

А. В. Сиволоб, К. С. Афанасьєва

Молекулярна організація хромосом

УДК 577.32

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України В.М. Кавсан
(Інститут молекулярної біології і генетики НАН України);

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України С.О. Костерін
(Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України);

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України А.В. Риндич
(Інститут молекулярної біології і генетики НАН України)

Сиволоб А.В., Афанасьєва К.С. Молекулярна організація хромосом

Викладено сучасні уявлення про структурно-функціональну організацію еукаріотичних хромосом. Описано білки хроматину, структуру та структурну динаміку інтерфазного хроматину на різних рівнях його організації, зміни хроматину при активації транскрипції, механізми інактивації транскрипції та епігенетичної спадковості в складі гетерохроматину, механізми реплікації ДНК, компактизації та сегрегації хромосом під час мітозу. Розглянуто також структурне розмаїття еукаріотичних хромосом та їх перетворення в процесі еволюції.

Для студентів біологічних факультетів університетів, а також для аспірантів та науковців, які цікавляться молекулярною біологією та генетикою.

Іл. 131. Бібліогр.: 239.

ЗМІСТ

Вступ

1. Еукаріотична хромосома: загальний огляд
2. Структурні білки хроматину
 - 2.1. Корові гістони
 - 2.1.1. Структура корових гістонів
 - 2.1.2. Гістонові комплекси
 - 2.1.3. Варіанти корових гістонів
 - 2.2. Лінкерний гістон H1
 - 2.3. Посттрансляційні модифікації гістонів
 - 2.3.1. Ацетилювання
 - 2.3.2. Метилювання
 - 2.3.3. Фосфорилування
 - 2.3.4. Убіквітинування
 - 2.3.5. Полі(ADP)-рибозилування
 - 2.3.6. Гістоновий код
 - 2.4. Білки HMG
 - 2.4.1. HMGA
 - 2.4.2. HMGB
 - 2.4.3. HMGN
3. Нуклеосома
 - 3.1. Структура нуклеосоми
 - 3.1.1. ДНК-гістонові взаємодії та просторова організація нуклеосоми
 - 3.1.2. Структура ДНК у нуклеосомі
 - 3.2. Механізми стабілізації нуклеосоми
 - 3.3. Конформаційна рухливість нуклеосоми
 - 3.3.1. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК
 - 3.3.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми в циркулярних ДНК
 - 3.3.3. Зміна хіральності нуклеосоми: реверсома
 - 3.4. Варіабельність нуклеосомних частинок у хроматині
4. Наднуклеосомна організація інтерфазного хроматину
 - 4.1. Позиціонування нуклеосом
 - 4.2. Структура та динаміка хроматинової фібрили

- 4.3. Хроматинова фібрила у клітинному ядрі
- 5. Функціональні процеси в інтерфазному хроматині
 - 5.1. Механізми транскрипції в еукаріотів: загальний огляд
 - 5.1.1. РНК-полімераза та її робочий цикл
 - 5.1.2. Базальні фактори транскрипції
 - 5.1.3. Структурна організація транскрипційної системи у клітинному ядрі
 - 5.1.4. Промотори
 - 5.1.5. Енхансери
 - 5.1.6. Регуляція транскрипції
 - 5.1.6.1. мікроРНК
 - 5.1.6.2. Транскрипційні фактори
 - 5.1.6.3. Зміни в хроматині та регуляція транскрипції
 - 5.2. Ремоделювання промоторів
 - 5.3. Комплекси ремоделювання хроматину
 - 5.4. Елонгація транскрипції у хроматині
 - 5.5. Конститутивна репресія транскрипції: гетерохроматин
 - 5.5.1. Теломера і субтеломерний гетерохроматин
 - 5.5.2. HP1-залежна система репресії
 - 5.5.3. Метилування ДНК
 - 5.6. Реплікація ДНК у хроматині
- 6. Мітотична хромосома
 - 6.1. Білкові компоненти мітотичної хромосоми
 - 6.1.1. Модифікації гістонів, що супроводжують компактизацію хромосом
 - 6.1.2. Топоізомераза II
 - 6.1.3. Білки SMC
 - 6.1.4. Конденсини
 - 6.1.5. Когезини
 - 6.2. Іонні взаємодії у мітотичній хромосомі
 - 6.3. Механічні властивості мітотичної хромосоми
 - 6.4. Моделі структури мітотичної хромосоми
- 7. Сегрегація мітотичних хромосом
 - 7.1. Структура центромери

- 7.1.1. Центромерна ДНК
- 7.1.2. Механізм визначення центромери та структура центромерного хроматину
- 7.2. Структура кінетохору
- 7.3. Веретено поділу
 - 7.3.1. Полімеризація мікротрубочок веретена поділу
 - 7.3.2. Взаємодія мікротрубочок з кінетохором
- 7.4. Розділення хромосом і система контролю збірки веретена поділу
- 7.5. Завершення процесу сегрегації хромосом
- 8. Різноманітність хромосом
 - 8.1. Еволюція каріотипів
 - 8.1.1. Методи аналізу каріотипів
 - 8.1.2. Загальні механізми еволюції каріотипів
 - 8.1.3. Статеві хромосоми та їх еволюція
 - 8.2. Особливі типи хромосом
 - 8.2.1. Мейотичні хромосоми
 - 8.2.2. Політенні хромосоми
 - 8.2.3. В-хромосоми
 - 8.2.4. Хромосоми дріжджів, що брунькуються
 - 8.2.5. Хромосоми інфузорій
 - 8.3. Хромосоми прокаріотів

Вступ

Загальна довжина ДНК в ядрі клітини, наприклад, ссавців – близько 2 м. Така кількість ДНК в еукаріотичних клітинах вимагає її щільної упаковки, яка, з одного боку, пригнічує функціональні активності у значній частині геному, а з іншого – дозволяє здійснювати такі активності у певних ділянках у певні моменти часу. Ці альтернативні завдання вирішуються завдяки тому, що молекули ДНК існують в клітинному ядрі у вигляді складних та динамічних нуклеопротеїнових комплексів – хромосом.

Хромосоми (від грецького χρῶμα і σῶμα) – "забарвлені тільця" – були вперше описані у клітинах, що діляться, у XIX столітті. Після того, як Морганом (Thomas Hunt Morgan) на початку минулого століття була сформульована хромосомна теорія спадковості, ці тільця стали центральним об'єктом у генетиці. А після відкриття у 70-х роках минулого століття нуклеосомної організації хроматину (нуклеопротеїнового "матеріалу", з якого побудовані хромосоми) хромосома – один з контрапунктів сучасної молекулярної біології, в якому сходяться такі різноманітні "теми" як структура ДНК і білків, механізми білково-нуклеїнових взаємодій, регуляція транскрипції та реплікації, репарації і рекомбінації ДНК, молекулярні механізми сегрегації генетичного матеріалу при клітинному поділі та багато інших.

Мета цієї книги – ознайомити студентів біологічних факультетів із сучасними уявленнями про молекулярну організацію хромосом на різних стадіях клітинного циклу. Книга передбачає попереднє знайомство читача з основами цитології, біохімії, генетики та молекулярної біології. Основна увага приділяється структурним аспектам та впливу структури хромосом на їхню функціональну активність.

У першому розділі представлено загальний огляд принципів структурної організації хромосом: вводяться основні поняття, зміст яких більш детально розглядається у наступних розділах. Розділ 2 присвячено основним білкам хроматину, які

визначають структурну організацію ДНК у його складі. У розділі 3 розглядається будова та конформаційна рухливість базової структурної одиниці хроматину – нуклеосоми, у розділі 4 – організація хроматину на наднуклеосомних рівнях. Розділ 5 присвячено механізмам головних функціональних процесів, що відбуваються в хроматині, – транскрипції та реплікації. У розділах 6 і 7 описуються молекулярні механізми надкомпактизації хромосом та їхнього розходження до дочірніх клітин у процесі клітинного поділу. Останній розділ присвячено розмаїттю структурних та морфологічних типів еукаріотичних хромосом та питанням їхнього еволюційного перетворення.

З метою полегшення сприйняття кількість посилань на оригінальні роботи в тексті зведена до мінімуму. Перелік рекомендованої літератури наведено наприкінці кожного розділу, при цьому зазначено конкретне коло питань, до якого відносяться певні джерела. Перелік літератури, наведений наприкінці першого розділу, є загальним до матеріалу книги в цілому.

Атомні координати структур макромолекул, якими проілюстровано книгу, отримано з Банку даних білкових структур (PDB – Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>), коди PDB наведено у підписах до рисунків. Зображення структур створено за допомогою програм PyMOL (DeLano Scientific LLC, США, <http://www.pymol.org/>) та UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

Розділ 1. Еукаріотична хромосома: загальний огляд

Ядро еукаріотичної клітини відокремлене від цитоплазми ядерною оболонкою, яка складається з двох мембран – зовнішньої та внутрішньої. Зовнішня мембрана формує з мембранами ендоплазматичного ретикулуму спільну мембранну систему. Зовнішня та внутрішня ядерна мембрани у багатьох місцях на поверхні ядра з'єднуються, утворюючи ядерні пори, де розміщені мультимолекулярні порові комплекси, що забезпечують ядерно-цитоплазматичний транспорт. В середині ядра внутрішню мембрану вистилає *ламiна* – сітка, що утворена білковими філаментами завтовшки близько 10 нм. Філаменти ламіни протягнуті від однієї пори до іншої, визначаючи позиції пор на поверхні ядра та взагалі форму та розмір ядра. Ламіна та ядерна оболонка утворюють єдину структуру, яку називають *ядерним конвертом*.

В ядрі кожної клітини багатоклітинного організму знаходиться кілька (до кількох десятків і навіть сотень) досить довгих лінійних молекул ДНК – набір молекул є ідентичним для усіх клітин. Соматична клітина містить подвійний – диплоїдний – набір молекул ДНК, утворений з двох гаплоїдних наборів батьків при заплідненні. Тобто, молекули ДНК диплоїдного набору представлені парами гомологічних молекул, однаковими за розміром та подібними за нуклеотидною послідовністю. Сукупність послідовностей ДНК у клітинах даного організму називається *геномом*. Під геномом виду розуміють сукупність послідовностей ДНК у гаплоїдному наборі.

Еукаріотичні геноми містять значну кількість ДНК – наприклад, у ссавців, близько $3 \cdot 10^9$ пар основ у гаплоїдному наборі. Переважна частина цієї ДНК не є кодуючою. Білковим генам еукаріотів (їхня кількість у вищих багатоклітинних є близькою до 20–30 тис.) притаманний мозаїчний принцип будови кодуючої частини: власне кодуюча частина представлена послідовністю окремих змістовних ділянок – *екзонів*, розділених беззмістовними *інтронами*. У ссавців кодуючі послідовності – екзони – займають лише ~1,5 % геному. Решта припадає на міжгенну ДНК (де містяться також регуляторні ділянки),

інтрони (~30 %) і, більше половини генома, – на послідовності, що повторюються (ділянки, представлені багатьма копіями).

Серед повторів зазвичай розрізняють:

- Деякі гени, що представлені кількома (іноді до 1000) копіями.
- Псевдогени – послідовності, що є гомологічними до певних генів, але не експресуються внаслідок мутацій, пошкоджень системи регуляції транскрипції тощо.
- Багатократні повтори коротких послідовностей (тандемні повтори), частина яких розподілена по всьому геному, але більшість – зосереджена в окремих особливих зонах (див. нижче).
- Інтерсперсні (мобільні) елементи, здатні до переміщення і розмноження в межах геному (або ділянки, які *були здатні* до переміщення в минулому, а після втрати такої активності просто залишились у геномі). Мобільні елементи займають значну частину еукаріотичного геному (від 30 до 50 %), але розподілені нерівномірно: є довгі ділянки, що на 90% представлені мобільними елементами, і такі зони, де інтерсперсні елементи відсутні.

Кожна молекула ДНК, що знаходиться у клітинному ядрі, має особливу **центромерну ділянку**, що розділяє молекулу на два плеча різної довжини. Плечі позначають латинськими літерами р (коротке плече) та q (довге плече). Довжина центромерної ділянки варіює від 125 пар основ у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до 0,1–4 млн пар основ у людини. Найчастіше послідовність ДНК в цій зоні представлена тандемними АТ-збагаченими повторами і не містить активних генів. На обох кінцях кожної молекули ДНК знаходиться ще одна особлива зона – **теломерна**, що складається з коротких елементів послідовності (у хребетних та більшості вищих рослин – ТTAGGG), що повторюються багато разів. Довжина теломерної ділянки варіює у різних організмів (наприклад, у миші більше 30 тис пар основ, у людини 10–15 тис пар основ). Ще одна особлива ділянка ДНК деяких хромосом – **ядерцевий організатор** – містить кластер генів рибосомної РНК, що тандемно повторюється від 100 до 1000 разів. Кожний кластер

представлений трьома генами рРНК – 18S, 5,8S та 28S – і має довжину приблизно 11 тис пар основ. В інтерфазному ядрі ядерцеві організатори кількох різних хромосом розташовуються поруч і формують щільну структуру, яка називається **ядерцем**. До складу ядерця входять також транскрипти генів рРНК, рибосомні білки та велика кількість інших білків (до 700 у людини) – ядерце є "фабрикою", де відбувається синтез рибосомних РНК і збірка рибосомних субодиниць.

Типова довжина однієї молекули ДНК у клітинному ядрі – кілька сантиметрів (наприклад, у людини, середня довжина дорівнює ~5 см, найдовша молекула – майже 10 см). Зрозуміло, що полімери такої довжини мають бути компактизовані всередині ядра, яке має мікронні розміри, – молекули ДНК існують у ядрі не самі по собі, а у вигляді комплексів з білками. Розміщений в клітинному ядрі нуклеопротейновий комплекс, до складу якого входить *одна* молекула ДНК та білки певних типів, називають **хромосою**. Нуклеопротейновий матеріал, з якого побудовані хромосоми, називають **хроматином**. Організація хроматину відрізняється наявністю ієрархії кількох структурних рівнів.

Головними структурними білками хроматину є **гістони** – білки двох класів, збагачені на позитивно заряджені амінокислотні залишки (загальна маса гістонів приблизно дорівнює масі ДНК). Крім гістонів до складу хроматину входять також численні негістонові білки (загальна маса яких приблизно дорівнює масі гістонів) – транскрипційні фактори, різноманітні ферменти, білки, що виконують специфічну структурну роль, тощо. На першому рівні структурної організації хроматину ДНК формує за рахунок взаємодії з **коровими гістонами** (перший клас гістонів) елементарні утворення – **нуклеосоми**. Білковий компонент нуклеосоми (кор) складається з 8 молекул корових гістонів H2A, H2B, H3 та H4 – по дві молекули кожного типу. Октамерний комплекс гістонів має на своїй поверхні своєрідний трек позитивно заряджених амінокислотних залишків, який використовується для взаємодії з нуклеосомною ДНК довжиною 145–147 пар основ: ДНК формує на поверхні октамера ~1,7 витка лівої суперспіралі (рис. 1.1).

Нуклеосоми утворюються вздовж усієї ДНК хроматину із середньою щільністю 1 нуклеосома на ~200 пар основ, сусідні нуклеосоми з'єднані міжнуклеосомними *лінкерними* ділянками. Нуклеосомна ДНК + лінкерна ділянка складають так званий *нуклеосомний повтор*, довжина якого варіює як уздовж полінуклеосомного ланцюга, так і в залежності від функціонального стану, типу клітин тощо. Характер розподілу нуклеосом уздовж геномної ДНК має важливе функціональне значення: зрозуміло, що лінкерна ДНК є більш доступною для зовнішніх регуляторних впливів.

Як показано на рис. 1.1, кінцеві неупорядковані ділянки корових гістонів (хвости) виходять за межі нуклеосоми. Завдяки своїй структурній лабільності вони беруть участь в організації хроматину на наднуклеосомному рівні, а також відіграють важливу роль платформи для зв'язування різноманітних негістонових білків. Така взаємодія гістонових хвостів з білками має важливі функціональні наслідки для регуляції генної активності і залежить від численних посттрансляційних модифікацій хвостів.

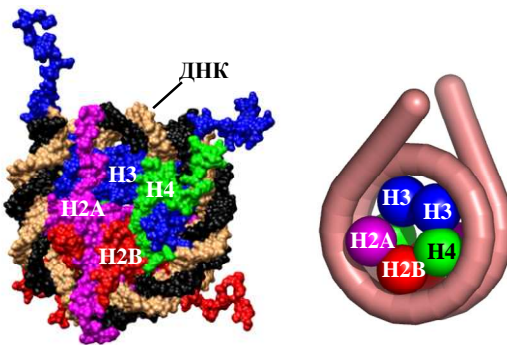


Рис. 1.1. Загальний вигляд поверхні (код PDB 1KX5) та схема структури нуклеосоми.

З нуклеосомами в хроматині взаємодіють (не більше однієї молекули на нуклеосому) *лінкерні гістони* (другий клас гістонів, представлений гістоном H1 та його варіантами). Ця взаємодія додатково стабілізує нуклеосому та забезпечує

"докручування" нуклеосомної ДНК приблизно до двох повних витків. Частинку, що складається з октамеру корових гістонів, однієї молекули гістона H1 та ДНК довжиною 160–180 пар основ, називають *хроматосомою*. За рахунок взаємодії з ДНК неупорядкованих хвостів корових гістонів та лінкерних гістонів полінуклеосомна нитка конденсується із утворенням на другому рівні компактизації хроматину (рис. 1.2) так званої *фібрили 30 нм* (мається на увазі приблизний діаметр). На кожні 11 нм уздовж такої фібрили припадає зазвичай 11 нуклеосом. Таким чином, загальна довжина фібрили суттєво скорочується у порівнянні з контурною довжиною ДНК в її складі – до кількох сотень мікронів.

Фібрила 30 нм є основною формою існування хроматину та хромосом під час інтерфази – між клітинними поділами (див. нижче), тобто тоді, коли на ДНК відбуваються всі функціональні процеси. Але у хроматині існує значна гетерогенність за ступенем конденсації. З одного боку, передумовою активації окремих ділянок хроматину є часткова тимчасова деконденсація фібрили. Така структурна динаміка на рівні стабільності хроматинової фібрили, а також окремих нуклеосом, є найважливішим шляхом регуляції транскрипційної активності. З іншого боку, у репресованих ділянках хроматинова фібрила може бути як додатково стабілізованою у компактному стані, так і піддаватися компактизації більш високого порядку. Частина хроматину, що зберігає стан підвищеної компактизації протягом інтерфази, називається *гетерохроматином* (решта хроматину, де в принципі може відбуватися активація транскрипції, позначається як *еухроматин*). Гетерохроматинові зони було описано у цитологічних дослідженнях ще в 1928 році як зони клітинного ядра, що інтенсивно забарвлюються основними барвниками, і, відповідно, характеризуються підвищеною компактністю. Сьогодні під гетерохроматином частіше розуміють репресовані ділянки ДНК, де значно пригнічена транскрипція. Утворення гетерохроматину відбувається, в першу чергу, у ділянках, що містять повтори – у центромерних, теломерних та суміжних прицентромерних і субтеломерних ділянках, зонах концентрації

мобільних елементів (*конститутивний* гетерохроматин), а також у специфічних для даного типу клітин геномних зонах, де забезпечується гарантована репресія генної активності (*факультативний* гетерохроматин). Додаткова компактизація гетерохроматину забезпечується особливими білками. Специфічні білки рекрутуються і до зазначених вище особливих зон хромосомної ДНК: комплекс таких білків та теломерної ДНК на кінцях хромосоми називають *теломерою*, а білково-нуклеїновий комплекс, що утворюється на центромерній ділянці, – *центромерою*.

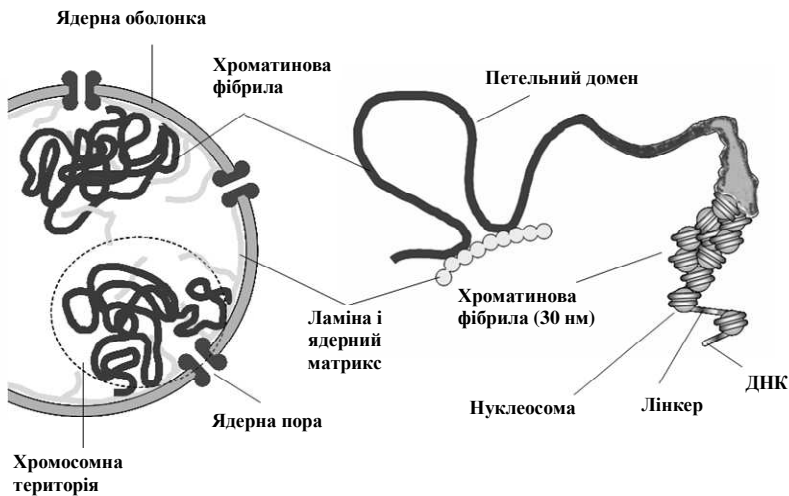


Рис. 1.2. Рівні структурної організації хроматину в інтерфазному ядрі.

На наступному рівні структурної організації хроматинова фібрила (принаймні її частина) формує петлі, кінці яких є жорстко закріпленими на *ядерному матриксі* – білкових скелетних філаментах ядра (рис. 1.2). Деякі петельні домени не є чітко детермінованими – петля в певній ділянці хроматину може утворюватись тільки в клітинах певного типу і бути постійною або виникати тимчасово у відповідь на регуляторні сигнали.

Питання про те, наскільки розвинутою є мережа філаментів внутрішнього матриксу залишається недостатньо з'ясованим – можливо, ця мережа пронизує увесь простір ядра, можливо – являє собою лише окремі порівняно короткі білкові філаменти. Частина таких філаментів протягується всередину ядра від периферійної частини матриксу – ламіни, існування якої та її роль у підтриманні цілісності ядра, а також взаємодія з нею петельних доменів хроматину, не викликають сумніву.

На ламіні фіксується значна частина гетерохроматину, зокрема центромери та теломери хромосом. Еухроматинова частина хромосоми “звішується” всередину ядра, де, можливо, взаємодіє з елементами внутрішнього матриксу. В результаті хромосома у вигляді хроматинової фібрили, вздовж якої чергуються еу- та гетерохроматинові ділянки, займає певну більш-менш чітко визначену зону в об'ємі ядра – ***хромосомну територію***.

У деяких клітинах (різноманітні тканини личинок комах, клітини трофобласту у ссавців, клітини зародкового міхура у рослин тощо) присутні хромосоми особливого типу, які є виключенням зі сформульованого вище визначення хромосоми – вони містять не одну, а кілька сотень або навіть тисяч ідентичних молекул ДНК (і, відповідно, хроматинових фібрил 30 нм, зв'язаних між собою по всій довжині). Ці молекули ДНК накопичуються в результаті багаторазової реплікації без наступних клітинних поділів. Такі хромосоми, що їх називають ***політенними***, мають гігантські розміри і є видимими в оптичний мікроскоп постійно. Біологічна роль політенії ймовірно пов'язана з високою метаболічною активністю певних клітин.

У переважній більшості еукаріотичних клітин в процесі підготовки до клітинного поділу відбувається однократна реплікація ДНК і, відповідно, подвоєння диплоїдного набору хромосом. Взагалі всі клітини багатоклітинного організму в процесі свого розвитку проходять ряд послідовних стадій – клітинних циклів – від одного поділу до іншого. Клітинний цикл складається з двох великих періодів – ***інтерфазу*** (періоду між двома поділами) та власне поділу (***мітозу***). Інтерфаза, в свою

чергу, поділяється на 3 фази – *пресинтетичну* (G1, від англ. gap – проміжок), *синтетичну* (S) та *постсинтетичну* (G2) (рис. 1.3).

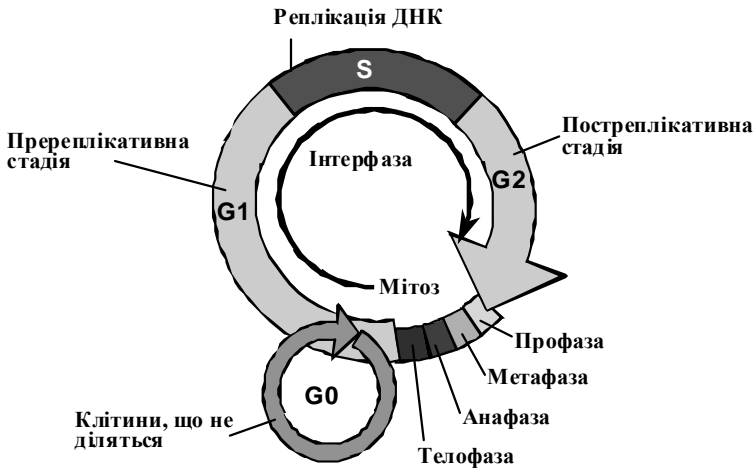


Рис. 1.3. Схема клітинного циклу.

Кожна стадія інтерфази характеризується певним набором подій, які необхідні для того, щоб клітина вступила до поділу: фактично, для клітин, які активно діляться, інтерфаза – період постійної підготовки до поділу. Ключовим моментом при цьому є подвоєння молекул ДНК для того, щоб при поділі кожна дочірня клітина отримала по одному диплоїдному набору хромосом. Власне процес реплікації ДНК відбувається під час S-фази і триває в середньому 10–12 годин. Синтез усіх білків, необхідних для цього процесу, відбувається в G1-фазі (синтез гістонів – одночасно з реплікацією в S-фазі). Під час G2-фази синтезуються і накопичуються усі елементи, необхідні для клітинного поділу. Мітоз розділяють на чотири етапи (профаза, метафаза, анафаза, телофаза), у процесі яких відбувається *каріокінез* (поділ ядра) та *цитокінез* (наприкінці телофази – поділ цитоплазми з утворенням двох дочірніх клітин). Клітини, які остаточно диференційовані і більше не вступають до поділу, виходять із циклічного процесу і знаходяться на стадії G0 (саме

на цій стадії усі клітини багатоклітинного організму виконують притаманні їм функції). Стадія G₀ закінчується, як правило, програмованою загибеллю клітини. У процесі розвитку статевих клітин останній клітинний цикл закінчується не мітозом, а *мейозом* – клітинним поділом, в результаті якого утворюються чотири клітини з гаплоїдними наборами хромосом.

Отже, в процесі реплікації ДНК під час S-фази кожна хромосома (у стані хроматинової фібрили) перетворюється на дві ідентичні дочірні хромосоми, які залишаються зв'язаними між собою за рахунок білок-білкових взаємодій. Після цього у профазі мітозу за участі особливих білків починається надкомпактизація хромосом: компактні мітотичні хромосоми мають зазвичай витягнуту форму в середньому довжиною порядку кількох мікронів (іноді до 50 мкм) та діаметром близько 1 мкм, і стають видимими в оптичний мікроскоп (ядерце при цьому, навпаки, зникає). Єдине значення процесу надкомпактизації хромосом полягає в тому, щоб забезпечити швидке переміщення хромосом у процесі клітинного поділу – надкомпактна мітотична хромосома, ДНК у складі якої є функціонально неактивною, являє собою щільно упаковану “порцію” спадкової інформації. Одночасно з компактизацією хроматинової фібрили “розчиняється” ядерний конверт.

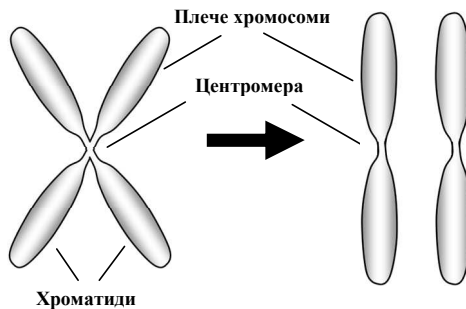


Рис. 1.4. Схема морфології мітотичних хромосом до (ліворуч) та після (праворуч) розходження хроматид (дочірніх хромосом).

Характерною морфологічною ознакою мітотичної хромосоми є так звана первинна перетяжка, що утворюється в зоні центромери (рис. 1.4). Центромера є ділянкою хромосоми, на якій відбувається утворення складного мультибілкового комплексу – *кінетохору*, необхідного для прикріплення мікротрубочок веретена поділу. В залежності від розміщення центромери хромосоми розподіляють на три типи: *метацентричні* (два плеча приблизно однакові за довжиною); *субметацентричні* (плечі суттєво розрізняються за довжиною); *ахроцентричні* (коротке плече є настільки маленьким, що під мікроскопом його не помітно взагалі). Хромосоми, що містять ядерцевий організатор, мають також так звану *вторинну перетяжку* в місці його локалізації. Сукупність морфологічних ознак, за якими можна охарактеризувати набір мітотичних хромосом організму називають *каріотипом* (рис. 1.5). Особливості каріотипу – кількість, розмір та морфологія хромосом – є паспортною характеристикою даного біологічного виду.



Рис. 1.5. Хромосоми людини на стадії метафази – кожна хромосома представлена двома хроматидами, з'єднаними в області центромер. Фото люб'язно предоставлено С. Р. Рушковським.

На перших стадіях мітозу зберігається зв'язок між дочірніми хромосомами в зоні центромер за допомогою спеціальних білків. Саме у такому надкомпактному стані хромосоми були відкриті та вперше описані, при цьому вважалося, що хромосома складається з двох половин – *хроматид*. Цей термін широко використовується і досі, але слід розуміти, що хроматиди – це просто дві копії материнської хромосоми, що утворились унаслідок реплікації ДНК. У процесі мітозу (під час анафази) зв'язок між центромерами руйнується, і веретено поділу забезпечує розходження дочірніх хромосом до полюсів клітини. У дочірніх клітинах знову формуються ядерні оболонки навкруг хромосом, а хромосоми декомпактизуються – переходять у стан хроматинової фібрили.

Рекомендована література

Сиволоб, А.В. Молекулярна біологія. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. et al. Molecular biology of the cell. – N.Y. : Garland Science, 2007.

Brown T.A. Genomes. – N.Y. : Garland Science, 2002.

Chromatin structure and gene expression: frontiers in molecular biology / eds. S. Elgin, J.L. Workman. – Oxford : Oxford University Press, 2002.

Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. New Comprehensive Biochemistry / eds. J. Zlatanova, S.H. Leuba. Amsterdam : Elsevier, 2004. – Vol. 39.

Cook, P.R. Principles of nuclear structure and function. – N.Y. : Wiley-Liss, 2001.

Kornberg, R. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // Science. – 1974. – Vol. 184. – P. 868-871.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S. et al. Molecular cell biology. – New York : W.H. Freeman and Company, 2007.

Samner, A.T. Chromosomes: organization and function. – Oxford : Blackwell Science, 2003.

van Holde, K.E. Chromatin. – N.Y. : Springer-Verlag, 1988.

Wolffe, A.P. Chromatin structure and function. – San Diego : Academic Press, 1999.

Розділ 2. Структурні білки хроматину

Структурна організація хроматину залежить від взаємодії з ДНК білків, що входять до його складу. У цьому розділі розглянуто структуру та властивості загальних неспецифічних білків, які відіграють основну роль в організації нуклеосом та хроматинової фібрили.

2.1. Корові гістони

До категорії корових – таких, які визначають структуру нуклеосом – відносяться чотири гістони: H2A, H2B, H3 та H4. Ці білки є одними з найбільш еволюційно консервативних за амінокислотною послідовністю. В той самий час, гістони є мішенями численних посттрансляційних модифікацій, що створює значну гетерогенність у хроматині за різними формами гістонів щодо модифікацій. Крім того, поряд із "канонічними" гістонами (що розглядаються у підпдрозд. 2.1.1), в хроматині всіх еукаріотів існує кілька більш спеціалізованих гістонових варіантів (підпдрозд. 2.1.3)

2.1.1. Структура корових гістонів. Амінокислотні послідовності "канонічних" корових гістонів представлено на рис. 2.1. Слід відмітити дві загальні характеристики цих послідовностей:

- Гістони відрізняються підвищеним вмістом позитивно заряджених амінокислотних залишків Lys та Arg. У складі гістонів H3 та H4 (так звана аргінін-збагачена група) вміст Arg становить 13,3 та 13,7 % відповідно, Lys – 9,6 та 10,8 %. У складі гістонів H2A та H2B (помірно лізин-збагачені гістони) відповідні відсотки Arg дорівнюють 9,3 та 6,4, Lys – 10,9 та 16. Відношення кількості позитивних залишків до кількості негативних дорівнює для гістонів H2A, H2B, H3 та H4 1,4; 1,7; 1,8 та 2,5 відповідно.

- Амінокислотні залишки різних типів розподілені вздовж ланцюгів нерівномірно – гідрофобні залишки зосереджені в С-кінцевих та центральних частинах молекул, на N-кінцях їх

практично немає (рис. 2.1). Відповідно, в області, де знаходяться гідрофобні залишки, формується глобулярна структура, N-кінцеві ділянки (хвости) довжиною від 15 до 44 амінокислот залишаються неупорядкованими. Гістон H2A має також помітний C-кінцевий хвіст. Неупорядковані хвости збагачені позитивно зарядженими амінокислотами і є субстратами для численних посттрансляційних ковалентних модифікацій.

Позитивно заряджені амінокислотні залишки присутні у досить великій кількості і в глобулярних частинах. На рис. 2.1 позначено залишки Arg, котрі відіграють особливу роль – занурюються у маленький жолобок ДНК у нуклеосомі, реалізуючи міцні електростатичні контакти з фосфатами (розділ 3). Глобулярна частина всіх корових гістонів має спільні риси. Вона виглядає як характерний триспіральний гістоновий мотив (histone fold), у якому одна довга α -спіраль ($\alpha 2$) фланкована двома короткими ($\alpha 1$, $\alpha 3$), приєднаними до неї петлями L1, L2 (рис. 2.1, 2.2). Гістон H3 містить також додаткову α -спіраль з боку N-кінця мотиву (αN -спіраль), гістон H2B – додаткову αC -спіраль, дві короткі α -спіралі знаходяться з двох боків поза гістоновим мотивом у складі гістона H2A. Гістоновий мотив зустрічається також в деяких еукаріотичних факторах транскрипції.

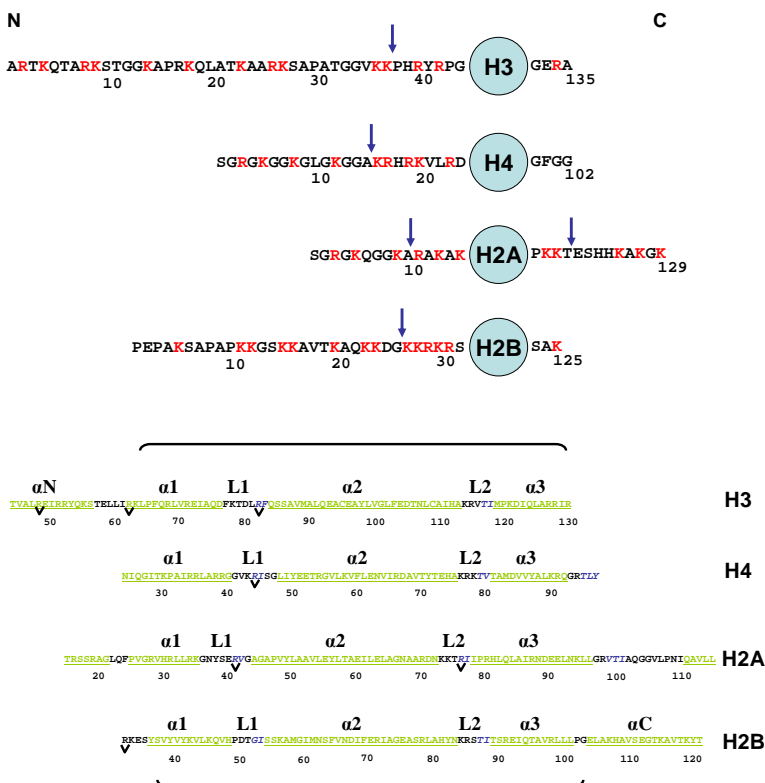


Рис. 2.1. Первинна структура корових гістонів людини. Верхня панель: амінокислотні послідовності невідсортованих кінцевих ділянок; глобулярні частини позначено колами; позитивно заряджені залишки Lys та Arg виділено червоним; стрілки позначають місця, де невідсортовані хвости виходять за межі нуклеосоми. Нижня панель: амінокислотні послідовності глобулярних частин; α -спіралі виділено зеленим та підкреслено, β -структурні ділянки – синім курсивом; дужками позначено стандартний гістоновий мотив; L1 та L2 – петлі між α -спіралями; знаком ∇ відмічено залишки Arg, що занурюються у маленький жолобок ДНК у нуклеосомі.

Таким чином, основним типом вторинної структури гістонів є α -спіралі, невеличкі ділянки β -структури (рис. 2.1, 2.2) утворюються при взаємодії між гістонами (наступний підрозділ). Глобулярні структури індивідуальних корових гістонів, показані на рис. 2.2, насправді не існують окремо: гістоновий мотив не формує гідрофобного ядра, заекранованого від розчинника, – значна кількість гідрофобних залишків опиняється на поверхні. Внаслідок цього одна молекула корового гістона не може існувати як окремий глобулярний білок у водному розчині.

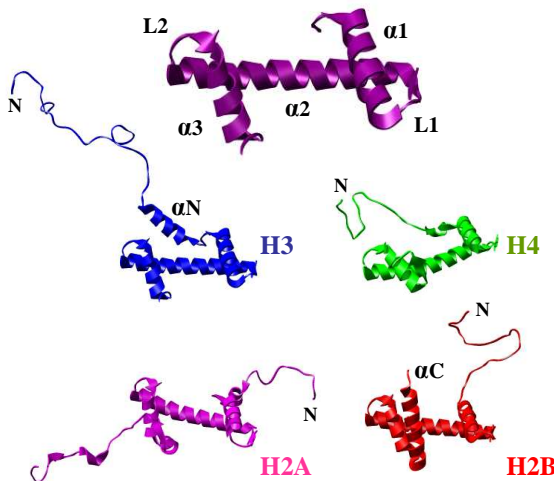


Рис. 2.2. Загальна структура гістонового мотиву та просторові структури гістонів, вилучені зі структури нуклеосоми (код PDB 1KX5). Відмічено α -спіралі, петлі L1 та L2, N-кінці поліпептидних ланцюгів.

2.1.2. Гістонові комплекси. Мінімальними стабільними структурними одиницями, які можуть існувати в розчині за фізіологічних умов, є гетеродимери H2A-H2B та H3-H4, які мають спільну будову – так званий "мотив рукоштовування" (handshake motif, рис. 2.3).

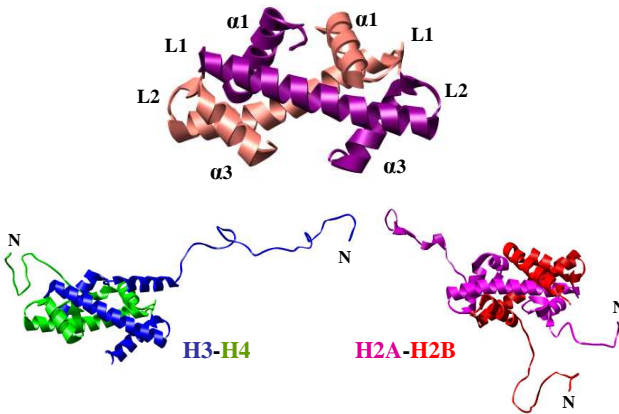


Рис. 2.3. Загальна структура димера гістонів та просторові структури гетеродимерів H3-H4 і H2A-H2B в нуклеосомі (код PDB 1KX5). Відмічено α -спіралі, петлі L1 та L2, N-кінці поліпептидних ланцюгів.

Два гістонові мотиви формують у складі димерів щільне гідрофобне ядро: можна сказати, що гістонові димери – це глобулярні білки з четвертинною структурою. Структури димерів стабілізовані в основному гідрофобними взаємодіями між спіралями $\alpha 2$ - $\alpha 2$ та $\alpha 1$ - $\alpha 2$ різних молекул. Специфічність утворення гетеродимерів залежить, головним чином, від додаткових взаємодій, що здійснюються із загальним мотивом рукоятискання αN - та αC -спіралі гістонів H3 та H2B відповідно. У наближених одна до одної петлях L1 та L2 різних молекул у складі димерів утворюються невеличкі елементи міжмолекулярної β -структури (рис. 2.3), які надають петлям конформаційної жорсткості.

Крім високої спорідненості в парах H3-H4 та H2A-H2B, гістони здатні також і до інших взаємодій між собою: у розчині двох різних гістонів можуть утворюватись менш стабільні комплекси у складі H2B-H4, H3-H3 та H2A-H3, що відображає здатність гістонових гетеродимерів до утворення комплексів

більш високого порядку та ієрархію міжгістонових взаємодій у нуклеосомі.

У розчині за фізіологічних умов два гетеродимери Н3-Н4 взаємодіють між собою за рахунок утворення чотириспірального пучка між спіралями $\alpha 3$ та С-кінцевими частинами довгих спіралей $\alpha 2$ гістонових мотивів молекул Н3. У результаті формується тетрамер $(\text{H3-H4})_2$ (рис. 2.4), стабілізований гідروفобними взаємодіями та водневими зв'язками між двома гістонами Н3. Структура тетрамера нагадує підкову, яка характеризується хіральністю – утворює елемент лівої спіралі. Вісь симетрії другого порядку тетрамерного комплексу проходить через інтерфейс між двома молекулами Н3 (вісь симетрії другого порядку – лінія, обертання навкруг якої на 180° переводить одну частину структури в іншу).

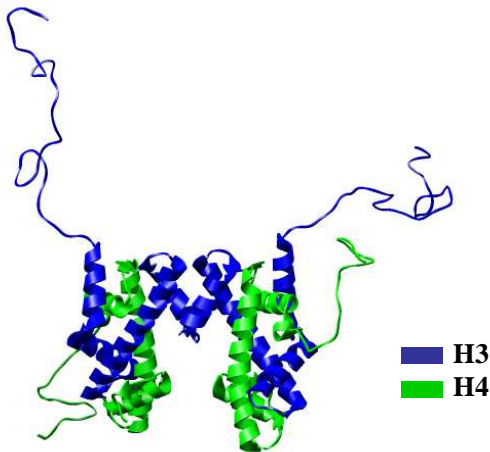


Рис. 2.4. Загальна структура тетрамера гістонів $(\text{H3-H4})_2$ в нуклеосомі (код PDB 1KX5). У просторі права частина тетрамера розташована ближче до глядача – виходить із площини рисунка вперед, ліва – назад.

Аналогічний за своєю структурою чотириспіральний пучок між гістоновими мотивами молекул Н4 та Н2В (рис. 2.5)

служить для забезпечення взаємодій між тетрамером $(H3-H4)_2$ та димером $H2A-H2B$. Таким чином, “підкова” тетрамера симетрично продовжується двома димерами $H2A-H2B$ в обидва боки, результатом чого є утворення білкового кора нуклеосоми – октамера $(H2A-H2B-H3-H4)_2$ (рис. 2.6).

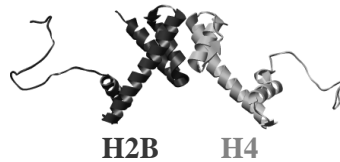


Рис. 2.5. Контакт між гістонами H2B та H4 у нуклеосомі (код PDB 1KX5).

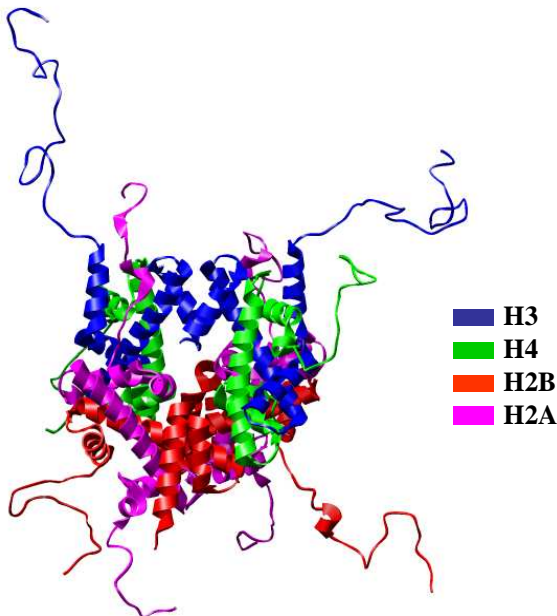


Рис. 2.6. Структура білкового кора нуклеосоми – октамера $(H2A-H2B-H3-H4)_2$ (код PDB 1KX5).

Контакт між гістонами H2B та H4, як і контакт H3–H3 у тетрамері (H3–H4)₂, стабілізується за рахунок гідрофобних взаємодій та водневих зв'язків. Крім того, між гістонами H2B та H4 утворюється кластер із трьох ароматичних залишків Туг, які здійснюють між собою стекинг-взаємодії. На відміну від контакту H3–H3, в області контакту H2B–H4 спостерігається скупчення позитивно-заряджених залишків. Відповідно, взаємодія між димером H2A–H2B та тетрамером (H3–H4)₂ є чутливою до іонної сили, і у відсутності ДНК контакт між димером та тетрамером може бути стабільним тільки за умови нейтралізації зарядів неорганічними аніонами у досить високій концентрації – у 2 М NaCl. За фізіологічних умов роль аніонів беруть на себе фосфатні залишки ДНК – нейтралізація позитивних зарядів гістонів за рахунок взаємодії з ДНК є передумовою утворення октамера гістонів, який, у свою чергу, забезпечує укладання ДНК у нуклеосомі.

Отже, гістоновий октамер складається з трьох структурних блоків: тетрамера (H3–H4)₂ та двох димерів H2A–H2B. Вісім молекул гістонів взаємодіють при цьому у послідовності, що закручена в ліву спіраль: H2A–H2B–H4–H3–H3'–H4'–H2B'–H2A'. Основний внесок у стабілізацію октамера дають контакти між гістонами H2B і H4, але додатково октамер стабілізується за рахунок взаємодій між гістонами H2A–H3' і між двома димерами H2A–H2B. Відповідно, збірка октамера *in vitro* у 2 М NaCl характеризується позитивною кооперативністю – зв'язування другого димера H2A–H2B із гексамером (H3–H4)₂(H2A–H2B) відбувається з підвищеною спорідненістю. За даними ізотермічної калориметрії константа зв'язування першого димера з одним із двох доступних сайтів на тетрамері у 2 М NaCl становить $2,12 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, константа зв'язування другого димера з гексамером дорівнює $9,96 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ – спорідненість підвищується приблизно в п'ять разів. Такі константи означають, що в еквімолярній суміші чотирьох гістонів у 2 М NaCl у відсутності ДНК октамер гістонів присутній у помітній кількості за концентрації білків $\sim 1 \text{ мг/мл}$, зниження загальної

концентрації зсуває рівновагу в бік комплексів більш низького порядку (рис. 2.7).

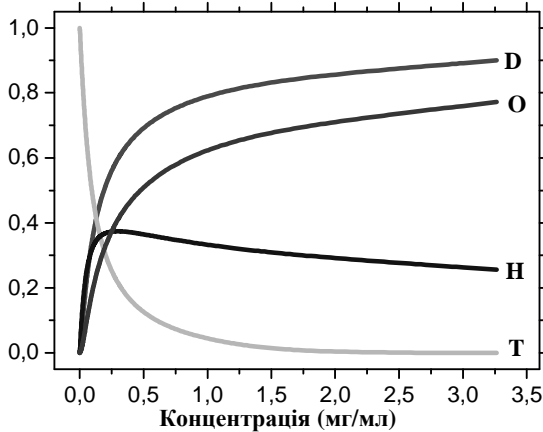


Рис. 2.7. Частка тетрамера $(H3-H4)_2$ у вільному стані (Т), у складі гексамера $(H3-H4)_2(H2A-H2B)$ (Н) і октамера гістонів (О) та частка зв'язаних димерів $H2A-H2B$ (D) як функція загальної концентрації білка в еквімолярній суміші чотирьох гістонів у 2 М NaCl. За даними Benedict *et al.* (1984).

Наведені значення констант зв'язування димера з тетрамером свідчать про загальну енергію взаємодії між двома типами гістонових комплексів на рівні 16–17 одиниць kT (міра кінетичної енергії теплового руху, k – константа Больцмана, T – абсолютна температура) або ~ 10 ккал/моль.

2.1.3. Варіанти корових гістонів. Основна кількість корових гістонів кодується гістоновими генами, які у всіх організмів зібрані у кластери (по п'ять генів – чотири гени корових гістонів плюс ген лінкерного гістона H1), що тандемно повторюються багато разів. На відміну від більшості інших еукаріотичних генів, гістонові гени характеризуються двома особливостями: вони не містять інтронів, та їхня мРНК не піддається

поліаденилуванню на 3'-кінці. Найбільш активна експресія гістонових генів відбувається в S-фазі клітинного циклу – одночасно з реплікацією ДНК, тобто тоді, коли утворюється вдвічі більше нуклеосом на подвоєній кількості ДНК. Узгоджена з реплікацією доставка гістонів до хроматину у вигляді гістонових комплексів здійснюється за допомогою гістонових шаперонів (факторів збірки нуклеосоми) CAF-1 (Chromatin Assembly Factor, складається з трьох субодиниць), який забезпечує доставку гістонів H3 та H4 (у формі гетеродимера), та NAP-1 (Nucleosome Assembly Protein), що відповідає за завантаження у хроматин димера (H2A-H2B). У яйцеклітинах та клітинах зародку хребетних присутні інші гістонові шаперони – нуклеоплазмін (Np) та N1.

Гени у гістонових кластерах характеризуються певним незначним поліморфізмом, і, відповідно, кодують гістони, що розрізняються кількома амінокислотними замінами. Такі варіанти гістонів називають *гомоморфними*. Наприклад, у людини всі гістонові гени кодують один варіант гістона H4 та, як і у більшості тварин, три варіанти гістона H3 (H3.1, H3.2, H3.3). H3.1 та H3.2 розрізняються однією амінокислотою заміною, H3.3 відрізняється від H3.2 по чотирьох амінокислотних позиціях. Гомоморфні варіанти H2A і H2B у людини розрізняються по десяти позиціях, подібний рівень поліморфізму спостерігається у миші, морського їжака та інших тварин. Частина гістонових генів зберігає активність і поза S-фазою – з метою "підкачки" гістонів у хроматин. Зокрема, це стосується гістона H3.3, який називають "гістоном підстановки" на відміну від інших гомоморфних варіантів. На варіант H3.3 збагачені транскрипційно активні ділянки – процеси транскрипції викликають тимчасове видалення гістонів, після чого частина цих гістонів замінюється на синтезовані *de novo*. Незалежна від реплікації доставка H3.3 (у складі тетрамера з гістоном H4) забезпечується шапероновим комплексом HIRA.

Крім гомоморфних, у хроматині існують і *гетероморфні* гістонові варіанти – такі, що більш суттєво відрізняються від канонічних гістонів. Відповідні унікальні гени (що не входять до складу гістонових кластерів) містять інтрони, мРНК

піддається поліаденилуванню, активність цих генів не залежить від реплікації ДНК. Серед гетероморфних варіантів корових гістонів розрізняють один спеціалізований варіант гістона H3 та кілька – гістона H2A.

CenH3 – варіант гістона H3, який замінює звичайний H3 у центромерних зонах хромосом (відомий також як CENP-A у ссавців, Cse4 у дріжджів, CID у дрозофіли). Глобулярна частина CenH3 має ~60% гомології з такою звичайного H3, N-кінцеві хвости двох білків не мають нічого подібного між собою. Більше того, N-кінцевий хвіст CenH3 різних організмів сильно варіює за послідовністю та довжиною – від 27 до 196 амінокислотних залишків. При цьому CenH3 не має специфічної спорідненості до повторів, з яких у багатьох організмів складається центромерна ДНК (і які відрізняються значною варіабельністю нуклеотидних послідовностей у різних видів). Доставка CenH3 в центромерні зони здійснюється завдяки особливим гістоновим шаперонам (розділ 7).

У глобулярній частині CenH3 також спостерігаються певні відмінності від звичайного H3: більш довгою є петля L1, кілька важливих залишків Arg (серед тих, що занурюються у маленький жолобок ДНК, рис. 2.1) замінені іншими амінокислотами. Нуклеосома, що містить CENP-A, відрізняється зниженням стабільності нуклеосомної суперспіралі ДНК на її кінцях – по 7 пар основ на кінцях нуклеосомної ДНК слабо взаємодіють з поверхнею октамера. При цьому сама структура нуклеосоми, реконструйованої *in vitro* за участі CenH3, суттєво не відрізняється від звичайної. Але *in vivo* у центромерах дрозофіли та людини формуються особливі частинки, що містять гетеротетрамер CenH3-H4-H2A-H2B замість октамера гістонів. Деякі результати свідчать, що ДНК у складі цих частинок, можливо, утворює праву, а не ліву суперспіраль.

Основна функція CenH3 полягає у визначенні центромери як такої: наявність цього гістонового варіанта забезпечує взаємодію з білками кінетохору; часткове розкручування нуклеосомної ДНК або більш радикальна перебудова нуклеосом у частинки, що містять гетеротетрамер, – доступ до ДНК інших центромерних білків. Наявність CenH3, напевно, запобігає

надкомпактизації мітотичної хромосоми в центромерній зоні, що сприяє формуванню кінетохору під час мітозу.

H2A.Z – варіант, який становить у хроматині 5–10% від загальної кількості гістона H2A та має зі звичайним H2A ~60% гомології амінокислотної послідовності. Відмінності послідовності стосуються С-кінцевого хвоста, а також елементів глобулярної структури, які залучені до контактів з гістоном H3 при взаємодії з тетрамером $(H3-H4)_2$ – ця взаємодія послаблюється. Заміна димерів H2A-H2B на H2A.Z-H2B забезпечується одним із АТР-залежних комплексів ремоделювання хроматину (розділ 5). На гістон H2A.Z збагачені нуклеосоми, що займають певні специфічні позиції в промоторах (розділ 4) – H2A.Z маркує промотор, де відбулась ініціація транскрипції. Крім того, H2A.Z зустрічається з підвищеною частотою в енхансерах.

H2A.X – ще один універсальний для більшості організмів варіант H2A, рівномірно розподілений по хроматину. Його вміст у хроматині становить 2–10% від загального H2A, 120 перших амінокислотних залишків ідентичні звичайному H2A, але С-кінцевий хвіст на 13 залишків довший та містить 22 залишки, не гомологічні звичайному H2A. У межах цієї зони амінокислотної послідовності є характерний олігопептидний мотив Ser-Gln-Glu/Asp-Φ, де Φ – гідрофобний залишок. Залишок Ser є сайтом фосфорилування специфічною кіназою. Фосфорилування здійснюється у відповідь на появу в ДНК дволанцюгових розривів (будь-яким шляхом – пошкоджуючий вплив іонізуючого випромінювання, апоптоз, гомологічна рекомбінація, V(D)J-рекомбінація імуноглобулінових генів тощо) – від 100 до 1000 молекул H2A.X піддаються фосфорилуванню в області розриву. Таким чином, фосфорильований H2A.X (позначається як γ H2A.X) є сенсором розривів, який рекрутує до зони розриву елементи репараційної системи негомологічного з'єднання кінців ДНК (NHEJ – Non-Homologous End Joining).

MacroH2A, поліпептидний ланцюг якого в 3 рази довший звичайного H2A, являє собою гібридну білкову молекулу – звичайна амінокислотна послідовність H2A плюс велика

негістонова частина на С-кінці, гомологічна деяким вірусним РНК-зв'язувальним білкам. MacroH2A зустрічається переважно у складі інактивованої Х-хромосоми самок ссавців (яка знаходиться у надкомпактному стані під час інтерфази – у вигляді так званого тільця Барра, Barr body). Напевно, MacroH2A взаємодіє з молекулами РНК Xist (продукт гена *Xist*, активного тільки у складі інактивованої Х-хромосоми), зв'язаними з тільцем Барра, та приймає участь у підтриманні інактивованого стану. Проте, MacroH2A зустрічається також у самців ссавців та у комах (у яких не відбувається інактивація Х-хромосоми), приймаючи, ймовірно, участь у додатковій компактизації певних геномних ділянок.

H2A.Bbd (від Barr body deficient) – специфічний для ссавців варіант H2A, на який збіднені інактивовані Х-хромосоми. За рахунок скорочення С-кінцевого хвоста, він коротший за звичайний H2A та гірше взаємодіє з тетрамером $(H3-H4)_2$ (подібно до H2A.Z). Нуклеосома, до складу якої входить H2A.Bbd, частково розкручена – містить 110–130 пар основ ДНК. Крім того, такі нуклеосоми сприяють деконденсації хроматинової фібрили 30 нм. На варіант H2A.Bbd збагачені транскрипційно-активні зони хроматину.

Розглянуті варіанти гістонів є властивими для соматичних клітин. У хроматині сперматоцитів та спермій усіх тварин та рослин присутні особливі спермій-специфічні варіанти гістонів, а також спермій-специфічні протаміни та протамін-подібні білки (протаміни – порівняно невеликі олігопептиди, збагачені на Arg), які забезпечують щільну компактизацію хроматину. У деяких видів хроматин спермій містить спермій-специфічні гістони та має нуклеосомну структуру. У інших (зокрема, у ссавців та осетрових риб) у процесі сперматогенезу гістони повністю або майже повністю замінюються на протаміни. У людини лише від 4 до 15% ДНК у сперматозоїдах входить до складу нуклеосом, решта – зв'язана з протамін-подібними білками. При цьому CENP-A залишається в хроматині сперматозоїдів, маркуючи центромерні зони.

Говорячи про гістонові варіанти, слід згадати також гістон-подібні білки археїв. Ці білки містять характерний гістоновий

мотив, але не мають невпорядкованих хвостів. Гістони археїв, як і еукаріотичні, формують димери, а також тетрамери, схожі за своєю структурою на тетрамер $(H3-H4)_2$. Такий тетрамер взаємодіє з ДНК, внаслідок чого утворюється частинка, у складі якої ділянка подвійної спіралі довжиною ~ 60 пар основ закручується в елемент (менше одного витка) лівої або правої суперспіралі.

2.2. Лінкерний гістон H1

Вміст гістона H1 у хроматині є тканиноспецифічним (розділ 4), але зазвичай не перевищує однієї молекули на октамер корових гістонів. На відміну від корових, лінкерний гістон H1 (позначається також як лізин-збагачений) – мономерний білок, який містить трохи більше 200 амінокислотних залишків: невпорядкований N-кінцевий хвіст довжиною ~ 40 залишків (збагачений на Lys та Ala), невеликий глобулярний домен (GH1), довгий (половина молекули) C-кінцевий невпорядкований хвіст, збагачений на Lys, Ala та Pro. Відношення кількості позитивних амінокислотних залишків до негативних у гістоні H1 дорівнює приблизно 5.

Гістон H1 існує у вигляді досить великої кількості варіантів – родини лінкерних гістонів. Наприклад, у ссавців у соматичних клітинах усіх тканин зустрічаються чотири варіанти H1, які позначаються як H1^s-1, 2, 3, 4. Крім того, у термінально диференційованих клітинах присутній варіант H1⁰, у сім'яниках, селезінці та тимусі – H1a, а також кілька ізоформ H1^t у сперматоцитах. У неактивному хроматині еритроцитів птахів міститься аналог гістона H1 – гістон H5. Усі ці варіанти розрізняються, головним чином, по невпорядкованих хвостах, глобулярний домен досить консервативний. Лінкерний гістон активного хроматину дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Hho1 містить два глобулярні домени замість одного (гомологічні GH1) та лізин-збагачений C-кінцевий хвіст. У хроматині інфузорії *Tetrahymena*, навпаки, міститься лінкерний гістон, в якому відсутній глобулярний домен.

За своєю структурою глобулярний домен Н1 відноситься до родини ДНК-зв'язувальних білків типу "спіраль-поворот-спіраль із крильцем" (winged helix-turn-helix). Дві α -спіралі (у складі досить стандартного для глобулярних білків триспірального пучка) розташовані приблизно під прямим кутом одна до одної, роль крильця відіграє невеликий β -структурний шар (рис. 2.8). Поверхня глобули є загалом позитивно зарядженою і, відповідно, має спорідненість до ДНК. Зрозуміло, що позитивно заряджені хвости також ефективно взаємодіють з ДНК. У хроматині глобулярний домен взаємодіє з нуклеосою на вході/виході нуклеосомної ДНК, С-кінцевий хвіст – із лінкерами (звідки й походить назва родини). Гістон Н1 є одним з головних факторів стабілізації хроматинової фібрили 30 нм (розділ 4).

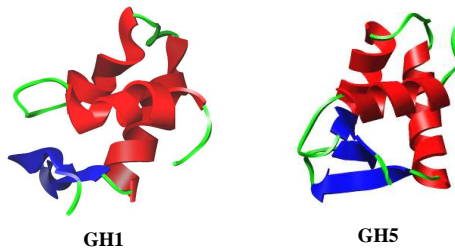


Рис. 2.8. Глобулярні домени гістонів Н1 (код PDB 1GHC) та Н5 (код PDB 1HST).

2.3. Посттрансляційні модифікації гістонів.

Різноманітні посттрансляційні модифікації здійснюються по консервативних амінокислотних залишках, розташованих у неупорядкованих хвостах (або на межі хвоста та глобулярної частини). Основні типи цих модифікацій (ацетилювання лізину, метилювання лізину та аргініну, фосфорилування серину та убіквітинування лізину) та залишки, які є їхніми мішенями в корових гістонах, показано на рис. 2.9. Гістон Н1 піддається

фосфорилуванню, а також ще одній модифікації, яка зустрічається і для корових гістонів, – полі(ADP)-рибозилуванню.

2.3.1. Ацетилювання залишків Lys полягає у приєднанні до ε-аміногрупи залишку оцтової кислоти (ацетату):



Джерелом ацетатних груп є ацетил-кофермент А, каталізує реакцію гістон-ацетилтрансфераза (HAT, Histone AcetylTransferase). Приєднання ацетату видаляє позитивний заряд на залишку лізину. Ацетилювання відноситься до короткотермінових модифікацій – гістон-деацетилази (HD, Histone Deacetylase, позначаються також як HDAC) здатні видаляти ацетатний залишок.

Гістон-ацетилтрансферази підрозділяються на два класи. Клас В – цитоплазматичні ферменти, які здійснюють ацетилювання гістонів відразу після синтезу. В ацетилюваній формі гістони комплекси транспортуються гістоновими шаперонами-переносниками до ядра, де завантажуються на ДНК. У хроматині статус ацетилювання у певній зоні залежить від балансу активностей деацетилаз та ацетилтрансфераз класу А – ядерних ферментів.

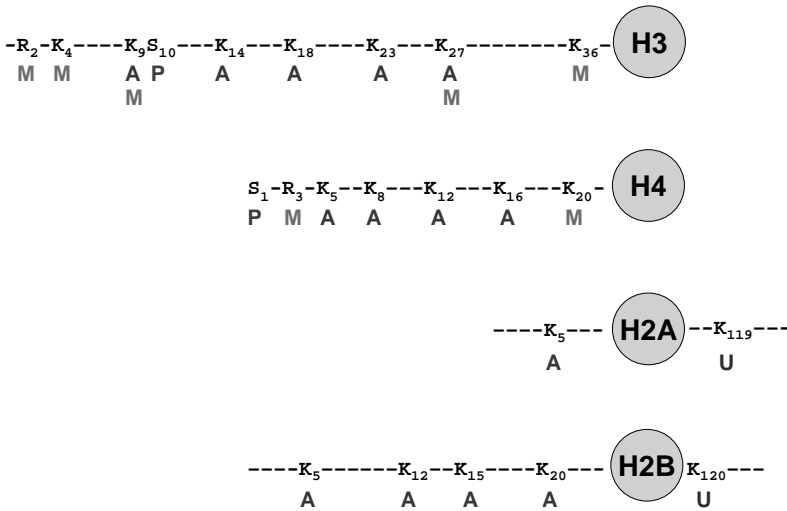


Рис. 2.9. Основні типи та сайти посттрансляційних модифікацій корових гістонів (А – ацетилювання, М – метилювання, Р – фосфорилування, U – убіквітинування).

Ядерні ацетилтрансферази завжди працюють у складі великих мультибілкових комплексів, деякі приклади наведено у таблиці 2.1. Аналогічно, до мультибілкових комплексів залучені і деацетилазні активності (наприклад, до складу комплексів Sin3, NuRD).

Таблиця 2.1. Приклади гістон-ацетилтрансфераз

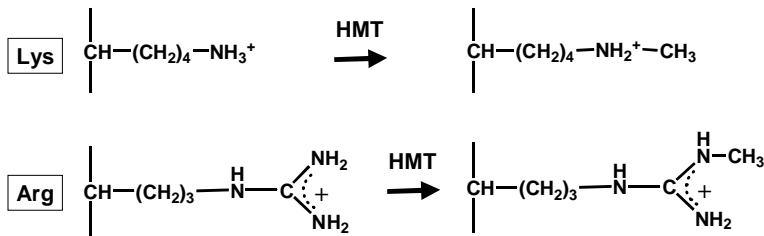
Родина ацетилтрансфераз	Представники	Комплекс, до складу якого входить	Специфічність	Процеси, до яких залучена
GNAT	GCN5	SAGA Ada	H3/H2B	Транскрипція
	PCAF	PCAF	H3	Транскрипція
MYST	Tirp60	Tirp60	H4/H2A	Транскрипція, репарація
	HBO 1	HBO 1	H3/H4	Реплікація

p300/CBP	p300 CBP	p300 CBP	4 гістони	Транскрипція, репарація, реплікація
TAF _{II} 250	TAF _{II} 250	TFIID	H3/H4	Транскрипція

Ацетилювання є єдиною з модифікацій, про яку можна сказати однозначно, що вона завжди корелює з підвищенням активності транскрипції та інших функціональних процесів, що відбуваються у хроматині. Так, гіперацетилювані гістони завжди присутні у транскрипційно активних ділянках хроматину, у репресованих підтримується деацетилюваний статус гістонів. Як видно з таблиці 2.1, ацетилювальна активність є, зокрема, компонентом загального фактору транскрипції TFIID. Крім того, компоненти цього фактора – фактори, асоційовані з білком TBP (TAFs), – входять також і до складу інших ацетилювальних комплексів (SAGA, PCAF). Таким чином, ацетилювання гістонів є невід'ємним елементом загальної системи регуляції транскрипції (розділ 5).

Існує два типи механізмів впливу ацетилювання гістонів на структурно-функціональний стан хроматину. Перший полягає в тому, що видалення позитивних зарядів з численних лізинів залишків (рис. 2.9) призводить до зниження спорідненості гістонів до ДНК. Як буде показано у наступному розділі, це не викликає суттєвої зміни структури нуклеосоми, але зумовлює деяке зниження її стабільності, а також сприяє деконденсації хроматинової фібрили. Другий, більш важливий механізм, є спільним для ацетилювання та інших модифікацій: ацетилювані лізини впізнаються численними негістоновими білками, що має певні функціональні наслідки (підпідрозд. 2.3.6).

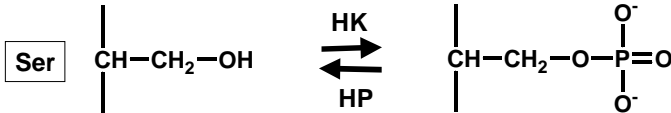
2.3.2. Метилювання залишків лізину та аргініну здійснюється за схемою:



де НМТ – гістон-метилтрансфераза – фермент, що переносить метильні групи з S-аденозилметіоніну на аміногрупу Lys або гуанідинову групу Arg. На аміногрупу може приєднатись не тільки одна (як на схемі), а дві або три метильні групи, на гуанідинову групу – одна або дві. Як показано на схемі, позитивний заряд не зникає внаслідок метилювання. Проте, деякі неспецифічні наслідки можуть мати місце: метилювання дещо підвищує гідрофобність залишку та знижує його здатність утворювати водневі зв'язки. Головний наслідок метилювання – впізнання метильованих залишків певними білками. Чіткої кореляції між метилюванням та транскрипційною активністю немає – наприклад, метильований H3Lys4 (четвертий Lys в гістоні H3) зазвичай присутній в транскрипційно активних ділянках, а H3Lys9 – у репресованих.

Гістон-метилтрансферази – високоспецифічні ферменти, кожен з яких здійснює метилювання лише конкретного залишку у конкретному гістоні. Деякі залишки можуть піддаватись деметилюванню за рахунок деметилазних активностей. Але для багатьох залишків – на відміну від інших модифікацій – метилювання є довготривалим: метильовані гістони зберігаються у певних ділянках хроматину довгий час і зникають з хроматинової ділянки тільки разом з гістоном внаслідок його заміни на неметильовану молекулу. Наприклад, метильовані гістони H3 при активації транскрипції можуть (і це супроводжується ацетилюванням гістонів) замінюватись на неметильований варіант H3.3. Довготривалість метилювання гістонів робить цю модифікацію одним із важливим механізмів епігенетичної спадковості (розділ 5).

2.3.3. Фосфорилування гістонів здійснюється по кількох залишках серину:



Фосфорилування – перенесення фосфату з АТФ на ОН-групу Ser за рахунок активності гістон-кіназ (HK) – є оборотним за рахунок гістон-фосфатазних (HP) активностей. Хоча фосфорилування призводить до появи двох негативних зарядів, зважаючи на невелику кількість мішеней фосфорилування в корових гістонах (рис. 2.9), ефект цієї модифікації на спорідненість гістонів до ДНК не є важливим. Головна роль фосфорилування корових гістонів (головним чином мова йде про H3Ser10) полягає в його впливі на інші модифікації (підпдрозд. 2.3.6).

Фосфорилуванню піддається також і гістон H1, і тут вплив фосфорилування на зниження спорідненості до ДНК є більш суттєвим: один Ser в N-кінцевому хвості, два Ser та два Thr – у C-кінцевому.

Функціональна роль фосфорилування є подвійною. З одного боку, в період інтерфази фосфорилування H1 призводить до деконденсації хроматинової фібрили і часто спостерігається в активованих промоторах. Аналогічно, фосфорилування H3Ser10 часто слугує сигналом для зв'язування гістон-ацетилтрансфераз у транскрипційно активних ділянках. З іншого боку, фосфорилування H1 та H3 зростає під час мітотичної надконденсації хромосом (розділ б). Можливо, тут також відбувається послаблення взаємодії H1 з ДНК з метою дати доступ до неї іншим білкам, від яких залежить надкомпактизація.

2.3.4. Убіквітинування гістонів здійснюється по двом залишкам Lys в гістонах H2A і H2B (рис. 2.9). Убіквітин (ubiquitin) – невеликий глобулярний білок, який містить 76 амінокислот. Реакція убіквітинування полягає в ковалентному приєднанні С-кінцевої карбоксильної групи убіквітину до ε-аміногрупи Lys – утворюється ізопептидний зв'язок. До реакції залучено три типи ферментів: фермент типу E1 АТР-залежним шляхом активує молекулу убіквітину, фермент E2 приєднує його до власного залишку Cys, фермент E3 (убіквітин-лігаза) переносить убіквітин з E2 на аміногрупу того чи іншого білка. Як добре відомо для багатьох білків, на приєднаний убіквітин переноситься ще одна молекула убіквітину, далі ще кілька, і такий поліубіквітин є маркером системи протеолітичної деградації у протеосомах. Гістони також можуть бути субстратом такої деградації, але тут мова йде про *моноубіквітинування*, яке не має жодного відношення до протеолізу. У хроматині зазвичай до 10% гістонів H2A є убіквітинованими по Lys119 і до 1–2% гістонів H2B – по Lys120. Приєднаний до гістонів убіквітин відщеплюється убіквітин-специфічною протеазою – убіквітин у складі модифікованих гістонів швидко обмінюється із загальним пулом вільного убіквітину в ядрі. Убіквітинування/деубіквітинування гістонів H2A і H2B здійснюється різними наборами специфічних ферментів.

Функціональні наслідки убіквітинування є різноманітними (у залежності від контексту інших модифікацій), але спостерігається наступна тенденція: убіквітинований H2A є частіше маркером репресії, убіквітинований H2B часто залучений до активації транскрипції (див. підпідрозд. 2.3.6).

2.3.5. Полі(ADP)-рибозилування – модифікація, яка суттєво змінює фізичні властивості гістонів. ADP-рибоза (аденозиндифосфат, до якого приєднаний ще один залишок рибози, рис. 2.10) переноситься на гістони (та деякі інші білки) зв'язаним із хроматином ферментом полі(ADP)-рибозополімеразою (PARP, poly(ADP)-ribose polymerase), донором ADP-рибози є нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD⁺).

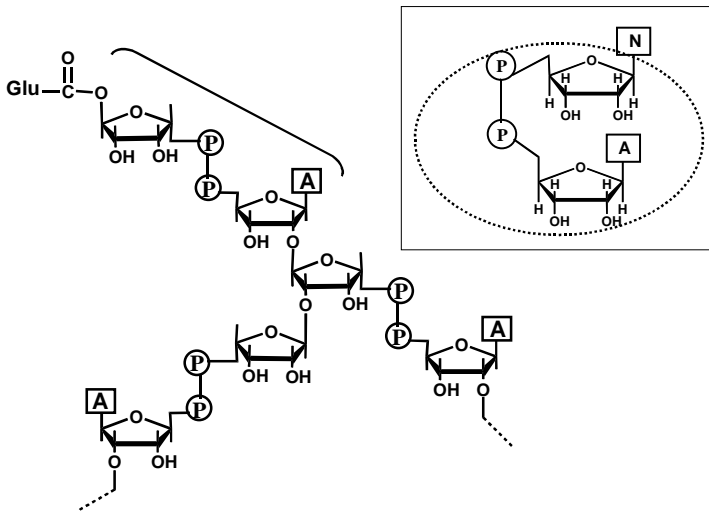


Рис. 2.10. Полі(ADP)-рибоза, приєднана до карбоксильної групи залишку Glu, дужкою позначено мономер – (ADP)-рибозу. На вставці: NAD^+ , овалом обведено (ADP)-рибозу. N – нікотинамід, A – аденін, P – фосфатний залишок.

Залишок (ADP)-рибози приєднується до карбоксильної групи (частіше у складі Glu). Модифікація може полягати у приєднанні одного такого залишку або багатьох (до 200) – полімерний ланцюг (полі(ADP)-рибоза), який може розгалужуватись, утворюється за рахунок приєднання мономерів до OH-груп рибоз (рис. 2.10).

Основна мішень полі(ADP)-рибозилування в хроматині – гістон H1 (два Glu в N-кінцевому хвості, один у C-кінцевому поряд із глобулярним доменом та C-кінцева карбоксильна група). Проте іноді модифікуються також і корові гістони – зокрема залишок Glu в N-кінцевому хвості H2B.

На відміну від інших модифікацій гістонів, полі(ADP)-рибоза являє собою масивний негативно заряджений (завдяки фосфатних залишків) полімер, дуже схожий на нуклеїнові кислоти. Такий поліаніон, по-перше, суттєво знижує

спорідненість модифікованих гістонів до ДНК. По-друге, полі(ADP)-рибоза може нековалентно взаємодіяти з гістоновими комплексами, сприяючи їх тимчасовому видаленню з ДНК. При цьому PARP, присутня у багатьох локусах хроматину, часто після певних регуляторних сигналів полі(ADP)-рибозилує сама себе, а цей полімер вже адсорбує гістонові комплекси.

Полі(ADP)-рибозилування іноді спостерігається при гіперактивації транскрипції деяких генів, сприяючи тимчасовому видаленню гістонових комплексів у кодуючих ділянках. Іншим добре вивченим процесом, до якого залучена ця модифікація, є репарація: активність PARP стимулюється у місцях накопичення розривів ДНК. Полі(ADP)-рибоза видаляє гістони, завдяки чому забезпечує доступ до ДНК елементів репараційних систем, після чого поліаніон досить швидко деградується спеціальними ферментами (період напіврозпаду полі(ADP)-рибози в хроматині від 30 с до 10 хв), і гістонові комплекси повертаються на ДНК.

2.3.6. Гістоновий код. Зважаючи на кількість модифікацій (рис. 2.9), можливо існування кількох тисяч різноманітних ізоформ нуклеосом, що розрізняються набором модифікованих амінокислотних залишків. Різноманітні комбінації (патерни) модифікацій залучені до регуляції функціональних процесів у хроматині – несуть певну інформацію, система зчитування цієї інформації базується на впізнанні модифікованих залишків негістоновими білками. Відповідність між патернами модифікацій та набором білків, що їх впізнають (і функціональними наслідками такого впізнання), називається *гістоновим кодом*. Білки, здатні взаємодіяти з модифікованими гістонами, називають *ефекторами*.

Деякі найбільш поширені структурні модулі, що здатні впізнавати модифіковані залишки в гістонах та зустрічаються в багатьох негістонових білках:

- **Бромодомен** (bromodomain) – структурний домен в білках, що впізнає ацетильовані лізини в гістонах. Досить часто бромодомени є специфічними – такими, що здатні взаємодіяти тільки з конкретним ацетильованим Lys. Зокрема, білки, що

містять бромодомен, часто входять до складу гістон-ацетилтрансферазних комплексів: НАТ здатна впізнати ацетилований Lys однієї нуклеосоми та здійснити ацетилювання іншого, на тій самій нуклеосомі чи на іншій – ацетилювання гістонів у певній геномній зоні може розповсюджуватись за таким каскадним механізмом. Багато інших білків, залучених до активації транскрипції (зокрема, компоненти загального фактору транскрипції TFIID) також містять бромодомени (рис. 2.11).

- **Хромодомен** (chromodomain) взаємодіє з метильованими лізинами. Наприклад, хромодомен у складі гетерохроматинового білка HP1 специфічно взаємодіє з метильованим H3Lys9, і ця взаємодія є суттєвим елементом системи підтримання гетерохроматинового стану (розділ 5).

- **PHD-палець** (PHD-finger, Plant HomeoDomain) також впізнає метильовані лізини – зокрема такі, що є маркерами активованого щодо транскрипції стану хроматину. Прикладом двохвалентного ефектора є транскрипційний фактор BPTF (bromodomain + PHD) – у його складі бромодомен, що впізнає ацетилований Lys, приєднаний α -спіральним лінкером до PHD-пальця, що зв'язується з триметильованим Lys4 у гістоні H3 (рис. 2.11).

Фізичною основою гістонового коду є те, що елементи системи регуляції транскрипції впізнають відразу *багато* різноманітних модифікацій: взаємодія з кожною окремою модифікованою групою є досить слабкою, але в цілому спорідненість одного чи кількох білків-ефекторів до даної нуклеосоми може бути достатньо високою. Така мультивалентна взаємодія забезпечує динамічний характер зв'язування: одну з певного набору взаємодій можна легко зруйнувати за рахунок якогось конкурента, що знизить загальну спорідненість та порушить комплекс. Різноманітні варіанти мультивалентних взаємодій з гістоновими хвостами схематично показано на рис. 2.12.

Мультивалентна взаємодія різноманітних ефекторів забезпечує не тільки специфічне зв'язування модифікованих гістонів, а й взаємний вплив модифікацій одна на одну.

Наприклад, в активованих ділянках хроматину метилювання H3Lys4 інгібує зв'язування гістон-деацетилаз та гістон-метильтрансферази, яка відповідає за метилювання H3Lys9. Одночасно, фосфорилування H3Ser10 індукує ацетилювання останнього лізину та H3Lys14, ці залишки в ацетильованому стані додатково блокують зв'язування НМТ (рис. 2.13). Деацетилювання вказаних лізинів, навпаки, стимулює зв'язування НМТ, яка здійснює метилювання H3Lys9, а цей останній метильований залишок інгібує метилювання H3Lys4 іншою гістон-метильтрансферазою – така комбінація модифікацій в N-кінцевому хвості H3 є ознакою репресованих ділянок (рис. 2.13).

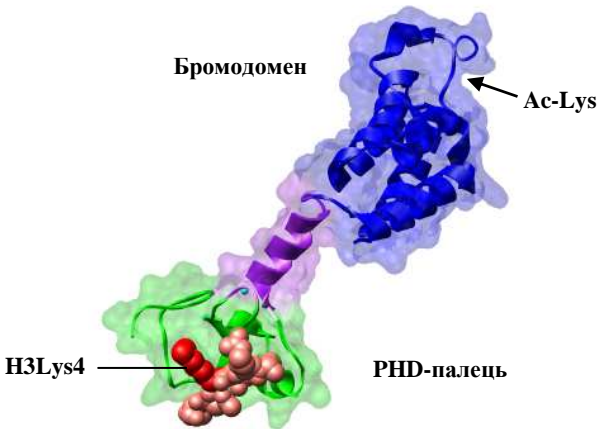


Рис. 2.11. Фактор транскрипції BPTF (код PDB 2FSA) у комплексі з метильованим Lys4 у гістоні H3. Стрілкою вказано сайт зв'язування ацетильованого Lys бромодоменом.

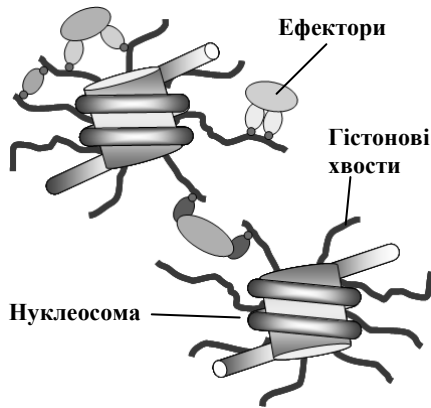


Рис. 2.12. Мультивалентна взаємодія ефекторів з модифікованими залишками, розташованими в межах одного хвоста, двох хвостів різних гістонів однієї нуклеосоми або на різних нуклеосомах.

Зазвичай, як у розглянутому прикладі, метильований H3Lys4 є маркером активних, а H3Lys9 – репресованих та гетерохроматинових ділянок. Проте, комбінація метильованих H3Lys4, H3Lys9 та H4Lys20 впізнається одним із активаторів транскрипції.

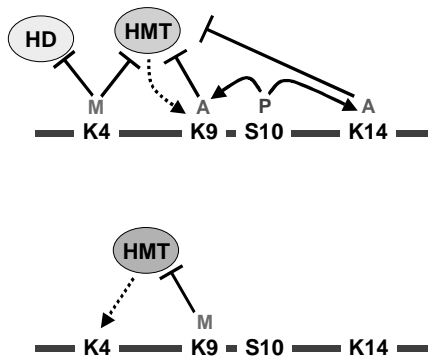


Рис. 2.13. Приклади гістонового коду: верхня комбінація модифікацій в N-кінцевому хвості гістона H3 відповідає транскрипційно активному стану, нижня – репресованому (пояснення в тексті).

До загальної системи гістонового коду залучене також і убіквітинування гістонів H2A та H2B. Як вже згадувалось вище, убіквітинований H2A (uH2A) є зазвичай маркером репресії. В нуклеосомі C-кінцевий хвіст H2A розташований в зоні входу/виходу нуклеосомної ДНК – там, де з нуклеосою взаємодіє гістон H1 (див. рис. 3.6 у наступному розділі). Поява убіквітину підвищує спорідненість до H1 і, відповідно, стабілізує компактний стан хроматинової фібрили. Крім того, uH2A інгібує метилювання H3Lys4 (маркера активних ділянок). І навпаки, деубіквітиназа uH2A рекрутується до міжмолекулярних комплексів, що збираються на промоторах при активації транскрипції.

Убіквітинований H2B (uH2B) є важливим активатором метилювання H3Lys4 – убіквітин упізнається фактором, необхідним для активації відповідної гістон-метилтрансферази. Після того, як метилювання (довгострокова модифікація) відбулось, убіквітин видаляється, виконавши свою роль, – в активних ділянках до 5% H2B є убіквітинованими, але до 35% H3 – метильованими по Lys4. Крім того, uH2B вірогідно слугує бар'єром для нормального руху РНК-полімерази при транскрипції – його видалення після ініціації транскрипції з нуклеосоми, що знаходиться відразу за стартовою точкою, є необхідною умовою нормального продовження руху полімерази.

Деякі найбільш характерні комбінації гістонових модифікацій, за якими розрізняються різні функціональні стани хроматину клітинної лінії дрозофіли, наведені у табл. 2.1. Насправді, комбінаторний аналіз дозволяє виділити 30 таких груп комбінацій – 30 станів хроматину, що розрізняються за функціональними властивостями та патернами гістонових модифікацій.

Позначення: ac – ацетилювання, me – метилювання (1, 2, 3 – кількість метильних груп), ubiq – убіквітинування. За даними The modENCODE Consortium (2010).

Таким чином, гістоновий код дає можливість тонкої регуляції та модуляції транскрипції за рахунок впізнання гістонових модифікацій численними ефекторами – факторами й кофакторами транскрипції, ферментами, що здійснюють модифікації гістонів і ДНК, комплексами ремодельовання хроматину тощо.

2.4. Білки HMG

Назва HMG (High Mobility Group, мається на увазі висока рухливість при електрофорезі) об'єднує три, структурно абсолютно різні, родини білків. Всі вони присутні в хроматині у досить великій кількості та суттєво модулюють його структурну динаміку – їх іноді називають "архітектурними білками" або "хроматиновими шаперонами".

2.4.1. HMGA (інша назва HMG-I/Y) – білки, що не мають впорядкованої структури та існують у вигляді трьох варіантів: HMGA-1a та HMGA-1b (продукти альтернативного сплайсингу одного гена) та HMGA-2 (продукт іншого гена). Гени HMGA є протоонкогенами – їхня гіперактивність може викликати злоякісну трансформацію. Ці гени є мішенями численних шляхів сигнальної трансдукції, що призводять як до зміни активностей промоторів генів, так і забезпечують різноманітні посттрансляційні модифікації їхніх продуктів.

Поліпептидний ланцюг HMGA містить 107 амінокислотних залишків, у первинній структурі є три характерні мотиви: так звані *AT-гачи* (AT-hooks) – паліндромні пентапептиди Pro-Arg-Gly-Arg-Pro. AT-гач має підвищену спорідненість до невеликого AT-збагаченого сайту ДНК (звідки походить назва мотиву) довжиною ~5 пар основ. AT-гач зв'язується з маленьким жолобком подвійної спіралі, де набуває витягнутої конформації – він добре укладається у

звужений маленький жолобок ділянки, збагаченої АТ-парами. Головний внесок у стабілізацію комплексу дають два занурені в жолобок залишки Arg, що утворюють водневі зв'язки з екзоциклічними групами тиміну (рис. 2.14).

Конформаційна рухливість поліпептидних з'єднань між АТ-гаками дозволяє білку впізнавати різноманітні комбінації АТ-збагачених сайтів, що знаходяться на різній відстані один від одного: білок взаємодіє або з АТ-збагаченою ділянкою довжиною ~15 пар основ, або з трьома АТ-збагаченими сайтами, віддаленими по ланцюгу один від одного. Такі АТ-збагачені треки досить часто зустрічаються в промоторах. При цьому сайти зв'язування з АТ-гаком по маленькому жолобку часто перекриваються з сайтами для транскрипційних факторів по великому. Оскільки сайт взаємодії має маленький розмір, він може бути доступним і на поверхні нуклеосомної ДНК.

Конформаційно лабільні з'єднання між АТ-гаками використовуються далі як платформи для збірки мультибілкових комплексів, що активують/блокують транскрипцію. Отже, зв'язування НМГА на промоторах та енхансерах часто ініціює збірку мультибілкових комплексів, які залучені до регуляції транскрипції.

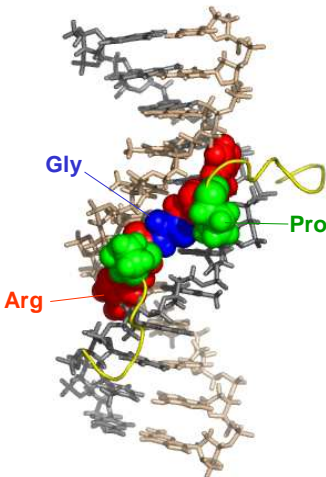


Рис. 2.14. АТ-гак у складі білка HMGA у комплексі з ДНК (код PDB 2EZD).

2.4.2. HMGB – білки, які містять у своєму складі особливі глобулярні структурні домени – так звані **HMGB-бокси**. В білках HMGB дріжджів, комах та рослин знаходиться один такий бокс, у хребетних – два. Загальна довжина поліпептидного ланцюга HMGB хребетних – 215 амінокислотних залишків (два HMGB-бокси поряд один з одним та негативно заряджений С-кінцевий хвіст). Два варіанти цього білка – HMGB-1,2 (стара назва HMG-1,2) присутні у клітинному ядрі в досить великій кількості – у ссавців 10–20 копій на нуклеосому. Спорідненість HMGB до ДНК є невисокою (білок повністю дисоціює від ДНК у 0,35 М NaCl). Негативний С-кінцевий хвіст дає свій додатковий внесок у зниження спорідненості, крім того, він, імовірно, здатен взаємодіяти з іншими білками.

HMGB-бокс має L-подібну структуру, що складається з трьох α -спіралей. Дві з них (більш короткі) вбудовуються у маленький жолобок ДНК, що супроводжується розкрученням подвійної спіралі та її вигином на $\sim 80^\circ$ у протилежний по відношенню до білка бік – у великий жолобок. У взаємодії між ДНК та білком беруть участь гідروفобні поверхні двох α -спіралей та деформованого маленького жолобка, при цьому здійснюється часткова інтеркаляція двох гідروفобних залишків (зазвичай Met, Phe або Ile) між парами основ. У складі білка HMGB бокс фланкований позитивно зарядженою N-кінцевою неупорядкованою ділянкою, яка додатково стабілізує комплекс, електростатично взаємодіючи з ДНК із внутрішнього боку вигину (рис. 2.15).

HMGB-бокс є дуже розповсюдженим структурним мотивом у багатьох ДНК-зв'язувальних білках. Серед HMGB-боксів є як специфічні до певних послідовностей пар основ (зокрема, в транскрипційних факторах LEF-1, Sox-5, SRY), так і неспецифічні. Неспецифічний білок HMGB виконує функцію фактора, що підвищує конформаційну рухливість ДНК у

клітині: білки зв'язуються на короткий проміжок часу, індують вигин, після чого дисоціюють та зв'язуються в іншому місці. Результатом є полегшення різноманітних маніпуляцій з ДНК, які потребують деформацій подвійної спіралі: рекомбінація, ремоделювання хроматину (розділ 5), зв'язування транскрипційних факторів у зоні тимчасового вигину тощо.

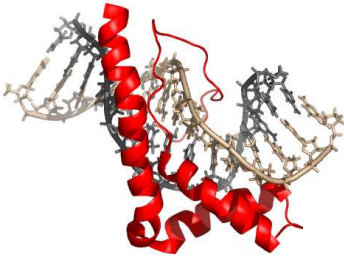


Рис. 2.15. Комплекс НМГ-бокса з ДНК а у складі білка НМGB (код PDB 1J5N).

2.4.3. HMGN – невпорядкований поліпептид довжиною ~100 амінокислот, який існує у двох варіантах: HMGN-1,2 (стара назва HMG-14, 17). Вміст HMGN у хроматині варіює для різних тканин, але не перевищує однієї копії на нуклеосому. В ланцюзі є дві зони (домени): позитивно заряджений NBD (Nucleosome Binding Domain) – ділянка від ~10-ї до 40-ї амінокислоти, що взаємодіє з нуклеосомою; та негативно заряджений С-кінцевий CUD (Chromatin UnfoldinG Domain). NBD взаємодіє з двома сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі ДНК, і ця взаємодія стабілізує структуру нуклеосом. З однією нуклеосомою кооперативно (підвищуючи спорідненість одна одної) зв'язуються дві молекули HMGN, причому завжди одного типу (1 чи 2). С-кінцева негативно заряджена частина молекули конкурує з ДНК за гістонові хвости. У результаті HMGN, який накопичується у транскрипційно активних ділянках, сприяє деконденсації хроматинової фібрили. Взаємодія HMGN з нуклеосомою – слабка, тобто він, як і HMGB, лише на короткий час (середній час імобілізації ~30 с) підвищує доступність ДНК

для інших елементів системи активації транскрипції. На деяких нуклеосомах (у залежності від компактності фібрили, контексту модифікацій, кофакторів) HMGN може затримуватись на більш довгий час і тоді стимулювати транскрипцію.

Рекомендована література

Загальна

Isenberg, I. Histones // *Ann. Rev. Biochem.* – 1979. – Vol. 48. – P. 159-191.

Sullivan, S., Sink, D.W., Trout, T.L. et al. The histone database // *Nucl. Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 341-342.

Корові гістони та гістонові комплекси

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.-C., Love, W.E., Moudrianakis, E.N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. P. 10148-10152.

Arents, G., Moudrianakis, E.N. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization // 1995. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – Vol. 93. P. 11174-11179.

Benedict, R.C., Moudrianakis, E.N., Ackers, G.K. Interactions of the nucleosomal core histones: a calorimetric study of octamer assembly // *Biochemistry.* – 1984. – Vol. 23. – P. 1214-1218.

D'Anna, J.A., Isenberg, I. A histone cross-complexing pattern // *Biochemistry.* – 1974. – Vol. 13. – P. 4992-4997.

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 319. – P. 1097-1113.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* – 1997. – Vol. 389. – P. 251-260.

Лінкерні гістони

Happel, N., Doenecke, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function // *Gene*. – 2009. – Vol. 431. – P. 1-12.

Ramakrishnan, V. Histone H1 and chromatin higher-order structure // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1997. – Vol. 7. – P. 215–230.

Варіанти гістонів

Banaszynski, L.A., Allis, C.D., Lewis, P.W. Histone variants in metazoan development // *Dev. Cell*. – 2010. – Vol. 19. – P. 662-674.

Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.-J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J., Luger, K. Nucleosomes containing the histone variant

H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 3314-3324.

Dalal, Y., Wang, H., Lindsay, S., Henikoff, S. Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells // *PLoS Biol.* – 2007. – Vol. 5. – P. 1798-1809.

Dimitriadis, E.K., Weber, C., Gill, R.K., Diekmann, S., Dalal, Y. Tetrameric organization of vertebrate centromeric nucleosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107. – P. 20317-20322.

Henikoff, S., Furuyama, T., Ahmad, K. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance // *Trends Genet.* – 2004. – Vol. 20. – P. 320-326.

Pereira, S.L., Reeve, J.N. Histones and nucleosomes in Archaea and Eukarya: a comparative analysis // *Extremophiles*. – 1998. – Vol. 2. – P. 141-148.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D., Luger, K. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 1121-1124.

Talbert, P.B., Henikoff, S. Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 264-275.

Посттрансляційні модифікації гістонів

Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription // *Nature*. – 1997. – Vol. 389. – P. 349-352.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., Hottiger, M.O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – Vol. 70. – P. 789-829.

Kuo, M. H., Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation // *Bioessays*. – 1998. – Vol. 20. – P. 615-626.

Lee, J.S., Smith, E., Shilatifard, A. The language of histone crosstalk // *Cell*. – 2010. – Vol. 142. – P. 682-685.

Marmorstein, R. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 422-432.

Strahl, D.D., Allis, C.D. The language of covalent histone modifications // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – P. 41-45.

Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. Histone acetyltransferases // *Ann. Rev. Biochem.* – 2001. – Vol. 70. – P. 81-120.

Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., Allis, C.D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 983-994.

Suganuma, T., Workman, J.L. Crosstalk among histone modifications // *Cell*. – 2008. – Vol. 135. – P. 604-607.

Weake, V.M., Workman, J.L. Histone ubiquitination: triggering gene activity // *Mol. Cell*. – 2008. – vol. 29. – P. 653-663.

Білки HMG

Agresti, A., Bianchi, M.E. HMGB proteins and gene expression // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2003. – Vol. 13. – P. 170-178.

Bustin, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins // *Mol. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 5237-5246.

Bustin, M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 152-153.

Reeves, R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function // Gene. – 2001. – Vol. 277. – P. 63-81.

Thomas, J.O., Travers, A.A. HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. P. 167-174.

Розділ 3. Нуклеосома

Нуклеосома є базовою структурною одиницею хроматину. В цьому розділі більш детально розглянуто її структуру, механізми стабілізації та структурної динаміки.

3.1. Структура нуклеосоми

3.1.1. ДНК-гістонові взаємодії та просторова організація нуклеосоми. Кожен гістоновий гетеродимер (рис. 2.3) має на своїй глобулярній поверхні три зони скупчення позитивно заряджених амінокислотних залишків, які здатні взаємодіяти з ДНК за електростатичним механізмом: у місцях взаємодії між петлями L1 та L2 різних субодиниць (які є конформаційно жорсткими за рахунок елементів міжмолекулярної β -структури, підпідрозд. 2.1.2) та в зоні контакту між N-кінцями спіралей $\alpha 1$. Разом ці три сайти створюють платформу для зв'язування ділянки ДНК довжиною 27-28 пар основ (~2,5 витка подвійної спіралі, рис. 3.1, див також рис. 2.3).

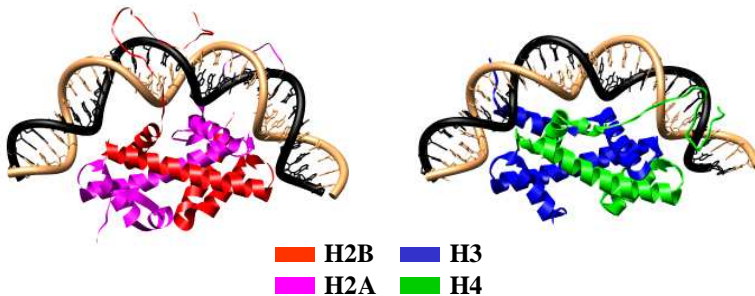


Рис. 3.1. Димери гістонів H2A-H2B та H3-H4 у комплексі з ДНК у складі нуклеосоми (код PDB 1KX5).

Тетрамер $(H3-H4)_2$ (рис. 2.4) займає центральну позицію в структурі нуклеосоми та зв'язує ~55 пар основ (рис. 3.2). Комплекс тетрамера з ДНК називають *тетрасомою*. Структура тетрасоми, як і тетрамера, нагадує підкову, яка утворює елемент

лівої суперспіралі. Вісь симетрії другого порядку тетрасоми (яка водночас є і віссю симетрії другого порядку всієї нуклеосоми) проходить через інтерфейс між двома молекулами H3 та центральну пару основ.

Два димери H2A-H2B (взаємодіючи при цьому з ДНК, що нейтралізує позитивні заряди гістонів, див. підпідрозд. 2.1.2) продовжують тетрасомну суперспіраль в обидва боки, утворюючи нуклеосомну частинку. Результатом реалізації ДНК-гістонових та гістон-гістонових взаємодій є формування на поверхні октамера ~1,7 витка лівої суперспіралі ДНК. Структуру нуклеосоми, що містить ДНК довжиною 147 пар основ, встановлену методом рентгеноструктурного аналізу кристалів нуклеосом у лабораторії Ричмонда (Timothy Richmond), показано на рис. 3.3 (див. також рис. 1.1).

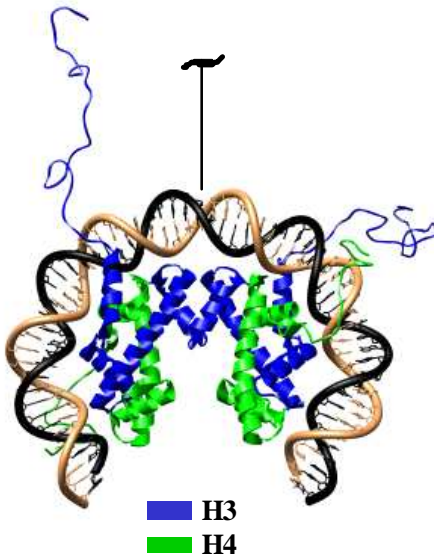


Рис. 3.2. Тетрасома – тетрамер гістонів H3 і H4 у комплексі з ДНК у складі нуклеосоми (код PDB 1KX5). Зображено вісь симетрії другого порядку, яка знаходиться в площині рисунку. У

просторі права частина тетрасоми розташована ближче до глядача – виходить із площини рисунка вперед, ліва – назад.

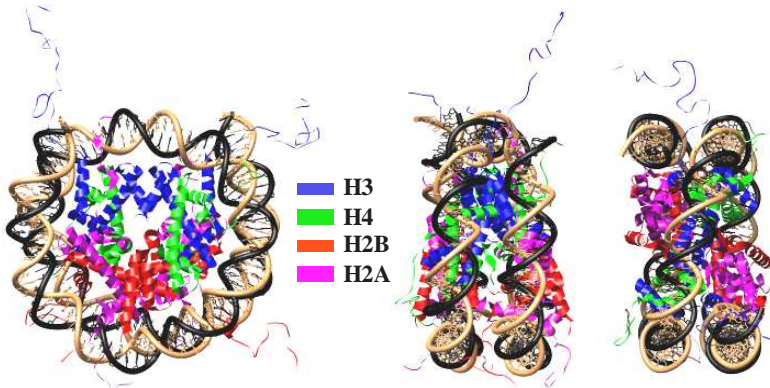


Рис. 3.3. Структура нуклеосоми, що містить 147 пар основ ДНК, в трьох проекціях (код PDB 1KX5).

Як зазначено вище, вісь симетрії нуклеосоми проходить точно через центральну пару основ (не через проміжок між двома парами) нуклеосомної ДНК – у цій точці великий жолобок подвійної спіралі є зверненим до поверхні октамера гістонів (рис. 3.2, 3.3). ДНК-гістонові взаємодії здійснюються у позиціях, де маленький жолобок контактує з октамером – з позитивно зарядженими сайтами на поверхні гістонових димерів (рис. 3.4, 3.5). Один із прикладів таких контактів зображено на рис. 3.4 – занурення залишку аргініну (див. також рис. 2.1) в маленький жолобок відбувається в кожному сайті взаємодії. У кожному сайті два фосфатні залишки різних ланцюгів ДНК (по обидва боки від маленького жолобка) жорстко фіксуються на поверхні октамера, яка, таким чином, задає певну конформацію нуклеосомної ДНК, що розглядатиметься у наступному підпідрозділі.

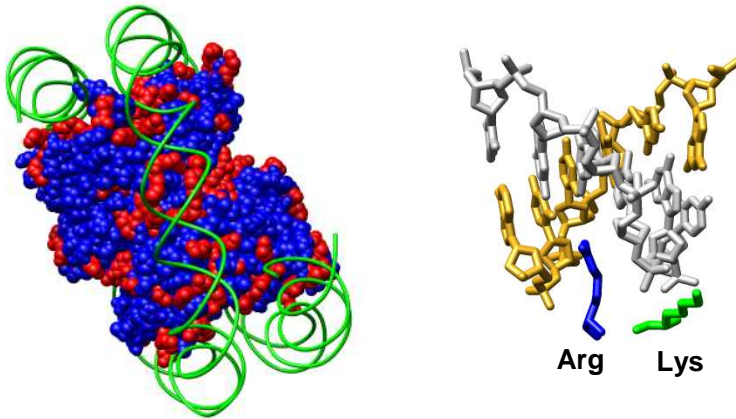


Рис. 3.4. Позитивно заряджений трек (залишки Arg та Lys забарвлено червоним) на поверхні октамера гістонів та приклад контактів між двома позитивно зарядженими амінокислотними залишками та маленьким жолобком ДНК у складі нуклеосомі (зі структури на рис. 3.3).

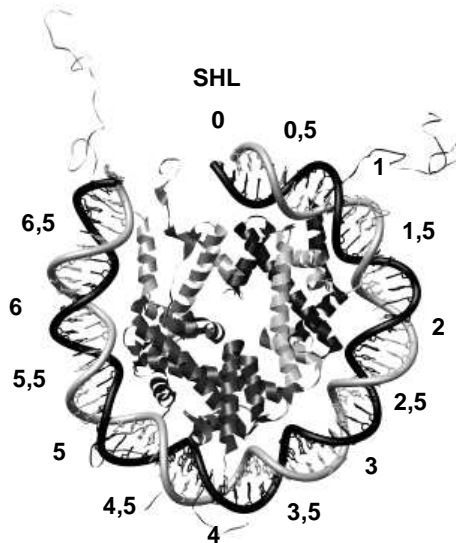


Рис. 3.5. Одна з симетричних половин нуклеосоми (зі структури на рис. 3.3). Позначено суперспіральні позиції (SHL) нуклеосомної ДНК.

Із зазначеними вище сайтами на поверхні чотирьох гістонових димерів взаємодіє центральна частина – ~121 пара основ (~12 витків подвійної спіралі) – нуклеосомної ДНК (12 контактів з маленьким жолобком). Два останні контакти (перед виходом ДНК з нуклеосоми) з маленькими жолобками реалізуються за допомогою α N-спіралей гістонів H3 (рис. 3.3, 3.5). Загалом нуклеосомна ДНК містить трохи більше 14 витків подвійної спіралі, невеликі додаткові фрагменти на кінцях стабілізуються частинами N-кінцевих хвостів H3, які фланкують α N-спіралі. Центральну точку нуклеосомної ДНК, через яку проходить вісь симетрії і в якій великий жолобок подвійної спіралі є зверненим до поверхні октамера гістонів, прийнято позначати як SHL 0 (SuperHelical Location – суперспіральна позиція). Позиції, де великий жолобок знову опиняється зверненим до поверхні октамера (через кожен виток подвійної спіралі), позначають цілими числами від 1 до 6 (при русі від

центру до периферії за годинниковою стрілкою, рис. 3.5) та від -1 до -6 (у протилежному напрямі). Відповідно, SHL $\pm 0,5$; $\pm 1,5$ і т.д. є позиціями, де маленький жолобок контактує з поверхнею октамера (рис. 3.5): нуклеосомна ДНК на ділянці від SHL $-2,5$ до $+2,5$ зв'язана з тетрамером $(H3-H4)_2$, від SHL $\pm 3,5$ до $\pm 5,5$ – з димерами H2A-H2B, в SHL $\pm 6,5$ – з αN -спіралями гістонів H3.

В основному, гістони взаємодіють з цукрофосфатним остовом ДНК: головну роль відіграють електростатичні контакти, до яких залучаються залишки аргініну та лізину, а також N-кінцеві частини диполей гістонових спіралей $\alpha 1$ (кожна α -спіраль в білках являє собою диполь – на N-кінці спіралі утворюється частковий позитивний, на C-кінці – негативний заряд). При цьому реалізуються численні водневі зв'язки з цукрофосфатним остовом (до більшої їх частини залучені залишки Arg та Lys), як безпосередні між ДНК та гістонами, так і опосередковані молекулами води (вода відіграє роль біфункціональної зшивки, утворюючи водневі зв'язки з ДНК та білковою поверхнею). Спостерігаються також водневі зв'язки з азотистими основами, які не можуть відігравати значної ролі в зв'язуванні, – 13% від загальної кількості безпосередніх водневих зв'язків. Взагалі, водневі зв'язки в даному випадку слід розглядати як приблизно ізоенергетичний наслідок заміни частини водневих зв'язків з водою на контакти між полярними поверхнями – головним чинником зв'язування є неспецифічні щодо нуклеотидної послідовності ДНК електростатичні взаємодії.

Нуклеосомна ДНК зв'язана з глобулярною частиною октамера гістонів, кінцеві неупорядковані хвости гістонів практично не беруть у цьому участі. N-кінцеві хвости гістонів H3 та H2B виходять за межі нуклеосоми через канали, сформовані маленькими жолобками двох дуплексів сусідніх витків нуклеосомної суперспіралі (рис. 3.6) – один з чотирьох хвостів H3 та H2B проходить через такий канал через кожні ~ 20 пар основ уздовж нуклеосомної ДНК: між SHL $+6,5$ та $-0,5$ і $-6,5$ та $+0,5$ (H3); між SHL $+4,5$ та $-2,5$ і $-4,5$ та $+2,5$ (H2B). Ділянки хвостів, які безпосередньо розташовані в каналах, є

позитивно зарядженими і, таким чином, додатково скріплюють сусідні витки суперспіралі. Іншим наслідком такого розташування чотирьох хвостів є сама необхідність створення каналів, тобто точного розташування маленьких жолобків сусідніх витків один напроти одного, що накладає певні обмеження на спіральну періодичність нуклеосомної ДНК. N-кінцеві хвости гістонів H4 та H2A взаємодіють з маленьким жолобком зовні нуклеосомної суперспіралі. Особливе місце – входу/виходу нуклеосомної ДНК – займають найбільш довгі N-кінцеві хвости гістона H3. Позитивно заряджений хвіст H3 стабілізує структуру нуклеосоми в цій зоні, де спостерігається найвища щільність негативних зарядів ДНК.

Зазначеним внеском у стабілізацію нуклеосоми роль хвостів не обмежується. Значна частина гістонових хвостів просто виходить за межі нуклеосоми (рис. 3.6). Завдяки своїй структурній лабільності вони приймають участь в організації хроматину на наднуклеосомному рівні (розділ 4), а також відіграють важливу роль платформи для зв'язування різноманітних білків, спорідненість до яких визначається посттрансляційними модифікаціями хвостів (підрозділ 2.3). Остання роль хвостів є одним із ключових елементів системи регуляції транскрипції (розділ 5).

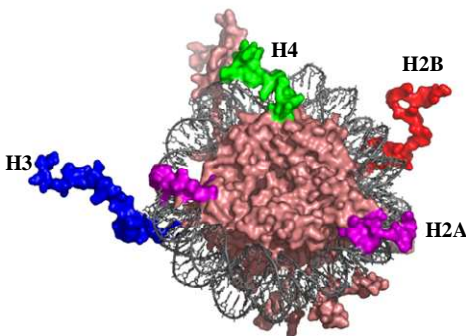


Рис. 3.6. Кінцеві хвости гістонів у структурі нуклеосоми (структура з рис. 3.3): кольором виділено по одному N-

кінцевому хвосту кожного гістона, а також С-кінцевий – гістона H2A (поряд із N-кінцем H3).

Оскільки позитивно заряджені хвости дають внесок у додаткову стабілізацію нуклеосоми, одна з модифікацій, яка знижує позитивний заряд хвостів, – ацетилювання (загалом більше 30 залишків може бути ацетильовано в складі нуклеосоми) – призводить до часткової дестабілізації структури. Ацетилювання не впливає на структуру нуклеосоми (яка практично не залежить від хвостів), але змінює характер структурної динаміки як нуклеосоми (підрозділ 3.3), так і хроматинової фібрили на наднуклеосомному рівні її організації (розділ 4).

3.1.2. Структура ДНК у нуклеосомі. На рис. 3.7 зображено нуклеосомну ДНК та одну з її симетричних половин. Очевидно, що подвійна спіраль є значно вигнутою на поверхні октамера гістонів, а загальна конфігурація її осі може бути апроксимована ідеальною лівою суперспіраллю із радіусом 41,9 Å і кроком 25,9 Å. Центральні 133 пари основ такої суперспіралі дають 1,67 витка, дві ділянки по 7 пар основ на вході/виході просто продовжують хід нуклеосомної ДНК по прямій. Нуклеосомна суперспіраль є майже ідеальною. Щоб з'ясувати, що означає “майже“ в попередньому реченні, слід спочатку зупинитись на тому, як має змінитись конформація дуплекса для утворення *ідеальної* суперспіралі.

Ідеальна спіральна лінія характеризується, зокрема, тим, що в кожній точці має постійне значення кривизни, яка однозначно визначається радіусом та кроком спіралі. Для ДНК “кожна точка“ – це кожен динуклеотидний крок уздовж подвійної спіралі, а кривизна є пропорційною до кута вигину Γ між сусідніми парами основ, який, у свою чергу, залежить від значень конформаційних кутів ролла ρ та тилта τ (див. нижче).

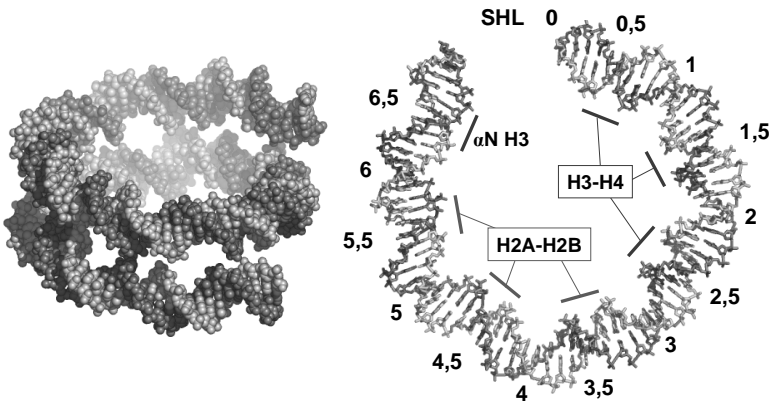


Рис. 3.7. ДНК довжиною 147 пар основ у нуклеосомі (зі структури на рис. 3.3) та одна з її симетричних половин (73 + одна центральна пара основ). Вказано суперспіральні позиції SHL та сайти взаємодії з гістоновими димерами й αN -спіраллю H3.

Взагалі для визначення конформації подвійної спіралі необхідно та достатньо для кожного динуклеотидного кроку визначити шість конформаційних параметрів, що задають відносні орієнтації сусідніх пар основ. До кожної пари ставиться у відповідність локальна декартова система координат (рис. 3.8). Два ланцюги, яким належать основи пари, позначаються як ланцюги I та II (довільно, але за ланцюг I приймається той, для якого записується послідовність нуклеотидів у напрямку від 5'-до 3'-кінця; абсолютні значення описаних нижче параметрів не залежать від нумерації ланцюгів). Вісь Y лежить у площині пари основ та спрямована від ланцюга II до ланцюга I (позитивний напрям). Перпендикулярна вісь Z (нормаль до пари основ) спрямована на наступну (у напрямку 5'-3' по першому ланцюгу) пару основ. Напрямок осі X обирається за правилами утворення правої декартової системи координат – жолобок, на який вона спрямована, позначається як “великий” (для B-форми ДНК цей жолобок є дійсно більшим за розмірами). Шість параметрів,

графічно представлених на рис. 3.8, характеризують конформацію динуклеотидного кроку – двох сусідніх пар основ:

- *шифт* (shift, Dx) – зміщення вздовж осі X – характеризує зсув другої пари основ відносно першої (у порядку нумерації по першому ланцюгу) у напрямку одного з жолобків (позитивне значення відповідає зсуву у великий жолобок, при зміні нумерації ланцюгів шифт змінює знак);

- *слайд* (slide, Dy) – зміщення вздовж осі Y – характеризує зсув у напрямку цукрофосфатного остова (позитивне значення відповідає зсуву у напрямку першого ланцюга, знак слайда не залежить від нумерації ланцюгів);

- *райз* (rise, Dz) – зміщення вздовж осі Z – характеризує відстань між парами основ уздовж нормалі до першої пари;

- *тилт* (tilt, τ) – кут обертання другої пари відносно першої навкруг осі X – характеризує локальний вигин у напрямку цукрофосфатного остова (позитивне значення відповідає вигину в бік другого ланцюга, при зміні нумерації ланцюгів тилт змінює знак);

- *ролл* (roll, ρ) – кут обертання навкруг осі Y – характеризує локальний вигин подвійної спіралі у напрямку одного з жолобків (позитивне значення відповідає вигину в бік великого жолобка, знак ролла не залежить від нумерації ланцюгів);

- *твіст* (twist, Ω) – кут обертання другої пари навкруг нормалі до першої, який характеризує ступінь спірального закручення (позитивне значення відповідає правій спіралі, негативне – лівій).

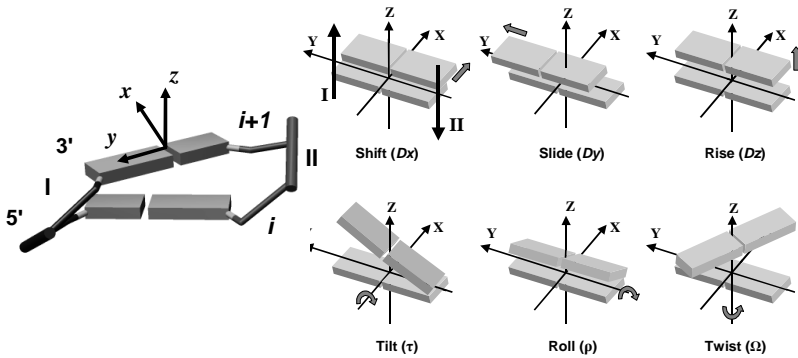


Рис. 3.8. Дві пари основ у молекулі ДНК і локальна декартова система координат, пов'язана з однією з них. Праворуч: шість параметрів, що описують конформацію двох сусідніх пар основ.

Пари основ орієнтовані до глядача маленьким жолобком, для першої структури позначено полінуклеотидні ланцюги. Стрілочками позначено позитивний напрямок зміни параметрів (для кутів – обертання за годинниковою стрілкою, якщо дивитись вздовж позитивного напрямку осі).

Серед трьох перелічених конформаційних кутів твіст описує ступінь торсійного закручення подвійної спіралі, а тилт та ролл – її вигину. Сумарний локальний кут вигину між двома парами основ $\Gamma = (\tau^2 + \rho^2)^{1/2}$, конкретний напрямок вигину визначається співвідношенням між роллом та тилтом. Одна з можливостей реалізувати постійну кривизну полягає в тому, щоб конформаційні кути змінювались від одного кроку до іншого періодично та зі зсувом по фазі на чверть періоду:

$$\begin{aligned} \rho &= \Gamma \cos(i\Omega_{loc}), \\ \tau &= \Gamma \sin(i\Omega_{loc}), \end{aligned} \quad (3.1)$$

де i – порядковий номер пари основ (другої пари кроку), який приймає позитивні та негативні значення, починаючи від

центральної пари нуклеосомної ДНК із нульовим номером, Ω_{loc} – певний кут, що визначає періодичність. Легко бачити, що в такому випадку сума квадратів двох кутів є для кожного кроку постійною величиною – рівняння (3.1) визначають суперспіральну конфігурацію із постійною кривизною. Крок такої суперспіралі залежить від співвідношення між кутом твіста Ω на кожному кроці та Ω_{loc} . Нехай $\Omega_{loc} = \Omega$ і на деякому кроці аргумент тригонометричних функцій в рівн. (3.1) є кратним до 360° – ролл набуває максимального позитивного значення Γ (вигин у великий жолобок), тилт дорівнює нулю. Через чверть витка подвійної спіралі у тому ж напрямі на поверхні дуплекса, де на вихідному кроці розміщувався великий жолобок, знаходиться один з ланцюгів; в цій точці ($\Omega_{loc} = \Omega$ змінився на 90°) $\rho = 0$, $\tau = \Gamma$ – вигин в бік цукрофосфатного остова, але в тому самому напрямі, що й на вихідному кроці. Через піввитка місце великого жолобка займає маленький жолобок – $\rho = -\Gamma$, $\tau = 0$; через виток знову маємо максимальний ролл у тому самому напрямі, що на вихідному кроці. Тобто, реалізується вигин ДНК в одній площині: крок суперспіралі дорівнює нулю. Щоб суперспіраль була лівою, точки максимального значення ролла та тилта мають бути розділеними дещо меншою кількістю пар основ, ніж укладається на повний виток дуплекса. Тобто необхідно, щоб виконувалась умова $\Omega_{loc} > \Omega$ (для правої суперспіралі – навпаки). Різниця $\Omega_{loc} - \Omega$ є при цьому пропорційною до так званого геометричного кручення, а величина Ω_{loc} – це кут локального твіста, який визначає періодичність контактів ДНК із поверхнею октамера гістонів.

Отже, для створення ідеальної лівої суперспіралі ДНК необхідно, щоб ролл та тилт змінювались періодично вздовж подвійної спіралі з однаковою амплітудою за рівн. (3.1), а також щоб кут локального твіста, який визначає цю періодичність, був більшим за кут твіста подвійної спіралі. Реальні конформаційні параметри нуклеосомної ДНК, які демонструють відхилення від такої “ідеальної поведінки“, представлено на рис. 3.9.

По-перше, у відповідності з анізотропією подвійної спіралі щодо вигину (ДНК значно легше вигинається в бік жолобків, а

не цукрофосфатного остова), ролл дає значно більший внесок у вигин нуклеосомної ДНК, ніж тилт. Якщо варіації останнього є досить безладними, то ролл змінюється періодично з високою амплітудою. При цьому вигин у бік великого жолобка (позитивний ролл) є суттєво більшим у порівнянні з вигином в бік маленького жолобка. Крім того, спостерігаються різкі вигини в декількох місцях, імовірно пов'язані з особливостями конкретної послідовності ДНК: наприклад, три різкі негативні вигини в SHL 3,5; 4,5 та 5,5 (рис. 3.9) трапляються на кроках SA/TG. Такі залежні від послідовності особливості конформації ДНК відображають певний структурний поліморфізм нуклеосом (див. нижче). Отже, вигин нуклеосомної ДНК головним чином визначається змінами ролла.

Періодична зміна твіста є цілком очікуваною і відображає добре відому негативну кореляцію між цим параметром та роллом (підвищення одного кута зазвичай супроводжується зниженням іншого, інакше кажучи, вигин у великий жолобок часто супроводжується розкручуванням спіралі, а вигин у маленький – закручуванням). Середнє значення твіста відповідає періодичності 10,4 п.о./виток подвійної спіралі в нуклеосомі – тобто, дещо менше, ніж для вільної ДНК у розчині (зазвичай $\sim 10,5$ п.о./виток). При цьому осциляція ролла відбувається практично з таким самим періодом – всупереч очікуванням, твіст та локальний твіст практично не відрізняються один від одного в нуклеосомній суперспіралі.

Натомість, спостерігається неочікувана періодична зміна слайда: кожного разу, коли великий жолобок є орієнтованим до поверхні октамера гістонів (цілі значення SHL), слайд має негативні значення (у середньому $\sim -0,5$ Å): реалізується зсув пари основ у напрямку другого ланцюга, тобто зсув відбувається вздовж осі нуклеосомної суперспіралі у напрямку, що відповідає самі лівій спіралі (праворуч на рис. 3.8., див. також рис. 3.3, 3.10). Коли до поверхні октамера орієнтований маленький жолобок, слайд має позитивні значення (більш ніж вдвічі більші за абсолютною величиною в порівнянні з великим жолобком): зсув до першого ланцюга, який через піввитка

дуплекса займає місце другого ланцюга на поверхні ДНК (рис. 3.10).

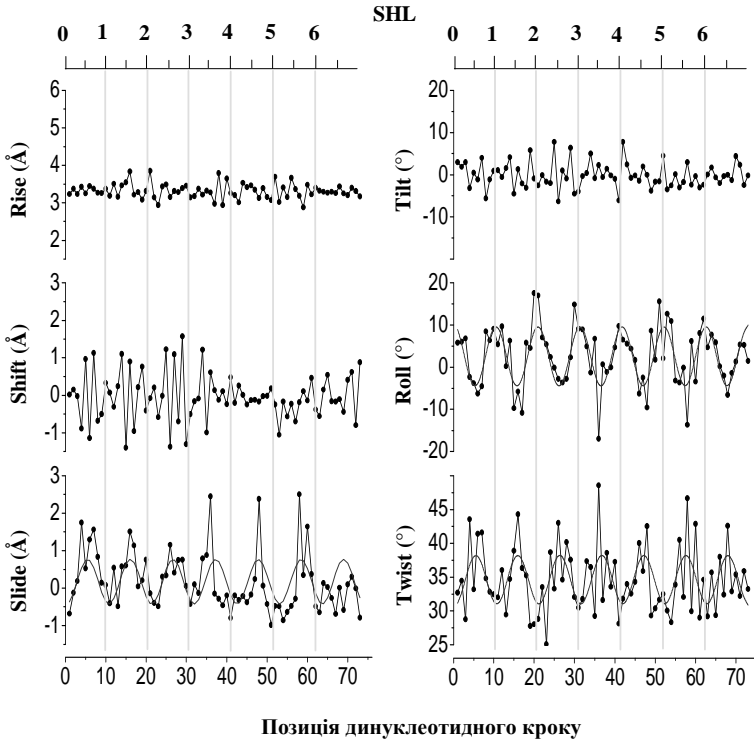


Рис. 3.9. Конформаційні параметри половини нуклеосомної ДНК, розраховані зі структури на рис. 3.5 за допомогою програмного пакету 3DNA (Lu, X.-J., Olson, W.K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // Nucl. Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 5108-5121). Динуклеотидні кроки пронумеровано від центру нуклеосомної ДНК до периферії. Суцільні криві – апроксимації залежностей синусоїдами.

Таким чином, суперспіральність нуклеосомної ДНК визначається періодичною зміною слайда: якщо в структурі

нуклеосомної ДНК зберегти всі конформаційні параметри як вони є, але задати нульове значення слайда на кожному кроці, реалізується вигин подвійної спіралі в одній площині (рис. 3.10).

Що стосується двох інших конформаційних параметрів зсуву, шифт варіює безладно (іноді в досить широких межах), відображаючи певні нерегулярності в структурі ДНК, залежні від вигинів (кореляцій між різними параметрами) та/або від особливостей послідовності. Райз варіює в дуже вузьких межах (середнє значення $3,35 \text{ \AA}$), що вказує на збереження міцних стекінг-взаємодій між парами основ у нуклеосомній ДНК.

Повертаючись до кутових параметрів, слід особливо зупинитись на різниці між середнім твістом ДНК у нуклеосомі та в розчині, яка свідчить про торсійну деформацію подвійної спіралі (закручування) на поверхні октамера гістонів. Це закручування, так само як і вигин, зумовлене ДНК-гістоновими взаємодіями – розподіл позитивно заряджених сайтів зв'язування по поверхні октамера вимагає зміни твіста для підведення фосфатних залишків під міцні контакти. Крім того, обмеження на твіст накладаються необхідністю сформувати канали виходу гістонових хвостів між двома витками суперспіралі (попередній підпідрозд.). Проте, структура нуклеосоми допускає досить значні залежні від послідовності варіації твіста, як локальні, так і в середньому по нуклеосомній ДНК.

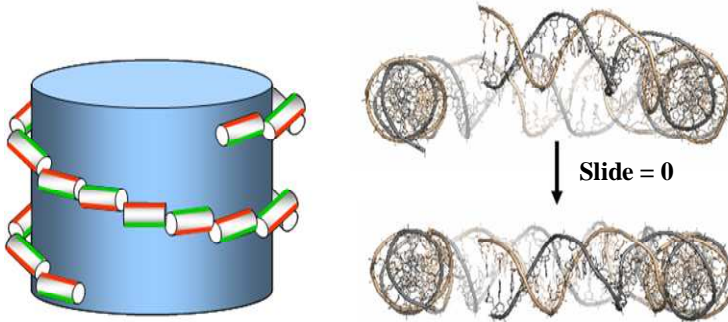


Рис. 3.10. Механізм утворення нуклеосомної суперспіралі за рахунок періодичної зміни слайда. Ліворуч: кожен маленький циліндр символізує ділянку ДНК довжиною піввитка подвійної спіралі, стик між циліндрами – місце, де один з жолобків орієнтований до поверхні октамера гістонів (великий циліндр), червоним та зеленим кольором позначено два ланцюги ДНК, що перехрещуються на стиках. Праворуч: половина нуклеосомної ДНК (інша проекція структури з рис. 3.7) перетворюється на планарне кільце, якщо задати $\text{Slide} = 0$ на кожному кроці, зберігаючи всі інші параметри без змін. Адаптовано з роботи Tolstorukov *et al.* (2007).

Досі в цьому розділі обговорювалась одна кристалічна структура нуклеосоми (нуклеосома-147), яка містить спеціально сконструйовану молекулу ДНК довжиною 147 пар основ: два однакові за послідовністю інвертовані фрагменти довжиною по 73 пари основ (фрагмент походить з α -сателітної – центромерної – ДНК людини) плюс одна пара між ними. Тобто, загальна послідовність являє собою паліндром – за винятком центрального нуклеотиду, читається однаково по обом ланцюгам від 5'- до 3'-кінця. Таким чином, і послідовність, і структура нуклеосоми характеризуються ідеальною симетрією другого порядку. У більшості кристалографічних робіт щодо

структури нуклеосоми (за єдиним виключенням, див. нижче), крім цього фрагменту ДНК, були використані ще три інші (які також походять з α -сателіту людини) – дві довжиною по 146 пар основ, та одна – 145 пар основ. Послідовність ДНК нуклеосоми-145 відрізняється від нуклеосоми-147 відсутністю двох симетричних пар основ на кінцевих ділянках. Обидві послідовності в складі нуклеосом-146 складаються з двох інвертованих повторів по 73 пари основ кожен. Повтор першої нуклеосоми практично співпадає за послідовністю (за винятком однієї пари основ) з повтором, використаним у нуклеосоми-147. Послідовність повтору другої нуклеосоми-146 є іншою (використано інший α -сателітний повтор). Оскільки вісь симетрії другого порядку проходить точно через пару основ, обидві структури зі 146 парами основ виявились дещо асиметричними – одна центральна пара та дві половини нуклеосомної ДНК довжиною 73 та 72 пари основ.

Асиметрія нуклеосомної ДНК довжиною 146 пар основ проявляється в тому, що більш коротка половина змушена, заради реалізації контактів з поверхнею октамера гістонів (який зберігає симетрію), трохи розтягнутися (дещо зростає райз) та збільшити закручення – сумарна кількість витків дуплекса залишається такою самою, що й для більш довгої половини, а кількість пар основ є зменшеною на 1. В результаті середній кут твіста коротшої половини зростає (кількість пар основ на виток дуплекса зменшується). Середнє значення твіста в двох нуклеосомах-146 відповідає періодичності подвійної спіралі 10,23 та 10,15 п.о./виток. В першій нуклеосомі довша та коротша половини мають, відповідно, 10,3 та 10,16 п.о./виток, в другій – 10,22 та 10,08 п.о./виток.

Зростання кута твіста та розтягування реалізуються локально на ділянках довжиною по ~ 12 пар основ, але в різних місцях для двох нуклеосом: в області SHL -2 або -5 (якщо для довшої половини використовувати позитивні значення SHL). У довшій половині саме ці місця характеризуються меншими, у порівнянні з іншими ділянками, значеннями твіста – локальне розтягування/закручування (stretching/overtwisting) відбувається там, де подвійна спіраль більш легко може здійснити торсійну

деформацію. Нуклеосома-145 є симетричною, але в ній в обох половинах спостерігається розтягування/закручування в $SHL \pm 2$ (на ділянці довжиною ~ 9 пар основ зростає райз до $3,63 \text{ \AA}$ та кут твіста); і середній кут твіста відповідає $10,26$ п.о./виток. Таким чином, навіть одна й та сама послідовність (у нуклеосомах-145 та -147) при утворенні нуклеосоми має "вибір" – або зберегти мінімальне значення райза та твіста, або трохи розтягнутись та збільшити закручення у певному невеликому сайті.

Найімовірніше, такий сайт розтягування/закручування може бути локалізований тільки в двох місцях – в $SHL \pm 2$ або ± 5 , тобто в позиціях, які фланковані однотипними сайтами взаємодії ДНК з поверхнею гістонових димерів H3-H4 та H2A-H2B відповідно (рис. 3.5, 3.7). Ця закономірність була підтверджена у ще одній кристалографічній роботі, де досліджувалась структура нуклеосоми, що містить так звану "послідовність 601" – синтетичну випадкову нуклеотидну послідовність, відібрану як така, що має підвищений потенціал щодо позиціювання нуклеосоми (розділ 4). Нуклеосома-601 містить 145 пар основ ДНК (послідовність є асиметричною), середній кут твіста відповідає $10,09$ п.о./виток, розтягування/закручування реалізується локально на ділянках по ~ 13 пар основ в оточенні $SHL \pm 5$. Слід зауважити, що, не дивлячись на асиметрію послідовності 601, дві половини октамера гістонів у складі нуклеосоми-601 характеризуються симетрією, більше того – структура октамера у складі нуклеосом-147 та 601, не дивлячись на відмінності у конформації ДНК, є дуже подібною. Отже, октамер гістонів, зберігаючи більш-менш жорстку структуру, "вимагає" від ДНК реалізувати контакти з гістонами, а подвійна спіраль адаптується під ці контакти, змінюючи свою конформацію у певних межах залежно від своєї нуклеотидної послідовності.

Спіральна періодичність ДНК для нуклеосом, що містять інші послідовності, досить широко досліджувалася за допомогою футпринтинга – розщеплення ДНК у нуклеосомі ДНКазою I або вільними радикалами. ДНКаза I та вільні $OH\cdot$ -радикали розщеплюють тільки експоновані зони кожного ланцюга ДНК з боку маленького жолобка; ділянки, які зв'язані з

гістонами, залишаються захищеними. М'яка обробка ферментом чи радикалами дає, таким чином, набір фрагментів, розмір яких є кратним до періодичності експонування, що можна проаналізувати за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах. За цими даними періодичність варіює від 9,9 до 10,5 п.о./виток, в середньому дорівнюючи 10,2-10,3 п.о./виток.

Отже, властивості конкретної послідовності, яка входить до складу нуклеосоми, визначають особливості її конформації – у відповідності до загальних уявлень щодо білково-нуклеїнових взаємодій, відбувається тонка підгонка конформації ДНК під поверхню октамера гістонів. Відповідно, нуклеосомам притаманний певний структурний поліморфізм – саме такий поліморфізм, власне, і не дозволяє отримати структурну інформацію високого розділення на кристалах нуклеосом, приготованих просто з тотального препарату нуклеосом хроматину.

3.2. Механізми стабілізації нуклеосоми

Як і для будь-якої іншої структури, стабільність нуклеосоми можна описати в термінах вільної енергії, яка характеризує імовірність реалізації того чи іншого стану тієї чи іншої системи. Зниження вільної енергії завжди відповідає підвищенню імовірності – зростанню стабільності. Вільна енергія будь-якої системи складається з певного набору стабілізуючих (із негативним знаком) і дестабілізуючих (із позитивним знаком) внесків: баланс між ними й визначає ступінь стабільності.

Описані в попередньому підрозділі значні деформації нуклеосомної ДНК потребують енергетичних витрат. Щоб приблизно оцінити найбільш вагомий дестабілізуючий внесок від вигину ДНК, можна скористатись добре відомим рівнянням для енергії вигину G_b еластичного стрижня:

$$G_b = kT \frac{as}{2R^2},$$

де kT – енергія теплових флуктуацій, $a = 50$ нм – так звана персистентна довжина ДНК (міра гнучкості молекули), s – загальна контурна довжина фрагмента ДНК, R – радіус кривизни, що в даному випадку визначається радіусом та кроком нуклеосомної суперспіралі. За цим рівнянням вигин 133 пар основ із радіусом кривизни 4,23 нм (виходячи з параметрів суперспіралі, що визначають кривизну) потребує 62 одиниць kT . Крім деформацій ДНК, ще одним дестабілізуючим внеском у вільну енергію нуклеосоми є електростатичне розштовхування між сусідніми витками суперспіралі ДНК.

Стабілізують нуклеосому, компенсуючи несприятливі внески, кілька факторів. Першим є взаємодії – насамперед, електростатичні – між ДНК та гістонами, які утримують деформовану подвійну спіраль на поверхні октамера гістонів. Але не менш важливими є гістон-гістонові взаємодії, що забезпечують цілісність самого октамера. При цьому останні, в першу чергу це стосується взаємодій між димерами H2A-H2B та тетрамером (H3-H4)₂, залежать від електростатичних ДНК-гістонових взаємодій – міцний контакт між димером та тетрамером є можливим за умови нейтралізації позитивних зарядів гістонів фосфатами ДНК. Інакше кажучи, взаємодія гістонових комплексів з ДНК забезпечує можливість утворення октамера, і тоді вигнутий стан нуклеосомної ДНК підтримується одночасно її адсорбцією на поверхні комплексів та взаємодіями між самими комплексами. Відповідно, розгортання нуклеосомної ДНК є можливим у два способи: або внаслідок порушення електростатичних взаємодій з гістонами, або шляхом порушення гістон-гістонових взаємодій, наприклад, у присутності денатурантів, коли нуклеосомна ДНК розгортається разом зі зв'язаними з нею гістонами. Додатковими факторами, що стабілізують структуру нуклеосоми, є асиметрична нейтралізація зарядів подвійної спіралі гістонами зі внутрішнього боку вигину (така нейтралізація завжди сприяє вигину ДНК) та присутність позитивно заряджених неупорядкованих хвостів, які знижують електростатичне розштовхування сусідніх витків нуклеосомної суперспіралі.

Серед зазначених внесків у вільну енергію нуклеосоми тільки один – енергія деформацій подвійної спіралі – залежить від послідовності пар основ, усі інші є неспецифічними. Відповідно, нуклеосоми прагнуть утворюватись на таких ділянках ДНК, які можна легше деформувати – саме такий механізм лежить в основі важливого феномена переважного позиціонування нуклеосом відносно послідовності, який розглядатиметься у розділі 4. Зараз слід тільки зауважити, що різниця вільних енергій між різними позиціями нуклеосом є досить невисокою – в принципі, якщо “немає вибору“, нуклеосома може сформуватись практично на будь-якій природній послідовності.

Усі неспецифічні внески у вільну енергію так чи інакше залежать від іонної сили. Відповідно, зміни концентрації солі допомагають змінити баланс вільної енергії у той чи інший бік і тим самим виявити ті чи інші взаємодії. Так, за дуже низької іонної сили (1–2 мМ NaCl) у нуклеосомі спостерігається так званий низько-сольовий структурний перехід: розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК при збереженні контактів з ними димерів H2A-H2B (електростатичні ДНК-гістонові контакти можуть лише підсилуватись при зниженні іонної сили). Рушійною силою низько-сольового переходу є зростання електростатичного розштовхування між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі, яка, подібно пружині, розгортається, руйнуючи контакти димера H2A-H2B із тетрамером (H3-H4)₂. Ензиматичне видалення невпорядкованих гістонових хвостів (тобто зниження ступеня нейтралізації негативних зарядів, насамперед, на кінцевих ділянках нуклеосомної ДНК) полегшує цей структурний перехід, зсуваючи його до дещо вищих концентрацій солі.

За фізіологічної іонної сили *in vitro* нуклеосома характеризується високою стабільністю. Електростатичні взаємодії є настільки міцними, що виключають не тільки тимчасову дисоціацію гістонових комплексів, а й навіть трансляційні переміщення нуклеосоми вздовж ДНК (слайдинг). У зв'язку з тим, що взаємне розташування ДНК і октамера гістонів є жорстко детермінованим (попередній підрозділ),

переміщення нуклеосоми потребує появи високо-енергетичних інтермедіатів (часткове розгортання нуклеосомної ДНК або її прокручування по поверхні октамера). За фізіологічних умов ці інтермедіати не є вірогідними. Відповідно, зміна позицій нуклеосом в клітині потребує наявності спеціальних АТР-залежних молекулярних машин – комплексів ремоделювання хроматину (розділ 5), що полегшують утворення таких інтермедіатних станів.

В діапазоні 0,3-0,6 М NaCl спостерігається дисоціація від ДНК неупорядкованих гістонових хвостів, а також ефективний слайдинг нуклеосом: у вказаних умовах вільна енергія інтермедіатних станів стає порівняною з енергією теплових флуктуацій, що робить можливими зміни позицій нуклеосом вздовж ДНК. Відповідно, зростання температури також підвищує ефективність слайдингу. Подальше зростання концентрації солі індукує двоступеневу дисоціацію нуклеосоми: в діапазоні 0,7–1,2 М NaCl дисоціюють димери H2A-H2B, у 1,2–2,0 М NaCl – тетрамер (H3-H4)₂, який взагалі є одним з найбільш міцно зв'язаних з ДНК білків.

Оскільки електростатичні взаємодії між ДНК та гістонами за фізіологічних умов дуже міцні, зв'язування гістонів з ДНК є практично необоротним – дуже висока константа зв'язування (див. нижче) робить неможливою рівновагу між зв'язаними та дисоційованими гістонами. Відповідно, хоча структура нуклеосоми відповідає мінімуму вільної енергії, цього мінімуму неможливо досягти за розумний проміжок часу: при змішуванні гістони швидко та безладно зв'язуються з ДНК без подальшої дисоціації. Реконструкція нуклеосоми *in vitro* можлива шляхом поступового зниження концентрації солі в суміші ДНК та гістонів від 2 М до фізіологічних або більш низьких значень за допомогою ступеневого діалізу. В таких умовах за проміжних концентрацій солі, коли електростатичні взаємодії ще не є надто ефективними, відбувається рівноважне зв'язування та формування нуклеосомної структури. Подальше зниження іонної сили “заморожує” цю структуру.

Для реалізації рівноважних умов ДНК-гістонової взаємодії *in vivo* у хроматині існують проміжні акцептори гістонів –

хроматинові шаперони, що виконують роль факторів збірки/руйнування нуклеосом, які згадувались у розділі 2. Ці акцептори мають спорідненість до гістонів трошки меншу, ніж спорідненість гістонів до ДНК (рис. 3.11), що й забезпечує можливість рівноважного обміну гістонами між ДНК та проміжними акцепторами зі зсувом цієї рівноваги у бік ДНК-гістонових комплексів. Наявність проміжних акцепторів гістонів призводить до можливості обміну димерами H2A-H2B між різними нуклеосомами: тимчасове видалення димерів є важливим шляхом структурної динаміки хроматину в клітині.

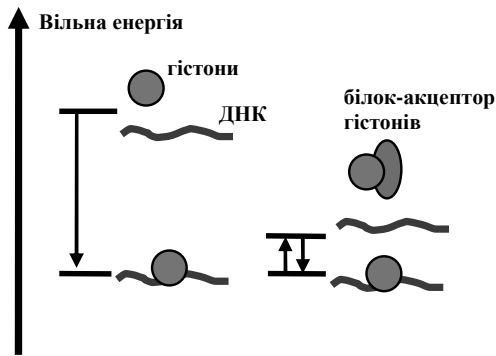


Рис. 3.11. Роль проміжних акцепторів гістонів у збірці нуклеосоми: дисоціація гістонів є практично забороненою за фізіологічної іонної сили; у присутності акцептора взаємодія гістонів з ДНК стає рівноважною.

Стабільність нуклеосоми може бути випробувана за допомогою механічних маніпуляцій з індивідуальними молекулами. Одна з таких технік використовує так звану оптичну пастку. Оптична пастка створюється лазерним променем, сфокусованим в певній точці, де утримується невеличка полістиренова кулька, пришта до кінця молекули ДНК. Інший кінець пришивають, наприклад, до кінчика мікропіпетки, що може рухатись, завдяки чому створюється розтягувальна сила різної величини. У роботі Mihardja *et al.* (2006) за допомогою техніки оптичної пастки досліджувалось

розтягування зовнішньою силою молекули ДНК, на якій знаходилась одна нуклеосома. Внаслідок закручування ДНК у нуклеосомі, загальна довжина такої конструкції у розтягнутому стані є меншою за сумарну контурну довжину ДНК, і нуклеосома чинить спротив остаточному розтягуванню до цієї контурної довжини. Остаточне розтягування реалізується при збільшенні розтягувальної сили і відбувається в два етапи. Перший етап відповідає розгортанню кінцевих ділянок (в нуклеосомі залишається ~ 1 виток суперспіралі), другий – розгортанню центрального витка нуклеосомної ДНК (рис. 3.12).

Другий перехід складно аналізувати кількісно, тому що він характеризується гістерезисом – повернення до вихідного стану при зменшенні розтягувальної сили відбувається із запізненням, при меншому значенні сили, ніж та, за якої перехід починався. Але перший перехід описується стандартною моделлю двох станів: за проміжного постійного значення сили довжина молекули осцилює між двома значеннями, що відповідають двом станам. Аналіз отриманих залежностей дозволяє оцінити константи швидкості прямого та зворотного переходу, а отже і константу рівноваги, у відсутності розтягувальної сили. Оцінки вказують, що спонтанне розгортання кінцевих ділянок (довжиною по ~ 30 пар основ) нуклеосомної ДНК є рідкою подією: у розгорнутому стані нуклеосома проводить ~ 17 мс проти ~ 44 хв у компактному стані. Різниця вільних енергій між двома станами становить ~ 12 одиниць kT . Екстраполяція цієї величини до всієї нуклеосоми дає грубу оцінку вільної енергії утворення нуклеосоми $\sim -30 kT$, що відповідає екстраординарно високій константі рівноваги $\sim 10^{13} M^{-1}$. Якщо врахувати оцінений вище найбільш вагомий дестабілізуючий внесок від вигину ДНК, стабілізуючі внески у вільну енергію нуклеосоми мають становити $\sim -90 kT$.

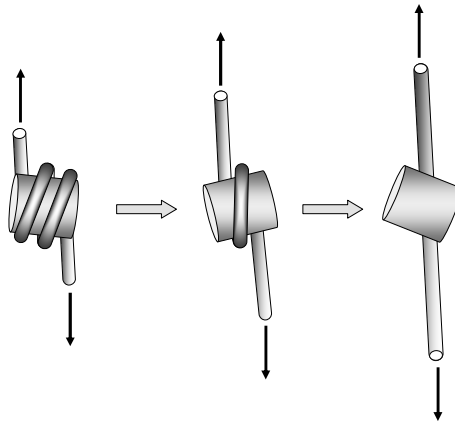


Рис. 3.12. Двоступеневе розкручування нуклеосомної суперспіралі під дією зовнішньої сили (адаптовано з роботи Mihardja *et al.*, 2006).

При цьому ефективність взаємодій ДНК з поверхнею октамера гістонів не є однорідною по довжині. Про це свідчить хоча б дуже різна концентрація солі, що є необхідною для дисоціації димерів H2A-H2B та тетрамера (H3-H4)₂ (див. вище). На відносну слабкість взаємодій на кінцях нуклеосомної ДНК вказує також різна термостабільність нуклеосомної ДНК: взагалі гістони відіграють роль “скріпки” (підвищують температуру плавлення подвійної спіралі у порівнянні з вільною ДНК), але при цьому центральні ділянки нуклеосомної плавляться за більш високих температур, ніж кінцеві. Пряму оцінку відносної сили ДНК-гістонових взаємодій по довжині нуклеосомної ДНК було здійснено за допомогою ще однієї з сучасних технік маніпуляцій з індивідуальними молекулами – розстібання подвійної спіралі (unzipping). Схему експерименту наведено на рис. 3.13: на дволанцюговій молекулі ДНК знаходиться нуклеосома, кінець одного ланцюга зафіксований в оптичній пастці, кінець іншого пришито до поверхні скельця, що рухається.

Під дією зовнішньої сили подвійна спіраль розкручується, а взаємодії ДНК з гістонами змушують скельце загальмуватись на певний час – розкручуванню передуює відрив подвійної спіралі

від поверхні октамера гістонів. Час гальмування відображає силу ДНК-гістонових взаємодій, а відстань між двома одноланцюговими кінцями ДНК, на якій це гальмування трапляється, – точку вздовж нуклеосомної ДНК, де реалізуються ці взаємодії. Результати вказують, що гальмування відбувається з періодичністю в ~ 5 нуклеотидів, відображаючи взаємодії гістонів з двома ланцюгами ДНК. Найслабкіші ДНК-гістонові контакти мають місце в $\text{SHL} \pm 6,5$ (див. рис. 3.5); відносно слабкі контакти – в $\text{SHL} \pm 5,5$, а також $\pm 3,5$ та $\pm 2,5$; зона більш сильних контактів знаходиться в оточенні $\text{SHL} \pm 4,5$; найміцніші контакти реалізуються на ділянці між $\text{SHL} -1,5$ та $+1,5$.

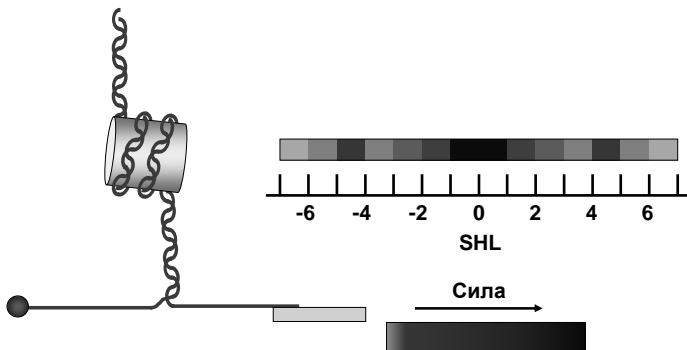


Рис. 3.13. Схема експерименту з розтігання подвійної спіралі ДНК (пояснення в тексті) та карта відносної сили ДНК-гістонових взаємодій вздовж нуклеосомної ДНК (адаптовано з роботи Hall *et al.*, 2009).

Наведені дані щодо структурних перетворень нуклеосоми стосуються досить екстремальних, цілком нефізіологічних впливів. Проте вони вказують на деякі “слабкі місця” у структурі, в яких можна очікувати перебудов нуклеосоми у фізіологічних умовах. Таких місць можна назвати принаймні два: кінцеві сегменти нуклеосомної ДНК, які найменш міцно стабілізовані у нуклеосомі, та контакти між димерами H2A-H2B та тетрамером $(\text{H3-H4})_2$.

3.3. Конформаційна рухливість нуклеосоми

3.3.1. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК є одним з основних шляхів конформаційних перебудов за фізіологічних умов. З одного боку, висока щільність негативного заряду (контакт між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі) дестабілізує нуклеосомну ДНК на виході з нуклеосоми, з іншого – ДНК-гістонові взаємодії на кінцевих ділянках є більш слабкими, ніж у центральній частині нуклеосомної ДНК.

Наведені в попередньому підпідрозділі приблизні оцінки дають -30 kT як вільну енергію утворення нуклеосоми за фізіологічних умов. Але розгортання нуклеосомної ДНК має здійснюватись не за принципом “все або нічого“, а поступово, починаючи з кінця ДНК – ДНК-гістонові контакти будуть тоді руйнуватись один за одним (рис. 3.5, 3.14). Порушення двох контактів – по одному на обох кінцях в $SHL \pm 6/5$ – залишає $\sim 1,4$ витки суперспіралі (1,67 витка відповідають 133 парам основ, 1 виток – 80 парам). Якщо по два контакти зруйновані на кінцях, суперспіраль, що залишилась, містить $\sim 1,2$ витки.

Виходячи з наведеної сумарної оцінки вільної енергії, руйнування одного контакту – розгортання ділянки довжиною один виток подвійної спіралі – коштує в середньому ~ 2 kT (на кінцях трохи менше, всередині нуклеосомної ДНК – більше). Ця енергія, наближена до енергії теплових флуктуацій, вказує на можливість спонтанного тимчасового розгортання коротких кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК за фізіологічних умов. Виходячи з наведеної оцінки вільної енергії розгортання, константа рівноваги K між розгорнутим та компактним станами одного кінцевого витка дуплекса ($K = \exp(-G)$, де G – вільна енергія в одиницях kT) має дорівнювати приблизно 0,1, для розгортання двох витків, коли після кінцевого руйнується другий контакт (рис. 3.14), константа конформаційного перетворення $\sim 0,01$ (приблизно протягом 1% часу ділянка є розгорнутою). Спонтанне розгортання половини нуклеосомної

ДНК (руйнування 6–7 контактів) має тоді відбуватись з низькою константою конформаційної рівноваги $\sim 10^{-6}$ – 10^{-7} .

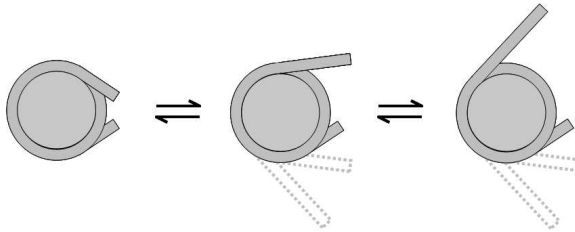


Рис. 3.14. Схема спонтанного розгортання нуклеосомної ДНК, починаючи з її кінців. На кожній стадії руйнується один контакт малого жолобка ДНК з поверхнею октамера гістонів.

Під час такого спонтанного розгортання специфічні сайти всередині нуклеосомної ДНК стають тимчасово доступними для взаємодії з відповідними білками. Тобто, така конформаційна динаміка нуклеосоми відкриває можливість для “проникнення” регуляторних білків до їхніх мішеней. Оскільки специфічні білки характеризуються високою спорідненістю до відповідних регуляторних елементів послідовності, взаємодія з білком може зафіксувати частково розгорнутий інтермедіатний високо-енергетичний стан нуклеосоми: таким чином може полегшуватись доступ до інших сайтів шляхом подальшого розгортання. Крім того, властивість нуклеосомної ДНК спонтанно розгортатись на кінцях може використовуватись комплексами ремоделювання хроматину, які власне й фіксують високо-енергетичні проміжні стани нуклеосоми, а також РНК-полімеразою для проникнення всередину нуклеосомної ДНК під час елонгації транскрипції (розділ 5).

Часткове розгортання нуклеосомної ДНК за фізіологічних умов було продемонстровано експериментально. У лабораторії Відома (Jonathan Widom) було показано, що нуклеосомна ДНК є тимчасово доступною до рестрикційних ендонуклеаз. Ця доступність є найбільшою на кінцях нуклеосомної ДНК і не пов’язана з трансляційним переміщенням нуклеосом:

експонування рестриктних сайтів усередині нуклеосоми відбувається за рахунок тимчасового визволення ДНК від поверхні октамера гістонів, яке прогресує, починаючись із кінця нуклеосомної ДНК. Оцінки констант рівноваги для розгортання кінцевих ділянок різної довжини (різної відстані розташування певного рестриктного сайта від кінця) узгоджуються з наведеними вище. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК було показано також методом реєстрації резонансного переносу енергії між двома флуоресцентними мітками – на кінці нуклеосомної ДНК та на гістонах поблизу від центру нуклеосомної ДНК. За фізіологічних значень іонної сили константа розгортання одного витка дуплекса оцінюється в 0,02–0,1.

3.3.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми в циркулярних ДНК. Оскільки *in vivo* нуклеосоми знаходяться в складі петельних доменів хроматину, вплив топологічних обмежень, які існують у таких доменах, на структурну динаміку нуклеосом є важливим фізіологічним фактором.

Кожна петля з зафіксованими кінцями топологічно еквівалентна до циркулярної ДНК. Центральним поняттям топології циркулярної ДНК є так зване число зачеплень *Lk* (linking number) двох полінуклеотидних ланцюгів – двох кілець, закручених одне навкруг одного у подвійну спіраль. Число зачеплень визначається як число перетинів одним циркулярним контуром поверхні, що натягнута на другий контур: відповідно, *Lk* може бути тільки цілим числом. Будь-які деформації кілець (за умови збереження цілісності кожного кільця) не змінюють цієї величини: кільця не можна ні розвести, ні збільшити ступінь зачеплень. Отже, і це друга важлива властивість числа зачеплень, *Lk* системи двох кілець є постійною величиною – топологічним інваріантом, – поки обидва кільця є інтактними (не містять розривів). Ці дві властивості числа зачеплень і накладають топологічні обмеження на молекулу циркулярної ДНК. Однакові циркулярні молекули, що розрізняються за числом зачеплень, називають *топоізомерами*.

У загальному випадку число зачеплень будь-якої циркулярної ДНК (або ДНК із зафіксованими кінцями) підпорядковане відомому рівнянню Калугареану-Вайта-Фуллера (Gheorghe Călugăreanu, James White, F. Brock Fuller):

$$Lk = Tw + Wr,$$

де Tw (twist) – твіст – кількість витків подвійної спіралі (дорівнює сумі кутів твісту для усіх пар основ, поділених на 360° , із позначкою “+” для правої спіралі та “-” для лівої), Wr (writhing) – райзинг – параметр, який є мірою відхилення осі подвійної спіралі від планарної конфігурації (для планарного кільця $Wr = 0$). Розподіл величини Lk по двом складовим залежить від механічних властивостей молекули ДНК.

Найбільш вигідний твіст ДНК Tw_0 (для якого частіше використовують еквівалентне позначення Lk_0) визначається зовнішніми умовами та послідовністю пар основ (типове середнє значення за фізіологічних умов відповідає приблизно 10,5 парам основ на виток подвійної спіралі). Якщо, як це часто буває, $Lk \neq Tw_0$, в ДНК присутня деформація (відхилення конформації від найбільш вигідної), і ця деформація мінімізується, розподіляючись певним чином між зміною твіста $\Delta Tw = Tw - Tw_0$ та ненульовим райзингом внаслідок зростання вигину молекули. Отже, загальною мірою деформації є величина

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = \Delta Tw + Wr. \quad (3.2)$$

Оскільки зростання райзинга (при зростанні загальні деформації) пов'язане зі спіралізацією осі подвійної спіралі – *надспіралізацією* (supercoiling), величина ΔLk використовується як міра надспіралізації у циркулярній ДНК. Таким чином, надспіралізація є тим більшою, чим більше Lk відрізняється від Lk_0 , і чим більша напруга, пов'язана з деформацією, накопичується в ДНК.

Одним з основних джерел виникнення надспіралізації у живих системах є різноманітні функціональні процеси, що

здійснюються на ДНК, – в першу чергу, транскрипція і реплікація. Проходження такого процесу пов'язане з пересуванням (транслокацією) уздовж ДНК того чи іншого ферменту (*транслокази*), який локально руйнує подвійну спіраль. Транслоказами є, зокрема, РНК- і ДНК-полімерази, а також інші ферменти. Оскільки молекула ДНК – спіраль, пересування транслокази має супроводжуватись або її обертанням навкруг осі подвійної спіралі (на кшталт обертання гайки навкруг гвинта), або прокручуванням самої подвійної спіралі (обертанням гвинта у гайці). Саме друга можливість і реалізується, оскільки транслоказа працює зазвичай у складі величезного мультибілкового комплексу – “гайка“ є надто масивною. Крім того, обертання транслокази додатково гальмується взаємодіями з ДНК, що реалізуються не тільки в області активного центру транслокази. Іноді транслоказа взагалі не здатна обертатись, оскільки сама зафіксована на елементах ядерного матриксу. Якщо кінці ДНК жорстко зафіксовані і не можуть обертатись, транслокація буде створювати топологічні проблеми (рис. 3.15).

У процесі пересування вздовж ДНК транслокази руйнує подвійну спіраль попереду від себе й відновлює її позаду. Локальне розкручування подвійної спіралі попереду транслокази має бути компенсованим позитивною надспіралізацією, відновлення спіралі (закручування) – надспіралізацією негативною. В результаті попереду й позаду від транслокази виникають дві “хвилі“ надспіралізації протилежного знаку.



Рис. 3.15. Дві хвили надспіралізації в процесі роботи транслокази у петельному домені.

Дві хвили надспіралізації, що виникають в процесі роботи РНК-полімерази, були продемонстровані експериментально, при чому як *in vitro*, так і *in vivo*. В першому випадку експеримент полягав у здійсненні транскрипції *in vitro* на циркулярній плазміді у присутності ферменту, що здатен знімати тільки негативну надспіралізацію: анігіляції двох хвиль не відбувалося, і після зупинки реакції матриця являла собою суміш позитивних топоізомерів. Експерименти *in vivo* здійснюються, наприклад, шляхом вирізання та замикання в кільце певного фрагмента ДНК в клітині специфічним ферментом. Кільце виділяється та використовується як “свідок” – воно містить надспіралізацію, що була присутньою в певній геномній зоні. Коли такий фрагмент знаходиться в промоторі (позаду від полімерази), інтенсифікація транскрипції призводить до накопичення негативної надспіралізації.

Зрозуміло, що накопичення надспіралізації (еластичної напруги) не може продовжуватись нескінченно: в решті решт напруга буде блокувати процес транслокації. Відповідно, має бути спосіб вирішувати цю проблему – знімати надспіралізацію, релаксуючи ДНК. Інструментом, який для цього використовується клітиною, є спеціальні ферменти – *ДНК-топоізомерази*, що здатні здійснювати релаксацію ДНК (знімати надспіралізацію), індукуючи тимчасовий розрив полінуклеотидного ланцюга. Після зашивання розриву утворюється топоізомер, Lk якого є максимально близьким до Lk_0 . Проте, топоізомерази не можуть реагувати на виникнення надспіралізації раптово – їм потрібен певний час на зв'язування з ДНК та здійснення релаксації. Виявляється, що частину еластичної напруги можуть знімати нуклеосоми за рахунок своєї конформаційної рухливості.

Із нуклеосомами в складі циркулярних молекул ДНК пов'язана давня проблема так званого *парадокса надспіральності*. Внаслідок формування лівої суперспіралі (негативне значення райзинга), нуклеосома вносить у

циркулярну ДНК позитивну надспіралізацію – або, що те ж саме, фіксує на собі частину негативної надспіралізації, якщо вона була присутня в циркулярній ДНК. Якщо здійснити реконструкцію нуклеосом на циркулярній плазміді у присутності еукаріотичної топоізомерази I (яка знімає напругу в лінкерних ділянках), то в отриманій таким чином циркулярній мініхромосомі мінімізовані еластичні напруження. Кількість нуклеосом у мініхромосомі підраховується під електронним мікроскопом. Далі нуклеосоми видаляються – вільна циркулярна ДНК містить негативні надспіральні витки (еластичні напруження), які вивільнилися внаслідок видалення нуклеосом (були зафіксовані нуклеосомами). Кількість цих надспіральних витків (ступінь надспіралізації) можна оцінити за допомогою електрофорезу – більш надспіралізована ДНК має підвищену електрофоретичну рухливість внаслідок зростання ступеня компактності. У таких експериментах було встановлено, що зниження числа зачеплень у мініхромосомі відносно вільної циркулярної ДНК, релаксованої в таких самих умовах, практично дорівнює кількості нуклеосом. Тобто, число надспіральних витків, зафіксоване однією нуклеосомою, $\Delta Lk_n = -1$.

У топологічному сенсі нуклеосомна суперспіраль має два витки – якщо лінкерна ДНК продовжує по прямій траєкторію, задану нуклеосомною суперспіраллю, відбувається два негативних перехрещення осі подвійної спіралі ДНК – усередині нуклеосом та на вході/виході. Більш точний розрахунок оцінює райзинг нуклеосомної ДНК як $Wr_n \approx -1,7$. Розбіжність між Wr_n та ΔLk_n і виглядає парадоксальною. Одним із рішень парадокса надспіральності може бути позитивний внесок від зміни твіста нуклеосомної ДНК ΔTw_n у загальну зміну числа зачеплень (за рівн. 3.2). Це рішення, запропоноване в свій час Кріком та Клугом (Francis Crick, Aaron Klug), відіграло важливу роль у розвитку молекулярної біології, але воно не дозволяє повною мірою вирішити парадокс надспіральності. Дійсно, хоча ΔTw_n має позитивне значення (відбувається додаткове закручення подвійної спіралі в нуклеосомі, підпідрозд. 3.1.2), зміна твіста не є достатньо високою, щоб повністю компенсувати Wr_n до

$\Delta Lk_n = -1$. Середня спіральна періодичність нуклеосомної ДНК дорівнює 10,2–10,3 п.о./виток, тобто, якщо середня періодичність вільної ДНК становить $\sim 10,5$ п.о./виток, то для 147 пар основ $\Delta Tw_n \sim +0,3 \div +0,4$, і ΔLk_n залишається достатньо далеким від експериментально отриманої величини.

Відповідь дає конформаційна динаміка нуклеосоми, яку вдається зафіксувати на простій системі – мононуклеосомі, що реконструйована на циркулярній ДНК малого розміру (мініциклі). Принципову схему експериментального підходу зображено на рис. 3.16: нуклеосома реконструюється на мініциклі розміром 350–360 пар основ, після чого мініцикл обробляється топоізомеразою I (за фізіологічних значень іонної сили та температури) для максимально можливої релаксації. З цього релаксованого матеріалу видаляються гістони, і рівень надспіралізації аналізується за допомогою електрофорезу.

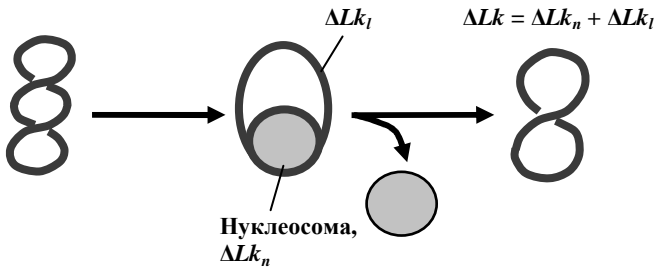


Рис. 3.16. Схема експерименту з нуклеосомами, реконструйованими на мініциклах ДНК (пояснення в тексті).

Внаслідок маленького розміру і, відповідно, високої жорсткості, вільні мініцикли дають зазвичай лише один топоізомер після релаксації (Lk якого є найближчим до значення Lk_0). Але за наявності нуклеосоми в релаксованій суміші присутні принаймні два топоізмери. Це відразу вказує на зростання загальної пластичності мініцикла – висновок неочікуваний та дещо контрінтуїтивний, зважаючи на те, що

розмір вільної петлі в складі реконструйованої частинки є значно меншим загальної контурної довжини мініцикла.

Циркулярна ДНК, що містить нуклеосому і піддається релаксації за допомогою топоізомерази, може бути розділеною на два топологічні домени: ДНК у складі нуклеосоми, структура якої визначена взаємодіями всередині частинки, та вільна петля, структура якої обмежена тільки на її кінцях. Сумарне значення ΔLk мініцикла складається з частини надспіралізації ΔLk_n , знятої нуклеосомою, та надспіралізації ΔLk_l , що залишилася в петлі (рис. 3.16):

$$\Delta Lk = \Delta Lk_n + \Delta Lk_l.$$

Тобто, ΔLk топоізомера дорівнює ΔLk_n , якщо петля повністю релаксована і $\Delta Lk_l = 0$. Зрозуміло, що в умовах релаксації переважним буде той топоізомер, для якого ΔLk_l наближається до нуля – тобто ΔLk якого є найближчим до ΔLk_n .

Аналіз результатів таких експериментів, проведених на мініциклах, які походять з фрагменту плазмиди pBR322, приводить до висновку, що нуклеосома існує у вигляді трьох структурних форм із різними значеннями ΔLk_n (рис. 3.17): закрита негативна ("канонічна" форма – 1,7 витків суперспіралі, негативне перехрещення лінкерів на виході з нуклеосоми); відкрита (1,4 витки суперспіралі, відсутність перехрещення); закрита позитивна (знову 1,7 витків, але позитивне перехрещення на виході). Реалізація останнього стану потребує певних перебудов структури нуклеосоми, які наближують одна до одної лінкерні ділянки, чим сприяють їх позитивному перехрещенню.

Таким чином, парадокс надспіральності вирішується просто: отримане на мініхромосомах значення $\Delta Lk_n = -1$ є усередненим для кількох структурних станів нуклеосоми, кожному з яких притаманне своє ΔLk_n . Кожне таке значення ΔLk_n відображає певний райзинг і, як правило, позитивну зміну твіста нуклеосомної ДНК.

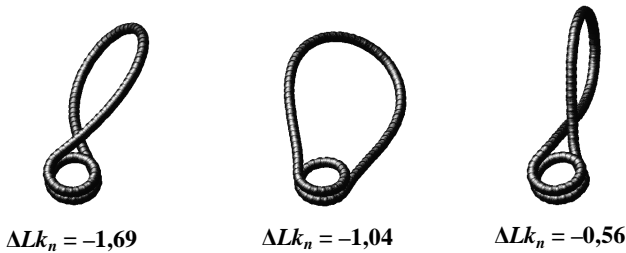


Рис. 3.17. Конфігурації мініциклів з нуклеосомами у трьох структурних формах (зліва направо: закрита негативна, відкрита, закрита позитивна) та відповідні значення ΔLk_n .
Адаптовано з роботи Sivolob *et al.* (2003).

Отримані значення ΔLk_n практично співпадають з оцінками райзинга для вказаних структурних форм: для мініциклів, що походять від плазміди рBR322, твіст ДНК у нуклеосомі дорівнює такому в розчині (останній в умовах експерименту відповідає 10,49 п.о./виток). Ця ситуація не є загальним правилом: на мініциклах іншого походження (тобто на ДНК інших послідовностей) зареєстровані інші, менші за абсолютною величиною, значення ΔLk_n , які вказують на додаткове закручування нуклеосомної ДНК. На мініциклах, що походять від фрагменту α -сателітної ДНК людини (як і ДНК, що використана в кристалографічних дослідженнях нуклеосоми, описаних у підрозділі 3.1) спіральна періодичність всередині нуклеосоми оцінюється у 10,3 п.о./виток (проти 10,49 п.о./виток у розчині), а значення ΔLk_n для трьох станів становлять $-1,55$, $-0,79$ та $-0,47$. На ДНК з гена рибосомної РНК 5S морського їжака *Lytechinus variegatus* відповідні ΔLk_n дорівнюють $-1,40$, $-0,72$ та $-0,41$, а спіральна періодичність у нуклеосомі 10,3 п.о./виток проти 10,54 п.о./виток у розчині.

Крім залежного від послідовності пар основ поліморфізму нуклеосом щодо спіральної періодичності, нуклеосоми на мініциклах різного походження характеризуються різною конформаційною динамікою. Переважним, що можна було очікувати, є закритий негативний стан, який відповідає

канонічній структурі нуклеосоми, – його вільна енергія ΔG_n (відносно відкритого стану, для якого прийнято $\Delta G_n = 0$) варіює від $-0,8$ до $-1,7$ одиниць kT . Закритий позитивний стан є найменш вигідним енергетично, і для деяких послідовностей він є взагалі практично недоступним.

Таким чином, невелика порівняно з енергією теплових флуктуацій різниця вільних енергій між структурними станами, власне, і забезпечує можливість конформаційної рівноваги. Ця рівновага зсувається в той чи інший бік залежно від рівня надспіралізації, а також модулюється послідовністю ДНК у складі нуклеосоми. Інакше кажучи, нуклеосомні структурні стани відіграють роль буфера, який знімає частину надспіралізації того чи іншого знаку, і ці буферні властивості залежать від послідовності пар основ нуклеосомної ДНК.

Крім того, конформаційна рівновага залежить від типу гістонів, що входять до складу нуклеосоми. Так, присутність у нуклеосомі CENP-A замість звичайного гістона H3 (див. підпідрозд. 2.1.3) сприяє розгортанню нуклеосомної ДНК – найбільш імовірною стає відкрита форма нуклеосоми. Це пояснюється заміною в складі CENP-A залишків Arg в α N-спіралях – послаблюється контакт між ДНК та гістонами на виході з нуклеосоми, в $SHL \pm 6,5$.

Гіперацетилювання гістонів також робить відкриту форму переважною: зниження позитивного заряду гістонових хвостів призводить до зростання розштовхування між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі на кінцях. Оскільки ацетилювання гістонів завжди позитивно корелює з транскрипційною активністю, значення відкритої форми нуклеосоми є очевидним: по-перше, розгортання нуклеосомної ДНК на кінцях підвищує її доступність до регуляторних білків; по-друге, таке розгортання дестабілізує димери H2A-H2B в нуклеосомі – їх перенесення на проміжні гістонові акцептори, яке досить активно відбувається під час транскрипції, полегшується.

Тимчасове видалення димерів залишає на ДНК тетрасому (рис. 3.2), яка також характеризується неабиякою конформаційною рухливістю: під дією надспіралізації того чи

іншого знаку тетрасомна суперспіраль змінює свою хіральність: більш енергетично вигідна лівоспіральна тетрасома (яка відповідає структурі в складі нуклеосоми) перетворюється на правоспіральну в складі позитивно надспіралізованих топоізомерів (рис. 3.18).

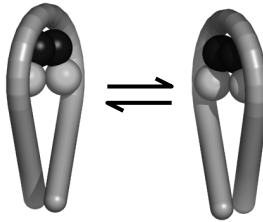


Рис. 3.18. Схема перетворення лівоспіральної тетрасоми (ліворуч) на правоспіральну (праворуч). Гістони зображено у вигляді кульок.

Правоспіральна тетрасома може легко поглинати частину позитивної надспіралізації, яка виникає попереду РНК-полімерази під час транскрипції: для неї також проявляються зазначені вище буферні властивості, які також залежать від послідовності ДНК в складі тетрасоми (різниця вільних енергій між двома станами трохи варіює для різних послідовностей) і від гістонових хвостів, видалення або гіперацетилювання яких значно полегшує перехід у правоспіральну конформацію.

Взагалі, конформаційна динаміка тетрасоми та нуклеосоми зумовлює неочікувану властивість ДНК-гістонових комплексів: їхня присутність на ДНК робить молекулу ДНК значно більш пластичною – здатною легше накопичувати надспіралізацію (торсійну напругу) того чи іншого знаку. Головним чинником підвищення пластичності є конформаційна рухливість ДНК-гістонових комплексів, яка дозволяє їм адаптуватись до того чи іншого топологічного стану циркулярної ДНК (петельного домену).

3.3.3. Зміна хіральності нуклеосоми: реверсома. Висока пластичність ДНК, що формує нуклеосоми, проявляється також в експериментах із магнітним пінцетом. Схему експерименту зображено на рис. 3.19.

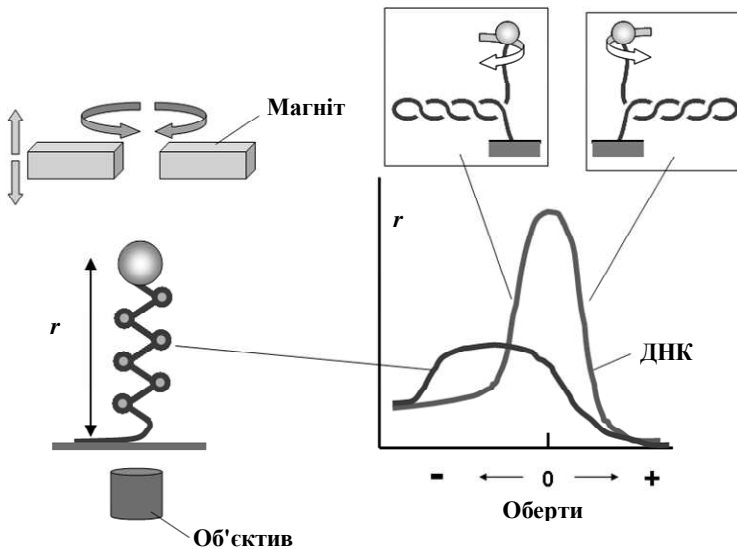


Рис. 3.19. Схema експерименту з магнітним пінцетом та типові залежності відстані r від кульки до підложки від кількості обертів. На вставках: утворення плектонами при закручуванні як причина скорочення відстані r . Інші пояснення в тексті.

Молекулу ДНК (зазвичай довжиною від ~ 5 до ~ 50 тис. п.о.) пришивають за один кінець до поверхні скла у невеличкій камері – у камеру подається розчин бажаного складу, під камерою знаходиться об'єктив оптичного мікроскопа. До іншого кінця приєднано кульку діаметром 2–3 мкм (яка добре видима в оптичний мікроскоп), що є парамагнетиком і знаходиться під дією постійного магнітного поля, створеного електромагнітом. Магніт може переміщуватись та обертатись, як показано на рисунку. Переміщення створює розтягувальну силу, що

прикладається до кінця ДНК, – величина сили залежить від висоти положення магніту над камерою. Кількість обертів магніту задає певний обертальний момент, прикладений до кінця молекули, – здійснюється кручення одного кінця відносно іншого в тому чи іншому напрямі.

Один оберт магніту, в залежності від напрямку обертання, закручує або розкручує подвійну спіраль на один виток, відповідно збільшуючи або зменшуючи твіст: виникає торсійна напруга, яка характеризується ненульовим значенням $\Delta Tw = Tw - Tw_0$ (позитивним при додатковому закручуванні та негативним – при розкручуванні правої подвійної спіралі). Досить швидко відносно скорочення відстані r (визначається за допомогою мікроскопа по зміні інтерференційної картини навкруг кульки) при зростанні кількості обертів у той чи інший бік пояснюється тим, що оберти магніту дійсно індукують торсійну деформацію тільки до певної межі – подвійна спіраль здатна накопичити торсійну напругу лише певної величини. Після досягнення критичної точки (певної питомої кількості обертів на одиницю довжини) енергія торсійних деформацій стає надто високою, і відбувається втрата стійкості: ДНК закручується у надспіральні *плектономічні витки* (рис. 3.19). В тому, що торсійне закручування має в певний момент перетворитися на плектономічні витки, можна легко переконатись, закручуючи гумову трубку або звичайну мотузку.

Для полінуклеосомної фібрили, так само, як для голої ДНК, відстань від парамагнітної кульки до підложки при обертанні магнітного пінцета скорочується внаслідок формування плектономи (але вже полінуклеосомним ланцюгом). Зрозуміло, що в порівнянні з відповідною вільною ДНК, фібрила є коротшою в точці максимуму, і сам цей максимум є зсунутим у негативному напрямку обертання магніту (рис. 3.19) – нуклеосоми скорочують фібрилу та фіксують на собі негативні надспіральні витки (обидва ефекти є пропорційними до кількості нуклеосом). Проте, є ще одна важлива відмінність: у порівнянні з голою ДНК, перед тим, як починається формування плектономи, полінуклеосомний ланцюг здатен накопичувати

значно більшу торсійну напругу (питому кількість обертів) за рахунок конформаційної рухливості нуклеосом (рис. 3.20).

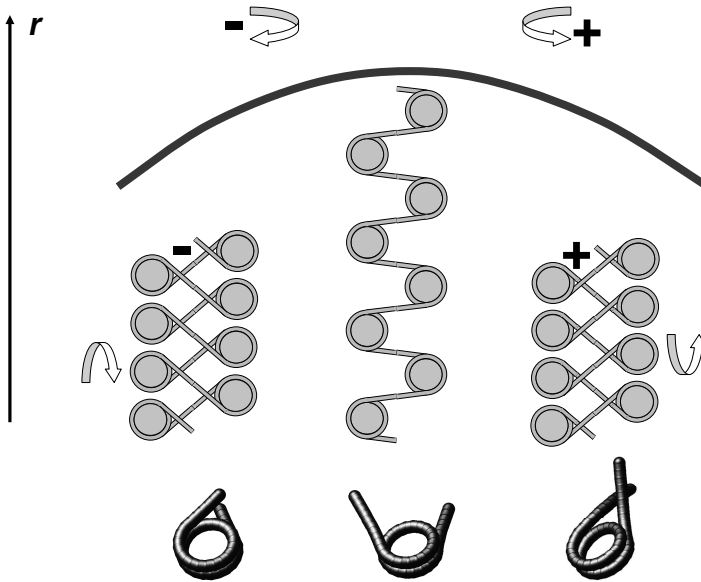


Рис. 3.20. Відповідь полінуклеосомного ланцюга на торсійну деформацію: крива схематично відображає зміну довжини ланцюга r (відстані від парамагнітної кульки до підложки) як функції кількості обертів в оточенні максимуму (подальше накопичення торсійних витків обох знаків призводить до більш різкого скорочення за рахунок утворення плектонем). Три структурні форми нуклеосоми (внизу) сприяють накопиченню напруги за рахунок обертання нуклеосом навкруг своїх осей симетрії в тому чи іншому напрямі. Адаптовано з роботи Bancaud *et al.* (2006).

Найбільше подовження полінуклеосомного ланцюга відповідає відкритій формі нуклеосоми в його складі – в умовах експерименту (низька іонна сила) ця форма є переважною внаслідок великого електростатичного розштовхування між

витками нуклеосомної суперспіралі. Утворення плектономом гальмується обертанням нуклеосом навкруг своїх осей симетрії та переходом у закриті структурні форми – негативну чи позитивну в залежності від напрямку обертання магнітного пінцета. Тільки після закінчення структурних переходів починається утворення плектономом.

Але найцікавіша структурна перебудова трапляється в нуклеосомах при накопиченні високого рівня позитивної торсійної напруги – після утворення плектонами. Результати вказують на зміну хіральності нуклеосомної суперспіралі – перетворення її на *праву* в складі частинки, що отримала назву *реверсоми* (reversome – reverse nucleosome).

Якщо кількість обертів пінцета в позитивному напрямі (в бік закручення подвійної спіралі) є не надто великою, зворотне обертання призводить до подовження фібрили по тій самій траєкторії – пряма та зворотна криві залежності довжини від кількості обертів співпадають. Але за певною граничною кількістю позитивних обертів (приблизно 20 обертів після того, як довжина знизилась до нуля внаслідок утворення плектонами), зворотний рух характеризується гістерезисом: скидання плектономічних витків (подовження фібрили) починається при більших значеннях кількості обертів – при однаковій їх кількості відносно нульової точки фібрила має довжину більшу, ніж ця довжина була при прямому русі (рис. 3.21).

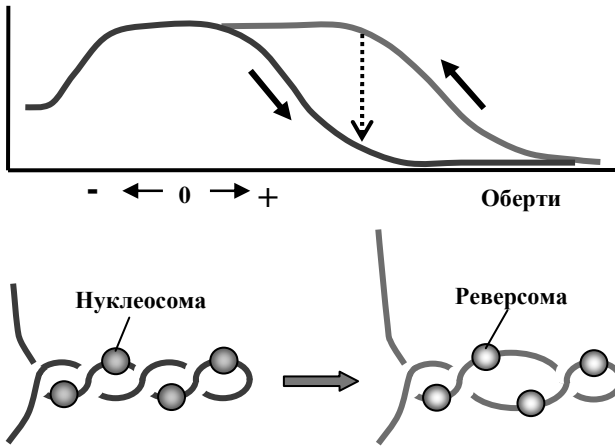


Рис. 3.20. Схема гістерезису при накопиченні та зворотному скиданні позитивної торсійної напруги в полінуклеосомній фібрилі. Стрілки вказують напрям обертання, пунктирна стрілка – напрям скорочення фібрили, якщо зворотне обертання зупиняється в певній точці. Внизу: внаслідок структурної перебудови реверсома поглинає частину позитивної надспіралізації. Адаптовано з роботи Vancaud *et al.* (2007).

Така поведінка дозволяє зробити два висновки. По-перше, за високого рівня позитивної торсійної напруги в нуклеосомі відбувається структурне перетворення, внаслідок якого нова частинка – реверсома – фіксує на собі певну частину позитивної надспіралізації. Амплітуда гістерезису (величина відносного зсуву двох кривих на рис. 3.21) є прямо пропорційною до кількості нуклеосом у складі фібрили, із нахилу цієї залежності отримано оцінку $\Delta Lk_n = +0,9$ для реверсоми. Очевидно, що ДНК в складі частинки утворює *праву* суперспіраль, яка, ймовірно, є дзеркальним відображенням лівоспіральної відкритої форми нуклеосоми. По-друге, наявність гістерезису вказує на те, що дві структури розділені високим активаційним бар'єром – при зворотному обертанні реверсома не встигає перебудуватись у

більш енергетично вигідну нуклеосому. Якщо зворотне обертання зупинити за деякої кількості обертів, спостерігається довге (за десятки хвилин) скорочення фібрили (пунктирна стрілка на рис. 3.20) – здійснюється перехід реверсоми в нуклеосому. Аналіз кінетики переходу дозволяє оцінити висоту активаційного бар'єра та різницю вільних енергій між нуклеосомою та реверсомою: вільна енергія реверсоми відносно нуклеосоми дорівнює ~ 10 *kT*, енергія активації ~ 30 *kT*. Остання величина приблизно співпадає з вільною енергією взаємодії двох димерів H2A-H2B з тетрамером (H3-H4)₂ у 2 M NaCl. Це вказує, що наявність активаційного бар'єра пов'язана з необхідністю зруйнувати енергетично вигідні контакти між димерами та тетрамером на шляху структурної перебудови.

Дійсно, перетворити ліву нуклеосомну суперспіраль на праву можна тільки в один спосіб: порушивши взаємодію димерів з тетрамером, розгорнувши нуклеосомну ДНК разом зі зв'язаними димерами, потім змінивши хіральність тетрасоми та встановивши нові контакти між димерами та тетрамером (рис. 3.21). Відповідно, видалення димерів з полінуклеосомної фібрили призводить до зникнення гістерезису: тетрасома, що залишається, легко змінює свою хіральність без будь-яких активаційних бар'єрів. Гістон-гістонові контакти в реверсомі відрізняються від таких у нуклеосомі (димери зв'язуються з іншого боку від тетрамера, рис. 3.21), що, напевно, і дає основний внесок у різницю вільних енергій між двома структурами.

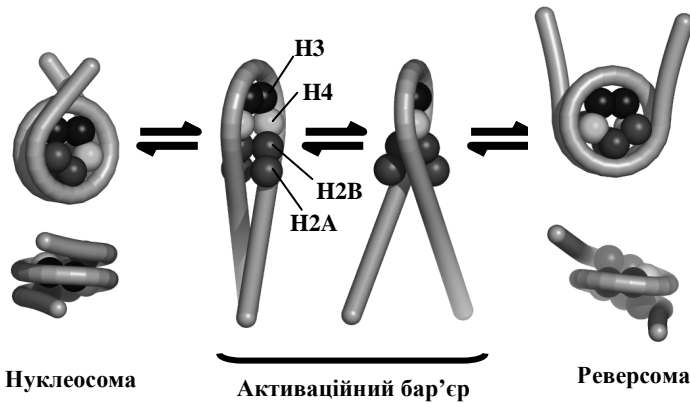


Рис. 3.21. Схема структурної перебудови в нуклеосомі зі зміною хіральності суперспіралі. Гістони зображено у вигляді кульок.

Для відповіді на питання про можливу фізіологічну роль реверсоми знову треба повернутись до хвилі позитивної надспіралізації, яка виникає попереду РНК-полімерази під час транскрипції: полімераза індукує обертальний момент анітрохи не менший, ніж під час експерименту з магнітним пінцетом. Тобто, реверсома є цілком можливою як тимчасова структура під час транскрипції. Значення її може бути подвійним. По-перше, реверсома ефективно поглинає позитивну надспіралізацію, забезпечуючи можливість продовження процесу транскрипції, поки не спрацюють ДНК-топоізомерази. По-друге, реверсома може розглядатись як високо-енергетична “активована” форма нуклеосоми – дестабілізовані в такій структурі димери H2A-H2B легше мають зніматись проміжними акцепторами.

Справа в тому, що в кодуючих ділянках генів нуклеосоми зберігаються під час транскрипції, але в експериментах *in vitro* на лінійних молекулах ДНК нуклеосома створює майже абсолютний бар'єр на шляху РНК-полімерази II. *In vivo* гістонові комплекси тимчасово знімаються з ДНК проміжними акцепторами попереду від полімерази та відразу повертаються після її проходження (розділ 5). Димер H2A-H2B є першим

блокатором руху полімерази – в транскрипційно активних ділянках реєструється швидкий обмін димерів. Таким чином, дві хвили надспіралізації, що створюються самою РНК-полімеразою, допомагають здійснити обидві операції, необхідні для ефективної елонгації транскрипції при збереженні нуклеосомної упаковки: попереду полегшується видалення димерів, позаду негативна надспіралізація сприяє відновленню лівоспіральної нуклеосомної структури.

3.4. Варіабельність нуклеосомних частинок у хроматині

Термін "нуклеосома" можна інтерпретувати і як позначення для структури, що містить октамер гістонів та близько 145 пар основ ДНК, і в більш широкому сенсі – як елементарну нуклеопротейнову частинку, що повторюється вздовж хроматинової фібрили. Тоді нуклеосома у вузькому сенсі терміна може бути позначена як *октасома* – зрозуміло, що це основний, базовий стан нуклеосоми. Але, як кілька разів згадувалось у цьому розділі, октасоми у хроматині характеризуються структурним поліморфізмом. Цей поліморфізм проявляється у вигляді:

- варіацій конформаційних параметрів нуклеосомної ДНК – твіста подвійної спіралі та інших параметрів динуклеотидних кроків;
- варіації в певних вузьких межах загальної форми нуклеосоми – кроку та радіусу нуклеосомної суперспіралі;
- варіації ступеня закручення нуклеосомної суперспіралі – кількості надспіральних витків, тобто довжини нуклеосомної ДНК – від ~120 (або навіть 100) до 160-170 пар основ.

Всі ці варіації визначаються нуклеотидною послідовністю нуклеосомної ДНК та наявністю у складі нуклеосоми гістонових варіантів та посттрансляційних модифікацій. Наприклад, деякі гістонові варіанти сприяють зниженню ступеня закручення нуклеосомної ДНК. Цей ступінь може залежати також від щільності нуклеосом у хроматині – у деяких дріжджів довжина нуклеосомного повтора дорівнює 156 парам основ, і нуклеосомна ДНК частково розгортається внаслідок стеричних

обмежень. Всі ці варіації можуть бути статичними – коли та чи інша переважна форма нуклеосоми існує довгий час, а також динамічними – відображати зсув у той чи інший бік рівноваги між різними конформаційними формами нуклеосоми. Найбільш радикально зміненою структурною формою октасоми є право-спіральна *реверсома*.

Унаслідок динамічних процесів, що відбуваються в хроматині під час функціонування геному, димери гістонів H2A-H2B тимчасово видаляються з нуклеосоми. Тоді в хроматині залишаються дві інші частинки: *гексасома*, що містить гексамер $(H3-H4)_2$ -H2A-H2B, та *тетрасома*, яка виникає після видалення другого димера H2A-H2B і яка може існувати в двох формах – ліво- та право-спіральній.

Крім того, обговорюється можливість існування в хроматині двох гіпотетичних частинок. Перша з них – так звана *гемісома*, частинка, що містить гетеротетрамер H3-H4-H2A-H2B. Вона не є цілком гіпотетичною, оскільки існують докази існування такої частинки (що містить SenH3 замість H3) в центромерах. Друга частинка є варіацією першої – "розколота" нуклеосома або *лексосома*: два гетеротетрамери H3-H4-H2A-H2B з порушеними взаємодіями між гістонами H3. Можливість існування гемісоми та лексосоми базується на тому, що в транскрипційно активних ділянках хроматину іноді спостерігається зростання доступності двох залишків Cys110 у гістоні H3 – ці консервативні залишки розташовані в зоні інтерфейсу між двома гістонами H3 та в звичайних нуклеосомах є недоступними для розчинника. Такі частинки з підвищеною доступністю Cys110 вдається виділити з активного хроматину, проте, не знайдені умови *in vitro*, в яких гемісома та лексосома могли б бути стабільними.

Рекомендована література

Загальна

Kornberg, R.D., Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome // *Cell*. – 1999. – Vol. 98. – P. 285-294.

Lavelle, C., Prunell, A. Chromatin polymorphism and the nucleosome superfamily // *Cell Cycle*. – 2007. – Vol. 6. – P. 2113-2119.

Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.M., Jackson, V., van Holde, K. The nucleosome family: dynamic and growing // *Structure*. – 2009. – Vol. 17. – P. 160-171.

Структура нуклеосоми

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 319. – P. 1097-1113.

Hall, M.A., Shundrovsky, A., Bai, L., Fulbright, R.M., Lis, J.T., Wang, M.D. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16. – P. 124-129.

Luger, K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes // *Curr. Op. Gen. Dev.* – 2003. – Vol. 13. – P. 127-135.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. – 1997. – Vol. 389. – P. 251-260.

Muthurajan, U.M., Bao, Y., Forsberg, L.J., Edayathumangalam, R.S., Dyer, P.N., White, C.L., Luger, K. Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein–DNA interactions // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 260-271.

Ong, M.S., Richmond, T.J., Davey, C.A. DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 368. – P. 1067-1074.

Richmond, T.J., Davey, C.A. The structure of DNA in the nucleosome core // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 145-150.

Tolstorukov, M.Y., Colasanti, A.V., McCandlish, D.M., Olson, W.K., Zhurkin, V.B. A novel roll-and-slide mechanism of DNA folding in chromatin: Implications for nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371. – P. 725-738.

Vasudevan, D., Chua, E.Y.D., Davey, C.A. Crystal structures of nucleosome core particles containing the '601' strong positioning sequence // *J. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 403. – P. 1-10.

Zheng, C., Hayes, J.J. Structures and interactions of the core histone tail domains // *Biopolymers.* 2003. – Vol. 68. – P. 539–546.

Структурна динаміка нуклеосоми

Anderson, J.D., Thastrom, A., Widom, J. Spontaneous access of proteins to buried nucleosomal DNA target sites occurs via a mechanism that is distinct from nucleosome translocation // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 7147-7157.

Bancaud, A., Conde E Silva, N., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J.F., Mozziconacci, J., Lavelle, C., Croquette, V., Victor, J.-M., Prunell, A., Viovy, J.-L. Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 444-450.

Bancaud, A., Wagner, G., Conde e Silva, N., Lavelle, C., Wong, H., Mozziconacci, J., Barbi, M., Sivolob, A., Le Cam, E., Mouawad, L., Viovy, J.-L., Victor, J.-M., Prunell, A. Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 27. – P. 135-147.

Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., Bustamante, C. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II // *Science.* – 2009. – Vol. 325. – P. 626-628.

Kelbauskas, L., Chan, N., Bash, R., Debartolo, P., Sun, J., Woodbury, N., Lohr, D. Sequence-dependent variations associated with H2A/H2B depletion of nucleosomes // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94. – P. 147-158.

Li, G., Widom, J. Nucleosomes facilitate their own invasion // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 11. – P. 763-769.

Mihardja, S., Spakowitz, A.J., Zhang, Y., Bustamante, C. Effect of force on mononucleosomal dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 15871-15876.

Muthurajan, U.M., Park, Y.-J., Edayathumangalam, R.S., Suto, R.K., Chakravarthy, S., Dyer, P.N., Luger, K. Structure and

dynamics of nucleosomal DNA // *Biopolymers*. – 2003. – Vol. 68. – P. 547-556.

Polach, K.J., Widom, J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 254. – P. 130-149.

Sivolob, A., De Lucia, F., Alilat, M., Prunell, A. Nucleosome dynamics VI. Histone tail regulation of tetrasome chiral transition. A relaxation study of tetrasomes on DNA minicircles // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 295. – P. 55-70.

Sivolob, A., Lavelle, C., Prunell, A. Sequence-dependent nucleosome structural and dynamic polymorphism. Potential involvement of histone H2B N-terminal tail proximal domain // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 326. – P. 49-63.

Sivolob, A., Lavelle, C., Prunell, A. Flexibility of nucleosomes on topologically constrained DNA // *IMA Volumes in Mathematics and its Applications*, Vol. 150 (Eds. C.J.Benham, S.Harvey, W.Olson, D.W.Sumners, D.Swigon). – New York: Springer-Verlag, 2009. – P. 251-291.

Sivolob, A., Prunell, A. Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics // *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A.* – 2004. – Vol. 362. – P. 1519-1547.

Tomschik, M., Zheng, H., van Holde, K., Zlatanova, J., Leuba, S.H. Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 3278-3283.

4. Наднуклеосомна організація інтерфазного хроматину

У цьому розділі розглядається організація хроматину на наднуклеосомному рівні у трьох головних аспектах: характер розташування нуклеосом у різних геномних зонах та механізми залежності цього розташування (позиціонування нуклеосом) відносно нуклеотидної послідовності ДНК; структурна організація та механізми стабілізації та дестабілізації компактної хроматинової фібрили 30 нм; розміщення хроматинової фібрили – інтерфазної хромосоми – у клітинному ядрі.

4.1. Позиціонування нуклеосом

Феномен позиціонування нуклеосом відносно послідовності пар основ проявляється в тому, що деякі ділянки послідовності є дещо кращими за інші для утворення там нуклеосом. Кращими – в енергетичному сенсі: експерименти, в яких порівнювалась відносна ефективність реконструкції нуклеосом на різних послідовностях ДНК, свідчать, що послідовності можуть розрізнятися між собою за вільною енергією утворення нуклеосом на величину до $\sim 6-7$ kT . Проте, це скоріше граничні випадки: зазвичай різниця енергій між різними послідовностями становить ~ 2 kT .

Щоб з'ясувати, що такі значення вільної енергії можуть означати в термінах імовірності заповнення тих чи інших позицій, розглянемо простий гіпотетичний випадок. Нехай на деякому фрагменті ДНК довжиною $N = 204$ пари основ (максимально $N - 144 = 60$ позицій для нуклеосом, що містить 145 пар основ) є тільки одна позиція, розташування нуклеосом в якій супроводжується відносним зниженням вільної енергії на $\Delta\Delta G = -2$ kT – вільні енергії для всіх інших позицій приймемо за нуль. Тоді ймовірність знаходження нуклеосом на переважній позиції за принципом Больцмана пропорційна до $\exp(-\Delta\Delta G) = 7,39$, на всіх інших позиціях – до 1. Нормування по всіх

позиціях дає імовірність знайти нуклеосому в переважній позиції

$$p = \frac{\exp(-\Delta\Delta G)}{N - 145 + \exp(-\Delta\Delta G)} = 0,11$$

проти ймовірності для кожної з інших позицій 0,01. Зниження відносної вільної енергії переважної позиції до $-6 k_B T$ призводить до підвищення першої імовірності до 0,87 та зниження другої до 0,002. Таким чином, позиціонування нуклеосом не є жорстко детермінованим – мова завжди йде про більшу чи меншу ймовірність присутності нуклеосом в даному сайті.

Вільна енергія утворення нуклеосом визначає “силу” даної позиції, а конкретний енергетичний профіль вздовж ДНК – складну картину переважного позиціонування. Наприклад, зазвичай на фрагментах довжиною 200–250 пар основ реєструються 2–3 альтернативні переважні позиції. Крім того, для появи регулярної картини позиціонування нуклеосом може бути достатнім існування на певній ділянці тільки однієї “сильно” позиційованої нуклеосом, яка задає рамку розташування для інших нуклеосом (рис. 4.1, *a*). Тобто, нуклеосом, розташовані за сильно позиційованою, займають не переважні, а просто доступні позиції, що не перекриваються. У результаті на ділянці певної довжини нуклеосом виявляються *фазованими* – спостерігається їх впорядковане розташування, коли на багатьох фрагментах ДНК, що аналізуються, в тій самій області з високою імовірністю знаходиться нуклеосома – так зване статистичне позиціонування. На віддаленні від позиційованої нуклеосом накопичуються випадкові зсуви нуклеосом в той чи інший бік, і регулярність їхнього розташування порушується – на багатьох фрагментах ДНК нуклеосом хаотично займають місця, що перекриваються. Якщо дві альтернативні сильні позиції перекриваються, обирається та з них, що є більш переважною (рис. 4.1, *б*) – вона й задає рамку фазованих нуклеосом. Але в межах цієї позиції

може бути розташований специфічний регуляторний сайт – зв'язування з ним транскрипційного фактора призведе до реалізації іншої переважної позиції та іншої рамки розташування нуклеосом (рис. 4.1, *в*). Зрозуміло, що специфічно зв'язаний білок сам по собі здатен визначати рамку фазування. І навпаки: розподіл нуклеосом визначає доступність елементів послідовності ДНК для різноманітних ДНК-зв'язувальних білків.

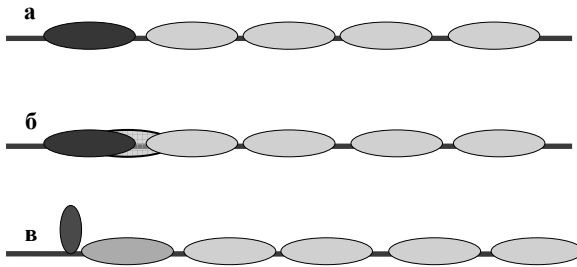


Рис. 4.1. Приклади варіантів розташування нуклеосом у геномних ділянках: (*а*) нуклеосома в сильній позиції (темний овал) задає рамку розташування інших нуклеосом (світлі овали); (*б*) з двох альтернативних сильних позицій, що перекриваються, обирається сильніша; (*в*) транскрипційний фактор заважає утворенню нуклеосоми на сильнішій позиції у випадку (*б*) – обирається наступна за силою позиція та утворюється нова рамка нуклеосом.

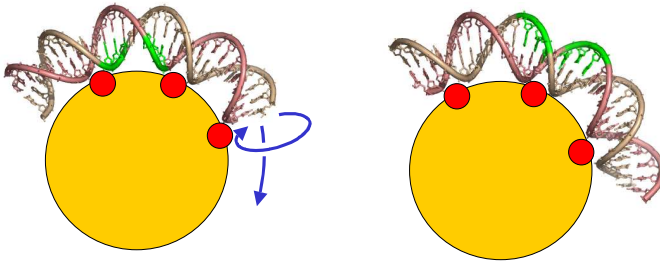


Рис. 4.2. Ротаційне позиціонування нуклеосоми: зсув ДНК по поверхні октамера гістонів на піввітка подвійної спіралі призводить до експонування чи екранування регуляторного сайту (збарвлений зеленим).

Доступність регуляторного елемента нуклеотидної послідовності не обов'язково пов'язана з його розташуванням у лінкері – досить короткі сайти зв'язування можуть знаходитись всередині нуклеосомної ДНК, і тоді їхня доступність залежить від того, на якому боці дуплекса – оберненого назовні чи до поверхні октамера гістонів – вони знаходяться. Оскільки для здійснення контактів між ДНК та гістонами маленький жолобок має стати точно проти сайту зв'язування на октамері, трансляційний зсув нуклеосоми призводить до одночасного прокручування дуплекса – змінюється так звана ротаційна позиція. При зсуві на піввітка подвійної спіралі експонований сайт стає недоступним і навпаки (рис. 4.2).

Відповідь на питання, яке походження має енергетичний профіль вздовж послідовності ДНК, що він визначає позиціонування нуклеосом, вже дана в підрозділі 3.2: тільки один внесок у вільну енергію утворення нуклеосоми – енергія деформацій подвійної спіралі – суттєво залежить від послідовності пар основ. Різниця між енергіями деформації різних ділянок (на рівні ~ 2 kT або іноді більше) і є головним механізмом переважного позиціонування нуклеосом відносно послідовності.

Залежність конформації ДНК та потенціалу щодо її змін від послідовності ілюструє таблиця 4.1, де представлено

конформаційні параметри динуклеотидних кроків різного типу в складі білково-нуклеїнових комплексів. Ці значення є середніми для певного типу контакту між парами основ у 92 кристалічних структурах, де не спостерігається значних деформацій ДНК (нуклеосома не залучена до цього масиву даних). Тобто, хоча вплив білків на конформацію ДНК у цих комплексах безумовно має місце, ці данні є непоганим наближенням до структурних параметрів вільної ДНК у розчині за фізіологічних умов.

Як видно з таблиці, конформаційні параметри – особливо це стосується твіста, ролла та слайда – досить суттєво залежать від типу контакту між парами основ. У табл. 4.1 представлено також стандартні відхилення конформаційних параметрів, які показують, наскільки легко значення параметра може відхилитися від переважного середнього значення. Тобто, стандартні відхилення є мірою *конформаційної рухливості* контакту даного типу. Серед шести конформаційних параметрів два – твіст і ролл – найбільшою мірою (тобто з найменшими енергетичними витратами) здатні відхилитися від своїх рівноважних значень. Таке відхилення відповідає двом головним типам деформації подвійної спіралі – торсійне закручування/розкручування (зміна твіста) та вигин (зміна ролла). При цьому подвійна спіраль характеризується *анізотропією щодо вигину* – переважний внесок саме ролла, а не тилта, у вигин ДНК призводить до того, що подвійна спіраль значно легше вигинається у бік жолобків, ніж у бік цукрофосфатного остова (що є цілком зрозумілим інтуїтивно і що повністю підтверджується аналізом структури ДНК у нуклеосомі, підпідрозд. 3.1.2).

Загалом здатність динуклеотидного контакту до конформаційних змін залежить від ефективності стекінг-взаємодій між даними парами основ, кількості водневих зв'язків у парах та типу екзоциклічних груп у жолобках. Все це визначає доступний конформаційний простір та енергію, яку необхідно витратити на деформацію. В цілому спостерігається наступна тенденція: піримідин-пуринові (YR) динуклеотидні кроки є найбільш конформаційно рухливими, пурин-піримідинові (RY)

– найменш, кроки RR/YY займають проміжне положення. Серед кроків одного класу більш рухливими є кроки, збагачені на АТ-пари: наприклад, для YR-контактів рухливість щодо твіста і ролла знижується в ряду TA > CA/TG > CG. Таким чином, найбільш конформаційно рухливим серед усіх контактів є контакт TA: згадана в підрозділі 3.1.2 "сильно" позиційована нуклеосома-601 містить контакт TA у п'яти позиціях, де маленький жолобок обернений до поверхні октамера гістонів, ще в чотирьох таких позиціях розташовані інші піримідин-пуринові контакти – саме це, головним чином, і мінімізує енергію вигину і, відповідно, зумовлює високу схильність послідовності 601 до утворення нуклеосоми. Слід зауважити, що характер залежності конформації ДНК від послідовності є насправді більш складним: конформаційні особливості визначаються не тільки найближчими сусідами – типом контакту між парами основ, але певною мірою і контекстом послідовності, де даний контакт знаходиться.

Таблиця 4.1. Параметри динуклеотидних кроків у кристалах білково-нуклеїнових комплексів

	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
AA/TT	-0,03 (0,57)	-0,08 (0,45)	3,27 (0,22)	-1,4 (3,3)	0,7 (5,4)	35,1 (3,9)
AT	0,00 (0,57)	-0,59 (0,31)	3,31 (0,21)	0,0 (2,5)	1,1 (4,9)	29,3 (4,5)
TA	0,00 (0,52)	0,05 (0,71)	3,42 (0,24)	0,0 (2,7)	3,3 (6,6)	37,8 (5,5)
GG/CC	0,05 (0,76)	-0,22 (0,64)	3,42 (0,24)	-0,1 (3,7)	3,6 (4,5)	32,9 (5,2)
GC	0,00 (0,61)	-0,38 (0,56)	3,40 (0,24)	0,0 (3,9)	0,3 (4,6)	33,6 (4,7)
CG	0,00 (0,87)	0,41 (0,56)	3,39 (0,27)	0,0 (4,2)	5,4 (5,2)	36,1 (5,5)
AG/CT	0,09 (0,69)	-0,25 (0,41)	3,34 (0,23)	-1,7 (3,3)	4,5 (3,4)	31,9 (4,5)
GA/TC	-0,28 (0,46)	0,09 (0,70)	3,37 (0,26)	-1,5 (3,8)	1,9 (5,3)	36,3 (4,4)

AC/GT	0,13 (0,59)	-0,58 (0,41)	3,36 (0,23)	-0,1 (3,1)	0,7 (3,9)	31,5 (4,2)
CA/TG	0,09 (0,55)	0,53 (0,89)	3,33 (0,26)	0,5 (3,7)	4,7 (5,1)	37,3 (6,5)
Середнє*	0,00 (0,64)	-0,09 (0,69)	3,36 (0,25)	0,00 (3,6)	2,7 (5,2)	34,2 (5,5)

Для кожного параметра представлено середні значення та стандартні відхилення (в дужках) за даними Olson *et al.* (1998).

*Середні значення є зваженими на загальну кількість контактів кожного типу в базі даних.

Оскільки різні елементи послідовності (мінімальні – динуклеотидні кроки) розрізняються між собою за потенціалом щодо певних деформацій, найважливішими з яких для нуклеосом є зміни ролла, твіста та слайда (підпідрозд. 3.1.2), в нуклеосомних ДНК проявляються певні закономірності частоти зустрічності різних динуклеотидів у різних позиціях. Наприклад, аналіз послідовностей ДНК, виділених з тотального препарату нуклеосом дріжджів вказує на те, що АТ-збагачені кроки частіше зустрічаються там, де маленький жолобок контактує з поверхнею октамера гістонів, а GC-збагачені частіше розташовані у протилежній фазі (рис. 4.3). Аналогічні статистичні закономірності виконуються і для інших еукаріотичних геномів, а також для нуклеосом реконструйованих *in vitro* на геномних ДНК. Остання обставина вказує на те, що саме послідовність ДНК, а не інші фактори (конкуренція інших білків, специфічні механізми репозиціонування при ремодельованні хроматину (див. наступний розділ), наднуклеосомна структура хроматину тощо) є головним чинником позиціонування.

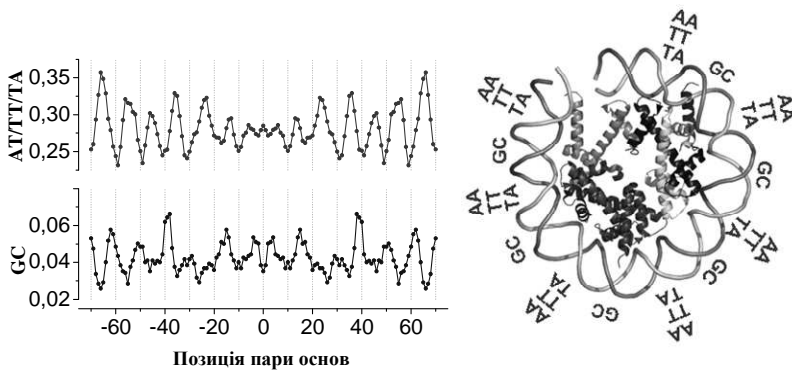


Рис. 4.3. Частота зустрічності динуклеотидних кроків AA/TT/TA та GC вздовж нуклеосомних ДНК в геномі дріжджів (0 – центральна точка нуклеосомної ДНК). Праворуч: переважні позиції відповідних динуклеотидних кроків. За даними Segal *et al.* (2006).

Встановлені статистичні закономірності можна використати для передбачення позицій нуклеосом, шукаючи ділянки з найбільш сприятливим для утворення нуклеосом розподілом динуклеотидів. Передбачувальна сила таких алгоритмів сягає 50% – але не більше. Напевно, від статистичних підходів і не слід очікувати кращого. Статистичні закономірності виникають в результаті усереднення по багатьом послідовностям, в результаті чого суттєво зменшується “шум”: кожна *індивідуальна* нуклеосомна ДНК характеризується розподілом динуклеотидів, який лише трохи відрізняється від випадкового.

Більш перспективними є підходи, що базуються на прямій оцінці вільної енергії деформації ДНК певної послідовності. Проте, вони поки що не здатні привести до кращих результатів. Найбільш повним на сьогодні джерелом інформації щодо залежних від послідовності еластичних властивостей ДНК є дані, отримані з кристалів білково-нуклеїнових комплексів (табл. 4.1). Але, по-перше, масив цих даних є не достатньо великим для надійної оцінки стандартних відхилень всіх

конформаційних параметрів для всіх динуклеотидних кроків. По-друге, еластичні особливості залежать від типу динуклеотидів лише в першому наближенні – має значення також контекст послідовності. По-третє, кристалографічні дані завжди залишають питання про ступінь впливу сил упаковки кристалів на досліджувані параметри. По-четверте, в білково-нуклеїнових комплексах ДНК вже є більш-менш деформованою (хоча найбільш деформовані комплекси виключаються з аналізу щодо оцінки конформаційних параметрів), а розраховувати енергію деформації в нуклеосомі слід відносно вільної ДНК у розчині. Нарешті, сама нуклеосомна ДНК відрізняється структурним поліморфізмом, і адекватною оцінкою енергії її деформації є різниця між станами вільної ДНК, і такої нуклеосомної, яка мінімізує деформацію при забезпеченні міцних контактів з гістонами. Подальший розвиток зазначених підходів на основі накопичення знань щодо фізичних властивостей ДНК має відкрити нові можливості аналізу геномних послідовностей.

Розвиток сучасних геномних технологій зробив можливим тотальне експериментальне картування позицій нуклеосом у масштабі цілого геному з високим розділенням. Процедура такого картування, як правило, включає наступні етапи (з деякими можливими варіаціями). Живі клітини обробляють формальдегідом, пришиваючи всі хроматинові білки (в першу чергу – гістони) до ДНК, виділяють хроматин та обробляють його *мікрококковою нуклеазою*. Мікрококкова нуклеаза – неспецифічна ендонуклеаза, що здійснює дволанцюговий розріз. Оскільки обидва ланцюги є доступними лише в лінкерах (у нуклеосомі один з ланцюгів завжди зв'язаний з октамером гістонів), тільки лінкерні ділянки піддаються деградації. У свій час результати обробки хроматину мікрококковою нуклеазою стали одним із перших доказів нуклеосомної організації хроматину: м'яка обробка нуклеазою продукує набір фрагментів ДНК із довжиною, кратною нуклеосомному повтору, – на електрофореграмі препарат ДНК має характерний вигляд "драбини" фрагментів, довжина яких відповідає моно-, ди-, три- і т.д. – олігонуклеосомам. Обробка нуклеазою протягом

більшого часу продукує окремі мононуклеосоми – так звані нуклеосомні кор-частинки, що містять ДНК довжиною ~145 пар основ.

На наступному етапі отриманий матеріал – нуклеосомні кор-частинки – осаджують антитілами до гістонів (канонічних гістонів, певних гістонових варіантів або гістонів, що містять певні посттрансляційні модифікації) – описані етапи відповідають стандартній процедурі імунопреципітації хроматину (ChIP – Chromatin ImmunoPrecipitation). Далі після руйнування зшивки отримують набір фрагментів ДНК, що входили до складу нуклеосом. На завершальному етапі за допомогою одного з автоматичних експрес-методів секвенування встановлюють нуклеотидні послідовності нуклеосомних ДНК – усі фрагменти або секвенують повністю (методом піросеквенування), або встановлюють лише невеликі ділянки на 5'-кінцях (визначають границі нуклеосомних ДНК – використовуючи технології Illumina-Solexa або Applied Biosystems SOLiD). Після цього залишається знайти місця отриманих послідовностей у відомій повній послідовності геному – встановити позиції нуклеосом.

Останнім часом накопичено дані щодо такого картування в геномах дріжджів, нематоди, дрозофіли та людини. Певна річ, кожна ділянка геному має свої тонкі особливості щодо позиціювання нуклеосом. Зокрема, ділянки, де проявляється чіткий патерн позиціювання (рамка фазованих нуклеосом), змінюються ділянками, де цей патерн є розмитим (позиції нуклеосом перекриваються). Позиційовані нуклеосоми в досліджених у цьому відношенні геномах мають тенденцію бути розташованими на більш-менш фіксованих відстанях одна від одної: в геномі дріжджів *S. cerevisiae* сусідні нуклеосоми найчастіше розташовані на відстані ~165 п.о. (лінкер довжиною ~20 п.о.), у дрозофіли *D. melanogaster* та нематоди *Caenorhabditis elegans* – ~175 п.о. (лінкер ~30 п.о.), геномі людини – ~185 п.о. (лінкер ~40 п.о.).

Найбільш вражаючі загальні закономірності проявляються щодо розташування нуклеосом відносно стартових точок транскрипції (рис. 4.4). У негативному напрямі (протилежному

по відношенню до напрямку транскрипції) на відстані ~ -220 пар основ від стартової точки часто розташована позиційована нуклеосома (позначена як -1 на рис. 4.4, позиція нуклеосоми визначається як позиція центральної точки нуклеосомної ДНК). Відразу за нею у позитивному напрямі часто розташована зона, вільна від нуклеосом (NFR – Nucleosome-Free Region), довжиною ~ 150 пар основ – прогалина, де могла бути розміщена одна нуклеосома (слід зауважити, що для геному людини саме ця – часто відсутню – нуклеосому зазвичай позначають як -1 , з метою уніфікації ми не будемо використовувати це позначення). За цією зоною, яка позначається як 5'-NFR, після стартової точки, розміщена сильно позиційована нуклеосома $+1$. В геномі дріжджів границя цієї нуклеосоми практично співпадає зі стартовою парою основ, у багатоклітинних еукаріотів границя нуклеосоми $+1$ розташована через ~ 10 пар основ у позитивному напрямі від стартової точки в неактивних промоторах, але через ~ 40 пар – в активних. Нуклеосоми $+1$ взагалі відносяться до найбільш сильно позиційованих в геномі. Таким чином, дві сусідні ділянки – з дуже низьким та дуже високим потенціалами щодо утворення нуклеосом – маркують старт транскрипції. Нуклеосома $+1$ задає рамку фазованих нуклеосом у кодуючій частині гена, яка згодом “затухає” і усереднений розподіл стає хаотичним. В області термінації транскрипції є інша характерна зона, вільна від нуклеосом, – 3'-NFR (рис. 4.4). В досить “компактному” геномі дріжджів 3'-NFR часто виступає і як 5'-NFR для сусіднього гена.

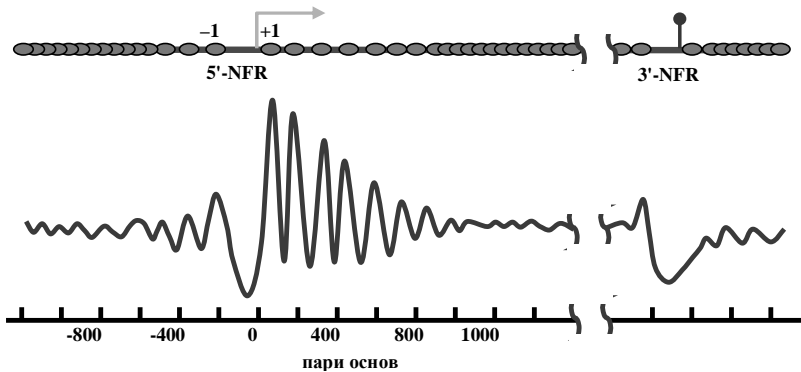


Рис. 4.4. Приблизний усереднений по всім стартовим точкам транскрипції розподіл нуклеосом відносно старту (нульова точка). Крива відображає частоту (у логарифмічній шкалі) зустрічності даної пари основ у складі нуклеосом. На верхній панелі нуклеосоми зображено як овали; зелена стрілка – старт транскрипції; червоне коло – сайт термінації транскрипції; NFR – зони, вільні від нуклеосом; -1 та $+1$ – дві нуклеосомы, що фланкують старт транскрипції.

Зрозуміло, що 5'-NFR є зоною збірки преініціаторного комплексу РНК-полімерази, а 3'-NFR – збірки мультіблкового комплексу, від якого залежить термінація транскрипції (розділ 5). В принципі можна припустити, що існування обох цих зон є просто наслідком транскрипції – видалення нуклеосом з промоторів та термінаторів активних генів. Але зони, збіднені на нуклеосомы, реєструються також і в неактивних генах. Крім того, загальна картина позиціонування нуклеосом є дуже подібною в живих клітинах дріжджів і в хроматині, реконструйованому на дріжджовій ДНК *in vitro*, – тобто тоді, коли залишається тільки послідовність пар основ у якості єдиного фактора позиціонування. Між розподілами нуклеосом *in vitro* та *in vivo* є певні відмінності (поява або зникнення деяких нуклеосом, зміна трансляційних позицій), але вони виглядають

як модуляції позиціювання за рахунок специфічних чинників. Отже, головним фактором, що визначає позиції нуклеосом, є послідовність пар основ, у тому числі це стосується особливостей розподілу нуклеосом в зоні стартових точок транскрипції. Зокрема, у складі 5'-NFR дріжджів часто зустрічаються треки poly(dA)-poly(dT) – такі ділянки характеризуються підвищеною жорсткістю щодо вигину, що сприяє формуванню вільної від нуклеосом прогалини.

Цілком можливо, що саме особливості розташування нуклеосом і визначають еукаріотичний промотор. В зоні старту транскрипції (так званому базальному промоторі) часто зустрічаються стандартні елементи послідовності (зокрема, ТАТА-бокс). Але велика частка еукаріотичних промоторів не містить таких елементів – як в таких випадках система транскрипції визначає промотор, залишалася не зовсім зрозумілим. Наявність 5'-NFR, фланкованих позиційованими нуклеосомами, дає вірогідне рішення цієї проблеми. Базальні фактори транскрипції мають у своєму складі структурні елементи, здатні взаємодіяти з певним чином модифікованими гістоновими хвостами (наприклад, бромодомени в складі TFIID). При цьому нуклеосоми -1 та +1 збагачені на ацетильовані форми гістонів, гістоновий варіант H2A.Z та метильований H3Lys4 – все це сприяє впізнанню цих нуклеосом факторами транскрипції. Отже, сильно позиційована нуклеосома +1 та вільна від нуклеосом ділянка ДНК поряд із нею формують зручний сайт для початкових етапів збірки преініціаторного комплексу. Цілком можливо, що стандартні елементи базального промотору виникли в процесі еволюції пізніше – як адаптація, що підсилює спорідненість до компонентів преініціаторного комплексу.

Наявність позиційованих нуклеосом по обидва боки від 5'-NFR має також інший наслідок: початкова збірка преініціаторного комплексу є недостатньою для ініціації транскрипції. Підсилення збірки залежить від доступності специфічних елементів промотору для факторів транскрипції, розташованих зазвичай у негативному напрямі від стартової точки. Це може потребувати зміни позицій чи видалення

нуклеосом, зокрема нуклеосоми -1 . Аналогічно, остаточне розташування РНК-полімерази на стартовій точці та ініціація її руху потребують дестабілізації та тимчасового видалення нуклеосоми $+1$, яка являє собою суттєвий бар'єр. Вказані вище модифікації, присутні в позиційованих нуклеосомах, як і присутність H2A.Z, сприяють видаленню/репозиціюванню цих нуклеосом при ремоделюванні активних промоторів, від якого залежить ефективна ініціація транскрипції (розділ 5). Взагалі, слід пам'ятати, що представлений на рис. 4.4 розподіл нуклеосом є *усередненим* по багатьом промоторам – всі ці промотори можна розподілити на певні групи, що мають свої особливості, які часто залежать від стану даного гена щодо його транскрипційної активності – це питання також обговорюватиметься у розділі 5.

4.2. Структура та динаміка хроматинової фібрили

У транскрипційно активних ділянках хроматин може бути збідненим на гістон H1 і знаходитись у деконденсованому стані полінуклеосомного ланцюга. Проте, більша частина хроматину являє собою компакту фібрилу товщиною 30 нм, до стабілізації якої задіяний гістон H1.

Перш ніж перейти до ролі гістона H1, варто розглянути, що власне являє собою полінуклеосомний ланцюг за своєю просторовою структурою. У хроматині нуклеосоми з'єднані лінкерами довжиною ~ 20 – 50 пар основ. Якщо лінкер, на який не накладено жодних структурних обмежень, просто продовжує хід нуклеосомної ДНК по прямій, нуклеосоми у складі полінуклеосомного ланцюга мають бути розташовані приблизно так, як показано на рис. 4.5 – конкретна геометрія буде варіювати в залежності від довжини та твіста лінкера. Проекція такої конфігурації на площину дає зигзаг – саме такий вигляд має декомпактизована (у відсутності H1 та за низької іонної сили) полінуклеосомна фібрила під мікроскопом (електронним чи атомно-силовим). Товщина такого тривимірного зигзага як раз і дорівнює приблизно 30 нм.

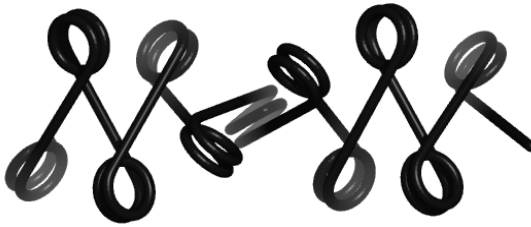


Рис. 4.5. Зигзагоподібна конфігурація полінуклеосомного ланцюга.

Аксіальна конденсація полінуклеосомного зигзага відбувається за фізіологічних значень іонної сили (100–150 мМ NaCl, присутність двовалентних катіонів підсилює здатність до компактизації). Неорганічні катіони (необхідна, але не достатня умова конденсації) забезпечують певний рівень нейтралізації фосфатів і, відповідно, зниження електростатичного розштовхування між наближеними одна до одної лінкерними ділянками та нуклеосомами в складі конденсованої фібрили. Головною рушійною силою конденсації є невпорядковані хвости корових гістонів: лабільні позитивно заряджені хвости ефективно “зшивають” фібрилу, взаємодіючи з лінкерами та ДНК сусідніх нуклеосом. При ензиматичному видаленні хвостів компактизація фібрили є неможливою навіть у присутності H1, і навпаки – без H1 компактизація відбувається тільки за рахунок хвостів корових гістонів. Відповідно, ацетилювання хвостів сприяє деконденсації хроматину в активних та потенційно активних ділянках. Найбільш важливу роль у сприянні конденсації відіграють N-кінцеві хвости гістонів H3 та H4.

Гістонові хвости можуть взаємодіяти не тільки з ДНК. Зокрема, N-кінцевий хвіст H4 здійснює контакти з негативно зарядженим сайтом на поверхні димера H2A-H2B іншої нуклеосоми. Крім того, у кристалічній структурі тетрануклеосом (фрагмента полінуклеосомної фібрили, “замороженого” у компактному стані, рис. 4.6), – спостерігається “стекинг” нуклеосомних дисків – взаємодії між глобулярними частинами димерів H2A-H2B різних нуклеосом.

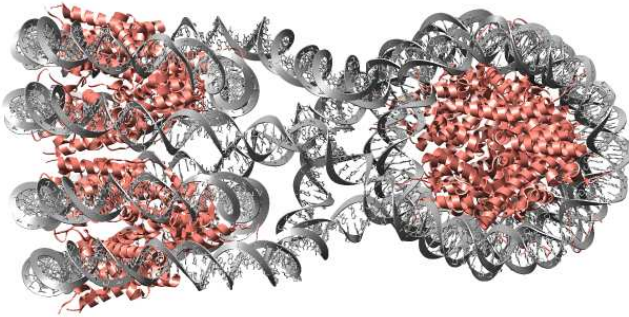


Рис. 4.6. Структура компактизованого елемента полінуклеосомної фібрили в кристалах тетрануклеосом (код PDB 1ZBB).

Таким чином, наявність лабільних позитивно заряджених хвостів корових гістонів призводить до появи своєрідних сил притягання між нуклеосомами. Проте, ці сили є досить слабкими: хвости швидко осцилюють, зв'язуючись з ділянками ДНК на короткий час. За низької іонної сили електростатичне розштовхування призводить до декомпактизації фібрили, а за фізіологічних умов сили розштовхування приблизно компенсуються силами притягання – сумарна вільна енергія взаємодії між нуклеосомами в компактному стані фібрили відносно деконденсованого приблизно дорівнює нулю. Тобто, і це підтверджується багатьма експериментами, полінуклеосомна фібрила є динамічним утворенням – ділянки фібрили осцилюють між приблизно рівноймовірними компактизованим та деконденсованим станами.

Натомість, у присутності лінкерного гістона H1 за фізіологічної іонної сили компактна фібрила стає значно більш стабільною: за результатами розтягування такої фібрили оптичним пінцетом (Cui, Bustamante, 2000), сумарна вільна енергія стабілізації компактного стану дорівнює $\sim -3,4$ *kT* на одну нуклеосому. Таке значення вказує, що компактна фібрила, сформована за участі H1, все рівно залишається досить динамічною – ~ 4 % часу будь-які дві сусідні нуклеосоми втрачають контакт та переходять у деконденсований стан.

Молекулярне моделювання з використанням даних по розтягуванню свідчить про організацію фібрили, сформованої за участі H1, як нерегулярного флюктууючого зигзага. Тобто, гістон H1 не створює нової структури, а просто використовує внутрішні властивості фібрили для додаткової стабілізації її компактного стану.

З однією нуклеосою в хроматині взаємодіє (якщо взаємодіє, див. нижче) одна молекула H1. Глобулярний домен H1 (приблизно 80 амінокислот) належить до родини "спіральных із крильцем" ДНК-зв'язувальних білків (рис. 2.7). По поверхні домена розподілені позитивно-заряджені залишки, що зумовлює можливість його взаємодії із наближеними у просторі ділянками ДНК. Відповідно, глобулярний домен, найімовірніше, зв'язується з двома ділянками ДНК на початку лінкерів (довжиною по ~10 пар основ), що виходять з нуклеосоми, а також взаємодіє з центральною ділянкою нуклеосомної ДНК довжиною 10 пар основ, симетрично розташованою відносно центральної пари основ (рис. 4.7). Напевно, "первинним" сайтом зв'язування є маленький жолобок подвійної спіралі, експонований назовні у позиції SHL0. Наслідком взаємодії GH1 із зазначеними ділянками є додаткова стабілізація нуклеосомної суперспіралі у складі хроматосоми.

С-кінцевий хвіст H1 взаємодіє з обома лінкерами (довжиною по 10-30 пар основ), що виходять з нуклеосоми. Важливим результатом цієї взаємодії є об'єднання двох лінкерів на виході з нуклеосоми у стеблоподібну структуру (рис. 4.7). Цьому стеблу, а також додатковій суттєвій нейтралізації негативно заряджених лінкерів С-кінцевим хвостом H1, належить ключова роль у стабілізації компактної хроматинової фібрили: за рахунок стебла сусідні нуклеосоми значно зближуються, що сприяє конденсації (рис. 4.8). Тобто, присутність H1 наближає нуклеосоми одна до одної у складі фібрили, чим сприяє "зшиванню" цих нуклеосом хвостами корових гістонів. І навпаки, компактизація фібрили за участю хвостів корових гістонів сприяє зв'язуванню H1 із наближеними у просторі ділянками лінкерів.

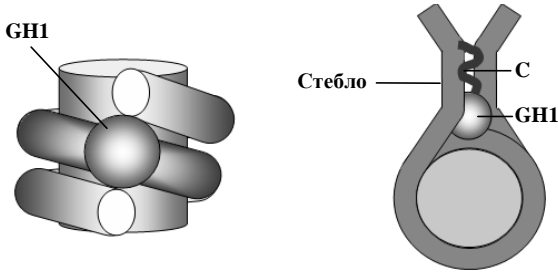


Рис. 4.7. Схема взаємодії глобулярного домена GH1 та С-кінцевого хвоста (С) гістона Н1 з нуклеосомою.

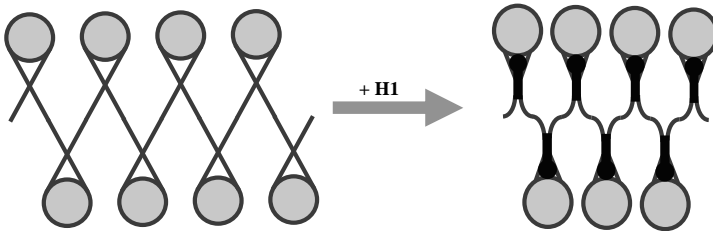


Рис. 4.8. Роль Н1-залежного стебла на виході з нуклеосоми у стабілізації компактного стану хроматинової фібрили.

Стебло, сформоване на виході з нуклеосоми за рахунок взаємодії з гістоном Н1, характеризується важливими властивостями, які виявляються в експериментах з хроматосомами, реконструйованими на мініциклах. Аналіз результатів релаксації таких мініциклів топоізомеразою I вказує на те, що Н1-залежне стебло являє собою подвійну суперспіраль з дуже великим кроком, яка складається з двох лінкерів: лінкери трохи закручуються один навкруг одного в той чи інший бік (рис. 4.9). Найбільш характерною ознакою стебла при цьому є його висока торсійна еластичність: ступінь взаємного закручування лінкерів у тому чи іншому напрямі змінюється дуже легко, з маленькими енергетичними витратами. Таким чином, гістон Н1 вносить ще більшу пластичність у хроматинову фібрилу (підрозділ 3.3). Можливість легкого обертання навкруг стебла має значення для адаптації нуклеосом

до свого оточення у складі компактної фібрили – реалізації компактного стану незалежно від довжини лінкерів, яка може варіювати вздовж полінуклеосомного ланцюга.

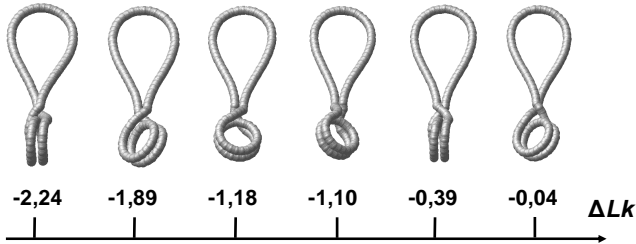


Рис. 4.9. Набір конфігурацій мініциклів за різних значень ΔLk демонструє обертання нуклеосоми навкруг стебла у відповідь на зміну надспіралізації. Адаптовано з роботи Sivolob, Prunell (2003).

Одна молекула гістона H1 не обов'язково взаємодіє з *кожною* нуклеосомою – загальний вміст гістона H1 у хроматині залежить від типу клітин. Кількість молекул H1 на одну нуклеосому та середня величина нуклеосомного повтору в деяких з них наведені у табл. 4.2. Із представлених у таблиці даних є очевидними два висновки. По-перше, кількість H1 є обернено пропорційною до величини нуклеосомного повтору. Імовірно, зниження кількості H1 вмикає певні компенсаторні механізми, спрямовані на підвищення вмісту корових гістонів (і загальної кількості нуклеосом) з метою підтримати загальний баланс негативних та позитивних зарядів у хроматині. По-друге, кількість H1 у хроматині є обернено пропорційною до загального рівня транскрипційної активності: репресований хроматин (еритроцити) характеризується підвищеним вмістом лінкерних гістонів, активний (стовбурові клітини, нейрони, клітини дріжджів) – суттєво зниженим.

Слід при цьому мати на увазі, що, на відміну від корових гістонів, взаємодія H1 з нуклеосоми є значно слабкішою (повна дисоціація H1 відбувається у 0,6 М NaCl) і надзвичайно

динамічною: спостерігається швидкий обмін лінкерних гістонів між хроматином та їхнім пулом у ядрі; середній час присутності молекули H1 у зв'язаному стані оцінюється в живих клітинах в 1–2 хв. Можна сказати, що молекули гістона H1 є узагальненими всіма нуклеосомами, і підвищення рівня їхньої присутності в хроматині приводить до тотального зниження рівня транскрипційної активності шляхом стабілізації компактного стану хроматинової фібрили.

Тонкі особливості внутрішньої структурної організації хроматинової фібрили залишаються недостатньо з'ясованими. Існуючі моделі можна розділити на два основні типи (рис. 4.10). Модель соленоїда (історична перша запропонована модель) передбачає, що полінуклеосомна фібрила утворює спіраль, в складі якої нуклеосоми взаємодіють між собою площинами своїх дисків. При цьому стекінг здійснюється між сусідніми по ланцюгу нуклеосомами, які з'єднані вигнутими лінкерами. Моделі другого типу передбачають, що фібрила сформована зигзагом нуклеосом: або закрученим у спіральну стрічку так, що лінкери орієнтовані під кутом від 0 до 50° до осі фібрили; або (модель схрещених лінкерів) компактизованим так, що лінкери приблизно перпендикулярні до осі. У моделях цього другого типу стекінг здійснюється між нуклеосомами, що розділені по ланцюгу – між i -тою та $(i+2)$ -ю, $(i+3)$ -ю або $(i+5)$ -ю (рис. 4.10, порівн. рис. 4.5, 4.6). Сучасні експериментальні дані (у тому числі, представлена на рис. 4.6 структура кристалів тетрануклеосом) краще узгоджуються з моделями другого типу.

Таблиця 4.2. Стехіометрія H1 та довжина нуклеосомного повтору в хроматині клітин різних типів

Тип клітин	Відношення H1/нуклеосома	Нуклеосомний повтор (пари основ)
Тимус миші	0,83	196
Печінка миші	0,79	195
Ембріональні стовбурові клітини	0,5	189

миші

Еритроцити курки*	1,3	212
Нейрони щура	0,45	162
Гліальні клітини щура	1,04	201
<i>S. cerevisiae</i> **	0,03–0,25	165

* гістон H5

** гістон Hho1

За даними, систематизованими Woodcock *et al.* (2006)

Розмаїття запропонованих у різний час моделей організації хроматинової фібрили відображає, найімовірніше, певний структурний поліморфізм, який залежить, у першу чергу, від довжини лінкерів. Ця довжина у хроматині зазвичай "квантується" – є кратною ~ 10 парам основ, тобто приблизно цілій кількості витків подвійної спіралі (лінкер довжиною 20, 30, 40 пар основ відповідає нуклеосомному повтору 167, 177, 187 пар основ). Така властивість лінкерів, імовірно, пов'язана з необхідністю оптимізації загального твіста між нуклеосомами для досягнення необхідного ступеня компактизації – додавання зайвої пари основ у лінкер призведе до обертання наступної нуклеосоми навкруг лінкера на $\sim 34^\circ$ (що відповідає куту твіста за періодичності 10,5 п.о./виток). Обмеження, що накладаються загальним твістом ДНК на геометрію фібрили, вказують також, що рівномірний розподіл нуклеосом (уніфікована та при цьому оптимальна довжина лінкерів) мають сприяти компактизації полінуклеосомного ланцюга.

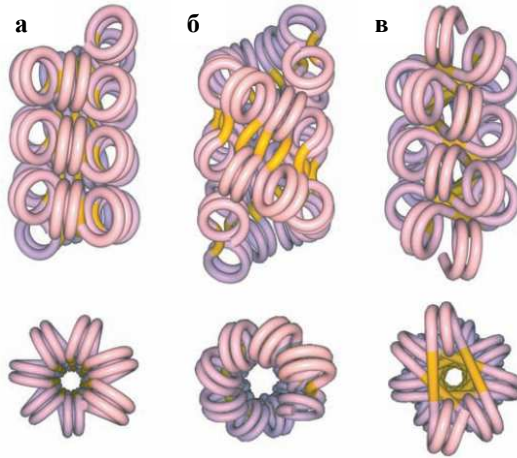


Рис. 4.10. Основні типи моделей просторової організації хроматинової фібрили: соленоїд (*а*), спіральна стрічка (*б*) та модель схрещених лінкерів (*в*). Лінкери виділено жовтим кольором. Репродуковано з роботи Dorigo *et al.* (2004) з дозволу American Association for the Advancement of Science (AAAS).

У регулярних фібрилах, реконструйованих з використанням ДНК, послідовність якої складається з тандемних повторів певної довжини (кожен повтор містить одну позиційовану нуклеосому), довжина лінкерів є уніфікованою вздовж фібрили. Електронно-мікроскопічне дослідження таких фібрил (Robinson *et al.*, 2006) вказує, що товщина фібрили залишається постійною (~33 нм) для нуклеосомного повтору від 177 до 207 пар основ, при цьому рівень компактизації становить ~11 нуклеосом на 11 нм вздовж фібрили. Для нуклеосомних повторів від 217 до 237 пар основ відбувається різке підвищення товщини до ~45 нм та рівня компактизації до ~15 нуклеосом на 11 нм.

Результати молекулярного моделювання таких фібрил представлено на рис. 4.11. Коротка довжина лінкера (повтор 177 пар основ) практично не дозволяє сформувати повноцінне стебло на виході з нуклеосоми. У складі фібрили здійснюється стекінг між кожною i -тою та $(i+5)$ -ю нуклеосомою, хоча сусідні

по ланцюгу нуклеосоми є також сусідніми в складі суперспіралі, що утворюється полінуклеосомним ланцюгом. Ця структура дещо нагадує модель соленоїда, яка передбачала стекінг між сусідніми по ланцюгу нуклеосомами. Зростання довжини лінкера дозволяє формування стебла, при цьому лінкери перехрещуються всередині фібрили, а загальна топологія розташування нуклеосом у фібрилі поступово змінюється (рис. 4.11). У всіх випадках гістон H1 опиняється всередині хроматинової фібрили, що відповідає факту, добре встановленому експериментально різноманітними методами.

Таким чином, імовірно, єдиної регулярної структури для хроматинової фібрили просто не існує: деталі просторової організації суттєво залежать від довжини лінкерів. Зрозуміло, що хроматинова фібрила, гетерогенна за довжиною лінкерів, є досить нерегулярною структурою. І навпаки: регулярне розташування нуклеосом (властиве, зокрема, гетерохроматиновим ділянкам) сприяє стабілізації хроматинової фібрили.

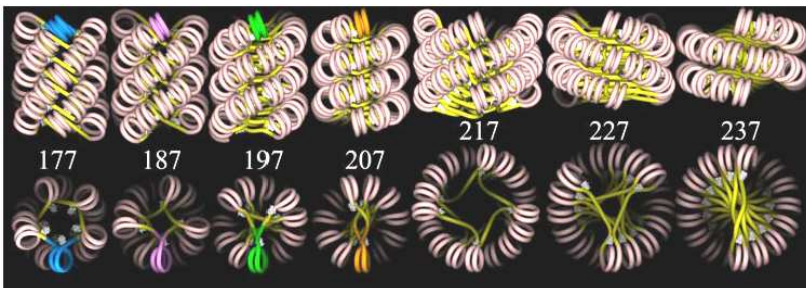


Рис. 4.11. Моделі регулярних компактних хроматинових фібрил із різною величиною нуклеосомного повтору (числа у парах основ). Жовтим кольором виділено лінкерні ділянки.

Репродуковано з роботи Wong *et al.* (2007).

Нерегулярність фібрили виникає не тільки внаслідок варіації довжини лінкерів. По-перше, у репресованих ділянках (які становлять більшу частину хроматину в диференційованих клітинах еукаріотів) хроматинова фібрила може бути як

додатково стабілізованою у компактному стані, так і піддаватися компактизації більш високого порядку за рахунок взаємодії з особливими негістоновими білками. Система утворення та підтримання гетерохроматинового статусу тісно пов'язана з гістоновим кодом і розглядатиметься у розділі 5, але деталі структури гетерохроматину залишаються нез'ясованими.

По-друге, нерегулярність структури хроматинової фібрили є наслідком її динаміки. Тимчасова дисоціація гістона H1, яка полегшується ацетилюванням корових гістонів, модифікаціями самого H1, а також конкурентними взаємодіями з ДНК інших білків (зокрема, HMGB), призводить до деконденсації фібрили – створює “вікно можливості” для доступу регуляторних білків до їх специфічних сайтів на ДНК.

4.3. Хроматинова фібрила у клітинному ядрі

Експерименти, в яких вимірювалась дифузія інертного барвника у просторі ядра (Vancaud *et al.*, 2009), приводять до висновку, що хроматин у клітинному ядрі можна описати в термінах фрактальної геометрії (фрактал – складна геометрична фігура, що складається з багатьох частин, де кожна частина подібна до всієї фігури в цілому). Простір ядра можна розділити на "компарменти" двох типів – більш та менш щільні, тобто, відповідно, гетеро- та еухроматинові. Дифузія флуоресцентного зонда є загальмованою (більшою мірою – в гетерохроматинових компартаментах), але при цьому параметри дифузії не залежать від розміру зонда, і всі ділянки хроматину (навіть у гетерохроматинових компартаментах) зберігають доступність для нього (рис. 4.12).

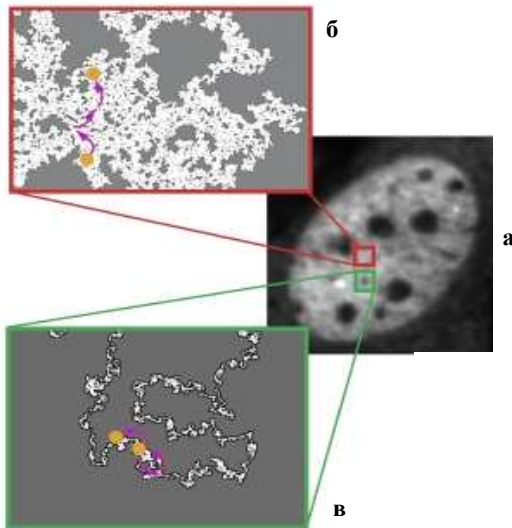


Рис. 4.12. Клітинне ядро з різною щільністю хроматину (*a*) та частини простору ядра, зайняті еухроматином (*б*) та гетерохроматином (*в*), представлені як спроектовані на площину фрактальні структури (сірі зони, обмежені чорним контуром) з різним ступенем компактності (різною фрактальною розмірністю). Оранжева кулька та стрілки відображають дифузію деякого маркера у межах доступного для нього простору (забарвлений світлим). Репродуковано з роботи Bancaud *et al.* (2009).

До аналогічних висновків приводять результати вивчення контактів між віддаленими по ланцюгу ділянками хроматину у клітинному ядрі (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Застосована для цього техніка (так звана Hi-C) базується на масованому секвенуванні великої кількості пар коротких фрагментів ДНК, які вилучаються з ділянок хроматину, зшитих формальдегідом (варіація методики "фіксації конформації хромосом" – chromosome conformation capture (3C)). Результати такого картування контактів знову вказують на існування

компартментів двох типів. В межах компартмента одного типу взаємодії між віддаленими по ланцюгу ділянками однієї хромосоми, а також між ділянками різних хромосом, є більш імовірними, ніж взаємодії між ділянками, що належать різним компартментам. Компартменти двох типів розрізняються своєю щільністю та займають різні просторові зони ядра.

Отже, хроматинова фібрила утворює своєрідну глобулу великого розміру особливого типу – так звану *фрактальну глобулу*: полімер "зминається" у субглобули, які, у свою чергу, утворюють глобули більш високого рівня. У результаті полімер заповнює певну область простору, не утворюючи вузлів, а окремі ділянки ланцюга зберігають можливість оберненої де/рекомпактизації. Розділені по ланцюгу гетерохроматинові ділянки, взаємодіючи між собою, опиняються у більш компактних зонах фрактальної глобули, а менш компактні еухроматинові – "випетлюються" з неї.

Таке випетлювання є тільки одним із проявів загального феномену утворення петель або петлевих доменів хроматину, які мають різноманітне походження: будь-яка ситуація, коли розділені по ланцюгу ділянки хроматинової фібрили взаємодіють між собою, приводить до утворення петлі. Петлі, які можна назвати динамічними, виникають на порівняно невеликий проміжок часу внаслідок білок-білкових взаємодій між віддаленими ділянками хроматину. Такі петлі формуються, наприклад, у відповідь на регуляторні сигнали між енхансерами та промоторами або при залученні різних промоторів до так званих транскрипційних фабрик – місць іммобілізації кількох РНК-полімеразних комплексів (розділ 5). Аналогічно, віддалені ділянки фібрили можуть об'єднуватись між собою у репресорні комплекси, специфічні для клітин даного типу, – при цьому здійснюється інактивація генів, які потрапляють у приєднанні до такого комплексу петлеві домени. Відомим прикладом таких репресорних комплексів є так звані полікомб-тільця (*polycomb bodies*) – дискретні утворення, сформовані спеціальними білками полікомбу (*PcG*, *Po_ucomb Group proteins*).

Крім того, існують також "конститутивні" петлі хроматину, закріплені на скелетних структурах ядра. Головним результатом

на користь існування таких петель є утворення так званих нуклеоїдів після видалення мембран та більшості білків клітинного ядра детергентами та високими концентраціями солі. Нуклеоїд виглядає як зона з високою концентрацією ДНК та остаточною білковим компонентом, що залишається після процедури лізису, навкруг якої формується гало, що складається з надспіралізованих петель ДНК розміром від 2 до 200 тис. пар основ. Зрозуміло, що тимчасові або специфічні лише для даного типу клітин петлі також можуть закріплюватись на скелетних структурах ядра.

Можна виділити принаймні три аспекти існування петельних доменів хроматину:

- об'єднання віддалених ділянок хроматину в основі петлі є важливим елементом регуляції генної активності, оскільки таке об'єднання може призводити до взаємного підсилення активації або репресії транскрипції на різних ділянках;
- зафіксована на білках певного типу основа петлі може слугувати своєрідним бар'єром, що просторово розмежовує різні у функціональному відношенні ділянки хроматину;
- оскільки основи петлі фіксуються, ДНК у складі петлі має топологічні обмеження, тобто є еквівалентною циркулярній.

Роль скелетної структури ядра, на якій закріплюються петлі хроматину, зазвичай відводиться *ядерному матриксу* – системі білкових філаментів у просторі ядра. Ділянки ДНК довжиною від 300 до 1 тис. пар основ, що взаємодіють з матриксом (основи петлевих доменів), позначають як MAR (Matrix Associated Regions).

Філаменти ядерного матриксу вдається візуалізувати під електронним мікроскопом тільки після спеціальної обробки та видалення з ядра ДНК та більшості білків – не виключено, що розгалужена сітка філаментів утворюється саме в результаті такої обробки, тобто є артефактом. Крім того, на сьогодні білки ядерного матриксу (майже єдиним виключенням є білок SATB1, який має підвищену спорідненість до АТ-збагачених ділянок ДНК і експресується тільки в тимоцитах ссавців) та характер їхньої взаємодії з ДНК настільки погано охарактеризовані, що це дає підстави для сумнівів в існуванні розгалуженого

внутрішньоядерного матриксу. Іншим аргументом проти наявності розгалуженої сітки білкових філаментів всередині ядра є достатньо висока швидкість дифузії білків та мРНК у внутрішньоядерному просторі. Слід підкреслити, що дискусійним залишається питання про існування матриксу як мережі філаментів, що пронизує *увесь* об'єм ядра: елементи матриксу – порівняно короткі філаменти (що складаються, зокрема з актину, а також деяких інших білків), з якими може взаємодіяти хроматинова фібрила, безсумнівно існують всередині ядра.

На відміну від внутрішньоядерного матриксу, периферійна сітка білкових філаментів – ядерна ламіна, яка тісно зв'язана з внутрішньою ядерною мембраною і, таким чином, є складовою ядерного конверта (див. рис. 1.2), вивчена значно краще. Головними структурними компонентами ламіни є білки двох типів, що називаються ламінами. Ламіни типу А (присутні також і всередині ядра, де можуть утворювати білкові філаменти) є водорозчинними і вільно дифундують у просторі клітини після руйнування ядерного конверта при клітинному поділі. Ламіни типу В – мембранні білки, тісно зв'язані з внутрішньою мембраною, які залишаються на фрагментах мембрани при її руйнуванні в ході мітозу. Ламіни мають три структурні домени: глобулярні N- та C-кінцевий, з'єднані довгою α -спіраллю. Дві α -спіралі забезпечують димеризацію субодиниць (утворюється двоспіральна структура – coiled coil), а глобулярні домени димерів взаємодіють між собою за принципом "голова до хвосту" з утворенням філаменту завтовшки ~ 10 нм (відноситься до категорії проміжних філаментів (intermediate filaments) цитоскелету, які є більш тонкими у порівнянні з мікротрубочками, але більш товстими у порівнянні з актиновими фібрилами). Крім того, з ламіновими філаментами тісно асоційовані ще кілька білків. Зокрема: LBR – рецептор ламінів В – мембранний білок, що взаємодіє з ламінами В, а також з ДНК, гістонами та гетерохроматиновими білками; Lap2 β – взаємодіє з ядерною мембраною та ламінами В, а також з деякими репресорами транскрипції; Emerin – мембранний білок, що взаємодіє з ламінами А, а також з актином та репресорами транскрипції.

Філаменти ламіни утворюють своєрідну "геодезичну" сітку, у вузлах якої знаходяться ядерні пори – філаменти протягнуті від однієї ядерної пори до іншої і позиціонують порові комплекси у площині ядерної оболонки. На ламіні та порових комплексах розпочинаються також білкові філаменти (актинові, такі, що складаються з ламінів А або інших білків), протягнуті всередину ядра на довжину в ~100–300 нм. За рахунок спорідненості білків ламіни до гетерохроматинових білків (зокрема, HP1, який розглядатиметься у розділі 5), а також до гетерохроматинових хімічних маркерів гістонів, ламіна зв'язує гетерохроматинові зони – в першу чергу, це стосується центромерних та теломерних зон хромосом. Проте, на ділянках фібрили, зв'язаних з ламіною, є можливою також і транскрипція – в першу чергу це стосується ділянок хроматину, асоційованих з поровими комплексами. Цілком імовірно, що "конститутивні петлі", які утворюють гало нуклеоїдів, являють собою петлі ДНК, зв'язані саме з ламіною.

Таким чином, інтерфазна хромосома фіксується на ламіні своїми центромерою та теломерами, а еухроматинова частина хромосоми опиняється глибше всередині ядра – частково закріплюючись там (або ні) на внутрішніх елементах ядерного матриксу. В межах *хромосомної території* – області простору, яку займає хромосома, – спостерігається "градієнт транскрипційної активності" – активність зростає від периферії ядра до його центру. В тому ж напрямку зростає загальна щільність генів, і, відповідно, знижується щільність некодуючих ділянок ДНК та відносний вміст АТ-пар у її складі.

Хроматинова фібрила, розташована в межах хромосомної території, здатна рухатись – як під дією теплових флуктуацій, так і внаслідок роботи молекулярних моторів. Основні типи такої рухливості зображено на рис. 4.13.

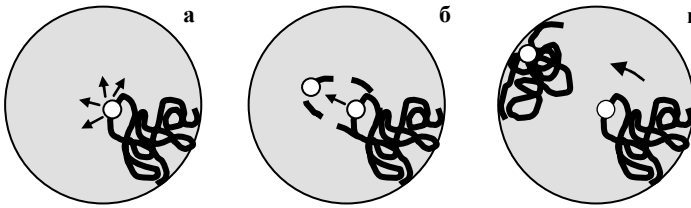


Рис. 4.13. Три типи рухливості інтерфазної хромосоми: (а) швидкі безладні рухи хромосомного локусу (світла кулька) на відстань менше 1 мкм за кілька секунд; (б) повільні (за кілька хвилин) АТР-залежні спрямовані рухи на кілька мікронів; (в) переміщення хромосоми на іншу територію після клітинного поділу, яке регулюється факторами диференціювання клітин. Адаптовано з Soutoglou, Misteli (2007).

По-перше, окремі хромосомні локуси здійснюють безладний броунівський рух в секундному часовому інтервалі у невизначеному напрямі (рис. 4.13, а). Такий рух є обмеженим невеликою зоною простору (не більше $\sim 0,5$ мкм), при цьому більш загальмованими є рухи хроматинових ділянок, що розташовані ближче до периферії ядра. По-друге, в ядрі зафіксовані більш значні та спрямовані рухи окремих локусів, які залежать від присутності АТР, актину та міозину I, – тобто, такі рухи, напевно, забезпечуються актоміозиновими молекулярними моторами (рис. 4.13, б). Нарешті, в процесі індивідуального розвитку та диференціювання клітин для окремих локусів спостерігаються передислокації в іншу область ядра (зі зміною хромосомної території), при цьому активні локуси зазвичай переміщуються ближче до центру, репресовані – до периферії ядра (рис. 4.13, в). Напевно, такі рухи знаходяться під контролем загальної програми дозрівання клітин даного типу і здійснюються після чергового клітинного поділу.

Рухливість хроматинової фібрили в межах хромосомної території, а також часткове перекриття сусідніх хромосомних

територій, створюють умови для міжхромосомних взаємодій. Отже, взаємне підсилення активації або репресії транскрипції на віддалених ділянках хроматину відбувається не тільки внаслідок утворення петлевих доменів у межах однієї хромосоми, а також у тих випадках, коли такі ділянки належать до різних хромосом.

Рекомендована література

Загальна

Arya, G., Maitra, A., Grigoryev, S.A. A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2010. – Vol. 27. – P. 803-821.

Horowitz-Scherer, R.A., Woodcock, C.L. Organization of interphase chromatin // *Chromosoma.* – 2006. – Vol. 115. – P. 1-14.

Rando, O.J., Chang, H.Y. Genome-wide views of chromatin structure // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 245-271.

Woodcock, C.L. Chromatin architecture // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. Vol. 16. – P. 213-220.

Woodcock, C.L., Ghosh, R.P. Chromatin higher-order structure and dynamics // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – a000596.

Механізми позиціонування нуклеосом

Balasubramanian, S., Xu, F., Olson, W.K. DNA sequence-directed organization of chromatin: structure-based computational analysis of nucleosome-binding sequences // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96. – P. 2245-2260.

Drew, H.R., Travers, A.A. DNA bending and its relation to nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 186. – P. 773-790.

Ioshikhes, I.P., Albert, I., Zanton, S.J., Pugh, B.F. Nucleosome positions predicted through comparative genomics // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38. – P. 1210-1215.

Lowary, P.T., Widom, J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 276. – P. 19-42.

Morozov, A.V., Fortney, K., Gaykalova, D.A., Studitsky V.M., Widom J., Siggia E.D. Using DNA mechanics to predict in vitro nucleosome positions and formation energies // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. 4707-4722.

Radman-Livaja, M., Rando, O.J. Nucleosome positioning: how is it established, and why does it matter? // *Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 339. – P. 258-266.

Segal, E., Widom, J. What controls nucleosome positions? // *Trends Genet.* – 2009. – Vol. 25. – P. 335-343.

Tolstorukov, M.Y., Colasanti, A.V., McCandlish, D.M., Olson, W.K., Zhurkin, V.B. A novel roll-and-slide mechanism of DNA folding in chromatin: Implications for nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371. – P. 725-738.

Widom, J. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics // *Quart. Rev. Biophys.* – 2001. – Vol. 34. – P. 269-324.

Wu, B., Mohideen, K., Vasudevan, D., Davey, C.A. Structural insight into the sequence dependence of nucleosome positioning // *Structure.* – 2010. – Vol. 18. – P. 528-536.

Xu, F., Olson, W.K. DNA architecture, deformability, and nucleosome positioning // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2010. – Vol. 27. – P. 725-739.

Позиціювання нуклеосом у геномах

Boyle, A.P., Davis, S., Shulha, H.P., et al. Highresolution mapping and characterization of open chromatin across the genome // *Cell.* – 2008. – Vol. 132. – P. 311-322.

Jiang, C., Pugh, B.F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 161-172.

Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-Mittendorf, et al. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome // *Nature.* – 2009. – Vol. 458. – P. 362-366.

Lee, W., Tillo, D., Bray, N., et al. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast // *Nat. Genet.* – 2007. – Vol. 39. – P. 1235-1244.

Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, et al. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome // *Nature.* – 2008. – Vol. 453. – P. 358-362.

Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., et al. A genomic code for nucleosome positioning // *Nature.* – 2006. – Vol. 442. – P. 772-778.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome // *Cell.* – 2008. – Vol. 132. – P. 887-898.

Segal, E., Widom, J. From DNA sequence to transcriptional behaviour: a quantitative approach // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 443-456.

Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., et al. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6(3). – e65.

Роль гістона H1 в структурній організації хроматину

Hamiche, A., Schultz, P., Ramakrishnan, V., Oudet, P., Prunell, A. Linker histone dependent DNA structure in linear mononucleosomes // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 257. – P. 30-42.

Happel, N., Doenecke, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function // *Gene.* – 2009. – Vol. 431. – P. 1-12.

Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., Brown, D.T. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 877-881.

Ramakrishnan, V. Histone H1 and chromatin higher-order structure // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1997. – Vol. 7. – P. 215-230.

Sivolob, A., Prunell, A. Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 331. – P. 1025-1040.

Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Becker, N., Meyer, S., Shukla, M.S., Hayes, J.J., Everaers, R., Angelov, D., Bednar, J., Dimitrov, S. Single-base resolution mapping of H1–nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 9620-9625.

Woodcock, C.L., Skoultchi, A.I., Fan, Y. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length // *Chromosome Res.* – 2006. – Vol. 14. – P. 17-25.

Структура та динаміка хроматинової фібрили

Arya, G., Schlick, T. Role of histone tails in chromatin folding revealed by a mesoscopic oligonucleosome model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 16236-16241.

Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., Woodcock, C.L. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 14173-14178.

Carruthers, L.M., Hansen, J.C. The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 37285-37290.

Cui, Y., Bustamante, C. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher order structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 127-132.

Dorigo, B., Schlach, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R., Richmond, T.J. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber // *Science.* – 2004. – Vol. 306. – P. 1571-1573.

Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., Schlick, T. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 13317-13322.

Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W., Woodcock, C.L. The three-dimensional architecture of chromatin *in situ*: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon // *J. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 125. – P. 1-10.

Katritch, V., Bustamante, C., Olson, W.K. Pulling chromatin fibers: computer simulations of direct physical micromanipulations // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 295. – P. 29-40.

Robinson, P.J., Fairall, L., Huynh, V.A., Rhodes, D. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 6506-6511.

Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., Richmond, T.J. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre // *Nature.* – 2005. – Vol. 436. – P. 138-141.

Sun, J., Zhang, Q., Schlick, T. Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 8180-8185.

Tremethick, D.J. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber // *Cell.* – 2007. – Vol. 128. – P. 651-654.

Wong, H., Victor, J.-M., Mozziconacci, J. An all-atom model of the chromatin fiber containing linker histones reveals a versatile structure tuned by the nucleosomal repeat length // *PLoS ONE.* – 2007. – Vol. 2(9). – e877.

Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A., Whitaker, N. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 9021-9025.

Wu, C., Bassett, A., Travers, A. A variable topology for the 30-nm chromatin fibre // *EMBO Rep.* – 2007. – Vol. 8. – P. 1129-1134.

Структура хроматину в інтерфазному ядрі

Bancaud, A., Huet, S., Daigle, N., et al. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 3785-3798.

Chen, M., Shen, X. Nuclear actin and actin-related proteins in protein dynamics // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 326-330.

Cook, P.R., Bazell, I.A. Supercoils in human DNA // *J. Cell Sci.* – 1975. – Vol. 19. – P. 261-279.

Cremer, T., Cremer, M. Chromosome territories // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2. – a003889.

Göndör, A., Ohlsson, R. Chromosome cross-talk in three dimensions // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 199-205.

Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D. et al. The nuclear lamina comes of age // Nat. Rev. – 2005. – Vol. 6. – P. 21–31.

Hancock, R. Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model // Biol. Cell. – 2004. – Vol. 96. – P. 595-601.

Hetzer, M.W. The nuclear envelope // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2. – a000539.

Hutchison, C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2002. – Vol. 3 – P. 848-858.

Kumaran, R.I., Thakar, R., Spector, D.L. Chromatin dynamics and gene positioning // Cell. – 2008. – Vol. 132. – P. 929-934.

Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L. et al. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome // Science. – 2009. – Vol. 326. – P. 289-293.

Nickerson, J.A. Experimental observations of a nuclear matrix // J. Cell Sci. – Vol. 114. – P. 463-474.

Pederson, T. Half a century of “the nuclear matrix.” // Mol. Biol. Cell. – 2000. – Vol. 11. – P. 799-805.

Rajapakse, I., Groudine, M. On emerging nuclear order // J. Cell Biol. – 2011. – Vol. 192. – P. 711-721.

Soutoglou, E., Misteli, T. Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2007. – Vol. 17. – P. 435-442.

Розділ 5. Функціональні процеси в інтерфазному хроматині

Хромосома на стадії інтерфази знаходиться у найважливішому зі своїх станів: саме в інтерфазному хроматині здійснюється первинний етап експресії генетичної інформації – транскрипція і процесинг РНК, а також реплікація ДНК при підготовці до клітинного поділу. Структура та структурна динаміка хроматину – визначальний фактор системи регуляції транскрипції та інших функціональних процесів. У цьому розділі увагу зосереджено на механізмах участі структурних перебудов хроматину в активації та репресії транскрипції. Наприкінці розділу розглядаються механізми реплікації ДНК у хроматині.

5.1. Механізми транскрипції в еукаріотів: загальний огляд

5.1.1. РНК-полімераза та її робочий цикл. В еукаріотичних клітинах функціонують РНК-полімерази трьох типів: *РНК-полімераза I* працює на кластерах генів рибосомної РНК і здійснює синтез рРНК 18S, 28S та 5,8S; *РНК-полімераза II*, яка виконує основну частину роботи по транскрипції в клітинному ядрі і тому привертає особливу увагу, транскрибує білкові гени, а також гени маленьких ядерних РНК та багатьох інших РНК, що не транскрибуються; ще одна високоспеціалізована полімераза – *РНК-полімераза III* – здійснює синтез тРНК, рибосомної РНК 5S і кількох інших низькомолекулярних РНК.

Кожна з цих полімераз містить чотири гомологічні кірові субодиниці, які є водночас гомологами чотирьох основних субодиниць бактеріальної РНК-полімерази. Крім того, до складу еукаріотичних полімераз входять п'ять спільних для всіх трьох ферментів субодиниць, а також певний набір специфічних субодиниць (у кількостях 5, 3 і 7 для РНК-полімераз I, II та III відповідно).

Отже, РНК-полімераза II, яка відповідає, зокрема, за синтез мРНК, складається з 12 субодиниць (рис. 5.1). У складі

найбільшої з них (гомолог субодиниці β' прокариотичної полімерази) знаходиться каталітичний активний центр, який здійснює приєднання чергового нуклеотида до 3'-кінця транскрипта в кожному елонгаційному циклі полімерази. 5'-Кінець транскрипта виходить за межі полімеразного комплексу через спеціальний канал виходу РНК, через інший – вторинний канал – до активного центру потрапляють рибонуклеозидтрифосфати.

Під час елонгації транскрипції полімераза може зупинитись на певний час – в залежності від перешкод, що створюються хроматиновими білками, особливостей вторинної структури транскрипта, що синтезується (зокрема – утворення дволанцюгових шпильок у його складі), нуклеотидної послідовності тощо. За умови нестабільності РНК-ДНК гібрида в оточенні активного центра (внаслідок приєднання помилкового нуклеотида до 3'-кінця транскрипта) здійснюється зворотний рух полімерази з виходом 3'-кінця РНК у вторинний канал. У цьому випадку взаємодія з фактором транскрипції **TFIIS** (**T**ranscription **F**actor **S** of RNA-polymerase **II**) індукує нуклеазну активність РНК-полімерази: здійснюється відщеплення 3'-кінцевого фрагмента РНК та нова спроба синтезу – операція, яка забезпечує редагування помилок при транскрипції.

Особливістю РНК-полімерази II є наявність у найбільшій субодиниці С-кінцевого домену – **CTD** (**C**-**T**erminal **D**omain). **CTD** – це довгий невпорядкований хвіст (не показаний на рис. 5.1), амінокислотна послідовність якого є гептапептидом Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, що тандемно повторюється 52 рази. Три залишки Ser у складі гептапептиду є субстратами фосфорилування/дефосфорилування для специфічних кіназ і фосфатаз. **CTD**, який відходить від полімерази поблизу від каналу виходу мРНК, є платформою для зв'язування численних білків, спорідненість яких залежить від патерна фосфорилування. Саме **CTD** відіграє ключову роль у збиранні елементів системи процесингу мРНК під час елонгації транскрипції.

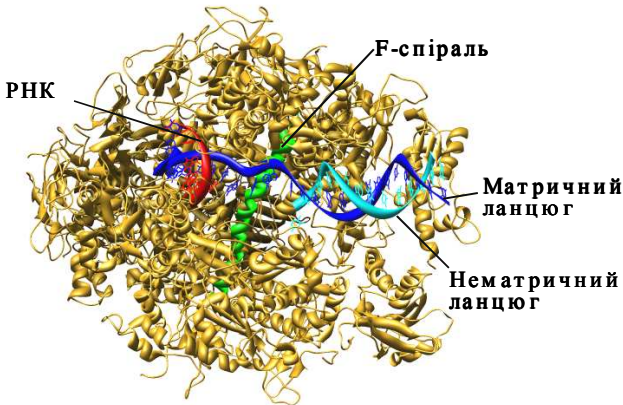


Рис. 5.1. Структура елонгаційного комплексу РНК-полімерази II (код PDB 1R9T). Активний центр знаходиться ліворуч від позначеної на рисунку F-спіралі, полімераза рухається праворуч.

Робочий цикл РНК-полімерази II розпочинається з ініціації транскрипції на *промоторі* – ділянці, що оточує стартову точку транскрипції. Першою подією ініціації є збирання преініціаторного комплексу за участі РНК-полімерази та шести базальних (загальних) факторів транскрипції (наступний підрозділ). Наступна подія – утворення *відкритого* комплексу – локальне плавлення ДНК за рахунок геліказної активності одного з базальних факторів транскрипції. Матричний ланцюг при цьому занурюється в активний центр, і починається синтез короткого первинного транскрипта. Досить часто при цьому здійснюється *абортивна ініціація* – дисоціація первинного транскрипта та РНК-полімерази, яка далі може зробити другу спробу ініціації. В іншому випадку реалізується перехід до елонгації транскрипції – РНК-полімераза продовжує синтез РНК після дисоціації більшості базальних факторів від полімерази (очищення промотора).

Ретельні дослідження кінетики роботи РНК-полімерази II на певному гені у живих клітинах дають наступні оцінки проміжків часу, які полімераза проводить у тому чи іншому стані, та ймовірностей переходів від одного стану до іншого

(напевно, на різних генах тривалість часових інтервалів та інші параметри можуть варіювати в залежності від ефективності роботи системи регуляції): середній час іммобілізації РНК-полімерази на промоторі після зв'язування з ним – 6 с; більшість молекул полімерази після цього просто дисоціюють і лише 13% полімераз переходять до ініціації транскрипції – тоді цей етап продовжується у середньому 54 с; лише 9% таких полімераз вступають до стадії елонгації транскрипції, решта здійснює абортивну ініціацію. Отже, тільки одна молекула полімерази з ~90 таких, що зв'язались із промотором, продукує молекулу мРНК. Така досить низька ефективність може мати біологічне значення, знижуючи ймовірність випадкової транскрипції будь-де в геномі ("транскрипційний шум"). Швидкість безупинної елонгації транскрипції становить 30–70 нуклеотидів за секунду. Але частина полімераз зупиняється всередині кодуючої частини гена – тривалість таких пауз може сягати кількох хвилин.

Власне, перша пауза у роботі полімерази відбувається після синтезу перших 20–30 нуклеотидів транскрипта, коли з CTD зв'язується білковий фактор DSIF (DRB-Sensitivity Inducing Factor, DRB – синтетичний інгібітор транскрипції, що спрацьовує тільки за наявності фактора), який рекрутує NELF (Negative Elongation Factor). Цей останній взаємодіє з DSIF, РНК і РНК-полімеразою, зумовлюючи зупинку руху полімерази. Під час цієї паузи із CTD, РНК і DSIF зв'язуються ферменти, від яких залежить перша подія процесингу мРНК – модифікація її 5'-кінця з утворенням кепа. Після того, як ці ферменти спрацьовують, вони рекрутують Р-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b), що приводить до втрати спорідненості DSIF і, відповідно, дисоціації NELF. У результаті РНК-полімераза продовжує свій рух.

Пауза в роботі РНК-полімерази відразу за стартом транскрипції є важливим моментом регуляції експресії гена. У генах, які потребують швидкої активації у відповідь на зовнішні сигнали (наприклад, гени теплового шоку), РНК-полімераза є "заарештованою" в цій позиції і продовжує рух тільки після індукованих зовнішніми сигналами (для генів теплового шоку – підвищенням температури) додаткових впливів. Отже,

зв'язування Р-ТЕФб, який знімає блокаду РНК-полімерази, залежить від присутності певних транскрипційних факторів та змін у характері модифікацій гістонів у складі найближчої нуклеосоми (мова йде про позиційовану нуклеосому +1, яка згадувалась у попередньому розділі, – саме вона знаходиться відразу за стартовою точкою транскрипції).

Процес синтезу мРНК супроводжується її сплайсингом: на інтронах у складі пре-мРНК і STD збираються *сплайсосоми*, де здійснюється вирізання інтронів та зшивання екзонів. Закінчується робочий цикл РНК-полімерази II у той момент, коли у складі пре-мРНК з'являється специфічна послідовність – сигнал термінації – *polyA-сигнал*. На цій послідовності відбувається збірка мультибілкового комплексу, в складі якого здійснюється розрізання транскрипта і поліаденилування 3'-кінця, що утворився, – події, що супроводжують термінацію транскрипції зі звільненням зрілої мРНК та дисоціацією полімеразного комплексу від ДНК.

5.1.2. Базальні фактори транскрипції. Для ініціації транскрипції є необхідним збирання на промоторі преініціаторного комплексу (PIC – Pre-Initiation Complex) за участю 12-субодиничної РНК-полімерази II та принаймні шести базальних факторів транскрипції TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIЕ, TFIIF, TFIIN. Послідовність збирання преініціаторного комплексу може бути різною, але всі базальні фактори мають бути присутніми у складі PIC для подальшого запуску транскрипції.

TFIID – один із найважливіших базальних факторів, який визначає впізнання стандартних елементів промотора (якщо вони присутні, див. наступний підпідрозділ). Основою структури TFIID є **TBP** (TATA-box Binding Protein) – білок зі специфічною спорідненістю до одного з таких стандартних елементів – TATA-бокса. Досить широкий β -шар у складі TBP взаємодіє з маленьким жолобком ДНК, наслідком чого є суттєва деформація подвійної спіралі з її розкручуванням та значним вигином у протилежний від білка бік (рис. 5.2). Саме з цього протилежного боку (усередині вигину) розташовуються інші

білкові компоненти преініціаторного комплексу, які обгортаються промотором. Отже, вигин ДНК, який індукується ТВР (незалежно від того, чи є присутнім у промоторі ТАТА-бокс) організує промотор і зв'язані з ним елементи в єдиний компактний комплекс і підтримує його стабільність. Досить часто (але не обов'язково) зв'язування TFIIID ініціює збирання PIC.

Із ТВР у складі TFIIID зв'язані так звані ТВР-асоційовані фактори (**TAFs** – **T**ВР **A**ssociated **F**actors) – вісім або більше білків (конкретний склад факторів варіює для різних промоторів). TAFs взаємодіють з ТВР і між собою, деякі з них здатні також взаємодіяти з ДНК та гістонами. Зокрема, білок TAF_{II}250 (250 – молекулярна вага в кілодальтонах) є практично обов'язковим компонентом TFIIID (як і ТВР), виконуючи роль основного фактора збирання, з яким взаємодіють інші TAFs. Крім того, TAF_{II}250 містить у своєму складі бромодомен і гістон-ацетилтрансферазну активність: відповідно, здатен як впізнавати ацетильовані гістони в зоні промоторів, так і здійснювати їхнє ацетилювання.

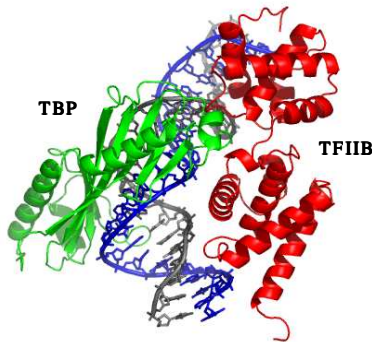


Рис. 5.2. Комплекс із ДНК ДНК-зв'язувального домену ТВР і С-кінцевої частини ТFIIB у двох проекціях (код PDB 1D3U).

TFIIA – гетеродимерний білок, кофактор, що стабілізує комплекс ТВР з ДНК. Відповідно, цей фактор можна було б вважати ще одним TAF.

TFIIВ – мономерний білок із мультидоменною структурою. Два С-кінцевих домени взаємодіють із ДНК по обидва боки від сайту зв'язування ТВР, із внутрішнього боку вигину, який індукується цим білком (рис. 5.2). Таким чином, два білки, які взаємодіють також між собою, зв'язуються з ДНК кооперативно, взаємно підсилюючи спорідненість до неї.

Два С-кінцеві домени TFIIВ мають різну структуру і взаємодіють з різними елементами ДНК (маленьким та великим жолобками). Така асиметрія (існування двох альтернативних варіантів зв'язування з ДНК) відіграє роль у визначенні напрямку транскрипції. Це пов'язано з тим, що N-кінцева частина TFIIВ (практично не має регулярної вторинної структури) взаємодіє з РНК-полімеразою II. Таким чином, саме TFIIВ визначає положення полімерази на ДНК відносно стартової точки в одній із двох можливих орієнтацій ферменту.

Витягнута N-кінцева частина TFIIВ взаємодіє з РНК-полімеразою в зоні активного центру, після початку транскрипції здійснює взаємодії з РНК-ДНК гібридом, а також блокує канал виходу РНК. Відповідно, TFIIВ має бути звільненим при переході від ініціації до елонгації транскрипції (при очищенні промотора).

TFIIF – гетеродимер, взаємодіє з РНК-полімеразою II (у зоні активного центру), з ДНК, з базальними факторами TFIIE та TFIIH. Після первинного плавлення ДНК при ініціації транскрипції TFIIF здійснює взаємодії з нематричним ланцюгом, стимулює роботу TFIIH (див. нижче), запобігає абортивній ініціації. Після завершення ініціації TFIIF разом з іншими базальними факторами дисоціює від РНК-полімерази, але може реасоціювати з нею під час елонгації – у випадку зупинки ферменту. Його роль як фактора елонгації транскрипції полягає у стимуляції продовження руху полімерази.

TFIIE – гетеродимер, стимулює роботу TFIIH, взаємодіє з транскрипційним міхуром при ініціації транскрипції.

TFIIH – найбільший із базальних факторів, складається з 10 субодиниць, має молекулярну вагу, порівняну з такою РНК-полімерази. TFIIH – єдиний базальний фактор, що має

ферментативні активності. Перша з них – АТР-залежна ДНК-геліказна (гелікази – helicases – ферменти, що розкручують подвійну спіраль). Саме за рахунок цієї активності відбувається первинне локальне плавлення подвійної спіралі ДНК в зоні активного центру при ініціації транскрипції (утворення відкритого комплексу). Друга ферментативна активність ТФІІІ – кіназна, за рахунок якої здійснюється фосфорилування С-кінцевого домену РНК-полімерази при переході від ініціації до елонгації транскрипції. У дефосфорильованій формі, на стадії збирання преініціаторного комплексу, STD взаємодіє з базальними факторами транскрипції; після фосфорилування певних залишків Ser ця взаємодія порушується, і виникає спорідненість до згаданих у попередньому підпідрозділі факторів, від яких залежить утворення кепа на 5'-кінці мРНК.

Ефективне збирання преініціаторного комплексу є можливою лише за участі ще одного структурного модуля – *медіатору* (mediator), який містить понад 20 субодиноць (склад варіює для різних промоторів – певний мінімальний набір субодиноць доповнюється більш специфічними за рахунок взаємодії з транскрипційними факторами). Цей мультибілковий комплекс має витягнуту структуру, яку можна розділити на три частини: голова (h, head), середня частина (m, middle) і хвіст (t, tail). Медіатор здійснює лише білок-білкові взаємодії: голова й середня частина взаємодіють з РНК-полімеразою, середня частина та хвіст – зі специфічними факторами транскрипції, що зв'язані на регуляторних елементах послідовності (цис-елементах, підпідрозд. 5.1.6). Таким чином, медіатор є засобом передачі “активаційних сигналів” з цис-елементів на РНК-полімеразу: збільшення кількості взаємодій підсилює ефективність збирання преініціаторного комплексу.

5.1.3. Структурна організація транскрипційної системи у клітинному ядрі. У принципі є можливими два варіанти взаємного переміщення РНК-полімеразного комплексу і ДНК під час транскрипції: або полімераза рухається вздовж ДНК (як потяг по рейках), або ДНК протягується через іммобілізовану

РНК-полімеразу. Напевно, реалізуються обидві можливості, але останнім часом накопичується все більше свідчень на користь того, що значна частина транскрипційних подій відбувається у так званих *транскрипційних фабриках* – великих мультимолекулярних комплексах, які містять віддалені по ланцюгу регуляторні елементи ДНК, зв'язані з ними білки та іммобілізовані молекули РНК-полімерази (рис. 5.3).



Рис. 5.3. Транскрипційна фабрика.

У різних клітинах знаходиться від кількох сотень до кількох тисяч таких фабрик (структурна основа фабрики залишається незрозумілою), на яких об'єднується від двох до кількох десятків транскрипційних одиниць (одна така спеціалізована фабрика – ядерце, де здійснюється синтез рибосомної РНК РНК-полімеразою I на об'єднаних в єдину структуру ядерцевих організаторах різних хромосом – є давно і добре відомою). Різноманітні елементи системи активації транскрипції можуть бути об'єднані в межах транскрипційної фабрики і спільно використовуватись кількома промоторами, які зв'язуються з фабрикою при ініціації транскрипції. При цьому певні елементи системи регуляції транскрипції (включаючи і саму РНК-полімеразу) можуть зв'язуватись з промоторами заздалегідь, переводячи їх у стан потенційної здатності взаємодії з транскрипційною фабрикою. Така фабрика може слугувати місцем для узгодженої транскрипції групи генів, що

активуються спільним набором активаторів, та, завдяки об'єднанню у єдиний комплекс, взаємно підтримують активований стан одне одного.

5.1.4. Промотори у вузькому сенсі (інша назва – базальний або кор-промотор) – ділянки ДНК, на яких відбувається збирання преініціаторного комплексу. Базальний промотор може включати (не обов'язково) певні стандартні консенсусні елементи послідовності (рис. 5.4): ТАТА-бокс (на відстані приблизно –30 пар основ відносно старту транскрипції, впізнається білком ТВР у складі загального фактору транскрипції TFIID); BRE (B Recognition Element, впізнається загальним фактором транскрипції TFIIB), який фланкує ТАТА-бокс; ініціаторний елемент (Initiator, INR), розташований безпосередньо в зоні старту; DPE (Downstream Promoter Element, впізнається ТВР-асоційованими факторами у складі TFIID) на відстані приблизно +30 пар основ від старту; MTE (Motif Ten Element), розміщений поряд з DPE.

Дуже незначна частина промоторів містить усі названі елементи. Для стандартних елементів у промоторах спостерігаються попарні кореляції – як позитивні, так і негативні. Так, наприклад, DPE частіше зустрічається в промоторах, що не містять ТАТА-бокса. ТАТА-бокс і BRE також мають тенденцію "унікати" один одного в промоторах. Навпаки, INR та DPE, як правило, присутні (якщо присутні) у промоторах одночасно. Крім того, спостерігається збагачення промоторів ссавців на дві потрібні комбінації стандартних елементів: BRE-INR-MTE та ТАТА-INR-MTE. Разом з тим, існують промотори, в яких не зустрічається жодного зі стандартних консенсусних елементів. В такому випадку промотор визначається або іншими, більш специфічними, елементами послідовності у проксимальній зоні вище (upstream) від базального промотора (цю зону також часто включають до промотора в широкому сенсі), або тільки особливостями розташування нуклеосом. Ці особливості (підрозділ 4.1) в багатьох випадках мають місце незалежно від присутності стандартних консенсусних елементів.

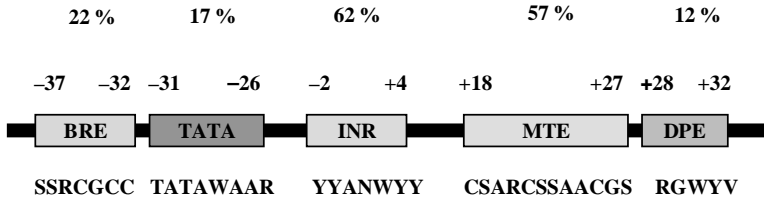


Рис. 5.4. Схема розміщення стандартних елементів послідовності у базальному промоторі. Вказано оцінку частоти присутності елементів у промоторах людини (у відсотках), межі розміщення елементів відносно стартової точки (стрілка) та консенсусні нуклеотидні послідовності (N – будь-який нуклеотид; R – A або G (purine); S – G або C (strong); V – A, G або C; W – A або T (weak); Y – C або T (pyrimidine)).

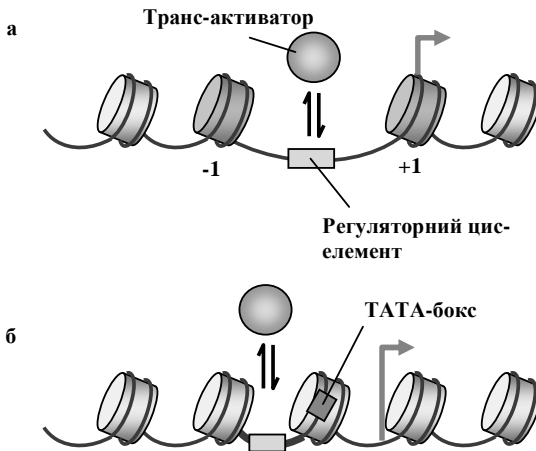


Рис. 5.5. Два типи промоторів: відкриті – із позиційованими нуклеосомами -1 та $+1$ і зоною, вільною від нуклеосоми (а, див також рис. 4.4); і закриті (б).

Стосовно розташування нуклеосом у промоторній зоні, серед промоторів можна виділити дві характерні групи (між

якими спостерігаються численні проміжні варіанти): "відкриті" (конститутивні), для яких яскраво проявляється загальна закономірність відсутності нуклеосоми перед стартовою точкою транскрипції (5'-NFR, підрозділ 4.1), та "закриті" – такі, що не містять зони, вільної від нуклеосоми (рис. 5.5). Промотори першого типу, характерні для генів "домашнього господарства" (генів, що є активними незалежно від спеціалізації клітин), є збідненими на ТАТА-бокс. Їхня вільна від нуклеосоми ділянка містить регуляторний цис-елемент, доступний для відповідного специфічного активатора транскрипції, зв'язування якого запускає збирання преініціаторного комплексу. Промотори другого типу збагачені на ТАТА-бокс, який є недоступним для транскрипційної машинерії, оскільки знаходиться в межах нуклеосоми. Зрозуміло, що такі промотори потребують спеціальних механізмів для своєї активації, які запускаються, як правило, зв'язуванням певного "піонерського" специфічного транс-активатора.

Аналіз *транскриптому* – тотальної сукупності транскриптів – дає важливу інформацію щодо загальної картини транскрипційної активності у клітинах. Такому аналізу присвячено, зокрема, міжнародний проєкт ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*), зосереджений, у першу чергу, на дослідженні транскриптому людини. Частка ДНК, що піддається транскрипції, є дуже високою – загалом у клітинах усіх типів до 80 % в еухроматинових зонах. Виявилося, що часто піддаються транскрипції регуляторні ділянки (у тому числі промотори). Можливо, така транскрипція є просто одним із засобів підтримувати регуляторну ділянку в доступному для транскрипційних факторів стані деконденсованої хроматинової фібрили.

Для білкових генів було продемонстровано наявність великої кількості невідомих раніше стартових точок транскрипції, що відстоять на 100 тис. пар основ від анотованих раніше стартів транскрипції цих генів. Деякі зі стартових точок використовують промотори інших генів: одна стартова точка може бути спільною для двох чи трьох генів, і первинний

транскрипт іноді містить кілька генних локусів (груп екзонів). Відповідно, спостерігається високий рівень альтернативного сплайсингу, в тому числі – на рівні різних генів. Результати проекту ENCODE вказують також на диспергований характер розподілу регуляторних елементів по всьому геному: багато регуляторних елементів розташовано всередині екзонів та інтронів, при цьому вони можуть бути елементами системи регуляції зовсім іншого гена.

Напевно, частина великої кількості первинних транскриптів є просто наслідком неспецифічної хаотичної активності РНК-полімераза. Проте значна частка транскриптів містить консервативні (для ссавців і серед популяцій людини) елементи послідовності. Імовірно, у багатьох випадках ці транскрипти являють собою невідомі раніше РНК, які не піддаються трансляції, для більшості з них їхнє функціональне значення ще має бути з'ясовано. Аналогічні результати отримано при дослідженні транскриптому миші: приблизно 65 % геному миші піддається транскрипції по обом ланцюгам; зони активної транскрипції ("транскрипційні ліси") у кількості близько 18 тис., де транскрипція відбувається практично без проміжків, чергуються з "транскрипційними пустелями", які відповідають гетерохроматиновим районам. Слід зауважити, що транскрипція є можливою також і в гетерохроматині (хоча загалом вона там пригнічена).

Транскриптом найпростіших еукаріотів – дріжджів – досліджено практично повністю. В цілому по обом полінуклеотидним ланцюгам в геномі дріжджів транскрибується ~85 % ДНК (у фазі експоненційного росту на багатому середовищі). Як і в геномах ссавців, спостерігається високий рівень альтернативного сплайсингу та велика кількість РНК, що не піддаються трансляції. Всі ці раніше невідомі РНК можна розділити на дві групи: 1) стабільні неанотовані транскрипти (SUT, Stable Unannotated Transcripts) – стабільні молекули РНК із поки що невідомими функціями; 2) нестабільні "загадкові" транскрипти (CUT, Cryptic Unstable Transcripts) – молекули РНК довжиною в середньому близько 260 нуклеотидів, які швидко деградуються нуклеазами у спеціальних комплексах – екзосомах. Іноді такі

нестабільні транскрипти співпадають за напрямом транскрипції з відомими мРНК (є *змістовними* по відношенню до цих мРНК), але частіше вони є *антизмістовними* по відношенню до відомих генів – транскрибуються у протилежному напрямі (рис. 5.6).

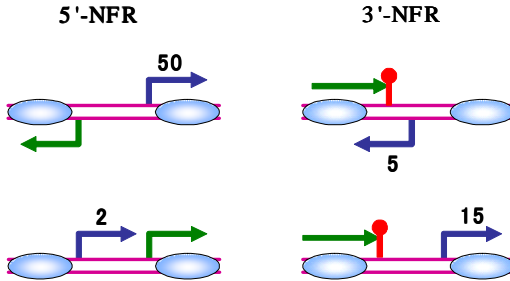


Рис. 5.6. Розподіл стартових точок для транскриптів дріжджів (синя стрілка), асоційованих з іншими транскриптами (зелена стрілка). Нуклеосоми позначено у вигляді овалів, червона кулька – сайт термінації транскрипції, цифри – приблизна частка у відсотках транскриптів даного типу.

Взагалі, початок транскрипції ~70 % всіх транскриптів дріжджів співпадає або з промотором іншого транскрипта (частіше при цьому інформація зчитується з тієї ж стартової області, але в іншому напрямі та з іншого ланцюга ДНК), або із зоною, збідненою на нуклеосоми, в області термінації транскрипції іншого гена (рис. 5.6) – в цьому випадку обидва напрями транскрипції зазвичай співпадають. Таким чином, переважна більшість промоторів дріжджів є *двоспрямованими* – одна зона, збіднена на нуклеосоми (5'-NFR), використовується як промотор для транскрипції в обох напрямках по обом ланцюгам (рис. 5.7).

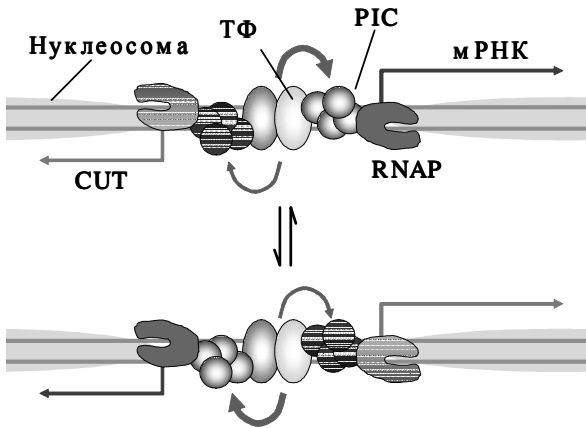


Рис. 5.7. Схема організації двоспрямованого промотора з конкуренцією між мРНК та нестабільним транскриптом (CUT). ТФ – специфічні транскрипційні фактори, РІС – преініціаторний комплекс, RNAP – РНК-полімераза. Адаптовано з Neil *et al.* (2009).

При цьому в деяких випадках таке узагальнення промоторної зони двома генами (або геном та нестабільним транскриптом) може забезпечувати координовану регуляцію – дві частини промотору взаємно підсилюють ініціацію транскрипції. В деяких двоспрямованих промоторах, навпаки (як на схемі рис. 5.7), відбувається конкуренція між двома напрямками за фактори транскрипції та РНК-полімеразу. Рівновага може бути зсунутою в той чи інший бік у залежності від контексту послідовності: наприклад, наявність ТАТА-бокса чи інших стандартних елементів базального промотору з одного боку сприятиме зв'язуванню РНК-полімерази у напрямку транскрипції мРНК, а не нестабільного транскрипта.

5.1.5. Енхансери. До складу промотора того чи іншого гена, крім базального промотора, досить часто включають також набір специфічних регуляторних елементів послідовності (так званих цис-елементів), які можуть розміщуватись або не дуже

далеко від старту транскрипції (проксимальні елементи на відстанях $\sim -50 \div -200$ пар основ від старту), або на значних відстанях (дистальні елементи). Ділянку, де розміщені цис-елементи, від яких залежить активація транскрипції, називають енхансером (enhancer), ділянку, що визначає репресію гена – сайленсером (silencer). Транскрипційні фактори, що зв'язуються з енхансером, мають спорідненість до базальних факторів транскрипції та медіатора, зв'язаного з РНК-полімеразою. Результатом такої взаємодії є ефективна збірка преініціаторного комплексу в зоні старту транскрипції (рис. 5.8). Певні компоненти мультибілкових комплексів, які збираються на цис-елементах, можуть, навпаки, блокувати ініціацію транскрипції – тоді їх називають репресорами та корепресорами.

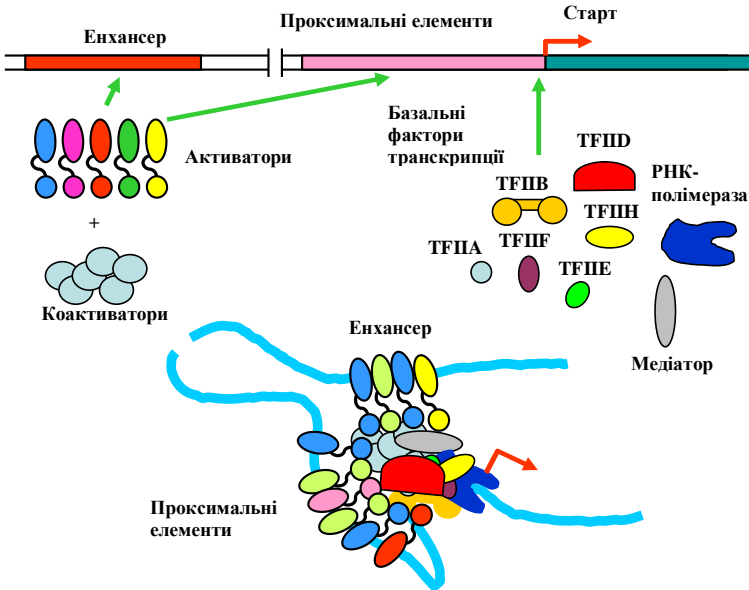


Рис. 5.8. Схема збірки комплексу активації транскрипції за участі енхансера та проксимальних регуляторних елементів.

Наявність віддалених від стартової точки енхансерів є характерною особливістю еукаріотів. Досить часто механізмом впливу енхансера є пряма фізична взаємодія зв'язаних з енхансером транскрипційних факторів з преініціаторним комплексом шляхом утворення петлі між енхансером та базальним промотором – так, як схематично зображено на рис. 5.8. Інший механізм має відношення до згаданих вище транскрипційних фабрик (рис. 5.9).

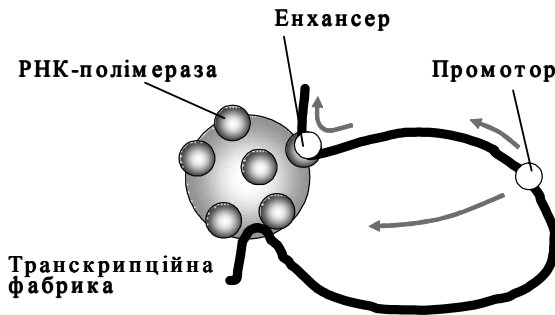


Рис. 5.9. Один із механізмів активуючого впливу енхансера на промотор.

Досить часто енхансер являє собою просто промотор, з якого розпочинається транскрипція у напрямі до промотора гена, що активується енхансером. Оскільки РНК-полімераза закорена у транскрипційній фабриці, цей останній промотор "втягується" до такої фабрики внаслідок транскрипційної активності енхансера, або взаємодія енхансера з транскрипційною фабрикою підвищує імовірність зв'язування з нею такого промотора, що опинився в межах утвореного таким петлевого домену. Імовірно, саме за таким механізмом працює, наприклад, глобіновий LCR (Locus Control Region) – енхансер, під контролем якого знаходиться кластер глобінових генів: кожен ген має свій власний промотор, але потенційна активність

всього кластеру в клітинах еритроїдного ряду визначається LCR.

Важливою умовою того, що даний енхансер у клітинах певного типу буде впливати на промотор даного гена, є не тільки наявність певного набору транскрипційних факторів, що взаємодіють з енхансером, а й відсутність перешкод на шляху передачі регуляторного сигналу з енхансера на промотор. Такі перешкоди створюють *інсулятори* – спеціальні елементи послідовності, асоційовані з певними білками, які встановлюють границі між активними та неактивними доменами хроматину. Інсулятори підрозділяють на два класи: енхансер-блокуючі та бар'єрні (які відокремлюють гетеро- від еухроматинових зон – розглядатимуться у підрозділі 5.5).

Енхансер-блокуючі інсулятори перешкоджають активуючому впливу енхансера на промотор, коли знаходяться між цими двома елементами (рис. 5.10, *a*). Найбільш імовірними механізмами дії інсуляторів є: 1) рознесення енхансера та промотора по різних петлевих доменах за рахунок взаємодії інсуляторних білків із елементами ядерного матриксу (рис. 5.10, *б*) або об'єднання двох інсуляторів у основі петлі за рахунок взаємодій між інсуляторними білками; 2) створення інсулятором бар'єру на шляху транскрипції, яка розпочинається з енхансера (рис. 5.10, *в*). У першому випадку знаходження енхансера та промотора в межах однієї петлі значно підвищує імовірність взаємодії між ними. У другому – інсулятор або просто перешкоджає руху РНК-полімерази з енхансера до промотора (промотора 2 на рисунку), або припиняє "втягування" цього промотора в транскрипційну фабрику. Таким чином, транскрипційні фабрики, енхансери та інсулятори дають суттєвий внесок у визначення динамічних петлевих доменів хроматину.

Взаємодія інсуляторних білків із відповідними елементами послідовності (тобто, інсуляторна активність) є тканиноспецифічною: ці білки є мішенями різноманітних модифікацій, які підвищують або знижують їхню спорідненість до інсуляторних елементів послідовності.

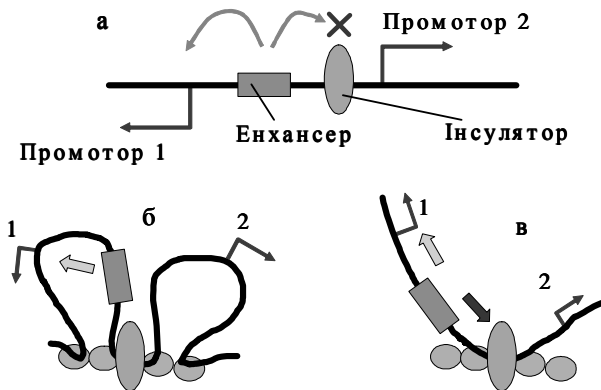


Рис. 5.10. Енхансер-блокуючий інсулятор (*а*) та два можливі механізми його дії (*б, в* – пояснення в тексті).

5.1.6. Регуляція транскрипції здійснюється трьома основними шляхами:

- взаємодія транскрипційних факторів з промоторами та енхансерами;
- вплив мікроРНК на експресію генів;
- зміни структури (стабільності хроматинові фібрили, позиціонування нуклеосом) та патерну хімічних модифікацій хроматину.

Всі три шляхи є взаємопов'язаними та інтегрованими в єдину систему. Так, ефективність взаємодії транскрипційних факторів визначається доступністю їхніх сайтів зв'язування у хроматині та патерном модифікацій ДНК та гістонів. І навпаки – транскрипційні фактори здатні конкурувати з гістонами за місця зв'язування на ДНК; зв'язування транскрипційних факторів ініціює процеси зміни модифікаційних патернів та локальні перебудови структури хроматину. Під контролем транскрипційних факторів знаходяться гени мікроРНК, і навпаки – гени транскрипційних факторів самі є мішенями

контролю з боку мікроРНК. Крім того, мікроРНК здатні стимулювати певні хімічні модифікації у хроматині.

МікроРНК. Механізм регуляторної дії мікроРНК базується на *РНК-інтерференції*. Взагалі процес РНК-інтерференції (RNAi) запускається будь-якою дволанцюговою РНК (у тому числі – штучно введеною до клітини). Дволанцюгова РНК стає субстратом для РНКаз, яка отримала назву *дайсер* (Dicer): дайсер розрізає молекулу на дволанцюгові фрагменти довжиною близько 21 пари основ, які позначають як siRNA (short interfering RNA). Вони зв'язуються з кількома білками, утворюючи комплекс RISC (RNA Induced Silencing Complex). Найважливішим компонентом цього комплексу є білок, що належить до родини *аргонавт* (Argonaute), один із доменів білка має нуклеазну активність. Один із ланцюгів siRNA руйнується, а той, що залишився, здійснює комплементарне спарювання з ділянкою мРНК, що синтезується у процесі транскрипції (вихідна дволанцюгова РНК має збігатися за послідовністю з кодуючою частиною даного гена), спрямовуючи туди RISC. За рахунок нуклеазної активності аргонавта здійснюється деградація транскрипту. Крім того, RISC може індукувати активність РНК-залежної РНК-полімерази (RdRP – RNA depended RNA Polymerase) для синтезу комплементарного ланцюга РНК на мРНК (чи її частині) як матриці. Відновлена дволанцюгова РНК буде знов підтримувати інактивацію гена шляхом інтерференції. Отже, хоча транскрипція відбувається, реалізується посттранскрипційне вимкнення гена (PTGS – posttranscriptional gene silencing).

У клітині РНК-інтерференція реалізується через використання мікроРНК (miRNA). Ці молекули є продуктами численних генів мікроРНК (транскрибуються РНК-полімеразою II, частина мікро-РНК походить також з інтронів деяких білкових генів). Безпосередній продукт транскрипції – пре-мікроРНК – молекули РНК, що містять дволанцюгові шпильки. З цих шпильок спеціальними нуклеазами вирізаються дволанцюгові фрагменти довжиною ~24 пари основ, які є аналогом siRNA: молекула мікроРНК зв'язується з білками RISC і спрямовує їх до мРНК-мішені (рис. 5.11). Результатом

взаємодії з мРНК може бути її посттранскрипційна деградація або блокування білкового синтезу (у цьому разі взаємодія з мРНК відбувається в цитоплазмі). Крім того, зв'язування мікроРНК у складі комплексу RISC з мРНК під час транскрипції викликає рекрутування до хроматину ферментів, що здійснюють певні модифікації гістонів (підрозділ 5.5).

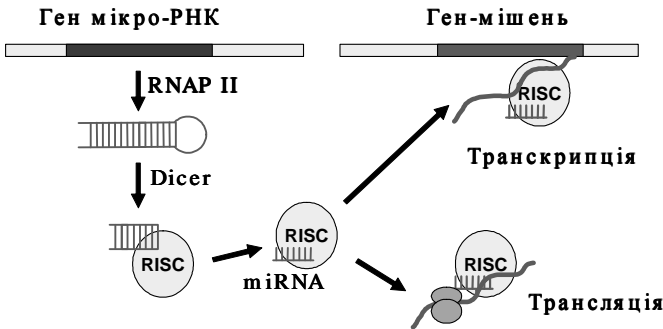


Рис. 5.11. Роль мікро-РНК у регуляції експресії генів.

Під контролем мікроРНК знаходяться, зокрема, певні гени білкових транскрипційних факторів, що мають специфічну спорідненість до регуляторних цис-елементів, розташованих у проксимальних та дистальних регуляторних зонах.

Транскрипційні фактори. Відповідно на необхідність регулювати окремо активність великої кількості генів лімітованим (хоча й дуже великим) набором факторів транскрипції є принцип *модульності* будови регуляторних зон. Кожен транскрипційний фактор залучений до регуляції багатьох генів. Але кожен промотор має свій власний набір модулів (цис-елементів), який відрізняє його від інших промоторів, і, відповідно, власний набір (комбінацію) досить великої кількості транскрипційних факторів, потрібних для активації/репресії гена. Із принципом модульності тісно пов'язаний принцип *кооперативності* взаємодії транскрипційних факторів із цис-елементами, що знаходяться поряд. Кожен з транскрипційних факторів зазвичай має порівняно невисоку спорідненість до

відповідних елементів послідовності. Але якщо два цис-елементи розташовані поруч, і два фактори здатні взаємодіяти між собою, спорідненість кожного з них підвищується і загальна стабільність комплексу значно зростає.

Більшість факторів транскрипції мають у своїй структурі принаймні два домени: той, що взаємодіє з ДНК, і так званий активаційний, який використовується для взаємодії з іншими білками. Активаційні домени зв'язують білкові кофактори (коактиватори), у результаті на дистальних і проксимальних елементах промотора формується складний мультибілковий комплекс – *енхансосома* (enhanceosome). До складу енхансосом часто входять також гістон-ацетилтрансферази та інші ферменти, що здійснюють ковалентні модифікації гістонів, і фактори ремоделювання хроматину (підрозділ 5.3). Активаційні домени транскрипційних факторів і коактиватори мають, у свою чергу, спорідненість до медіатору та базальних факторів транскрипції, результатом чого є ефективне збирання преініціаторного комплексу на базальному промоторі (рис. 5.8). Різні елементи енхансосоми діють синергічно, підвищуючи загальну стабільність комплексу. З іншого боку, відсутність кількох елементів може зумовити дестабілізацію та розпад енхансосоми, де спорідненість до ДНК кожного окремого елемента є невисокою. Це забезпечує *динамізм* активації: енхансосома не є фіксованою, а збирається / розбирається в певні моменти.

У геномах нематоди та дрозоділи описані так звані НОТ-сайти (Highly Occupied Target) – ділянки довжиною ~100–400 пар основ, з якими постійно асоційована велика кількість транскрипційних факторів (~300 сайтів такого типу існує в геномі нематоди і ~2000 – в геномі дрозоділи). При цьому такі ділянки не містять відомих специфічних для цих факторів цис-елементів послідовності – і це відрізняє їх від специфічних сайтів зв'язування транскрипційних факторів в промоторах та енхансерах. Напевно, НОТ-сайти визначаються ще не описаними ДНК-зв'язувальними білками, які, у свою чергу, рекрутують інші транскрипційні фактори й кофактори. НОТ-сайти (які одночасно є збідненими на нуклеосоми) асоційовані зі

стартовими точками транскрипції деяких генів (у нематоди – головним чином, генів домашнього господарства), а також (у дрозоді) – з місцями ініціації реплікації на ранніх стадіях S-фази (підрозділ 5.6).

Гени транскрипційних факторів самі є мішенями регуляції з боку транскрипційних факторів та мікроРНК. Тобто, в клітині працює складна регуляторна мережа, організована за ієрархічним принципом: певний ключовий транскрипційний фактор, що активується на перших стадіях диференціювання клітин різних типів, впливає на експресію генів інших факторів, під контролем яких знаходиться набір факторів "нижчого рівня" і т.д. до різноманітних генів-мішеней. Приклад такої мережі для 76 транскрипційних факторів та 77 мікроРНК дрозоді зображено на рис. 5.12 (в даному випадку під транскрипційними факторами маються на увазі також і кофактори). Регуляторні впливи транскрипційних факторів встановлено за фактом їхнього зв'язування з промоторами генів (за даними імунопреципітації), впливи мікроРНК – на підставі порівняння послідовностей мікроРНК та мРНК. Загалом зображені на рис. 5.12, *a* 76 транскрипційних факторів здійснюють 158 588 регуляторних впливів на гени-мішені, загальна кількість мішеней цих факторів – 12 482: тобто один ген-мішень регулюється в середньому ~12 факторами транскрипції (максимально – до 54), що відображає великі можливості комбінаторного контролю. 77 мікроРНК мають загалом 5 805 регуляторних зв'язків, контролюючи 3 099 генів. Із наведеної загальної кількості регуляторних зв'язків, 1 847 (зображені на рис. 5.12, *a*) відносяться до регуляції експресії генів транскрипційних факторів. На рис. 5.12, *б* зображено найбільш характерні елементарні "мотиви" регуляторної мережі. Перші 5 з них відображають кооперативну дію транскрипційних факторів – сумісне зв'язування факторів у промоторах. При цьому для кожного з цих мотивів якнайменше 2 фактори впливають на промотори генів одне одного, що демонструє широке використання позитивного та негативного зворотного зв'язку. Мотиви 6–7 відображають залучення мікроРНК до сумісної з транскрипційними факторами регуляції, мотив 8 –

елемент регуляції зі зворотним зв'язком, коли транскрипційний фактор нижчого рівня впливає на експресію фактора вищого рівня через мікроРНК.

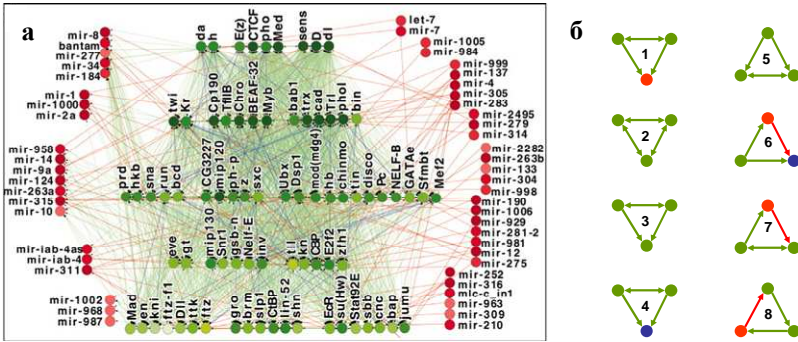


Рис. 5.12. Мережа регуляції транскрипції за участі транскрипційних факторів та мікроРНК у клітинах дрозофіли (а) та найбільш характерні елементи цієї мережі (б). Транскрипційні фактори позначено зеленим, мікроРНК – червоним, гени-мішені (на частині б) – синім. Інтенсивність забарвлення на частині а відповідає кількості мішеней, що знаходяться під контролем фактора. П'ять рівнів відображають ієрархію факторів – вищий рівень відповідає більшій кількості генів-мішеней фактора у порівнянні з кількістю факторів, для яких ген цього фактора є мішенню. У межах кожного рівня знаходиться три групи транскрипційних факторів: такі, що регулюють гени мікроРНК (ліворуч); такі, гени яких регулюються мікроРНК (праворуч); такі, які не мають регуляторних зв'язків з мікроРНК, мікроРНК, гени яких знаходяться під контролем транскрипційних факторів, зображені ліворуч, мікроРНК, які тільки самі регулюють гени транскрипційних факторів – праворуч. Зелені лінії – регуляція транскрипційним фактором вищого рівня генів факторів нижчих рівнів, сині лінії – регуляція "знизу наверх", червоні лінії – регуляція генів транскрипційних факторів за участі мікроРНК. На панелі б стрілками позначено напрям регуляції. Репродуковано з роботи The modENCODE Consortium (2010) [3](#) дозволу American Association for the Advancement of Science (AAAS).

Таким чином, білкові транскрипційні фактори й кофактори разом з мікроРНК інкорпоровані в єдину складну систему регуляції транскрипції, яка забезпечує специфічний для даного типу клітин залежний від концентрації регуляторів профіль експресії геному. Третім – і центральним – таким, що забезпечує інтеграцію різноманітних впливів у єдину систему, шляхом регуляції транскрипції є перебудови хроматину.

Зміни в хроматині та регуляція транскрипції. Основні важливі для регуляції транскрипції зміни в структурі хроматину полягають у модуляції стабільності хроматинової фібрили, репозиціонуванні та тимчасовому видаленні нуклеосом, змінах патернів хімічних модифікацій гістонів та ДНК.

Позиціонування нуклеосом відносно нуклеотидної послідовності (підрозділ 4.1) визначає доступність регуляторних цис-елементів для транскрипційних факторів. Зміни цієї доступності внаслідок видалення нуклеосом або зміни їхніх позицій реалізується завдяки активності АТР-залежних комплексів (факторів) *ремоделювання хроматину*, які можна розглядати як транскрипційні кофактори. Комплекси ремоделювання можуть рекрутуватись до певних ділянок хроматину транскрипційними факторами, а внаслідок активності комплексів ремоделювання відкриваються нові ділянки ДНК для зв'язування нових факторів транскрипції, які, таким чином, можуть підтримувати вільний від нуклеосомі стан. Взаємодія комплексів ремоделювання та їхня активність залежить також від патерну хімічних модифікацій у хроматині. Той чи інший патерн встановлюється завдяки активності певних ферментів, що рекрутуються до ділянок хроматину факторами транскрипції. В багатьох випадках завдяки каскадним механізмам здійснюється експансія модифікацій, коли однотипні модифікації вносяться у сусідні нуклеосомі (підрозділи 2.3, 5.5). Патерни модифікацій впізнаються факторами і кофакторами транскрипції, в тому числі – комплексами ремоделювання. Крім того, деякі модифікації гістонів діють опосередковано: наприклад, гіперацетилювання гістонів сприяє декомпактизації хроматинової фібрили та

дестабілізації нуклеосом, підвищуючи тим самим доступність ДНК та полегшуючи роботу комплексів ремоделювання. Отже, фактори транскрипції, комплекси ремоделювання хроматину та ферментативні активності, від яких залежать хімічні модифікації, діють синергічно, сумісно визначаючи той чи інший функціональний стан хроматинової ділянки.

У наступних підрозділах більш детально розглядаються зміни структури хроматину в промоторах при активації транскрипції, механізми дії комплексів ремоделювання хроматину, зміни в хроматині при елонгації транскрипції, механізми встановлення репресованого стану в гетерохроматинових ділянках та закономірності реплікації ДНК у хроматині.

5.2. Ремоделювання промоторів

Одним із детально вивчених прикладів структурних змін хроматину в промоторній зоні є активація дріжджового гена *PHO5*, промотор якого – класичний представник групи "закритих" промоторів (див. рис. 5.5). Ген, продуктом якого є кисла фосфатаза, активується при збідненні середовища на фосфати, коли транскрипційний фактор Pho4 переміщується із цитоплазми в ядро і зв'язується з двома цис-елементами – UASp1 (Upstream Activator Sequence) та UASp2. У репресованому стані промотор містить три чітко позиційовані нуклеосоми: у межах нуклеосоми N₁ знаходиться недоступний для машинерії транскрипції ТАТА-бокс, у межах нуклеосоми N₂ – цис-елемент UASp2, у лінкері між нуклеосомами N₂ та N₃ – UASp1 (рис. 5.13). Зв'язування транскрипційного фактора Pho4 з цим цис-елементом приводить до рекрутування гістон-ацетилтрансфераз та комплексів ремоделювання хроматину. Перші здійснюють гіперацетилювання гістонів у складі промотора, другі забезпечують тимчасове видалення та переміщення нуклеосом. У результаті в промоторі реалізується динамічна рівновага (рис. 5.13): в середньому промотор є збідненим на 1,85 нуклеосом із трьох, але кожна з нуклеосом від

0,18 до 0,6 частини часу зберігається в активному промоторі. Таким чином, за рахунок активності комплексів ремоделювання активованій промотор являє собою ансамбль конфігурацій, що генеруються у випадкових подіях видалення та реформування нуклеосом, а також переміщення нуклеосом, що залишились, на інші позиції. У конфігураціях, в яких стає доступним ТАТА-бокс, відбувається збірка преініціаторного комплексу та ініціація транскрипції.

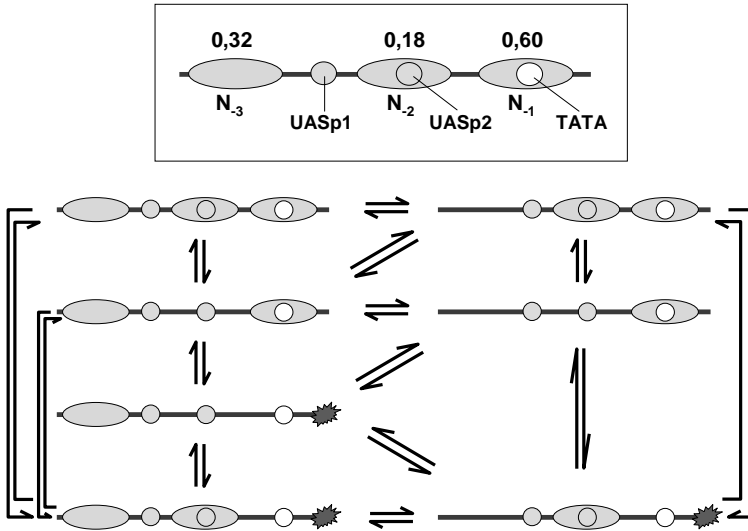


Рис. 5.13. Схема організації промотора гена *PHO5* та динамічної рівноваги різних конфігурацій розміщення нуклеосом у ньому при активації гена. Показано три позиційовані нуклеосоми N_1 , N_2 та N_3 , регуляторні цис-елементи UAS і ТАТА-бокс. Числа наверху – середня частка часу, коли дана нуклеосома присутня в активованому промоторі. Зірочкою позначено конфігурації, в яких відбувається ініціація транскрипції. Адаптовано з Voeger *et al.* (2003) і Mao *et al.* (2010).

Іншими словами, перехід між репресованим та активованим станами промотора являє собою перетворення із статичної конфігурації чітко позиційованих нуклеосом, які блокують

ТАТА-бокс і стартову точку транскрипції, в динамічний стан, який характеризується досить швидким руйнуванням/відновленням нуклеосом, що значно підвищує імовірність збірки преініціаторного комплексу та ініціації транскрипції. Ацетилювання гістонів у промоторних нуклеосомах сприяє зниженню їхньої стабільності, а також стимулює збірку преініціаторного комплексу за рахунок спорідненості TFIIID до ацетильованих лізинових залишків.

Інший приклад перебудов у промоторній зоні дає дослідження спільного двонаправленого промотора двох дріжджових генів – *GAL1* і *GAL10*, – які знаходяться під контролем транскрипційного фактора Gal4 і продукти яких задіяні у катаболізмі галактози (гени активуються за умови присутності у середовищі галактози при відсутності глюкози). Кілька специфічних сайтів зв'язування Gal4 (цис-елементів UAS) знаходяться між двома чітко позиційованими нуклеосомами (рис. 5.14), зв'язаний з ними транскрипційний фактор здатен, у свою чергу, взаємодіяти з ацетилтрансферазним комплексом SAGA, базальним транскрипційним фактором TFIIID та медіатором. Дослідження доступності фрагментів промоторної зони до мікрококкової нуклеази у різні моменти часу після активації було здійснено за допомогою зшивання білків з ДНК формальдегідом, наступної деградації зростаючими концентраціями нуклеази, виділення отриманої моонуклеосомної ДНК та наступної ампліфікації конкретних фрагментів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі – рівень ампліфікації відображає ступінь захищеності даного фрагмента від нуклеази. Результати вказують, що в репресованому стані в промоторі спостерігаються зони гіперчутливості до нуклеази у проміжках між позиційованими нуклеосомами, а зона між двома нуклеосомами завжди – і в репресованому стані, і в стані активації – захищена від нуклеази невідомими білками (не гістонами і не фактором Gal4). При цьому в репресованому стані промоторні нуклеосоми (на відміну від стабільних нуклеосом всередині кодуєчих частин генів) приблизно 50% часу відсутні (рис. 5.14) – реалізується залежна від факторів

ремоделювання хроматину рівновага
 видалення/реформування нуклеосом. Проте, у відсутності фактора Gal4 такий динамічний стан є недостатнім для активації транскрипції.

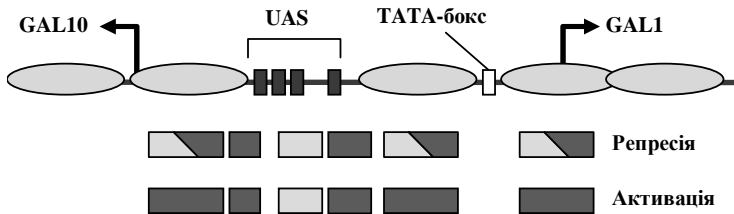


Рис. 5.14. Схема організації промотора між генами *GAL1* і *GAL10*, прямокутниками позначено цис-елементи (UAS) транскрипційного фактора Gal4, овалами – нуклеосоми.

Співвідношення між світлим і темним забарвленням прямокутників унизу символізує частку часу, коли даний фрагмент промотора є, відповідно, недоступним або доступним для мікрококкової нуклеази у репресованому та активованому станах. Адаптовано з Bryant *et al.* (2008).

Після активації (у відповідь на появу галактози в середовищі) зв'язаний Gal4 здатен сам по собі, використовуючи цю рівновагу, індукувати, хоча й достатньо повільну, збірку преініціаторного комплексу. У присутності комплексу ремоделювання SWI/SNF (див. наступний підрозділ), який рекрутується до промотору, промоторні нуклеосоми зникають практично повністю (рис. 5.14), і тоді ініціація транскрипції стає значно більш ефективною, пришвидшуючись майже на два порядки. Аналіз відповідних мутантів вказує, що SWI/SNF пришвидшує і видалення нуклеосом, і запуск транскрипції. Натомість, ацетилтрансферазний комплекс SAGA є важливим тільки для пришвидшення збірки преініціаторного комплексу і не впливає на видалення нуклеосом.

Тимчасове видалення нуклеосом з активних промоторів є досить загальним правилом. Тотальний аналіз розподілу нуклеосом по ділянках усього геному дріжджів та інших

еукаріотів указує, що існує зворотна кореляція між щільністю нуклеосом у промоторах і рівнем транскрипційної активності відповідних генів, причому за умови активації / репресії даного гена часто спостерігається перебудова нуклеосомної організації – деякі нуклеосоми зникають / виникають на певних позиціях або змінюють свої позиції.

Зважаючи на високу спорідненість гістонів до ДНК і, відповідно, високу стабільність нуклеосом, таке ремоделювання структури хроматину в промоторах було б неможливим без АТР-залежних комплексів ремоделювання хроматину.

5.3. Комплекси ремоделювання хроматину

Висока стабільність нуклеосоми практично виключає спонтанне переміщення (не кажучи вже про видалення) нуклеосоми вздовж ДНК (слайдинг): таке переміщення потребує появи високоенергетичних інтермедіатів із частковим порушенням взаємодії гістонів із ДНК. Завдання каталізу конформаційних перетворень нуклеосом, наслідком якого є їхнє репозиціонування або перенесення на проміжні акцептори, вирішують комплекси (або фактори) ремоделювання хроматину – АТР-залежні мультитілкові машини, що місять від 2 до 14 субодиниць.

Основні типи активності комплексів ремоделювання (КР) представлено на рис. 5.15. Ремоделюючі комплекси здатні, переміщуючи нуклеосоми, уніфікувати довжину лінкерів у хроматині. Ця функція є важливою, зокрема, під час реплікації ДНК, коли гістони тимчасово знімаються з ДНК, а за реплікативною вилкою відновлюється хроматинова структура на дочірніх дуплексах з використанням як щойно знятих гістонових комплексів, так і синтезованих *de novo* (підрозділ 5.6). Уніфікація довжини лінкерів є важливою також для підвищення стабільності компактного стану хроматинової фібрили, який залежить від регулярності розташування нуклеосом (підрозділ 4.2), у репресованих ділянках хроматину. Іншим результатом роботи ремоделюючих комплексів є репозиціонування нуклеосом внаслідок утворення інтермедіатів із

частково розгорнутою ДНК, а також перенесення гістонів на проміжні акцептори – видалення нуклеосом. Таке перенесення може бути частковим, коли видаляються тільки димери H2A-H2B. Можливим результатом при цьому буде заміна димерів в складі нуклеосом на такі, що містять особливі варіанти гістонів.

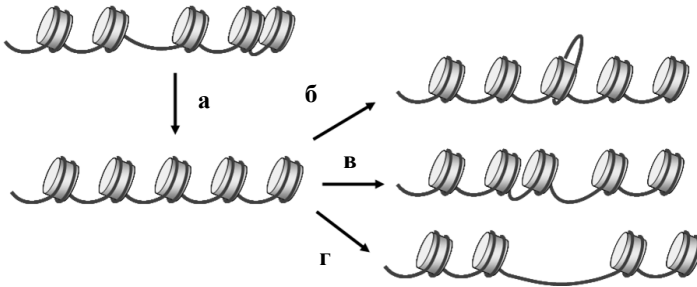


Рис. 5.15. Основні наслідки активності ремоделюючих комплексів: сприяння рівномірному розміщенню нуклеосом (а), підвищення доступності нуклеосомної ДНК за рахунок її часткового розгортання (б), репозиціювання нуклеосом (в), тимчасове видалення нуклеосом (г).

До складу всіх комплексів ремоделювання входить АТР-азна субодиниця. Її АТР-азний домен є гомологічним для всіх комплексів і відноситься до родини АТР-аз Swi2/Shf2 (надродина ДНК-геліказ SF2), але власне геліказної активності не має – використовуючи енергію гідролізу АТР, пересувається вздовж подвійної спіралі, не руйнуючи її. АТР-азний домен розділений на два субдомени, що позначаються як DExx і HELICs. У залежності від наявності додаткових структурних доменів різного типу в складі каталітичної субодиниці, комплекси ремоделювання розділяють на чотири основні групи (рис. 5.16): SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80.

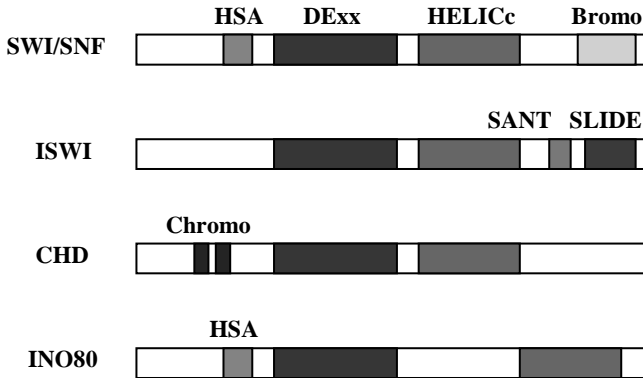


Рис. 5.16. Схема будови АТР-азної субодиниці, що входить до складу комплексів ремоделювання хроматину чотирьох основних родин. Dexx і HELICc – субдомени, що забезпечують АТР-азну активність, HSA – домен, що взаємодіє з актином та актин-подібними білками, Bromo – бромодомен, SANT і SLIDE – домени, що взаємодіють з ДНК та гістонами, Chromo – хромодомени.

Комплекси родини **SWI/SNF** (*switching defective/sucrose nonfermenting* – назва походить від першого описаного КР цієї родини, який було відкрито як групу мутацій дріжджів з певними біохімічними проявами) складаються з 8–14 субодиниць (зокрема, актин або актин-подібні білки), каталітична субодиниця містить бромодомен. Типові представники: SWI/SNF і RSC дріжджів, VAP і PBAF дрозофіли, VAF і PBAF людини. АТР-аза комплексів цієї родини активується у відповідь на зв'язування з вільною ДНК або нуклеосою, при цьому комплекс здійснює транслокацію вздовж подвійної спіралі. Молекулярна вага комплексів є значно більшою за таку нуклеосоми (наприклад, ~2 млн у SWI/SNF, ~1 млн у RSC). У структурі комплексів існує глибока порожнина, що слугує для взаємодії з нуклеосою. Під час дії комплексів родини SWI/SNF спостерігаються різноманітні проміжні структурні форми нуклеосоми, що характеризуються високою

доступністю нуклеосомної ДНК. Наслідком дії комплексів SWI/SNF є не тільки переміщення нуклеосом на сусідні ділянки (переміщення *in cis*), а й перенесення на віддаленні ділянки ДНК або на проміжні акцептори гістонів (перенесення *in trans*). Хоча комплекси родини SWI/SNF приймають участь у репресії транскрипції (а також у ремоделюванні хроматину при інших функціональних процесах), головна їх роль – часткове очищення промоторів від нуклеосом при активації транскрипції.

Комплекси родини **ISWI** (*i*mitation *s*witch) містять від двох до чотирьох субодиниць, каталітична субодиниця містить домени SANT і SLIDE, що забезпечують взаємодію з ДНК та невпорядкованими хвостами гістонів. Комплекси цієї родини були вперше відкриті у дрозофіли (NURF, CHRAC, ACF), відповідні гомологи описані також для дріжджів та людини. На відміну від комплексів SWI/SNF, АТФ-азна активність комплексів ISWI індукується тільки нуклеосою і тільки у випадку присутності невпорядкованих гістонових хвостів. Проміжні стани нуклеосоми, які б суттєво відрізнялись за своєю структурою від звичайної, при дії цих комплексів не спостерігаються. Основний наслідок їхньої активності – переміщення (слайдинг) нуклеосом. Деякі комплекси ISWI (зокрема, NURF) приймають участь в активації транскрипції, забезпечуючи випадкове переміщення нуклеосом у промоторах. Але головна їхня функція – уніфікація відстані між сусідніми нуклеосомами, забезпечення регулярного розміщення нуклеосом, важливого для стабілізації хроматинової фібрили у репресованих ділянках.

Головною відмінністю комплексів родини **CHD** (*c*hromodomain, *h*elicase, *D*NA binding) є наявність у складі каталітичної субодиниці двох хромодоменів. Комплекси цієї родини (CHD1, Mi-2, NuRD) містять від 1 до 10 субодиниць. Деякі з цих комплексів здатні індукувати слайдинг нуклеосом та їх тимчасове видалення. Інші – зокрема, Mi-2/NuRD – виконують виключно функцію корепресорів, оскільки містять в своєму складі гістон-деацетилази та білки, що мають домени зі спорідненістю до метильованої ДНК (MBD-домени). Тобто, комплекс NuRD забезпечує інтеграцію в єдину систему таких

маркерів репресованого хроматину, як метилювання та деацетилювання гістонів і метилювання ДНК (підрозділ 5.5).

Для комплексів родини **INO80** (*inositol requiring*) є характерним збільшення ділянки, що розділює два каталітичні субдомени в складі АТР-азної субодиниці (рис. 5.16). Представники цієї родини (INO80, Tip60, SRCAP, SWR1) містять більше 10 субодиниць. Комплекси родини INO80 виконують різноманітні функції, зокрема, залучені до активації транскрипції та репарації ДНК. Комплекс SWR1 (який іноді виділяють в окрему родину) є унікальним у тому відношенні, що забезпечує заміщення канонічних димерів H2A-H2B на димери H2A.Z-H2B у складі нуклеосом.

Механізм дії комплексів ремоделювання базується на гомології з ДНК-геліказами. Хоча АТРазна субодиниця КР не здатна діяти як геліказ – розводити два ланцюги, вона, подібно до геліказ, може пересуватись вздовж ДНК (але без її руйнування), використовуючи енергію гідролізу АТР. Найбільш імовірний механізм дії ремоделюючих комплексів схематично зображено на рис. 5.17.

Для комплексів типу ISWI було показано, що взаємодія АТР-азного домену з нуклеосою відбувається за два витки дуплекса від центру нуклеосомної ДНК – у $SHL \pm 2$. Інший ДНК-зв'язувальний домен взаємодіє з лінкером на вході в нуклеосому. Принаймні для частини комплексів цього типу показано, що з нуклеосою кооперативно та симетрично зв'язуються два комплекси, кожен з яких містить свою АТР-азну субодиницю. У випадку комплексів типу SWI/SNF нуклеосома зв'язується у глибокій щілині, що формується комплексом, а єдина АТР-аза взаємодіє, як і для комплексів ISWI, поблизу від центру нуклеосомної ДНК (рис. 5.17). АТР-азний домен взаємодіє з нуклеосомною ДНК поблизу від центру, інший ДНК-зв'язувальний домен АТР-азної субодиниці – на вході в нуклеосому. Цей останній домен зумовлює порушення взаємодії кінцевої ділянки ДНК з гістонами, “віддираючи” ДНК з поверхні октамера. АТР-азний домен взаємодіє також з неупорядкованими гістоновими хвостами, що забезпечує його фіксоване положення відносно нуклеосоми. Зв'язування та

гідроліз АТФ індукує конформаційні зміни та, відповідно, транслокацію АТФ-азного домену вздовж ДНК у напрямку до ДНК-зв'язувального домену. Оскільки положення АТФ-азного домену є при цьому фіксованим, така транслокація призводить до “відпомповування” нуклеосомної ДНК з периферії всередину нуклеосоми – на поверхні гістонового октамера утворюються петля ДНК, яка потім мігрує від центру в другу половину нуклеосоми. Під час переміщення петлі (яке нагадує хвилеподібний рух гусениці) зруйнованими увесь час є лише 1–2 контакти між ДНК та гістонами. Результатом міграції петлі та, зрештою, виходу її назовні є трансляційне переміщення нуклеосоми.

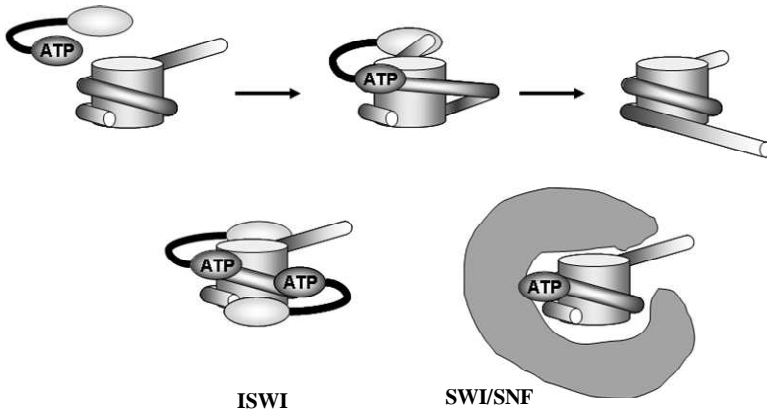


Рис. 5.17. Гіпотетична схема роботи АТФ-азної субодиниці ремодельюючого комплексу. Позначено АТФ-азний та інший ДНК-зв'язувальний домен, інші пояснення в тексті. Внизу: симетричне зв'язування з нуклеосомою двох АТФ-азних субодиниць у складі комплексу ISWI та взаємодія нуклеосоми зі внутрішньою порожниною комплексу SWI/SNF, до складу якого входить одна АТФ-азна субодиниця. Адаптовано з Raski *et al.* (2008) і Lorch *et al.* (2010).

У випадку комплексів ISWI дві АТР-азні субодиниці працюють, напевно, за принципом конкуренції одна з одною (рис. 5.17). При цьому АТР-азна (тобто транслокаційна) активність залежить від довжини лінкера – активність є більш високою для субодиниці, ДНК-зв'язувальний домен якої взаємодіє з більш довгим лінкером. В результаті здійснюється переміщення нуклеосоми вперед/назад, і рівноважний стан відповідає ситуації з двома однаковими лінкерами по обидва боки від нуклеосоми – відбувається уніфікація довжини лінкерів. Для комплексів SWI/SNF механізм репозиціонування нуклеосом є цілком аналогічним: один АТР-азний домен у складі комплексу забезпечує переміщення ДНК відносно октамера гістонів, взаємодії з яким є суттєво порушеними по всій довжині за рахунок зв'язування ДНК із внутрішньою позитивно зарядженою поверхнею порожнини, що формується комплексом (рис. 5.17).

Різні комплекси ремоделювання можуть створювати петлі ДНК різного розміру на поверхні нуклеосоми: від мікропетель, що містять 1–12 пар основ, до великих петель розміром до ~100 пар основ. У першому випадку нуклеосома під час ремоделювання не суттєво відрізняється за своєю структурою від “звичайної” – це стосується комплексів типу ISWI. Комплекси родини SWI/SNF генерують великі петлі та, відповідно, інтермедіатні структури нуклеосоми, в складі яких великі ділянки нуклеосомної ДНК втрачають зв'язок з гістонами. Велика петля, що генерується комплексами типу SWI/SNF, може бути важливою сама по собі – ДНК в її складі є тимчасово доступною для регуляторних білків. Петля може захоплюватись цими білками, що сприятиме подальшій дестабілізації нуклеосоми за рахунок кооперативного зв'язування інших факторів транскрипції та, відповідно, тимчасовому перенесенню гістонових комплексів на проміжні акцептори. Напевно, саме такий механізм використовується в промоторах для реалізації рівноваги, під час якої нуклеосоми увесь час протягом активації транскрипції втрачаються та відновлюються, що забезпечує високу доступність регуляторних елементів послідовності.

Ремоделюючі комплекси всіх груп мають спорідненість до нуклеосоми; містять домени або білки, що здатні впізнавати модифікації (різні для різних груп) гістонових хвостів; домени або білки, що взаємодіють з транскрипційними факторами, ферментативними комплексами, що здійснюють модифікації гістонів, або іншими хроматиновими білками. За рахунок наявності таких структурних блоків комплекси ремоделювання адресно рекрутуються до ділянок хроматину, де необхідна їхня активність.

Більшість ремоделюючих комплексів (за виключенням деяких високо спеціалізованих) залучена до ремоделювання хроматину не тільки при активації, а й при репресії транскрипції, коли регуляторні ділянки послідовності переводяться в недоступний стан завдяки відповідного репозиціонування нуклеосом. Конкретна роль даного ремоделюючого комплексу в даній ділянці хроматину залежить, таким чином, від контексту інших факторів системи регуляції транскрипції, у координації з якими цей комплекс працює. Аналогічно, операції по зміні відстані між нуклеосомами, репозиціонуванню та тимчасовому видаленню нуклеосом забезпечуються комплексами ремоделювання хроматину і при всіх інших функціональних процесах: реплікації, репарації та рекомбінації ДНК, встановленні гетеро- та еухроматинових ділянок і границь між ними тощо.

5.4. Елонгація транскрипції у хроматині

На стадії елонгації транскрипції нуклеосома має створювати суттєві перешкоди для проходження РНК-полімерази. При цьому хроматин, навіть у межах активних генів, у цілому зберігає нуклеосомну структуру. В експериментах *in vitro* наявність нуклеосом у складі матриці значно гальмує транскрипцію. У той же час, швидкість транскрипції *in vivo* практично така сама, як *in vitro* на вільній ДНК. Отже, мають існувати особливі механізми, котрі забезпечують “прозорість” нуклеосом для РНК-полімерази у клітинному ядрі.

На модельній системі *in vitro*, що містила мономерну РНК-полімеразу бактеріофага SP6 і коротку (227 пар основ) ДНК-матрицю з однією позиційованою нуклеосою, було показано, що гістоновий октамер переноситься як ціле на ділянку позаду полімерази (рис. 5.18). При цьому октамер ніколи не втрачає повністю свого контакту з ДНК: у процесі перенесення спостерігаються інтермедіати, які нагадують проміжні структури з петлею ДНК на поверхні октамеру гістонів при ремоделюванні нуклеосом (порівн. рис. 5.17 та 5.18).

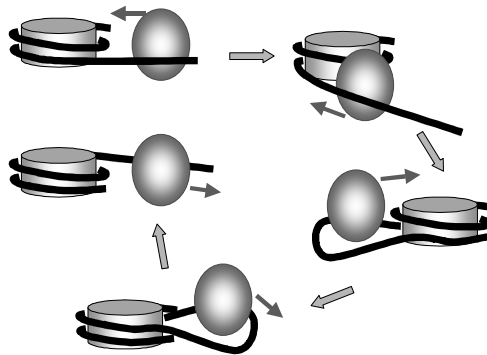


Рис. 5.18. Проходження мономерної РНК-полімерази бактеріофага SP6 через нуклеосому. Адаптовано з Studitsky *et al.* (2004).

За аналогічним механізмом із перенесенням октамеру здійснюється проходження через нуклеосому еукаріотичної РНК-полімерази III. Що стосується РНК-полімерази II, її проходження через хроматин може супроводжуватись і перенесенням октамера гістонів як цілого, і, частіше, *частковим* руйнуванням нуклеосом попереду полімерази та відновленням їх позаду:

- в ядрах клітин спостерігається досить швидкий, транскрипційно-залежний обмін гістонів H2A і H2B між хроматином та ядерним пулом гістонів;
- нуклеосомы, які транскрибуються РНК-полімеразою II, тимчасово збіднені на гістони H2A і H2B.

В експериментах з індивідуальними молекулами ДНК, що містять одну позиційовану нуклеосому, досліджувалась елонгація РНК-полімерази II у реальному часі (Hodges *et al.*, 2009) – саме в цій системі продемонстрована можливість перенесення октамеру на ділянку позаду полімерази. Аналіз кінетики елонгації свідчить, що полімераза не розгортає нуклеосому ДНК сама, а просто "чекає" спонтанного розгортання, використовуючи внутрішню конформаційну динаміку нуклеосом (підпдрозд. 3.3.1). В процесі елонгації полімераза робить паузи, імовірність та тривалість яких знижується при зростанні іонної сили. Зрозуміло, що підвищення іонної сили знижує спорідненість гістонів до ДНК і тим самим певною мірою дестабілізує нуклеосому, підвищуючи ймовірність спонтанного розгортання нуклеосомної ДНК.

Роль трошки підвищеної, у порівнянні з фізіологічною, іонної сили можуть відігравати *in vivo* фактори елонгації транскрипції, які працюють як проміжні переносники гістонів. Описано кілька факторів елонгації, що прискорюють роботу РНК-полімерази II:

- ***Elongator*** – мультибілковий комплекс, одна із субодиниць якого є гістон-ацетилтрансферазою. Комплекс взаємодіє з РНК-полімеразою II і здійснює ацетилювання гістонів під час елонгації транскрипції.

- ***FACT* (FAcilitates Chromatin Transcription)** – складається з двох субодиниць, одна з яких є НМGB-подібним білком. FACT має підвищену спорідненість до димерів гістонів H2A-H2B – виконує роль проміжного переносника димерів, забезпечуючи їх видалення з нуклеосом попереду полімерази та повернення до хроматину позаду.

- ***Spt6*** – проміжний акцептор зі спорідненістю до гістонів H3-H4.

У хроматині є також інші переносники гістонів. Зокрема, цю роль може виконувати мРНК, що синтезується, та полі(ADP)-рибоза (підпдрозд. 2.3.5). Крім того, елонгації транскрипції сприяють АТР-залежні комплекси ремоделювання хроматину.

Проходження РНК-полімерази (як і будь-якого іншого ферменту, котрий здійснює транслокацію вздовж ДНК) за умов жорсткого закріплення кінців матриці (основ хроматинової петлі) має створювати позитивну надспіралізацію попереду та негативну – позаду полімеразного комплексу (див. рис. 3.15). Надспіралізація в процесі транскрипції виникає у зв'язку з тим, що обертальний рух РНК-полімеразного комплексу навкруг подвійної спіралі значно загальмований унаслідок масивності комплексу, у тому числі – присутності в його складі довгого ланцюга РНК, що синтезується. Крім того, значна кількість полімераз закорена на транскрипційних фабриках. У результаті під час роботи полімерази ДНК змушена обертатися навкруг своєї осі, що призводить до торсійного перекручування дуплекса попереду полімерази і, відповідно, еквівалентного розкручування – позаду. Позитивна надспіралізація дестабілізує *ліву* суперспіраль нуклеосомної ДНК попереду полімерази, що сприяє дії проміжних переносників гістонів. І навпаки – негативна надспіралізація позаду полімерази сприяє ефективному відновленню нуклеосом. Особливу роль в дестабілізації нуклеосом, яка відбувається дуже швидко на великій ділянці попереду від полімерази, може відігравати правозакручена реверсома (підпідрозд. 3.3.3). Можливо, саме такий механізм дестабілізації та наступного перенесення гістонів на проміжні акцептори лежить в основі видалення нуклеосом по всій довжині деяких гіперактивних генів. Прикладом є гени теплового шоку, при активації яких нуклеосоми швидко (значно раніше, ніж перша РНК-полімераза може дістатись до кодуючої частини) зникають по всій довжині гена, роль проміжного акцептора гістонів при цьому відіграє полі(ADP)-рибоза.

Незважаючи на описані вище механізми полегшення проходження РНК-полімерази, слід пам'ятати, що нуклеосома являє собою бар'єр для елонгації транскрипції. Отже, щільність та характер розміщення нуклеосом всередині частини гена, що транскрибується (а відповідно – ефективність описаних вище механізмів), може слугувати додатковим регуляторним фактором, який впливає на швидкість транскрипції та на тісно

пов'язаний із транскрипцією процес сплайсингу мРНК. Останнім часом накопичено дані про неоднорідність розміщення нуклеосом всередині еукаріотичних генів: екзони (незалежно від транскрипційної активності гена) характеризуються підвищеною присутністю нуклеосом у порівнянні з інтронами – ця закономірність проявляється для людини, миші, курки, дрозофіли, нематоди та інших організмів; особливо збагаченими на нуклеосоми є екзони, що оточені довгими інтронами (середня довжина екзона ссавців передбачає, що всередині екзона знаходиться тільки одна позиційована нуклеосома); підвищеною є присутність нуклеосом всередині екзонів, які мають слабкі сплайс-сайти (у порівнянні з екзонами, що відокремлені сильними сплайс-сайтами, які більш ефективно впізнаються машинерією сплайсингу); псевдоекзони (ділянки всередині інтронів, які оточені сильними сплайс-сайтами, але не включаються до зрілих мРНК) збіднені на нуклеосоми; нуклеосоми в екзонах характеризуються специфічним набором хімічних модифікацій гістонів (див. табл. 2.1).

Таким чином, особливості позиціонування нуклеосом по обидва боки від сплайс-сайта можуть слугувати додатковим маркером екзона, а зміни цього позиціонування під впливом комплексів ремоделювання хроматину – впливати на альтернативний сплайсинг. По-перше, нуклеосома всередині екзона може полегшувати впізнання сплайс-сайтів, які знаходяться в наближених у просторі лінкерах (зв'язування факторів сплайсингу в двох сусідніх сплайс-сайтах характеризується позитивною кооперативністю). По-друге, нуклеосоми можуть відігравати роль у рекрутуванні факторів сплайсингу, безпосередньо взаємодіючи з ними – можливо, така взаємодія залежить від гістонових модифікацій. По-третє, розміщення нуклеосом має впливати на кінетику транскрипції, яка, у свою чергу, є важливим фактором альтернативного сплайсингу.

5.5. Конститутивна репресія транскрипції: гетерохроматин

Великий розмір еукаріотичного геному (майже половина якого припадає на послідовності, що повторюються) вимагає існування систем, які б визначали гарантовану інактивацію значної частини генетичного матеріалу – і така конститутивна репресія є не менш важливою частиною загальної системи регуляції транскрипції, ніж вибіркова активація генів. При цьому інактивованій стан як некодуєчої ДНК, так і значної частини генів у клітинах певного типу має відтворюватись у дочірніх клітинах після мітозу.

Успадкування такої тканиноспецифічної системи репресії (при збереженні повної генетичної програми даного організму) називають *епігенетичною спадковістю*. В її основі лежить передача клітинам-нащадкам не просто батьківської ДНК, а хроматину разом із певними хімічними маркерами (маються на увазі патерни посттрансляційних модифікацій гістонів і метилювання ДНК). Такі маркери впізнаються відповідними білками, котрі вступають у різноманітні взаємодії з репресорами та корепресорами транскрипції, ферментами, що здійснюють посттрансляційні модифікації, і білками, які додатково компактизують хроматинову фібрилу. Подібні системи в першу чергу працюють у ділянках *гетерохроматину* – частини хроматину, що зберігає високий ступінь компактності протягом інтерфази. Прикладами конститутивного гетерохроматину (такого, що утворюється в усіх клітинах) є субтеломерні та прицентромерні зони хромосом, одна з Х-хромосом самок ссавців. Інші гетерохроматинові зони є специфічними для клітин певного типу.

5.5.1. Теломера і субтеломерний гетерохроматин. ДНК теломер побудована з коротких елементів послідовності, що повторюються багато разів. У всіх хребетних, у тому числі у людини, послідовність повтору – TTAGGG.

Ланцюг ДНК теломерної ділянки, який містить багато гуанінові залишки, називається *G-ланцюгом*, а комплементарний йому – *C-ланцюгом*. Довжина теломерної ділянки сильно варіює в залежності від виду організму, типу клітин та кількості раундів реплікації, яку пройшла ДНК. В середньому, вона складає 10-15 тис пар основ у людини і може сягати аж до 100 тис пар основ у деяких видів гризунів. На самому кінці теломери G-ланцюг ДНК формує невеликий (приблизно 50-300 нуклеотидів) 3'-одноланцюговий виступ, який називається *G-виступом* або G-хвостом (G-overhang, G-tail). Для того, щоб зрозуміти природу появи такого виступу на кінці теломери, необхідно коротко розглянути особливості реплікації кінців еукаріотичних хромосом.

Унаслідок реплікації на 3'-кінцях матричних ланцюгів ДНК залишаються одноланцюгові хвости: два РНК-праймери, які були побудовані праймазою на 5'-кінцях ланцюгів, що синтезовані, видаляються, а прогалина не може бути заповненою, оскільки немає 3'-кінця, який міг би бути використаним як праймер (рис. 5.19, див. також наступний підрозділ). Одноланцюгові хвости піддаються швидкій нуклеазній деградації, і після кожної реплікації ДНК повинна вкоротитися. Подовження теломер (для запобігання вкороченню хромосом) після реплікації здійснюється за допомогою спеціального ферменту – *теломерази*, яка є зворотною транскриптазою – РНК-залежною ДНК-полімеразою. РНК-матриця входить до складу самого ферменту й містить ділянку, комплементарну теломерному повтору. Використовуючи її як матрицю і 3'-кінець як праймер, теломераза покроково добудовує до 3'-кінця кілька копій теломерного повтору. Подовжений теломеразою одноланцюговий хвіст використовується як матриця для синтезу іншого ланцюга за звичайним реплікативним механізмом. І знову після видалення РНК-праймера на обох кінцях подовженої хромосоми залишаються одноланцюгові 3'-вирости (G-виступи).

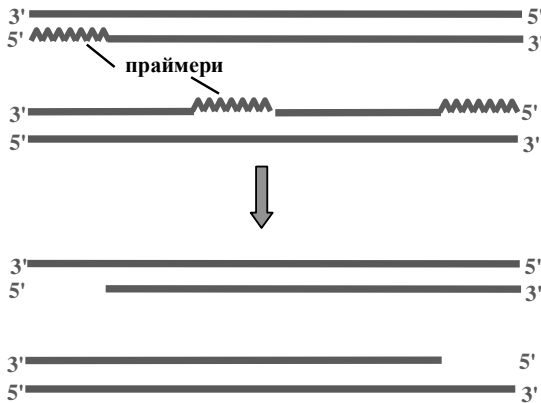


Рис. 5.19. Дві дочірні молекули ДНК після реплікації.

Їх вказаний вище розмір набагато перевищує розмір праймера (приблизно 12 нуклеотидів). Це пов'язано з декількома причинами. В першу чергу, за рахунок екзонуклеазної активності відбувається постреплікативна деградація 5'-кінця С-ланцюга. Крім того, в момент добудови другого ланцюга ДНК на подовженому теломеразою хвості, праймаза може спрацювати не на самому початку виступу, тим самим залишаючи певну кількість нуклеотидів без комплементарної пари.

Впродовж клітинного циклу теломера перебуває у двох різних станах: відкритому і закритому. Відкритий стан, при якому G-виступ є вільним і доступним для роботи теломерази, реалізується в основному під час реплікації ДНК. В інші моменти циклу, а у клітинах, які припинили поділ (остаточно диференційовані клітини), – завжди, теломера перебуває у закритій конформації: одностанцюговий виріст вбудовується у дволанцюгову ДНК, здійснюючи комплементарні взаємодії з одним ланцюгом і виштовхуючи інший у вигляді одностанцюгової *D-петлі*. При цьому ДНК вигинається на 180° , утворюючи так звану *t-петлю* (рис. 5.20). Розмір *t*-петлі варіює у різних організмів і не завжди залежить від довжини теломери: мінімальний розмір складає 1000 пар основ у трипаносом, а

максимальний – більше 50 тис пар основ у гороху посівного.

Така замкнена форма теломери захищає кінці молекул ДНК від білків системи репарації дволанцюгових розривів, які здатні ефективно впізнавати вільні кінці і зшивати різні молекули ДНК між собою.



Рис. 5.20. Структура теломерної t-петлі.

Стабілізацію t- та D-петлі забезпечують специфічні теломерні білки, тому ця зона часто повністю позбавлена нуклеосом. Найбільш детально білковий компонент теломери досліджений у хребетних. З теломерною ділянкою взаємодіє комплекс з шести основних білків, який називається *шелтерин* (shelterin). Два білка – Trf1 та Trf2 (від telomeric repeat binding factor) – взаємодіють з дволанцюговою ДНК, впізнаючи теломерний повтор за рахунок так званого Myb-домену. Одноланцюговий G-виступ стабілізує білок Pot1 (від protection of telomeres). Три інших білки (Rap1, Tin2, Trp1) безпосередньо з ДНК не взаємодіють, а утворюють комплекс із ДНК-зв'язувальними теломерними білками. Кожен елемент шелтеринового комплексу має особливі функції у підтриманні структури теломери та у захисті кінців лінійної ДНК. Зокрема, білок Trf2 полегшує інвазію 3'-виступу і, тим самим, утворення t-петлі; білок Pot1 стабілізує структуру D-петлі; білки Trf2, Rap1, Pot1 пригнічують роботу основних білків системи репарації дволанцюгових розривів. Білок Rap1 сприяє також рекрутуванню білкового комплексу, від якого залежить гетерохроматиновий стан субтеломерних ділянок (див. нижче).

Крім основного теломерного комплексу шелтерину, в теломері також присутні інші білки, зокрема частина білків системи репарації дволанцюгових розривів (на випадок руйнування теломери – з метою в разі потреби швидко залучити

інші білки для пришивання пошкодженого кінця хромосоми до кінця іншої молекули ДНК). Їх рекрутування в теломерну ділянку забезпечується білками Trf1 та Trf2. Важливим компонентом теломери є білковий комплекс, який дістав назву 911 (до його складу входять три білки Rad9, Rad1 та Hus1, звідки і походить назва комплексу). Трімер 911 формує кільцеву замкнену структуру навколо дволанцюгової ділянки в межах D-петлі, таким чином стабілізуючи її. Припускають, що у клітинах, які активно діляться, трімер 911 підвищує процесивність теломерази, утримуючи її на ДНК. Схему взаємодії білків з t-петлею наведено на рис. 5.21.

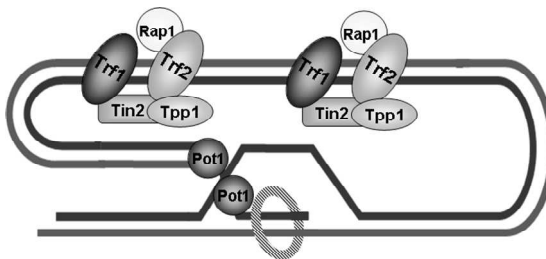


Рис. 5.21. Загальна організація основних білків t-петлі, у вигляді кільця зображено комплекс 911.

Поряд із теломерою всередині хромосоми завжди розташована ділянка субтеломерного гетерохроматину (яка, як і всі інші ділянки хроматину, має нуклеосомну будову). Визначальну роль у підтриманні гетерохроматинового стану субтеломерної ділянки відіграє деацетилювання гістонів – найкраще вивченим прикладом є теломери дріжджів (рис. 5.22).

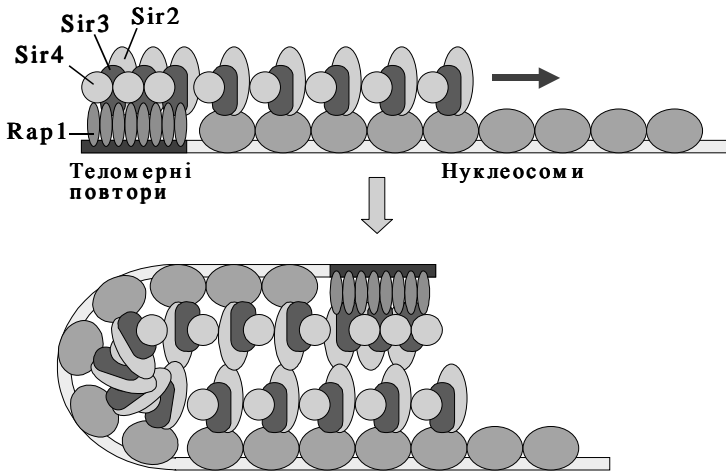


Рис. 5.22. Розповсюдження та самопідтримання гетерохроматинового стану в субтеломерних ділянках дріжджів. Для спрощення t-петля в теломерах не показана.

Згаданий вище білок Rap1 (**R**epressor **a**ctivator **p**rotein) рекрутує білок Sir4 (**S**ilencing **i**nformation **r**egulator). Цей останній зв'язує ще два білки – Sir3 та Sir2, останній є гістон-деацетилазою. Sir2 здійснює деацетилювання кількох специфічних лізинових залишків гістонів H4 і H3 найближчої нуклеосоми. Деацетилювані гістони хвости упізнаються новим Sir3, утворюється новий Sir-комплекс, здійснюється деацетилювання нової нуклеосоми – процес деацетилювання та збирання Sir-комплексу розповсюджується вздовж фібрили. Експансія гетерохроматинової зони блокується бар'єрним інсулятором (див. нижче).

За рахунок взаємодії між Sir-комплексами гетерохроматинова ділянка піддається додатковій компактизації – можливо, на кінцях хромосоми утворюється компактна зіпер-подібна структура (рис. 5.22). Утворення подібних структур завдяки певним білкам є досить загальною ознакою інших гетерохроматинових ділянок. Зокрема, зіпер-подібні структури спостерігаються в термінально-диференційованих клітинах, які

містять значну частину хроматину в гетерохроматиновому стані. Утворення таких структур в еритроцитах птахів залежить від білка MENT (Myeloid and Erythroid Nuclear Termination). Серед інших білків, що забезпечують підвищений ступінь компактизації гетерохроматину, слід згадати білок MeCP2, який впізнає метильовані динуклеотиди CpG в ДНК (один з хімічних маркерів гетерохроматину) і сприяє латеральним взаємодіям між хроматиновими фібрилами, а також найкраще охарактеризований та найбільш загальний гетерохроматиновий білок HP1.

5.5.2. HP1-залежна система репресії. Білок HP1 (Heterochromatin Protein 1) містить два структурні домени: хромодомен і так званий хромощеду (chromoshadow) – домен, який має спорідненість до певних специфічних гістон-деацетилаз (HD) і гістон-метилтрансферази (HMT), а також здатен взаємодіяти з іншою молекулою HP1. При цьому HP1 має також спорідненість до білків ламіни, що зумовлює розташування гетерохроматину в периферичних зонах клітинного ядра. Прикладом залучення HP1 до утворення гетерохроматину є прицентромерні зони хромосом (рис. 5.23.; структура центромери, що знаходиться між такими зонами, розглядатиметься в розділі 7).

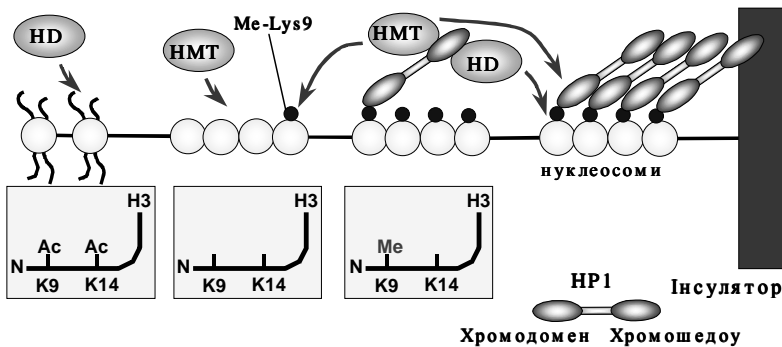


Рис. 5.23. Розповсюдження та самопідтримання гетерохроматинового стану в прицентромерних зонах. На вставках: стан модифікацій двох ключових залишків у N-кінцевому хвості гістону H3.

Деацетилювання Lys9 і Lys14 гістону H3 сприяє зв'язуванню специфічної НМТ, яка здійснює метилювання Lys9 гістону H3. Цей метильований Lys (Me-Lys9) упізнається хромодоменом HP1. Завдяки хромошодоу-домену HP1 рекрутує HD, яка підтримує деацетилюваний статус суміжних нуклеосом, і ту саму НМТ, що здійснює метилювання Lys9 у складі суміжних нуклеосом: як і в теломерах, виникає лавиноподібний процес, що самопідтримується та розповсюджується на сусідні ділянки. Взаємодія між білками HP1 забезпечує додаткову компактизацію фібрили – у тому числі, за рахунок взаємодії між віддаленими по ланцюгу ділянками. У результаті виникають більш компактні гетерохроматинові "компарменти" (щільні зони фрактальної глобули, сформованої хроматиною фібрилою), які обговорювались у підрозділі 4.3.

Розповсюдження гетерохроматину поза центромерну зону обмежується *бар'єрними інсуляторами* – ділянками, що відокремлюють еу- та гетерохроматинові зони. Відомо два основні типи бар'єрних інсуляторів (які не є взаємовиключними):

- Зона, збіднена на нуклеосоми – прогалина, яка зумовлює обрив ланцюга реакцій, що передають гетерохроматинові маркери з нуклеосоми на нуклеосому (у гетерохроматинових зонах нуклеосоми зазвичай розташовані досить регулярно та на невеликій відстані одна від одної). Наявність такої прогалини може залежати від нуклеотидної послідовності, зв'язування специфічних білків, активності ремоделюючих комплексів.

- Зона, де зв'язуються специфічні білки, які рекрутують ферментативні активності, що вносять у хроматин еухроматинові маркери, – гістон-ацетилтрансферази та гістон-метильтрансферази, від яких залежить метилювання Lys4 у

гістоні H3. Гіперацетилування гістонів та метилування Lys4 блокує роботу ферментів, що вносять гетерохроматинові маркери, перешкоджає зв'язуванню HP1 та інших гетерохроматинових білків.

Крім того, бар'єр між еу- та гетерохроматином може виникати за рахунок зв'язування інсуляторної зони з певною частиною ядерного матриксу – це робить такі бар'єрні інсулятори подібними до енхансер-блокуючих, що обговорювались у підпідрозд. 5.1.5. Описано також випадки, коли бар'єром слугує гіперактивний ген домашнього господарства: висока транскрипційна активність гена забезпечує збіднення на нуклеосоми та рекрутування гістон-деацетилаз. Зокрема, саме такий бар'єр відокремлює гетерохроматинову зону в теломерах дріжджів – активним геном виступає ген tРНК. В якості бар'єру може виступати також сильний енхансер. Взагалі, бар'єрні інсулятори мають багато спільних рис з енхансерами та промоторами – всі ці ділянки рекрутують подібні активності та часто є збідненими на нуклеосоми.

Отже, бар'єрні інсулятори відокремлюють центромерну зону, всередині якої реалізується додаткова компактизація хроматину за рахунок підтримання певного набору гетерохроматинових маркерів. При реплікації білки тимчасово знімаються з ДНК у точці реплікації (наступний підрозділ). Реплікація ДНК здійснюється нерівномірно – гетерохроматин реплікується в останню чергу. За точкою реплікації гістони батьківського хроматину (які несуть на собі гетерохроматинові маркери) повертаються на дочірні молекули ДНК разом із гістонами, синтезованими *de novo*, HP1 також повертається на той самий локус, де він був присутній, і відновлює патерни модифікацій гістонів і компактний (репресований) стан гетерохроматинової ділянки: гетерохроматиновий стан даного локусу відтворюється в дочірніх клітинах.

Подібна система репресії за участю HP1 широко використовується в інших ділянках гетерохроматину, а також для гарантованого блокування генів в еухроматинових зонах. Гетерохроматин утворюється передусім на послідовностях ДНК,

що повторюються. Причому має значення не послідовність як така, а саме наявність повторів. У формуванні та підтриманні гетерохроматинового стану повторів важливу роль відіграє також процес РНК-інтерференції.

Зв'язування мікро-РНК у складі комплексу RISC з мРНК під час транскрипції (підпідрозд. 5.1.6), крім нуклеазної деградації мРНК, викликає рекрутування до хроматину гістон-метилтрансфераз, що здійснюють метилювання Lys9 в гістоні H3 із наступною репресією даного гена (за схемою рис. 5.23). Дещо подібне відбувається і в прицентромерному гетерохроматині. При порушенні компактизації на центромерних повторах може відбуватися спонтанна транскрипція в різних напрямках. Оскільки матрицею є повтори, існує висока ймовірність синтезу комплементарних молекул РНК: утвориться дволанцюгова РНК, яка запустить процес інтерференції. Крім деградації транскриптів, інтерференція має інший наслідок: RISC, який опиняється в зоні повторів, рекрутує до хроматину гістонметилтрансферазу, що здійснює метилювання Lys9 гістону H3: відбувається зв'язування HP1 і компактизація гетерохроматину.

Отже, метилювання Lys9 гістону H3 та деацетилований стан лізинів гістонів H3/H4 є найхарактернішою ознакою гетерохроматинових ділянок. Як описано вище, обидві модифікації самопідримуються та підтримують одна одну через опосередковану дію HP1. Важливу роль у забезпеченні репресованого стану відіграє також метилювання цитозинів ДНК – інша ковалентна модифікація, яка також відновлюється при клітинному поділі й замикає своєрідне “коло репресії” (рис. 5.24).

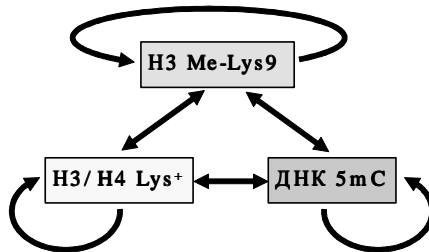


Рис. 5.24. Взаємний вплив деацетилювання гістонів, метилювання Lys9 гістону H3 і метилювання ДНК у гетерохроматині.

5.5.3. Метилювання ДНК. Субстратом метилювання ДНК є цитозини (метильна група приєднується до п'ятого атому кільця з утворенням 5mC – 5-метилцитозину) у складі динуклеотидів CpG. Узагалі, у 70–80 % динуклеотидних контактів CpG обидва цитозини є метильованими в геномі хребетних. Зони, де підтримується деметилюваний стан CpG (так звані CpG-острівці), часто розташовані в промоторах генів домашнього господарства.

Патерн тканиноспецифічного метилювання ДНК є результатом двох процесів: підтримання метильованого статусу після реплікації та метилювання *de novo*.

Підтримуюча ДНК-метилтрансфераза (DNA methyltransferase, Dnmt) спрацьовує протягом 1–2 хвилини після реплікації: дві дочірні молекули ДНК містять батьківській ланцюг ДНК (з 5mC у складі CpG) і синтезований ланцюг, де С не метильований. Dnmt упізнає такі напівметилювані динуклеотидні контакти й відновлює симетрію щодо метилювання цитозину. За рахунок цього процесу патерн метилювання відтворюється в дочірніх клітинах, що є, поряд з відновленням модифікацій гістонів, одним із важливих механізмів епігенетичного спадкування.

Інші ДНК-метилтрансферази здійснюють метилювання ДНК *de novo*. Особливо важливим цей процес є на ранніх стадіях ембріонального розвитку, коли ДНК є тотально деметилюваною. У процесі диференціації у ссавців відбувається масове метилювання ДНК, що визначає специфічне вимикання певних груп генів у спеціалізованих клітинах. Крім того, деметилювання є можливим і в диференційованих клітинах, де Dnmt використовуються для відновлення метильованого статусу.

Отже, метилювання ДНК є ознакою репресованих і гетерохроматинових ділянок. Залучення 5mC до репресії пов'язане з наявністю у складі певних білків особливих структурних модулів – MBD (Methyl Binding Domain), які мають

специфічну спорідненість до метильованих динуклеотидів CpG. Білки, що містять MBD, є компонентами різноманітних репресуючих комплексів. Зокрема, такі білки рекрутують до метильованих ділянок хроматину гістон-деацетилази. З іншого боку, деацетилований стан гістонових хвостів блокує деметилюючі активності, і навпаки – ацетилювання хвостів може викликати деметилювання ДНК у активних ділянках.

Аналогічно, білки, що містять MBD, рекрутують гістон-метилтрансферазу, яка здійснює метилювання Lys9 гістону H3, що призводить до репресії (рис. 5.23, 5.24). І навпаки: Me-Lys9 упізнається білком, що містить хромодомен і рекрутує ДНК-метилтрансферазу. Саме такий шлях (за формулою "*histones first, DNA second*") реалізується для визначення сайтів метилювання ДНК в процесі індивідуального розвитку: репресуючі комплекси індують метилювання H3Lys9, після чого здійснюється метилювання ДНК, яке закріплює інактивований статус.

Хоча Me-Lys9 та 5mC є загальними маркерами конститутивно репресованих ділянок хроматину, не завжди репресія та додаткова компактизація залежить від HP1 – реалізуються також інші системи, більшість з яких є ще не достатньо вивченими. Прикладом такої системи є інактивація однієї з X-хромосом у клітинах самок ссавців. У складі X-хромосоми, яка буде інактивованою (обирається випадково на ранніх стадіях розвитку), спрацьовує ген *Xist*, що продукує велику некодуючу молекулу РНК. Ці РНК укривають собою хромосому і взаємодіють з деякими білками, серед яких – варіант гістону H2A масгоH2A (підпідрозд. 2.1.3). Імовірно, масгоH2A рекрутує гістон-метилтрансферазу (здійснюється метилювання Lys9 гістону H3) і гістон-деацетилазу. Метилювання Lys9, у свою чергу, зумовлює метилювання ДНК (що забезпечує епігенетичну спадковість). Крім того, до X-хромосоми рекрутуються структурні компактизуючі білки (але не HP1).

5.6. Реплікація ДНК у хроматині

Перед поділом клітини, під час періоду інтерфази, що позначається як S-фаза, відбувається дуплікація хромосом. При цьому здійснюється як реплікація ДНК, так і відновлення профілю епігенетичної інформації у вигляді хімічних модифікацій ДНК та гістонів.

Реплікація ДНК починається з порівняно невеликої ділянки – *ориджина* (origin), де здійснюється ініціація процесу, головним моментом якої є розходження ланцюгів ДНК. Далі по ходу реплікації такий *реплікативний міхур* розростається у двох протилежних напрямках. На кожному боці міхура існує так звана *реплікативна вилка*, в основі якої й відбувається синтез ДНК. Ділянку ДНК, де здійснюється реплікація, що розпочинається з однієї точки, називають *репліконом*.

Кожна хромосома є полірепліконом: загалом геном, наприклад ссавців, містить близько 40 тис. точок ініціації – *ориджинів* (розмір еукаріотичного реплікона варіює від 50 до 200 тис. пар основ). Ориджини важко ідентифікувати, оскільки спільних елементів послідовності у них немає, вони лише характеризуються підвищеним вмістом АТ-пар.

Ініціація реплікації залежить від мультибілкового комплексу ORC (OriRigin Recognition Complex), який збирається на ориджині. При підготовці до реплікації у фазі G1 клітинного циклу відбувається фосфорилування циклінзалежними кіназами певних факторів регуляції клітинного циклу. У результаті дві реплікативні ДНК-гелікази MCM завантажуються в ORC та індукують локальне плавлення подвійної спіралі. З розплетеними полінуклеотидними ланцюгами взаємодіють компоненти реплікативної машинерії (див. нижче), і розпочинається рух двох реплікативних вилок у протилежних напрямках. Кожен ориджин використовується для ініціації реплікації тільки один раз під час клітинного циклу – після початку реплікації вмикаються спеціальні молекулярні механізми, що запобігають повторній ініціації.

У кожній реплікативній вилці працюють принаймні дві молекули ДНК-полімерази, що здійснюють синтез двох полінуклеотидних ланцюгів. Оскільки два ланцюги у складі молекули ДНК є антипаралельними, і синтез відбувається тільки

в напрямку від 5'- до 3'-кінця, синтез тільки одного з ланцюгів відбувається безперервно, починаючись від ориджина. Цей ланцюг називають *лідуючим* (leading strand), його 3'-кінець розташований поблизу від основи реплікативної вилки. Синтез іншого ланцюга – *ланцюга, що запізнюється* (lagging strand) – розпочинається від реплікативної вилки: синтезуються окремі фрагменти довжиною ~200 нуклеотидів – так звані *фрагменти Оказакі* (Reiji Okazaki), які пізніше з'єднуються між собою.

У реплікативній вилці працює складний мультибілковий комплекс – *реплісома*, до якого входять компоненти, що забезпечують розплітання ДНК, підвищення процесивності ДНК-полімерази та виконують інші важливі допоміжні операції. Головними компонентами еукаріотичної реплісоми, крім двох ДНК-полімераз (ДНК-полімерази δ/ϵ), ϵ (рис. 5.25): моногексамерна геліказа MCM; білки, що стабілізують одноланцюговий стан ДНК, – RPA (Replication Protein A); праймаза, що синтезує короткий РНК-праймер на початку кожного фрагмента Оказакі (цю роль в еукаріотів виконує ДНК-полімераза α , яка містить РНК-полімеразну активність); два зажими, що ковзають (sliding clamps) – своєрідні монотримерні "хомути", які, охоплюючи ДНК кільцем та зв'язуючись з ДНК-полімеразами, забезпечують їхню високу процесивність (PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigene); мультибілковий комплекс RFC (Replication Factor C) – основний структурний елемент реплісоми та завантажувач PCNA на ДНК. Процес реплікації потребує також активностей ДНК-топоізомераз, які здійснюють релаксацію позитивної надспіралізації попереду реплікативної вилки, а також – топоізомерази класу II – забезпечують розділення двох дуплексів при зустрічі двох реплікативних вилок сусідніх репліконів.

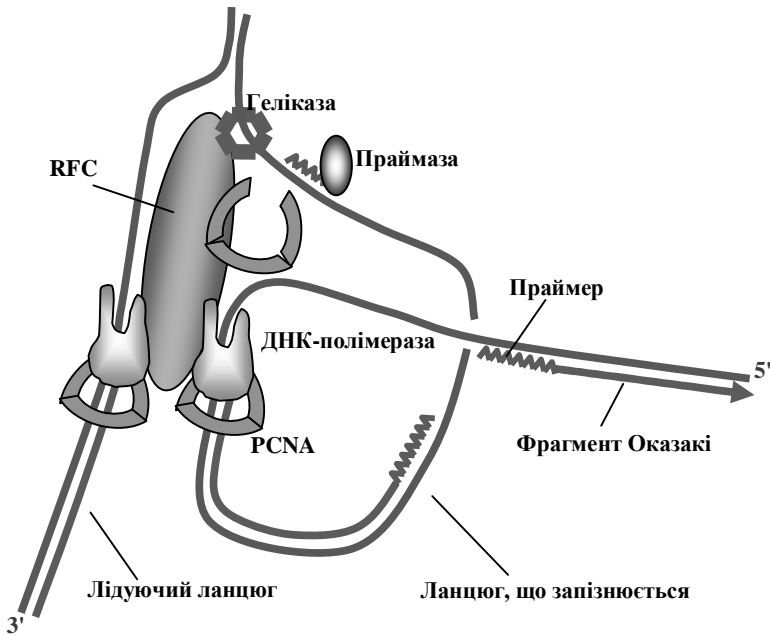


Рис. 5.25. Схема організації реплісоми.

Зрозуміло, що нуклеосоми є суттєвим бар'єром на шляху реплісоми. Попереду реплікативної вилки відбувається декомпактизація хроматинової фібрили й тимчасове видалення відносно легко взаємодіючого з ДНК гістону H1. Нуклеосоми руйнуються удва етапи (рис. 5.26): спочатку видаляється димер гістонів H2A-H2B, потім найміцніше зв'язаний із ДНК тетрамер (H3-H4)₂. Процес видалення гістонових комплексів забезпечується активністю комплексів ремодельовання хроматину і присутністю проміжних акцепторів гістонів – гістонових шаперонів. Такі шаперони зв'язують гістонові комплекси, що витісняються реплісомою, а потім виконують роль факторів збирання нуклеосом позаду реплікативної вилки.

До найбільш вивчених факторів збирання нуклеосом, що працюють під час реплікації, відносять: NAP1 (Nucleosome

Assembly Protein), що має підвищену спорідненість до димерів H2A-H2B; трьох-субодиничний комплекс CAF1 (Chromatin Assembly Factor) та білок ASF1 (Anti-Silencing Function) – споріднені до гістонів H3-H4 і PCNA, за рахунок чого вказані гістони (імовірно, у формі димерів H3-H4) спрямовуються до основи реплікативної вилки (рис. 5.26); RSF (Remodeling and Spacing Factor), який є проміжним акцептором гістонів, а також сприяє регулярному розподілу відновлених нуклеосом на ДНК. У сприянні такому рівномірному розподілу на дочірніх ланцюгах ДНК приймають участь також комплекси ремоделювання родини ISWI.

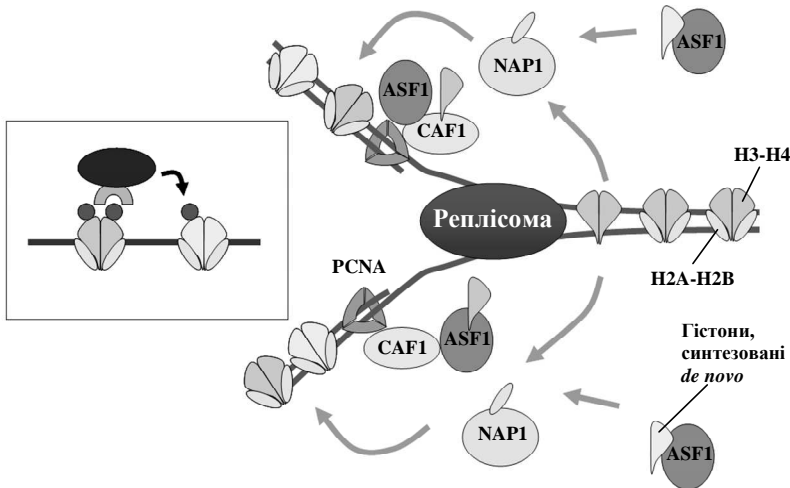


Рис. 5.26. Руйнування та відновлення нуклеосом у реплікативній вилці (синтезовані *de novo* гістони H2A-H2B не показано). На вставці: механізм відновлення хімічних модифікацій (кульки), що несуть батьківські гістони.

Відновлення нуклеосом позаду реплікативної вилки відбувається також у дві стадії: першим на ДНК повертається тетрамер $(H3-H4)_2$ (у вигляді двох димерів, що звільняються від

гістонових шаперонів), який зв'язує два димери H2A-H2B. По двох дочірніх ланцюгах ДНК гістонові комплекси розподіляються випадково, до них додаються гістони, синтезовані в цитоплазмі *de novo* під час реплікації. Ці нові гістони транспортуються до ядра у вигляді комплексів димерів H2A-H2B і H3-H4 з відповідними шаперонами. Таким чином, "старі" гістони, що несуть на собі певні характерні модифікації, повертаються на ту саму ділянку ДНК обох ланцюгів, на якій вони були присутні на материнській молекулі. До ділянок хроматину поза реплікативною вилкою рекрутуються відповідні ферменти, котрі здійснюють аналогічні модифікації щойно синтезованих гістонів, використовуючи "читаючі головки" (бромодомени, хромодомени тощо) – патерн модифікацій відновлюється, що сприяє збереженню певного функціонального стану ділянки хроматину в дочірніх клітинах. Принцип відновлення модифікацій на нових гістонах за допомогою батьківських в якості "матриць" зображено на вставці рис. 5.26 – саме такий механізм, який реалізується через білок HP1 у гетерохроматині розглядався у попередньому підрозділі. Відновлення патерну модифікацій гістонів стосується в першу чергу гістонів H3 та H4 (досить інтенсивний обмін димерами H2A-H2B між різними ділянками хроматину робить ці гістони значно менш важливими для епігенетичної спадковості).

Важливу роль інтеграції процесів відновлення нуклеосом та епігенетичних маркерів в процесі реплікації відіграє PCNA – крім гістонових шаперонів, він має спорідненість і до багатьох ферментів, що здійснюють модифікації гістонів. Аналогічно, саме PCNA рекрутує до реплікативної вилки ДНК-метилтрансферазу, яка відновлює патерн метилювання динуклеотидів CpG в ДНК (підпідрозд. 5.5.3).

Дуплікація надзвичайно великого еукаріотичного геному повинна відбутися в клітині, що готується до поділу, однократно і тільки однократно. Загальна система регуляції реплікації в еукаріотів залишається далекою від остаточного розуміння. Найважливішим для такого розуміння є питання про координацію роботи різних репліконів під час S-фази. Відомо,

що різні ділянки хроматину реплікуються не одночасно (виключення становлять дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, в клітинах яких реплікація ініціюється практично одночасно на чітко визначених ориджинах): існує певний "розклад" ініціації реплікації в різних репліконах, і S-фазу прийнято розділяти на ранню, середню і пізню стадії. На ранніх стадіях здійснюється реплікація еухроматинових зон, які активно транскрибуються, на пізніх – транскрипційно мовчазного гетерохроматину. При цьому ориджини "вмикаються" випадково – так, що часовий розподіл ініціації реплікації на різних ориджинах варіює від одного клітинного циклу до іншого.

Ориджини ранньої S-фази, з одного боку, розташовані в зонах, що активно транскрибуються, з іншого – характеризуються порівняно низької швидкістю ініціації реплікації. Випадковий характер вмикання ориджинів залишається і на пізніх стадіях, але ефективність ініціації значно зростає – напевно, за рахунок підвищення концентрації факторів ініціації реплікації, які звільняються від ориджинів, де ініціація вже відбулась. При цьому ймовірність ініціації є підвищеною на ориджинах, сусідніх до реплікона, де вже відбувається синтез ДНК.

Ці факти укладаються в модель, згідно якої реплікація відбувається за "принципом доміно" (рис. 5.27). Важливим фактором визначення ранніх ориджинів є, напевно, "відкрита" структура хроматину в ділянках, що активно транскрибуються: це сприяє ефективному зв'язуванню в таких ділянках і факторів транскрипції, і факторів ініціації реплікації. Реплікація, що відбувається в кількох таких ранніх репліконах, індукує ініціацію реплікації на сусідніх ориджинах – принаймні один із факторів такого впливу може полягати в підвищенні структурної динаміки хроматину на ділянках, що фланкують активний реплікон. У результаті ориджини стають більш доступними, там також розпочинається реплікація, а це, в свою чергу, індукує ініціацію на сусідніх ділянках: процес продовжується лавиноподібно (із підвищенням ефективності ініціації) і виключає наявність прогалин, які б залишились нереплікованими.

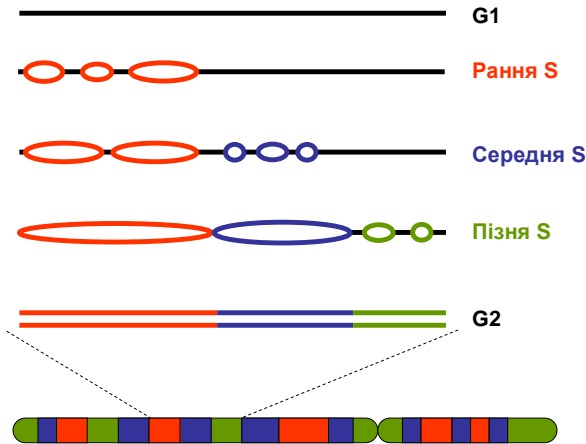


Рис. 5.27. Процес реплікації на ділянці хромосоми за принципом доміно. Адаптовано з Chagin *et al.* (2010).

Після закінчення реплікації дві дочірні хромосоми, які зберігають контакт між собою за допомогою особливих білкових комплексів, що завантажуються на материнську хромосому ще до реплікації (розділ 7), розпочинають підготовку до фінальної стадії клітинного циклу: відбувається надкомпактизація хромосом з метою забезпечити їхню ефективну сегрегацію – розходження до дочірніх клітин. Механізми цих процесів розглядаються у двох наступних розділах.

Рекомендована література

Загальна

Berger, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription // *Nature*. – 2007. – Vol. 447. – P. 407-412.

Fuda1, N.J., Ardehali, M.B., Lis, J.T. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo* // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – P. 186-192.

Li, B., Carey, M., Workman, J.L. The role of chromatin during transcription // *Cell*. – 2007. – Vol. 128. – P. 707-719.

Rando, O.J., Chang, H.Y. Genome-wide views of chromatin structure // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 245-271.

Транскрипція та її регуляція

Boeger, H., Bushnell, D.A., Davis, R. et al. Structural basis of eukaryotic gene transcription // *FEBS Letters*. – 2005. – Vol. 579. – P. 899–903.

Carter, D.R.F., Eskiw, C., Cook, P.R. Transcription factories // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36. – P. 585–589.

Chakalova, L., Fraser, P. Organization of transcription // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2(9). – a000729.

Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S. et al. Structure of eukaryotic RNA polymerases // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – Vol. 37. – P. 337-352.

Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turrís et al. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 14. – P. 796-806.

Darzacq, X., Yao, J., Larson, D.R. et al. Imaging transcription in living cells // *Annu. Rev. Biophys.* – 2009. – Vol. 38. – P.173–196.

David, L., Huber, W., Granovskaia, M. et al. A high-resolution map of transcription in the yeast genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 5320–5325.

Gaszner, M., Felsenfeld, G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms // *Nat. Rev. Genetics*. – 2006. – Vol. 7. – P. 703–713.

Gerstein, M.B., et al. Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE Project // *Science*. – 2010. – Vol. 330. – P. 1775-1787.

Ghildiyal, M., Zamore, P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 94-108.

Heintzman, N.D., Ren, B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2007. – Vol. 64. – P. 386–400.

Kim, H.D., O'Shea, E.K. A quantitative model of transcription factor-activated gene expression // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 15. – P. 1192-1198.

Kornberg, R.D. Mediator and the mechanism of transcriptional activation // *Trends Biochem. Sci.* – 2005. – Vol. 30. P. 235-239.

Neil H., Malabat, C., d'Aubenton-Carafa, Y. et al. Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – P. 1038–1042.

Panne, D. The enhanceosome // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 236-242.

The ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project // *Nature.* – 2007. – Vol. 447. – 799–816.

The FANTOM Consortium and RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group. The transcriptional landscape of the mammalian genome // *Science.* – 2005. – Vol. 309. – P. 1559–1563.

The modENCODE Consortium. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE // *Science.* – 2010. – Vol. 330. – P. 1787-1797.

Tilgner, H., Guigó, R. From chromatin to splicing. RNA-processing as a total artwork // *Epigenetics.* – 2010. – Vol. 5. – P. 180-184.

Visel, A., Rubin, E.M., Pennacchio, L.A. Genomic views of distant-acting enhancers // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – P. 199-205.

Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., et al. Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – P. 1033–1037.

Структурні зміни в хроматині при транскрипції

Boeger, H., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D. Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. – P. 716-726.

Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., Kornberg, R.D. Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter // *Mol. Cell.* – 2003. – Vol. 11. – P. 1587-1598.

Bryant, G.O., Prabhu, V., Floer, M., et al. Activator control of nucleosome occupancy in activation and repression of transcription // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6(12). – e317.

Cairns, B.R. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – P. 193-198.

Jiang, C., Pugh, B.F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 161-172.

Mao, C., Brown, C.R., Falkovskaia, E., et al. Quantitative analysis of the transcription control mechanism // *Molecular Systems Biology.* – 2010. – Vol. 6. – e431.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome // *Cell.* – 2008. – Vol. 132. – P. 887-898.

Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., et al. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6(3). – e65.

Комплекси ремоделювання хроматину

Cairns, B.R. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 14. – 989-996.

Chaban, Y., Ezeokonkwo, C., Chung, W.-H., et al. Structure of a RSC–nucleosome complex and insights into chromatin remodeling // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 15. – P. 1272-1277.

Clapier, C.R., Cairns, B.R. The biology of chromatin remodeling complexes // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 273-304.

Lorch, Y., Maier-Davis, B., Kornberg, R.D. Mechanism of chromatin remodeling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 3458-3462.

Racki, L.R., Narlikar, G.J. ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2008. – Vol. 18. – P. 137-144.

Racki, L.R., Yang, J.G., Naber, N., Partensky, P.D., Acevedo, A., Purcell, T.J., Cooke, R., Cheng, Y., Narlikar, G.J. The chromatin

remodeller ACF acts as a dimeric motor to space nucleosomes // *Nature*. – 2009. – Vol. 462. – P. 1016-1021.

Rippe, K., Schrader, A., Riede, P., Strohner, R., Lehmann, E., Längst, G. DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 15635-15640.

Shukla, M.S., Syed, S.H., Montel, F., et al. Remosomes: RSC generated non-mobilized particles with approximately 180 bp DNA loosely associated with the histone octamer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107. – P. 1936-1941.

Елонгація транскрипції в хроматині

Belotserkovskaya, R., Reinberg, D. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2004. – Vol. 14. – P. 139-146.

Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., Bustamante, C. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II // *Science*. – 2009. – Vol. 325. – P. 626-628.

Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., et al. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell*. – 2002. – Vol. 9. – P. 541-552.

Mazurkiewicz, J., Kepert, J.F., Rippe, K. On the mechanism of nucleosome assembly by histone chaperone NAP1 // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 16462-16472.

Petes, S.J., Lis, J.T. Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci // *Cell*. – 2008. – Vol. 134. – P. 74-84.

Sims, R.J., Belotserkovskaya, R., Reinberg, D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it // *Genes Dev.* – 2004. – Vol. 18. – P. 2437-2468.

Studitsky, V.M., Walter, W., Kireeva, M. et al. Chromatin remodeling by RNA polymerases // *Trends Biochem. Sci.* – 2004. – Vol. 29. – P. 127-135.

Svejstrup, J.Q. Chromatin elongation factors // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – Vol. 12. – P. 156-161.

Weake, V.M., Workman, J.L. Clearing the way for unpaused polymerases // *Cell*. – 2008. – Vol. 134. – P. 16-18.

Гетерохроматин

Klose, R.J., Bird, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators // *Trends Biochem. Sci.* – 2006. – Vol. 31. – P. 89-97.

Maison, C., Almouzni, G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance // *Nature Rev.* – 2004. – Vol. 5. – P. 296–304.

Matzke, M.A., Birchler, J.A. RNAi-mediated pathways in the nucleus // *Nature Rev.* – 2004. – Vol. 6. – P. 24–35.

O'Sullivan, R.J., Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 171-181.

Probst, A.V., Dunleavy, E., Almouzni, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 192-206.

Rhodes, D., Fairall, L., Simonsson, T., Court, R., Chapman, L. Telomere architecture // *EMBO Rep.* – 2002. – Vol. 3. – P. 1139-1145.

Richards, E.J., Elgin, S.C.R. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects // *Cell*. – 2002. – Vol. 108. – P. 489–500.

Реплікація в хроматині

Akey, C.W., Luger K. Histone chaperones and nucleosome assembly // *Curr. Op. Struct. Biol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 6–14.

Aladjem, M.I. Replication in context: dynamic shownion of DNA replication patterns in metazoans // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 8. – P. 588-600.

Baker, T.A., Bell, S.P. Polymerases and the replisome: machines within machines // *Cell*. – 1998. – Vol. 92. –P. 295–305.

Cadore, J.C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., et al. Genomewide studies highlight indirect links between human replication origins

and gene regulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 15837-15842.

Chagin, V.O., Stear, J.H., Cardoso, M.C. Organization of DNA Replication // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2. – a000737.

Demeret, C., Vassetzky, Y., Méchali, M. Chromatin remodelling and DNA replication: from nucleosomes to loop domains // Oncogene.– 2001. – Vol. 20. – P. 3086–3093.

Donaldson, A.D. Shaping time: Chromatin structure and the DNA replication programme // Trends Genet. – 2005. – Vol. 21. P. 444-449.

Hamdan, S.M., Richardson, C.C. Motors, switches, and contacts in the replisome // Annu. Rev. Biochem. – 2009. – Vol. 78. – P. 205–243.

Hübscher, U., Maga, G., Spadari, S. Eukaryotic DNA polymerases // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – Vol. 71. – P. 133–163.

Розділ 6. Мітотична хромосома

Організація хроматину в інтерфазних ядрах клітин забезпечує вибірккову функціональну активність певних локусів в певні моменти часу. ДНК у складі мітотичної хромосоми, навпаки, не повинна виконувати жодних функцій – під час мітозу молекули ДНК лише розподіляються між дочірніми клітинами. Зрозуміло, що переміщення довгих хроматинових фібрил не може бути ефективним – рух таких фібрил, які займають значний об'єм у вигляді клубків, буде гальмуватись силами тертя. Відповідно, для забезпечення процесу сегрегації хромосом при клітинному поділі ступінь компактизації має бути якомога більшим – з метою мінімізувати загальну площу контакту хромосоми з оточуючим середовищем і, тим самим, максимально знизити сили тертя. Довжина мітотичної хромосоми у 10–20 тис разів менша відносно контурної довжини ДНК у її складі та у 10–50 разів – відносно інтерфазної хроматинової фібрили (виключенням є лише клітини дріжджів, що брунькуються (*S. cerevisiae*), для яких мітотична хромосома всього вдвічі компактніша за інтерфазну хроматинову фібрилу).

Важливо пам'ятати, що в результаті реплікації в S-фазі клітинного циклу утворюються дві ідентичні молекули ДНК і, відповідно, дві дочірні (сестринські) хромосоми, які з'єднані між собою за допомогою білкових *когезинових комплексів*. На цій стадії, а також в G2-фазі, що змінює S-фазу, та на двох перших стадіях мітозу – в *профазі* та *метафазі* – сестринські хромосоми часто називають *хроматидами*. Слід зауважити, що іноді для зручності (наприклад, при аналізі каріотипів, коли мова йде *тільки* про мітотичні хромосоми) цей комплекс сестринських хроматид називають *однією* хромосомою – у цій книзі ми будемо притримуватись визначення хромосоми, даного в першому розділі, і вважати сестринські хроматиди двома хромосомами. Утримання поруч однакових копій ДНК забезпечує можливість потім точно розділити їх та розвести по майбутнім новоутвореним клітинам. Під час першої стадії поділу – профазі – як раз і відбувається компактизація хромосом (та одночасне руйнування ядерної оболонки).

Дуже щільна упаковка ДНК в мітотичній хромосомі, велика кількість білків, що її забезпечують (значна частина яких досі залишаються не описаними), обмеженість методів мікроскопії як основного підходу для візуалізації хромосом – все це суттєво утруднює дослідження тонкої структурної організації мітотичної хромосоми. І хоча відкриття мітотичних хромосом припадає на кінець ХІХ століття, на сьогодні існують лише моделі організації надкомпактних мітотичних хромосом та гіпотези щодо механізмів компактизації ДНК в їх складі.

6.1. Білкові компоненти мітотичної хромосоми

Детальний білковий склад мітотичної хромосоми до сих пір не встановлений остаточно (загалом за останніми оцінками налічують більше 700 різноманітних білків), але головними структурними білковими компонентами є *ДНК-топоізомераза II* та білки *SMC (Structure Maintains of Chromosomes)*, які утворюють *конденсинові* та *когезинові* комплекси. Саме ці компоненти відіграють найважливішу роль: клітинні лінії, дефектні за цими білками, мають суттєві порушення в компактизації хромосом, їх морфології та сегрегації по дочірніх клітинах при поділі. Крім того, зрозуміло, що головною білковою складовою мітотичної хромосоми залишаються гістони (48% усіх хромосомних білків).

6.1.1. Модифікації гістонів, що супроводжують компактизацію хромосом. Гістони залишаються важливим фактором компактизації хромосоми і під час мітозу. В численних експериментах було встановлено, що клітини, збіднені на гістон Н1, утворюють мітотичні хромосоми, приблизно вдвічі довші та тонші, ніж у контрольних лініях. Такі дефектні хромосоми не здатні правильно розходитись до полюсів при клітинному поділі. Позбавлення хроматину корових гістонів призводить до повної неможливості утворення мітотичних хромосом.

Свідченням важливої ролі гістонів у конденсації мітотичних хромосом є також той факт, що певні хімічні модифікації цих

білків завжди пов'язані з початком компактизації ДНК. Проте, роль гістонових модифікацій залишається не до кінця зрозумілою.

Лінкерний гістон H1, який підтримує стабільність фібрили 30 нм в інтерфазному ядрі, виявляється гіперфосфорильованим в момент початку компактизації хромосом. Відповідальним за це фосфорилування є білковий комплекс, що називається MPF (Maturing/Metaphase Promoting Factor). До складу комплексу входять циклін В та циклін-залежна кіназа cdc2 (у ссавців частіше позначається як CDK1 – відноситься до класу ферментів, активність яких регулюється в клітинному циклі за допомогою білків *циклінів*, розділ 7). MPF присутній в клітині в неактивному стані до моменту входу клітини в мітоз або мейоз і активується під час ранньої профази. Залежна від стадії клітинного циклу специфічність активації MPF і те, що однією з мішеней його кіназної активності є гістон H1, свідчать про важливу роль фосфорилування H1 в ініціації компактизації хромосом.

Фосфорилування в період конденсації мітотичних хромосом характерне також і для гістона H3 – його здійснює кіназа Aurora B (один з важливих елементів системи регуляції клітинного поділу, який часто буде згадуватись в цьому та наступному розділах). Як і під час активації транскрипції, фосфатний залишок приєднується до Ser10. Мутаційний аналіз клітин війчастих інфузорій *Tetrahymena* показав, що заміна цього серину на аланін призводить до порушень в компактизації та сегрегації хромосом. Фосфорилування гістона H3 також спостерігається при індукції передчасної компактизації хромосом при додаванні інгібіторів фосфатаз. Зміни у модифікаціях спостерігаються також для гістонів H2A та H2B – на стадії метафази вони повністю втрачають убіквітинові залишки і знову убіквітинуються лише в наступному циклі.

Роль зміни у гістонових модифікаціях як тригера переходу хроматину в максимально конденсований стан, як вже зазначалося, залишається незрозумілою: експериментальні дані вказують на критичність певних модифікацій для одних організмів і їх необов'язковість для інших. Наприклад,

фосфорилування H3Ser10 є необхідним для конденсації хромосом у клітинах інфузорій і ніяк не впливає на ефективність цього процесу у дріжджів, що брунькуються. Прямий вплив незначних модифікацій гістонів на рівень компактизації хроматину є дуже мало ймовірним. Припускають, що фосфорильовані та деубіквітиновані форми гістонових білків підвищують спорідненість інших факторів компактизації, наприклад конденсинів (підпідрозд. 6.1.4), до хроматину.

6.1.2. Топоізомераза II еукаріотів складається з двох однакових субодиниць. Фермент зв'язується з двома ділянками ДНК, здійснює тимчасовий дволанцюговий розріз в одній з них та АТР-залежні структурні перебудови, унаслідок яких інша ділянка проштовхується крізь розріз (рис. 6.1). Після цього відновлюється цілісність ДНК у місці розрізу. Результатом такої операції є або релаксація надспіралізації (видалення надспіральних витків), або розділення двох топологічно зачеплених одна за одну двоспіральних молекул ДНК, або, навпаки – топологічне зачеплення двох молекул (утворення *катенани*) чи формування вузла в межах однієї молекули ДНК. У еукаріотів є дві ізоформи топоізомерази II – II α та II β . Під час мітозу лише топоізомераза II α присутня на хроматині (її зв'язок з хроматином при цьому дуже динамічний), в той час як топоізомераза II β локалізується в цитоплазмі.

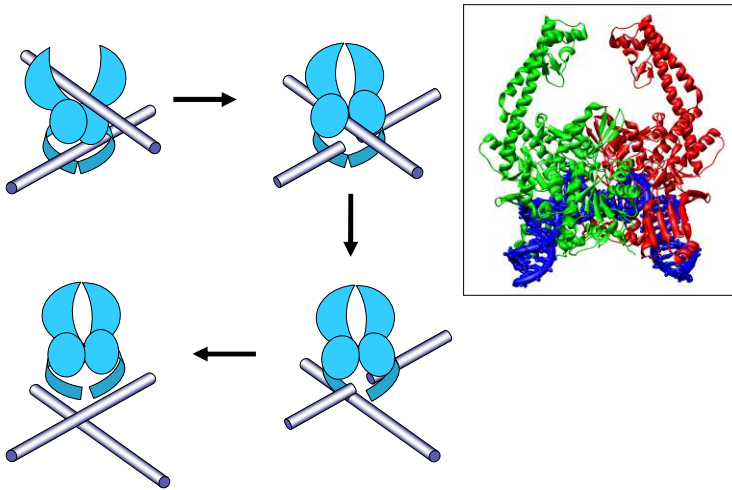


Рис. 6.1. Схема роботи топоізомерази II: дві симетричні половини ферменту – дві однакові субодиниці, у вигляді циліндрів зображено ділянки ДНК. На вставці: структура еукаріотичної топоізомерази II у комплексі з сегментом ДНК, в якому здійснюється дволанцюговий розріз (код PDB 2RGR).

На відміну від іншого важливого фактору компактизації – конденсинів, – топоізомераза II взаємодіє з хроматином не лише під час мітозу, а й в інтерфазі. В G1- та S-фазах клітинного циклу топоізомераза II розподілена на хроматині більш-менш рівномірно. Вона релаксує напругу в молекулі ДНК, яка виникає під час реплікації, та забезпечує розділення двох дочірніх молекул ДНК у точці зустрічі реплікативних вилок двох сусідніх репліконів. Під час мітозу топоізомераза II концентрується в аксіальній частині хромосоми, густина її зв'язування з ДНК дорівнює 1 молекулі на приблизно 20–50 тис пар основ. Слід підкреслити, що за нормальних умов клітини вступають в мітоз лише після подвоєння ДНК і це є критичним моментом у регуляції клітинного поділу. Ініціація конденсації хромосом *in vitro* без попереднього подвоєння ДНК не відбувається навіть у присутності активної топоізомерази II, а

сама топоізомераза не перерозподіляється по хроматину. Існує гіпотеза, що постійна асоціація топоізомерази з реплікативною вилкою, що рухається, створює передумови для перерозподілу ферменту на хроматині та утворення субхромосомних петельних структур.

Одним із факторів, що зумовлюють перерозподіл топоізомерази на хроматині та її локалізацію всередині хромосом може бути фосфорилування топоізомерази II, рівень якого в пізній G2-фазі збільшується в 6-10 разів у порівнянні з G1- та S-фазами. Фосфорилування відбувається в С-кінцевих доменах двох субодиниць, за що відповідає ряд ферментів. Основний з них – кazeїн-кіназа II – активується вже згаданою вище циклін-залежною мітотичною кіназою cdc2. Оскільки пік активності cdc2 припадає на момент, коли відбувається компактизація хромосом, вважається, що опосередковане нею фосфорилування топоізомерази II є необхідним для конденсації хроматину. Можливо, таке фосфорилування забезпечує взаємодію топоізомерази II з іншими факторами компактизації.

Кіназа cdc2 разом із цикліном В утворює стабільний комплекс з топоізомеразою II на мітотичній хромосомі в момент пізньої G2-фази та ранньої профазі і стимулює початкову конденсацію хромосом, фосфорилуючи інші білки, які приймають участь у компактизації, – зокрема, конденсини (наступний підпідрозділ) та гістон H1. Безпосередній контакт cdc2 з топоізомеразою II також впливає на взаємодію останньої з ДНК, що може спричинювати зміну сайтів її локалізації.

Оскільки топоізомераза II здатна впізнавати зони перехрещень ділянок ДНК та при цьому концентрується в аксіальній частині хромосоми, припускають, що цей фермент виконує структурну роль. Але добре встановлено, що в процесі конденсації мітотичних хромосом топоізомераза II приймає участь лише на початкових етапах – інгібування її активності під час ранньої профазі мітозу призводить до порушення процесу конденсації, в той час, як додавання інгібіторів в прометафазі суттєво не впливає на морфологію вже сконденсованих хромосом. Більше того, вилучення топоізомерази II в момент, коли мітотична хромосома утворена,

також не викликає видимих порушень архітектури хромосоми. Отже, топоізомераза II є необхідною для початку конденсації мітотичної хромосоми, але не для підтримання її структури впродовж клітинного поділу. Основною функцією топоізомерази II на початкових етапах конденсації хромосом може бути розділення сестринських хроматинових фібрил, які, ймовірно, переплітаються у процесі компактизації. З іншого боку, топоізомераза II здатна сприяти утворенню вузлів в межах однієї фібрили, забезпечуючи тим самим топологічні з'єднання між її віддаленими ділянками.

6.1.3. Білки SMC. В еукаріотичних організмів є шість типів білків SMC (SMC1–6), які відрізняються один від одного за амінокислотним складом, проте схожі за загальною організацією своїх структурних доменів. Ця група білків є дуже консервативною – клітини бактерій та археобактерій також містять білки SMC, щоправда одного типу, які утворюють гомодимери при взаємодії з бактеріальною хромосоною. В прокаріотичних клітинах комплекси білків SMC приймають участь в сегрегації реплікованих молекул ДНК (бактеріальних хромосом) по дочірніх клітинах.

Еукаріотичні білки SMC, в залежності від їхньої еволюційної спорідненості та типів гетеродимерів, що вони формують, розділяють на дві підгрупи. До першої відносять білки SMC1, 3, 5, до другої – SMC2, 4, 6. Димери SMC є високоспеціалізованими: гетеродимер SMC2-SMC4 є основою комплексів *конденсинів* – білків, що забезпечують компактизацію хромосом та підтримують їх структуру в мітозі та мейозі; димер SMC1-SMC3 є базовим у структурі *когезинів* – мультибілкових комплексів, які утримують разом сестринські хроматиди у мітозі (забезпечують їхню *когезію*); білки SMC5-SMC6 приймають участь у репарації ДНК. Незважаючи на різноманітність функцій, які виконують білки SMC в клітинах, вони мають загальну будову.

Всі шість типів молекул мають у своєму складі 4 структурні домени: глобулярні N-кінцевий та C-кінцевий домени, домен *coiled coil* (дві закручені одна навкруг одної довгі α -спіралі) та

шарнірний домен, що забезпечує поворот поліпептидного ланцюга на 180° (рис 6.2). У складі центрального шарнірного домену, який складається приблизно зі 150-200 амінокислотних залишків, консервативними і обов'язковими є 4 залишки гліцину (для деяких прокаріотів – 5 залишків) в межах загального консенсусу $G(X)_6G(X)_3GG$. Саме наявність гліцину зумовлює високу гнучкість молекули в даній ділянці – заміна гліцинів на тільки трохи більшу за розміром амінокислоту аланін призводить до повної дисфункції білків SMC та комплексів, що вони утворюють.

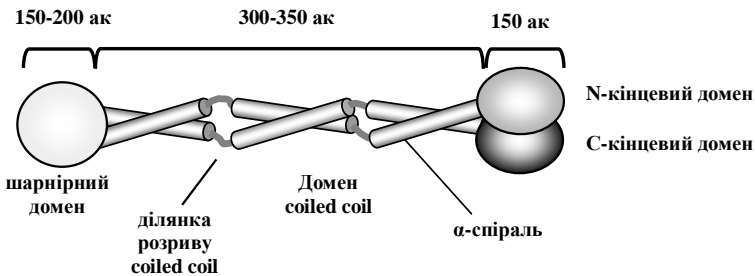


Рис. 6.2. Загальна схема структури білків SMC, ак – амінокислоти.

В один бік від шарнірного домену відходять довгі (300-350 амінокислотних залишків) ділянки ланцюга, що утворюють домен coiled coil – дві довгі, трохи закручені одна навкруг одної, α -спіралі. Ці α -спіралі в кількох місцях порушуються, формуючи так звані ділянки розриву структури coiled coil. Інакше кажучи, кілька спіралей в складі кожної половини домену coiled coil з'єднані між собою достатньо гнучкими перемичками поліпептидного ланцюга. Місця розташування таких ділянок (але не їх послідовності) є консервативними в межах підгруп SMC, що дає можливість припустити важливість цих гнучких з'єднань у функціонуванні молекули (див. наступні підпідрозділи).

Два глобулярні домени, розміщені на N- та С-кінцевих ділянках молекул SMC, містять приблизно по 150 амінокислотних залишків кожен. Численні експерименти

вказують на те, що С-кінцевий домен, на відміну від N-кінцевого, здатен взаємодіяти з ДНК, причому з підвищеною спорідненістю до АТ-збагачених ділянок, а також до двоспиральних шпильок та хрестоподібних структур. Аналіз амінокислотних послідовностей білків SMC виявив ще одну особливість С-кінцевого домену – наявність специфічного структурного мотиву (так званого С-мотиву), який є дуже консервативним елементом білків, що відносяться до родини АТРаз ABC (ATP-binding cassette). Крім того, С-мотив забезпечує взаємодію двох глобулярних кінцевих доменів білків SMC при зв'язуванні АТР. Структурна подібність SMC до АТРаз ABC виявляється і в наявності інших двох структурних елементів, які здатні зв'язувати нуклеотиди, – мотивів Walker A та Walker B у N-кінцевому та С-кінцевому доменах відповідно. За рахунок нуклеотид-зв'язувальних ділянок обидва домени ефективно взаємодіють з АТР, але самі по собі не мають здатності до її гідролізу. Активна АТРаза утворюється лише при безпосередньому контакті між двома кінцевими глобулярними доменами, що завжди спостерігається в комплексах когезинів та конденсинів. Аналогічну структуру має каталітичний домен АТРаз ABC, який складається N- та С-кінцевих субдоменів молекули. Як зазначено вище, просторова наближеність N- та С-кінцевих доменів SMC зумовлена гнучкістю шарнірного домену – поліпептидний ланцюг SMC укладається сам на себе, утворюючи антипаралельний тяж coiled coil (рис.6.2).

Таким чином, білки SMC належать до великої родини АТРаз ABC, роль яких в клітинах про- та еукаріотів доволі різноманітна: від забезпечення міжклітинного транспорту невеликих молекул (ABC-транспортери) до репарації двониткових розривів ДНК (прокаріотичний білок системи репарації Rad50), конденсації та сегрегації хромосом (конденсинові та когезинові комплекси) і інактивації статевих хромосом (білковий комплекс MIX-1–DPY-27 у *C. elegans*).

6.1.4. Конденсини. В складі мітотичної хромосоми існує два типи конденсаєнових комплексів – конденсаєни I та конденсаєни II. Обидві форми складаються з гетеродимеру SMC2-SMC4 та

трьох інших білків, які у хребетних мають назву CAP (chromosomes-associated polypeptides), і за якими розрізняються два типи конденсинів. Схему структури конденсинового комплексу наведено на рис 6.4.

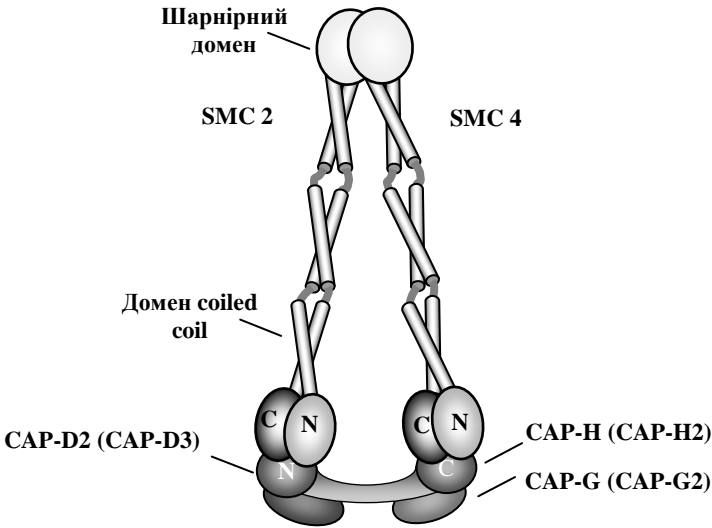


Рис. 6.3. Схема організації конденсинового комплексу у закритій структурній формі. У дужках – назви білків для конденсинів II типу, літери N та C позначають відповідні кінцеві домени білків.

Два білки SMC взаємодіють один з одним за допомогою своїх шарнірних доменів і ця взаємодія відбувається так, що доменні coiled coil двох субодиниць спрямовані в один бік. В пентамерному комплексі білок CAP-H (CAP-H2 для конденсинів II) – відноситься до родини так званих *клейзинів* – взаємодіє своїм N-кінцевим доменом з SMC2 та білками CAP-D2 (CAP-D3), а C-кінцевим – з білком CAP-G (CAP-G2) та SMC4. Таким чином, CAP-H замикає пентамерний комплекс. Результати атомно-силової та електронної мікроскопії конденсинових комплексів свідчать про те, що вони існують у двох структурних

формах – відкритій та закритій. У відкритій формі C/N-кінцеві домени білків SMC2 та SMC4 не взаємодіють один з одним (V-подібна форма), а у закритій – взаємодіють через CAP-H (як на рис. 6.3). Під електронним мікроскопом конденсиновий комплекс у закритій формі виглядає як "льодяник на паличці" (lollipop) – два плеча coiled coil взаємодіють між собою майже по всій довжині.

Крім відмін у складі білків CAP, конденсини I та II типів розрізняються за своєю локалізацією в клітині та характером взаємодії з хромосоною. Конденсини II є ядерними білками, але зв'язуються з хроматином лише в ранній профазі. В інтерфазі конденсини I розміщені в цитоплазмі і реєструються на хроматині лише після зникнення ядерної оболонки під час середньої або пізньої профазі. Починаючи з цього моменту, обидва типи конденсинів присутні в хромосомах впродовж мітозу і дисоціюють у телофазі (рис. 6.4). Клітинні лінії, нокаутні по генам білків CAP-D3 та CAP-G2, мають суттєво знижений рівень конденсації хромосом в ранній профазі, а лінії, дефектні по генам білків CAP-D2 та CAP-G, характеризуються нормальним ступенем конденсації хромосом на цьому етапі. Отже, конденсини II типу приймають участь у компактизації на її початкових стадіях, а конденсини I типу додатково стабілізують структуру хромосом в кінці профазі (рис. 6.4). На відміну від топоізомерази II, відсутність конденсинів в момент початку компактизації хромосом не призводить до драматичних змін в цьому процесі, проте спостерігаються значні дефекти в морфології мітотичних хромосом та порушення процесу сегрегації.

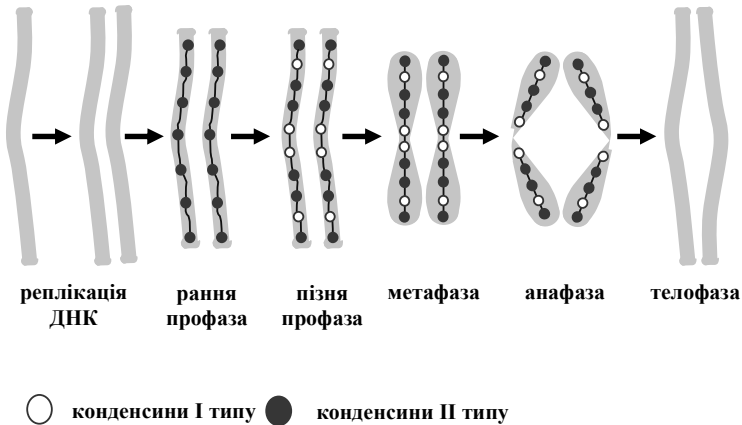


Рис. 6.4. Присутність конденсинів I та II типів на хроматині на різних стадіях клітинного циклу.

Здатність конденсинів взаємодіяти з хроматином залежить від патернів їхнього фосфорилування, які суттєво розрізняються в інтерфазі та під час мітозу. За специфічне для мітозу фосфорилування конденсинів I типу відповідають два ферменти – згадані вище циклін-залежна кінза *cdc2* та кінза *Aurora B*. Декілька невідомих кінз відповідають за фосфорилування конденсинів II типу. Після фосфорилування конденсини обох класів здатні взаємодіяти з хромосою, при цьому їх завантаження на хроматин забезпечують топоізомераза II та білок-супресор пухлин *Rb* для конденсинів II або білок АКАР 95 для конденсинів I. Конденсини II залишаються після зв'язування з хроматином нерухомими, а взаємодія конденсинів I є дуже динамічною – упродовж всього мітозу здійснюється швидкий обмін між зв'язаними з хромосою та дисоційованими конденсинами (середній час іммобілізації конденсинів I на хромосомі оцінюється в 4 хв).

Дослідження з використанням мічених антитіл, специфічних до конденсинів I та II, вказують на осьову локалізацію обох комплексів в межах хромосом. При цьому комплекси двох типів

чергуються вздовж осі і місця їхнього скупчення частково перекриваються. Крім того, конденсини II розміщені ближче до осі хромосоми, тоді як конденсини I – більш дифузно та трохи далі від осі. Така локалізація може бути зумовлена тим, що конденсини I завантажуються на хромосому пізніше і характеризуються високою мобільністю. Слід зауважити, що зони скупчень конденсинів та топоізомерази II також чергуються уздовж осі хромосоми.

Численні експерименти *in vitro* на плазмідних циркулярних ДНК показали, що конденсини взаємодіють з ДНК з високою кооперативністю та, у присутності АТР та топоізомерази I, вносять позитивну надспіралізацію у циркулярні молекули. Така їх активність підвищується при фосфорилуванні білків САР кіназою *cdc2*. Кооперативність зв'язування вказує на можливість утворення конденсинами великих міжмолекулярних комплексів при взаємодії з хроматином в процесі компактизації хромосом. Зв'язування з ДНК є більш ефективним у присутності АТР, а здатність індукувати позитивні надспіральні витки потребує її гідролізу. Вважають, що конденсини АТР-залежним шляхом закручують ділянку ДНК у праву суперспіраль, внаслідок чого в решті циркулярної молекули виникає негативна надспіралізація. Ця остання видаляється топоізомеразою I – у результаті кільце ДНК виявляється позитивно надспіралізованим після видалення конденсинів.

Як зазначалося вище, активна АТРаза конденсинового комплексу утворюється при безпосередньому контакті N- та С-кінцевих глобулярних доменів білків SMC. Оскільки при взаємодії з ДНК та при індукції надспіралізації конденсини утворюють закритий комплекс, вважається, що здатність до гідролізу АТР потребує просторового наближення глобулярних доменів різних білків SMC. Тригером переходу відкритої/закритої конформації є АТР: зв'язування двох молекул призводить до замикання комплексу, подальший гідроліз – до переходу у відкриту конформацію (рис. 6.5).

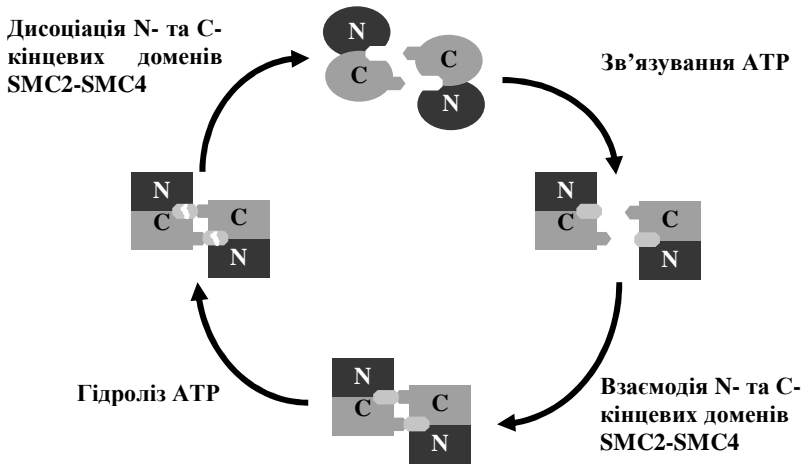


Рис. 6.5. Цикл зв'язування та гідролізу ATP в роботі конденсинів.

Мікроманіпуляції за допомогою магнітного пінцета з лінійними молекулами ДНК, зв'язаними з одним конденсиновим комплексом, дозволяють оцінити рівень компактизації ДНК, що ним забезпечується. З'ясувалося, що один конденсиновий комплекс створює два супервитки розміром 30 нм (~90 пар основ) кожен, таким чином компактизуючи ДНК на 60 нм (рис. 6.6). Ці оцінки співпадають з даними електронної мікроскопії, які демонструють, що один комплекс взаємодіє з ділянкою ДНК довжиною приблизно 65 нм.

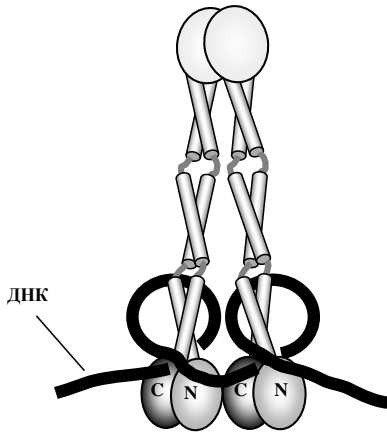


Рис. 6.6. Одна з можливих схем взаємодії конденсинового комплексу з двома позитивними надспіральними витками ДНК (для спрощення рисунка білки CAP не наведено).

Отже, як і топоізомераза II, конденсини здатні змінювати топологію циркулярних молекул ДНК. Яким чином ці два драйвери топологічного стану хроматину приймають участь у компактизації хромосом і як скоординована робота цих білків під час утворення мітотичної хромосоми? Відповіді на ці запитання суперечливі і мають здебільшого характер спорадичних експериментальних фактів, на основі яких можна зробити лише ряд припущень. Існують, зокрема, розбіжності у баченні того, навколо якого елементу білків SMC (домену coiled coil чи глобулярних доменів) формуються надспіральні витки, та залишається суперечливим питання, чи взаємодіють конденсини з хроматином у вигляді V-подібної чи замкненої конфігурації. Деякі можливі сценарії участі конденсинів у компактизації ДНК і підтриманні структури хромосоми розглядатимуться у наступних підрозділах. Але будь-які сценарії мають узгоджуватись з тим, що компактизація ДНК на ранніх стадіях мітозу забезпечується топоізомеразою II та конденсинами II типу. В кінці профазі, коли відбувається розрив ядерної оболонки, з хроматином взаємодіють цитоплазматичні

конденсини I типу, що призводить до додаткового ущільнення хромосоми.

6.1.5. Когезини. Основу когезинового комплексу складає гетеродимер білків SMC1 та SMC3, які мають структуру, характерну для інших білків родини SMC (див. рис. 6.2). Структура гетеродимера, у свою чергу, аналогічна структурі димера SMC2 та SMC4 у складі конденсинів. Крім білків SMC до складу когезинів входять також два інші білки – Scc1 та Scc3. У складі когезинового комплексу Scc1, що відноситься до родини клейзинів, зв'язується з обома типами білків SMC: своєю N-кінцевою частиною він взаємодіє з глобулярним доменом SMC3, а C-кінцевою – з глобулярним доменом SMC1 (рис. 6.7). Фактично, Scc1 у складі когезинів виконує роль, аналогічну такої білків CAP-H/CAP-H2 конденсинів. На відміну від конденсинів, когезиновий комплекс має під електронним мікроскопом форму замкненого чи відкритого кільця: взаємна орієнтація шарнірних доменів зумовлює розходження плечей coiled coil у різні боки, а при замиканні структури у межах плечей здійснюється кілька різких вигинів. Внутрішній діаметр такої кільцеподібної структури становить приблизно 50 нм. Цю структуру додатково стабілізує білок Scc3 (два його гомологи у ссавців позначаються також як SA1 та SA2 – до складу когезинового комплексу входить лише якийсь один з них). Чотири білки – SMC1, SMC3, Scc1 та Scc3 – є основою когезинів, проте, крім них до складу комплексу можуть входити й інші білки, функції яких остаточно не з'ясовані.

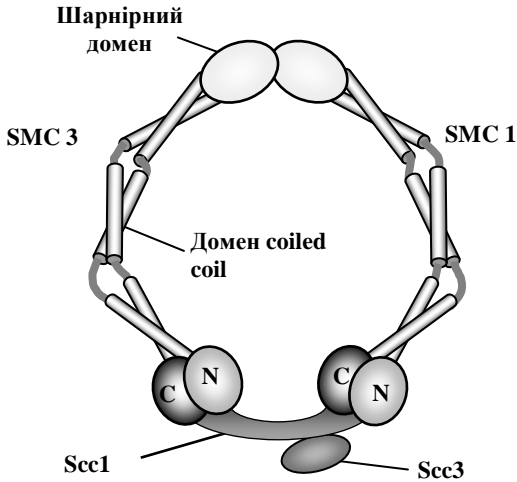


Рис. 6.7. Схема структури когезинового комплексу.

Численні експерименти як *in vitro*, так і *in vivo*, свідчать про низьку спорідненість когезинів до ДНК і підтверджують модель, згідно якої когезини оточують ДНК кільцем, утримуючи таким чином поруч дві сестринські хроматиди (рис. 6.8, *a*). В літературі також обговорюються й інші моделі, які, не заперечуючи кільцевої топологічної взаємодії когезинів з ДНК, передбачають димеризацію або олігомеризацію комплексів (рис. 6.8, *б, в*).

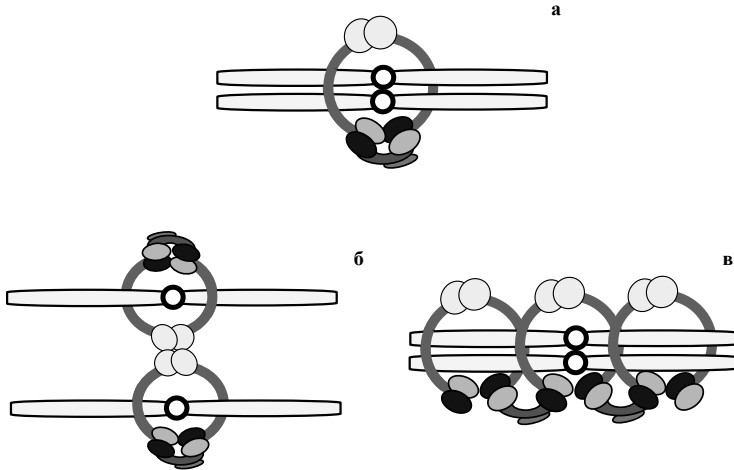


Рис. 6.8. Моделі взаємодії когезинів з ДНК: модель кільця (*a*), модель наручників (*б*), модель браслета (*в*).

У дріжджів, що брунькуються (*S. cerevisiae*), завантаження когезинів на ДНК розпочинається наприкінці G1-фази клітинного циклу, у той час як у хребетних вони наявні на хроматині вже у пізній телофазі в момент утворення ядерної оболонки (наприкінці попереднього циклу). Тобто, в обох випадках, реплікація ДНК відбувається у присутності когезинів: діаметр кільця, що утворюють когезинові комплекси, є достатнім для безперешкодного проходження машинерії реплікації. Посадка когезинів на хроматин здійснюється за допомогою комплексу білків Scc2 та Scc4, який взаємодіє як з ДНК, так і з когезинами. Припускають, що Scc2 та Scc4 стимулюють АТРАЗну активність N- та С-кінцевих глобулярних доменів білків SMC, що призводить до конформаційних перебудов комплексу. При цьому спостерігається часткове розкриття когезинів в межах шарнірних доменів білків SMC – між ними порушуються взаємодії. Подальше зв'язування АТР знову закриває комплекс, але вже після захоплення всередину молекули ДНК.

Когезини зв'язуються з хроматиною фібрилою по всій її довжині (сайт взаємодії займає ~800 пар основ ДНК) на відстані приблизно 10 тис. пар основ один від одного. Аналіз розташування когезинів на хроматині виявив, що вони зосереджені в основному в АТ-збагачених міжгенних районах (у дріжджів та ссавців), в транскрипційно активних ділянках та зонах ориджинів реплікації (у дрозофіли), а також можуть розміщуватися в інтронах (у людини). Доволі цікавим є той факт, що сайти розміщення когезинів можуть не співпадати з сайтами взаємодії з ДНК їх завантажувачів – білків Scc2 та Scc4. Припускають, що когезини зсуваються вздовж ДНК РНК-полімеразними комплексами під час транскрипції.

Надкомпактизація сестринських хроматид є несумісною з наявністю когезинових комплексів, що утримують ці хроматиди разом по усій довжині. Відповідно, у ранній профазі за рахунок дисоціації когезинових комплексів з плечей хромосом відбувається порушення зв'язку між хроматидами скрізь, крім центромерних зон – сестринські хромосоми, які продовжують компактизуватись, залишаються з'єднаними когезиновими комплексами тільки своїми центромерами.

Ключовими білками, що забезпечують звільнення когезинів з плечей хромосом, є дві кінази – Plk-1 та Aurora B. За рахунок активності Plk-1 у профазі спостерігається гіперфосфорилування білків Scc1 та Scc3, що зумовлює розкриття когезинів та їх дисоціацію з хроматину (рис. 6.9). В експериментах *in vitro* було показано, що кіназа Aurora B безпосередньо не модифікує жодної складової когезинів, проте її активність є необхідною для їхньої дисоціації. Припускають, що фосфорилування інших хромосомних білків-мішеней цією кіназою (зокрема, конденсинів I типу) опосередковано стимулює від'єднання когезинів. Отже, процес видалення когезинів тісно узгоджений із компактизацією хромосом у профазі.

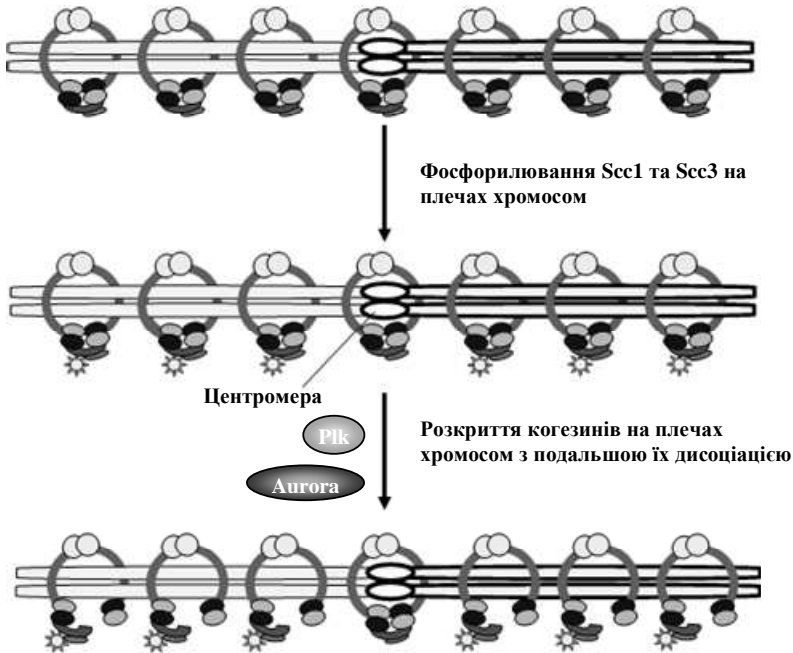


Рис. 6.9. Дисоціація когезинів з плечей хромосом. Зірочкою позначені залишки фосфорної кислоти.

Слід підкреслити, що при масованому видаленні когезинів у профазі вони, проте, не звільняються із центромерних районів, оскільки захищені в цих ділянках від деструктивної дії фосфорилування білком Sgo1. Цей білок специфічно локалізується лише в центромері і рекрутується туди гетерохроматиновим білком HP1 та деякими центромерними білками. Акумуляція Sgo1 в центромері забезпечує зв'язування з цією ділянкою протеїн-фосфатази 2A, яка відщеплює з когезинів приєднані кіназами фосфатні залишки, тим самим роблячи дисоціацію неможливою.

6.2. Іонні взаємодії у мітотичній хромосомі

Основною частиною хромосоми (приблизно третина маси) є високозаряджена молекула ДНК. Беручи до уваги сумарний заряд гістонів (загальна маса яких приблизно дорівнює масі ДНК), вони здатні нейтралізувати негативні заряди на фосфатних залишках приблизно на 50 % – загальний баланс заряду в хроматині залишається негативним. Решта фосфатних залишків нейтралізується негістоновими білками та, головним чином, неорганічними катіонами. При цьому ефективність електростатичних білково-нуклеїнових взаємодій суттєво залежить від концентрації неорганічних катіонів – знижується при зростанні іонної сили розчину. Тобто, необхідний для компактизації ДНК високий рівень нейтралізації її негативного заряду вимагає тонкого балансу нейтралізуючих агентів: концентрація неорганічних катіонів повинна бути достатньо високою, щоб забезпечити нейтралізацію, але при цьому достатньо низькою, щоб ефективність нейтралізації за рахунок білків також залишалась на високому рівні. Відповідно, електростатичні взаємодії та неорганічні катіони як їх модулятори (і важливі нейтралізатори негативного заряду ДНК) суттєво впливають на рівень конденсації і інтерфазного хроматину (підрозділ 4.2), і мітотичної хромосоми.

Результати дослідження розподілу неорганічних катіонів у клітині методами мас-спектрометрії 3D (так звана іонна мікроскопія) свідчать, що концентрація K^+ (як відомо, основний одновалентний катіон всередині клітини) є підвищеною в інтерфазному ядрі у порівнянні з цитоплазмою. З огляду на високий сумарний негативний заряд хроматину це є цілком очікуваним. Аналогічно розподілені по клітині іони Na^+ , загальна кількість яких є значно меншою. При переході клітини до мітозу перерозподілу одновалентних катіонів не спостерігається – обидва катіони залишаються асоційованими з мітотичними хромосомами.

Більш цікаво поведуть себе двохвалентні катіони. В інтерфазі Mg^{2+} і Ca^{2+} розподілені по клітині більш-менш рівномірно (концентруючись у певних компартментах), без особливої різниці між ядром та цитоплазмою. Загальна внутрішньоклітинна концентрація дорівнює ~ 2 мМ для Mg^{2+} і ~ 8

мМ для Ca^{2+} . В мітозі загальна концентрація Mg^{2+} не змінюється, а Ca^{2+} – знижується у $\sim 1,3$ рази. При цьому спостерігається суттєвий перерозподіл двохвалентних катіонів та підвищення рівня їхньої асоціації з хромосомами. Оцінки свідчать, що щільність зв'язування становить один іон Ca^{2+} на кожні 12–20 нуклеотидів ДНК і один іон Mg^{2+} на кожні 20–30 нуклеотидів. Якщо іони Mg^{2+} розподілені по мітотичній хромосомі більш-менш дифузно, Ca^{2+} концентрується в аксіальній частині – практично так само, як топоізомераза II та конденсини II. Відношення $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в аксіальній частині хромосоми оцінюється як 3:1.

Підвищення рівня асоціації двохвалентних катіонів з мітотичними хромосомами є, найімовірніше, просто неспецифічним наслідком підвищення рівня компактизації, тобто зростання локальної концентрації фосфатів ДНК. При цьому адсорбція катіонів на конденсованій ДНК, у свою чергу, приводить до суттєвої стабілізації компактного стану. Додаткове накопичення Ca^{2+} в аксіальній частині зумовлено присутністю там топоізомерази II – показана пряма взаємодія Ca^{2+} з цим ферментом. Важливо при цьому, що Ca^{2+} є інгібітором топоізомерази II, зупиняючи реакцію, зображену на рис. 6.1, на стадії дволанцюгового розриву. При співвідношенні 3:1 між Ca^{2+} та Mg^{2+} *in vitro* активність топоізомерази II повністю блокується: таким чином, накопичення Ca^{2+} в аксіальній частині хромосоми зумовлює вимикання активності топоізомерази II при високих рівнях компактизації. Можливо, це є засобом загальмувати активність (яка була необхідною на ранніх етапах компактизації) та "законсервувати" фермент до стадії декомпактизації, де така активність знадобиться знову (див. наступний підрозділ). З іншого боку, блокування каталітичної активності дозволяє припустити структурну роль топоізомерази II – інактивованій фермент перетворюється у ДНК-зв'язувальний білок, який фіксує перехрещені ділянки ДНК. Стає також цілком зрозумілою згадана у підрозд. 6.1.2 відсутність впливу інгібіторів топоізомерази II на морфологію хромосоми у пізній профазі – топоізомераза II і так є заінгібованою на цій стадії за рахунок іонів Ca^{2+} .

Видалення обох двохвалентних катіонів з мітотичної хромосоми хелатними сполуками призводить до її часткової деконденсації, а також до дисоціації значної частини топоізомерази II та конденсинів II. Підвищення концентрації Mg^{2+} у дослідах *in vitro* до 10 мМ, навпаки, викликає зростання рівня компактизації у порівнянні з нативним станом мітотичної хромосоми. У 100 мМ Mg^{2+} хромосома декомпактизується внаслідок послаблення ДНК-білкових електростатичних взаємодій.

Аналогічно, рівень компактизації хромосоми суттєво змінюється при змінах концентрації одновалентних катіонів *in vitro* (при цьому зміни морфології хромосоми є оборотними – відновлення фізіологічної концентрації солі повертає хромосому до вихідного стану). Найбільший рівень компактизації хромосоми спостерігається у розчинах з концентрацією одновалентних катіонів, близькою до фізіологічної (~100 мМ). Зниження концентрації викликає деконденсацію внаслідок зниження ступеня нейтралізації зарядів ДНК і, відповідно, зростання електростатичних сил розштовхування – аналогічний ефект є також добре відомим для інтерфазної хроматинової фібрили. Підвищення концентрації одновалентних катіонів також декомпактизує хромосому (у 400 мМ NaCl об'єм хромосоми, наприклад, тритона зростає у ~5 разів) за рахунок зниження ефективності білково-нуклеїнових електростатичних взаємодій. Всі зміни об'єму при змінах концентрації солі є ізотропними – довжина змінюється у стільки ж разів, що й товщина.

Важливо розуміти, що надкомпактний стан нативної мітотичної хромосоми зовсім не є *максимально можливим* компактним станом. Проста оцінка показує, що хроматинова фібрила діаметром 30 нм, до складу якої входить молекула ДНК довжиною 5 см, має об'єм ~0,5 мкм³ (за умови ступеня компактизації фібрили 11 нуклеосом на 11 нм довжини при нуклеосомному повторі 200 пар основ). Якщо б у мітотичній хромосомі реалізувалась щільна упаковка такої фібрили, хромосома повинна була б мати такий самий об'єм. Насправді середній об'єм мітотичної хромосоми є приблизно на порядок

вищим. Відповідно, додавання до хромосом *in vitro* тривалентних катіонів (ефективних нейтралізаторів зарядів ДНК) дозволяє знизити об'єм хромосоми втричі.

Отже, хроматинова фібрила в мітотичній хромосомі компактизована за рахунок доволі слабких ДНК-білкових електростатичних взаємодій, які можуть бути легко зруйновані шляхом змін іонного оточення. При цьому основна частина об'єму мітотичної хромосоми заповнена просто водою та розчиненими в ній неорганічними іонами. Інакше кажучи, хромосома являє собою об'єкт, який нагадує гель – полімерну сітку, пори якої заповнені розчинником. Таке уявлення повністю підтверджується експериментами по вивченню механічних властивостей мітотичних хромосом.

6.3. Механічні властивості мітотичної хромосоми

У дослідженнях механічних властивостей ізольовану хромосому жорстко фіксують обома кінцями за допомогою мікропіпеток і поступово розтягують, визначаючи ступінь поздовжньої деформації та величину розтягувальної сили, необхідної для такої деформації. З'ясувалося, що мітотична хромосома характеризується неабиякою еластичністю: вона легко повертається до своєї нормальної довжини навіть після п'ятикратного розтягування, а незворотна зміна структури хромосоми спостерігається лише при більш сильній її деформації. При розтягуванні в 10 і більше разів еластичність порушується: хромосоми зберігають збільшену довжину після зникнення розтягувальної сили, при цьому зростає також їхня товщина, що свідчить про декомпактизацію.

Рівень еластичності мітотичної хромосоми є суттєво вищим у порівнянні з таким молекул, з яких вона складається. Коефіцієнт поздовжньої пружності (сила, необхідна для збільшення довжини вдвічі) становить для мітотичної хромосоми в середньому ~500 пН (піконьютон; для індивідуальних хромосом має місце розподіл цієї величини від 200 до 2000 пН). Відповідний модуль Юнга (відношення коефіцієнта пружності до площі поперечного перетину), який, власне, і характеризує

еластичність того чи іншого матеріалу, дорівнює ~ 500 Па (паскаль, $1 \text{ Па} = 1 \text{ Н/м}^2$). Для порівняння: модуль Юнга агарозного геля становить $\sim 10^4$ Па, металів – $\sim 10^{10}$ Па. Подвійна спіраль ДНК має модуль Юнга $\sim 3 \cdot 10^8$ Па (величинами того ж порядку характеризуються глобулярні білки). Модуль Юнга хроматинової фібрили 30 нм дорівнює $\sim 10^4$ Па (якщо при розтягуванні фібрили порушується її компактний стан, але зберігається нуклеосомна структура) – це означає, що при застосуванні сили 500 пН фібрила як така практично не розтягується. Тобто, фібрила організована в мітотичній хромосомі у певні клубко-подібні структури, які швидко повертаються до вихідного стану при зникненні розтягувальної сили. При цьому еластичність нативної мітотичної хромосоми щодо вигину цілком узгоджується з наведеним вище рівнем еластичності щодо розтягування – це означає, що матеріал, з якого побудована хромосома, є достатньо гомогенним.

Отже, загалом поведінка хромосоми у відповідь на деформацію зовнішньою силою є цілком подібною до такої полімерних матеріалів. Найпростішою інтерпретацією цих результатів є те, що мітотична хромосома являє собою утворену хроматиновою фібрилою сітку, елементи якої знаходяться у стані клубка; у вузлах сітки знаходяться зшивки, що з'єднують вузли нековалентними взаємодіями (рис. 6.10). Найбільш імовірні кандидати на роль таких зшивок – конденсинові комплекси.

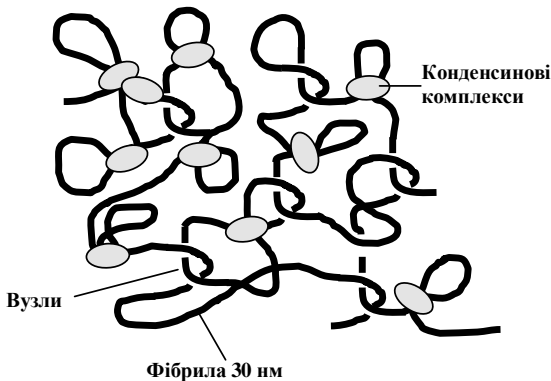


Рис. 6.10. Хроматинова сітка, скріплена конденсиновими комплексами та перехрещеннями (вузлами) хроматинової фібрили.

Така інтерпретація підтверджується рядом встановлених в експериментах по розтяганню хромосом закономірностей. Зокрема, значне зниження або навіть зникнення еластичності спостерігається при обробці хромосоми неспецифічними нуклеазами – цілісність хромосомної молекули ДНК є необхідною умовою для високої пластичності. При обробці рестриктазами зниження пластичності спостерігається в тому випадку, коли середня відстань між рестриктними сайтами є меншою порогової величини – 15 тис пар основ. Отже, середня відстань між зшивками по ланцюгу фібрили становить приблизно 15 тис пар основ, що приблизно співпадає зі щільністю розміщення конденсинів на хроматині.

М'яка обробка хромосоми протеазами призводить до часткової деконденсації та зниження жорсткості (константа пружності зменшується на 20–50 %), але еластичність не зникає повністю. Роль нечутливих до протеаз додаткових скріплюючих елементів можуть відігравати перехрещення (вузли) між ділянками ДНК – топологічні зшивки (рис. 6.10). Підтвердженням важливої ролі таких перехрещень є результати експериментів, в яких мітотичну хромосому обробляли *in vitro* надлишком топоізомерази II у присутності АТР. В результаті такої обробки жорсткість хромосоми щодо розтягання знижується на 35 %, і цей ефект не спостерігається у відсутності АТР. Додавання АТР до нативної хромосоми також призводить до релаксації, хоча й значно меншої: напевно, відбувається часткова активація ендогенної топоізомерази II, інактивованої іонами Ca^{2+} всередині хромосоми. Обробка хромосоми топоізомеразою I, здатною тільки знімати надспіралізацію внаслідок внесення тимчасових одноланцюгових розривів, призводить до лише незначного зниження жорсткості. Тобто, вплив активності топоізомерази II на еластичні властивості хромосоми пояснюється не просто релаксацією надспіралізації, а розділенням топологічних зшивок між ділянками ДНК.

Отже, топологічні зшивки, "заморожені" завдяки інактивації топоізомерази II іонами Ca^{2+} , дають суттєвий внесок у стабілізацію хроматинової сітки всередині мітотичної хромосоми. У процесі декомпактизації хромосом наприкінці мітозу ці зшивки мають бути розділені – зрозуміло, що це залежить від топоізомерази II, яка знову стає активною після дисоціації Ca^{2+} .

Слід зауважити, що описані вище закономірності базуються, в основному, на результатах, отриманих групою Марко (John Marko) на хромосомах, виділених з клітин тритона (ці хромосоми відрізняються досить великим розміром, що робить їх зручним об'єктом мікромеханічних досліджень). Основні висновки, зроблені цією групою, підтверджуються також ранніми дослідженнями мікромеханіки мейотичних хромосом всередині клітин коника. Групою Дімітрова (Stefan Dimitrov) проведено аналогічні мікромеханічні дослідження на хромосомах, реконструйованих у екстрактах яйцеклітин шпроцевої жаби *Xenopus laevis*. Ці хромосоми, як і хромосоми тритона, характеризуються модулем Юнга ~ 1000 Па, але відрізняються значно вищою гнучкістю (зниженою жорсткістю щодо вигину). Це означає, що хромосоми не є гомогенними: результати механічних досліджень свідчать про наявність всередині цих хромосом достатньо тонких та більш жорстких структур, побудованих з конденсинових комплексів, оточених "м'якою" хроматиновою сіткою. Цілком можливо, що мітотичні хромосоми ембріональних клітин, які швидко діляться, проходячи через порівняно короткі клітинні цикли (яйцеклітини *Xenopus*), відрізняються певною "недокомпактизованістю" у порівнянні з хромосомами звичайних соматичних клітин.

У будь-якому разі, уявлення про мітотичну хромосому як хроматинову сітку, відображаючи суттєві риси внутрішньої організації хромосоми, є при цьому дещо спрощеним. Головна добре відома риса організації хромосоми, яку не пояснює проста модель сітки, – аксіальне розміщення конденсинів та топоізомерази II у хромосомі.

6.4. Моделі структури мітотичної хромосоми

Найбільш розповсюдженим поглядом на структуру мітотичної хромосоми, який, в основному, базується на результатах електронної мікроскопії, була до останніх років класична *модель радіальних петель, закріплених на скефолді* (radial loops and scaffold model). Термін "*скефолд*" – білковий осьовий остов мітотичної хромосоми – був запропонований наприкінці 1970-х років Леммлі (Ulrich Laemmli) на підставі спостережень, що після видалення з хромосом гістонів та більшості інших білків (наприклад, у високосольових розчинах) ДНК утворює гало, випетлюючись із електроннощільної осьової структури діаметром приблизно 200 нм (рис. 6.11). Ця структура зберігає характерну X- або V-подібну морфологію пари сестринських мітотичних хромосом. Основи петель, закріплені на цьому хромосомному "скелеті" (які зберігають такий зв'язок навіть після обробки концентрованими розчинами солі), отримали назву скефолд-асоційованих ділянок (SARs – Scaffold Associated Regions).

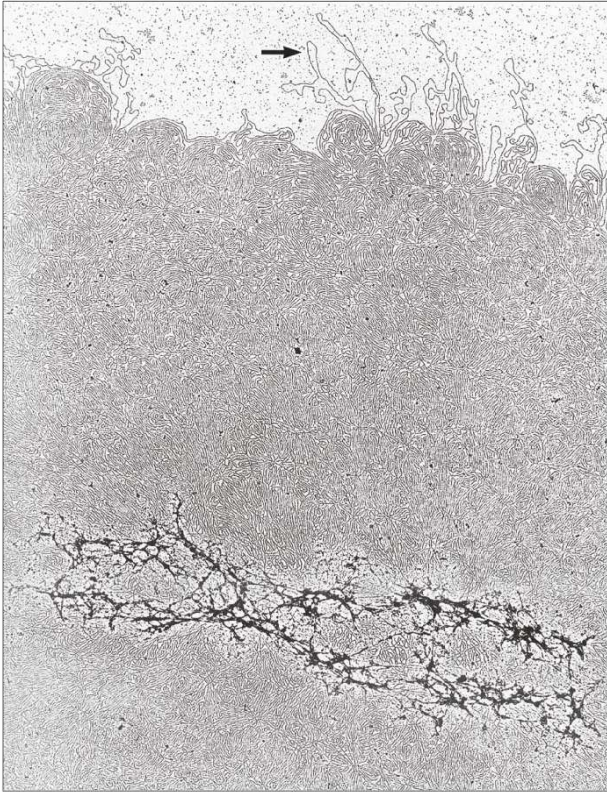


Рис. 6.11. Електронна мікрофотографія хромосоми після видалення гістонів високосольовим розчином. Репродуковано з роботи Paulson, Laemmli (1977) з дозволу

Уявлення про осьову скелетну основу мітотичної хромосоми відіграло важливу роль своєрідного змістовного "скефолду" – стрижня, навкруг якого вибудовувались дослідження структури мітотичної хромосоми в останні десятиліття. Це уявлення зберігає свою популярність і сьогодні, хоча його вже не можна назвати загальноприйнятим – не виключено, що суцільний скефолд виникає як артефакт унаслідок процедур обробки хромосоми при видаленні гістонів або фіксації препаратів. Слід

відразу зауважити, що скефолд на рис. 6.11 не є насправді монолітним.

Згідно моделі радіальних петель та її модифікації – *моделі спірально закручених радіальних петель* (helical coiling of radial loops model), – хромосома являє собою зібрані разом та компактизовані петлі хроматинової фібрили 30 нм, основи яких зафіксовані на білках скефолду. Скефолд при цьому є жорсткою скелетною основою хромосоми і формує її вісь (рис. 6.12). В ранніх дослідженнях було з'ясовано, що мажорними компонентами скефолду є два білки, позначені як Sc I та Sc II. Пізніше виявилось, що перший з них – це ДНК-топоізомераза II α , а другий – SMC2. Тобто, скефолд складається, в основному, з топоізомерази II та конденсинових комплексів, що добре узгоджується з аксіальним розміщенням цих білків у мітотичній хромосомі.

Згідно "осьових" моделей, хроматинова фібрила взаємодіє зі скефолдом у межах АТ-збагачених скефолд-асоційованих ділянок ДНК (SARs). Хроматинові петлі або просто радіально відходять від центральної білкової осі (у моделі радіальних петель), або (у моделі спірально закручених радіальних петель) скефолд разом з прикріпленими до нього петельними доменами спірально закручується, утворюючи більш складно організовану просторову структуру типу соленоїда (рис. 6.12). Оскільки петельні домени присутні також і в інтерфазному хроматині (підрозділ 4.3), згідно моделі радіальних петель компактизація хромосом супроводжується реорганізацією петельних доменів інтерфазного ядра з утворенням осьової білкової структури – скефолду, який є перебудованим ядерним матриксом і слугує структурною платформою для організації мітотичної хромосоми.

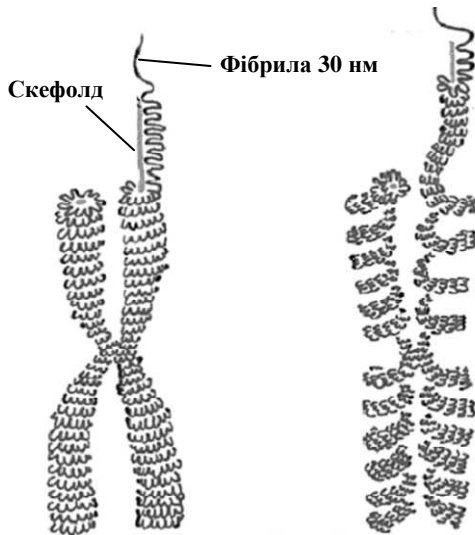


Рис. 6.12. Схематичне зображення структури мітотичних хромосом згідно моделі радіальних петель, закріплених на скефолді (ліворуч) та її модифікації – моделі спірально закручених радіальних петель (праворуч). Репродуковано з роботи Ushiki *et al.* (2002) з дозволу

Модель радіальних петель, закріплених на скефолді, базується в основному на дослідженнях структури хромосом на фіксованих препаратах. А такий підхід не дає можливості дослідити процес компактизації хромосом у динаміці, він дозволяє лише бачити окремі часові "зрізи" структури. Сучасні методи візуалізації клітин без фіксації препаратів дали змогу досліджувати процеси компактизації/декомпактизації хромосом у реальному часі. Дані таких спостережень свідчать, що перехід від інтерфазного хроматину до мітотичної хромосоми і навпаки відбувається у декілька етапів з утворенням проміжних структур різного рівня компактизації. Ці результати привели до появи **ієрархічних моделей** ультраструктури мітотичної хромосоми (hierarchical models).

В межах ієрархічного підходу існують два принципово різні погляди на організацію хромосом. Перший варіант передбачає, що під час ранньої профазі фібрила 30 нм, спіральсно закручуючись, утворює соленоїд спочатку діаметром 100–150 нм, подальше ущільнення якого призводить до появи фібрил діаметром 200–300 нм і далі, під час середньої та пізньої профазі, цей діаметр збільшується майже вдвічі і становить 500–750 нм, що відповідає діаметру мітотичної хромосоми (рис. 6.13).

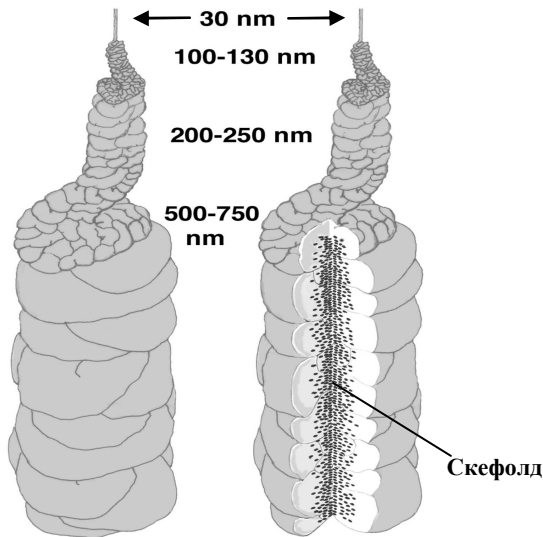


Рис. 6.13. Схематичне зображення структури хромосоми згідно однієї з ієрархічних моделей. Репродуковано з роботи Kireeva *et al.* (2004).

На відміну від моделі радіальних петель, закріплених на скефолді, така ієрархічна модель заперечує необхідність утворення осевого скелету хромосоми як основи, навкруг якої здійснюється компактизація хроматину. Скефолд згідно цих уявлень утворюється наприкінці конденсації в пізній профазі: на

користь цього свідчить аналіз розподілу SMC2 та топоізомерази II у хроматині – осьова локалізація обох білків у хромосомі спостерігається лише в середній та пізній профазі (хоча, слід звернути увагу на те, що результати по розміщенню цих двох білків доволі суперечливі в різних експериментах). Таким чином, даний варіант ієрархічної моделі передбачає наявність додаткових факторів (інших білків?), що ініціюють компактизацію хромосом. Проте, кінцевий стан у цій моделі є схожим на такий у моделі радіальних петель у тому відношенні, що обидві моделі постулюють наявність скефолду, який стабілізує і підтримує структуру мітотичної хромосоми.

Ієрархічна модель другого типу є, знову, варіацією моделі радіальних петель. Вона базується на тих спостереженнях, що на перших стадіях компактизації формуються дискретні "глобули" діаметром ~100 нм – *хромомери*, які містять петлі хроматину. Модель передбачає, що хроматинова фібрила 30 нм спочатку утворює розеткові структури (хромомери), які складаються з петельних доменів, зібраних до купи. В процесі компактизації кількість петель у розетках та кількість самих розеток поступово зростає, а ядерний матрикс, до якого приєднані петлі, реорганізується у скефолд мітотичної хромосоми (рис. 6.14). Початок компактизації хромосом, зумовлений активністю топоізомерази II, представляється в цій моделі як об'єднання окремих хроматинових петель у хромомери, закріплені на "первинному" скефолді. Ущільнення такої структури забезпечується конденсинами обох типів в процесі профазі.

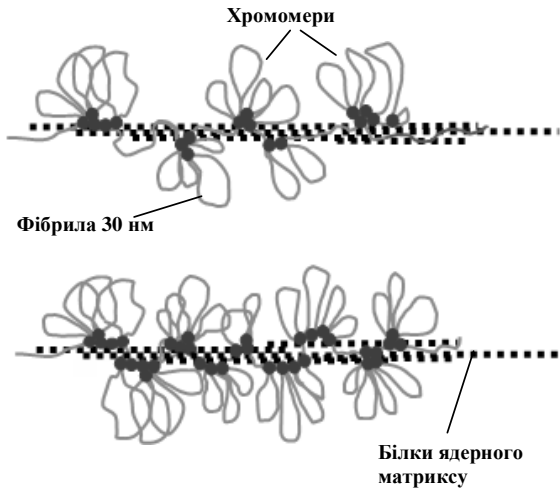


Рис. 6.13. Початкові етапи компактизації хромосоми згідно хромомерної моделі.

Розглянуті моделі структури мітотичної хромосоми мають спільну рису – вони передбачають наявність суцільної скелетної основи, побудованої з конденсинів та топоізомерази II. Ці моделі добре пояснюють випетлювання ДНК після видалення гістонів і аксіальне розміщення конденсинів та топоізомерази II. Але всі ці моделі є абсолютно несумісними з описаними у попередньому підрозділі даними про високу еластичність хромосоми: суцільна осьова білкова структура не може бути розтягнутою в 5 разів та повернутись до вихідного стану після зникнення розтягувальної сили.

Натомість, як зазначено у попередньому підрозділі, результати дослідження мікромеханіки хромосом привели до формулювання *моделі хроматинової сітки* (chromatin network model). Згідно цієї моделі білки хромосомного скефолду не утворюють суцільного скелету всередині хромосоми – окремі білкові елементи (найімовірніше, конденсини) скріплюють (прошивають) сітку, що формується хроматиною фібрилою (рис. 6.10). Модель сітки цілком узгоджується із визволенням петель ДНК після видалення гістонів (рис. 6.11) – після такого

визволення всередині хромосоми залишаються окремі блоки (конденсинові зшивки основ петель), які сприймаються під електронним мікроскопом як скефолд. Такий "дискретний скефолд" зовсім не обов'язково формує суцільну монолітну структуру (власне, така дискретність цілком узгоджується з зображенням, наведеним на рис. 6.11). Але велика кількість даних свідчить також і про те, що білкові зшивки, які скріплюють сітку, мають бути зосереджені, в основному, в аксіальній частині хромосоми. Одна із спроб інтегрувати дані, отримані за допомогою різних підходів, представлена у моделі на рис. 6.14.

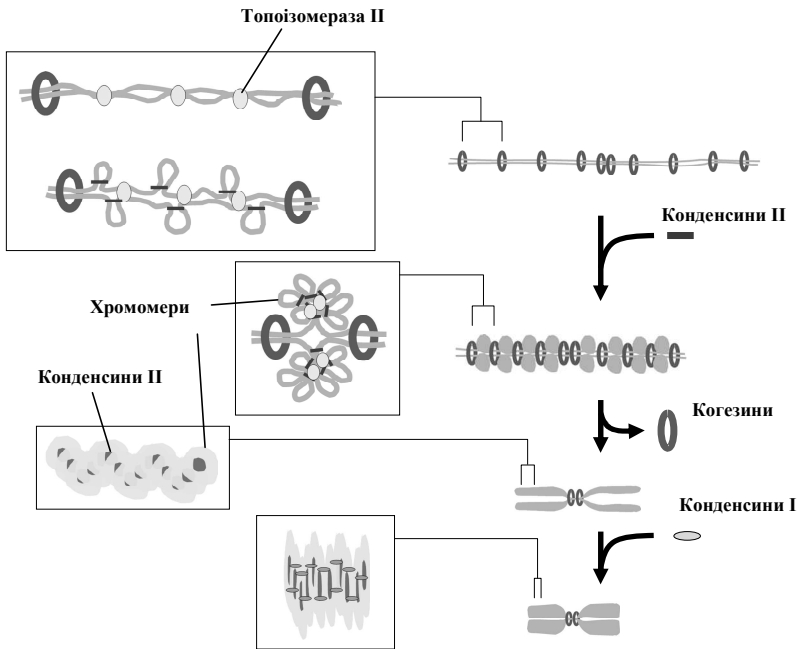


Рис. 6.14. Схема послідовних стадій компактизації мітотичної хромосоми (пояснення в тексті). Адаптовано з Marko (2008).

Загальний сценарій компактизації хромосоми виглядає, згідно цієї моделі, наступним чином. Після реплікації сестринські хроматиди у вигляді хроматинових фібрил з'єднані

між собою когезиновими комплексами по всій довжині зі щільністю 1 комплекс на ~10 тис пар основ. На фібрилах присутня також топоізомераза II, активність якої є необхідною для роз'єднання сестринських хроматид після реплікації. На початку профазі, після фосфорилування конденсинів II, вони зв'язуються з фібрилами та індукують формування надспіральних витків. Поява перехрещень ДНК змушує топоізомеразу II впізнавати ці перехрещення і, ймовірно, індукувати утворення вузлів в межах однієї фібрили та розділяти переплетені сестринські хроматиди. Частина міжхроматидних зачеплень при цьому, напевно, залишається – відомо, що активність топоізомерази II є необхідною на перших етапах розходження хромосом при мітозі (розділ 7). Результатом сумісної активності конденсинів II та топоізомерази II є накопичення петель, які об'єднуються у розеткові структури – хромомери, обмежені когезиновими комплексами. Власне, поява хромомерів є просто наслідком наявності когезинів, що чергуються по ланцюгу і створюють перешкоди для компактизації там, де вони знаходяться. Об'єднання петель у розетки також обумовлено обмеженістю простору для компактизації, а конденсини та топоізомераза II, які взаємодіють, головним чином, з основами петель (з перехрещеннями), автоматично опиняються всередині розетки (і потім залишаються всередині хромосоми). Можна сказати, що когезини, таким чином, каналізують хаотичний процес утворення хроматинової сітки у певному напрямі.

Продовження компактизації після утворення хромомерів є несумісним з наявністю когезинових комплексів – відбувається їх масоване видалення. Після зняття когезинових обмежень хромомери набувають змоги взаємодіяти між собою, утворюючи більш компактну структуру. При таких взаємодіях утворюються додаткові зшивки та перехрещення ділянок ДНК. На такі перехрещення рекрутується топоізомераза II, яка, таким чином, частково виштовхується із хромомерів, що призводить до чергування скупчень конденсинів та топоізомерази II уздовж хромосоми. Продовження компактизації не відбувається тільки там, де залишаються когезини – в зоні центример, які після

закінчення компактизації хромосоми зберігають порівняно невеликий рівень компактності, що й надає їм вигляд перетяжок.

Після зникнення ядерної оболонки з хромосоною починають динамічно взаємодіяти конденсини I, які ще більше підсилюють ступінь компактизації, утворюючи динамічні білкові зшивки. Одночасно з конденсиновими зшивками, за рахунок активності топоізомерази II формуються топологічні зшивки – вузли, які суттєво стабілізують компактний стан. Одночасно з підвищенням рівня компактизації з хромосоною взаємодіють двохвалентні катіони, і ця взаємодія ще більше сприяє стабілізації компактного стану хромосоми. При цьому іони Ca^{2+} , інактивуючи топоізомеразу II, фіксують зроблені нею топологічні зшивки. Цілком можливо також, що конденсини, які здатні взаємодіяти між собою, можуть утворювати динамічні тимчасові комплекси – своєрідні елементи скелетних структур. Прикладом хромосом, де, ймовірно, наявні такі структури, є згадані в попередньому підрозділі хромосоми яйцеклітин *Xenopus*.

Наприкінці мітозу відбувається дисоціація конденсинів, яка ініціює процес декомпактизації хромосом. Руйнування хроматинової сітки сприяє дисоціації двохвалентних катіонів та активації топоізомерази II, яка розділює топологічні зшивки, забезпечуючи остаточну декомпактизацію.

Отже, на сьогодні можна сформулювати наступні твердження щодо структурної організації мітотичної хромосоми: (1) мітотична хромосома являє собою компактизовану та реорганізовану хроматинову фібрилу, присутню в інтерфазному ядрі, і ця компактизація відбувається у декілька послідовних етапів; (2) головними факторами компактизації є конденсинові комплекси, топоізомераза II та двохвалентні катіони; (3) хроматинова фібрила всередині мітотичної хромосоми формує сітку, вузли якої стабілізовані білковими (конденсиновими) зшивками та топологічними зачепленнями елементів сітки; (4) білкові зшивки концентруються в аксіальній зоні хромосоми.

Рекомендована література

Загальна

Koshland, D., Strunnikov, A. Mitotic chromosome condensation // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1996. – Vol. 12. – P. 305-333.

Marko, J.F. Micromechanical studies of mitotic chromosomes // *Chromosome Res.* – 2008. – Vol. 16. – P. 469-497.

Ohta, S., Bukowski-Wills, J.-C., Sanchez-Pulido, L, et al. The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics // *Cell.* – 2010. – Vol. 142. – P. 810-821.

Woodcock, C.L., Ghosh, R.P. Chromatin higher-order structure and dynamics // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – a000596.

Роль топоізомерази II в конденсації мітотичних хромосом

Cuvier, O., Hirano, T. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation // *J. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 160. – P. 645-655.

Escargueil, A.E., Plisov, S.Y., Skladanowski, A., Borgne, A., Meijer, L., Gorbsky, G.J., Larsen, A.K. Recruitment of cdc2 kinase by DNA topoisomerase II is coupled to chromatin remodeling // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15. – P. 2288-2290.

Kawamura, R., Pope, L.H., Christensen, M.O., Sun, M., Terekhova, K., Boege, F., Mielke, C., Andersen, A.H., Marko, J.F. Mitotic chromosomes are constrained by topoisomerase II-sensitive DNA entanglements // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 188. – P. 653-663.

Wells, N.J., Hickson, I.D. Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – Vol. 231. – P. 491-497.

Білки SMC, конденсини та когезини

Díaz-Martínez, L.A., Giménez-Abián, J.F., Clarke D.J.

Chromosome cohesion – rings, knots, orcs and fellowship // *J. Cell Sci.* – 2008. – Vol. 121. – P. 2107-2114.

Hagstrom, K.A., Meyer, B.J. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 520-534.

Hirano, T. SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2005. – Vol. 360. – P. 507-514.

Hirano, T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 311-322.

Hudson, D.F., Marshall, K.M., Earnshaw, W.C. Condensin: Architect of mitotic chromosomes // *Chromosome Res.* – 2009. – Vol.17. – P. 131-144.

Jessberger, R. The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 767-778.

Nakajima, M., Kumada, K., Hatakeyama, K., Noda, T., Peters, J.-M., Hirota, T. The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase // *J. Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 4188-4196.

Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., Hirano, T. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells // *Cell.* – 2003. – Vol. 115. – P. 109-121.

Peters, J.-M., Tedeschi, A., Schmitz, J. The cohesin complex and its roles in chromosome biology // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22. – P.3089-3114.

Strick, T.R., Kawaguchi, T., Hirano, T. Real-time detection of single-molecule DNA compaction by condensin I // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 874-880.

Tanno, Y., Kitajima, T.S., Honda, T., Ando, Y., Ishiguro, K., Watanabe, Y. Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24. – P.2169–2179.

Роль неорганічних іонів в організації мітотичної хромосоми

Maniotis, A.J., Wojanowski, K., Ingber, D.E. Mechanical continuity and reversible chromosome disassembly within intact genomes removed from living cells // *J. Cell Biochem.* – 1997. – Vol. 65. – P. 114-130.

Poirier, M.G., Marko, J.F. Micromechanical studies of mitotic chromosomes // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 2002. – Vol. 23. – P. 409-431.

Strick, R., Strissel, P.L., Gavrilov, K., Levi-Setti, R. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes // *J. Cell Biol.* – 2001. – vol. 155. – P. 899-910.

Механічні властивості мітотичної хромосоми

Almagro, S., Riveline, D., Hirano, T., Houchmandzadeh, B., Dimitrov, S. The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 5118–5126.

Houchmandzadeh, B., Dimitrov, S. Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes // *J. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 145. – P. 215-223.

Marko, J.F. Micromechanical studies of mitotic chromosomes // *Chromosome Res.* – 2008. – Vol. 16. – P. 469-497.

Nicklas, R.B. Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase // *J. Cell Biol.* – 1983. – Vol. 97. – P. 542-548.

Poirier, M.G., Marko, J.F. Micromechanical studies of mitotic chromosomes // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 2002. – Vol. 23. – P. 409-431.

Poirier, M.G., Marko, J.F. Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 15393-15397.

Poirier, M.G., Marko, J.F. Micromechanical studies of mitotic chromosomes // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 55. P. 75-141.

Моделі структури мітотичної хромосоми

Belmont, A.S. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 15855–15857.

Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., Sunkel, C.E. Could condensin scaffold the mitotic chromosome? // Cell Cycle.– 2004. – Vol. 3. – P. 538-540.

Cook, P.R. A chromomeric model for nuclear and chromosome structure // J. Cell Sci.– 1995. – Vol. 108. – P. 2927-2935.

Earnshaw, W.C., Laemmli, U.K. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds // J. Cell Biol. – 1983. – Vol. 96. – P. 84-93.

Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T., Belmont, A.S. Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure // J. Cell Biol. – 2004. – Vol. 166. – P. 775-785.

Laemmli, U.K., Maeshima, K.A Two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly // Dev. Cell. – 2003. – Vol. 4. – P. 467-480

Marko, J.F. Micromechanical studies of mitotic chromosomes // Chromosome Res.– 2008. – Vol. 16. – P. 469-497.

Paulson, J.R., Laemmli, U.K. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes // Cell. – 1977. – Vol. 12. – P. 817-828.

Sumner, A.T. Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase // Chromosoma. – 1991. – Vol. 100. – P. 410-418.

Ushiki, T., Hoshi, O., Iwai, K., Kimura, E., Shigeno, V. The structure of human metaphase chromosomes: its histological perspective and new horizons by atomic force microscopy // Arch. Histol. Cytol. – 2002. – Vol. 65. – P.377-390.

Розділ 7. Сегрегація мітотичних хромосом

Як описано у попередньому розділі, під час першої стадії мітозу – *профази* – відбувається компактизація хромосом та руйнування ядерної оболонки, в результаті чого хромосоми опиняються в цитоплазмі клітини. Одночасно з цим на полюсах клітини розпочинається формування *мікротрубочок веретена поділу*. По мірі росту мікротрубочок реалізуються контакти між ними та *кінетохорами* хромосом – мультибілковими комплексами, які збираються на центромерних ділянках. Клітина переходить на стадію *метафази*, під час якої здійснюється рух хромосом по мікротрубочках і врешті-решт хромосоми опиняються в екваторіальній площині – формується так звана *метафазна пластинка*.

Наступна за метафазою стадія *анафази* характеризується порушенням зв'язку між двома сестринськими хромосомами (хроматидами), і розпочинається їхній рух до полюсів. Досягнувши полюсів клітини, хромосоми припиняють рух – клітина вступає до стадії *телофази*, під час якої практично відбувається реверсія подій, що здійснювались у профазі: навколо хромосом знову утворюється ядерна оболонка і здійснюється їхня деконденсація. Після завершеного таким чином каріокінезу розпочинається цитокінез, в результаті якого утворюються дві ідентичні клітини з однаковими наборами хромосом.

Для утворення в процесі поділу двох функціональних клітин необхідно, щоб усі етапи клітинного циклу знаходилися під жорстким контролем: жодна наступна фаза не повинна розпочатися до тих пір, поки не буде успішно завершена попередня. Всі події на кожному етапі повинні бути інваріантними, необоротними і відбуватися у чітко визначений час.

Тригерами переходу від однієї фази до іншої є білки родини *циклін-залежних протеїнкіназ (CDKs)*. Вони зумовлюють фосфорилування ряду білків-мішеней, що є необхідним для запуску внутрішньоклітинних процесів, характерних для конкретної фази клітинного циклу. Активність CDKs у клітині

змінюється в залежності від стадії, на якій клітина перебуває. Контроль активності здійснює особлива група білків, основними серед яких є **цикліни**: лише у безпосередньому зв'язку з циклінами циклін-залежні кінази здатні до фосфорилування своїх мішеней. Найбільш важливими серед циклінів є дві родини цих білків – цикліни, що з'являються в момент переходу клітини від пресинтетичної до синтетичної фази (G1/S-цикліни або просто S-цикліни) та ті, що синтезуються при переході від постсинтетичної фази до мітозу (G2/M-цикліни або M-цикліни).

У випадку, коли на якійсь стадії клітинного циклу відбувся "збій" у нормальному проходженні процесів, характерних для того чи іншого етапу, необхідно затримати клітину на цій стадії, щоб дати час для виправлення дефекту. Для цього існують групи білків, які контролюють кожний етап. Їх модифікації та каскадні реакції білок-білкових взаємодій створюють умови, за яких клітина не здатна "рухатись" далі по клітинному циклу. Момент, на якому відбувається перевірка готовності клітини перейти до наступної стадії, називають **контрольною точкою** або контрольно-пропускним пунктом (**checkpoint**). Під словом "checkpoint" часто розуміють скоріше не сам момент, коли здійснюється перевірка, а **систему контролю** – комплекс реакцій, які запускаються для того, щоб здійснити контроль і, у разі потреби, затримати клітину на певній стадії. Основними контрольними точками клітинного циклу є три: перша при переході від G1-фази до S-фази, друга – між G2-фазою та мітозом і третя – в момент розходження хромосом до полюсів.

У цьому розділі увагу буде приділено, зокрема, саме процесам, які лежать в основі контролю розходження (сегрегації) хромосом. Очевидно, що рівноцінне розділення молекул ДНК між двома клітинами – важливий момент поділу, тому приєднання мікротрубочок до хромосом перед їхнім розходженням і є однією з контрольних точок клітинного циклу. Тут спрацьовує спеціальна **система контролю збірки веретена поділу** (SAC, **s**pinde **a**ssembly **c**heckpoint), яка забезпечує виконання жорсткого правила: розходження хромосом під час анафази є можливим лише за умови коректного приєднання їх

кінетохорів до мікротрубочок веретена поділу. Для перевірки коректності такого приєднання необхідна координація роботи великої кількості білків – елементів контрольної системи. Частина цих елементів виконує роль сенсорів (білки, які здатні "відчувати" дефекти у приєднанні мікротрубочок до кінетохору), інша частина – роль ефекторів (білки, що здатні у випадку дефектів затримати клітину на стадії метафази, залишаючи сестринські хроматиди з'єднаними в центромерних ділянках).

Отже, можна виділити три найважливіші аспекти, що мають головне значення для успішного та коректного розходження хромосом по дочірніх клітинах: хромосоми мають бути компактизованими, щоб забезпечити швидке переміщення великої маси ДНК; дочірні хромосоми повинні зберігати зв'язок між собою від моменту реплікації ДНК до початку розходження; у чітко визначеному місці на кожній хромосомі має сформуватись основний інструмент розходження – кінетохор, який повинен коректно приєднатись до машинерії розходження – веретена поділу. Надкомпактизація мітотичних хромосом розглянута в попередньому розділі, а в цьому описано сучасні уявлення щодо інших аспектів сегрегації хромосом.

Нагадаємо, що в процесі компактизації хромосом у профазі відбувається описана у підпідрозд. 6.1.5 дисоціація когезинових комплексів з плечей хромосом (так званий профазний шлях дисоціації). У результаті сестринські хроматиди залишаються з'єднаними між собою лише в ділянці центромери, що надає їм характерної Х- або V-подібної форми. Дисоціація когезинових комплексів з центромер забезпечується іншим механізмом, ніж профазний шлях. Відбувається така дисоціація (і розділення сестринських хроматид по центромерним ділянкам) під час анафази і лише за умови коректного приєднання мікротрубочок до кінетохорів.

7.1. Структура центромери

Центромера як видима в світловий мікроскоп первинна перетяжка мітотичних хромосом була вперше описана

Вальтером Флемінгом (Walther Flemming) у 1880 році. Через декілька десятків років було встановлено, що ця ділянка є необхідною для нормального розділення хромосом між клітинами у процесі їх поділу. На сьогодні послідовності ДНК, що формують центромеру, та білки, які з ними взаємодіють, описані для багатьох організмів. Проте, до сих пір в літературі немає єдиної загальноприйнятої дефініції терміну “центромера”. Розбіжності полягають у тому, що одні автори визначають центромеру як ділянку ДНК, де розміщені характерні центромерні послідовності, другі включають до складу центромери і гетерохроматинові блоки, які фланкують центромерний район, треті вважають центромерою лише ділянку хроматину, яка має у складі нуклеосом особливий варіант гістона H3 – CenH3 (підпідрозд. 2.1.3), що він є платформою для рекрутування білків кінетохору. Ми скористаємось цим останнім підходом і під центромерою будемо розуміти, головним чином, хроматинову ділянку, яка містить CenH3-нуклеосоми і є достатньою для формування повноцінного кінетохору.

7.1.1. Центромерна ДНК у більшості організмів представлена досить довгою ділянкою, розмір якої коливається в межах від 10 тис. пар основ у дріжджів *Schizosaccharomyces pombe* до декількох сотень тис. пар основ у ссавців. Такі центромери називають **регіональними**. Крім того, існують два особливі випадки: центромерна ділянка у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* складає 125 пар основ і містить всього одну нуклеосому – така центромера називається **точковою**; у нематод та деяких видів раків центромери є **дифузними** – здатність формувати кінетохор (основна властивість центромерної ділянки) притаманна практично всій хромосоми (рис. 7.1).

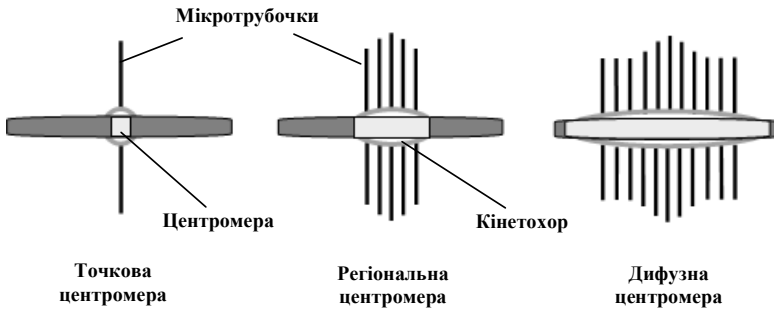


Рис. 7.1. Схематичне зображення трьох типів центромерних ділянок.

Точкова центромера *S. cerevisiae* складається з трьох елементів послідовності (рис. 7.2): CDE I, CDE II та CDE III (centromere DNA element). Послідовність CDE I, яка фланкує центральний домен CDE II з 5'-кінця центромери, – найкоротша (10 пар основ). Не зважаючи на консервативність CDE I, повна делеція цього елемента не впливає на функціонування центромерного району. Домен CDE III (25 пар основ) фланкує CDE II з 3'-кінця центромери. Цей елемент є також консервативним, спостерігається високий ступінь гомології CDE III між усіма 16 хромосомами *S. cerevisiae* (рис. 7.2). Мутаційний аналіз послідовностей CDE III окремих хромосом показав, що навіть заміна одного нуклеотиду призводить до повної дисфункції центромери. Центральний елемент – CDE II – довжиною 76–85 пар основ є найменш консервативним з трьох центромерних елементів. Головна його ознака – збагаченість на АТ-пари (більше 90%), причому зменшення їх вмісту суттєво порушує сегрегацію хромосом. На ділянці ДНК довжиною 125 пар нуклеотидів (основною частиною якої є зазначені три елементи послідовності) формується одна нуклеосома, яка містить замість канонічного гістона H3 його варіант Cse4 (назва CenH3 у *S. cerevisiae*). Кожний елемент CDE взаємодіє також із специфічними білковими комплексами, що створюють функціональний кінетохор.

	CDEI				CDEII			
	1	10	20	30	40	50	60	
CEN1	GT	CAC	ATG	AC	ATA	ATA	ATAA	ATAA
CEN2	AT	CAT	GTG	AC	TTA	TTT	TTAAT	TAT
CEN3	GT	CAC	ATG	AC	GAT	ATT	GTAT	TT
CEN4	GT	CAC	ATG	CT	TATA	ATCA	ACT	TTTT
CEN5	AT	CAC	GTG	CT	TTTT	AAAA	ATAA	ATAA
CEN6	AT	CAC	GTG	CT	ATA	AAAA	ATAA	ATAA
CEN7	AT	CAC	GTG	CT	ATAT	TACT	ATATA	AAAA
CEN8	AT	CAC	ATG	AC	TAATA	ATCT	TTAAT	TTAAT
CEN9	TT	CAC	GTG	AA	AA	TTTT	TATAT	TTAAT
CEN10	AT	CAC	GTG	TT	AAAA	TAAT	TAAAT	TTAAT
CEN11	GT	CAC	ATG	AC	AAAA	CATAT	TTAAT	TTAAT
CEN12	AT	CAC	GTG	TA	ATAA	TATAT	TAAAA	AGTT
CEN13	AT	CAC	ATG	AC	TAC	CTAAC	AAAA	TAT
CEN14	GT	CAC	GTG	CA	GC	TTTT	TAAAA	TAT
CEN15	AT	CAC	GTG	AA	CTT	ATTT	TGCAT	TTA
CEN16	AT	CAC	ATG	AT	ATAT	TTTT	TATTT	TTAAT

	CDEIII			
	70	80	90	100 110
CEN1	TAT	TTT	TAC	AGT
CEN2	TAAT	TAAT	TTTT	TTCT
CEN3	TTAT	TTTT	TAAAAA	TAAAT
CEN4	AAAC	ATAA	TAAAT	TATTTAT
CEN5	TAAAAA	TTG	AAAAA	TATA
CEN6	ATAGA	AGT	AAAAA	AGAAAT
CEN7	ATAT	TAT	TACAT	TTTTAT
CEN8	TACT	AAAT	TGTT	TTTAAAA
CEN9	ATTG	ATAT	TAAAA	TAAAT
CEN10	TTTT	TAT	TTTTAAAA	AACAAAA
CEN11	ATAT	TTTT	TAAAT	TACATA
CEN12	AT	TTTT	TAAAT	TAAGT
CEN13	TAT	TTTT	TGTT	TTTTG
CEN14	AT	TTTT	TATAT	TAAAT
CEN15	TTTT	AT	TTTT	TAAAT
CEN16	AAAT	TAA	CAAAA	AATTTGTT

Рис. 7.2. Нуклеотидні послідовності центрмер 16 хромосом (CEN1–16) *S. cerevisiae* (за даними *Saccharomyces Genome Database*, www.yeastgenome.org). Позначено елементи CDE I–III.

Довжина центромерної ділянки у дріжджів, що діляться (*Schizosaccharomyces pombe*), коливається від 10 до 40 тис. пар основ. Її теж розділяють на декілька блоків послідовностей (рис. 7.3). Центральна частина – кор (позначається як *cnt*) – має розмір 4–5 тис. пар основ і містить неповторювальні послідовності ДНК. Кор фланкований ідентичними інвертованими повторами (*imr*), в межах яких знаходяться гени тРНК. Обидва елементи – *cnt* і *imr* – є АТ-збагаченими та містять крім звичайних нуклеосом нуклеосоми з білком Сnp1 (CenH3 у *S. pombe*). За внутрішніми інвертованими повторами

розташовані так звані зовнішні повтори (*otr*), які входять до складу прицентромерного хроматину і формують канонічні нуклеосоми.

Центромерна ділянка ДНК дрозофіли (*Drosophila melanogaster*), довжиною 420 тис. пар основ, організована у вигляді мікросателітних послідовностей, що тандемно повторюються. Мікросателітні повтори розділені в багатьох місцях вставленими в цю зону ретротранспозонами та ділянками послідовності, що не повторюються (рис.7.3). Послідовності повторів представлені двома типами довжиною по п'ять пар основ, які є дуже консервативними: ААТАТ та СТСТТ. Варіабельність послідовності сателіту ААТАА складає 2 %, а сателіту СТСТТ – всього 0,3 %. Аналіз послідовностей ретротранспозонів в центромерах дрозофіли виявив низьку їх варіабельність. Припускають, що інсерція цих мобільних елементів в дану ділянку відбулася недавно в процесі еволюції геному *Drosophila*. Як і у дріжджів, центромерний хроматин *D. melanogaster* також збагачений CenH3 (позначається як білок CID).

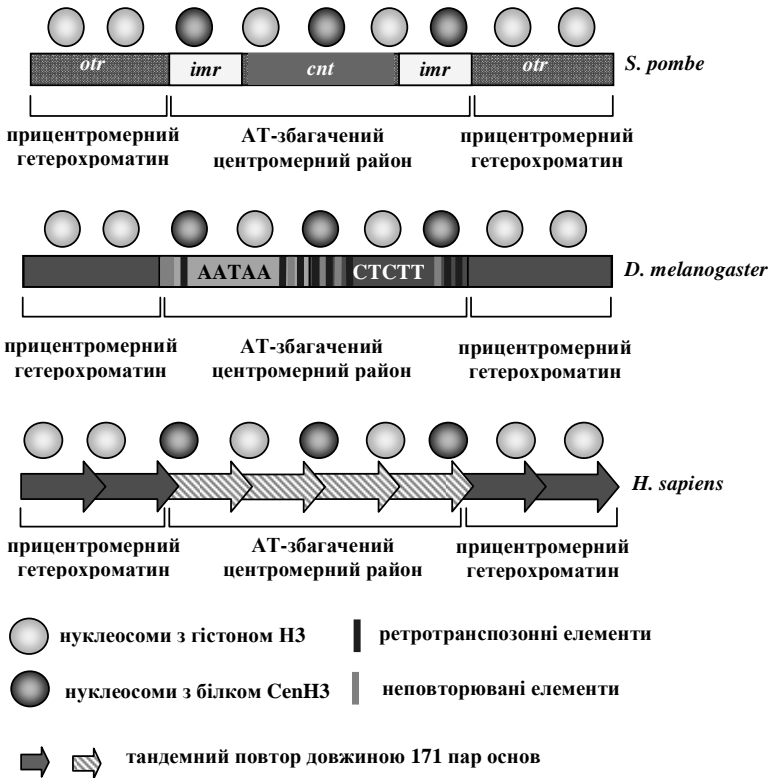


Рис. 7.3. Організація центроммерних районів хромосом різних видів організмів.

У людини (та у більшості досліджених ссавців) так само, як і у дрозофіли, ДНК центроммерної ділянки організована у вигляді тандемних повторів так званої *α-сателітної ДНК*, довжина повтору становить 171 пару основ (рис.7.3). Центроммерна ділянка може містити більше 20 тис. таких повторів (загальна довжина ділянки коливається від 0,1 до 4 млн. пар основ). Середня варіабельність послідовностей *α-сателітних* повторів є меншою 2%. Проте, високий консерватизм нуклеотидних послідовностей спостерігається лише в центральній частині

центромерної ділянки. По мірі віддалення від центру дивергенція поступово зростає і сягає 30 % на фланкуючих ділянках довжиною по 40 тис. пар основ. Ця закономірність може мати відношення до механізму встановлення центримери (наступний підпідрозділ): делеційний аналіз центримерних сателітних послідовностей людини виявив, що для створення кінетохору необхідно є невелика центральна ділянка розміром приблизно 500 тис. пар основ. Саме в цій області поряд зі звичайними нуклеосомами наявні нуклеосоми з білком CENP-A (так називається білок CenH3 у ссавців).

Незважаючи на різноманітність центримерних послідовностей як за довжиною, так і за нуклеотидним складом, вони мають ряд спільних рис. По-перше, всі вони містять АТ-збагачені ділянки і майже не містять активних генів. По-друге, в усіх регіональних центримерах присутні елементи послідовності, що тандемно повторюються багато разів. По-третє, центримерні ділянки ДНК завжди фланковані гетерохроматиновими прицентримерними районами.

7.1.2. Механізм визначення центримери та структура центримерного хроматину. Класифікація хромосом за їх морфологією, наприклад, при каріотипуванні, базується на двох основних моментах: на розмірі хромосом та розміщенні центримери відносно кінців (відповідно до нього хромосоми розділяють на акроцентричні, метацентричні та субметацентричні). Очевидно, що показники, обрані базисом опису видоспецифічного набору хромосом, повинні бути інваріантними в усіх клітинах організму та майже ідентичними в усіх представників даного виду (слово “майже” враховує поліморфізм хромосом). Дійсно, X-хромосома людини в нормі є субметацентричною, а Y-хромосома – акроцентричною, і це притаманне без виключення будь-яким клітинам людського організму та відтворюється від поділу до поділу.

Постає питання, яким чином ділянка ДНК, що є центримерою, незмінно упізнається як місце утворення кінетохору на хромосомі? Перша відповідь, яка спадає на думку, полягає в тому, що центримеру визначає центримерна ДНК,

тобто описані у попередньому підрозділі особливості її організації. Певна роль центромерної ДНК у визначенні центромери не виключена, але вона не може бути ключовою. По-перше, розмаїття центромерних ДНК різних організмів за довжиною та нуклеотидними послідовностями є несумісним з універсальністю механізмів сегрегації хромосом при клітинному поділі. По-друге, численні експерименти вказують на те, що центромерна ДНК зазвичай (за виключенням точкової центромери *S. cerevisiae*) практично не містить (або містить дуже мало) сайтів взаємодії з кінетохорними білками.

Не зважаючи на різноманітність центромерних послідовностей ДНК різних організмів, хроматин в цій ділянці має універсальну спільну рису: частина нуклеосом містить замість гістона H3 його варіант CenH3. Вважається, що саме присутність CenH3 є необхідною і достатньою для визначення центромери як такої і, відповідно, для утворення кінетохору. На користь провідної ролі CenH3 у якості платформи для збірки кінетохору свідчить феномен утворення центромер у ділянках, в нормі для цього не призначених. В численних експериментах була показана здатність АТ-збагачених послідовностей ДНК, які до того не мали функції центромери, формувати повноцінний кінетохор. Така центромера, утворена *de novo*, називається **неоцентромерою**. Її поява можлива лише при умові порушення функціонування “старої” центромери або на ацентричних фрагментах хромосом, утворених внаслідок хромосомних аберацій (рис. 7.4). В обох випадках спостерігається акумулювання CenH3 в ділянці неоцентромери з подальшим утворенням там кінетохору.

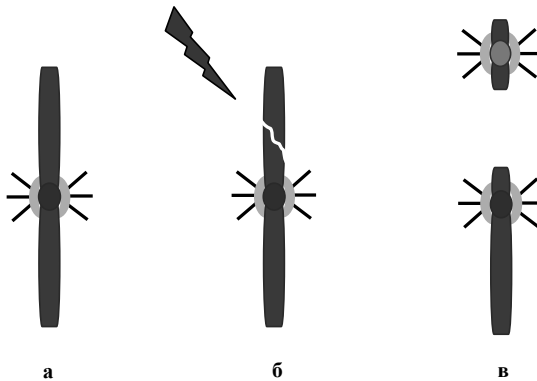


Рис. 7.4. Схема появи неоцентромери після утворення ацентричного фрагмента хромосоми. (а) – нативна хромосома з функціональним кінетохором, (б) – хромосомний розрив після дії пошкоджуючого чинника, (в) – утворення неоцентромери на ацентричному фрагменті.

Нуклеосоми, що містять CenH3, присутні тільки в ділянці центромери і ніколи не спостерігаються в інших районах хромосом (за виключенням неоцентромер). При цьому пошук в центромері нуклеотидних послідовностей, які могли б слугувати сайтами впізнання CenH3, не дав результату: жоден елемент послідовності не здатен специфічно упізнаватися цим білком. Яким же чином CenH3 завантажується саме в нуклеосоми центромер? Очевидно, що таке завантаження вимагає спеціальних механізмів. Зокрема, важливу роль виконує специфічний для CenH3 елемент його амінокислотної послідовності. Докази цього були отримані в експериментах з химерним гістоном H3, сконструйованим рекомбінантними методами. Цей білок містив у межах гістонового фолду (в ділянці петлі L1 та спіралі $\alpha 2$) 15-ти амінокислотну послідовність CATD (CENP-A targeting domain), характерну для білка CENP-A і відсутню у канонічного гістона H3. Виявилося, що нуклеосоми з химерним гістоном H3^{CATD} успішно акумулюються в центромерній ділянці і створюють повноцінний кінетохор.

Інкорпорація новосинтезованого CenH3 в центромержу, на відміну від інших варіантів H3, що завантажуються у хроматин під час реплікації (H3.1, H3.2) або в процесі транскрипції в інтерфазі (H3.3), відбувається під час телофази чи на початку G1-фази клітинного циклу. Доставка димера CenH3-H4, як і канонічного димера H3-H4, забезпечується гістоновими шаперонами. У ссавців за це відповідає специфічний гістоновий шаперон HJURP (Holliday Junction Recognition Protein), який впізнає CATD-домен CenH3. Проте, у обох видів дріжджів та у дрозозіли не було виявлено специфічних для CenH3-H4 шаперонів: доставку забезпечує фактор збірки нуклеосом RbAp48 – компонент шаперонового комплексу CAF-1 (який здійснює завантаження димерів H3-H4 при реплікації, підрозділ 5.6) та деяких інших мультибілкових комплексів. Як вже зазначалося, особливістю збірки CenH3-нуклеосом є те, що вона не залежить від реплікації ДНК, а відбувається при виході клітини з мітозу. Очевидно, що після S-фази в центромержній ділянці залишається вдвічі менше CenH3-нуклеосом. Існує припущення, що під час реплікації, їх "нестачу" компенсують нуклеосоми із звичайними гістонами H3-H4 і роль шаперонів зводиться до заміни одного гістонового комплексу на інший, щоб забезпечити, таким чином, утворення кінетохору в наступному клітинному циклі. Цілком можливо також, що після S-фази в центромержній ділянці залишаються проміжки, які потім заповнюються нуклеосомами, що містять CenH3.

Впізнанню центромержи комплексами шаперонів та димерів CenH3-H4 у більшості організмів передують зв'язування з нею білка Knl-2 (рис.7.5), мутація в гені якого призводить до порушення у локалізації CenH3-нуклеосом і, відповідно, до аномальної сегрегації хромосом. Детальний механізм впізнання центромержи білком Knl-2 залишається недостатньо зрозумілим, але до складу білка входить так званий Муб-домен (структурний мотив білків, який забезпечує впізнання коротких нуклеотидних послідовностей). Це дозволяє припустити, що Knl-2 здатен специфічно взаємодіяти з невеликим повторюваним елементом центромержи. У ссавців білок Knl-2 взаємодіє з центромержною ділянкою у складі мультибілкового комплексу Mis 18 (рис.7.5).

У нижчих еукаріотів (*S. cerevisiae* та *S. pombe*) функцію білка Knp1-2 виконує негомологічний йому білок Scm 3 (який у дріжджів, що брунькуються, входить до складу центромерної нуклеосоми, заміщуючи димер H2A-H2B). Після завантаження CenH3 Knp1-2 (або комплекс Mis 18) дисоціюють з центромерної ділянки в G1-фазі.

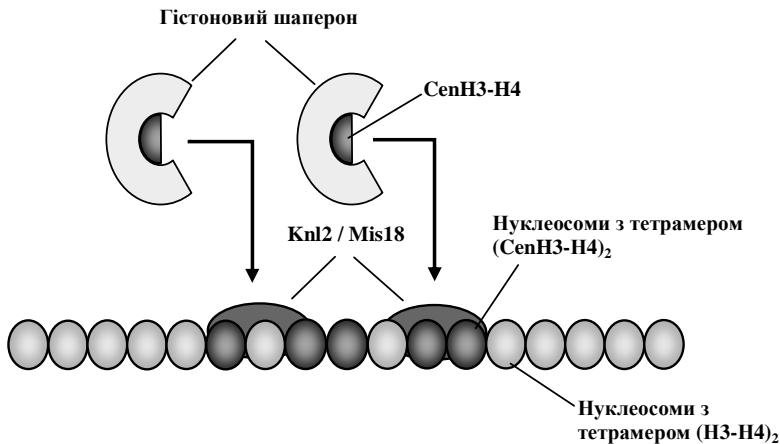


Рис. 7.5. Завантаження CenH3 в ділянку центромери, опосередковане білком Knp1.

Незважаючи на роль білка Knp1, певне значення у завантаженні CenH3 можуть мати пасивні механізми. Для мутантних клітин, де здійснюється гіперекспресія CenH3, було показано, що в такому випадку цей гістоновий варіант включається по всій довжині хромосом, переважно в еухроматинові регіони. При цьому такі "нецентромерні" CenH3-нуклеосоми зберігають здатність індукувати утворення кінетохору, що призводить до дефектів сегрегації хромосом. Це ще раз доводить, що для утворення кінетохору є необхідною наявність CenH3 у хроматиновій ділянці і не має значення нуклеотидна послідовність ДНК. Але CenH3-нуклеосоми залишаються в плечах хромосоми тільки за умови інгібування системи протеасомного протеолізу – при нормальній роботі цієї системи спостерігається поступове очищення хроматину від

СенНЗ та його заміна на канонічний НЗ, яка відбувається скрізь, крім центромери. Напевно, заміна на звичайний НЗ зумовлена порівняно низькою стабільністю СенНЗ-нуклеосом (див. нижче) – після такої заміни звільнені гістонові комплекси, що містять СенНЗ, піддаються протеолітичній деградації. При цьому в центромерах СенНЗ залишаються, оскільки більш компактна структура гетерохроматину, що оточує центромеру, не дозволяє відбуватись транскрипції та асоційованому з нею обміну гістоновими комплексами між хроматином та їхнім пулом у ядрі. Наскільки такий пасивний механізм може мати відношення до встановлення центромери за нормальних умов – без гіперекспресії СенНЗ, – залишається нез'ясованим.

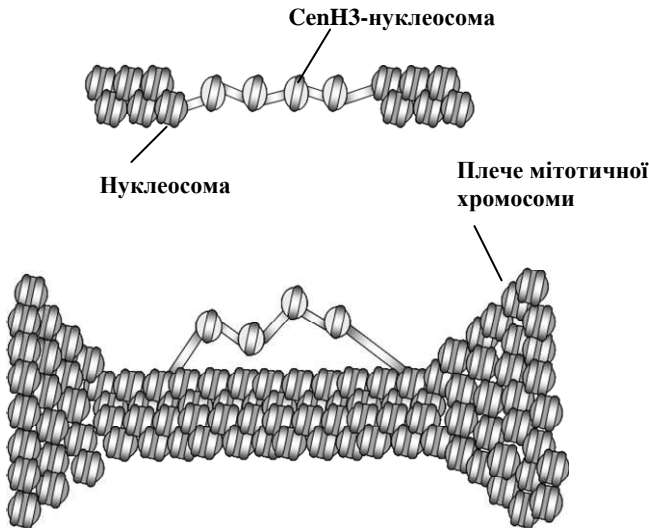


Рис. 7.6. Модель центромерного хроматину: декомпактизована ділянка центромерного хроматину в оточенні гетерохроматинових регіонів у складі інтерфазної хромосоми (вверху) та випетлювання такої ділянки на поверхні мітотичної хромосоми в області її первинної перетяжки (унизу).

Адаптовано з Dalal *et al.* (2007).

Імовірно, для утворення кінетохору мають значення структурні особливості центромерного хроматину. По-перше, центромерний хроматин (хоча він і знаходиться всередині прицентромерних гетерохроматинових регіонів) характеризується підвищеною довжиною лінкерів та зниженим потенціалом щодо компактизації. Саме це, разом із наявністю когезинових комплексів у центромері, зумовлює наявність у мітотичній хромосомі порівняно декомпактизованої перетяжки, яка розділює два надкомпактизовані блоки – два хромосомних плеча (рис. 7.6). По-друге, самі CenH3-нуклеосоми суттєво відрізняються від звичайних. Як зазначалось у підпідрозд. 2.1.3, при реконструкції *in vitro* за участі CenH3 формується нуклеосома, що містить октамер гістонів та ліву суперспіраль ДНК. Але така нуклеосома відрізняється частковим розкрученням нуклеосомної суперспіралі та зниженою стабільністю – гістонові комплекси достатньо легко видаляються гістоновими шаперонами або поліаніонами (наприклад, гепарином). Більше того, *in vivo* у центромерах дрозофіли та людини зафіксовані особливі частинки (гемісоми, див. підрозділ 3.4), що містять гетеротетрамер CenH3-H4-H2A-H2B замість октамера гістонів. Така радикальна структурна перебудова не може відбуватись інакше, ніж під дією якихось факторів, присутніх у центромері (чи кінетохорі).

Значення декомпактизованого стану центромерного хроматину (та особливої структури нуклеосомних частинок у його складі) може полягати в тому, що CenH3-нуклеосоми утворюють всередині компактної мітотичної хромосоми "вставки" декомпактизованої хроматинової фібрили, які, випетлюючись із компактного конгломерату звичайних нуклеосом, опиняються на поверхні, формуючи платформу для збірки кінетохору (рис. 7.6).

Хоча деталі структурної організації центромери та механізми її визначення залишаються далекими від остаточного з'ясування, не викликає сумніву, що інкорпорація CenH3 у центромеру є ключовим моментом у визначенні цієї ділянки як майбутнього місця утворення кінетохору та прикріплення мікротрубочок до хромосоми. В процесі мітозу центромерні нуклеосоми

упізнаються різноманітними білками та мультибілковими комплексами, які рекрутують всі елементи, необхідні для коректного приєднання хромосом до веретена поділу.

7.2. Структура кінетохору

Перед тим, як перейти до розгляду організації кінетохору, слід нагадати, що в момент його збірки дві ідентичні молекули ДНК з'єднані в ділянках центромер когезиновими комплексами. Тобто, на сестринських хроматидах формуються два кінетохори, спрямовані в різні боки (рис. 7.7). Така протилежна орієнтація є важливим моментом для контролю сегрегації хромосом.

Ультраструктура кінетохору виглядає під електронним мікроскопом як три шари з різною електронною щільністю (рис. 7.8). Електронно-щільний шар, який прилягає до центромерного хроматину, називається *внутрішнім кінетохором*. *Зовнішній кінетохор*, товщиною 50-60 нм, є інтерфейсом взаємодії з мікротрубочками веретена поділу. Розташований між зовнішнім та внутрішнім кінетохором менш щільний шар називається *центральним регіоном*.

Усі шари кінетохору формуються групами специфічних конститутивних білків. Як вказує молекулярний аналіз білкового складу кінетохорів різних організмів, чіткий розподіл на три шари є дещо умовним: насправді в кінетохорі існують великі мультибілкові комплекси, які пронизують усю його товщу від внутрішнього до зовнішнього шару. При відсутності зв'язку хромосоми з мікротрубочками навколо зовнішнього кінетохору спостерігається утворення дифузного нестабільного шару – *фіброзної корони*. Фіброзна корона містить мобільні білкові комплекси, які присутні на кінетохорі у разі неприєднання мікротрубочок до зовнішнього шару.

Точкова центромера у *S. cerevisiae* зумовлює утворення найбільш простого (за кількістю білків) кінетохору серед усіх досліджених видів. Кінетохори багатоклітинних організмів, навпаки, характеризуються великою кількістю різноманітних білкових комплексів (на сьогодні описано близько 125 білків, вважають, що насправді їх приблизно вдвічі більше) та

складною ієрархією їх рекрутування до центромерної ділянки. Проте, ці комплекси у багатьох випадках мають гомологію з елементами кінетохору *S. cerevisiae*. Фактично, кінетохори вищих еукаріотів являють собою повторювальні блоки точкового кінетохору дріжджів, що брунькуються.

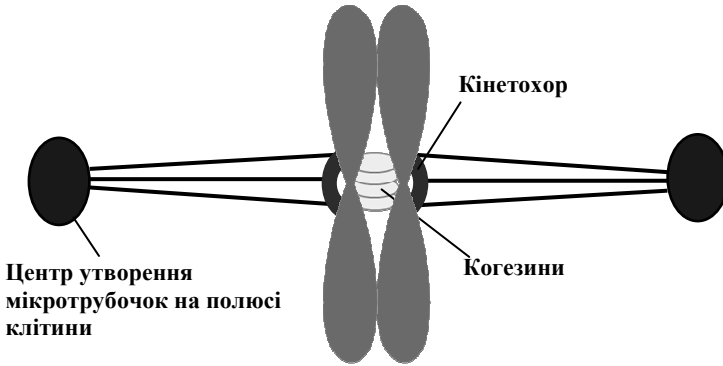


Рис. 7.7. Протилежна орієнтація кінетохорів, зібраних на двох сестринських хроматидах.

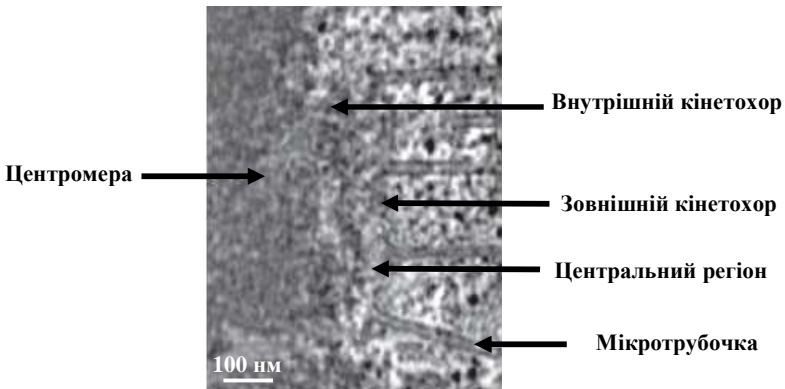


Рис. 7.8. Ультраструктура кінетохору під електронним мікроскопом. Репродуковано з роботи Cheeseman, Desai (2008) з дозволу

Центромерні нуклеосоми взаємодіють з білковим комплексом – основою внутрішнього кінетохору, – який у хребетних називається CCAN (Constitutive Centromere Associated Network). 14 білків, що входять до його складу, позначаються як CENP (centromere proteins), вони присутні в ділянці центромери впродовж всього клітинного циклу (згаданий багато разів білок CENP-A не входить до складу комплексу CCAN, хоча й взаємодіє з ним). Гомологом основної частини комплексу CCAN у дріжджів *S. cerevisiae* та *S. pombe* є комплекси Ctf19 та Sim4 відповідно. Зв'язування білків CCAN з центромерою має ієрархічний характер – одні білкові субкомплекси рекрутують інші. Основними функціями комплексу CCAN є стабілізація в центромері CenH3-нуклеосом та рекрутування до кінетохору білкових комплексів центрального та зовнішнього кінетохору.

Серед усіх білків CCAN особливої уваги заслуговують два – CENP-B та CENP-C, які здатні безпосередньо взаємодіяти з центромерною ДНК (див. рис. 7.10 нижче). Білок CENP-B, який є висококонсервативним у ссавців (його гомологи знайдені також і у дріжджів, що діляться), є ДНК-зв'язувальним білком, що має високу гомологію із транспозазою ДНК-транспозонних елементів родини *Pogo*. В межах кожної одиниці α -сателітного повтору, із яких складається центромерна ділянка ссавців (наприклад, у людини це 171 пара основ), є консервативні 17 пар основ, що слугують сайтом взаємодії з CENP-B. Слід зауважити, що ця сайт-специфічна взаємодія CENP-B з центромерою не є критичною для збірки кінетохору і не має відношення до доставки в цю ділянку CenH3. Серія експериментів вказує на участь білка CENP-B в підтриманні метильованого стану як ДНК, так і гістонів у складі центромерної/прицентромерної ділянки, що полегшує зв'язування інших кінетохорних комплексів.

CENP-C також є консервативним компонентом кінетохорів всіх без виключення досліджених організмів, який здатен

взаємодіяти з центромерною ДНК. Відсутність цього білка призводить до повної дисфункції кінетохору та зумовлює порушення у сегрегації хромосом. Колокалізуючись із білком CenH3, CENP-C сприяє стабілізації центромерних нуклеосом, а також рекрутує деякі білки центрального та зовнішнього кінетохору.

Висококонсервативним компонентом кінетохорів еукаріотів є комплекс KMN, в структурі якого виділяють три субкомплекси – Knl-1 (до його складу входить 2 білка), Mis12 (4 білка) та Ndc80 (4 білка). Власне, назва KMN є акронімом назв цих трьох субкомплексів. Knl-1 та Mis12 взаємодіють у кінетохорі з білками CCAN на межі між внутрішнім та центральним шаром, а Ndc80 простягається від внутрішнього до зовнішнього шару, пронизуючи товщу кінетохору. Чотири білки, які формують субкомплекс Ndc80, створюють структуру гантелеподібної форми, яка одним своїм кінцем взаємодіє з білками внутрішнього кінетохору (елементами Knl-1 та Mis12), а іншим – із мікротрубочками веретена поділу (рис. 7.9, 7.10).

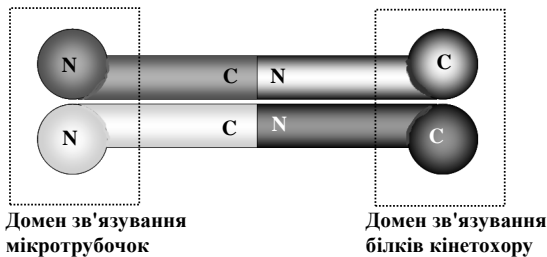


Рис. 7.9. Схема структури кінетохорного субкомплекса Ndc80, позначено N- і C-кінці чотирьох білків.

Крім субкомплексу Ndc80, взаємодію кінетохору з мікротрубочками веретена поділу у *S. cerevisiae* забезпечує ще один кінетохорний білковий комплекс – Dam1 (нараховує 10 білків). Субодиниці Dam1 олігомеризуються, утворюючи навколо мікротрубочки кільцеву структуру, яка утримує мікротрубочку на кінетохорі (рис. 7.10).

Вищі еукаріоти не мають структурного гомолога комплексу Dam1, проте нещодавно був відкритий функціональний гомолог – комплекс Ska, який складається з трьох білків. Обидва білкові комплекси входять до зовнішнього шару кінетохору і рекрутуються туди комплексом Ndc80. Отже, комплекси Dam1/Ska стабілізують зв'язок Ndc80 із мікротрубочками веретена поділу. Схему загальної організації на центромері кінетохорних комплексів CCAN, KMN та Dam1/Ska наведено на рис. 7.10.

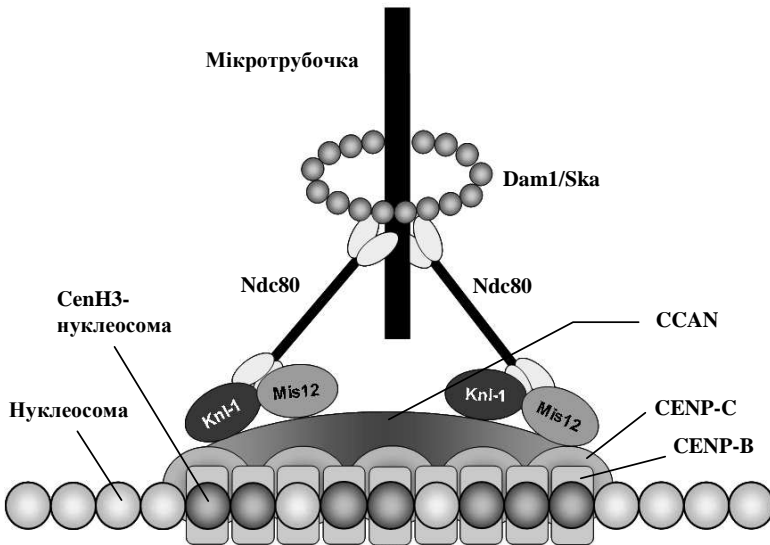


Рис. 7.10. Організація на центромері кінетохорних комплексів CCAN, KMN та Dam1.

Доволі цікавим компонентом кінетохорно-центромерного регіону є білковий комплекс, який називається CPC (chromosomal passenger complex). Таку назву він отримав через зміну його локалізації в клітині під час поділу: білки CPC присутні на хромосомі від ранньої профазі до метафазі, а під час анафазі вони звільняють кінетохор і асоціюються з

клітинним кортексом (периферійною частиною цитоскелету). На стадії телофази майже всі компоненти CPC переміщуються на екватор клітини, де, вважається, маркують майбутню площину поділу в процесі цитокінезу. Коли білки CPC зв'язані з центромерно-кінетохорною зоною хромосом, то, на відміну від інших кінетохорних комплексів, вони розміщуються всередині між двома хроматидами, а не з боку приєднання мікротрубочок. Серед чотирьох білків, які входять до складу CPC, особливо важливими для функціонування кінетохору та регуляції його зв'язку з мікротрубочками веретена поділу є кіназа Aurora-B (згадувалась у розділі 6, більш детально роль цієї кінази у функціонуванні кінетохору описана в підрозділі 7.4) та білок INCENP. Рекрутування складових CPC в центромерну ділянку забезпечується N-кінцевим доменом білка INCENP, який формує структурний каркас комплексу.

Крім основних описаних білкових комплексів, кінетохори дріжджів та вищих еукаріотів містять велику кількість інших допоміжних білків, які забезпечують повноцінну сегрегацію хромосом. До них відносяться як структурні білки, так і різноманітні кінетохорні кінази. Основна роль структурних білків полягає у рекрутуванні до кінетохору білків-ефекторів контрольної точки збірки веретена поділу (підрозділ 7.5), а кінетохорних кіназ – у регуляції цього рекрутування.

Як вже зазначалося, функції кінетохору не обмежуються приєднанням мікротрубочок до центромери: його компоненти приймають участь і в контролі коректності цього приєднання. На відміну від конститутивних кінетохорних комплексів (таких як CCAN, KMN та Dam1), білки, які забезпечують такий контроль, входять до складу кінетохорів тільки тоді, коли кінетохори не приєднані до мікротрубочок веретена поділу. Ці білки зв'язуються з конститутивними кінетохорними комплексами на короткий час та дисоціюють, утворюючи дифузний шар навколо кінетохору – фіброзну корону. Основними елементами фіброзної корони є білки груп MAD та BUB, молекулярні мотори (кінезин-подібний мотор CENP-E, який також приймає участь у взаємодії кінетохору з

мікротрубочками веретена поділу, та динеїн), убіквітин-лігазний комплекс APC та його кофактор білок cdc20.

7.3. Веретено поділу

7.3.1. Полімеризація мікротрубочок веретена поділу.

Мікротрубочки являють собою полімерні спіральні філаменти, які складаються з гетеродимерів двох білків – α - та β -тубуліну. Тубулінові $\alpha\beta$ -димери полімеризуються у так звані протофіламенти, які утворюють пучок – полий циліндр зовнішнього діаметру ~ 25 нм. Одночасно димери сусідніх протофіламентів формують спіраль по поверхні циліндра (13 димерів на виток). Взаємодія між димерами у протофіламенті здійснюється за принципом "голова-хвіст" (α -субодиниця одного димера зв'язується з β -субодиницею іншого) – у результаті і протофіламент, і мікротрубочка в цілому характеризуються полярністю: кінець, на якому розміщені α -субодиниці позначається як мінус-кінець, протилежний (де знаходяться β -субодиниці) – як плюс-кінець (рис. 7.11).

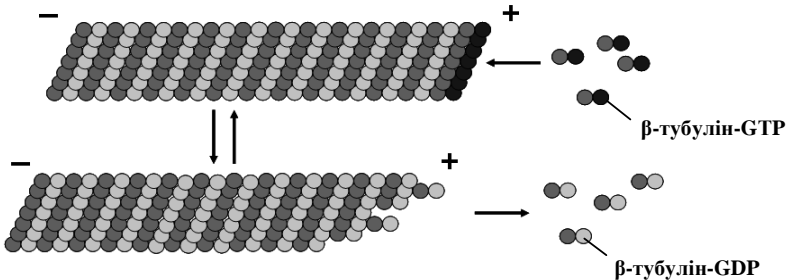


Рис. 7.11. Схема полімеризації/деполімеризації мікротрубочок.

Обидві субодиниці тубулінів зв'язані з GTP і тільки в такій формі вони мають високу здатність до полімеризації. Коли димер приєднується до кінця мікротрубочки, що зростає, індукується GTP-азна активність β -тубуліну. Після гідролізу GTP β -тубулін, асоційований з GDP, змінює свою конформацію, втрачається спорідненість до кінця протофіламенту і $\alpha\beta$ -димер дисоціює. Після дисоціації молекула GDP замінюється на GTP,

що дозволяє наступний акт полімеризації. Якщо до щойно приєднаного димера відразу приєднається наступний, і гідроліз GTP першим тубуліновим димером відбудеться після цього, дисоціація буде неможливою. Таким чином, мікротрубочки постійно знаходяться у стані динамічної нестабільності – їхній плюс-кінець постійно полімеризується/деполімеризується (мінус-кінець при цьому заблокований кільцем γ -тубулінів, яке ініціює полімеризацію мікротрубочки, див. нижче). В залежності від концентрації тубулінових димерів (тобто від того, чи встигає відбутись гідроліз GTP до приєднання наступного димера), а також від асоційованих з мікротрубочкою білків, які регулюють процеси полімеризації/деполімеризації, динамічна рівновага зсувається в той чи інший бік: плюс-кінець може зростати, скорочуватись, або довжина мікротрубочки може підтримуватись на постійному рівні. Слід зазначити, що зміна довжини мікротрубочок відбувається на рівні окремих протофіламентів: різні протофіламенти можуть змінювати свою довжину з різною швидкістю. Динамічна нестабільність мікротрубочок є дуже важливою для функціонування веретена поділу та для контролю сегрегації хромосом.

Мікротрубочки слугують своєрідним треком для руху в клітині різноманітних органел чи їх складових (у тому числі і хромосом при поділі). За рахунок полярності мікротрубочок цей рух є спрямованим. Він здійснюється за допомогою молекулярних моторів, які здатні зв'язувати певні "вантажі" і, використовуючи енергію гідролізу АТФ, пересуватися вздовж мікротрубочок у тому чи іншому напрямку. Розрізняють два основні класи моторів, що рухаються по мікротрубочкам: *кінезини*, які зазвичай пересуваються до плюс-кінця (плюс-мотори), та *динейни*, які зазвичай рухаються до мінус-кінця (мінус-мотори).

У більшості типів клітин ріст мікротрубочок веретена поділу розпочинається з полюсів клітини у зоні так званих *центрів організації мікротрубочок*. Складовою такого центру є кільцеві комплекси γ -тубуліну, які створюють первинну платформу для приєднання тубулінових $\alpha\beta$ -димерів – таким чином, що мінус-кінці мікротрубочок знаходяться в межах центру, а їх плюс-

кінці спрямовані в різні боки від нього. В процесі росту частина мікротрубочок досягне клітинного кортексу і наприкінці поділу вони будуть забезпечувати процес цитокінезу (так звані *астральні мікротрубочки*), частина – буде поступово рости від одного полюсу до іншого, так і не досягнувши ніякої мішені (*міжполюсні мікротрубочки*), і, врешті, невелика кількість мікротрубочок, які ростуть від полюсів клітин до екватору, будуть захоплені білками кінетохору (*кінетохорні мікротрубочки*) (рис. 7.12). За винятком *S. cerevisiae*, у яких до кінетохорів сестринських хроматид з обох сторін приєднуються всього по одній мікротрубочці, кінетохори вищих еукаріотів зв'язані приблизно з 20–40 мікротрубочками, об'єднаними у так звані *k-фібрили*.

7.3.2. Взаємодія мікротрубочок з кінетохором. Первинне зв'язування мікротрубочок з кінетохором здійснюється майже відразу після руйнування ядерної оболонки і реалізується лише з однією мікротрубочкою з якогось одного полюсу. При цьому кінетохор взаємодіє з бічною поверхнею мікротрубочки, а не з її плюс-кінцем, який залишається вільним і здатним продовжувати ріст (*латеральне приєднання*) (рис. 7.13, *а*). Латеральний зв'язок, який забезпечується лише кінетохорним субкомплексом Ndc80, є слабким, проте достатнім для того, щоб забезпечити рух хромосоми до відповідного полюсу (рис. 7.14, *а*) із швидкістю 1–2 мкм/хв (подібна швидкість притаманна хромосомам і в анафазі). Цей рух забезпечується мінус-направленим молекулярним мотором – динеїном, який розміщується поблизу кінетохора в районі фіброзної корони. Під час руху відбувається взаємодія з іншими мікротрубочками (в тому числі такими, що розпочинаються з іншого полюсу) і заміна латерального приєднання на *перпендикулярне*: плюс-кінець кожної мікротрубочки розміщується під кутом 90^0 до площини кінетохору (рис. 7.13, *б*, 7.14, *б*).

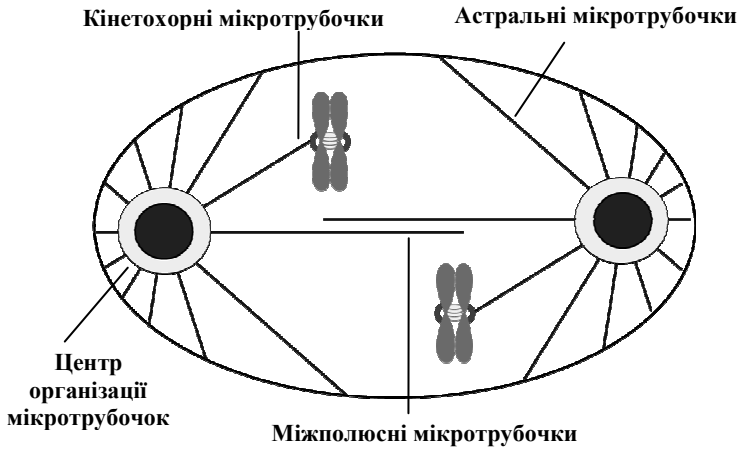


Рис. 7.12. Типи мікротрубочок.

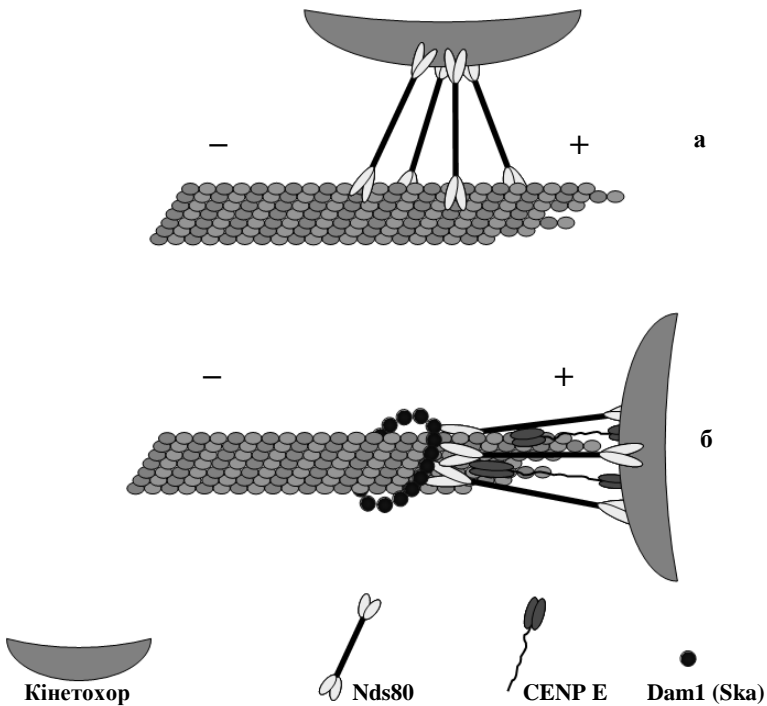


Рис. 7.13. Латеральний (а) та перпендикулярний (б) типи приєднання мікротрубочки до кінетохору.

В цей момент крім субкомплексу Ndc80 з мікротрубочкою починають взаємодіяти білкові комплекси Dam1 (Ska) та білок CENP-E, що відноситься до класу кінезин-подібних моторів. Зв'язок елементів кінетохору з мікротрубочкою при перпендикулярному приєднанні реалізується в такий спосіб, щоб її плюс кінець (як і при латеральному приєднанні) залишався вільним (див. також рис. 7.10): це дає змогу регулювати довжину мікротрубочки.

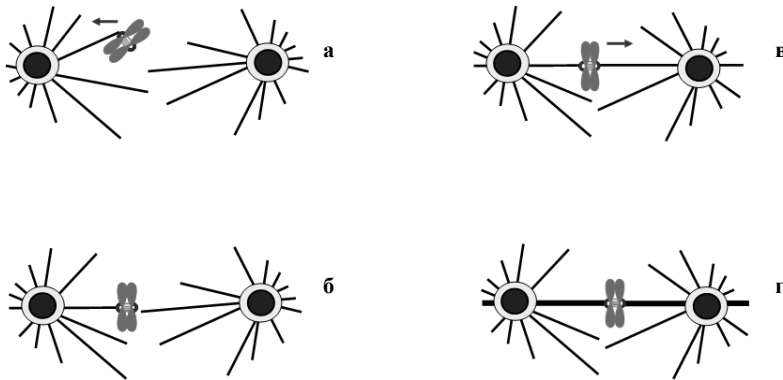


Рис. 7.14. Рух хромосом в цитоплазмі при утворенні метафазної пластинки. (а) – рух до полюса, зумовлений динеїном (латеральне приєднання), (б) – заміна латерального приєднання на перпендикулярне, (в) – конгресія хромосом, (г) – зупинка хромосоми на екваторі клітини. Стрілками вказано напрям руху хромосоми. Товстішими лініями на панелі (г) зображено к-фібрили.

Швидке переміщення до полюсу клітини гальмується взаємодією сестринського кінетохору з мікротрубочкою, яка полімеризується з протилежної сторони, і хроматидна пара розпочинає рух до екватора (етап **конгресії**) (рис. 7.14, в). Декілька механізмів задіяні в перемиканні напрямку руху. Численні експерименти свідчать про те, що за пересування в екваторіальному напрямку відповідає кінезин-подібний плюсомотор CENP-E, який починає взаємодіяти з мікротрубочкою при зміні латерального типу приєднання на перпендикулярне. З іншого боку, конгресію хромосом полегшує і мінус-мотор динеїн, який рухає хромосоми до полюса, протилежного напрямку первинного руху (треком є мікротрубочка, яка була щойно приєднана). Сумісна дія двох різноспрямованих моторів на сестринських кінетофорах є визначальною у конгресії хромосом. Швидкість руху хромосом в клітині майже співпадає з такою для динеїну та CENP-E.

Проте, певну роль у рухливості хромосом в цитоплазмі, зокрема в їх конгресії, виконує також динамічна нестабільність мікротрубочок. Перпендикулярне приєднання мікротрубочок до кінетохору є доволі стабільним, але, як було зазначено, здійснюється в такий спосіб, щоб плюс-кінець був вільним для приєднання або дисоціації тубулінових димерів. Таким чином, сестринські кінетохори зв'язані з динамічним веретеном поділу, що призводить до осциляції хромосом в цитоплазмі. Під час конгресії на кінетохорі, який першим був приєднаний до мікротрубочки, спостерігається активність білків, що підвищують здатність тубулінів до полімеризації: це зсуває хромосоми до екватора клітини. Доволі цікавим є також інший спосіб участі мікротрубочок у конгресії хромосом. Ефективність приєднання кінетохорних мікротрубочок до хромосом залежить від градієнту концентрації навколо кінетохорів особливого білка – GTPази Ran. Цей білок є компонентом ядерних пор, а після руйнування ядерної мембрани локалізується поблизу хромосом. Активна GTPаза Ran стимулює полімеризацію тубулінових димерів в безпосередній близькості від кінетохорів, які захоплюють утворений плюс-кінець коротких мікротрубочок. Поступовий ріст плюс-кінця штовхає хромосоми до екватора, а стабільний мінус-кінець за рахунок транспорту, опосередкованого динеїном, по якійсь іншій мікротрубочці тягнеться до полюса клітини.

Отже, за рахунок дії молекулярних моторів та полімеризації/деполімеризації мікротрубочок хромосоми рухаються в цитоплазмі від одного полюса до іншого. В процесі цього все більша кількість мікротрубочок приєднується до кінетохорів, що зумовлює коливальний рух, амплітуда якого поступово зменшується. Хромосоми повністю припиняють рухатись на екваторі клітини, коли кількість мікротрубочок, приєднаних до сестринських кінетохорів, однакова, і сили, що діють на кінетохори з різних полюсів, врівноважені. Зупинка хромосом в екваторіальній площині клітини – утворення метафазної пластинки – є останньою подією метафази. Кожна сестринська хроматида при цьому приєднана до мікротрубочок, які полімеризуються з різних полюсів (*амфітелічне* або

біполярне приєднання) (рис. 7.14, з) – клітина є готовою вступити в анафазу.

7.4. Розділення хромосом і система контролю збірки веретена поділу

Ще раз нагадаємо, що наприкінці метафази в екваторіальній площині розташовані пари ідентичних хромосом (сестринських хроматид), з'єднані одна з одною в центромерних ділянках за рахунок когезинових комплексів. Для того, щоб відбулось розходження сестринських хроматид до полюсів, необхідно порушити цей зв'язок. На відміну від профазного шляху дисоціації когезинів (підпідрозд. 6.1.5), провідна роль у цьому процесі належить специфічній серін-треоніновій протеазі – **сепаразі**. Вона взаємодіє з когезинами і каталізує протеолітичне розщеплення складової комплексу – білка Scc1. Це призводить до дисоціації когезинів з центромерного району (рис. 7.15) і дозволяє хроматидам розійтись (механізм руху хромосом в анафазі розглядатиметься в підрозділі 7.5).

Активність сепарази в клітині повинна жорстко контролюватись: якщо розрізання когезинів відбудеться до моменту утворення метафазної пластинки, частина молекул ДНК буде втрачена через те, що не всі кінетохори були приєднані до мікротрубочок. Тому більшість часу клітинного циклу (фактично, до початку анафази) протезна активність сепарази заблокована білком **секьюрином**, який утворює з нею стабільний комплекс. Зняття інгібуючої дії секьюрину здійснюється шляхом його поліубіквітинування спеціальним убіквітин-лігазним комплексом APC (anaphase promoting complex). В убіквітинованому стані секьюрин дисоціює від сепарази і розщеплюється в протеасомах. Убіквітин-лігазна активність APC залежить від його взаємодії з білком cdc20, який рекрутує субстрати до цього ферменту: лише у комплексі з cdc20 APC є активною убіквітин-лігазою (рис.7.16).

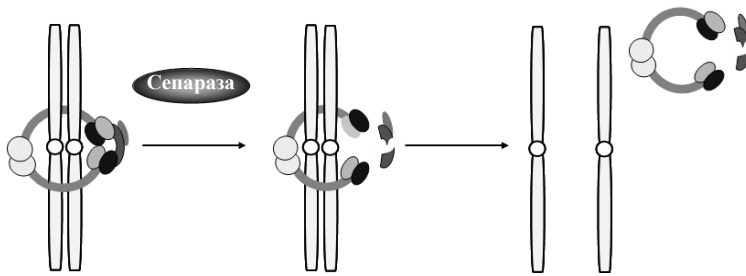


Рис. 7.15. Схема розщеплення когезинів сепаразою.

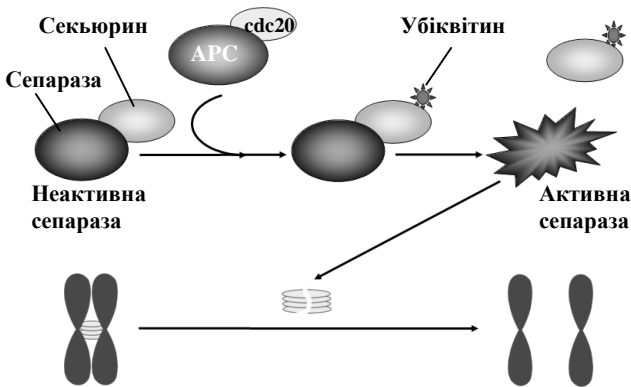


Рис. 7.16. Активація роботи сепарази шляхом убіквітинування секьюрина.

Комплекс APC-cdc20 утворюється в клітині лише тоді, коли повинна відбутися сегрегація хромосом. Декілька механізмів забезпечують своєчасність появи цього комплексу. В першу чергу, синтез cdc20 спостерігається в пізній G2-фазі/ранній профазі – таким чином, концентрація цього білка є максимальною в метафазі, коли його активність є необхідною. Крім того, важливим моментом в регуляції утворення комплексу APC-cdc20 є фосфорилування основних складових APC мітотичними циклін-залежними кіназами: ця модифікація сприяє ефективності взаємодії cdc20 з убіквітин-лігазним

комплексом. Найважливішою умовою активації сепараци є точне приєднання мікротрубочок веретена поділу до сестринських кінетохорів.

В процесі руху хромосом до екватора клітини реалізуються декілька типів аномального приєднання мікротрубочок до кінетохорів. На перших етапах конгресії здійснюється *монотелічне* приєднання – мікротрубочки приєднуються до кінетохора лише з одного полюсу, залишаючи протилежний кінетохор не зв'язаним з ними взагалі (рис. 7.17). Оскільки ріст мікротрубочок від центру їх полімеризації різнонаправлений, існує певна імовірність того, що мікротрубочки, які ростуть від одного полюсу клітини, будуть приєднані до протилежних сестринських кінетохорів. Таке приєднання може бути *синтелічним* (обидва кінетохори сполучені з мікротрубочками одного полюсу) або *меротелічним* (один з сестринських кінетохорів одночасно приєднаний до мікротрубочок різних полюсів) (рис. 7.17). Три варіанти некоректного зв'язку мікротрубочок із кінетохором зумовлюють активацію системи контролю збірки веретена поділу, яка, практично, є системою блокування розділення хромосом.

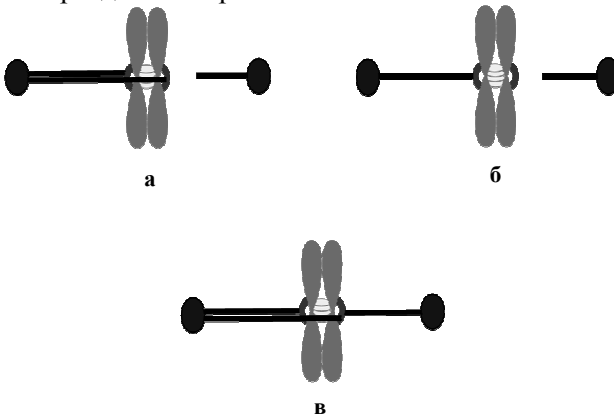


Рис. 7.17. Типи аномального приєднання мікротрубочок до кінетохорів.

При нормальному (амфітелічному) приєднанні мікротрубочок вони створюють силу, що діє на сестринські кінетохори у протилежних напрямках. Декомпактизовані ділянки центромерного хроматину, які містять CenH3-нуклеосоми та випетлюються (рис. 7.6, 7.18), є достатньо еластичними – під дією зовнішньої сили такі ділянки розтягуються, але така розтягувальна напруга передається і на з'єднанні між собою хроматиди (рис. 7.18). Напевно, з'єднанні сестринські центромери являють собою своєрідний тензіометр: еластична напруга, що створюється в інтерфейсі між двома хроматидами, є важливим засобом перевірки коректного приєднання мікротрубочок.

Очевидно, що синтелічне та меротелічне приєднання знімає або суттєво зменшує цю напругу між хроматидами. З'ясувалося, що в даних випадках основним сенсором відсутності напруги є білок Aurora-B. Як було зазначено у підрозділі 7.2, ця кіназа входить до складу білкового комплексу CPC, який розміщується між двома сестринськими хроматидами. Відсутність напруги при синтелічному та меротелічному приєднаннях стимулює кіназну активність Aurora-B за допомогою інших компонентів CPC, зокрема білка INCENP. Aurora-B фосфорилує ряд білків, які забезпечують зв'язок кінетохору з мікротрубочками (у дріжджів – це компоненти Dam1 та Ndc80, у вищих еукаріотів – Ndc80 та білок CENP-E). Фосфорилування призводить до порушення зв'язку з веретеном поділу, в результаті чого приєднання мікротрубочок або порушується повністю (після чого може відновитись), або стає монотелічним.

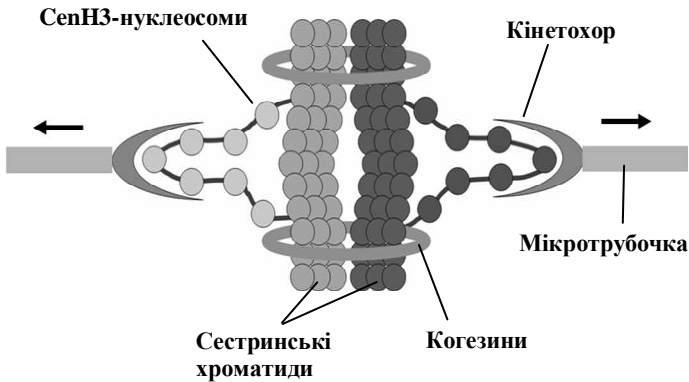


Рис. 7.18. Розтягування центромер сестринських хроматид на стадії метафази створює напругу між хроматидами.

Тут слід ще раз нагадати, що поблизу зовнішнього шару кінетохору в районі фіброзної корони розміщуються білки, які є сенсорами дефектів приєднання та ефektорами контрольної системи. Ці білки присутні у великій кількості *лише на кінетохорах, які не приєднані до мікротрубочок веретена поділу*. В момент приєднання їхня концентрація поблизу кінетохорів зменшується у 50-100 разів, що призводить до інактивації системи контролю. Відповідно, монотелічне приєднання (або відсутність приєднання взагалі) зумовлює підвищення концентрації цих білків.

Як більшість біологічних процесів, контроль збірки веретена поділу має каскадний характер: білки-сенсори дефекту безпосередньо чи опосередковано індують біохімічні модифікації білків-ефекторів, які забезпечують затримку клітини на стадії метафази і блокують сегрегацію хромосом. Численні експерименти вказують на те, що при відсутності приєднання хоча б одного кінетохору до мікротрубочок веретена поділу формується стабільний комплекс із чотирьох білків фіброзної корони – Mad2, BubR1 (Mad3 – у дріжджів), Vub3 та cdc20 – так званий комплекс MCC (mitotic checkpoint complex). Його утворення забезпечує зупинку клітини на стадії

метафази шляхом інгібування роботи основного тригера переходу до анафази – убіквітин-лігазного комплексу APC. Блокування активності APC зумовлено тим, що його основний кофактор – білок cdc20 – зв'язується компонентами MCC і, тим самим, втрачає можливість забезпечувати впізнання субстратів APC, основним з яких є інгібітор сепарази – секьюрин.

Яким чином вільний від мікротрубочок кінетохор стимулює утворення комплексу MCC? У відповідь на відсутність зв'язку з мікротрубочками відбувається активація ряду кінетохорних кіназ, зокрема Bub1, Mps1 та BubR1. Це, внаслідок фосфорилування певних білків кінетохору, призводить до рекрутування на кінетохор білкового гетеродимеру Mad1-Mad2. В інтерфазі комплекс Mad1-Mad2 є структурним компонентом ядерних пор, а після руйнування ядерної оболонки він знаходиться в цитозолі поблизу кінетохорів. Наряду з ним в цитозолі також присутній вільно дифундуєючий білок Mad2. Структурний аналіз Mad2 виявив, що білок існує у двох конформаціях: закритій (Mad2_C) в складі гетеродимеру та відкритій (Mad2_O) у вільному стані. У закритій конформації Mad2_C має спорідненість до білка cdc20, але гетеродимери Mad1-Mad2_C не можуть створити помітну концентрацію Mad2_C поблизу кінетохору, оскільки практично не дисоціюють. Відкрита ж форма Mad2_O не має спорідненості до cdc20.

Після приєднання Mad1-Mad2_C до кінетохору цей димер ефективно зв'язує вільно дифундуєючий Mad2_O. Ця взаємодія індукує зміну конформації Mad2_O на Mad2_C: при цьому дві структурні форми білка розділені високим енергетичним бар'єром – обидві структури (що спостерігається для білків не так часто, але є властивістю, зокрема, пріонів) відповідають глибоким мінімумам вільної енергії. Тобто, закрита конформація Mad2_C може існувати достатньо довго: Mad2_C дисоціює, його концентрація поблизу кінетохору зростає і утворюється комплекс cdc20-Mad2_C (рис.7.19).

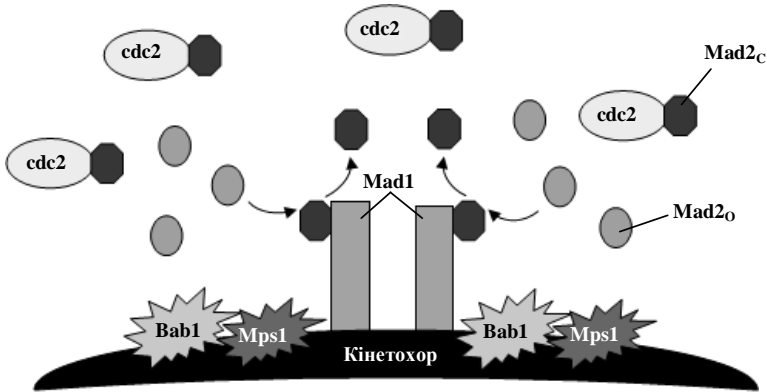


Рис. 7.19. Утворення субкомплексу MCC – димера Mad2_c-Cdc20.

Два інших компоненти комплексу MCC – білки BubR1 та Bub3 – знаходяться на кінетохорі, колокалізуючись з кінезин-подібним мотором CENP-E. Відсутність зв'язку CENP-E з веретеном поділу стимулює кіназну активність BubR1 (див. вище), що, в свою чергу, через каскад реакцій фосфорилування компонентів фіброзної корони веде до дисоціації з кінетохору димера Bub3-BubR1 (рис. 7.20). Два утворених субкомплекси cdc20-Mad2_c та Bub3-BubR1 об'єднуються в єдиний комплекс MCC, який надійно утримує cdc20 – активність APC блокується і клітина залишається на стадії метафази.

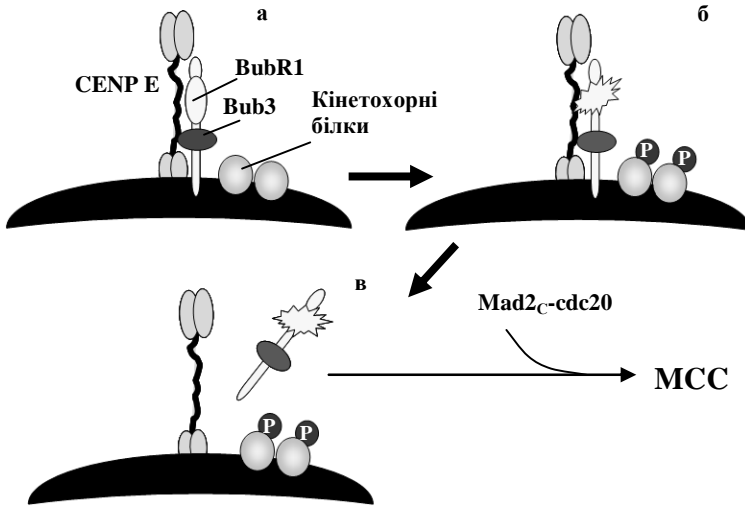


Рис. 7.20. Етапи активації субкомплексу MCC – димера Bub3-BubR1. (а, б) – активація білком CENP-E кінатної активності BubR1 та фосфорилювання компонентів кінетохору (P – фосфатні залишки), (в) – дисоціація Bub3-BubR1 з кінетохору та його об'єднання з Mad2_C-cdc20 (рис. 7.19) у комплекс MCC.

Затримка клітини на стадії метафази, зумовлена інгібуванням активності APC, необхідна для того, щоб дати час виправити дефекти приєднання мікротрубочок до хромосом. Коли амфітелічне приєднання встановлено, необхідно вимкнути систему контролю і дати можливість клітині перейти до анафази. Для цього в першу чергу необхідно припинити утворення комплексів, які здійснюють блокування сегрегації хромосом. В клітині існує декілька механізмів, що відповідають за це.

Першим найбільш важливим механізмом є швидке переміщення, після коректного приєднання мікротрубочок, основних білків-ефекторів та сенсорів системи контролю (білків Mad1, Mad2 та кінетохорних кіназ) від кінетохорів до полюсів клітини. Зменшення концентрації цих елементів системи контролю веде до неможливості утворення комплексу MCC. Рух

білків фіброзної корони до полюсів забезпечується мінус-направленим мотором динеїном. Клітинні лінії, дефектні за цим білком, не здатні до інактивації системи контролю, і всі компоненти фіброзної корони присутні на кінетохорах, які коректно приєднані до мікротрубочок. Активація роботи динеїна співпадає з інактивацією кінетохорних кіназ Bub1 та Mps1, яка відбувається при встановленні контакту з мікротрубочками. Інший додатковий механізм вимикання системи контролю збірки веретена поділу полягає в інактивації кінази BubR1. Оскільки її активність контролюється білком CENP-E, встановлення зв'язку з мікротрубочками призводить до блокування роботи BubR1, димер Bub3-BubR1 не дисоціює з кінетохору і, відповідно, не утворюється комплекс MCC.

Крім зниження ефективності утворення MCC *de novo*, необхідною умовою інактивації системи контролю є також деструкція вже утворених комплексів. Єдиним дослідженням (хоча і не до кінця) механізмом руйнування MCC є активація білка p31^{comet}. Цей білок взаємодіє з димером cdc20-Mad2_C в межах комплексу MCC та стимулює убіквітин-лігазну активність cdc20. В результаті аутоубіквітинування cdc20 відбувається дисоціація компонентів комплексу MCC (див. рис. 7.20). Крім того, p31^{comet} здатен взаємодіяти з гетеродимером Mad1-Mad2_C (див. рис. 7.19) на кінетохорі в такий спосіб, щоб заблокувати сайт взаємодії з Mad2_O: в результаті цього ефективність конформаційного перетворення Mad1_O в Mad2_C суттєво знижується.

Усі процеси, що безпосередньо чи опосередковано забезпечують інактивацію системи контролю збірки веретена поділу запускаються незалежно один від одного. Їх сумісна дія призводить до повного зняття блокади переходу від метафази до анафази і розпочинається процес розходження хромосом.

7.5. Завершення процесу сегрегації хромосом

Як тільки сестринські кінетохори амфітелічно приєднуються до мікротрубочок веретена поділу і активація сепараци приводить до розщеплення когезинів, клітина переходить до

анафази. Цю стадію прийнято розділяти на два етапи: анафазу А, під час якої власне відбувається порушення зв'язку між двома хроматидами, і анафазу В, яка характеризується рухом хромосом до полюсів клітини. Коли хромосоми опиняються на полюсах, розпочинається стадія телофази, основним призначенням якої є утворення двох повноцінних ядер, які недовгий час будуть знаходитися в одній цитоплазмі. Наступний за телофазою етап цитокінезу зумовлює розділення клітини на дві дочірні.

Визначальну роль у переході клітини від метафази до анафази, як описано в попередньому підрозділі, відіграє убіквітин-лігазний комплекс APC, активність якого приводить до деградації двох основних регуляторних білків. В першу чергу убіквітинуванню та деструкції піддаються секьюрини, що зумовлює активацію сепарази та вхід клітини в анафазу А. Майже миттєвий перехід до анафази В реалізується за рахунок руйнування М-циклінів (зокрема, цикліна В1). Їх деструкція приводить до інактивації відповідних циклін-залежних кіназ, що дає змогу фосфатазам дефосфорилувати білки-субстрати цих кіназ. Така хвиля дефосфорилування через каскадні реакції контролює в клітині процеси, характерні для анафази та телофази.

Рух хромосом в анафазі А та В забезпечується тими ж механізмами, що і конгресія хромосом: з одного боку в ньому приймають участь молекулярні мотори, а з іншого – важливу роль відіграє динамічна нестабільність мікротрубочок. В анафазі А пересування хромосом до полюсів здійснюється за рахунок деполімеризації мікротрубочок на плюс-кінцях. Оскільки білки кінетохору утримують постійний зв'язок з ними, рух хромосом на перших етапах забезпечується просто скороченням мікротрубочок веретена поділу (рис. 7.21).

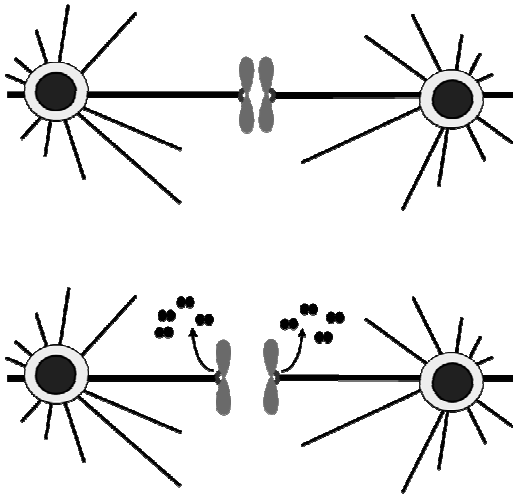


Рис. 7.21. Рух хромосом в анафазі А, зумовлений деполімеризацією кінетохорних мікротрубочок.

Під час анафази В у русі хромосом починають приймати участь також і молекулярні мотори. Плюс-направлені кінезин-подібні мотори взаємодіють з міжполосними мікротрубочками в зоні їх перекриття і, рухаючись по одній мікротрубочці, штовхають іншу – ту, що полімеризується з протилежного полюса, до її мінус-кінця. У результаті збільшується відстань між полюсами (рис.7.22), тобто і між кінетохорними мікротрубочками, а, відповідно, і між двома хромосомами. Не слід забувати, що при цьому відбувається також і деполімеризація плюс-кінця кінетохорних мікротрубочок.

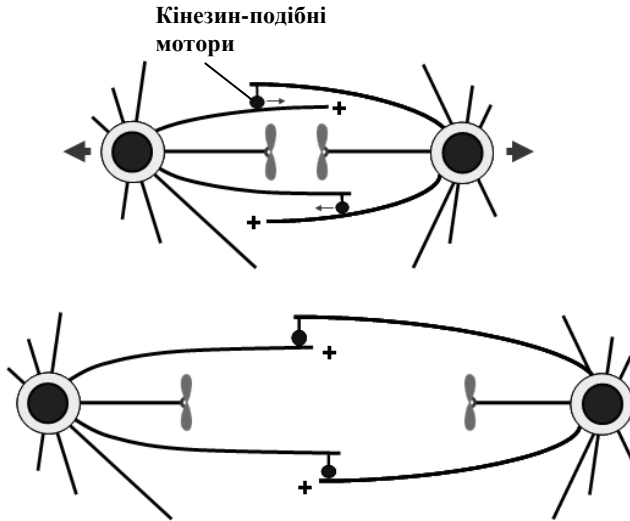


Рис. 7.22. Рух полюсів клітини в анафазі В, зумовлений роботою молекулярних моторів, що працюють на міжполюсних мікротрубочках.

На самому початку руху хромосом, з кінетохорів дисоціюють білки *Aurora-B* та *INCENP* (компоненти комплексу CPC) – вони залишаються в екваторіальній площині клітини і не переміщуються разом з хромосомами до полюсів. Їх дисоціація зумовлена дефосфорилюванням *INCENP*, яке відбувається після інактивації мітотичних циклін-залежних кіназ. *Aurora-B* та *INCENP* стабілізують плюс-кінці міжполюсних мікротрубочок в районі їх перекриття, полегшуючи розштовхування полюсів клітини в анафазі В. Крім того, ряд робіт вказує на участь *Aurora-B* та *INCENP* у цитокінезі: до них рекрутується група білків, які забезпечують розділення цитоплазми.

Коли хромосоми сягають полюсів клітини, розпочинається утворення ядерної оболонки навколо них, і руйнується веретено поділу. На сьогоднішній день описана група білків, задіяних у декомпактизації хромосом, але детальний механізм цього процесу не встановлений. Відомо, що у більшості організмів

деконденсація хроматину спостерігається після утворення ядерної оболонки, формування якої ініціюється взаємодією компонентів ядерної ламіни з поверхнею компактних хромосом.

В ранній телофазі відбувається заміна кофактора убіквітинлігандного комплексу APC: замість cdc20 з ним починає взаємодіяти білок cdh1 (хоча така заміна відбувається не в усіх організмів). Комплекс APC-cdh1 забезпечує убіквітування і подальшу деструкцію білків-стабілізаторів мікротрубочок, кінетохорних кіназ та білків, які забезпечують зв'язок хромосоми з веретеном поділу. В результаті цього хромосоми від'єднуються від мікротрубочок, а веретено поділу деградує.

Утворення ядерної оболонки знаходиться під контролем часового та просторового сигналів. Початок її організації *de novo* співпадає з інактивацією М-циклінів та їхніх кіназ. В профазі ці CDKs фосфорилують велику кількість білків – складових ядерних пор, внутрішньої мембрани ядра та ламіни – порушуючи таким чином цілісність ядра. Дефосфорилування цих білків фосфатазами після інактивації CDKs необхідно для початку утворення оболонки ядра. Власне, часовий контроль збірки ядерної оболонки полягає у тому, що її утворення можливо лише тоді, коли клітина перейде до телофазі (саме в цей момент повністю деградують М-цикліни, інактивуються CDKs і розпочинається хвиля дефосфорилування). Просторовий контроль утворення ядерної оболонки здійснюється за участі GTPази Ran. Як зазначалося вище, цей білок концентрується поблизу хромосом і сприяє росту кінетохорних мікротрубочок в профазі. В телофазі GTPаза Ran рекрутує до хромосом частину складових ядерних пор і мембранні везикули. Таким чином, збірка ядерної оболонки розпочинається на рівні взаємодії індивідуальних хромосом з компонентами ядерного конверта.

Паралельно з утворенням ядер відбувається розподіл цитоплазми. Таким чином в результаті послідовних фаз мітозу утворюються дві дочірні клітини з однаковим набором хромосом, який був характерний для батьківської клітини.

Рекомендована література

Загальна

Bloom, K., Joglekar, A. Towards building a chromosome segregation machine // *Nature*. – 2010. – Vol. 463. – P. 446-456.

Morgan, D.O. The cell cycle. Principles of control – Oxford : Oxford University Press, 2007.

Walczak, C.E., Cai, S., Khodjakov, A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 91-102.

Організація центромери

Carroll, C.W., Straight, A.F. Centromeric chromatin gets loaded // *J. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 176. – P. 735-736.

Centromere. Structure and evolution /eds. Đ. Ugarković. – Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2009.

Dalal, Y., Furuyama, T., Vermaak, D., Henikoff, S. Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 15974-15981.

Ekwall, K. Epigenetic control of centromere behavior // *Annu. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 41. – P. 63–81.

Furuyama, T., Dalal, Y., Henikoff, S. Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 6172–6177.

Hayashi, T., Yohta F., Osamu, I., Yoh A., Kohta T., Mitsuhiro Y. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres // *Cell*. – 2004. – Vol. 118. – P. 715–729.

Lamb, J.C., Birchler, J.A. The role of DNA sequence in centromere formation // *Genome Biology*. – 2003. – Vol. 4. – P. 214-218.

Maddox, P.S., Hyndman, F., Monen, J., Oegema, K., Desai, A. Functional genomics identifies a Myb domain-containing protein family required for assembly of CENP-A chromatin // *J. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 176. – P. 757–763.

Shuaib, M., Ouarrarhni, K., Dimitrov, S., Hamicheand, A.

HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1349-1354.

Sullivan, B.A., Blower, M.D., Karpen, G.H. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – Vol. 2. – P. 584-596.

Torras-Llort1, M., Moreno-Moreno1, O., Azorin, F. Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 2337–2348.

Структура кінетохору

Casola, C., Hucks, D., Feschotte, C. Convergent domestication of pogo-like transposases into centromere-binding proteins in fission yeast and mammals // *Mol. Biol. Evol.* – 2008. – Vol. 25. – P. 29-41.

Cheeseman, I.M., Desai, A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 33-46.

Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., et al. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore // *Cell.* – 2008. – Vol. 135. – P. 1039-1052.

Joglekar, A., Bloom, K., Salmon, E.D. *In vivo* protein architecture of the eukaryotic kinetochore with nanometer scale accuracy // *Curr. Biol.* – 2009. – Vol. 19. – P. 694-699.

Nogales, E., Ramey, V.H. Structure-function insights into the yeast Dam1 kinetochore complex // *J. Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122. – P. 3831-3836.

Ohta, S., Bukowski-Wills, J.-C., Sanchez-Pulido, L., et al. The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics // *Cell.* – 2010. – Vol. 142. – P. 810-821.

Ruchaud, S., Carmena, M., Earnshaw, W.C. Chromosomal passengers: conducting cell division // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 798-812.

Santaguida, S., Musacchio, A. The life and miracles of kinetochores // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 2511-2531.

Vader, G., Medema, R.H., Lens, S.M.A. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 173. – P. 833-837.

Wilson-Kubalek, E.M., Cheeseman, I.M., Yoshioka, C., Desai, A., Milligan, R. A. Orientation and structure of the Ndc80 complex on the microtubule lattice // *J. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 182. – P. 1055-1061.

Організація веретена поділу

Rieder, C.L. Kinetochore fiber formation in animal somatic cells: dueling mechanisms come to a draw // *Chromosoma.* – 2005. – Vol. 114. – P. 310-318.

Scholey, J.M., Brust-Mascher, I. Mogilner, A. Cell division // *Nature.* – 2003. – Vol. 422. – P. 746-752.

Walczak, C.E. Molecular mechanisms of spindle function // *Genome Biology.* – 2000. – Vol. 1. – P. 101-104.

Рух хромосом у клітині та система контролю збірки веретена поділу

Bharadwaj, R., Yu, H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. – P. 2016-2027.

Civelekoglu-Scholey, G., Scholey, J.M. Mitotic force generators and chromosome segregation // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67. – P. 2231-2250.

Díaz-Martínez, L.A., Clarke, D.J. Chromosome cohesion and the spindle checkpoint // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8. – P. 2733-2740.

Ganem, N.J., Compton, D.A. Functional roles of poleward microtubule flux during mitosis // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5. – P. 481-485.

Maresca, T.J., Salmon, E.D. Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal // *J. Cell Sci.* – 2010. – Vol. 123. – P. 825-835.

Musacchio, A., Hardwick, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 731-741.

Skinner, J.J., Wood, S., Shorter, J., Englander, S.W., Black, B.E. The Mad2 partial unfolding model: regulating mitosis through Mad2 conformational switching // *J. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 183. – P. 761-768.

Sullivan, M., Morgan, D.O. Finishing mitosis, one step at a time // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 894-903.

Tanaka, T.U. Kinetochore–microtubule interactions: steps towards bi-orientation // *EMBO J.* – 2010. – Vol. 29. – P. 4070-4082.

Tanaka, T.U., Stark, M.J.R., Tanaka, K. Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 929-942.

Розділ 8. Різноманітність хромосом

8.1. Еволюція каріотипів

Секвенування геномів багатьох організмів та їх порівняльний аналіз виявив високу консервативність послідовностей ДНК – великі ділянки, довжиною іноді у ціле плече хромосоми, є гомологічними у різних таксонів. Відповідно сучасним уявленням, біологічна еволюція відбувалась не стільки шляхом появи нових нуклеотидних послідовностей, скільки за рахунок "перетасування" вже існуючих. Імовірно, саме унаслідок такого перетасування для різних організмів спостерігається значна різноманітність каріотипів: навіть близькі види часто мають різну кількість хромосом, які відрізняються за своєю морфологією. За останні роки завдяки сучасним молекулярним та цитологічним методам встановлено основні механізми еволюції каріотипів. Шляхи зміни кількості та морфології хромосом подібні у різних таксонів, але наведені у цьому підрозділі приклади стосуються, головним чином, хребетних як однієї з найбільш досліджених у цьому напрямку груп.

8.1.1. Методи аналізу каріотипів. Як зазначалося у розділі 1, аналіз морфології хромосом проводять зазвичай на стадії метафази, коли ступінь компактизації ДНК є максимальним, що дозволяє дискримінувати під оптичним мікроскопом окремі хроматинові структури.

Найбільш простим варіантом фарбування хромосом є метод рутинного забарвлення, коли барвник зв'язується із хромосомою рівномірно по її довжині. Для більш точної ідентифікації хромосом та їх специфічних ділянок застосовують спеціальні методи диференційного забарвлення хромосом, які базуються на використанні певних барвників та процедур попередньої обробки препаратів (рис. 8.1). Найбільш поширеним методом диференційного пофарбування є метод G-забарвлення, який дозволяє отримати хромосоми, нерівномірно пофарбовані по довжині. Малюнок чергування темних (G–позитивних) та світлих (G–негативних) смуг є унікальним для кожної пари

гомологічних хромосом. Цікаво, що темні та світлі смуги асоційовані з ділянками, збагаченими на АТ- та GC-пари відповідно (для останніх характерна підвищена щільність кодуючих послідовностей). Практично таку саму картину чергування смуг дає метод Q-забарвлення (базується на використанні флуоресцентних барвників). Малюнок сегментів при R-забарвленні є протилежним до такого, що спостерігається при G- та Q-забарвленнях: R-позитивні смуги відповідають GC-збагаченим ділянкам геному. Існують також методи диференційного забарвлення, що дозволяють, наприклад, виявляти центромери та перицентромерний гетерохроматин (C-забарвлення) або ядерцеві організатори – місця локалізації кластерів генів рРНК – (ЯОР-забарвлення).

Довгий час методи диференційного фарбування хромосом (особливо G-метод) були основними при дослідженні та порівнянні морфології хромосом різних видів. Але для чіткого розподілення смуг довжина хромосом повинна бути достатньо великою, а значна кількість видів має дрібні хромосоми – це суттєво обмежувало сферу застосування таких методів. Останнім часом при дослідженні каріотипів використовують метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*). Метод FISH базується на здатності полінуклеотидних ланцюгів утворювати дуплекси із комплементарними їм ланцюгами. Штучно синтезований зонд, мічений якимось флуорофором, являє собою фрагмент ДНК, комплементарний ділянці хромосоми, яку треба візуалізувати. Такий зонд гібридується із препаратами хромосом у денатуруючих умовах, і факт гібридизації встановлюють за допомогою флуоресцентного мікроскопа. Зони хромосом, з якими гібридувався зонд, випромінюють світло у певному спектральному діапазоні в залежності від властивостей використаної флуоресцентної мітки – світяться відповідним кольором (рис. 8.2).

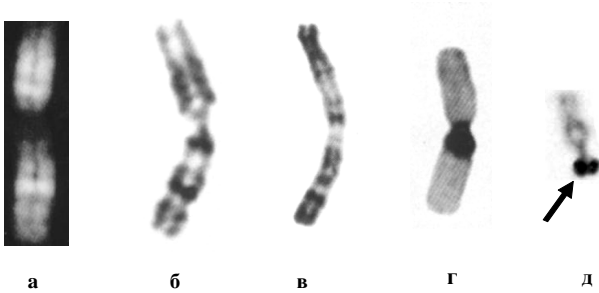


Рис. 8.1. Диференційне забарвлення хромосом людини: Q-забарвлення (а); G-забарвлення (б); R-забарвлення (в); C-забарвлення (г); ЯОР-забарвлення (д), ядерцевий організатор вказано стрілкою.

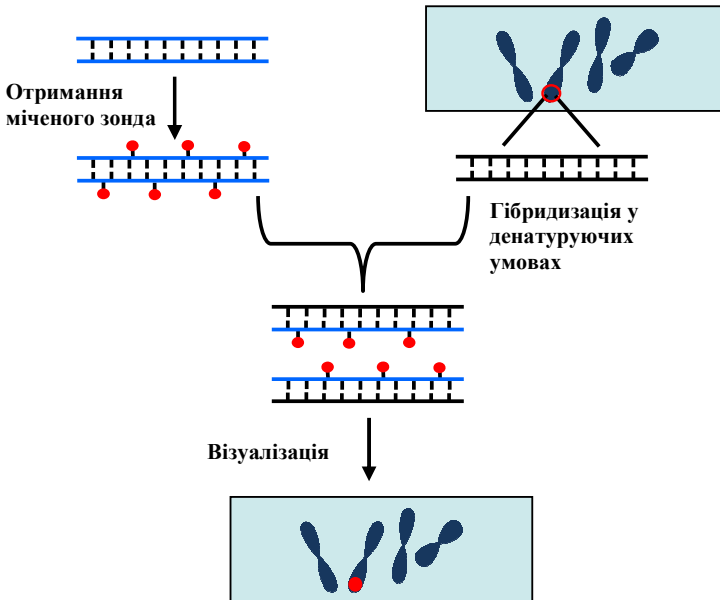


Рис. 8.2. Схема методу FISH.

Використання різних комбінацій флуорофорів при міченні зондів та складних систем фільтрів на мікроскопах дозволяє одночасно детектувати велику кількість ділянок на одній хромосомі (метод багатокольорової FISH) на препаратах метафазних пластинок. На відміну від класичних методів диференційного фарбування, методи FISH мають більшу роздільну здатність по відношенню до довжини фрагменту хромосоми, що аналізується (наприклад, проведення специфічної обробки препаратів хромосом перед гібридизацією дозволяє виявляти ділянки довжиною у десятки тисяч пар основ).

Великі блоки хромосом, що виявляються при диференційному забарвленні або при флуоресцентній гібридизації, називаються *синтенічними блоками*. При порівнянні між різними видами іноді спостерігається однаковий характер розміщення синтенічних блоків на хромосомах. В інших випадках синтенічні блоки можуть входити до складу різних пар гомологічних хромосом та/або змінювати порядок свого розташування. Якщо синтенічні блоки зустрічаються в однаковому порядку у різних видів організмів, це є ознакою спільного предкового каріотипу. Якщо характер їх розташування різний у різних таксонів, це означає більшу еволюційно відстань між такими таксонами. Механізми, що лежать в основі перекомбінації синтенічних блоків і приводять до утворення різних за морфологією хромосом, описуються у наступному підпідрозділі.

8.1.2. Загальні механізми еволюції каріотипів. Нагадаємо ще раз, що загальний опис каріотипу на стадії метафази (у тих організмів, у яких це можливо зробити) базується на визначенні кількості хромосом та їх морфології. При аналізі морфології хромосом визначають їх довжину та *центромерний індекс* – процентне відношення довжини короткого плеча до цілої хромосоми. На основі останнього хромосоми розділяють на метацентричні (центромерний індекс 50 %), субметацентричні (центромерний індекс менше 50 %) та акроцентричні (центромера майже повністю зміщена до кінця хромосоми і

короткі плечі не видно під мікроскопом). Саме за кількістю і співвідношенням в каріотипі трьох типів хромосом принципово розрізняються каріотипи різних видів, і причиною таких відмінностей є численні хромосомні перебудови, що виникають у процесі еволюції. Ці перебудови також призводять і до більш тонких змін у структурі – перекомбінації синтенічних блоків, – які часто не змінюють тип хромосоми і виявляються лише при диференційному забарвленні.

Для того, щоб будь-яка зміна у структурі чи кількості хромосом була зафіксована (збережена) в процесі еволюції, необхідно щоб вона відповідала ряду вимог. По-перше, така зміна повинна виникнути у статевих клітинах. По-друге, вона має стабільно відтворюватися у клітинних поділах. По-третє, її наявність у каріотипі не повинна суттєво впливати на життєздатність організму-носія. На сьогодні описано декілька типів хромосомних перебудов, які відповідають цим вимогам, а отже є причиною утворення нових каріотипів.

Одним із розповсюджених типів перебудов є *транслокації* – обміни ділянками між негомологічними хромосомами. Розрізняють реципрокні та нереципрокні транслокації. При реципрокних транслокаціях відбувається взаємний обмін ділянками негомологічних хромосом, а при нереципрокних – ділянка однієї хромосоми приєднується до кінця іншої (за умови порушення її теломерної зони). Обидва типи транслокацій потребують наявності дволанцюгових розривів у молекулах ДНК хромосом, що задіяні в перебудові. Системи репарації упізнають кінці розривів і сполучають фрагменти між собою у декілька різних способів (рис. 8.3).

У випадку сполучення, яке зображене на рис. 8.3 *a*, кількість хромосом у каріотипі залишається сталою, а поява змін у центромерному індексі залежить від того, чи однаковими за розміром були фрагменти, що перехресно сполучалися. Такий тип транслокацій неодноразово відбувався під час формування каріотипів різних видів. Як приклад на рис. 8.4 наведено схематичне зображення гібридизації зондів, отриманих із хромосом гібона, на хромосомах людини. Можна бачити, що хромосома 16 та довге плече хромосоми 5 людини виникли в

результаті реципрокної транслокації двох хромосом деякої предкової форми, що відповідають хромосомам 2 та 18 гібона. Оскільки в процесі еволюції такі транслокації відбувалися неодноразово, і часто в них були задіяні не лише дві хромосоми, то встановити послідовність транслокаційних подій, які привели до появи тієї чи іншої хромосоми, доволі складно.

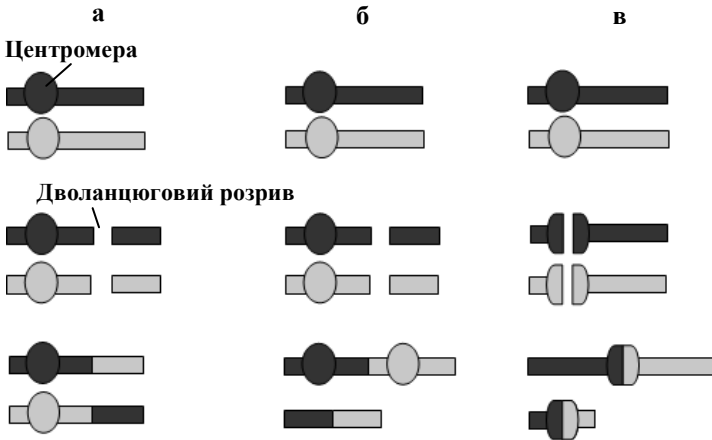


Рис. 8.3. Реципрокні транслокації без утворення дицентричної хромосоми (*а*), з утворенням дицентричної хромосоми та ацентричного фрагменту (*б*) та робертсонівська транслокація з утворенням великої метацентричної хромосоми та короткого фрагменту із залишками центромерних ділянок (*в*).

Іншим наслідком транслокацій є утворення дицентричної хромосоми та ацентричного фрагменту (рис. 8.3, *б*), що може мати декілька різних наслідків. Найчастіше фрагмент хромосоми, позбавлений центромерної ділянки, буде втрачений при клітинних поділах, а наявність двох центромер у одній хромосомі приводить до аномального розходження хроматид в анафазі. За таких умов хромосомна перебудова не буде спадкуватися і не стане причиною утворення нового каріотипу. Проте, у деяких випадках у межах ацентричного фрагменту може утворюватись неоцентромера (розділ 7), що дасть йому

зможу бути приєднаною до веретена поділу, а отже, стабільно передаватися дочірнім клітинам при поділі. Такі фрагменти із неоцентромерами є однією із причин появи у каріотипах так званих додаткових *B-хромосом* (див. підпідрозд. 8.2.3). З іншого боку, у складі дицентричної хромосоми одна із центромер може підлягати інактивациї, що забезпечить нормальну передачу хромосоми при поділі. Прикладом такої інактивациї може слугувати поява субметацентричної хромосоми 2 у людини, яка виникла внаслідок транслокації двох акроцентричних хромосом спільного предка людини і шимпанзе (відповідають хромосомам 12 та 13 шимпанзе). В результаті цього кількість хромосом у каріотипі людини (46 у диплоїдному наборі) зменшилася на дві у порівнянні із шимпанзе (48). Слід зазначити, що поява неоцентромери на ацентричному фрагменті та інактивация центромери в дицентричній хромосомі є незалежними подіями і дуже рідко відбуваються одночасно.

Особливим типом реципрокних транслокацій є *Робертсонівські транслокації* – об'єднання двох акроцентричних хромосом (після розриву у центромерних зонах) у одну мета- або субметацентричну (рис. 8.3, в). Новоутворена об'єднана центромера при цьому зберігає свою функціональність і ефективно формує кінетохор. Іноді й невеликий фрагмент, який містить частину центромерних послідовностей двох хромосом (рис. 8.3, в), також отримує змогу передаватися дочірнім клітинам при поділі. В такому випадку він може слугувати причиною появи у каріотипах *B-хромосом* (підпідрозд. 8.2.3).

Робертсонівські транслокації є дуже частою подією в еволюції каріотипів – за їх рахунок каріотипи, що мають велику кількість дрібних акроцентричних хромосом, еволюціонують у каріотипи із переважанням великих мета- та субметацентриків. Наприклад, каріотип домашньої собаки представлений 39 парами хромосом, з яких усі аутосоми (нестатеві хромосоми) є акроцентричними. Каріотип іншого представника, який відноситься до цієї ж родини, – рудої лисиці – характеризується наявністю 16 пар метацентричних або субметацентричних хромосом, частину з яких легко ідентифікувати як результат

робертсонівських транслокацій хромосом собаки. В наслідок хромосомних перебудов цього типу можуть відрізнятися навіть каріотипи в межах одного виду: наприклад, варіації хромосомних наборів представників миші *Mus musculus* із різних популяцій є результатом великої кількості робертсонівських транслокацій.

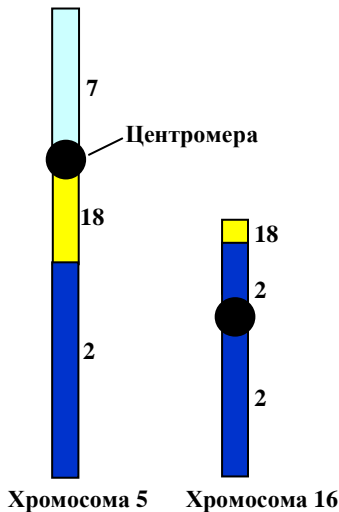


Рис. 8.4. Схематичне зображення гібридизації зондів, отриманих із хромосом гібона, на двох хромосомах людини. Цифрами праворуч вказані номери хромосом гібона, послідовності яких були використані у якості зондів.

Робертсонівські транслокації передбачають злиття двох акроцентричних хромосом у одну, що призводить до зменшення кількості хромосом в каріотипі. Збільшення їх кількості відбувається шляхом розриву мета- або субметацентричних хромосом у центромерних зонах; при цьому утворюються дві акроцентричні хромосоми. Подібні хромосомні розриви супроводжували, наприклад, утворення різних каріотипів гризунів.

У робертсонівських транслокаціях, які приводять до появи нових хромосом, задіяні центромерні ділянки. Ще одним

пов'язаним із центромерою ефектом, задіяним до еволюції каріотипів, є так званий "центромерний зсув" (centromere shift) – зміна розташування центромери на хромосомі. Більшість дослідників схиляються до думки, що центромерний зсув є особливим випадком утворення неоцентромери, яке супроводжується інактивацією "старої" центромери. Наприклад, статеві X-хромосоми (див. підпідрозд. 8.1.3) двох видів лемурів не відрізняються одна від одної за послідовністю розташування синтенічних блоків, проте у чорного лемура X-хромосома є акроцентричною, а у лемура котячого – метацентричною, тобто в даному випадку відбулося "переміщення" центромери вздовж хромосоми. Цікаво, що обидві X-хромосоми лемурів майже співпадають за послідовностями блоків із людською X-хромосомою, яка при цьому є субметацентричною.

Крім транслокацій суттєву роль в еволюції каріотипів відіграють *інверсії* – повороти ділянки хромосоми на 180° . Залежно від того, залучає інверсія область центромери чи ні, розрізняють, відповідно, перицентричні та парацентричні інверсії. Перші можуть значно змінювати морфологію хромосоми, а другі не приводять до зміни морфологічного типу хромосоми й детектуються лише за допомогою методів диференційного забарвлення. (рис. 8.5) Поява інверсій в одній із сестринських хромосом приводить до неможливості проходження рекомбінації між гомологами на інвертованих ділянках, що спричинює незалежну їх еволюцію в гомологічній парі. Саме інверсіям належить провідна роль в утворенні гетероморфних (різних за будовою) статевих хромосом ссавців (див. підпідрозд. 8.1.3). Прикладом інверсій в еволюції каріотипів є 1 та 18 хромосоми людини, які відрізняються перицентричними інверсіями від відповідних хромосом шимпанзе.

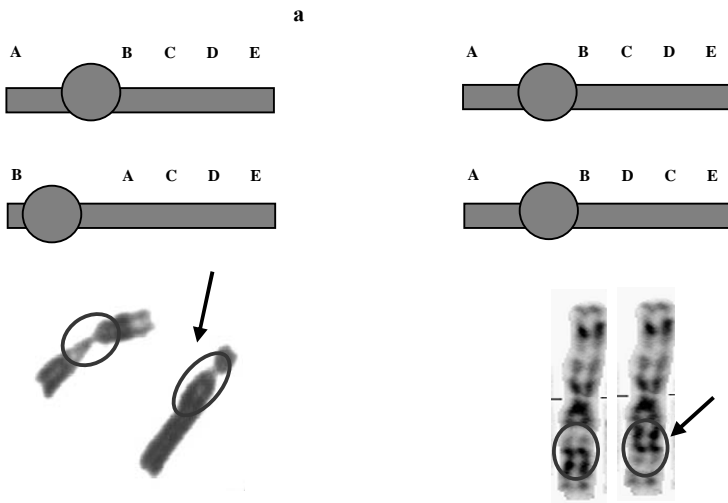


Рис. 8.5. Схема та фото перичентричної (а) і парацентричної (б) інверсій. На фото наведені хромосоми людини, ділянки інверсій обведено, хромосоми з інверсіями вказано стрілкою. Буквами зверху вказано порядок розташування генів у хромосомі.

В процесі еволюції каріотипів окрім хромосомних перебудов велику роль відігравали також *поліплоїдії* – кратні гаплоїдному збільшення кількості хромосом. Поліплоїдія може бути зумовлена або кратним збільшенням власних для даного виду хромосом (*автополіплоїдія*), або виникати за рахунок міжвидової гібридизації, тобто об'єднання геномів різних видів (*аллополіплоїдія*). Причиною виникнення автополіплоїдій може бути явище ендореплікації ДНК, коли клітина проходить декілька циклів реплікації без подальшого виходу в поділ. Інший механізм – порушення мікротрубочок веретена поділу, що приводить до нерозходження сестринських молекул ДНК (див. розділ 7). Крім того, автополіплоїдні клітини можуть виникати при блокуванні цитокінезу, коли каріокінез уже відбувся.

Поліплоїдії широко розповсюджені у рослинному світі – більшість культурних сортів є поліплоїдними формами диких предкових рослин. У тваринному світі поліплоїдизації відбувалися неодноразово при формуванні каріотипів нижчих хордових. Існують популяції поліплоїдних видів жаб та риб. Для деяких видів риб, жаб, ссавців описані міжвидові гібриди.

Підсумовуючи вищесказане, слід зазначити, що еволюція каріотипів супроводжувалася різноманітними перебудовами хромосомного апарату. Деякі із них приводили виключно до зміни морфології хромосом (інверсії, центромерний зсув, деякі типи реципрокних транслокацій), деякі – лише до зміни кількості хромосом (поліплоїдія). Частина хромосомних перебудов (дицентричні хромосоми з фрагментами, робертсонівські транслокації та центромерні розриви) забезпечували зміни як кількості, так і морфології хромосом. Очевидно, що чим більш еволюційно віддаленими є види, тим більша кількість перебудов відбулася під час утворення їх каріотипів, і, навпаки, хромосомні набори споріднених видів часто відрізняються всього декількома перебудовами.

8.1.3. Статеві хромосоми та їх еволюція. У більшості видів тварин та рослин стать визначається наявністю специфічних статевих хромосом, одна із яких несе ген/гени, що є ключовими у формуванні чоловічої чи жіночої статі. Особливість статевих хромосом у порівнянні з іншими хромосомами набору (аутосомами) полягає у тому, що їх пара є негомологічною, і вони значно відрізняються одна від одної за морфологією (є гетероморфними) (рис. 8.6).

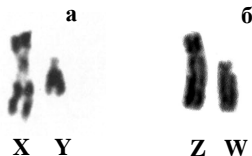


Рис. 8.6. Морфологія статевих хромосом людини (а) та птаха (б).

Найбільш розповсюдженими системами статевих хромосом є дві – XX/XY (притаманна ссавцям, деяким риbam, комахам та рослинам) та ZZ/ZW (характерна в основному для метеликів, птахів та рептилій). У першому випадку особини жіночої статі несуть дві однакові статеві хромосоми, які позначаються як X-хромосоми (XX), а особини чоловічої статі – дві різні (XY). У другому випадку, навпаки, в каріотипах самок присутні різні хромосоми ZW, а самців – однакові хромосоми ZZ. Слід зазначити, що види, стать яких визначається за типом XX/XY, не обов'язково мають дві статеві хромосоми. Наприклад, у деяких риб самки мають дві пари X-хромосом ($X_1X_1X_2X_2$), а самці – дві різні X- та одну Y-хромосому (X_1X_2Y). У такому випадку говорять про *множинні статеві хромосоми*. Особливим видом у цьому сенсі є качкодзьоб (**Ornithorhynchus anatinus**). Хромосомний набір самок включає 5 різних пар X-хромосом, які поводять себе під час мейозу аналогічно іншим хромосомам. Каріотип самців має 5 різних X- та 5 різних Y-хромосом. Під час мейозу всі десять статевих хромосом утворюють ланцюг, в якому у теломерних районах по чергово сполучені X- та Y-хромосоми – таким чином утворюється одна гігантська хромосома із багатьма центромерами.

Майже в усіх описаних видів статеві хромосоми є гетероморфними: Y- та W-хромосоми невеликі за розміром, майже повністю гетерохроматинізовані і мають невелику кількість генів (наприклад, у людини у складі Y-хромосоми нараховується приблизно 80 генів, а її розмір складає 2% від геному). Саме ці хромосоми несуть ключові гени, які визначають стать у більшості хребетних – чоловічу (Y-хромосома в системі XX/XY) або жіночу (W-хромосома в системі ZZ/ZW). Відповідно, у відсутності Y-хромосоми розвивається жіноча стать, а W-хромосоми – чоловіча. Хромосоми X та Z за своїм розміром та кількістю генів відповідають середньому значенню цих показників для аутосом відповідного виду.

Визначення статі за системами XX/XY або ZZ/ZW зустрічається у видів, які відносяться до різних типів і навіть

царств, отже статеві хромосоми виникали неодноразово у процесі еволюції. Молекулярний аналіз свідчить, що гомологічних послідовностей між хромосомами X-Z і Y-W майже немає – відповідні системи статевих хромосом виникли незалежно одна від одної. Більш того, подібність послідовностей ДНК статевих хромосом є незначною навіть для таксонів, які характеризуються однаковою хромосомною системою визначення статі: наприклад, Z-хромосоми суттєво відрізняються за нуклеотидним складом у птахів та змій.

Походження статевих хромосом від якоїсь аутосомної пари не викликає сумніву. Одним із підтверджень цього є наявність у статевих хромосомах *псевдоаутосомних регіонів* – ділянок гомології між гетероморфними хромосомами, за рахунок яких відбувається кон'югація цих хромосом в мейозі. Найбільш досліджені псевдоаутосомні регіони статевих хромосом ссавців. Вони займають ділянки довжиною від декількох сотень тисяч до декількох мільйонів пар основ, розміщених поблизу кінців хромосом. За своїм нуклеотидним складом псевдоаутосомні регіони дуже варіабельні навіть серед плацентарних, хоча окрім некодуючих послідовностей містять декілька генів, спільних для X- та Y-хромосом.

Інший доказ аутосомного походження статевих хромосом на прикладі ZZ/ZW системи був отриманий із дослідження каріотипів змій. Аналіз морфології Z- та W-хромосом трьох видів змій виявив, що найбільш еволюційно древній вид має дві статеві хромосоми, які є абсолютно мономорфними і не відрізняються навіть при застосуванні методів диференційного забарвлення та флуоресцентної гібридизації, отже вони є гомологічними, як і інші аутосоми. Даний випадок, таким чином, являє собою виключення із загального правила гетероморфності статевих хромосом. Еволюційно більш пізній вид характеризується незначною гетероморфністю статевих хромосом в основному в межах короткого плеча і, зрештою, найбільш молодий вид має дві гетероморфні статеві хромосоми, які гомологічні лише у кінцевих ділянках. Отже, поступова зміна морфології "предкової" пари аутосом може привести до появи структурно різних варіантів хромосом у видів-нащадків.

Першим кроком до відокремлення певної пари гомологів як статевих хромосом є набуття однією із них генів, що детермінують розвиток статі. Наприклад, у ссавців таким геном є ген *SRY* (Sex Determining Region Y), продукт якого є транскрипційним фактором для генів, котрі визначають розвиток тестикул (чоловічих гонад) у зародку. Поява нової нуклеотидної послідовності в одному із гомологів перешкоджає гомологічній рекомбінації у цій точці. Відсутність рекомбінації чи її зниження надає можливість послідовностям ДНК еволюціонувати незалежно одна від одної, у той час як обмін ділянками між гомологічними хромосомами постійно підтримує їх подібність на певному рівні.

Однією із найбільш розповсюджених причин припинення рекомбінації між гомологами є інверсії в одному із них. Дійсно, порівняльний аналіз ДНК Y-хромосом різних підкласів ссавців вказує на наявність декількох послідовних інверсій (перша з яких як раз торкається ділянки поблизу гена *SRY*), які поступово знижували можливість рекомбінації двох гомологічних хромосом-попередників. За рахунок такої генетичної "ізоляції" майбутня Y-хромосома накопичувала різноманітні мутації, серед яких спостерігалися делеції еухроматинових сегментів та транспозиції, які спричинювали її гетерохроматинізацію. Змінені в результаті мутацій послідовності ДНК X-хромосом могли бути легко відновлені за рахунок гомологічної рекомбінації між ними у геномах самок. Подібний механізм еволюції пари статевих хромосом ZW також описаний для птахів та рептилій.

8.2. Особливі типи хромосом

Організація інтерфазних хромосом та механізми їх компактизації під час мітозу, описані у попередніх розділах, є загальними для значної більшості клітин та організмів в цілому. Проте, як завжди буває у біологічних системах, із цього правила існує ряд виключень. Саме ці особливі, виключні варіанти хромосом будуть коротко розглянуті у даному підрозділі.

8.2.1. Мейотичні хромосоми. При утворенні гамет їх безпосередні клітини-попередники діляться у процесі *мейозу*, у результаті якого утворюються чотири гаплоїдні клітини. Мейоз здійснюється шляхом двох послідовних клітинних поділів, які подібні до мітотичних і мають ті ж самі чотири стадії. У профазі I (яка складається із стадій лептотени, зиготени, пахітени, диплотени та діакінезу) відбувається утворення так званих *бівалентів*, або *тетрад*, – комплексів гомологічних пар хроматид. Дві з чотирьох хроматид бівалента, що належать гомологічним хромосомам, у кількох точках утворюють за участю певних білків *синаптонемні комплекси*, де починається процес гомологічної рекомбінації. У результаті гомологічні хромосоми обмінюються своїми ділянками. Далі здійснюється поступова конденсація хроматид, і під мікроскопом можна побачити характерні перехрещення між хроматидами – *хіазми*, що утворилися внаслідок рекомбінації. Профаза I закінчується розділенням конденсованих бівалентів. Далі в метафазі I пари хроматид вишукуються по екватору, в анафазі I відбувається їхнє розходження, у телофазі I – остаточне розділення двох клітин, що містять подвійний набір молекул ДНК. Сестринські хроматиди при цьому залишаються з'єднаними в зоні своїх центромер. Далі у другому поділі відбувається розділення центромер і розходження хромосом до полюсів, у результаті чого утворюються чотири гаплоїдні клітини.

Власне під час профазі I мейозу хромосоми проходять ряд кардинальних структурних перетворень, які включають у себе їх компактизацію, формування хроматинових структур типу "*лампових щіток*" (див. нижче), а також утворення бівалентів за участю білкового синаптонемного комплексу.

До складу компактизованих мейотичних хромосом входять ті ж білкові комплекси, що описані для мітотичних хромосом – топоізомераза II та конденсини. Останні дещо відрізняються від мітотичних за своїм складом: SMC-білки такі самі, як і в мітотичних хромосомах (підрозділ 6.1), відміни стосуються допоміжних білків, що не відносяться до класу SMC. Нещодавні роботи вказують на те, що конденсинові комплекси в складі мейотичних хромосом є більш критичними для коректного

формування синаптонемного комплексу та сегрегації хромосом, а не для їх компактизації, яка може відбуватися, хоча і з затримкою, у мутантів, нокаутних по генам білків SMC.

На відміну від мітозу, коректний розподіл хромосом під час мейозу вимагає утримання поруч не лише двох ідентичних молекул ДНК, але і гомологічних хромосом. В обох випадках ключову роль відіграють когезинові комплекси, проте у складі мейотичної хромосоми є два типи когезинів, які дещо розрізняються за своїми складовими. При когезії гомологічних хромосом (утворенні бівалентів) когезини входять до складу мультибілкового синаптонемного комплексу. Його формування розпочинається на стадії лептотени із збірки на одній із сестринських хроматид білкового шару, який називається аксіальним елементом (axial element, AE) і складається із когезинів та декількох специфічних синаптонемних білків. У зиготені розпочинається зближення гомологів і між двома аксіальними елементами формується білковий тяж, який називається центральним елементом (central element, CE). Три білкових прошарки – два аксіальних елемента та центральний елемент – додатково скріплюються поперечними тяжами із білків, що формують поперечні елементи (transverse element, TE) (рис 8.7). Саме їм належить основна роль у остаточному формуванні синаптонемного комплексу та максимальному зближенні гомологів – утворенні *синапсу*. Таким чином, у структурі біваленту наявні пари гомологічних хроматид, які міцно скріплені білковими тяжами – синаптонемним комплексом. Білки цього комплексу забезпечують рекомбінацію між молекулами ДНК.

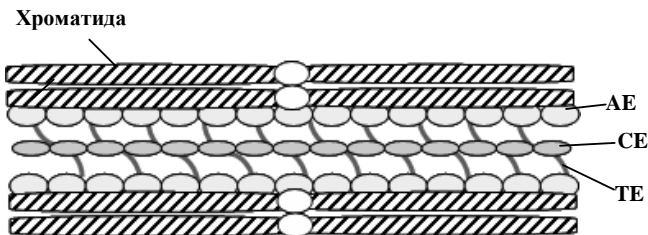


Рис. 8.7. Схематична структура синаптонемного комплексу.

АЕ – аксіальний елемент, СЕ – центральний елемент, ТЕ – поперечні елементи.

Особливою подією профазы I мейозу є утворення на стадії диплотени специфічних за морфологією мейотичних хромосом – хромосом типу "лампових щіток" (рис. 8.8). В основному такі хромосоми спостерігаються при дозріванні ооцитів, проте у деяких видів комах вони з'являються і під час сперматогенезу. Їх поява пов'язана із активною транскрипцією, яка приводить до деконденсації частини хромосоми, у результаті чого біваленти стають довшим у декілька десятків разів. На стадії "лампових щіток" від кожної хромосоми відходять латерально спрямовані петлі, які формуються ділянками ДНК, що транскрибуються; осьова частина хромосоми при цьому є компактизованою. Саме така організація хромосом типу "лампових щіток", яку легко зафіксувати методами світлової мікроскопії, стала одним з аргументів на користь моделі радіальних петель, закріплених на скефолді, для структури мітотичної хромосоми (підрозділ 6.4).

За рахунок різного ступеня компактизації та різної кількості петель в окремих ділянках хромосоми типу "лампових щіток" мають характерну посмугованість, яка проявляється без застосування методів диференційного фарбування. Більш щільні, інтенсивніше забарвлені ділянки називаються *хромомерами*. Петлі хромосом типу "лампових щіток" дуже варіабельні як за розміром, так і за послідовностями, що їх складають: транскрипції підлягають не тільки гени, а і велика кількість повторюваних елементів. З петлями "лампових щіток" постійно зв'язана білкова машинерія транскрипції та процесингу, яка у комплексі з новосинтезованими молекулами РНК утворює навколо петель щільний *нуклеопротейновий матрикс*.

Активация транскрипції під час мейозу довгий час пояснювалася необхідністю для ооциту накопити велику кількість різноманітних РНК та білків, щоб забезпечити розвиток майбутньої зиготи. Проте, виявлення у складі нуклеопротейнового матриксу великої кількості невеликих за

розміром РНК, що не транслюються, та транскриптів повторюваних елементів привело до думки, що є також інші, не зовсім зрозумілі причини такої гіперактивної транскрипції. Існують дані, які вказують на участь транскриптів, що не транлюються, у підтриманні та визначенні гетерохроматинових сегментів хромосом та когезії сестринських хроматид.

Остаточно сформовані біваленти наприкінці профазі I мейозу розпочинають рух до екваторіальної площини. Наступні за цим стадії поділу, як вже зазначалося, подібні до мітотичних і були розглянуті у розділі 7.

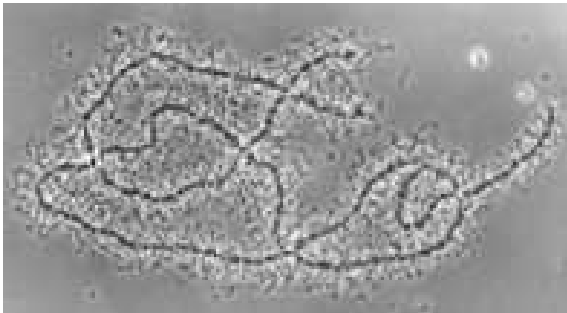


Рис. 8.8. Фото хромосом типу "лампових щіток" (фото із сайту www.cellbiol.ru).

8.2.2. Політенні хромосоми. Як дискретні морфологічні структури хромосоми можна побачити лише під час клітинного поділу. Це пов'язано з тим, що ступінь їх компактизації під час мітозу є дуже високою, у той час як в інтерфазному ядрі вони являють собою витягнуті деконденсовані нуклеопротейнові фібрили. Єдиний тип хромосом, який можна побачити за допомогою оптичного мікроскопа на стадії інтерфазі – це *політенні хромосоми*, які, на відміну від звичайних хромосом, складаються із великої кількості латерально з'єднаних паралельних ідентичних молекул ДНК, а отже мають гігантські розміри (200-600 мкм) (рис. 8.9). Причиною утворення політенних хромосом є *ендомітоз* – клітина проходить раунди реплікації без подальшого поділу та втрати зв'язків між дочірніми хроматидами, таким чином накопичуючи велику

кількість молекул ДНК. Кількість таких молекул у складі однієї хромосоми може коливатися від декількох десятків до декількох тисяч. Крім того, у політенних ядрах два гомологи також фізично з'єднані один з одним і на цитологічних препаратах виглядають як одна ціла хромосома. У деяких видів організмів центромерні райони політенних хромосом зібрані у єдиний кластер – *хромоцентр*.

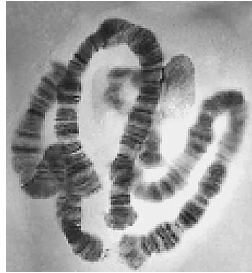


Рис. 8.9. Фото політенних хромосом. Репродуковано з роботи Makarov, Chentsov (2010).

Характерною рисою політенних хромосом є їх поперечна посмугованість – більш темні ділянки (*хромомери*) чергуються із світлими (*міжхромомерами*), причому ця посмугованість виявляється без застосування методів диференційного забарвлення (рис. 8.9). Якщо приблизна довжина однієї смуги, яка виявляється, наприклад, при G-забарвленні хромосом людини, становить більше ніж 10^7 пар основ, то хромомер дрозофіли має довжину 50–100 тис пар основ. Один хромомер містить один або декілька генів, а міжхромомери, як вважалося довгий час, взагалі позбавлені генів. Проте, в останні роки деякі відкриті рамки зчитування ідентифіковані і в їхньому складі. Активна транскрипція хромомерів політенних хромосом приводить до випетлювання ДНК із їх складу і така структура називається *пуфом* (великі за розміром пуфи називають кільцями Бальбіані (Edouard Balbiani)).

Механізми, які забезпечують утримання великої кількості молекул ДНК у тісному зв'язку одна з одною, досі не з'ясовані, хоча описана велика кількість (більше 100) білків-кандидатів

для виконання цієї функції. В експериментах *in vitro* було показано, що внаслідок видалення гістона H1 за допомогою 0,6 М NaCl політенні хромосоми розпушуються і втрачається дискретна хромомерна посмугованість, але цілісність хромосом зберігається. Такий структурний перехід є зворотнім – при зниженні іонної сили до фізіологічних значень характерний хромомерний рисунок відновлюється. Проте видалення всіх гістонів у 2 М NaCl приводить до дисоціації політенних хромосом, які перестають бути видимими під мікроскопом. Таким чином, так само як і для будь-яких інших інтерфазних хромосом, організація політенних хромосом підтримується основними білками хроматину – гістонами. Крім того, значний внесок роблять і негістонові білки: при специфічній попередній обробці препаратів хромосом усунення гістонів не дає очікуваного ефекту – політенія хромосом зберігається.

Політенія є досить розповсюдженим явищем у природі – політенні ядра притаманні інфузоріям, тканинам личинок двокрилих, клітинам зародкового мішка рослин, клітинам трофобласту ссавців, тощо.

8.2.3. В-хромосоми. Каріотип зазвичай є однією із незмінних характеристик виду – кількість хромосом є однаковою у всіх представників. Процеси, які лежать в основі мейотичного та мітотичного поділів, забезпечують відтворення постійної кількості хромосом у поколіннях особин та генераціях клітин. Проте, існують види, представники яких у своїх каріотипах мають додаткові так звані *В-хромосоми* (хромосоми основного набору називають *А-хромосомами*). "Додатковість" цих хромосом полягає у тому, що вони можуть бути присутні в каріотипах лише деяких особин із деяких популяцій, а їх відсутність найчастіше не приводить до видимих фенотипових ефектів у тих організмів, які позбавлені В-хромосом.

За своєю морфологією В-хромосоми подібні до А-хромосом, проте зазвичай мають набагато менші розміри (деякі із них відносять до так званих *мікрохромосом*, довжина яких настільки мала, що знаходиться поза роздільною здатністю світлових мікроскопів). Особливим структурним варіантом В-хромосом є

ізохромосоми, в яких обидва плеча мають ідентичні послідовності ДНК, що дзеркально розміщені в обидва боки від центромери. В основному В-хромосоми складаються із гетерохроматинових сегментів. Молекулярний аналіз ДНК виявив, що основну частину послідовностей додаткових хромосом складають різноманітні повтори та транспозони. Серед повторюваних елементів В-хромосом доволі часто зустрічаються гени рРНК і іноді вони входять до складу ядерцевих організаторів. У незначній кількості видів на В-хромосомах були картовані специфічні гени, гомологи яких відсутні в А-хромосомах, проте дані про їх активність та функції досить суперечливі.

Спорадичність появи В-хромосом серед організмів (так само як і нестабільна кількість в різних типах клітин, де вони присутні) пов'язана із декількома причинами. По-перше, під час профазі I мейозу вони не кон'югують із А-хромосомами і таким чином часто залишаються поза метафазною пластинкою, а отже рівноцінна їх сегрегація по дочірнім клітинам неможлива. У рідкісних випадках кон'югація між В-хромосомами відбувається і вони розміщуються у екваторіальній площині, але класичні біваленти не утворюються – до синаптонемального комплексу входять мультіваленти негомологічних В-хромосом. По-друге, саме для додаткових хромосом у мітозі та мейозі спостерігається підвищена частота нерозходження сестринських молекул ДНК і новоутворені клітини отримують різну їх кількість.

Незважаючи на нестабільність відтворення, В-хромосоми широко розповсюджені у рослинному та тваринному світі (знайдені у більш ніж 1300 видів рослин та 500 видів тварин). В-хромосоми описані також у каріотипах грибів. Слід відзначити, що дані про поширення додаткових хромосом серед різноманітних таксонів не завжди пов'язані із реальними частотами їх появи, оскільки виявлення В-хромосом залежить насамперед від того, наскільки легко можна отримати препарати та візуалізувати хромосоми. Саме тому найбільшу кількість видів із В-хромосомами описано у представників родин злакових та лілейних. Кількість додаткових хромосом в

каріотипах дуже варіює, але спостерігається тенденція до підвищення їх числа у видів із великими геномами (в даному випадку під геномом розуміють послідовності ДНК А-хромосом). Представники природних популяцій зазвичай мають не більше трьох-чотирьох В-хромосом, проте у особин одомашнених або ендемічних видів їх кількість може сягати 34. Велика кількість В-хромосом у геномах може приводити до зниження життєздатності та фертильності особин.

Доволі цікавим є питання про походження цих додаткових В-хромосом. Методи гібридизації нуклеїнових кислот виявили, що більшість послідовностей В-хромосом присутні також і в А-хромосомах даного каріотипу (як в аутосомах, так і в статевих хромосомах). Цей факт привів до виникнення так званої внутрішньовидової теорії походження В-хромосом, згідно якої додаткові хромосоми є побічним результатом еволюції основного каріотипу. Центричні фрагменти, що утворилися при реципроктних транслокаціях, ампліфікації центромерних повторів з подальшим їх вирізанням із "батьківських" хромосом, поява нецентромер на делетованих фрагментах – все це може бути передумовою появи у каріотипі додаткових хроматинових структур, які більш-менш стабільно передаються дочірнім клітинам при поділах.

Явище утворення В-хромосом *de novo* спостерігається у гібридів при міжвидовій гібридизації (при тому, що у батьківських видів додаткові хромосоми були відсутні). Крім того, в літературі описані часті випадки, коли послідовність, що присутня у В-хромосомі одного виду, наявна в А-хромосомі іншого виду. Такі факти лягли в основу міжвидової теорії походження В-хромосом: об'єднання у клітині геномів різних видів приводить до значної дестабілізації каріотипів і підвищує імовірність появи додаткових хромосом. Обидві теорії, які мають свої експериментальні підтвердження, принципово не відрізняються одна від одної – напевно, обидва механізми можуть бути задіяні до утворення В-хромосом.

В-хромосоми, так само, як і А-хромосоми, підлягають певним змінам: в їх складі змінюється копійність повторів;

відбуваються інверсії, які запобігають рекомбінації з А-хромосомами; спостерігаються інсерції мобільних елементів.

8.2.4. Хромосоми дріжджів, що брунькуються. Серед усіх видів дріжджів, що брунькуються, найбільш дослідженими в різних аспектах є, безумовно, пекарські дріжджі – *Saccharomyces cerevisiae*. Їх хромосоми мають ряд особливостей організації та функціонування у порівнянні з іншими еукаріотами (наприклад, розглянута у розділі 7 точкова центромера притаманна лише дріжджам, що брунькуються). Проте унікальність хромосом *S. cerevisiae* не обмежується лише центромерними районами.

Шістнадцять хромосом, що складають гаплоїдний геном дріжджів, мають розміри від 230 до 3000 тис пар основ і у різних штамів характеризуються значною варіабельністю за довжиною за рахунок делецій, транслокацій, дуплікацій чи зміни копійності ретротранспозона *Tu*. Найдовша 12-та хромосома має у своєму складі ядерцевий організатор. Хроматин дріжджів відрізняється від вищих еукаріотів тим, що у його складі присутній (у незначній кількості) незвичайний лінкерний гістон *Hho1* (підрозділи 2.2, 4.2).

В інтерфазному ядрі хромосоми *S. cerevisiae* розміщені таким чином, що їх центромери зібрані у єдиний кластер, який прикріплений до центру організації мікротрубочок. При цьому кожна точкова центромера постійно з'єднана з однією внутрішньоядерною мікротрубочкою. Теломерні райони, які складаються із тандемних G-збагачених повторів, також утворюють кластери на периферії ядра у зонах, розташованих напроти центру організації мікротрубочок (рис. 8.10). Таким чином, в інтерфазному ядрі спостерігається своєрідна центромерно-теломерна поляризація.

Мітотичний поділ дріжджової клітини також має ряд особливостей. По-перше, він відбувається без руйнування ядерної оболонки (*внутрішньоядерний мітоз*). По-друге, під час профазі мітозу чи мейозу конденсація хромосом майже не відбувається і за ступенем компактності інтерфазна та мітотична хромосоми розрізняються всього в два рази (тому хромосоми

дріжджів неможливо візуалізувати при використанні оптичної мікроскопії). Незважаючи на низький ступінь компактності, хромосома *S. cerevisiae* містить білки, які в інших еукаріотів утворюють та підтримують організацію конденсованих хромосом – топоізомеразу II та конденсинові комплекси. По-третє, постійне приєднання центромер до мікротрубочок позбавляє клітину необхідності утворення метафазної пластинки – під час поділу хромосоми певний час осцилюють між двома центрами утворення мікротрубочок, які дуплікуються у профазі, але екваторіального розміщення так і не набувають.

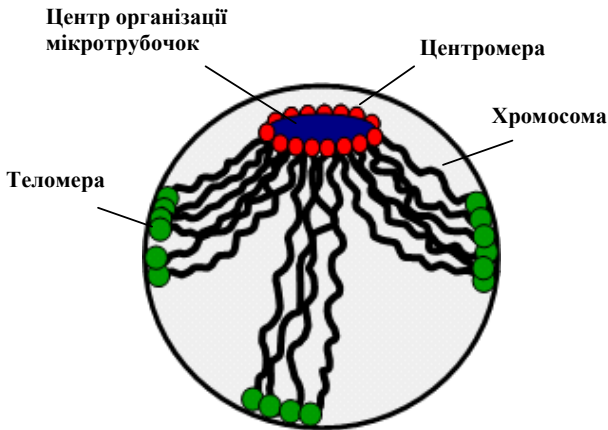


Рис. 8.10. Центромерно-теломерна поляризація хромосом в інтерфазному ядрі *S. cerevisiae*.

8.2.5. Хромосоми інфузорій. Особливістю організації геномів представників типу Інфузорії (*Ciliophora*) є наявність у клітині двох типів ядер – *мікронуклеуса* (генеративного ядра) та *макронуклеуса* (вегетативного ядра), які суттєво розрізняються за морфологією, функціями, кількістю та структурою хромосом. Таке явище називається *ядерним дуалізмом* або *ядерним*

гетероморфізмом. Мікронуклеус є транскрипційно інертним і слугує лише для обміну генетичним матеріалом під час статевого процесу, у той час як макронуклеус метаболічно активний і забезпечує усі життєві потреби клітини.

При вегетативному розмноженні інфузорій мікронуклеус проходить мітотичний поділ, а макронуклеус ділиться шляхом амітозу – в такому випадку дві новоутворені клітини отримують ядра з притаманною їм морфологією (дочірні макронуклеуси місять вдвічі меншу кількість ДНК). Під час статевого процесу мікронуклеуси двох інфузорій, що кон'югують, діляться шляхом мейозу і між клітинами відбувається обмін гаплоїдними ядрами: одне з чотирьох новоутворених ядер однієї клітини переміщується в іншу і навпаки. Після обміну два гаплоїдних ядра, що походять від різних клітин, зливаються, і утворюється зиготичне ядро, яке проходить раунд реплікації і ділиться шляхом мітозу. В результаті в кожній клітині утворюються два ідентичних диплоїдних ядра: одне з них стане мікронуклеусом, а друге, після кардинальних перетворень хромосомного апарату, – макронуклеусом. Невикористані “продукти” мейозу та старий макронуклеус деградує (рис. 8.11). Відміни у структурі двох ядер виникають у процесі дозрівання, який супроводжується глобальною реорганізацією хромосомного апарату макронуклеуса.

Ядро, яке буде виконувати функцію генеративного, містить декілька довгих молекул ДНК, організованих у хромосоми за загальним для всіх еукаріотів принципом. Проте, у макронуклеусі ситуація суттєво відрізняється від звичайної: хромосоми являють собою невеликі фрагменти ДНК, які майже позбавлені некодуючих послідовностей і в деяких випадках взагалі містять один ген. Такі мініхромосоми, як і всі інші еукаріотичні хромосоми, закінчуються теломерами, але часто не мають центромери. На відміну від диплоїдного мікронуклеуса, мініхромосоми містяться у вегетативному ядрі у тисячах копій (і на певних етапах є політенізованими).

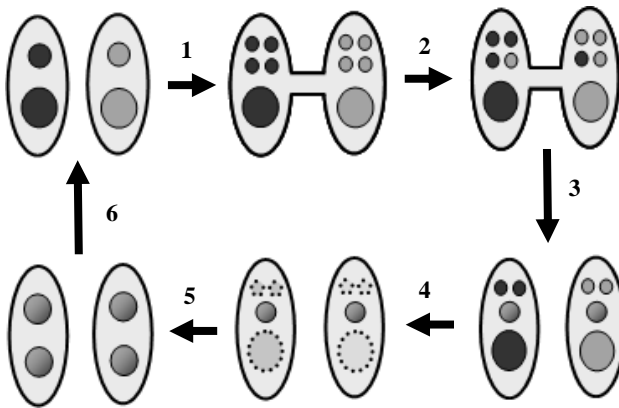


Рис. 8.11. Статевий процес у інфузорій. 1 – кон'югація та мейотичний поділ мікронуклеусів; 2 – обмін гаплоїдними ядрами; 3 – утворення зиготичного ядра; 4 – деградація продуктів мейозу; 5 – мітотичний поділ зиготичного ядра; 6 – диференціація ядер на мікро- та макронуклеуси.

Утворення із зиготичного ядра-попередника зрілого макронуклеуса із реорганізованим геномом протікає у декілька стадій, які включають фрагментацію хромосом з подальшою добудовою на кінцях утворених фрагментів теломерних повторів, делецію міжгенних повторювальних ділянок та ампліфікацію зрілих мініхромосом. Під час фрагментації хромосом довгі молекули ДНК ядра-попередника макронуклеуса розрізаються на ряд невеликих фрагментів. Їх розмір коливається від 21 тис до 3 млн пар основ у тетрахімен, але може становити всього 300-2000 пар основ у інфузорій гіпотрих та спіротрих. В останньому випадку кожна мініхромосома несе всього один ген, фланкований невеликими (до 150 нуклеотидів) нетрансльованими послідовностями і теломерами. У деяких видів інфузорій місця розривів хромосом являють собою консервативні короткі послідовності довжиною 10–15 пар основ, отже розрізання є сайт-специфічним і забезпечується впізнанням точок розриву специфічними

нуклеазами. Проте, частина видів інфузорій не має подібних маркерів фрагментації, що приводить до суттєвих варіацій у довжині мініхромосом. Наслідком фрагментації хромосом є суттєве підвищення їхньої кількості в макронуклеусі у порівнянні з мікронуклеусом. Так, п'ять пар хромосом зиготичного ядра тетрахімен утворюють 250-300 мініхромосом макронуклеуса, а із 120-150 хромосом спіротрих таких фрагментів нараховується 24000.

Після "подрібнення" кожний новоутворений фрагмент фланкується теломерними олігонуклеотидними повторами. Основною відмінністю синтезованих *de novo* теломер є їх невелика довжина, яка варіює від 36 до 250 пар основ. Крім того, теломерні ділянки мініхромосом деяких видів інфузорій не формують t-петлю, а стабілізація кінців відбувається за рахунок специфічних білків.

Крім фрагментації хромосом, при дозріванні макронуклеуса у всіх досліджених видів інфузорій відбувається елімінація частини генома (*димінуція хроматину*), в результаті якої майбутнє вегетативне ядро може бути позбавлене від 15% (наприклад, у *Tetrachymena*) до 96-98% (у деяких родів гіпотрих) послідовностей ДНК ядра-попередника. За своєю природою ДНК, яка підлягає елімінації, відноситься до повторювальних послідовностей, транспозонних елементів, міжгенних спейсерних ділянок або до так званих *внутрішніх послідовностей, що елімінуються* (IES – *i*nternal *e*liminated *s*equences). IES можуть розташовуватися як в міжгенних районах, так і в середині генів і часто представлені в геномах унікальними послідовностями. Загалом, геноми інфузорій нараховують від 6000 до 100000 послідовностей, що елімінуються.

Димінуція хроматину супроводжується розривами хромосом у чітко визначених сайтах (найчастіше, в АТ-збагачених ділянках) з подальшим зшиванням фрагментів, що повинні залишитися у зрілій хромосомі. Послідовності, що маркують границі IES (а іноді і інших димінуційних елементів), упізнаються специфічними білками Pdd (від *P*rogram *D*NA *D*egradation *p*rotein), рекрутування яких забезпечується

стабільними модифікаціями хроматину в цих ділянках, зокрема, метилуванням гістону H3 по лізінах 9 та 27. Якщо димінуції підлягають некодуючі послідовності генів, то після своєрідного "сплайсінгу" кодуючі послідовності можуть мати трохи інший порядок, ніж у ядрі-попереднику і, відповідно, у мікронуклеусі.

Ампліфікація міні-хромосом макронуклеуса, яка є завершальним етапом реорганізації його хромосомного апарату, приводить до накопичення величезної кількості (іноді до 10^6) ідентичних молекул ДНК. Таким чином, кількість ДНК в макронуклеусі може перевищувати таку в мікронуклеусі більш ніж у 50 разів. Крім того, під час дозрівання, у деяких видів інфузорій спостерігається поява політенії з характерною диск-міждисковою посмугованістю хромосом.

Отже, сформований макронуклеус інфузорій має велику кількість міні-хромосом, які майже позбавлені некодуючих послідовностей ДНК і часто мають лише один ген. Після димінуції повторювальних послідовностей та фрагментації більшість новоутворених хромосом не мають центромери. Зрозуміло, що рівноцінний розподіл генетичного матеріалу між двома дочірніми клітинами при поділі є неможливим. Саме тому макронуклеус ділиться шляхом амітозу, а його мініхромосоми не підлягають типовій для інших еукаріотичних ядер компактизації.

8.3. Хромосоми прокаріотів

Геноми бактерій представлені однією чи, рідше, двома молекулами ДНК, які формуючи комплекси з білками, утворюють бактеріальну хромосому. Бактеріальні хромосоми не відокремлені від цитоплазми мембранами і створюють у клітині компартмент неправильної форми, який називається *нуклеоїдом*. Крім хромосом, бактеріальні геноми містять також невеликі автономні кільцеві молекули ДНК – *плазмід*, які реплікуються незалежно від бактеріальної хромосоми. У більшості видів бактерій нуклеоїд сформований однією циркулярною молекулою ДНК. Проте, представники родів

Streptomyces та *Borrelia* містять одну лінійну молекулу ДНК, а роду *Agrobacterium* – одну лінійну та одну кільцеву молекули.

Розмір бактеріальної хромосоми зазвичай коливається від 500 тис до 10 млн пар нуклеотидів. Приблизно 90 % її ДНК представлено кодуєчими послідовностями, але також бактеріальний геном може містити псевдогени (у *Mycobacterium leprae* вони складають 27 % генома), профаги (у деяких штамів *E. coli* їх кількість може сягати 16 % від розміру генома) та повторювальні послідовності. Серед останніх найбільшу кількість становлять короткі олігонуклеотидні повтори, що не мають кодуєчих функцій. Інша частина припадає на "кодуєчі повтори", до яких відносяться оперони генів рРНК та IS-елементи (від *insertion*), що кодують білок транспозазу, який забезпечує переміщення IS-елементів по геному. Послідовності ДНК, які складають бактеріальну хромосому, дуже мінливі навіть в межах декількох клітинних поколінь: втрата частини генів або набуття нових послідовностей відбувається за рахунок горизонтального перенесення генів, базисом якого є процеси трансдукції, кон'югації та трансформації.

Незважаючи на невеликий (у порівнянні з еукаріотами) розмір генома, контурна довжина ДНК бактерій перевищує розмір самої клітини приблизно у 1000 разів, тому, так само як і в еукаріотів, бактеріальна хромосома зазнає значної компактизації в нуклеоїді. В першу чергу така компактизація забезпечується наявністю в циркулярній молекулі ДНК бактеріальної хромосоми надспіралізації негативного знаку, за рахунок якої утворюються надспіральні плектономічні витки. У результаті простір, який займає циркулярна молекула ДНК в нуклеоїді, стає меншим (рис. 8.12). Надспіралізації піддаються окремі петельні домени ДНК, (в середньому розміром 10 тис. пар основ), які розгалужуються і випетлюються із центральної частини нуклеоїда в цитоплазму. Найчастіше вони розміщені у вигляді стопки один над одним в орієнтації, перпендикулярній до довгої осі клітини. Місце розташування доменів вздовж ДНК не залежить від послідовності і суттєво відрізняється між різними бактеріальними клітинами.

Рівень надспіралізації доменів залежить від фази, на якій перебуває клітина: під час експоненційного росту ступінь надспіралізації є набагато більшим, ніж під час стаціонарної фази. Топологічний стан доменів бактеріальної хромосоми підтримується роботою трьох основних ферментів – топоізомерази I, гірази та топоізомерази IV. Їх робота забезпечує баланс рівня торсійної напруги у петлях: у той час як гіраза вносить негативні надспіральні витки, топоізомераза I їх релаксує. Активність топоізомерази IV є необхідною під час реплікації бактеріальної хромосоми – вона забезпечує декатенацію (розділення двох топологічно зачеплених одна з одною циркулярних молекул ДНК, що утворилися).

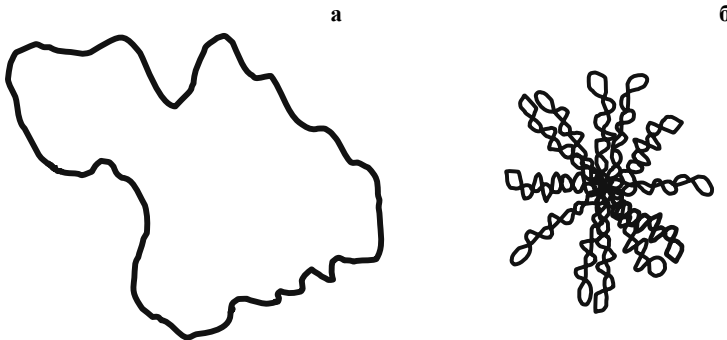


Рис. 8.12. Релаксована циркулярна ДНК (а) та циркулярна ДНК із надспіралізованими доменами (б).

Окрім надспіралізації, суттєвий внесок у компактизацію бактеріальної хромосоми і підтримання структури нуклеоїда вносять білки. Їх якісний та кількісний склад у нуклеоїді дуже сильно залежить від стадії, на якій перебуває бактерія (експоненційний ріст чи стаціонарна фаза). Це, в свою чергу, дещо змінює локальну структуру самого нуклеоїда впродовж клітинного циклу бактерій.

Найбільш детально білковий склад бактеріальної хромосоми досліджений у *E. coli*. Серед білків, які присутні в нуклеоїді, найбільшу кількість становлять ті, що відносяться до групи гістон-подібних білків. Таку назву вони отримали через свою

функціональну (але не структурну) схожість із еукаріотичними гістонами: це невеликі за молекулярною вагою лужні білки, які взаємодіють з ДНК за електростатичним механізмом. Основними гістон-подібними білками, які приймають участь у компактизації ДНК, є HU (heat-unstable nucleoid protein), IHF (integration host factor), H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) та Fis (factor for inversion stimulation). Їх функція не обмежується лише підтриманням компактною структури бактеріальної хромосоми, вони також відіграють важливу роль в регуляції експресії генів, рекомбінації та репарації ДНК.

Білок HU є основним компонентом бактеріального нуклеоїда. У більшості бактерій він є гомодимером, але у *E. coli* та інших ентеробактерій під час пізньої фази експоненційного росту дві гомологічні субодиниці утворюють гетеродимер HU α/β . HU взаємодіє з ДНК незалежно від послідовності в маленькому жолобку подвійної спіралі, індукуючи при цьому вигин подвійної спіралі (рис. 8.13), – це робить його функціональним аналогом еукаріотичних білків HMGB (підпідрозд. 2.4.2). Роль білка HU в компактизації бактеріальної хромосоми залежить від його концентрації: при низьких концентраціях він забезпечує конденсацію ДНК, а при високих – навпаки, робить її більш витягнутою. Такий вплив на структуру хромосоми пояснюється тим, що при зв'язуванні з ДНК невеликої кількості молекул HU, вони індукують вигини цієї молекули під різними кутами (від 60° до 140°) (рис. 8.14, *a*). При цьому, крім конденсації, спостерігається також і загальне підвищення конформаційної рухливості ДНК за рахунок тимчасових вигинів. Зростання концентрації білка приводить до його полімеризації у довгі жорсткі спіральні філаменти, які закручуються навколо ДНК, знімаючи при цьому негативну надспіралізацію і тим самим збільшуючи її довжину (рис. 8.14, *a*). Так само, як і у випадку білків HMGB, деформації ДНК, викликані HU, забезпечують ефективну взаємодію різноманітних регуляторних білків з промоторами генів та з іншими компонентами бактеріальної хромосоми.

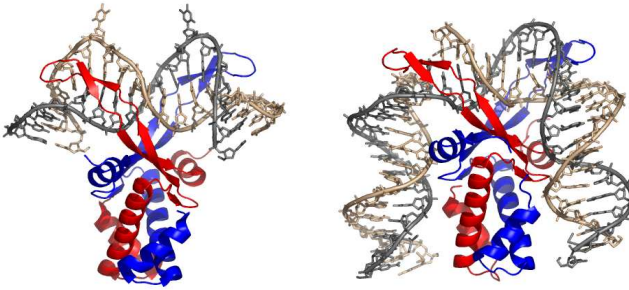


Рис. 8.13. Комплекси з ДНК димерних білків HU (ліворуч, код PDB 1P78) та IHF (праворуч, код PDB 1IHF).

Гомолог HU, гетеродимерний білок IHF, також є одним із мажорних компонентів бактеріальної хромосоми. На відміну від свого гомолога, він взаємодіє з ДНК у чітко визначених сайтах, розміром приблизно 30 пар основ із консенсусною послідовністю в 13 пар основ. В геномі *E. coli* нараховується приблизно 1000 таких сайтів, розміщених в основному поблизу промоторів генів, що забезпечує ефективне функціонування білка IHF також і як транскрипційного регулятора. В місцях взаємодії IHF з ДНК індуються значні вигини молекули під кутом більш ніж 160° (рис. 8.13), що зумовлює компактизацію бактеріальної хромосоми на 30 %.

Ще одним фактором компактизації бактеріальної хромосоми є білок H-NS. В його структурі виділяють два домени (N- та С-кінцеві), які з'єднані між собою гнучким лінкером. N-кінцеві домени забезпечують димеризацію двох молекул H-NS, а С-кінцеві взаємодіють з ДНК. Ця взаємодія відбувається незалежно від послідовності, але переважно в АТ-збагачених ділянках. За рахунок наявності у димері двох ДНК-зв'язувальних доменів, H-NS з'єднує між собою дві віддалені по ланцюгу ділянки ДНК, у тому числі й ті, що відносяться до різних суперспіральних доменів. Взаємодія цього білка з ДНК має кооперативний характер: з'єднувальні містки, сформовані декількома димерами H-NS, при підвищенні його концентрації перетворюються у паличкоподібні жорсткі структури (рис. 8.14, б). Мутантні штами бактерій, в яких спостерігається

гіперекспресія гена H-NS, мають аномально сконденсований нуклеоїд. Так само, як і білок HU, H-NS має підвищену спорідненість до негативно надспіралізованої ДНК (як і нуклеосома в еукаріотів, фіксує на собі негативні надспіралізовані витки). Крім підтримання компактного стану бактеріальної хромосоми, білок H-NS є важливим регулятором транскрипції бактеріальних генів (у *E. coli* він впливає на експресію 5 % генів).

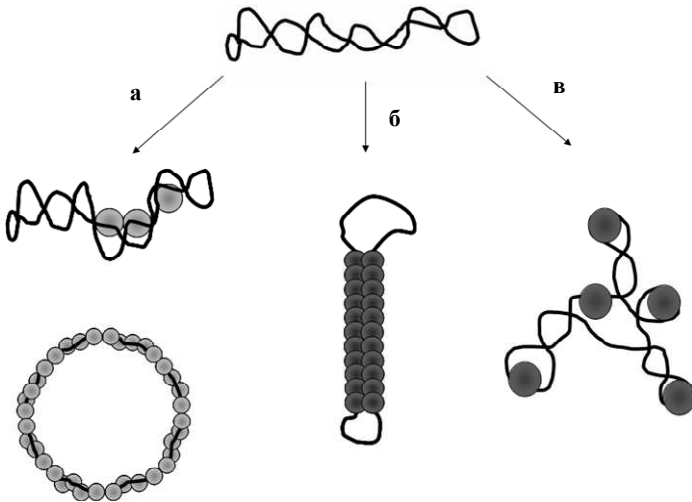


Рис. 8.14. Вплив гістон-подібних білків HU (а), H-NS (б) та Fis (в) на структуру надспіралізованого домена ДНК бактеріальної хромосоми. Для білка HU вказано ефект двох концентрацій – низької (верхня панель) та високої (нижня панель).

Під час логарифмічної стадії росту, нуклеоїд бактерій містить велику кількість білка Fis, концентрація якого суттєво знижується при виході клітини в стаціонарну фазу. Його взаємодія з ДНК здійснюється як в межах слабо консервативного сайту, так і неспецифічно. В першому випадку Fis індукує вигини під кутом 90° , забезпечуючи суттєву компактизацію хромосоми, у другому – зумовлює розгалуження

надспіралізованих доменів (рис. 8.14, в). Виступаючи негативним регулятором транскрипції генів, що кодують субодиниці гірази, Fis опосередковано впливає на рівень надспіралізації доменів бактеріальної хромосоми, і тим самим регулює експресію інших генів. Крім гістон-подібних, бактеріальна хромосома містить ряд інших білків, зокрема гомодимерні комплекси білків SMC, які додатково підтримують компактизований стан нуклеоїда та полегшують реплікацію бактеріальної хромосоми.

Таким чином, компактизація ДНК в нуклеоїді бактеріальних клітин забезпечується та підтримується за рахунок надспіралізації та білків, що стабілізують надспіралісні домени, регулюють рівень надспіралізації і зумовлюють вигини в молекулі ДНК.

Розмір та загальна організація геномів представників надцарства Археї подібна до бактерій (всі досліджені види мають одну циркулярну молекулу ДНК). Проте, механізми компактизації ДНК, які розрізняються для різних таксономічних груп, що входять до складу Археїв, можуть відрізнятися від бактеріальних. Ключовим моментом є наявність чи відсутність у нуклеоїді білків, *структурно* подібних до еукаріотичних гістонів, – гістонів археїв (див. також підрозділ 2.1).

Представники систематичної групи *Crenarchaeota* у більшості випадків не містять гістонів. Компактизацію та підтримання структури нуклеоїда забезпечують різноманітні білки, які взаємодіють з ДНК неспецифічно, фіксуючи на собі негативно надспіралізовані домени.

Основним фактором, що забезпечує конденсацію ДНК у представників типу *Euryarchaeota*, є гістони археїв. В геномах майже всіх видів цього типу знайдені один або декілька гістонових генів, причому їх кількість не залежить від розміру ДНК: часто організми з великими геномами мають всього один гістоновий ген (і, відповідно, один варіант гістонів).

На відміну від еукаріотів, більшість типів гістонів археїв не мають N- та C-кінцевих невпорядкованих хвостів та складаються лише із глобулярної частини (65-69 амінокислот), яка організована як стандартний гістоновий мотив. Так само, як

і для еукаріотичних гістонів, мінімальними стабільними комплексами в клітині є гомо- або гетеродимери. Серед усіх гістонових варіантів (їх нараховується більше 20) найбільш дослідженими є два – НМfВ та НМfА. При взаємодії з ДНК їх гомо- або гетеродимери утворюють тетраметр, з яким взаємодіє приблизно 90 пар нуклеотидів, формуючи приблизно один суперспіральний виток: утворюється структура, аналогічна тетрасомі еукаріотів. Дослідження з використанням методу хроматинової імуопреципітації свідчать, що майже вся геномна ДНК в нуклеоді асоційована з гістонами. Аналогічно до еукаріотів, крім компактизації ДНК, нуклеосомо-подібні частинки археїв відіграють важливу роль в регуляції експресії генів. Крім гістонів до складу нуклеода представників *Euryarchaeota* входить група низькомолекулярних білків, які, подібно бактеріальним білкам, вносять та підтримують негативну надспіралізацію циркулярної ДНК, а також індують вигини та розгалуження молекули.

Рекомендована література

Загальна

Samner, A.T. Chromosomes: organization and function. – Oxford : Blackwell Science, 2003.

Еволюція каріотинів

Ferguson-Smith, M.A., Trifonov, V. Mammalian karyotype evolution // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 8. – P. 950-962.

Speicher, M.R., Carter, N.P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology // *Nat. Rev. Genet.* – 2005. – Vol. 6. – P. 782-792.

Ventura, M., Archidiacono, N., Rocchi, M. Centromere emergence in evolution // *Genome Res.* – 2001. – Vol.11. – P.595-599.

Wong, L.H., Choo, K.H.A. Centromere on the move // *Genome Res.* – 2001. – Vol.11. – P.513-516.

Статеві хромосоми

Bachtrog, D., Charlesworth, B. Towards a complete sequence of the human Y chromosome // *Genome Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 1-5.

Charlesworth, D., Charlesworth, B., Marais, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes // *Heredity.* – 2005. – Vol.95. – P.118-128.

Ellegren, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety // *Nat. Rev. Genet.* – 2011. – Vol. 12. – P. 157-166.

Особливі типи хромосом

Catacho, J.P.M., Sharbel, T.F., Beukeboom, L.W. B-chromosome evolution // *Phil.Trans. R. Soc. Lond.* – 2000. – Vol. 355. – P. 163-178.

Jones, N., Houben, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? // *Trends in Plant Science.* – 2003. – Vol.8. – No.9. – P.417-423.

Loidl, J. Chromosomes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *International Review of Cytology.* – 2003. – Vol.222. – P.141-196.

Suja, J.A., Barbero, J.L. Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis // *Meiosis, Vol.5* (Eds. R.Benavente, J.-N.Volff). – Bazel: Karger, 2009. – P. 94-117.

Хромосоми прокариотів

Samson, R., Reeve, J.N. DNA-binding proteins and chromatin // In: *Archaea: molecular and cellular biology, Chapter 4* (Eds. Rachel Samson and John N. Reeve). – Washington: ASM Aess, 2007. – P. 110-117.

Schumann, W. Dynamics of the bacterial chromosome. Structure and function. – Weinhein : Wiley-VCH, 2006.