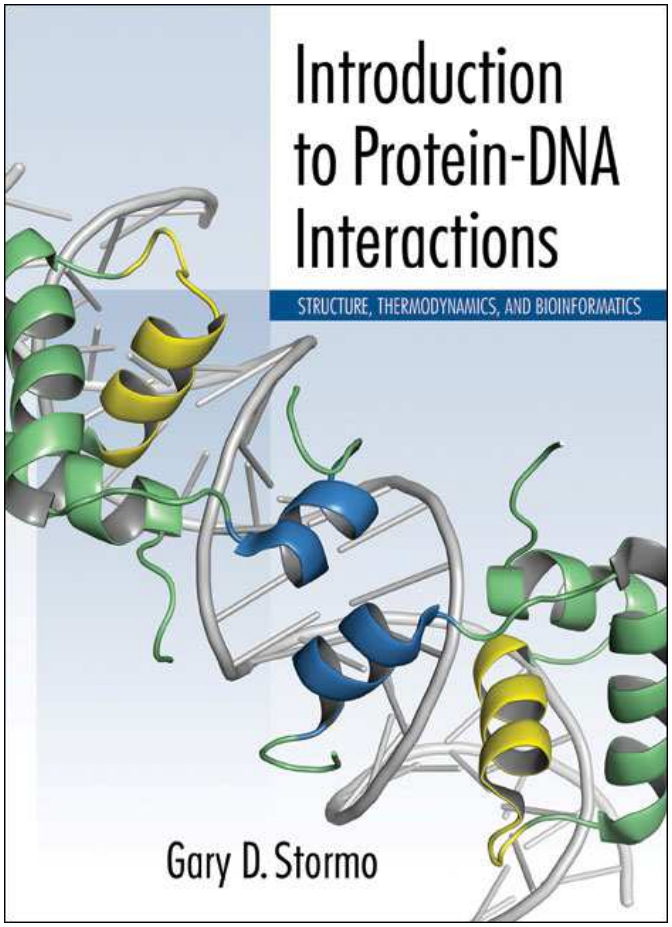
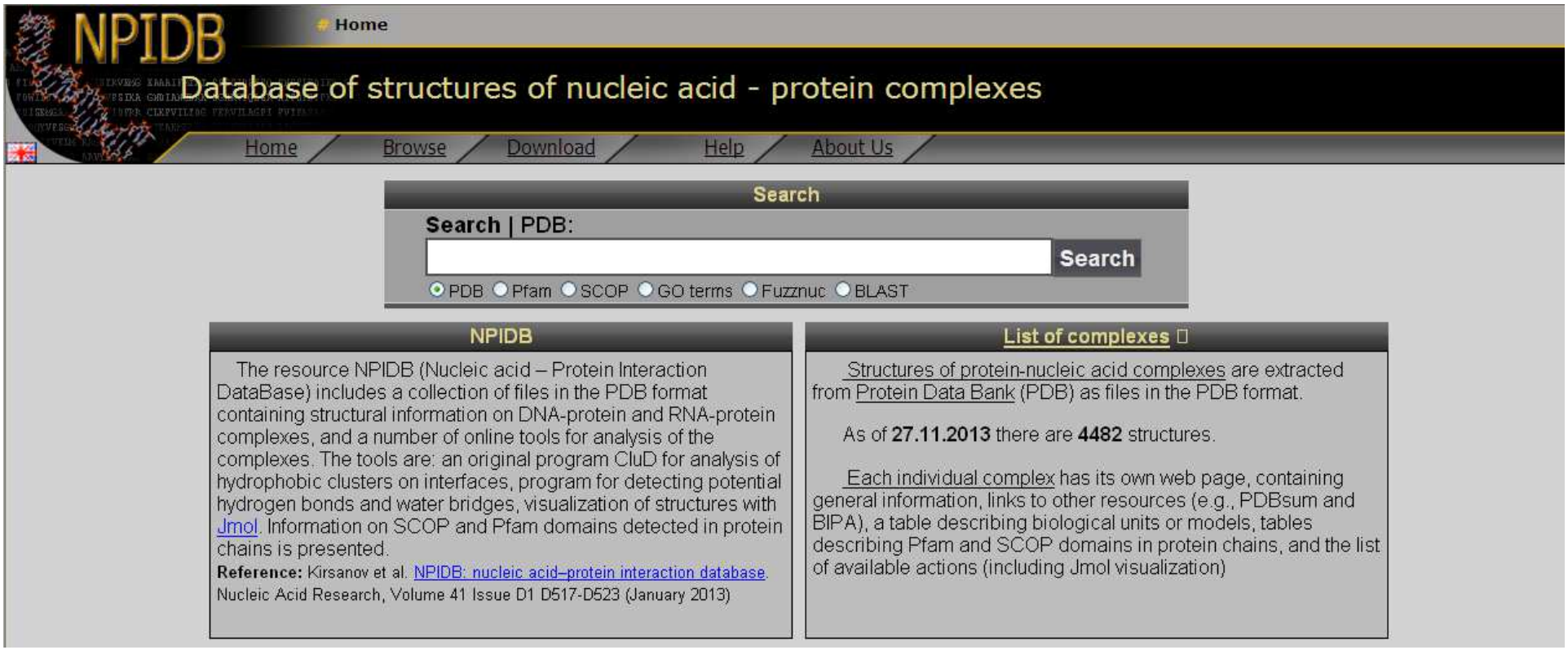
(DNA-)proteinové komplexy



DNA-proteinové komplexy

Komplexy spojené s transkripcí (až 5% genomu)
Komplexy spojené s duplikací genomu
Komplexy podílející se na opravě genomu
Chromatinové strukturní komplexy

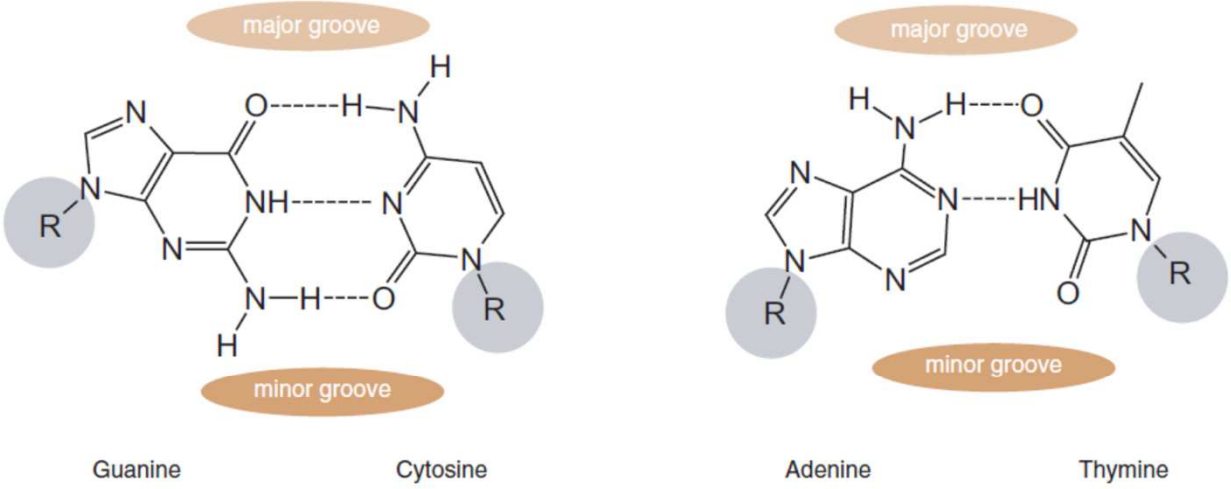
GENOM



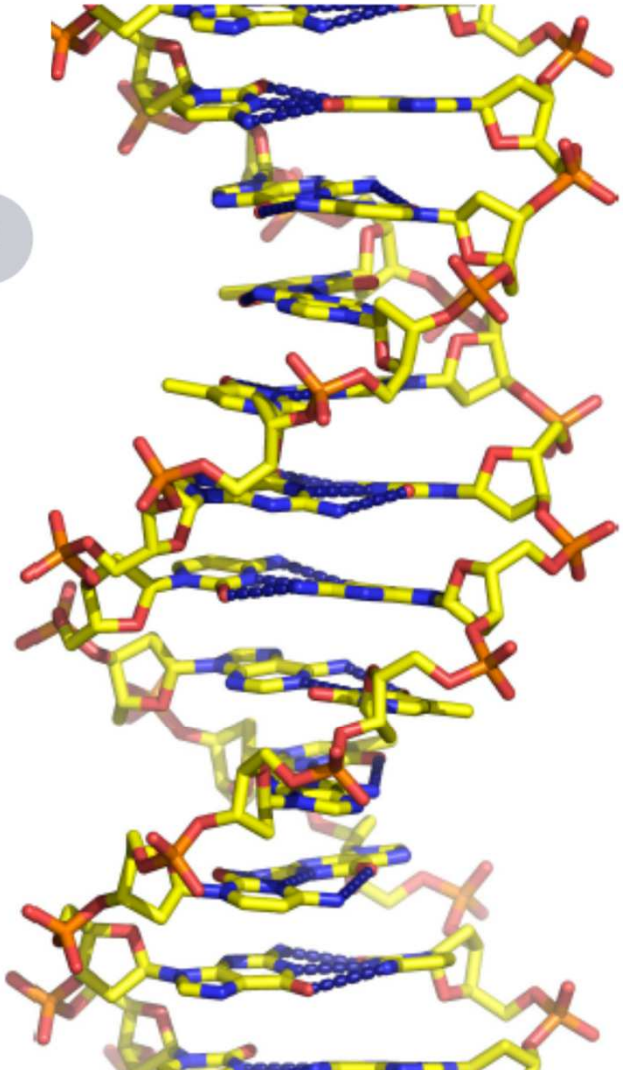
http://npidb.belozersky.msu.ru/

5000 struktur v PDB (v roce 2014)

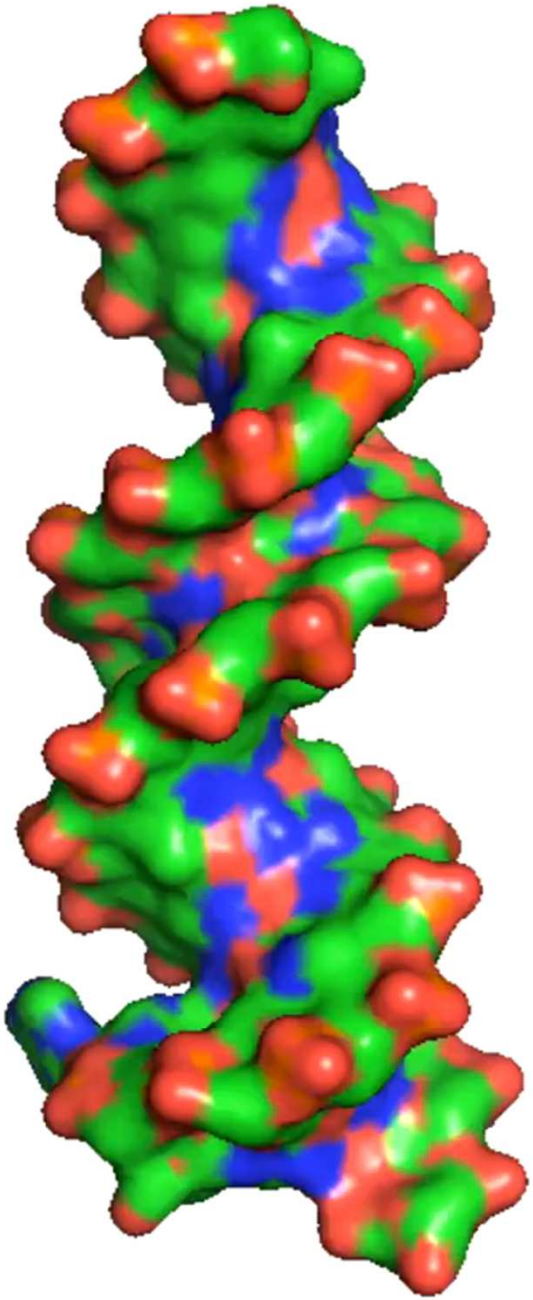
Tvarová a nábojová specifita DNA determinuje typy DNA-vazebnýchdomén (oproti velké rozmanitosti protein-proteinových i

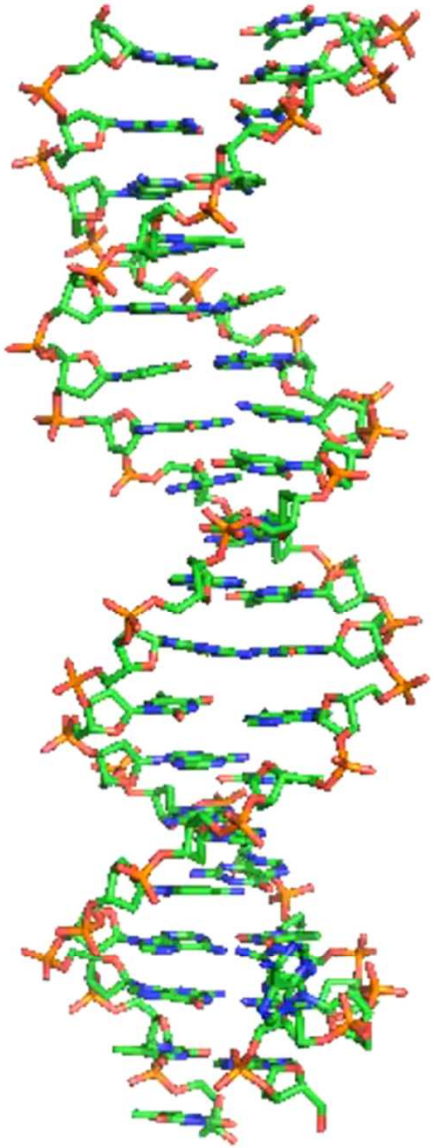


- proteiny interagují s cukrfosfátovou kostrou (fosfát) nebo přes žlábky s bazemi (vod. vazba, tvar šroubovice)
- Interakce sekvenčně nespecifické (kostra – histony; strukturně specifické
- HMG proteiny) nebo sekvenčně specifické (kostra+žlábky – kombinace: *Bgl*II (AGATCT) a *Bam*HI (GGATCC) kontaktují stejné báze a „čtou“ zakřivení okolní DNA …)



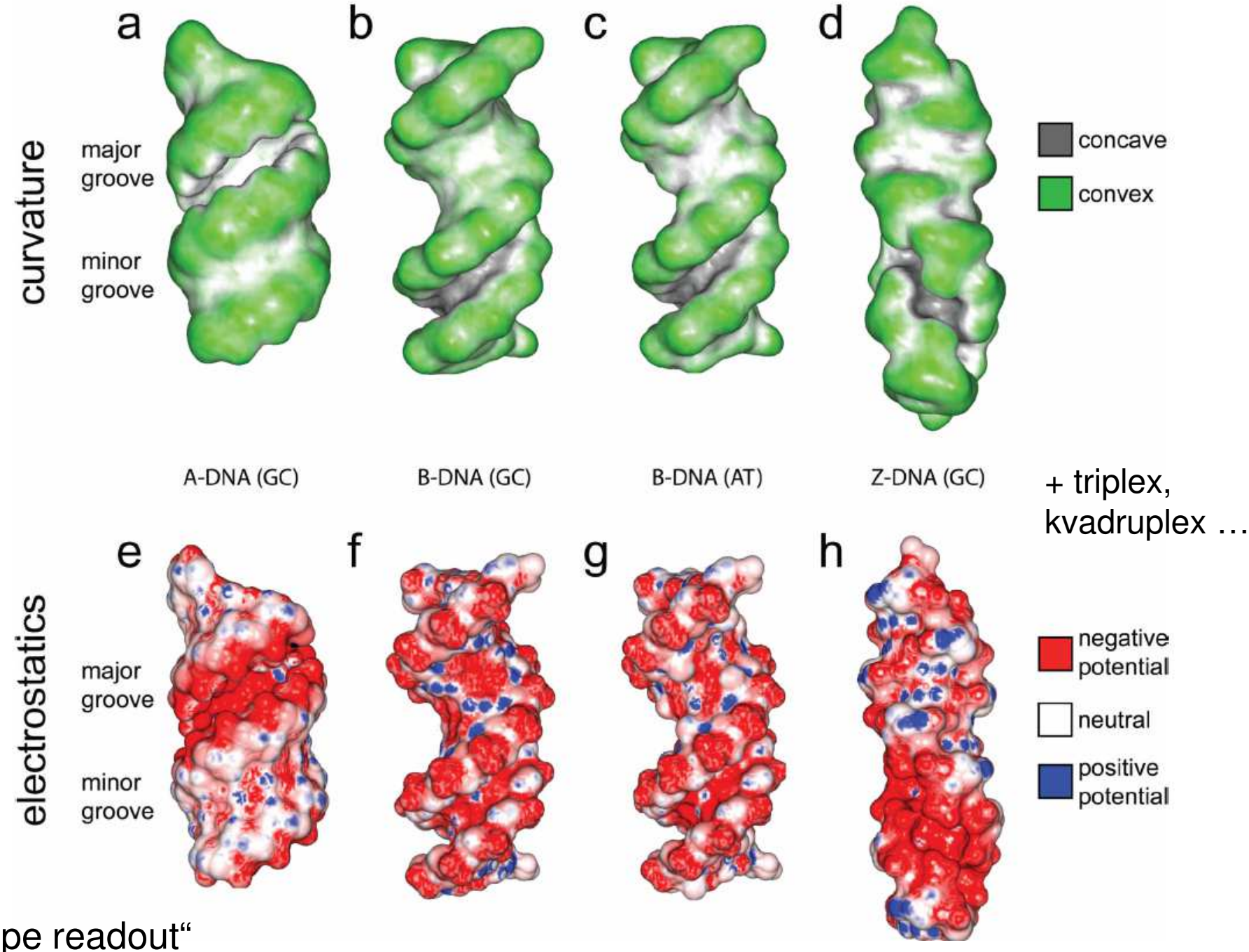
„shape readout“
zakřivení kostry souvisí se sekvencí





B-DNA

ELIXIR: DNATCO.ORG: Cerny et al, NAR, 2016

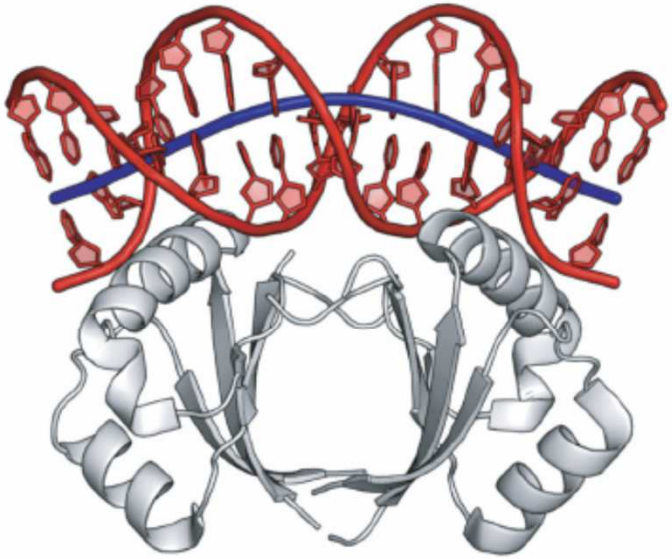


„shape readout“
zakřivení kostry - souvisí se sekvencí a prostředím

Rohs et al, Annu Rev Bioch, 2010

Vazba DNA-protein může indukovat změny

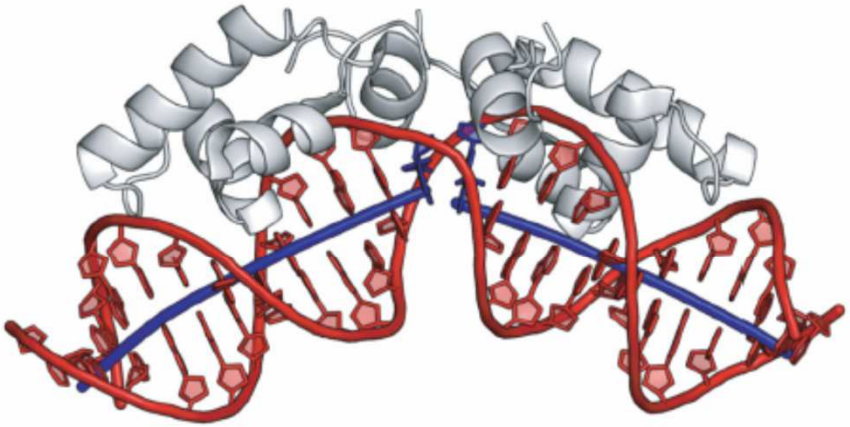
a



Bend

1jj4 (… např. histony)

b



Rohs et al, Annu Rev Bioch, 2010

Kink

2kei, Lac represor
(Leu do malého žlábku)

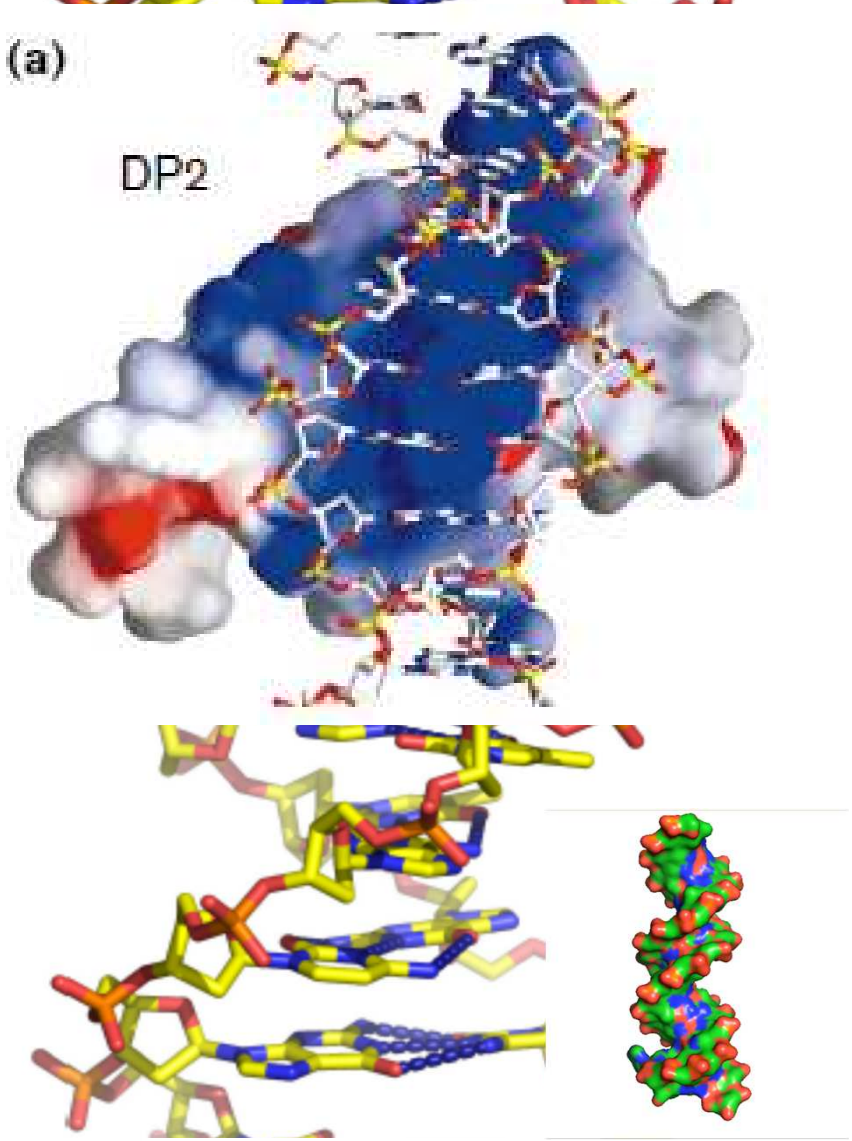
- vazba proteinu může indukovat změny ve struktuře DNA
- vazba DNA na protein často indukuje změny v jeho struktuře
- případně u nestrukturovaných proteinů strukturu indukuje (c-Jun/c-Fos = šroubovice až po navázání dimeru na DNA)

Vazba proteinů s DNA prostřednictvím solných můstků

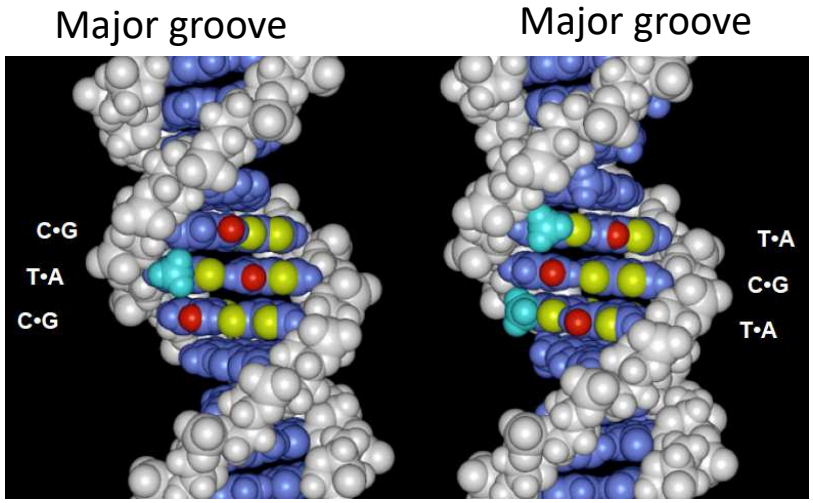
- fosfáty mohou interagovat s **Arg** a Lys – solné můstky/salt bridges (pozitivní náboje Arg a Lys vytváří vazbu s negativním nábojem fosfátové skupiny)
- Elektrostatický náboj/povrch naznačuje vazebné schopnosti proteinu

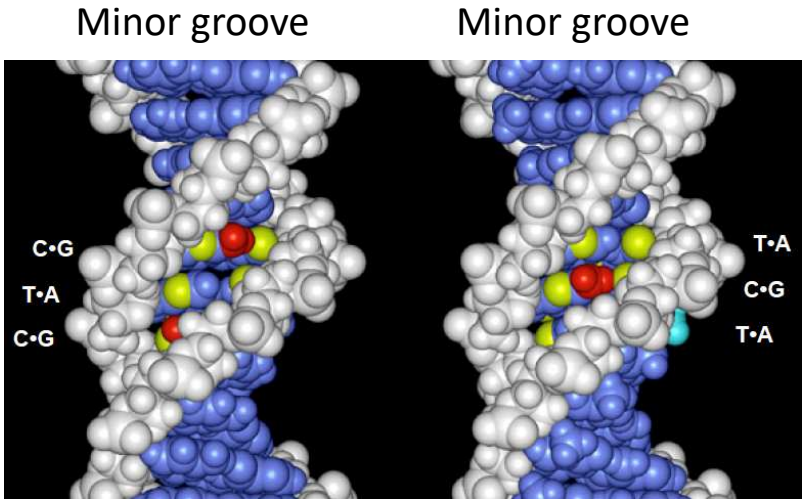
Table 2. The simplified relative charge set defined from CHARMM (10) used in the calculation of the electrostatic potential of atoms in the DNA-binding proteins

Atom type (PDB entry)	Residue	Relative charge
NZ	Lys	1.00
NH1	Arg	0.50
NH2	Arg	0.50
OE1	Glu	–0.50
OE2	Glu	–0.50
OD1	Asp	–0.50
OD2	Asp	–0.50
OXT	All residues	–1.00
N	All residues	–0.10
CA	All residues	0.10
C	All residues	0.55
O	All residues	–0.55

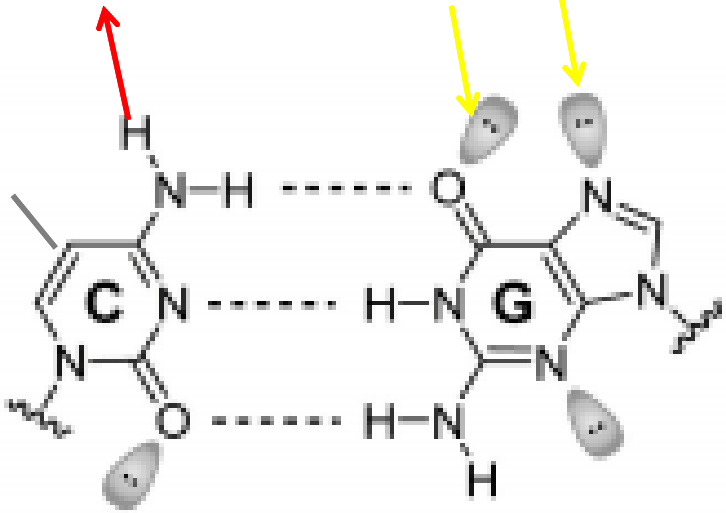


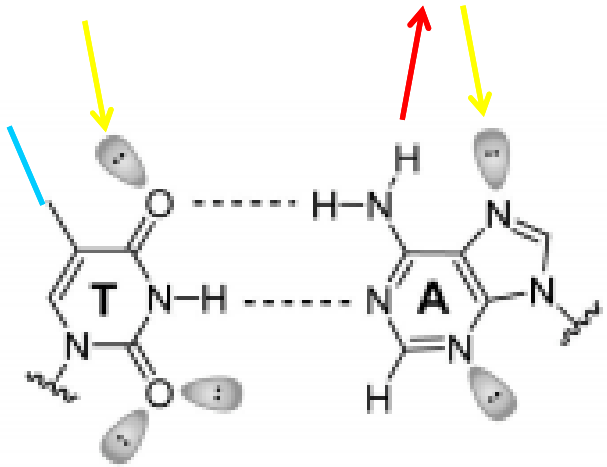
Gajiwala & Burley, COiSB, 2000

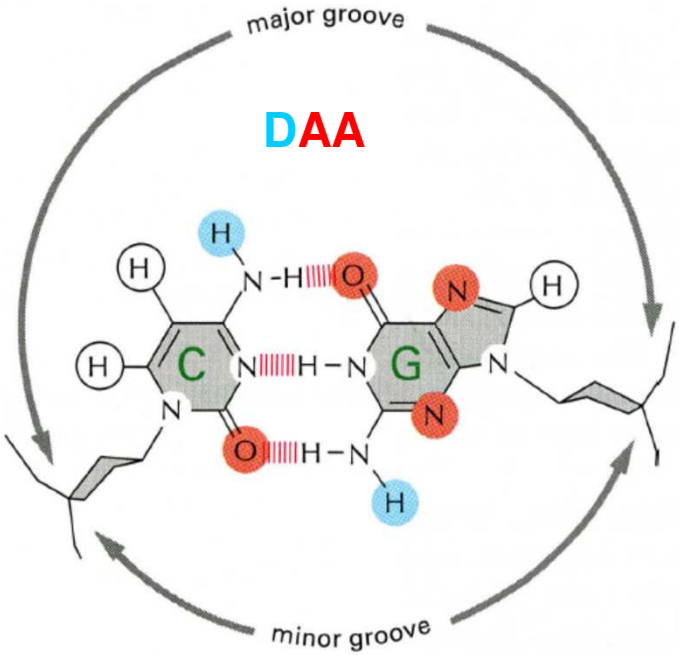


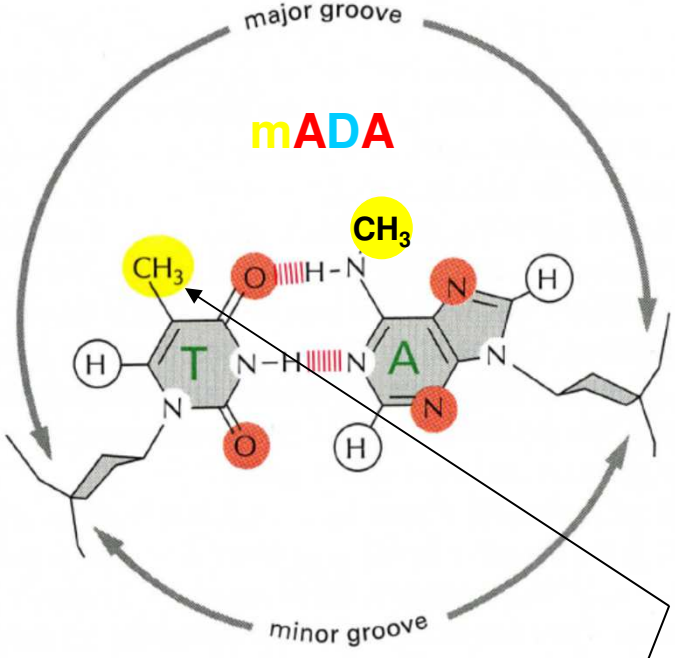


sekvenčně-specifický protein kontaktuje báze („direct“ readout) – skrze velký nebo malý žlábek – **velký žlábek** je lépe přístupný – vodíkové vazby (donor vs akceptor elektronu)





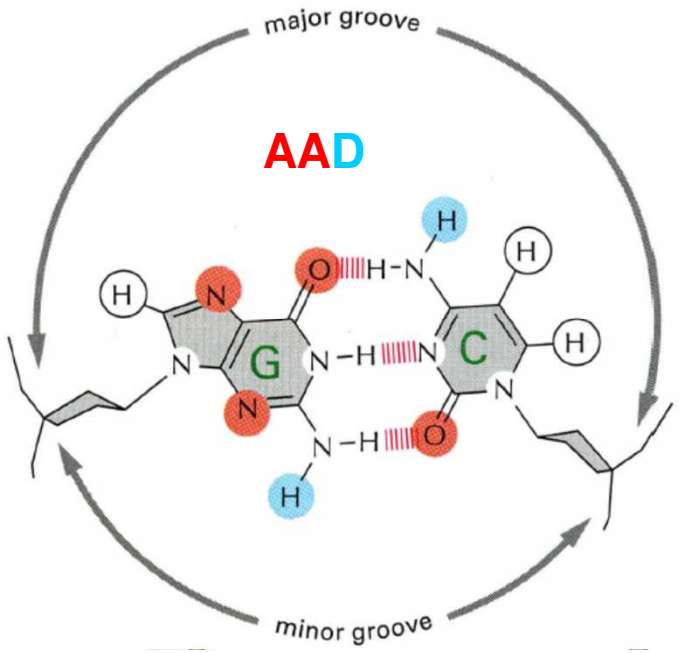


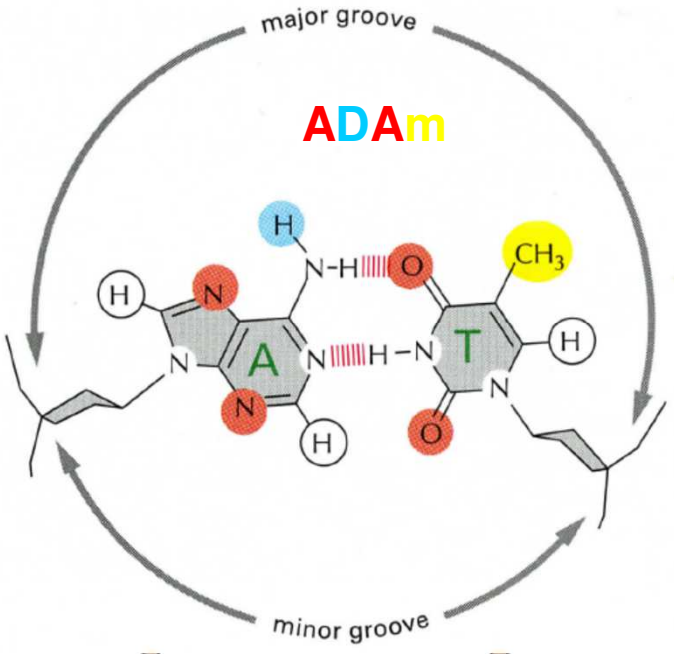


Jak odliší protein různé páry bazí?

“base readout”

Pozice donor vs akceptor
+ metyl skupina





metylace Ade u bakterií změna!

KEY:

= H-bond acceptor

= H-bond donor

= hydrogen atom

= methyl group

Vazba proteinů s DNA prostřednictvím vodíkových vazeb

- **Velký žlábek** má velikost odpovídající rozměrům α-**šroubovice** a má exponované H-vazebné skupiny
- Ade zbytky C-6(NH_2) a N-7 mohou tvořit specifické vodíkové vazby s **Gln** a **Asn**
- Gua může tvořit specifické vodíkové vazby s **Arg**

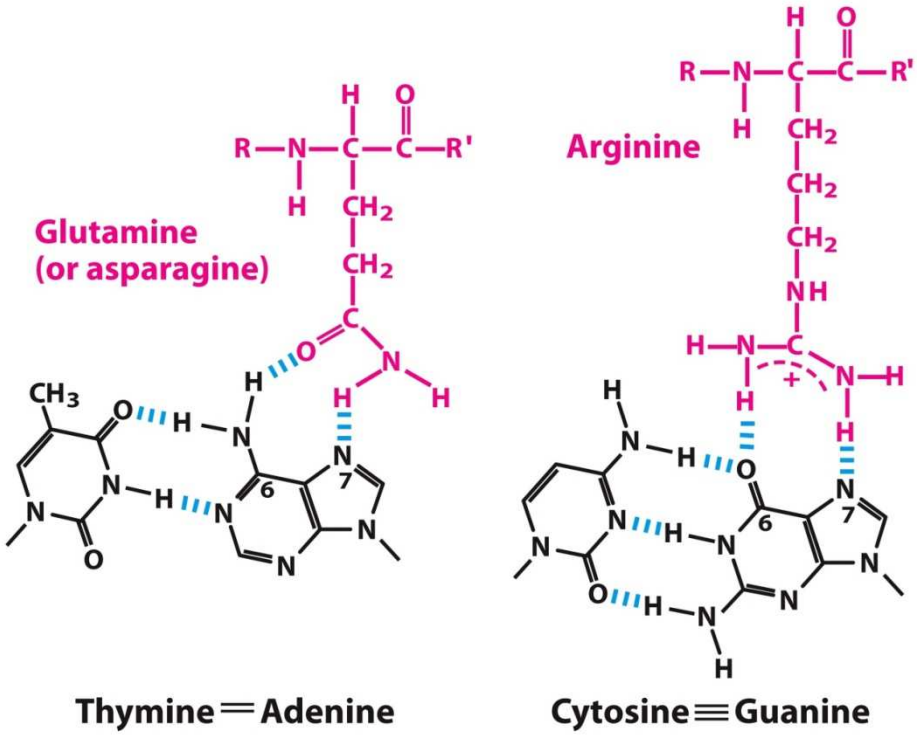
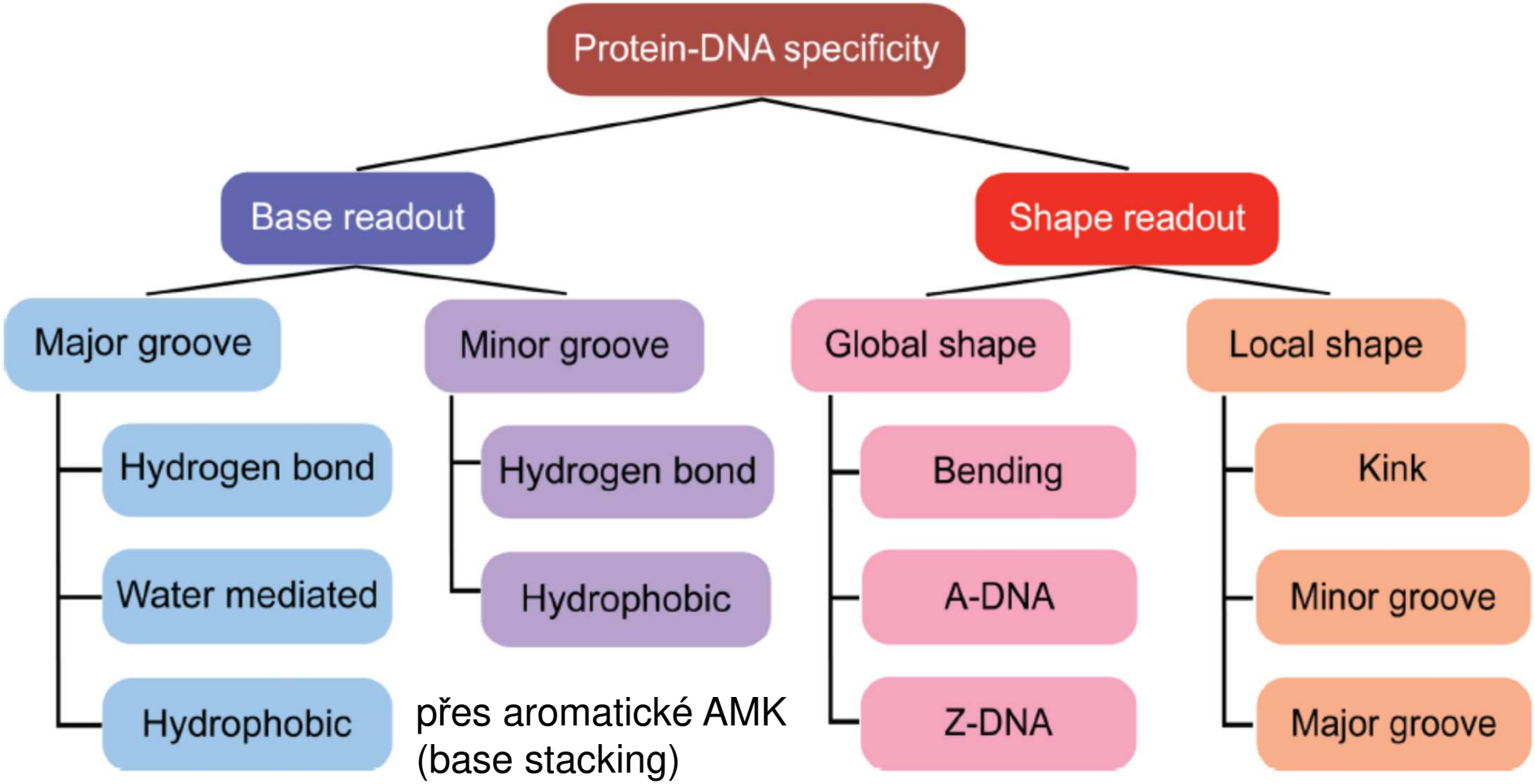


Figure 28-10
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

Silná vazba, sekvenčně specifická - afinita nM – μM
Slabá vazba, strukturně specifická - afinita μM – mM



- více jak 70 SCOP superrodin (strukturních motivů)
- dle sekundárních struktur – α-šroubovice (17), β-listy (7), smíšené α/β motivy (48)

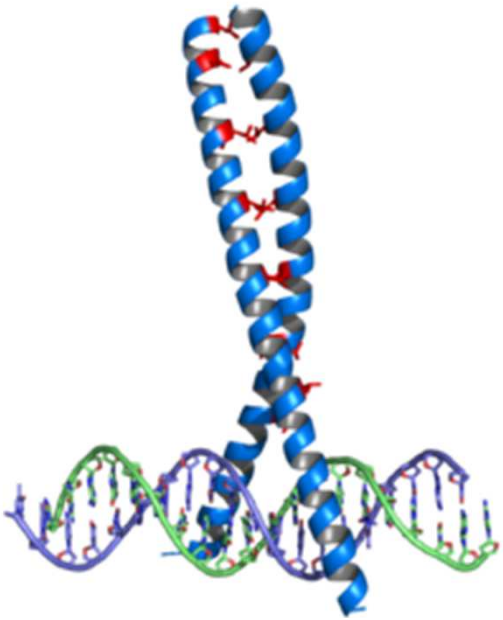
Rohs et al, Annu Rev Bioch, 2010

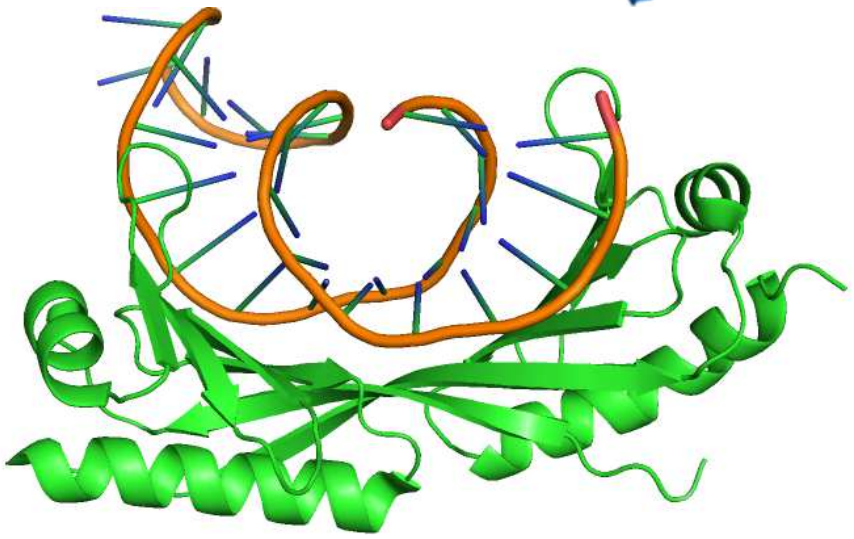
Motivy DNA-vazebných domén

- **Zipper typ**
  - Leucinový zip
  - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
  - HTH
  - Winged helix
  - TALE
- **Zinkový prst**
  - ββα zinc-finger
  - Hormon-receptor
  - Loop-sheet-helix
  - Gal4
- **Histon, HMG-box**
- **β-sheet motivy**

α-šroubovice

β-listy



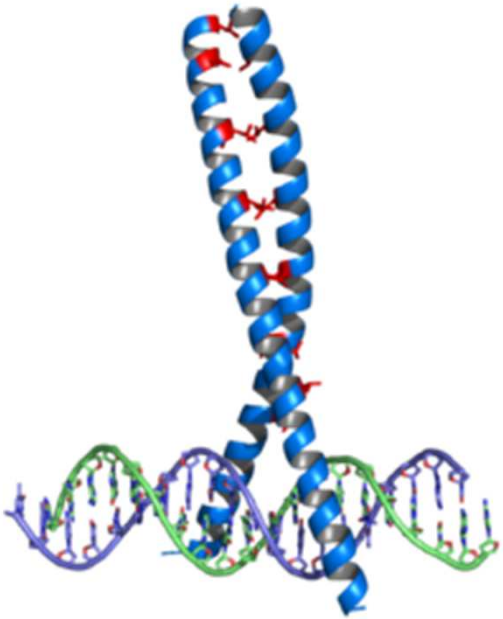


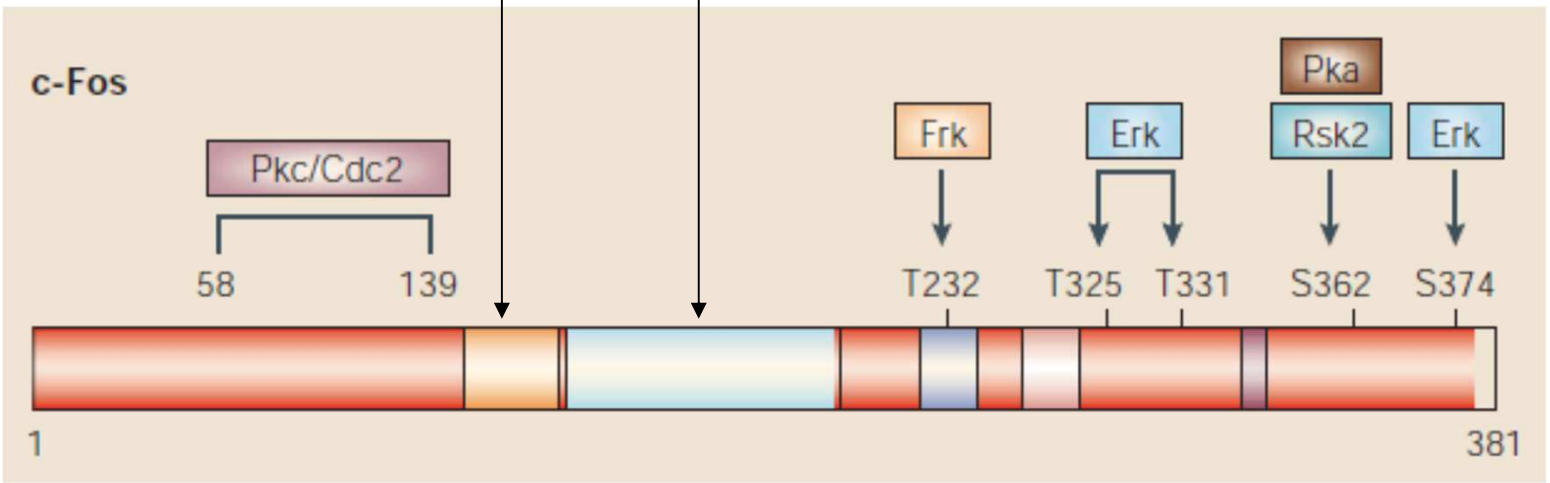
Luscombe et al, Genome Biology, 2000

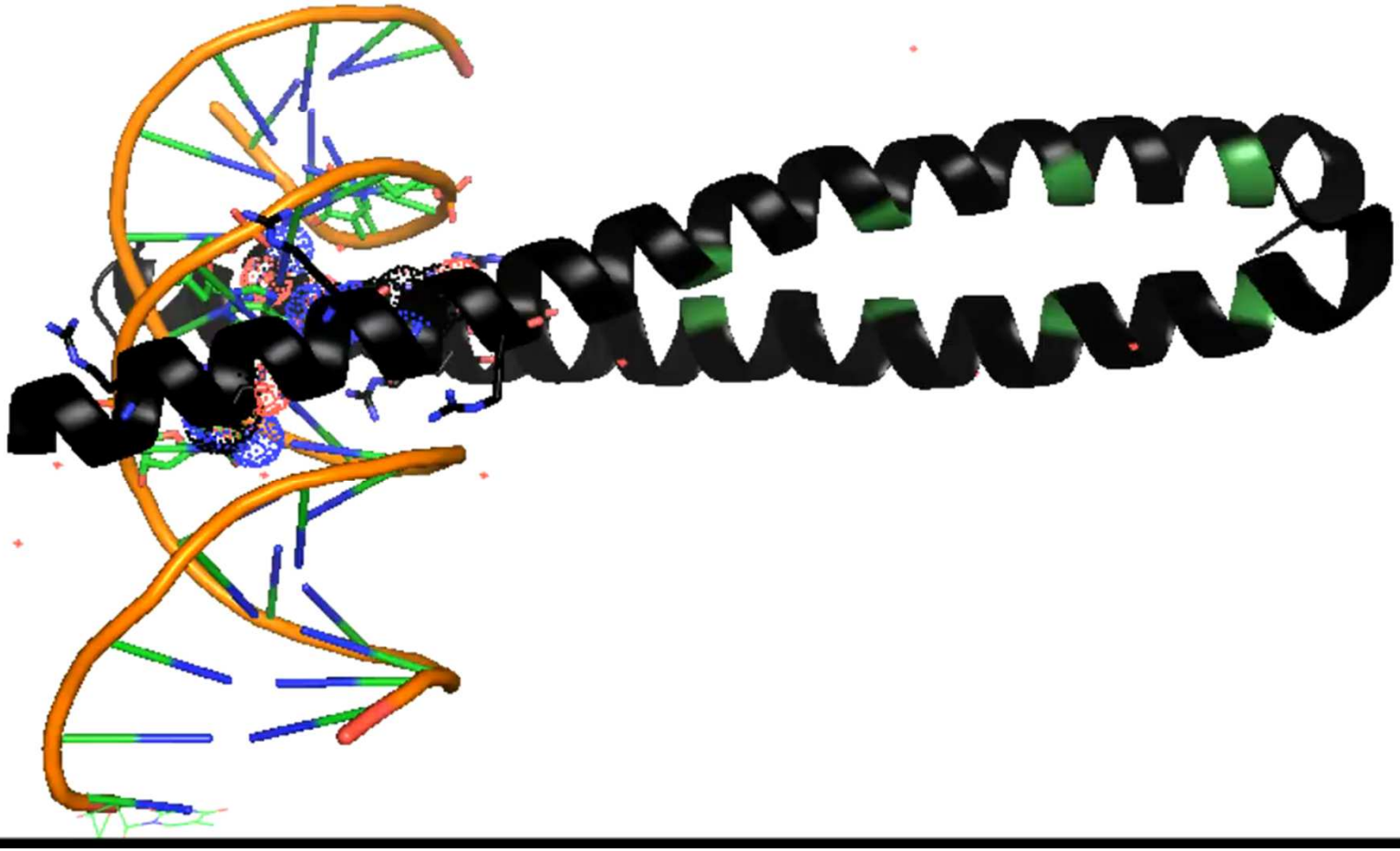
Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ** (dle způsobu dimerizace)
  - **Leucinový zip** (tzv. bZIP = basic)

  (transkr. fakt. yGCN4, c-Jun/c-Fos=AP-1)
    - 2 α-šroubovice
    - coiled-coil (>30AMK, Leu, C-term)
    - bazická část (N-terminus, navazuje na CC)
    - bazická šroubovice vázána do VŽ





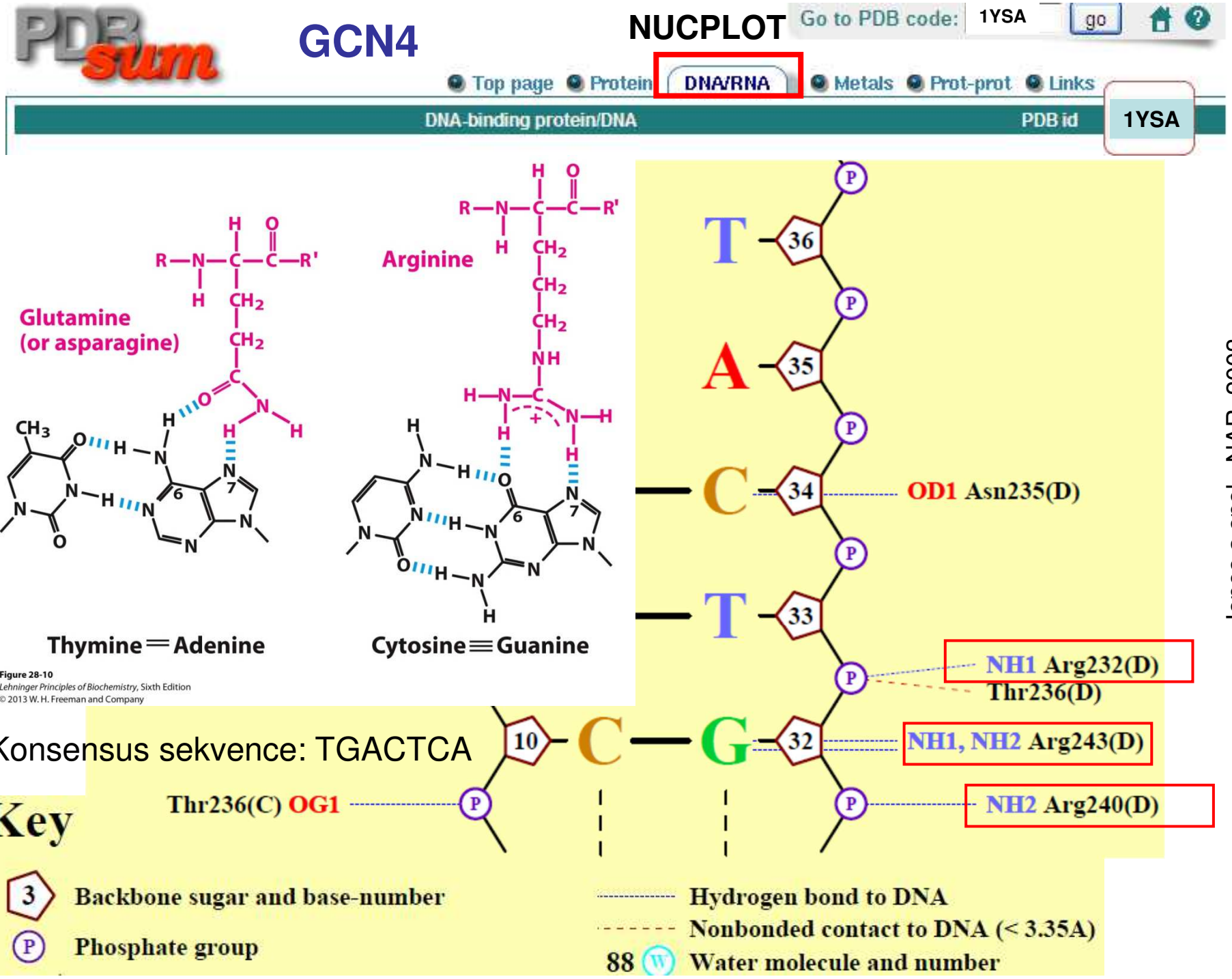


Interakce bazických AMK: Arg(232+240)=PO_4, Arg(243)=Gua
Konsensus sekvence: TGACTCA
GCN4 – regulace genů pro syntézu AMK

PDB: 1YSA

GCN4

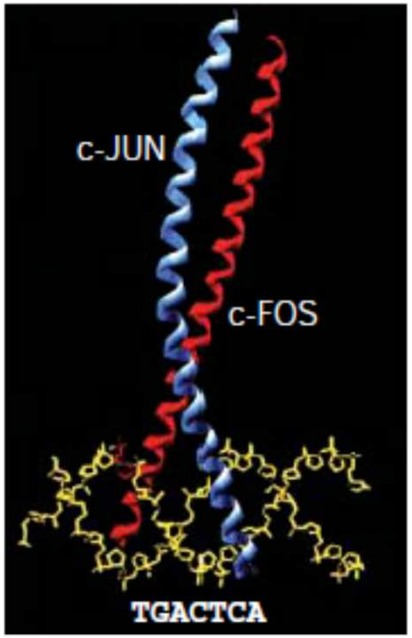
NUCPLOT



Konsensus sekvence: TGACTCA

Jones a spol., NAR, 2003

a



AP-1

b

TRE:	TGACTCA ACTGAGT
CRE:	TGACGTCA ACTGCAGT
MARE I:	TGCTGACTCAGCA ACGACTGAGTCGT
MARE II:	TGCTGACGTCAGCA ACGACTGCAGTCGT
ARE:	a/gTGACnnnGC t/cACTGnnnCG

(e.g. FasL, Int)

c

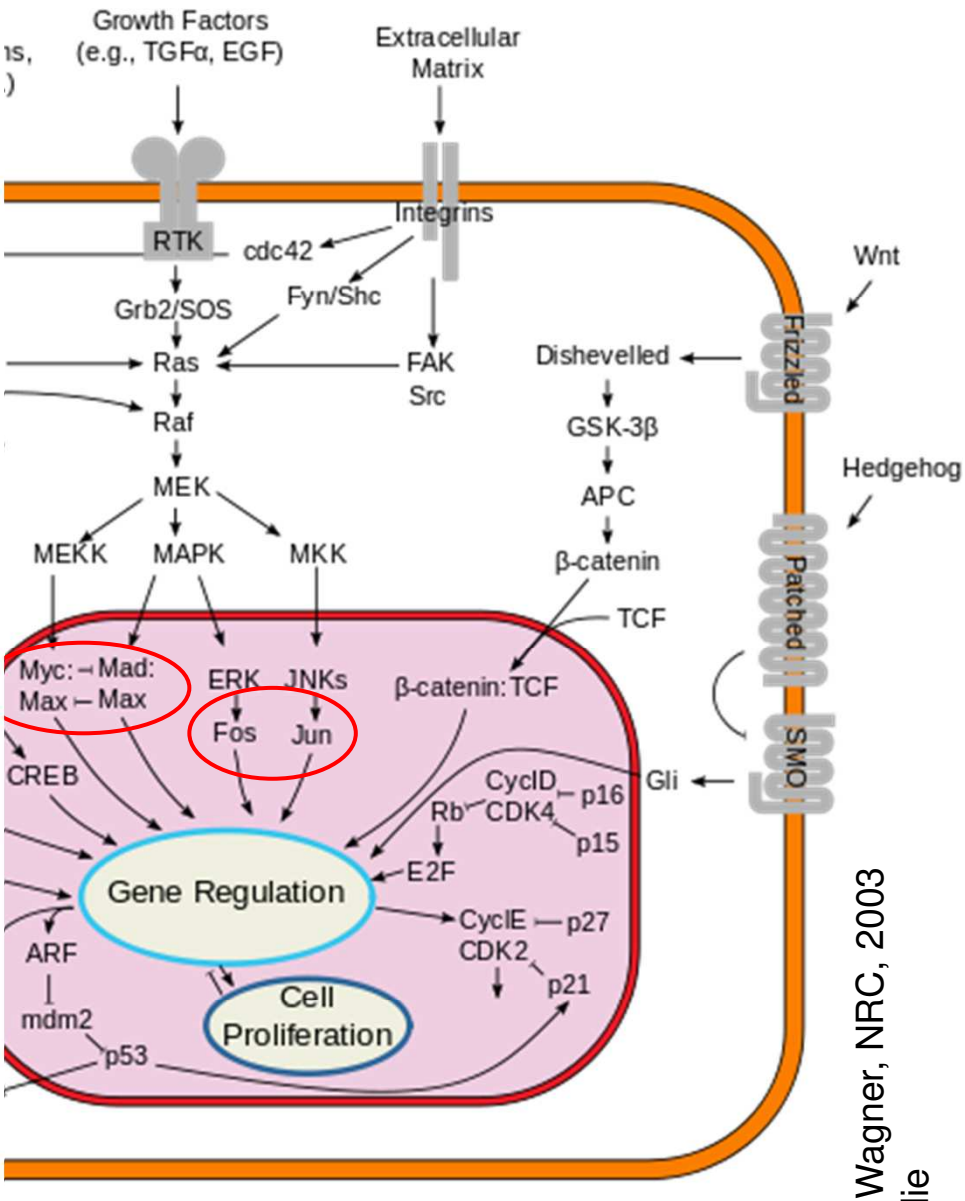
homo/hetero

c-JUN	
c-JUN	(TRE > CRE)
JUNB	(TRE > CRE)
JUND	(TRE > CRE)
FOSB	(TRE > CRE)
FRA1	(TRE > CRE)
FRA2	(TRE > CRE)
ATFa	(TRE = CRE)
ATF2	(CRE > TRE)
ATF3	(CRE > TRE)
ATF4	(CRE)
B-ATF	(TRE > CRE)
c-MAF	(MARE I/II)
MAFA	(MARE I/II)
NRL	(TRE-related)
MAFF/G/K	(MARE I/II)
NRF1	(ARE)
NRF2	(ARE)
NFIL-6	(TRE)

heterodimery

d

c-FOS	
c-JUN	(TRE > CRE)
JUNB	(TRE > CRE)
JUND	(TRE > CRE)
ATFa	(No binding)
ATF2	(CRE > TRE)
ATF4	(CRE)
c-MAF	(MARE I/II)
MAFA	(MARE I/II)
MAFB	(MARE I/II)
NRL	(TRE-related)
MAFF/G/K	(MARE I/II)
NRF2	(ARE)
NFIL6	(TRE)

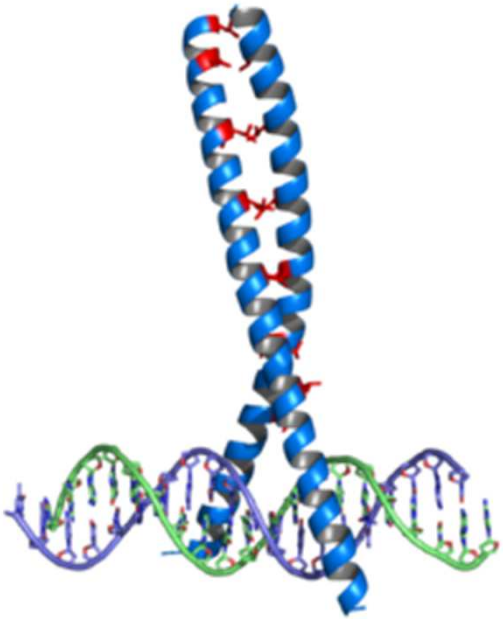


Efferl & Wagner, NRC, 2003
Wikipedie

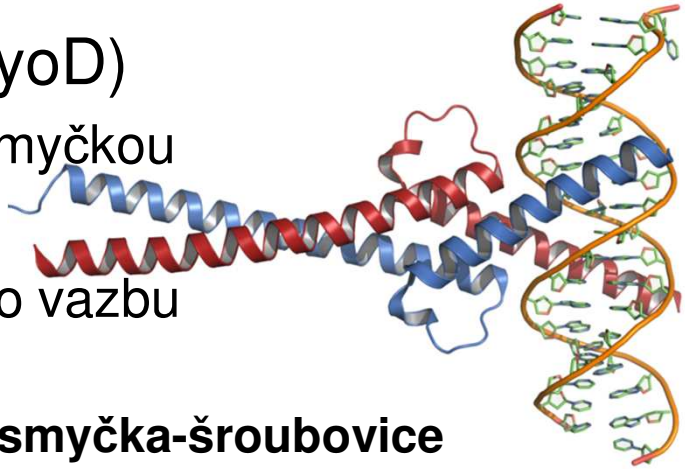
Kombinace – různá specifita/afinita

Motivy DNA-vazebných domén

- **Zipper typ** (dle způsobu dimerizace)
  - **Leucinový zip** (tzv. bZIP = basic – transcr. fact. yGCN4, c-Jun/c-Fos)
    - 2 α-helixy (2 x 60 AMK)
    - coiled-coil (30AMK, Leu, C-term)
    - basická část (N-terminus, navazuje na CC)
    - bazická šroubovice vázána do VŽ



  - **Helix-loop-helix** (c-Myc/Max, MyoD)
    - CC a bazické části jsou odděleny smyčkou
    - bazická šroubovice vázána do VŽ
    - smyčka poskytuje větší flexibilitu pro vazbu

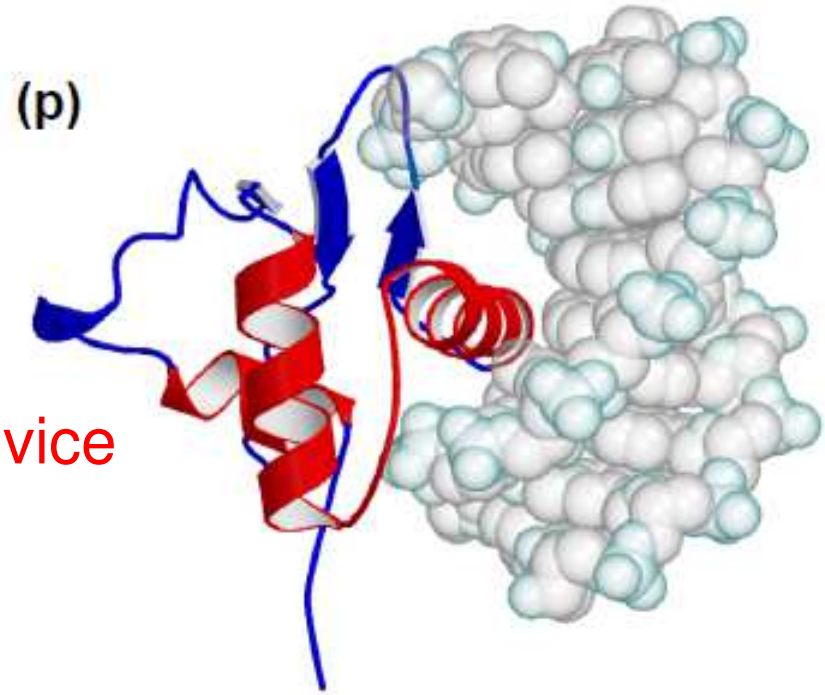


šroubovice-smyčka-šroubovice

Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ**
  - Leucinový zip
  - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
  - HTH
  - Winged helix
  - TALE
- **Zinkový prst**
  - ββα zinc-finger
  - Hormon-receptor
  - Loop-sheet-helix
  - Gal4

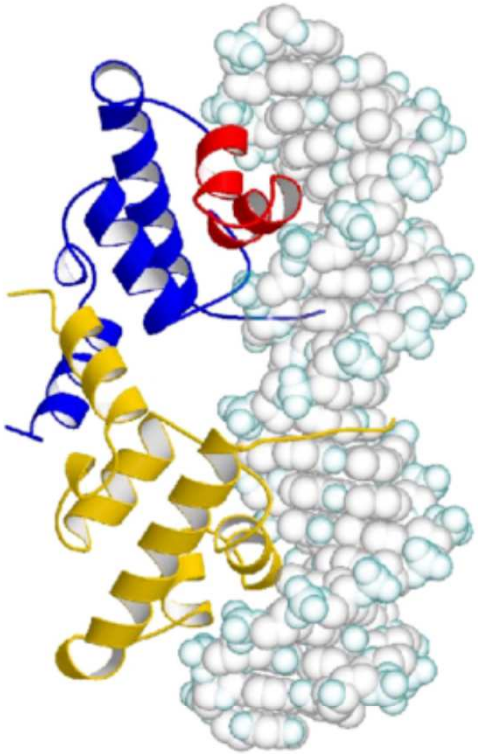
α-šroubovice



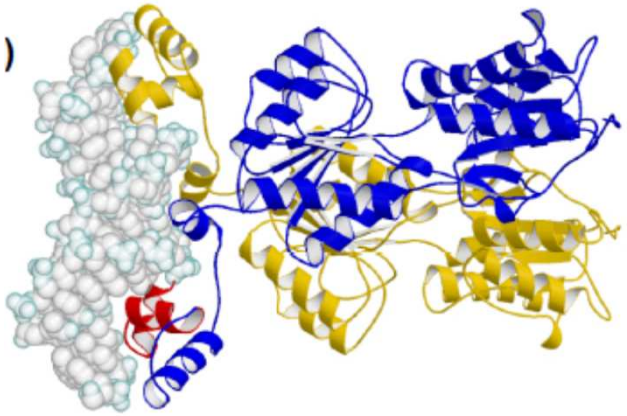
16. Ets domain (1bc8)

Helix-turn-helix motiv (HTH)

- Obsahuje vzájemně kolmé šroubovice
  - α-helix pro vazbu na DNA („recognition“) - β-obrátka – druhá šroubovice
  - Sekvenčně-specifická vazba prostřednictvím „recognition“ šroubovice a velkého žlábku
  - nejčastější motiv u prokaryot - homodimery vážou palindromatické sekvence
  - HTH motiv se obvykle vyskytuje ve svazku 3-6 šroubovic (stabilizovaných hydrofobním jádrem)
  - motiv může být buď součástí hlavního proteinu (Cro) nebo z něj může pouze vybíhat (LacI)

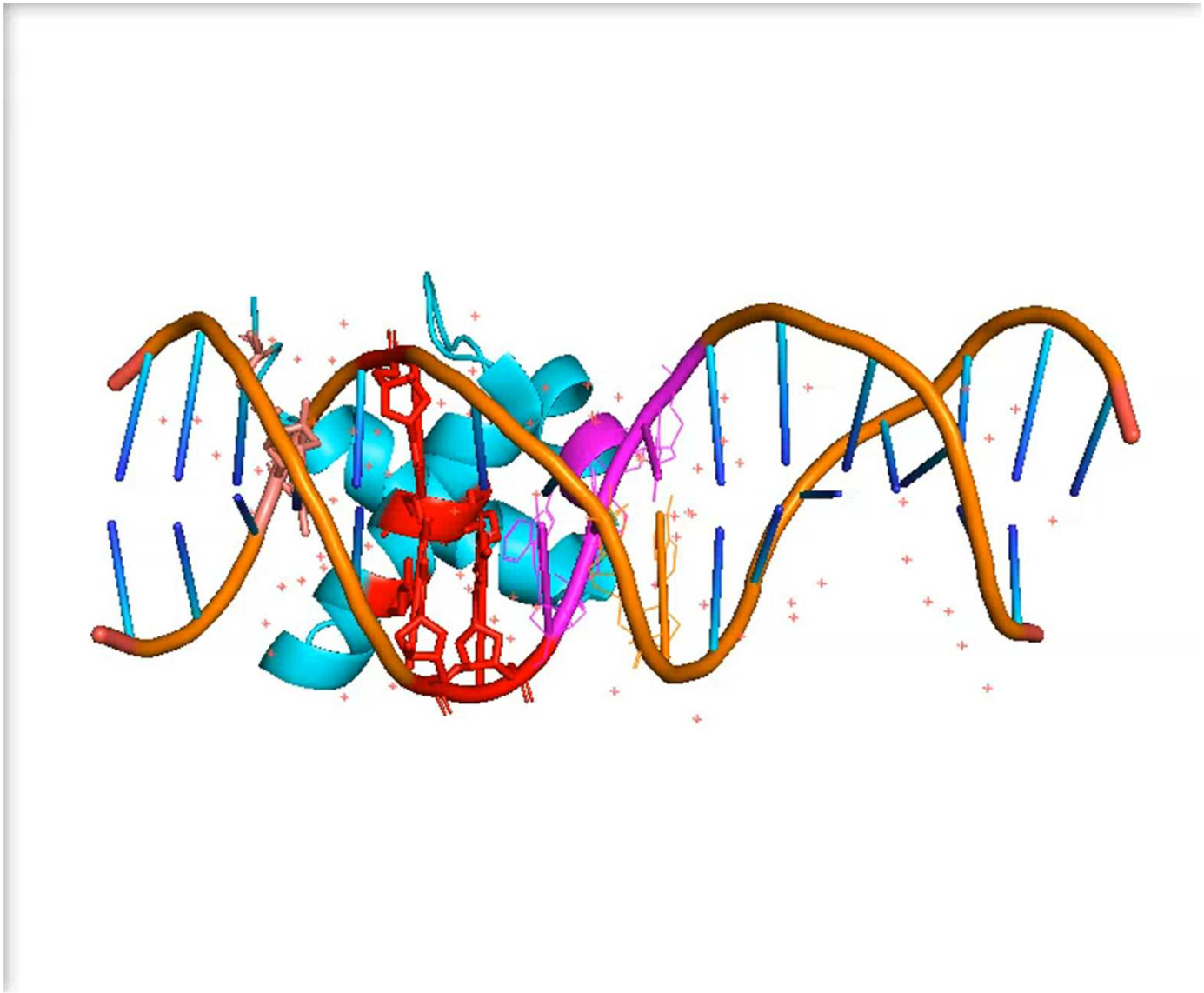


1. Cro and Repressor (1lmb)



Luscombe et al, Genome Biology, 2000

3. LacI repressor (1wet)

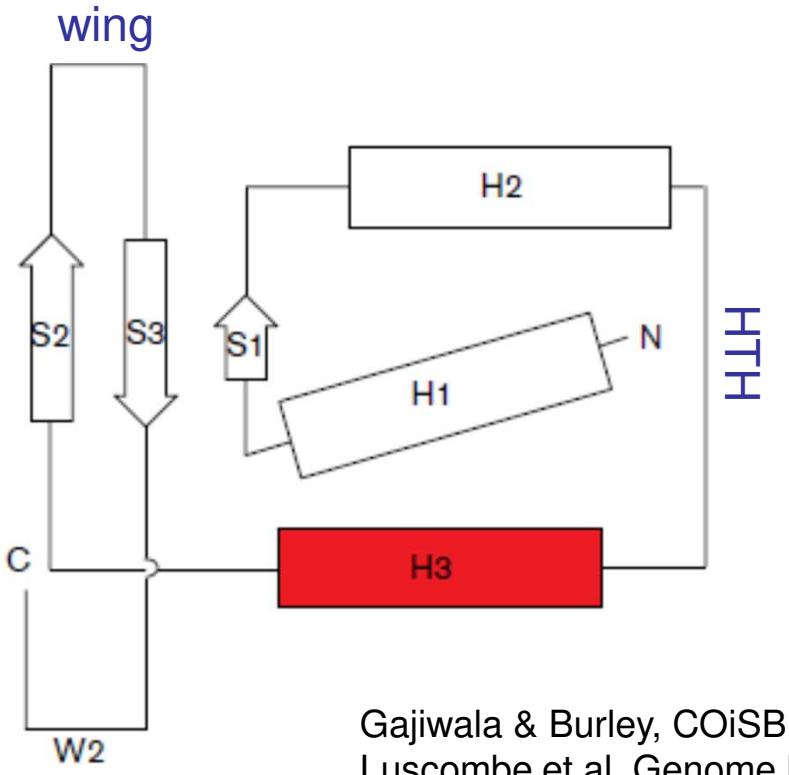


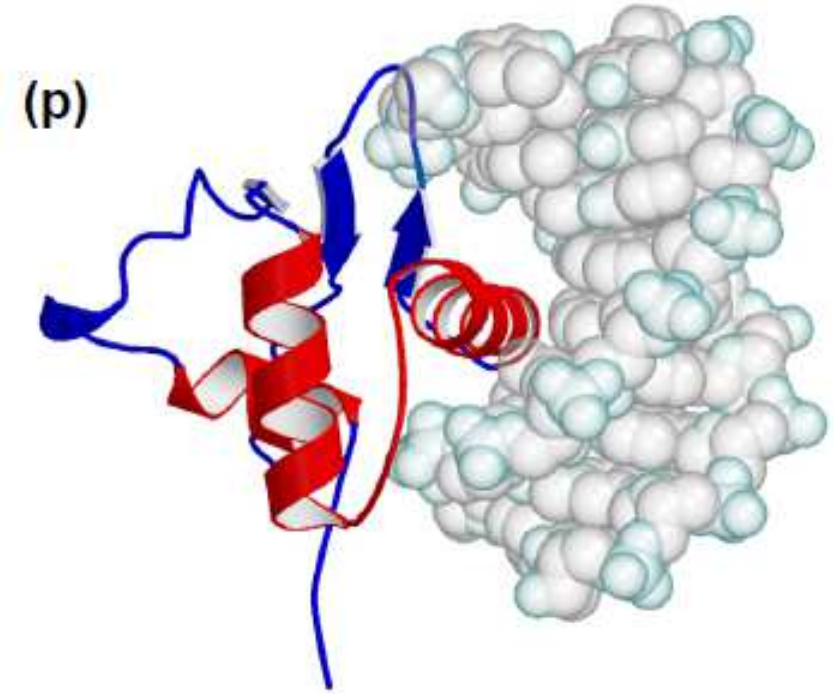
AMK motiv: **KD**RW**R**
DNA sekvence: TTA**GG**G (komplementární: C**C**CTAA)
TRF2 (myb) doména – vazba na telomery (Shelterin komplex)

PDB: 1W0U

„Winged“ helix (okřídlená šroubovice)

- „winged“ HTH obsahuje „recognition“ šroubovici **(H3)** a β-listy, které poskytují další kontakty s DNA (smíšený α/β typ)



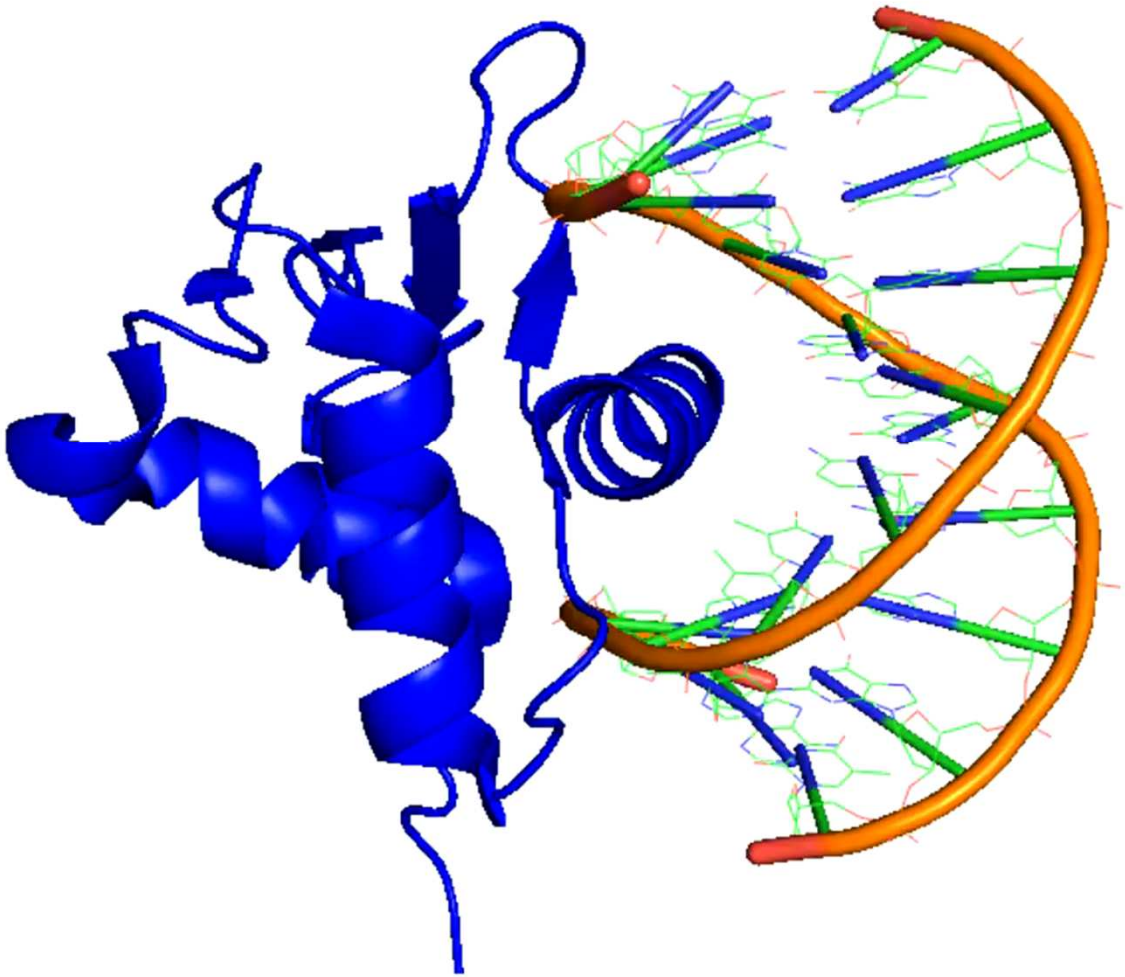


16. Ets domain (1bc8)

Gajiwala & Burley, COiSB, 2000
Luscombe et al, Genome Biology, 2000

Méně často křídlo ve VŽ a cukr-fosfátová kostra se šroubovicí (hRFX1)

Interakce bazí se šroubovicí (H3) a křídla s cukr-fosfátovou kostrou

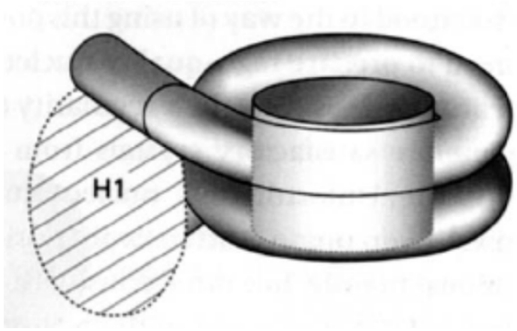


PDB: 1BC8, SAP-1

Méně často křídlo ve VŽ a cukr-fosfátová kostra se šroubovicí (hRFX1)

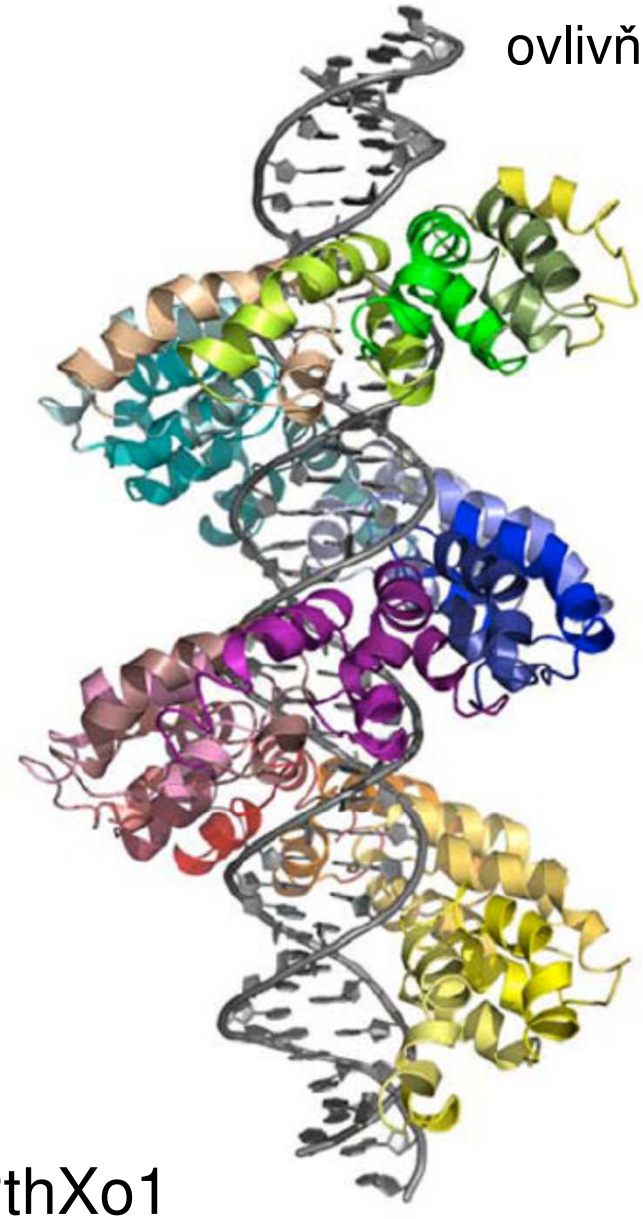
PDB: 5NL0

Histon H1/H5 interaguje s DNA vybíhající z nukleosomů (kompaktnější struktura) – WH doména může vytvářet více kontaktů (intergaují: H2, H3 i křídlo s 3 DNA řetězci)

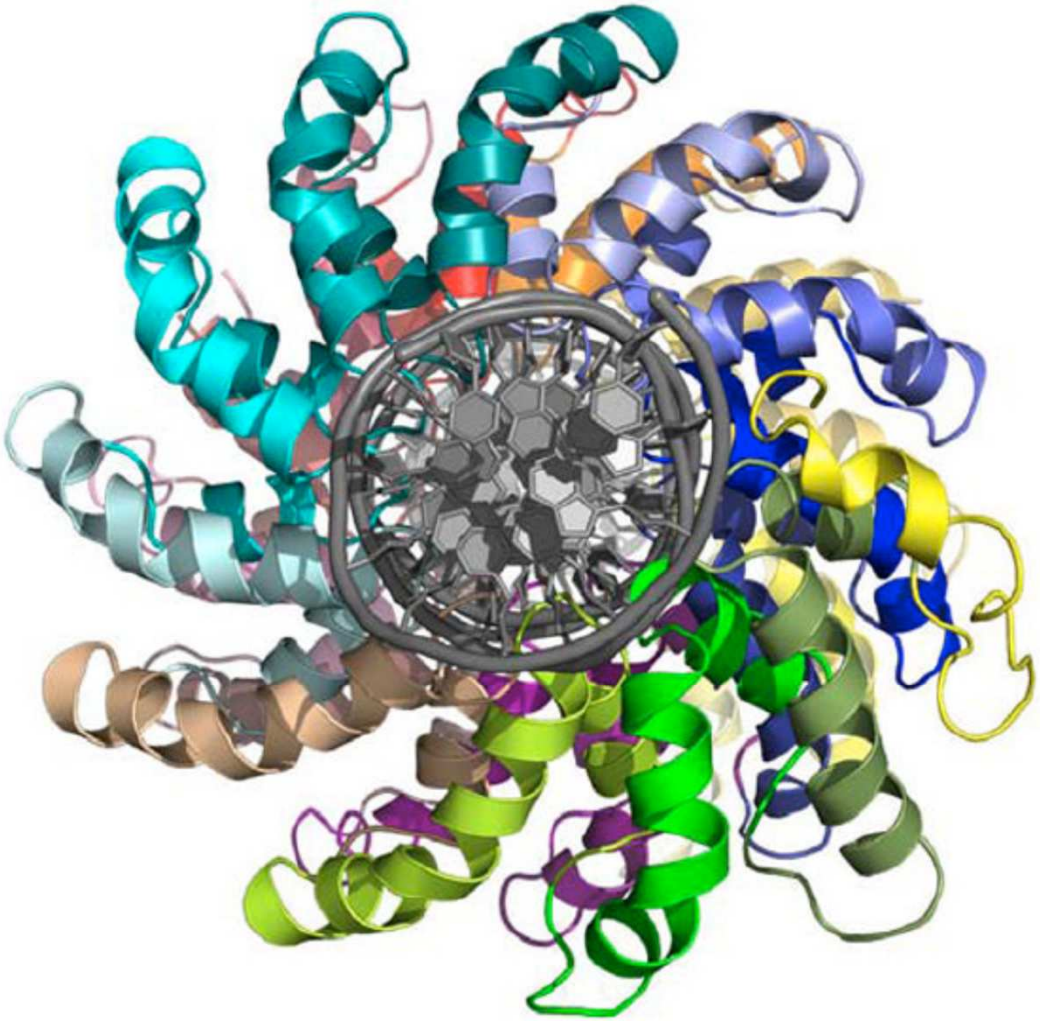


Transcription activator-like effectors (TALE)

Patogenní bakterie injikují do rostlinných buněk
ovlivňují transkripci hostitelských rostlinných promotorů

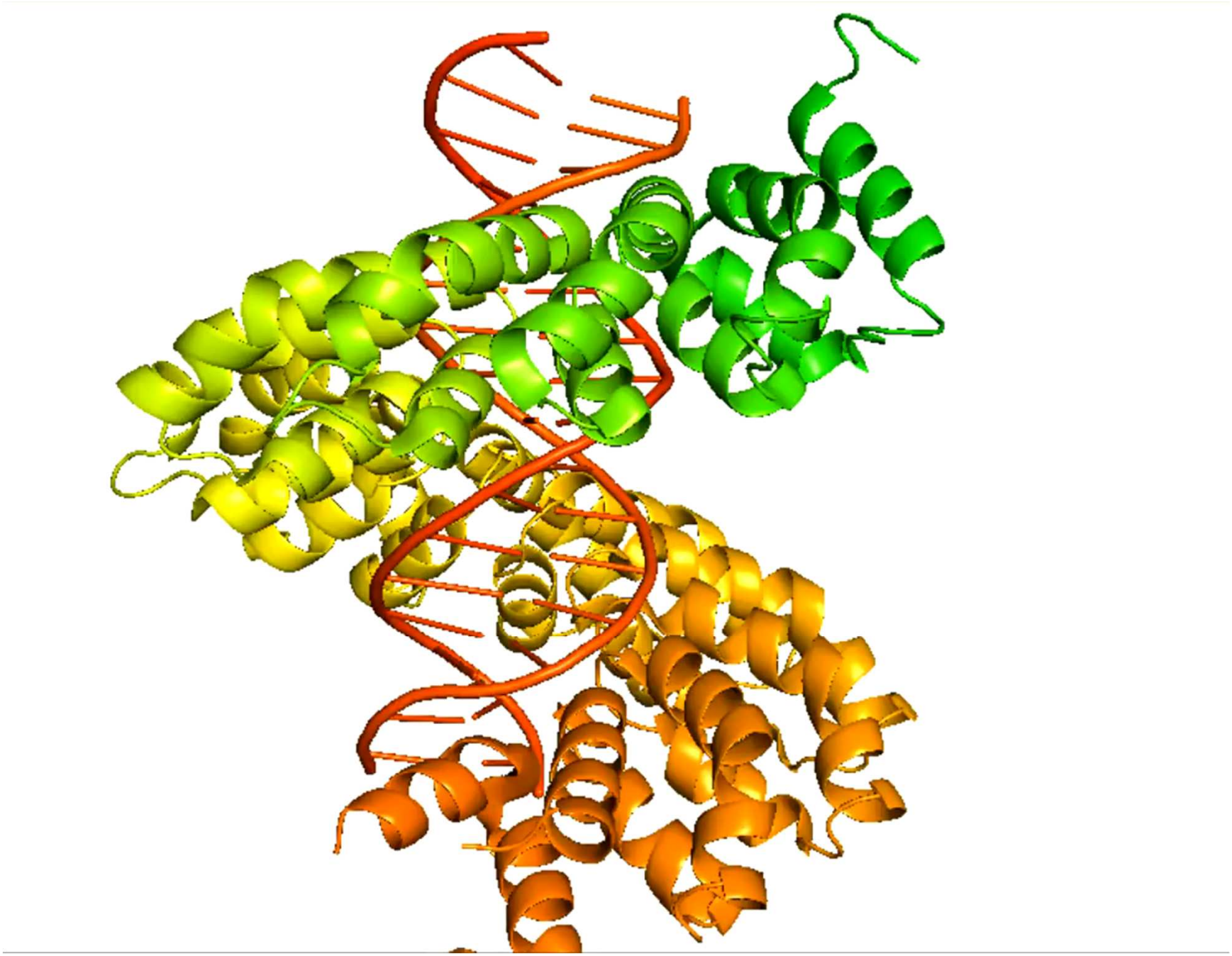


PthXo1
23 repetic obtáčí DNA ve VŽ

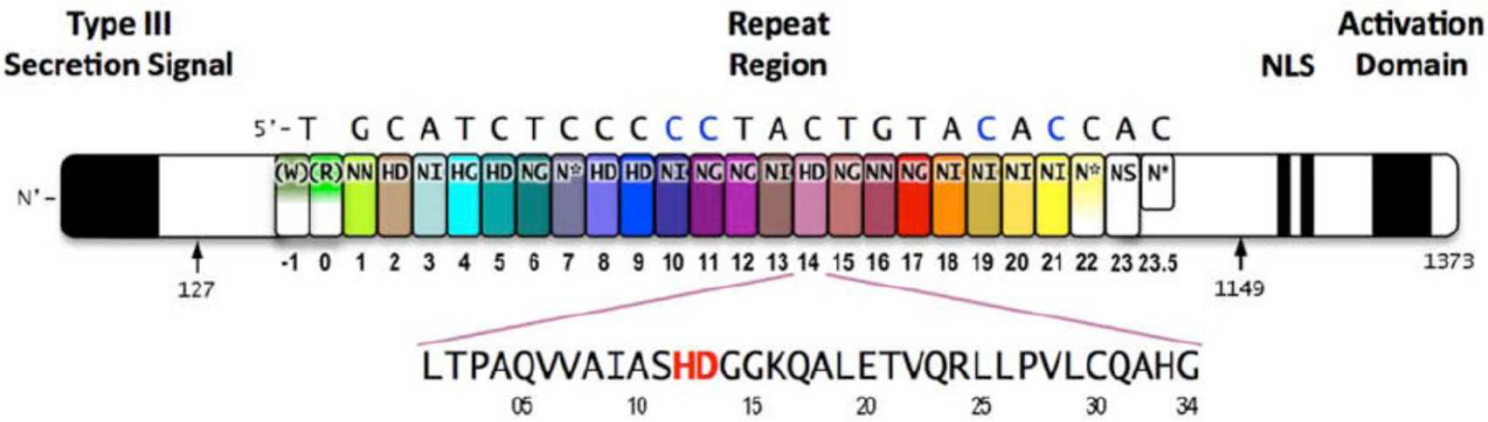


TALEN technologie

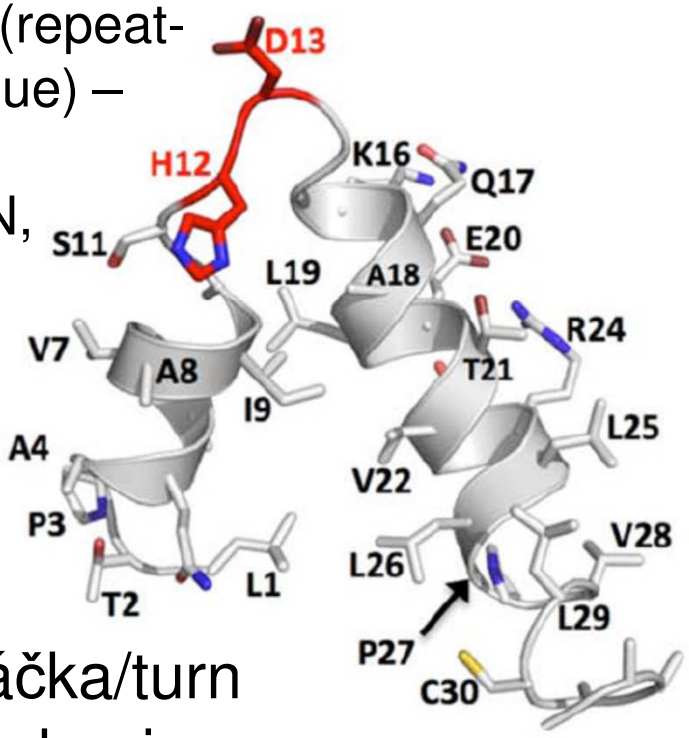
Mak et al, Science, 2012

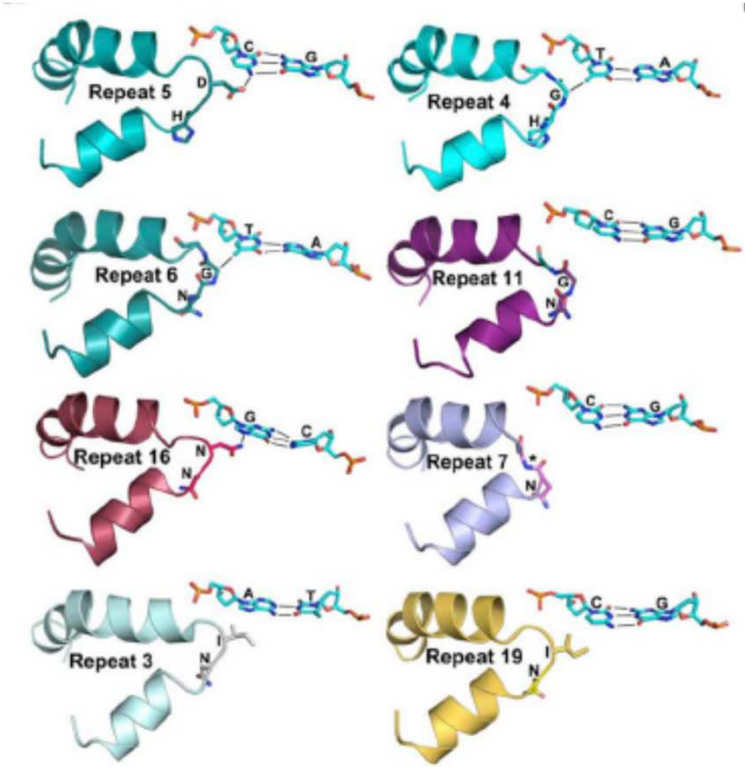


Interaguje otáčka/turn spíše než šroubovice, PDB: 3V6T



Tandemové repetice (34)
AMK v pozicích 12 a 13 určují specifitu (repeat-variable diresidue) – hlavní:
HD, NG, NI, NN, NS, HG





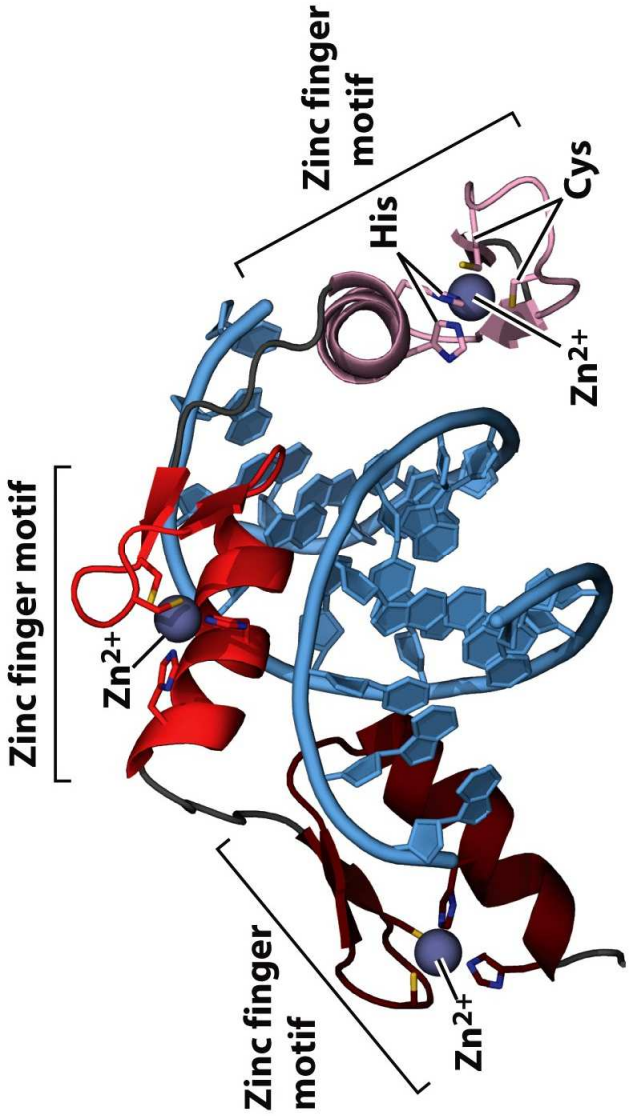
Interaguje otáčka/turn spíše než šroubovice

Mak et al, Science, 2012

Motivy DNA-vazebných domén

- **Zipper typ**
  - Leucinový zip
  - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
  - HTH
  - Winged helix
  - TALE
- **Zinkový motiv**
  - ββα zinc-finger
  - Hormon-receptor
  - Loop-sheet-helix
  - Gal4

α-šroubovice

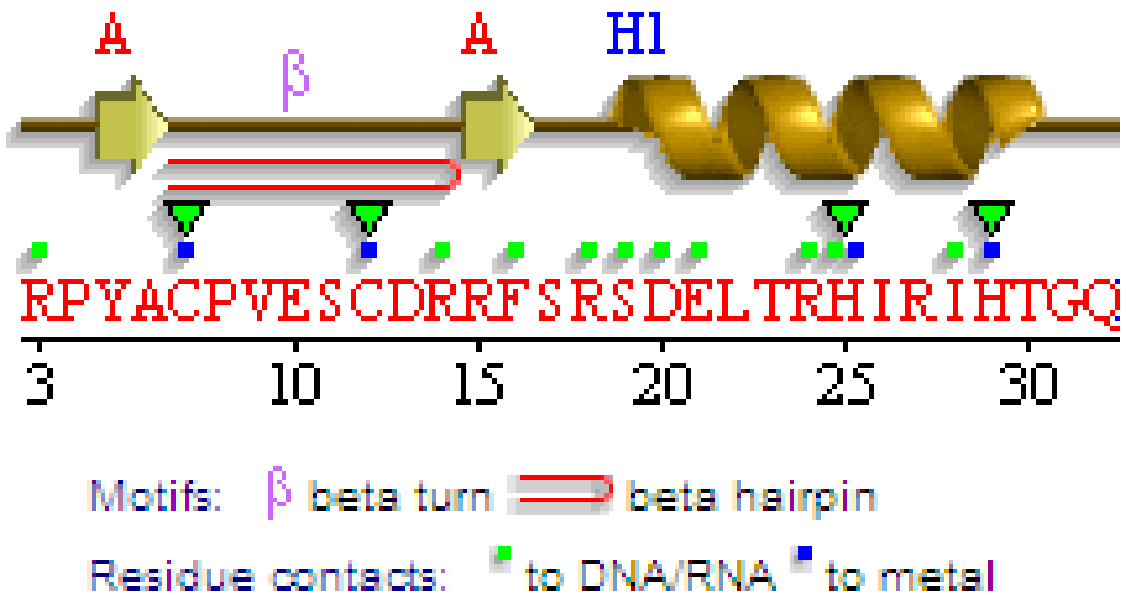


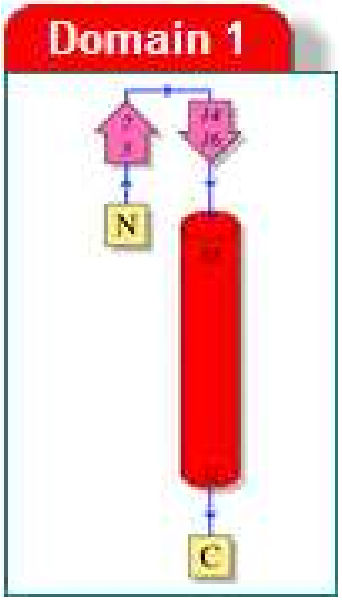
Zinc-finger/Zinkový prst

- cca 30 AMK ve dvou krátkých antiparalelních β-listech a α-šroubovici
- smyčka („hairpin“) stabilizovaná („crosslinked“) Zn^{2+} - **koordinovaný** 4xCys nebo 2xCys + 2xHis (tetraedrická struktura)

C2H2 motiv:

Cys-X_{2-4}-Cys-X_3-Phe-X_5-Leu-X_2-His-X_3-His



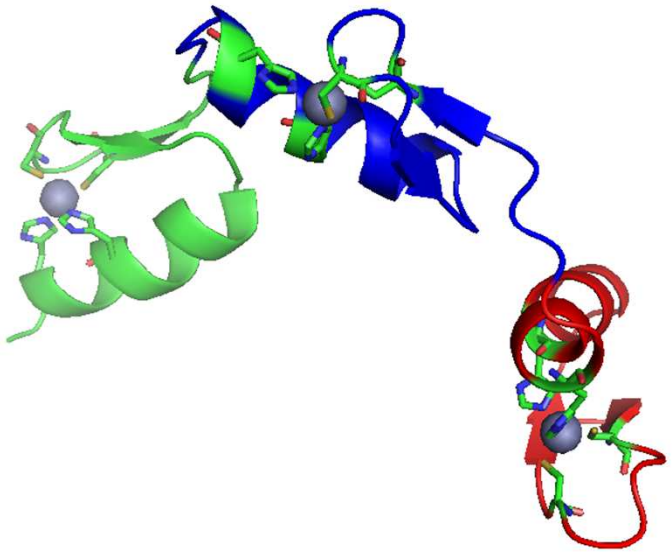


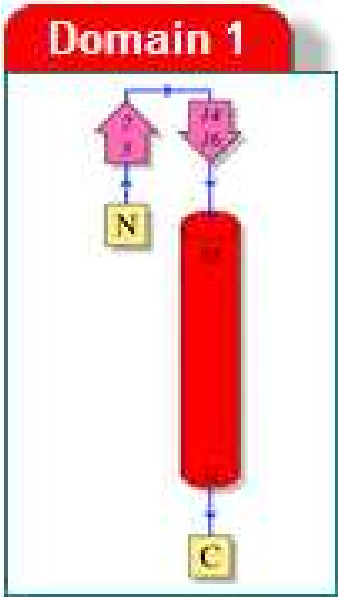
Zinc-finger/Zinkový prst

- cca 30 AMK ve dvou krátkých antiparalelních β-listech a α-šroubovici
- smyčka („hairpin“) stabilizovaná („crosslinked“) Zn^{2+} - **koordinovaný** 4xCys nebo 2xCys + 2xHis (tetraedrická struktura)

C2H2 motiv:

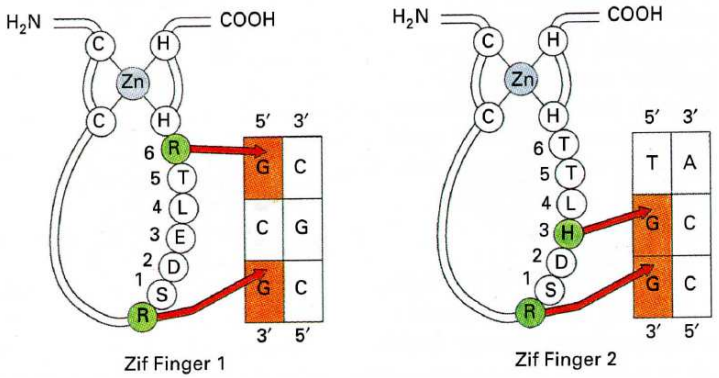
Cys-X_{2-4}-Cys-X_3-Phe-X_5-Leu-X_2-His-X_3-His

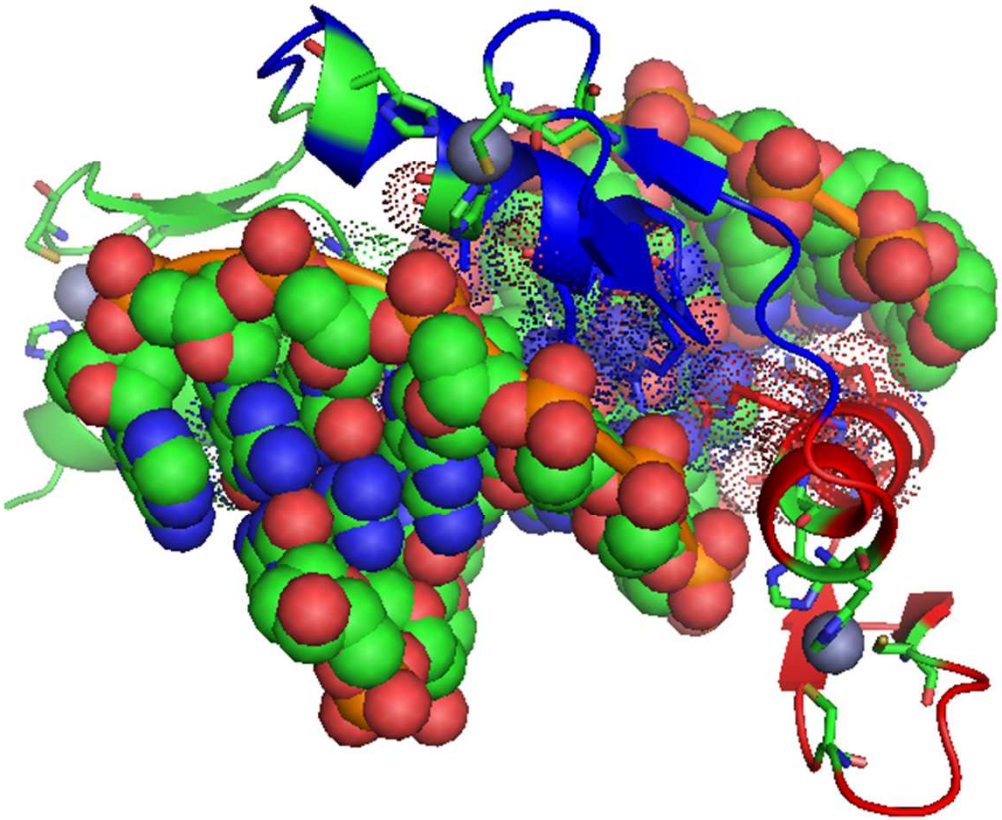




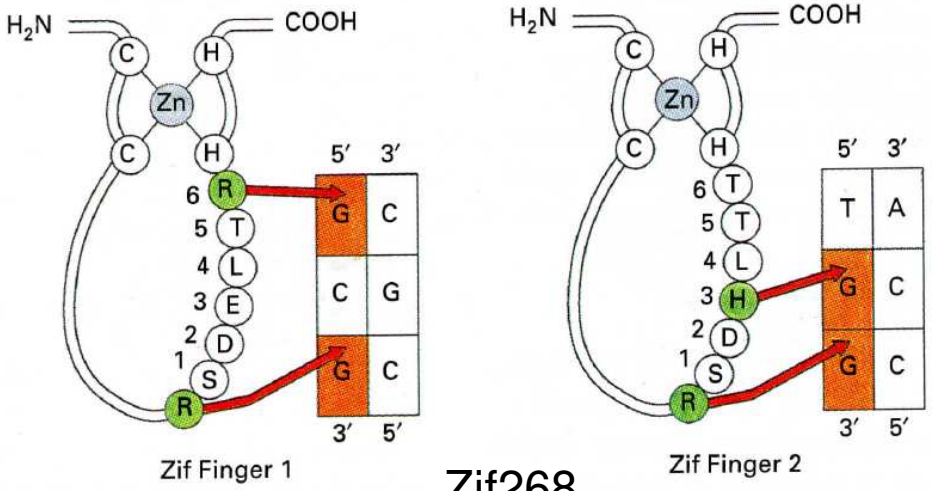
- 3x v Zif268, PDB=1zaa
- α-šroubovice se váže do VŽ
- v tandemu obtáčí VŽ
- AMK na pozici 0 – 6; variancemi AMK

=> sekvenční specifita



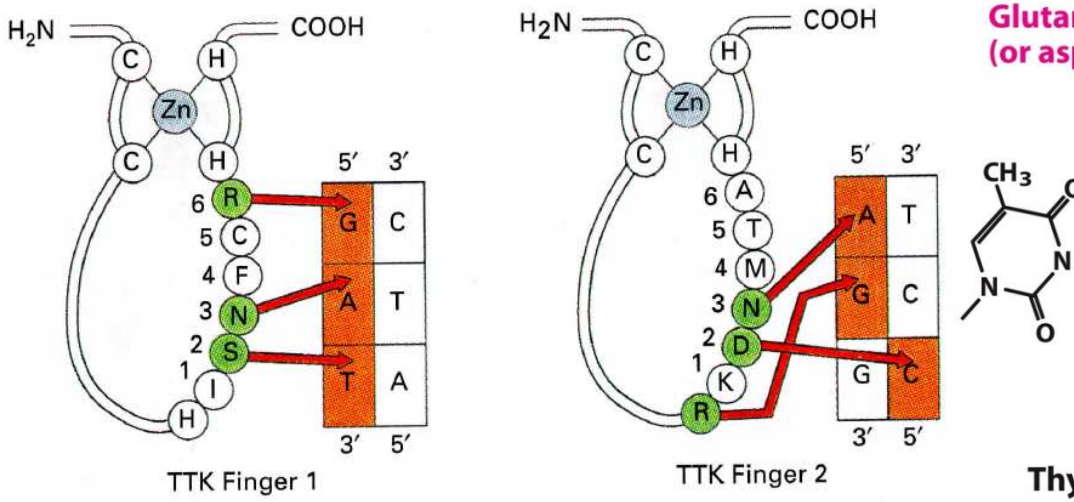


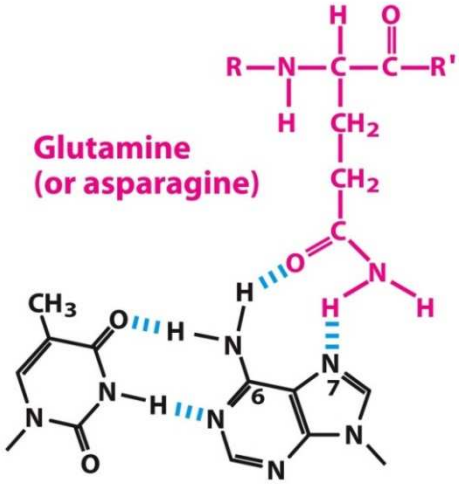
- AMK na pozici 0 – 6; variancemi AMK v těchto pozicích lze dosáhnout různé sekvenční specifity
– α-šroubovice váže 2, **3** nebo 4 sousední páry bazí

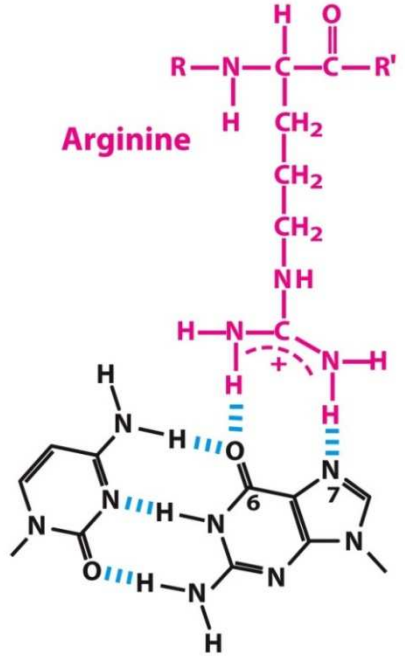


Zif268

- nejčastější jsou kontakty Gua-Arg
- Gua se může vázat i na His, Lys, Ser
- Ser se může vázat na T či A







Thymine = Adenine

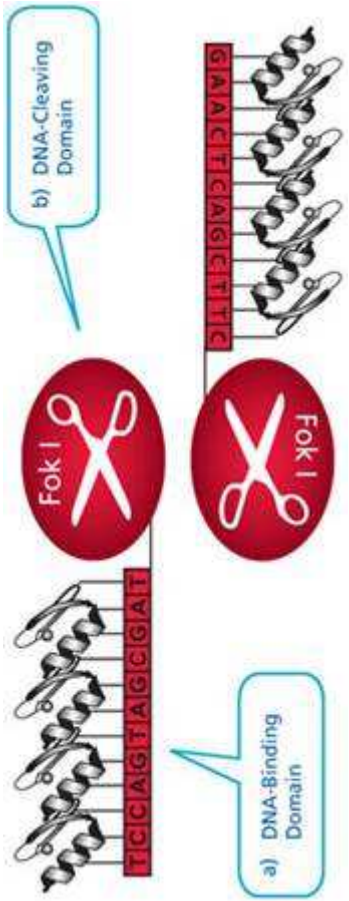
Cytosine ≡ Guanine

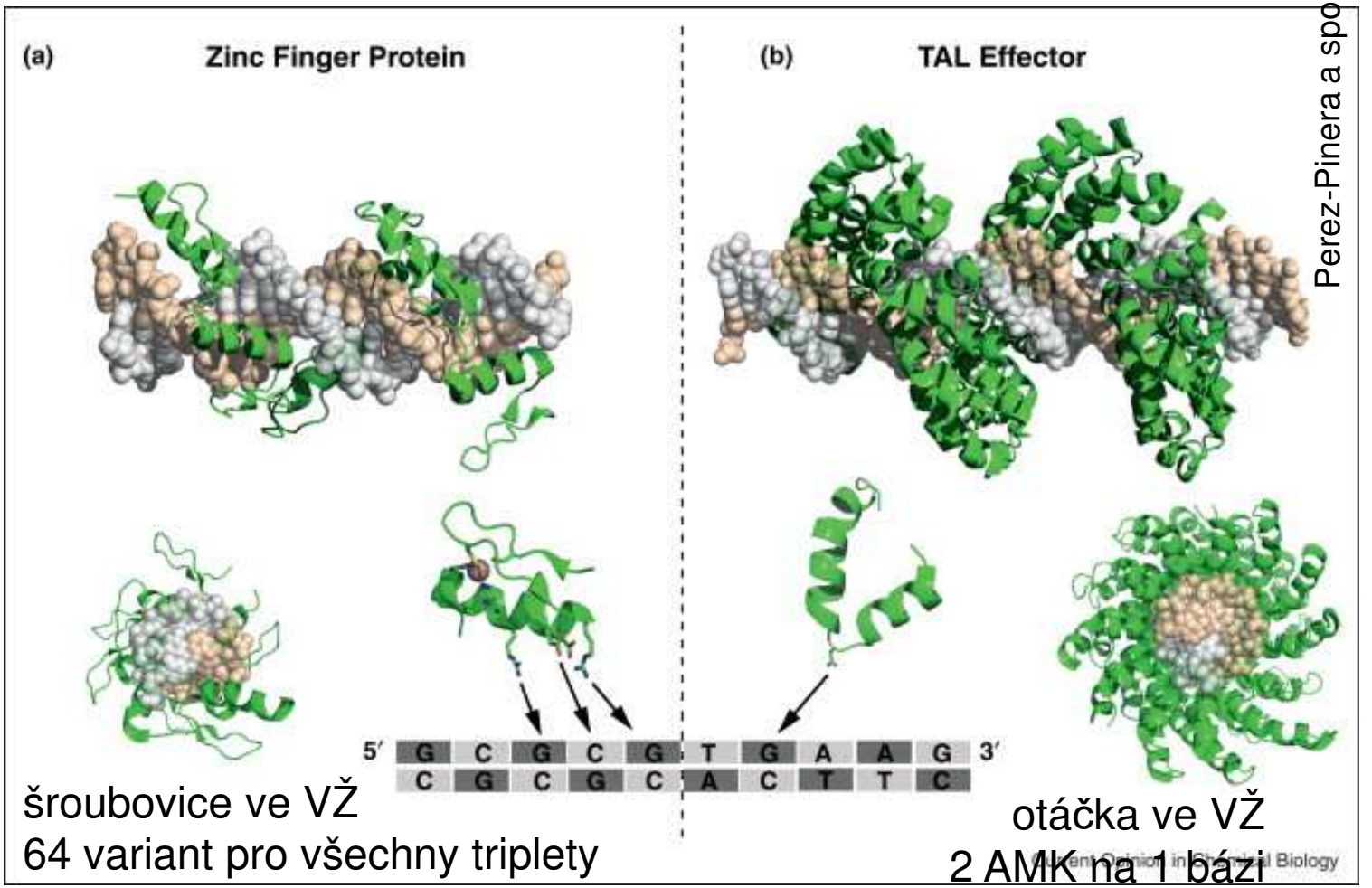
- Dobře charakterizované DNA-proteinové kontakty –je známá specifita ZFs pro všech 64 možných kombinací 3 sousedních bp
- Lze pro specifickou sekvenci DNA poskládat ZFs – nová technologie „zinc nuclease“ pro genové manipulace

- Dobře charakterizované DNA-proteinové kontakty –je známá specifita ZFs pro všech 64 možných kombinací 3 sousedních bp
- Lze pro specifickou sekvenci DNA poskládat ZFs – nová technologie „zinc nuclease“ pro genové manipulace

„genome editing“

Transcription **a**ctivator-**l**ike



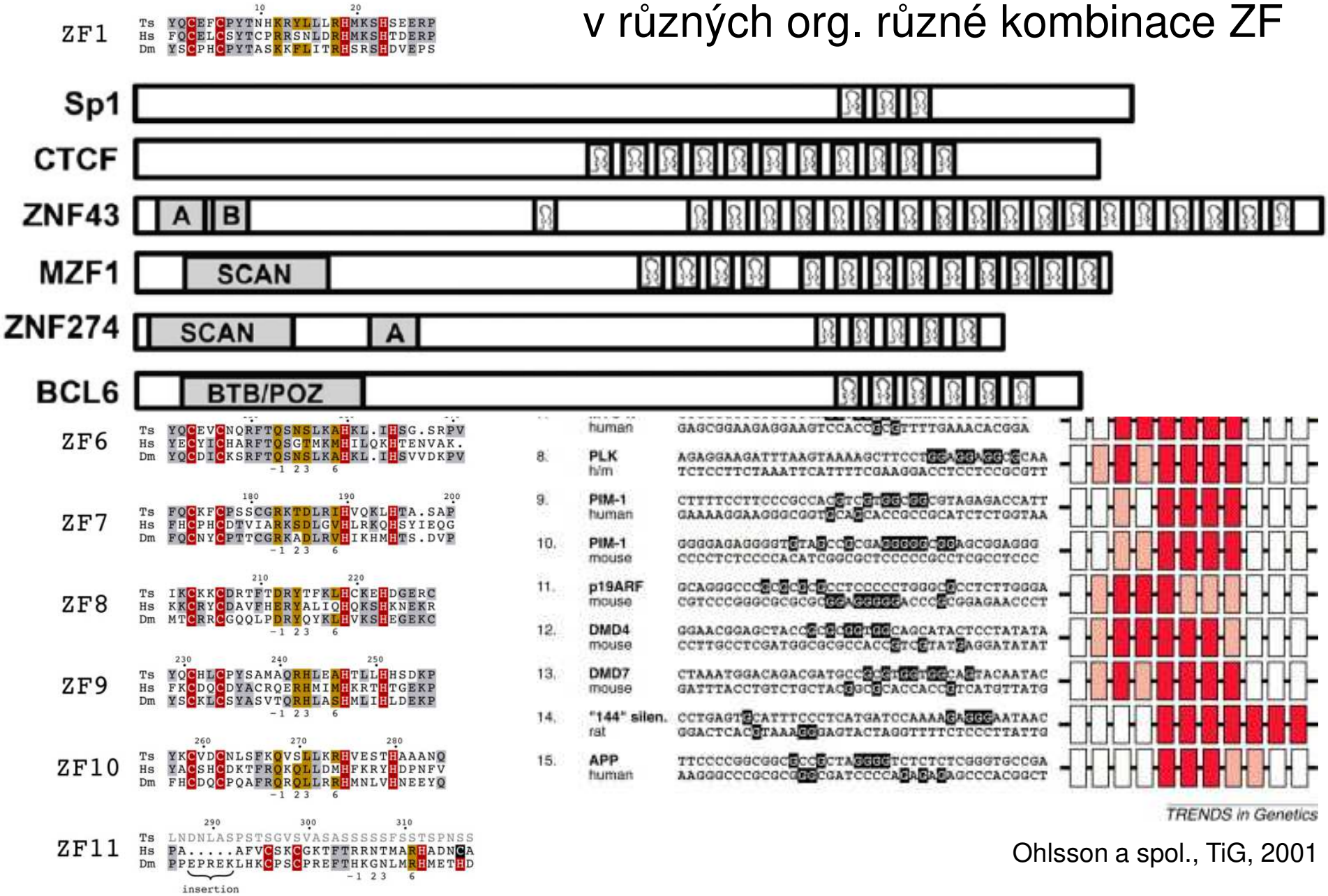


šroubovice ve VŽ
64 variant pro všechny triplety

otáčka ve VŽ
2 AMK na 1 bázi

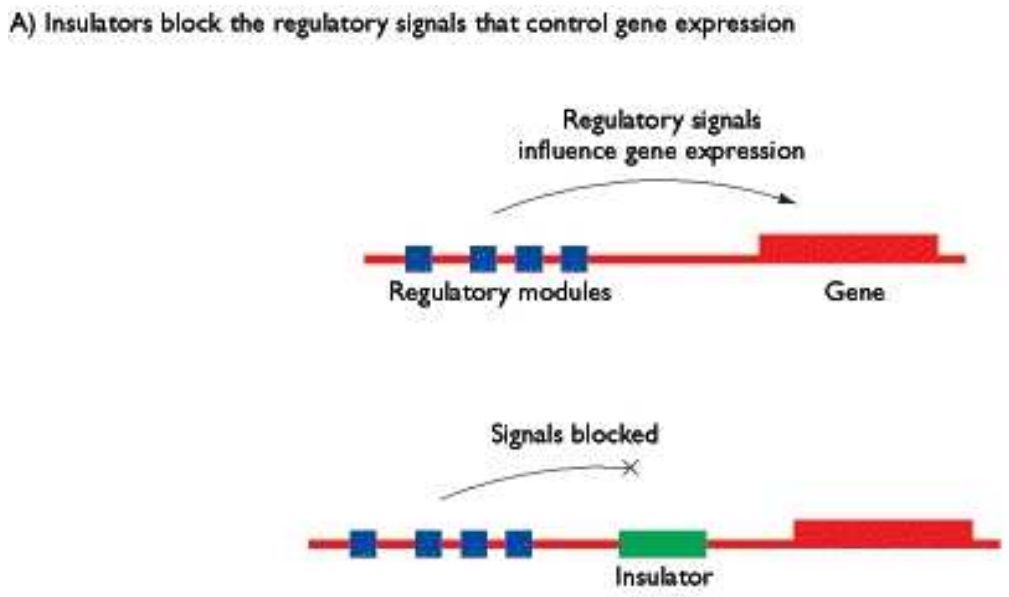
Perez-Pinera a spol., COiCB, 2012

- CTCF obsahuje 11 zinkových prstů – k vazbě na DNA používá v různých org. různé kombinace ZF



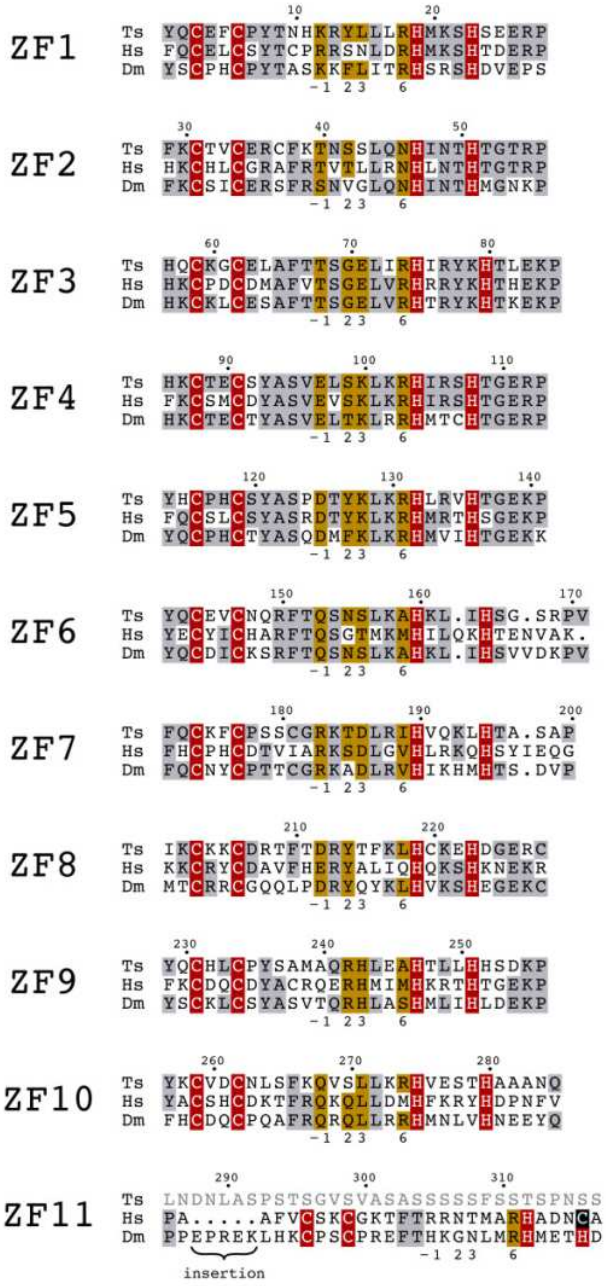
Ohlsson a spol., TiG, 2001

CTCF

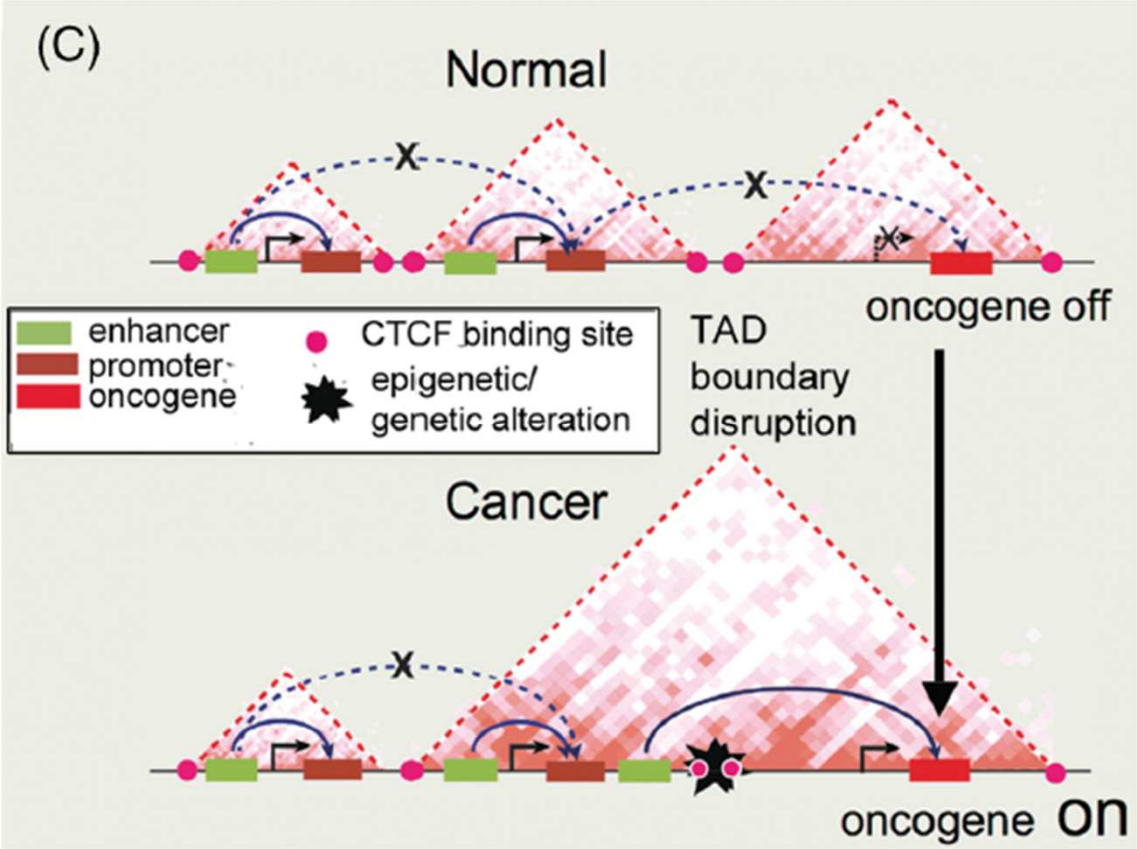


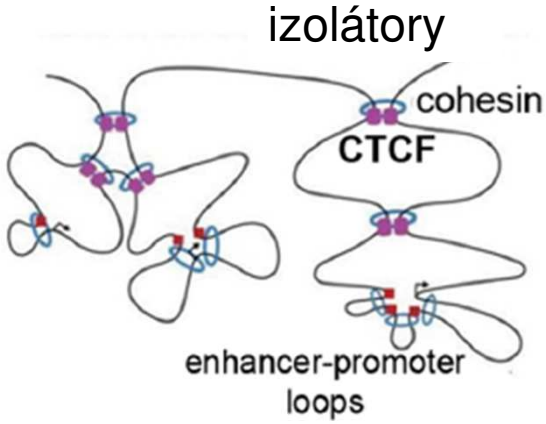
- CTCF (zkratka z CCCTC factor)
- izolátor/insulator brání transkripci …

Braccioli a spol., Ess in Bioch, 2019



CTCF





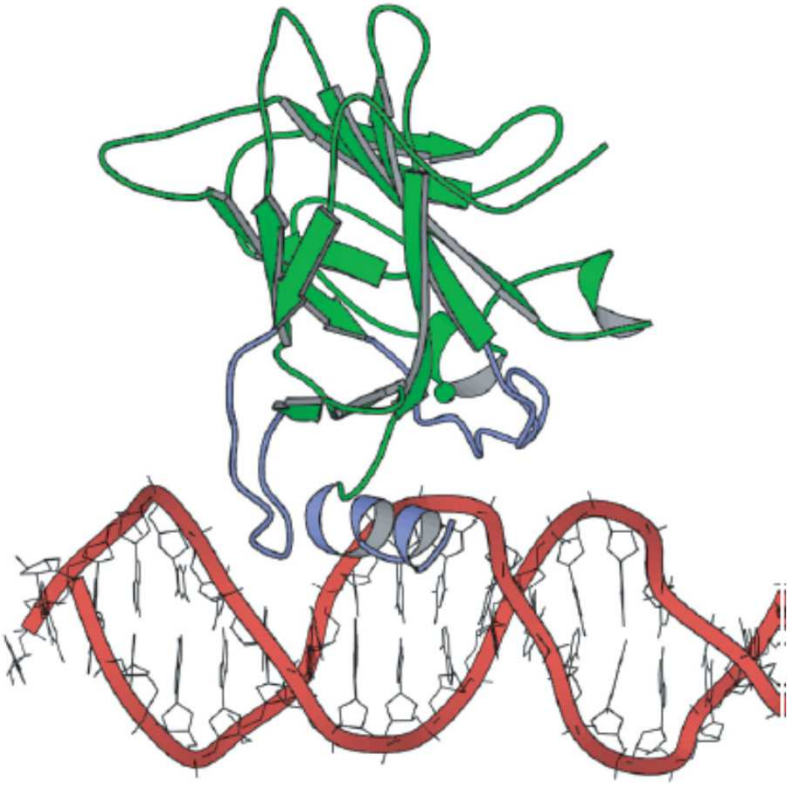
- CTCF interaguje s kohesinem a vytváří TAD (topologicky asociované domény)
- sousední domény jsou „ nezávislé“ (izolované)

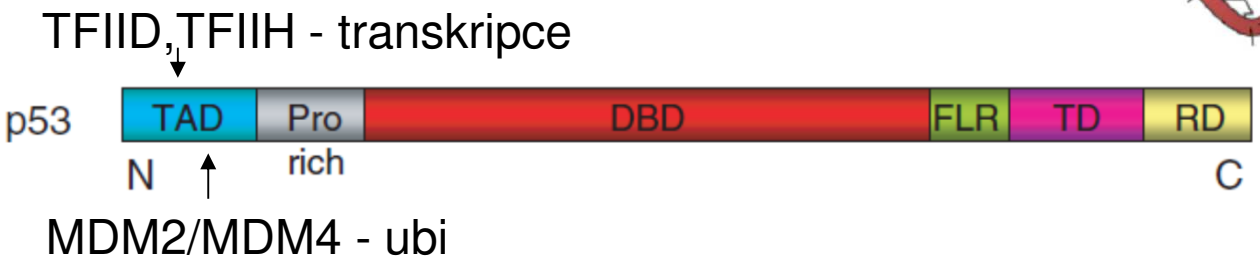
Cremer a Cremer, GCC, 2019

Loop-sheet-helix

- core/DNA-vazebná doména p53 – transkripční faktor důležitý pro regulaci buněčného cyklu, apoptozy a opravy poškozené DNA (nádorový supresor)

  - smyčky vycházející mimo hlavní core doménu – vyčnívá β-list a α-šroubovice
  - 3 Cys a 1His koordinují Zn
  - helix ve velkém žlábku a smyčka v malém žlábku
  - Aktivace transkripce skrze kyselou TA doménu



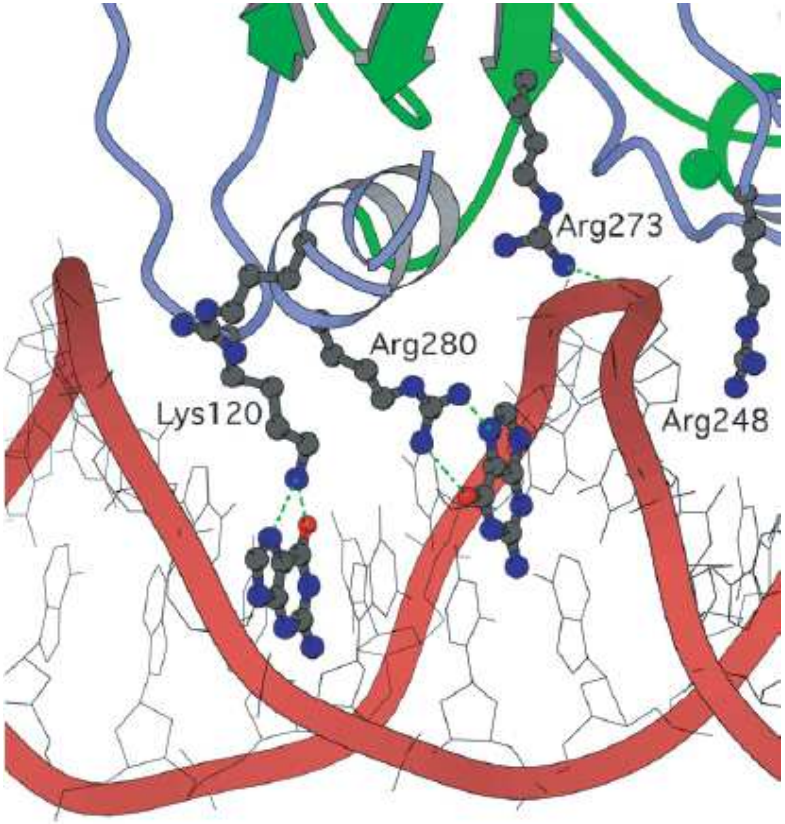


Loop-sheet-helix

- core/DNA-vazebná doména p53 – transkripční faktor důležitý pro regulaci buněčného cyklu, apoptozy a opravy poškozené DNA (nádorový supresor)

  - Konsensus sekvence PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy (v promotorech p21, PUMA)
  - 95% “nádorových” mutací je v „core“ doméně (R273H)
  - Regulace/aktivace modifkací C-koncové domény

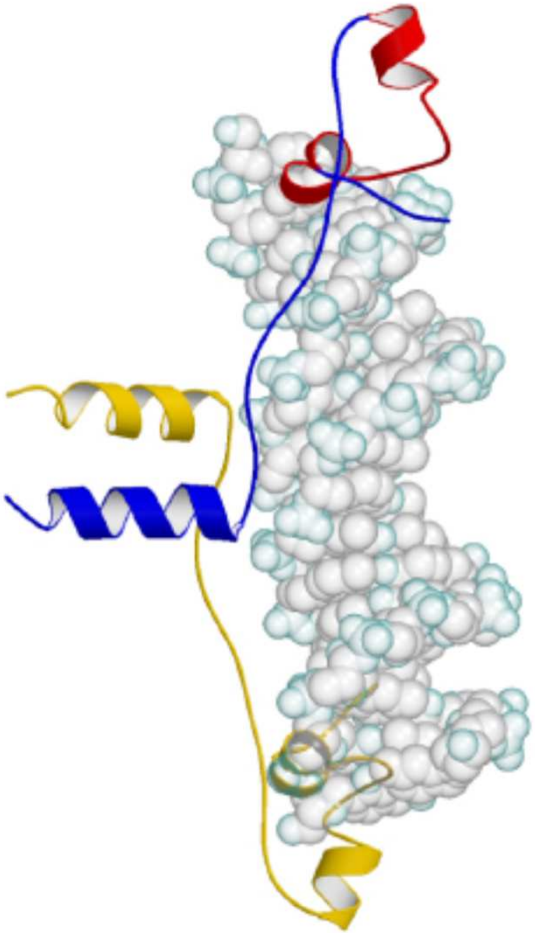
  Protein se váže jako tetramer (C-koncová doména)



Gal4

- transkripční faktor reguluje v kvasinkách metabolismus galaktosy (kvasinkový dvou-hybridní systém)

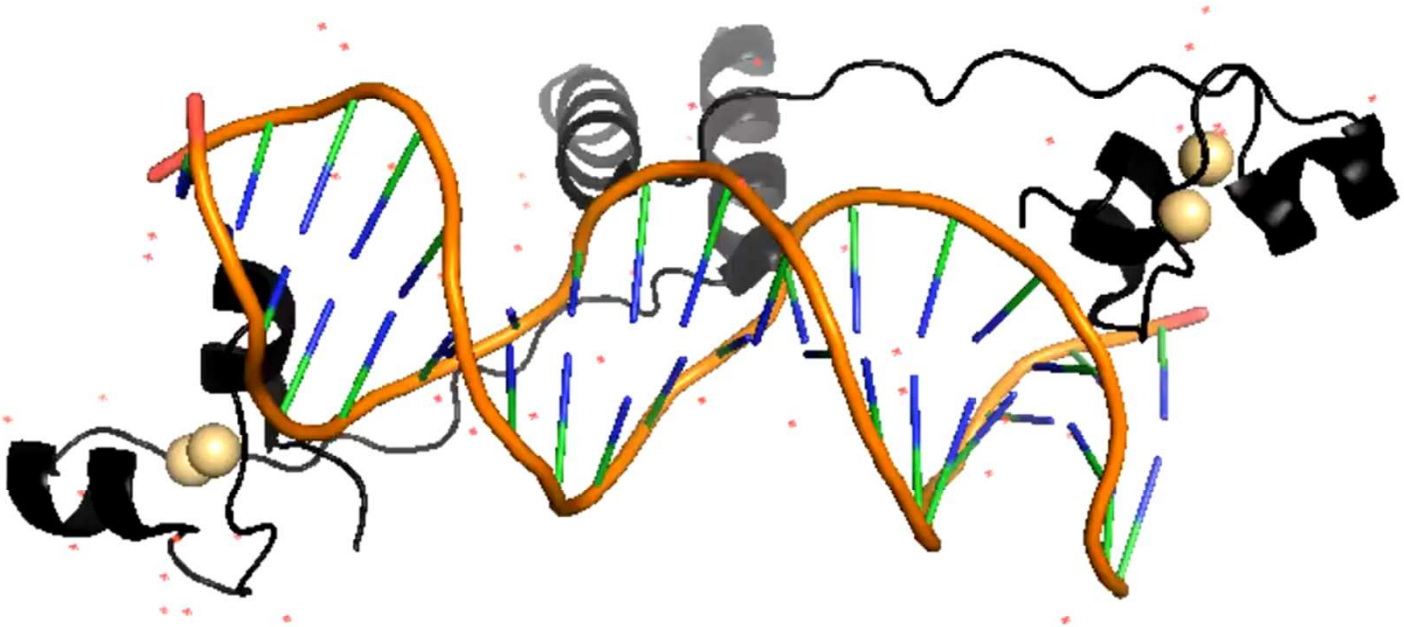
  - 2 α-šroubovice
  - 6 Cys koordinuje 2 Zn (2 Cys sdílené 2 Zn)
  - 1. šroubovice ve velkém žlábku a smyčka k 2. šroubovici kontaktuje cukr-fosfátovou kostrou
  - Dimerizuje přes krátký CC segment



20. Gal4-type (1d66)

Marmortstein et al.: Nature, 1992

Gal4



PDB: 1D66

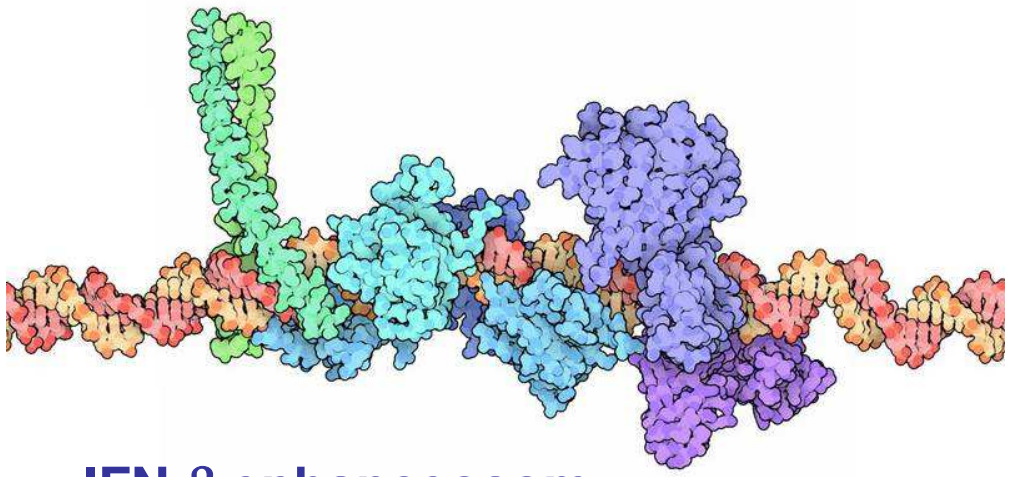
Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ**
  - Leucinový zip
  - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
  - HTH
  - Winged helix
  - TALE
- **Zinkový prst**
  - ββα zinc-finger
  - Hormon-receptor
  - Loop-sheet-helix
  - Gal4

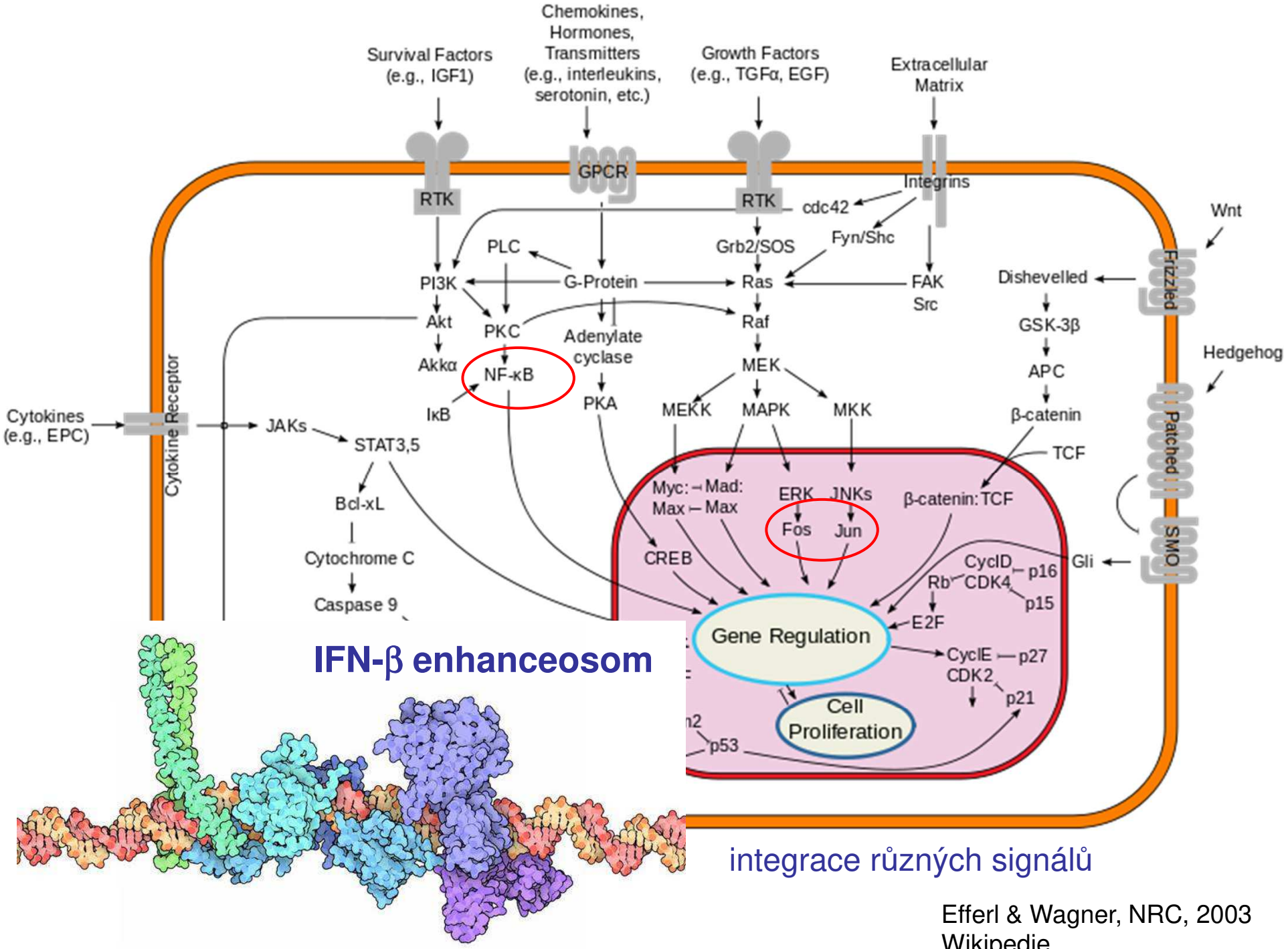
Transkripce …

Kombinace více proteinů …

Vliv chromatinu …



IFN-β enhanceosom

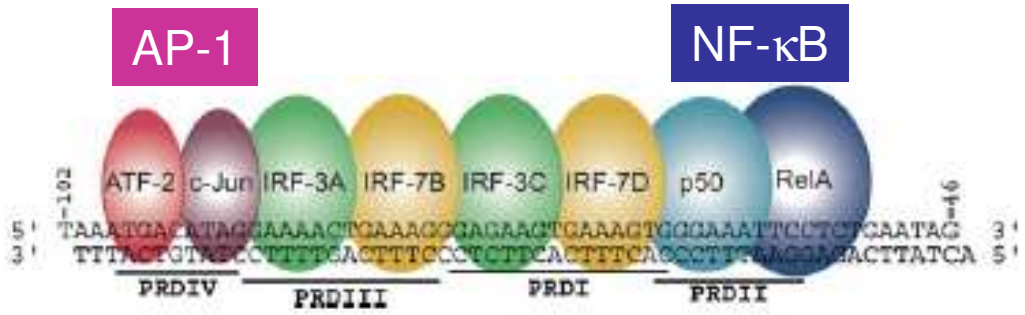


IFN-β enhanceosom

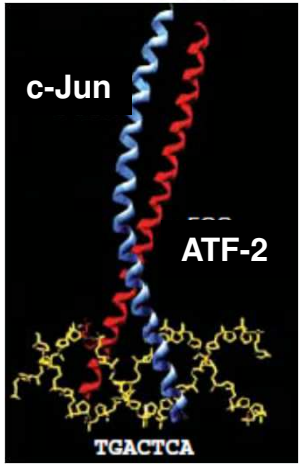
integrace různých signálů

Efferl & Wagner, NRC, 2003
Wikipedie

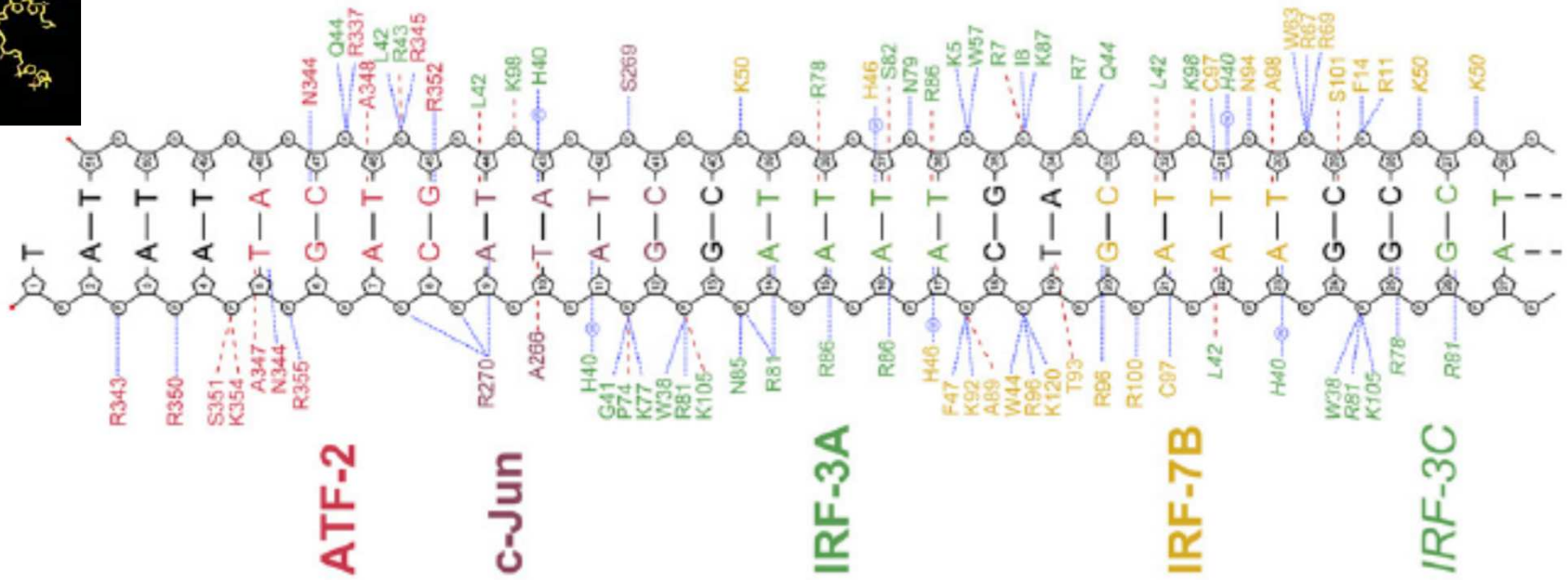
IFN-β enhanceosom



transkripce



- jeden z nejlépe popsaných enhancerů u vyšších eukaryot – induk. viry
- sekvence -102 až -47 bází upstream od počátku transkripce
- TF pokrývají 72% povrchu DNA (těsné sbalení DB-domén) – málo PPI
- nicméně vazba 8 proteinů je koordinovaná (AP-1, IRF-3, IRF-7, NF-kB)

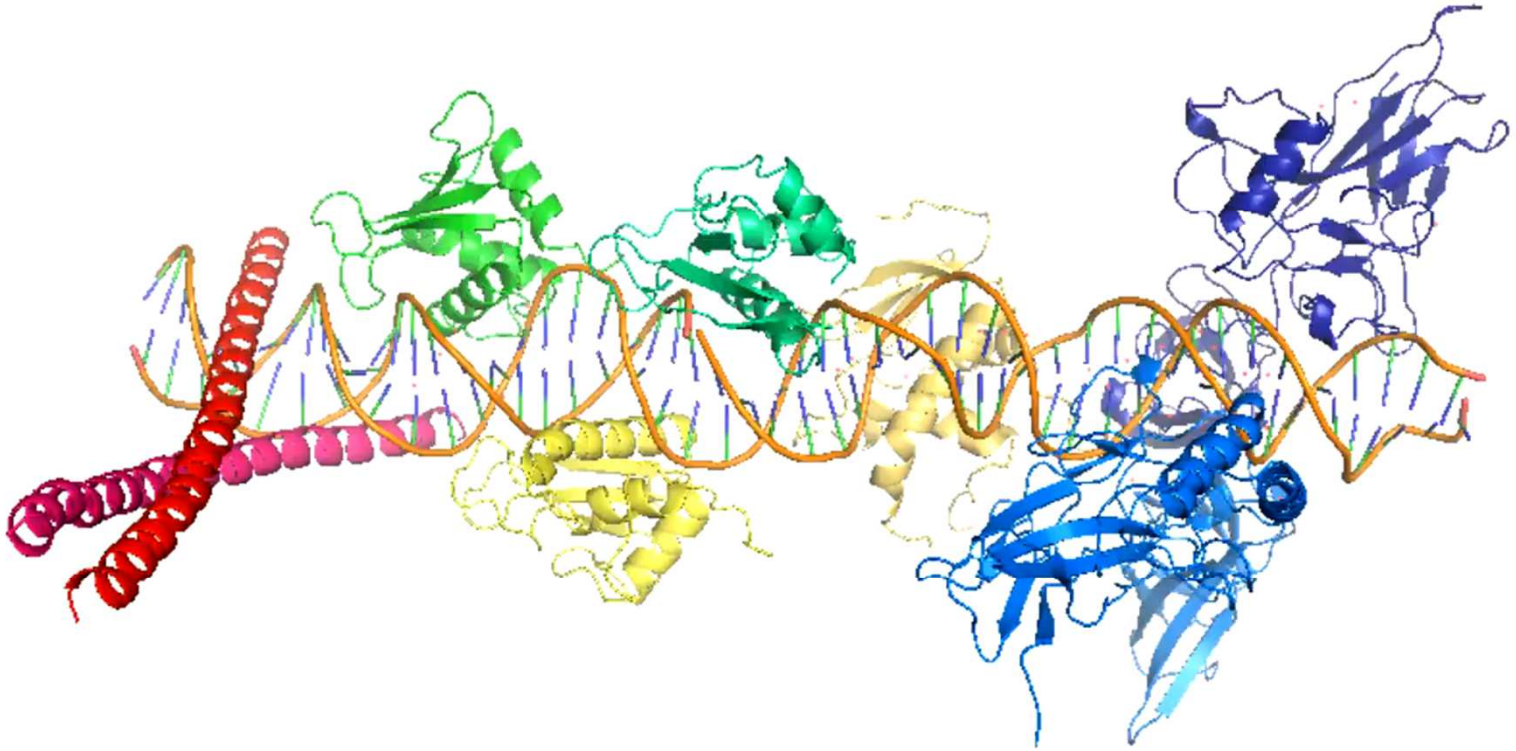


Panne et al, Cell, 2008
Panne, CO in SB, 2008

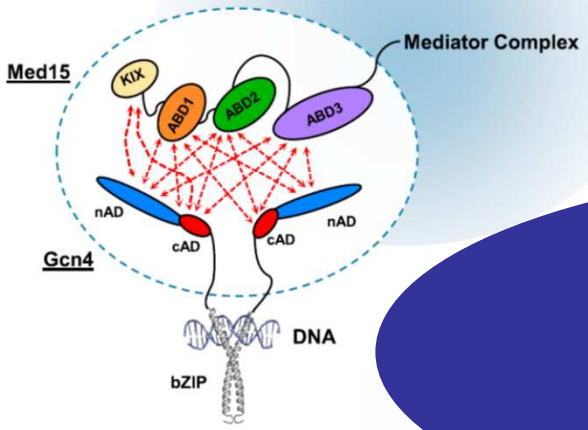
AP-1

Activator Protein = b-ZIP (basic leucine zipper)

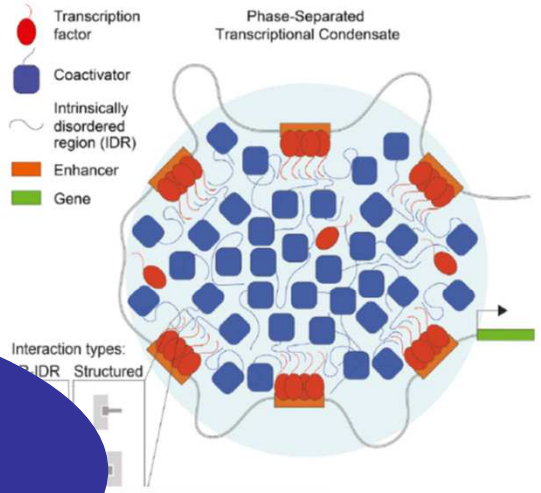
IFN-β enhanceosom

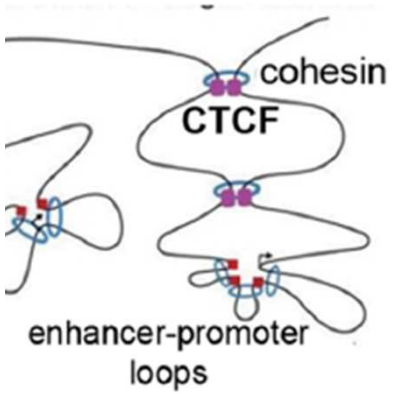


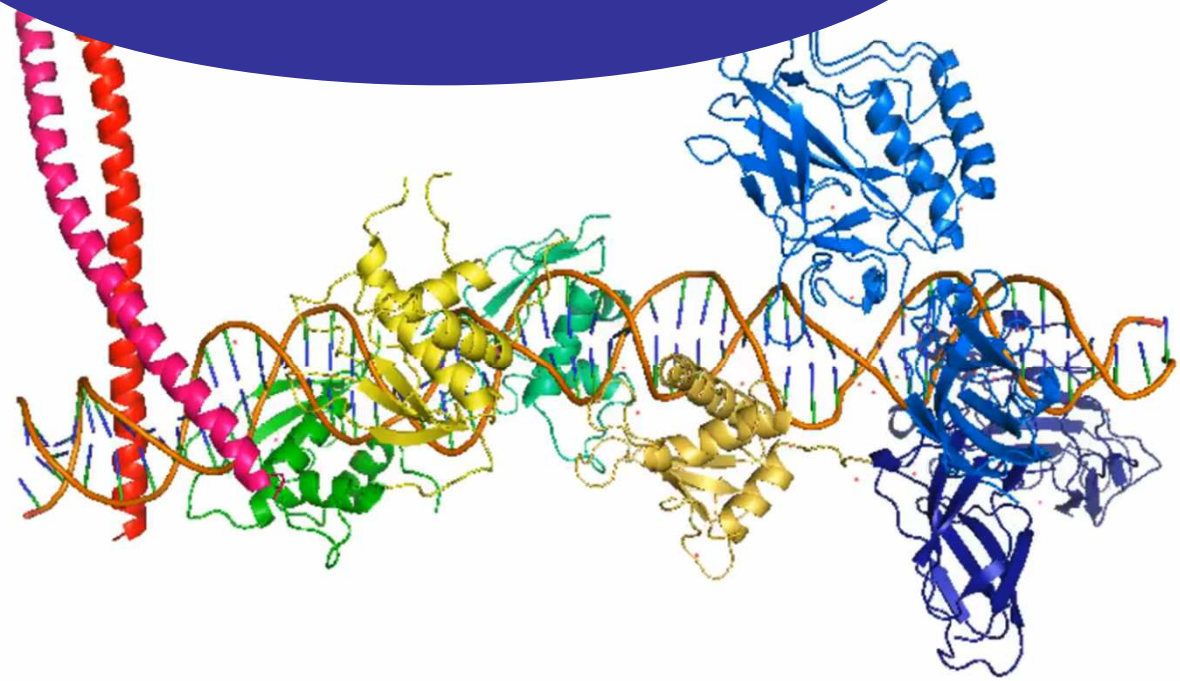
AP-1 leucin zipper, IRF – podobný WHD (směs), NFkB – komplexní motiv
červené tečky – molekuly vody http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=122



mediator







Boija et al, Cell, 2018
Tuttle et al, Cell Rep, 2018

- TF obsahují **aktivační doménu** – na AD se váže mediator komplex – integruje/propojí TF – zprostředkuje vazbu s RNA polymerasou - iniciaci transkripce