

Курс молекулярной биологии

Тема лекции

Структура геномов

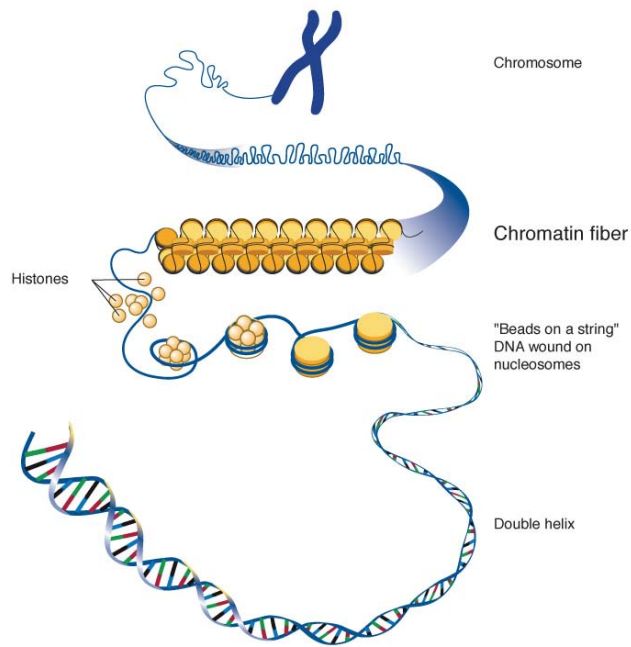
**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ГЕНОМ: СТРУКТУРНЫЙ АСПЕКТ

Термин «геном» был предложен Г. Винклером в 1920 г. для описания совокупности генов, заключенных в гаплоидном наборе хромосом одного биологического вида

Современное определение:

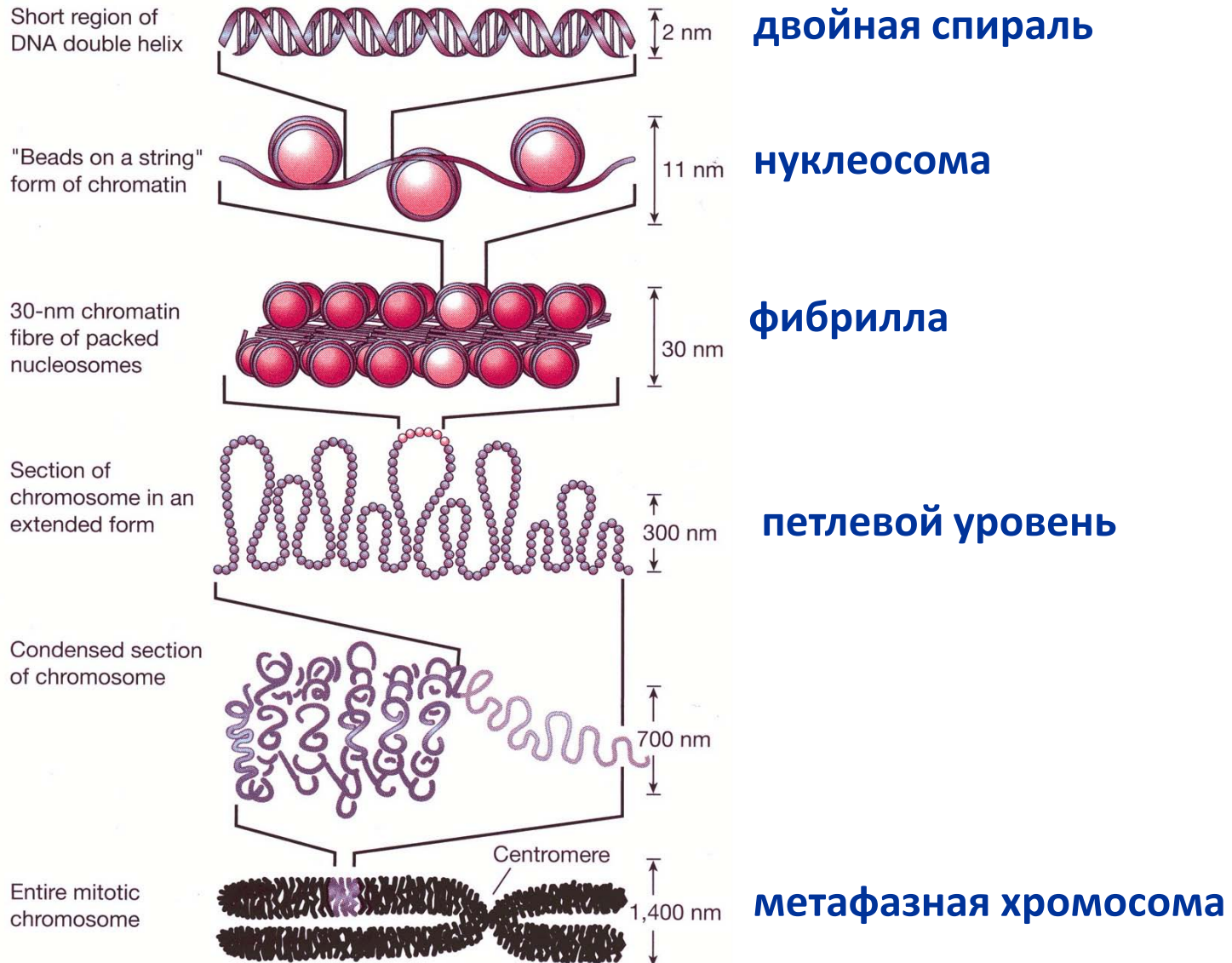
Геном — совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма



Размер человеческой ДНК - 1,8 м
Размер ядра - 10 мкм
Степень упаковки - 40 000 х

Геномная ДНК всех эукариотических организмов, суммарная длина которой для одной копии генома может достигать нескольких метров, находится в составе **высокоупорядоченного нуклеопротеинового комплекса, называемого хроматином**

Уровни компактизации геномной ДНК в составе хроматина



Структурные компоненты хромосомы

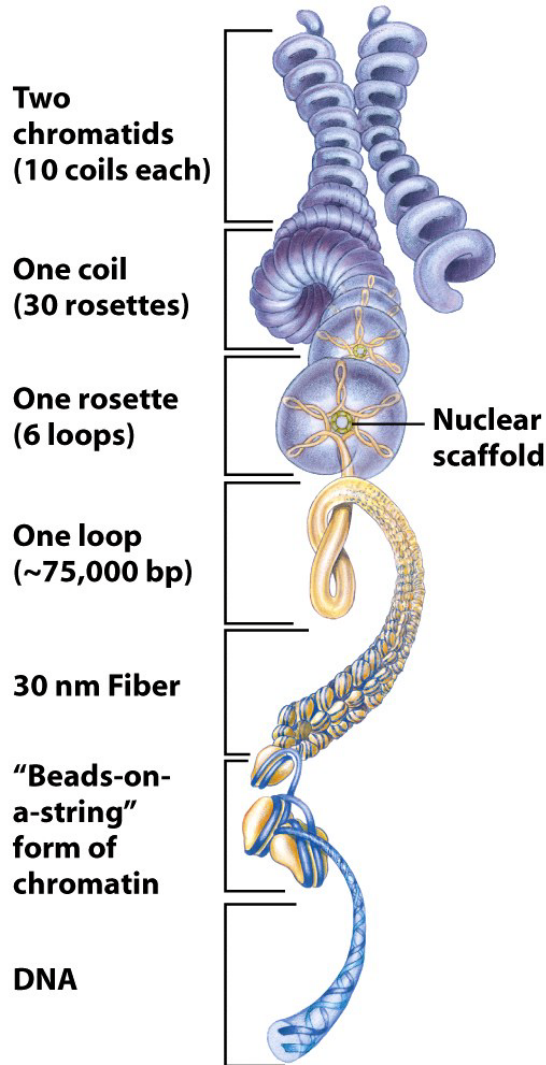


Figure 24-33
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

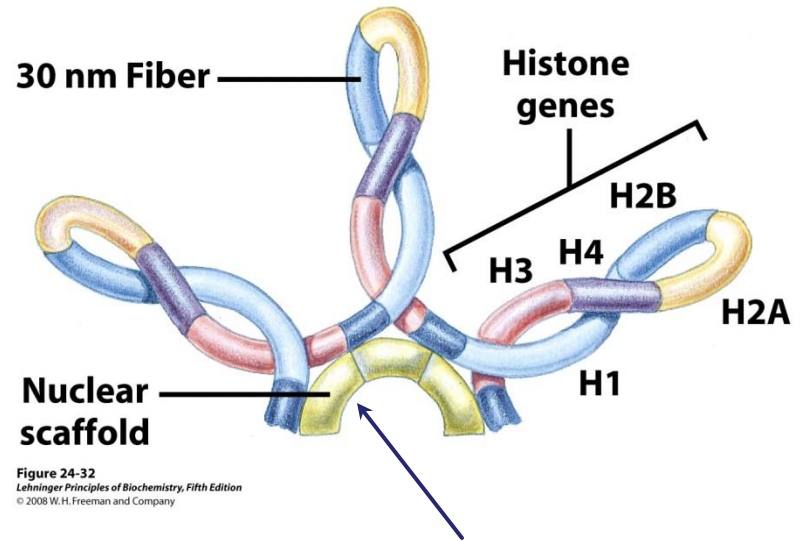


Figure 24-32
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Петли хромосомной ДНК прикреплены к ядерному каркасу.

Эта модель показывает уровни организации, которые могли бы обеспечить наблюдаемую степень уплотнения ДНК в хромосомах эукариот.

Компактизация ДНК в ядре осуществляется при посредстве сложного комплекса белков, среди которых принято выделять

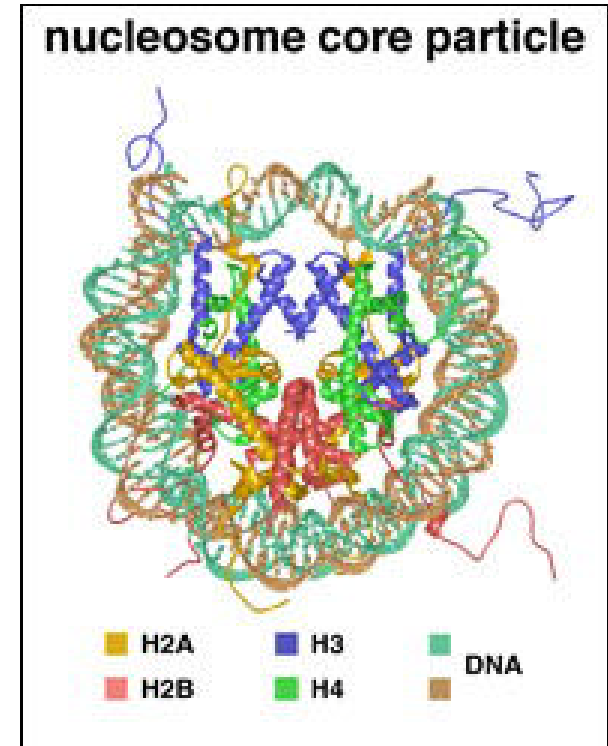
- гистоны и
- негистоновые белки

Гистоны являются чрезвычайно консервативными белками.

Выделяют 5 основных типов гистонов
H1, H2A, H2B, H3, H4

Core Particle - минимальная нуклеосома -
гистоны **H2A, H2B, H3, H4** - «коровые»
гистоны

H1 – линкерный гистон



Структурная организация «коровых» гистонов

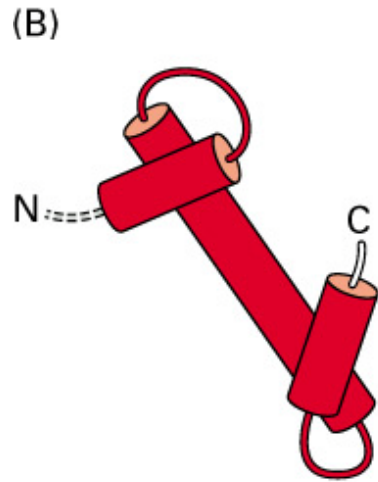
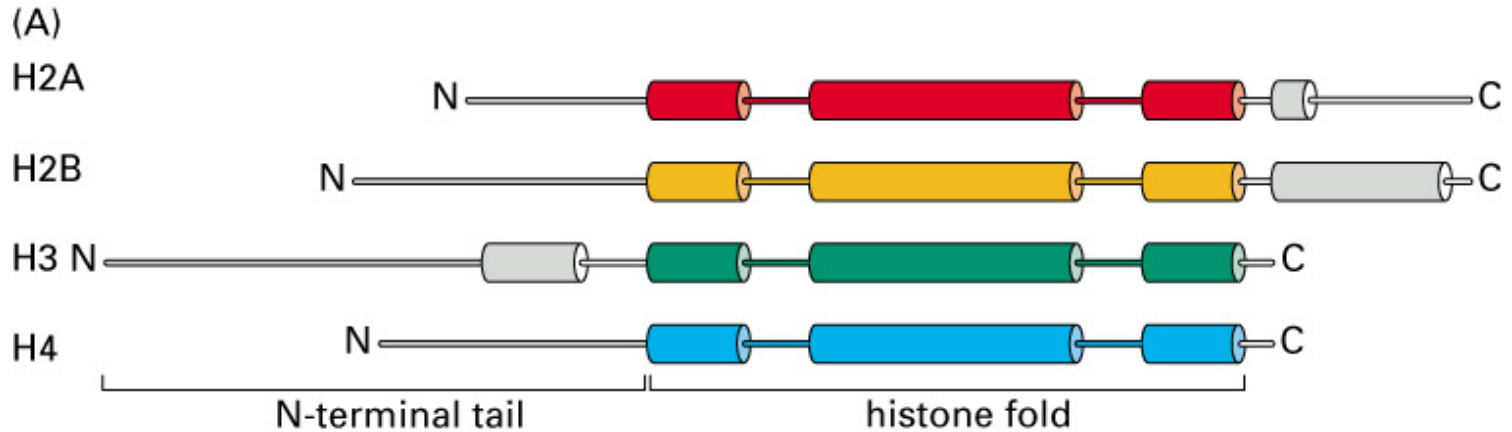


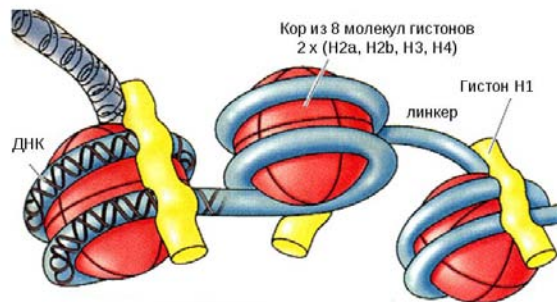
Figure 4-26. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Нуклеосома является базовой структурной единицей первого уровня упаковки ДНК в хроматине.

Представляет собой белковый диск, на который намотан фрагмент ДНК протяженностью 146 п.н. (1,65 витка)

Состоит из восьми молекул гистонов: тетрамера $(H3)_2-(H4)_2$ и двух димеров H2A-H2B. Диаметр глобулы-диска составляет ~ 11 нм, а высота - $\sim 5,7$ нм

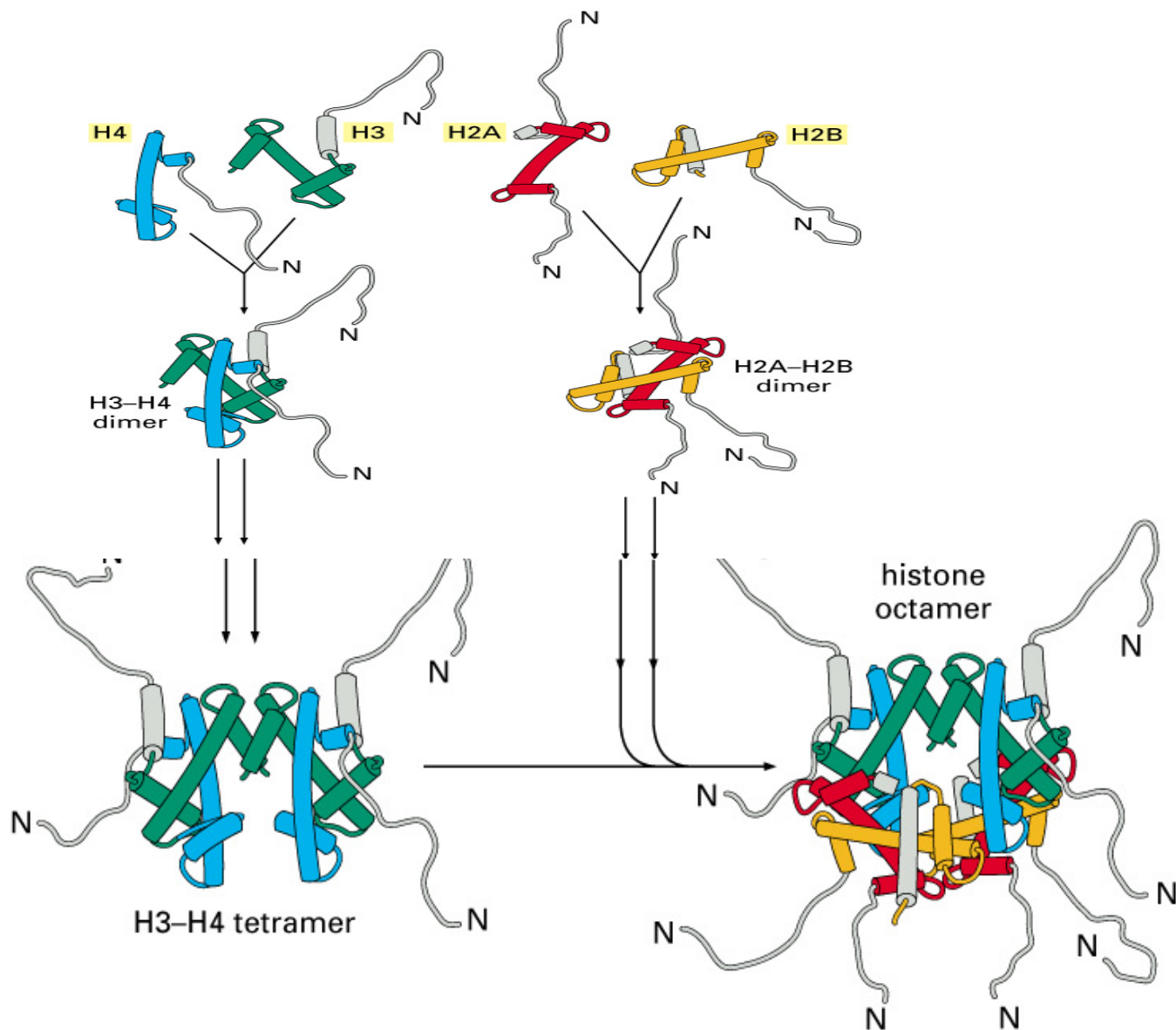
Строение нуклеосомы



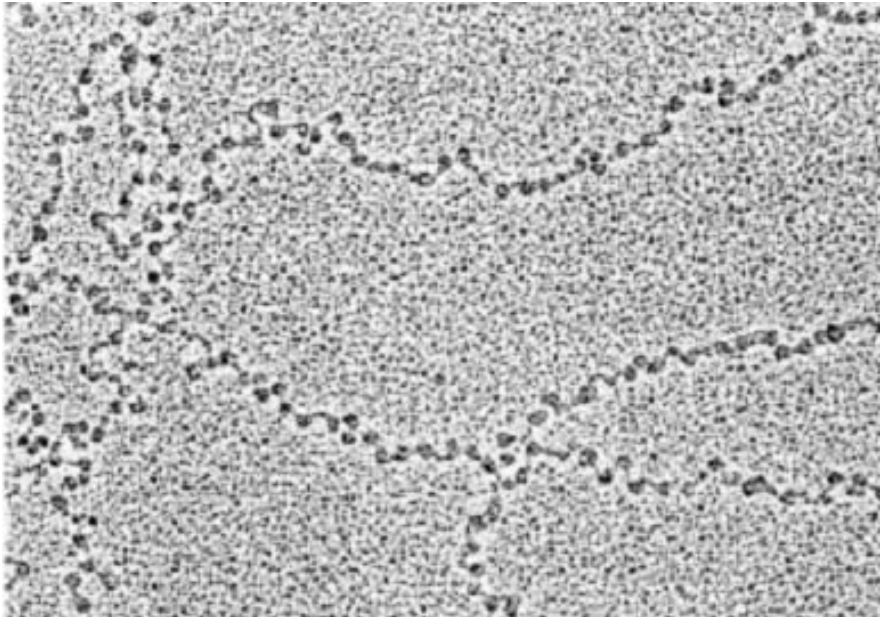
H1 связывается с ДНК, входящей на нуклеосому, и ДНК, выходящей из нуклеосомы, обеспечивая замыкание двух полных витков ДНК

Гистон H1 и некоторые другие белки стабилизируют структуру нуклеосом, предотвращают их перемещение (скольжение) вдоль ДНК и участвуют в формировании и поддержании пространственной структуры хроматина высшего порядка

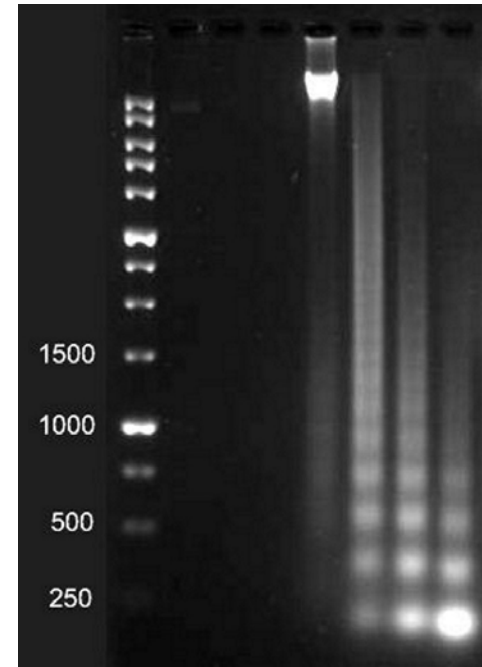
Порядок сборки октамера



К открытию нуклеосом привели две группы экспериментов:



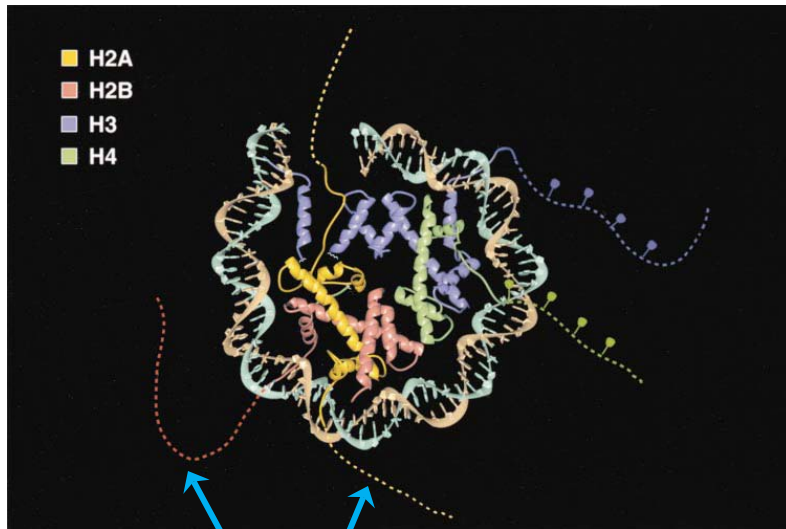
1. Электронная микроскопия препаратов хроматина



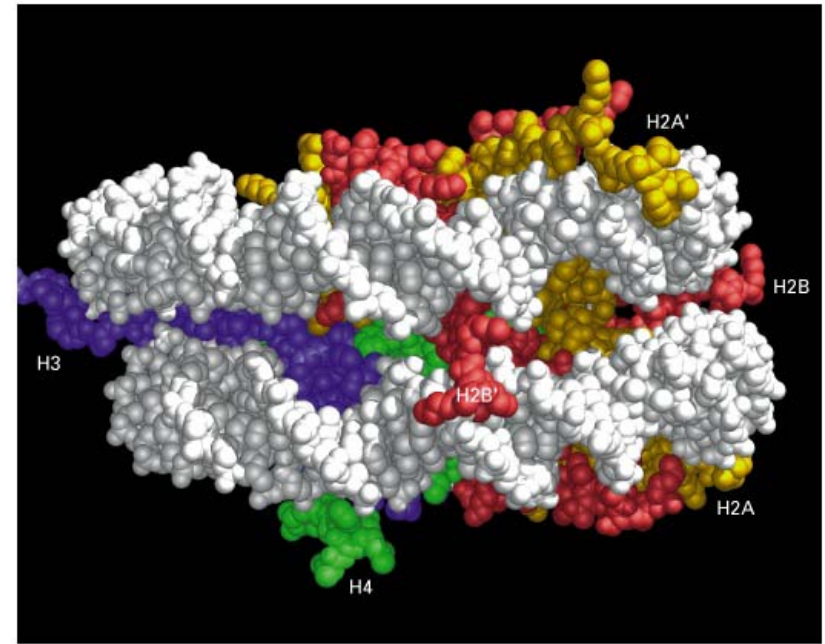
2. Анализ продуктов расщепления хроматина эндонуклеазой

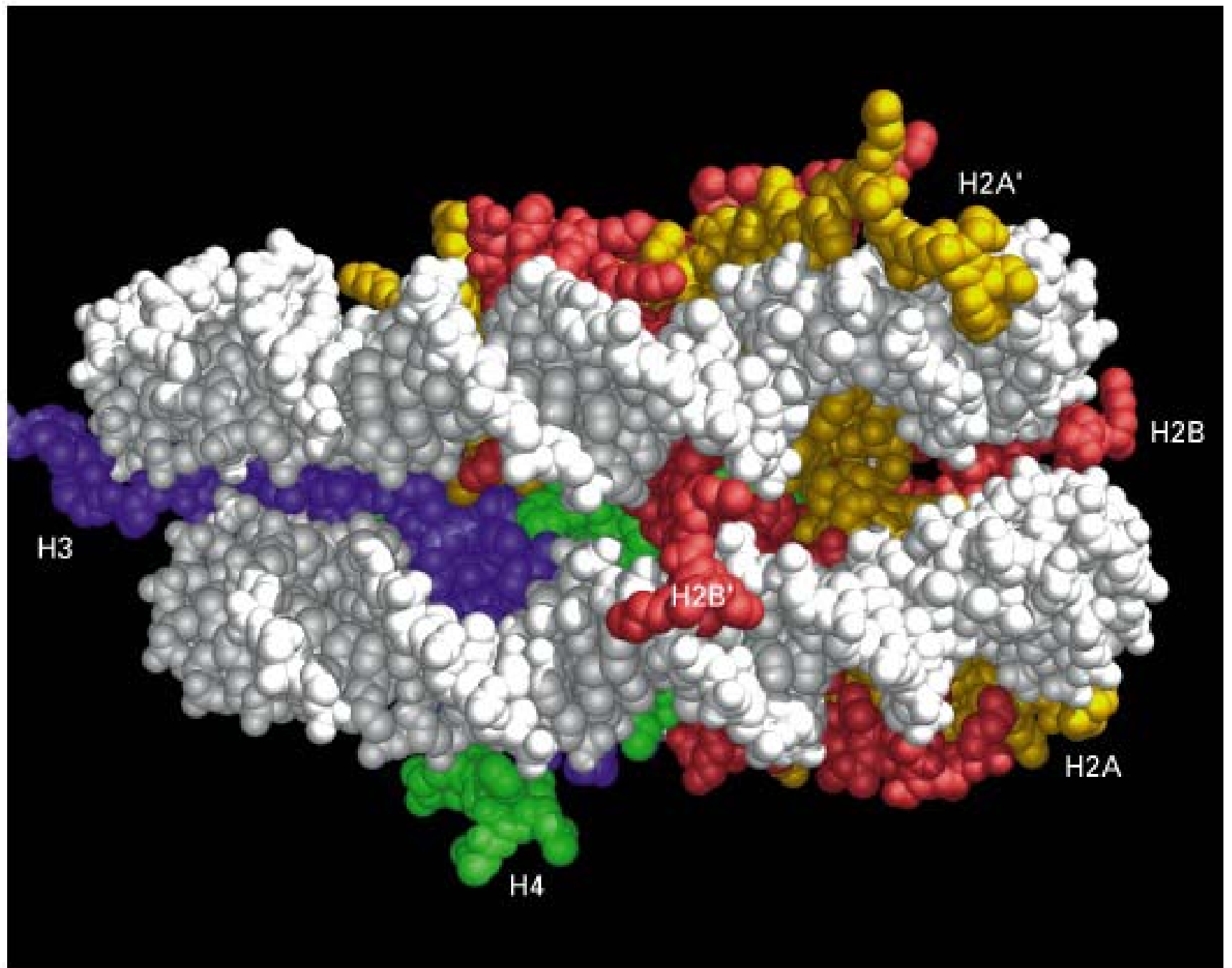
**Нуклеосомные частицы не являются
вполне идентичными благодаря
модификациям гистонов и наличию
вариантных гистонов**

Концевые домены гистонов выходят за пределы нуклеосомного ядра. На них находится много мишеней для модификаций, имеющих сигнальное значение



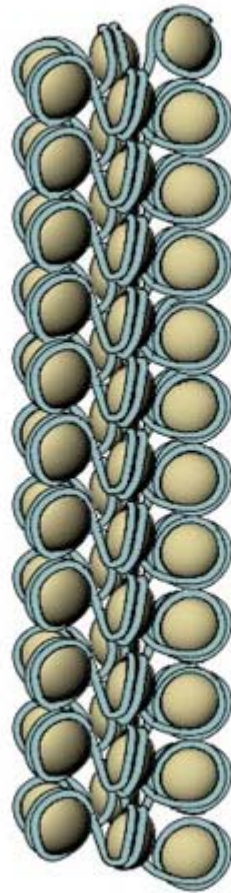
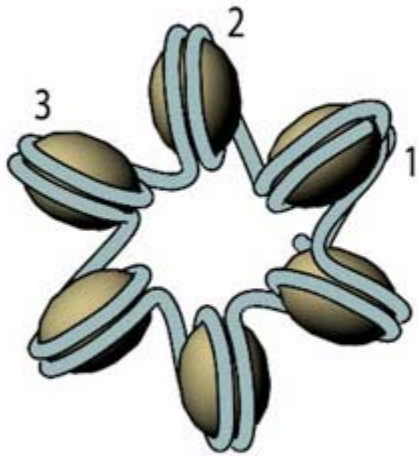
Концевые домены гистонов



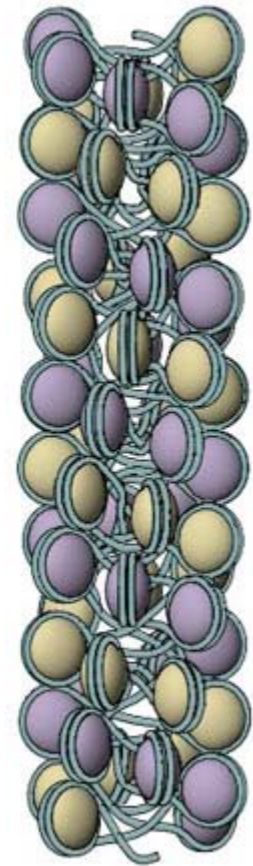
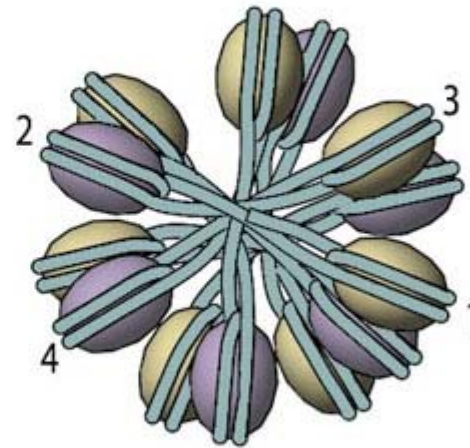


Модели 30-nm хроматиновой фибриллы

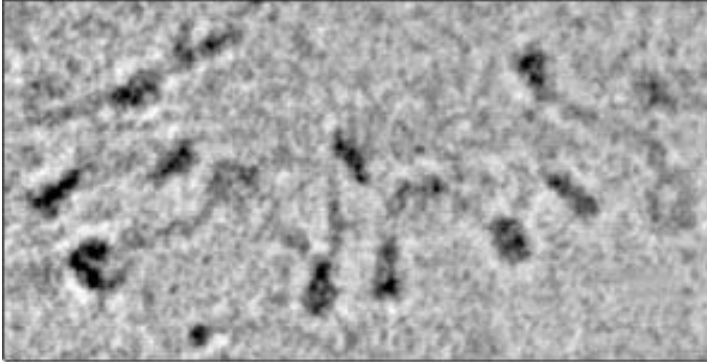
A. Solenoid



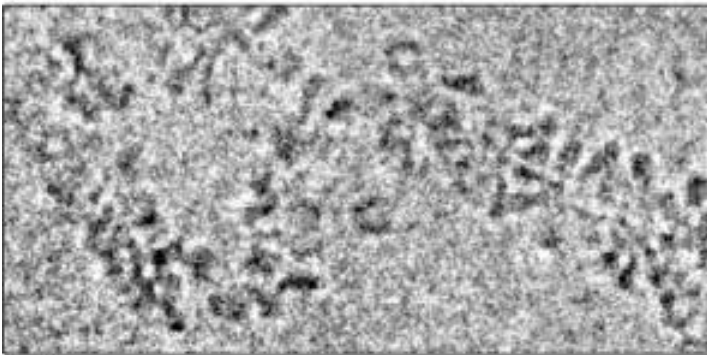
B. Zigzag



Модель «зигзаг» 30-нм хроматиновой фибриллы

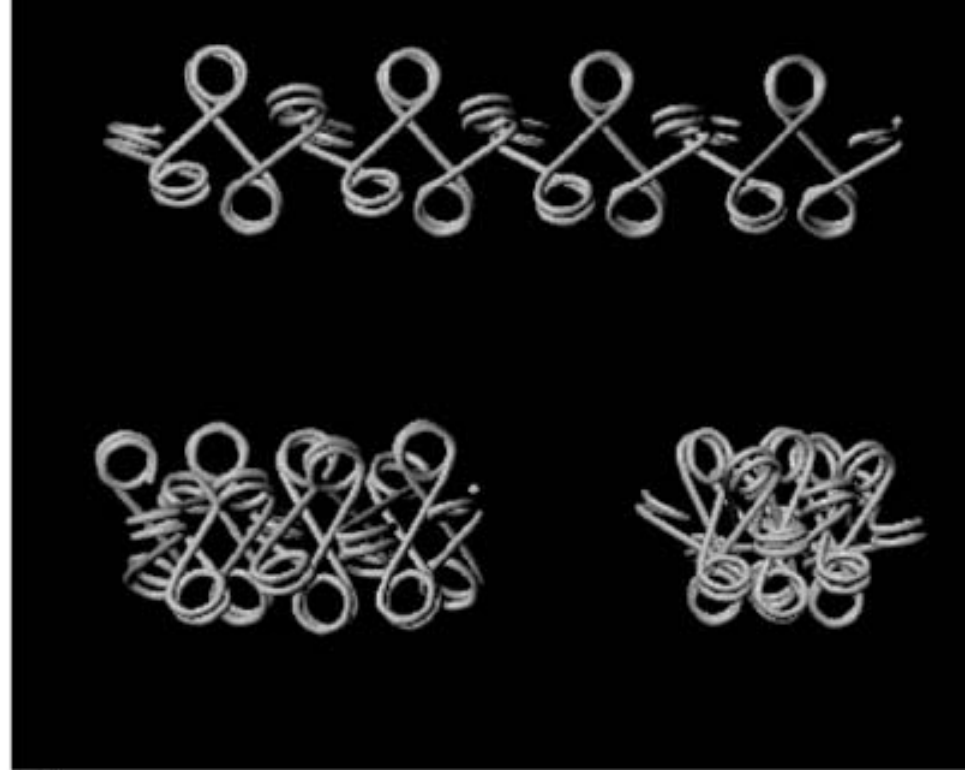


(A)



(B)

50 nm



(C)

Механизм конденсации хромосомы с участием негистоновых белков был открыт в 1997 году Татсуйя Хирано (Tatsuya Hirano).

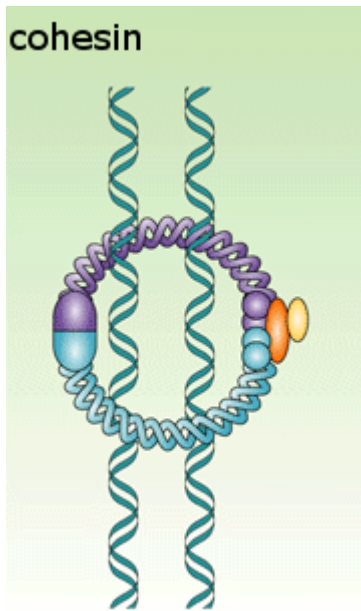
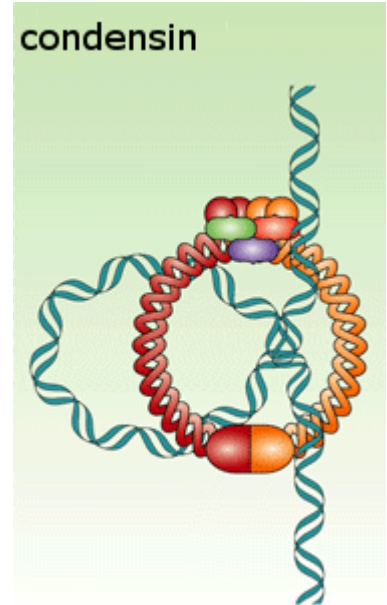
Белки, участвующие в конденсации хромосомы получили название SMC - Structural Maintenance of Chromosomes



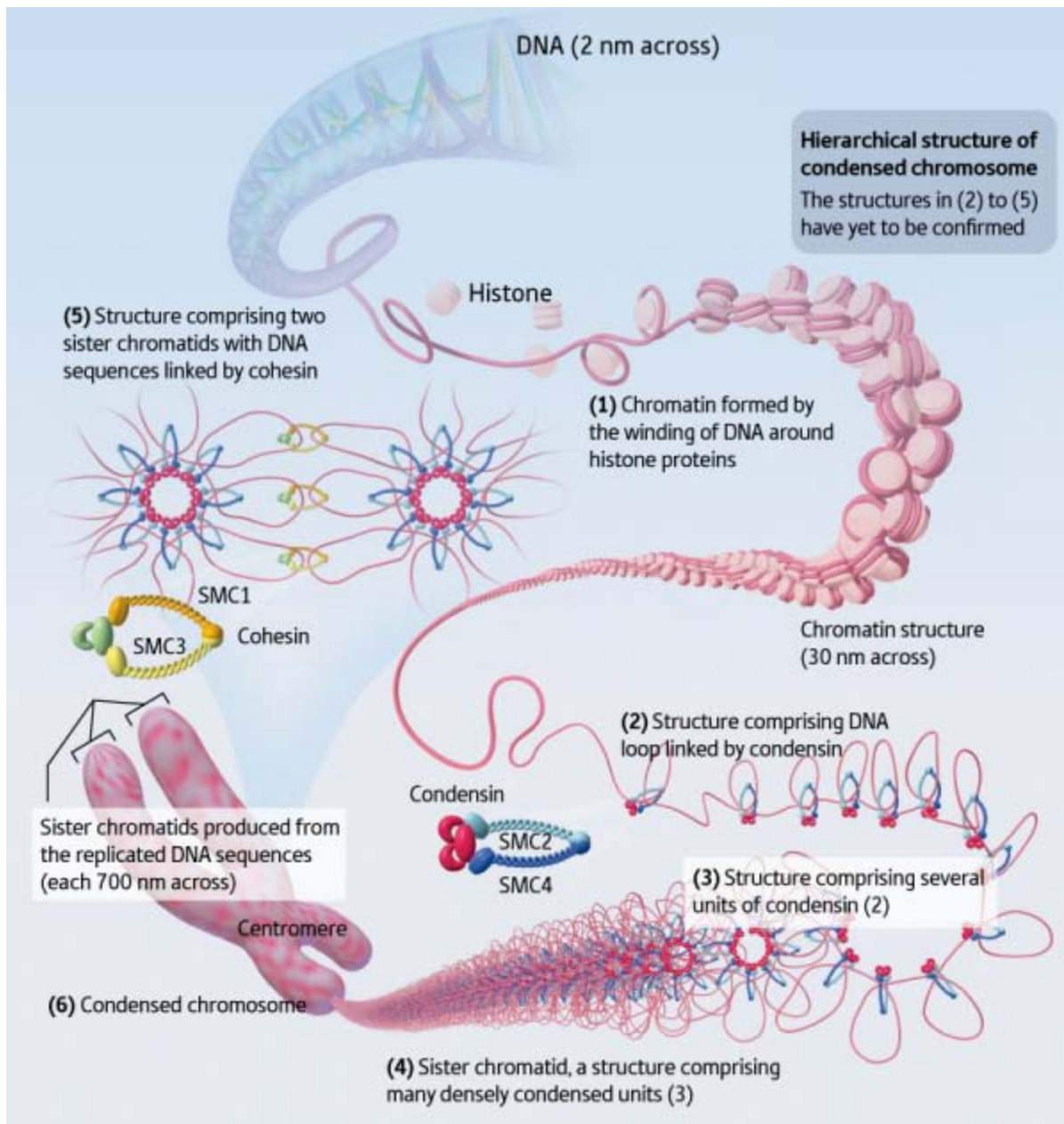
Татсуйя Хирано (Tatsuya Hirano), Ph.D.

Открытие белкового комплекса конденсина признано крупным прорывом, который привел к быстрому прогрессу не только в расшифровке базовых биологических процессов с участием хромосом, но и в понимании болезней человека, обусловленных хромосомными aberrациями.

SMC2 и SMC4 образуют комплекс с тремя другими белками и что этот комплекс, названный им **конденсином**, играет важнейшую роль в конденсации хромосом.

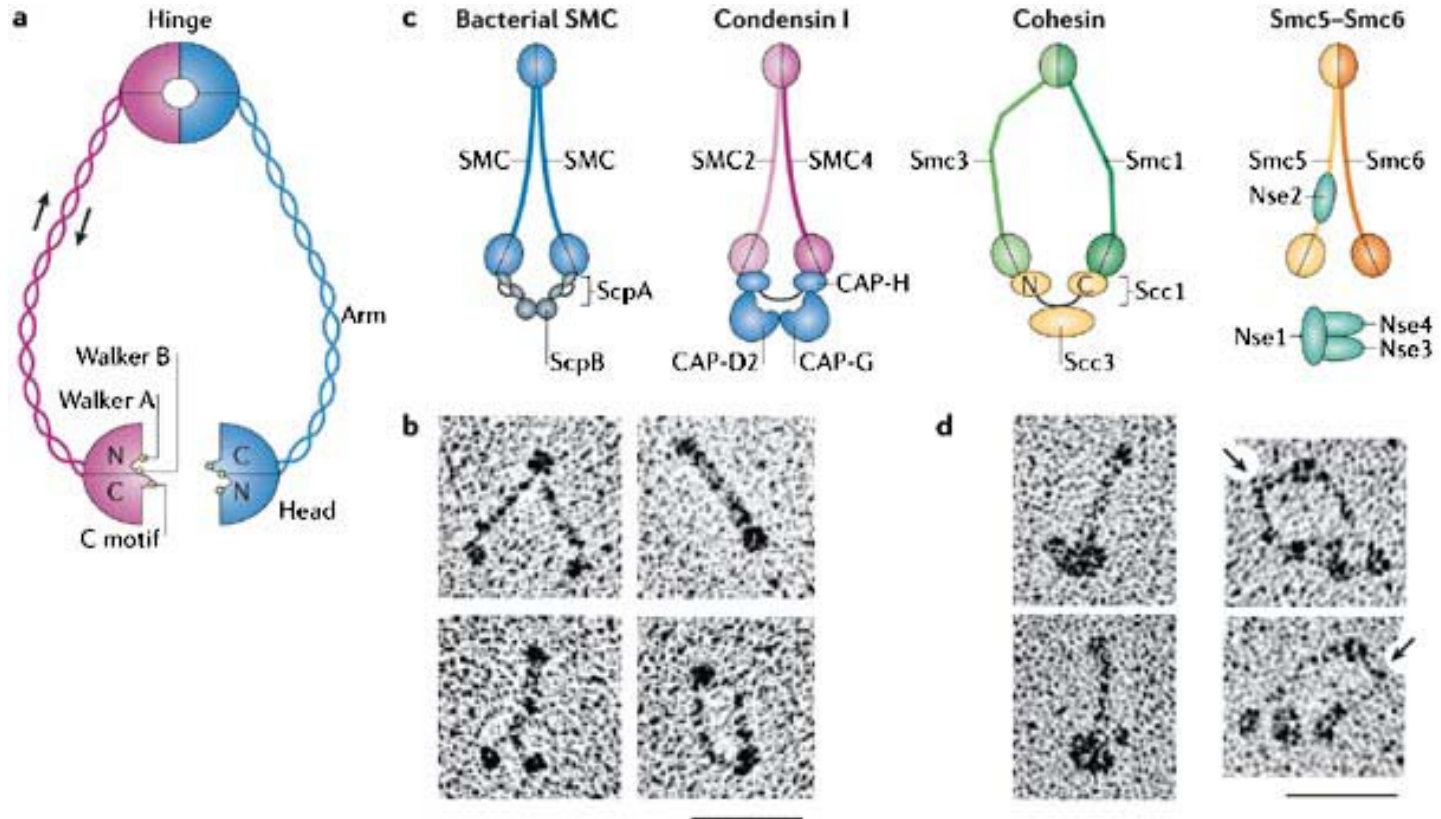


SMC1 и SMC3 комплекс функционирует в качестве «клея», связывающего две сестринские хроматиды. Теперь он известен как **когезин**



белки,
ответственные
конденсацию и
когезию хромосом,
конденсин и
когезин, содержат в
своем основном
компоненте **SMC**,
обладая, таким
образом,
структурным
сходством друг с
другом

Структура белков SMC



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Hirano *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 311–322 (May 2006) | doi:10.1038/nrm1909

В хроматине принято выделять два компартмента

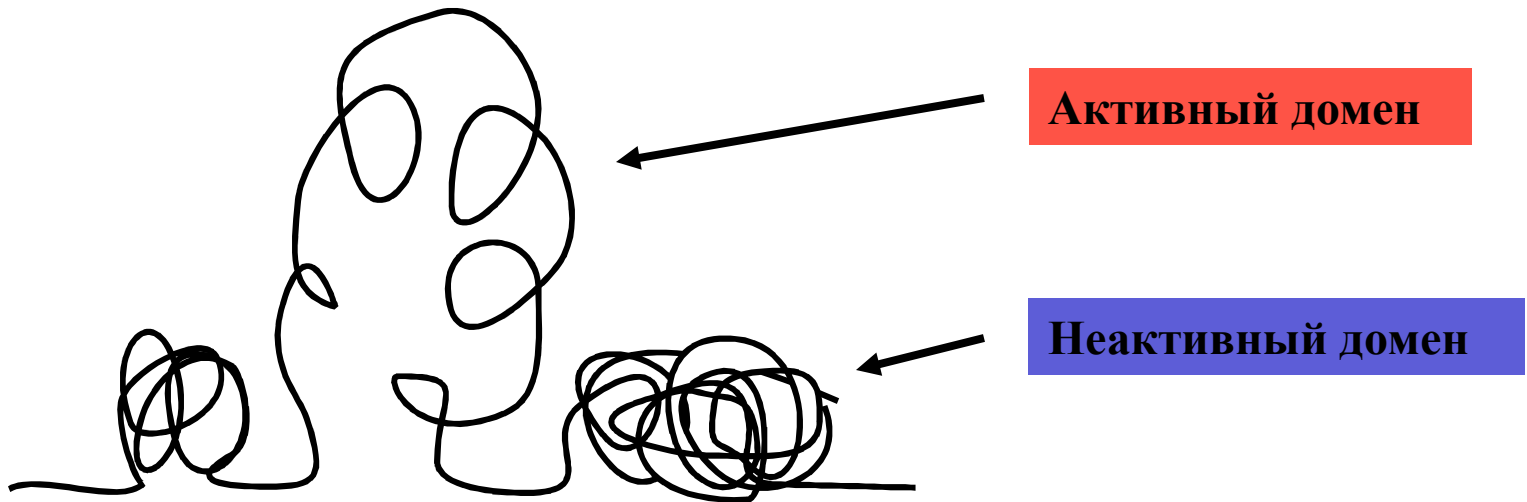
ГЕТЕРОХРОМАТИН – более плотно упакованный хроматин. Содержит преимущественно неактивные гены

ЭУХРОМАТИН – менее плотно упакованный хроматин, содержит как активные, так и неактивные гены

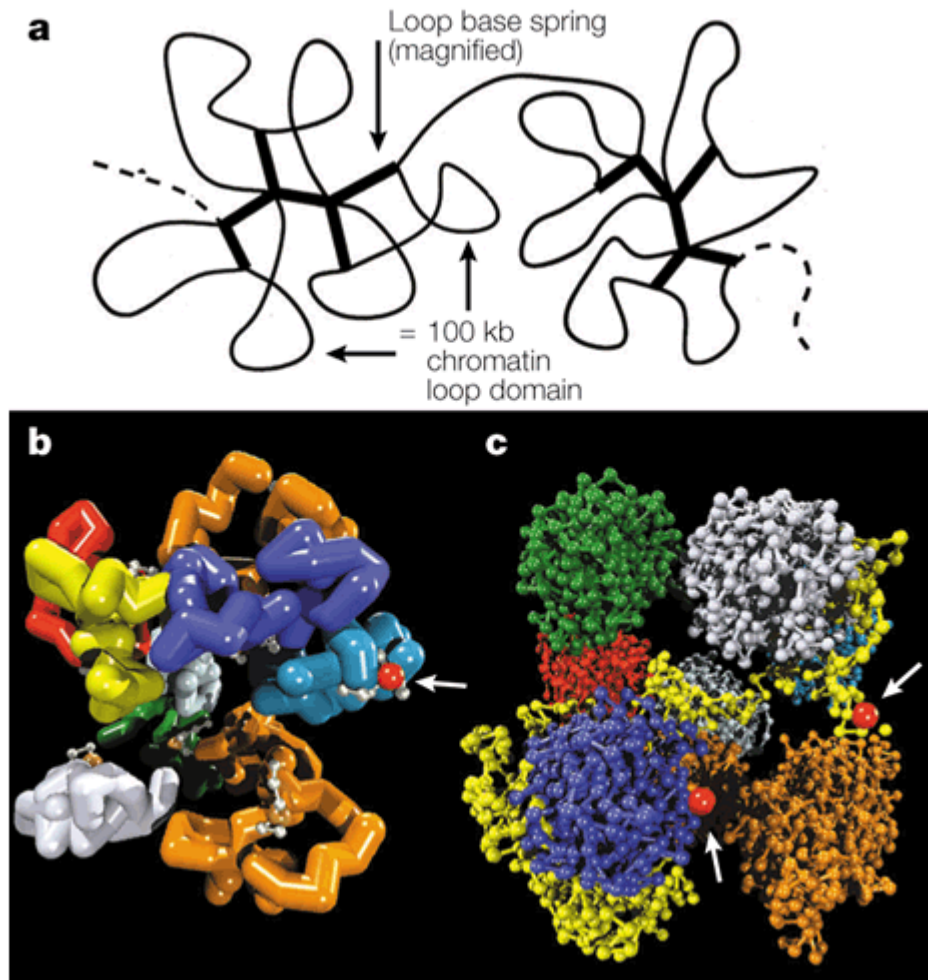
Доменная гипотеза организации эукариотического генома

Весь геном построен из блоков - доменов, которые могут включать один или несколько генов

Транскрипционный статус домена регулируется на уровне упаковки (более компактной или менее компактной) всего домена в интерфазной хромосоме



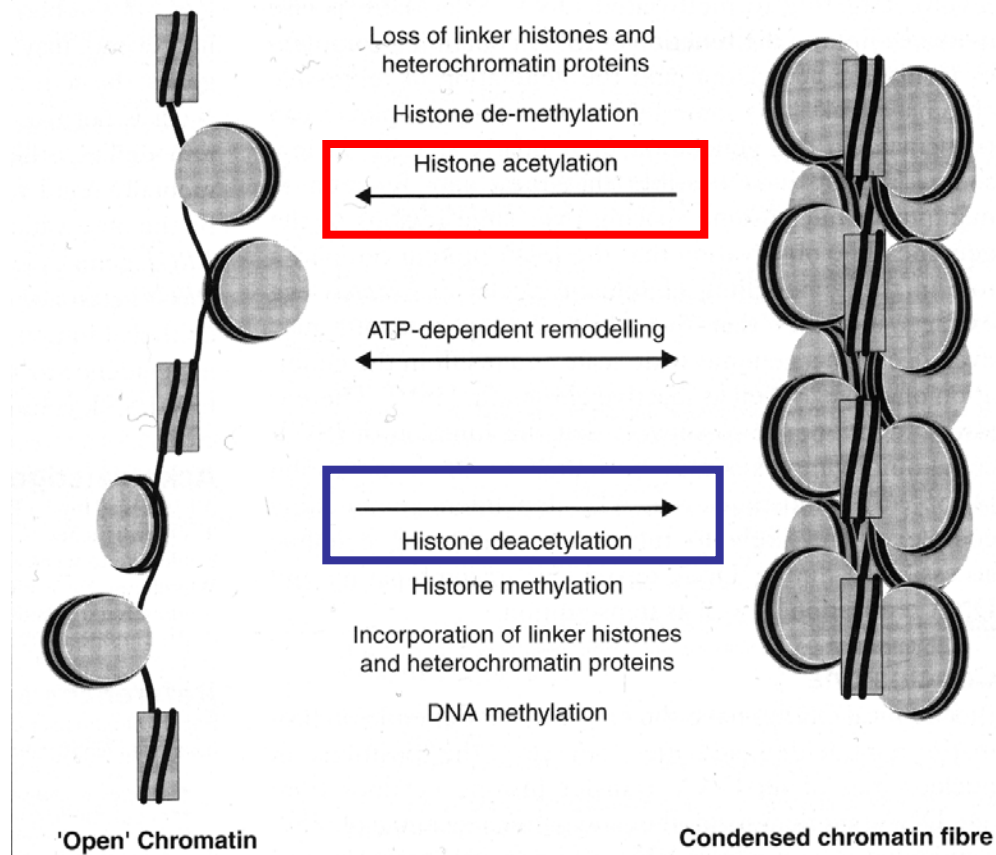
Модель хроматиновых доменов



Nature Reviews | **Genetics**

T. Cremer & C. Cremer

Существует целый ряд факторов, влияющих на степень конденсации хроматина, среди которых наиболее изучено ацетилирование гистонов



Модификации гистонов вносятся и удаляются особыми ферментами, которые, как правило, входят в состав мультисубъединичных комплексов

все модификации обратимы

гистонацетилазы

гистондезацетилазы

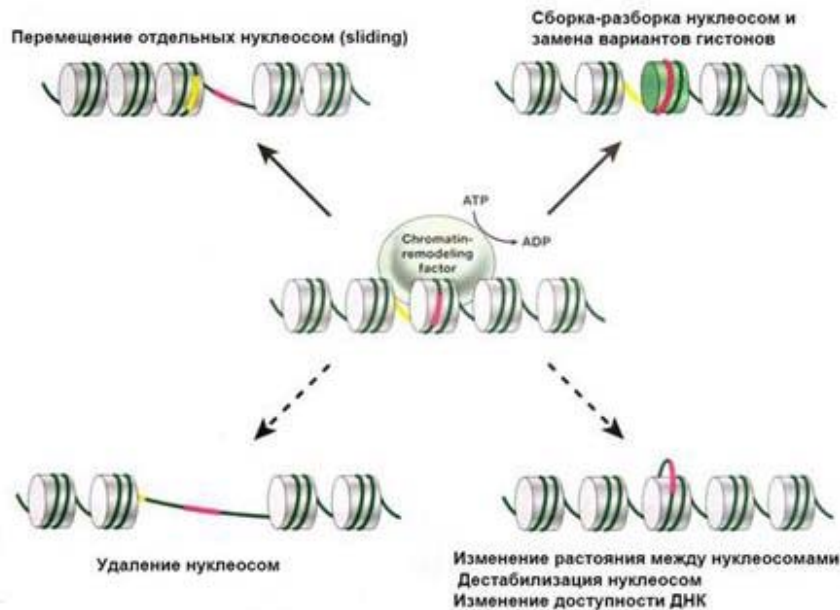
гистонметилазы

гистондеметилазы

АТФ-зависимое ремоделирование хроматина

Хроматин-ремоделирующие факторы представляют собой структурно и функционально различные белковые комплексы, но все они содержат белки из **SNF2-семейства АТФаз**

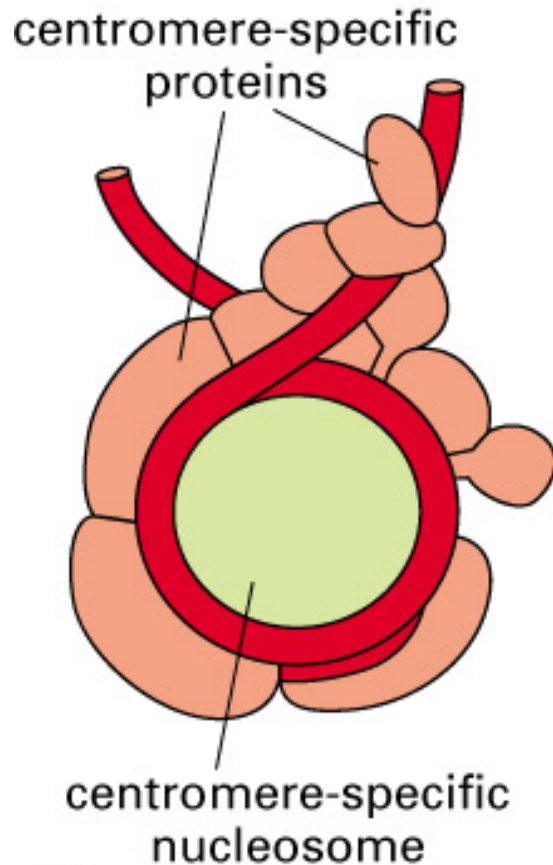
АТФ-зависимые хроматин-ремоделирующие белки модифицируют структуру хроматина, изменяя ДНК-гистоновые контакты



Механизмы:

- Нуклеосомы могут быть собраны в состав хроматина или удалены,
- Коровые гистоны могут быть заменены на варианты,
- Изменение позиций нуклеосом по отношению к последовательности ДНК

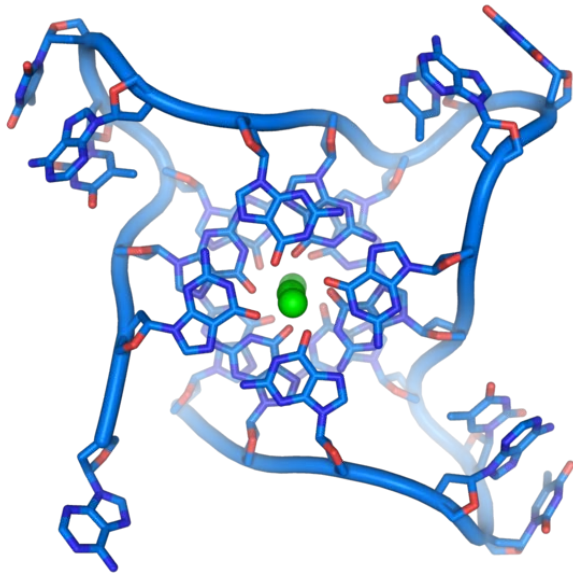
Специализированная нуклеосома центромер



Содержит

- вариант гистона H3 – CENP-A
- центромерный белок – CENP-C

Теломеры



Структура теломер. Зелёным цветом показан ион металла, хелатированный в центре структуры

В клетках человека теломеры часто представлены *одноцепочечной ДНК* и состоят из нескольких тысяч единиц последовательности ТТАГГГ

Четыре гуаниновых основания, находятся в одной плоскости и образуют **G-квадруплексы**

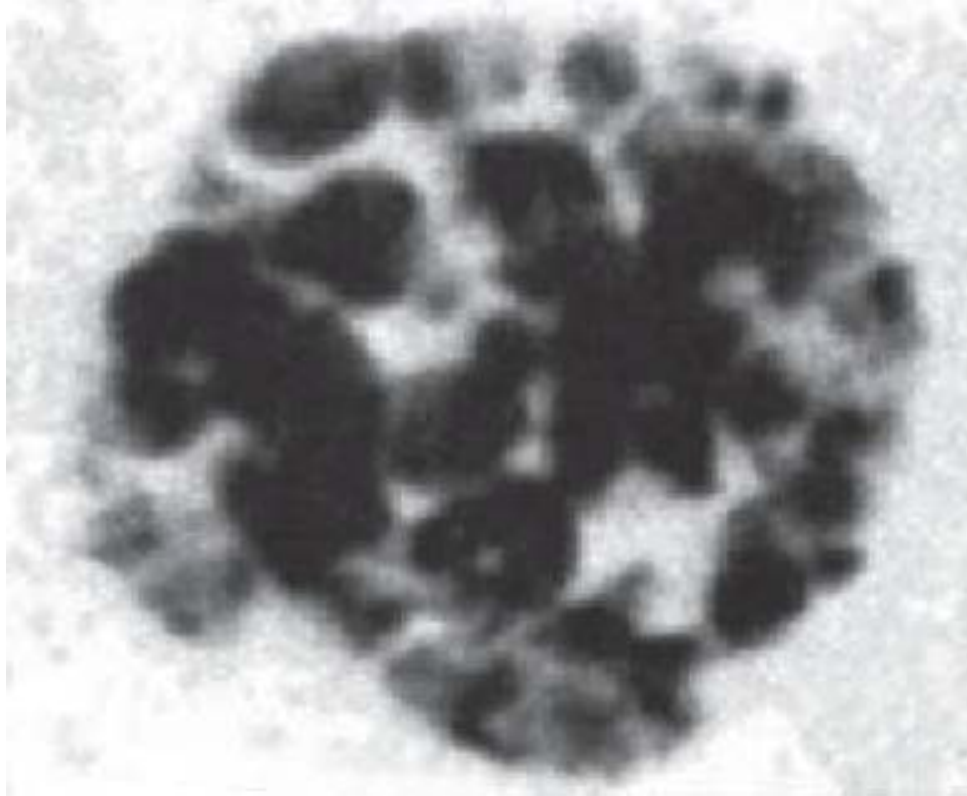
Формируют большие петлеобразные структуры - **теломерные петли** из одноцепочечной ДНК, которая присоединяется к двухцепочечной ДНК и образует **триплекс ДНК**

Хромосомные территории

Отдельные хромосомы занимают в интерфазных ядрах более или менее четко разграниченные области – так называемые хромосомные территории.

Предположение об этом было впервые высказано К. Раблом и Т. Бовери на рубеже XIX и XX веков

В 1977 году Стефан Стэк, Дэвид Браун и Уильям Дэви показали, что во время интерфазы хромосомы остаются на разных территориях



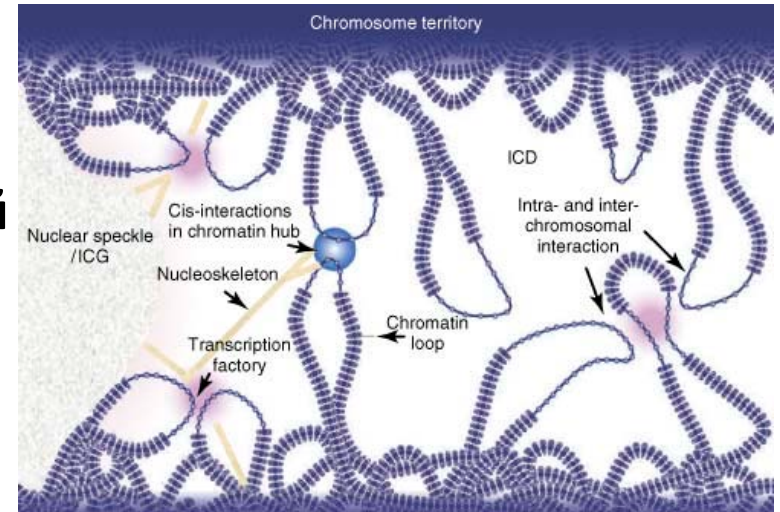
Stack et al. 1977

Интерфазное ядро фиксированной клетки китайского хомячка, окрашенное по Гимза, показывающее скопления хроматина, отображающие отдельные хромосомные территории

Модель хромосомных территорий interchromosome domain (ICD) model

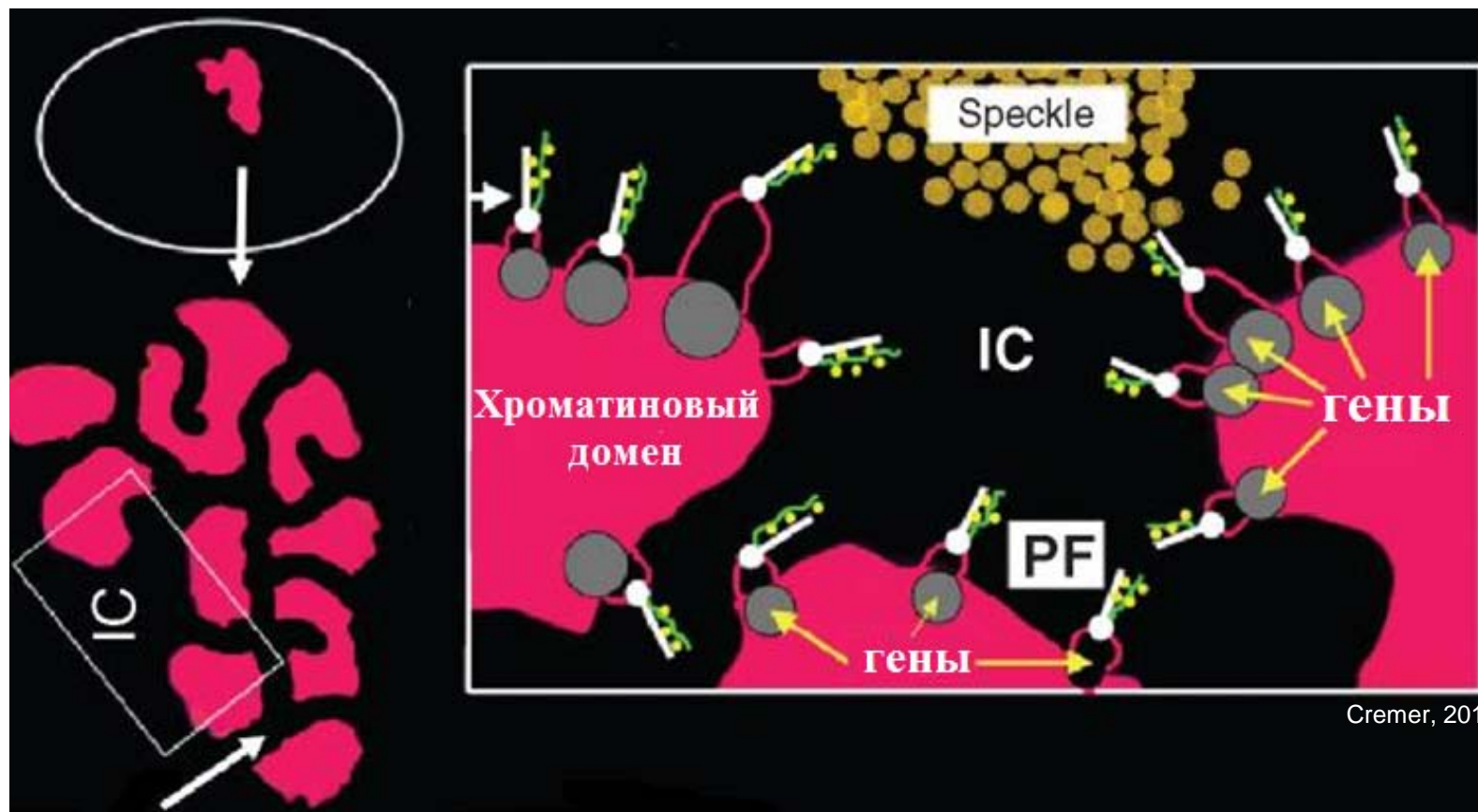
Хромосомные территории, представленные высококонденсированным хроматином, отделены друг от друга системой каналов, получивших название межхромосомных доменов

Транскрибируемые гены локализованы на периферии хромосомных территорий в деконденсированном состоянии в межхромосомном пространстве

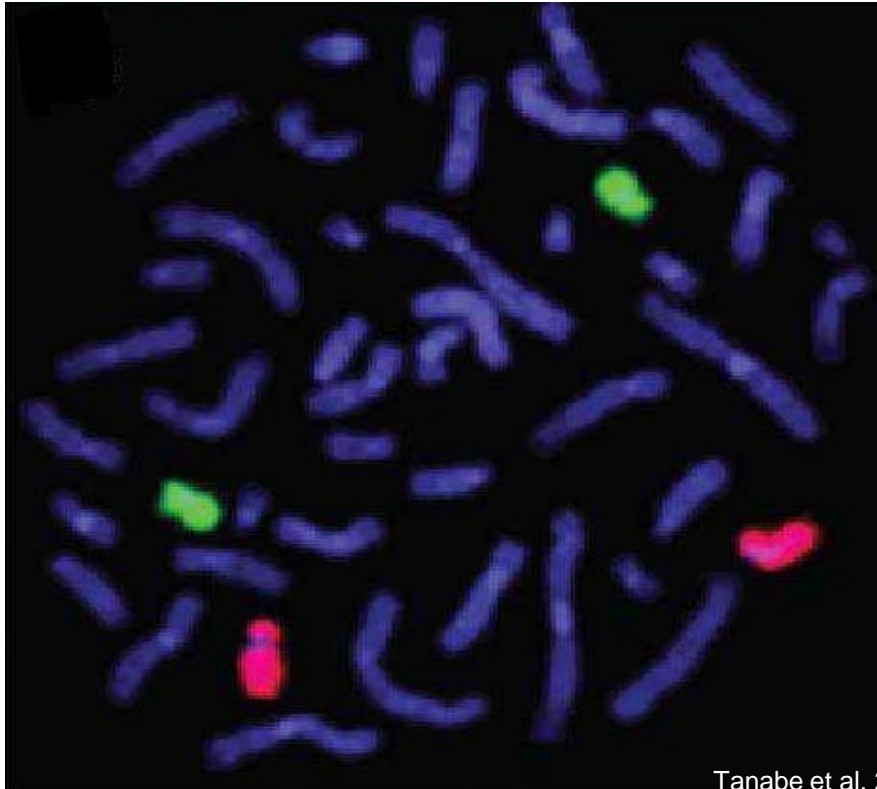


Ответвления межхромосомных доменов - межхроматиновые компартменты – interchromatin compartment (CT-IC) берут начало от ядерных пор и ветвятся внутри хромосомных территорий, формируя сеть каналов, оканчивающихся у доменов хроматина

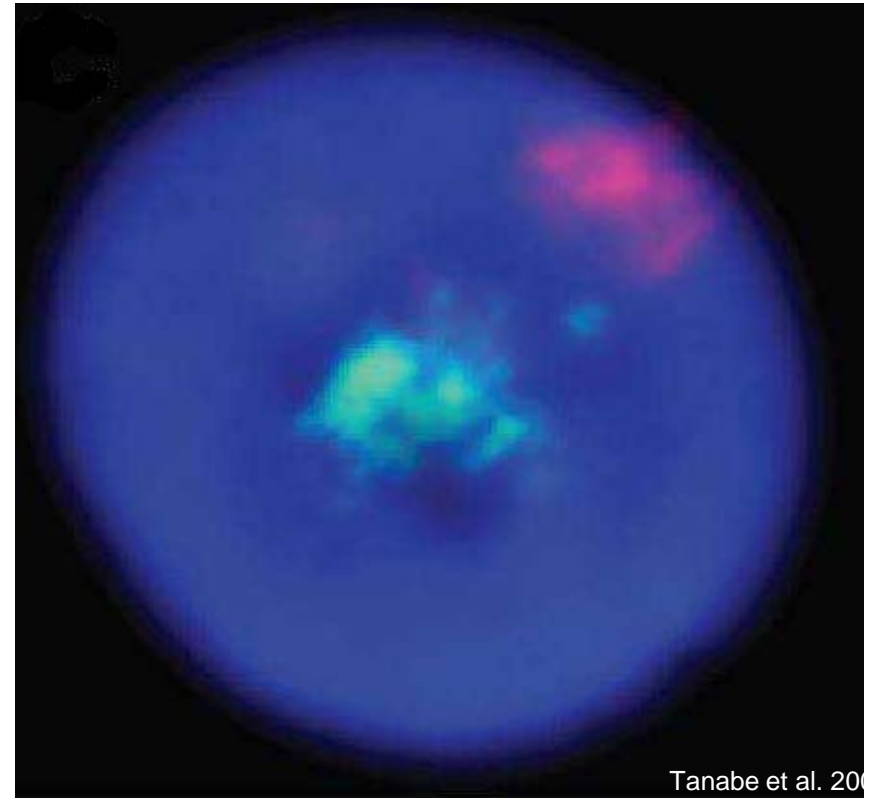
Модель межхроматинового компартмента – interchromatin compartment (CT-IC) model - предполагает, что ядро состоит из двух основных компонентов: хромосомных территорий (CTs) и межхроматинового компартмента (IC).



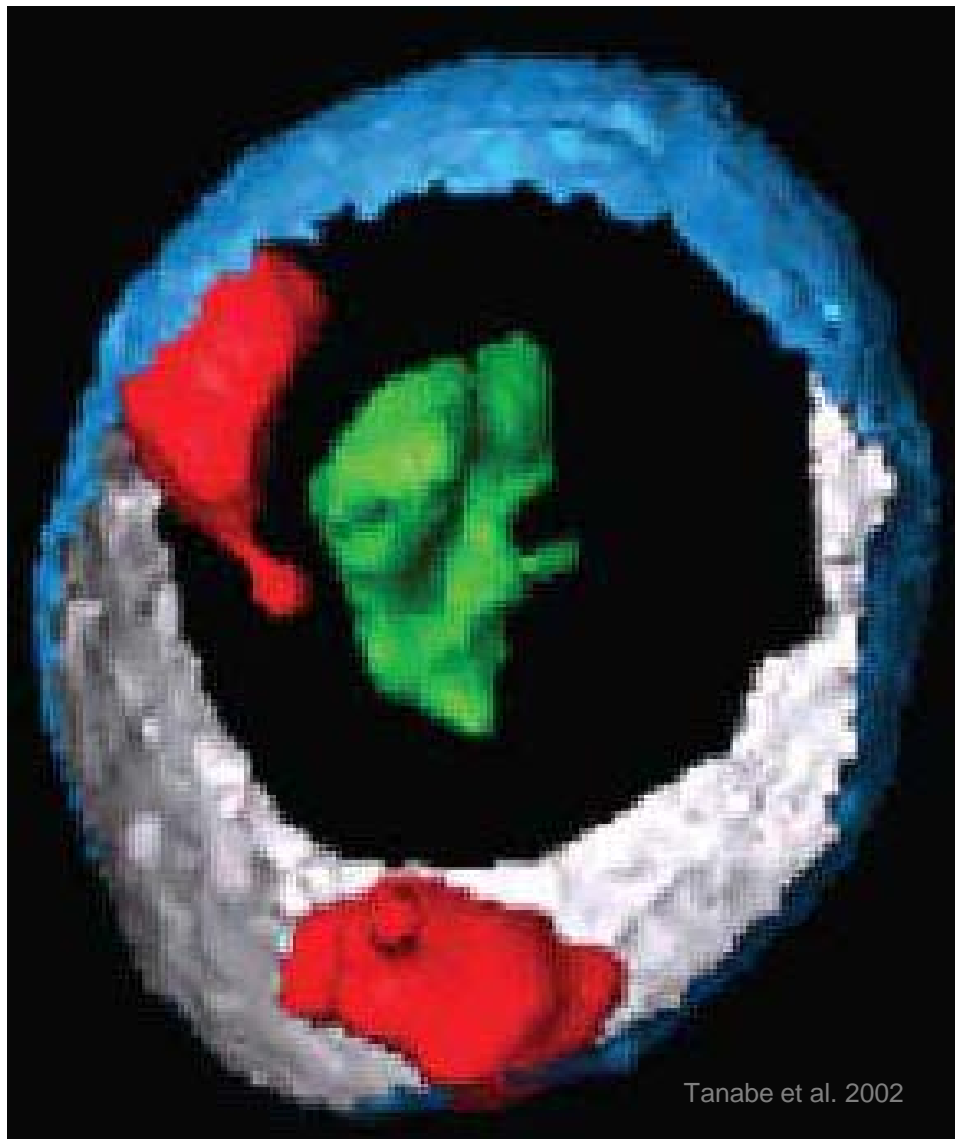
Гибридизация in situ



Микрофотография метафазной пластинки. FISH с использованием специфических окрашивающих зондов (18 хромосома-красная, 19 хромосома- зеленая).



Оптический срез ядра лимфобластоидной клетки человека, полученный с помощью конфокального микроскопа, после 3D FISH с теми же окрашивающими метками.

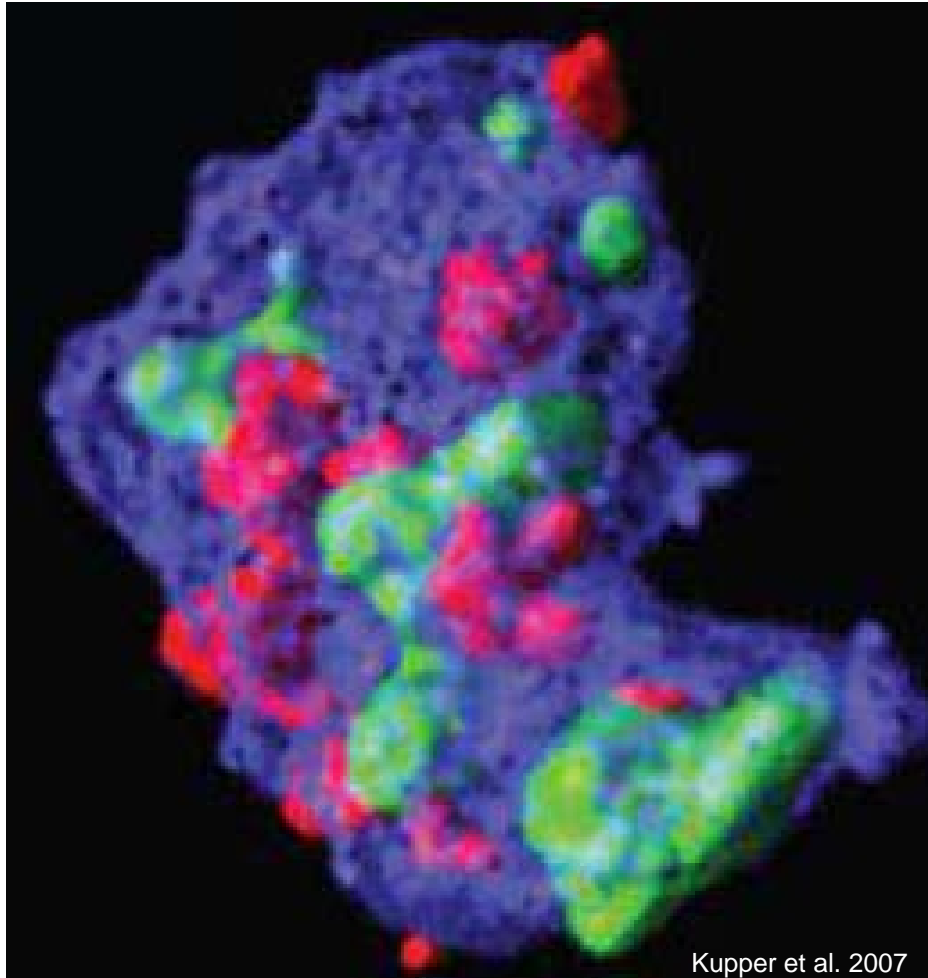


Tanabe et al. 2002

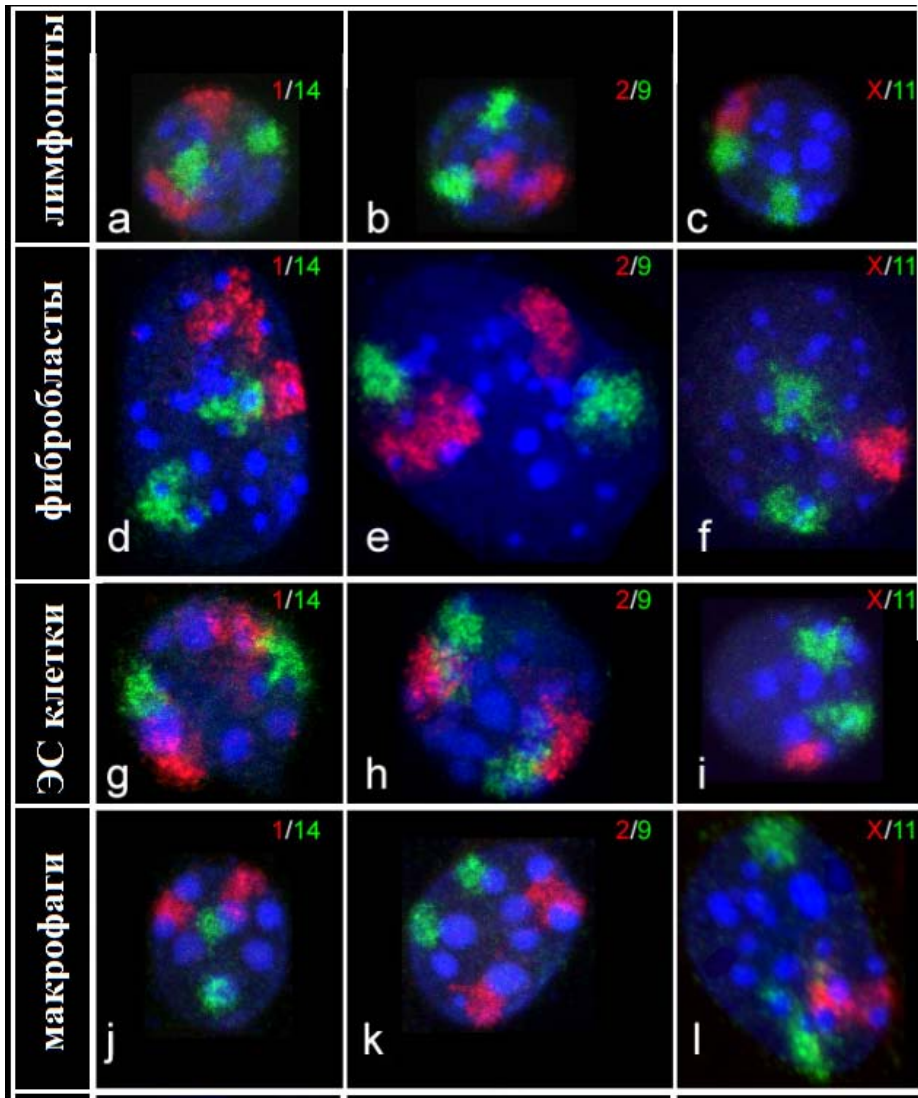
Компьютерная обработка серии оптических срезов позволяет получить трехмерную реконструкцию ядра.

Видно, что обе хромосомы 19 расположены вплотную друг к другу в центре ядра, тогда как хромосомы 18 - порознь и на периферии.

Хромосомные территории, визуализированные с помощью 3D FISH, выглядят как структуры с множеством форм, состоящих из хроматиновых доменов.

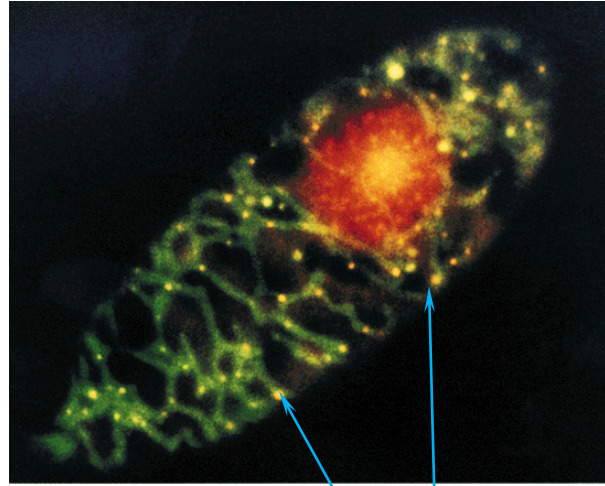
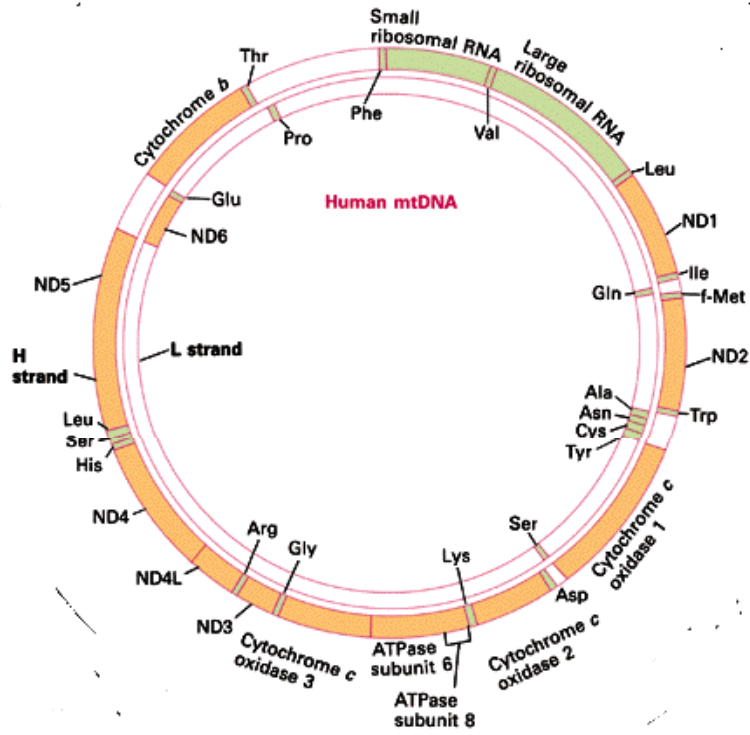


**Активно
экспрессирующиеся и
репрессированные
участки хроматина
равномерно
распределены по всей
хромосомной территории.**

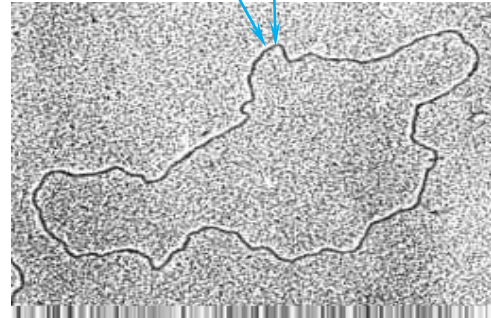


Предпочтительные радиальные позиции индивидуальных хромосом могут различаться в клетках, дифференцированных по разным путям (на примере хромосом мыши в разных типах клеток)

Внехромосомная ДНК эукариот содержится в митохондриях и пластидах



Митохондриальная ДНК



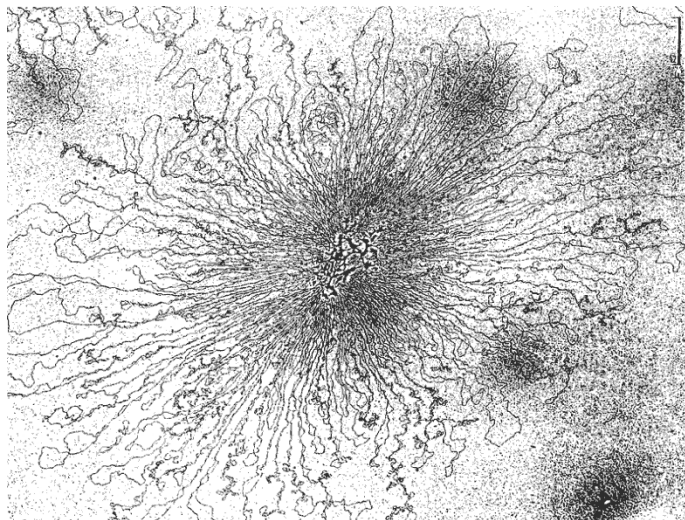
Организация митохондриальной ДНК человека

- **Митохондриальная ДНК имеет циклическую структуру.**
- **Намного меньше ядерного генома, организована компактно (человек - 16.5 т.п.н., дрожжи - 85 т.п.н., арбуз 2500 т.п.н.)**
- **У человека:**
 - **~ 10 идентичных молекул на митохондрию (100-10,000 митохондрий на клетку)**
 - **37 генов; интронов нет (есть у *S. cerevisiae*)**
 - **Единственный регуляторный регион – *D-петля*, других некодирующих последовательностей нет.**
 - **13 генов, кодирующих субъединицы комплексов дыхательной цепи I, III, IV и V**
 - **24 нетранслируемых гена (2 – рРНК и 22 – тРНК)**

Организация прокариотического генома

Геномы прокариот включают два типа генетических структур

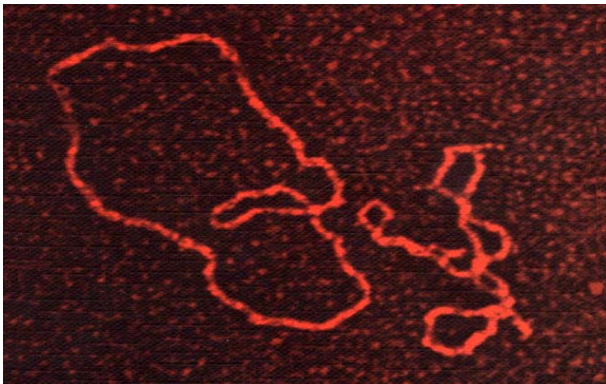
- нуклеоид (аналог хромосомы)
- внехромосомные элементы (плазмиды, способные к автономной репликации)



**Изолированный нуклеоид E.coli.
Хорошо различимы расправленные
петли ДНК. Отрезок соответствует
1µm.**

Внехромосомные элементы бактерий – Плазмиды

- Плазмиды – это небольшие кольцевые (иногда линейные) экстрахромосомные молекулы ДНК, способные к автономной репликации.
- Размеры плазмид варьируют от 2 000 до 200 000 и более п.н.
- Плазмиды, способные существовать в двух состояниях – автономном и интегрированном в нуклеоид, называют **эписомами**.
- Конъюгативные плазмиды содержат гены переноса и обеспечивают у бактерий процесс конъюгации
- Плазмиды содержат гены, обеспечивающие дополнительные свойства бактериальной клетки (например, устойчивость к антибиотикам)



Электронная микрофотография
плазмидных кольцевых молекул ДНК

Вариабельность геномов

Под видовым геномом следует понимать совокупность всех генов (и базовых, и вспомогательных) всех штаммов данного вида.

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида

Консервативный базовый набор (core)

включает гены так называемого **«домашнего хозяйства»**, ответственные за системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую/родовую принадлежность

В категорию вариабельной (гибкой) части

входят гены, контролирующие процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие ***приспособленность к определенной экологической нише.***

РАЗМЕРЫ И СТРУКТУРА ГЕНОМОВ

Кольцевые (большинство)

Линейные (*структура отличается от эукариотических*)

Вид	Организация генома
Agrobacterium tumefaciens	1 линейная и 1 кольцевая
Bacillus subtilis	1 кольцевая
Borrelia burgdorferi	2 кольцевые
Escherichia coli	1 кольцевая
Paracoccus denitrificans	3 кольцевые
Streptomyces griseus	1 линейная
Vibrio cholerae	2 кольцевые

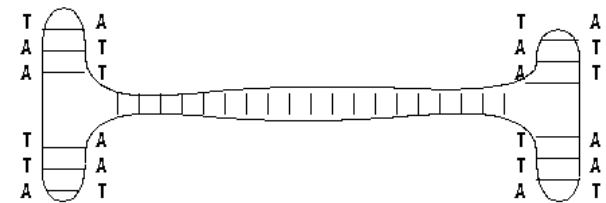
Типы линейных хромосомы бактерий

Отличается от эукариотических, которые имеют специальные концевые последовательности, теломеры, и используют при репликации теломеразу

Hairpins

имеют ковалентно замкнутые «шпилечные» концы, (у спирохет рода *Borrelia*)

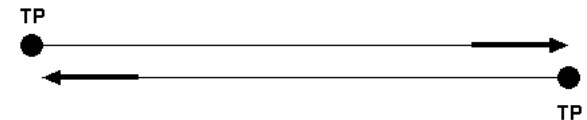
Hairpins

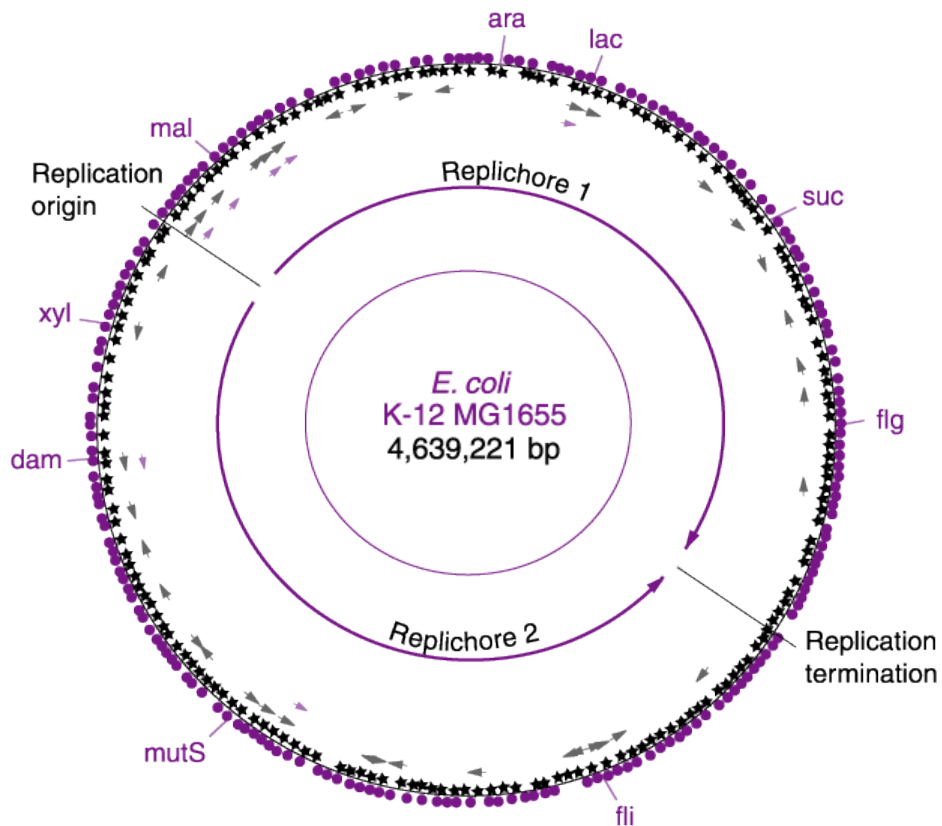


Invertons

На 5'-концах линейных хромосом имеются длинные концевые инвертированные повторы, к которым ковалентно присоединены белки, обеспечивающие инициацию репликации (у стрептомицетов)

Invertons





Репликон — молекула или участок ДНК или РНК, реплицирующийся из одной точки начала репликации

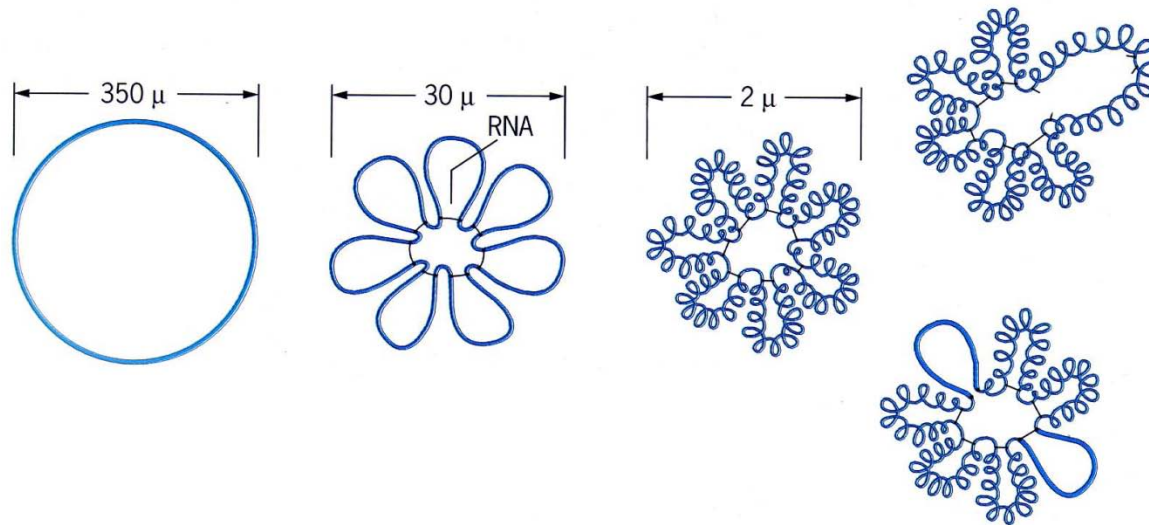
Реплихоры - функциональные единицы репликации

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NC_000913.3	U00096.3	4.64	50.8	4,140	22	89	67	4,498	184

Компактизация прокариотической ДНК

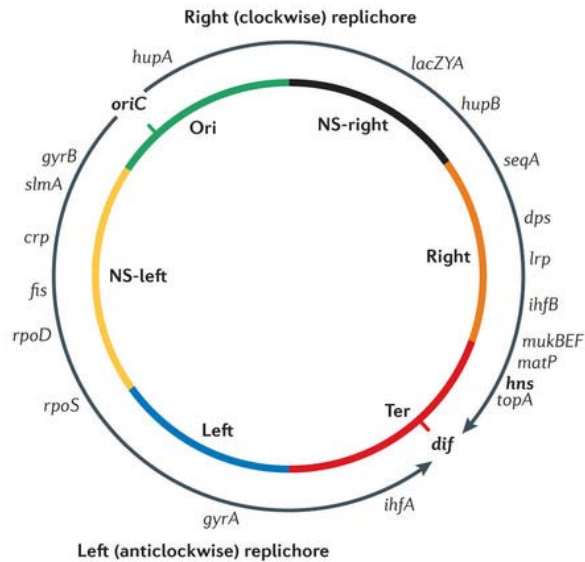
- У *E. coli* протяженность хромосомной ДНК равна 1300 мкм (1,3 мм – $4,6 \times 10^6$ п.н.), а размер клетки 1,1-1,5 x 2,0-6,0 мкм. Причем ДНК не заполняет всю клетку, а содержится только в ограниченной области, составляющей, приблизительно, одну треть объема клетки.
- Бактериальные хромосомы всегда связаны с плазматической мембраной через специфические мембранные белки, которые взаимодействуют с ДНК в зоне старта ее синтеза. ***В процессе клеточного деления существенных изменений в компактности нуклеоида не наблюдается***, в отличие от эукариотических хромосом.

Компактизация прокариотической ДНК

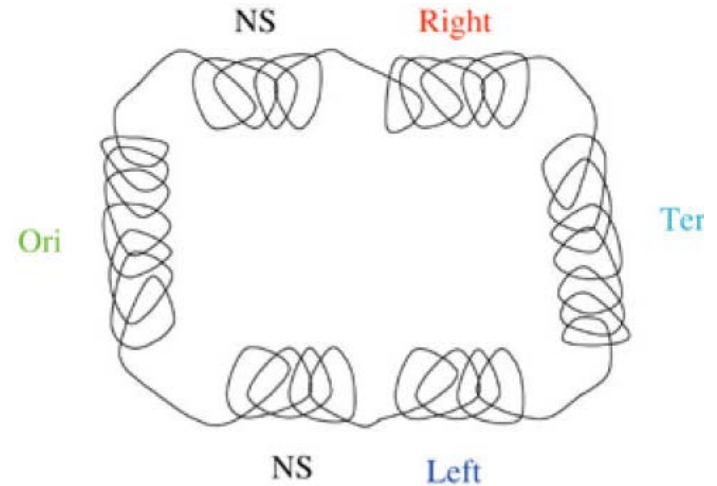


Хромосома с помощью РНК и белков многократно складывается, образуя многочисленные петли, ДНК которых подвергается сверхспирализации, что приводит к значительной компактизации всего комплекса, который и представляет собой нуклеоид. Степень компактизации ДНК в нуклеоиде бактерий достигает 1000 крат

a



Nature Reviews | Microbiology



Valens, M., Penaud, S., Rossignol, M., Cornet, F. & Boccard, F. Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.* **23**, 4330–4341 (2004)

Кольцевая хромосома *E. coli* состоит из четырех макродоменов (Ori, Ter, Right и Left) и двух неструктурированных регионов (NS).

Бактерии имеют разнообразные наборы белков, которые в совокупности обеспечивают формирование компактного и динамичного нуклеоида

Факторы, обеспечивающие организацию нуклеоида

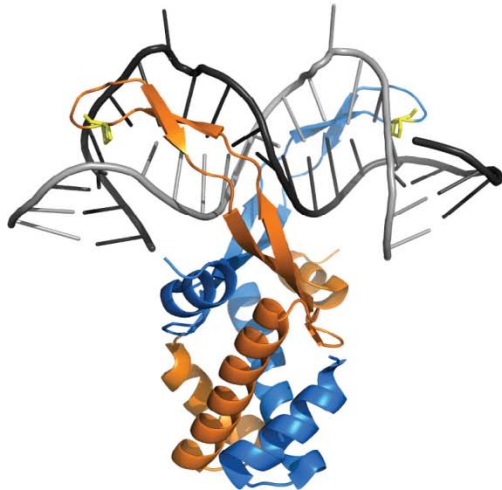
- I. Отрицательная ДНК сверхспирализация – обеспечивается действием ДНК-гиразы**

- II. Пространственное ограничение в цитоплазме за счет формирования архитектуры нуклеоида ДНК-связывающими белками (NAPs – nucleoid associated proteins)**

NAPs (nucleoid associated proteins)

➤ **Первая группа NAPs** вызывают локальную деформацию или изгиб ДНК:

- HU (heat-unstable nucleoid protein)
- FIS (Factor for inversion stimulation)



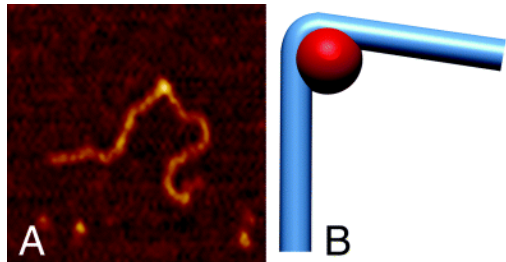
HU protein



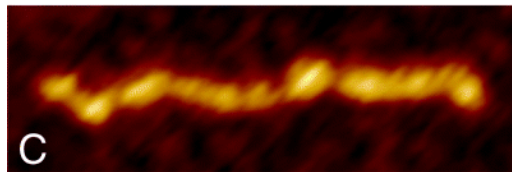
FIS protein

**Димеры белков
связываются с ДНК
и изгибают ее**

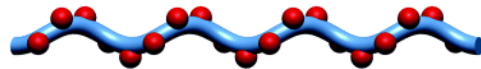
Роль нуклеоид-ассоциированных белков в организации и уплотнении бактериального хроматина



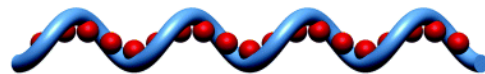
 HU (heat-unstable nucleoid protein)



Связывание HU с ДНК приводит к образованию суперспирализованных филаментов



D



E

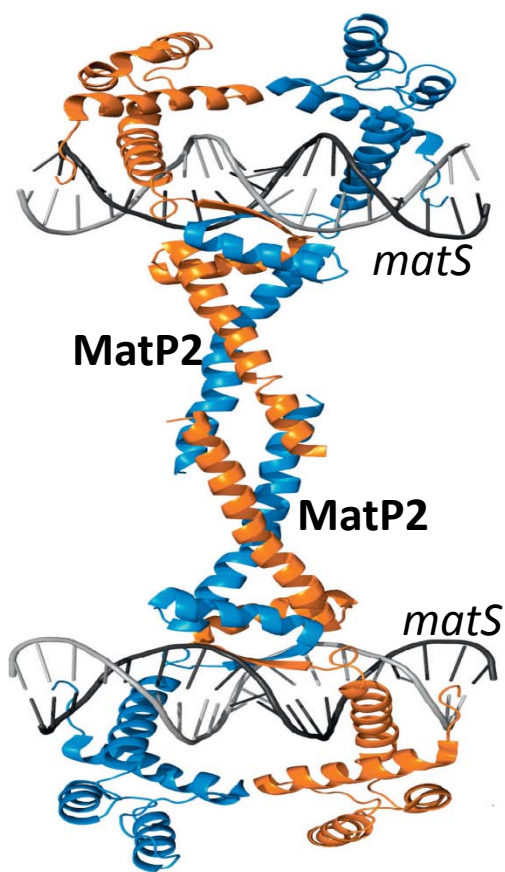
Molecular Microbiology
[Volume 56, Issue 4](#), pages 858-870, 24 MAR 2005 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x

Формирование и внутриклеточное позиционирование крупных хромосомных субдоменов не может быть результатом только простого изгиба ДНК

DNA bridges

Общим механизмом формирования изолированных доменов бактериальных хромосом является

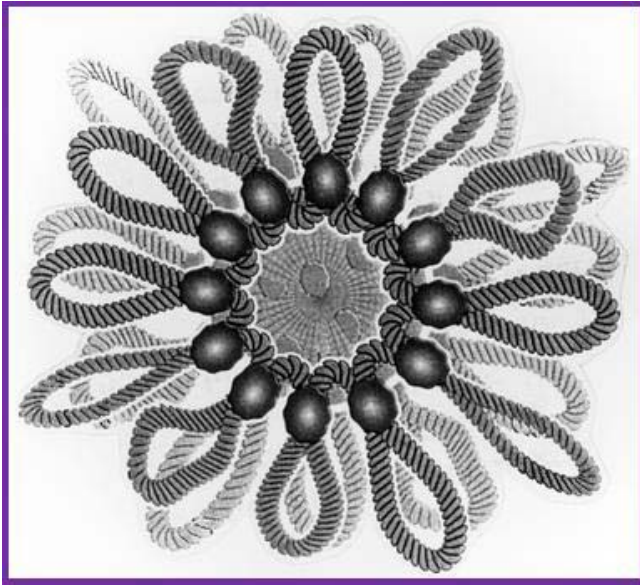
взаимодействие отдаленных сегментов ДНК посредством белковых «мостиков» -
вторая группа NAPs :



- 1. MatP** белковые димеры присоединяются к своим сайтам узнавания на ДНК *matS*, взаимодействуют между собой с образованием *тетрамеров* и конденсируют часть хромосомы порядка 800 т.п.н. в **макродомен**.

DNA bridges

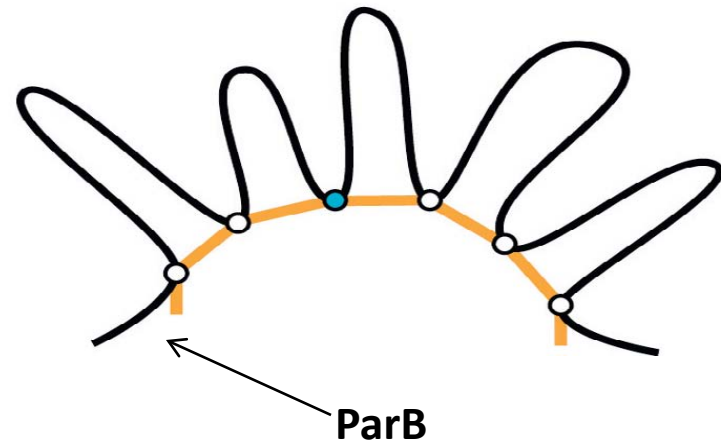
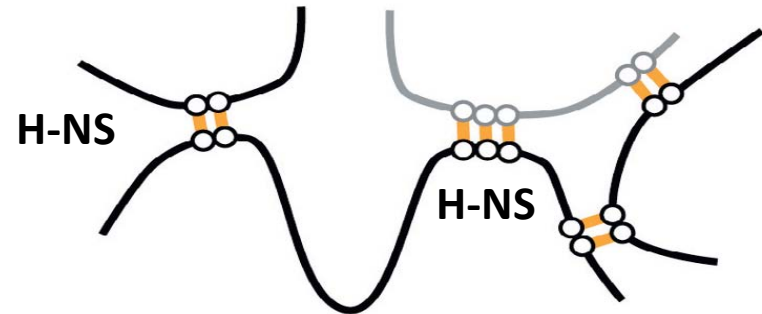
Вторая группа NAPs



Организация суперспиральных петель связана нуклеоид-ассоциированными белками:

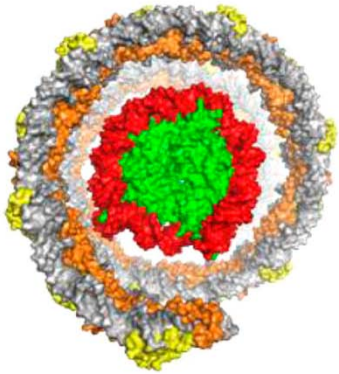
2.H-NS

3.ParB



Каждый *макродомен* состоит из суперспирализованных ДНК-петель, размером около 10 т.п.н.

A



B



H-NS - histone-like
nucleoidstructuring
protein

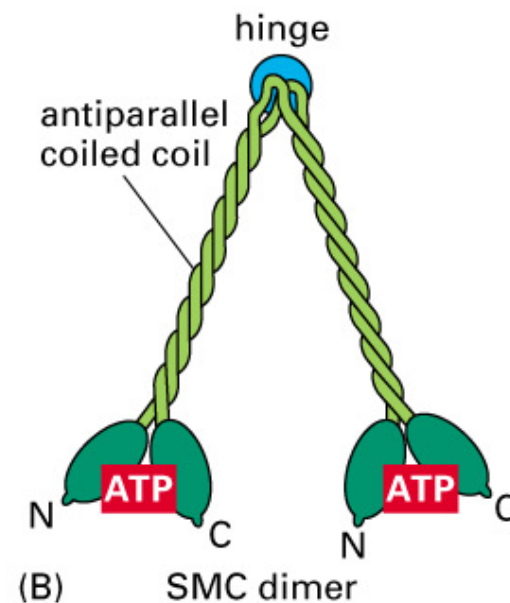
H-NS

- обеспечивает конденсацию ДНК в нуклеоид
- контролирует доступ белков, необходимых для транскрипции генов.

SMC - Structural Maintenance of Chromosomes

Белковые комплексы SMC высоко консервативны и почти повсеместно присутствуют в бактериях, а также у архебактерий и эукариот

Они имеют решающее значение для сегрегации хромосом бактерий и имеют очень необычную архитектуру

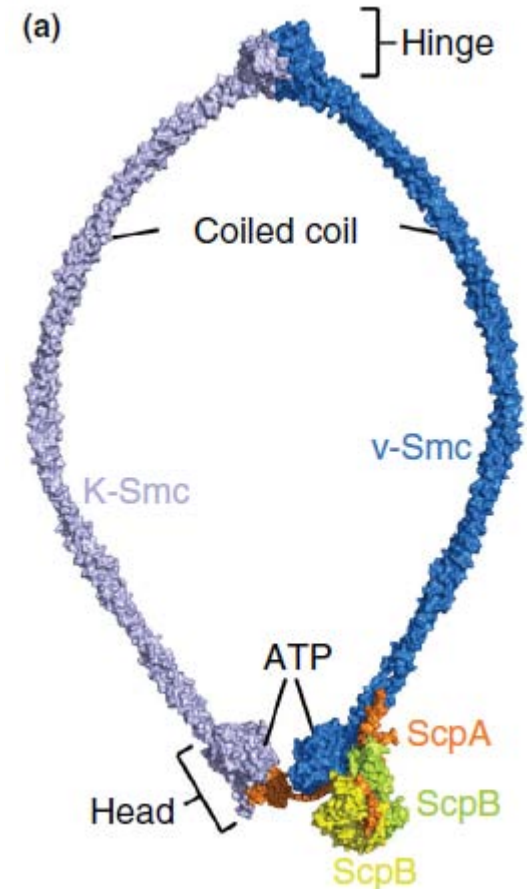


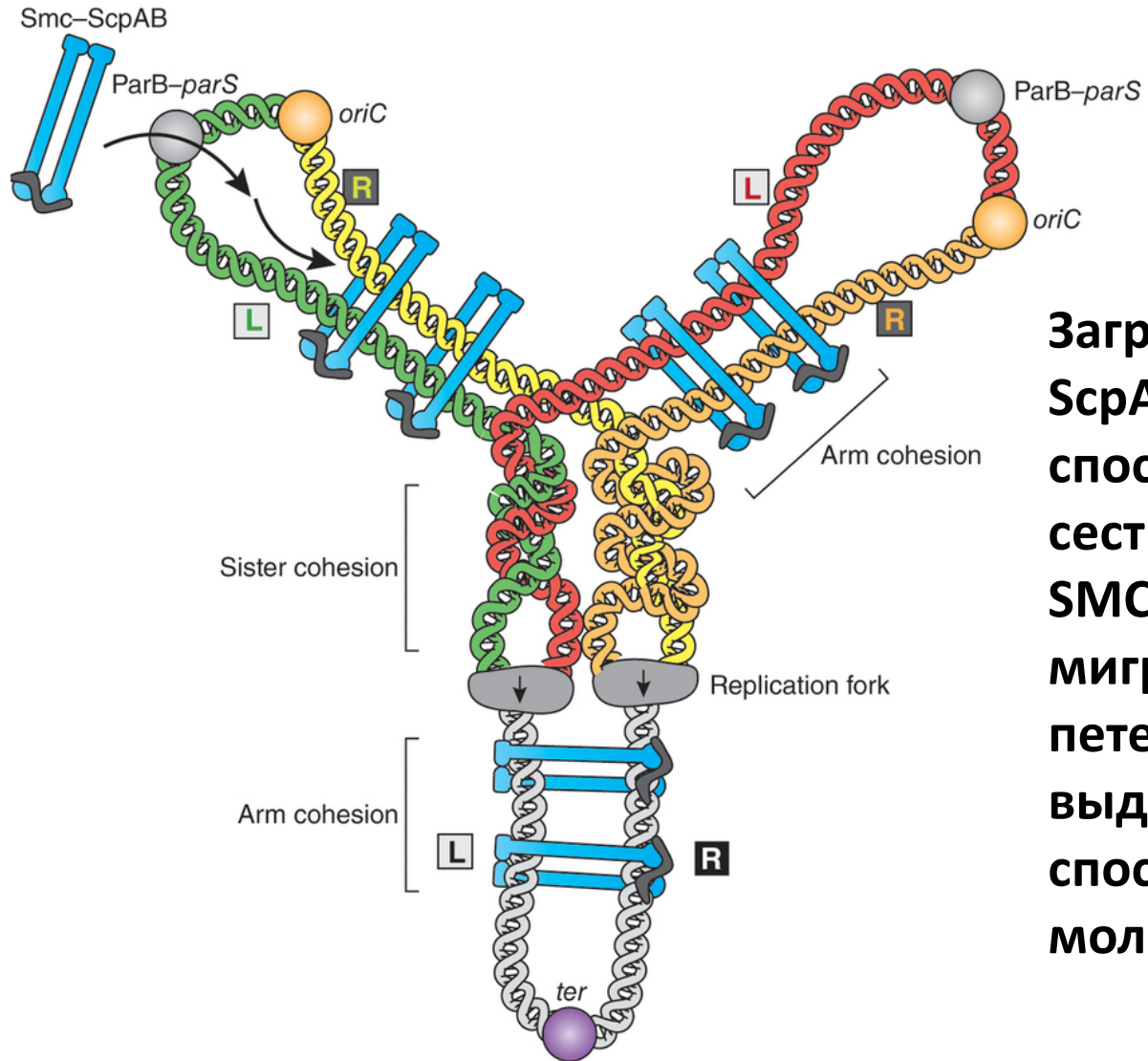
Структура белков SMC

центральный шарнирный домен соединяет два **длинные суперскрученных плеча**, каждое из которых имеет **АТФ-связывающий домен**

SMC взаимодействует специфически с двумя non-SMC субъединицами

ScpA и **ScpB**, что стабилизирует контакт головка-головка SMC путем супрессии его АТФазной активности





Загрузка комплекса SMC-ScpAB через ParB-ParS сайты способствует разделению сестринских хромосом. SMC-ScpAB могут мигрировать вдоль крупных петель ДНК и активно выдавливать их, тем самым способствуя разделению молекул ДНК

Роль нуклеоид-ассоциированных белков NAPs в организации и компактизации бактериального хроматина

Изгибающие белки

HU protein

FIS protein

ДНК- мостики

1. MatP – формирует макродомены

2. H-NS – Фиксация ДНК-петель,
3. ParB – размером около 10 т.п.н.

Белковый комплекс SMC

- Способствует сегрегации хромосом при делении клетки
- Удержание вместе новореплицированных сестринских ДНК
- Содействие репарации ДНК