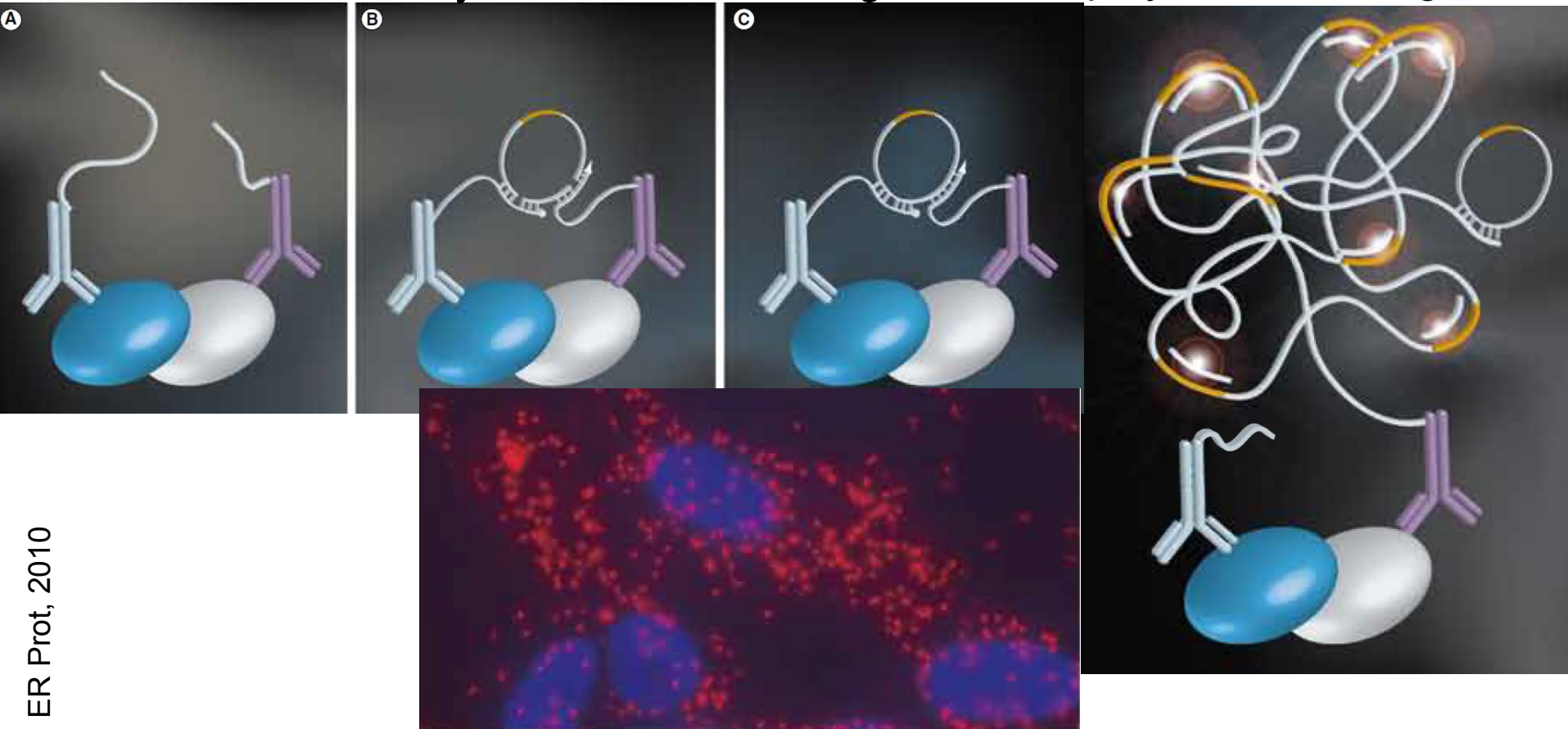


Ko-lokalizace a proximity ligation assay

hybridizace

ligace

polymerace/rolling circle



Weibrecht et al, ER Prot, 2010

- Sekundární protilátky obsahují oligonukleotidy komplementární k oligonukleotidům schopným tvořit kruhovou DNA – pouze pokud jsou sekundární protilátky blízko sebe (<16nm) - po ligaci může polymeráza obíhat po kružnici

Přednáška **5.5.2015** od **15.00 v A11, 205**

prof. A.R. Lehmann, FRS

Xeroderma pigmentosum: in-depth molecular, cellular and clinical analysis of a DNA repair disorder.

přednáška **7.5. (10.00 v A2, 211)**

Evoluce proteinů a proteinových komplexů

04/05/2015

MONDAY

start 10:00

Seminar room 2.11, pavilion A4
University campus Bohunice

CEITEC STRUCTURAL
BIOLOGY
SPECIAL LECTURE

You are cordially invited to the lecture

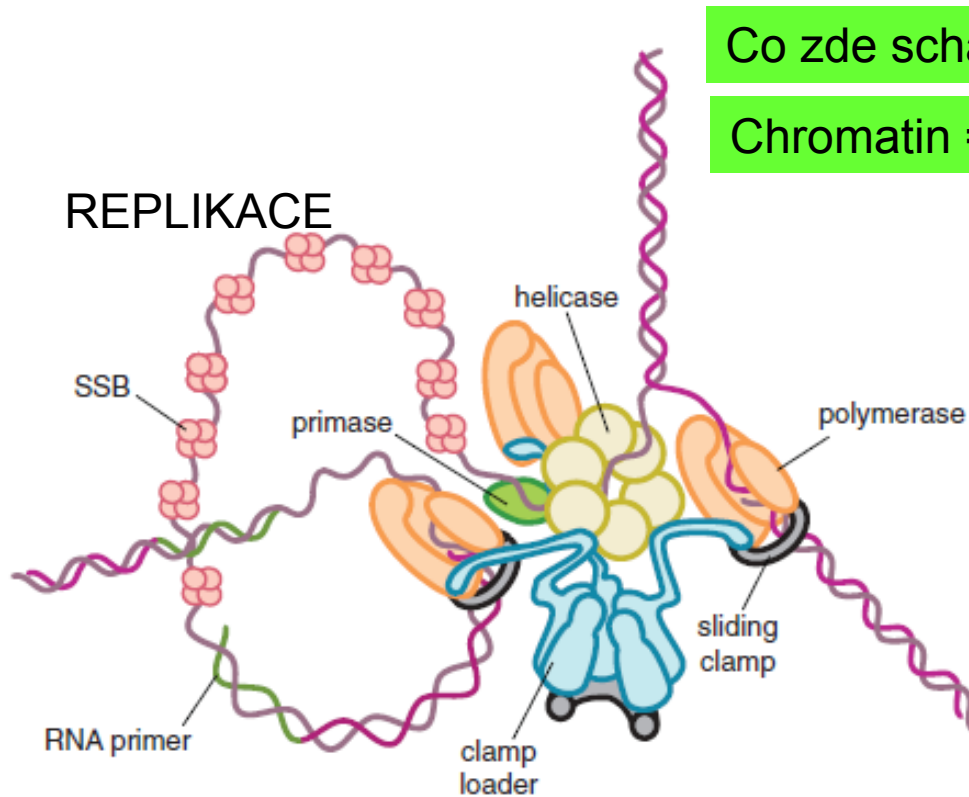
**„Structure and *in situ* organisation
of mitochondrial ATP synthases“**

delivered by

Karen M. Davies

Candidate for a Research Group Leader Position
in Structural Biology Programme

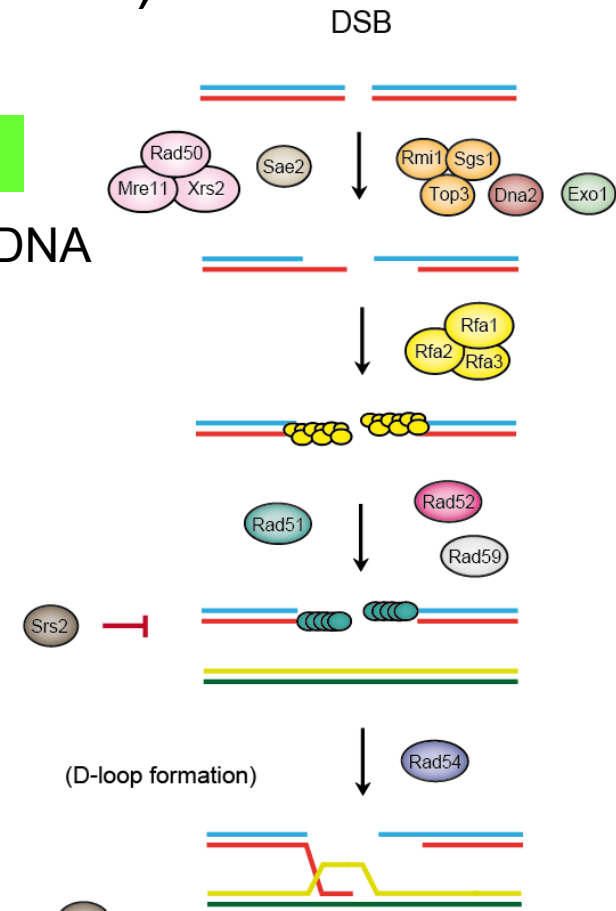
- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)



Co zde schází??

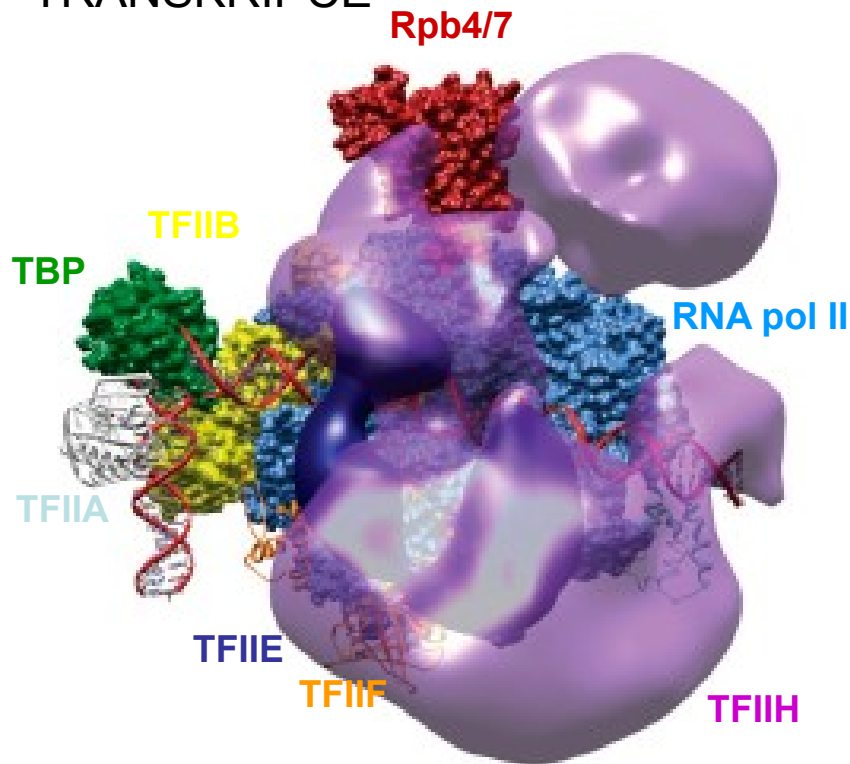
Chromatin = histony ...

OPRAVA DNA

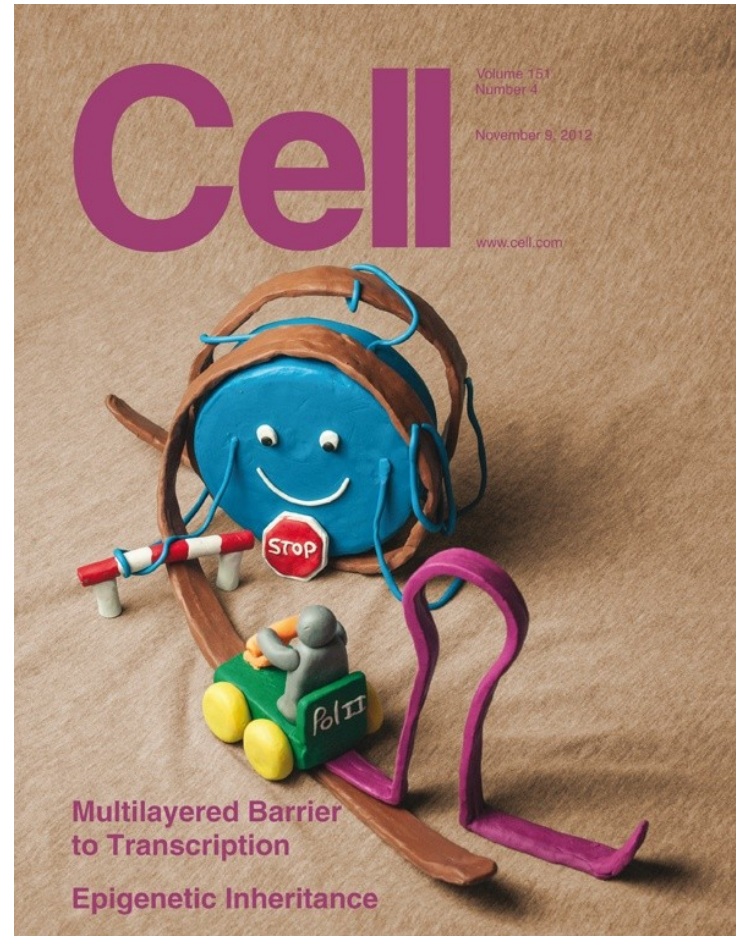


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA

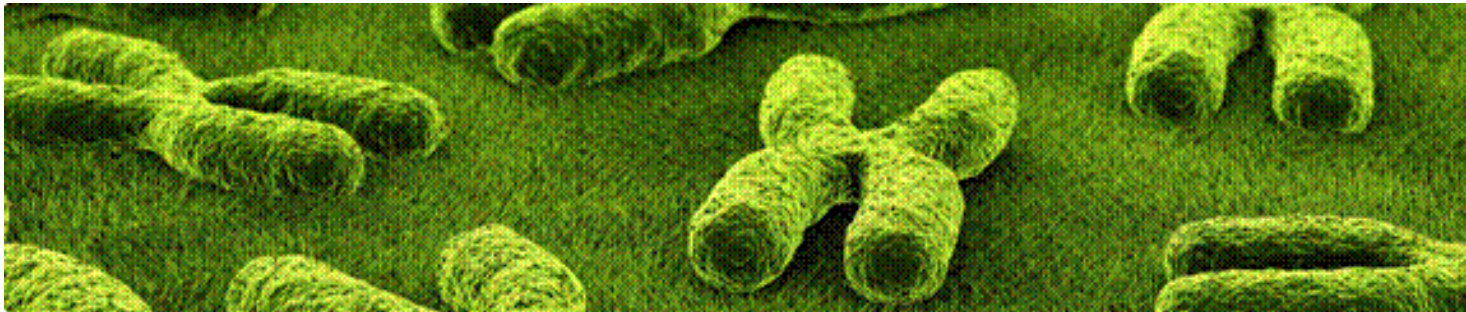
TRANSKRIPCE



kvasinkový PIC komplex
Gibbons et al, PNAS, 2012



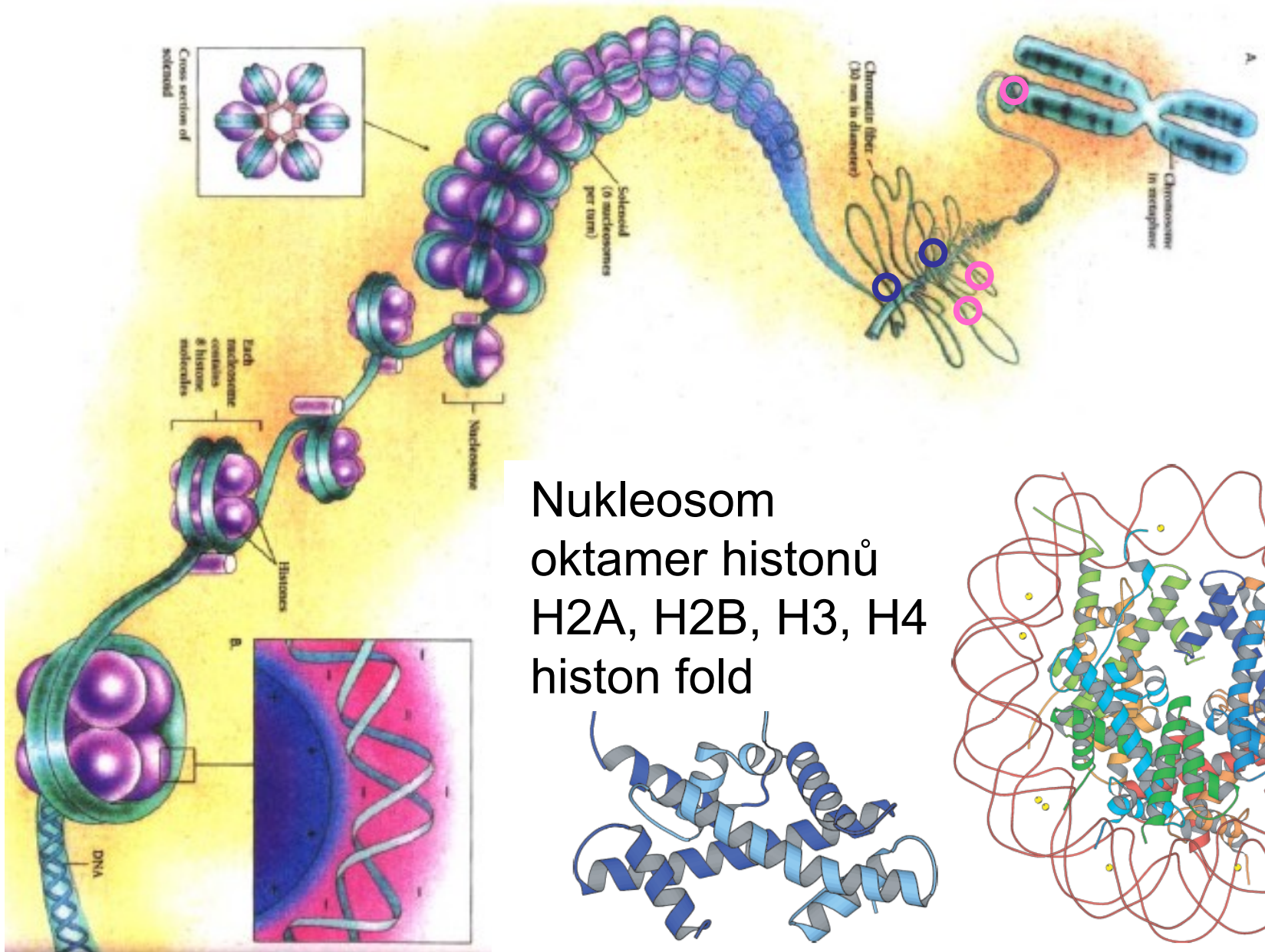
- Samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem s mnoha odlišnými částmi
- DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom 3×10^9 bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4 cm!!)
 - **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
 - **vytváří základní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



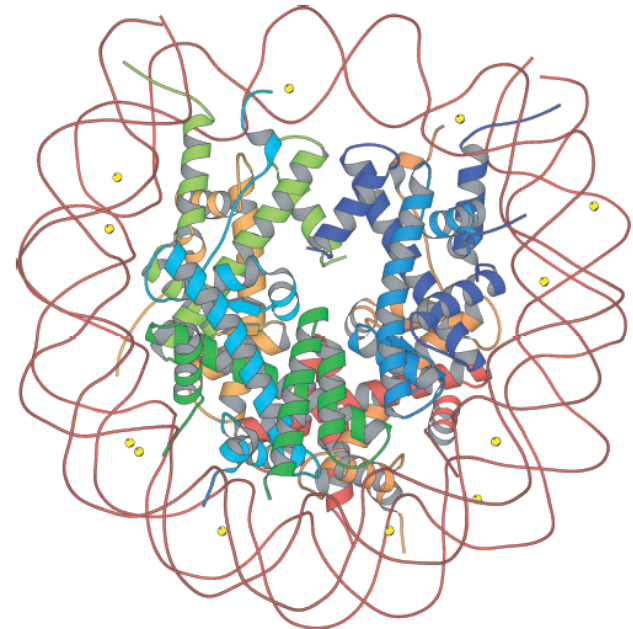
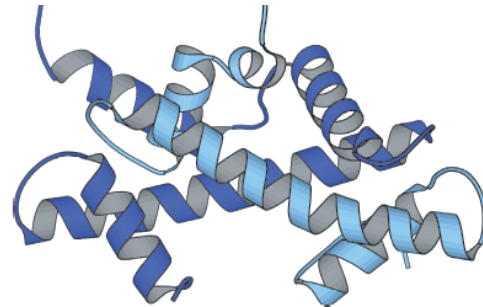
přednášky prof. Fajkuse:

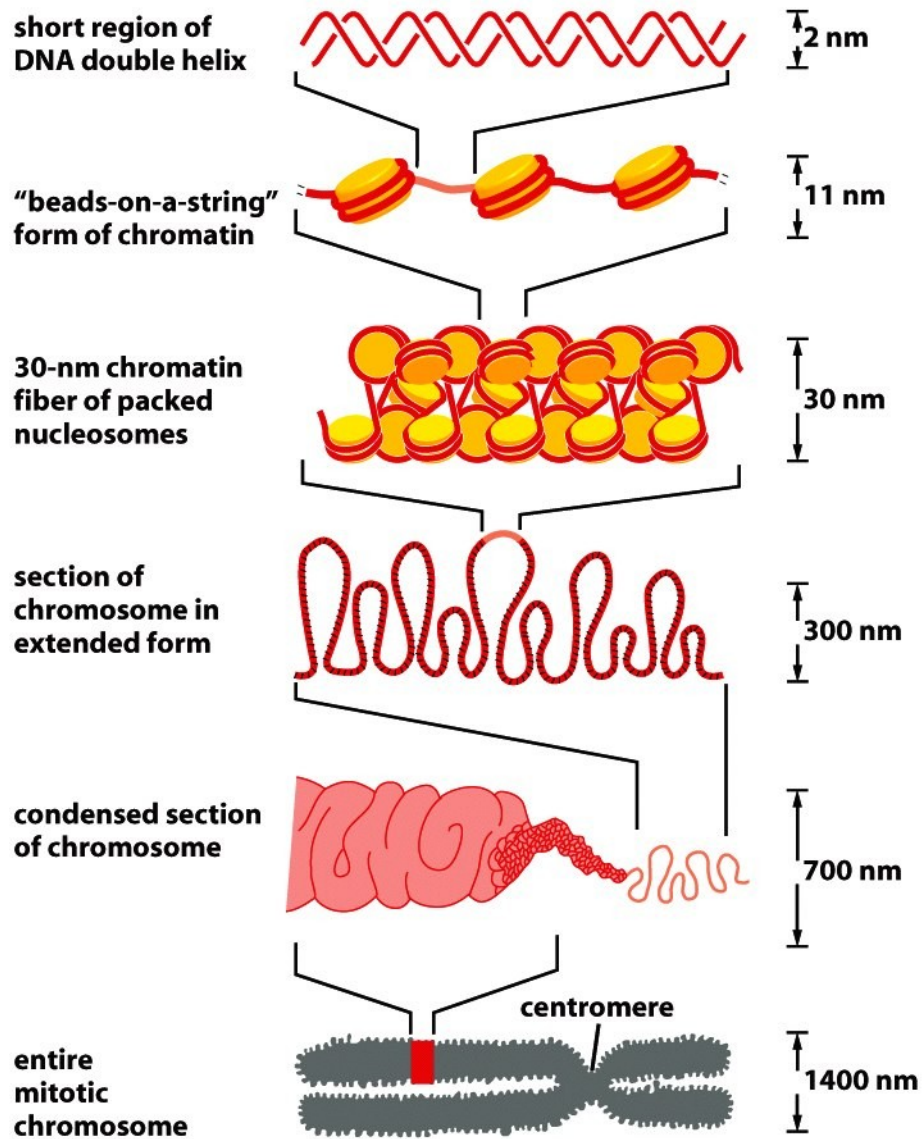
Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041)

komplexy vytvářející strukturu chromosomu



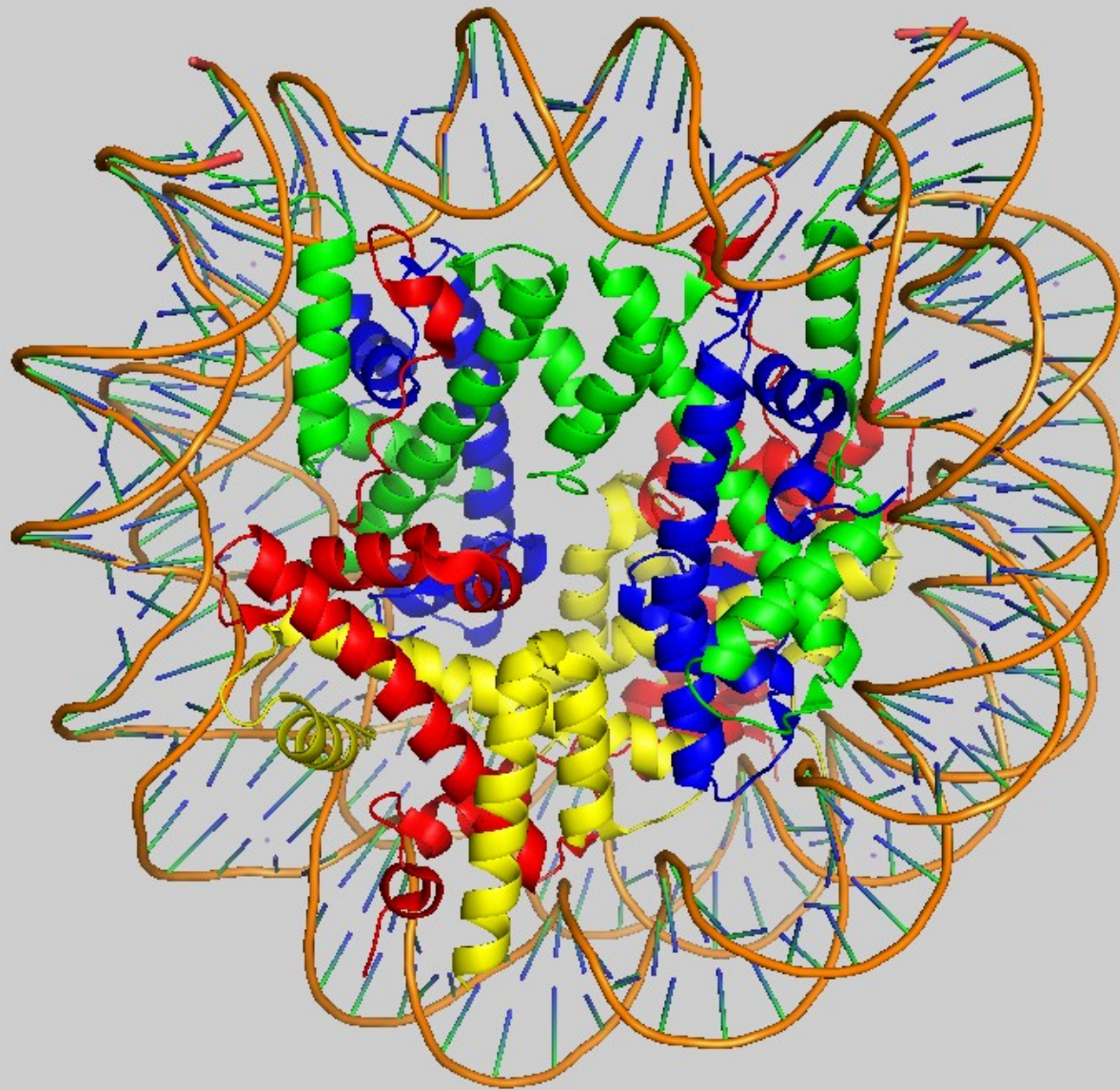
Nukleosom
oktamer histonů
H2A, H2B, H3, H4
histon fold





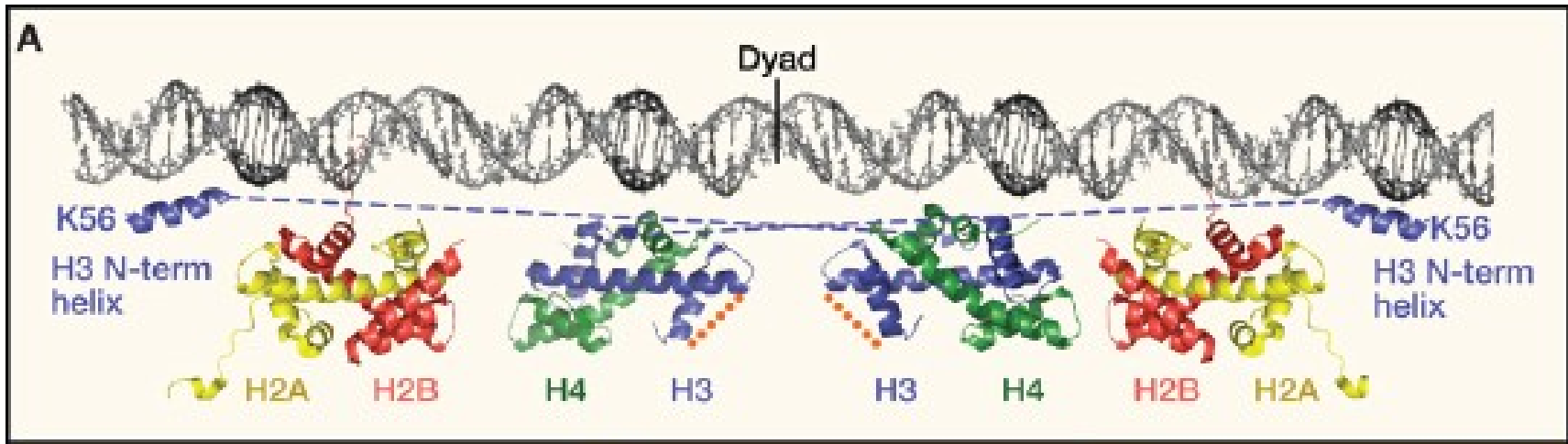
NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 10,000-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

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

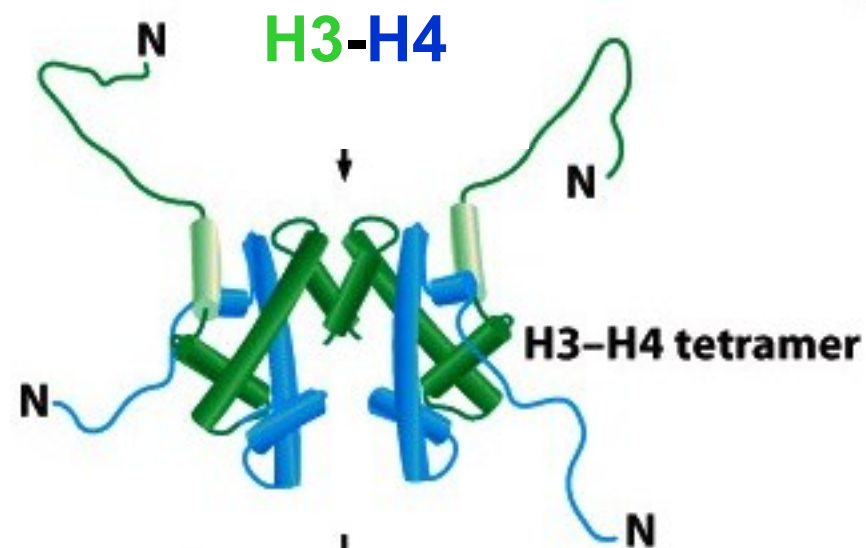


- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)

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)

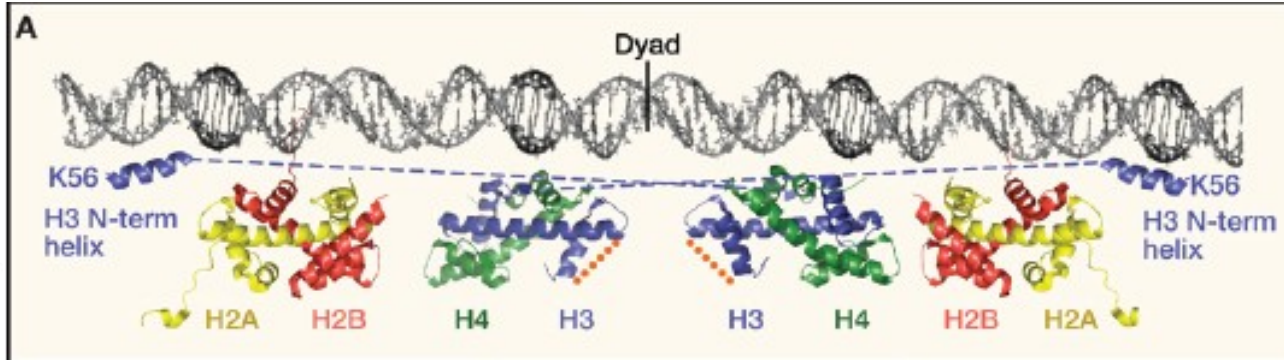
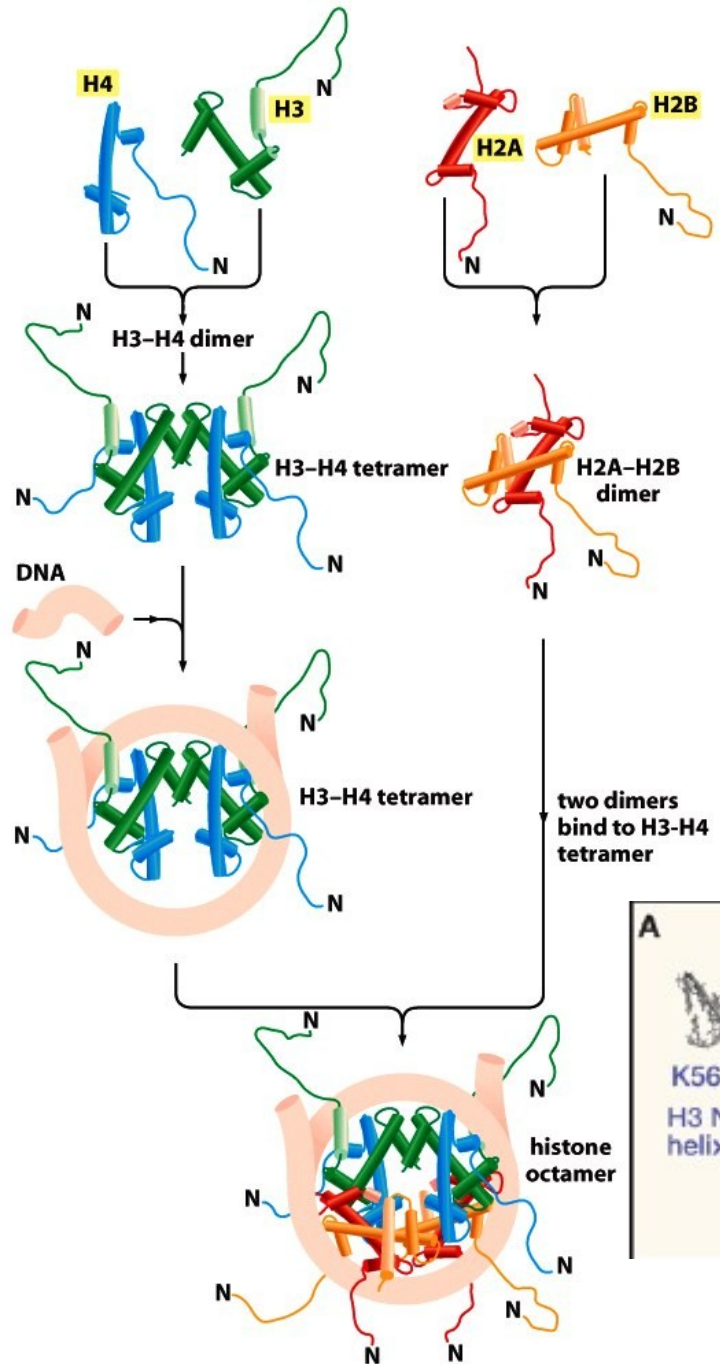


Sestavování nukleozomu:

- 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

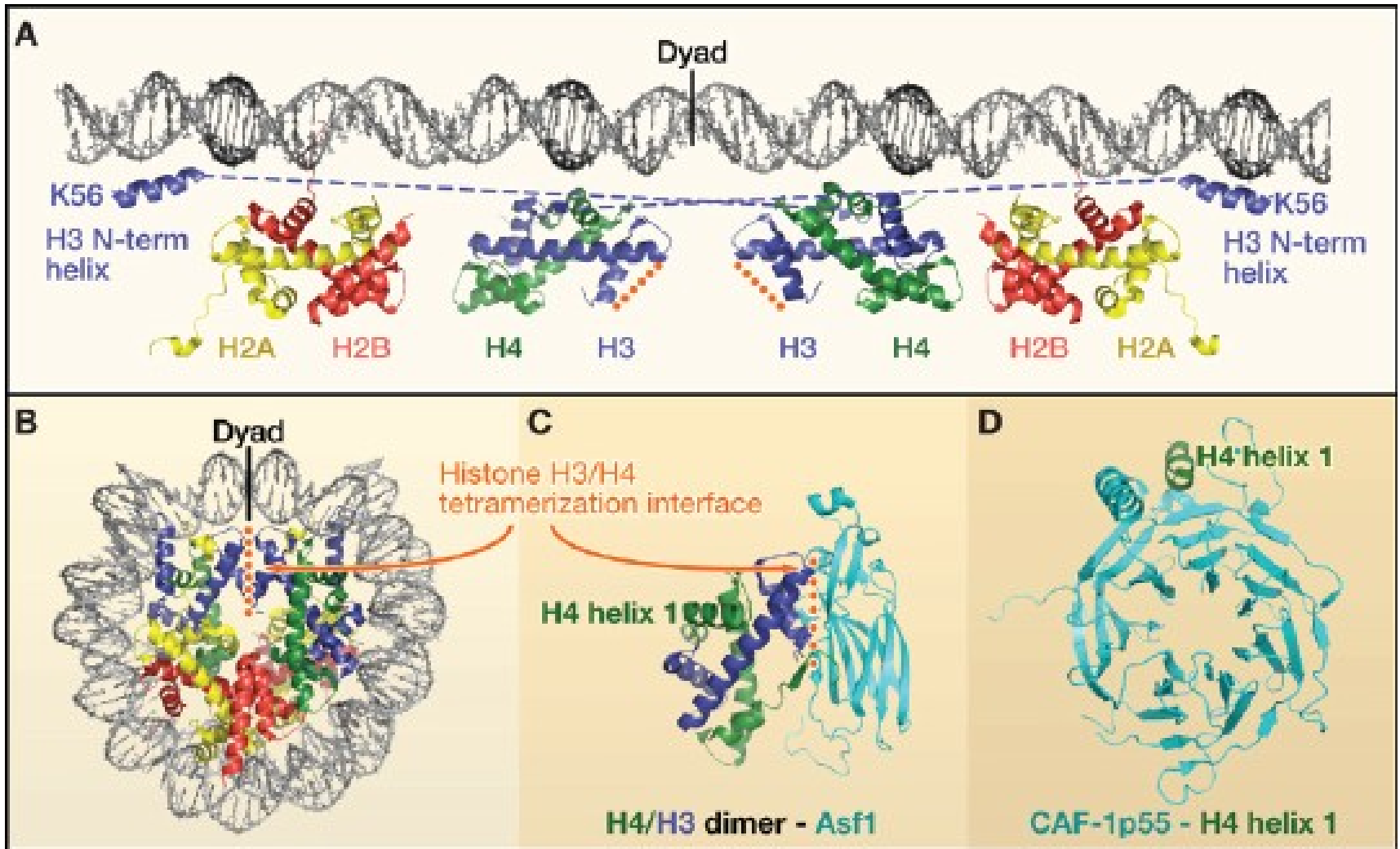
- při uvolňování odpadají nejdříve dimery H2A-H2B

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



Nabalování a rozbalování histonů

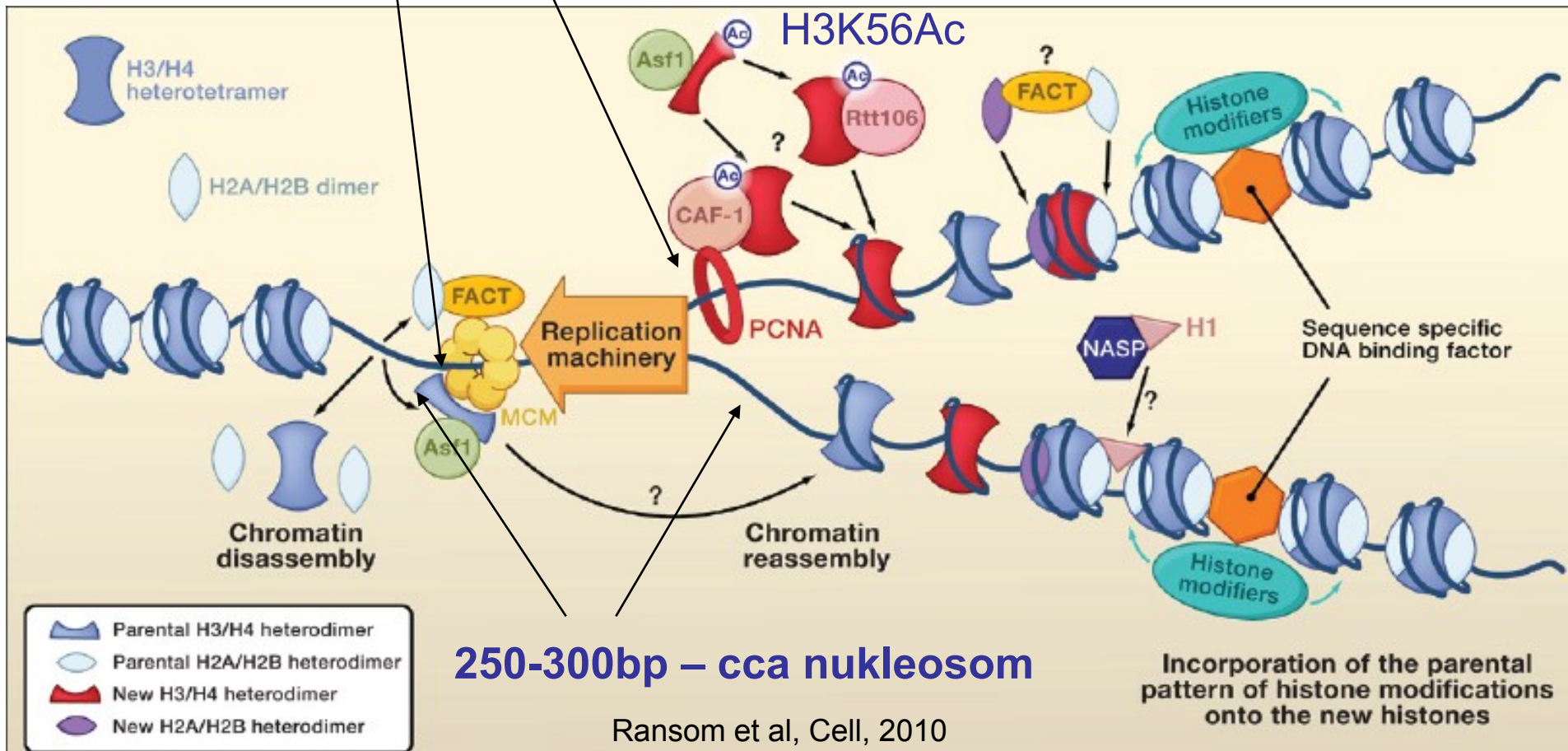
Histonové H3-H4 chaperony



- Postupné sestavování (a uvolňování) histonů je zprostředkováno různými chaperony (+ ATP-dependent remodeling "stroji") – „*chaperony pro komplexy*“
- ASF1 (antisilencing function, tetramerizace) => CAF1 (chromatin assembly factor, vazba k DNA)

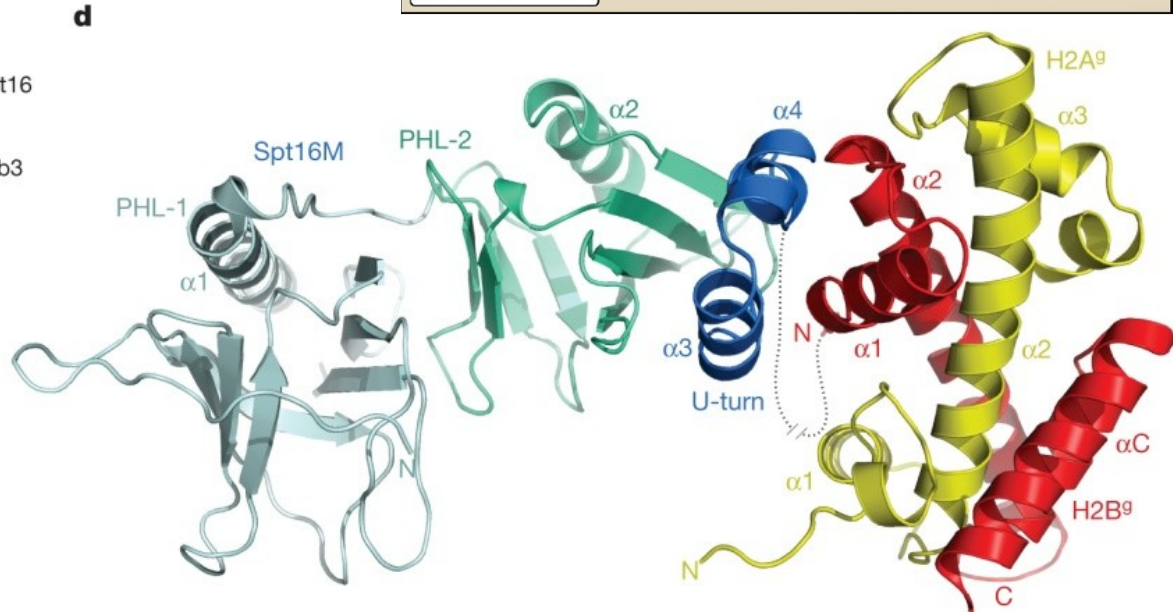
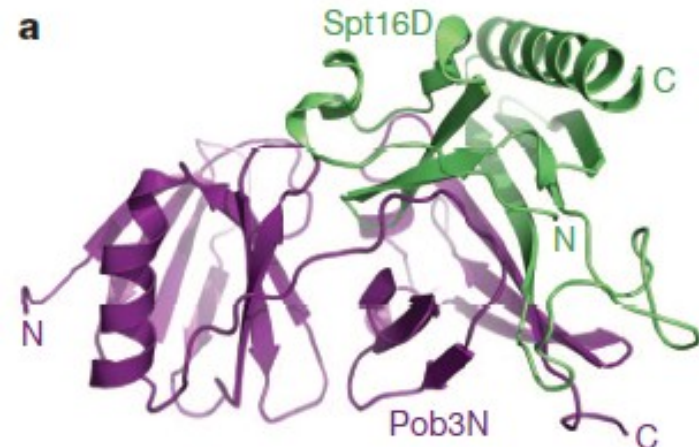
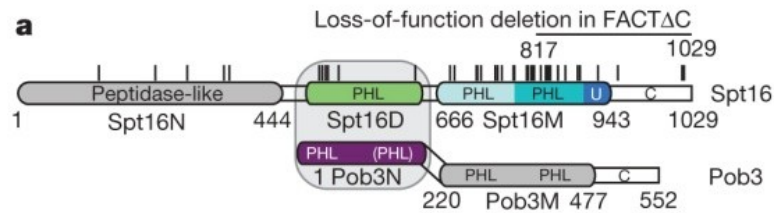
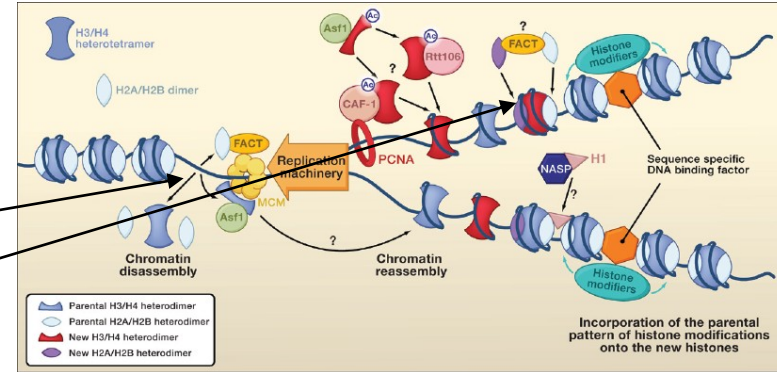
Histon chaperony - replikace

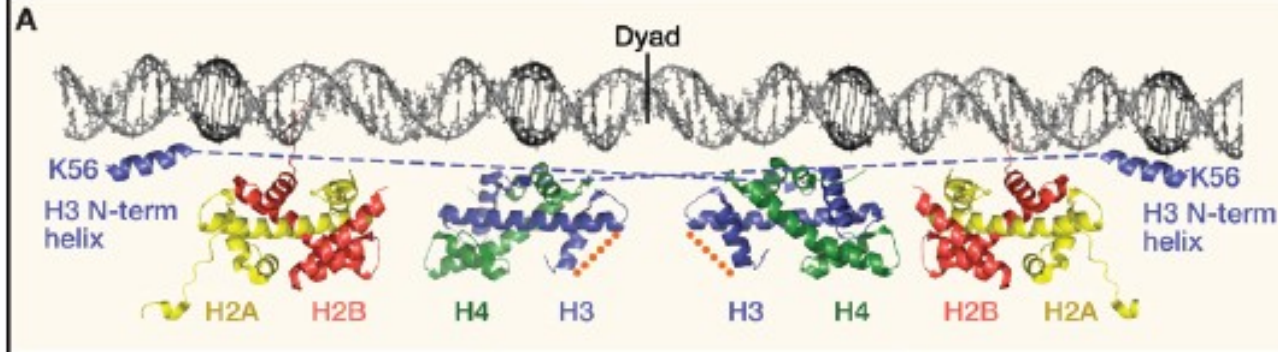
- na ssDNA nukleosomy nejsou: replikace, transkripce, oprava DNA ...
- před těmito procesy se musí histony odstranit a poté zase nabalit ...
(feedback: inhibice chromatin assembly inhibuje disassembly nukleosomů)
- 1. ASF1 (váže MCM a PCNA) a 2. CAF1 (assembly) pro H3-H4 disassembly a assembly



FACT komplex

- histon chaperon komplex FACT (facilitates chromatin transcription) je složen ze 2 podjednotek (Spt16 a Pob3/SSRP1)
 - dimerizační část také interaguje s DNA-polymerásou (spojení s replikací)
 - rozeznává histon H2A-H2B heterodimer (interferuje s vazbou na DNA tzn. rozrušení vazby H2A-H2B s DNA)
- disassembly a assembly

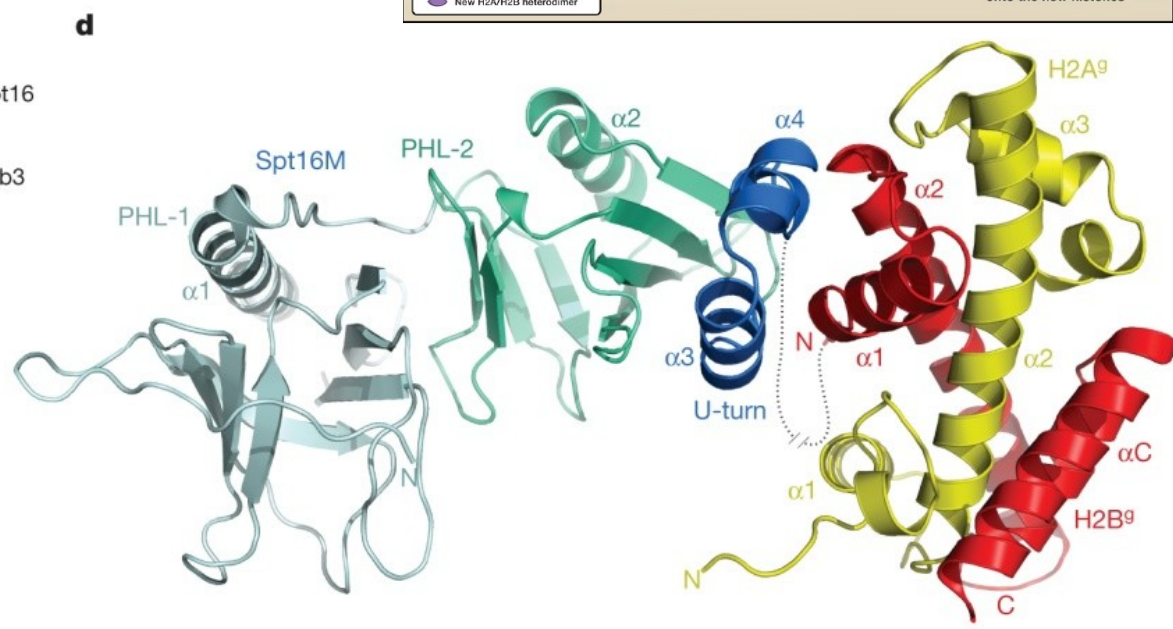
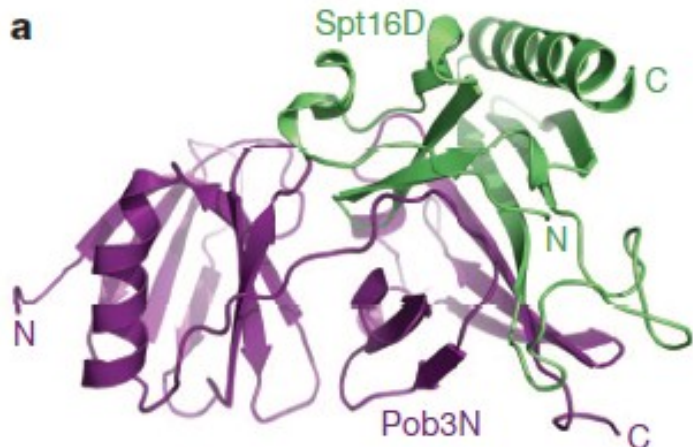
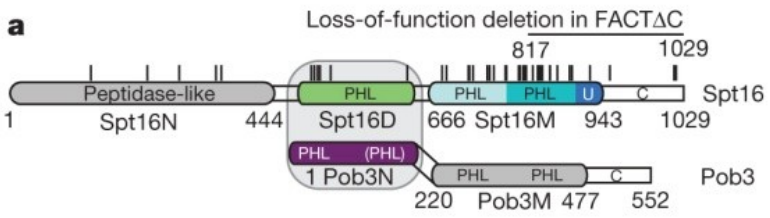
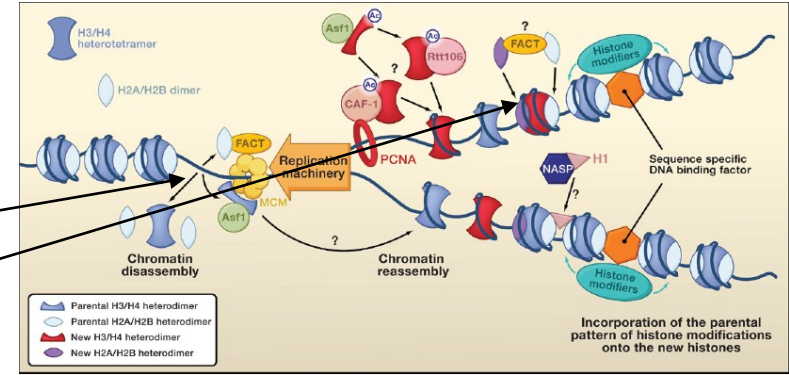




transcription) je
(spojení s

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

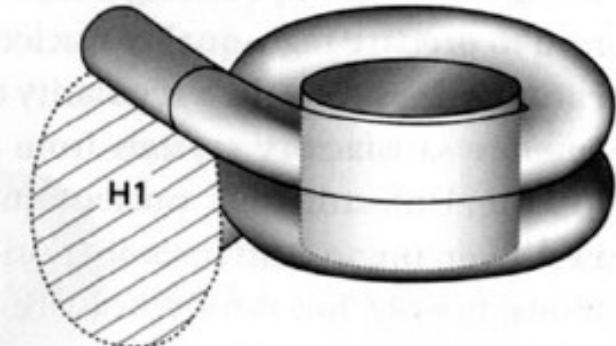
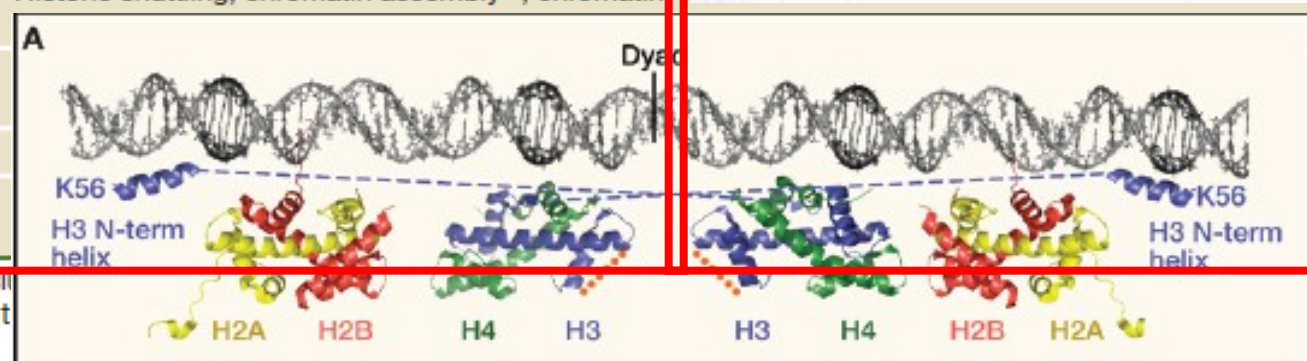
disassembly a assembly



Hondele et al., Nature, 2013

Histon chaperony

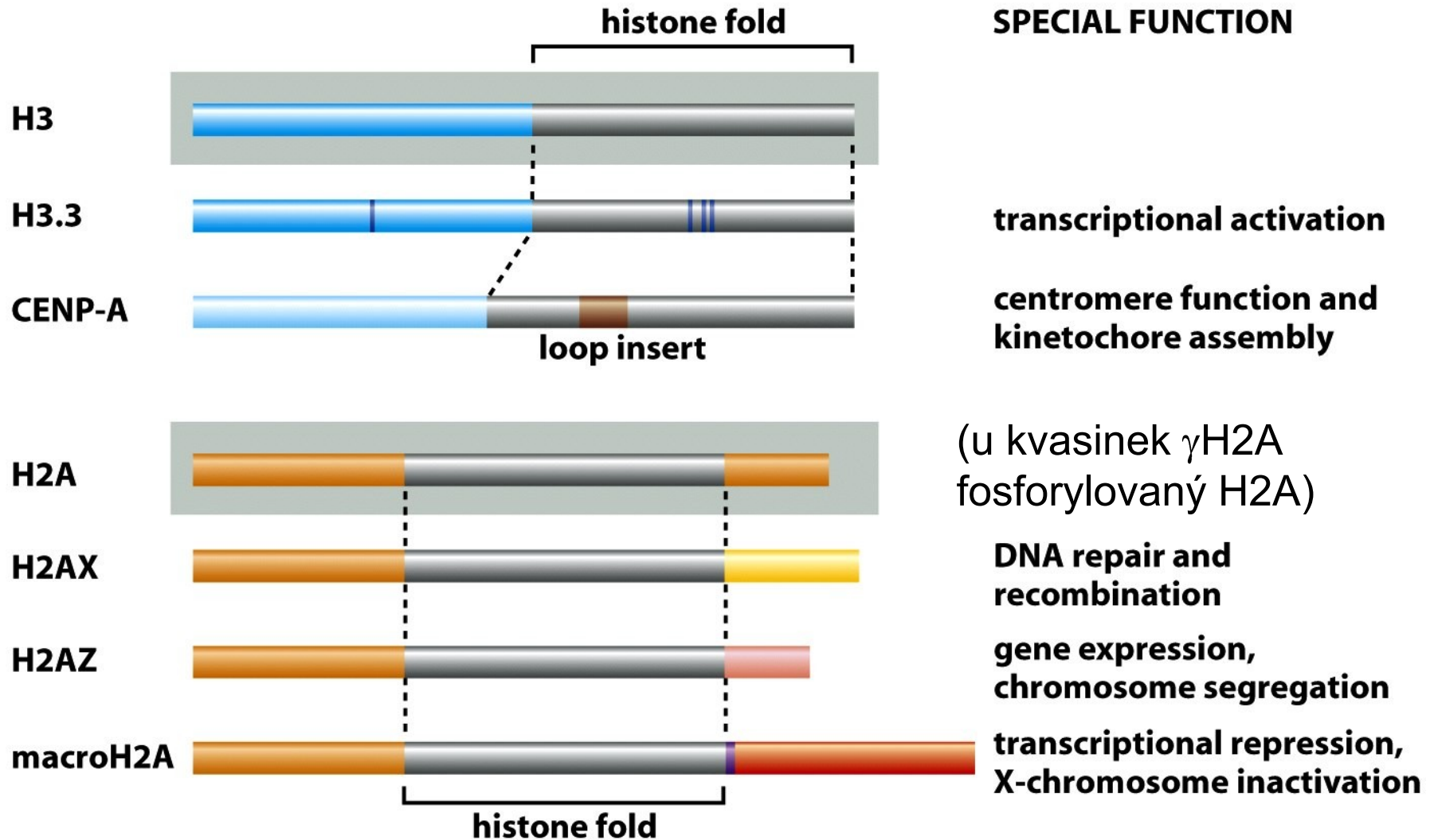
Table 1. Histone Chaperones Implicated in DNA Replication and Repair

| 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 |  |
| | Asf1 | RFC, MCM, CAF-1; promotes H3 K56 acetylation leading to chromatin assembly; chromatin disassembly*; histone buffer | |
| | Rtt106 | Chromatin assembly; heterochromatin silencing | |
| | NASP | Histone buffer* | |
| H2A/H2B | FACT (Spt16 and Pob3); also binds H3/H4 | MCM, RPA, DNA pol I; chromatin assembly*; chromatin disassembly* |  |
| | NAP1 | Histone shuttling; chromatin assembly**; chromatin | |
| | Chz1 | | |
| H1 | NASP | | |
| CenH3/H4 | Scm3 (S.c. and S.p.); HJURP (H.s.) | | |

*** indicates a likely role although not confirmed in *Saccharomyces pombe*; H.s., *Homo sapiens*. Only the 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

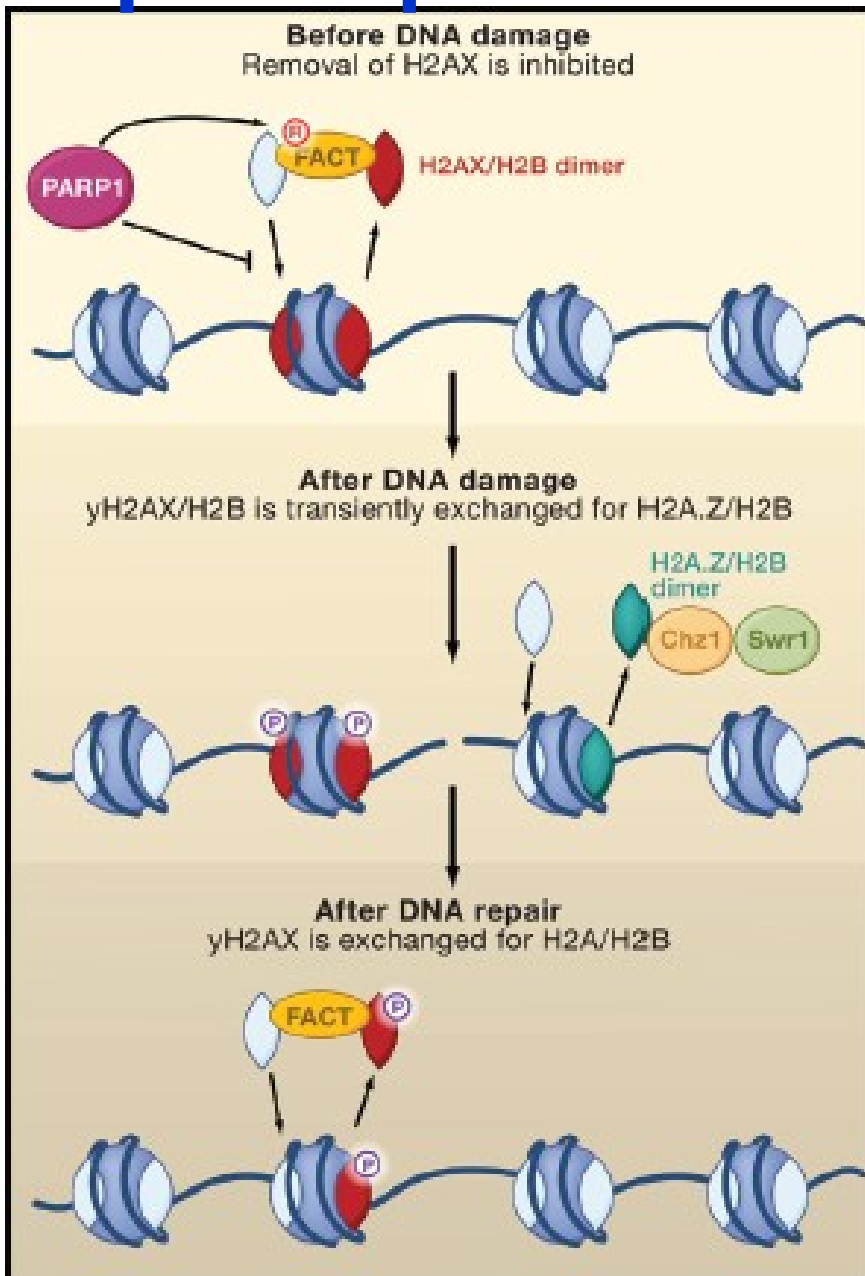


Funkční diverzita variantních histonů (Pusarla & Bhargava, FEBS J. 2005)

| Histone | Variant | | | Functional association |
|---------|----------|-------|-------------------|--|
| | Mammals | Yeast | <i>Drosophila</i> | |
| H3 | H3.1 | – | – | S-phase subtypes |
| | H3.2 | – | – | S-phase subtypes |
| | H3.3 | H3.3 | H3.3 | Transcriptionally active regions |
| | Cenp-A | Cse4 | Cid | Centromeric nucleosomes |
| H2A | H2A.Z | Htz1 | H2Av ^a | Different functions in various organisms: maintenance of pericentric and telomeric heterochromatin, transcriptional activation and viability |
| | H2A.X | H2A | H2Av ^a | Sex body in mammals, site of DNA double stranded breaks; condensation and silencing of male sex chromosome |
| | MacroH2A | – | – | Inactivation of X-chromosome, interferes with both transcription factor binding and SWI/SNF remodelling |
| | H2A.Bbd | – | – | Close spacing of nucleosomes |
| | | | | |

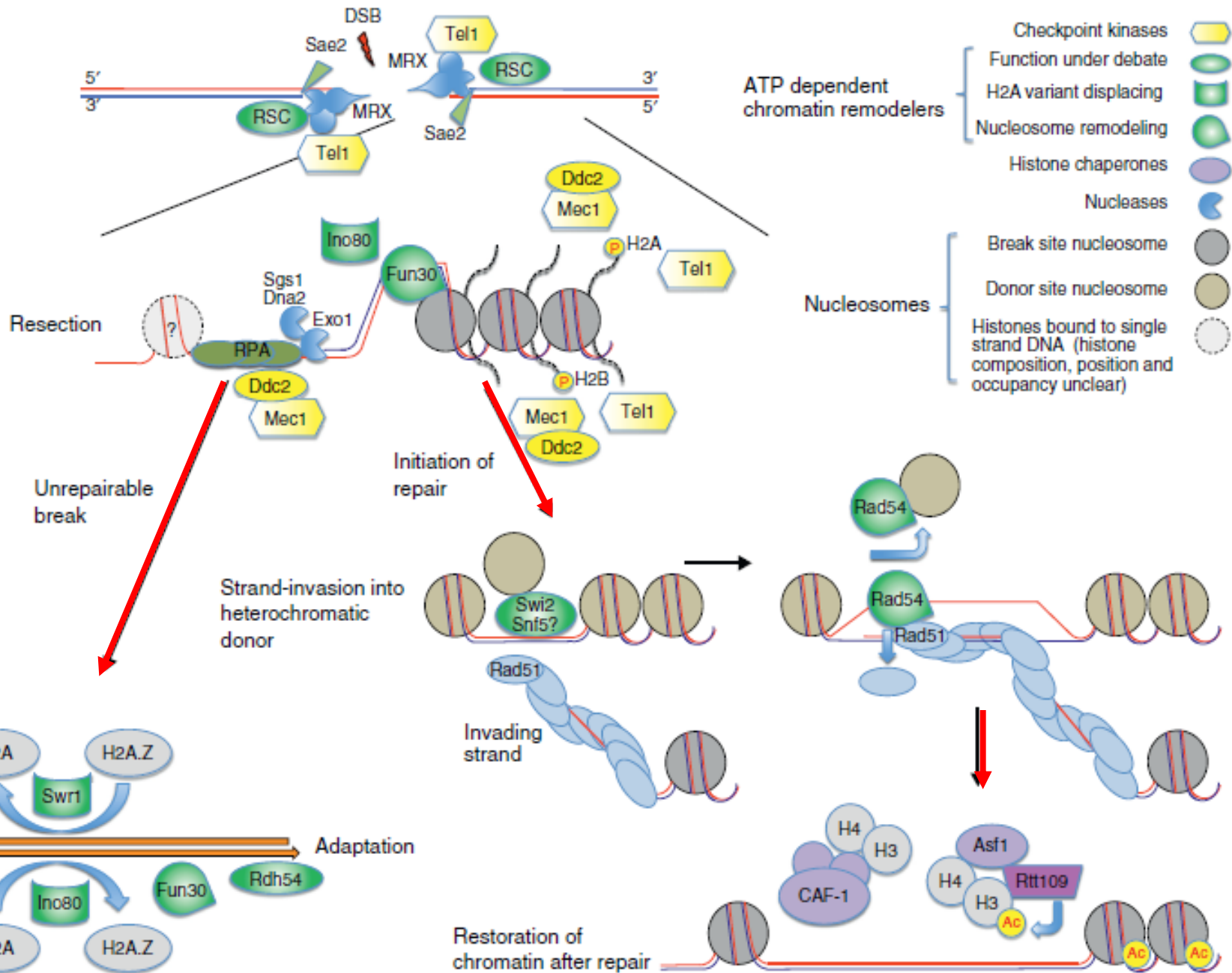
- možnost nově zabudovat histonové varianty pomocí chaperonů a remodelačních komplexů
- nejznámější: **CenH3/CENP-A** (specificky v centromerách – ukotvení kinetochor – klíčový pro segregaci chromosomu)
- **H2A.X** klíčový v opravě DNA
- **H2A.Z** v regulaci transkripce, opravě DNA, hranice chromatinu

Oprava poškozené DNA – H2A histony



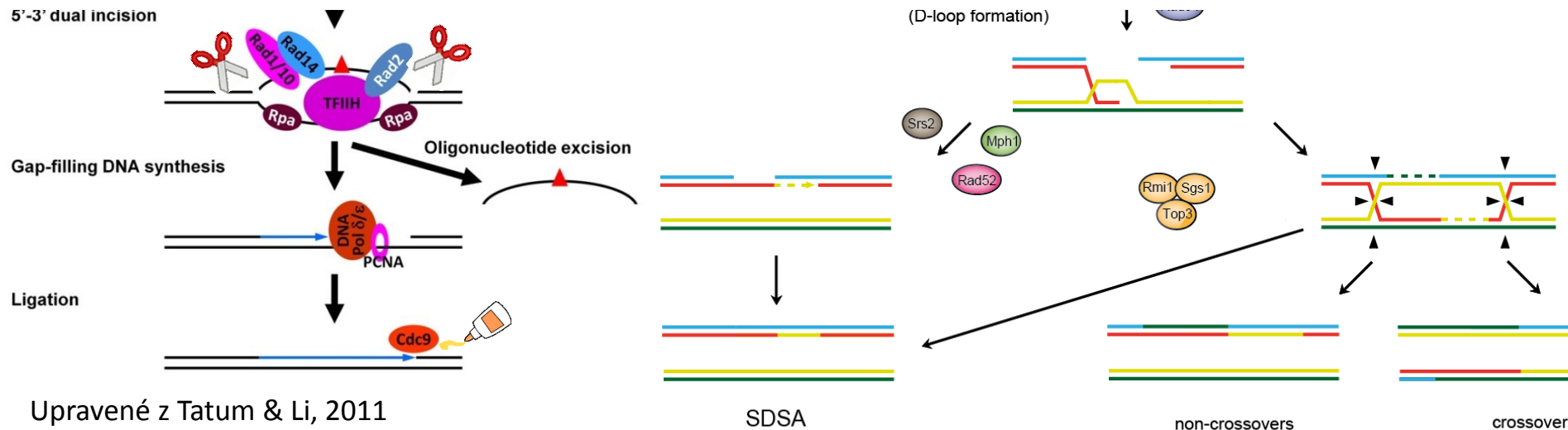
Ransom et al, Cell, 2010

- 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



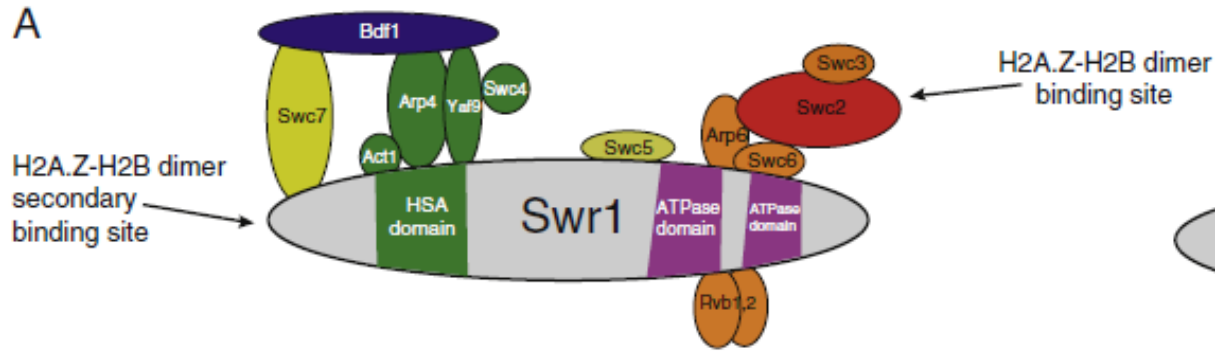
Oprava poškozené DNA - chromatin

- 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 a CAF-1, 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!

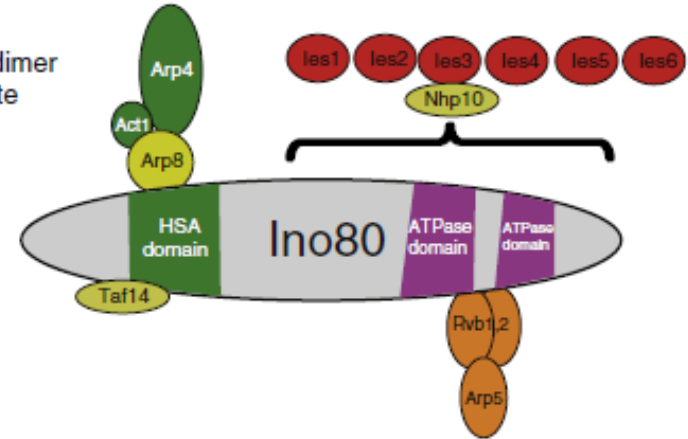


bromodoména

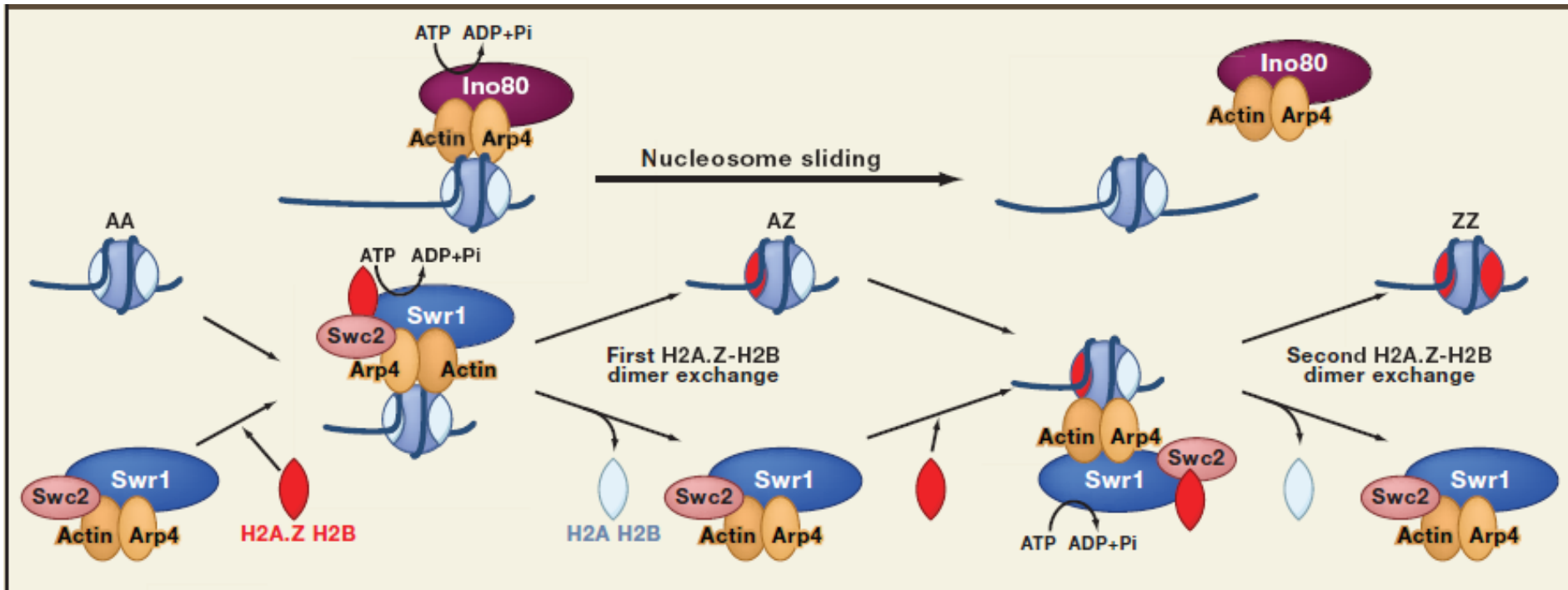
A



Billon a Cote, BBA, 2012

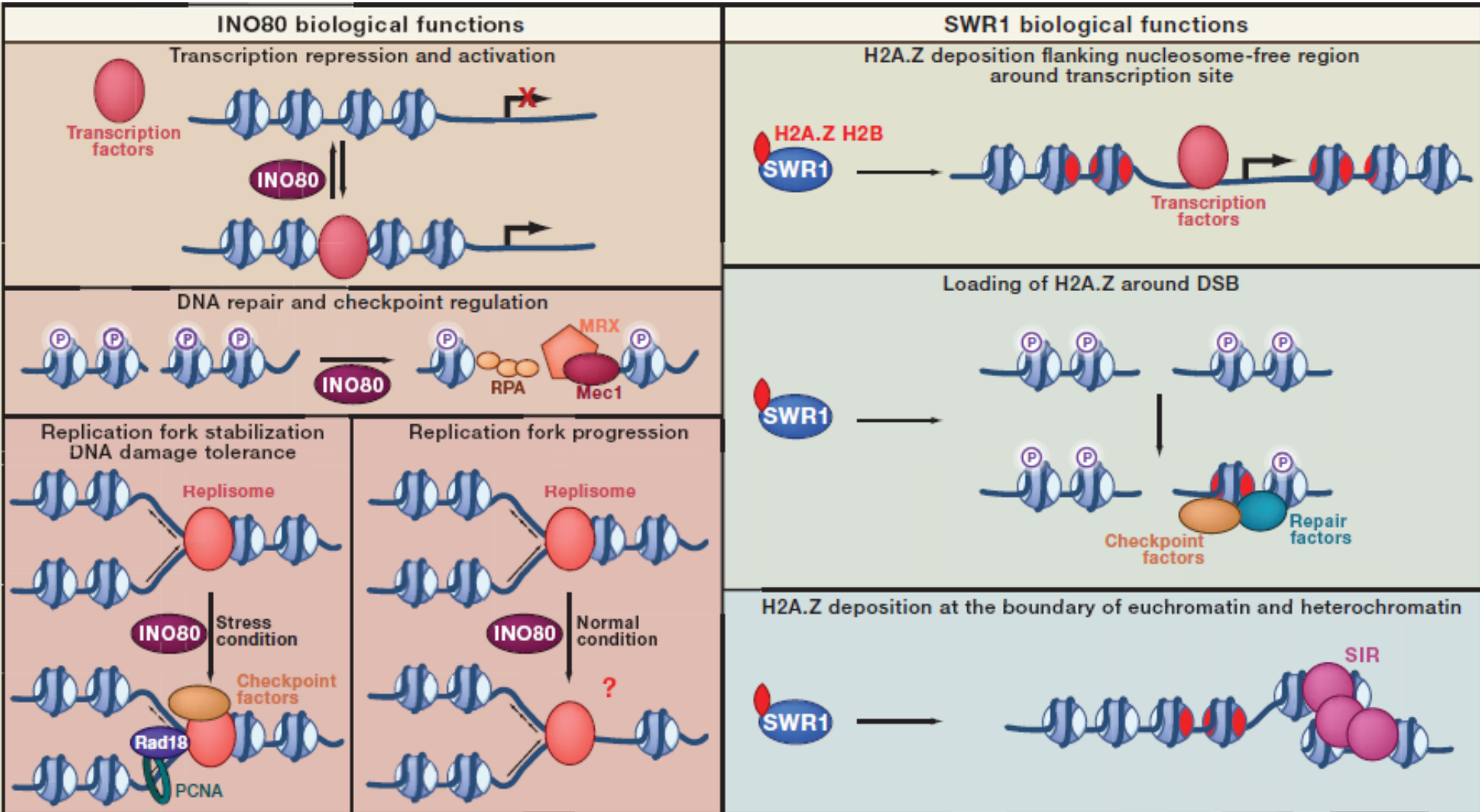


Bao a Shen, Snapshot in Cell, 2010



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

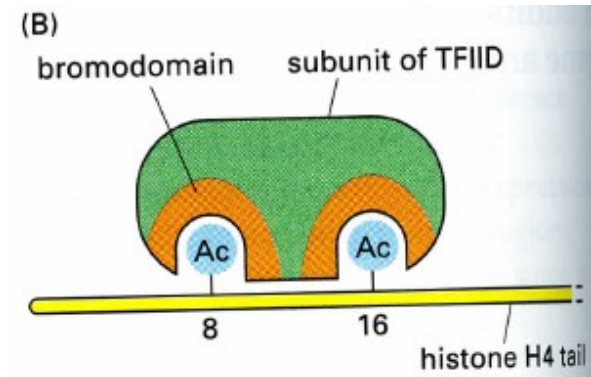
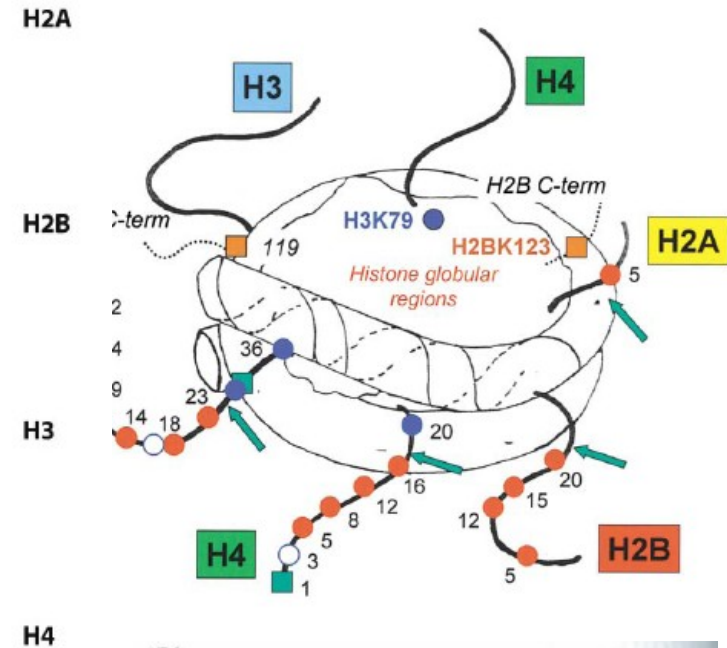
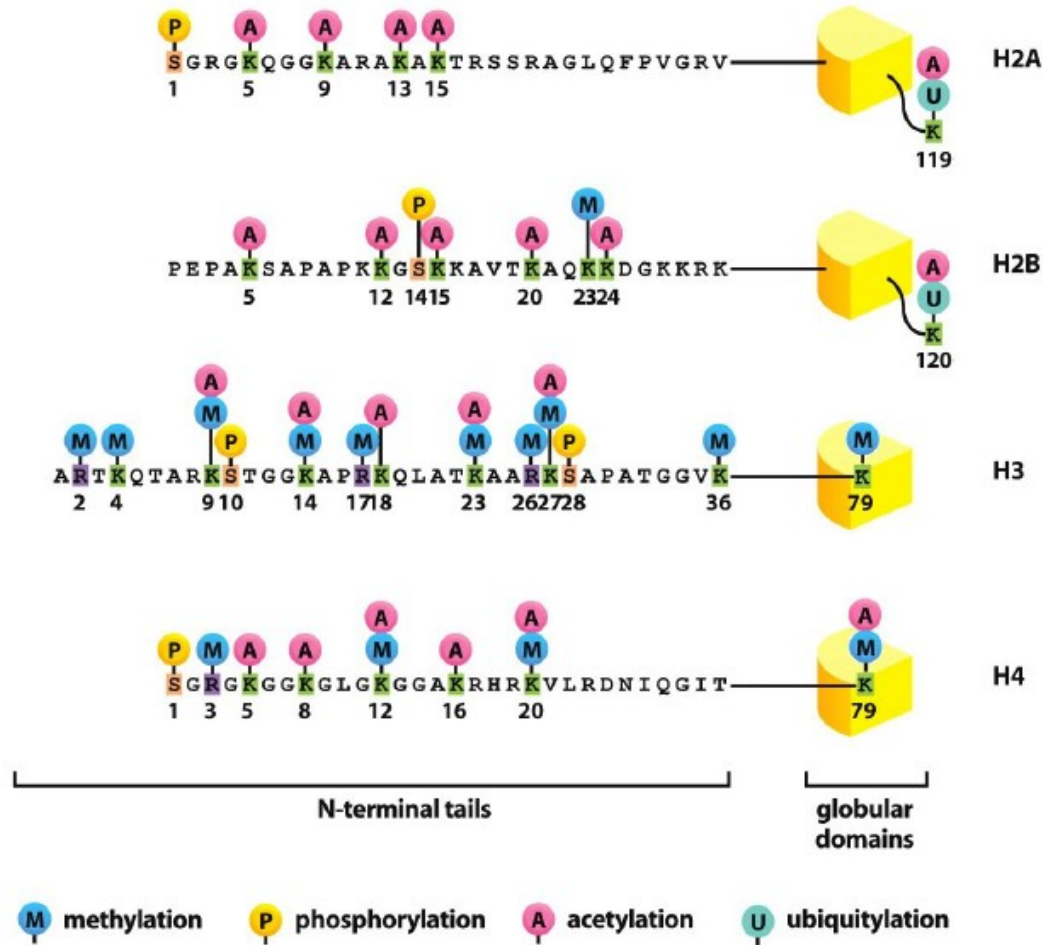
- „skluznutí“, rozložení, odstranění nukleosomu nebo „výměna“ histonových dimerů

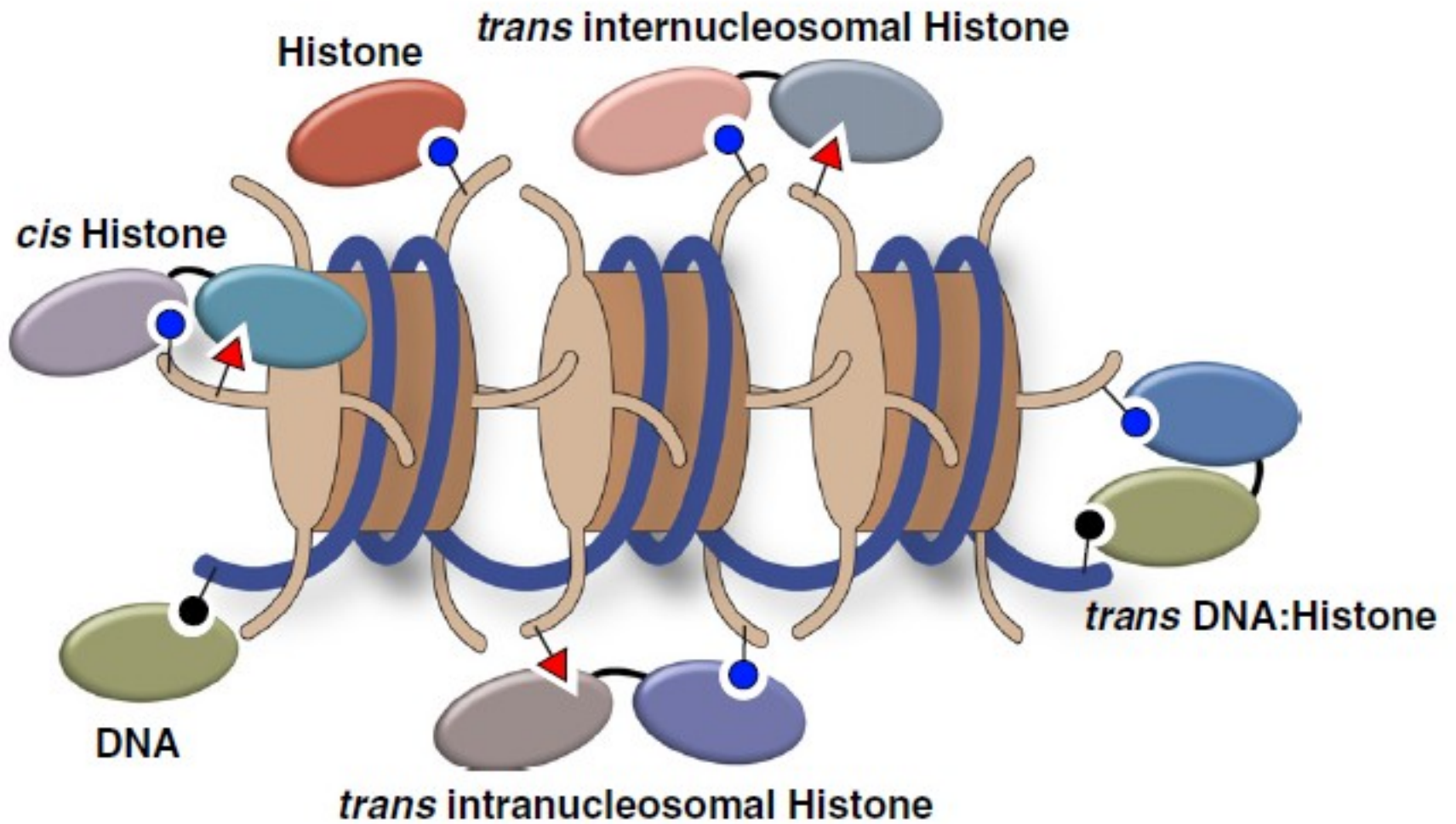


- **H2A.Z** - v regulaci transkripce, opravě DNA, hranice chromatinu (integrita centromer a telomer)

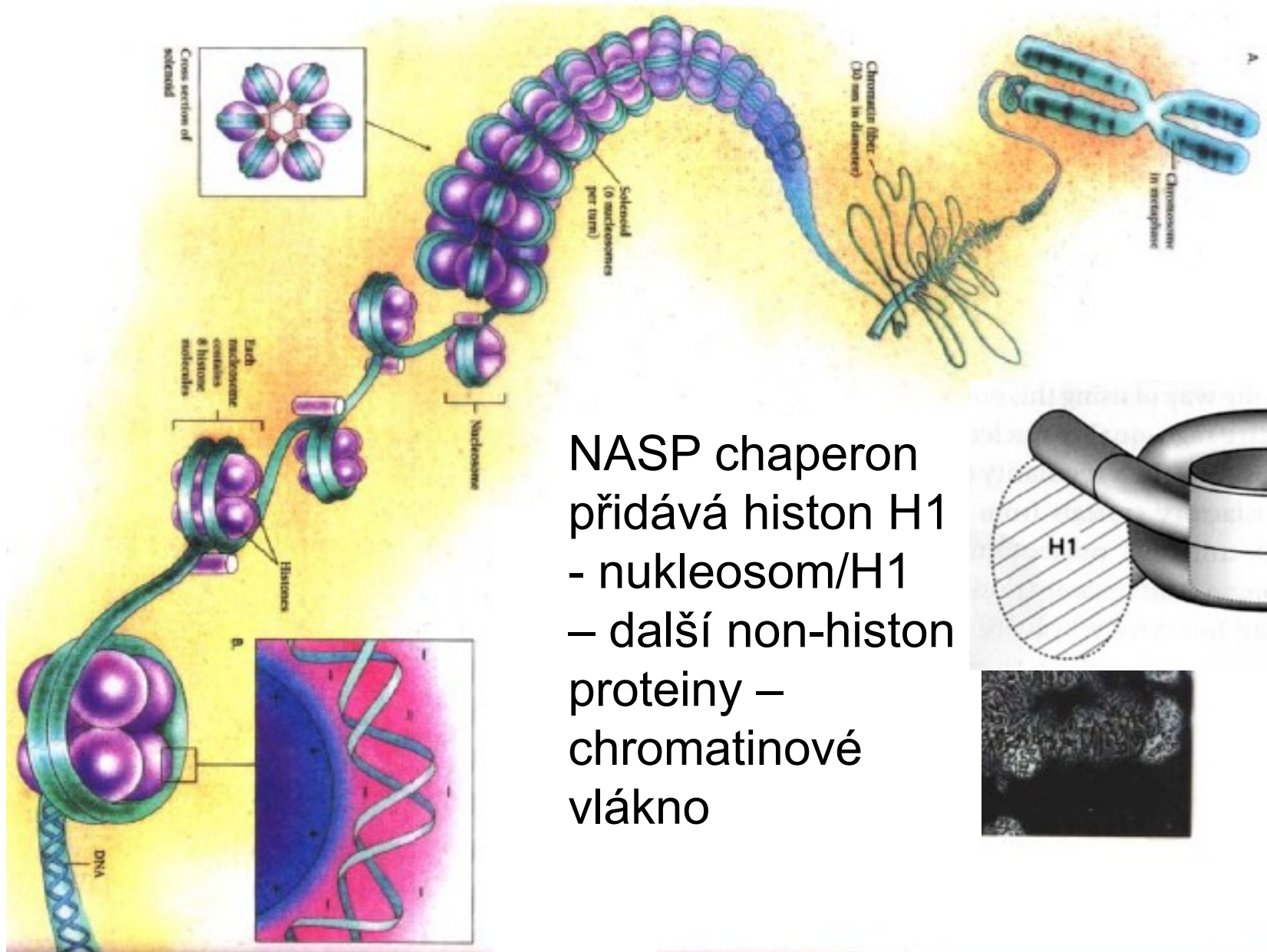
Modifikace histonů

- acetylace rozvolňuje vazbu oktameru a zpřístupňuje sekvence DNA pro TBP
- TFIID se váže na Ac-H4 (K8, K16) prostřednictvím bromodomény TAF1 proteinu

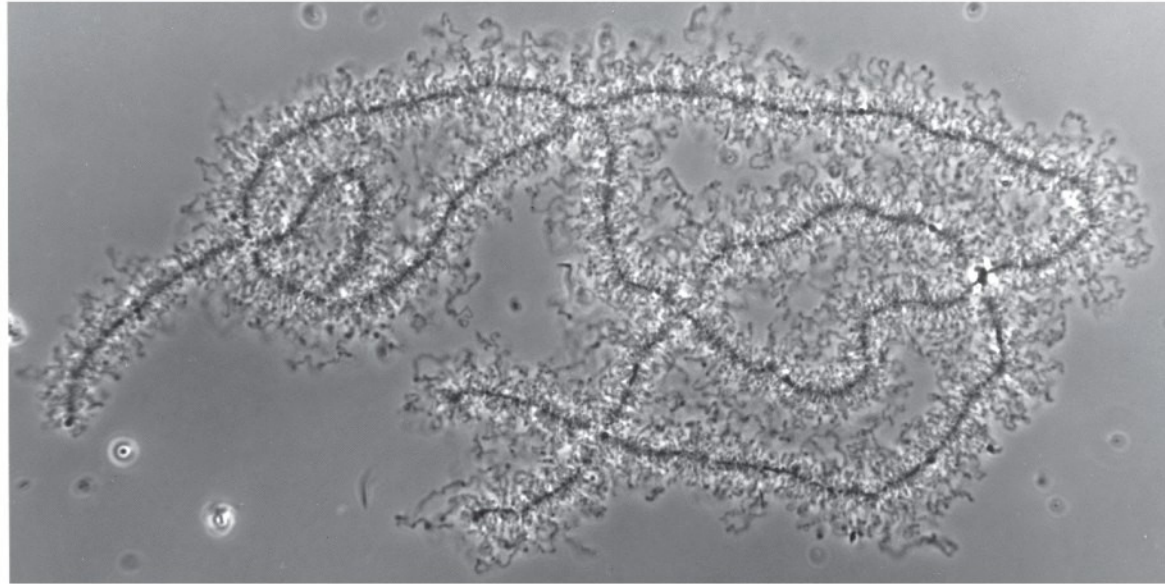




Vazba H1 uzavírá remodelaci chromatinu

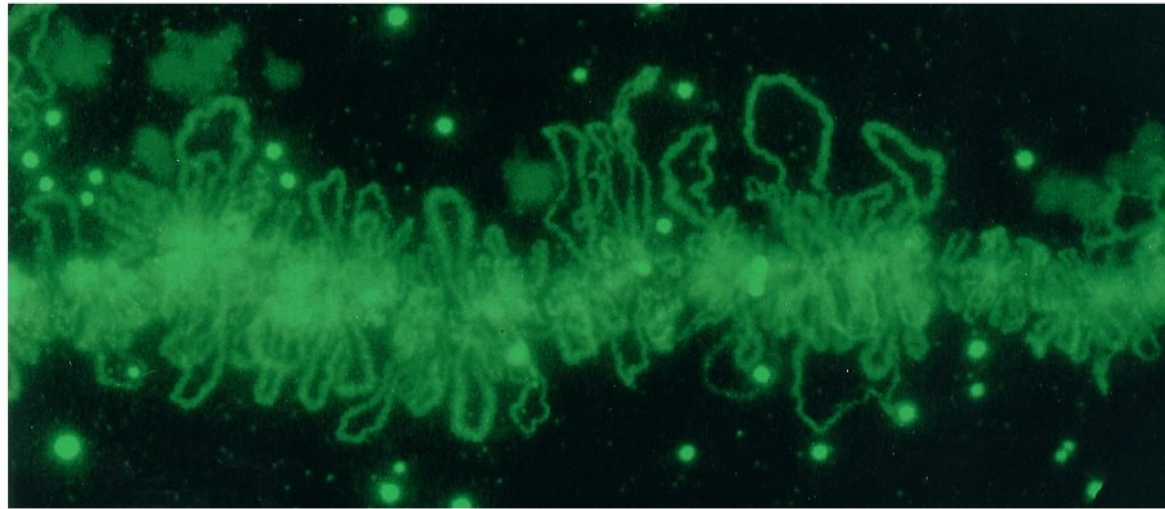


NASP chaperon
přidává histon H1
- nukleosom/H1
– další non-histon
proteiny –
chromatinové
vlákno



(A)

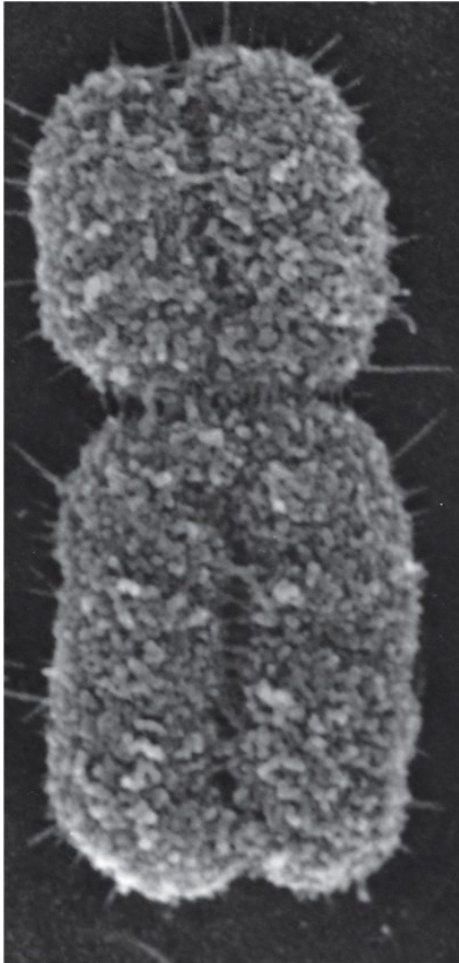
100 μm



(B)

20 μm

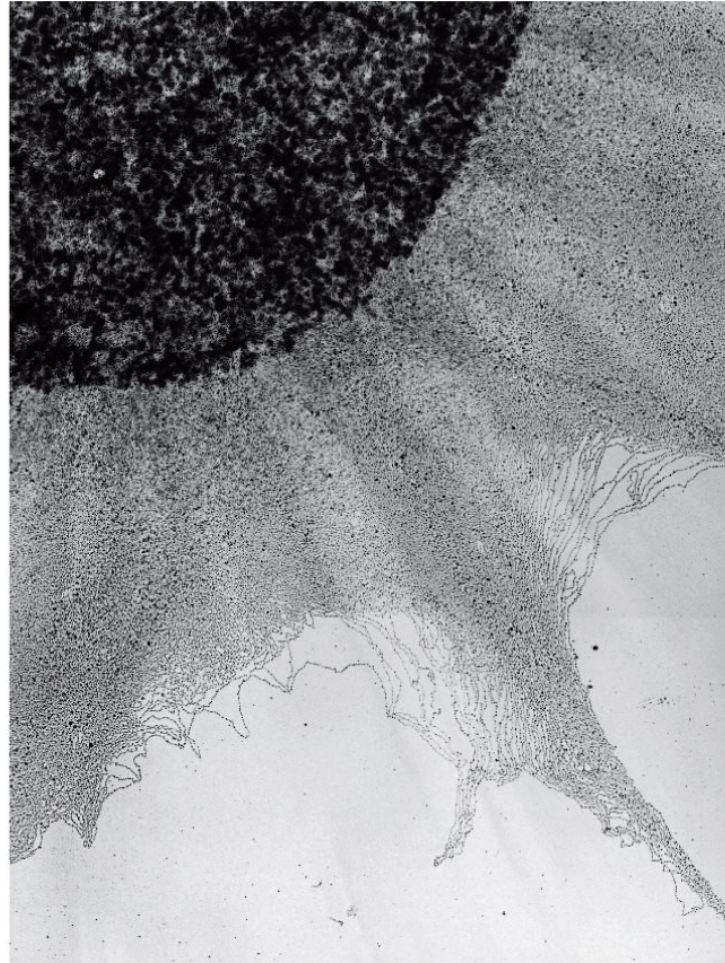
mitotický



(A)

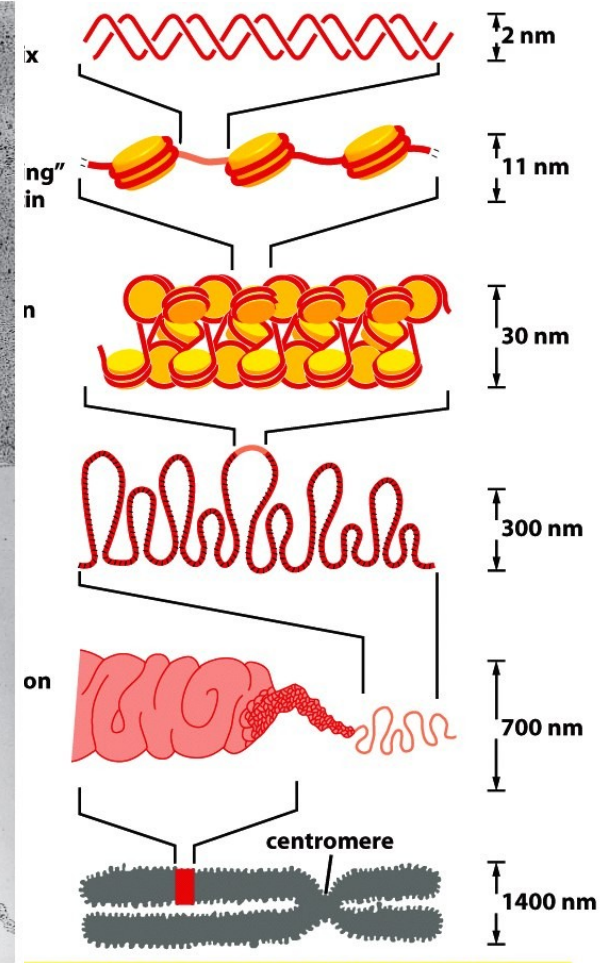
1 μm

interfázni



(B)

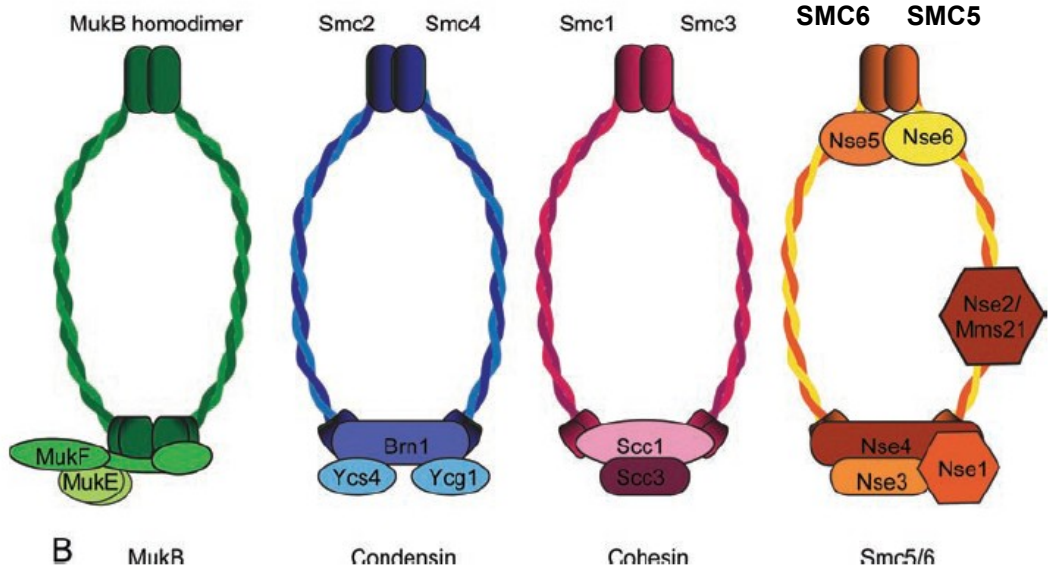
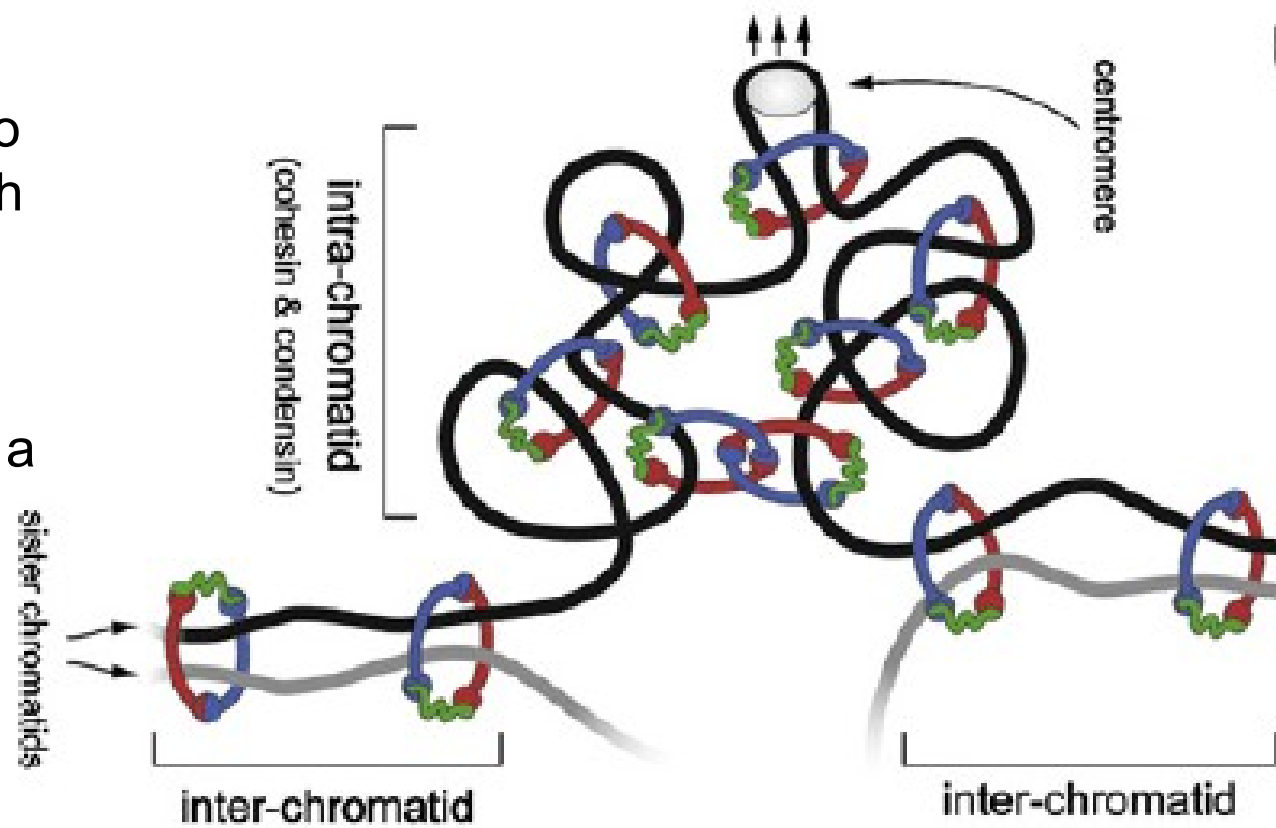
10 μm



NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT 100-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

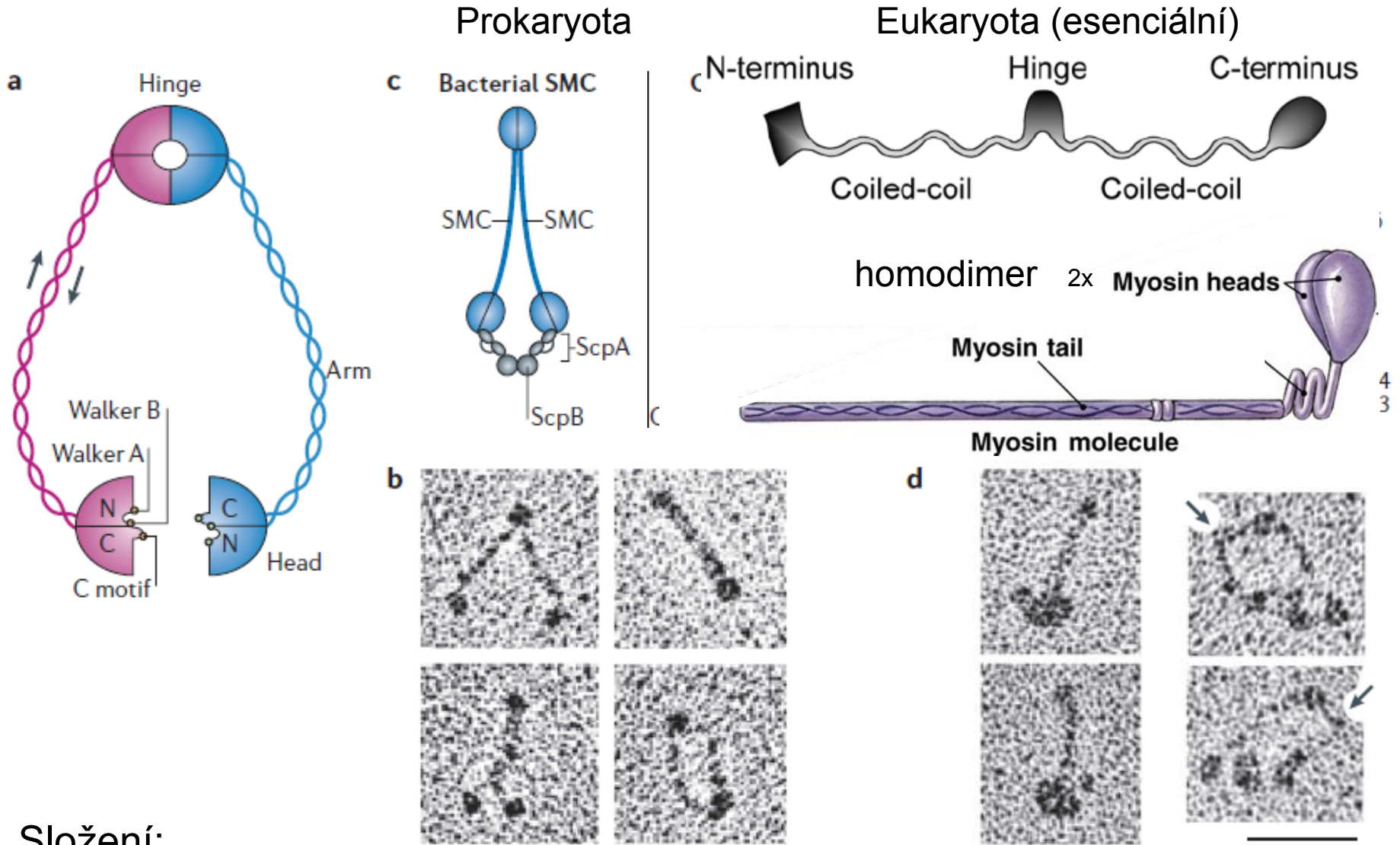
- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

- 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

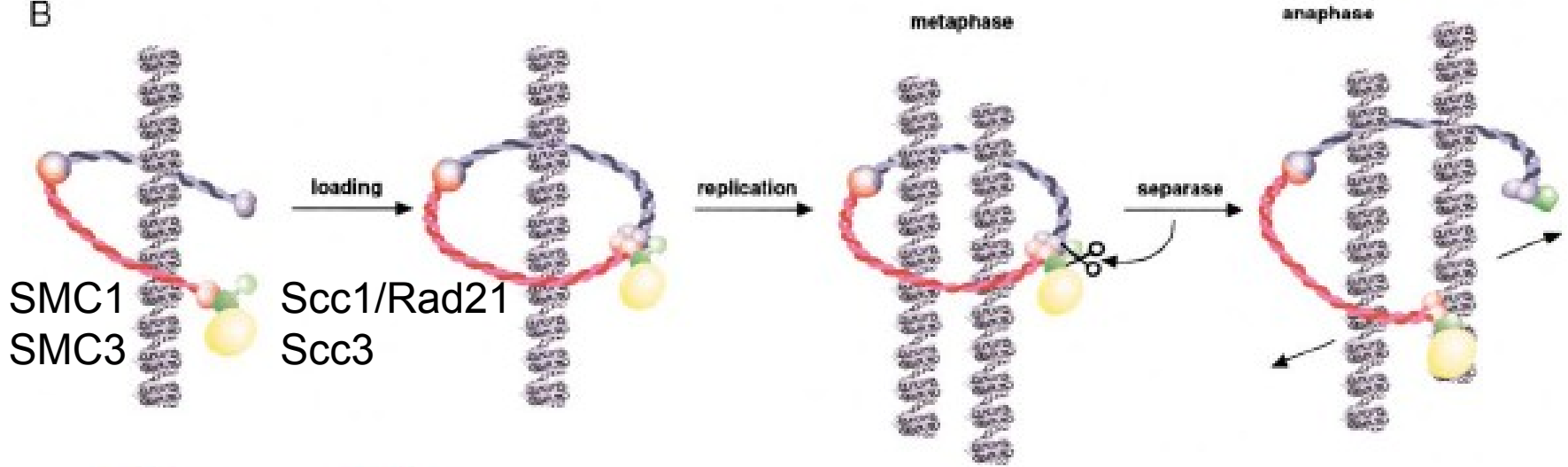


Složení:

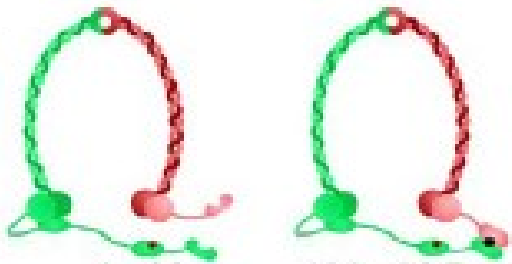
SMC dimery (homo- a hetero-) - konzervovanější (starší) než histony
 non-SMC podjednotky (2 – 6)

Kohesin „objímá” DNA

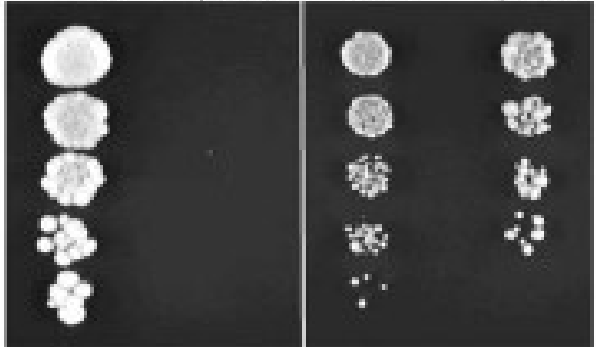
B



Haering et al, Mol Cell, 2002



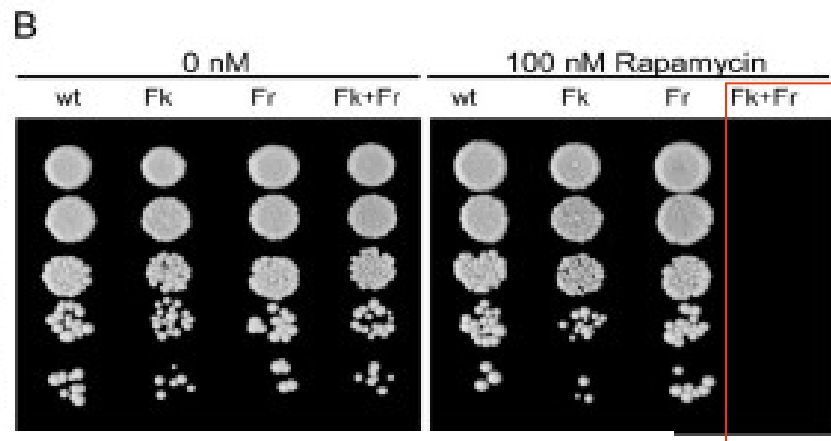
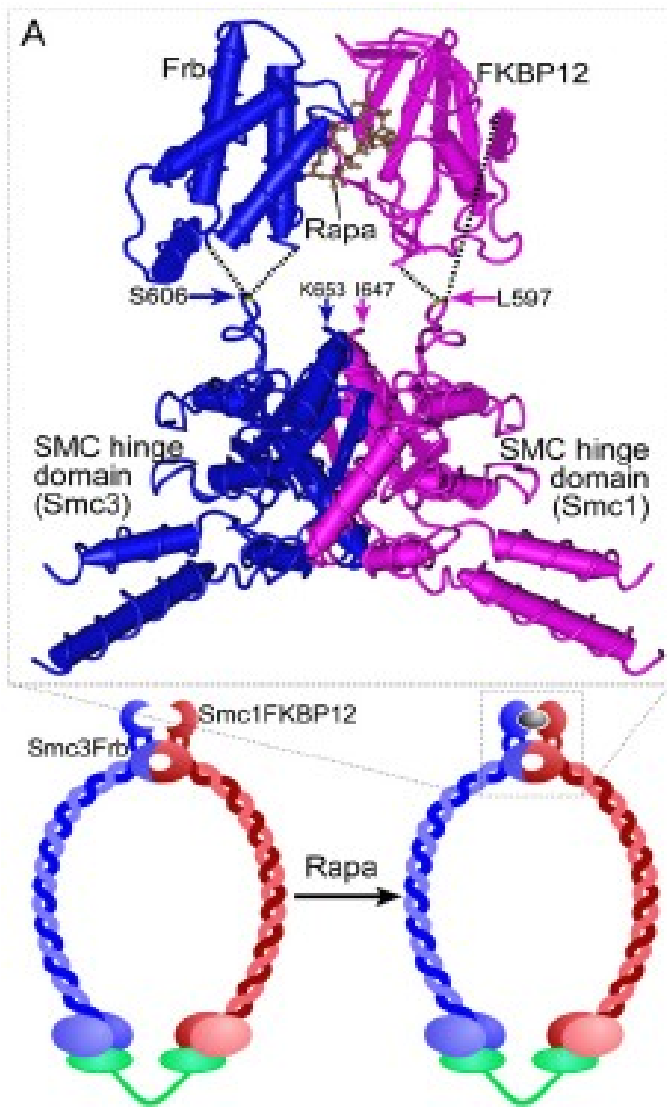
0 nM 100 nM Rapa
wt Q544K wt Q544K



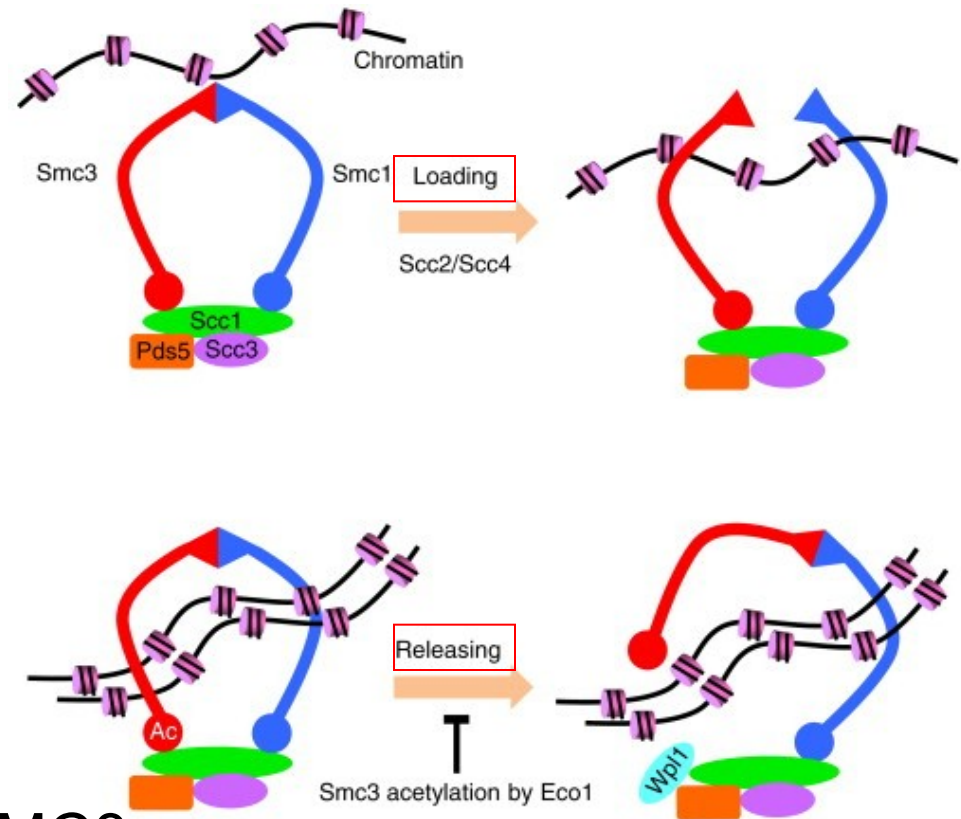
Použití fúzních proteinů při studiu kohese sesterských chromatid

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

Gruber et al., Cell, 2006

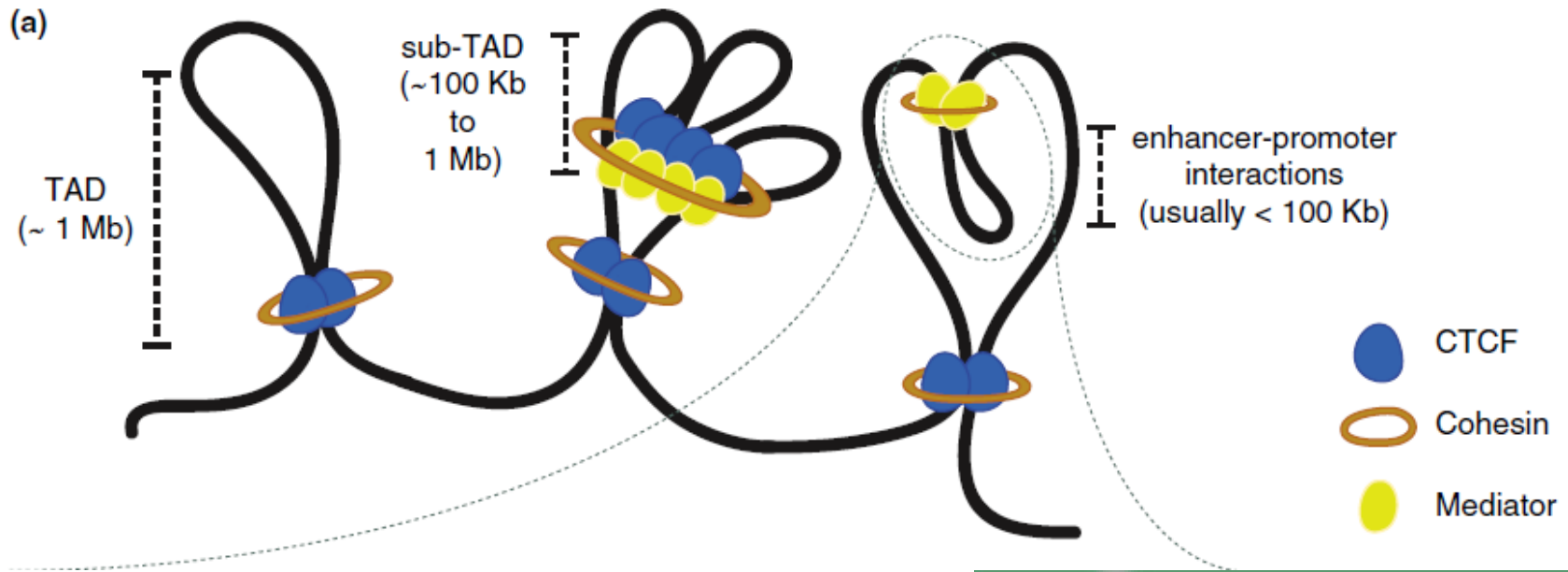


Uzamčení je pro buňku letální

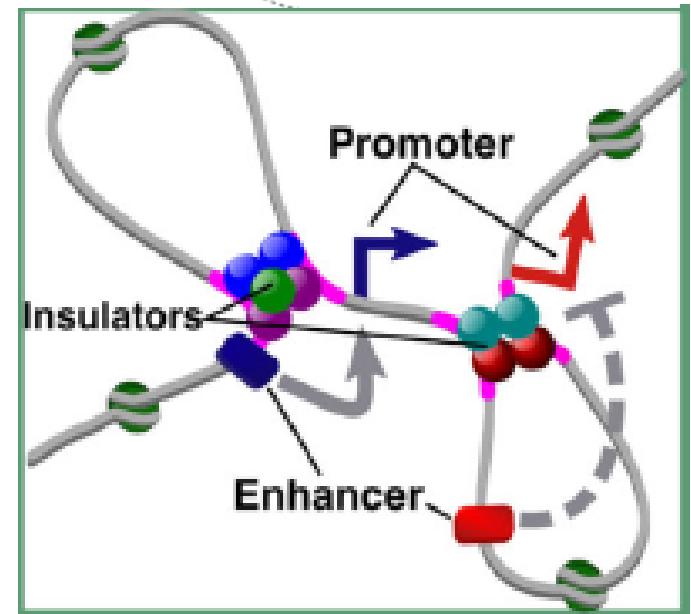


- loading přes hinge
- exit přes head
- Wpl1 destabilizuje Scc1-SMC3

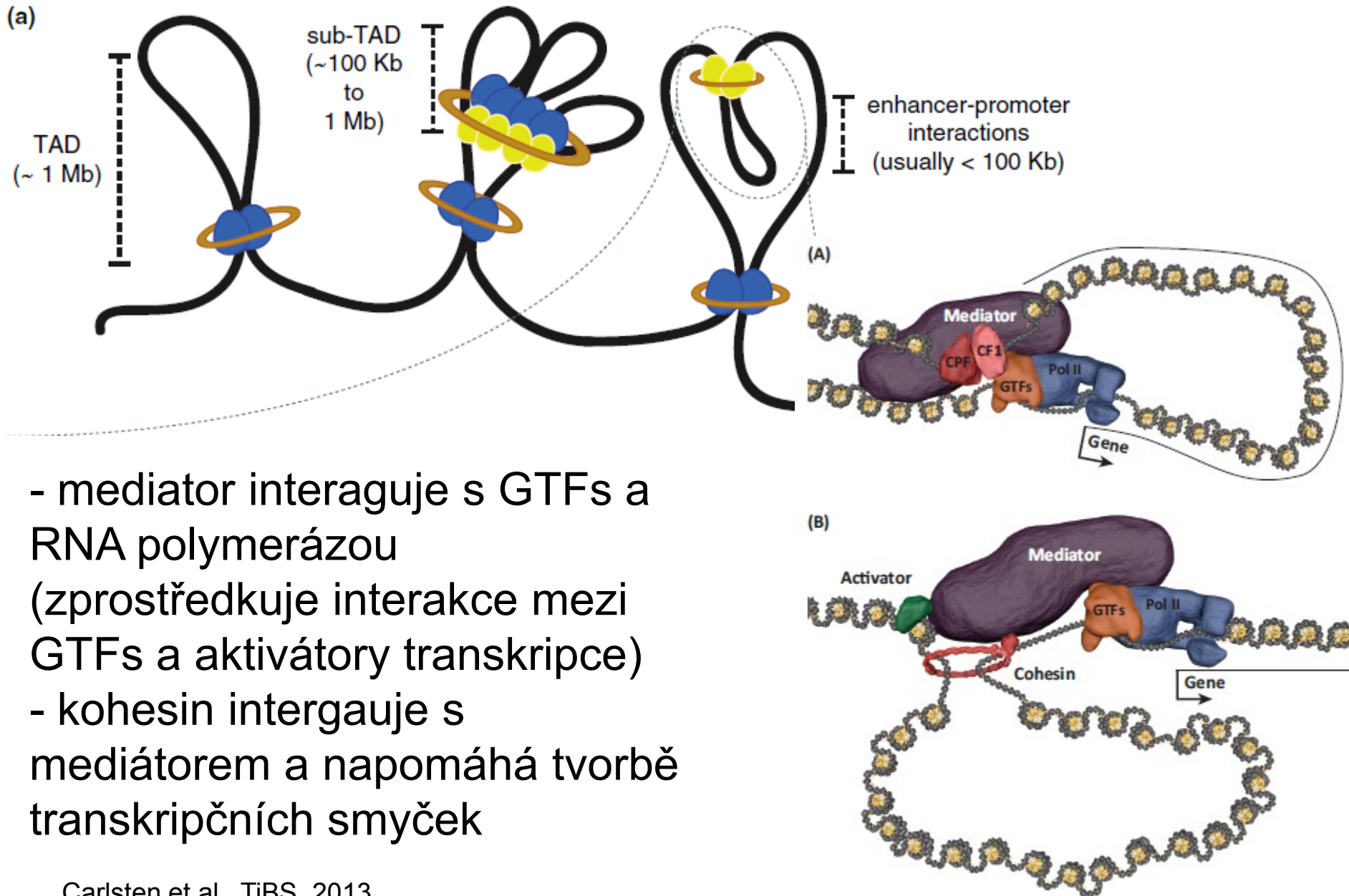
Kohesin interaguje s CTCF ...

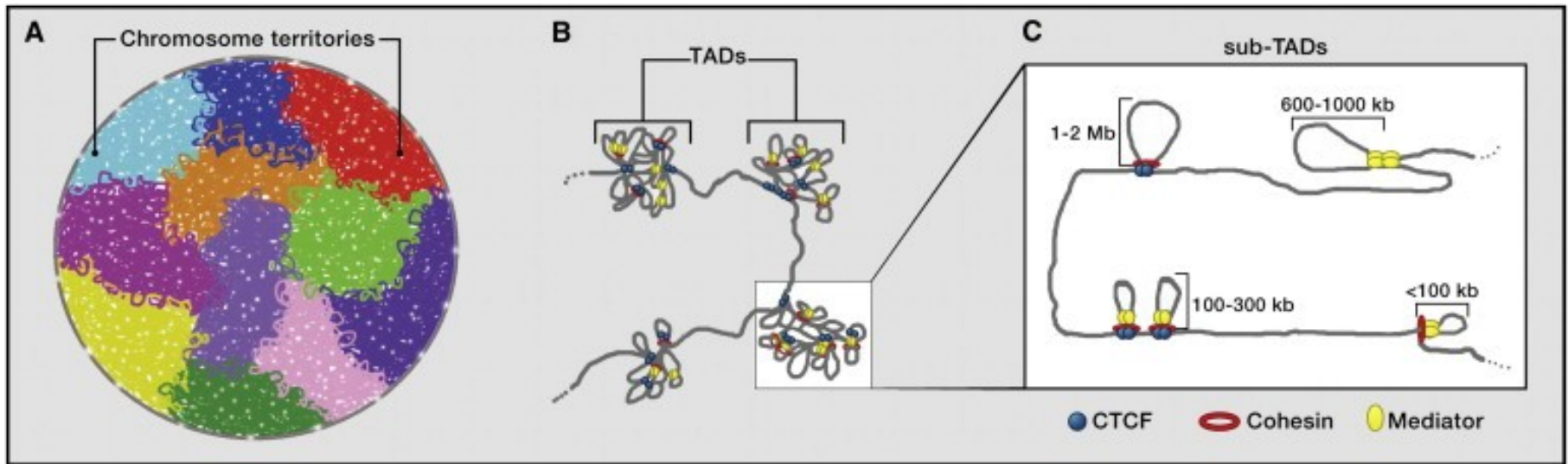


- CTCF „izoluje“ transkripční faktory a reguluje transkripci
- interaguje s kohesinem a podílí se na utváření vyšších chromatinových struktur

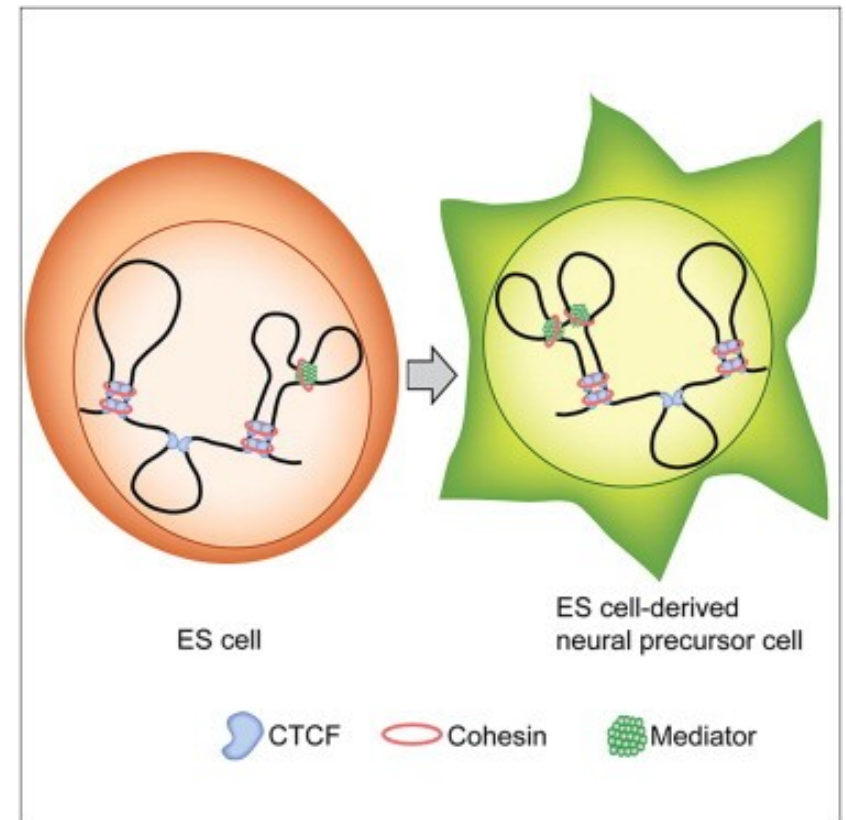


... a kohesin interaguje s mediátorem



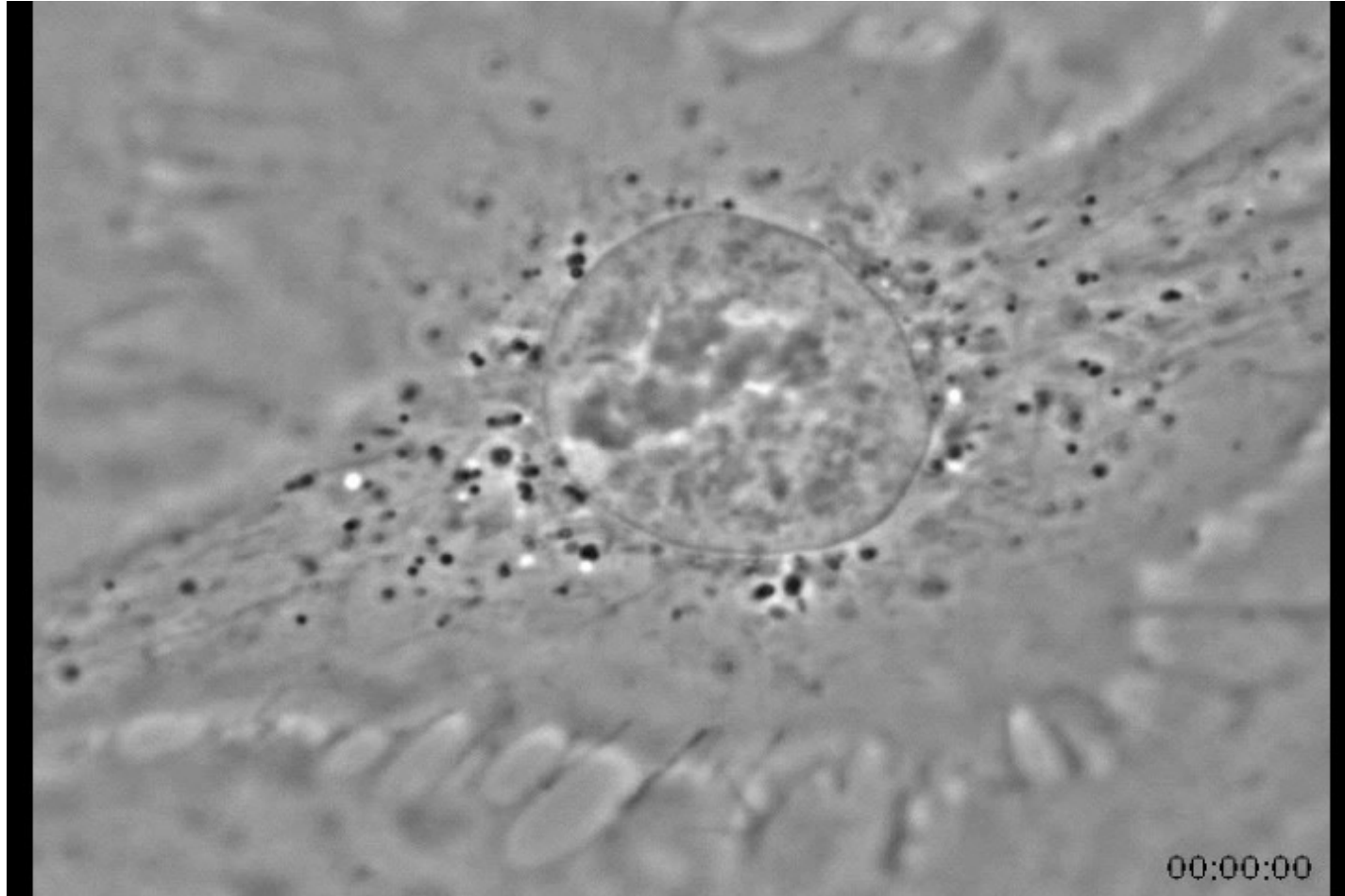


- kohesin se podílí na regulaci „cell-specific“ transkripce a chromatinové struktury (ukazuje se jak úzký vztah mezi těmito úrovněmi existuje)
- kombinace interakcí kohesinu s CTCF a mediátorem jsou klíčové pro „buněčnou specificku“



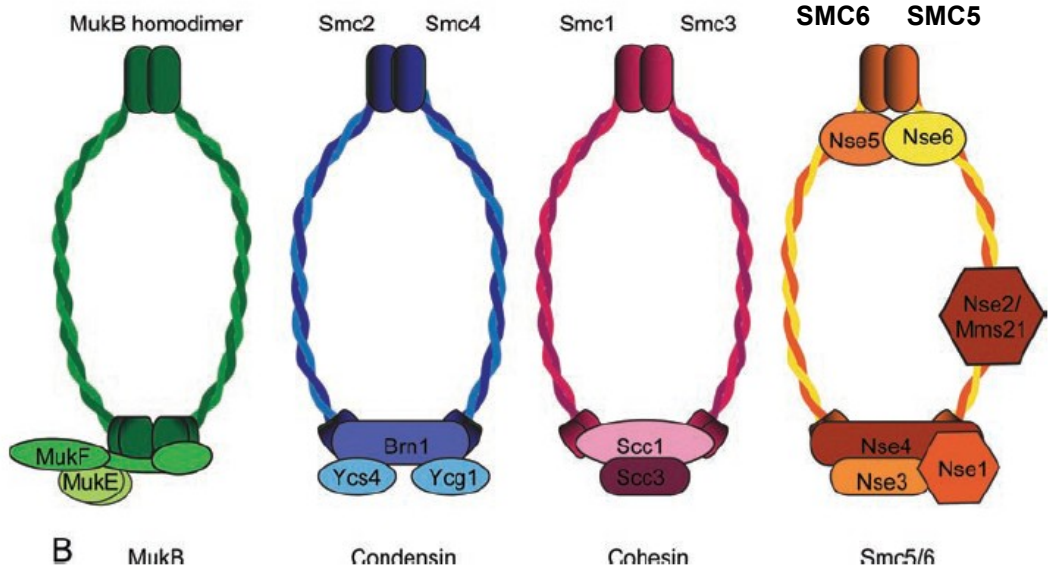
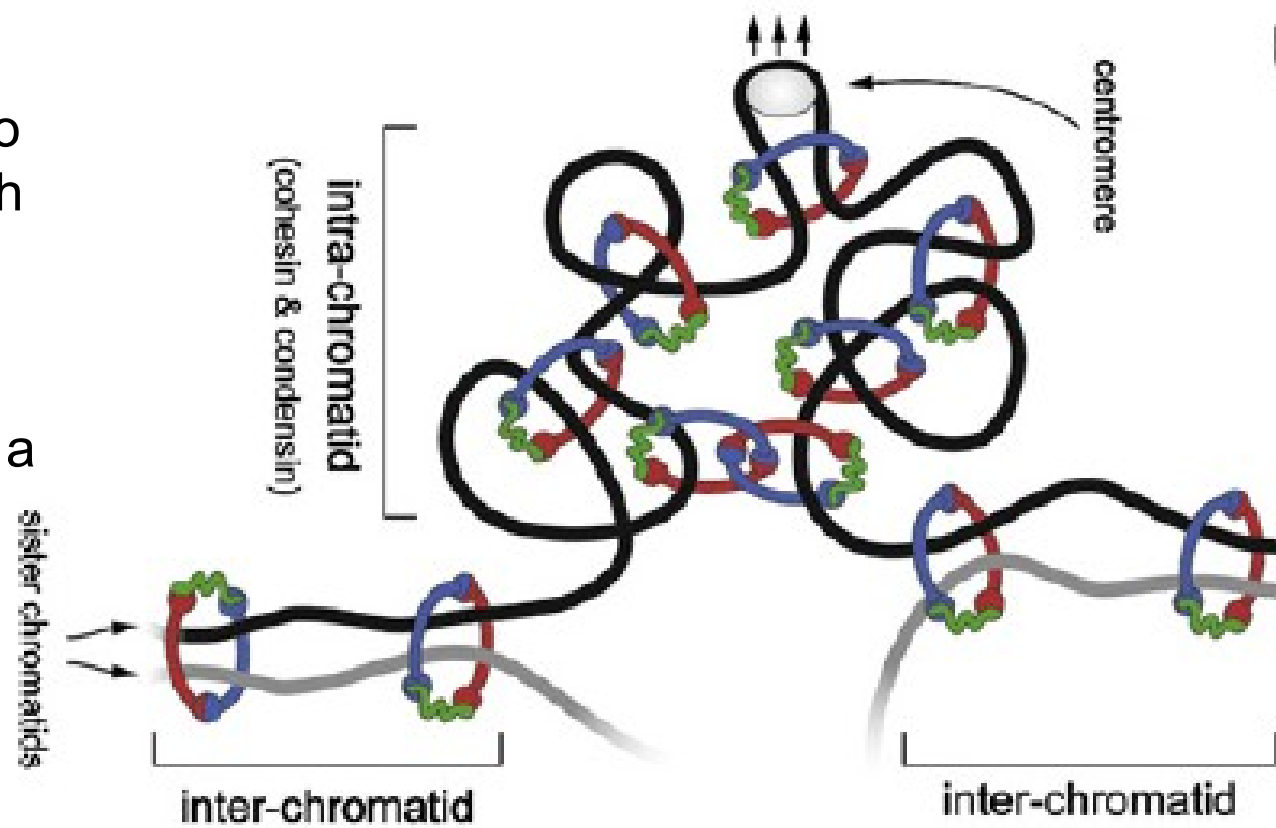
Dynamika chromatinu

Dr. Grobky



- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

- podílí se na regulaci segregace chromosomů a na opravě DSBs



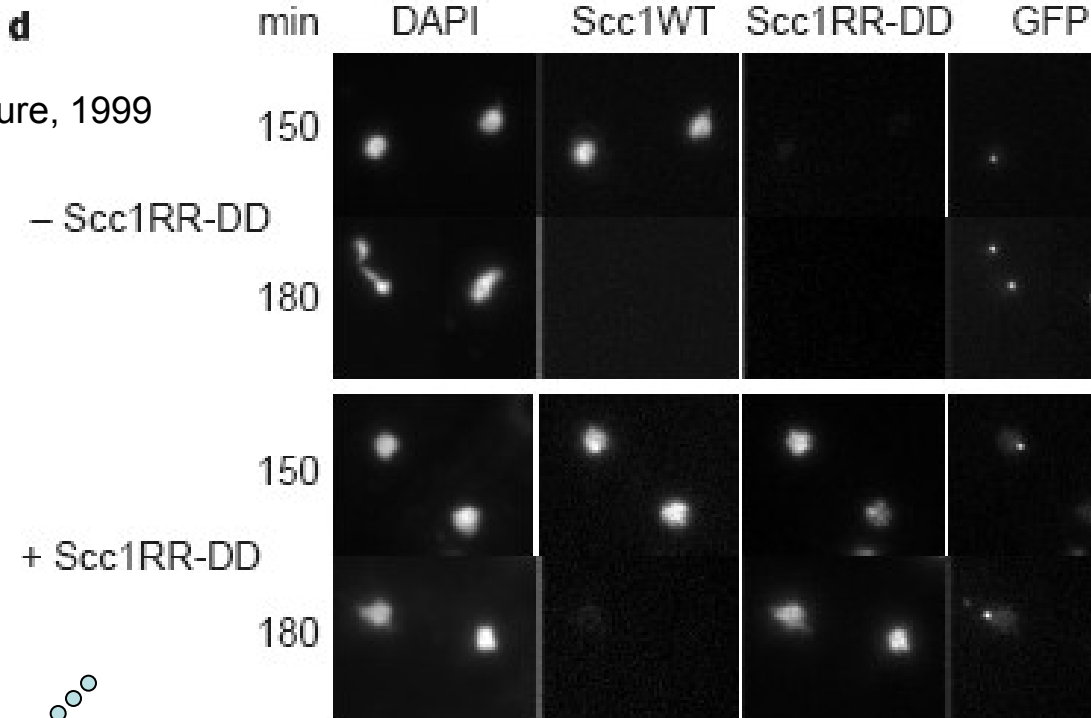
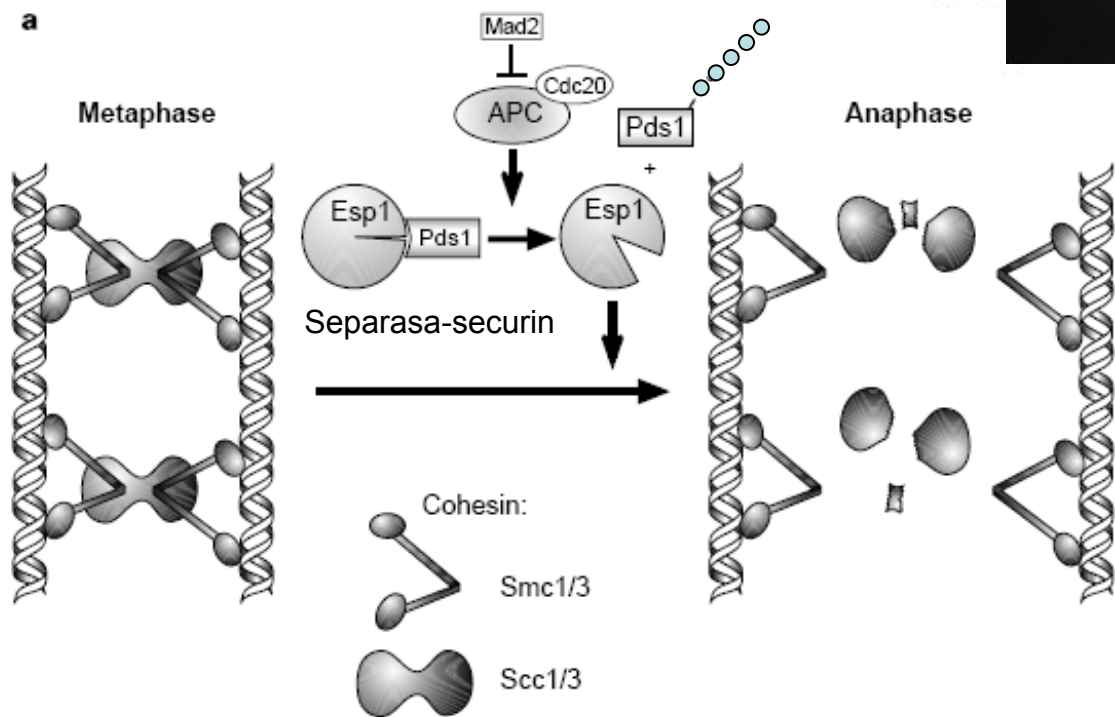
- Kohesin vytváří jednak smyčky (transkripční) a jednak drží sesterské chromatidy při sobě

- Kondensin spojuje dále smyčky k sobě (kondensuje chromatin ...)

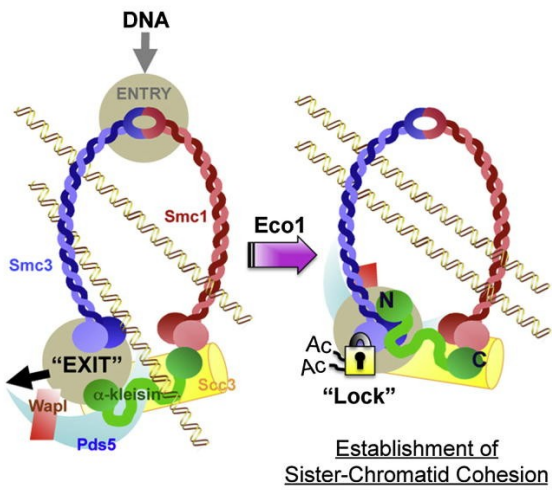
1. model Uhlmann et al., Nature, 1999

segregace chromosomů (*S. cerevisiae*)

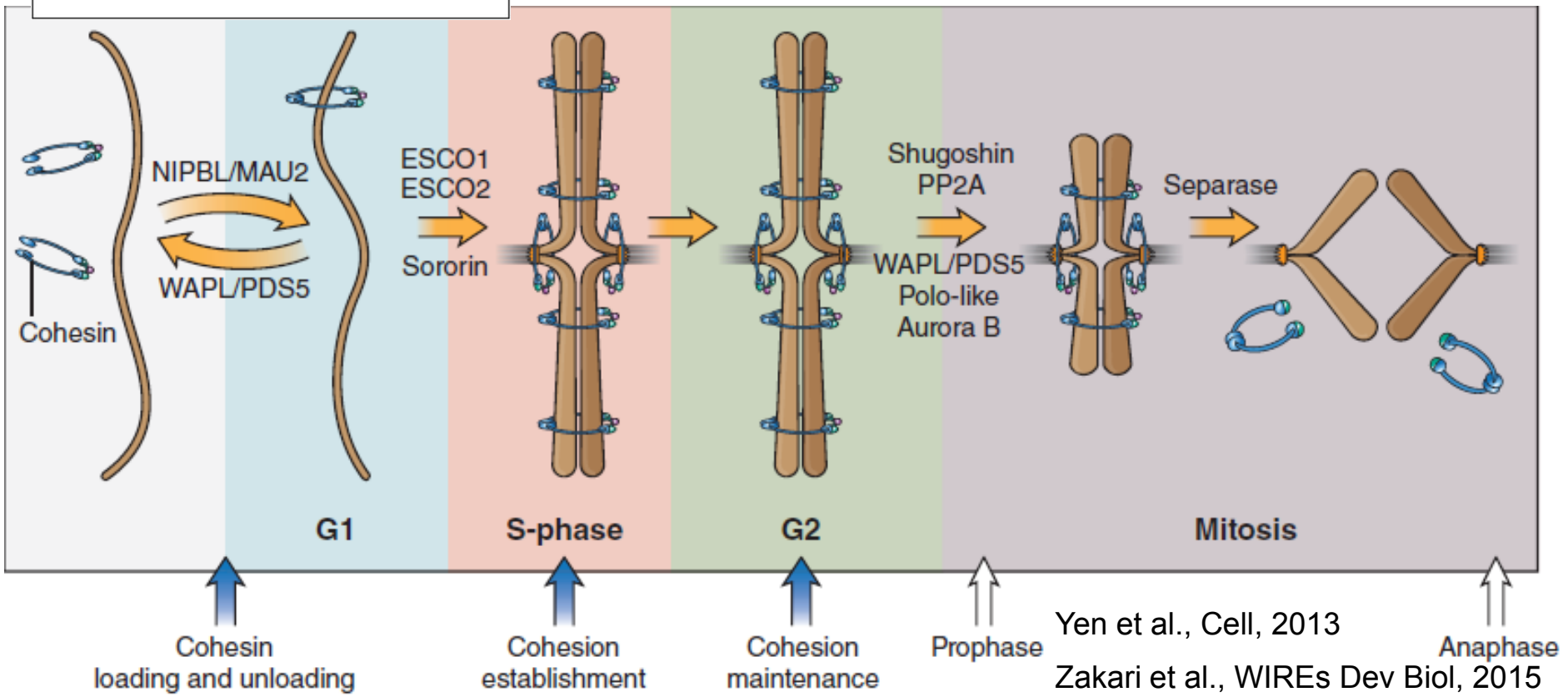
APC=anaphase promoting complex



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



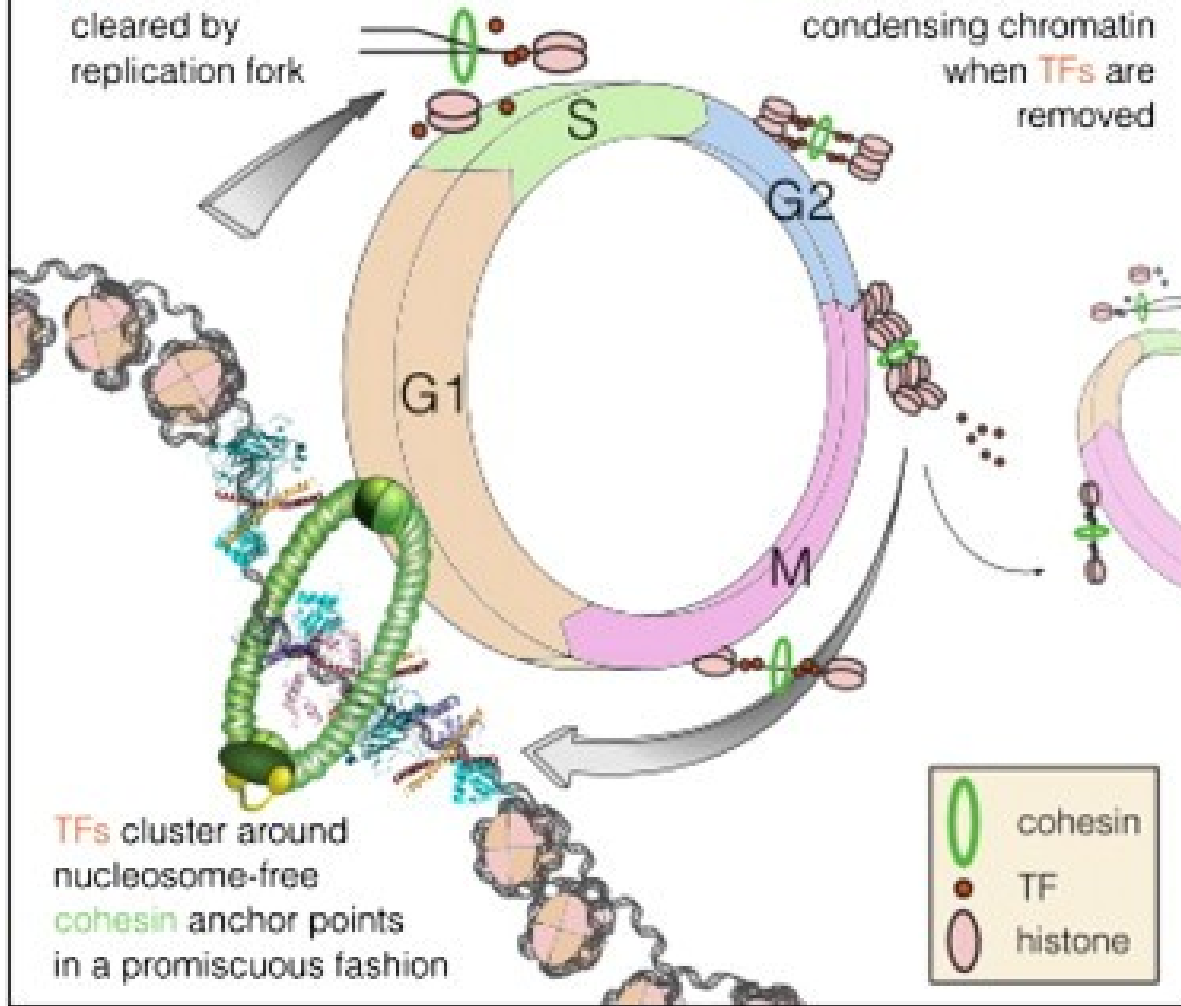
- SMC se podílí na dynamice chromatinu
- jsou regulovány v průběhu buněčného cyklu



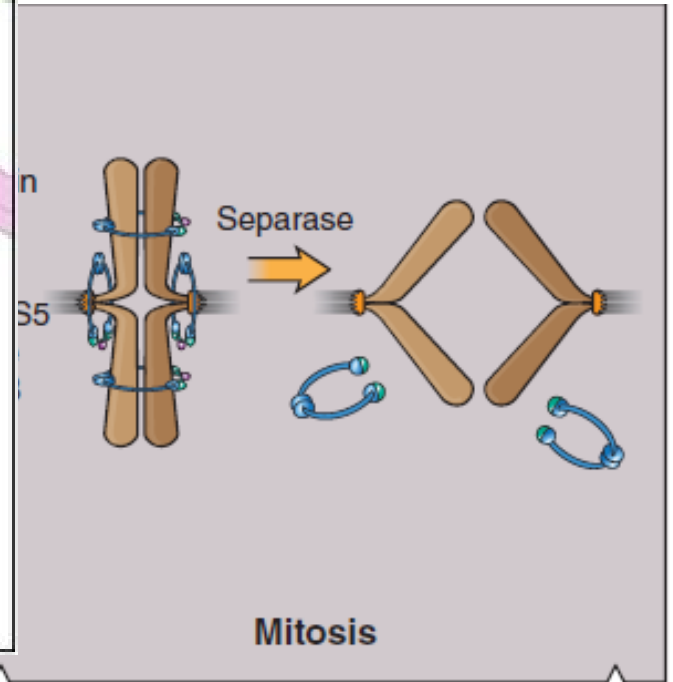
High-throughput ChIP-seq analysis

TFs and histones cleared by replication fork

cohesin remains bound in condensing chromatin when TFs are removed



TFs cluster around nucleosome-free cohesin anchor points in a promiscuous fashion



Cohesin loading and unloading

Cohesion establishment

Cohesion maintenance

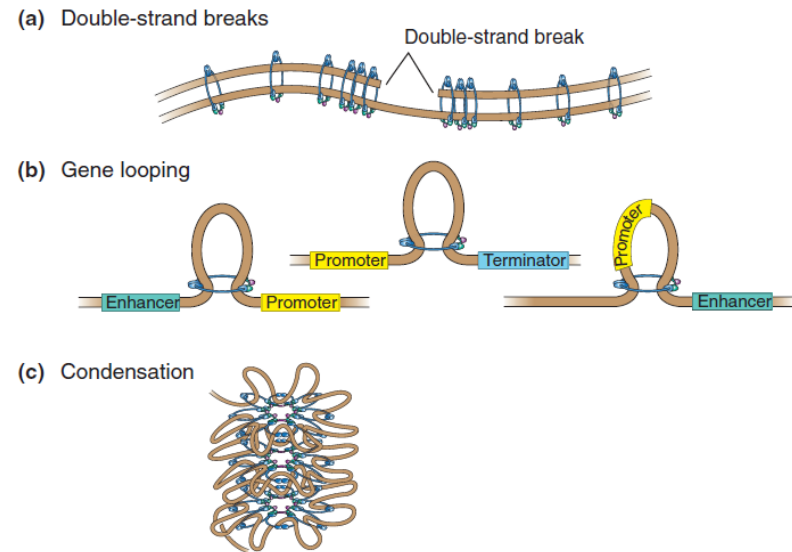
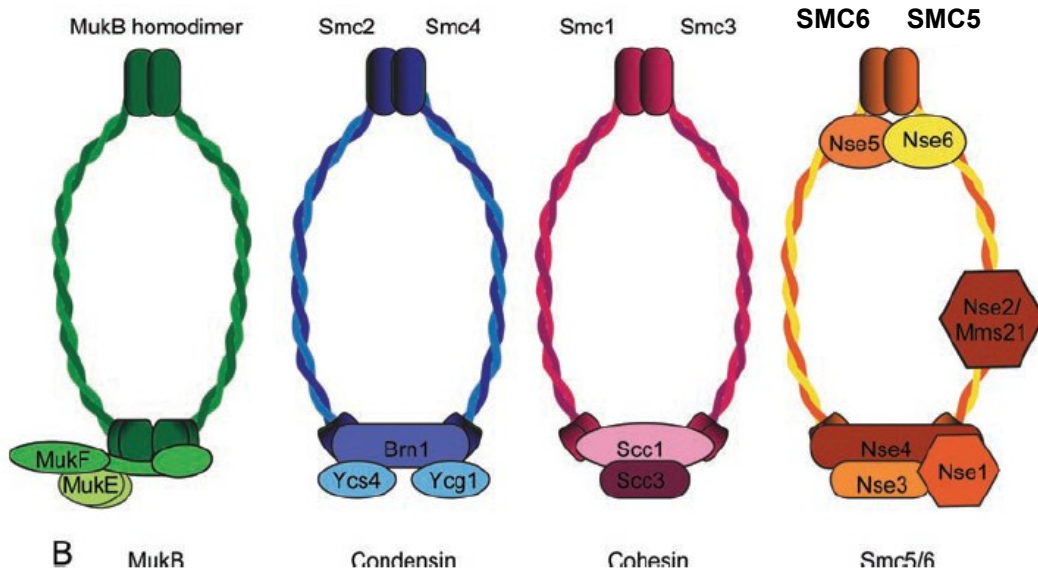
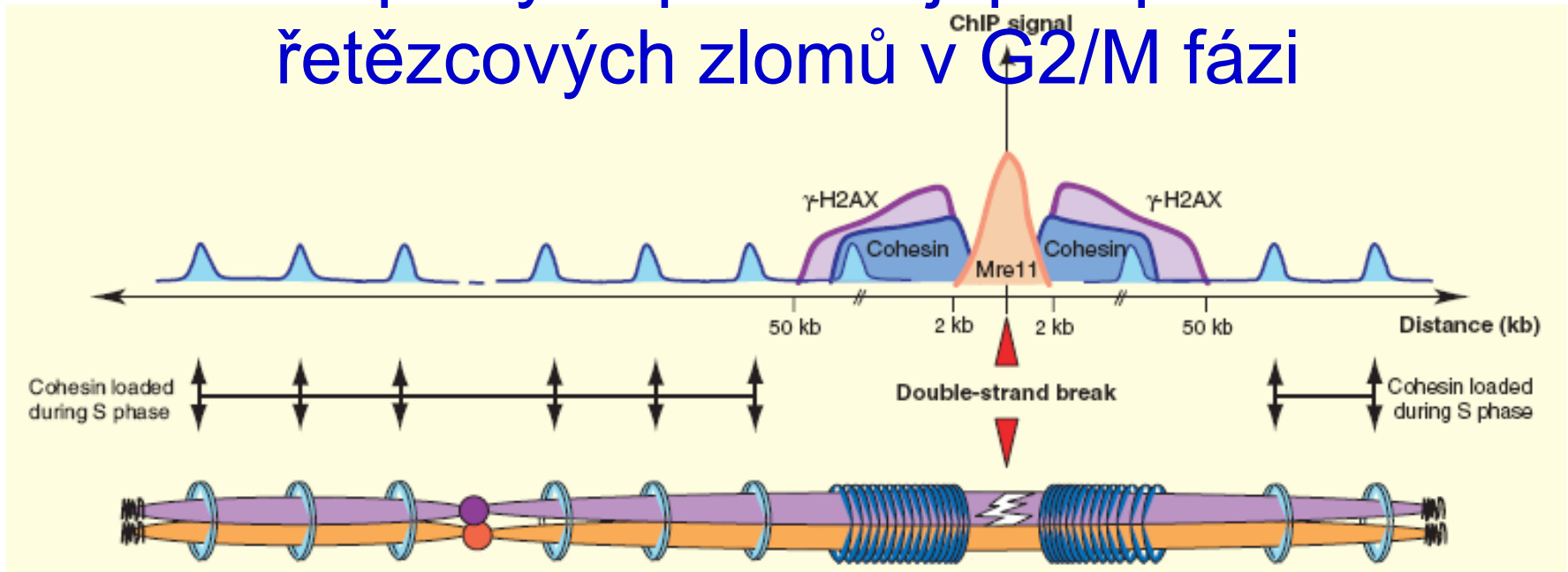
Prophase

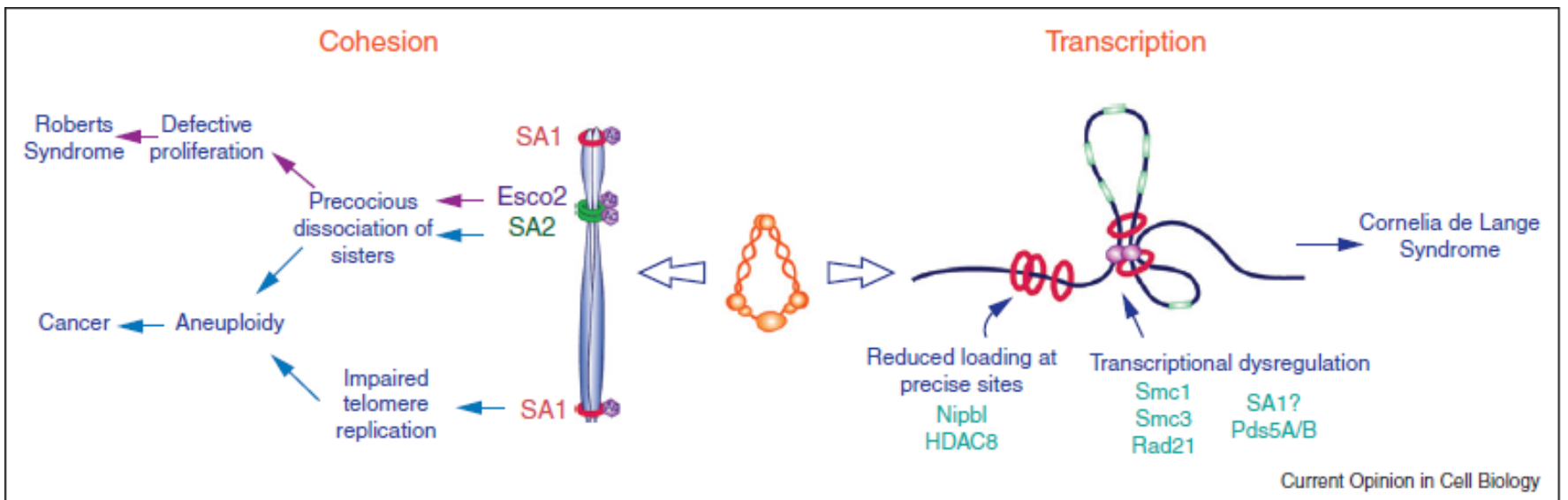
Yen et al., Cell, 2013

Zakari et al., WIREs Dev Biol, 2015

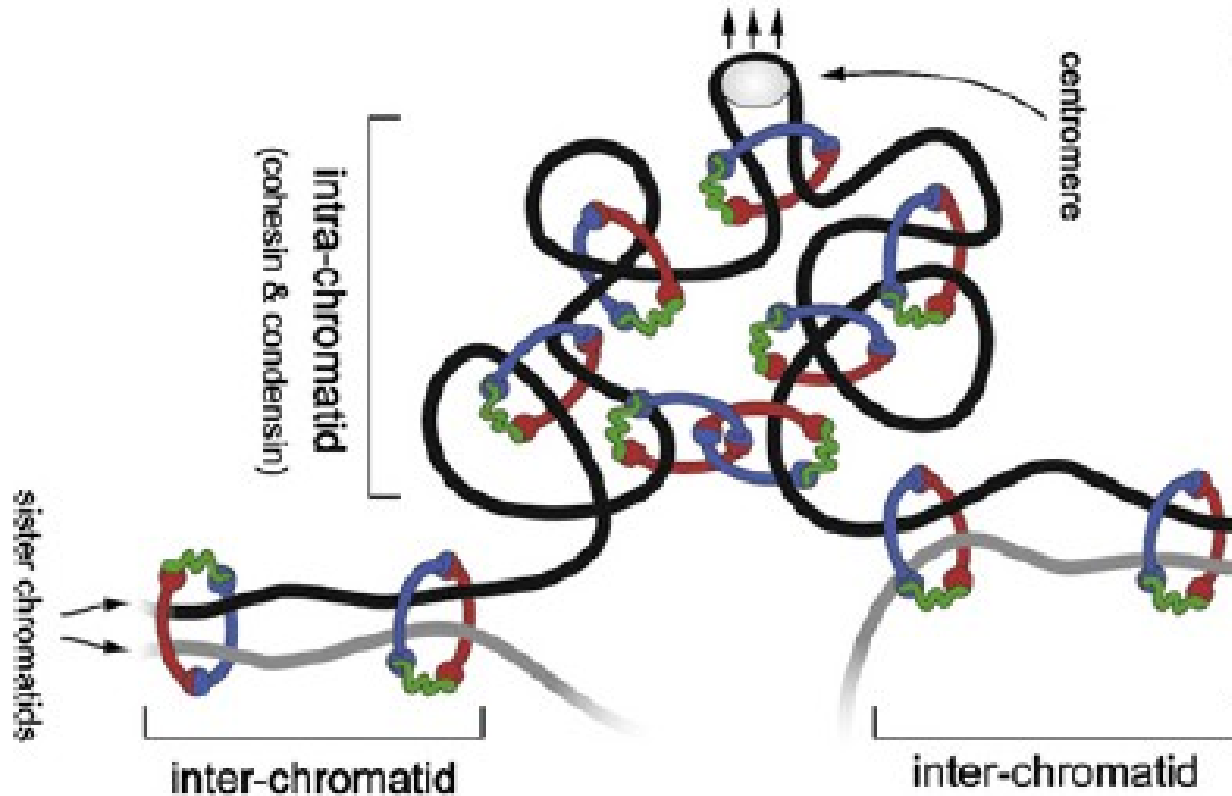
Anaphase

SMC komplexy napomáhají při opravě dvouřetězcových zlomů v G2/M fázi



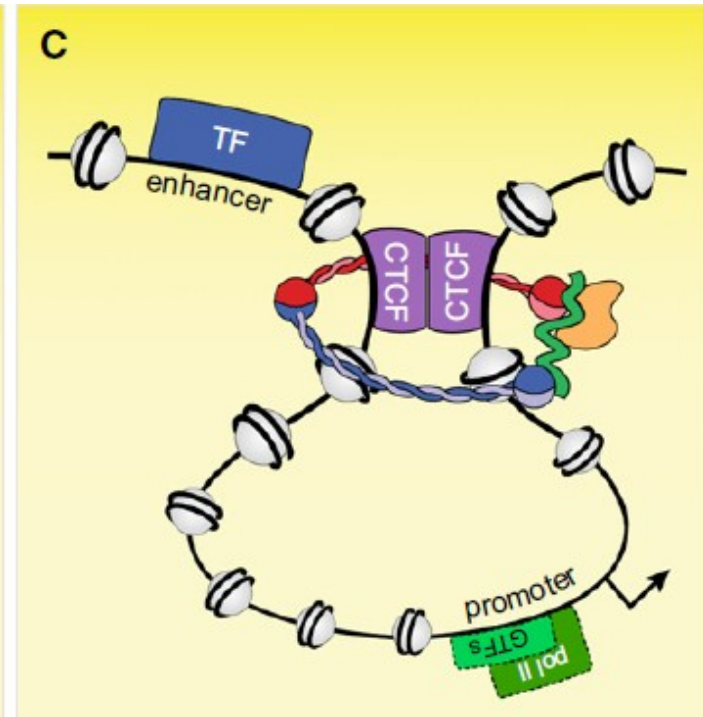
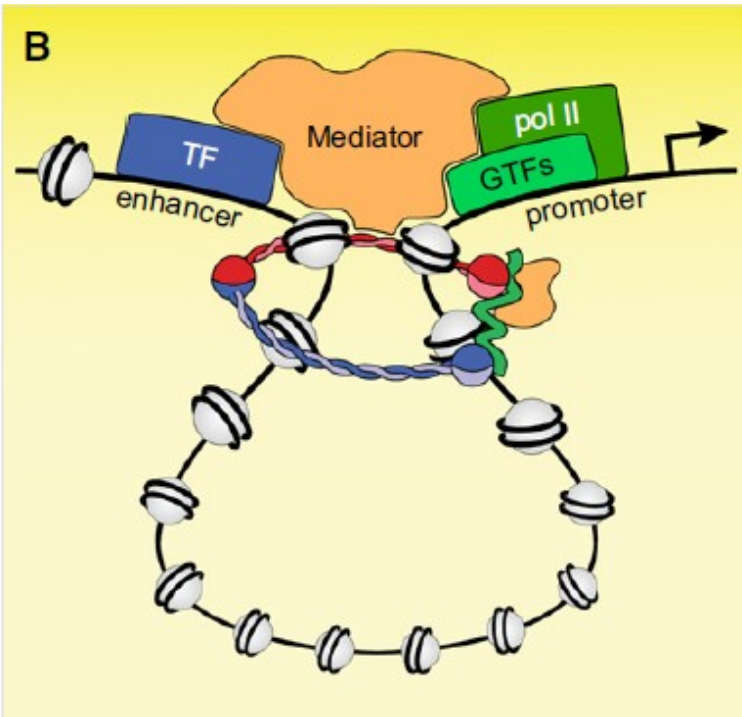
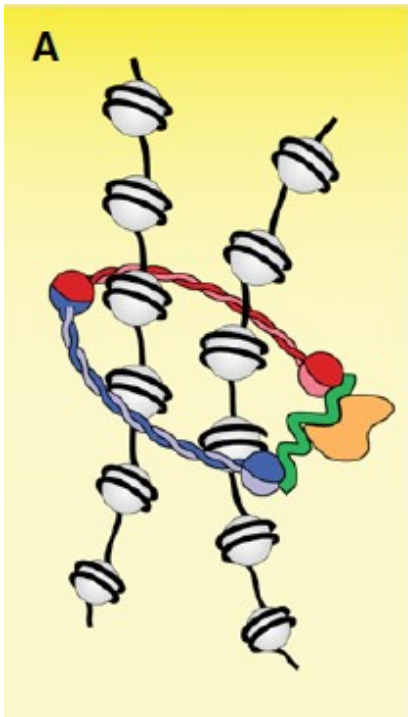


Remeseiro & Losada, CO in Cell Biol, 2012



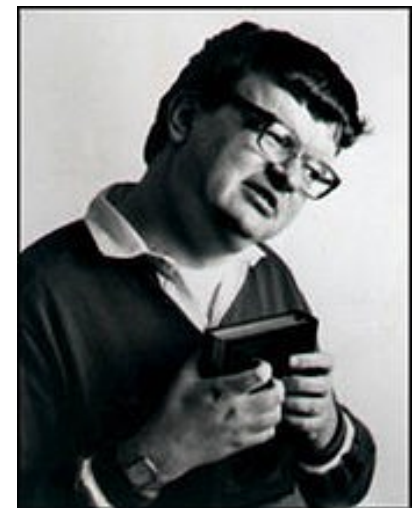
Mannini et al, Hum Mut, 2013





mutace v mediatoru:
 mental retardation syndroms
 (FGS/Opitz-Kaveggia S.,
 Lujan-Fryns S., schizophrenia)

Cuylen & Haering, Cell Stem Cell, 2010



Kim Peek (Rain Man)