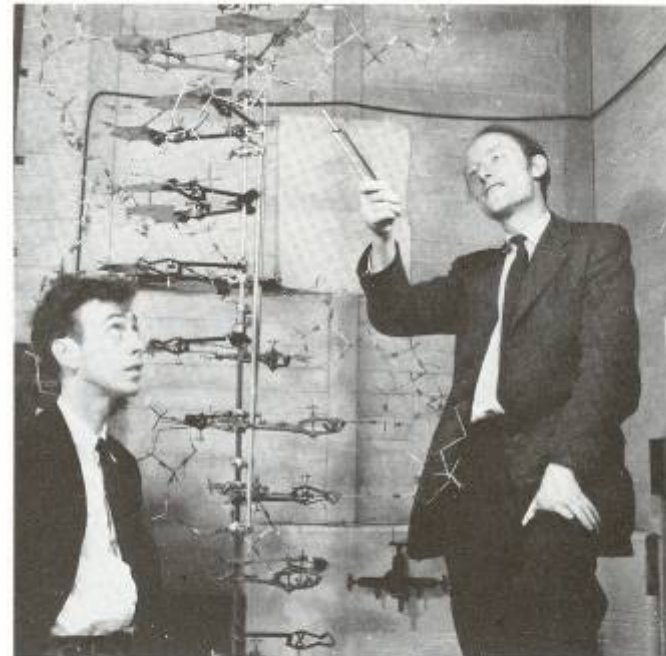


Chromatin

Struktura a
modifikace
chromatinu

Chromatinové
domény

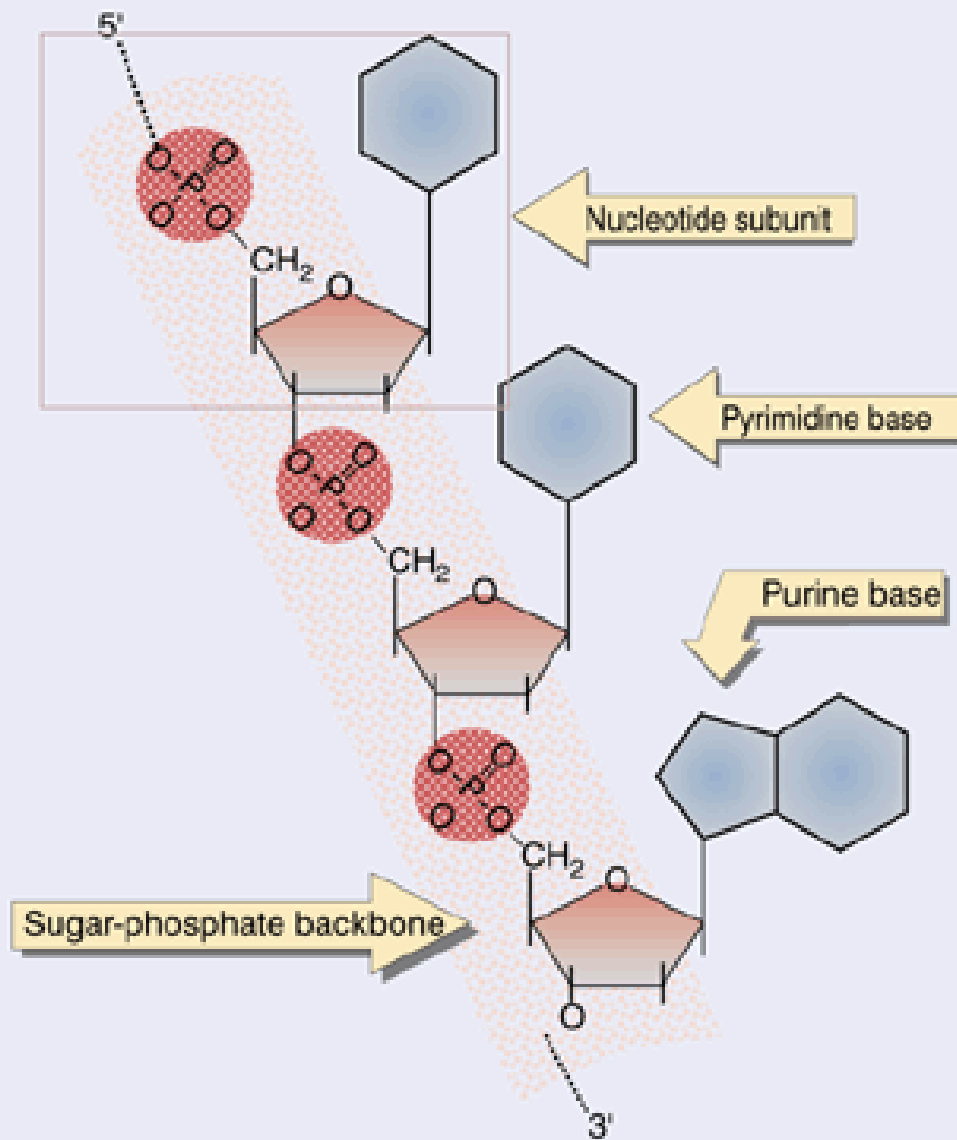


▲ **Figure I-12** (left) James D. Watson (1928–) and (right) Francis H. C. Crick (1916–) with the double-helical model of DNA they constructed in 1952–1953. From J. D. Watson, *The Double Helix*, Atheneum, p. 215, copyright 1968 by J. D. Watson. Courtesy of A. C. Barrington Brown.

2

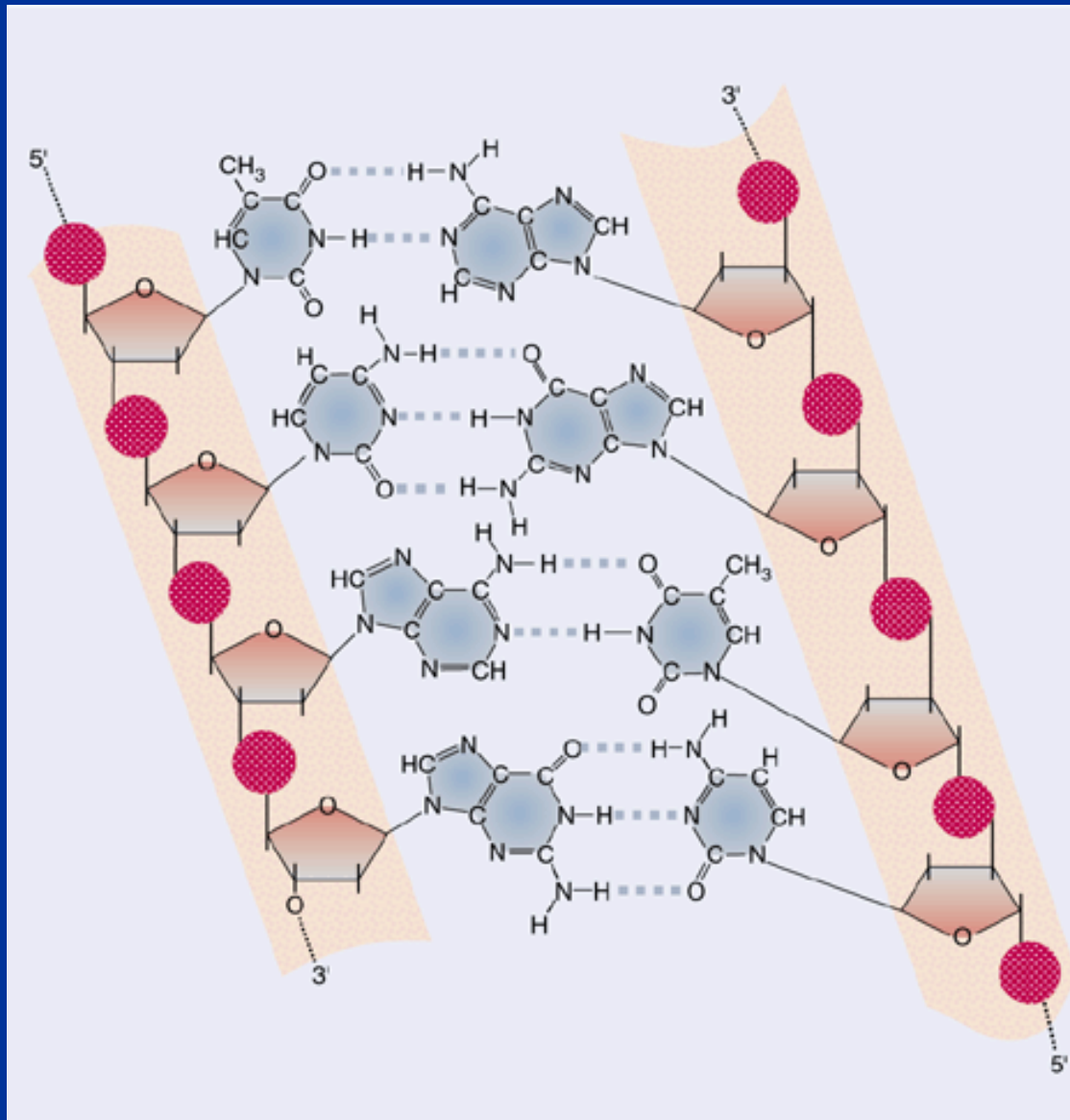
DNA

konsensus 5' → 3'

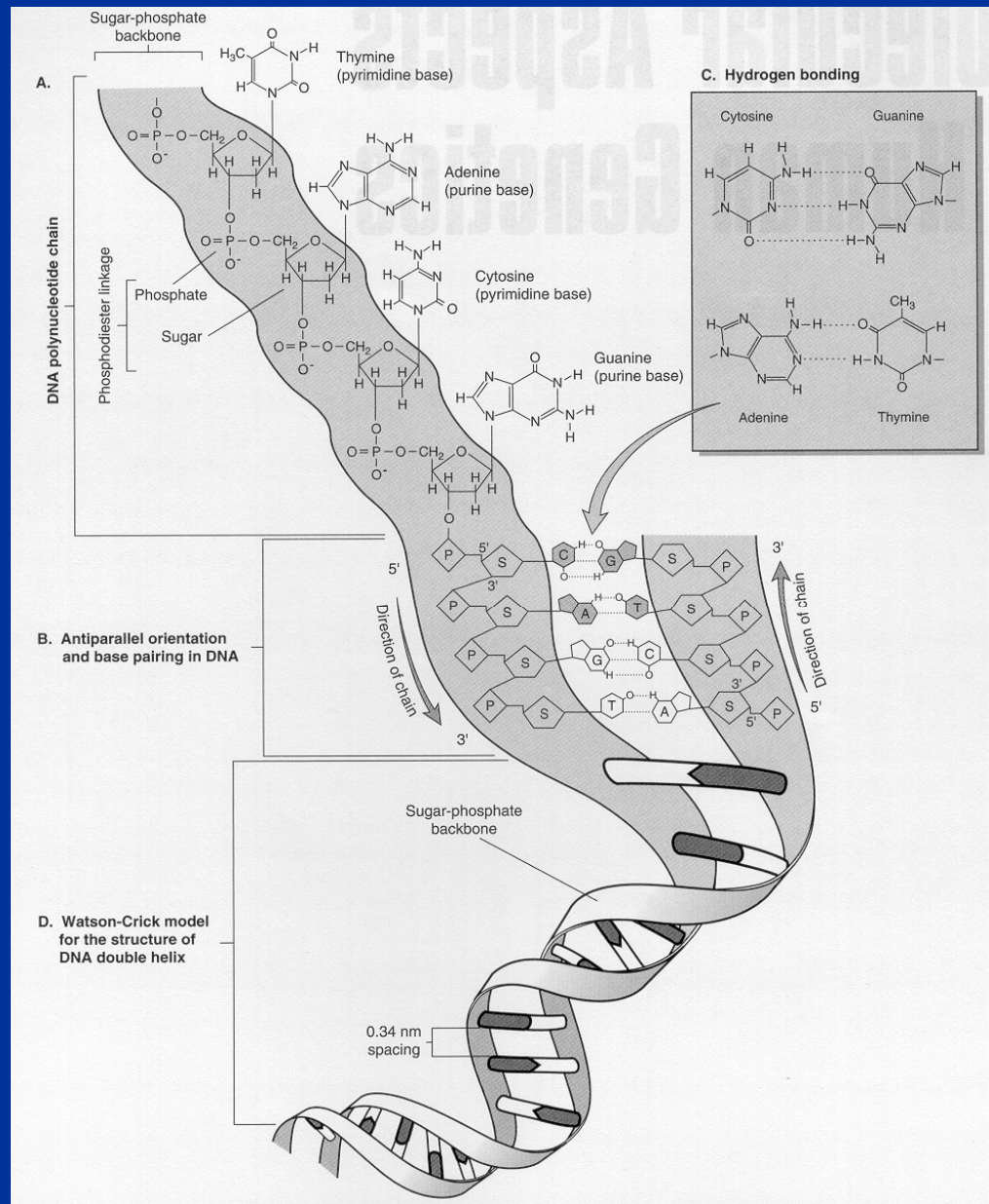


3

DNA



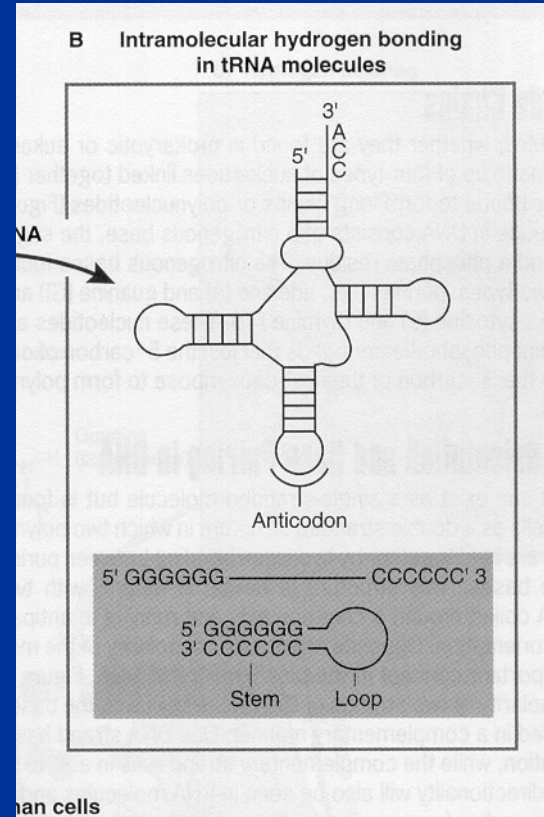
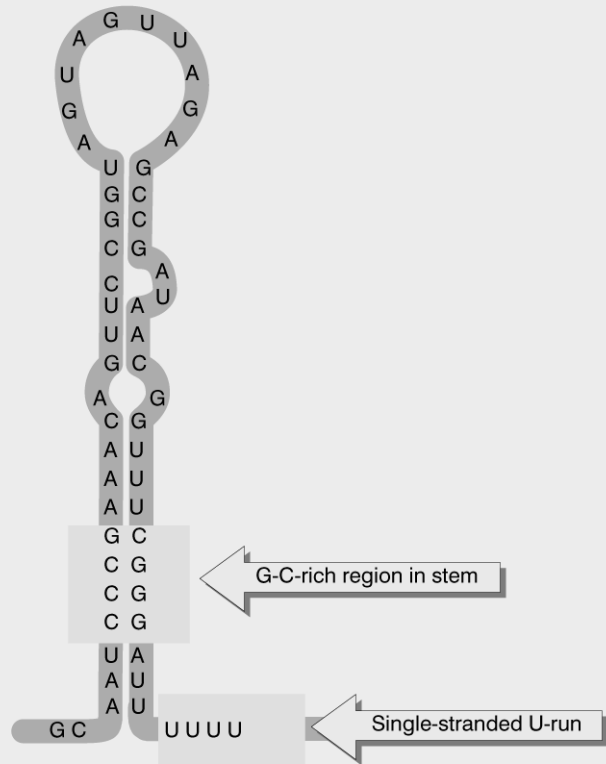
DNA



4

RNA

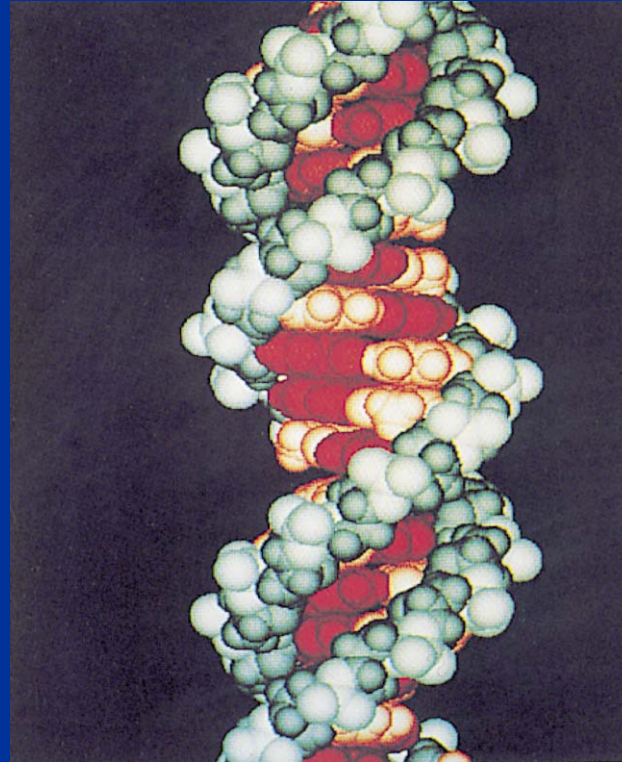
Figure 9.27 Intrinsic terminators include palindromic regions that form hairpins varying in length from 7 to 20 bp. The stem-loop structure includes a G-C-rich region and is followed by a run of U residues.



5

- ss RNA tvoří sekundární strukturu s ds vlásenkami

ds forms of nucleic acids

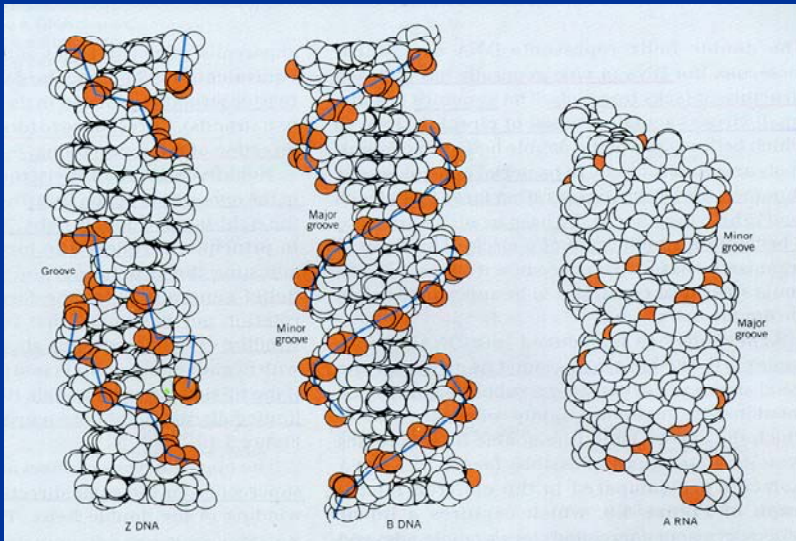


6

Forma	točivost	bp/turn	rotation/bp	průměr
ds				
A	R	11	34,7°	2,3 nm
B	R	10	43,0°	1,9 nm
Z	L	12	30°	1,8 nm

7

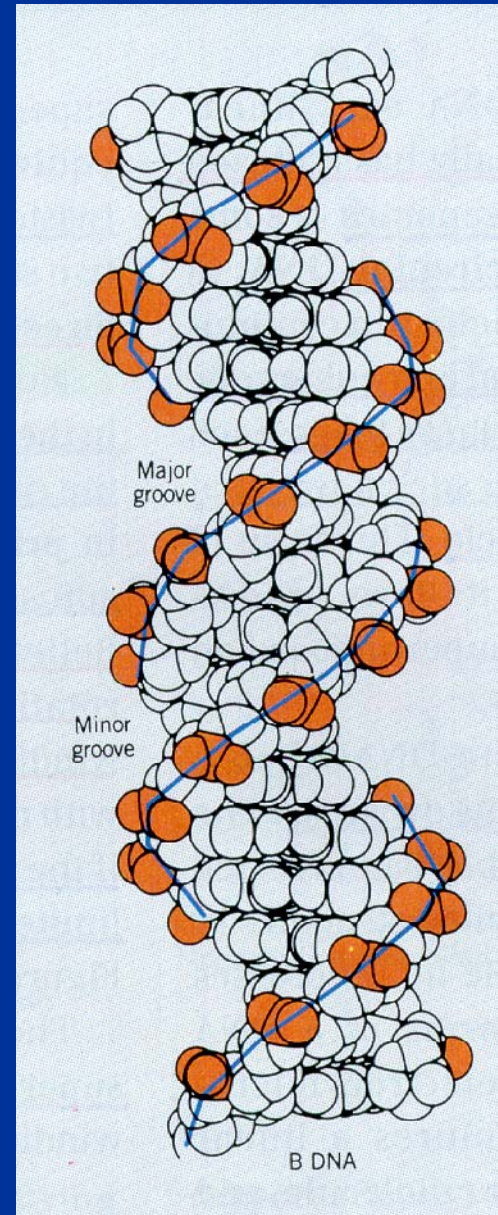
ds forms of nucleic acids



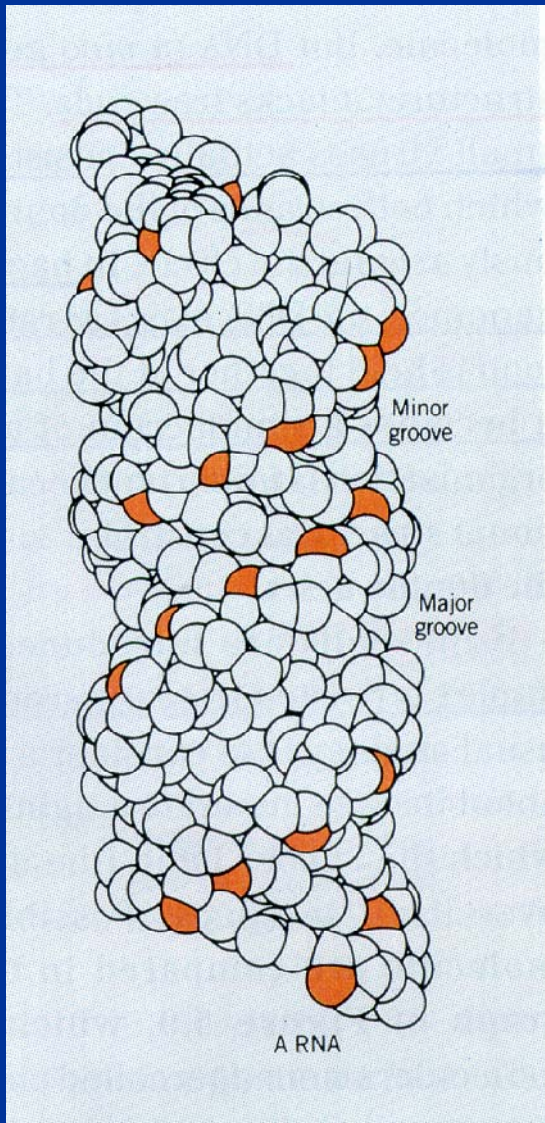
Form	coiling	bp/turn	rotation/bp	diameter ds
A	R	11	34,7°	2,3 nm
B	R	10	43,0°	1,9 nm
Z	L	12	30°	1,8 nm

B form

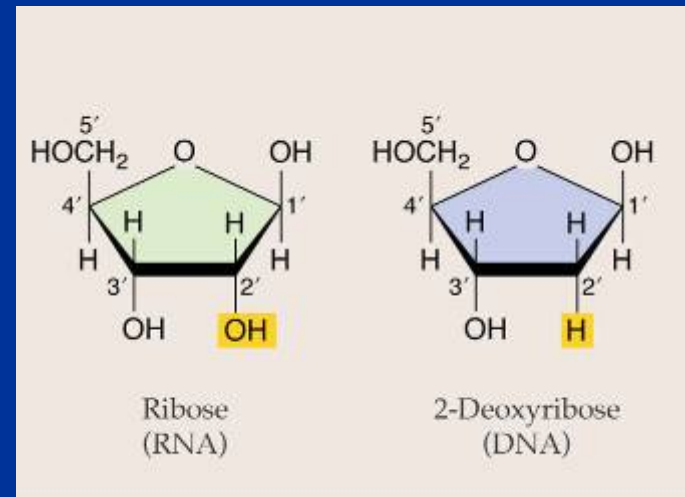
- *in vitro* většina dsDNA v B formě
- *in vivo* za určitých podmínek přechází do jiné formy
- velký žlábek hlavním místem interakce se sekvenčně specifickými DNA-vazebnými proteiny



8



A form



Z form (Zigzag)

10

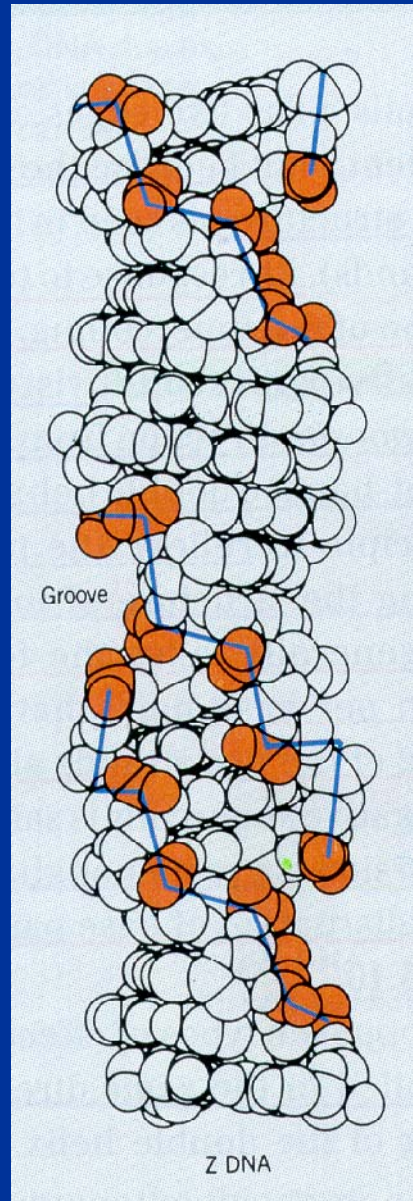
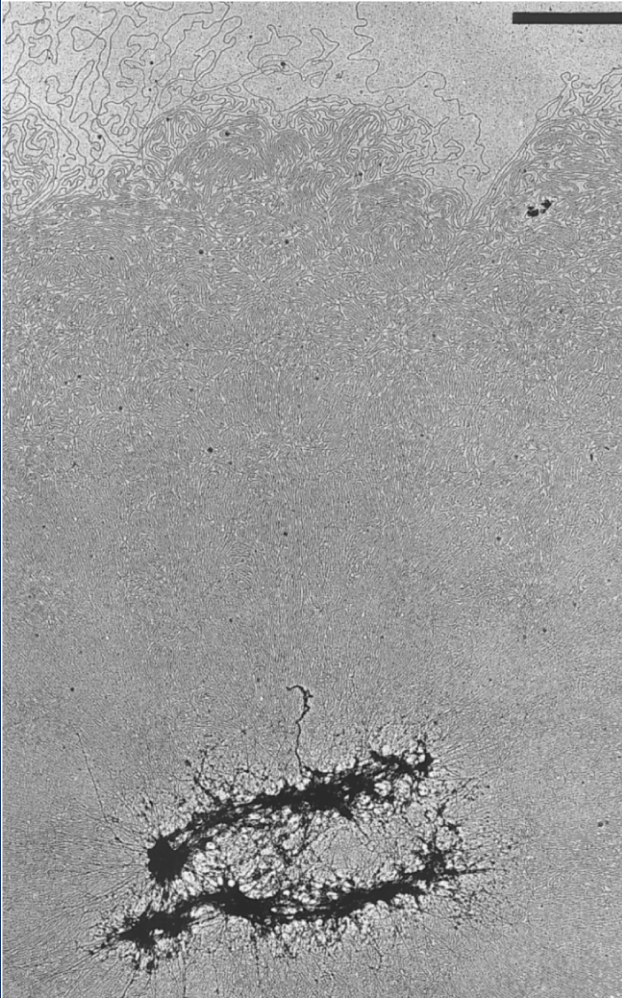


Figure 18.7 Histone-depleted chromosomes consist of a protein scaffold to which loops of DNA are anchored. Photograph kindly provided by Ulrich K. Laemmli.



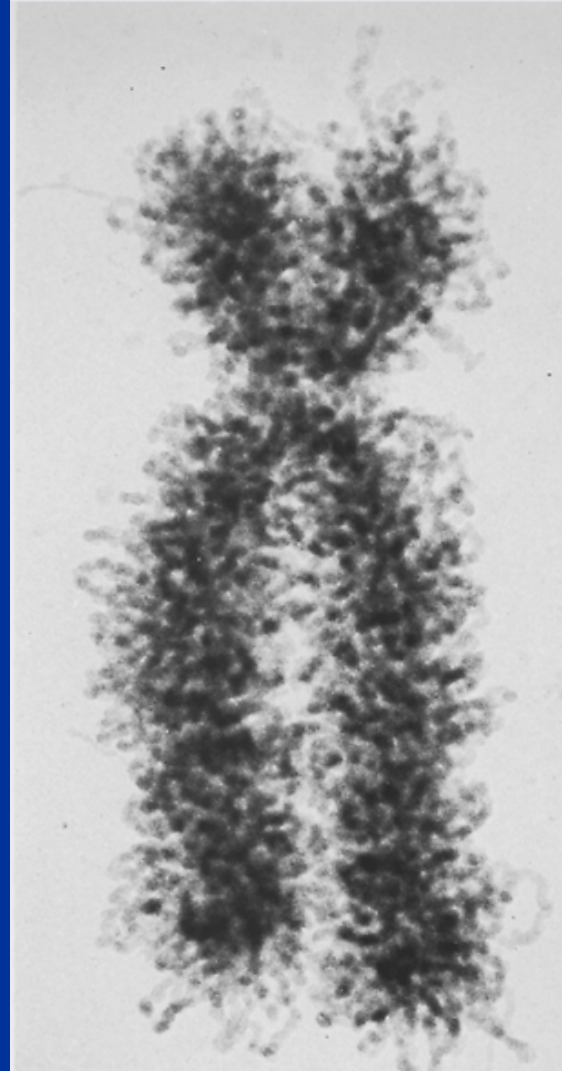
supercoiling ¹¹ (nadšroubovicové vinutí)

- pozitivní - převinutí
dvojšroubovice, utěsňuje
strukturu
- negativní - strukturu
uvolňuje, snižuje rotaci/1
bp, místně narušení
párování bazí

proteiny chromatinu

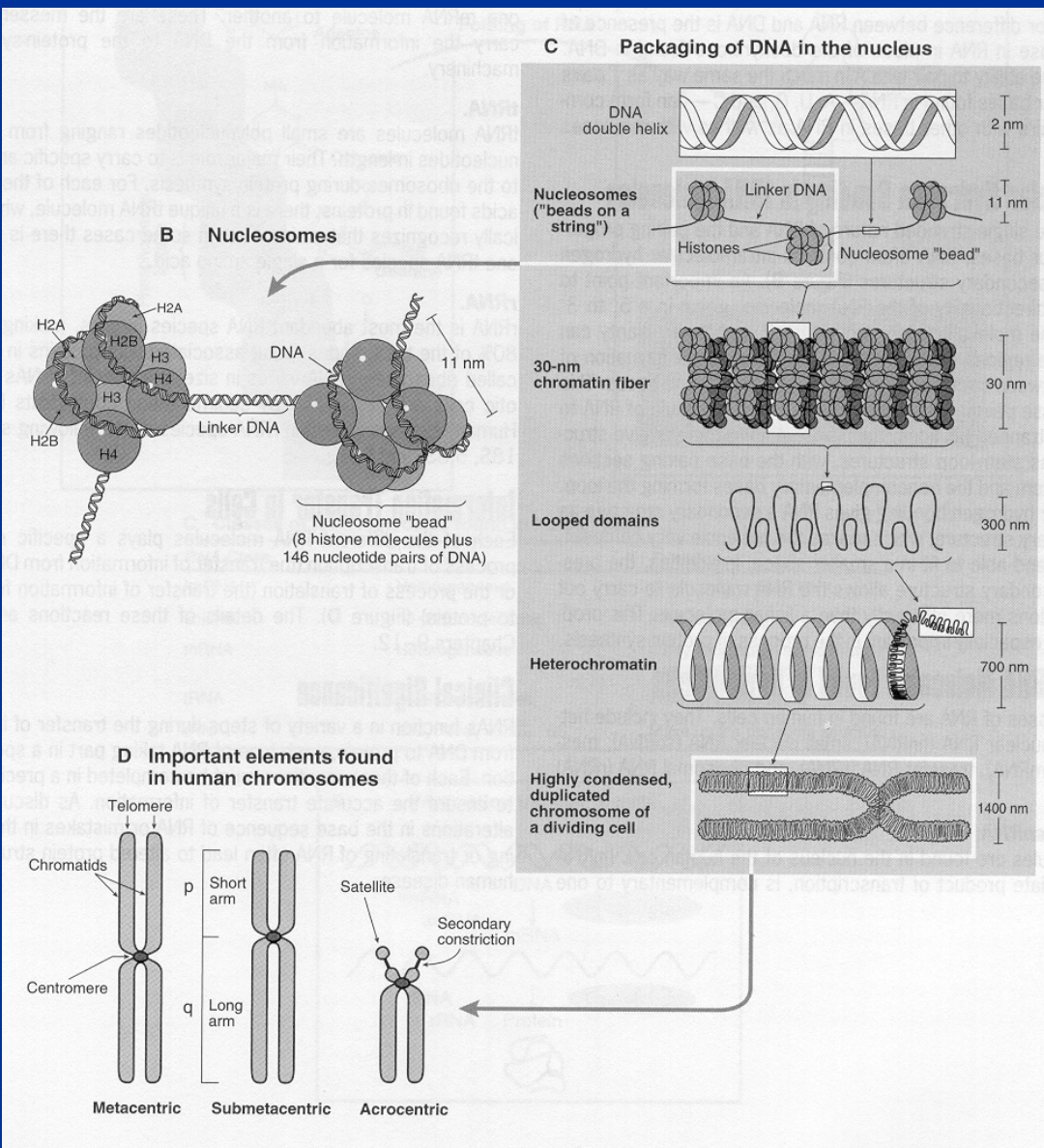
- neutralizace záporného náboje DNA molekuly
- usnadnění kondenzace chromatinu
- tvorba struktur, které umožní vznik smyček a domén
- vliv na genovou expresi

Figure 18.9 The sister chromatids of a mitotic pair each consist of a fiber (~30 nm in diameter) compactly folded into the chromosome. Photograph kindly provided by E. J. DuPraw.



12

13



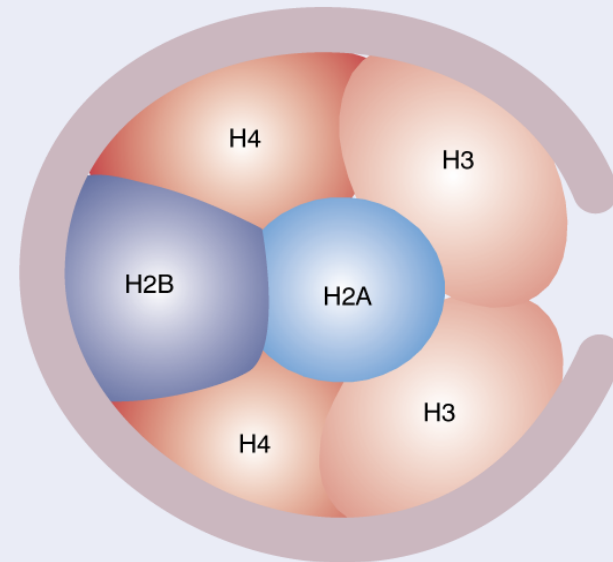
úrovně
chromatinu

1. úroveň chromatinu - nukleozomy

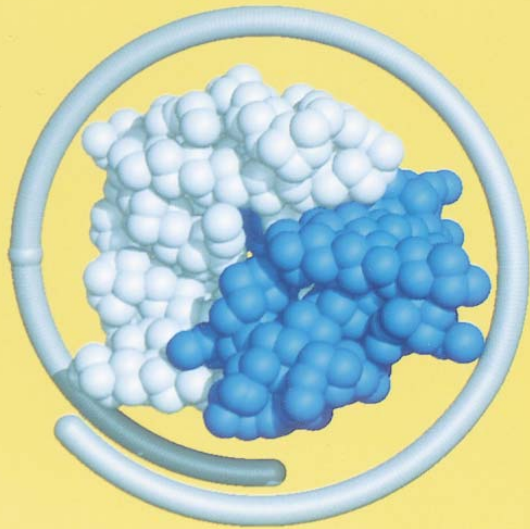
14

obtočení 2 nm vlákna
DNA kolem „korálek“
tvořených malými
zásaditými proteiny -
histony H2A, H2B, H3,
H4

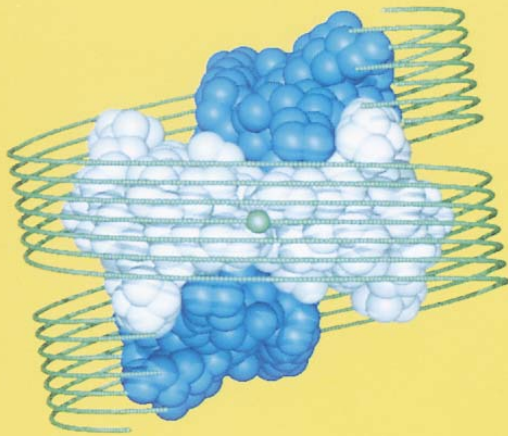
Figure 19.21 In a symmetrical model for the nucleosome, the H3₂-H4₂ tetramer provides a kernel for the shape. One H2A-H2B dimer can be seen in the top view; the other is underneath.



15



Side view

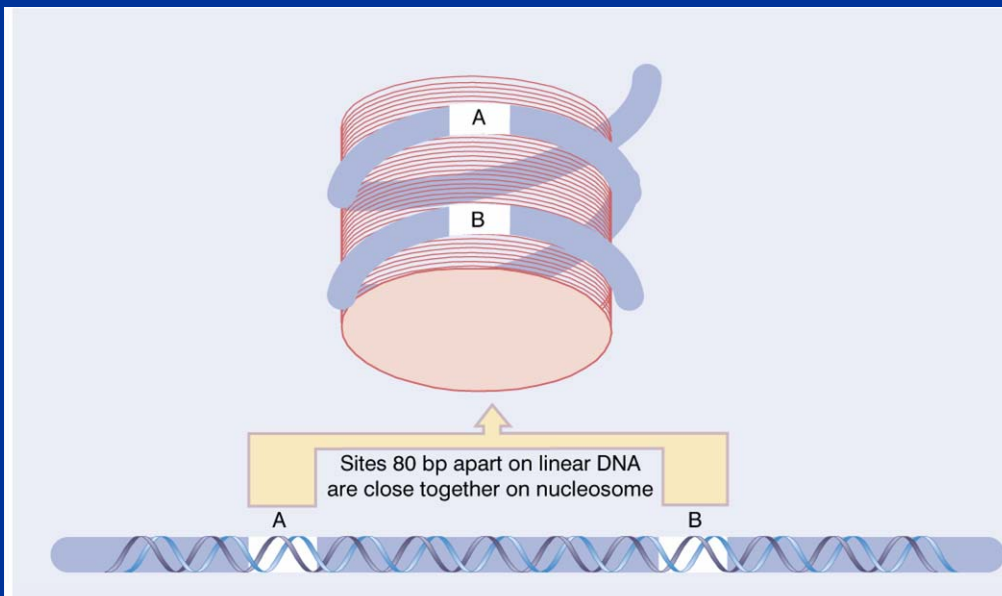


1. úroveň chromatinu nukleozomy

1st level of chromatin - nucleosomes

16

protein může interagovat se sekvencemi DNA, které leží na různých koncích nukleozomu
místa vzdálená 80bp na lineární DNA se na nukleozomu dostávají do blízkosti



1. úroveň chromatinu nukleozomy

Figure 19.4 The nucleosome may be a cylinder with DNA organized into two turns around the surface.

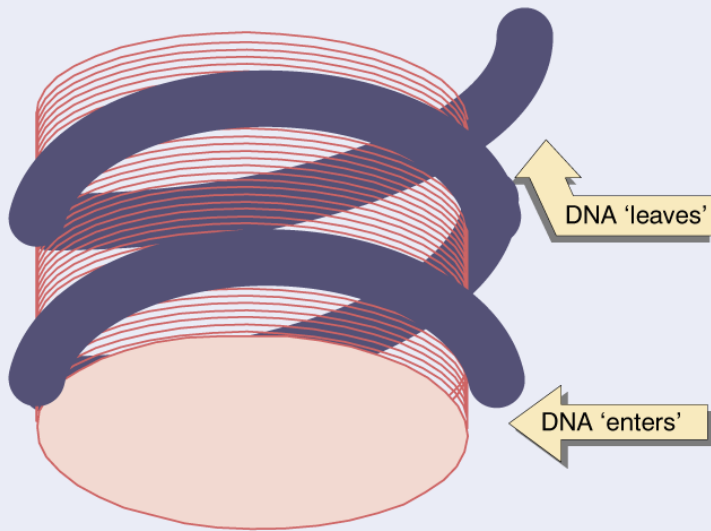


Figure 19.3 The nucleosome consists of approximately equal masses of DNA and histones (including H1). The predicted mass of the nucleosome is 262 kD.

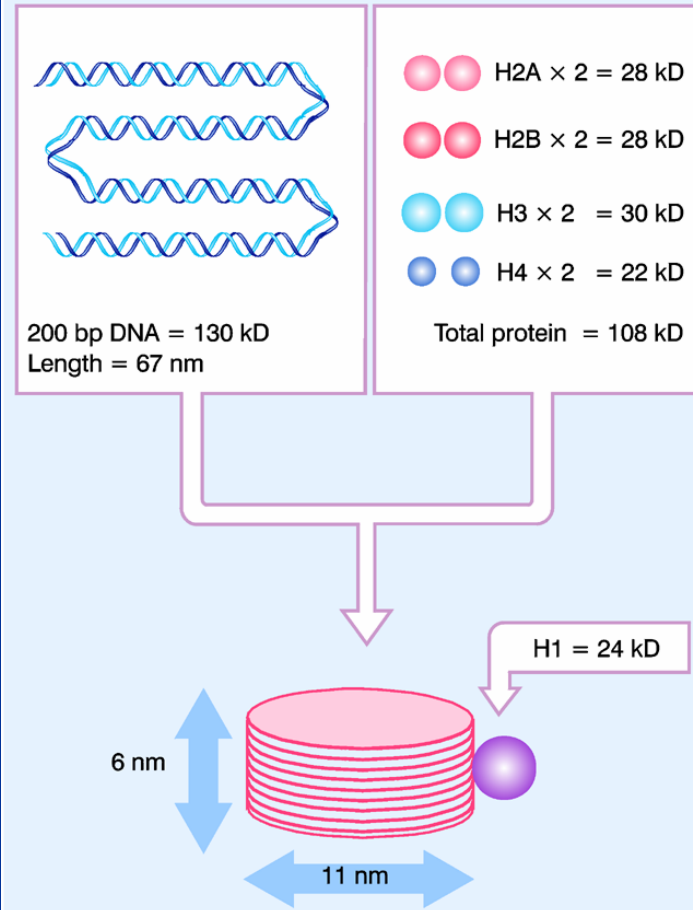


Figure 19.18 The 10 nm fiber is a continuous string of nucleosomes.

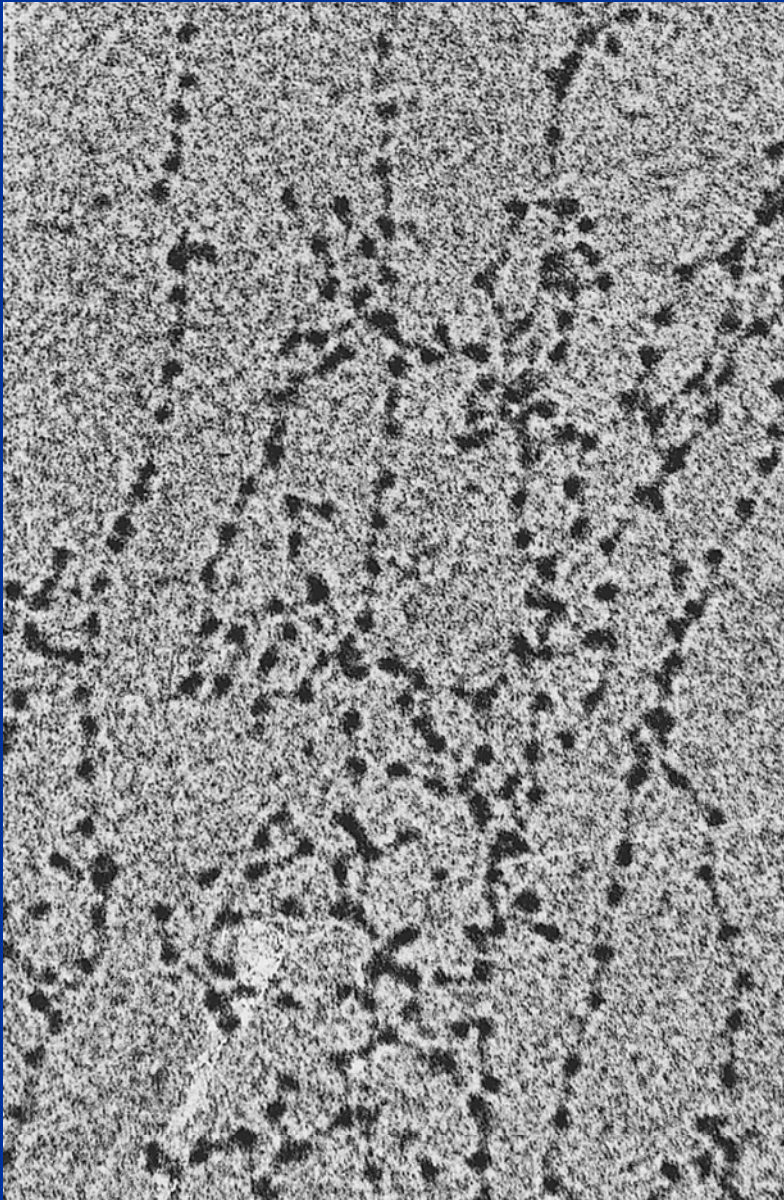


1. úroveň chromatinu nukleozomy

nukleozomální vlákno
10 nm - „beads on string“

asi 200 bp/nukleozom

1. úroveň chromatinu nukleozomy

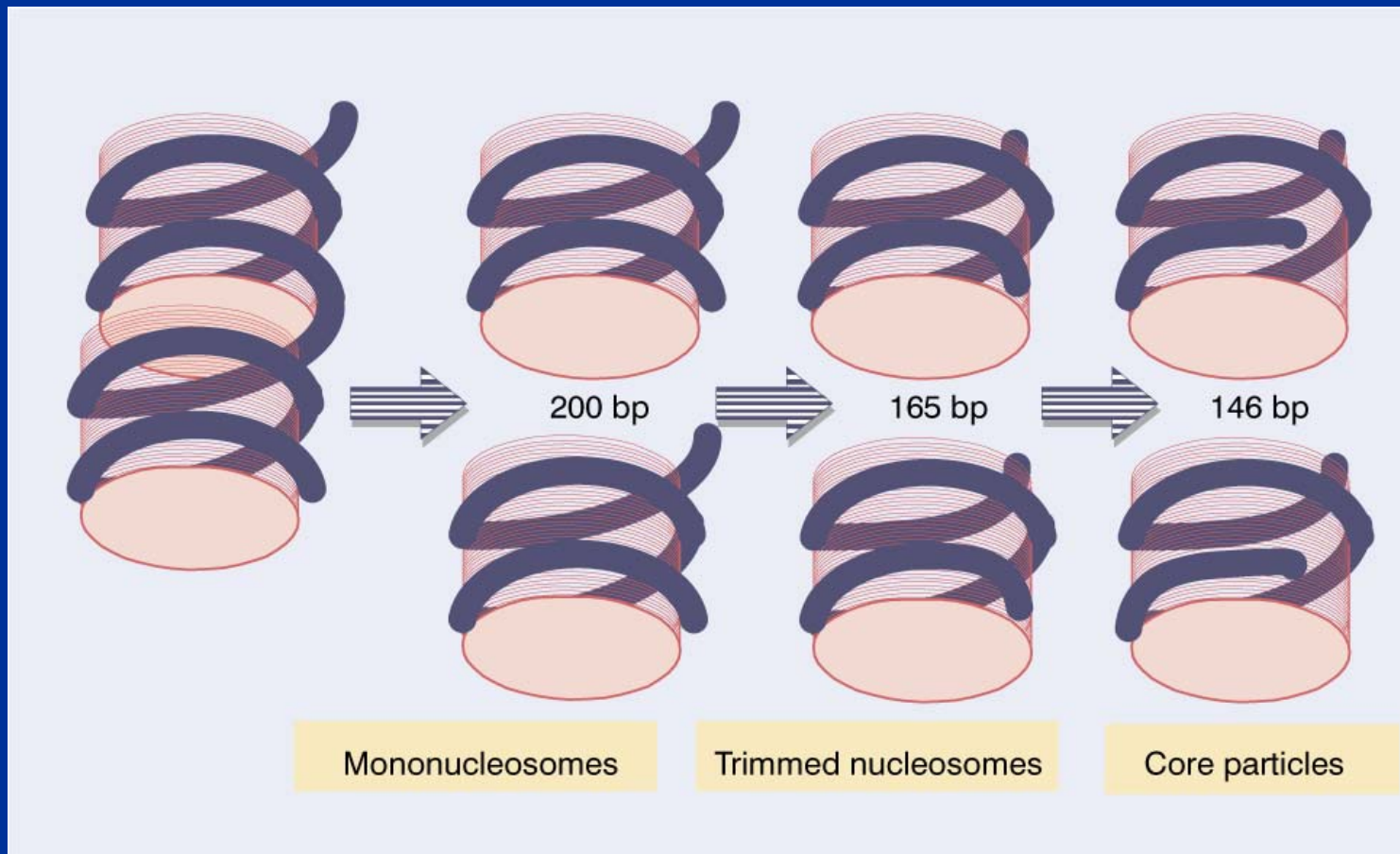


nukleozomální vlákno
10 nm - „beads on string“

míra „sbalení“ asi 6x

1. úroveň chromatinu nukleozomy

20

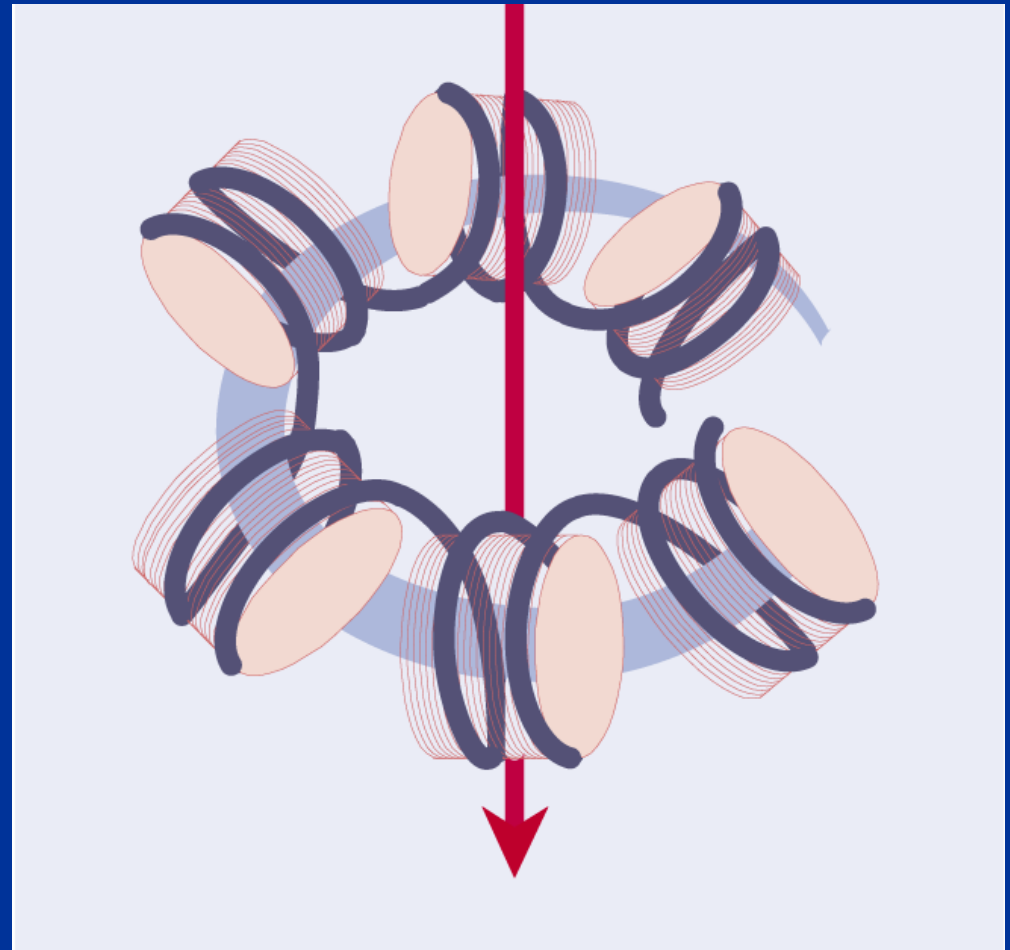


2. úroveň chromatinu - solenoid

21

stočení DNA do
30 nm vlákna

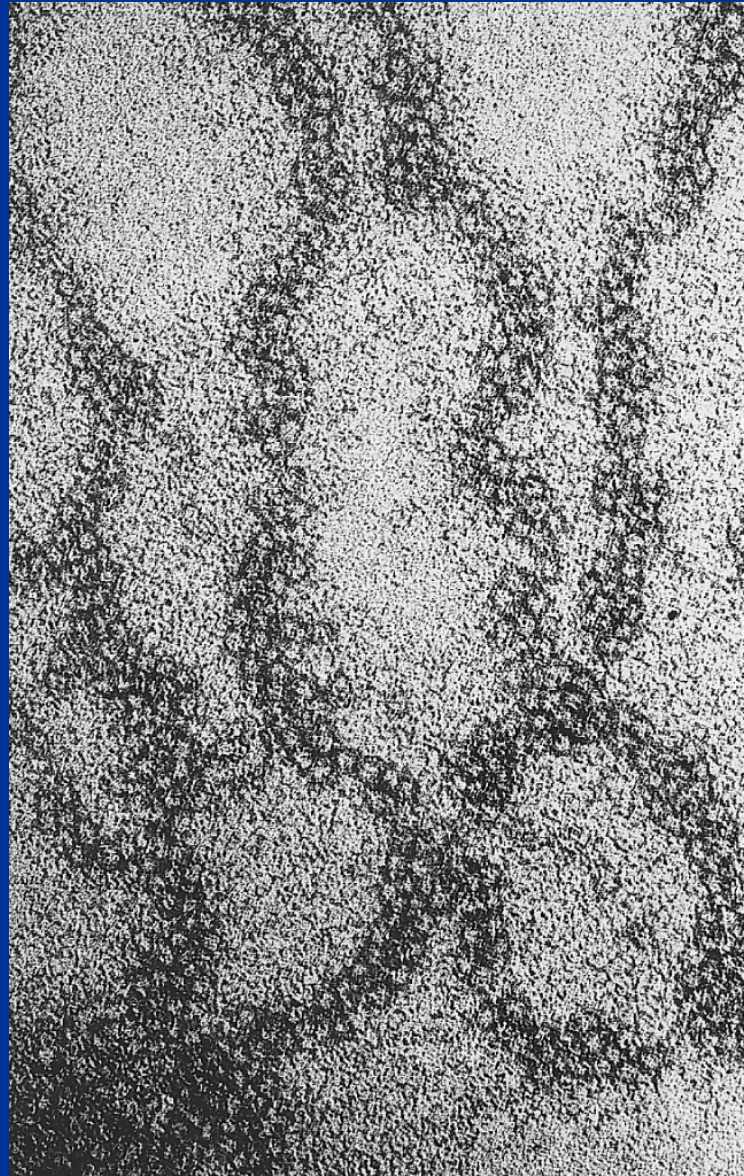
6 nukleozomů na
otáčku helixu



2. úroveň chromatinu - solenoid

vyžaduje histon H1 a
další nehistonové
proteiny

míra „sbalení“ ~ 40x



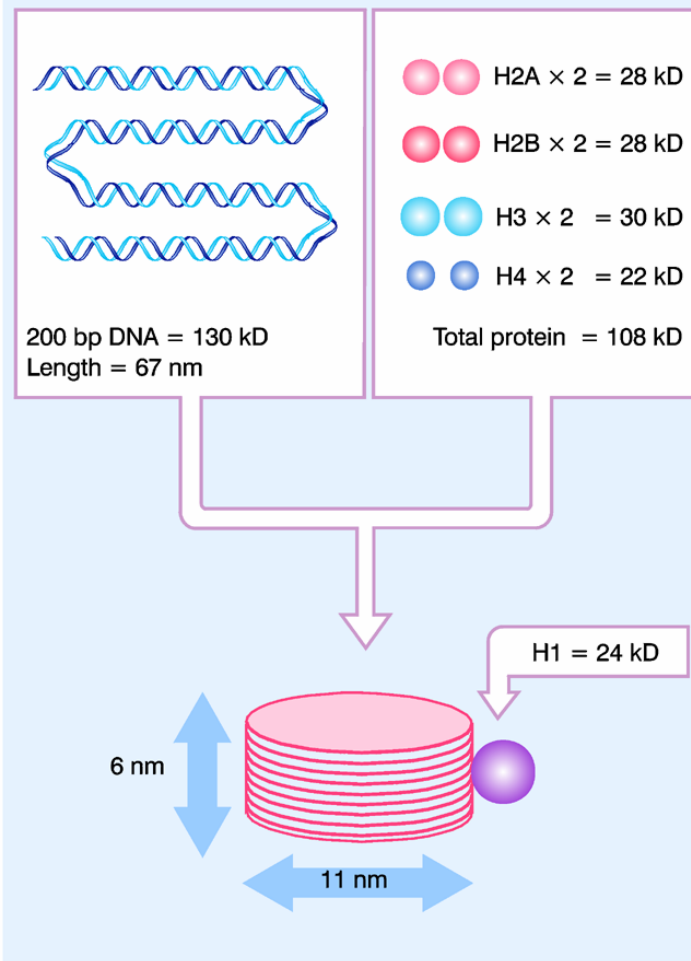
22

2. úroveň chromatinu - solenoid

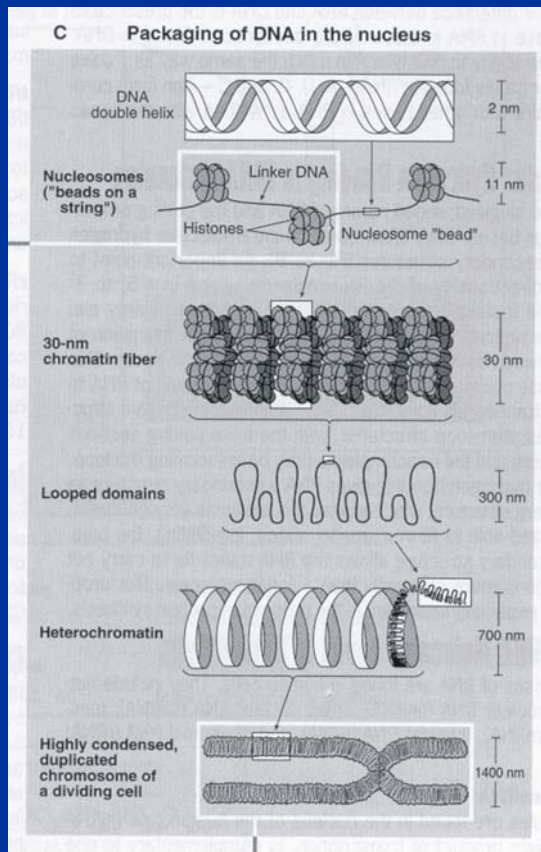
histon H1 - „linker“
histone

Figure 19.3 The nucleosome consists of approximately equal masses of DNA and histones (including H1). The predicted mass of the nucleosome is 262 kD.

23



vyšší úrovně chromatinu

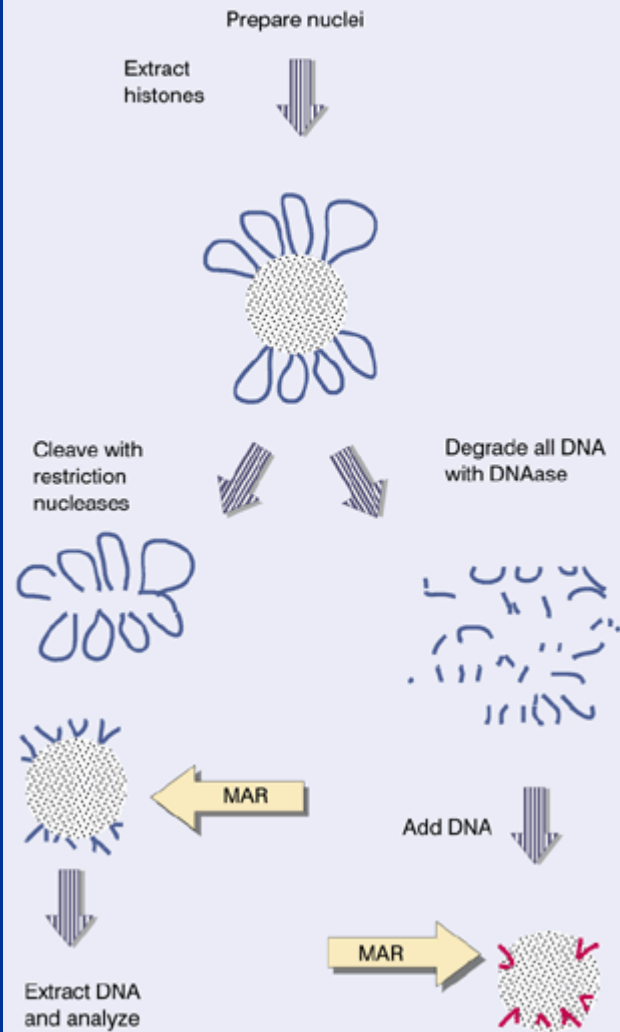


za pomoci dalších proteinů
rozdíl v míře „sbalení“
(kondenzace):

euchromatin ≥ 1000

mitotické chromosomy $\leq 10\ 000$

Figure 18.8 Matrix-associated regions may be identified by characterizing the DNA retained by the matrix isolated *in vivo* or by identifying the fragments that can bind to the matrix from which all DNA has been removed *in vivo*.



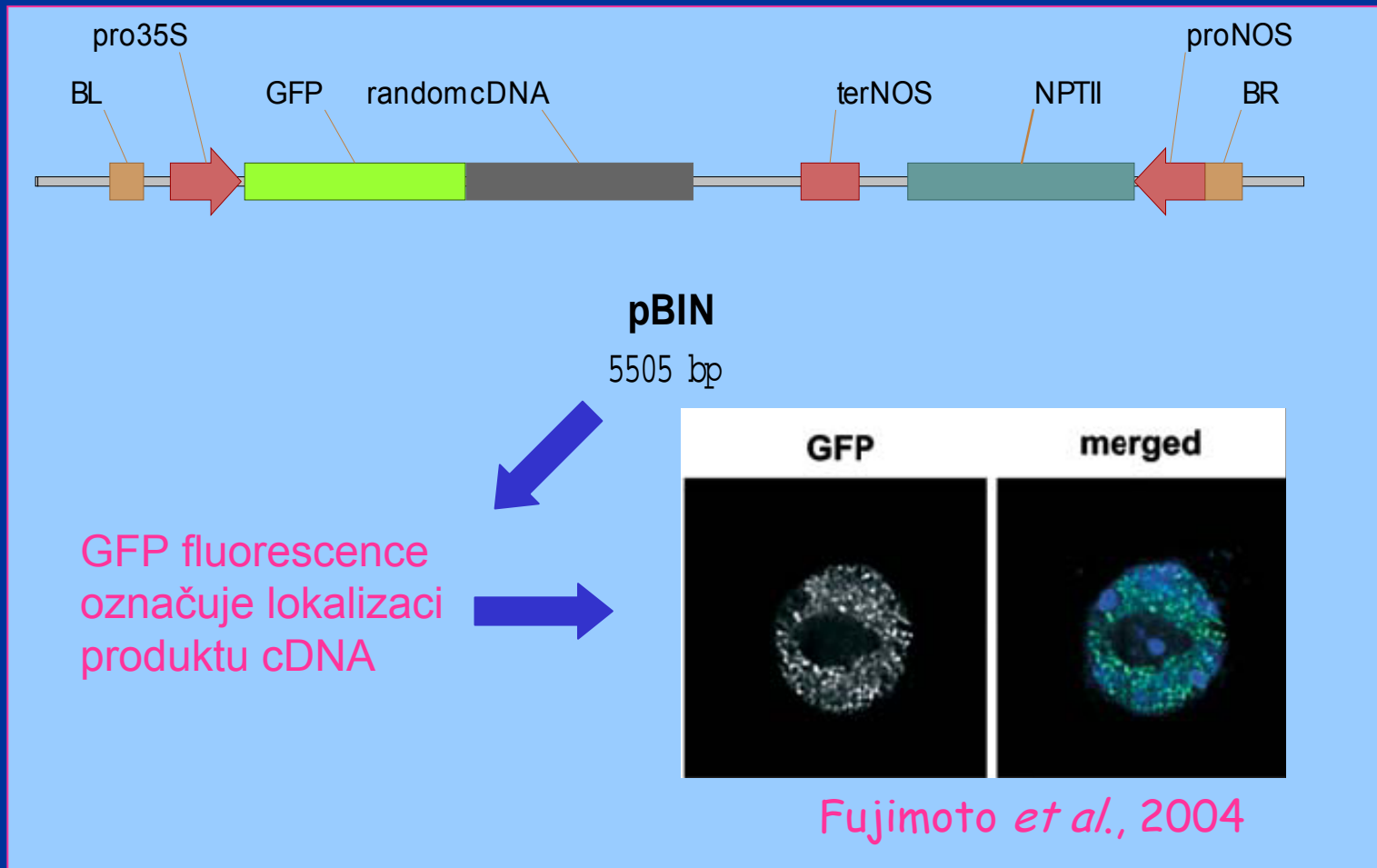
nuclear
matrix
associated
regions -

oblasti spojené s
jadernou matrix

25

vyhledávání MAR-vazebných proteinů

26



- **MARs**

(matrix attachment regions) také SARs (scaffold attachment regions)

- ukotvují oblasti kolem kódujících oblastí (funkčních genů) k bílkovinné matričce chromosomu nebo jaderné matričce interfázického jádra
- AT bohaté, rozpoznávány topoizomerázou II
- vzdáleny vzájemně 3kb až 100kb
- MAR sekvence poblíž transgenu zvyšuje expresi až o dva řády, snižuje variabilitu exprese mezi v souboru nezávislých transformantů

genome is a collection of loops)

- **LBARs**

(loop basement attachment regions)

- stálejší, udávají „adresu“ každému genu
- organizují genom do velkých smyček (vzdálenost 20kb až 100kb)

vliv MARs na transgeny

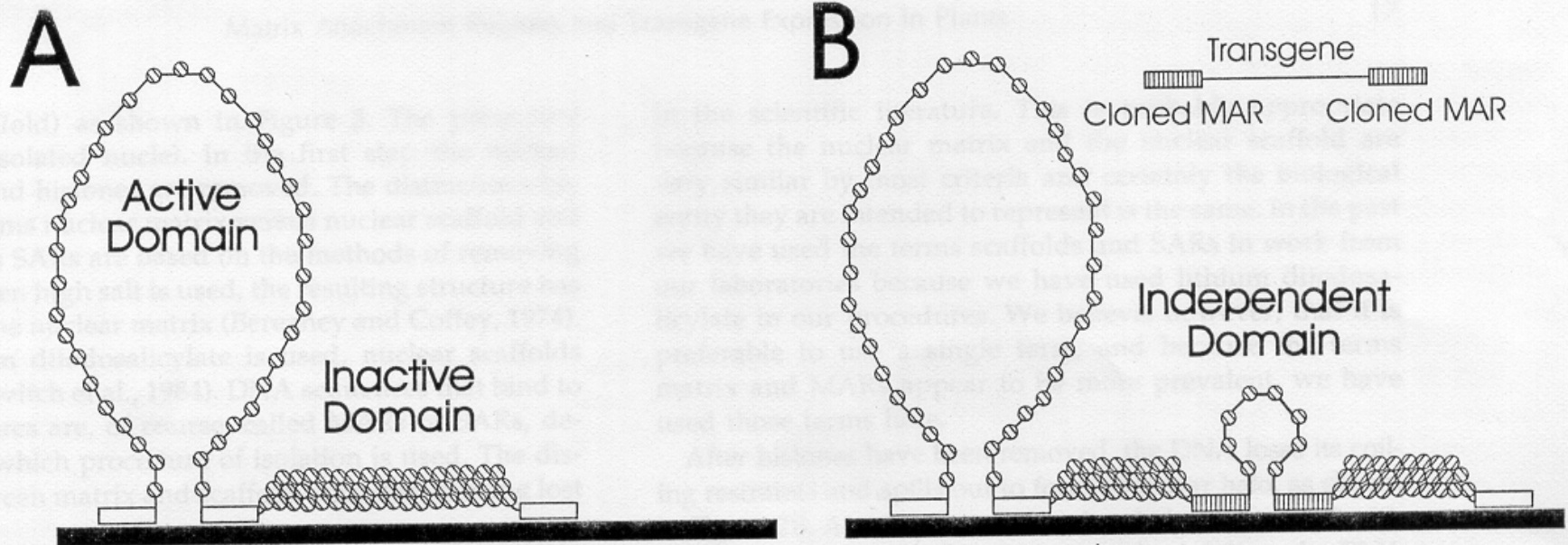
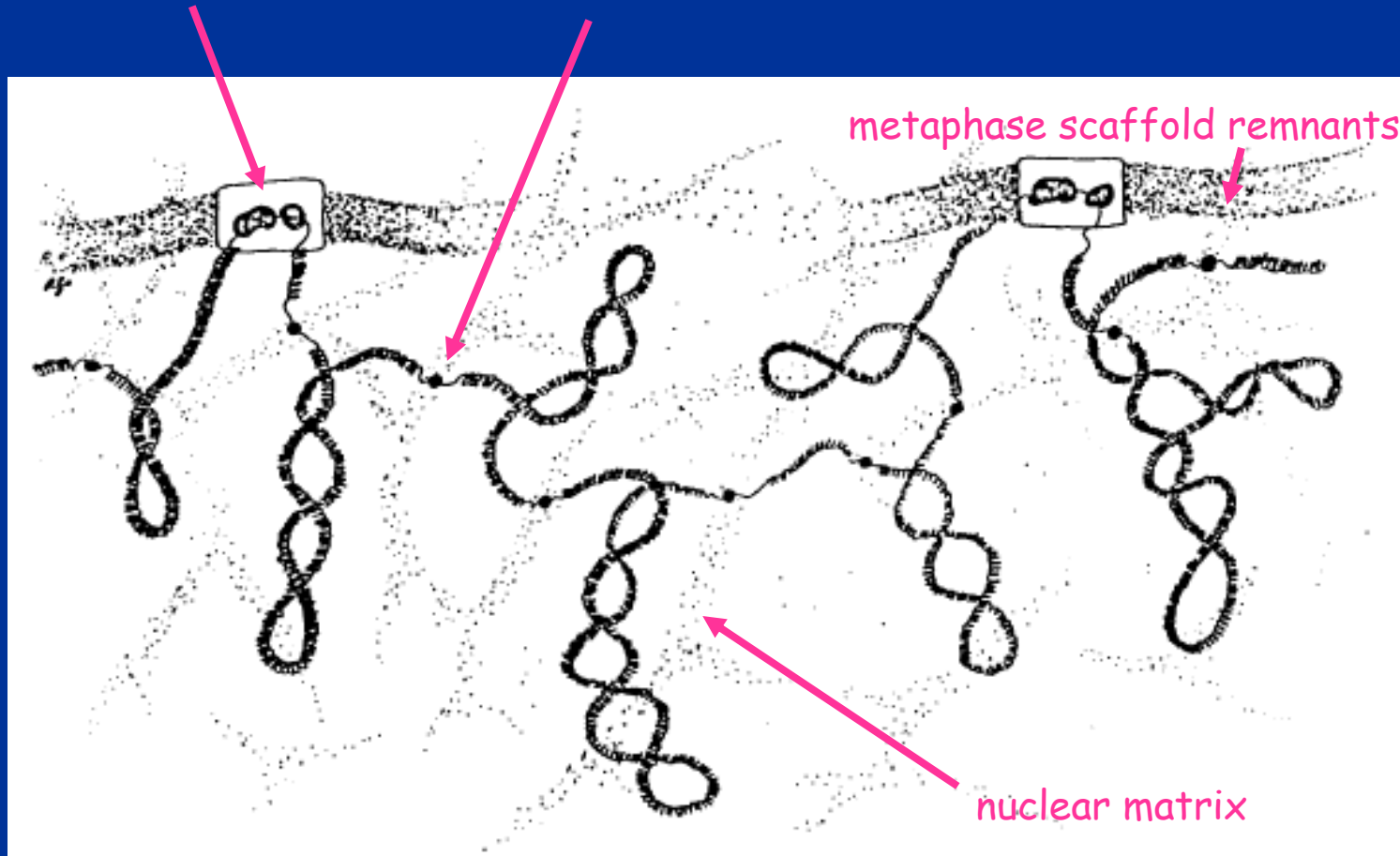


Figure 1. Models depicting the organization of chromatin into active and inactive loop domains and the formation of independent transgenic loop domains. A, MAR sequences (open boxes) interact with nuclear matrix fiber (filled bar) to form two loop domains. The active domain is depicted as an 11-nm nucleosome fiber and the inactive domain as a 30-nm fiber formed by supercoiling of the 11-nm fiber. B, An independent domain formed by the integration of MAR-flanked transgene into the inactive domain.

LBARs a MARs model

29



Paul A.-L., Ferl R.J., 1999

Chromatin modification and remodelling

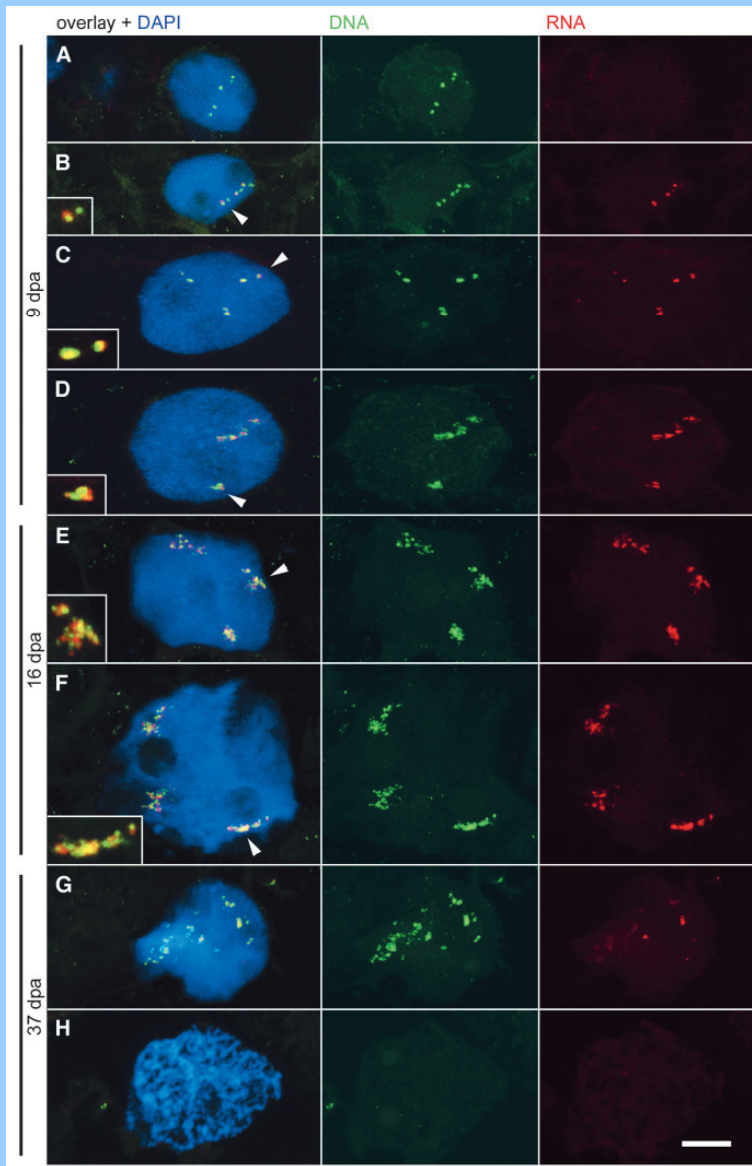
30

- aktivně transkribující chromatin obsahuje hyperacetylované histony a je senzitivní k DNázeI
- vzdálenosti mezi nukleozomy jsou kratší v aktivním chromatinu
- chromatin má represivní efekt na genovou expresi
- metylace DNA je spojena s transkripční inaktivací

31

decondenzace chromatinu při transkripci

Wegel et al., 2004



1. kovalentní posttranslační modifikace chromatinu

32

dynamická přeměna chromatinu

- linker histon

(H1) má zásadité amino i karboxy-konce a interaguje s histony i s DNA

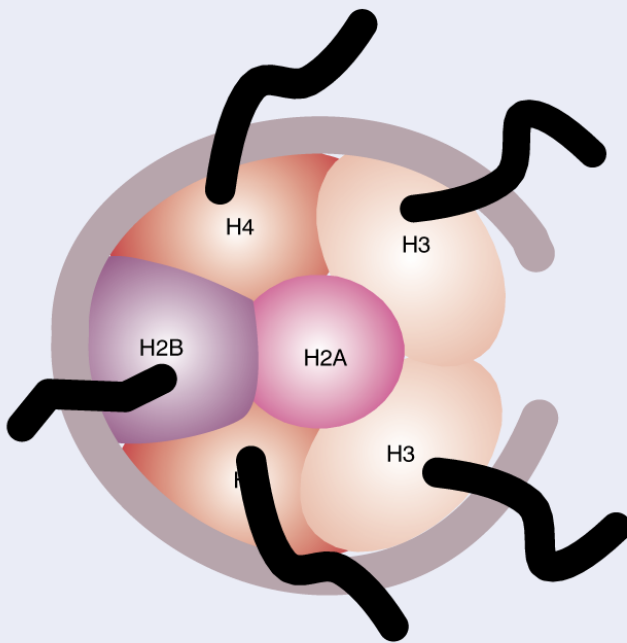
phosphorylace H1 na začátku mitózy, později reverze

vztah k přeměně chromatinu (? afinita k chromatinu/DNA?)

1. Covalent posttranslational modification of chromatin

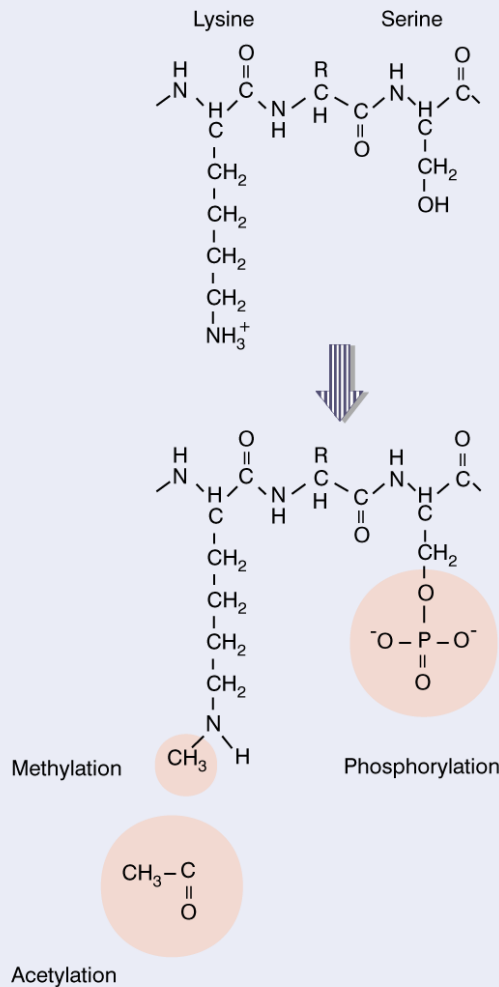
33

Figure 19.24 The globular bodies of the histones are localized in the histone octamer of the core particle, but the locations of the N-terminal tails, which carry the sites for modification, are not known, and could be more flexible.



- nucleozomální histony

Figure 19.25 Acetylation of lysine or phosphorylation of serine reduces the overall positive charge of a protein.



1. kovalentní posttranslační modifikace chromatinu

1. Covalent posttranslational modification of chromatin

35

- nucleosomal histones

Acetylase

otevívá chromatinovou strukturu celých domén a ovlivňuje velké množství nukleozomů, brání tvorbě vyšších úrovní chromatinu

ADP ribosylase

molekula podobná ssDNA může lokálně narušit strukturu chromatinu

Ubiquitinylase

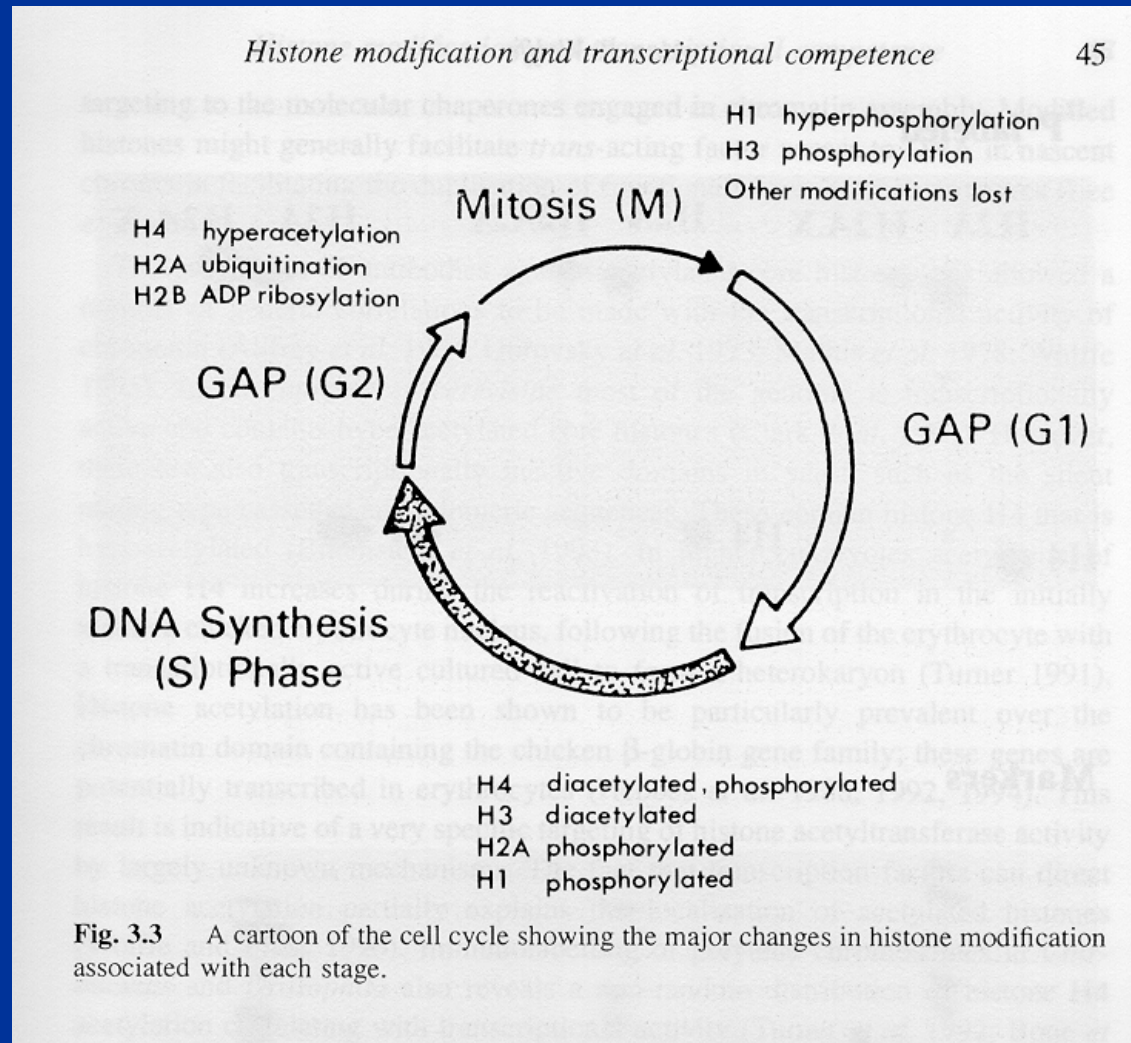
peptid (76 aa) označí protein k degradaci

? ztráta nukleozomů v aktivně transkribovaných genech

Metylase

!! histonů, žádné známé strukturální změny

Kovalentní posttranslační modifikace chromatinu v průběhu buněčného cyklu



36

Kovalentní posttranslační modifikace chromatinu a diferenciaci

Změny v acetylaci histonů důležité pro ustanovení stabilní aktivity nebo inaktivity genu v průběhu vývoje (zejména raná stadia - embryogeneze) a zachování epigenetického vtisku

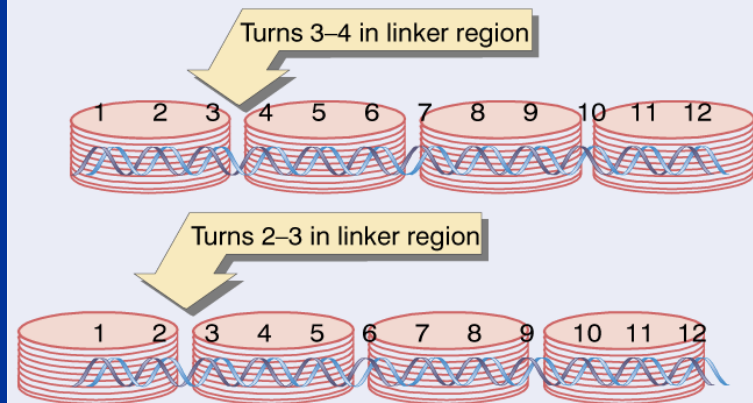
Po replikaci musí stejně modifikované proteiny vytvořit nukleozomální strukturu na obou dceřiných chromatidách

2. nucleosome positioning

38

- Umístění nukleozomu podél sekvence DNA není nahodilé
- Možnost modulace transkripce
- Umístěný nukleozom zprostředkuje kontakt fyzicky vzdálených úseků
- Umístění nukleozomu ovlivněno sekvencí DNA

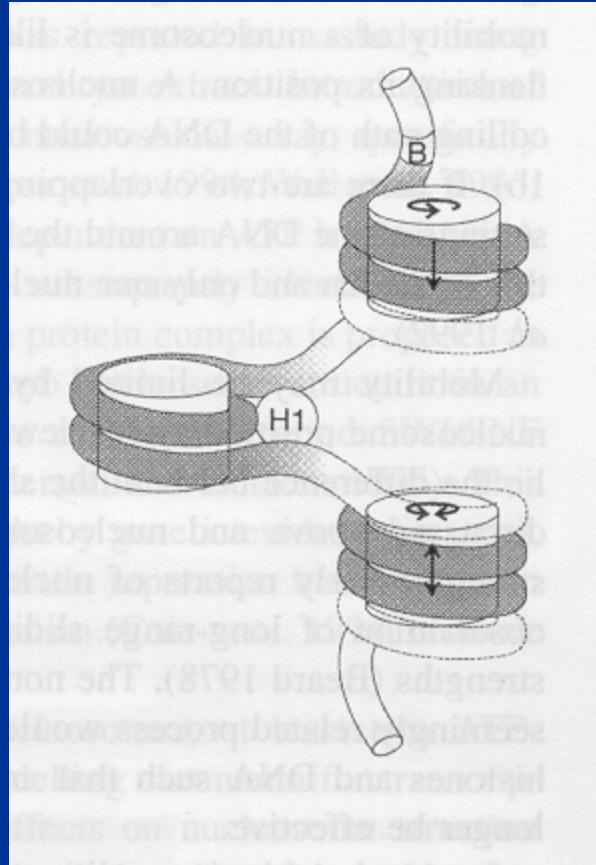
Figure 19.31 Translational positioning describes the linear position of DNA relative to the histone octamer. Displacement of the DNA by 10 bp changes the sequences that are in the more exposed linker regions, but does not alter which face of DNA is protected by the histone surface and which is exposed to the exterior. DNA is really coiled around the nucleosomes, and is shown in linear form only for convenience.



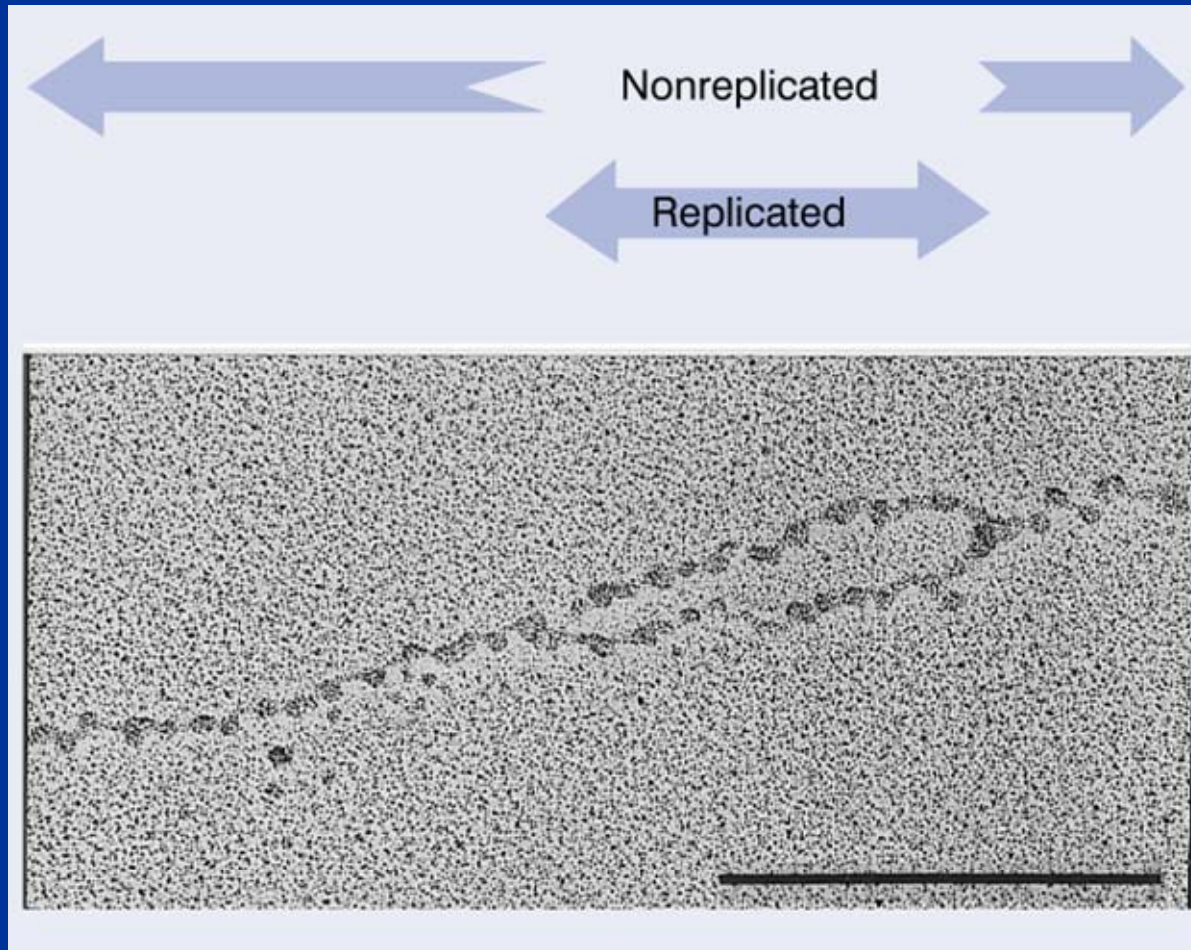
nucleosome mobility

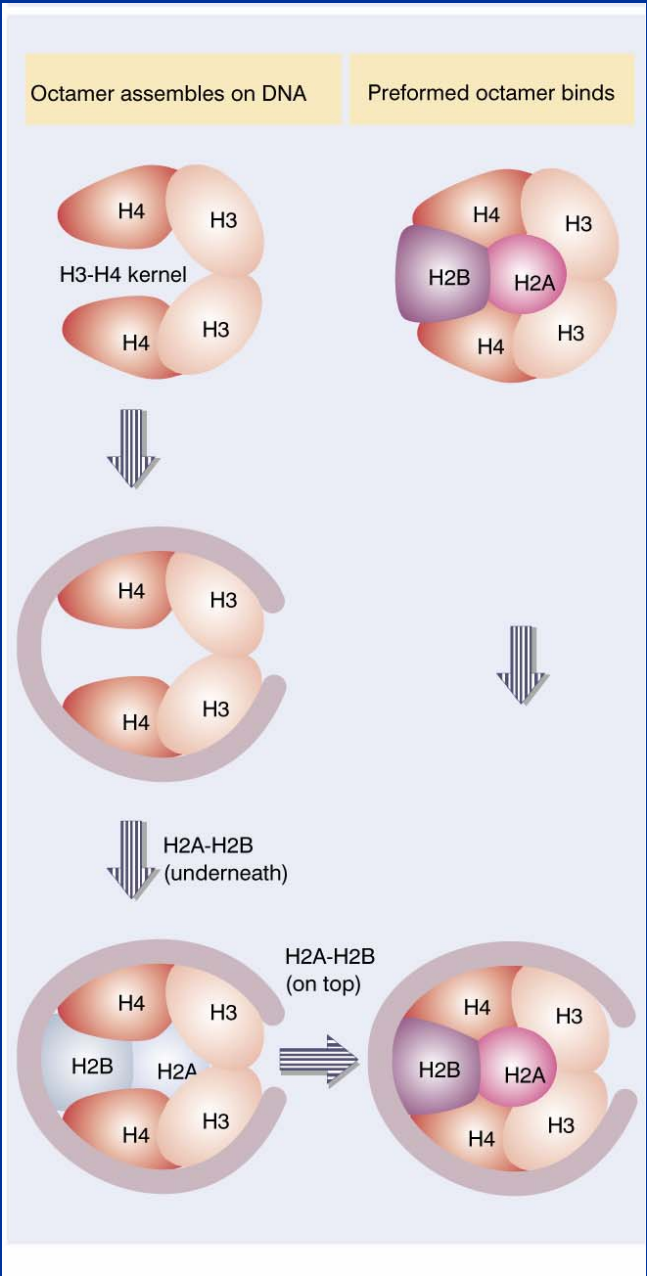
(pohyb nukleozomů)

39



Reprodukce nukleozomů při replikaci 40



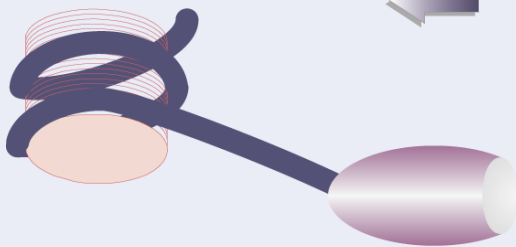


Reprodukce nukleozomů při replikaci

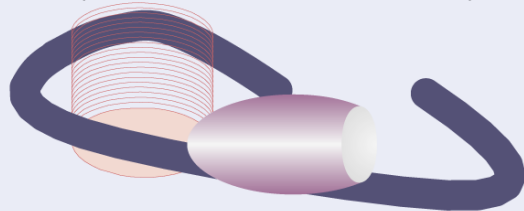
Figure 19.37 RNA polymerase displaces DNA from the histone octamer as it advances. The DNA loops back and attaches (to polymerase or to the octamer) to form a closed loop. As the polymerase proceeds, it generates positive supercoiling ahead. This displaces the octamer, which keeps contact with DNA and/or polymerase, and is inserted behind the RNA polymerase.

nukleozomy v 42 přepisovaných genech

RNA polymerase advances



DNA is displaced from octamer and forms closed loop



Torsion ahead of RNA polymerase displaces octamer, which reinserts behind polymerase

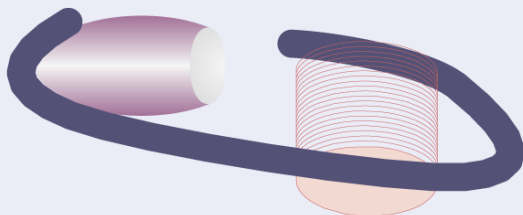
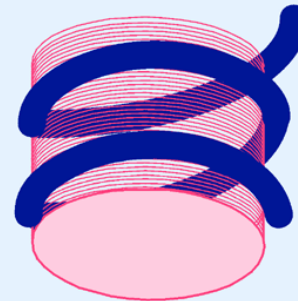
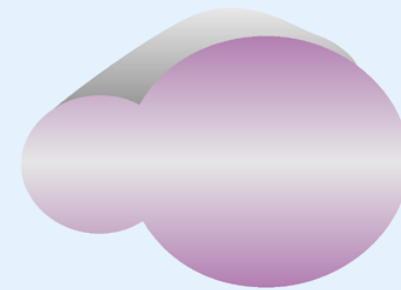


Figure 19.35 RNA polymerase is comparable in size to the nucleosome and might encounter difficulties in following the DNA around the histone octamer.

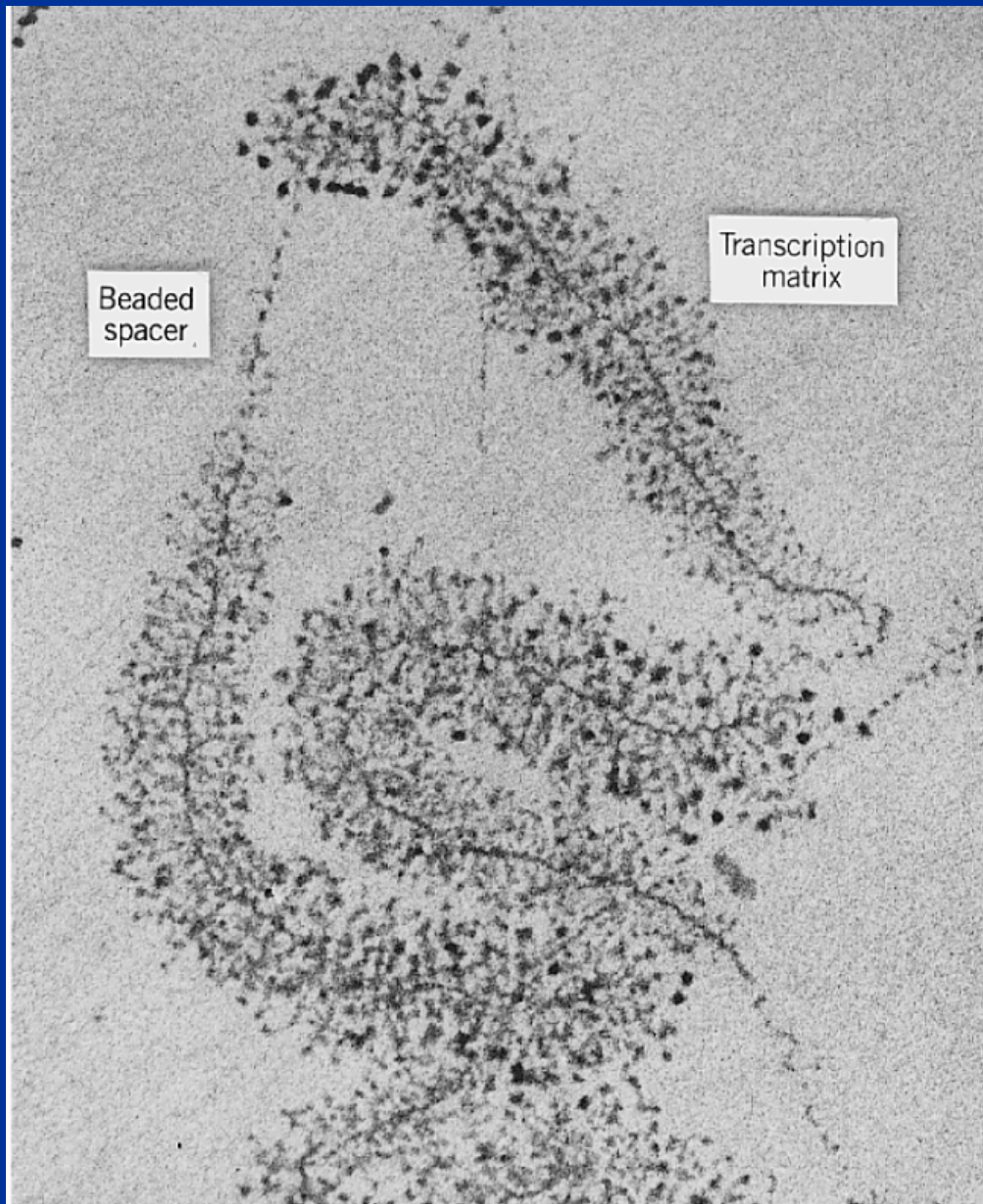


Nucleosome
300 kD
6 × 11 nm



RNA polymerase
500 kD
14 × 13 nm

43

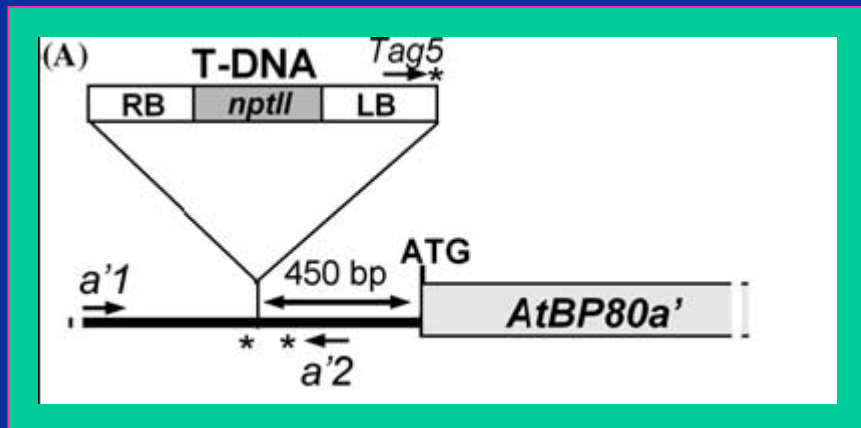


nukleozomy v
přepisovaných
genech

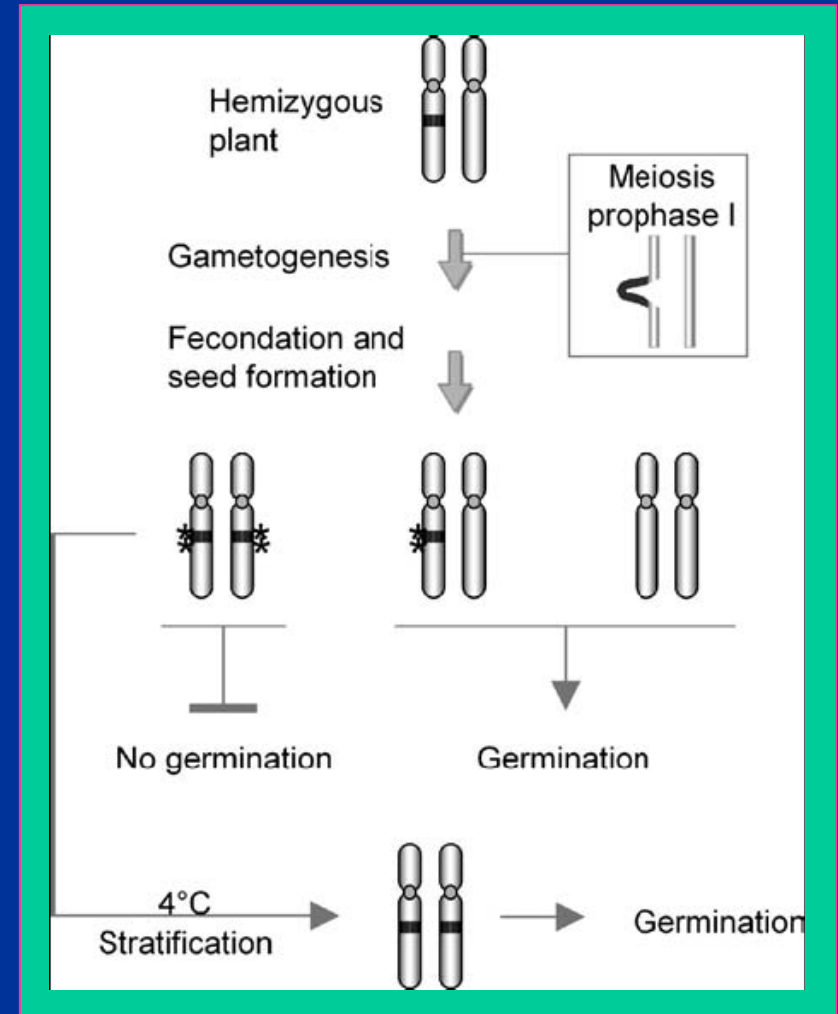
3. DNA methylation

44

- Metylace cytosinů v pozici C5 u CpG dinukleotidů



Masclaux et al., 2005



Komplexy zajišťující změny chromatinu

45

- ATP-dependentní (chromatin remodelling complexes)
 - energie z hydrolýzy ATP, lokální narušení či změna chromatinu
- komplexy histon acetyltransferáz a histon deacetyláz (chromatin modifying complexes)
 - stupeň acetylace histonů reguluje transkripční aktivitu genů

Funkční chromatinové domény

46

Strukturální domény
smyčky tvořeny MARs

nejsou shodné s funkčními doménami, i když často vymezují oblast transkripce

Funkční domény
vzájemně nezávislé
domény genové exprese
strukturální změny chromatinu v doméně nastávají při indukci exprese genu dané domény

Positional effect

47

Přemístěním aktivního genu v rámci genomu může dojít k zablokování jeho exprese (nesprávná interakce regulačních proteinů s promotorem, nevytvoření správné chromatinové struktury...)

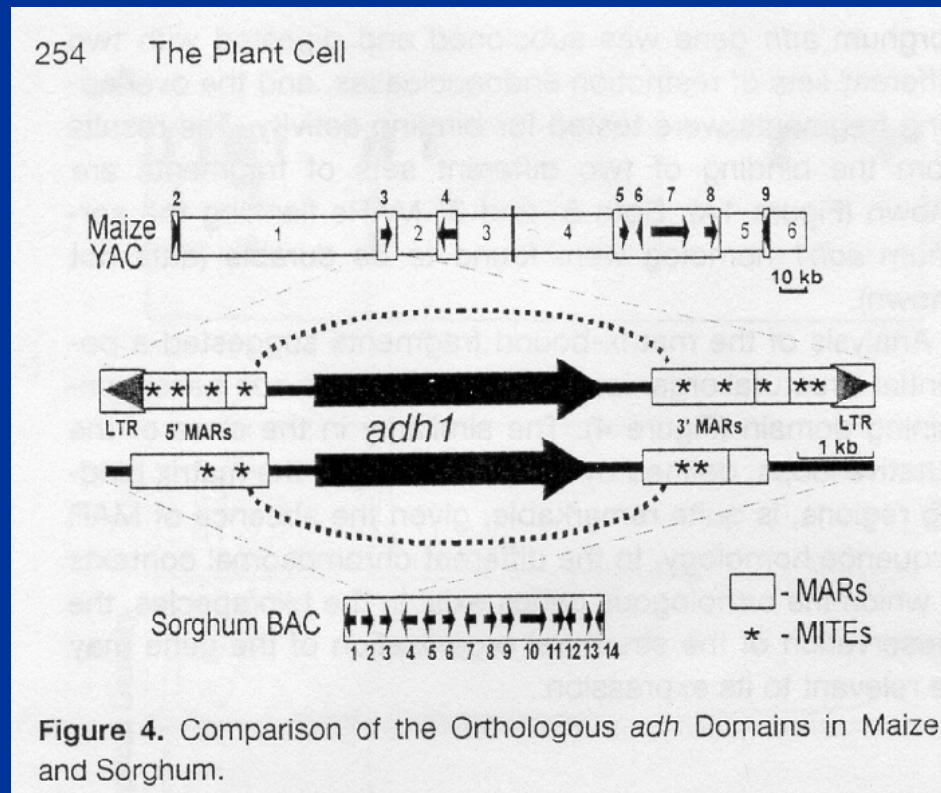
A naopak

Boundary chromatin elements

48

sekvence chránící transgen před pozičním efektem

MARs

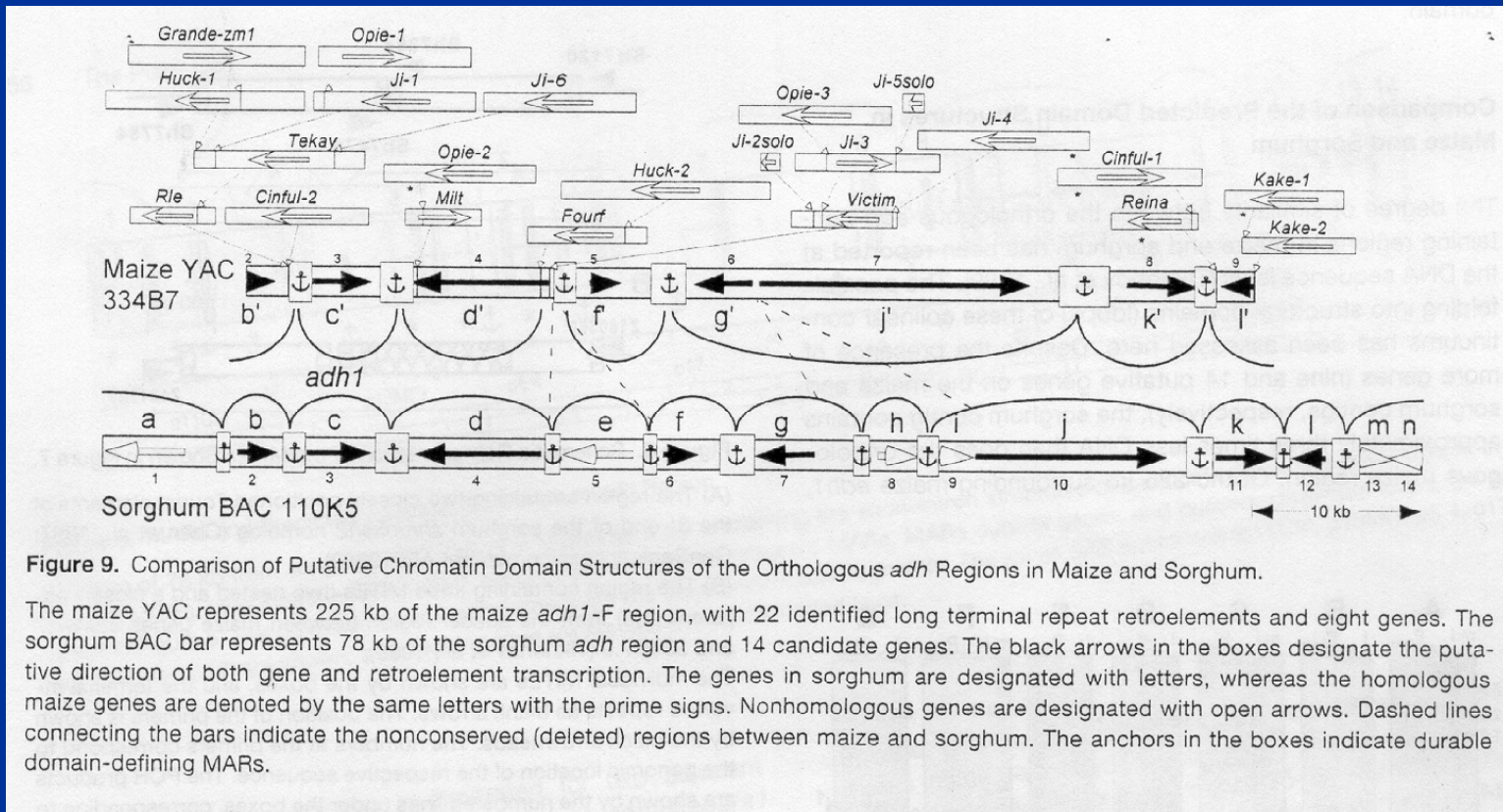


Tikhonov et al., 2000

MARs

49

porovnání *adh* lokusu dvou genomů



Tikhonov et al., 2000

Boundary chromatin elements

Inzulátor

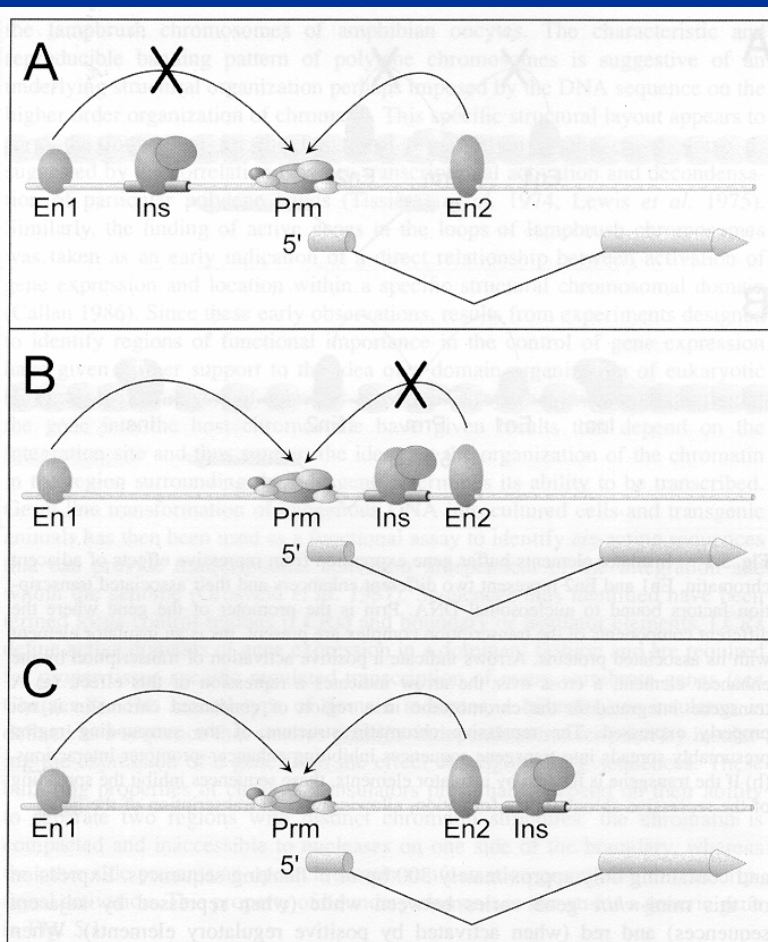


Fig. 5.2 Polar effect of an insulator on enhancer–promoter interactions. Symbols are as in Fig. 5.1. (a) An insulator located in the 5' region of the gene inhibits its transcriptional activation by an upstream enhancer (En1) without affecting the function of a second enhancer (En2) located in the intron of the gene. (b) When the insulator is located in the intron, expression from the downstream enhancer (En2) is blocked, whereas the upstream enhancer (En1) is still active. (c) When the insulator is located in the intron but distal to the En2 enhancer, both enhancers are active and transcription of the gene is normal. This property distinguishes an insulator from a typical repressor.

Boundary chromatin elements

51

LCRs

(locus control regions), v genomu velmi rozšířené

Obsahují místa senzitivní k Dnáze I a motiv pro vazbu TF
enhancerová aktivita - způsobují přeuspořádání/otevření
struktury chromatinu na úseku 10-100 kb

funkce izolátoru

množství genů v blízkosti LCR