



Doctoral Thesis

The binding of MEF2A to DNA biochemical and structural characterization

Author(s):

Santelli, Eugenio

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003914046> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

ETH dissertation number 13752

The binding of MEF2A to DNA: biochemical and structural characterization

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Eugenio Santelli

Laurea dottore in Chimica Industriale, Università degli Studi, Milan, Italy
born December 12th, 1967
citizen of Italy

Accepted on the recommendation of
Prof. T.J. Richmond, examiner:
Prof. F. Winkler, coexaminer:

Zurich, 2000

Summary

Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) DNA-binding transcription regulators have an essential, well established role in the myogenesis of cardiac and skeletal muscle cells. Their additional crucial involvement in other biological functions, such as smooth muscle and nervous system development, immediate-early gene activation, muscle-specific gene regulation in all adult muscle types, multiple roles in the immune system, makes them a major subject of interest in the field of gene-specific transcriptional activation. The four MEF2 members, named MEF2A, -B, -C, -D, constitute a subfamily of the MADS-box family of transcription factors, characterized by a 56-residue motif, which together with a variable C-terminal stretch of 20-30 amino-acids defines a core domain which mediates DNA binding, dimerization and interaction with further factors.

The crystal structures of two MADS-box members, SRF and MCM1, have been solved and show that the primary DNA binding motif is an antiparallel coiled-coil formed by two 25-residue α -helices and two corresponding N-terminal 12-residue random coil extensions, one of each from the two subunits constituting the DNA-binding dimer. The highly bent DNA wraps around the coiled-coil making major groove contacts, while the N-extension makes further DNA contacts in the minor groove. Overall, the protein shows a three-layer architecture, completed by a four-stranded antiparallel β -sheet and another pair of helices, each layer contributing to the dimerization interface.

This work presents the subcloning, expression and purification of MEF2A core, and the biochemical and crystallographic structural characterization of its complex with DNA. The X-ray structure of MEF2A core shows both shared and completely new features: in

common with SRF and MCM1 are the three-layer arrangement and the main theme of DNA recognition by a cluster of charged residues on the surface of the coiled-coil which select a narrow minor groove as part of the DNA binding specificity determination. New unanticipated features include the way the N-terminal three residues dictate specific recognition of the DNA site sequence bound by MEF2 proteins and the novel fold of the C-terminal layer of the motif, constituted by two α -helices running perpendicular to the underlying β -sheet. The DNA is essentially unbent in the crystals, but the structure shows how DNA bending could be stabilized by residues in the middle layer.

This study is a significant contribution to the understanding of DNA binding by MADS-box proteins, showing how modulation of DNA binding specificity and architecture can be achieved within the context of the MADS-box rigid scaffold. The fold of the C-terminal portion is important for the interactions with other transcription factors, crucial to the understanding of the function of this family of transcriptional regulators.

Zusammenfassung

Myocyte Enhancer Faktor 2 (MEF2) Proteine sind DNA bindende Transkriptionsregulatoren, welche eine wesentliche Rolle bei der Myogenese von Herz- und Skelettmuskelzellen spielen. Ihr zusätzliches entscheidendes Mitwirken bei anderen biologischen Funktionen wie der Entwicklung glatter Muskulatur und des Nervensystems, der Aktivierung der immediate-early Gene, der Regulierung muskelspezifischer Gene im entwickelten Muskel und verschiedener Aufgaben im Immunsystem, machen sie zu einem Hauptthema im Bereich der genspezifischen Transkriptionsaktivierung. Die vier MEF2 Typen, MEF2A, -B, -C, -D, bilden eine Untergruppe der MADS-box Familie der Transkriptionsaktivatoren: Ein 56 Aminosäuren langes Motif bildet zusammen mit einem 20-30 Aminosäuren langen variablen C-terminalen Stück die zentrale Domäne, welche die DNA Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit weiteren Faktoren vermittelt.

Die Kristallstrukturen zweier Transkriptionsfaktoren aus der MADS-box Familie, SRF und MCM1, wurden gelöst und zeigen, dass das primäre DNA bindende Motif aus einem antiparallelen Coiled-Coil aus zwei 25 Aminosäuren langen Helices und zwei entsprechenden N-terminalen 12 Aminosäuren langen Random-Coil Verlängerungen besteht, wobei je eine Helix und eine N-terminale Verlängerung von einer der beiden Untereinheiten stammen, welche das DNA bindende Dimer bilden. Die stark gebogene DNA wickelt sich um den Coiled-Coil, welcher dabei Kontakte zur Major Groove macht, während die N-terminale Verlängerung weitere Kontakte zur DNA-Minor Groove ausbildet. Ergänzt mit einem 4 strängigen antiparallelen beta-Blatt und noch einem Helixpaar zeigt das Protein insgesamt eine dreistöckige Architektur, wobei jede

Ebene dabei zur Dimerisierungs-Berührungsfläche beiträgt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde MEF2A core subkloniert, exprimiert und gereinigt. Die Struktur des Komplexes mit DNS wurde mit biochemischen und kristallographischen Methoden charakterisiert. Die Röntgenstruktur des MEF2A core/DNS Komplexes zeigt bekannte und ganz neue Merkmale: Mit SRF und MCM1 hat er die dreistöckige Architektur und die DNS Erkennung durch eine Gruppe von geladenen Aminosäuren-Seitenketten auf der Oberfläche des Coiled-Coil gemeinsam, was eine enge Minor Groove als Teil der Spezifität der DNS-Bindung bestimmt. Neue unvorhergesehene Elemente umfassen die Art und Weise wie die N-terminalen drei Aminosäuren die spezifische Erkennung von DNS Sequenzen bestimmen, welche MEF2 Proteine binden, und die neuartige Faltung der C-terminalen Ebene des Motifs, bestehend aus zwei alpha-Helices, welche rechtwinklig zum darunterliegenden beta-Blatt verlaufen. Die DNS ist praktisch nicht gebogen im Kristall, aber die Struktur zeigt, wie ein Biegen der DNS stabilisiert werden könnte durch Aminosäuren der mittleren Ebene.

Die vorliegende Arbeit ist ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der DNS-Bindung durch MADS-box Proteine, indem sie zeigt, wie die Spezifität und Architektur von DNS-Bindung im Rahmen des starren MEF2 Gerüsts moduliert werden kann. Die Faltung des C-terminalen Teiles ist wichtig für die Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren, was unabdingbar für das Verständnis der Funktion dieser Familie von Transkriptionsaktivatoren ist.