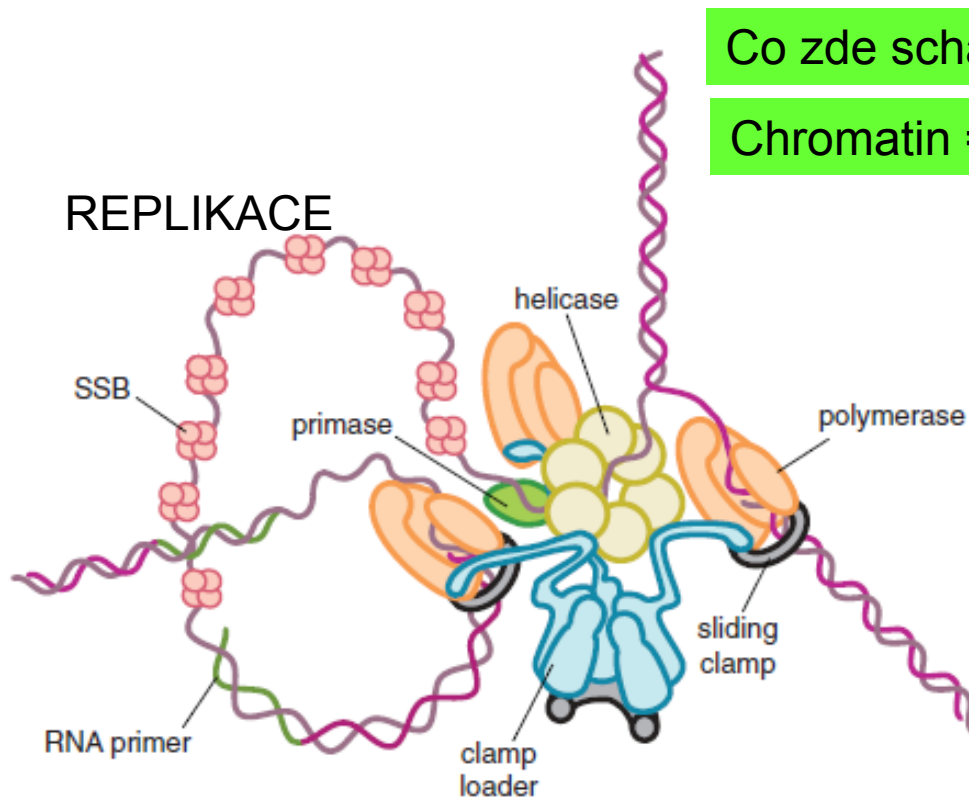


- Úvod - Analýza proteinu
 - Domény
 - fold-struktura (ss, 3D – homolog v PDB? – I-TASSER)
 - Interakce (IntAct, BioGRID)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - evoluce
- Konkrétní nová data – článek
- V PyMolu připravit 3D movie

Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

PhD studenti anglicky

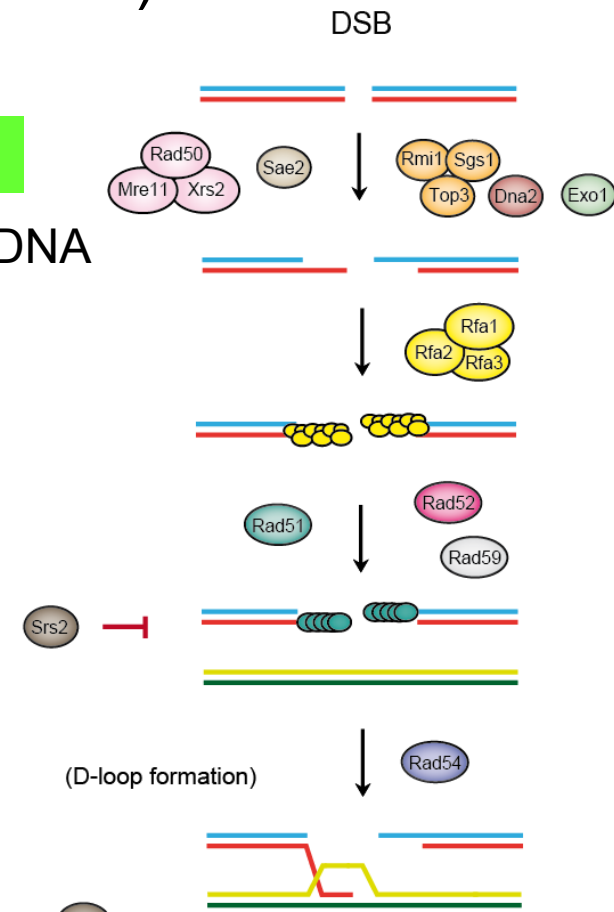
- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)



Co zde schází??

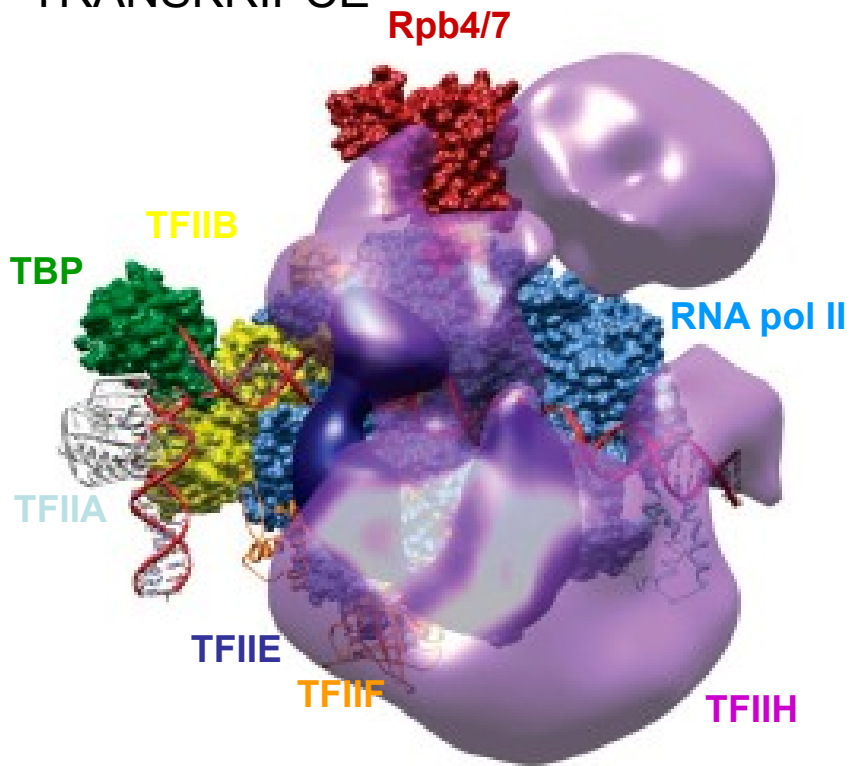
Chromatin = histony ...

ÓPRAVA DNA

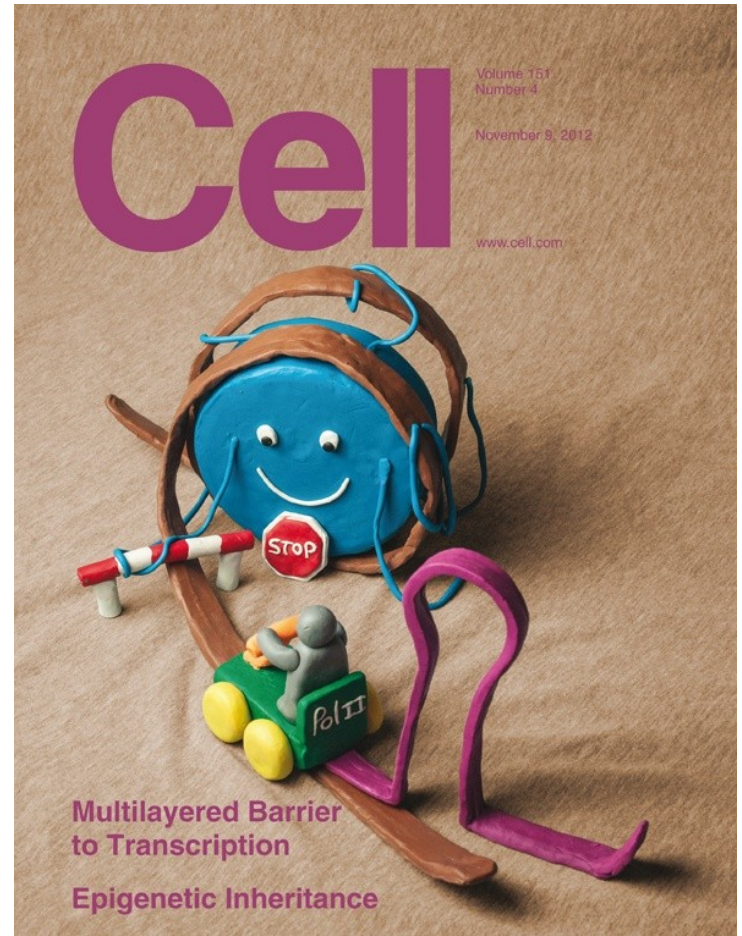


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA

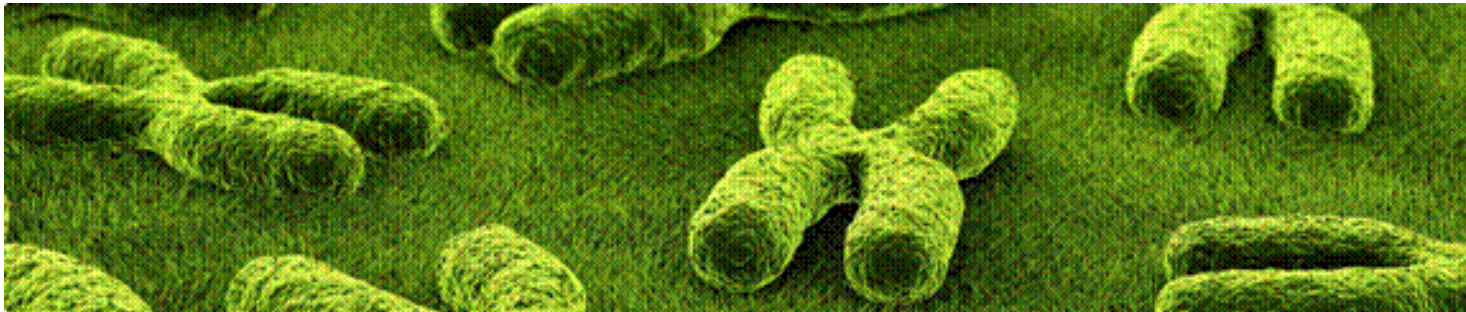
TRANSKRIPCE



kvasinkový PIC komplex
Gibbons et al, PNAS, 2012



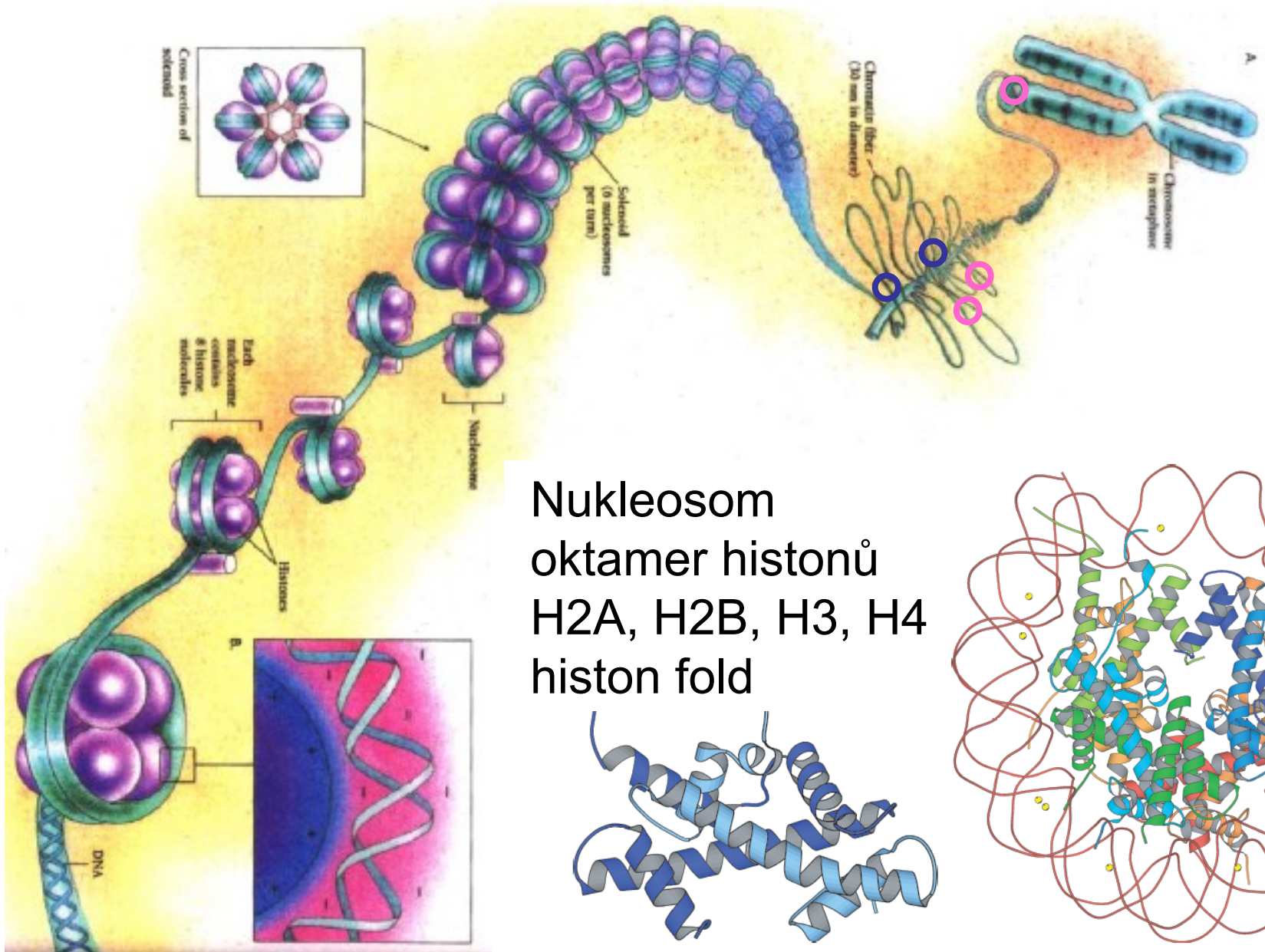
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom 3×10^9 bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4 cm!!)
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- **vytváří základní strukturu**
 - nukleosomy (histonový oktamer) a histony (H1)
 - HMG, HP proteiny
- vytváří specializované domény
 - centromery, telomery
- podílí se na dynamice struktury
 - kohesin, kondensin a SMC5-6 komplex



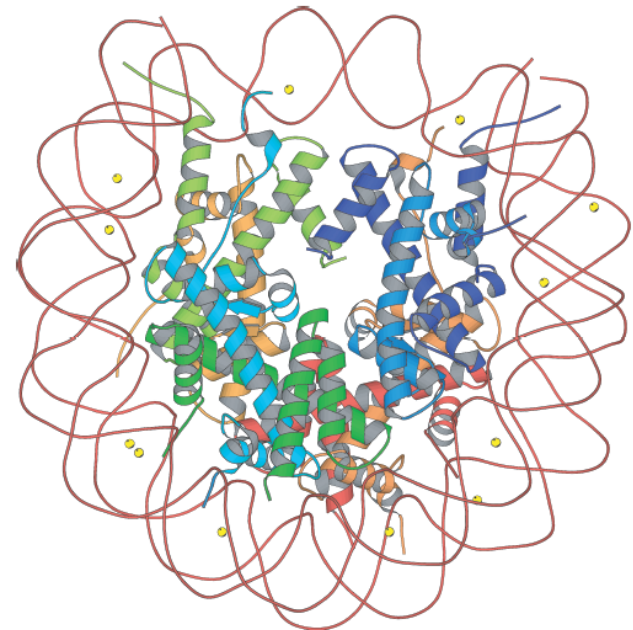
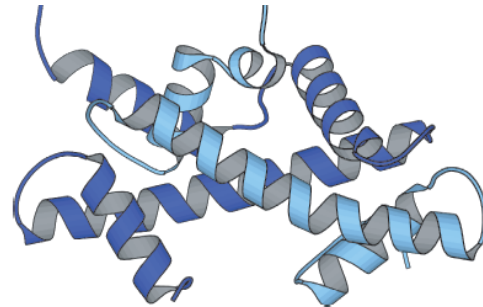
přednášky prof. Fajkuse:

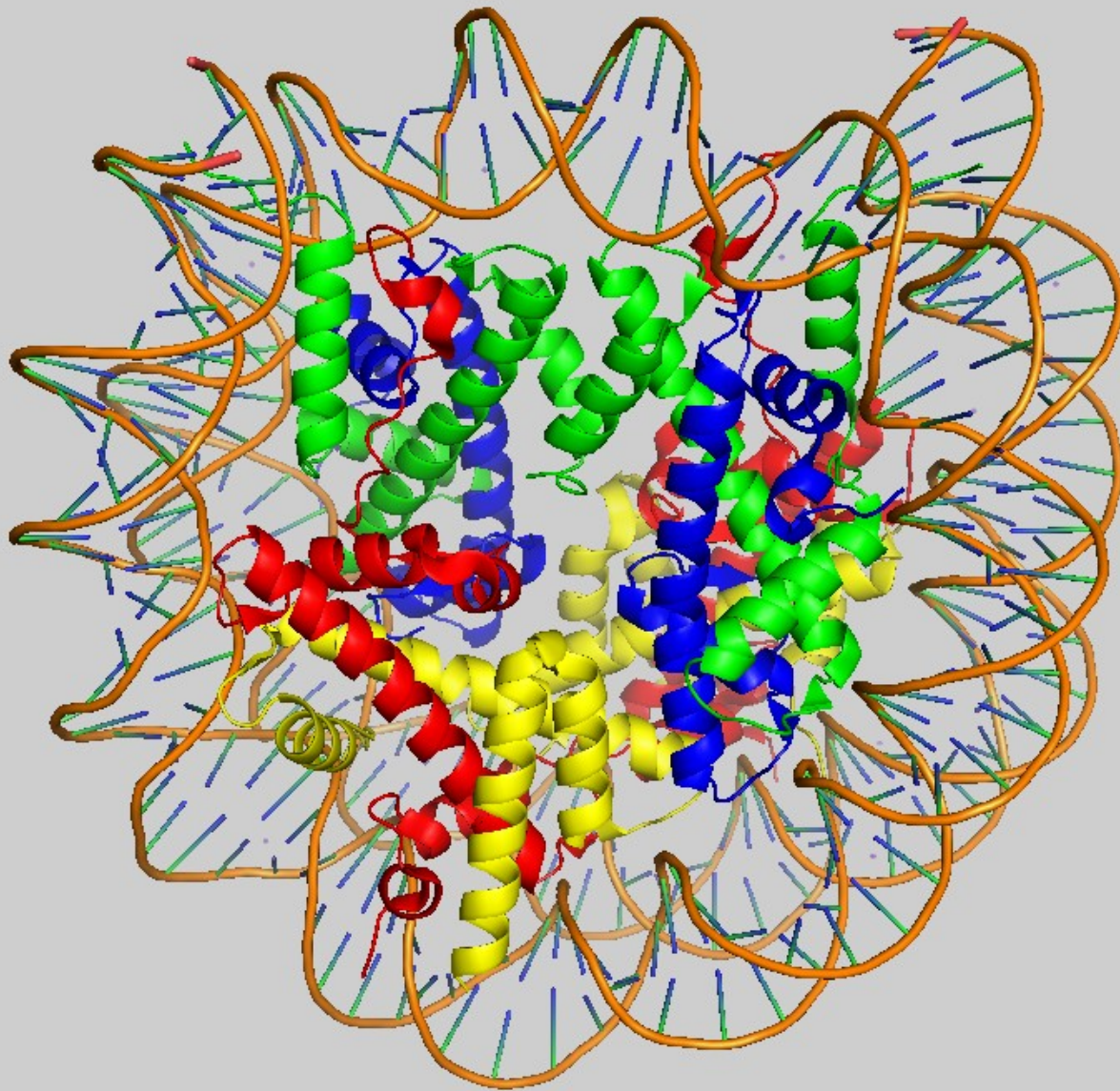
Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041)

komplexy vytvářející strukturu chromosomu



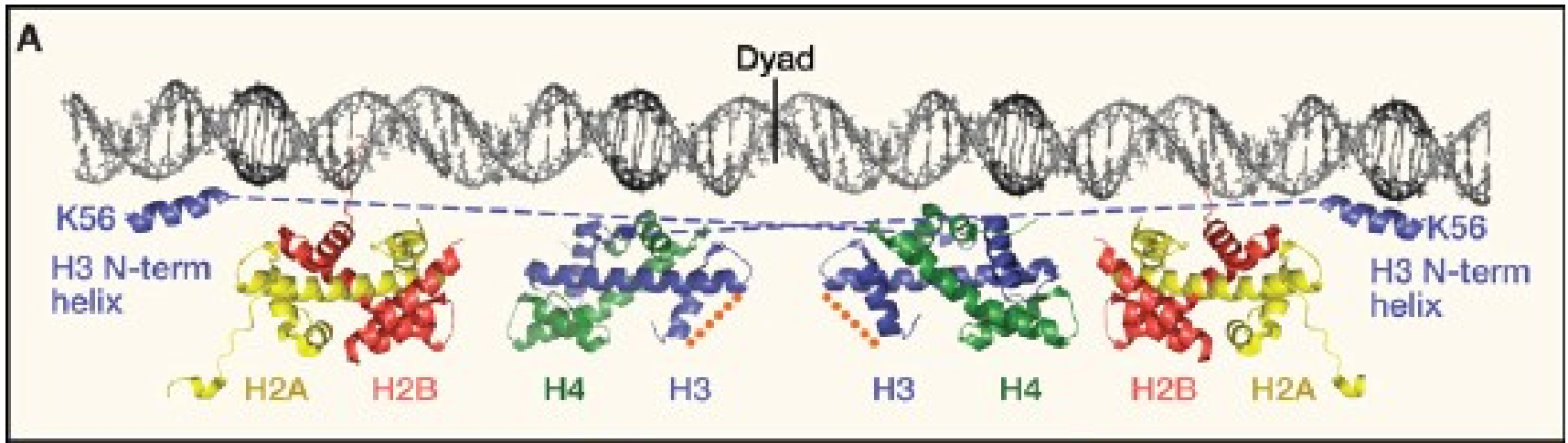
Nukleosom
oktamer histonů
H2A, H2B, H3, H4
histon fold



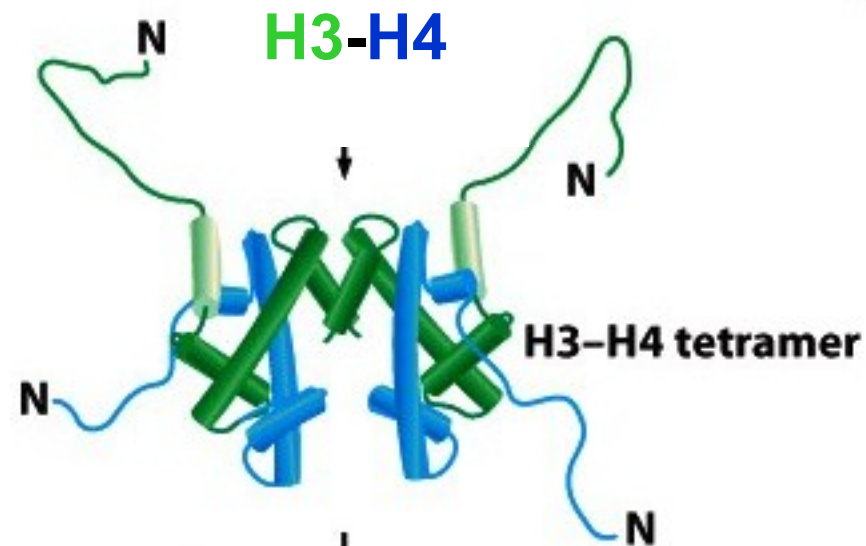


- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)

Skládání histonů do nukleosomu (komplexu)



- 146bp - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- H3 dimerizuje přes postraní šroubovici
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou šroubovice H3 (acetylovaný K56)

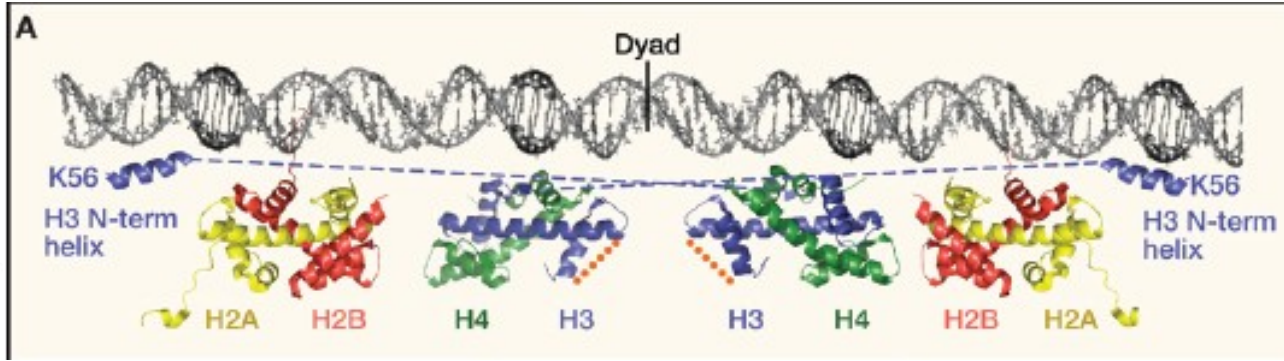
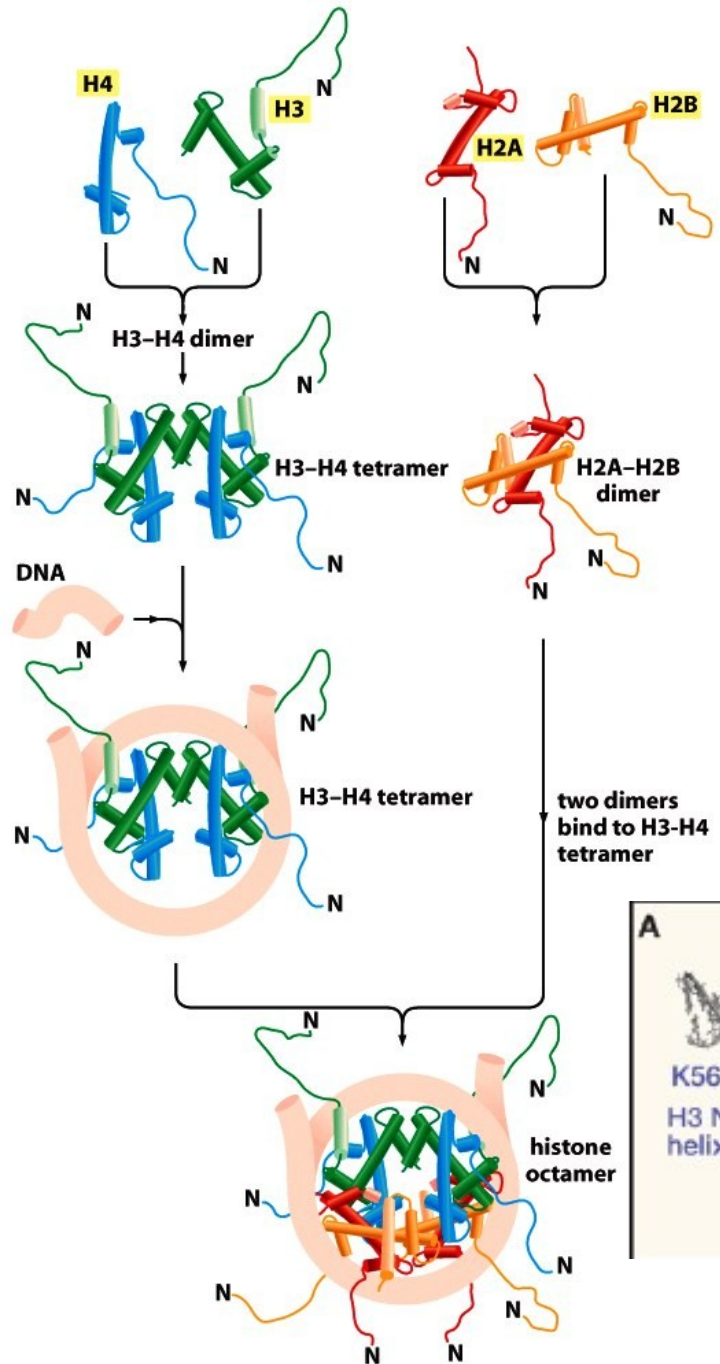


Sestavování nukleozomu:

- Silnější je interakce mezi H3-H4
- H3 dimerizuje přes postraní šroubovici a vytváří tetramer který asociuje s DNA
- dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru (H3-H4)₂

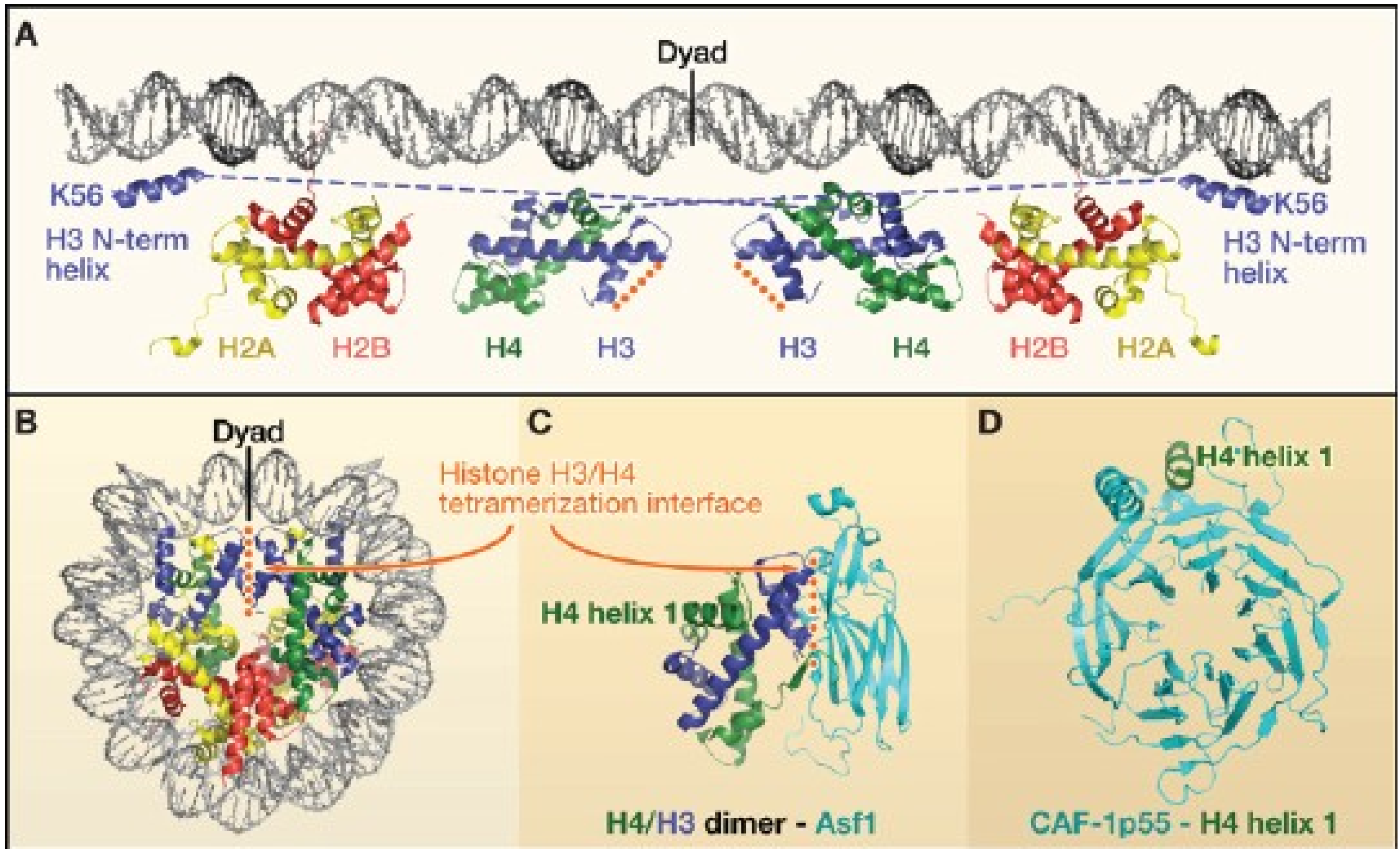
- při uvolňování odpadají nejdříve dimery H2A-H2B

- H2A a H3 existují ve více variantách, které mohou být zaměněny v nukleosomu



Nabalování a rozbalování histonů

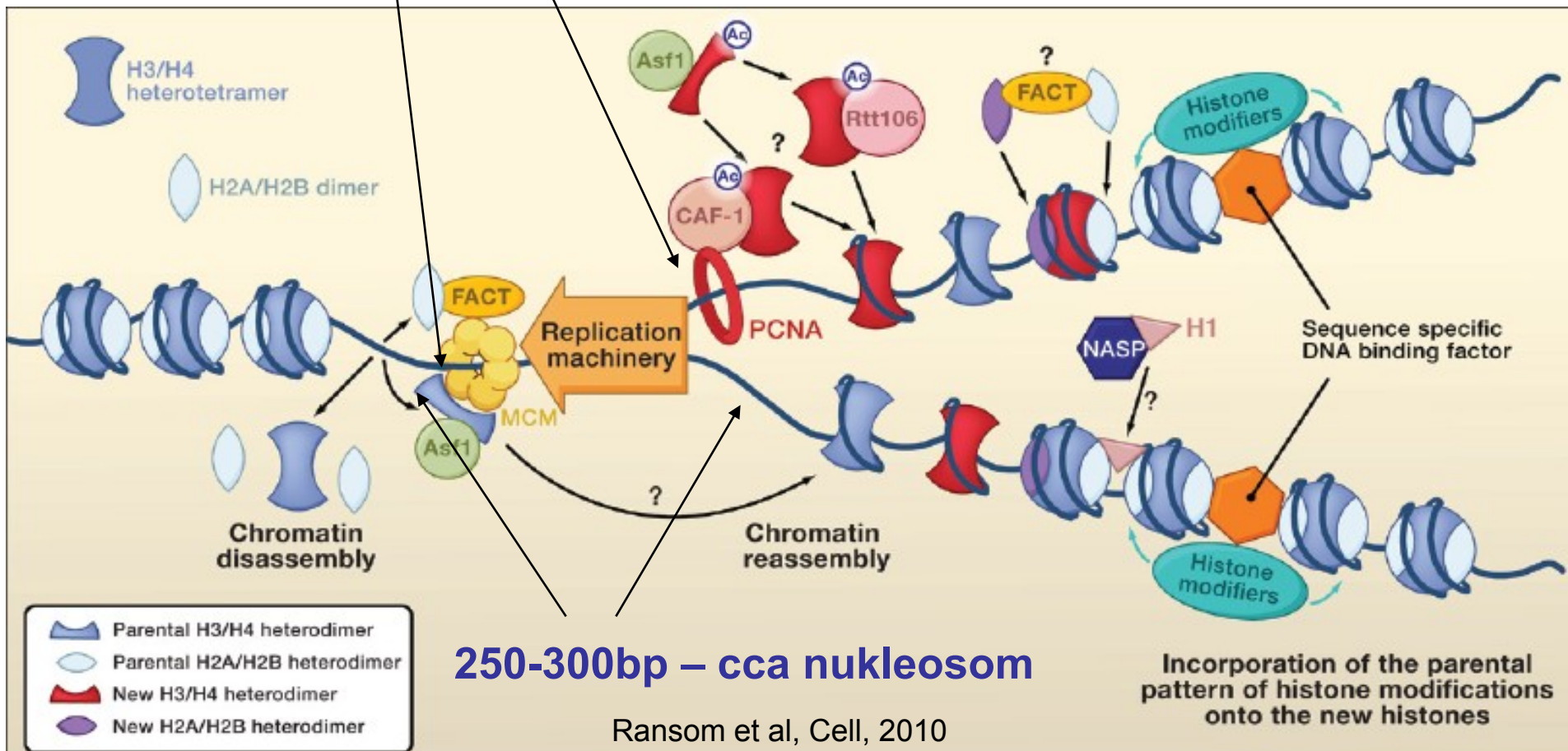
Histonové H3-H4 chaperony



- Postupné sestavování (a uvolňování) histonů je zprostředkováno různými chaperony (+ ATP-dependent remodeling "stroji")
- ASF1 (antisilencing function, tetramerizace) => CAF1 (chromatin assembly factor, vazba k DNA)

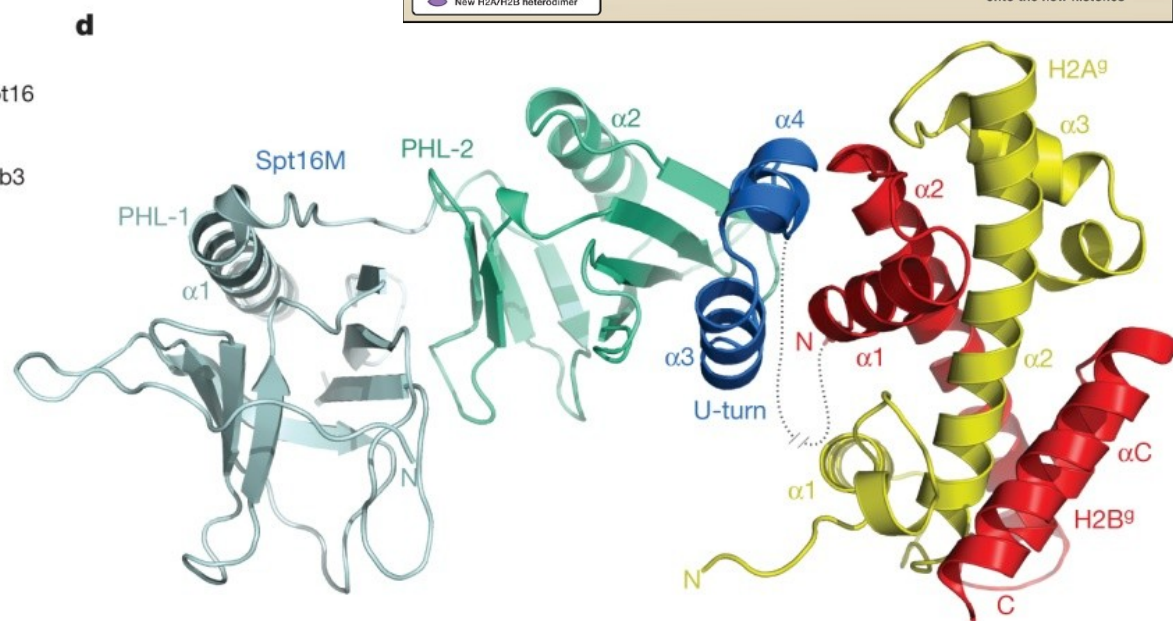
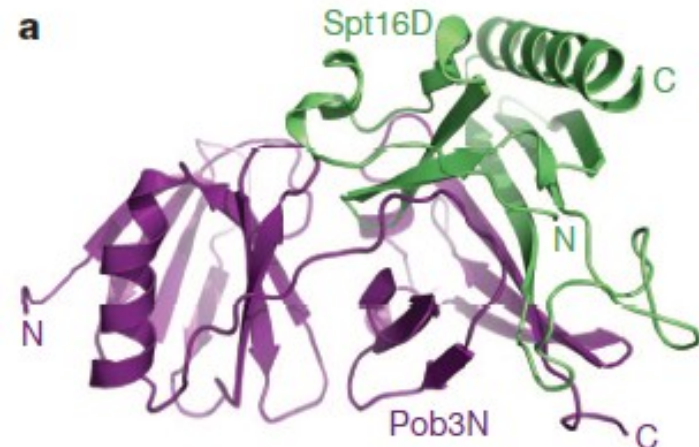
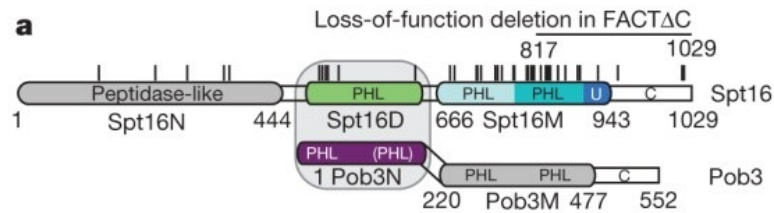
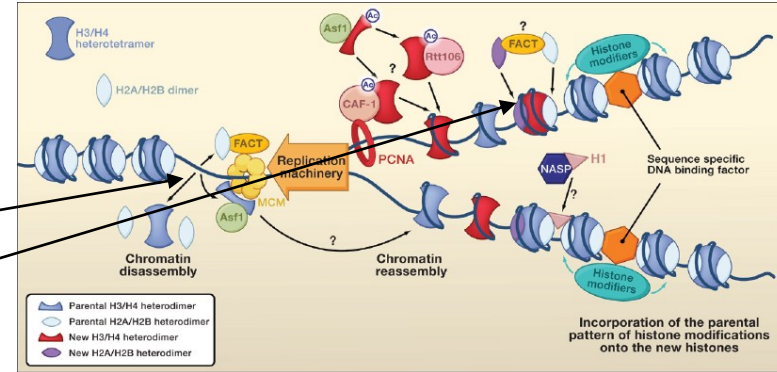
Histon chaperony - replikace

- na ssDNA nukleosomy nejsou: replikace, transkripce, oprava DNA ...
- před těmito procesy se musí histony odstranit a poté zase nabalit ...
(feedback: inhibice chromatin assembly inhibuje disassembly nukleosomů)
- 1. ASF1 (váže MCM a PCNA) a 2. CAF1 (assembly) pro H3-H4 disassembly a assembly



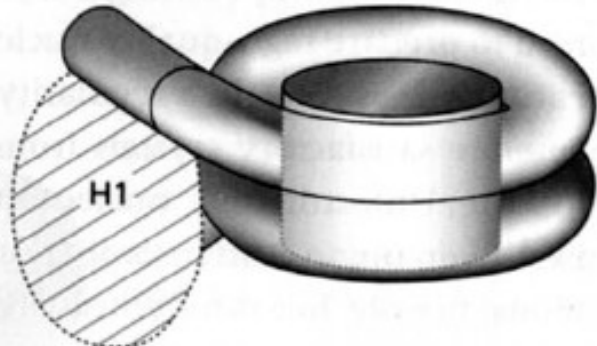
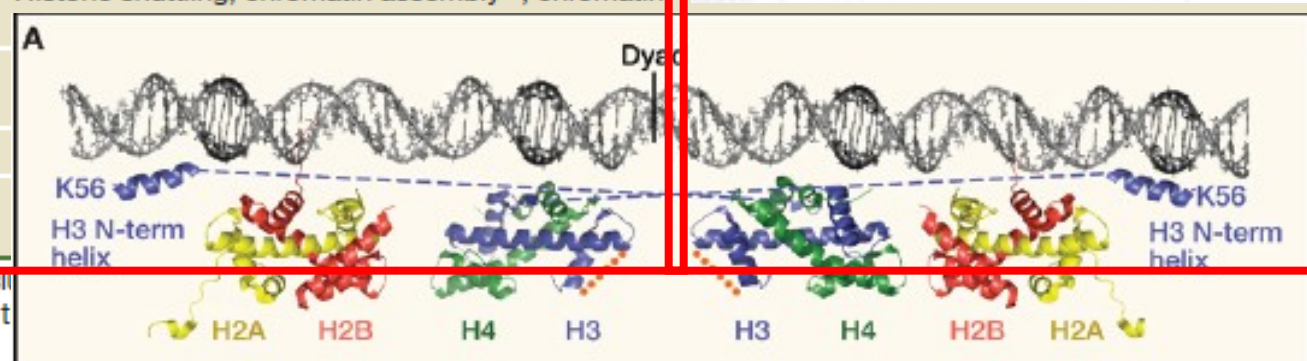
FACT komplex

- histon chaperon komplex FACT (facilitates chromatin transcription) je složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSRP1)
 - dimerizační část také interaguje s DNA-polymerásou (spojení s replikací)
 - rozeznává histon H2A-H2B heterodimer (interferuje s vazbou na DNA tzn. rozrušení vazby H2A-H2B s DNA)
- disassembly a assembly



Histon chaperony

Table 1. Histone Chaperones Implicated in DNA Replication and Repair

Histone Cargo	Histone Chaperone	Interactions and Function during Replication	Interactions and Function during Repair
H3/H4	CAF-1 (p150, p60, p48)	PCNA, Asf1; chromatin assembly; heterochromatin silencing	
	Asf1	RFC, MCM, CAF-1; promotes H3 K56 acetylation leading to chromatin assembly; chromatin disassembly*; histone buffer	
	Rtt106	Chromatin assembly; heterochromatin silencing	
	NASP	Histone buffer*	
H2A/H2B	FACT (Spt16 and Pob3); also binds H3/H4	MCM, RPA, DNA pol I; chromatin assembly*; chromatin disassembly*	
	NAP1	Histone shuttling; chromatin assembly**; chromatin disassembly*	
	Chz1		
H1	NASP		
CenH3/H4	Scm3 (S.c. and S.p.); HJURP (H.s.)		

*** indicates a likely role although not confirmed in *Saccharomyces pombe*; H.s., *Homo sapiens*. Only the information given are cited in the text.

- nově syntetizované H3 (replikace) jsou acetylované na K56 – jsou specificky rozeznávány a zainkorporovány CAF-1 komplexem
- acetylace K56 (šroubovice) interferuje s vazbou na DNA (cca 8x slabší)
- pozice nukleosomu je náhodná a následně je „upravená“ pomocí remodelačních komplexů (a teprve poté je H3 K56 deacetylován a stabilizován)
- pozdější acetylace (Gcn5-HAT) rozvolňuje nukleosomy v místech **transkripce**

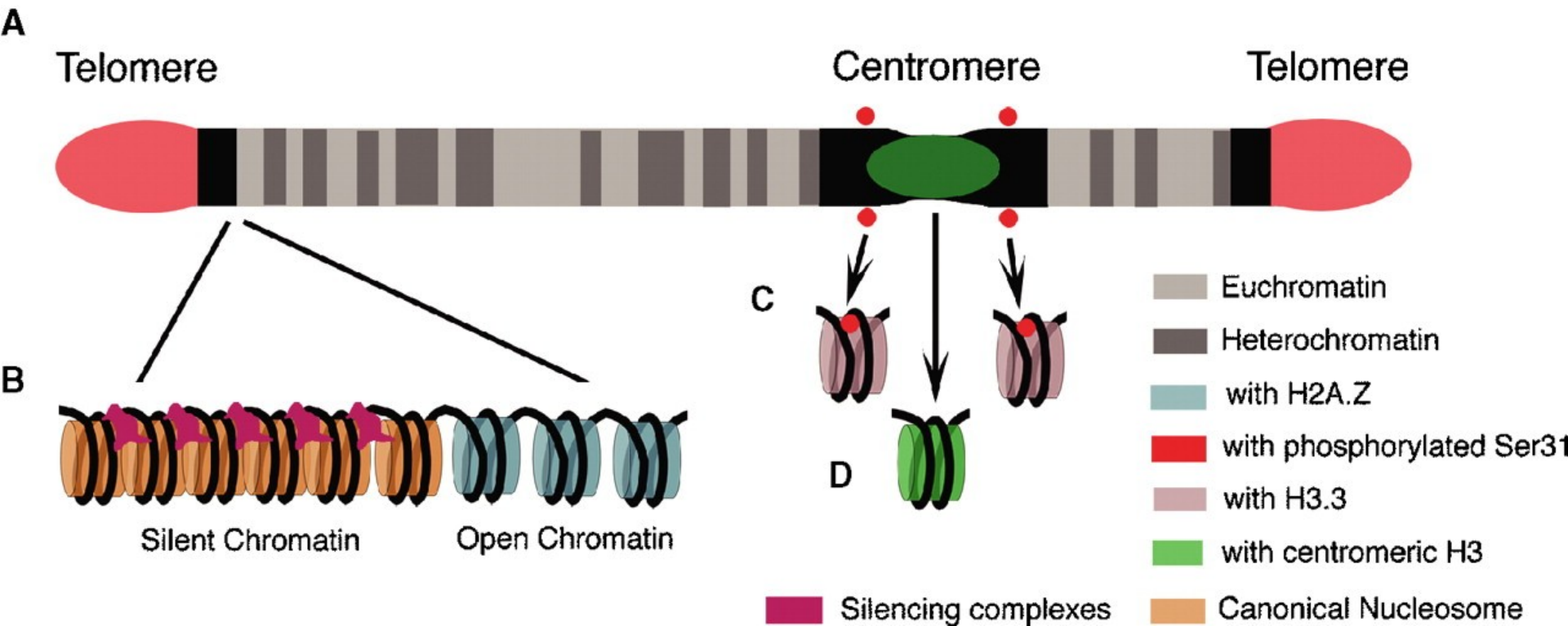
Funkční diverzita variantních histonů (Pusarla & Bhargava, FEBS J. 2005)

Histone	Variant			Functional association
	Mammals	Yeast	<i>Drosophila</i>	
H3	H3.1	–	–	S-phase subtypes
	H3.2	–	–	S-phase subtypes
	H3.3	H3.3	H3.3	Transcriptionally active regions
	Cenp-A	Cse4	Cid	Centromeric nucleosomes
H2A	H2A.Z	Htz1	H2Av ^a	Different functions in various organisms: maintenance of pericentric and telomeric heterochromatin, transcriptional activation and viability
	H2A.X	H2A	H2Av ^a	Sex body in mammals, site of DNA double stranded breaks; condensation and silencing of male sex chromosome
	MacroH2A	–	–	Inactivation of X-chromosome, interferes with both transcription factor binding and SWI/SNF remodelling
	H2A.Bbd	–	–	Close spacing of nucleosomes

^a*Drosophila melanogaster* has a single H2A variant, H2Av, in addition to the major H2A. H2Av is not only a member of H2A.Z family, it also contains an SQ motif similar to mammalian H2A.X. It is phosphorylated at Ser137 and hence it is a functional homologue of H2A.X.

- možnost nově zabudovat histonové varianty
- nejznámější: **CenH3/CENP-A** (specificky v centromerách – ukotvení kinetochor – klíčový pro segregaci chromosomu)
- **H2A.Z** v regulaci transkripce, opravě DNA, hranice chromatinu

Variantní histony



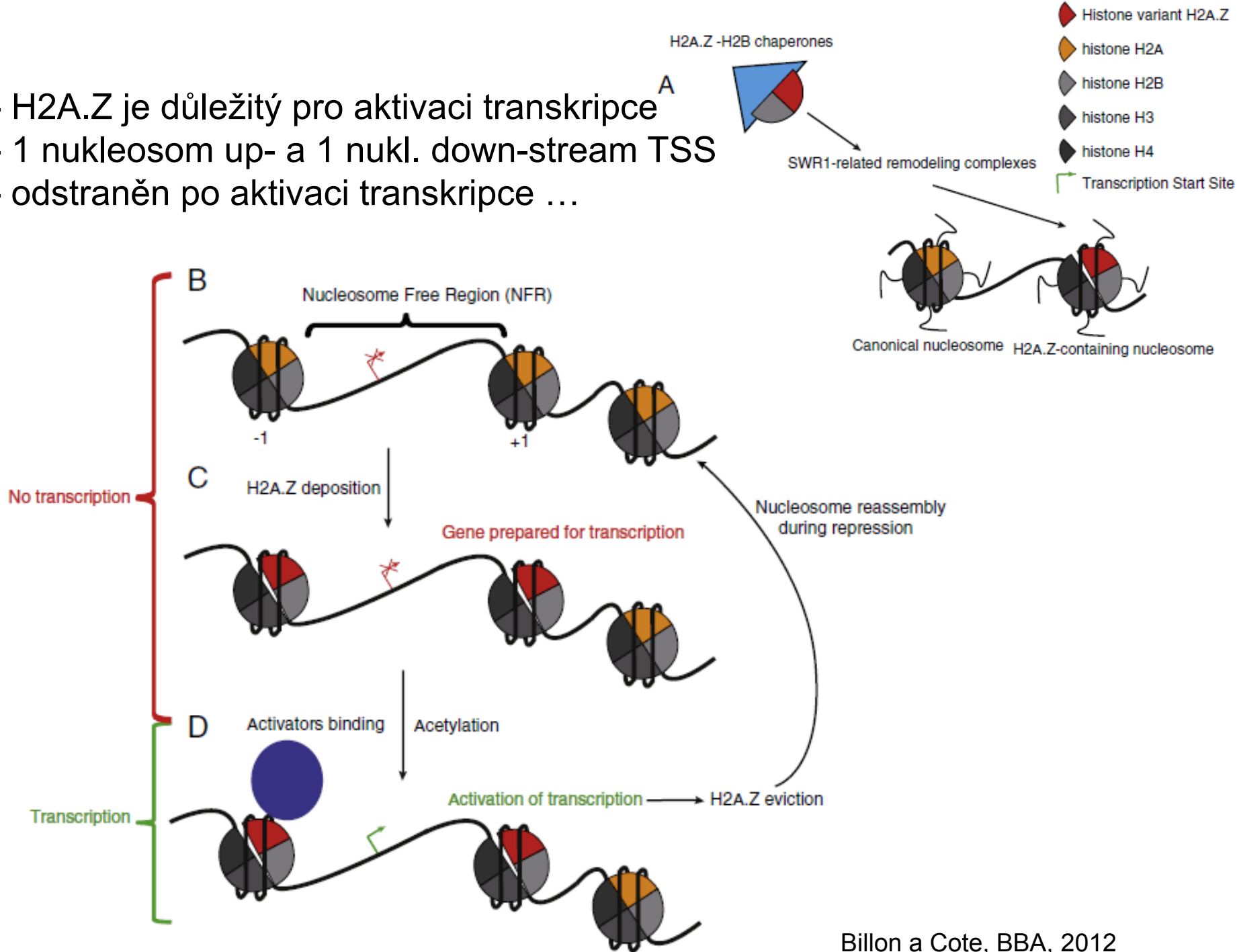
Variantní histony mohou vyznačovat hranice chromozomálních domén.

(A) Typický chromozom vykazující doménové členění. (B) V kvasinkách brání H2A.Z šíření umlčeného chromatinu do sousedních oblastí...

(D) Centromerické nucleozómy obsahují centromerickou variantou H3.

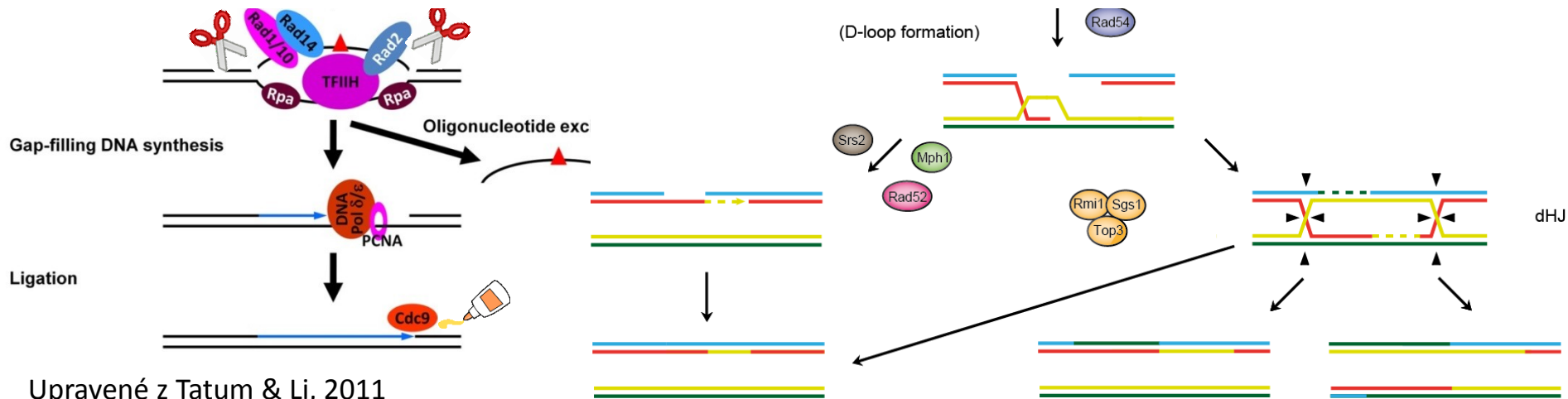
- **CenH3/CENP-A** ... specificky v centromerách
- **H2A.Z** - v regulaci transkripce, opravě DNA, **hranice chromatinu** (integrita centromer a telomer)

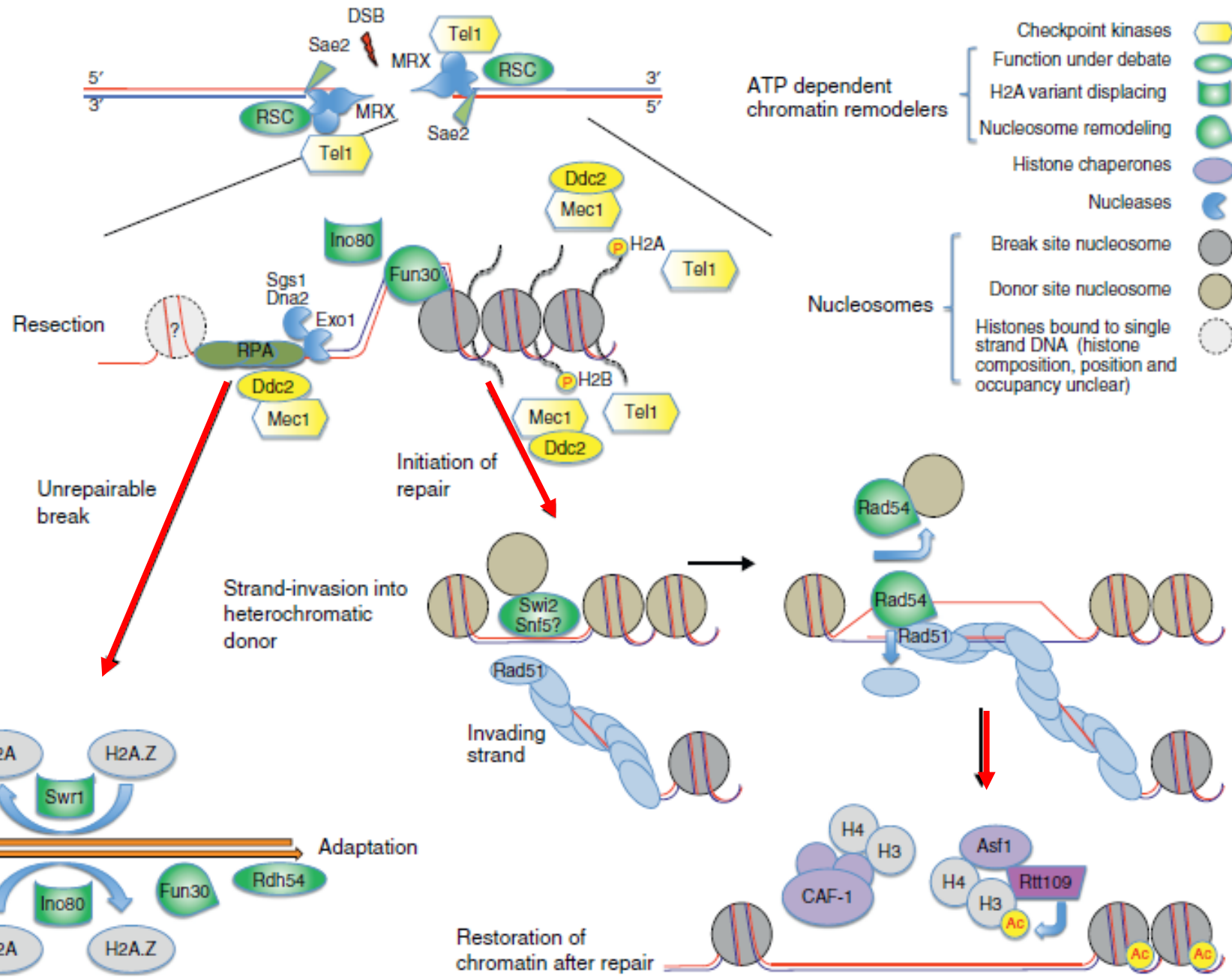
- H2A.Z je důležitý pro aktivaci transkripce
- 1 nukleosom up- a 1 nukl. down-stream TSS
- odstraněn po aktivaci transkripce ...



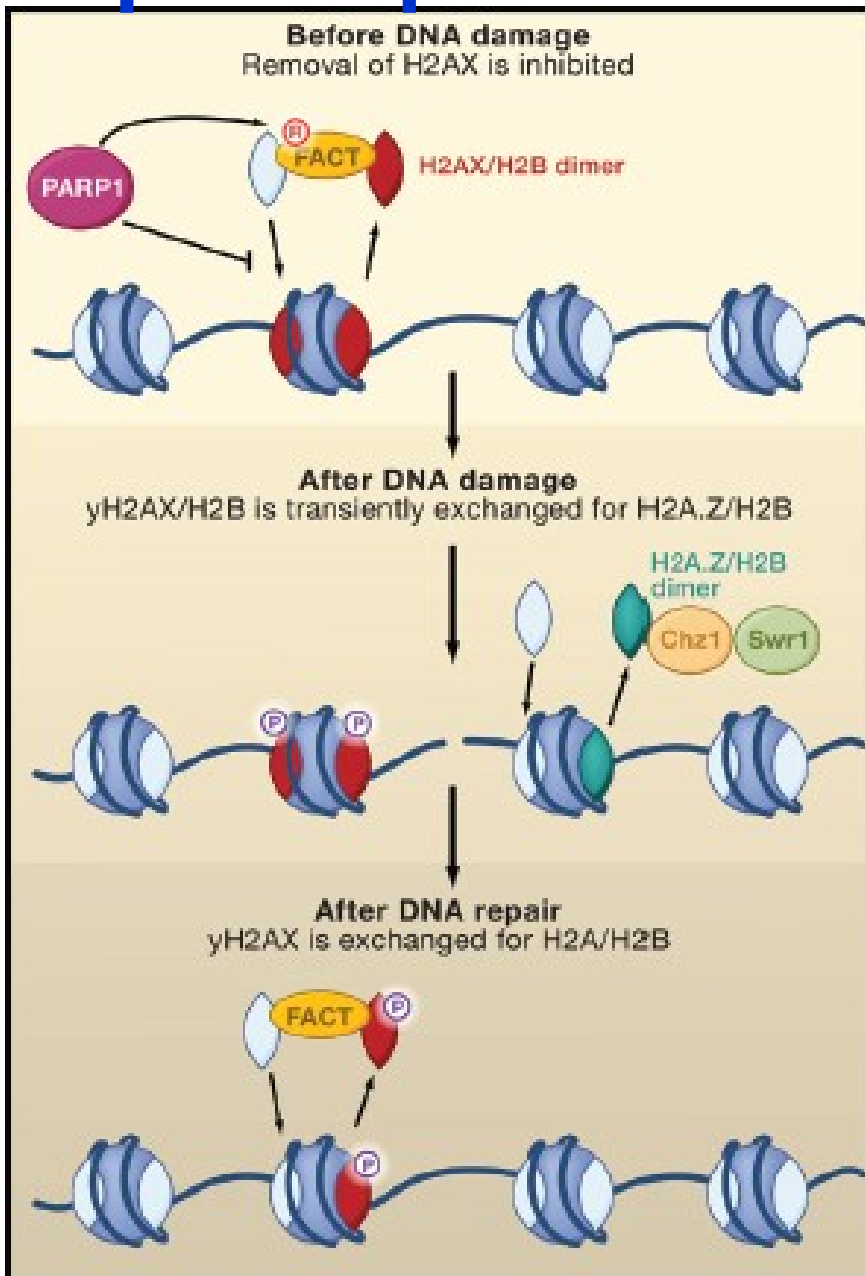
Oprava poškozené DNA - chromatin

- na ssDNA nukleosomy nejsou ... **oprava DNA**
- před těmito procesy se musí histony odstranit a poté zase nabalit ...
- pro malá poškození (NER, BER) postačí menší změny chromatinu zatímco pro větší (DSB - resekce DNA tj. vznik ssDNA) musí nukleosomy odstranit
- NER (BER) doprovázeno acetylací histonů a remodelací (posuvem)
- při DSB musí být odstraněny nukleosomy pomocí ASF1 a CAF-1, aby mohlo dojít k účinné resekci (patrně fyzicky spojené procesy)
- po opravě poškozené DNA jsou nukleosomy uloženy zpět (díky interakci PCNA s ASF1 a CAF-1 – i zde je H3 K56 acetylován)
- Sgs1/BLM interaguje s CAF-1 a reguluje jeho funkci
- až kompletní reassembly chromatinu signalizuje dokončení opravy!





Oprava poškozené DNA – H2A histony

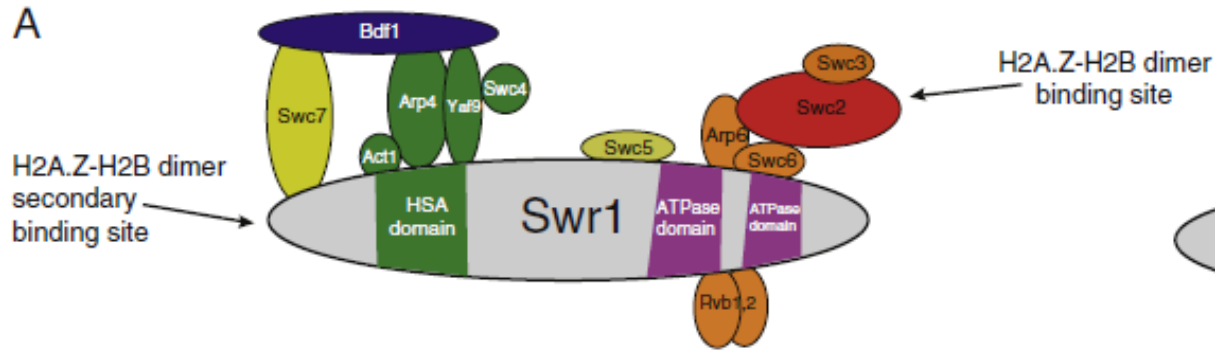


Ransom et al, Cell, 2010

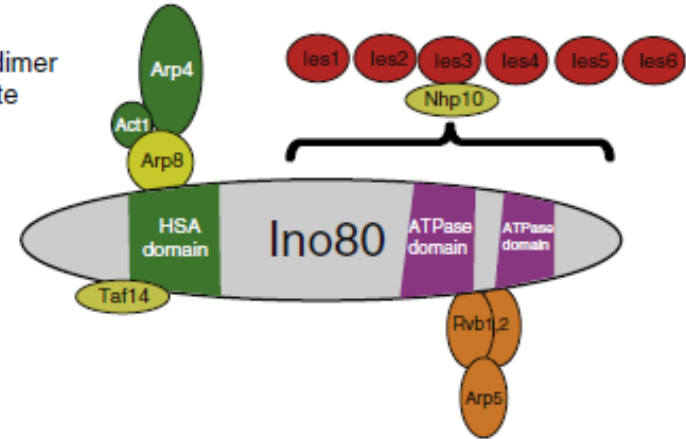
- poškozená DNA signalizuje/spouští „DNA damage checkpoint“ - kinasy
- **H2A.X varianta** je fosforylována (v okolí poškození ~50kb během 15min; H2A u kvasinek)
- po opravě poškození je γ H2A.X vyměněn FACT komplexem za nefosforylovaný H2A.X (a H2A)
- nefosforylovaný H2A.X je chráněn před FACT ribosylací (PARP1)
- **H2A.Z varianta** je zainkorporována v okolí poškození (**SWR** a Chz1) a pomáhá resekci DNA
- ukončení opravy je signalizováno až dokončením chromatinového vlákna

bromodoména

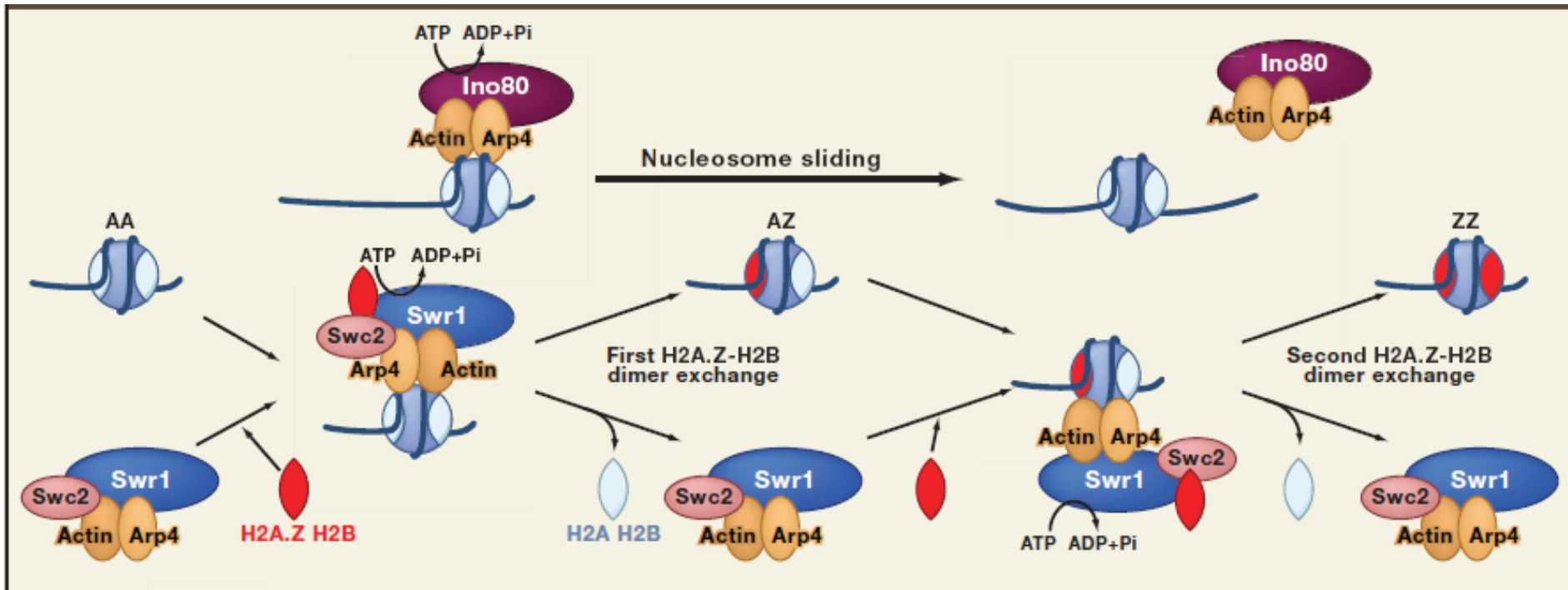
A



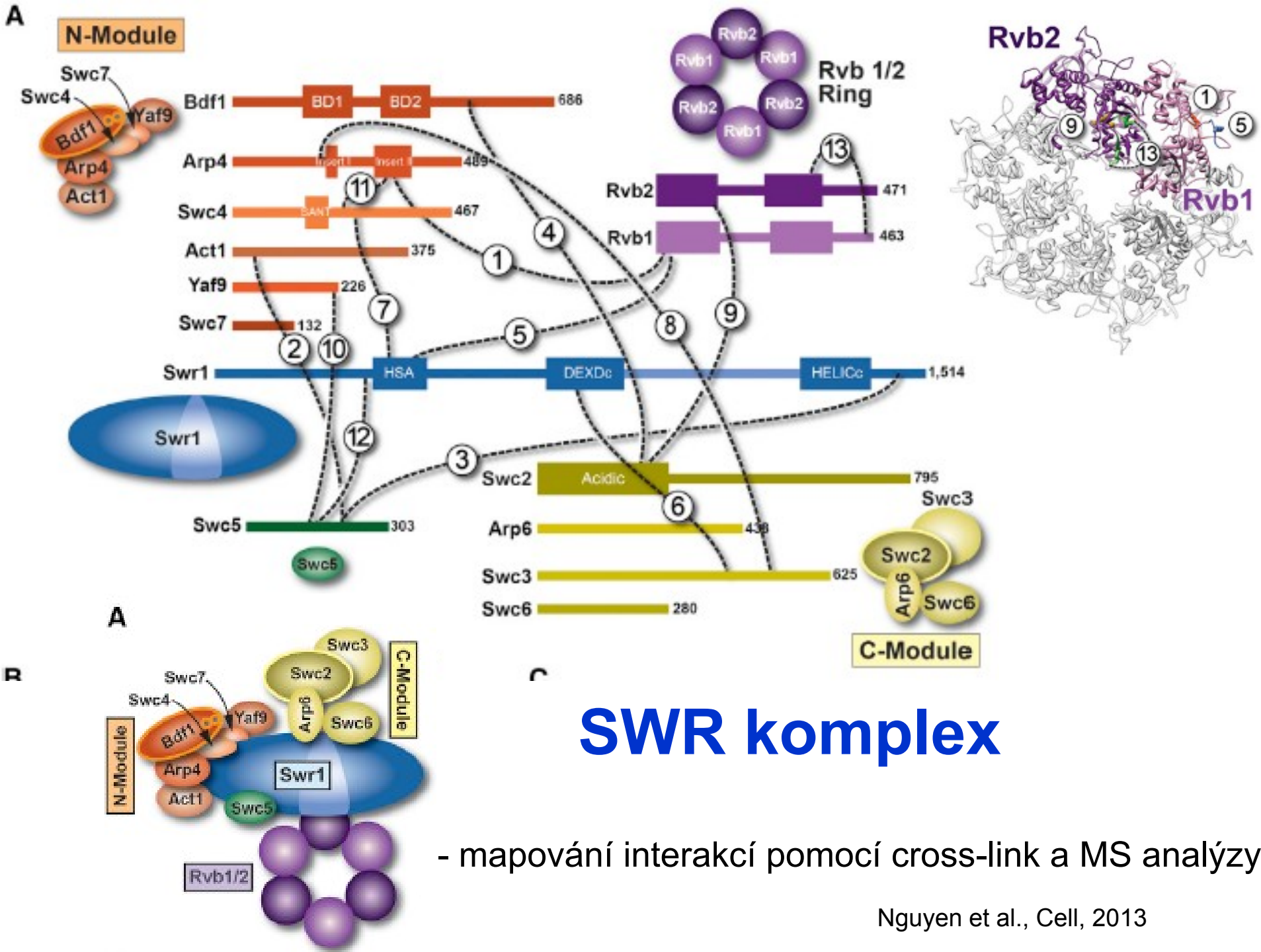
Billon a Cote, BBA, 2012

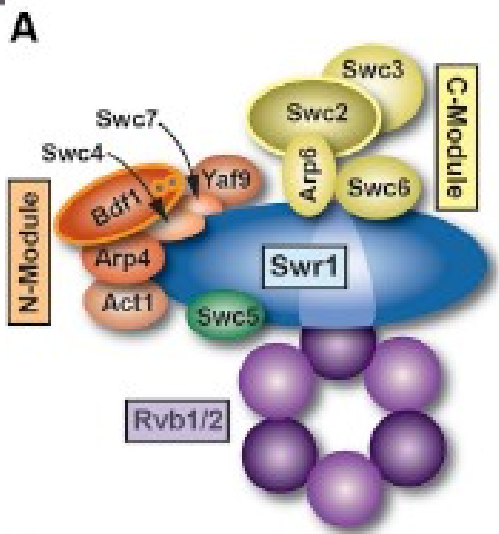
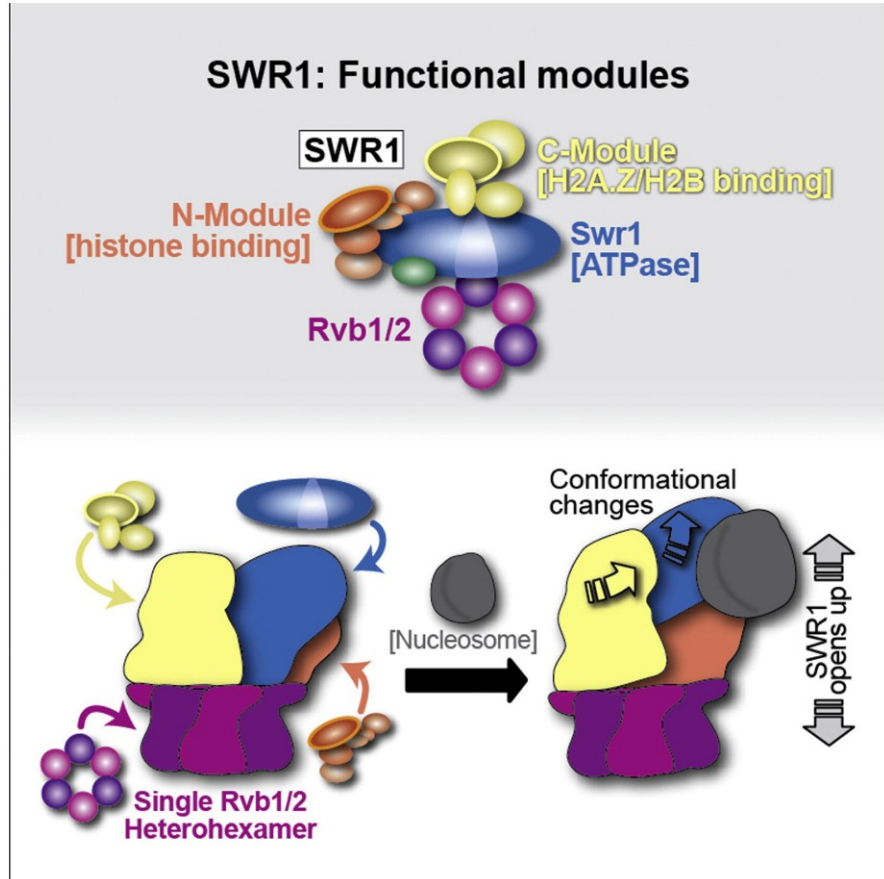
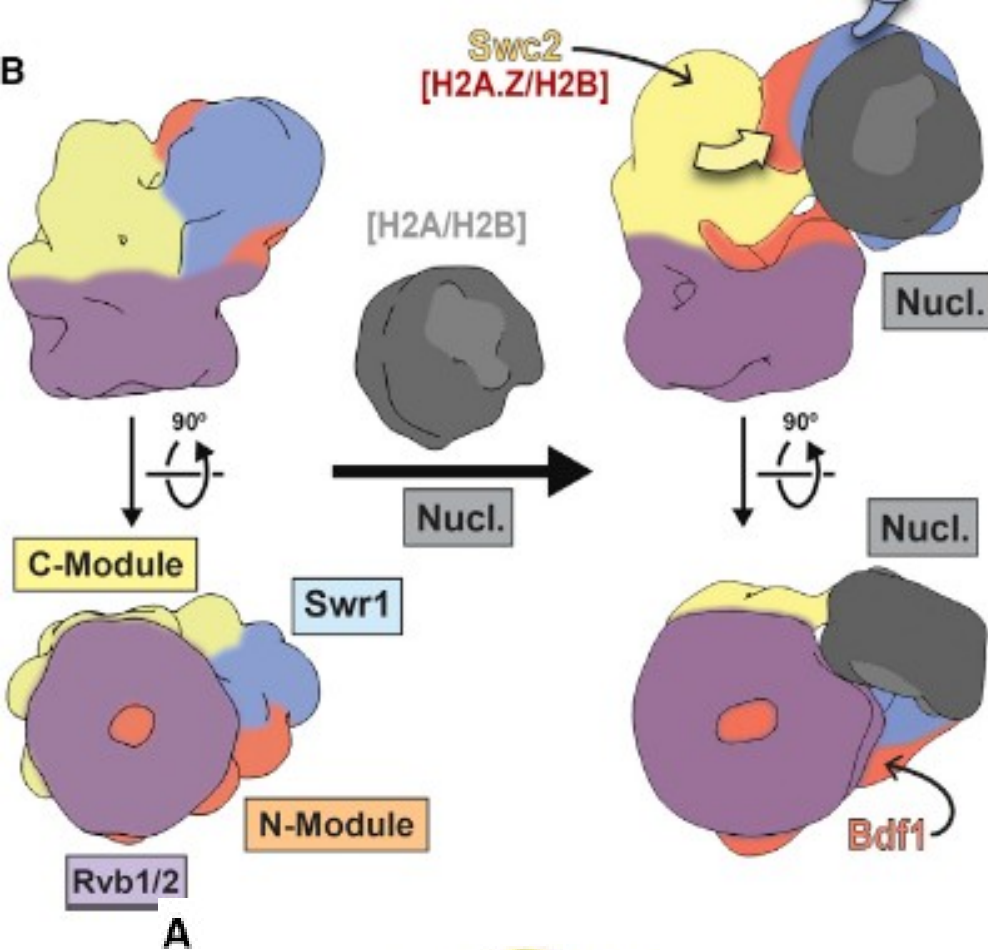


Bao a Shen, Snapshot in Cell, 2010



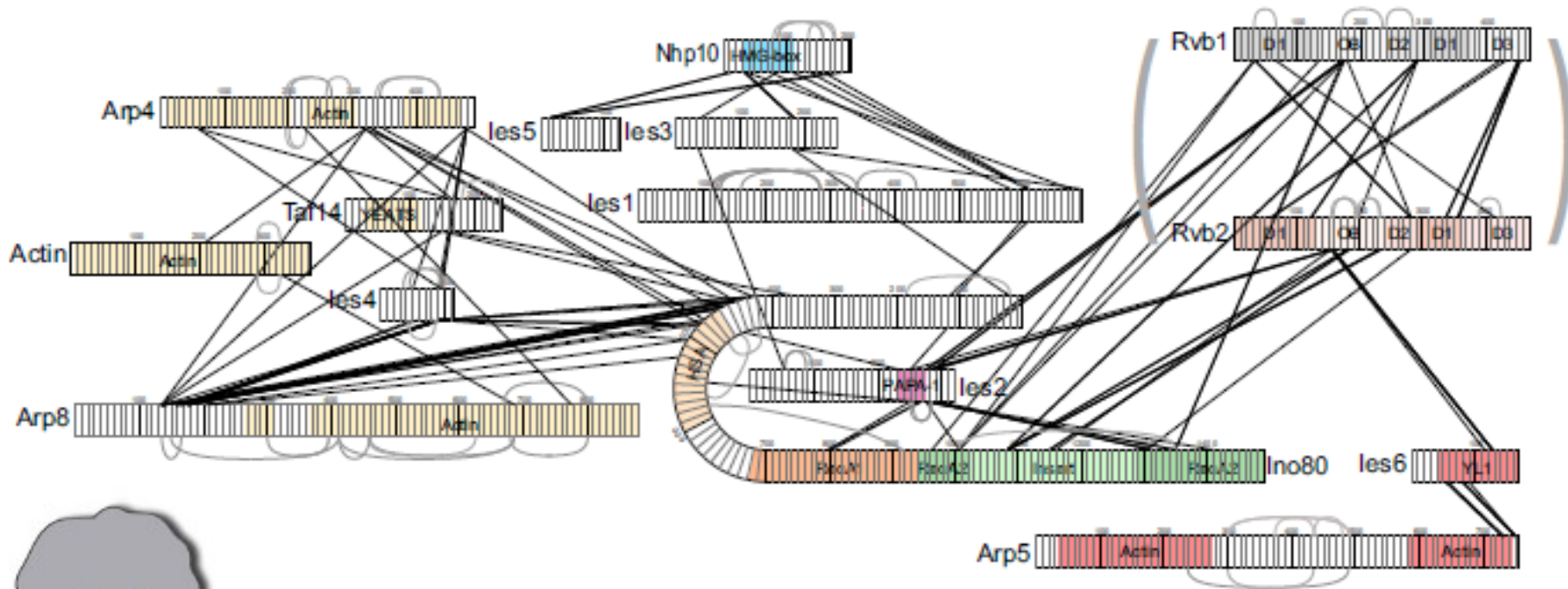
- SWR komplex specificky zaměňuje H2A-H2B dimer za H2A.Z-H2B





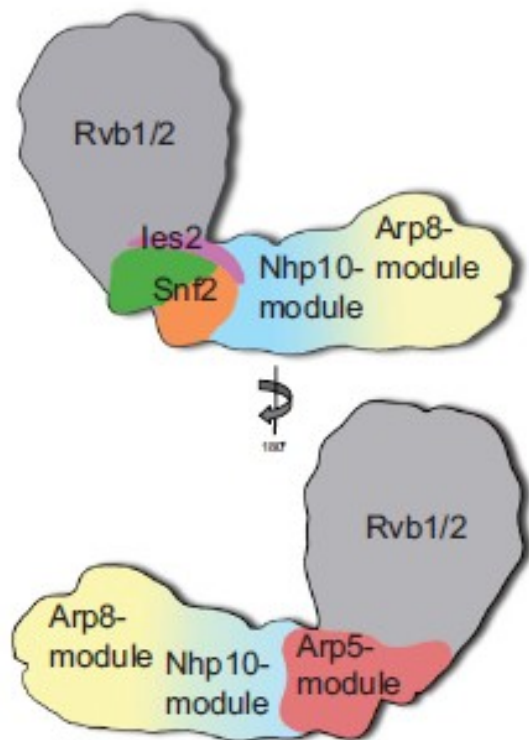
SWR komplex

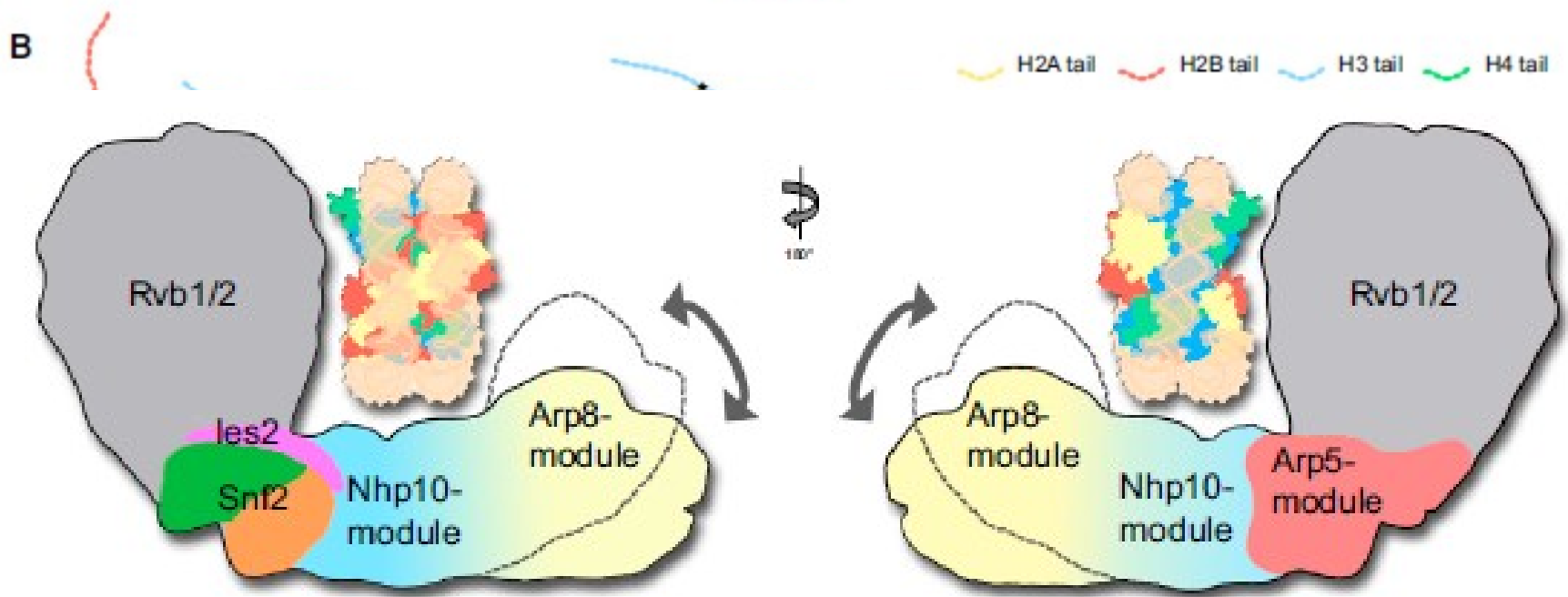
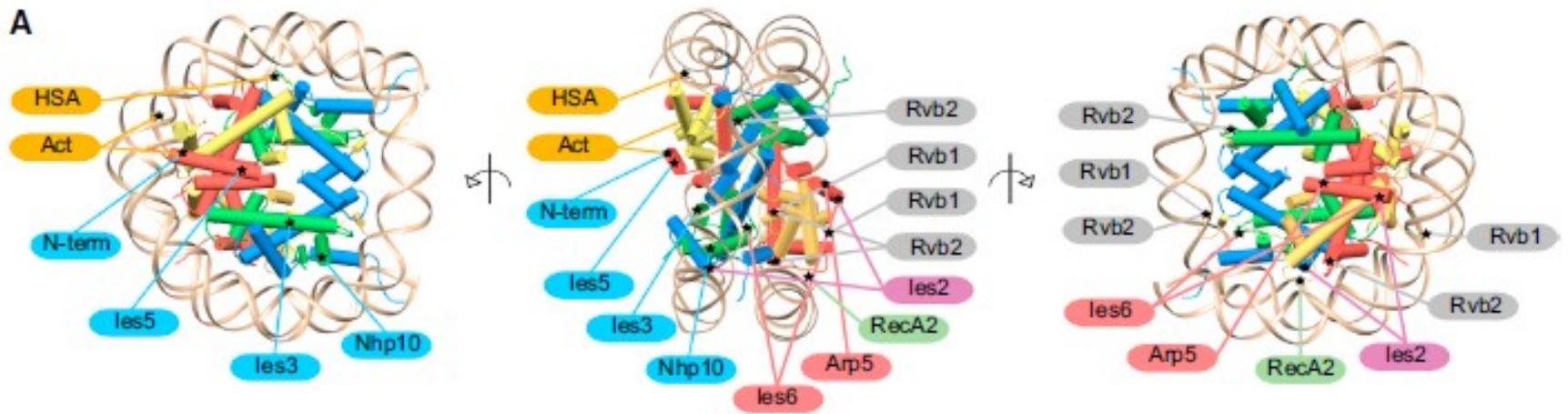
- EM ukázala celkovou strukturu komplexu a konformační změny po navázání nukleosomu



INO80 komplex

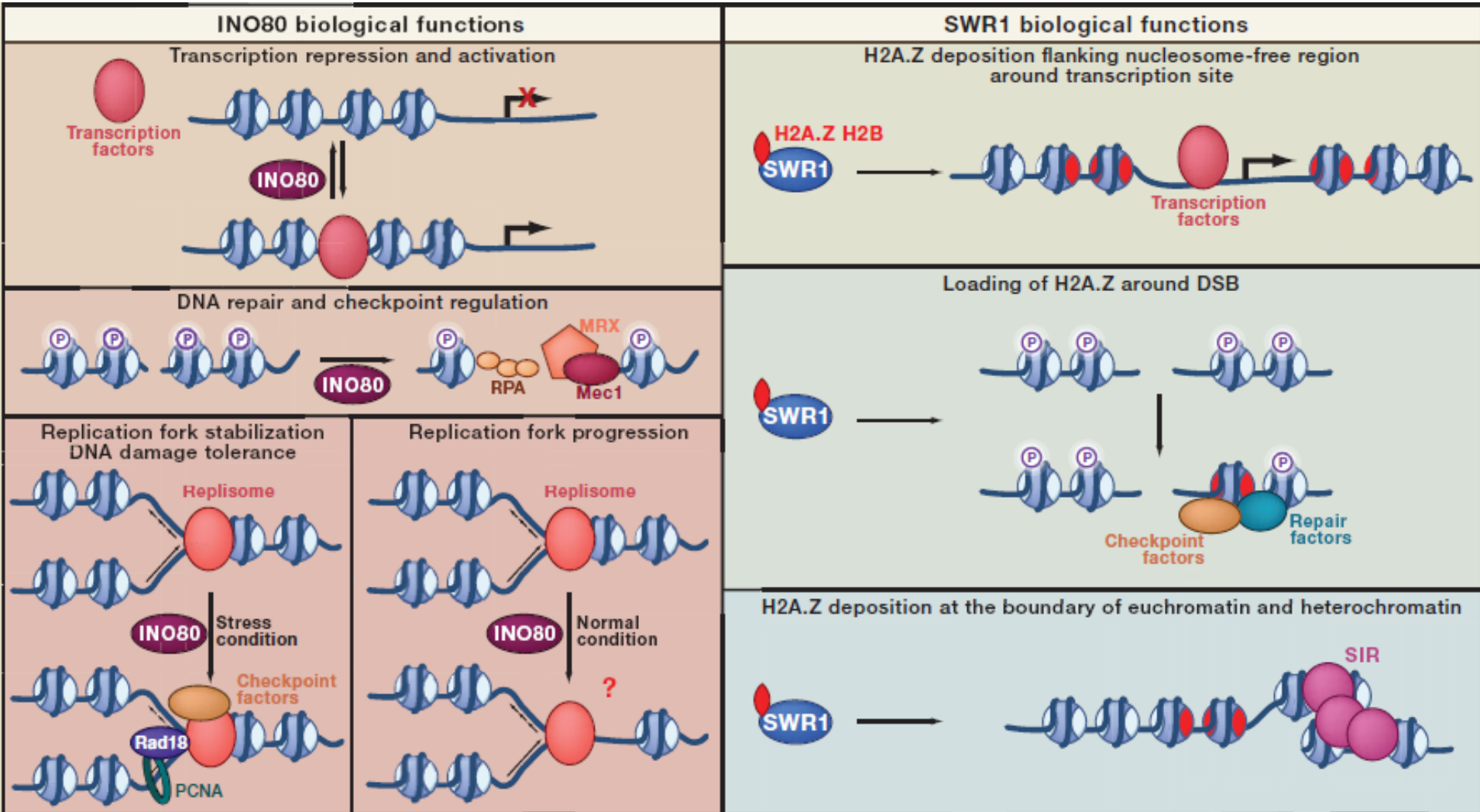
- mapování interakcí pomocí cross-link a MS analýzy
- EM analýza ukázala celkovou strukturu komplexu





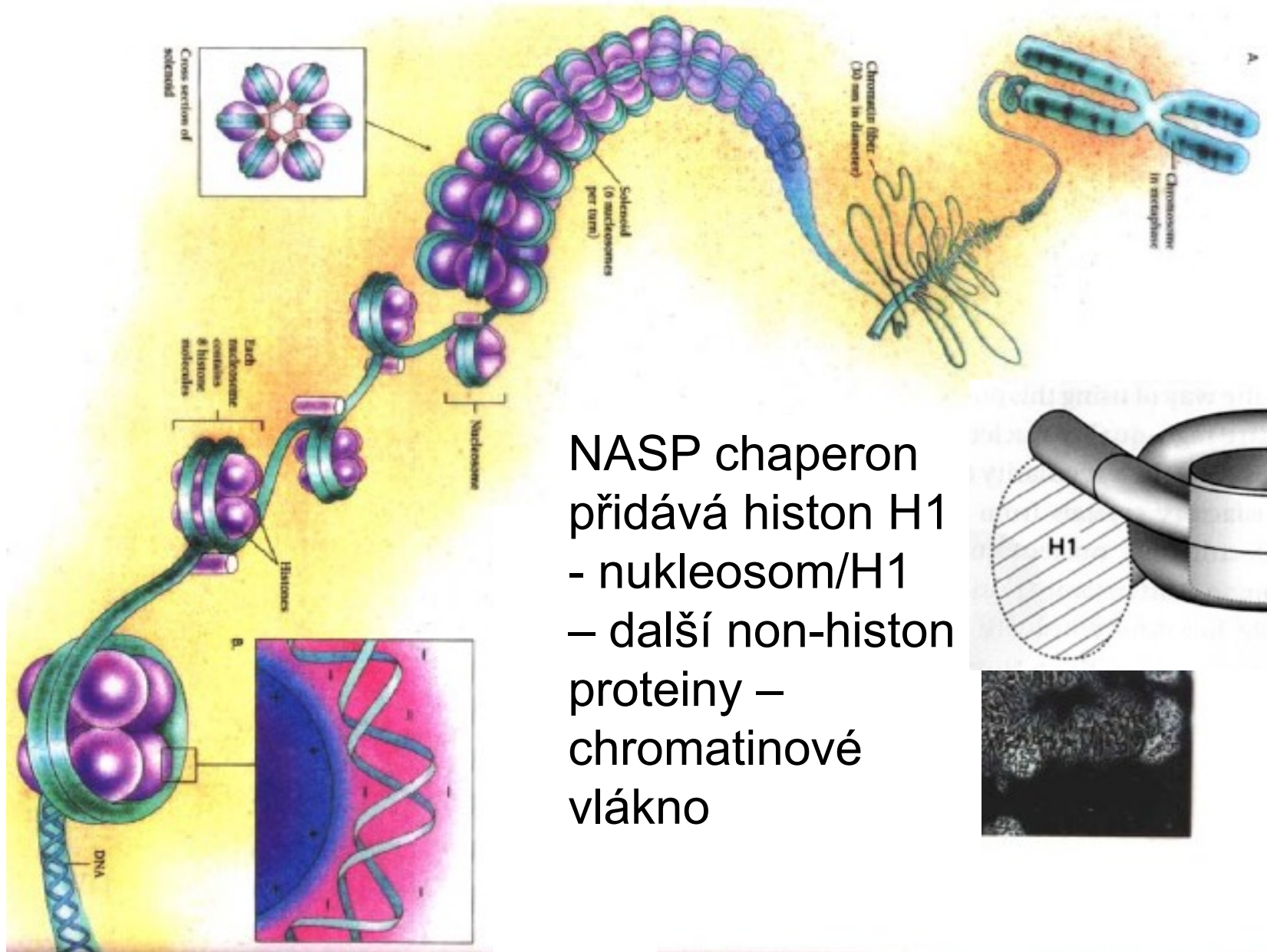
- zmapovali i interakce INO80 s nukleosomem (jádru i „ocásky“)
- konformační změna po navázání nukleosomu

- „skluznutí“, rozložení, odstranění nukleosomu nebo „výměna“ histonových dimerů



- **H2A.Z** - v regulaci transkripce, opravě DNA, hranice chromatinu (integrita centromer a telomer)

Vazba H1 uzavírá remodelaci chromatinu



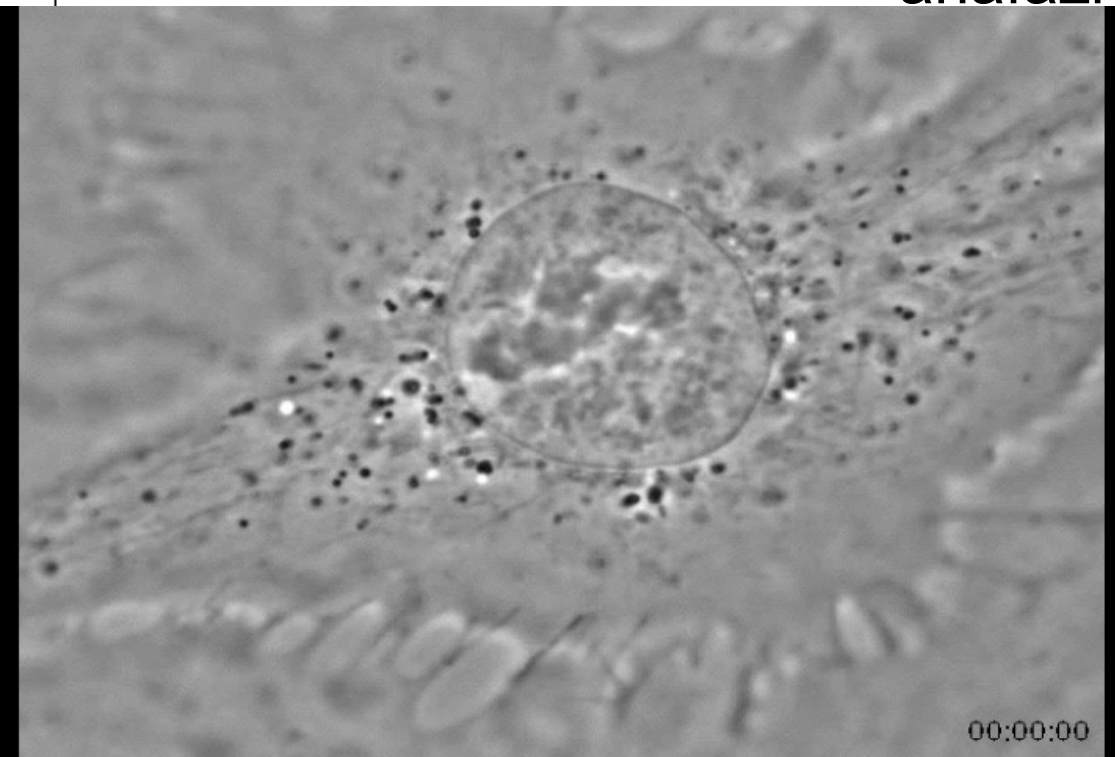
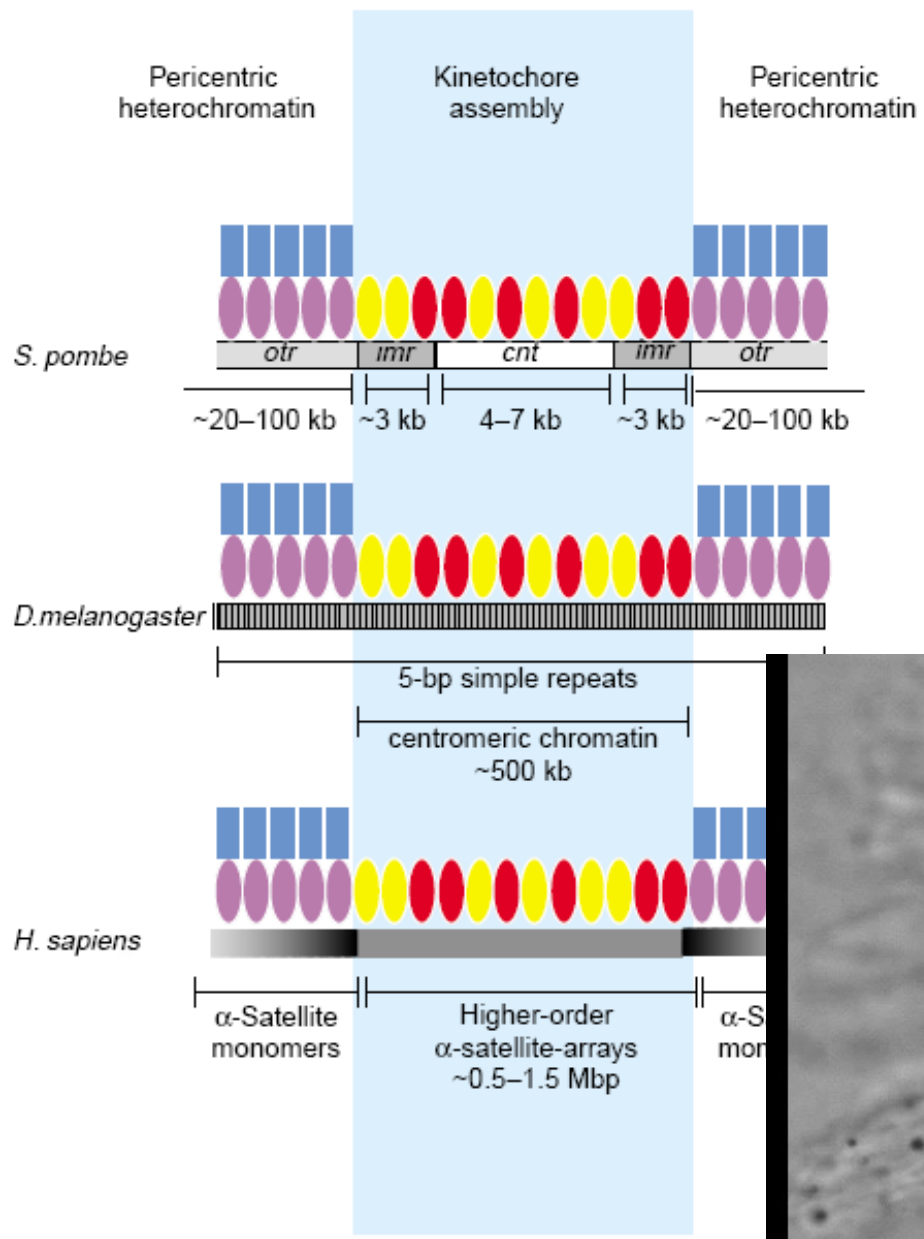
NASP chaperon
přidává histon H1
- nukleosom/H1
– další non-histon
proteiny –
chromatinové
vlákno

komplexy vytvářející strukturu chromosomu

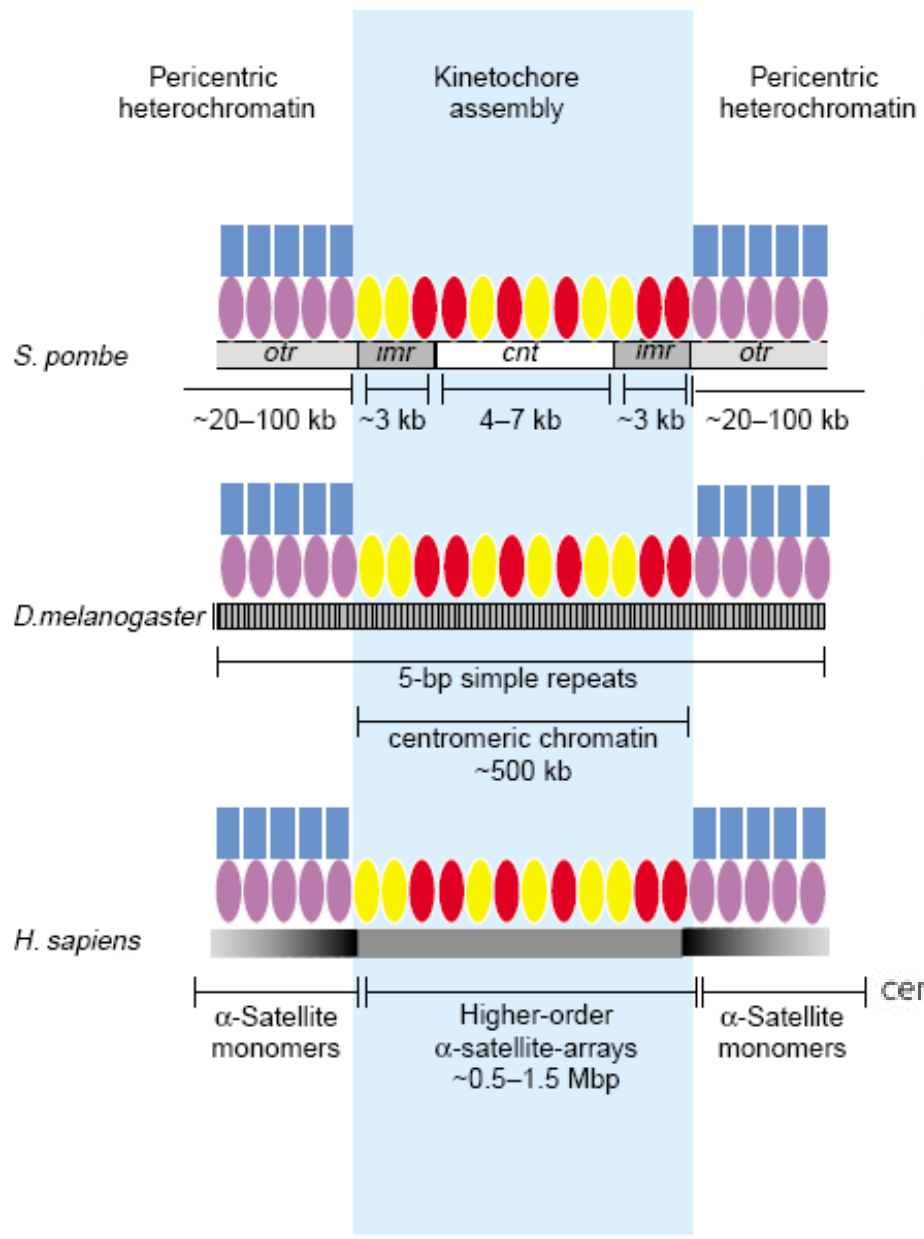
- vytváří základní strukturu
 - nukleosomy (histonový oktamer) a histony (H1)
 - HMG, HP proteiny
- **vytváří specializované domény**
 - centromery, telomery
- podílí se na dynamice struktury
 - kohesin, kondensin a SMC5-6 komplex



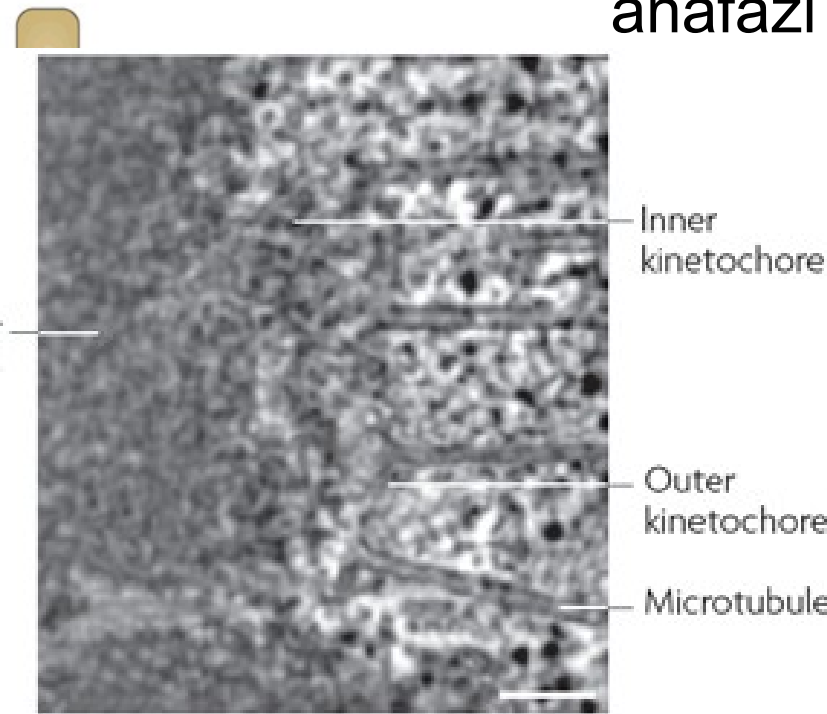
Repetitivní sekvence vytvářející specifický chromatin – CENP-A histon, který kotví kinetochoru (kolem je pericentromerický heterochromatin a SMC komplexy) tah mikrotubulů a kohesiny zajišťují správnou segregaci v anafázi



Repetitivní sekvence vytvářející specifický chromatin – CENP-A histon, který kotví kinetochoru (kolem je pericentromerický heterochromatin a SMC komplexy) tah mikrotubulů a kohesiny zajišťují správnou segregaci v anafázi



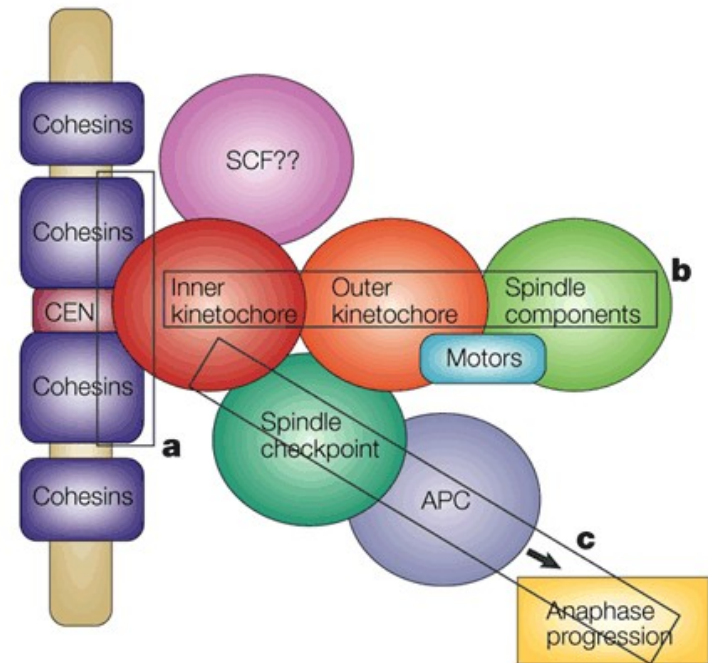
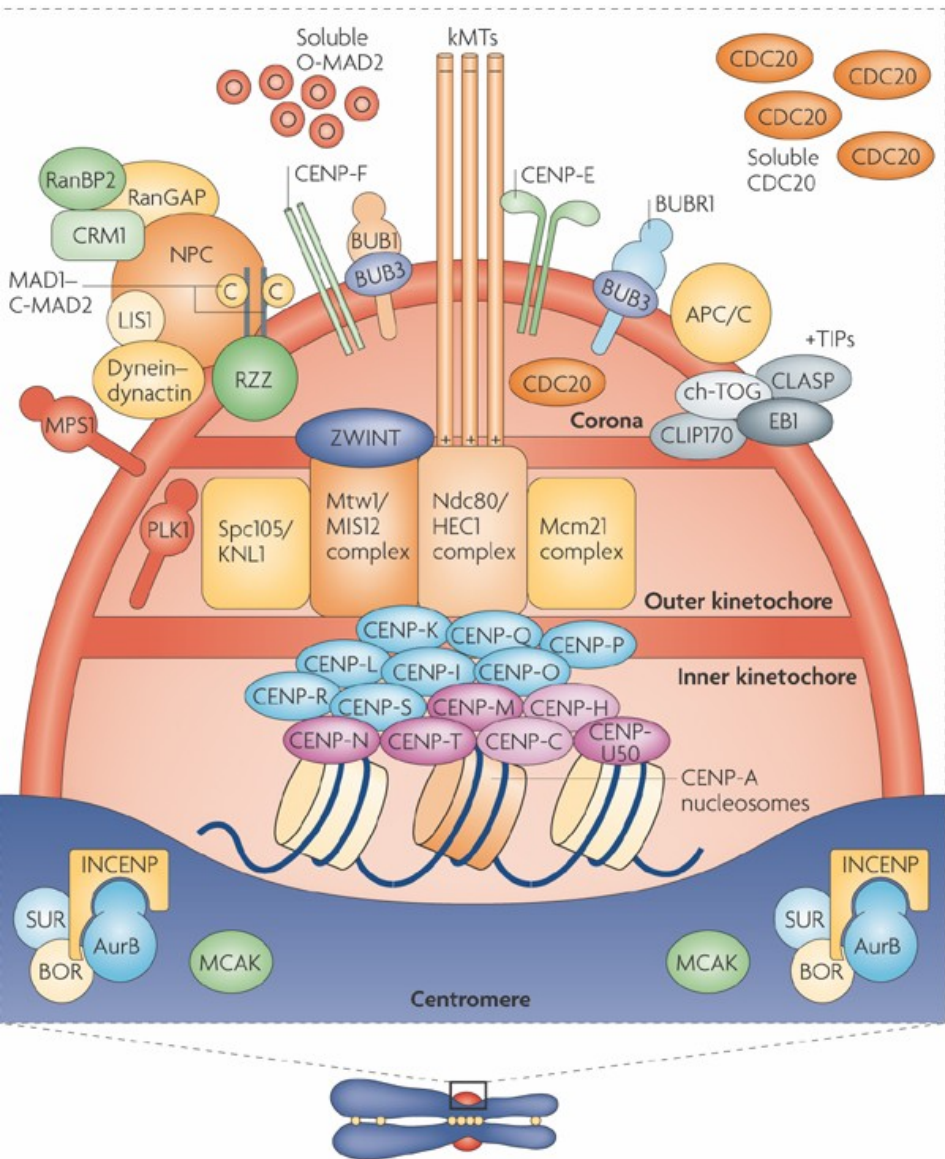
- HP1
- Me-K9 H3
- diMeK4-H3
- CENP-A



Velké komplexy viditelné EM

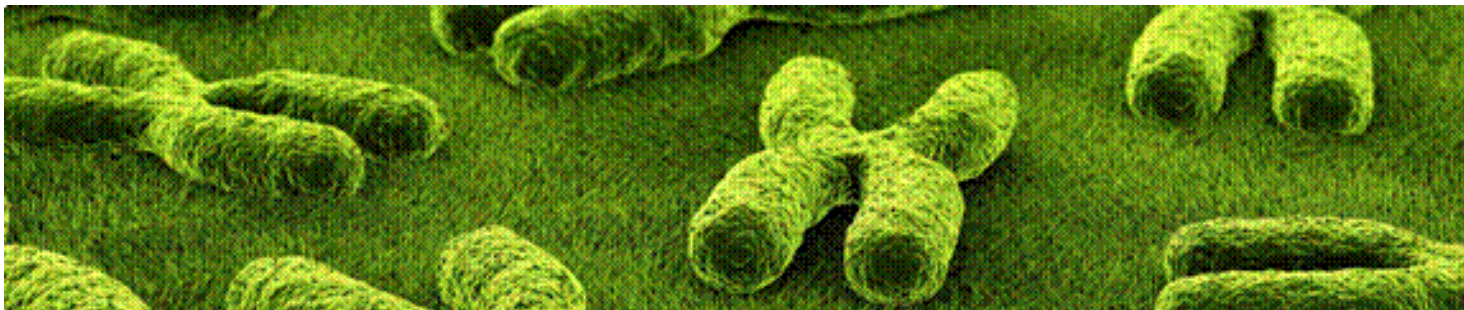
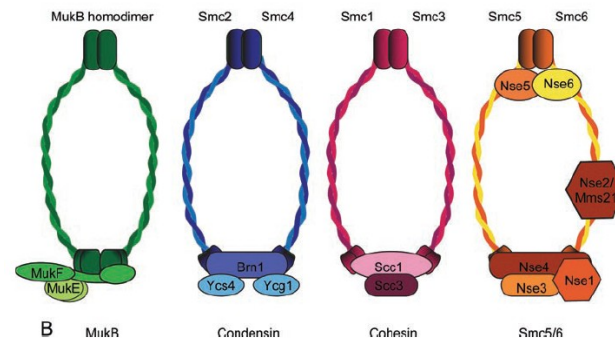
Mad2 komplexy kontrolují ukotvení kinetochor (konformační změna - dokud nejsou všechny nedojde k segregaci)

APC komplex (ubiquitin ligasa) proteolyticky štěpí např. sekurin (uvolňuje separasu, která štěpí kleisin tj. otevírá kohesin)



vytváří základní strukturu

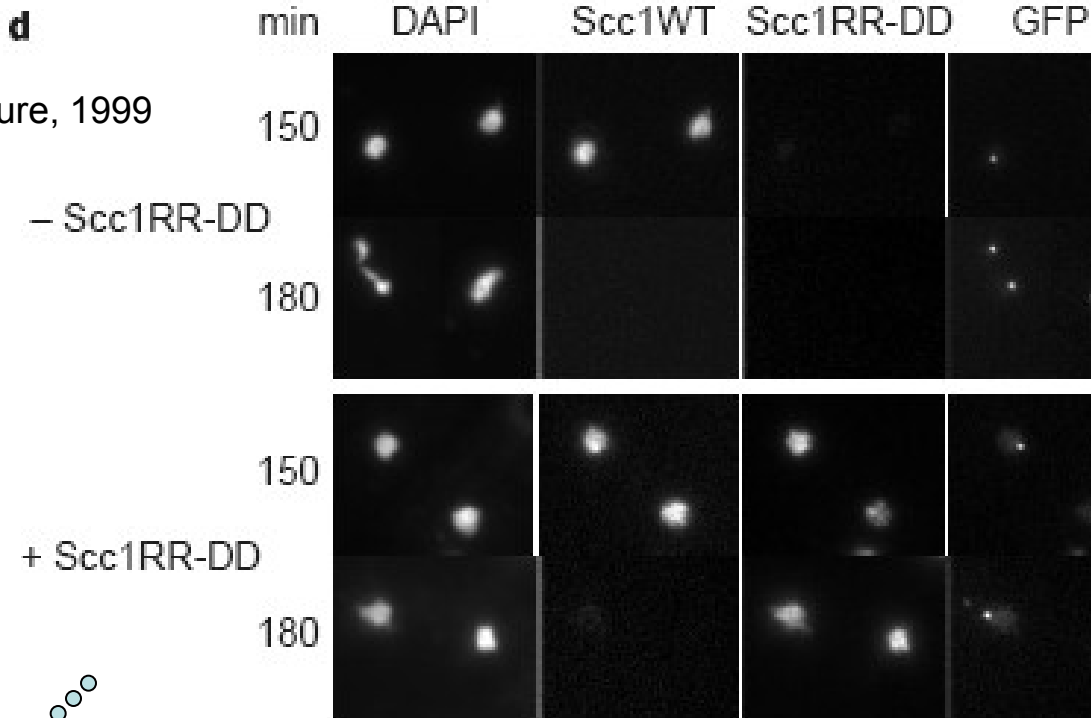
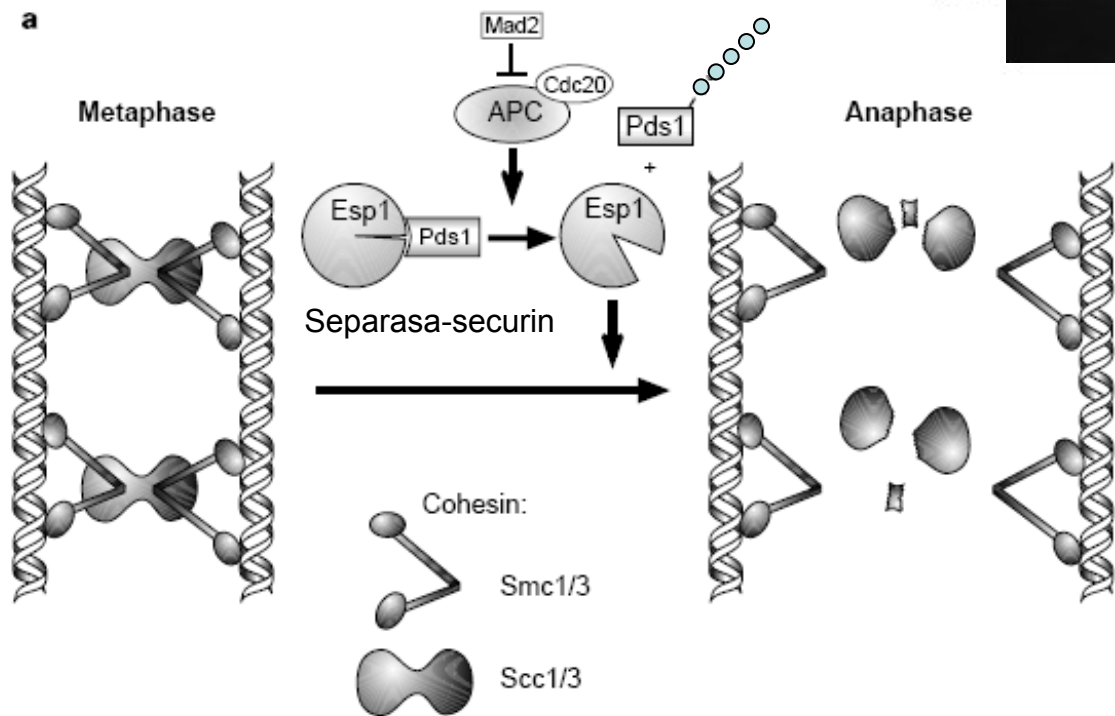
- nukleosomy (histonový oktamer) a histony (H1)
- HMG, HP proteiny
- vytváří specializované domény
 - centromery, telomery
- **podílí se na dynamice struktury**
 - kohesin, kondensin a SMC5-6 komplex



Model separace chromosomů (*S. cerevisiae*)

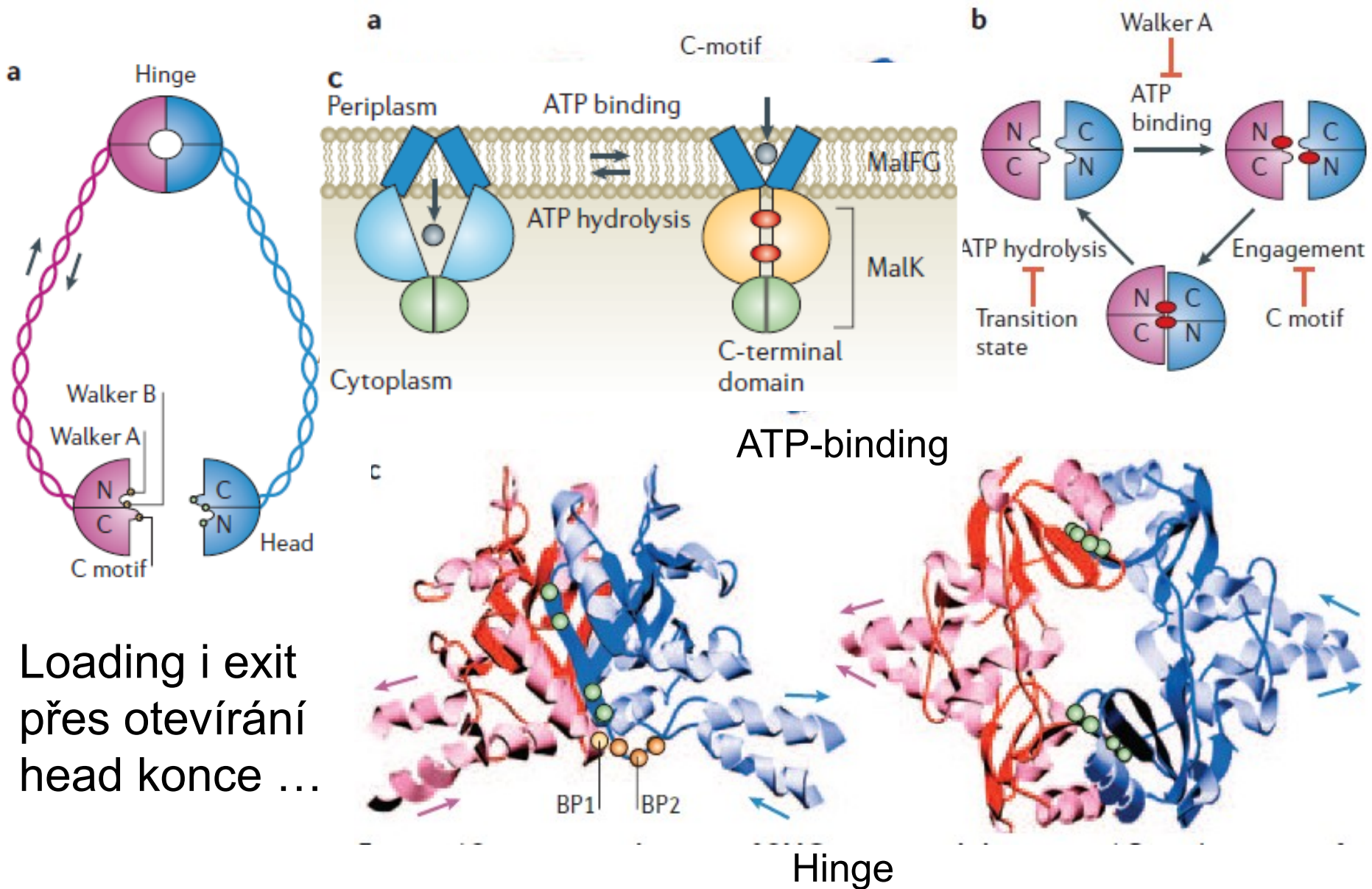
Uhlmann et al., Nature, 1999

APC=anaphase promoting complex



Komplex Mad2/Cdc20 inhibuje APC – po jeho uvolnění degraduje (ubiquityluje) securin – uvolní se tak separasa – štěpí Scc1 kleisin kohesinového komplexu

ATP-binding cassette (ABC)

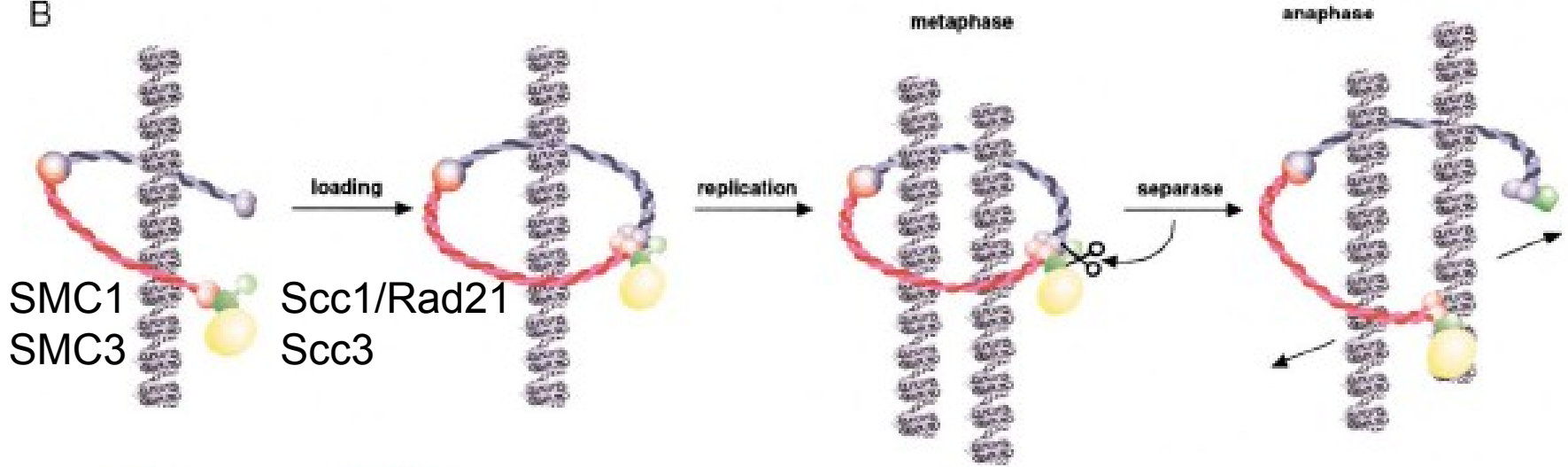


Loading i exit
přes otevírání
head konce ...

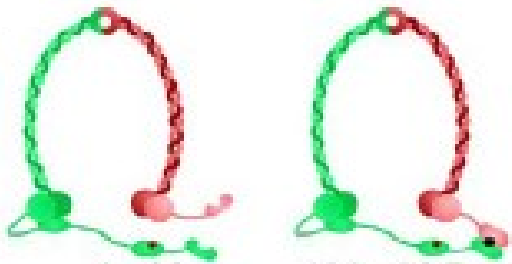
Dimerizace, vazba na DNA

Kohesin „objímá” DNA

B

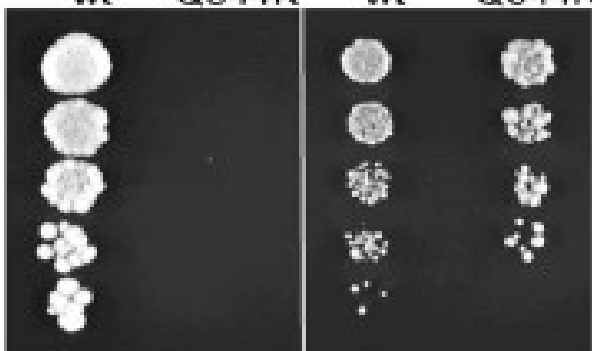


Haering et al, Mol Cell, 2002

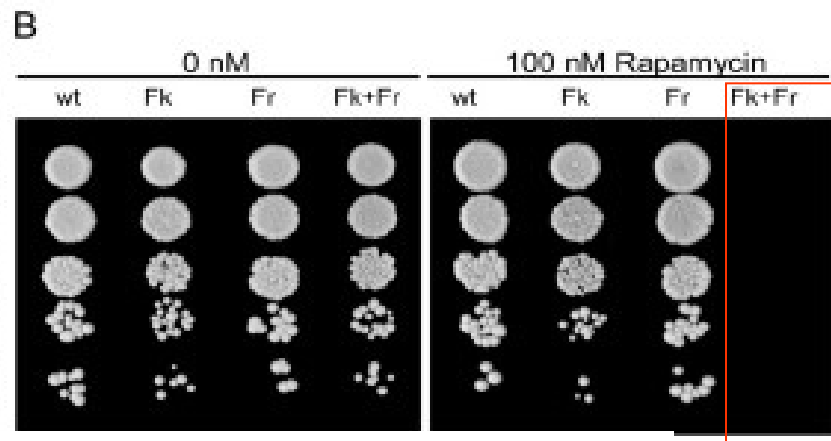
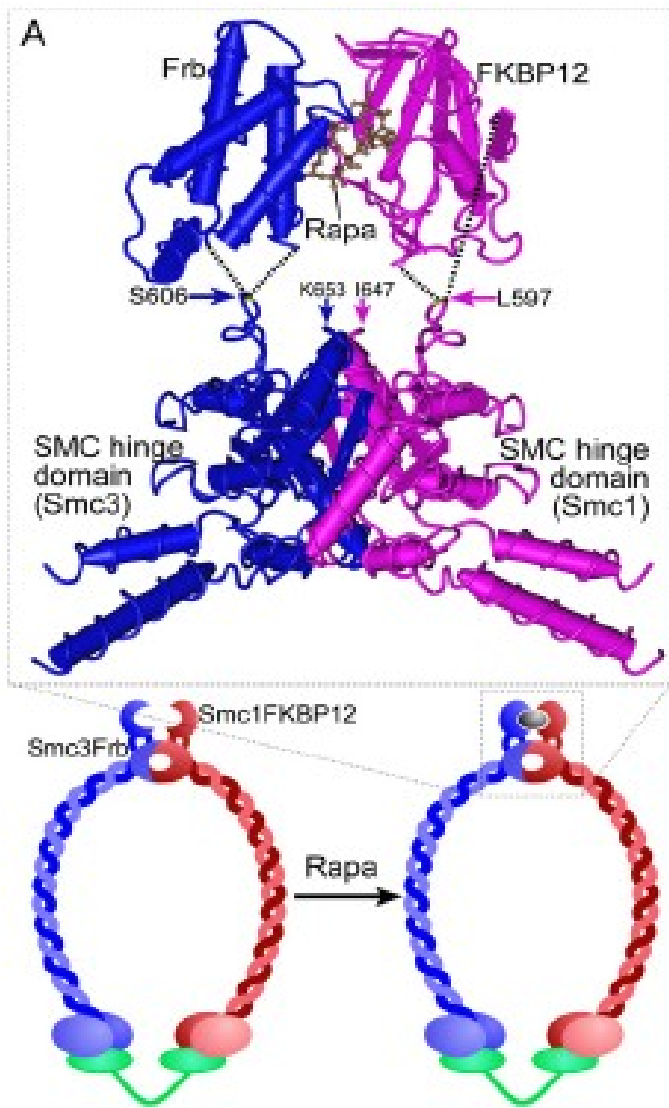


Použití fúzních proteinů při studiu kohese sesterských chromatid

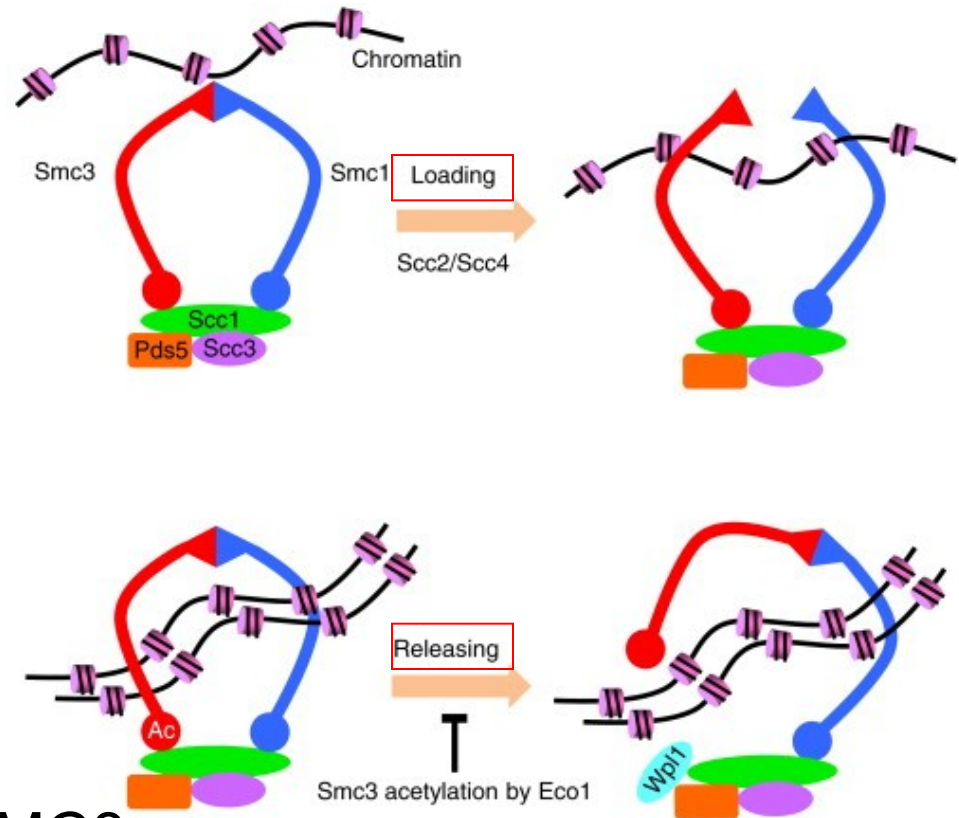
SMC3-Scs1-Frb + SMC1-FKBP12
(vážou rapamycin)



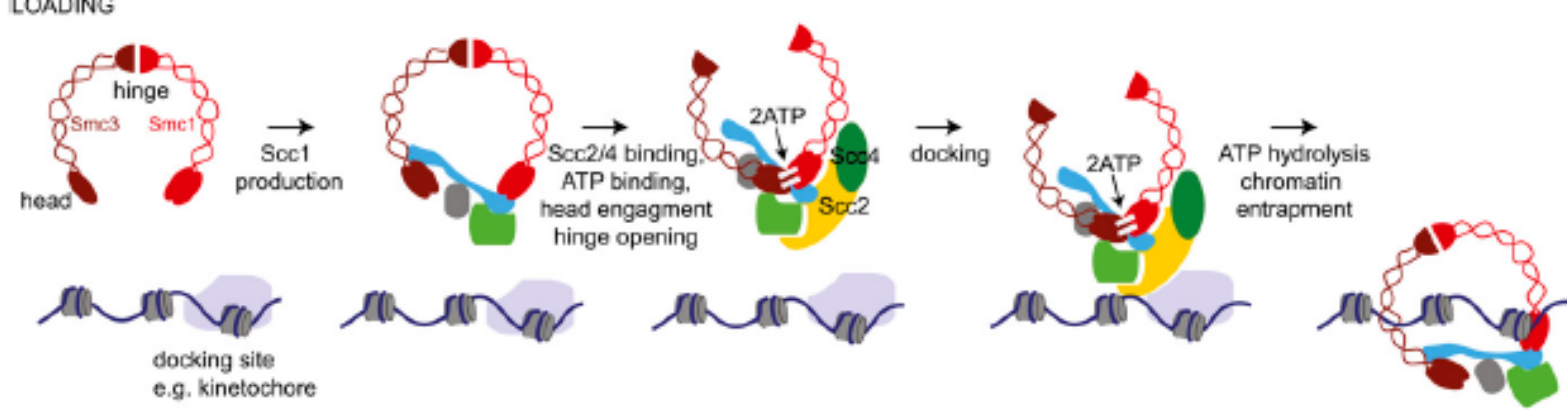
Gruber et al., Cell, 2006



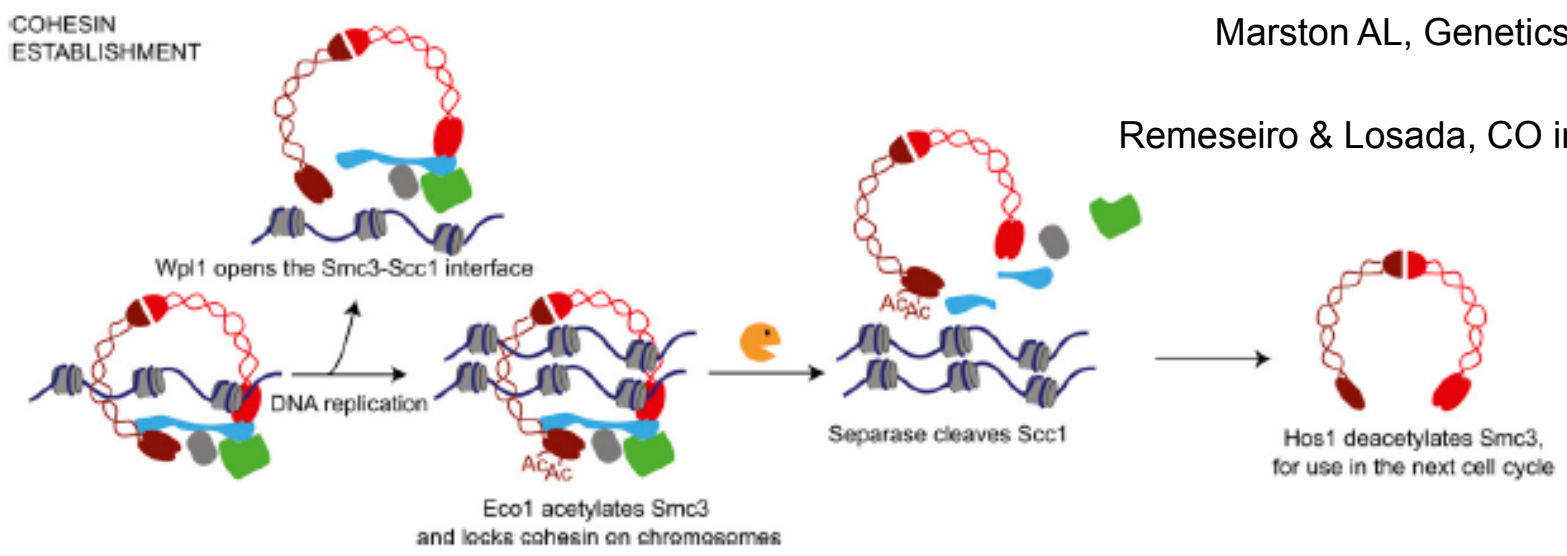
Uzamčení je pro buňku letální



- loading přes hinge
- exit přes head
- Wpl1 destabilizuje Scc1-SMC3



Marston AL, Genetics, 2014

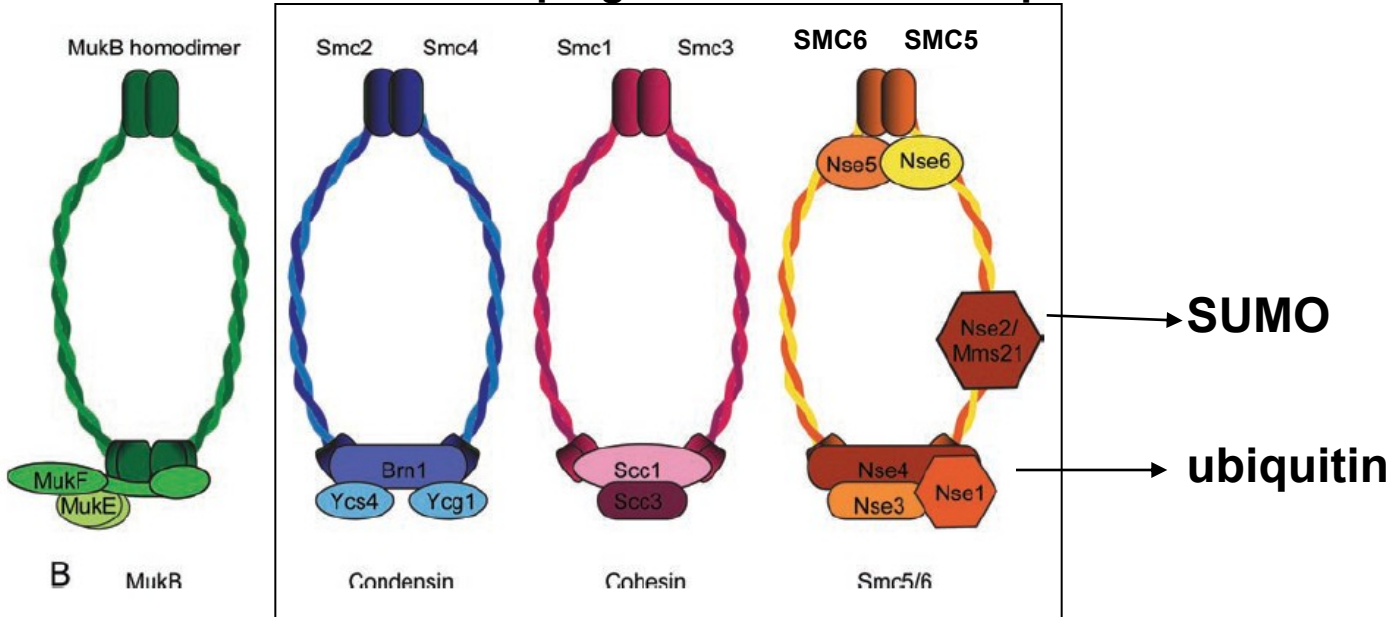


Remeseiro & Losada, CO in Cell Biol, 2012

Loading přes hinge, exit přes head dvěma způsoby – štěpením kleisinu nebo ATP-řízený

- regulace acetylací SMC3
- regulace fosforylací Scc3

Condensation looping/cohesion DNA-repair



SMC introduction

- common features:

- long SMC arms, dimers=hinge, ATPase heads bridged by kleisin subunits, ring shape (trapping of DNA)

- specific features:

- Nse2 SUMO ligase, Nse1 ubiquitin E3-ligase

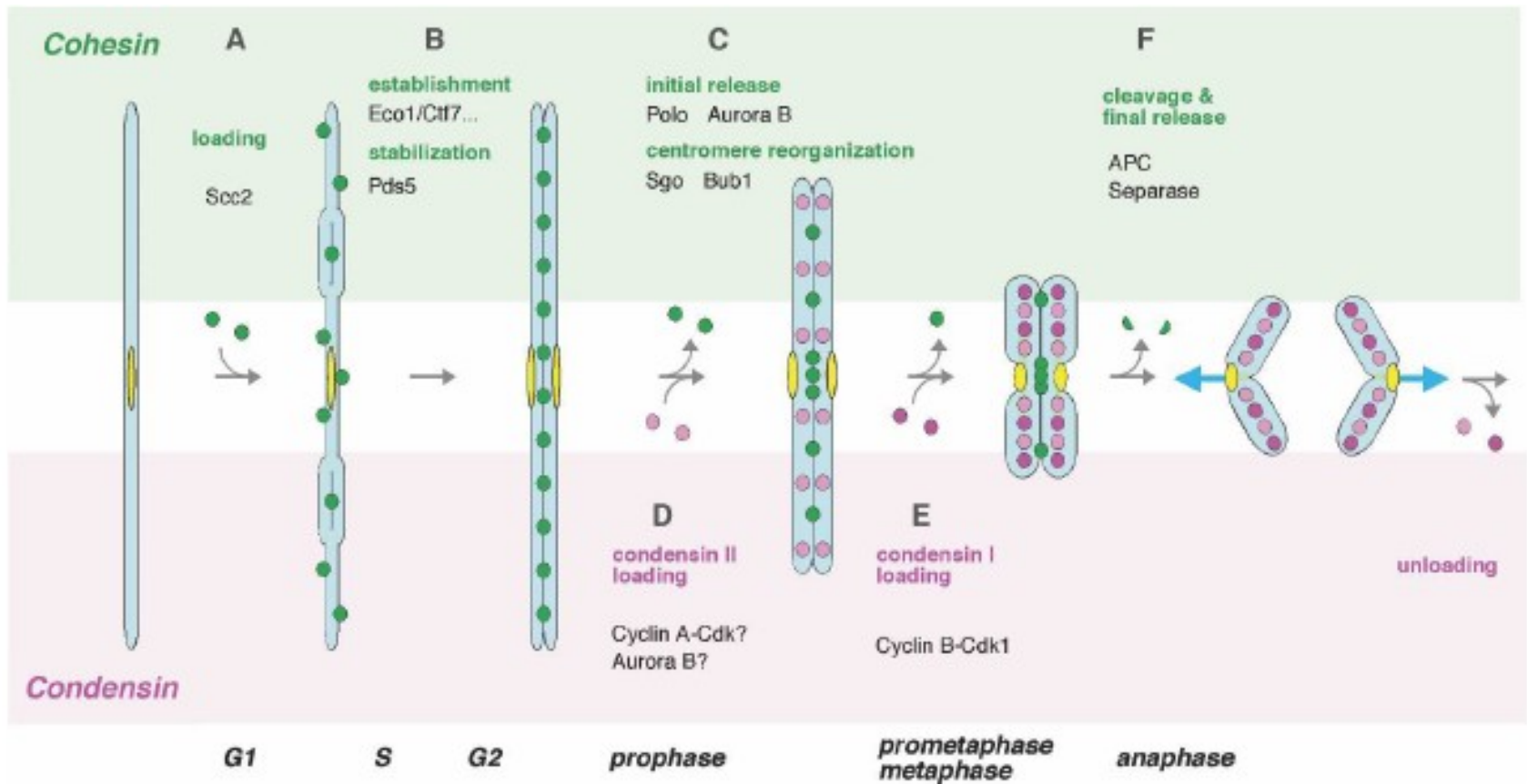
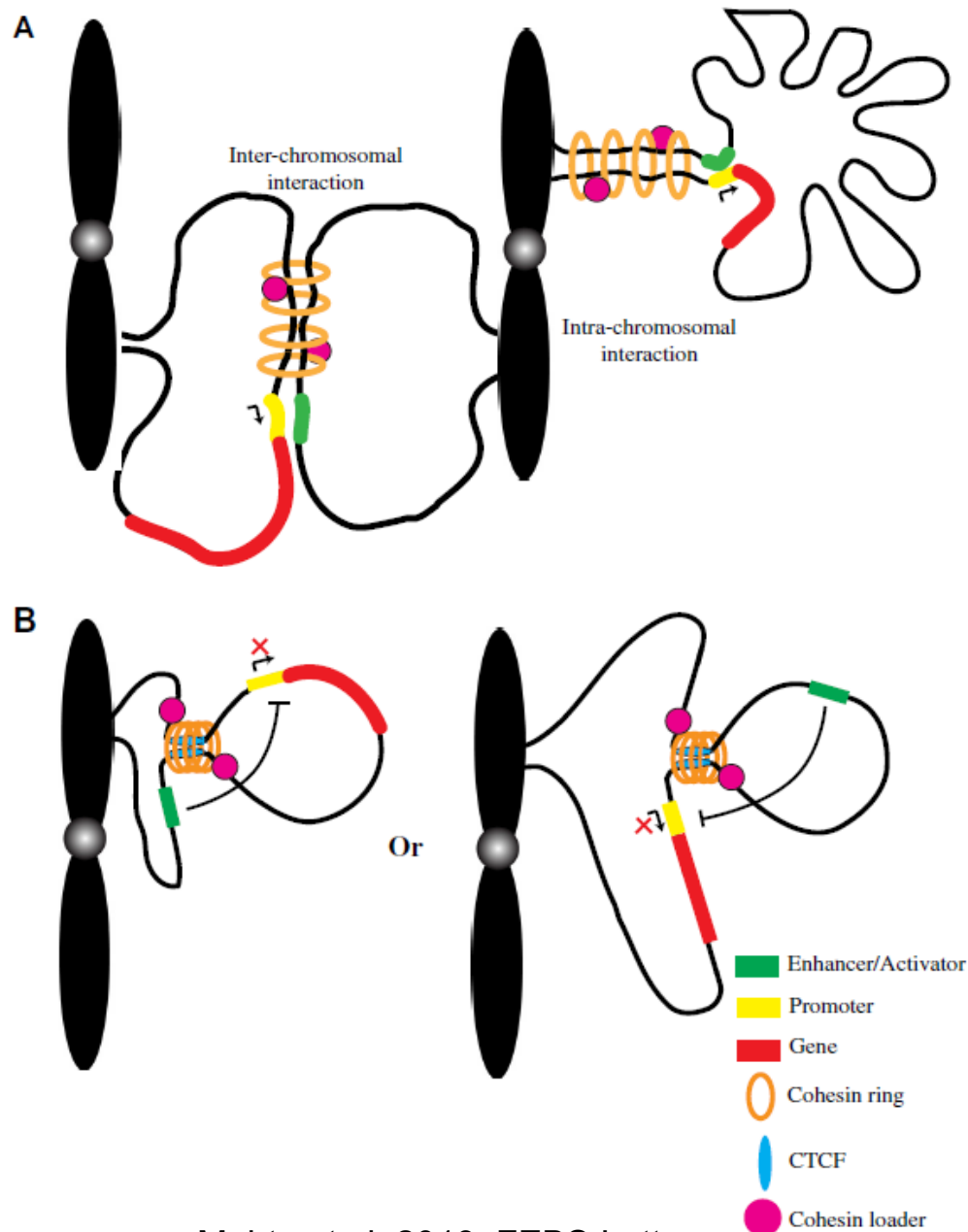
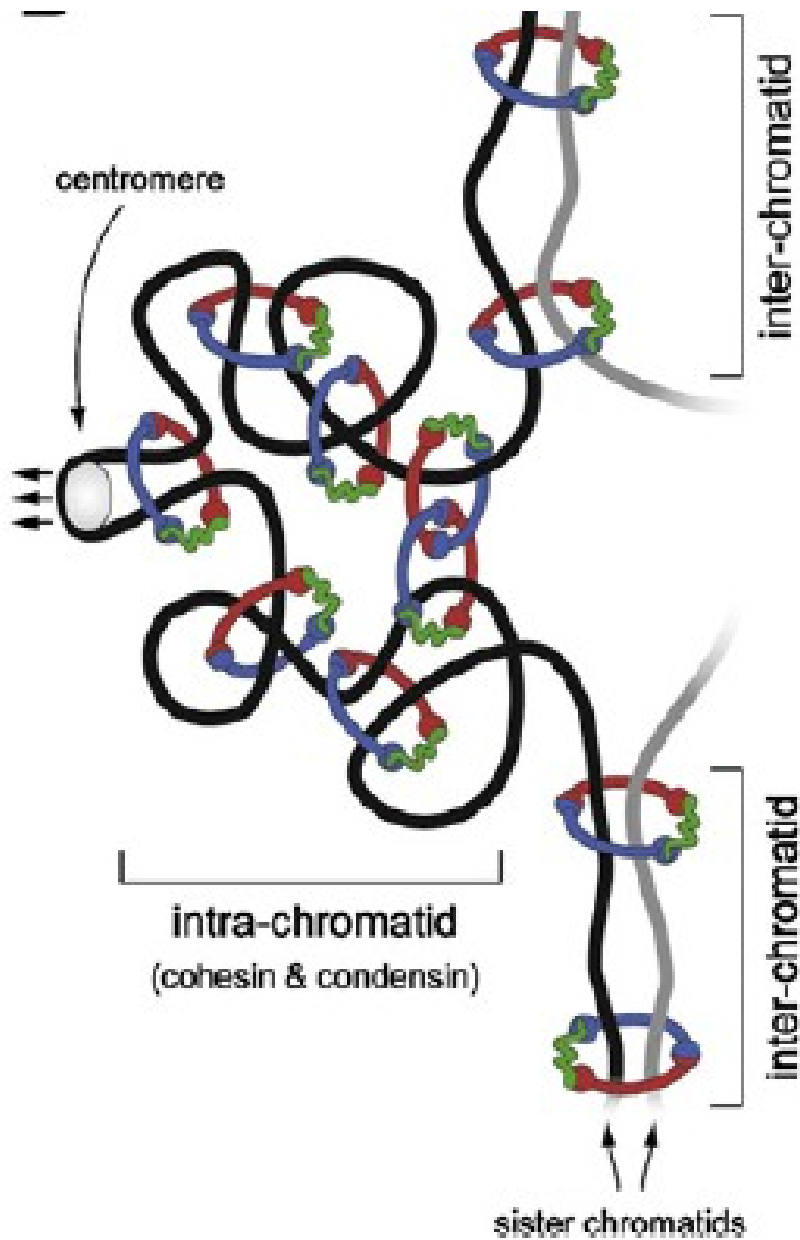


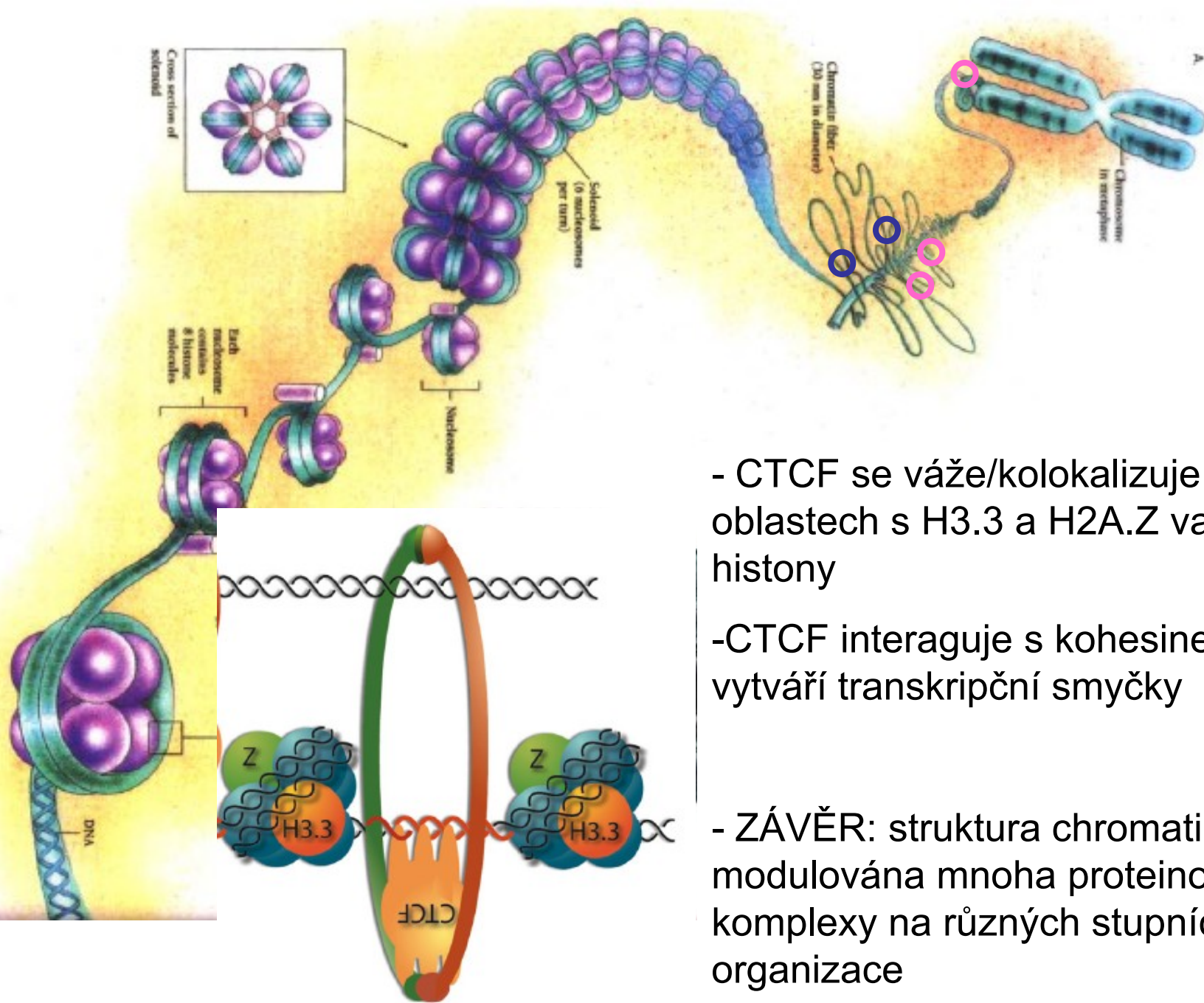
Figure 3. Overview of the mitotic chromosome cycle. The *top* and *bottom* parts of the cartoon indicate the major events regulating the dynamics of cohesin and condensin, respectively, along with their regulatory factors. (Green circle) Cohesin; (magenta circle) condensin I; (light-magenta circle) condensin II. See the text for details.

Losada & Hirano, 2005, Gen&Dev

- aby se mohl chromatin dále kondenzovat musí být část kohesinu odstraněna



Mehta et al, 2013, FEBS Lett.



- CTCF se váže/kolokalizuje v oblastech s H3.3 a H2A.Z variantními histony
- CTCF interaguje s kohesinem a spolu vytváří transkripční smyčky
- ZÁVĚR: struktura chromatinu je modulována mnoha proteinovými komplexy na různých stupních jeho organizace