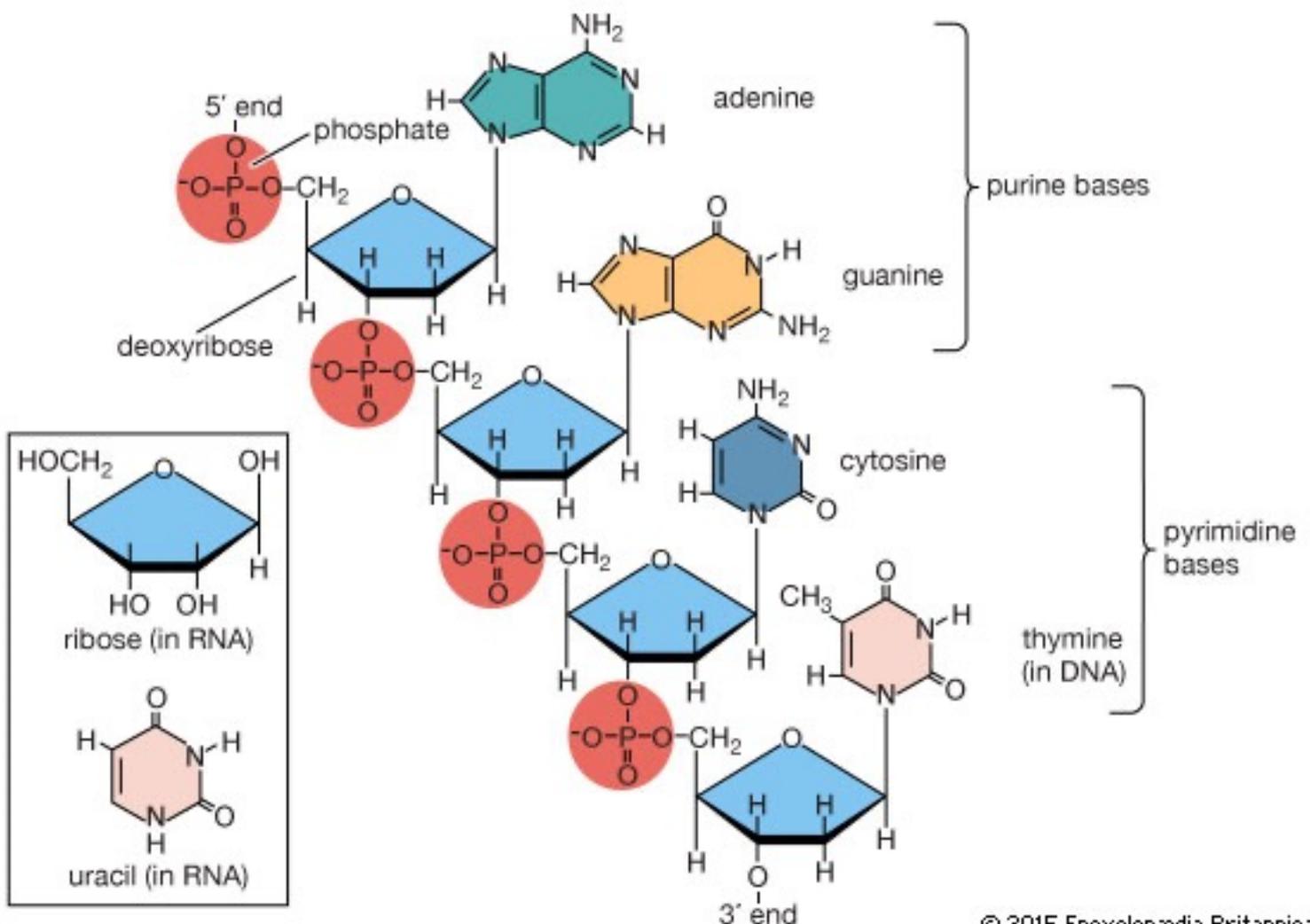
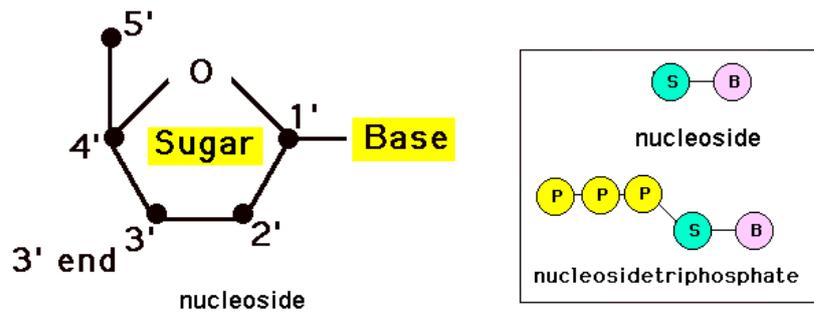
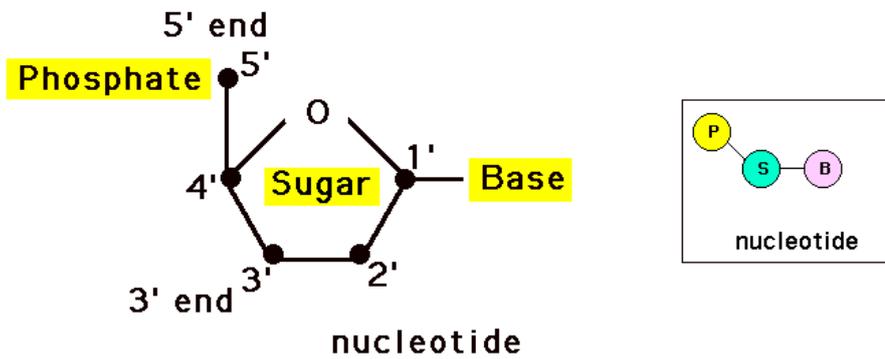


UE EN190

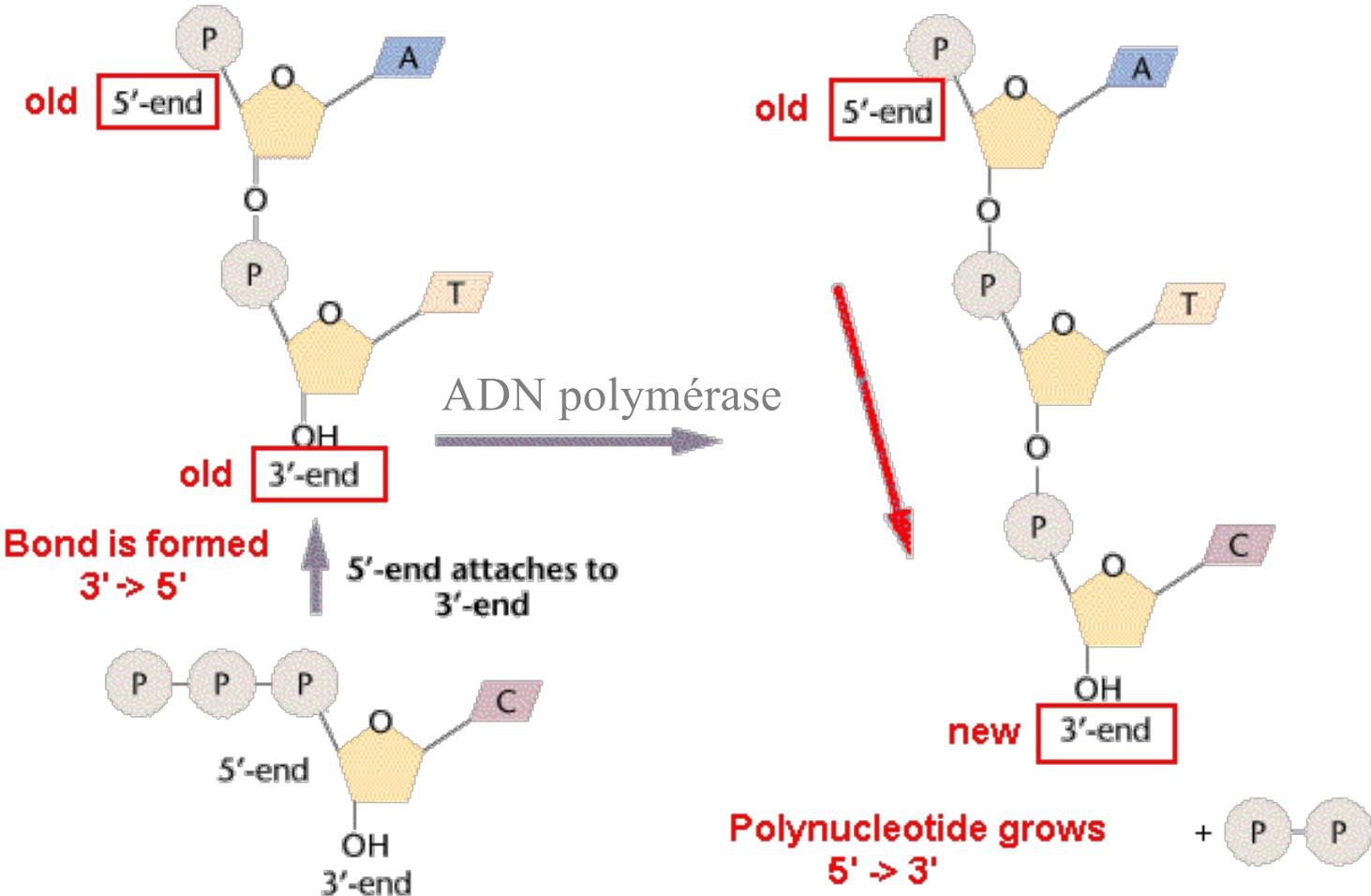
Biochimie structurale et fonctionnelle

Etude des interactions protéine-ADN

Les polynucléotides



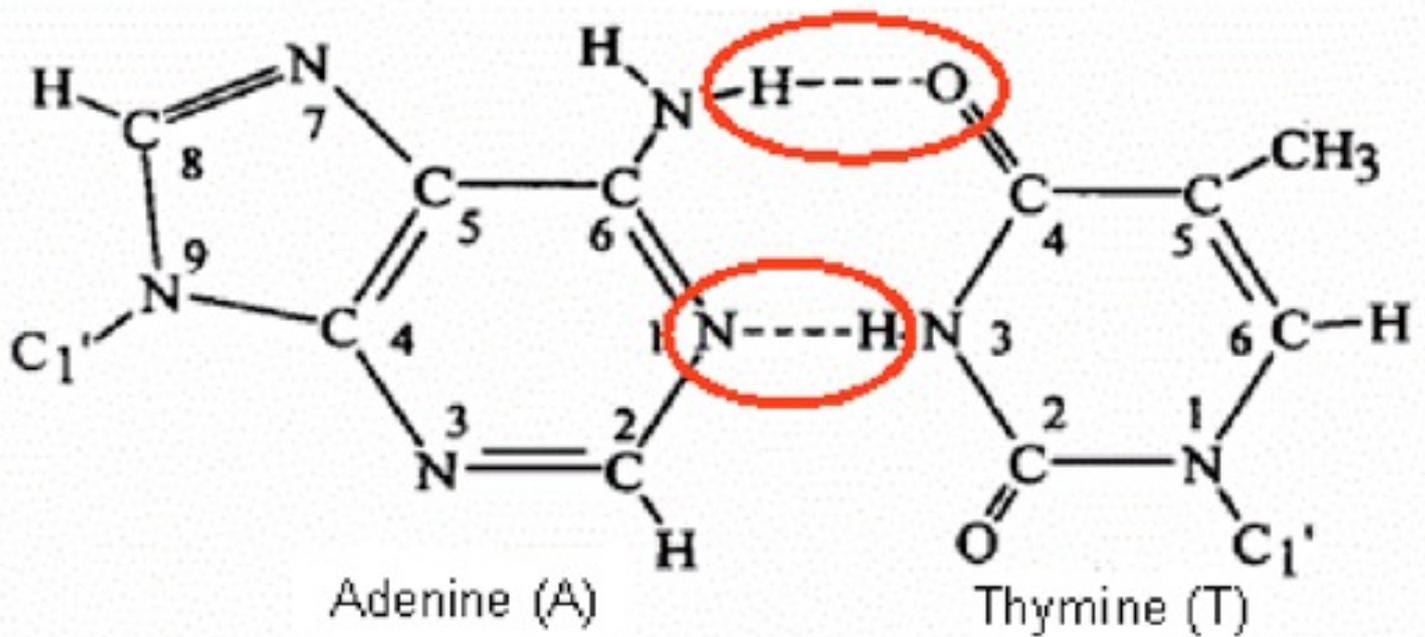
Synthèse de l'ADN



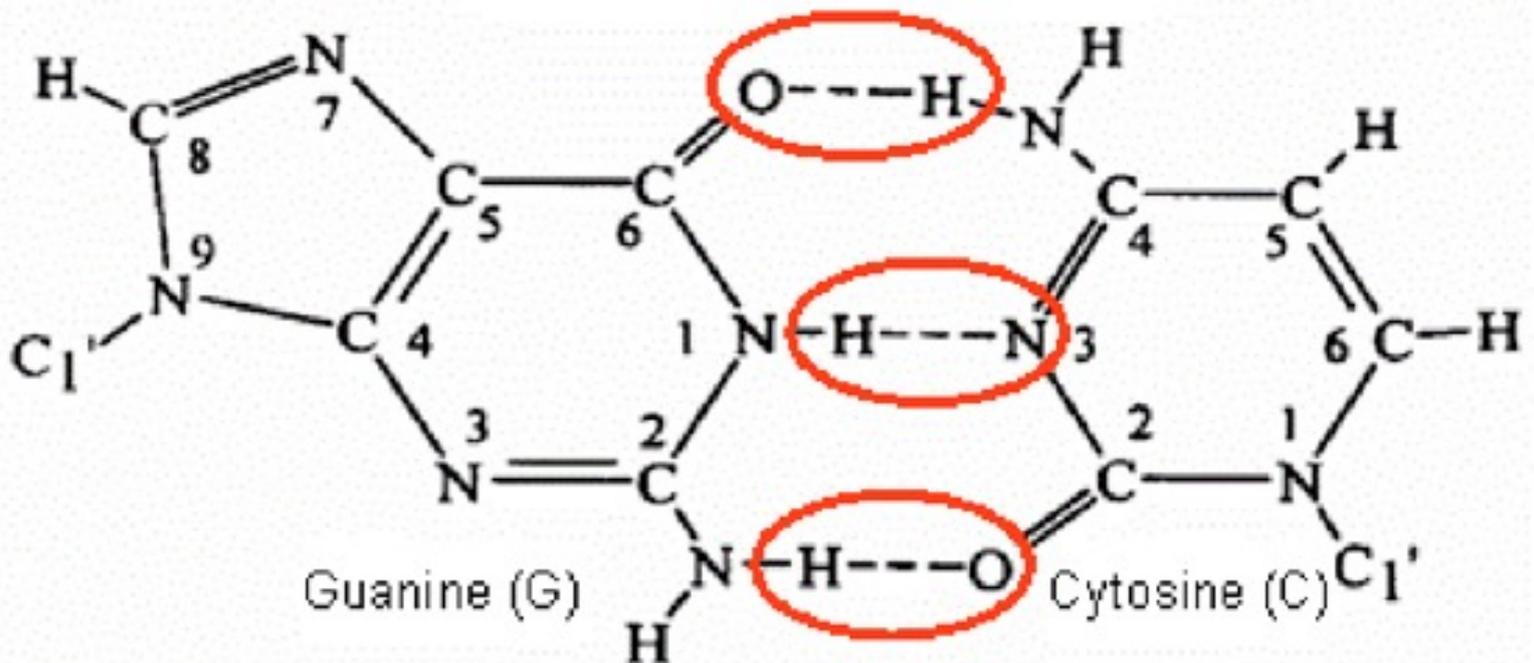
(after Klug & Cummings 1997)

Appariements de bases

Adenine-Thymine base pair

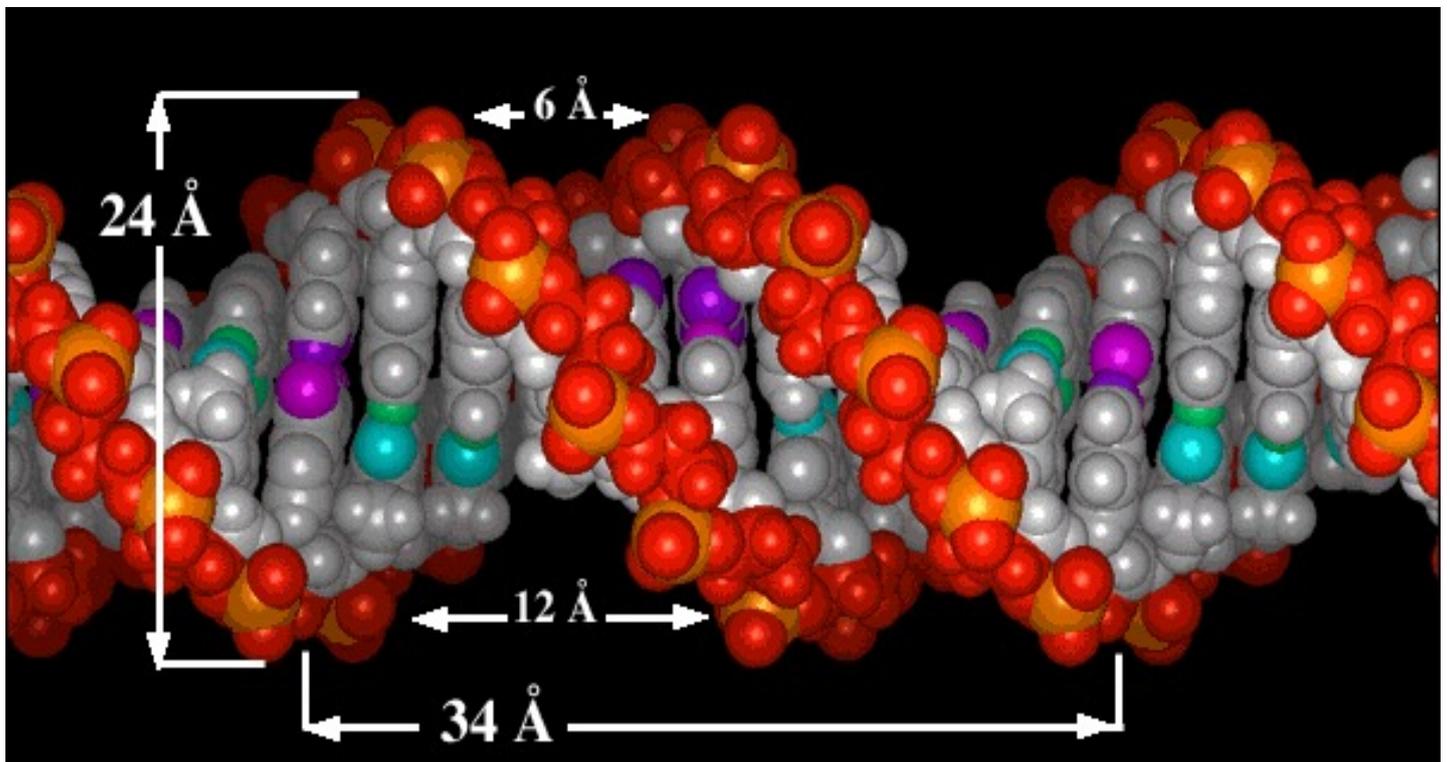
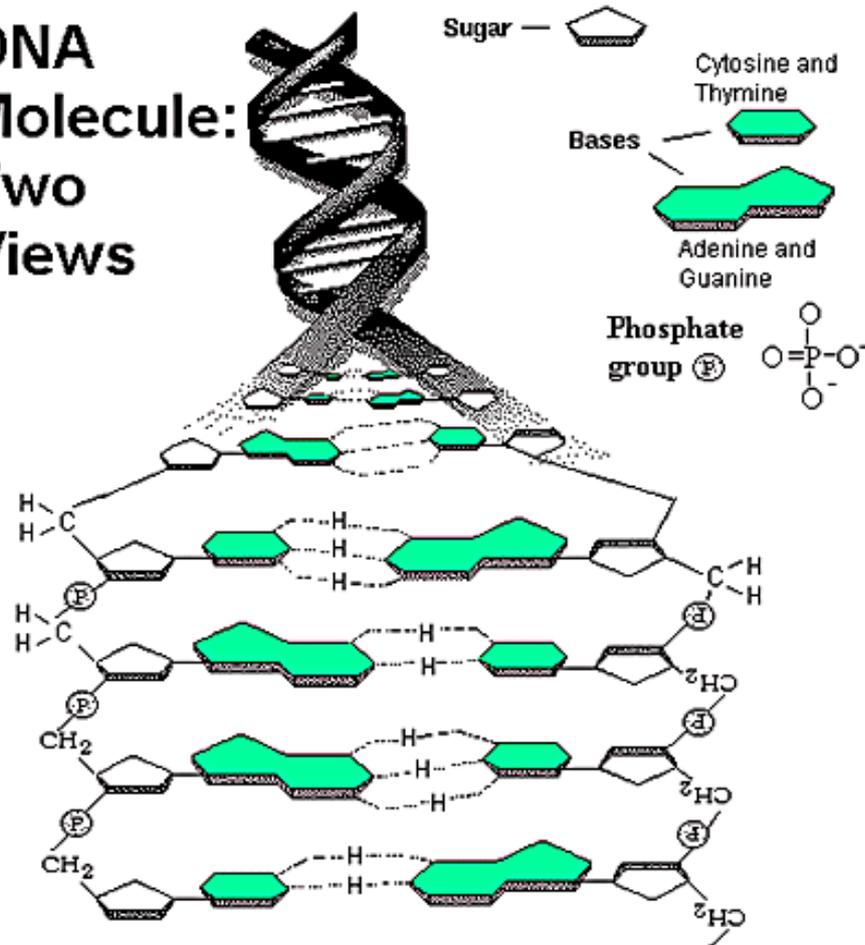


Guanine-cytosine base pair

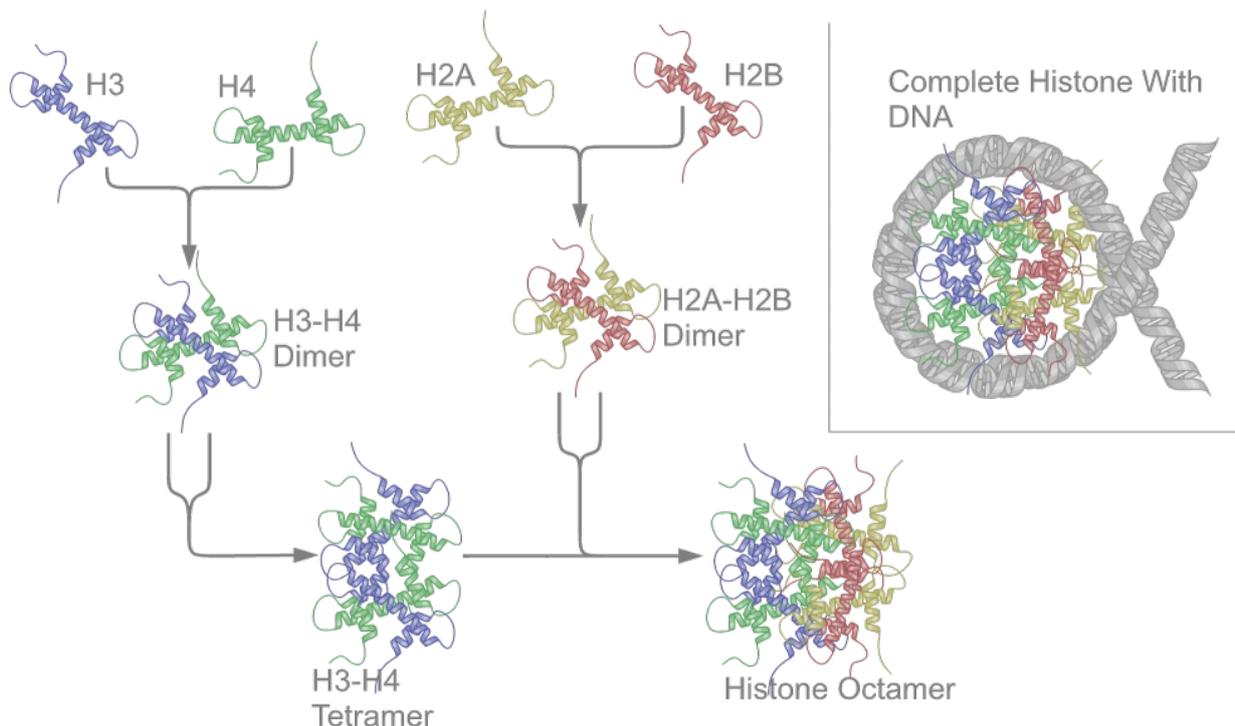
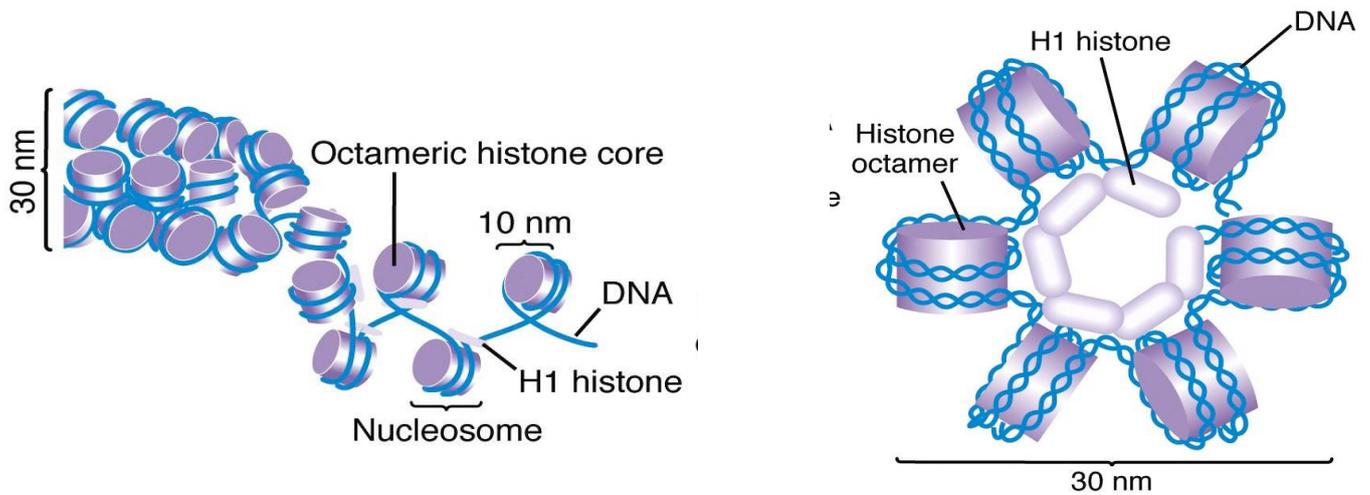
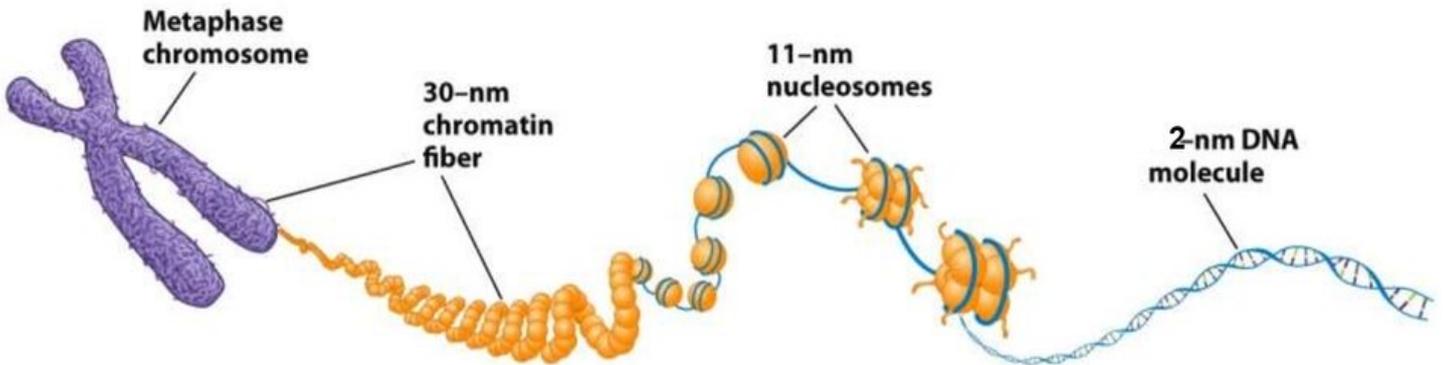


Structure de l'ADN

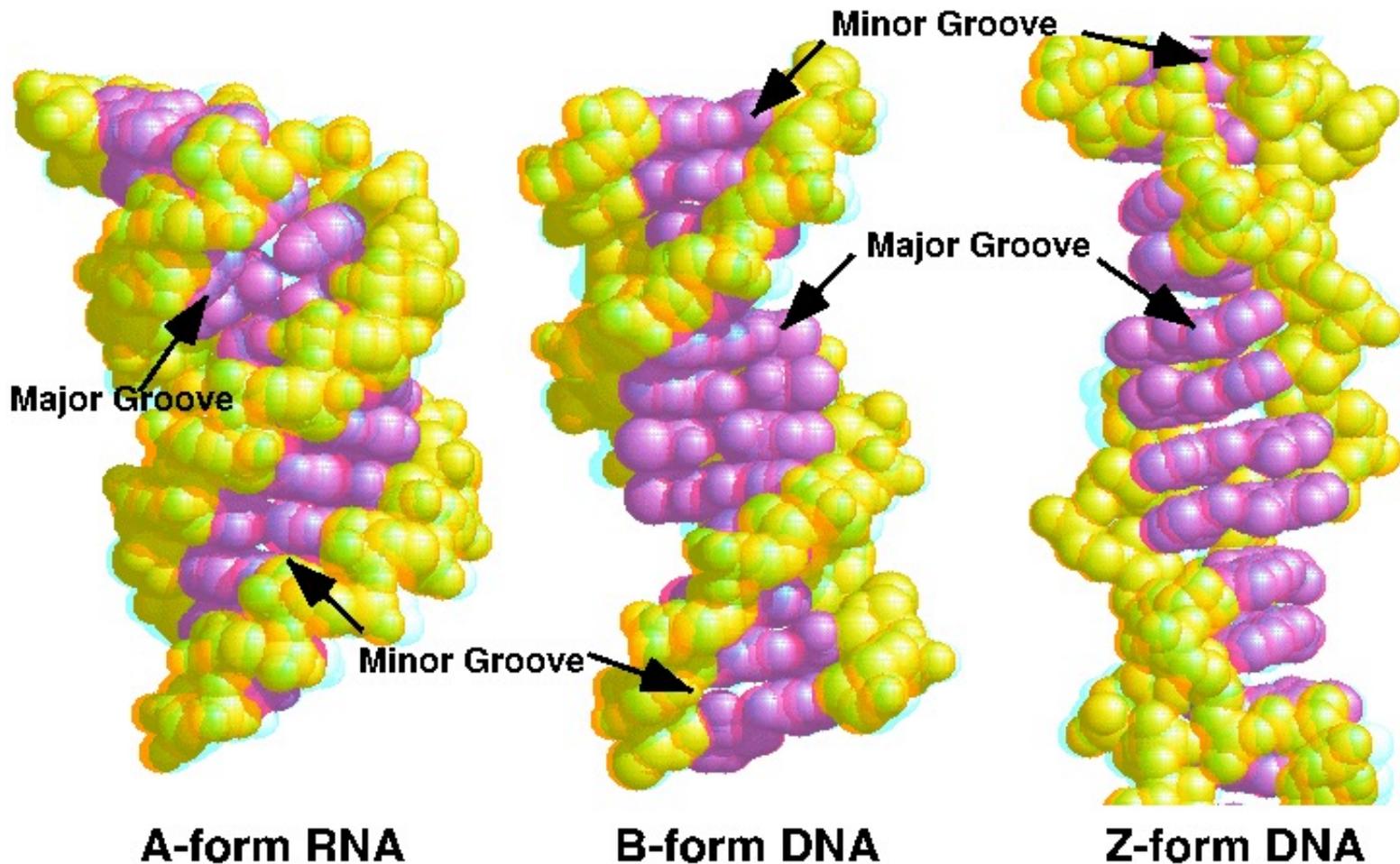
DNA
Molecule:
Two
Views



La compaction de l'ADN chez les eucaryotes



Différentes conformations de la double hélice d'ADN



Hélice droite
11 pb / tour
2.55 Å / pb
28 Å / tour

Hélice droite
10 pb / tour
3.4 Å / pb
34 Å / tour

Hélice gauche
12 pb / tour
3.7 Å / pb
45 Å / tour

Forme
transitoire

Forme
majoritaire

Séquences GC
à forte [sel]

Surfaces d'interaction



Squelette sucre-phosphate

Petit sillon

Squelette sucre-phosphate

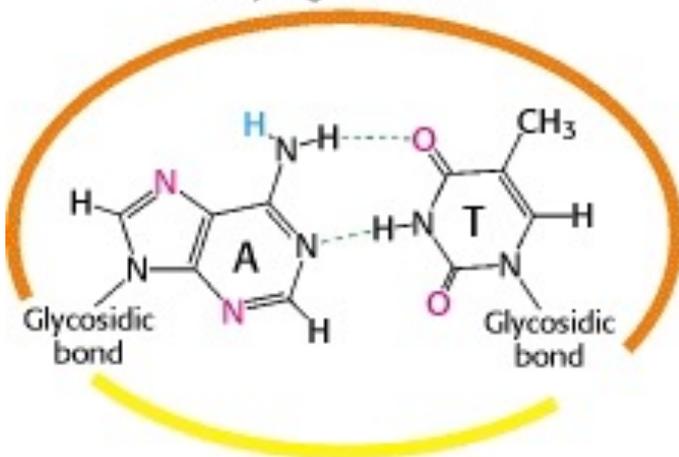
Grand sillon

Squelette sucre-phosphate

Petit sillon

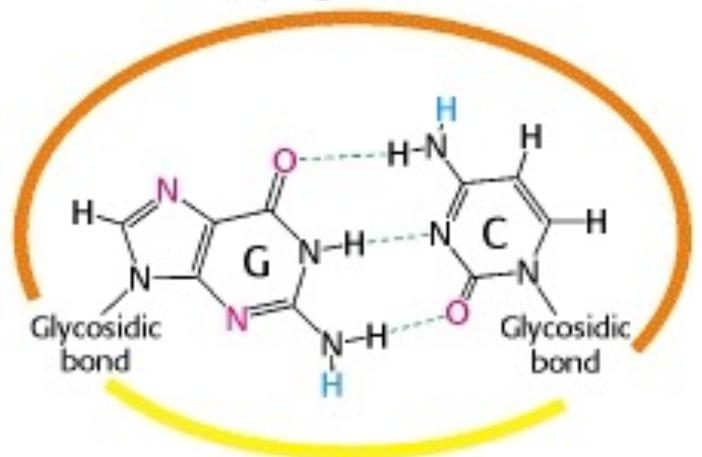
Squelette sucre-phosphate

Major groove side



Minor groove side
Adenine-Thymine

Major groove side

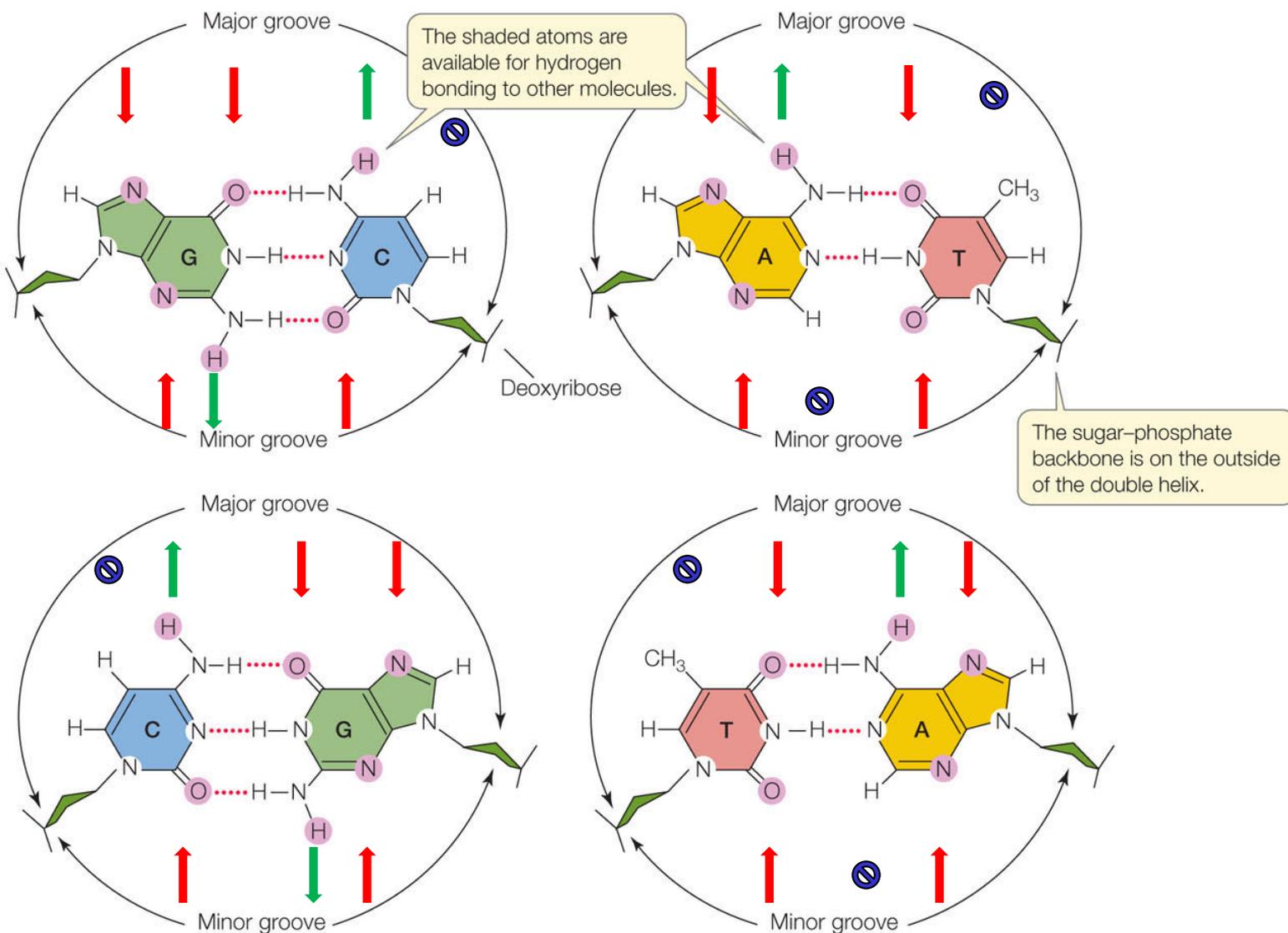


Minor groove side
Guanine-Cytosine

Des sites **donneurs** et **accepteurs** de liaison H

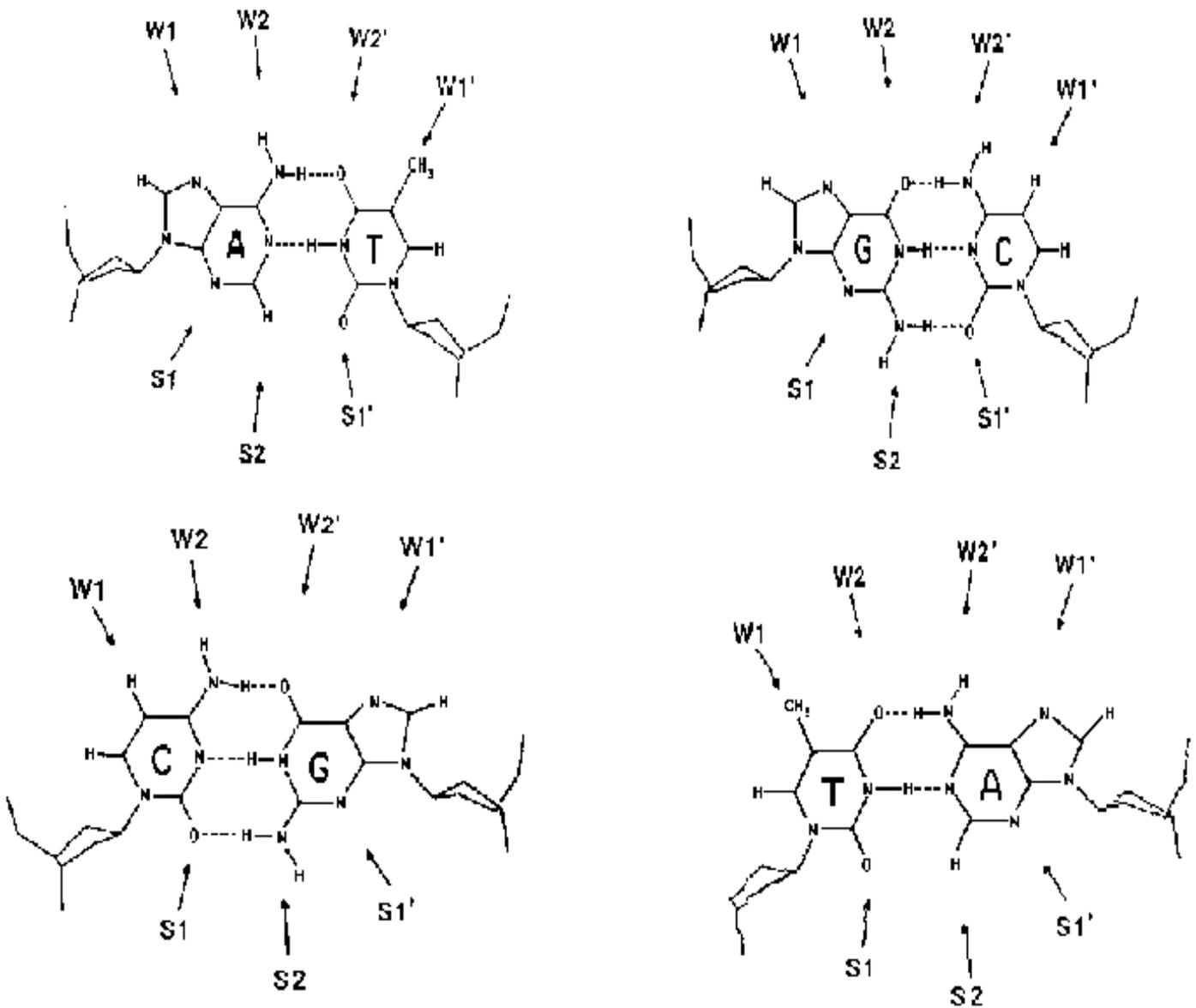
Reconnaissance spécifique uniquement dans le grand sillon

4 sites dans le grand sillon



3 sites dans le petit sillon

Spécificité d'interactions dans le grand sillon

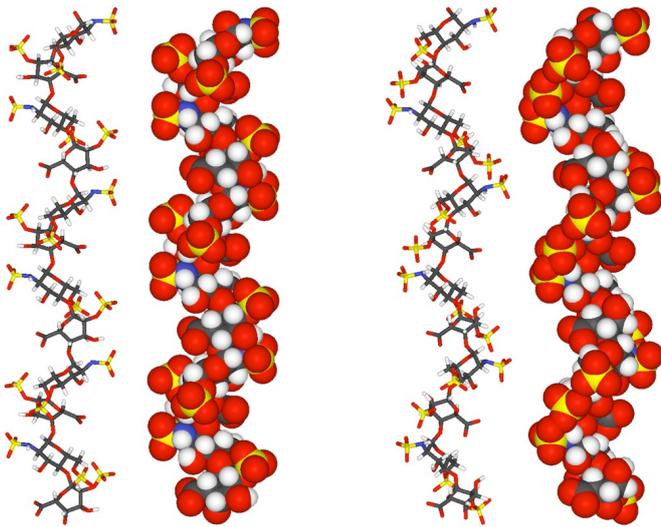


Sites de liaison H	AT	GC	CG	TA
w1,w2,w2',w1'	ADA-	AAD-	-DAA	-ADA
s1,s2,s1'	a-a	ada	ada	a-a

Purification des protéines fixant l'ADN

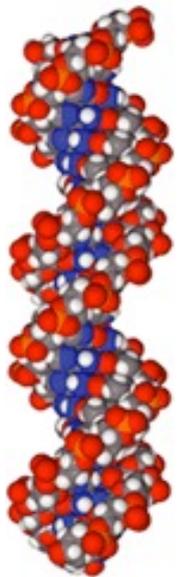
Chromatographie d'affinité à l'héparine

Polymère d'héparine (5-30 kDa)



Molécule
biomimétique

ADN

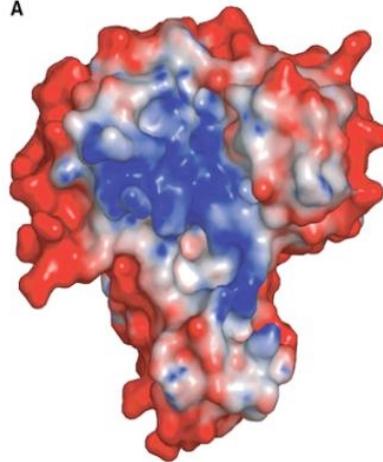


2 conformations possibles de l'héparine

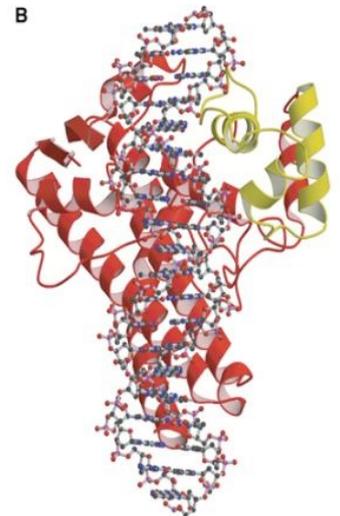
Interactions électrostatiques
avec les régions basiques
des protéines fixant l'ADN.

→ Elution par gradient de sel

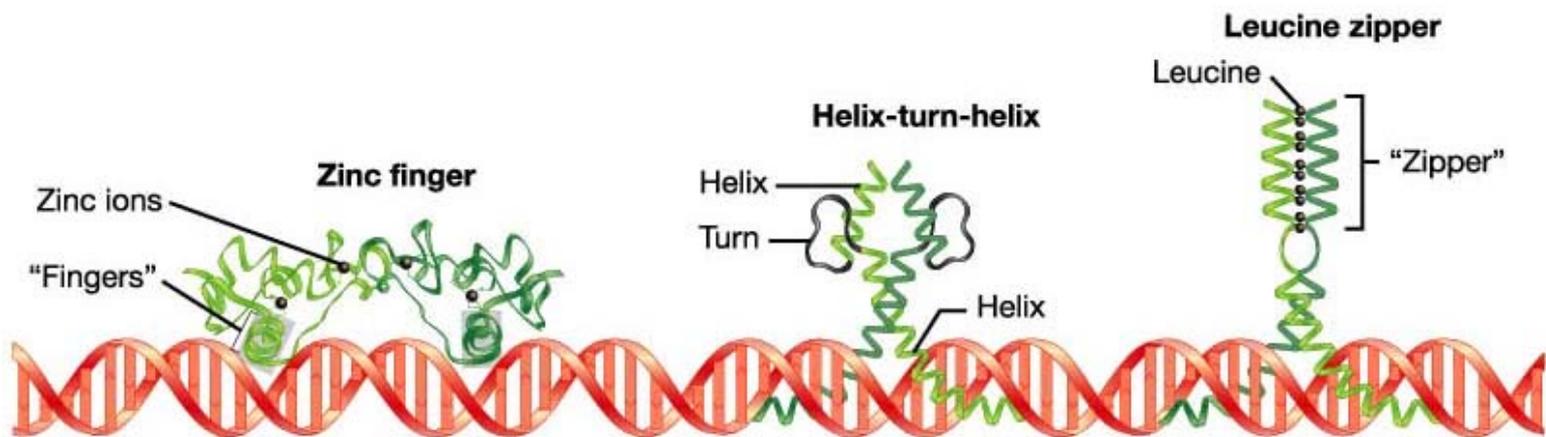
A



B



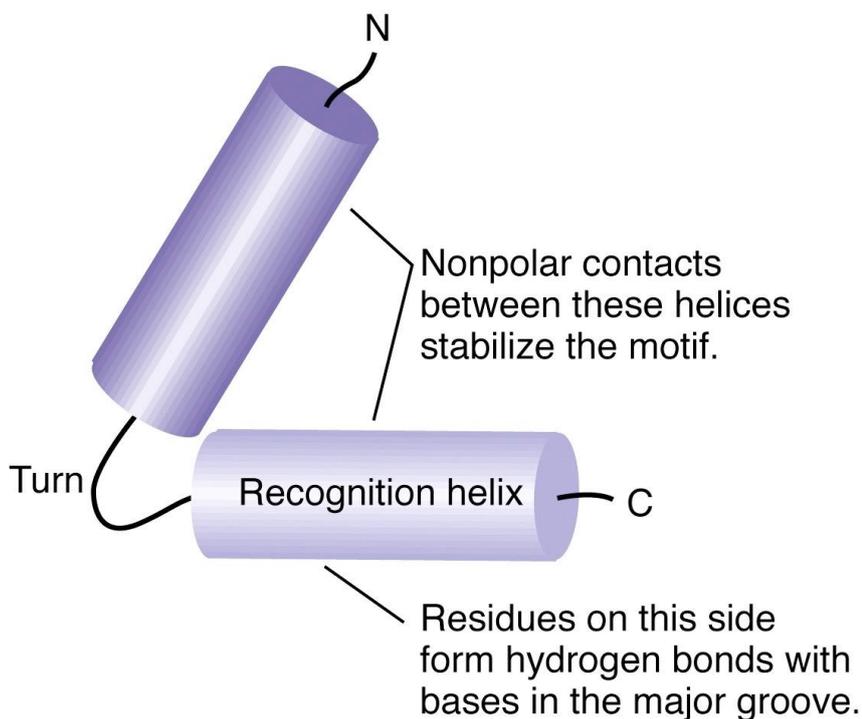
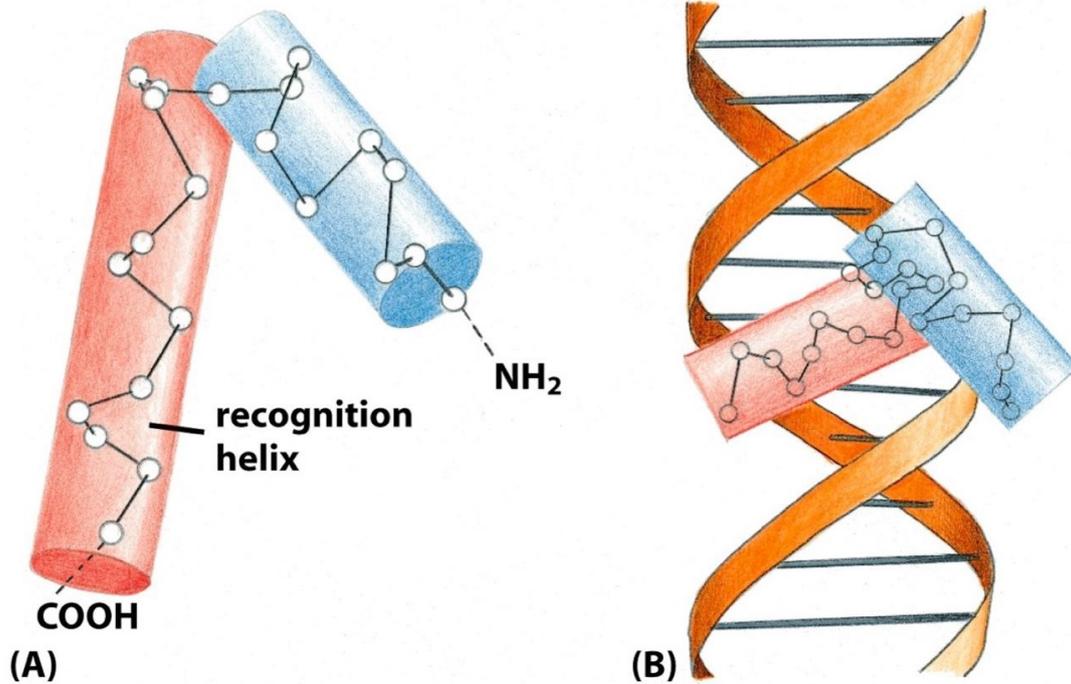
Principaux motifs d'interactions protéine/ADN



Motif Helix-Turn-Helix (HTH)

Motif le plus courant.

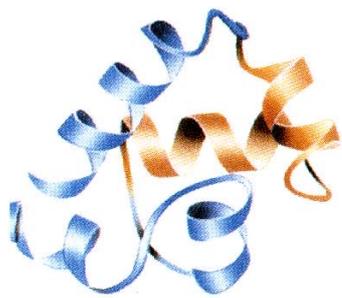
Trouvé chez les protéines de la régulation génique



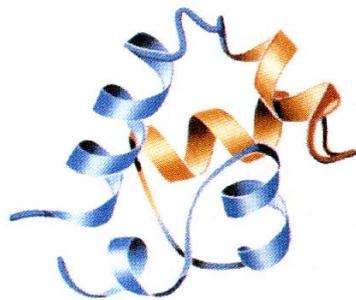
Fixation de l'hélice de reconnaissance dans le grand sillon

Différentes familles de domaines HTH

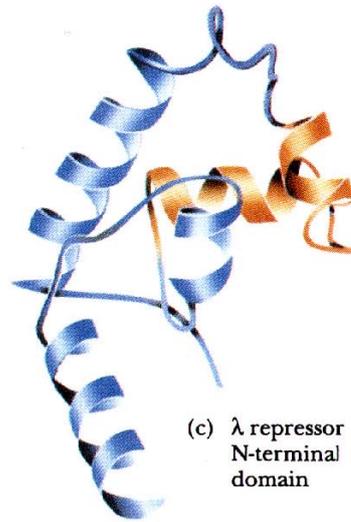
Le motif HTH est associé à différents éléments pour former le domaine de fixation à l'ADN (environ 60 résidus)



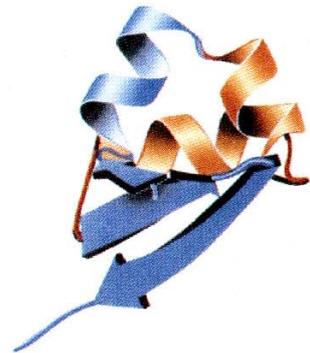
(a) 434 repressor N-terminal domain



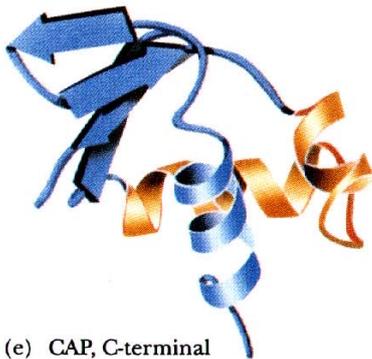
(b) 434 Cro



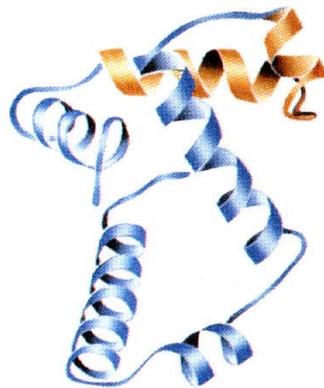
(c) λ repressor N-terminal domain



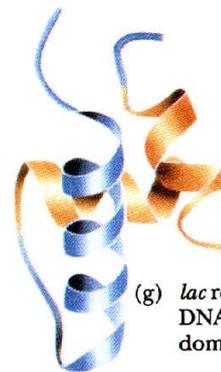
(d) λ Cro



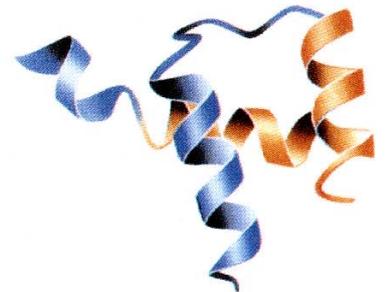
(e) CAP, C-terminal domain



(f) *trp* repressor subunit



(g) *lac* repressor DNA-binding domain



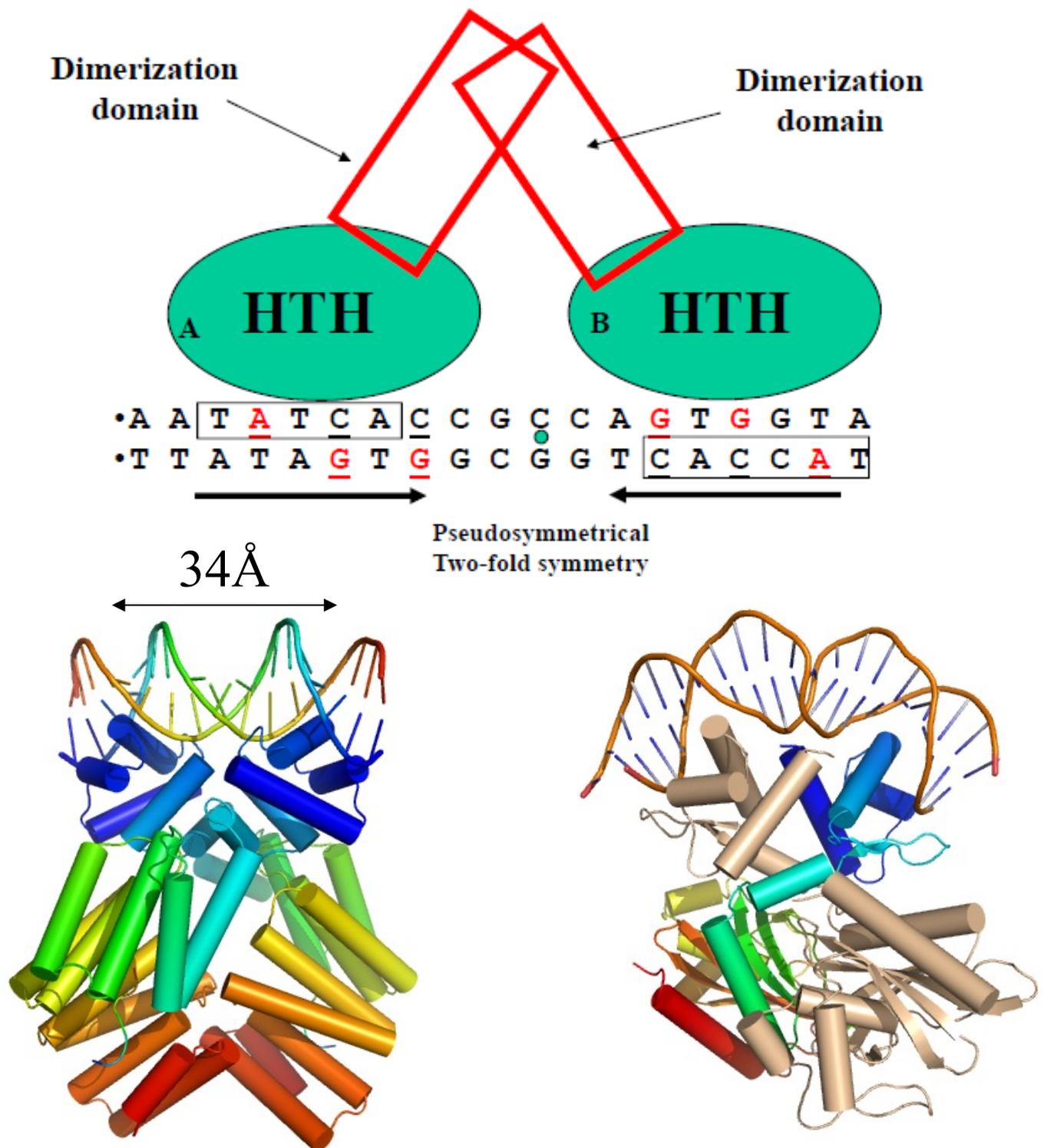
(h) *Antp* homeodomain

Chaque type de domaine HTH est caractérisé par une séquence consensus

PS80943 / #=263

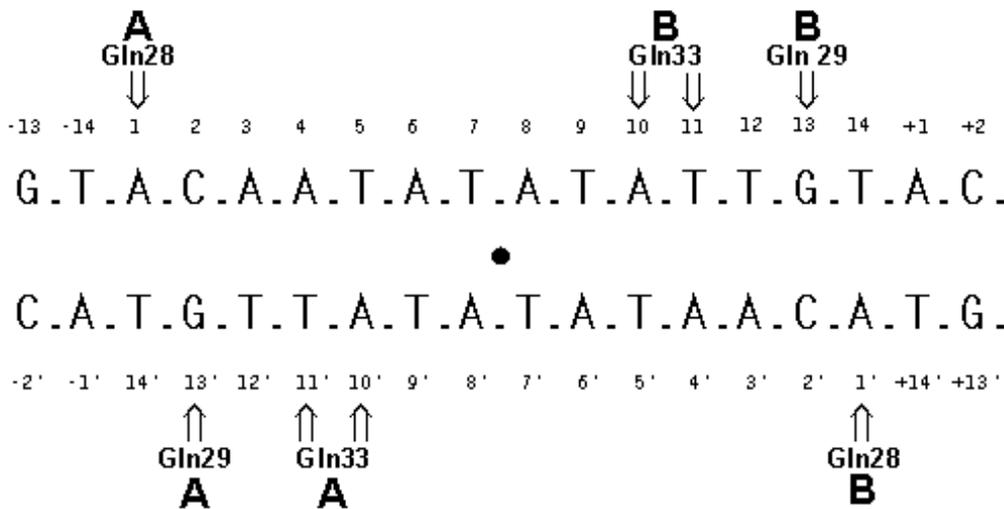


Dimérisation des HTH

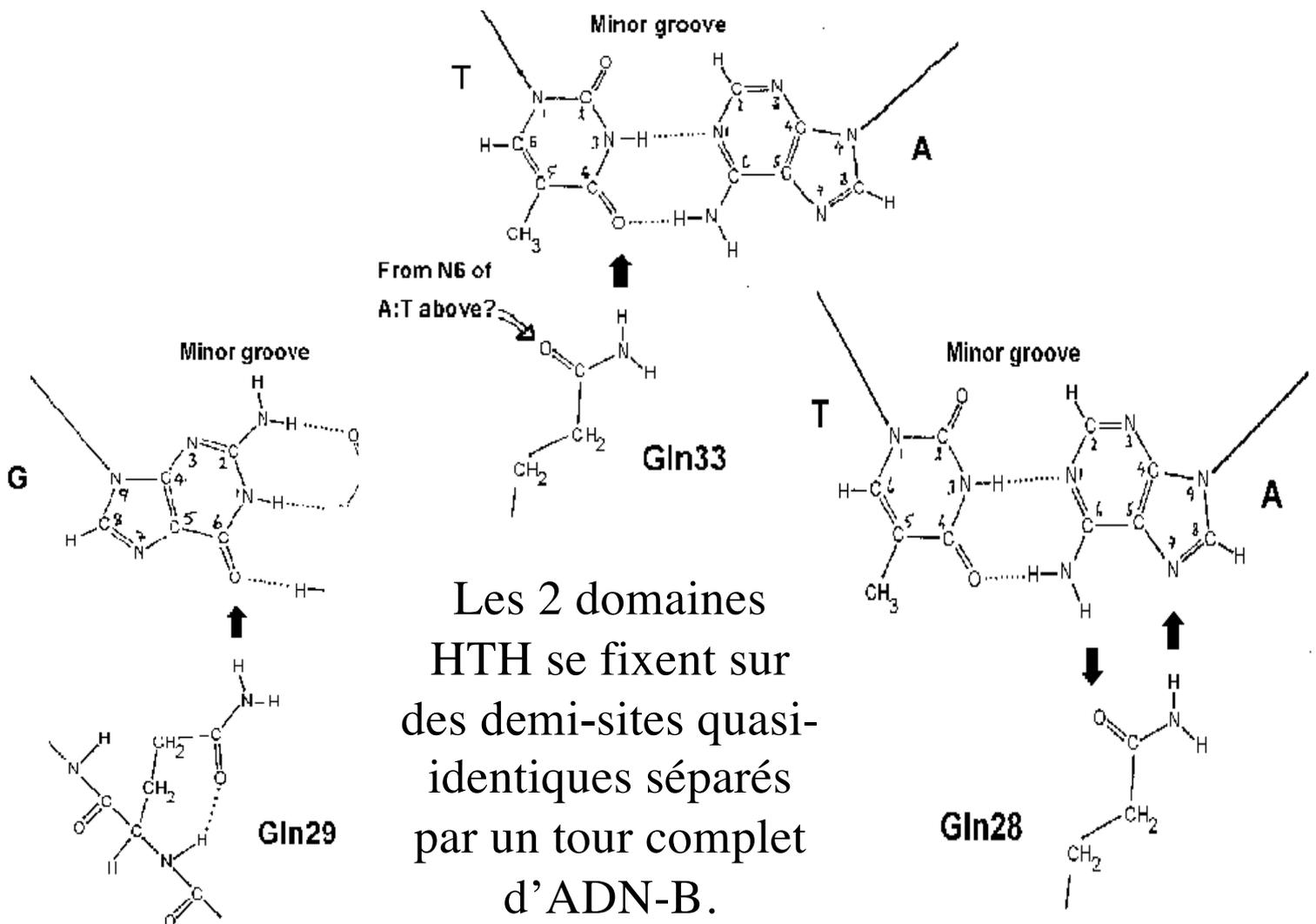


Le domaine HTH de fixation à l'ADN est associé à un domaine de dimérisation variable

Interaction HTH-ADN

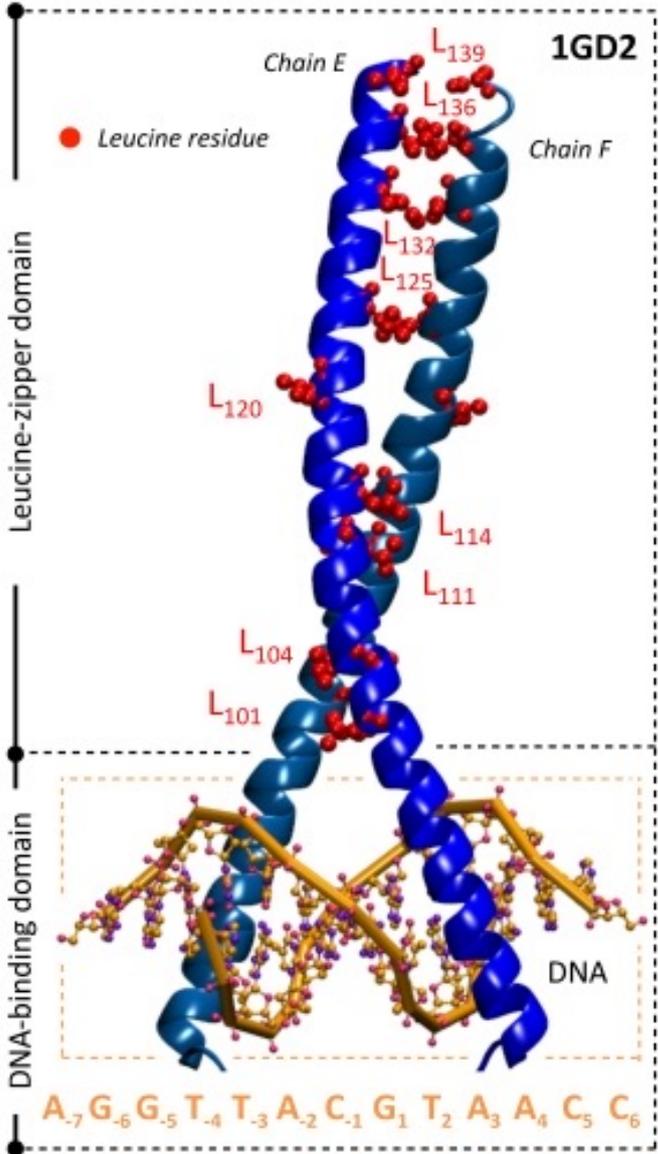


2 demi-sites
 espacés de
 ~ 10 pb
 (~34 Å)

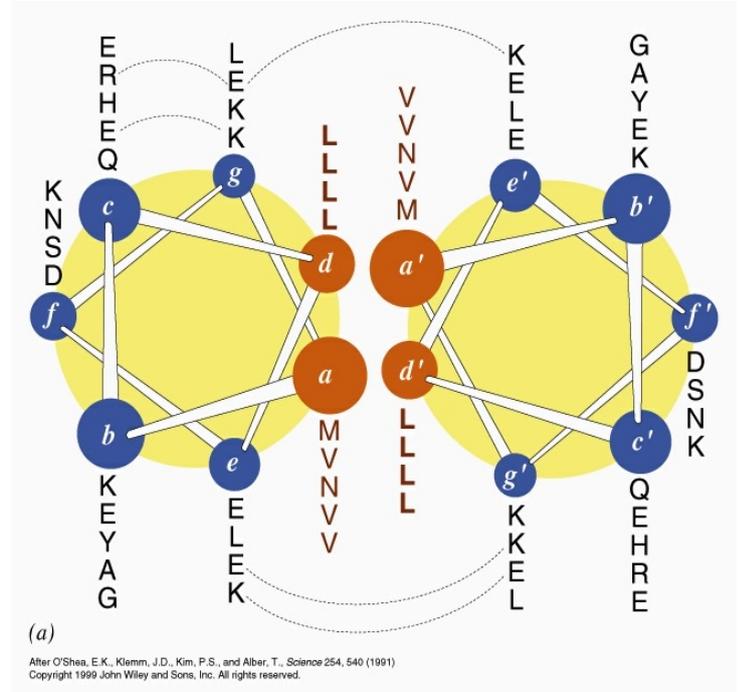


Motif Basic Leucine Zipper

Grande famille de facteurs de transcription eucaryotes

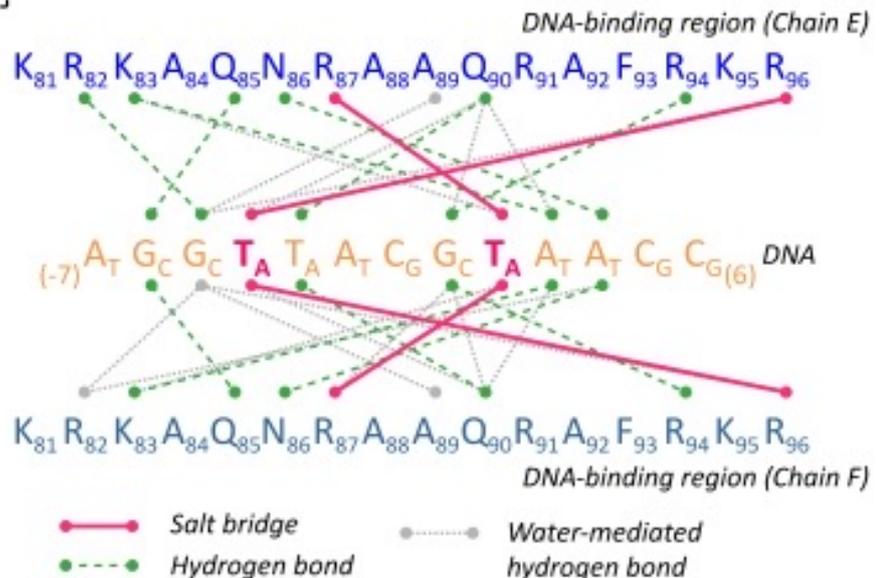


Domaine Leucine zipper de dimérisation

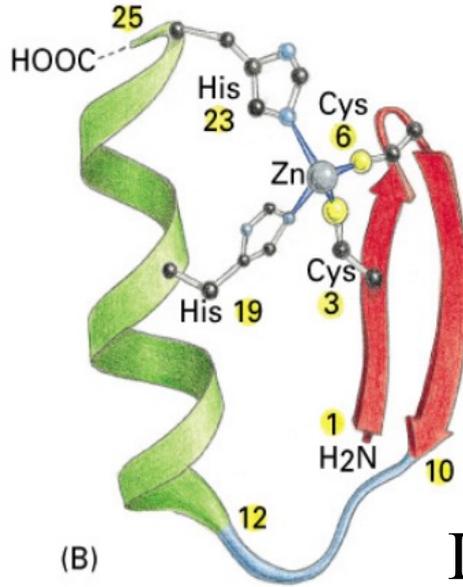
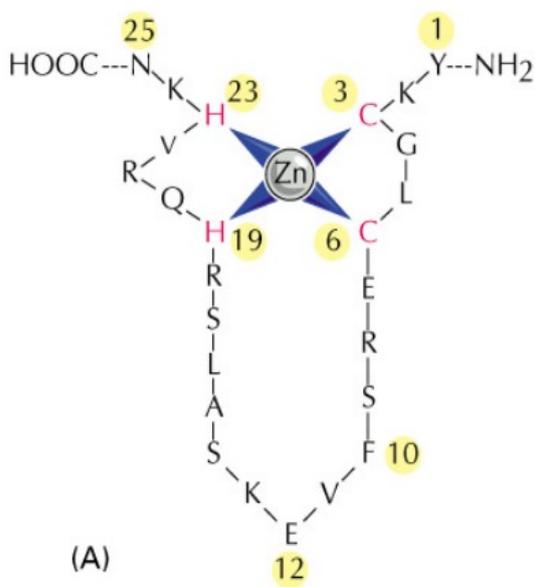


Domaine basique d'interaction avec l'ADN

Interaction avec le grand sillon de l'ADN dans 2 demi-sites palindromiques

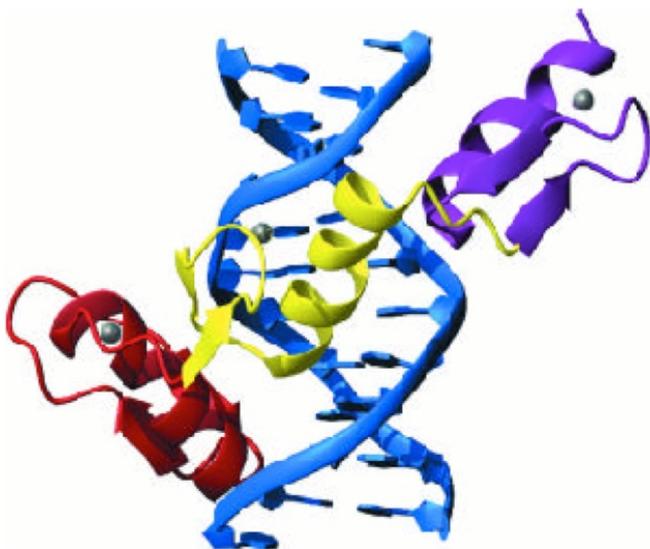


Doigts de zinc 2-Cys/2-His

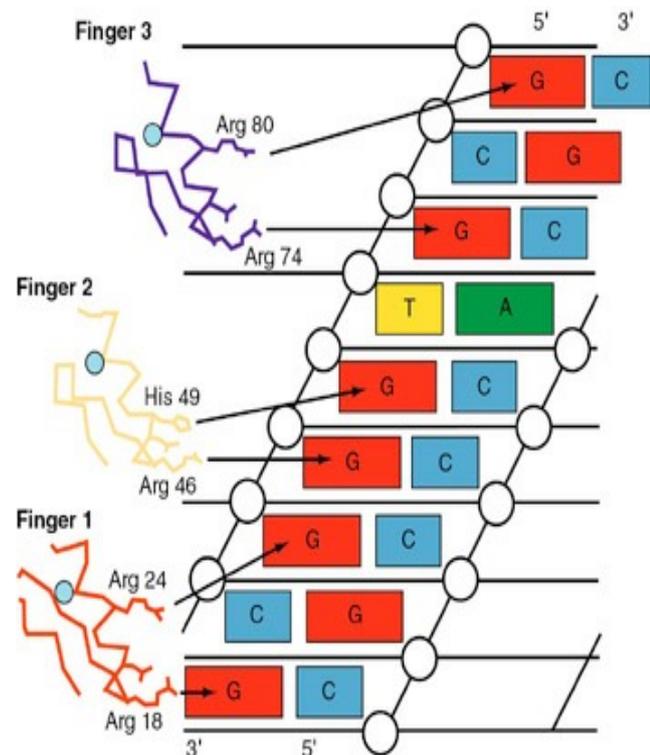


L'hélice interagit avec le grand sillon de l'ADN

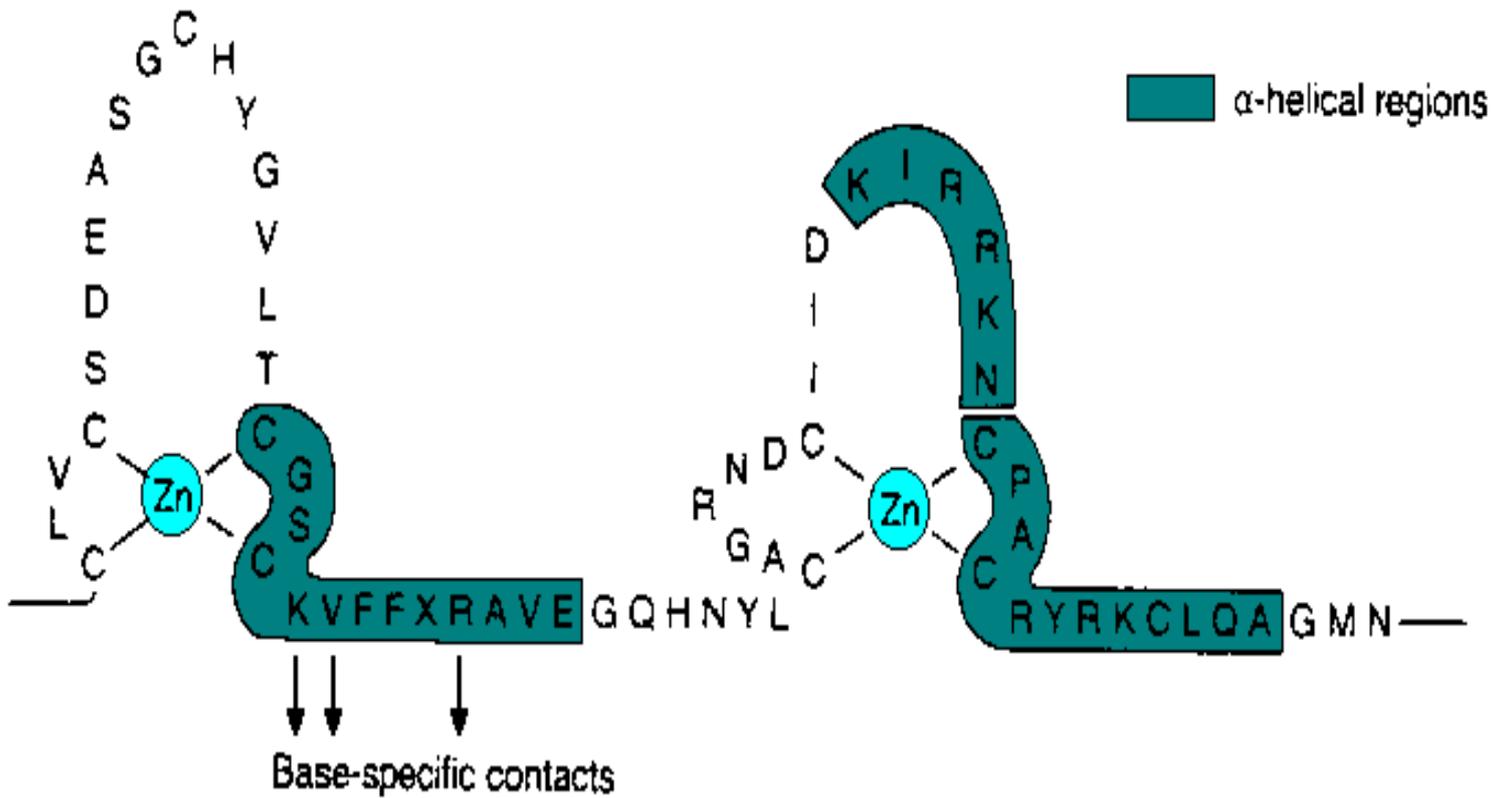
Nombreuses répétitions du motif dans la protéine



5'	3'
G	C
C	G
G	C
T	A
G	C
C	G
G	C
T	A
3'	5'



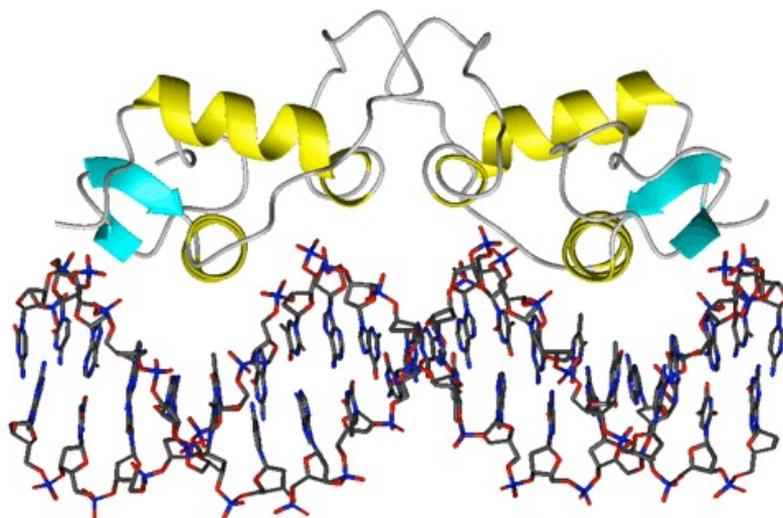
Doigts de zinc 4-Cys



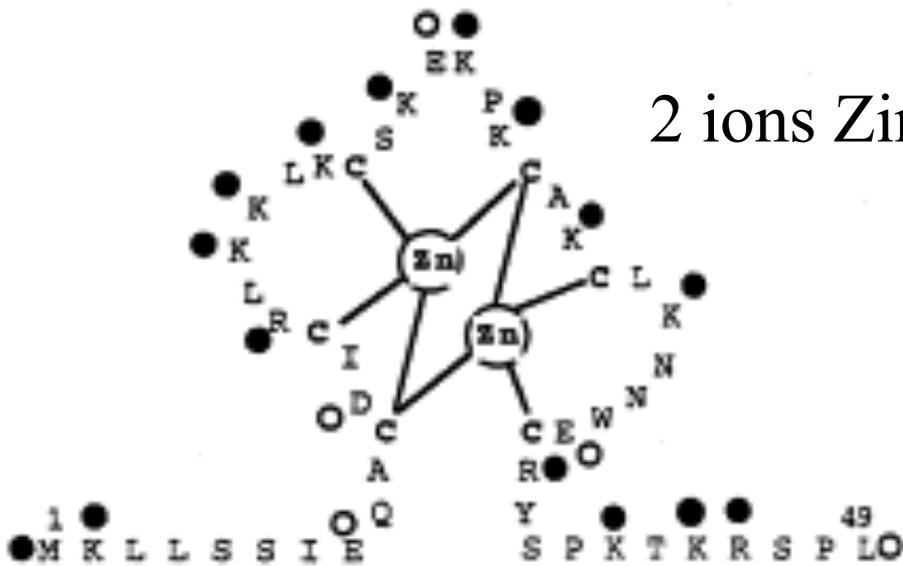
Motif d'environ 70 résidus constitué de 2 éléments boucle-hélice qui fixent chacun un ion Zinc.

Coordination par 4 cystéines.

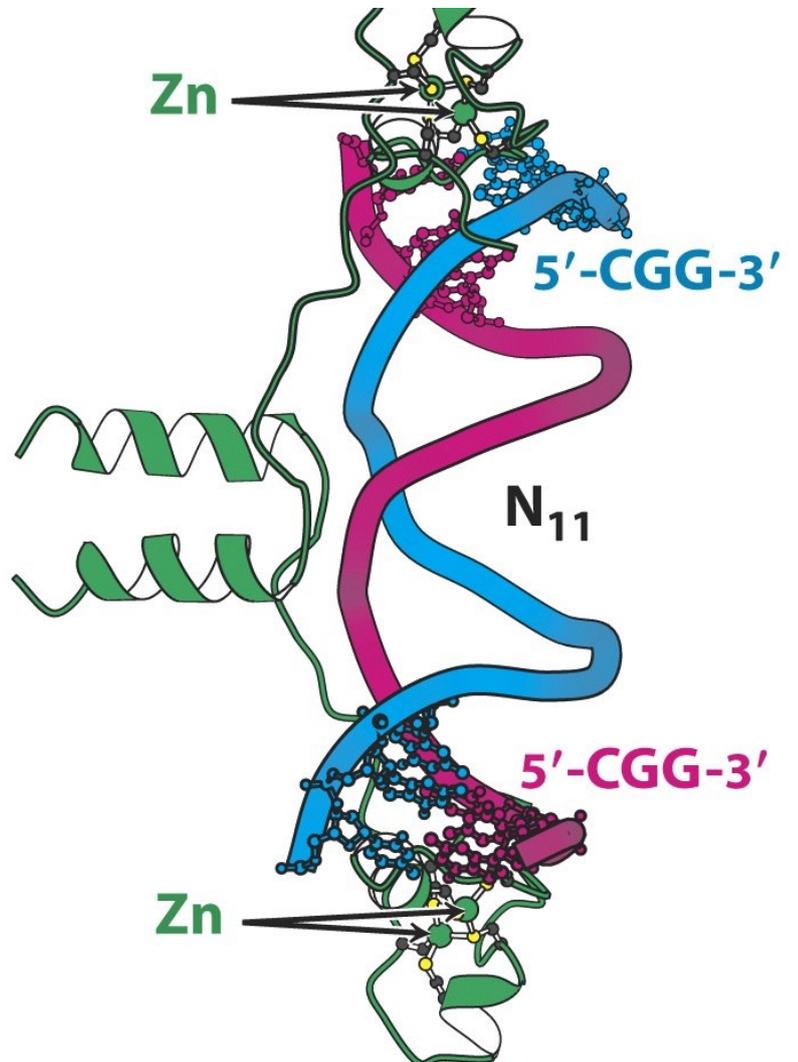
Ce double motif se fixe dans le grand sillon d'une séquence ADN symétrique.



Doigts de Zinc 6-Cys

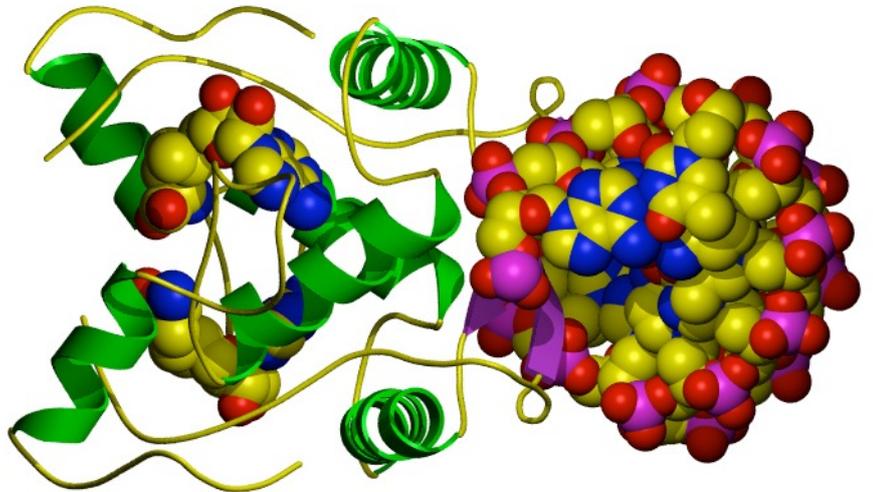
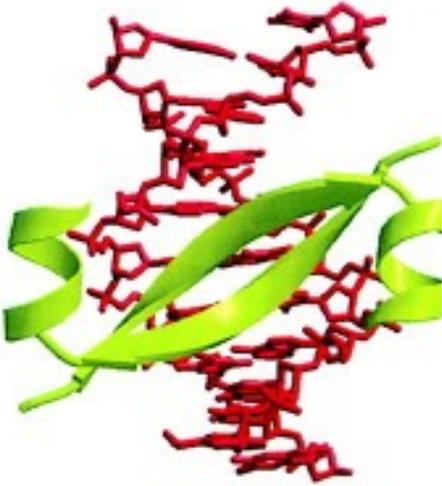


Domaine coiled-coil
de dimérisation

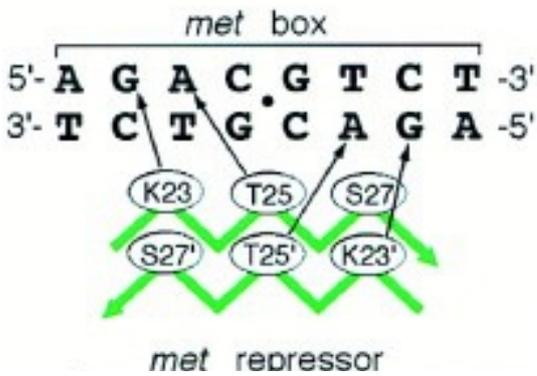


Séquence ADN palindromique

Motif Beta-ribbon

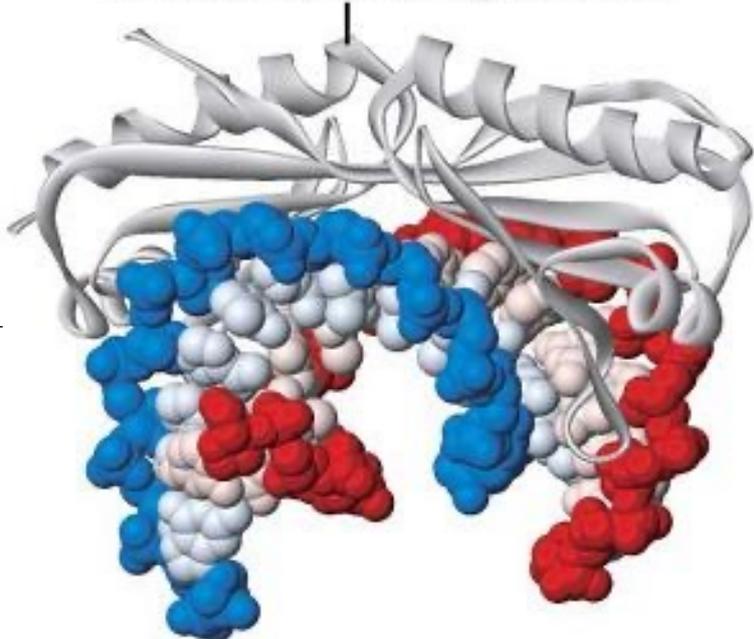


Methionine represser
MetJ d'*E. coli*



(TBP)

TATA box-binding protein



Forte déformation
de l'ADN
qui se courbe
sous la TBP

Changement de conformation

La protéine et/ou l'ADN se déforment au cours de l'interaction.

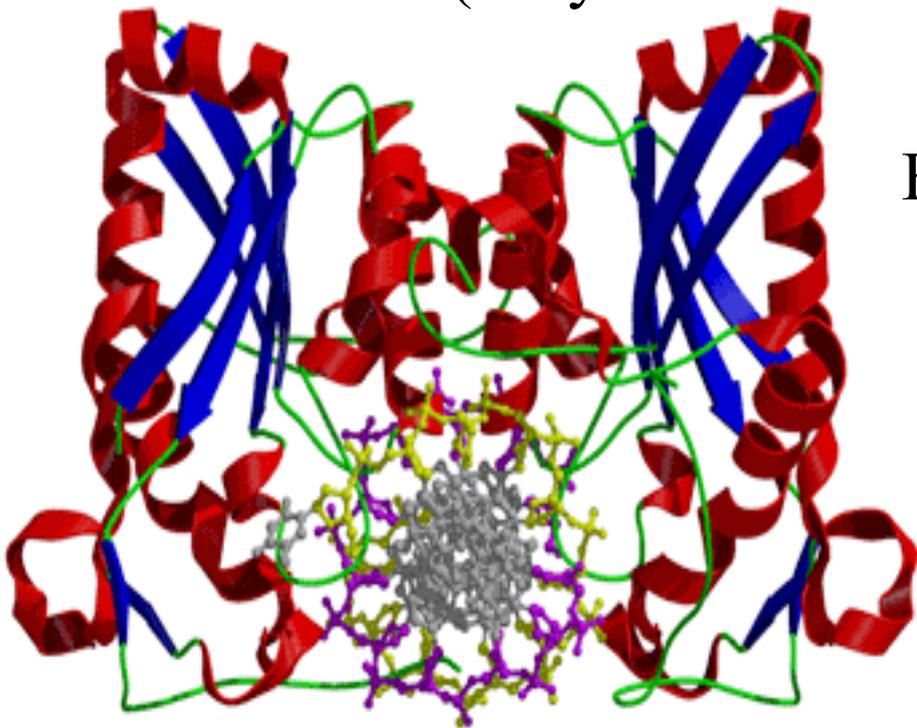
Dans le cas de la protéine Cro, les brins du feuillet β à l'interface du dimère se vrillent, entraînant une rotation de 40° des sous-unités



La fixation de Cro tord la conformation B de l'ADN. La région centrale de l'opérateur est surenroulée. Ce qui se traduit par une distance réduite entre les squelettes sucre-phosphate du petit sillon

Interactions spécifiques et non spécifiques

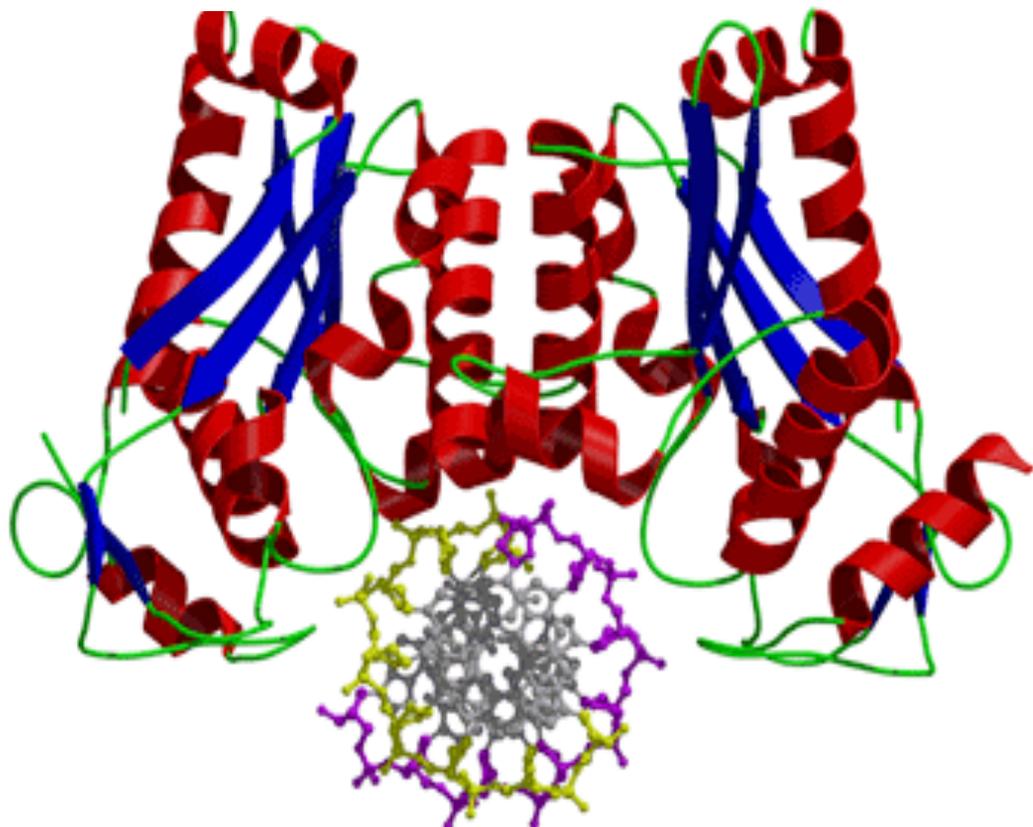
Exemple de l'endonucléase BamHI
(enzyme de restriction)



Fixation fonctionnelle
de BamHI
sur un site spécifique

5'-G[^]G A T C C-3'
3'-C C T A G[^]G-5'

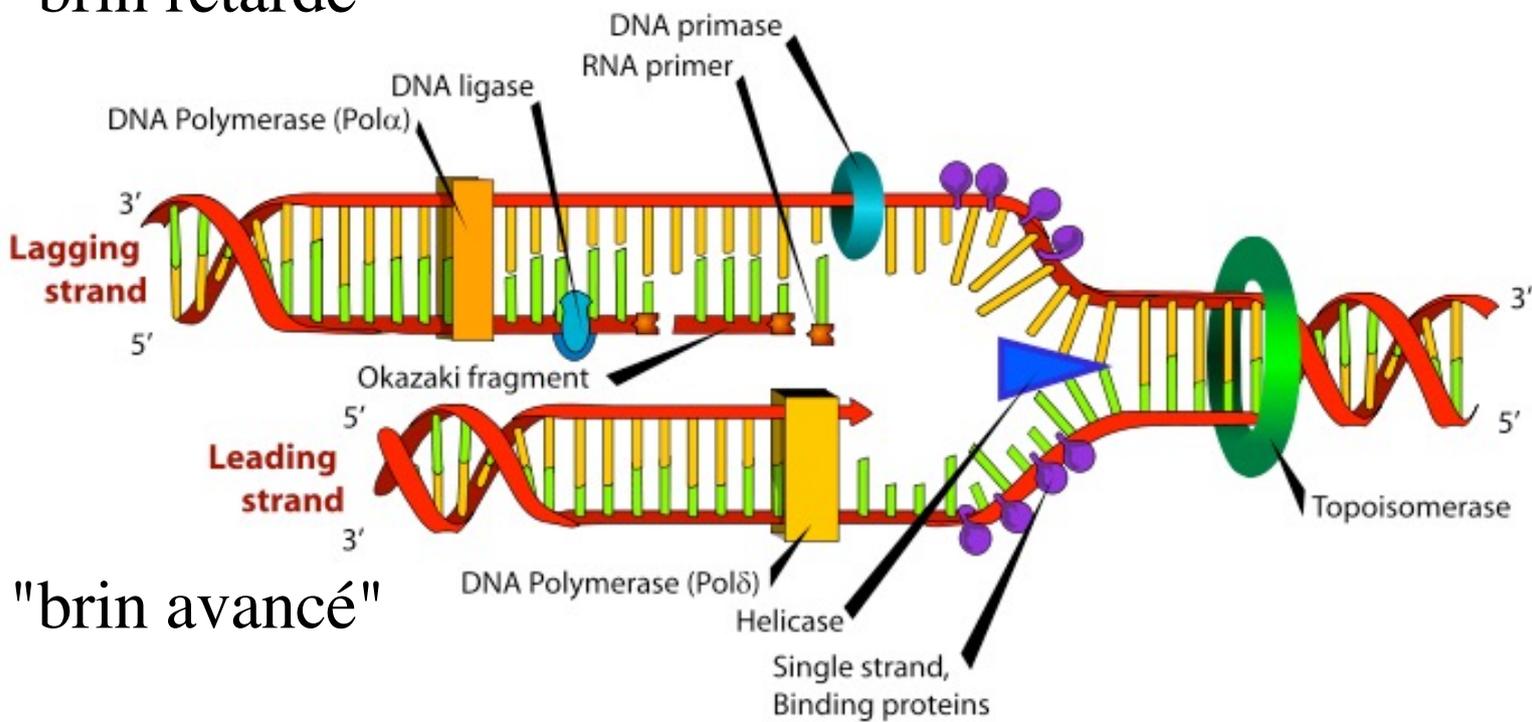
Fixation non
fonctionnelle de
BamHI
sur un site non
spécifique



**Processus biologiques
impliquant des
interactions protéine-ADN**

La réplication

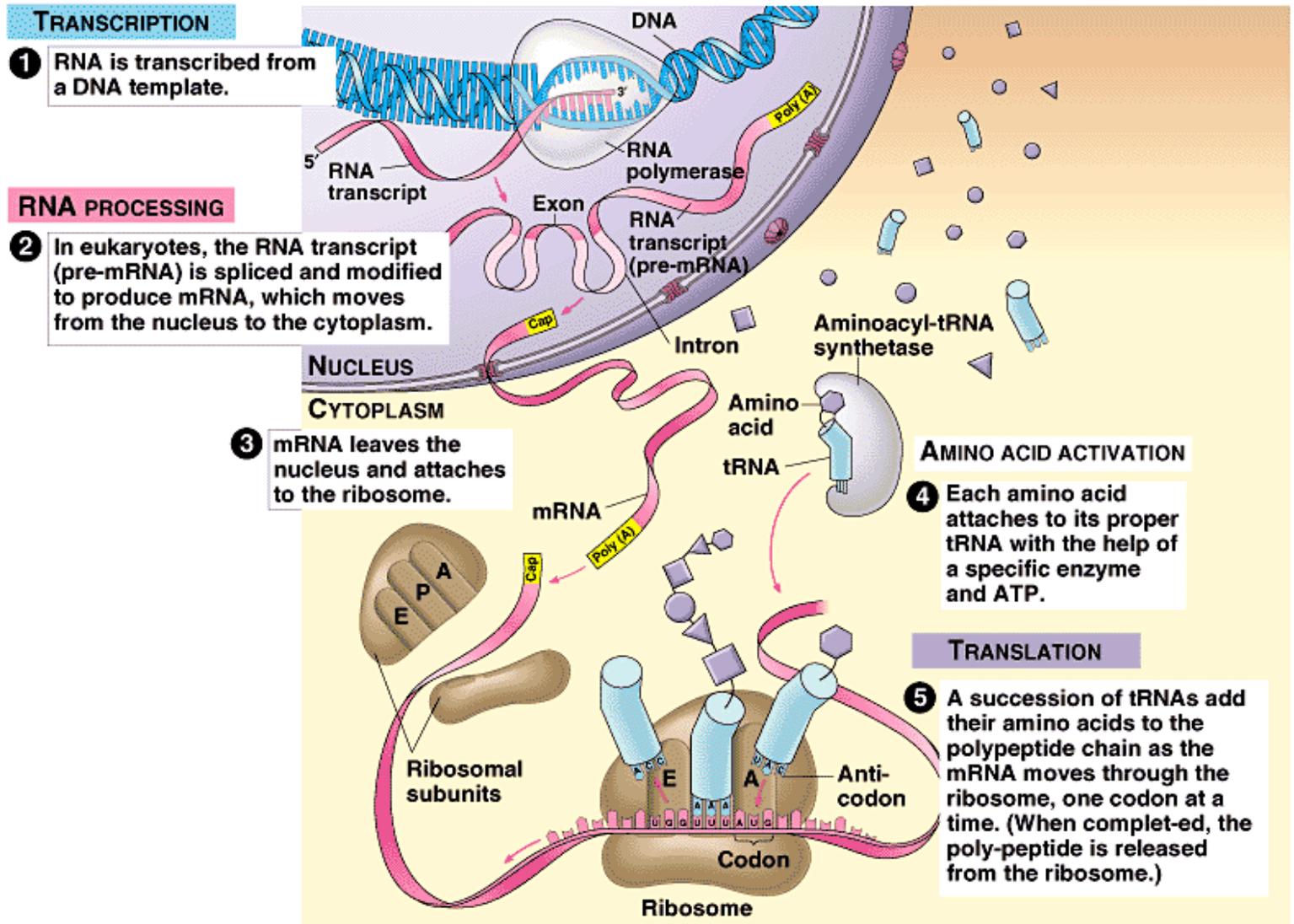
"brin retardé"



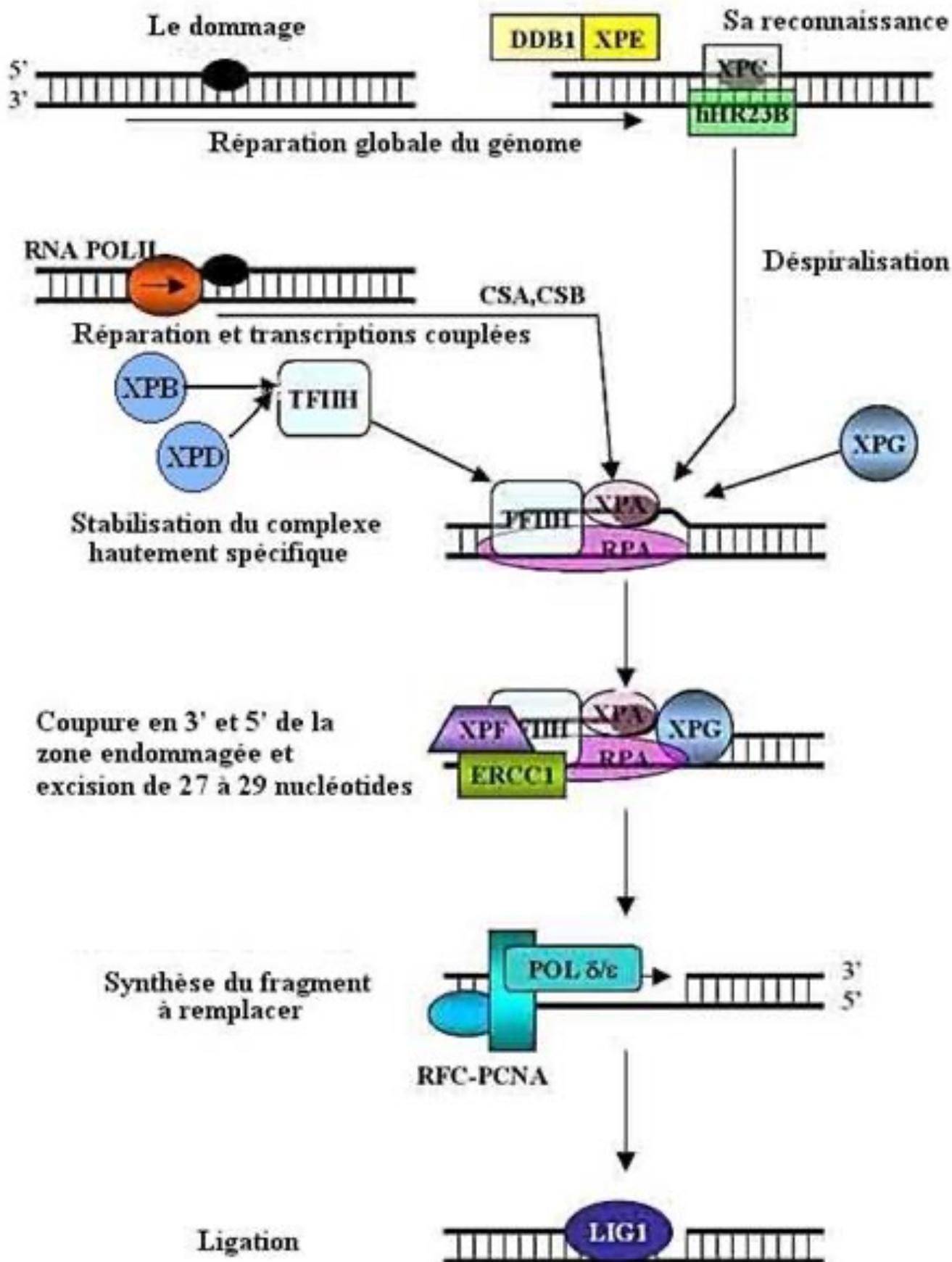
"brin avancé"

- Ajout de nucléotides à l'extrémité 3'
- Synthèse bidirectionnelle, simultanée pour les deux brins, avec fourche de réplication
- Synthèse continue sur l'un des brins et discontinue sur l'autre
- Chaque "fragment d'Okasaki" est précédé d'une amorce d'ARN, qui devra être remplacée par une séquence d'ADN

Transcription → Traduction

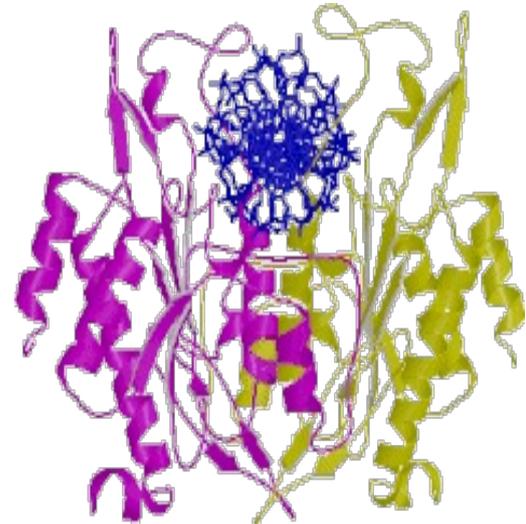
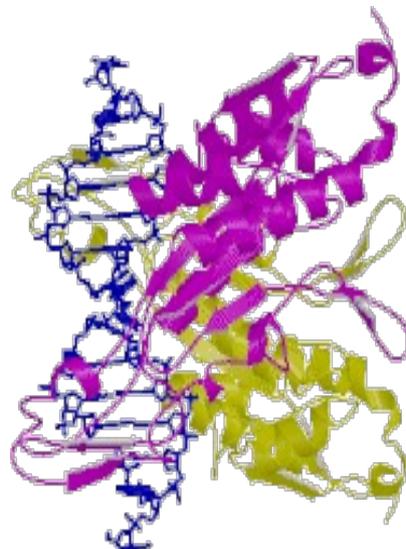
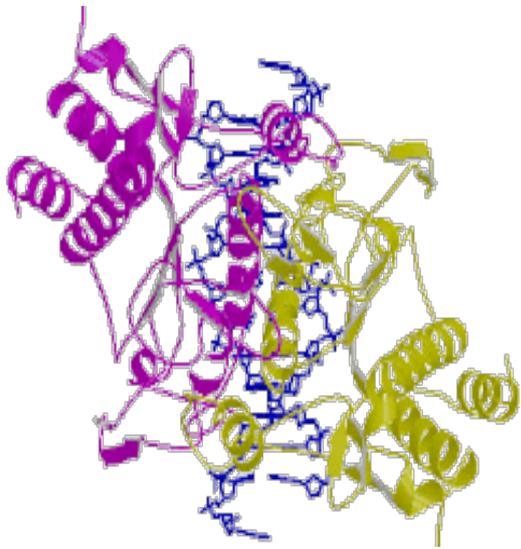


Réparation de l'ADN

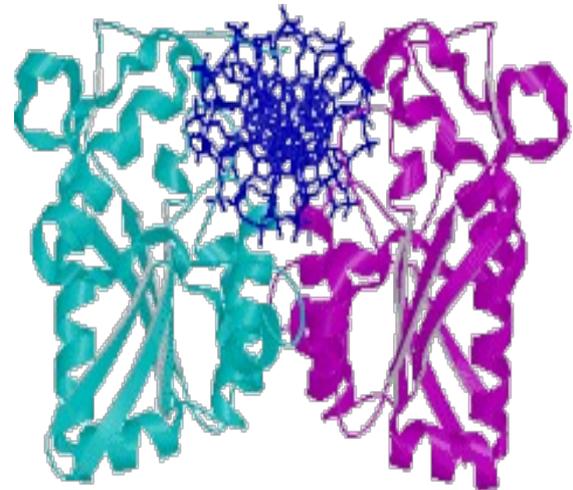
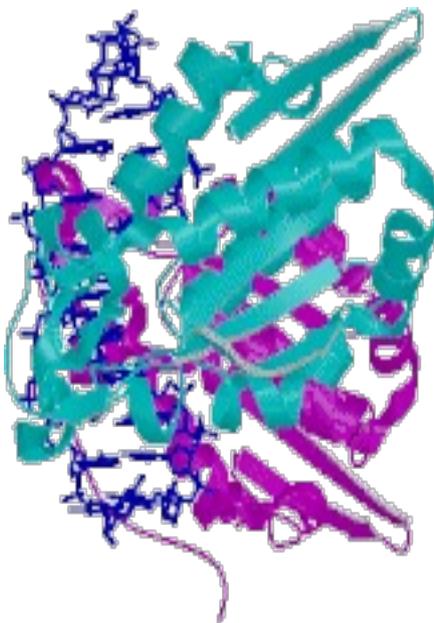
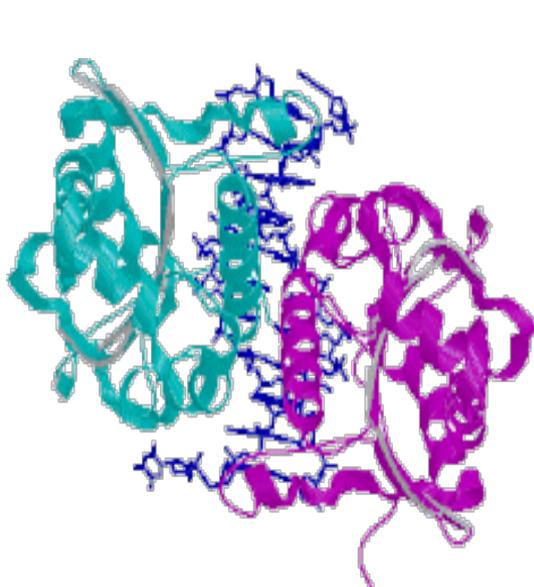


Les enzymes de restriction

EcoRI et BamHI



EcoRI 5'-G[^]AATTC-3'
 3'-CTTAA[^]G-5'



BamHI 5'-G[^]GATCC-3'
 3'-CCTAG[^]G-5'