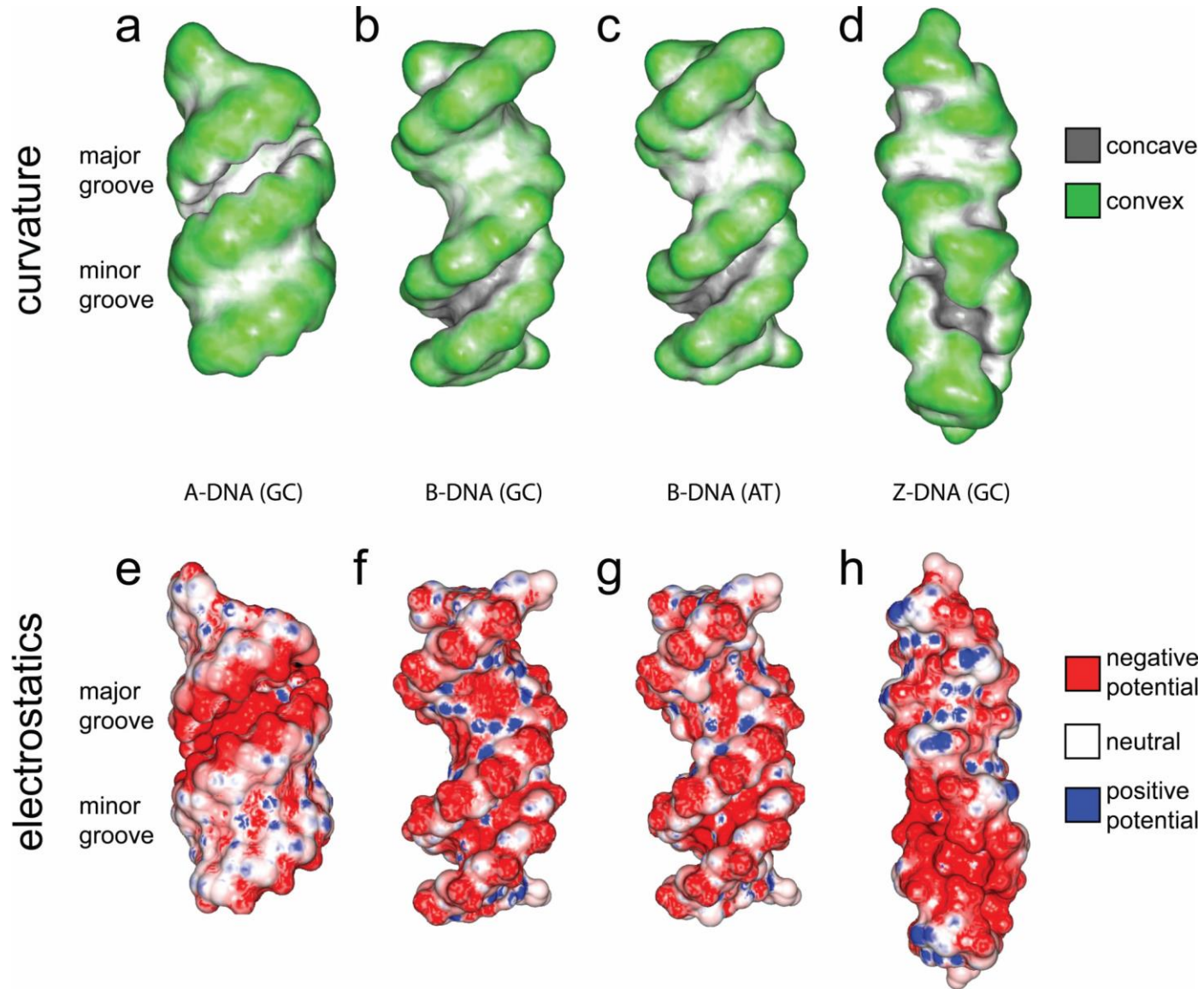


Interakcije protein-DNA

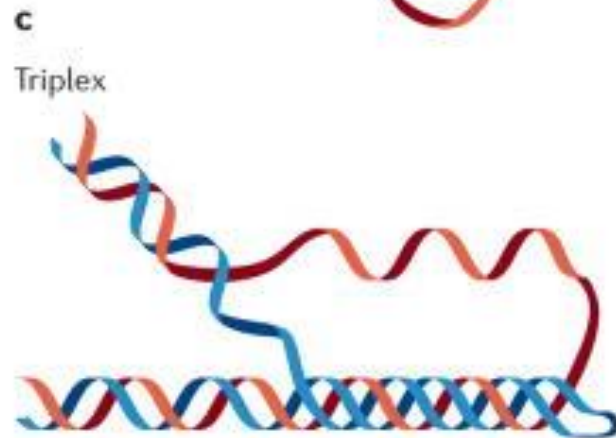
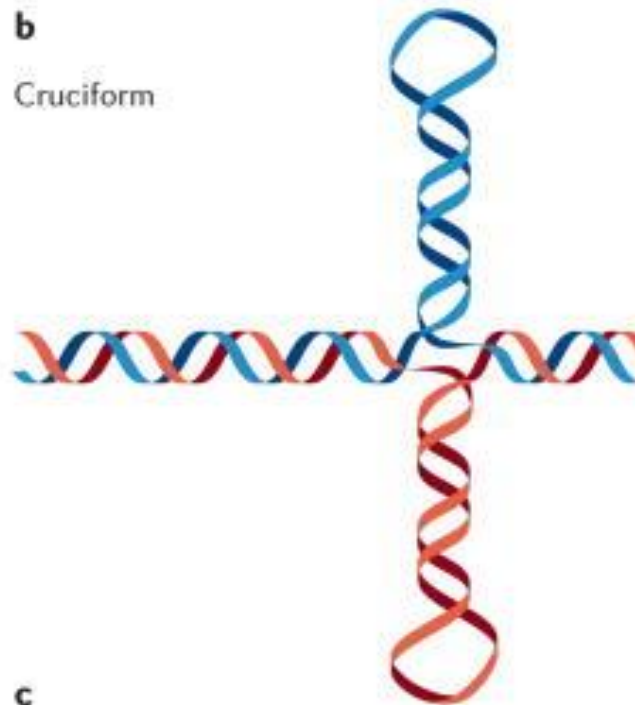
Temeljne lastnosti:

- Specifične interakcije (branje baz) + nespecifične interakcije (ogrodje)
- Konformacijske spremembe proteina in/ali DNA
- Pogosto se pojavljajo nekateri DNA-vezavni motivi
- Odvisne od lokalne strukture DNA
- Simetrične interakcije

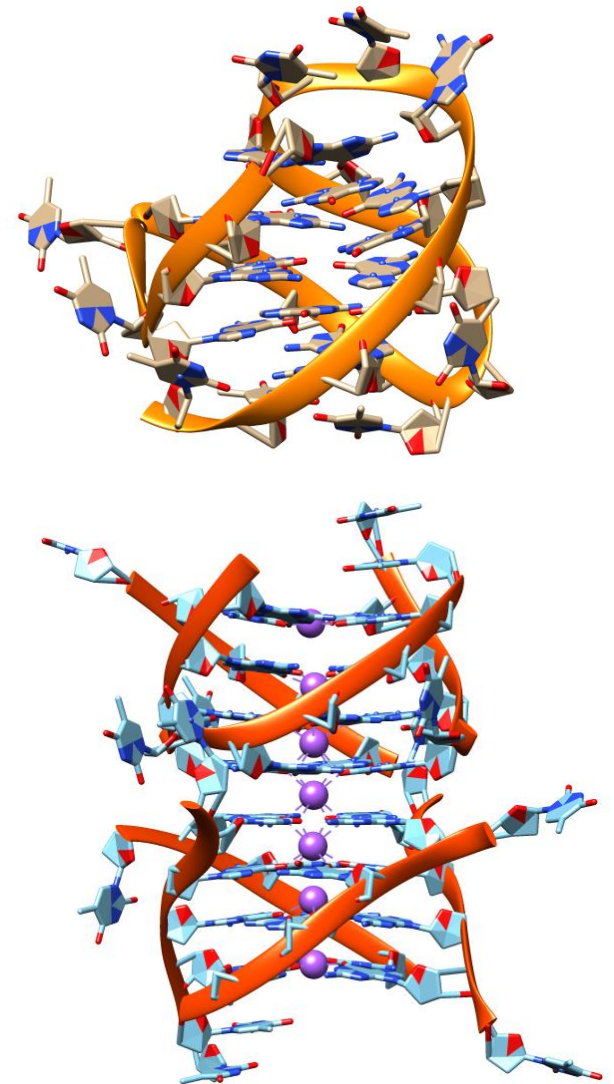
Struktura DNA



Struktura DNA



kvadrupleksi



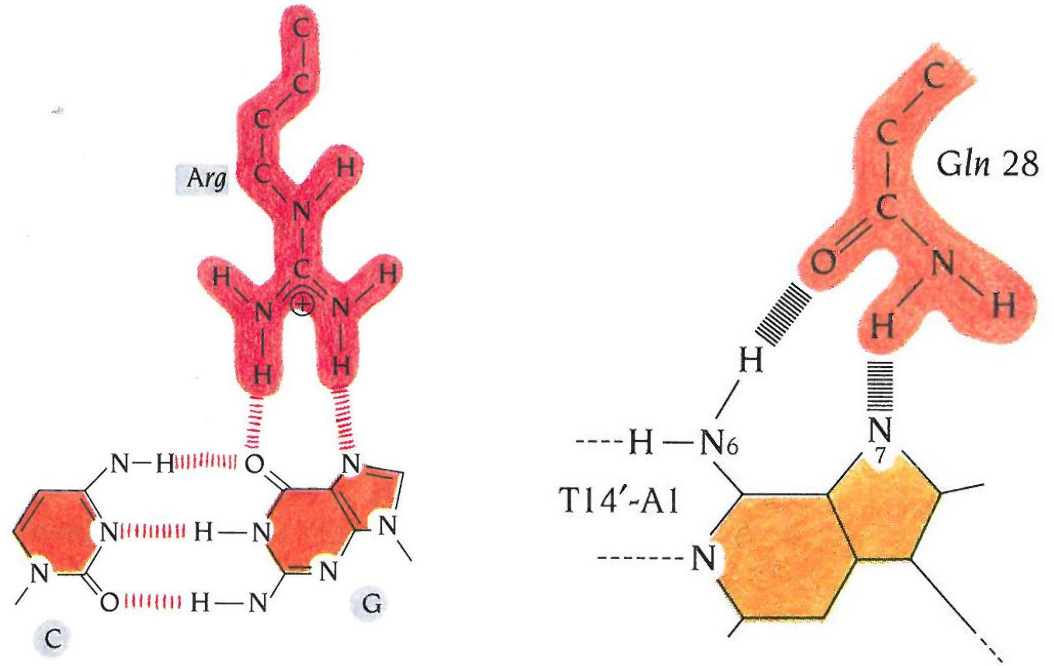
Struktura DNA

Tendency of DNA sequence elements to form specific structural motifs.

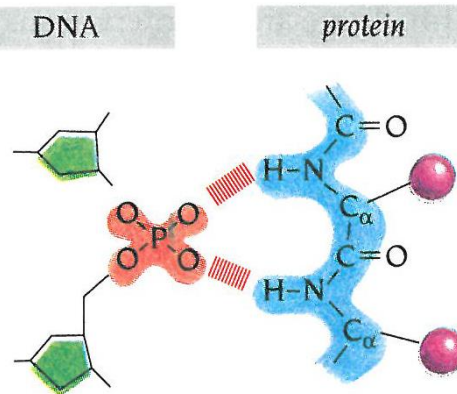
Sequence element	Structural motif
AT-rich	B-DNA
GC-rich	A-DNA at low humidity
A-tract	B'-DNA, narrow minor groove, bending, rigid for ≥ 4 bp
TATA box	high deformability, A-DNA, TA-DNA upon TBP binding
RY alternating (especially GC alternating)	Z-DNA at high salt concentration, upon cytosine methylation or supercoiling
YpR step (especially TpA step)	compresses major groove, high deformability, 'hinge' step, kinking
RpY step	compresses minor groove, low deformability

Interakcije protein-DNA

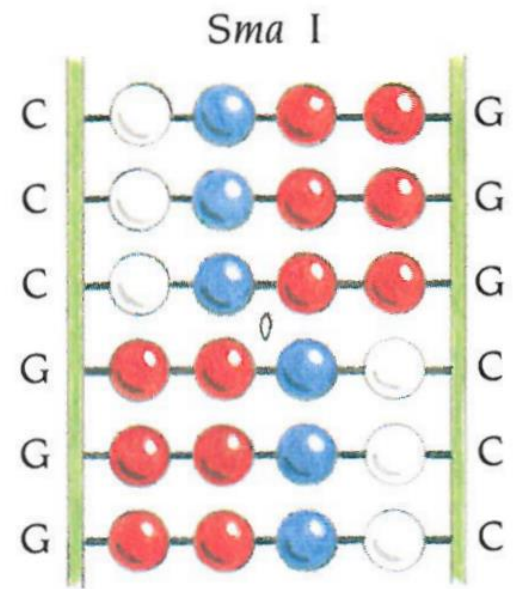
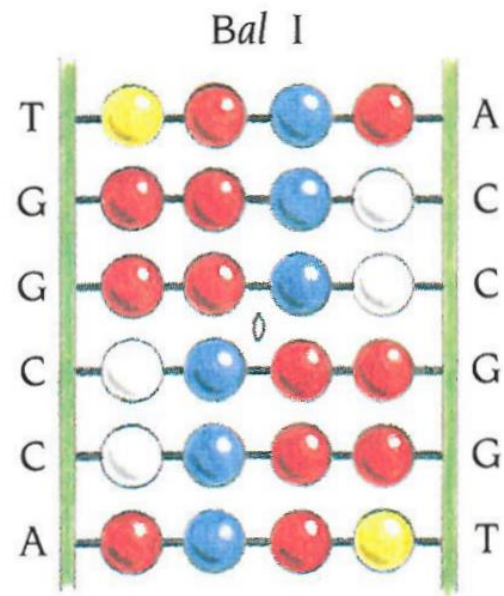
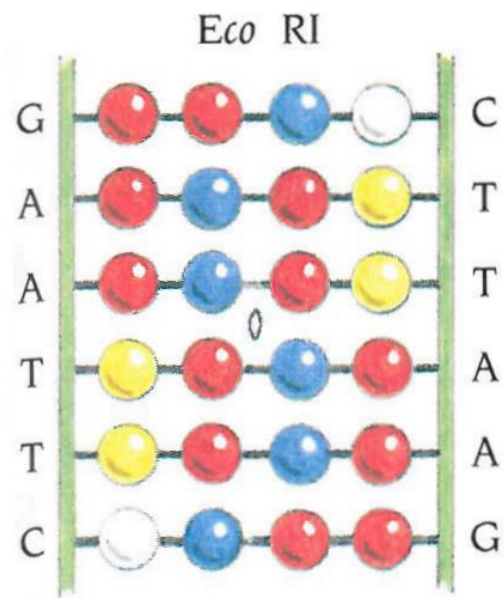
Specifične interakcije:



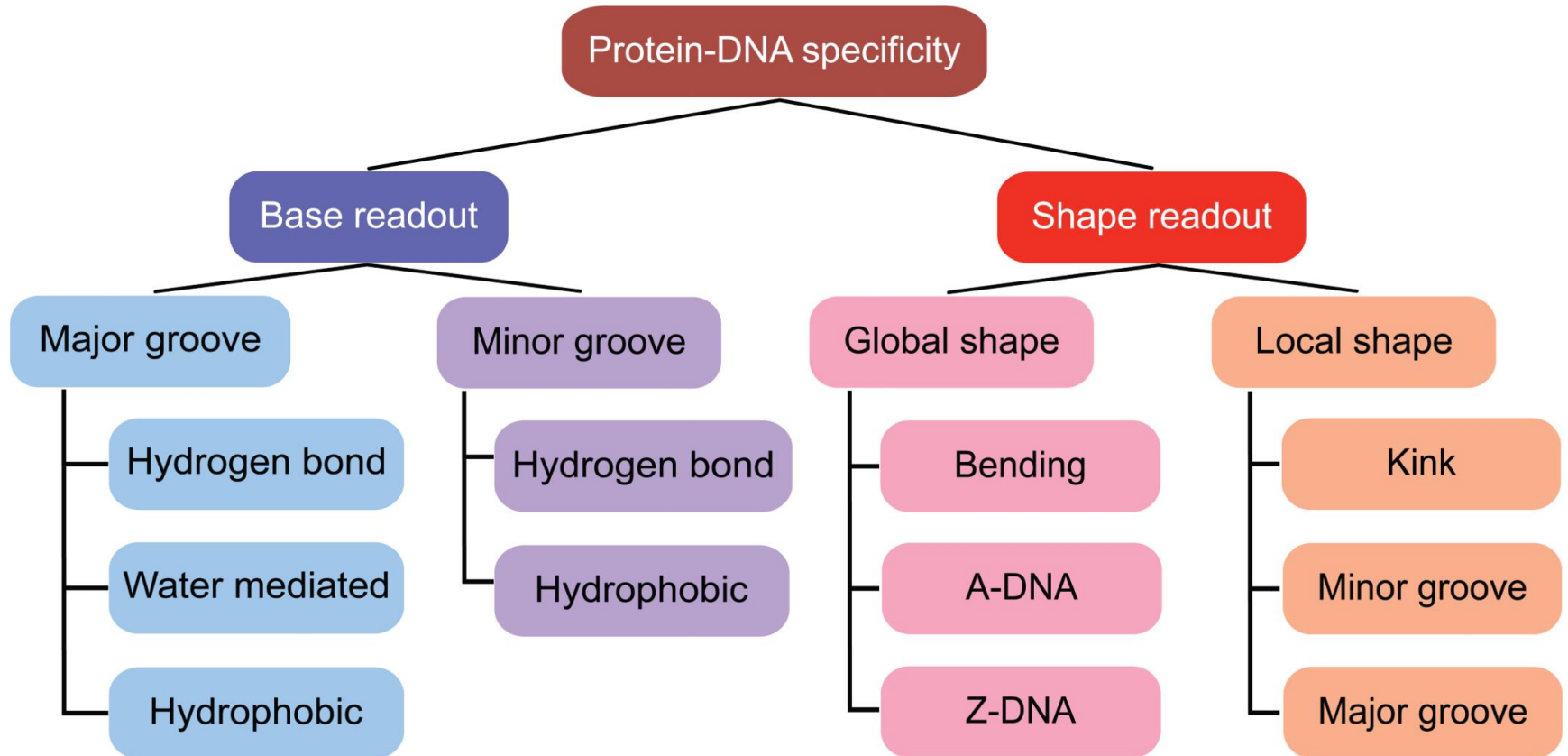
Nespecifične interakcije:



Interakcije protein-DNA



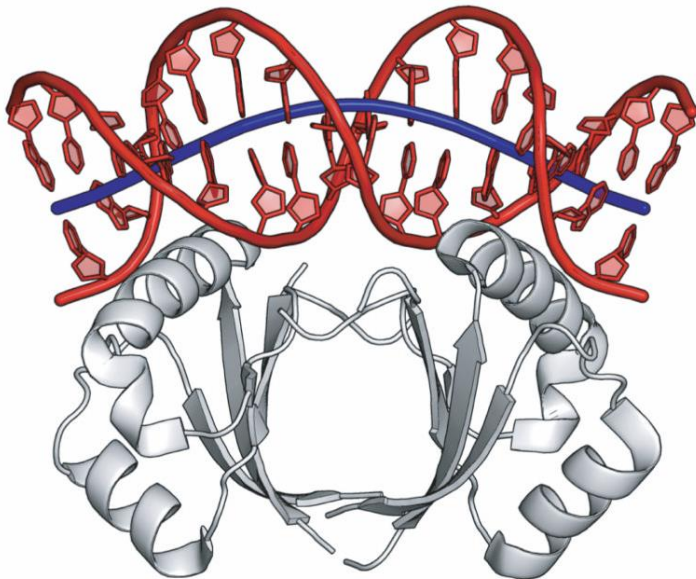
Interakcije protein-DNA



Inducirane deformacije DNA

Upogib vijačnice

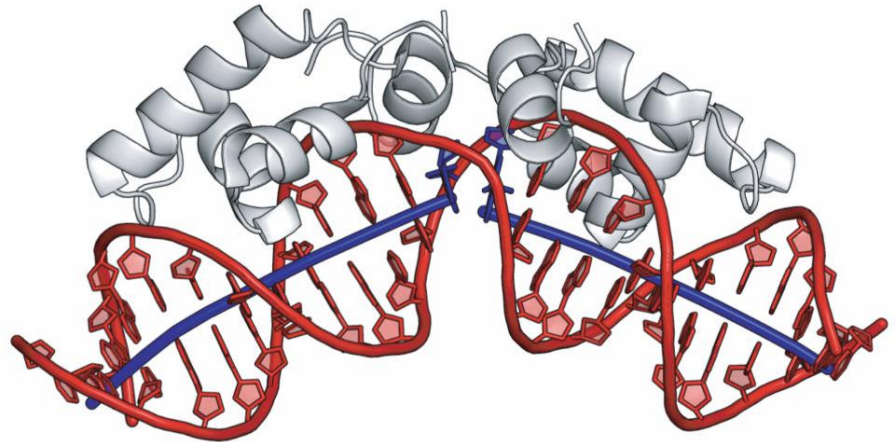
os vijačnice je upognjena kontinuirno preko daljšega segmenta DNA



Bend

Prelom vijačnice

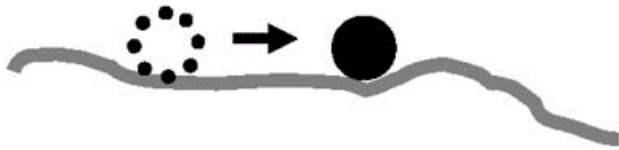
smer osi vijačnice se nenadoma spremeni



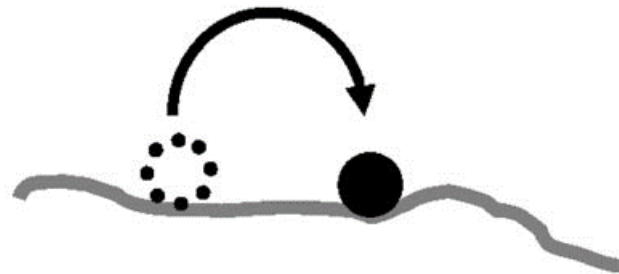
Kink

Specifično prepoznavanje DNA

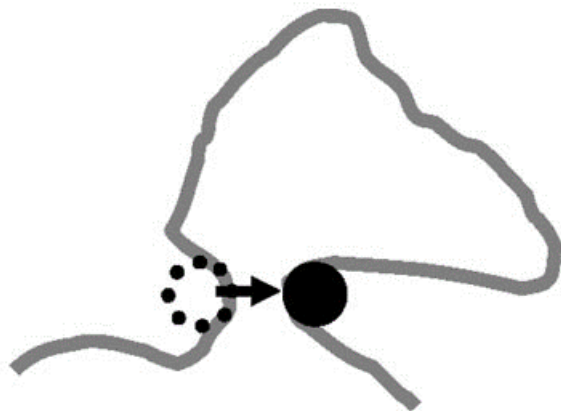
Kako proteini najdejo tarčno zaporedje na DNA?



Drsenje – difuzija v eni dimenziji (*EcoRV*)



Skakanje – vezava samo na specifično zaporedje (*EcoRI*)

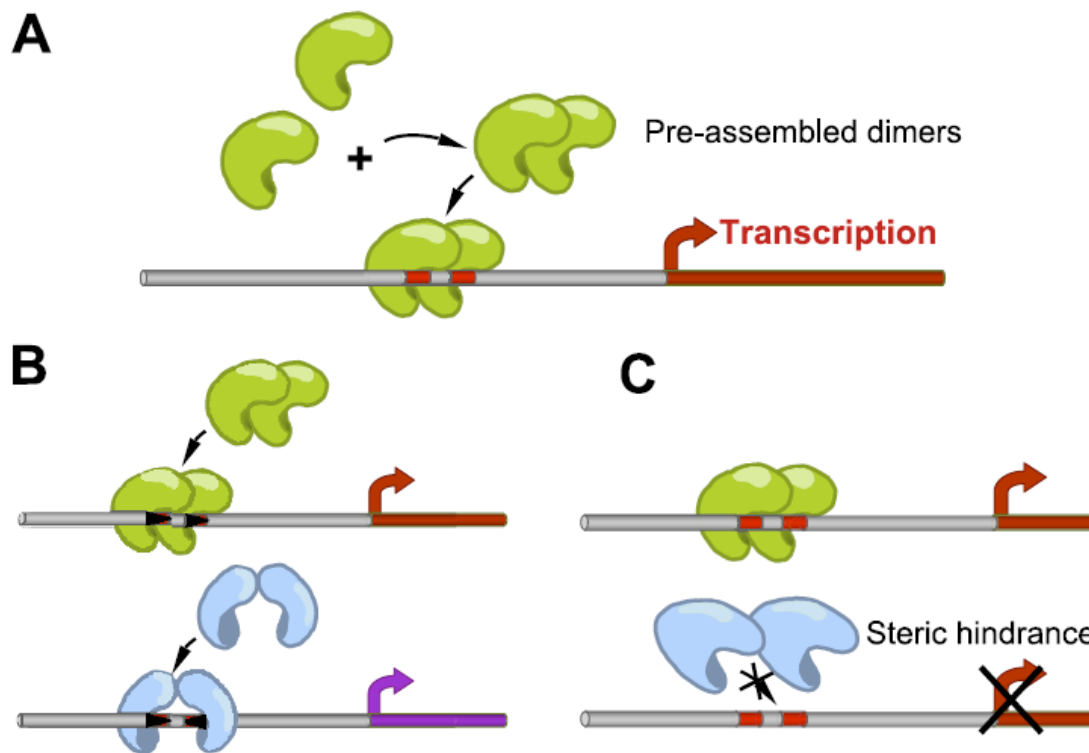


prenos med segmenti

Specifično prepoznavanje DNA

Pomen dimerizacije – vezava vnaprej sestavljenih dimerov

$$K_{dimer} = K_{monomer}^2$$

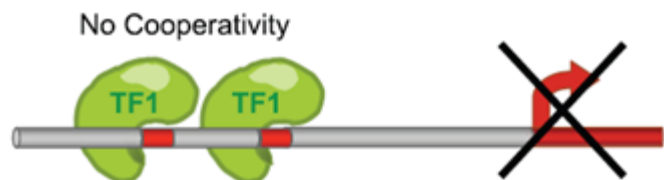
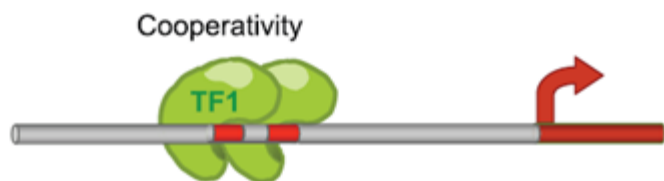


efekt razdalje med zaporedji

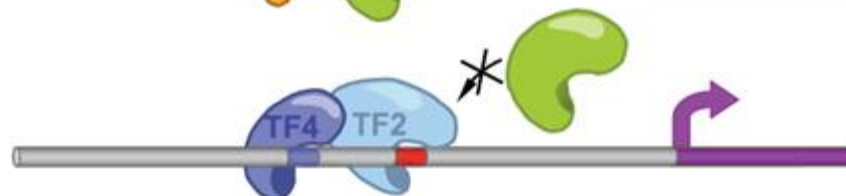
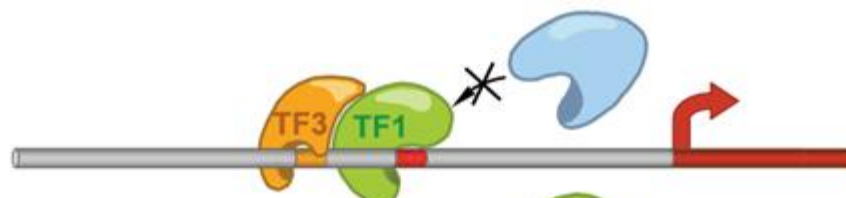
Specifično prepoznavanje DNA

Pomen dimerizacije – sestavljanje homo/heterodimerov na DNA

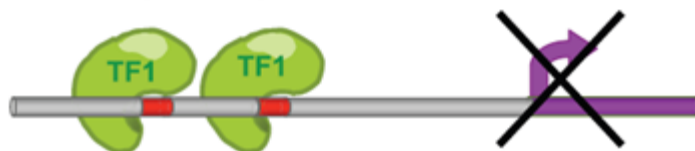
kooperativnost v homooligomerih



interakcije v izključujočih kombinacijah

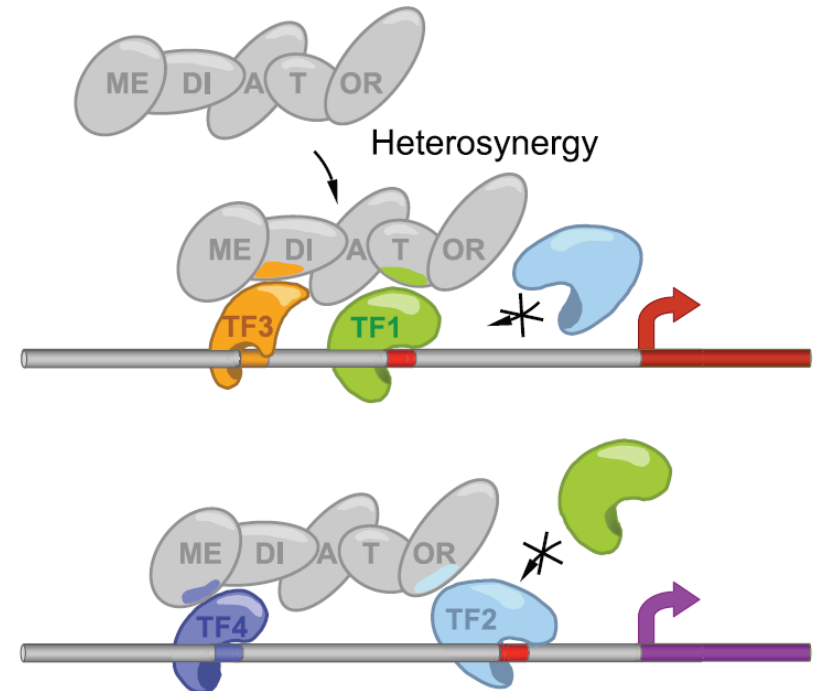
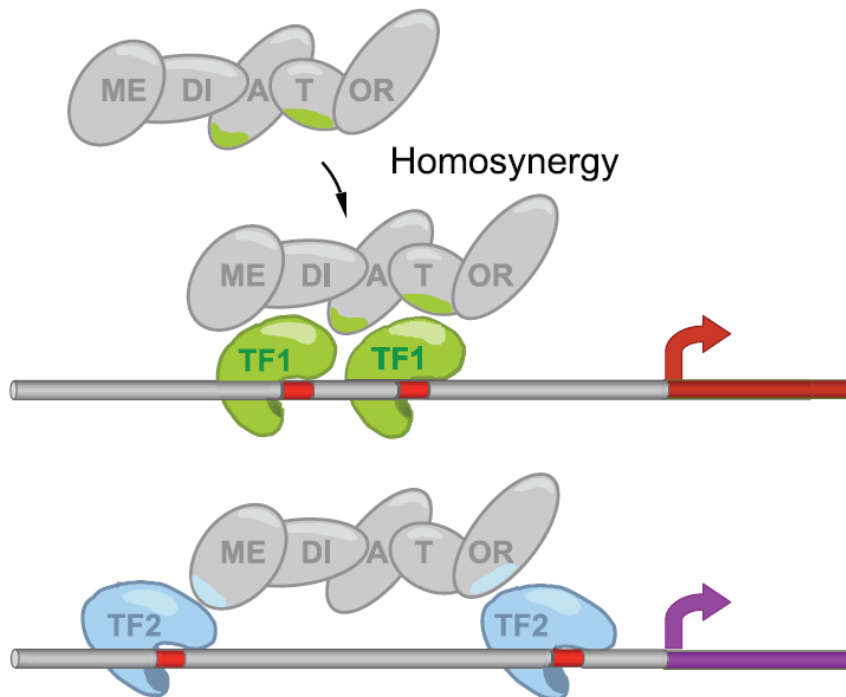


interakcije istega proteina z različnimi partnerji



Specifično prepoznavanje DNA

Pomen dimerizacije – vezani transkripcijski faktorji rekrutirajo mediatorje (npr. RNAPol) v specifičnih kombinacijah.



Klasifikacija DNA-vezavnih proteinov glede na DNA-vezavne motive

Pretežno α

vijačnica-zavoj-vijačnica (HTH)
vijačnica-zanka-vijačnica (HLH)
levcinska zadruga

Pretežno β

TATA-vezavni protein
Imunoglobulinski β sendvič
 β -detelja
motiv β - β - β

Mešano α/β

cinkov prst
 β -pentlja-vijačnica-vijačnica
ostali

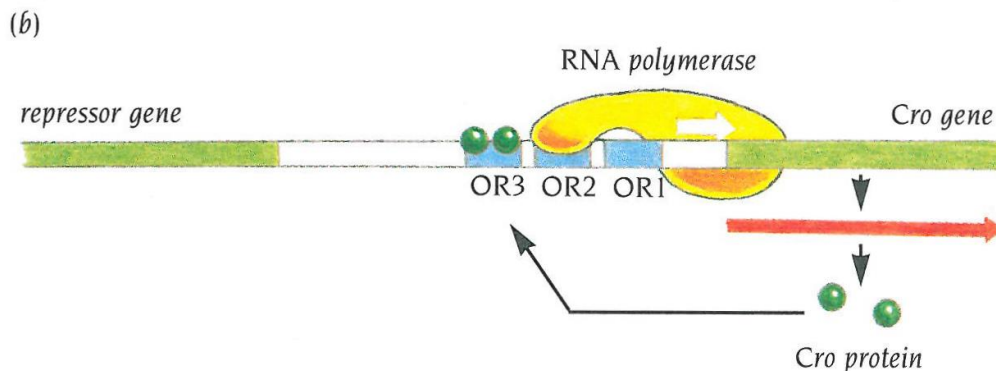
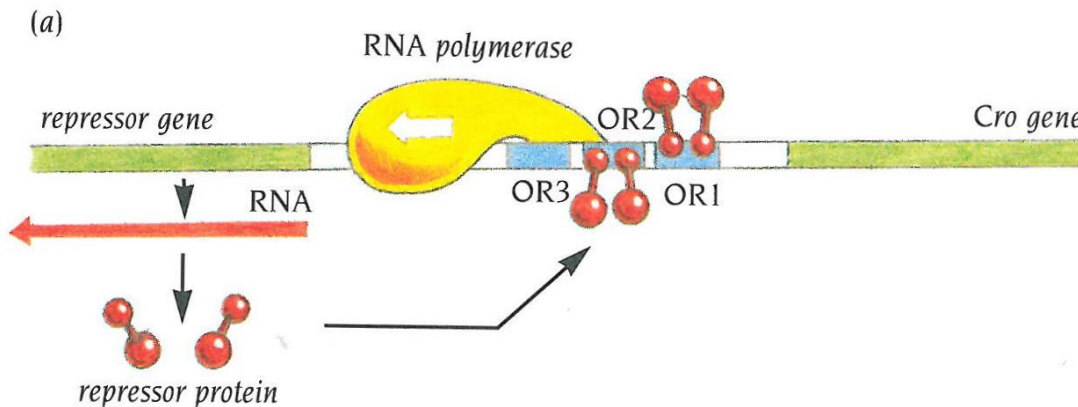
Encimi

Kompleksne interakcije – preko več DNA-vezavnih motivov/domen

Proteini, ki vežejo enoverižno DNA

Motiv HTH

Skupino motivov vijačnica-zavoj-vijačnica delimo v več družin. Med najenostavnejše predstavnike spadata regulatorna proteina **Cro** in **represor**, ki regulirata lizogen/litičen cikel bakteriofaga λ in sorodnih bakteriofagov 434 in P22.

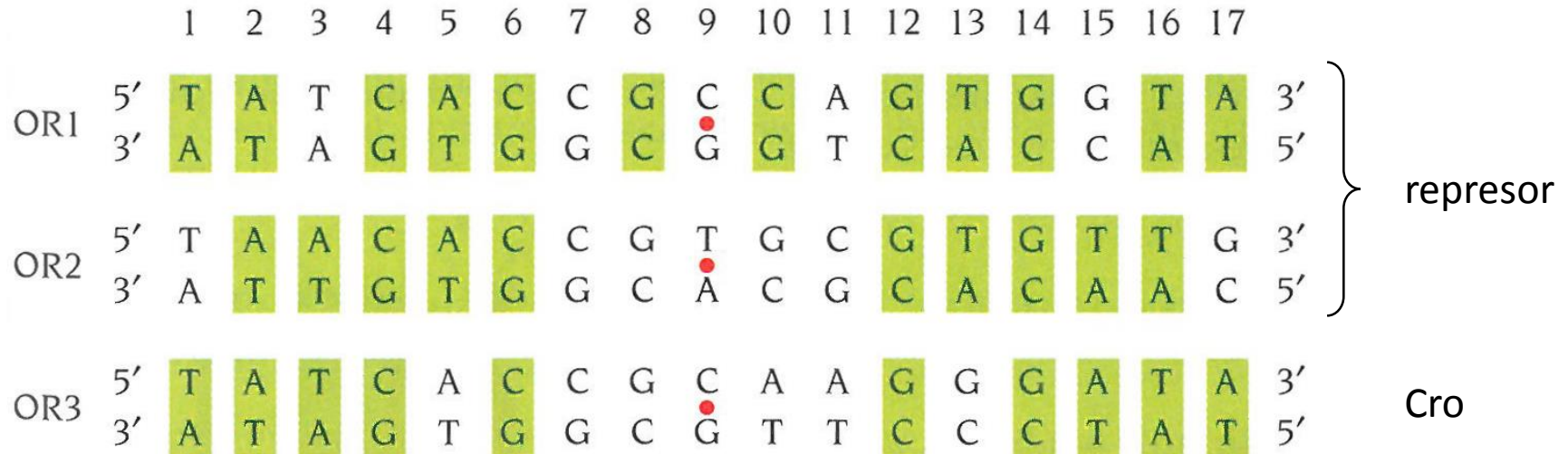


Cro promovira litičen cikel.

Motiv HTH

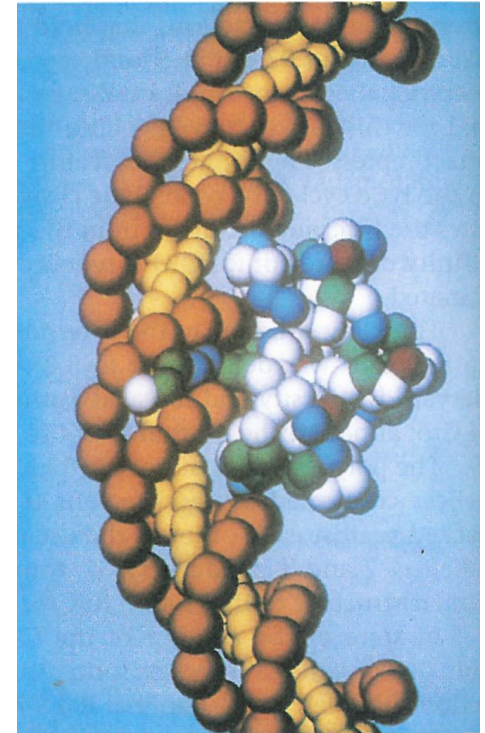
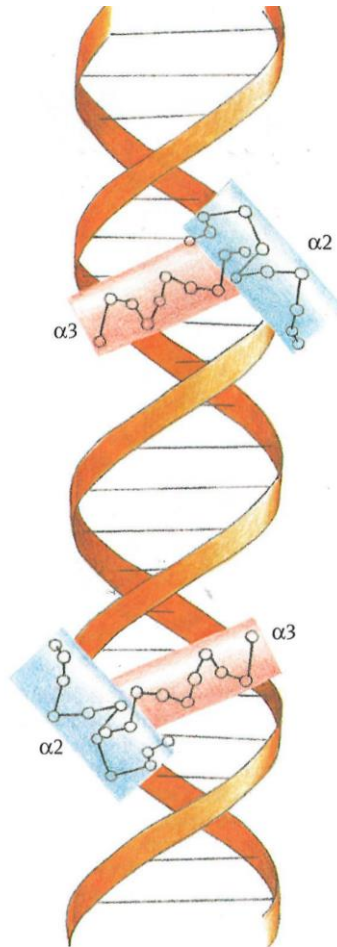
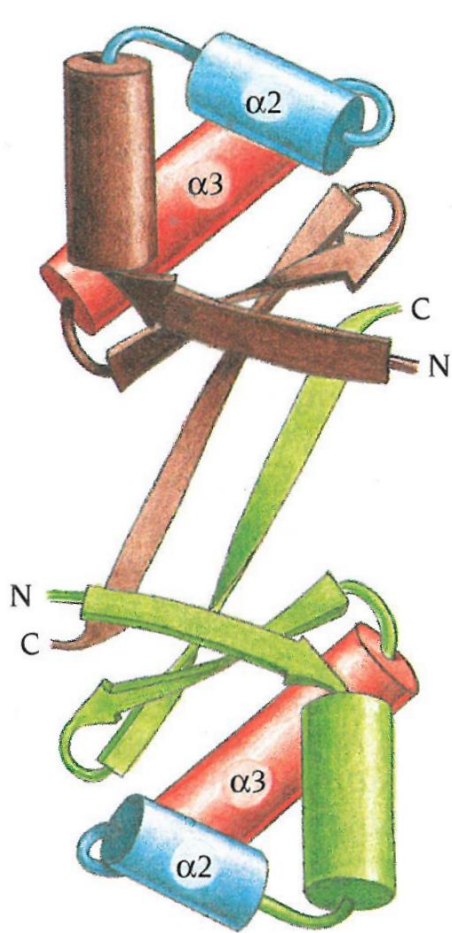
Skupino motivov vijačnica-zavoj-vijačnica delimo v več družin. Med najenostavnejše predstavnike spadata regulatorna proteina **Cro** in **represor**, ki regulirata lizogen/litičen cikel bakteriofaga λ in sorodnih bakteriofagov 434 in P22.

Zaporedje operatorjev:



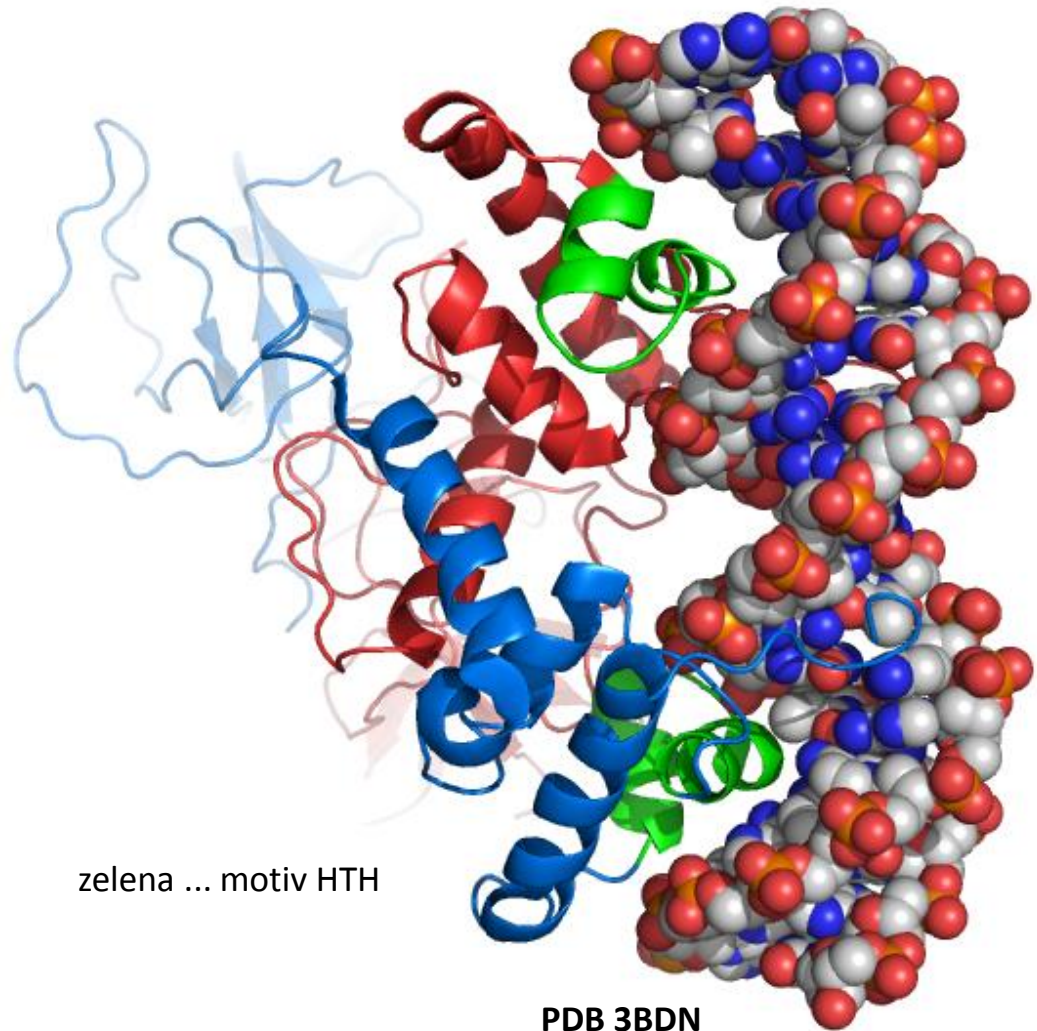
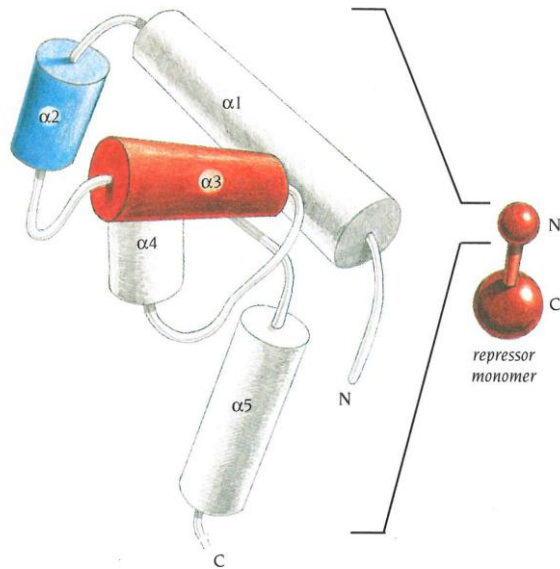
Motiv HTH

λ Cro je majhen endomemski protein (66 ostankov), ki tvori stabilne dimere preko intermolekulske β -ploskve. DNA-vezavni motiv predstavljata vijačnici 2 in 3 ter zavojev med njima. Vijačnica 3 se veže v veliki žleb DNA in ji rečemo *prepoznavna vijačnica*.



Motiv HTH

λ **represor** je dvodomenski protein, ki prav tako tvori dimere. DNA veže N-končna domena, C-končna domena pa je dimerizacijska domena.

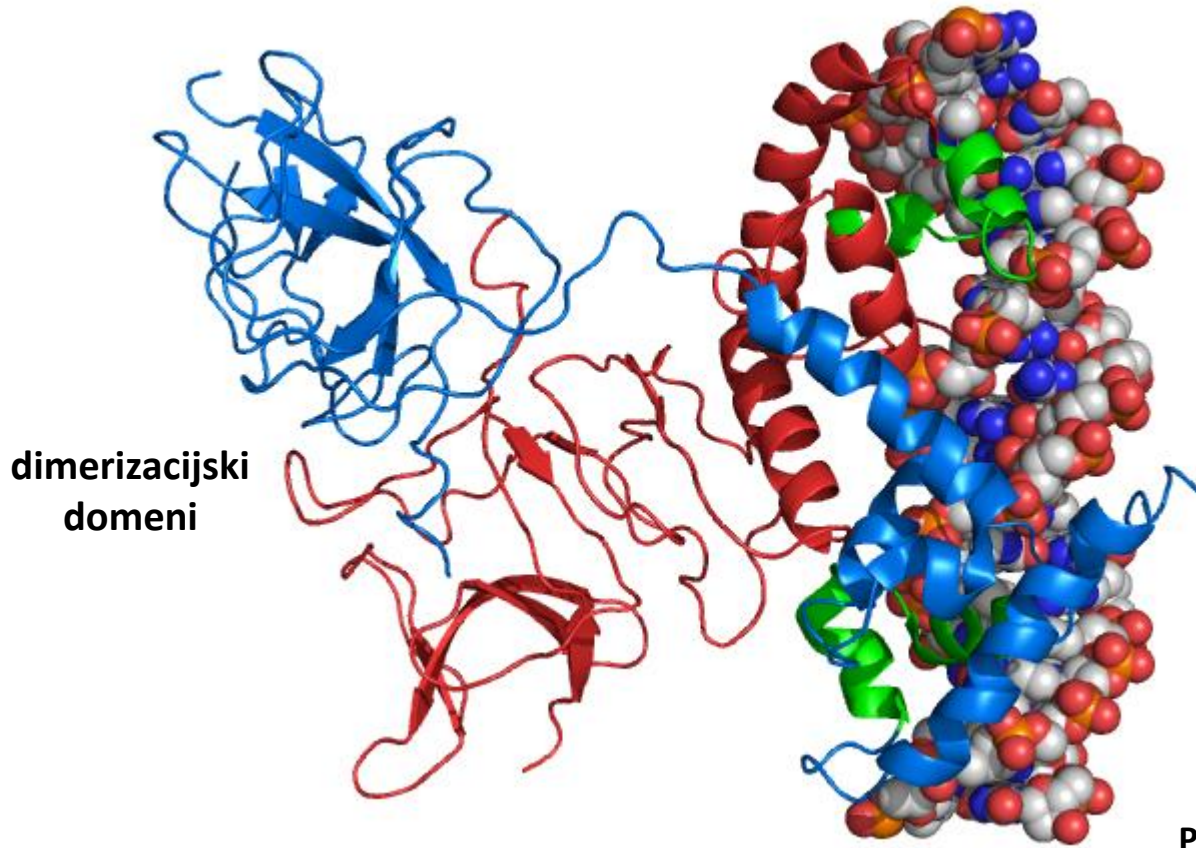


zelená ... motiv HTH

PDB 3BDN

Motiv HTH

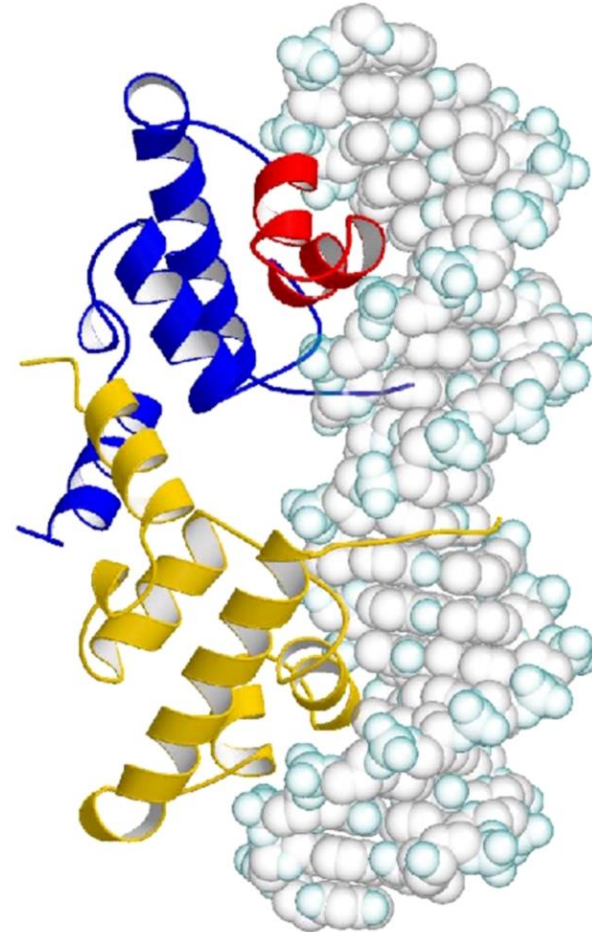
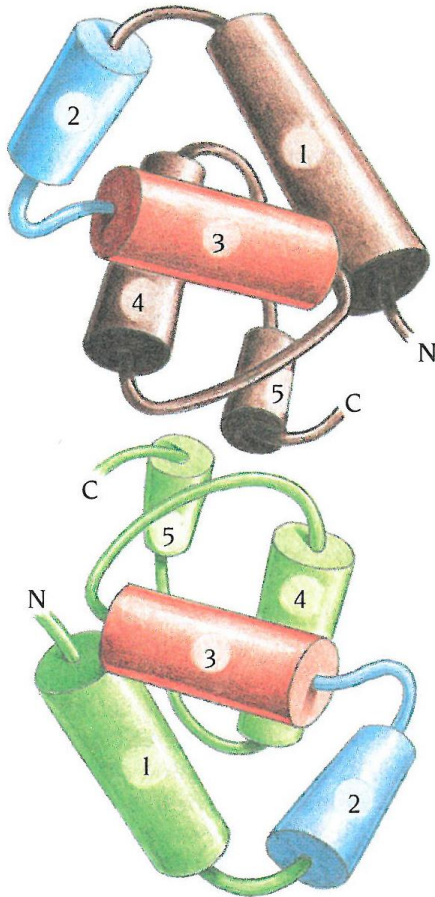
λ **represor** je dvodomenski protein, ki prav tako tvori dimere. DNA veže N-končna domena, C-končna domena pa je dimerizacijska domena.



Dimer N-končnih domen se slabo veže na DNA. Pod vplivom UV svetlobe pride do proteolitičnega odcepa dimerizacijskih domen represorja, s čemer se onemogoči njegova vezava na DNA in prehod v litični cikel.

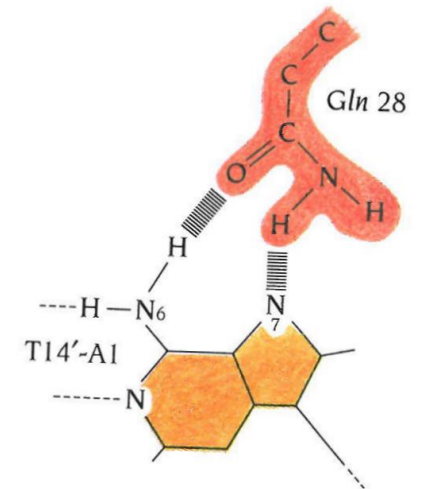
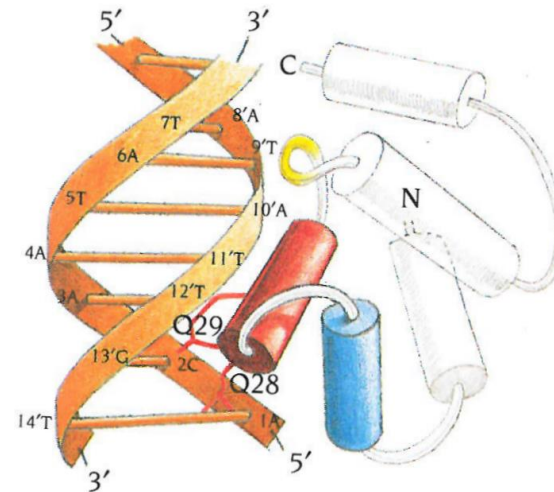
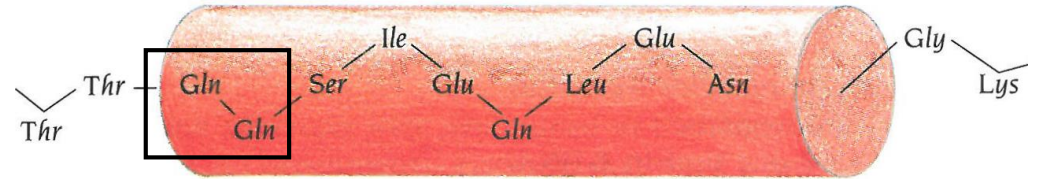
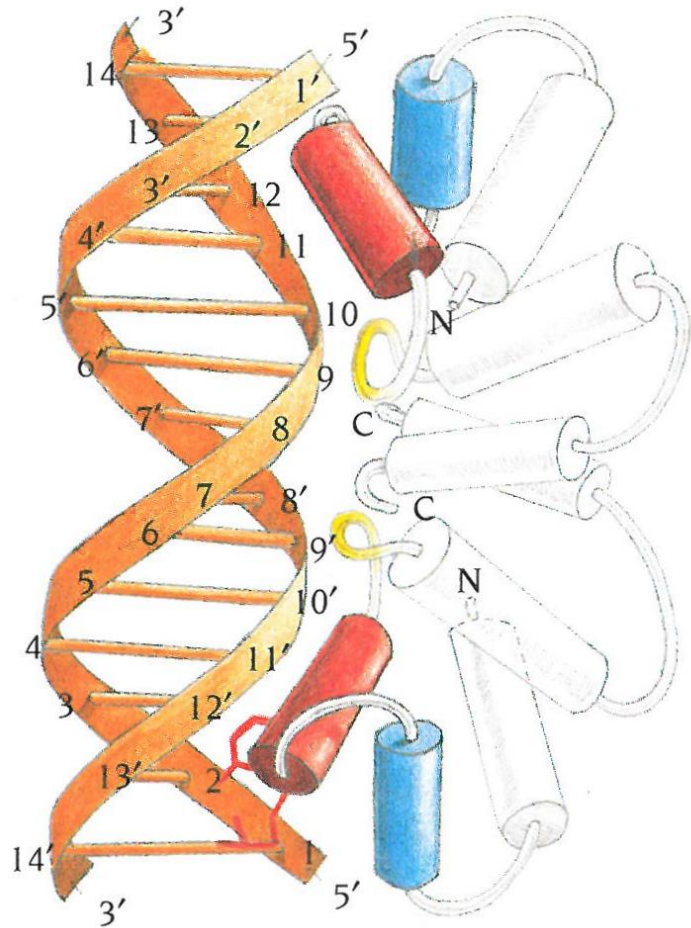
Motiv HTH

Zanimivo je, da imata pri sorodnem bakteriofagu 434 Cro in DNA vezavna domena represorja enako zvitje.



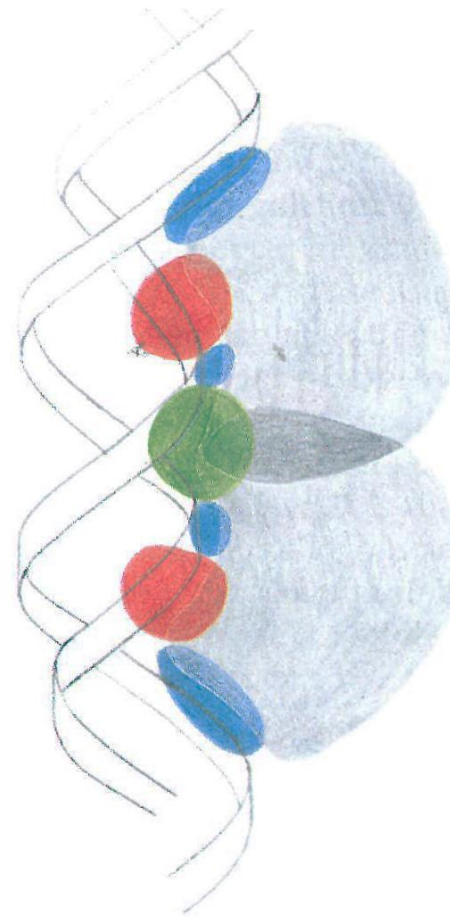
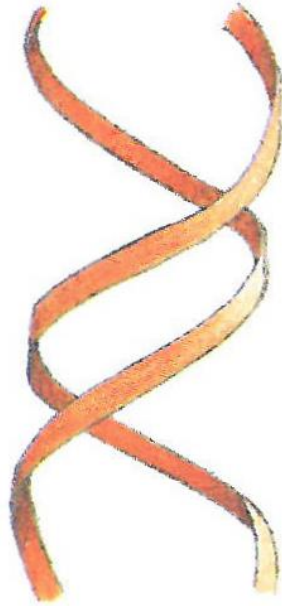
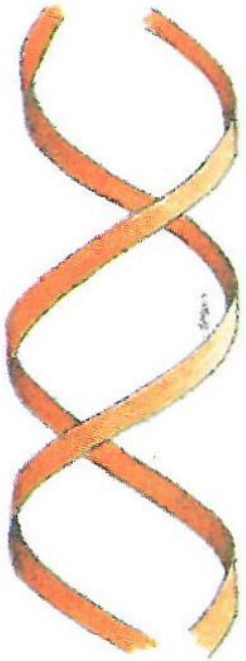
Motiv HTH

Struktura 434 represorja z modelnim palindromnih 14-merom DNA.



Motiv HTH

Celokupno so te interakcije pokazale način interakcije proteinov z motivom HLH na DNA.



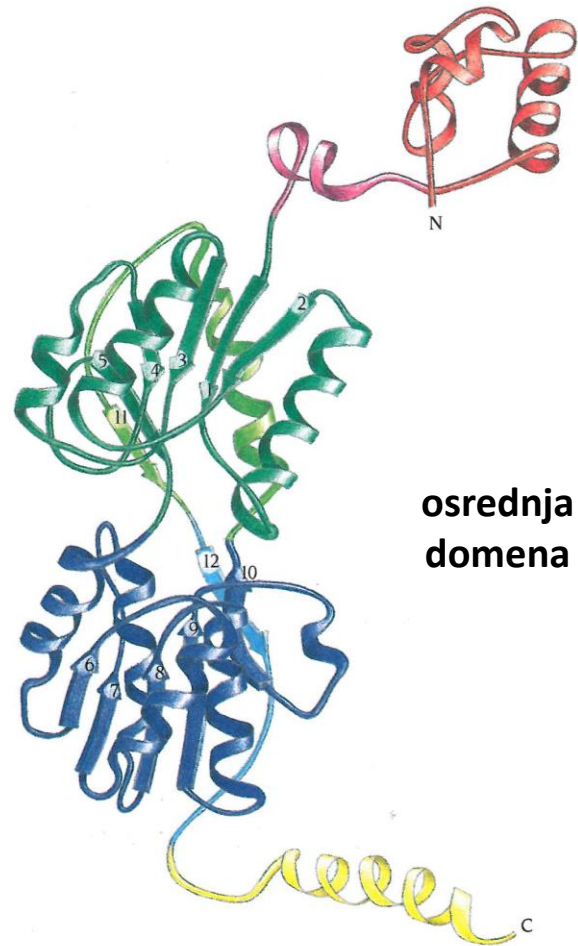
- 1 H-bonds between sugar-phosphate backbone and protein help anchor protein to DNA
- 2 Sequence-specific interaction between DNA and recognition helix allows recognition of OR regions
- 3 DNA distortion allows close interactions with other regions of Cro and repressor and accounts for differential affinities

levo: regularna DNA

desno: DNA po vezavi Cro/represorja

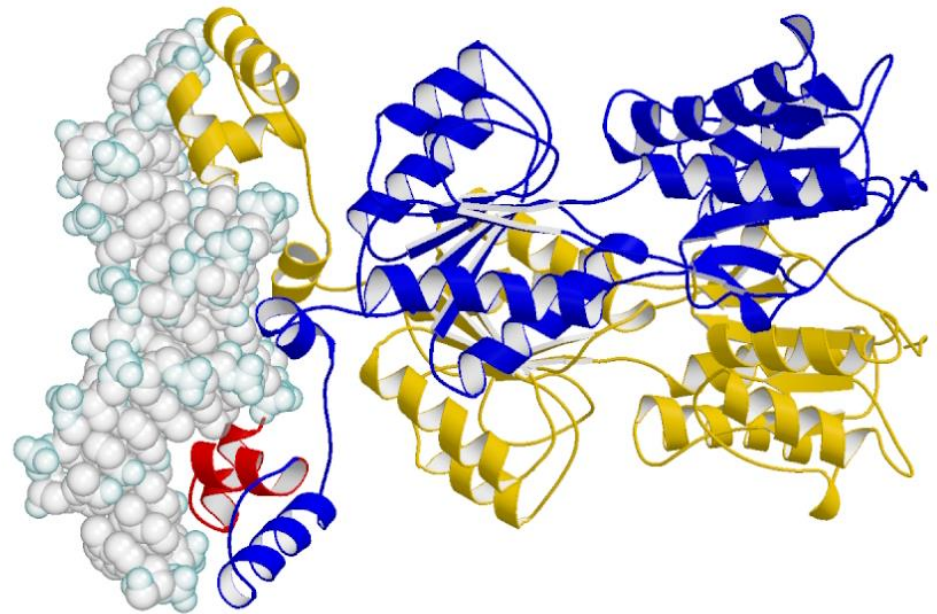
Motiv HTH

Med prokariotske DNA-vezavne proteine s HTH motivi uvrščamo tudi *lac* represor (in homologen PurR) in CAP, ki spadata vsak v svojo družino.



Monomer lacI

DNA vezavna domena



Dimer lacI

Motiv HTH

Med prokariotske DNA-vezavne proteine s HTH motivi uvrščamo tudi *lac* represor (in homologen PurR) in CAP, ki spadata vsak v svojo družino.

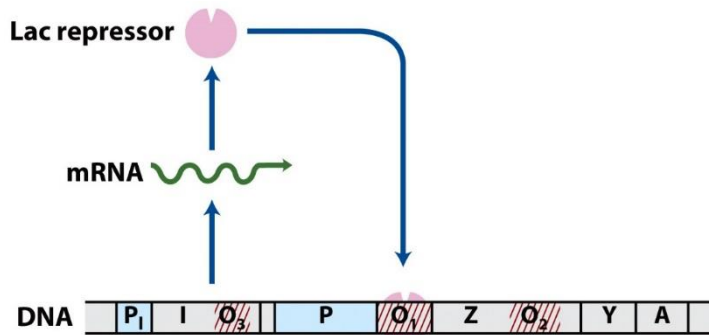


Figure 28-7a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

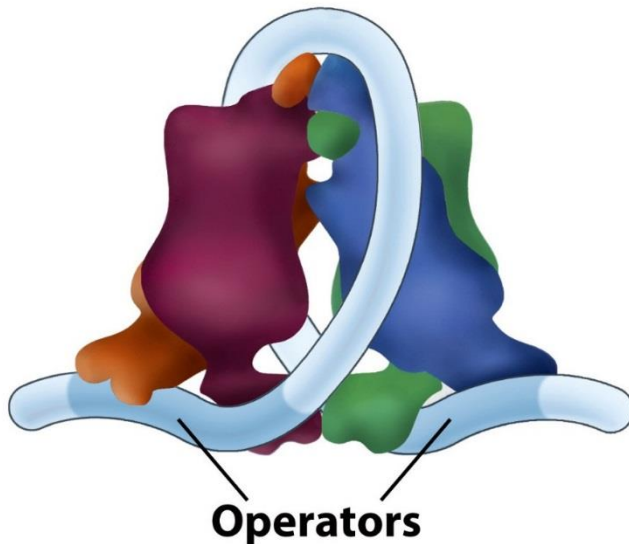


Figure 28-7b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

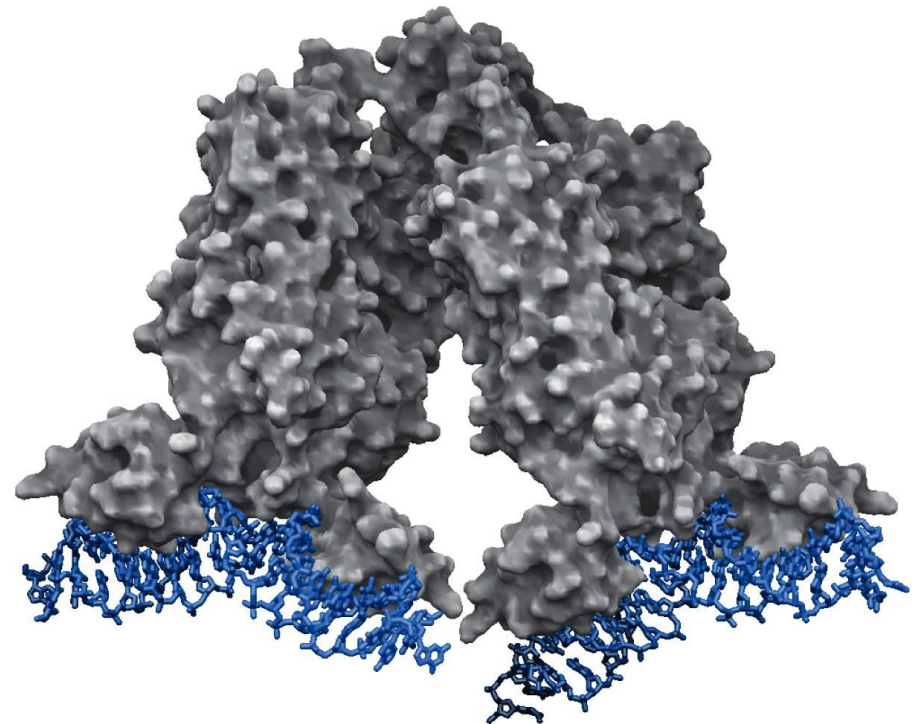
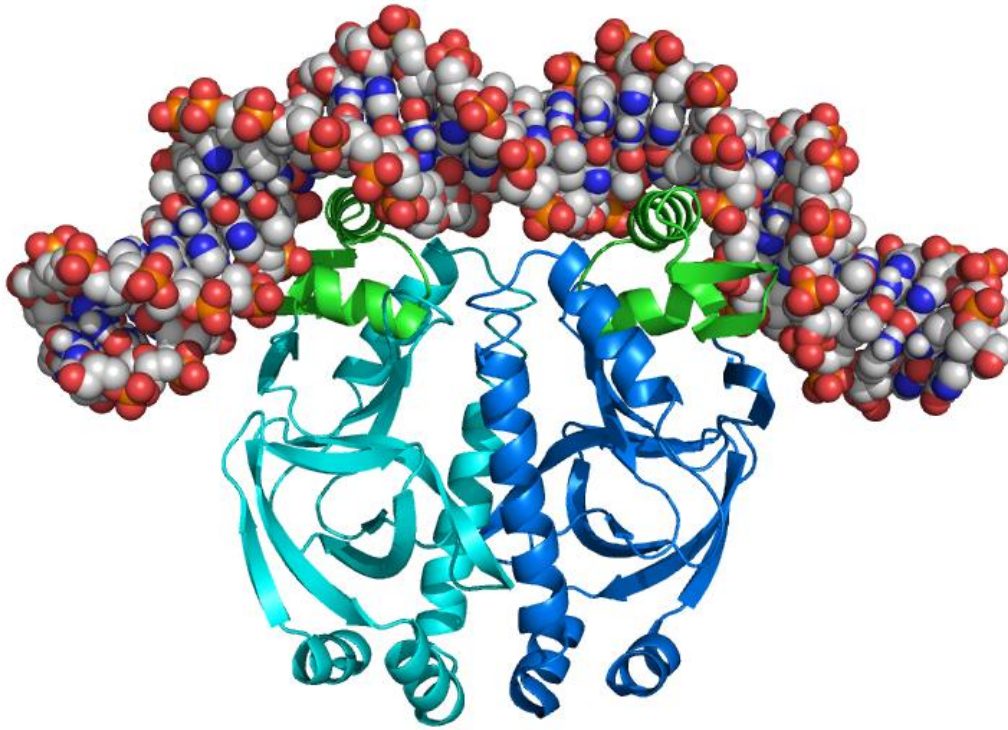


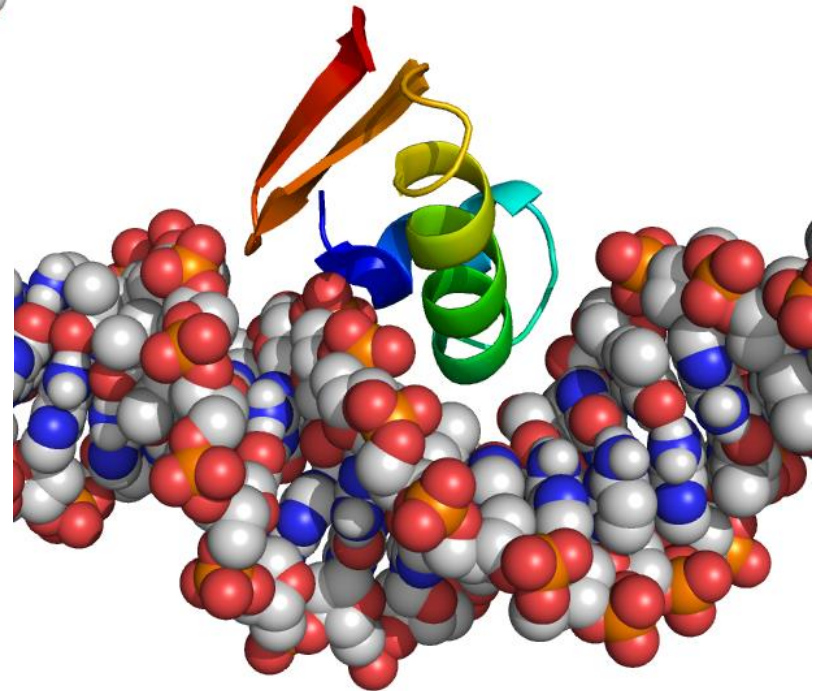
Figure 28-7c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Motiv HTH

Med prokariotske DNA-vezavne proteine s HTH motivi uvrščamo tudi *lac* represor (in homologen PurR) in CAP, ki spadata vsak v svojo družino.

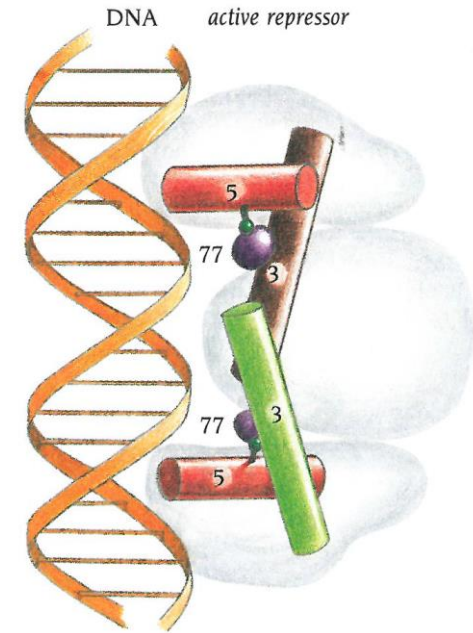
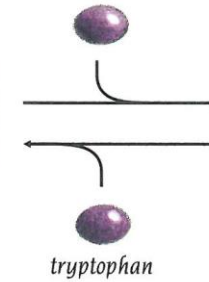
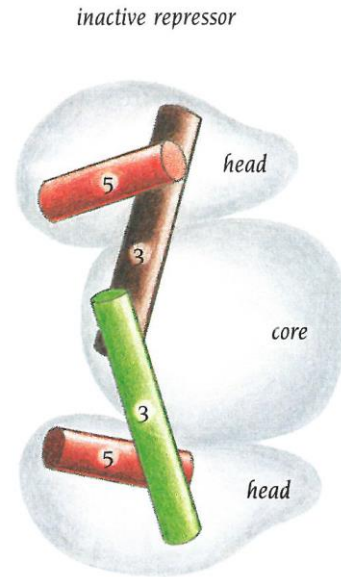
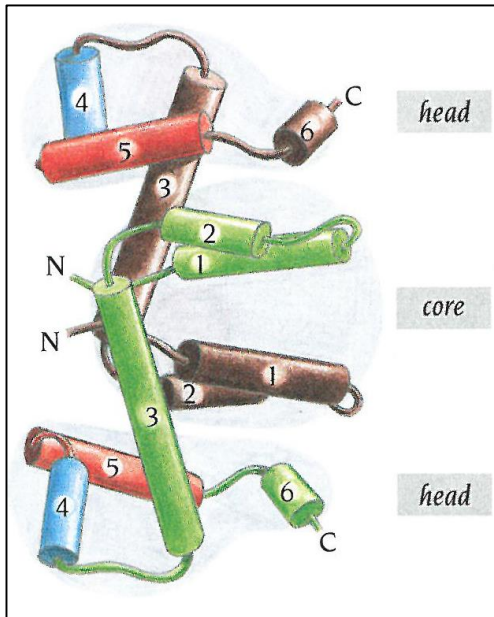


CAP spada v družino s t.i. „winged HTH“ motivom, kjer HTH motivu sledi še majhna antiparalelna β ploskev, ki interagira z malim žlebom DNA.



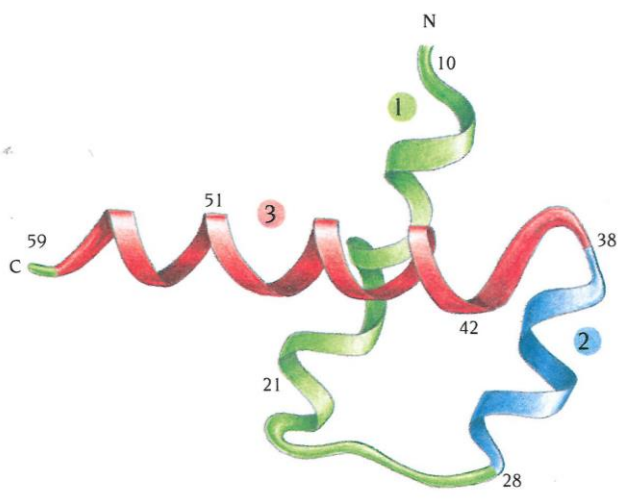
Motiv HTH

V posebno družino proteinov s HTH motivi spada tudi **Trp represor**, katerega posledica je alosterična regulacija s produktom metabolne poti, katero regulira.

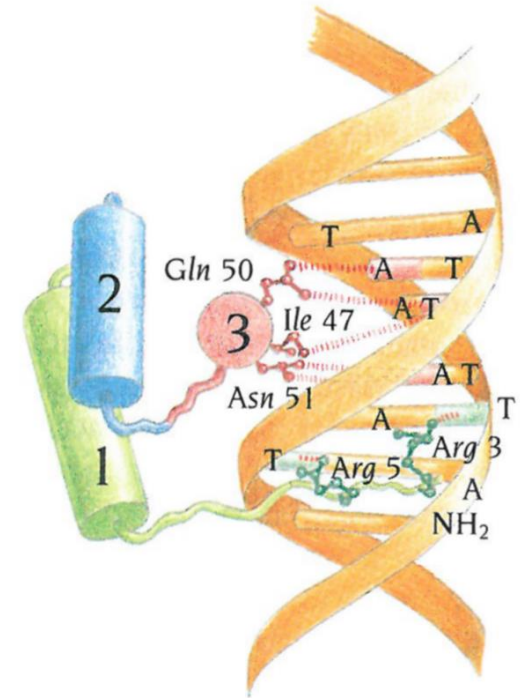
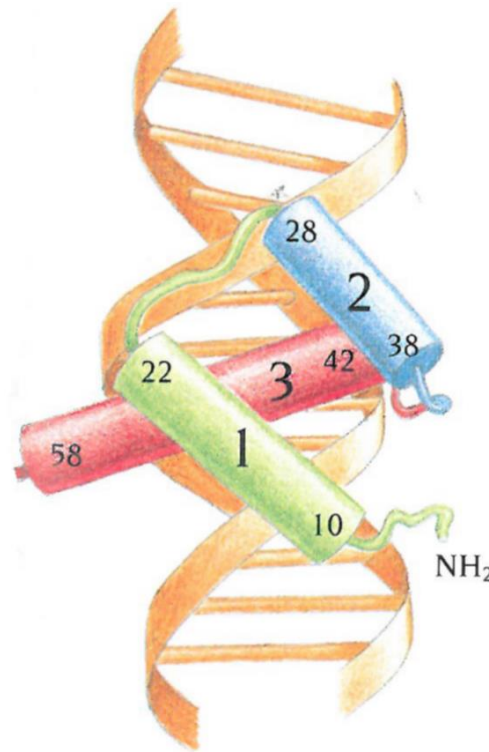


Motiv HTH

Pri evkariontih motiv HTH pogosto najdemo v **homeodomenah** transkripcijskih faktorjev. Regulirajo predvsem homeotične gene, ki določajo razvoj telesne osi. Na DNA se lahko vežejo kot monomeri.



Homeodomena proteina
Antennapedia iz *Drosophila*

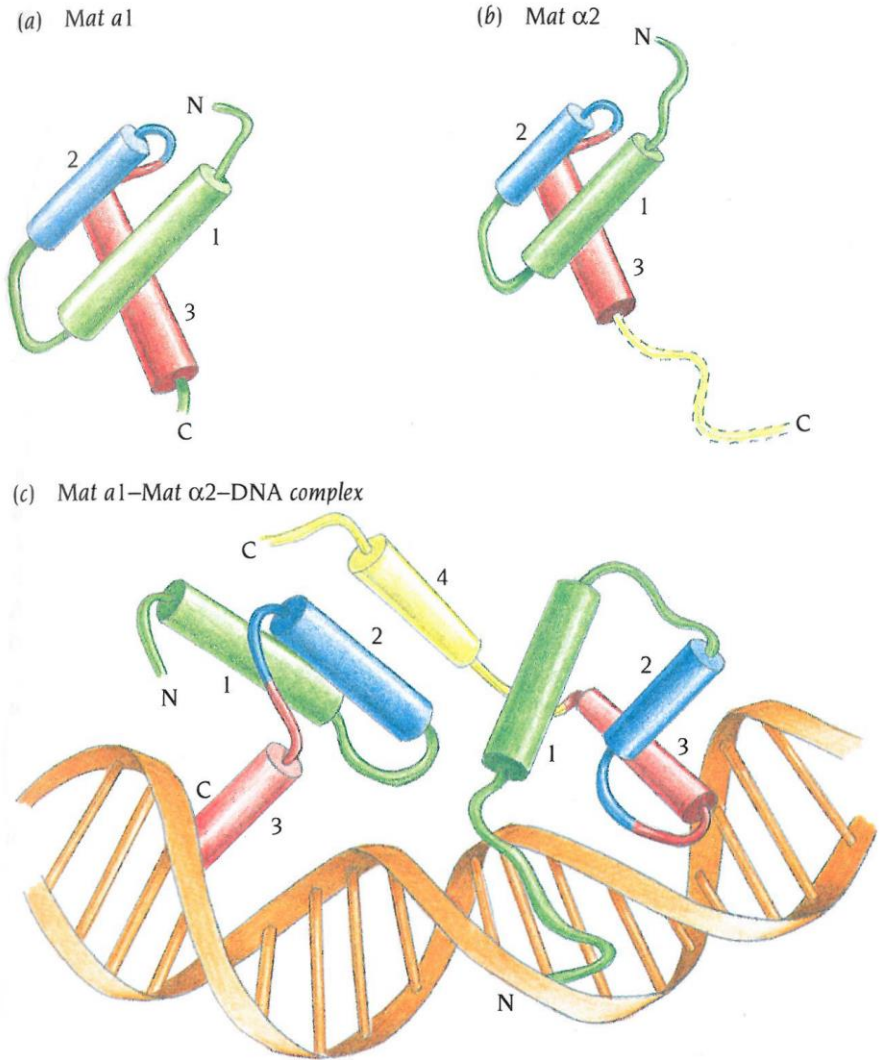


Homeodomene interagirajo tako z velikim kot z malim žlebom DNA.

Motiv HTH

Visoko specifičnost aktivacije homeotičnih genov se doseže s koordiniranim delovanjem večih transkripcijskih faktorjev, ki lahko vsebujejo homeodomene ali katere druge DNA-vezavne motive.

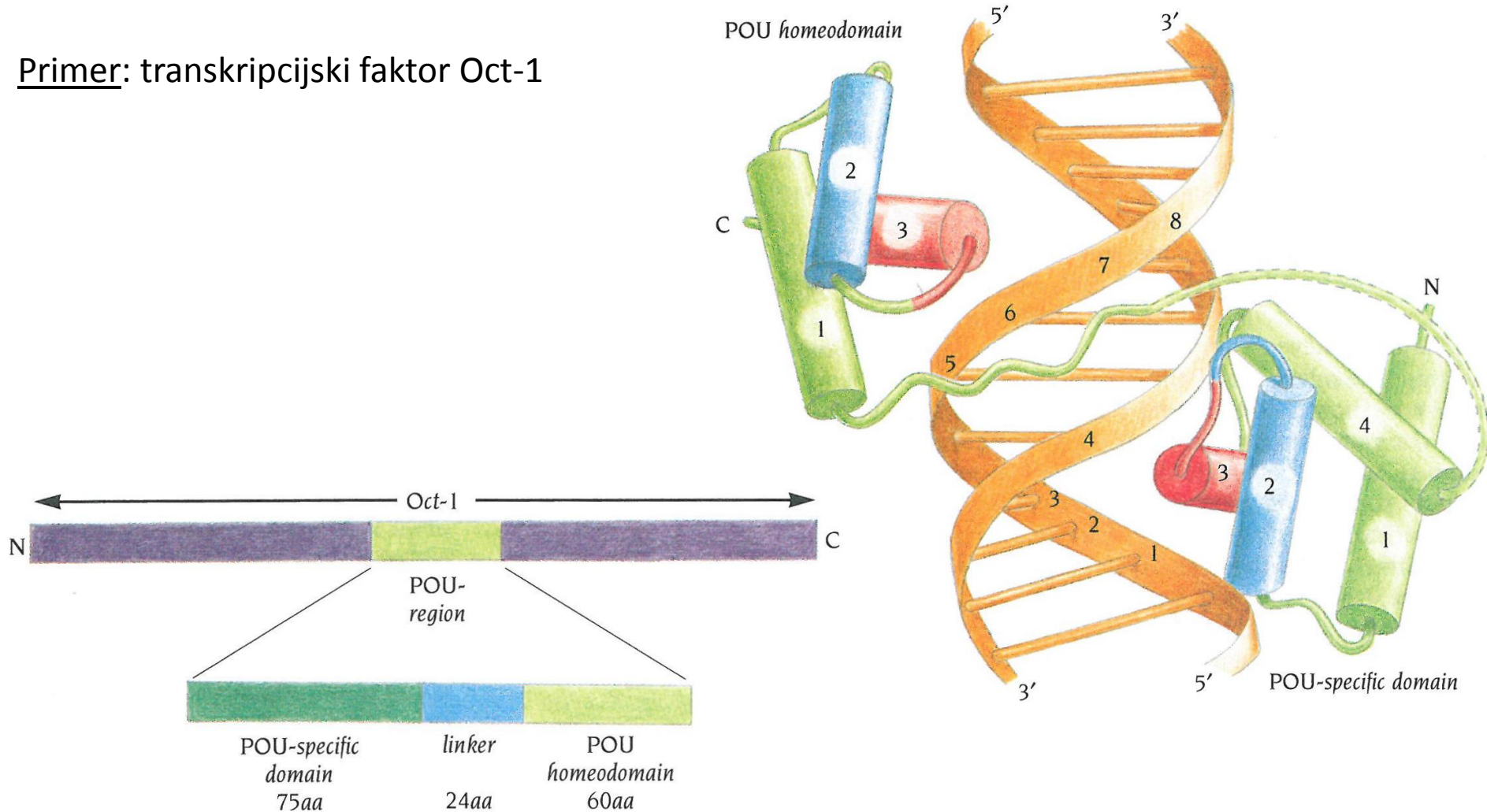
Primer: heterodimerni transkripcijski faktor Mat- α 1/Mat- α 2 iz kvasovke



Motiv HTH

Variacijo na temo kombiniranja različnih DNA-vezavnih elementov najdemo v transkripcijskih faktorjih, ki vsebujejo t.i. **POU regijo** in ponavadi regulirajo izražanje rastnih faktorjev, histonov in imunoglobulinov.

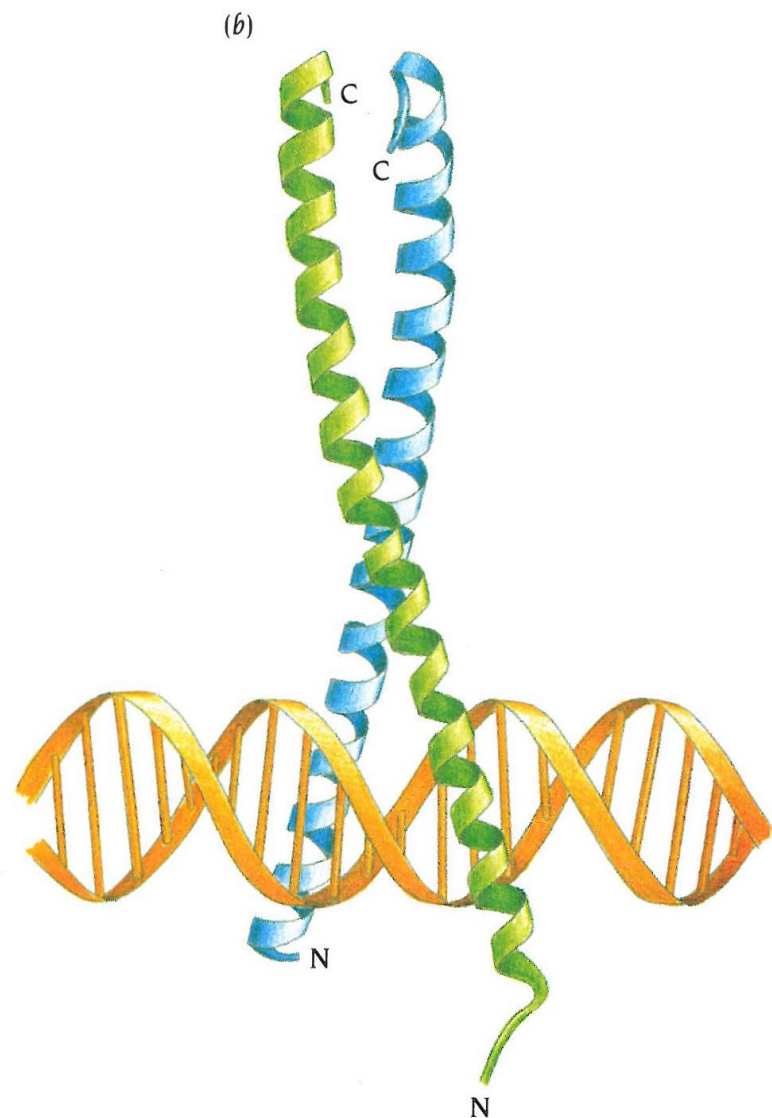
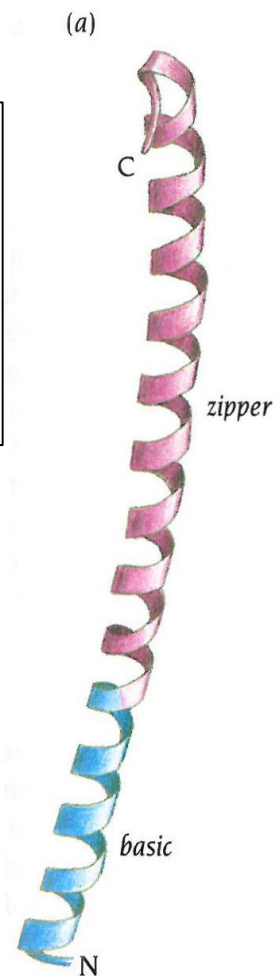
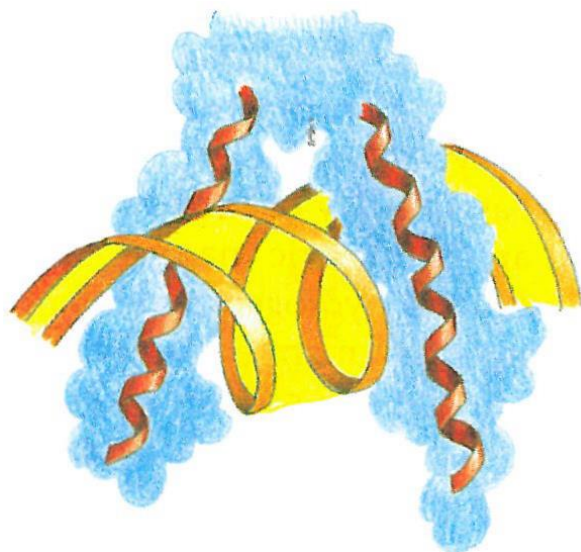
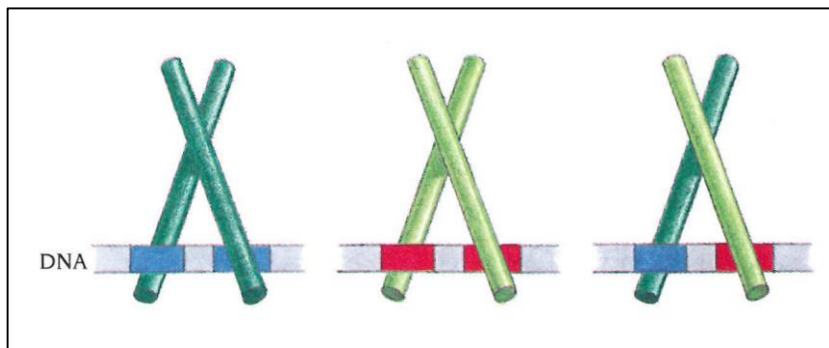
Primer: transkripcijski faktor Oct-1



Levcinska zadruga

Proteini z DNA vezavnim motivom levcinske zadrge tvorijo homo- ali heterodimere, s čimer dosežejo visoko specifičnost vezave na DNA.

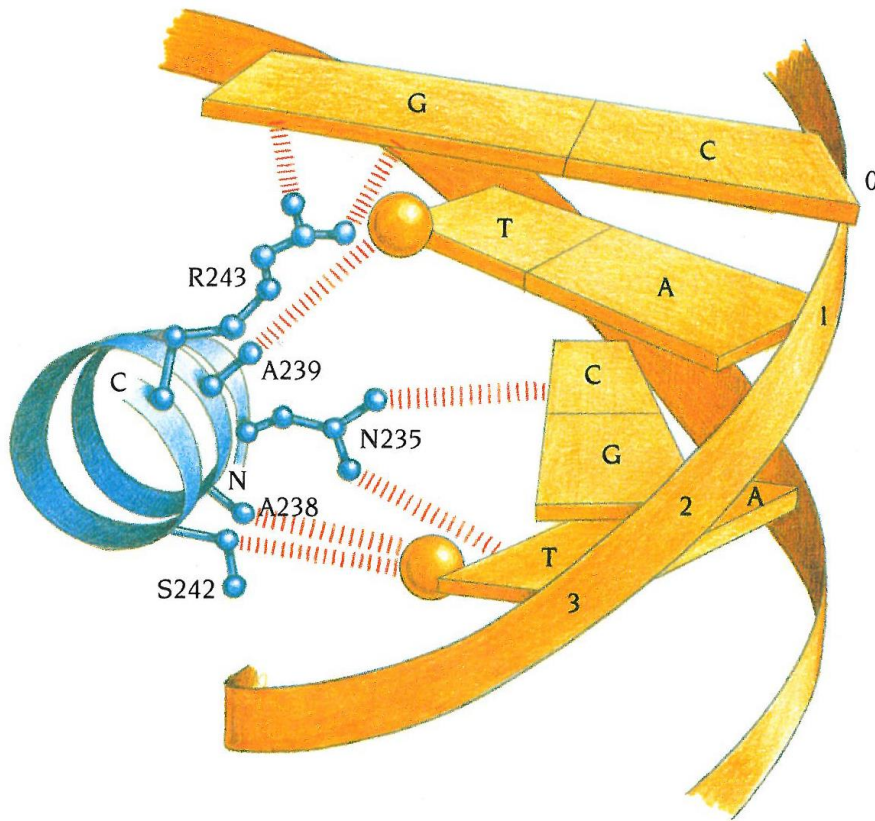
Primer: kvasni transkripcijski faktor GCN4



Levcinska zadruga

Proteini z DNA vezavnim motivom levcinske zadrge tvorijo homo- ali heterodimere, s čimer dosežejo visoko specifičnost vezave na DNA.

Primer: kvasni transkripcijski faktor GCN4

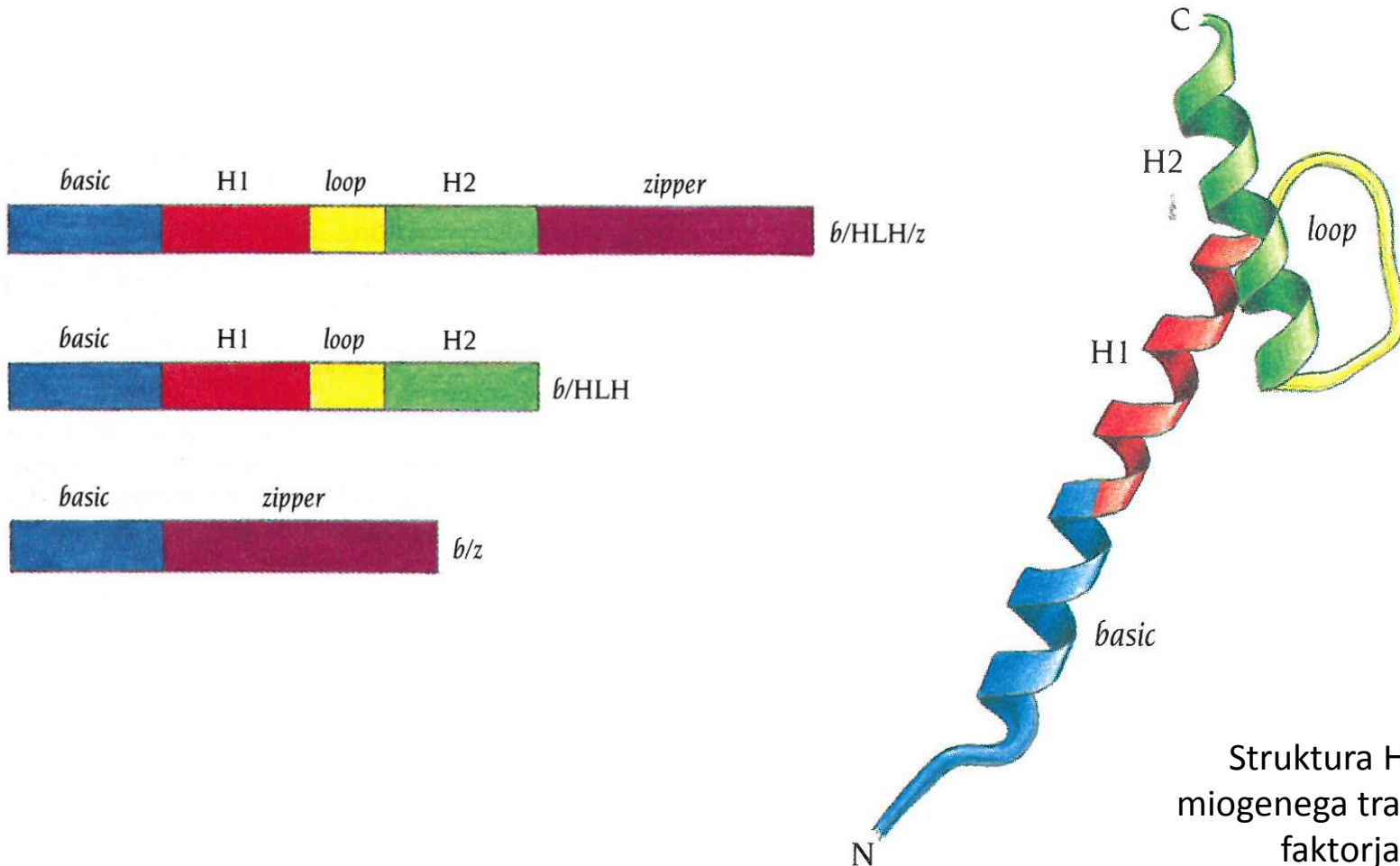


Levcinske zadrge tvorijo tako specifične interakcije z bazami (levo) kot nespecifične interakcije z ogrodjem DNA.

Vsaka vijačnica interagira z velikim žlebom s štirimi stranskimi verigami.

Motiv HLH

Motiv vijačnica-zanka-vijačnica je sestavljena iz bazične DNA-vezavne vijačnice, zanke in krajše vijačnice. Motiv se pogosto kombinira z levcinsko zadrigo. Člani družine so si med seboj zelo podobni (nad 2/3 identičnih ak). Ponavadi vežejo DNA zaporedja 5'-CANNTG-3'.

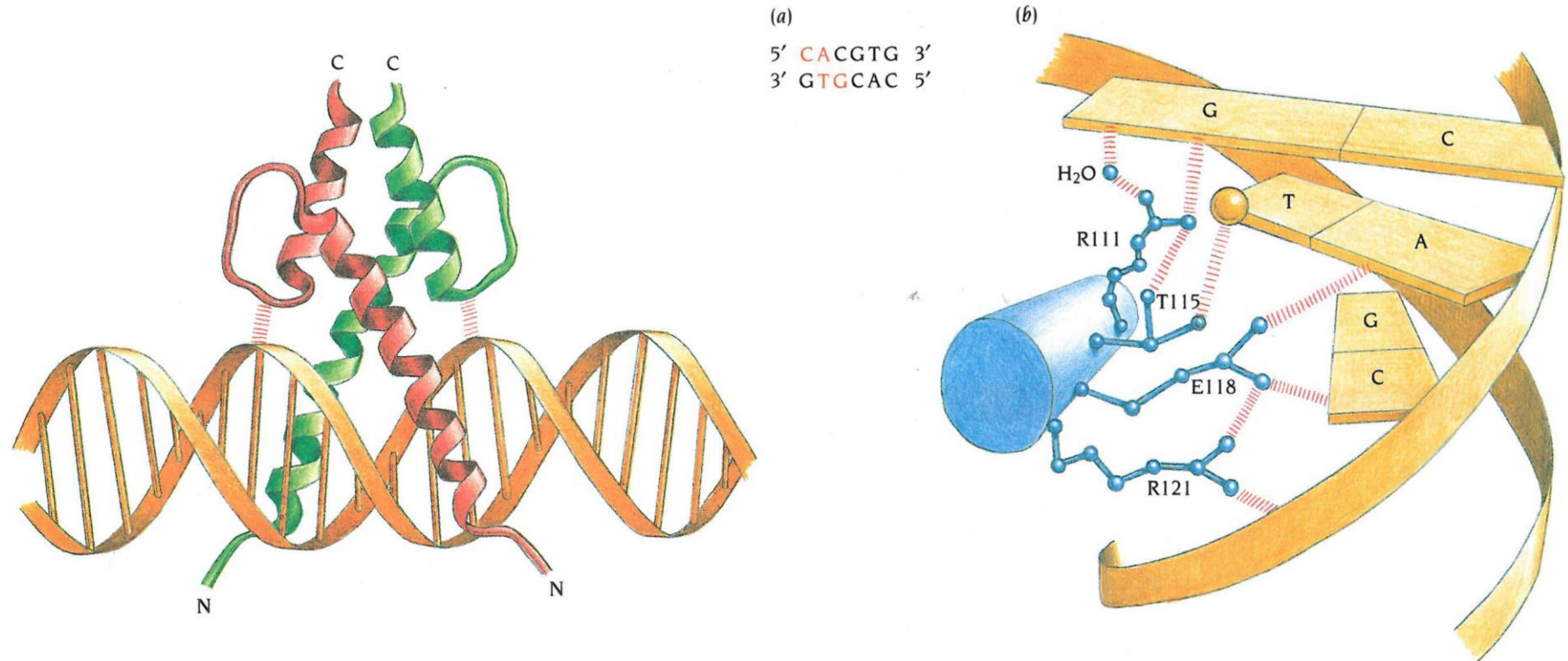


Struktura HLH motiva miogenega transkripcijskega faktorja MyoD.

Motiv HLH

Motiv vijačnica-zanka-vijačnica je sestavljena iz bazične DNA-vezavne vijačnice, zanke in krajše vijačnice. Motiv se pogosto kombinira z levcinsko zadrigo. Člani družine so si med seboj zelo podobni (nad 2/3 identičnih ak). Ponavadi vežejo DNA zaporedja 5'-CANNTG-3'.

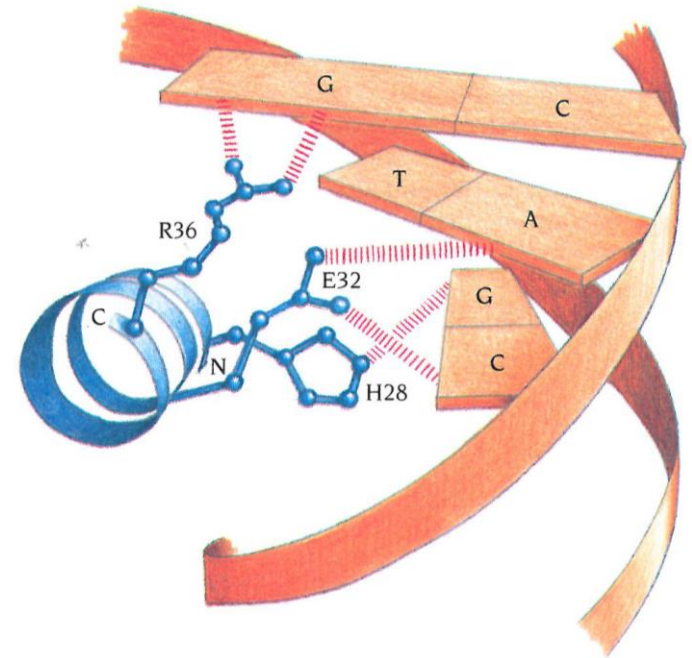
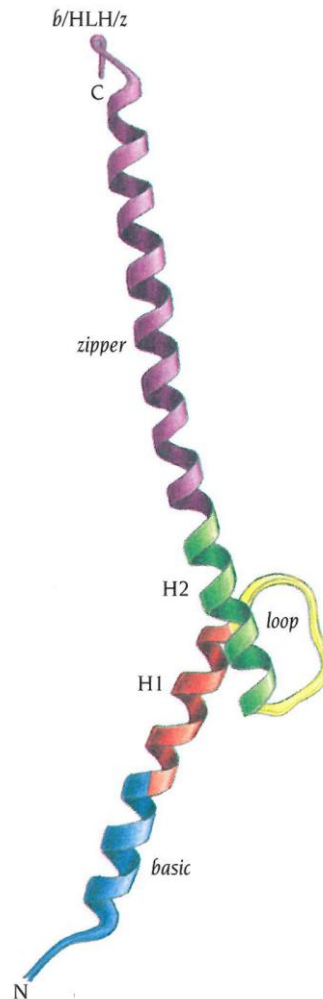
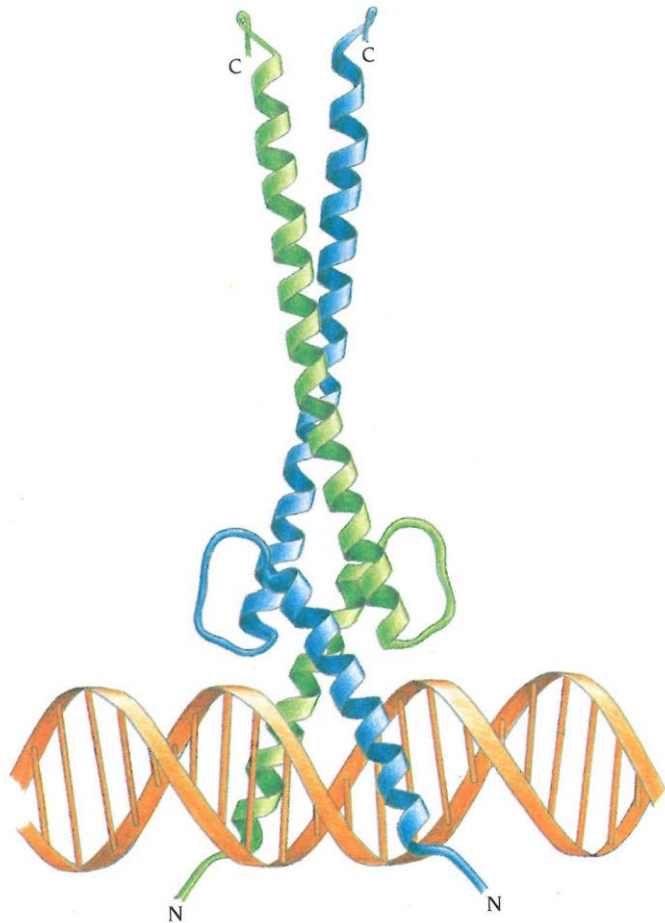
Primer: miogeni transkripcijski faktor MyoD



Motiv HLH

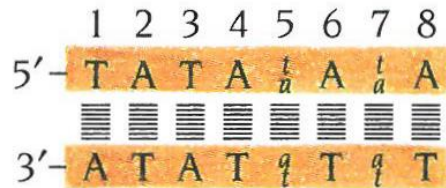
Motiv vijačnica-zanka-vijačnica je sestavljena iz bazične DNA-vezavne vijačnice, zanke in krajše vijačnice. Motiv se pogosto kombinira z levcinsko zadrigo. Člani družine so si med seboj zelo podobni (nad 2/3 identičnih ak). Ponavadi vežejo DNA zaporedja 5'-CANNTG-3'.

Primer: transkripcijski faktor Max

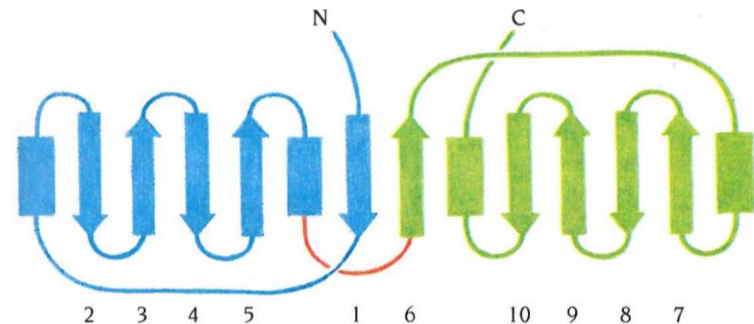
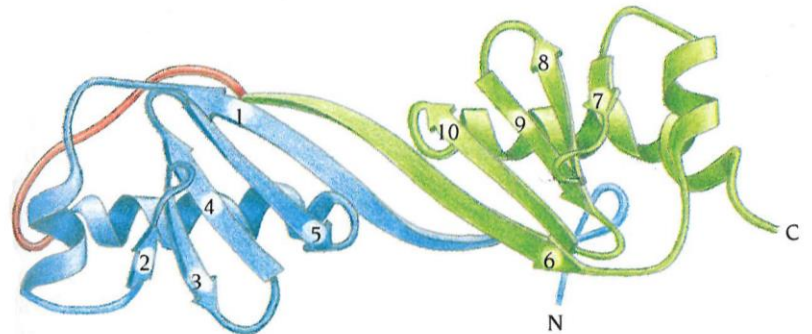
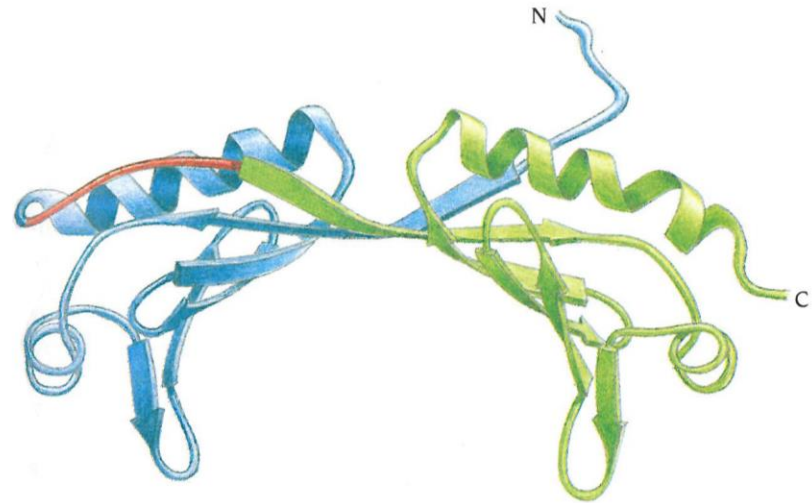


TATA-vezavni protein

TBP je zgrajen iz dveh tandemnih enot α/β sendviča, ki tvorita kontinuirno antiparalelno beta ploskev v obliki sedla.

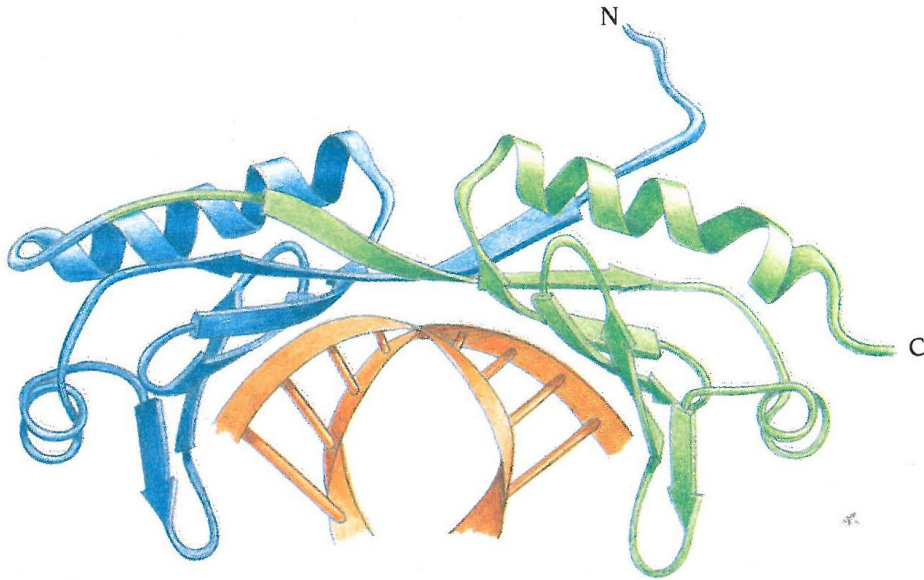


(a) consensus sequence of the TATA box

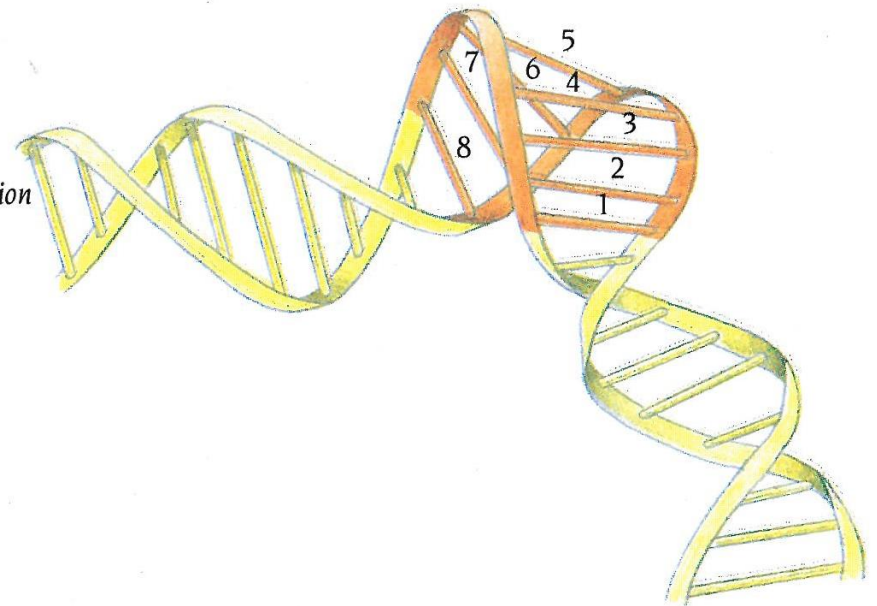


TATA-vezavni protein

TBP se veže v mali žleb DNA in povzroči veliko konformacijsko spremembo. Interakcije so pretežno hidrofobne.

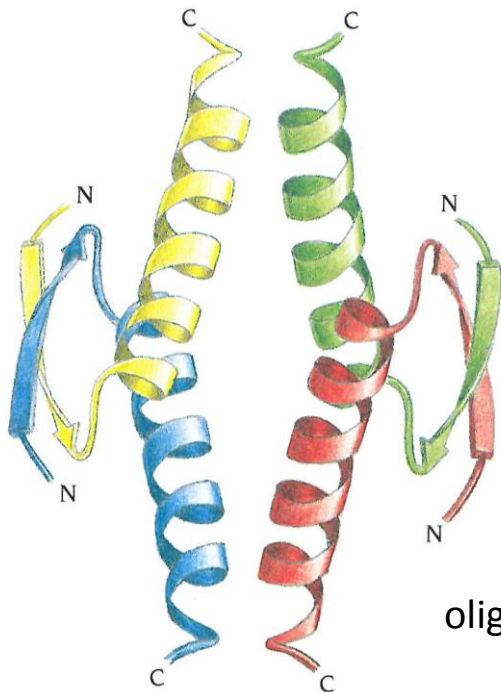
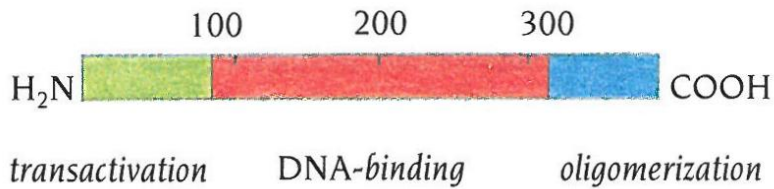


*Transcription
start site*

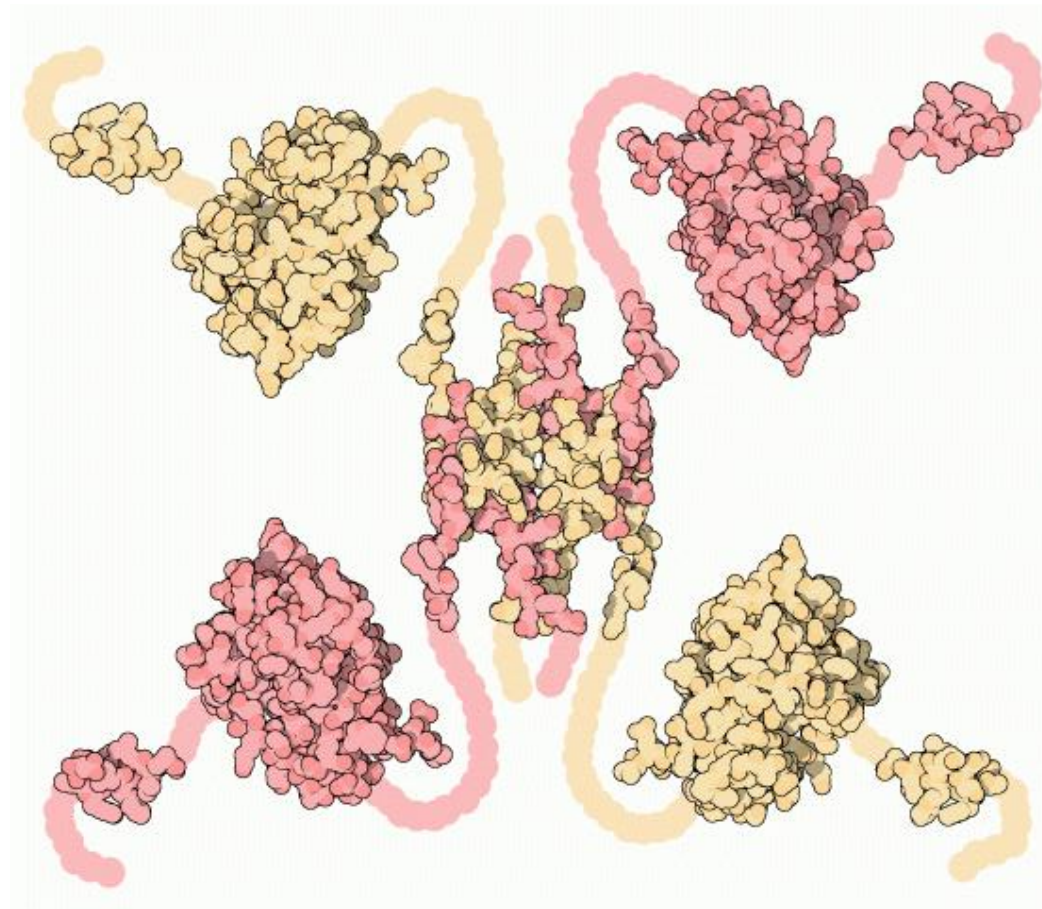


Protein p53

Tumorski supresor p53 je primer proteina, ki veže DNA preko interakcij, ki jih posredujejo zanke domene z zvitjem β sendviča. Je homotetramer, vsaka polipeptidna veriga pa je sestavljena iz treh domen.



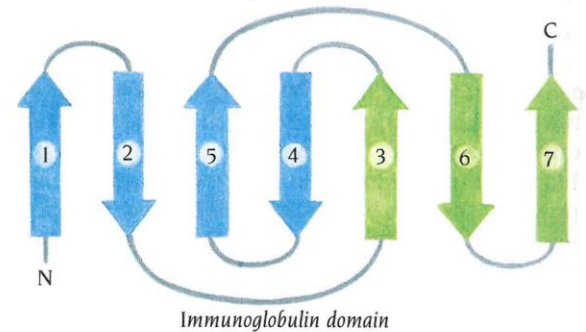
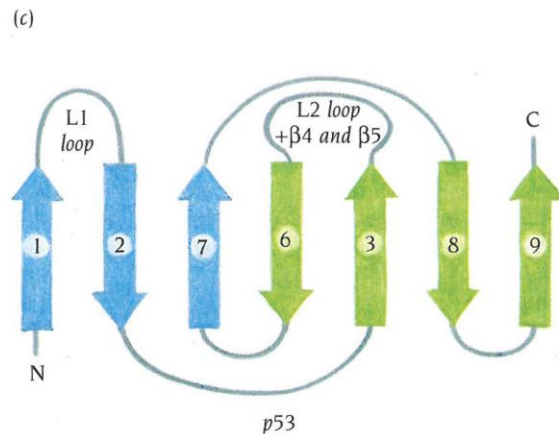
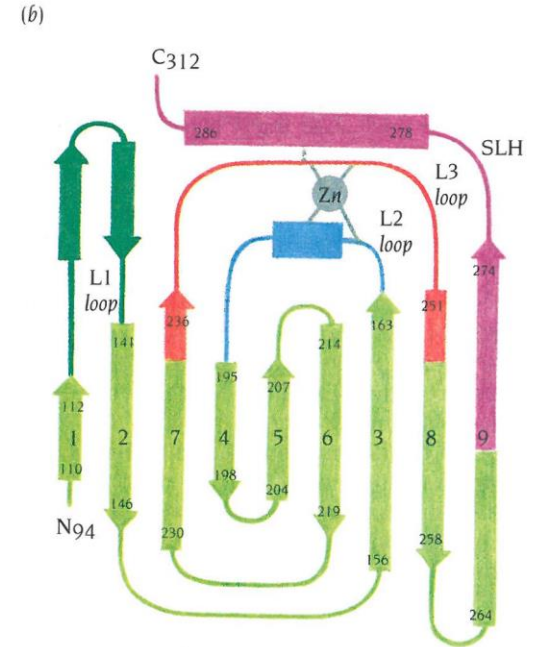
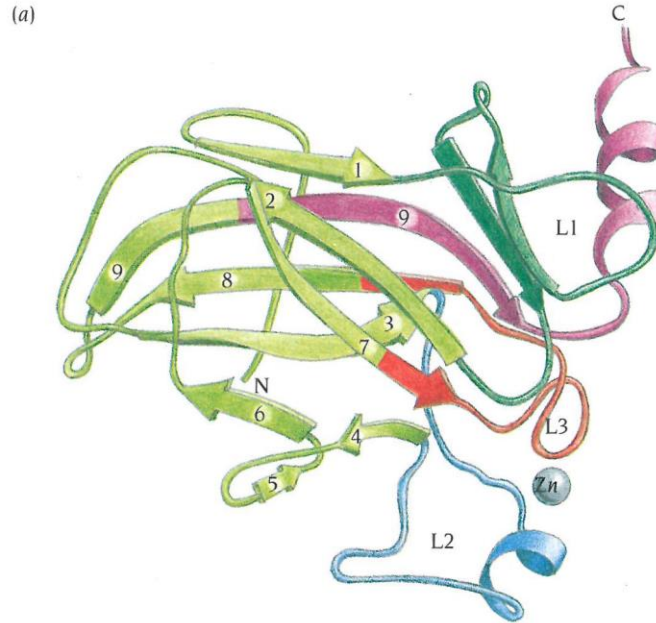
oligomerizacijska
domena



Protein p53

Tumorski supresor p53 je primer proteina, ki veže DNA preko interakcij, ki jih posredujejo zanke domene z zvitjem β sendviča. Je homotetramer, vsaka polipeptidna veriga pa je sestavljena iz treh domen.

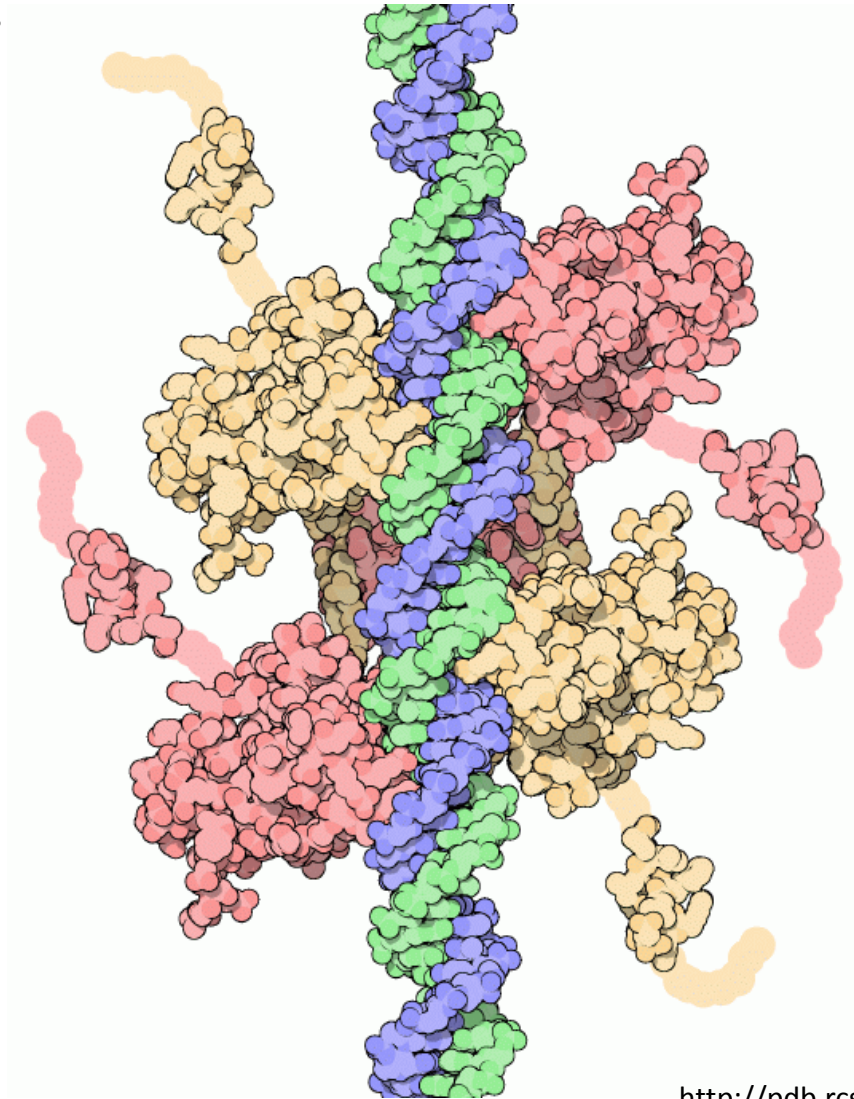
Struktura DNA-vezavne domene:



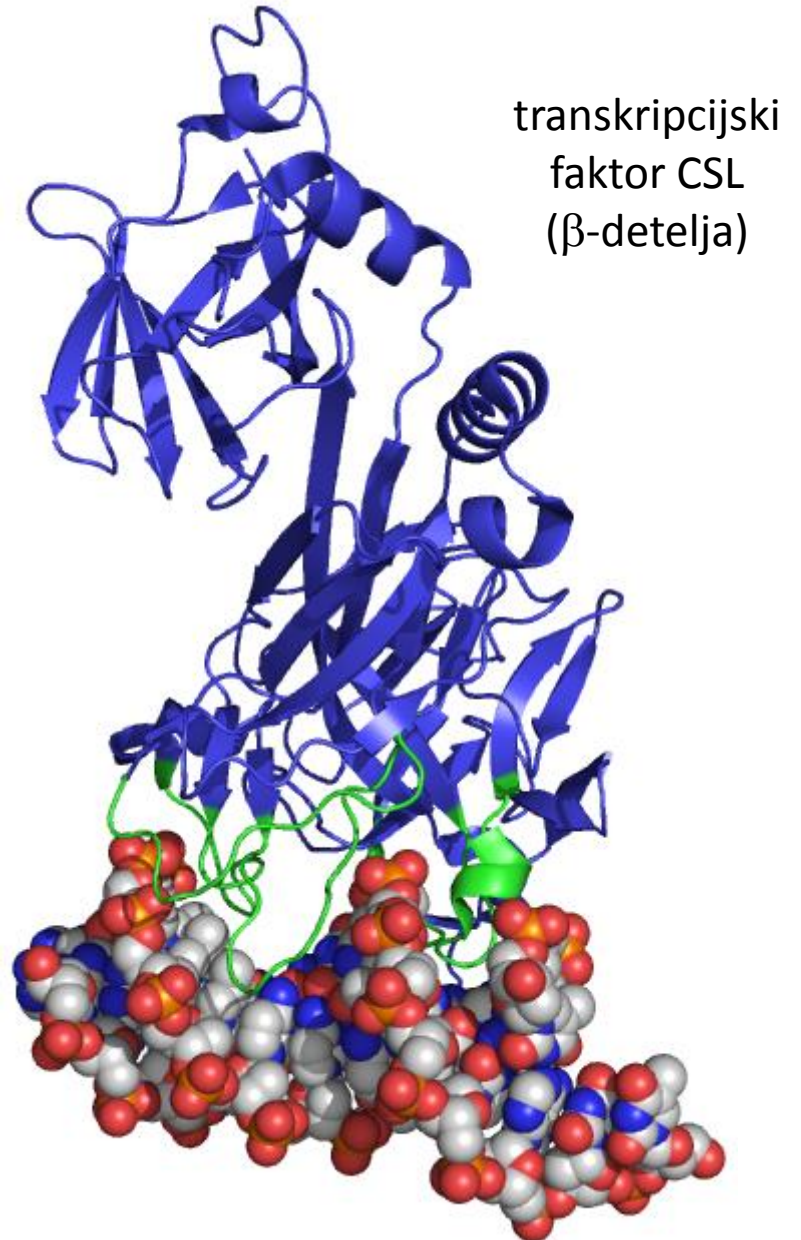
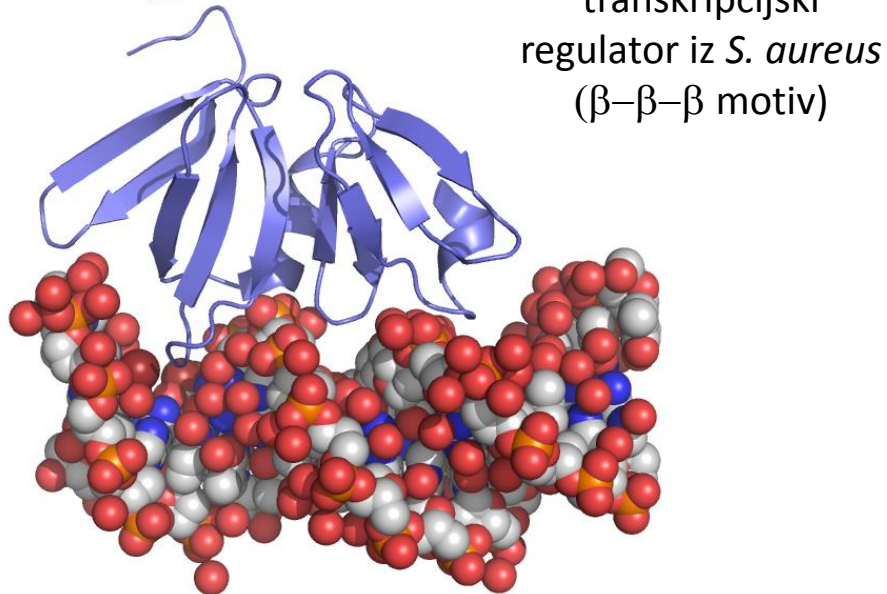
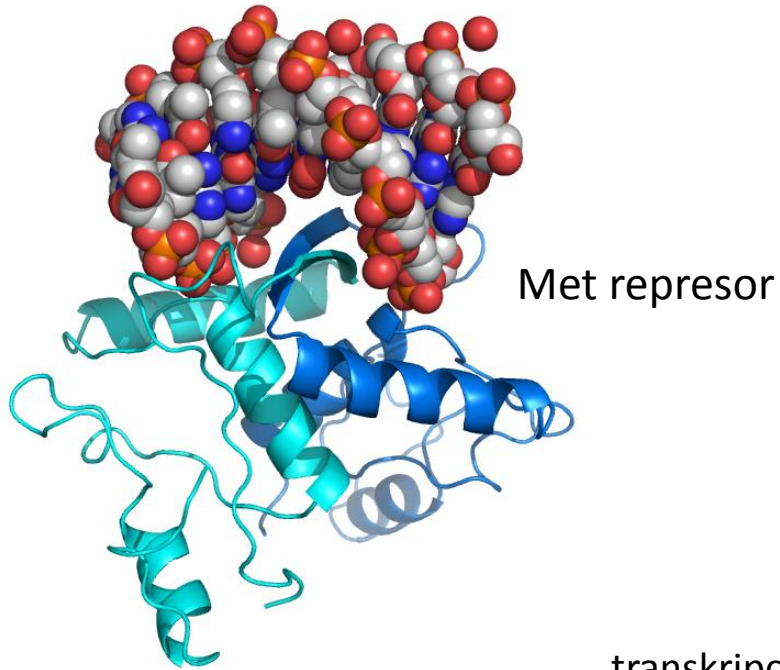
Protein p53

Tumorski supresor p53 je primer proteina, ki veže DNA preko interakcij, ki jih posredujejo zanke domene z zvitjem β sendviča. Je homotetramer, vsaka polipeptidna veriga pa je sestavljena iz treh domen.

Na DNA se vežejo vse štiri podenote hkrati:



Drugi β -motivi

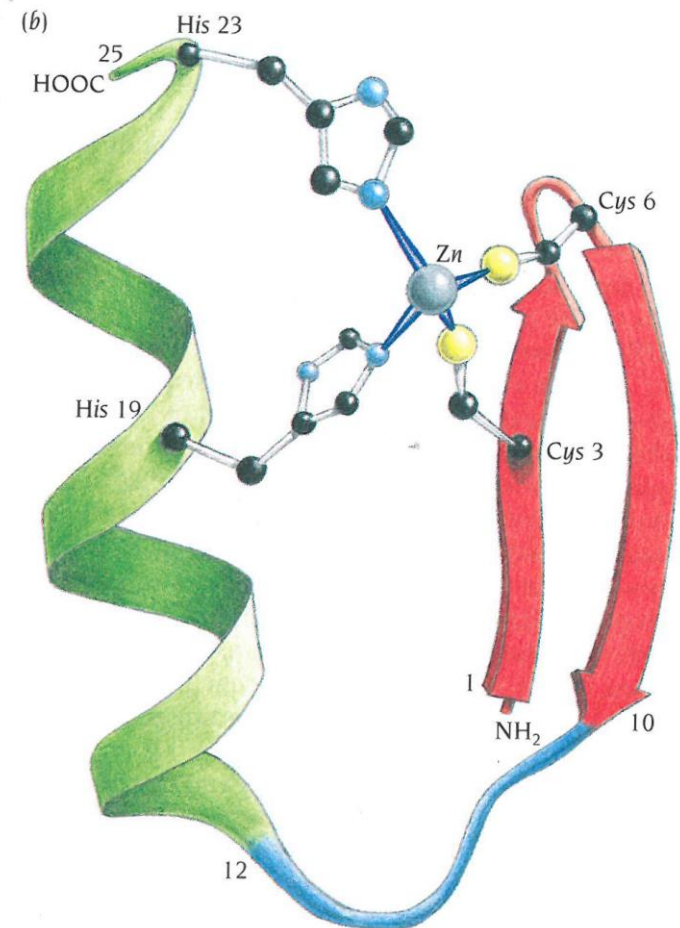
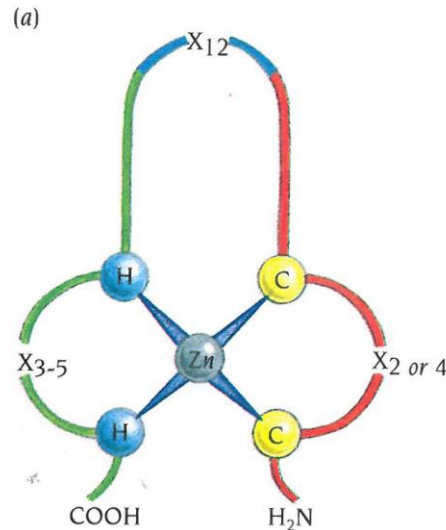


Cinkovi prsti

Cinkov prst je najbolj znan primer mešanega α/β DNA-vezavnega motiva. Vsebuje ga preko tisoč različnih transkripcijskih faktorjev.

Zgradba klasičnega cinkovega prsta:

Poleg Cys_2His_2 motivov poznamo še cinkove prste s Cys_4 , Cys_6 , ... motivi



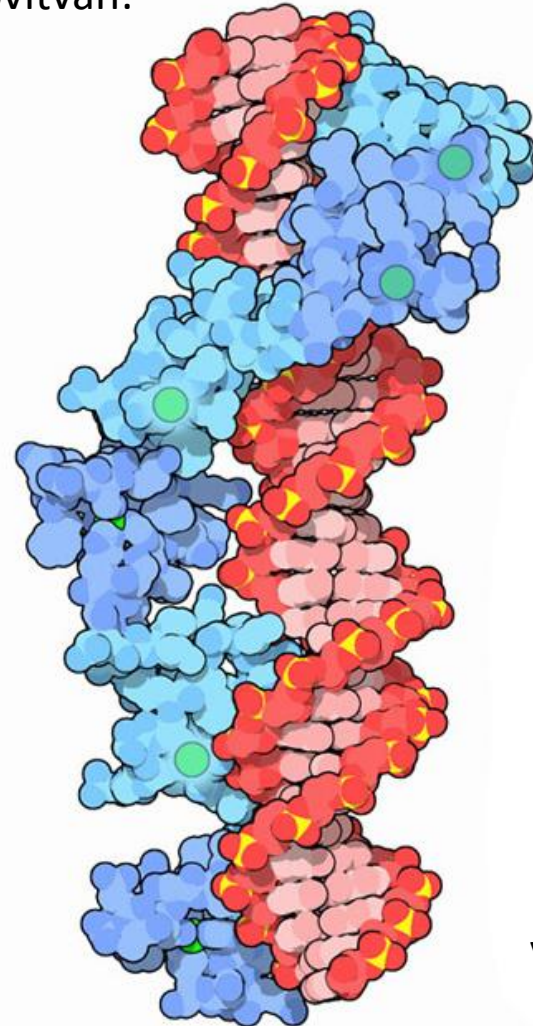
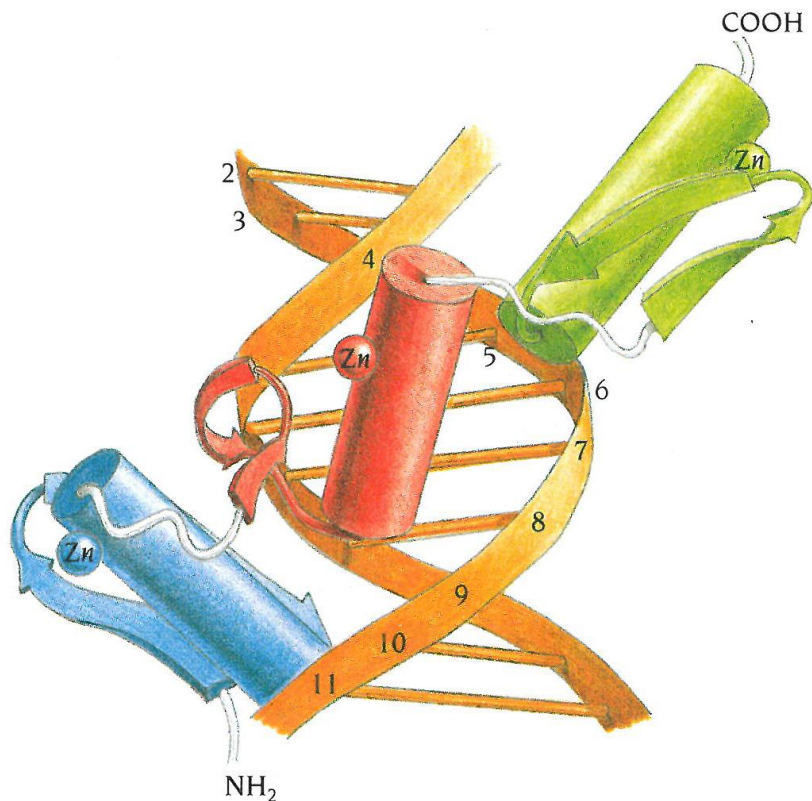
Specifične interakcije z DNA tvori prepoznavna vijačnica, ki prepozna največ 2 do 4 bazne pare.

Vezava posameznega motiva cinkovega prsta na DNA je relativno šibka.

Cinkovi prsti

Cinkov prst je najbolj znan primer mešanega α/β DNA-vezavnega motiva. Vsebuje ga preko tisoč različnih transkripcijskih faktorjev.

Cinkovi prsti se vežejo na DNA v več tandemnih ponovitvah:

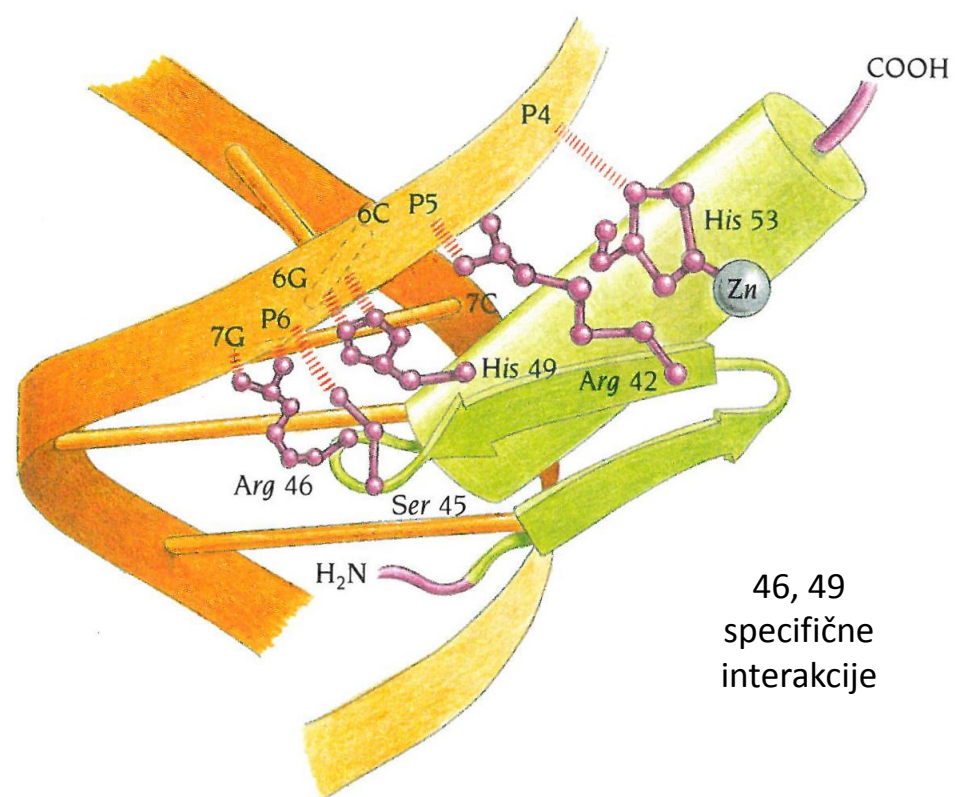
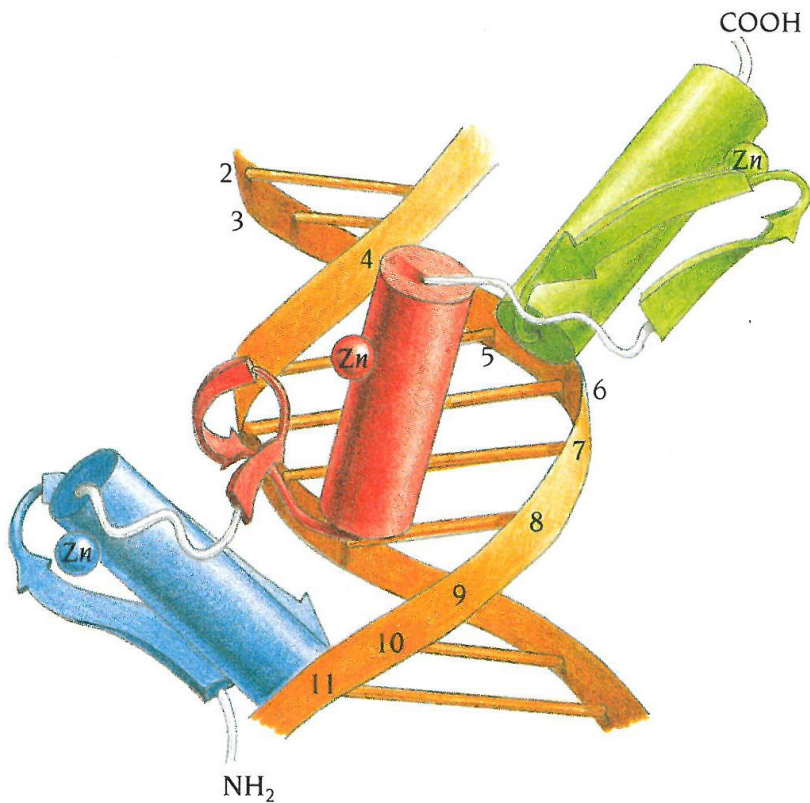


6 zaporednih
motivov TFIIIA
vezanih na DNA.

Cinkovi prsti

Cinkov prst je najbolj znan primer mešanega α/β DNA-vezavnega motiva. Vsebuje ga preko tisoč različnih transkripcijskih faktorjev.

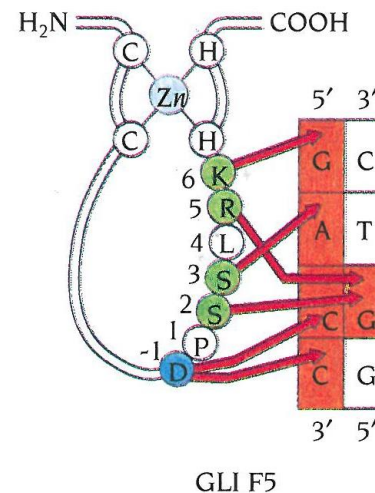
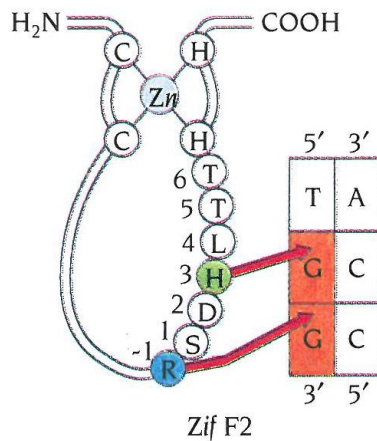
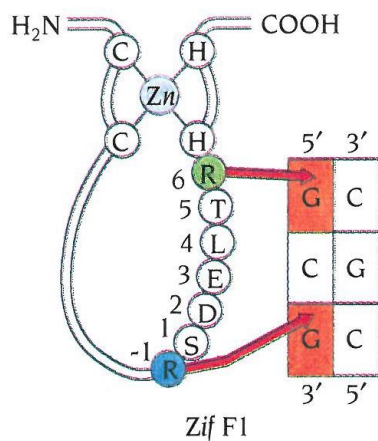
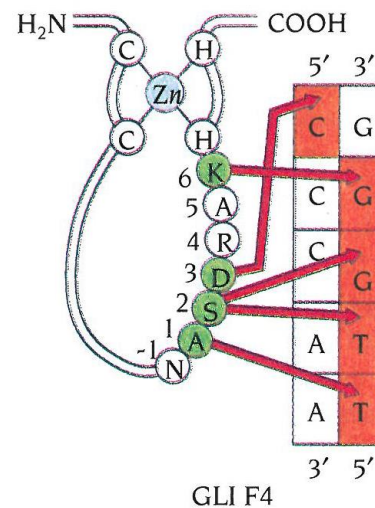
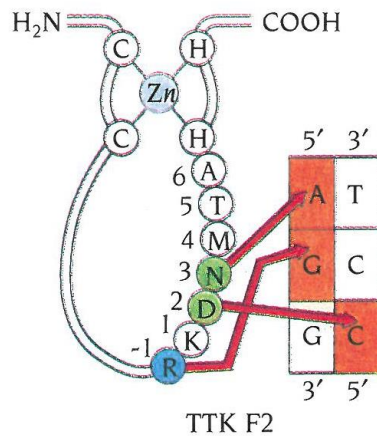
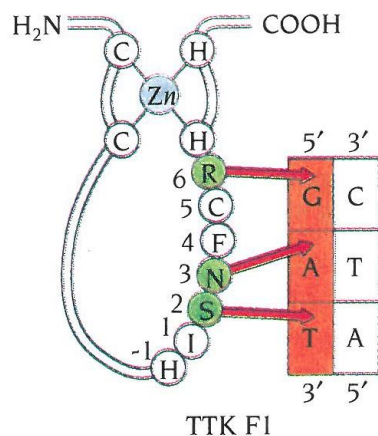
Interakcije z DNA so tako specifične kot nespecifične:



Cinkovi prsti

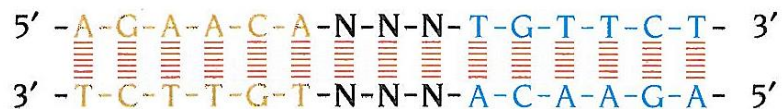
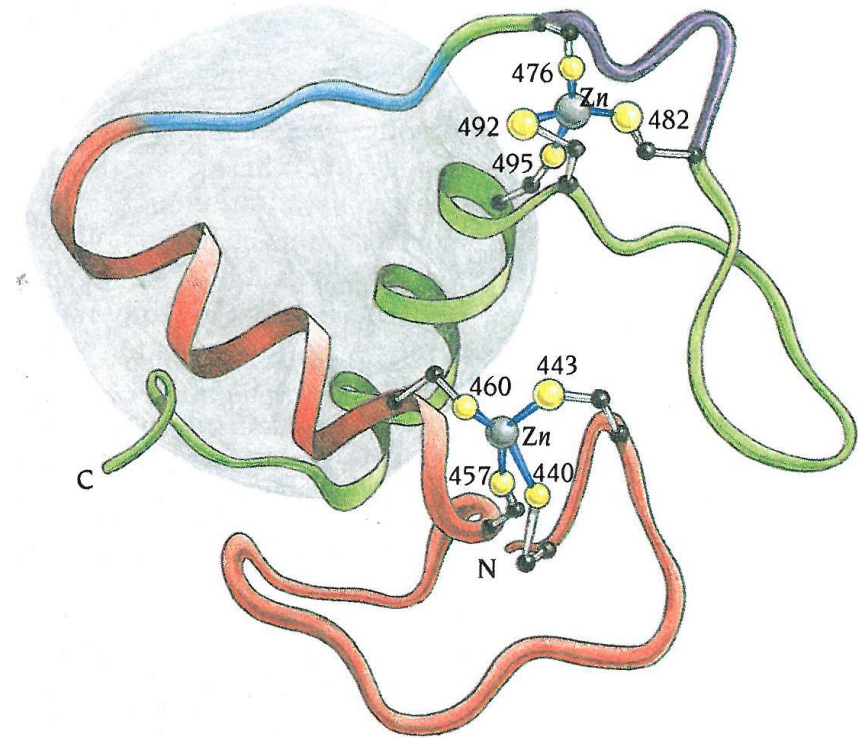
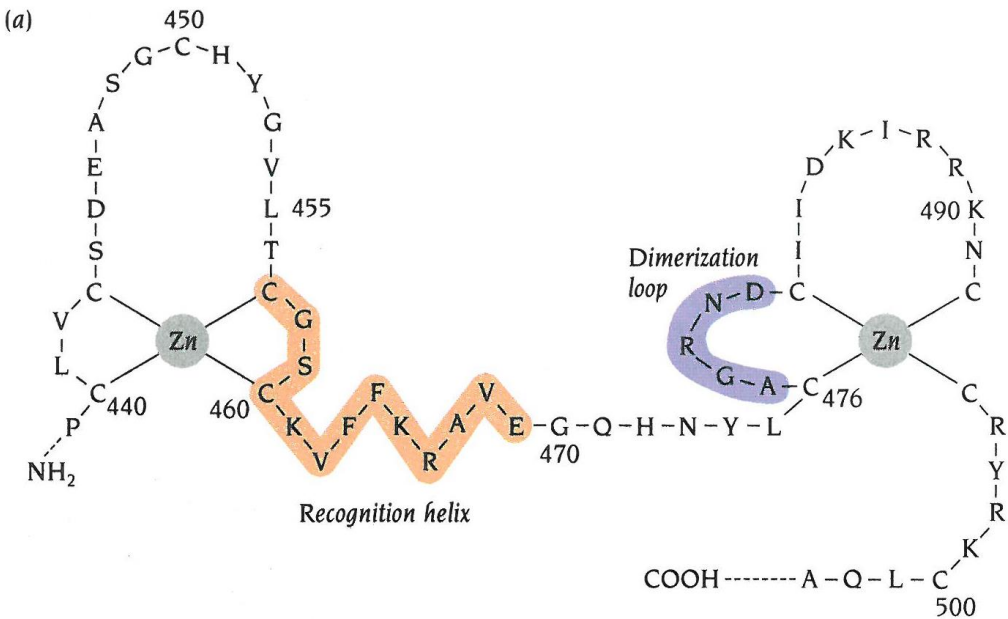
Cinkov prst je najbolj znan primer mešanega α/β DNA-vezavnega motiva. Vsebuje ga preko tisoč različnih transkripcijskih faktorjev.

Primerjava specifičnosti različnih cinkovih prstov:



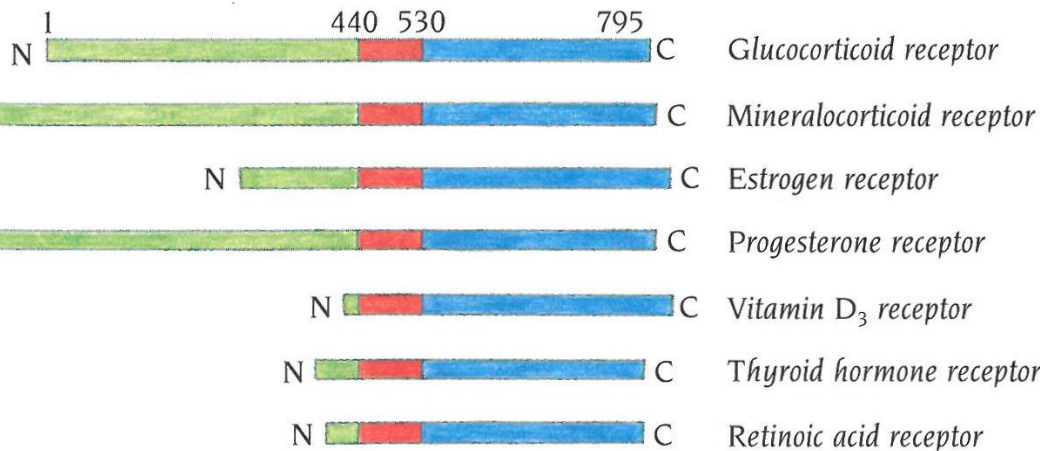
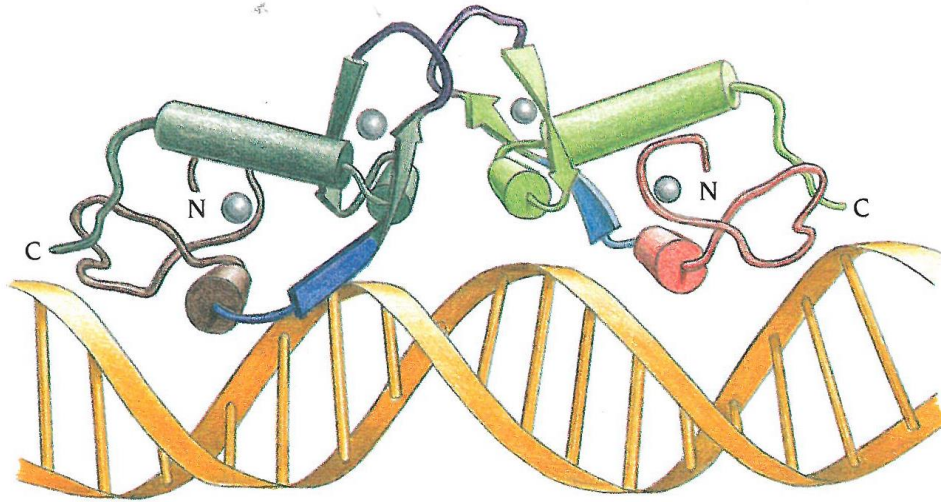
Glukokortikoidni receptor

DNA vezavna domena glukokortikoidnega receptorja vsebuje dva vezana Zn iona, eden stabilizira DNA-vezavno prepoznavno vijačnico, drugi pa dimerizacijsko zanko. Na DNA se veže dimer receptorja.



Glukokortikoidni receptor

DNA vezavna domena glukokortikoidnega receptorja vsebuje dva vezana Zn iona, eden stabilizira DNA-vezavno prepoznavno vijačnico, drugi pa dimerizacijsko zanko. Na DNA se veže dimer receptorja.

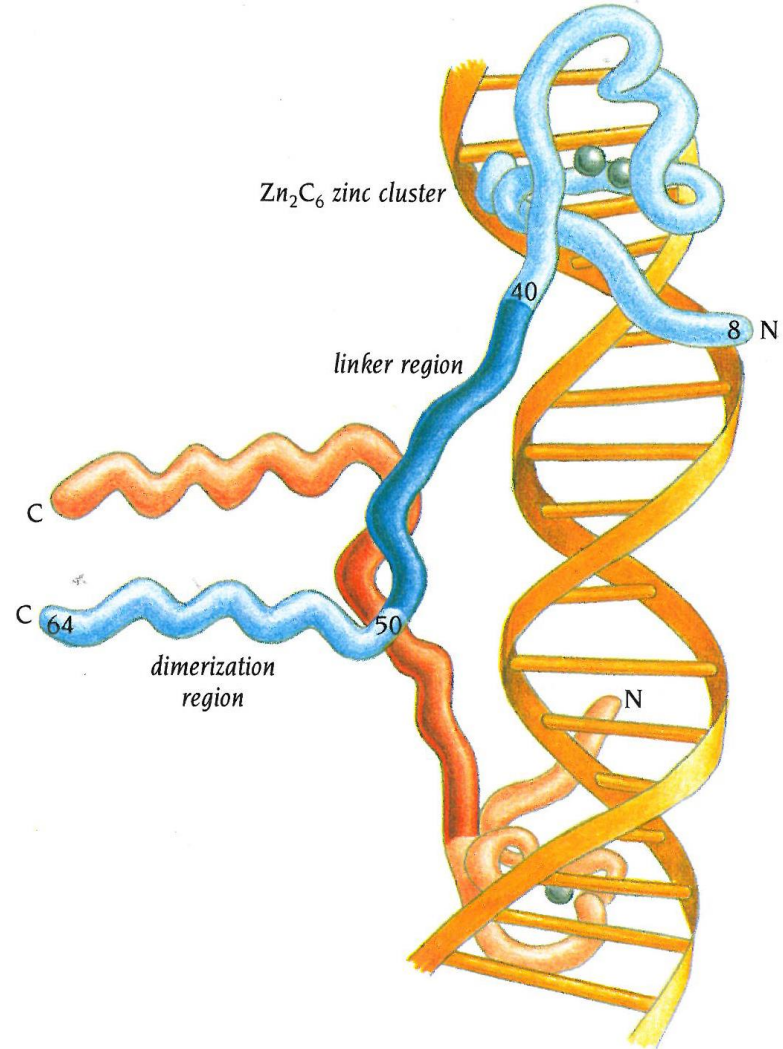
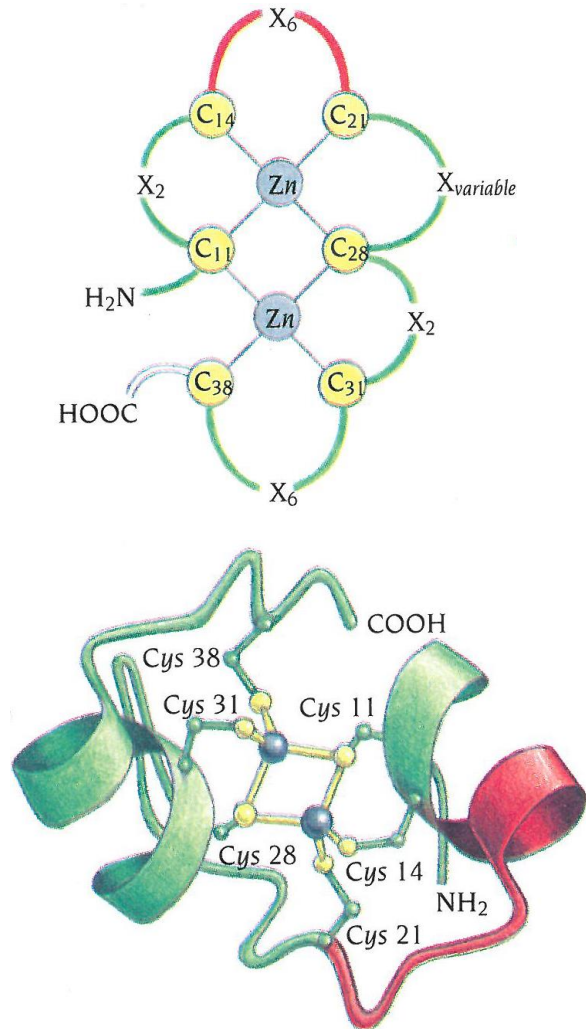


Homologe domene najdemo tudi v drugih receptorjih (*rdeče*) in so dobro ohranjene, medtem ko so ligand-vezavne domene (*modre*) manj.

Cinkov klaster

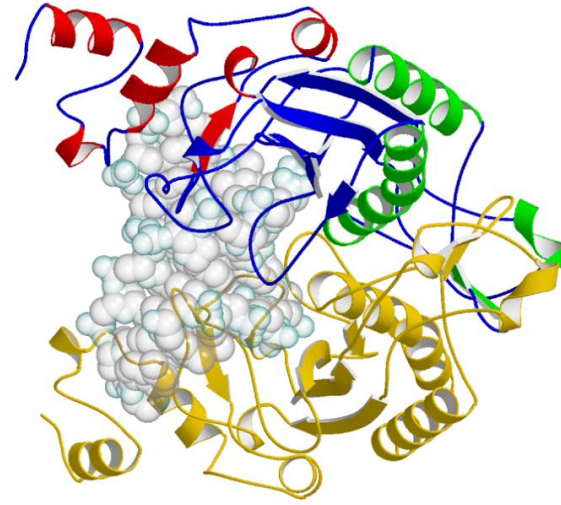
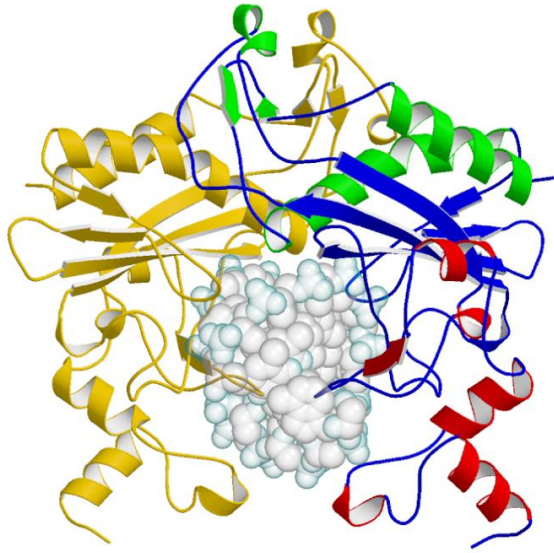
Nekatere DNA-vezavne domene vsebujejo klaster dveh Zn ionov, koordiniran preko šestih Cys.

Primer: cinkov klaster kvasnega transkripcijskega faktorja GAL4

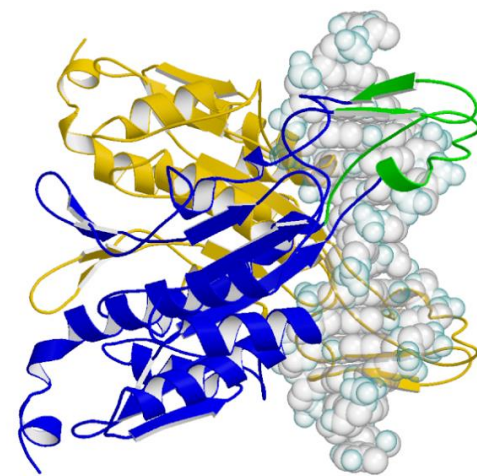
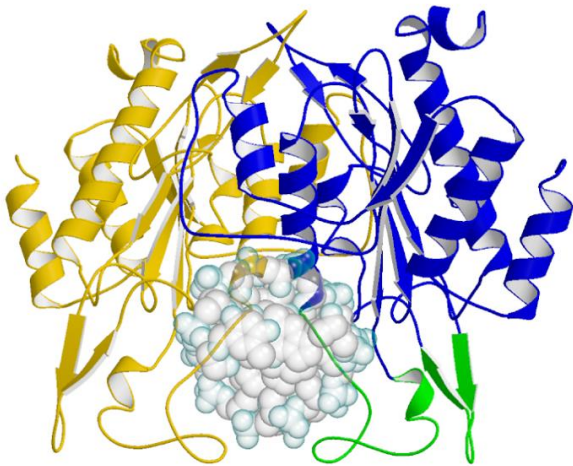


Encimi

EcoRV

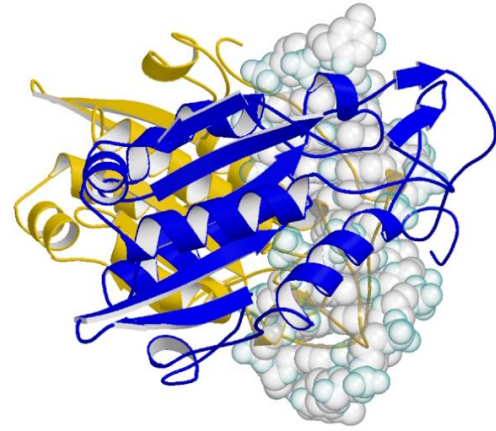
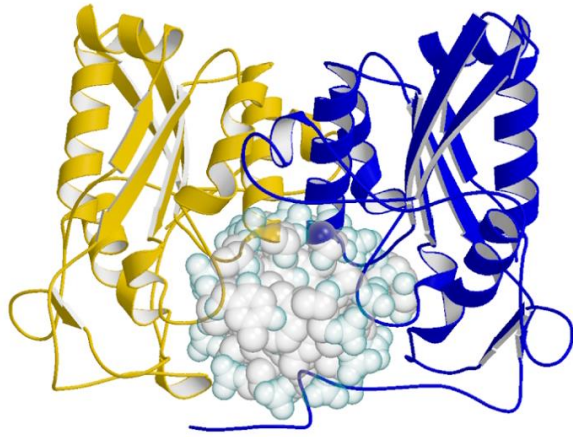


EcoRI

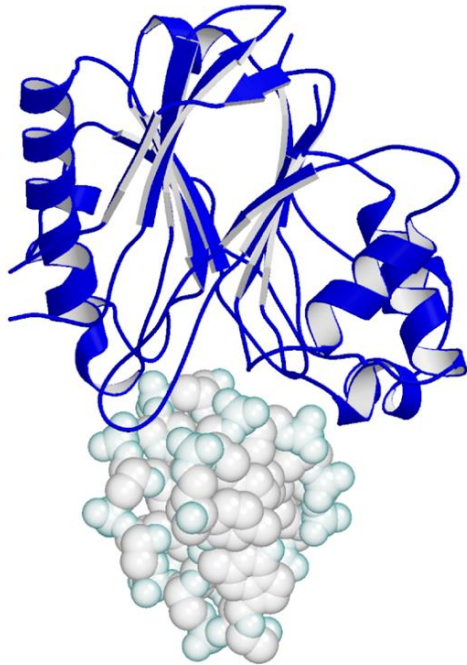


Encimi

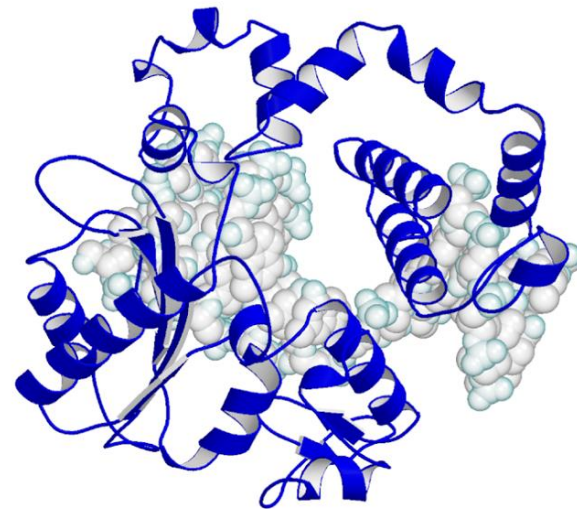
*Bam*HI



DNaza I

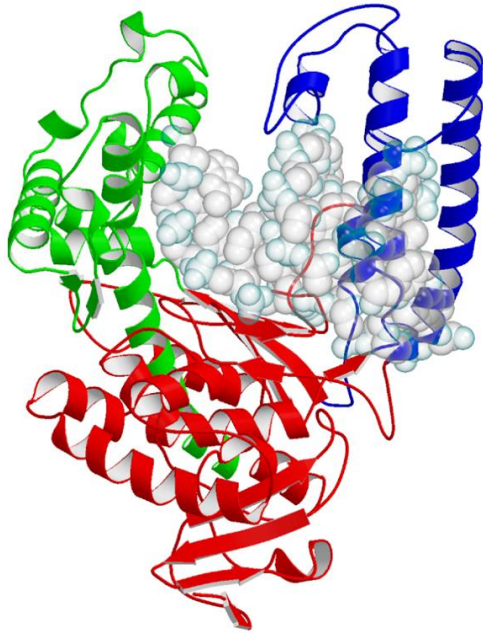


DNApol β

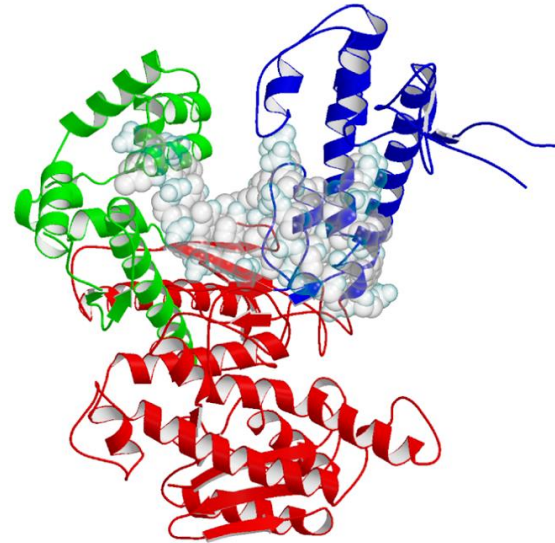


Encimi

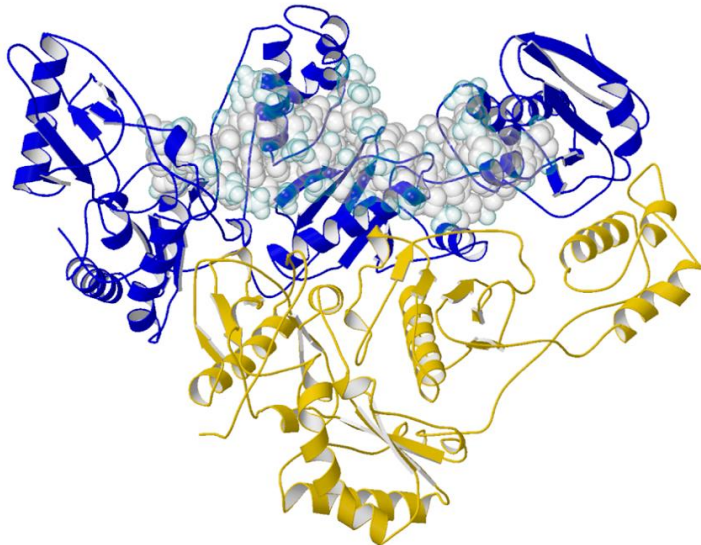
DNApol I
(*Bacillus*)



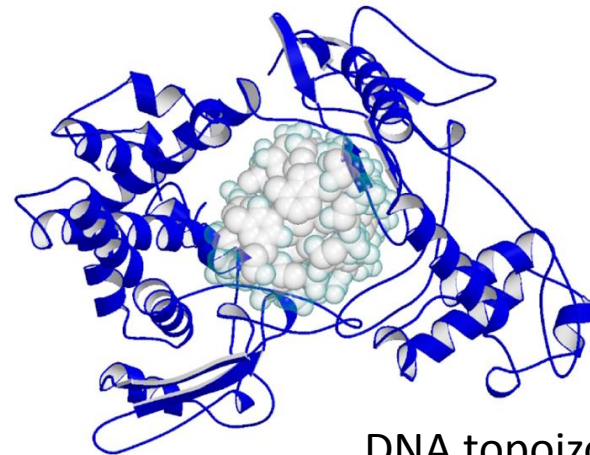
DNApol T7



HIV RT

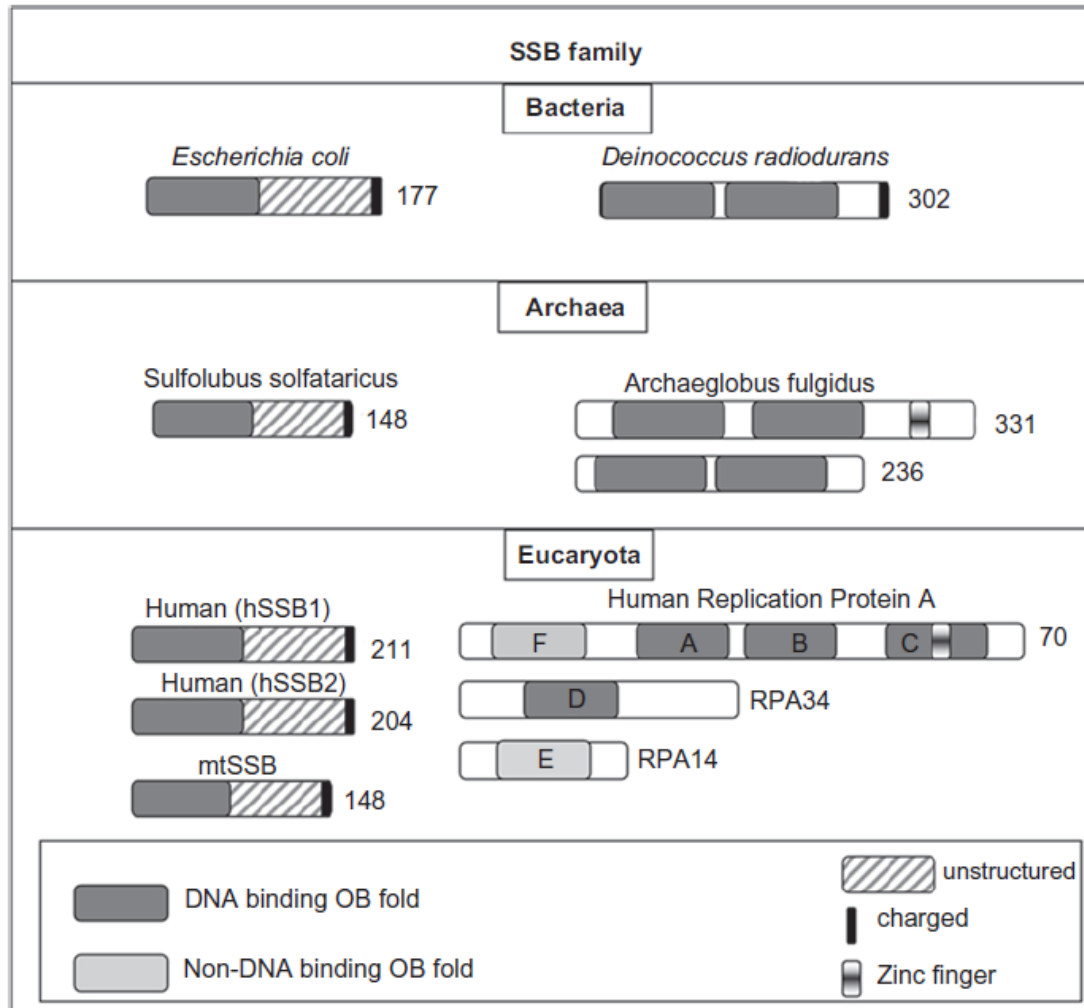


DNA topoisomerasa I



Proteini, ki vežejo enoverižno DNA

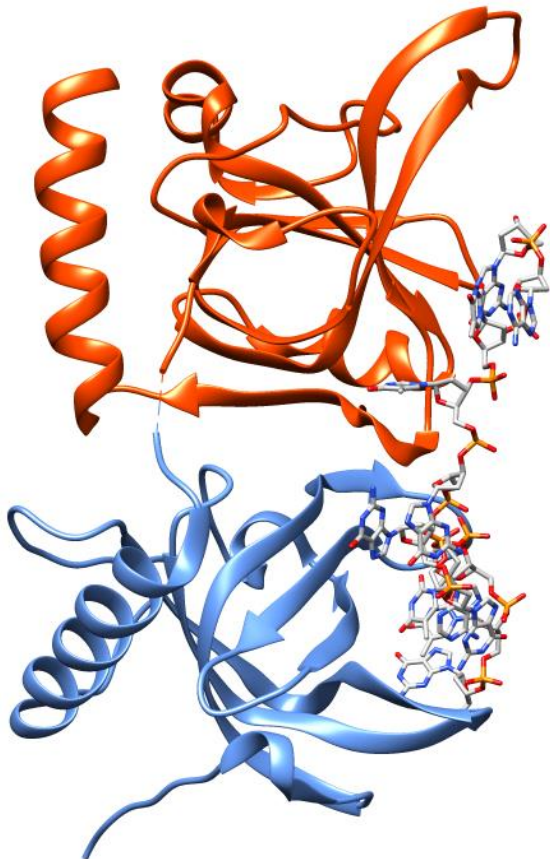
Večina proteinov, ki veže enoverižno DNA, spada v družino proteinov z OB domeno (oligonukleotid/oligosaharid-vezavna domena).



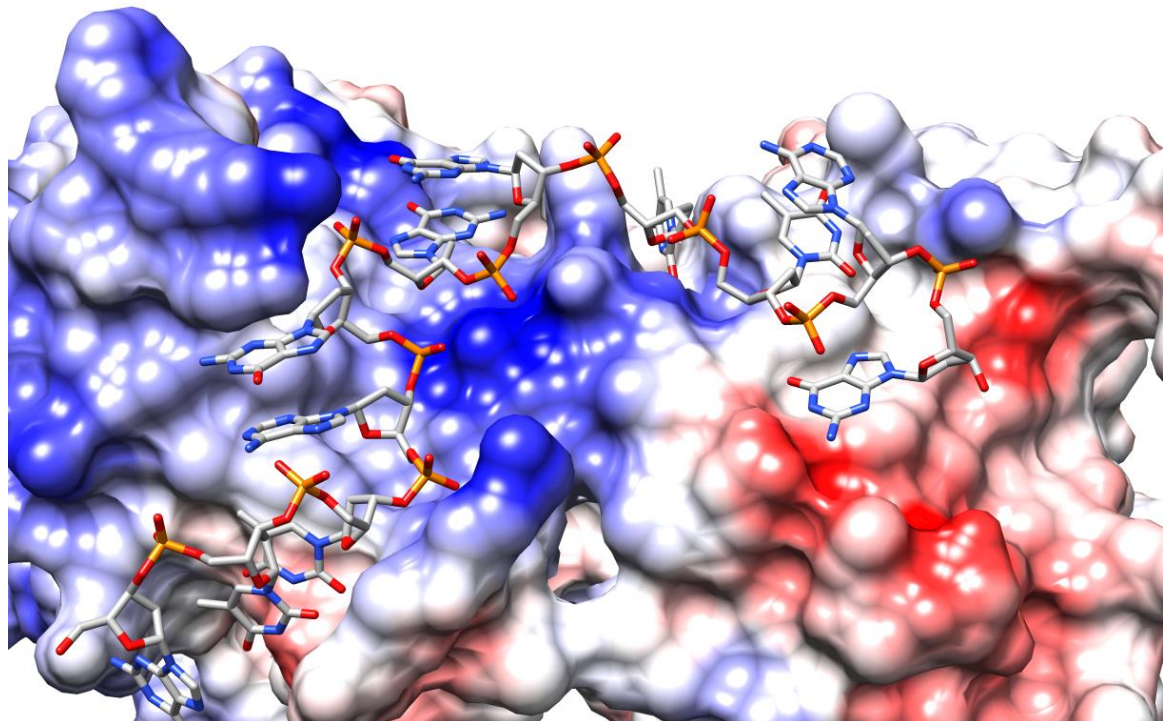
Proteini, ki vežejo enoverižno DNA

Večina proteinov, ki veže enoverižno DNA, spada v družino proteinov z OB domeno (oligkonukleotid/oligosaharid-vezavna domena).

Primer: telomerni protein POT1 z DNA-vezavno regijo iz dveh zaporednih OB domen v kompleksu z dvema ponovitvama GGTTAG.



elektrostatske interakcije, H-vezi , π -interakcije



Proteini, ki vežejo enoverižno DNA

Večina proteinov, ki veže enoverižno DNA, spada v družino proteinov z OB domeno (oligkonukleotid/oligosaharid-vezavna domena).

Primer: telomerni protein TEBP iz enoceličarja *Oxytricha nova* veže telomerno ssDNA in DNA kvadrupleks.

