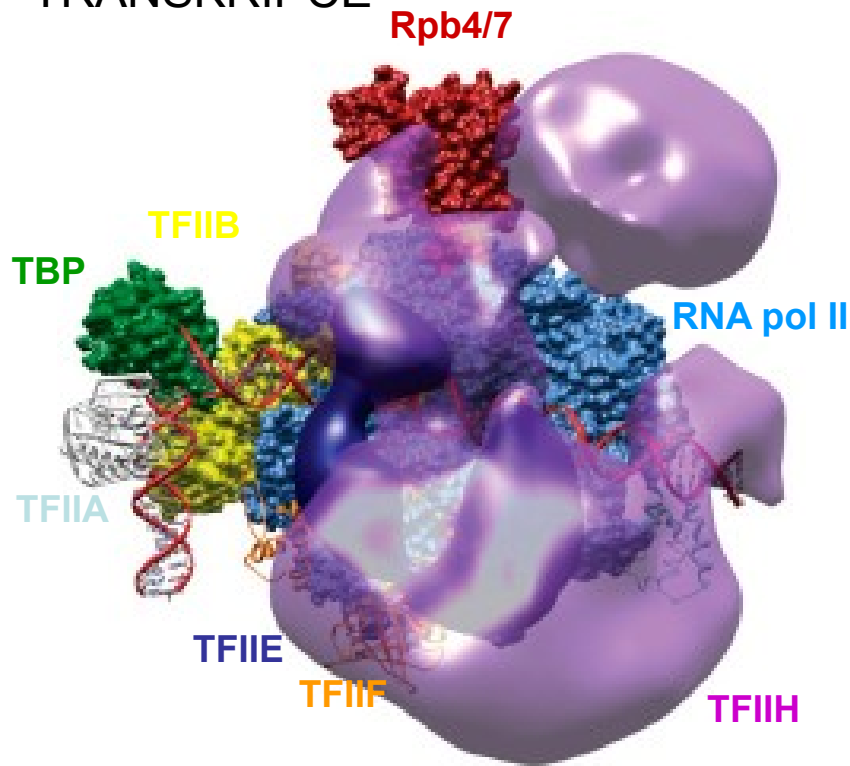
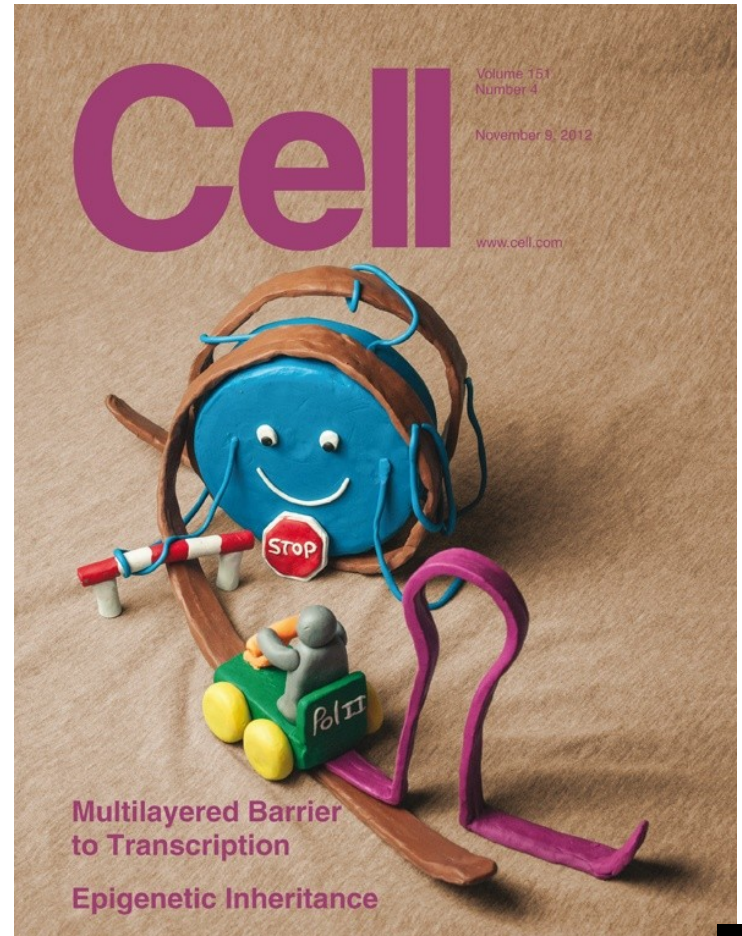


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA

TRANSKRIPCE



kvasinkový PIC komplex
Gibbons et al, PNAS, 2012

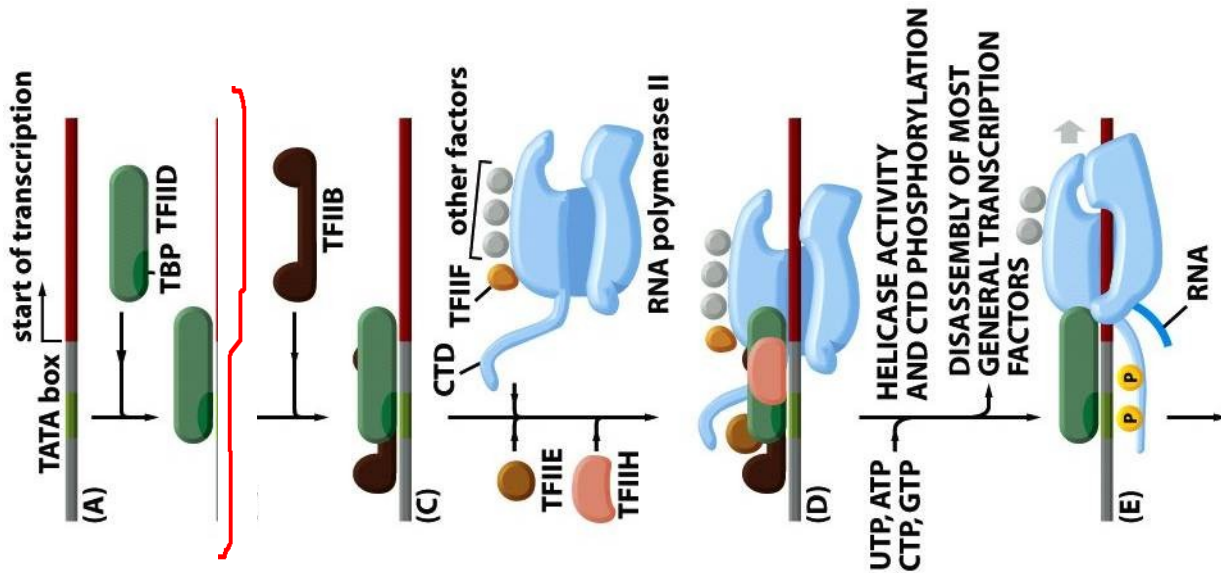


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastníci se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)

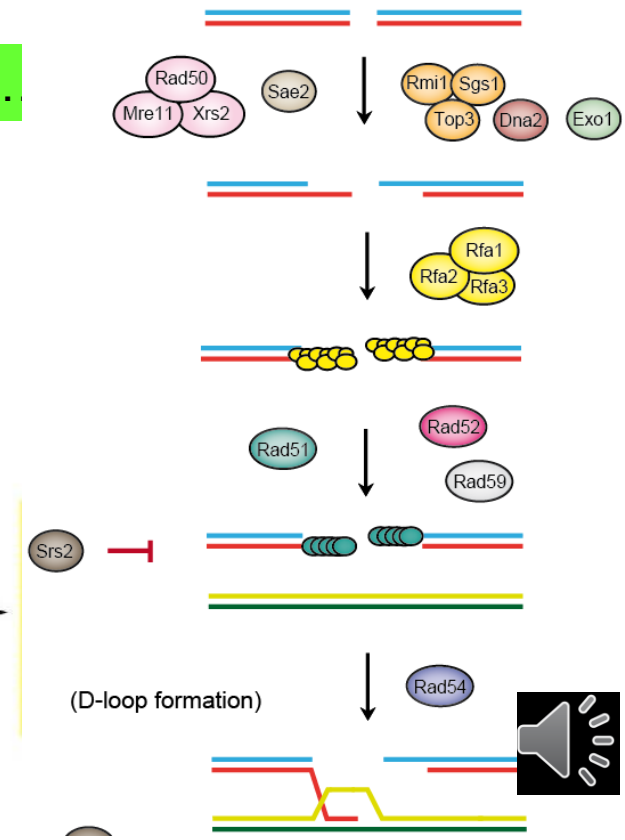
Co zde schází??

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:

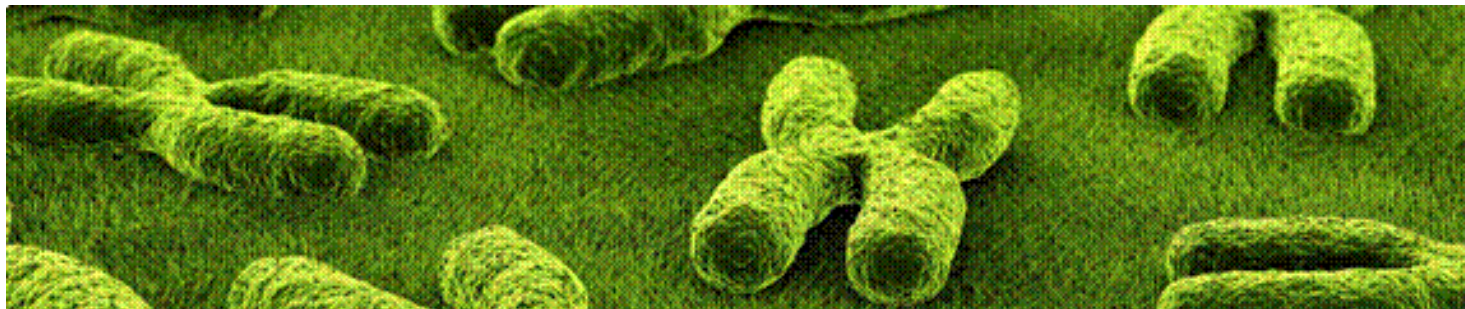
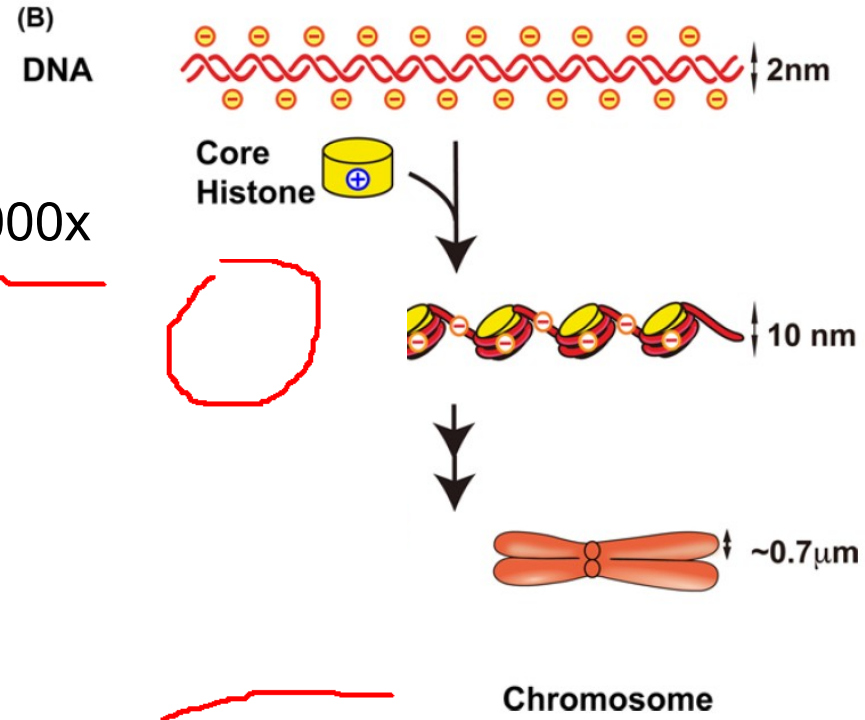
DNA molecule: ~4 cm

Mitotic chromosome ~4 μ m

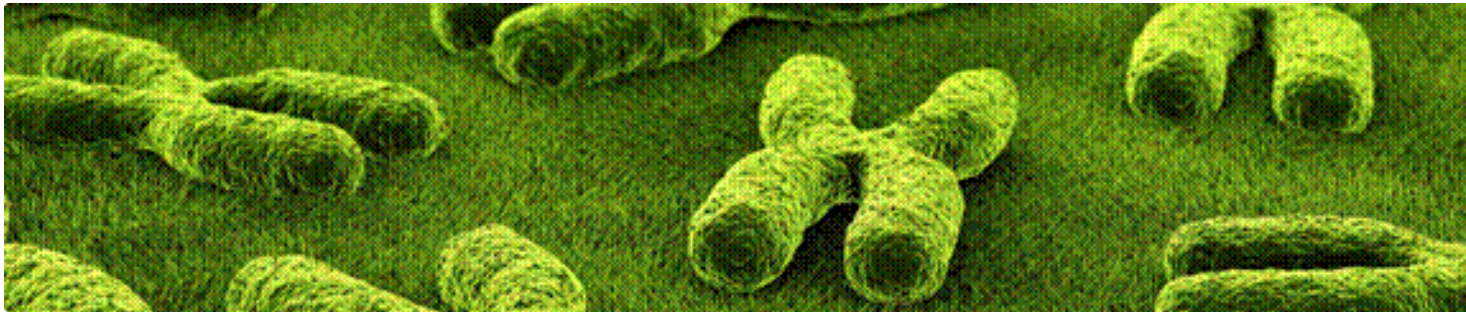
10 000x

Genome sizes:

human	3 billion bp (x2 dipl)
field bean	13 billion bp
trumpet lilly	90 billion bp
salamander	<120 billion bp



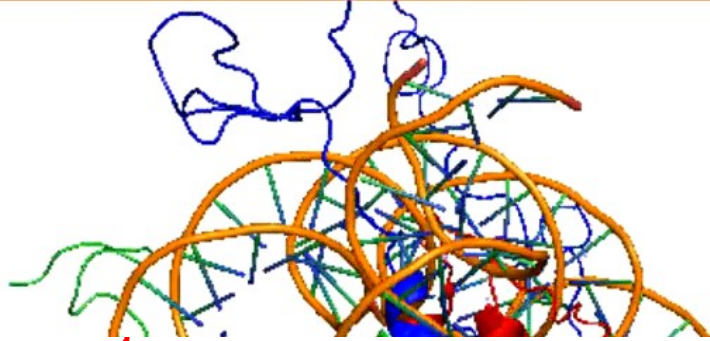
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom 3×10^9 bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4 cm!!)
 - komplexy vytvářející **strukturu chromosomu**
 - vytváří základní strukturu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





12

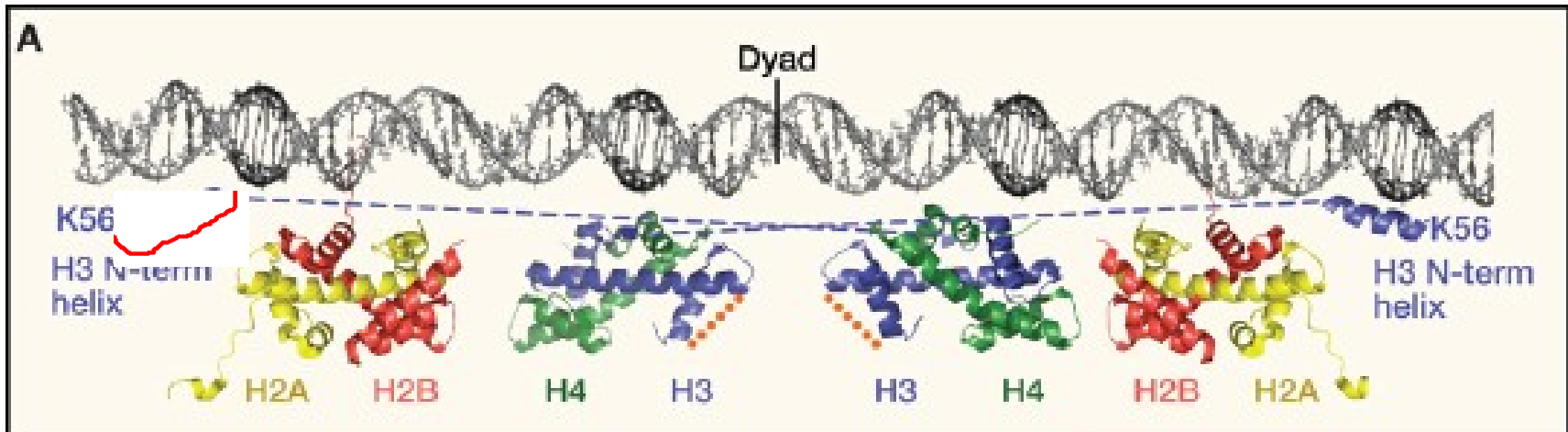


- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)

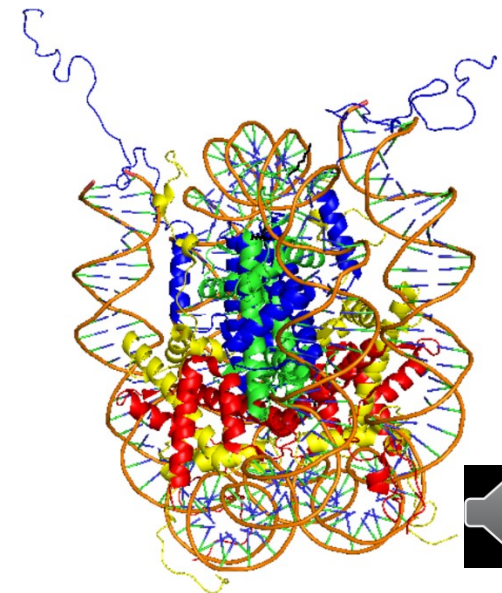
PDB: 1K



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)

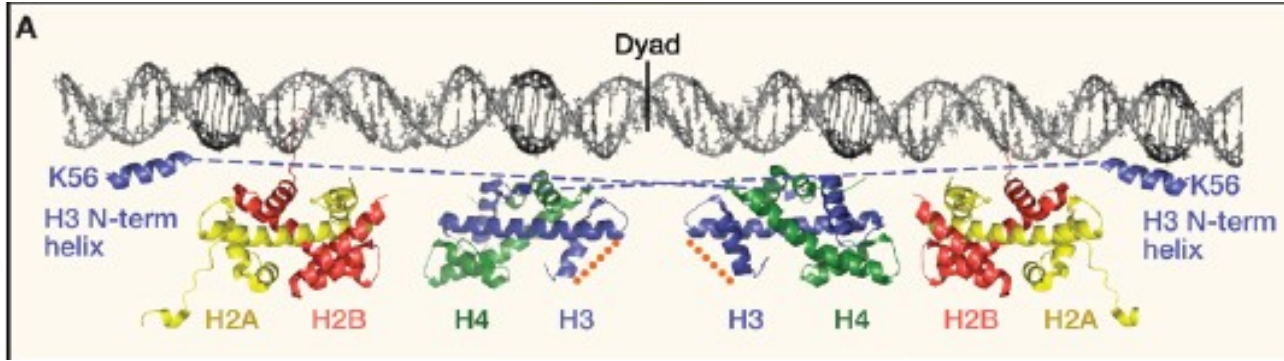
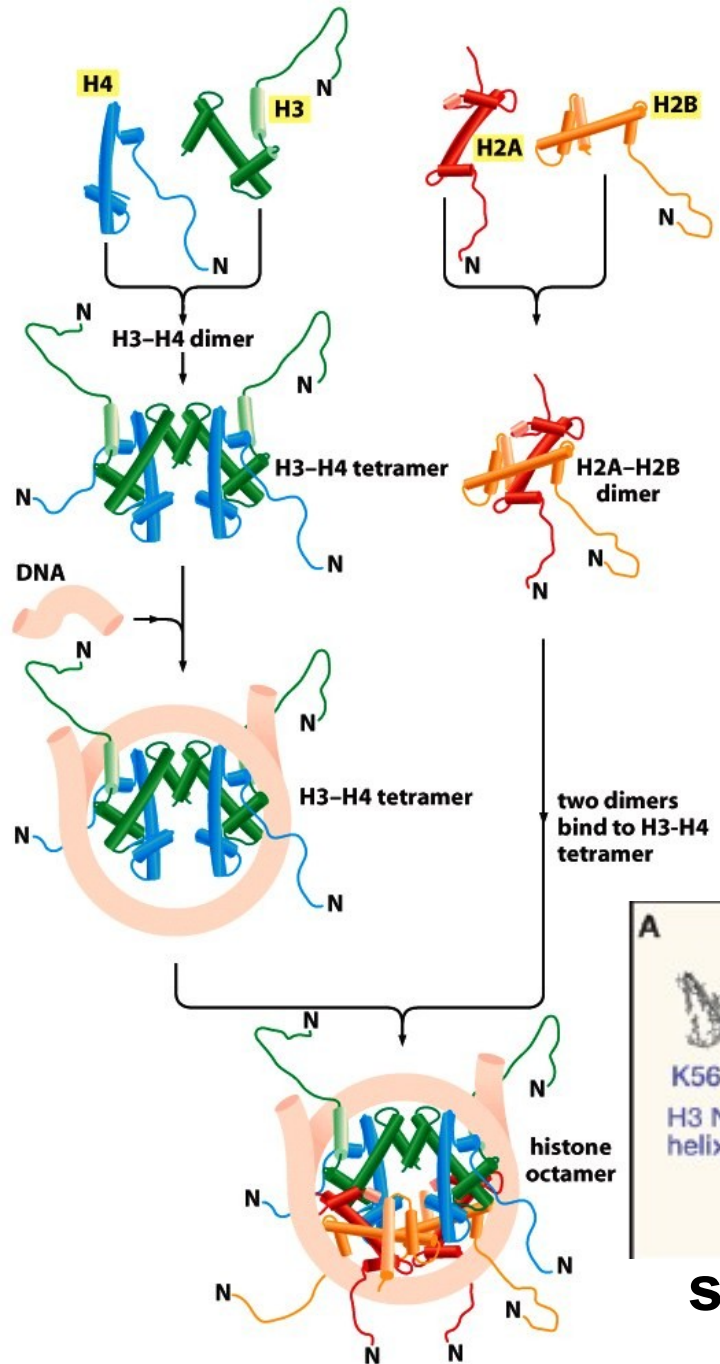


Sestavování nukleozomu:

- 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

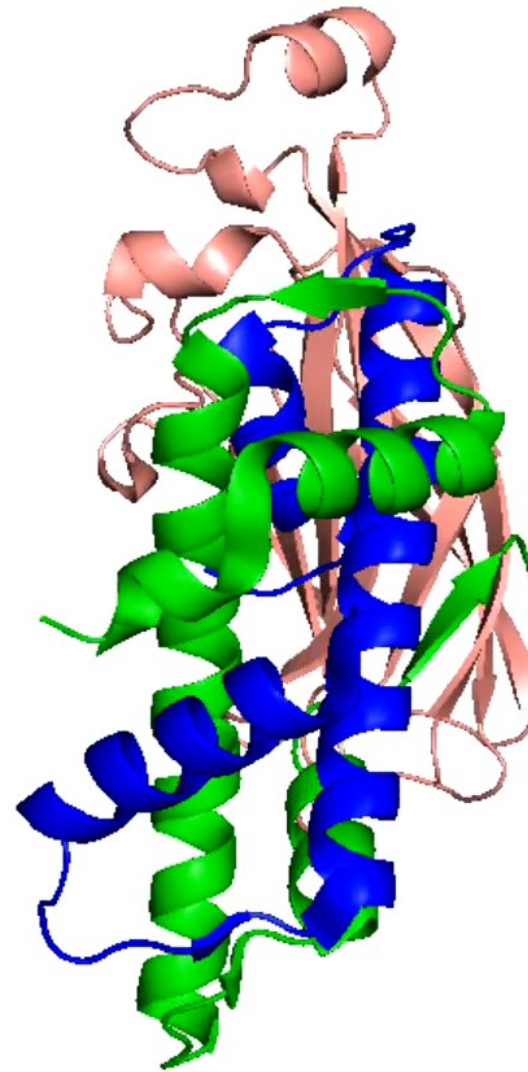
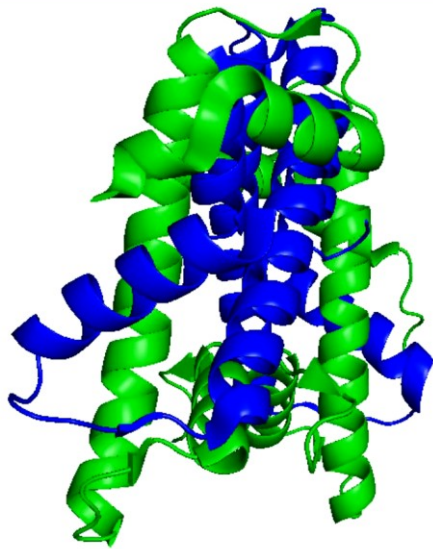
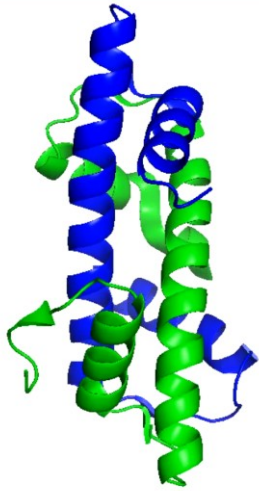
- H2A a H3 existují ve více variantách, které mohou být zaměněny v nukleosomu



sbalování a rozbalování nukleosomů



H3-H4

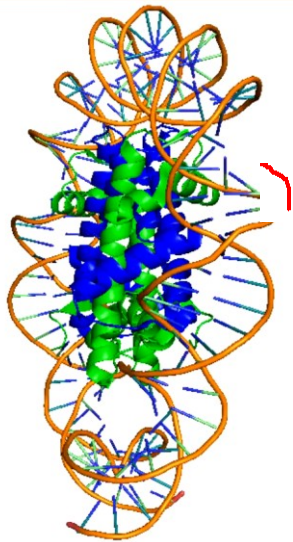
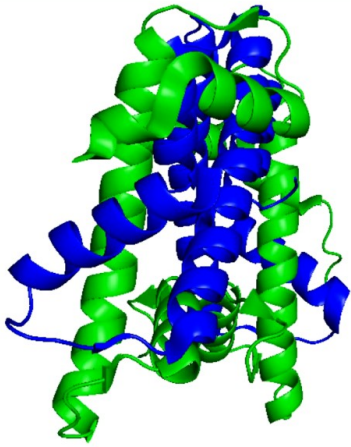


ASF1 (antisilencing function)

- interferuje s tetramerizačním povrchem
- skládání (assembly i disassembly)



H3-H4



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

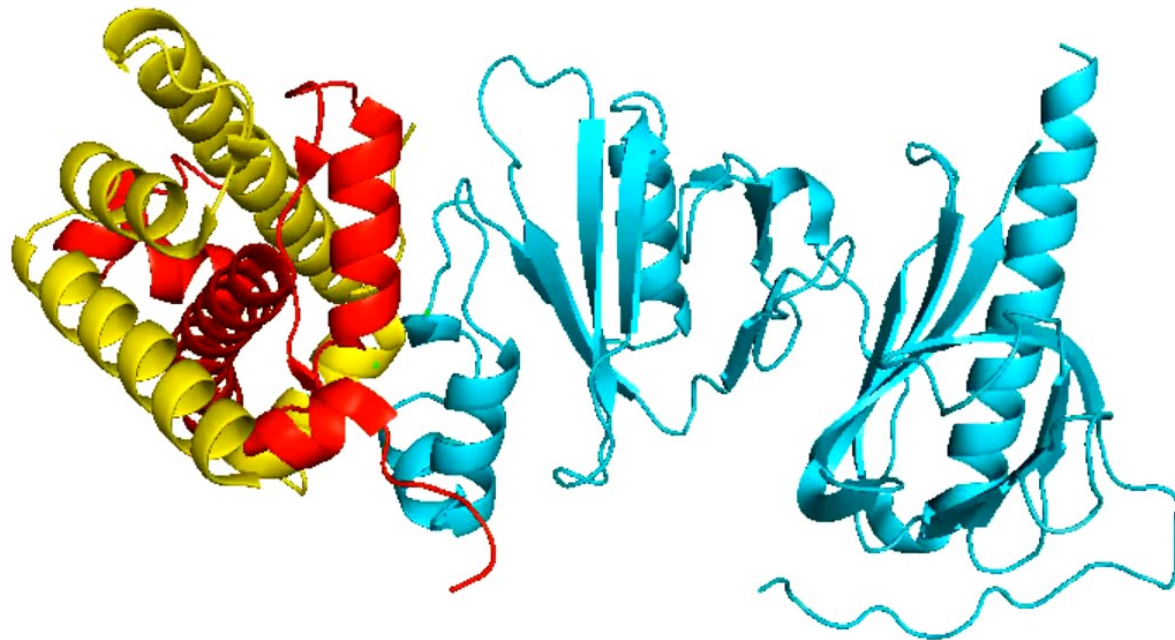
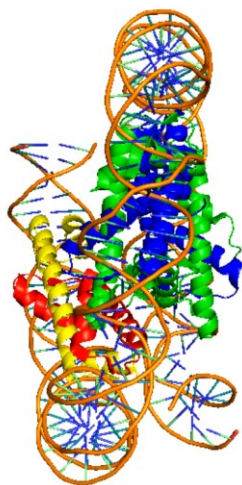
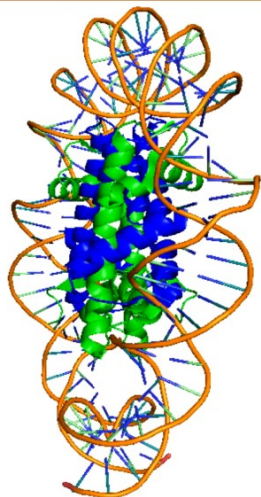


CAF-1 (chromatin assembly factor)

Složen ze 3 podjednotek (p55 podjednotka)
interferuje s vazbou H3/H4 na DNA



H3-H4



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

PDB: 4KHA

FACT (facilitates chromatin transcription)
složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSF1)
interferuje s vazbou H2A/H2B ...

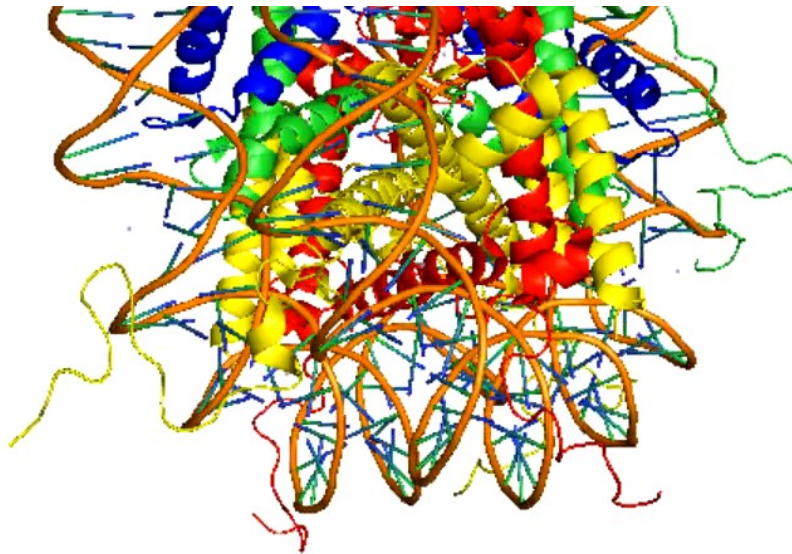
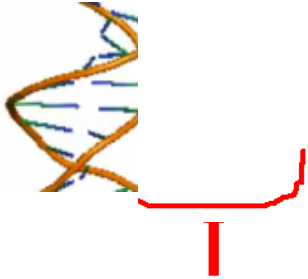
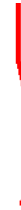




FACT (facilitates chromatin transcription)
pomáhá při assembly ...

Liu et al., Nature, 20



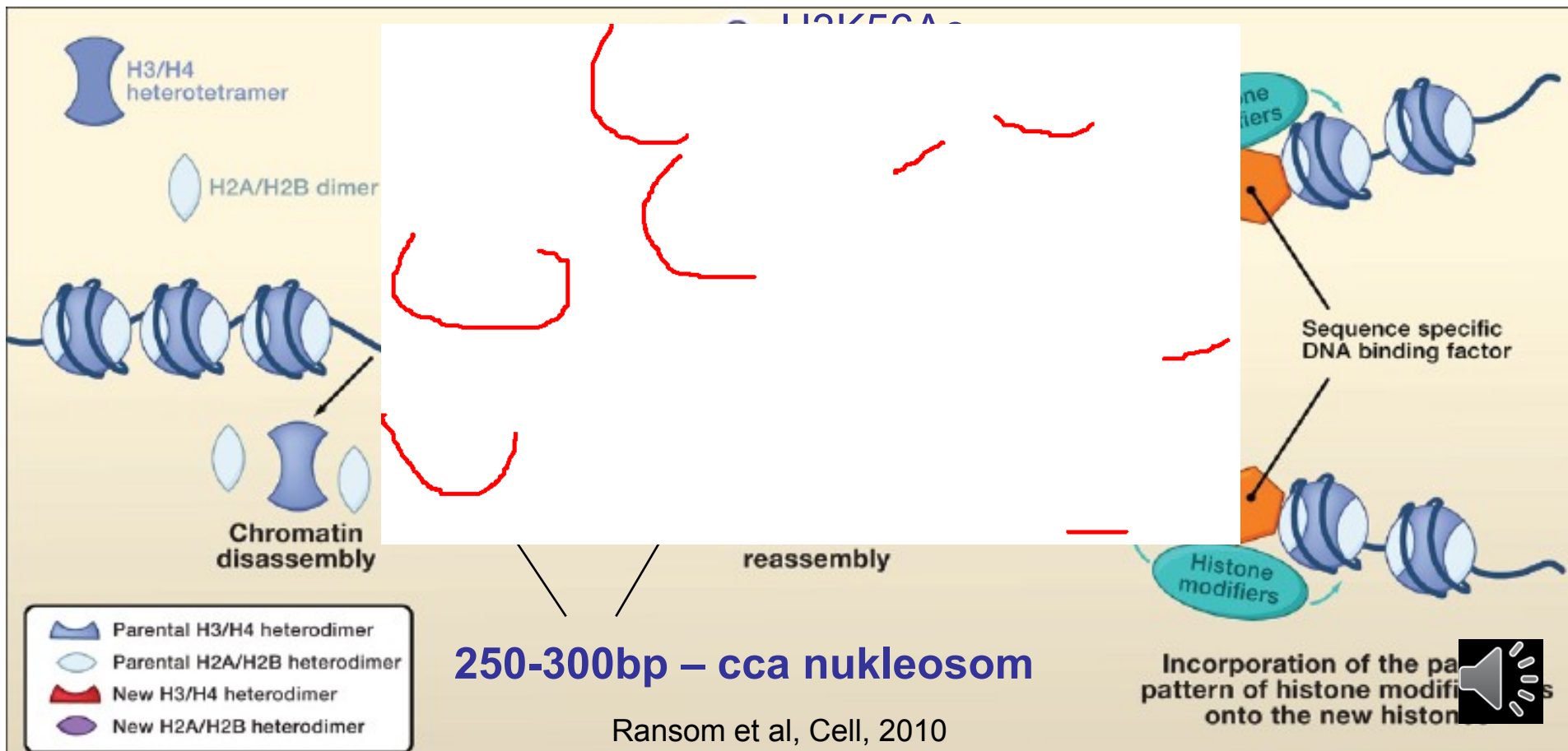


- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice **H3** (acetylovaný **K56**)
- Asf1 moduluje H3K56 acetylaci ...
- H3**K56Ac** interferuje s vazbou na DNA (cca 8x slabší) – nestabilní pozice nukleosomu je následně „upravená“ pomocí remodelačních komplexů (a teprve poté je H3**K56** deacetylován a nukleosom stabilizován)



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)



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
H2A/H2B			
H1			
CenH3/H4			

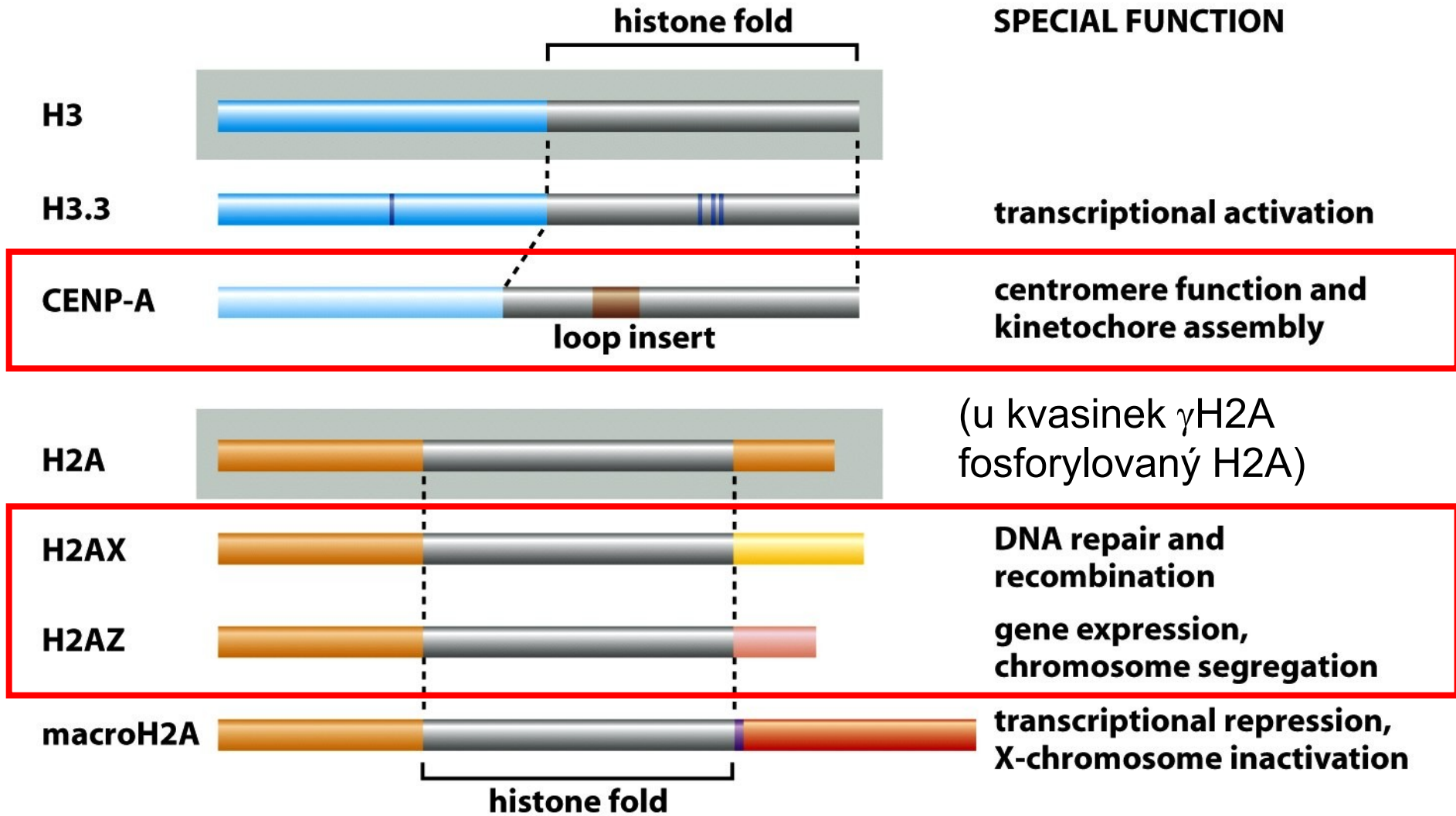
*** indicates a link to *Saccharomyces pombe* database for all information regarding

a-
of

- funkce
- funkce
- ... další chaperony a remodelační faktory ... specifické varianty H3 a H2A



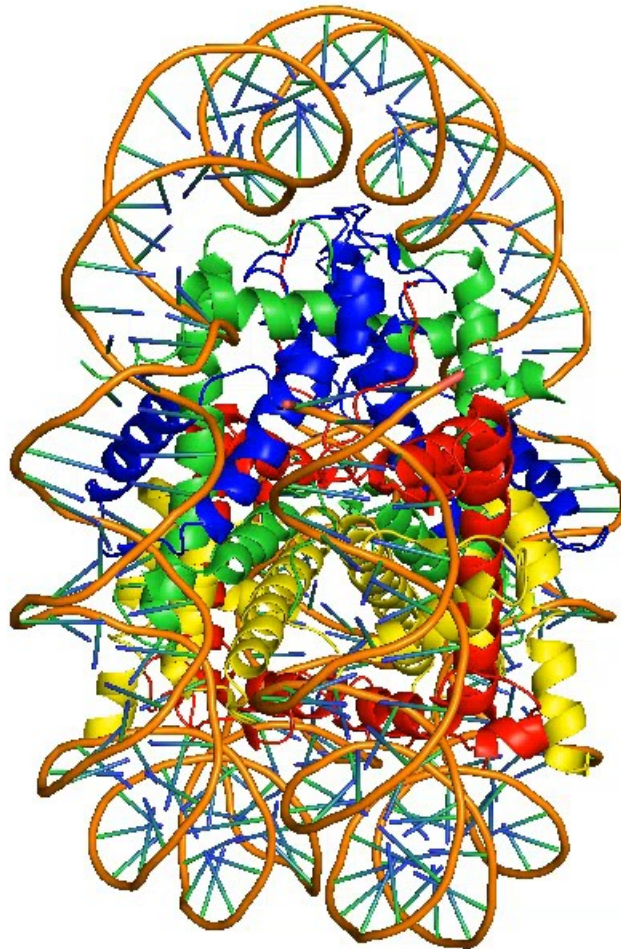
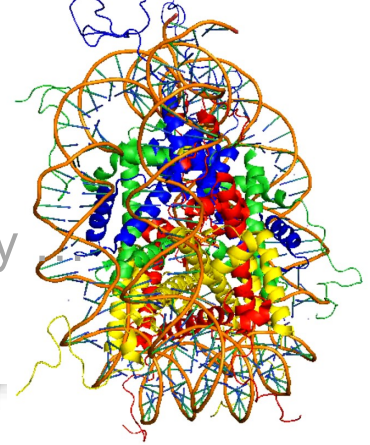
Histonové varianty



(u kvasinek γ H2A fosforylovaný H2A)

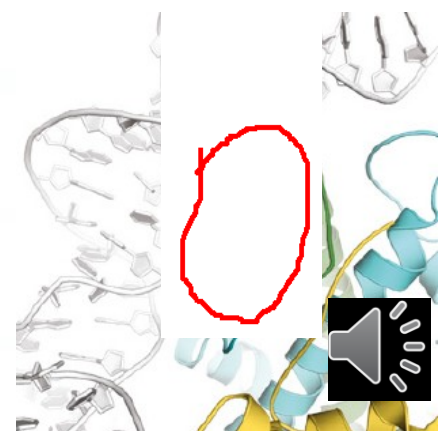


- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice
- CENP-A (H3 varianta) má kratší šroubovici
- vazba na DNA je slabší tj. otevřenější struktura
- ... jiný interakční povrch pro specifické interakční partnery



P

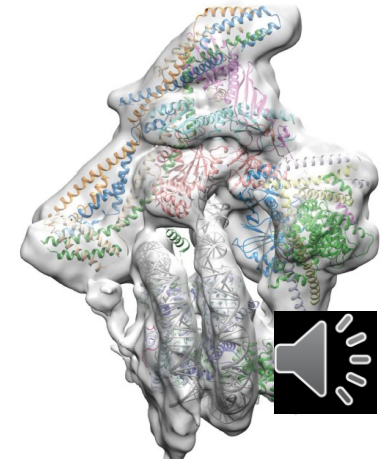
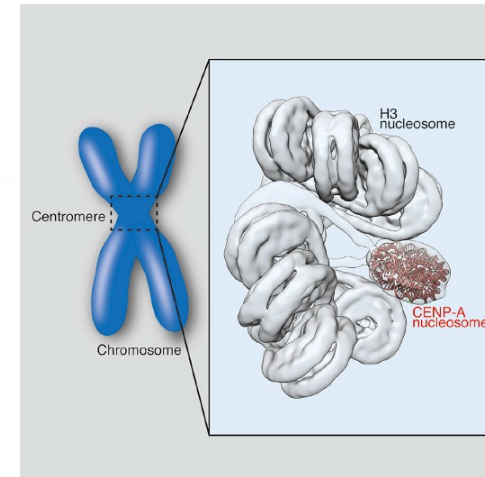
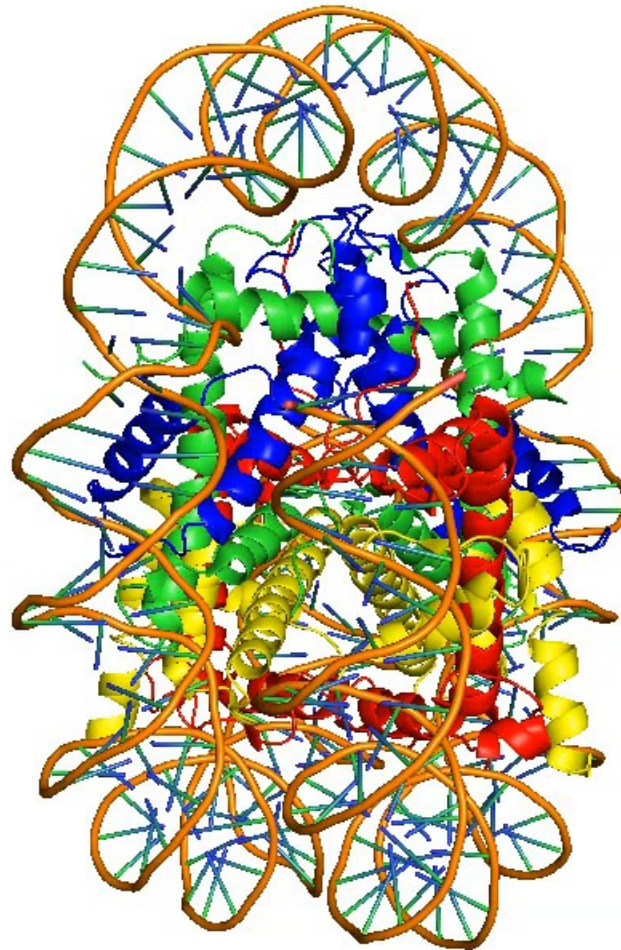
N2

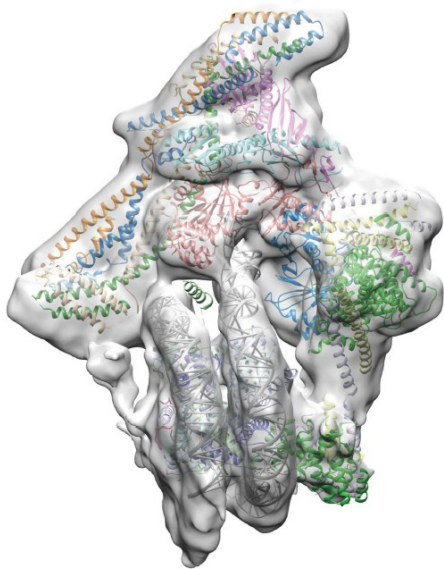


- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice
- CENP-A (H3 varianta) má kratší šroubovici
- vazba na DNA je slabší tj. otevřenější struktura - přístupnější
- ... jiný interakční povrch pro specifické interakční partnery ...

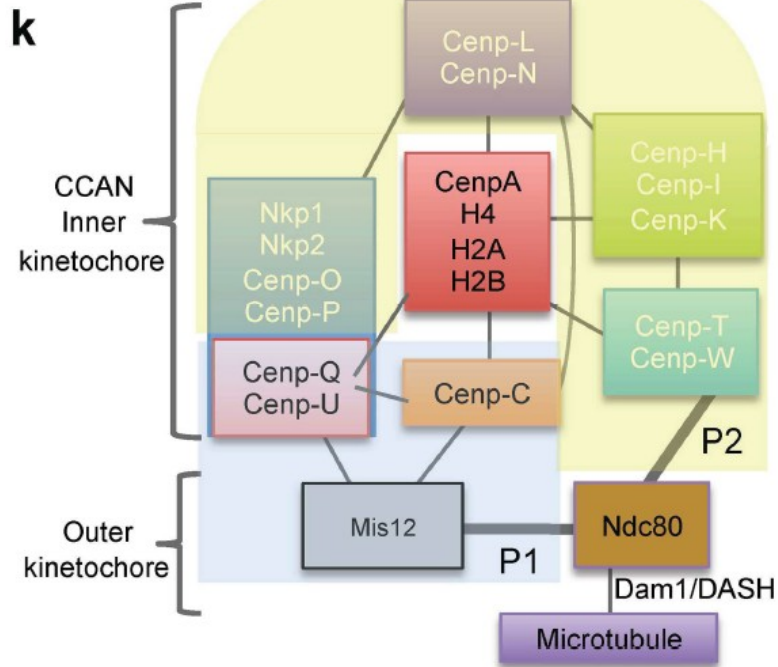
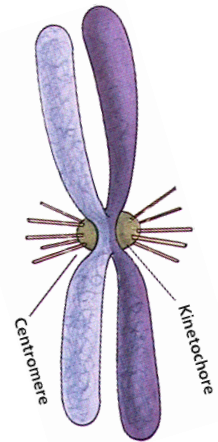
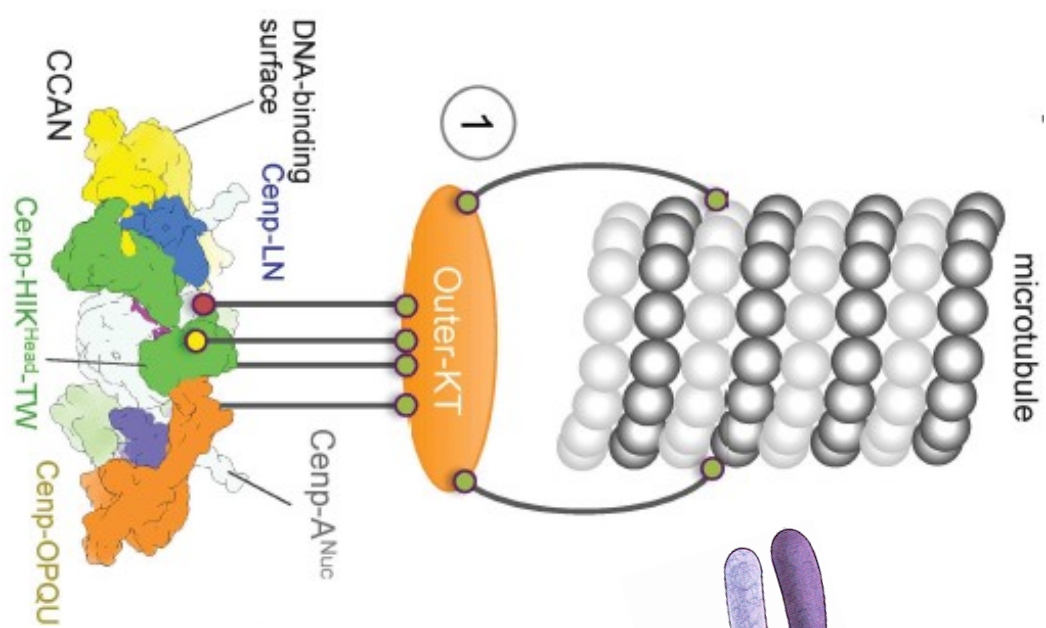
Yan et al., Nature, 2019
Takizawa et al, Structure, 2020

aining)





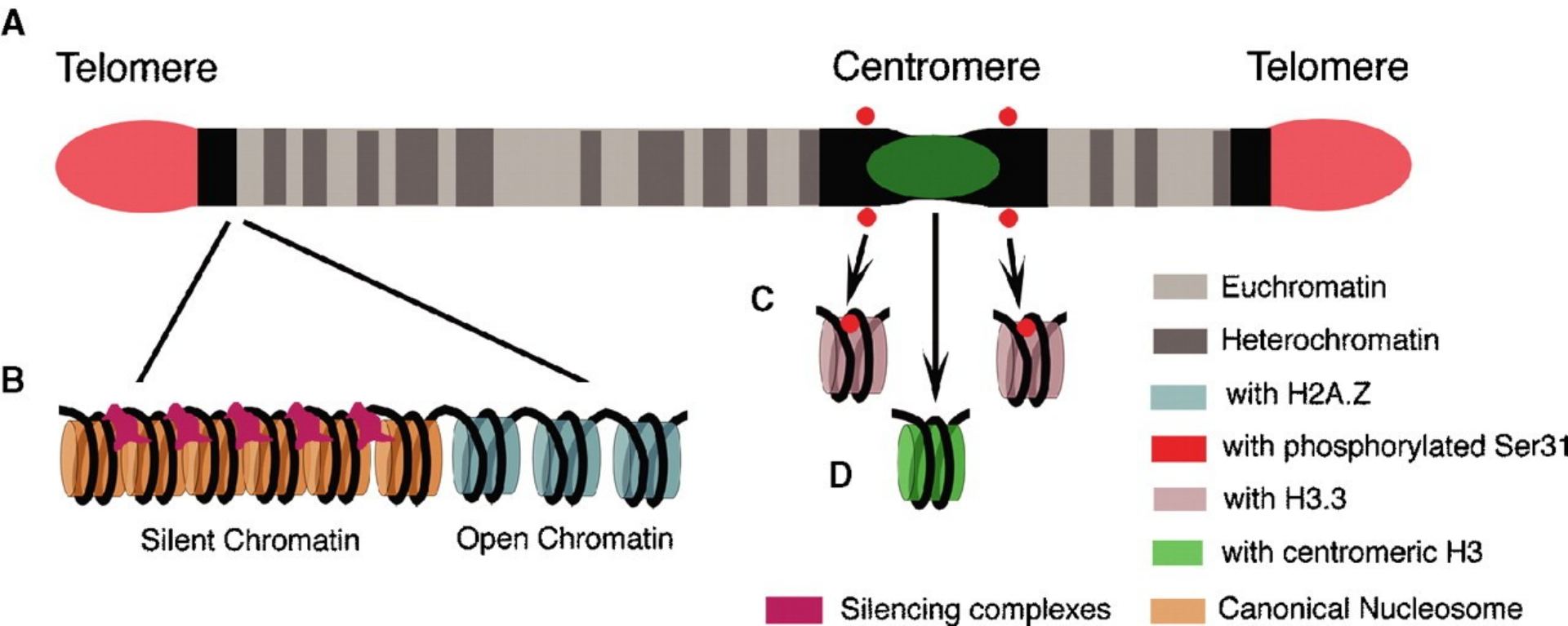
CCAN-Cenp-A^{Nuc}
(uncross-linked)



CENP-A(H3) nukleosom a další CENP proteiny tvoří vnitřní kinetochoru ... kotví vnější kinetochoru a mikrotubuly



Varianty histonů



Varietní histony mohou vyznačovat hranice chromozomálních domén.

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

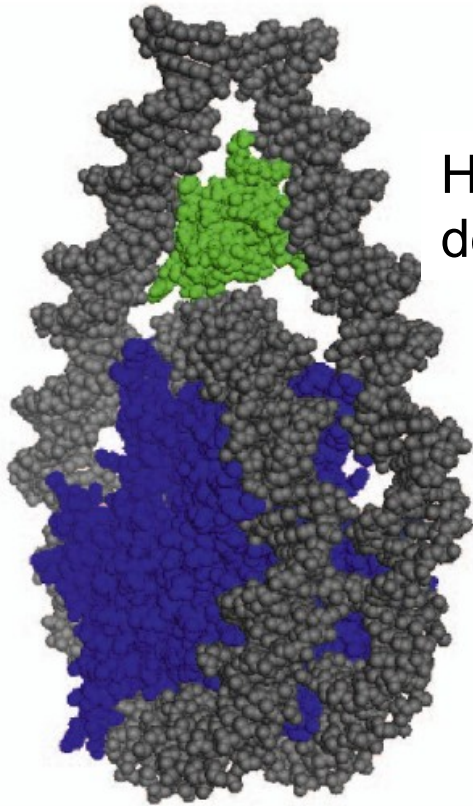
(D) Centromerické nucleozómy obsahují centromerickou variantou H3.

- **CenH3/CENP-A** ... specificky v centromerách

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

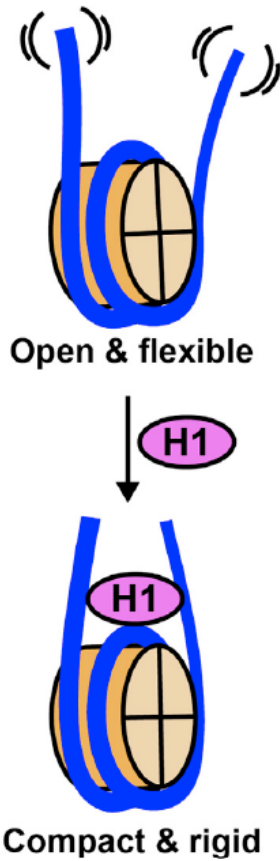
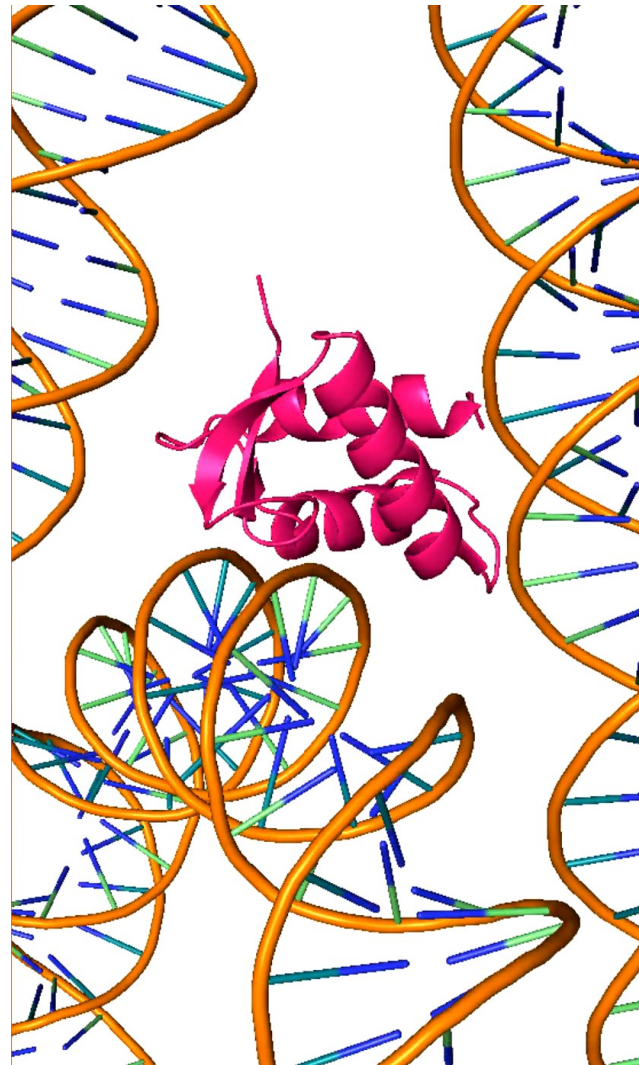


Nukleosom může být stabilizován H1/H5 histony

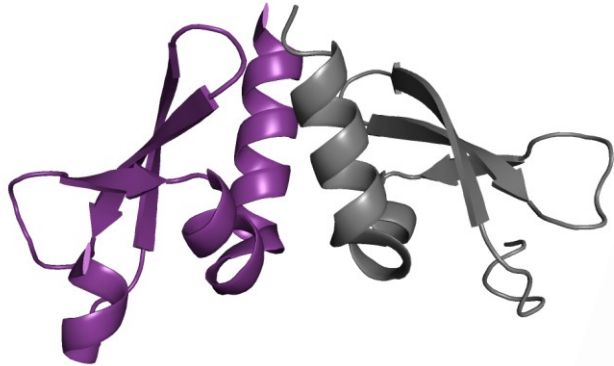


H1 WHD
doména

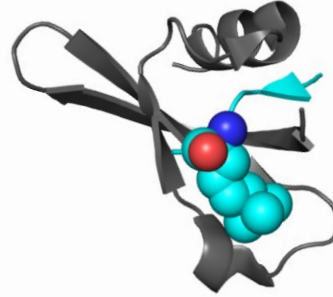
Bednar et al, Mol Cell, 2017
Cutter a Hayest, FEBS Let, 2015



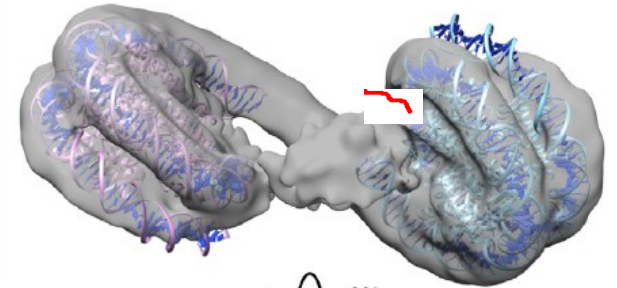
Heterochromatin protein – HP1



dimer

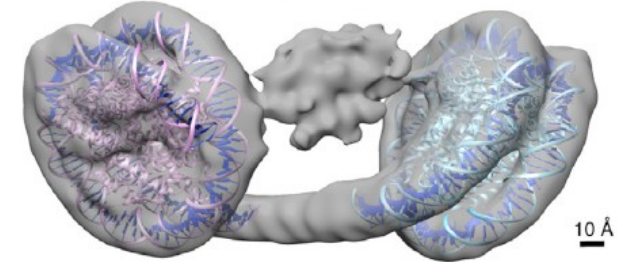


chromodomena
H3K9me3



90°

HP1 α dimer



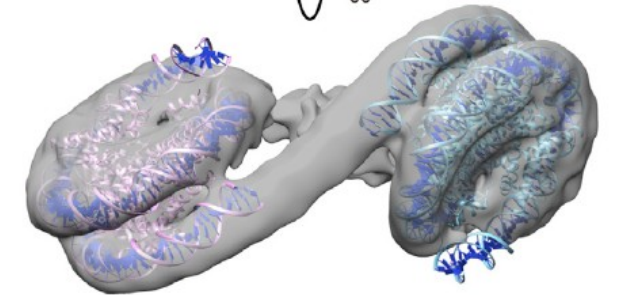
nucleosome

linker DNA

nucleosome

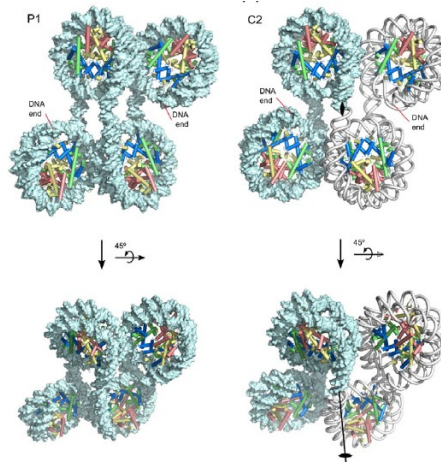
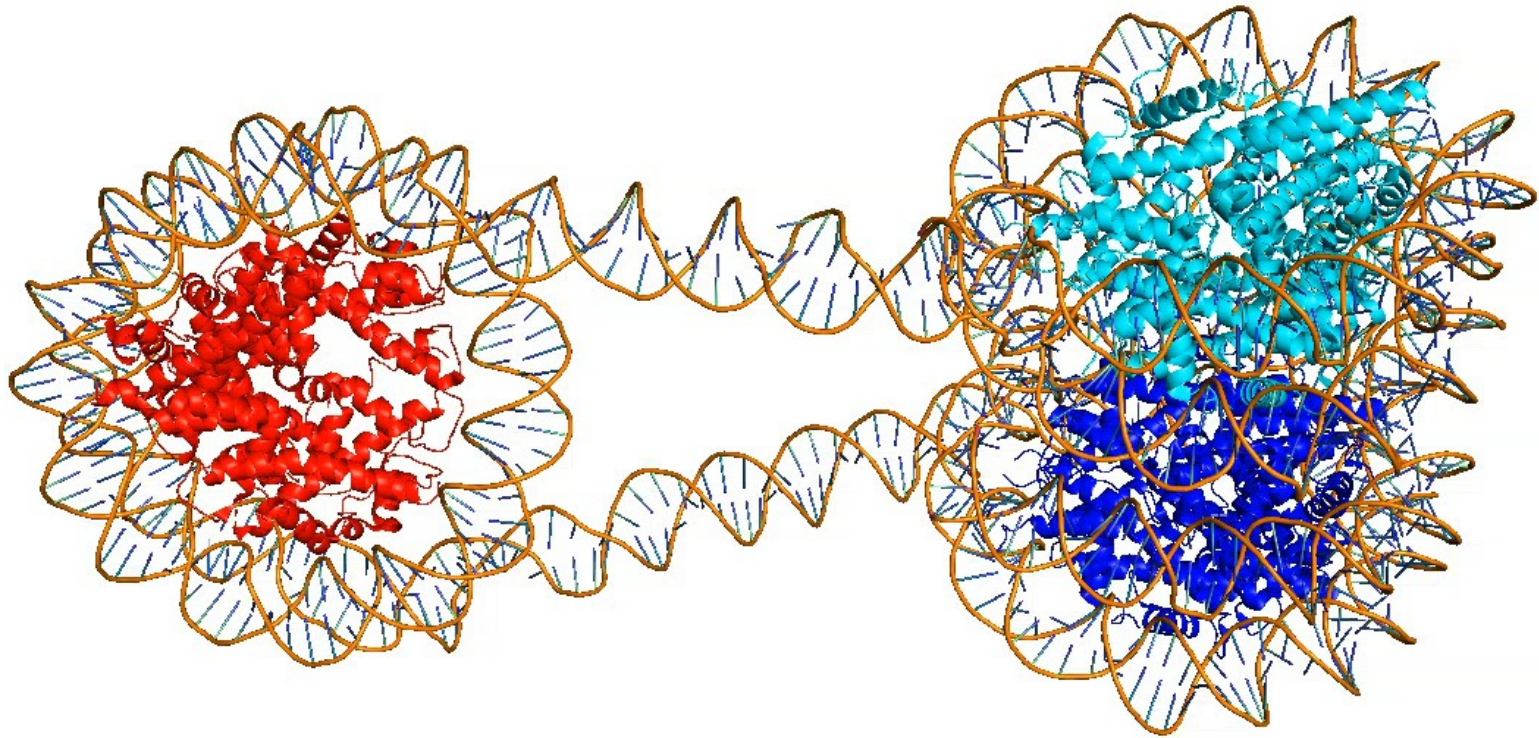
10 Å

90°



obsahuje chromodoménu, která se váže na 3x-metylovaný lysin (H3K9me3) – dimer spojuje dva „metylované“ nukleosomy – kondenzovanější a rigidnější struktura chromatinu





Chromatinová struktura?

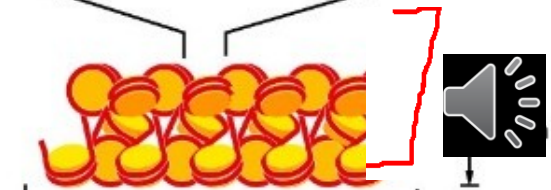
short region of DNA double helix



"beads-on-a-string" form of chromatin

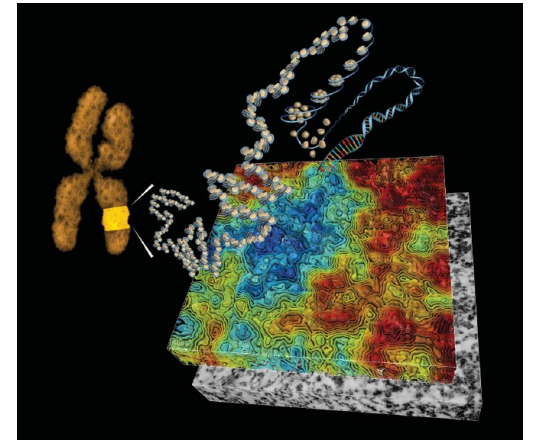
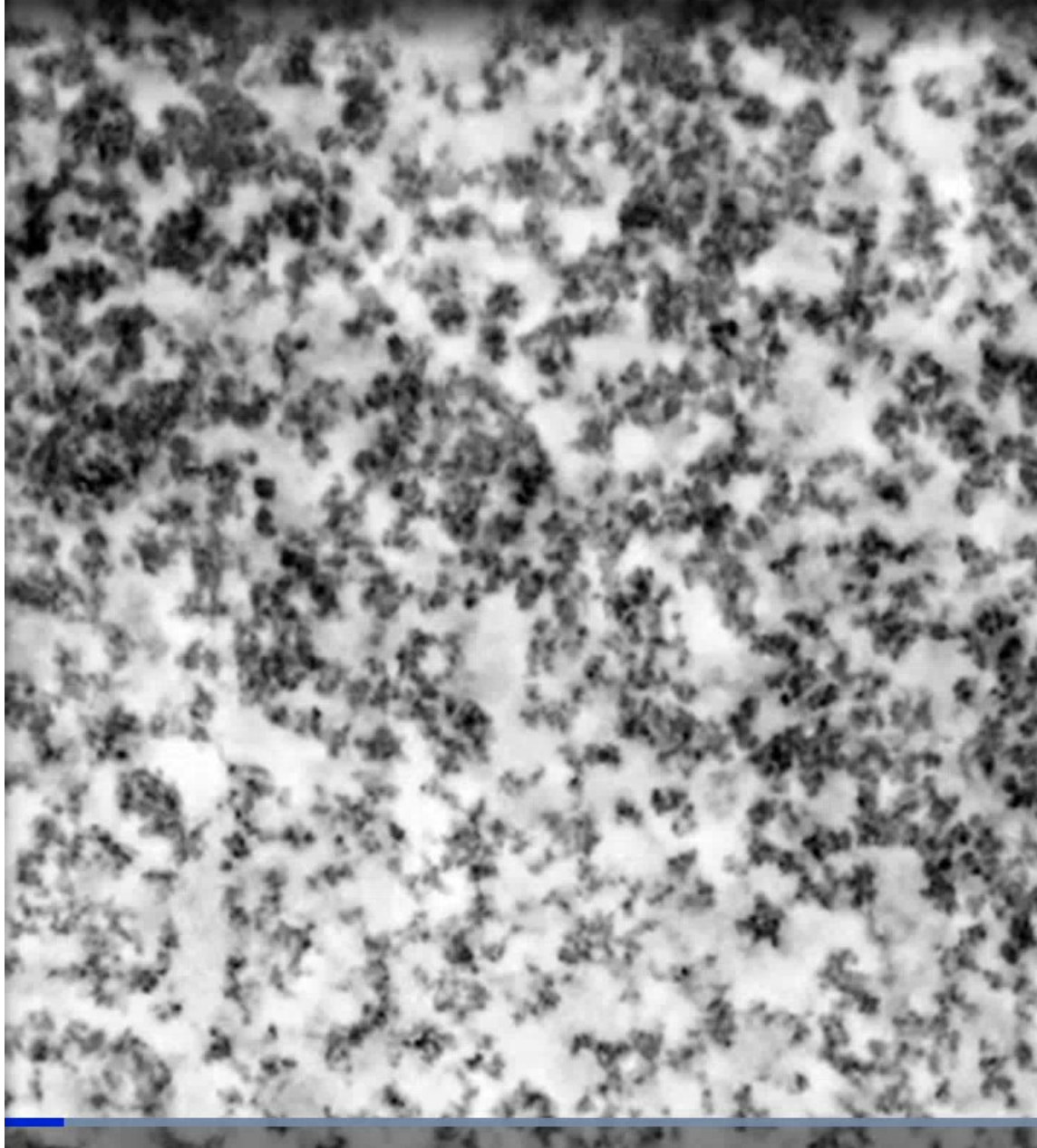


30-nm chromatin fiber of packed nucleosomes



PDB: 6L49

Ekundayo et al, JMB, 2017

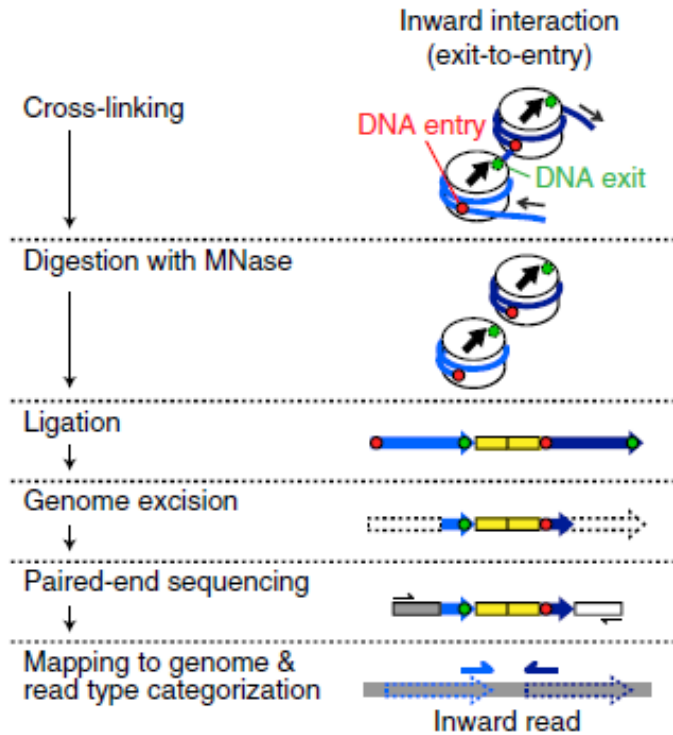
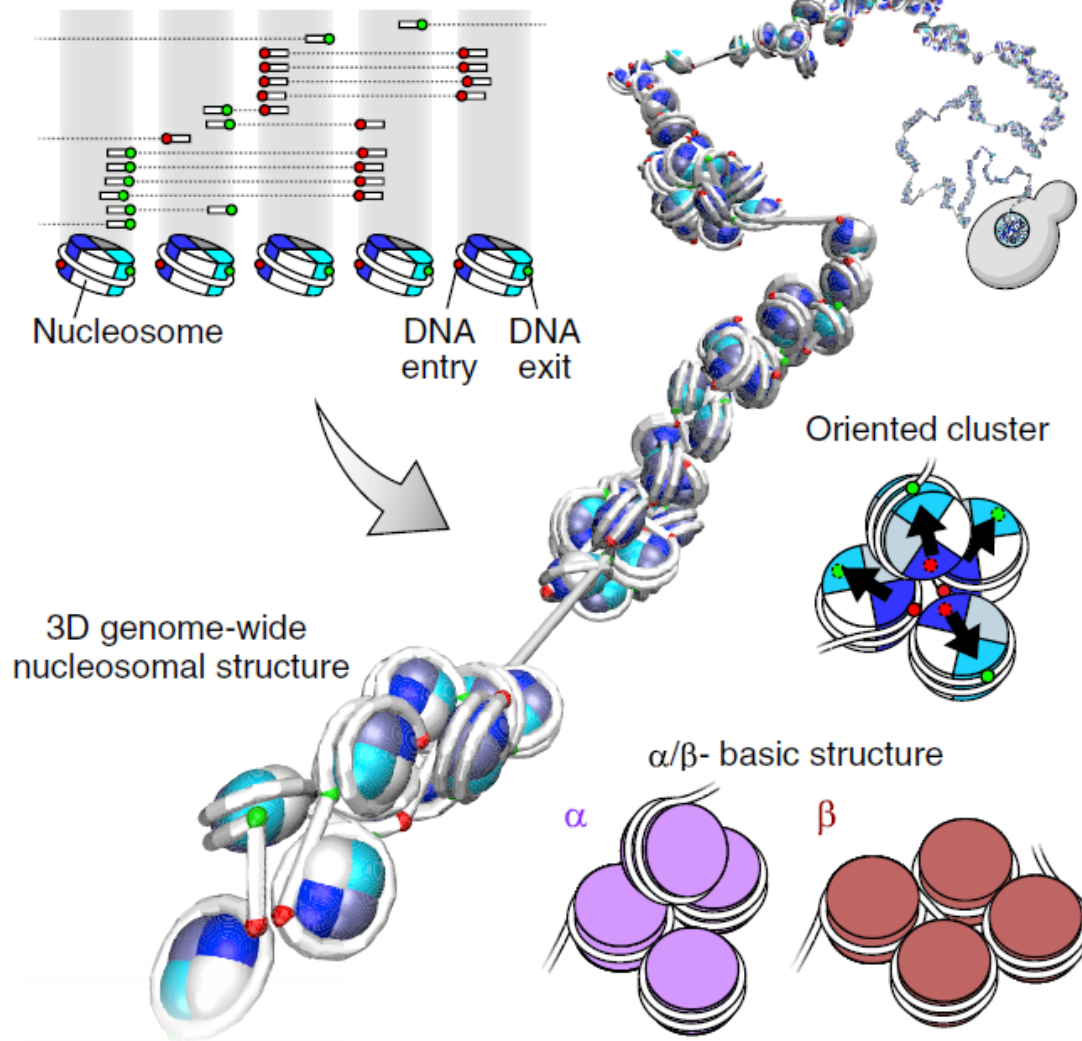


https://players.brightcove.net/53038991001/Byx2STOH0_default/index.html?videoid=55221986410

Ou a spol, Science, 2017



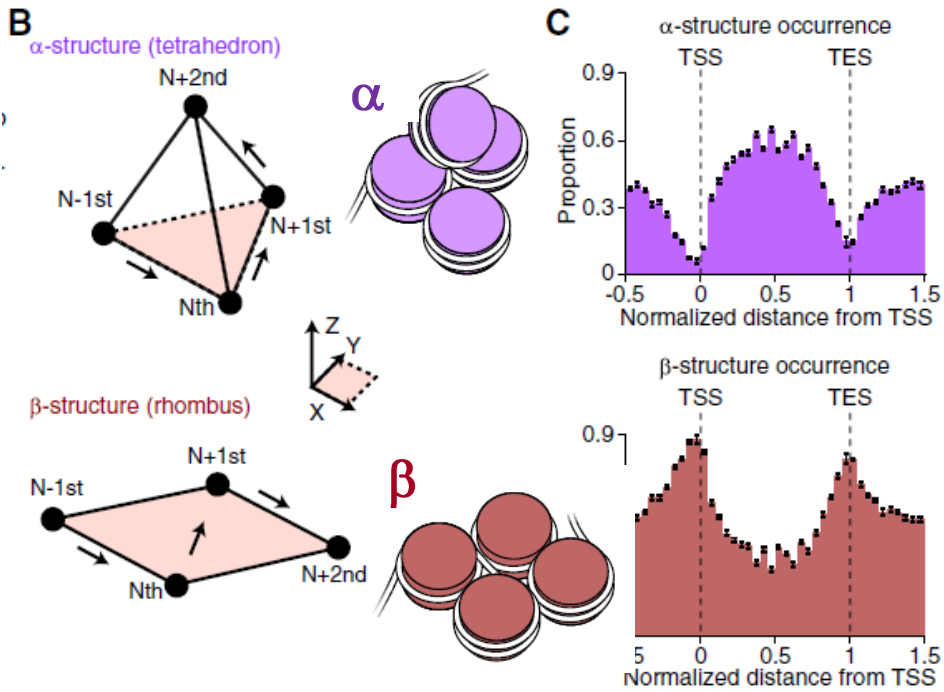
Sub-nucleosomal interaction analysis



kombinace Hi-C a mapování pozic nukleosomů = Hi-CO

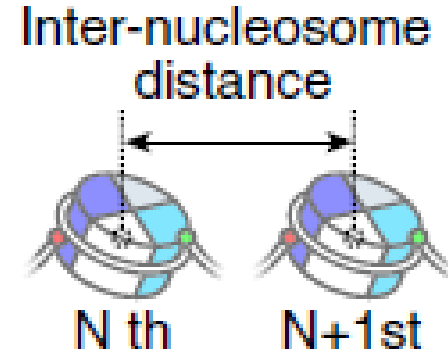
2 typy sbalení (4) nukleosomů: **pyramidální** (jako α -šroubovice) je kompaktnější; **kosočtverec** (jako β -list plochý) je otevřenější



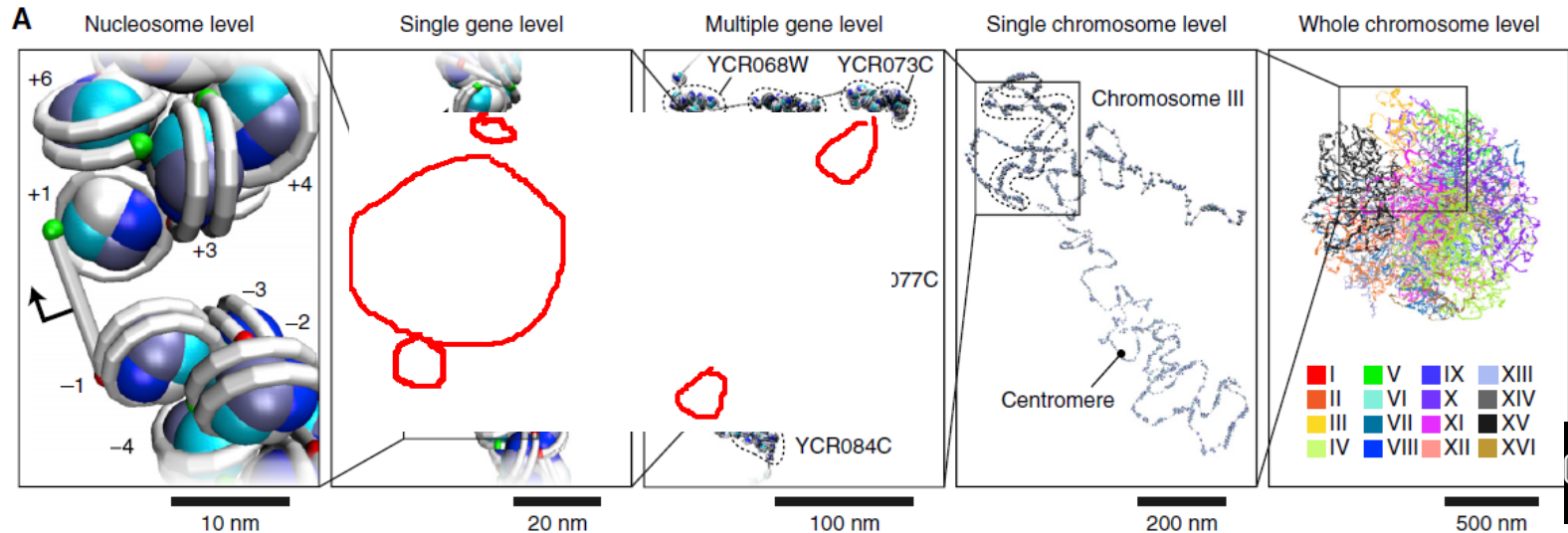


(pyramidální α je kompaktnější)

kosočtverec β je otevřenější –
na počátcích a koncích genových
oblastí

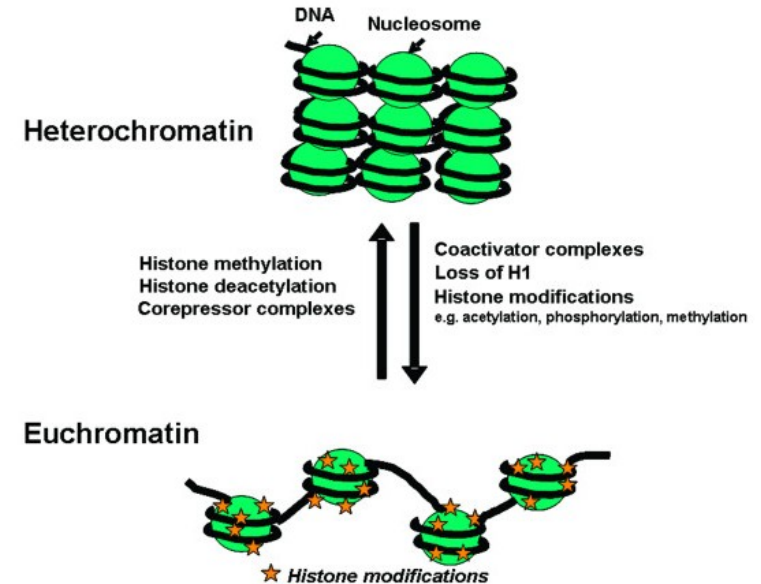
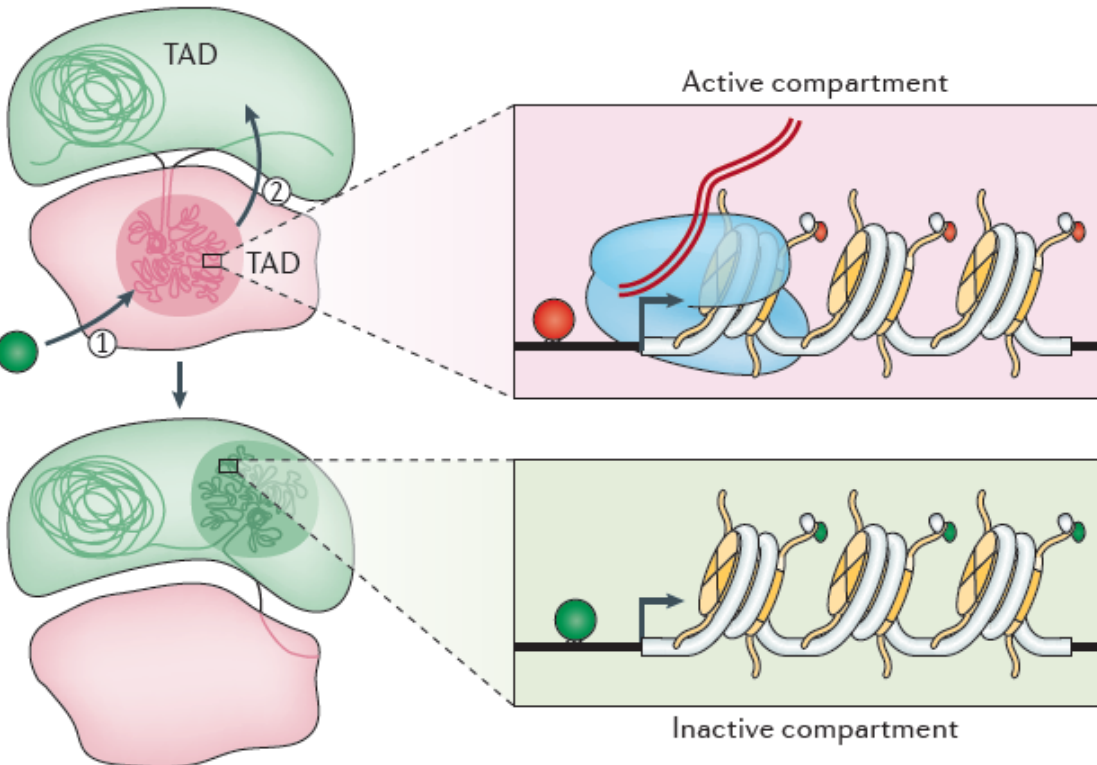


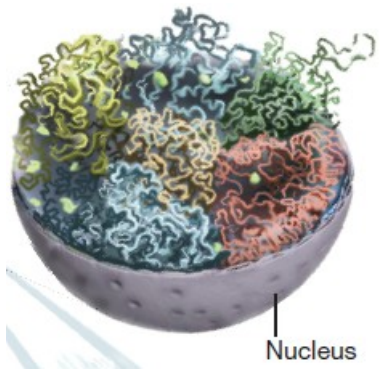
Nukleosomy jsou také více vzdáleny na začátku a konci genových oblastí



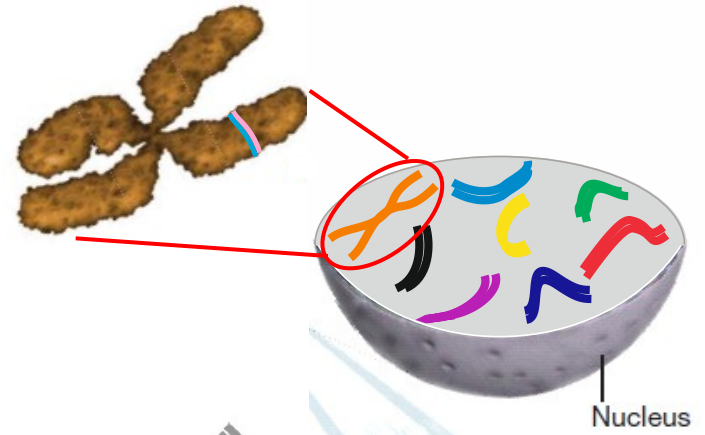
Heterochromatin – vysoce spiralizovaný (kompaktní) chromatin;
 transkripčně neaktivní geny, repetitivní sekvence,
 transpozony; oblast centromer, pericentromer a telomer
 Konstitutivní a fakultativní heterochromatin

Euchromatin – rozvolněné
 uspořádání, obsahuje
 transkribující se geny

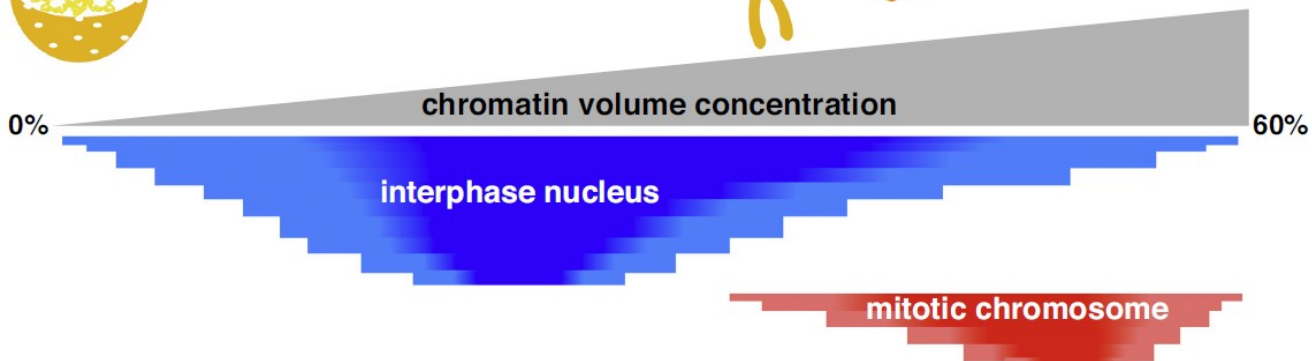
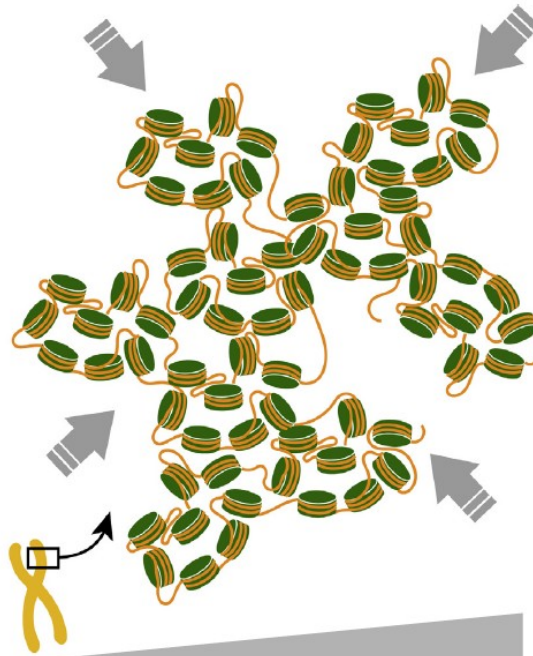
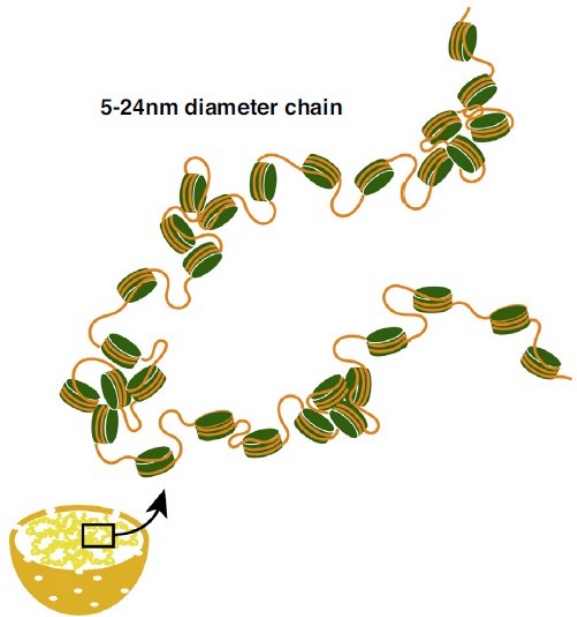




cell cycle
 ⇔



Interfázni chromatinová vlákna



Kondensované
 Mitotické
 chromosomy

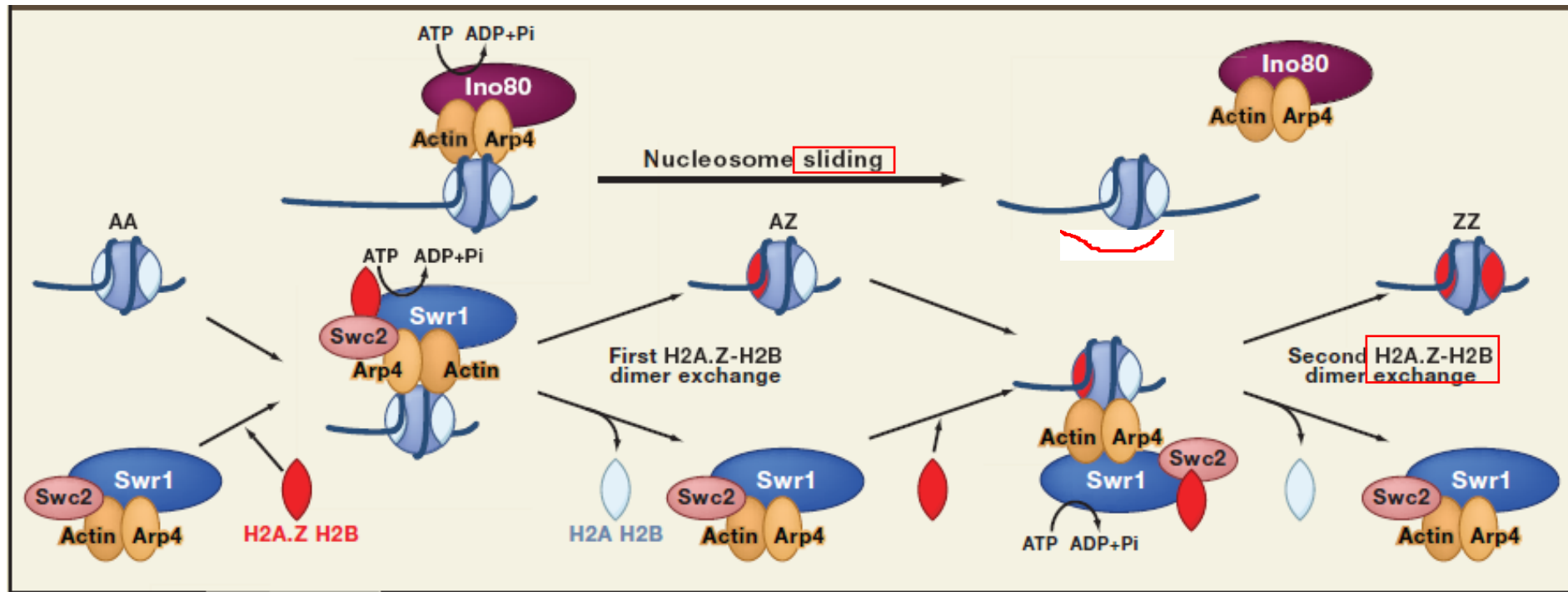


Remodelovací komplexy

- ATP-dependentní remodelace (SWI2/SNF superrodina)
- „sklouznutí“ (INO80), rozložení, odstranění nukleosomu nebo „výměna“ histonových dimerů

Billon a Cote, BBA, 2012

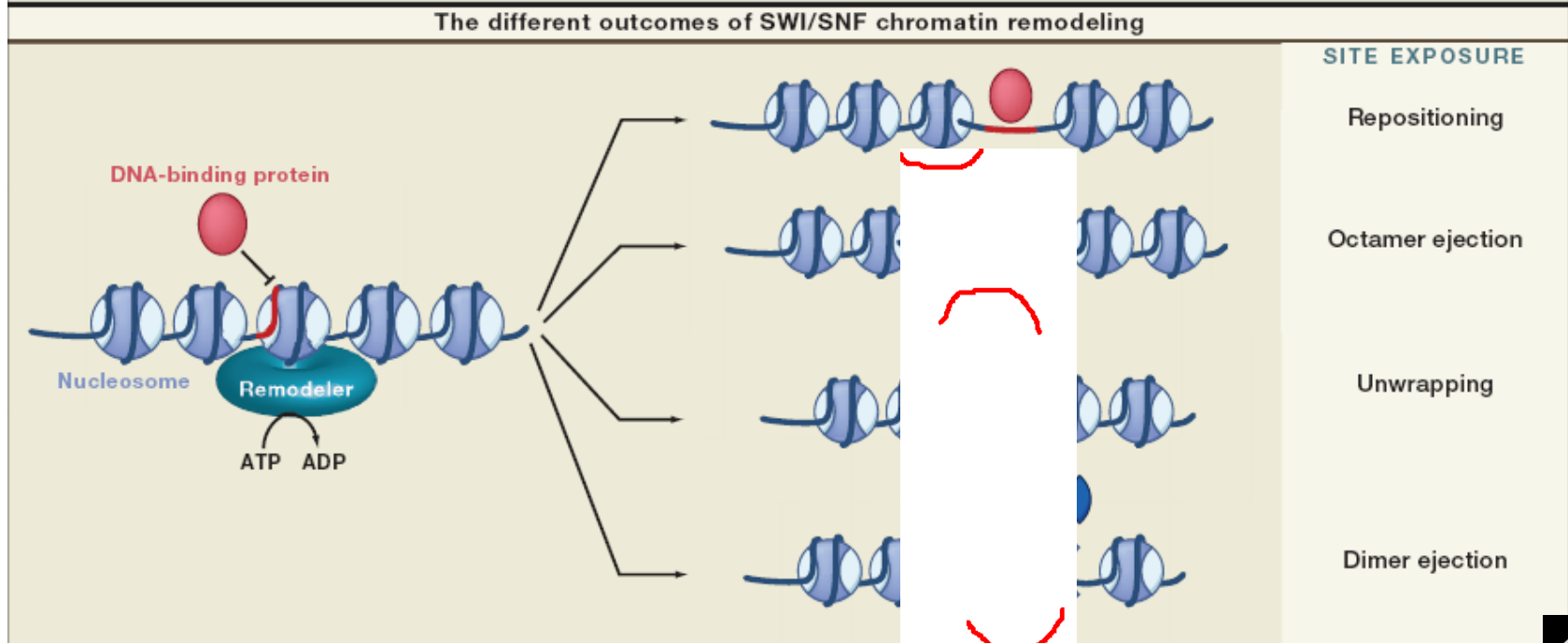
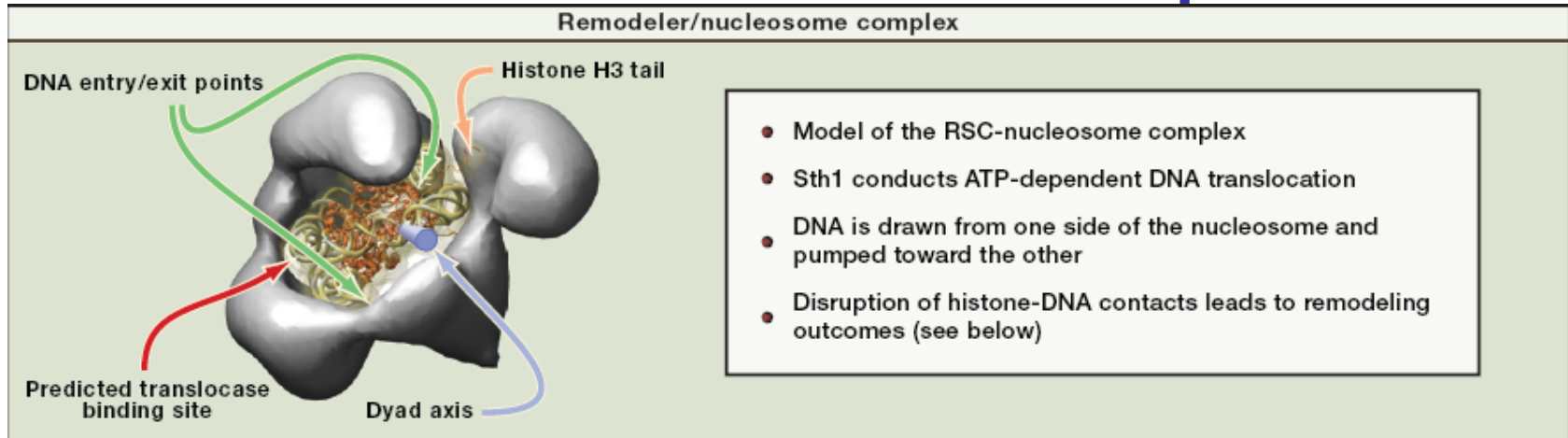
Bao, Snapshot-Cell, 2010



SWR1 komplex specificky zaměňuje (exchange) H2A-H2B dimer za H2A.Z-H2B dimer



RSC remodelovací komplex

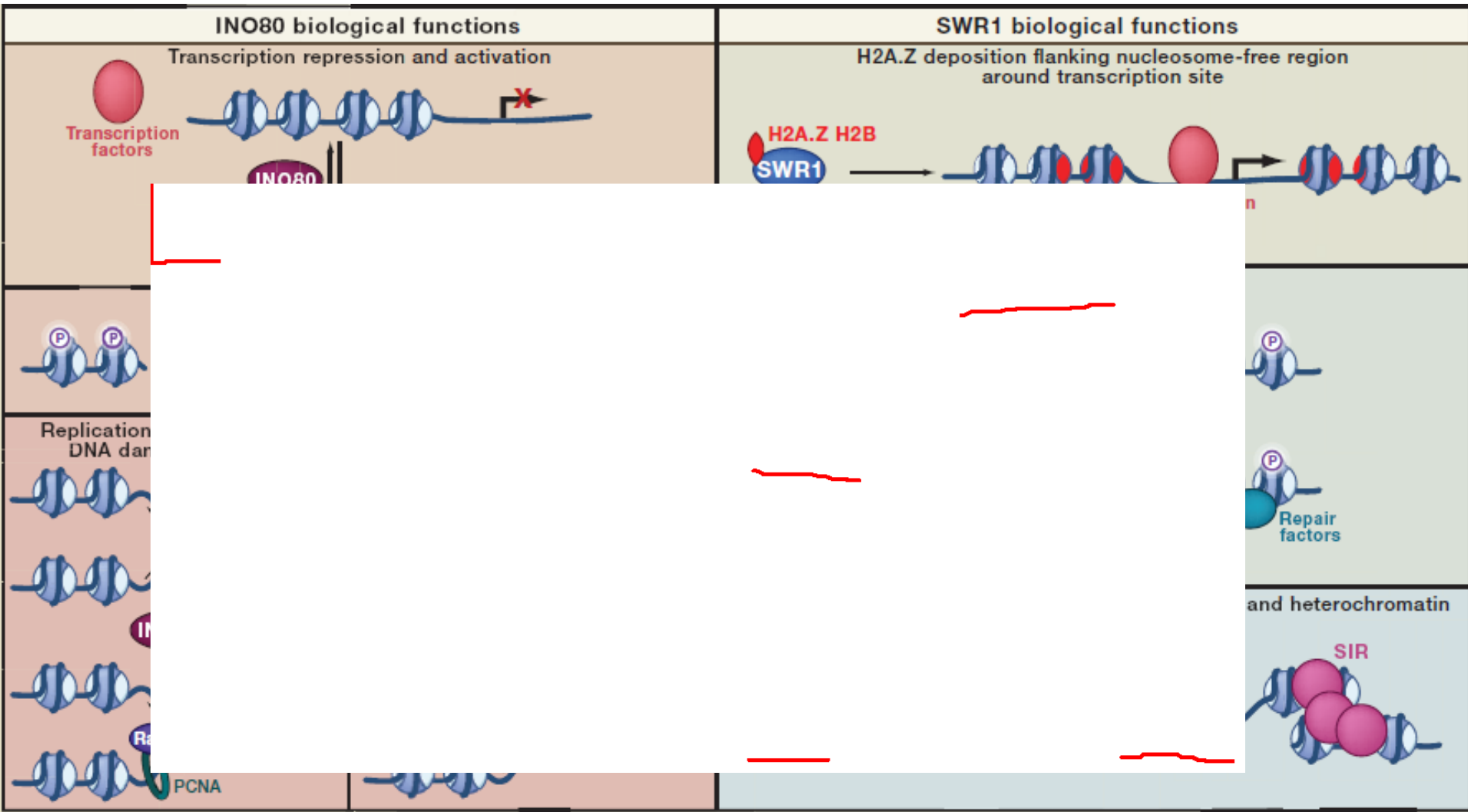


SNAPSHOT, Cell (144), 2011

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



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

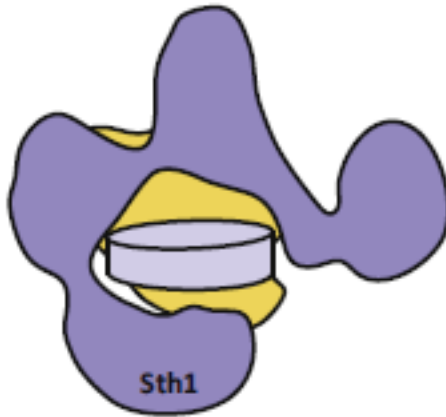


- INO80 komplex sliding + zaměňuje H2AZ-H2B dimer zpět za H2A-H2B

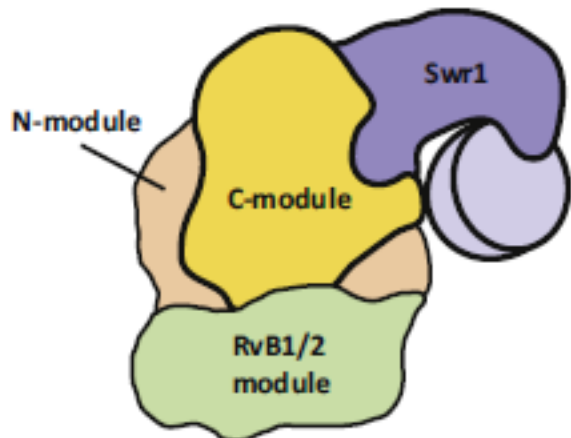
Bao a Shen, Snapshot in Cell, 2010



(A) **RSC**
Nucleosome engulfing

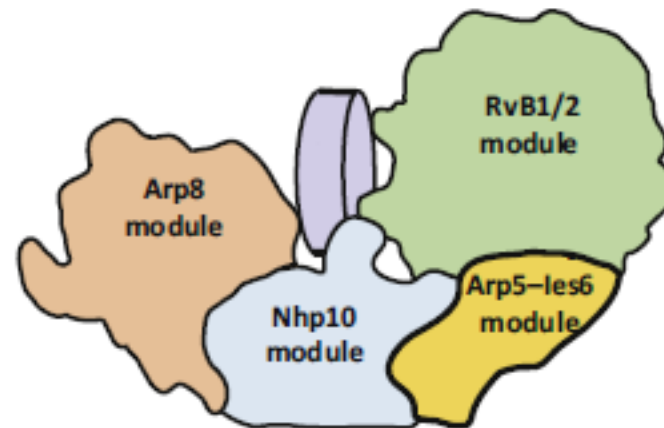


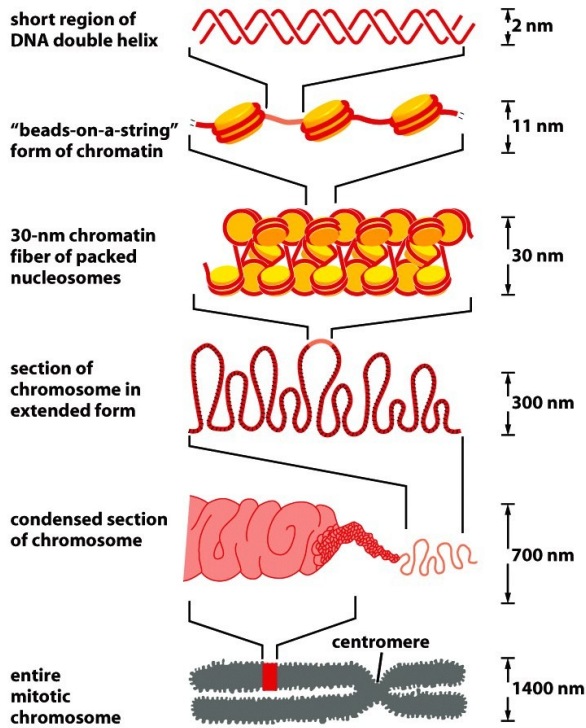
(C) **SWR-C**
Nucleosome clinging



- **RSC** (SWI/SNF) komplexy obklopí nukleosom (rozvolní se vazba s DNA a posouvá se)
- nukleosom je zavěšen na **SWR-C** komplexu – komplex váže ještě H2... dimer, který je schopen vyměnit
- nukleosom je uchopen **INO80** komplexem (přes podobné složení podjednotek – fungují odlišně)

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





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

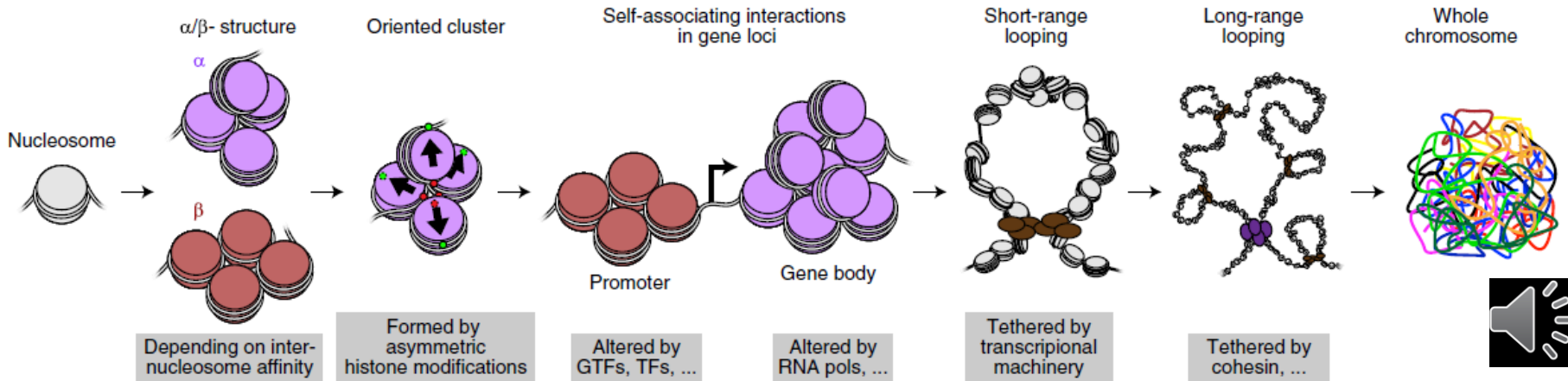
Strukturní úrovně uspořádání chromatinu

Nukleosomy

Strukturní proteiny

Ohno, Cell, 2019

Hierarchical architecture of *S. cerevisiae* chromatin

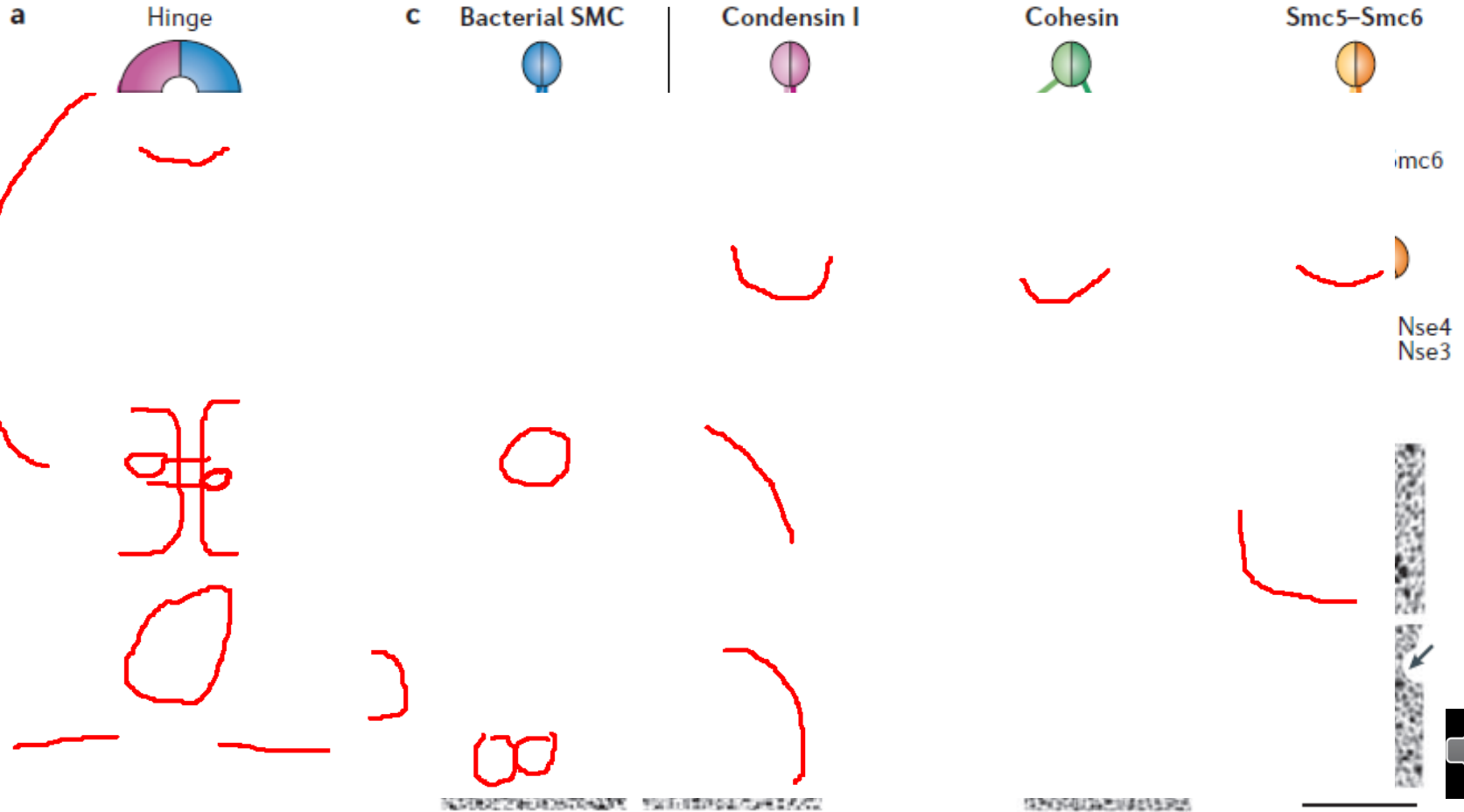


Komplexy SMC

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

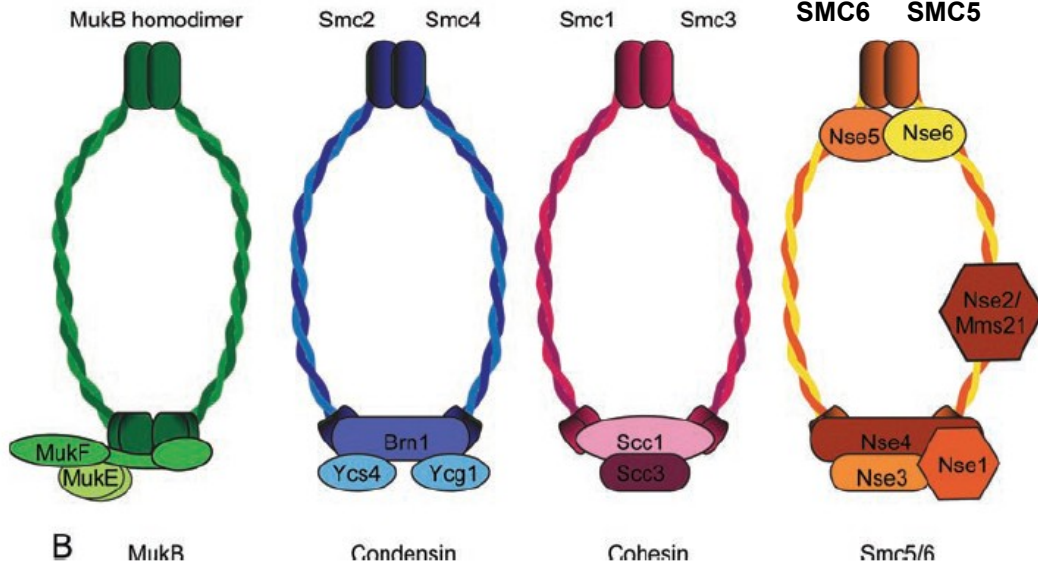
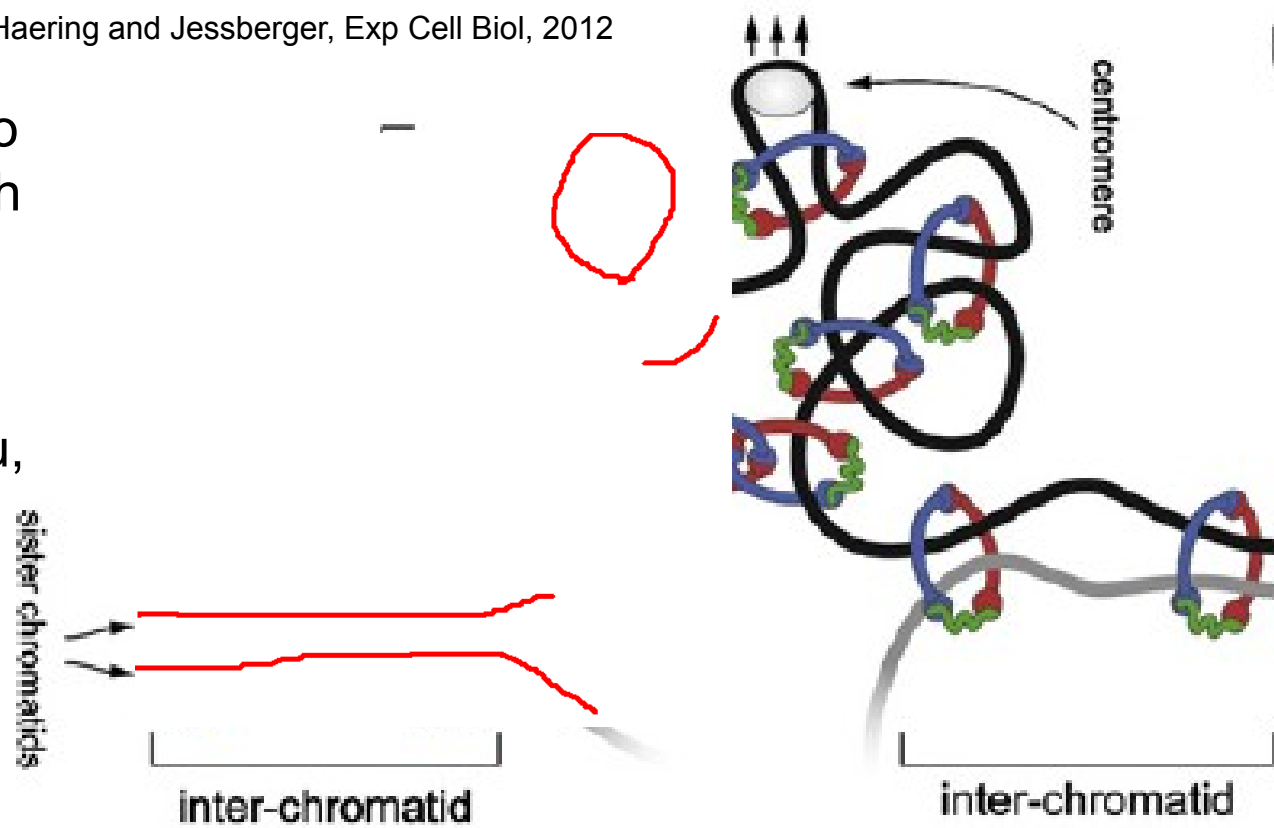
Prokaryota

Eukaryota (esenciální)



- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

- podílí se na segregaci, kondenzaci chromosomů, chromatinových struktur (TAD) ... a na opravě DSBs

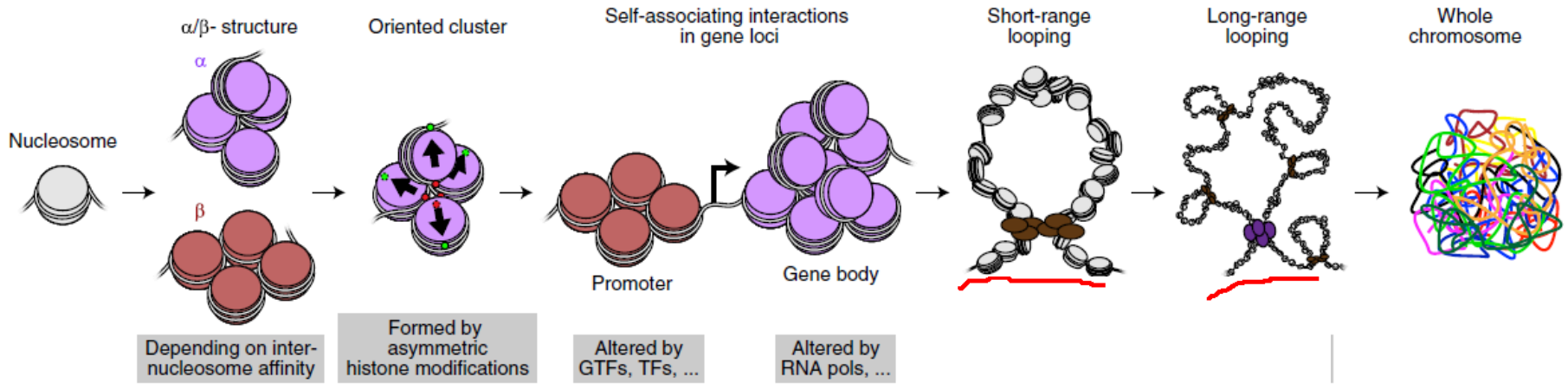


- složení SMC komplexů
 - dlouhá ramena SMC, dimerizace přes hinge, ATPase heads přemostěny ATP a kleisinovou podjednotkou
 - SMC proteiny vytváří kroužky, které drží DN

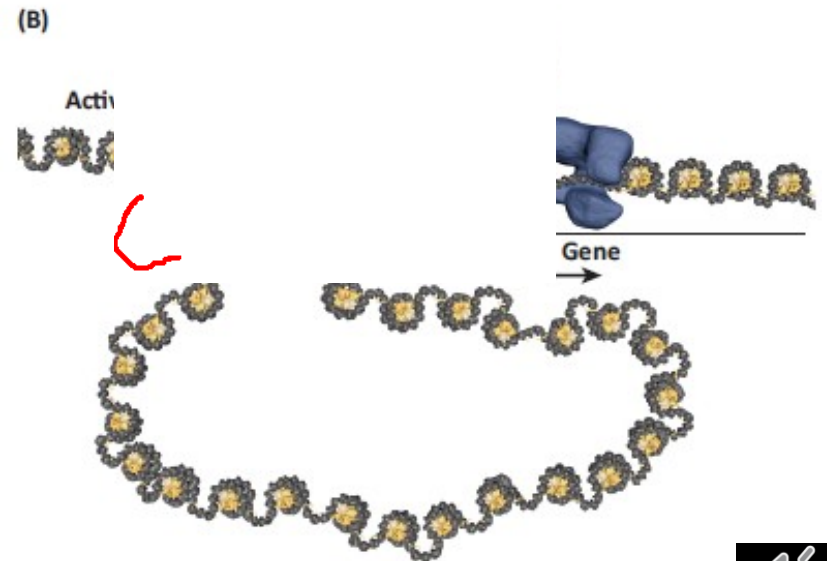


kohezin interaguje s mediátorem

Hierarchical architecture of *S. cerevisiae* chromatin

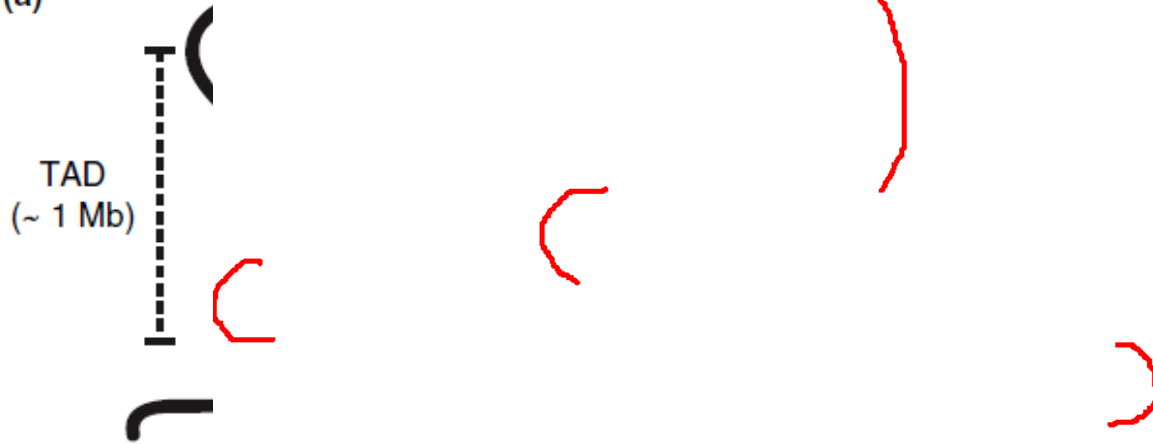


- mediator interaguje s GTFs a RNA polymerázou (zprostředkuje interakce mezi GTFs a aktivátory transkripce)
- kohezin interaguje s mediátorem a napomáhá tvorbě transkripčních smyček



Kohesin interaguje s CTCF

(a)



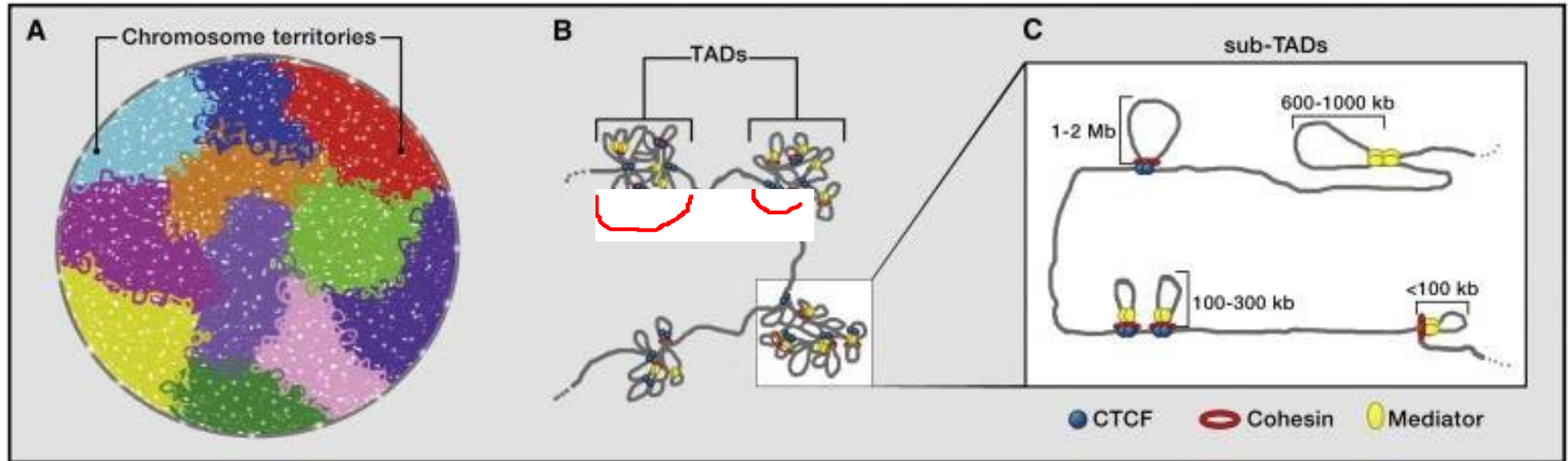
- CTCF faktory
- interak
- utváře
- (TAD –



S
II
C
r

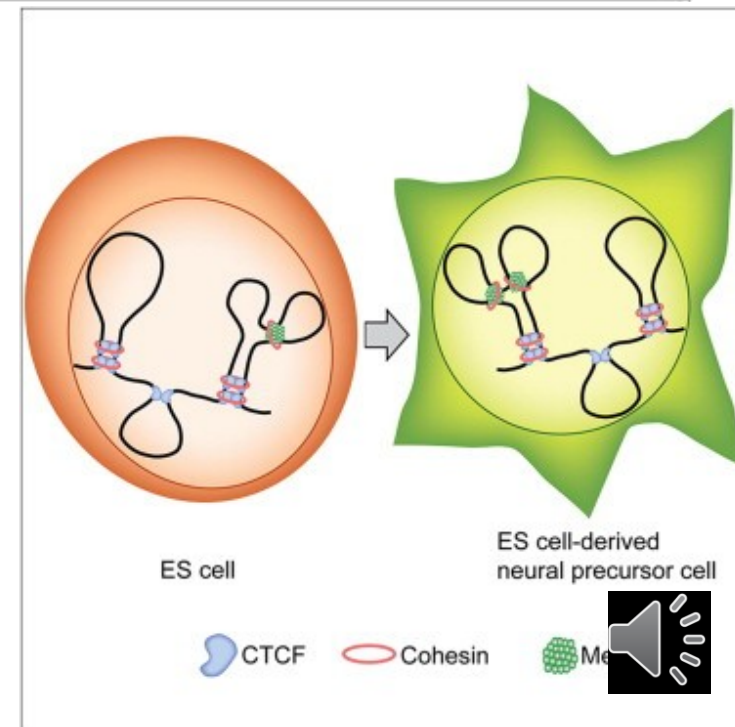


TAD – topologicky asoc. domény

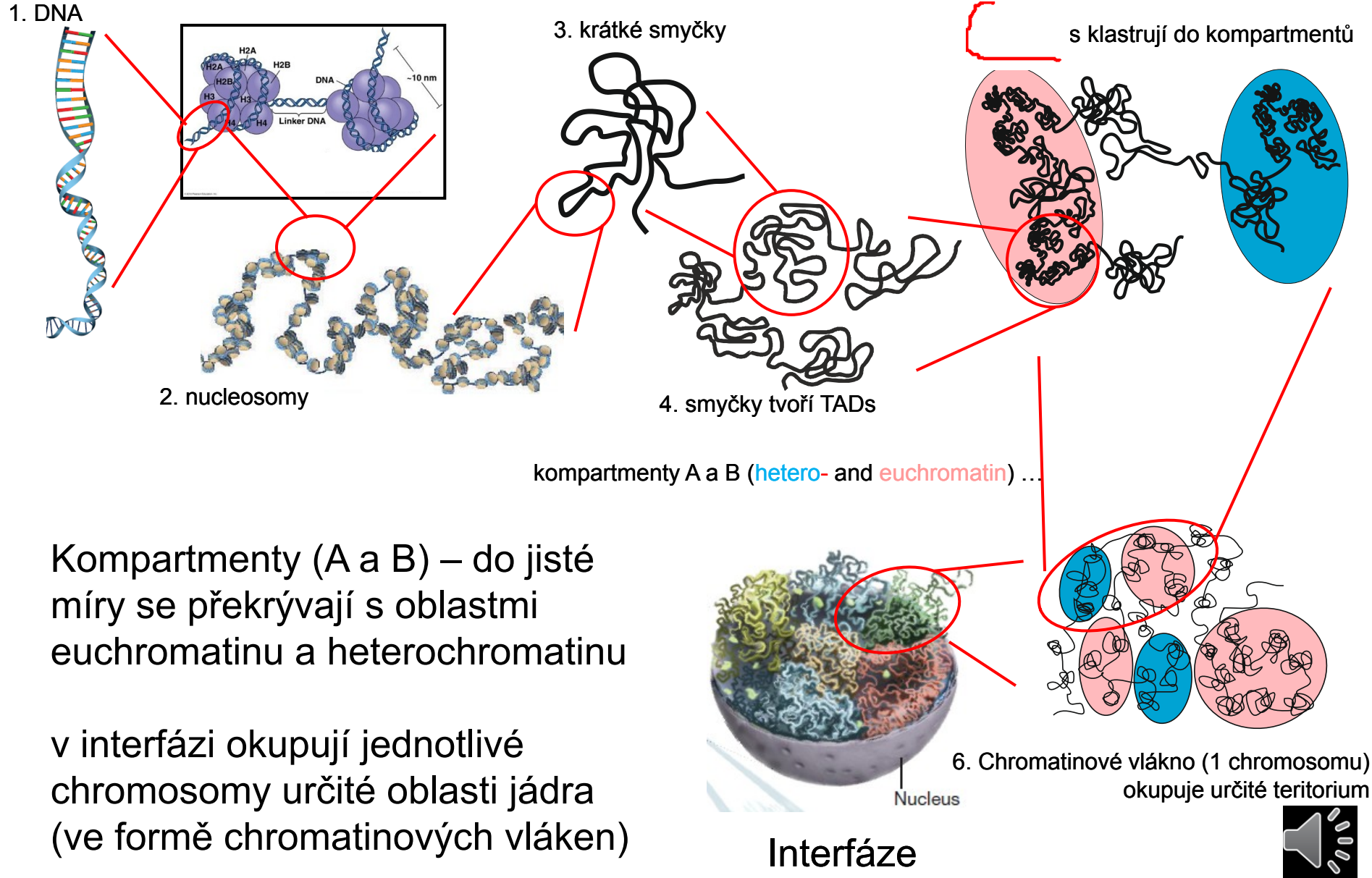


cohesin se podílí na regulaci „cell-specific“ transkripce a chromatinové struktury (např. diferenciaci kmenových buněk)

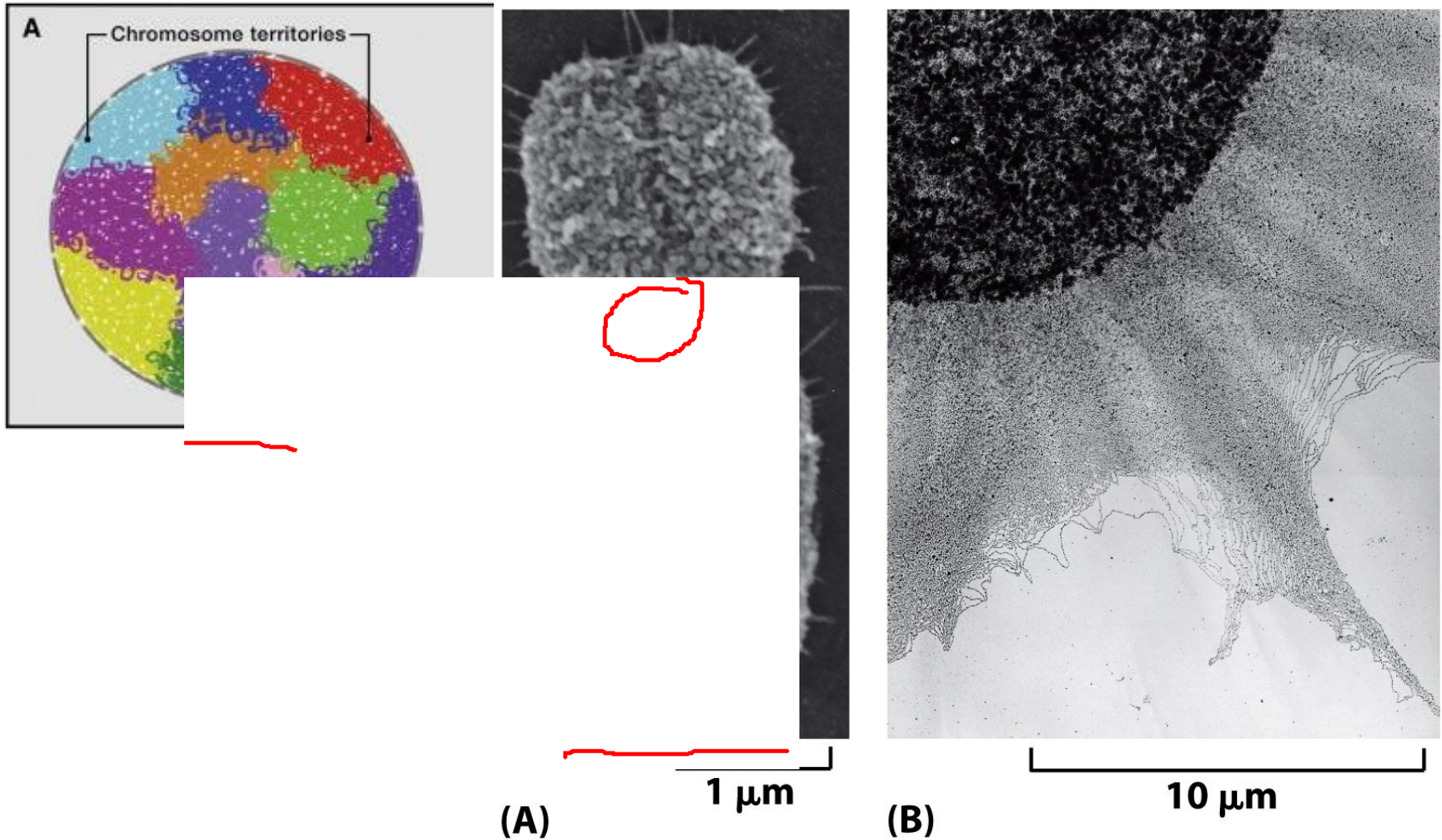
Bodnar and Specter, Cell, 2013
Phillips-Cremnis et al, Cell, 2013
Schoborg et al, CMLS, 2014



nový model struktury chromatinu



interfáze vs mitóza

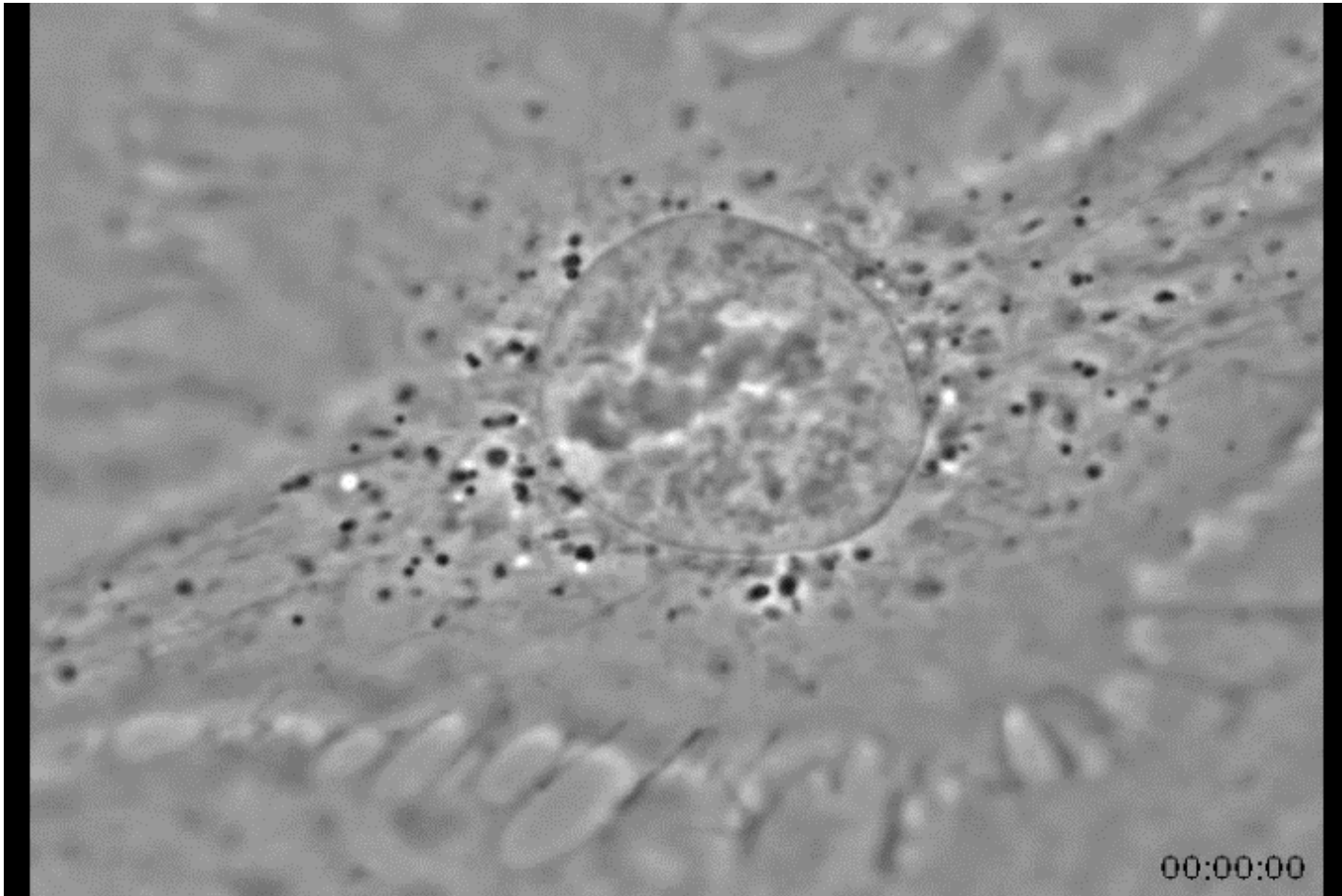


v interfázi okupují jednotlivé chromosomy určité oblasti jádra (ve formě chromatinových vláken) – v průběhu mitózy chromosomy kondenzují do typických X-struktur (kvůli snadnější segregaci)



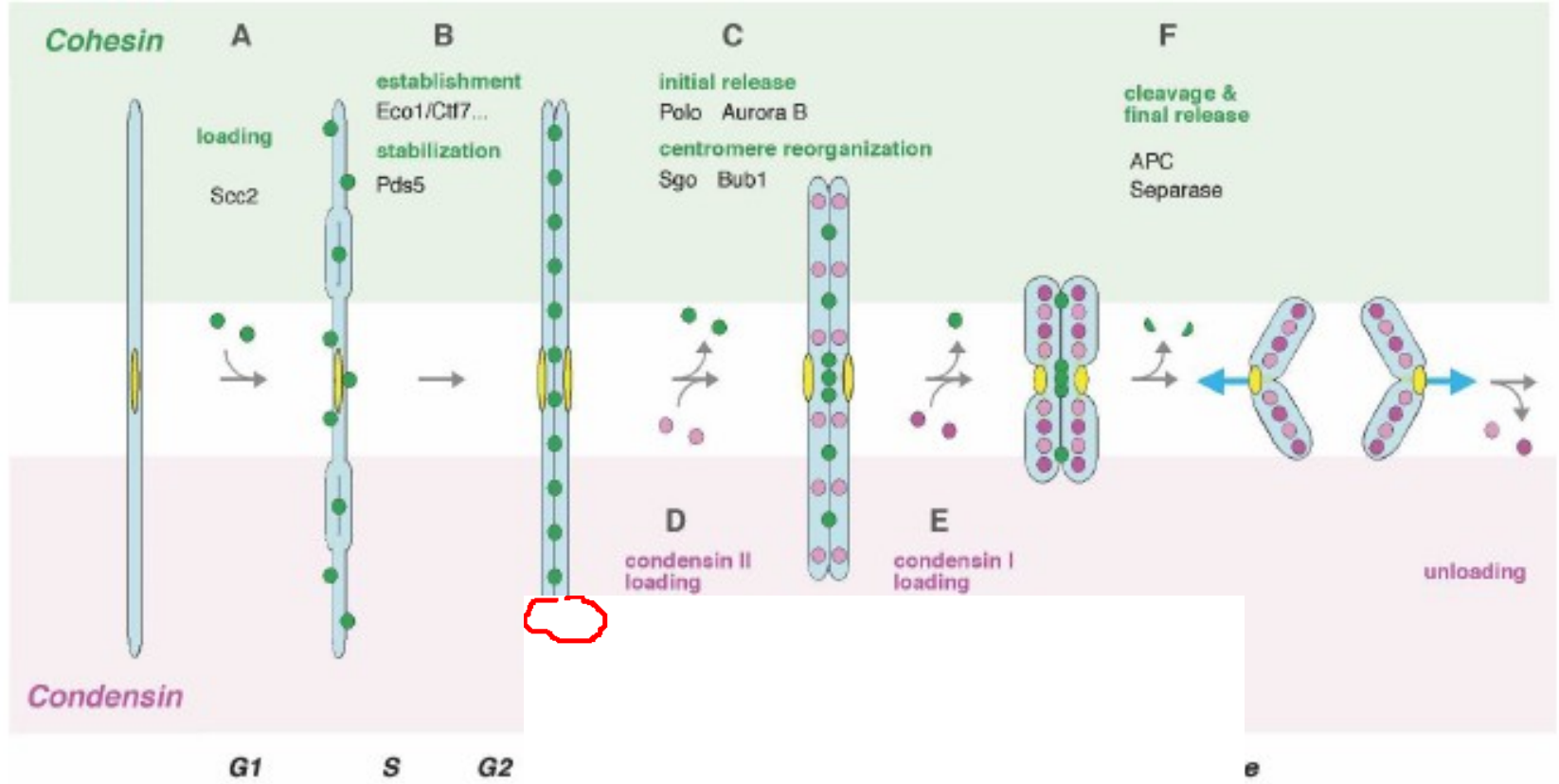
Dynamika chromatinu

Dr. Gorbsky



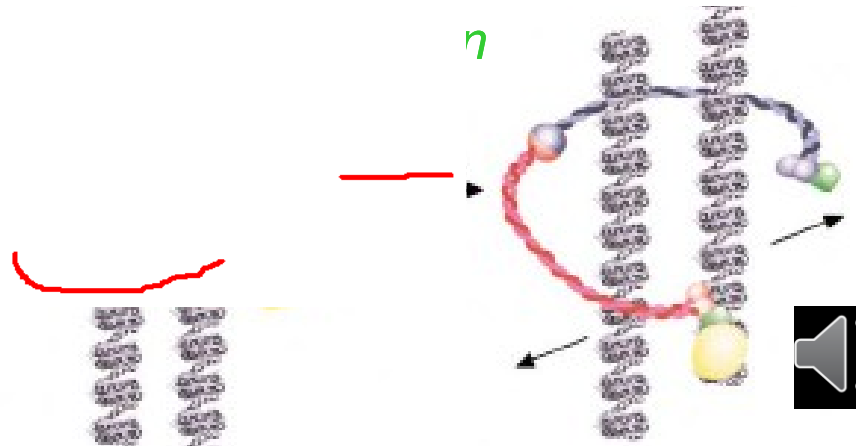
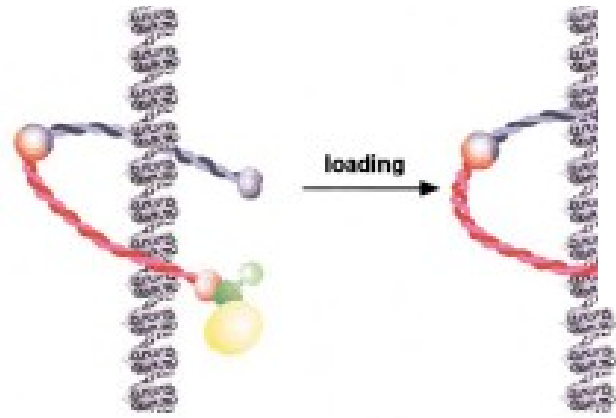
Kondensace chromatinu = kondensin
Držení sesterských chromatid = kohesin





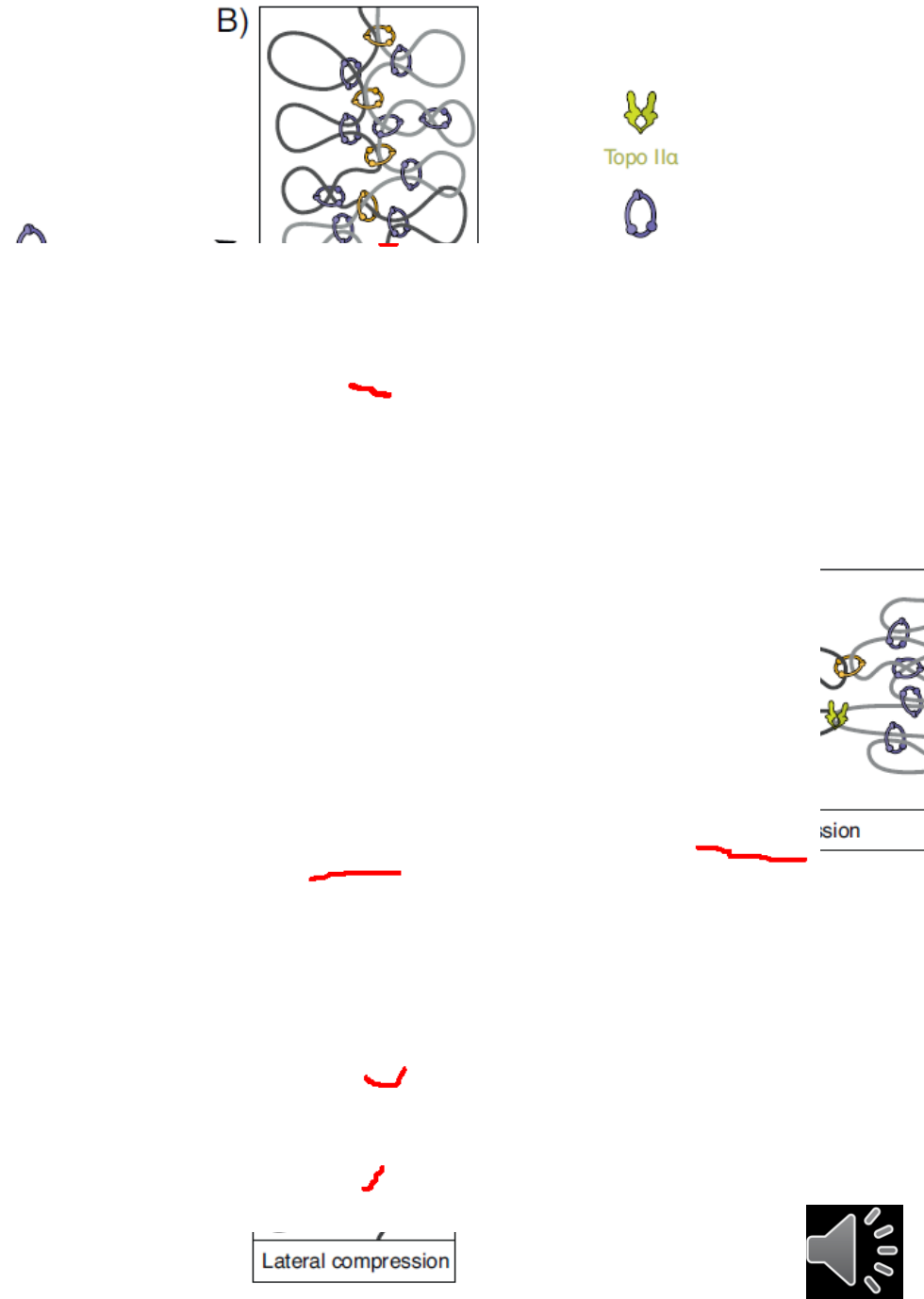
Losada & Hirano, 2005, Gen&Dev

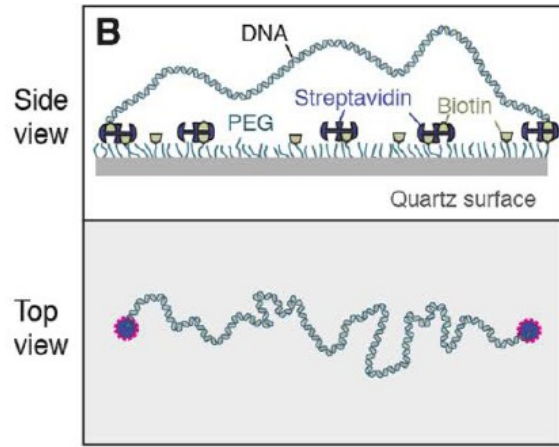
- „navlékání“ SMC komplexu
- kohesin obepíná 2 vlákna



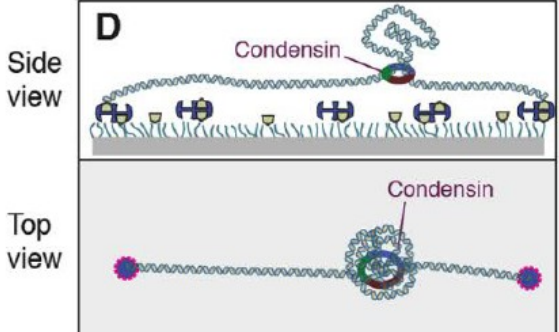
Haering et al, Mol Cell, 2002

Kondensin II vytváří
 lineární smvčkv (osová
 kompre
 konder
 laterálr

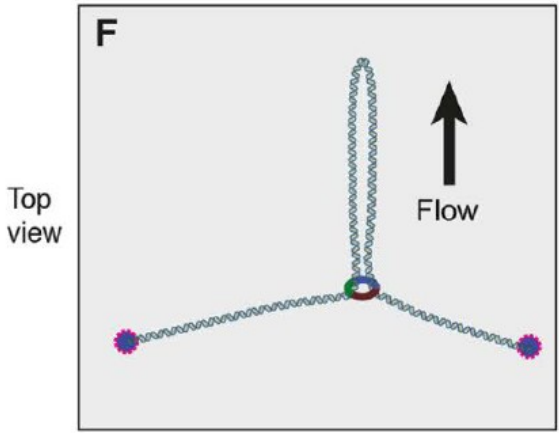




Add condensin & ATP ↓

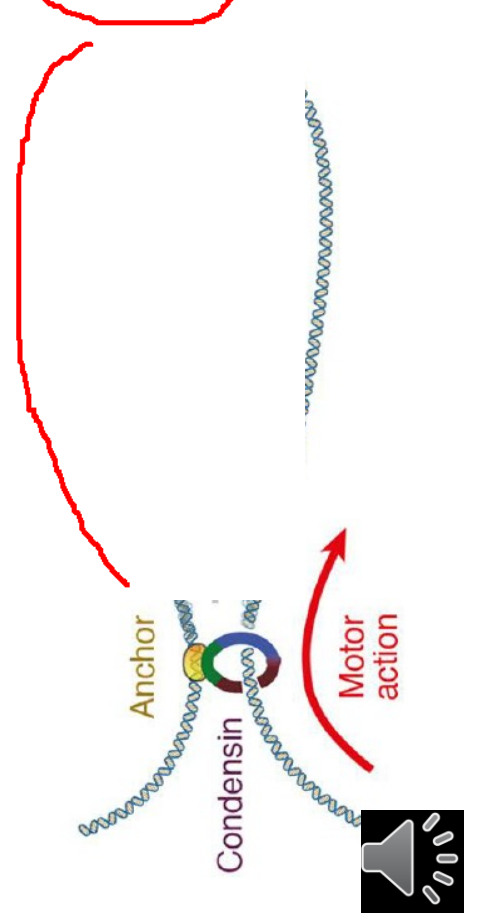
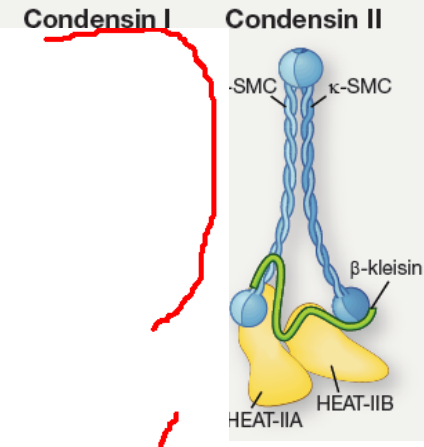
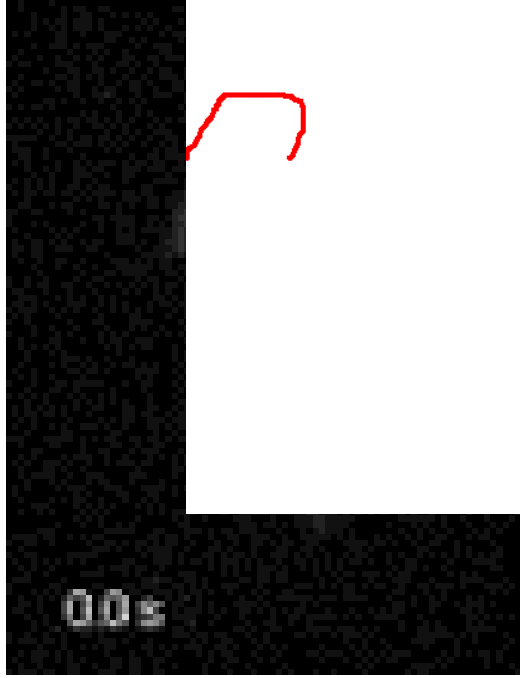


Apply flow ↓



konce mole

přidán kond
hydrolýza A
smyčky („lo

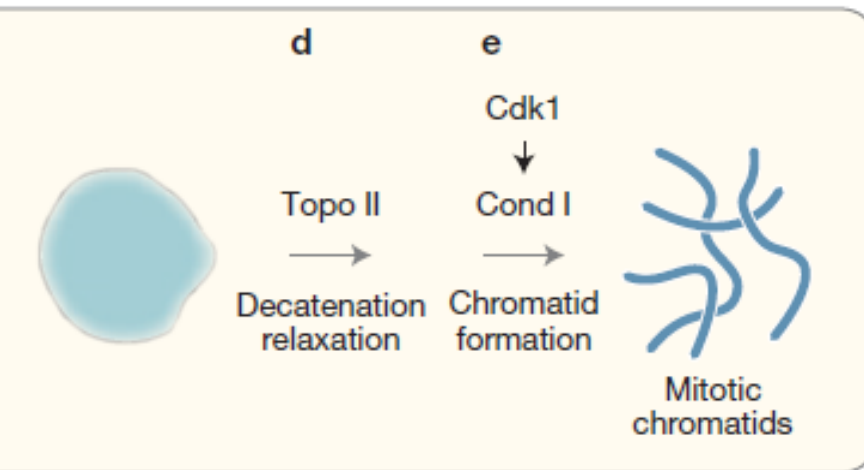
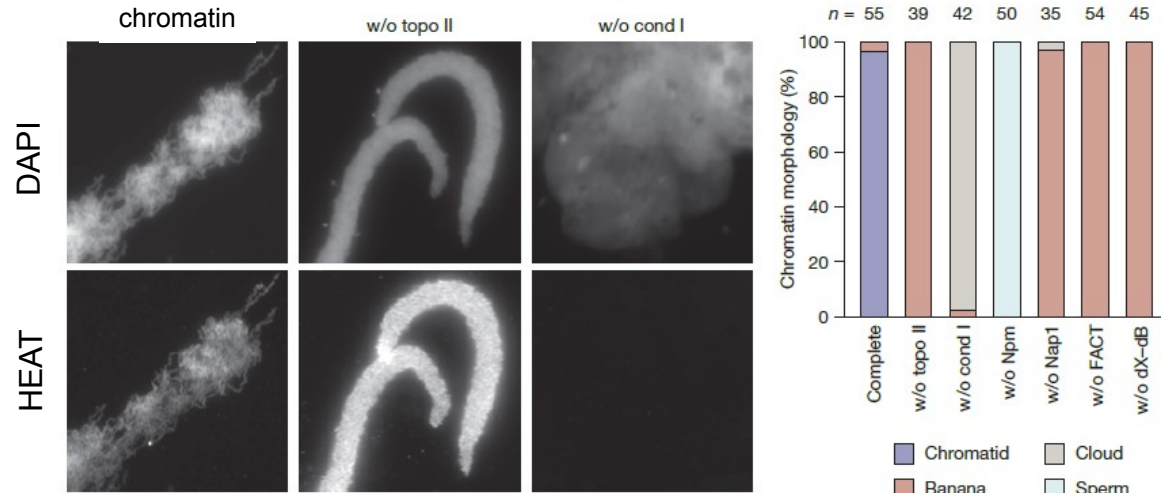
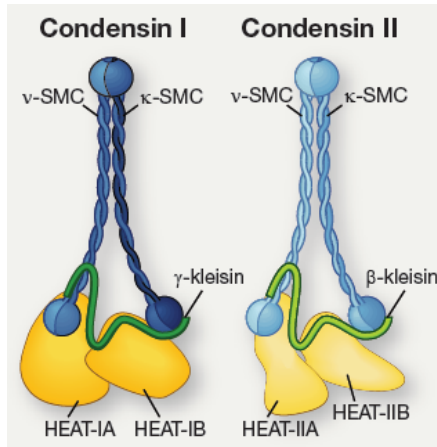


Ganji et al, Science, 2018
Takahashi, CO in CB, 2019



in vitro rekonstrukce chromosomů

DNA + H3/H4/H2A/H2B ... FACT ... TopoII ... kondensin I (+ATP)

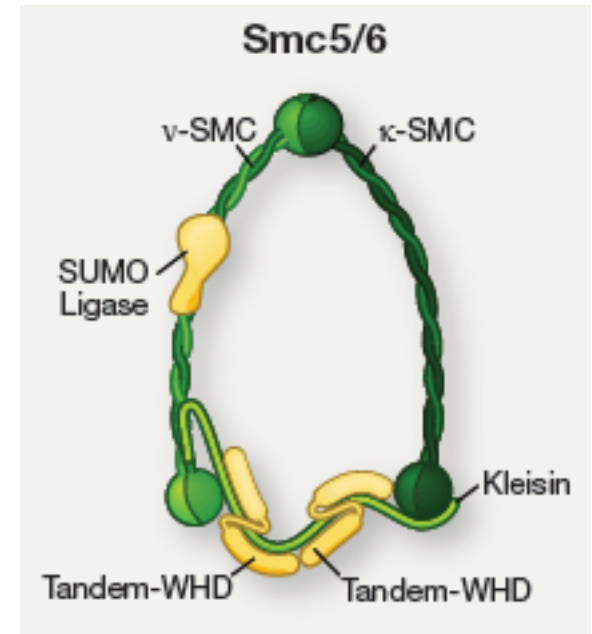


kondensin I a TopoII
 postačovaly pro rekonstrukci
 mitotických chromátid (z chromatinu
 obsahujícího H2A/H2B/H3/H4
 nukleosomy)



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 ...

