

Přednáška-zkouška

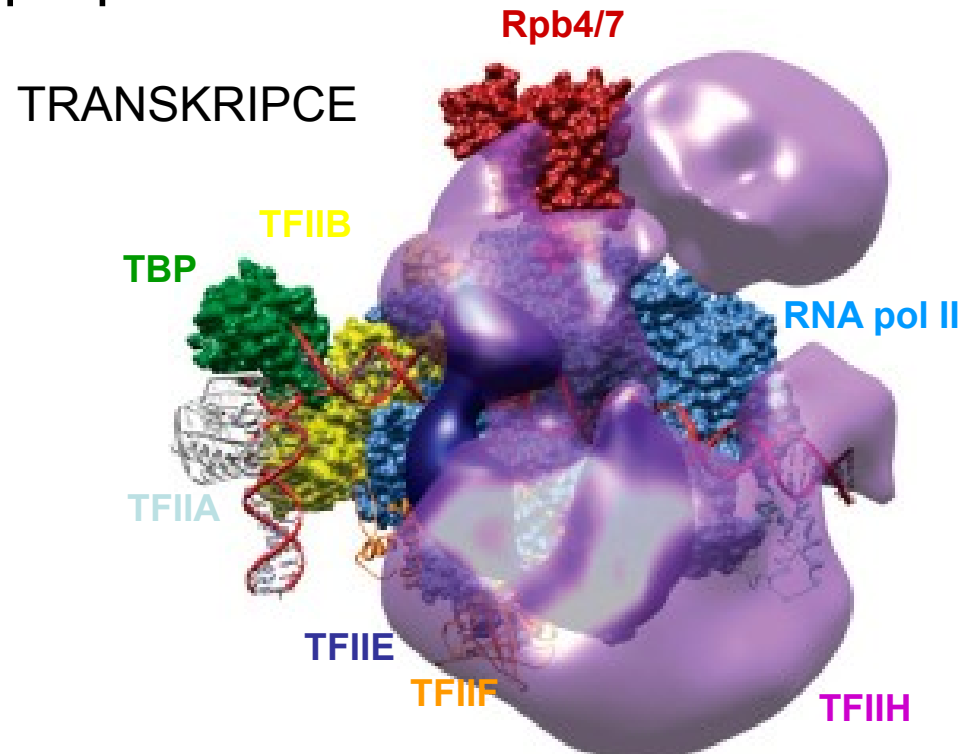
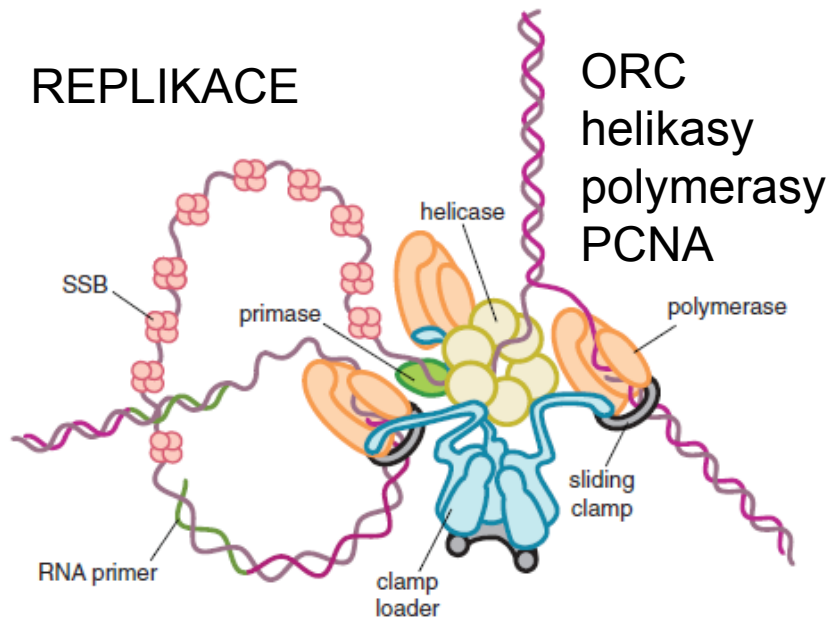
7.5. Rektorské volno???

21.5. (14.5. jsem v Praze)

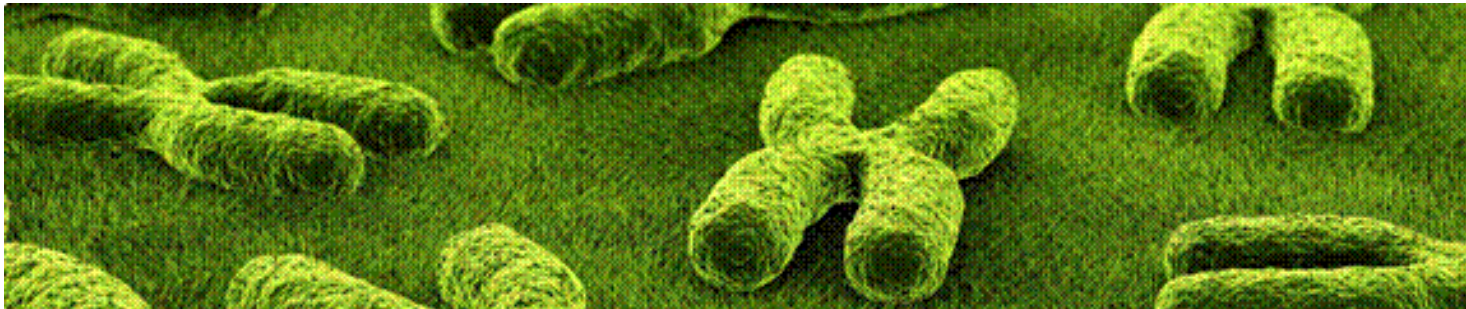
- Úvod - Analýza proteinu
 - Domény
 - fold-struktura (ss, PDB)
 - Interakce (IntAct)
 - Komplexy
 - Funkce
 - Lokalizace
 - evoluce
- Konkrétní nová data – článek

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

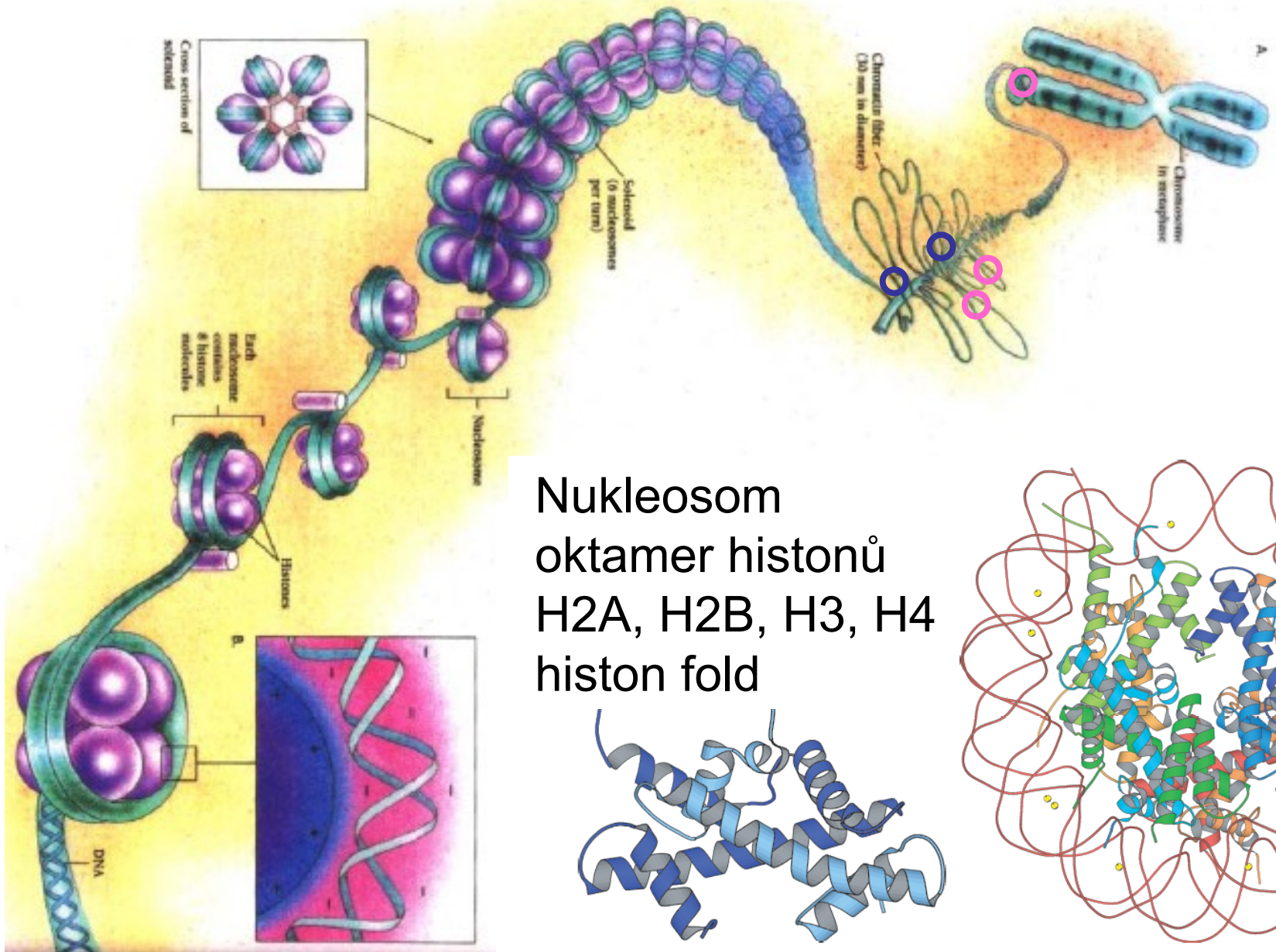
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy –
 - **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
 - komplexy podílející se na replikaci DNA
 - komplexy opravující poškozenou DNA
 - komplexy účastnící se přepisu informace



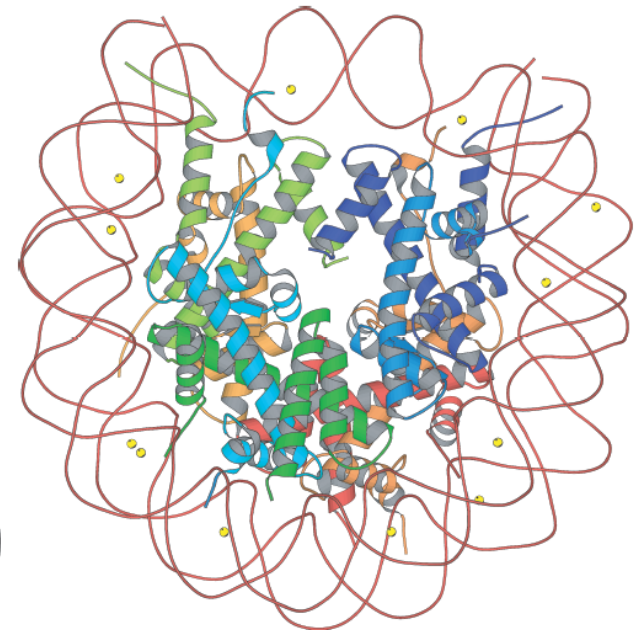
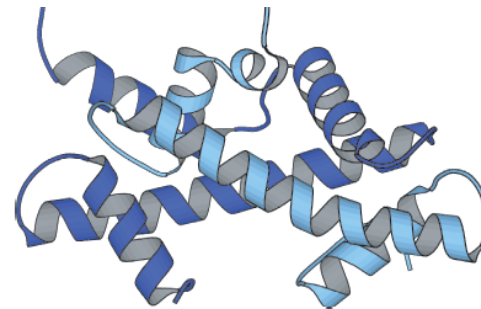
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy –
 - **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
 - **vytváří základní strukturu**
 - nukleosomy (histonový oktamer) a histony (H1)
 - HMG, HP proteiny
 - vytváří specializované domény
 - centromery, telomery
 - podílí se na dynamice struktury
 - kohesin, kondensin a SMC5-6 komplex

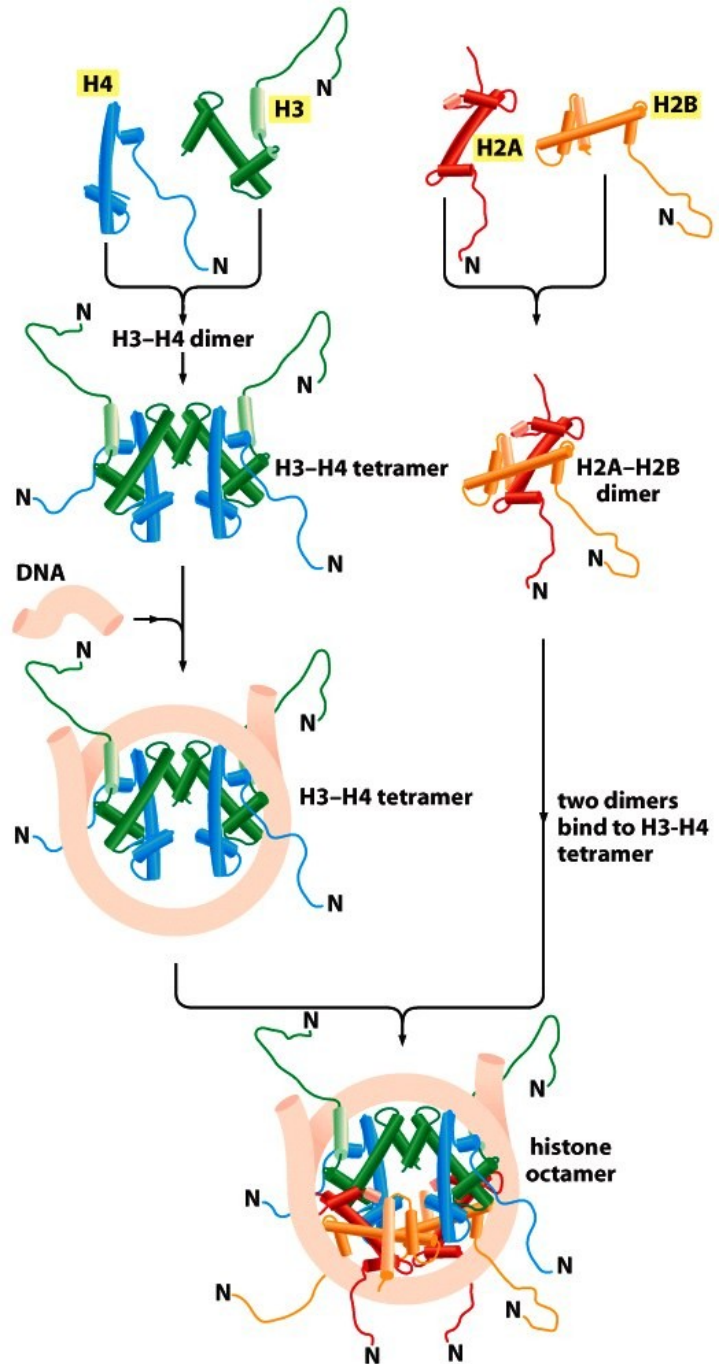


komplexy vytvářející strukturu chromosomu



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





Sestavování nukleozomu:

Nukleosom musí být dostatečně stabilní, ale zároveň je třeba s ním „pohybovat“ (transkripce, replikace)

Silnější je interakce mezi H3-H4 -

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

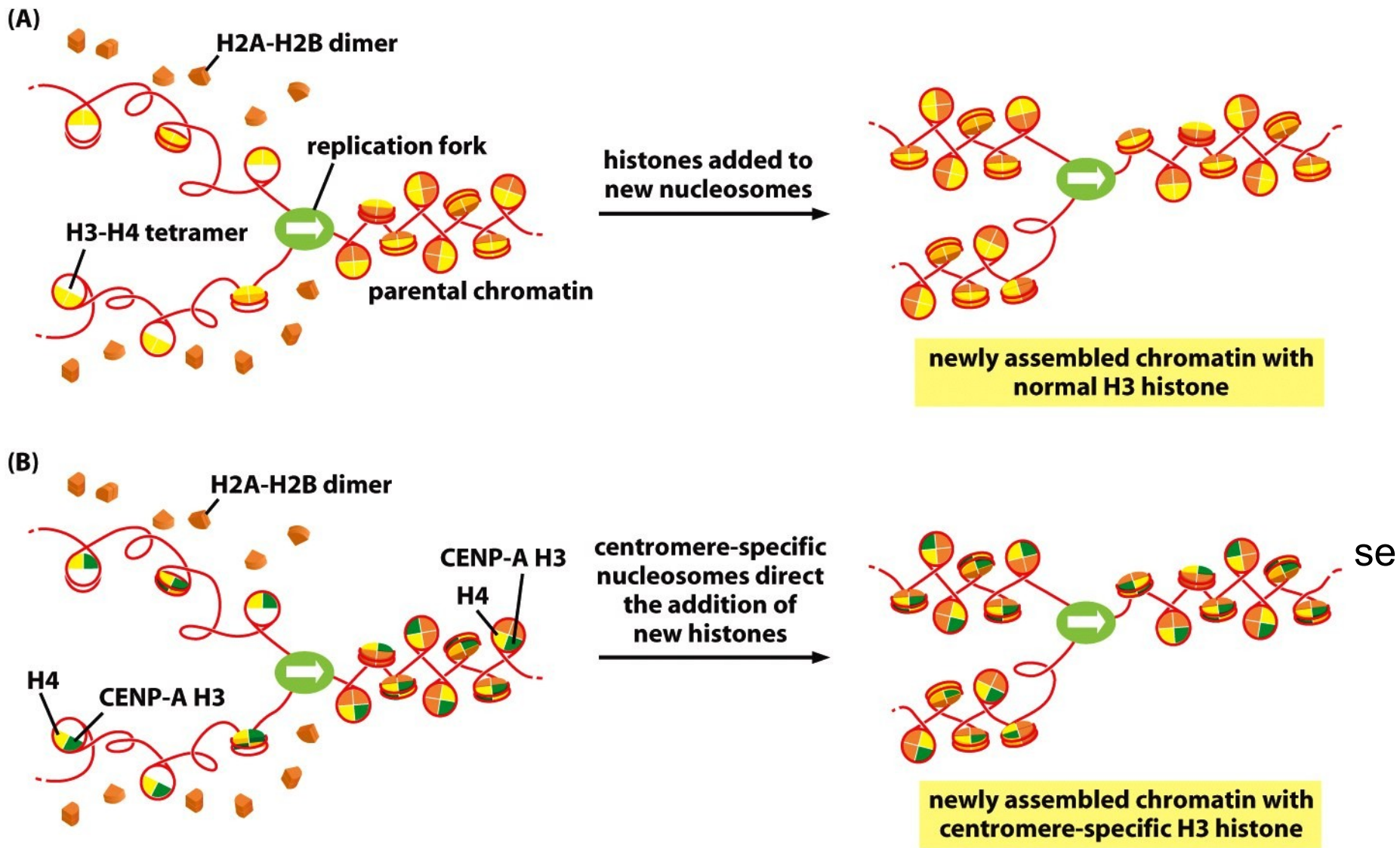
H3 existuje ve více variantách

CENP-A je centromerickou variantou (podílí se na určení oblasti centromery) – přichycení kinetochor

H2A existuje ve více variantách

H2A.Z je v pericentromerách a telomerách (heterochromatinová struktura)

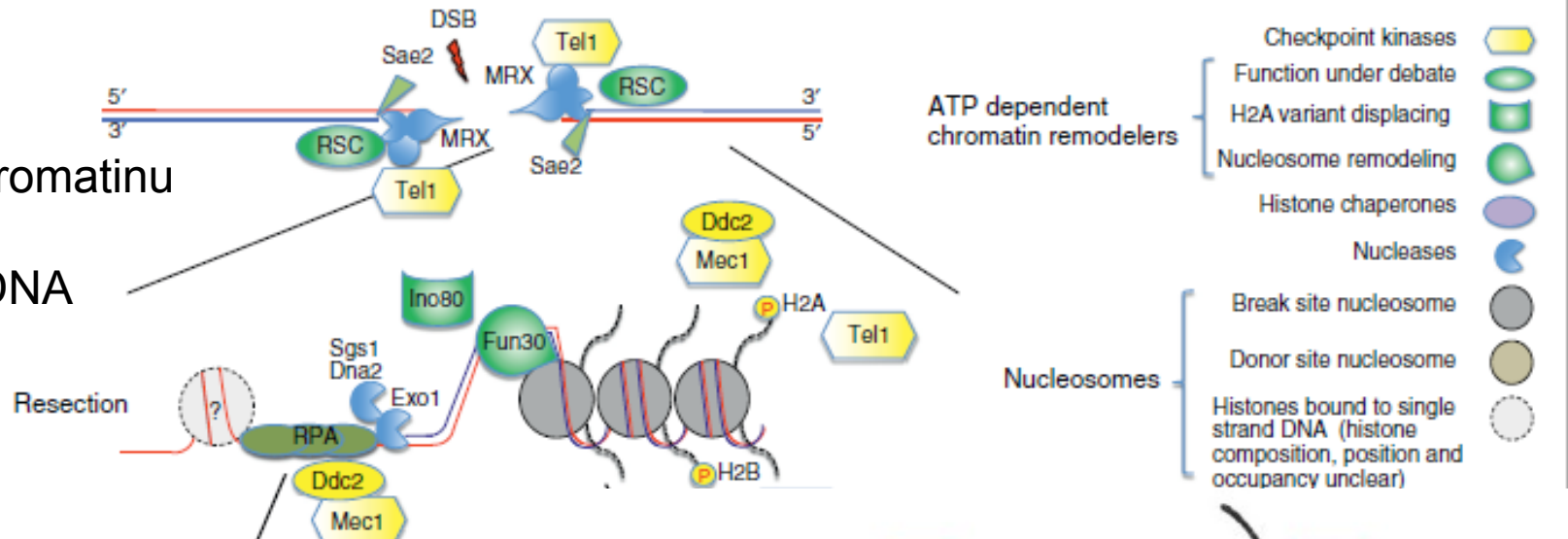
H2A.X (γ -H2A / fosforylovaný) v místech dvouřetězcových zlomů



CENP-A je centromerickou variantou a podílí se na určení oblasti centromery (epigenetika)

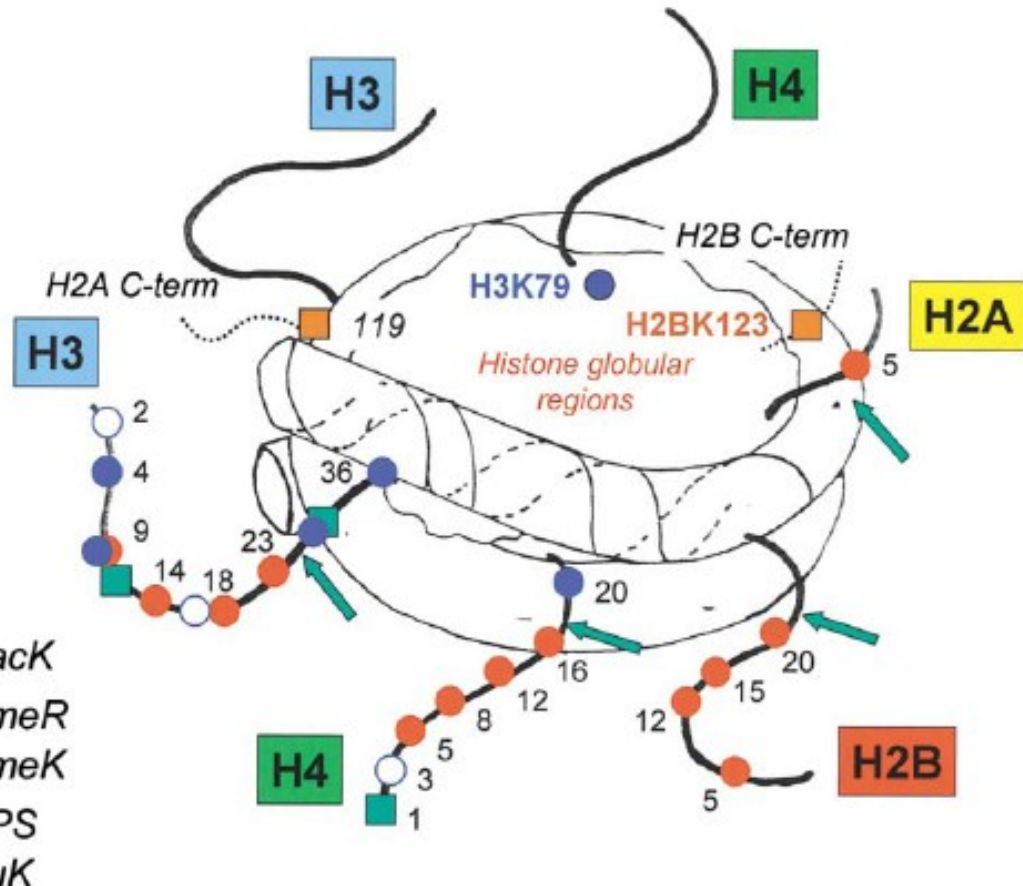
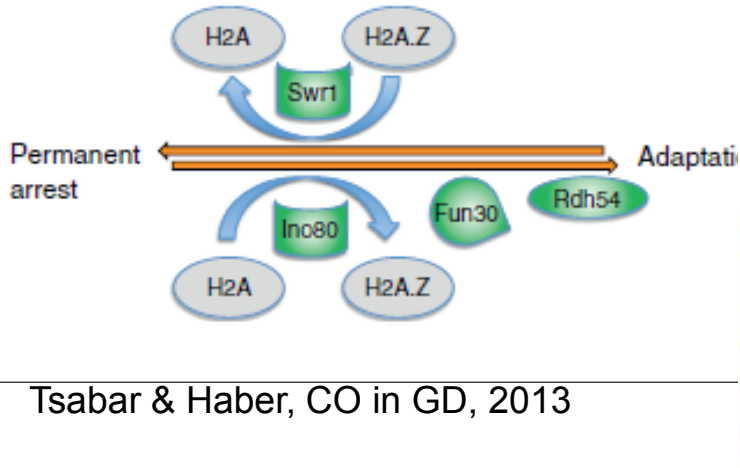
Modifikace:

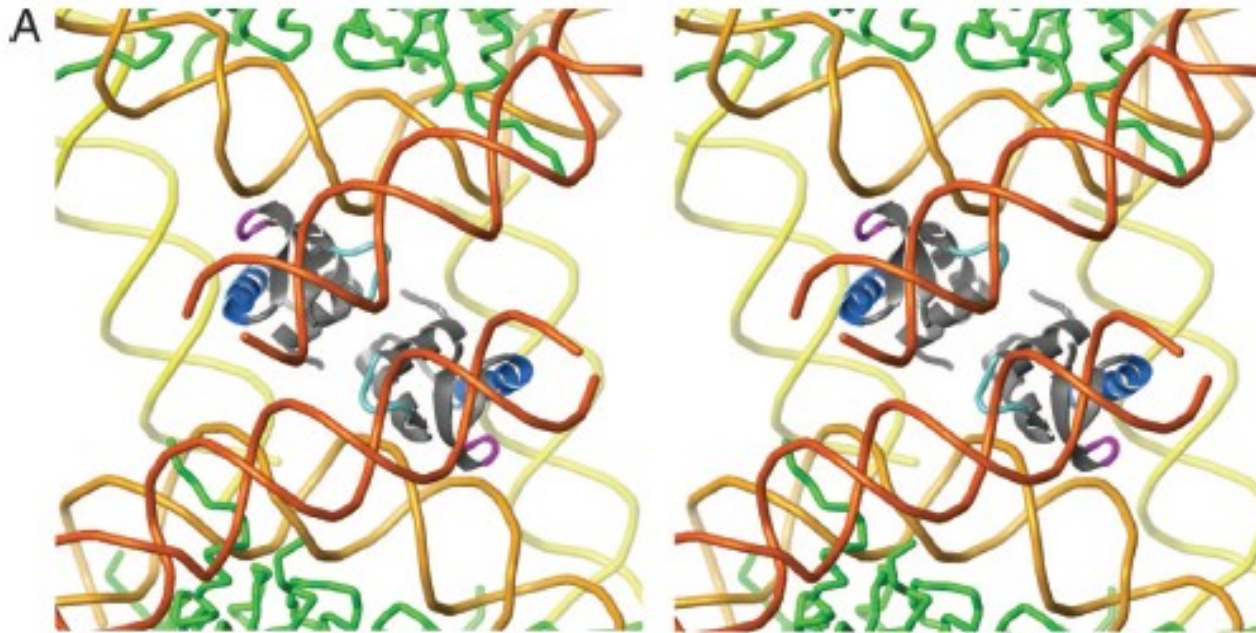
- struktura chromatinu
- transkripce
- poškození DNA



Unrepairable break

Strand-invasion into heterochromatic donor

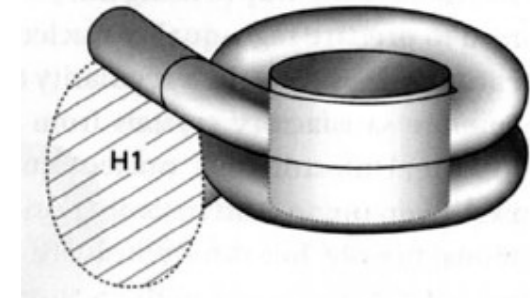
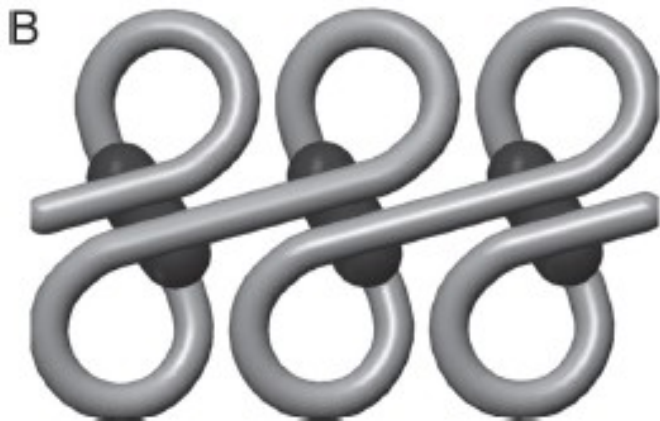




stereoskopický obrázek
docking (pouze model)

Skládání nukleosomů
do kompaktnějších
struktur

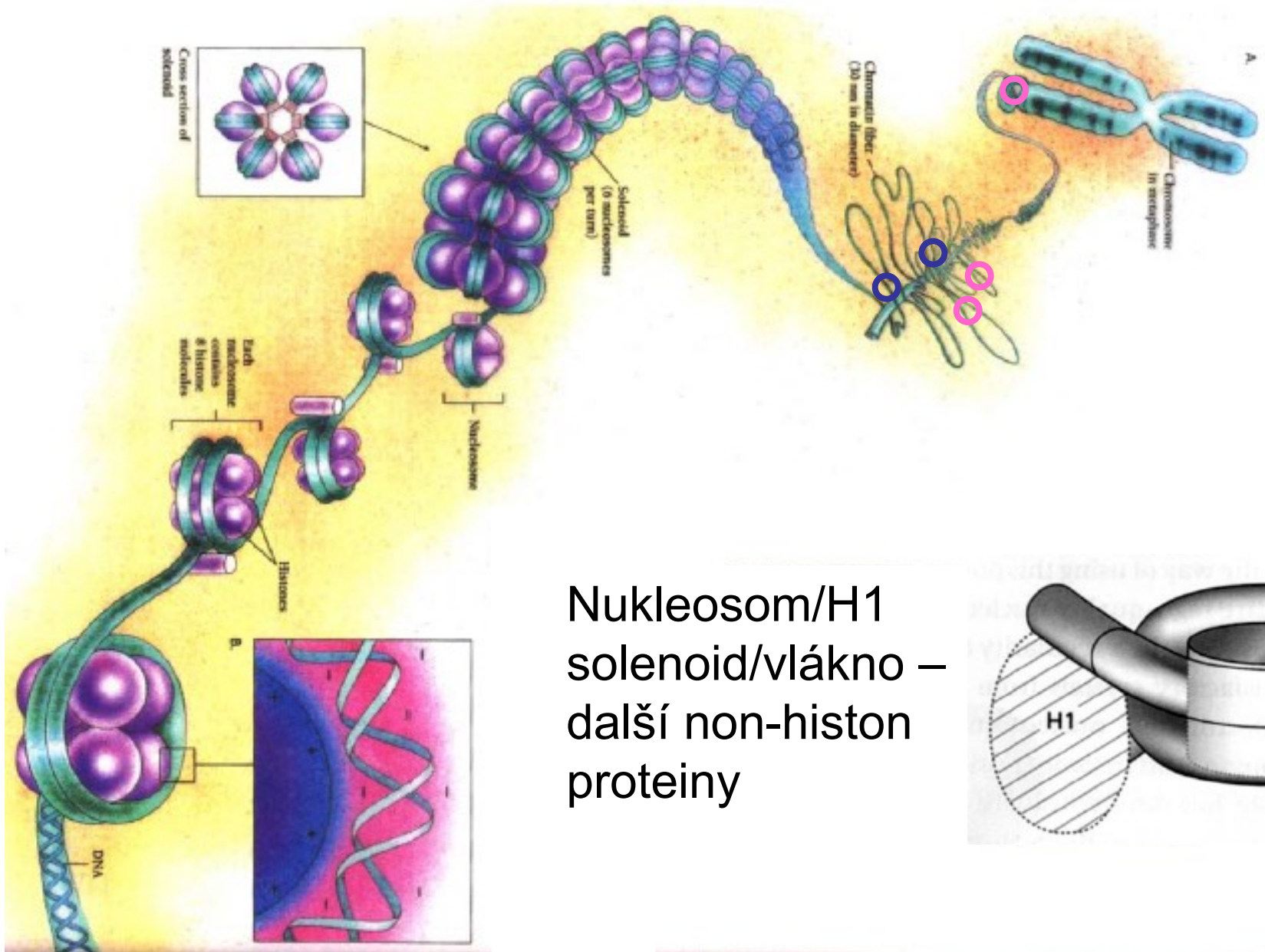
Fan & Roberts, PNAS, 2006



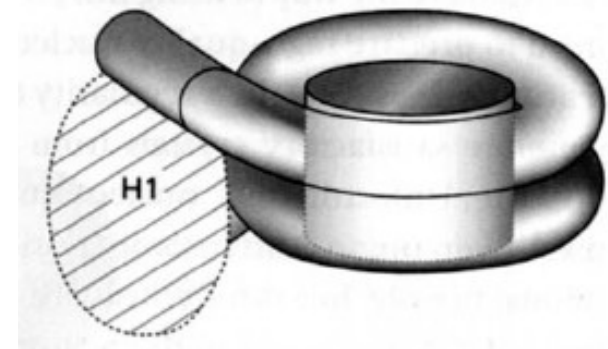
J. Fajkus

Histon H1/H5 interaguje s DNA (nukleosomem) a vytváří dimery (nukl. diady) – WHD doména může vytvářet více kontaktů (H3 šroubovice-MŽ, wing-cukrfosfátová kostra, protein-protein int.)

komplexy vytvářející strukturu chromosomu

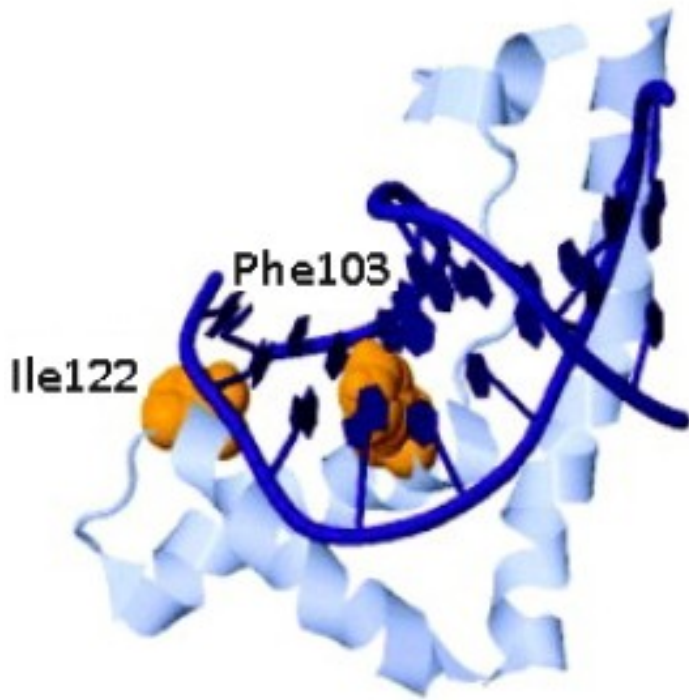


Nukleosom/H1
solenoid/vlákno –
další non-histon
proteiny



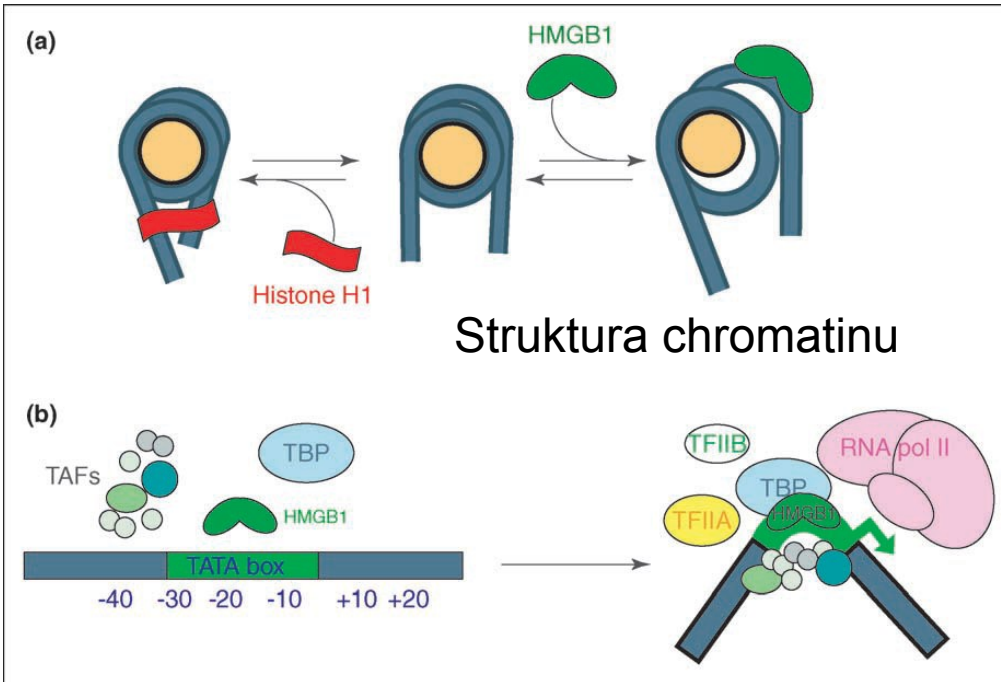
- HMGB (B-box) obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace Phe (aromatický kruh) způsobuje ohnutí DNA

HMGB box B domény proteinu HMGB1 v interakci s DNA

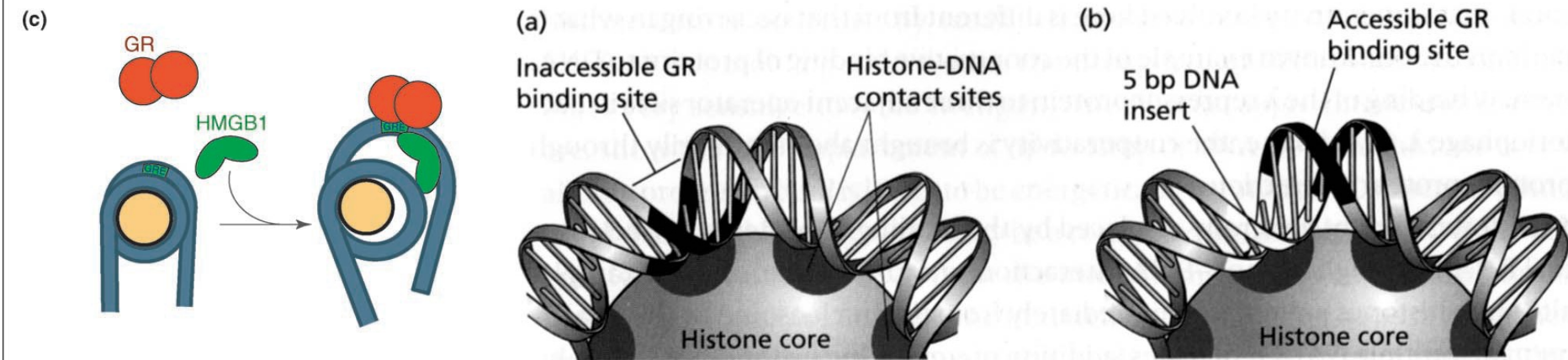


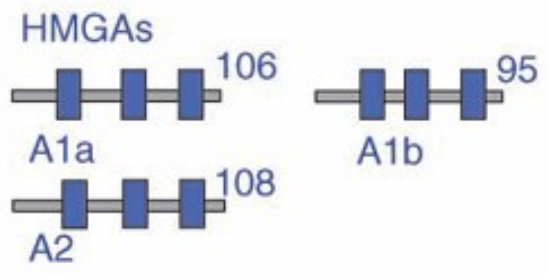
- ohyb a rozvolnění párování dsDNA může napomáhat procesům replikace, transkripce a rekombinace/opravy poškozené DNA
- ohyb napomáhá přiblížení vzdálených míst nebo zpřístupňuje DNA pro transkripční faktory
- HMG má vysokou afinitu k neobvyklým strukturám DNA (four-way junctions ...)

- HMGB (B-box) obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L
- 1. a 2. šroubovice váže cukrfosfátovou kostru a báze v MŽ
- interkalace Phe (aromatický kruh) způsobuje ohnutí DNA



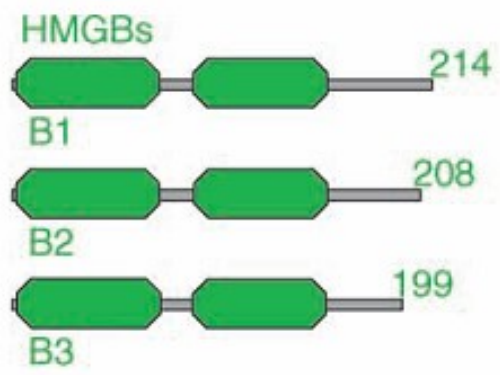
- ohyb napomáhá rozvolnění struktury chromatinu tj. moduluje pozici nukleosomů
- ohyb může pomáhat TBP a iniciaci transkripce
- pomáhá zpřístupnit DNA pro transkripční regulátory



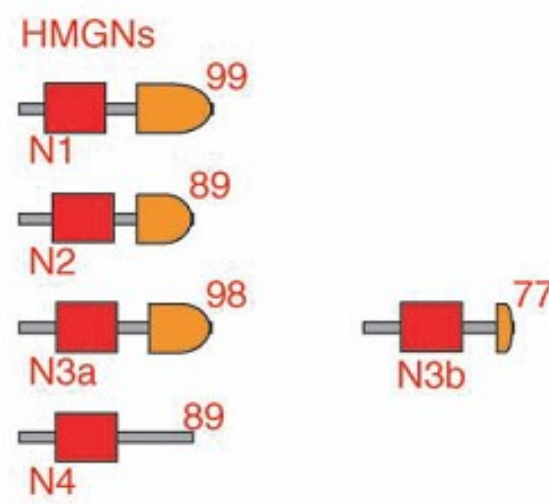


HMG – high-mobility group (PAGE)

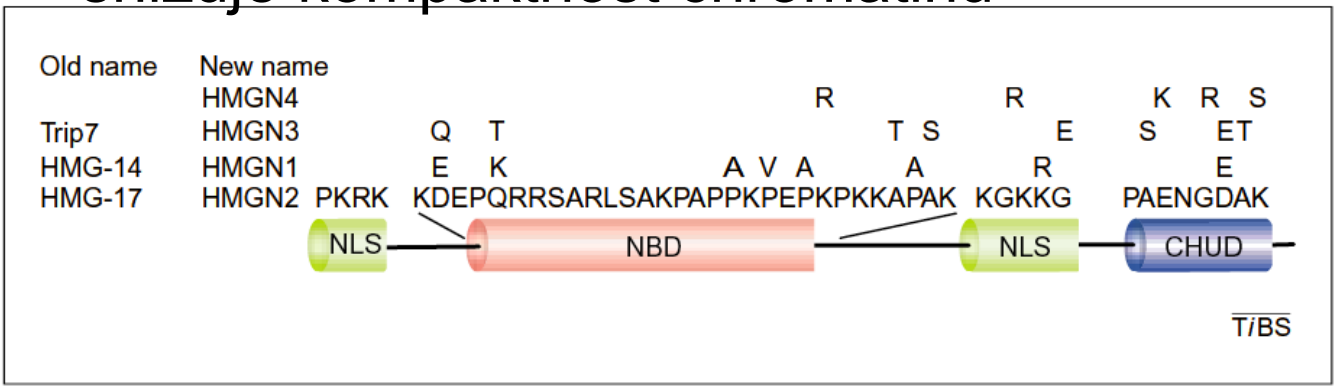
- HMGA obsahuje AT-hook (Arg a Gly) a váže se na AT-bohatou DNA – také ohýbá DNA a pomáhá transkripci

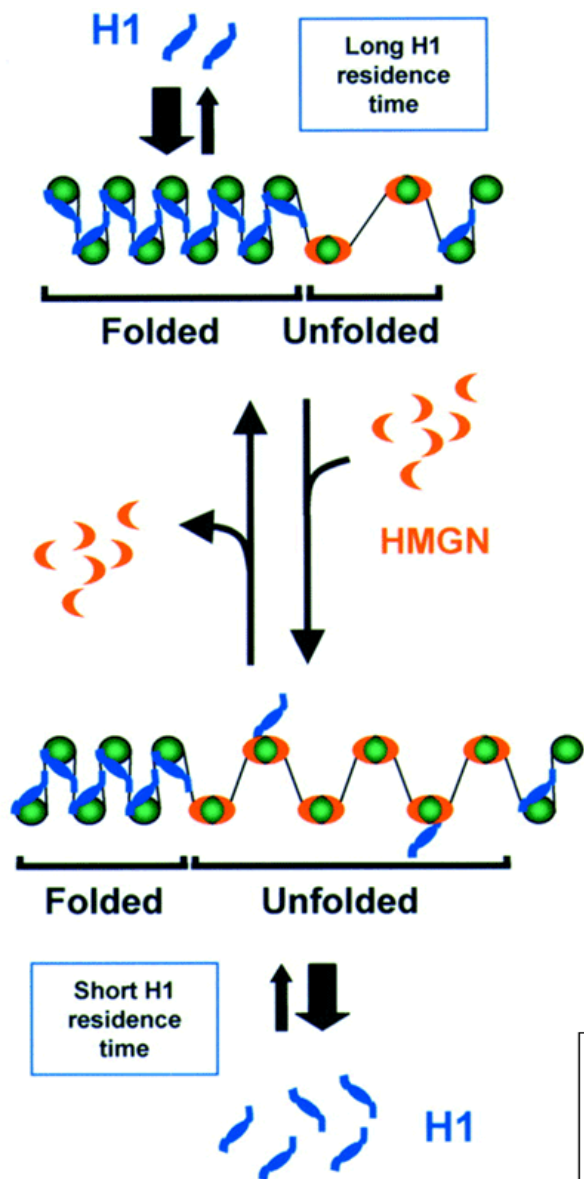


- HMGB (B-box) obsahuje 3 šroubovice uskupené ve tvaru L

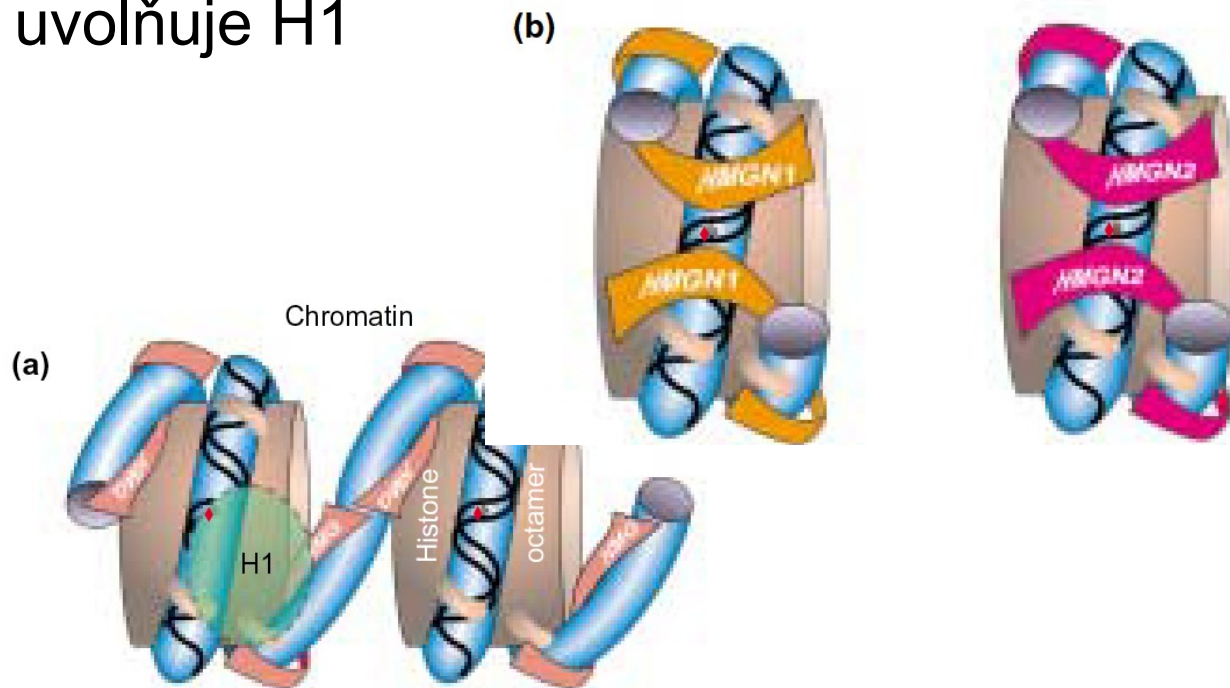


- HMGN obsahuje nucleotid-binding doménu a chromatin unfolding doménu
- snižuje kompaktnost chromatinu





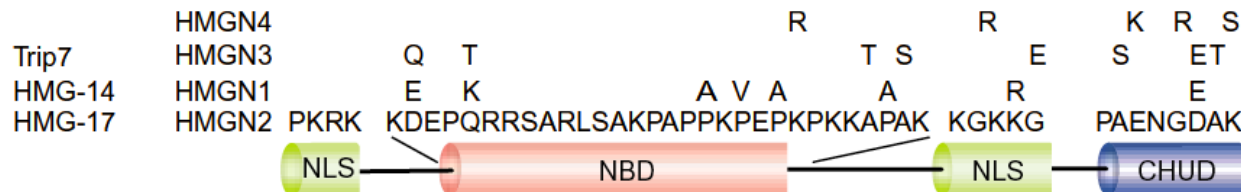
- HMGN interaguje s DNA i histony a uvolňuje H1



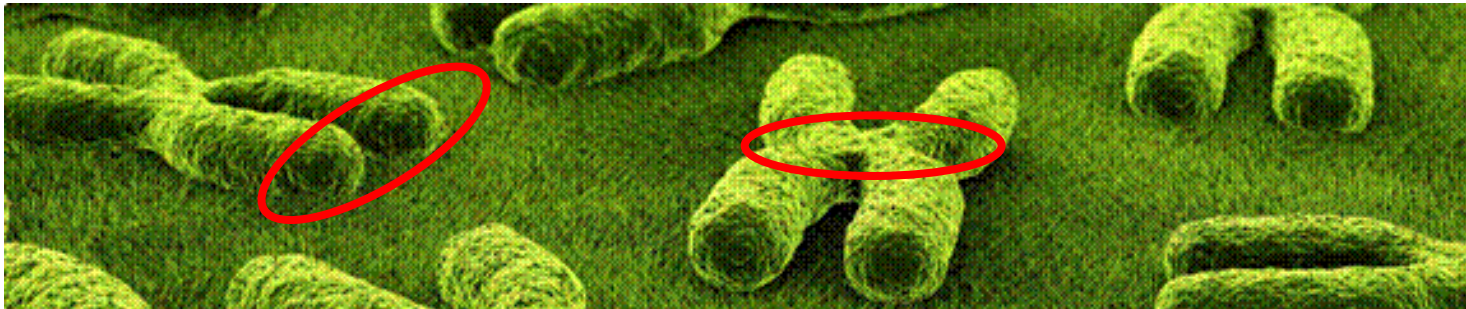
- HMGN obsahuje nucleotid-binding doménu a chromatin unfolding doménu

- snižuje kompaktnost chromatinu

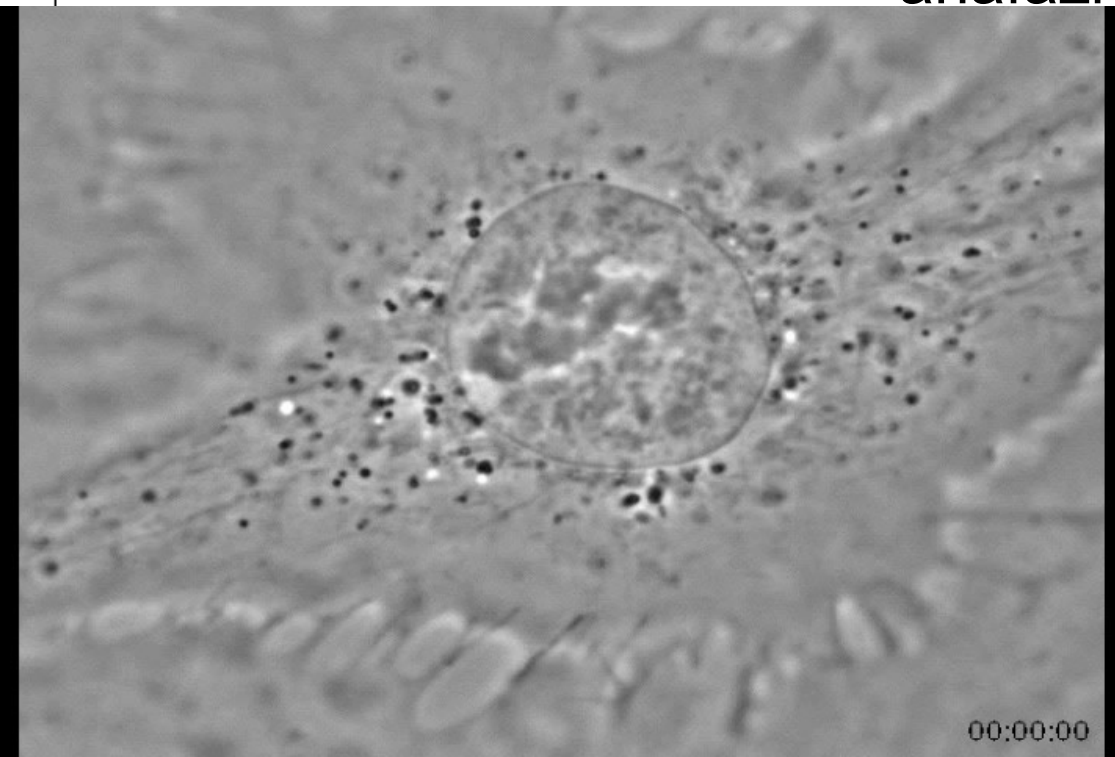
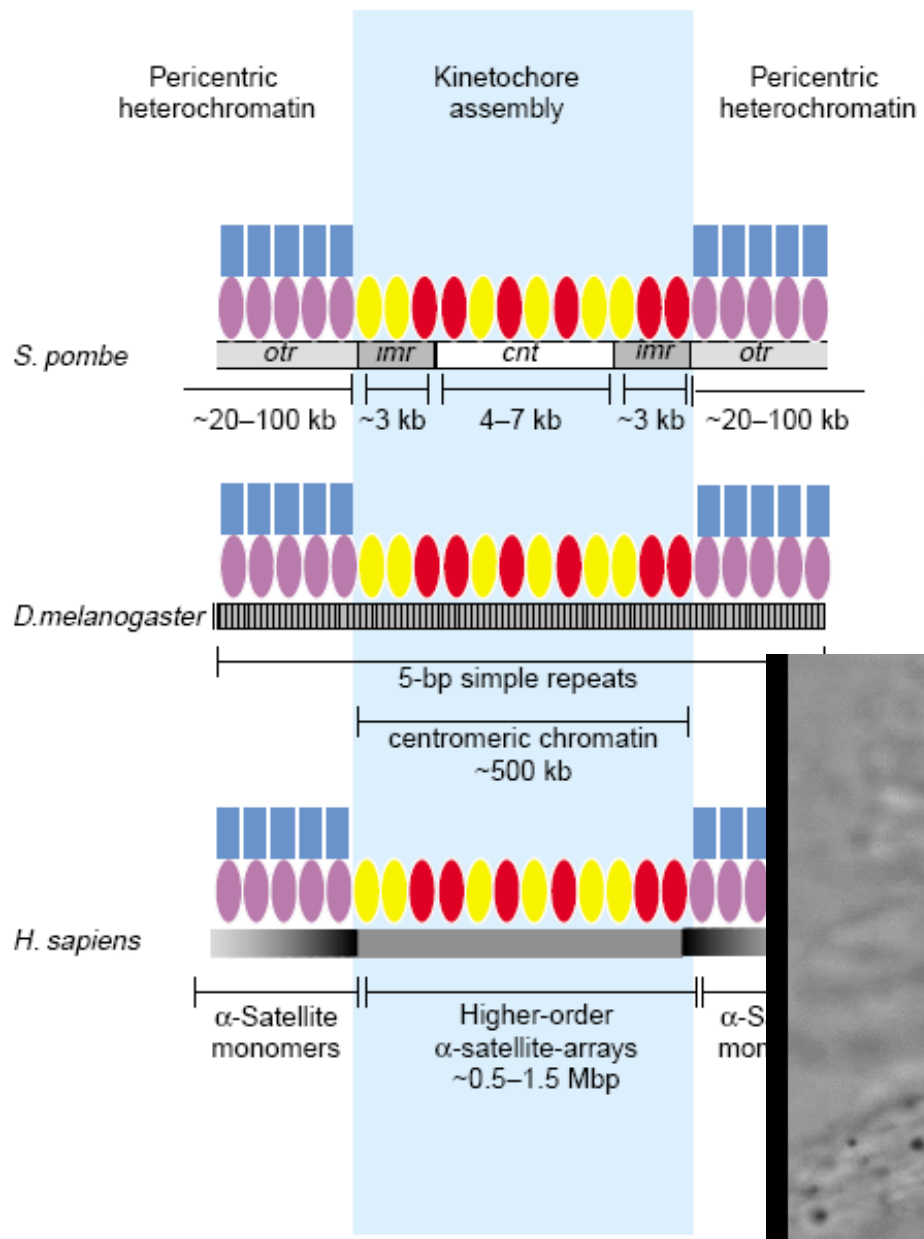
Old name	New name
Trip7	HMGN4
HMG-14	HMGN3
HMG-17	HMGN1
	HMGN2



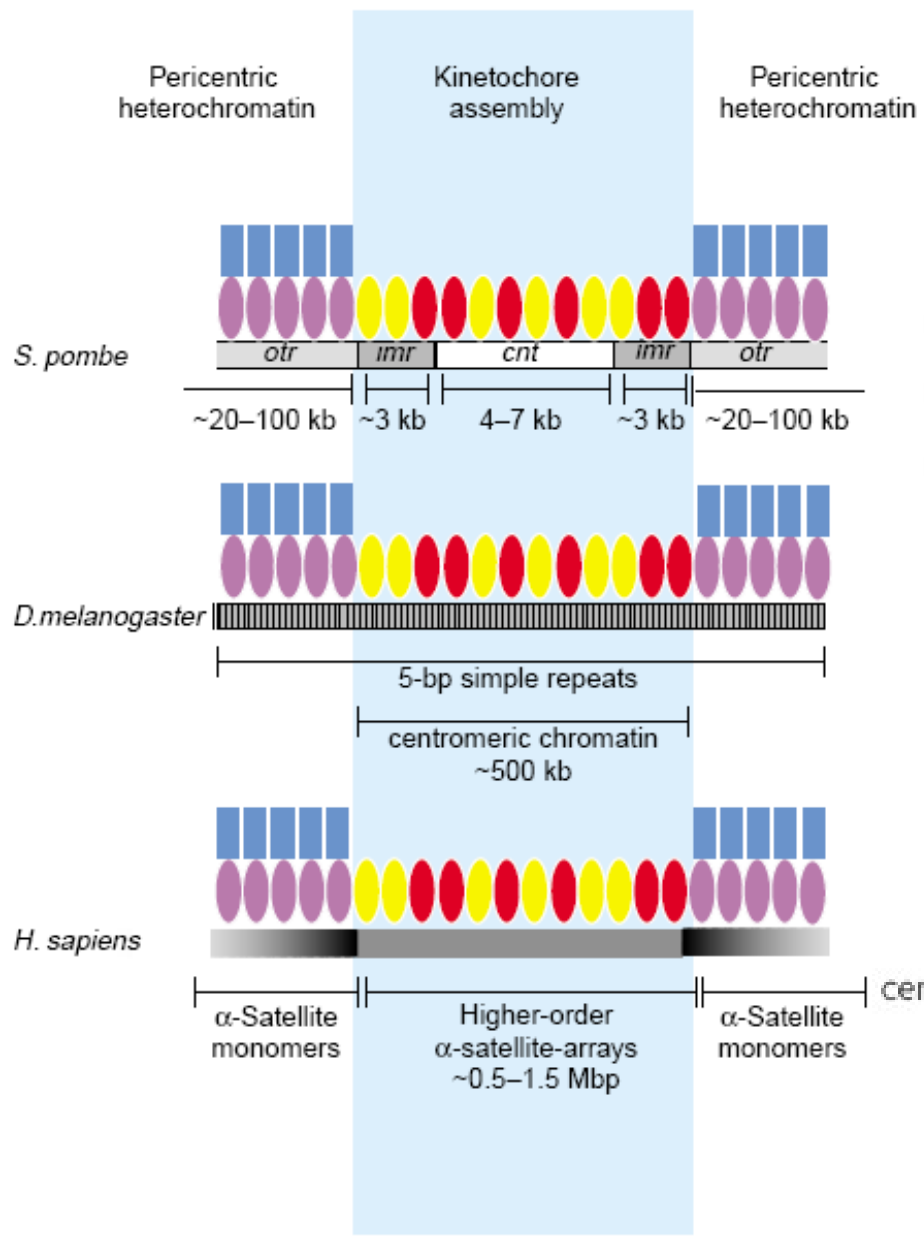
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy –
 - **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
 - vytváří základní strukturu
 - nukleosomy (histonový oktamer) a histony (H1)
 - HMG, HP proteiny
 - **vytváří specializované domény**
 - centromery, telomery
 - podílí se na dynamice struktury
 - kohesin, kondensin a SMC5-6 komplex



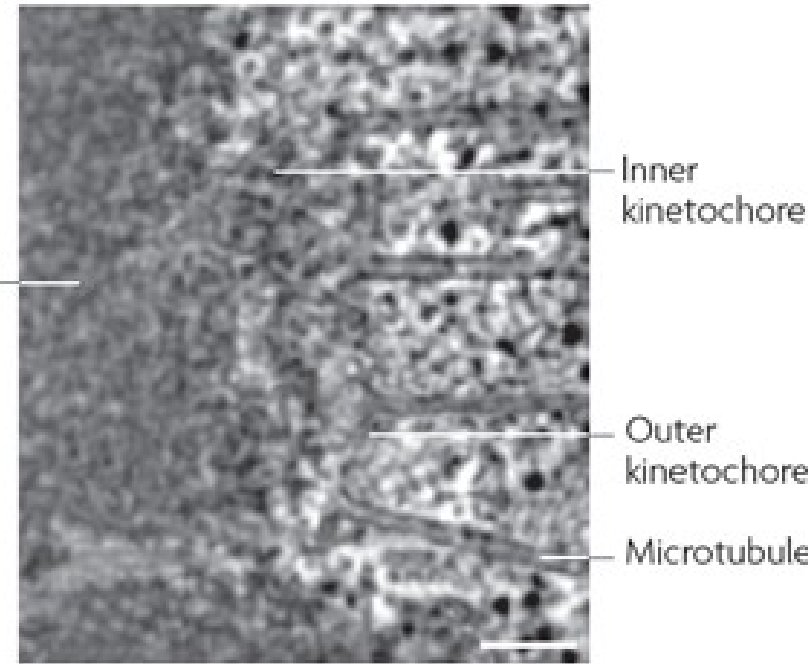
Repetitivní sekvence vytvářející specifický chromatin – CENP-A histon, který kotví kinetochoru (kolem je pericentromerický heterochromatin a SMC komplexy) tah mikrotubulů a kohesiny zajišťují správnou segregaci v anafázi



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

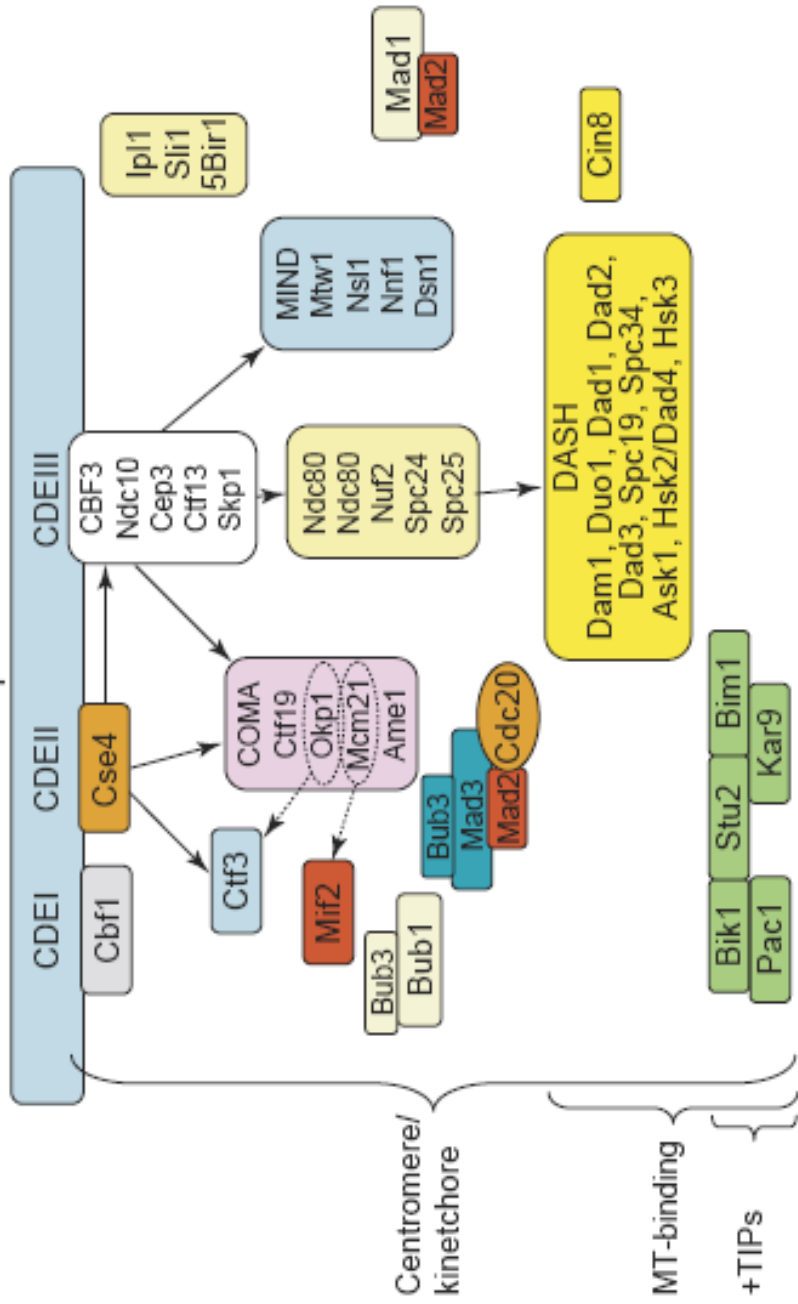


- HP1
- Me-K9 H3
- diMeK4-H3
- CENP-A



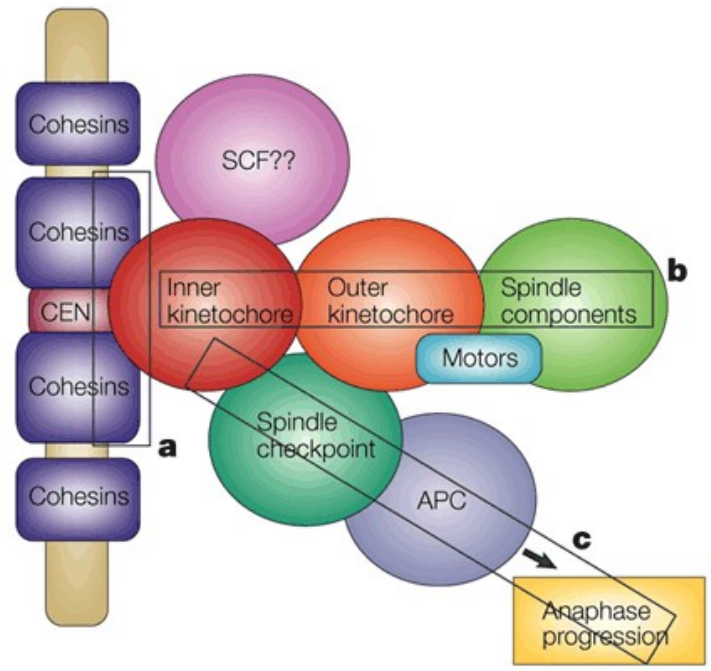
Velké komplexy viditelné EM

Budding yeast centromere/kinetochore
125-bp CEN DNA



Mad2 komplexy kontrolují ukotvení kinetochor (konformační změna - dokud nejsou všechny nedojde k segregaci)

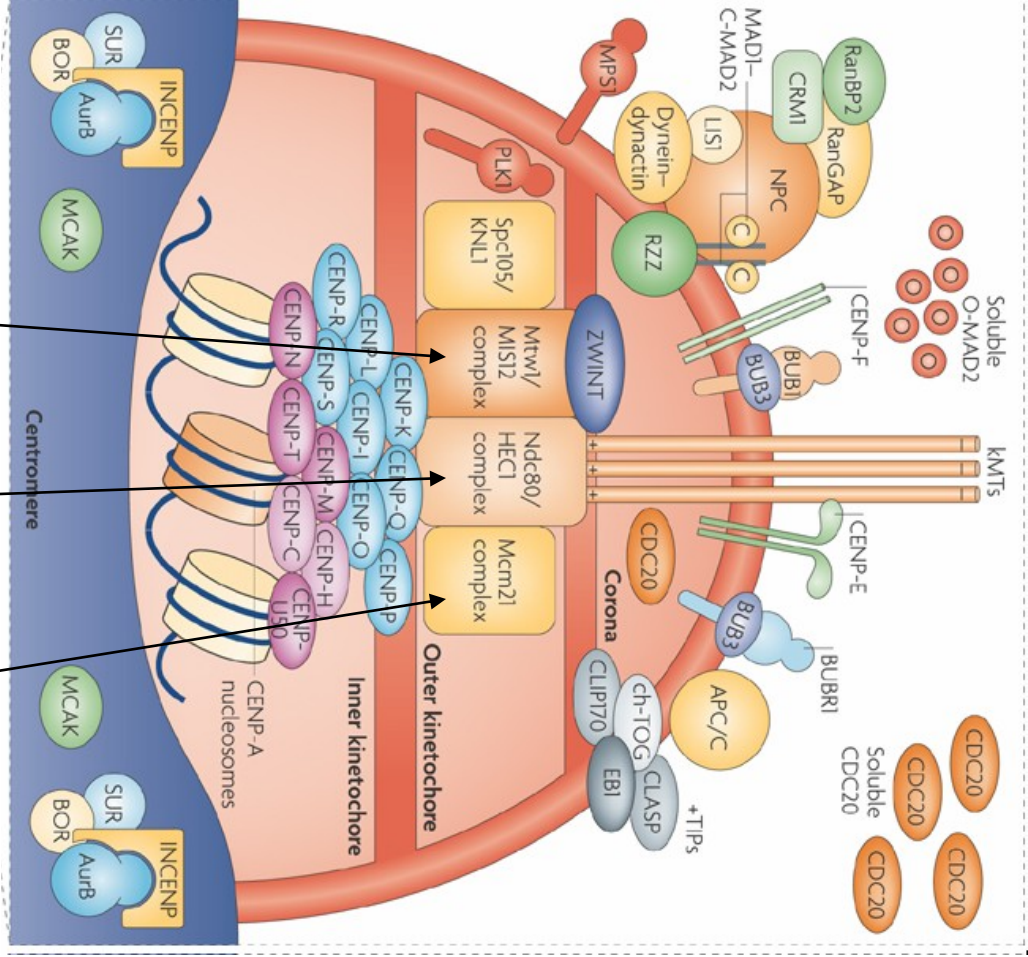
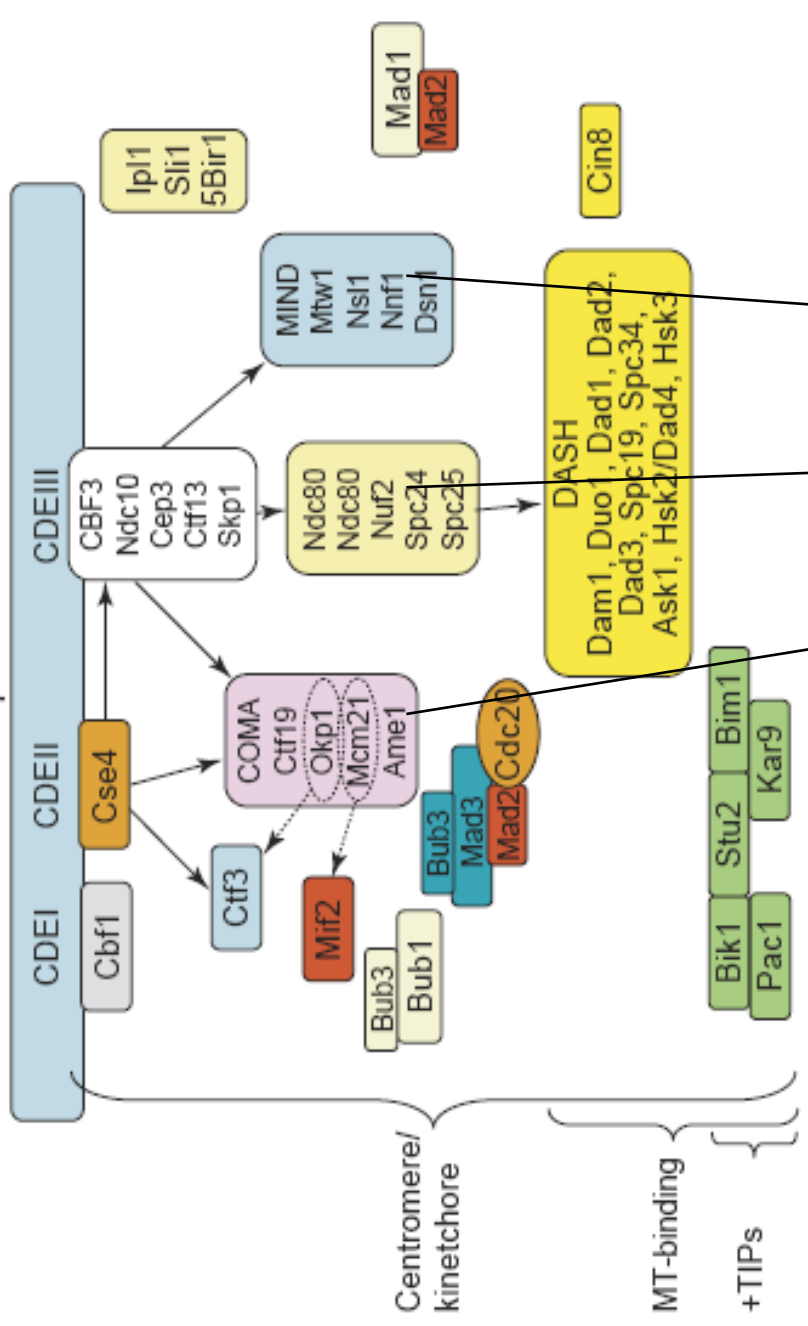
APC komplex (ubiquitin ligasa) proteolyticky štěpí např. sekurin (uvolňuje separasu, která štěpí kleisin tj. otevírá kohesin)



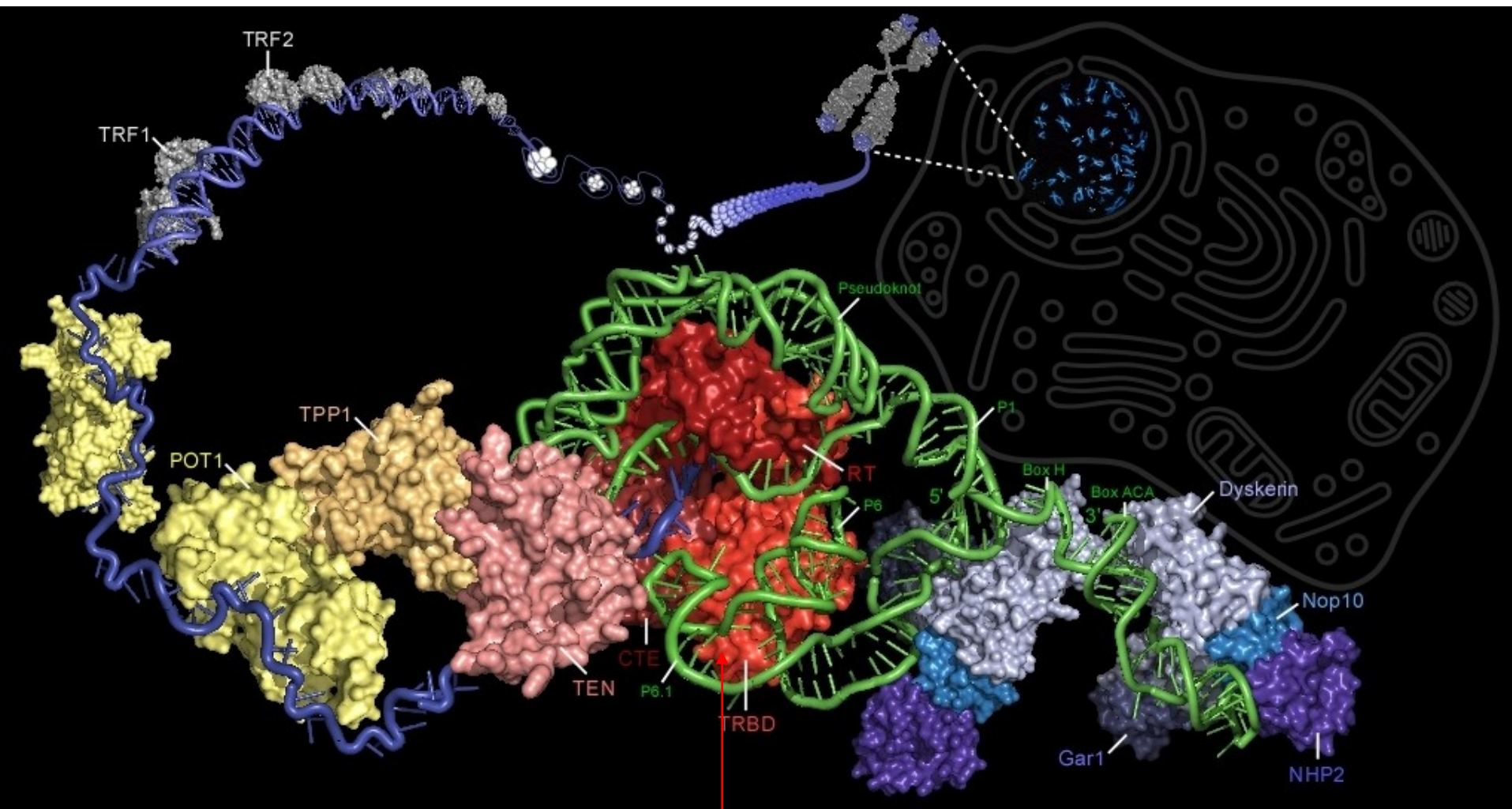
(c)

Budding yeast centromere/kinetochore

125–bp CEN DNA



COMA, MIND, NDC ... komplexy jsou konzervované



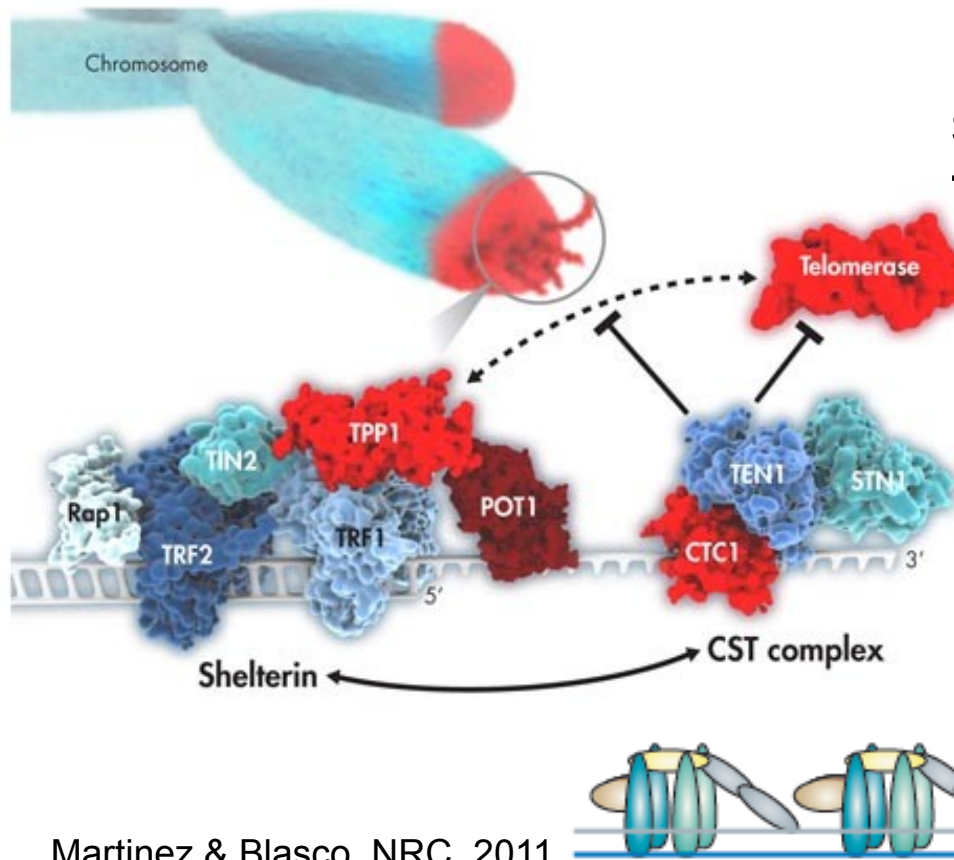
Shelterin
ochrana telomer před
opravou či fúzí

Telomerása

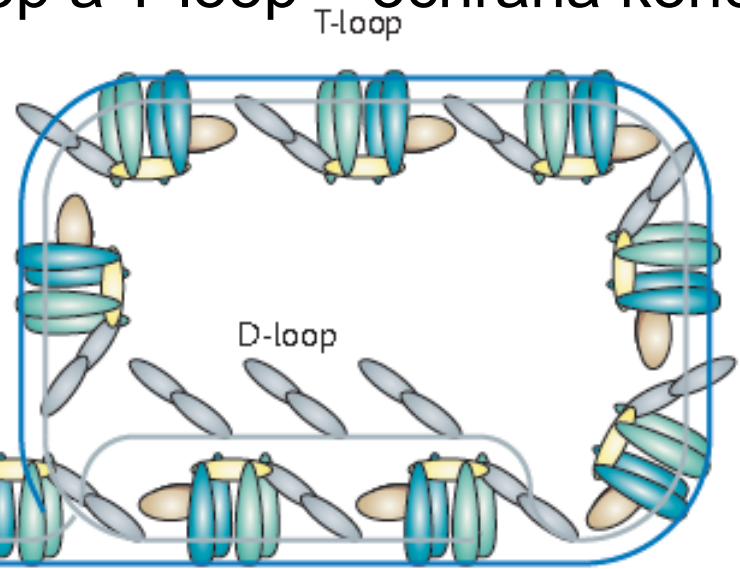
Dyskerin
Stabilizuje RNA podjednotku

Prodlužování telomer (zkracují se nedoreplikováním konců)

Telomeres



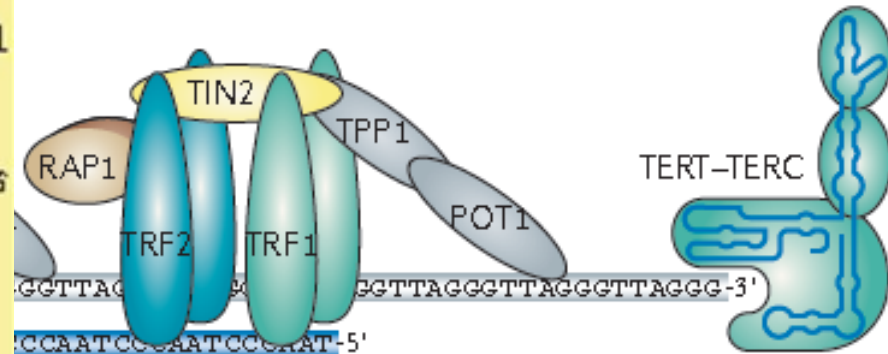
TRF1 a TRF2 vážou dsDNA (TTAGGG), zatímco POT1 váže ssDNA (3'-overhang) - TIN2, TPP1 a Rap1 dotváří komplex D-loop a T-loop – ochrana konce



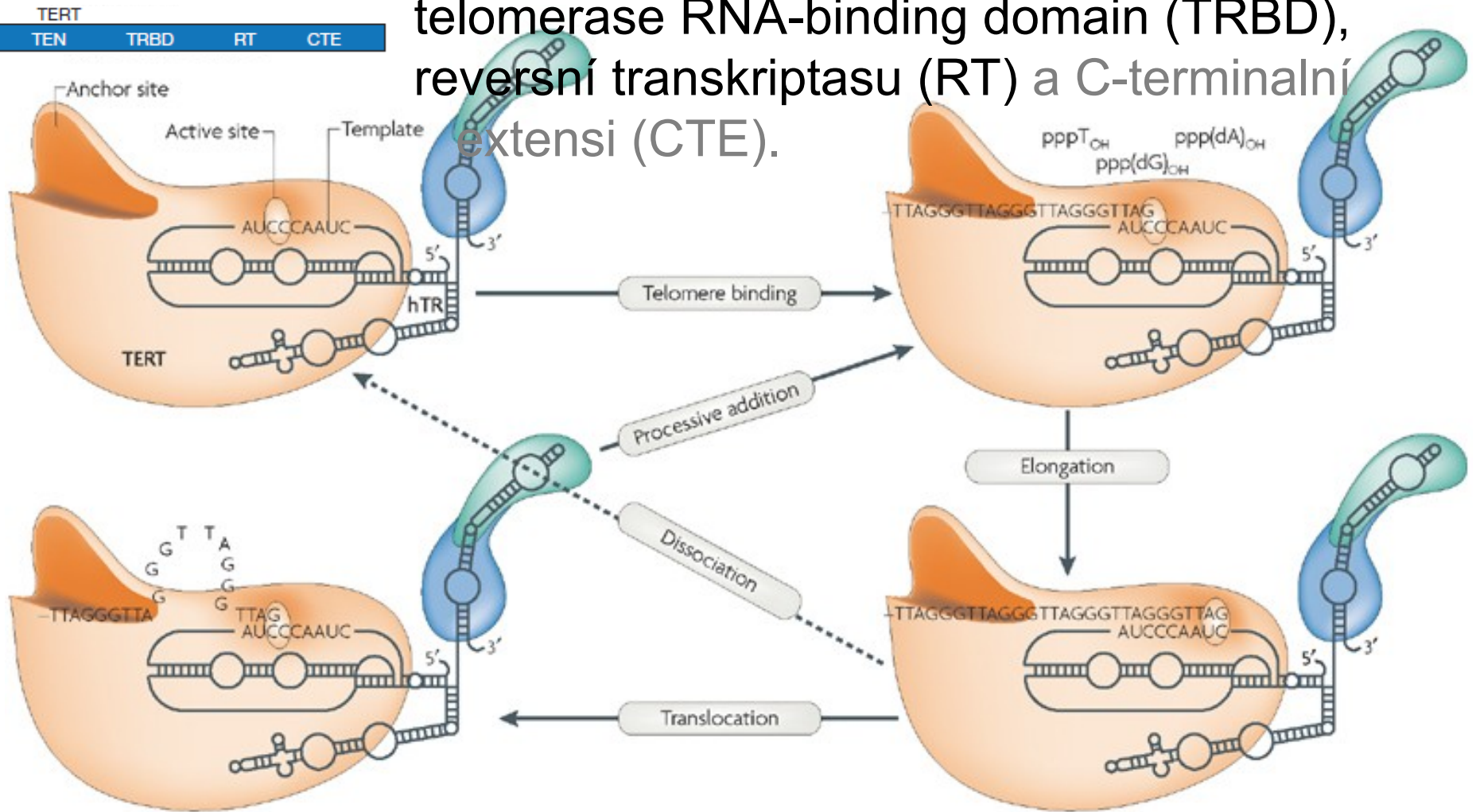
Martinez & Blasco, NRC, 2011

Telomeric roles

- Protection and recombination (TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 and RAP1)^{8,12,36}
- G-strand protection (POT1)^{9,1,35,75}
- Length regulation (TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 and RAP1)^{8,12,36}
- Inhibition DDR (TRF2, TRF1, POT1 and RAP1)^{8,36,44,84}
- Telomere replication (TRF1)^{37,85}
- Telomerase recruitment (TPP1)^{43,39}



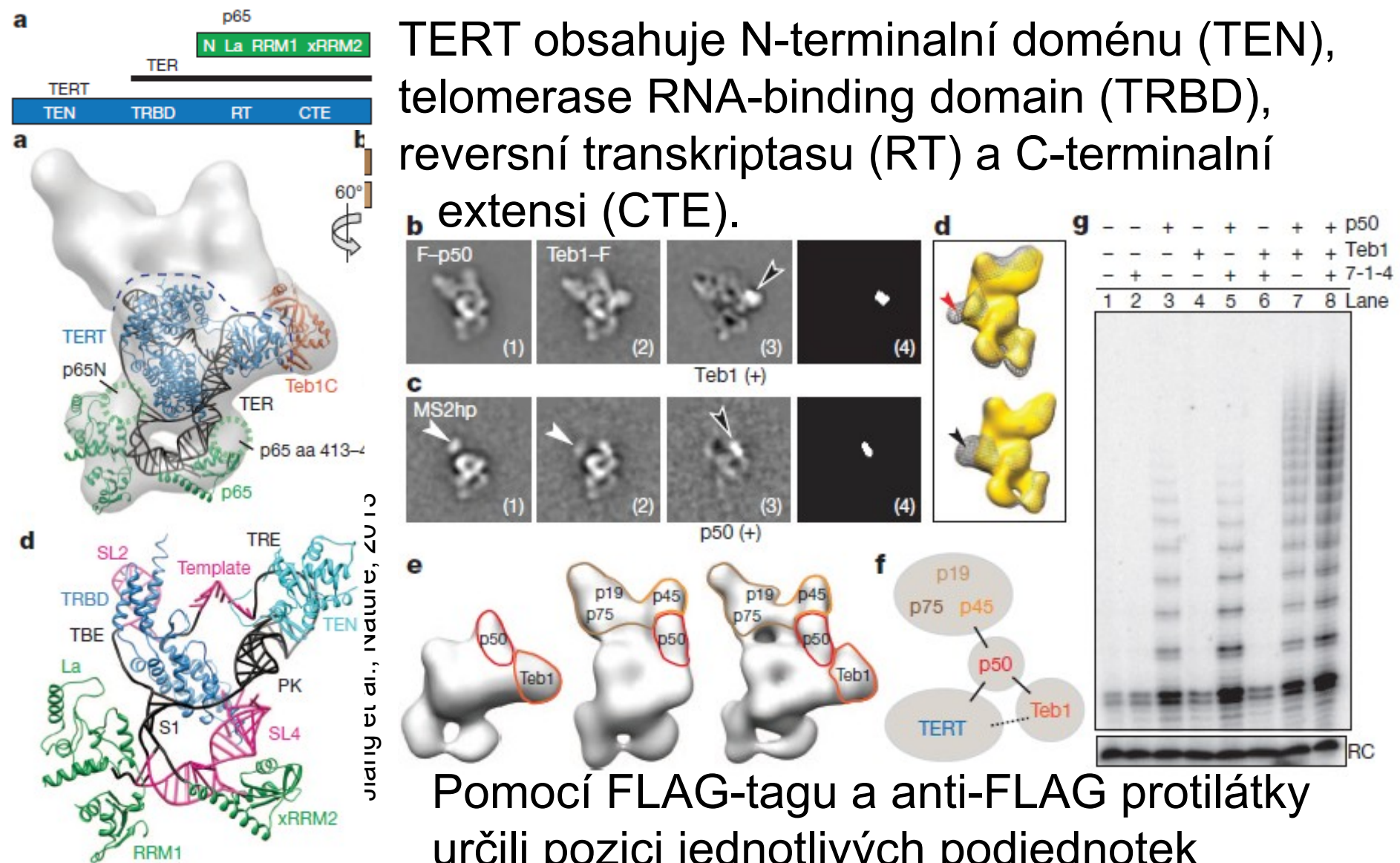
TERT obsahuje N-terminální doménu (TEN), telomerase RNA-binding domain (TRBD), reverzní transkriptasu (RT) a C-terminální extenzi (CTE).



Nature Reviews | Cancer

Telomeráza je RNA-dependentní reverzní transkriptáza jejíž templátová RNA (telomerase RNA component (TR)) je součástí enzymu (*in vitro* stačí TERT ale *in vivo* 6 podjednotek)

TERT obsahuje N-terminální doménu (TEN), telomerase RNA-binding domain (TRBD), reversní transkriptasu (RT) a C-terminální extenzi (CTE).

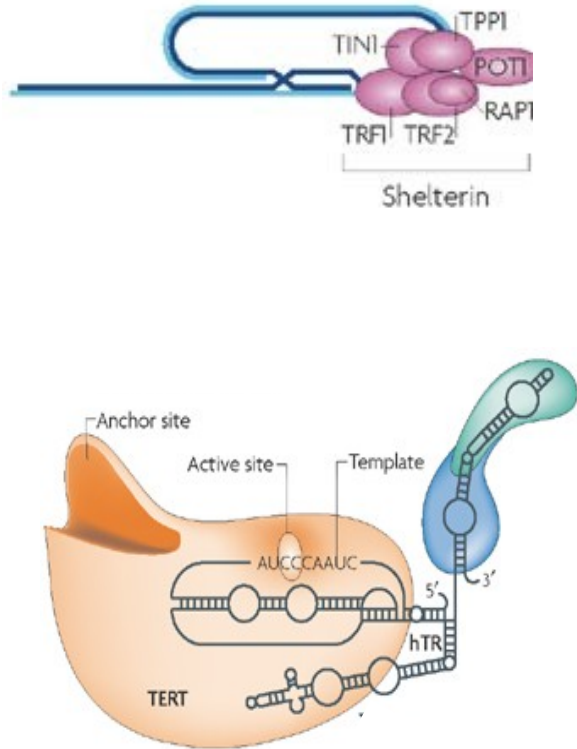


Pomocí FLAG-tagu a anti-FLAG protilátky určili pozici jednotlivých podjednotek

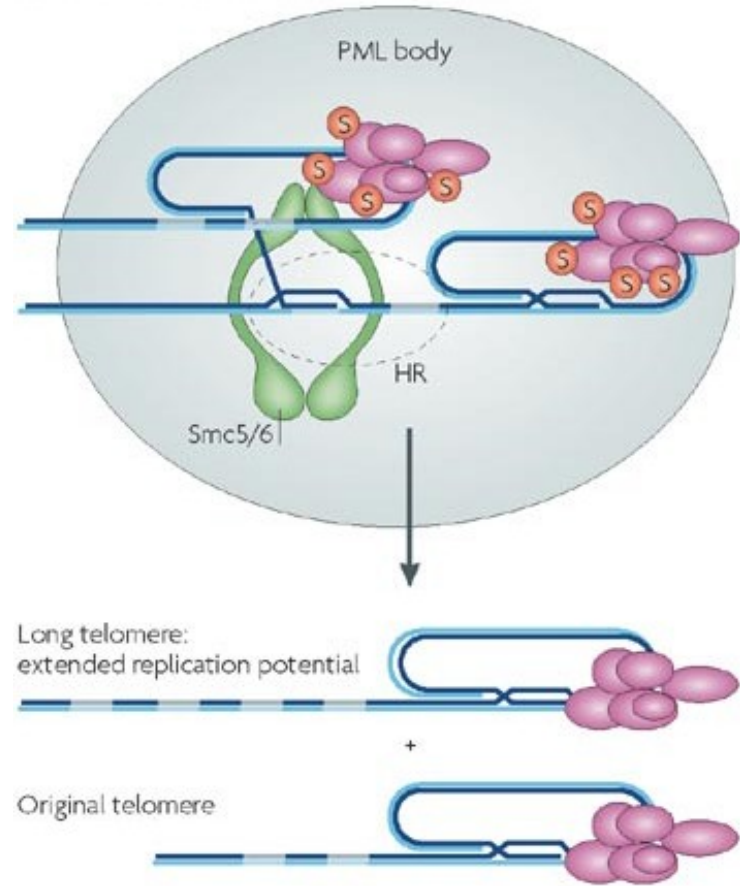
in vitro stačí TERT ale *in vivo* 6 podjednotek – p50 a Teb1 stimulují/pomáhají v prodlužování telomeroevých sekvencí

Strategie pro udržování délky telomer

a) telomeráza

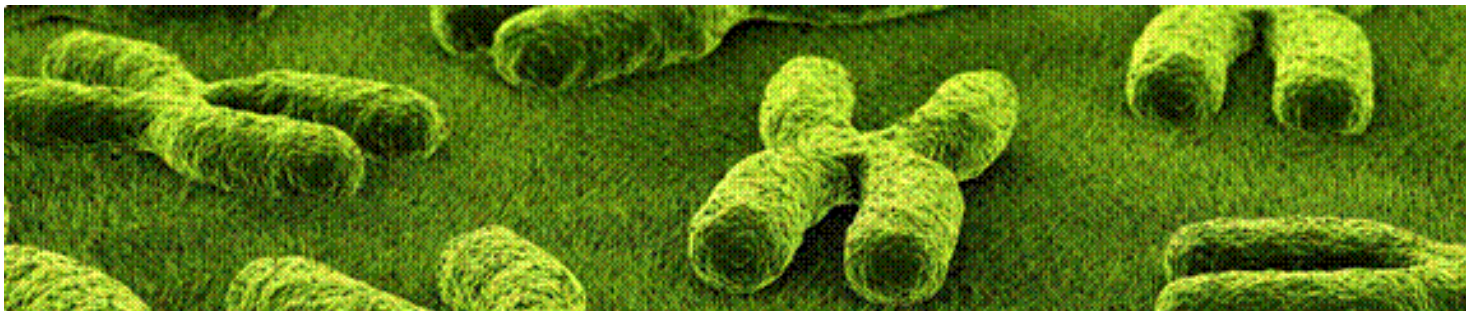


b) Alternativní prodlužování telomer (ALT)



Harley, C.B. Nat. Reviews Canc., 2008
Murray, JM and Carr, AM. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008

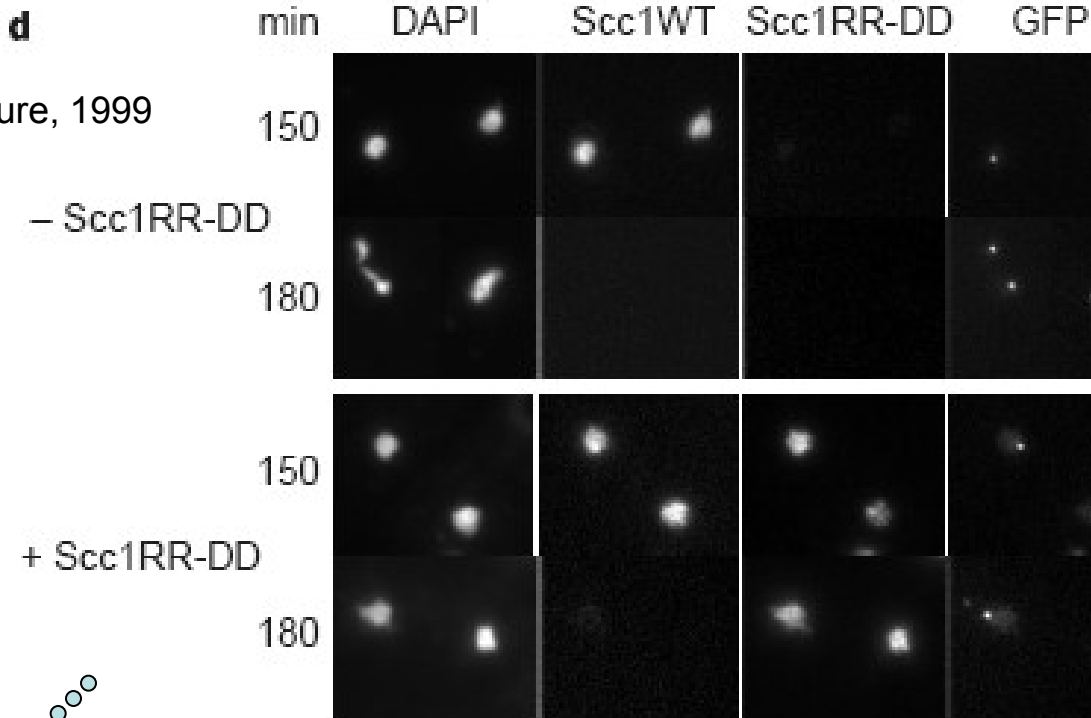
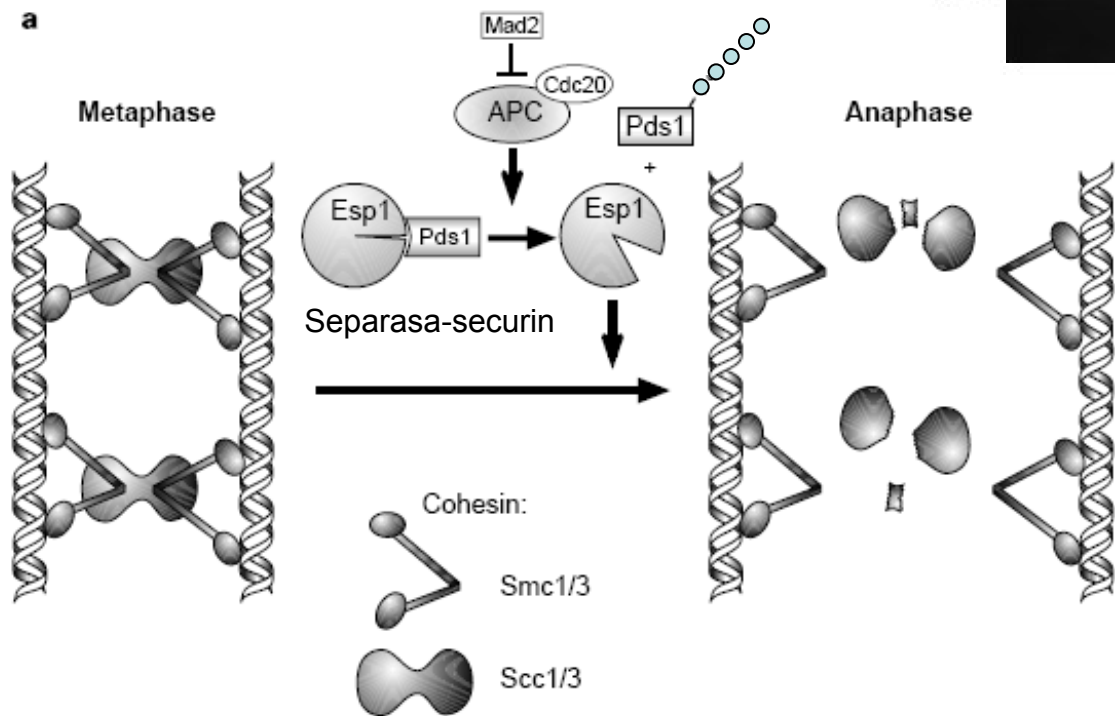
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy –
 - **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
 - vytváří základní strukturu
 - nukleosomy (histonový oktamer) a histony (H1)
 - HMG, HP proteiny
 - vytváří specializované domény
 - centromery, telomery
 - **podílí se na dynamice struktury**
 - kohesin, kondensin a SMC5-6 komplex



Model separace chromosomů (*S. cerevisiae*)

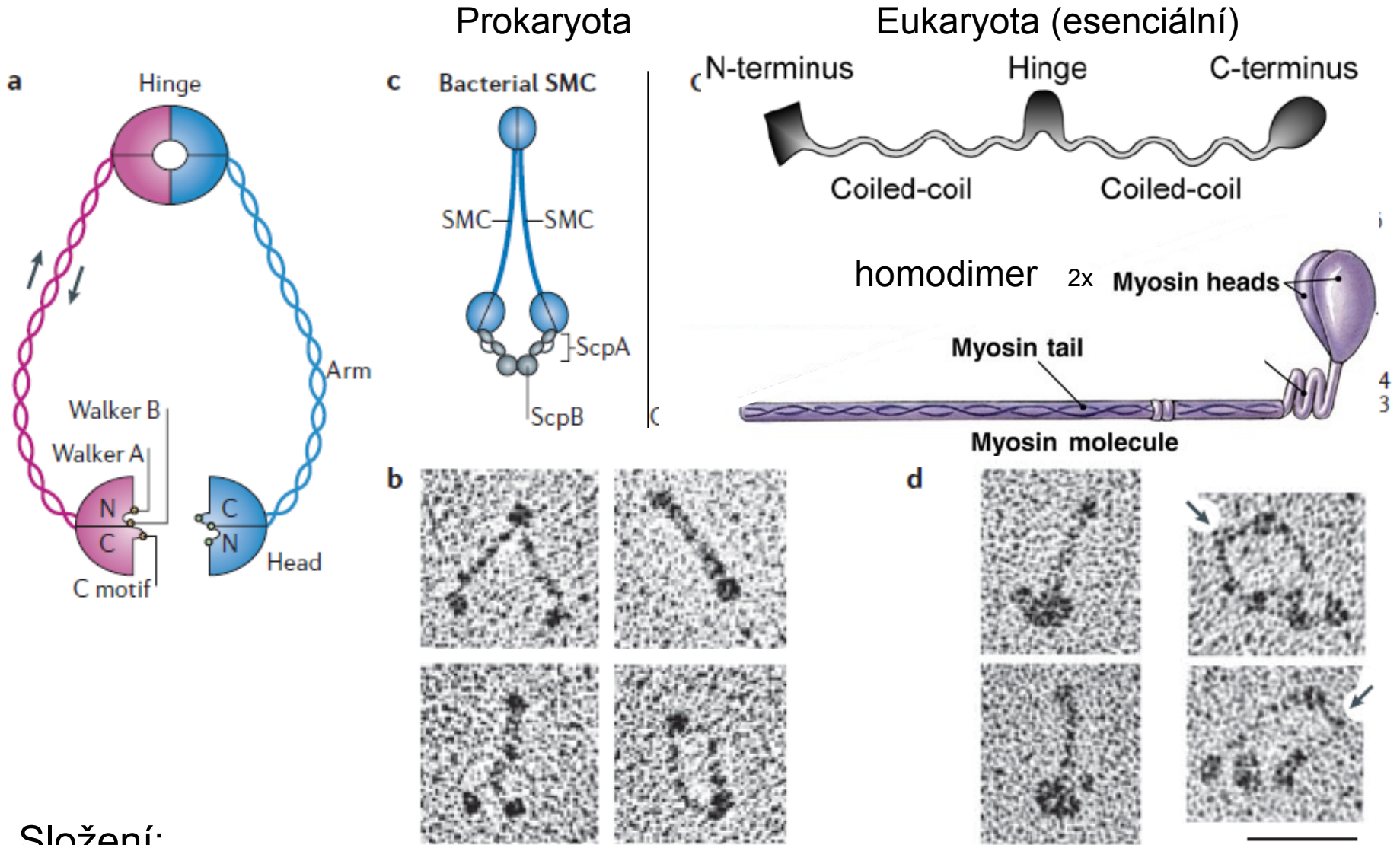
Uhlmann et al., Nature, 1999

APC=anaphase promoting complex



Komplex Mad2/Cdc20 inhibuje APC – po jeho uvolnění degraduje (ubiquityluje) securin – uvolní se tak separasa – štěpí Scc1 kleisin kohesinového komplexu

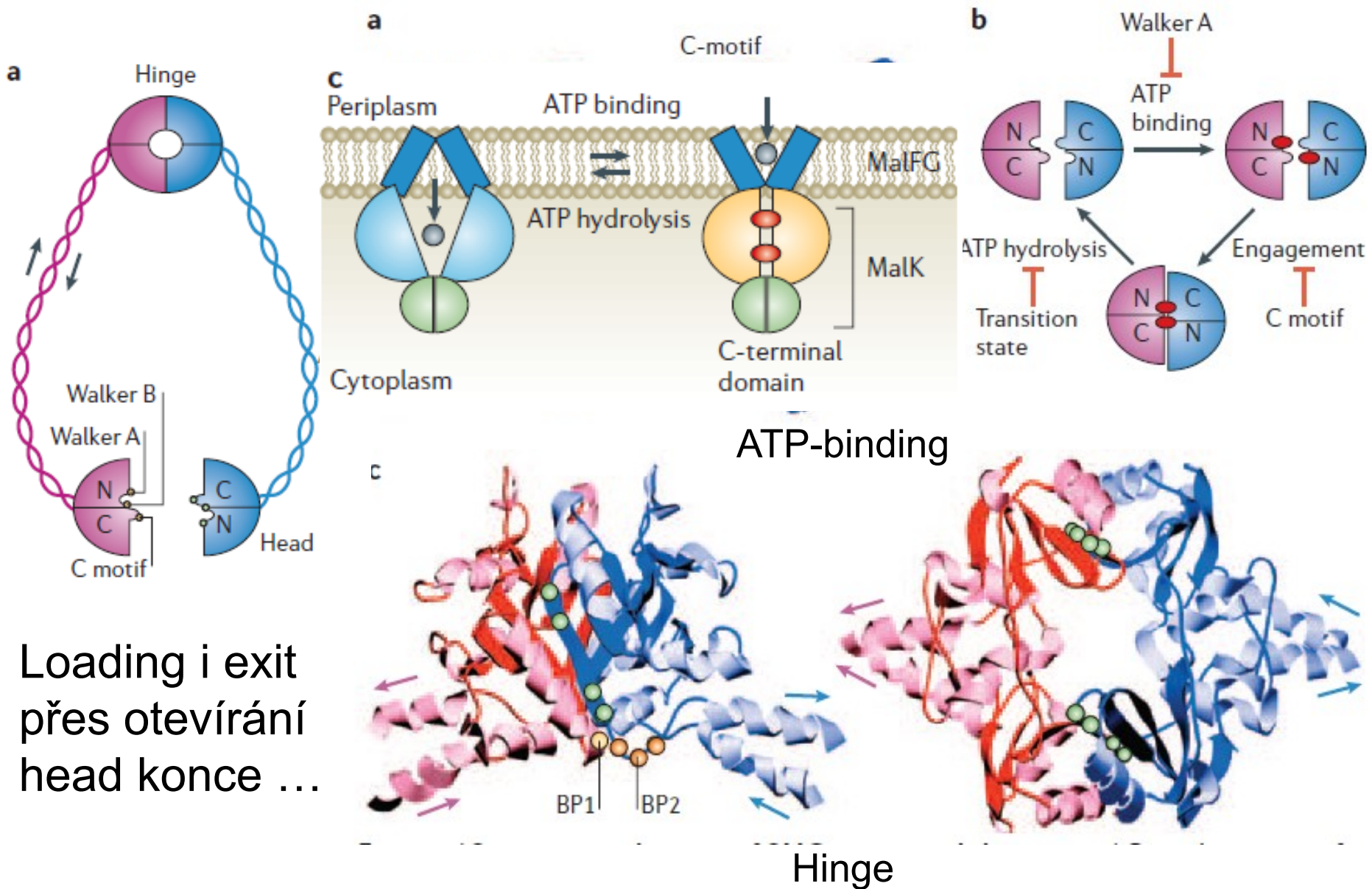
Komplexy SMC



Složení:

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

ATPase-binding cassette (ABC)

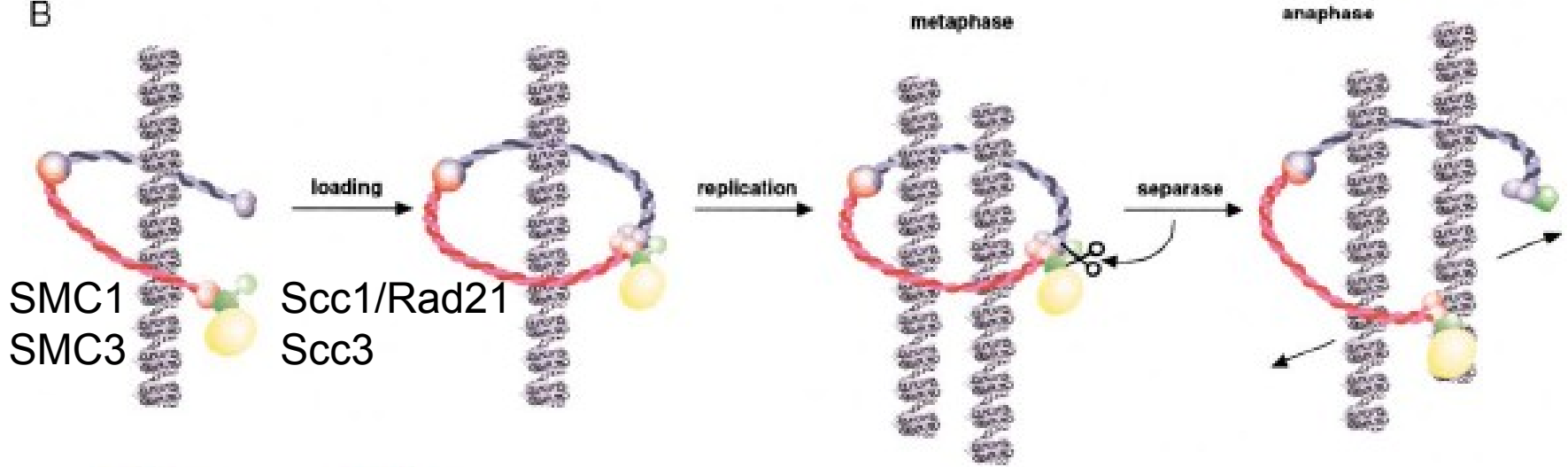


Loading i exit
přes otevírání
head konce ...

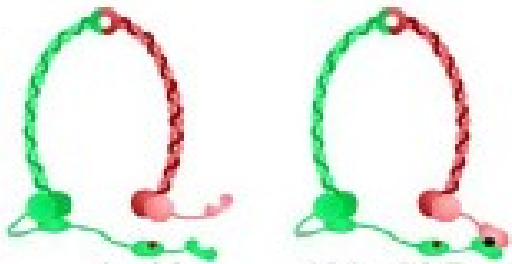
Dimerizace, vazba na DNA

Kohesin „objímá” DNA

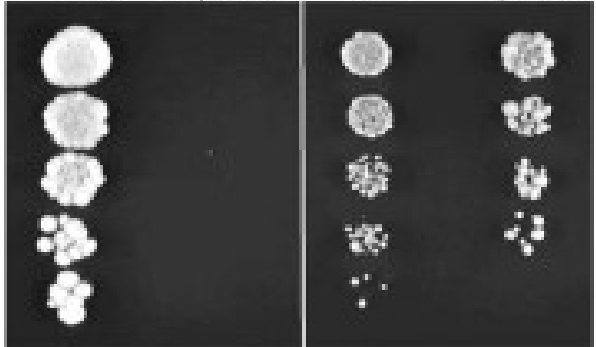
B



Haering et al, Mol Cell, 2002



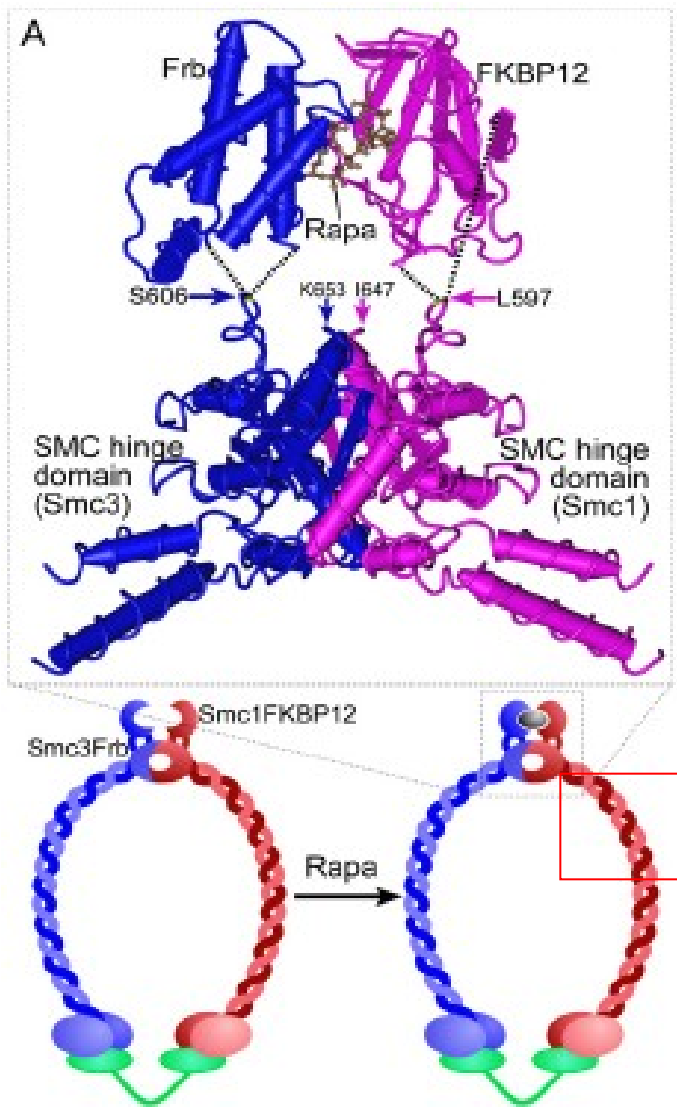
0 nM 100 nM Rapa
wt Q544K wt Q544K



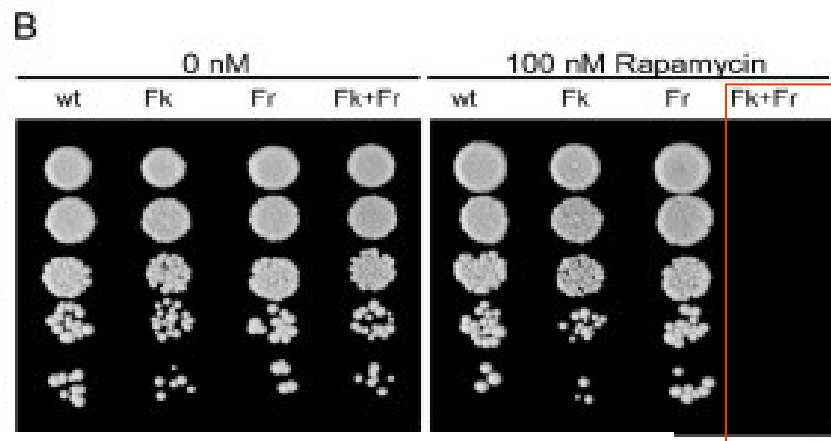
Použití fúzních proteinů při studiu kohese sesterských chromatid

SMC3-Scc1-Frb + SMC1-FKBP12
(vážou rapamycin)

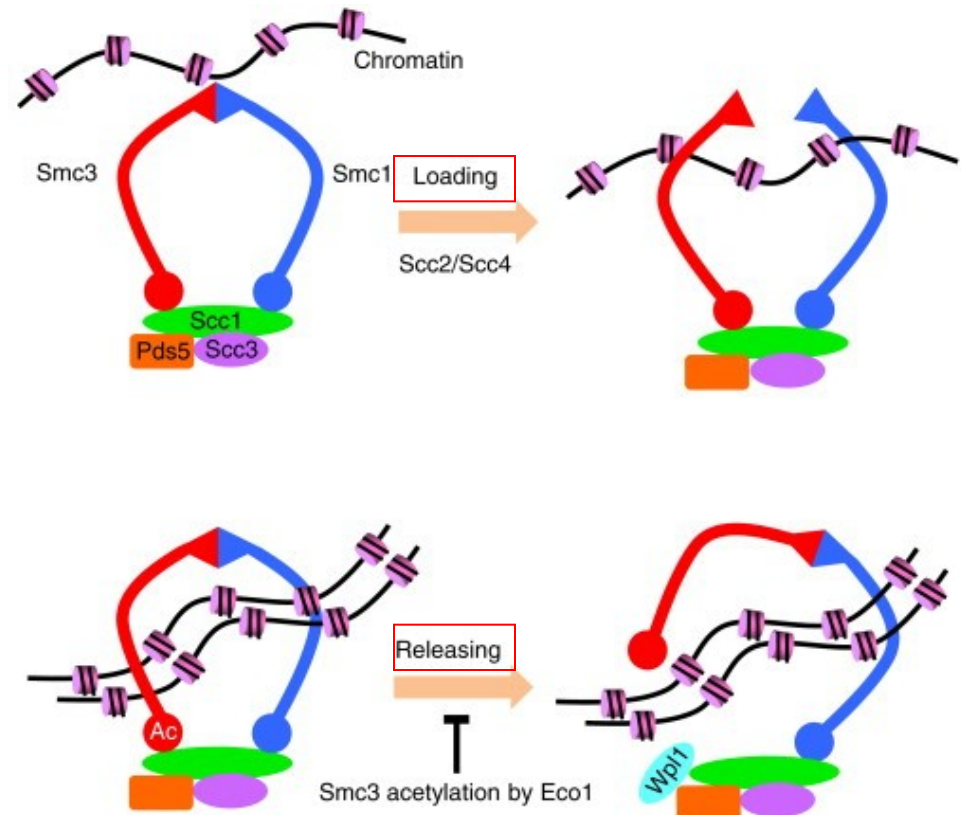
Gruber et al., Cell, 2006

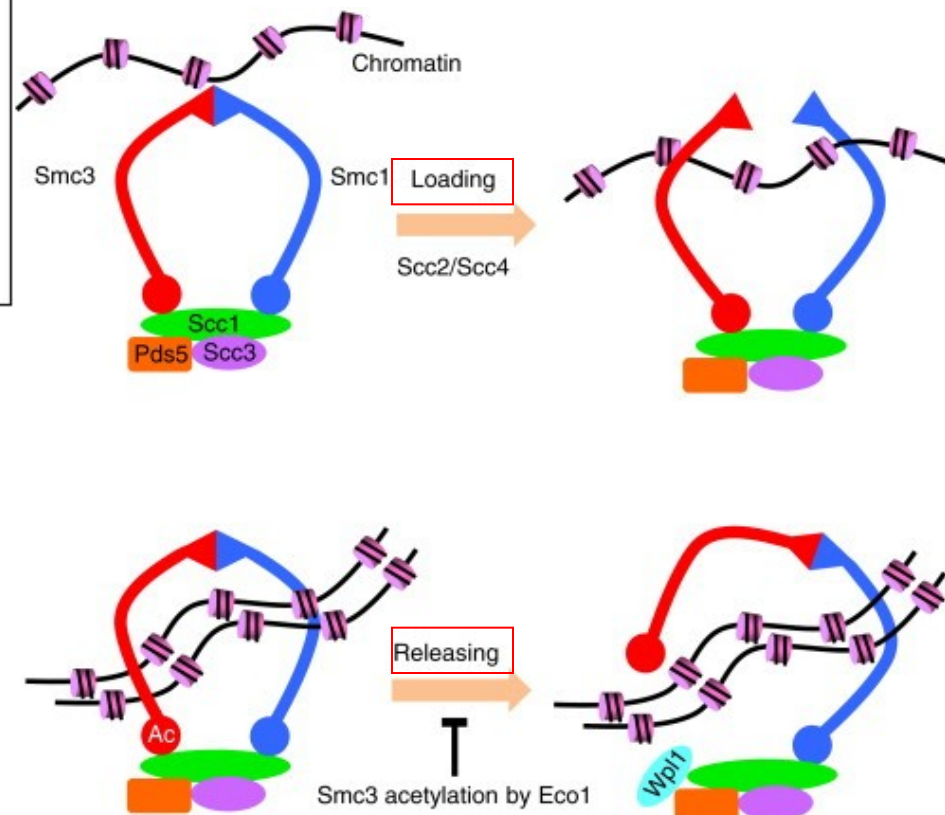
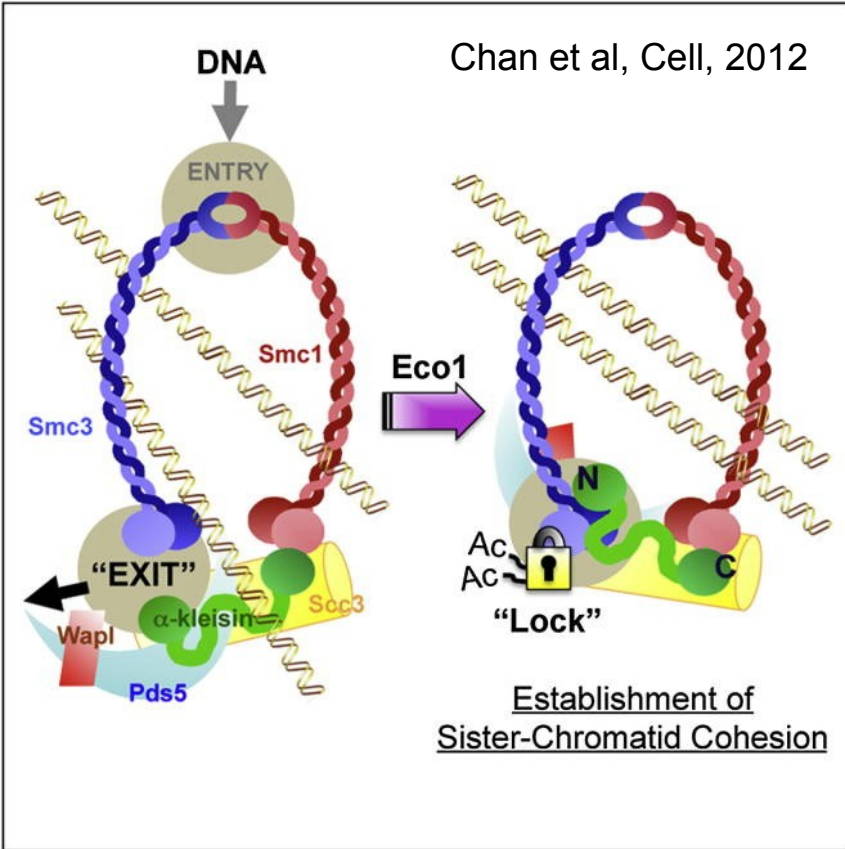


Loading přes hinge,
exit přes head



Uzamčení je pro buňku letální

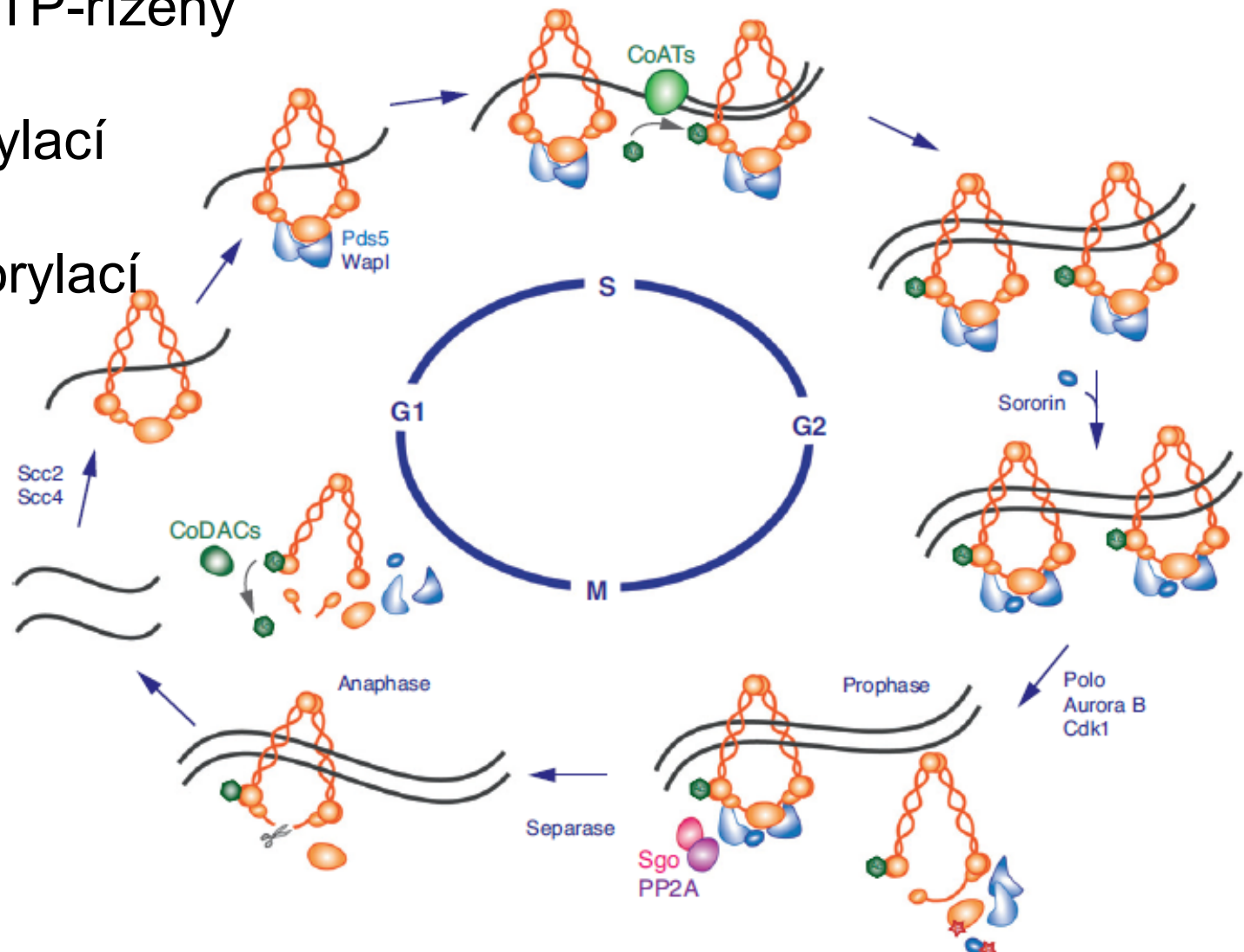




Loading přes hinge,
 exit přes head dvěma
 způsoby – štěpením
 kleisinu nebo ATP-řízený
 - regulace acetylací SMC3
 - regulace fosforylací Scc3

Loading přes hinge,
 exit přes head dvěma
 způsoby – štěpením
 kleisinu nebo ATP-řízený

- regulace acetylací
 SMC3
- regulace fosforylací
 Scc3



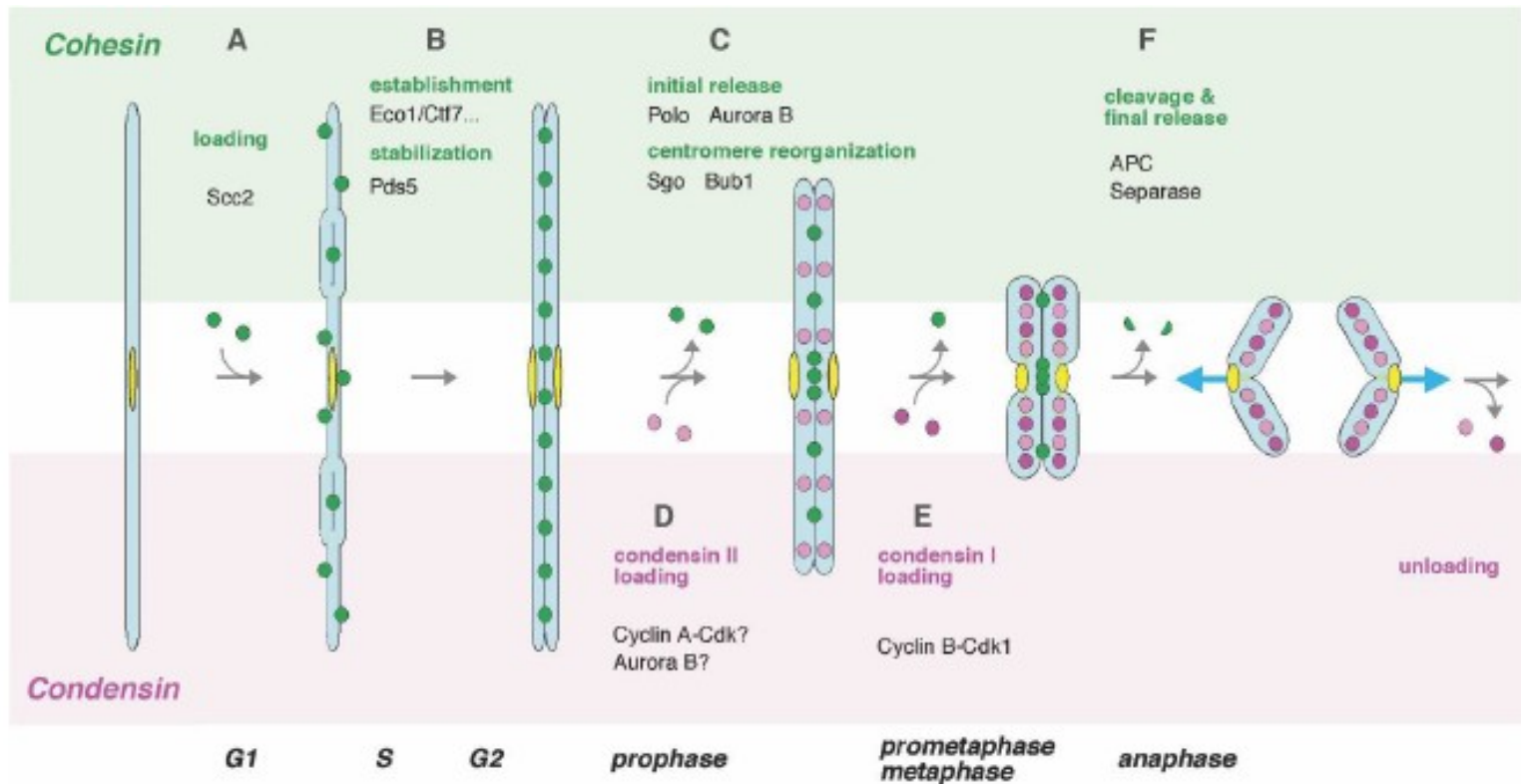
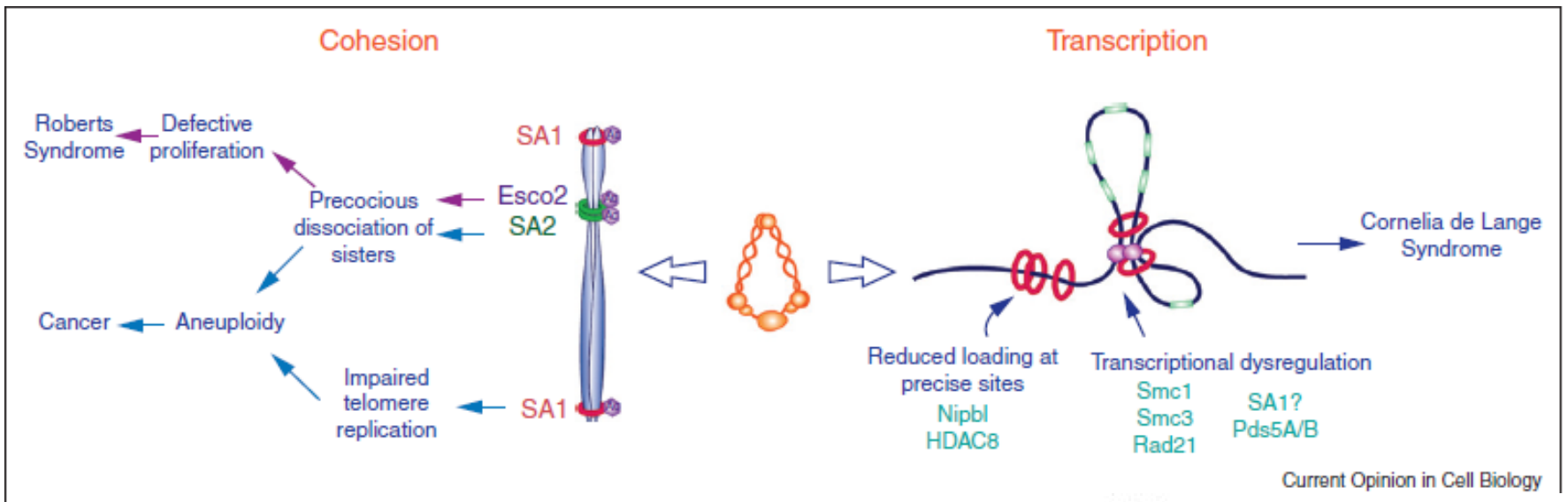


Figure 3. Overview of the mitotic chromosome cycle. The *top* and *bottom* parts of the cartoon indicate the major events regulating the dynamics of cohesin and condensin, respectively, along with their regulatory factors. (Green circle) Cohesin, (magenta circle) condensin I, (light-magenta circle) condensin II. See the text for details.

Losada & Hirano, 2005, Gen&Dev



Remeseiro & Losada, CO in Cell B

Cohesin a condensin
 ?SMC5-6 komplex?
 ?oprava poškozené DNA?
 ?kooperuje s kohesinem?

