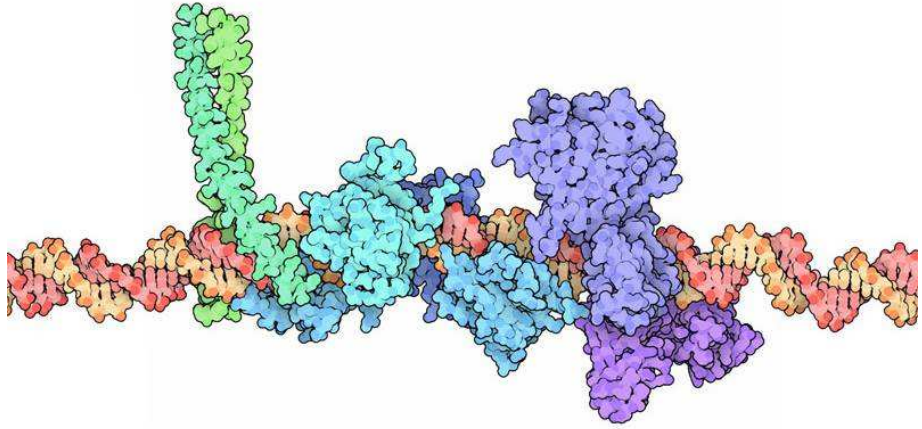
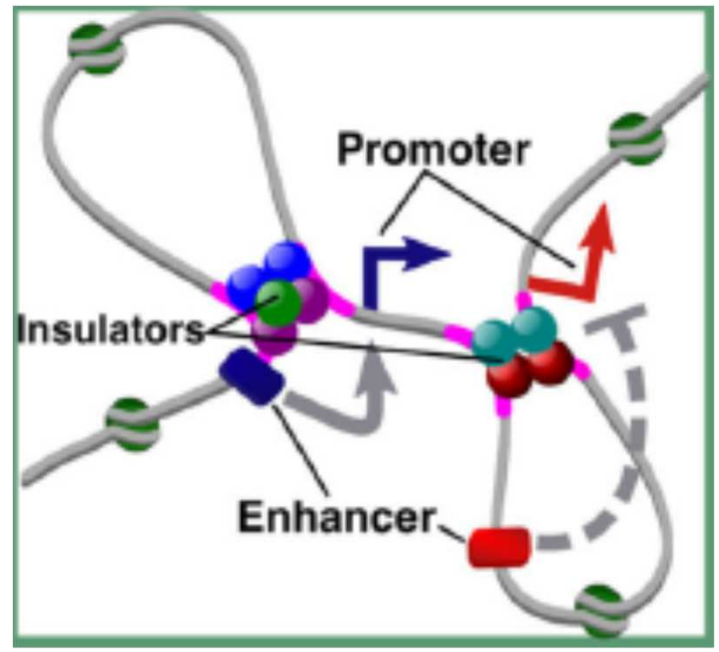
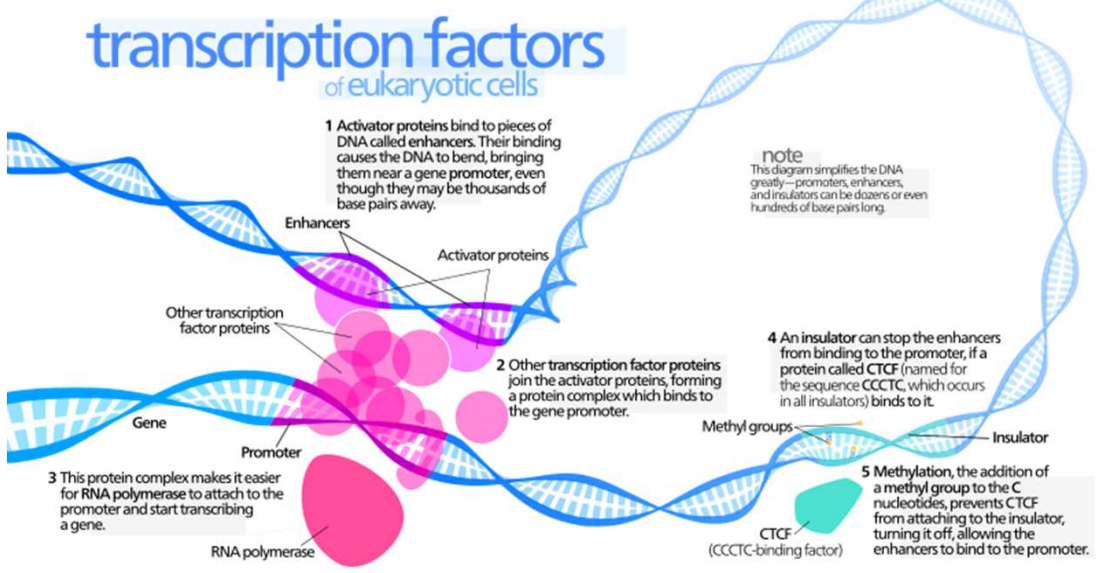


# Komplexy spojené s transkripcí

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

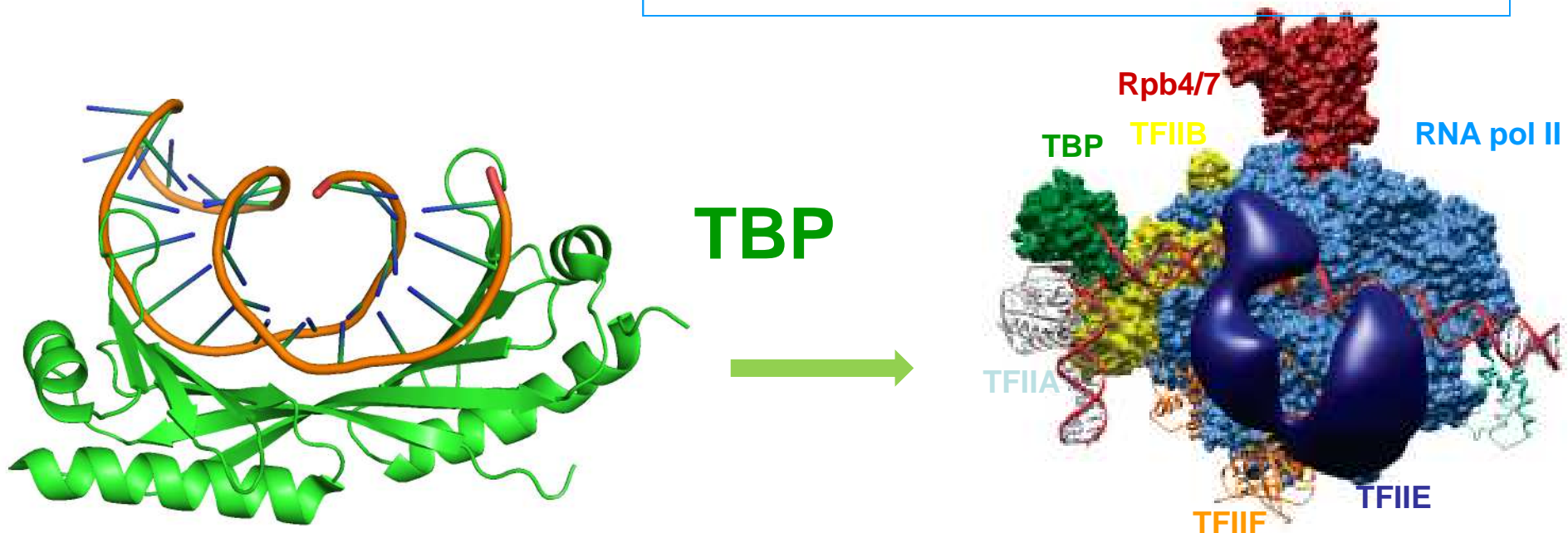


- velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům  $\alpha$ -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- nejčastěji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)

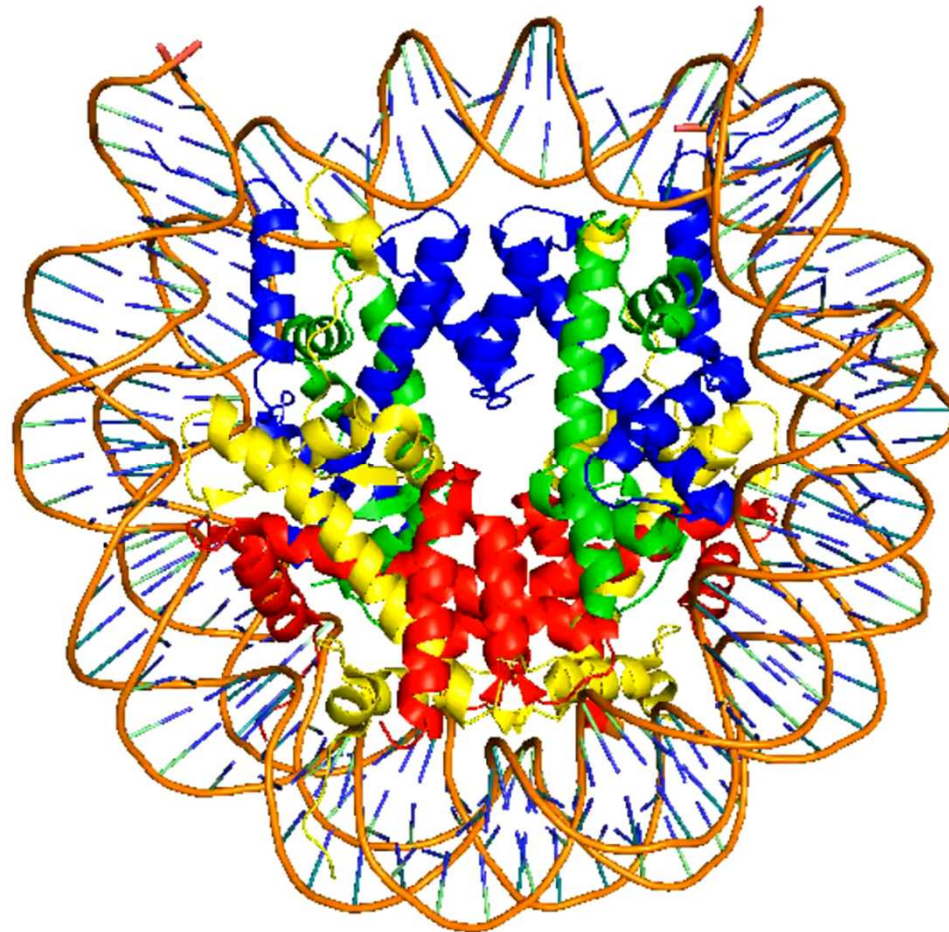


- Zipper typ
- Helix-turn-helix
- Zinkový prst
- **Histon, HMG-box**
- $\beta$ -barrel
- $\beta$ -hairpin/ribbon
- Smíšené  $\alpha/\beta$

- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům  $\alpha$ -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



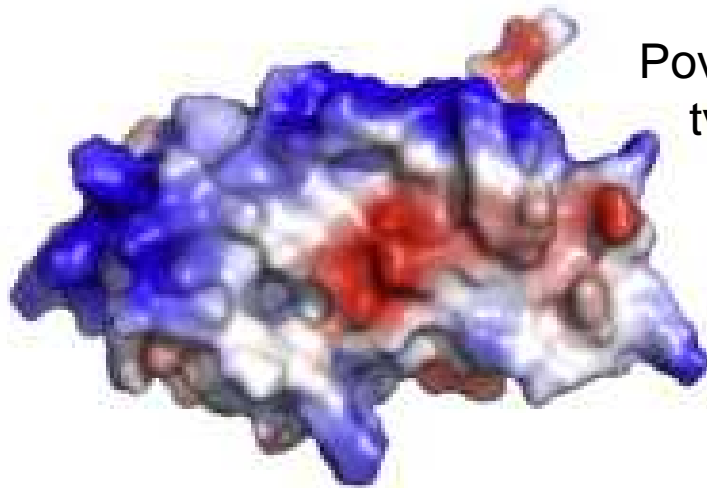
3AFA

## Sestavování nukleozomu:

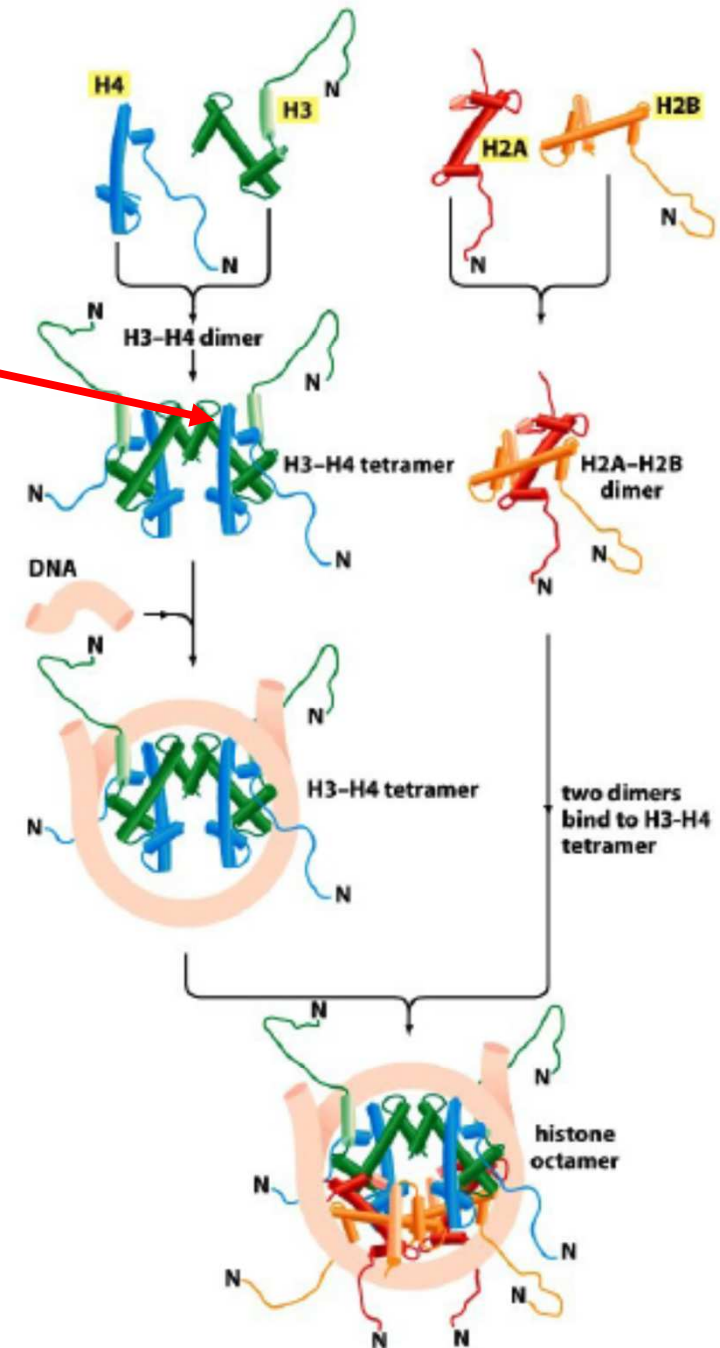
klíčová interakce mezi dvěma H3-H4 dimery je zprostředkována histonem H3

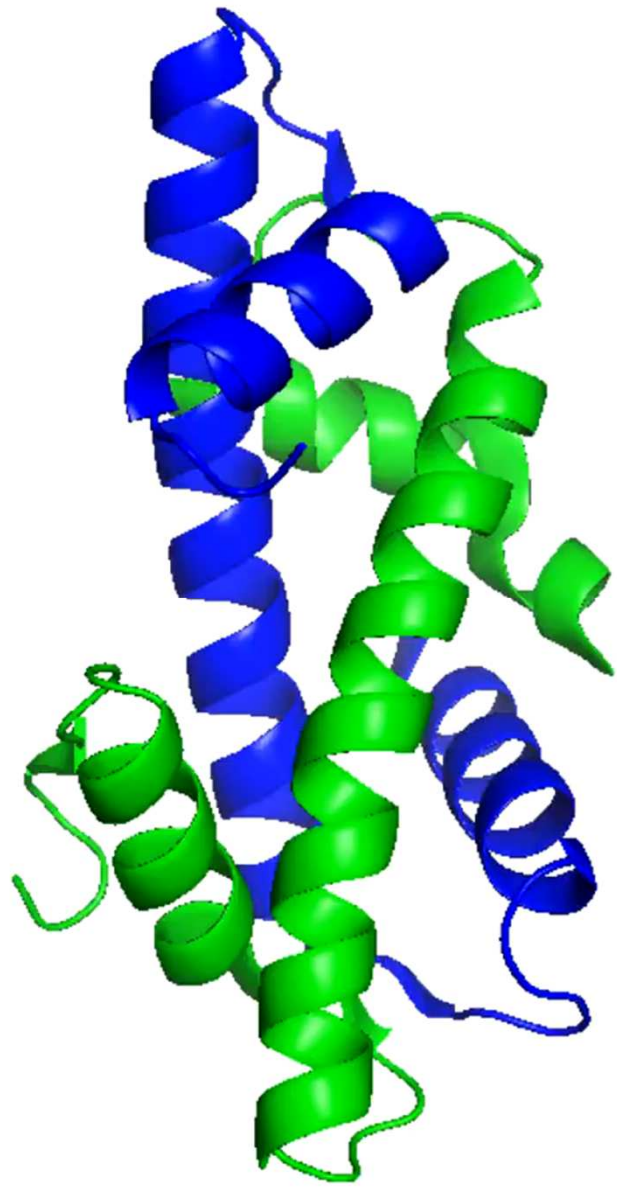
Dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru (H3-H4)<sub>2</sub>

Povrch/kontakt tvoří lysiny a argininy

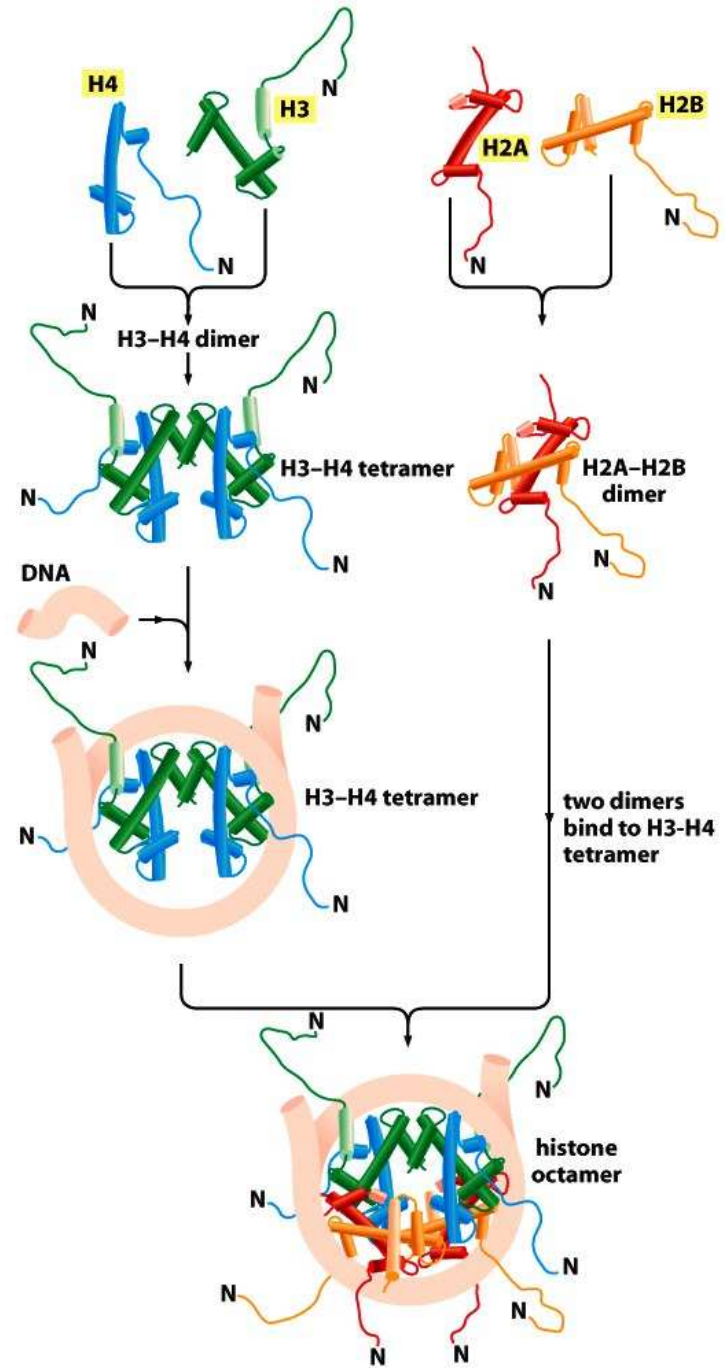


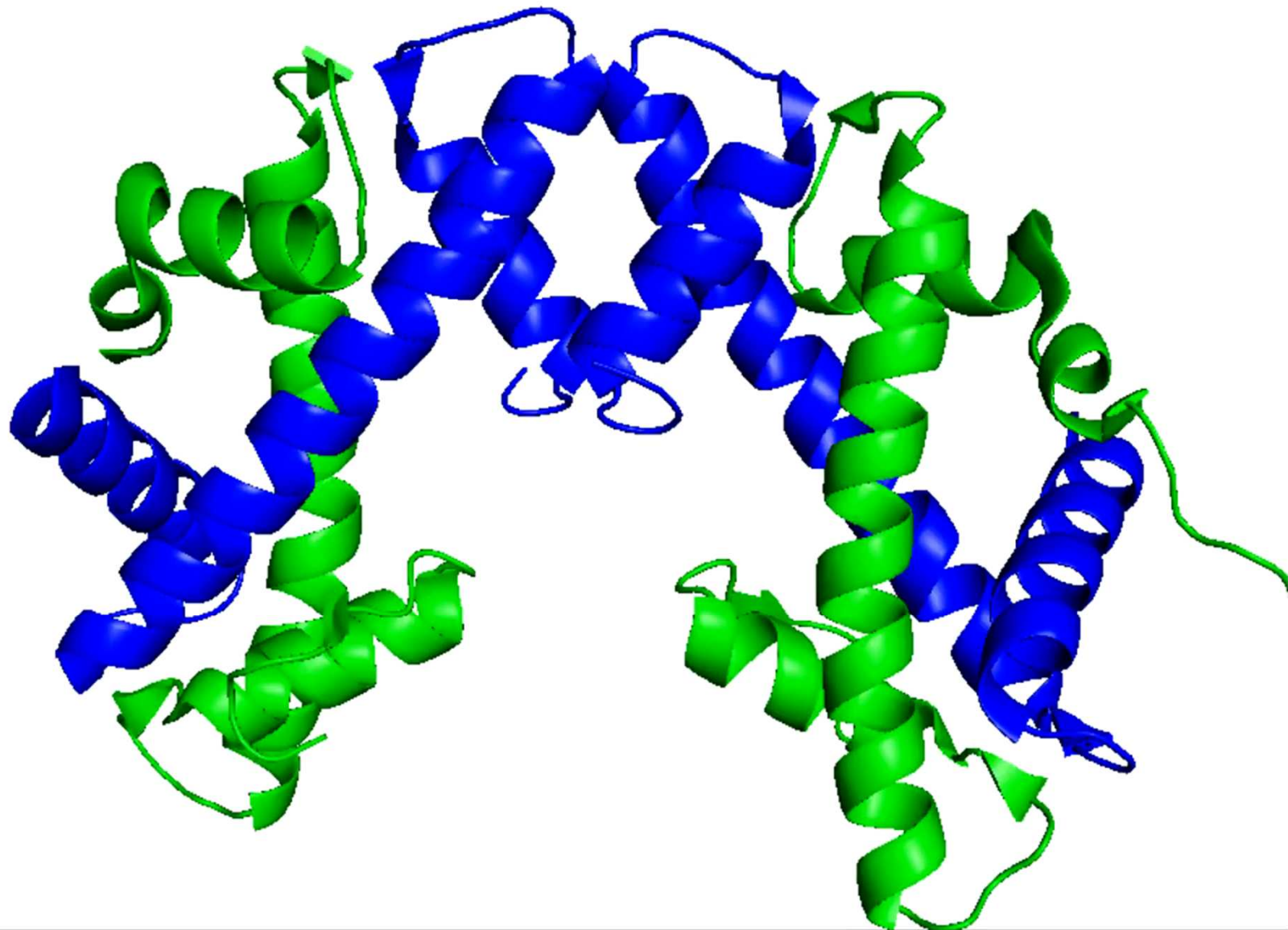
H2B/H2A



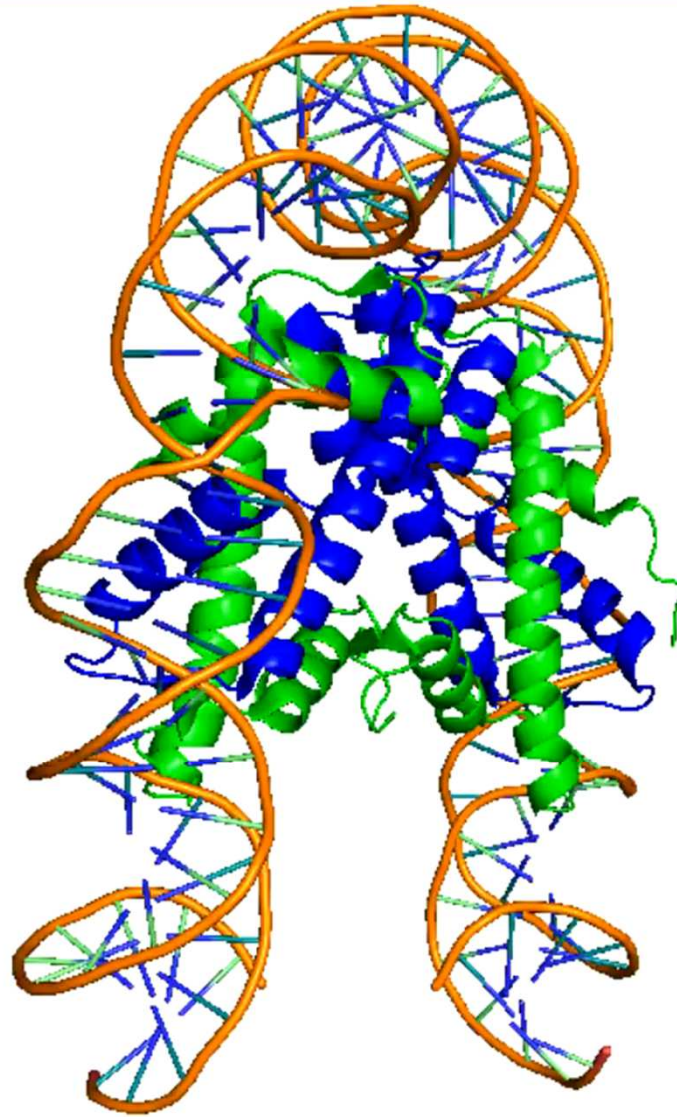


H3-H4 dimer

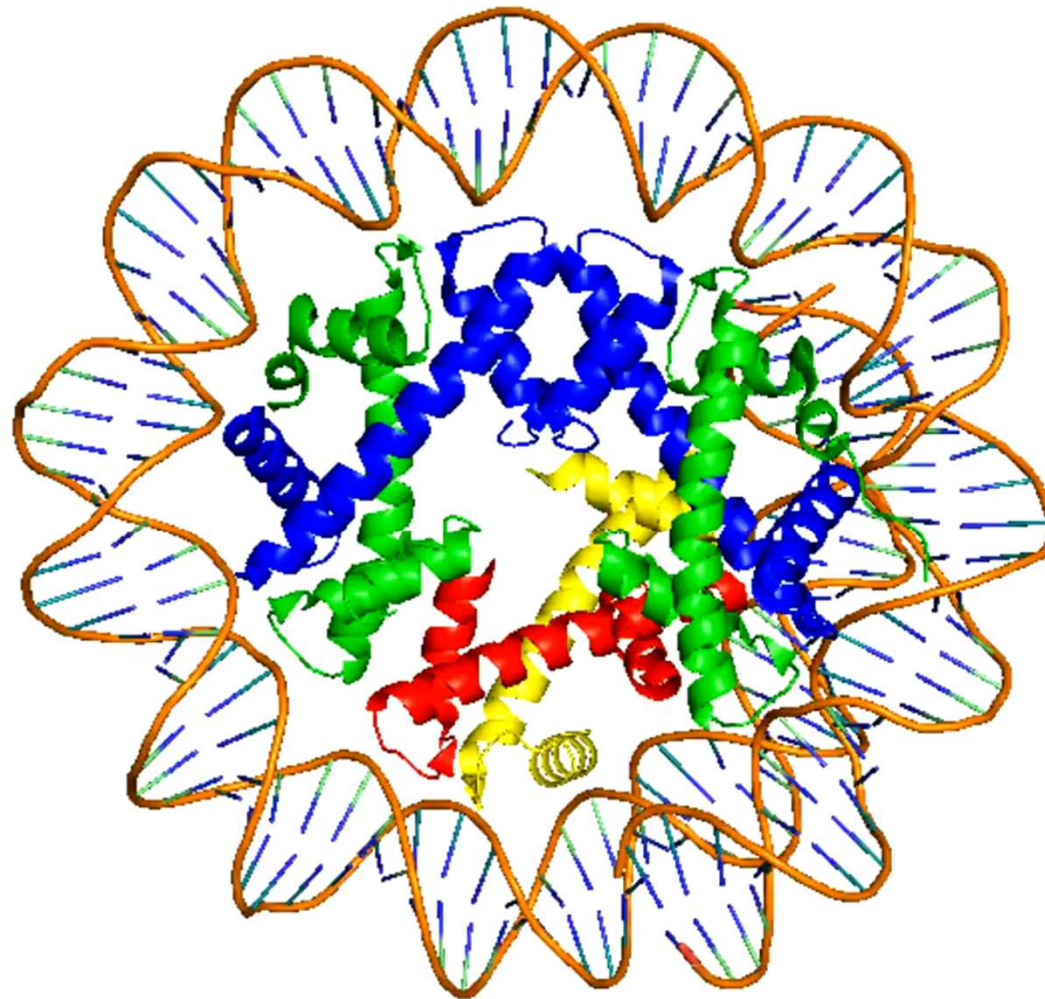




- H3-H3 interakce = (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer

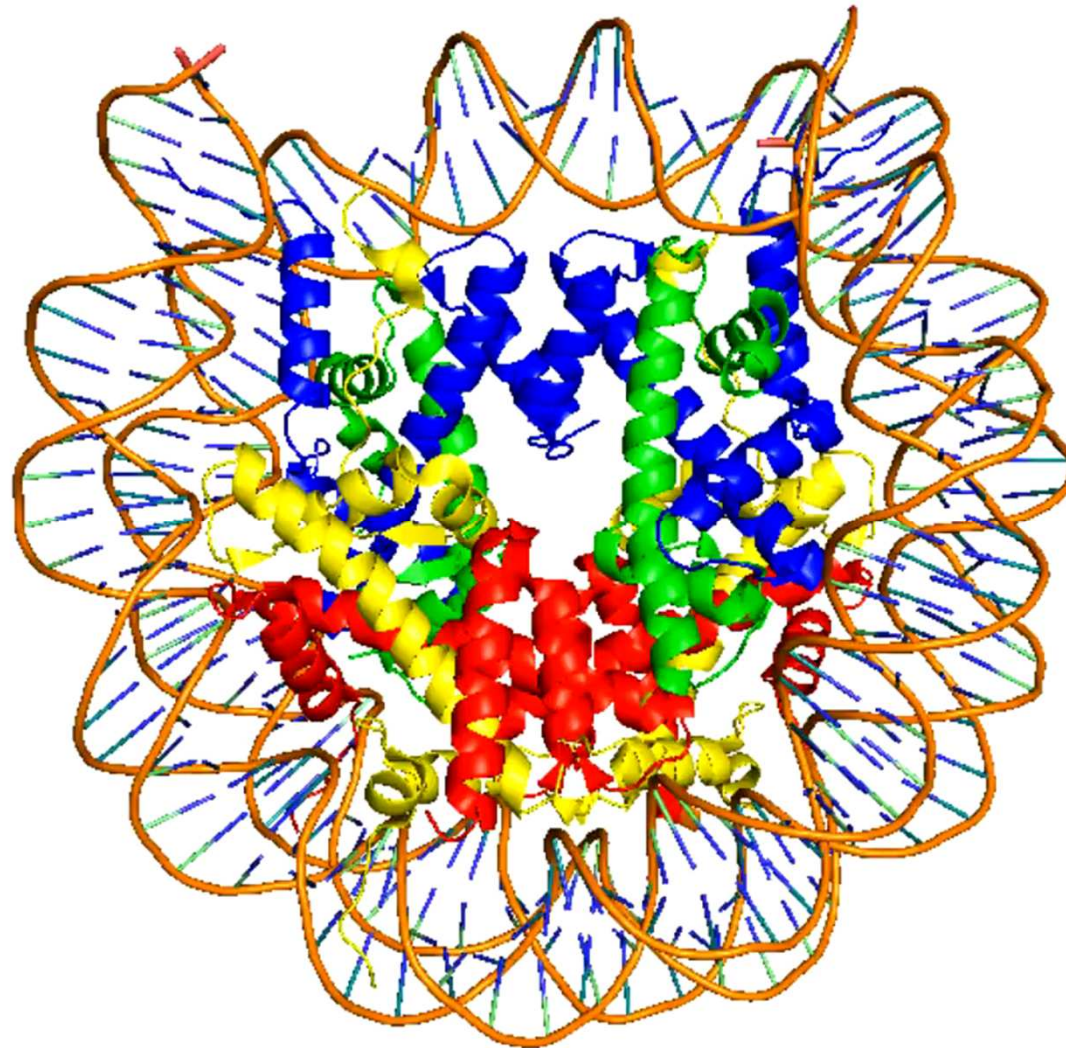


- H3-H3 interakce = (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer – vazba na DNA



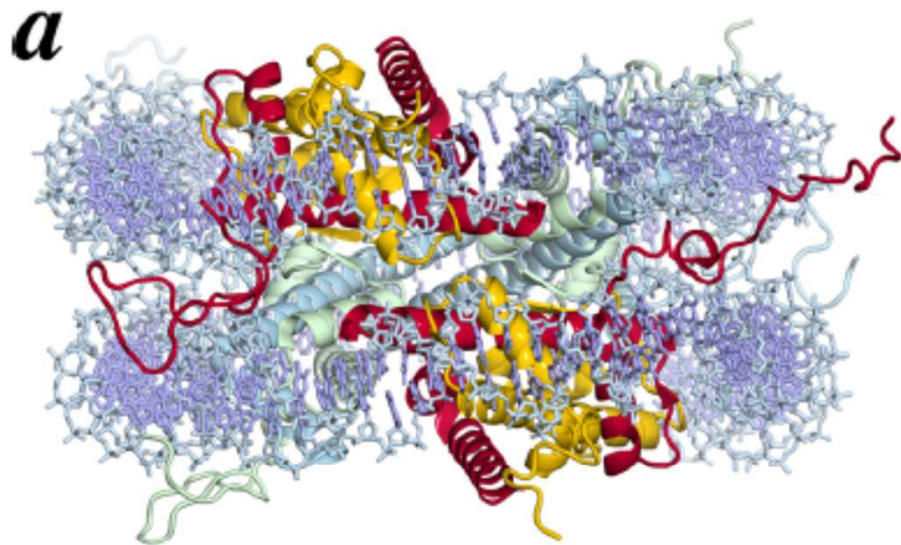
- H3-H3 interakce =  $(\text{H3-H4})_2$  tetramer
- dimery H2A-H2B (H2A – váže H3)



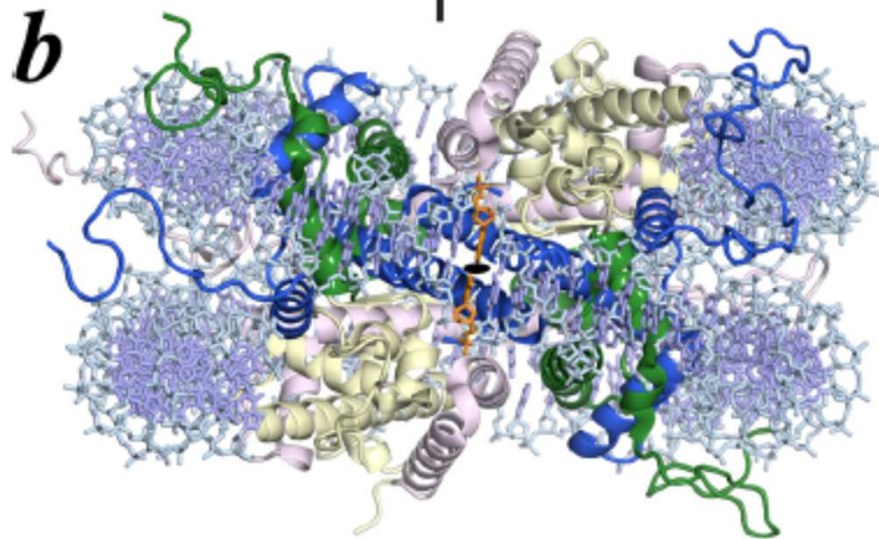


- H3-H3 interakce = (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer
- dimery H2A-H2B (H2A – váže H3)

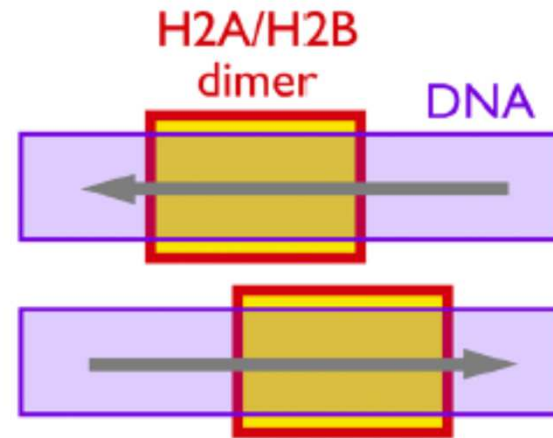
3AFA



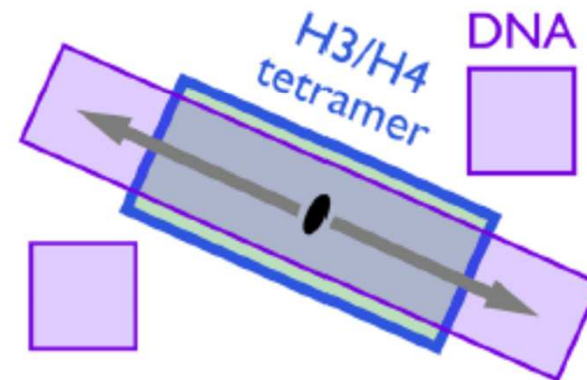
■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA



■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA



**H2A/H2B** váže dvě vlákna  
**H3/H4** váže jedno vlákno, ale silněji



info o komplexech/PPI (vizuální, typy vazeb)  
**(PDBsum – detailní info)**

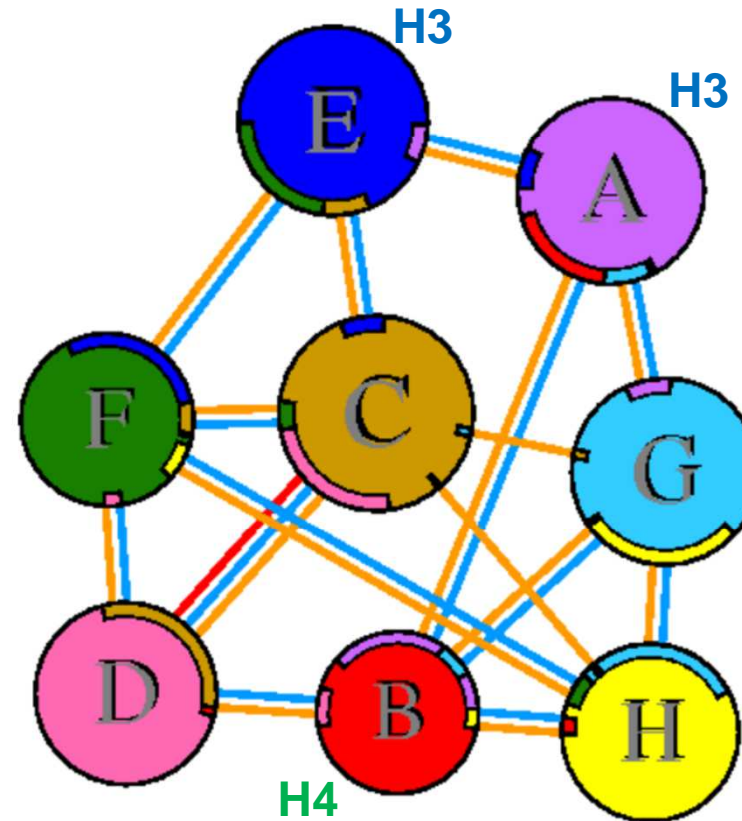
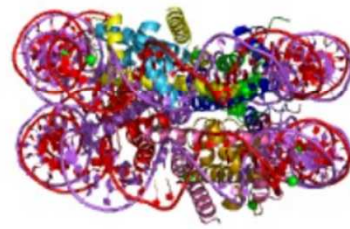
(krystal lidského nukleosomu – 3AFA)

**PDBsum** Go to PDB code: 3afa go  

[Top page](#)
[Protein](#)
[DNA/RNA](#)
[Metals](#)
[Prot-prot](#)
[Pores](#)
[Links](#)

Protein-Protein interfaces for 3afa PDB id **3afa**

Interfaces summary for 3afa



Interface statistics

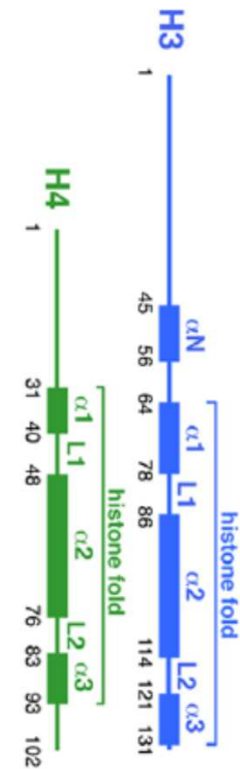
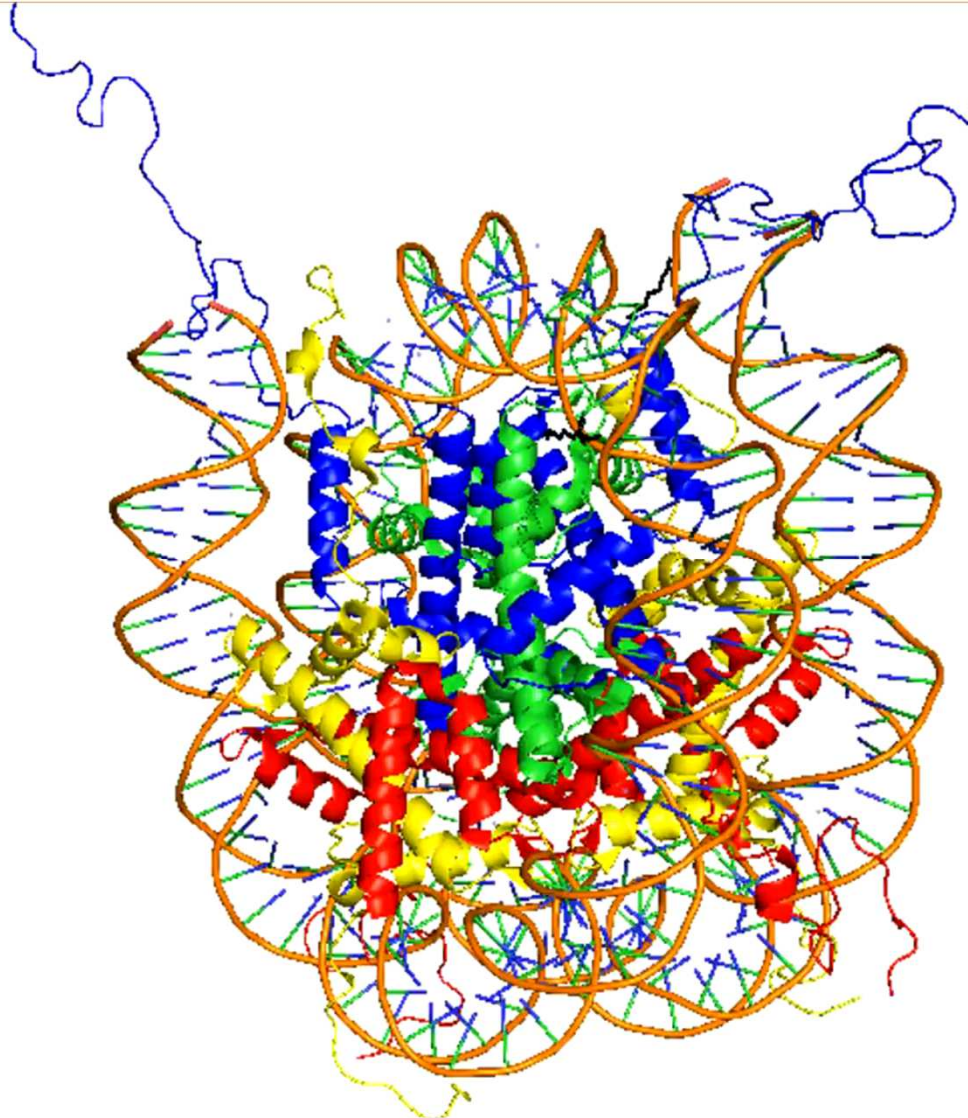
Chains	No. of interface residues	Interface area (Å <sup>2</sup> )	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
A:H	43 : 42	2417:2524	-	-	18	246
A:H	12 : 13	592:576	-	-	2	47
A:H	11 : 13	710:671	-	-	5	52
B:H	9 : 9	496:453	-	-	5	73
B:H	8 : 7	450:452	-	-	4	34
B:H	4 : 4	257:238	-	-	3	40
C:H	47 : 52	2522:2530	1	-	19	296
& C:H	47 : 52	2431:2494	-	-	14	262
D:H	13 : 12	672:708	-	-	6	48
C:H	7 : 7	437:426	-	-	4	33
C:H	3 : 4	128:136	-	-	-	16
C:H	3 : 1	52:73	-	-	-	7
D:H	4 : 3	216:247	-	-	2	25
E:H	50 : 46	2525:2593	-	-	21	271
F:H	9 : 9	490:458	-	-	5	72

Key: — Salt bridges — Disulphide bonds — Hydrogen bonds — Non-bonded contacts



# 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)

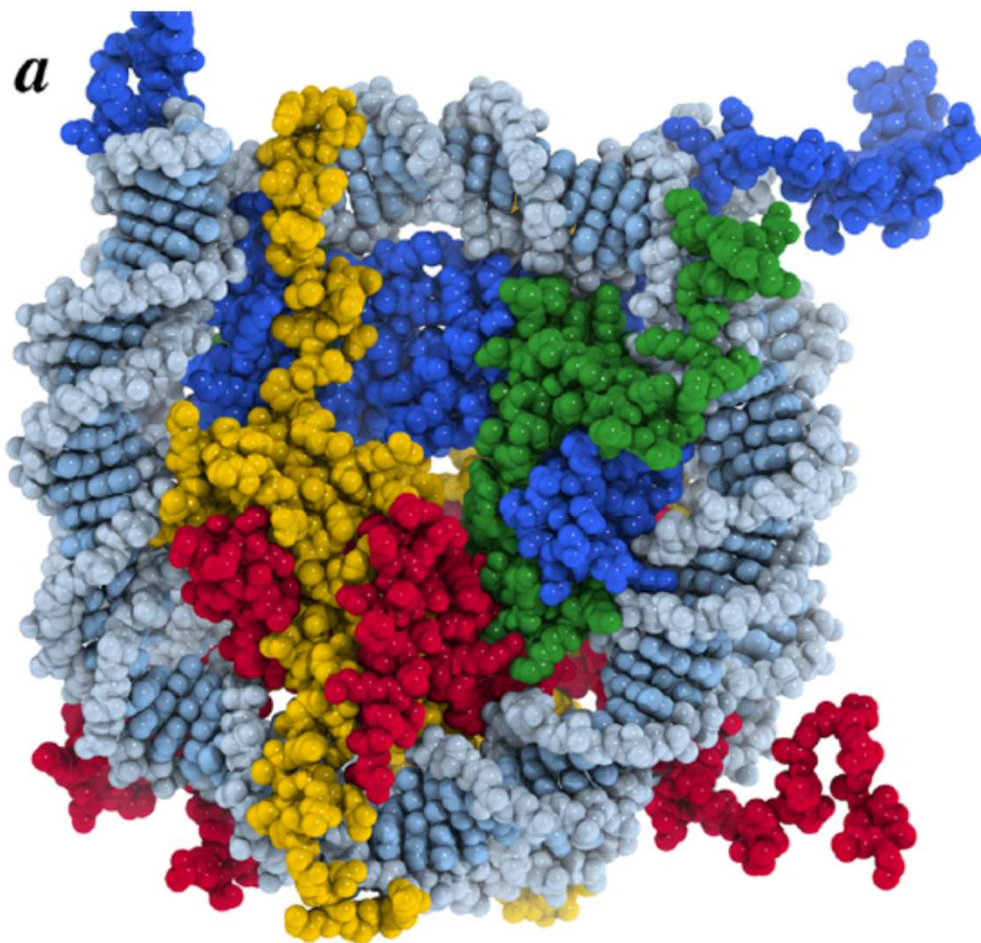


H4 lysiny K8, K16

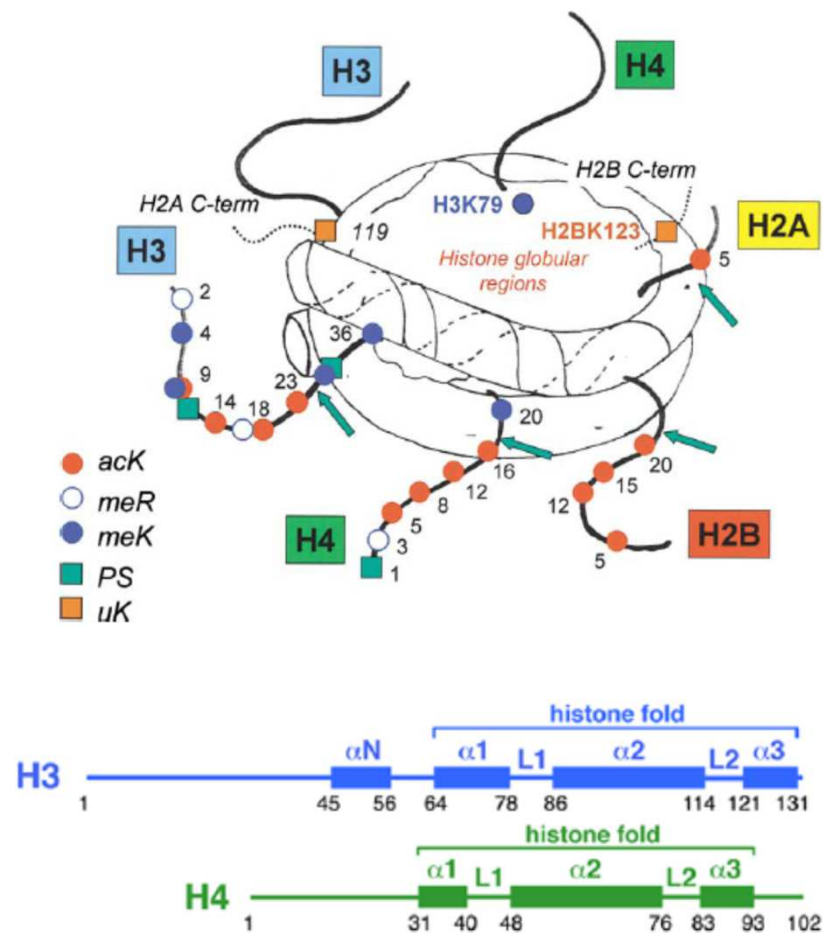
1KX5

# Konce histonů

- N- a C-konce histonů vybíhají z jádra nukleosomu a ovlivňují jeho vazbu
- modifikace (např. acetylace,) mohou oslabit/posílit interakce s DNA nukleosom – značky pro vazbu proteinů

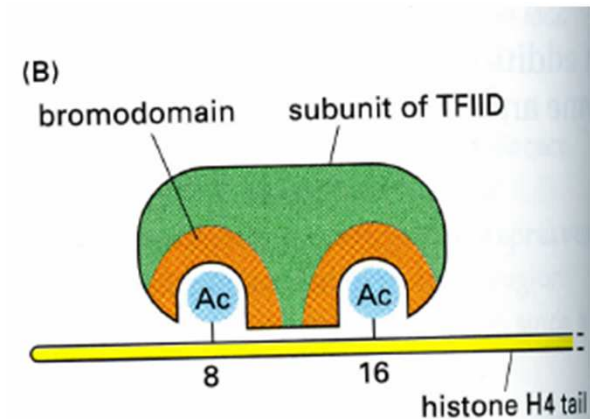
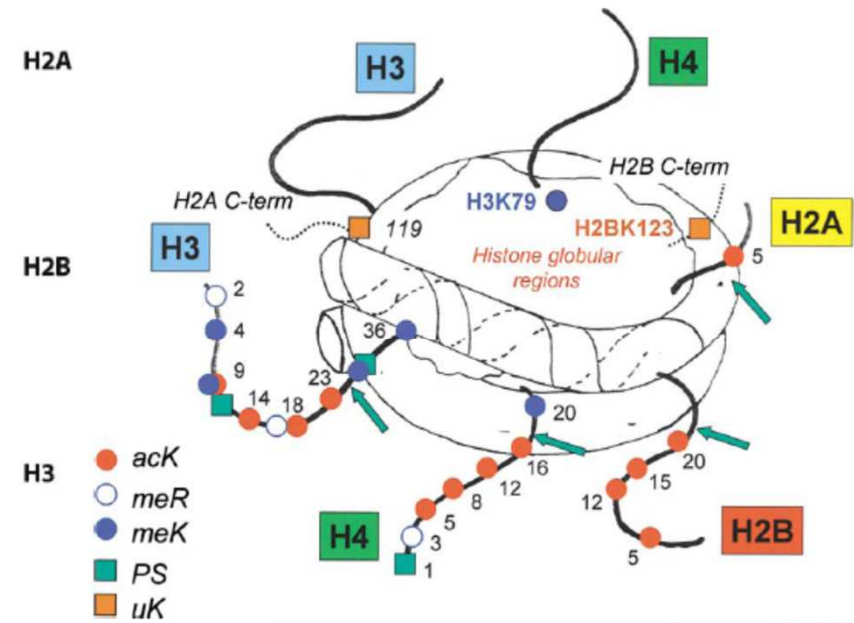
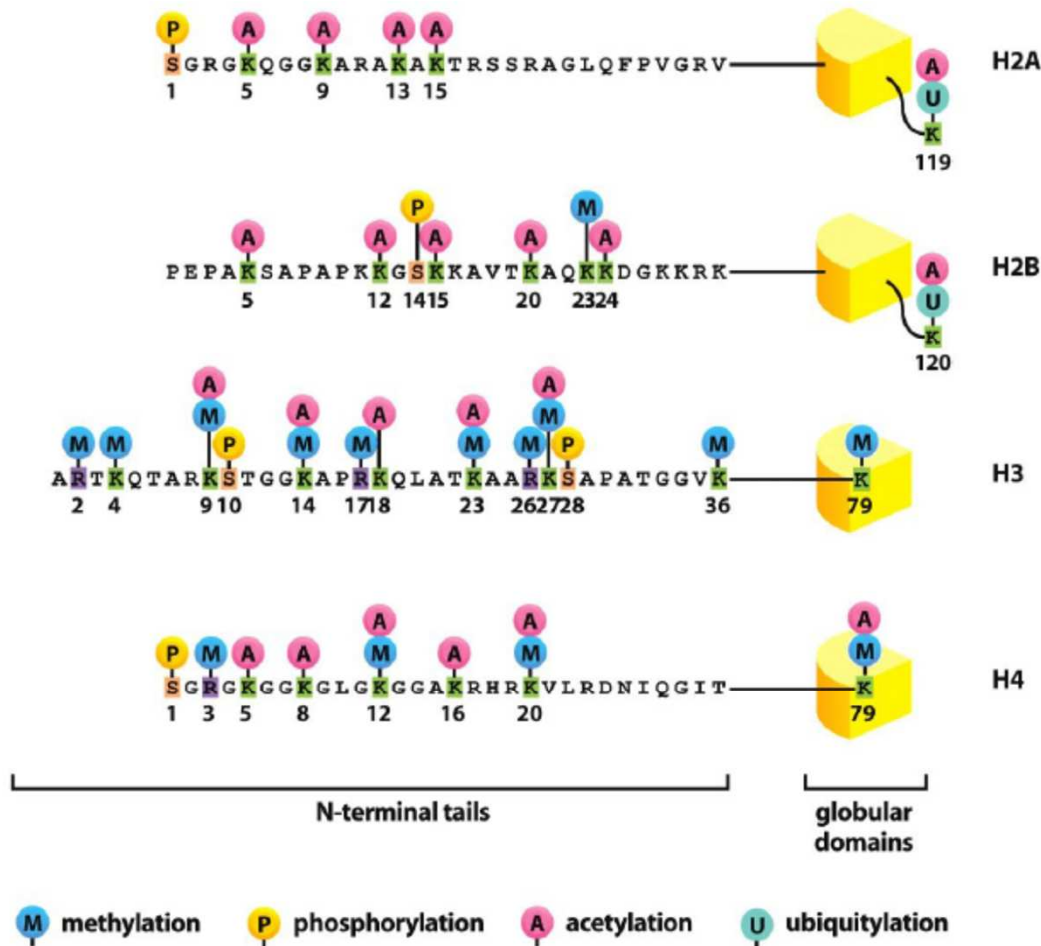


■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA

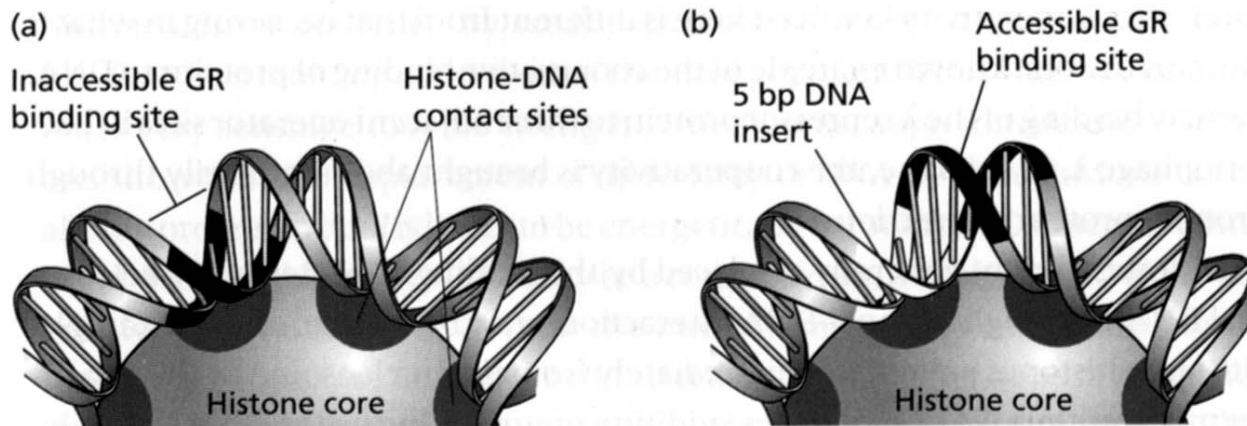


# Modifikace histonů

- 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**)

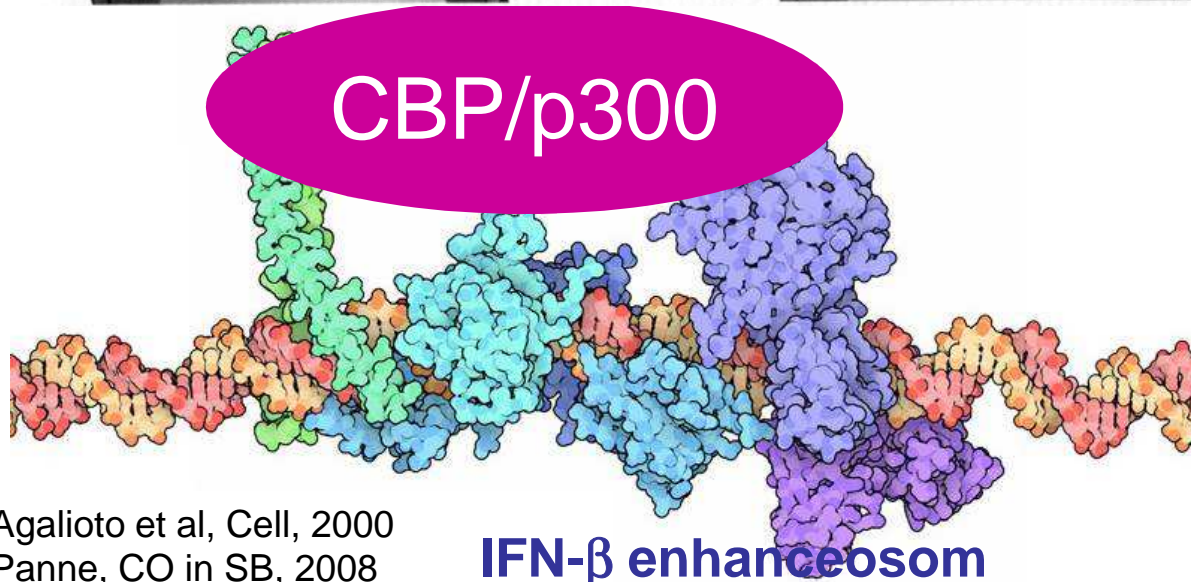


- AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- $\kappa$ B pokrývá sekvenci -102 až -47 bází upstream od TSS = tj. mezi nukleosomy (nukleosom-free oblast)
- nukleosom downstream zakrývá TATA-box
- všechny podjednotky (TA domény) enhanceosomu interagují s CBP/p300 acetylásou a acetylace nukleosomu vede k jeho remodelaci/přemístění a uvolnění TATA-boxu
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP/TFIID a RNA polymerasy II



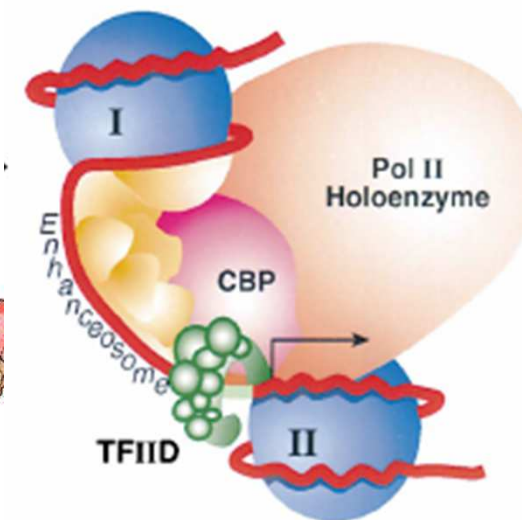
sekvence DNA může být zcela zakryta nukleosomem nebo může být přístupná nebo může být v oblasti mezi nukleosomy

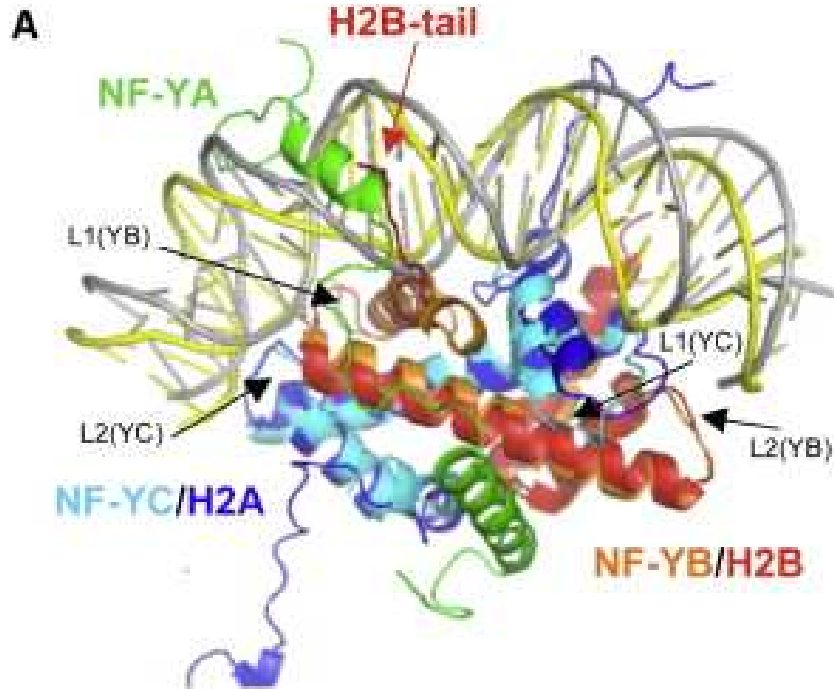
Přednáška o chromatinu



Agalioto et al, Cell, 2000  
Panne, CO in SB, 2008

IFN- $\beta$  enhanceosome

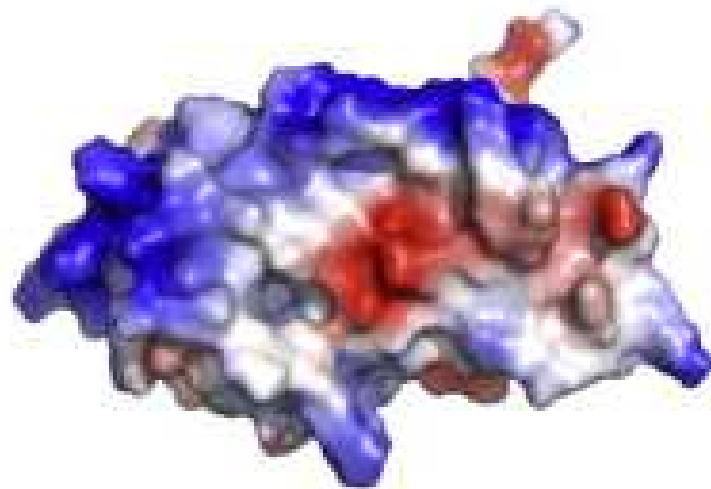




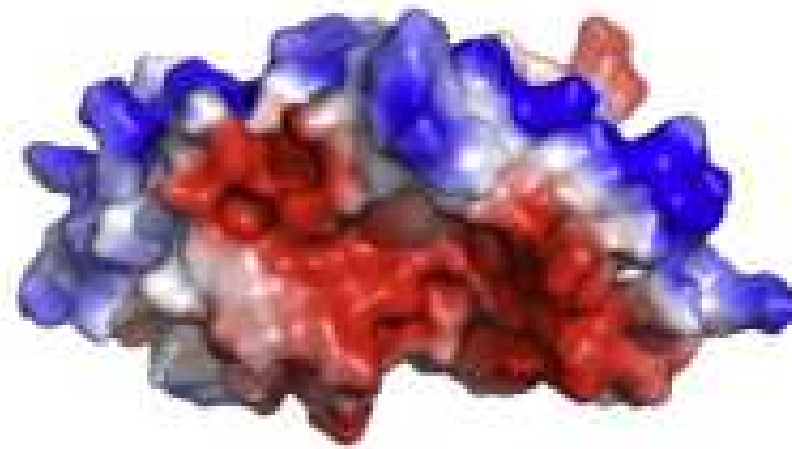
## Transkripční faktory NF-Y

(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  $\alpha$ -šroubovice (interkalace do MŽ)

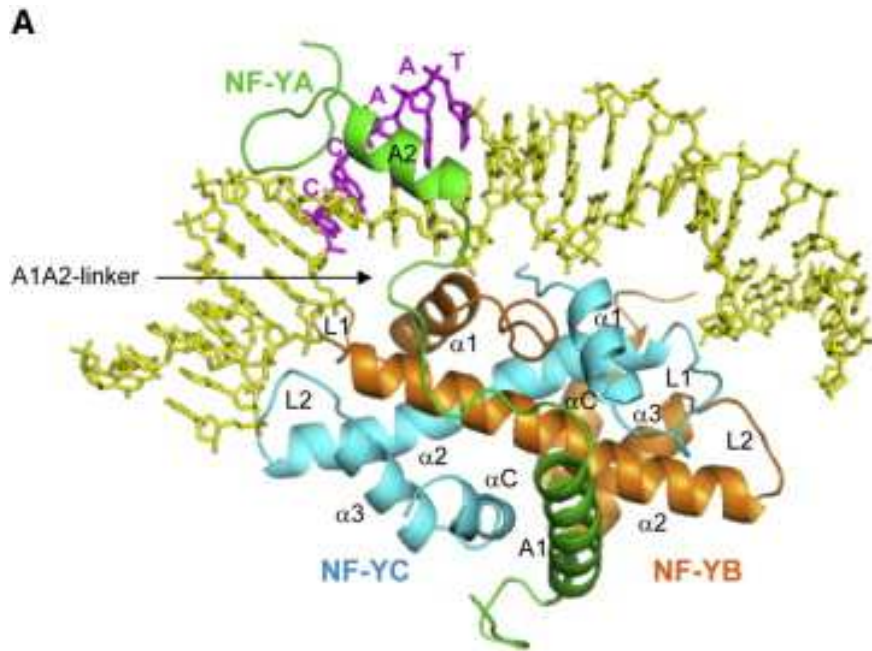


H2B/H2A

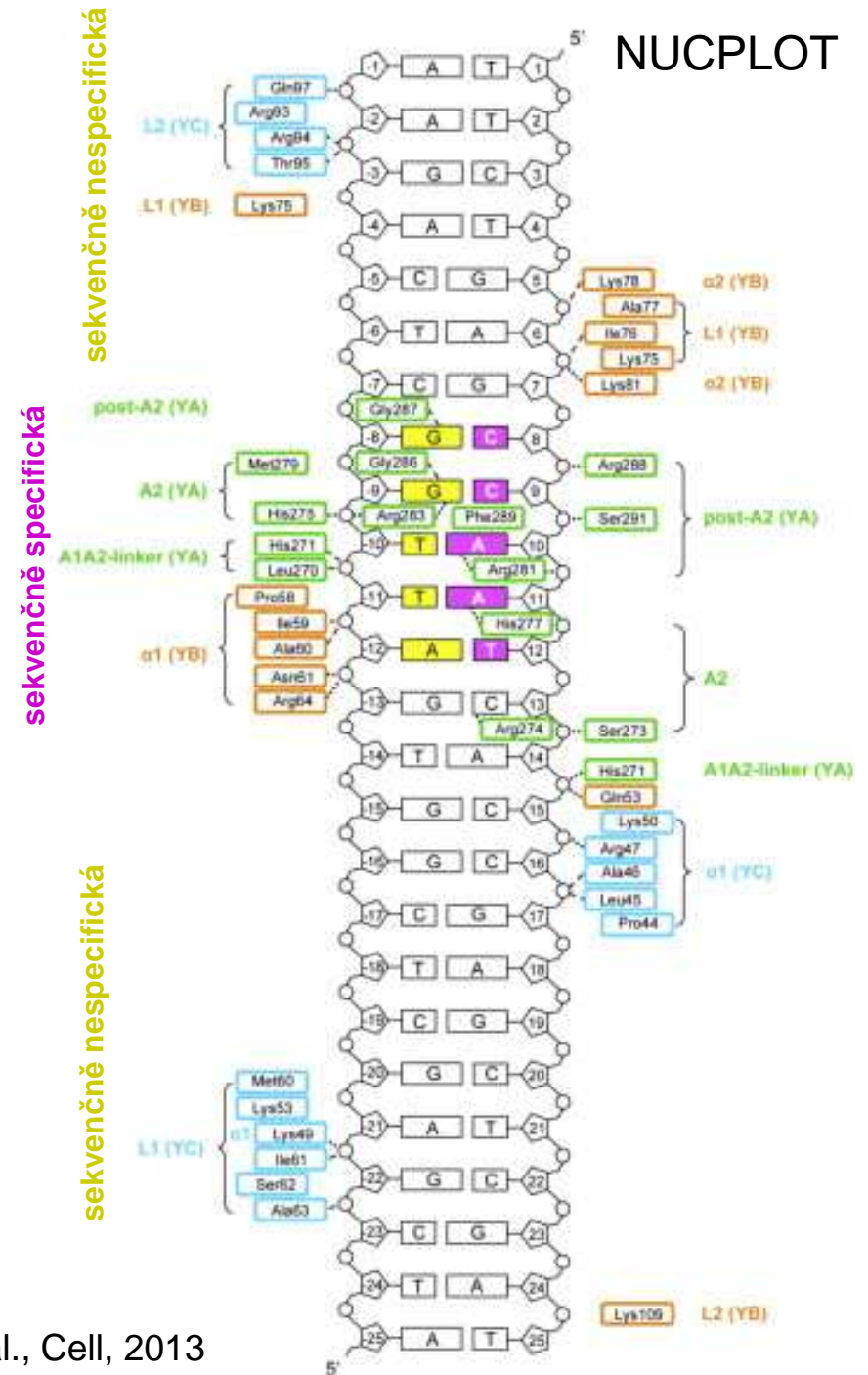
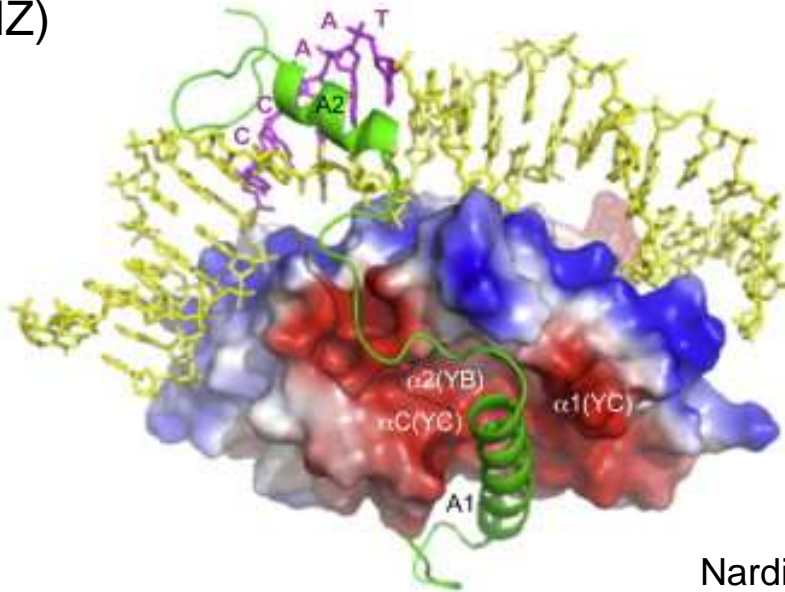


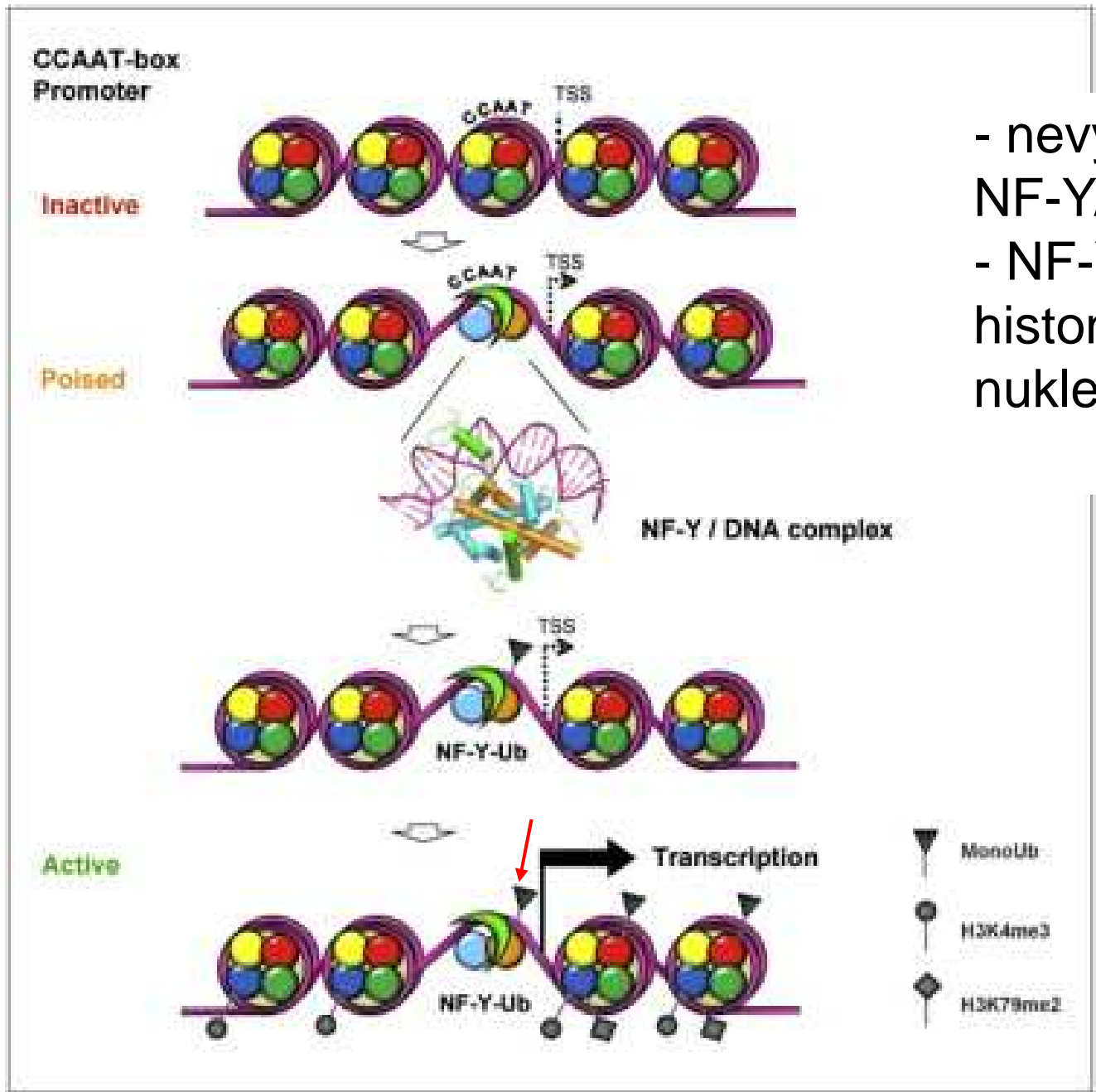
NF-YB/NF-YC





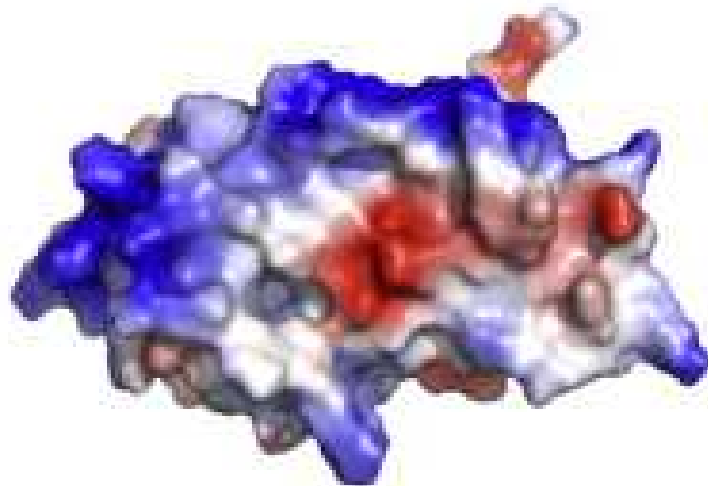
NF-YA podjednotka rozeznává CCAAT  
sekvenci pomocí  $\alpha$ -šroubovice (interkalace  
do MŽ)



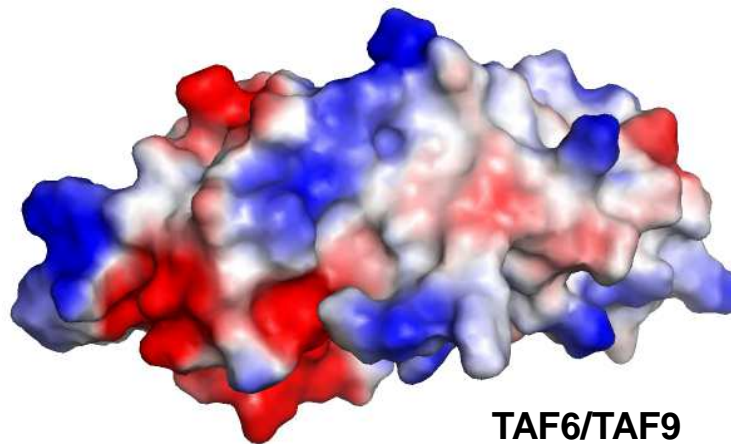


- nevytváří oktamer, ale NF-YA/YB/YC trimer
- NF-Y se váže přes histon-fold a nahrazuje nukleosom

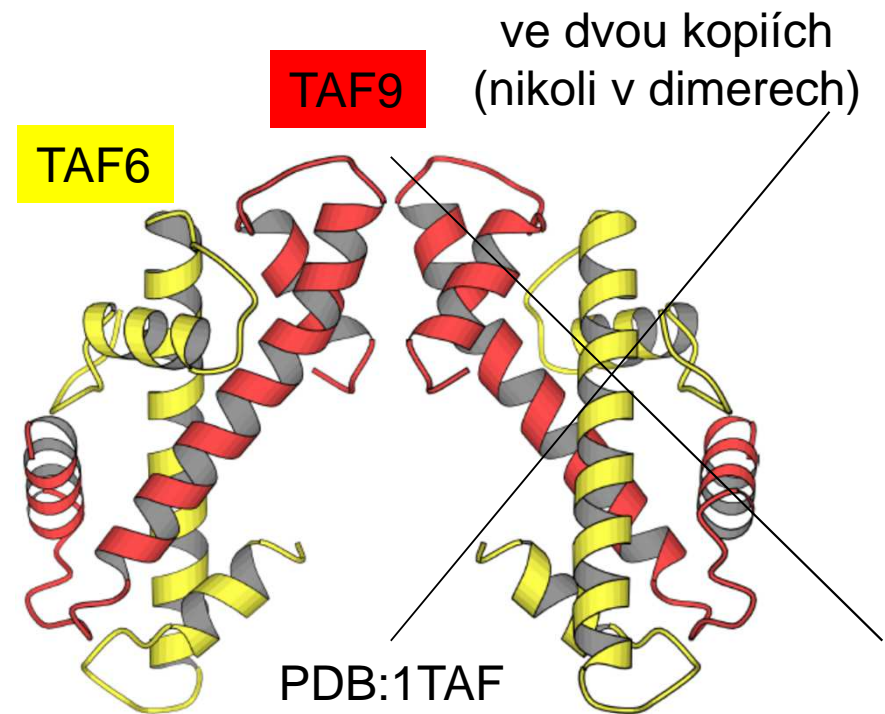
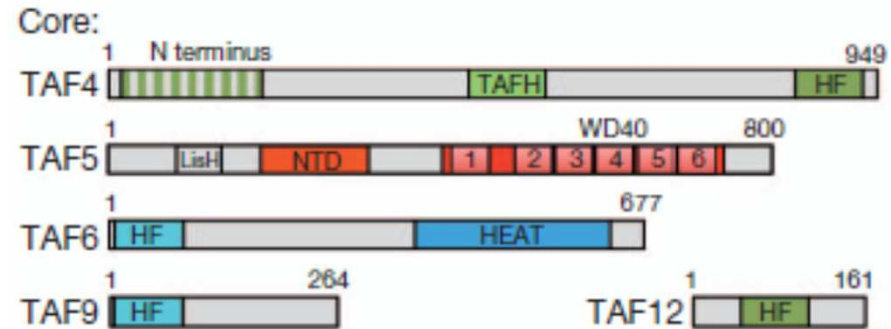
TBP-associated factors = TAF (podjednotky TFIID komplexu mají histon-fold (HF), ale nevytváří oktamery)



H2B/H2A



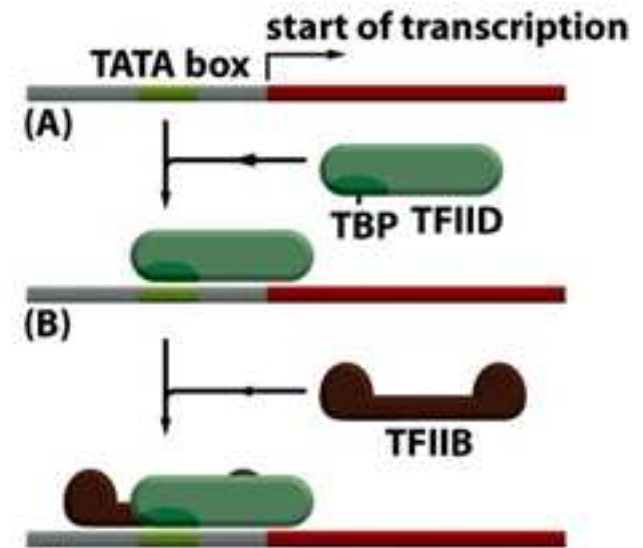
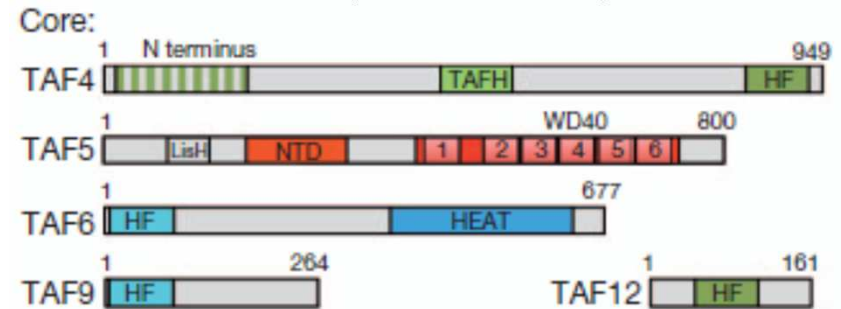
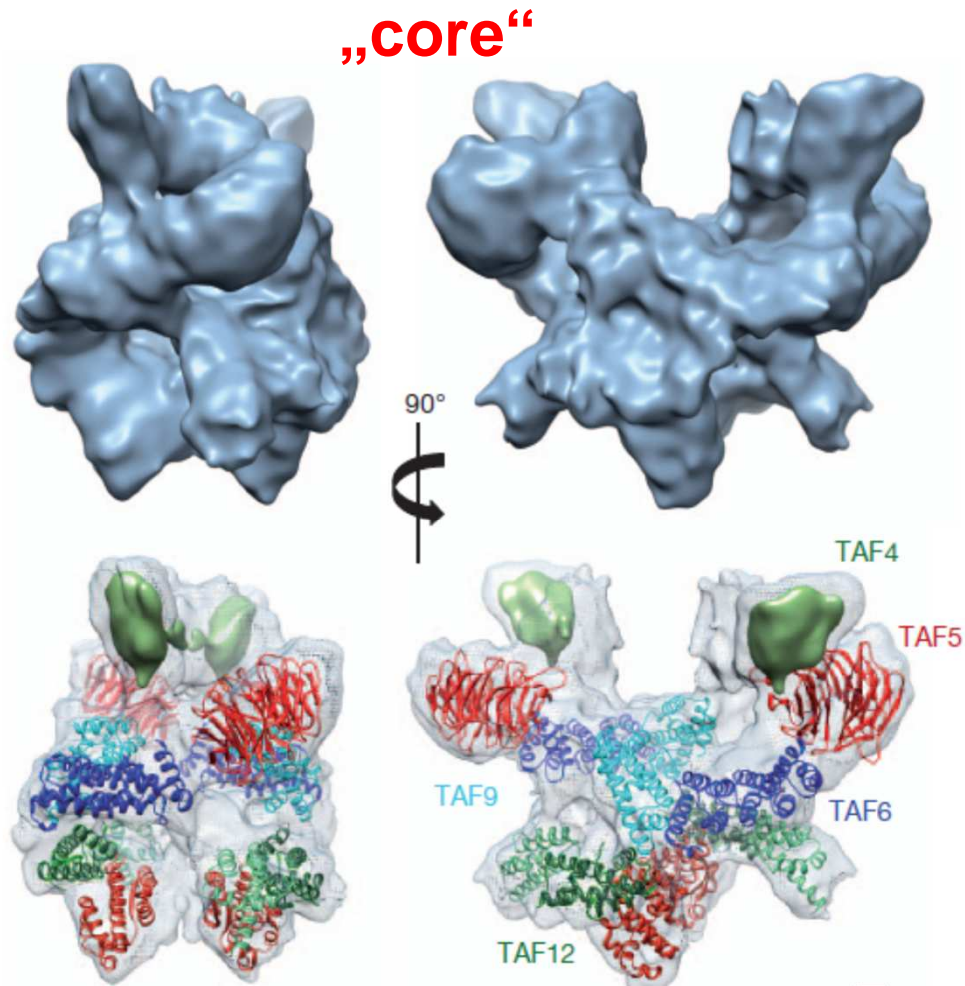
TAF6/TAF9



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

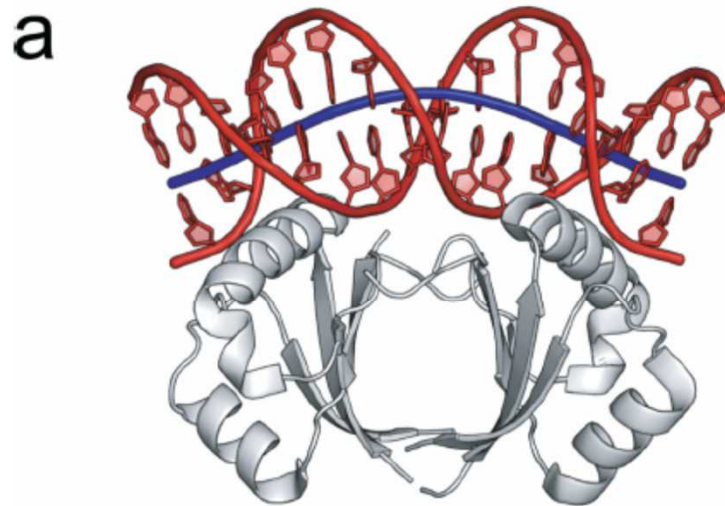
Shao et al, MCB, 2005

- 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



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

- **Zipper typ**
- **Helix-turn-helix**
- **Zinkový prst**
- **Histon, HMG-box**
- $\beta$ -barrel
- $\beta$ -hairpin/ribbon
- **Smíšené  $\alpha/\beta$**



histon

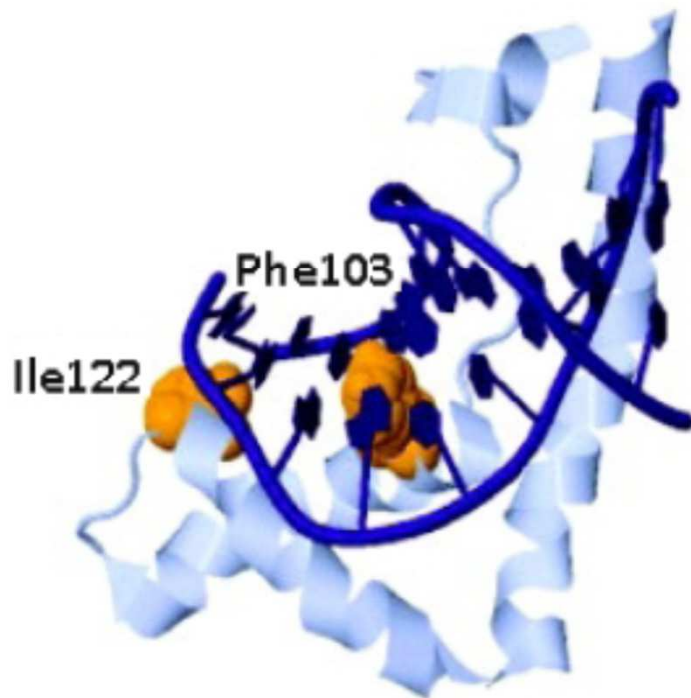
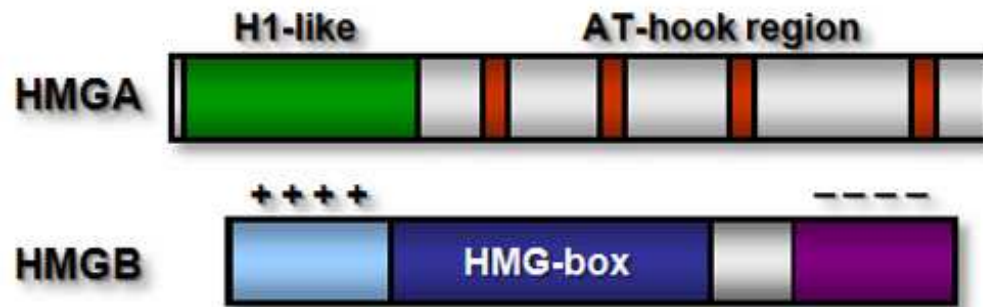
Bend



HMG

Kink

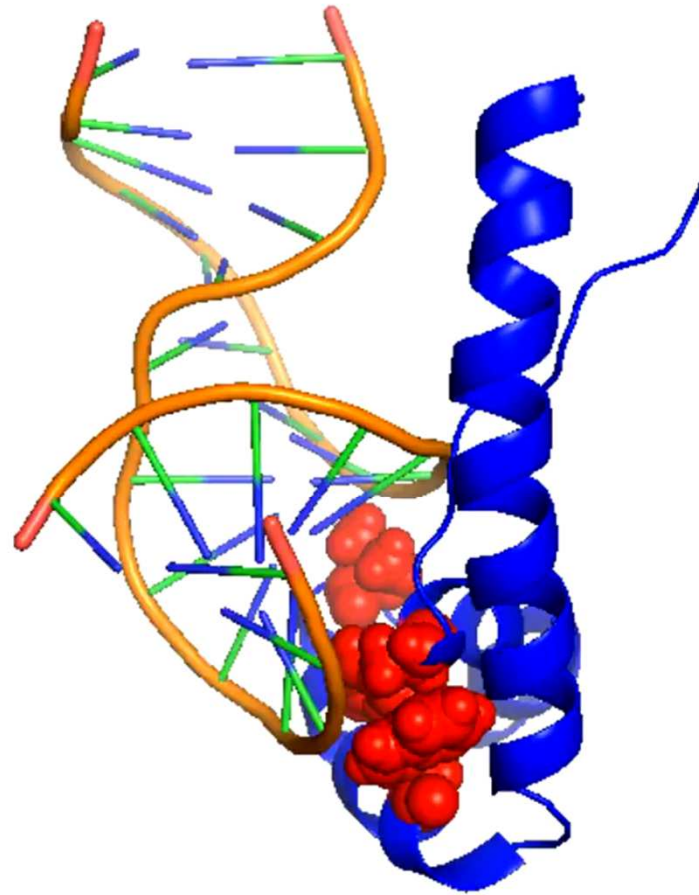
- **HMGB (HMG-box)** obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace aromatických AMK způsobuje ohnutí DNA



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

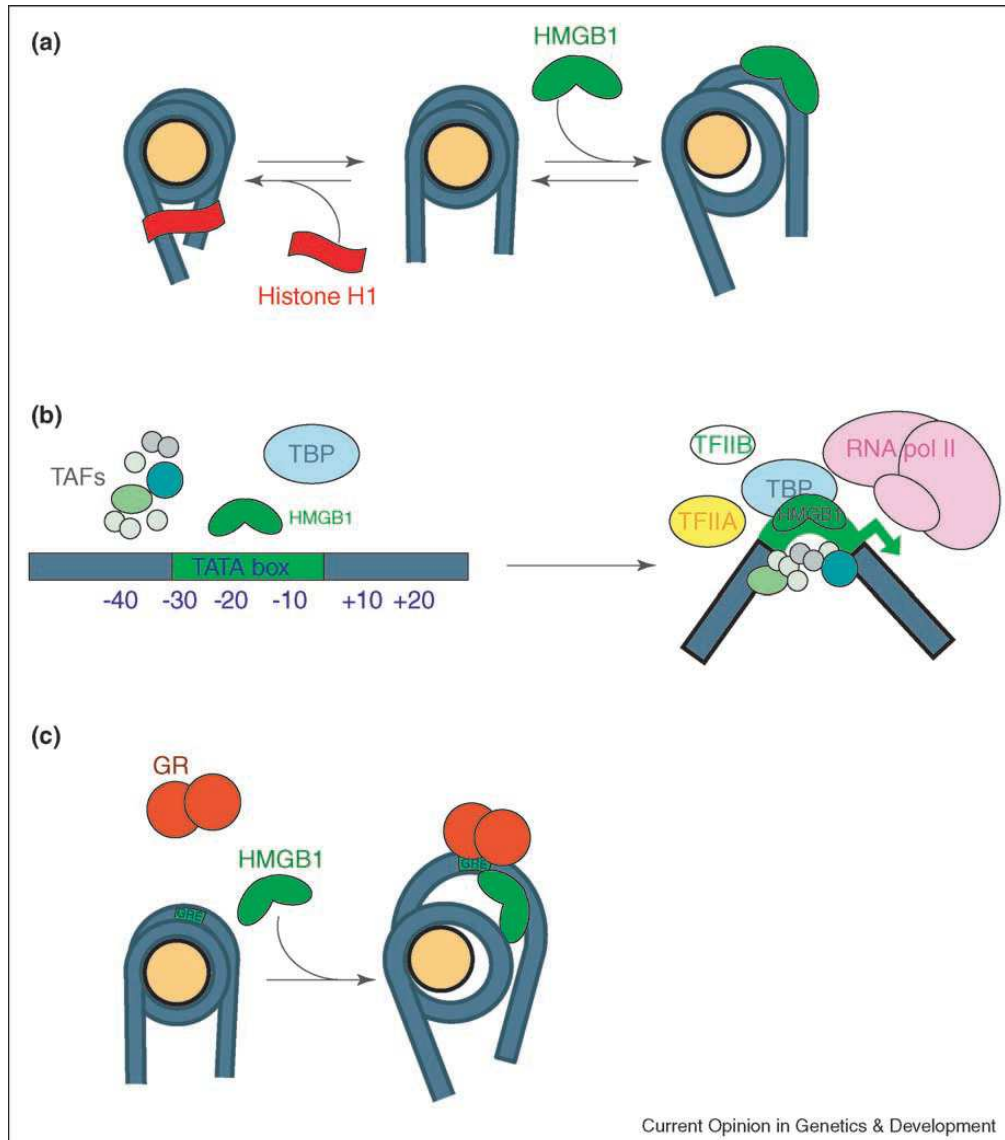
## HMG-D (1E7J)

---



Aromatické aminokyseliny se interkalují do MŽ a vytváří kink

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



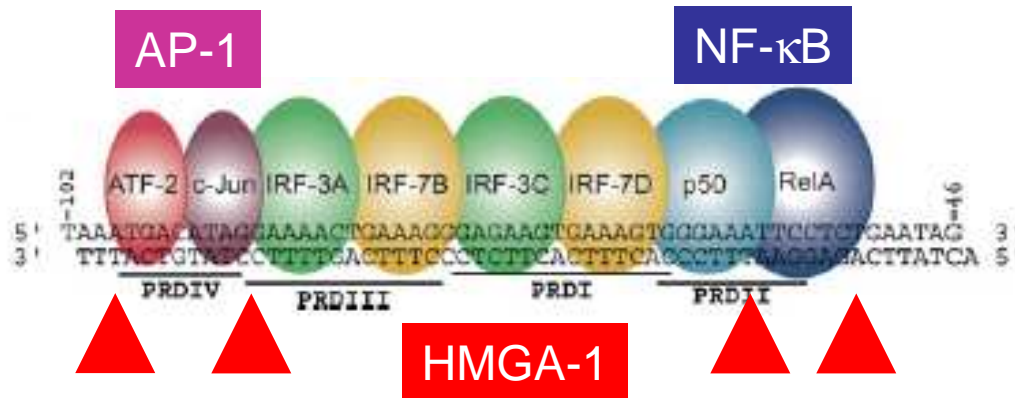
- ohyb napomáhá rozvolnění struktury chromatinu tj. moduluje pozici nukleosomů

- ohyb může pomáhat TBP a iniciaci transkripce

- pomáhá zpřístupnit DNA pro transkripční regulátory

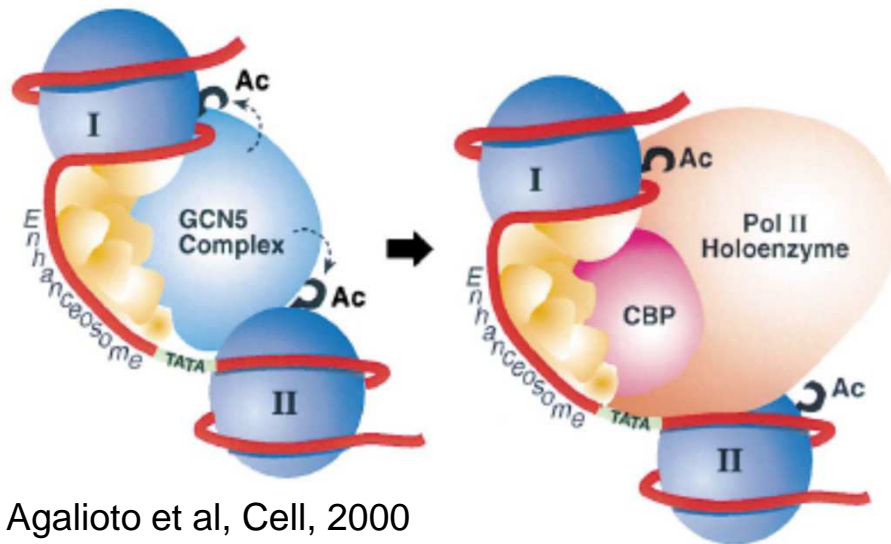


# IFN- $\beta$ enhanceosom

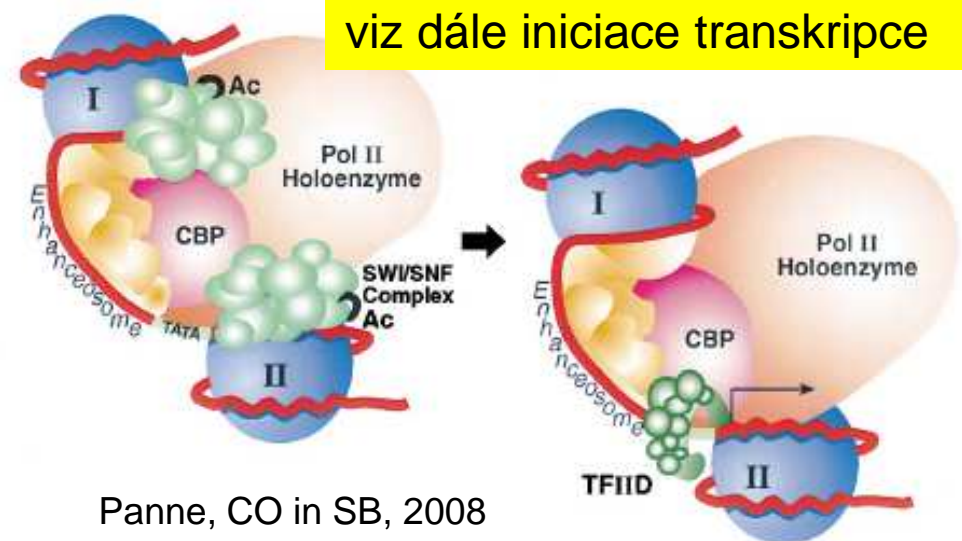


→  
transkripce

- HMGA1a se váže na 4 místa a (ohýbá DNA) napomáhá sestavení enhanceosomu
- není ale součástí finálního komplexu - AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- $\kappa$ B, který se váže na nukleosom-free oblast
- všechny podjednotky (TA domény) 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



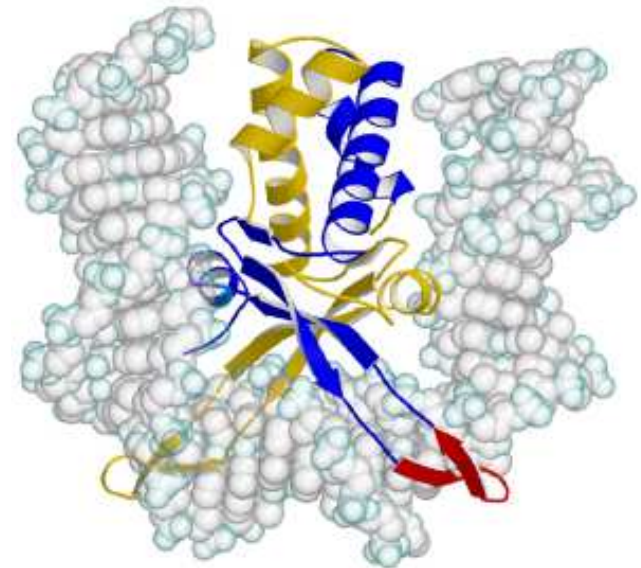
Panne, CO in SB, 2008

viz dále iniciace transkripce

# 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**
- **$\beta$ -hairpin/ribbon**
- **$\beta$ -barrel**
- **Enzymy**

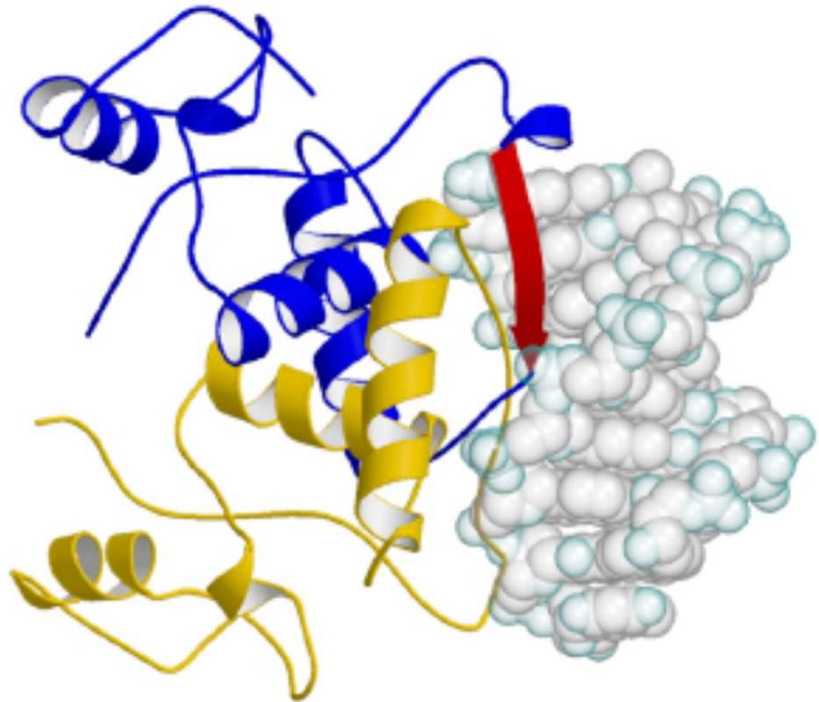
$\alpha$ -šroubovice



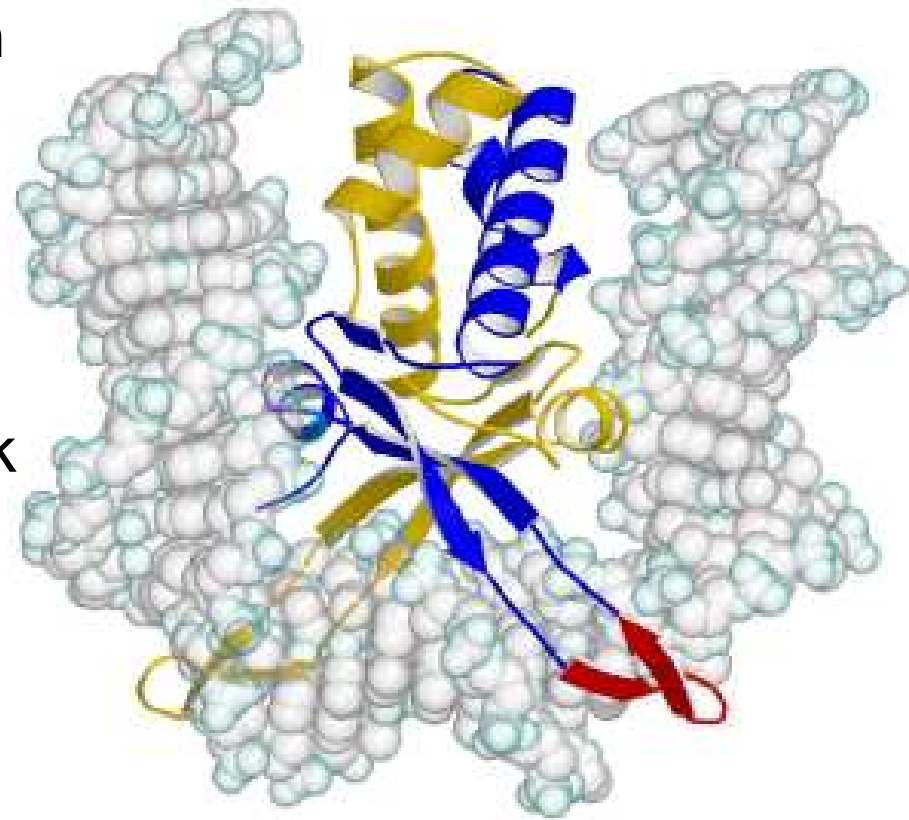
33. Integration host factor (1ihf)

$\beta$ -listy

- pouze 2-3  $\beta$ -listy nebo hairpin (vlásenka)
- represory, chromosomální proteiny (lešení pro strukturu DNA)
- vážou velký nebo malý žlábek



31. Met repressor (1cma)



33. Integration host factor (1ihf)

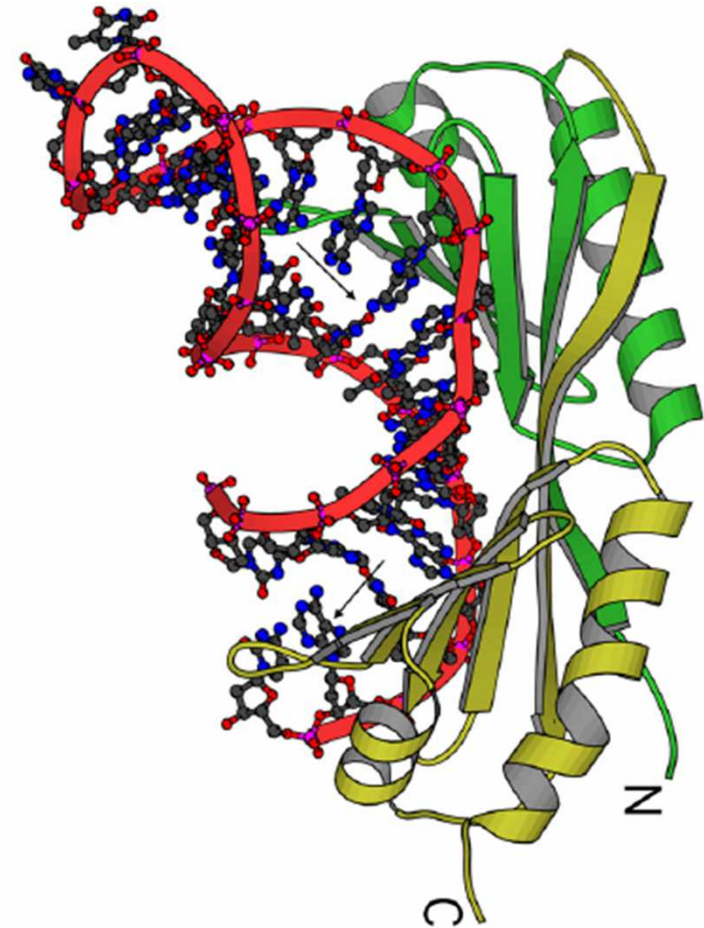
- $\beta$ -hairpins lokalizovány podél malého žlábků
- Inzerce Pro mezi baze a ohyb DNA

# 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**
- **$\beta$ -hairpin/ribbon**
- **$\beta$ -barrel**

$\alpha$ -šroubovice

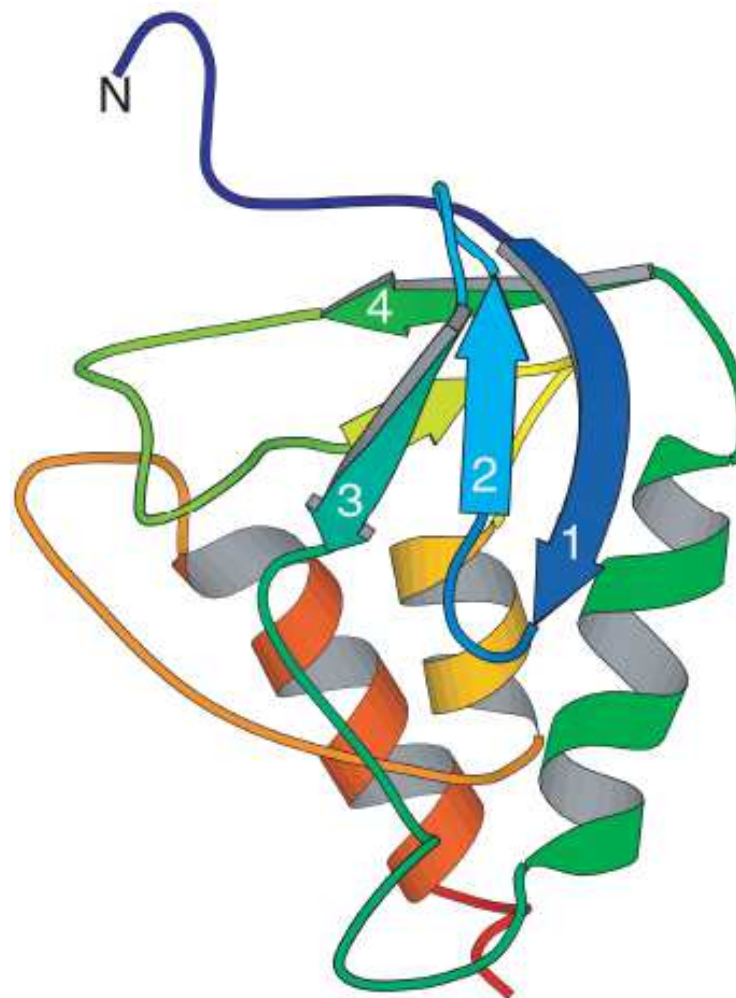
$\beta$ -listy



# OB-fold

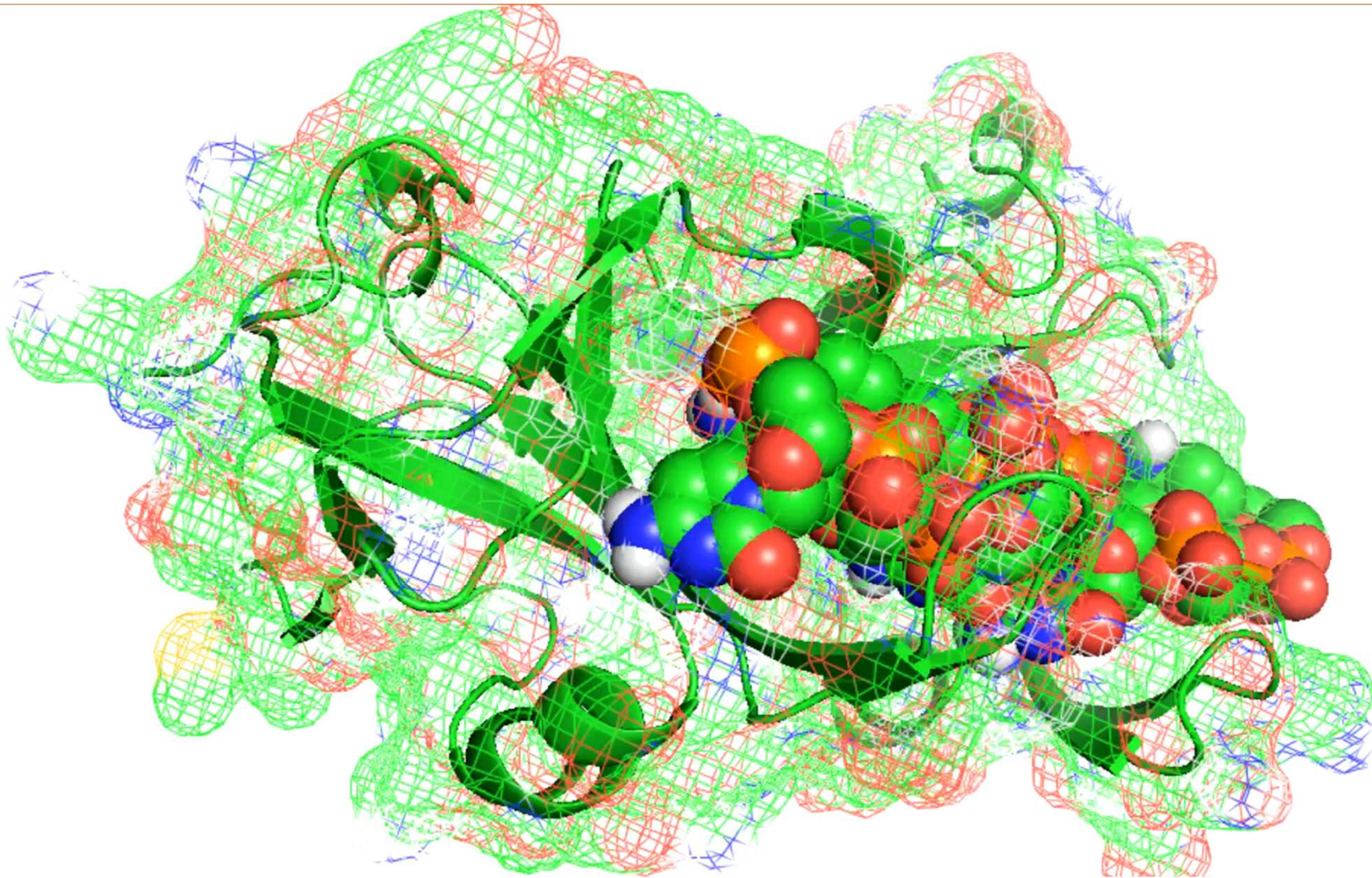
(oligonucleotide/oligosaccharide binding)

- 4-5 anti-paralelních  $\beta$ -listů ( $\beta$ -barel) zakončeno  $\alpha$ -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)

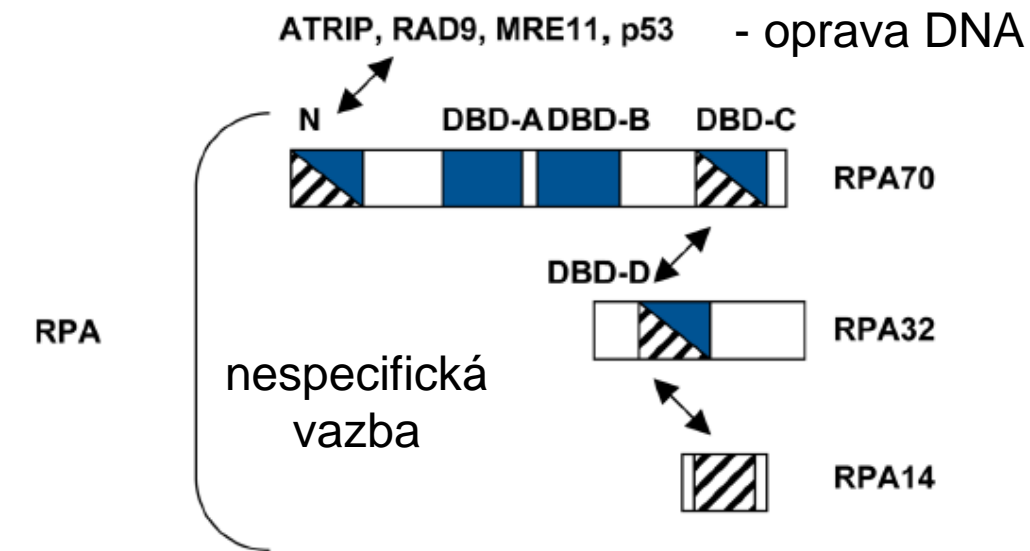


# OB-fold (oligonucleotide/oligosachcaride binding, 1JMC)

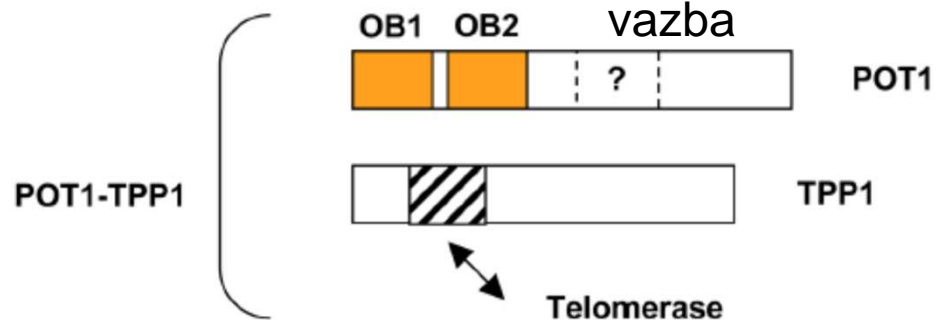
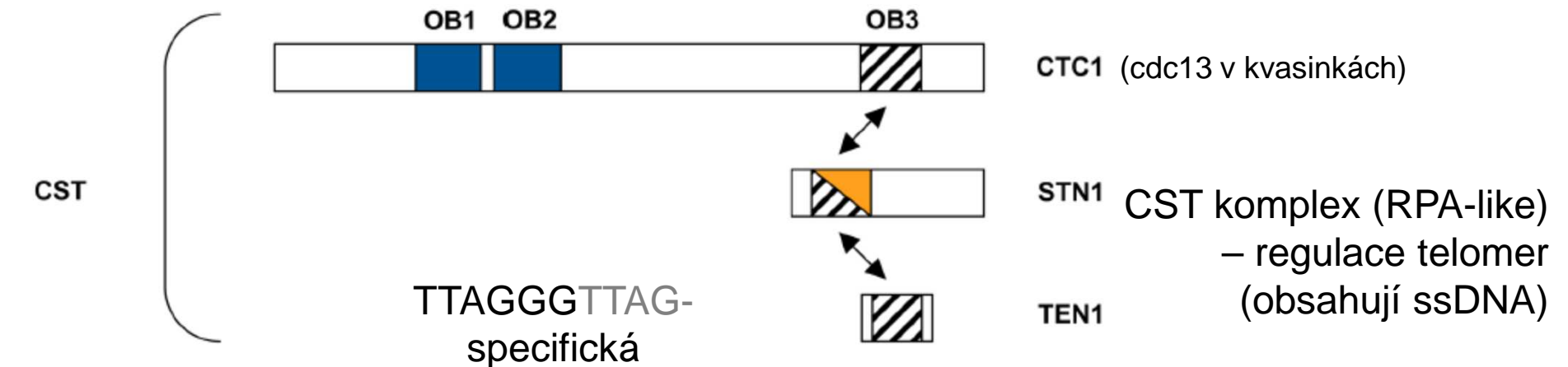
---



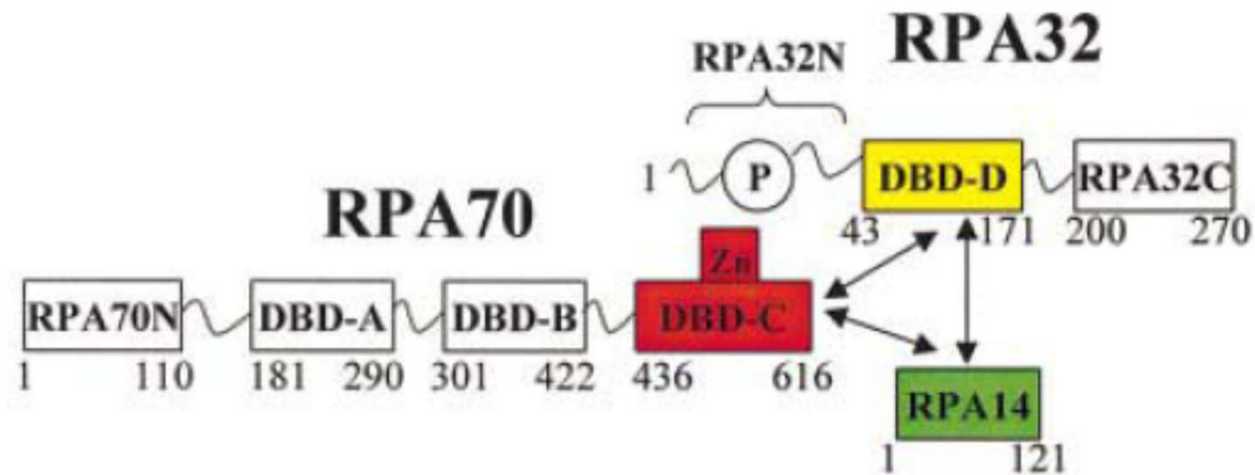
Více OB – RPA70 (A+B) vytváří prodlouženou lineární kapsu



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

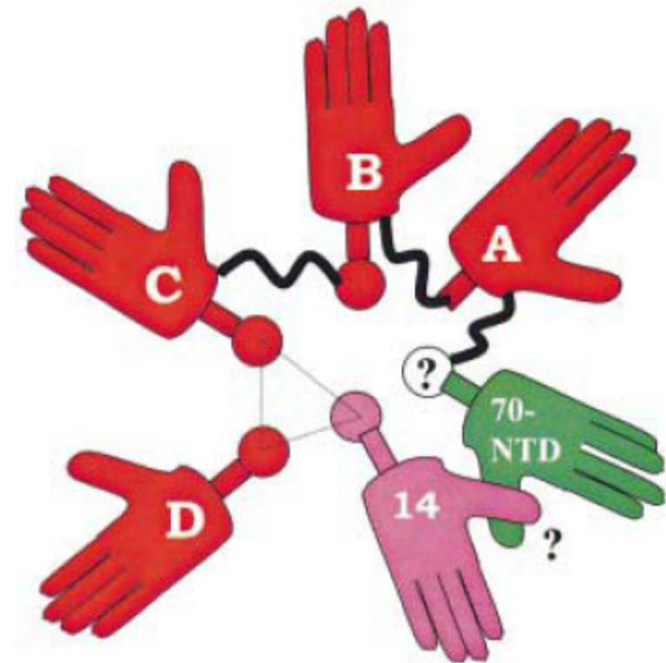
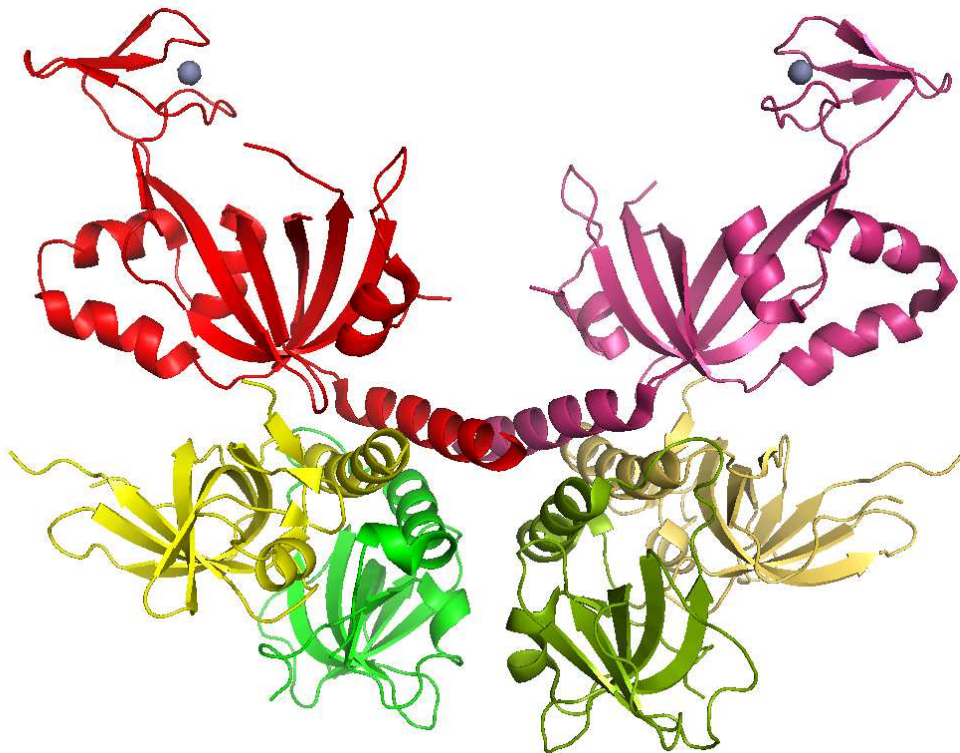


- část komplexu SHELTERIN  
- chrání telomery (aby nebyly považovány za DSB, reguluje přístup telomerázy)



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

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

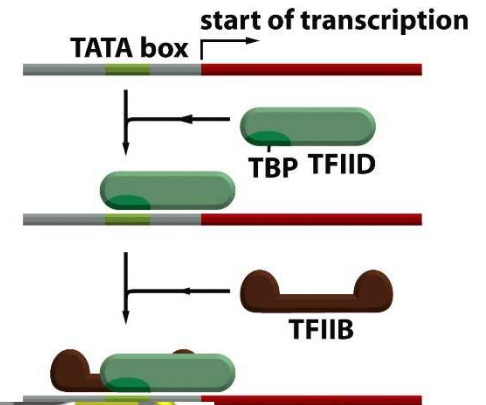


Bochkareva et al, EMBO J, 2002  
 Flynn a Zou, CR in BMB, 2010

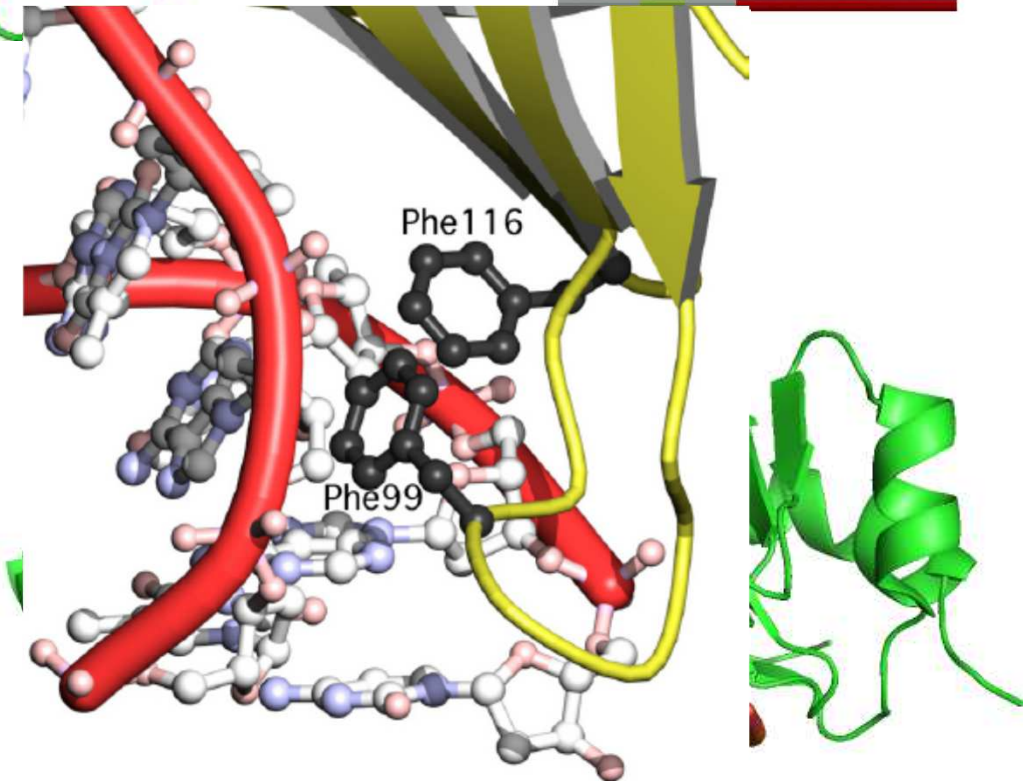


1YTB

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



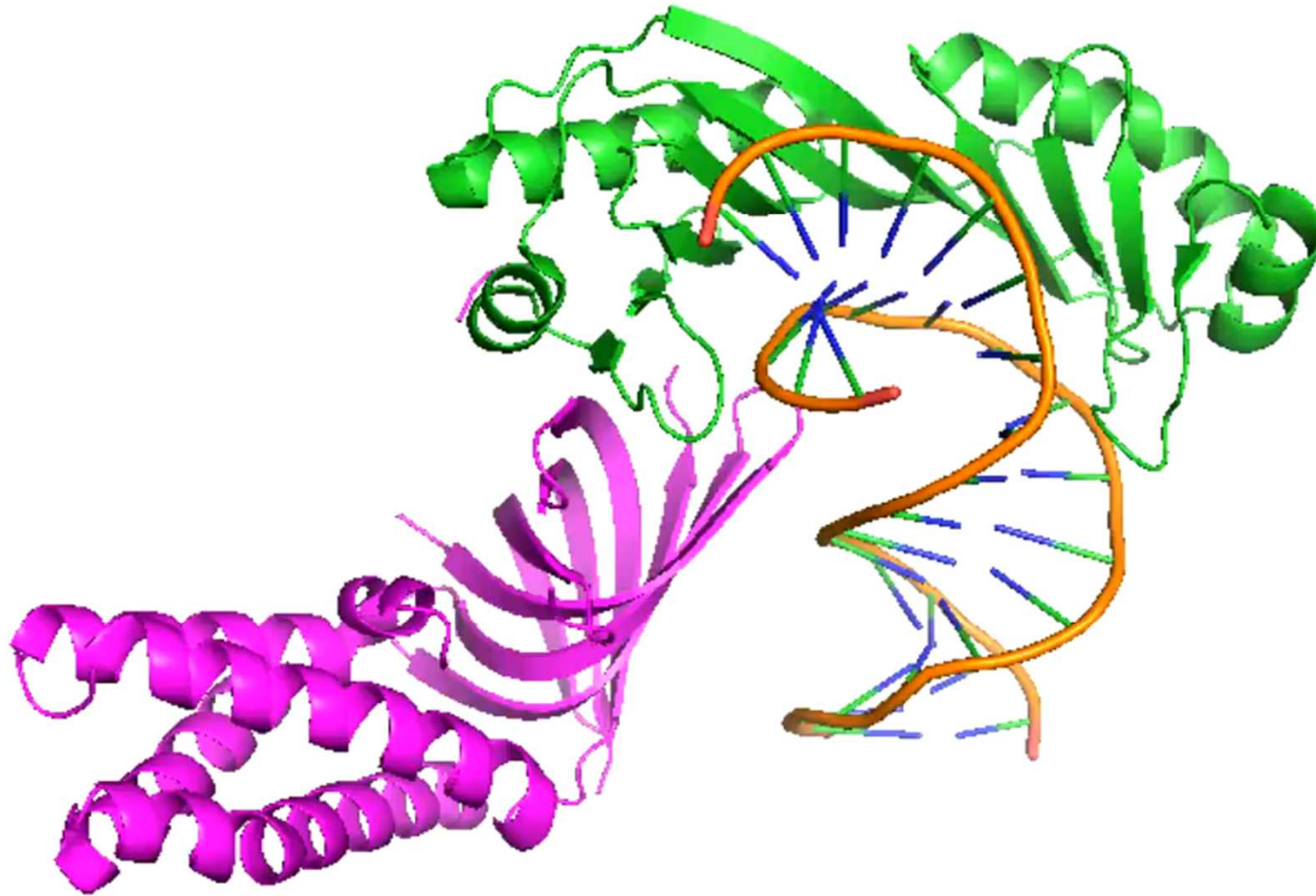
- 10 anti-paralelních  $\beta$ -listů pokrývá MŽ
- Interkalují se postranní řetězce **Phe** (hydrofobní v.)
- vytváří **ohyb (kink) a rozplétá dsDNA**
- Konsensní sekvence: TATA(A/T)A(A/T)(A/G)



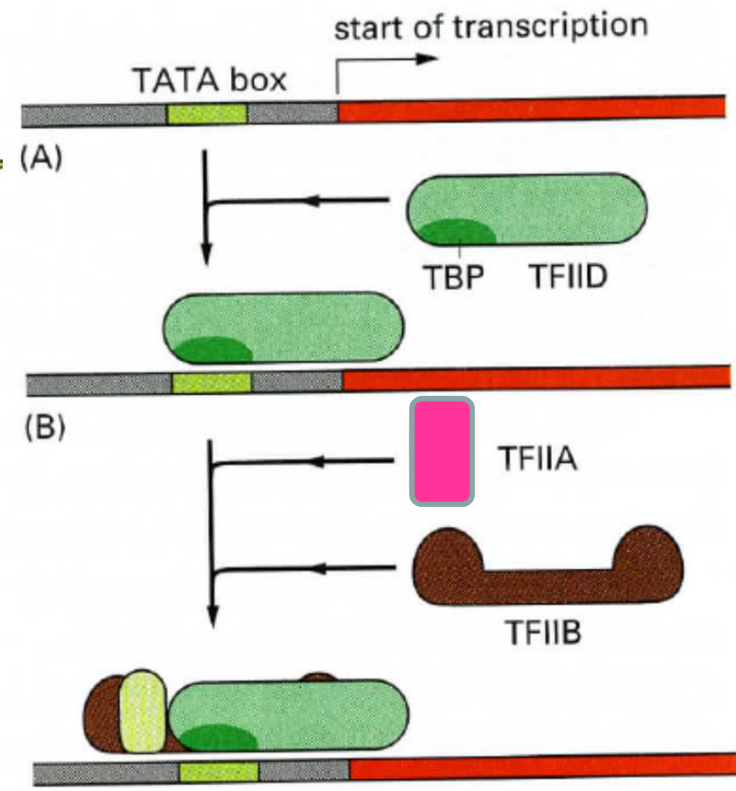
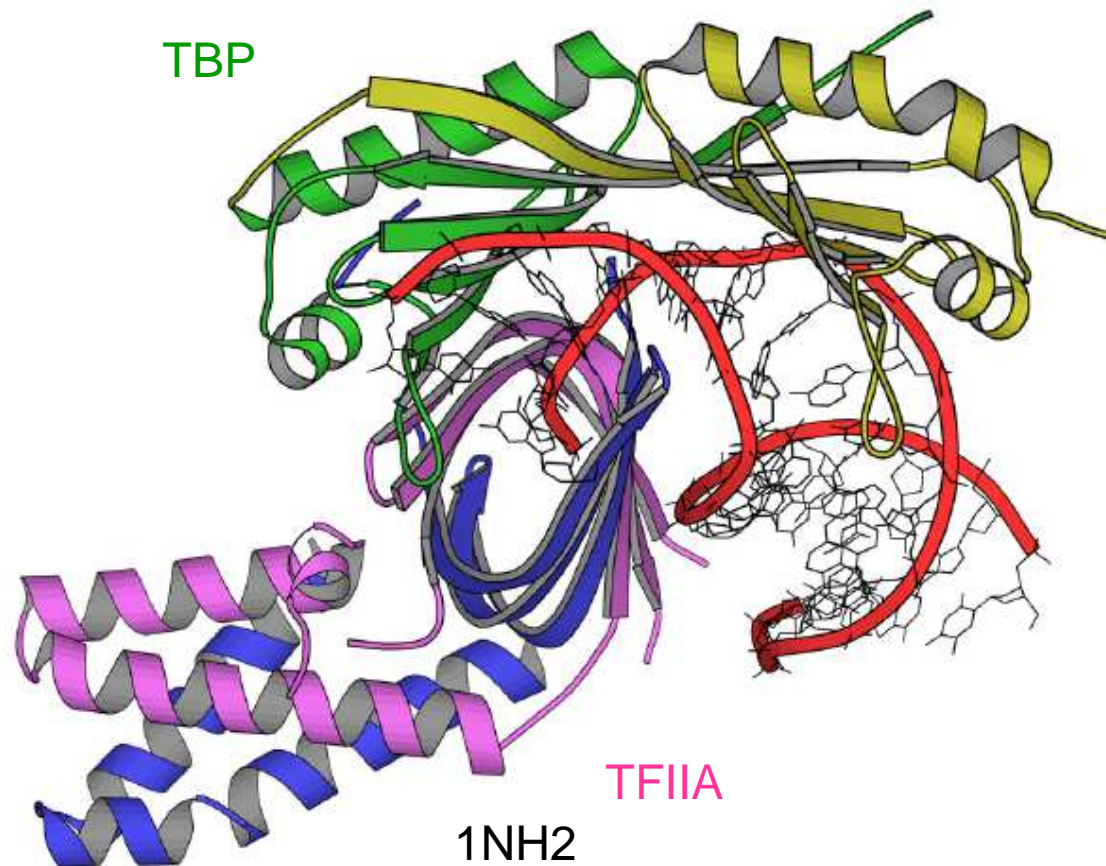
# TBP a TFIIA ( $\beta$ -barrel – neovlivní DNA strukturu)

---

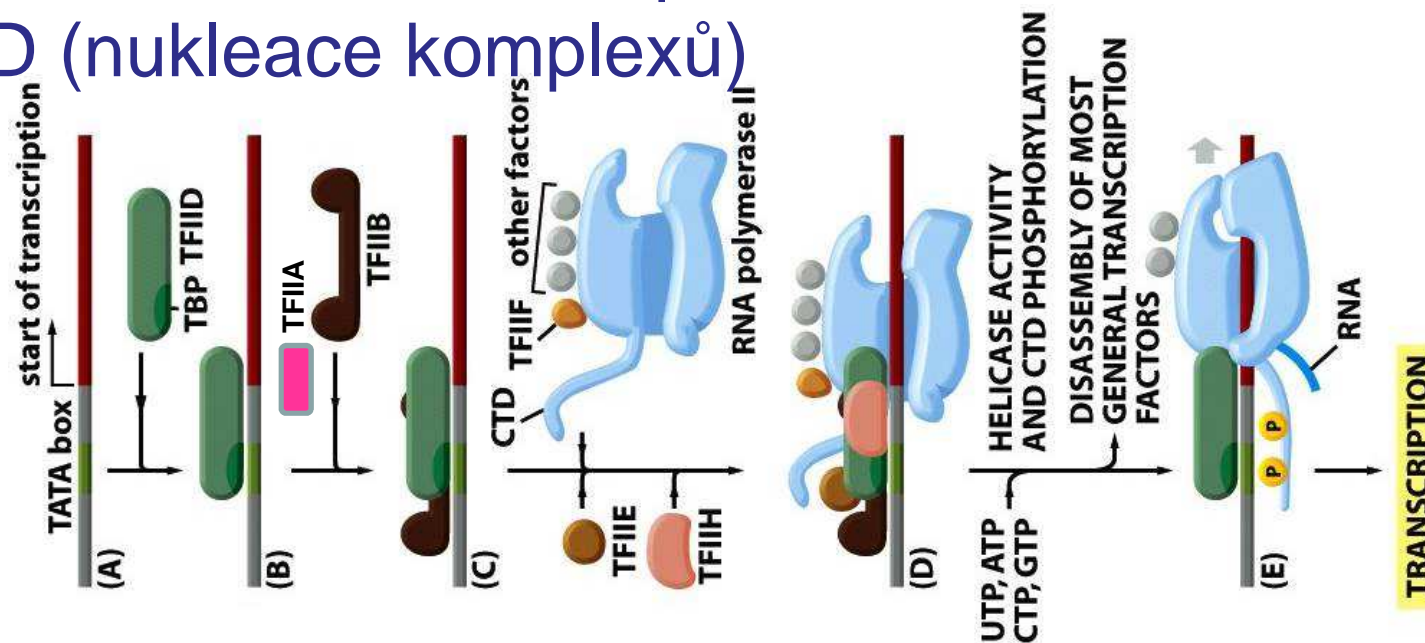
1NH2



- TFIIA (2 podjednotky) komplex interaguje s TBP a DNA a zajišťuje jeho správnou pozici
- brání represorům v inhibici vazby TBP na TATA-box (koaktivátor některých sekvenčně specifických trans. faktorů)
- $\beta$ -barrel váže DNA (neovlivňuje strukturu)



# Začátek/iniciace transkripce – TFIID (nukleace komplexů)



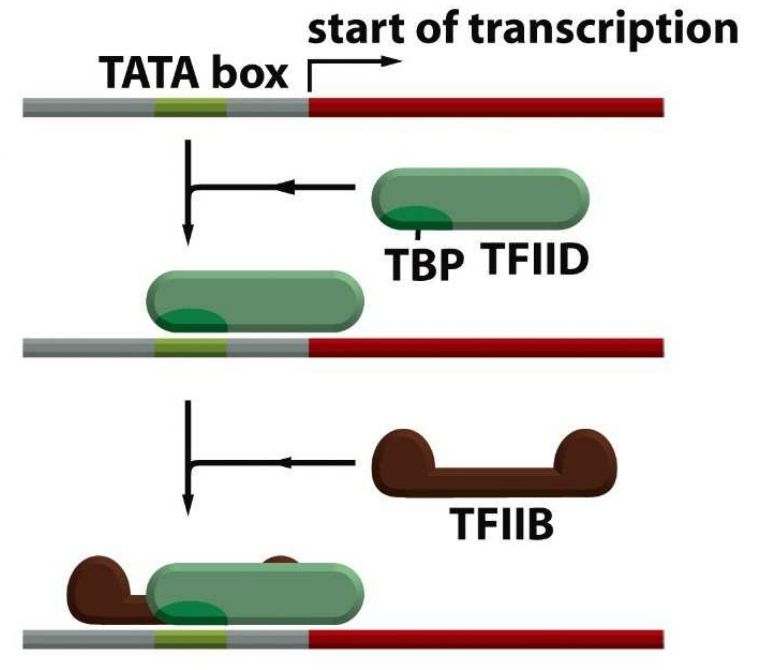
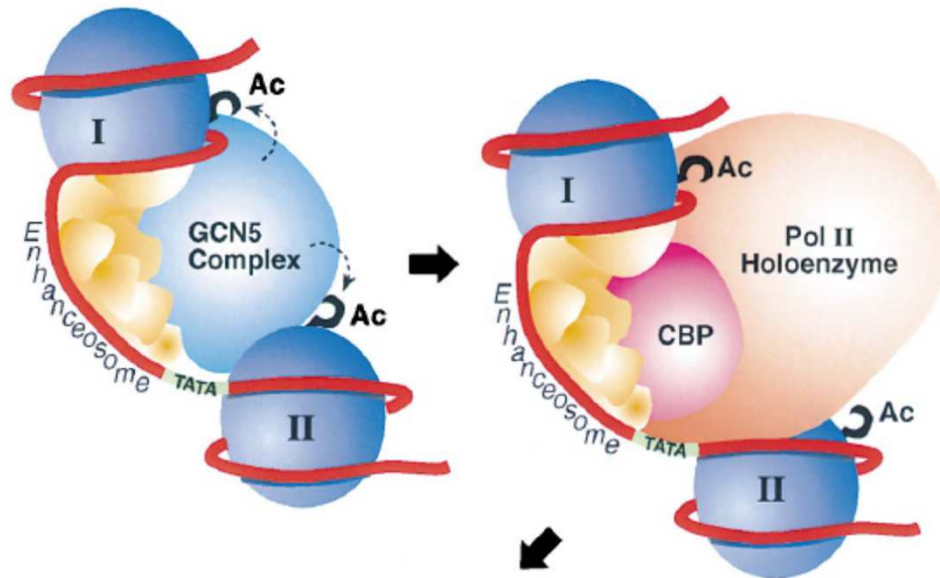
**Table 6-3 The General Transcription Factors Needed for Transcription Initiation by Eucaryotic RNA Polymerase II**

NAME	NUMBER OF SUBUNITS	ROLES IN TRANSITION INITIATION
<b>TFIID</b>		
TBP subunit	1	recognizes TATA box
TAF subunits	13	recognizes other DNA sequences near the transcription start point; regulates DNA-binding by TBP
<b>TFIIB</b>	1	recognizes BRE element in promoters; accurately positions RNA polymerase at the start site of transcription
<b>TFIIF</b>	3	stabilizes RNA polymerase interaction with TBP and TFIIB; helps attract TFIIE and TFIIH
<b>TFIIE</b>	2	attracts and regulates TFIIH
<b>TFIIH</b>	9	unwinds DNA at the transcription start point, phosphorylates Ser5 of the RNA polymerase CTD; releases RNA polymerase from the promoter

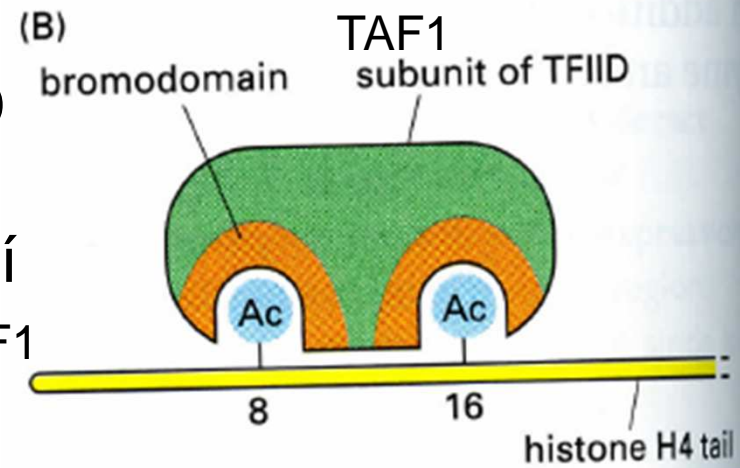
TFIID is composed of TBP and ~11 additional subunits called TAFs (TBP-associated factors); CTD, C-terminal domain.

Plus TFIIA

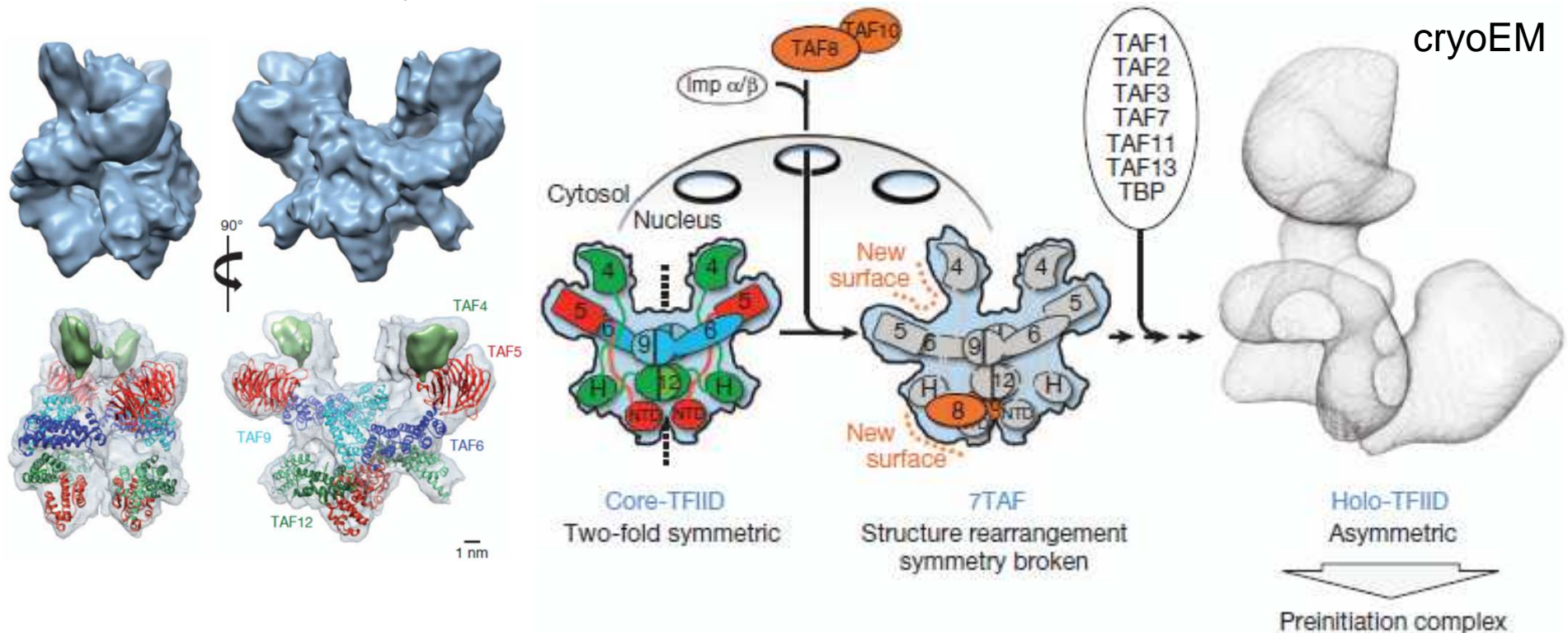
- TFIID (SAGA) komplex s TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému (nukleace PIC)



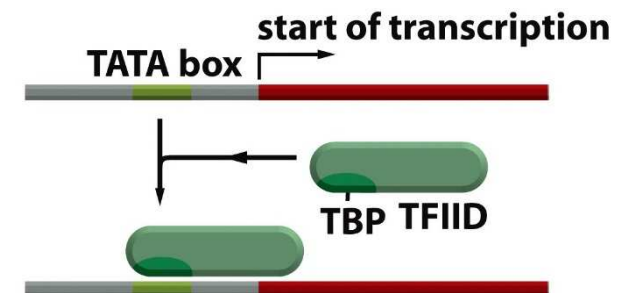
- po připojení všech podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční holokomplex – TAFs vážou transkripční faktory, epigenetické značky ... např. TAF1 se váže na Ac-H4



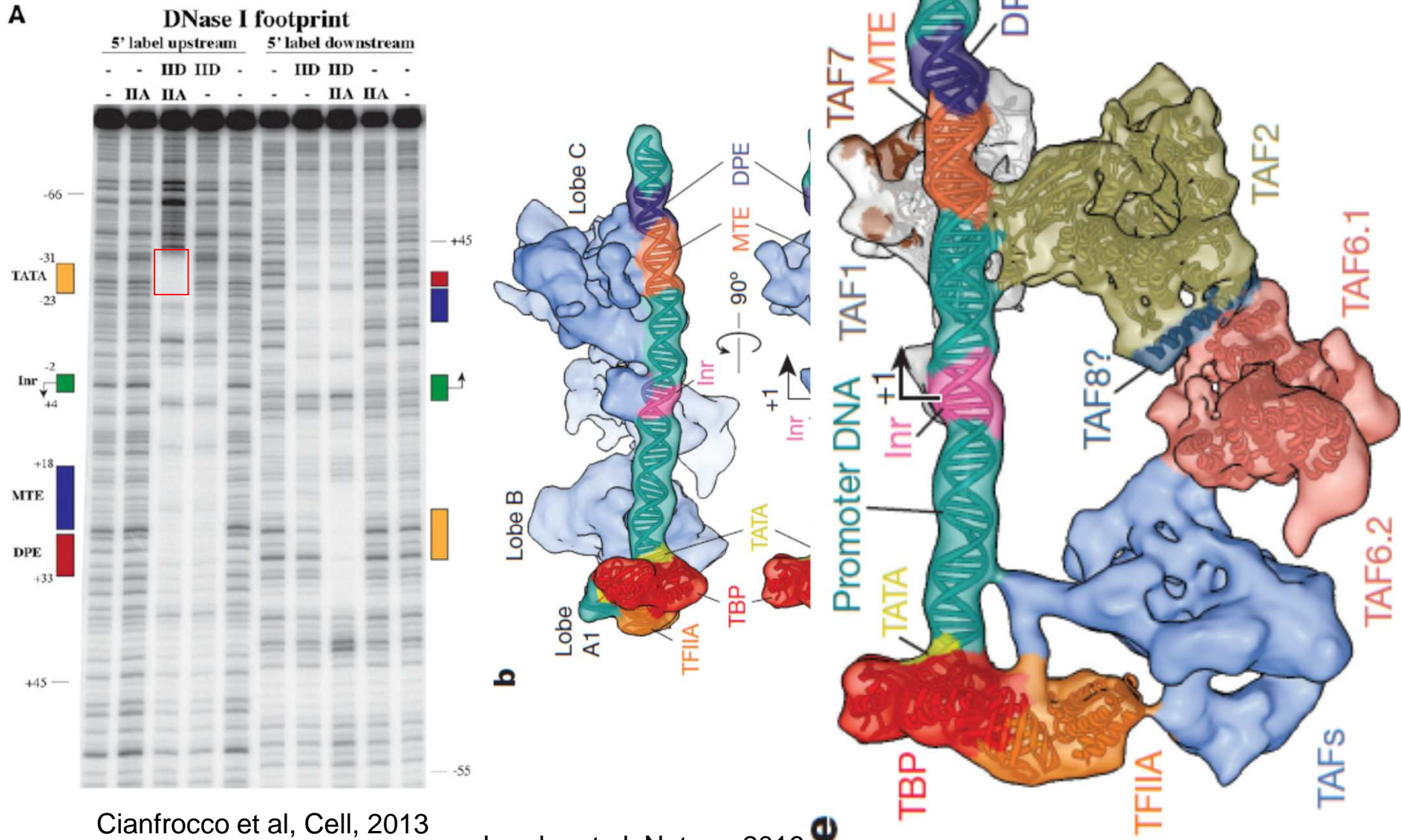
- TFIID (1MDa, TAFs) komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému (nukleace PIC) Bieniossek et al., Nature, 2013



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



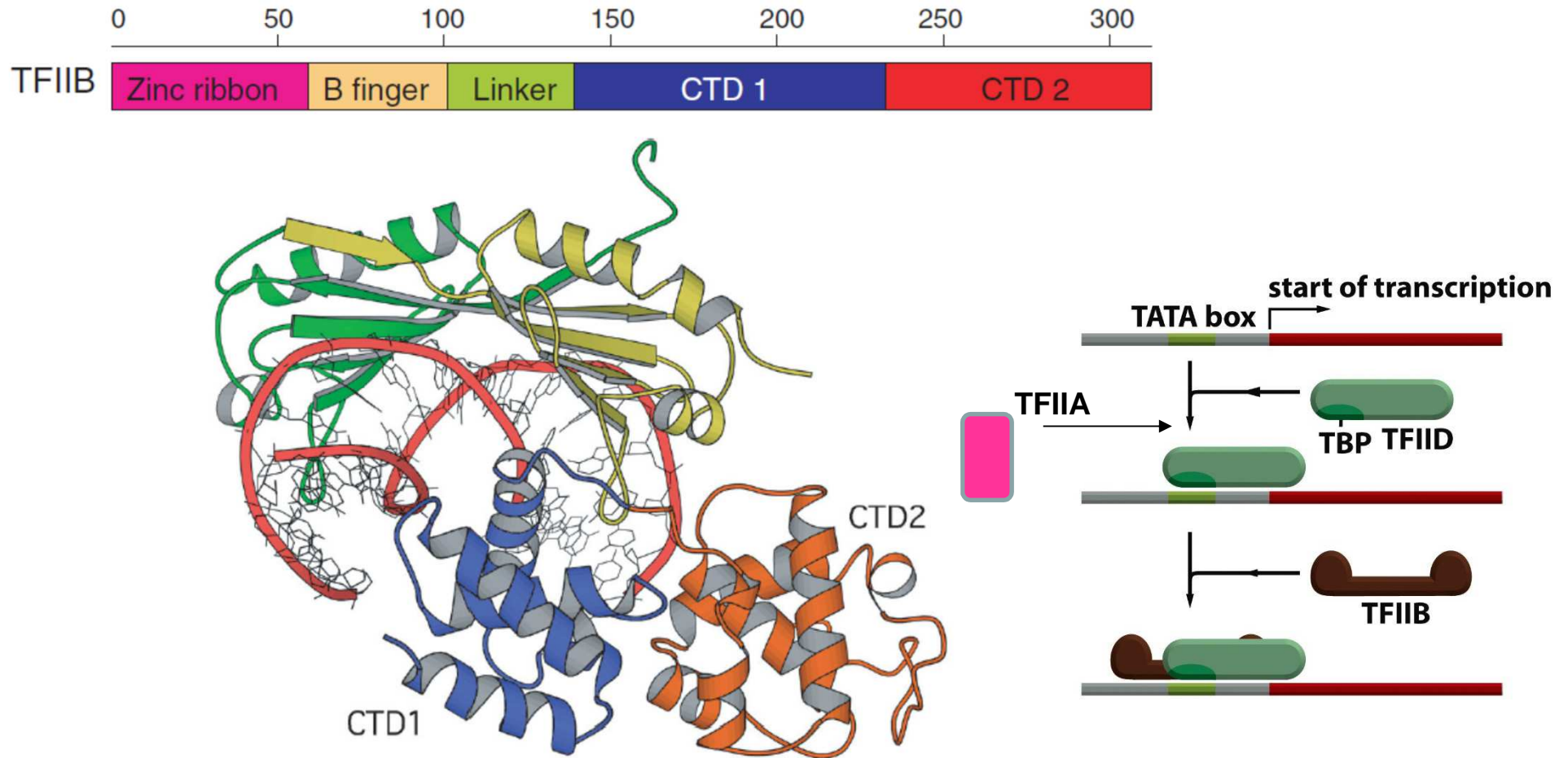
- footprint analýza ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)



Cianfrocco et al, Cell, 2013

Louder et al, Nature, 2016

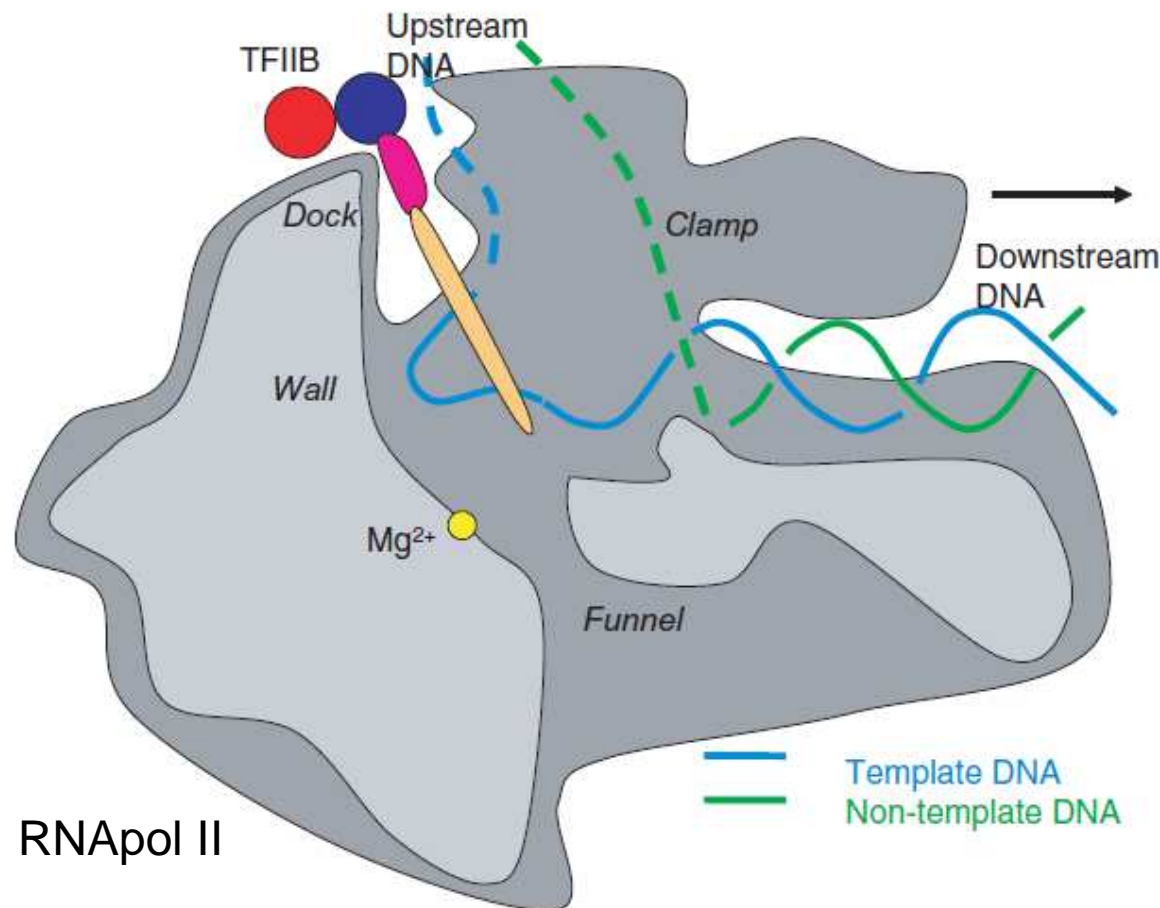
pro další postup transkripce je klíčový TFIIIB – propojuje TFIIID-TFIIA s RNAPol II



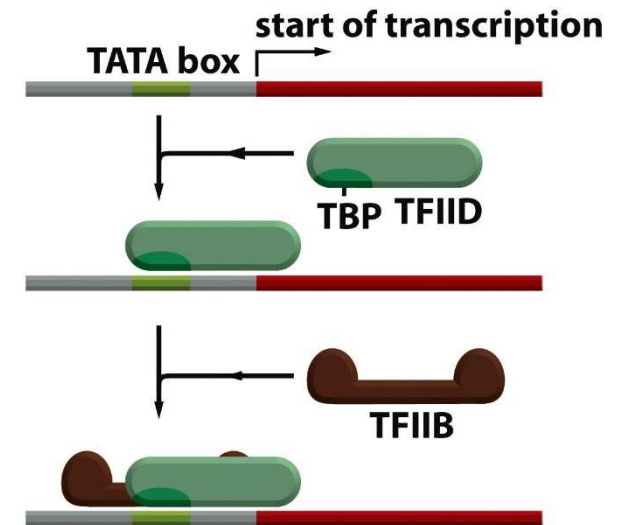
- TFIIIB (C-konec = CTD1 a CTD2) váže TBP a 6-7bp up- a downstream od ohybu DNA přes cukrfosfátovou kostru (blízko TATA boxu)



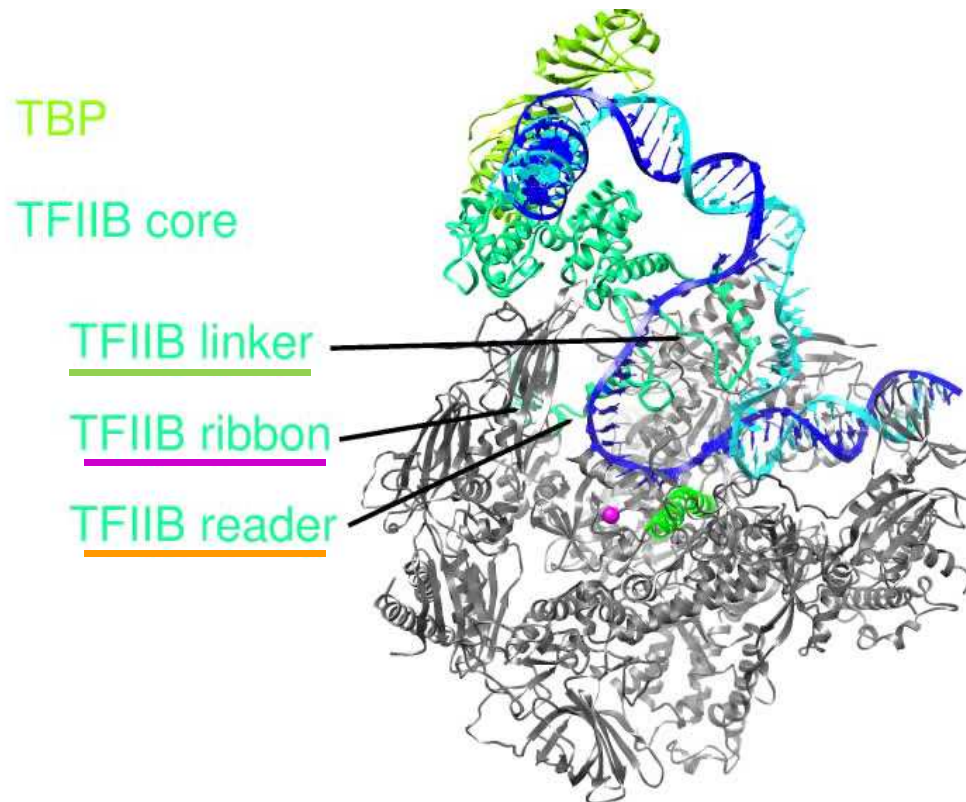
- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje TFIID-TFIIA-DNA komplex na pol II (do jeho aktivního centra/cleft)
- Zn-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem



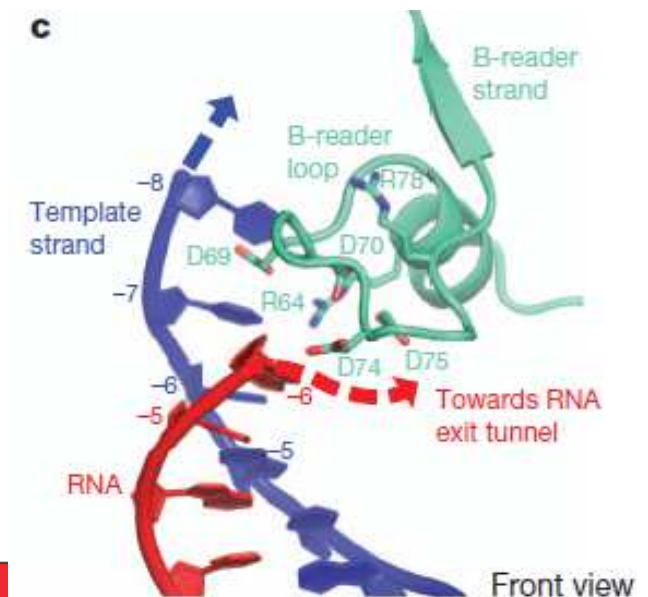
RNAPol II



- 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...)

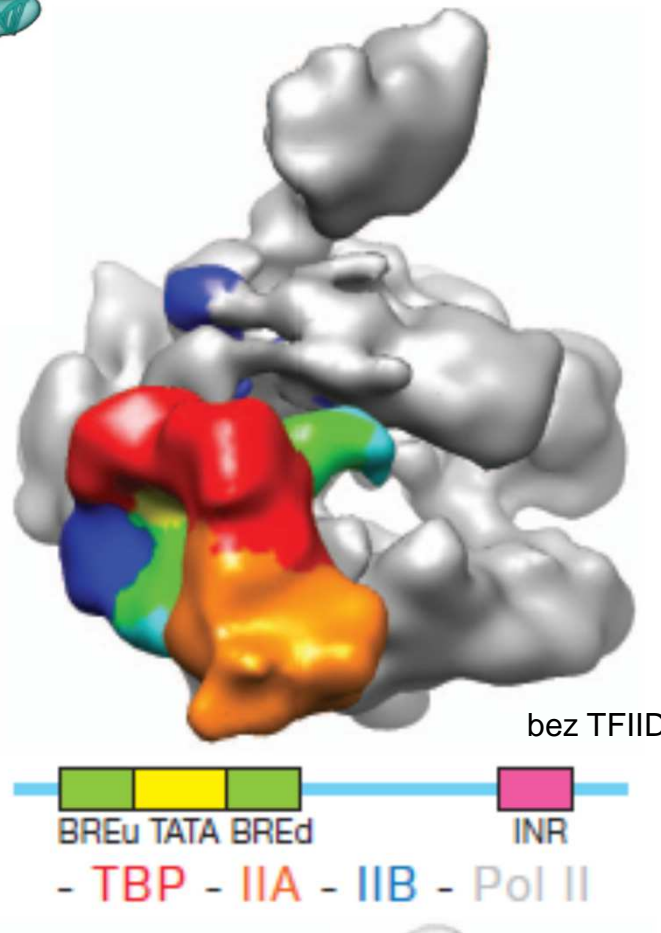
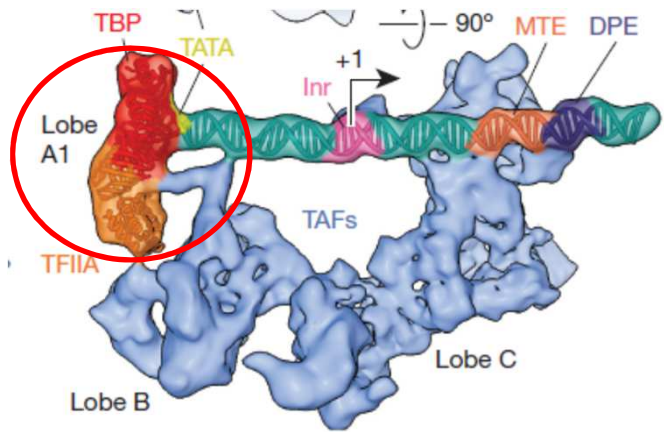


Video  
ukázka RNA polymerázy



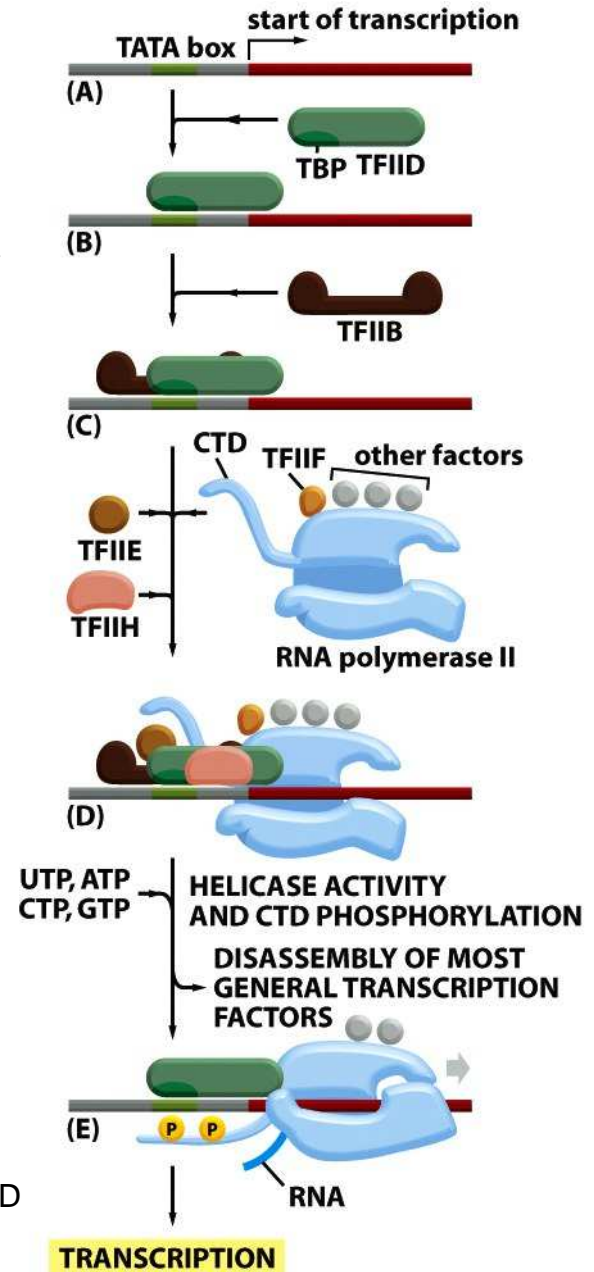
# TFIIB propojuje RNAPol II s již sestaveným TBP/TFIID+TFIIA

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



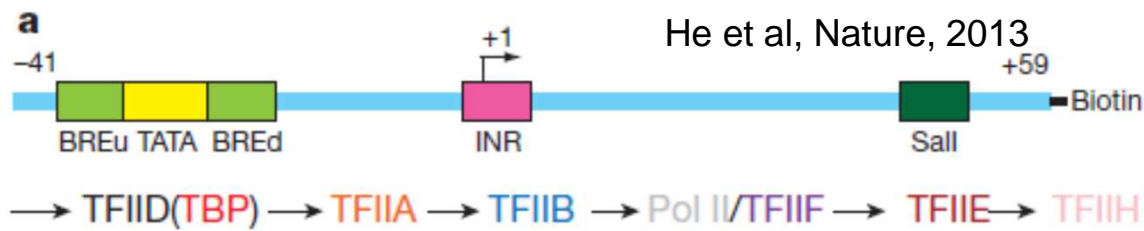
- cryoEM komplexu **TBP** (bez TFIID) + **TFIIA** + **TFIIB** + RNAPol II
- po navázání pol II disociuje TAF1/2 ...

He et al, Nature, 2013

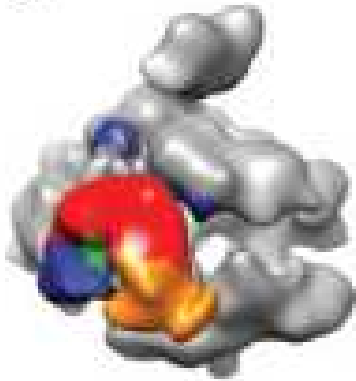


# Rekonstrukce celého PIC

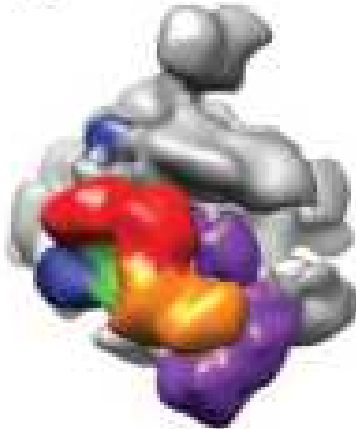
- biotin-DNA navázána na streptavidinové kuličky – na DNA nachytány *in vitro* sestavené komplexy – odštěpeno *Sall* a cryoEM - postupně rekonstruován celý PIC



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



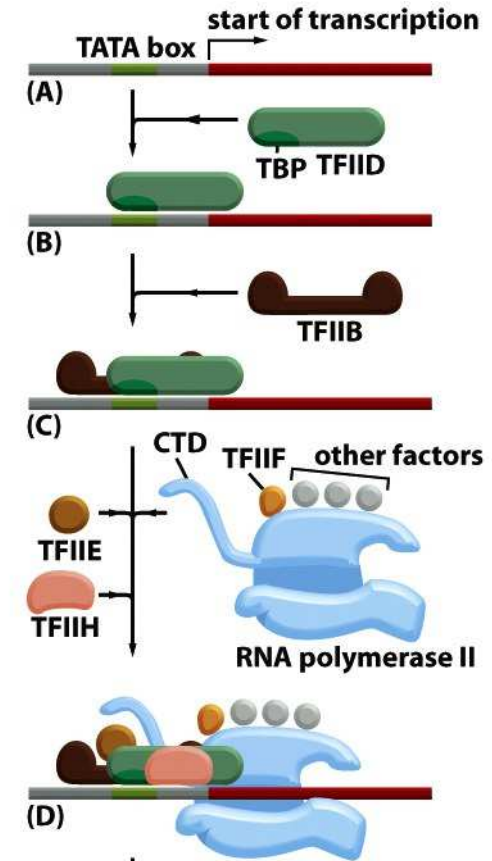
**c** + TFIIF

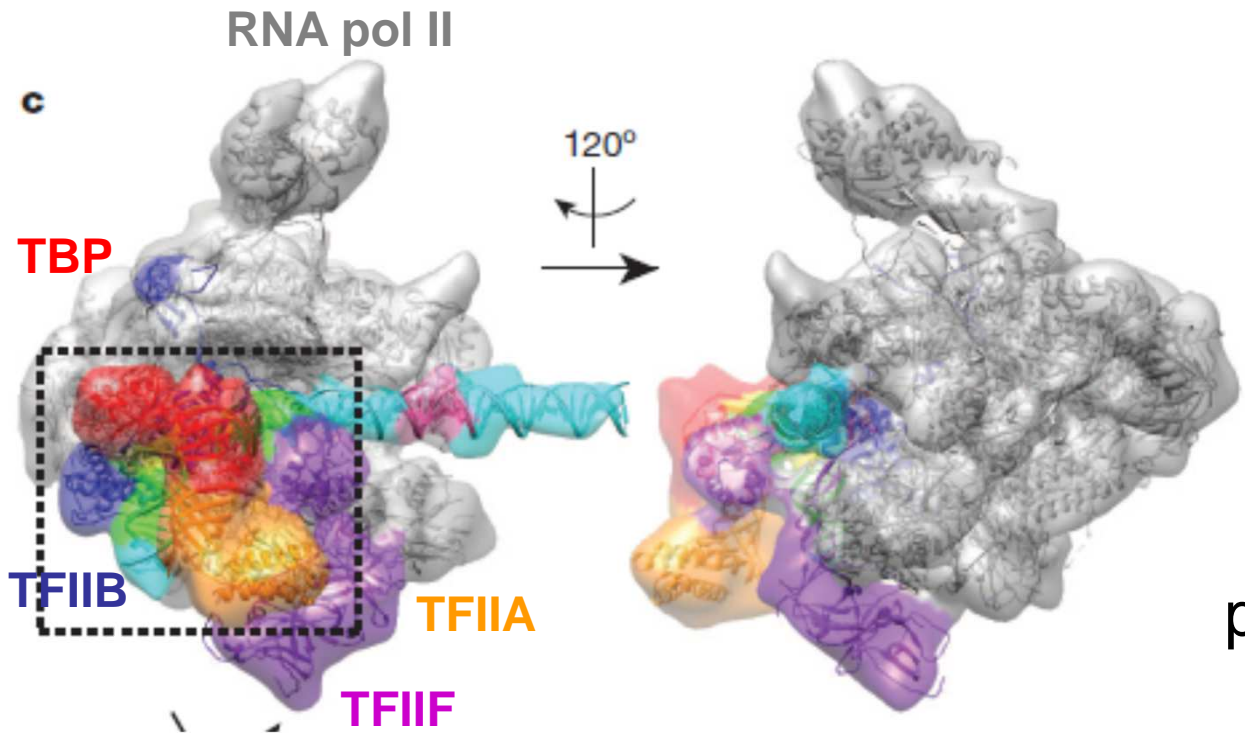


**d** + TFIIIE

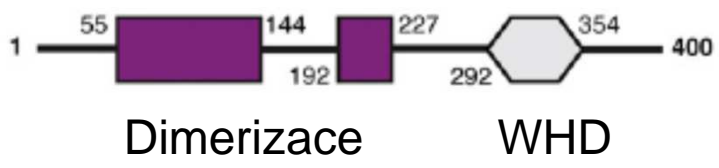
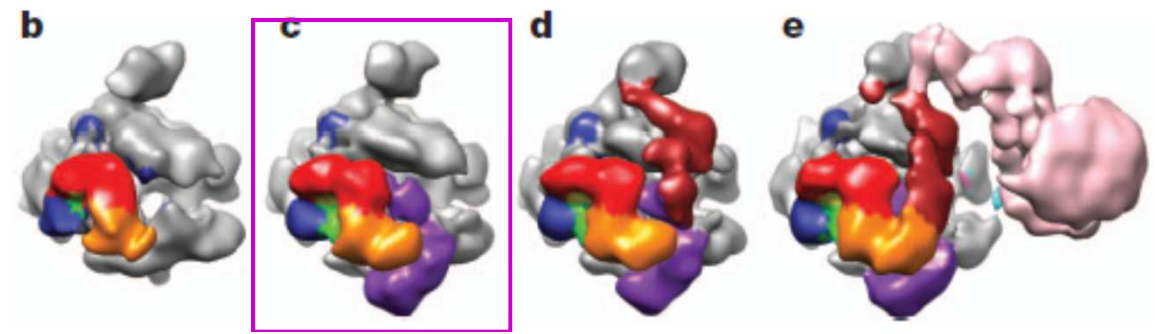
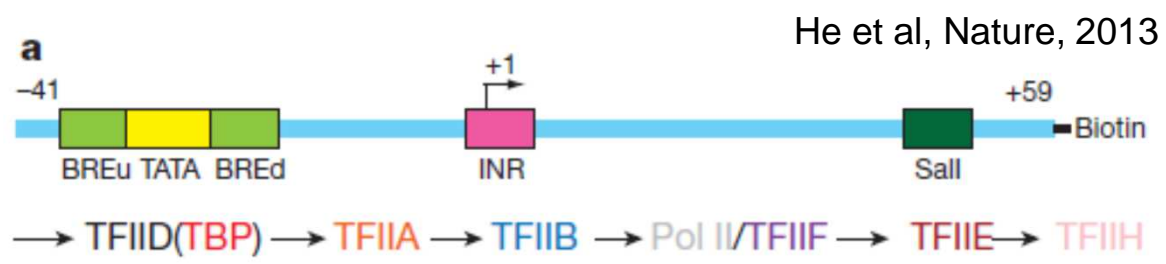


**e** + TFIIF

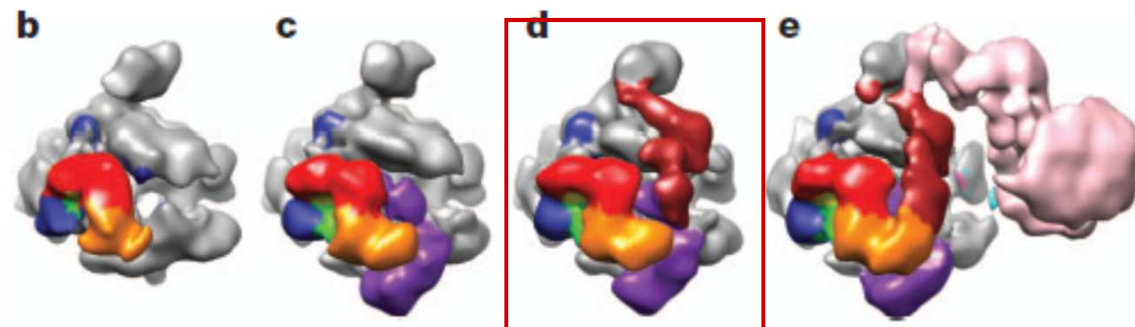
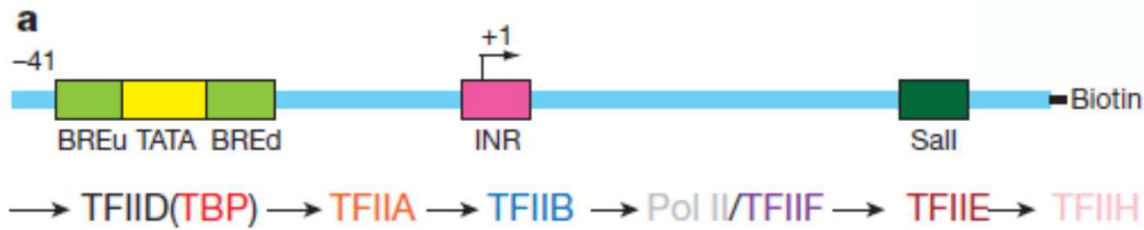
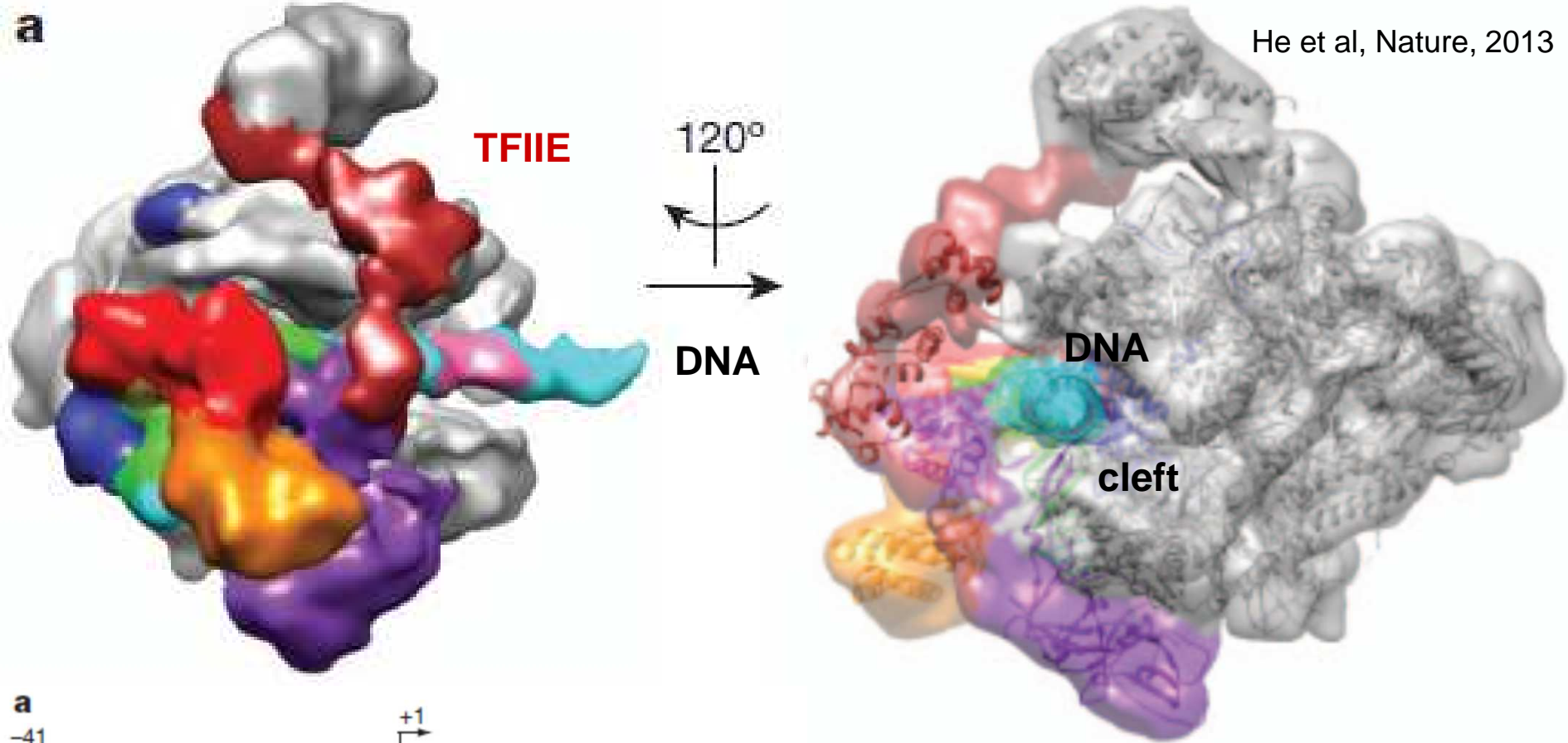




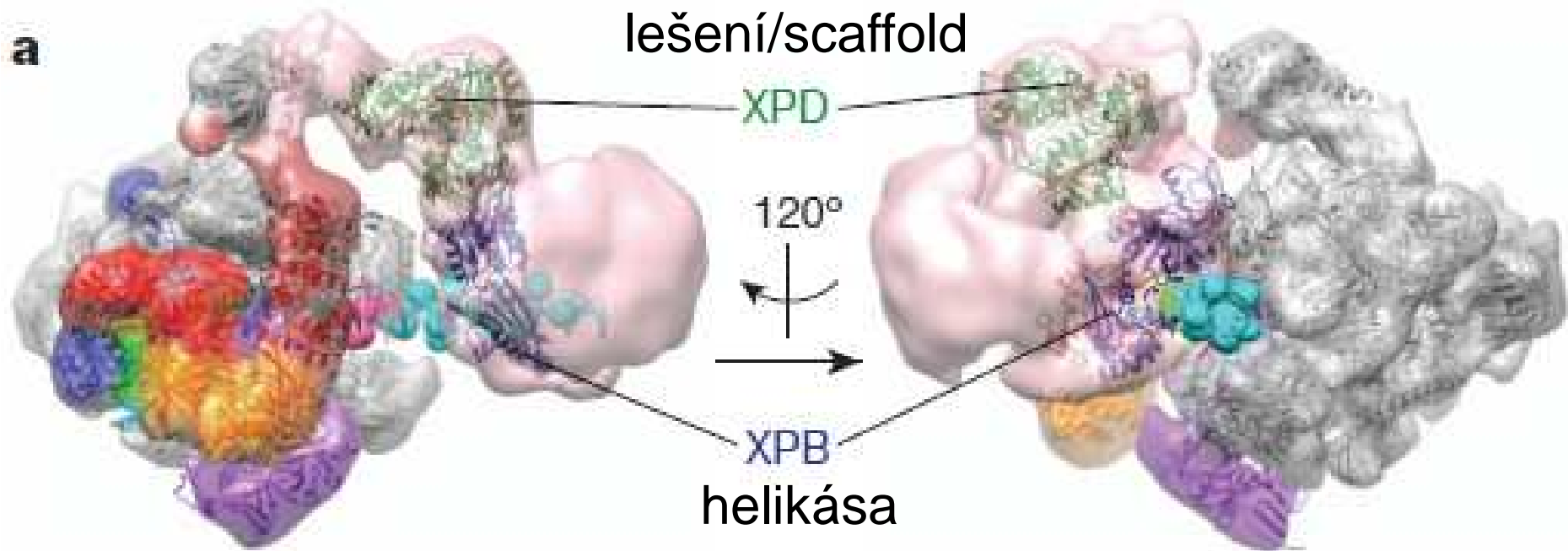
- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE<sub>downstream</sub>)
- váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu



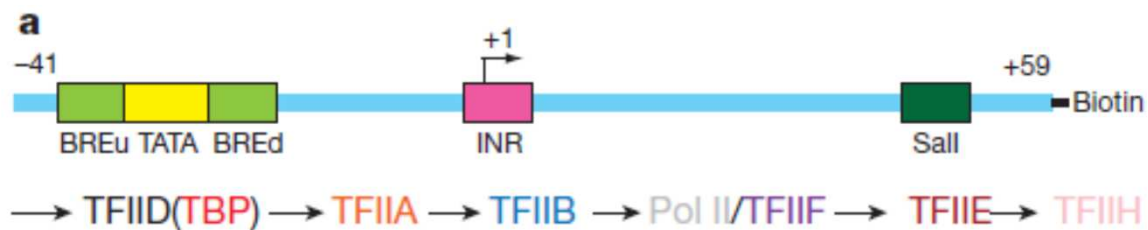
Vanini & Cramer, Mol Cell, 2012



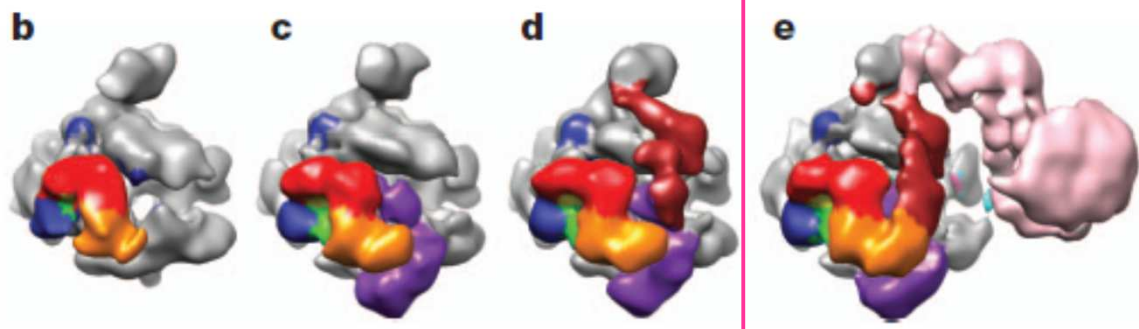
- TFIIF váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu
- tandem 4x WHD uzamyká DNA v RNAPol II prohlubni



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



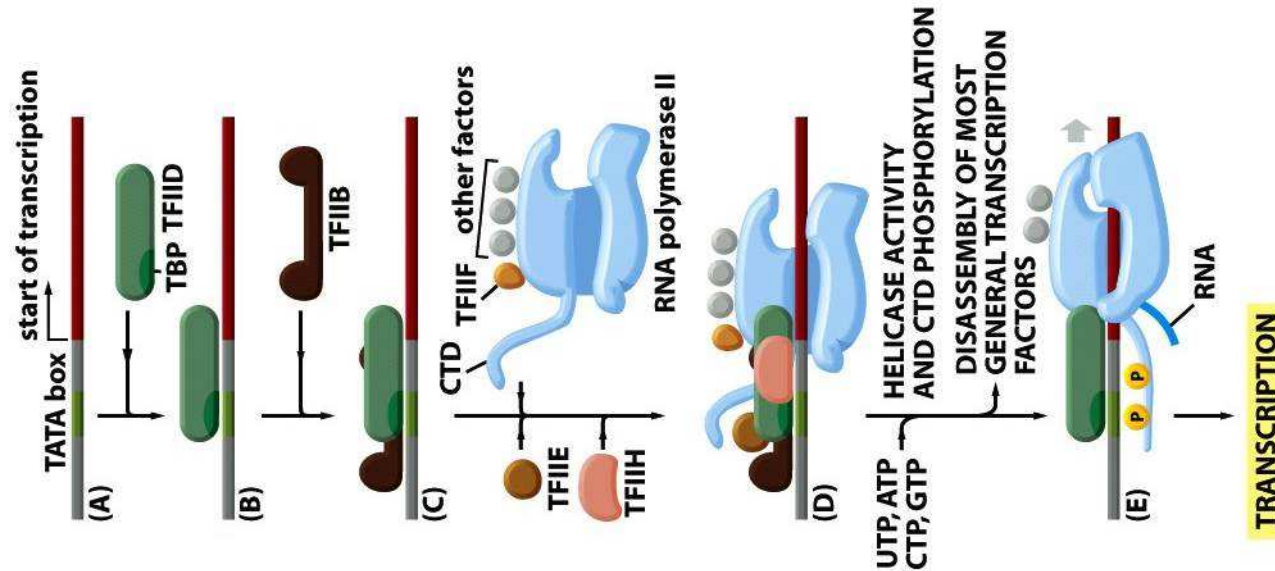
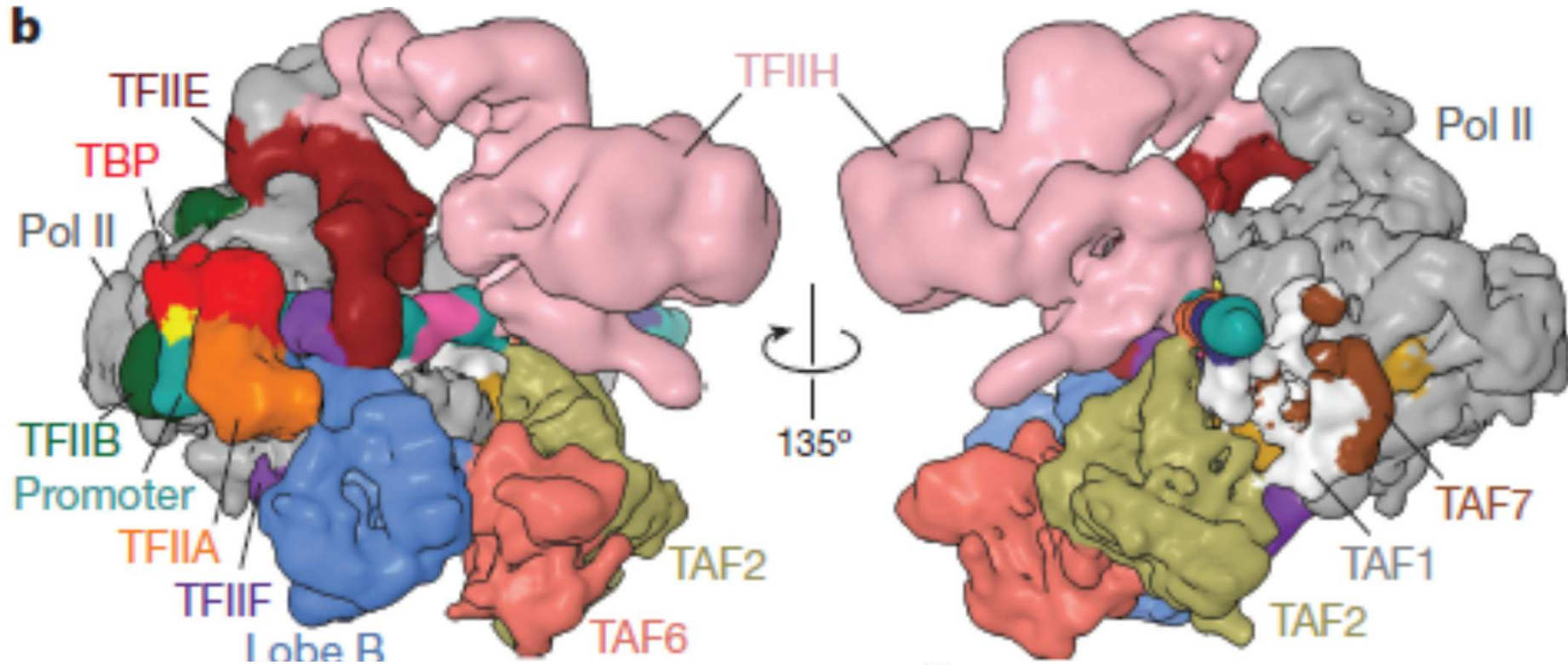
lidský PIC komplex  
He et al, Nature, 2013



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

# Kompletní PIC i s TFIID komplexem

Louder et al, Nature, 2016

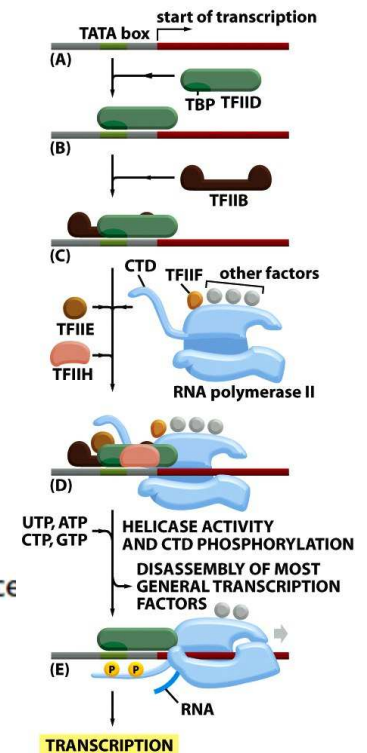




# začátek transkripce - faktory

TABLE 1 Components of the human general transcription machinery

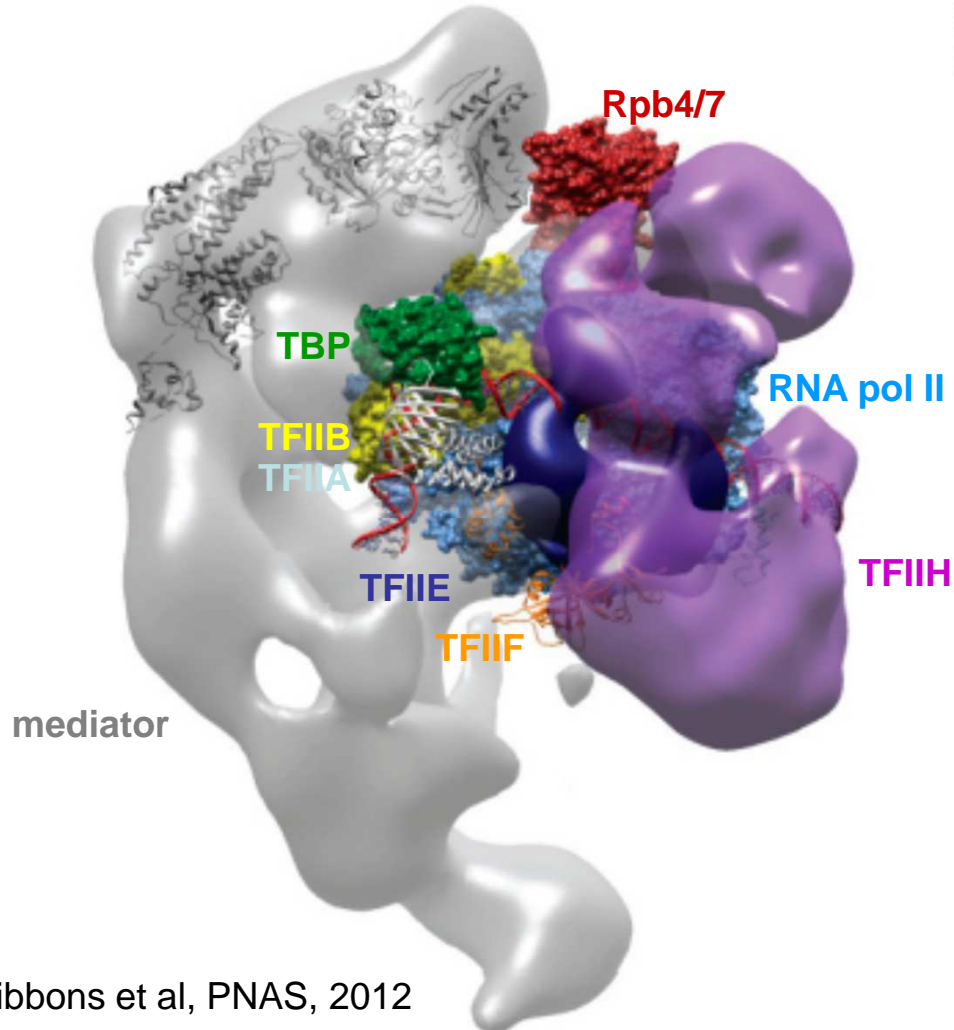
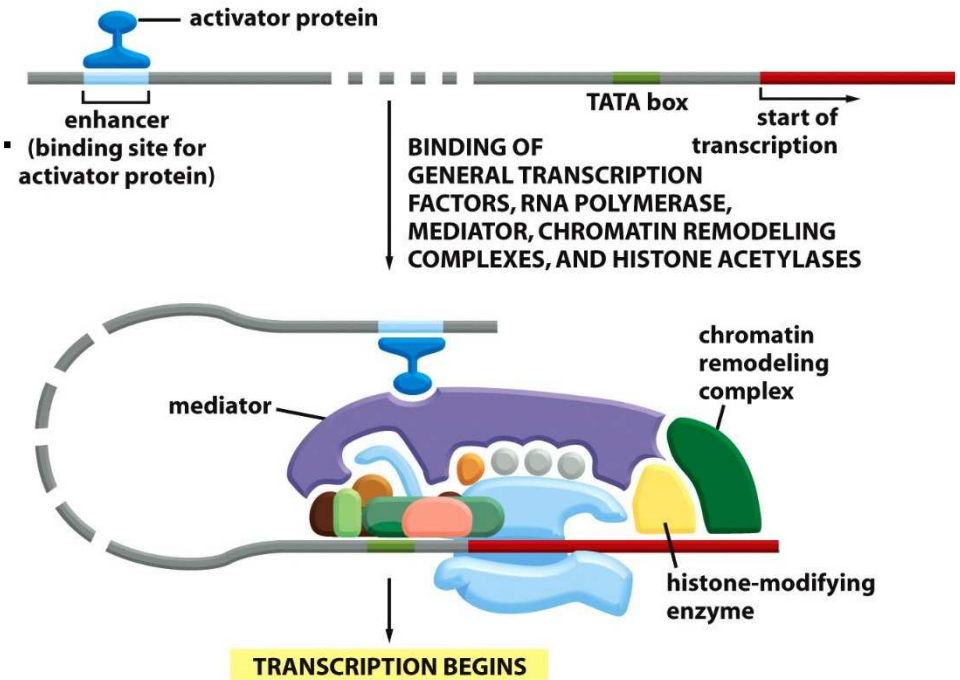
Factor	Protein composition	Function
TFIIA	p35 ( $\alpha$ ), p19 ( $\beta$ ), and p12 ( $\gamma$ )	Antirepressor; stabilizes TBP-TATA complex; coactivator
TFIIB	p33	Start site selection; stabilize TBP-TATA complex; pol II/TFIIF recruitment
TFIID	TBP + TAFs (TAF1-TAF14)	Core promoter-binding factor Coactivator Protein kinase Ubiquitin-activating/conjugating activity Histone acetyltransferase
TFIIE	p56 ( $\alpha$ ) and p34 ( $\beta$ )	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. Kolesár P89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cyclin H, p34, p32/MAT1, and p8/TFB5 Dr. Blažek	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



RPB1 CTD (heptapeptide YSPTSPS repeat) fosforylace

Thomas et al., CRiBMB, 2006

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



Gibbons et al, PNAS, 2012

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

