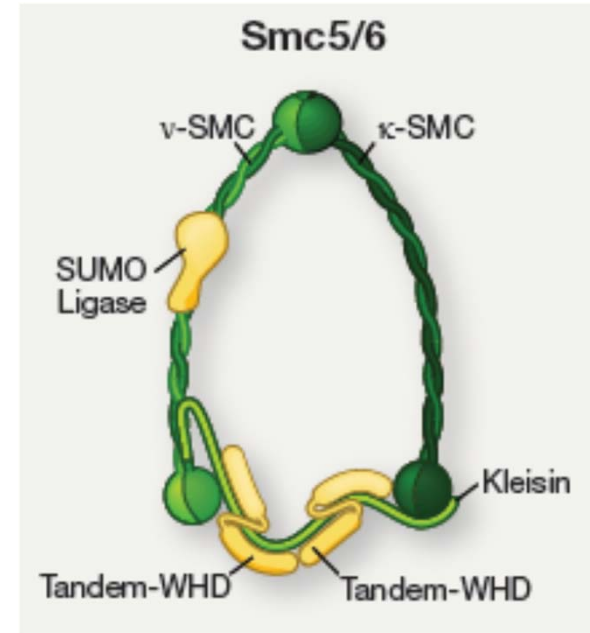


Zkouška: - test + přednáška

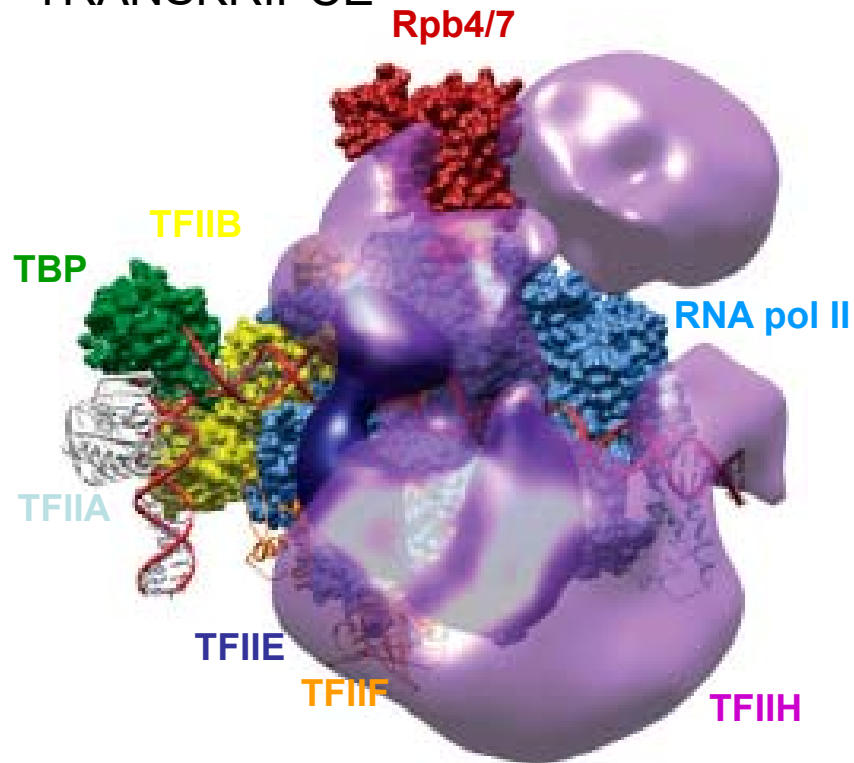
- Úvod - Analýza proteinu
 - Domény
 - fold-struktura (ss, PDB)
 - v PyMolu připravit 3D strukturu
 - Interakce (IntAct)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - evoluce
- Konkrétní nová data – článek (< 5 let)



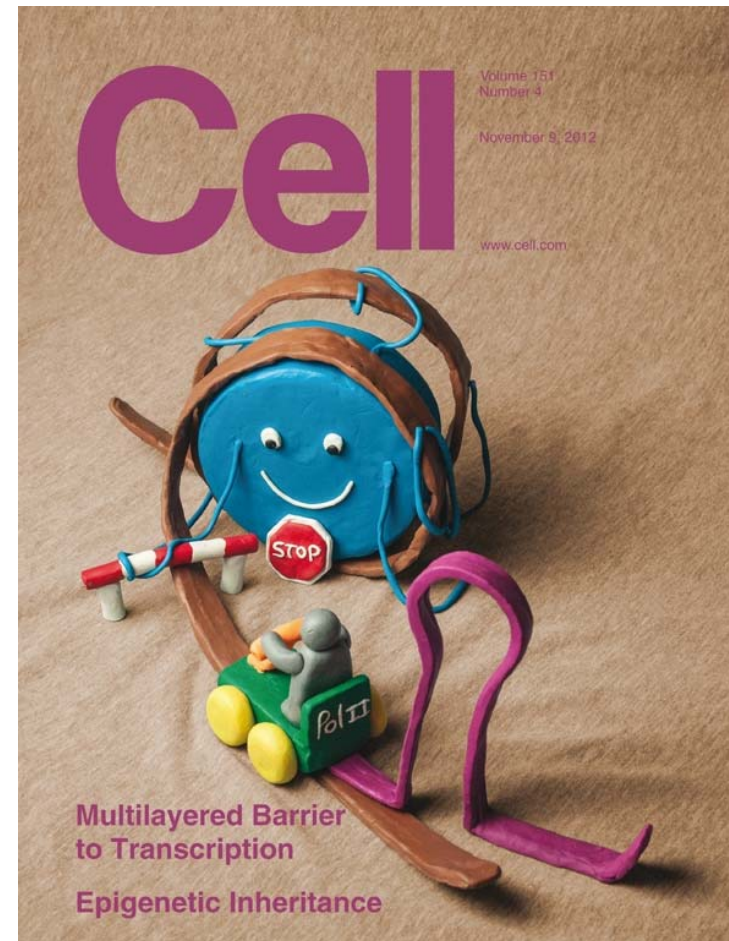
Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

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

TRANSKRIPCE



kvasinkový PIC komplex
Gibbons et al, PNAS, 2012

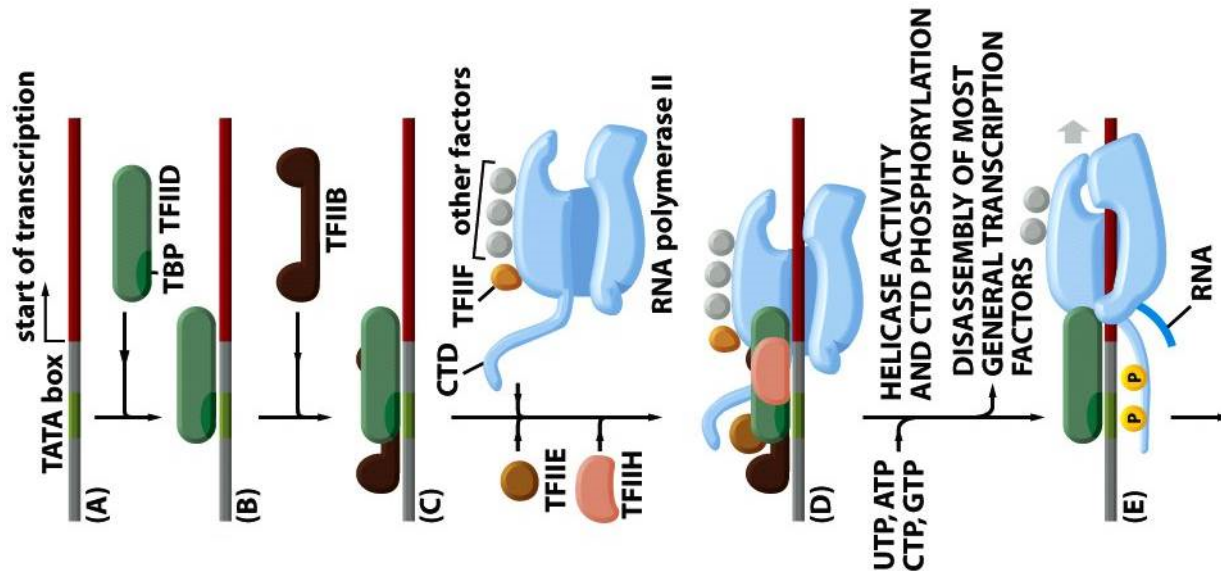


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)

Co zde schází??

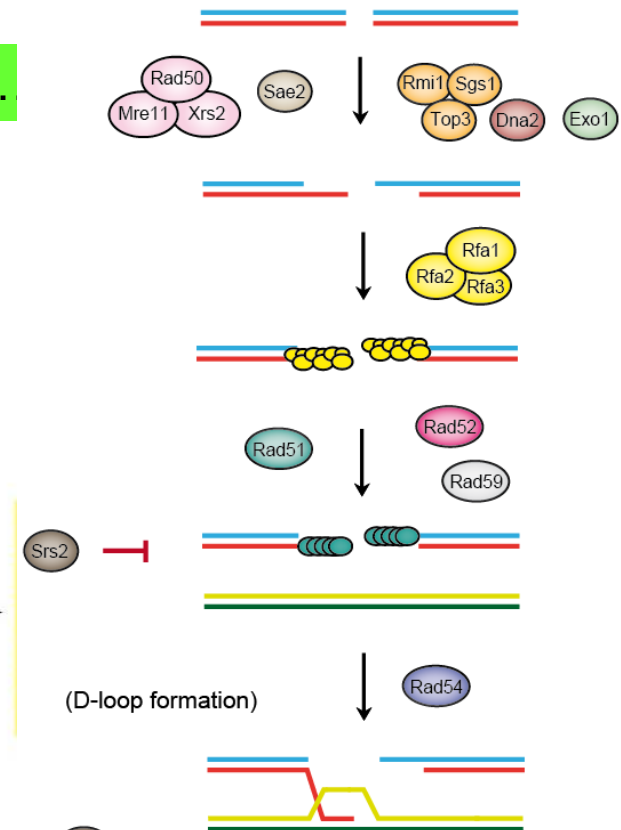
Chromatin = histony ..

TRANSKRIPCE



OPRAVA DNA

DSB



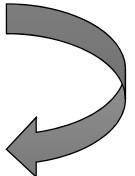
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom 3×10^9 bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4 cm!!)

Average human chromosome:

DNA molecule: ~4 cm

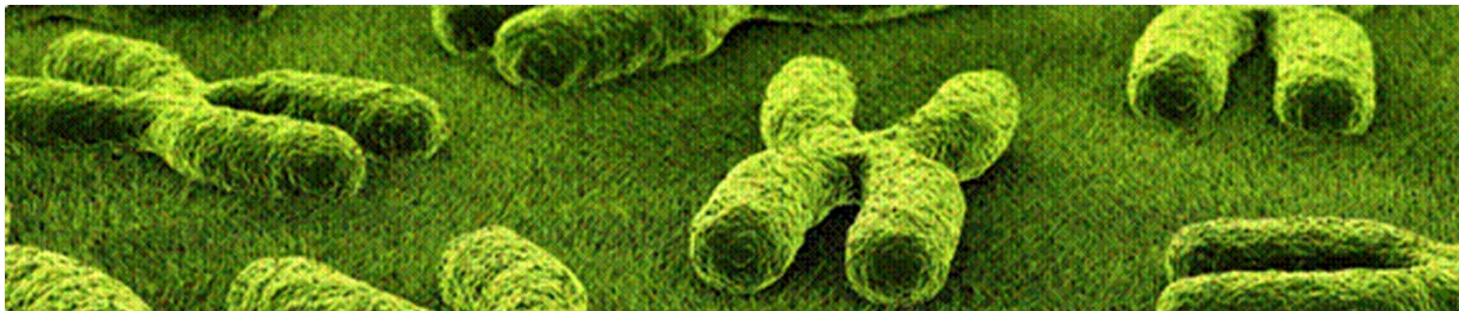
Mitotic chromosome ~4 μ m

10 000x

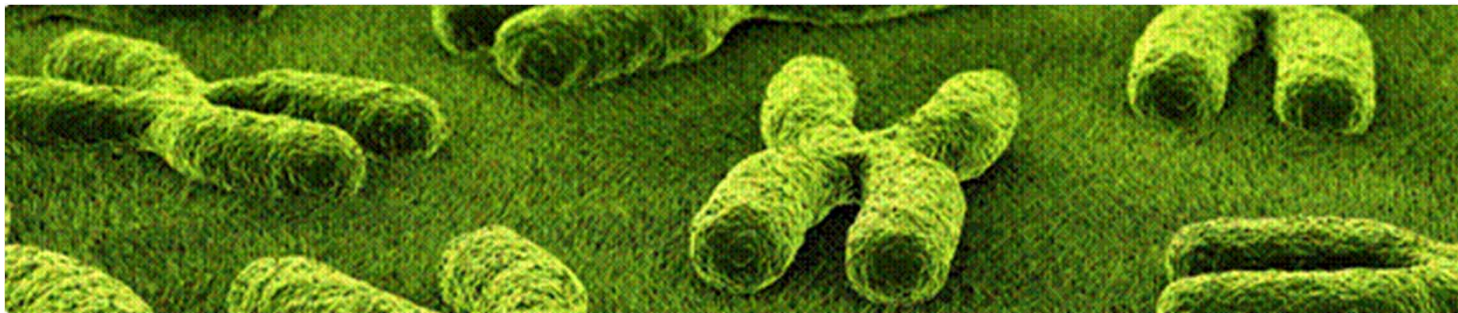


Genome sizes:

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



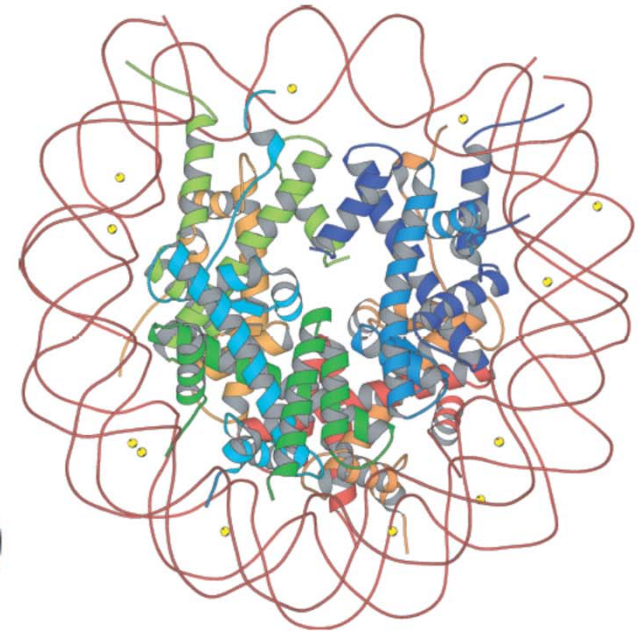
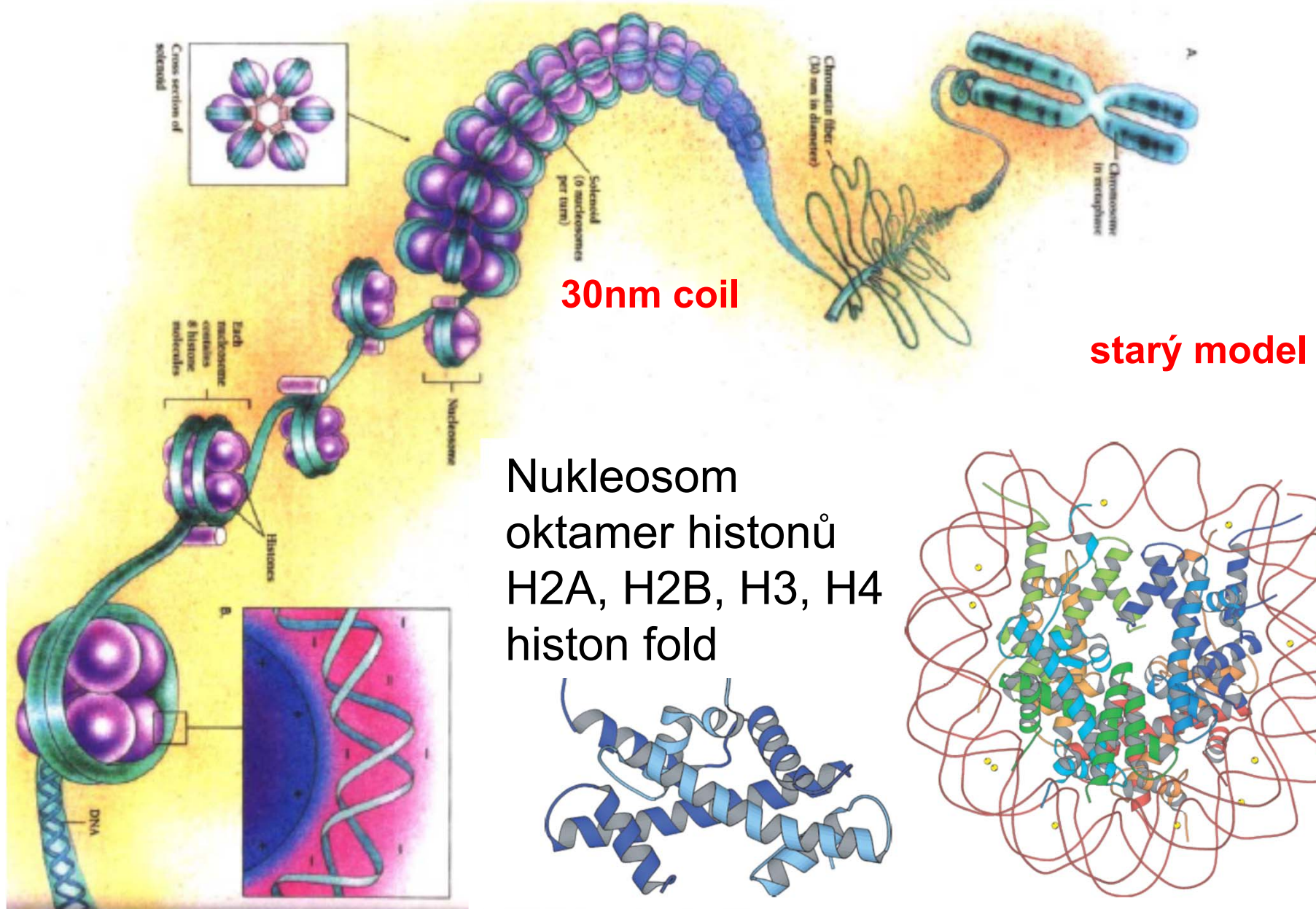
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom 3×10^9 bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4cm!!)
 - komplexy vytvářející **strukturu chromosomu**
 - vytváří základní strukturu
 - **nukleosomy – chaperony, remodelační komplexy**
 - histon **H1, HP1** protein
 - vytváří specializované domény
 - centromery, telomery
 - podílí se na dynamice struktury
 - **SMC komplexy** - kohesin, kondensin a SMC5/6

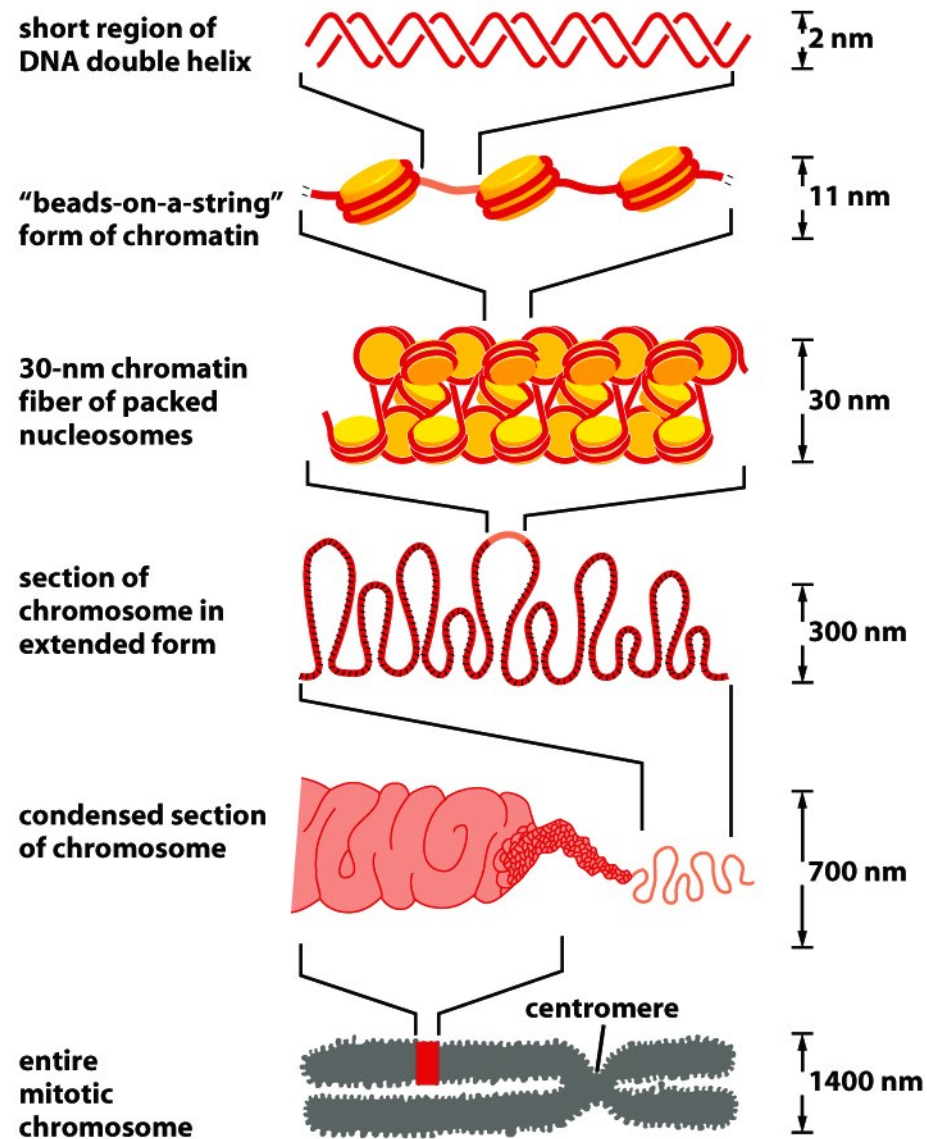


přednášky prof. Fajkuse:

Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041)

komplexy vytvářející strukturu chromosomu



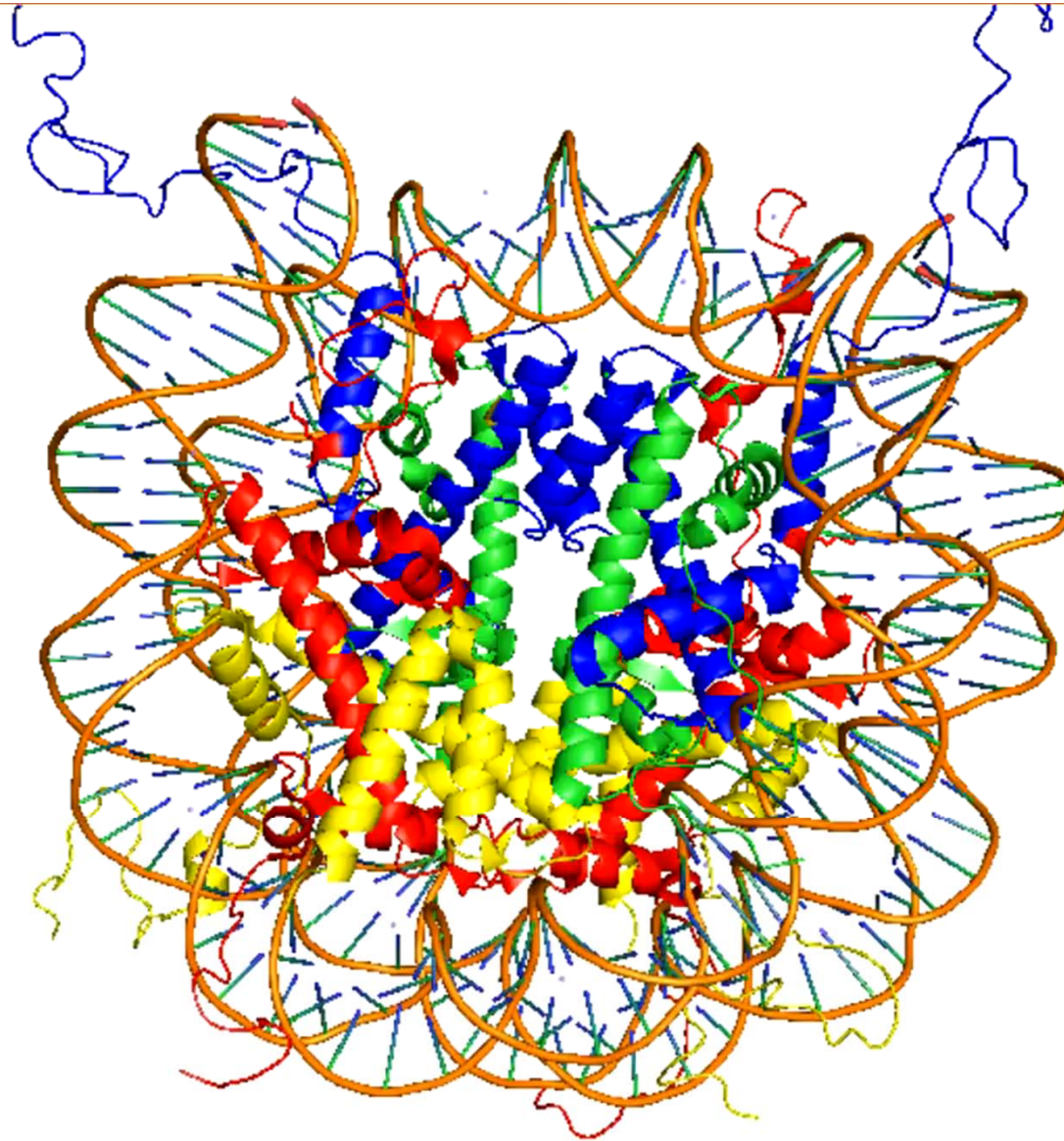


30nm coil

starý model (hierarchie)

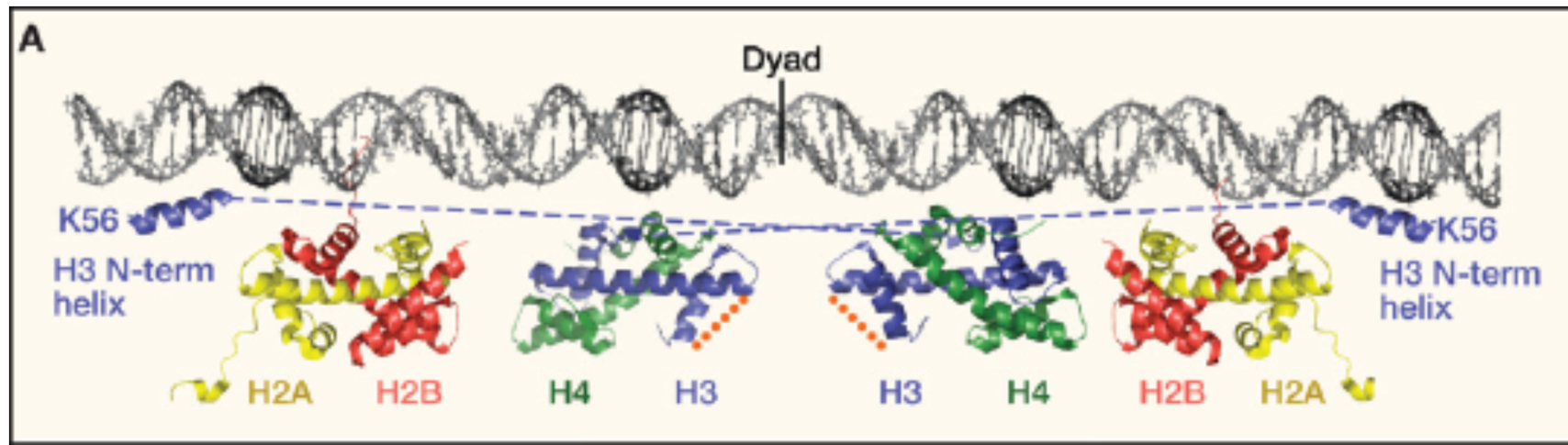
NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 10,000-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

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

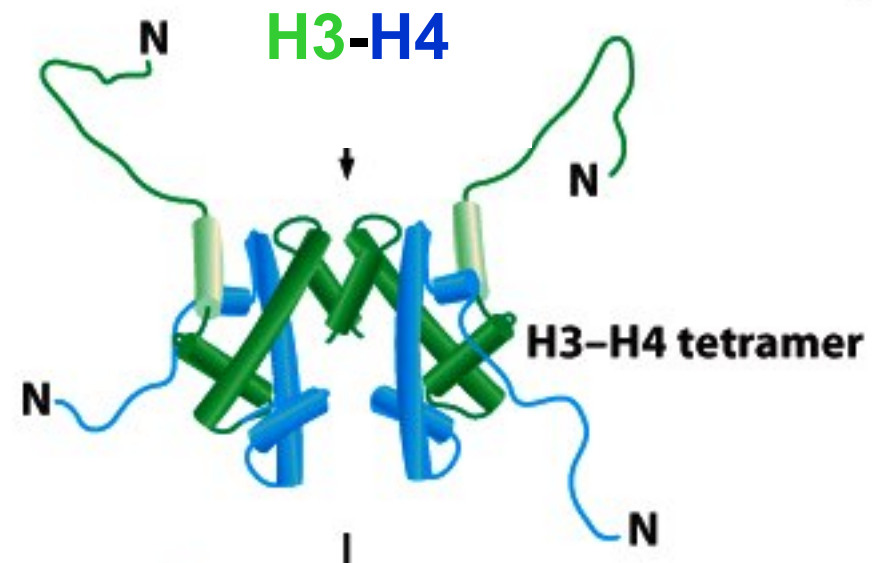


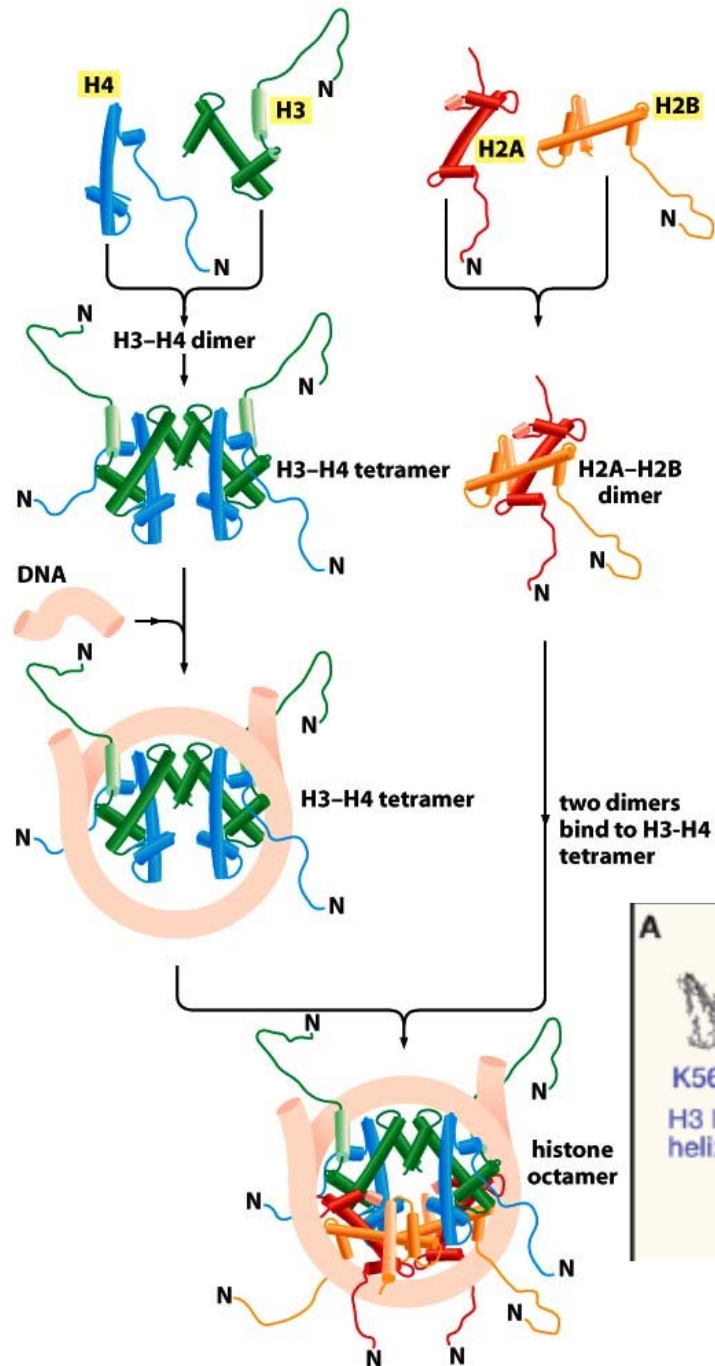
- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)

Skládání histonů do nukleosomu (komplexu)



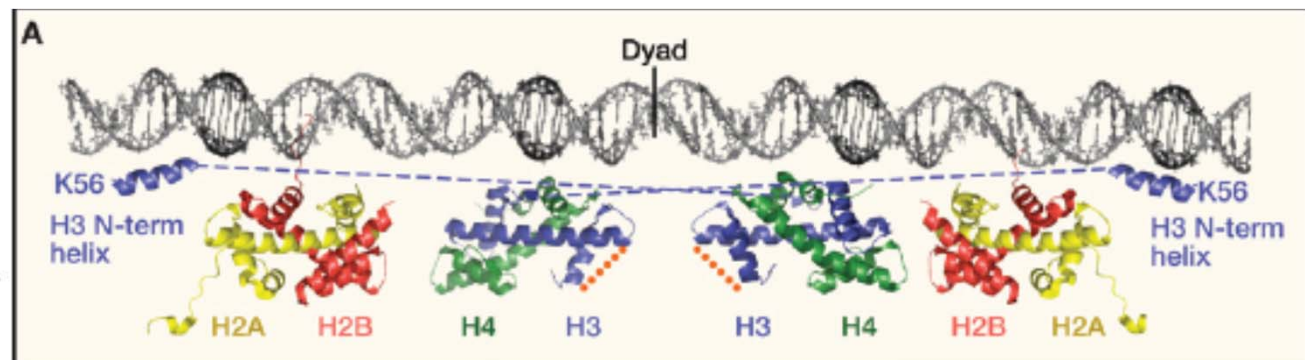
- 146bp - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- H3 dimerizuje přes postraní šroubovici
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou šroubovice H3 (acetylovaný K56)



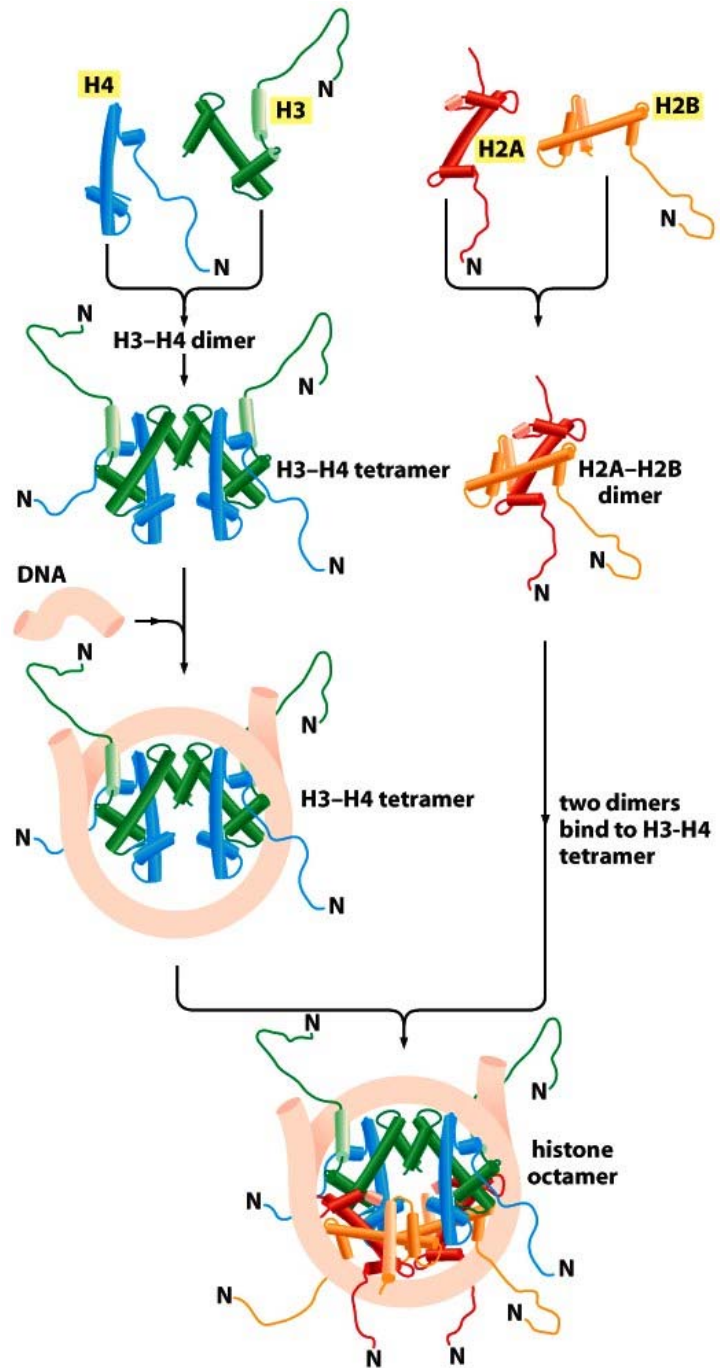


Sestavování nukleozomu:

- 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

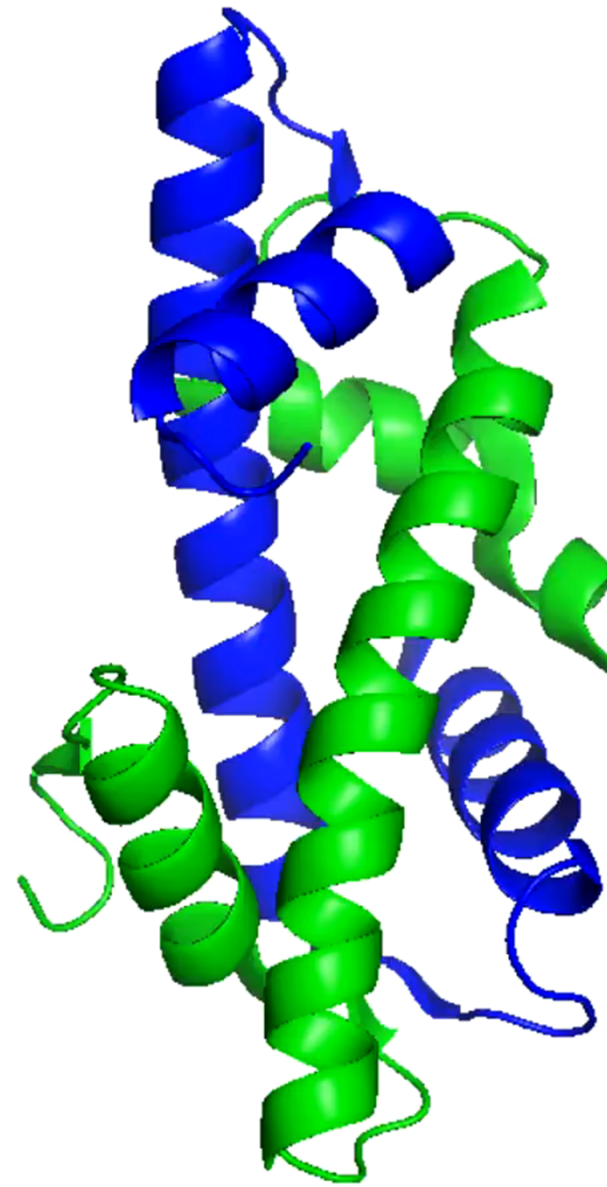


Nabalování a rozbalování histonů

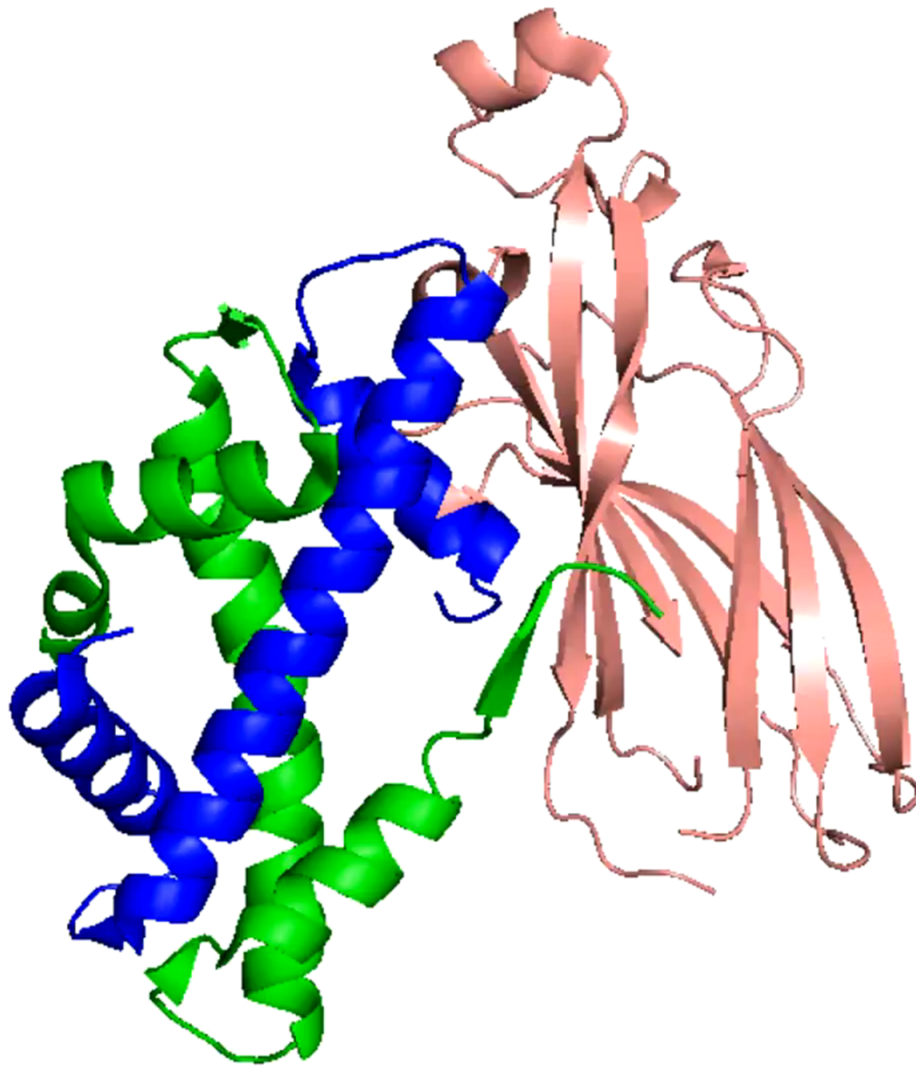


(opačné barvy)

H3-H4



H3-H4



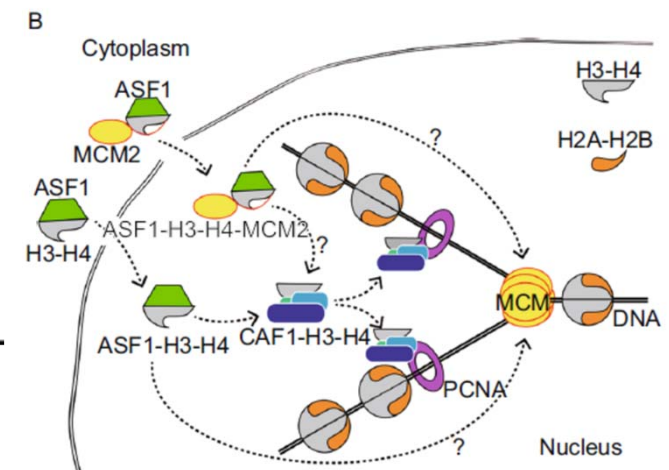
ASF1

(antisilencing function)

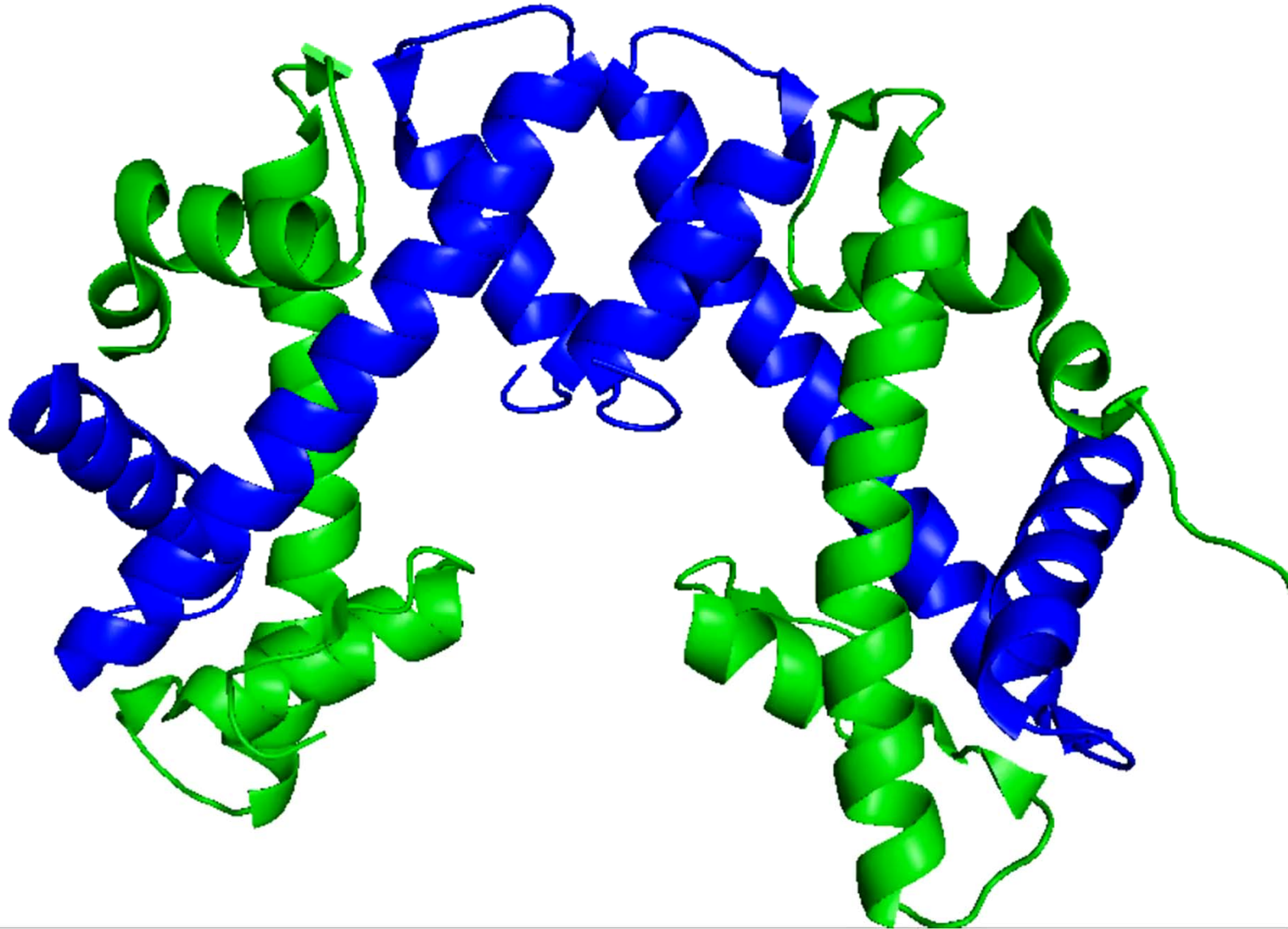
interferuje s
tetramerizačním
povrchem

skládání (assembly i
disassembly)

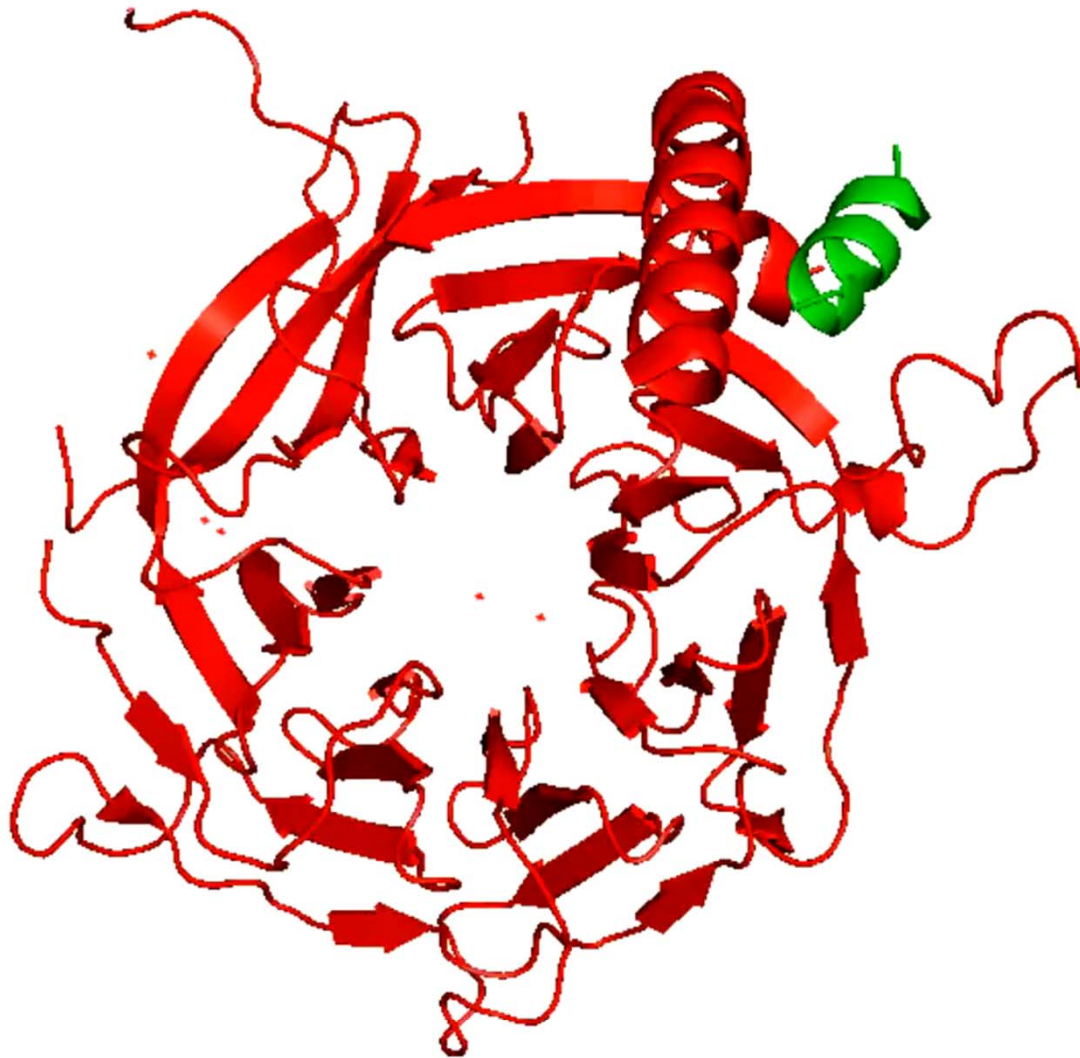
Wang et al, Prot Cell, 2015
PDB: 5C3I



H3-H4



ASF1 (antisilencing function) interferuje s tetramerizačním povrchem



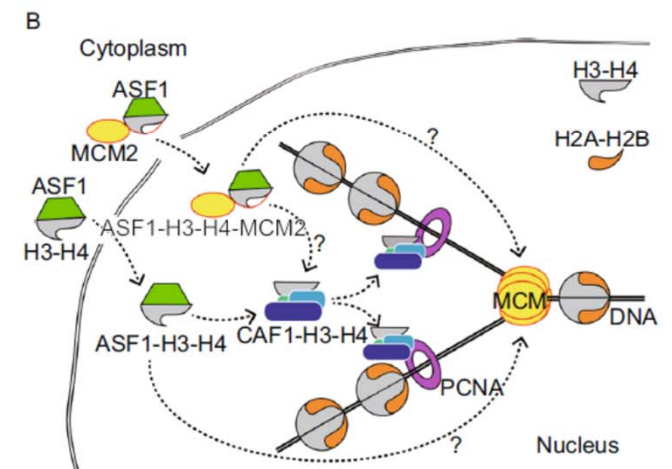
CAF-1

(chromatin assembly factor)

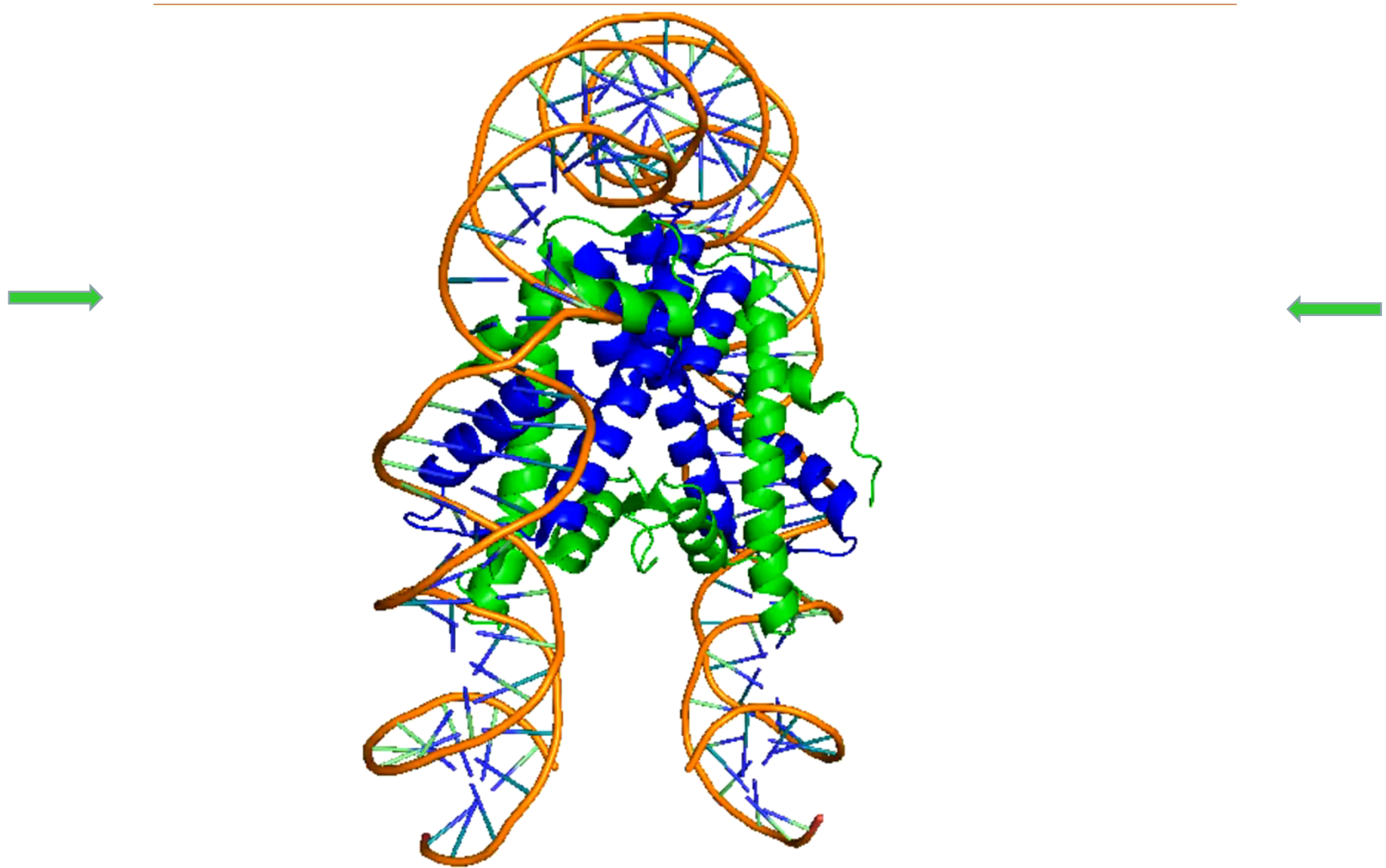
interferuje s vazbou k DNA

skládání (assembly i disassembly)

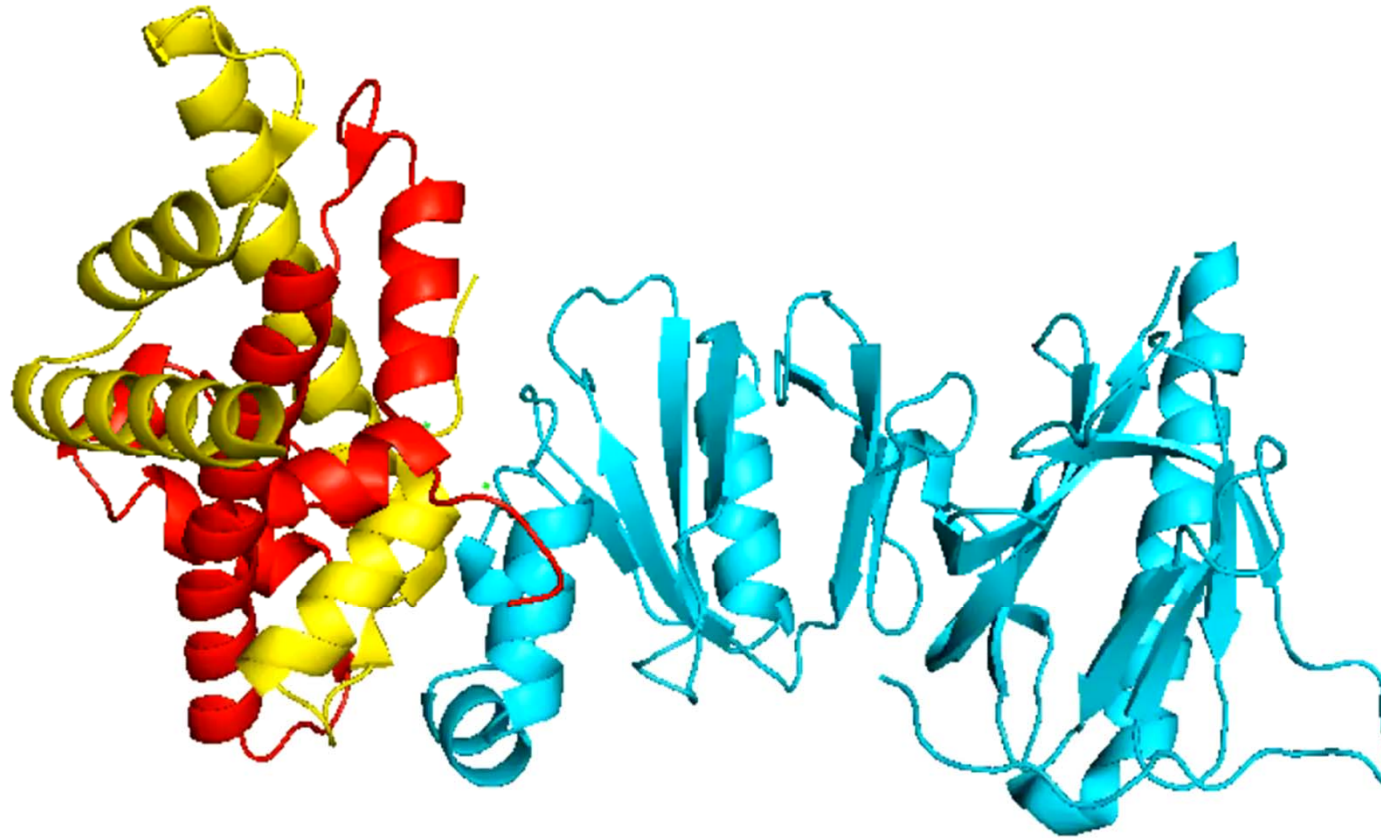
Song et al, G&D, 2008
PDB: 3C9C



H3-H4

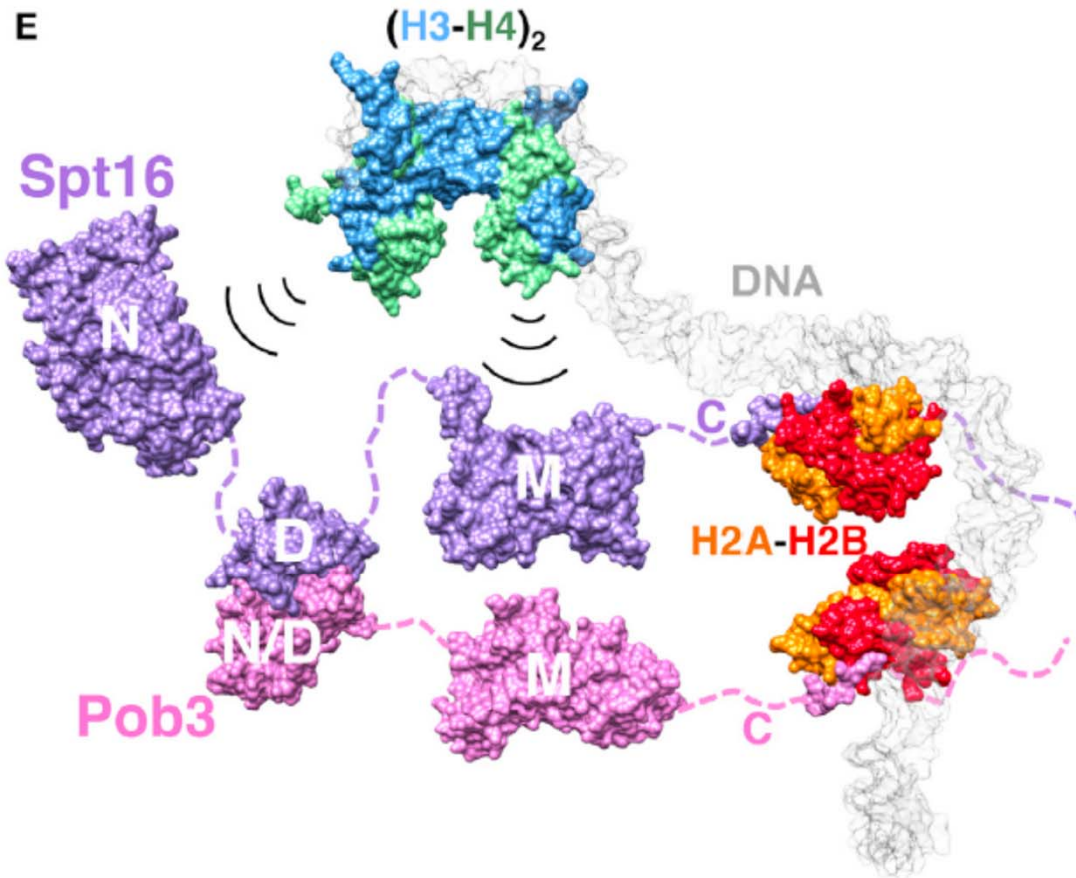
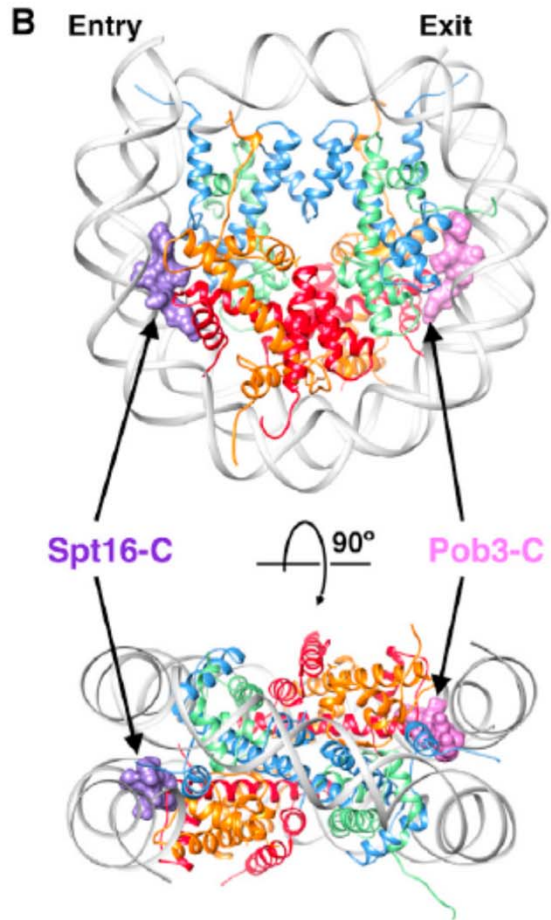


CAF-1 (chromatin assembly factor) interferuje s vazbou k DNA



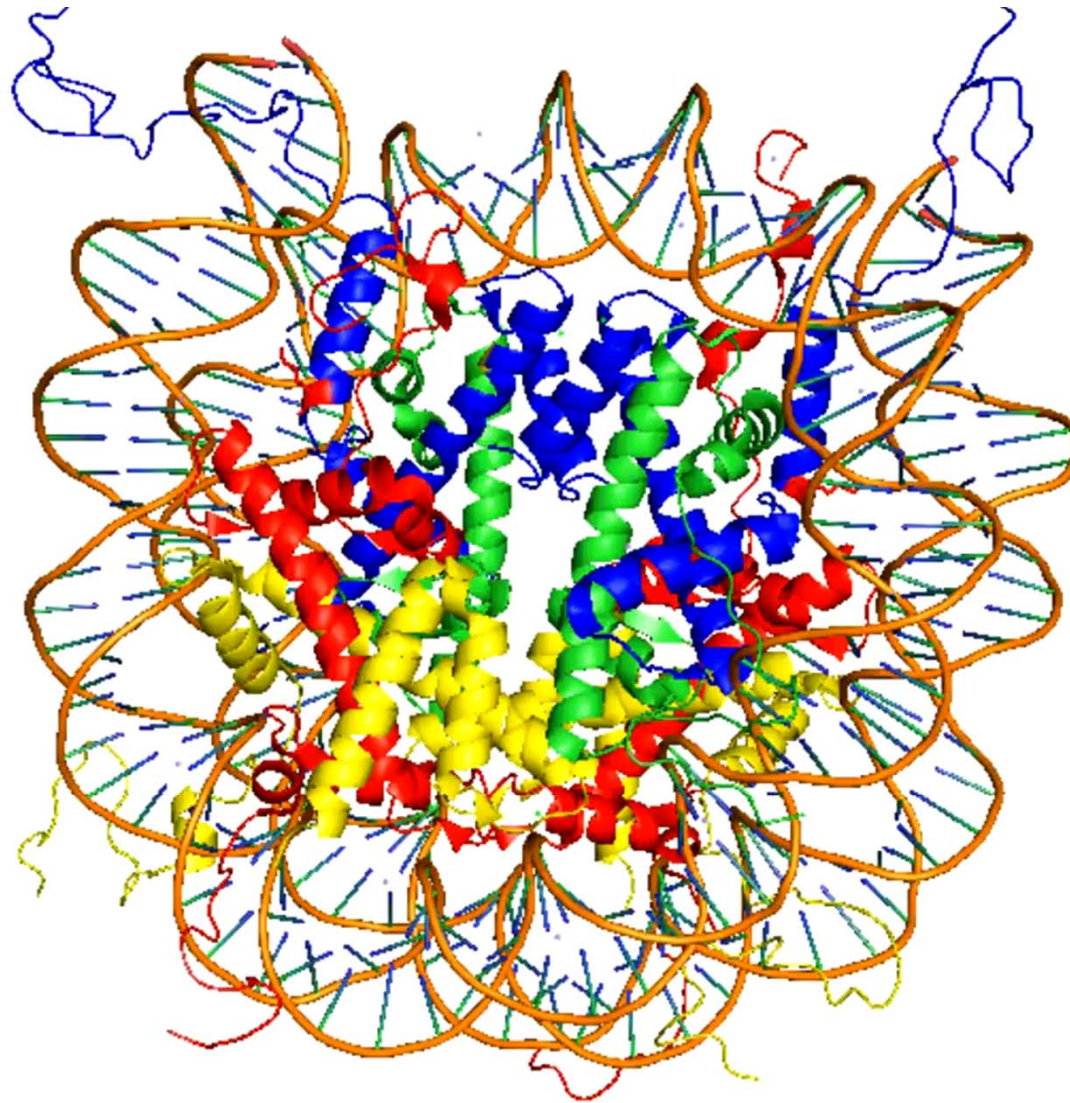
FACT (facilitates chromatin transcription)
složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSRP1)
interferuje s vazbou **H2A/H2B** na DNA ...

Hondele et al., Nature, 2013
Kemble et al, Mol Cell, 2015
PDB: 4KHA



FACT (facilitates chromatin transcription)
 složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSRP1)
 interferuje s vazbou H2A/H2B na DNA i s H3/H4 interakcí

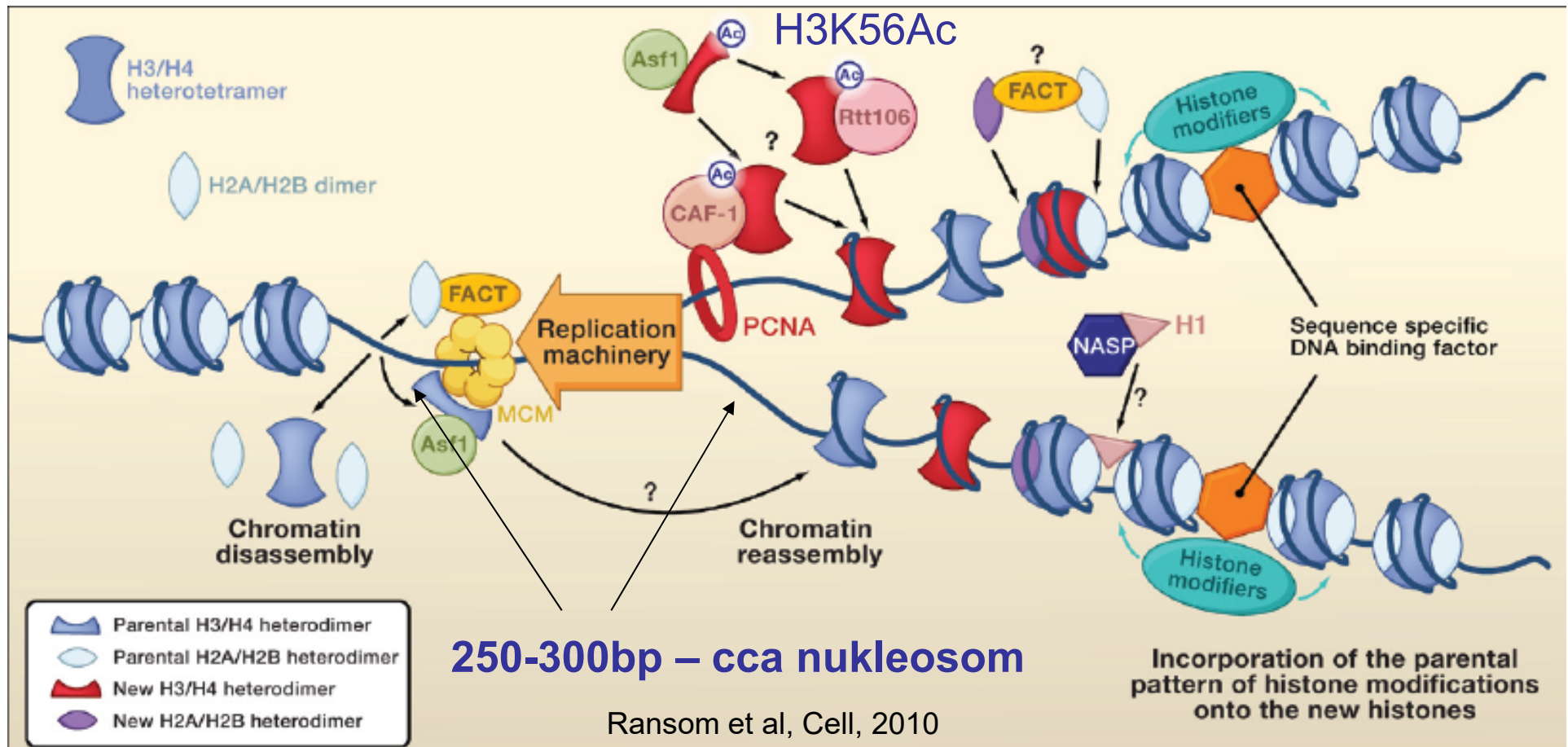
Hondele et al., Nature, 2013
 Kemble et al, Mol Cell, 2015

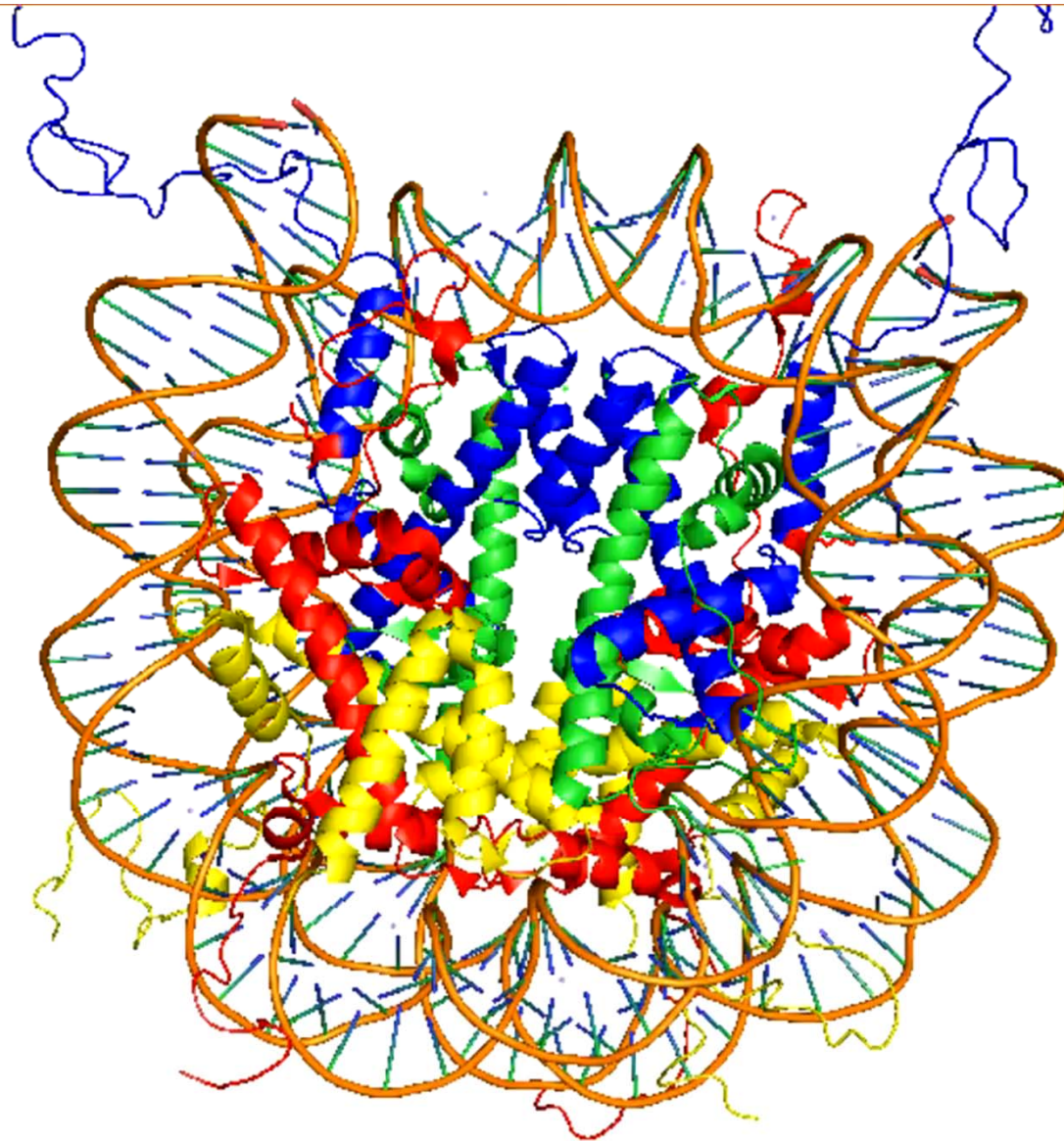


- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)
- nově syntetizované H3 (replikace) jsou acetylované na K56 – jsou specificky rozeznávány a zainkorporovávány CAF-1 komplexem - acetylace K56 (šroubovice) interferuje s vazbou na DNA (cca 8x slabší)

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)
- ASF1 (váže MCM, disassembly) + CAF1 (váže PCNA, assembly) pro H3-H4, FACT (váže MCM - disassembly)





- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice **H3** (acetylovaný K56)
- pozice nukleosomu je náhodná a následně je „upravená“ pomocí remodelačních komplexů (a teprve poté je H3 K56 deacetylován a stabilizován)

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)
- pozdější acetylace (Gcn5-HAT) rozvolňuje nukleosomy v místech **transkripce**

Histonové varianty

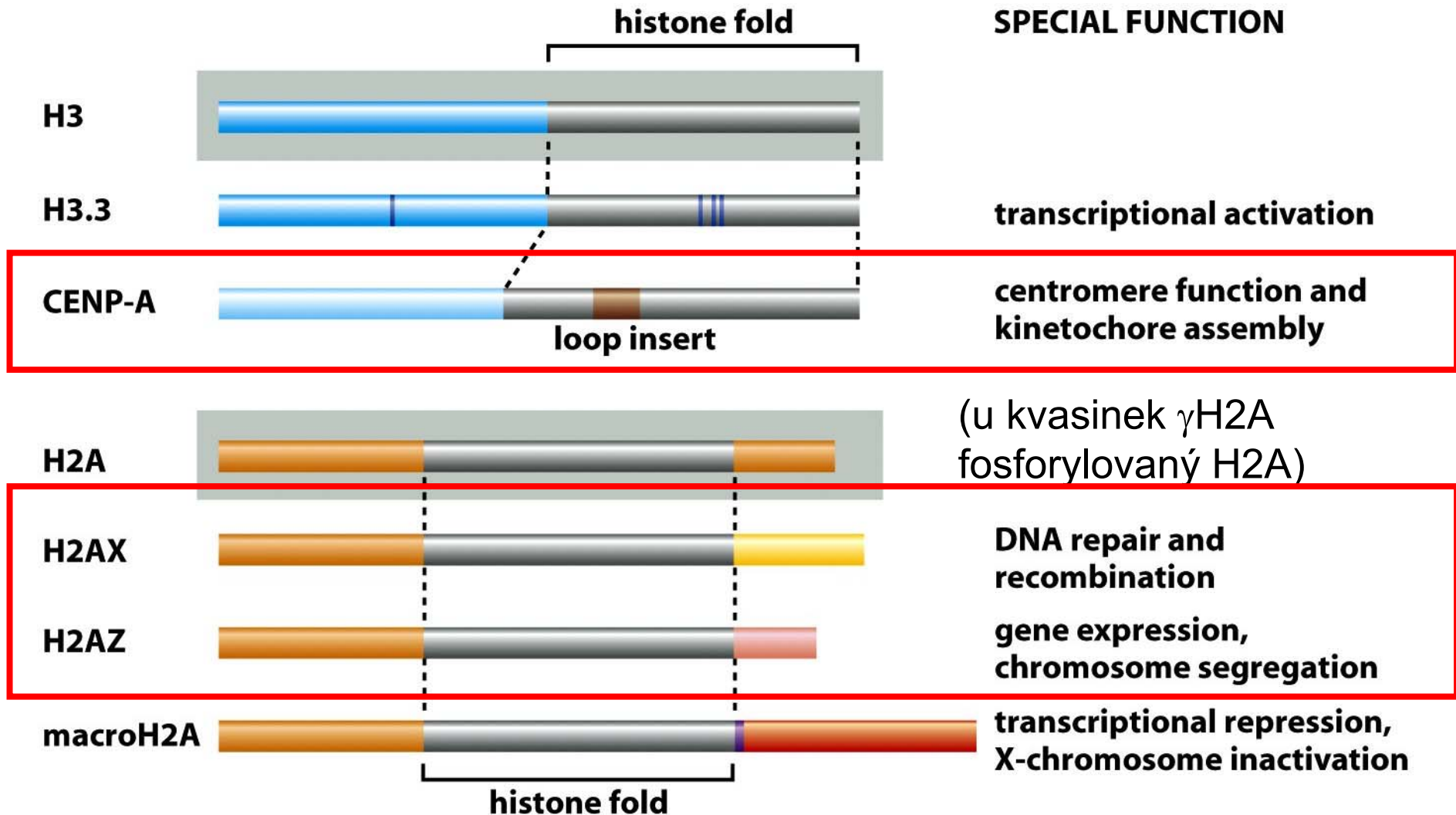
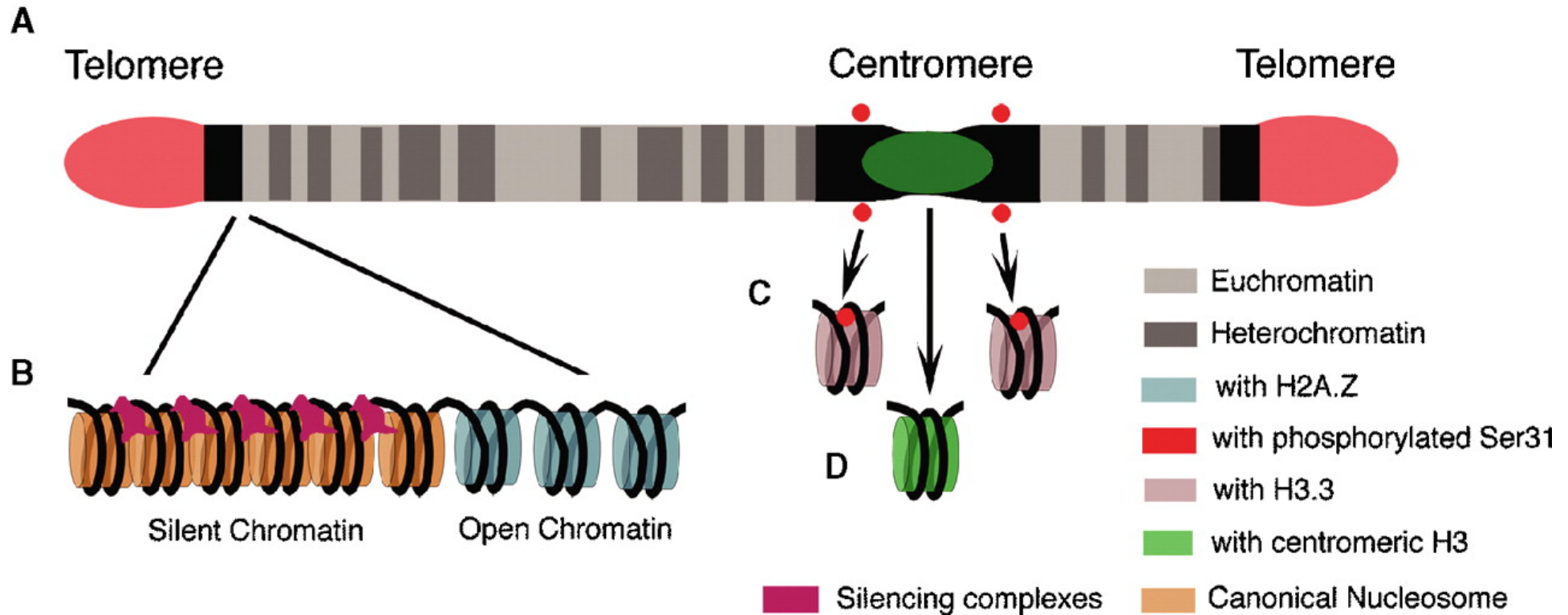


Figure 4-41 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

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)

specifický chromatin s CENP-A histonem kotví kinetochory -
tah mikrotubulů (a kohesiny) zajišťují správnou segregaci v
anafázi

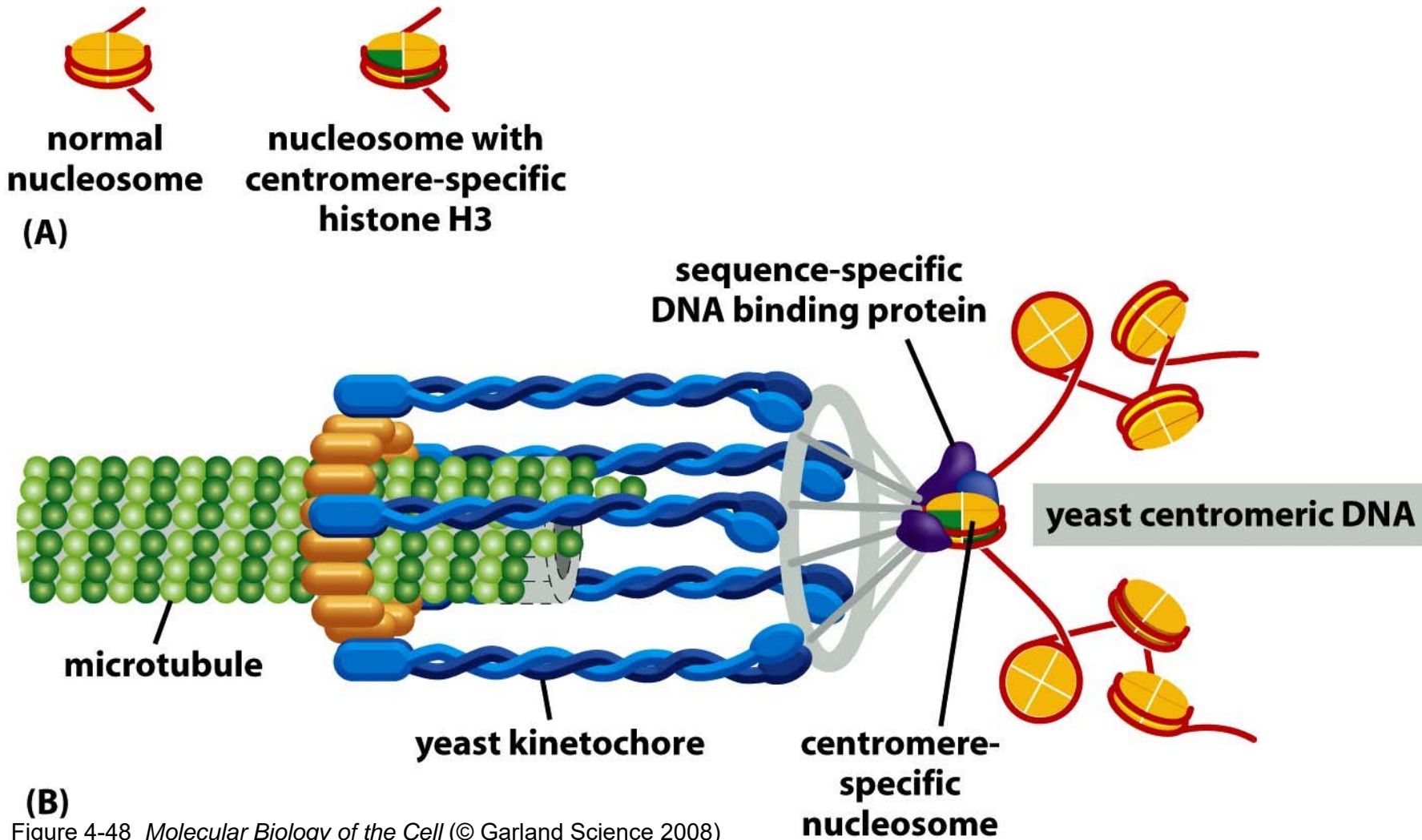
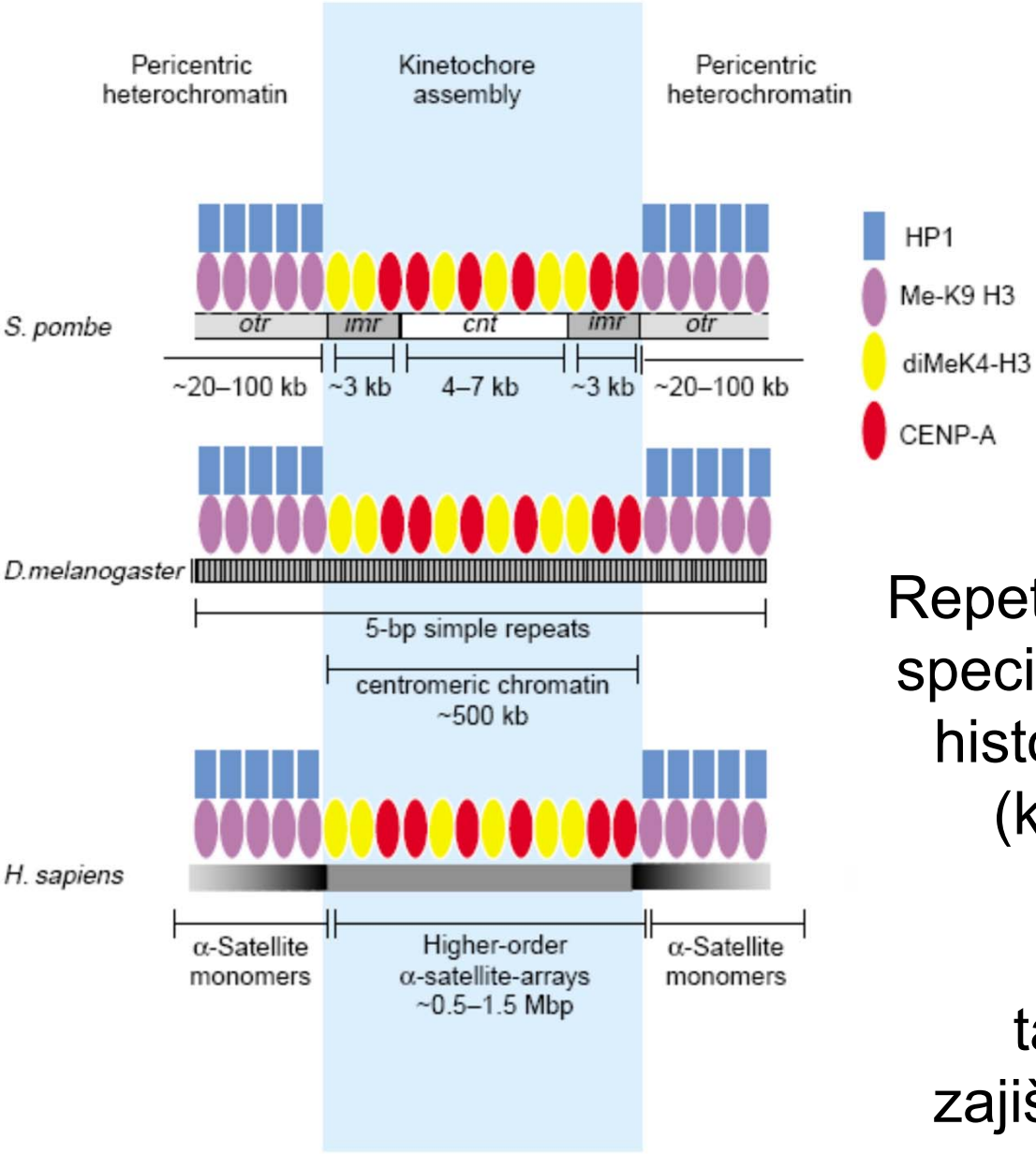


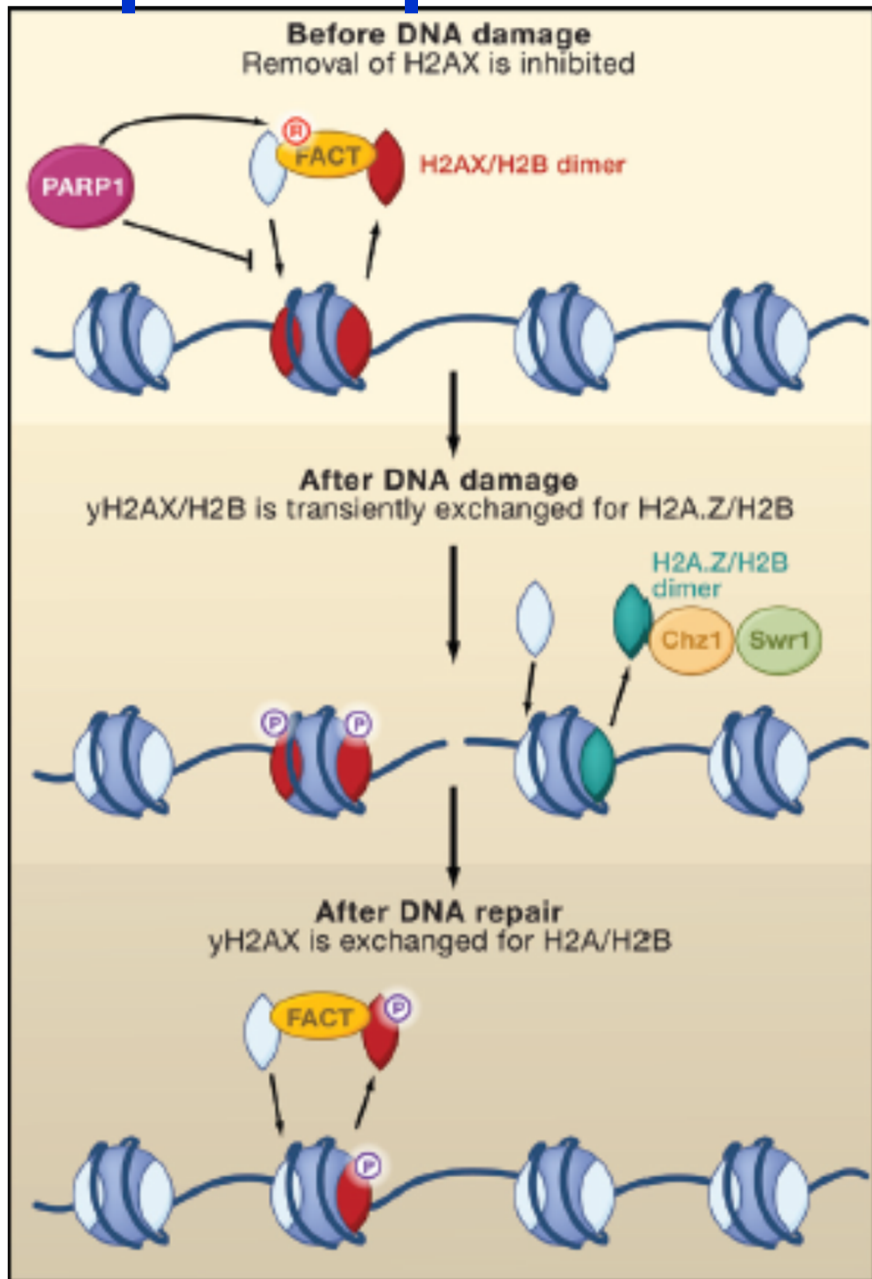
Figure 4-48 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Centromery



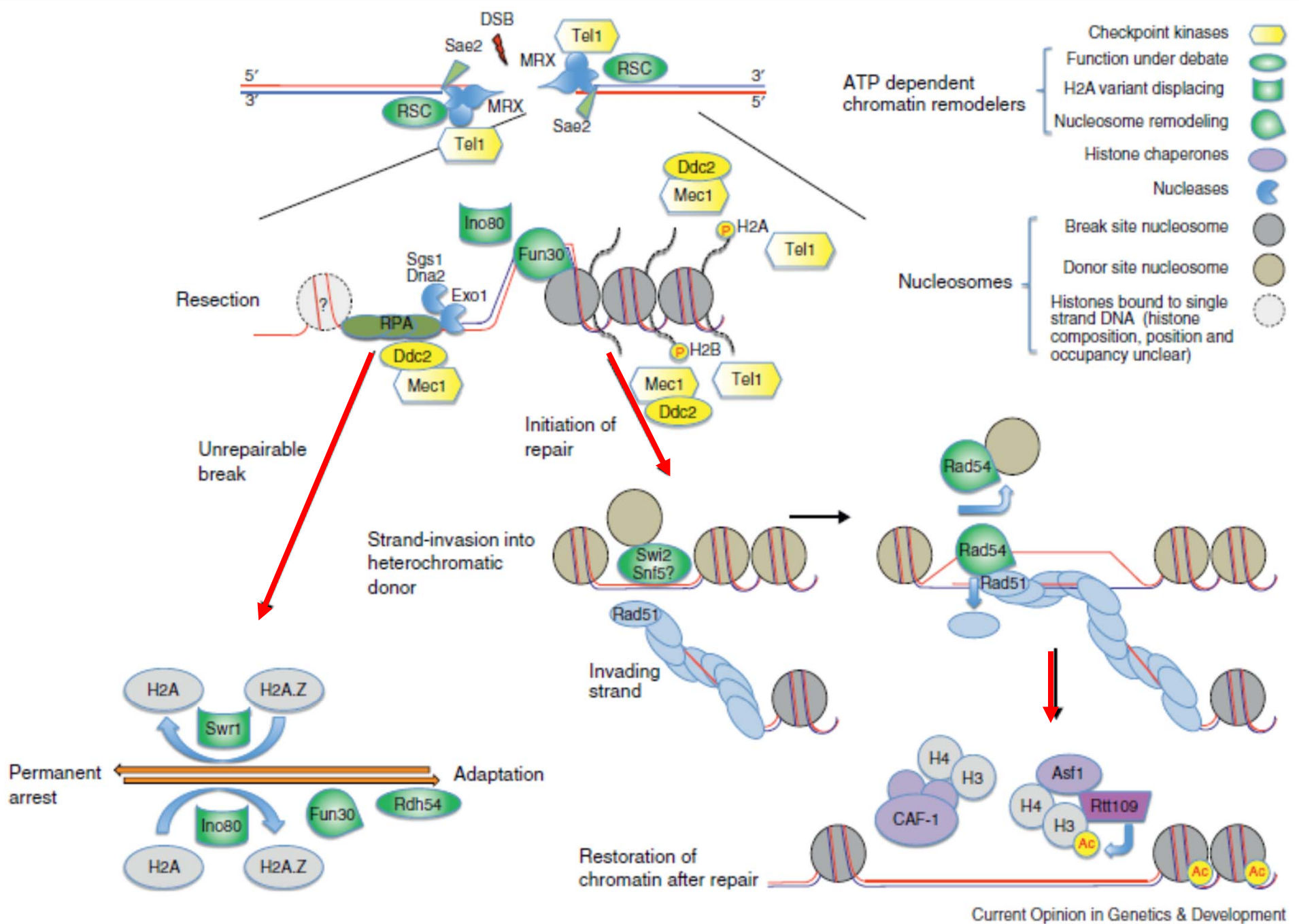
Repetitivní sekvence vytvářející specifický chromatin – CENP-A histon, který kotví kinetochoru (kolem je pericentromerický heterochromatin a SMC komplexy) tah mikrotubulů a kohesiny zajišťují správnou segregaci v anafázi

Oprava poškozené DNA – H2A histony



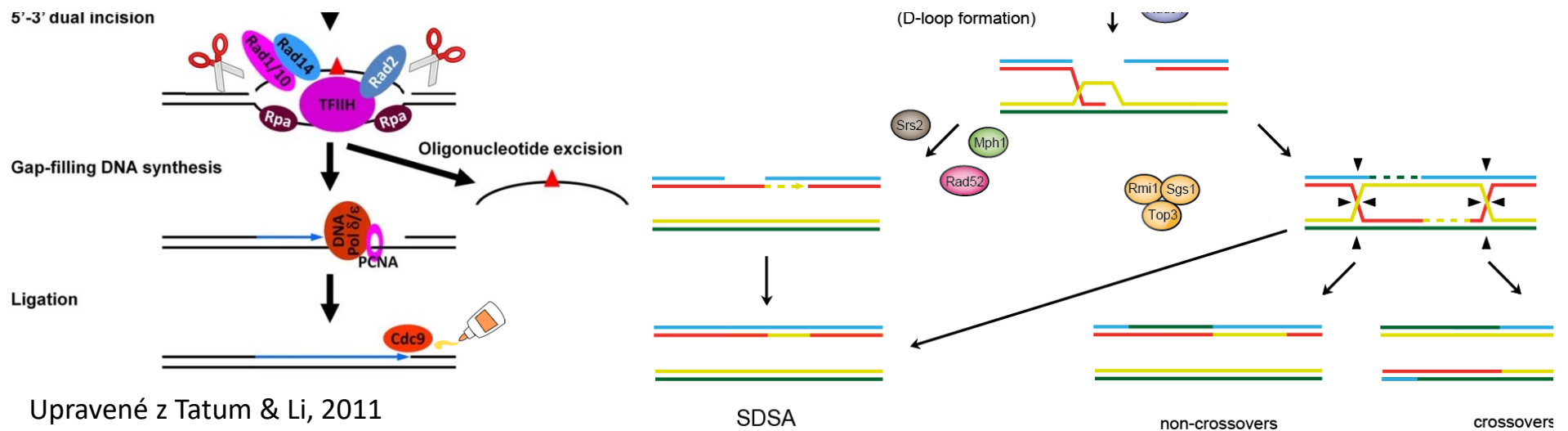
Ransom et al, Cell, 2010

- 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

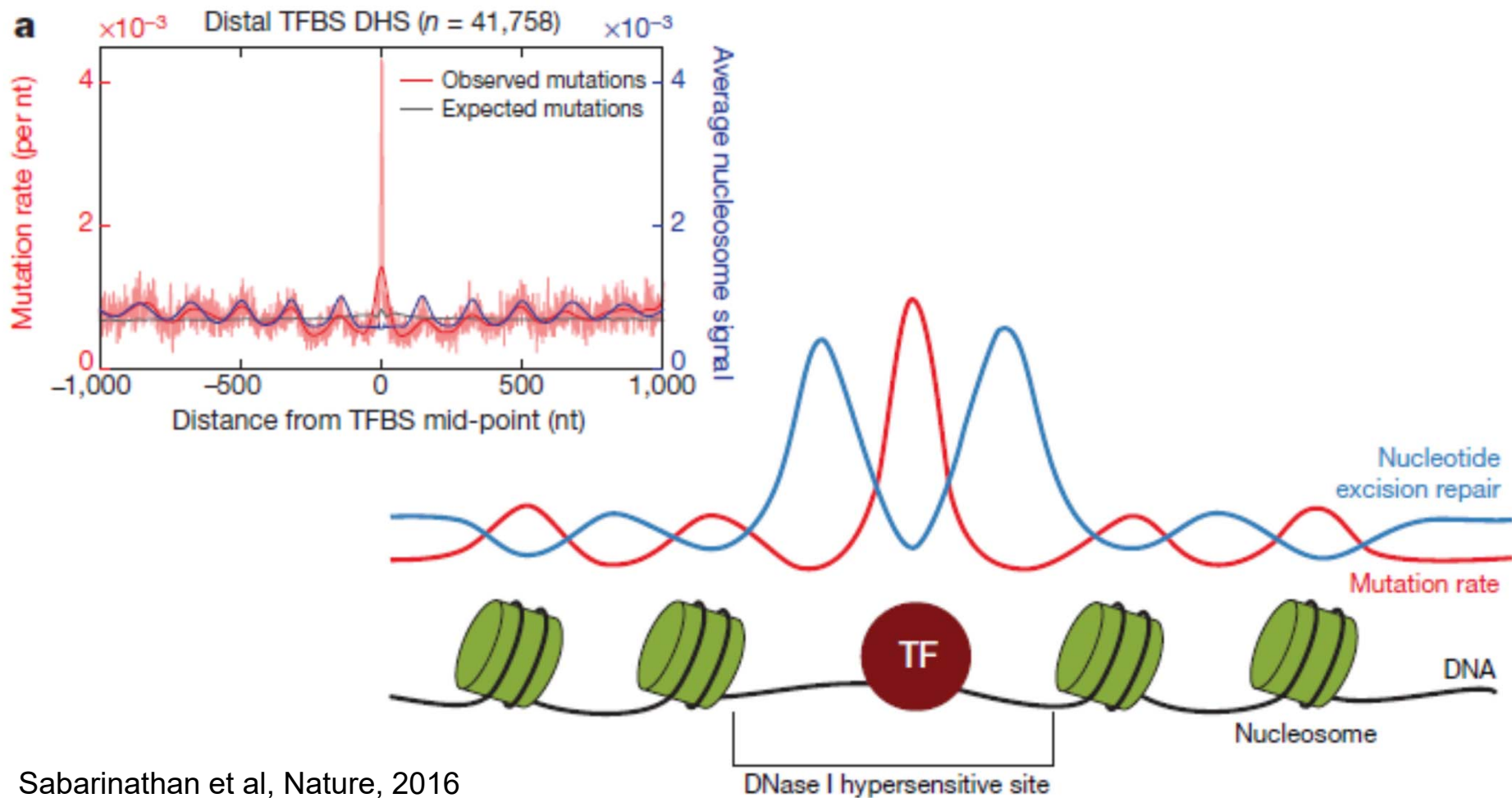


Oprava poškozené DNA - chromatin

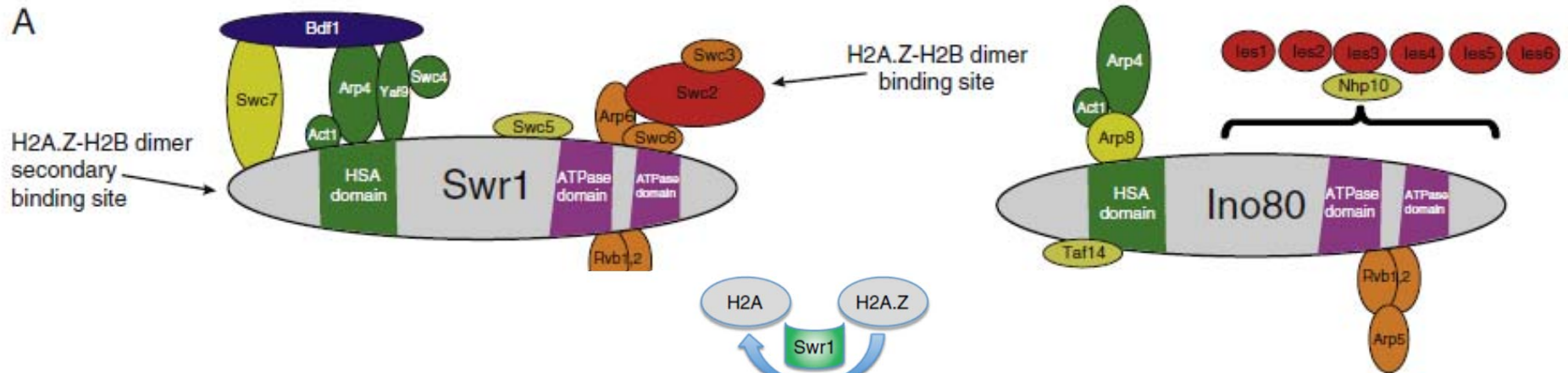
- na ssDNA nukleosomy nejsou ... **oprava DNA**
- před těmito procesy se musí histony odstranit a poté zase nabalit ...
- pro malá poškození (NER, BER) stačí menší změny chromatinu zatímco pro větší (DSB - resekce DNA tj. vznik ssDNA) musí nukleosomy odstranit
- **NER (BER)** doprovázeno acetylací histonů a remodelací (posuvem)
- při **DSB** musí být odstraněny nukleosomy pomocí ASF1, CAF-1 a FACT, 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!



- 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)
- nová studie ukazuje, že NER je méně účinný (DNA je méně přístupná) v místech okupovaných nukleosomy (a transkripčními faktory)

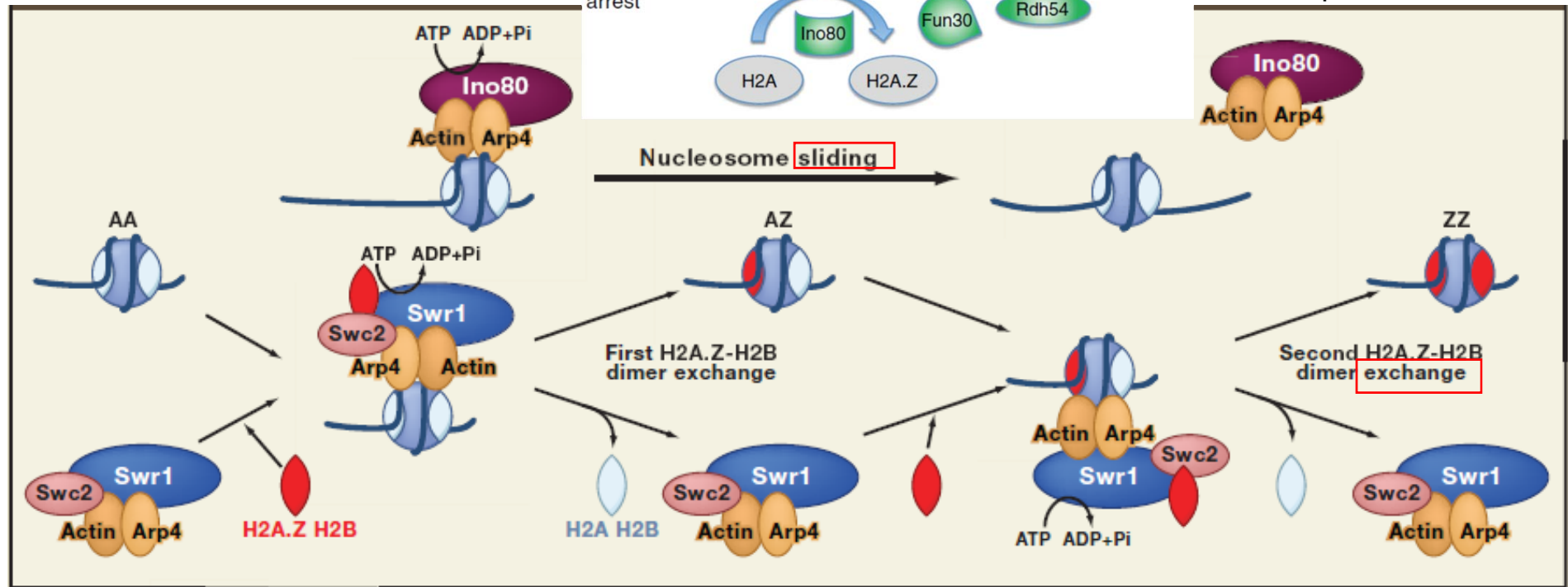


bromodoména



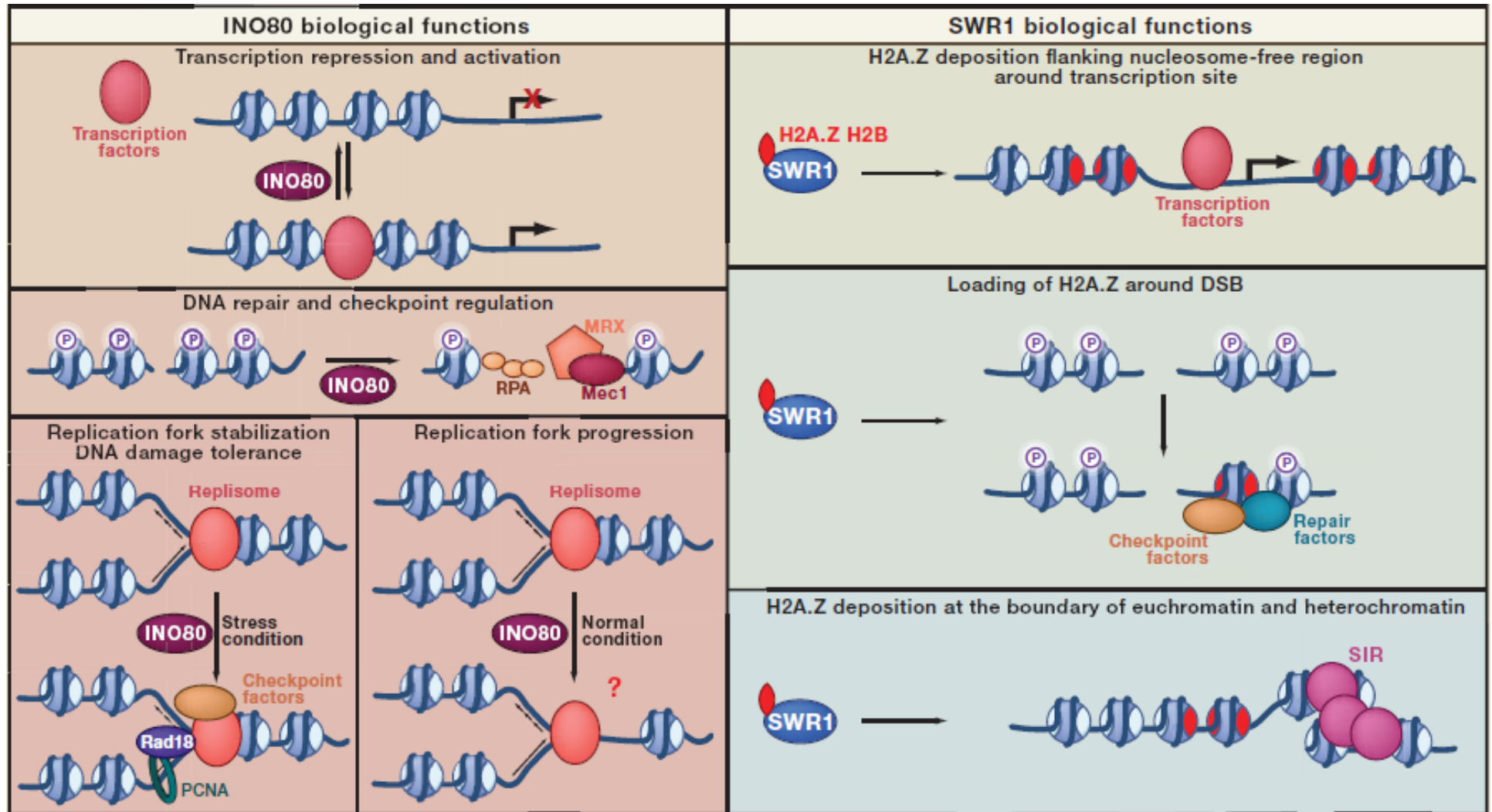
Billon a Cote, BBA, 2012

Bao, Snapshot-Cell, 2010



SWR komplex specificky zaměňuje (Exchange) H2A-H2B dimer za H2A.Z-H2B

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



- INO80 komplex sliding + zaměňuje H2AZ-H2B dimer zpět za H2A-H2B

RSC remodelovací komplex

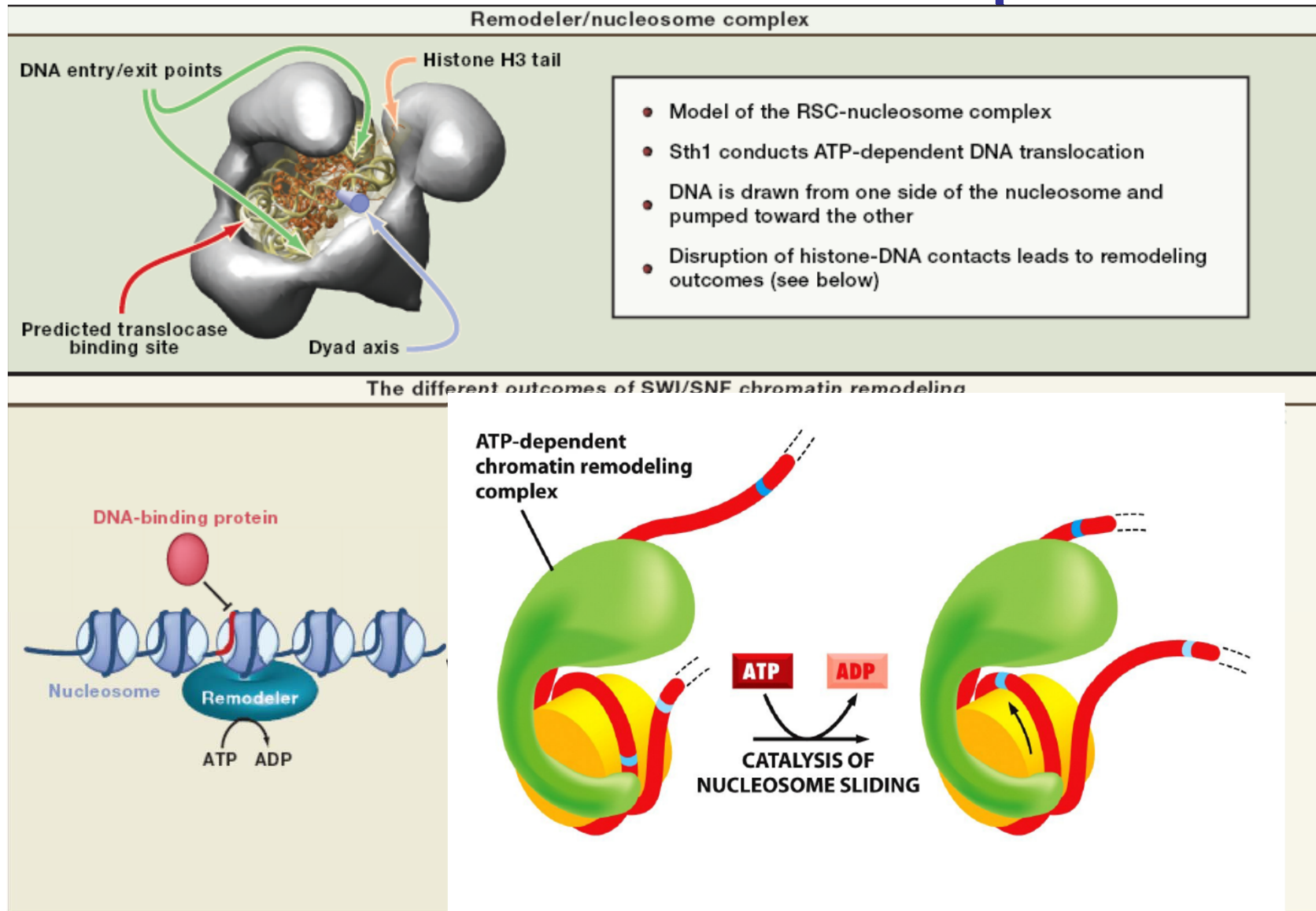
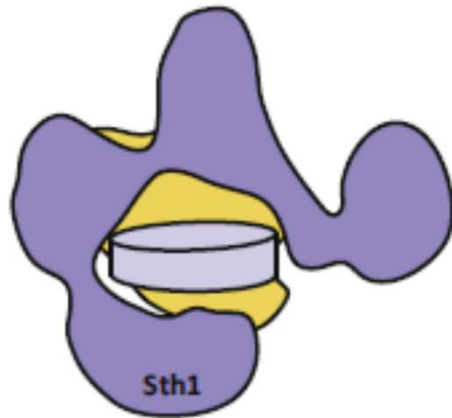


Figure 4-29 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

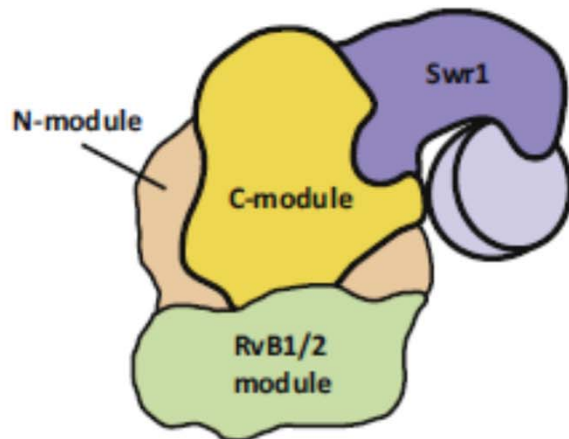
SNAPSHOT, Cell (144), 2011

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

(A) **RSC**
Nucleosome engulfing

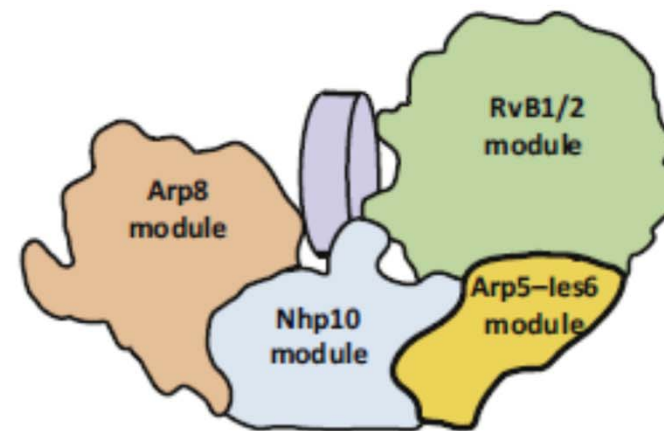


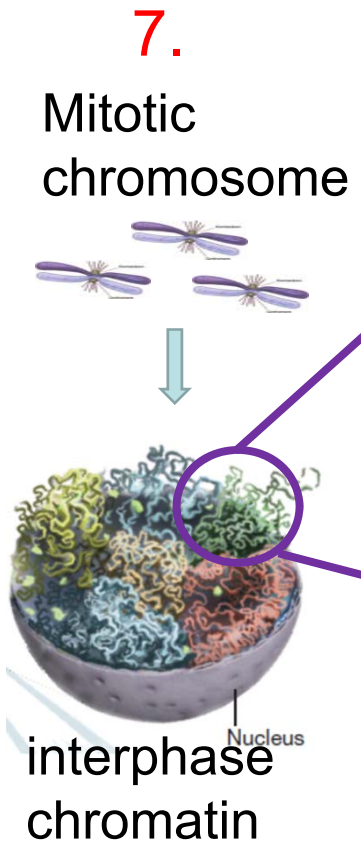
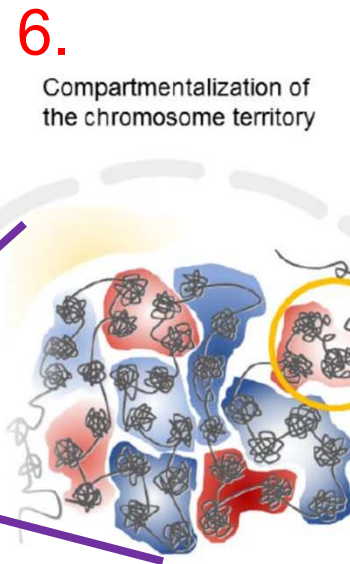
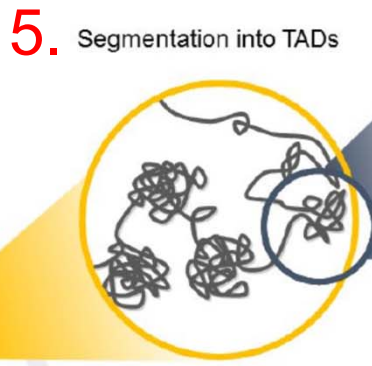
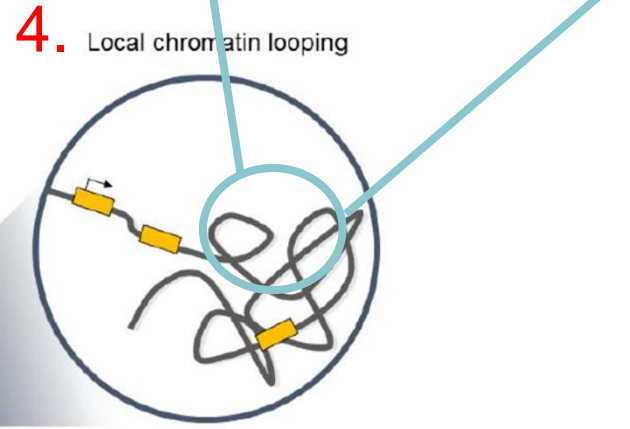
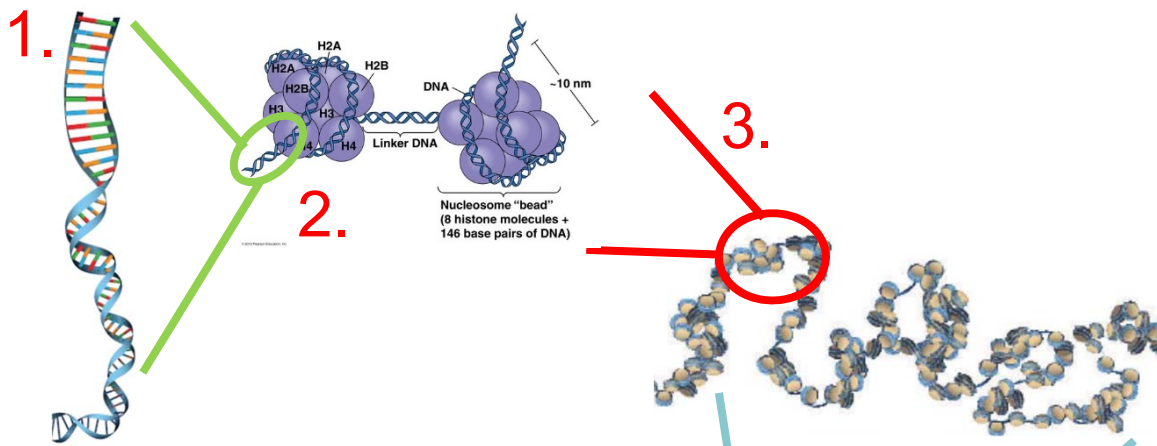
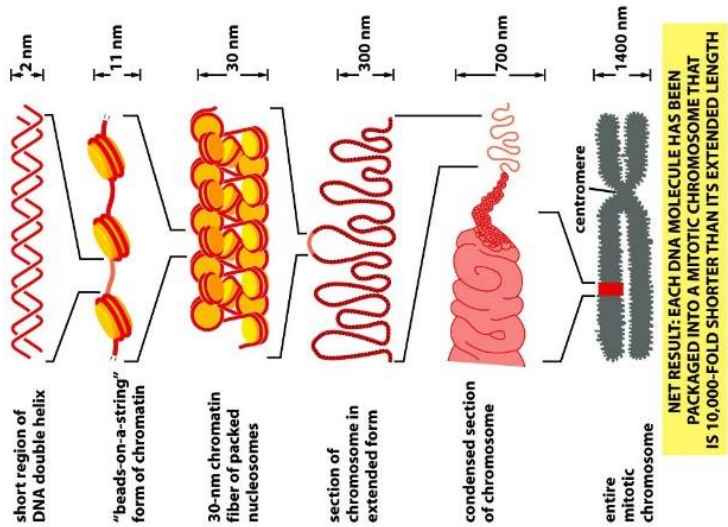
(C) **SWR-C**
Nucleosome clinging



- **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)

(D) **INO80-C**
Nucleosome grasping

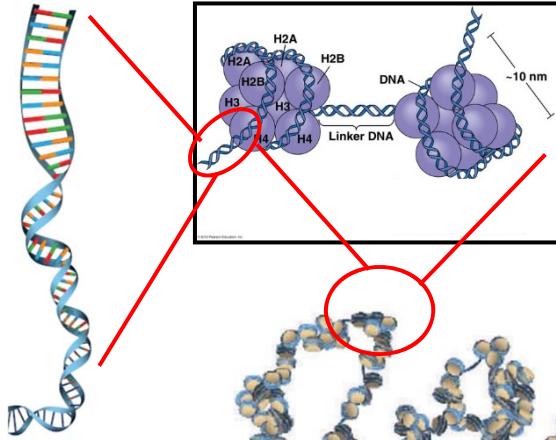




Chromatinové vlákno

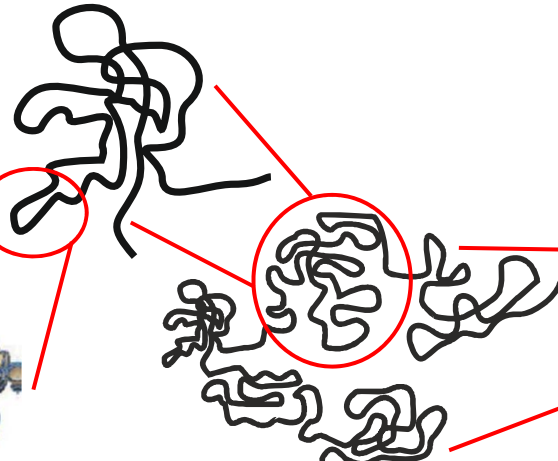
nový model

1. DNA strand.



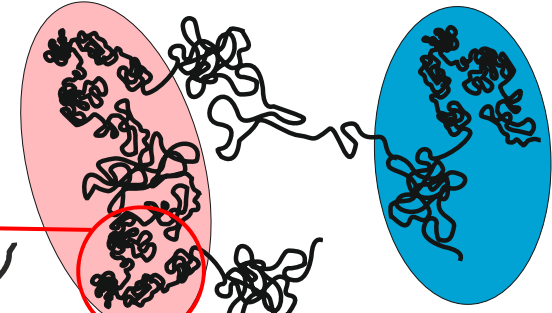
2. string with nucleosomes

3. string makes loops



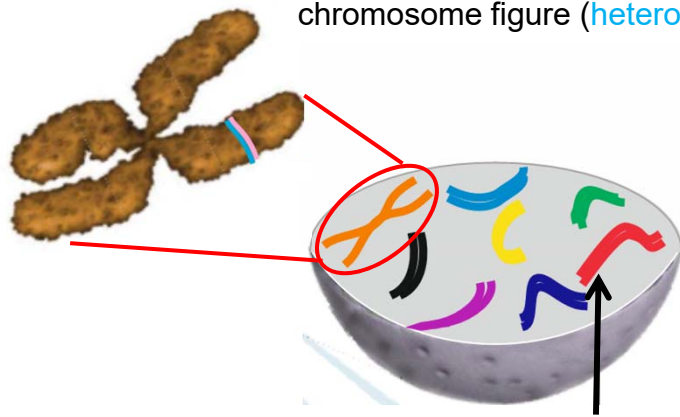
4. Loops make TADs

5. TADs cluster to compartments



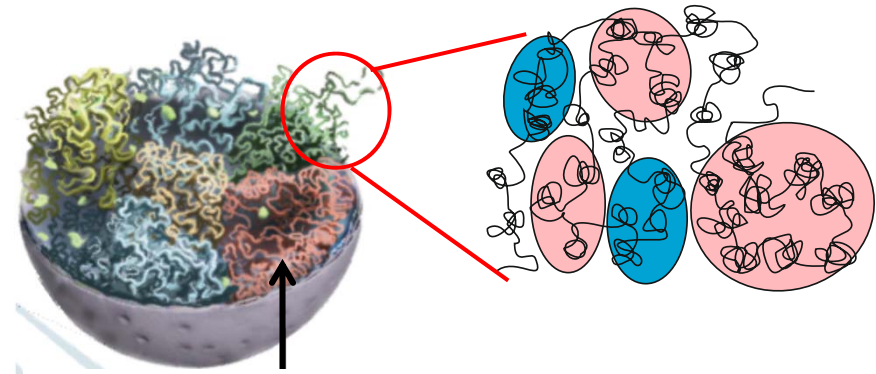
nový model

chromosome figure (hetero- and euchromatin) ... chromatin fiber ... compartments (hetero- and euchromatin) ...

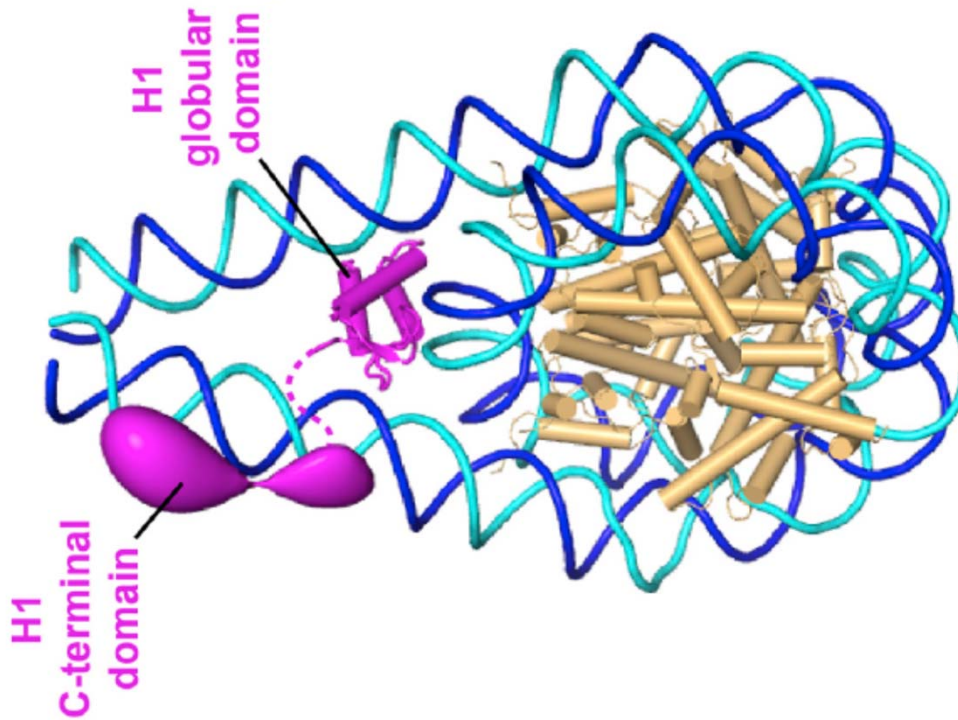
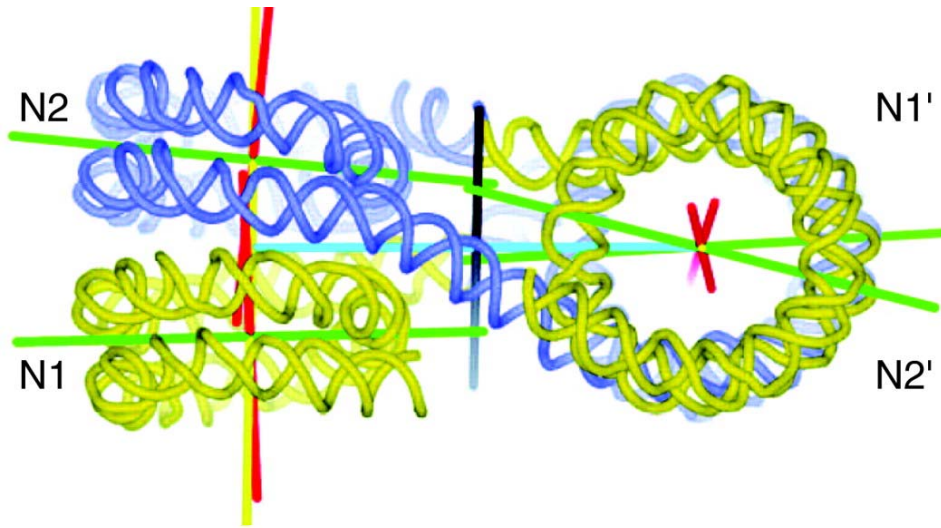


condensed mitotic chromosomes in nucleus

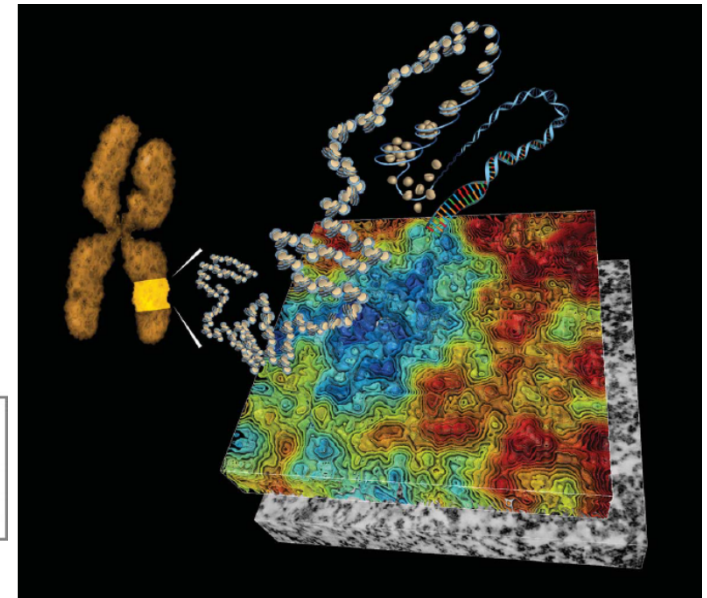
cell cycle



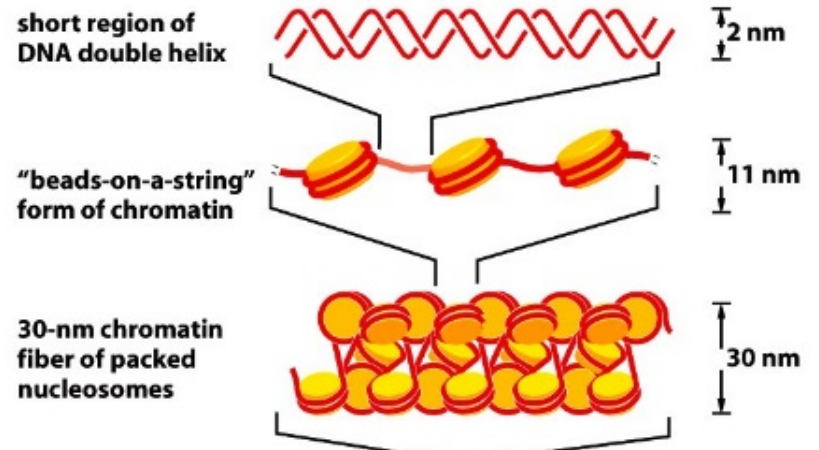
Interphase chromatin fibers in nucleus



Bednar et al, Mol Cell, 2017
 Zhou et al, PNAS, 2013
 Cutter a Hayest, FEBS Let, 2015
 Woodcock a Ghosh, CSHPB, 2010

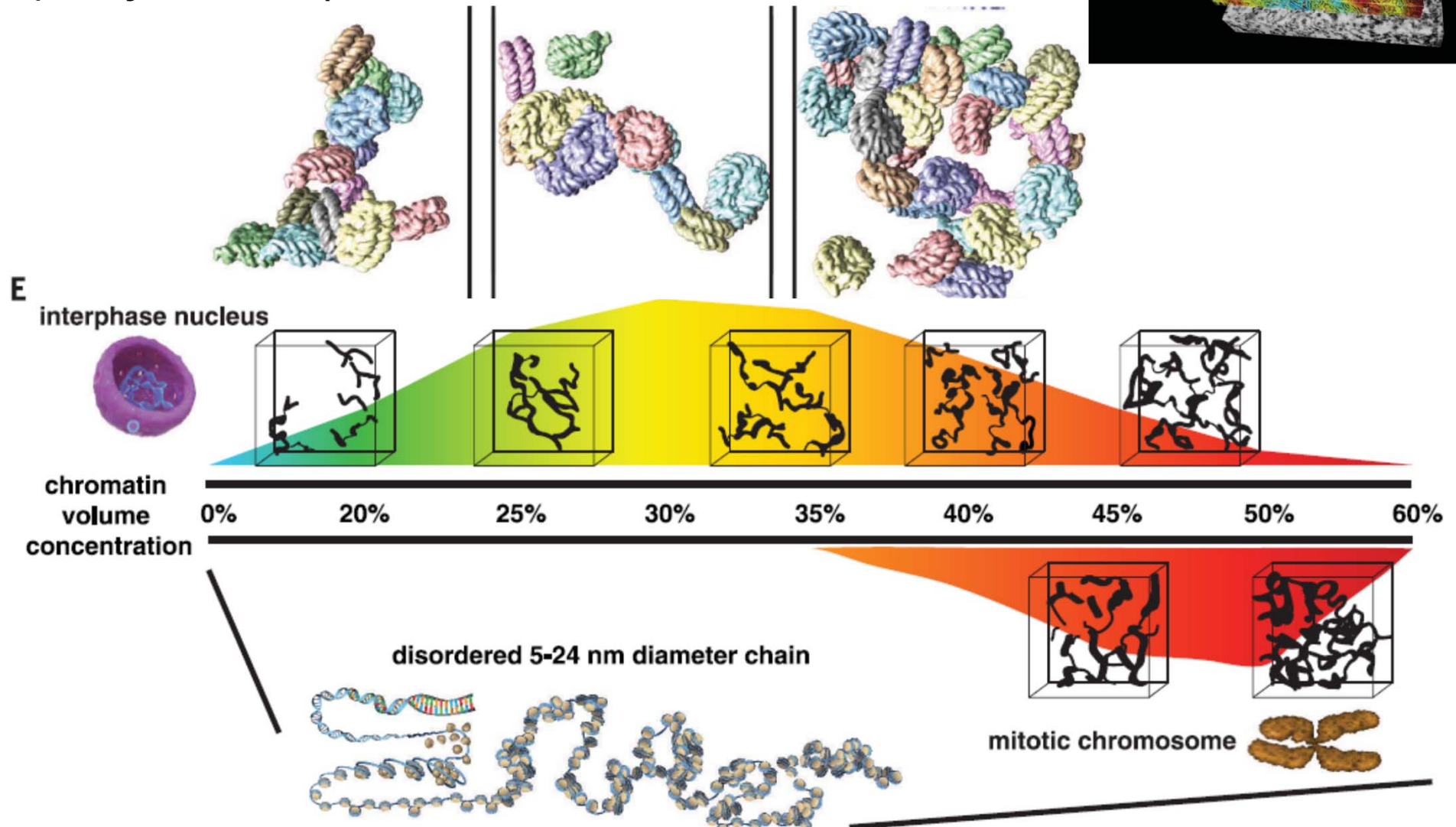
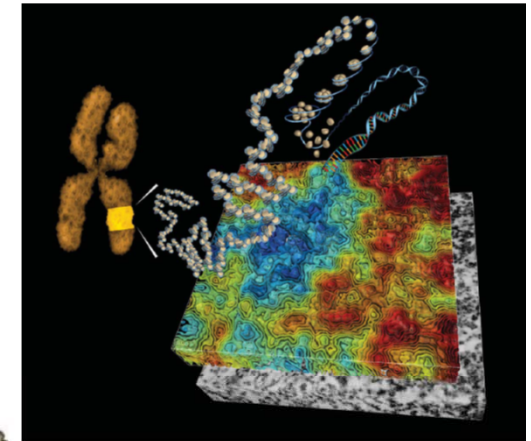


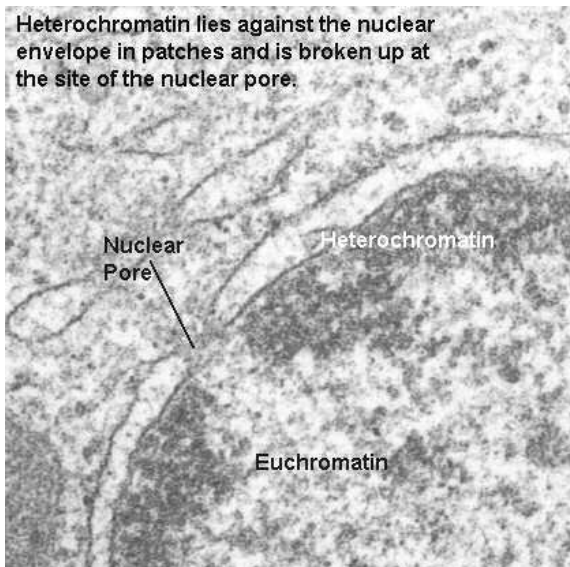
30nm coil



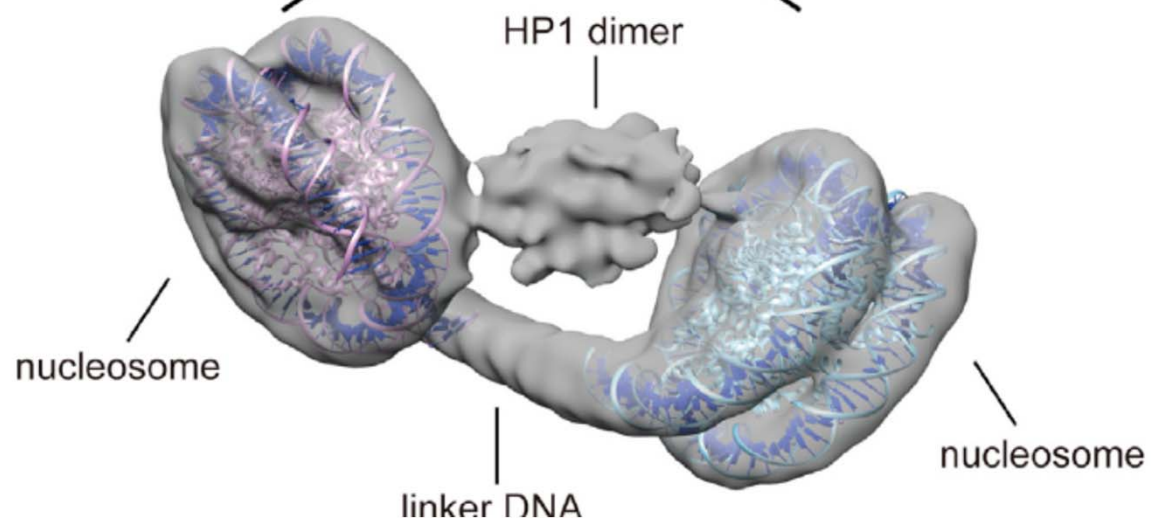
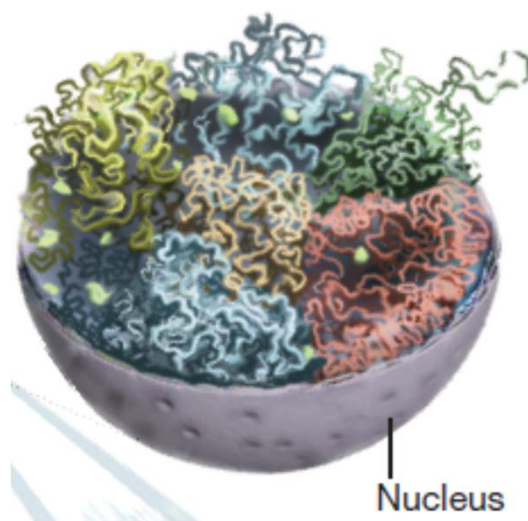
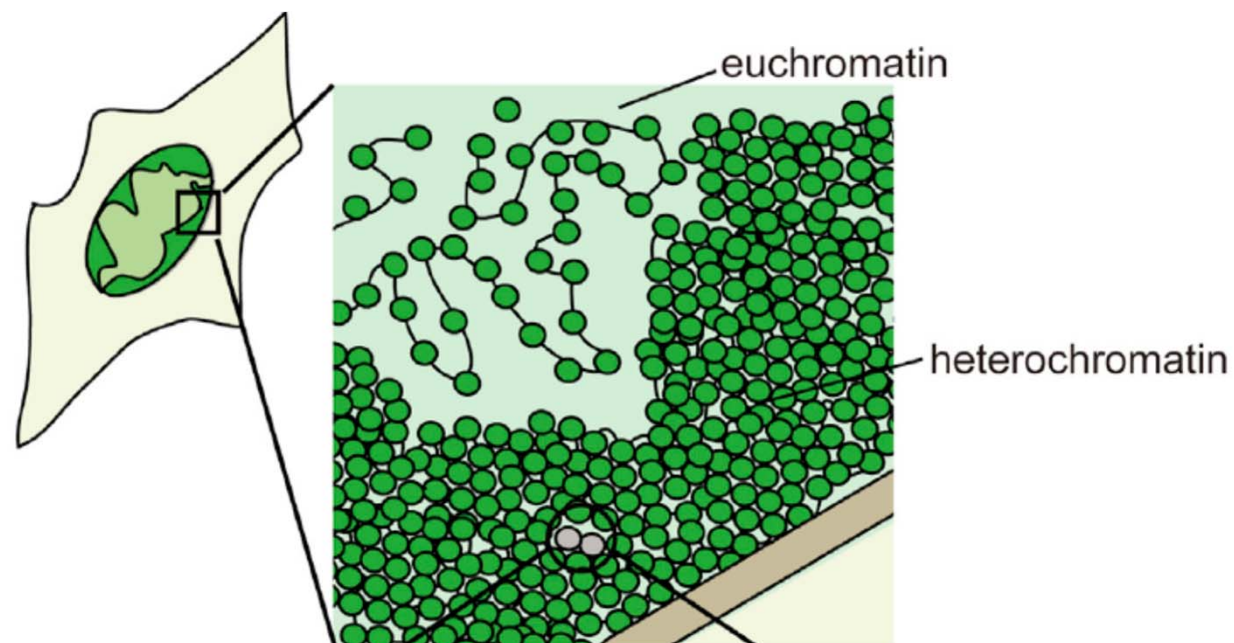
https://players.brightcove.net/53038991001/Byx2STOH0_default/index.html?videoid=5522198641001

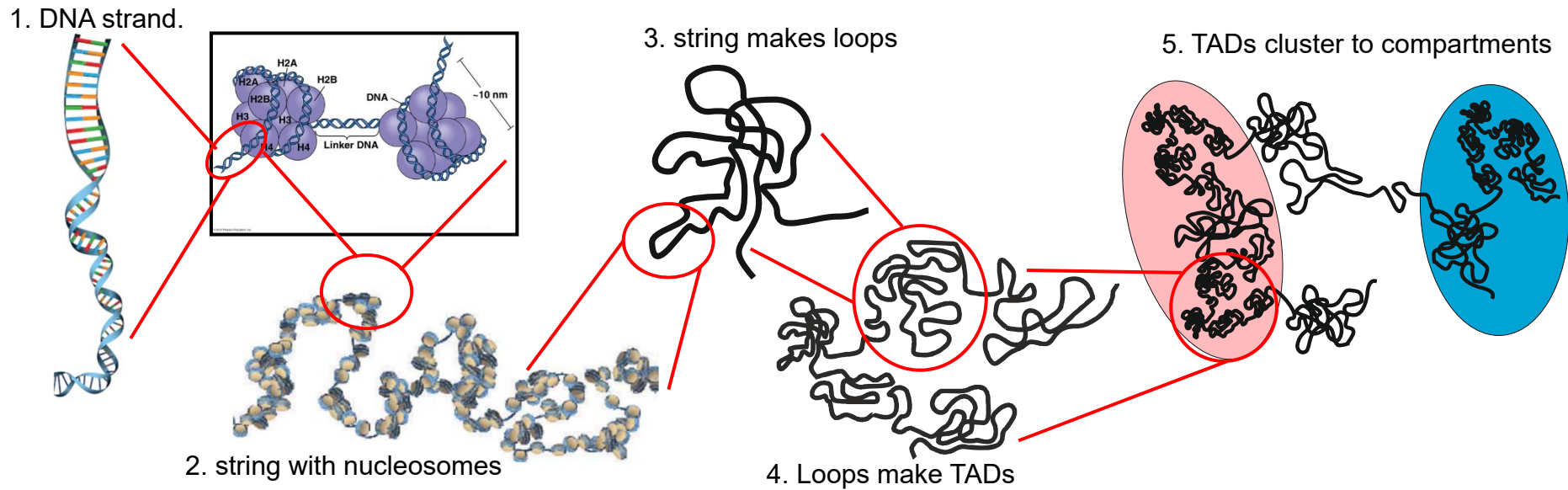
3. Chromatin fibers – disordered 5-24nm diameter chain (žádný 30nm coil) Ou a spol, Science, 2017 – cryoEM chromatinu





heterochromatin protein HP1 - spojuje



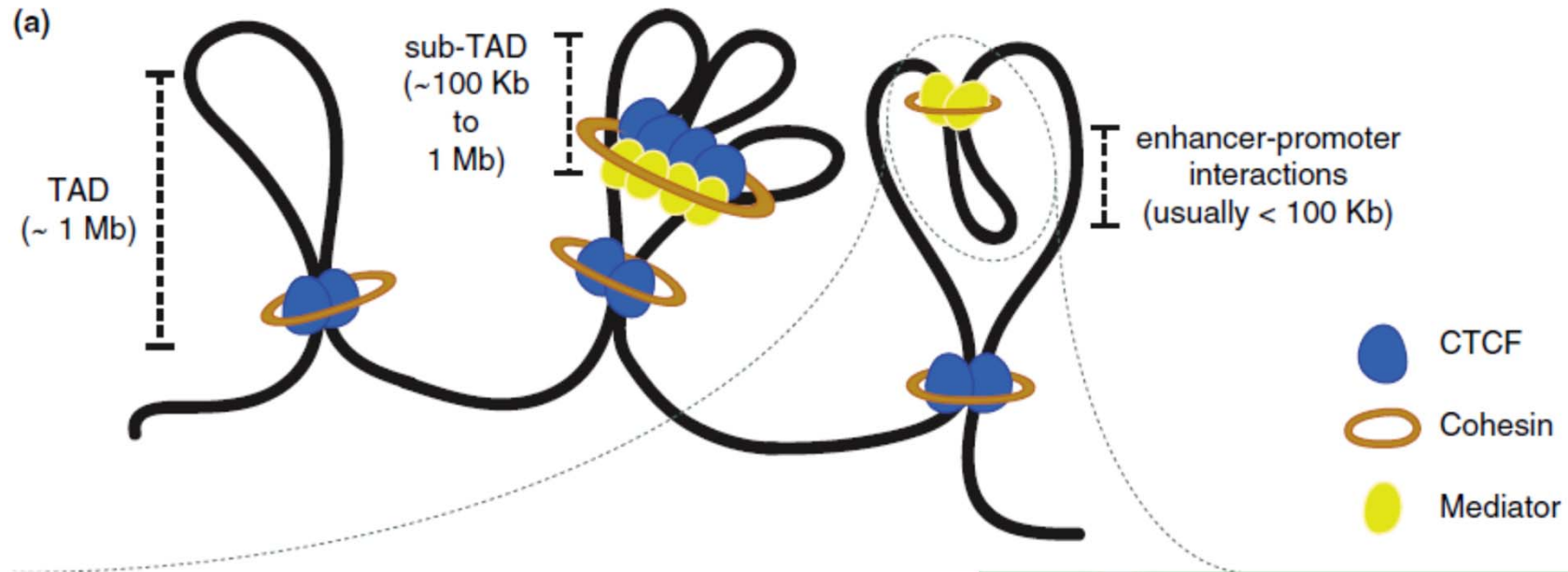


nový model

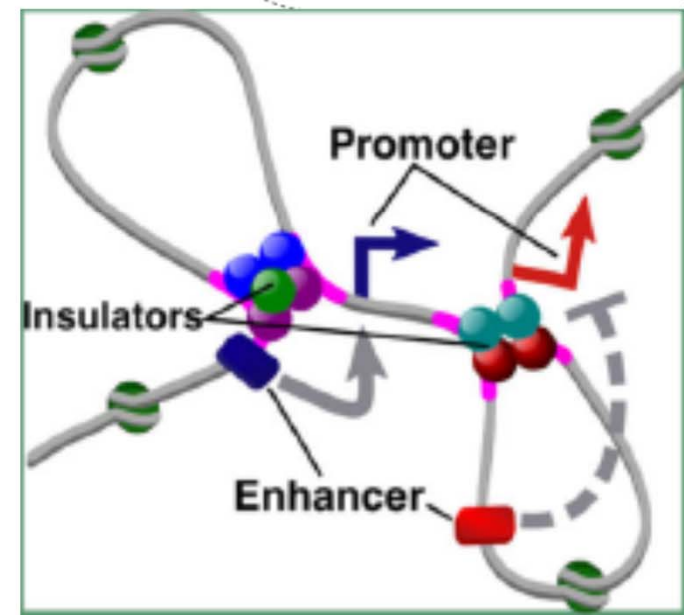
3. Chromatinová vlákna vytváří smyčky – transcription loops – CTCF, cohesin ...

Chromatin loops may cluster in TADs (topologically associated domains - hundreds of kbps) – **cohesin** – (Schwarzer et al, Nature, 2017; Haarhuis, EMBO J, 2017)

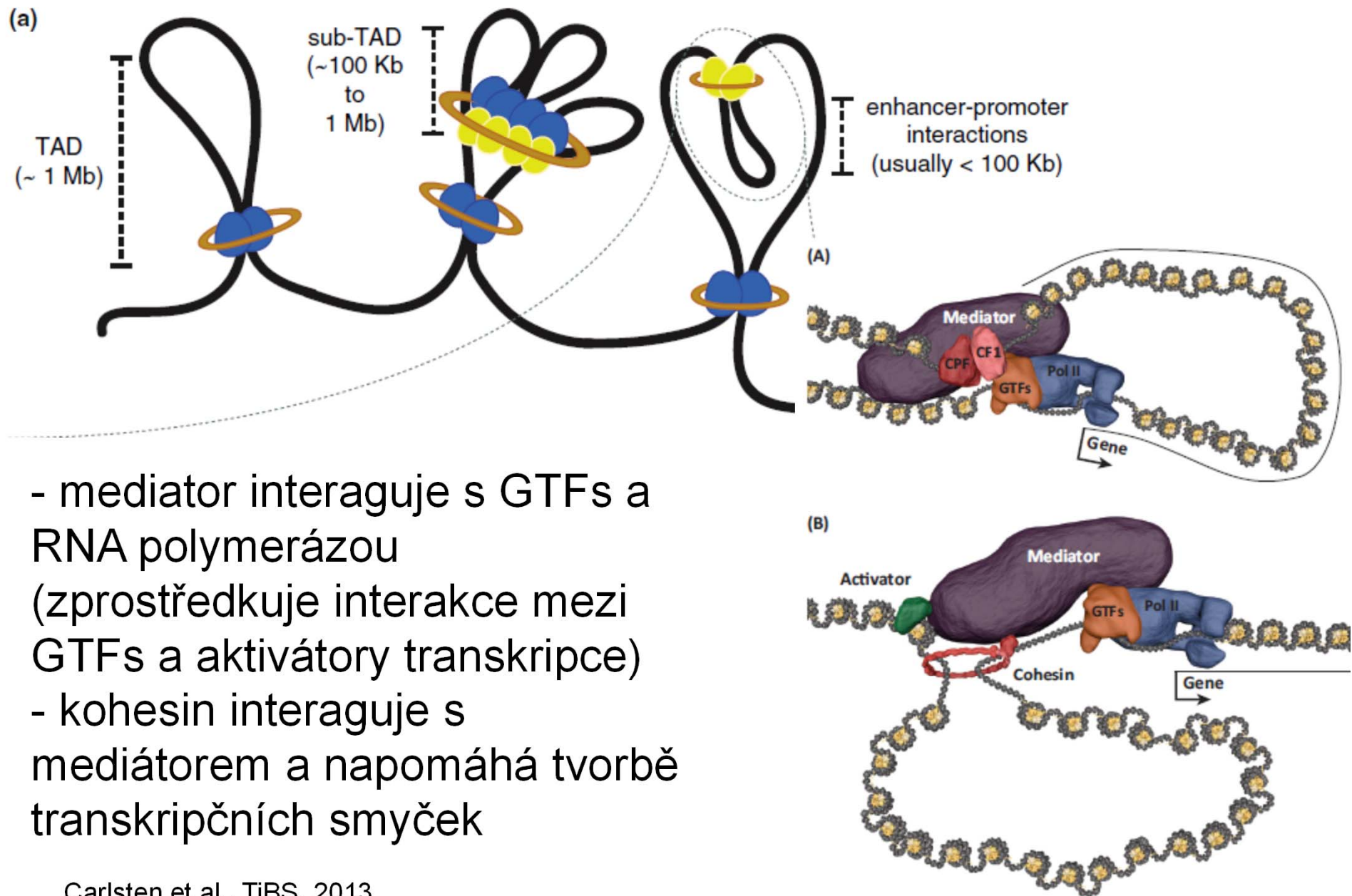
Kohesin interaguje s CTCF ...



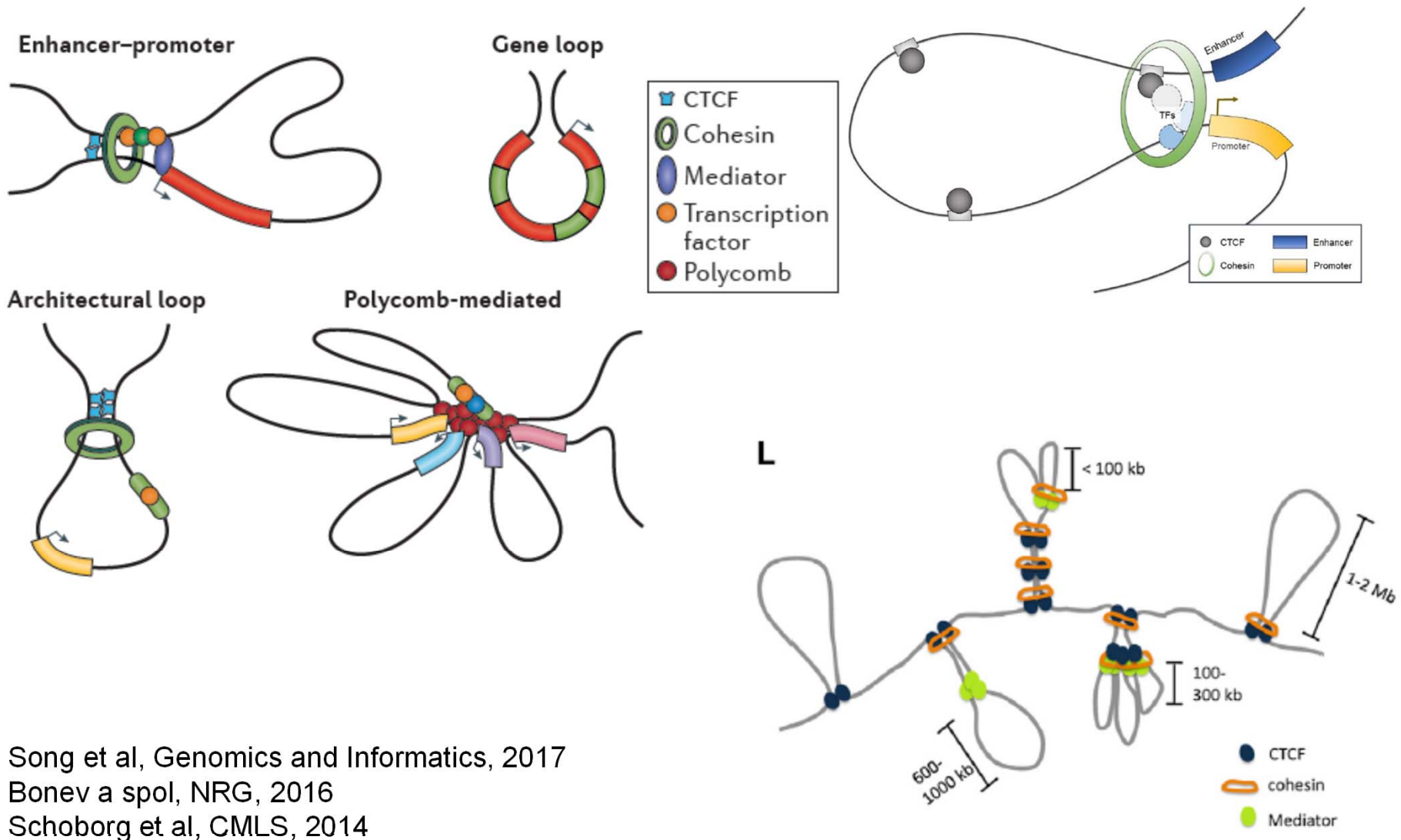
- CTCF „izoluje“ transkripční faktory a reguluje transkripci
- interaguje s kohesinem a podílí se na utváření vyšších chromatinových struktur



... a kohesin interaguje s mediátorem

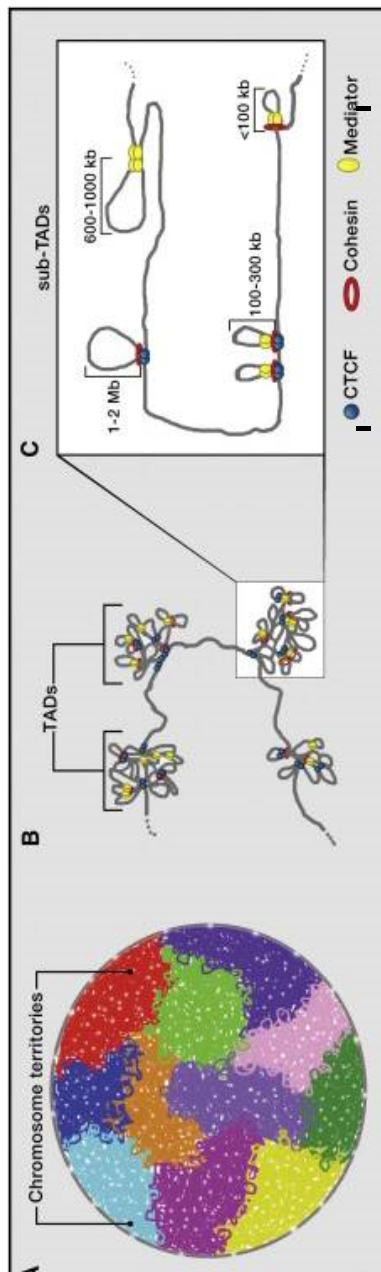


cohesin (SMC1/3) complex assists in looping (loop extrusion model) of transcription loop units – interacts with CTCF, mediator ... different looping may result in different transcription outcome (influences cell differentiation)

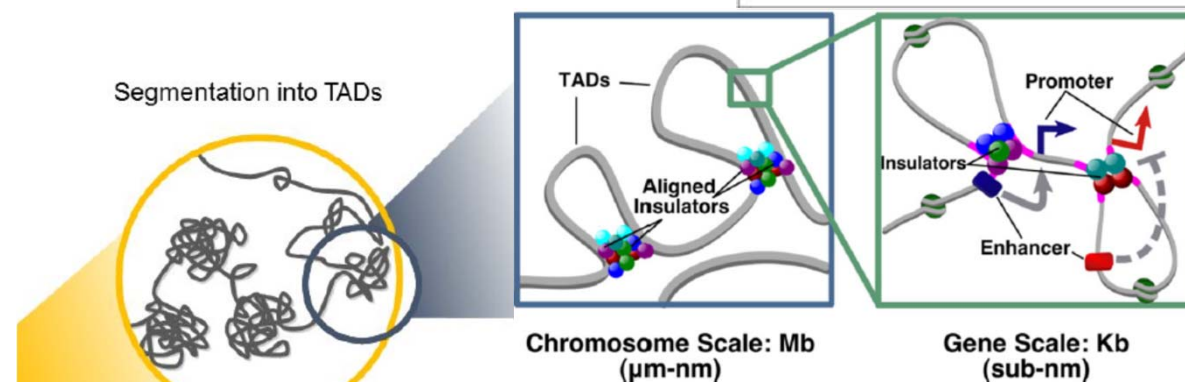
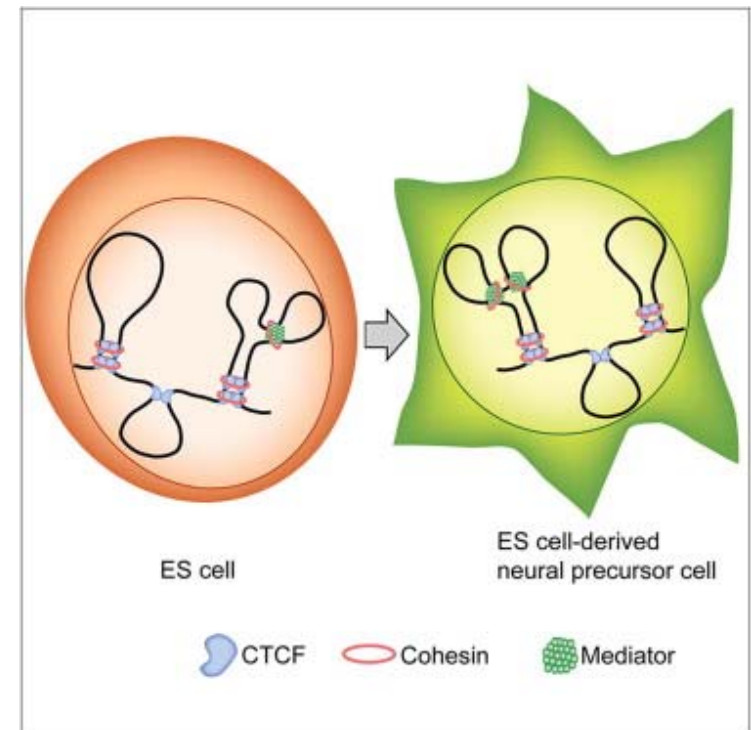


Song et al, Genomics and Informatics, 2017
 Bonev a spol, NRG, 2016
 Schoborg et al, CMLS, 2014

4. Chromatin loops may cluster in TADs (topologically associated domains) – cohesin dependent

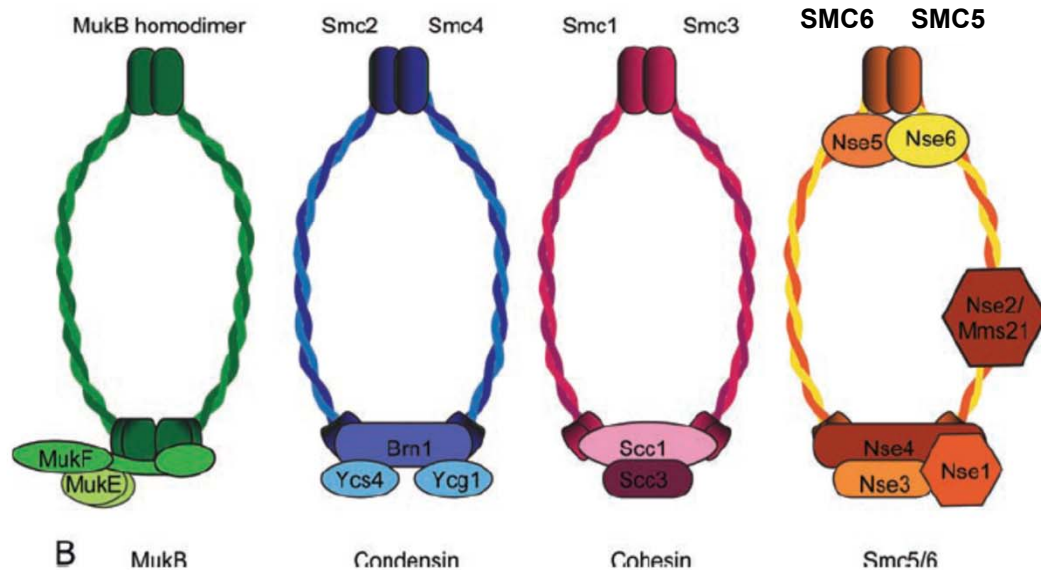
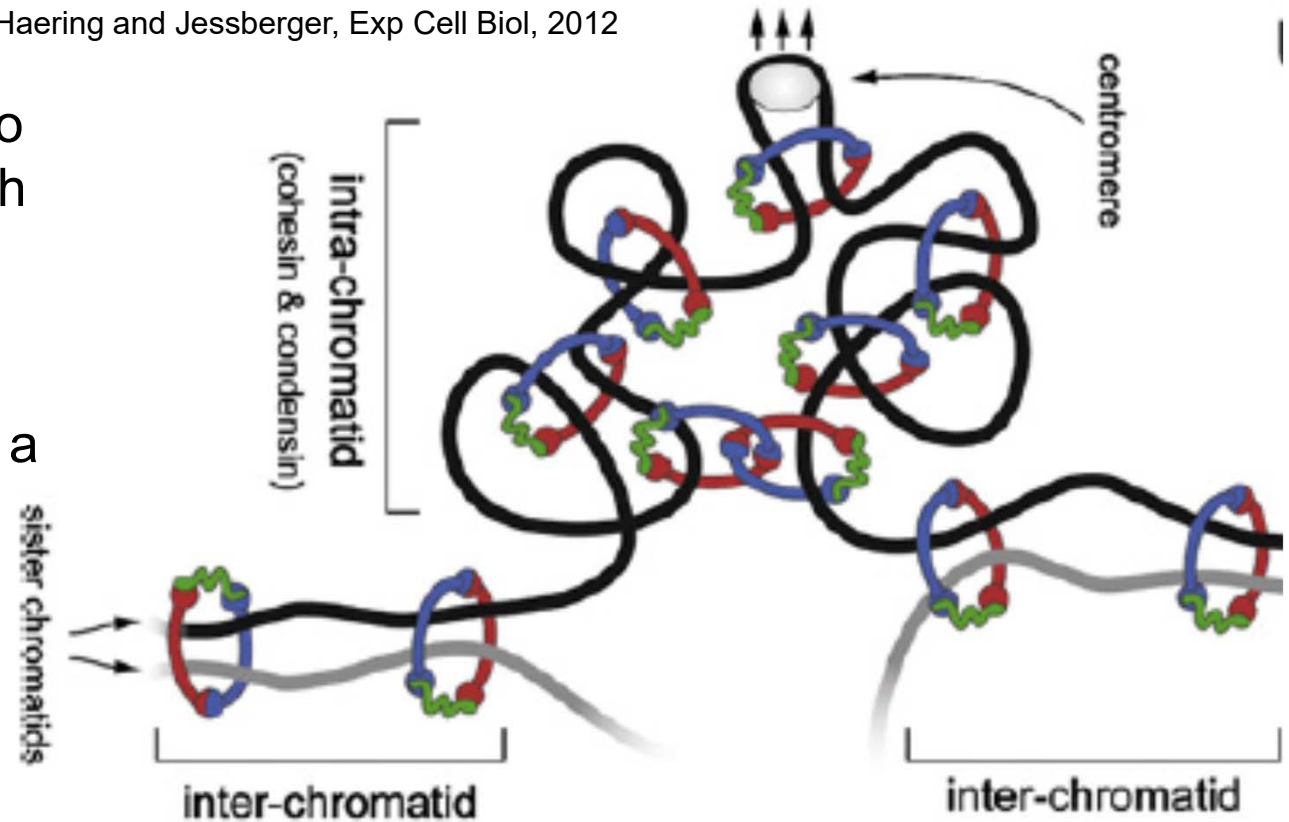


cohesin se podílí na regulaci „cell-specific“ transkripce a chromatinové struktury (ukazuje se jak úzký vztah mezi těmito úrovněmi existuje) kombinace interakcí kohesinu s CTCF a mediátorem jsou klíčové pro „buněčnou specifitu“ (např. diferenciace kmenových buněk)



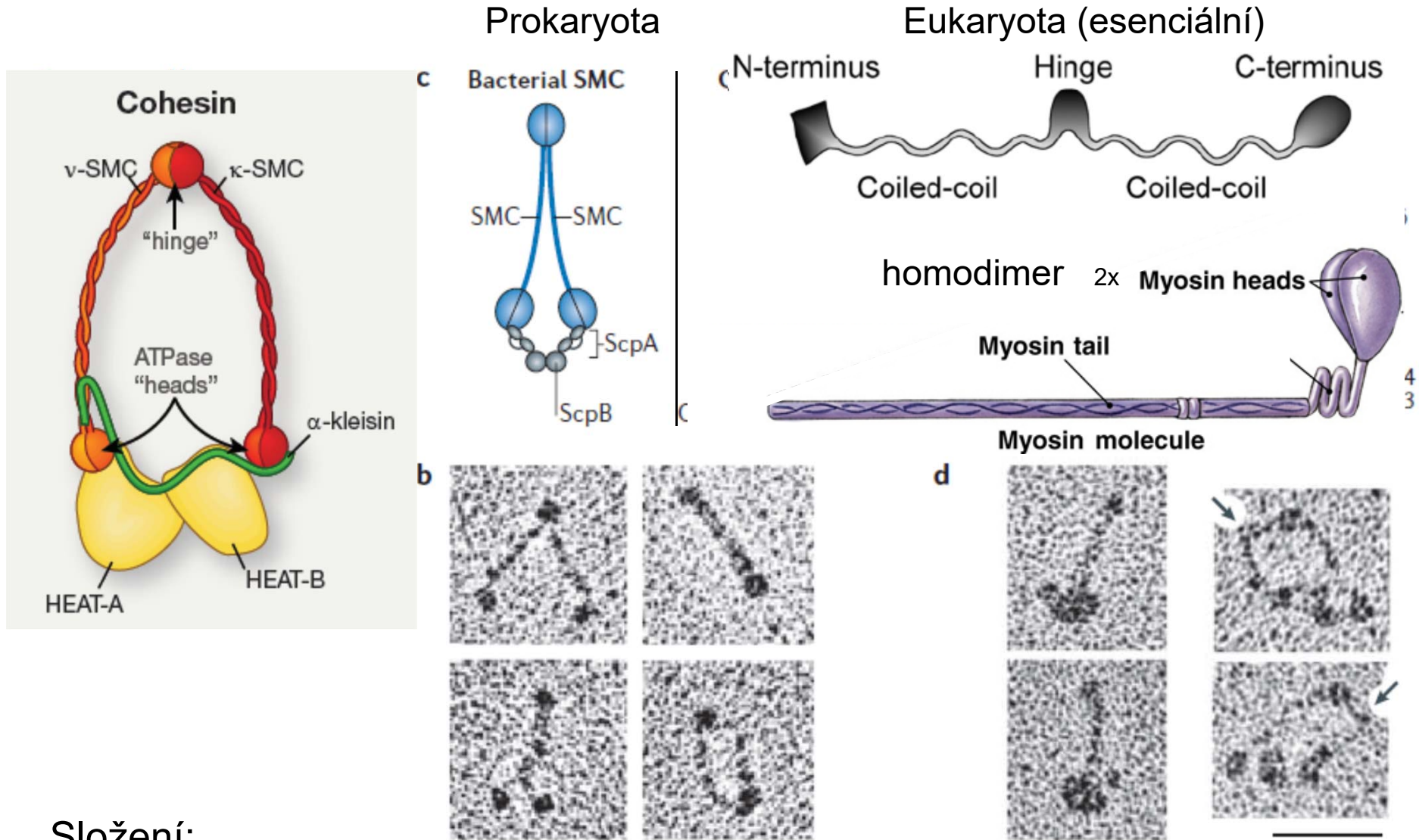
Bodnar and Specter, Cell, 2013
 Phillips-Cremnis et al, Cell, 2013
 Schoborg et al, CMLS, 2014

- 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

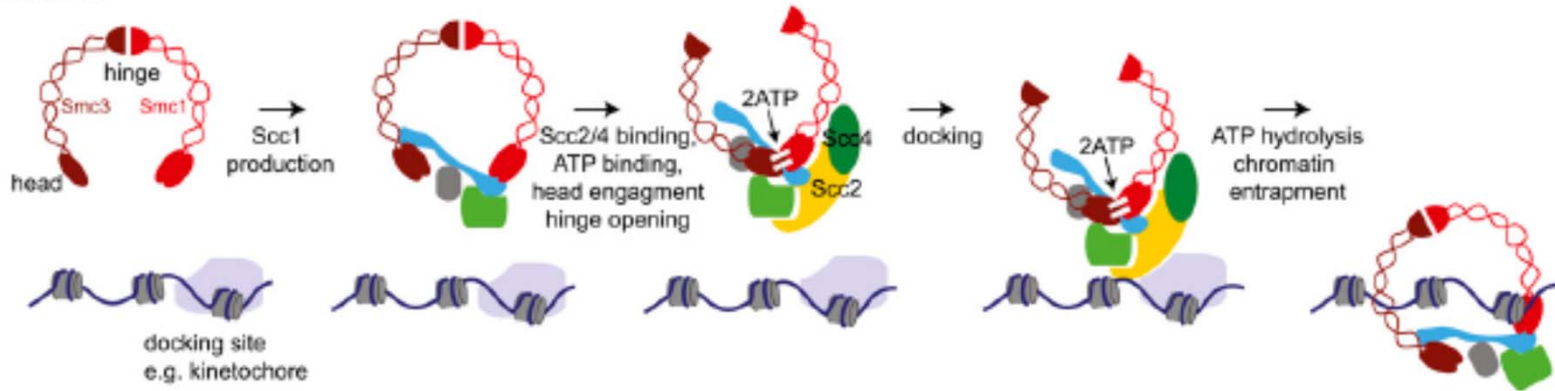
Komplexy SMC



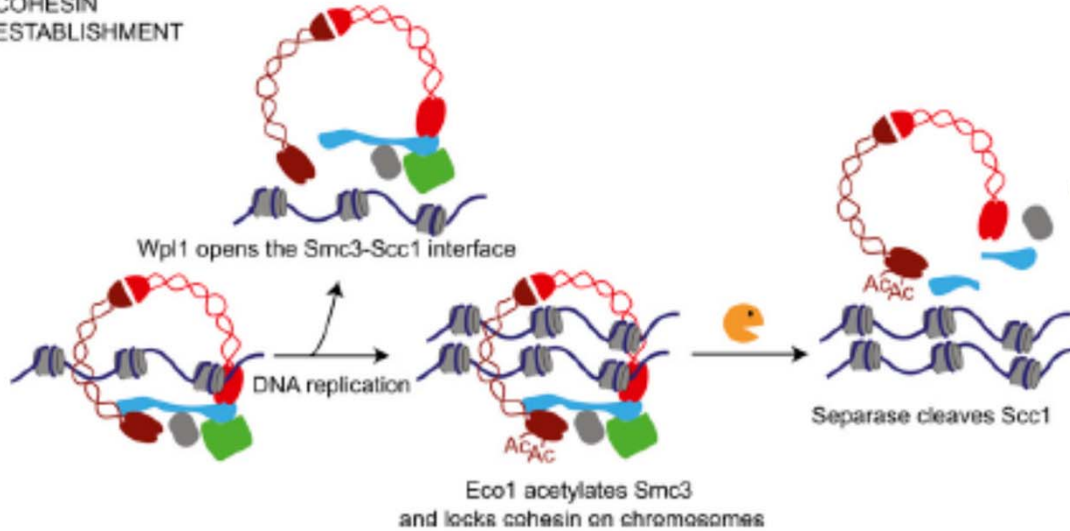
Složení:

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

LOADING



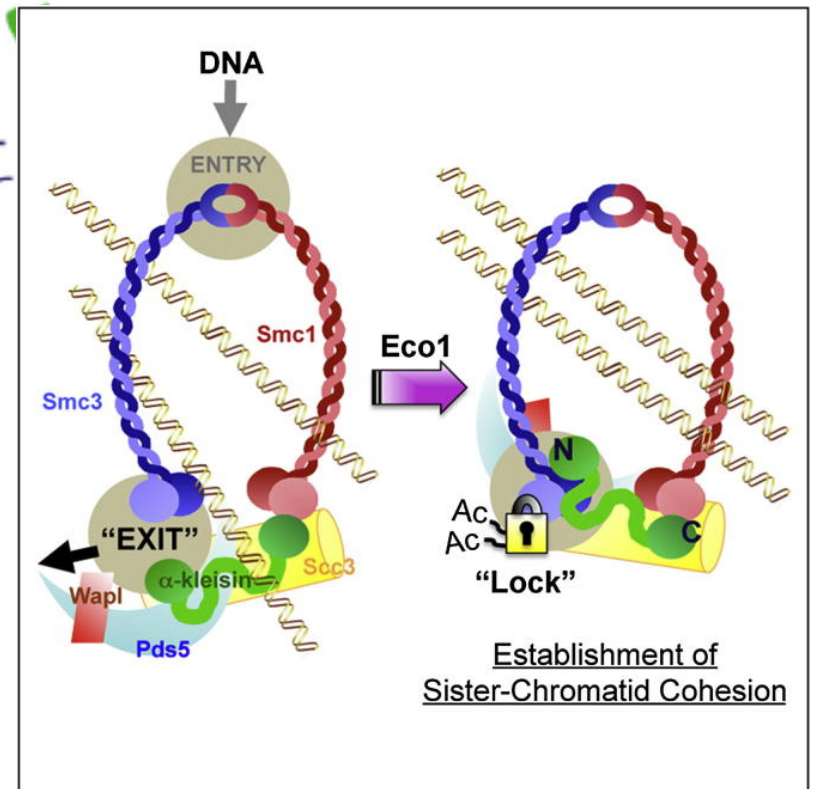
COHESIN ESTABLISHMENT



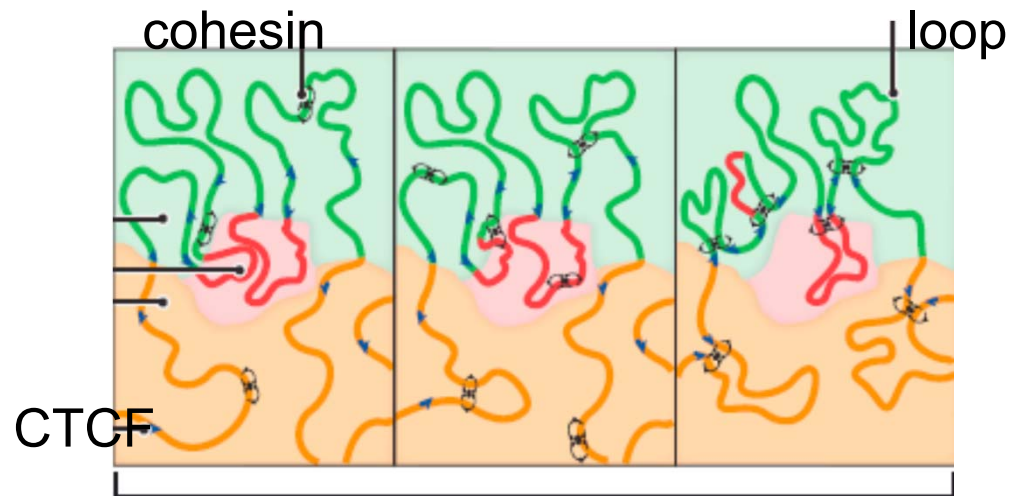
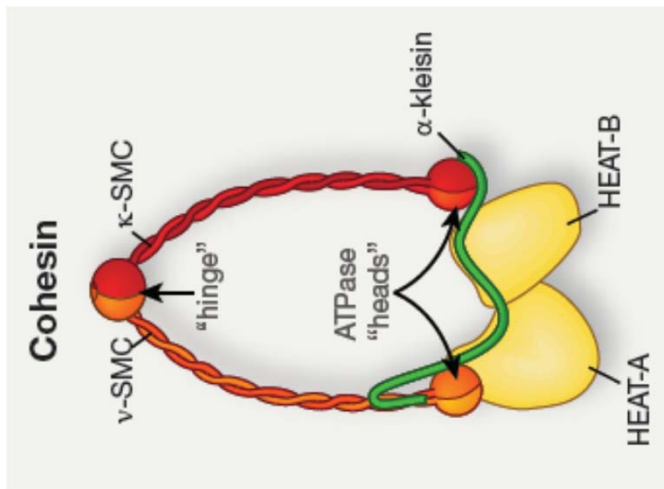
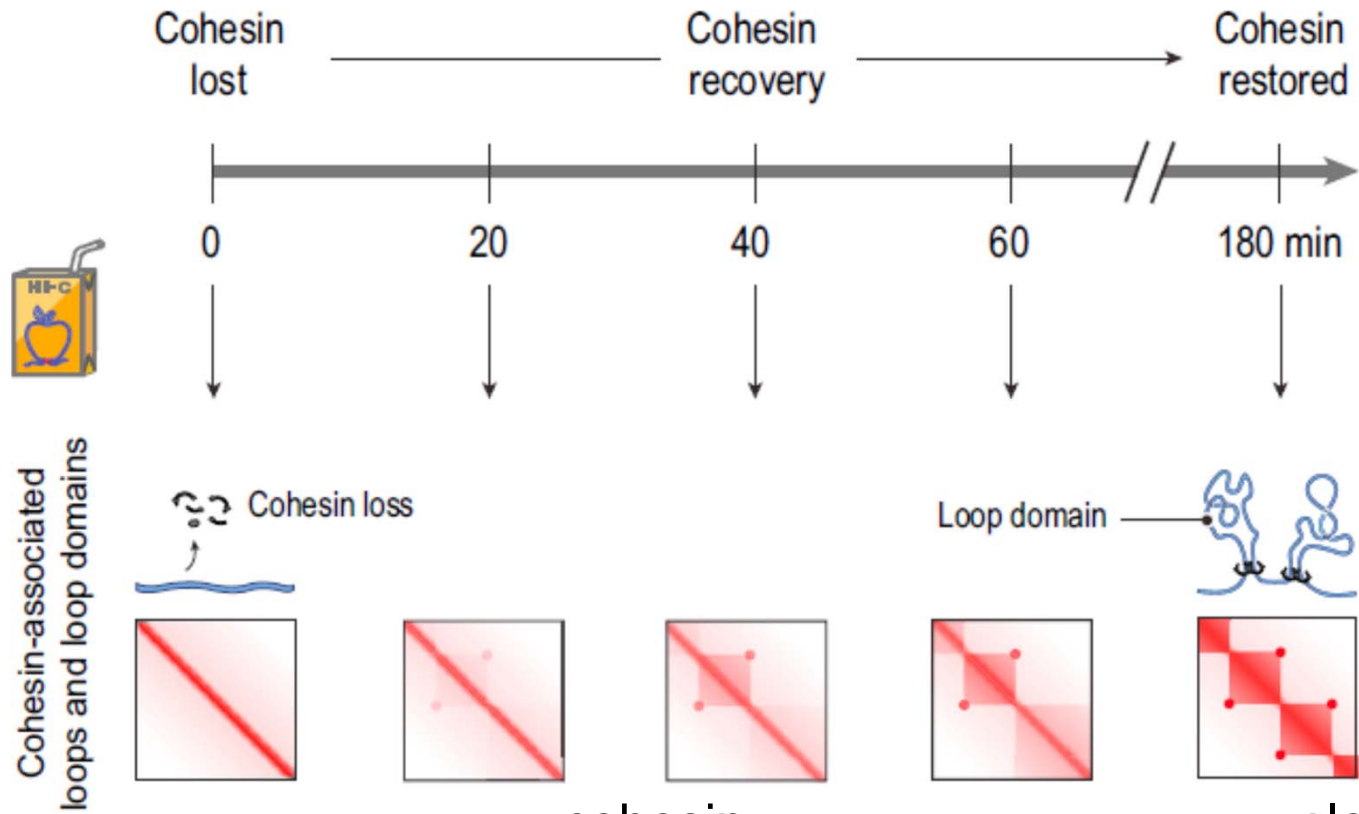
Marston AL, Genetics, 2014

Remeseiro & Losada, CO in Cell Biol, 2012

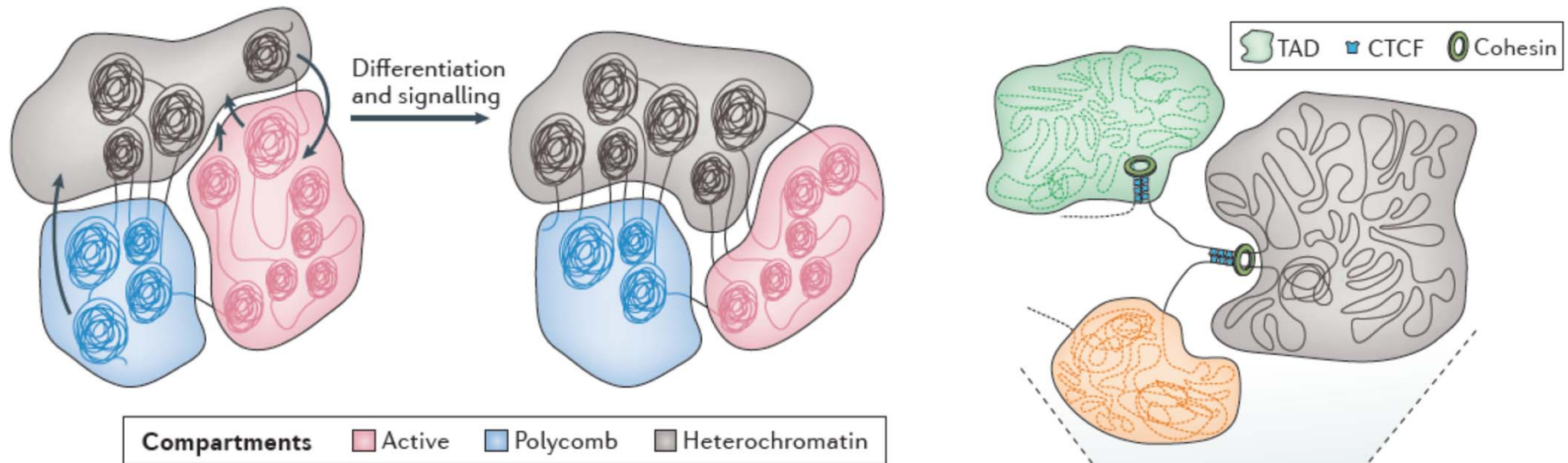
Loading přes hinge, exit přes head dvěma způsoby – štěpením kleisinu nebo ATP-řízený
 - regulace acetylací SMC3
 - regulace fosforylací Scc3



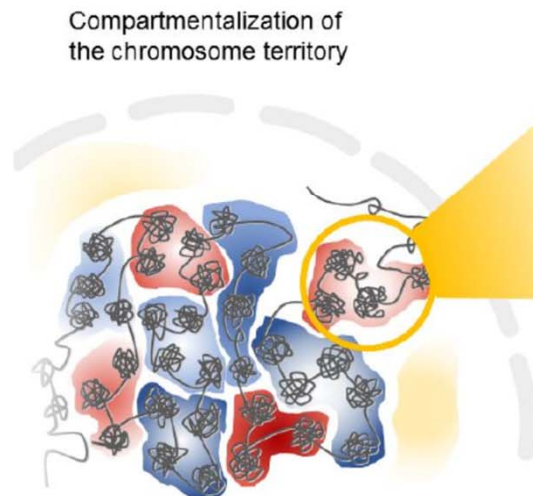
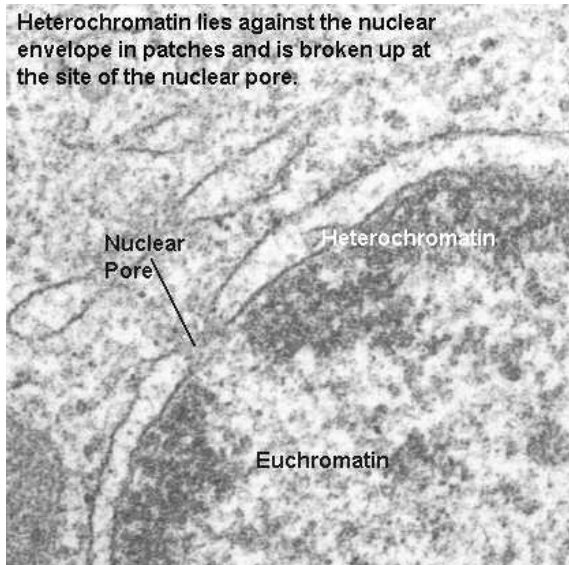
Cohesin makes up chromatin loops and TADs



5. TADs cluster to compartments - formed by Mbps loops (not cohesin)

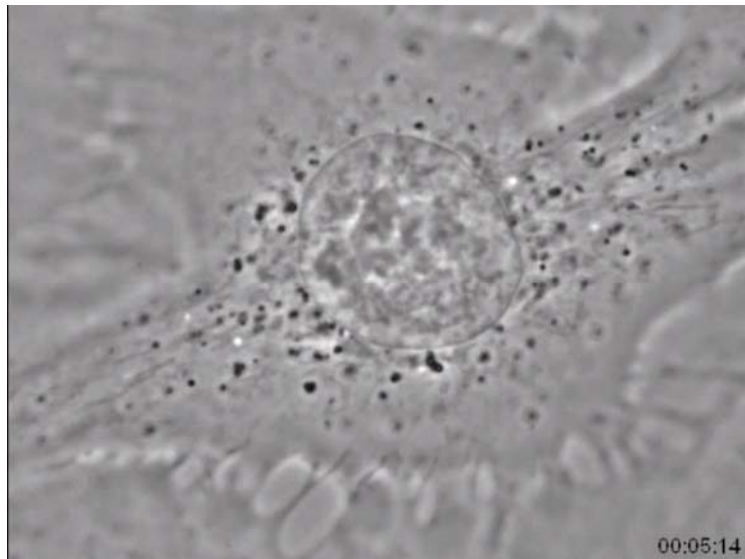


TAD transition to different compartment may result in different transcription outcome (influences cell differentiation) – **euchromatin vs heterochromatin**



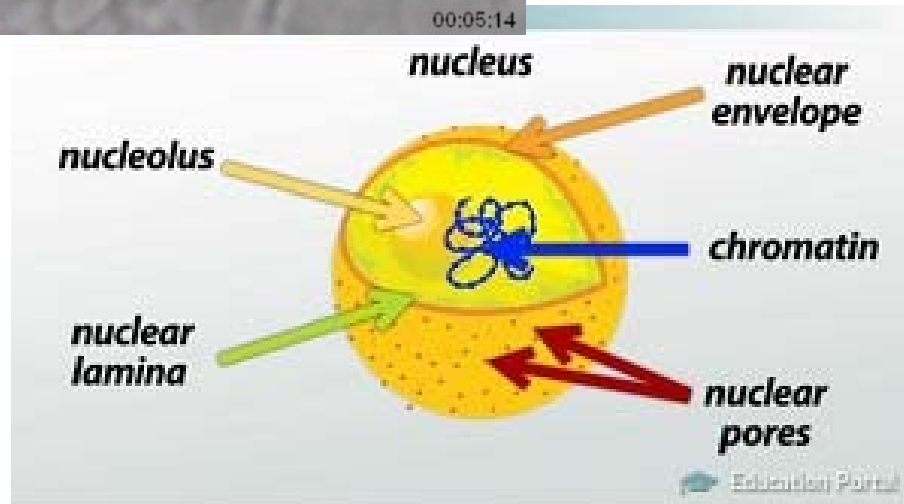
Bonev a spol, NRG, 2016

6. One chromatin fiber (chromosome) occupies certain territory – specific territories



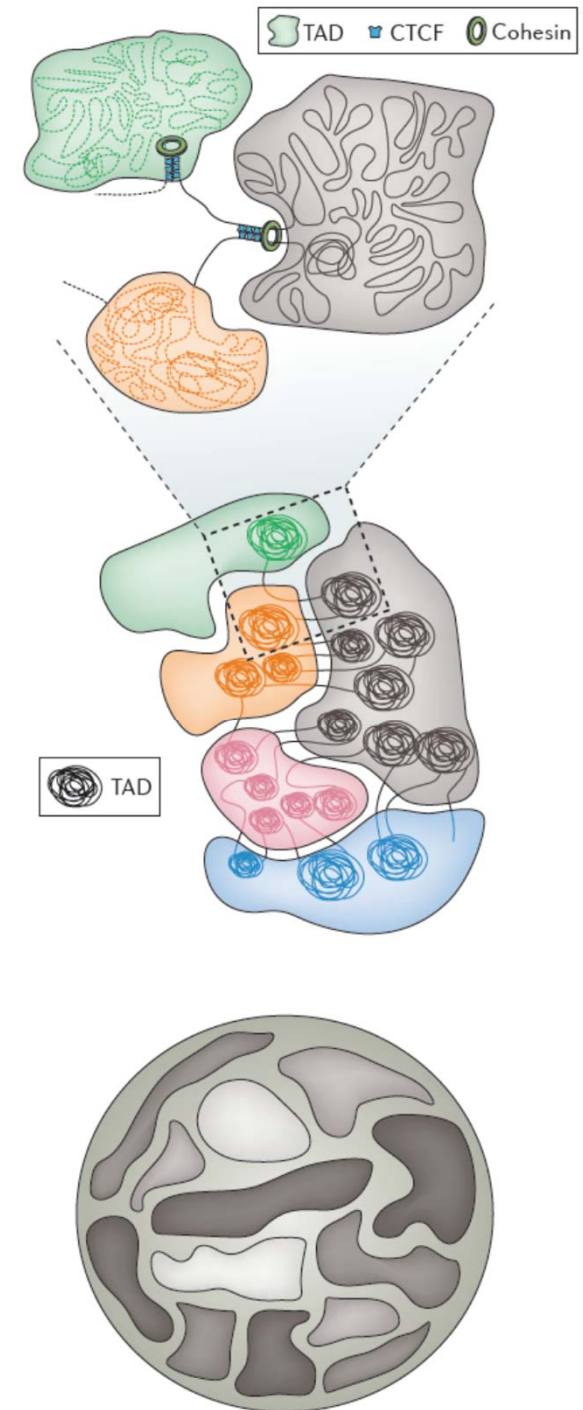
interphase nucleus – some territories visible

euchromatin vs heterochromatin



nucleolus is specialized territory with rDNA repeats – ribosome assembly ...

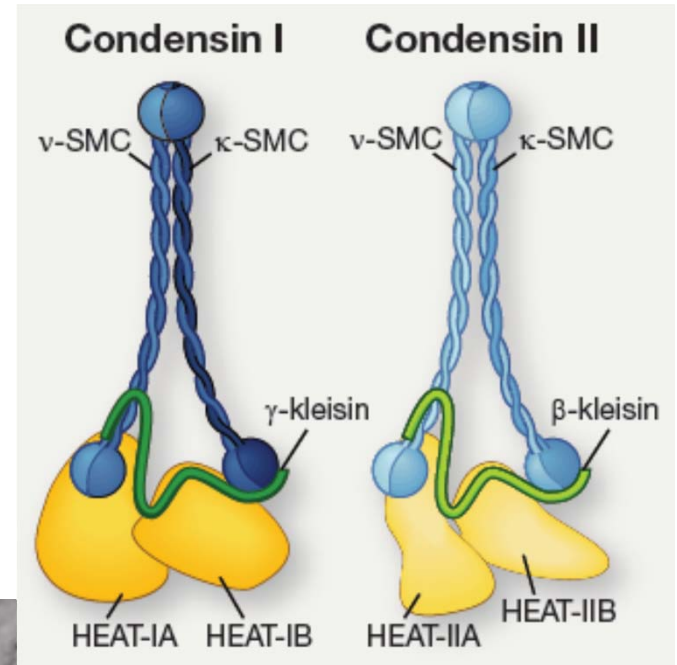
Dekker a spol, Nature, 2017
Bonev a spol, NRG, 2016



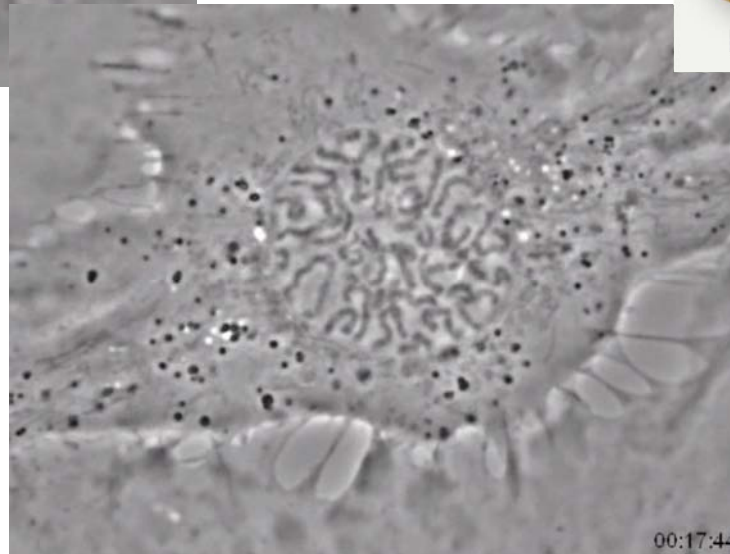
One chromatin fiber (chromosome) occupies certain territory



interphase nucleus – some territories visible

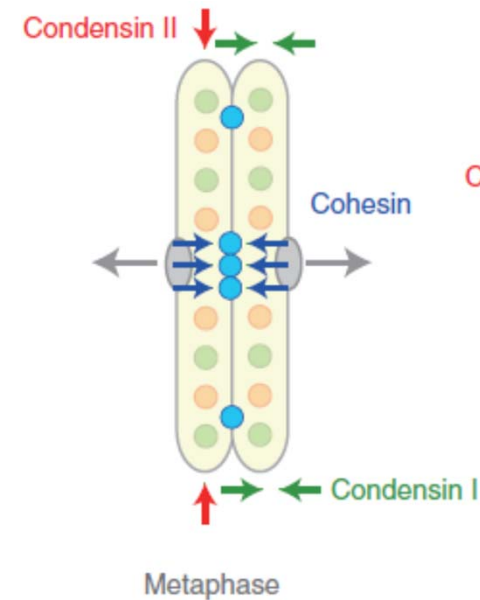
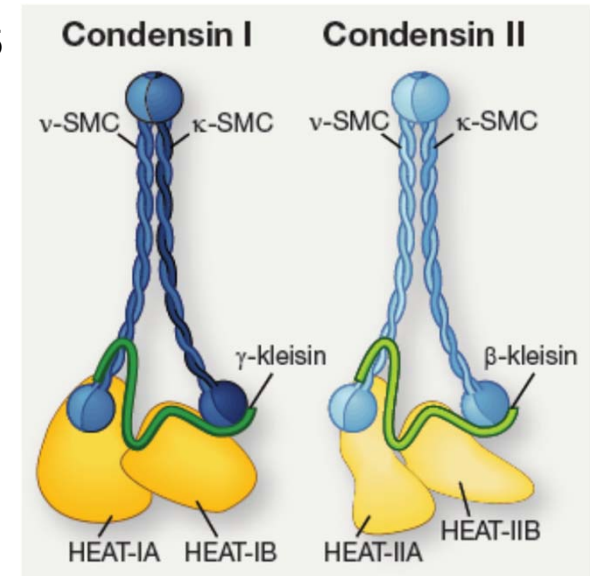
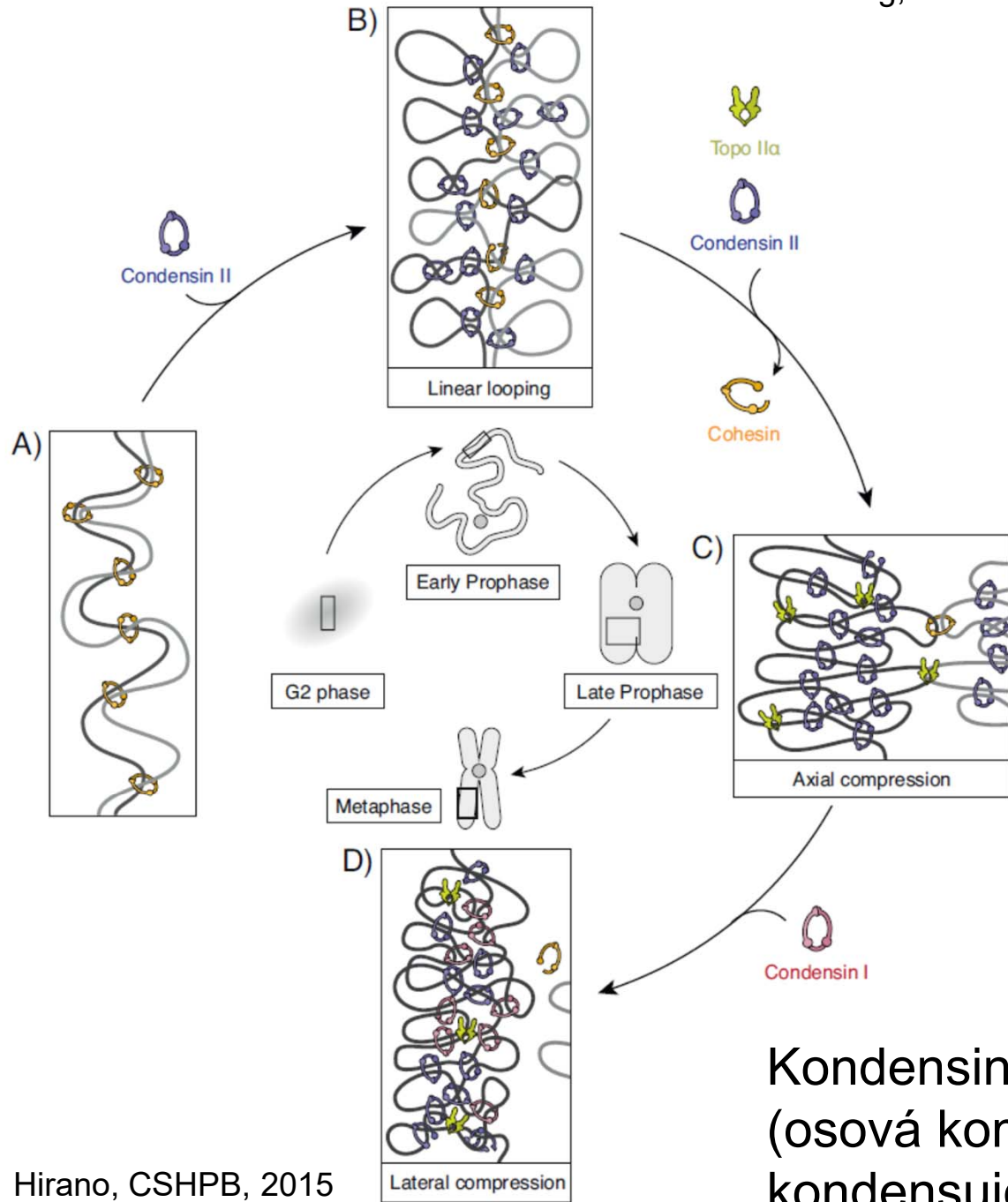


prophase nucleus
– condensed
(condensin II)
chromosome figures



Each chromatin fiber/chromosome occupies certain territory in the interphase nucleus – then, in mitosis, it condenses to typical chromosome figures – **condensin** I and II (SMC2/4)

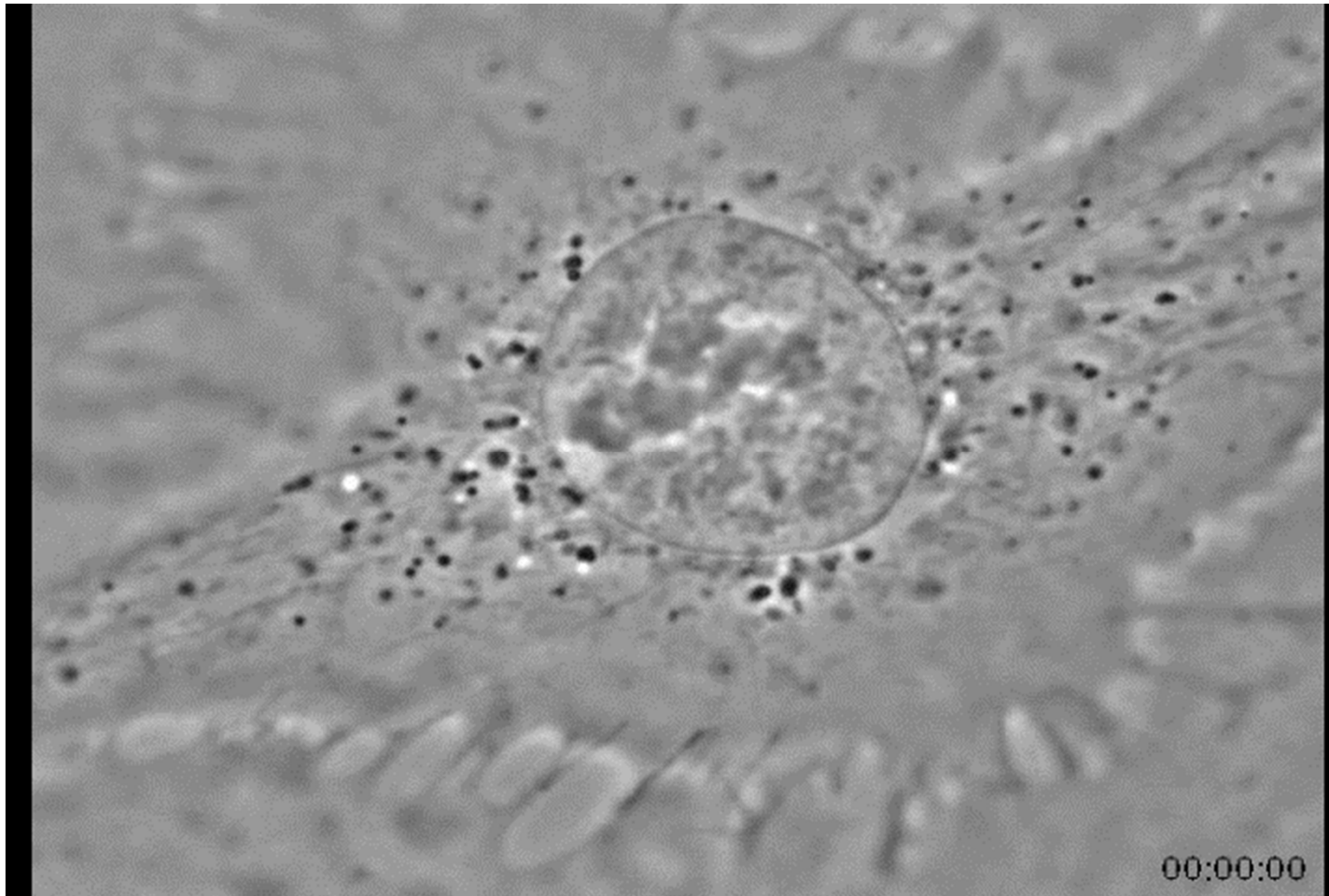
Dekker a spol, Nature, 2017
Bonev a spol, NRG, 2016

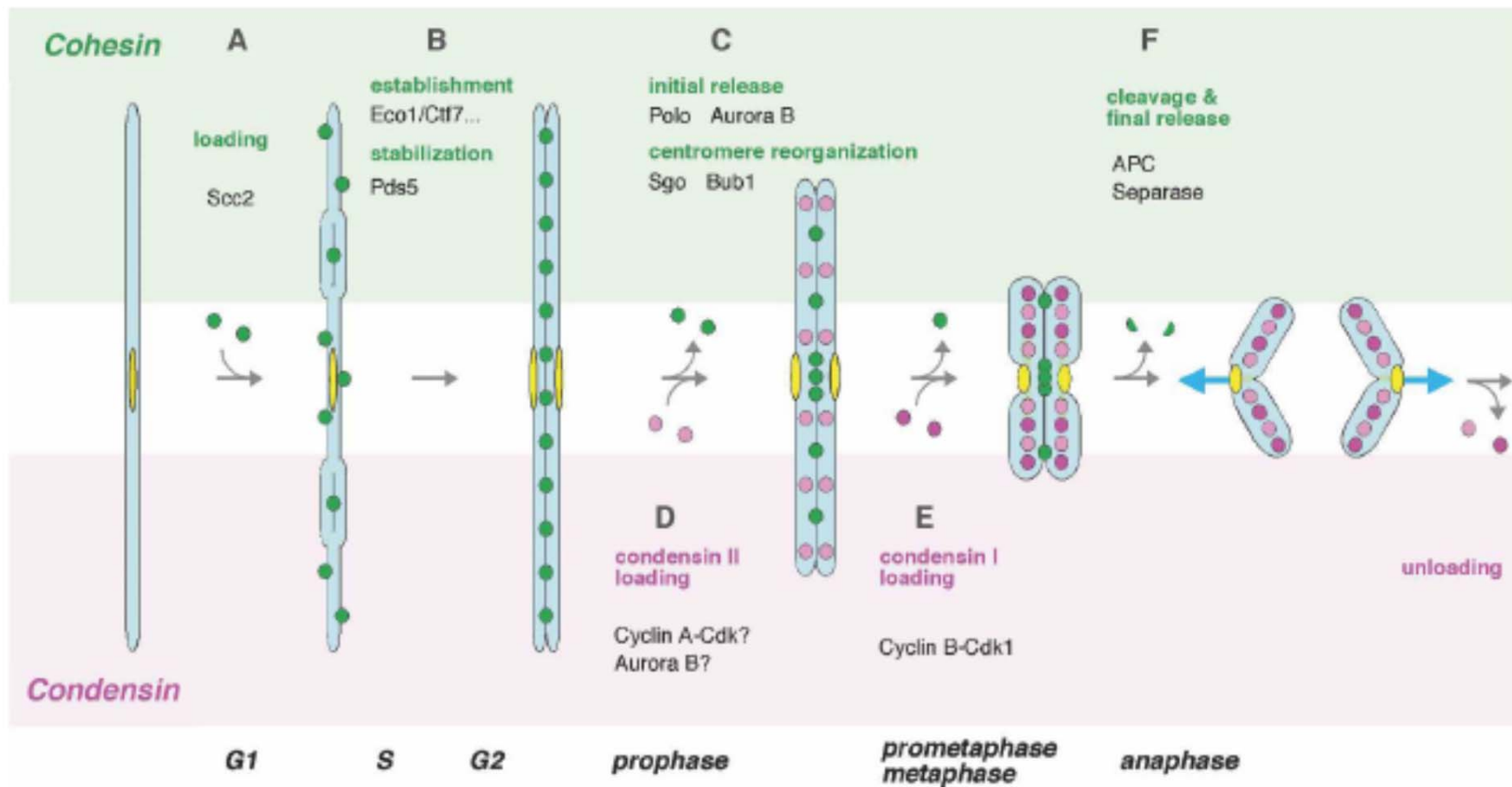


Kondensin II vytváří lineární smyčky (osová komprese), zatímco komplex I kondensuje laterálně

Dynamika chromatinu

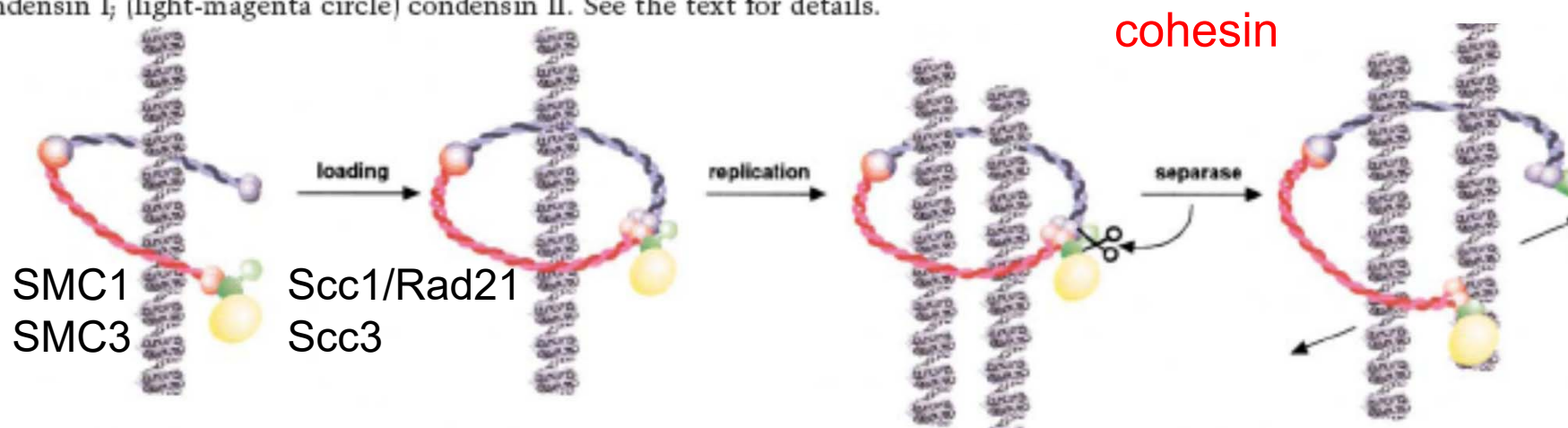
Dr. Grobky



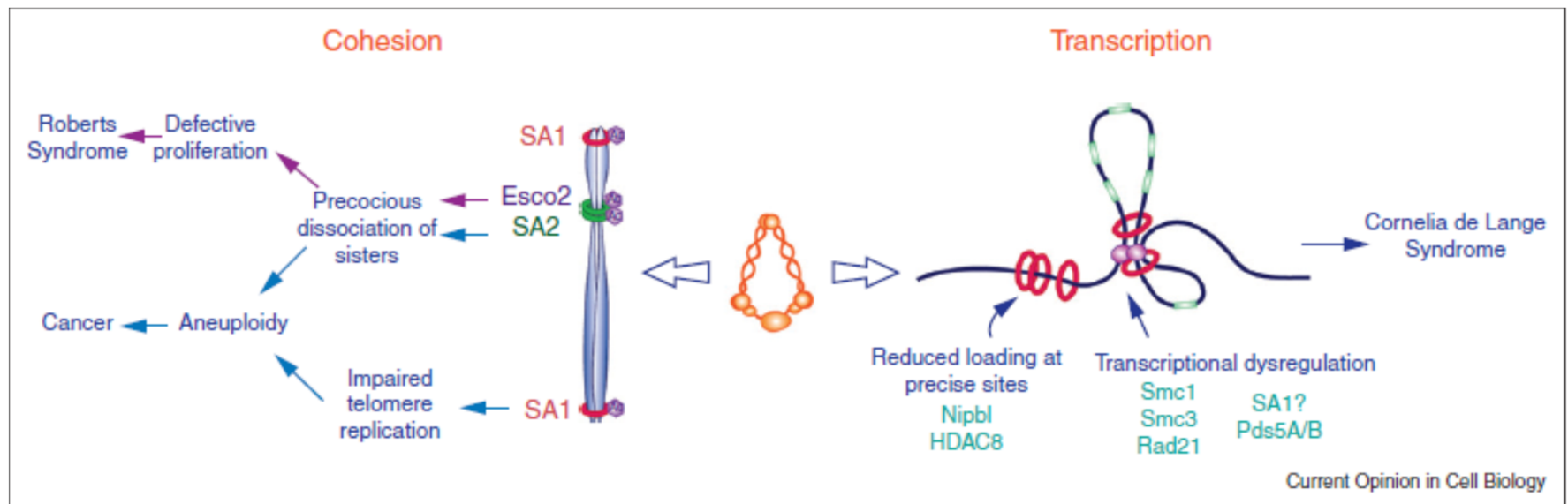


Losada & Hirano, 2005, Gen&Dev

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.



Haering et al, Mol Cell, 200:



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 segregace – 95% nádorů je aneuploidních)

