

Zkouzka: - test + p ednázka

” Úvod - Analýza proteinu

. Domény

- ” fold-struktura (ss, PDB)
- ” v PyMolu p ipavit 3D strukturu
- ” Interakce (IntAct)

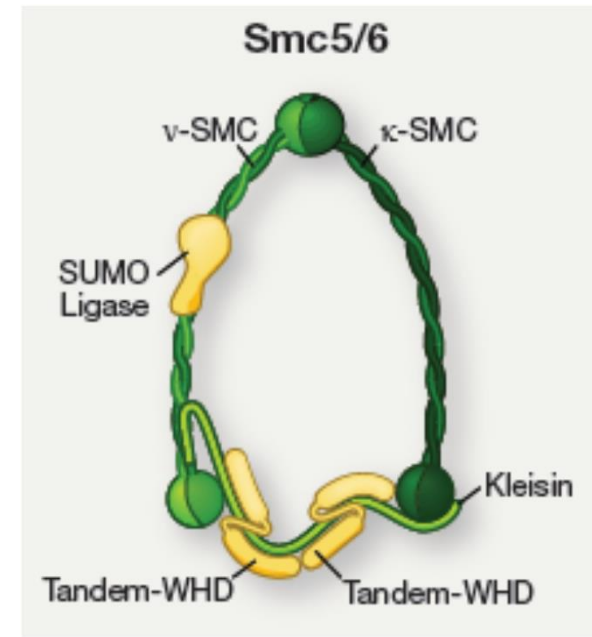
. Komplexy

- ” Funkce
- ” Lokalizace

. evoluce

” Konkrétní nová data . lánek (< 5 let)

Ujasnit si souvislosti, rozzít si znalosti, aplikovat poznatky z p ednázek ō

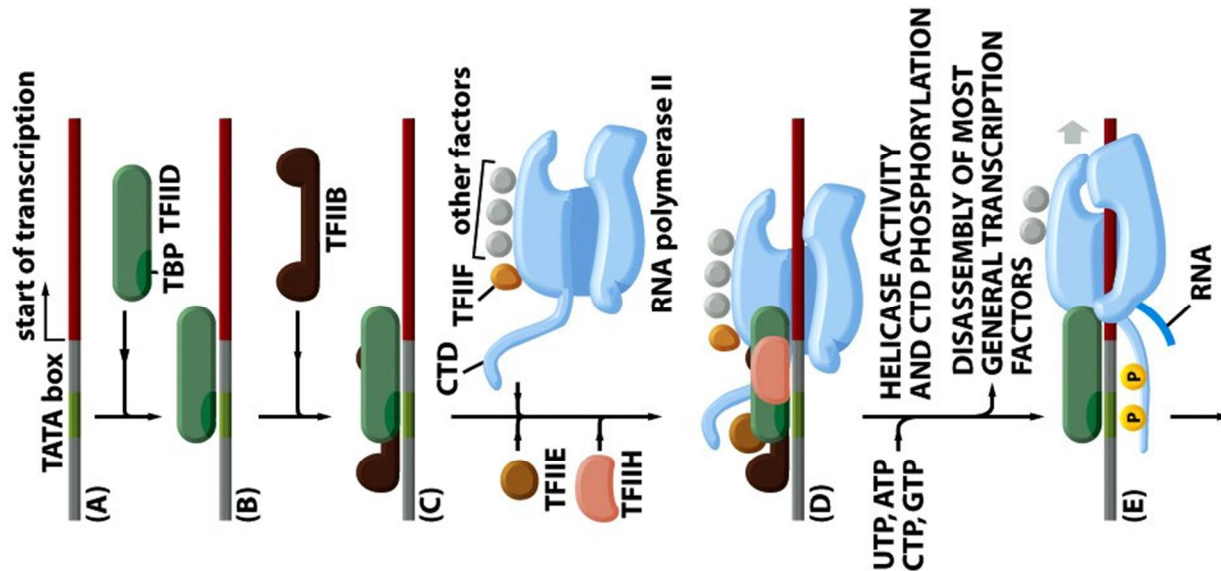


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přenosu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)

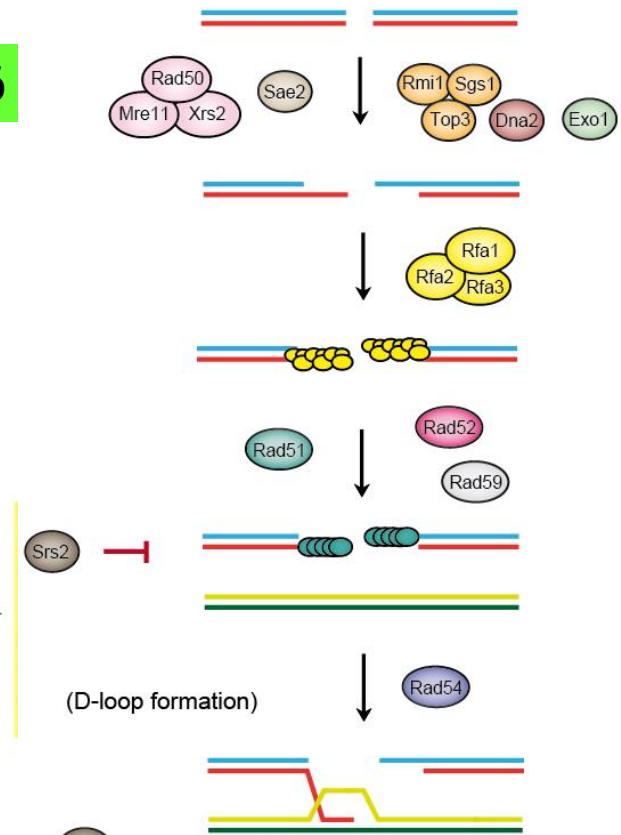
Co zde schází??

Chromatin = histony + DNA

TRANSKRIPCE



OPRAVA DNA DSB

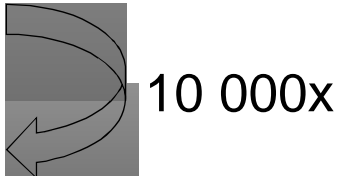


- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy . (lidský genom 3×10^9 bp . natažený et zec 1 chromosomu cca 4cm!!)

Average human chromosome:

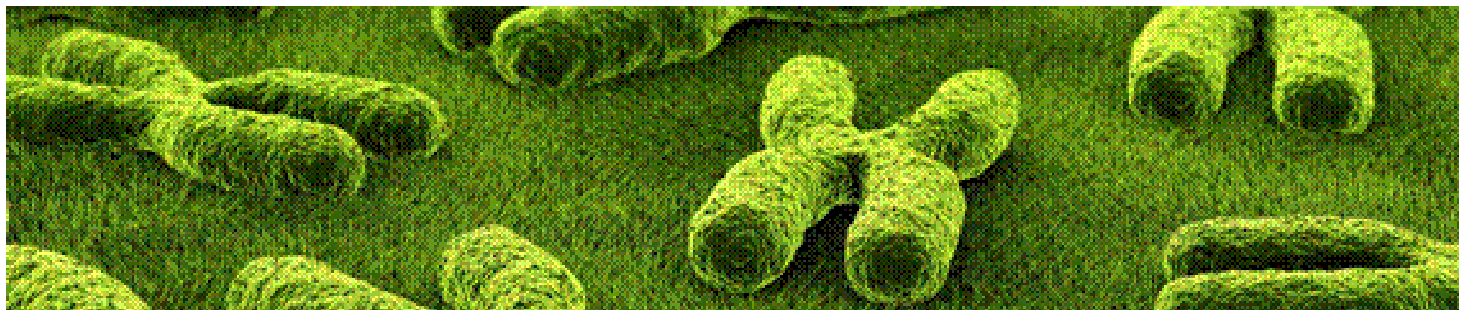
DNA molecule: ~4 cm

Mitotic chromosome ~4 μ m

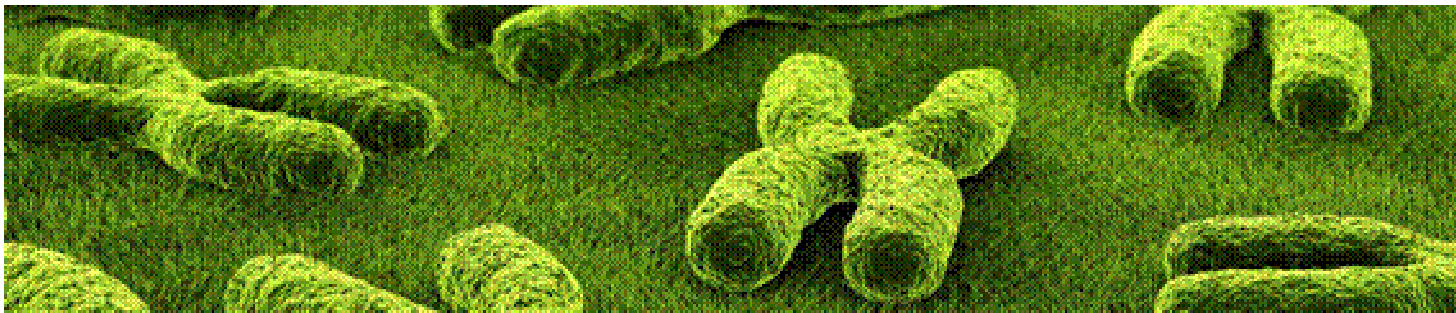


Genome sizes:

human	3 billion bp	2 m
field bean	13 billion bp	9 m
trumpet lily	90 billion bp	60 m
salamander	<120 billion bp	80 m



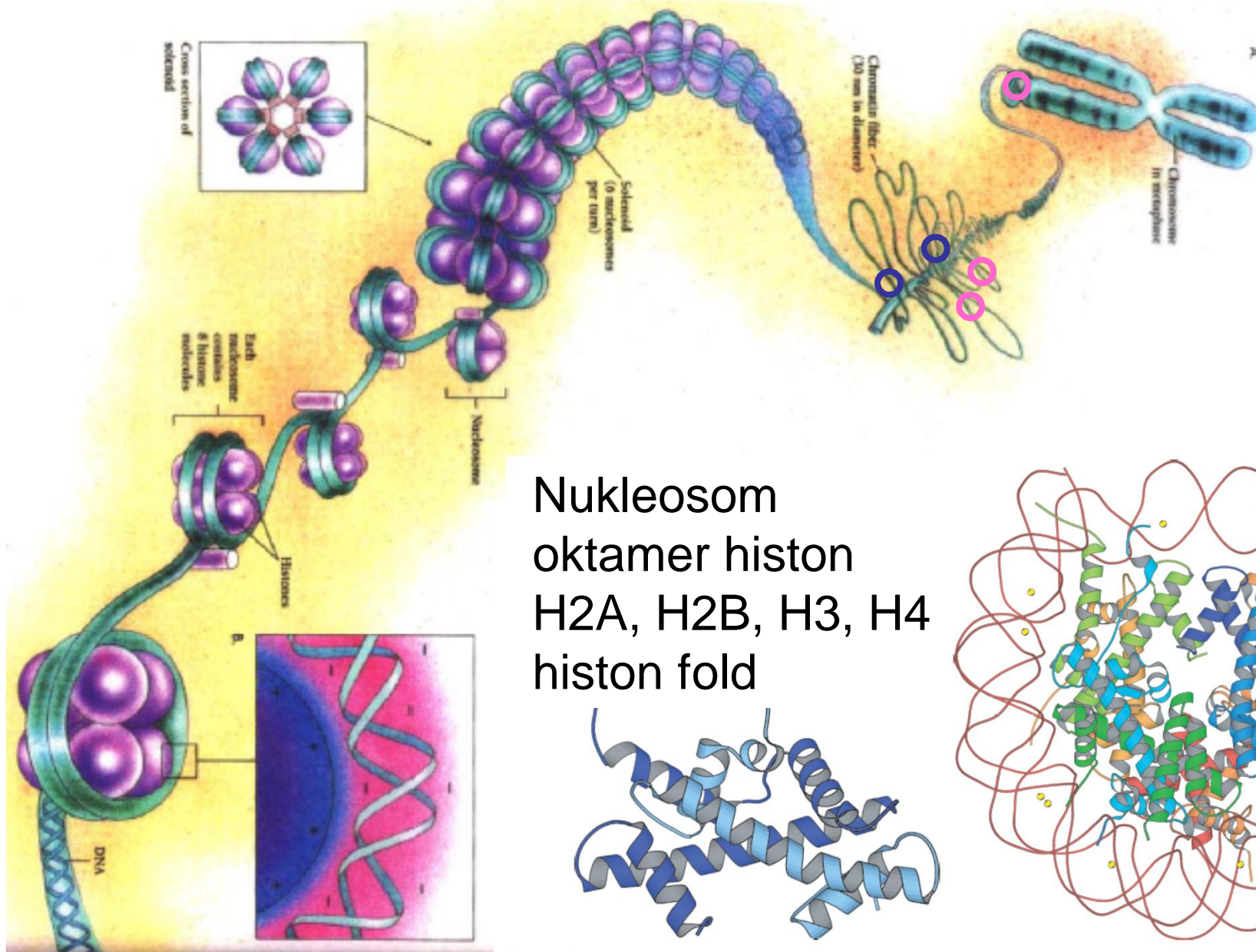
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy . (lidský genom 3×10^9 bp . natažený et zec 1chromosomu cca 4cm!!)
- **komplexy vytvářejí strukturu chromosomu**
- **vytváří základní strukturu**
 - 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



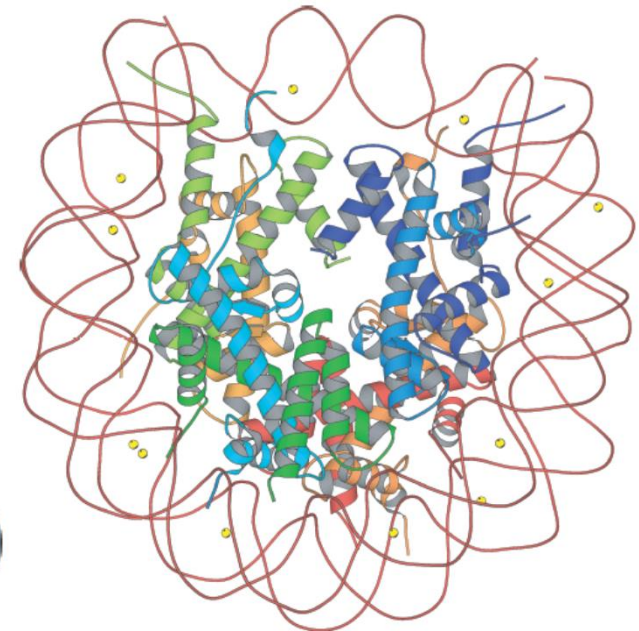
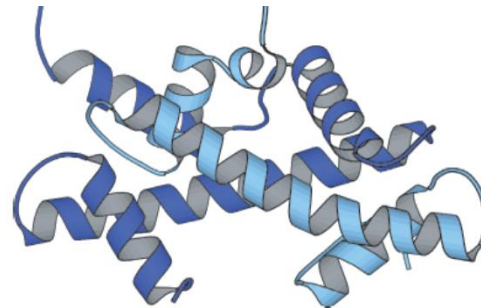
p ednážky prof. Fajkuse:

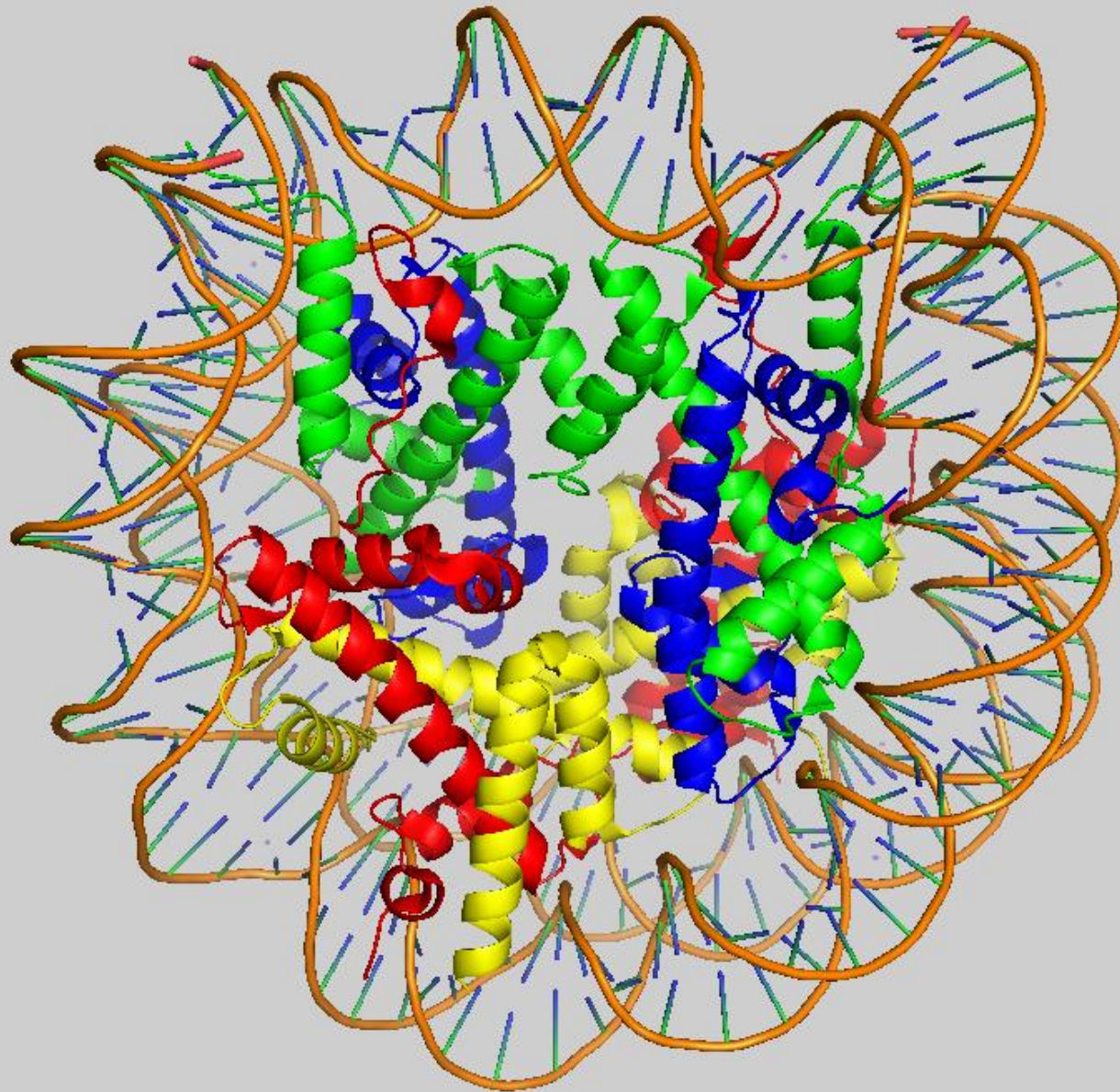
Struktura a funkce eukaryotických chromozom (C9041)

komplexy vytvářejí strukturu chromosomu



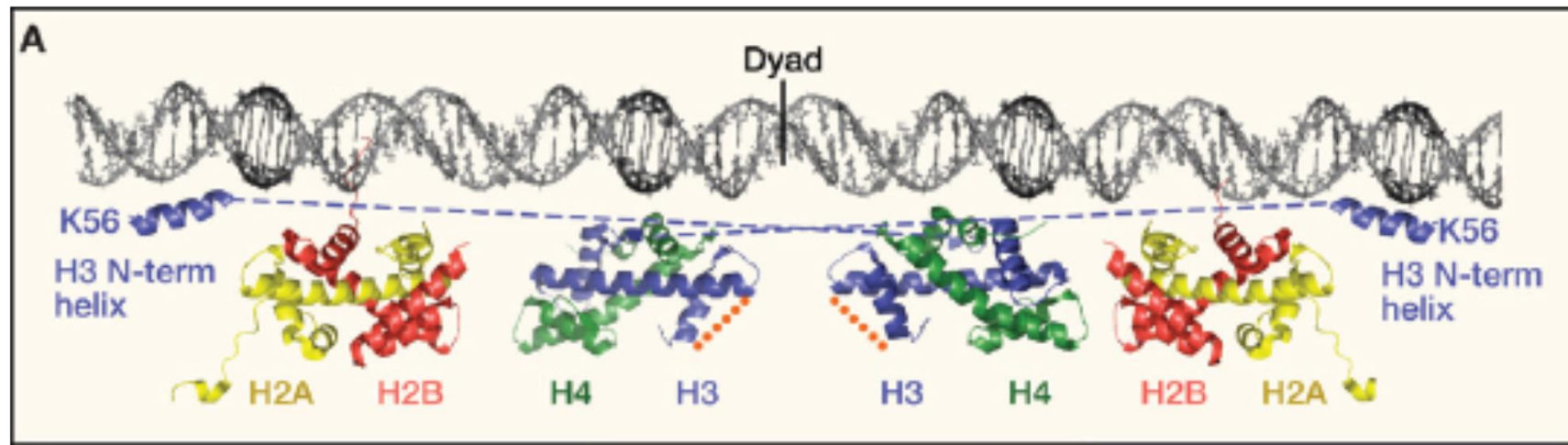
Nukleosom
oktamer histon
H2A, H2B, H3, H4
histon fold



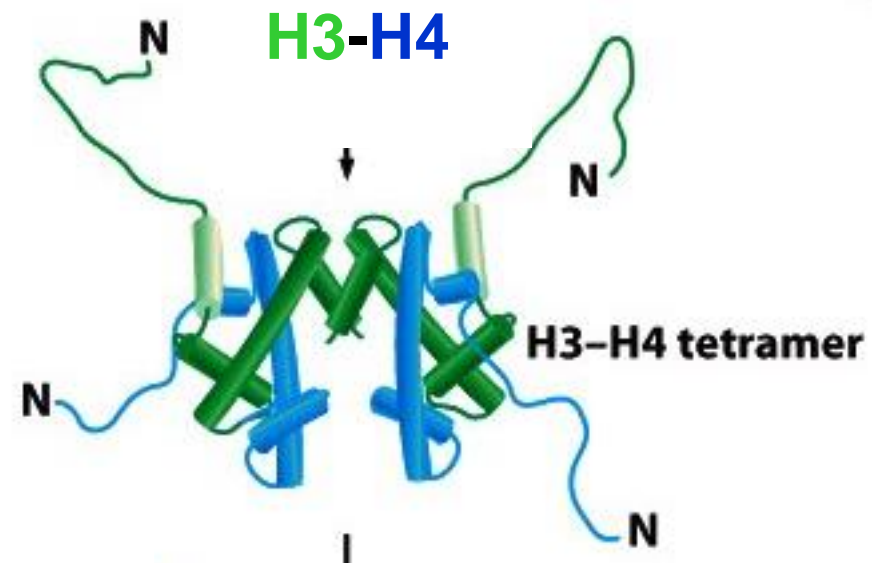


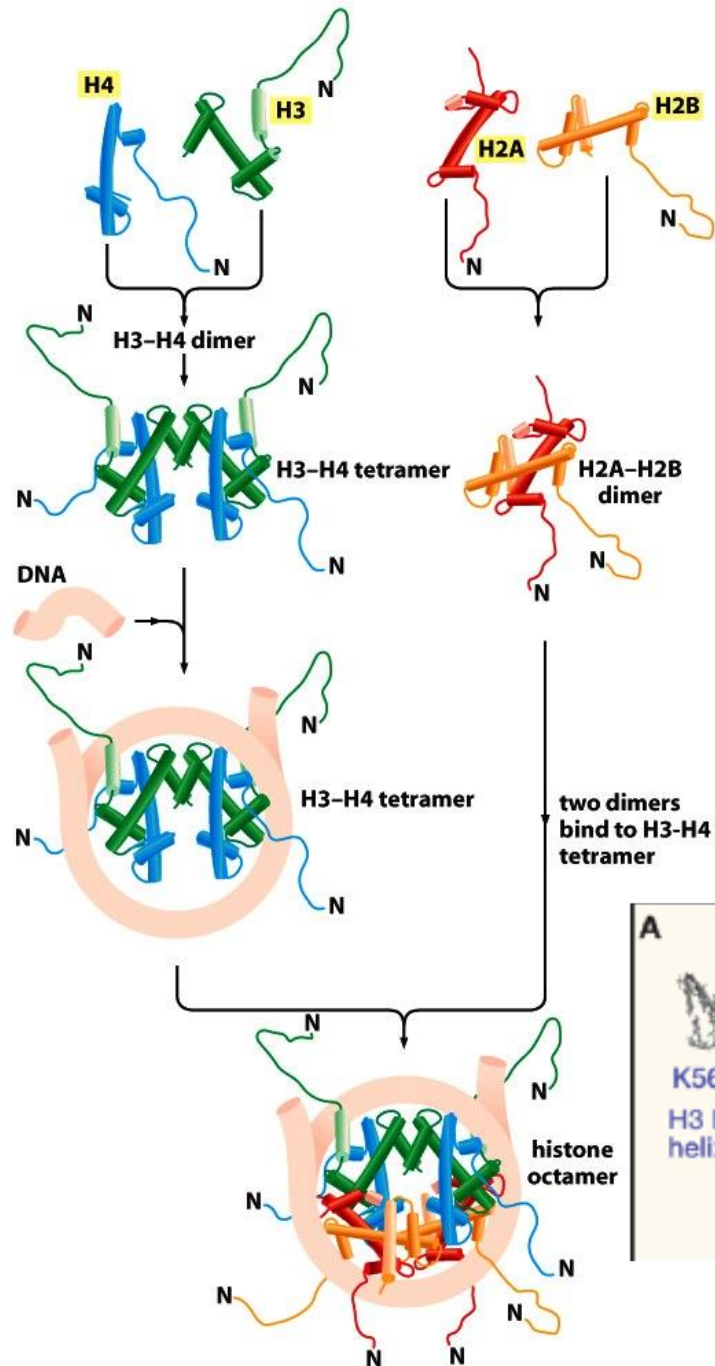
- 146bp . histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA váže dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA váže N-koncové zroubovice H3 (acetylovaný K56)

Skládání histonů do nukleosomu (komplexu)



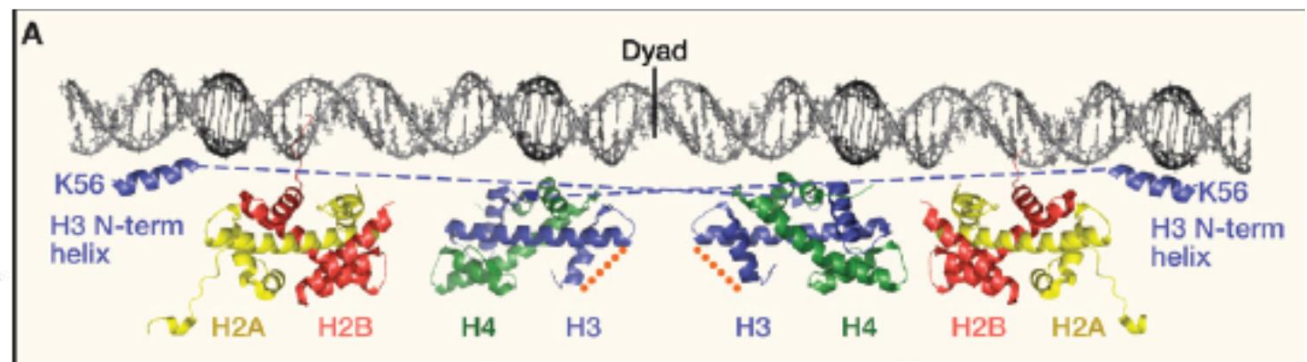
- 146bp - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- H3 dimerizuje přes postraní zroubovici
- okraje DNA váže dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA váže zroubovice H3 (acetylovaný K56)



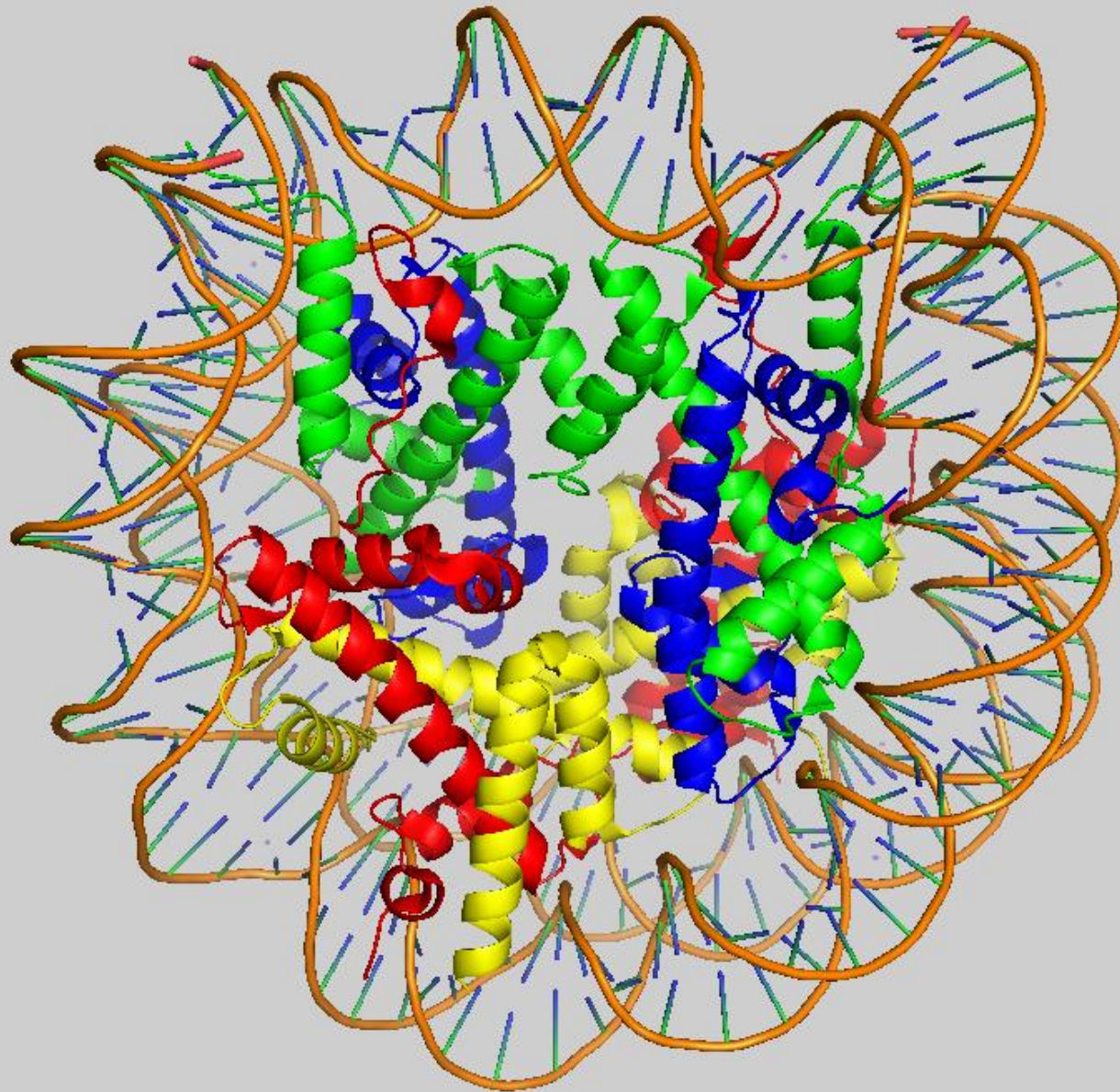


Sestavování nukleozomu:

- Silnější je interakce mezi H3-H4
- H3 dimerizuje přes postraní zroubovici a vytváří tetramer který asociuje s DNA
- dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru $(H3-H4)_2$
- při uvolnění odpadají nejdříve dimery H2A-H2B
- H2A a H3 existují ve více variantách, které mohou být zaměněny v nukleosomu

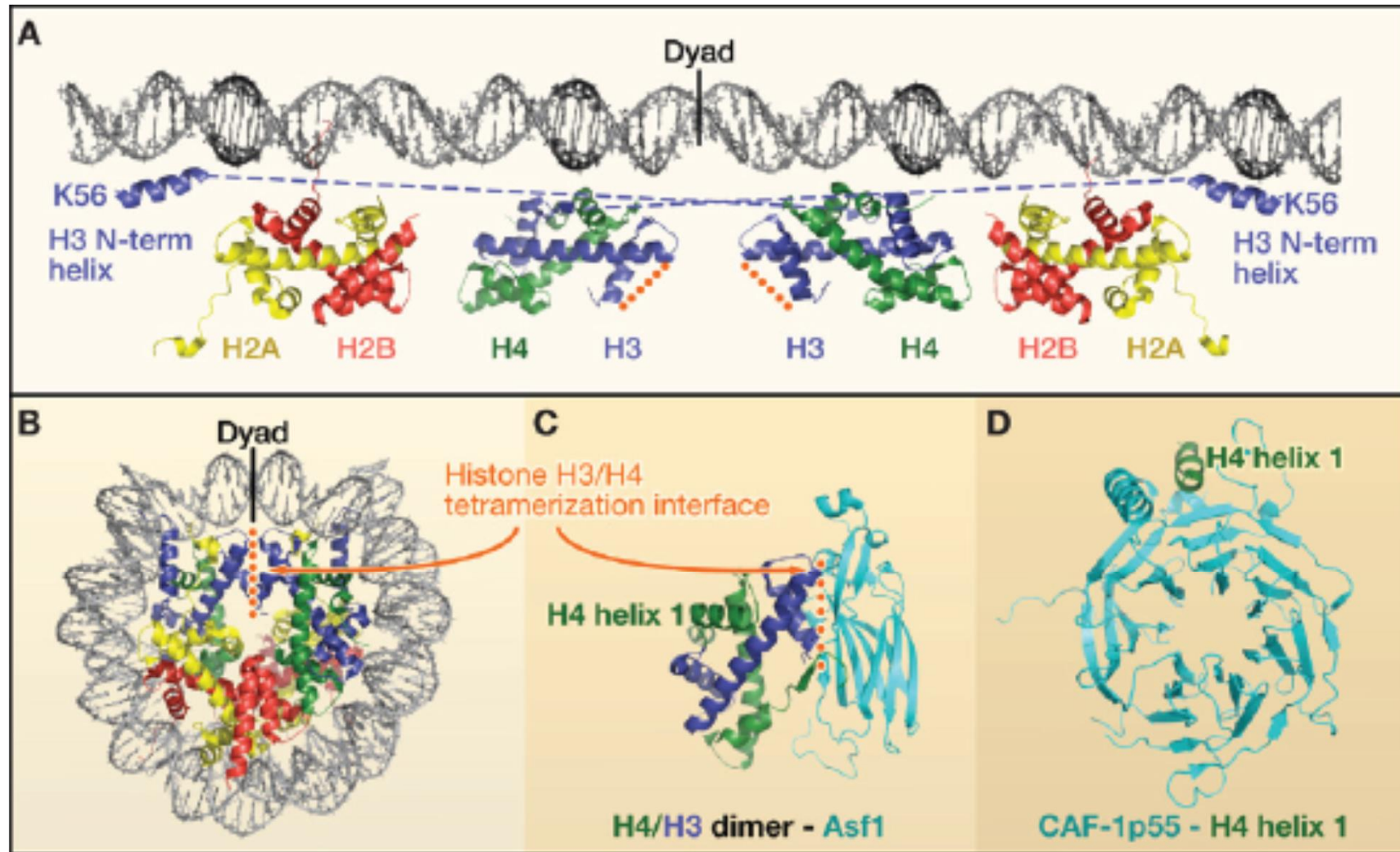


Nabalování a rozbalování histon



- H3-H3 interakce = dimer
- dimery H2A-H2B (H2A . vá0e H3)

Histonové H3-H4 chaperony

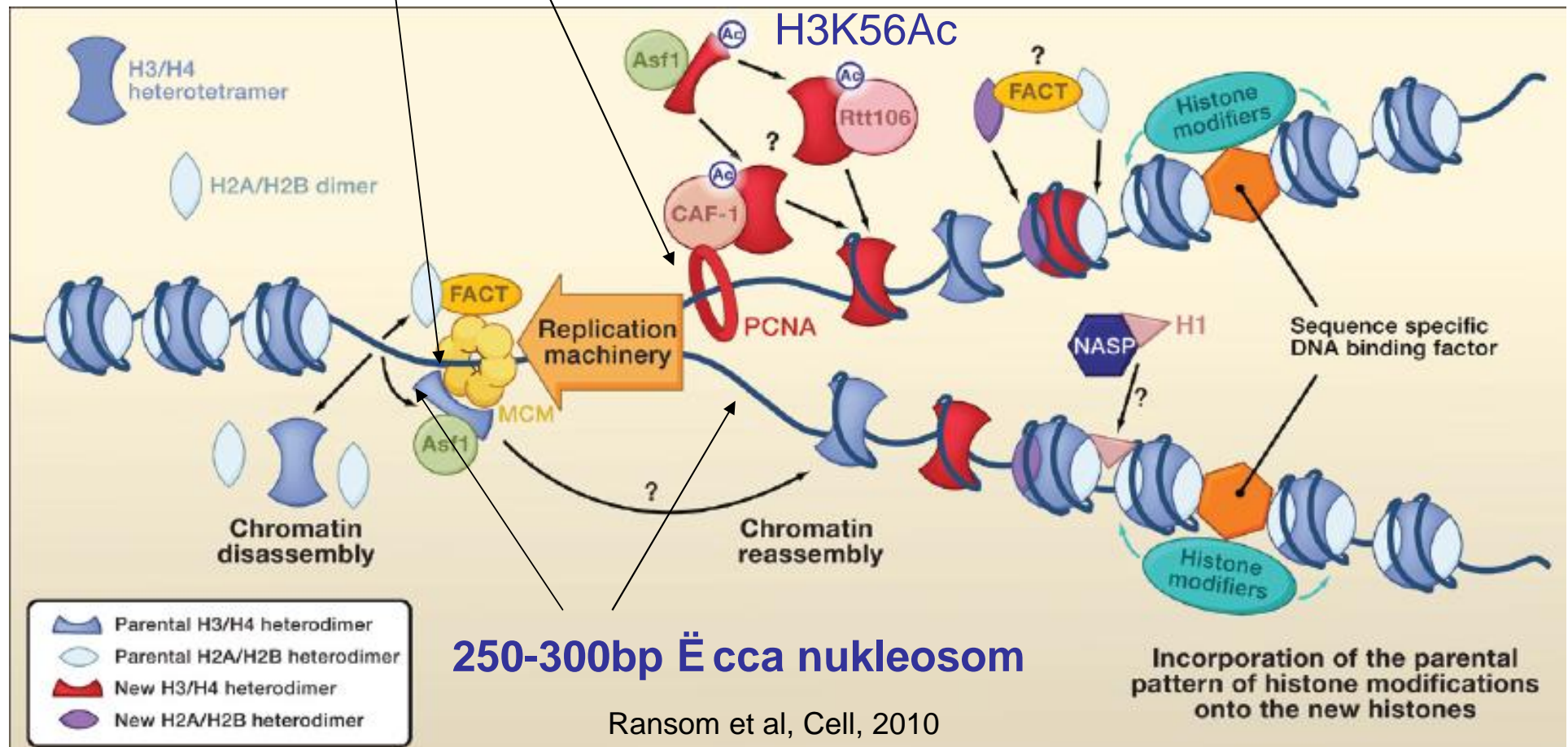


Ransom et al, Cell, 2010

- Postupné sestavování (a uvolnění) histon je zprostředkováno různými chaperony (+ ATP-dependent remodeling stroji) . *schaperony pro komplexy*
- ASF1 (antisilencing function, tetramerizace) => CAF1 (chromatin assembly factor, vazba k DNA)

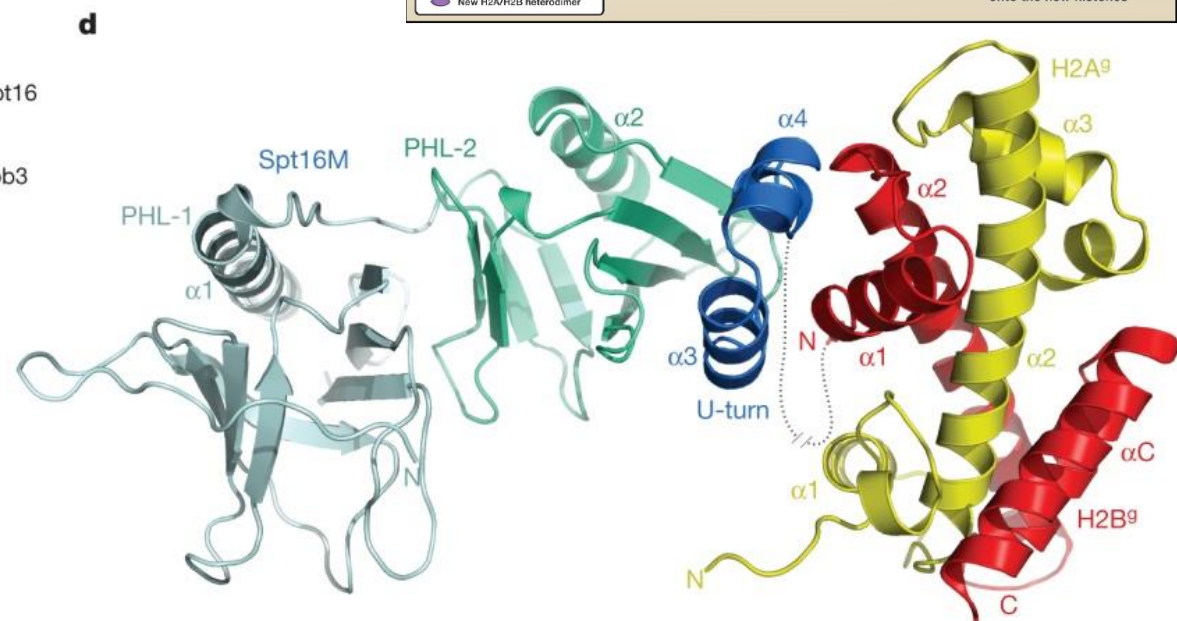
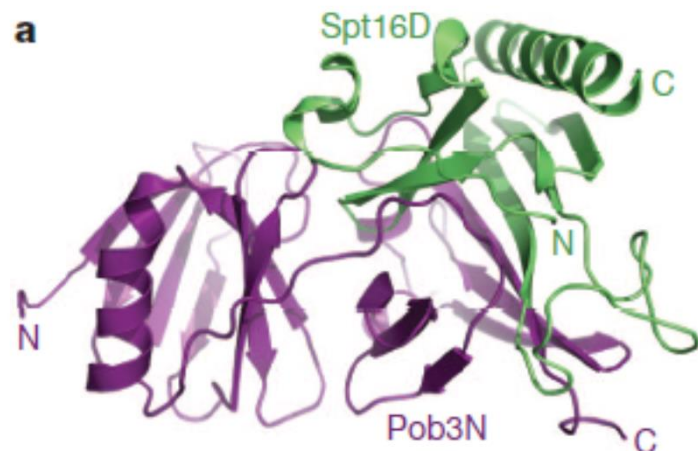
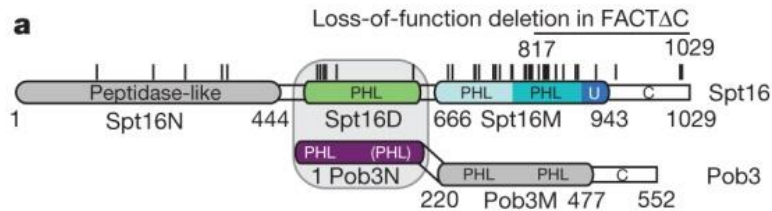
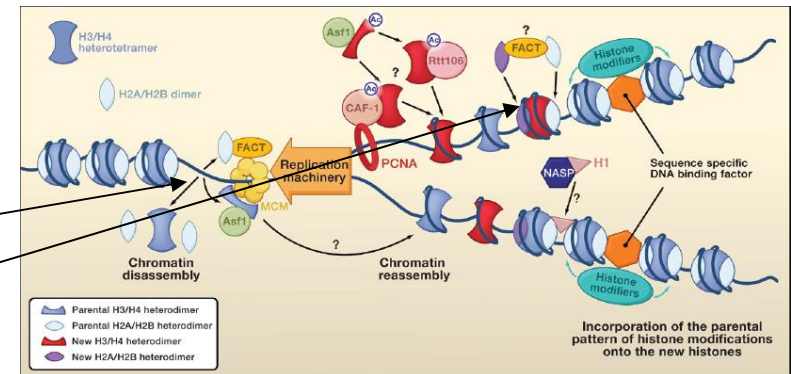
Histon chaperony - replikace

- na ssDNA nukleosomy nejsou: replikace, transkripce, oprava DNA ...
- p ed t mito procesy se musí histony odstranit a poté zase nabalit ò (feedback: inhibice chromatin assembly inhibuje disassembly nukleosom)
- 1. ASF1 (vá0e MCM a PCNA) a 2. CAF1 (assembly) pro H3-H4 disassembly a assembly



FACT komplex

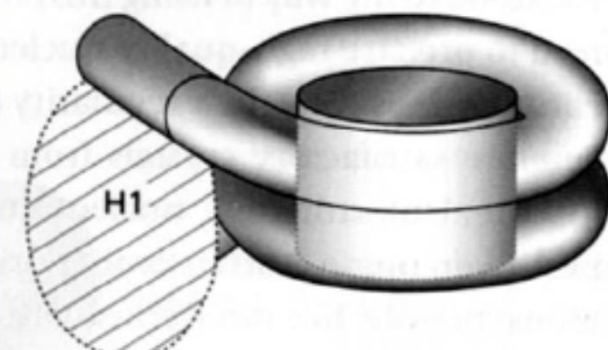
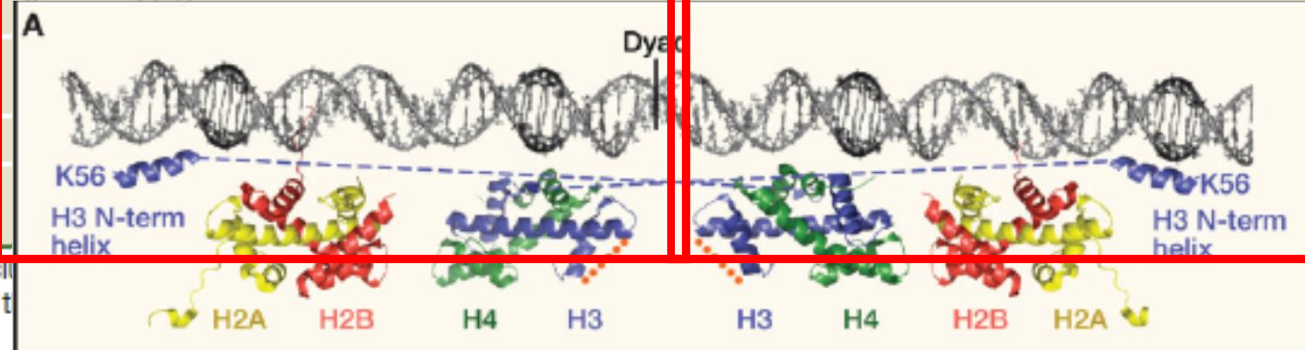
- histon chaperon komplex FACT (facilitates chromatin transcription) je složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSRP1)
- dimerizace část také interaguje s DNA-polymerásou (spojení s replikací)
- rozeznává histon H2A-H2B heterodimer (interferuje s vazbou na DNA tzn. rozrušení vazby H2A-H2B s DNA) disassembly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



Hondele et al., Nature, 2013

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	
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.

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

Histonové varianty

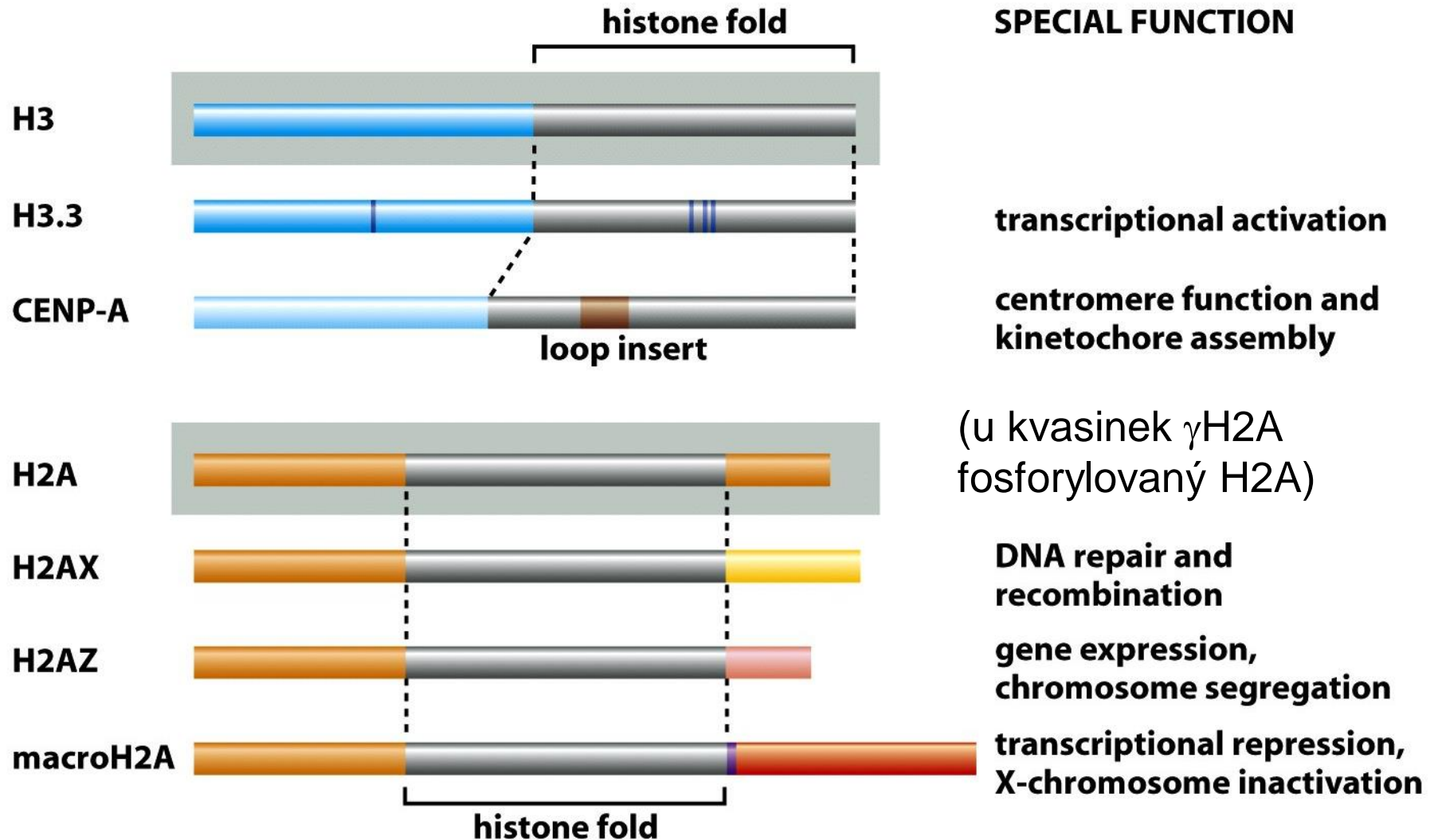
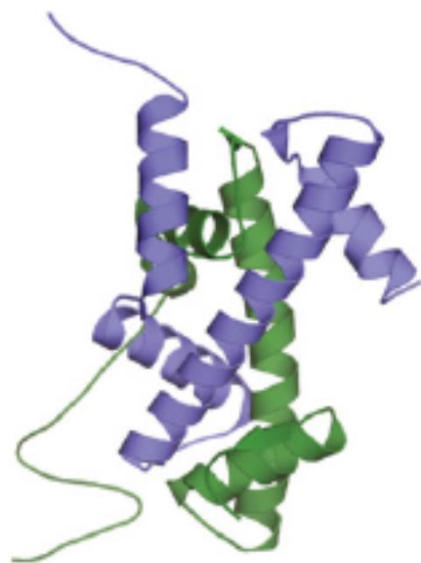


Figure 4-41 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

		Select human H3 variants	Identity	Chaperones
H3.1/2	A	SAVM C/S	100%	ASF1, CAF-1
H3.3	S	AAIG S	96%	ASF1, HIRA, DAXX/ATRX
CenH3 ^{CENP-A}			63%	HJURP
		Yeast H3 variants		
H3	S	SAIG S	88%	Asf1, CAF-1, HIR
CenH3 ^{Cse4}			30%	Scm3

H3-H4

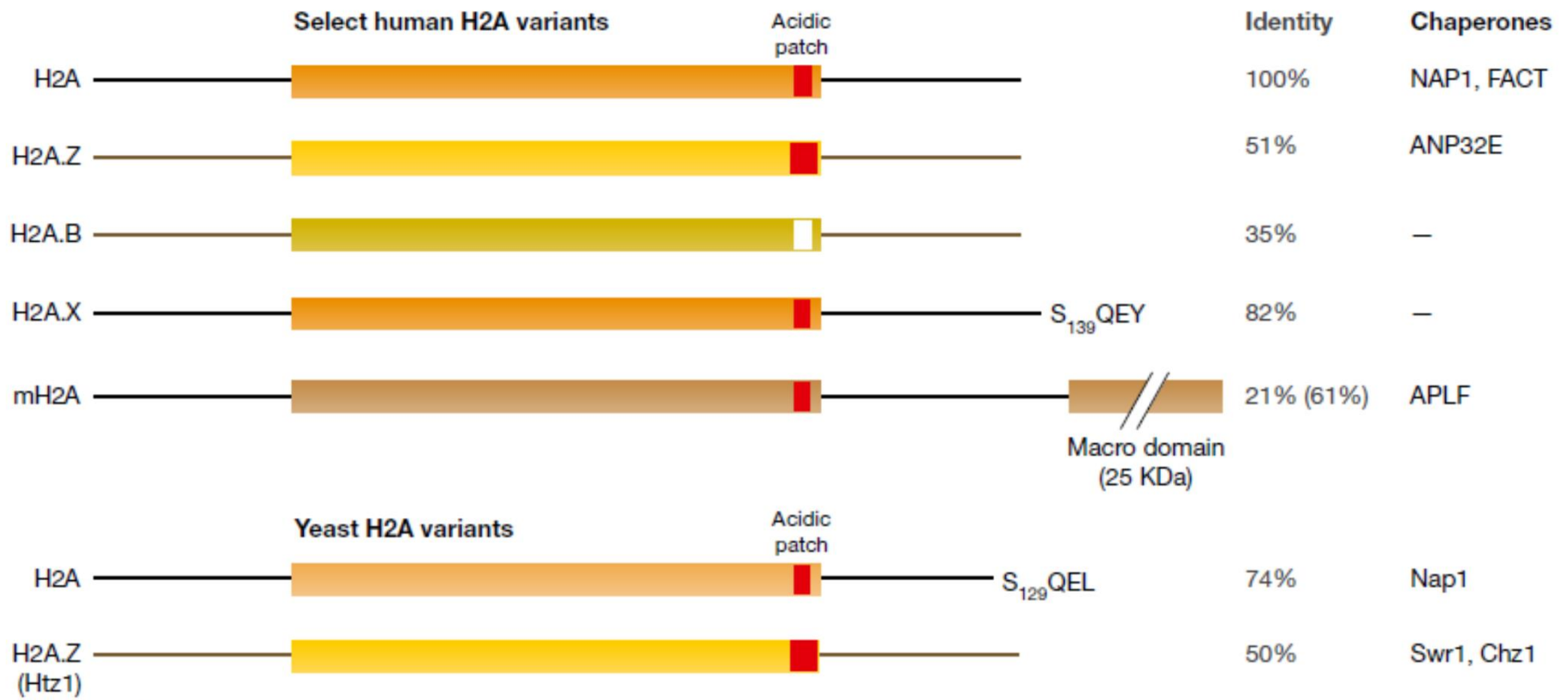


H3.3-H4

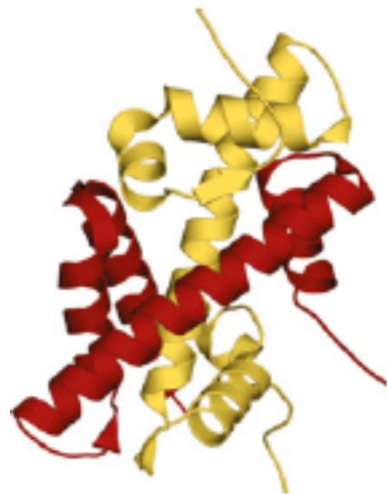


CenH3^{CENP-A}-H4

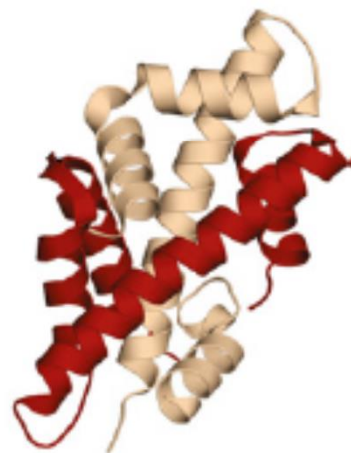




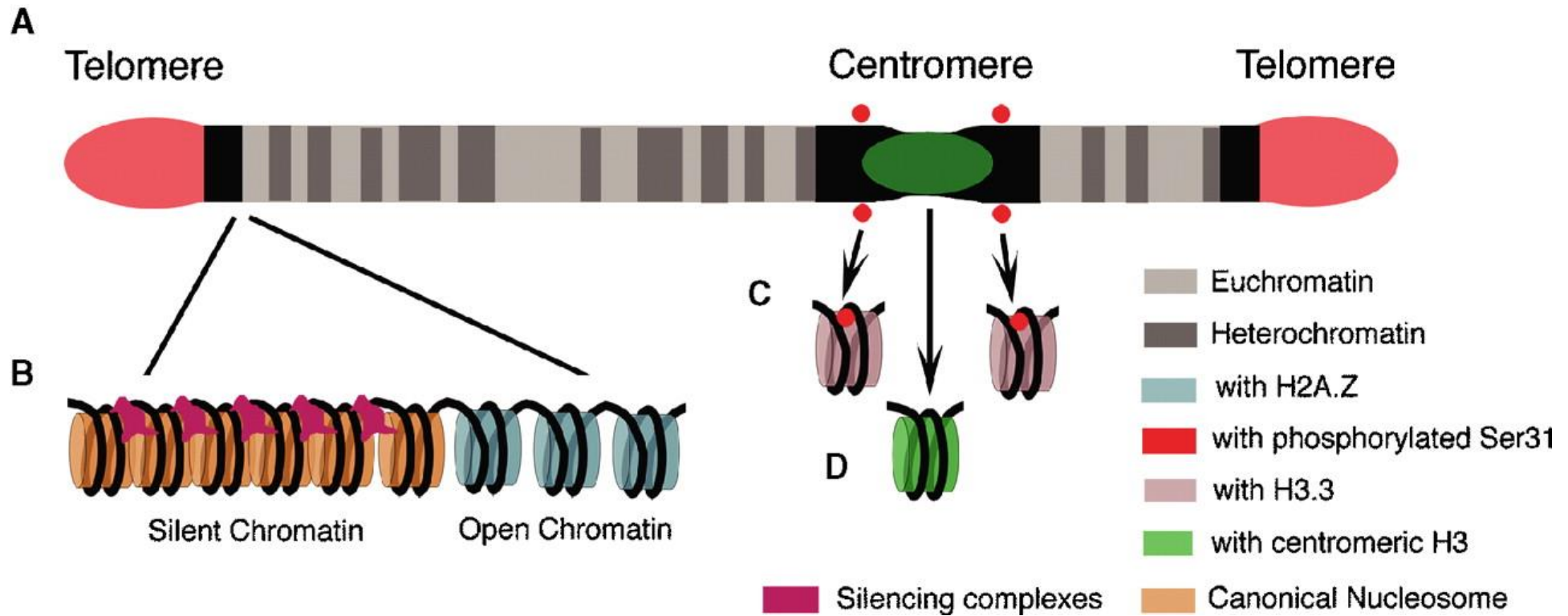
A H2A-H2B



H2A.Z-H2B



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 variantu H3.

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

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

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

specifický chromatin s CENP-A histonem kotví kinetochory -
tah mikrotubul (a kohesiny) zajiz ují správnou segregaci v
anafázi

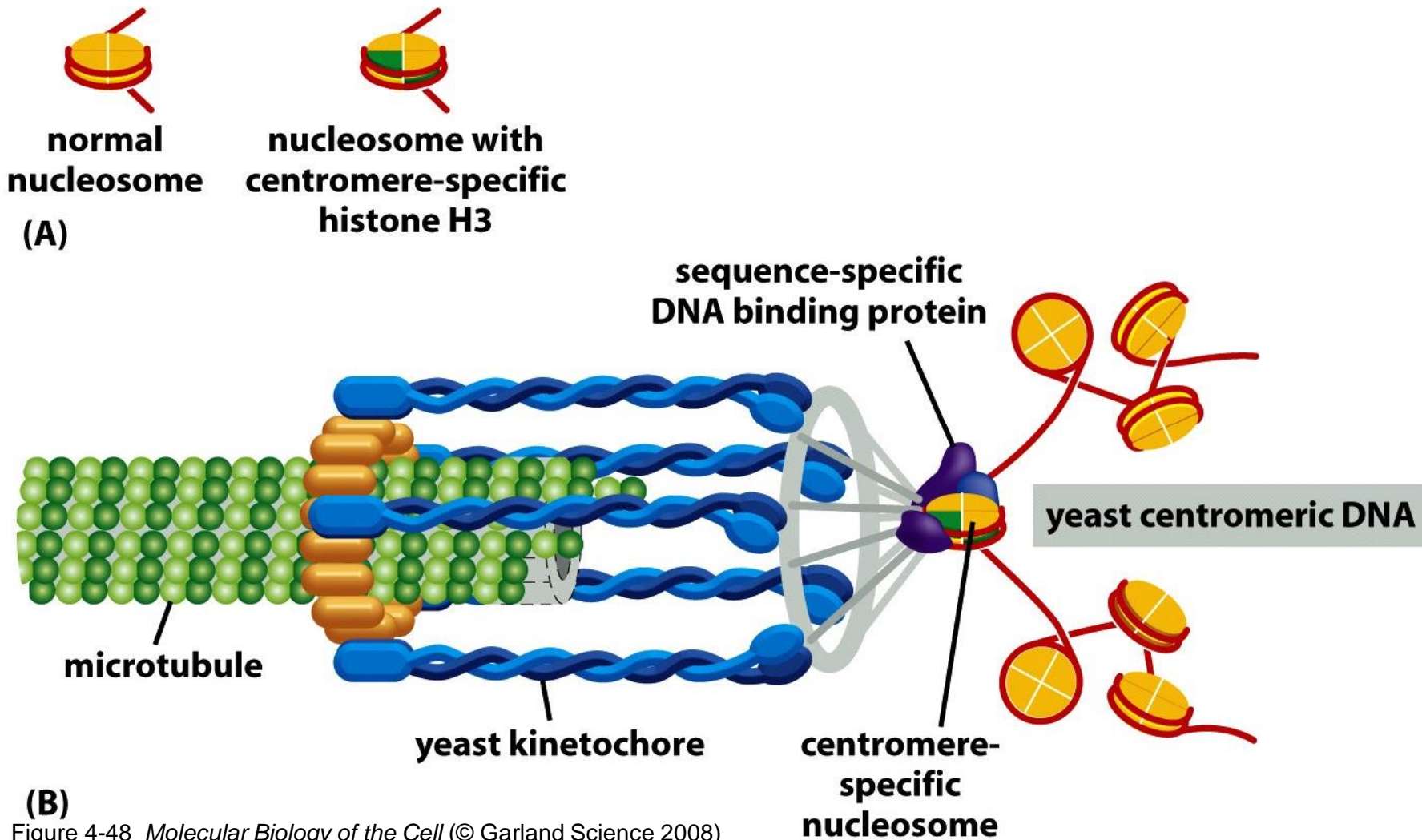
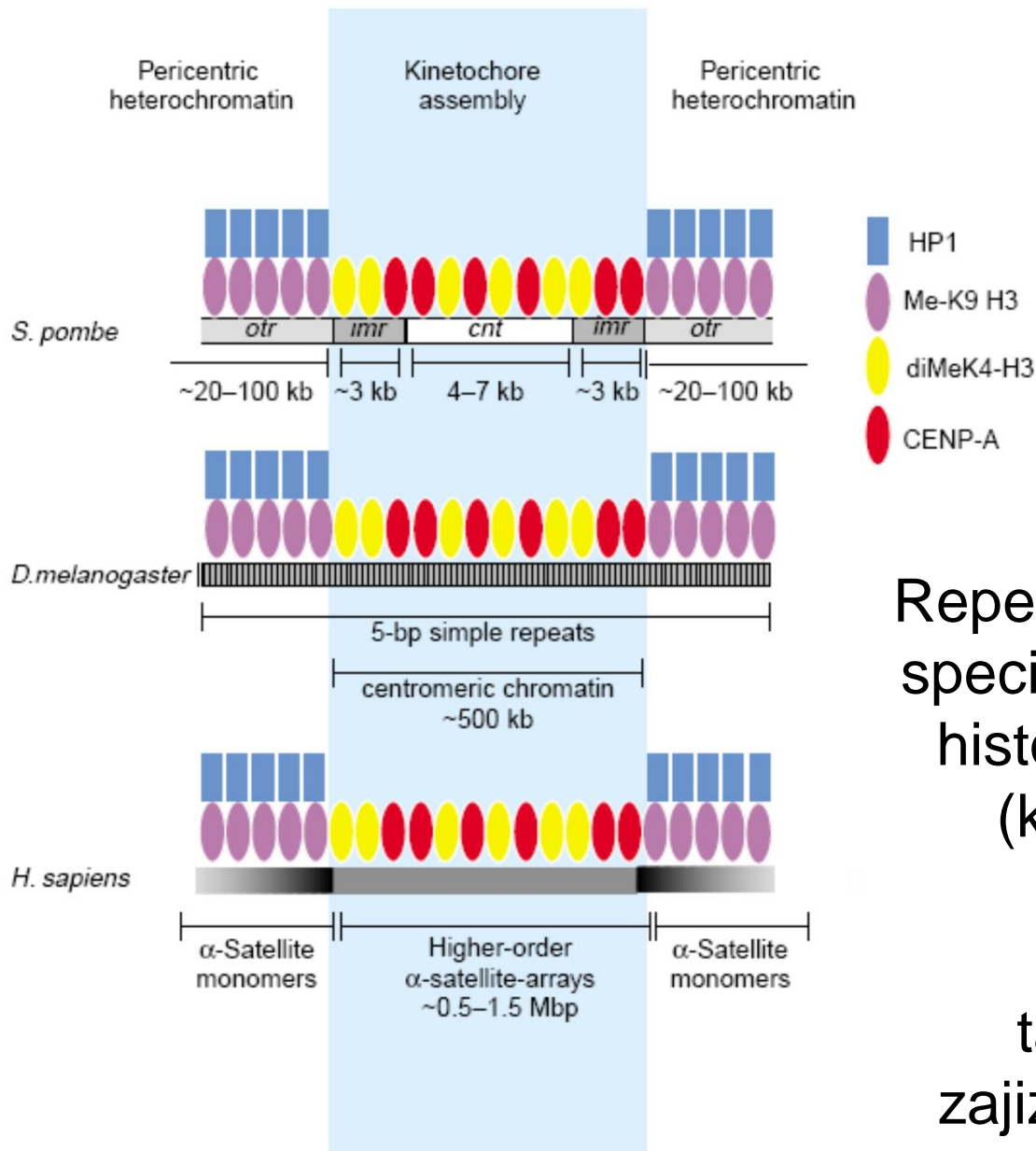


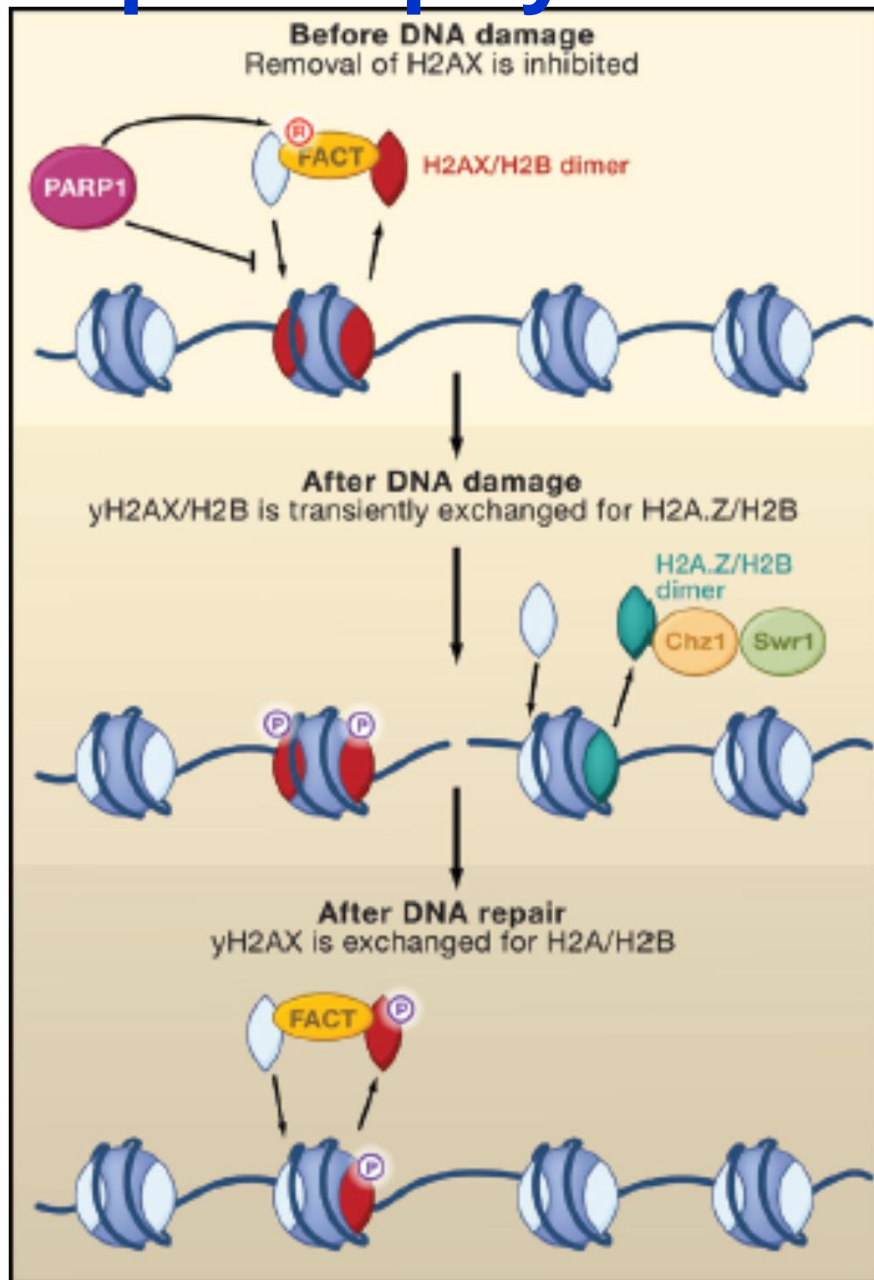
Figure 4-48 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Centromery



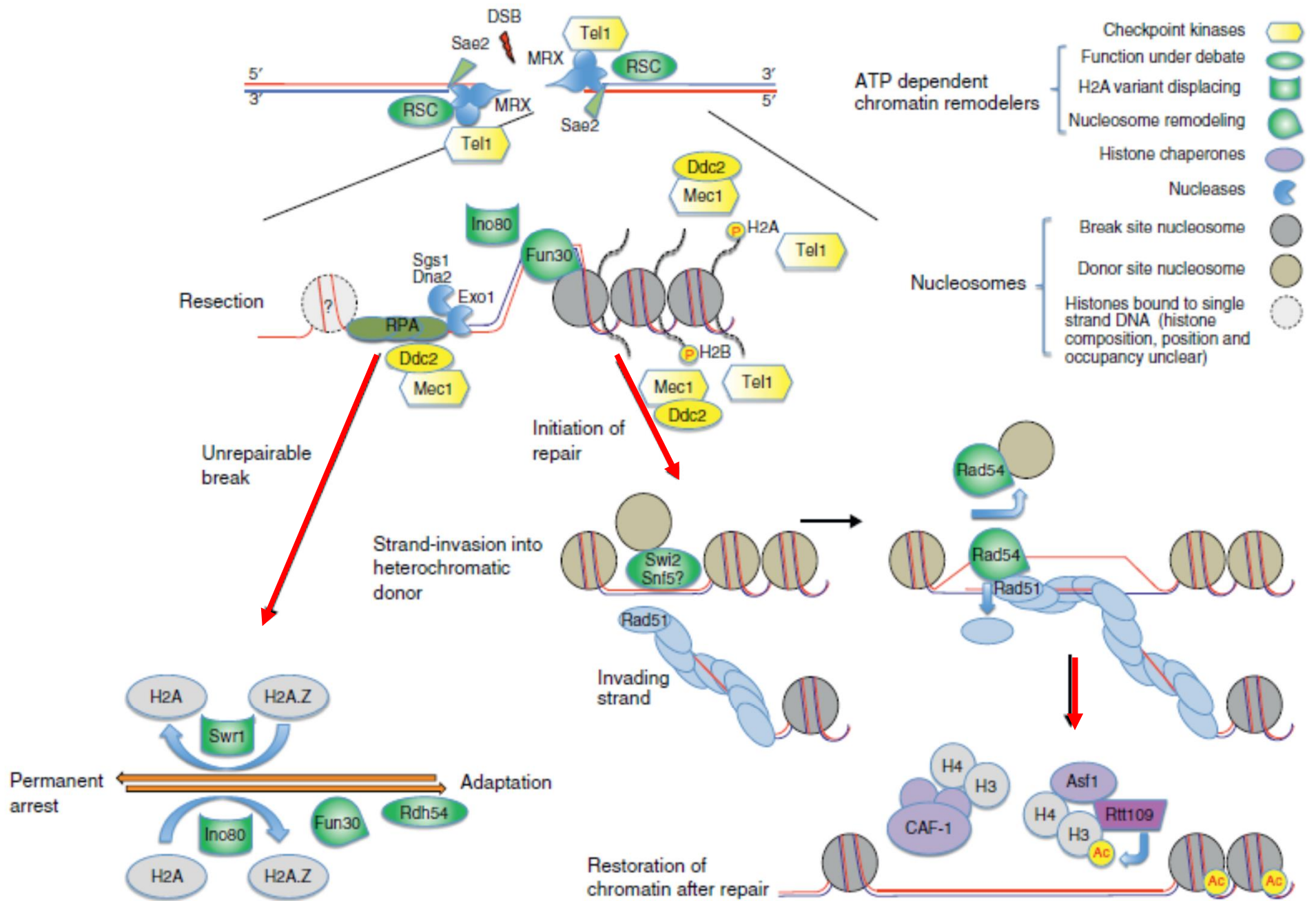
Repetitivní sekvence vytvářejí specifický chromatin. CENP-A histon, který kotví kinetochoru (kolem je pericentromerický heterochromatin a SMC komplexy) tahá mikrotubula a koheze zajišťují správnou segregaci v anafázi.

Oprava poškozené DNA ě H2A histony



Ransom et al, Cell, 2010

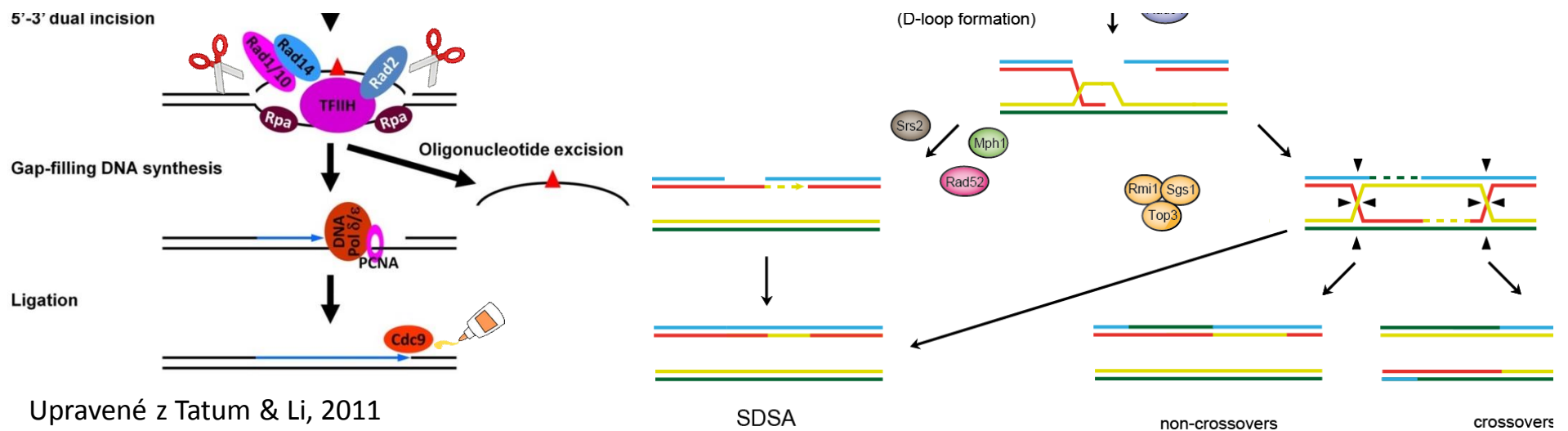
- poškozená DNA signalizuje/spouští sDNA damage checkpoint%∞ kinasy
- **H2A.X varianta** je fosforylována (v okolí poškození ~50kb b hem 15min; H2A u kvasinek)
- po oprav poškození je γH2A.X vyměněn FACT komplexem za nefosforylovaný H2A.X (a H2A)
- nefosforylovaný H2A.X je chráněn před FACT ribosylací (PARP1)
- **H2A.Z varianta** je zainkorporována v okolí poškození (**SWR** a Chz1) a pomáhá resekci DNA
- ukončení opravy je signalizováno a dokončením chromatinového vlákna



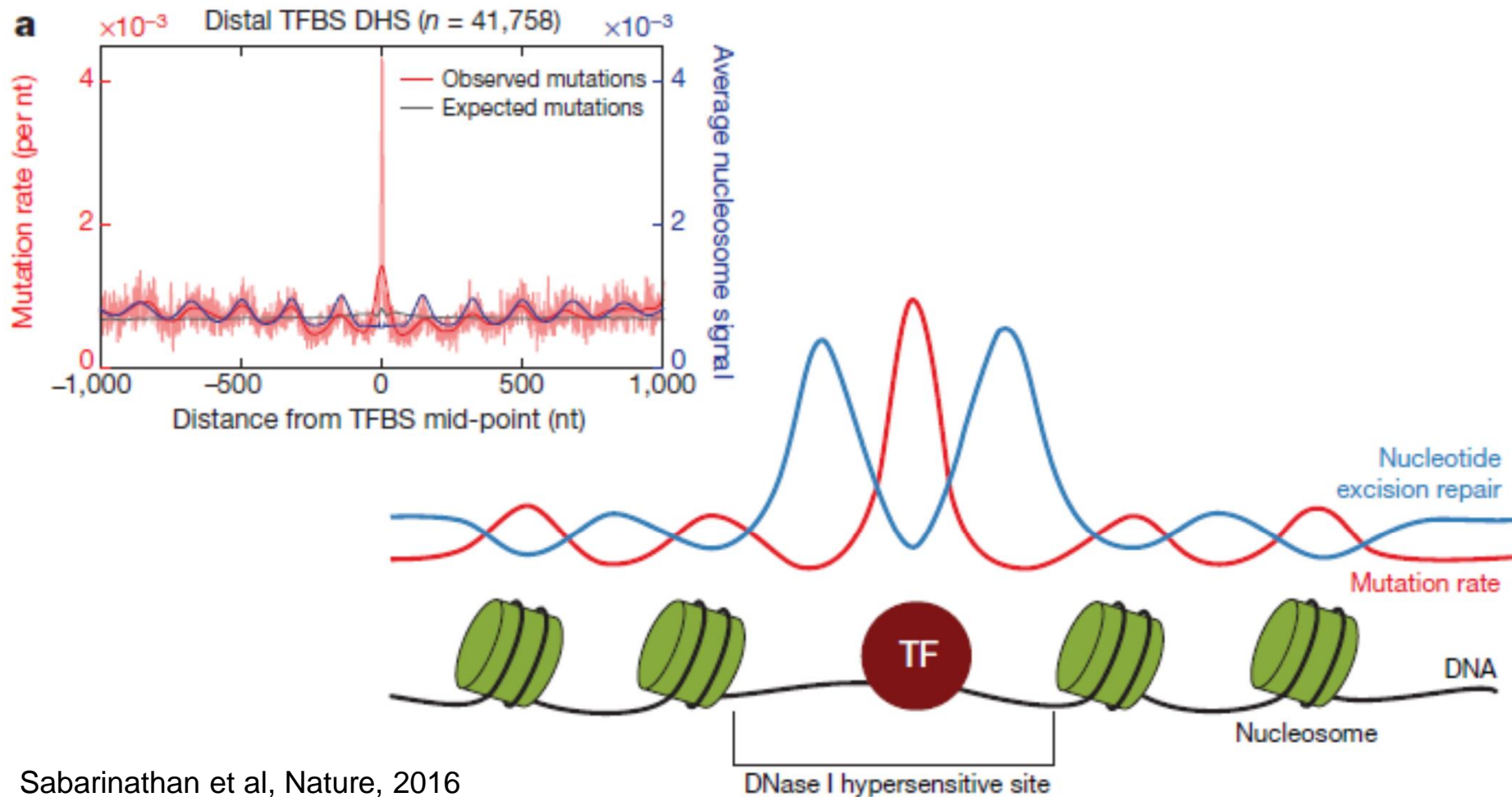
H3K56Ac - positioning

Oprava poškozené DNA - chromatin

- na ssDNA nukleosomy nejsou a oprava DNA
- před tímto procesem se musí histony odstranit a poté zase nabít
- pro malá poškození (NER, BER) postačí změny chromatinu zatímco pro větší (DSB - resekce DNA tj. vznik ssDNA) musí nukleosomy odstranit
- NER (BER) doprovázeno acylací histonů a remodelací (posuvem)
- před 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
- a0 kompletní reassembly chromatinu signalizuje dokončení opravy!



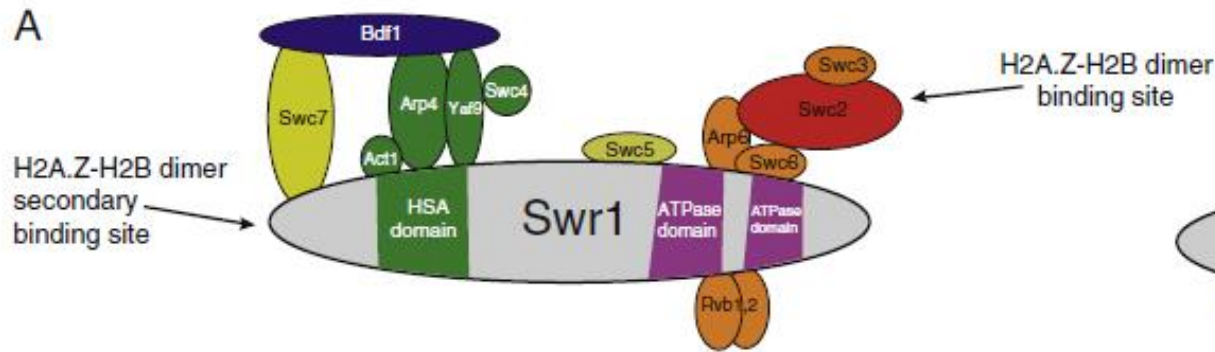
- pro malá pozkození (NER, BER) posta í menší zm ěny chromatinu zatímco pro větší (DSB - resekce DNA tj. vznik ssDNA) musí nukleosomy odstranit
- NER (BER) doprovázeno acetylací histon ů a remodelací (posuvem)
- nová studie ukazuje, že NER je mén ě ú ěinný (DNA je mén ě p ěístupná) v místech okupovaných nukleosomy (a transkrip čními faktory)



Sabarinathan et al, Nature, 2016

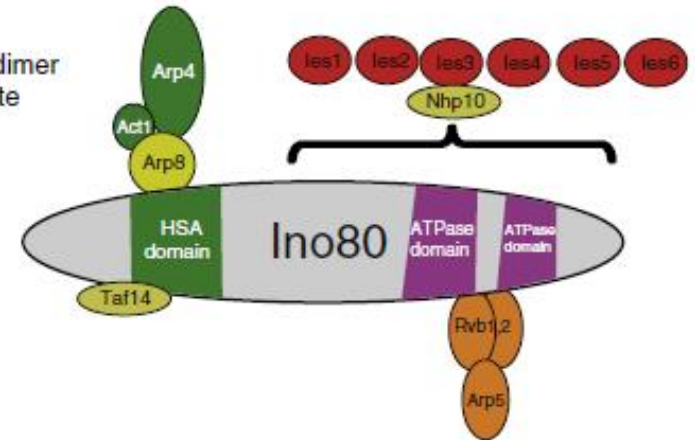
bromodoména

A

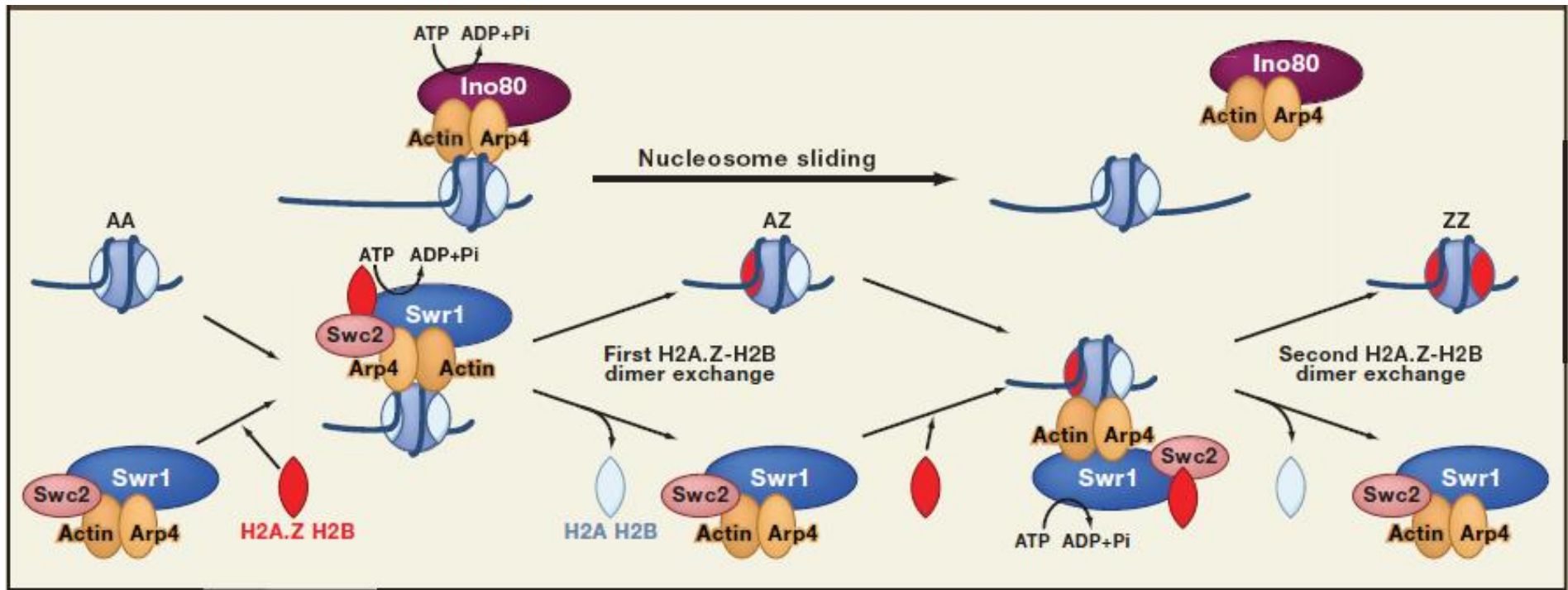


H2A.Z-H2B dimer secondary binding site

Billon a Cote, BBA, 2012

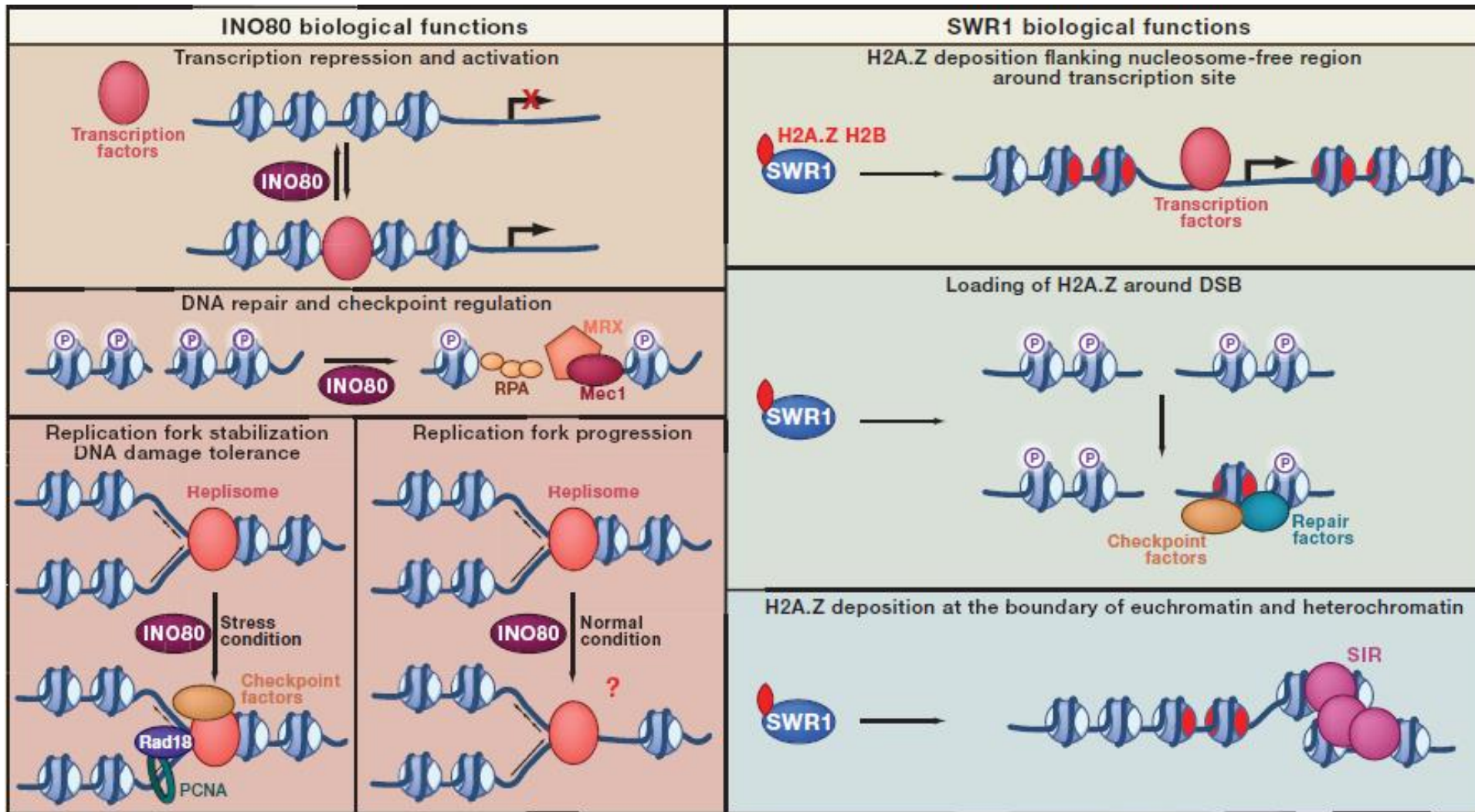


Bao a Shen, Snapshot in Cell, 2010



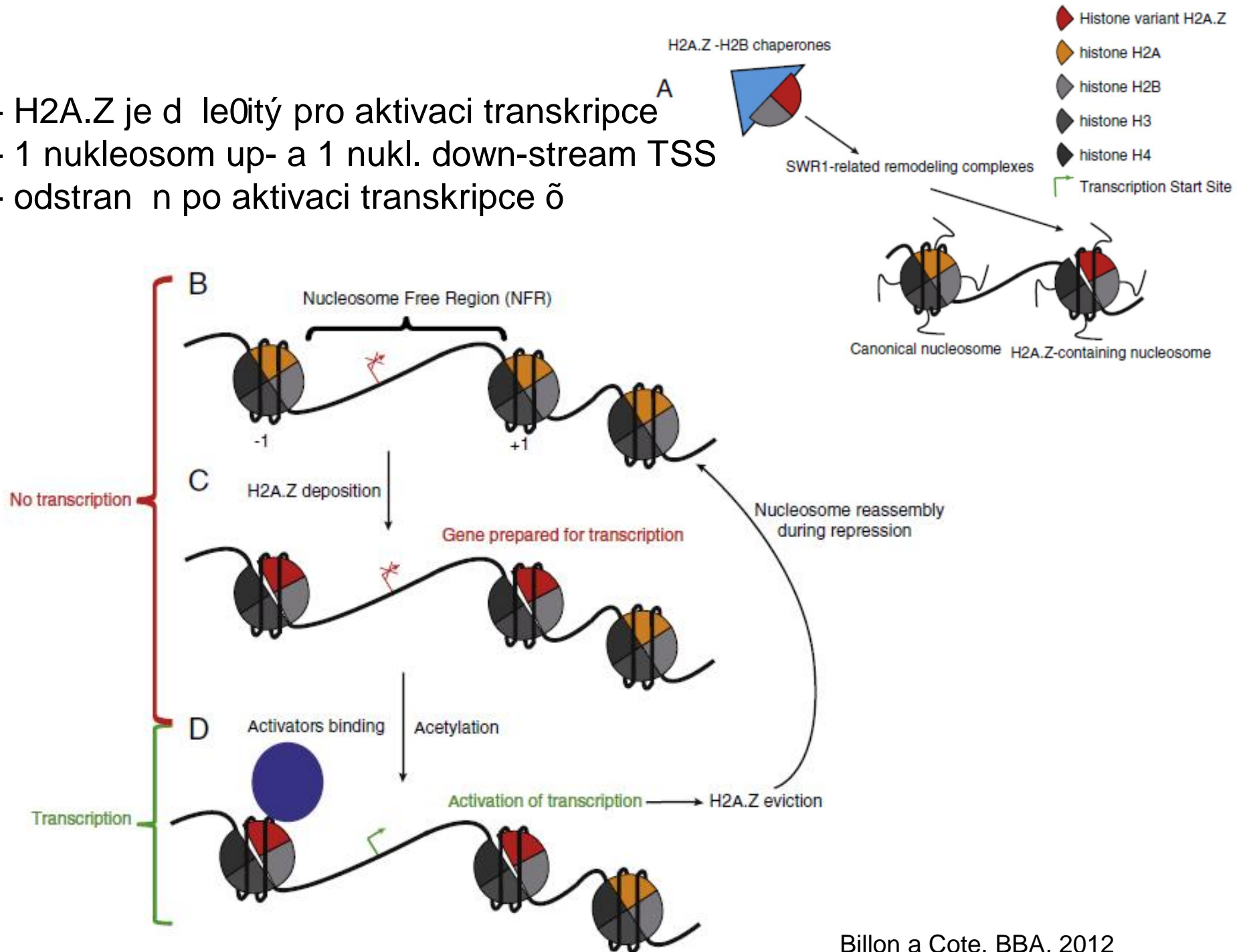
- SWR komplex specificky zam uje H2A-H2B dimer za H2A.Z-H2B

- sklouznutí, rozložení, odstranění nukleosomu nebo svým na histonových dimer



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

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



RSC remodelovací komplex

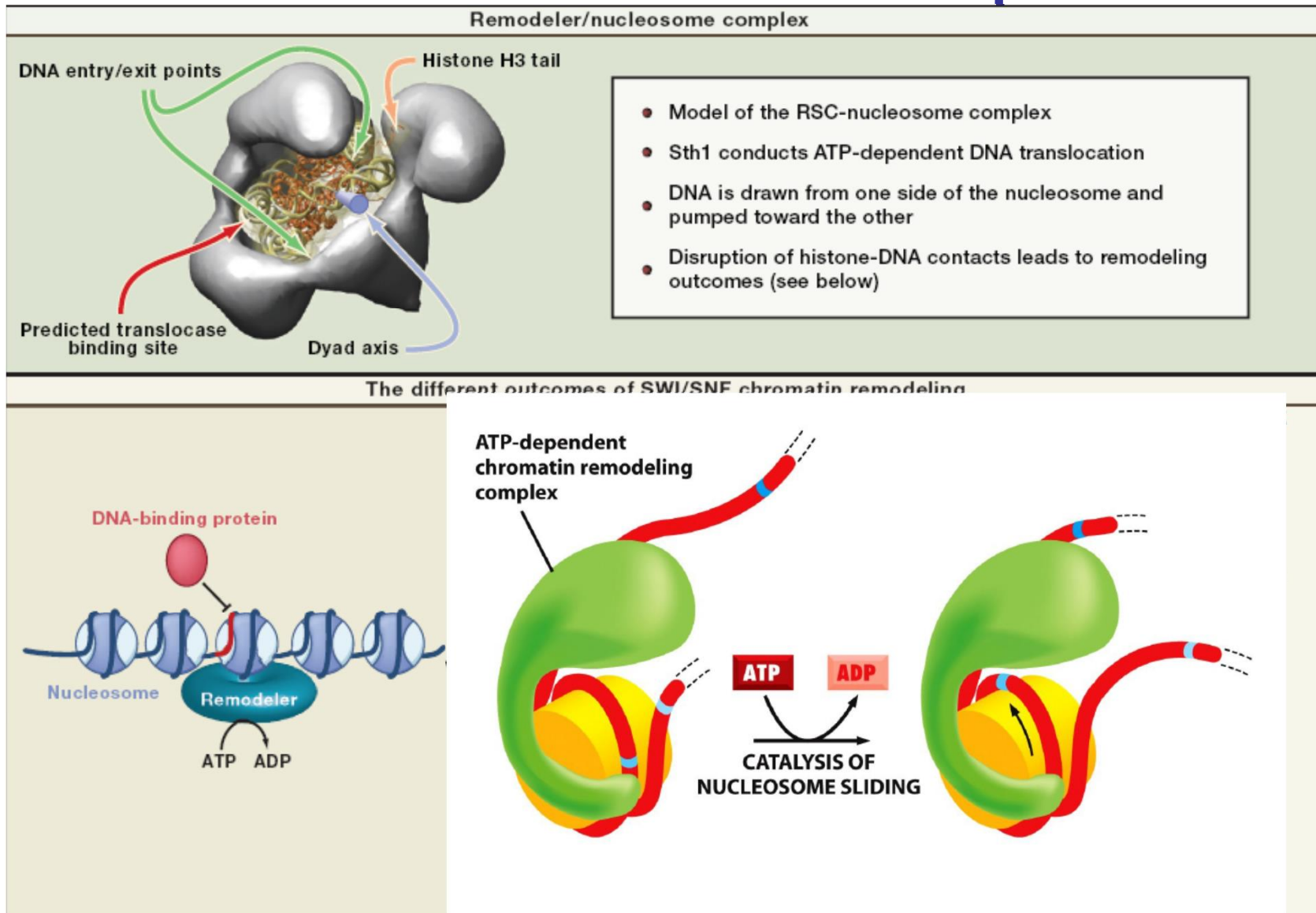
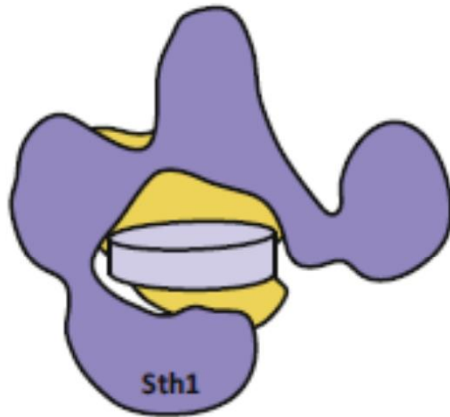


Figure 4-29 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

SNAPSHOT, Cell (144), 2011

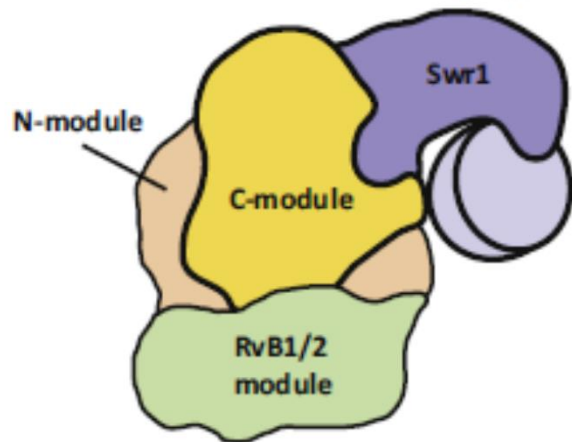
RSC (SWI/SNF) komplexy obklopi nukleosom (rozvolni se vazba s DNA a posouvá se)

(A) RSC
Nucleosome engulfing

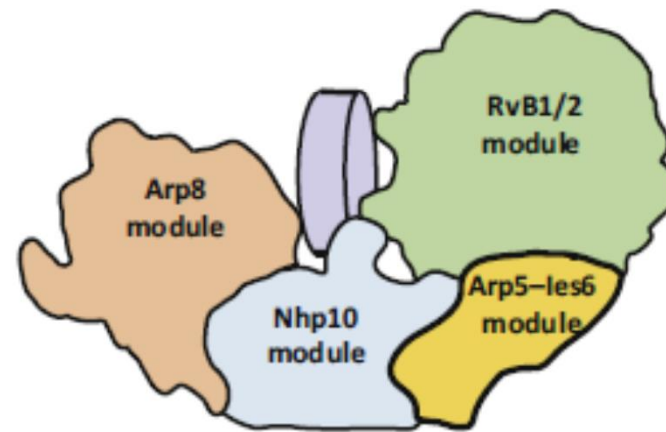


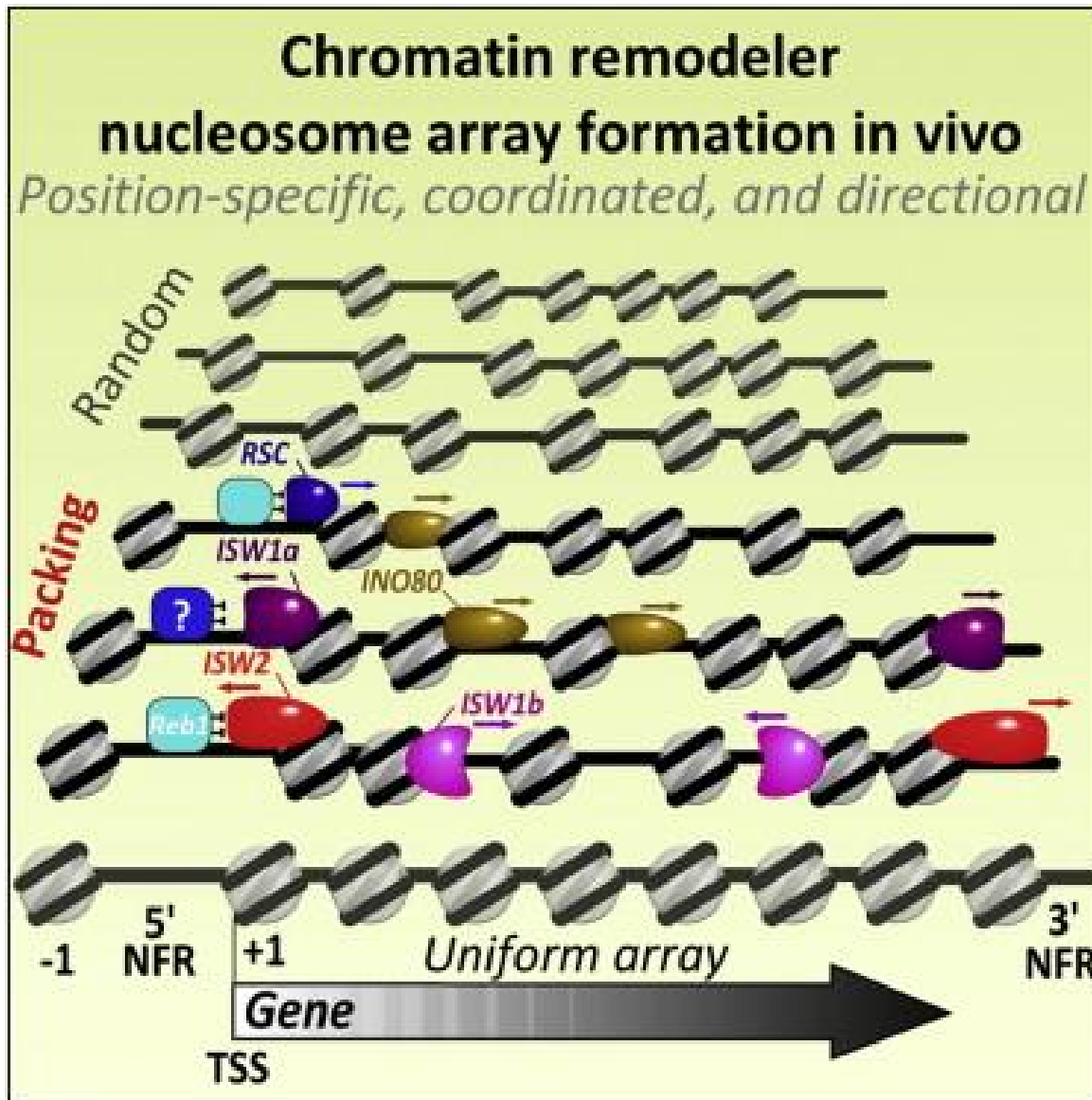
- RSC (SWI/SNF) komplexy obklopí nukleosom (rozvolní se vazba s DNA a posouvá se)
- nukleosom se zavázan na SWR-C komplexu . komplex váže jeztdimer, který je schopen vyměnit
- nukleosom je uchopen INO80 komplexem (přes podobné složení podjednotek . fungují odlišně)

(C) SWR-C
Nucleosome clinging



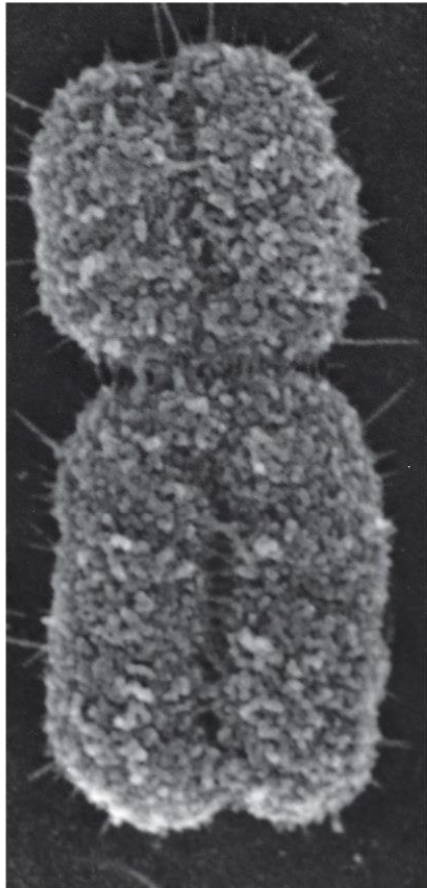
(D) INO80-C
Nucleosome grasping





- distribuce nukleosom není uniformní . vliv remodelačních komplex

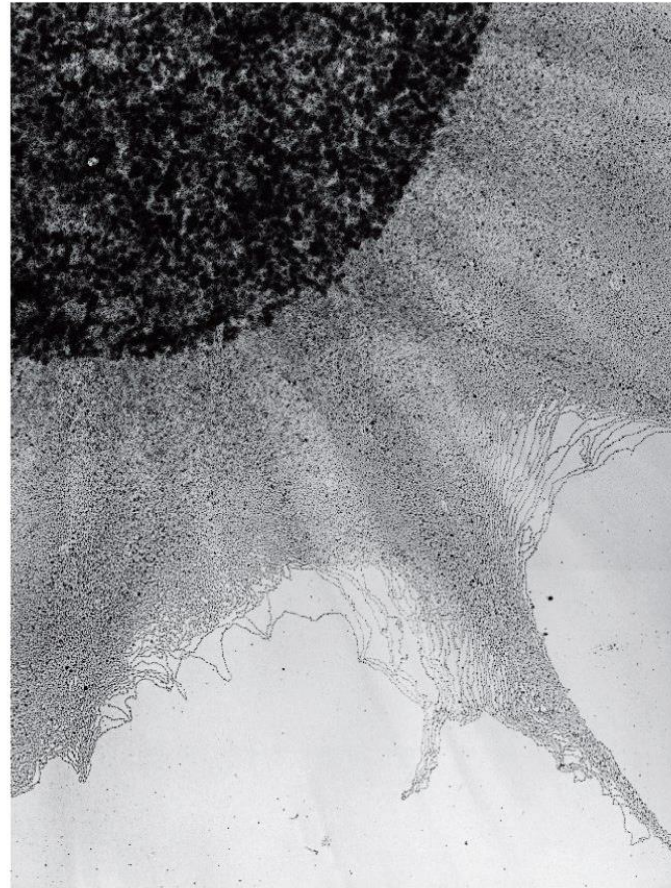
mitotický



(A)

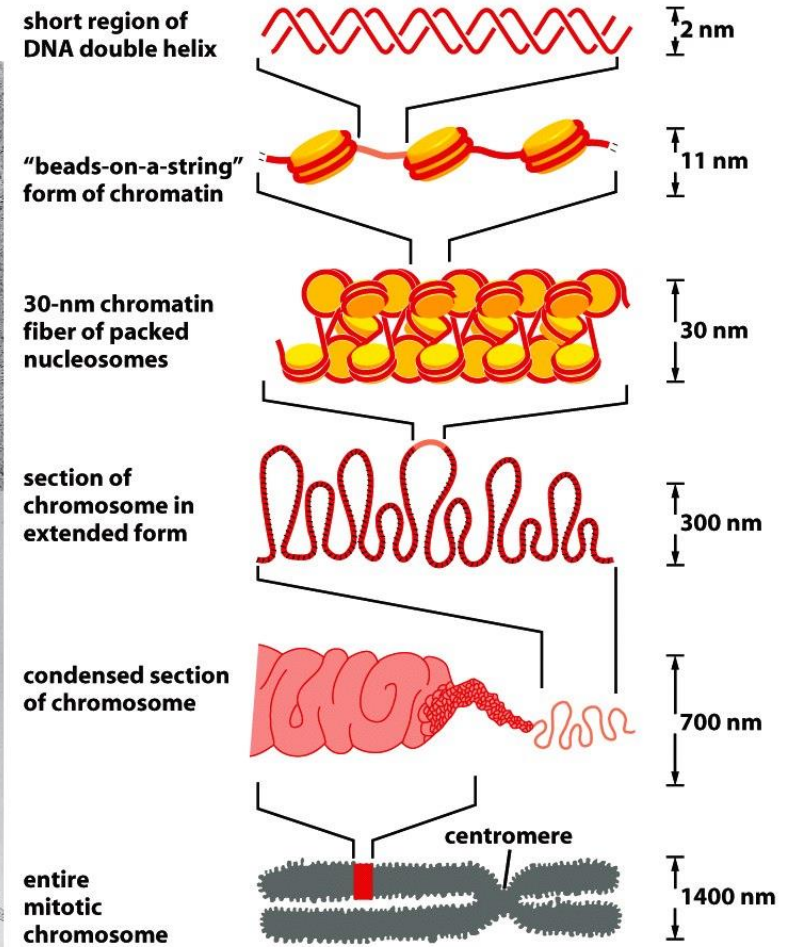
1 μm

interfázni



(B)

10 μm

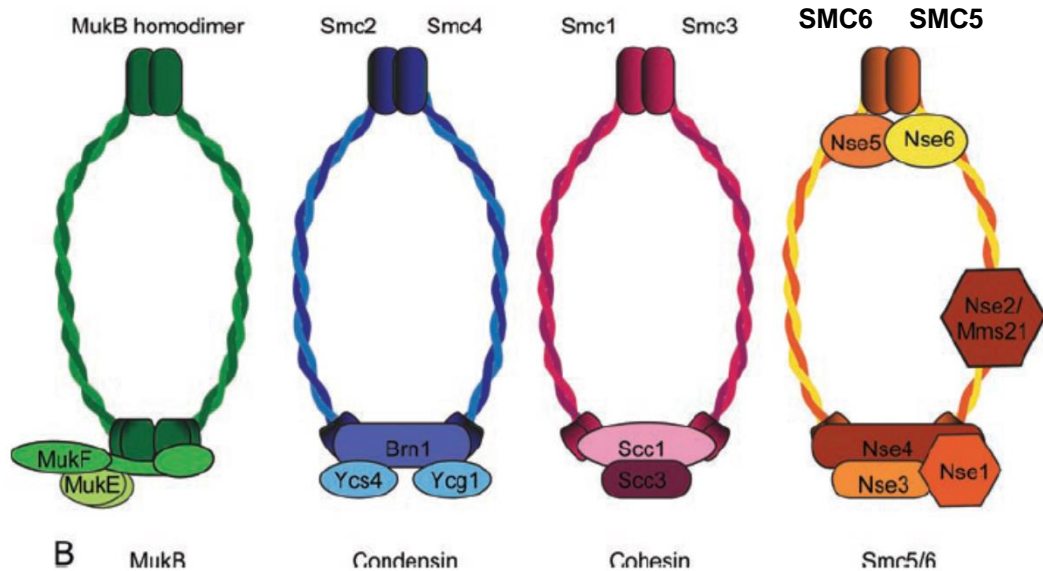
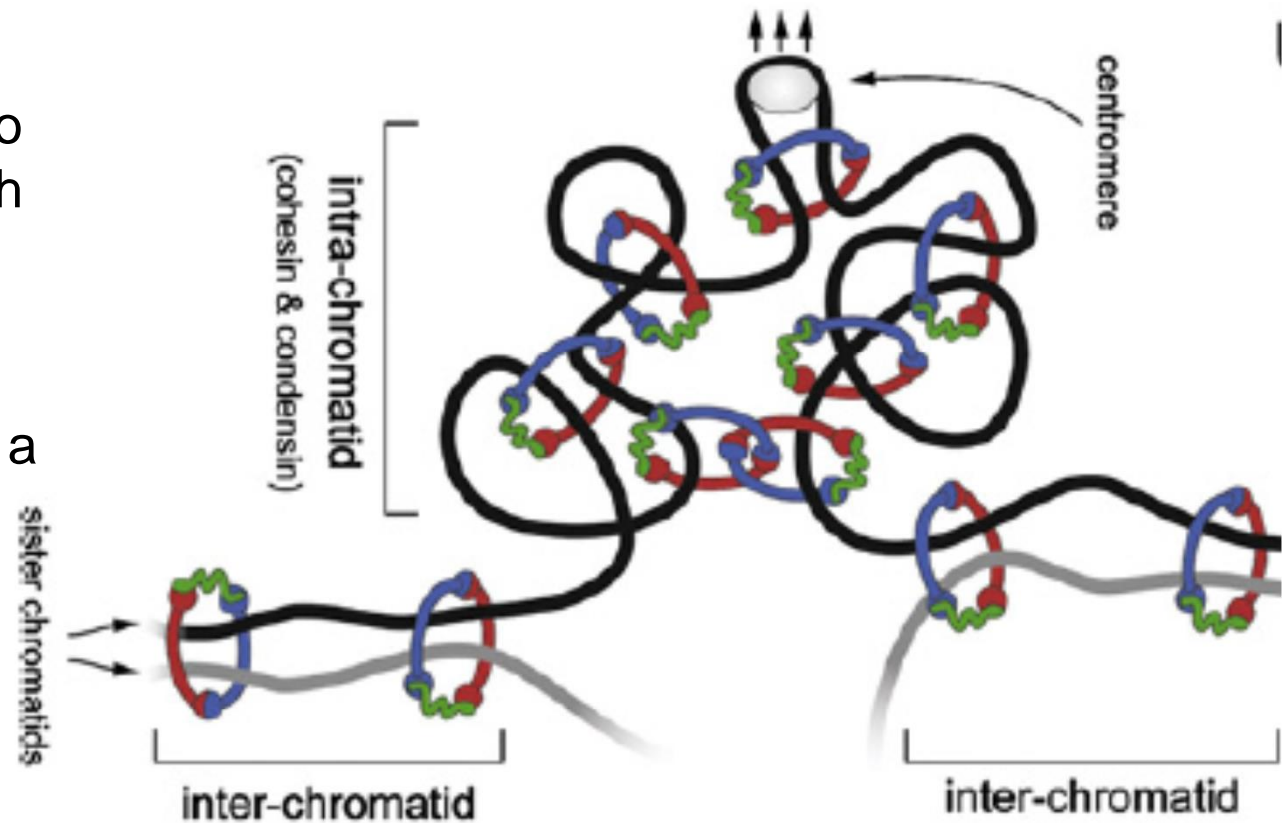


NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 10,000-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

Figure 4-20 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

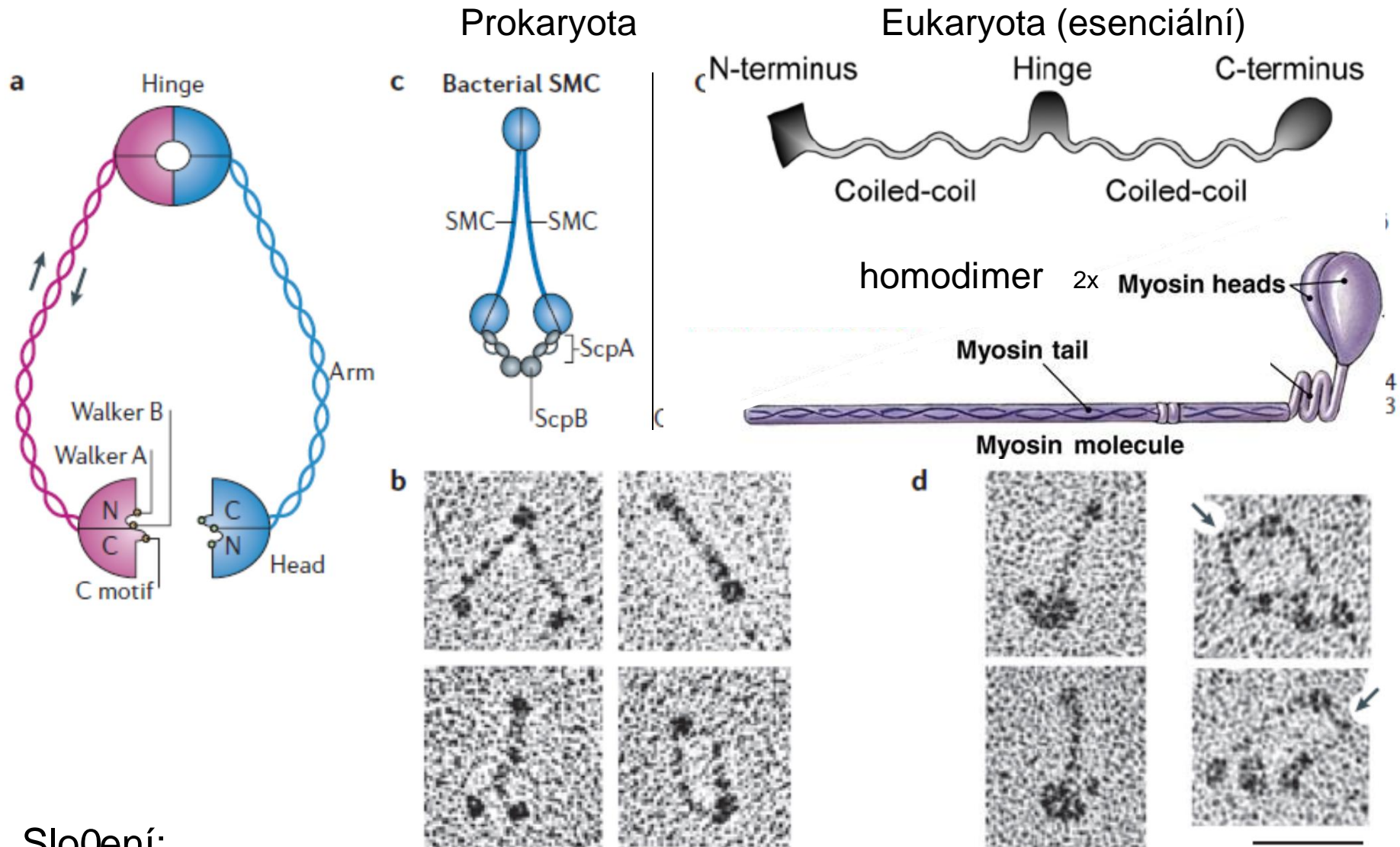
- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

- podílí se na regulaci segregace chromosomů a na opravě DSBs



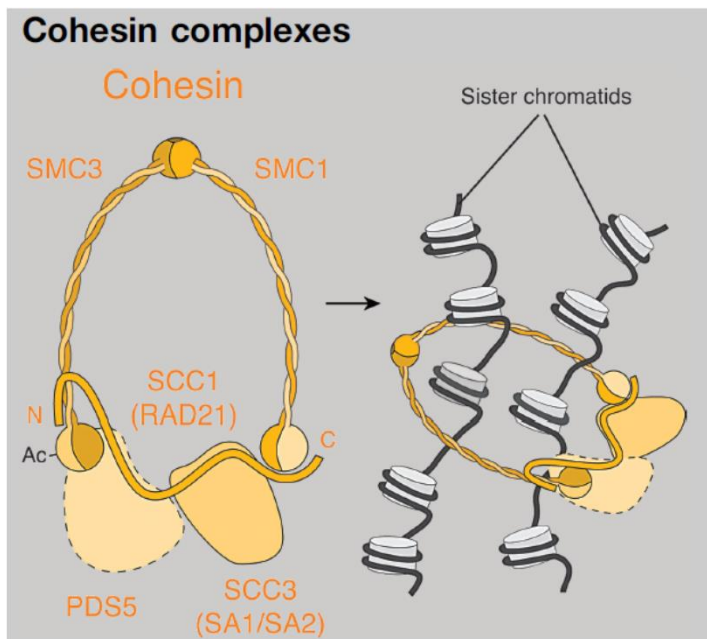
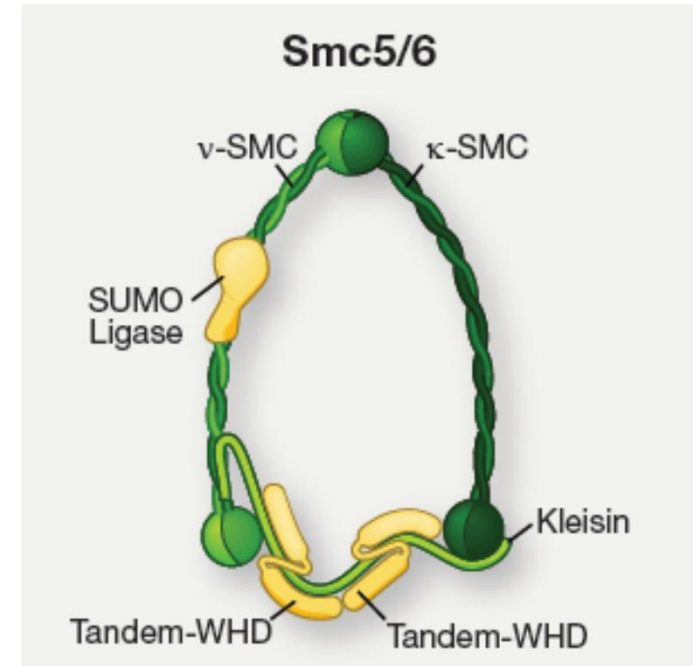
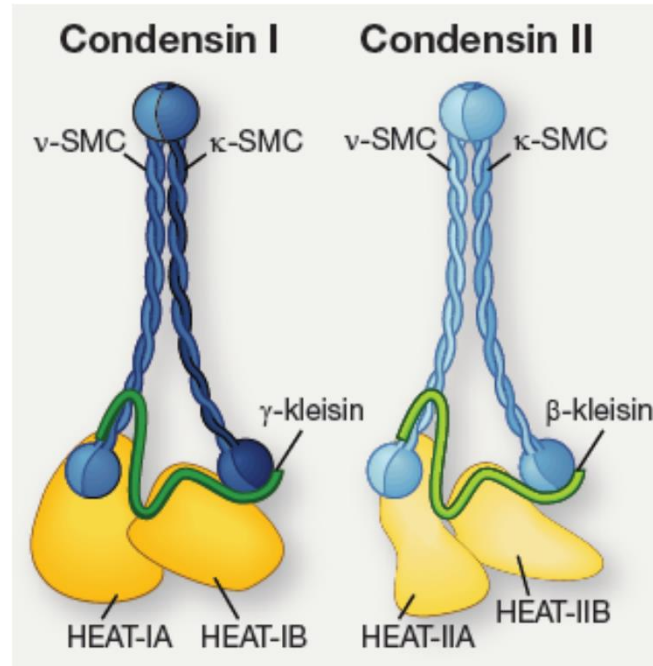
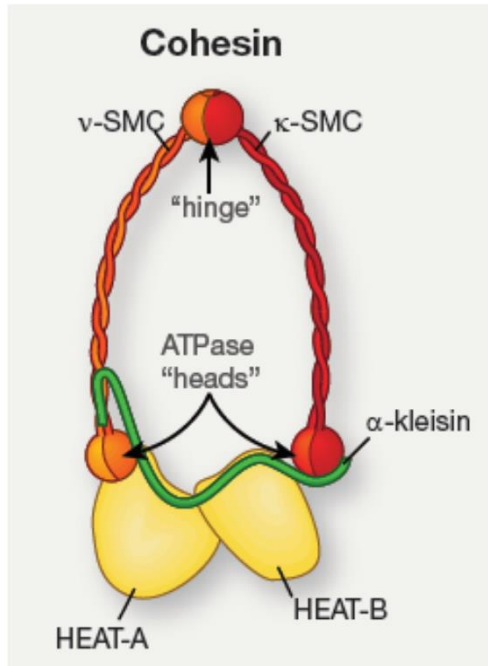
- složení SMC komplex
 - dlouhá ramena SMC, dimerizace přes hinge, ATPase heads přeměstňují ATP a kleisinovou podjednotkou
 - SMC proteiny vytvářejí kroužky, které drží DNA

Komplexy SMC



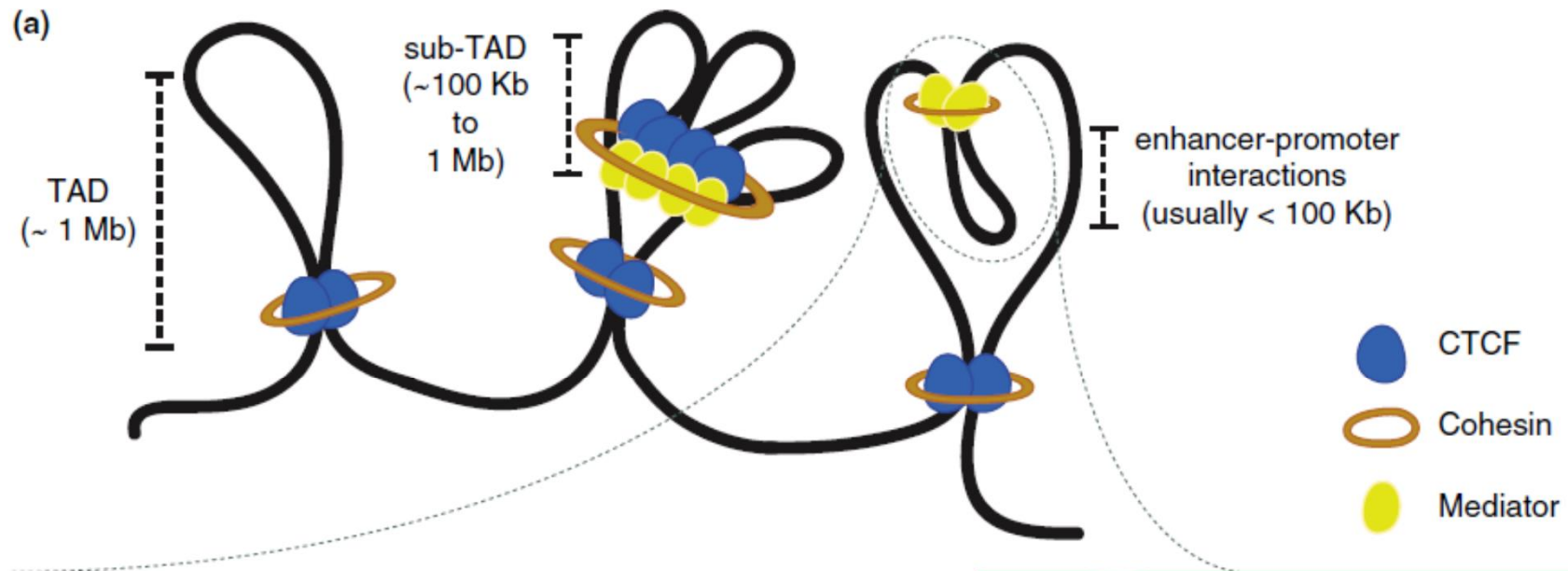
Slo0ení:

SMC dimery (homo- a hetero-) - konzervovan jzí (starzí) ne0 histony
non-SMC podjednotky (2 . 6)

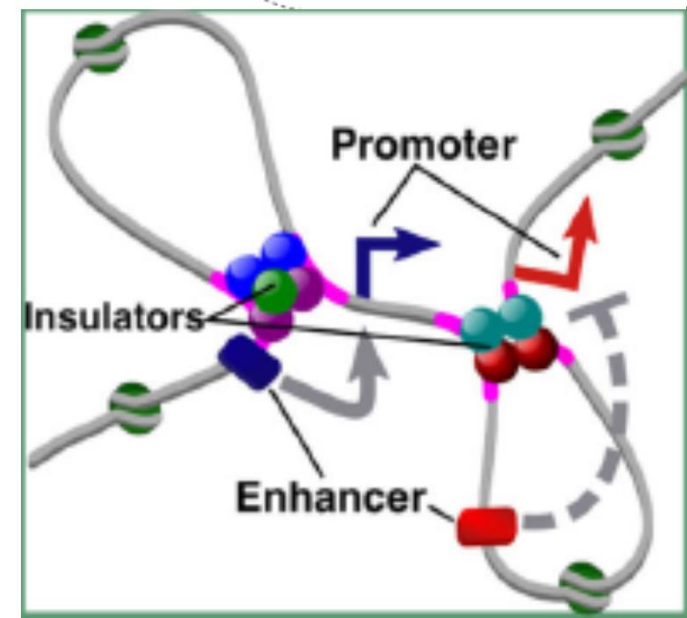


- nejlépe prostudovaný kohesin . objímá DNA . pojme 2 vlákna (chromatinová smy ka nebo sesterské chromatidy)

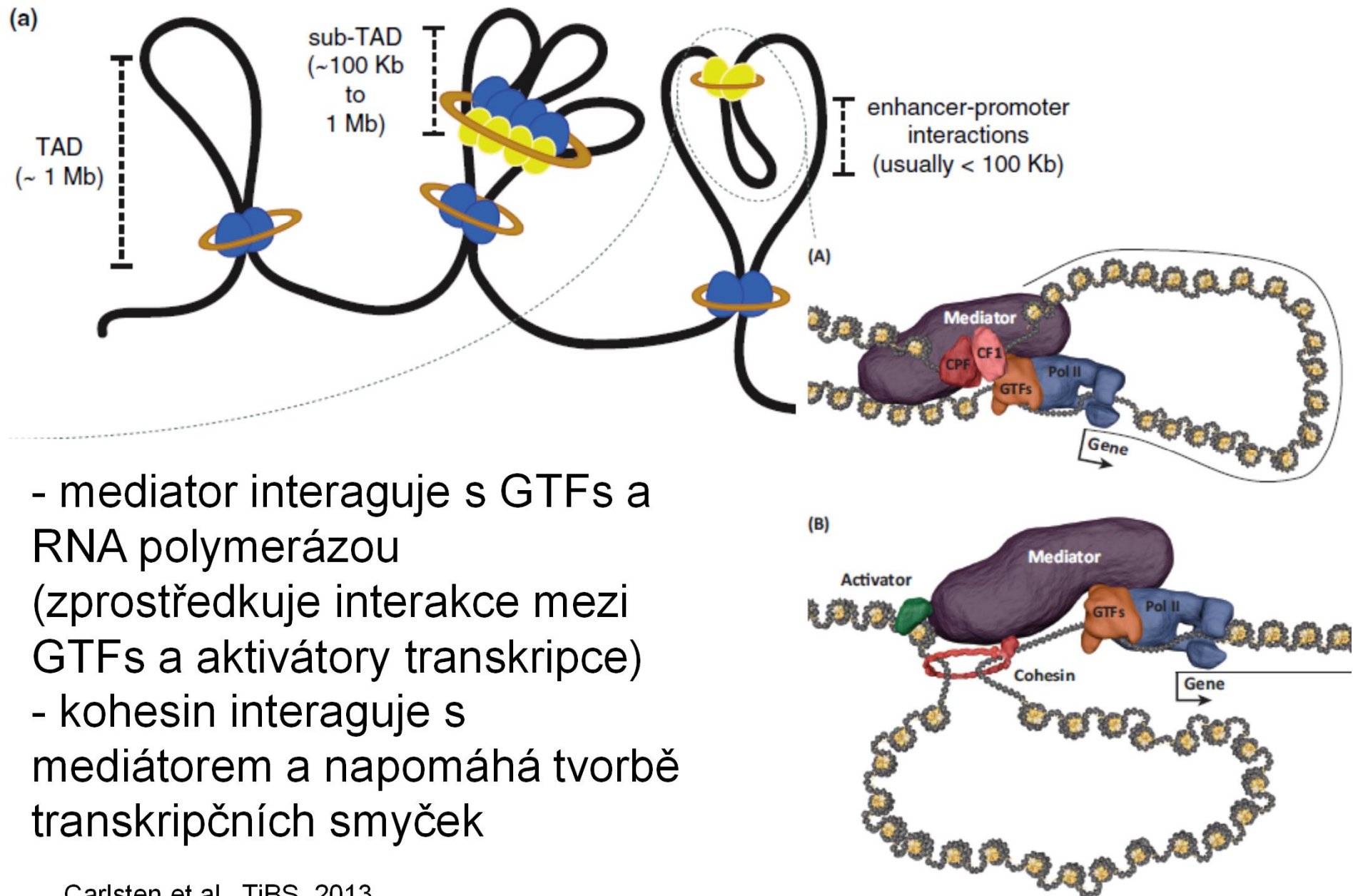
Kohesin interaguje s CTCF ě



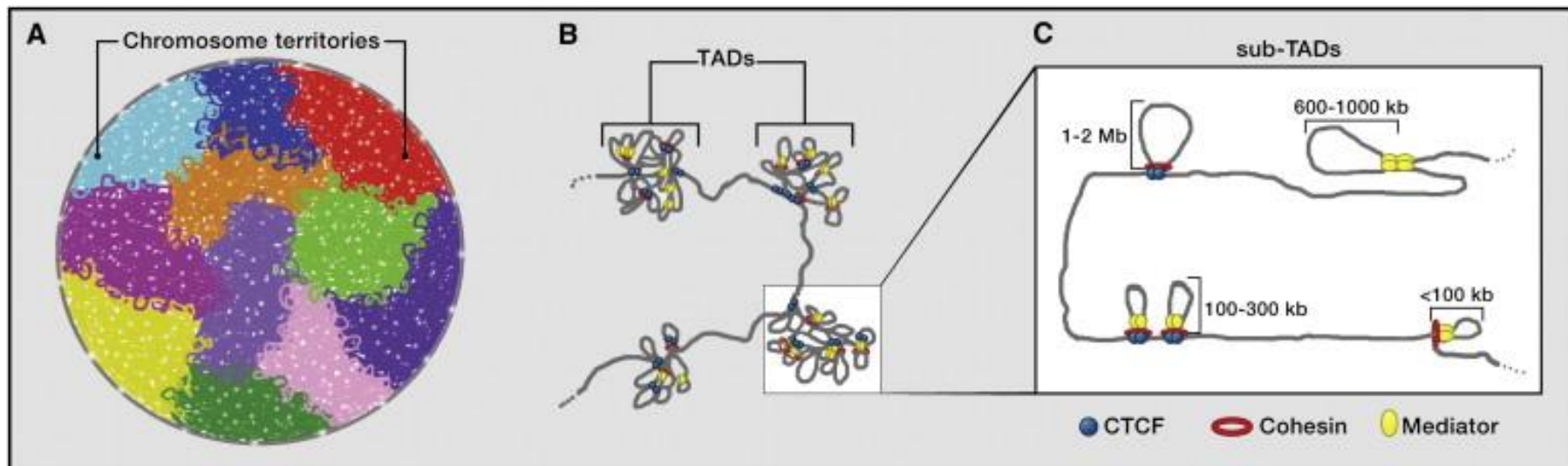
- CTCF izoluje transkripční faktory a reguluje transkripci
- interaguje s kohesinem a podílí se na utváření výzích chromatinových struktur



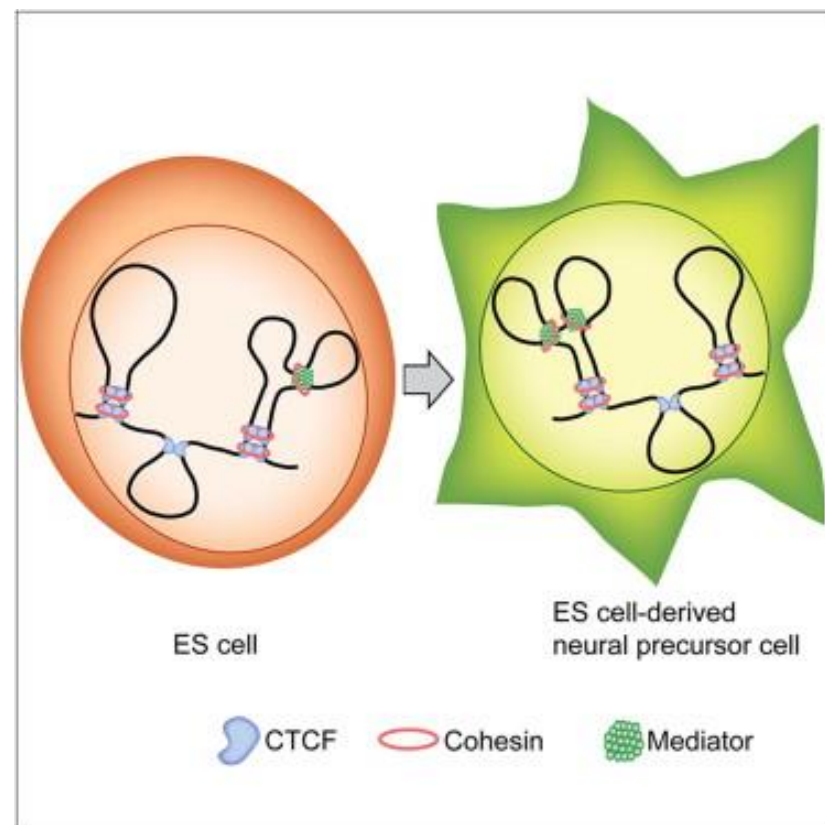
Cohesin a kohesin interaguje s mediátorem



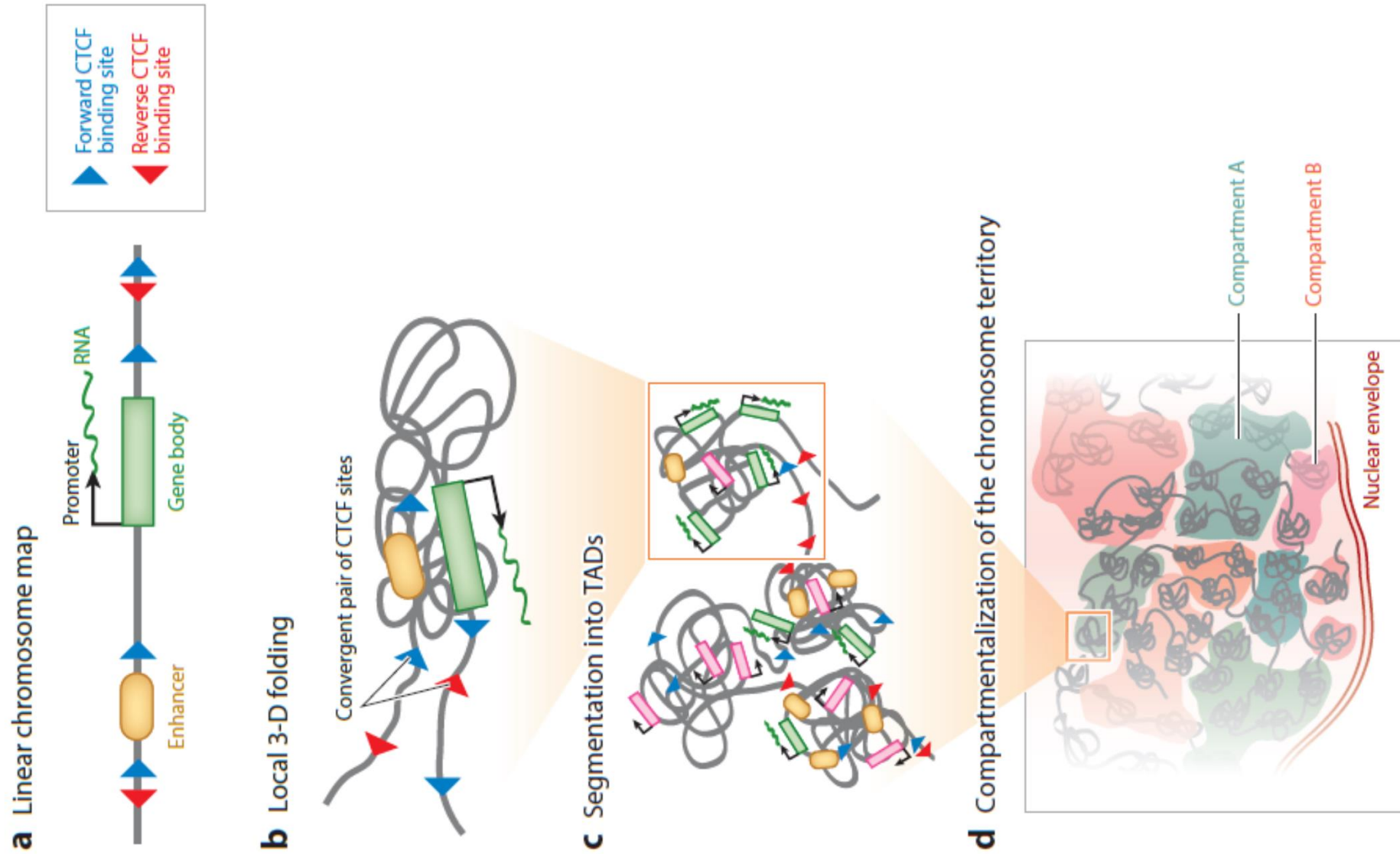
- mediator interaguje s GTFs a RNA polymerázou (zprostředkuje interakce mezi GTFs a aktivátory transkripce)
- kohesin interaguje s mediátorem a napomáhá tvorbě transkripčních smyček



- kohesin se podílí na regulaci cell-specific transkripce a chromatinové struktury (ukazuje se jak úzký vztah mezi těmito úrovněmi existuje)
- kombinace interakcí kohesinu s CTCF a mediátorem jsou klíčové pro buněčnou specifitu

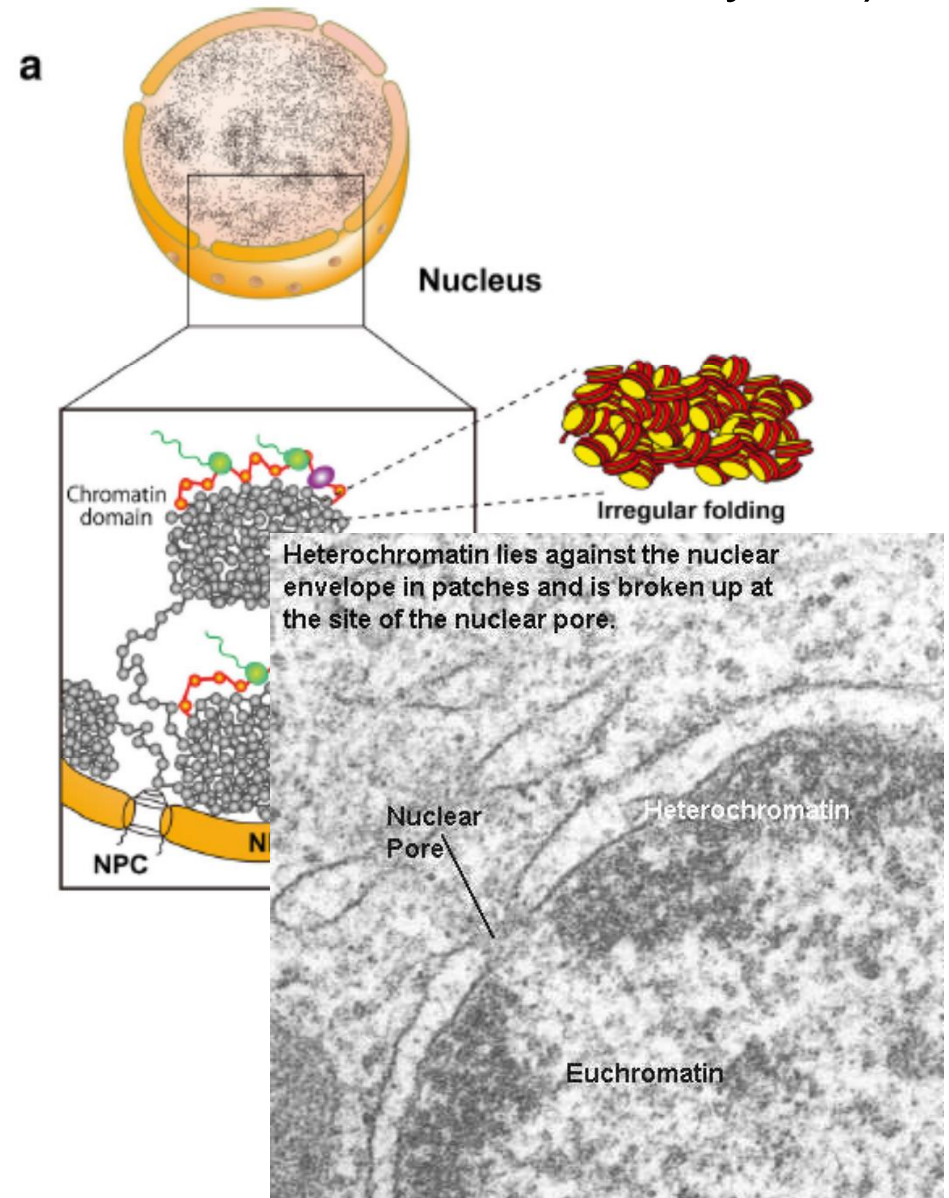
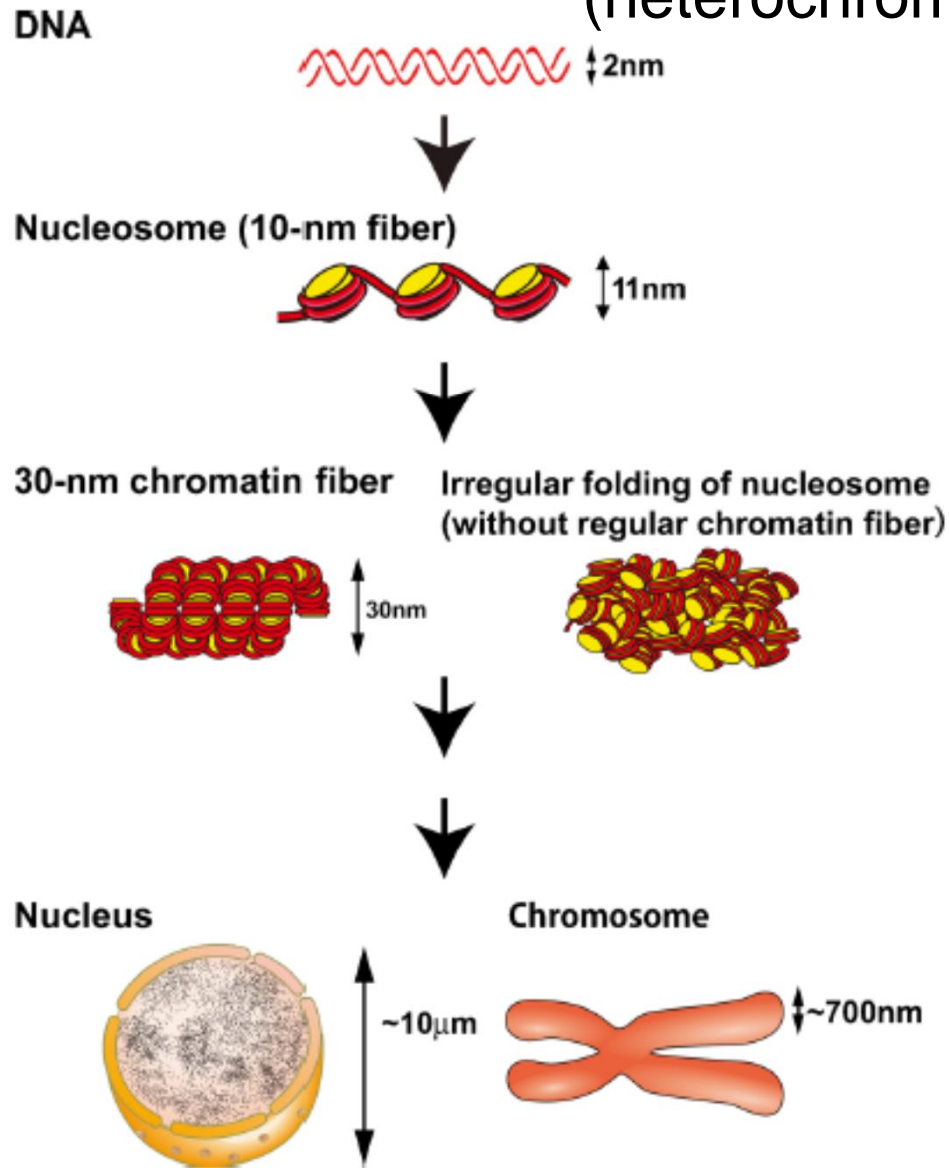


Bodnar & Spector, Cell, 2013
 Phillips-Cremins et al, Cell, 2013



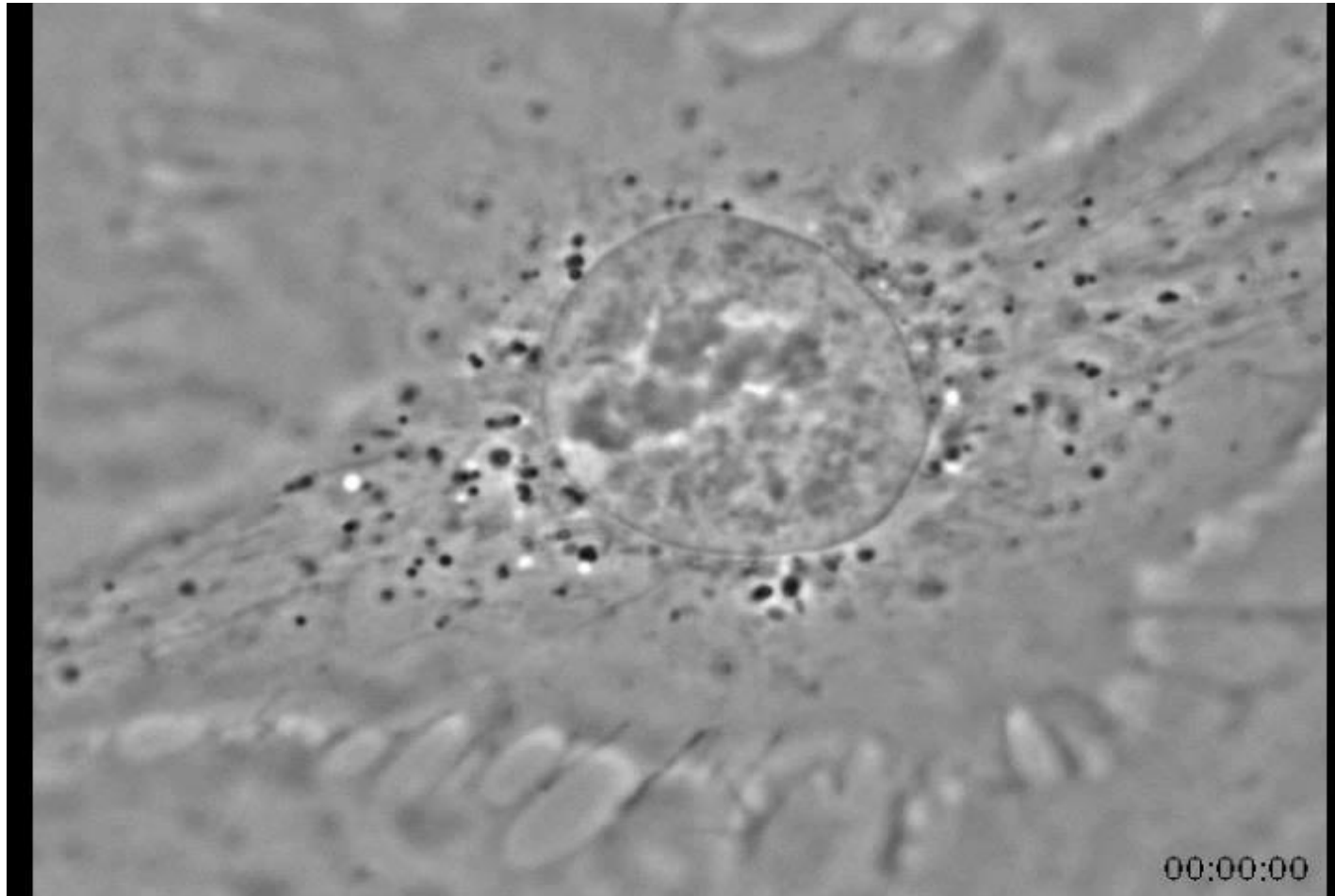
Struktura chromatinu je utvá ena mno0stvím smy ek a hierarchických domén (struktura interfázního chromatinu)

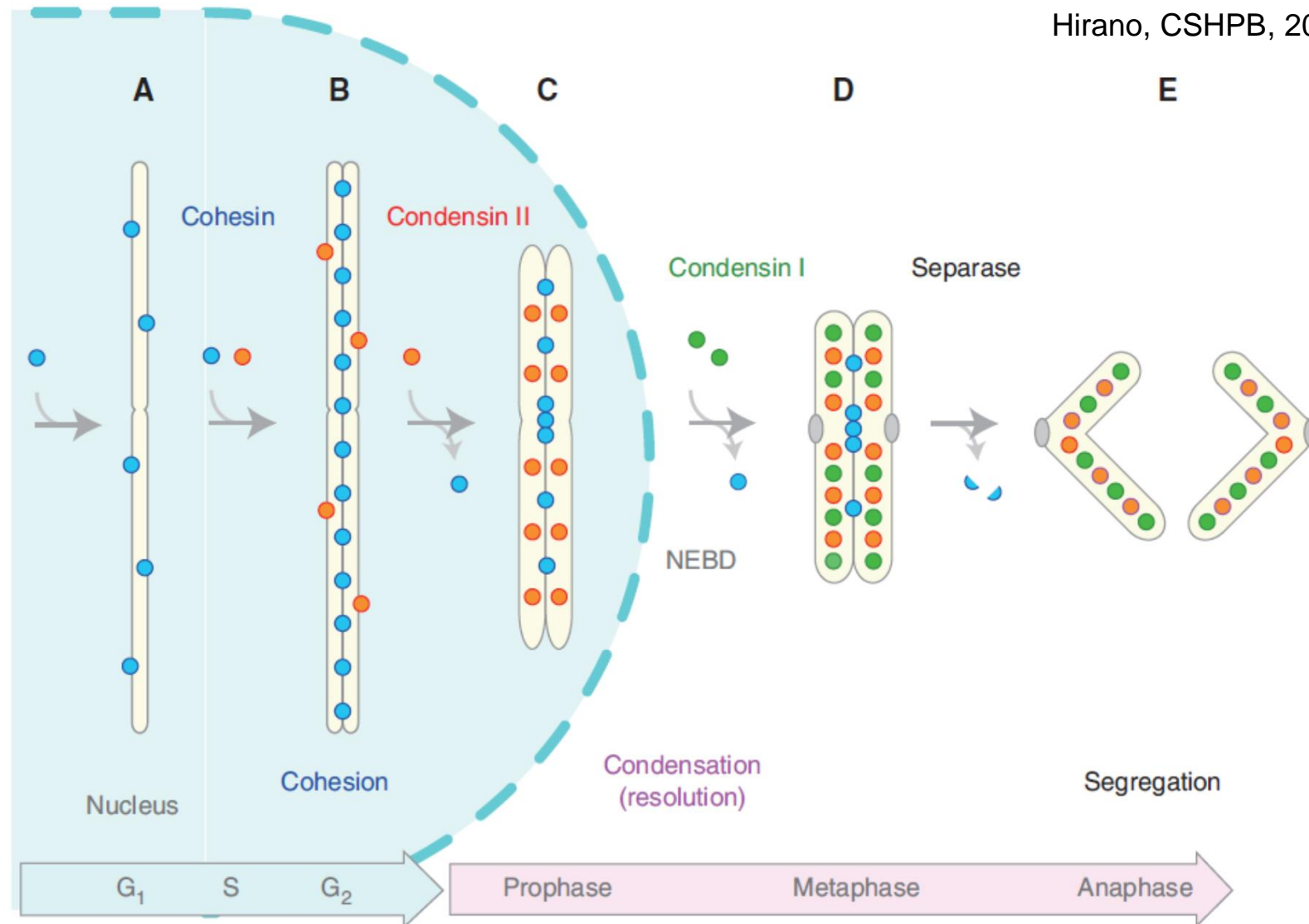
Chromatinové domény mají různou strukturu smyček a vláken.
 . lokalizace domén v prostoru jádra . ukotvení (heterochromatinu v blízkosti membrány NP)



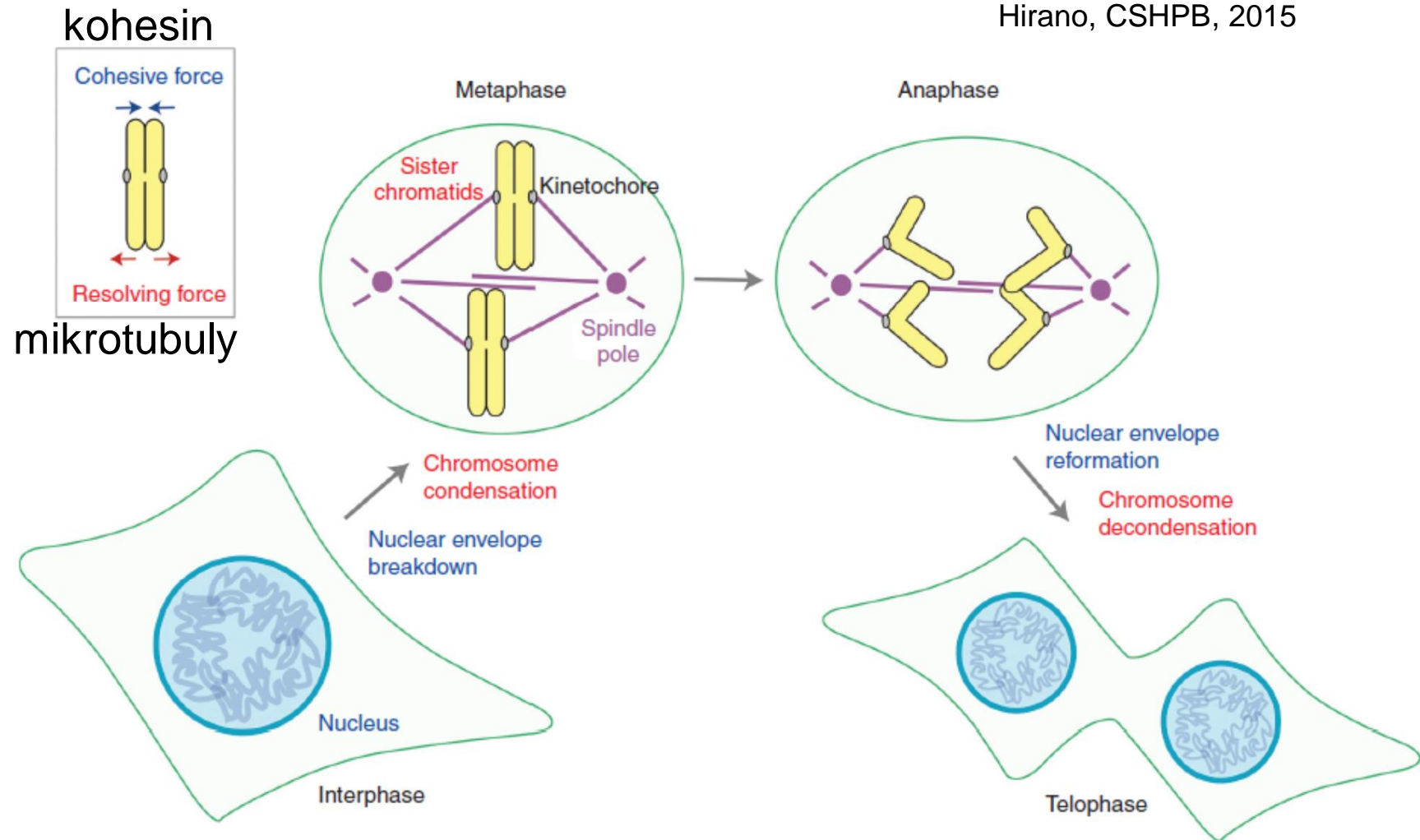
Dynamika chromatinu

Dr. Grobky



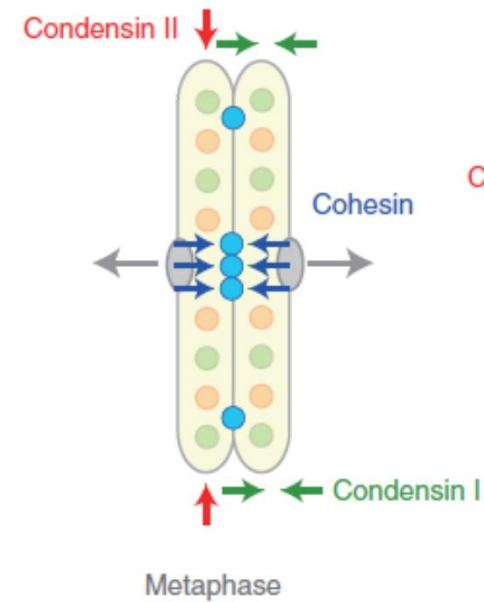
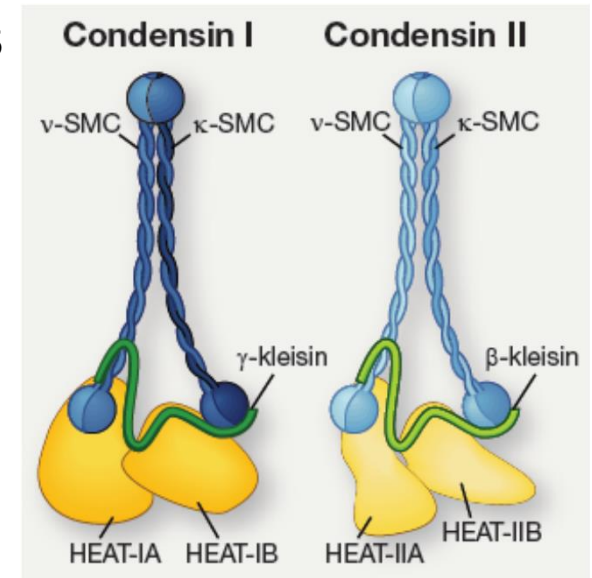
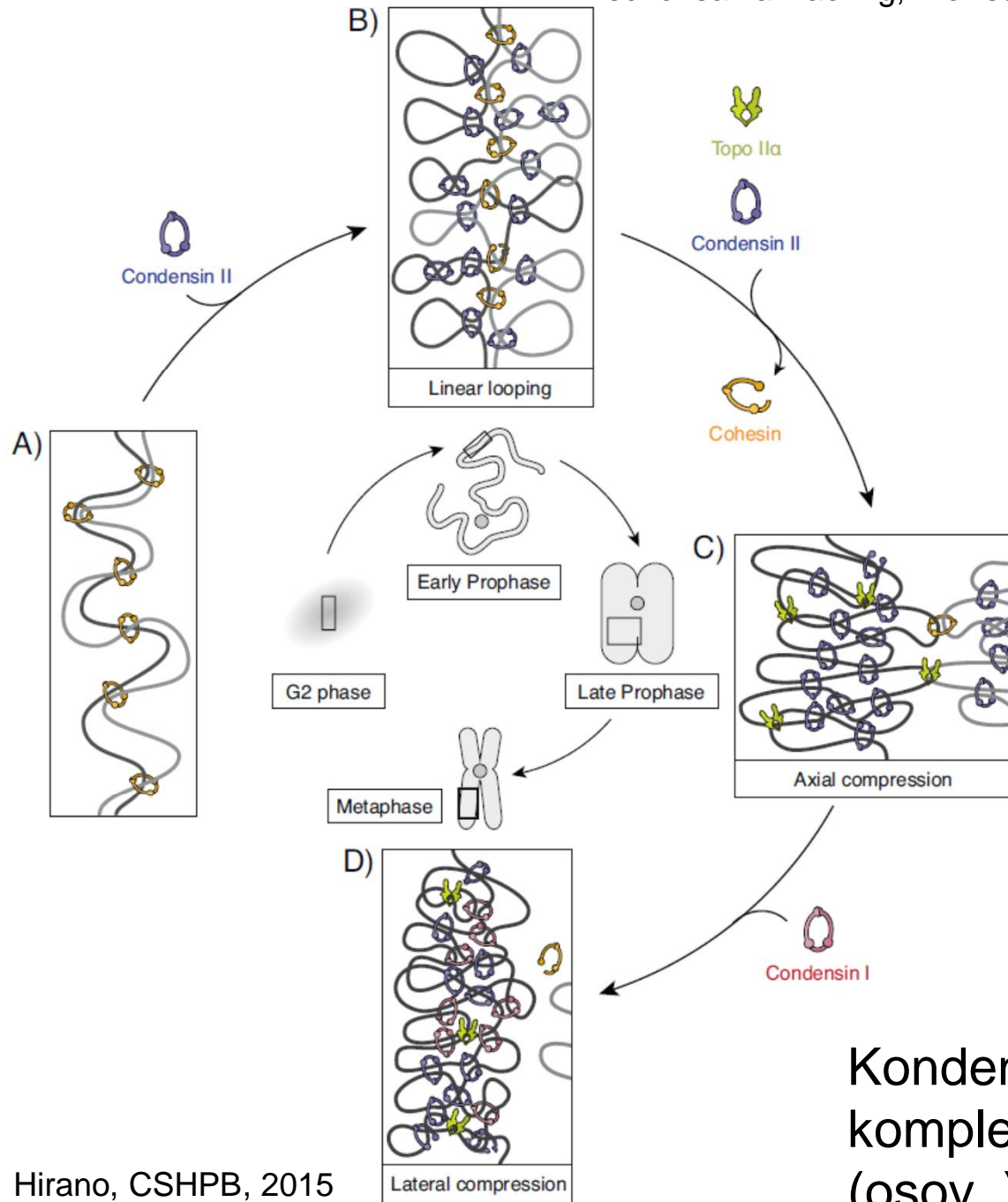


- kohesin a kondensin v průběhu buněčného cyklu (viz video) . kohesin drží sesterské chromatidy p i sobě . kondensin I a II vytváří kompaktní chromosomální struktury



- kohesin a kondensin v průběhu buněčného cyklu (viz video) . kohesin drží sesterské chromatidy p i sobě . kondensin I a II vytváří kompaktní chromosomální struktury

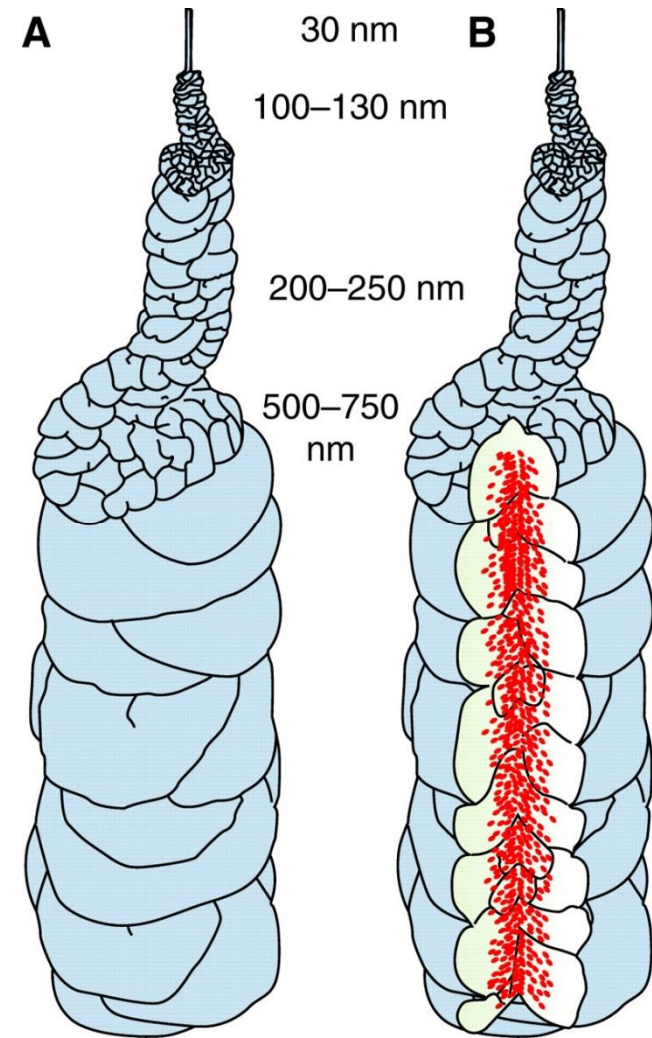
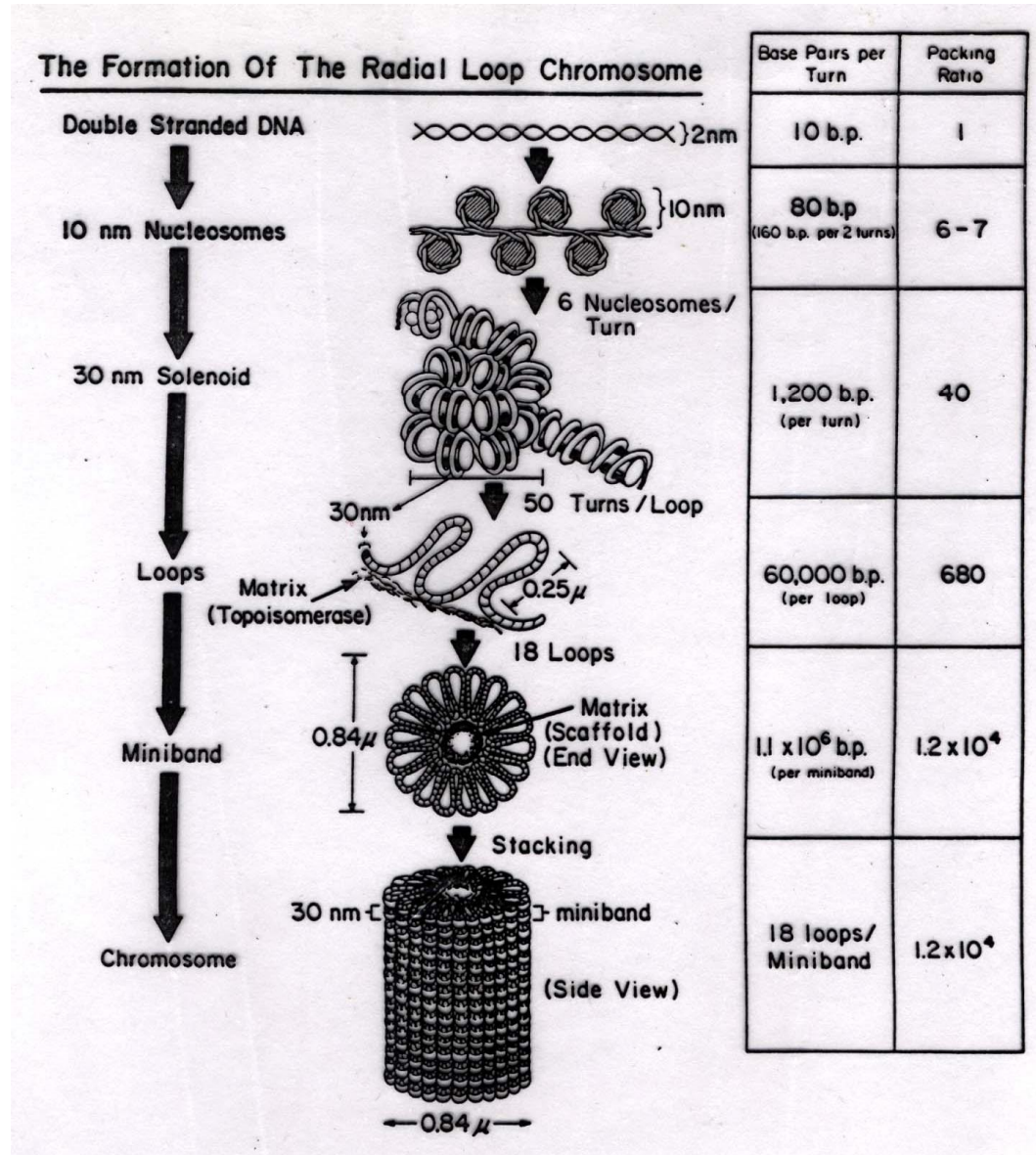
Kschonsak a Haering, BioEssays, 2015

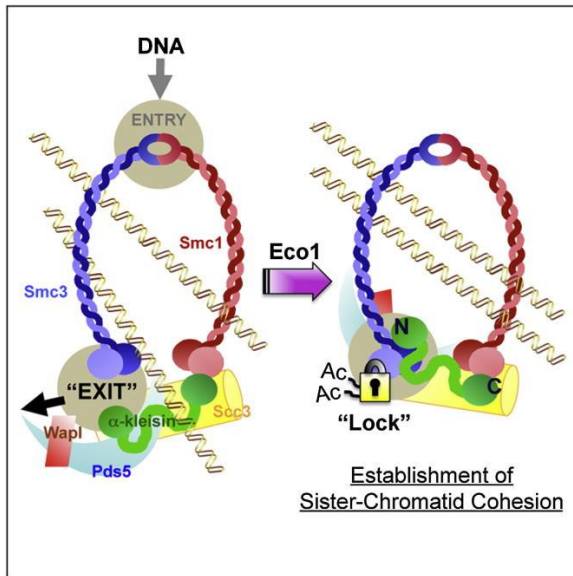


Hirano, CSHPB, 2015

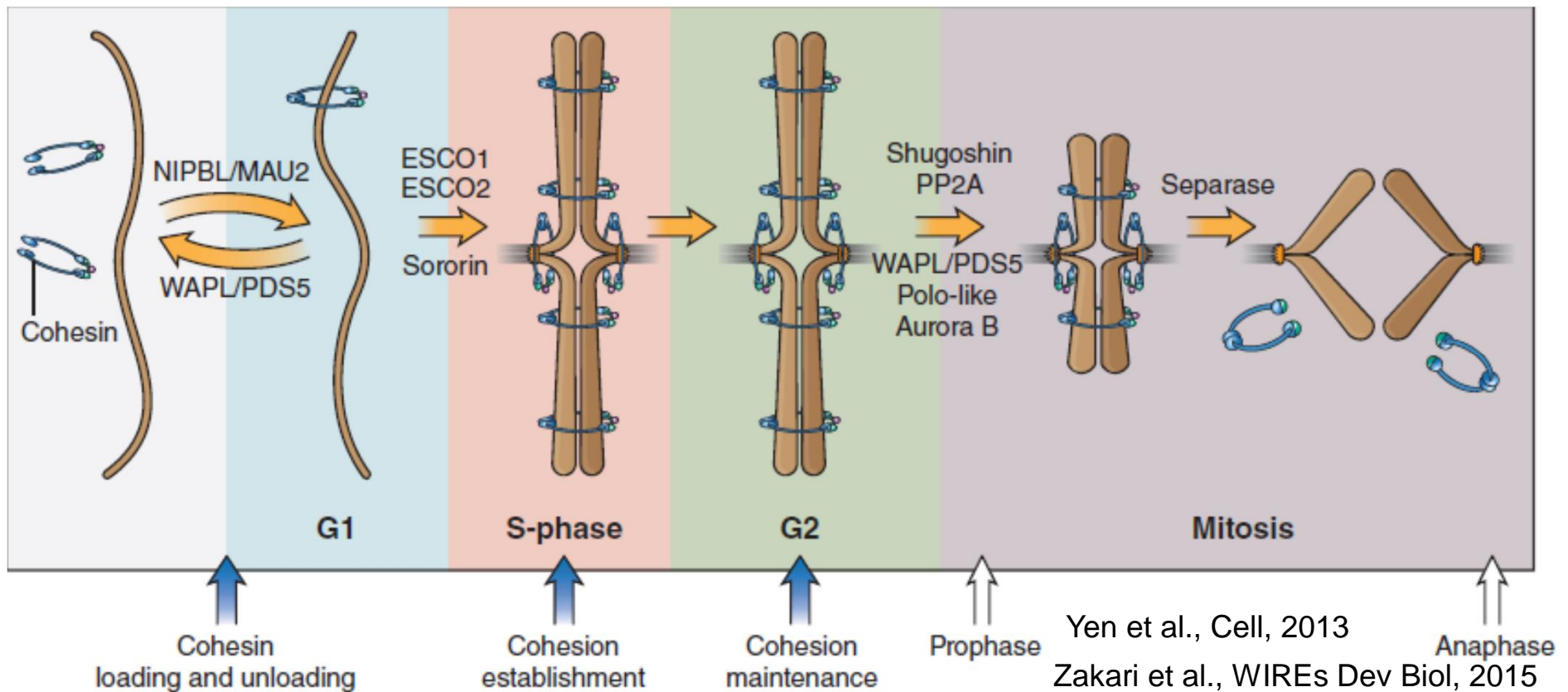
Kondensin I sru0uje%zatímco
komplex II kondensuje podéln
(osov)

Kondensin tvoří centrální osu (červená) . organizuje nepravidelné smyčky chromatinových vláken



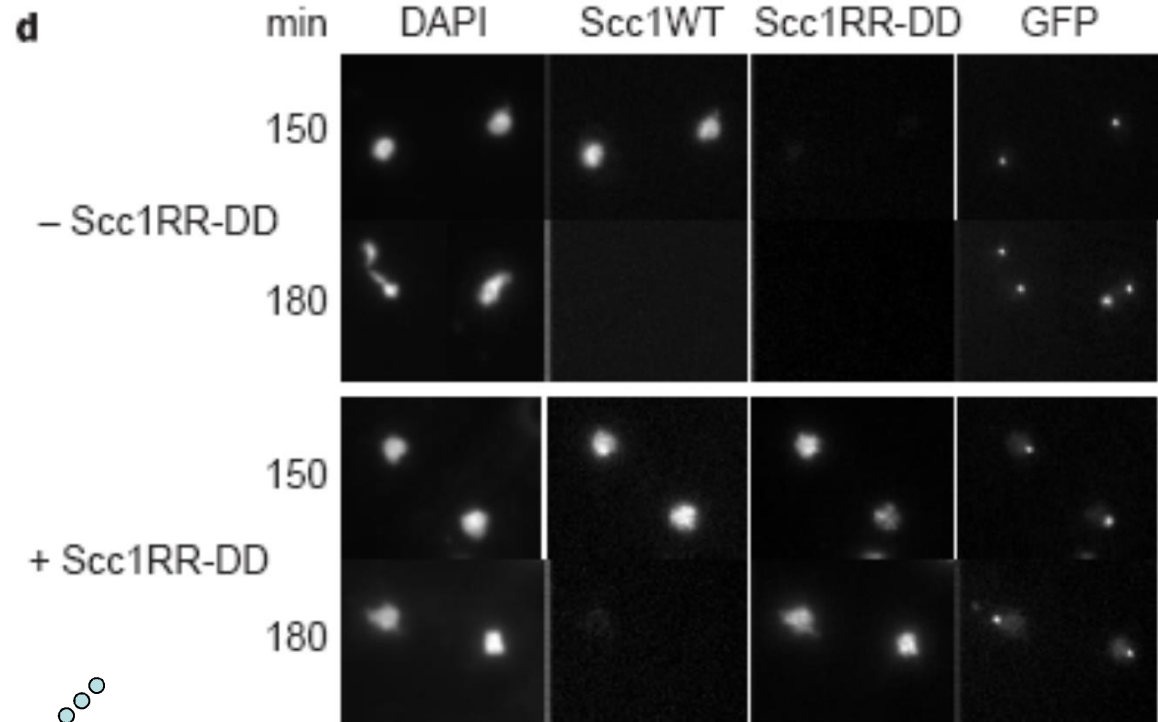
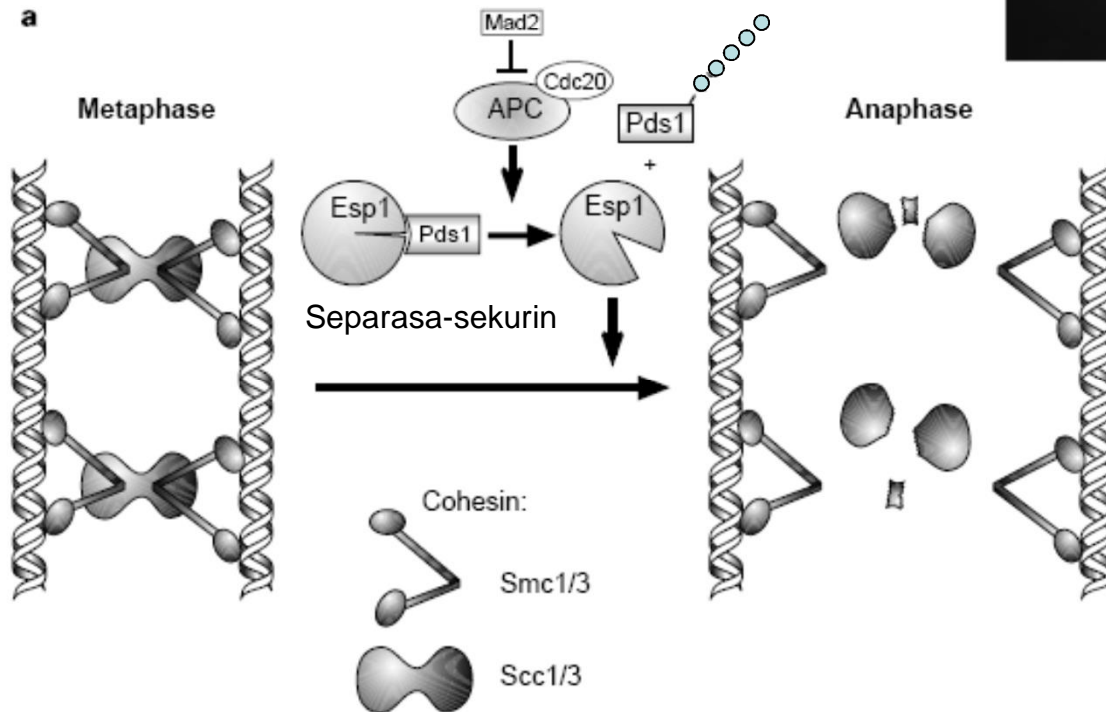


- na navle ení kohesinu na DNA a jeho stabilizaci se podílí mnoho faktor (loading faktor NIPBL/MAU2, acetylace ESCO1)
- kohesin je odstraněn z ramen při kondenzaci, ale na centromerách ho chrání shugoshin
- v anafázi je otevřen separasou



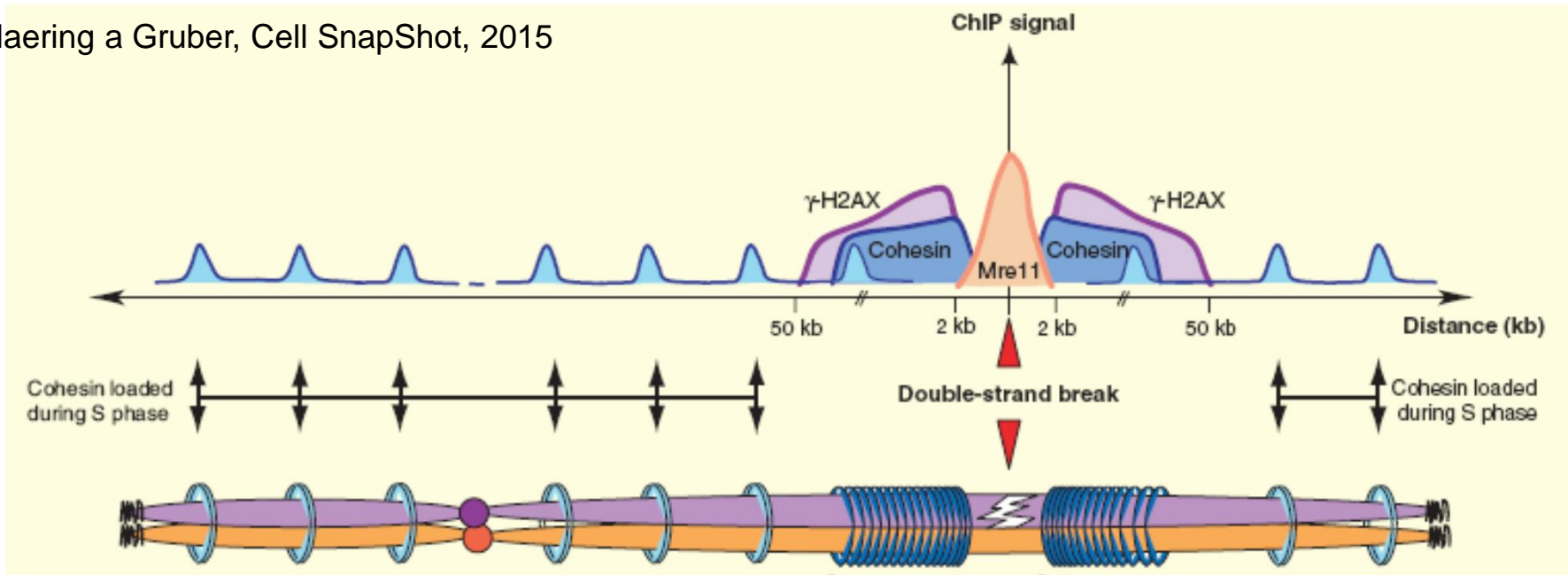
1. model segregace chromosomů (*S. cerevisiae*)

APC=anaphase promoting complex

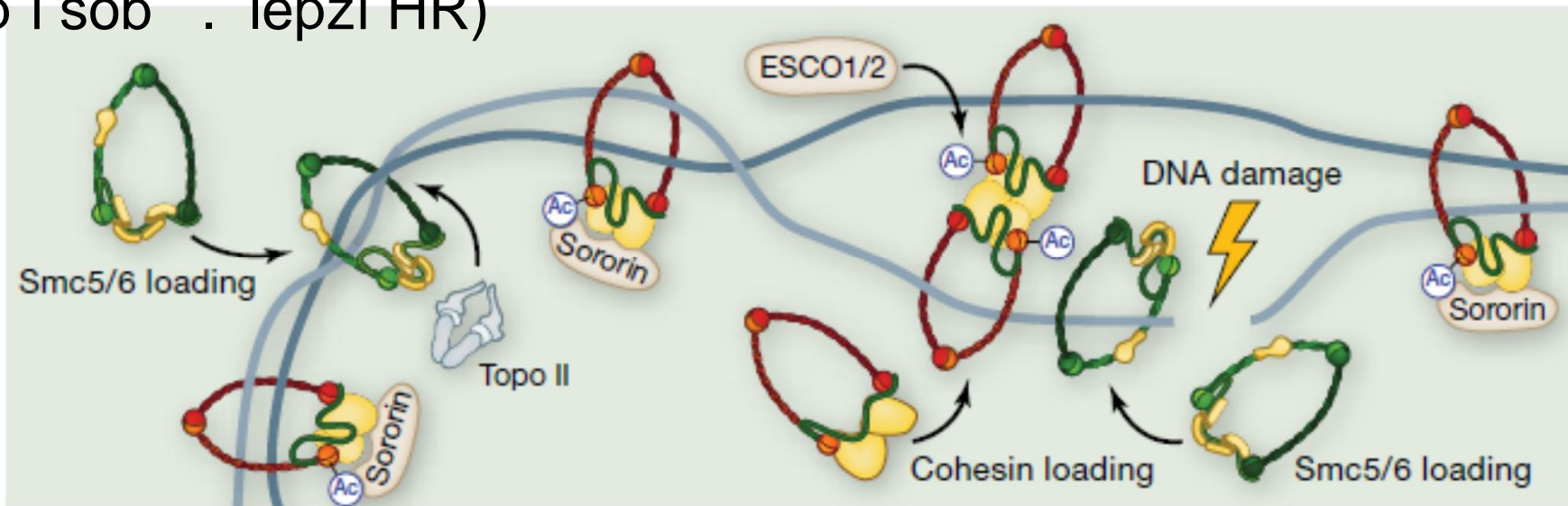


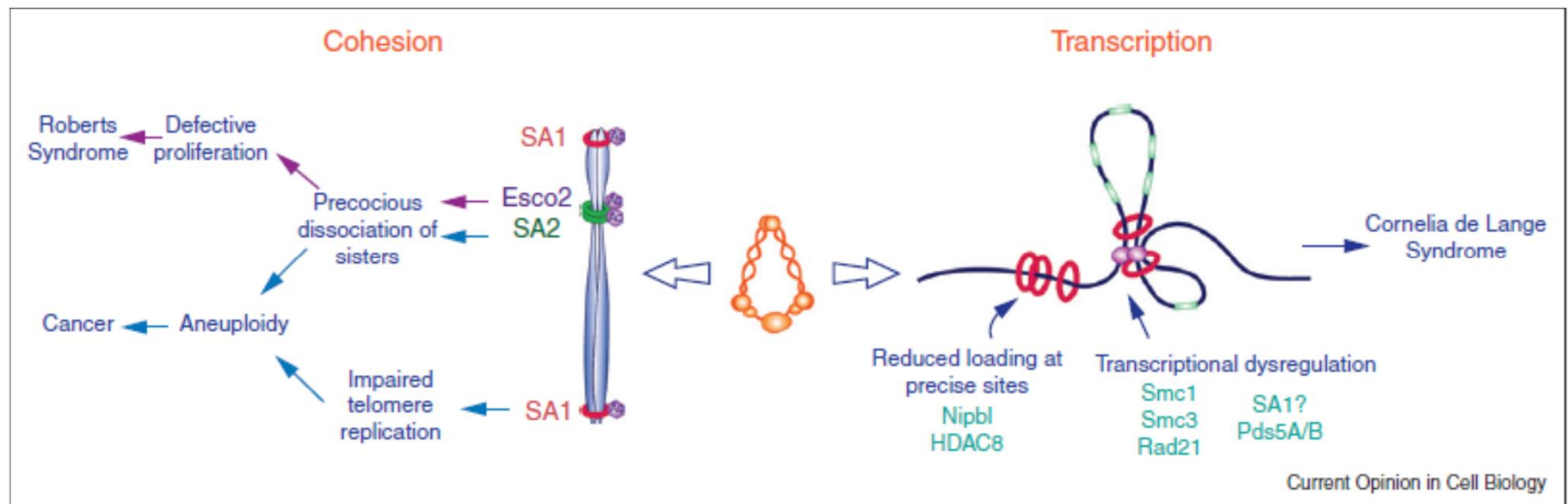
Komplex Mad2/Cdc20 inhibuje APC . po jeho uvoln ní degraduje (ubiquityluje) sekurin . uvolní se tak separasa . zt pí Scc1 kleisin kohesinového komplexu

Haering a Gruber, Cell SnapShot, 2015



Kohesin a SMC5/6 napomáhají p i oprav dvou- et zcových zlom v G2/M fázi (kohesin dr0í homologní sesterské chromatidy p i sob . lepzí HR)



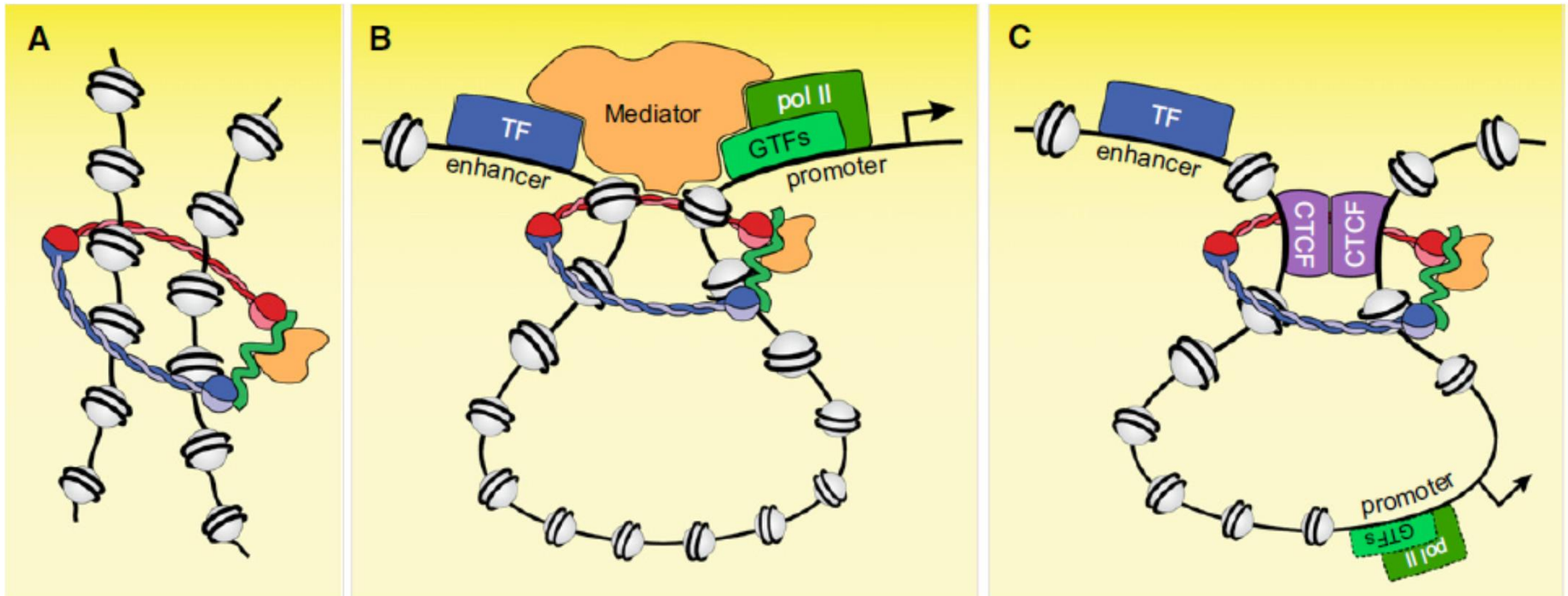


Remeseiro & Losada, CO in Cell Biol, 2012

Mannini et al, Hum Mut, 2013

mutace podjednotek kohesinu a jeho regula níh faktor zp sobují kohesinopatie (nap . Cornelia de Lange syndrom = transkrip ní defekt) a r zné typy nádor (defekt segrega ní . 95% nádor je aneuploidních)





mutace v mediatoru:
 mental retardation syndroms
 (FGS/Opitz-Kaveggia S.,
 Lujan-Fryns S., schizophrenia)

Cuylen & Haering, Cell Stem Cell, 2010



Kim Peek (Rain Man)