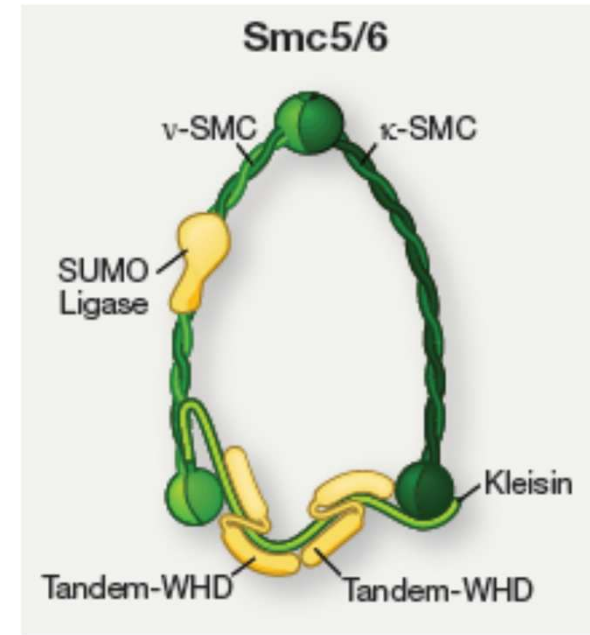


Zkouška: - test + přednáška

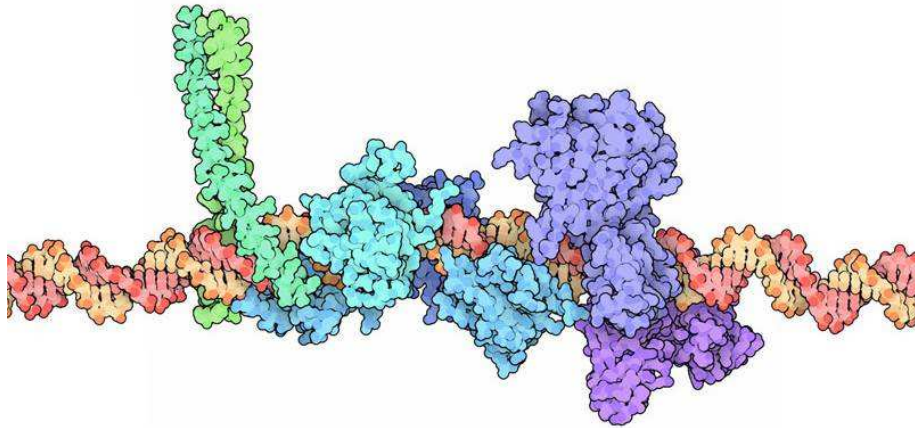
- Úvod - Analýza proteinu
 - Domény
 - fold-struktura (ss, PDB)
 - v PyMolu připravit 3D strukturu
 - Interakce (IntAct)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - evoluce
- Konkrétní nová data – článek (< 5 let)



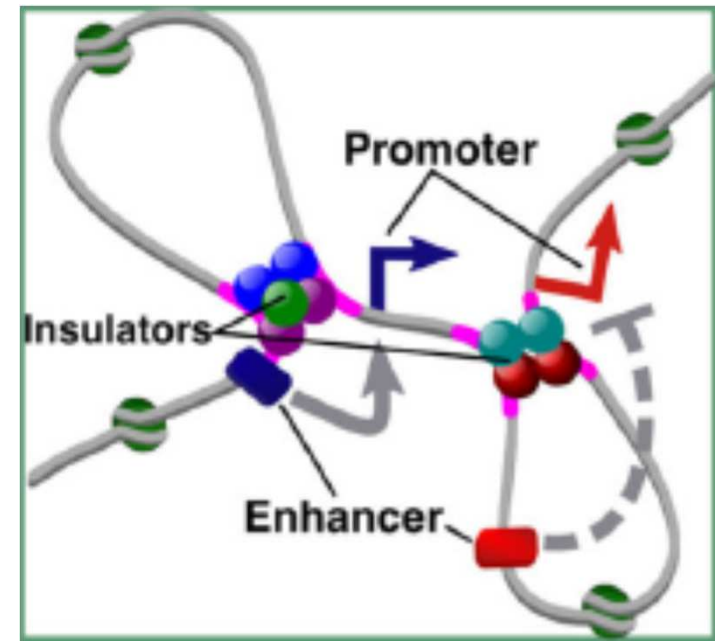
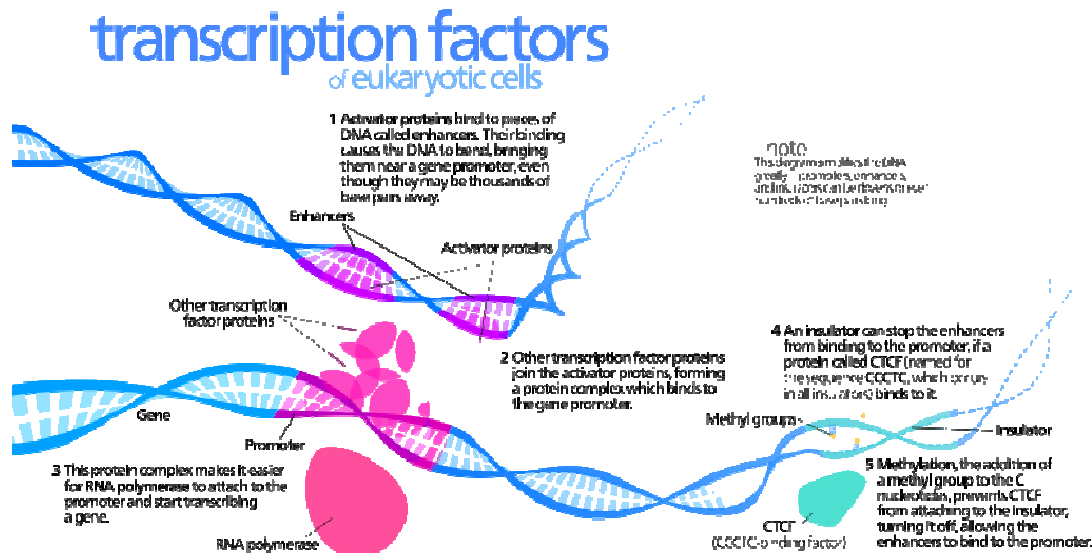
Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

Komplexy spojené s transkripcí

DNA-vazebné motivy specifických transkripčních faktorů
Obecné TFII komplexy, histon ... a proces transkripce

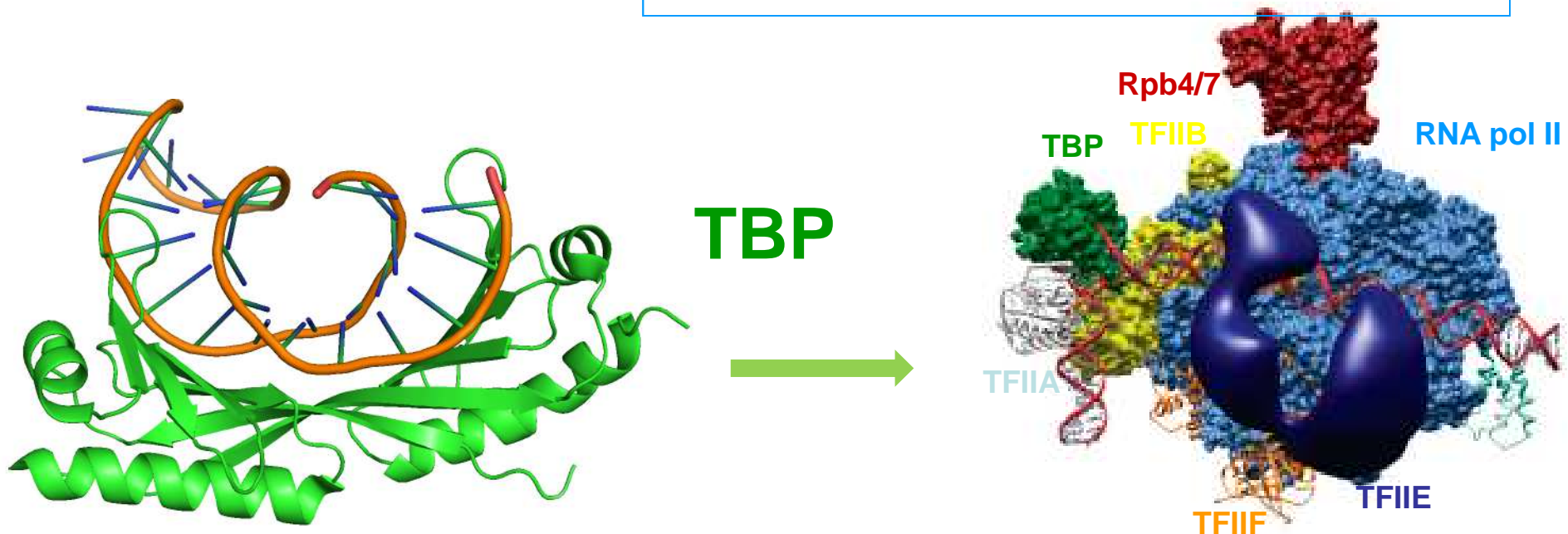


- velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- nejčastěji interaguje Arg (pozitivní náboj + vodíkové vazby)

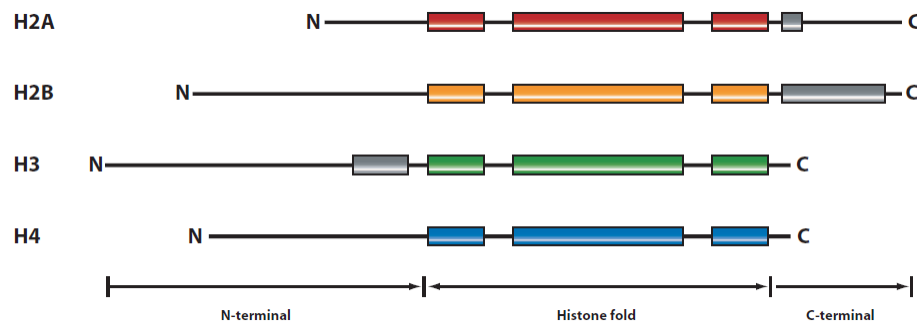


- Zipper typ
- Helix-turn-helix
- Zinkový prst
- **Histon, HMG-box**
- **β -barrel**
- β -hairpin/ribbon
- Smíšené α/β

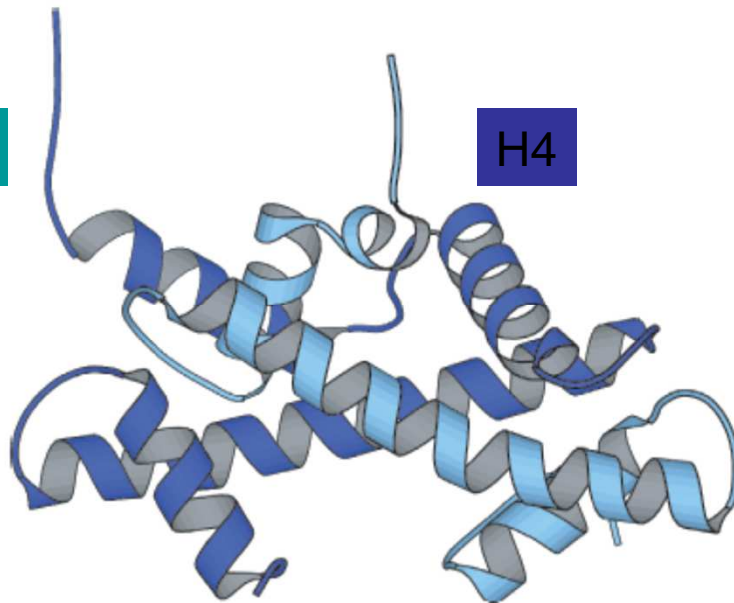
- Velký žlábek má velikost odpovídající rozměrům α -šroubovice a má exponované vazebné skupiny
- Nejčastěji interaguje **Arg** (pozitivní náboj + vodíkové vazby)
- **Průběh transkripce – skládání komplexů**



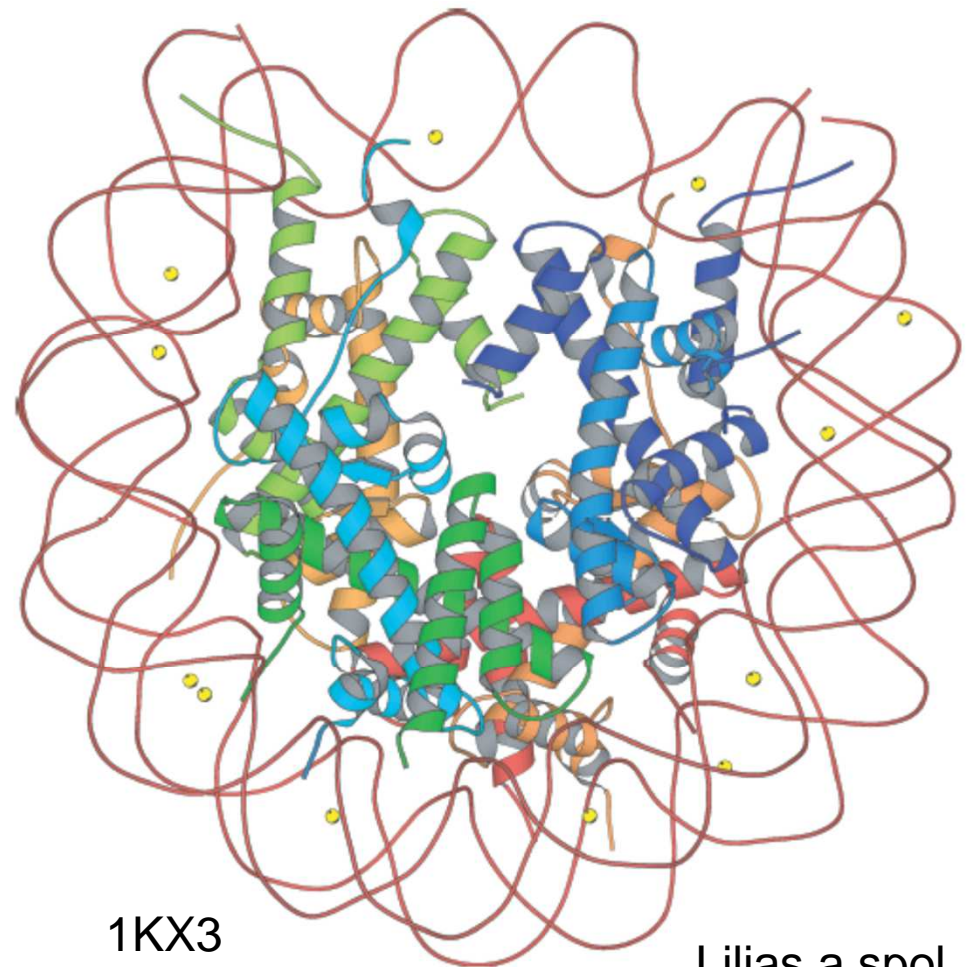
- **histony** vážou DNA sekvenčně nespecificky
- histonové podjednotky (H2A, H2B, H3, H4) obsahují svazky 3-4 šroubovic skládaných proti sobě (histon fold)
- DNA se obtáčí kolem válcovitého oktameru (2x4 histony)
- šroubovice se vážou na cukrfosfátovou kostru DNA



H3



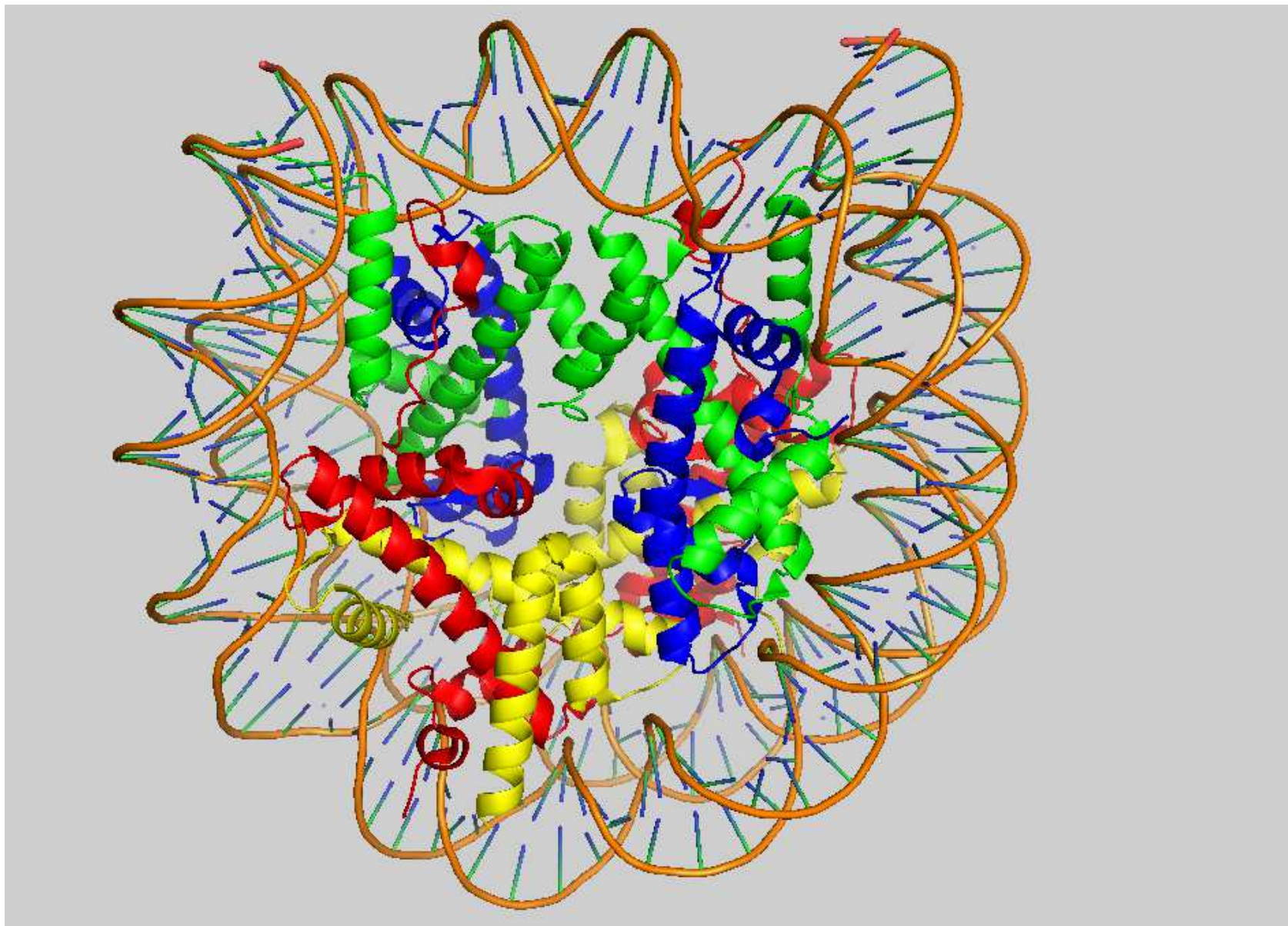
H4



1KX3

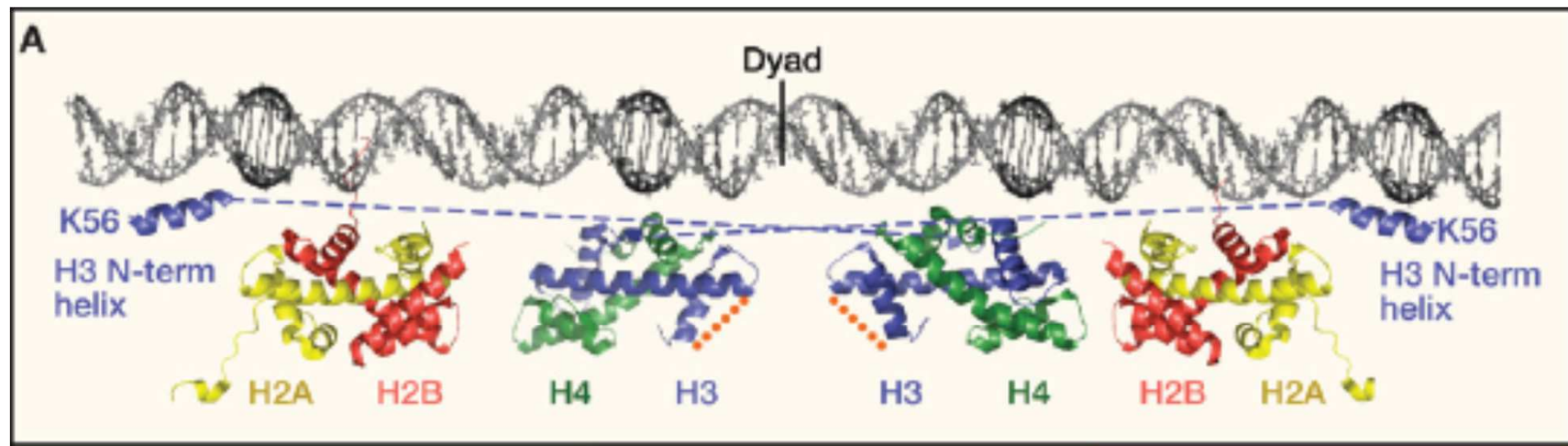
Liljas a spol.

1KX3

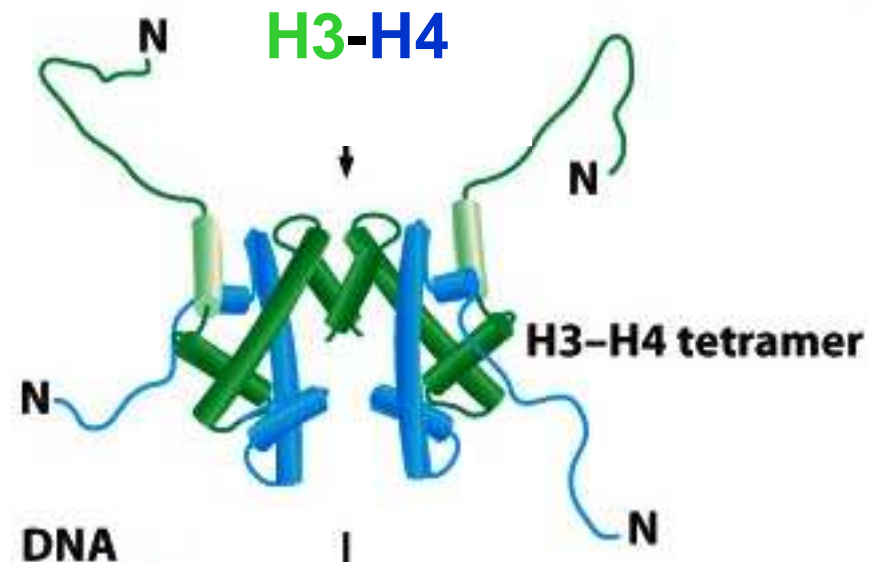


- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3

Skládání histonů do nukleosomu



- 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:

klíčová interakce mezi dvěma H3-H4 dimery je zprostředkována histonem H3

Dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru (H3-H4)₂

H2A/H2B

Povrch/kontakt tvoří lysiny a argininy

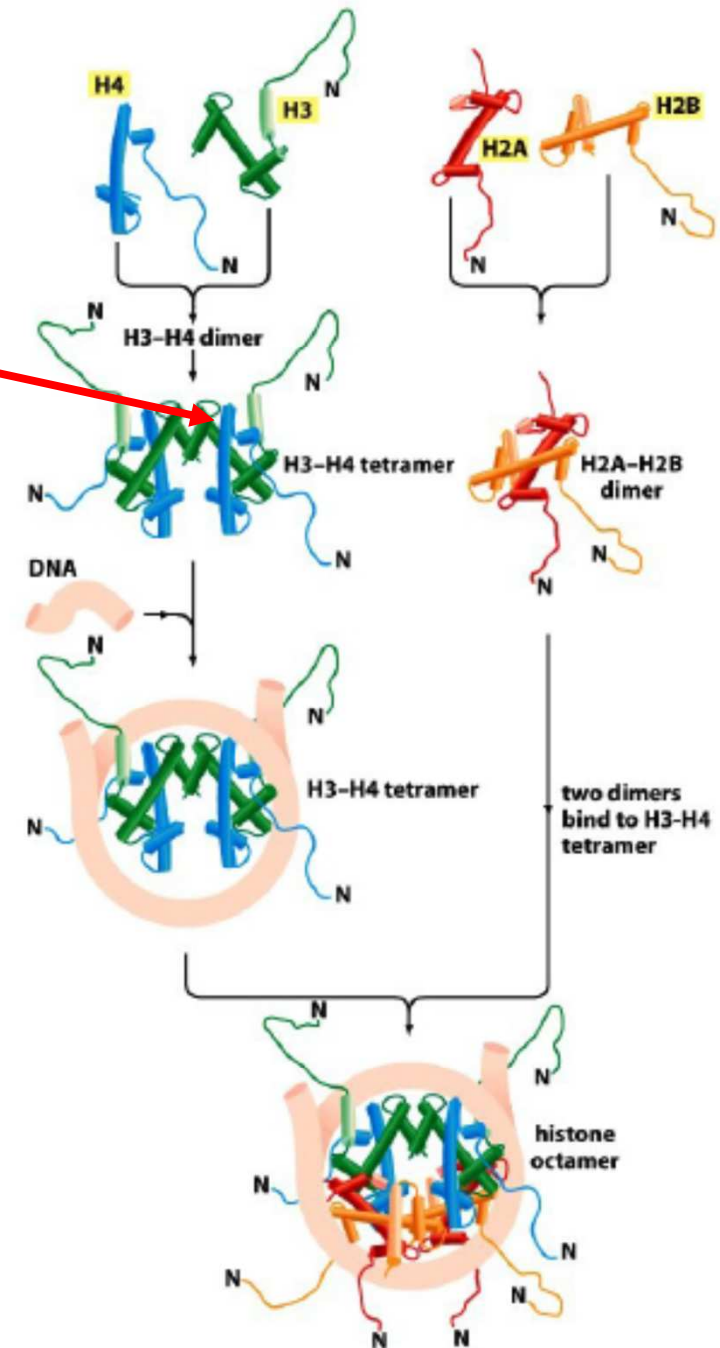
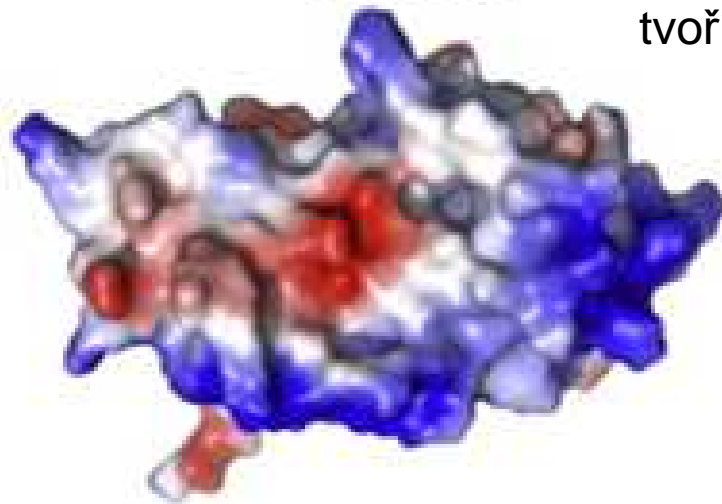
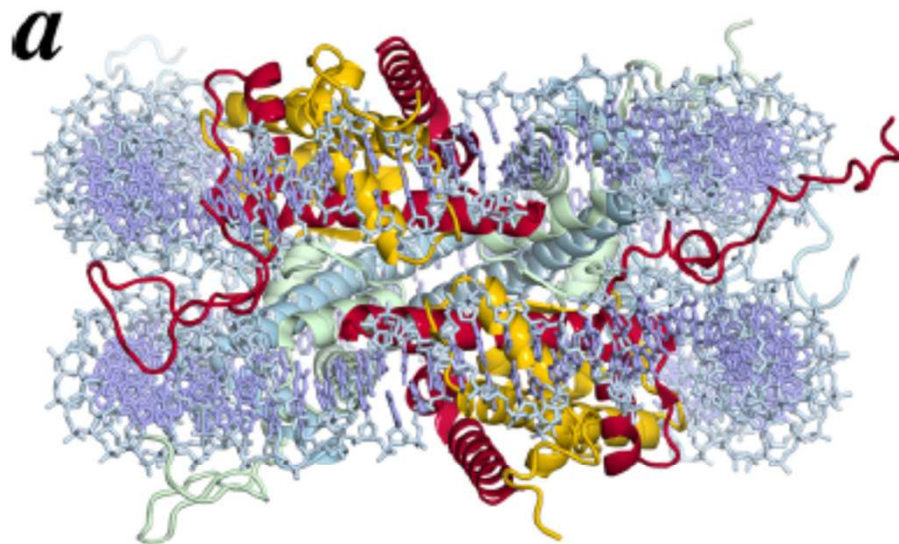
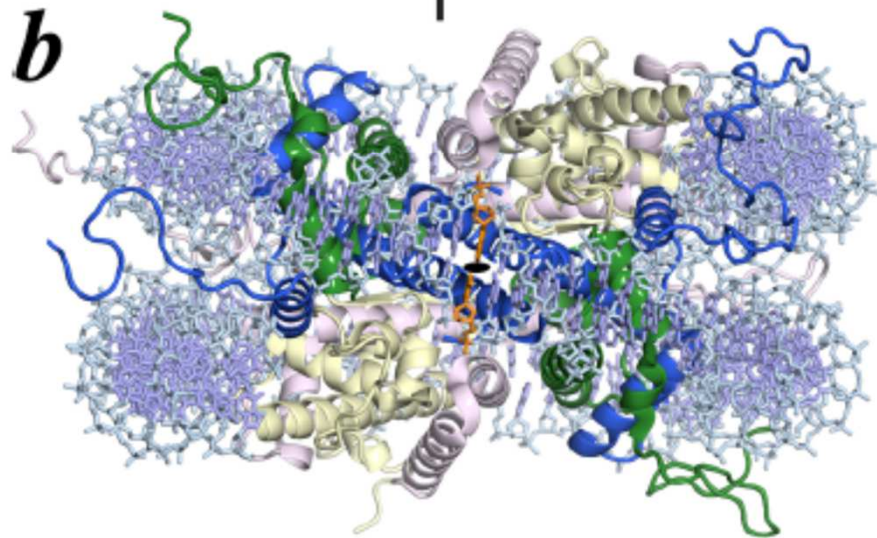


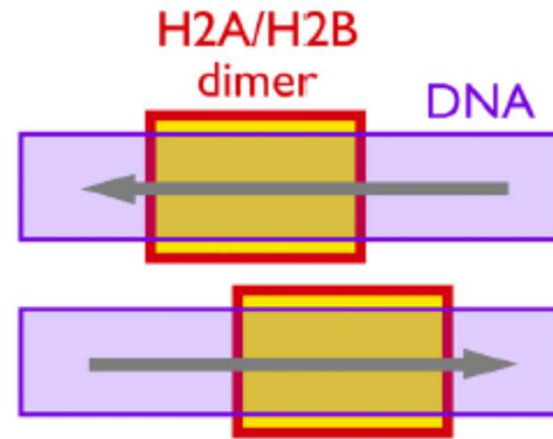
Figure 4-26 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



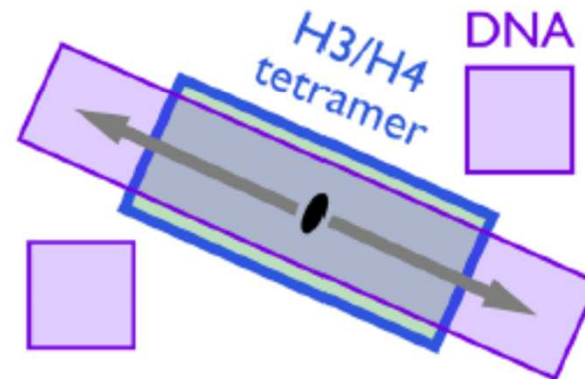
■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA



■ H3 ■ H4 ■ H2A ■ H2B ■ DNA



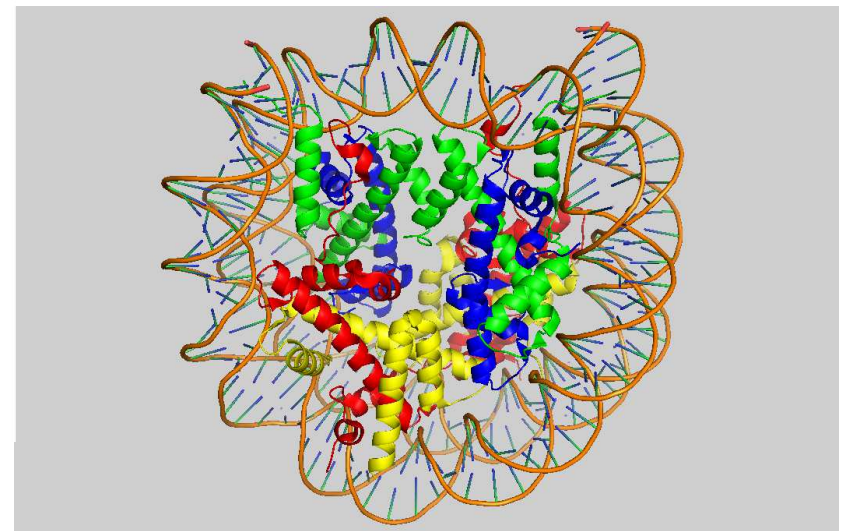
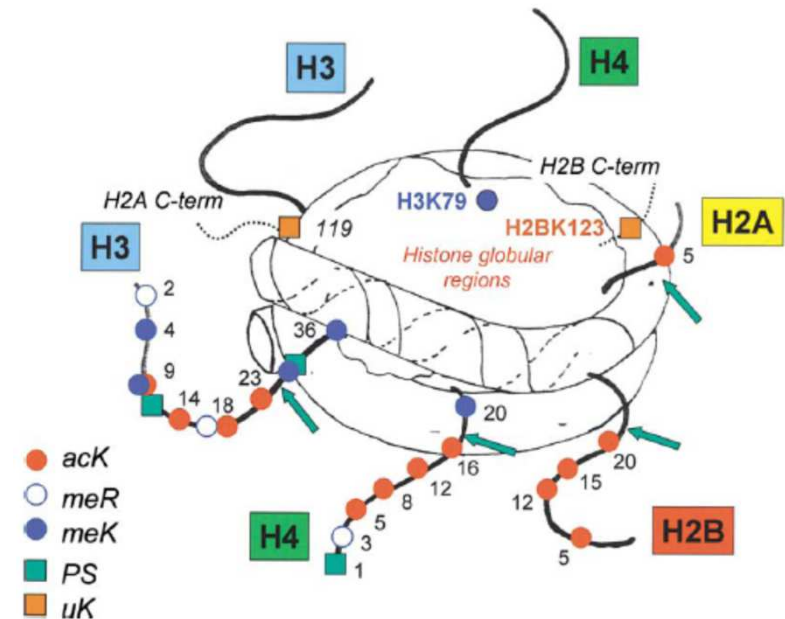
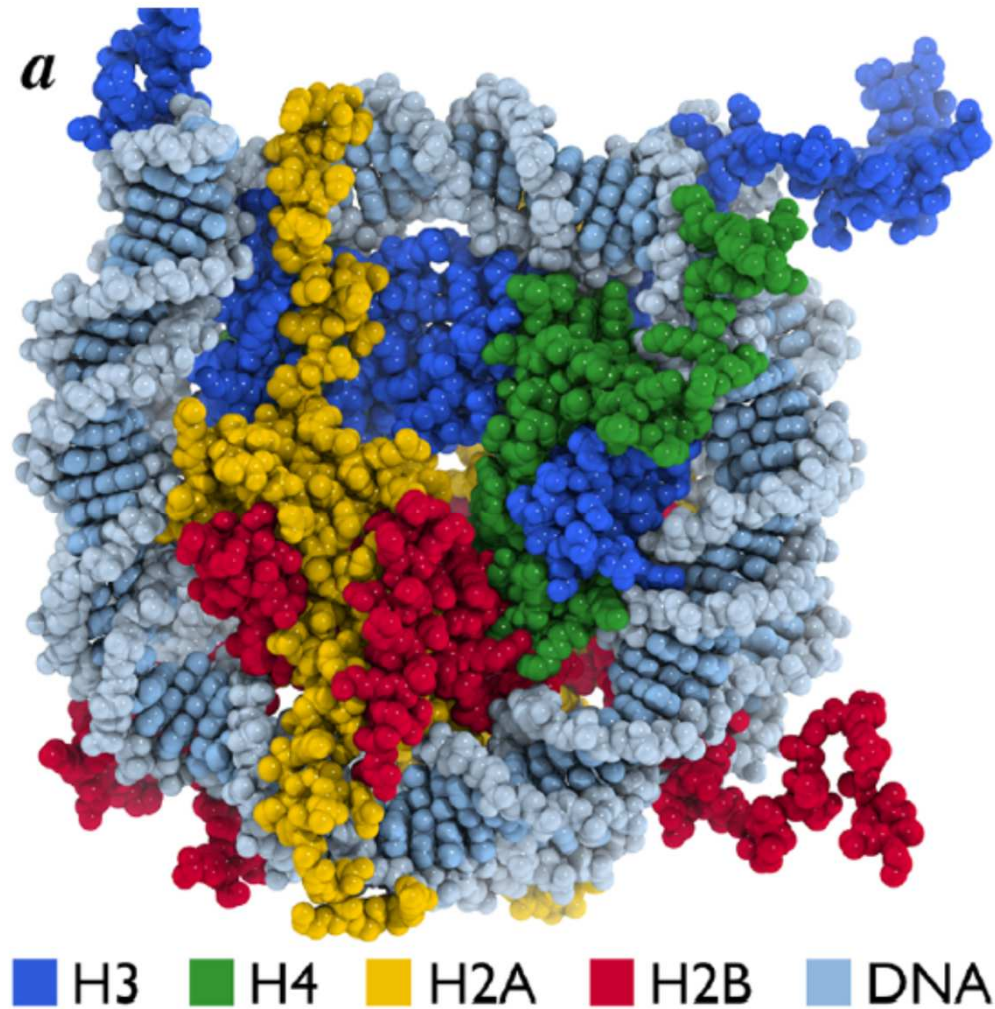
H2A/H2B váže dvě vlákna
H3/H4 váže jedno vlákno, ale silněji (více objímá)



McGinty a Tan, Chem Rev, 2015
 (opačné barvy)

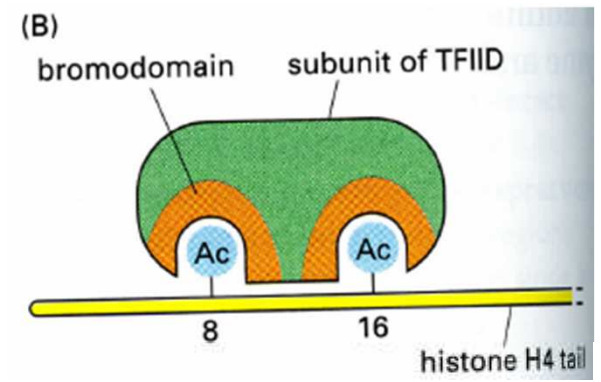
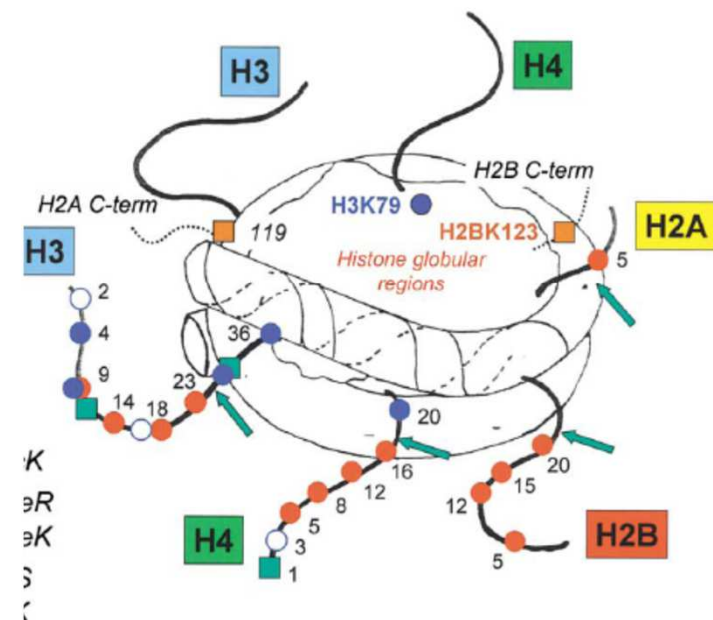
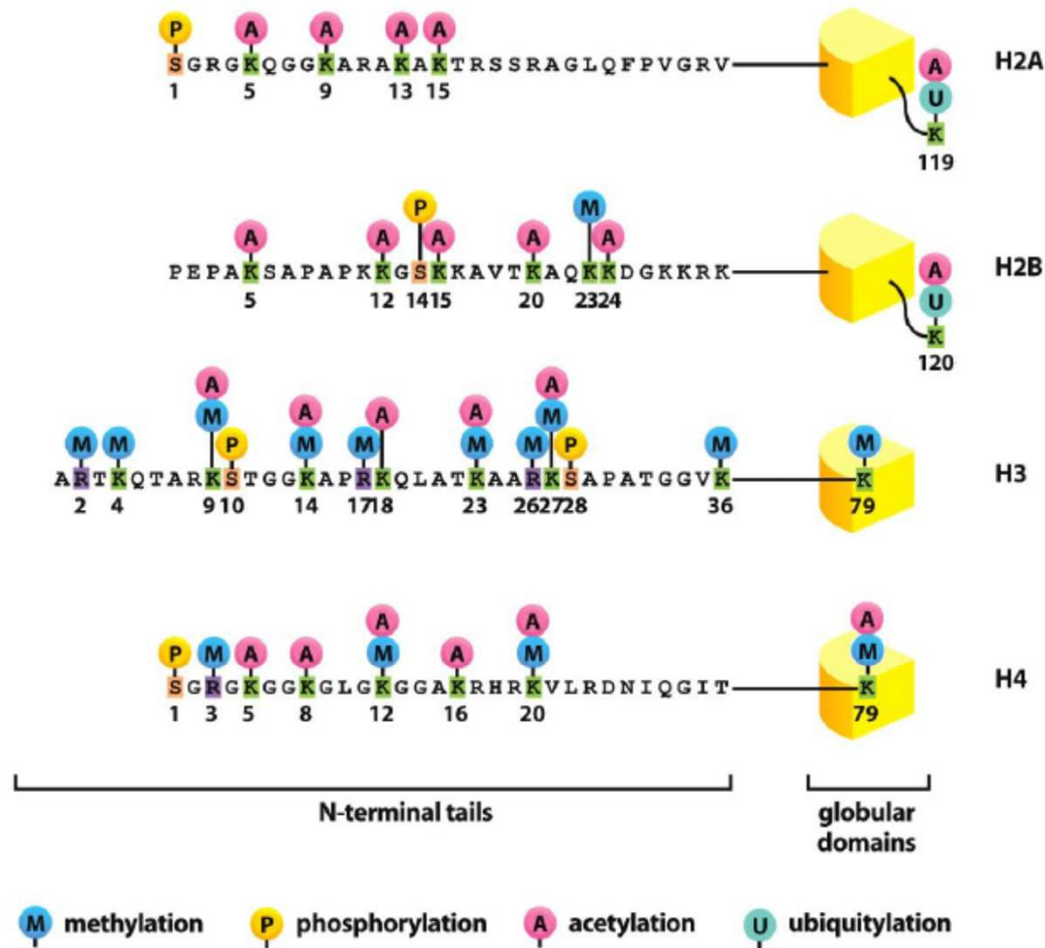
Konce histonů

- N- a C-konce histonů vybíhají z jádra nukleosomu a ovlivňují jeho dynamiku
- mohou posílit/oslabit interakce s DNA – rozvolnit nukleoproteinový komplex

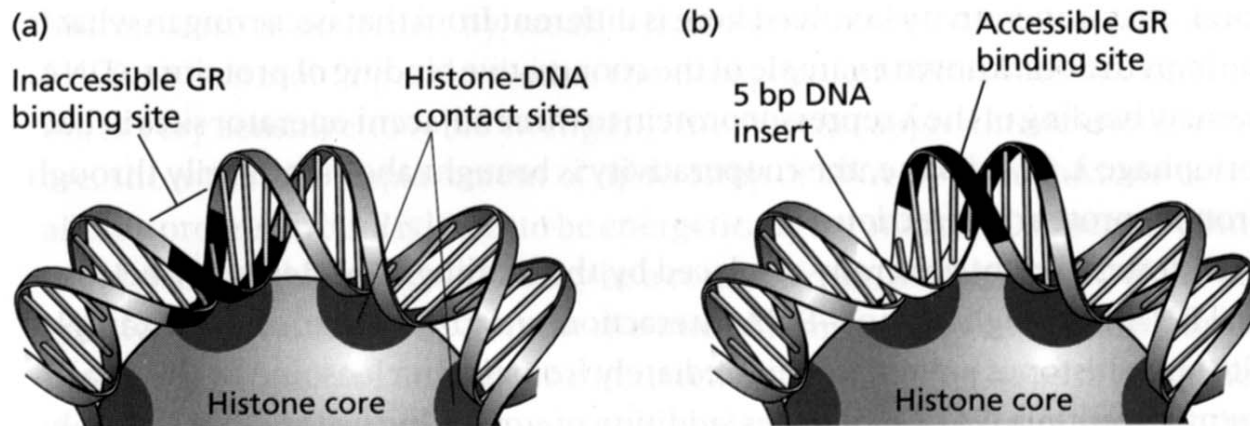


Modifikace histonů

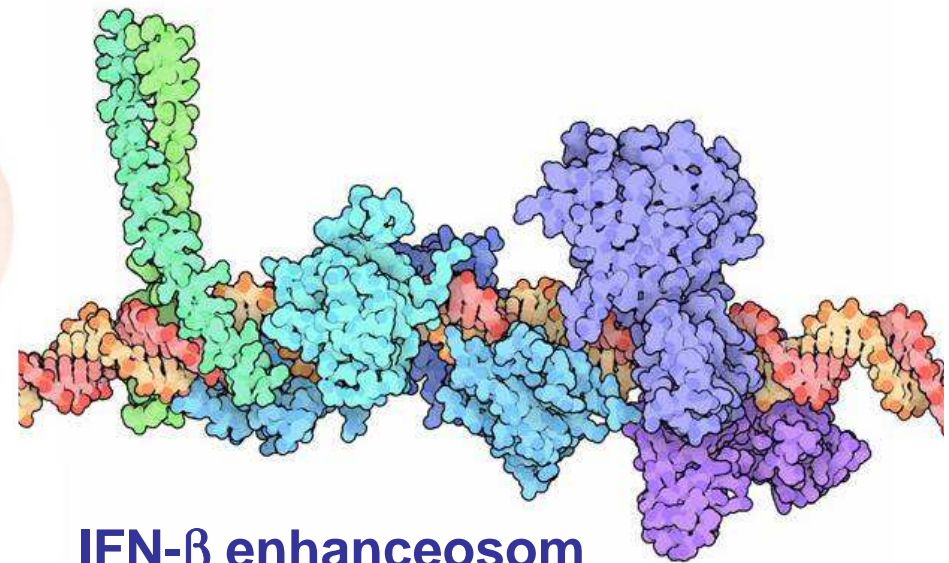
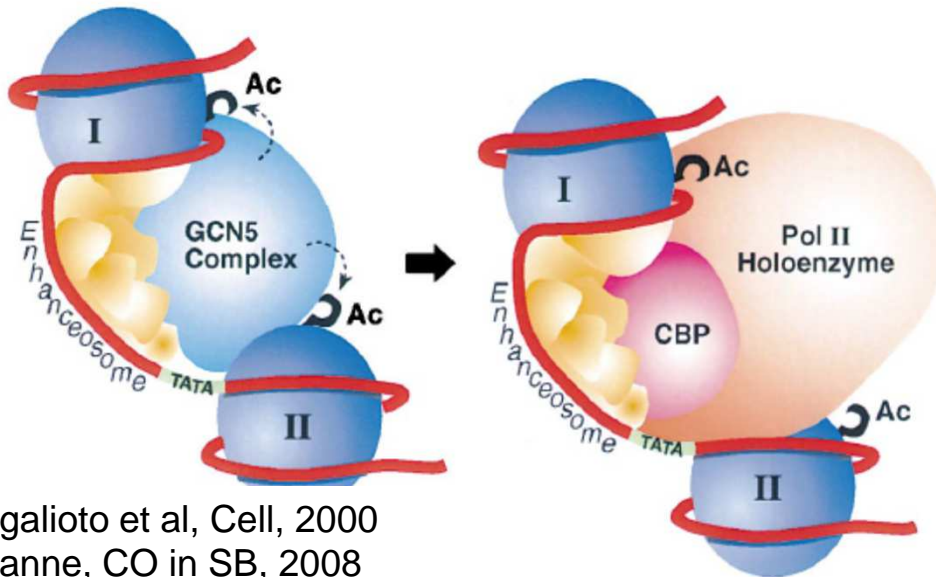
- např. acetylace lysinů (změna náboje) oslabí interakci s DNA a rozvolní vazbu oktameru (zpřístupní DNA pro TBP)
- následně se TFIID váže na Ac-H4 (K8, K16) prostřednictvím bromodomény TAF1 proteinu (**reader/writer/eraser**)



- AP-1/IRF-3/IRF-7/NF- κ B pokrývá sekvenci -102 až -47 bází upstream od TSS = tj. mezi nukleosomy (nukleosom-free oblast)
- nukleosom downstream zakrývá TATA-box
- všechny podjednotky (TA domény) enhanceosomu interagují s SAGA a CBP/p300 acetylásou - acetylace nukleosomu vede k remodelaci/přemístění a uvolnění TATA-boxu
- uvolní se TATA-box pro vazbu TBP/TFIID a RNA polymerasy II



sekvence DNA může být zcela zakryta nukleosomem nebo může být přístupná nebo může být v oblasti mezi nukleosomy



Agalioto et al, Cell, 2000
Panne, CO in SB, 2008

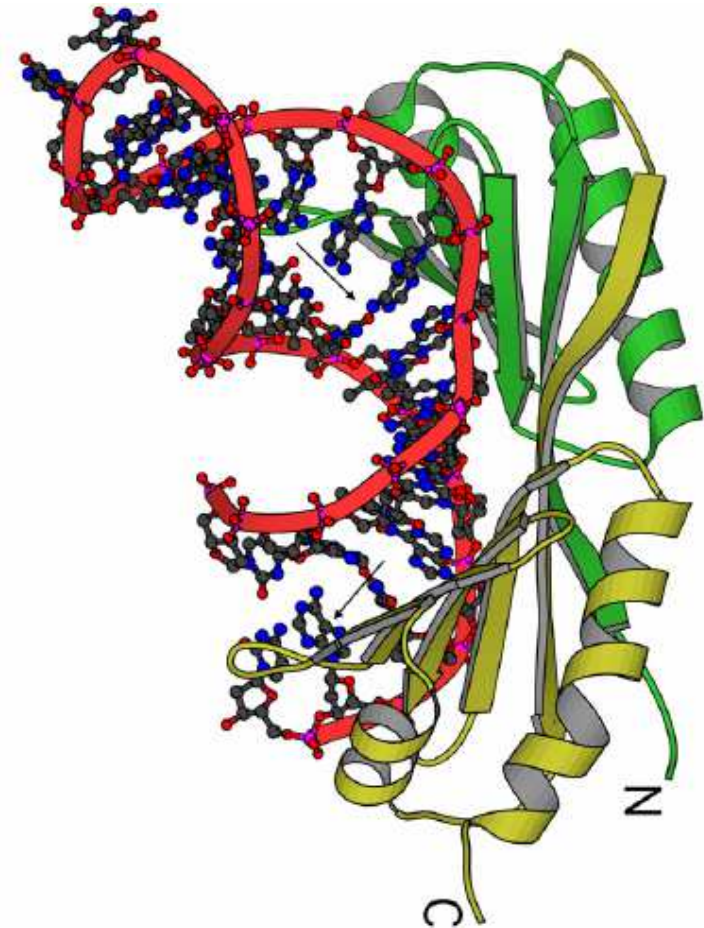
Motivy DNA vazebných domén

- **Zipper typ**
 - Leucinový zip
 - Helix-loop-helix
- **Helix-otáčka-helix**
 - Winged helix
- **Zinkový prst**
 - $\beta\beta\alpha$ zinc-finger
 - Hormon-receptor
 - Loop-sheet-helix
 - Gal4
- **Histon, HMG-box**
- **β -hairpin/ribbon**
- **β - barrel**

α -šroubovice

β -listy

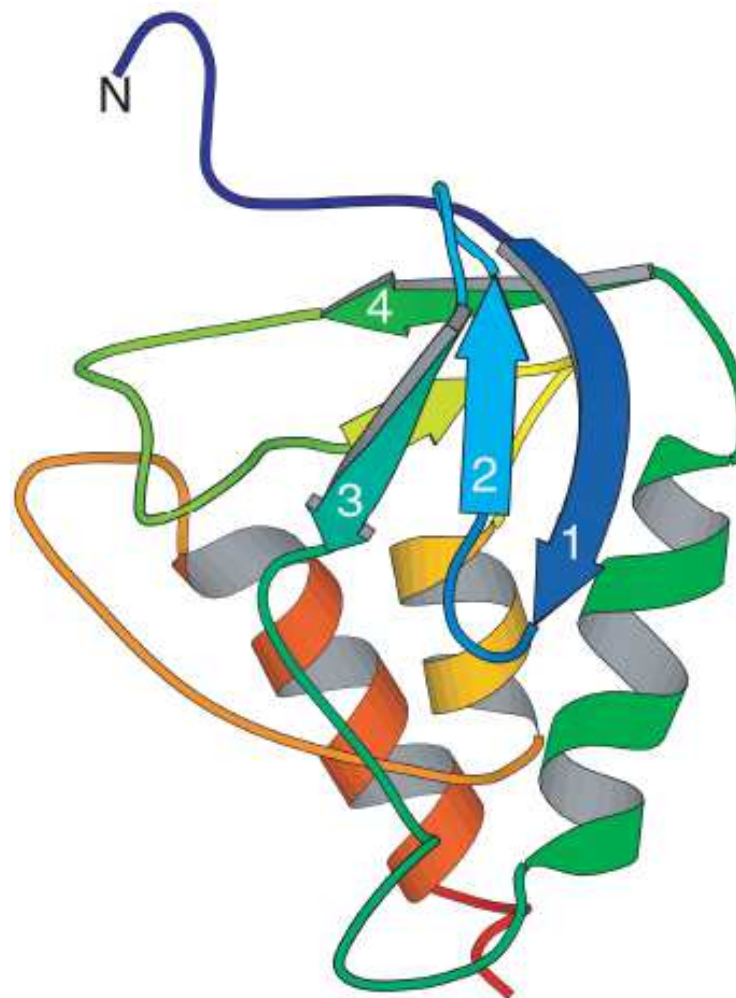
TBP, OB-fold,



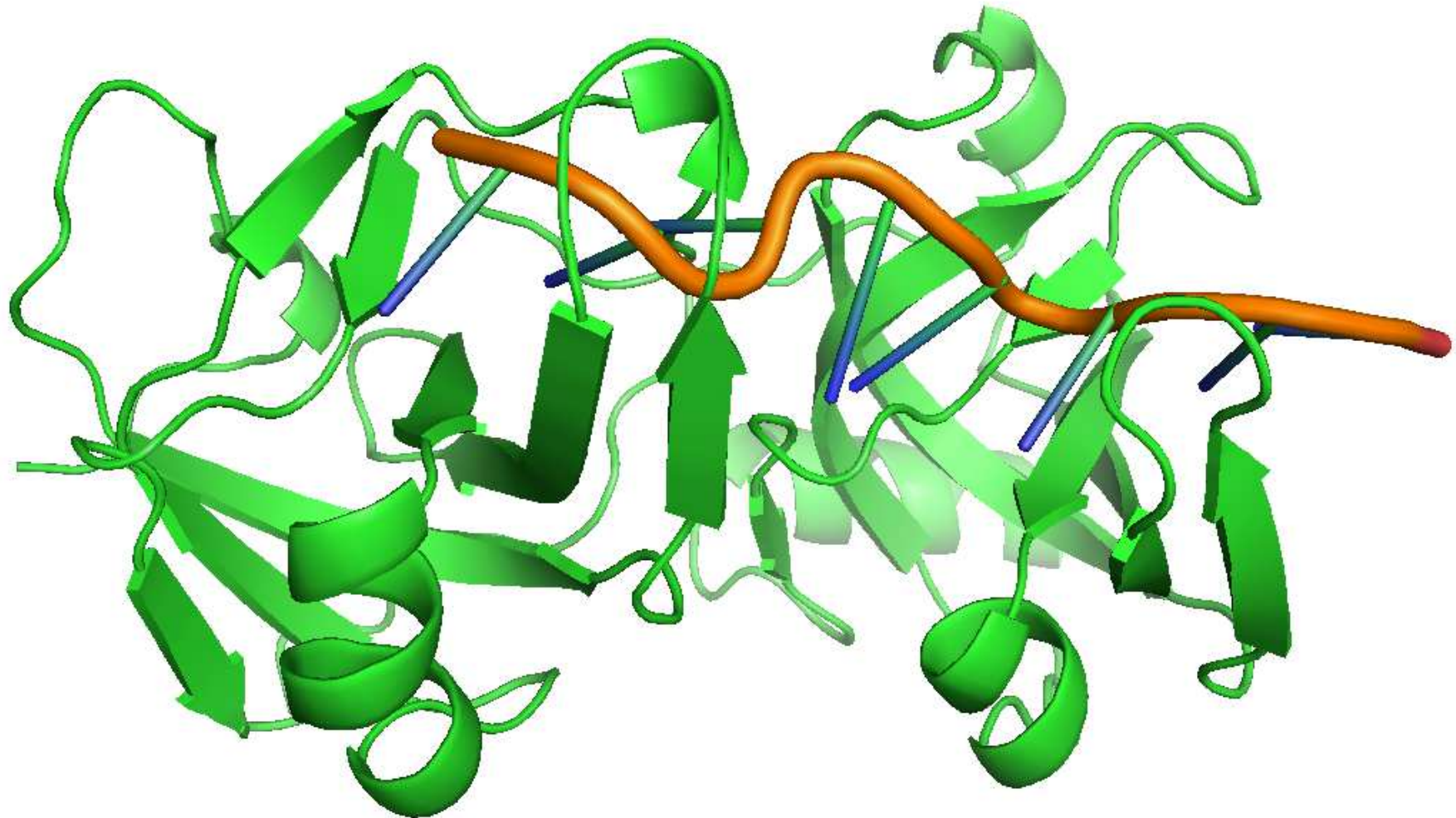
OB-fold

(oligonucleotide/oligosaccharide binding)

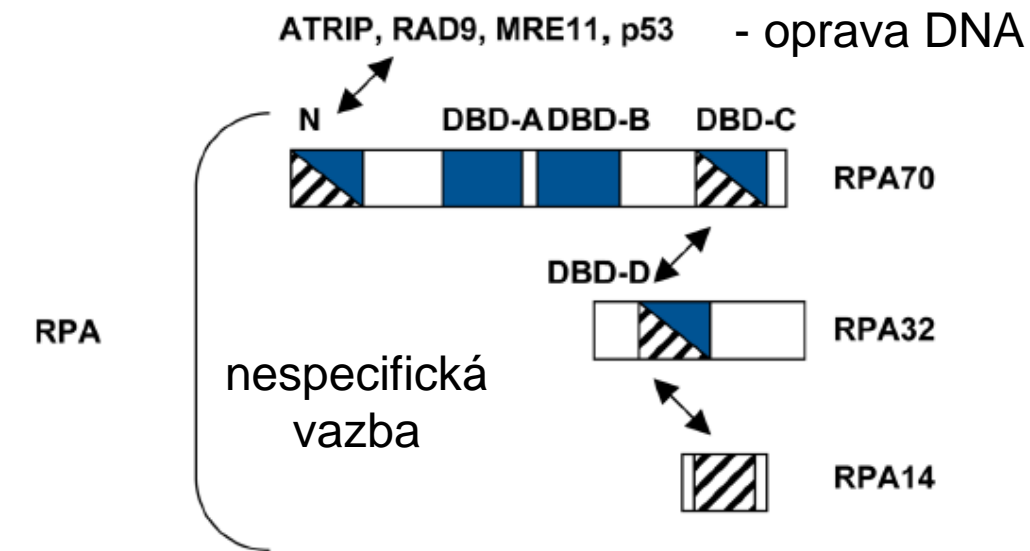
- 4-5 anti-paralelních β -listů (β -barel) zakončeno α -šroubovicí (kompaktní)
- vytváří úzkou jamku pro jednořetězcovou ssDNA (RNA, oligosacharidy)
- váže 2-5 nukleotidů (**báze, cukry i fosfáty**)
- SSB/RP-A a TRF proteiny (replikace, HR, telomery ...
Dr. Špirek)



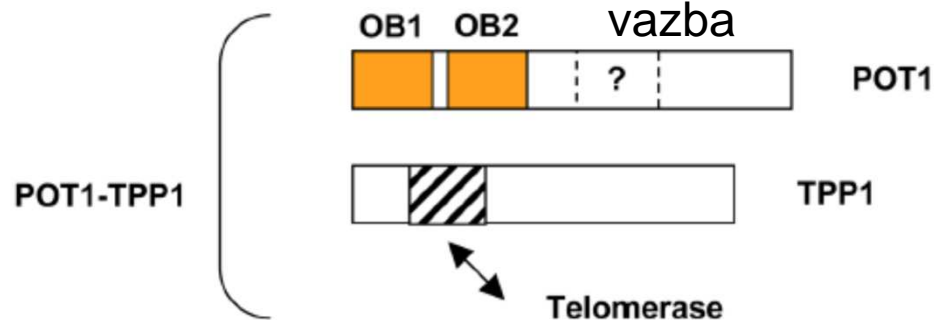
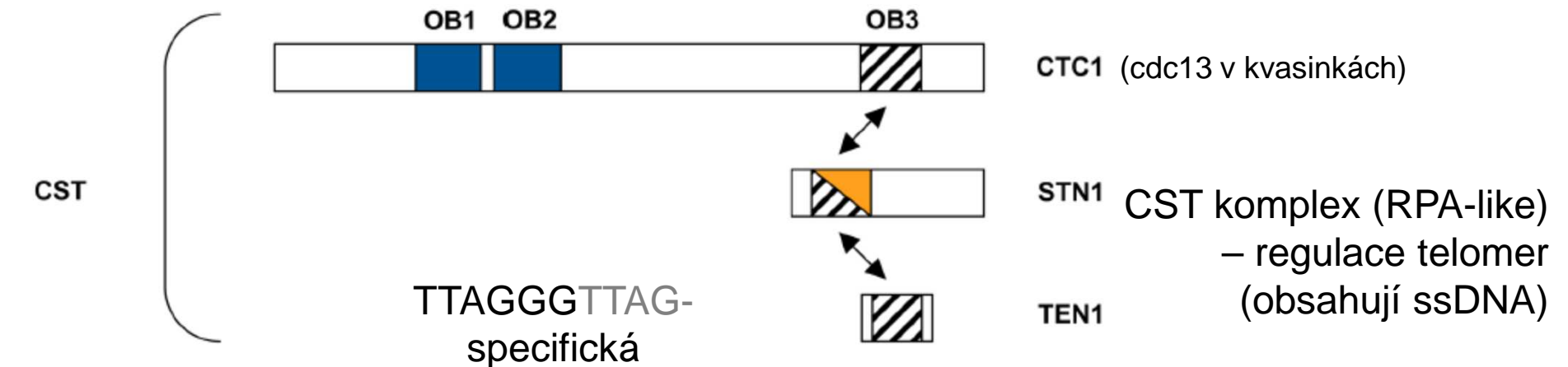
OB-fold (oligonucleotide/oligosachcaride binding, 1JMC)



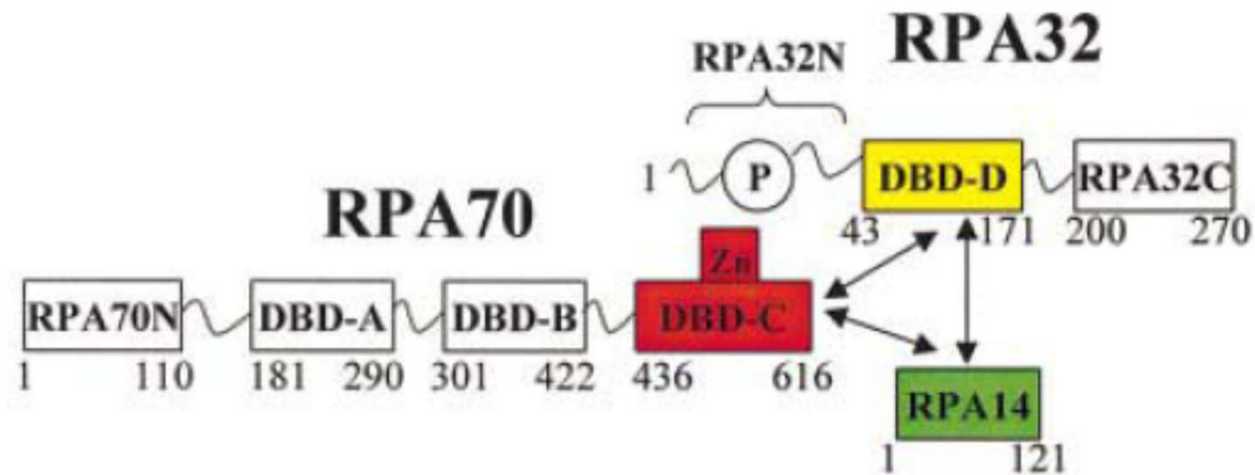
Více OB – RPA70 (A+B) vytváří prodlouženou lineární kapsu



- protein-proteinové interakce (integrita komplexu + interakce s dalšími proteiny/komplexy)
- Dr. Spirek

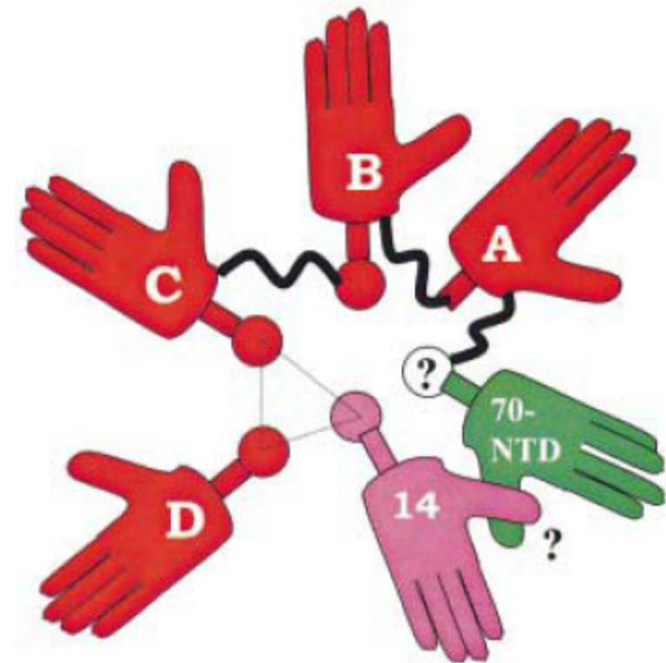
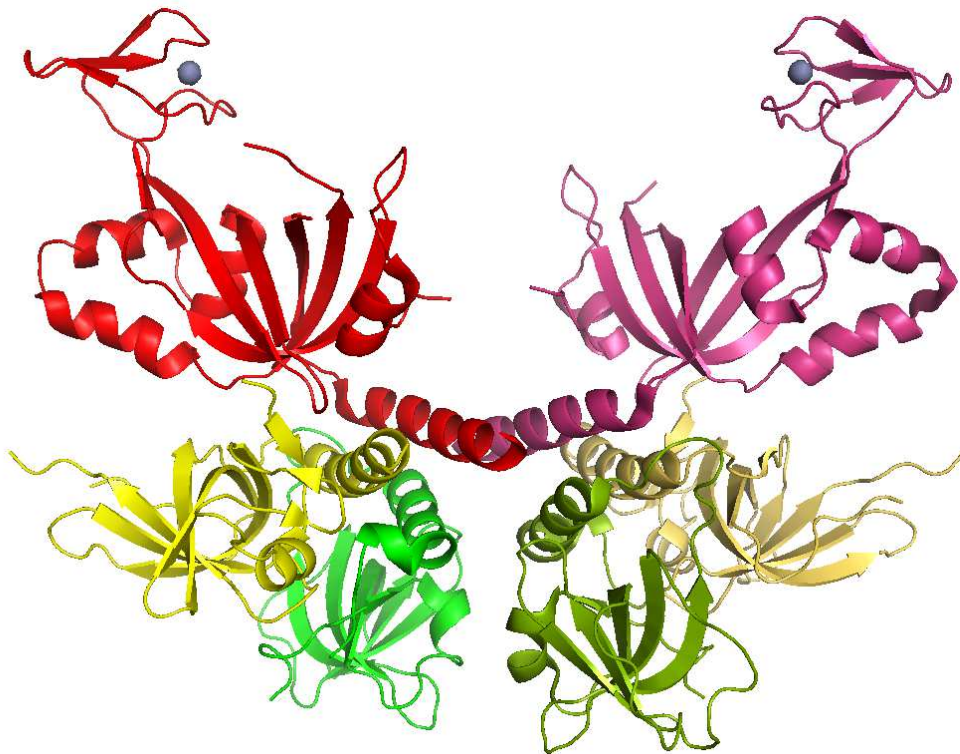


- část komplexu SHELTERIN
– chrání telomery (aby nebyly považovány za DSB, reguluje přístup telomerázy)



- protein-proteinové interakce (integrita komplexu)
- celý komplex ~30nt

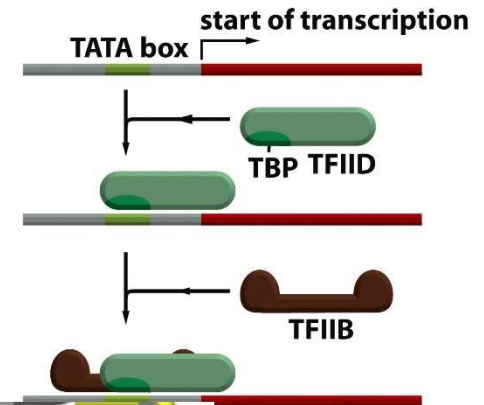
Centrální část RPA komplexu (1L10) a model celého komplexu



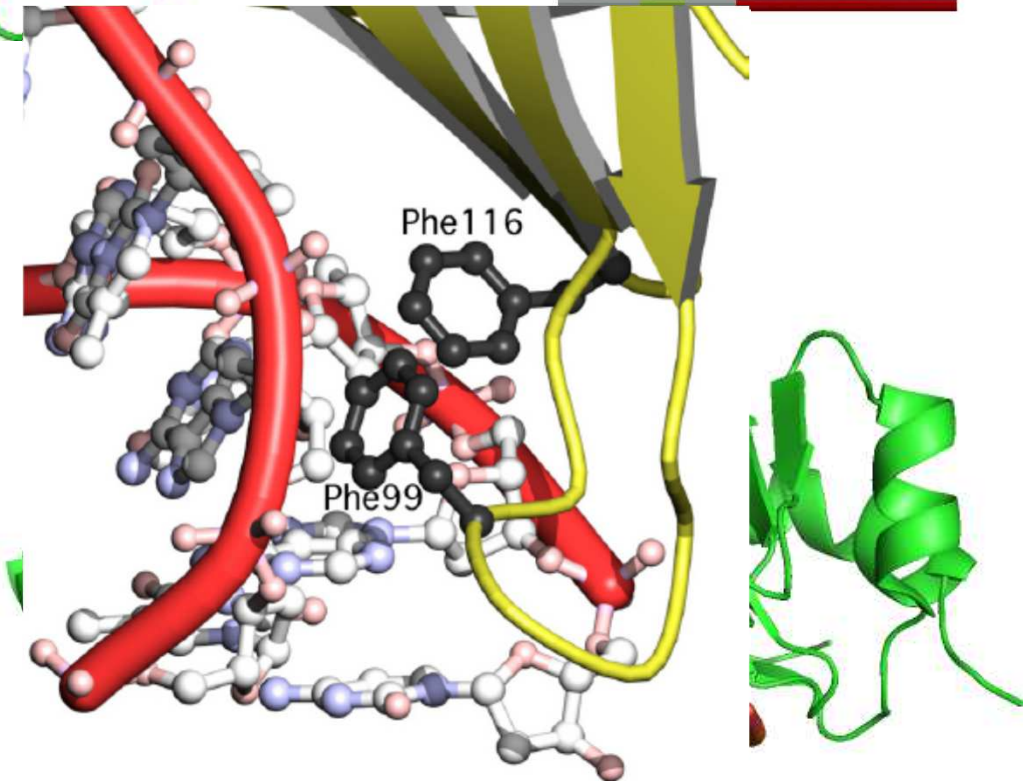
Bochkareva et al, EMBO J, 2002
 Flynn a Zou, CR in BMB, 2010

1YTB

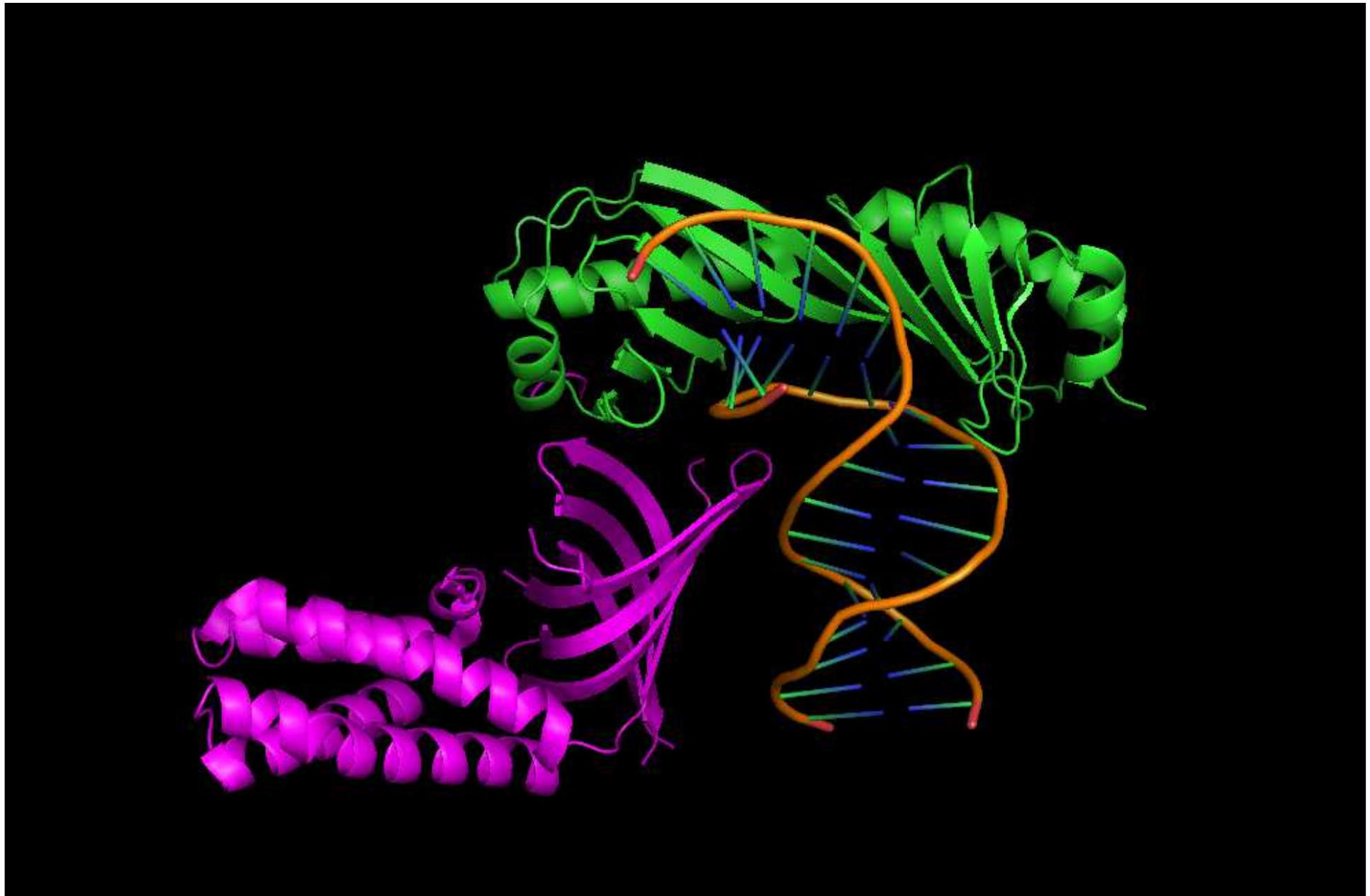
TATA-box vážící protein (TBP) – klíčový pro sestavení preiniciačního komplexu (PIC)



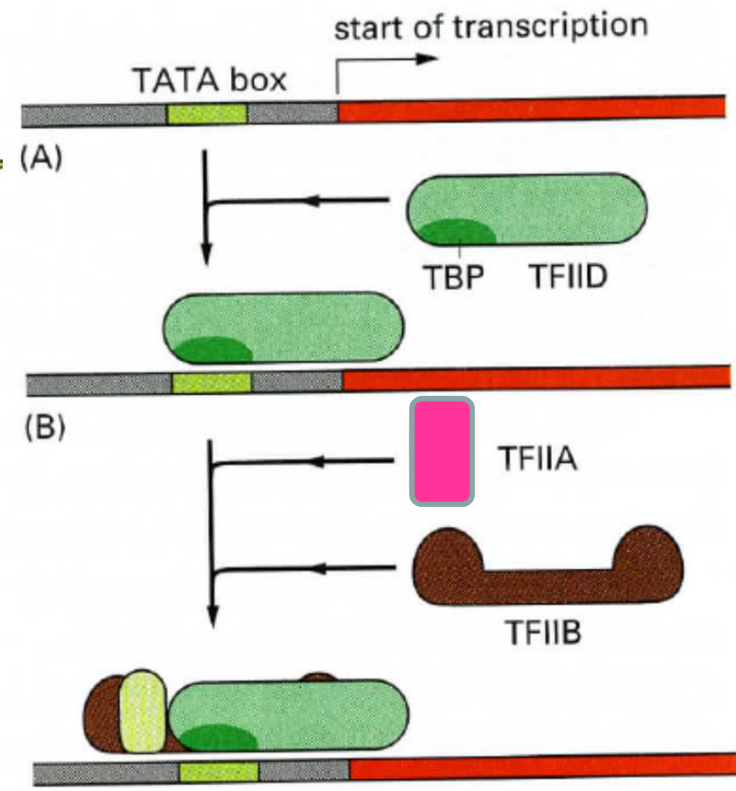
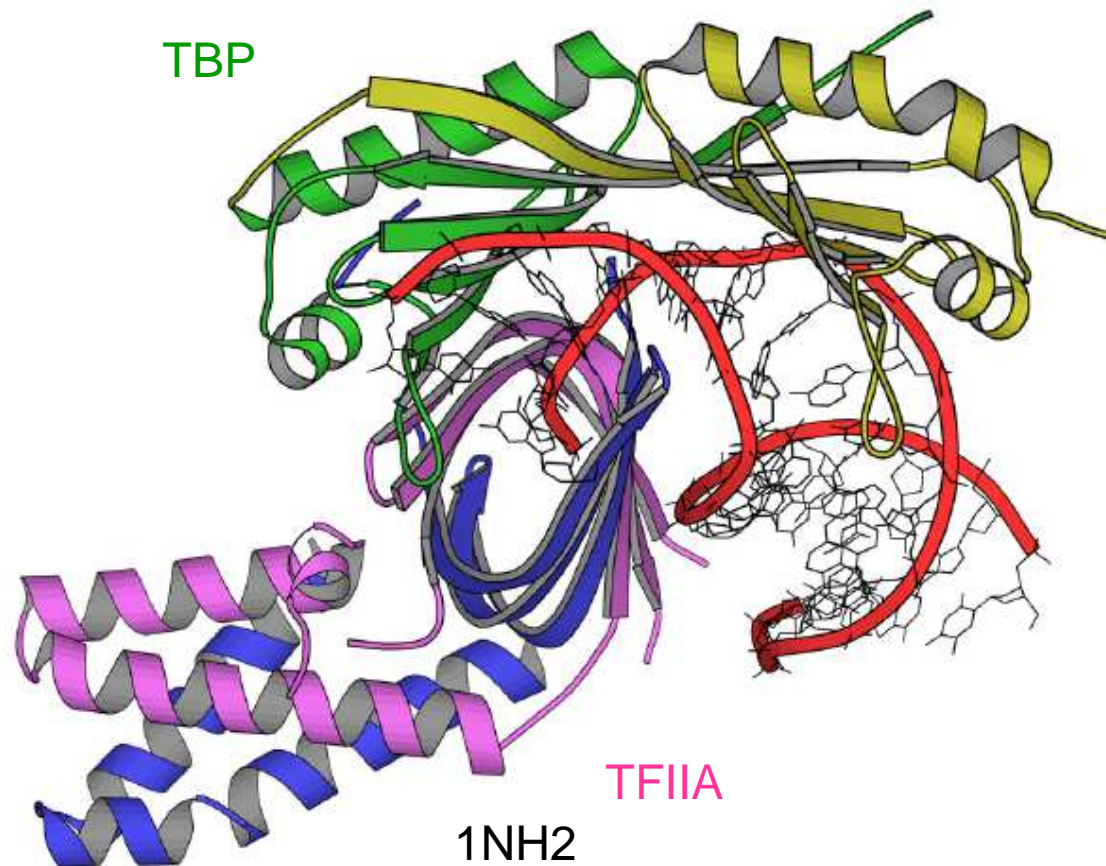
- 10 anti-paralelních β -listů pokrývá MŽ
- Interkalují se postranní řetězce **Phe** (hydrofobní v.)
- vytváří **ohyb (kink) a rozplétá dsDNA**
- Konsensní sekvence: TATA(A/T)A(A/T)(A/G)



TBP a TFIIA (β -barrel – neovlivní DNA strukturu)



- TFIIA (2 podjednotky) komplex interaguje s TBP a DNA a zajišťuje jeho správnou pozici
- brání represorům v inhibici vazby TBP na TATA-box (koaktivátor některých sekvenčně specifických trans. faktorů)
- β -barrel váže DNA (neovlivňuje strukturu)



Začátek/iniciace transkripce – TFIID (nukleace komplexů)

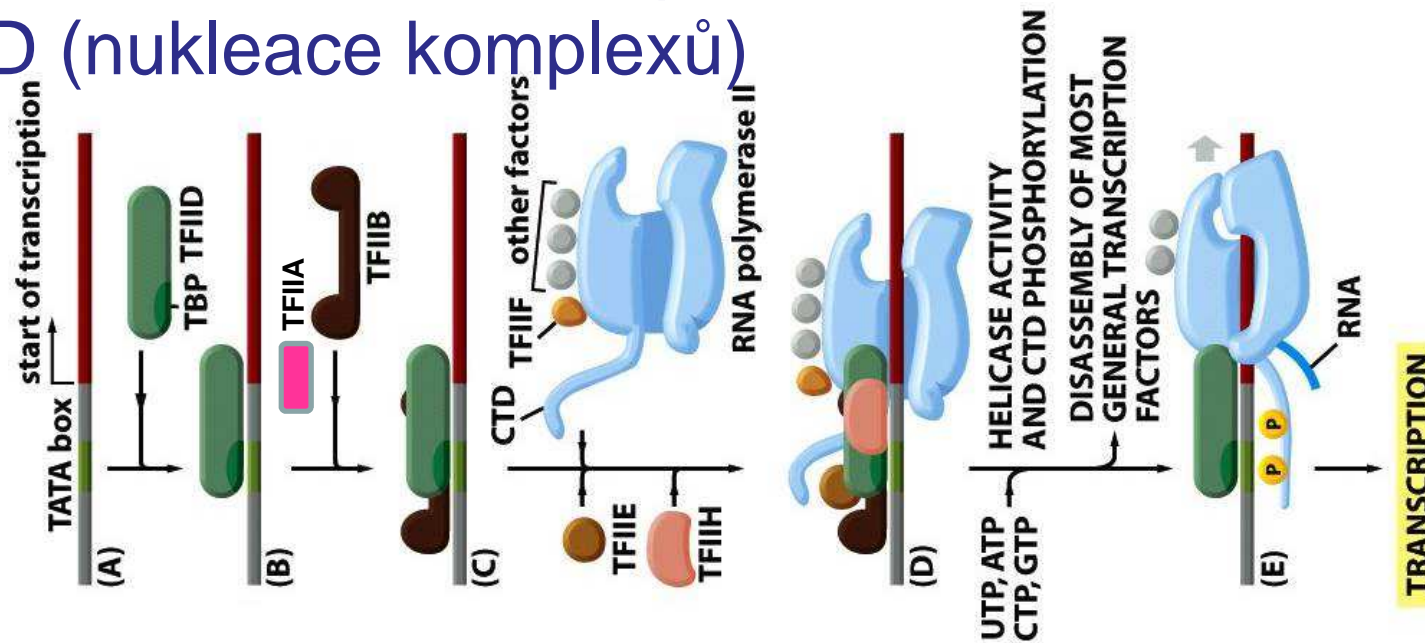
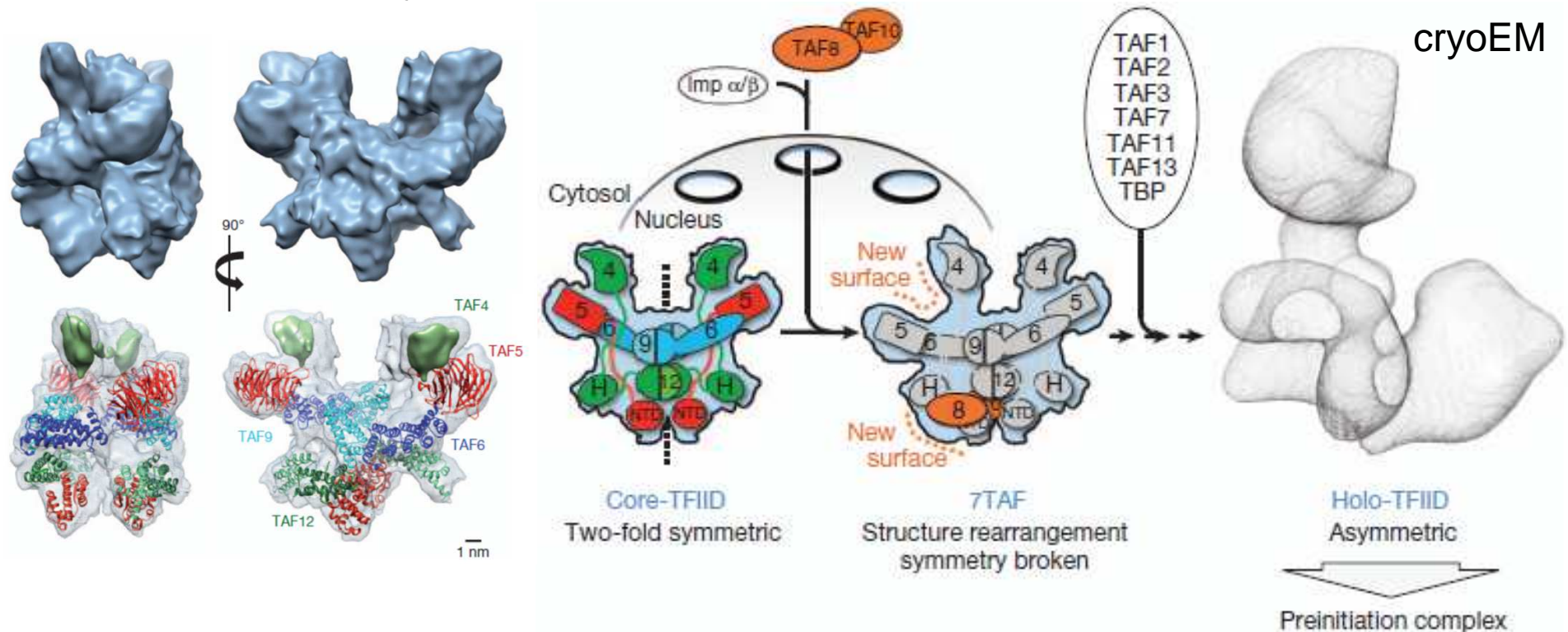


Table 6–3 The General Transcription Factors Needed for Transcription Initiation by Eucaryotic RNA Polymerase II

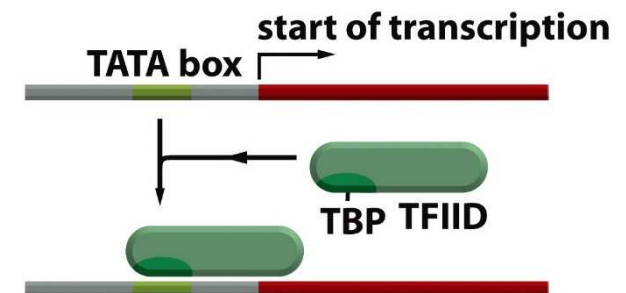
| NAME | NUMBER OF SUBUNITS | ROLES IN TRANSITION INITIATION |
|--------------|--------------------|--|
| TFIID | | |
| TBP subunit | 1 | recognizes TATA box |
| TAF subunits | 13 | recognizes other DNA sequences near the transcription start point; regulates DNA-binding by TBP |
| TFIIB | 1 | recognizes BRE element in promoters; accurately positions RNA polymerase at the start site of transcription |
| TFIIF | 3 | stabilizes RNA polymerase interaction with TBP and TFIIB; helps attract TFIIE and TFIIH |
| TFIIE | 2 | attracts and regulates TFIIH |
| TFIIH | 9 | unwinds DNA at the transcription start point, phosphorylates Ser5 of the RNA polymerase CTD; releases RNA polymerase from the promoter |

TFIID is composed of TBP and ~11 additional subunits called TAFs (TBP-associated factors); CTD, C-terminal domain.

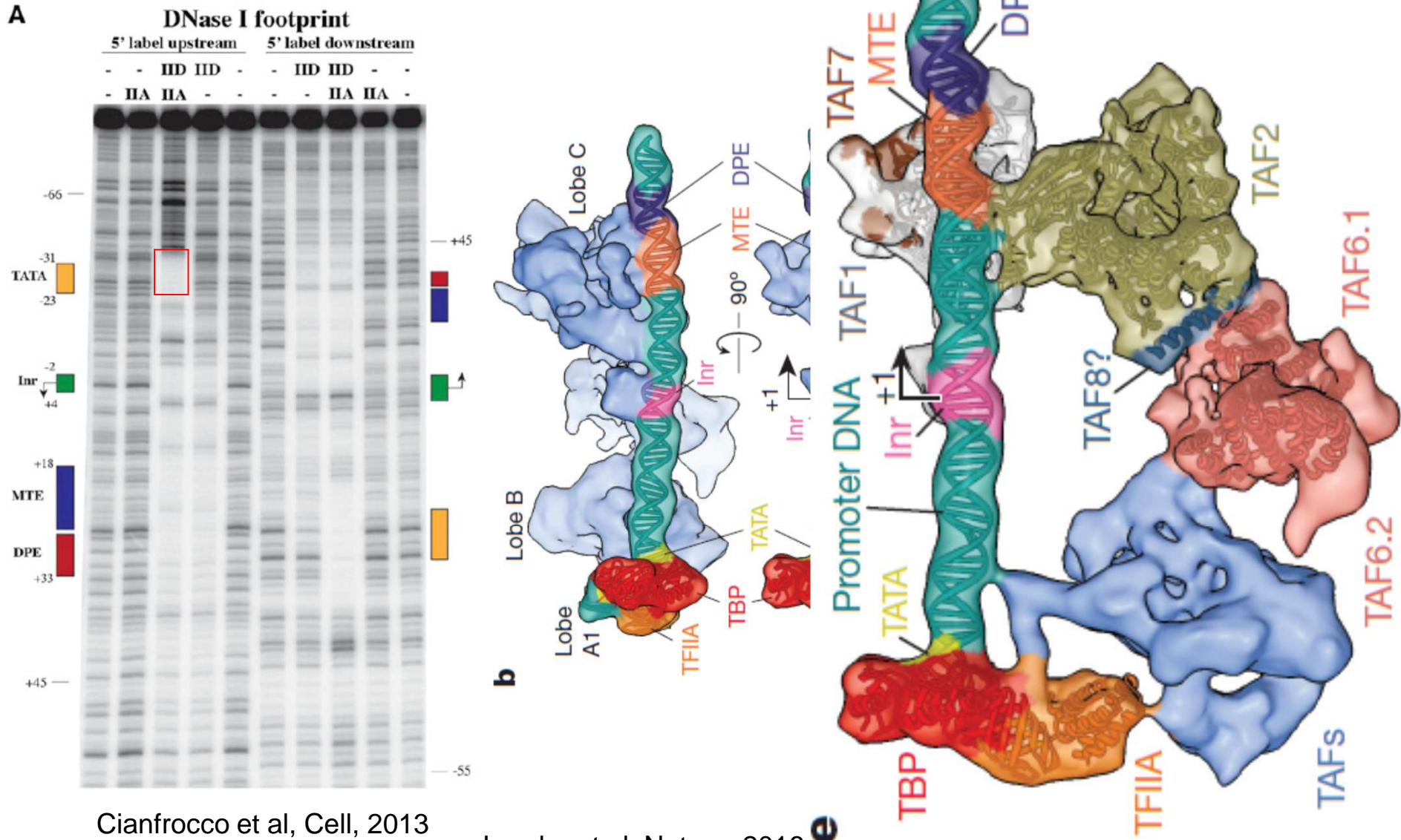
- TFIID (1MDa, TAFs) komplex a TBP jsou klíčové pro rozpoznání promotorů a poskytují scaffold/lešení pro sestavení transkripčního systému (nukleace PIC) Bieniossek et al., Nature, 2013



- jádro komplexu (symetrické) tvoří TAF4, 5, 6, 9 a 12 - po připojení všech podjednotek TFIID komplexu včetně TBP vzniká funkční (asymetrický) holokomplex (PIC)



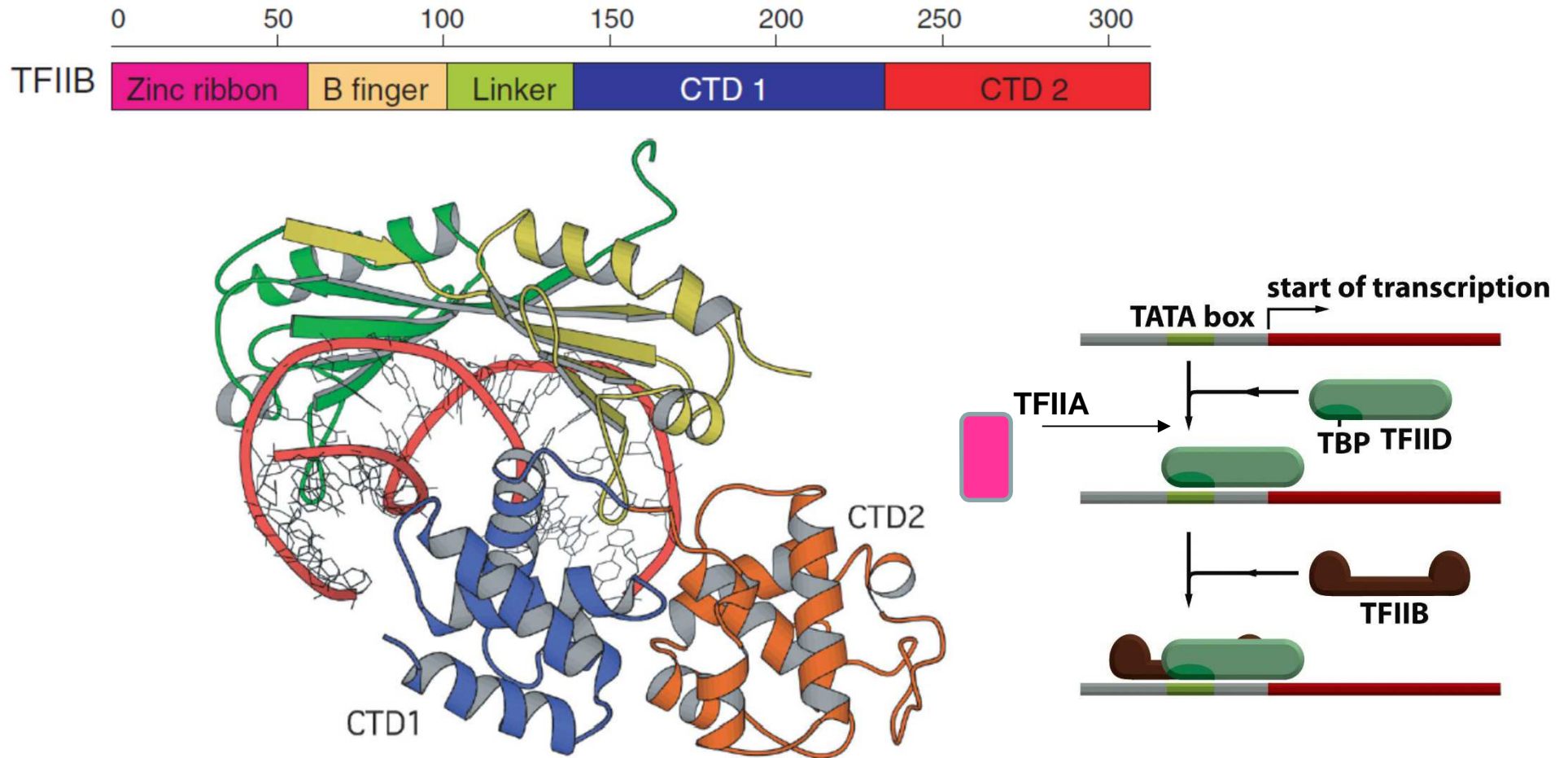
- footprint analýza ukázala jak se TFIIA-TFIID/TBP komplex společně váže na DNA (TFIIA pomáhá vázat TATA box)



Cianfrocco et al, Cell, 2013

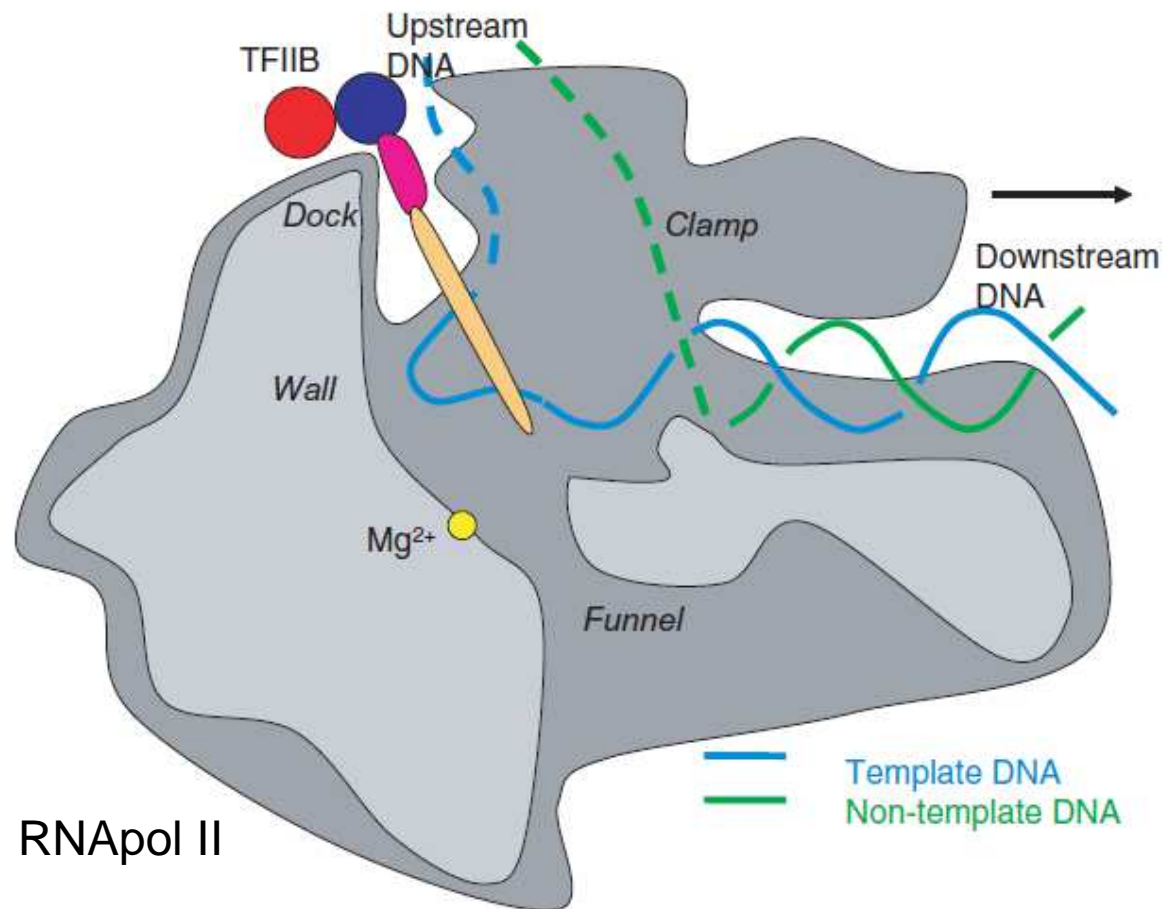
Louder et al, Nature, 2016

pro další postup transkripce je klíčový TFIIIB – propojuje TFIIID-TFIIA s RNAPol II

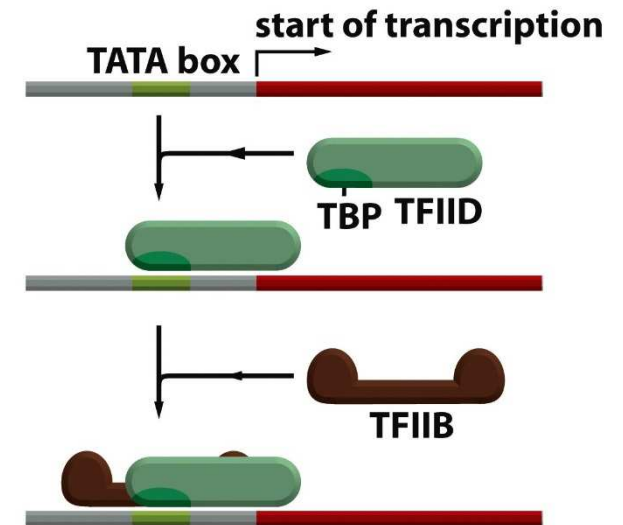


- TFIIIB (C-konec = CTD1 a CTD2) váže TBP a 6-7bp up- a downstream od ohybu DNA přes cukrfosfátovou kostru (blízko TATA boxu)

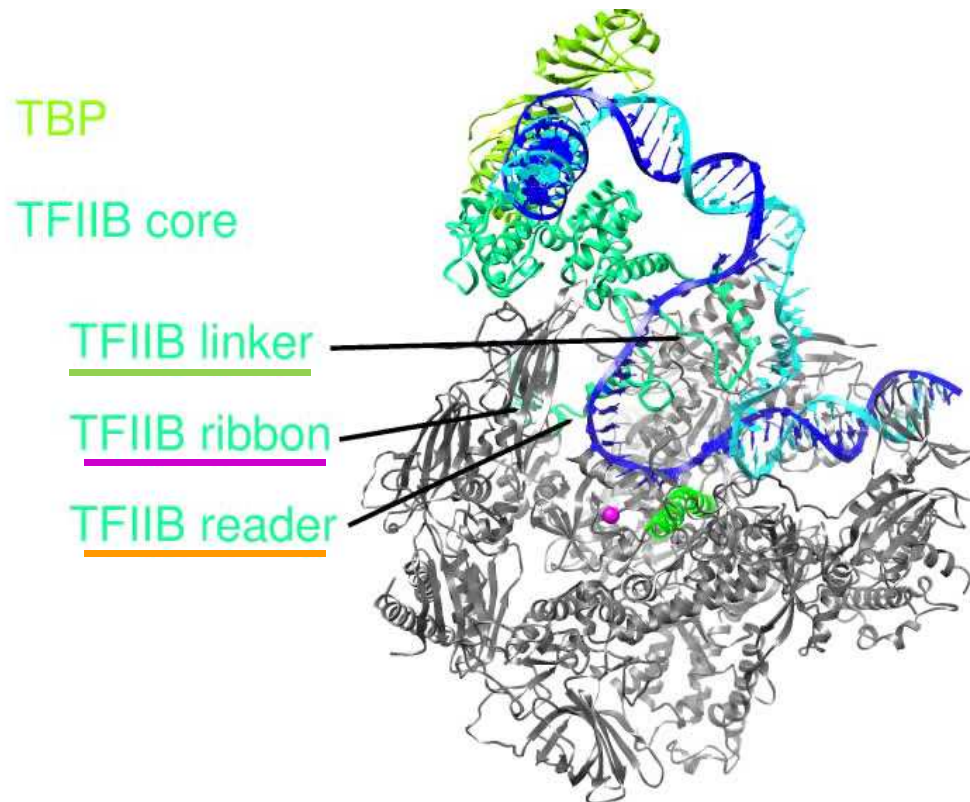
- TFIIB (N-konec) váže RNA polymerasu II a orientuje TFIID-TFIIA-DNA komplex na pol II (do jeho aktivního centra/cleft)
- Zn-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem



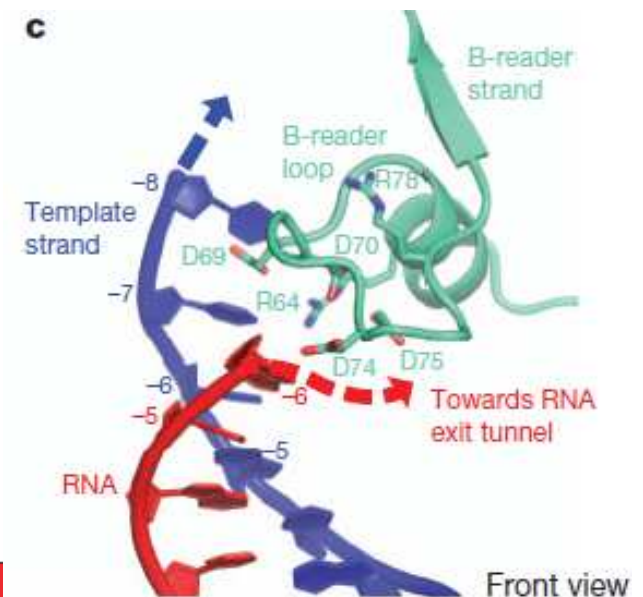
RNAPol II



- B-ribbon s dock, B-finger/reader s RNA tunelem, B-core/CTD1 s wall, B-linker s CC clamp
- umístění TFIIB determinuje pozici počátku transkripce
- pozice B-reader (v RNA tunelu) limituje iniciační krok (12nt RNA)
- po dosažení 12nt RNA dochází k disociaci TFIIB (elongace...)

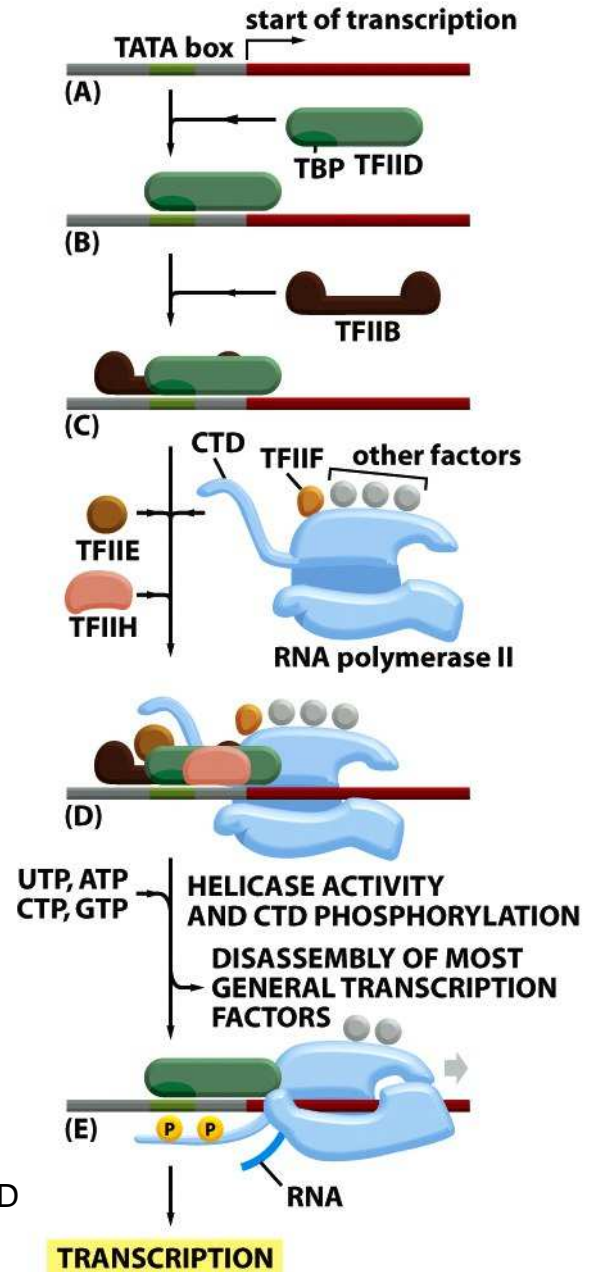
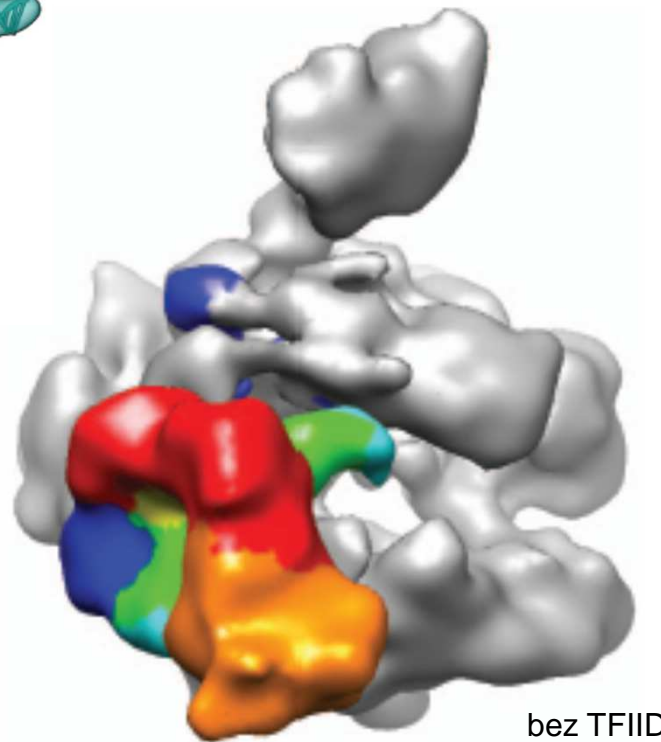
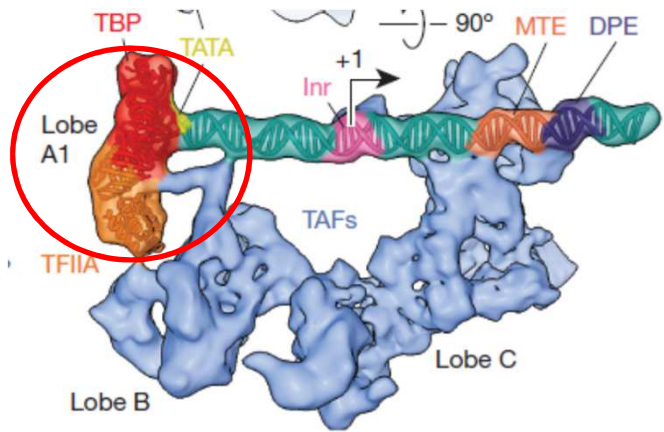


Video
ukázka RNA polymerázy



TFIIB propojuje RNAPol II s již sestaveným TBP/TFIID+TFIIA

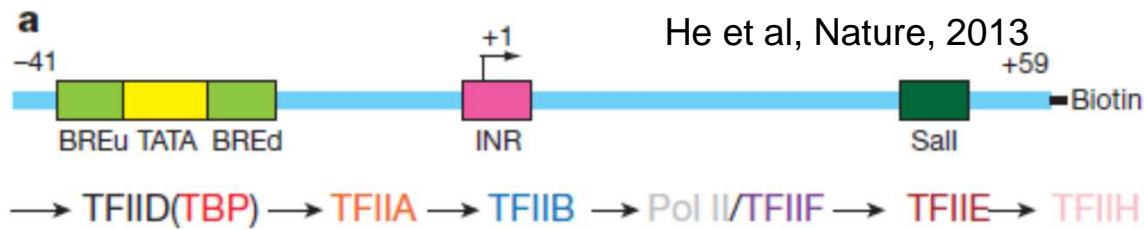
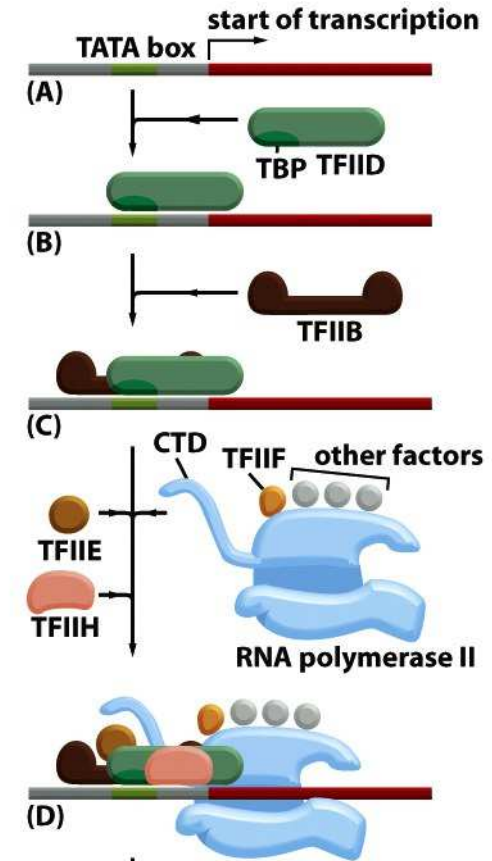
(postupným odhalováním detailů struktur, mutagenézí podjednotek, funkčními testy (*in vitro* a *in vivo*) byly identifikovány všechny TFII a určeno pořadí jejich působení)



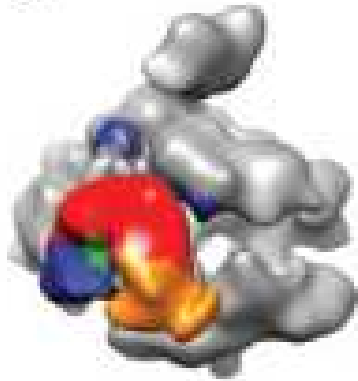
- cryoEM komplexu **TBP** (bez TFIID) + **TFIIA** + **TFIIB** + RNAPol II
- po navázání pol II disociuje TAF1/2 ...

Rekonstrukce celého PIC

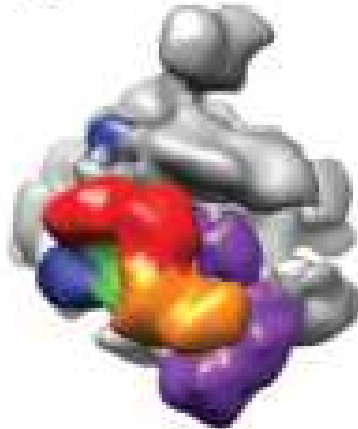
- biotin-DNA navázána na streptavidinové kuličky – na DNA nachytány *in vitro* sestavené komplexy – odštěpeno *Sall* a cryoEM - postupně rekonstituován celý PIC



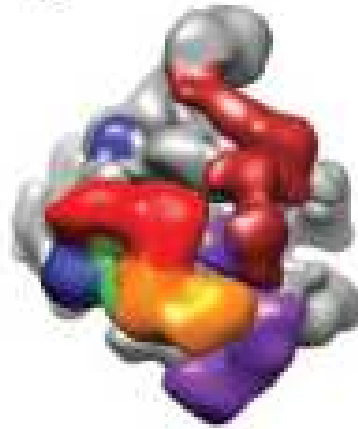
a TBP (bez TFIID) + TFIIA
b + TFIIB + RNApol II



c + TFIIF

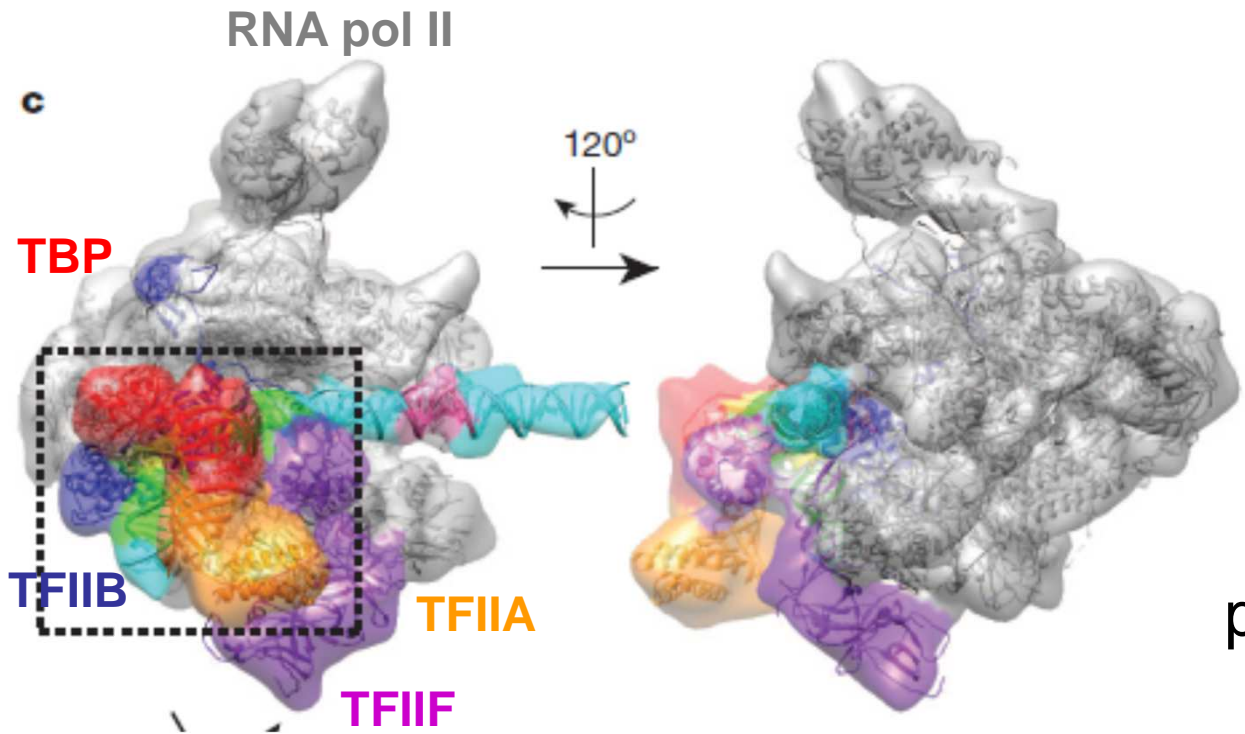


d + TFIIE

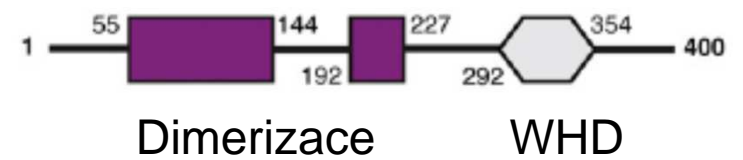
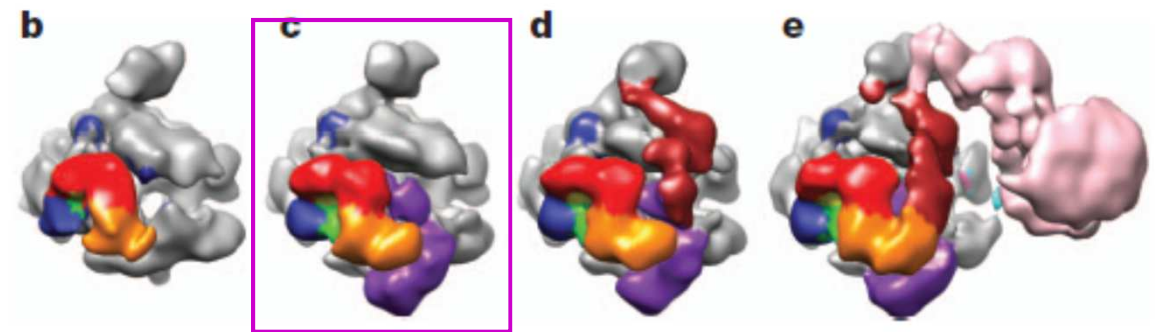
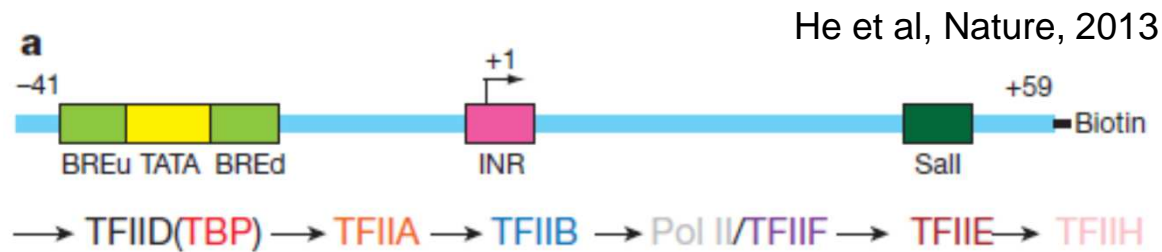


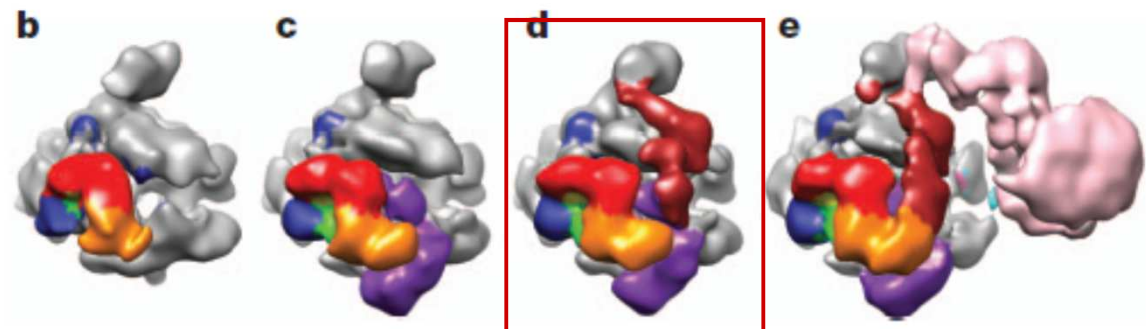
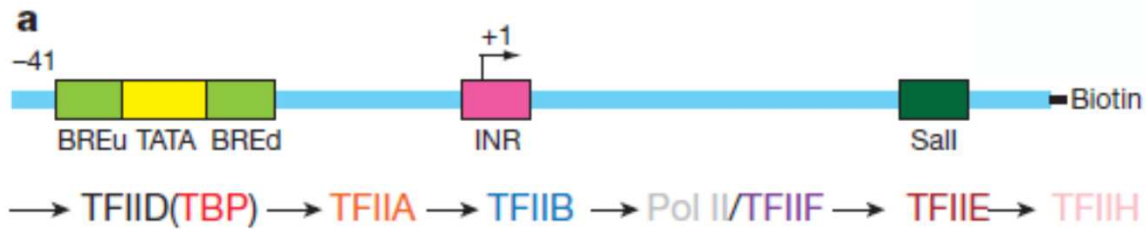
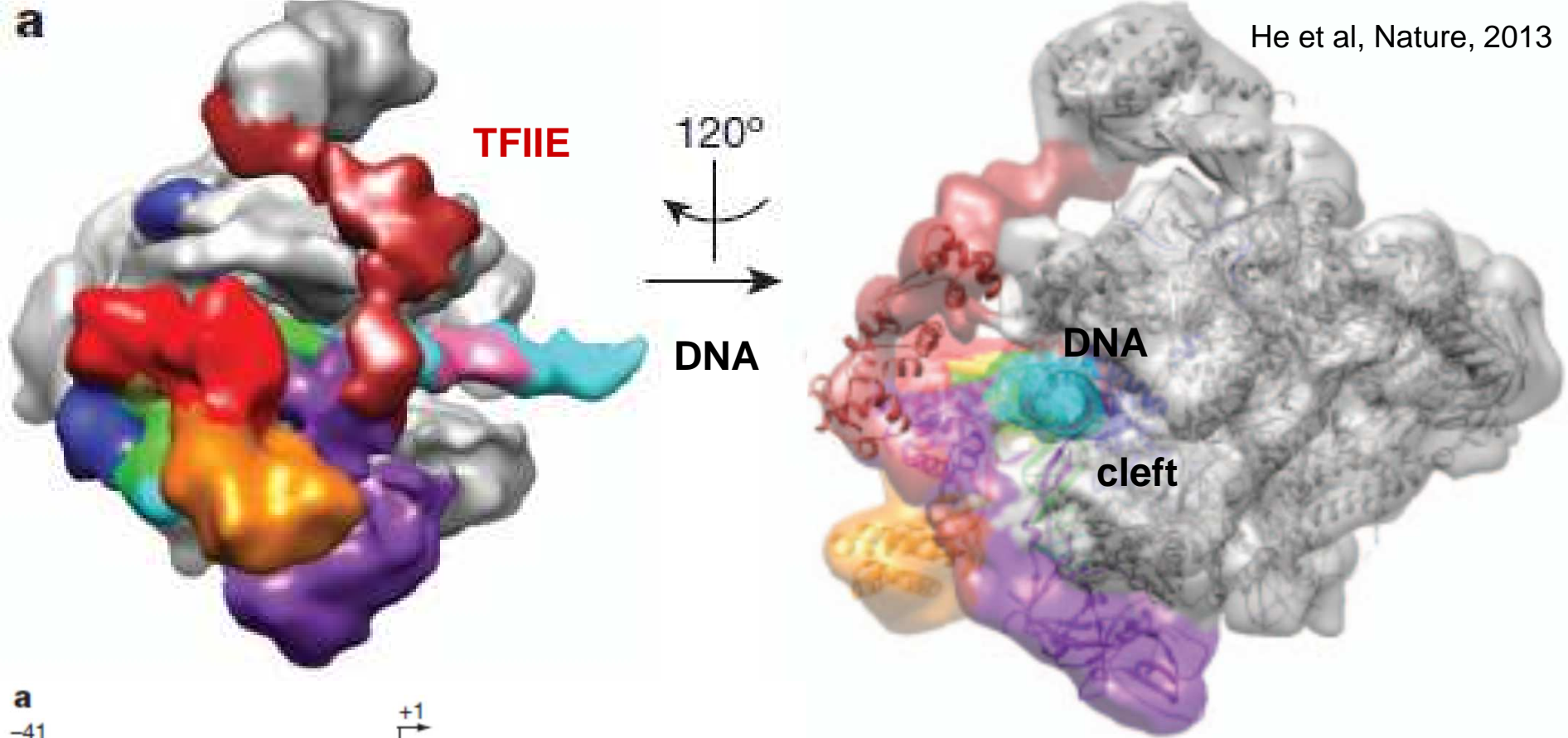
e + TFIIH



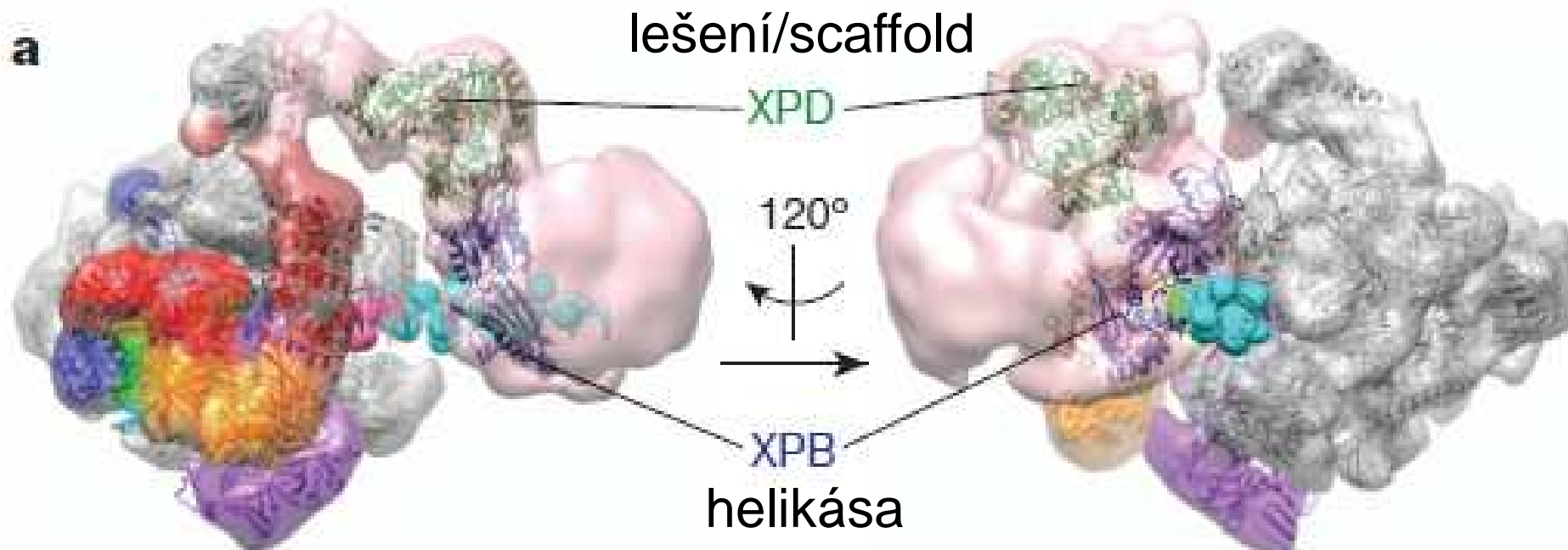


- **TFIIF** (navázaný na pol II) stabilizuje DNA v prohlubni/cleft pol II a pomáhá TFIIB s nastavením startu (WHD z RAP30 podjednotky váže přímo DNA: BRE_{downstream})
- váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu

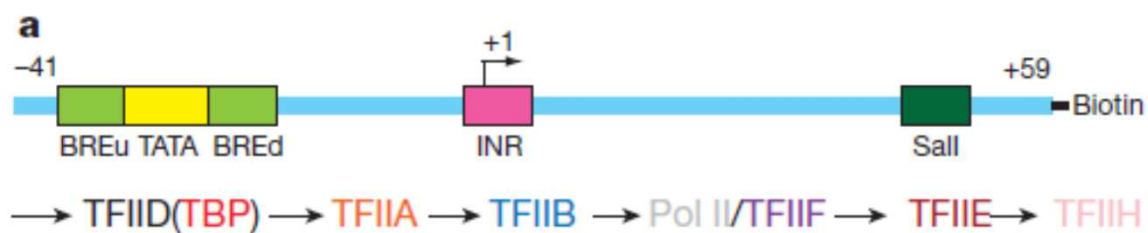




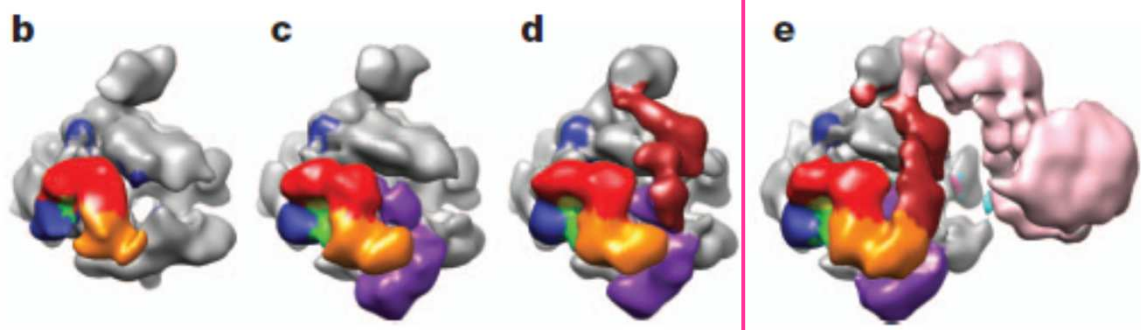
- TFIIF váže TFIIE a pomáhá tak stabilizaci komplexu
- tandem 4x WHD uzamyká DNA v RNAPol II prohlubni



- XPB a XPD regulují transkripci vs opravu DNA (NER)



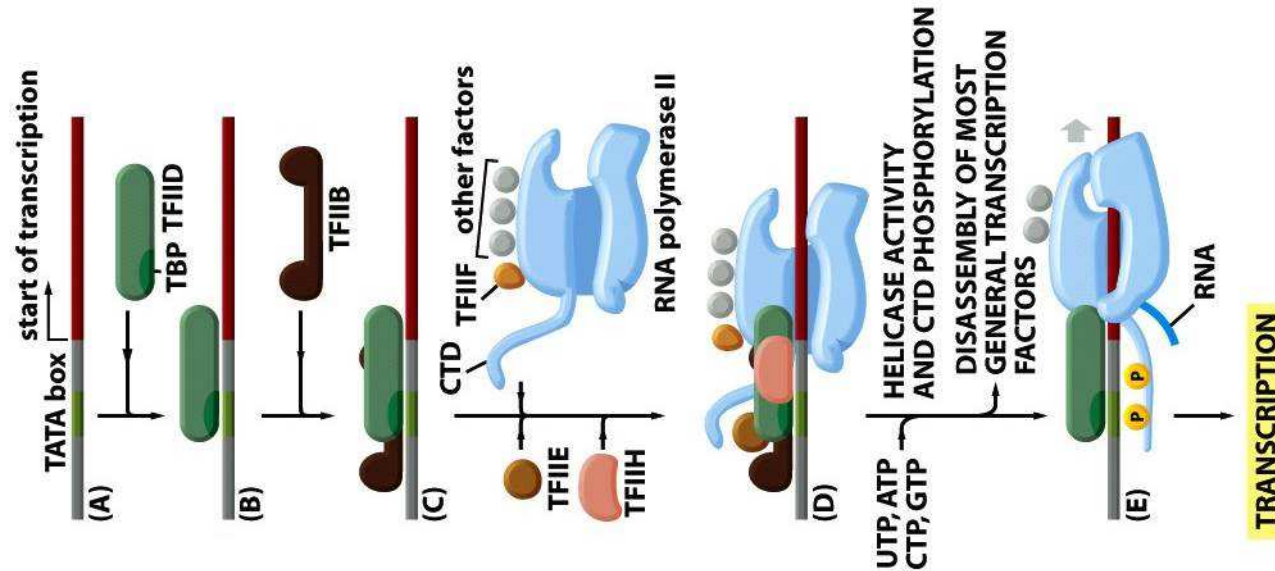
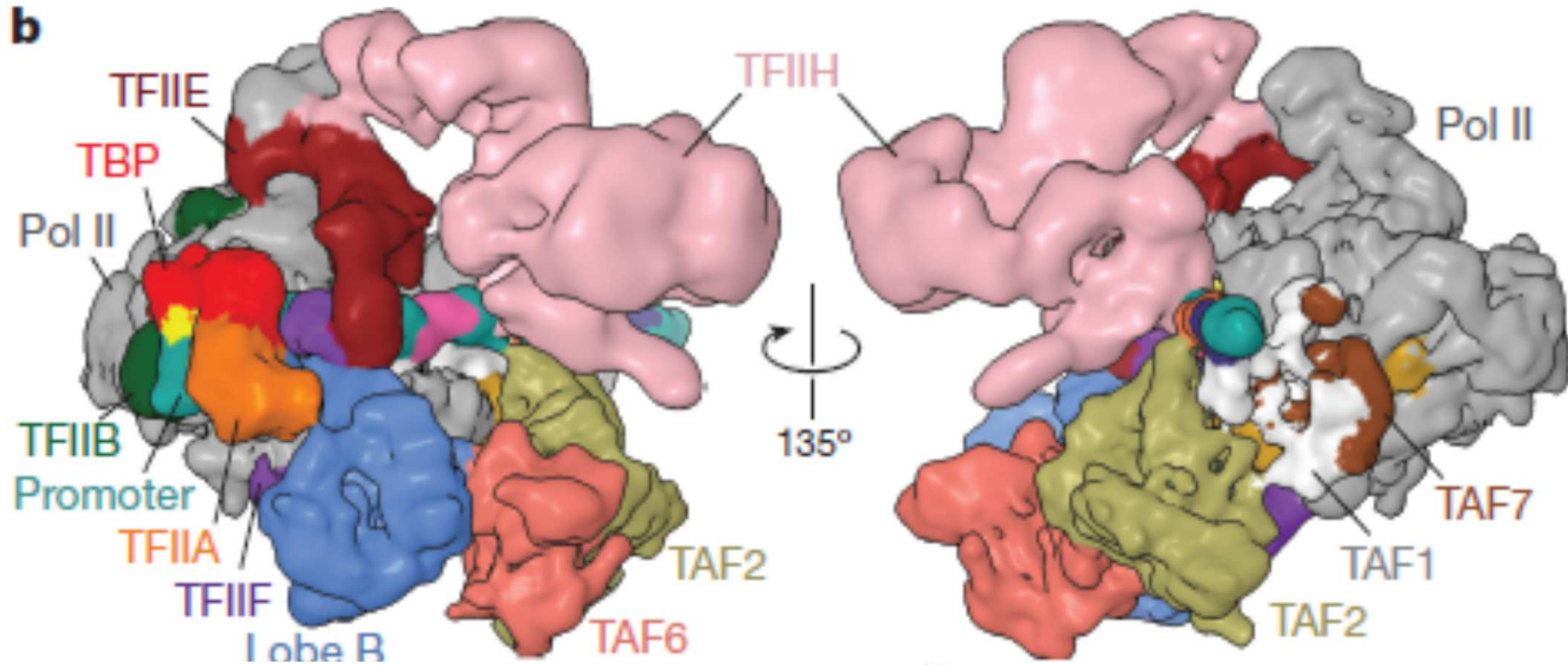
lidský PIC komplex
He et al, Nature, 2013



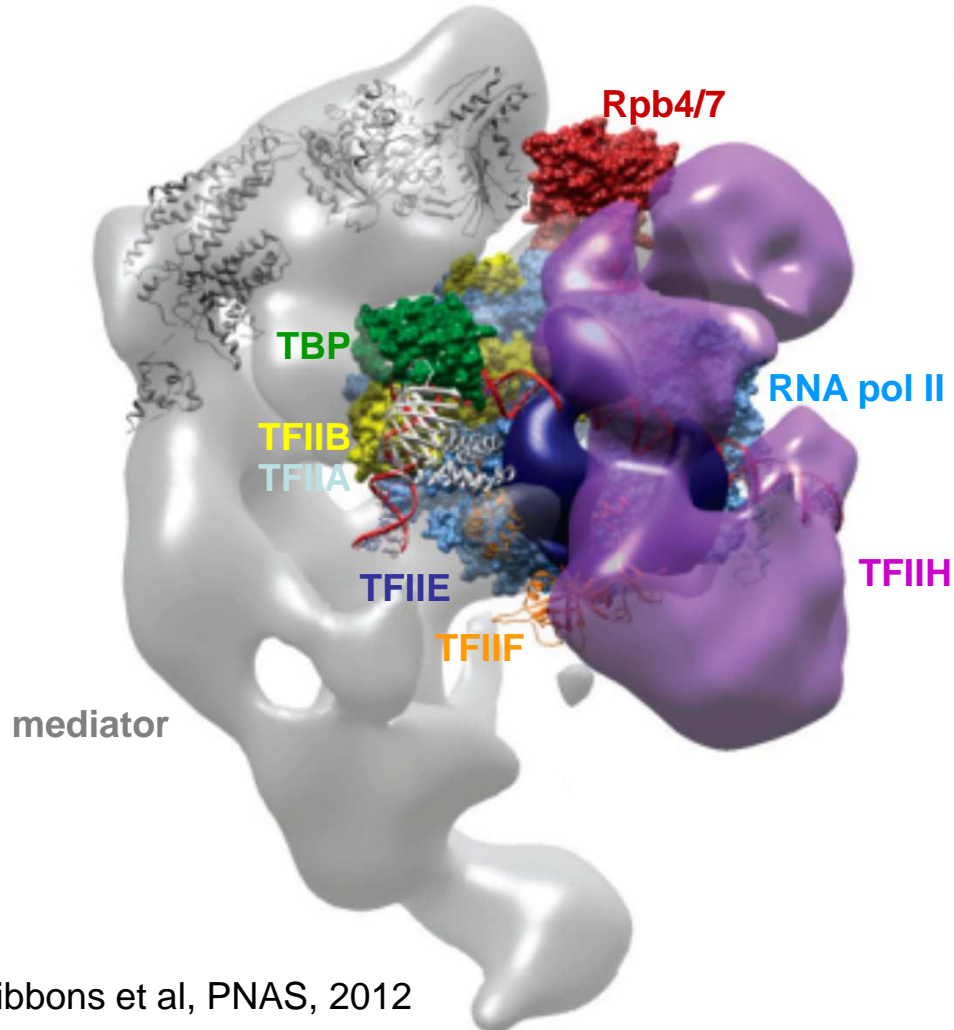
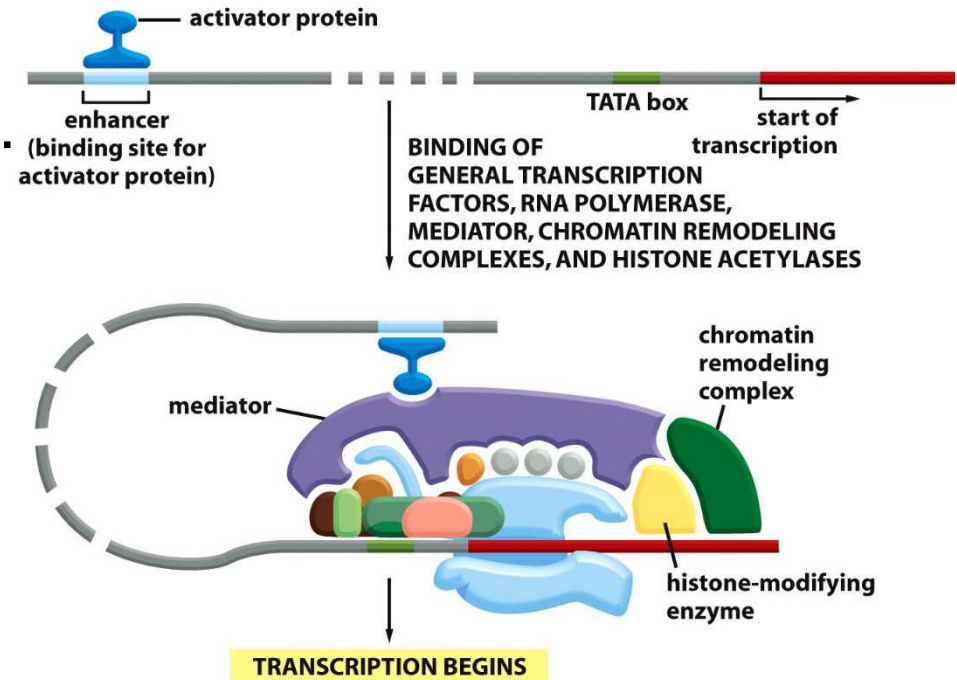
- **TFIIH** (10 podjednotek, 450KDa), podkomplex CDK7-cyclin H-MAT1 fosforyluje pol II (Rpb1)
- XPB v kontaktu s DNA rozvíjí dvoušroubovici

Kompletní PIC i s TFIID komplexem

Louder et al, Nature, 2016

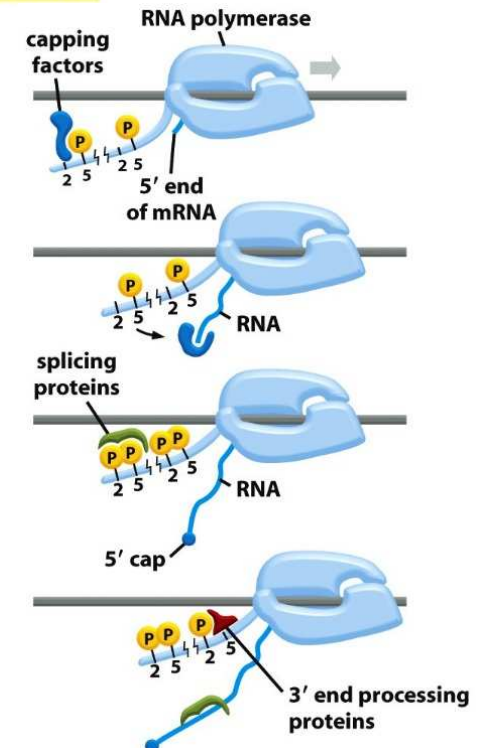


- celý mechanismus aktivace transkripce od vazby aktivátoru ...
 ... uvolnění chromatinové struktury ...
 ... zahrnuje ještě další komplexy (jako např. mediator)



Gibbons et al, PNAS, 2012

Příště
 Dr. Blažek:
 Úloha Cdk
 kinás v
 regulaci
 transkripce a
 buněčného
 cyklu



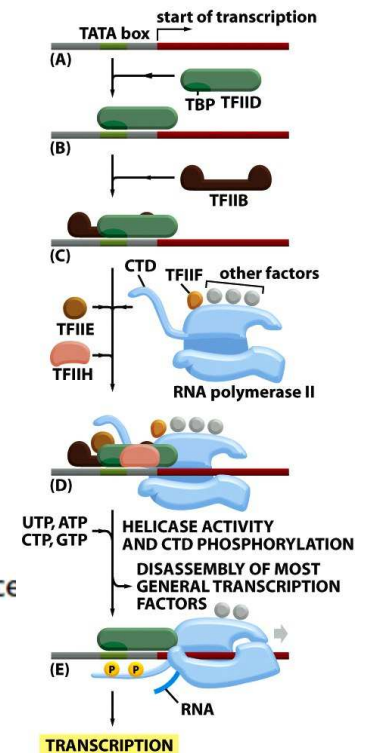
začátek transkripce - faktory

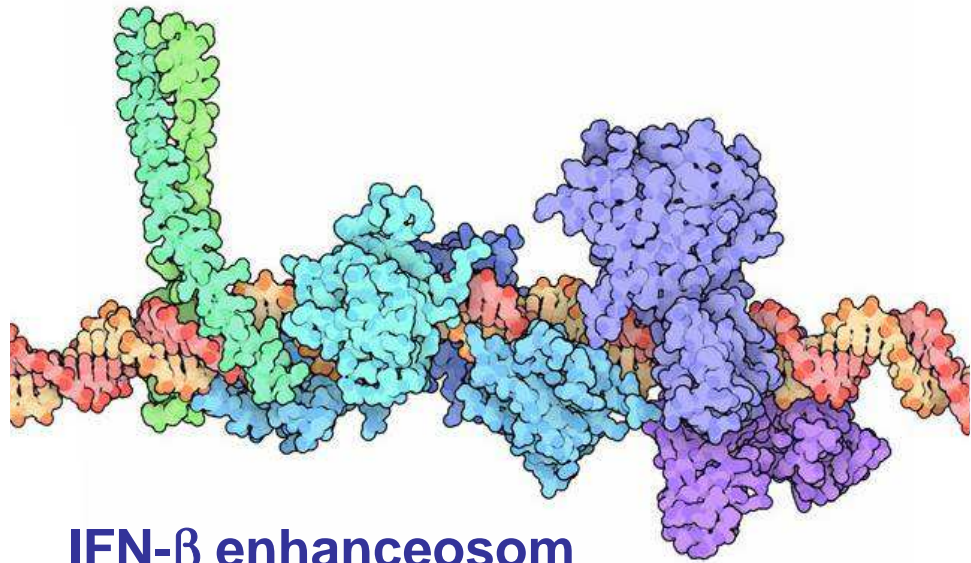
TABLE 1 Components of the human general transcription machinery

| Factor | Protein composition | Function |
|--------|---|---|
| TFIIA | p35 (α), p19 (β), and p12 (γ) | Antirepressor; stabilizes TBP-TATA complex; coactivator |
| TFIIB | p33 | Start site selection; stabilize TBP-TATA complex; pol II/TFIIF recruitment |
| TFIID | TBP + TAFs (TAF1-TAF14) | Core promoter-binding factor Coactivator Protein kinase Ubiquitin-activating/conjugating activity Histone acetyltransferase |
| TFIIE | p56 (α) and p34 (β) | Recruits TFIIH Facilitates formation of an initiation-competent pol II Involved in promoter clearance |
| TFIIF | RAP30 and RAP74 | Binds pol II and facilitates pol II recruitment to the promoter Recruits TFIIE and TFIIH Functions with TFIIB and pol II in start site selection Facilitates pol II promoter escape Enhances the efficiency of pol II elongation |
| TFIIH | p89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cyclin H, p34, p32/MAT1, and p8/TFB5 | ATPase activity for transcription initiation and promoter clearance Helicase activity for promoter opening Transcription-coupled nucleotide excision repair Kinase activity for phosphorylating pol II CTD E3 ubiquitin ligase activity |
| pol II | RPB1-RPB12 | Transcription initiation, elongation, termination Recruitment of mRNA capping enzymes Transcription-coupled recruitment of splicing and 3' end processing factors CTD phosphorylation, glycosylation, and ubiquitination |

Dr. Špirek

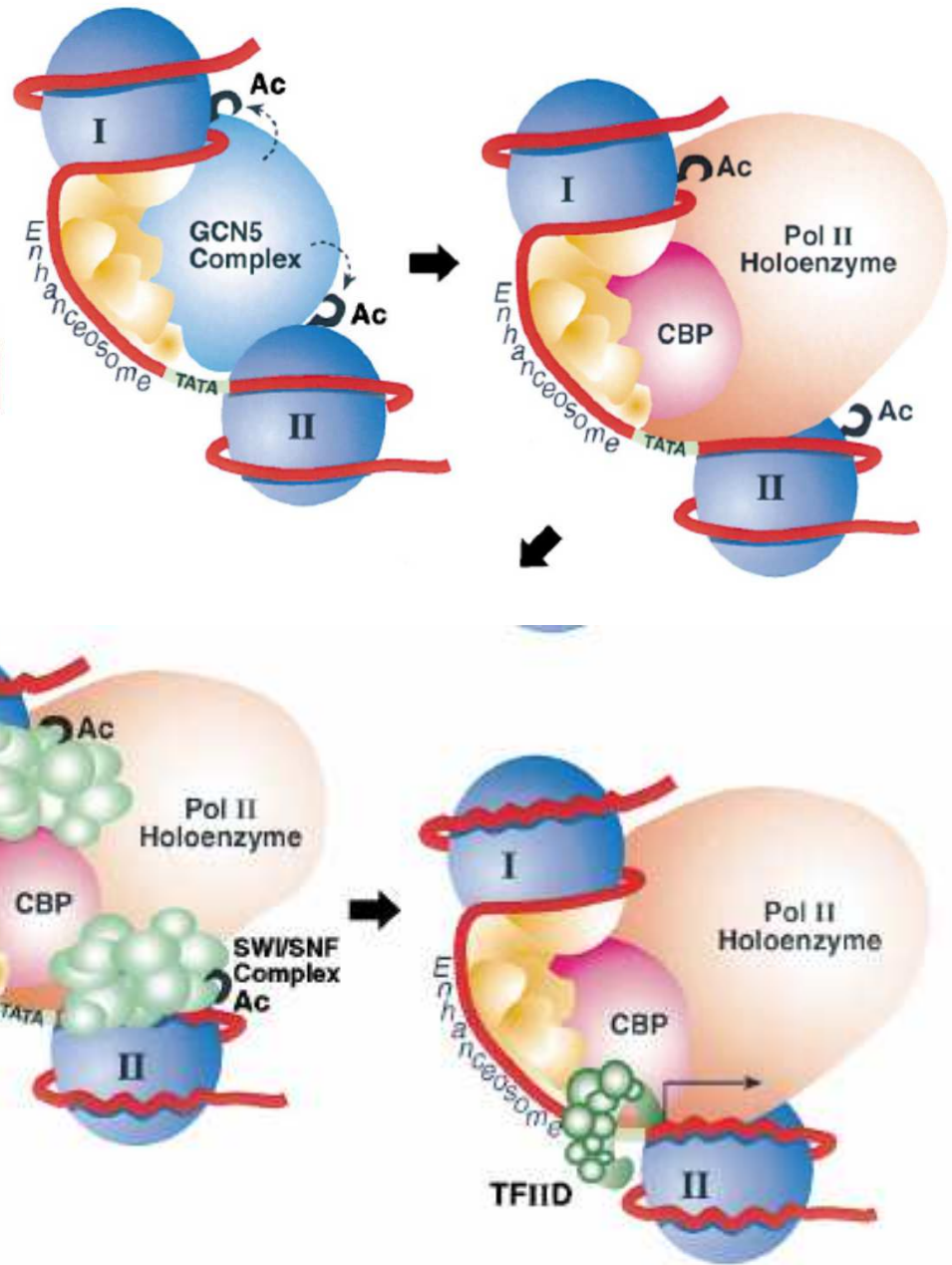
Dr. Blažek





IFN- β enhanceosom

DNA není rovná volná kolej ...,
 ale obrovský nukleoproteinový
 komplex
 před i v průběhu transkripce
 musí být proteiny (nukleosomy)
 rozvolněny či odstraněny a poté
 opět navázány

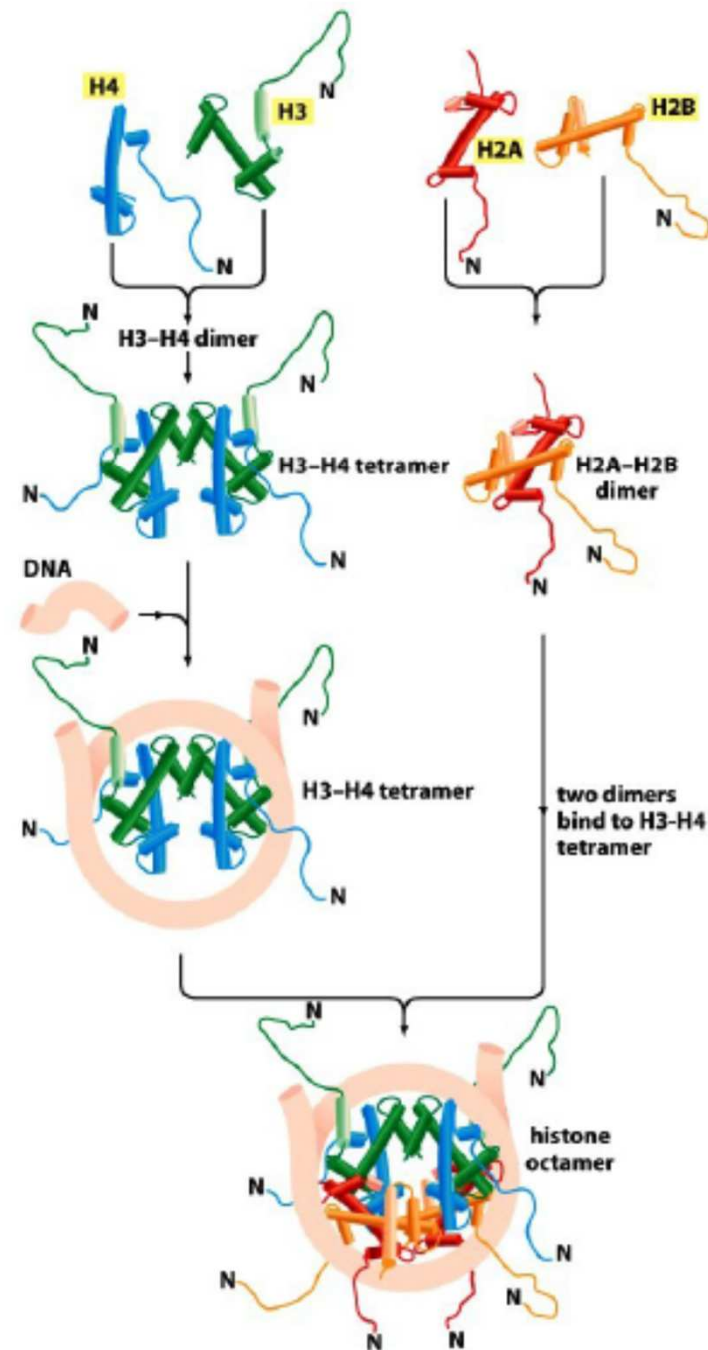


...rozbalování nukleosomů

klíčová interakce mezi dvěma H3-H4 dimery je zprostředkována histonem H3

Dimery H2A-H2B se vážou následně z obou stran tetrameru (H3-H4)₂

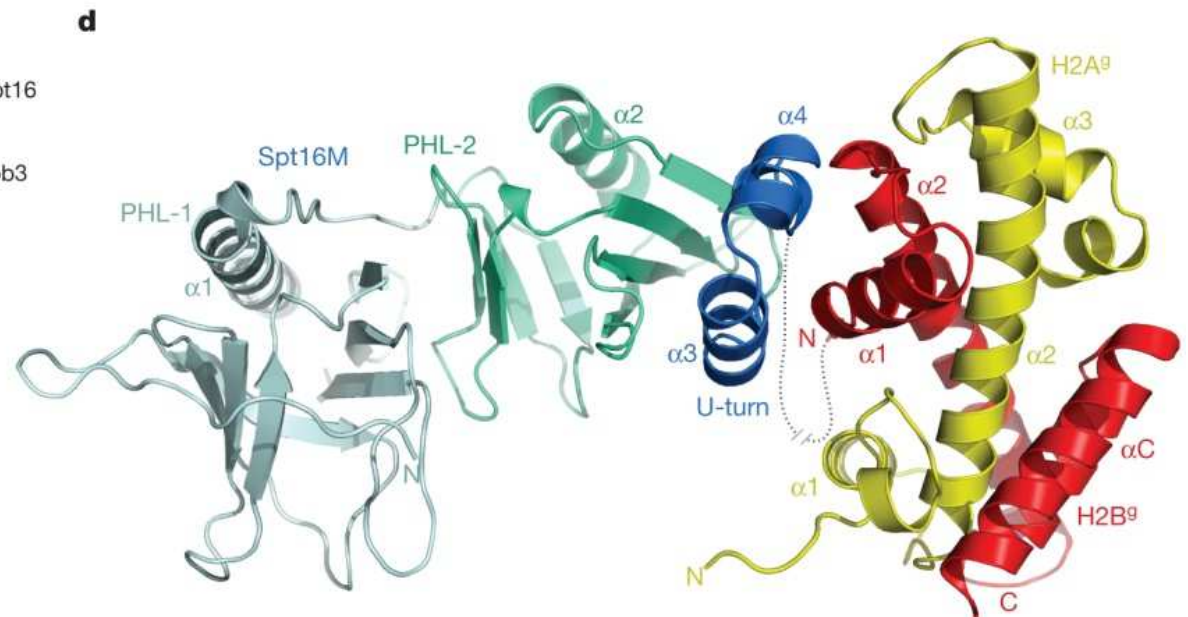
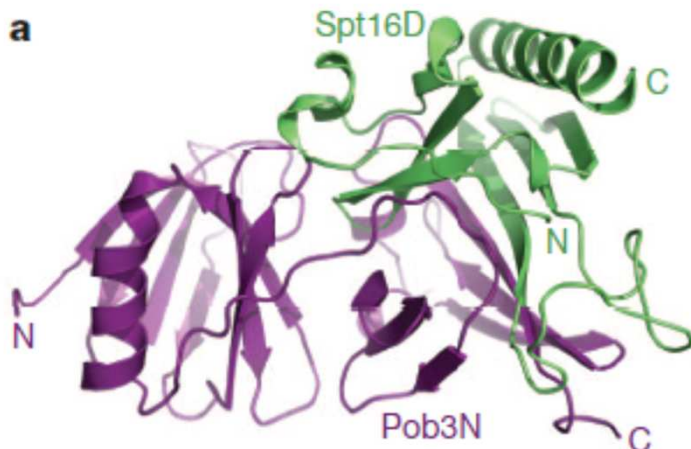
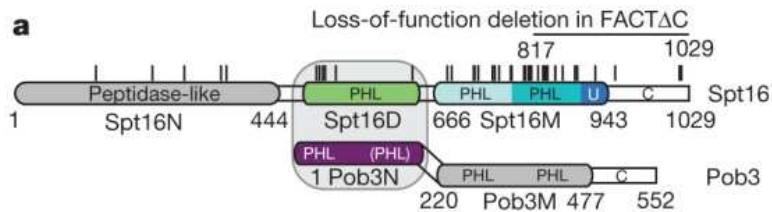
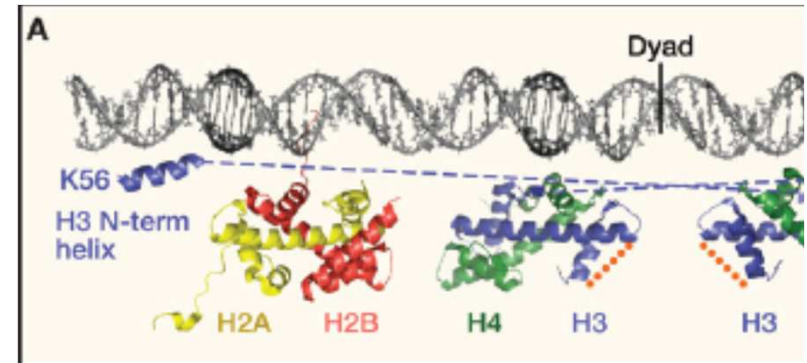
- v opačné pořadí lze nukleosom rozbalit
- chaperony (ATP-dependent remodelační "stroje", „*chaperony pro komplexy*“) pomáhají sbalit i rozbalit nukleosomy



FACT komplex

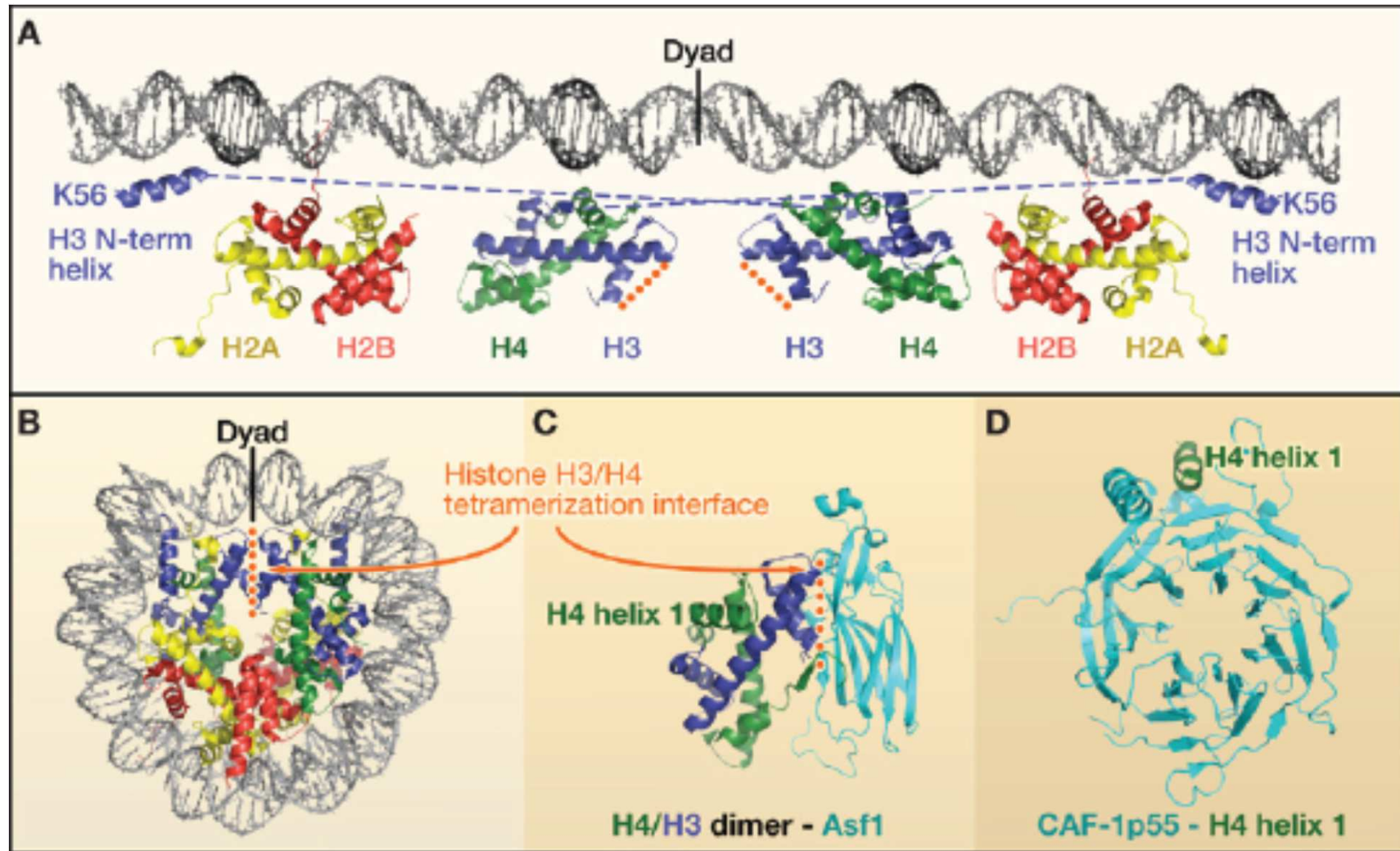
- histon chaperon komplex FACT (facilitates chromatin transcription) je složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSRP1)

- rozeznává histon H2A-H2B heterodimer (interferuje s vazbou na DNA tzn. rozrušení vazby H2A-H2B s DNA)



Hondele et al., Nature, 2013

Histonové H3-H4 chaperony



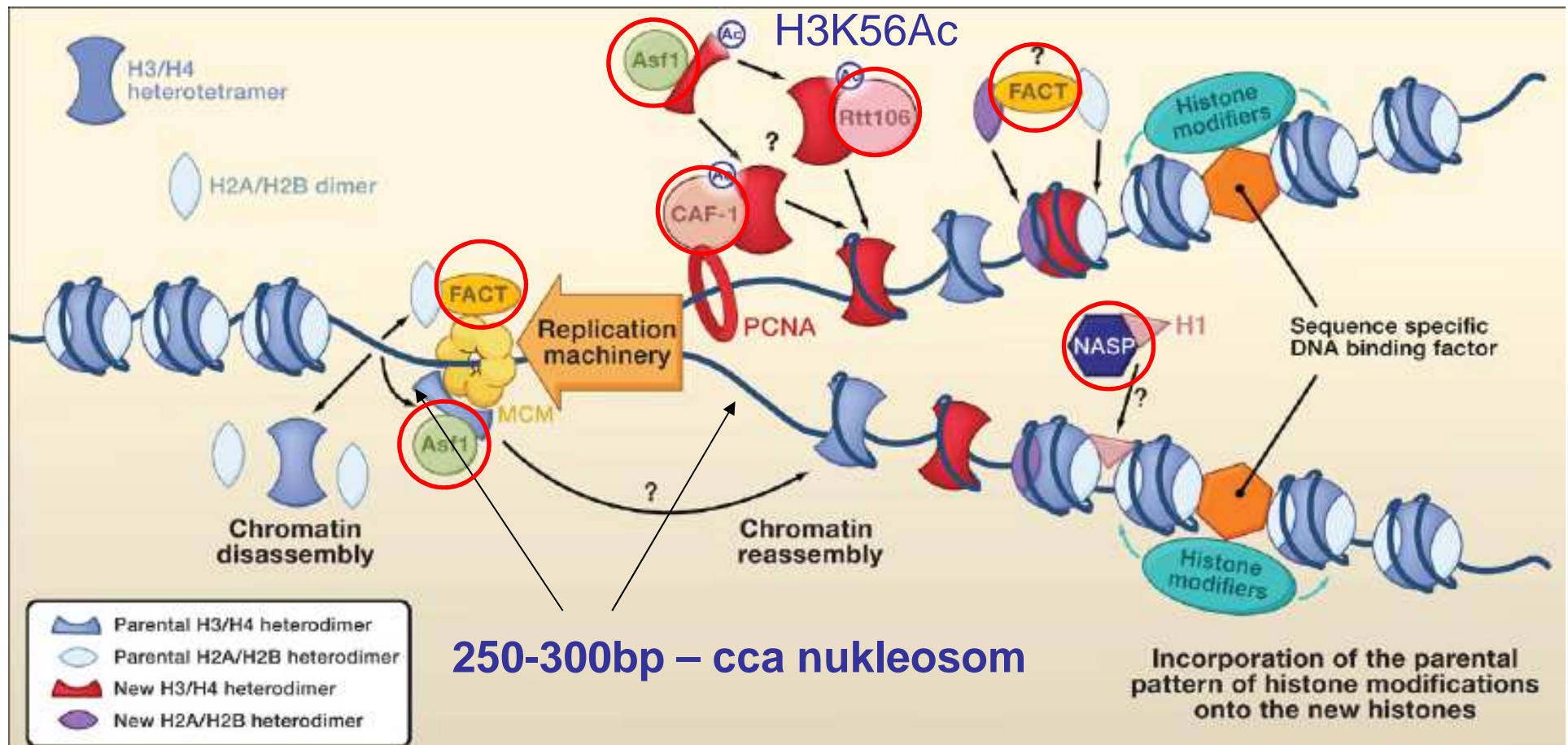
Ransom et al, Cell, 2010

- ASF1 (antisilencing function) – interferuje s tetramerizačním povrchem H3-H4
- CAF1 (chromatin assamby factor) – interferuje s vazbou H3-H4 k DNA)

Histon chaperony - replikace

- procesy jako replikace, transkripce, oprava DNA vyžadují odstranění nukleosomů (obsahují ssDNA) ... a poté zase jejich nabalení ... (feedback: inhibice chromatin assembly inhibuje disassembly nukleosomů)

Ransom et al, Cell, 2010



Histon chaperony

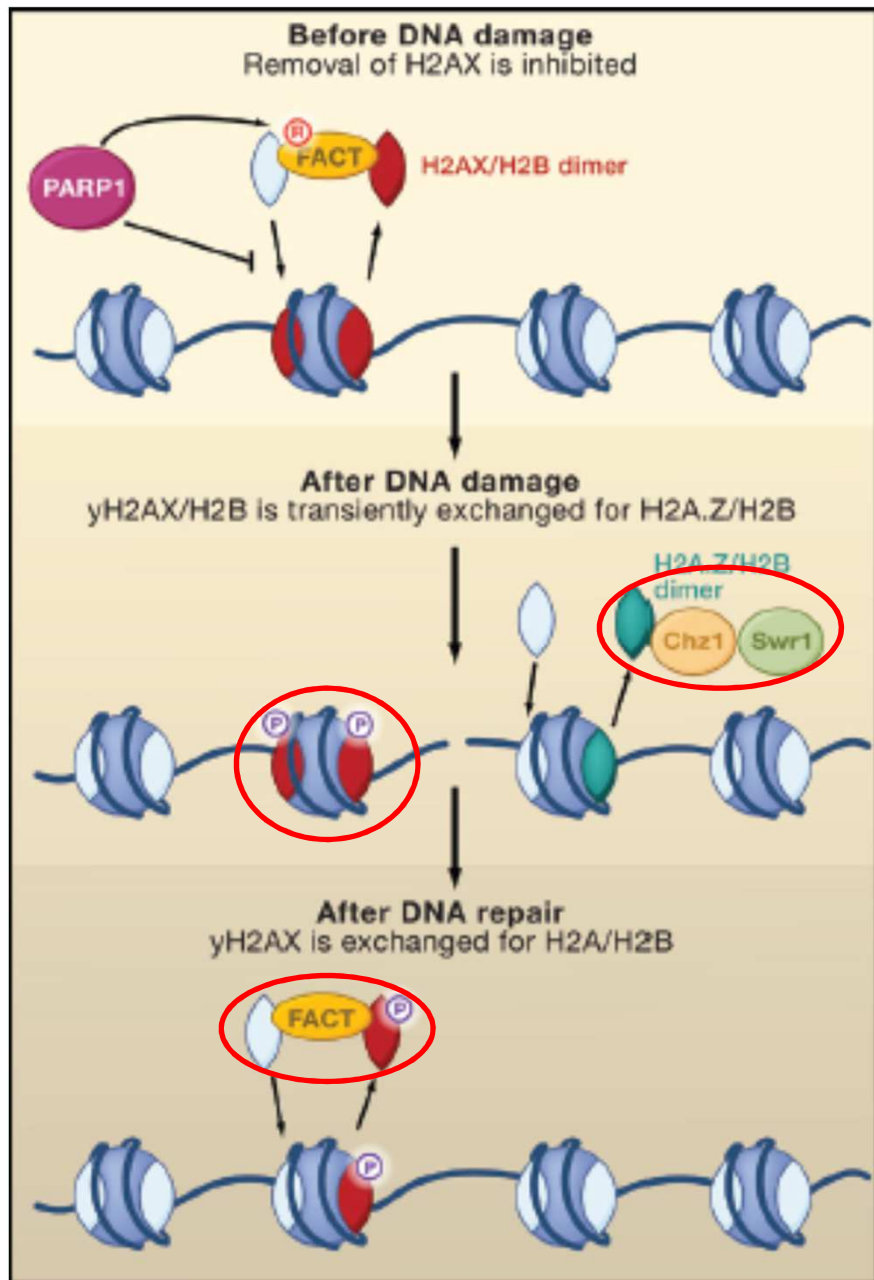
Table 1. Histone Chaperones Implicated in DNA Replication and Repair

| 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 | PCNA, BLM, WRN, Asf1; chromatin assembly; promotes checkpoint recovery |
| | Asf1 | RFC, MCM, CAF-1; promotes H3 K56 acetylation leading to chromatin assembly; chromatin disassembly*; histone buffer | CAF-1; promotes H3 K56 acetylation leading to chromatin assembly; promotes checkpoint recovery |
| | Rtt106 | Chromatin assembly; heterochromatin silencing | |
| | NASP | Histone buffer* | Histone buffer* |
| H2A/H2B | FACT (Spt16 and Pob3); also binds H3/H4 | MCM, RPA, DNA pol I; chromatin assembly*; chromatin disassembly* | γ H2AX/H2B exchange for H2A/H2B |
| | NAP1 | Histone shuttling; chromatin assembly**; chromatin disassembly** | |
| | Chz1 | | H2AZ.H2B exchange for H2A/H2B; promotes DNA resection |
| H1 | NASP | Chromatin assembly* | |
| CenH3/H4 | Scm3 (S.c. and S.p.); HJURP (H.s.) | Mis18, RbAp48, Nucleophosmin; centromere identity | |

*** indicates a likely role although not conclusively proven, and ** indicates a possible role. S.c., *Saccharomyces cerevisiae*; S.p., *Schizosaccharomyces pombe*; H.s., *Homo sapiens*. Only the interacting proteins that are pertinent to DNA repair and replication have been listed. The sources of all information given are cited in the text.

- nově syntetizované H3 (replikace) jsou acetylované na K56 – jsou specificky rozeznávány a zainkorporovávány 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)

Oprava poškozené DNA – histonové varianty



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)
- **H2A.Z varianta** je zainkorporována v okolí poškození (**SWR** a Chz1 – remodelační komplexy) a pomáhá resekci DNA
- 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)

Histonové varianty

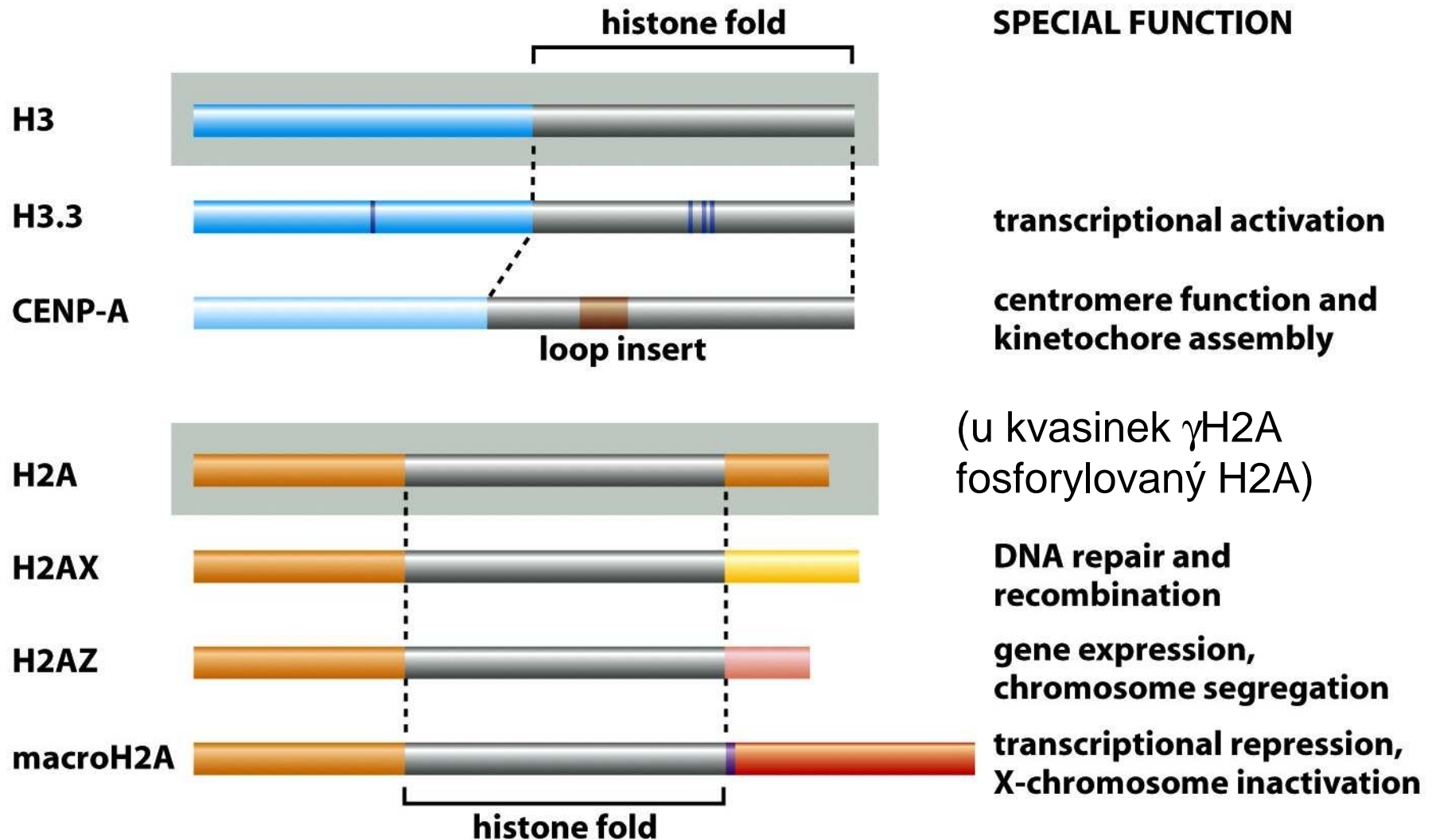
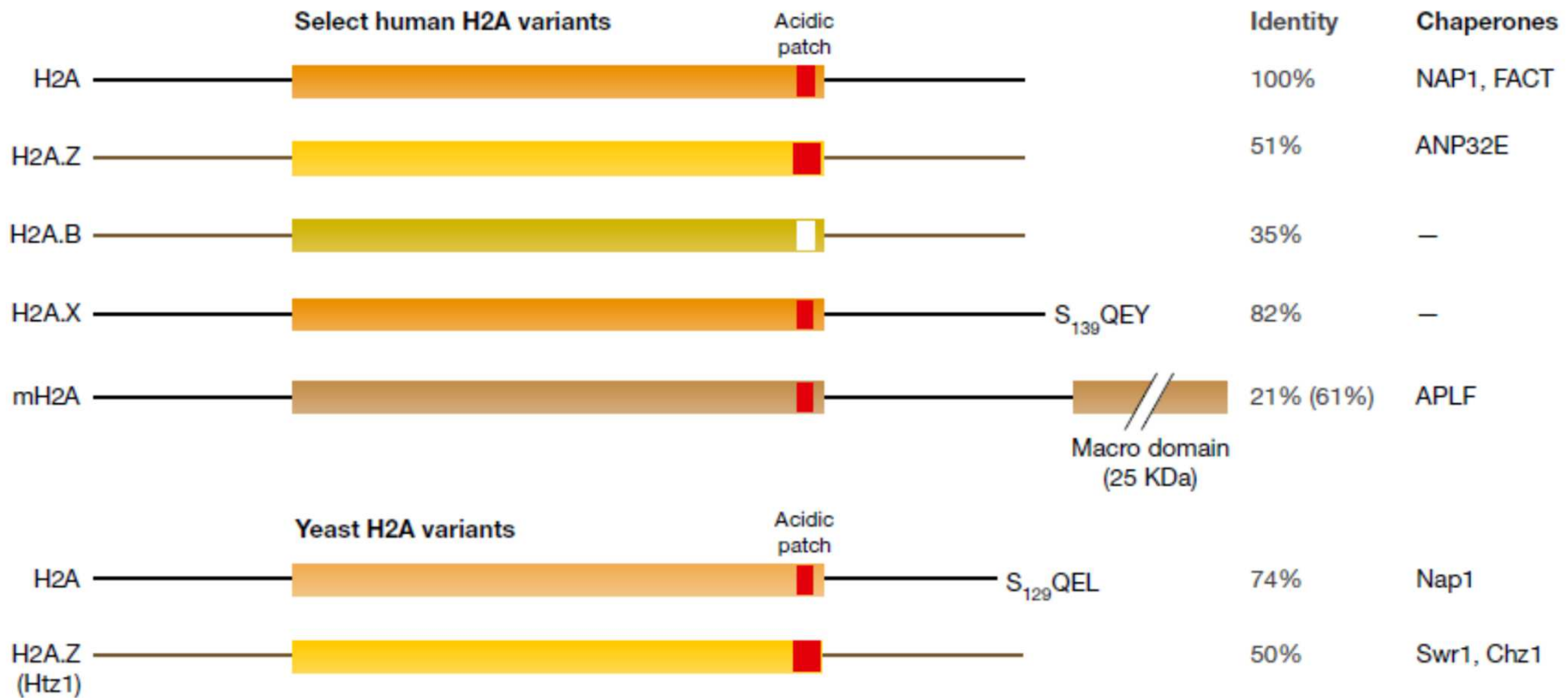
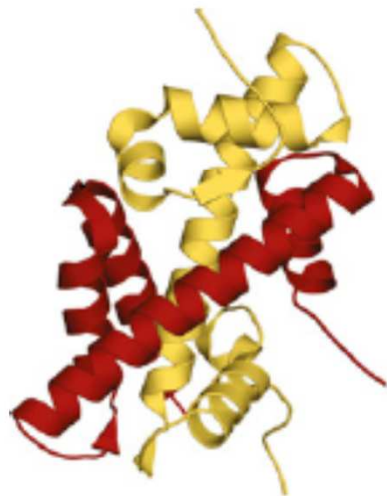


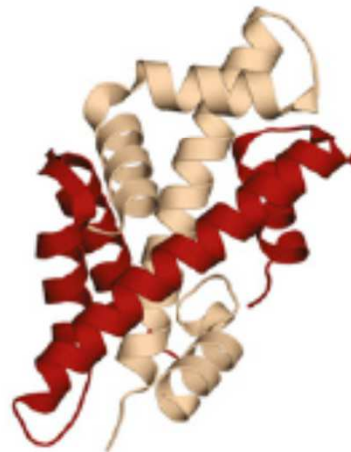
Figure 4-41 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



A H2A-H2B



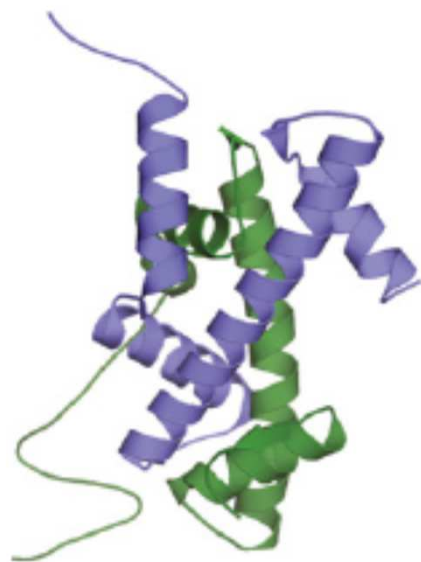
H2A.Z-H2B



mají (mírně) odlišné vlastnosti
výsledný chromatin se liší od
„normálního“

| | | 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



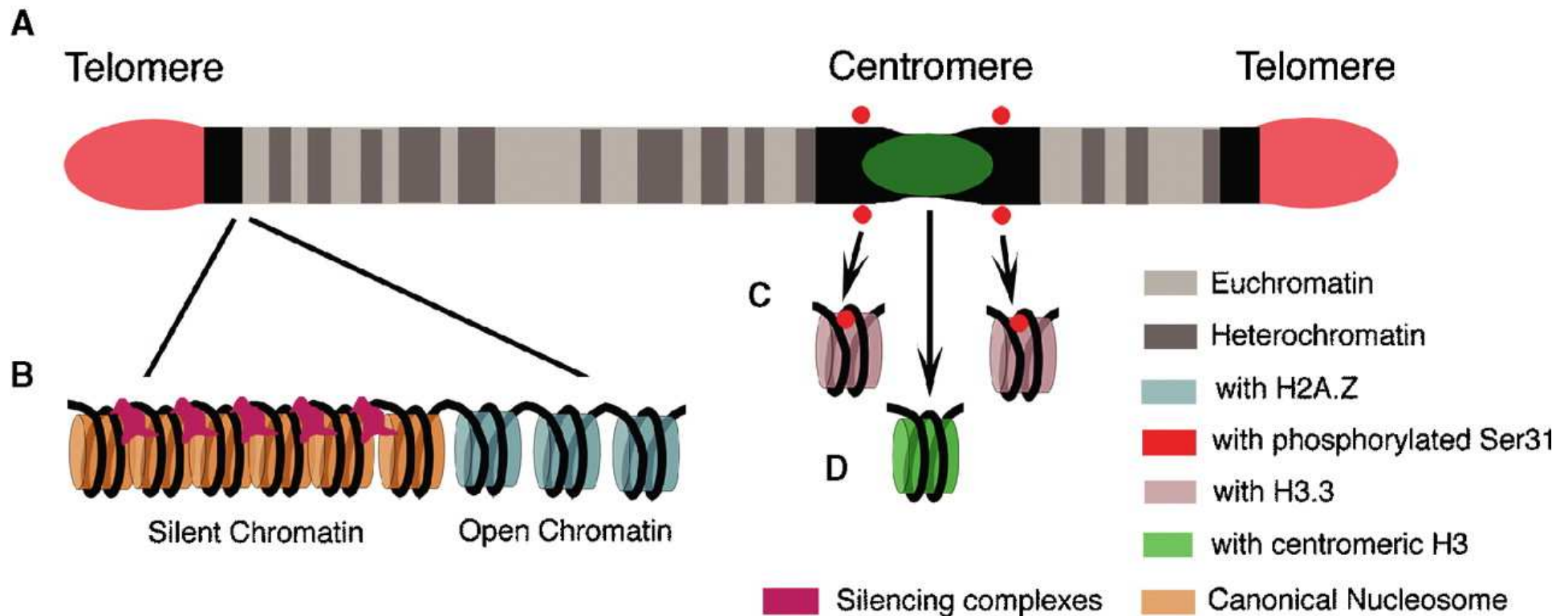
H3.3-H4



CenH3^{CENP-A}-H4



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** ... 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 chaperonů 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 mikrotubulů (a kohesiny) zajišťují správnou segregaci v
 anafázi – CENP-A musí mít jiné vazebné schopnosti ...

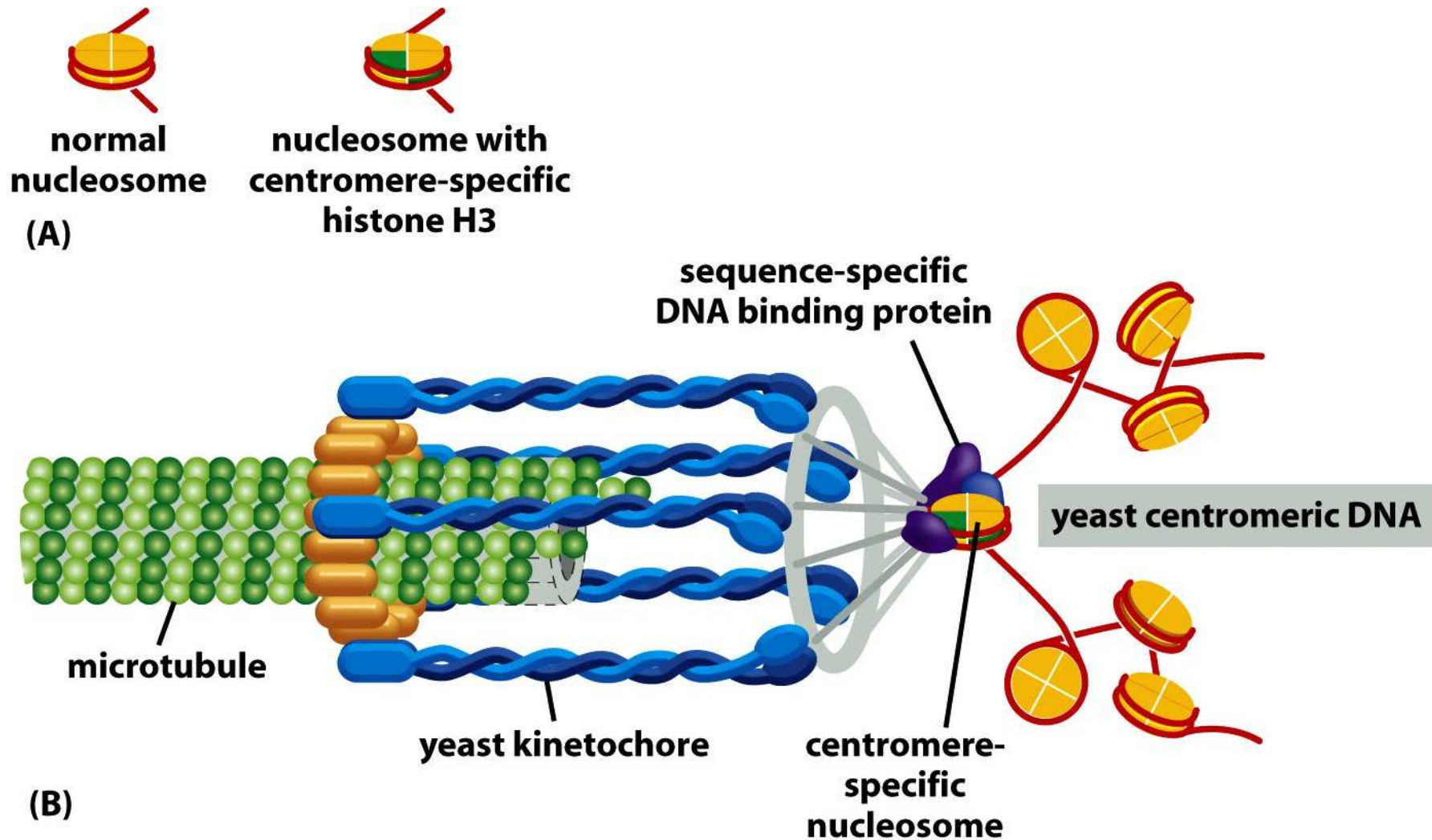
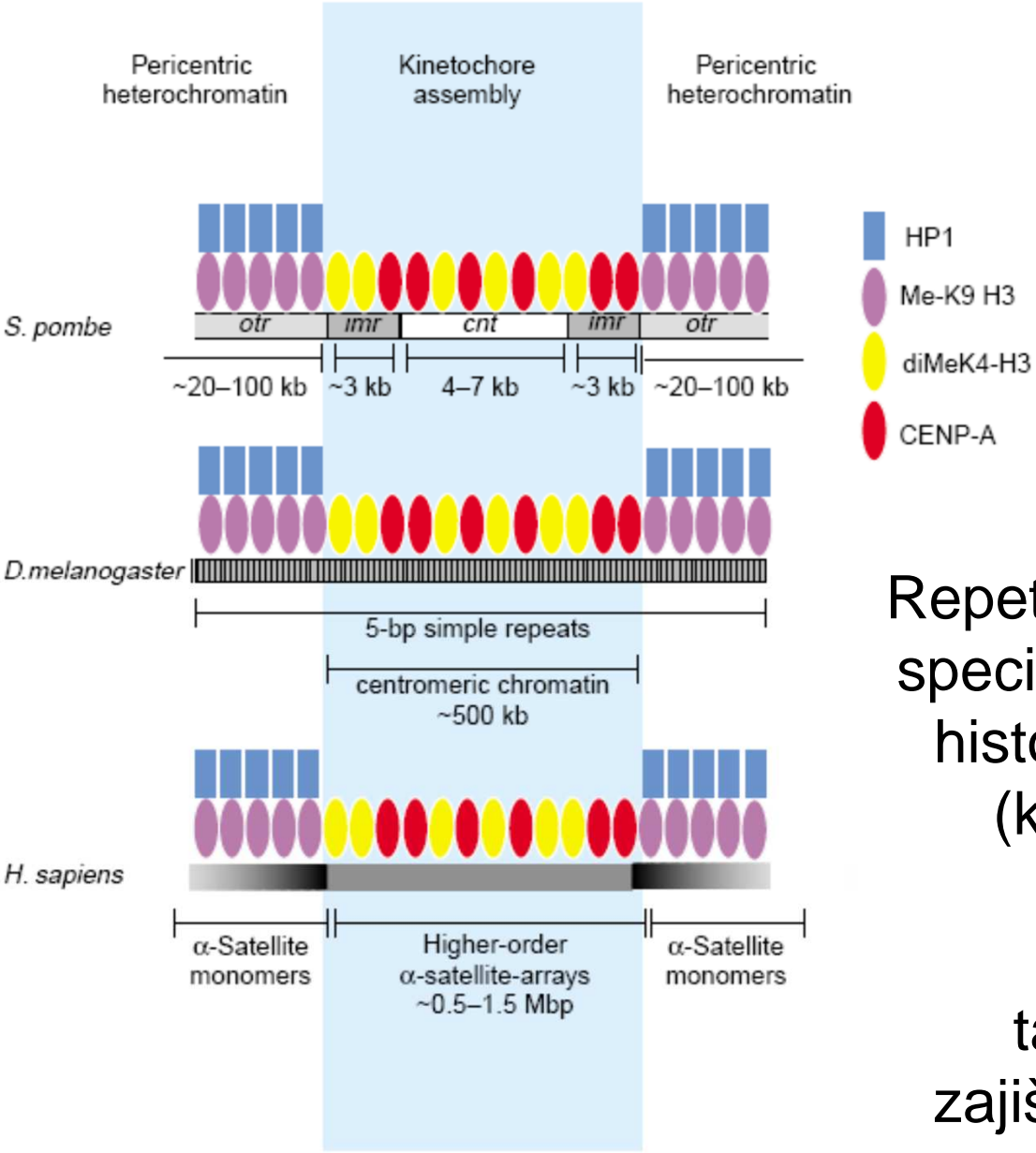


Figure 4-48 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

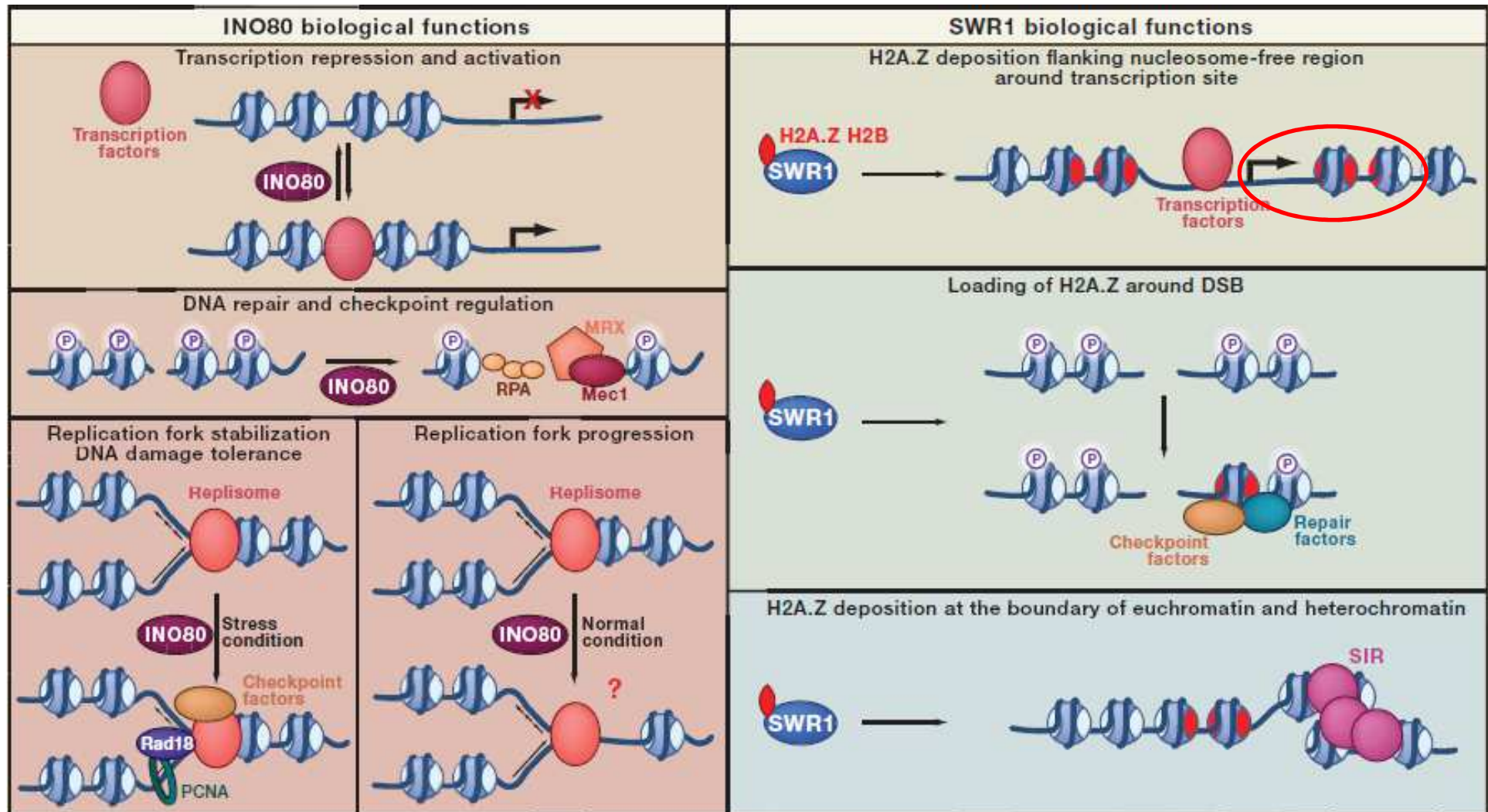
Centromery



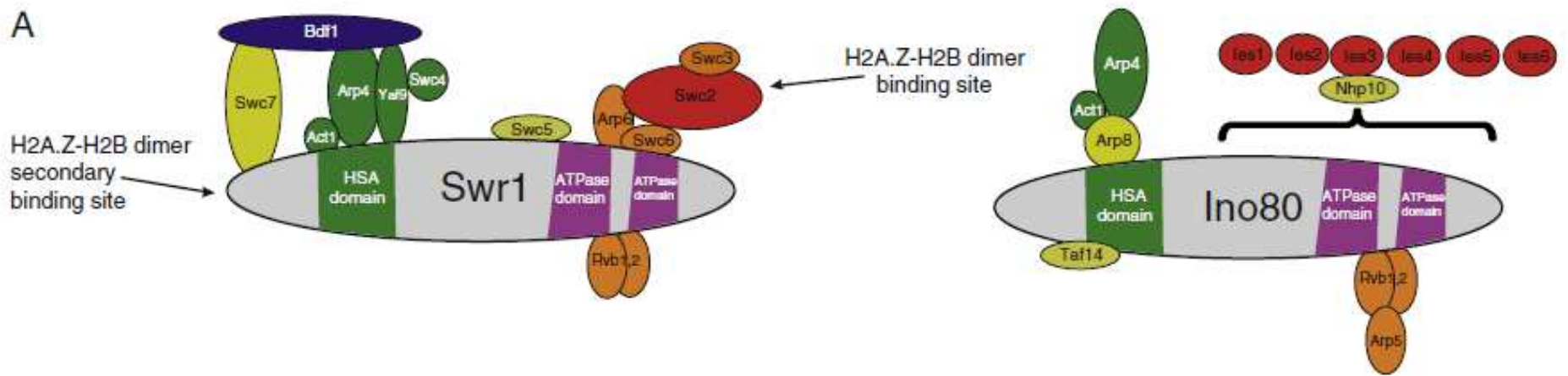
Repetitivní sekvence vytvářející specifický chromatin – CENP-A histon, který kotví kinetochoru (kolem je pericentromerický heterochromatin a SMC komplexy) tah mikrotubulů a kohesiny zajišťují správnou segregaci v anafázi

Remodelační komplexy

- neodstraňují histony, ale pomáhají při výměně histonových variant (SWR) nebo „sklouznutí“ (INO80, RSC) tj. remodelování nukleosomu

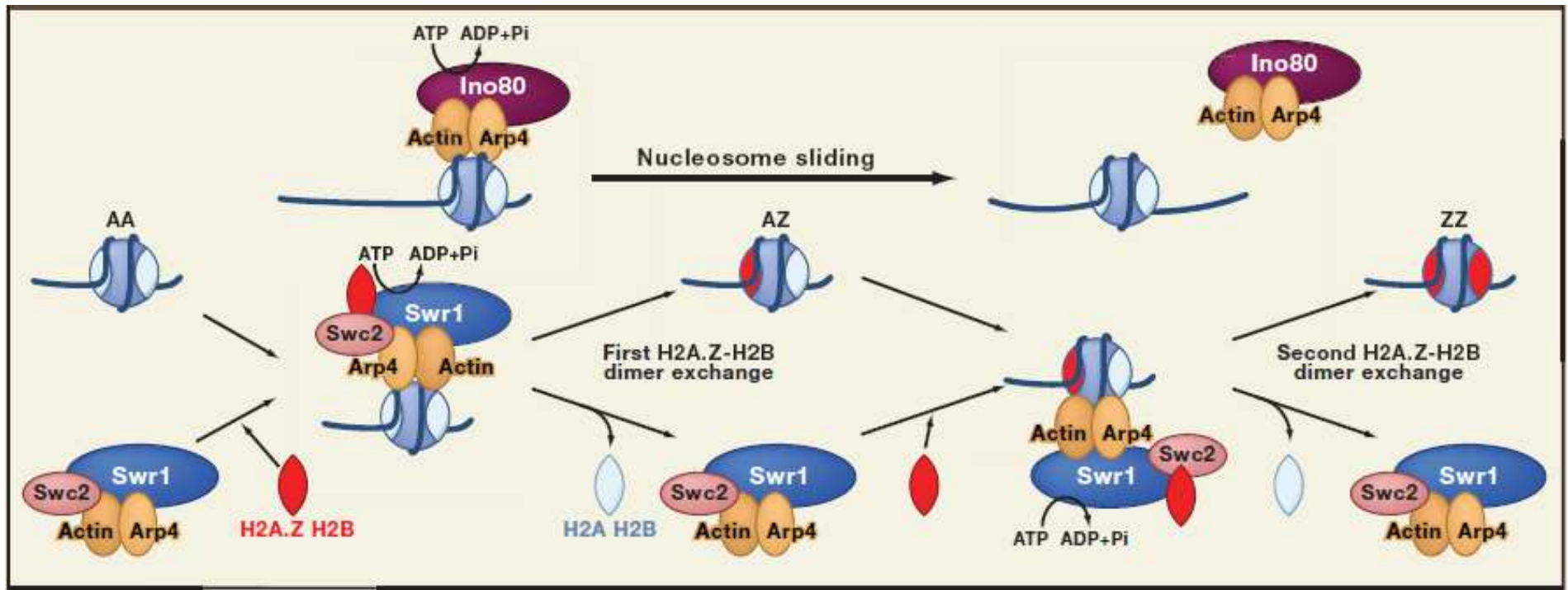


bromodoména



Billon a Cote, BBA, 2012

Bao a Shen, Snapshot in Cell, 2010



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

RSC remodelovací komplex

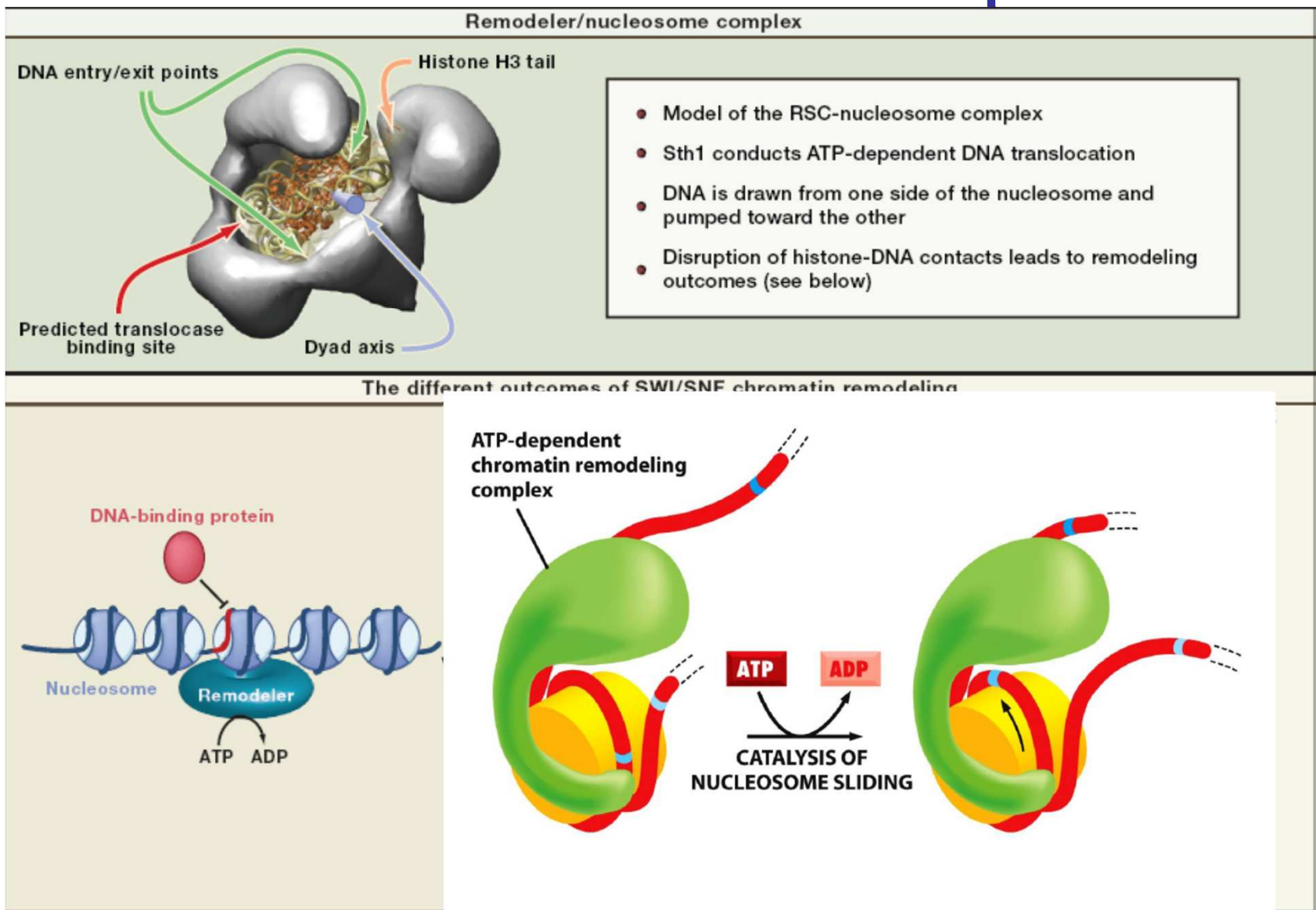
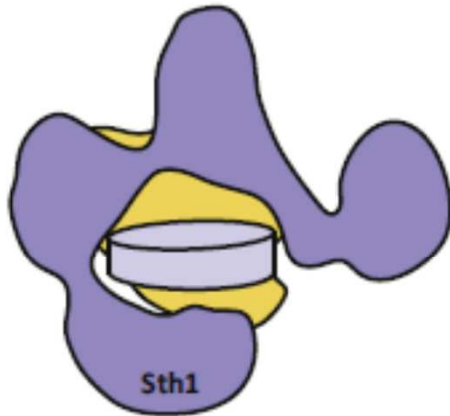


Figure 4-29 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

SNAPSHOT, Cell (144), 2011

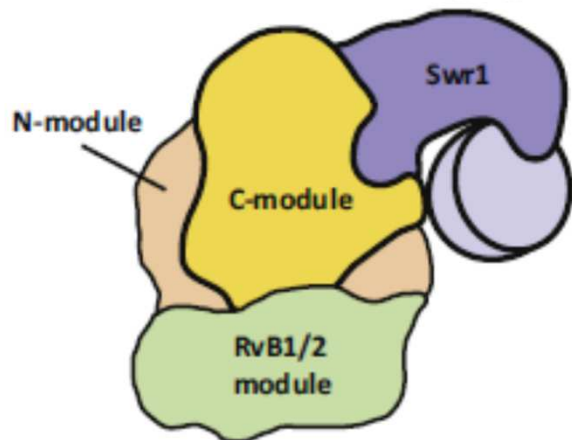
RSC (SWI/SNF) komplexy obklopi nukleosom (rozvolni se vazba s DNA a posouvá se)

(A) RSC
Nucleosome engulfing

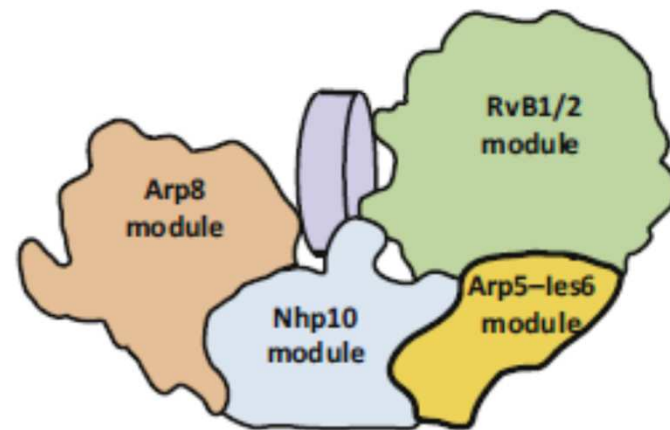


- RSC (SWI/SNF) komplexy obklopí nukleosom (rozvolní se vazba s DNA a posouvá se)
- nukleosom je zavěšen na SWR-C komplexu – komplex váže ještě dimer, který je schopen vyměnit
- nukleosom je uchopen INO80 komplexem (přes podobné složení podjednotek – fungují odlišně)

(C) SWR-C
Nucleosome clinging



(D) INO80-C
Nucleosome grasping



- 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!!)

Average human chromosome:

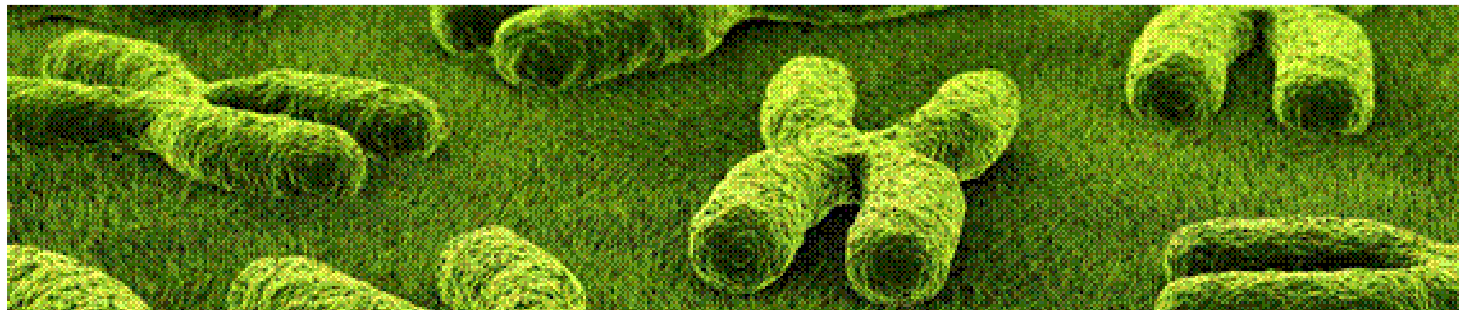
DNA molecule: ~4 cm

Mitotic chromosome ~4 μ m

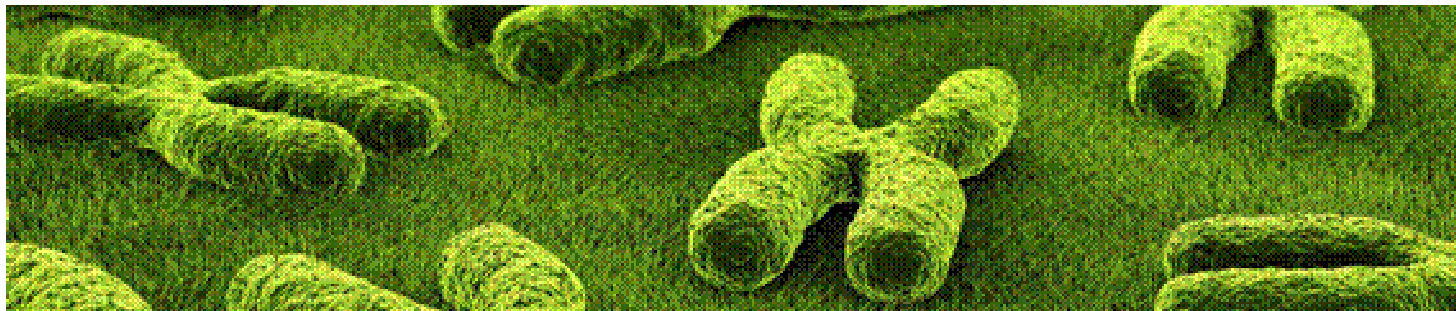
10 000x

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 řetězec 1 chromosomu cca 4cm!!)
 - **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

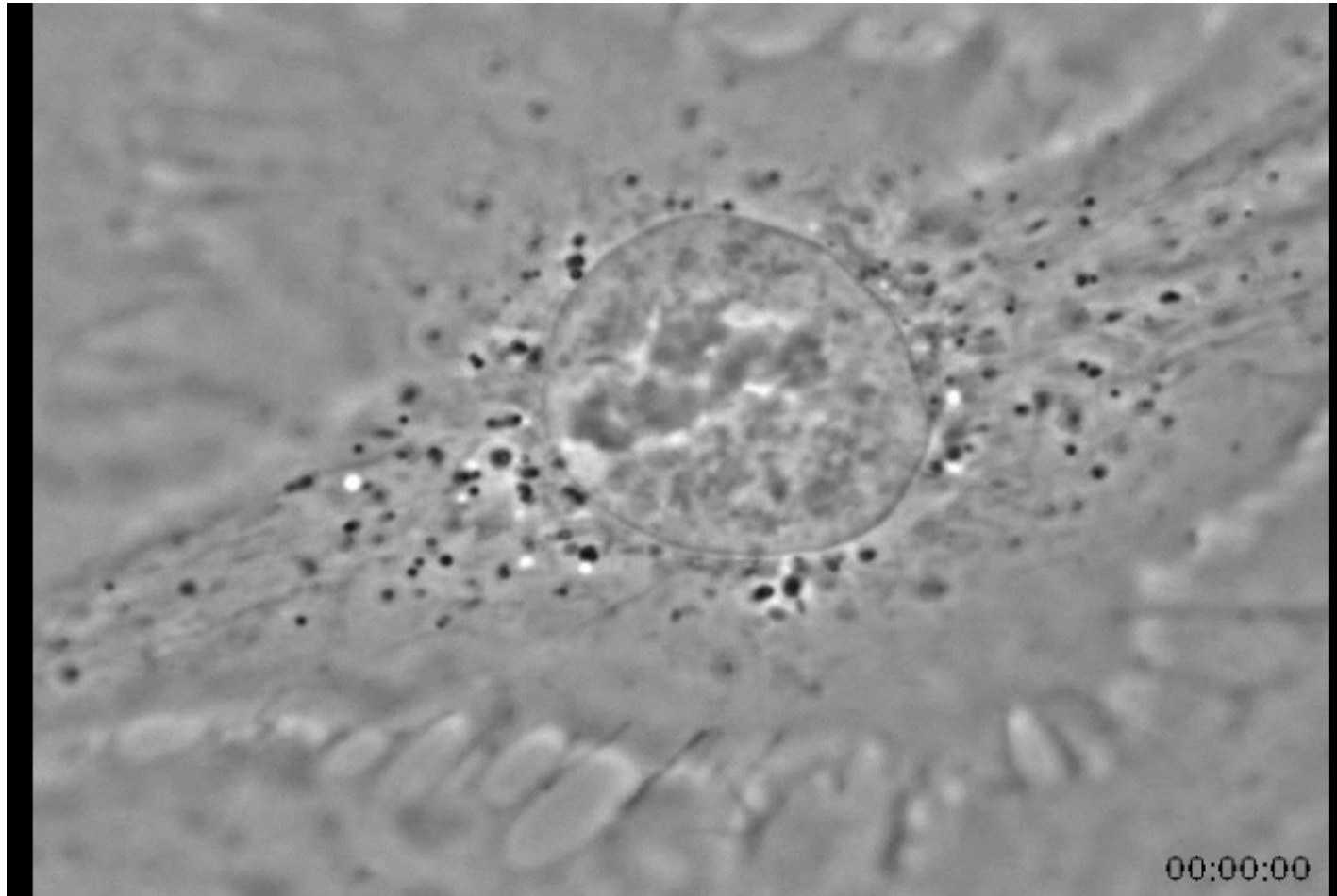


přednášky prof. Fajkuse:

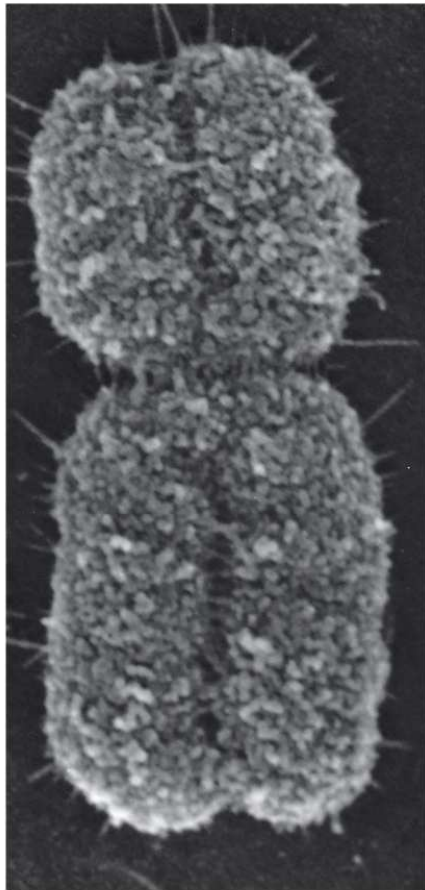
Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041)

Dynamika chromatinu

Dr. Grobky



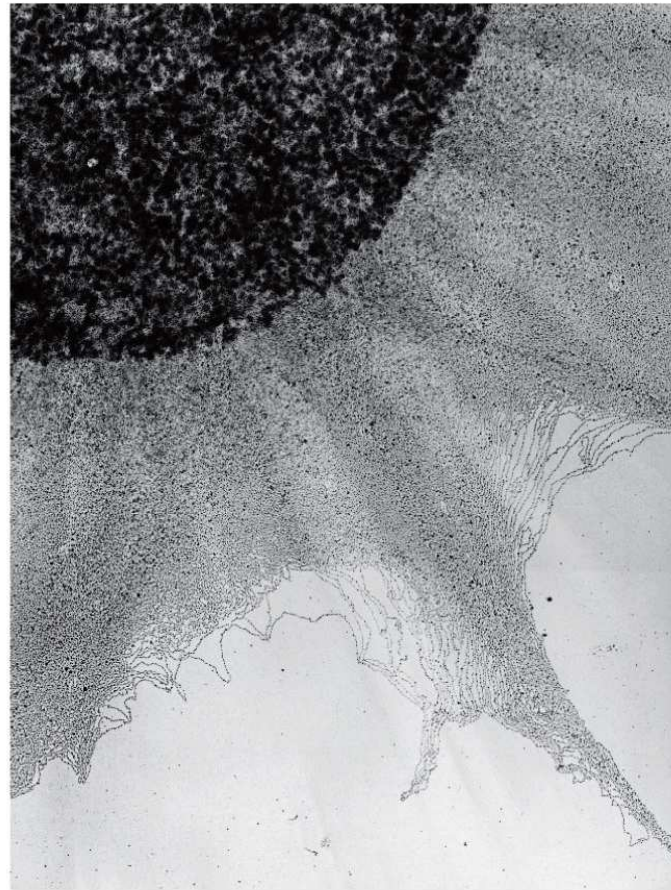
mitotický



(A)

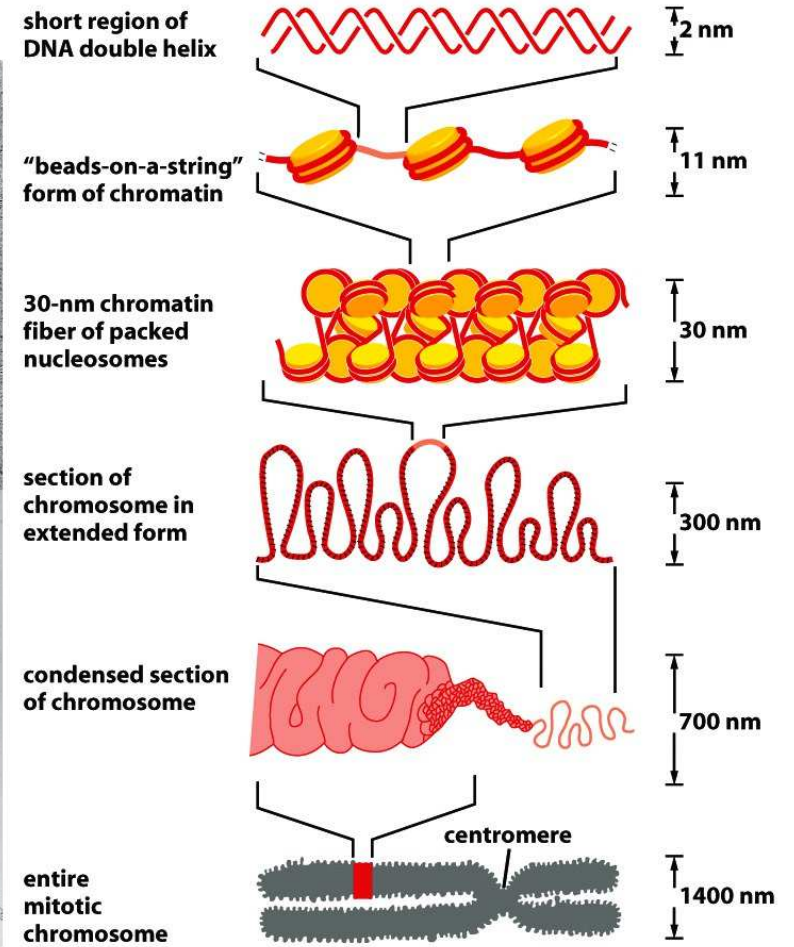
1 μm

interfázní



(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)

- H2A, H2B, H3, H4 histony vytváří nukleosomy = první úroveň organizace
- histon H1 propojuje nukleosomy
-
- Jaké jsou další organizační úrovně?
- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

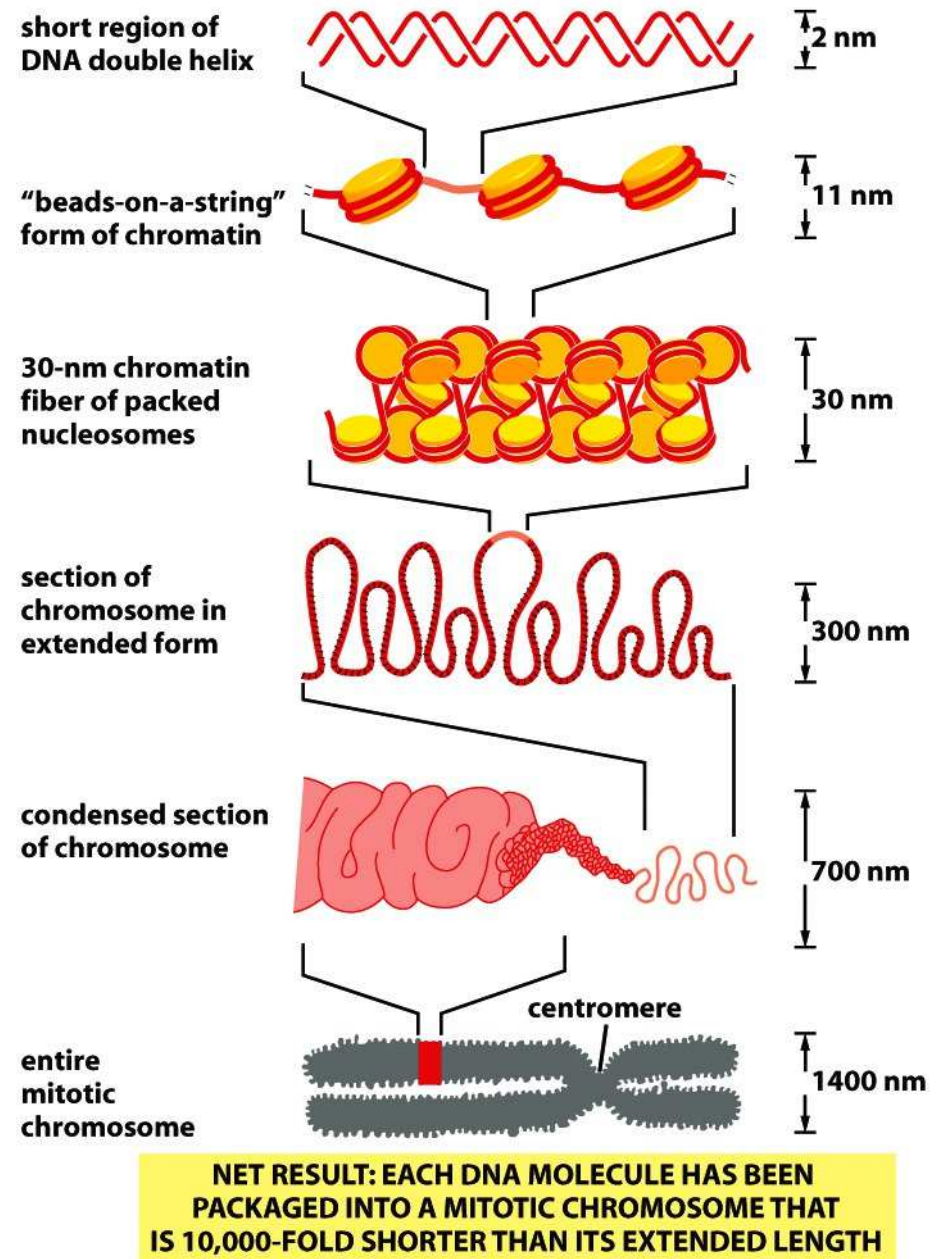
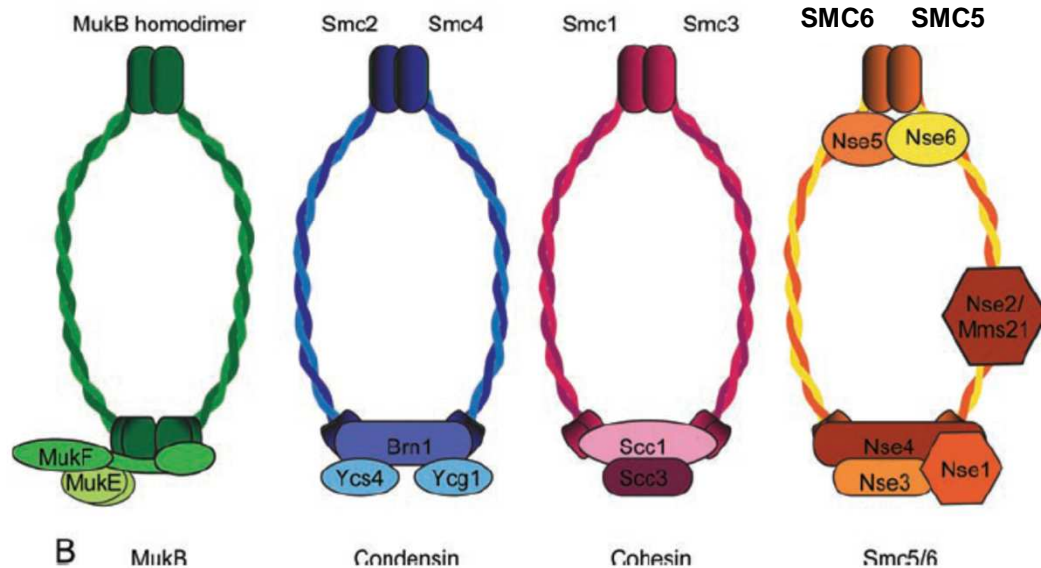
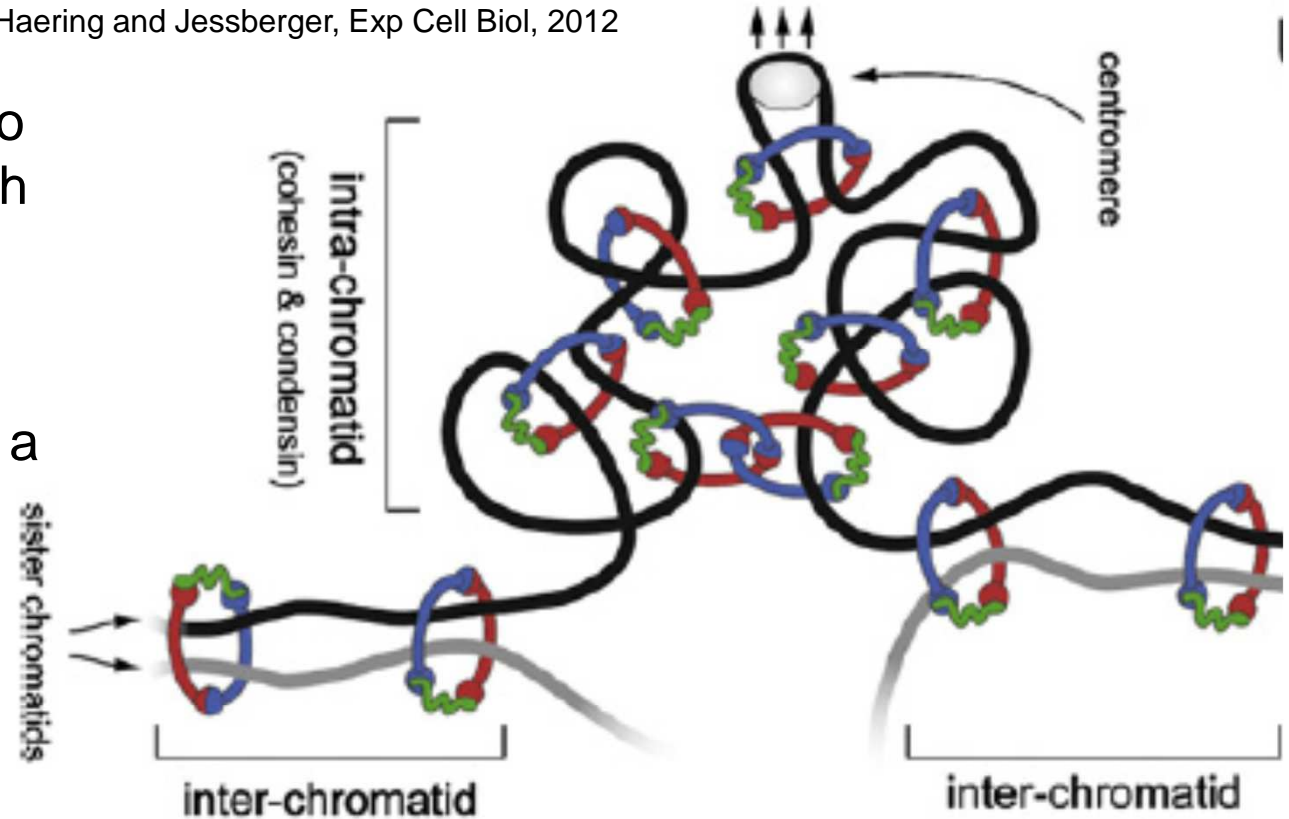


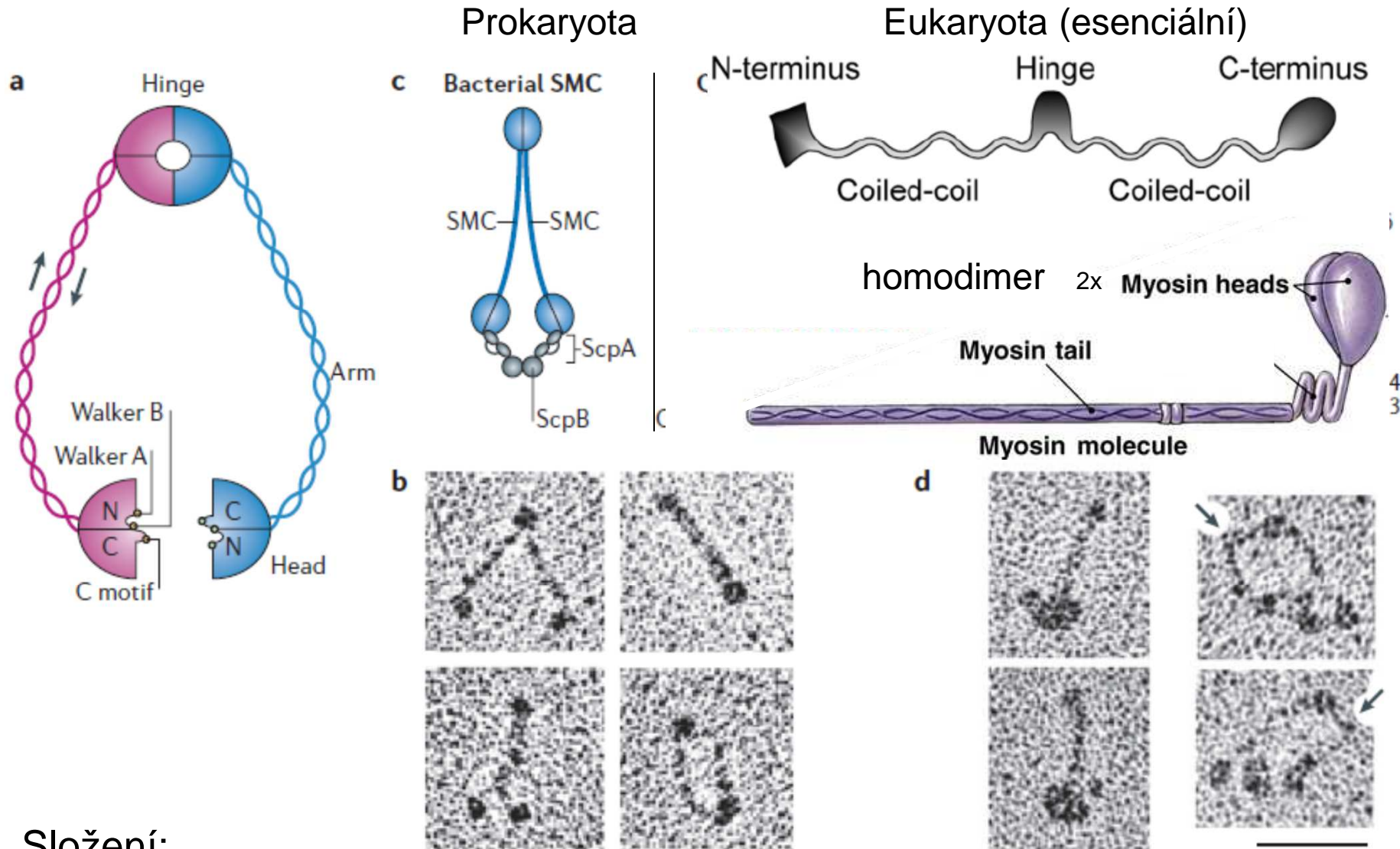
Figure 4-72 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček
- podílí se na regulaci segregace chromosomů a na opravě DSBs



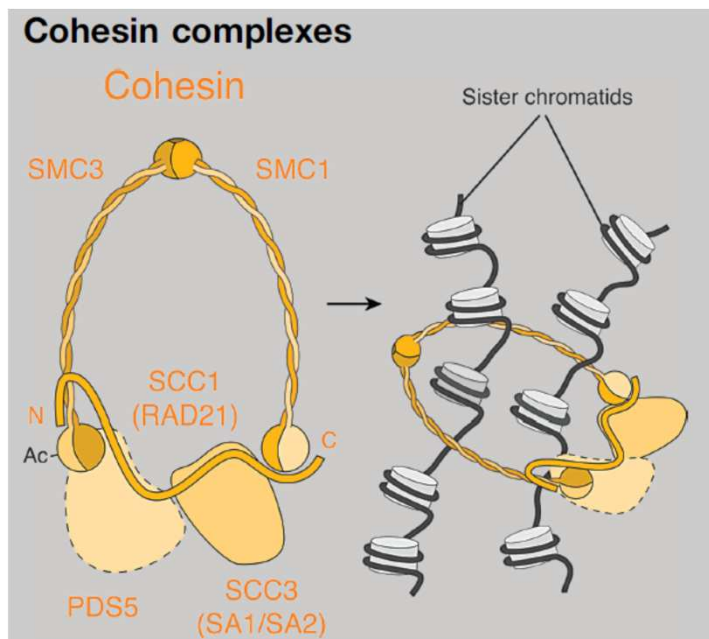
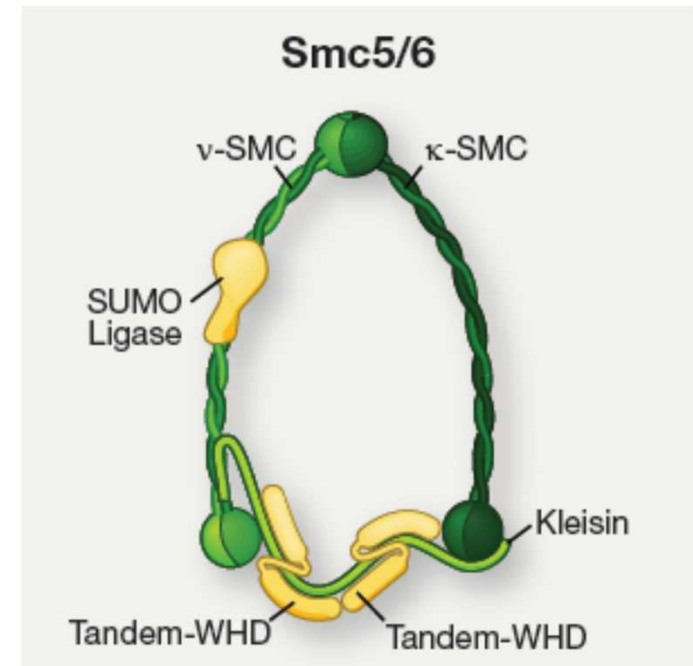
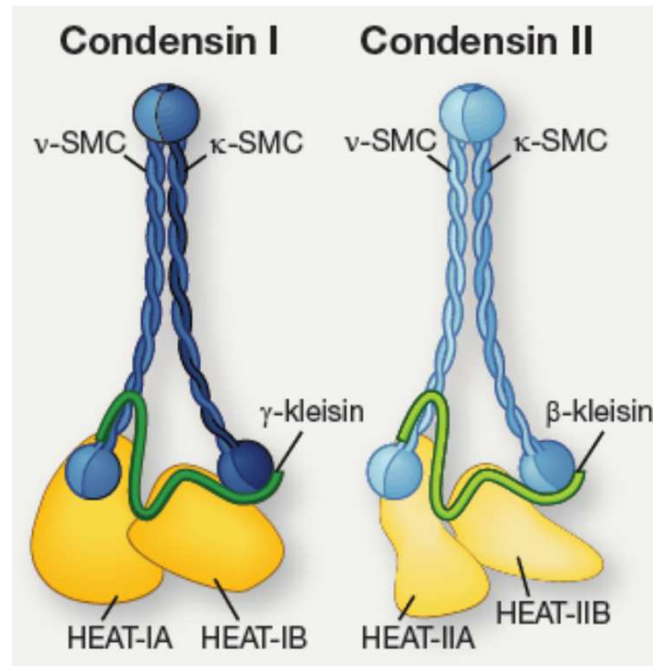
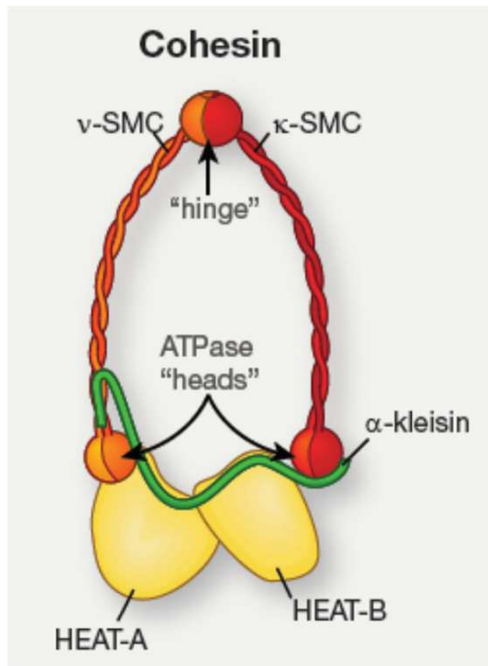
- složení SMC komplexů
- dlouhá ramena SMC, dimerizace přes hinge, ATPase heads přemostěny ATP a kleisinovou podjednotkou
- SMC proteiny vytváří kroužky, které drží DNA

Komplexy SMC



Složení:

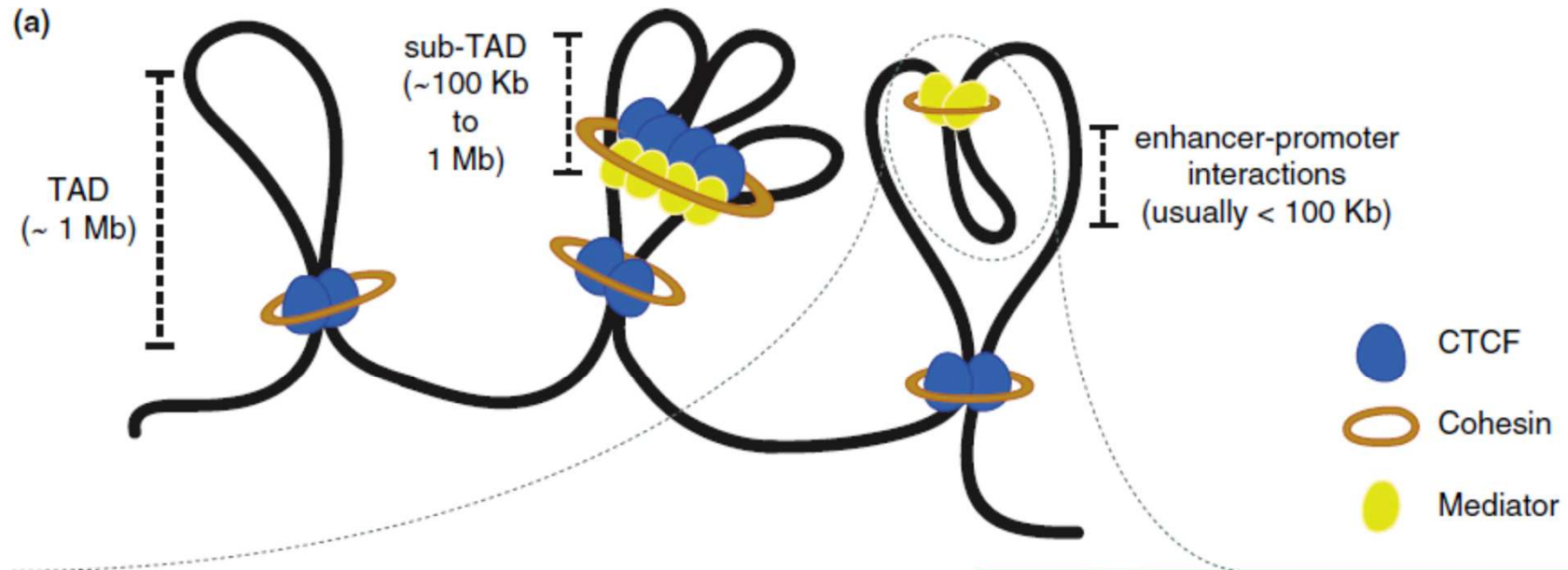
SMC dimery (homo- a hetero-) - konzervovanější (starší) než histony
 non-SMC podjednotky (2 – 6)



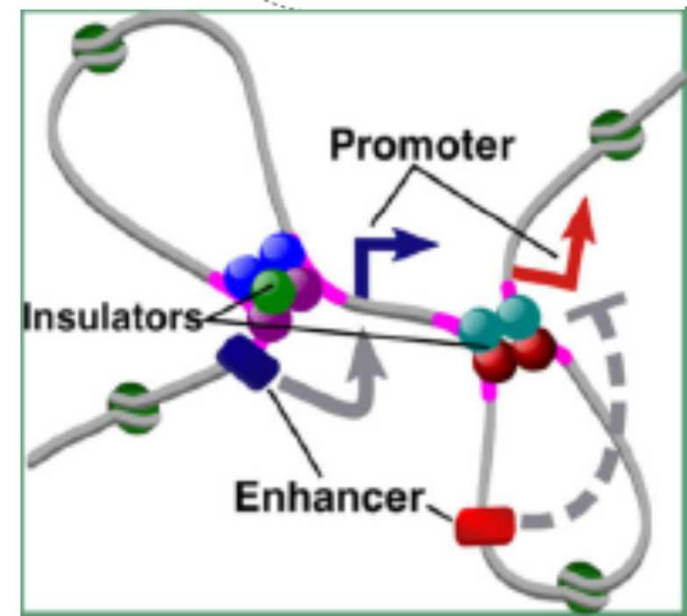
- nejlépe prostudovaný kohesin – objímá DNA – pojme 2 vlákna (chromatinová smyčka nebo sesterské chromatidy)

Haering a Gruber, Cell SnapShot, 2015

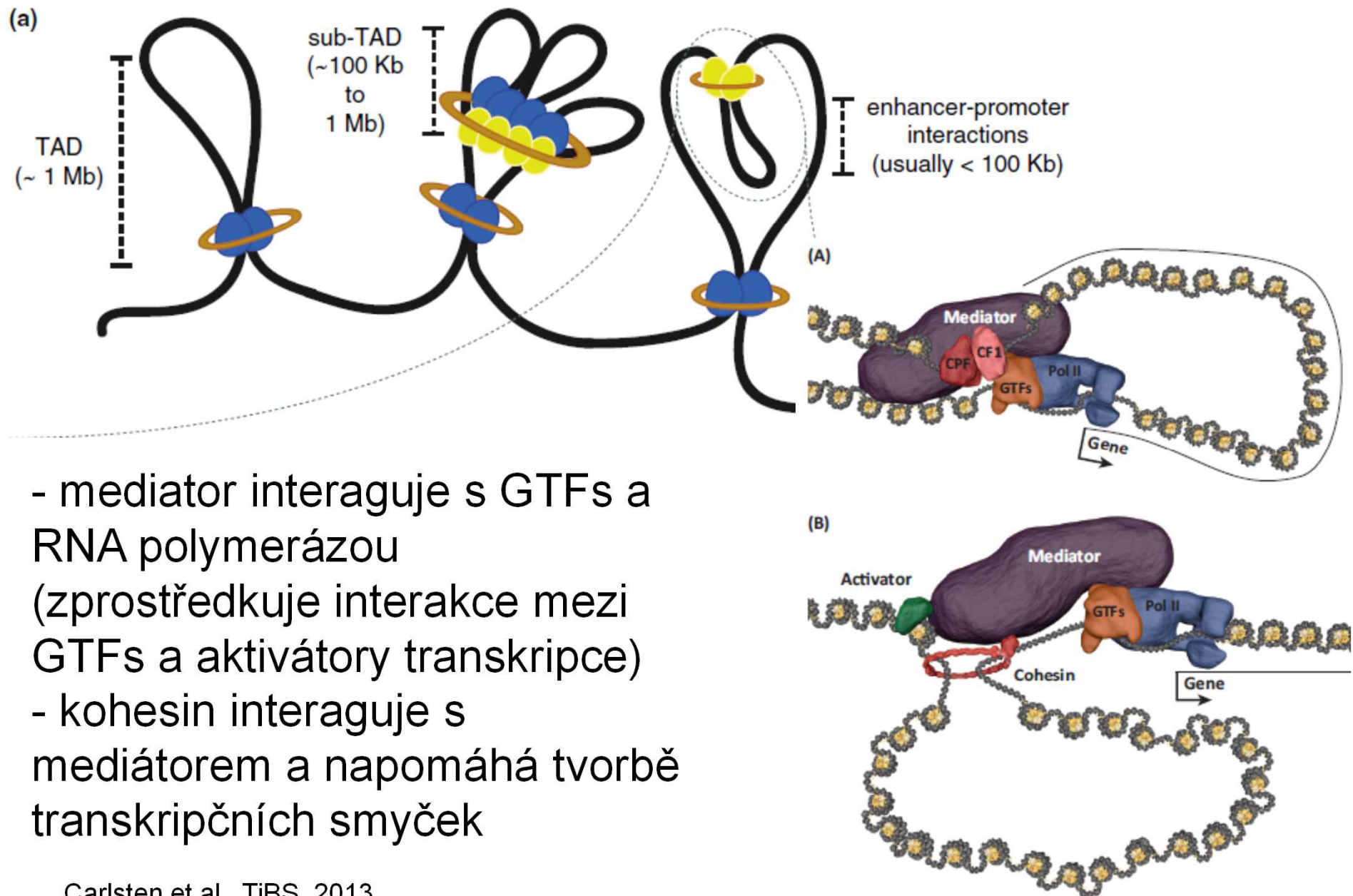
Kohesin interaguje s CTCF ...

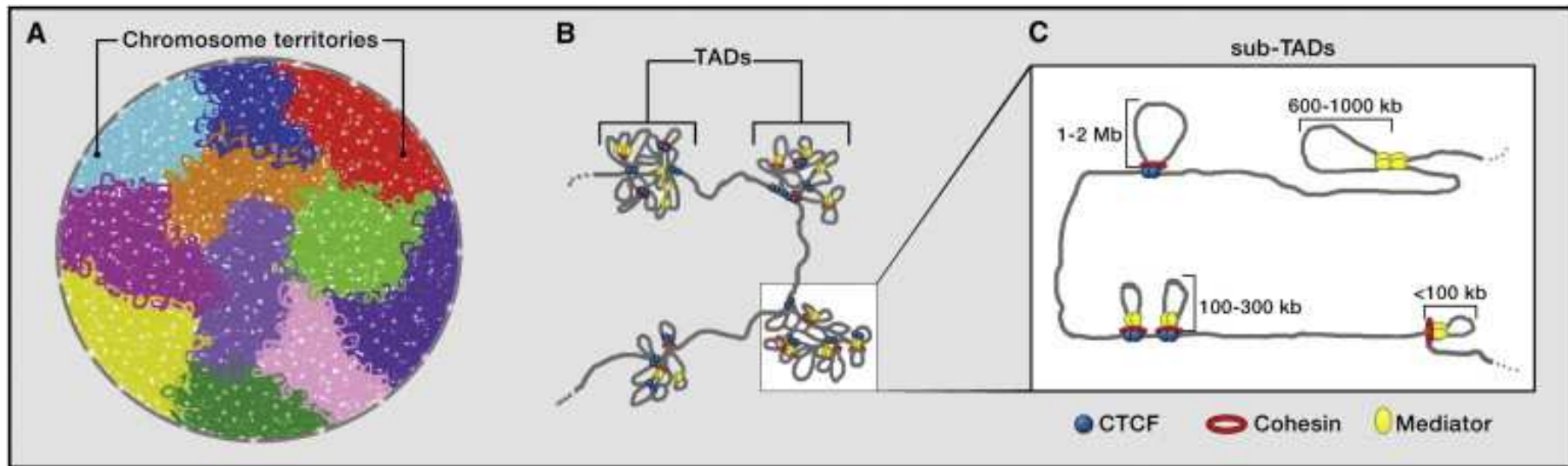


- CTCF „izoluje“ transkripční faktory a reguluje transkripci
- interaguje s kohesinem a podílí se na utváření vyšších chromatinových struktur

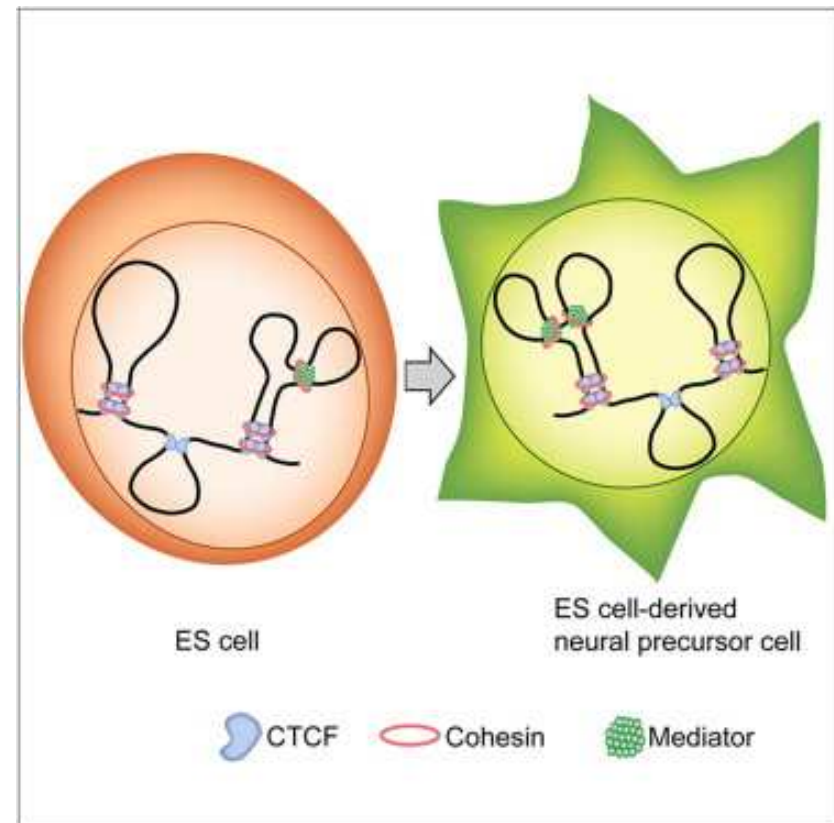


... a kohesin interaguje s mediátorem



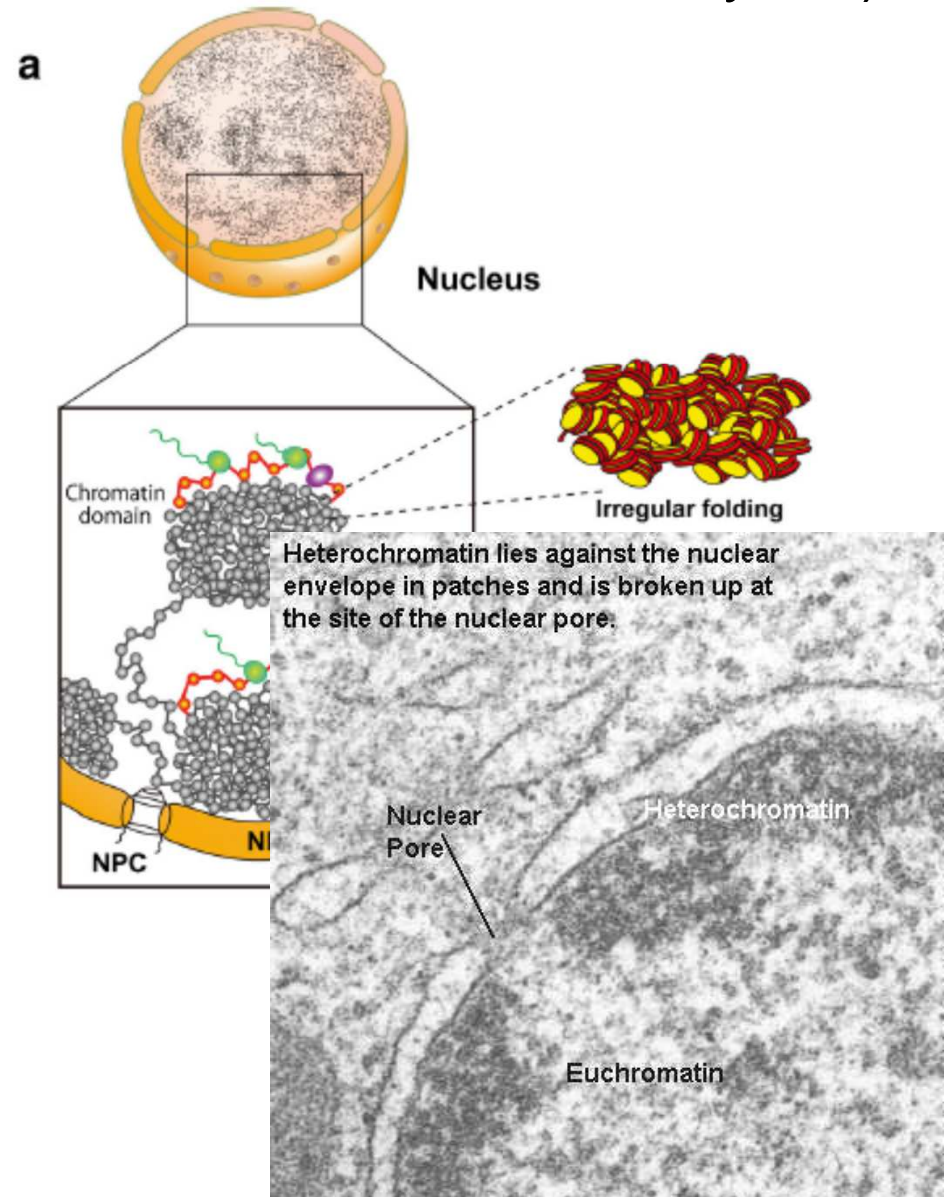
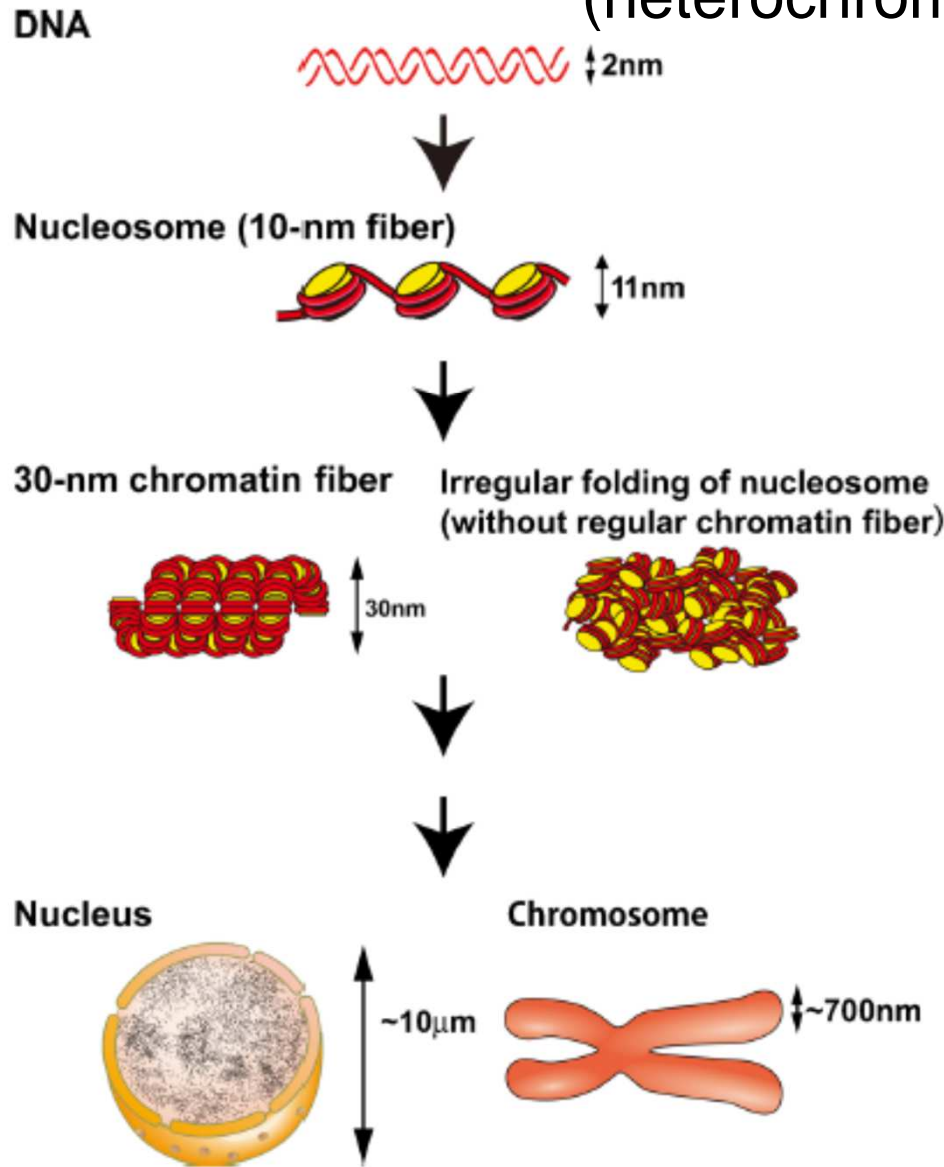


- kohesin se podílí na regulaci „cell-specific“ transkripce a chromatinové struktury (ukazuje se jak úzký vztah mezi těmito úrovněmi existuje)
- kombinace interakcí kohesinu s CTCF a mediátorem jsou klíčové pro „buněčnou specificitu“

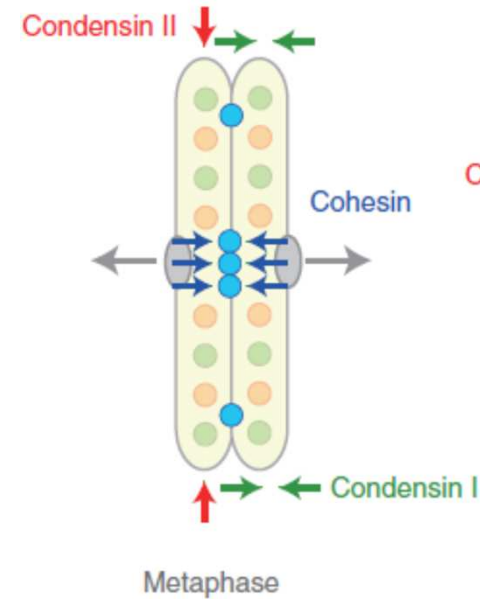
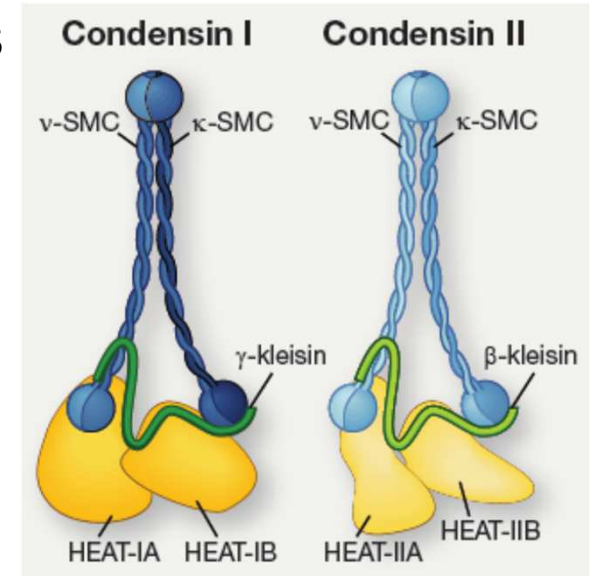
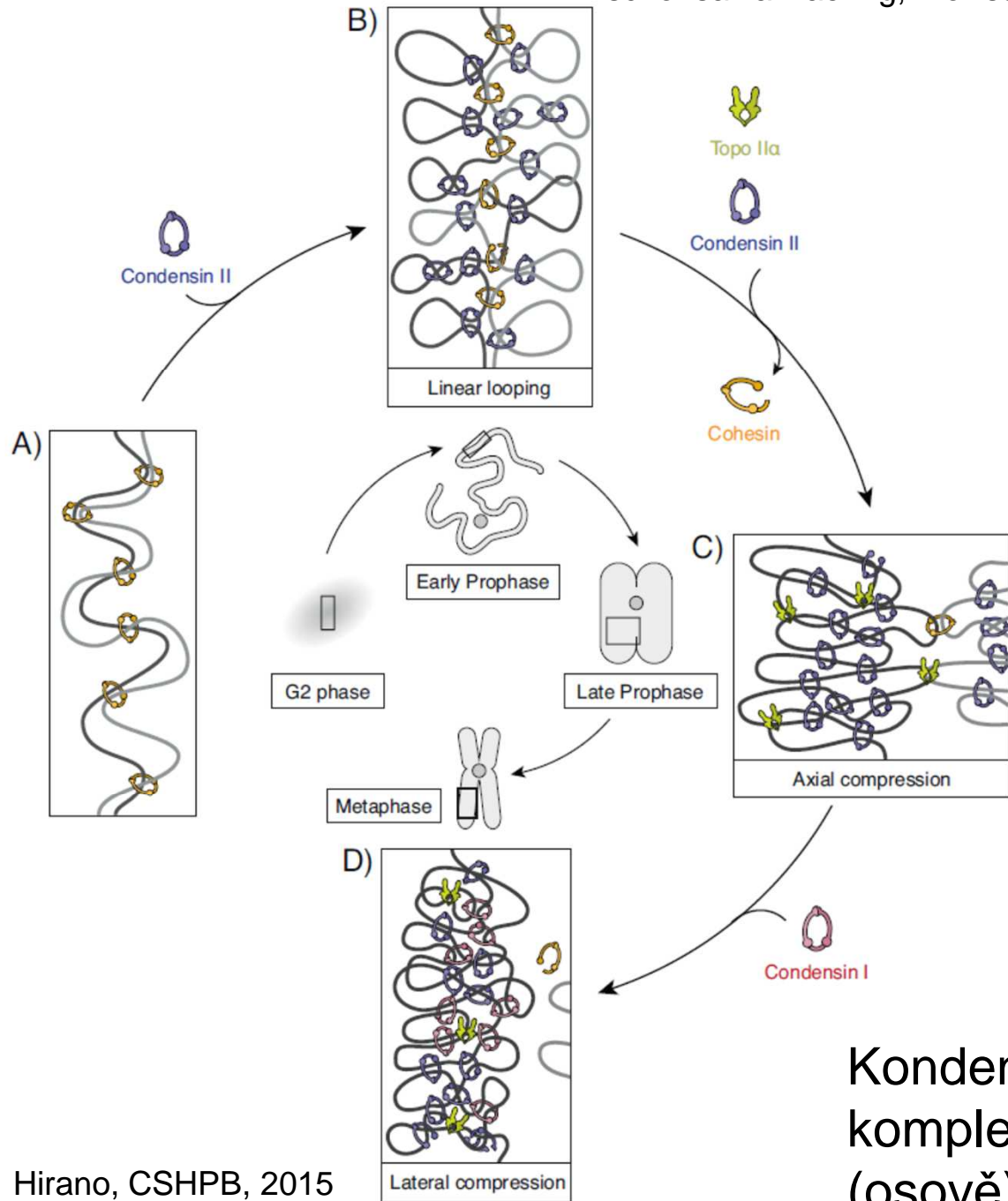


Bodnar & Spector, Cell, 2013
 Phillips-Cremins et al, Cell, 2013

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



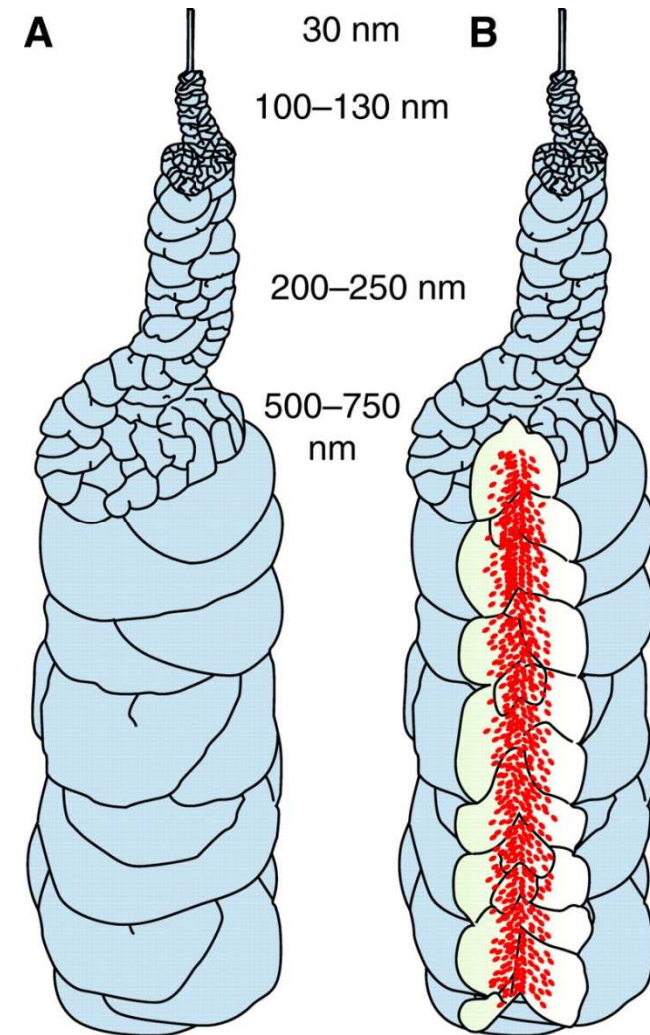
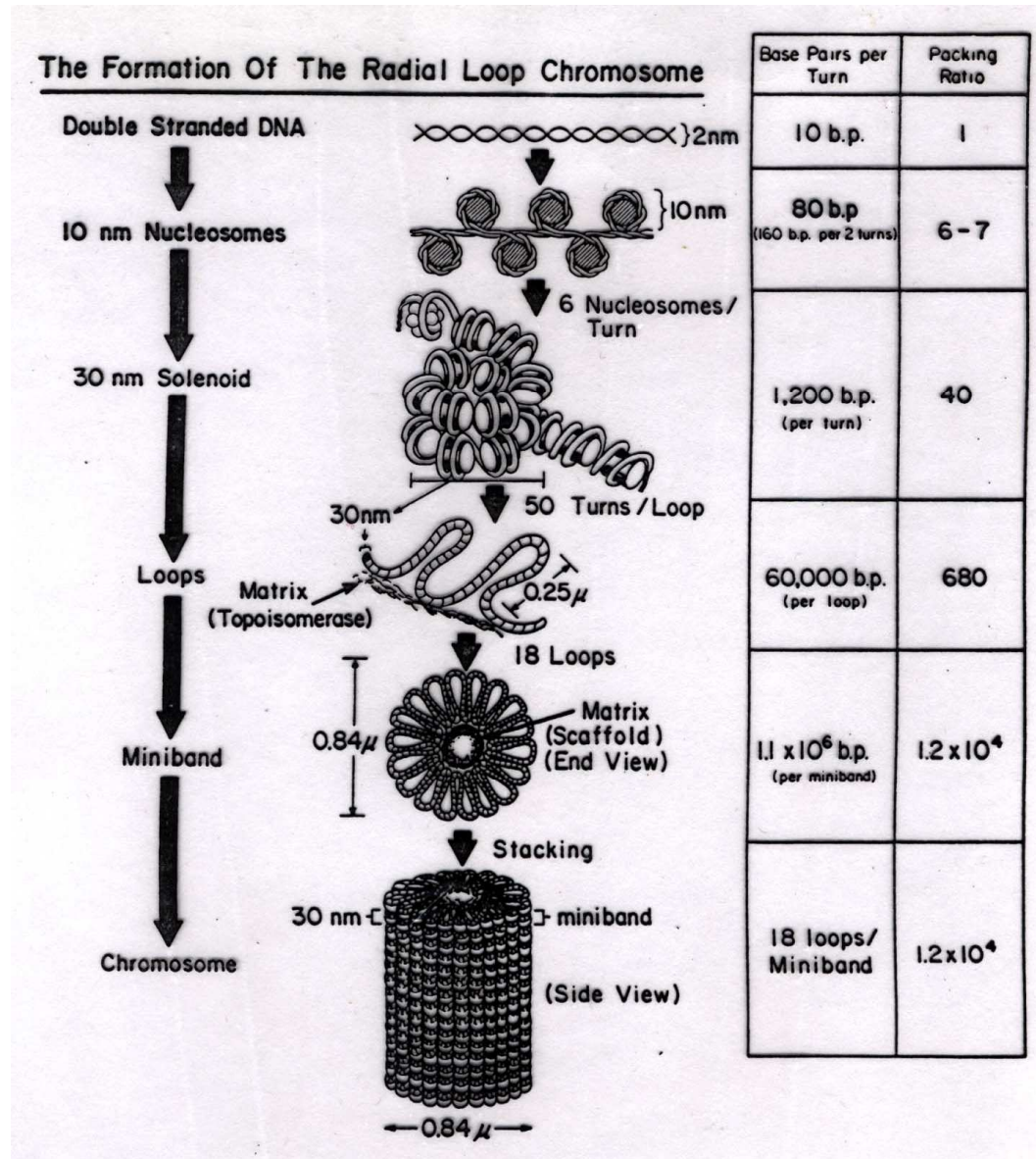
Kschonsak a Haering, BioEssays, 2015

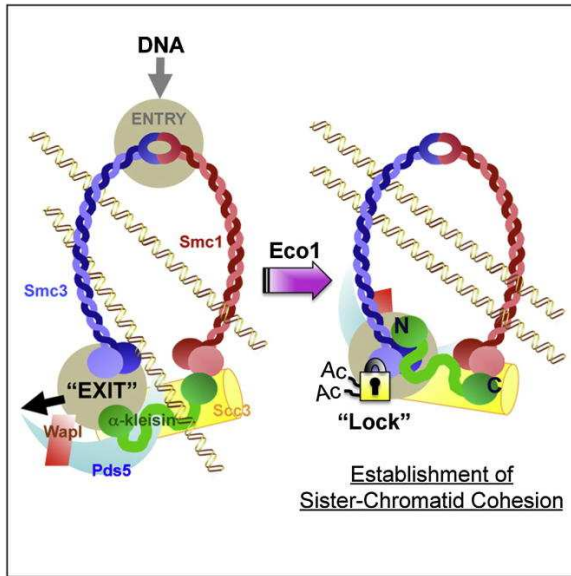


Kondensin I „zužuje“ zatímco komplex II kondensuje podélně (osově)

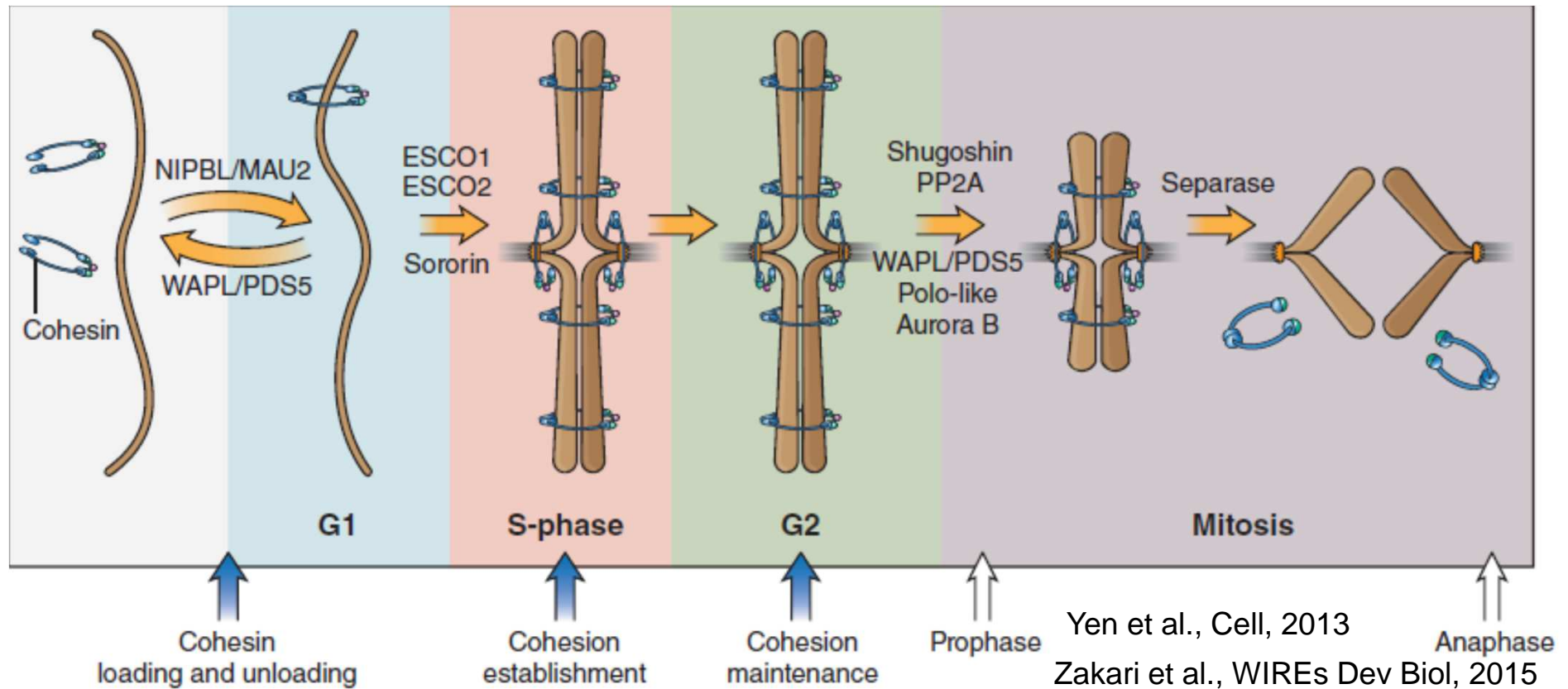
Hirano, CSHPB, 2015

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

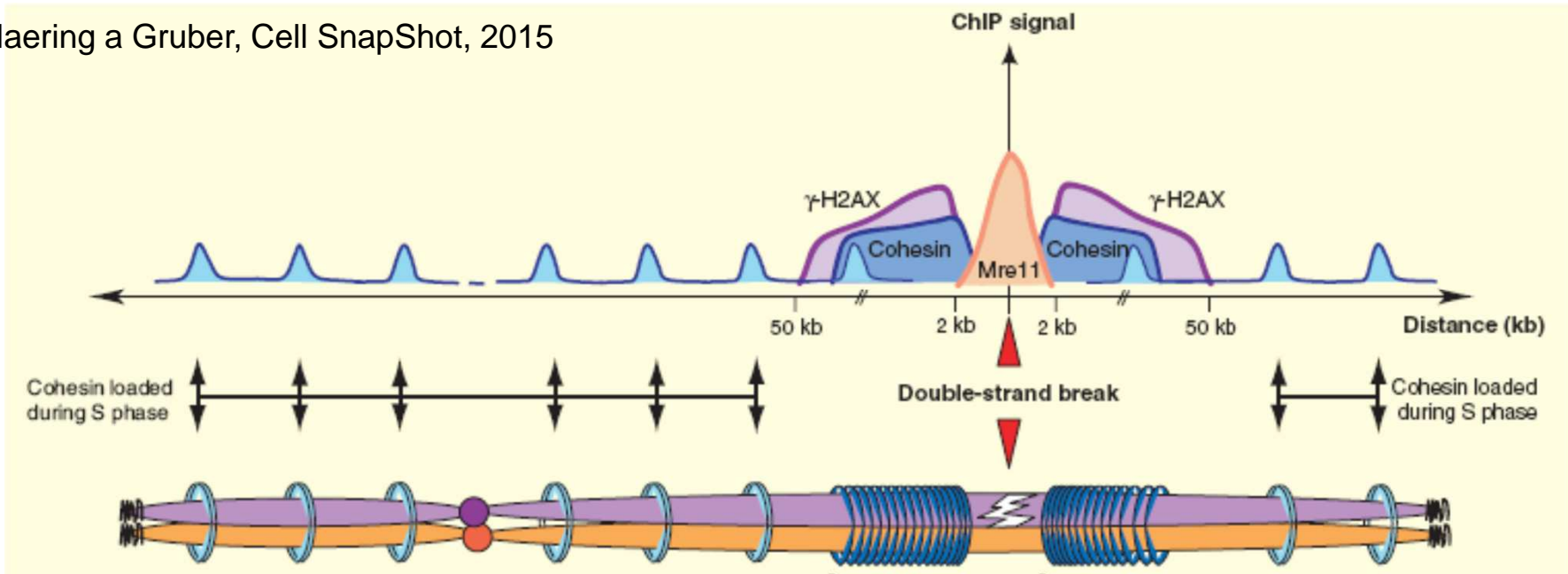




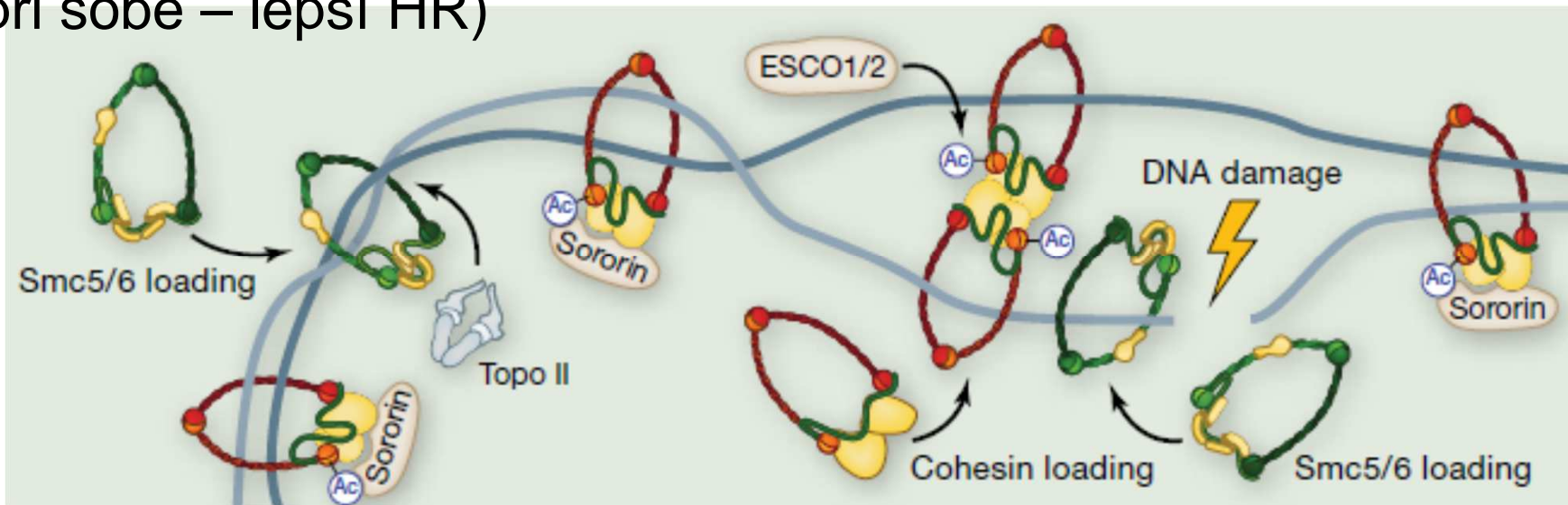
- na navlečení kohesinu na DNA a jeho stabilizaci se podílí mnoho faktorů (loading faktor NIPBL/MAU2, acetylace ESCO1)
- kohesin je odstraněn z ramen při kondenzaci, ale na centromerách ho chrání shugoshin
- v anafázi je otevřen separasou

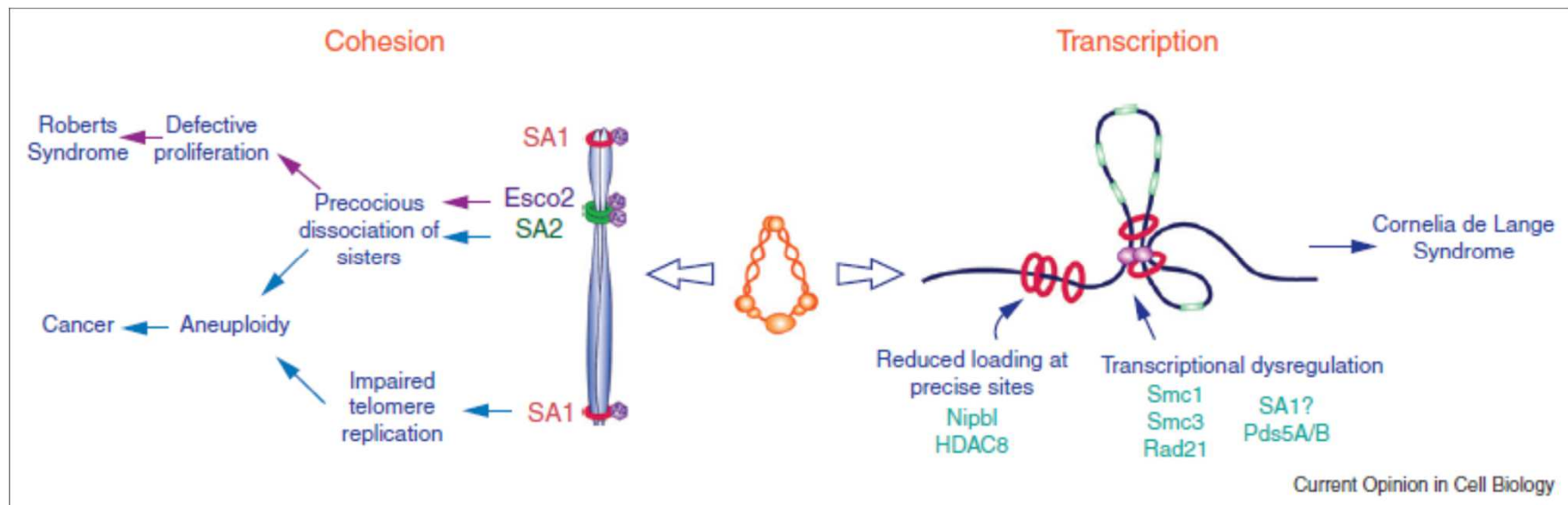


Haering a Gruber, Cell SnapShot, 2015



Kohesin a SMC5/6 napomáhají při opravě dvou-řetězcových zlomů v G2/M fázi (kohesin drží homologní sesterské chromatidy při sobě – lepší HR)





Remeseiro & Losada, CO in Cell Biol, 2012

Mannini et al, Hum Mut, 2013

mutace podjednotek kohesinu a jeho regulačních faktorů způsobují kohesinopatie (např. Cornelia de Lange syndrom = transkripční defekt) a různé typy nádorů (defekt segregační – 95% nádorů je aneuploidních)

