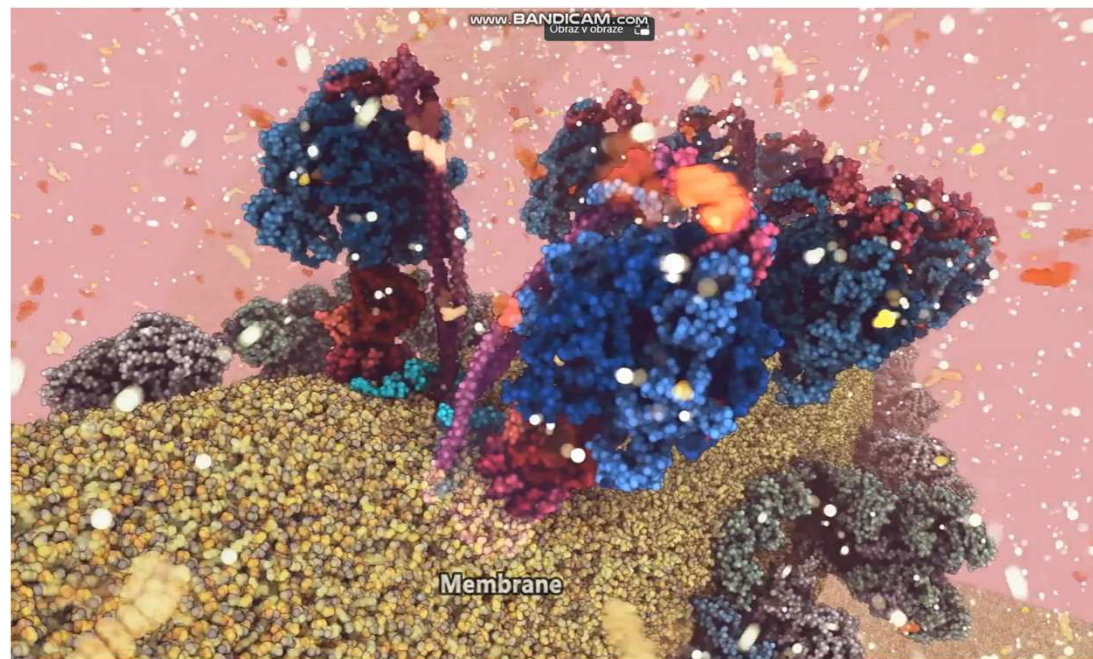


# Pomoc při vývoji vizualizačního nástroje (FI MU – doc. Kozlíková)

dotazník:

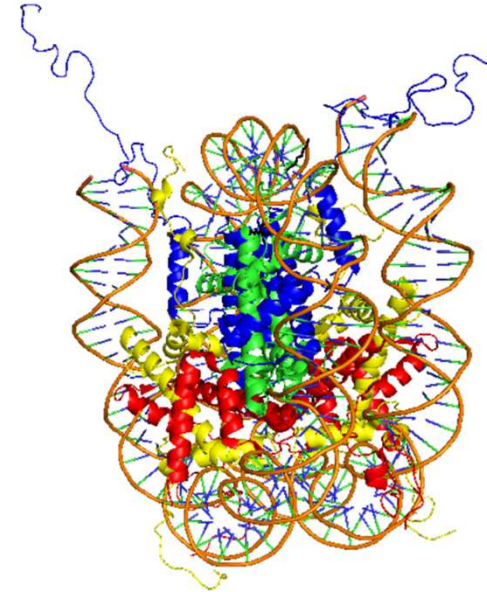
<http://decibel.fi.muni.cz/study/representations/>



[http://decibel.fi.muni.cz/study/representations/videos%20for%20website/version\\_4.mp4](http://decibel.fi.muni.cz/study/representations/videos%20for%20website/version_4.mp4)

# Zkouška: - test + přednáška

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

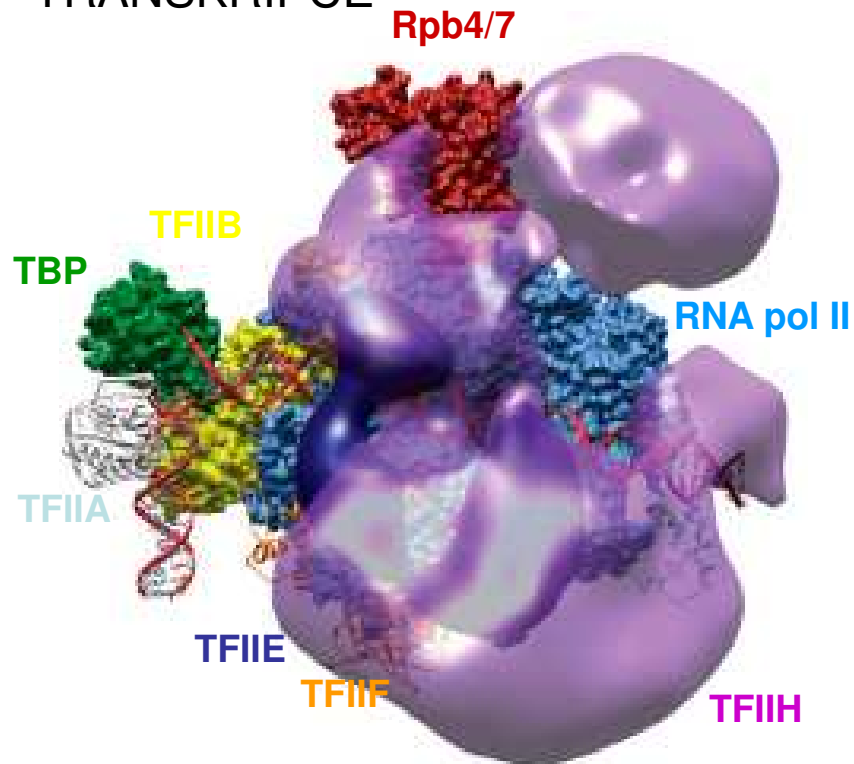


Ujasnit si souvislosti, rozšířit si znalosti, aplikovat poznatky z přednášek ...

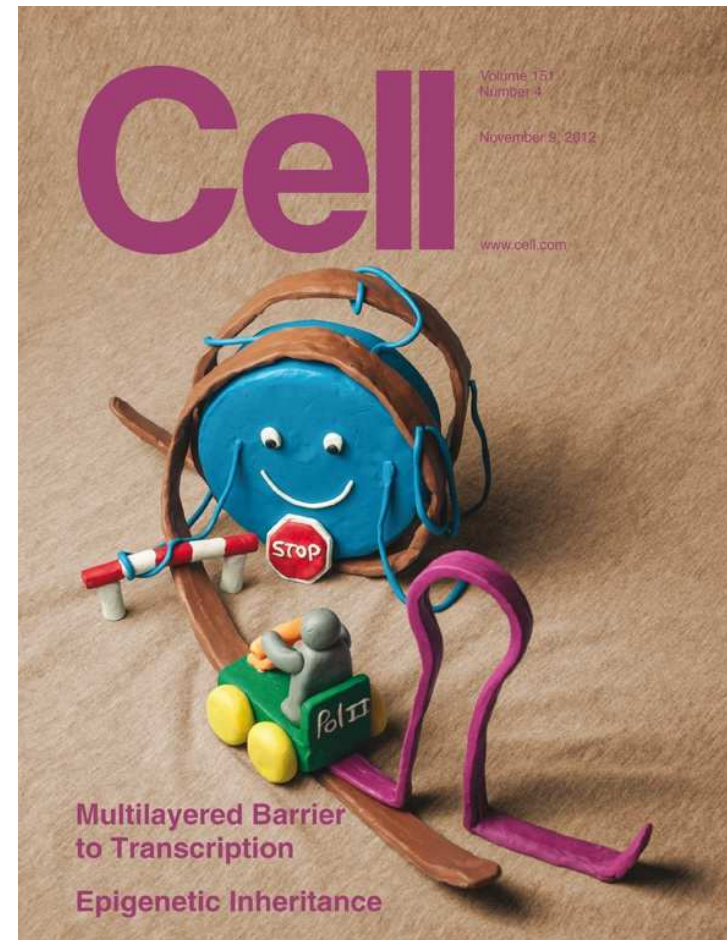
**12.05.2022 9.00 hod C2-2.11 zkouška (test + prezentace)**

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

## TRANSKRIPCE



kvasinkový PIC komplex  
Gibbons et al, PNAS, 2012

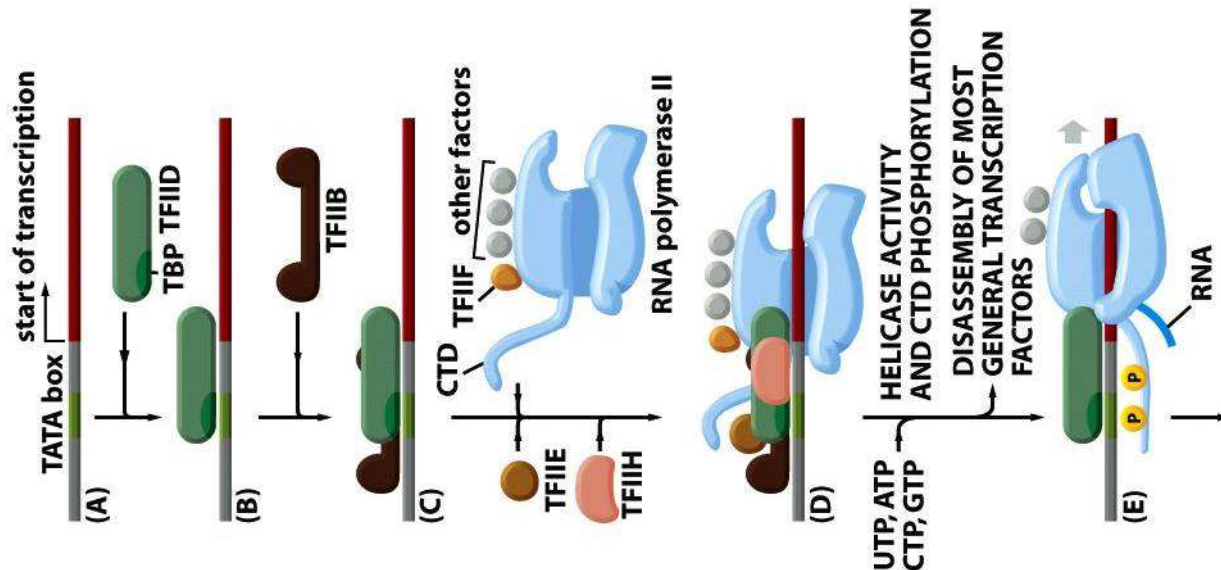


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)

Co zde schází??

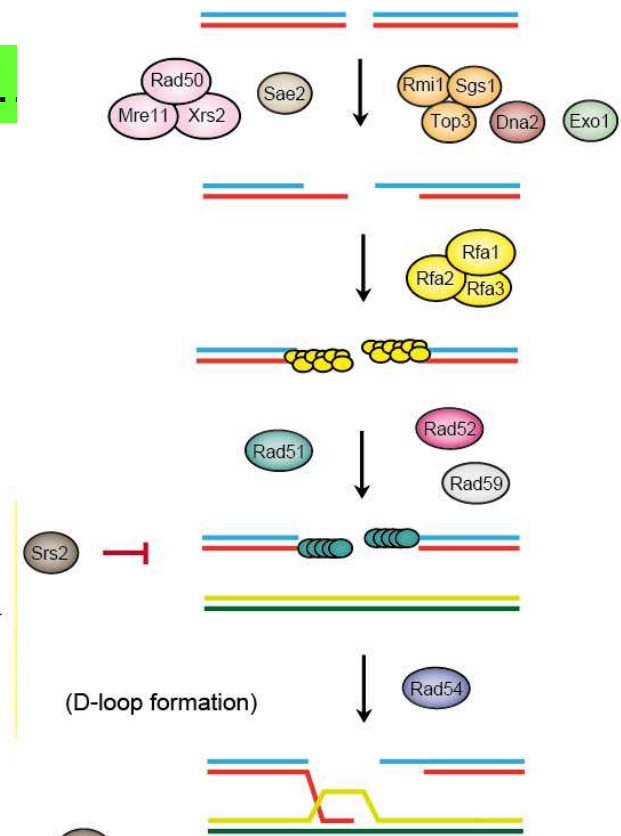
Chromatin = histony ..

## TRANSKRIPCE



## OPRAVA DNA

DSB



# chromosom

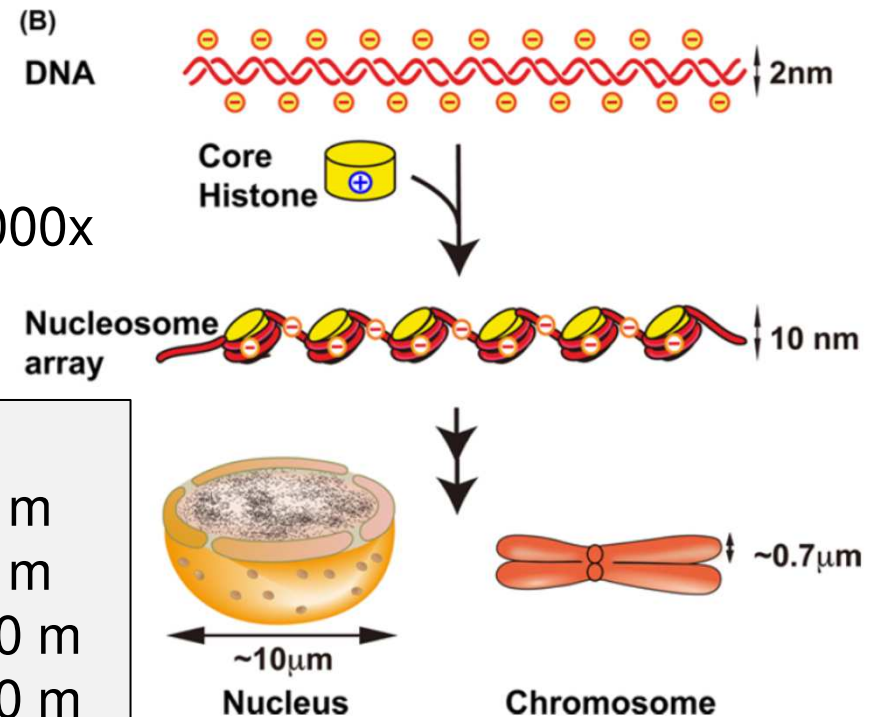
DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom  $3 \times 10^9$  bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4 cm!!)

Průměrný lidský chromosom:

DNA molekula: ~4 cm

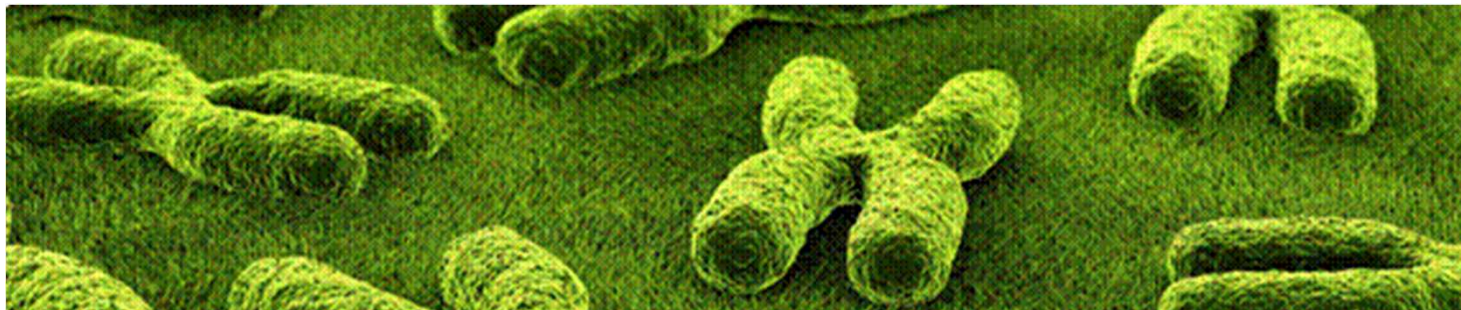
Mitotický chromosom ~4  $\mu$ m

10 000x



velikosti genomů:

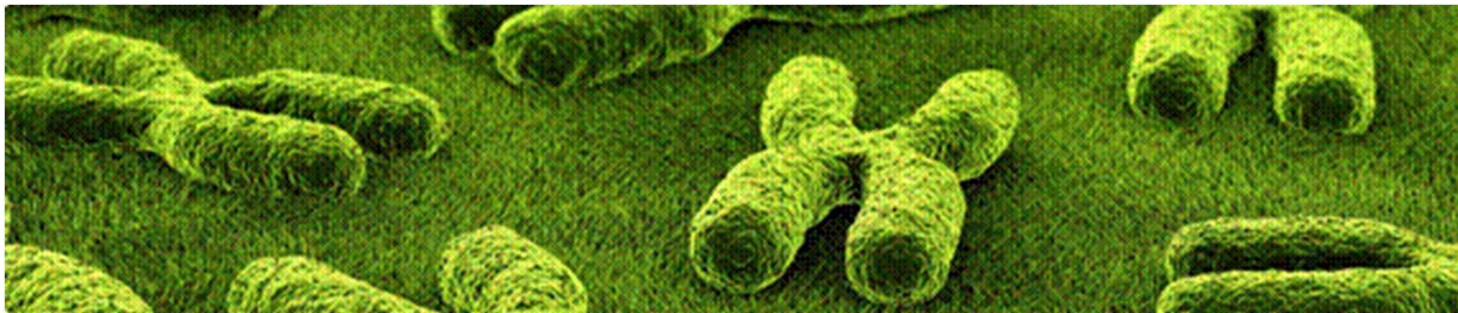
člověk	3 miliardy bp (x2 dipl)	2 m
fazole	13 miliard bp	9 m
lilie	90 miliard bp	60 m
salamandr	<120 miliard bp	80 m



# chromatin

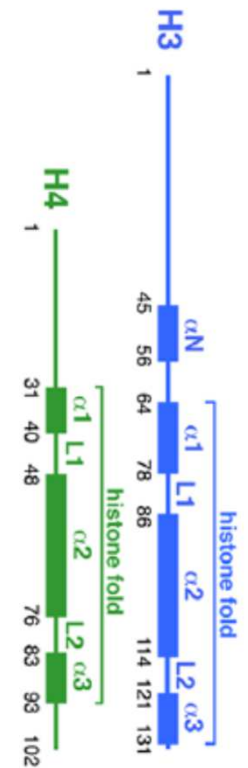
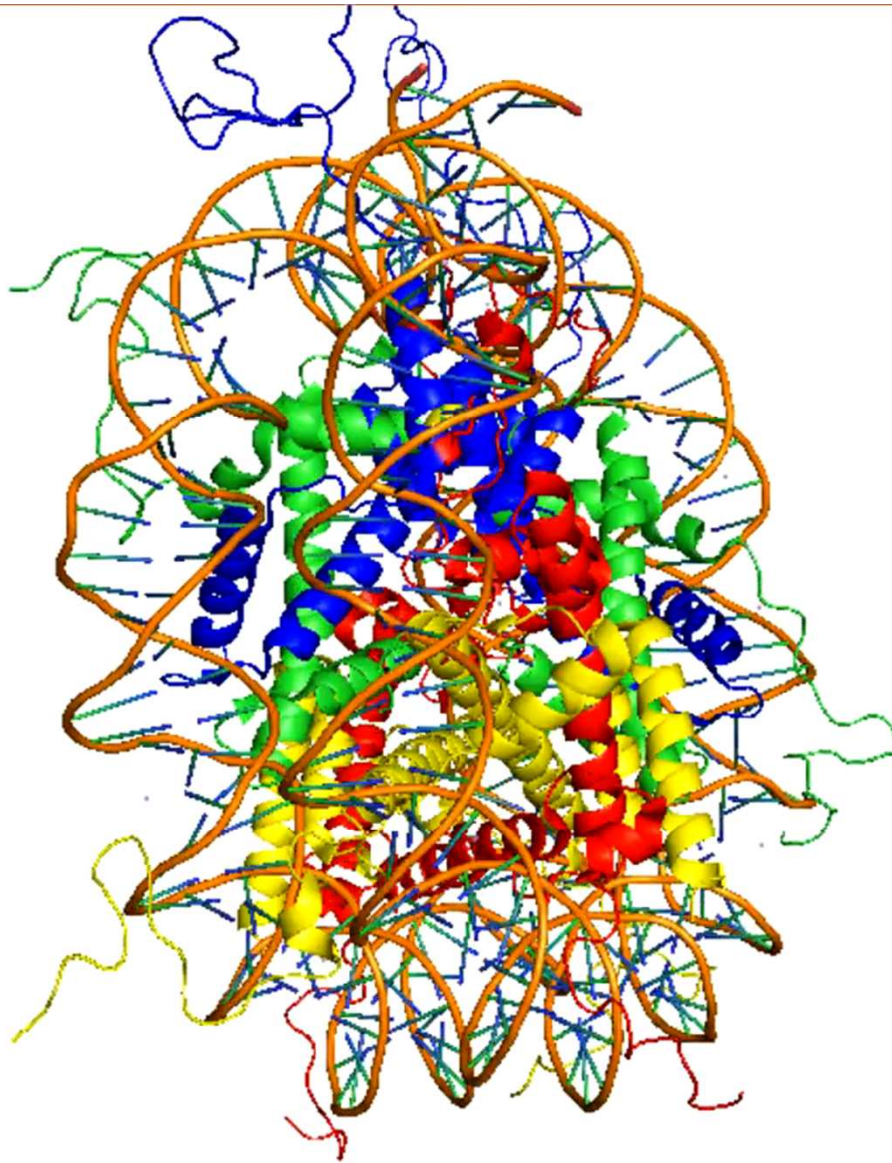
DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom  $3 \times 10^9$ bp – natažený řetězec 1chromosomu cca 4cm!!)

- komplexy vytvářející **strukturu chromatinu**
- vytváří základní strukturu
  - **nukleosomy** – chaperony, remodelační komplexy
  - histon **H1, HP1** protein
- vytváří specializované domény
  - centromery, telomery
- vytváří vyšší struktury a podílí se na dynamice
  - **SMC komplexy** - kohesin, kondensin a SMC5/6



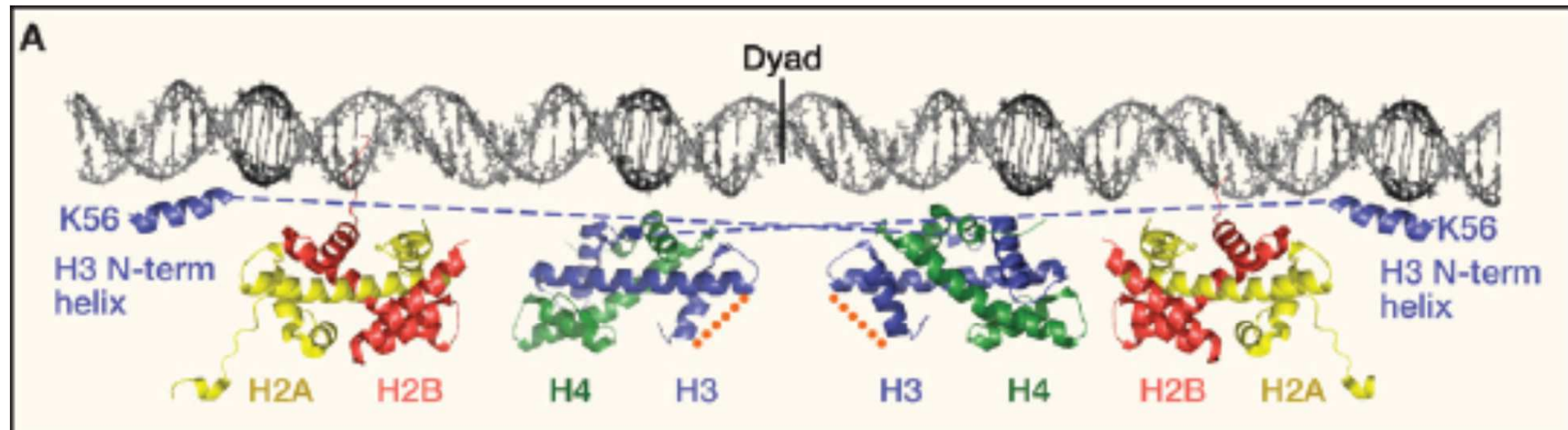
přednášky prof. Fajkuse:

Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041)

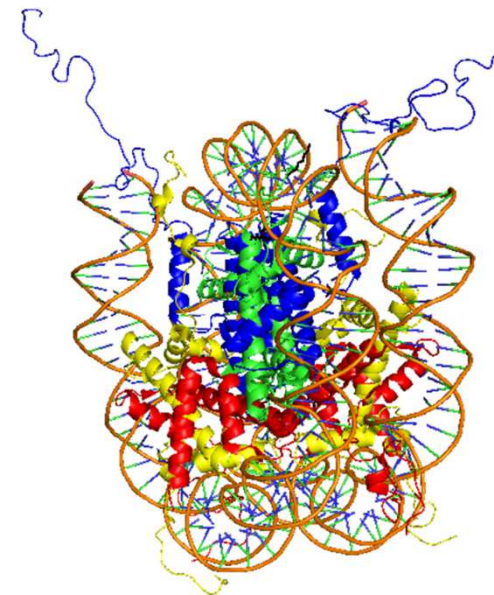


- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B PDB: 1KX5
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)

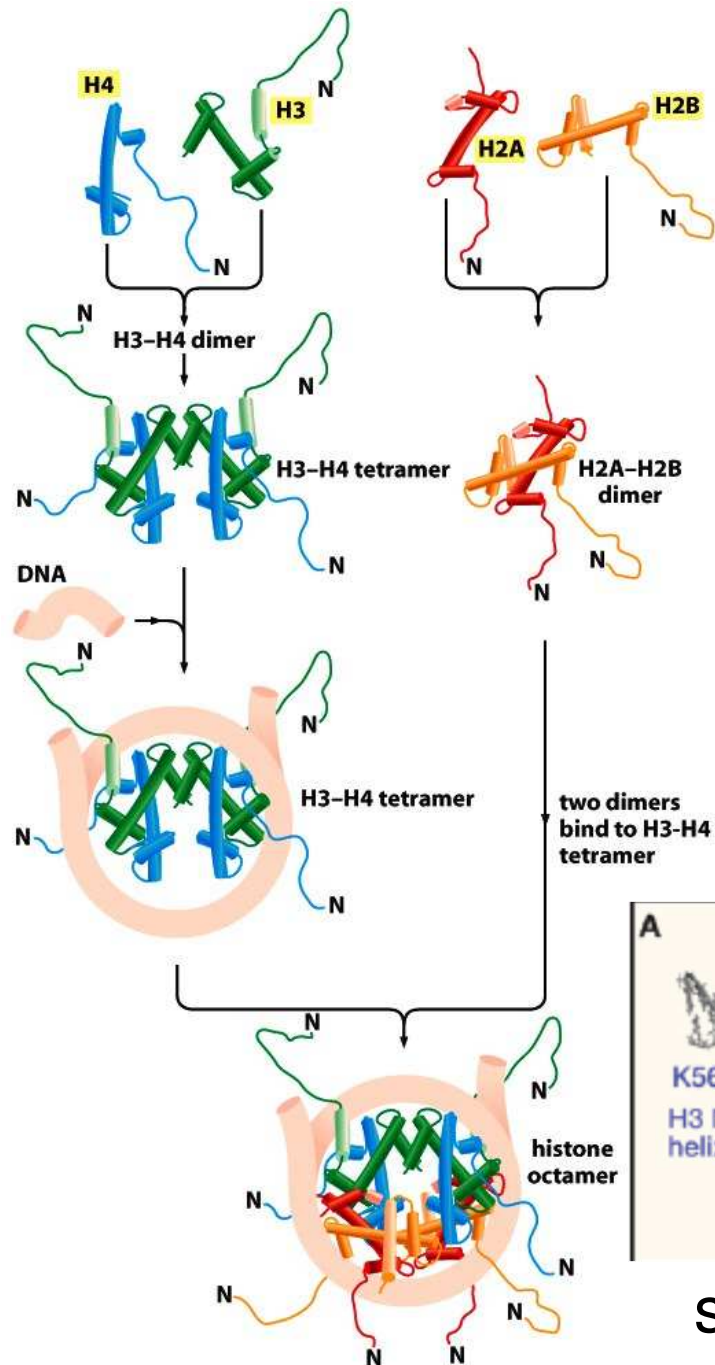
# Skládání histonů do nukleosomu (komplexu)



- 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)

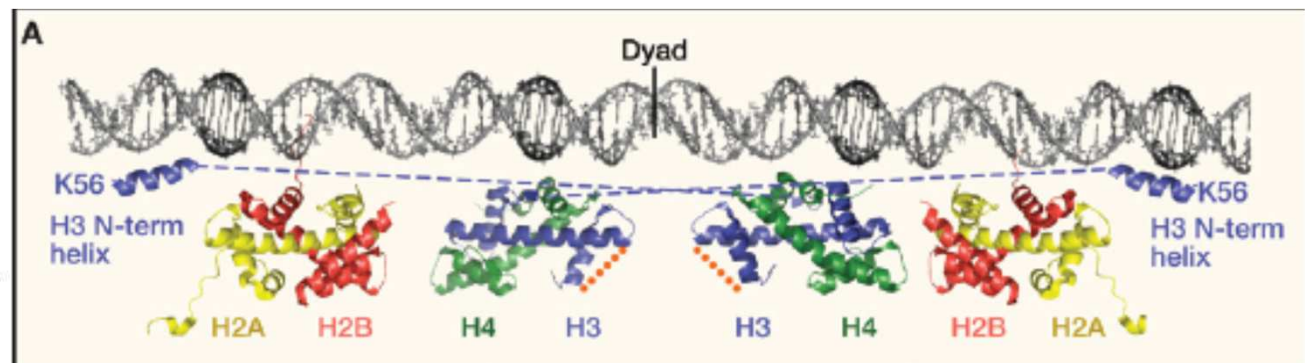




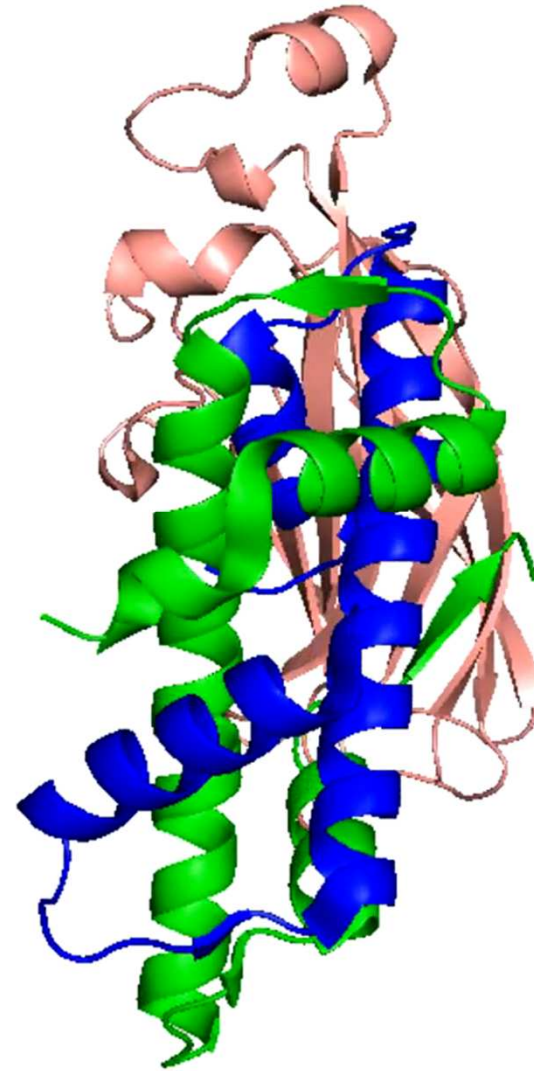
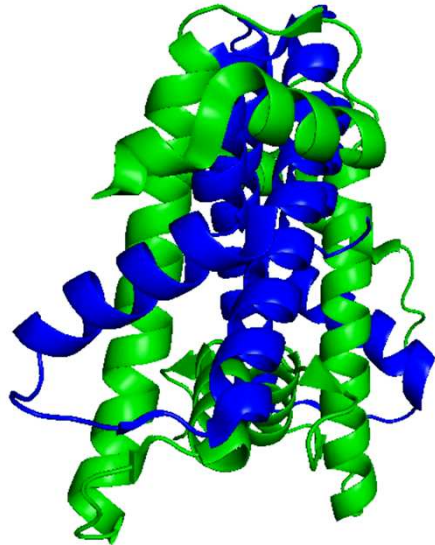
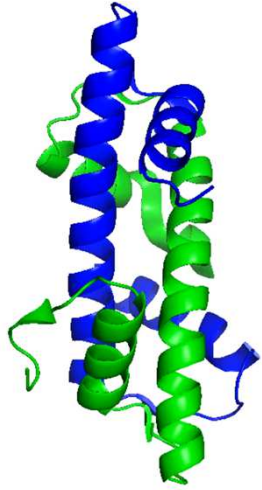


## Sestavování nukleozomu:

- 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

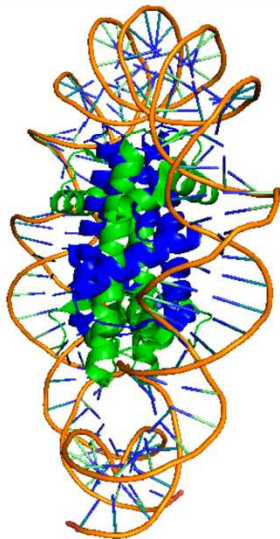
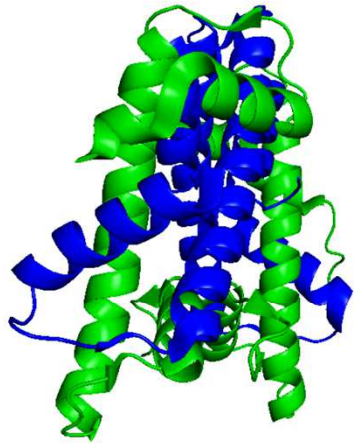


## sbalování a rozbalování nukleosomů

**H3-H4****ASF1** (antisilencing function)

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

H3-H4



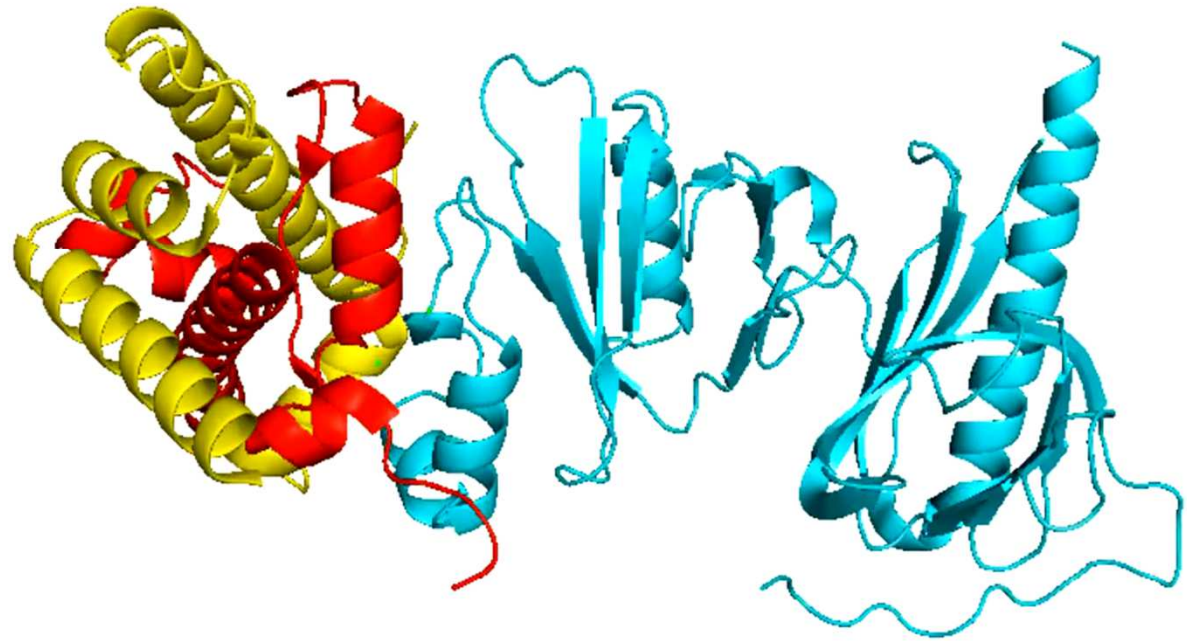
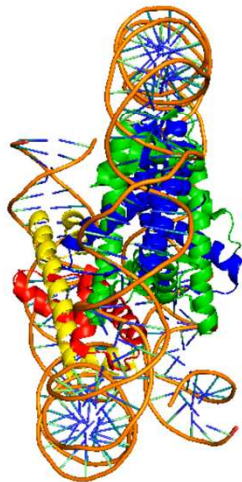
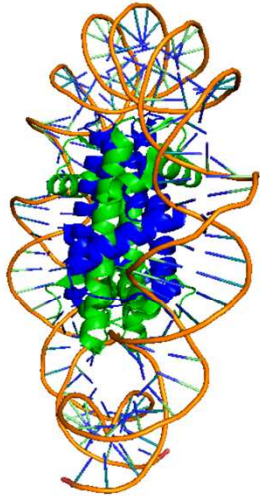
Song et al, G&D, 2008  
PDB: 3C9C



**CAF-1** (chromatin assembly factor)

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

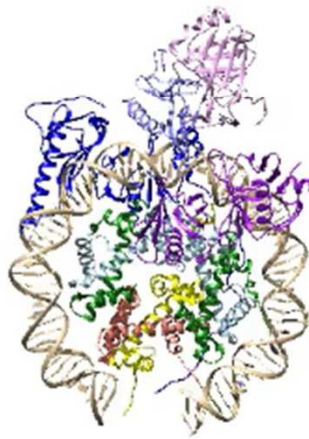
## H3-H4



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

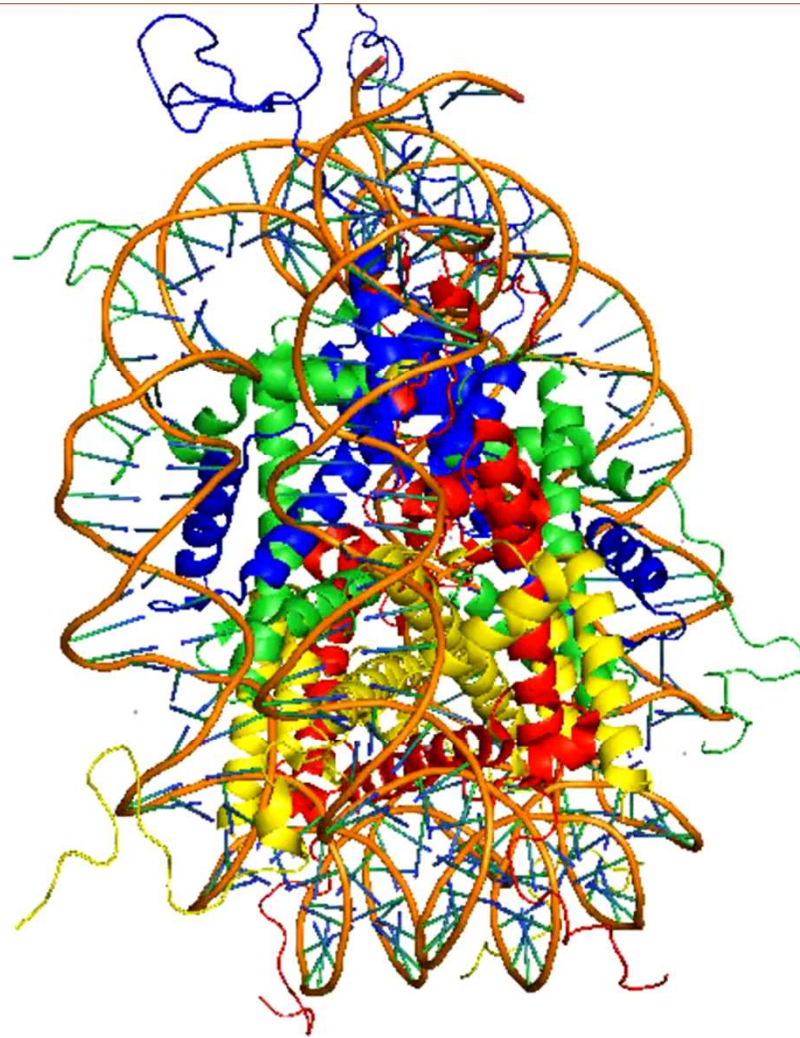
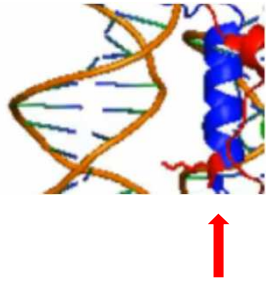
PDB: 4KHA

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



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

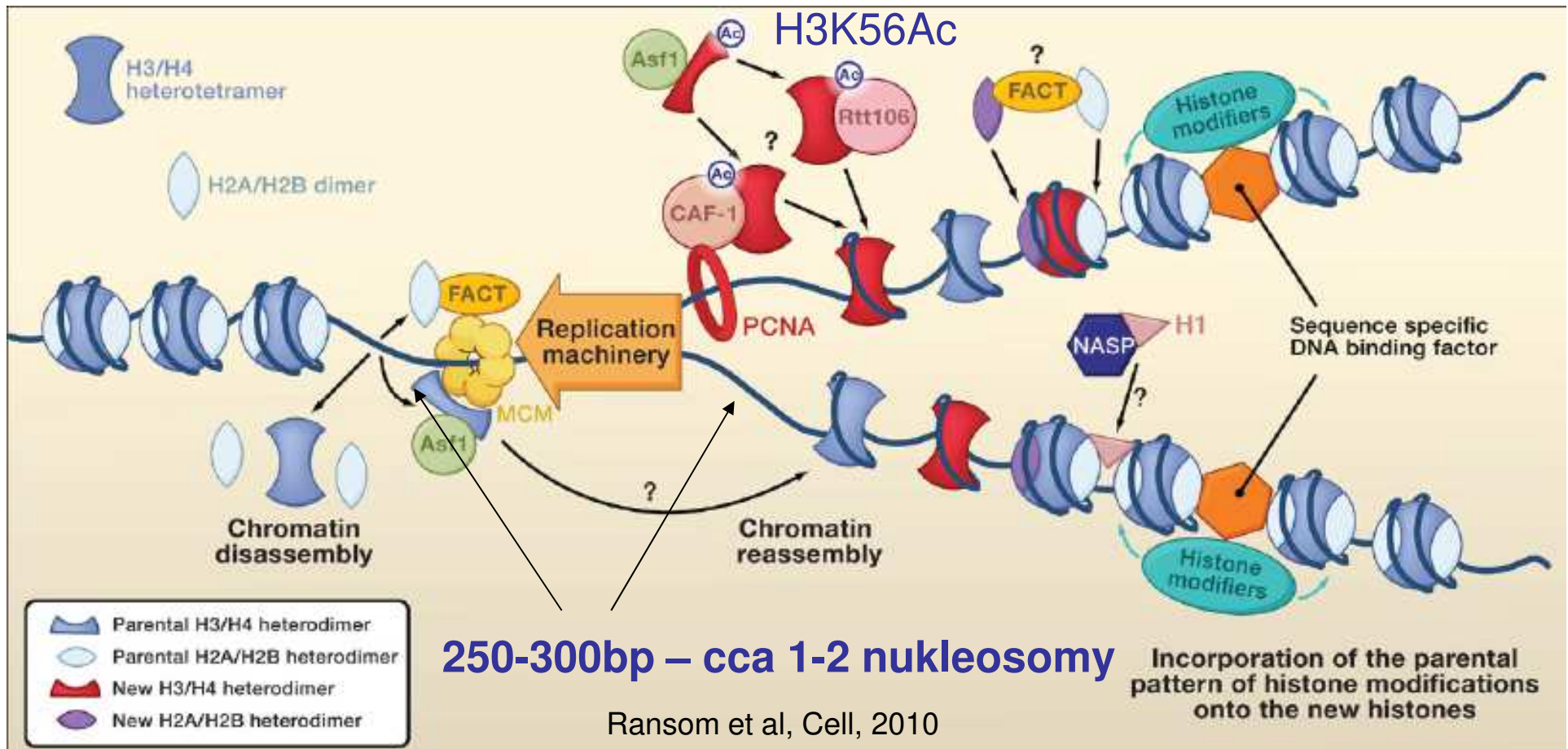
Liu et al., Nature, 2020



- 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)

# Histonové chaperony - replikace

- nukleosomy nejsou na ssDNA : replikace, oprava DNA, (transkripce) ...
- před těmito procesy se musí histony posunout nebo 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	<u>CAF-1</u> (p150, p60, p48)	PCNA, Asf1; chromatin assembly; heterochromatin silencing	PCNA, BLM, WRN, Asf1; chromatin assembly; promotes checkpoint recovery
	<u>Asf1</u>	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*
	<u>FACT</u> (Spt16 and Pob3); also binds H3/H4	MCM, RPA, DNA pol I; chromatin assembly*; chromatin disassembly*	$\gamma$ H2AX/H2B exchange for H2A/H2B
H2A/H2B	NAP1	Histone shuttling; chromatin assembly**; chromatin disassembly**	
	Chz1		H2AZ.H2B exchange for H2A/H2B; promotes DNA resection
	NASP	Chromatin assembly*	
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.

- funkce při replikaci ...
- funkce při opravě DNA (napomáhá výměně H2A za specifický fosfo  $\gamma$ H2AX)
- ... další chaperony a remodelační faktory ... specifické varianty H3 a H2A



# Histonové varianty

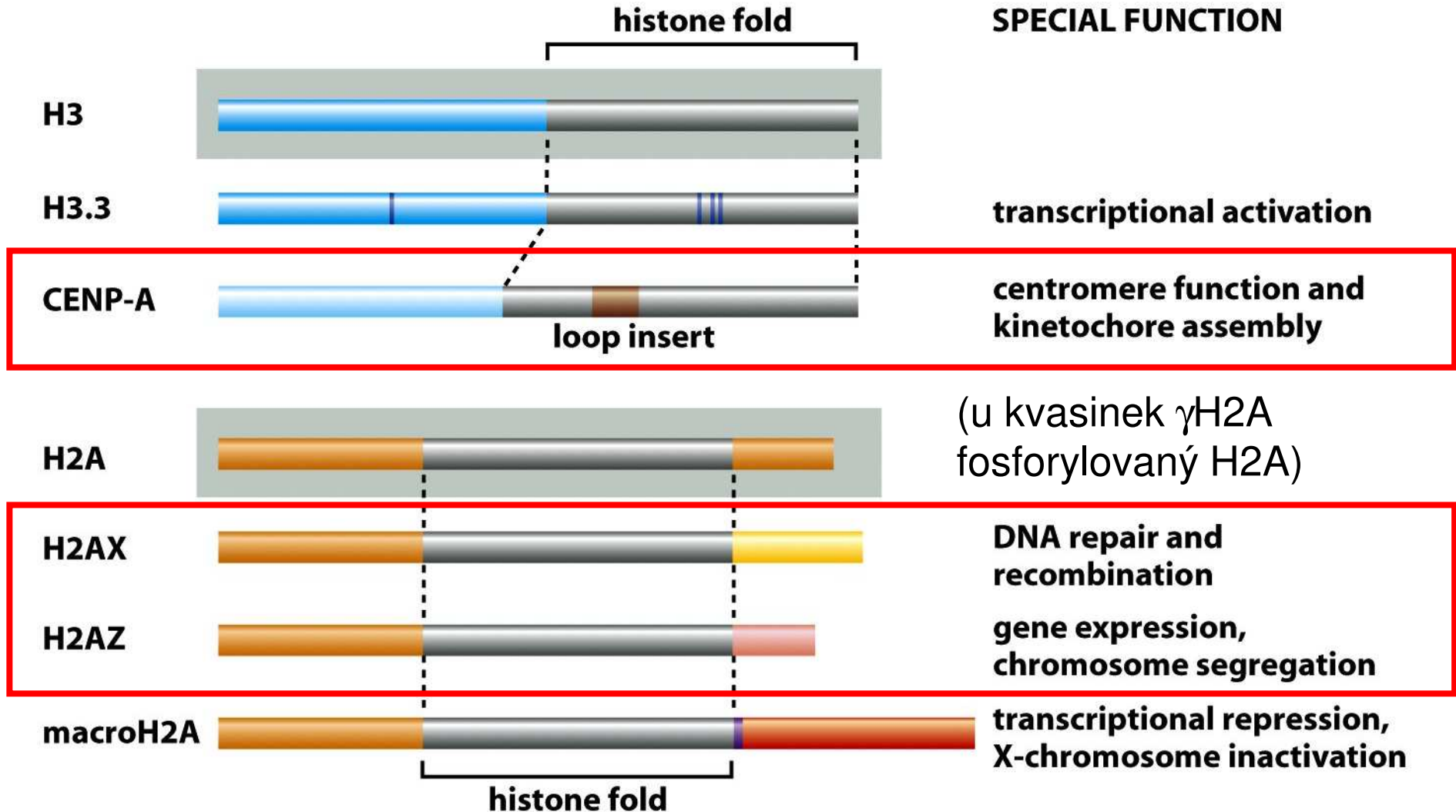
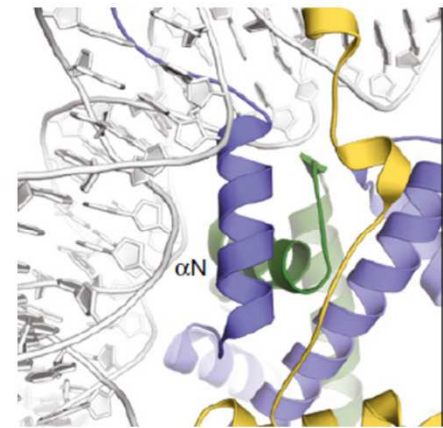
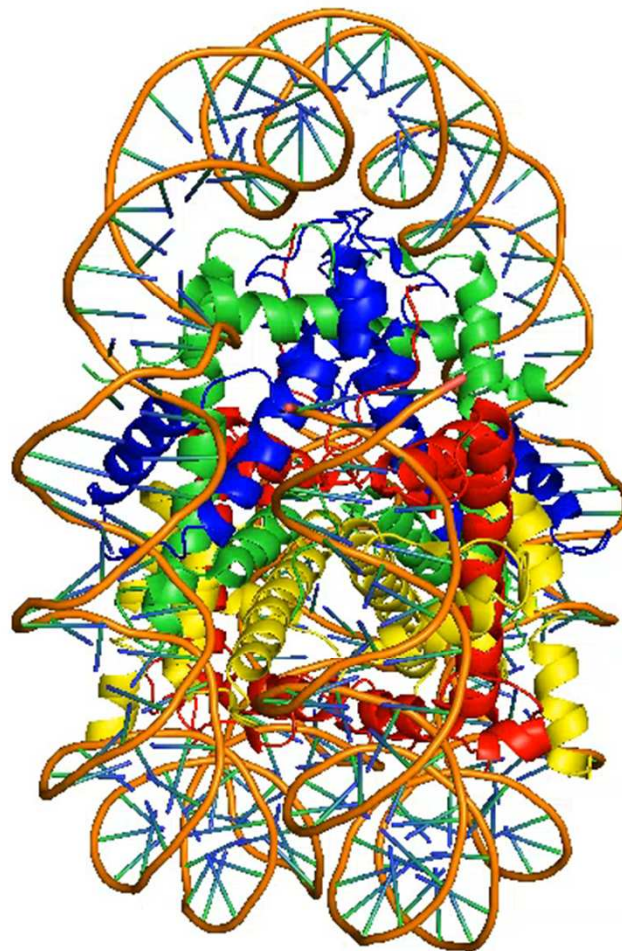
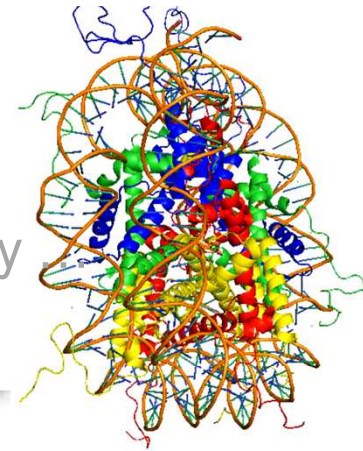
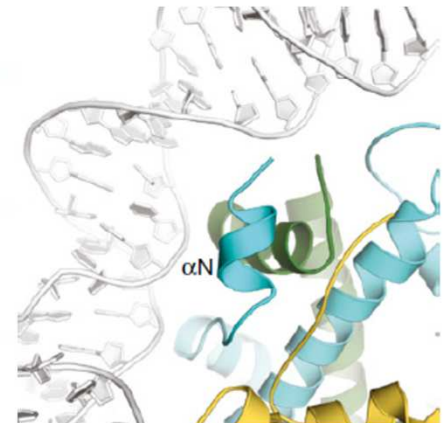


Figure 4-41 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008) Mattioli et al, EMBO Rep, 2015

- 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



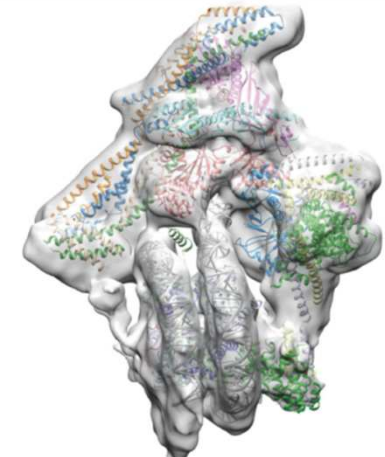
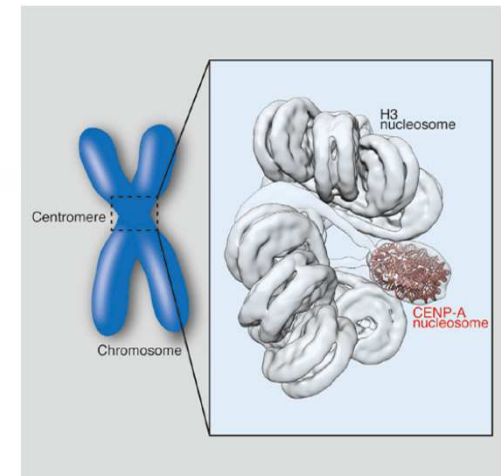
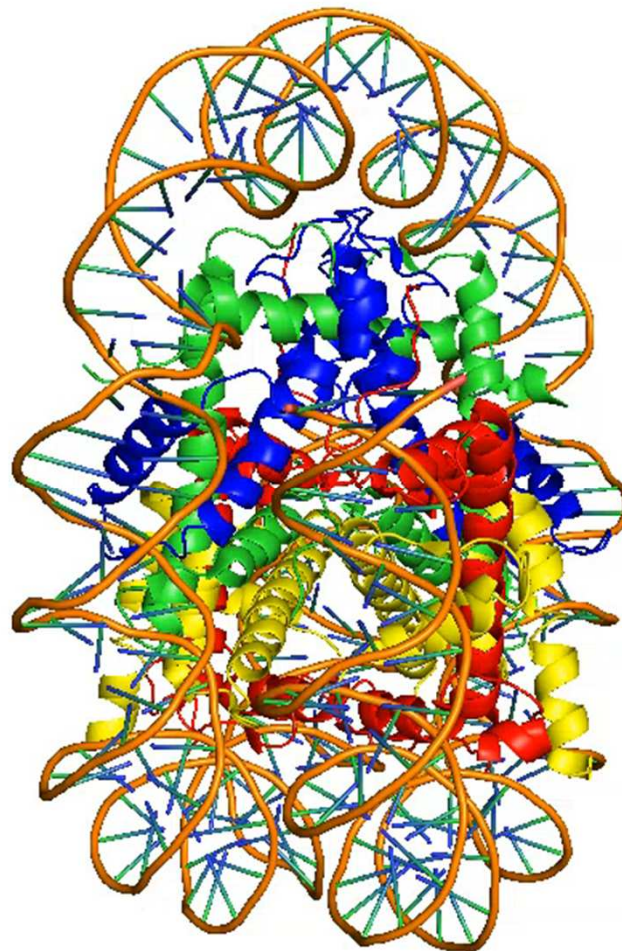
PDB: 3AN2

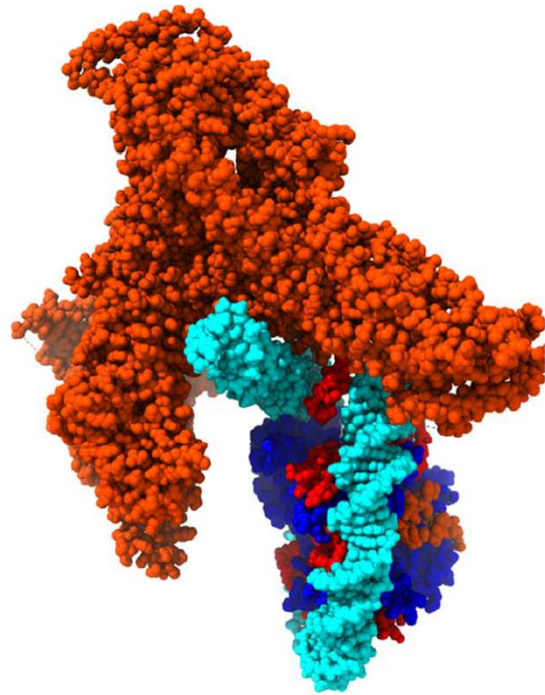


- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice
- CENP-A (H3 varianta) má kratší šroubovici
- vazba na DNA je slabší tj. otevřenější struktura - přístupnější
- ... jiný interakční povrch pro specifické interakční partnery ...

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

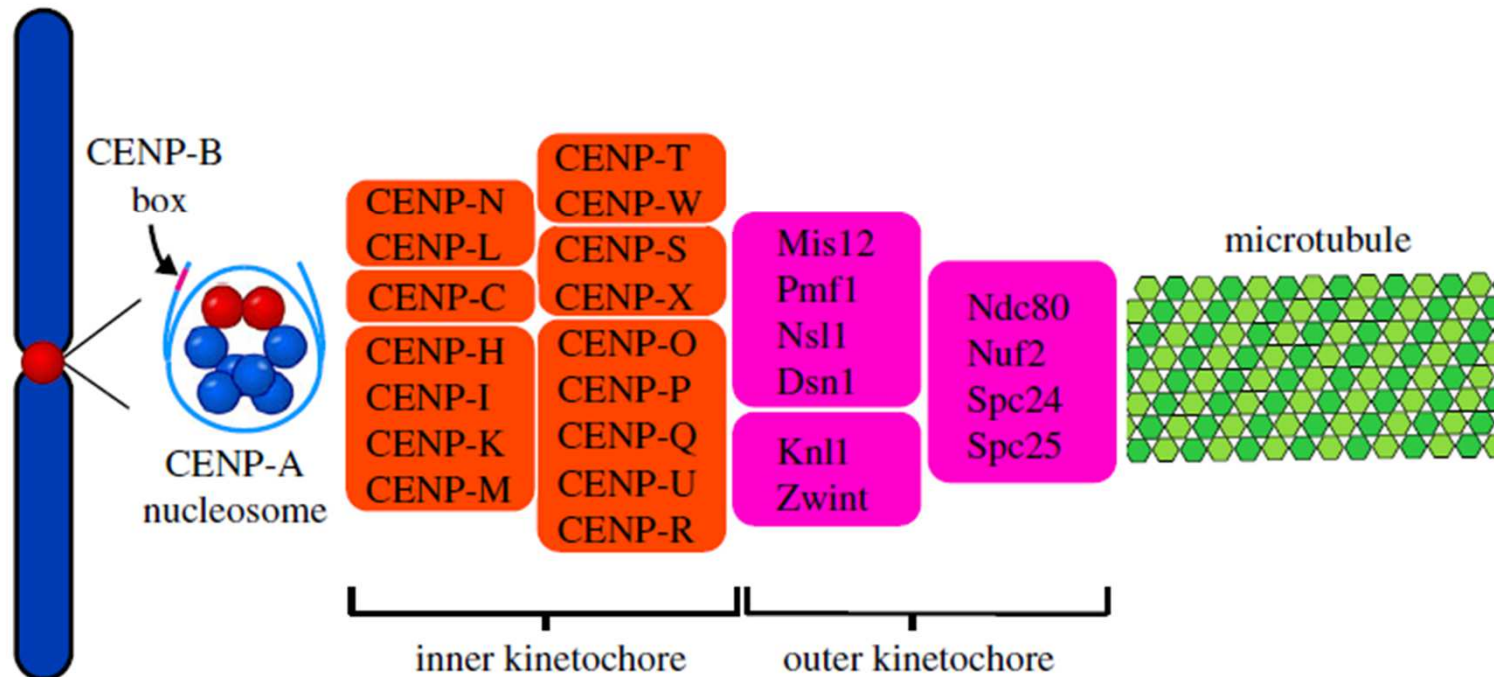
aining)



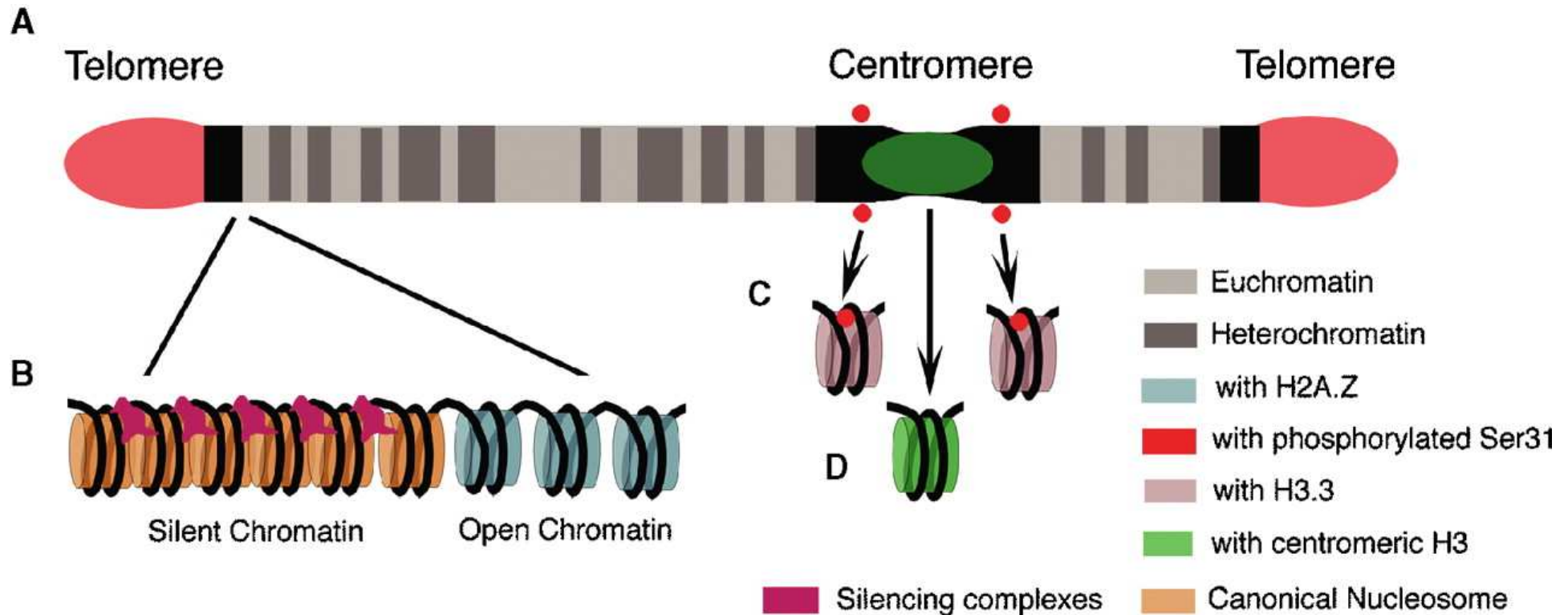


CENP-A(H3) nukleosom a další CENP proteiny tvoří vnitřní kinetochoru ... kotví vnější kinetochoru a mikrotubuly

Yan et al., Nature, 2019  
Kixmoeller a spol, Open Biol, 2021



# 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 variantu H3.

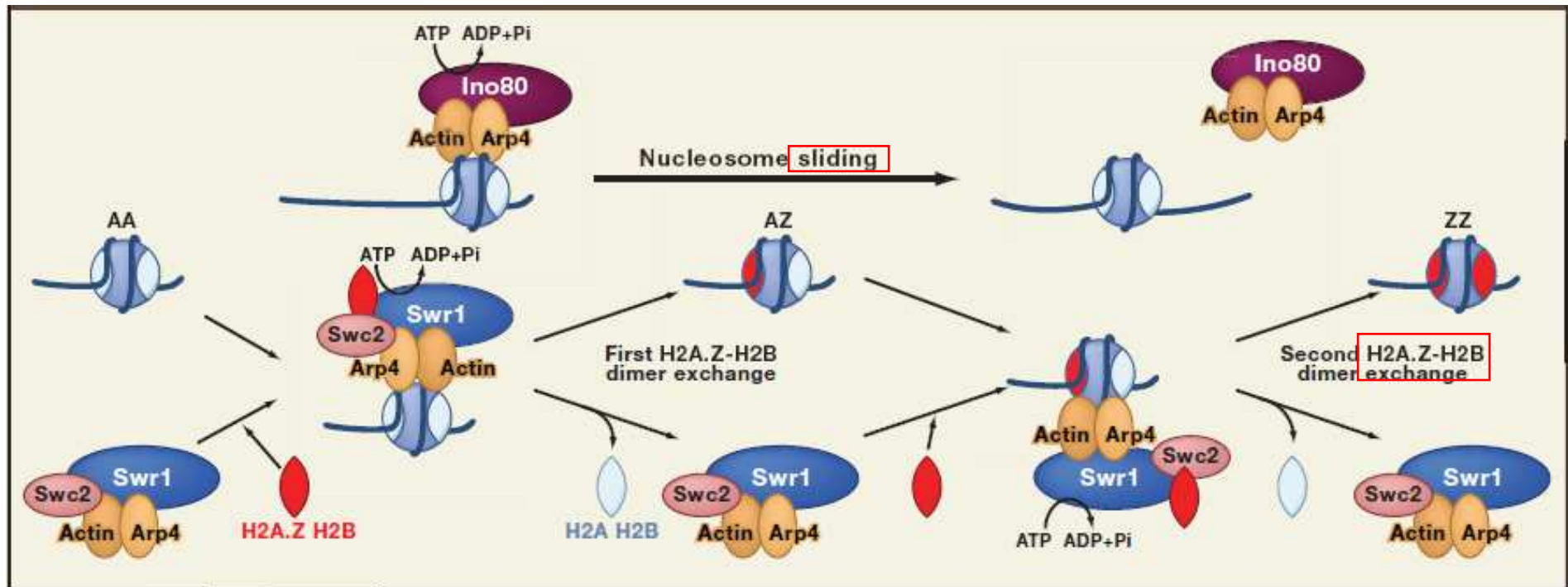
- **CenH3/CENP-A** ... specificky v centromerách
- **H2A.Z** - v regulaci transkripce, opravě DNA, **hranice chromatinu** (integrita centromer a telomer)

# Remodelovací komplexy

- ATP-dependentní remodelace (SWI2/SNF superrodina)
- „sklouznutí“ (INO80) nebo „výměna“ histonových dimerů (SWR)

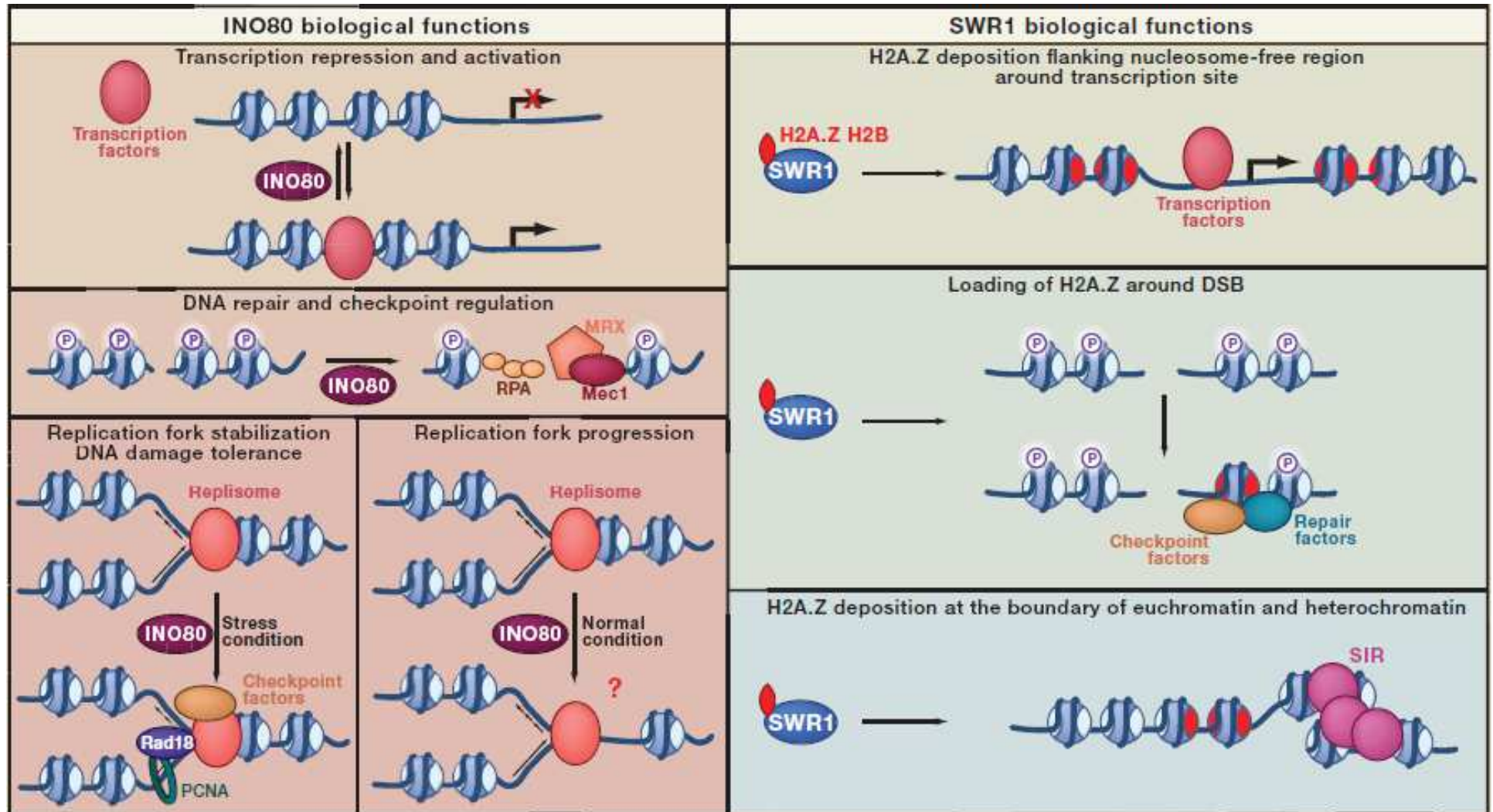
Billon a Cote, BBA, 2012

Bao, Snapshot-Cell, 2010



SWR komplex specificky zaměřuje (exchange) H2A-H2B dimer za H2A.Z-H2B

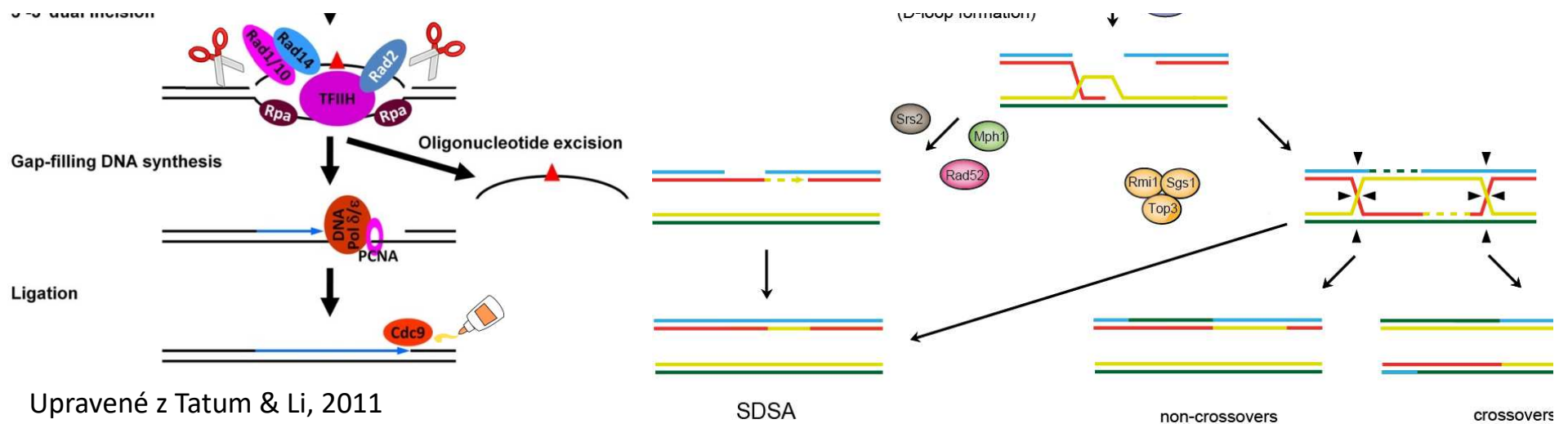
- „sklouznutí“, rozložení, odstranění nukleosomu nebo „výměna“ histonových dimerů



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

# Oprava poškozené DNA - chromatin

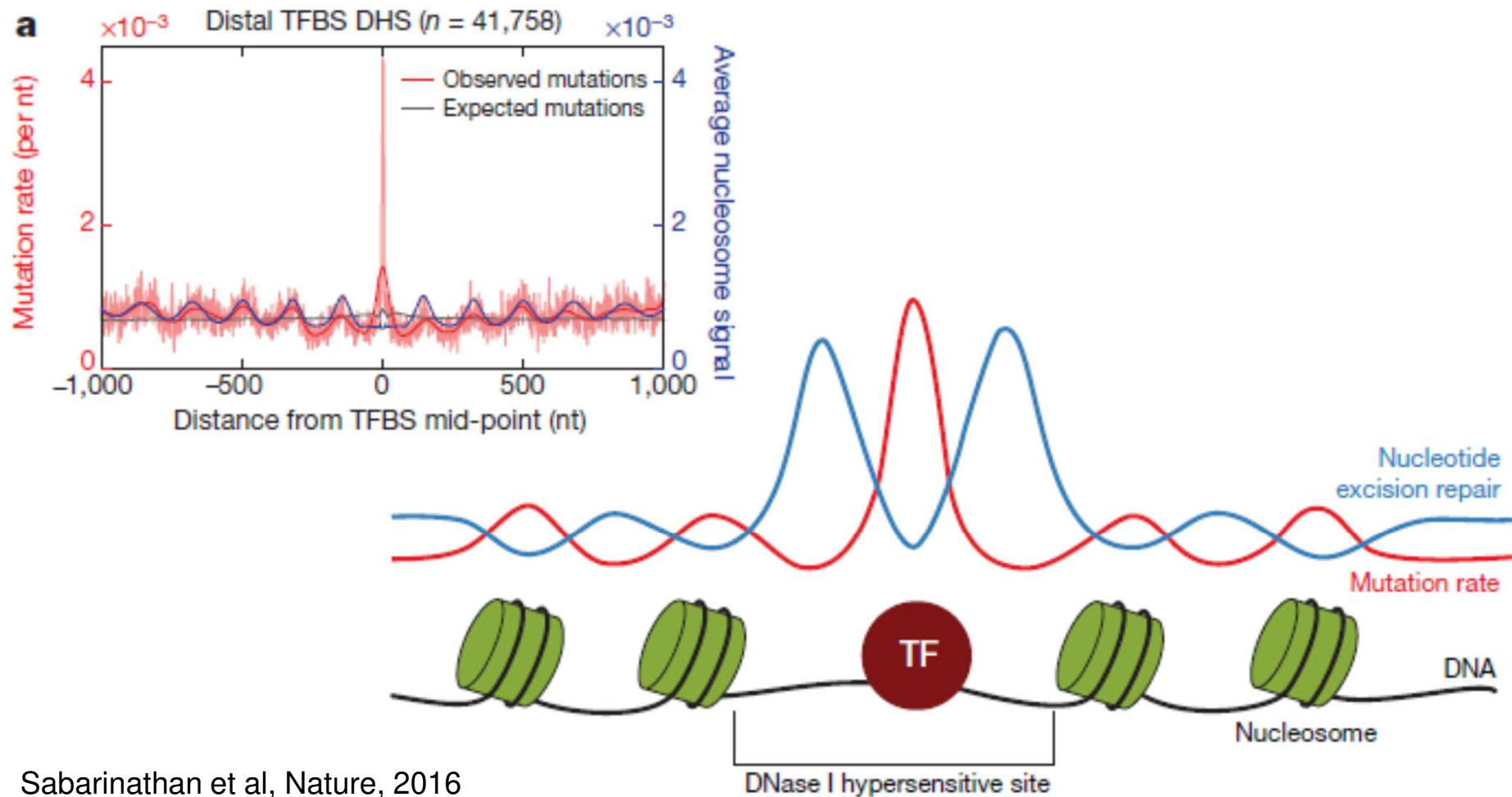
- nukleosomy nejsou na ssDNA ... **oprava DNA**
- před těmito procesy se musí histony odstranit a poté zase nabalit ...
- pro malá poškození (NER, BER) stačí menší změny chromatinu zatímco pro větší (DSB - resekce DNA tj. vznik ssDNA) musí nukleosomy odstranit
- **NER (BER)** doprovázeno acetylací histonů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



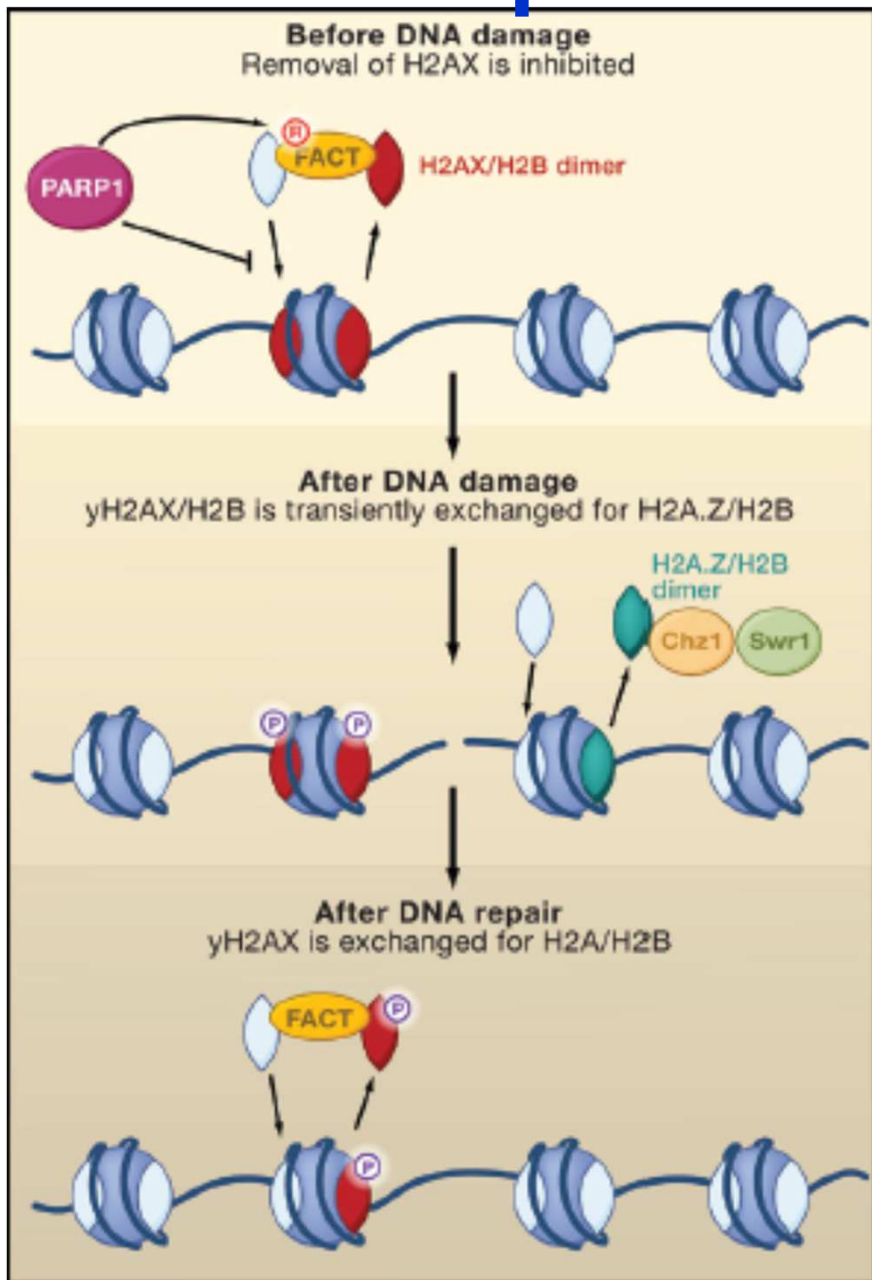


# NER oprava - chromatin

NER je méně účinný (DNA je méně přístupná) v místech okupovaných nukleosomy (a transkripčními faktory)

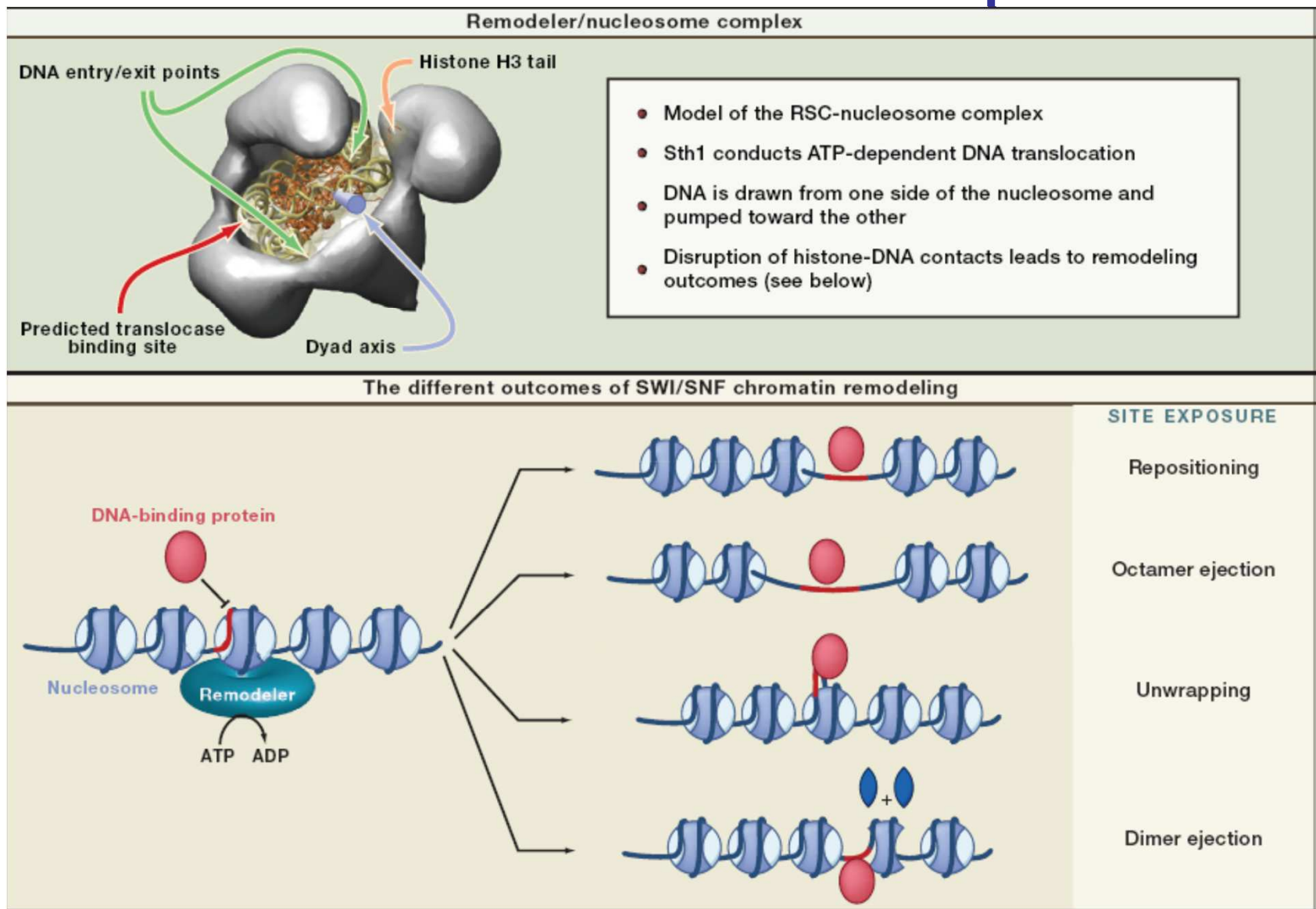


# DSB poškození – chromatin



- DSB signalizuje/spouští „DNA damage checkpoint“ - kinasy
- **H2A.X varianta** je fosforylována (okolí poškození ~50kb během 15min; H2A u kvasinek)
- po opravě poškození je  $\gamma$ 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

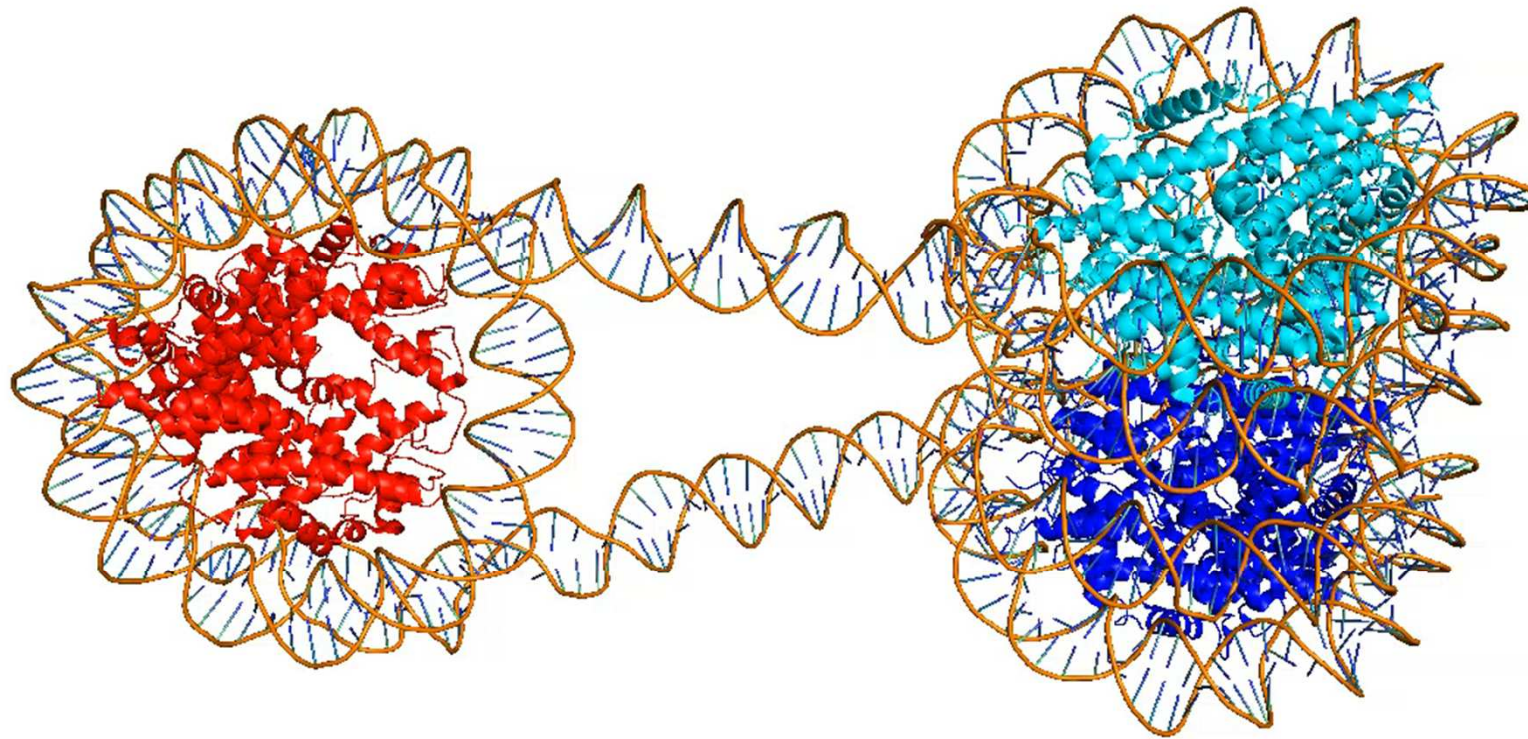
# RSC remodelovací komplex



SNAPSHOT, Cell (144), 2011

Fig

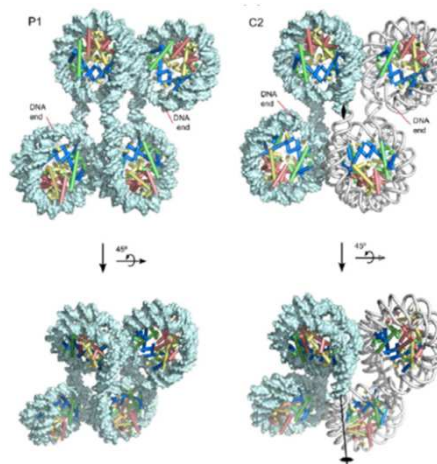
RSC (SWI/SNF) komplexy obklopí nukleosom (rozvolní se vazba s DNA a posouvá se)



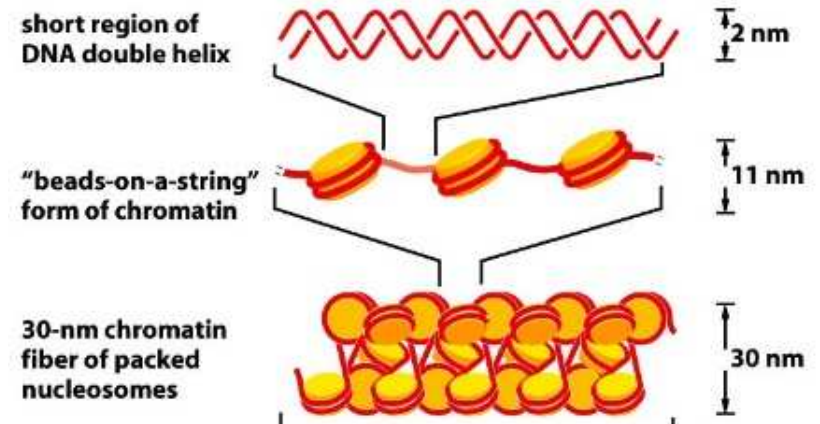
pravidelné  
uspořádání v  
krystalech a za  
specifických  
podmínek ...

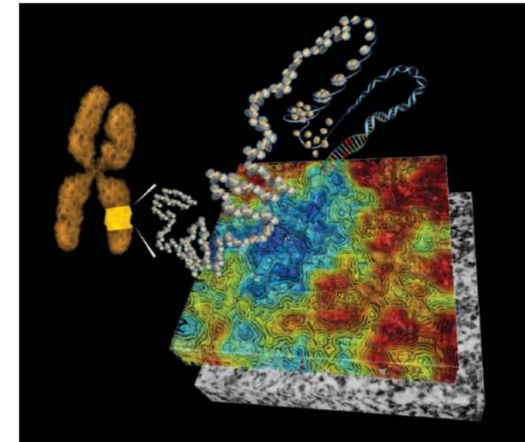
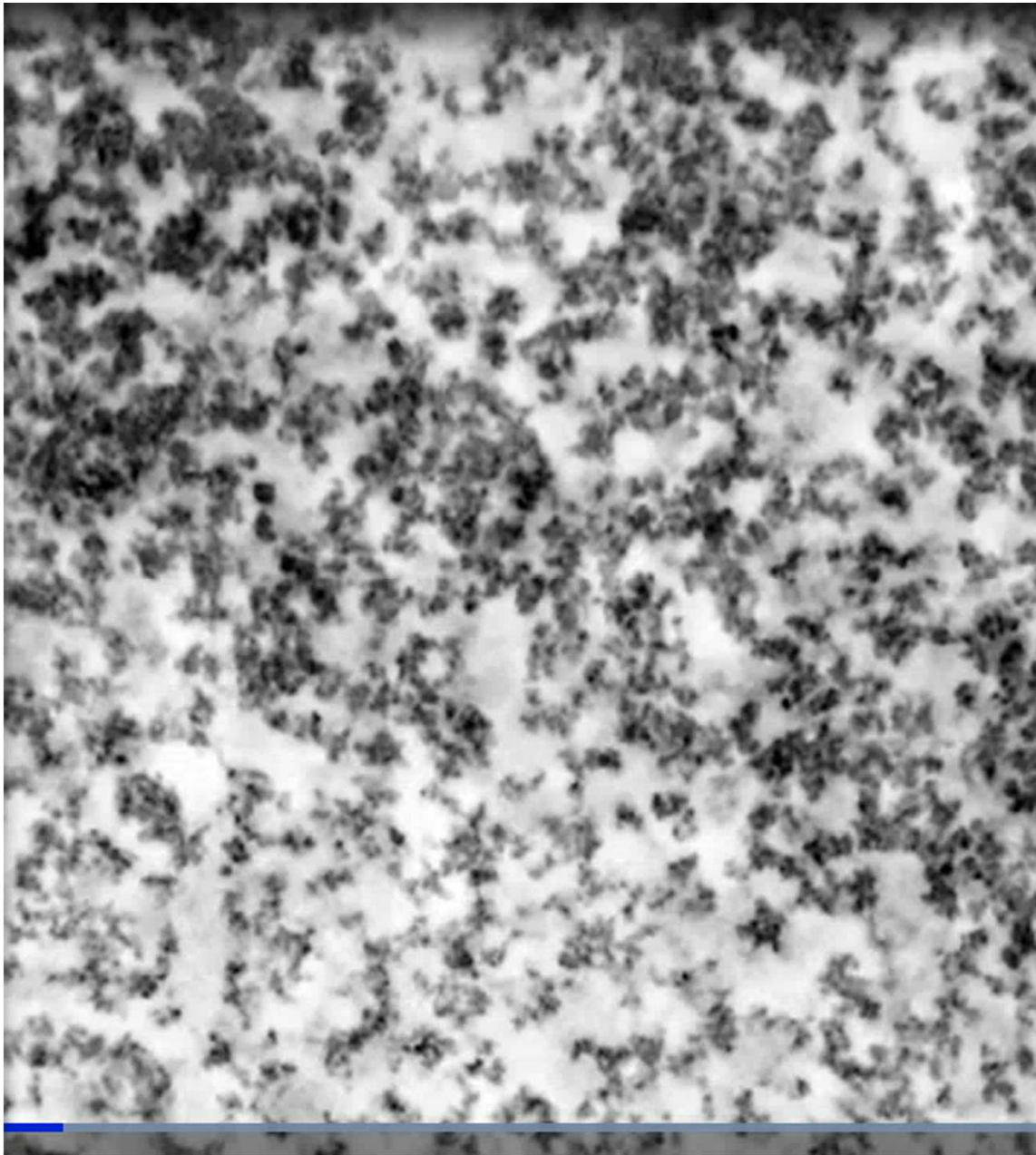
PDB: 6L49

Ekundayo et al, JMB, 2017

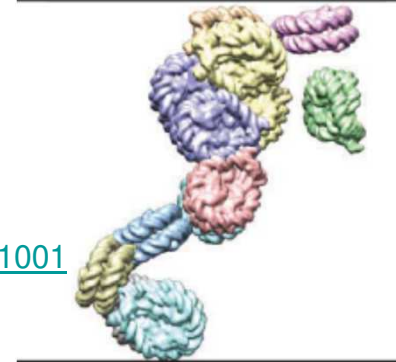


## Chromatinová struktura?





cryoEM jádra  
nepravidelné uspořádání  
nukleosomů

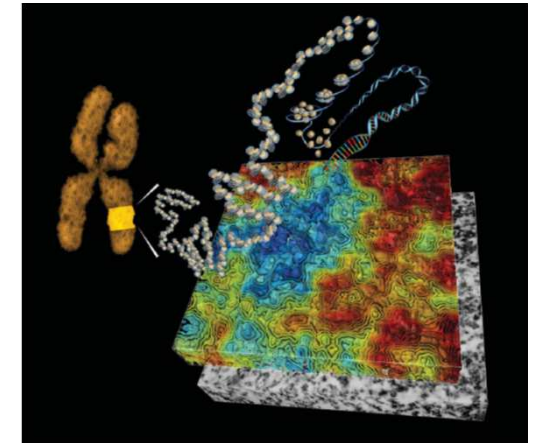


[https://players.brightcove.net/53038991001/Byx2STOH0\\_default/index.html?videoId=5522198641001](https://players.brightcove.net/53038991001/Byx2STOH0_default/index.html?videoId=5522198641001)

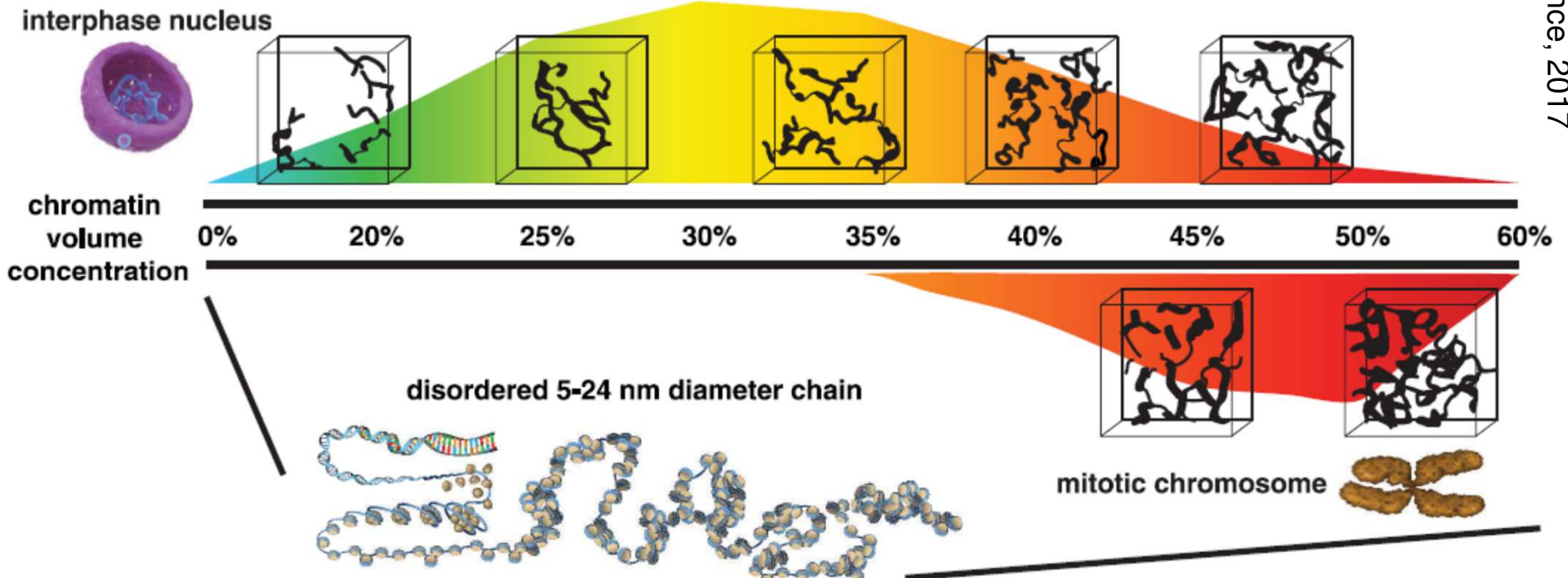
Ou a spol, Science, 2017

# Chromatinová vlákna

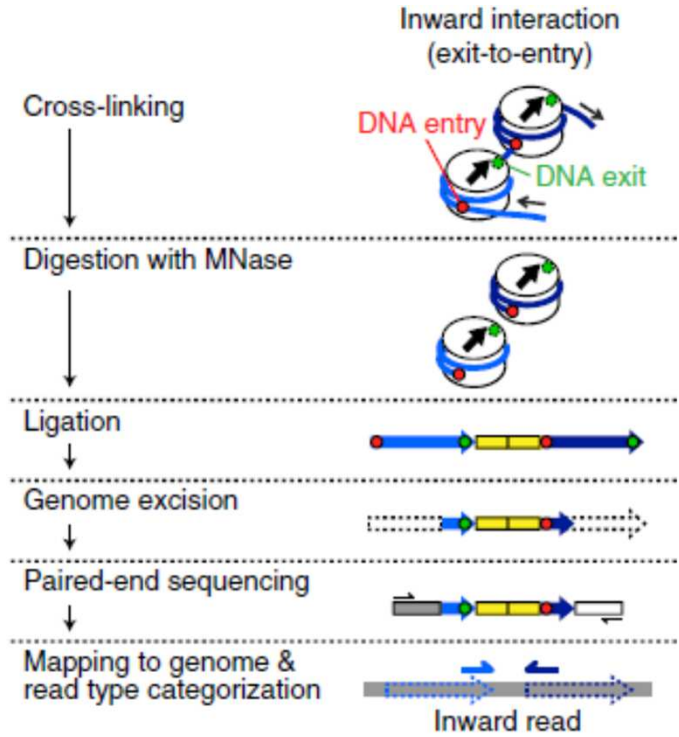
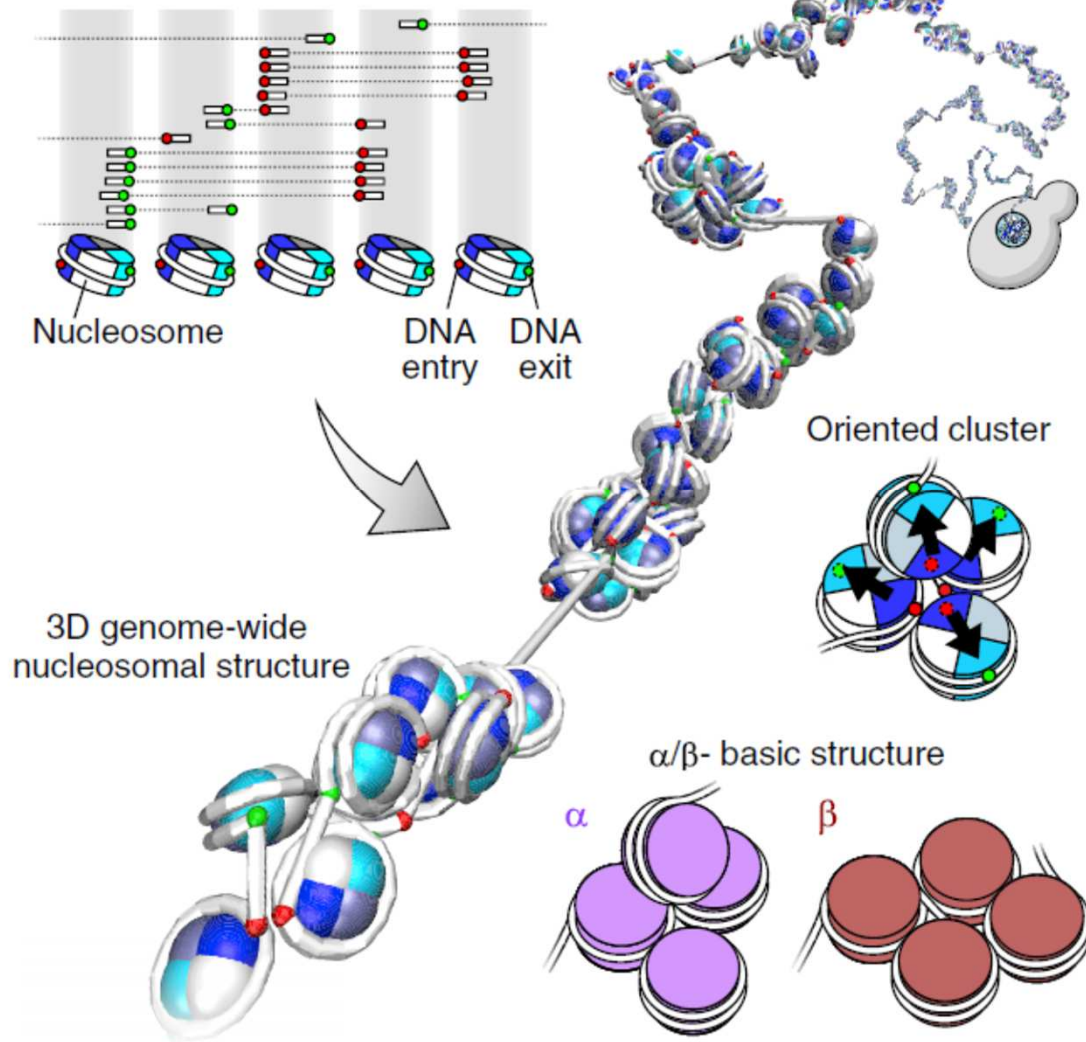
neuspořádaný řetězec 5-24nm (žádný 30nm coil)



Ou a spol., Science, 2017

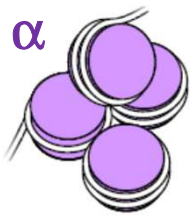
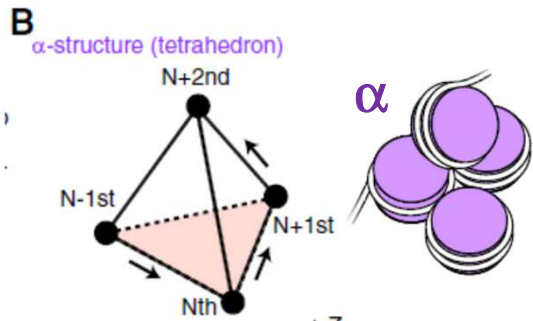


Sub-nucleosomal interaction analysis

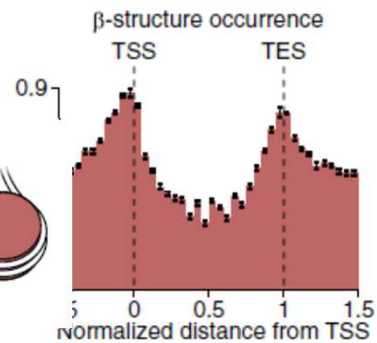
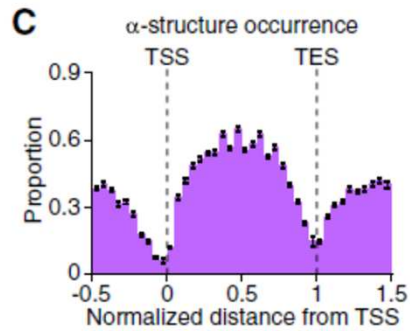
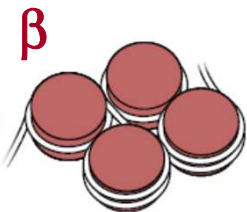
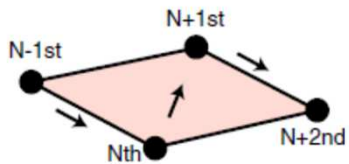


kombinace Hi-C a mapování pozic nukleosomů = Hi-CO

2 typy sbalení (4) nukleosomů: **pyramidální** (jako  $\alpha$ -šroubovice) je kompaktnější; **kosočtverec** (jako  $\beta$ -list plochý) je otevřenější



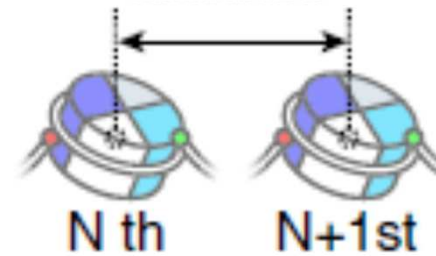
$\beta$ -structure (rhombus)



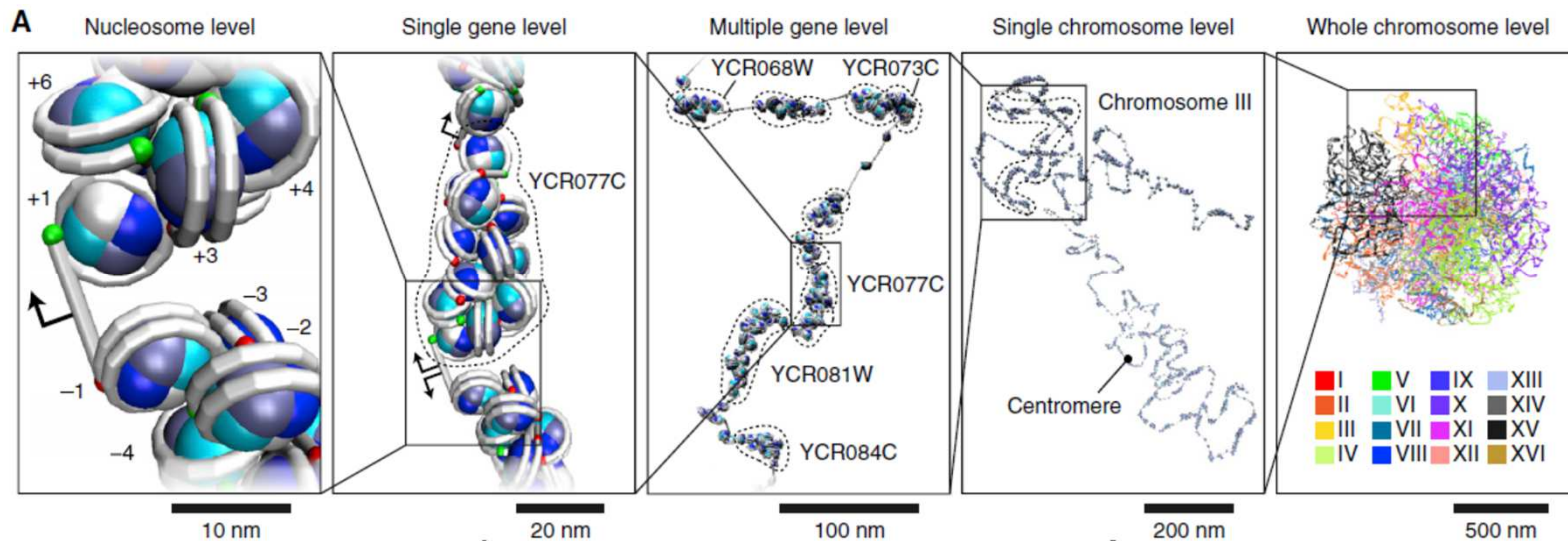
(pyramidální  $\alpha$  je kompaktnější)

kosočtverec  $\beta$  je otevřenější –  
na počátcích a koncích genových  
oblastí

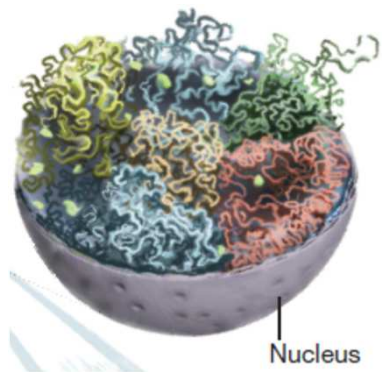
Inter-nucleosome  
distance



Nukleosomy jsou také více vzdáleny na začátku a konci genových oblastí

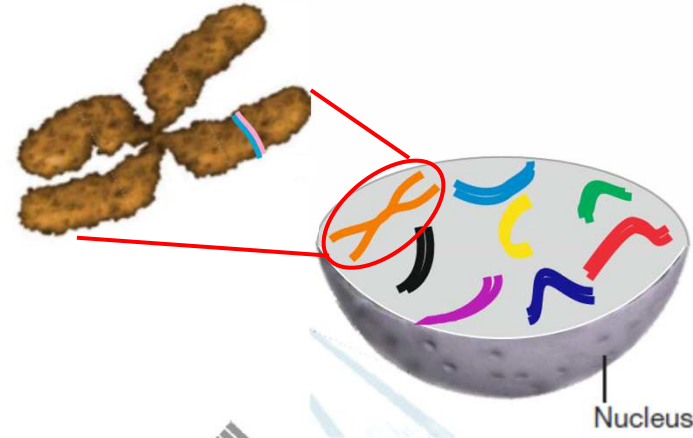






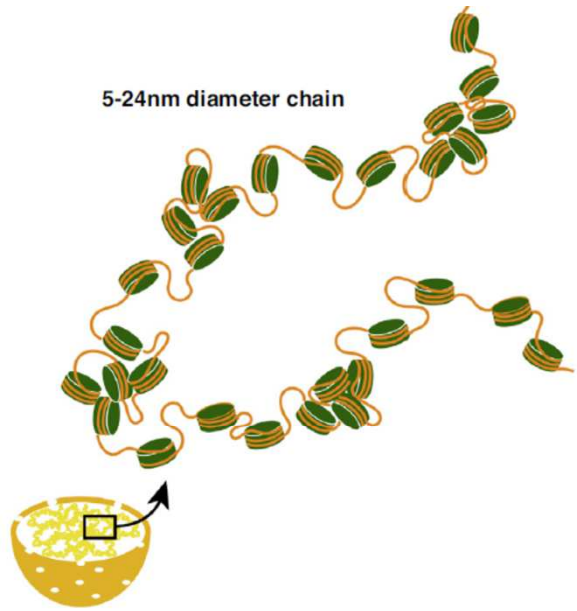
Nucleus

cell cycle  
 ←→

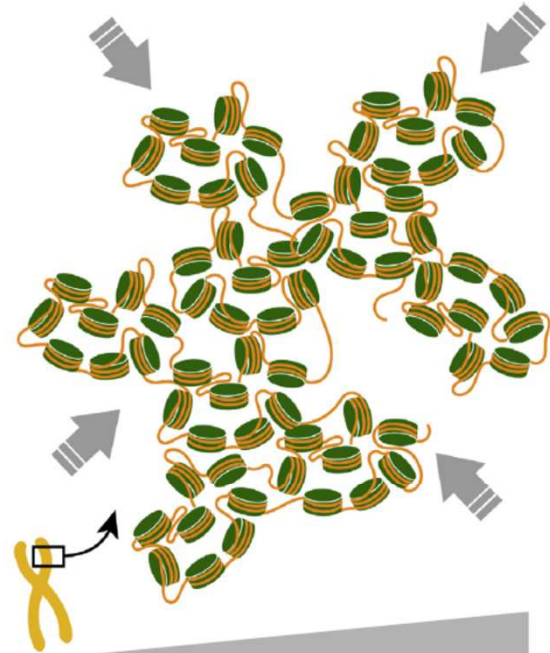


Nucleus

Interfázni chromatinová vlákna

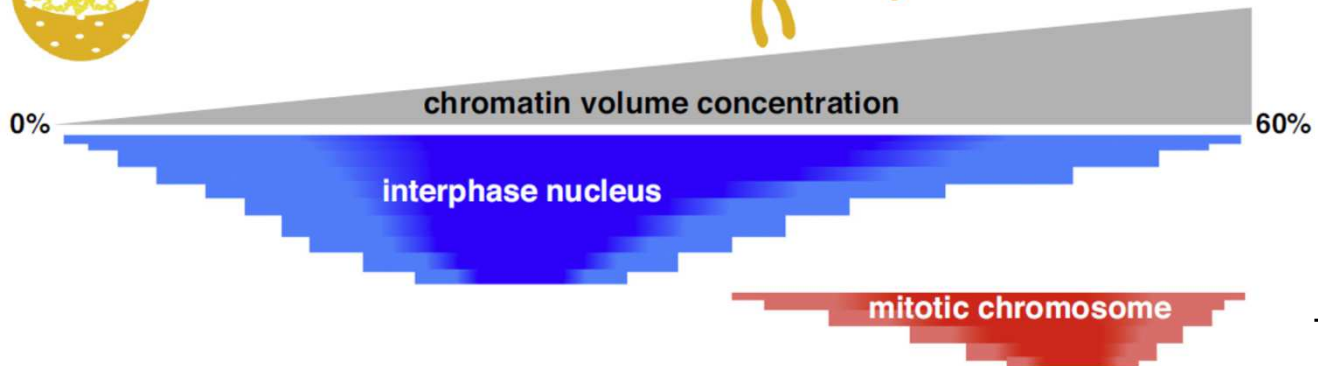


5-24nm diameter chain

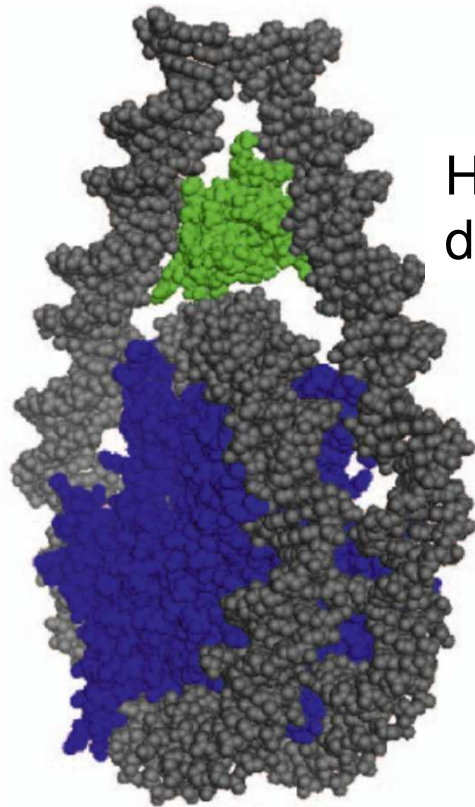


Kondensované  
 Mitotické  
 Chromosomy

kondensiny

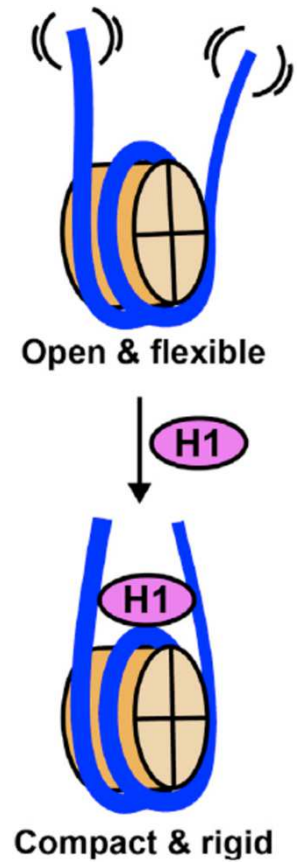
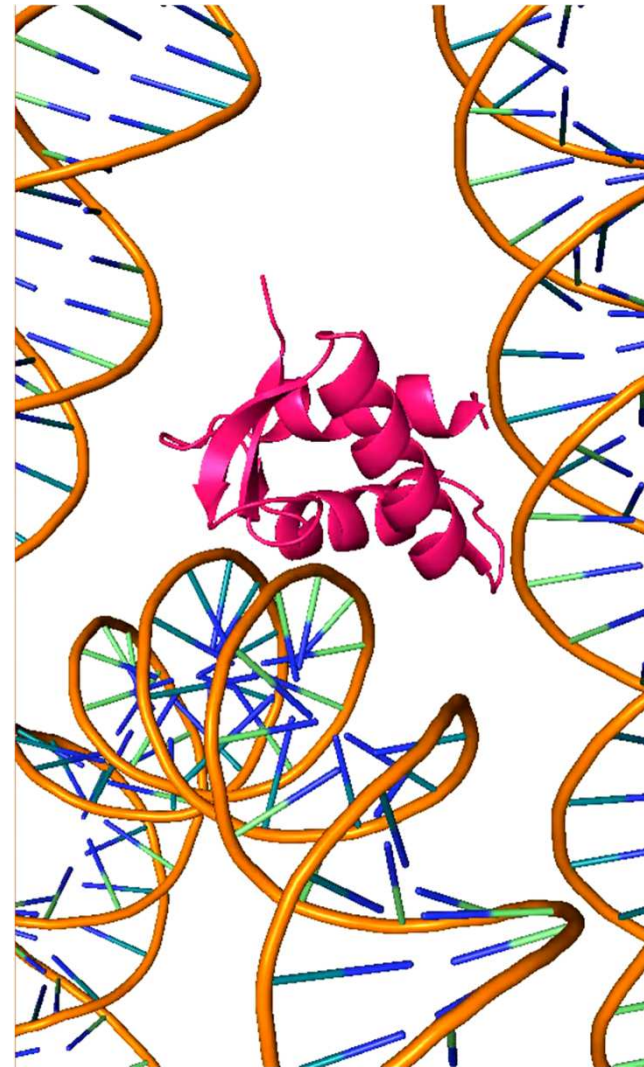


# Nukleosom kompaktnější - H1/H5 histony

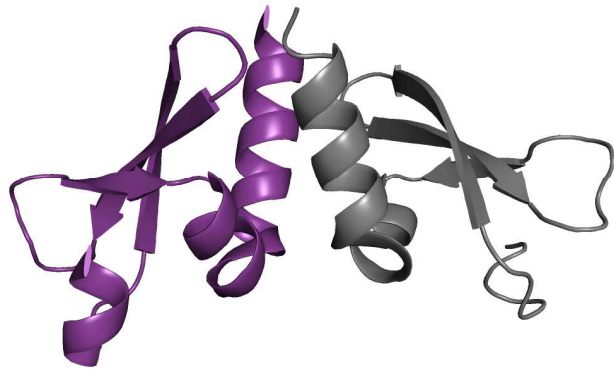


H1 WHD  
doména

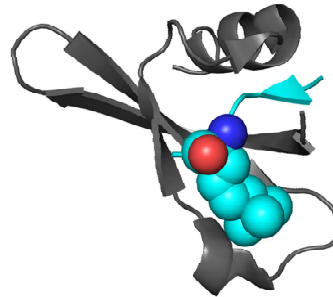
Bednar et al, Mol Cell, 2017  
Cutter a Hayest, FEBS Let, 2015



# Heterochromatin protein – HP1

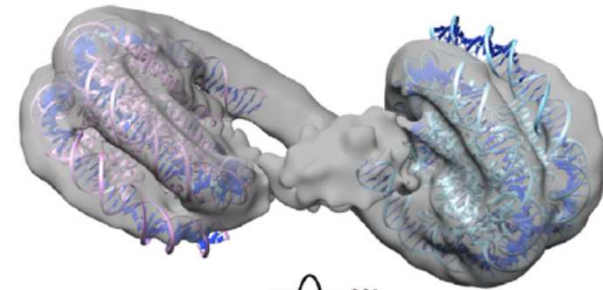


dimer

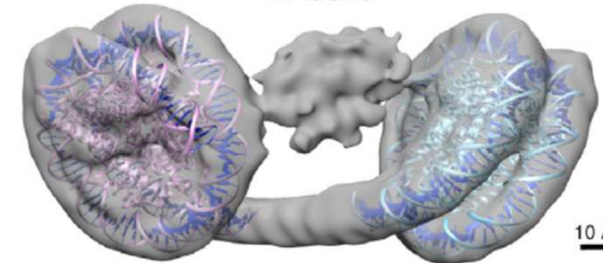


chromodomena  
H3K9me3

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



HP1 $\alpha$  dimer

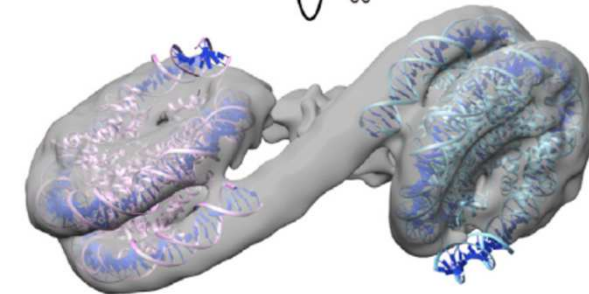


nucleosome

linker DNA

nucleosome

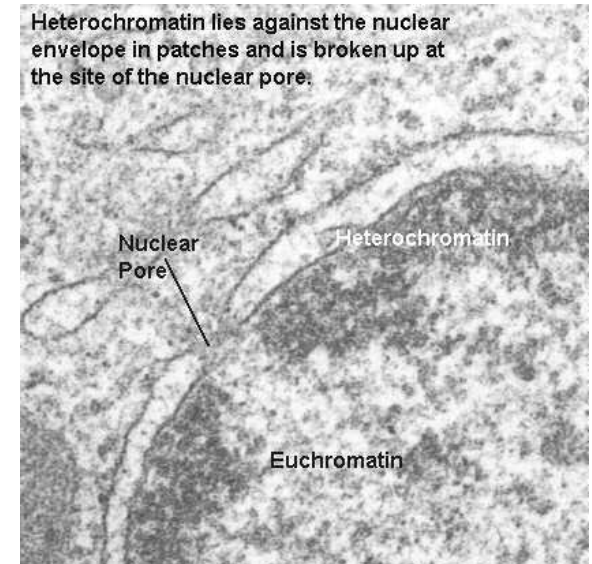
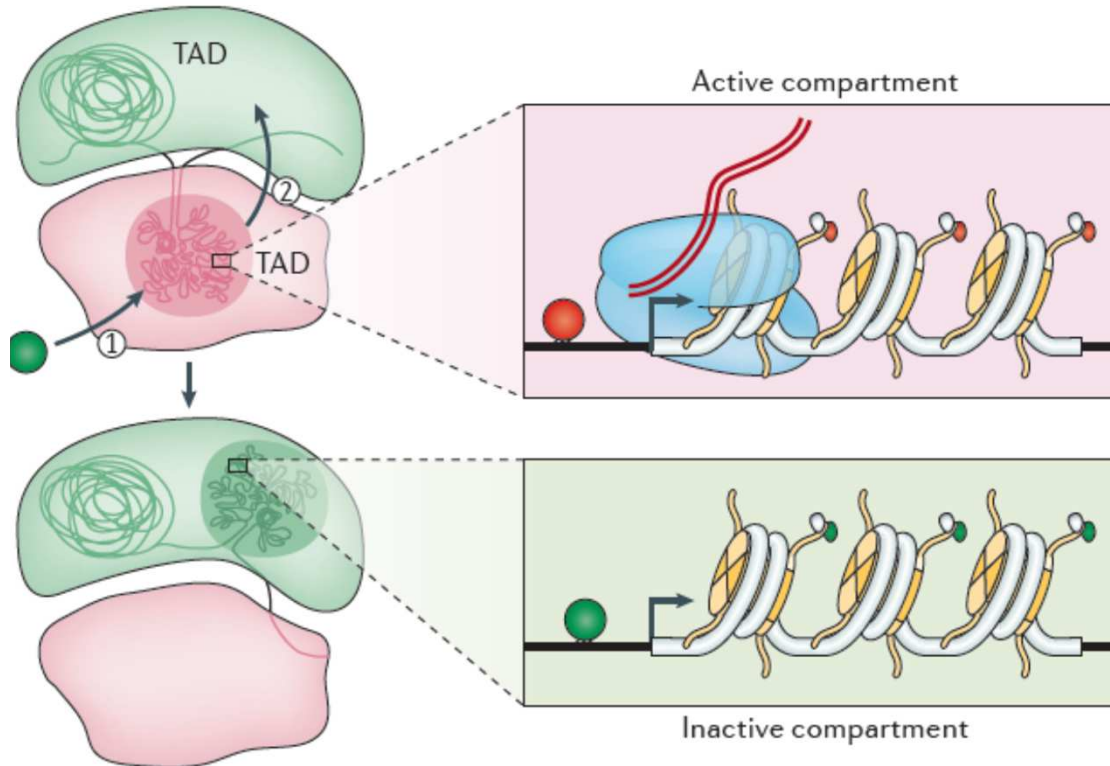
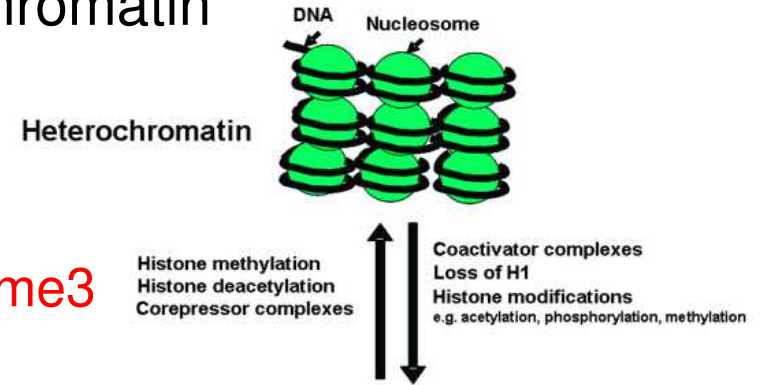
10 Å

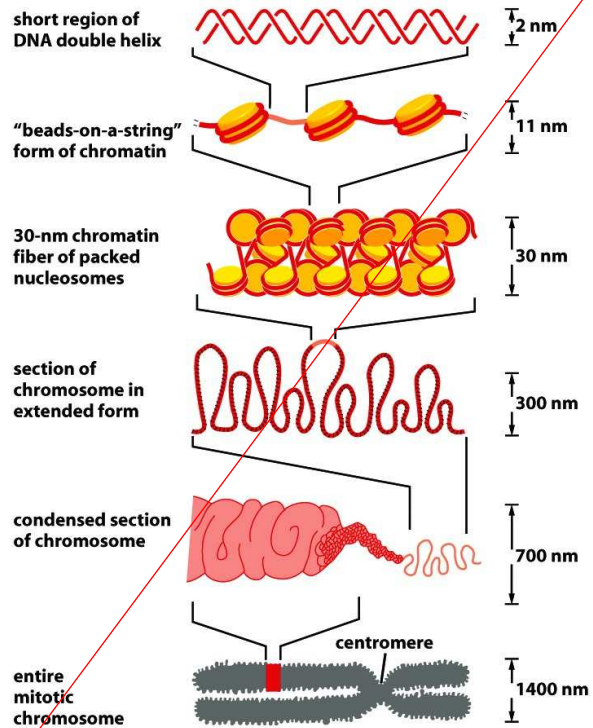


**Heterochromatin** – více spiralizovaný (kompaktní) chromatin; transkripčně neaktivní geny, repetitivní sekvence, transpozony; oblast centromer, pericentromer a telomer  
Konstitutivní a fakultativní heterochromatin

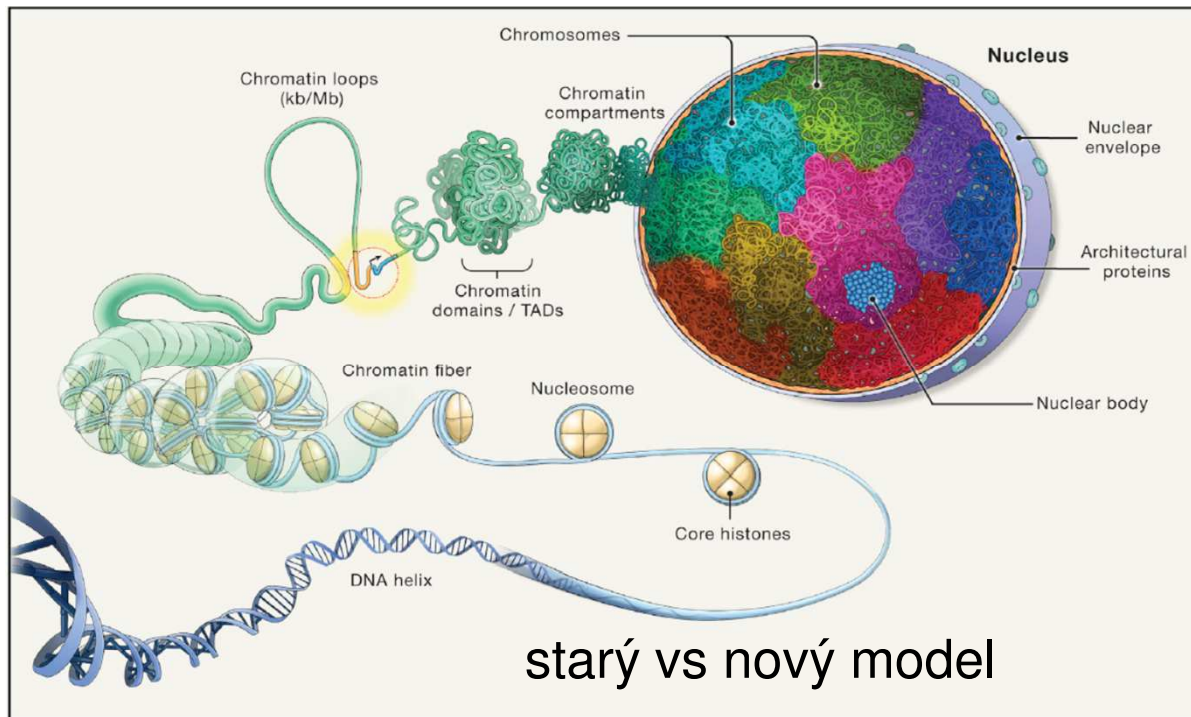
**Euchromatin** – rozvolněné uspořádání, obsahuje transkribující se geny

HP1-H3K9me3





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

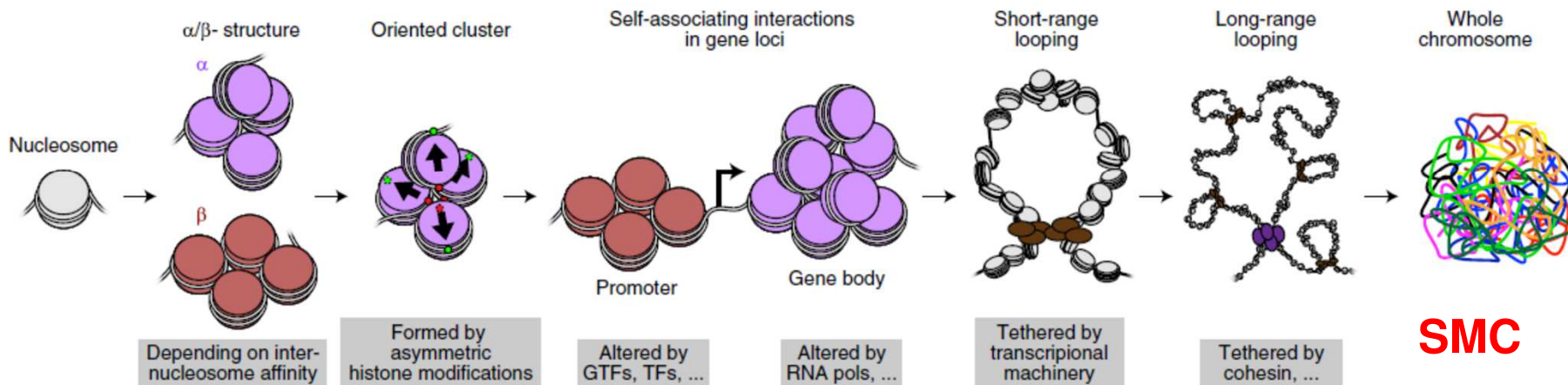


starý vs nový model

strukturní úrovně uspořádání chromatinu od nukleosomů ke smyčkám ...

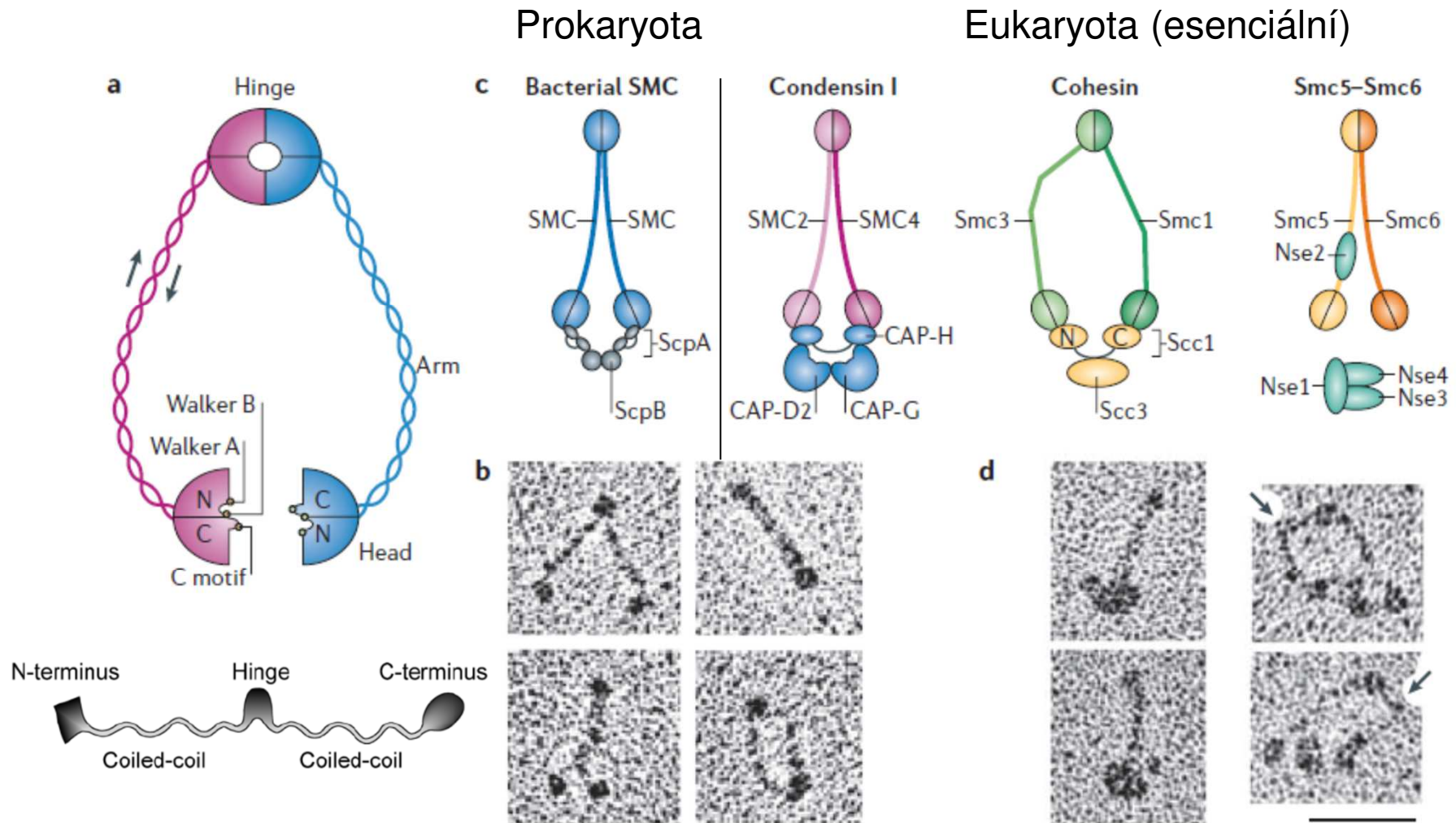
Ohno, Cell, 2019

Hierarchical architecture of *S. cerevisiae* chromatin



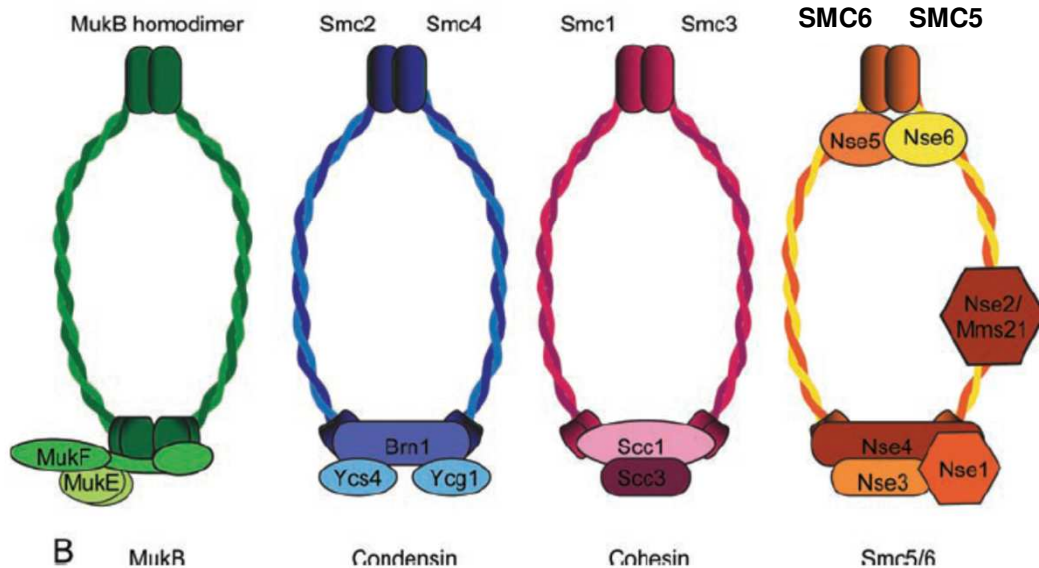
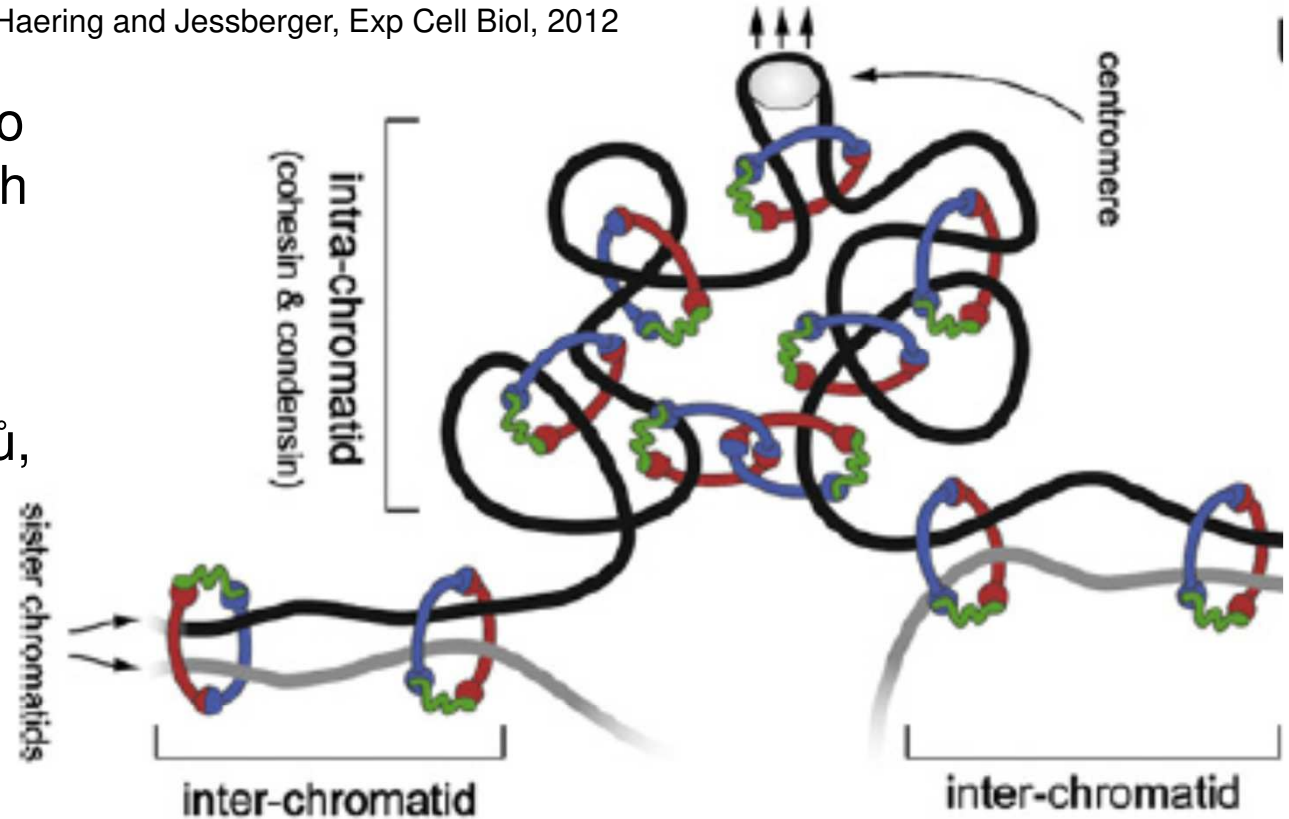
# Komplexy SMC

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



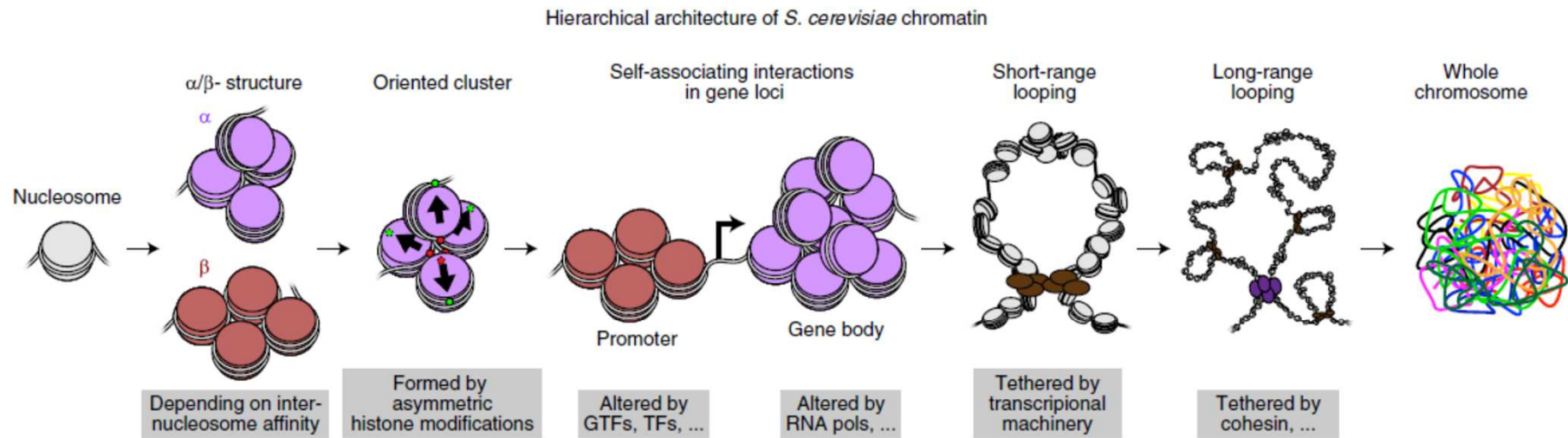
- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

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

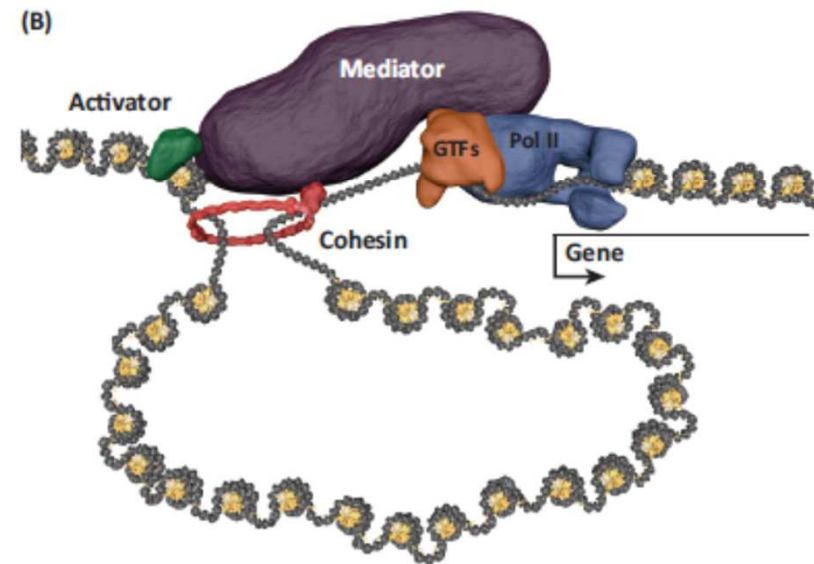


- složení SMC komplexů
- dlouhá ramena SMC, dimerizace přes hinge, ATPase heads přemostěny ATP a kleisinovou podjednotkou
- SMC proteiny vytváří kroužky, které drží DNA

# kohezin interaguje s mediátorem

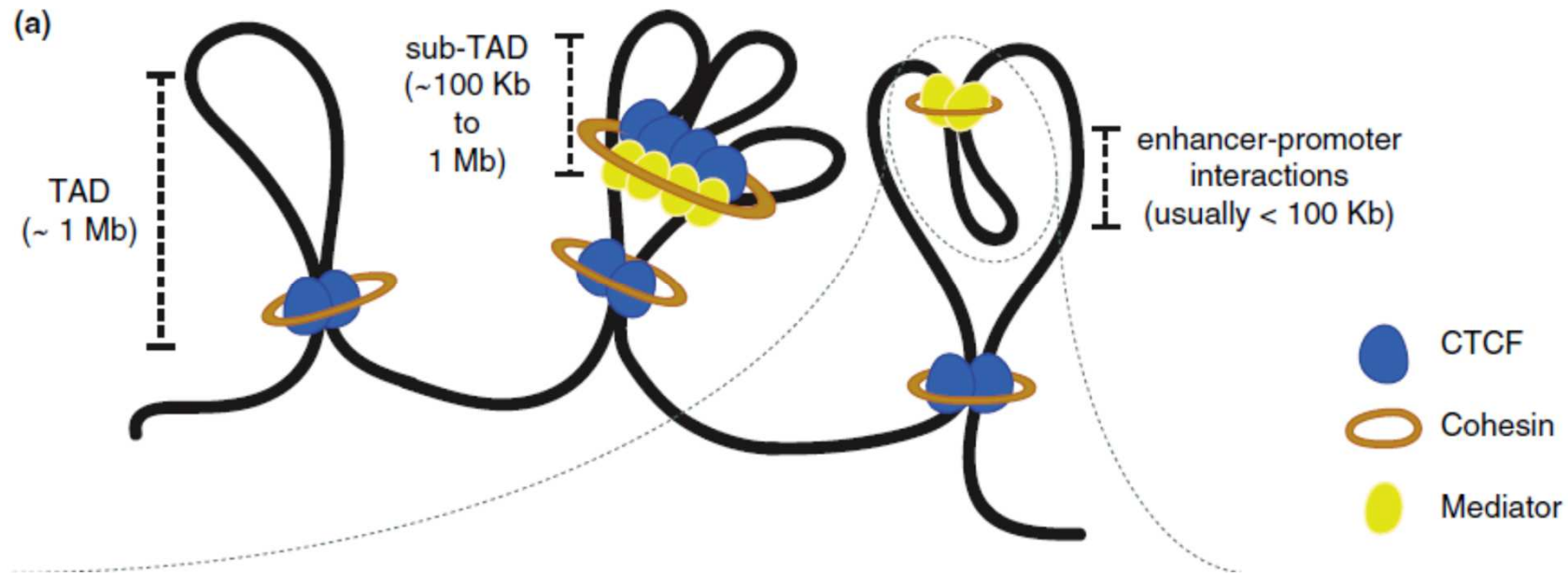


- mediator interaguje s GTFs a RNA polymerázou (zprostředkuje interakce mezi GTFs a aktivátory transkripce)
- kohezin interaguje s mediátorem a napomáhá tvorbě transkripčních smyček

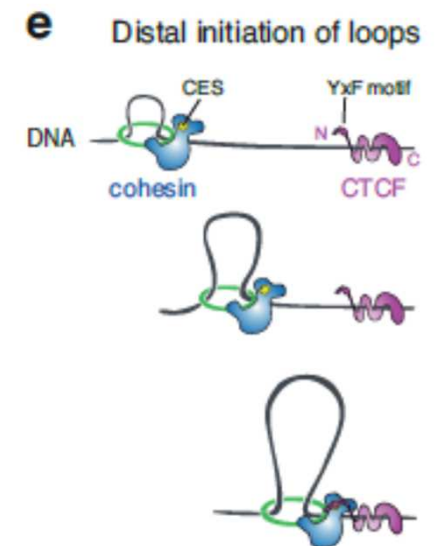




# Kohesin interaguje s CTCF

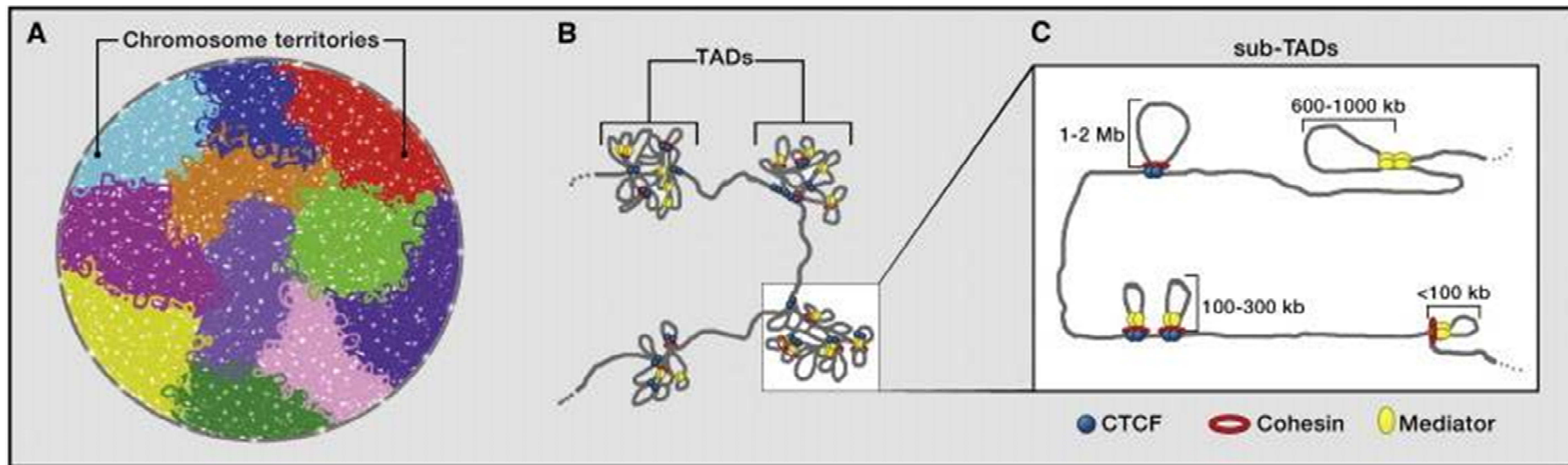


- CTCF (zinc-finger) „izoluje“ transkripční faktory a reguluje transkripci
- interakce vymezuje kohesinové smyčky
- utváření vyšších chromatinových struktur (TAD – topologically associated domains)



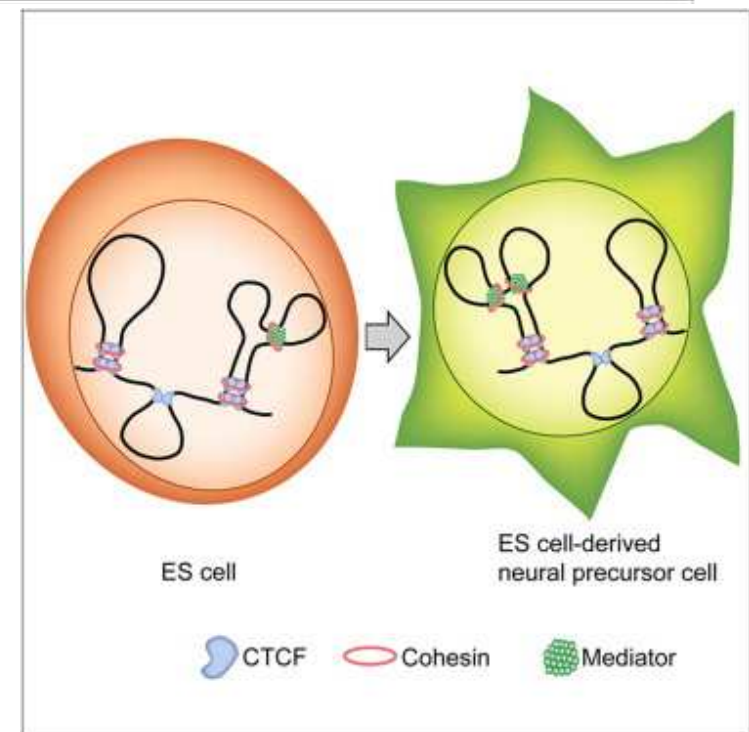
Bonora et al, CO in GD, 2014  
Pugacheva et al., PNAS, 2020  
Li et al., Nature, 2020

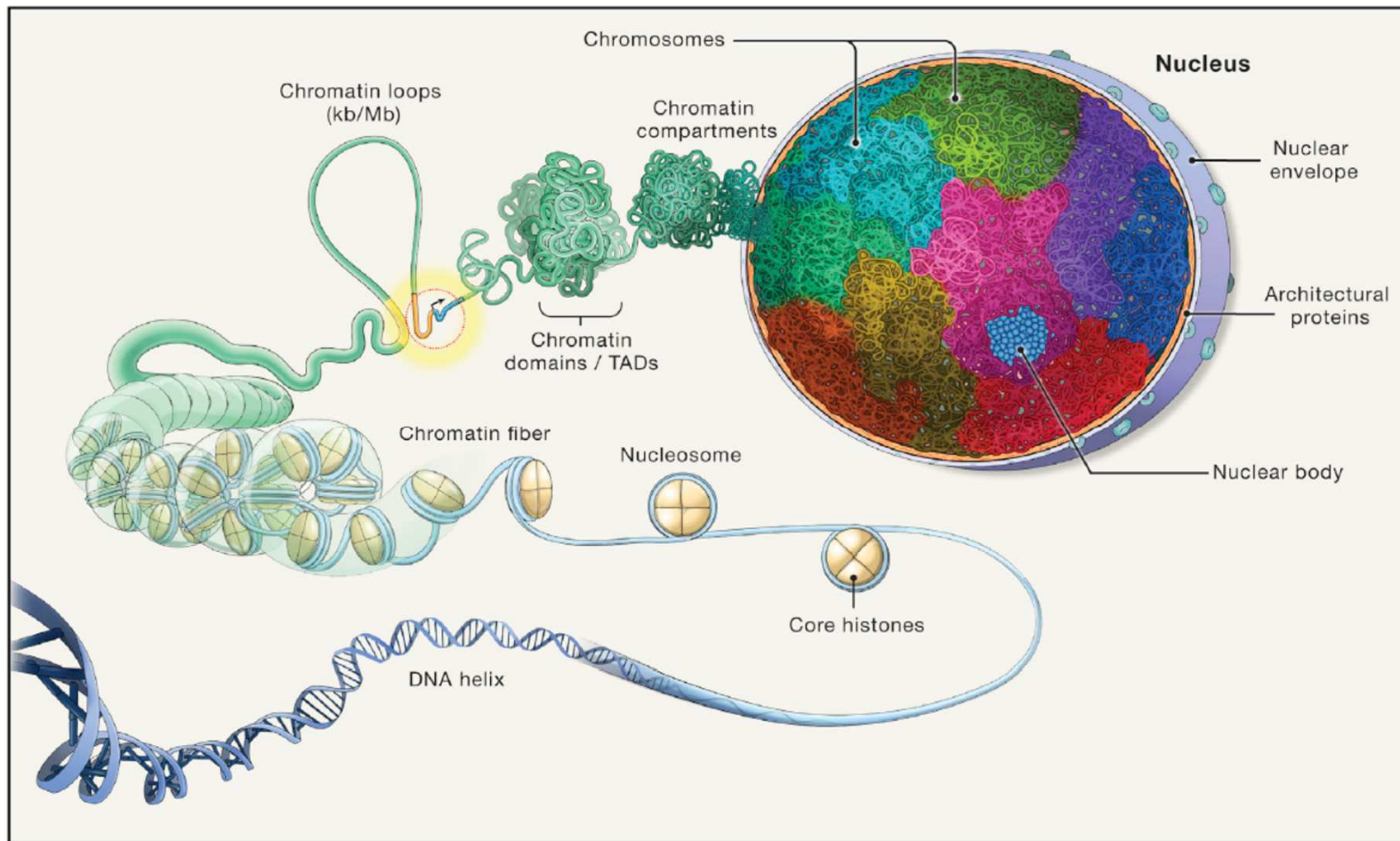
# TAD – topologicky asoc. domény



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

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

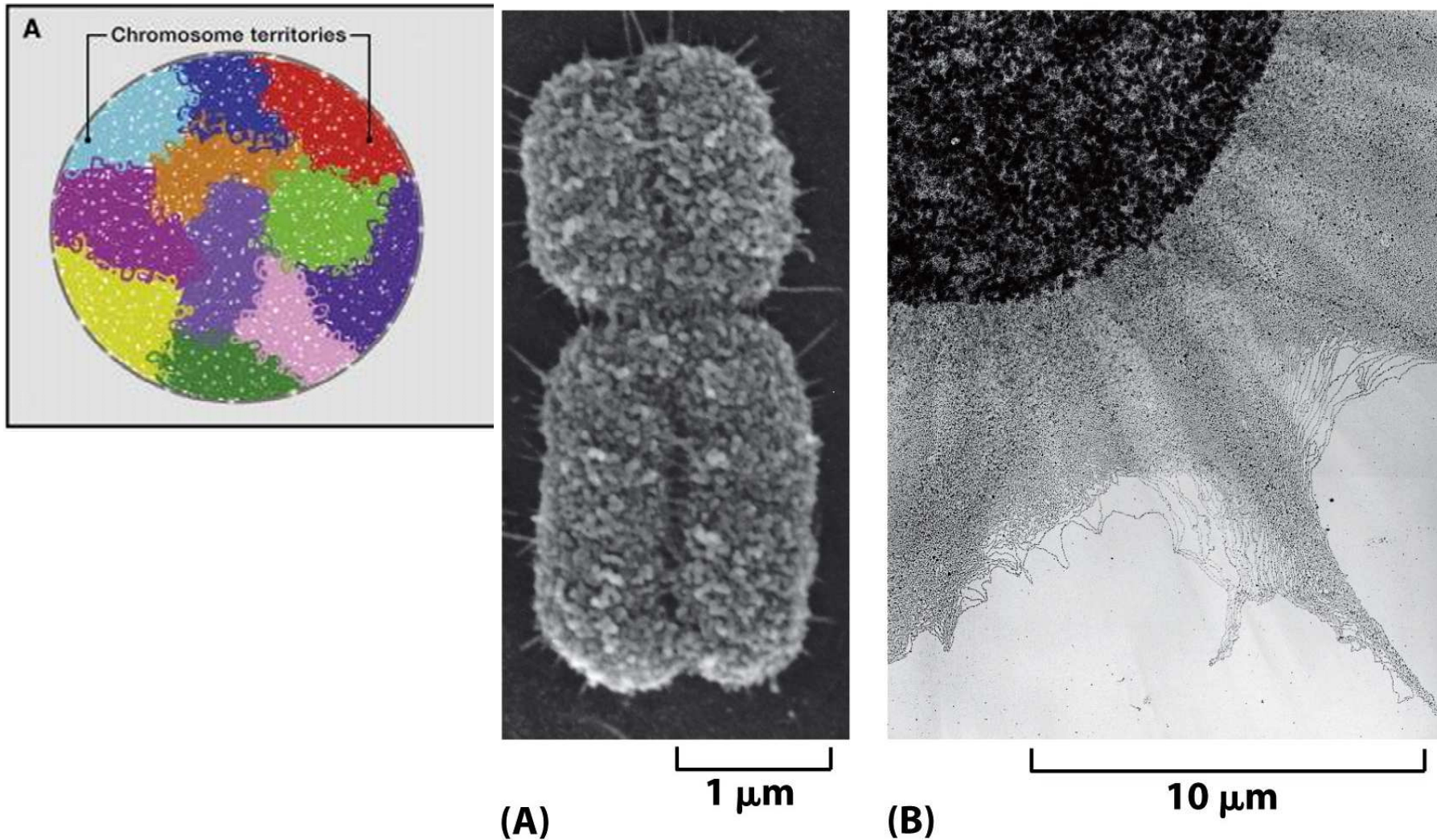




Kompartmenty (A a B) – do jisté míry se překrývají s oblastmi euchromatinu a heterochromatinu

v interfázi okupují jednotlivé chromosomy určité oblasti jádra (ve formě chromatinových vláken)

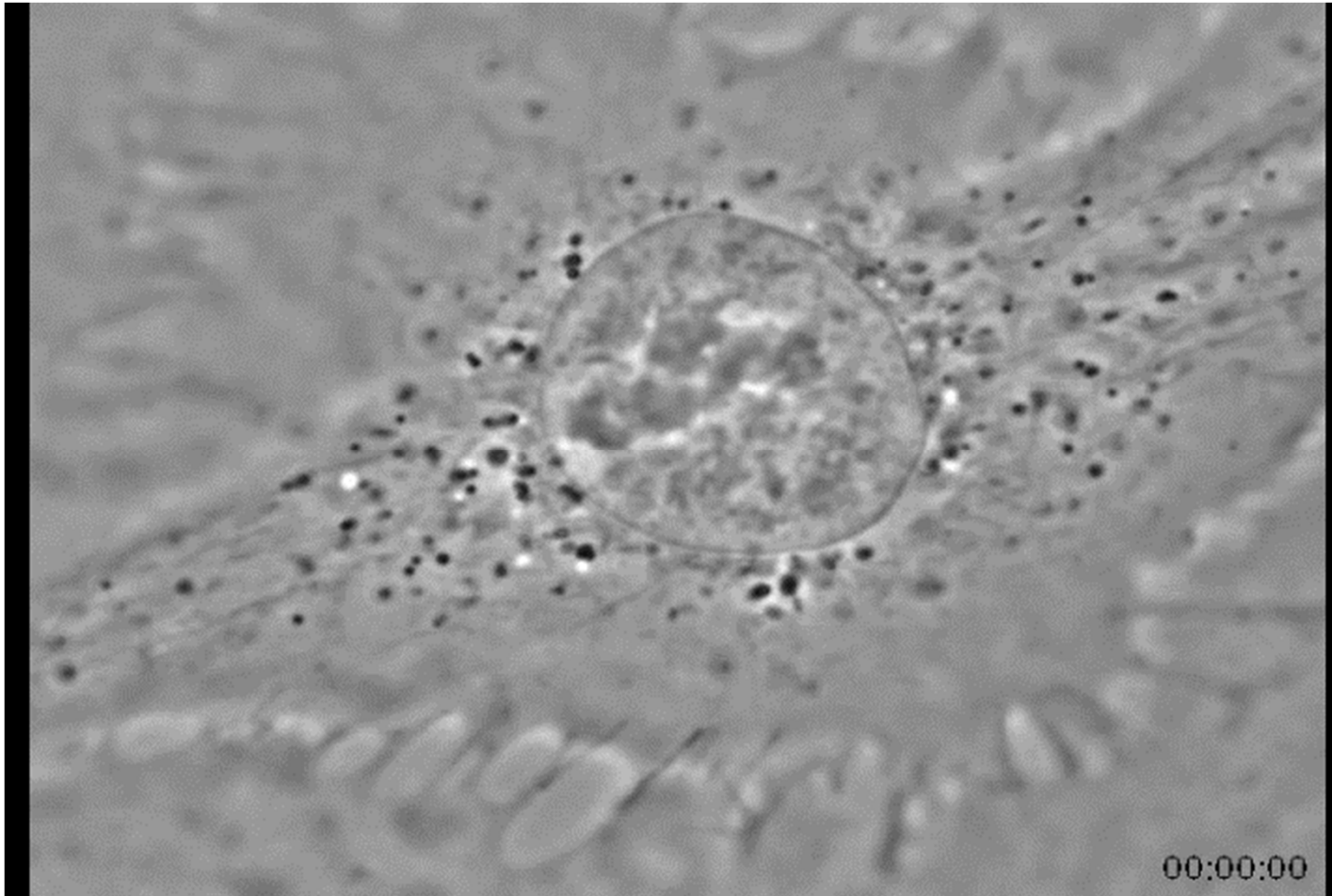
# interfáze vs mitóza



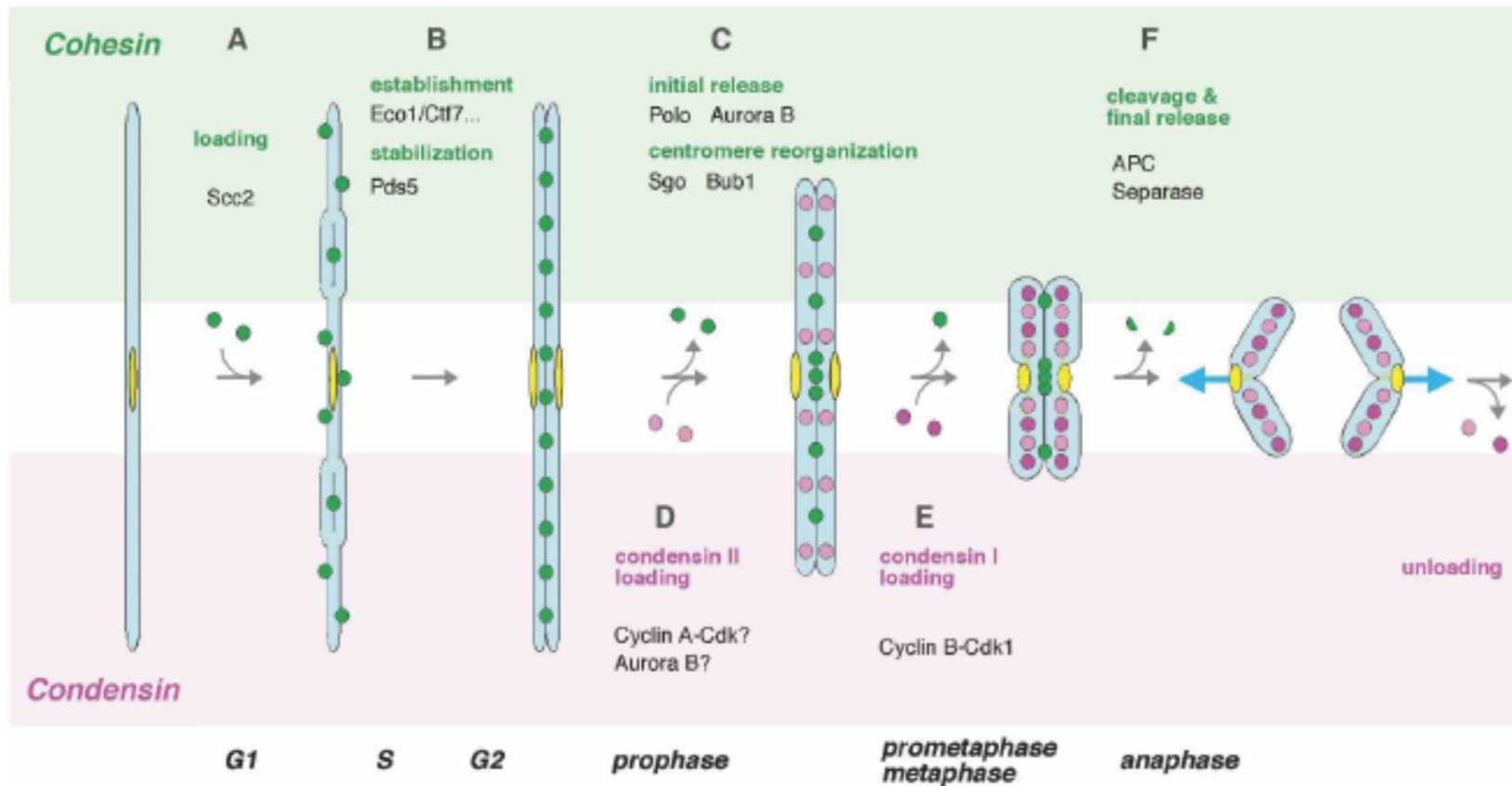
v interfázi okupují jednotlivé chromosomy určité oblasti jádra (ve formě chromatinových vláken) – v průběhu mitózy chromosomy kondenzují do typických X-struktur (kvůli snadnější segregaci)

# Dynamika chromatinu

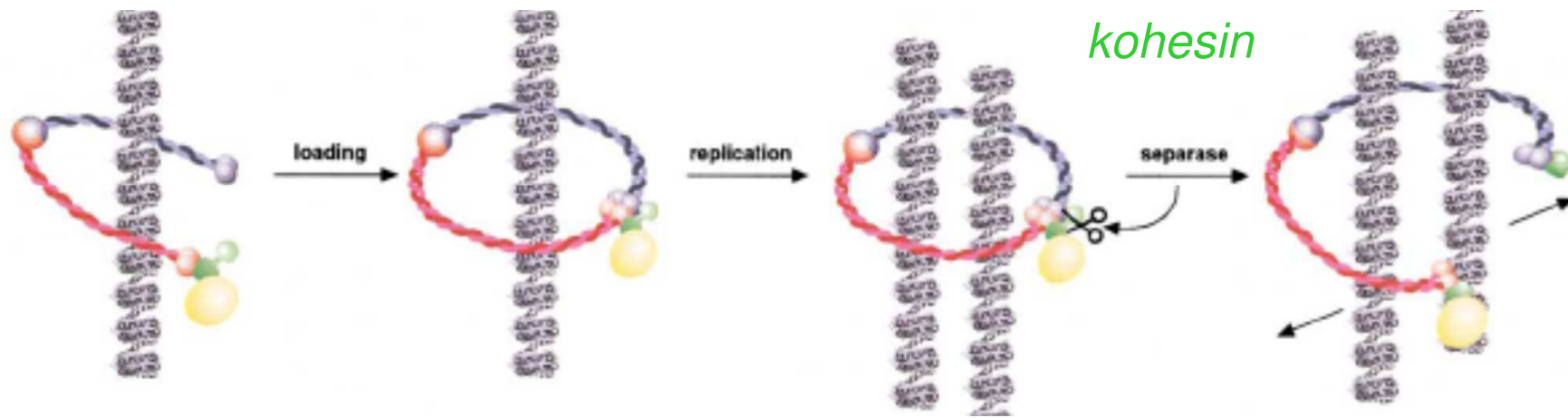
Dr. Gorbsky



Kondensace chromatinu = kondensin  
Držení sesterských chromatid = kohesin

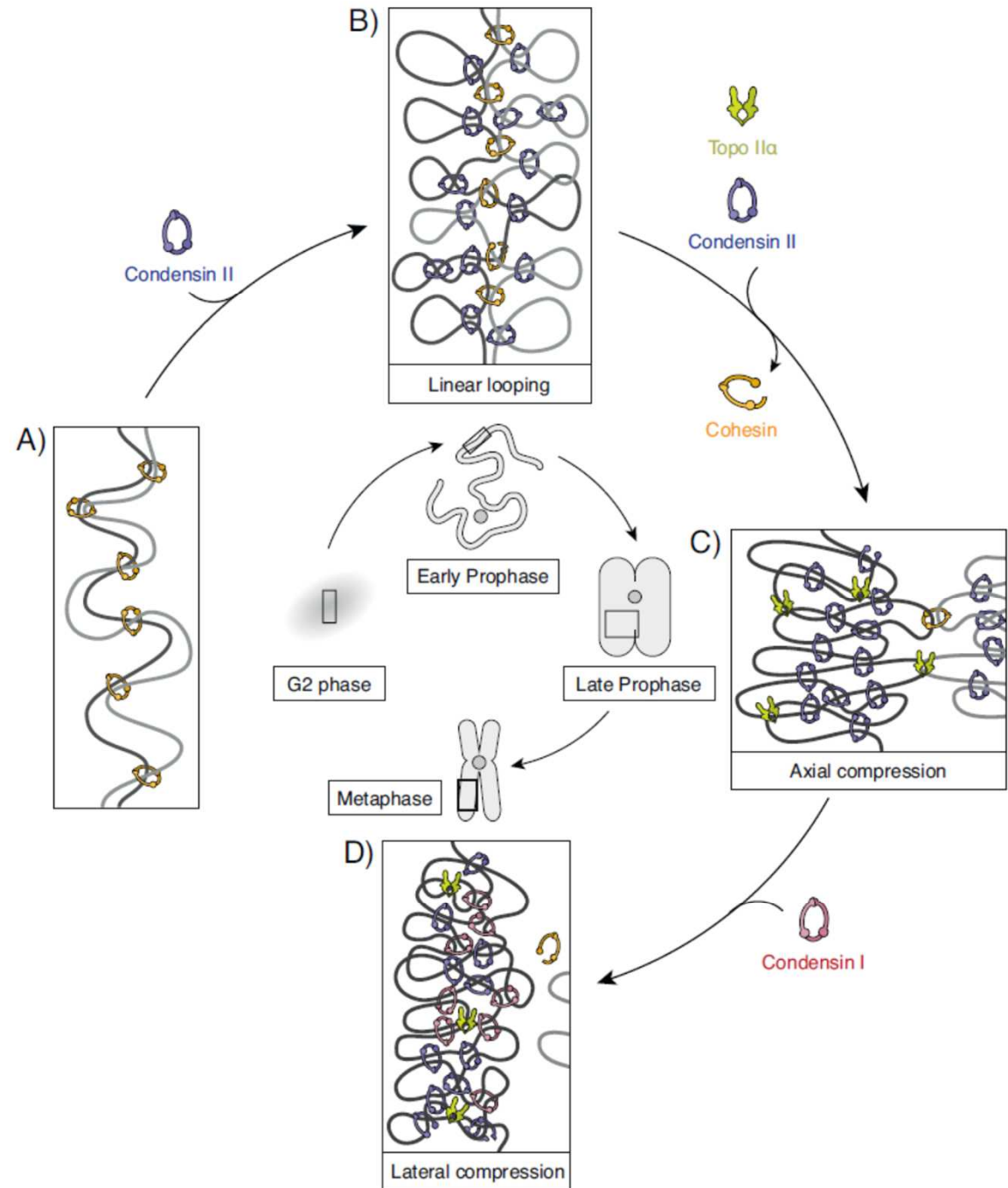
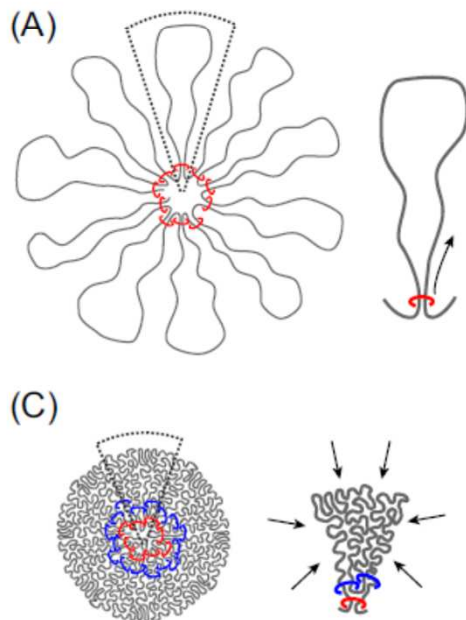


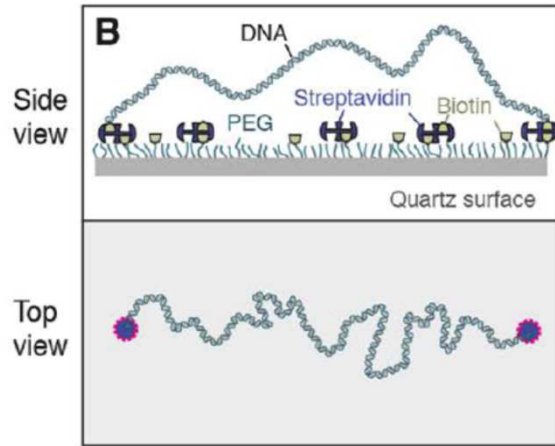
- „navlékání“ SMC komplexů na chromatin v průběhu buněčného cyklu
- kohesin obepíná 2 vlákna a drží je až do anafáze – otevře se proteolyticky



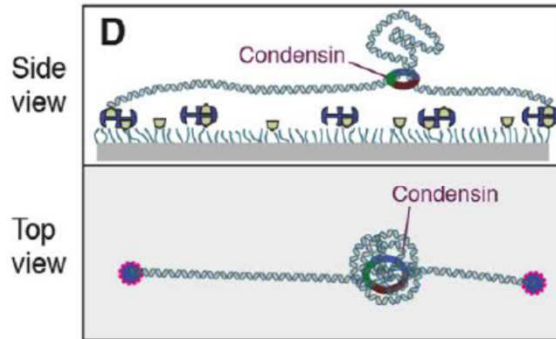
# kondensiny

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

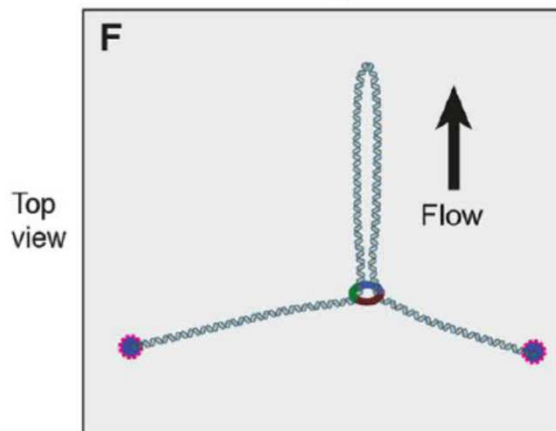




Add condensin & ATP ↓

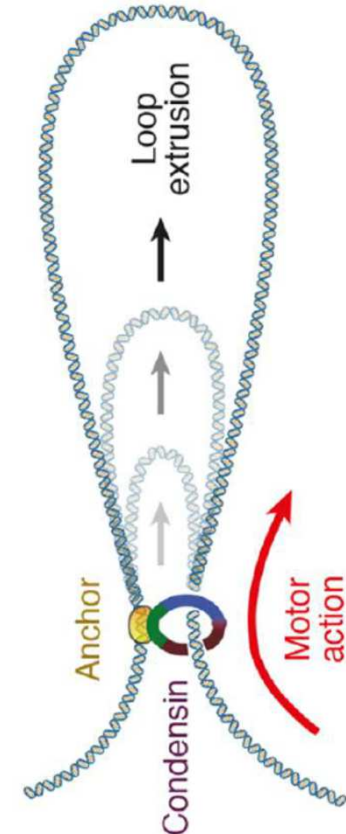
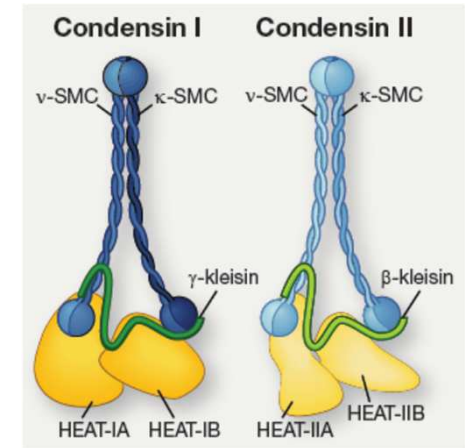


Apply flow ↓



konce molekuly DNA uchyceny

přidán kondenzin + vazba a  
hydrolýza ATP – vytvoření  
smyčky („loop extrusion“)

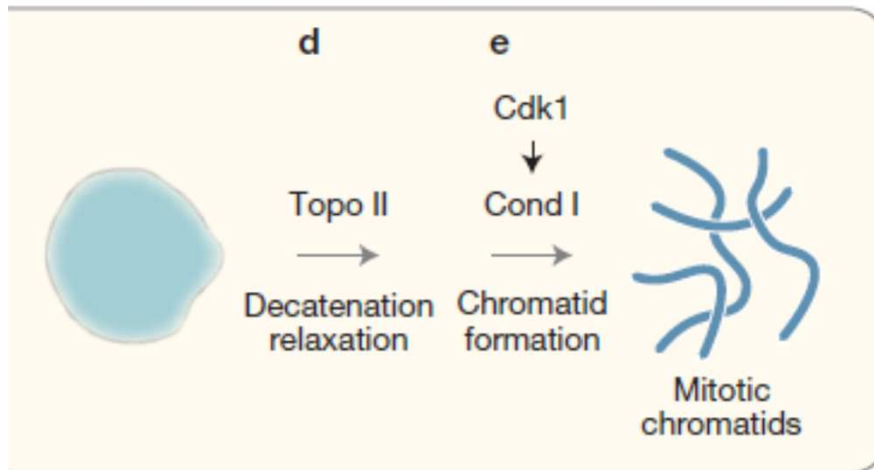
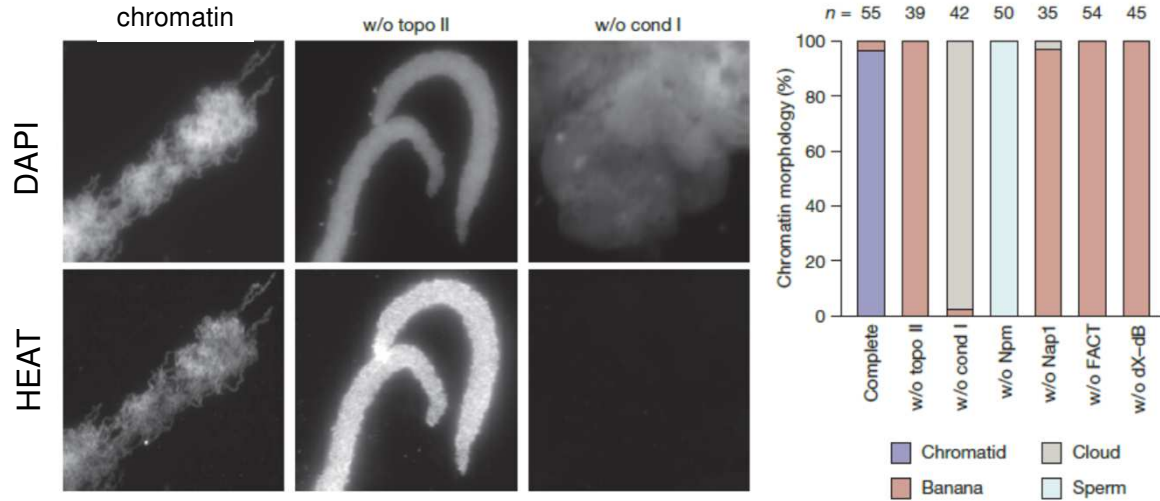
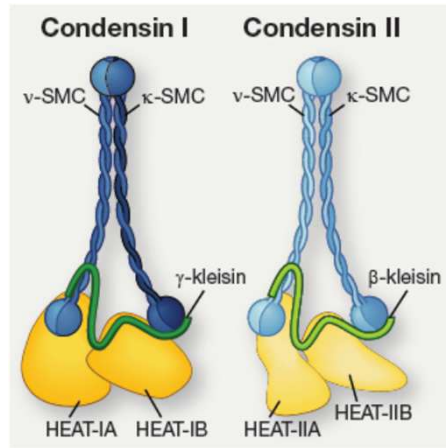


Ganji et al, Science, 2018  
Takahashi, CO in CB, 2019



# *in vitro* rekonstrukce chromosomů

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



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