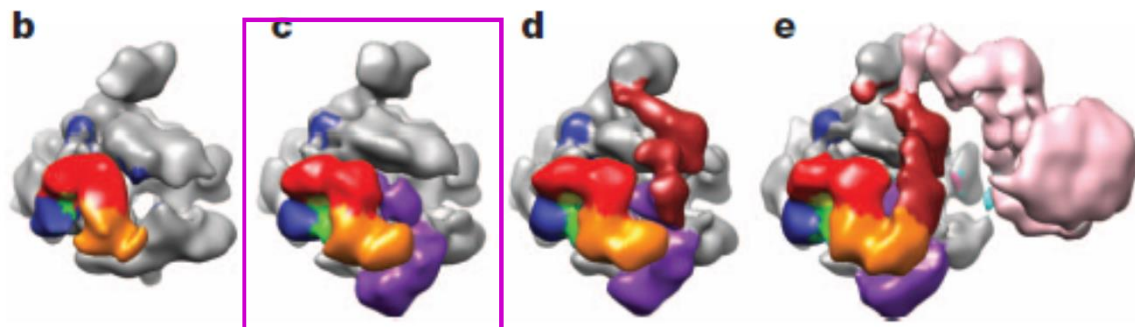
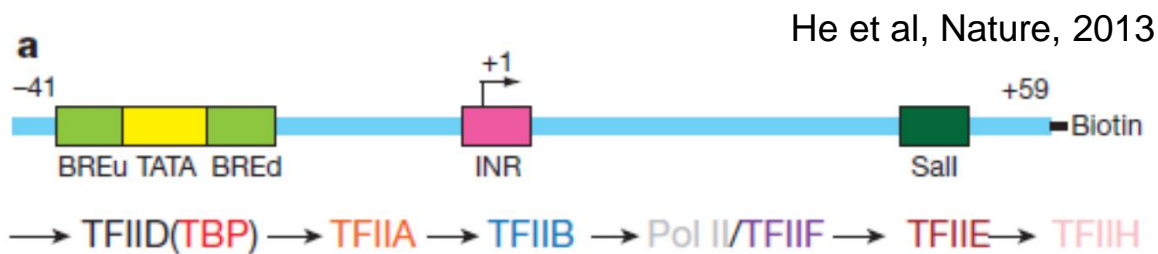


e + TFIIH

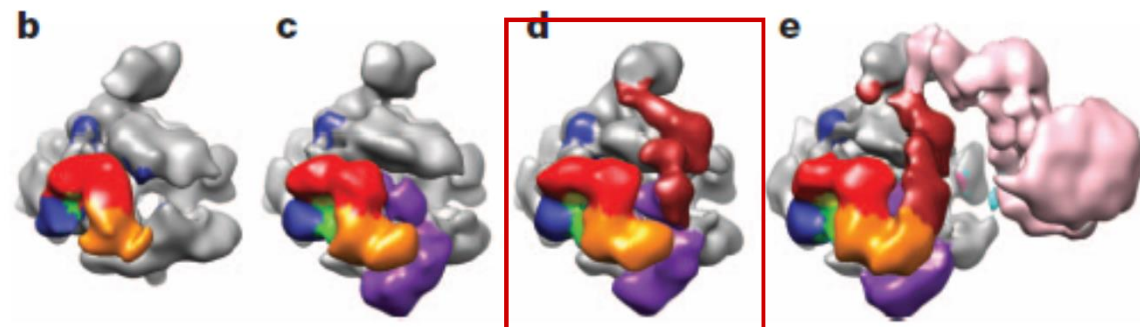
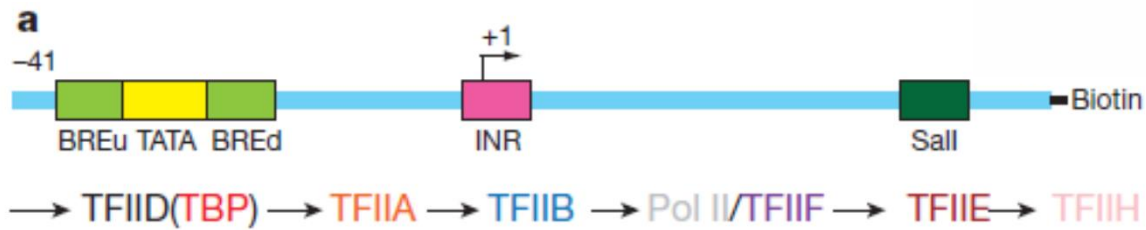
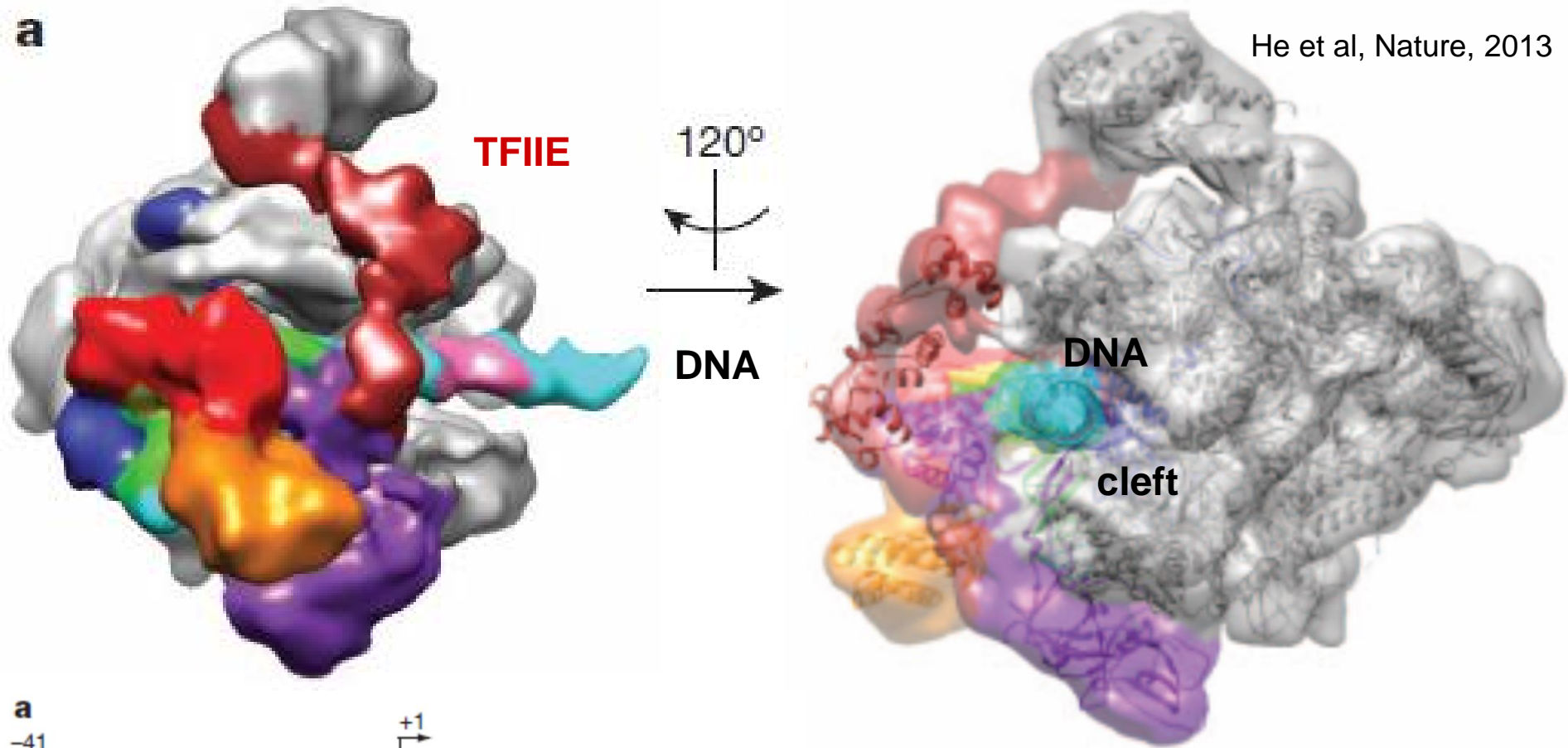




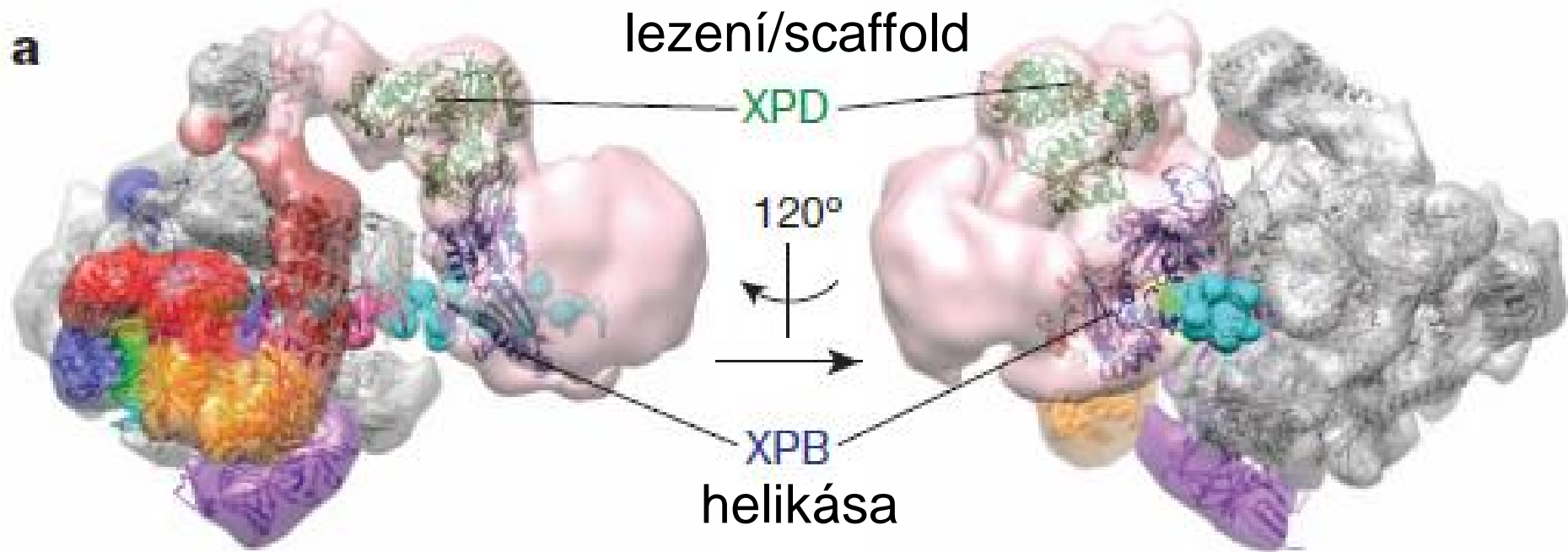
- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})
- změna nastavení TFIIA+TFIIB+TBP + RNA pol II
- váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu



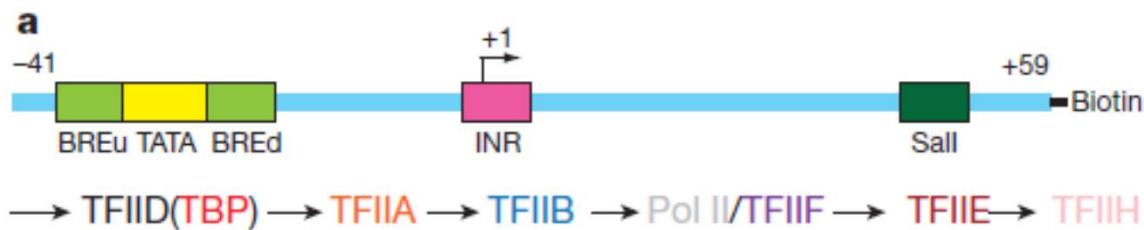
Vanini & Cramer, Mol Cell, 2012



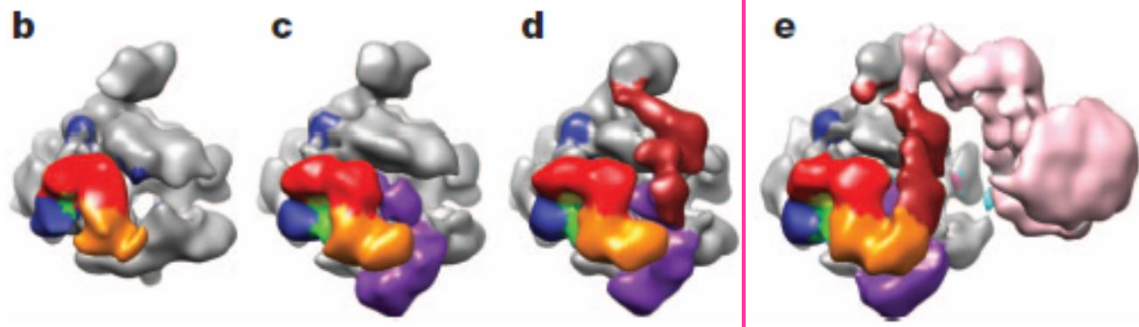
- TFIIF vá0e TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu
- tandem 4x WHD uzamyká DNA v RNAPol II prohlubni



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



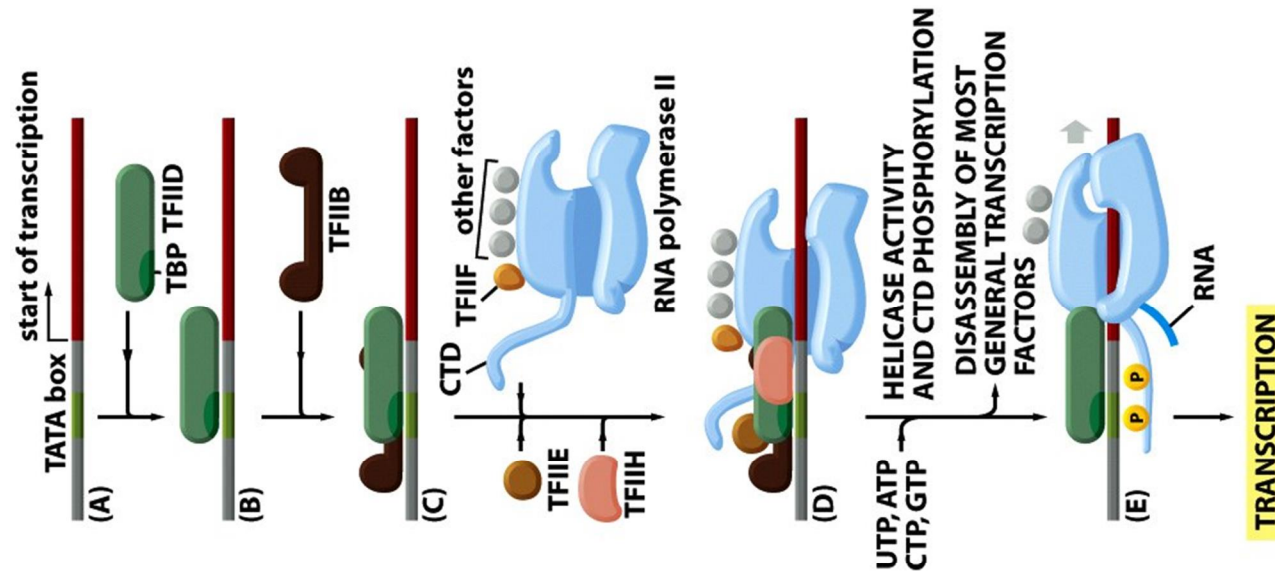
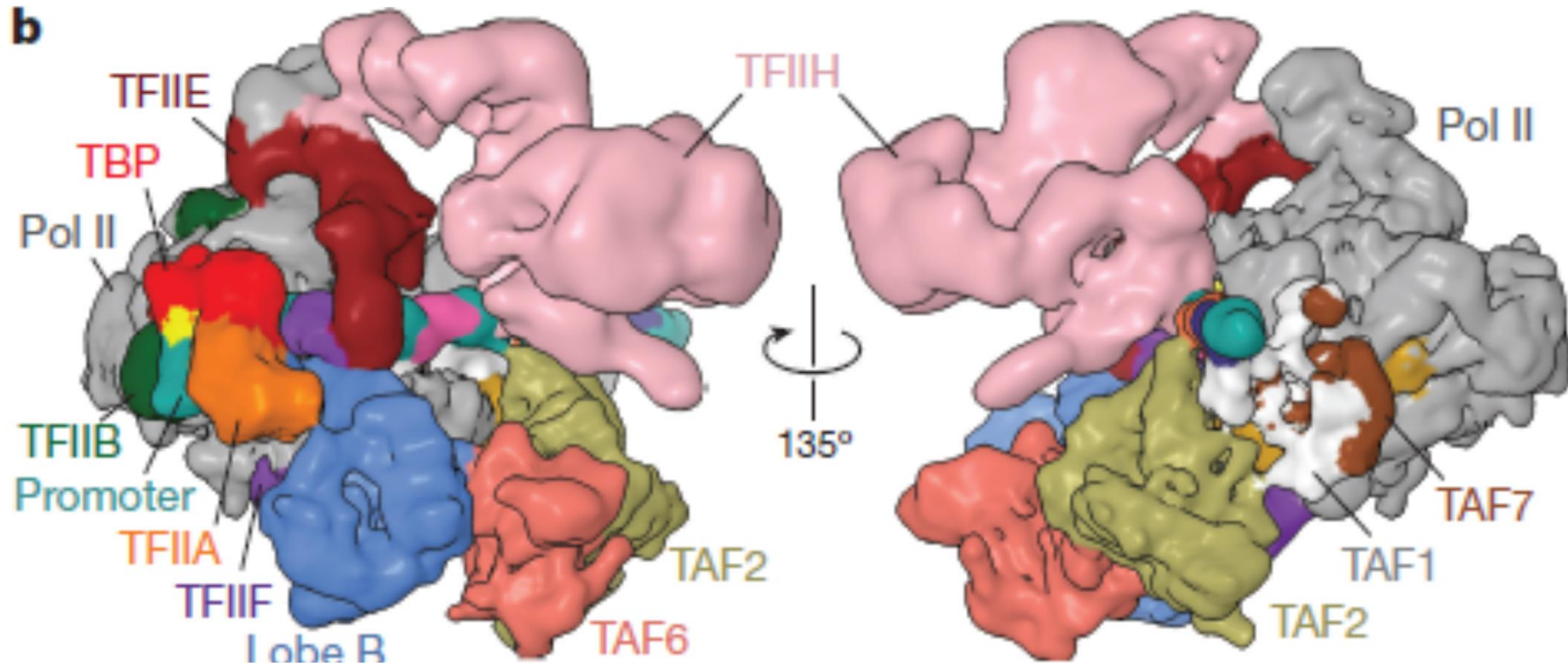
lidský PIC komplex
He et al, Nature, 2013



- **TFIIF** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)
- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvouzroubovici

Kompletní PIC i s TFIID komplexem

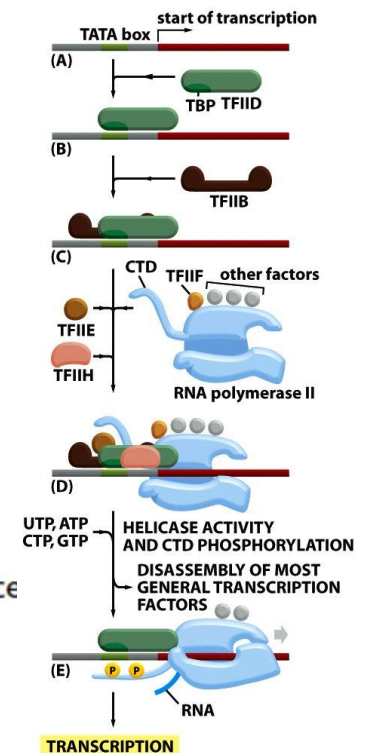
Louder et al, Nature, 2016



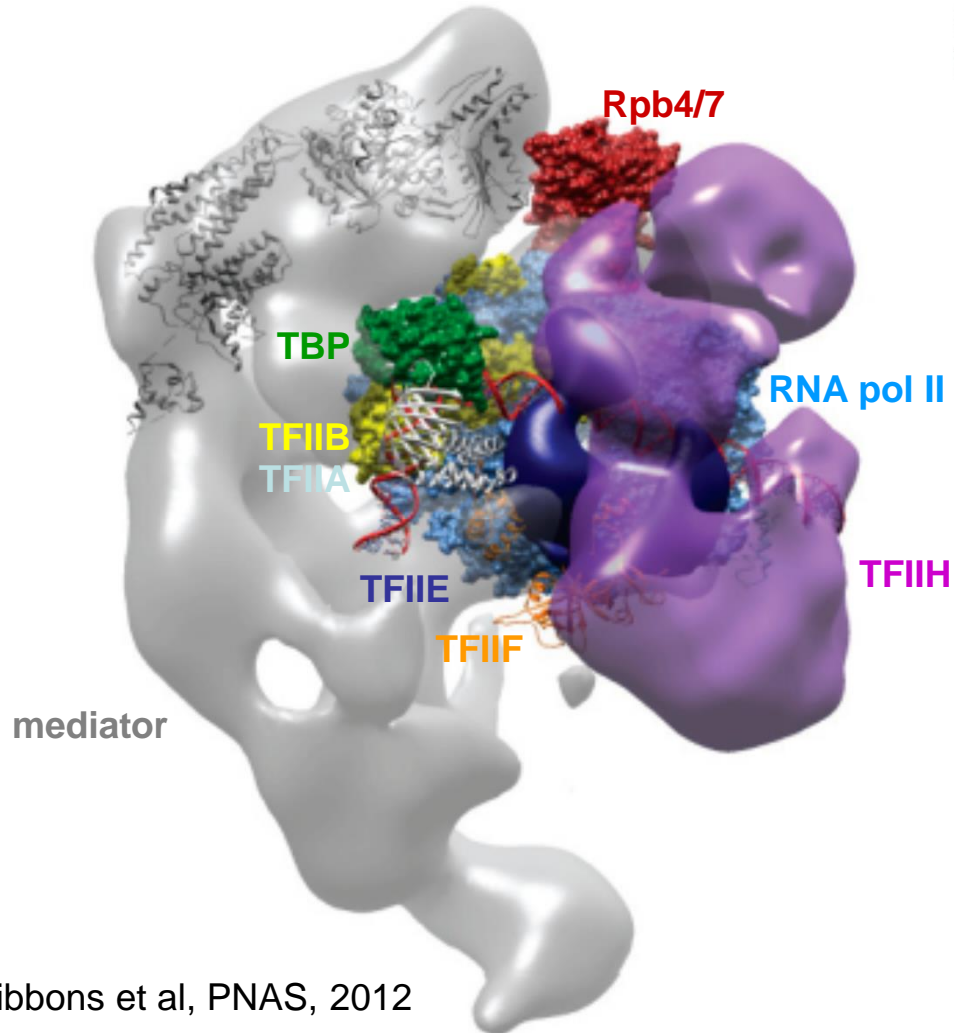
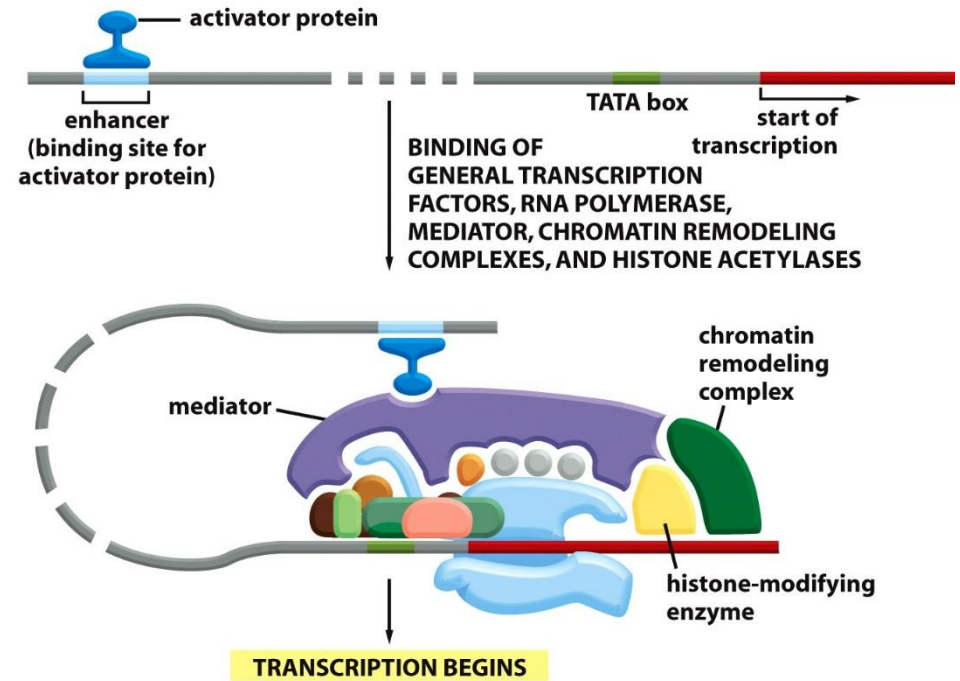
za átek transkripce - faktory

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	Dr. ¥pirek P89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cyclin H, p34, p32/MAT1, and p8/TFB5 Dr. Bla0ek	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 ō uvoln ní chromatinové struktury ō zahrnuje jezt další komplexy (jako nap . mediator)



P ízt
Dr. Bla0ek:
Úloha Cdk
kinás v
regulaci
transkripce a
bun ného
cyklu

