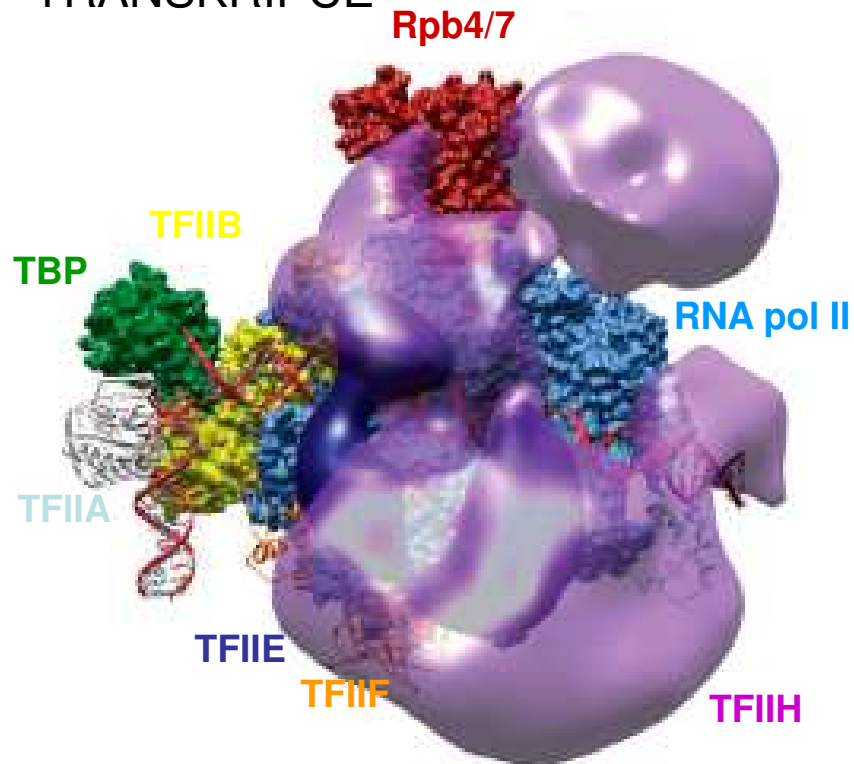
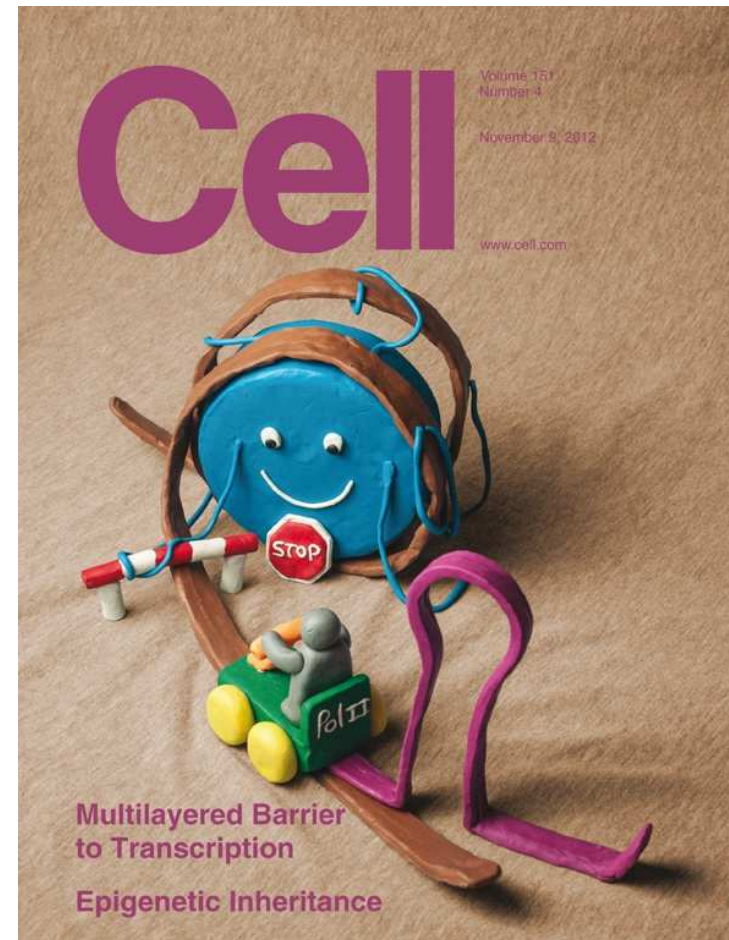


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA

TRANSKRIPCE



kvasinkový PIC komplex
Gibbons et al, PNAS, 2012

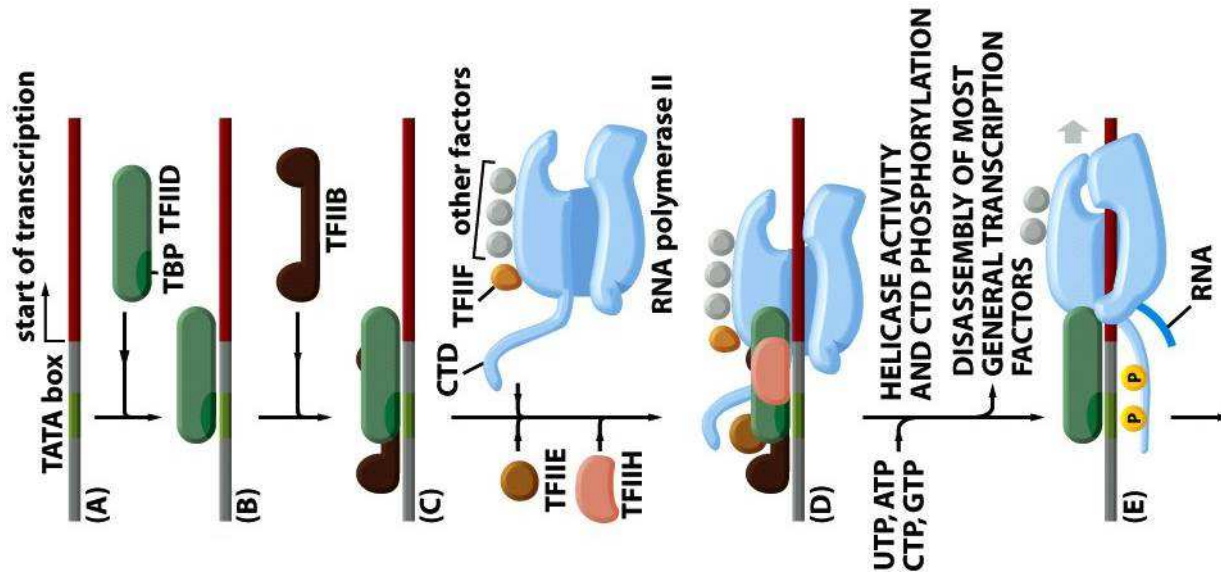


- komplexy podílející se na replikaci DNA
- komplexy účastnící se přepisu informace
- komplexy opravující poškozenou DNA
- **komplexy vytvářející strukturu chromosomu**
- samotný chromosom je obrovským dynamickým nukleoproteinovým komplexem (nikoli holá DNA)

Co zde schází??

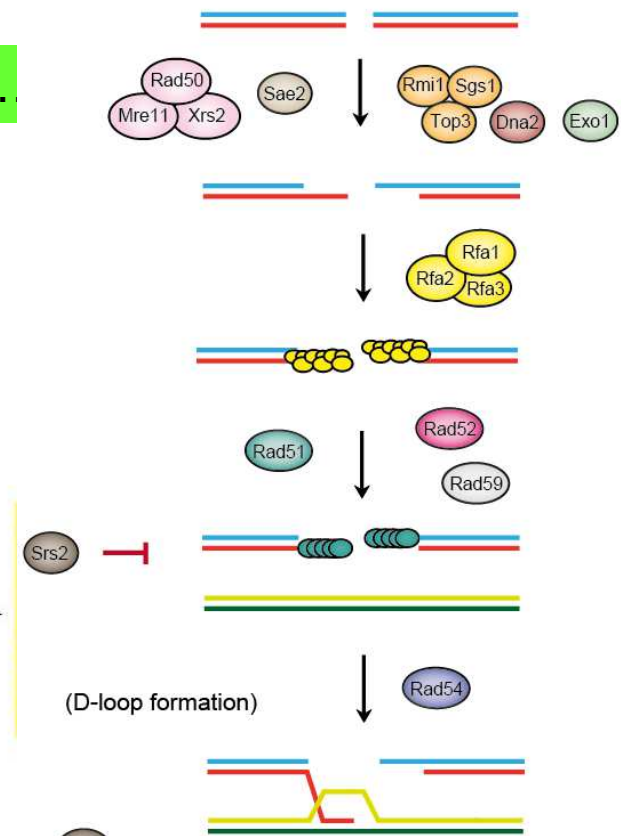
Chromatin = histony ..

TRANSKRIPCE



OPRAVA DNA

DSB



chromosom

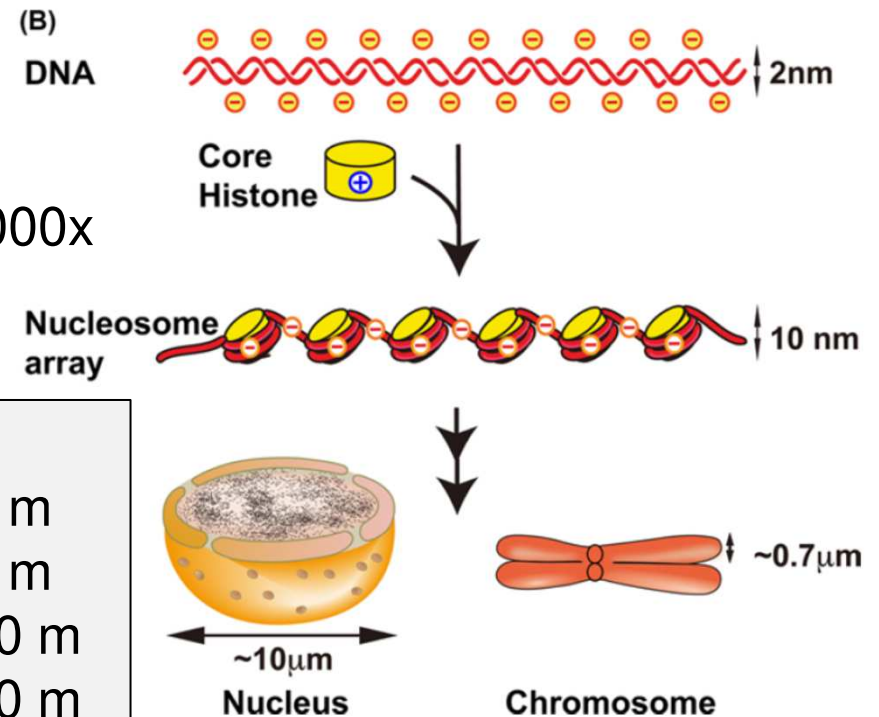
DNA makromolekula asociovaná s různými proteinovými komplexy – (lidský genom 3×10^9 bp – natažený řetězec 1 chromosomu cca 4 cm!!)

Průměrný lidský chromosom:

DNA molekula: ~4 cm

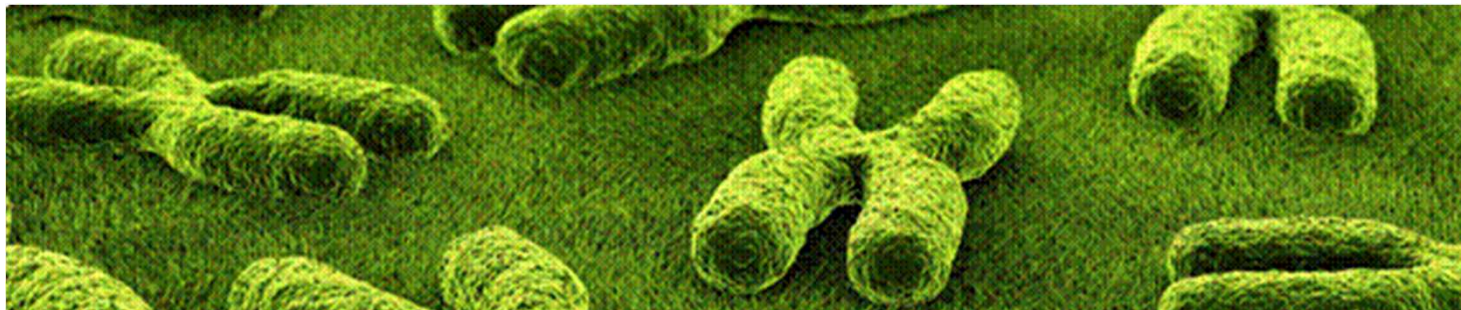
Mitotický chromosom ~4 μ m

10 000x



velikosti genomů:

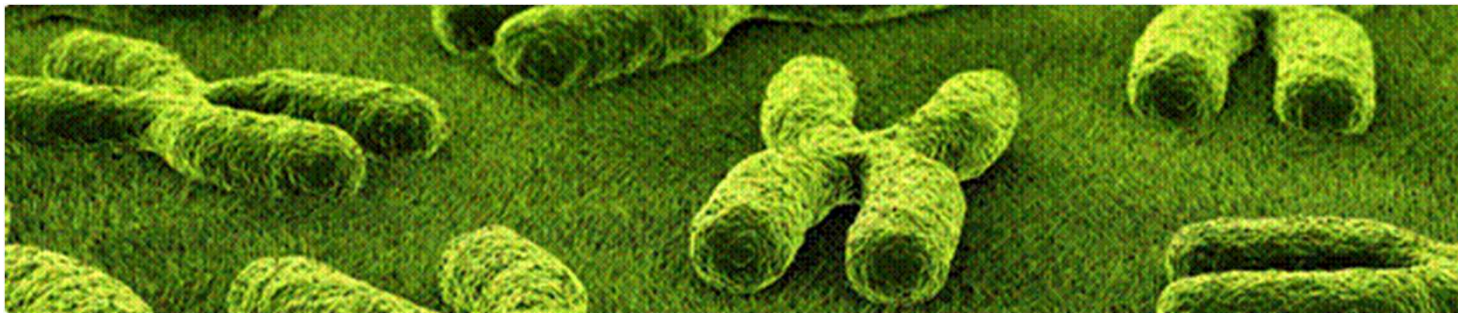
člověk	3 miliardy bp (x2 dipl)	2 m
fazole	13 miliard bp	9 m
lilie	90 miliard bp	60 m
salamandr	<120 miliard bp	80 m



chromatin

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

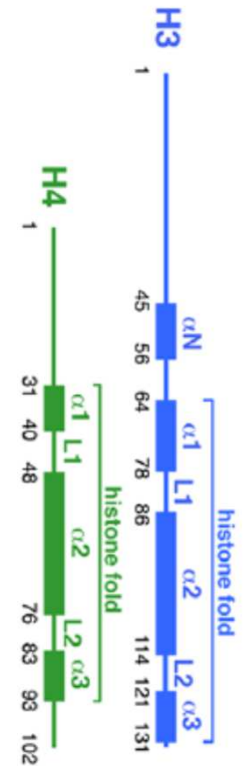
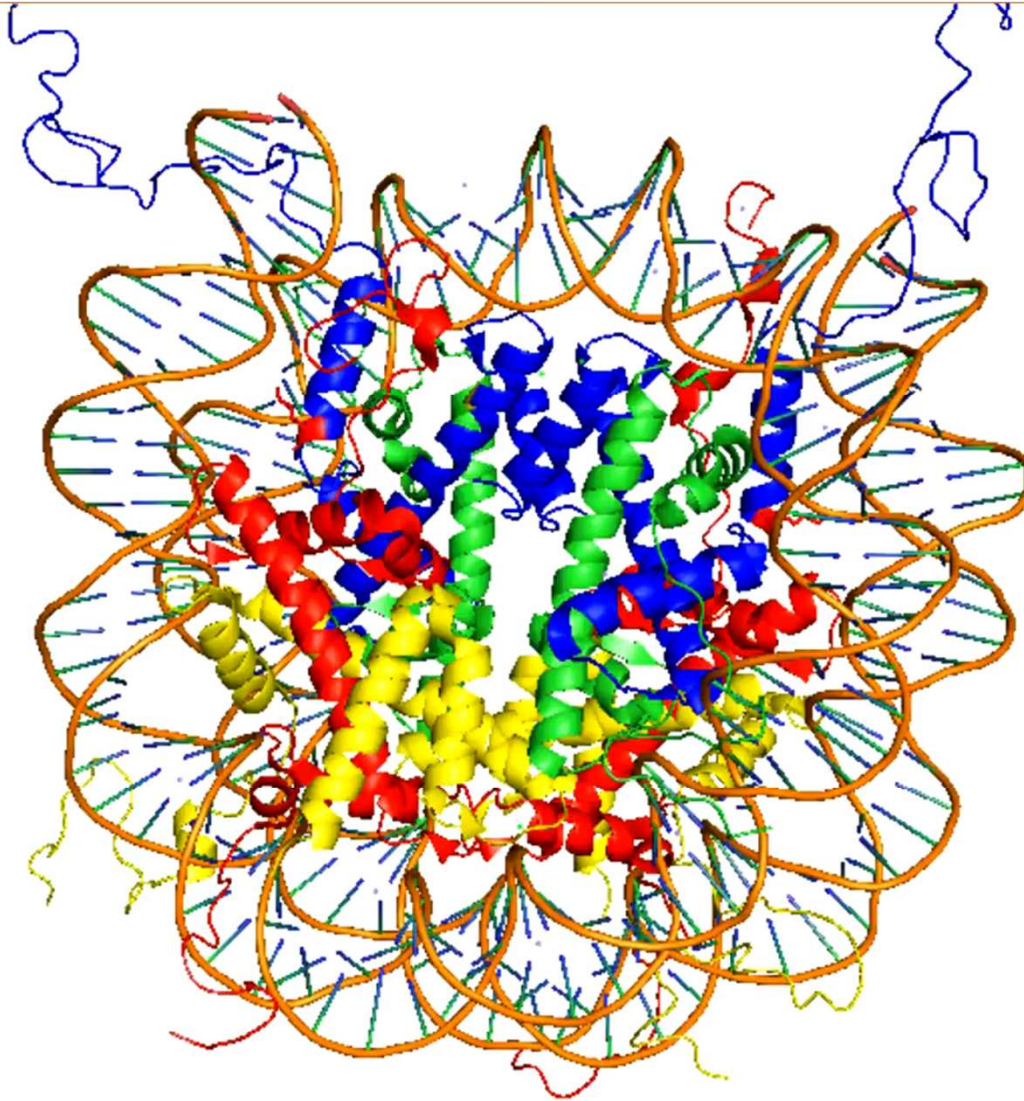
- komplexy vytvářející **strukturu chromatinu**
- vytváří základní strukturu
 - **nukleosomy** – chaperony, remodelační komplexy
 - histon **H1, HP1** protein
- vytváří specializované domény
 - centromery, telomery
- vytváří vyšší struktury a podílí se na dynamice
 - **SMC komplexy** - kohesin, kondensin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



přednášky prof. Fajkuse:

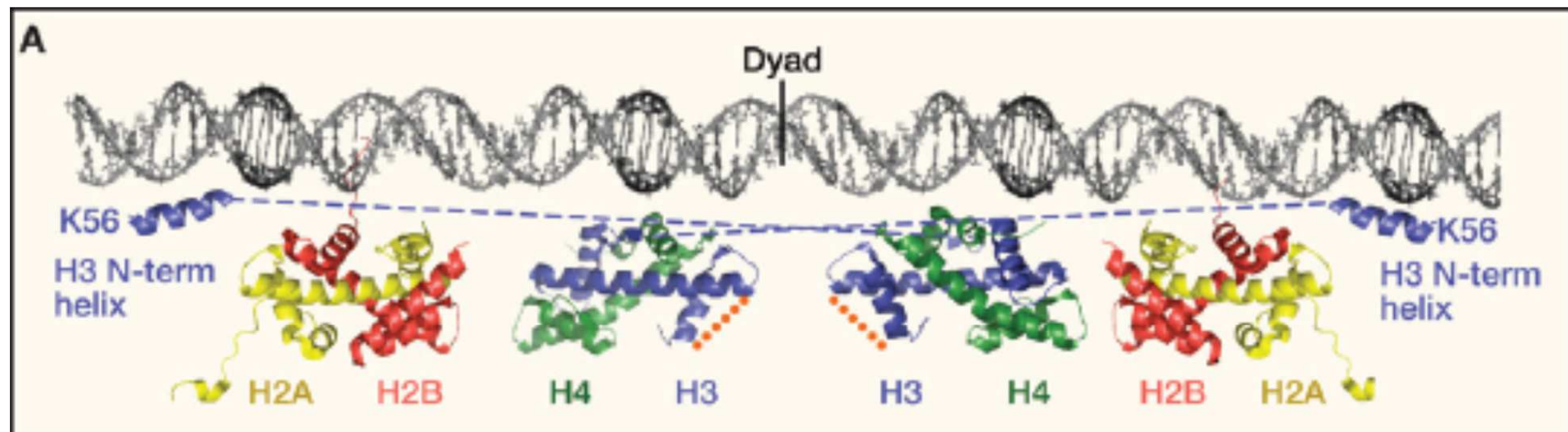
Struktura a funkce eukaryotických chromozomů (C9041)

Only

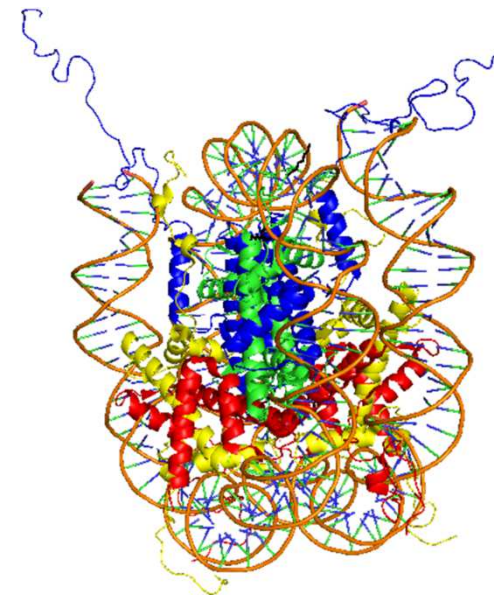


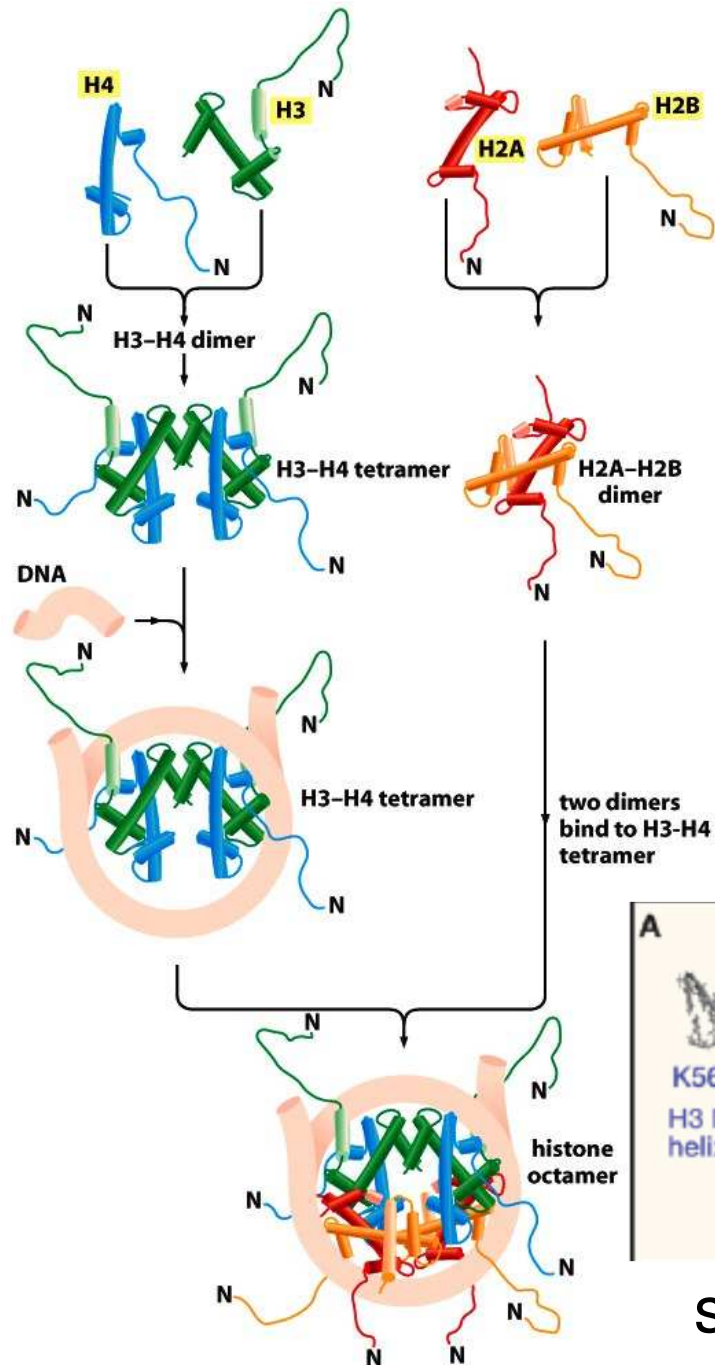
- 146bp – histon fold - centrální část DNA váže tetramer H3-H4
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B PDB: 1KX5
- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice H3 (acetylovaný K56)

Skládání histonů do nukleosomu (komplexu)



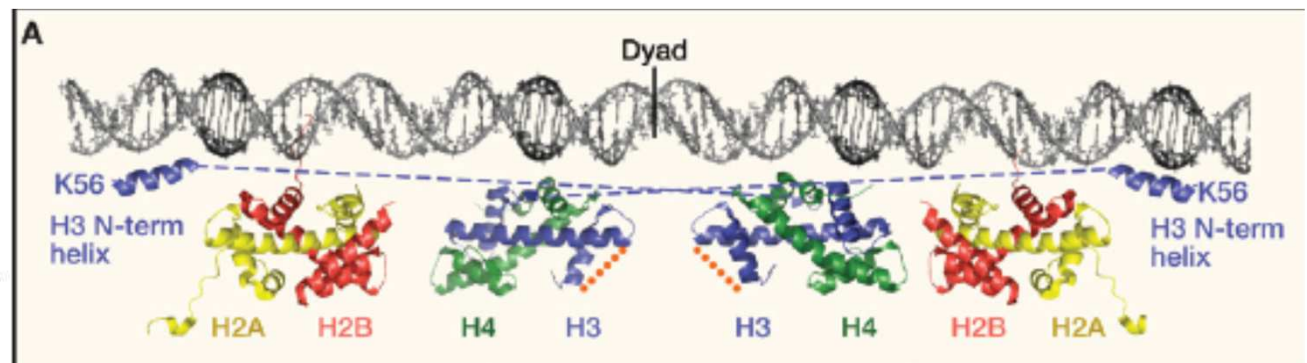
- 146bp - centrální část DNA váže tetramer **H3-H4**
- **H3** dimerizuje přes postraní šroubovici
- okraje DNA vážou dimery H2A-H2B
- 10bp konce DNA vážou šroubovice **H3** (acetylovaný K56)



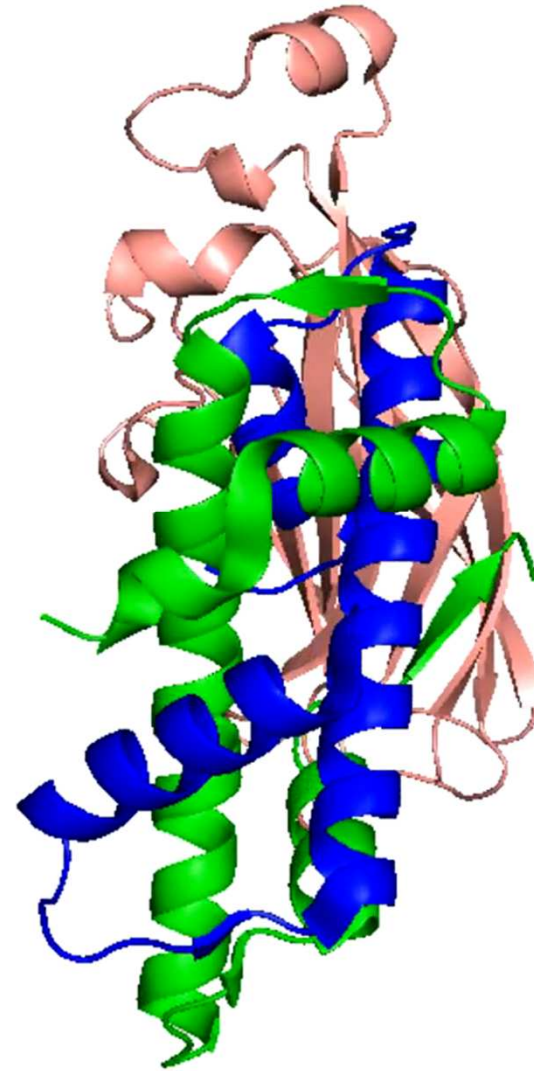
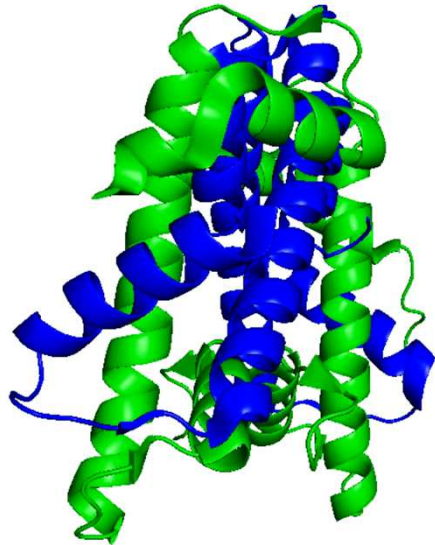
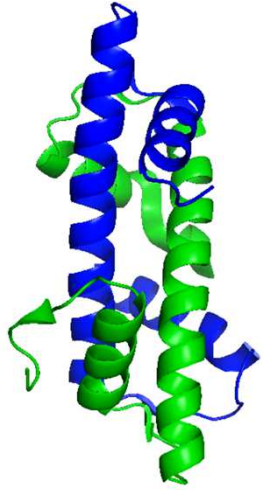


Sestavování nukleozomu:

- 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

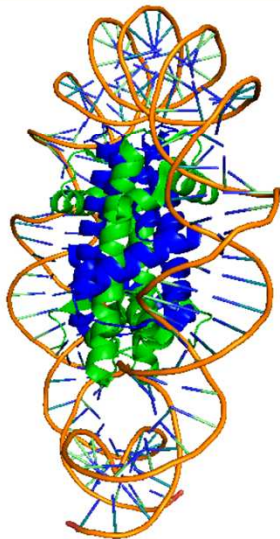
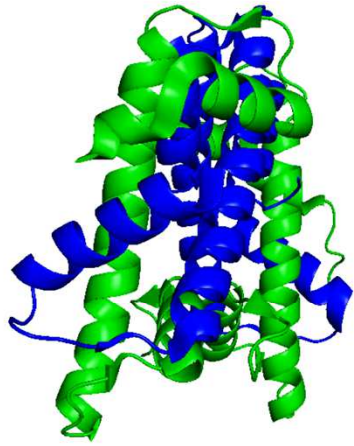


sbalování a rozbalování nukleosomů

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

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

H3-H4



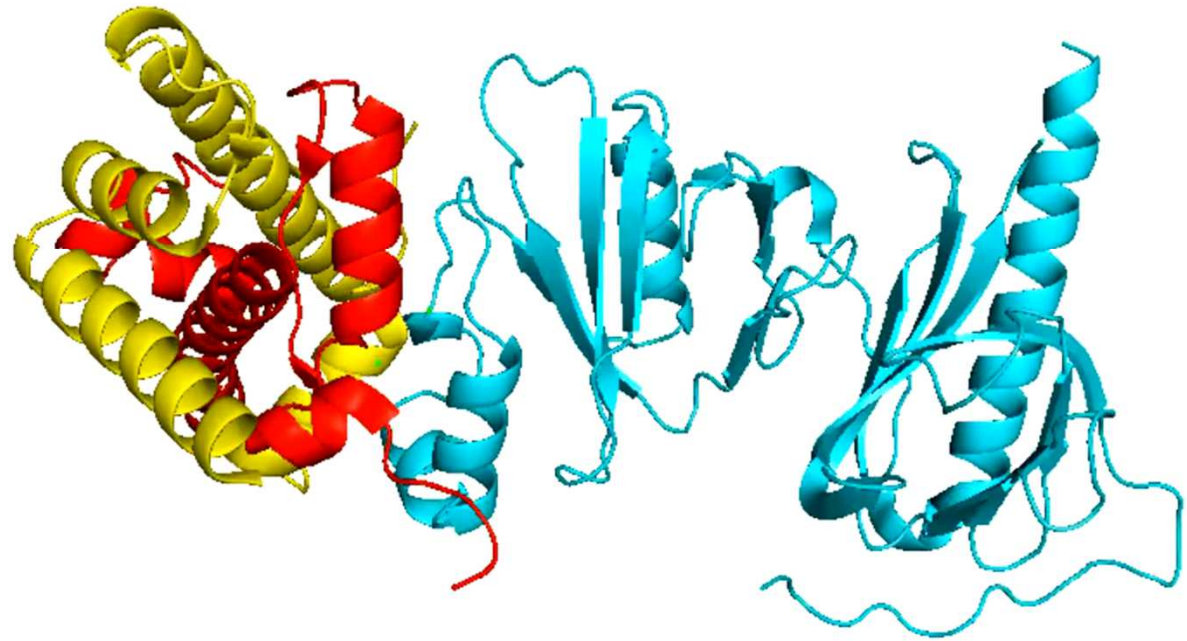
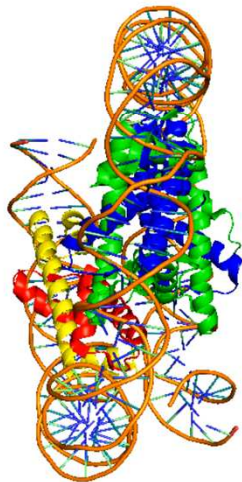
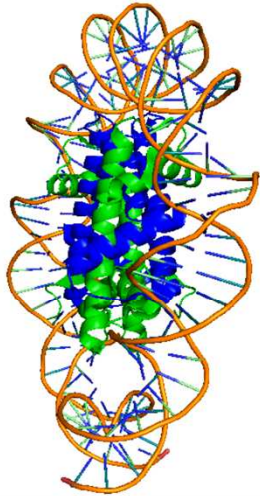
Song et al, G&D, 2008
PDB: 3C9C



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

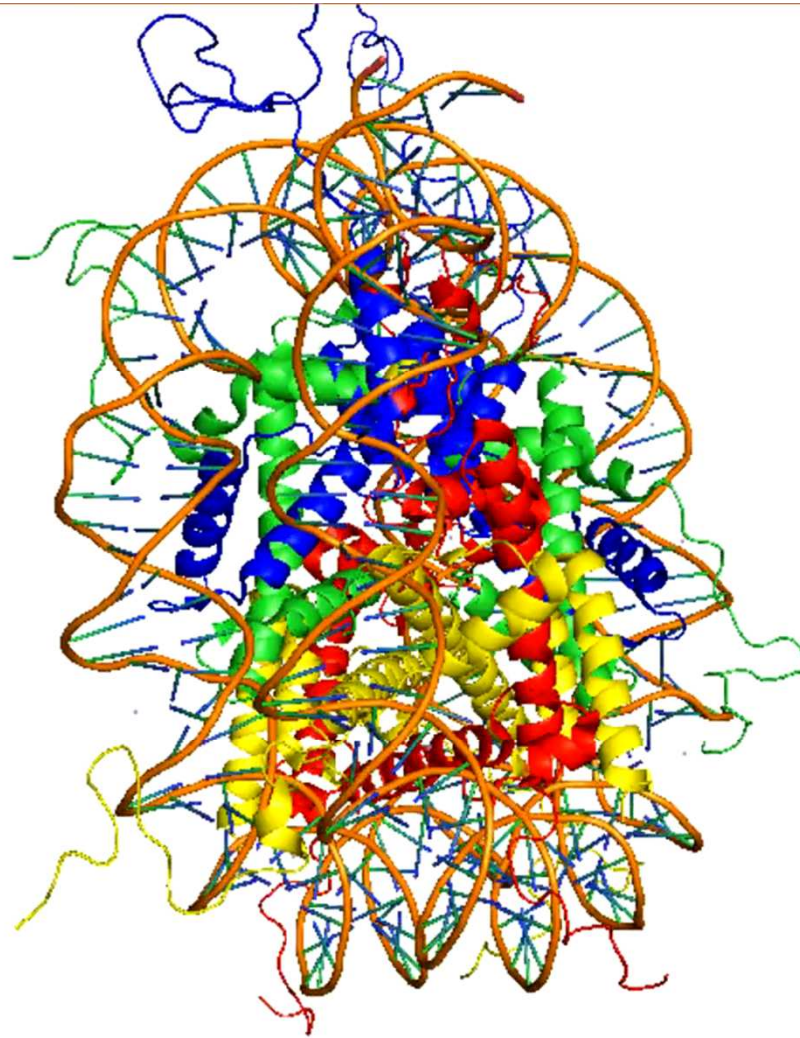
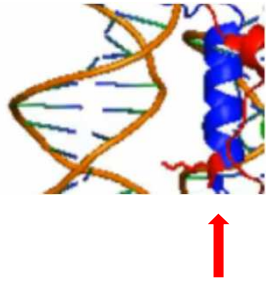
PDB: 4KHA

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



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

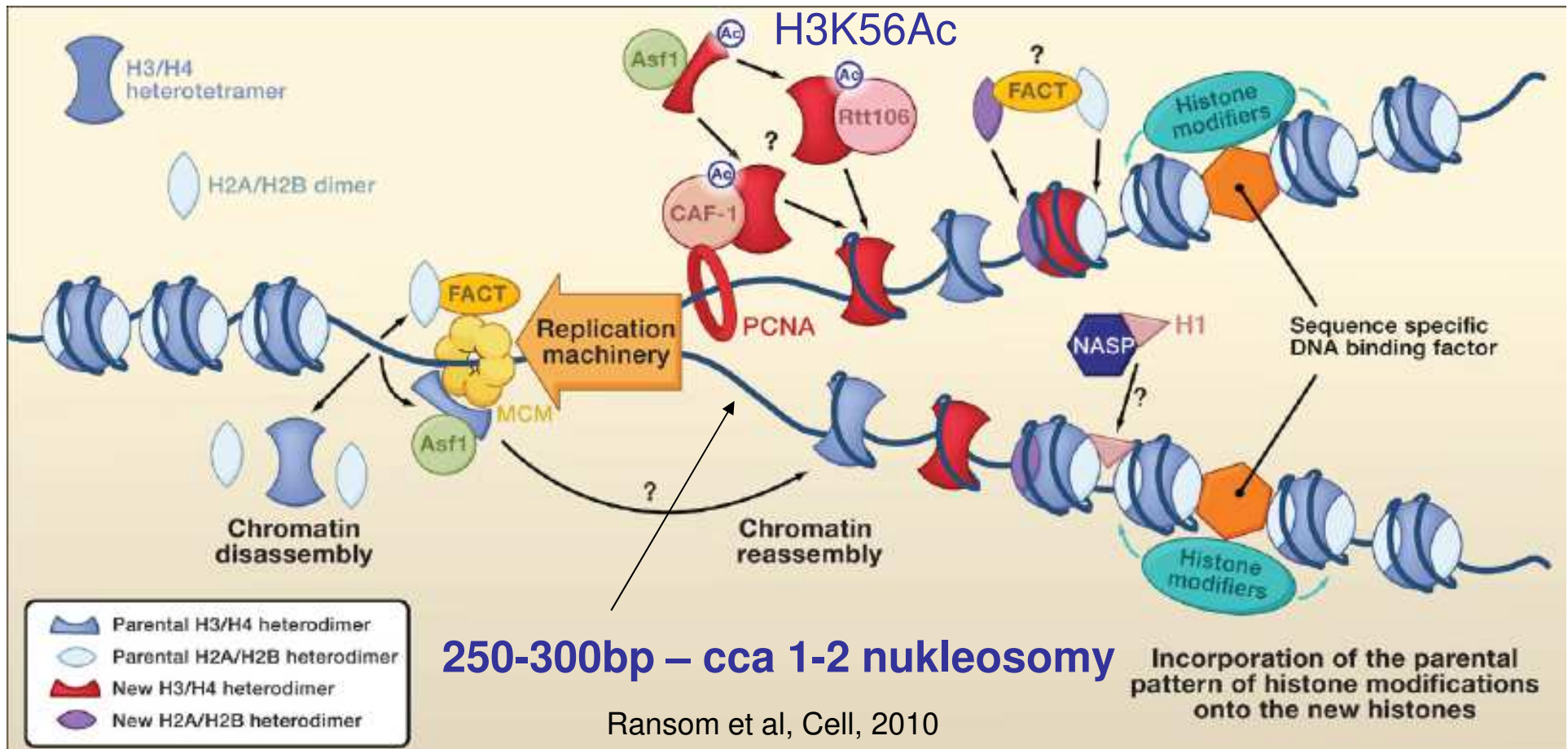
Liu et al., Nature, 2020



- 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*	γ 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*	
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 γ H2AX
- ... další chaperony a remodelační faktory ... specifické varianty H3 a H2A

Histonové varianty

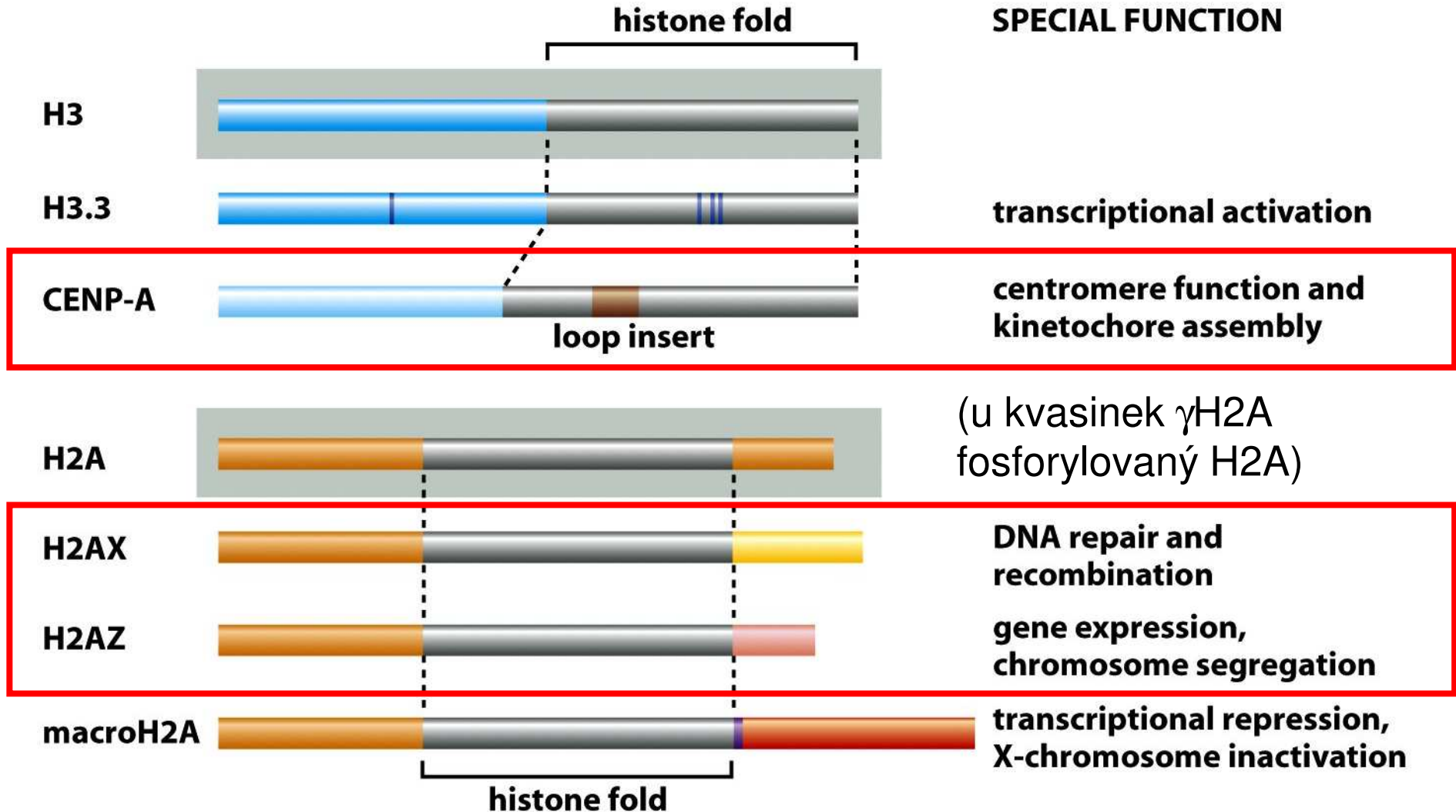
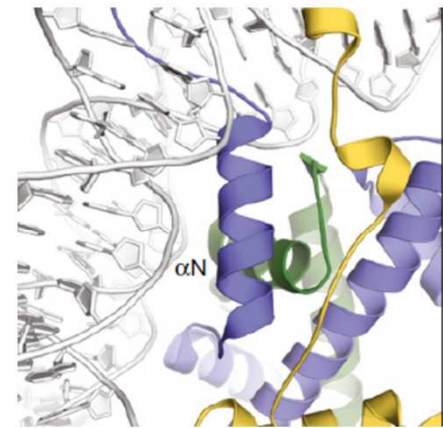
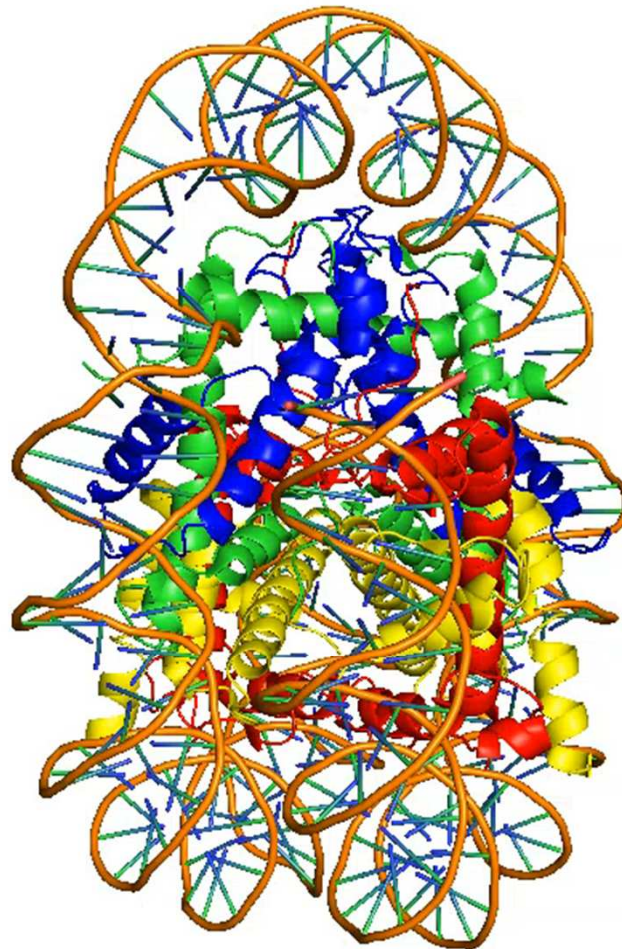
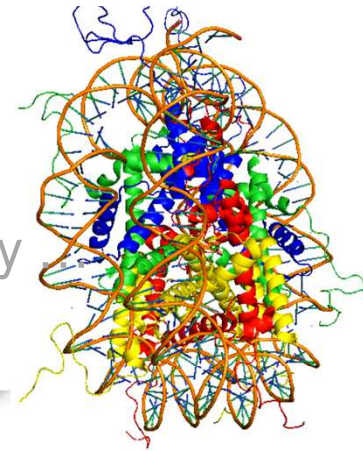
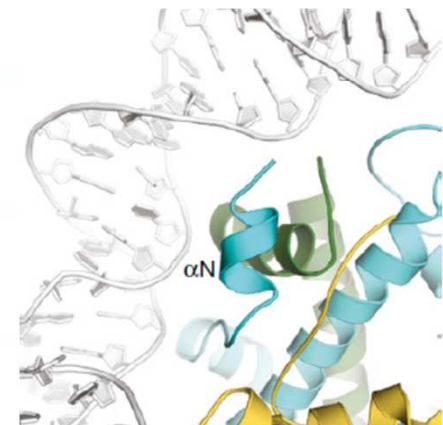


Figure 4-41 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008) Mattioli et al, EMBO Rep, 2015

- 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



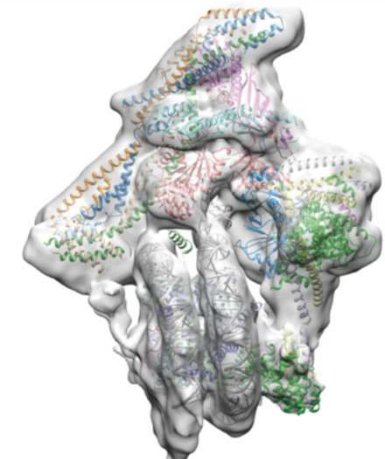
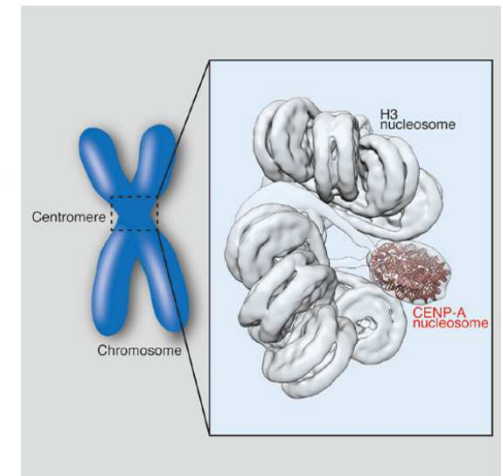
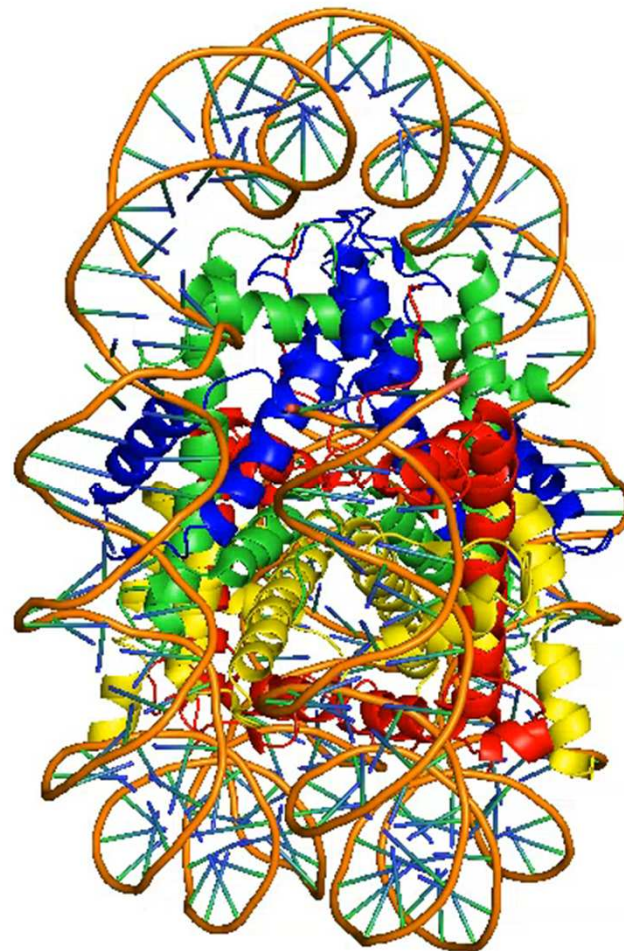
PDB: 3AN2

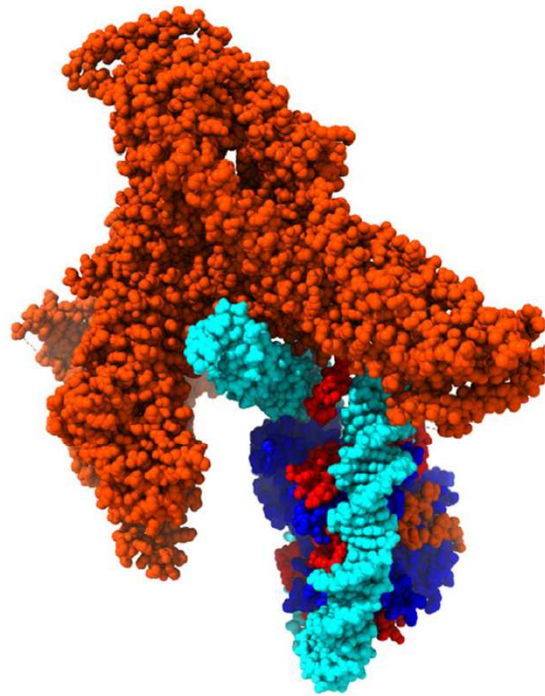


- 10bp konce DNA vážou N-koncové šroubovice
- CENP-A (H3 varianta) má kratší šroubovici
- vazba na DNA je slabší tj. otevřenější struktura - přístupnější
- ... jiný interakční povrch pro specifické interakční partnery ...

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

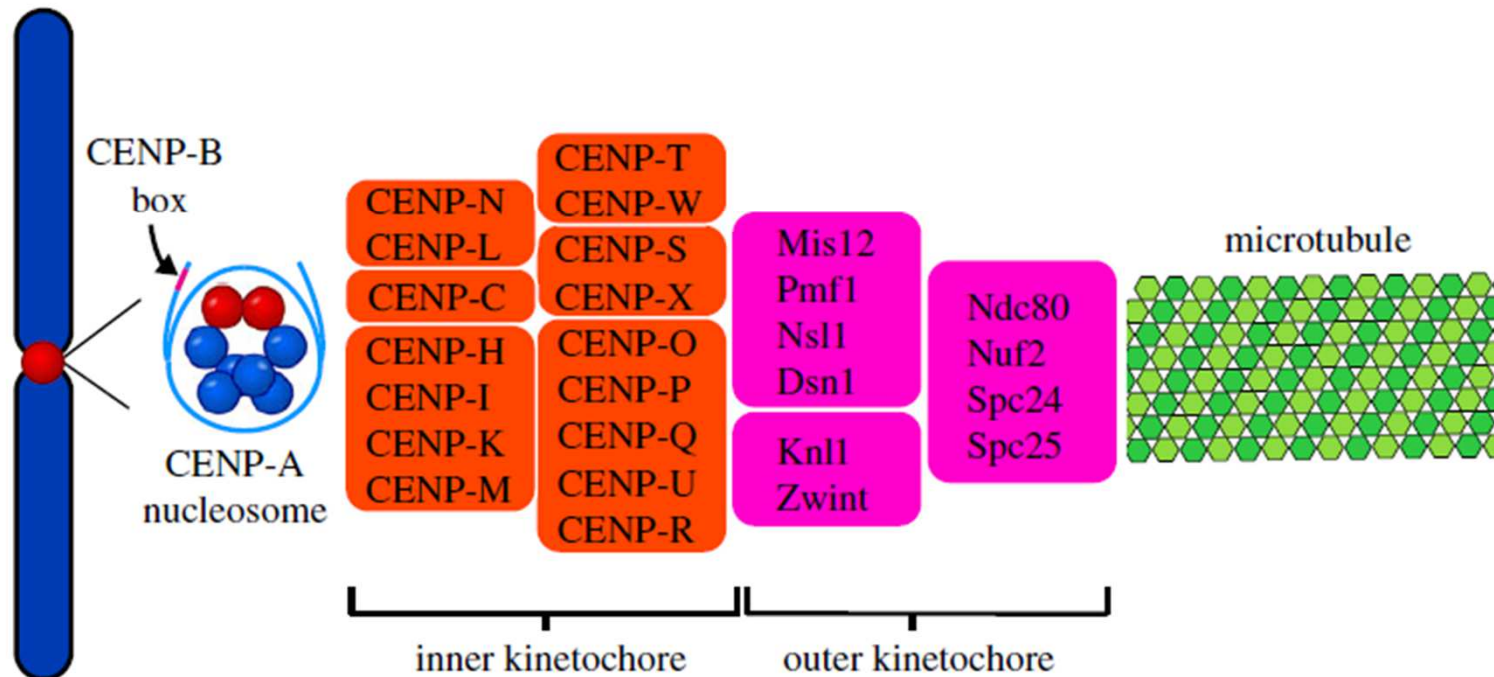
aining)



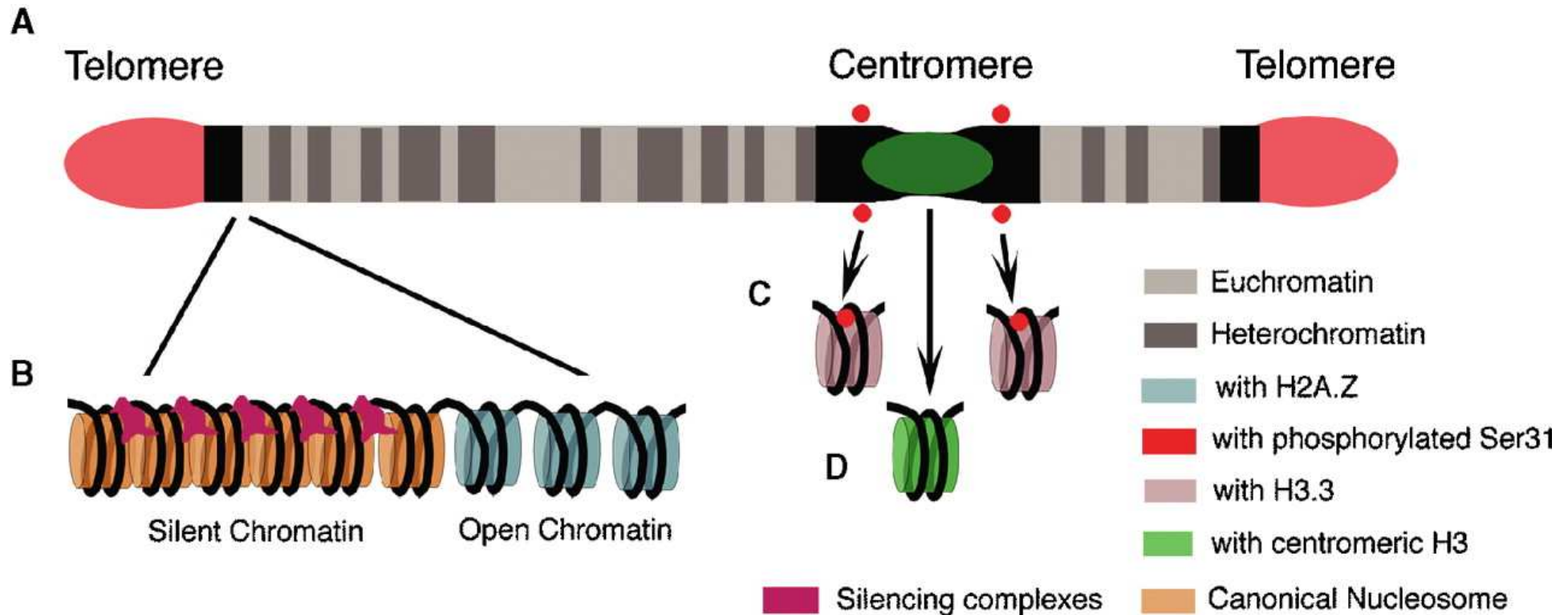


CENP-A(H3) nukleosom a další CENP proteiny tvoří vnitřní kinetochoru ... kotví vnější kinetochoru a mikrotubuly

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 nukleozómy obsahují centromerickou variantu H3.

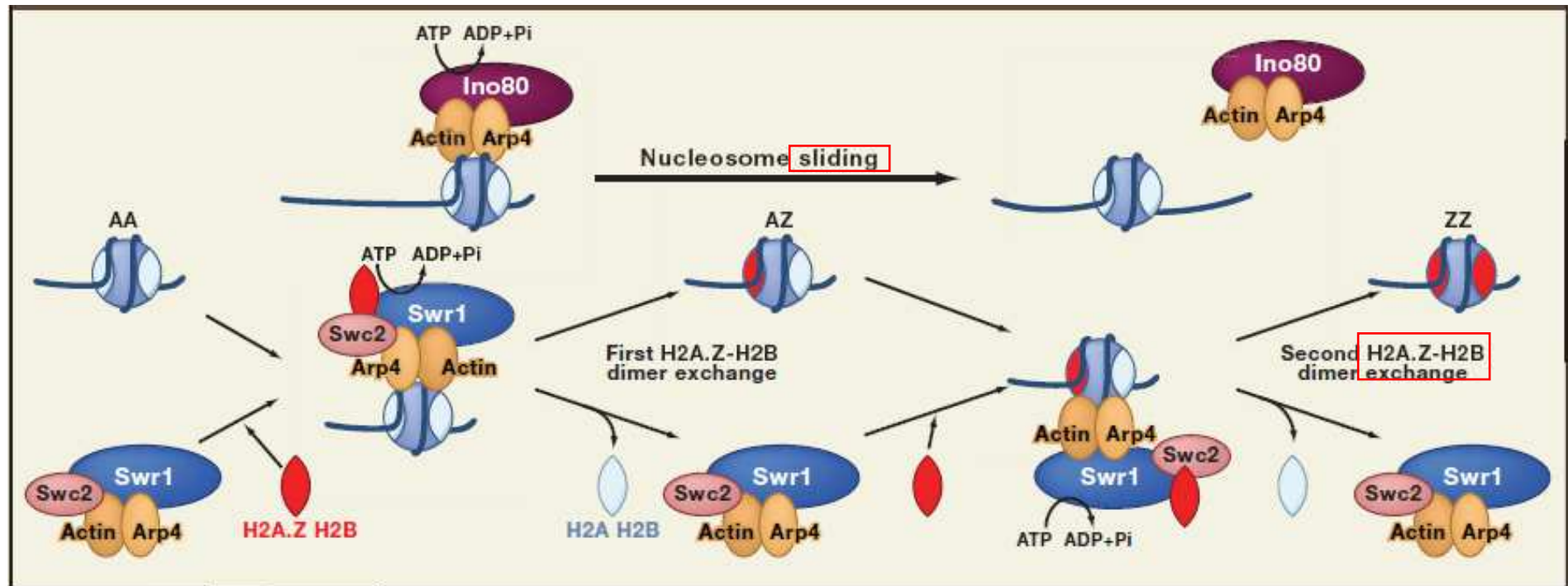
- **CenH3/CENP-A** ... specificky v centromerách
- **H2A.Z** - v regulaci transkripce, opravě DNA, **hranice chromatinu** (integrita centromer a telomer)

Remodelovací komplexy

- ATP-dependentní remodelace (SWI2/SNF superrodina)
- „výměna“ histonových dimerů (SWR) nebo „sklouznutí“ (INO80) (výměna H2A/H2B je jednodušší – na „okraji“ nukleozomu je lépe přístupný/uvolnitelný)

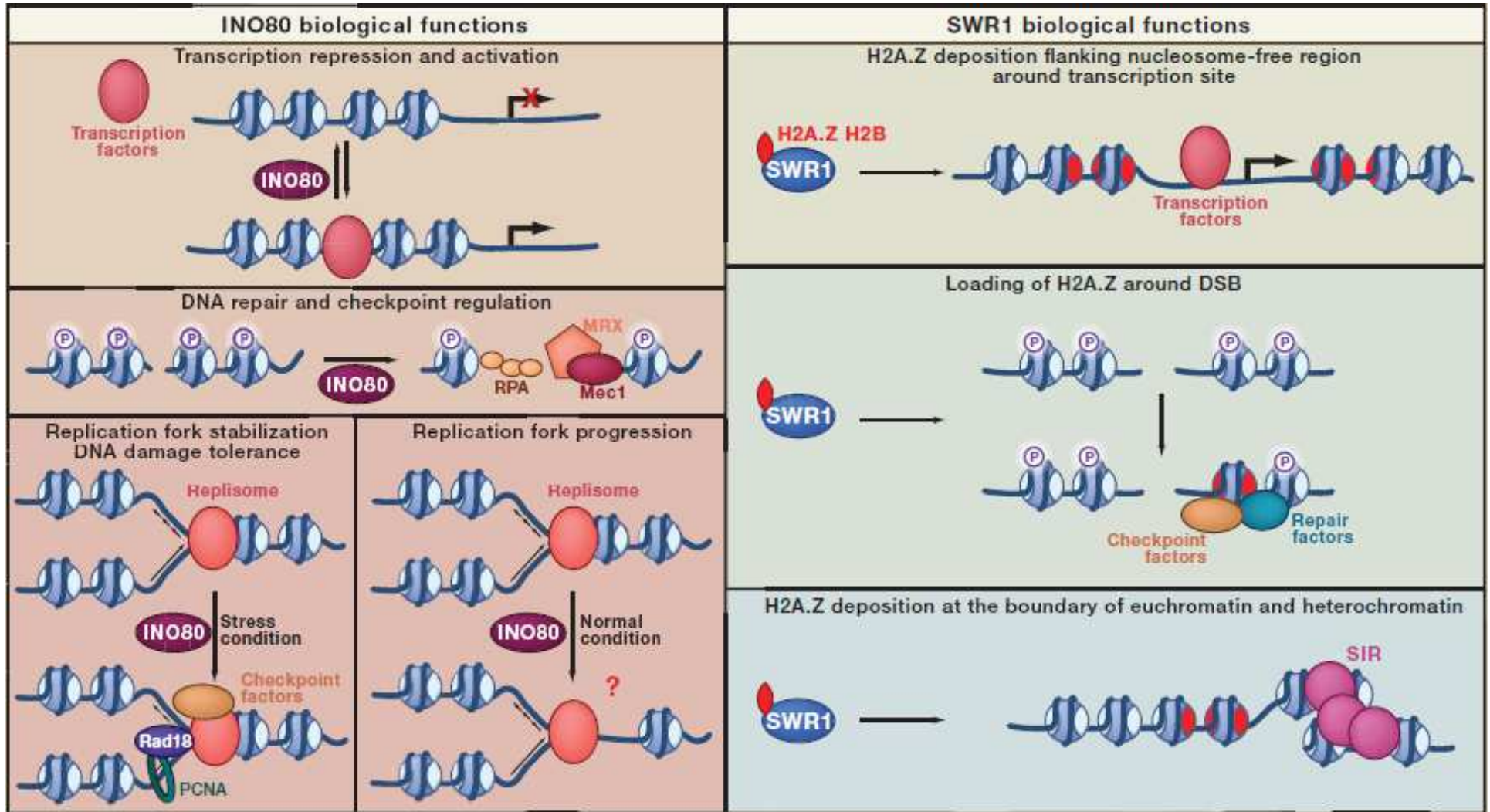
Billon a Cote, BBA, 2012

Bao, Snapshot-Cell, 2010



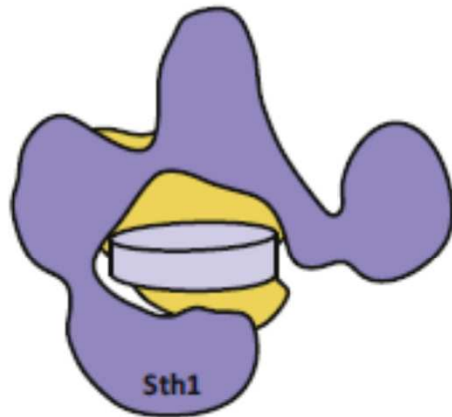
SWR komplex specificky zaměřuje (exchange) H2A-H2B dimer za H2A.Z-H2B

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



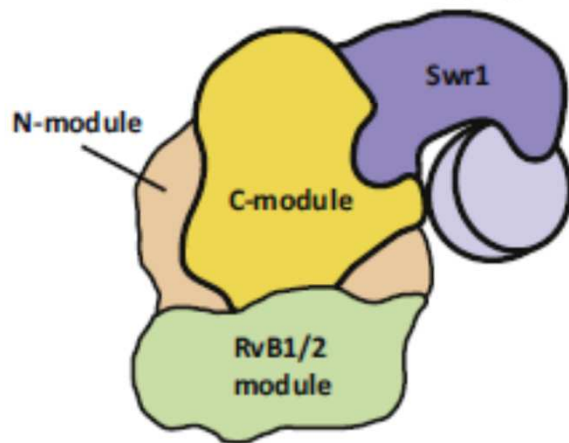
- INO80 komplex sklouzne, SWR zaměňuje H2A.Z-H2B dimer zpět za H2A-H2B

(A) **RSC**
Nucleosome engulfing

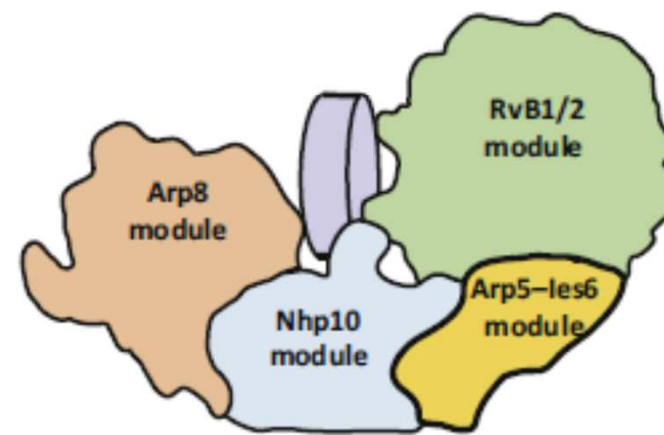


- **RSC** (SWI/SNF) komplexy obklopí nukleosom (rozvolní se vazba s DNA a posouvá se)
- nukleosom je zavěšen na **SWR-C** komplexu – komplex váže ještě H2... dimer, který je schopen vyměnit
- nukleosom je uchopen **INO80** komplexem (přes podobné složení podjednotek – fungují odlišně)

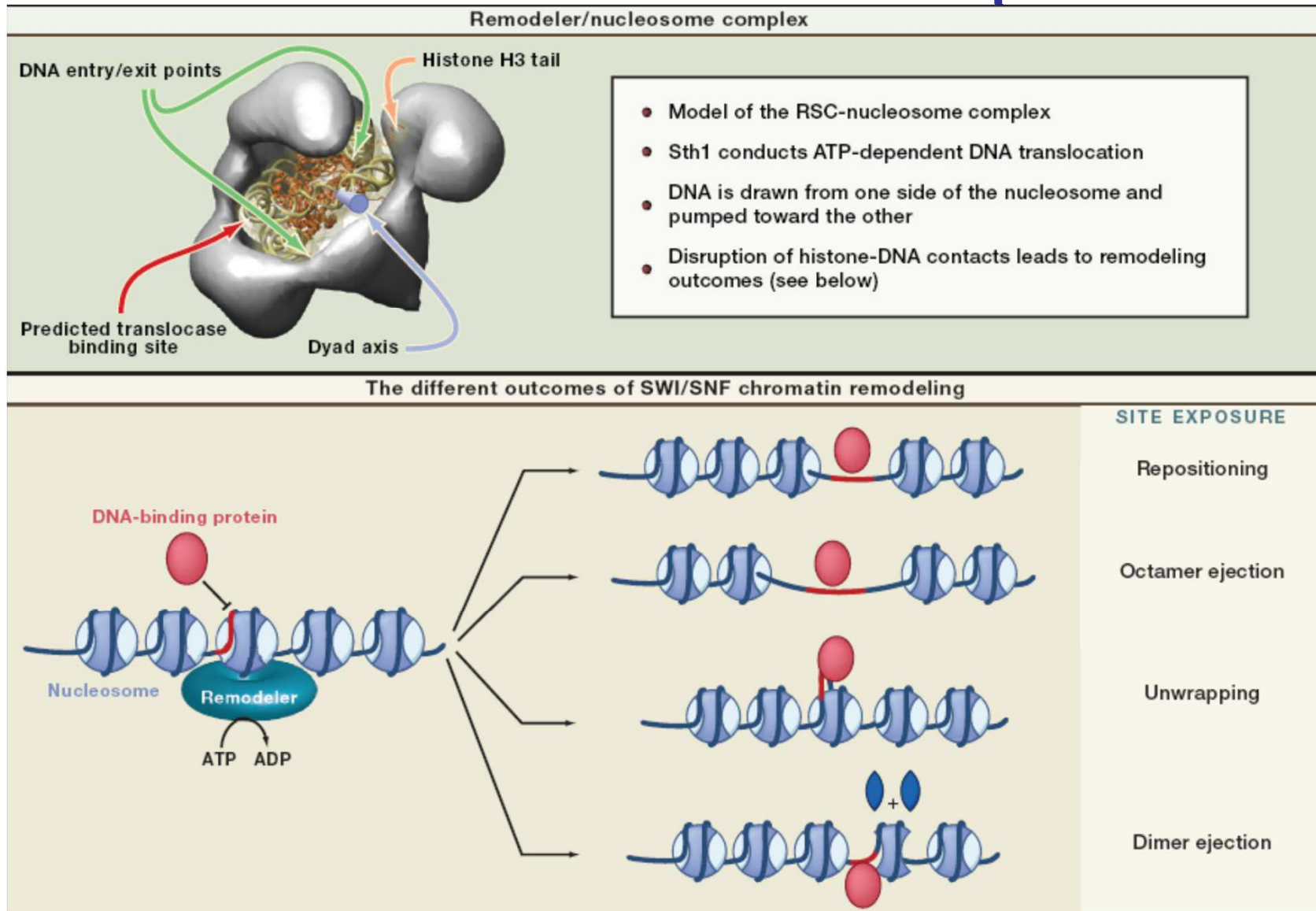
(C) **SWR-C**
Nucleosome clinging



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



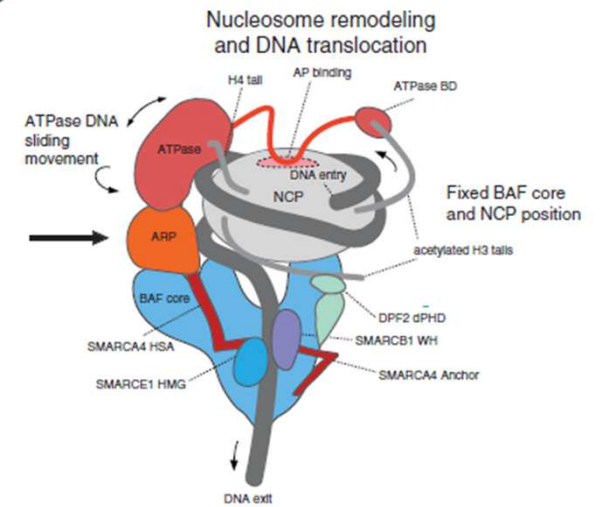
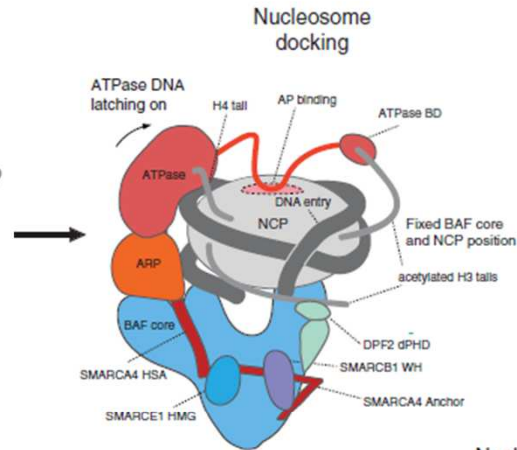
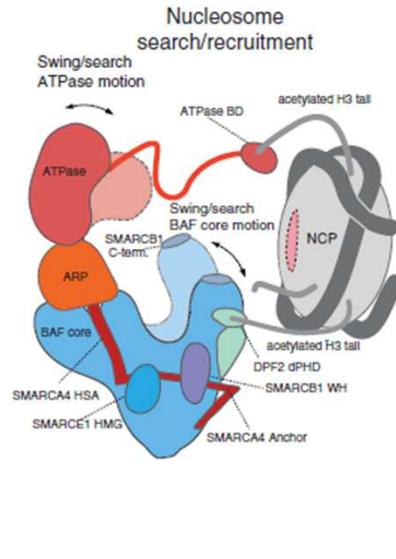
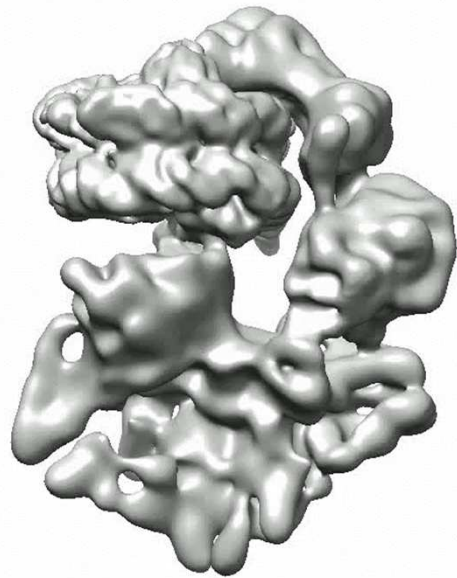
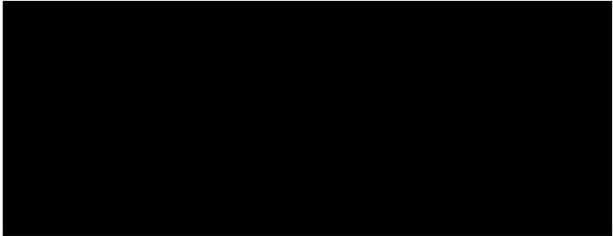
RSC remodelovací komplex



SNAPSHOT, Cell (144), 2011

Fig

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



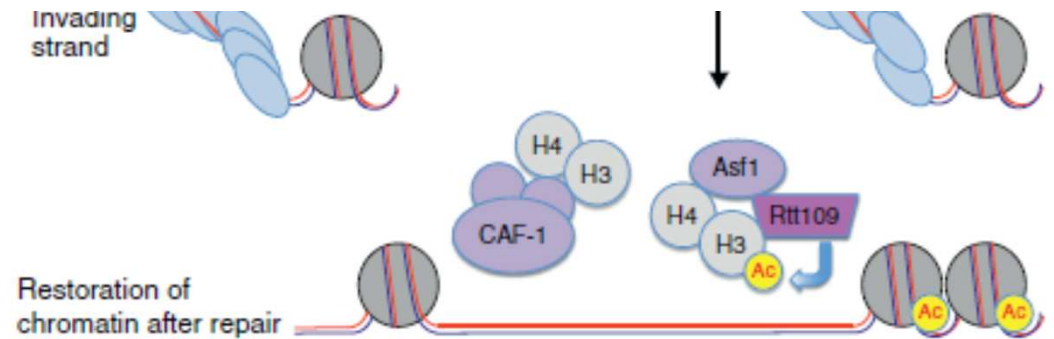
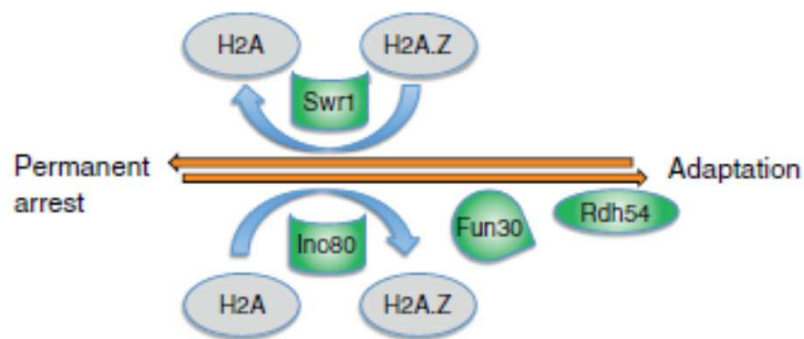
BAF remodelační komplex

pomáhá v transaktivaci genové exprese – váže acetylované H3 (bromodomény) - uvolňuje nukleosom (volnější konce DNA)

Mashtalir et al, Cell, 2020

Oprava poškozené DNA - chromatin

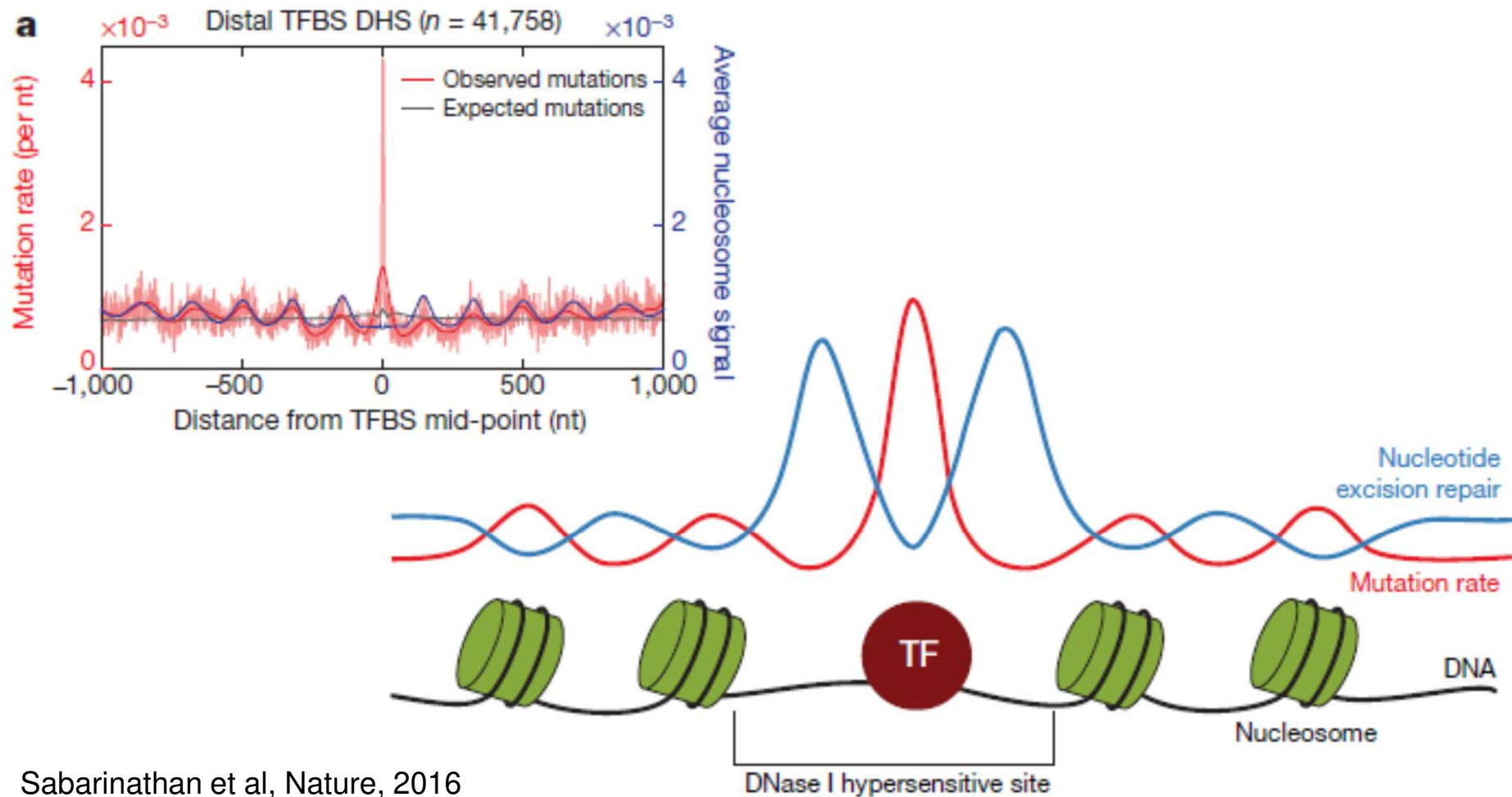
- nukleosomy nejsou na ssDNA ... **oprava DNA**
- pro malá poškození (NER, BER) postačí menší změny chromatinu zatímco pro větší (DSB - resekce DNA tj. vznik ssDNA) musí nukleosomy odstranit
- **NER (BER)** doprovázeno acetylací histonů a remodelací (posuvem)
- při **DSB** musí být odstraněny nukleosomy 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 H3K56 acetylován)
- Sgs1/BLM interaguje s CAF-1 a reguluje jeho funkci
- až kompletní **reassembly chromatinu** signalizuje dokončení opravy!



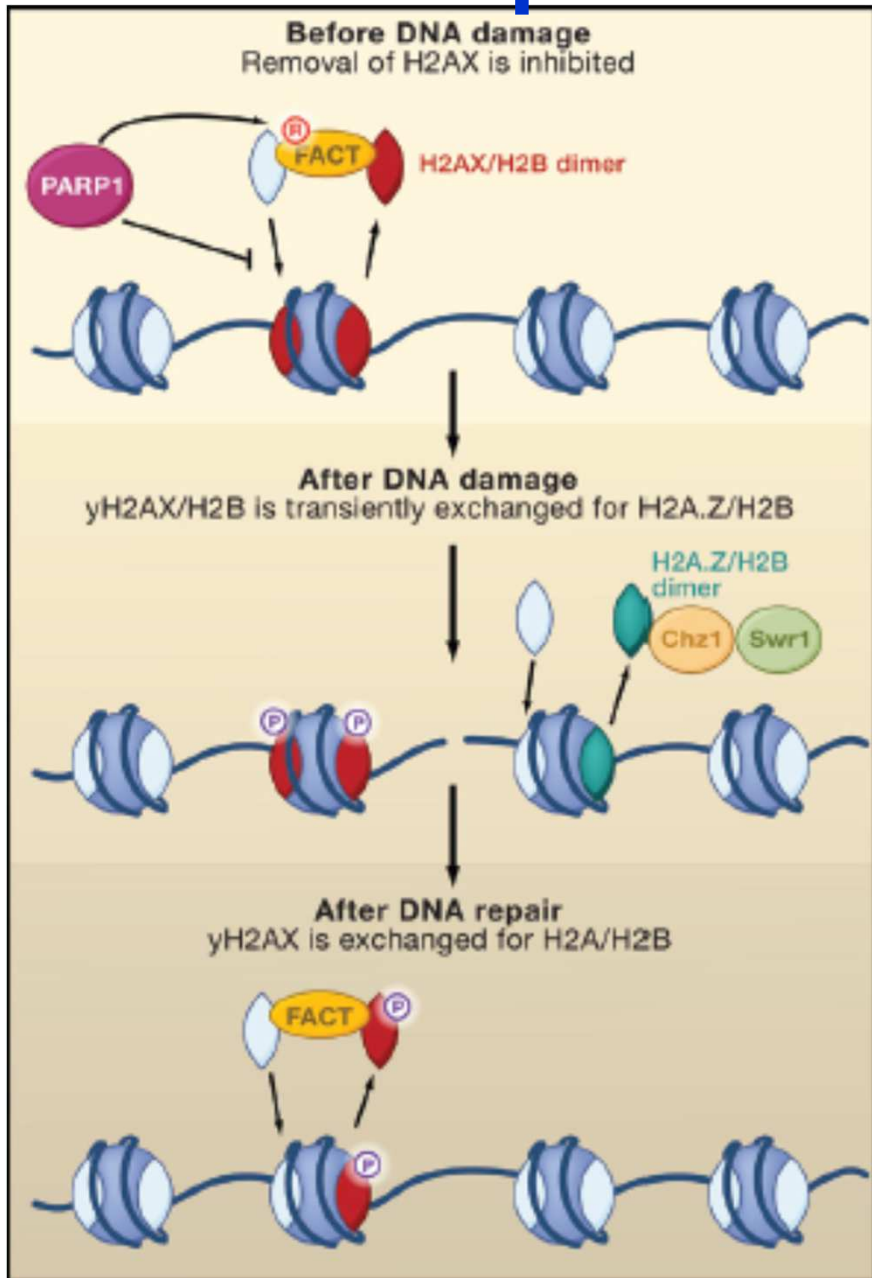
Current Opinion in Genetics & Development

NER oprava - chromatin

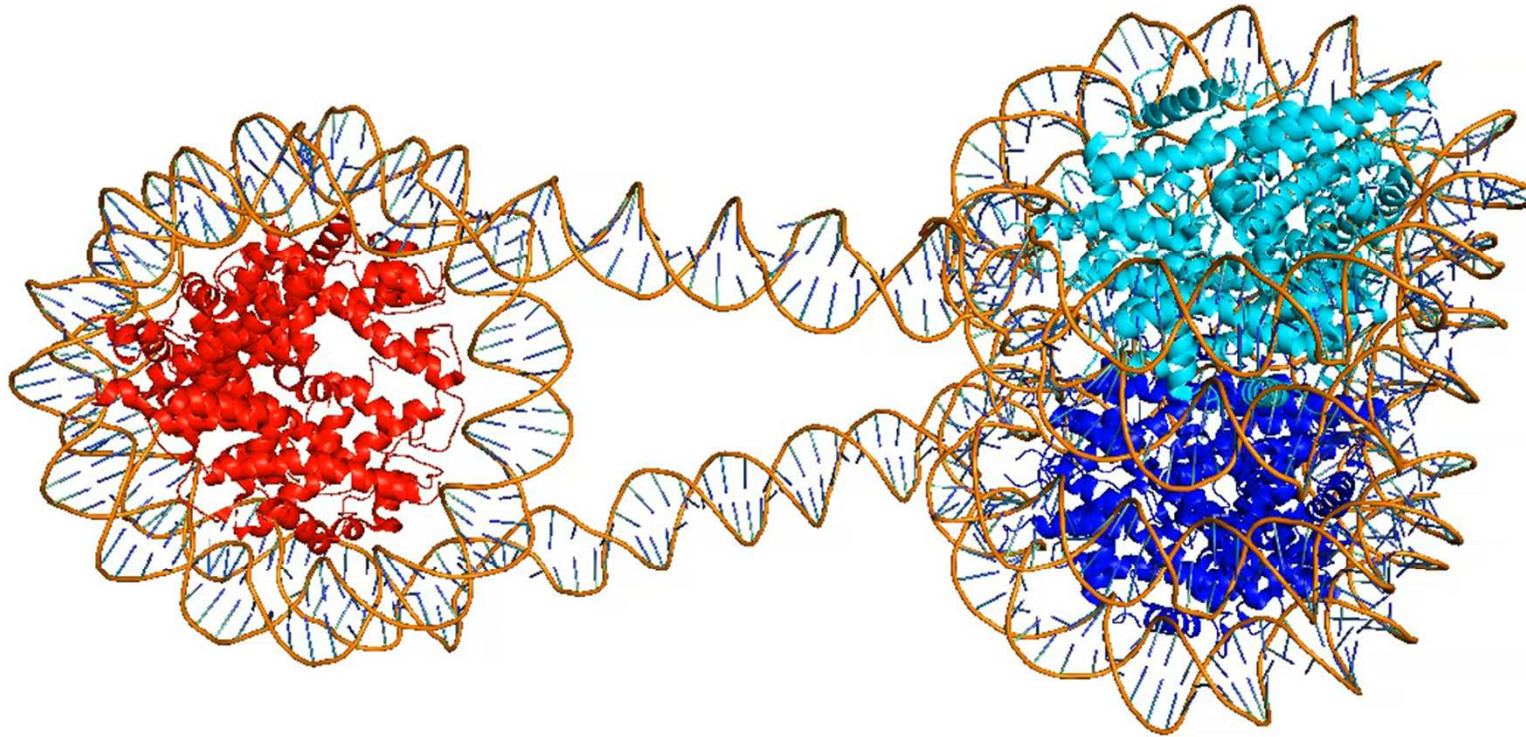
NER je méně účinný (DNA je méně přístupná) v místech okupovaných nukleosomy (a transkripčními faktory)



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 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

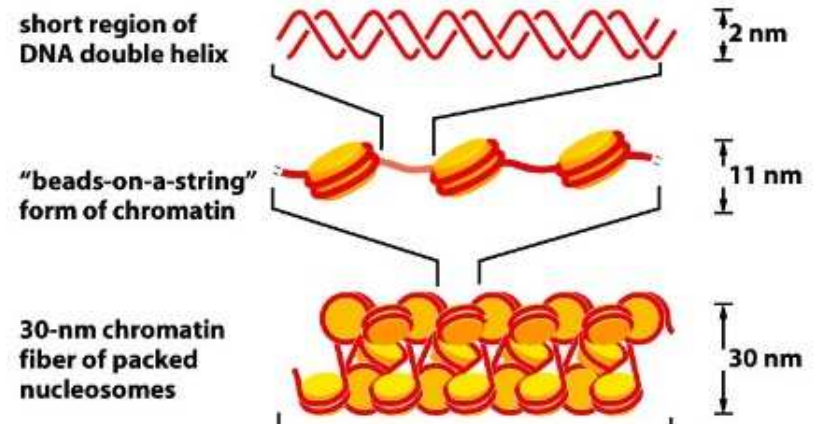


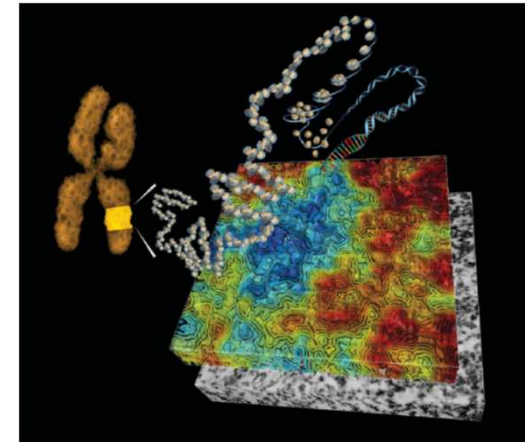
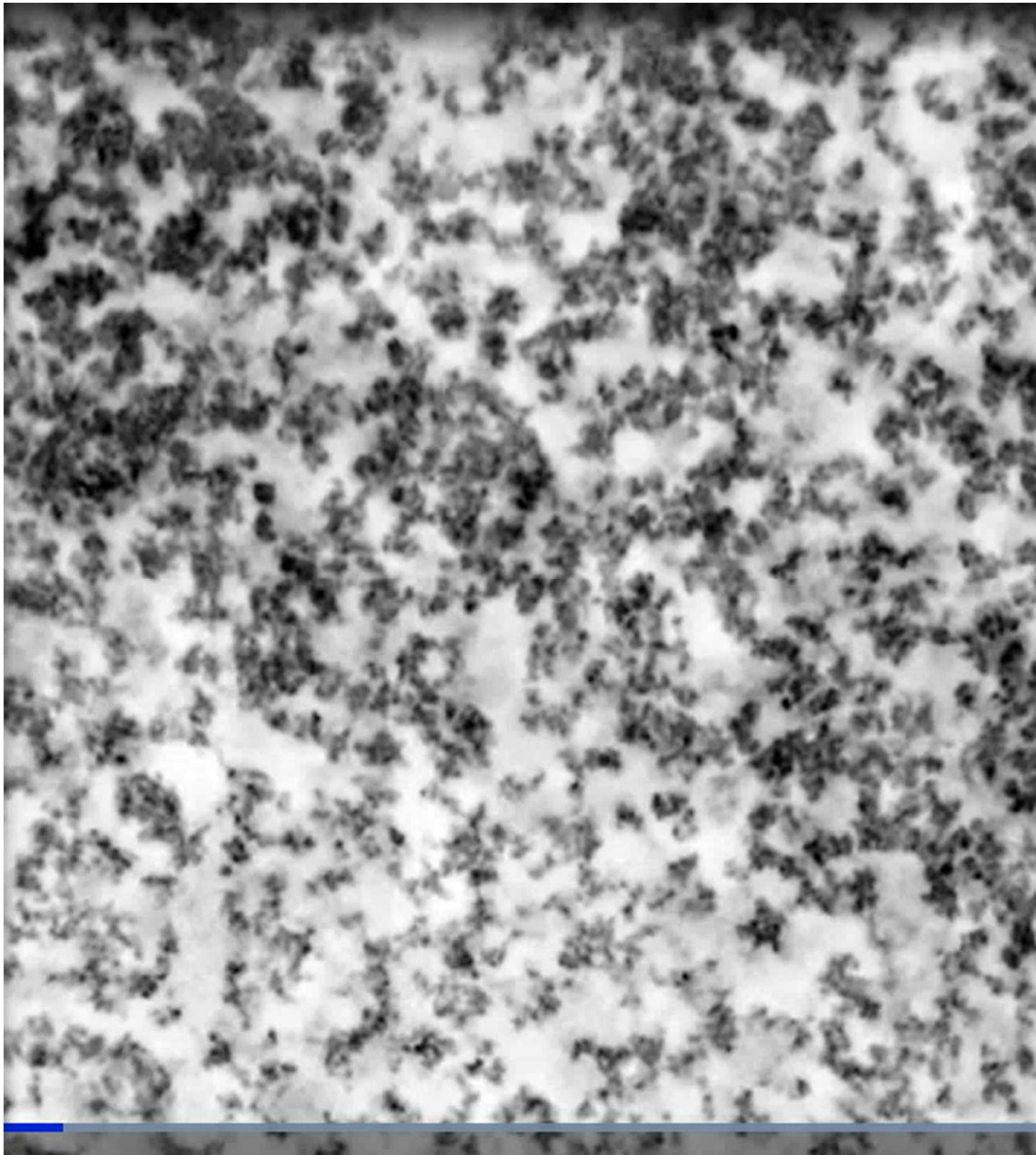
Jsou tedy nukleosomy uspořádány pravidelně?
Pravidelné uspořádání v krystalech a za specifických podmínek ...

PDB: 6L49

Ekundayo et al, JMB, 2017

Chromatinová struktura?





cryoEM jádra
nepravidelné uspořádání
nukleosomů

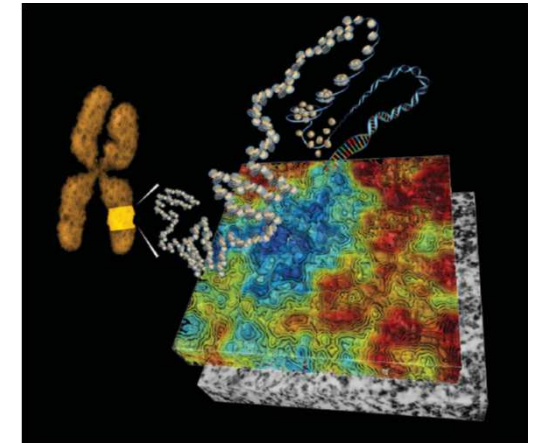
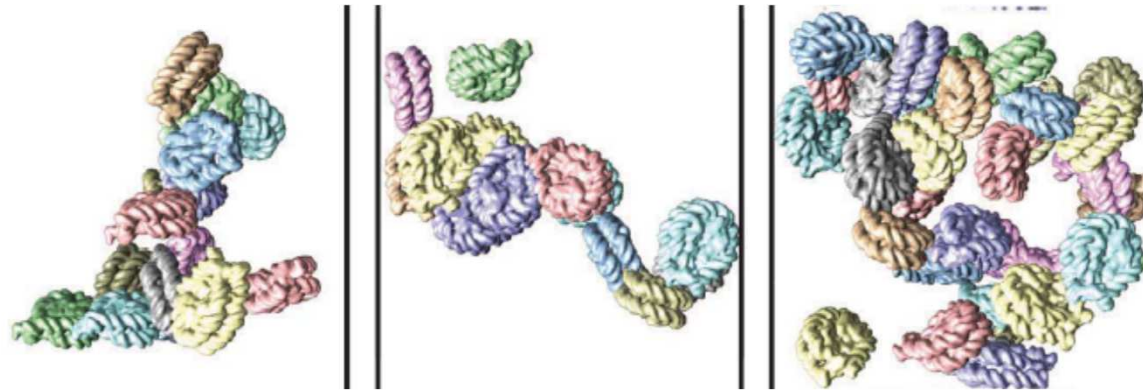


https://players.brightcove.net/53038991001/Byx2STOH0_default/index.html?videoId=5522198641001

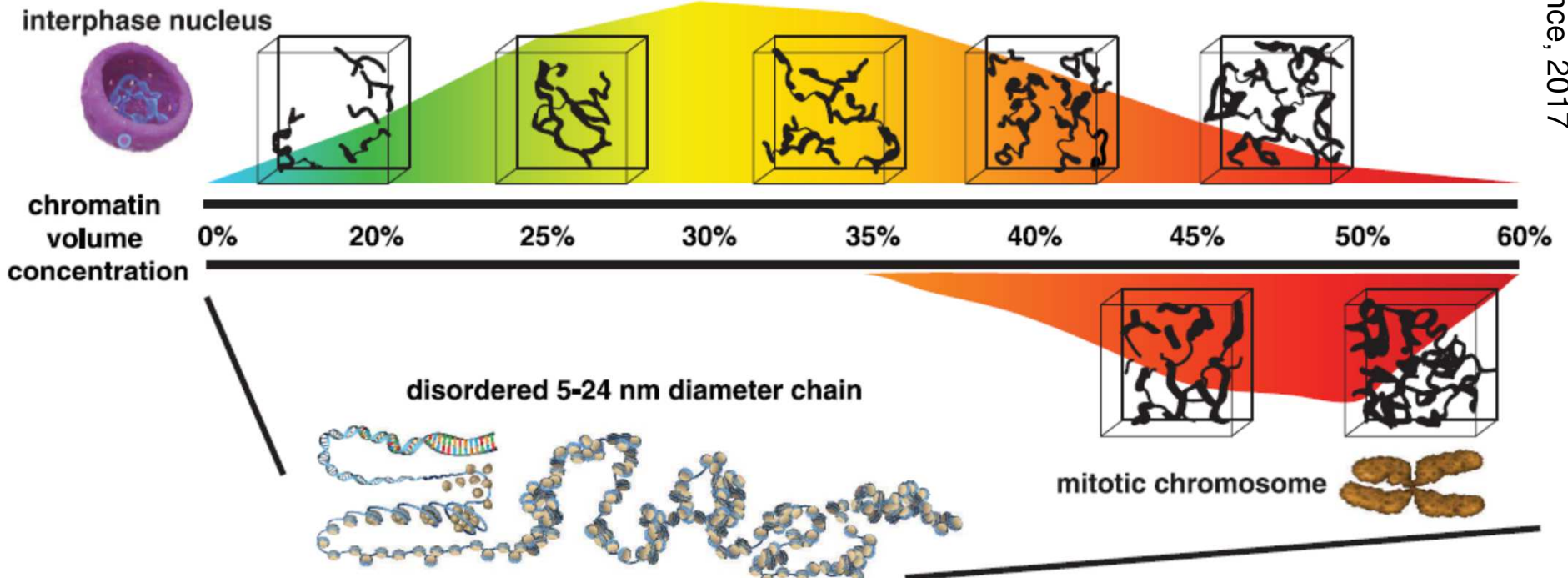
Ou a spol, Science, 2017

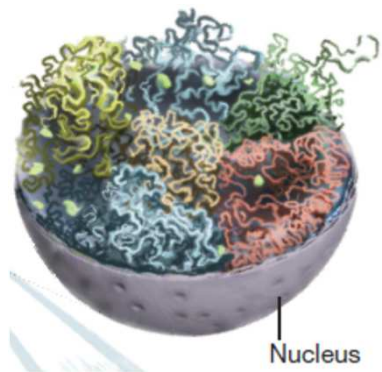
Chromatinová vlákna

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



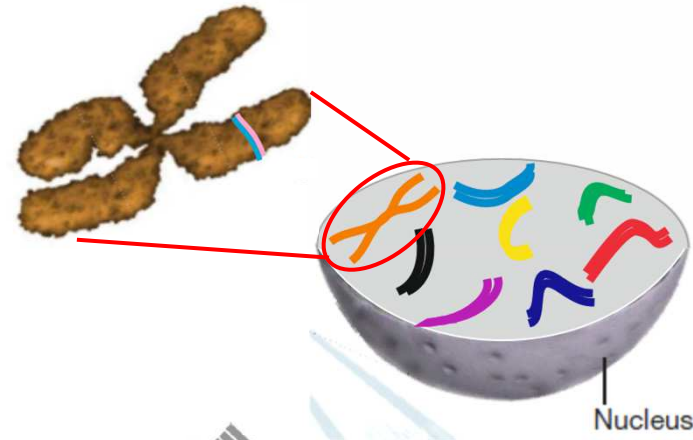
Ou a spol., Science, 2017





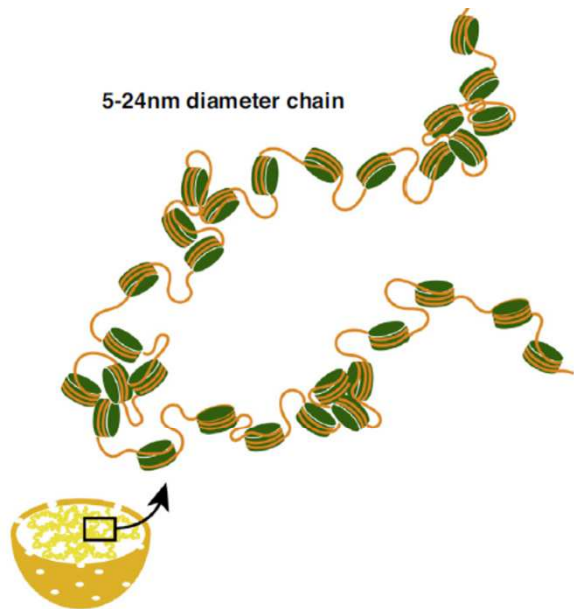
Nucleus

cell cycle
 ←→

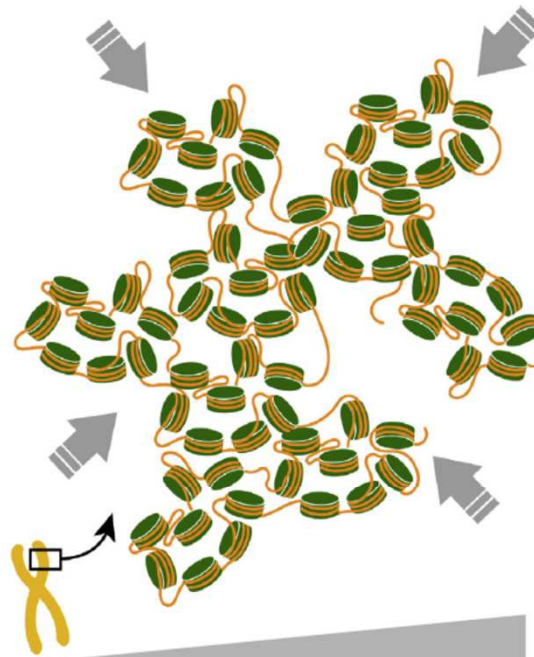


Nucleus

Interfázni chromatinová vlákna

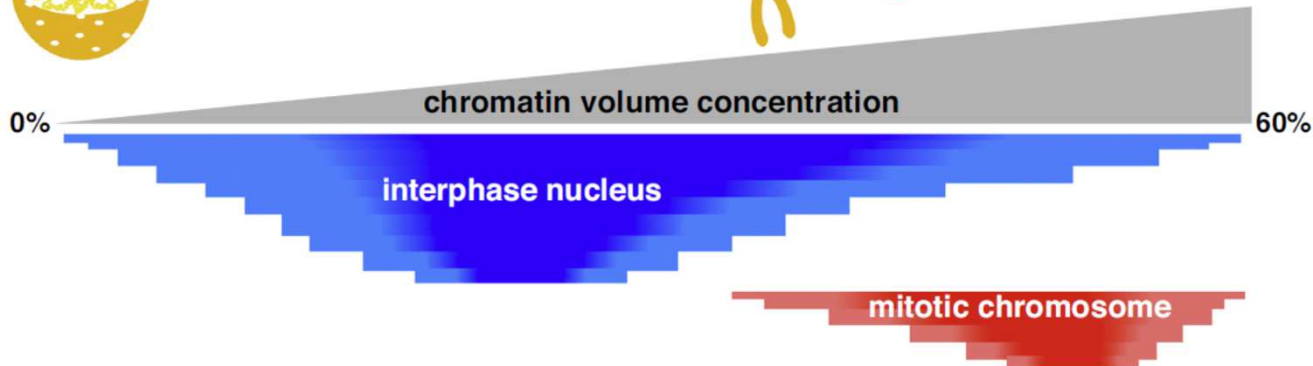


5-24nm diameter chain

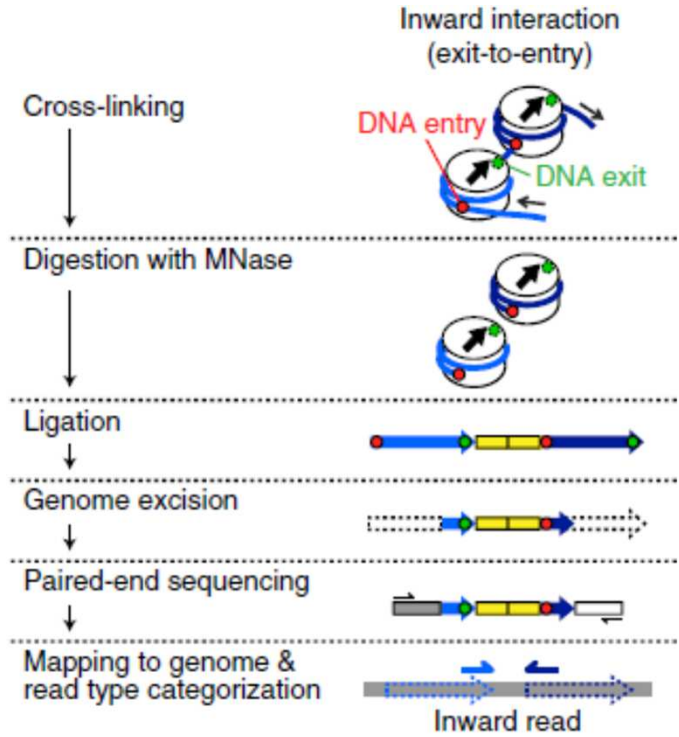
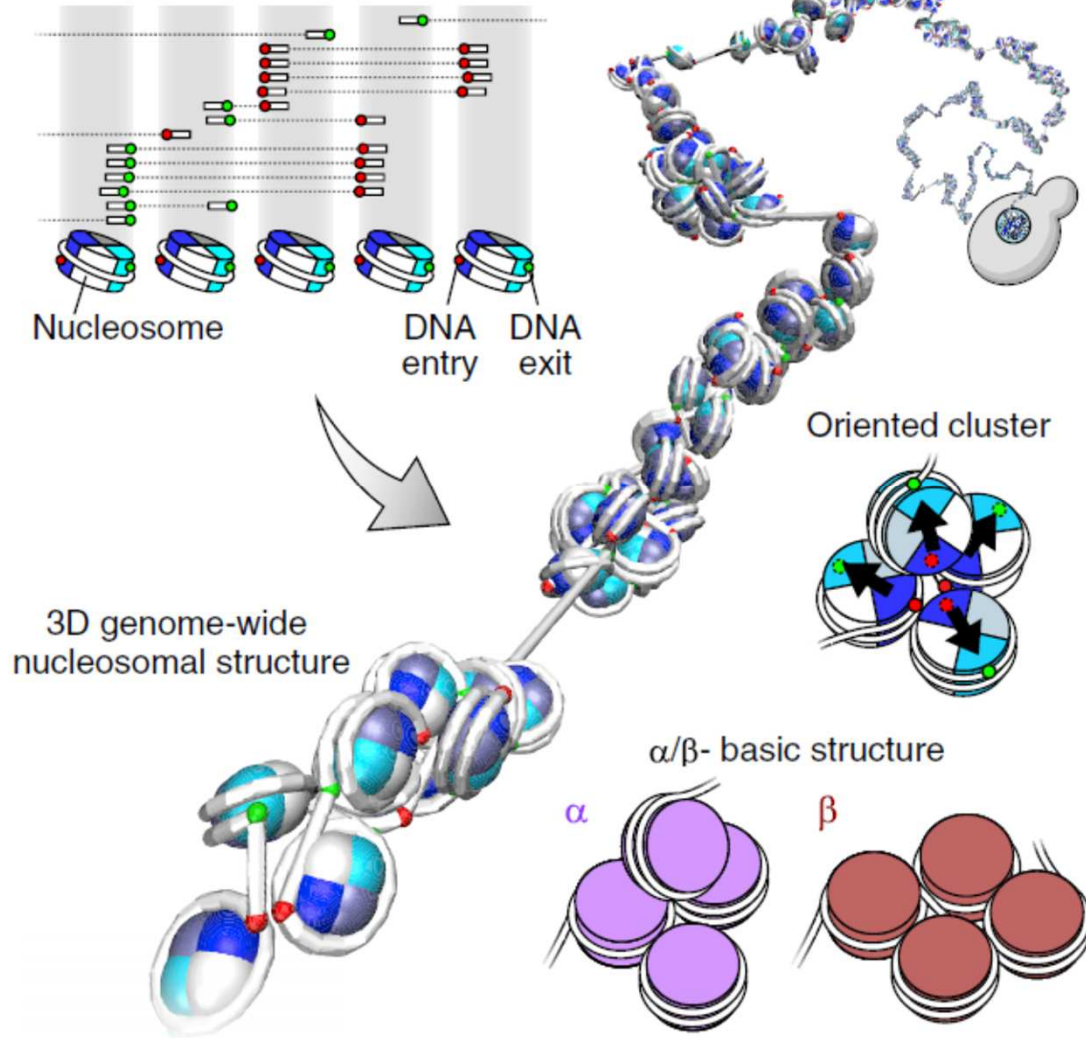


Kondensované
 Mitotické
 Chromosomy

kondensiny

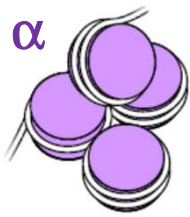
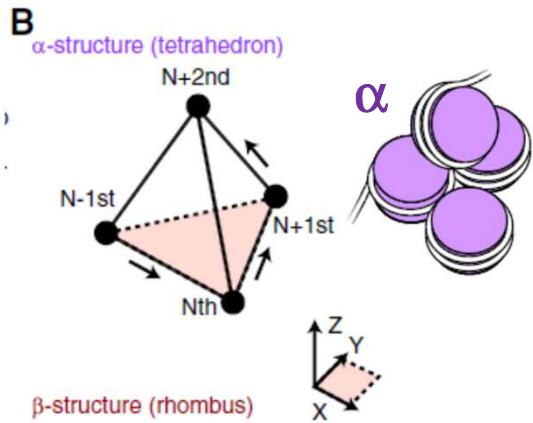


Sub-nucleosomal interaction analysis

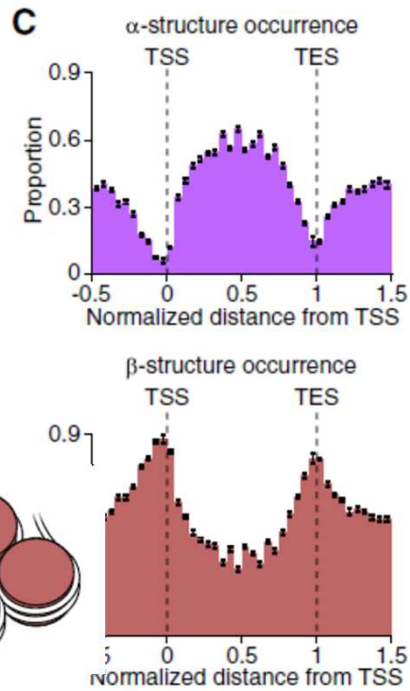
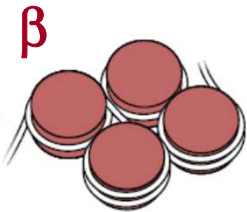
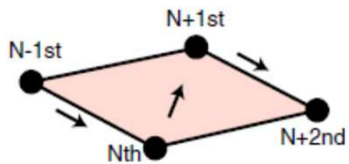


kombinace Hi-C a mapování pozic nukleosomů = Hi-CO

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



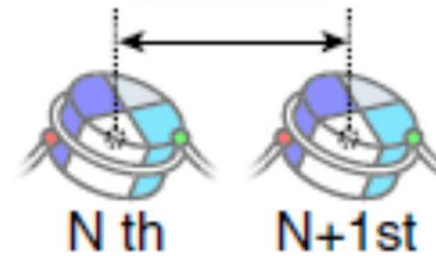
β -structure (rhombus)



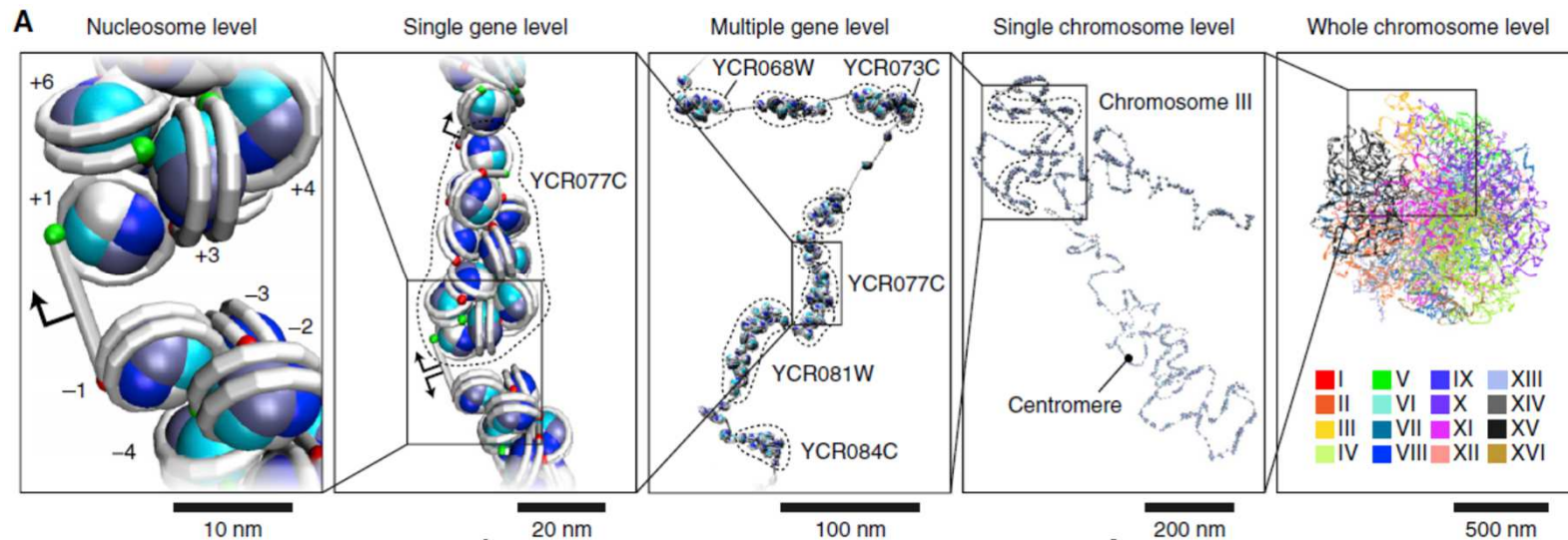
(pyramidální α je kompaktnější)

kosočtverec β je otevřenější –
na počátcích a koncích genových
oblastí

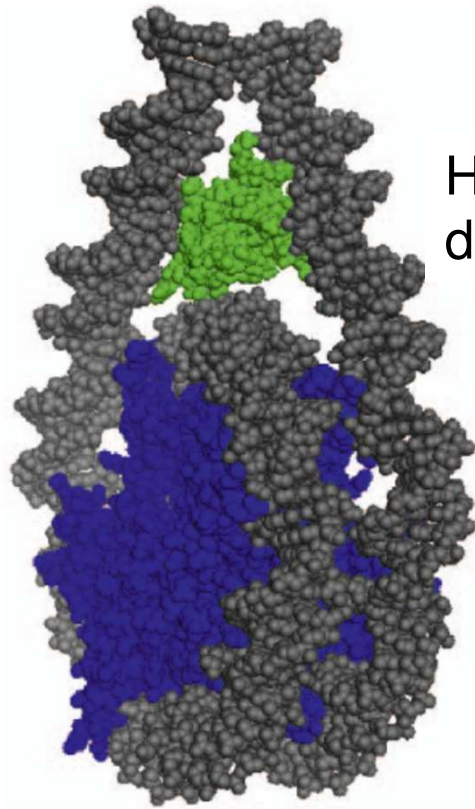
Inter-nucleosome
distance



Nukleosomy jsou také více vzdáleny na začátku a konci genových oblastí

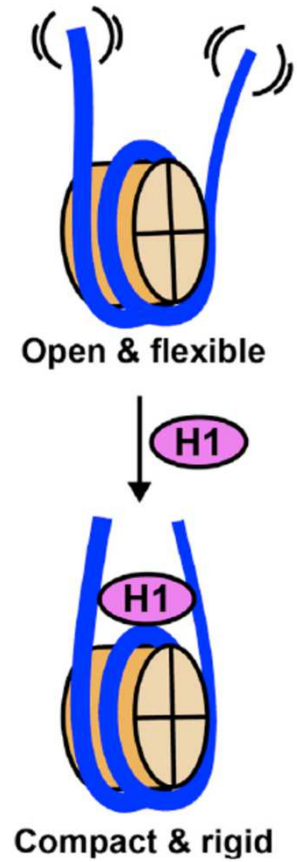
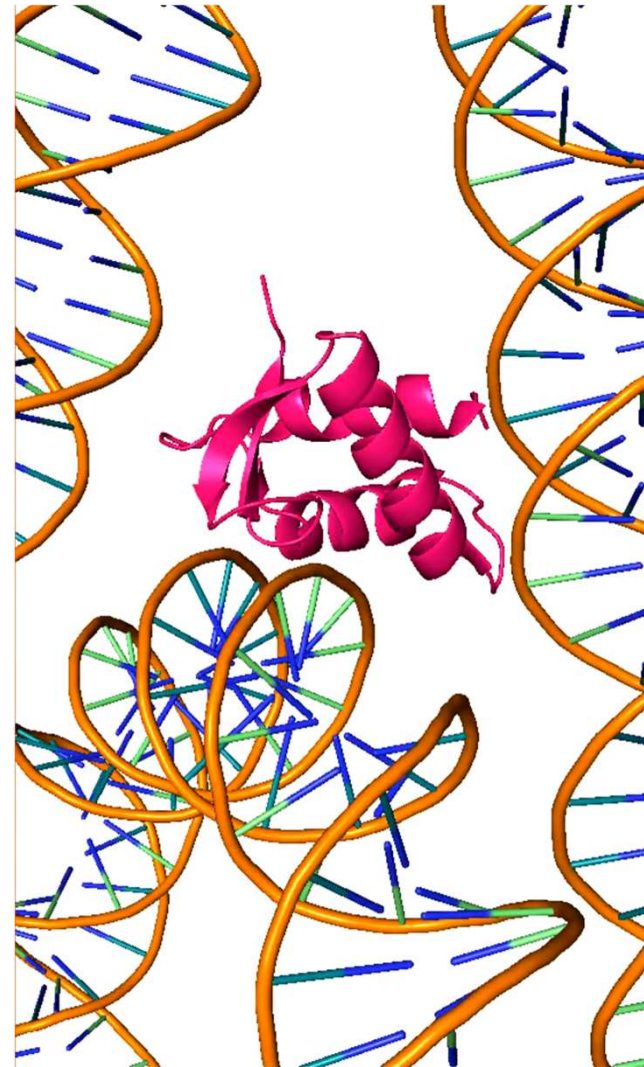


Nukleosom kompaktnější - H1/H5 histony

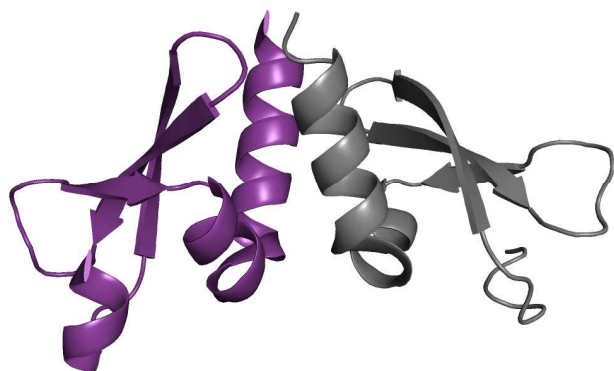


H1 WHD
doména

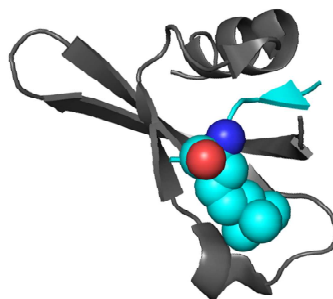
Bednar et al, Mol Cell, 2017
Cutter a Hayest, FEBS Let, 2015



Heterochromatin protein – HP1

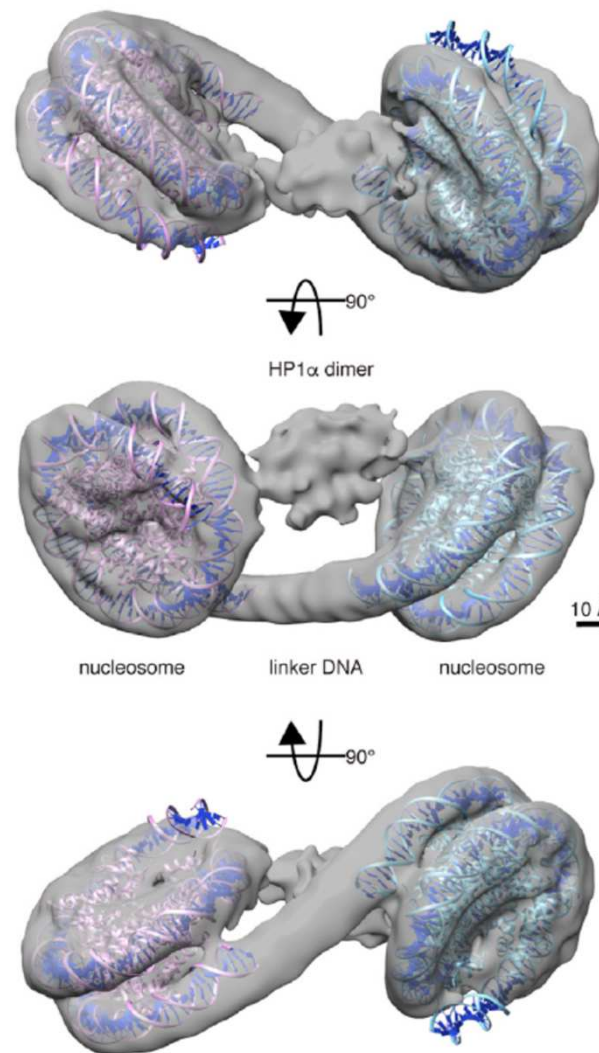


dimer



chromodomena
H3K9me3

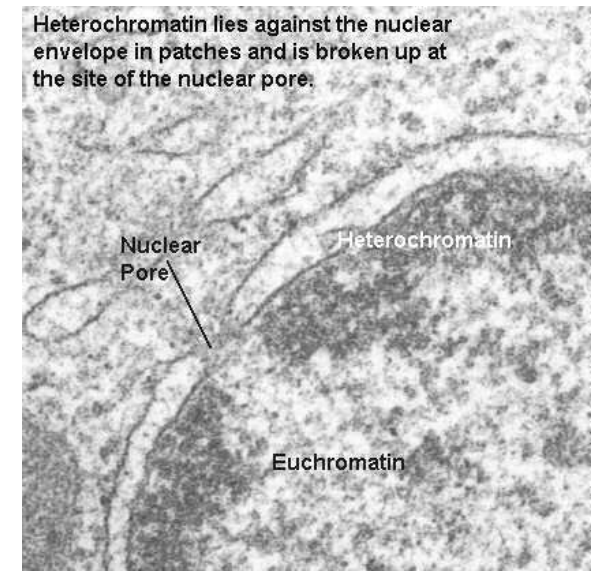
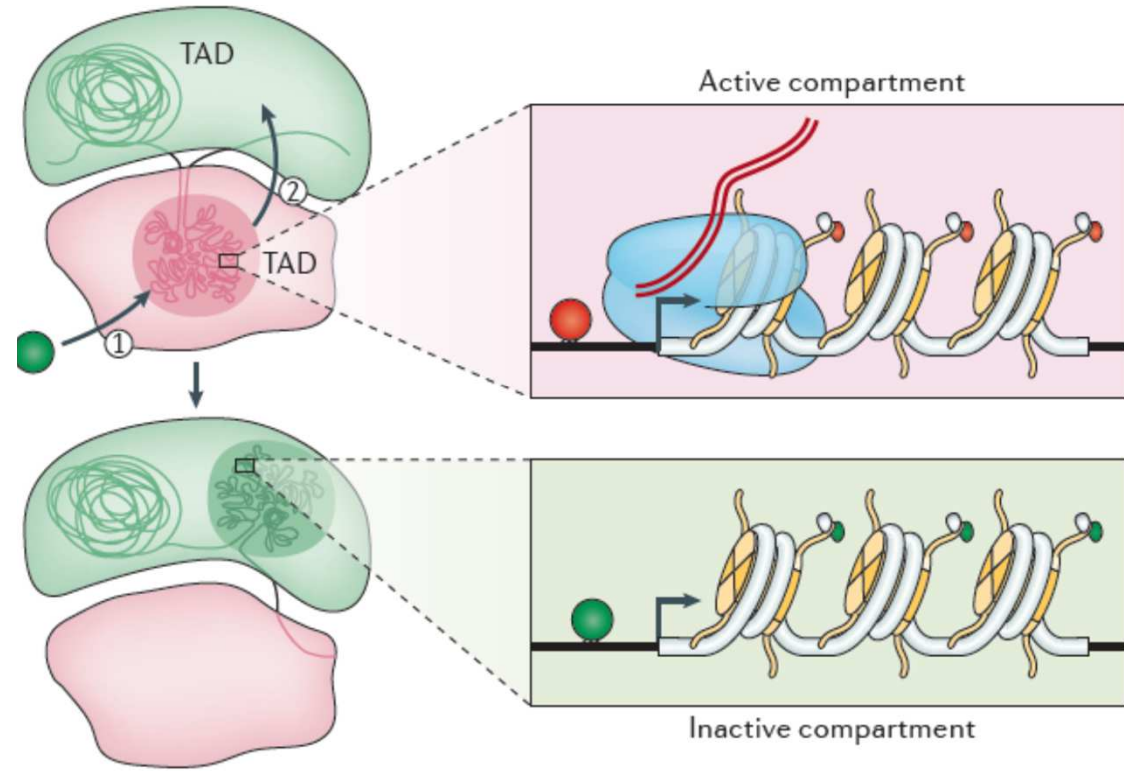
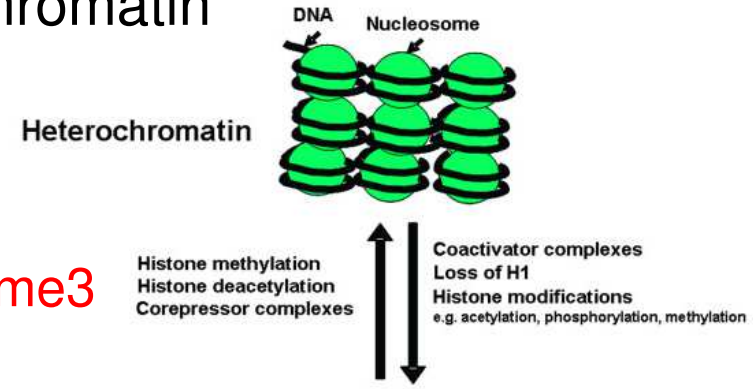
obsahuje chromodoménu, která se váže na 3x-metylovaný lysin (H3K9me3) – dimer spojuje dva „metylované“ nukleosomy – kondenzovanější a rigidnější struktura chromatinu



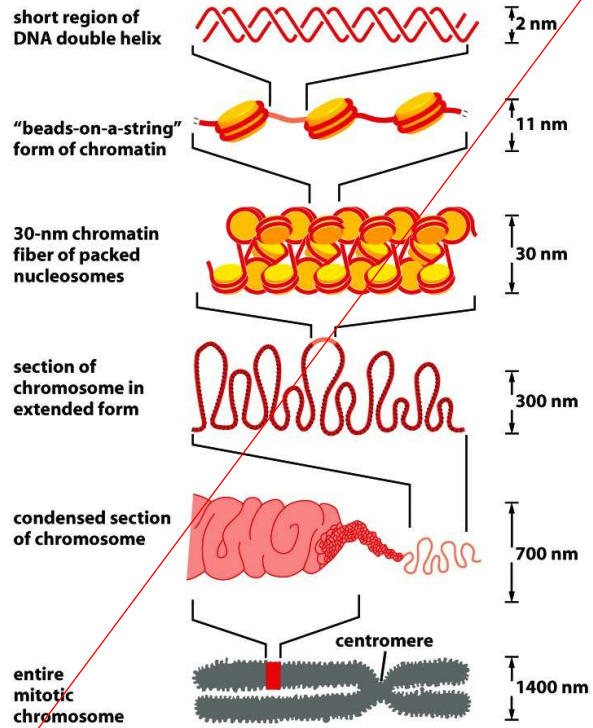
Heterochromatin – více kompaktní chromatin;
 transkripčně neaktivní geny, repetitivní sekvence,
 transpozony; oblast centromer, pericentromer a telomer
 Konstitutivní a fakultativní heterochromatin

Euchromatin – rozvolněné
 uspořádání, obsahuje
 transkribující se geny

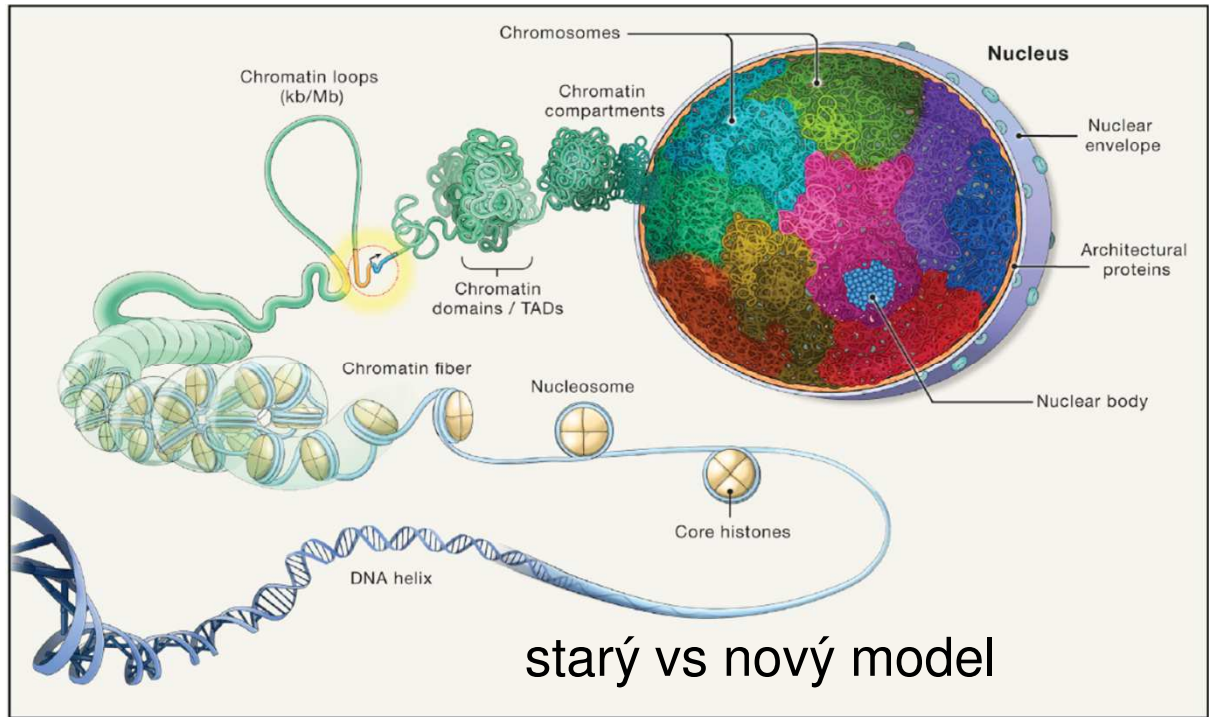
HP1-H3K9me3



Heterochromatin lies against the nuclear envelope in patches and is broken up at the site of the nuclear pore.



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

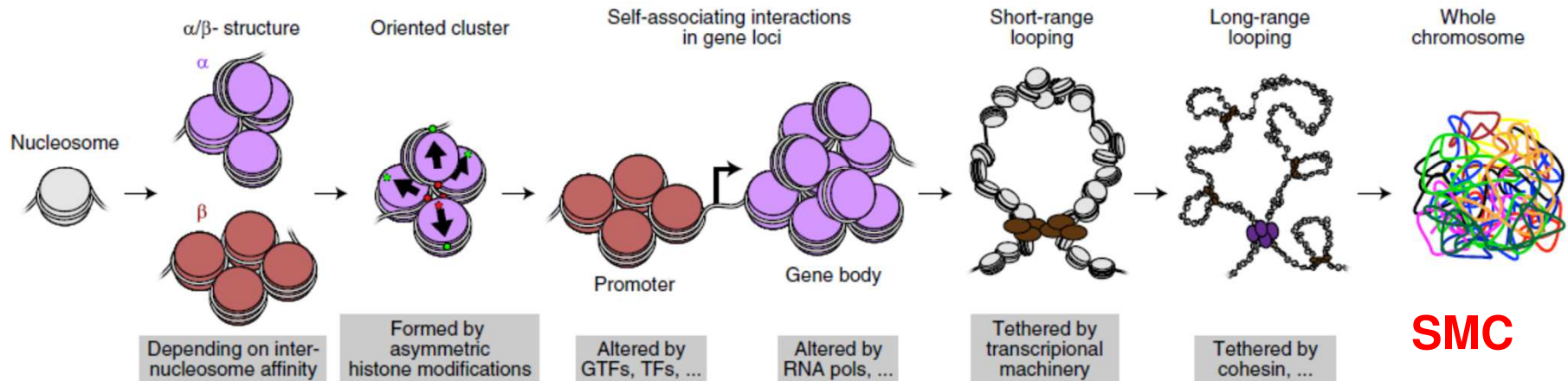


starý vs nový model

strukturní úrovně uspořádání chromatinu od nukleosomů ke smyčkám ...

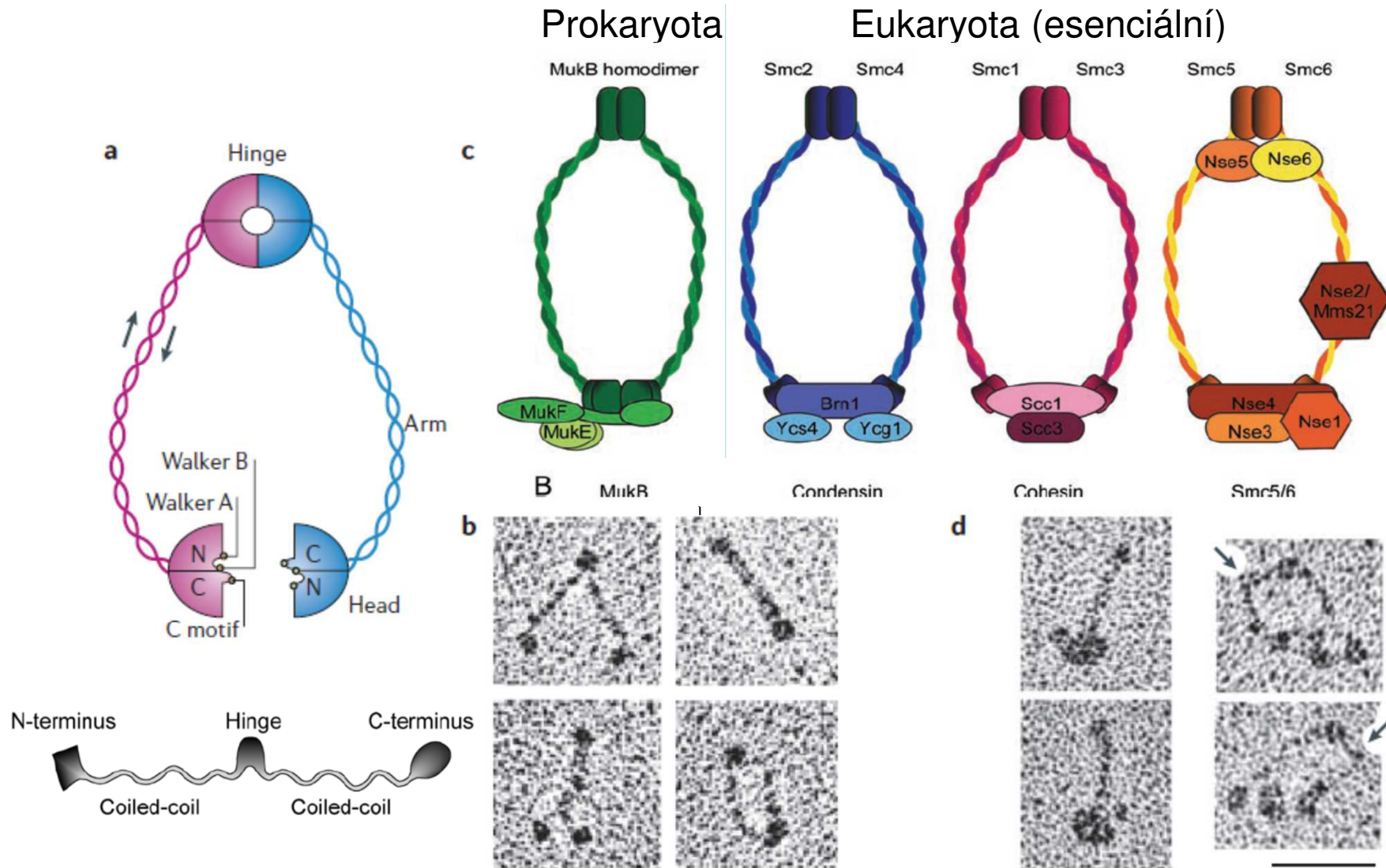
Ohno, Cell, 2019

Hierarchical architecture of *S. cerevisiae* chromatin



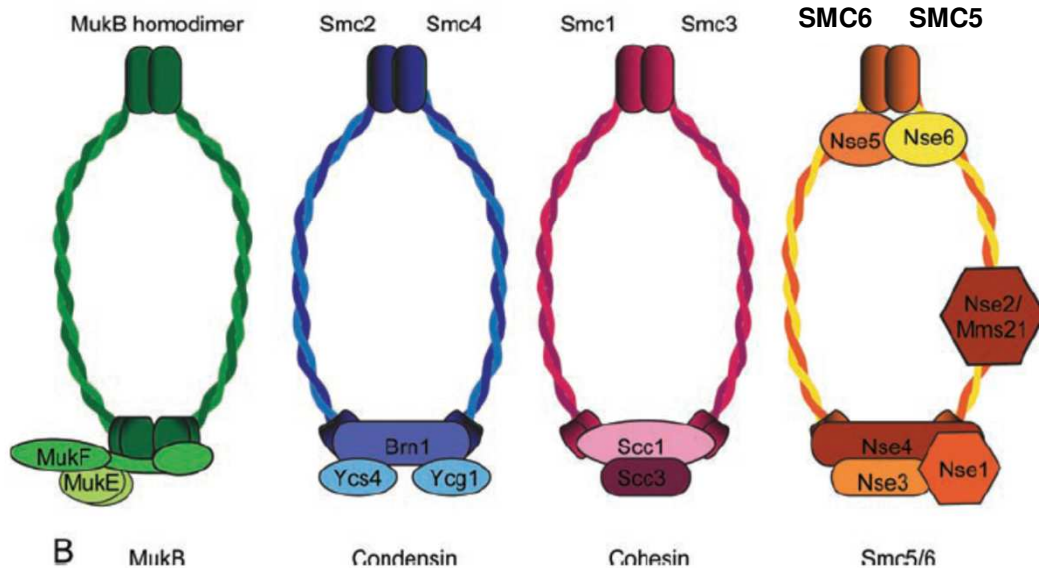
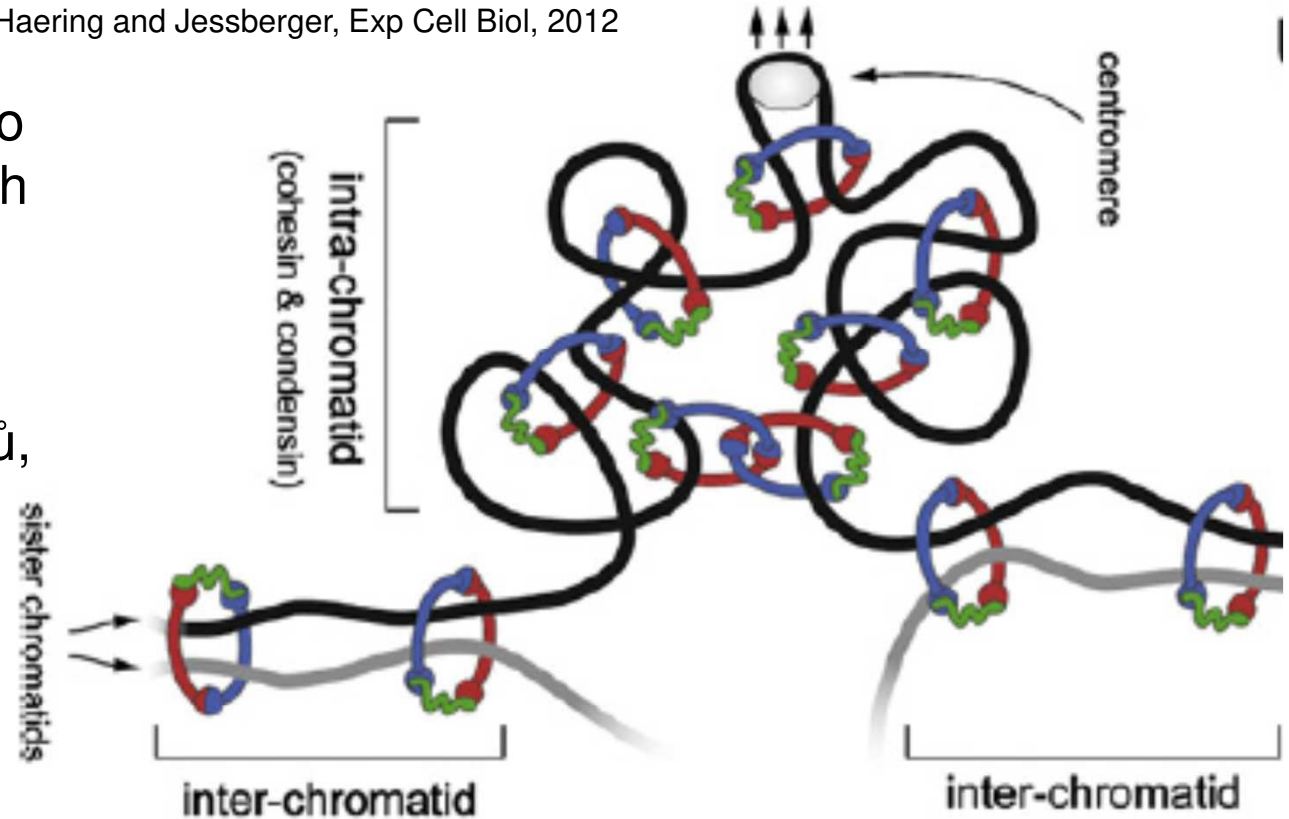
Komplexy SMC

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



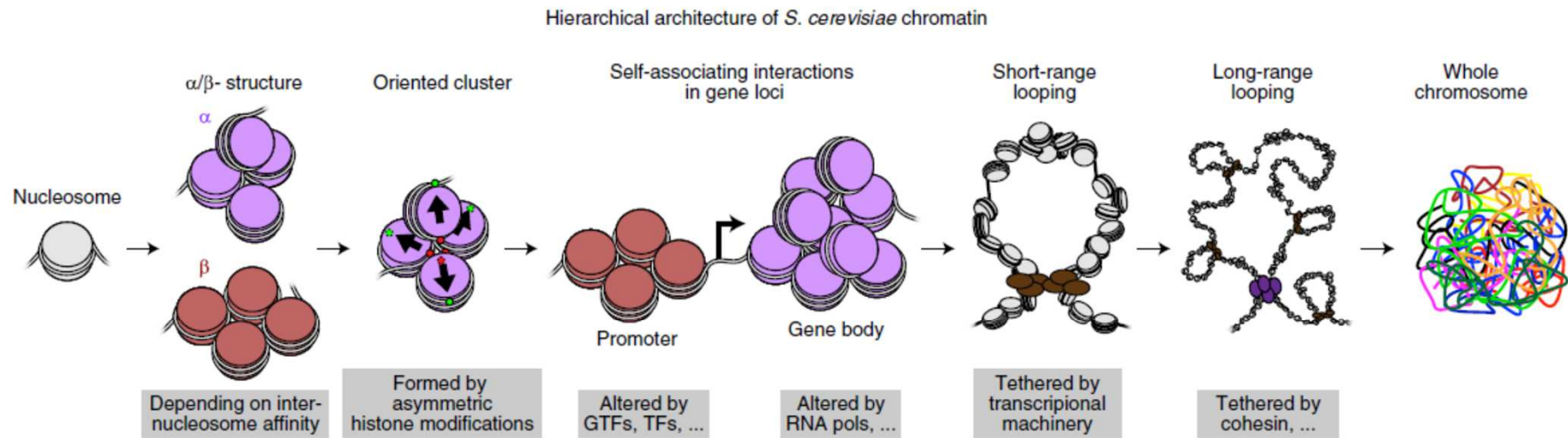
- SMC jsou nezbytné pro vytváření chromatinových smyček

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

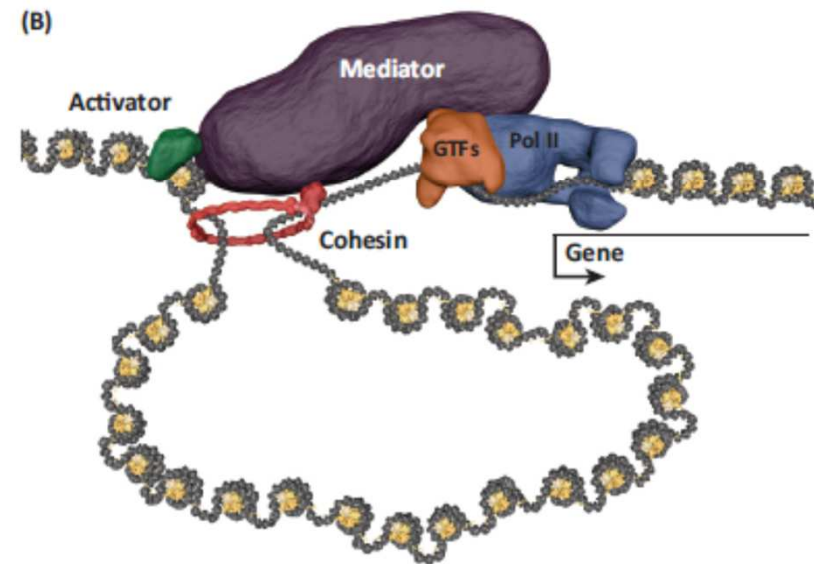


- složení SMC komplexů
- dlouhá ramena SMC, dimerizace přes hinge, ATPase heads přemostěny ATP a kleisinovou podjednotkou
- SMC proteiny vytváří kroužky, které drží DNA

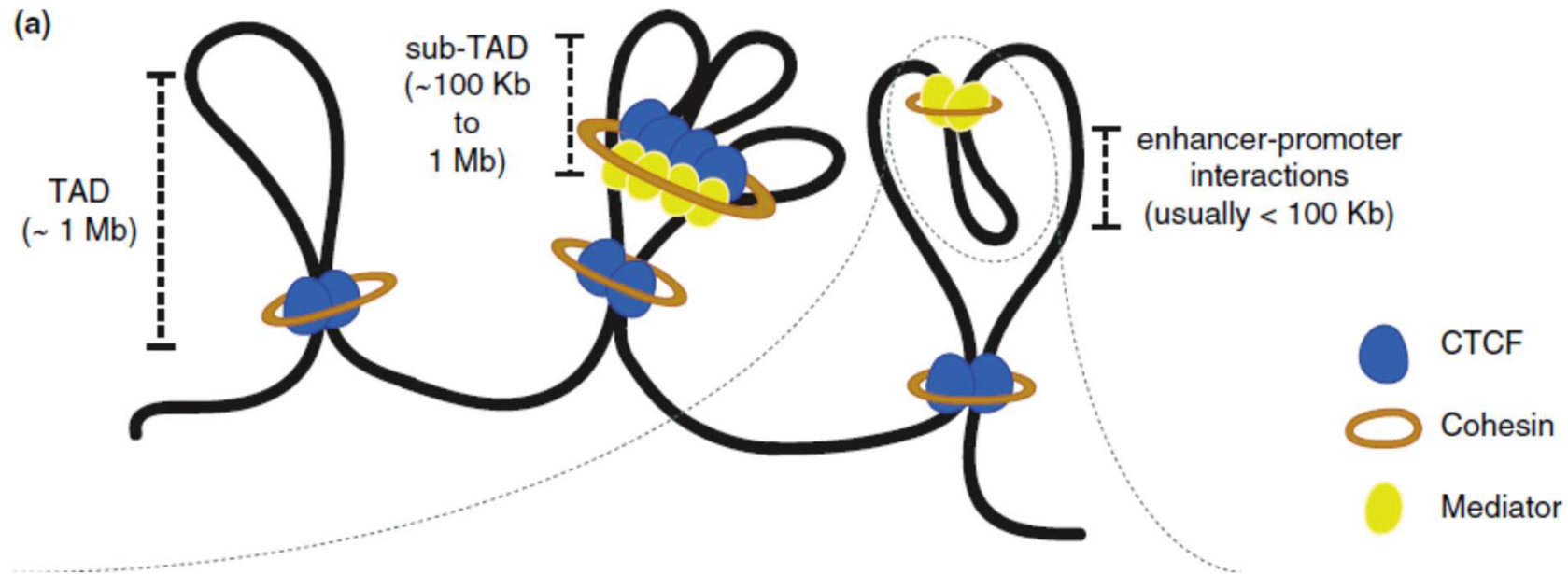
kohesin interaguje s mediátorem



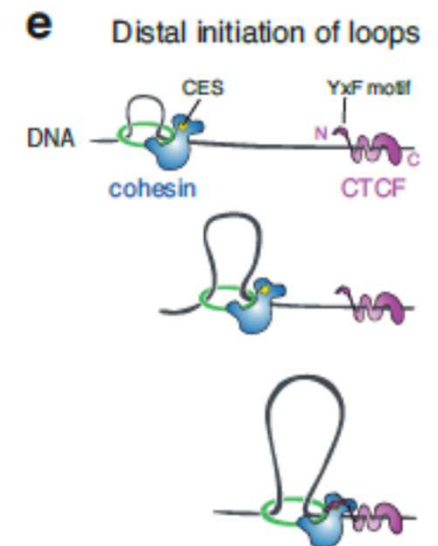
- mediator interaguje s GTFs a RNA polymerázou (zprostředkuje interakce mezi GTFs a aktivátory transkripce)
- kohesin interaguje s mediátorem a napomáhá tvorbě transkripčních smyček



Kohesin interaguje s CTCF

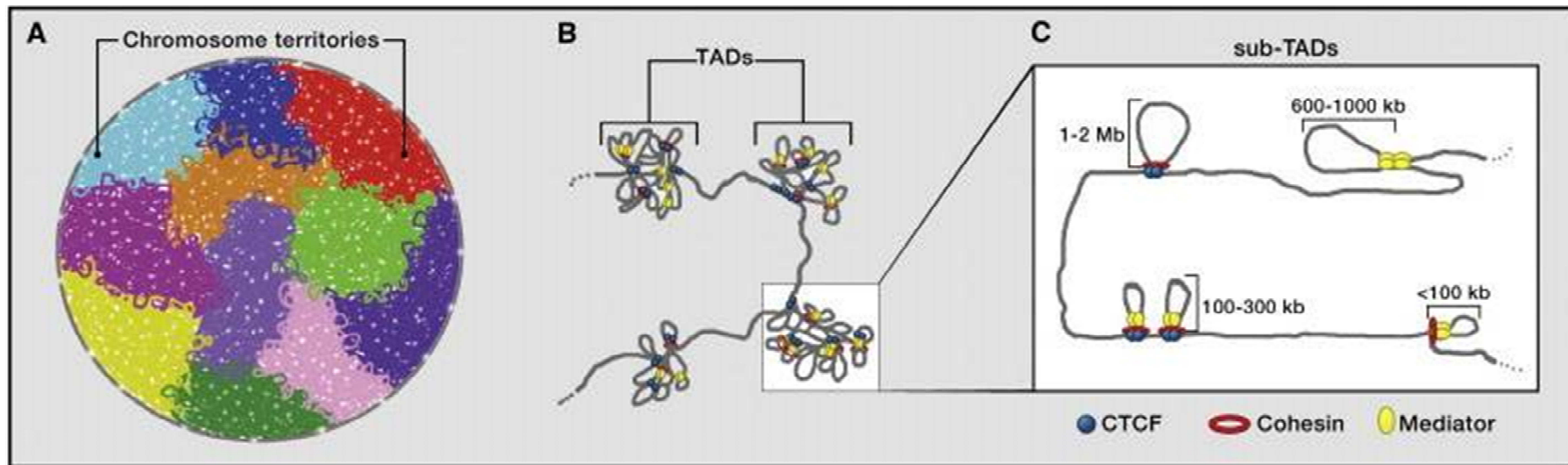


- CTCF (zinc-finger) „izoluje“ transkripční faktory a reguluje transkripci
- interakce vymezuje kohesinové smyčky
- utváření vyšších chromatinových struktur (TAD – topologically associated domains)



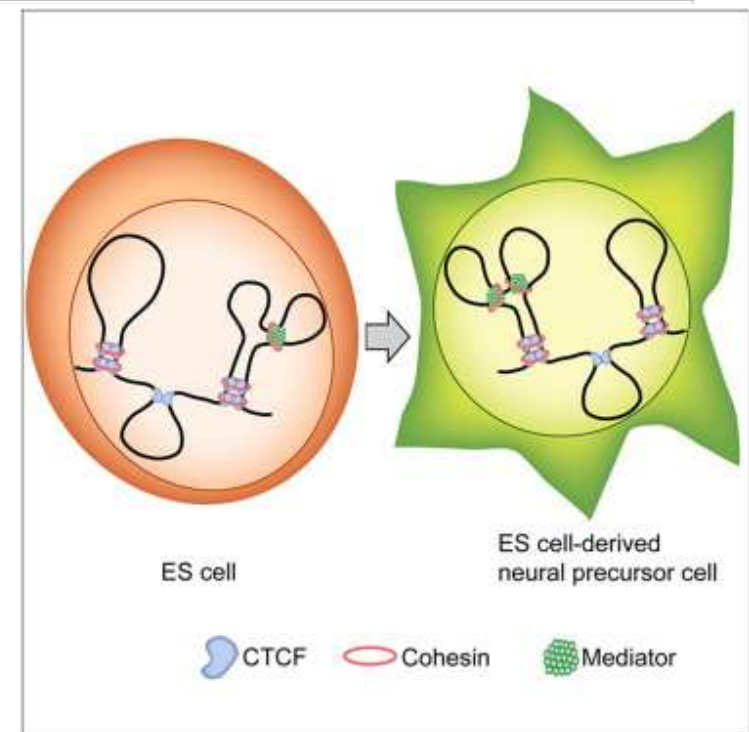
Bonora et al, CO in GD, 2014
Pugacheva et al., PNAS, 2020
Li et al., Nature, 2020

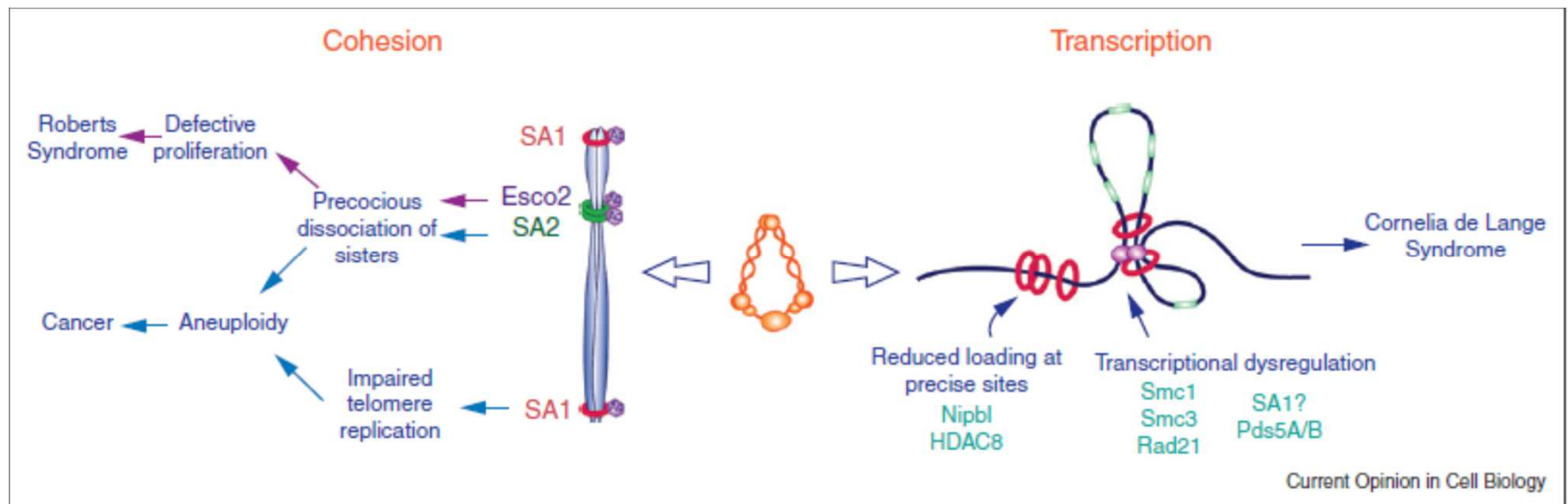
TAD – topologicky asoc. domény



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



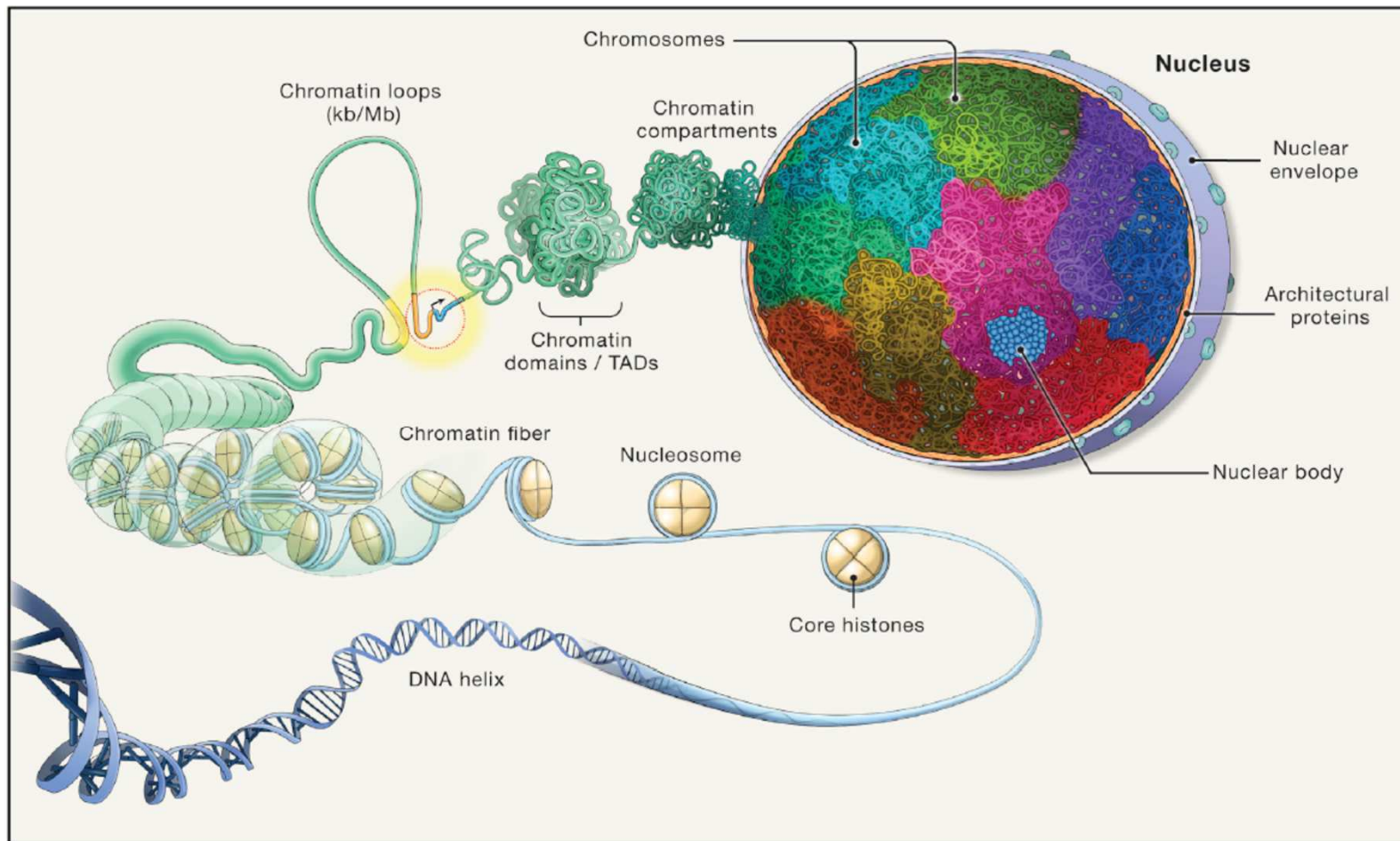


Remeseiro & Losada, CO in Cell Biol, 2012

Mannini et al, Hum Mut, 2013

mutace podjednotek kohesinu a jeho regulačních faktorů způsobují kohesinopatie (např. Cornelia de Lange syndrom = transkripční defekt) a různé typy nádorů (defekt segregace – 95% nádorů je aneuploidních)

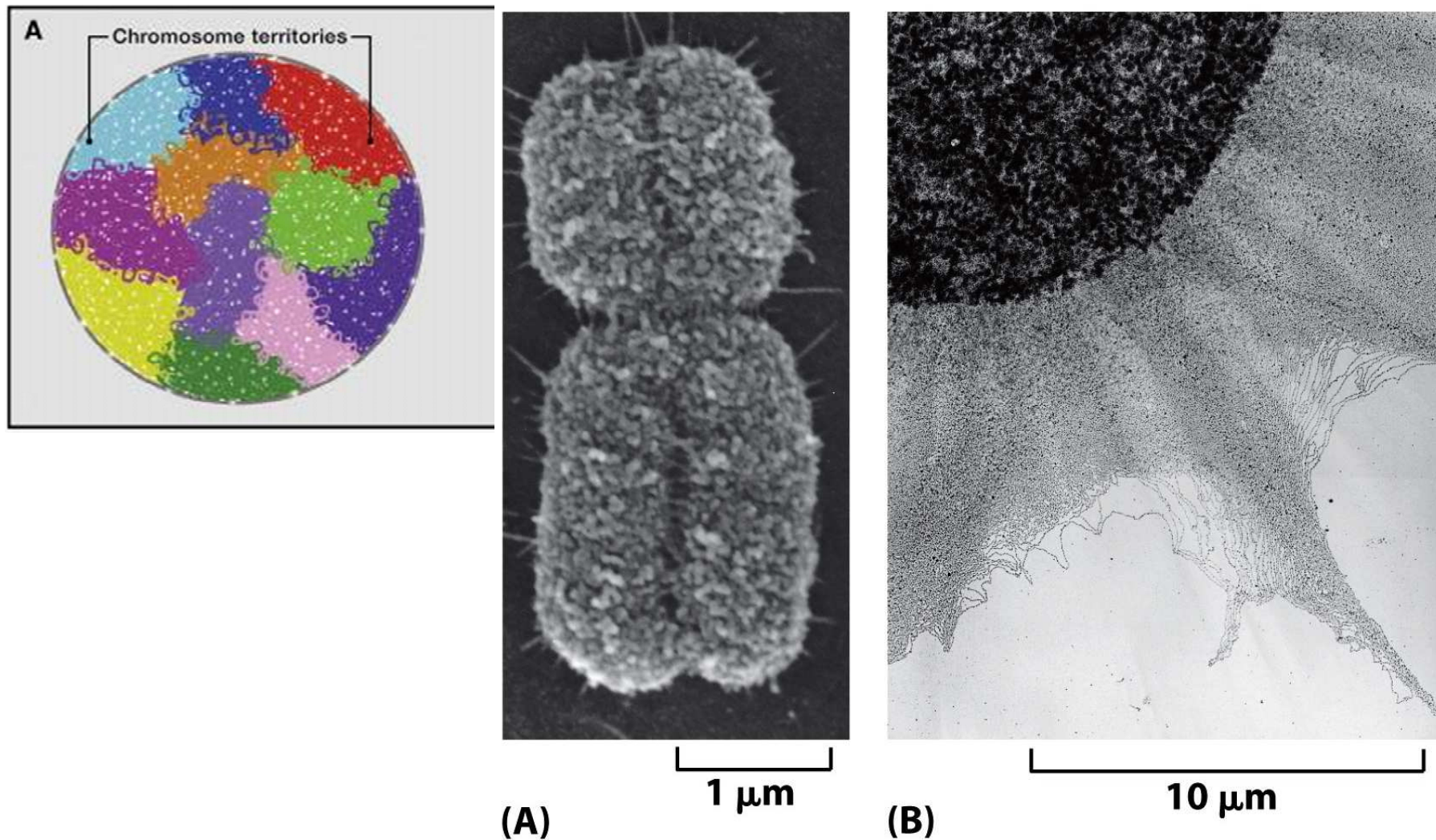




Kompartmenty (A a B) – do jisté míry se překrývají s oblastmi euchromatinu a heterochromatinu

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

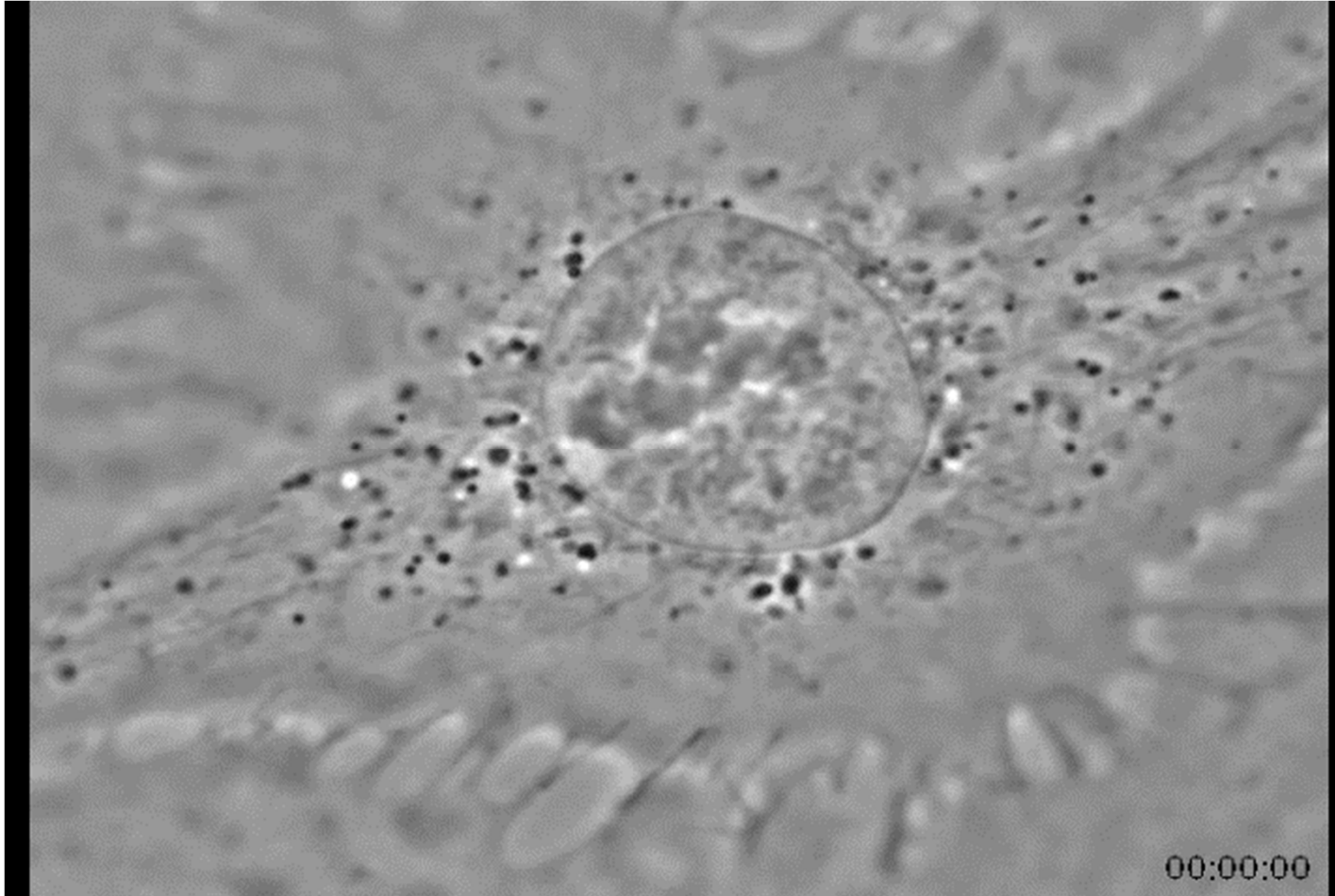
interfáze vs mitóza



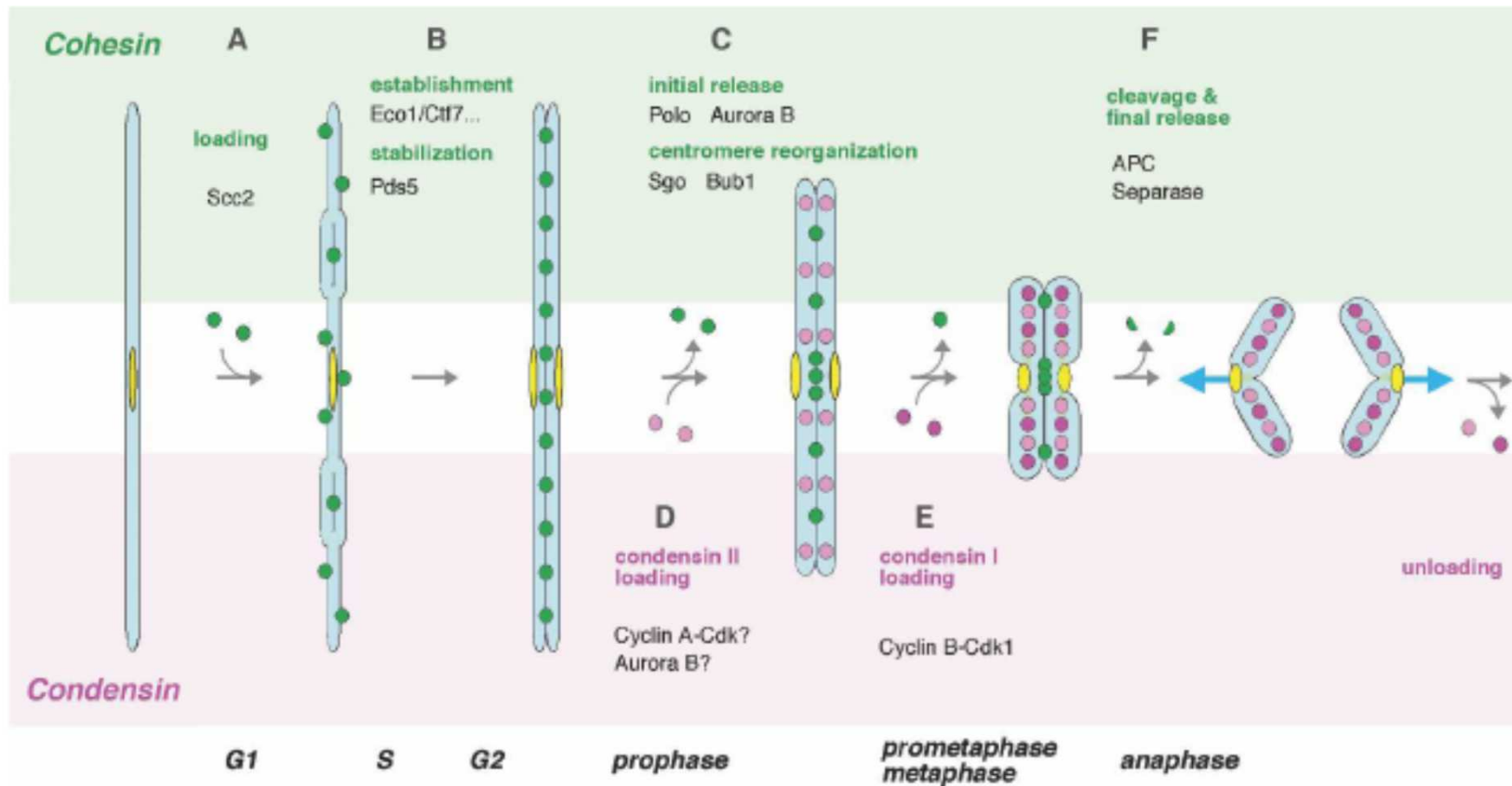
v interfázi okupují jednotlivé chromosomy určité oblasti jádra (ve formě chromatinových vláken) – v průběhu mitózy chromosomy kondenzují do typických X-struktur (kvůli snadnější segregaci)

Dynamika chromatinu

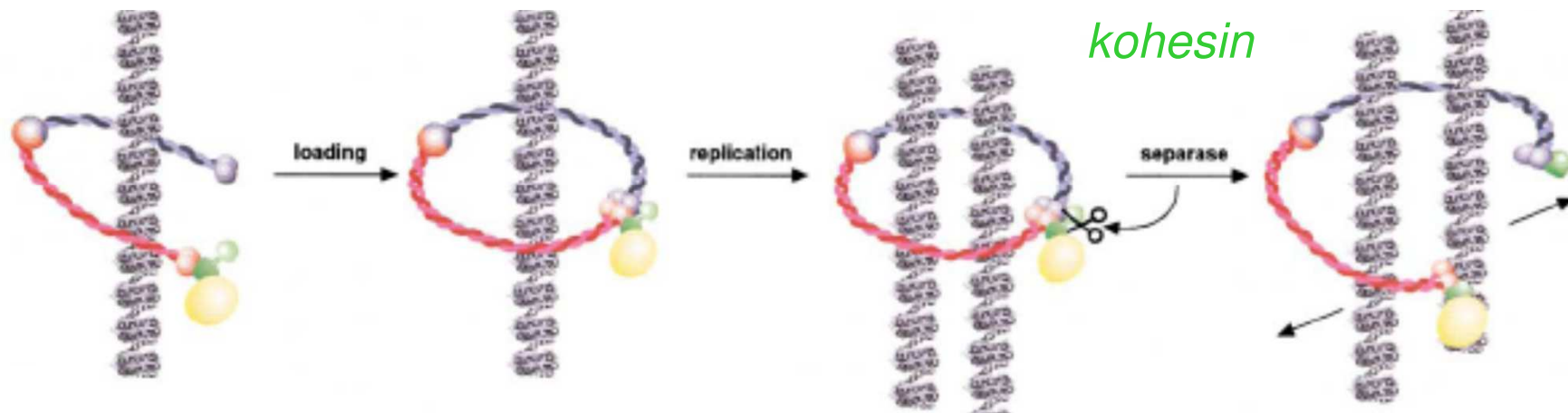
Dr. Gorbsky



Kondensace chromatinu = kondensin
Držení sesterských chromatid = kohesin

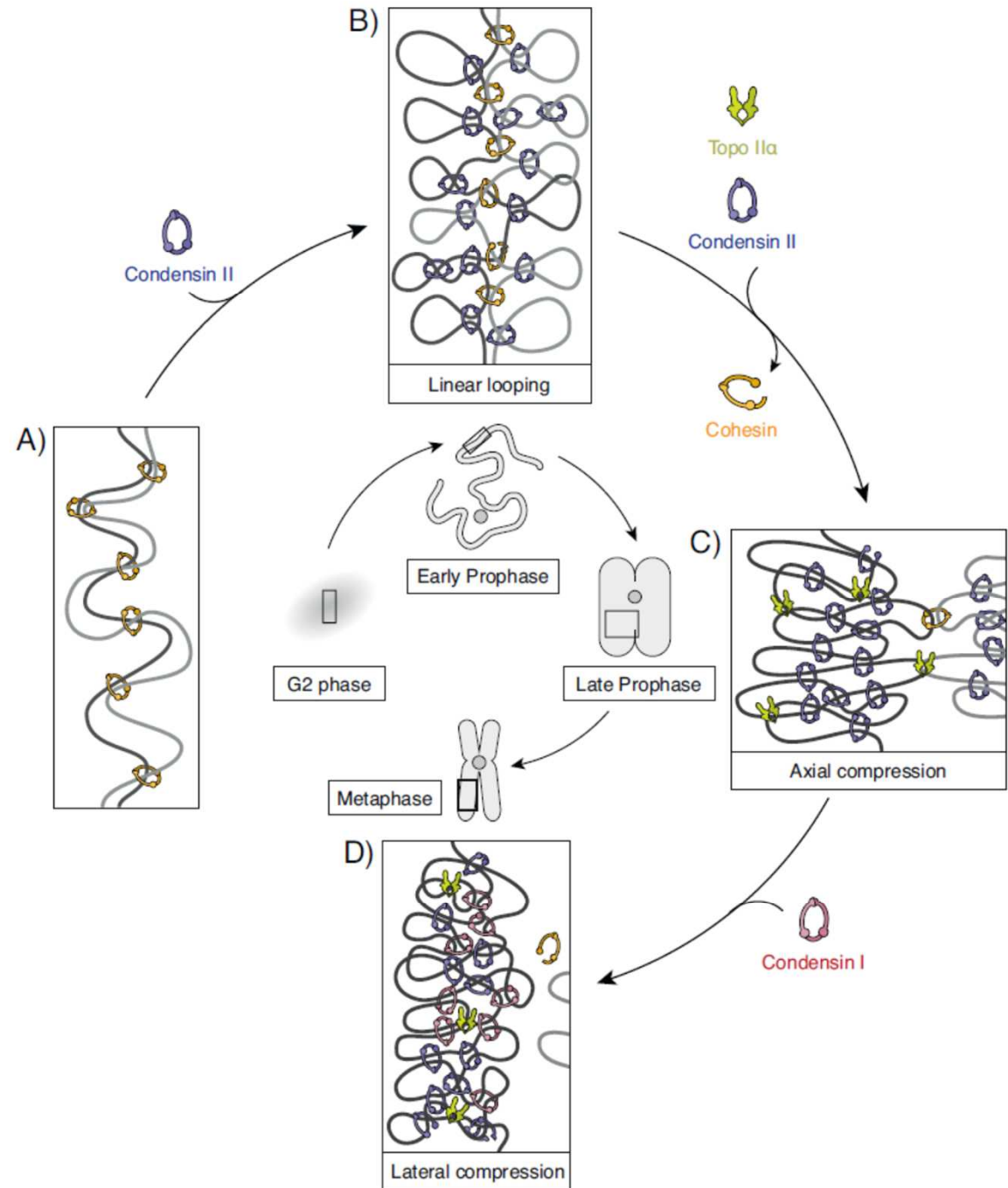
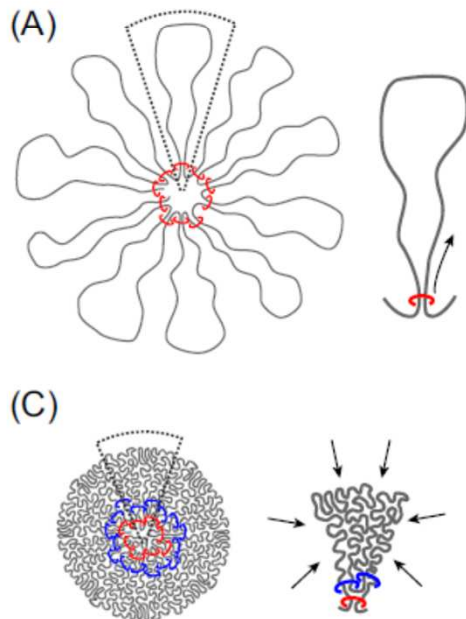


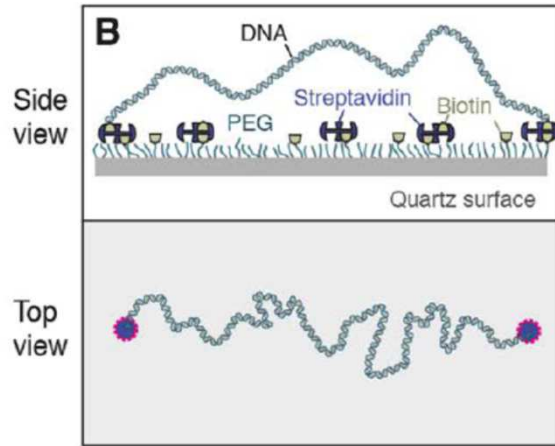
- „navlékání“ SMC komplexů na chromatin v průběhu buněčného cyklu
- kohesin obepíná 2 vlákna a drží je až do anafáze – otevře se proteolyticky



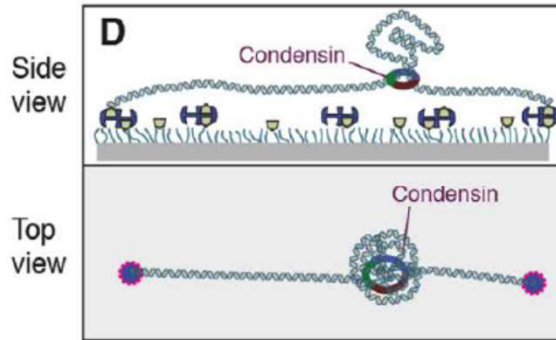
kondensiny

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

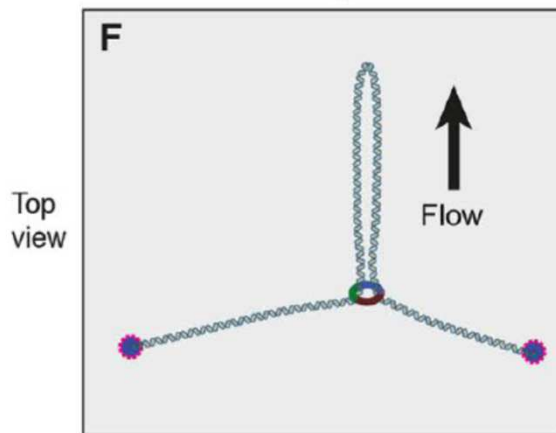




Add condensin & ATP ↓

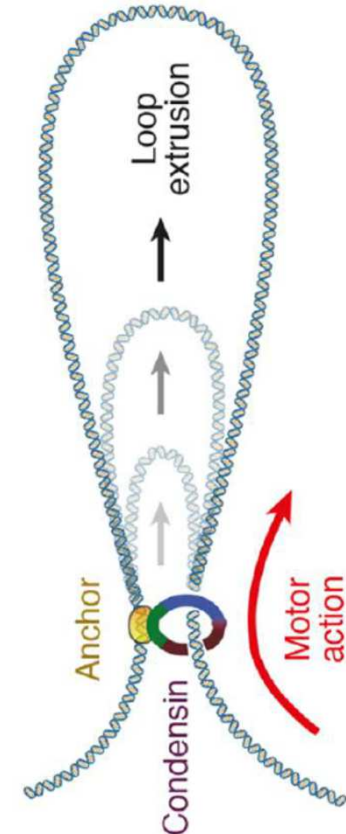
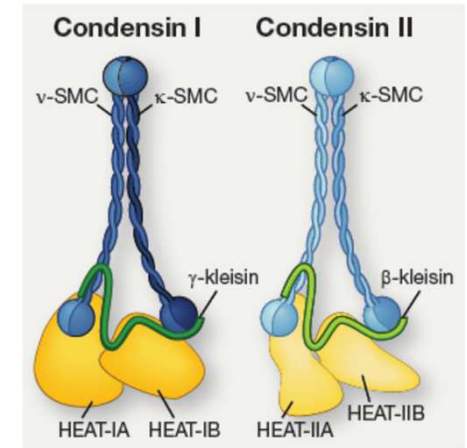


Apply flow ↓



konce molekuly DNA uchyceny

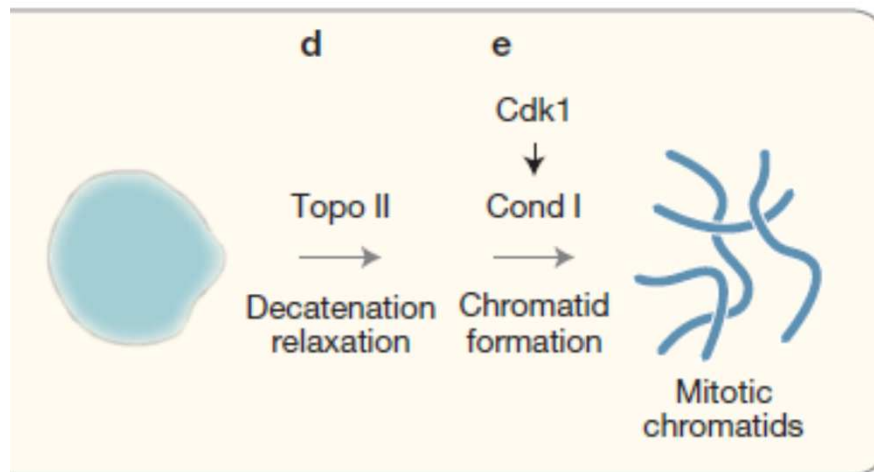
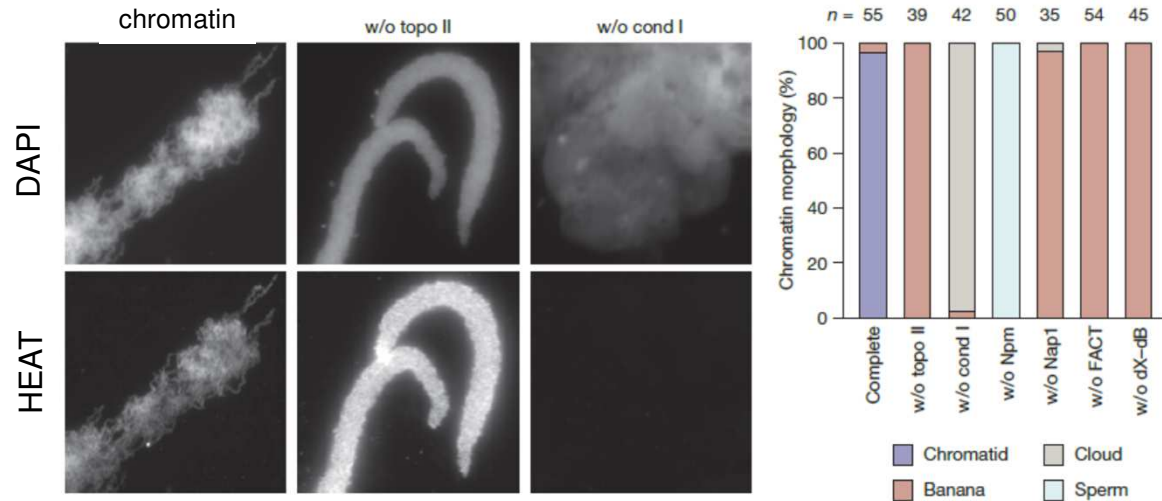
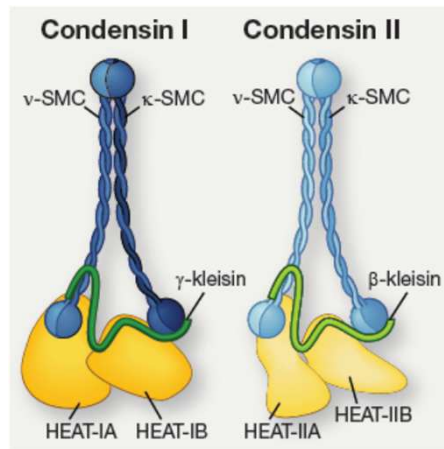
přidán kondenzin + vazba a hydrolýza ATP – vytvoření smyčky („loop extrusion“)



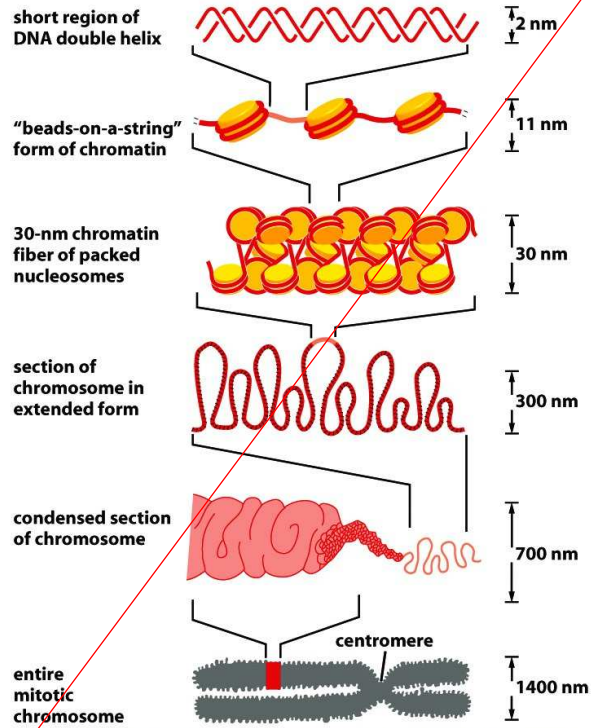
Ganji et al, Science, 2018
Takahashi, CO in CB, 2019

in vitro rekonstrukce chromosomů

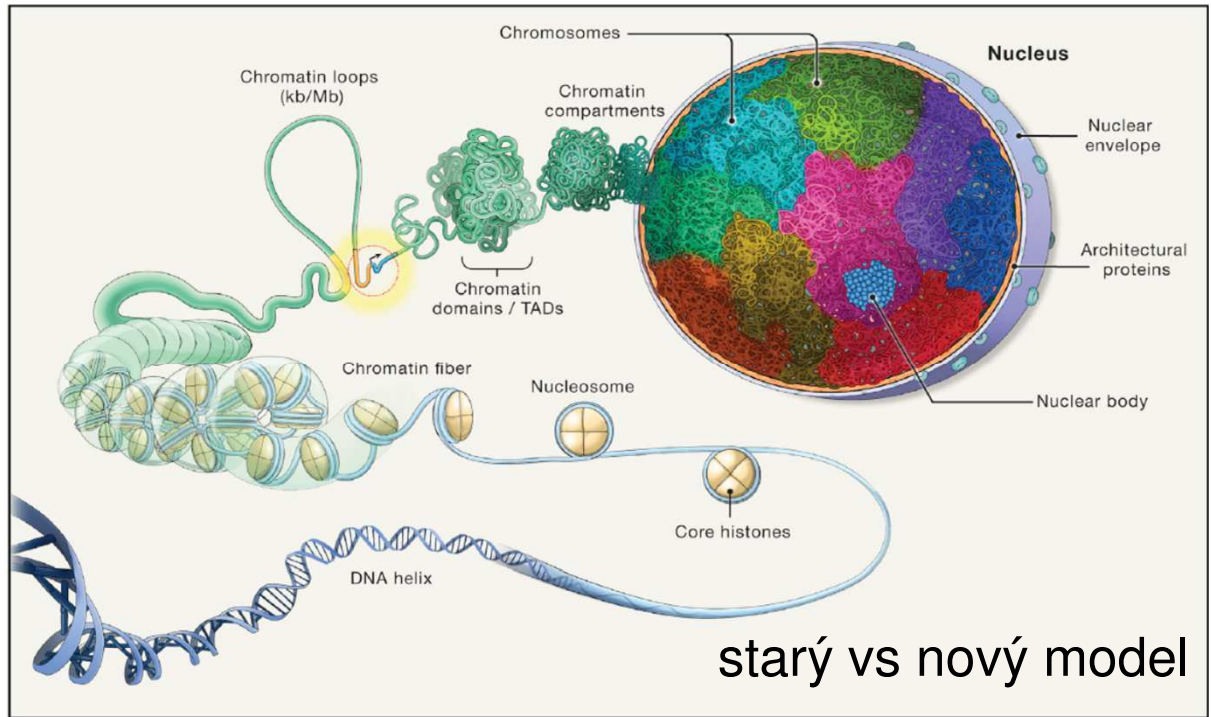
DNA + H3/H4/H2A/H2B ... FACT ... TopoII ... kondensin I (+ATP)



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



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

od nukleosomů ... ke smyčkám ... po mitotický chromosom

Ohno, Cell, 2019

Hierarchical architecture of *S. cerevisiae* chromatin

