

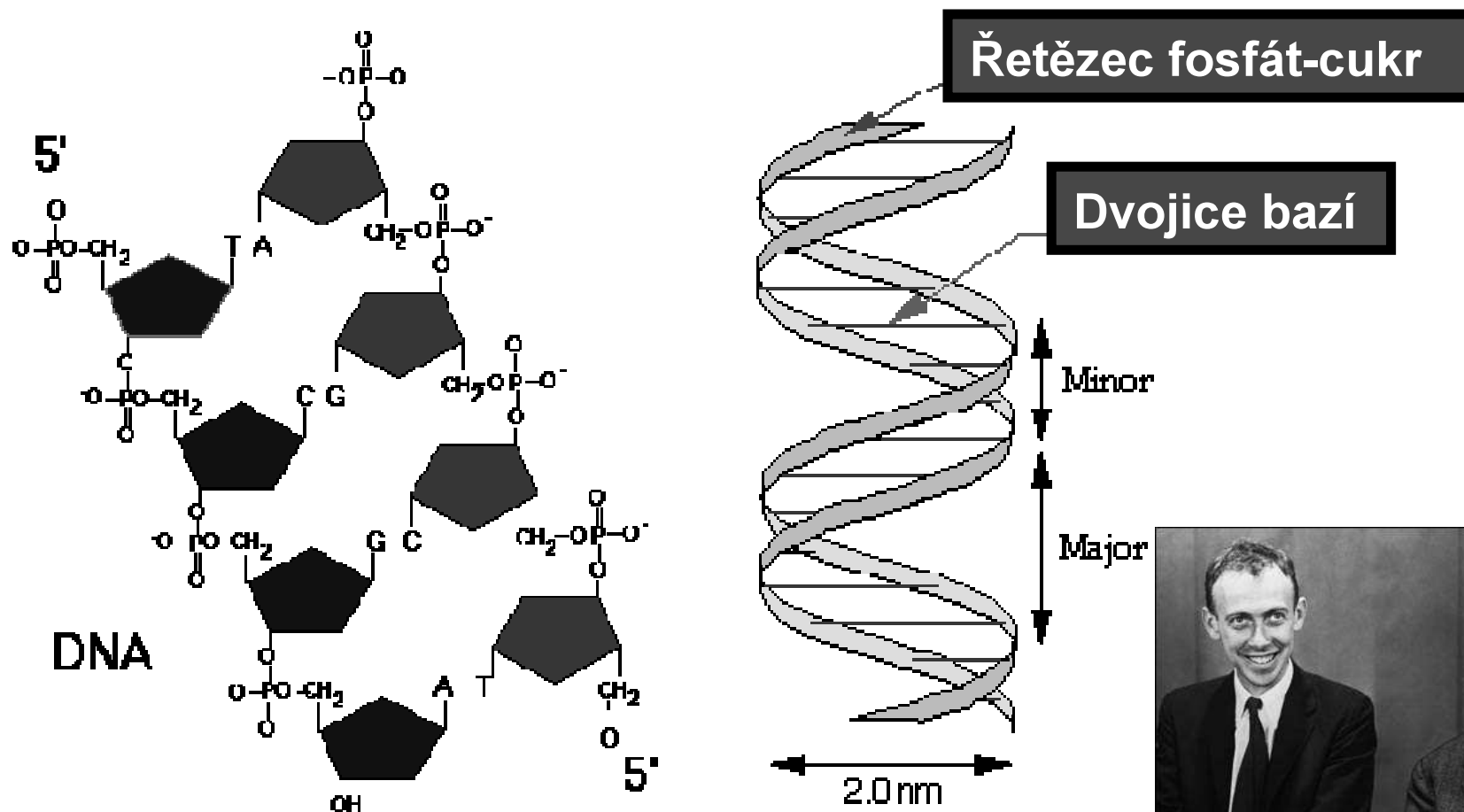
Základní poznatky o struktuře genomu

Primární a sekundární struktura DNA

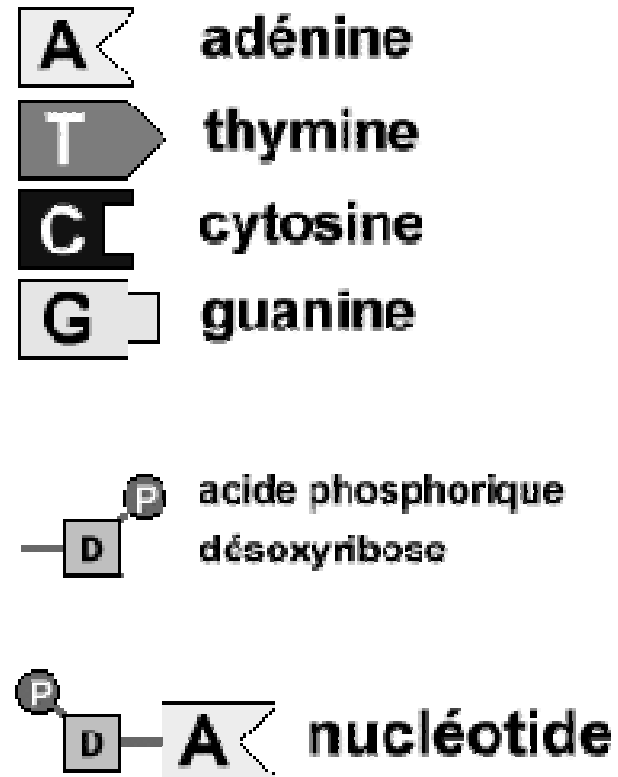
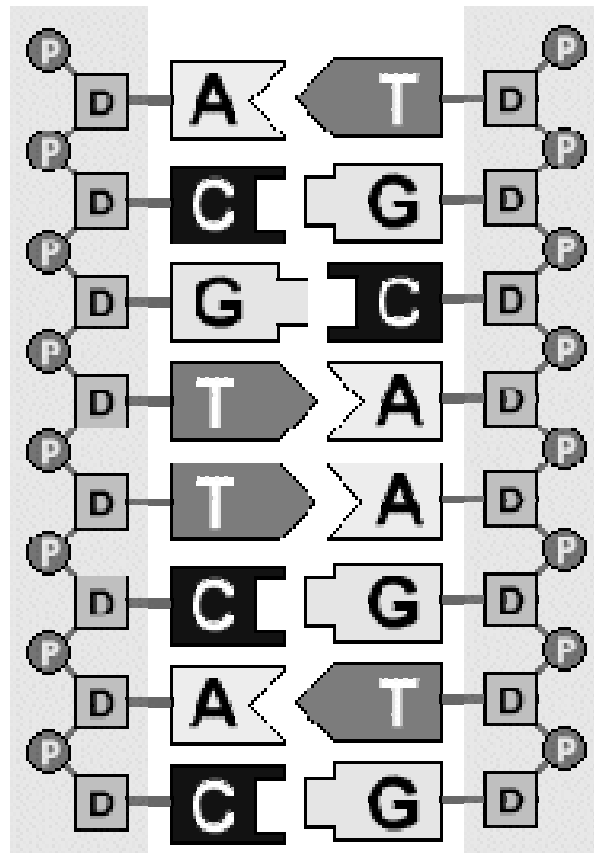
Nukleosom a chromatinové vlákno

Chromosomy a genom

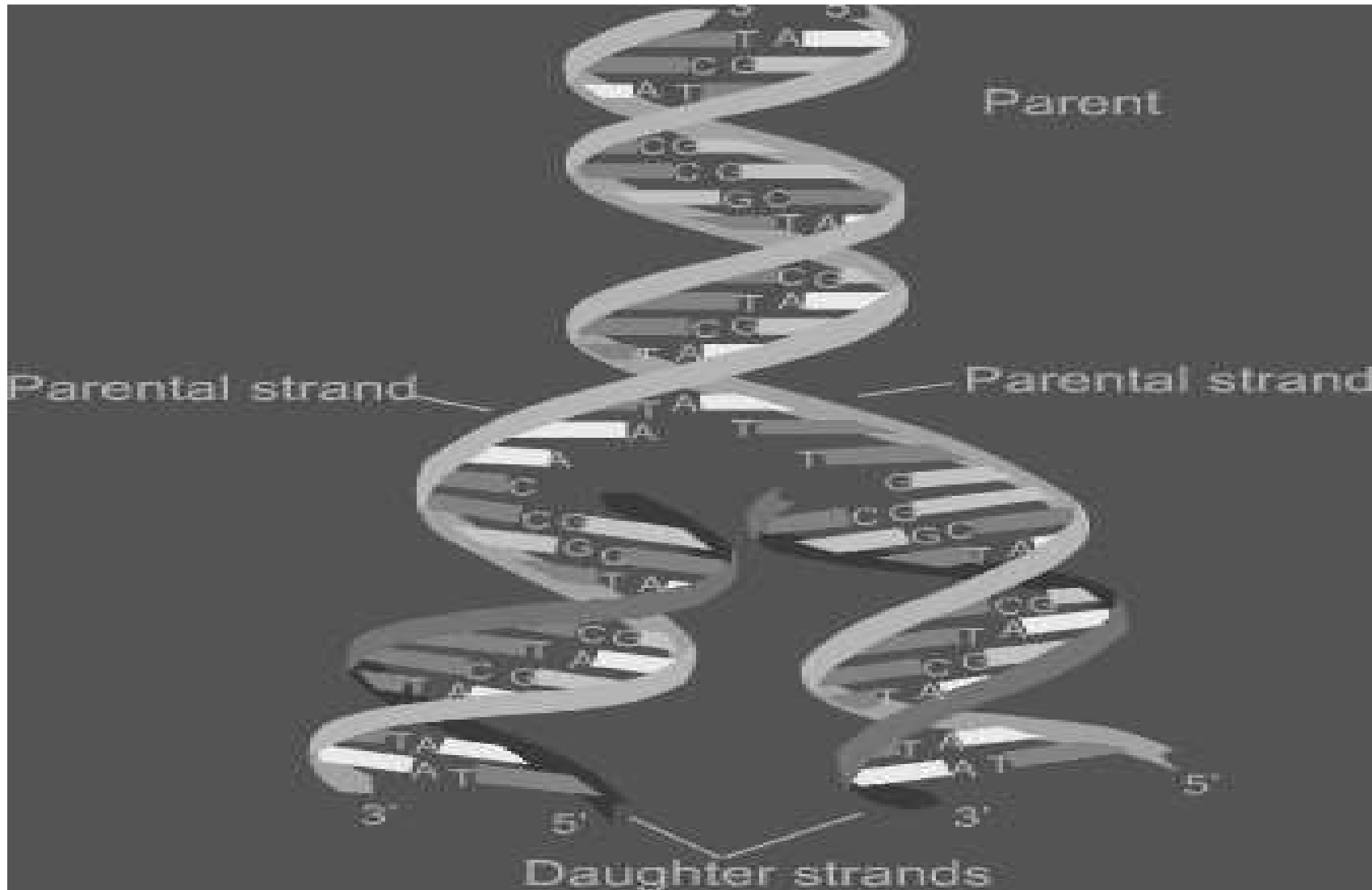
Primární a sekundární struktura DNA



Komplementarita DNA umožňuje replikaci



Replikace DNA



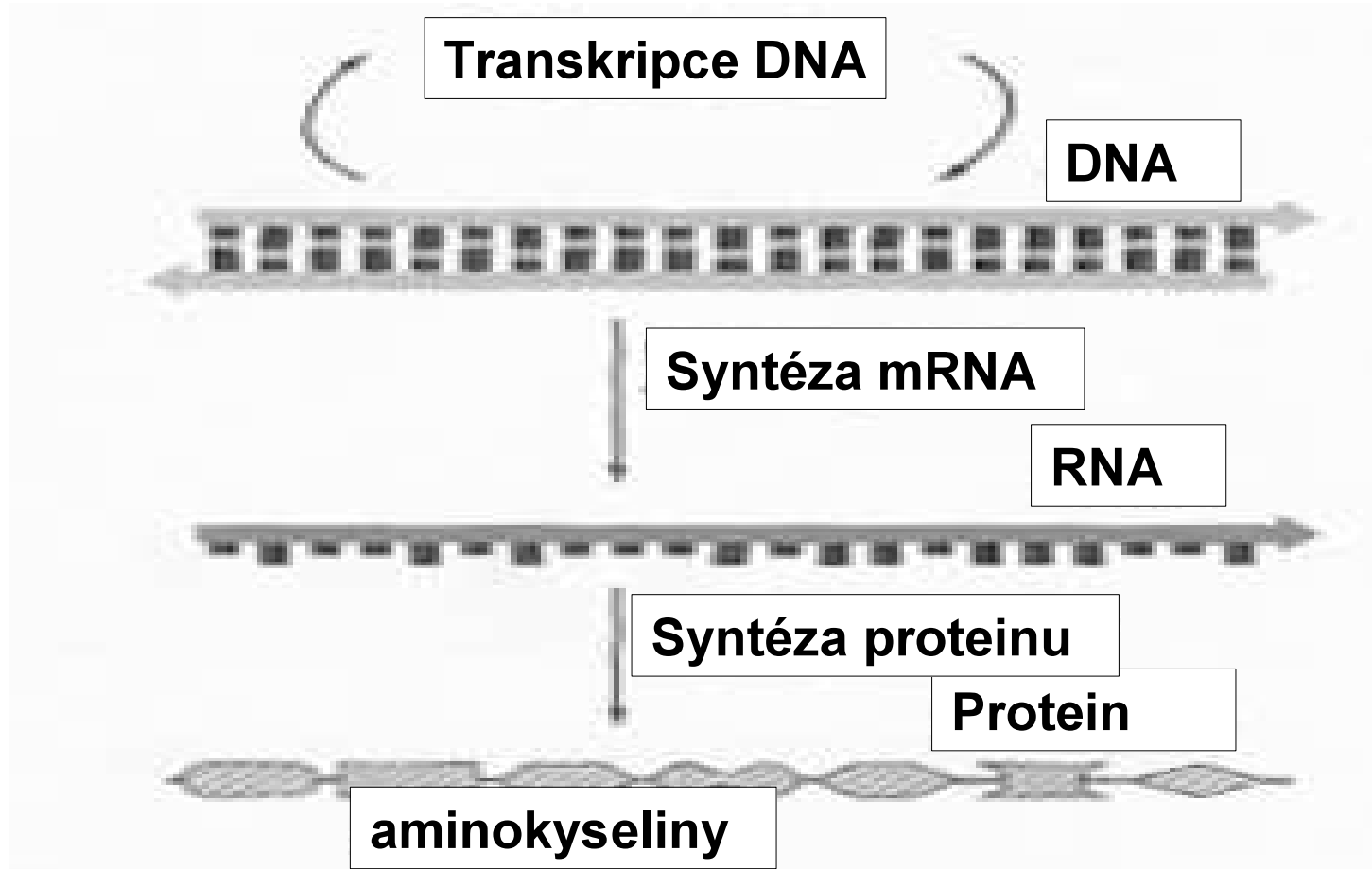
DNA koduje aminokyseliny

Genetický kód je system pravidel, které přiřazují posloupnost nukleotidů v DNA aminokyselinám. Tento kód je využit v živých buňkách a je universální.

Vznik kódu je předmětem teorií:

- 1) afinita aminokyselin k jejich tripletům – možná se dříve syntéza děla přímo, tj. bez tRNA
- 2) vývoj prostřednictvím selekce tak, aby byl co nejmenší počet chyb (mutací)

Od DNA k proteinu



mRNA koduje aminokyseliny

| 1st position (5' end) ↓ | 2nd position | | | | 3rd position (3' end) ↓ |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | U | C | A | G | |
| U | Phe Phe Leu Leu | Ser Ser Ser Ser | Tyr Tyr STOP STOP | Cys Cys STOP Trp | U C A G |
| C | Leu Leu Leu Leu | Pro Pro Pro Pro | His His Gln Gln | Arg Arg Arg Arg | U C A G |
| A | Ile Ile Ile Met | Thr Thr Thr Thr | Asn Asn Lys Lys | Ser Ser Arg Arg | U C A G |
| G | Val Val Val Val | Ala Ala Ala Ala | Asp Asp Glu Glu | Gly Gly Gly Gly | U C A G |

Kód je

-degenerovaný
(existuje $4^3=64$ komb.)

-skryté mutace

-stop kodon (UAG,
UGA, UAA)

-důležitá je fáze čtení

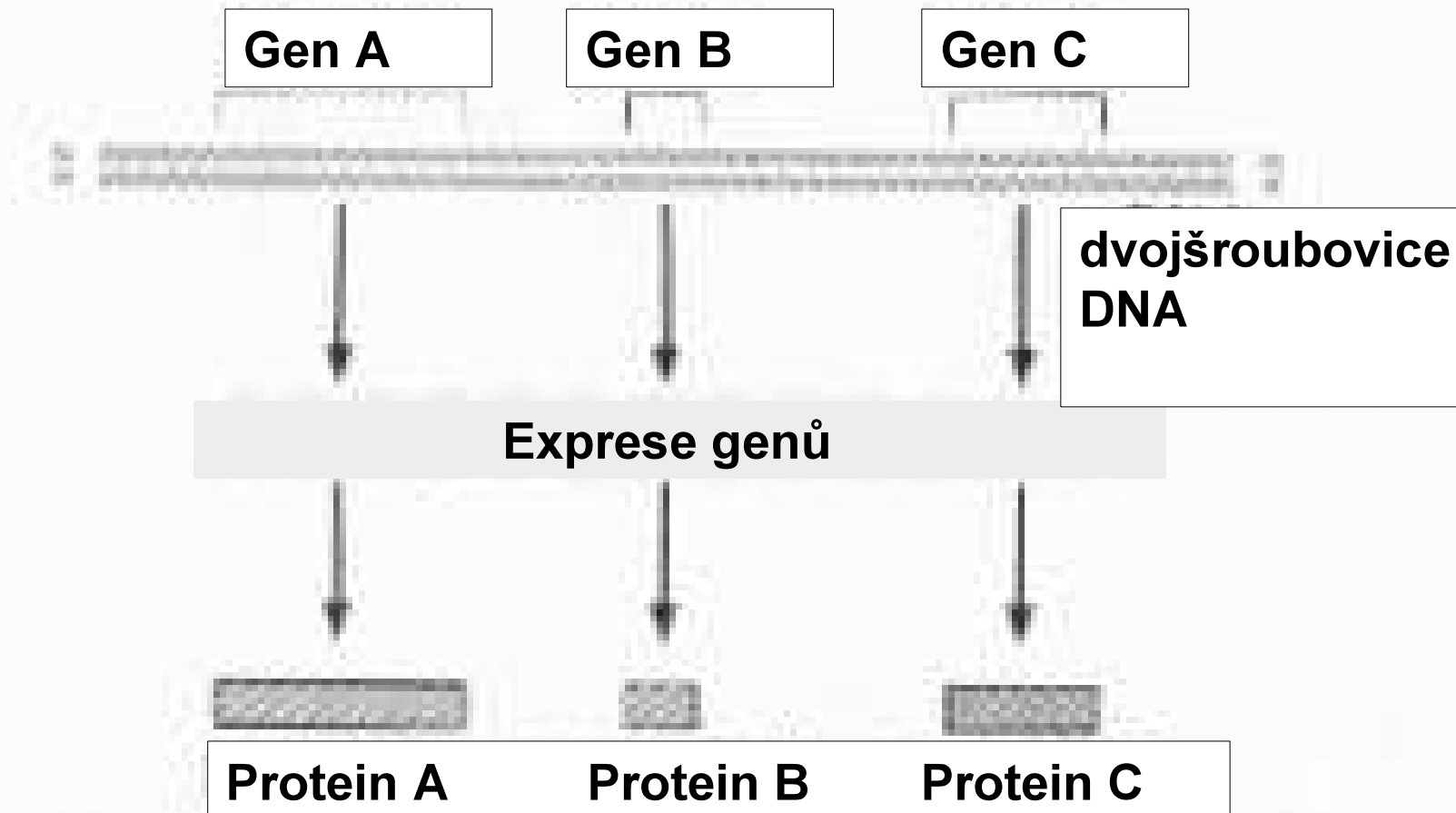
-variace:

-mykoplasma (UGA
je tryptofan)

-bičíkovci (UAG je
glutamin)

-candida (CUG –
Serin)

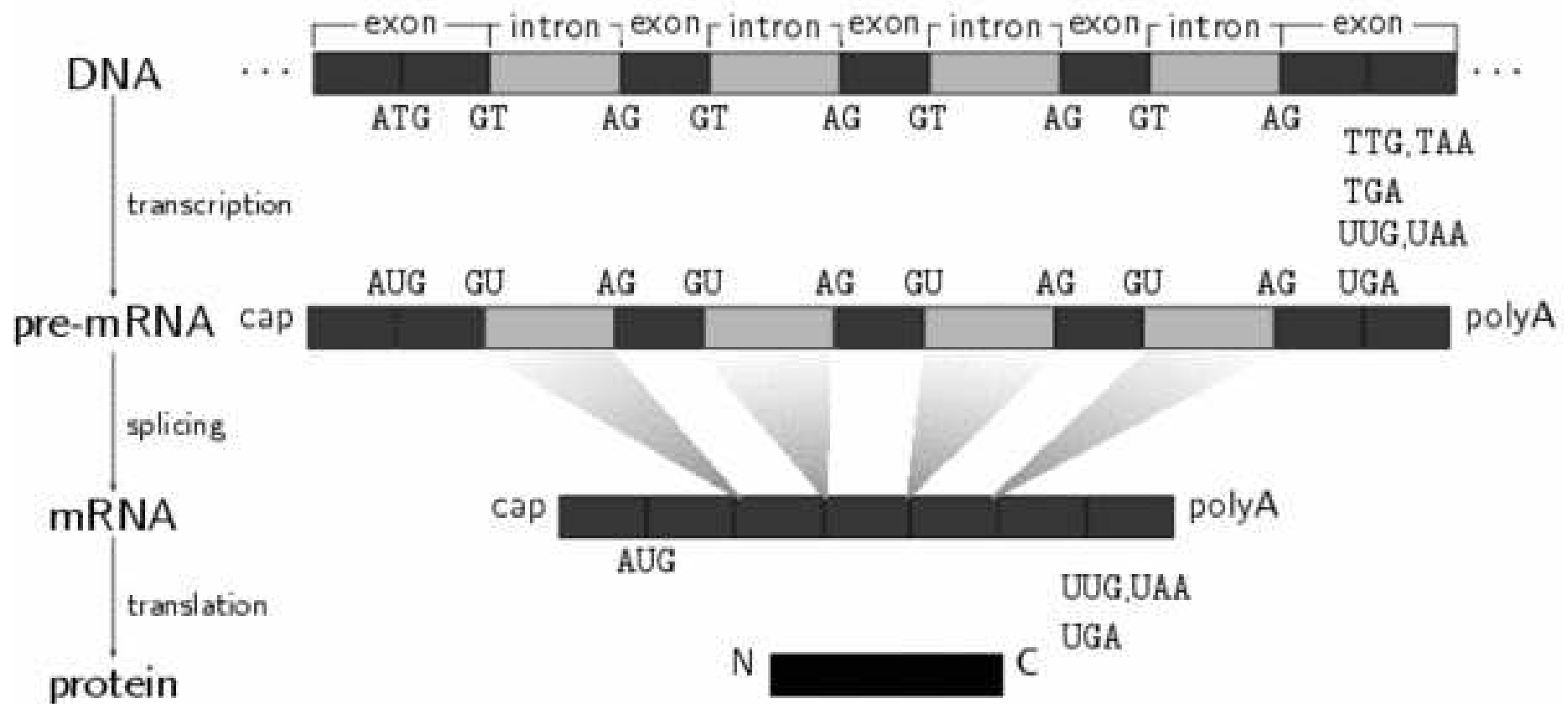
Genetická informace v DNA



Sestřih – u eukaryot

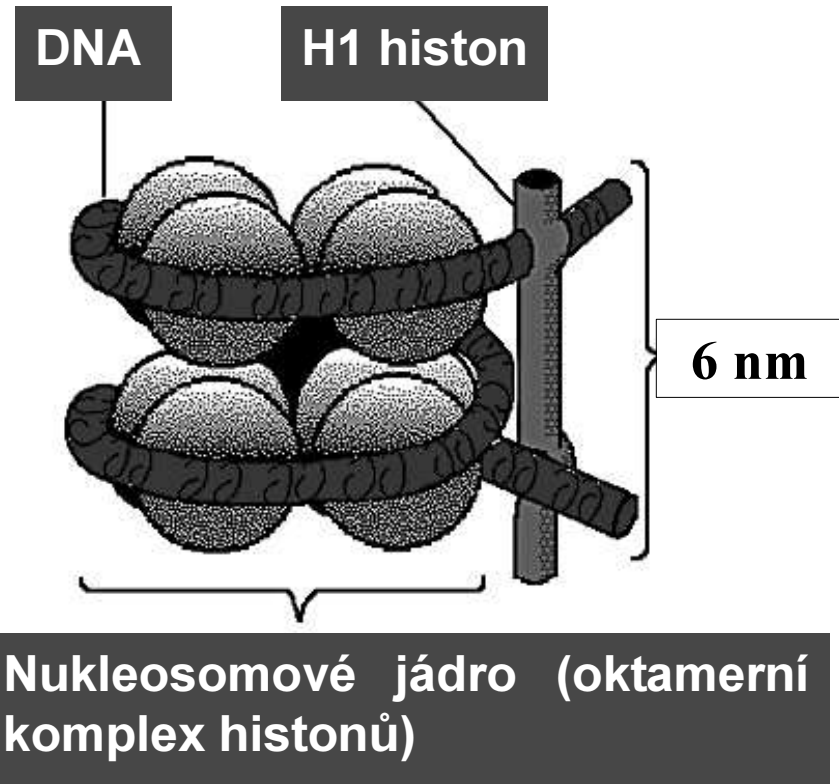
Splice sites are locations on DNA at boundaries of

- exons (which code for proteins)
- introns (which do not)



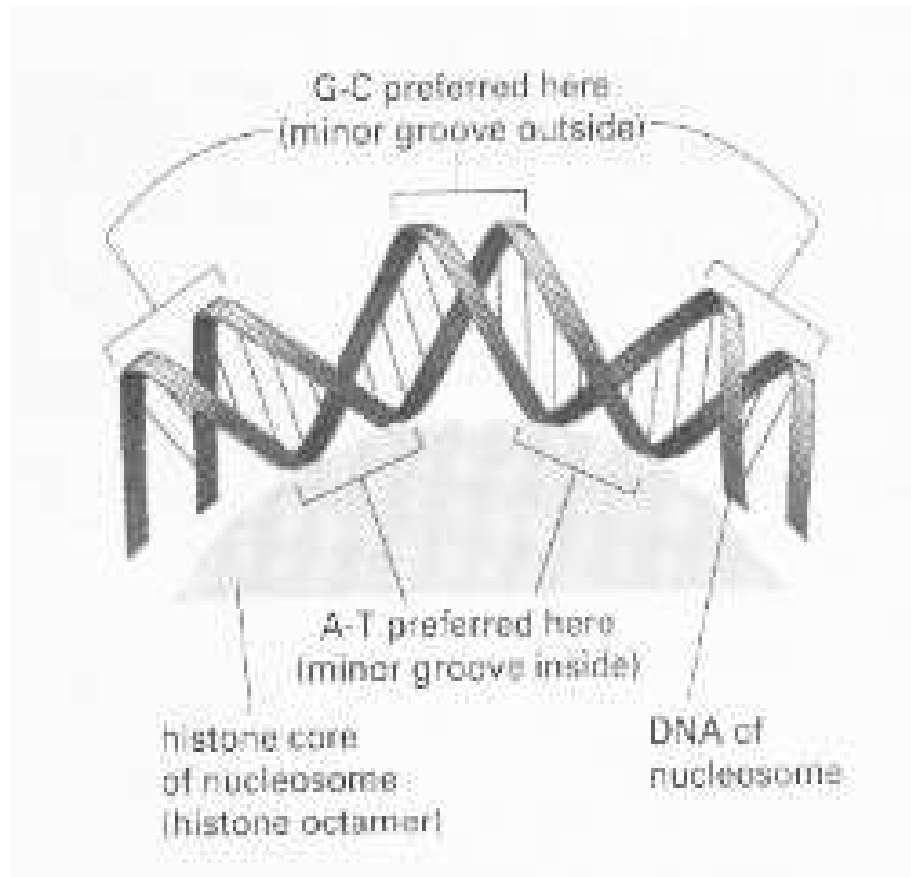
Nukleosom

Histony (H2A a H2B) a (H3 a H4) tvoří dimery, ty tvoří tetramery a dohromady pak vzniká oktamer



Roger Kornberg, 1974

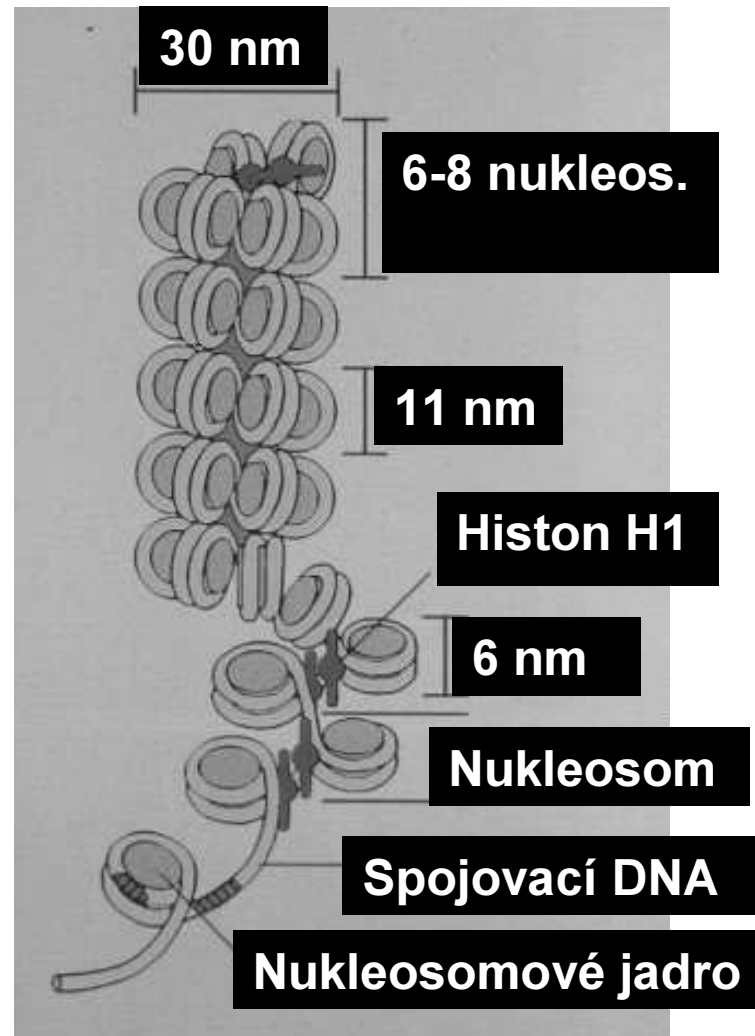
Vazba DNA k histonům nukleosomu



Na nukleosom připadá zhruba 200 bp, z toho 146 bp se točí 1.65 krát kolem histonového jádra

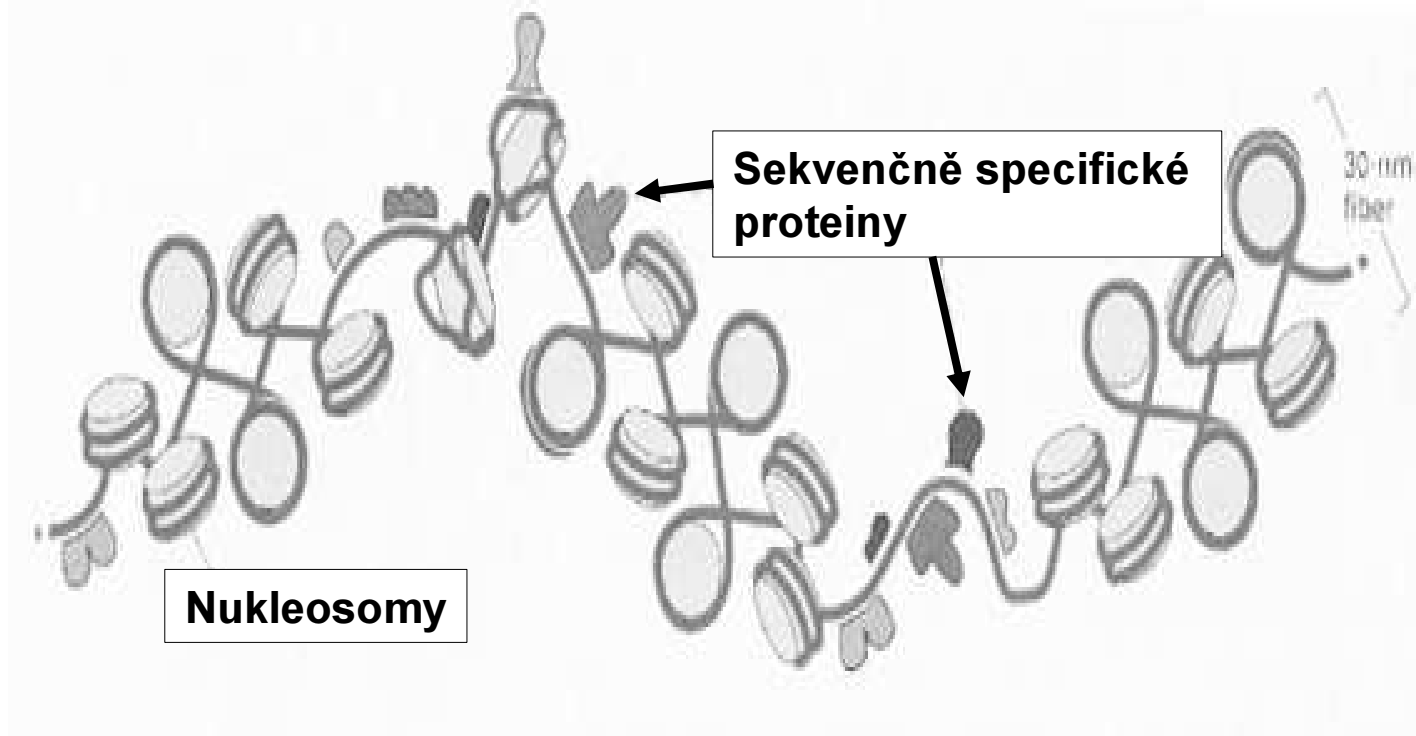
Vazba deformuje malý žlábek DNA, snadněji se deformují A-T páry (preferenční pozice na DNA; většinou volně).

Chromatinové vlákno

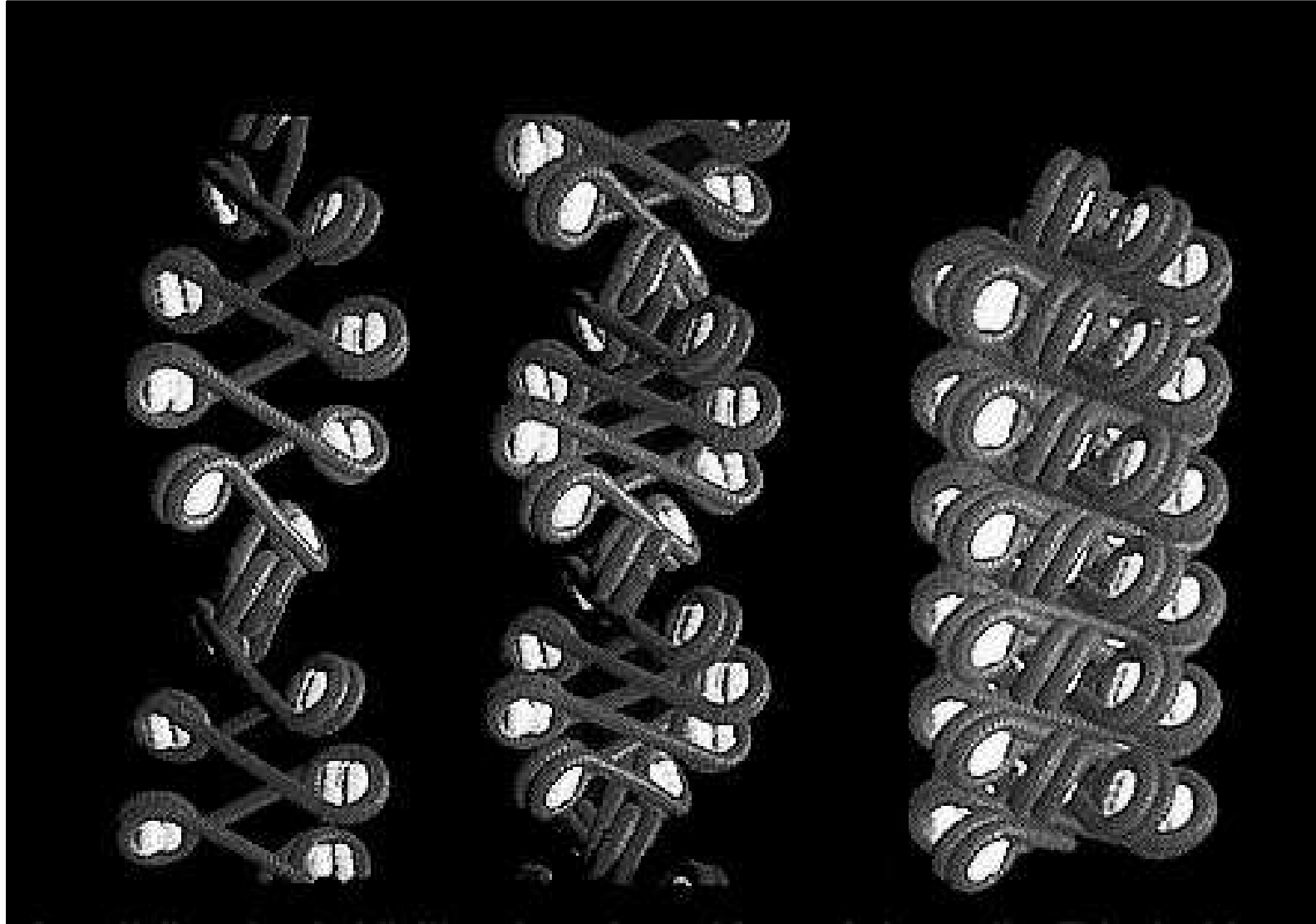


Chromatinové vlákno

30-nm chromatinové vlákno s nukleosomy a navázanými proteiny



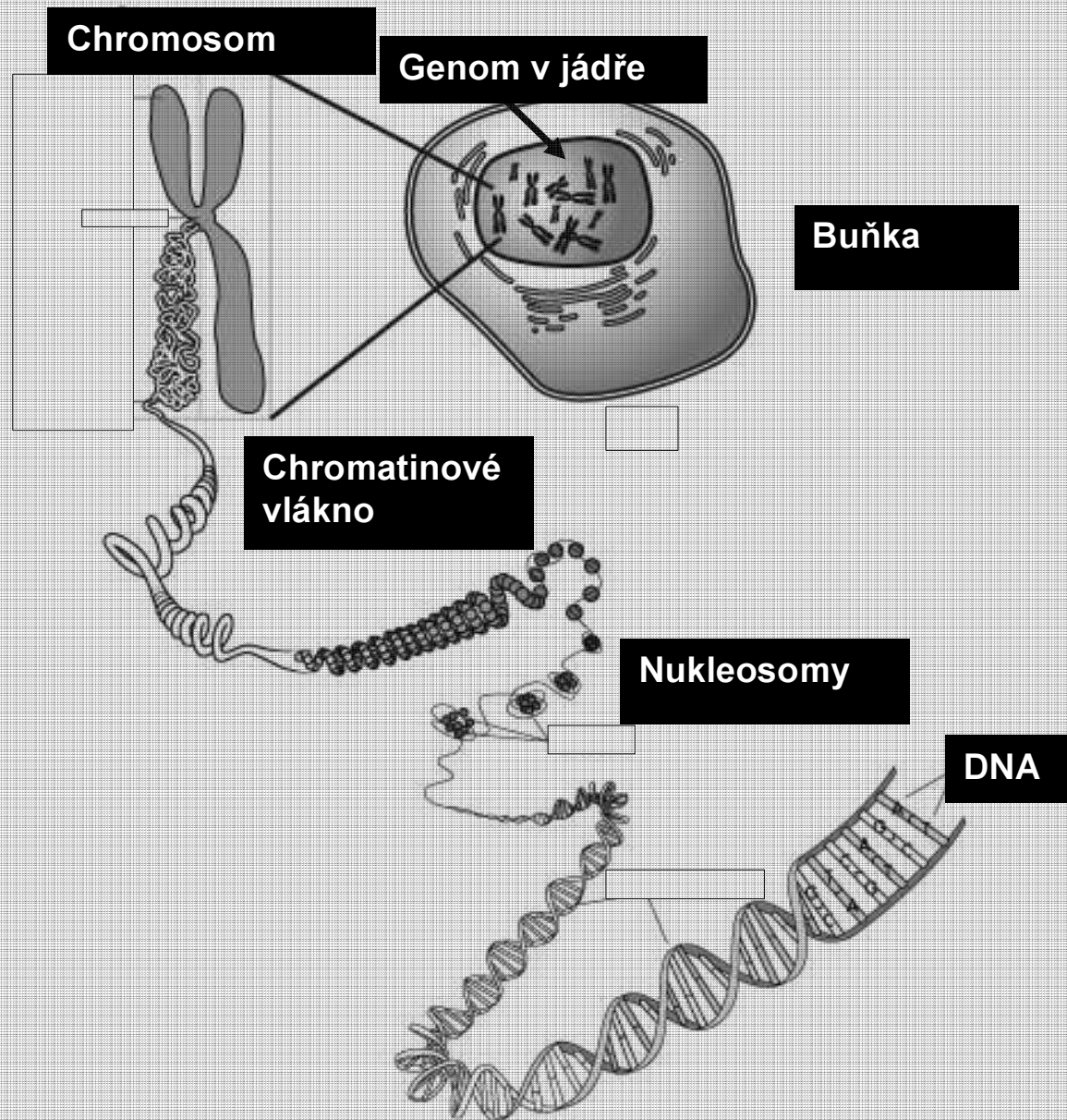
Struktura chromatinu



**Roztažená a částečně roztažená
forma chromatinu**

**Kondensovaná forma
forma chromatinu**

DNA, nukleosomy, chromatin, chromosom a genom



Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

CT a jejich části jsou disjunktní

Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

Nenáhodná vnitřní struktura CT

Chromosomy-složení

Chromosom obsahuje jedinou molekulu DNA spojenou s proteiny:

- a) 5 druhů molekul histonů – proteiny bohaté na lysina a arginin – proto s pozitivním nábojem. Proto se vážou silně s negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA***
- b) různé proteiny nehistonové povahy- většinou jsou to transkripční faktory***

Chromosomy-struktura

Interfáze vs mitóza – stupeň kondenzace, v mitóze dobře viditelné

V S-fázi dochází k syntéze DNA, a proto v mitóze pozorujeme chromosomy duplikované, složené ze dvou sesterských chromatid spojených v centromerické oblasti

V oblasti centromery jsou přítomny proteiny kinetochory, které se vážou na vlákna dělicího vřeténka

Ramena se označují p-raménko (kratší) a q-raménko

Barvení Giemsou zviditelní sérii pruhů (tzv. G-pruhy)

Chromosomy-počty

Všechna zvířata mají charakteristický počet chromosomů ve svém těle, tzv. diploidní počet ($2n$)

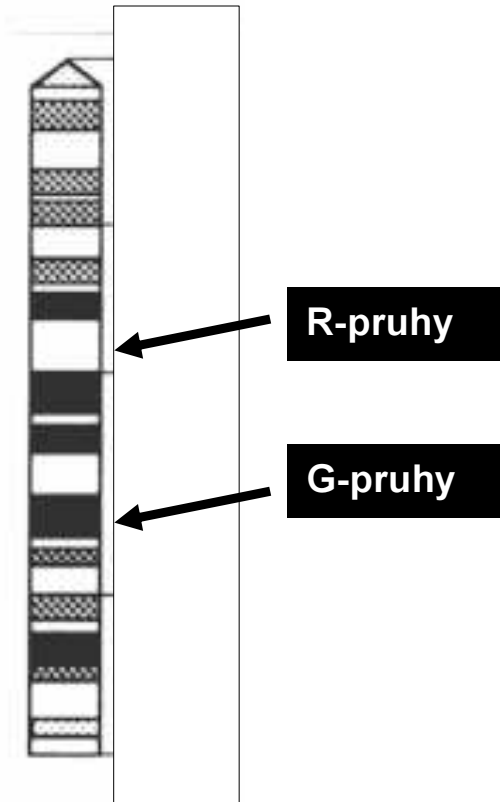
Ty se vyskytují jako homologní páry, každý z páru byl získán od jednoho z rodičů

Pohlavní buňky obsahují haploidní počet chromosomů

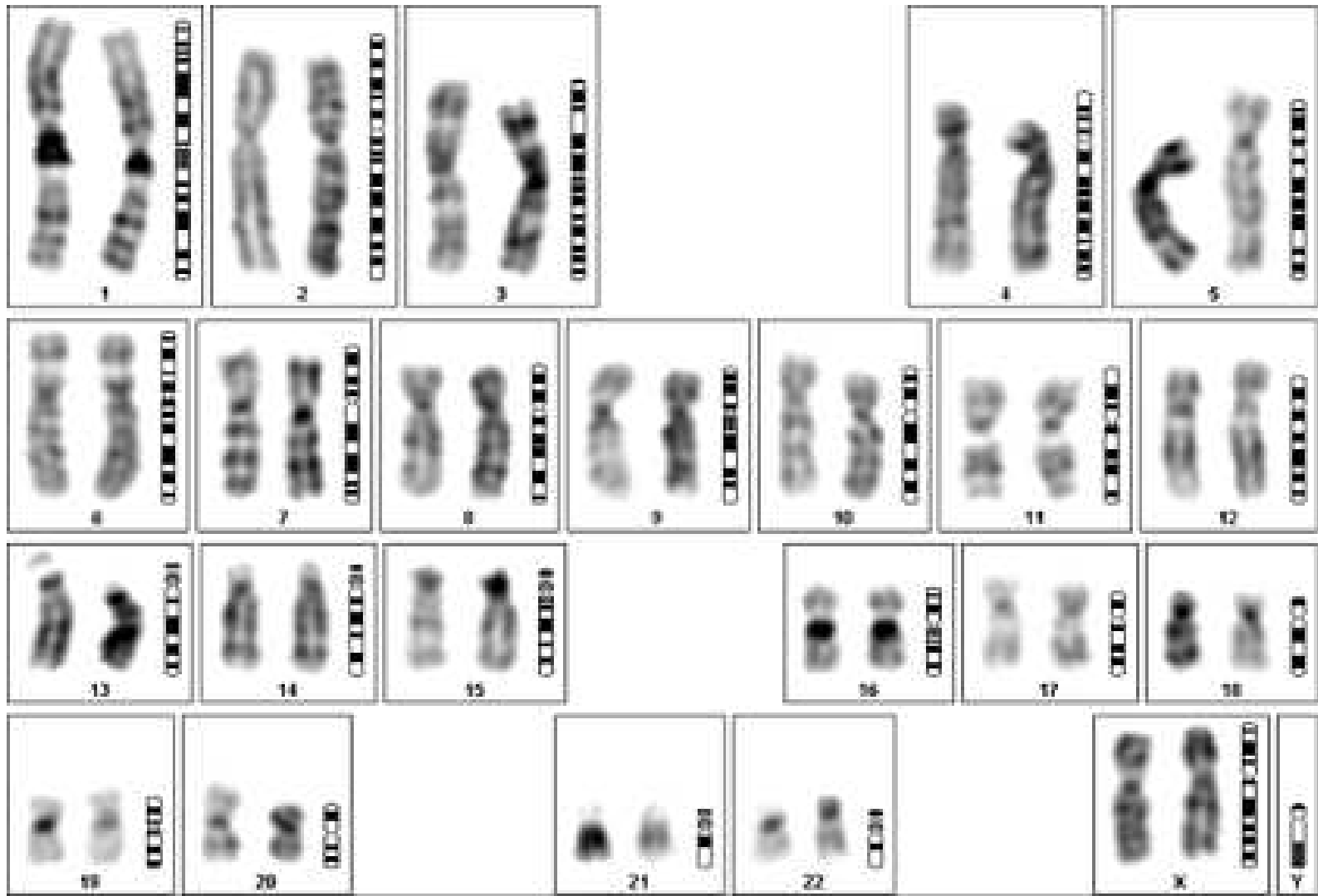
Chromosomy-počty

| | |
|--|-----|
| Člověk | 46 |
| Myš | 40 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | 8 |
| Mikroskopický červ <i>Caenorhabditis elegans</i> | 12 |
| Kvasinky (<i>Sacharomyces cerevisie</i>) | 32 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> (rostlina) | 10 |
| Žába <i>Xenopus laevis</i> (jižní Afrika) | 36 |
| Pes | 78 |
| Kuře | 78 |
| Pšenice | 20 |
| Mravenec <i>Myrmecia pilosula</i> | 2 |
| Červ <i>Parascaris equorum</i> | 2 |
| Rak <i>Cambarus clarkii</i> | 200 |
| Přeslička rolní <i>Equisetum arvense</i> | 216 |

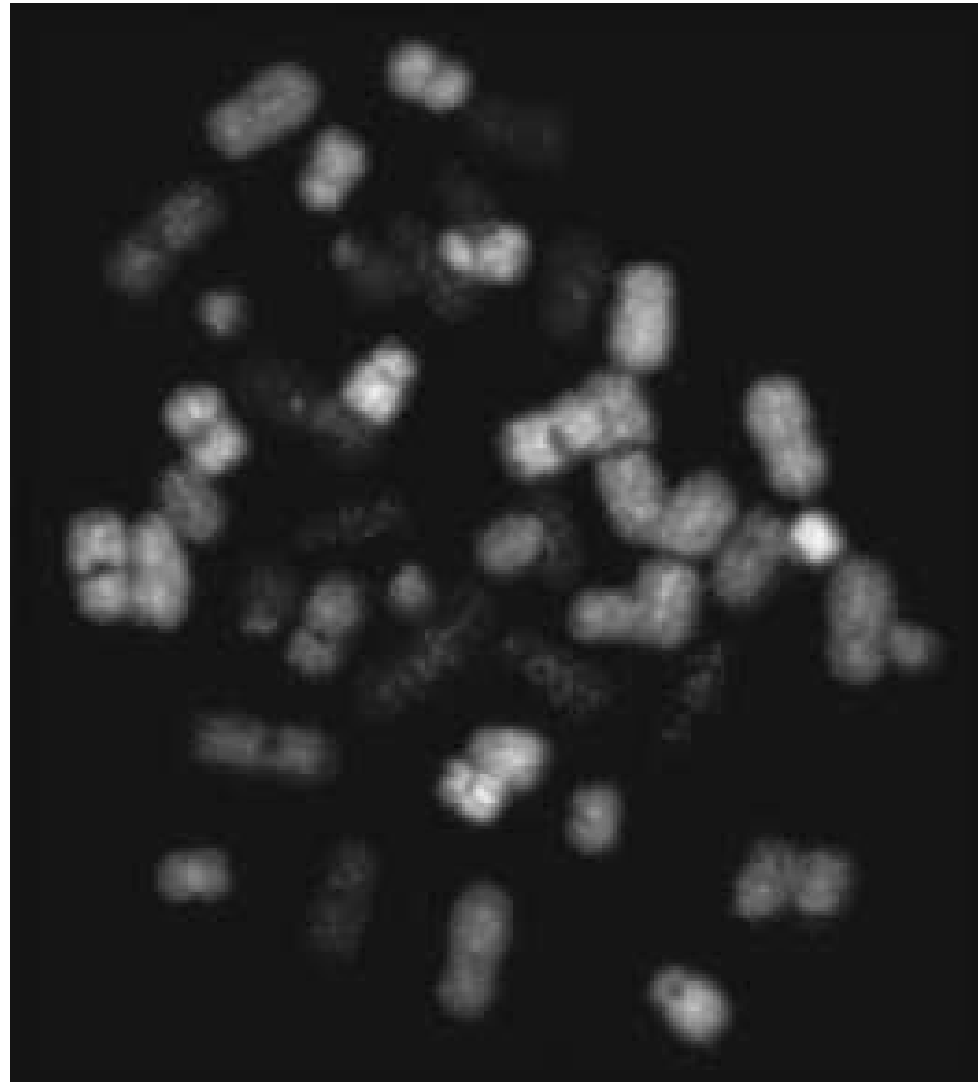
Klasické barvení chromosomů



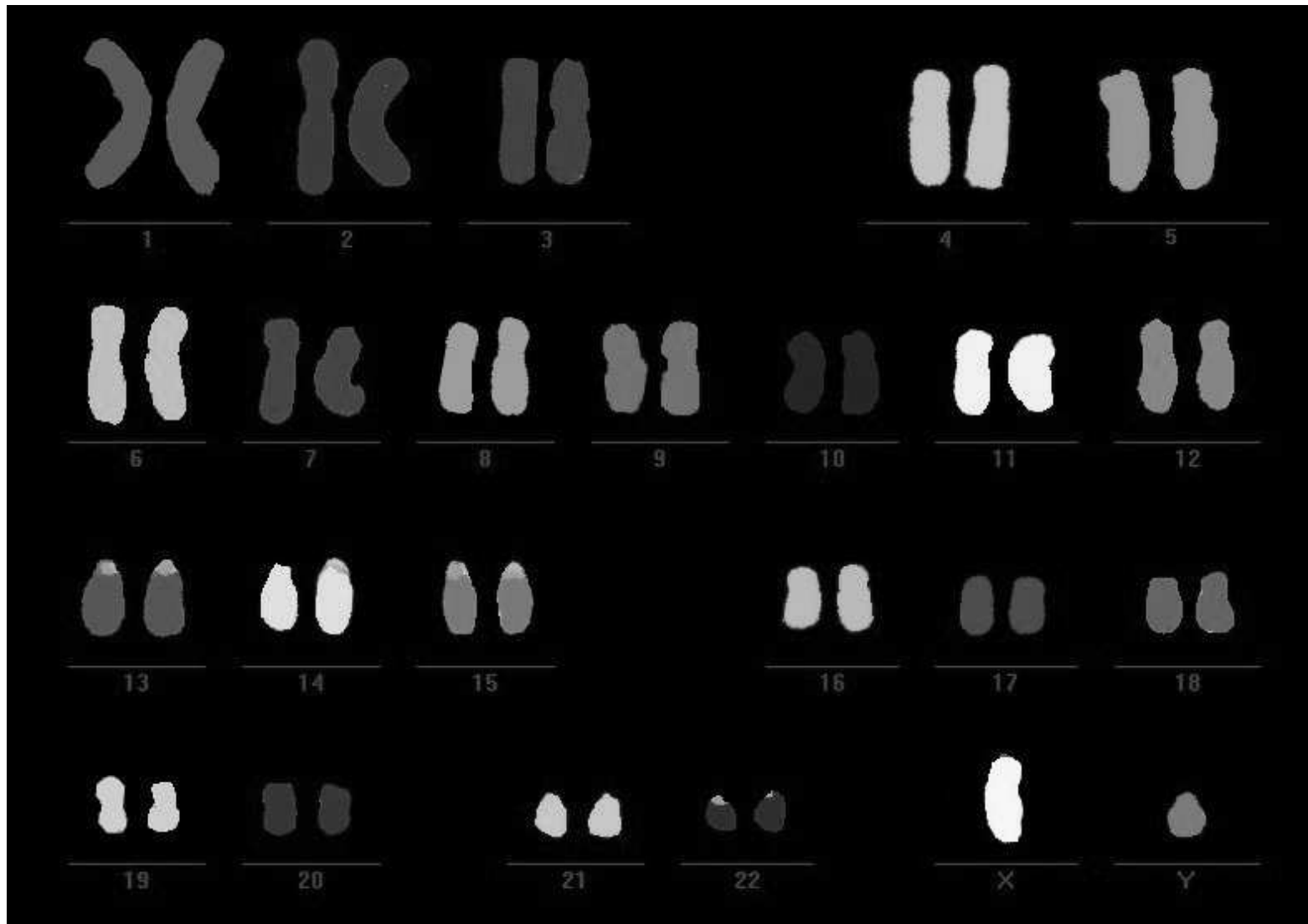
Barvení chromosomů - G-banding



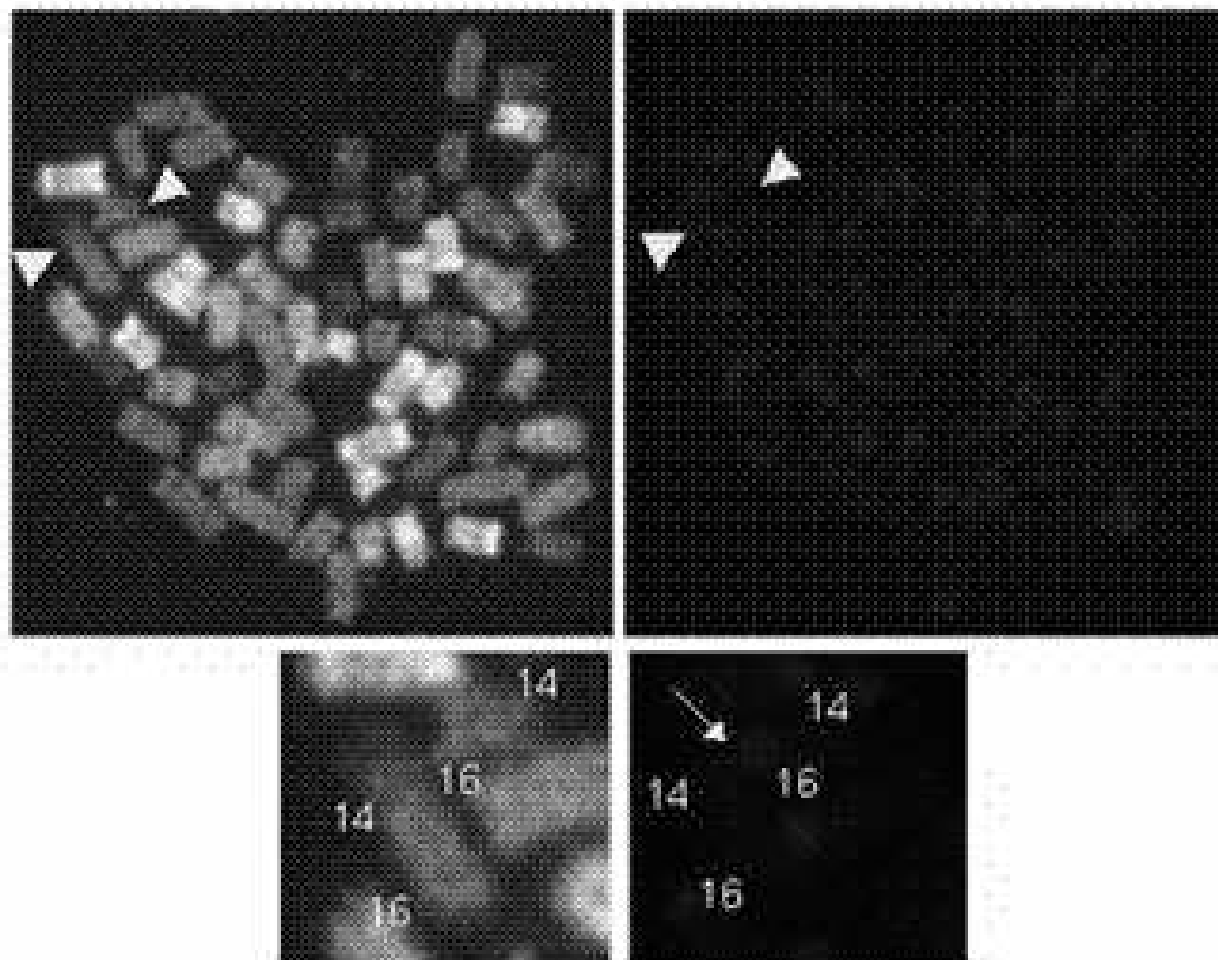
Lidské chromosomy obarvené pomocí multicolor FISH



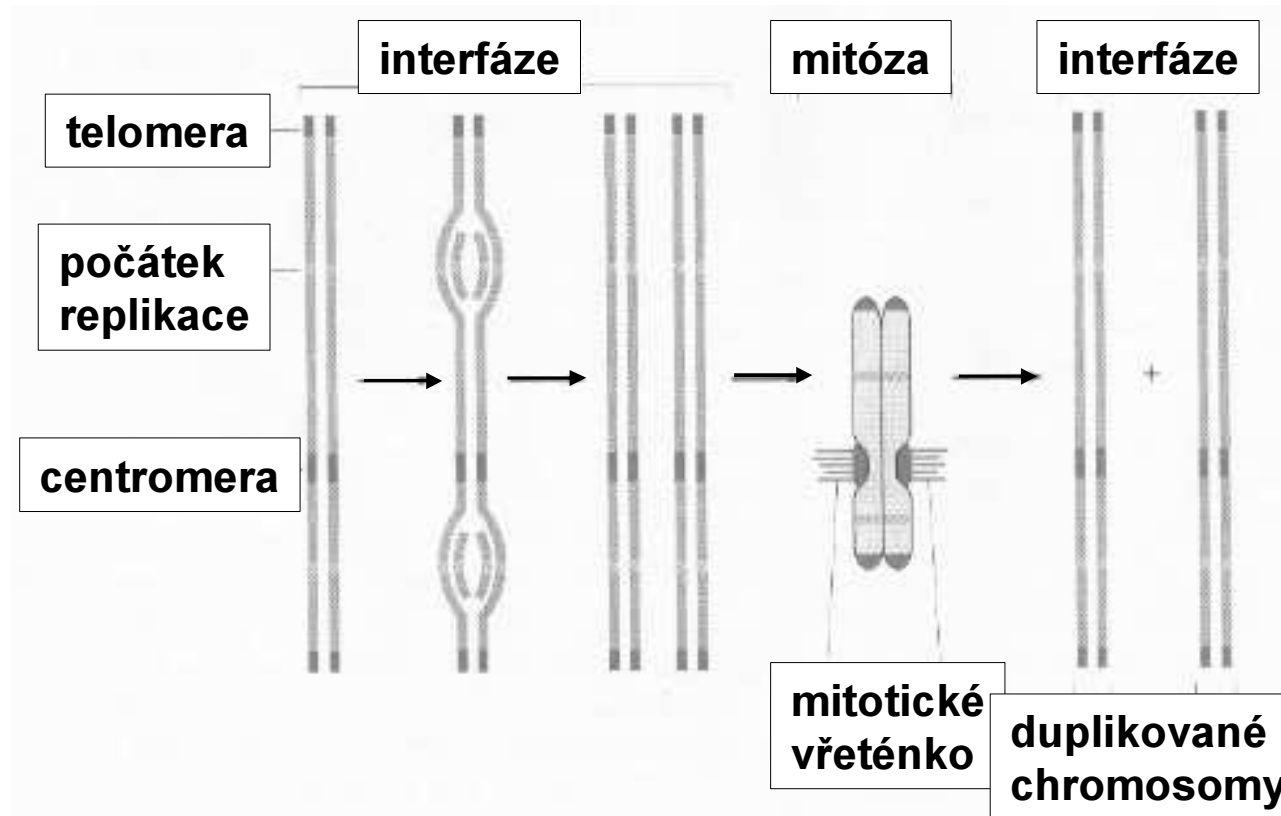
Lidské chromosomy obarvené pomocí multicolor FISH



Translokace detekovaná pomocí m-FISH



Významné sekvence na chromosomech



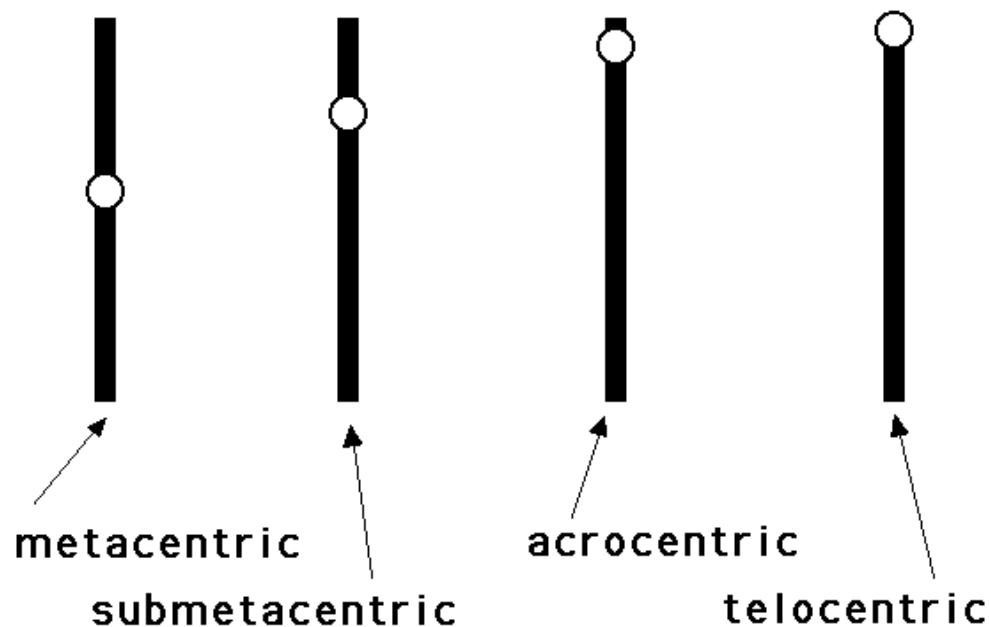
Na chromosomech rozlišujeme:

telomery (konce chromosomů obsahující sekvence zajišťující zachování délky chromosomu)

centromery (účastní se při segregaci chromosomů v mitóze)

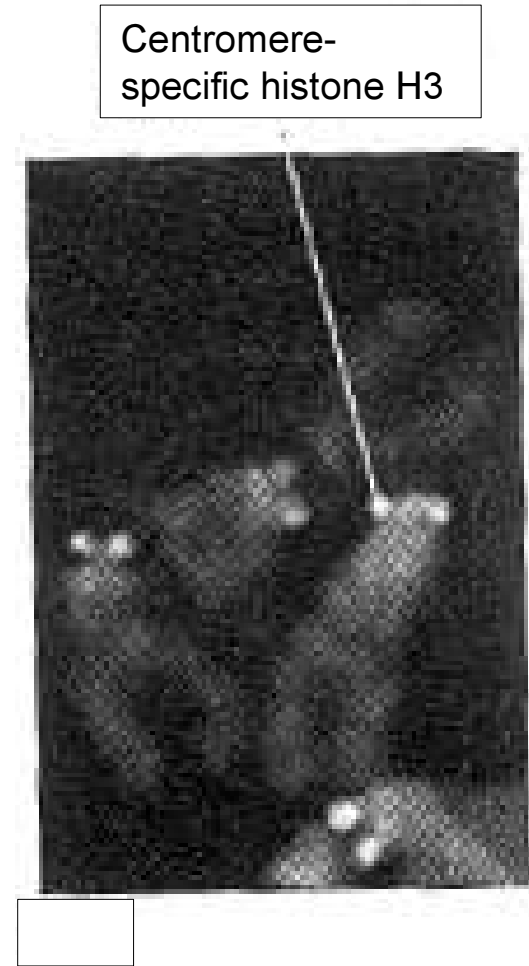
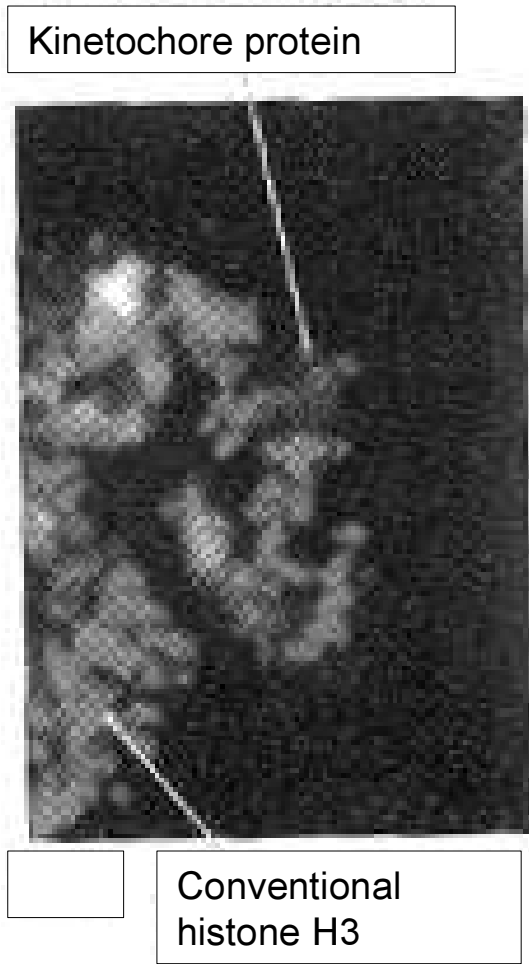
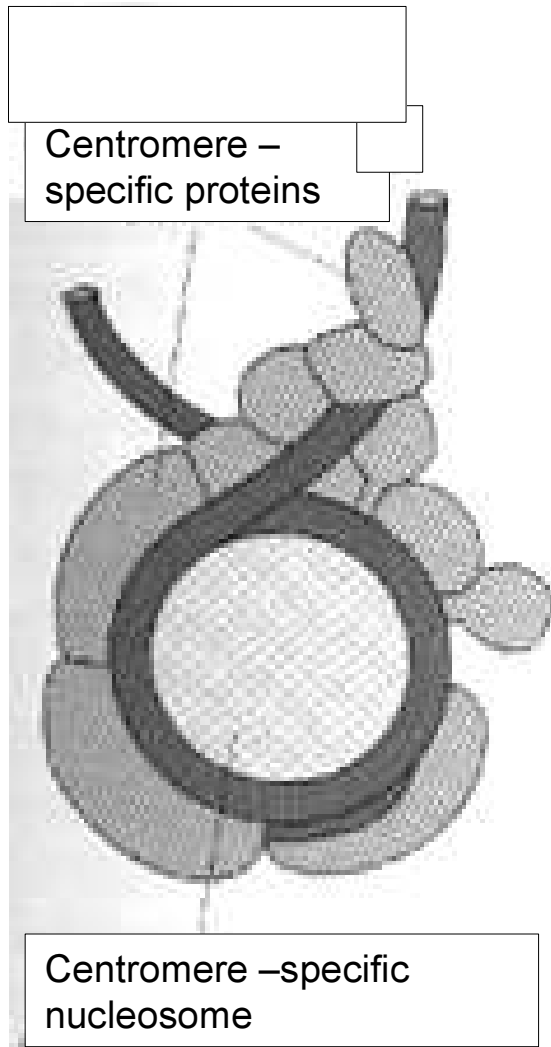
počátky replikace (více míst, kde začíná replikace)

Typy chromosomů podle umístění centromery

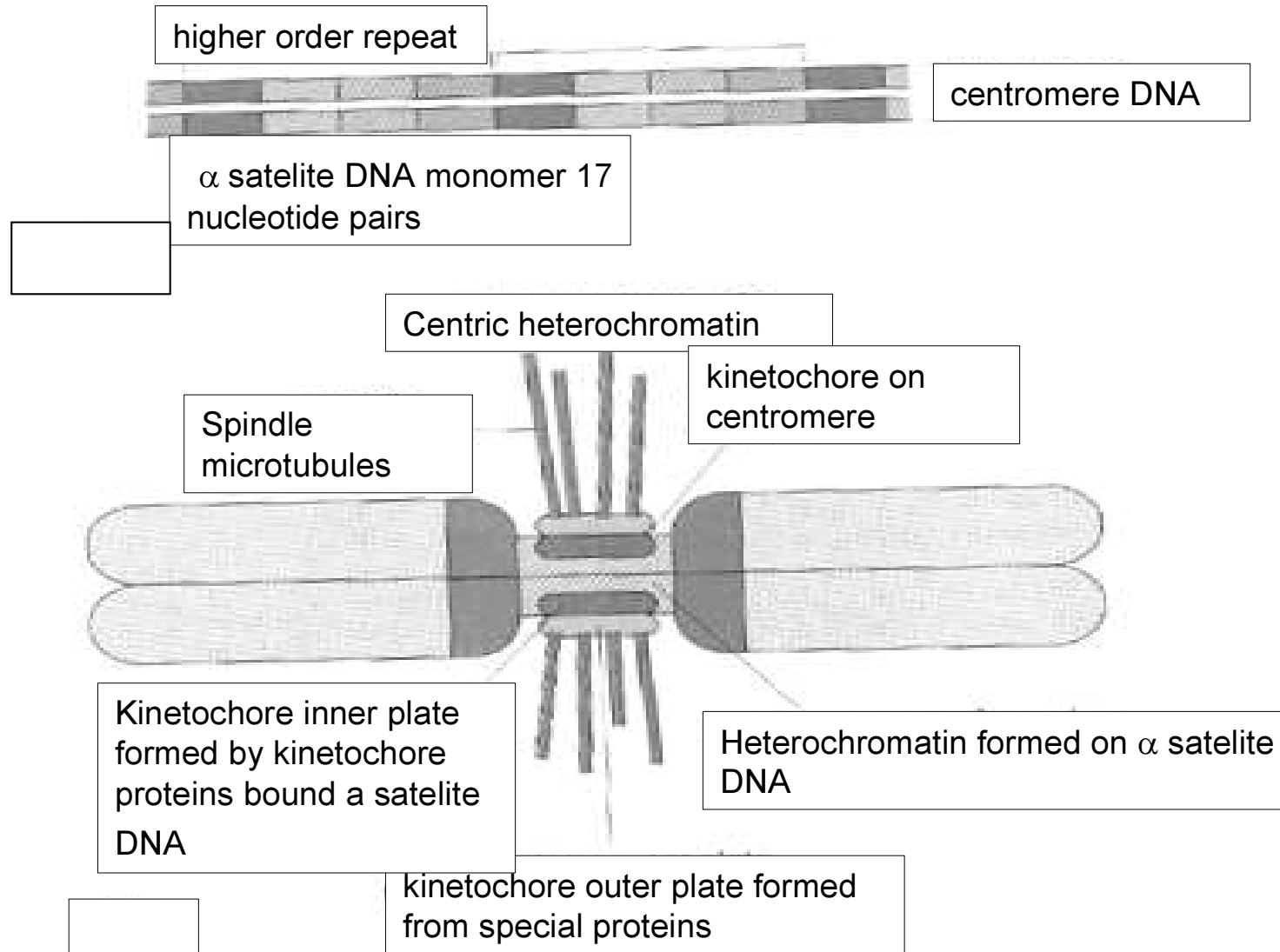


Centromery – identifikovatelné jako místa konstriktce, v nichž jsou chromatidy spojeny k sobě, odpovědné za segregaci CT, fixovány na určité místo v CT, mají určitou sekvenci. Tyto sekvence mohou být stejné nebo podobné pro více CT.

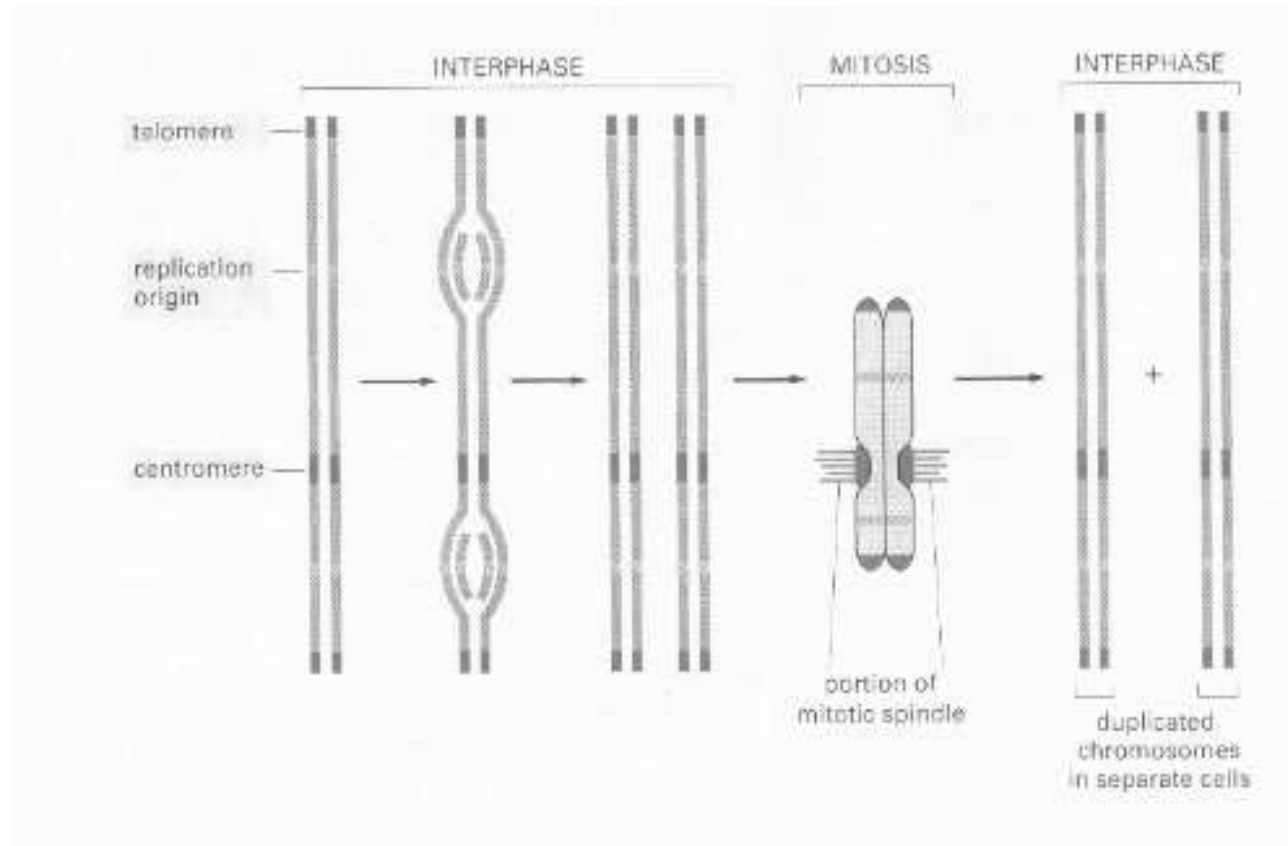
Centromery mají odlišné histony



Struktura centromery

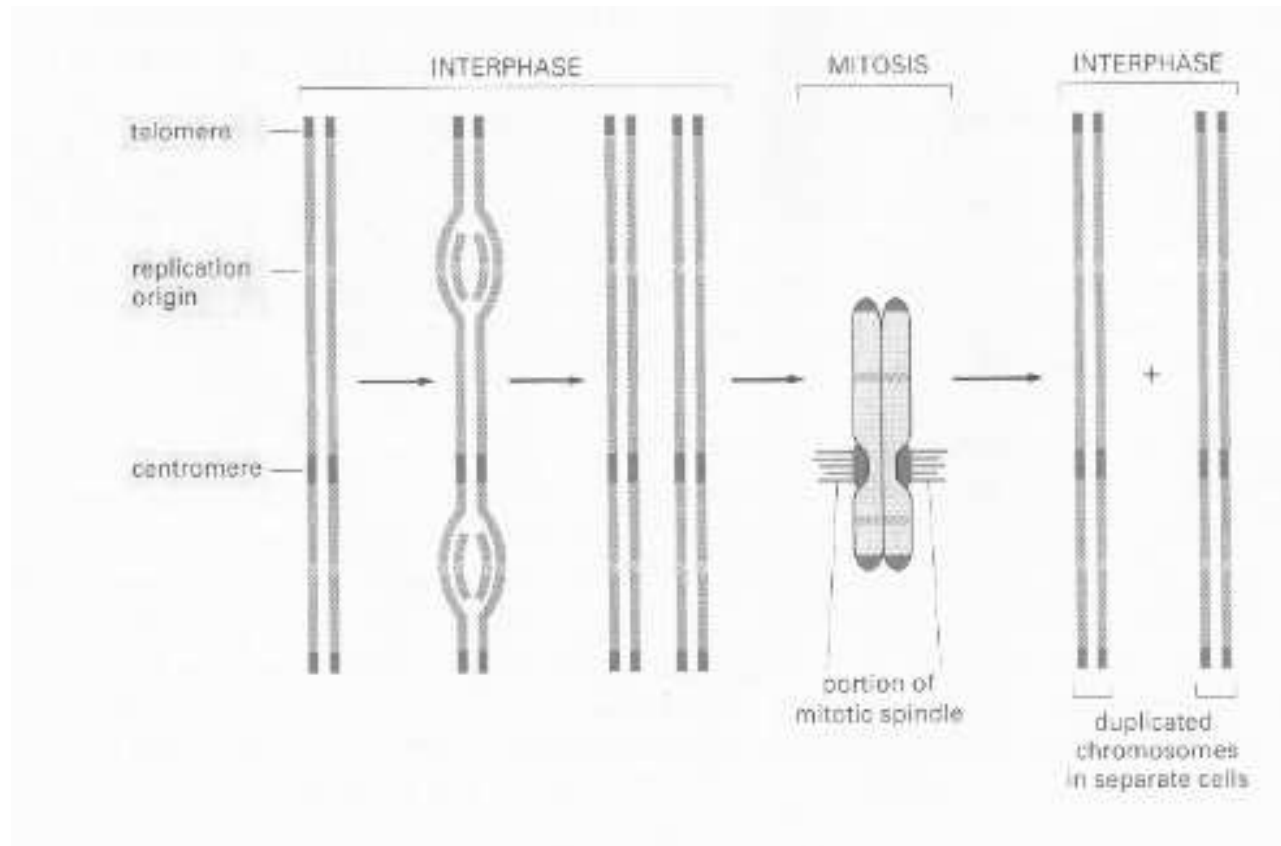


Významné sekvence na chromosomech



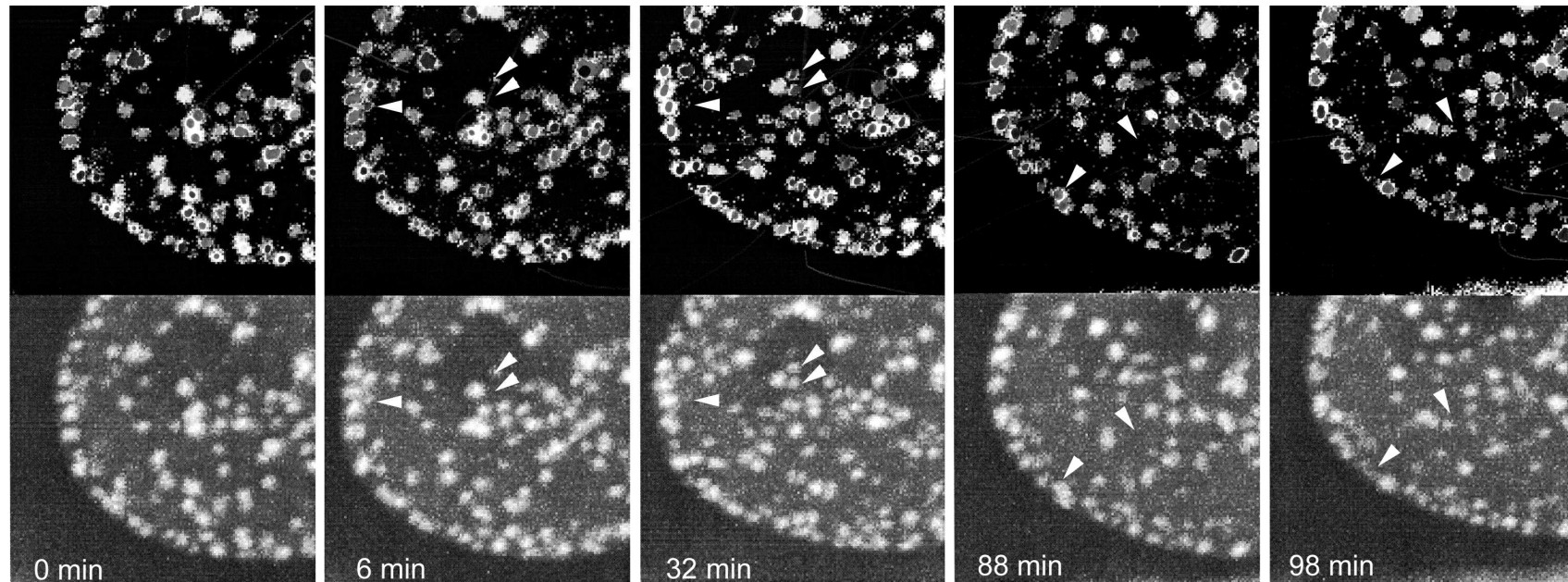
Telomery – problém při replikaci na konci lineárních molekul DNA se řeší speciální sekvencí (tandem GGGTTA – až 10 kbp), která váže enzym telomerázu, tj. enzym, který funguje v komplexu s krátkým úsekem RNA, podle kterého syntetizuje (jako reverzní transkriptáza) malé úseky DNA na koncích chromosomů.

Významné sekvence na chromosomech



Počátky replikace – replikace běží v obou směrech od společného počátku (50 bp/s), který je charakterizován určitým typem sekvence; v lidském genomu je mnoho počátků replikace (10^3). Replikace je aktivována v klastrech a probíhá nejdříve pro méně kondensovaný chromatin.

Vizualizace více DNA sekvencí *in vivo* pomocí GFP

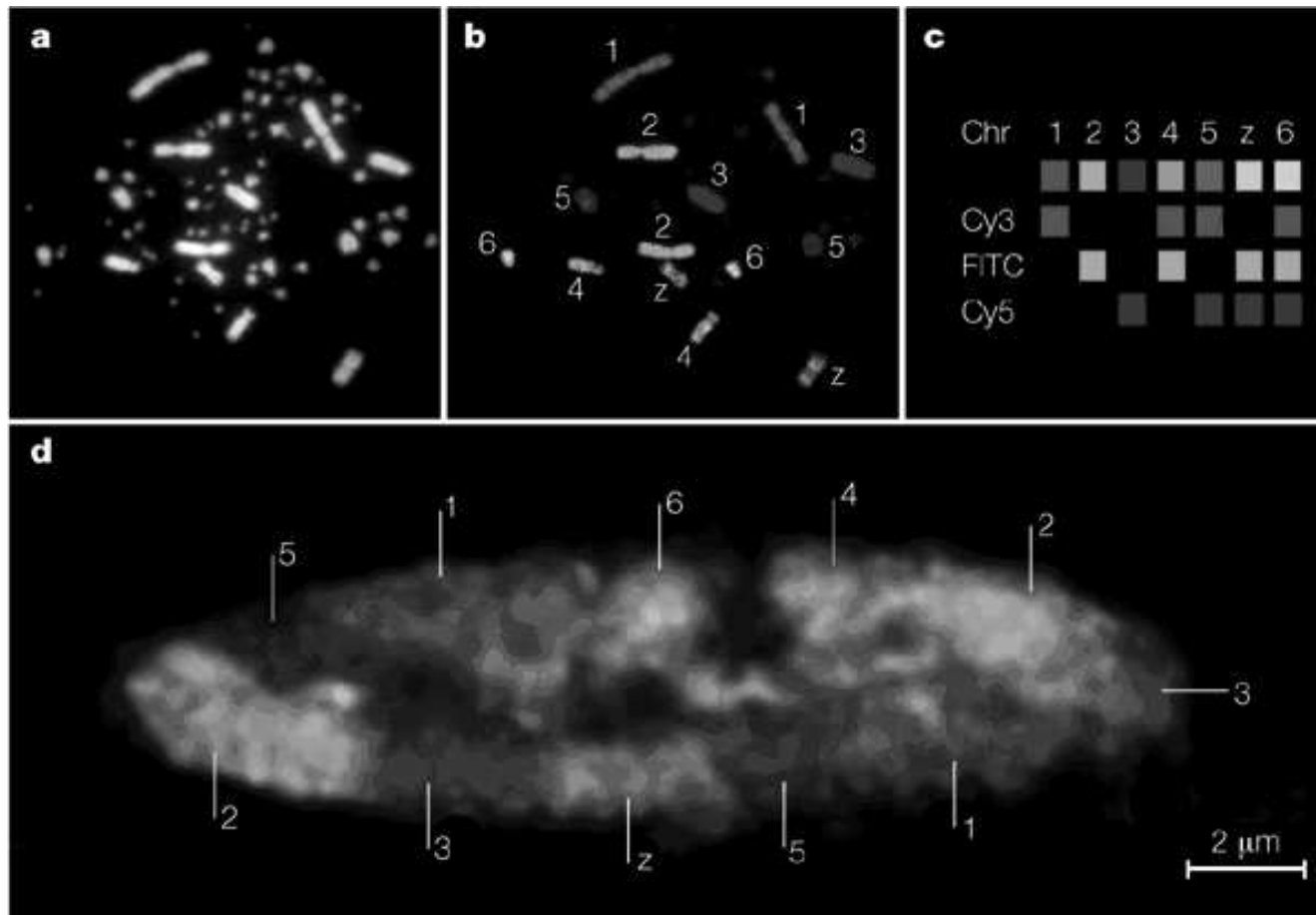


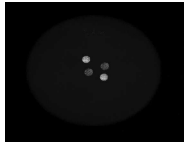
Sadoni et al., JCB 2000



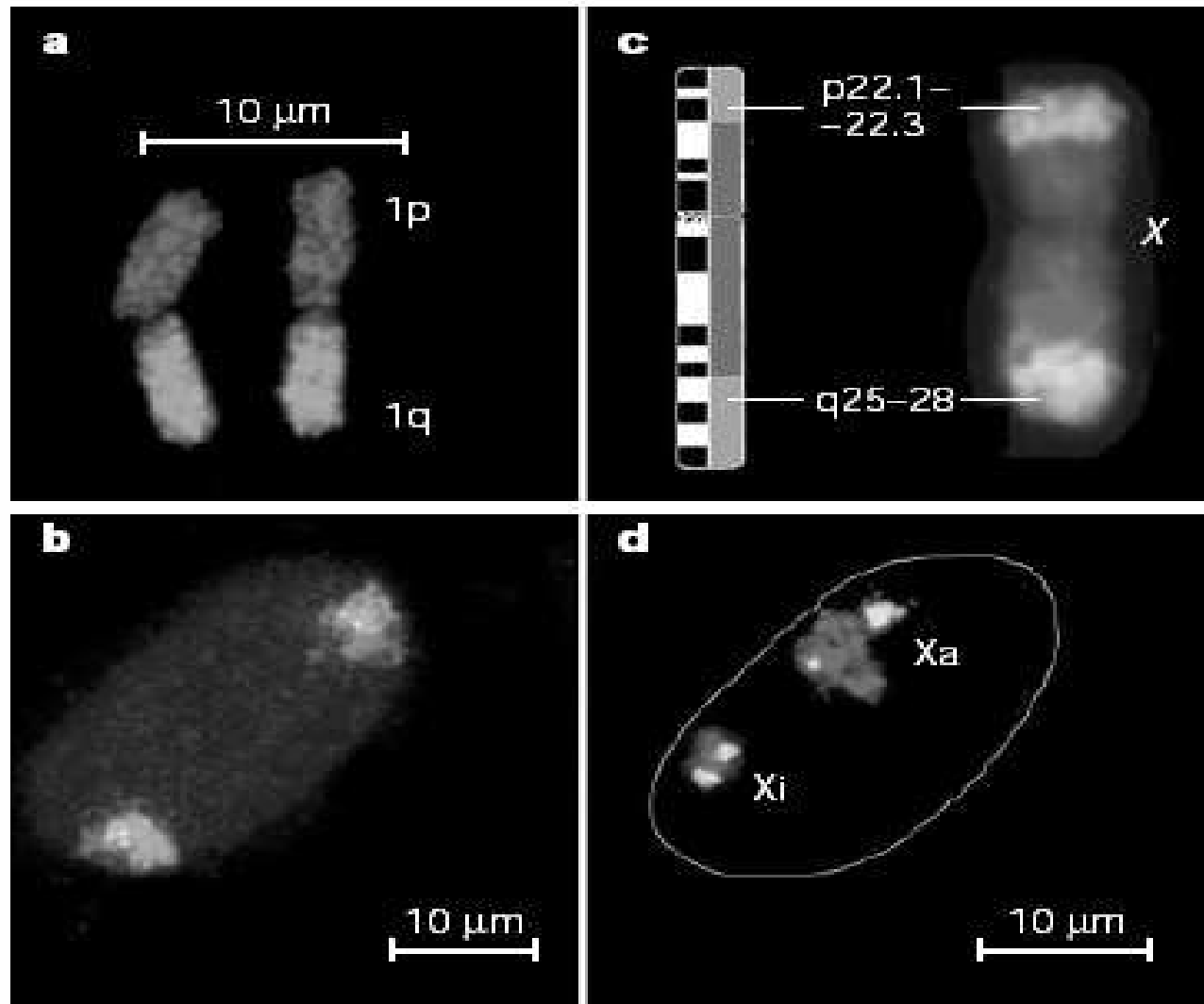
Chromosomová teritoria (CT)

První experimenty, které vedly k závěru, že chromosomy se nacházejí v jádře v podobě ohraničených domén, byly pokusy T. Cremera v létech 1982-1984. Zavedení FISH podstatně urychlilo poznání chromosomů jak v mitóze, tak v interfázi.

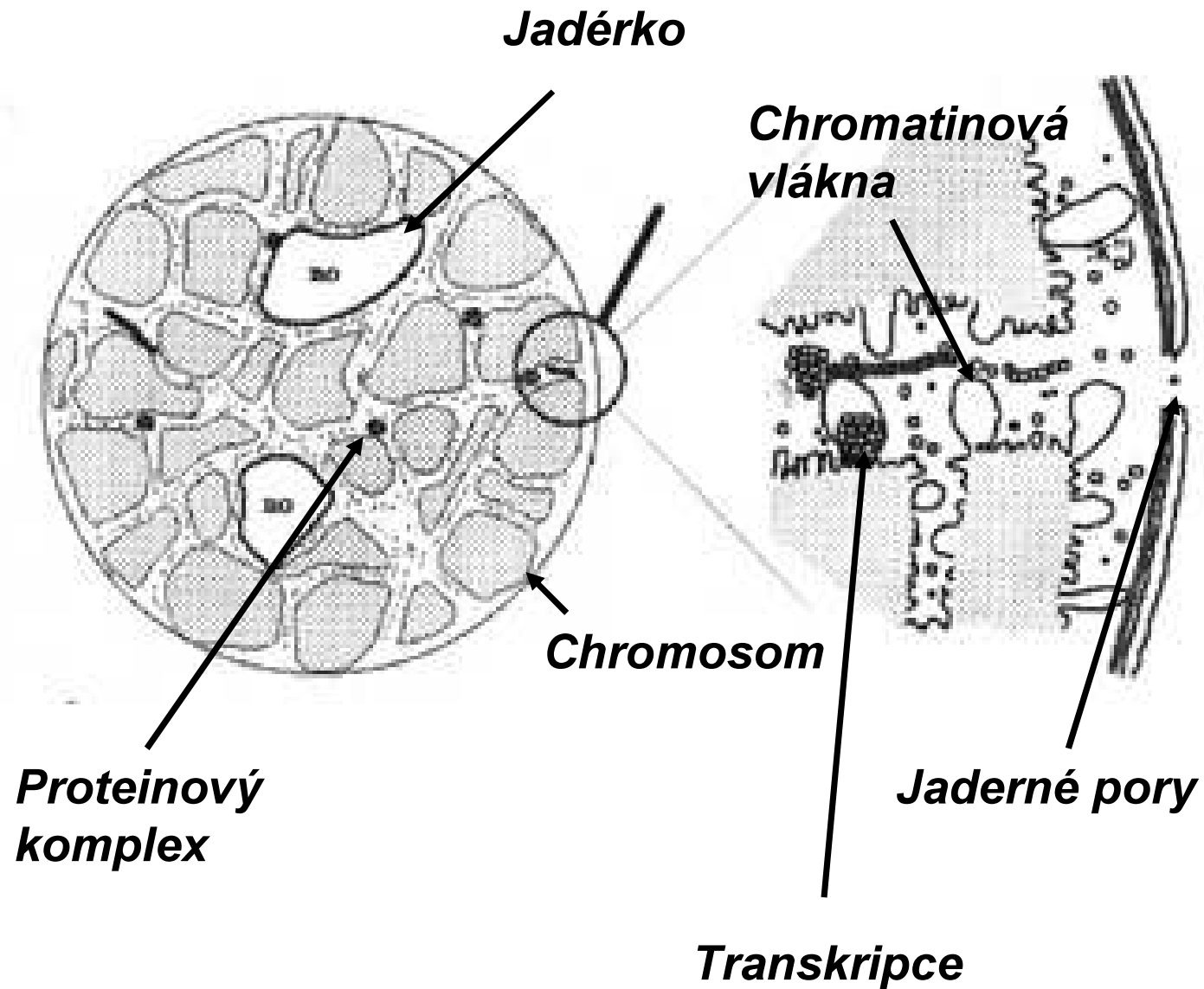




Chromosomová teritoria se nepřekrývají; ani jejich části



Funkční uspořádání genomu v jádře



Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

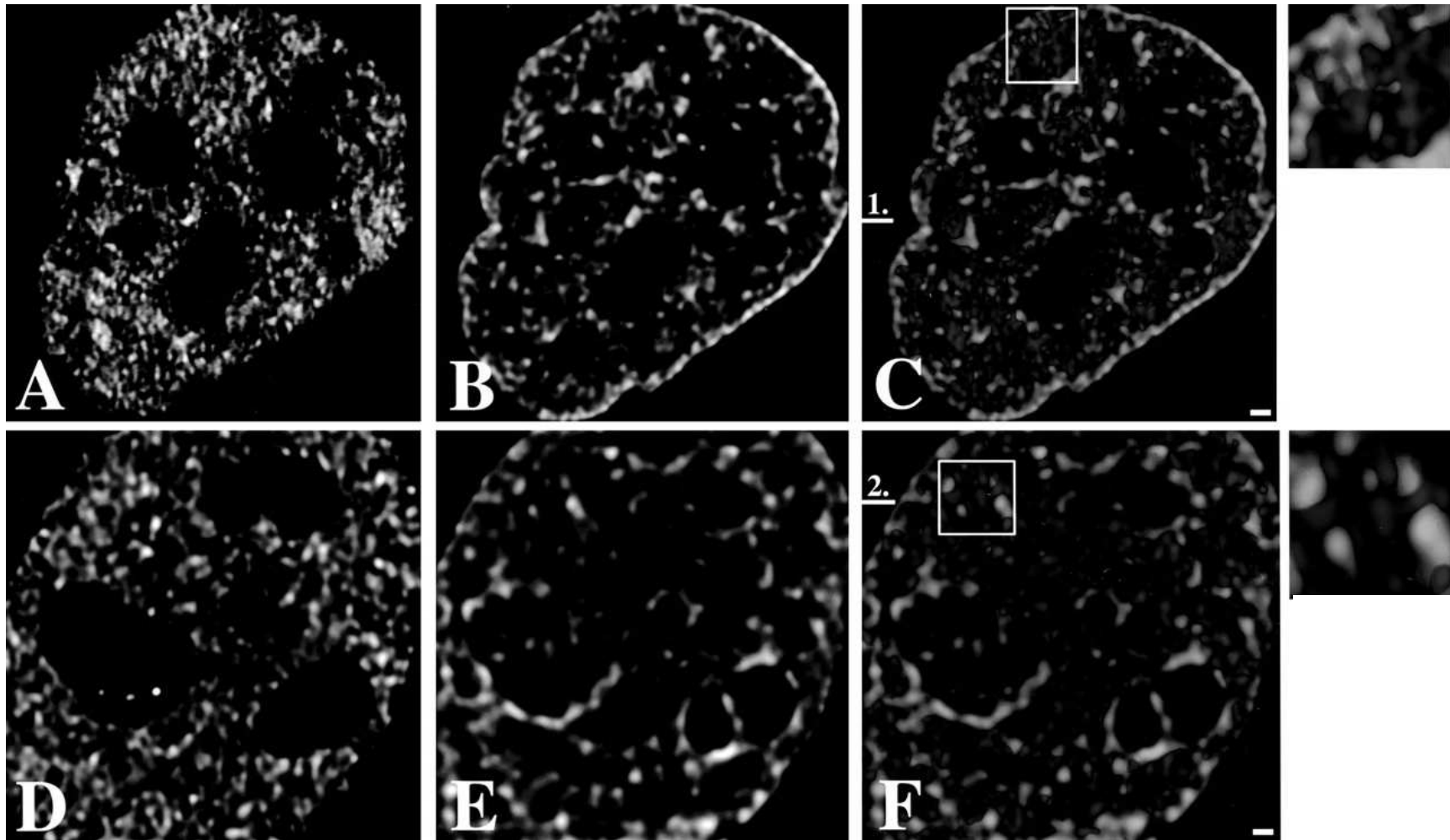
CT a jejich části jsou disjunktní

Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

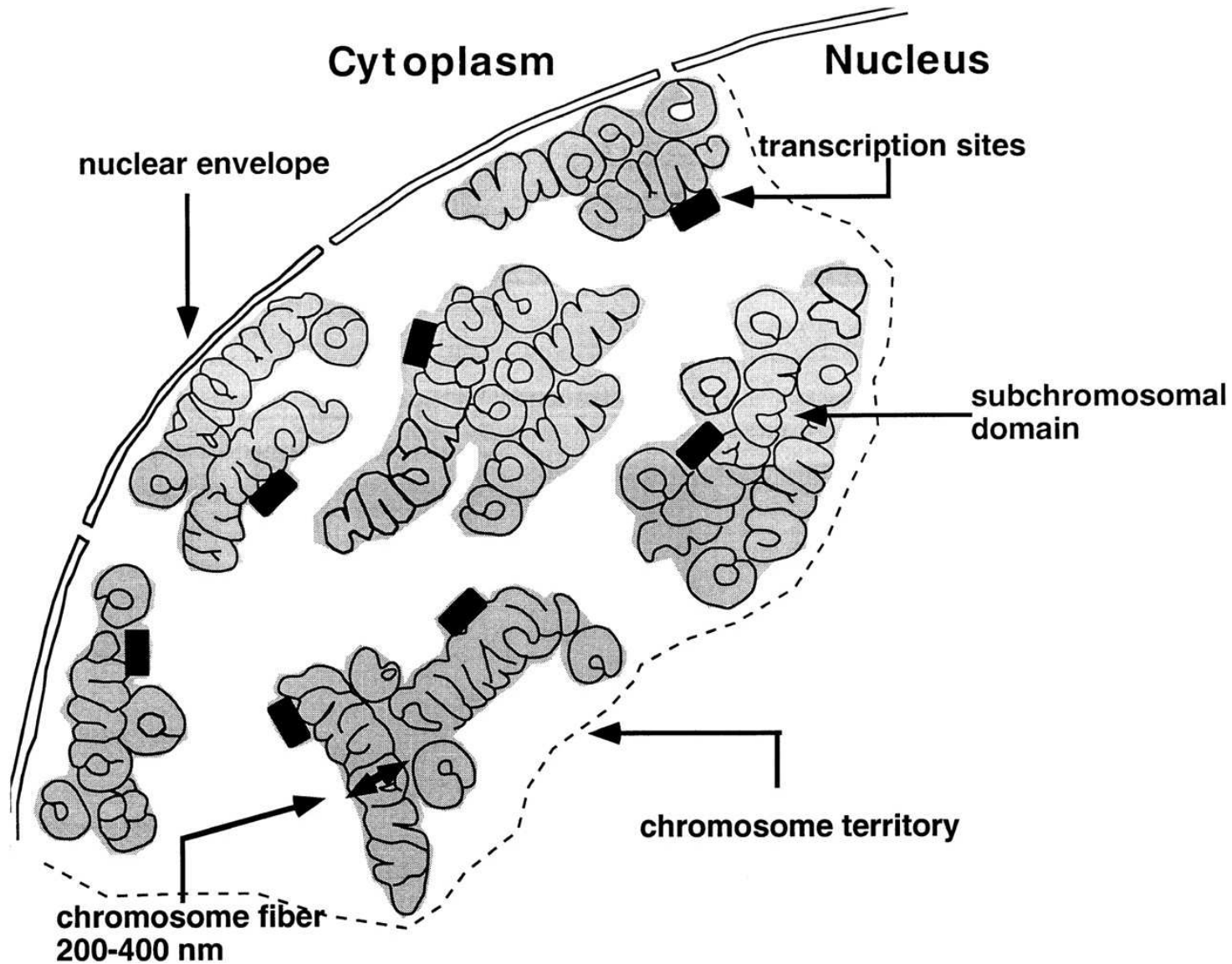
Nenáhodná vnitřní struktura CT

Struktura CT – CT je tvořeno subdoménami



Verschure et al., 1999 – H2B+GFP a nascentní mRNA (BrUTP) + Cy3 ukazuje, že mRNA se nachází mezi chromatinem vizualizovaným pomocí GFP.

Struktura CT - schéma



Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

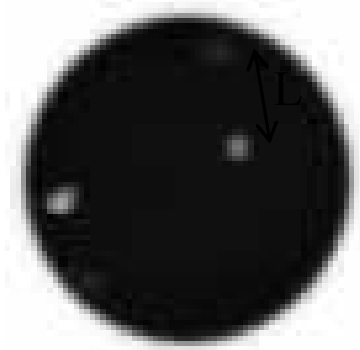
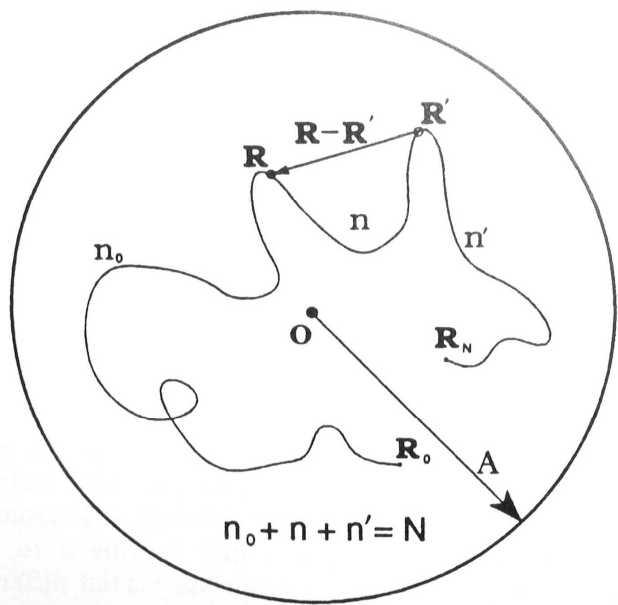
CT a jejich části jsou disjunktní

Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

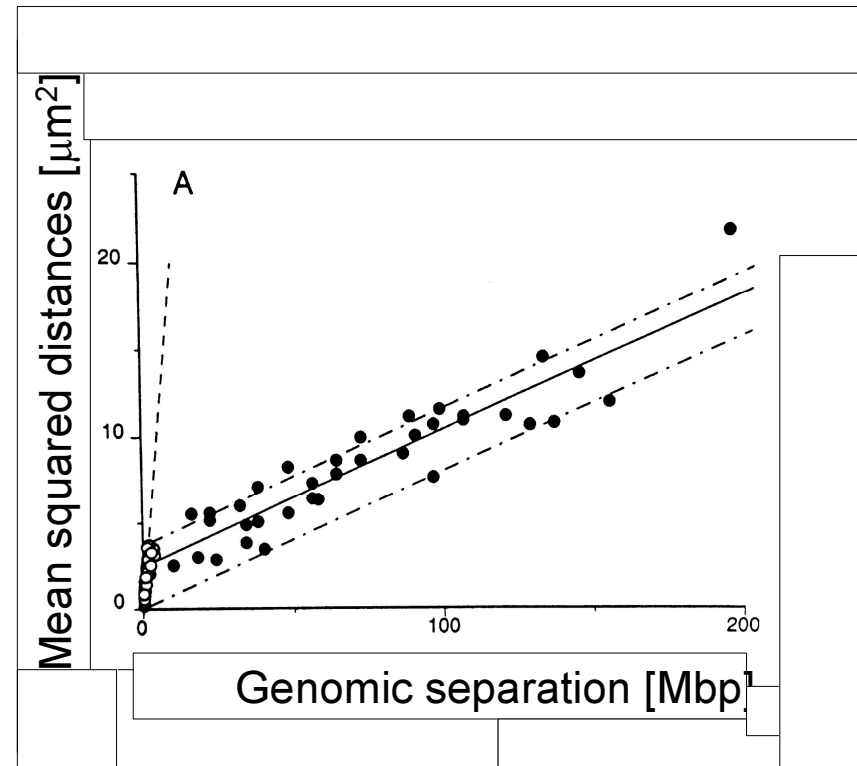
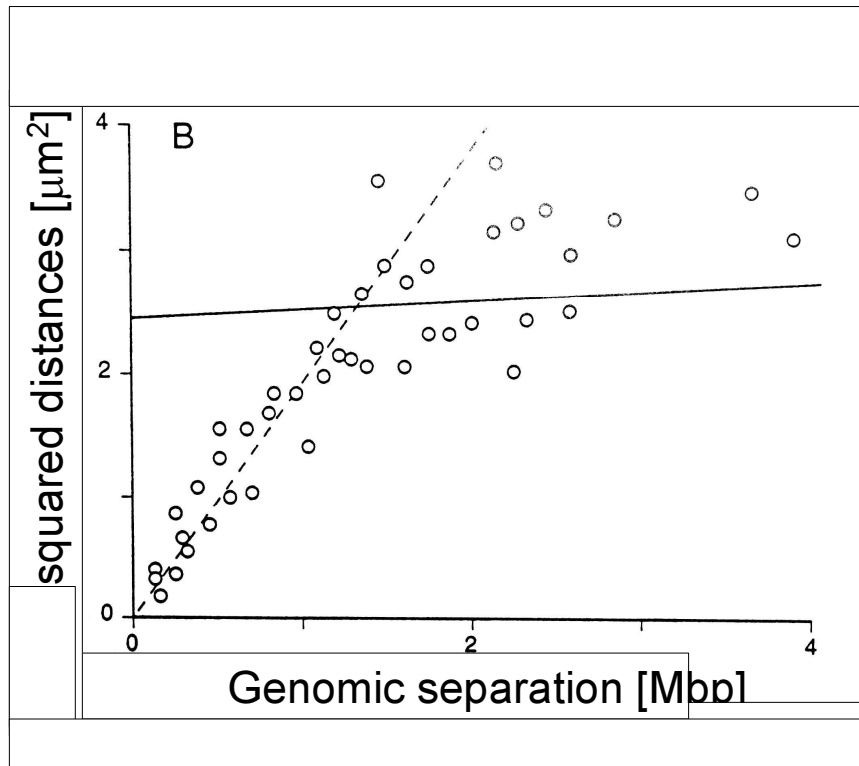
Nenáhodná vnitřní struktura CT

**Náhodný (Gausovský) polymer v jádře buňky
(jsou zobrazeny 2 body polymeru R a R')**

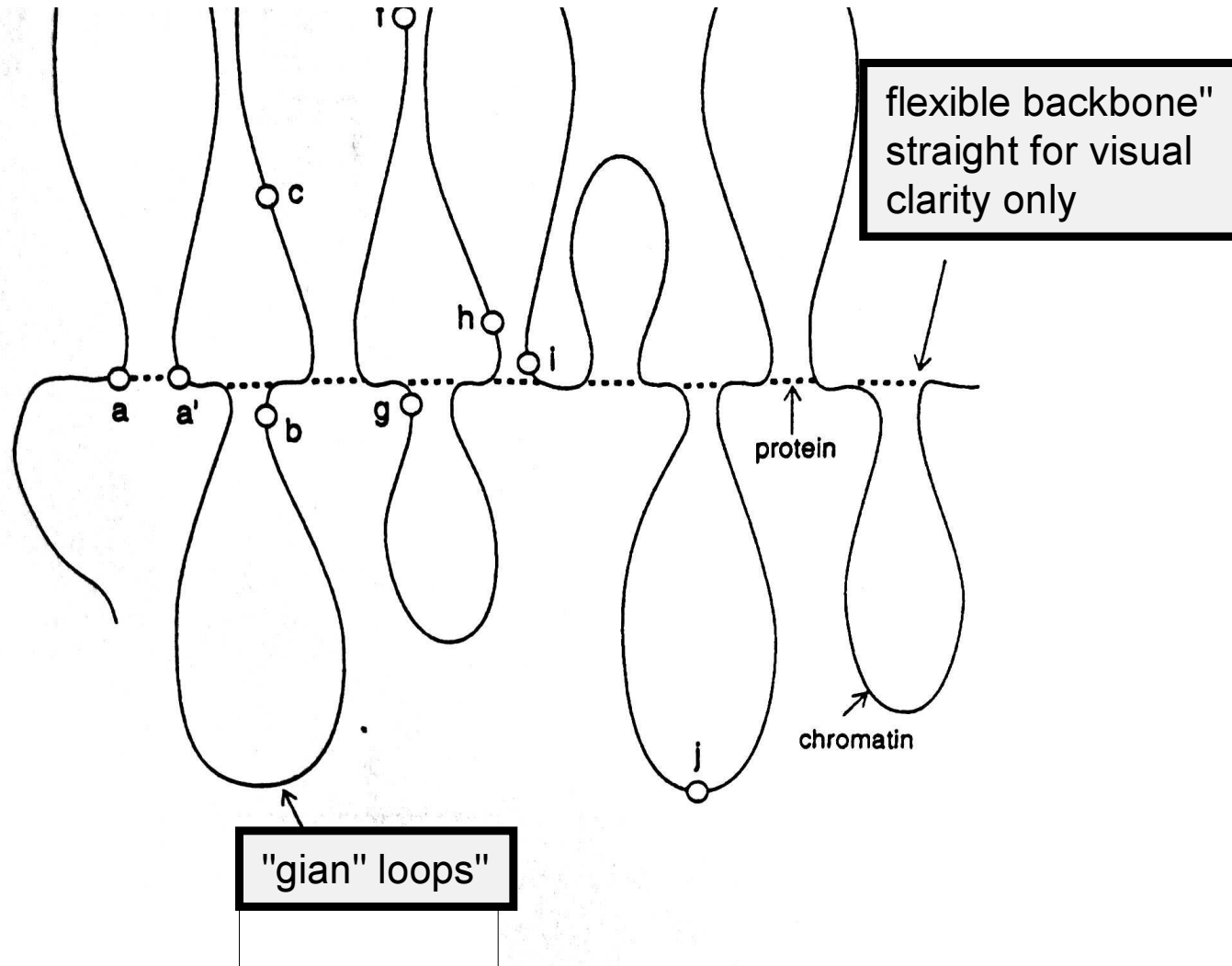


$$\langle L^2 \rangle \approx n$$

Střední vzdálenosti mezi genetickými elementy v závislosti na jejich molekulárních vzdálenostech (H. Yokota et al., 1995)

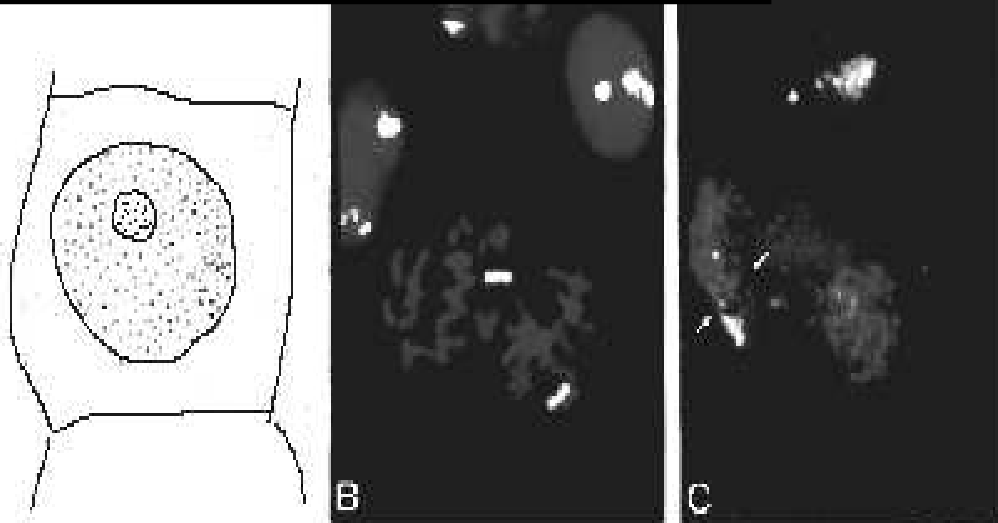


A random-walk/giant-loop model Interfázniho jádra (Sachs et al., 1995)

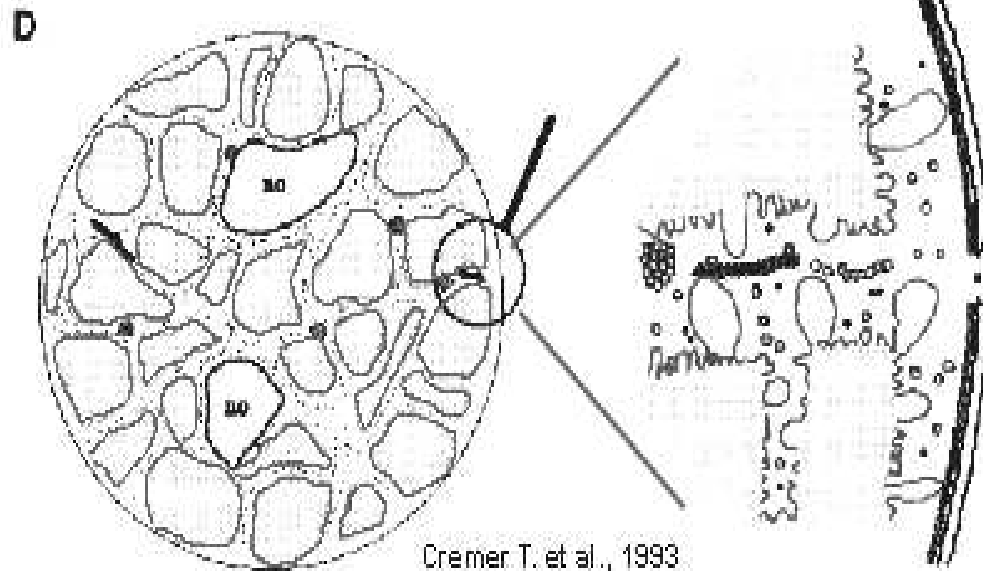
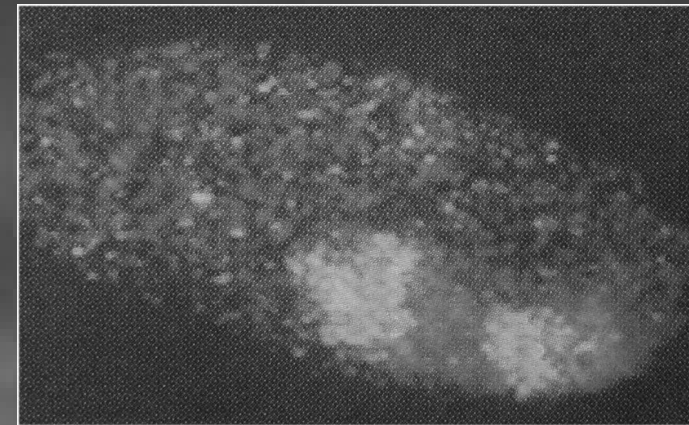


Multi-loop subcompartment model (Münkel et al., 1999)

Existence disjunktních CT

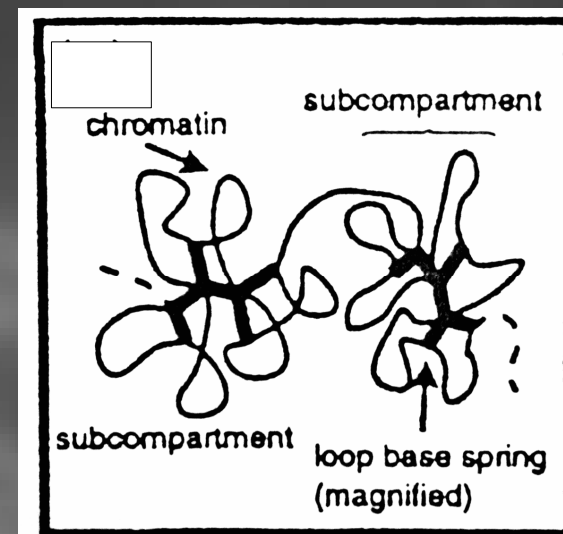


Existence subdomén uvnitř CT

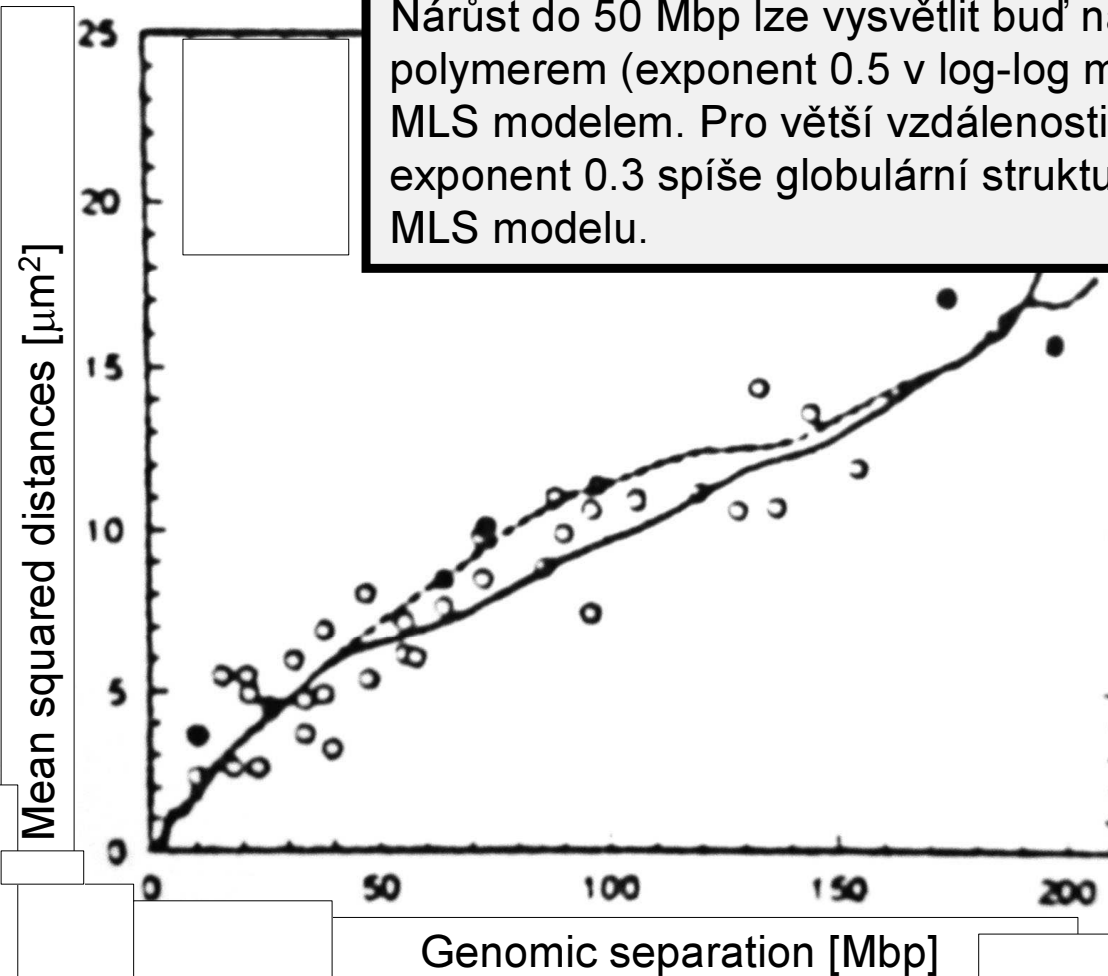


Cremer T. et al., 1993

Schéma modelu



$L^2(n)$ závislost pro velké molekulární vzdálenosti podle MLS modelu



Nárůst do 50 Mbp lze vysvětlit buď náhodným polymerem (exponent 0.5 v log-log měřítku) nebo MLS modelem. Pro větší vzdálenosti odpovídá exponent 0.3 spíše globulární struktuře popsané v MLS modelu.

Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

CT a jejich části jsou disjunktní

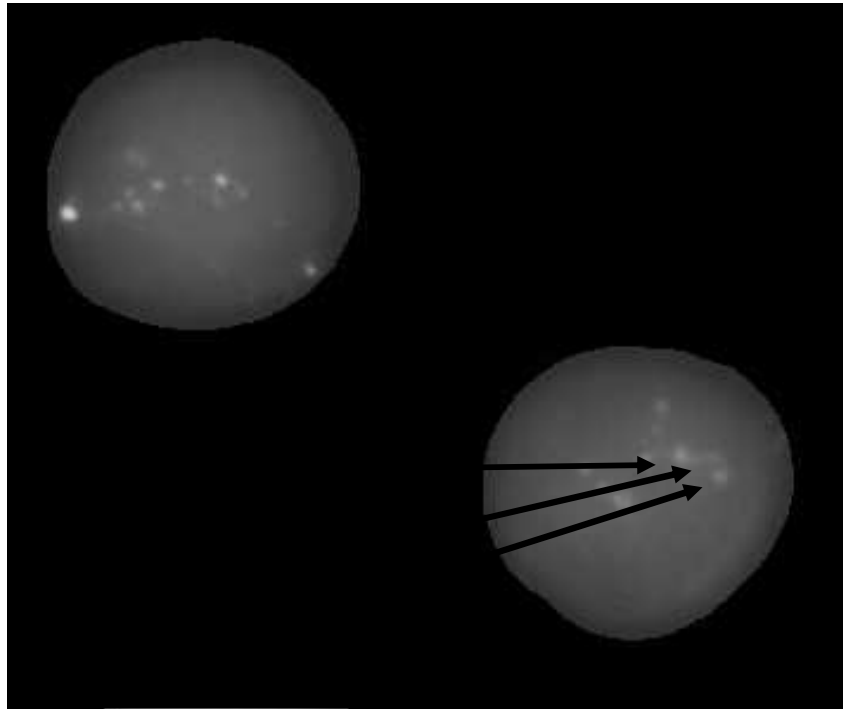
Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

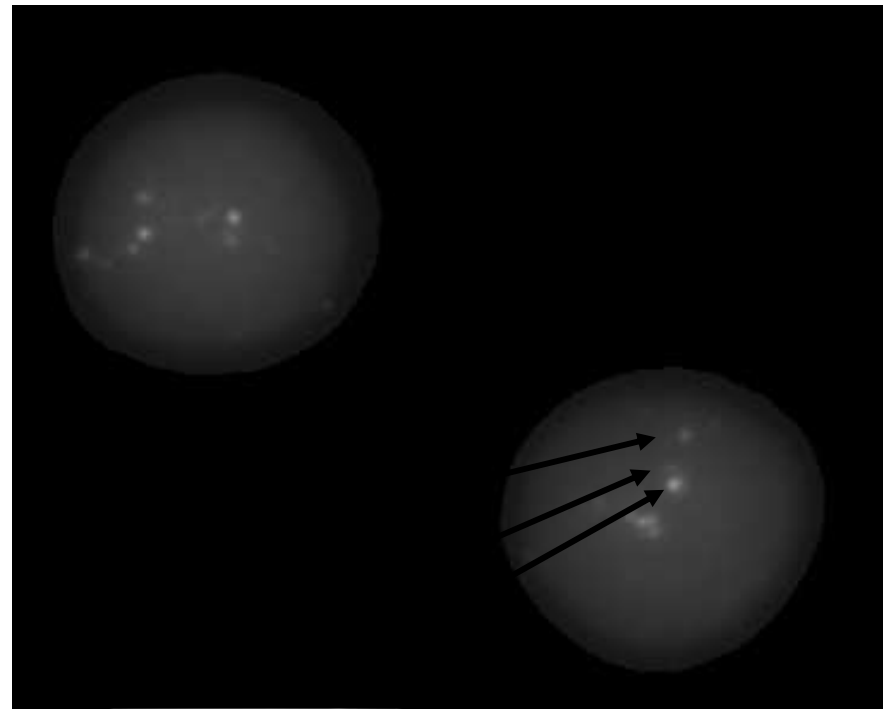
Nenáhodná vnitřní struktura CT

Použití více DNA prob pro tentýž chromosom

Signály z první hybridizace lze rozlišit v druhé



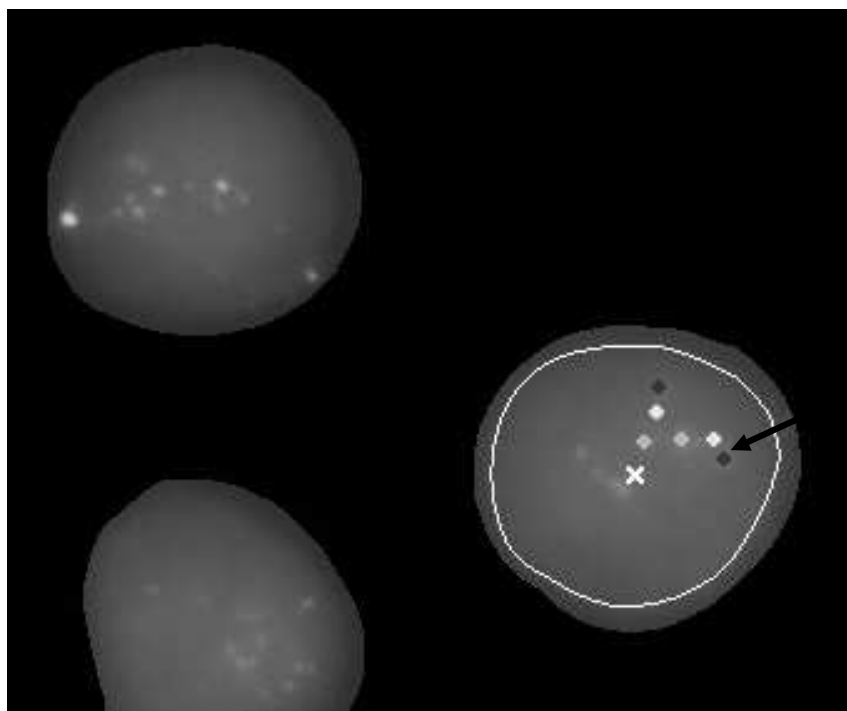
1st hybridization – 6 probes



2nd hybridization – 3 probes

Cytometrie s vysokým rozlišením – nalezení signálů

Topografické parametry jsou vypočteny pro každý signál – souřadnice x, y, z v těžišťovém systému jádra, intenzita, výška, velikost apod.



Signal attributes:

| | | | |
|------------------|----------------|-------------------|----------|
| Hybridization #1 | Probe #1 | Signal type: Gene | |
| X: 621 | Y: 189 | Z: 35 | |
| dX: 36 | dY: 6 | dZ: 2 | |
| %R: 75 | Intensity: 239 | Height: 126 | Size: 24 |
| A1(FWHMx): 0 | A2(FWHMy): 0 | A3(FWHMz): 0 | |

Intensity criterion: 1 of 4
Height criterion: 1 of 4
Size criterion: 2 of 4

Do you want to delete this signal?

Zpracování dat

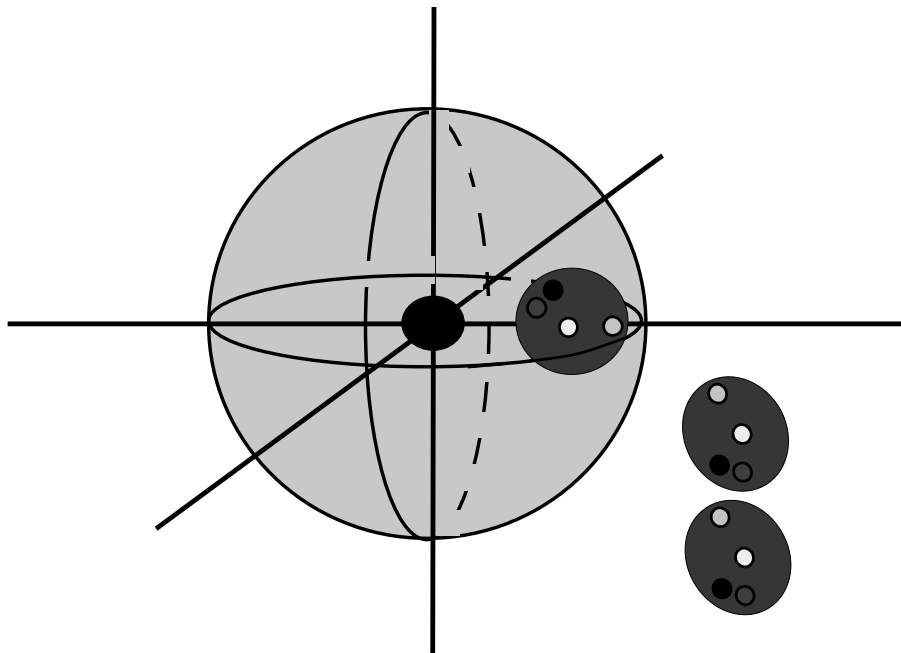
Souřadnice a další parametry lze uložit do textového souboru a exportovat z programu FISH 2.0

V průběhu další analýzy CT lze vzájemně porovnat a zkoumat míru podobnosti:

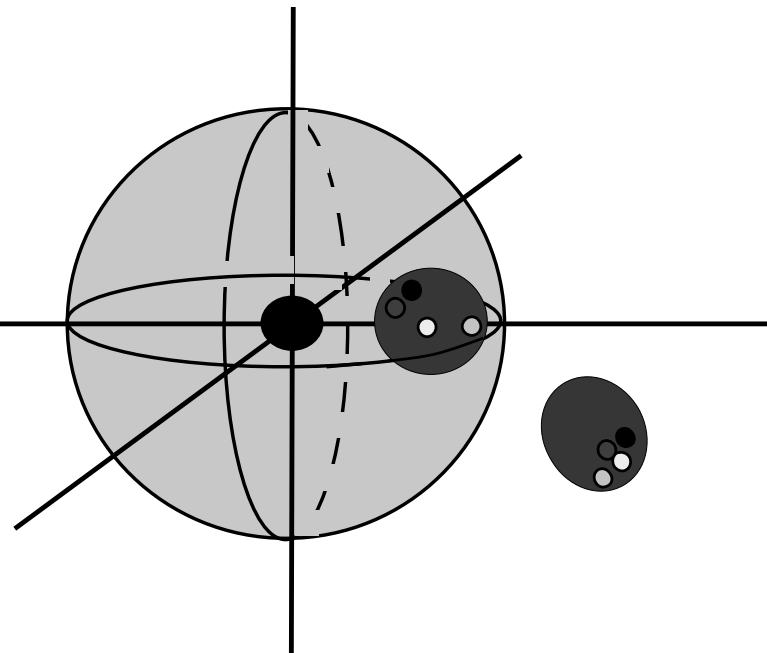
- ***Podobnostní funkce – definice a výpočet pro sérii CT***
- ***Jsou vypočtena těžiště CT a posunuta do jednoho bodu***
- ***CT jsou rotována v 3D prostoru tak, abychom dostali co nejlepší hodnotu podobnostní funkce***
- ***Definice klastrů genetických lokusů a výpočet jejich disperze***

CT jsou vzájemně porovnány

CT jsou stejná

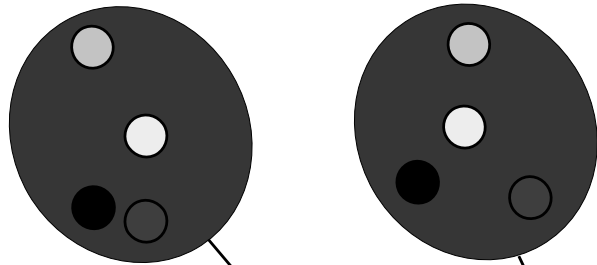


CT se velmi liší



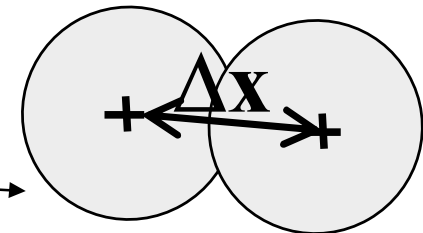
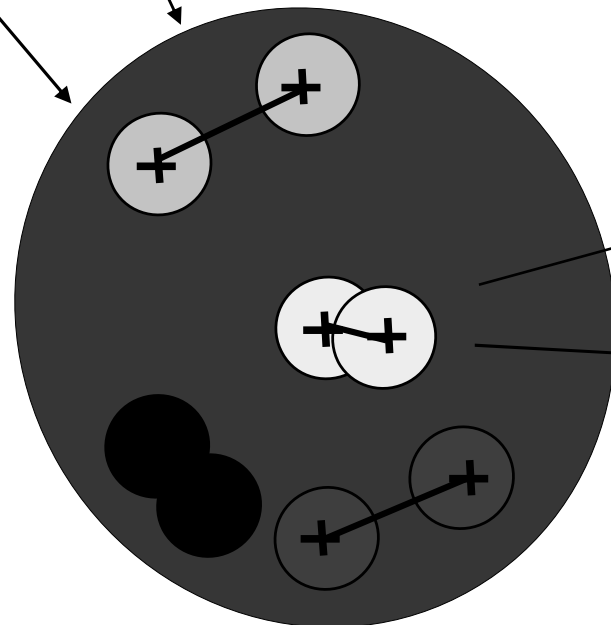
Definice podobnostní funkce pro 2 teritoria

Použijeme translace a rotace pro superponování CT



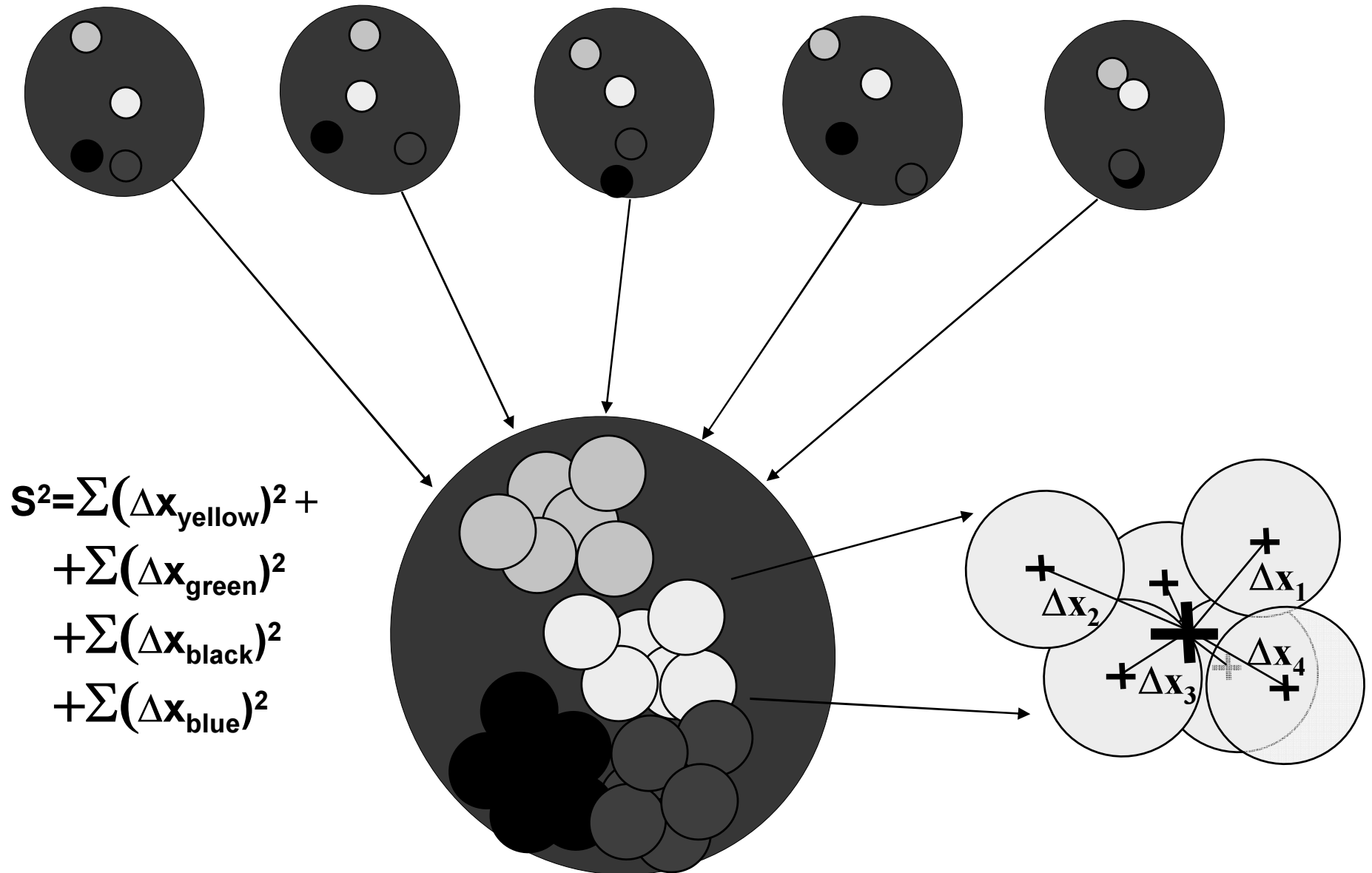
$$S^2 = \Sigma(\Delta x_{\text{yellow}})^2 + \Sigma(\Delta x_{\text{green}})^2 + \Sigma(\Delta x_{\text{black}})^2 + \Sigma(\Delta x_{\text{blue}})^2$$

Podobnost je definována jako minimální možná hodnota funkce S^2

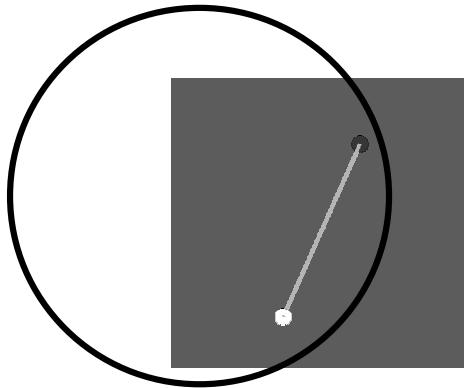


Definice míry podobnosti pro více CT

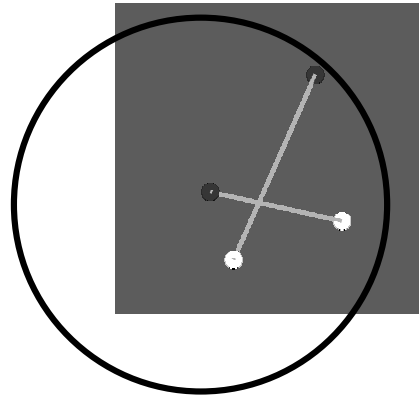
Superposice teritorií jedné na druhou metodou nejmenších čtverců



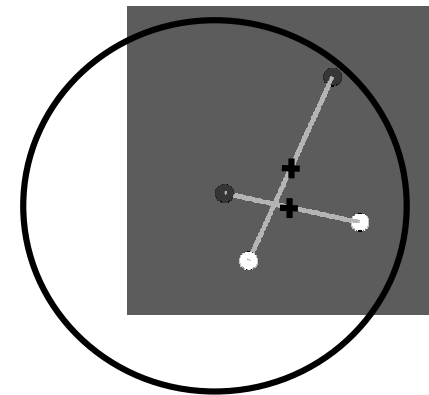
Ukážeme metodu na příkladu 2 lokusů



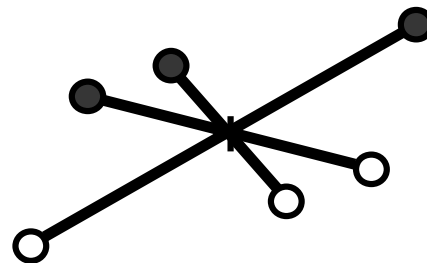
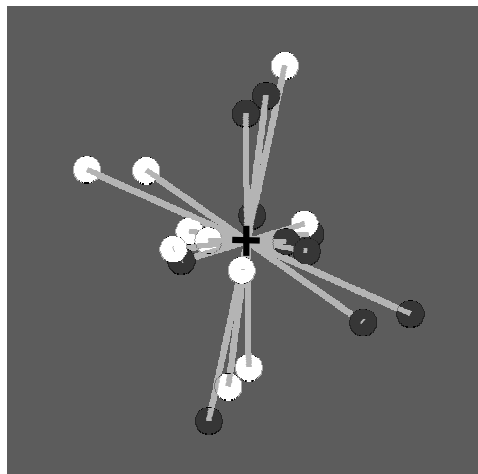
CT se 2 lokusy



2 CT se 2 lokusy
každá

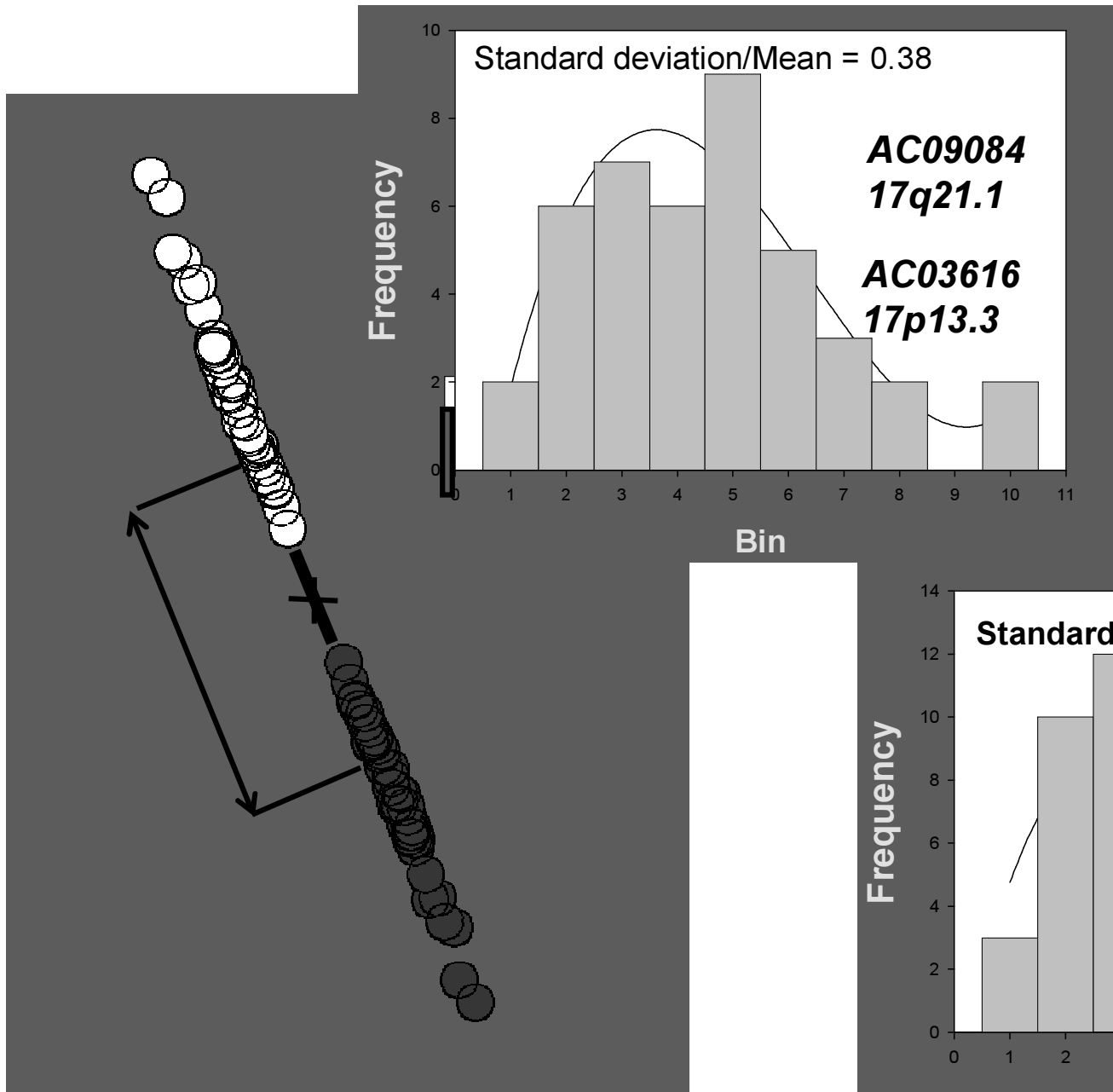


Křížkem jsou označena
těžiště



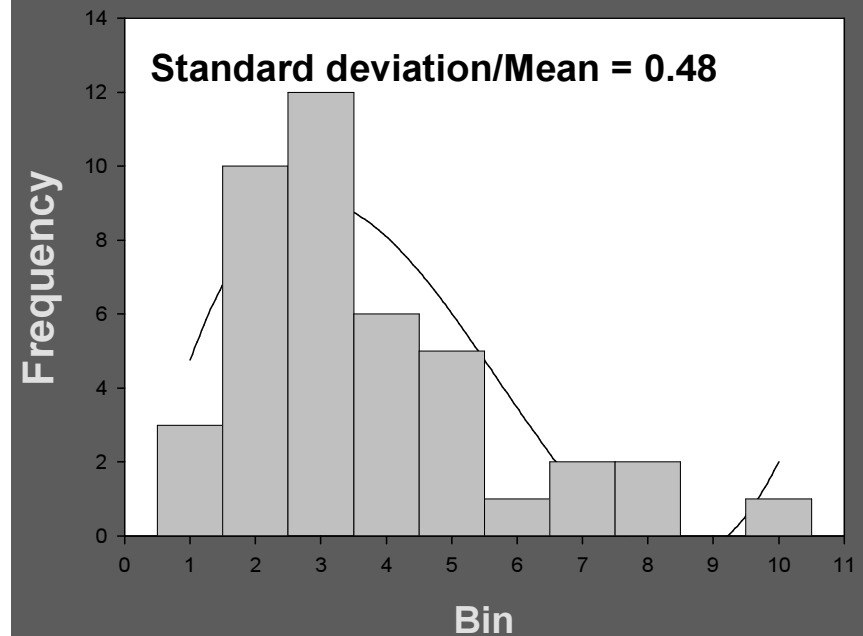
Těžiště lze posunout
do stejného bodu a CT
lze rotovat tak, abychom
dostali lokusy na stejnou
osu, červené k sobě a
bílé k sobě.

Výsledky rotace vidíme pro reálné lokusy HSA 17



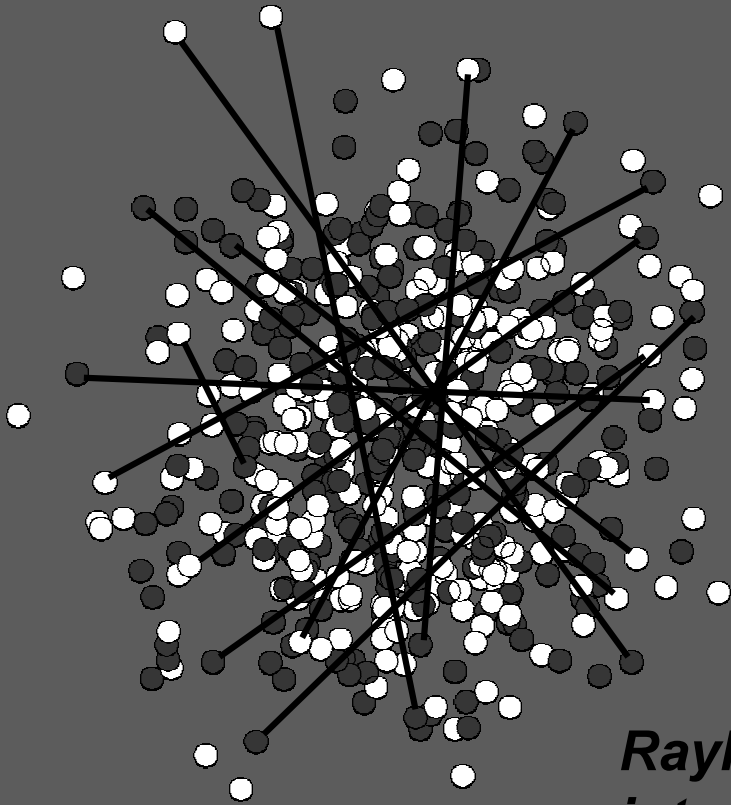
Lze vypočítat
rozdělení vzdáleností
a poměr

$$R = \text{S.D.} / \text{Mean}$$



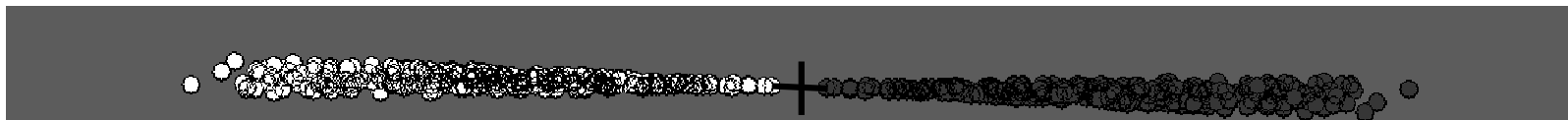
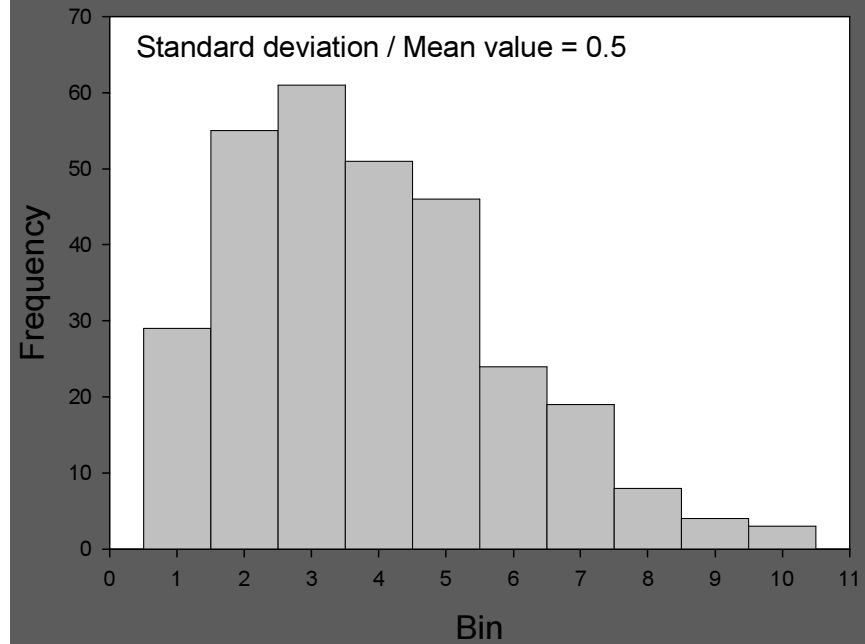
Porovnání s náhodným modelem:

300 dvojic bodů byly náhodně generovány v prostoru podle Gaussovy distribuce

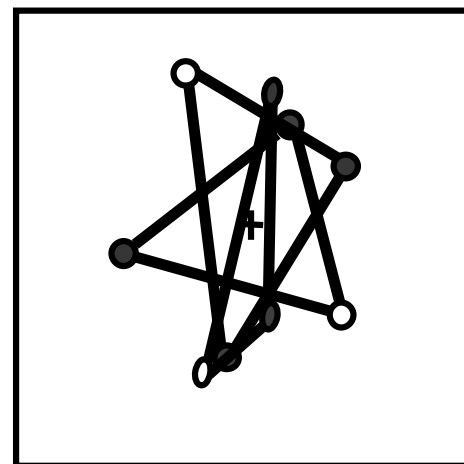
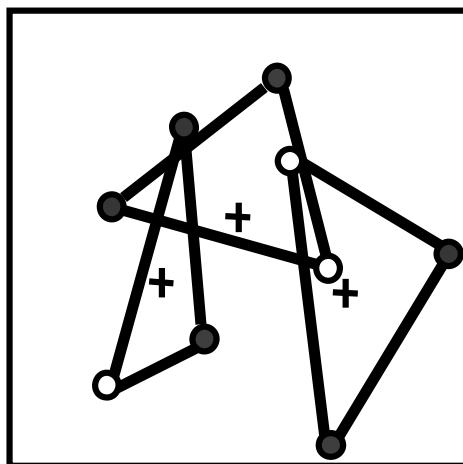
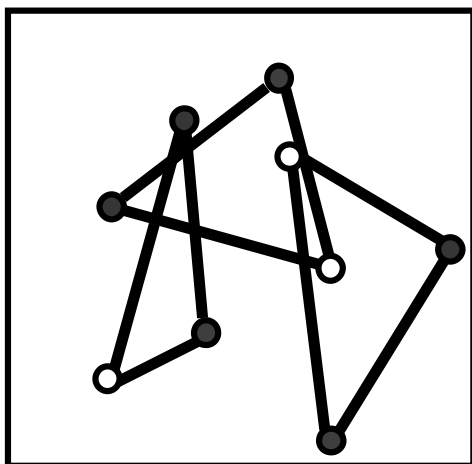


Rayleigho rozdělení vede k závěru, že interfázní chromosom se chová jako volně plovoucí polymer

Rayleigh distribution, $R=0.5$

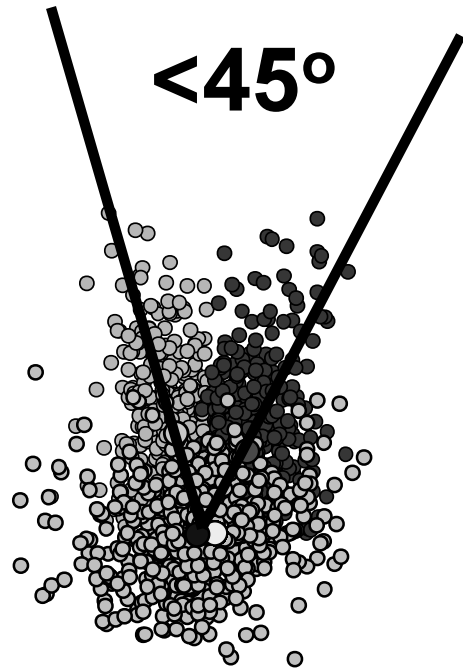


Uvažujme nyní 3 genetické elementy



- **Vypočteme těžiště trojúhelníků,**
- **Položíme je do jednoho bodu**
- **Rotujeme trojúhelníky tak, abychom dostali signály stejné barvy co nejblíže k sobě**
- **Genetické elementy stejného typu vytvoří klastry**

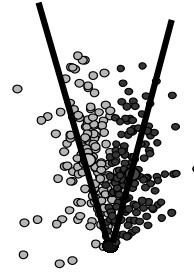
Polární struktura chromosomových teritorií



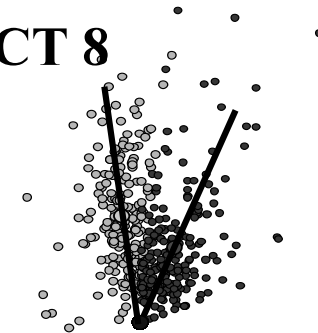
CT 8 in
Go-lymphocytes

Go-lymphocytes Stimulated lym

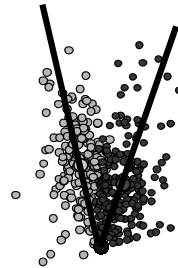
CT 8



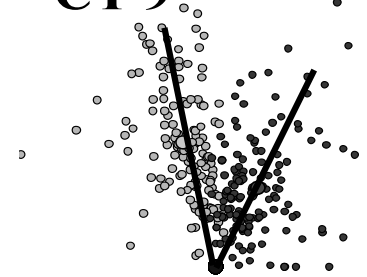
CT 8



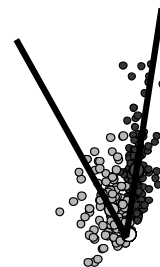
CT 9



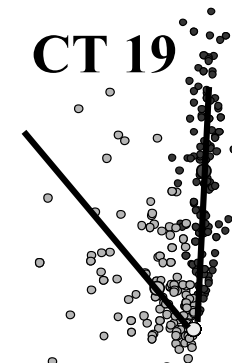
CT 9



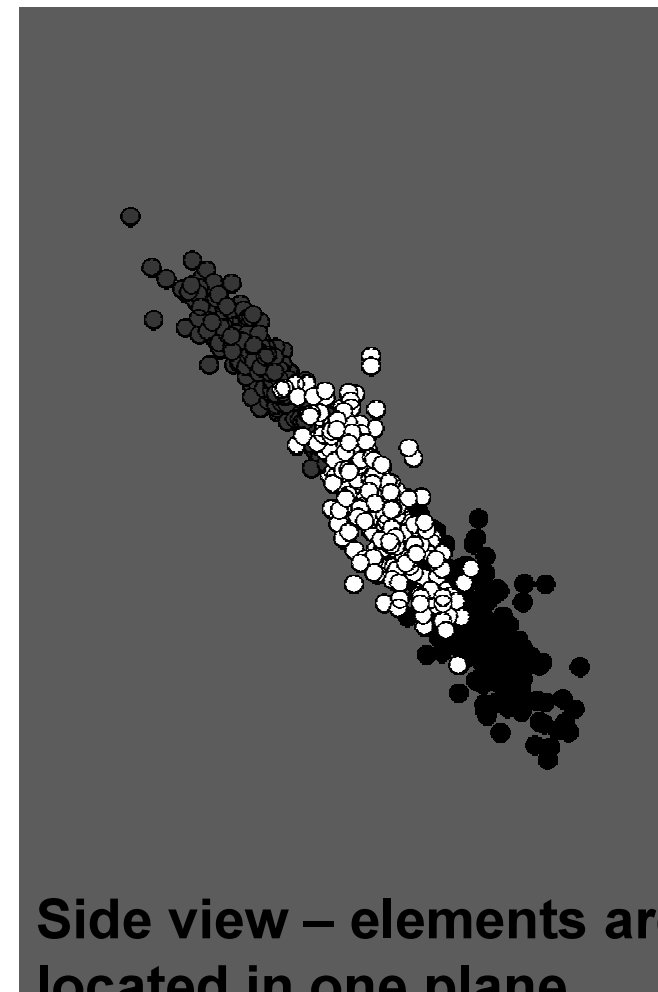
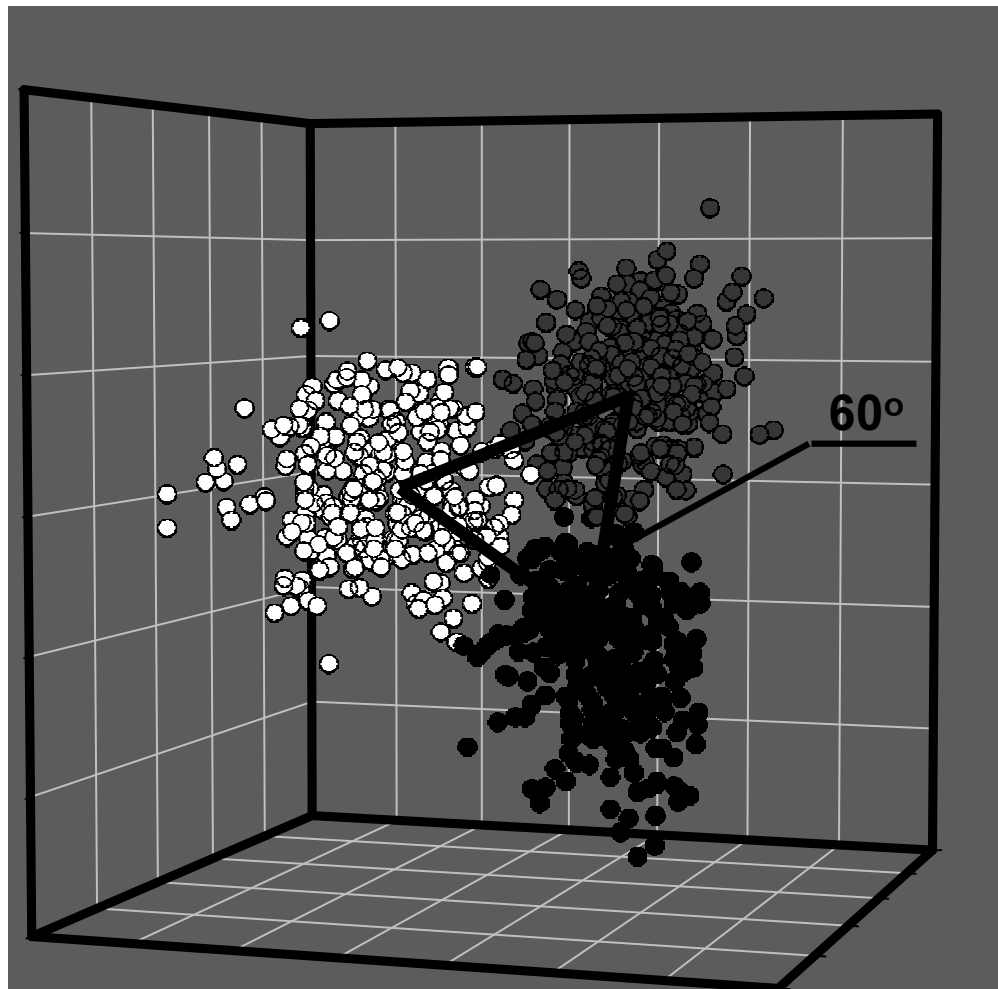
CT 19



CT 19

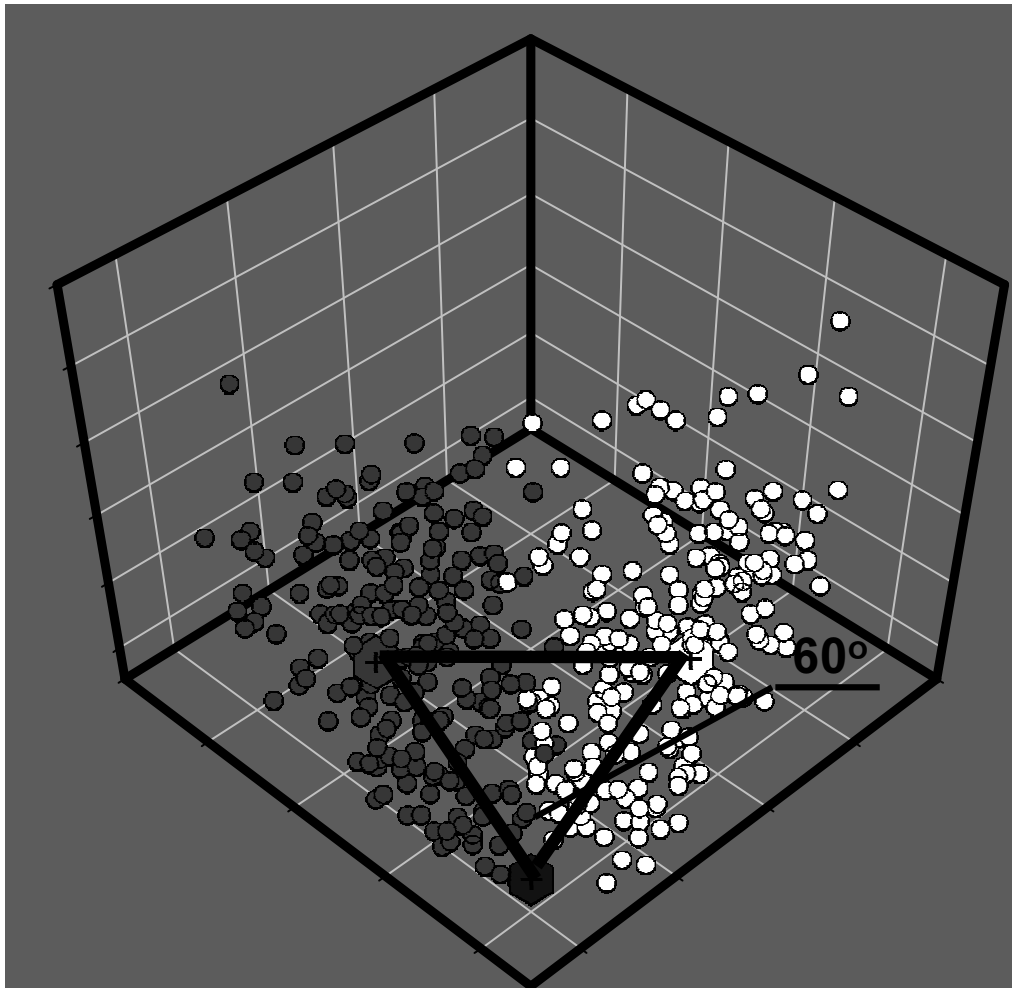


Porovnání s náhodným modelem: 3 elementy náhodně generovány po rotaci



Side view – elements are
located in one plane

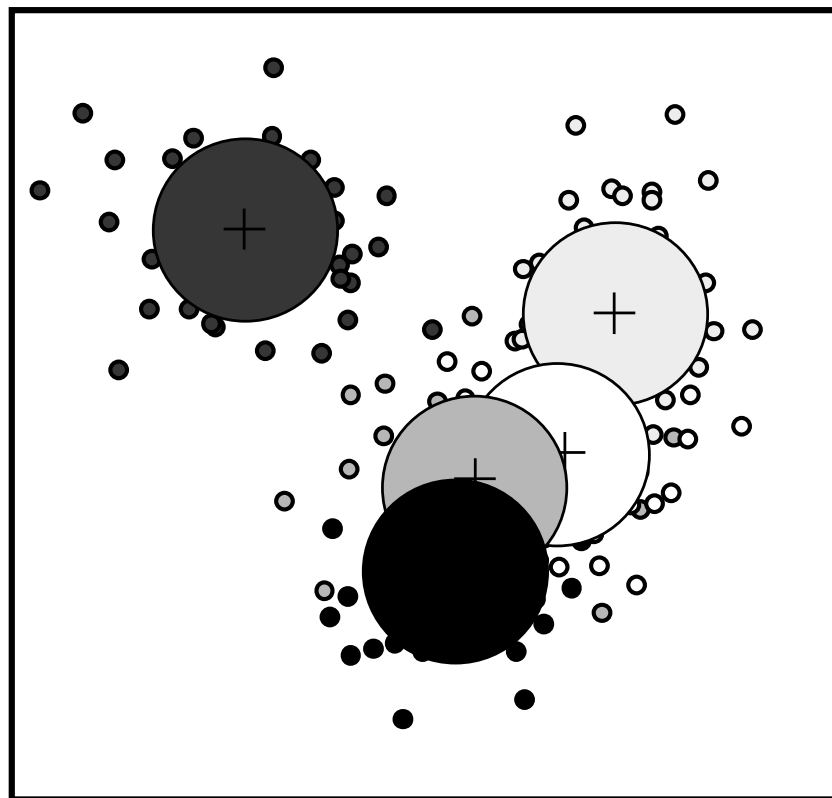
Porovnání s náhodnými modely: 3 elementy náhodně generovány v prostoru po rotaci kolem jednoho z nich



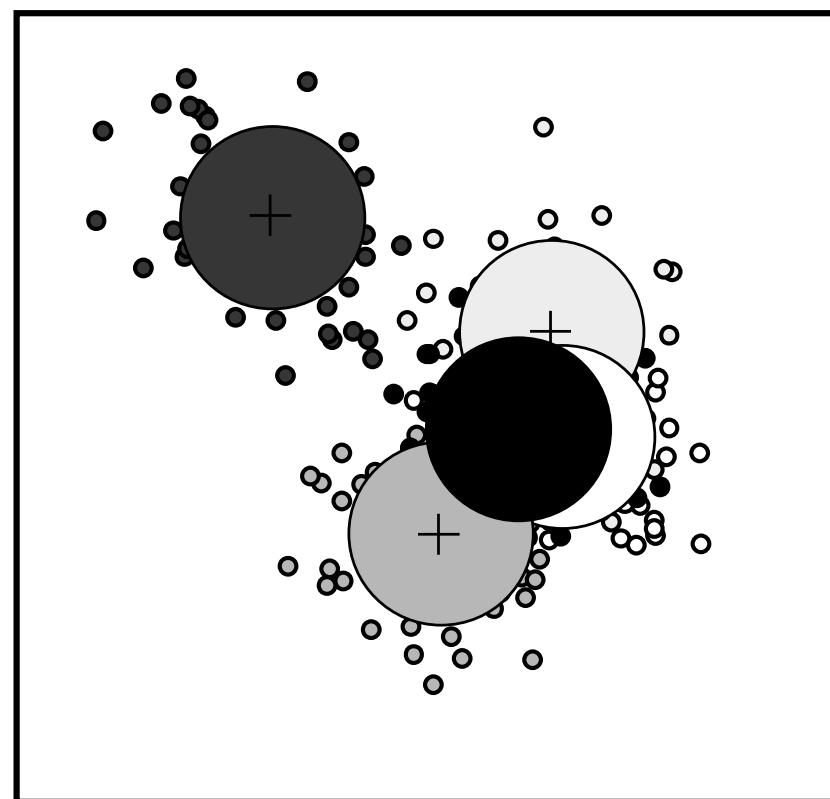
Podle náhodných modelů by
úhly rovnostranného
Trojúhelníku měly být 60°

Menší hodnoty získané
v experimentu představují
důkaz nenáhodného
uspořádání CT

Více genetických elementů: 5 lokusů CT 17 u Go- a stimulovaných lymfocytů

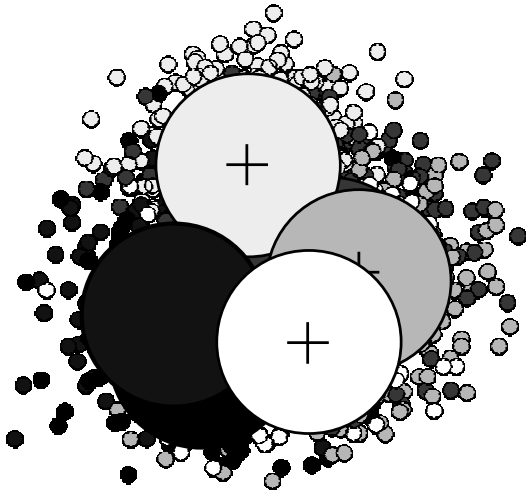


Go-lymphocytes

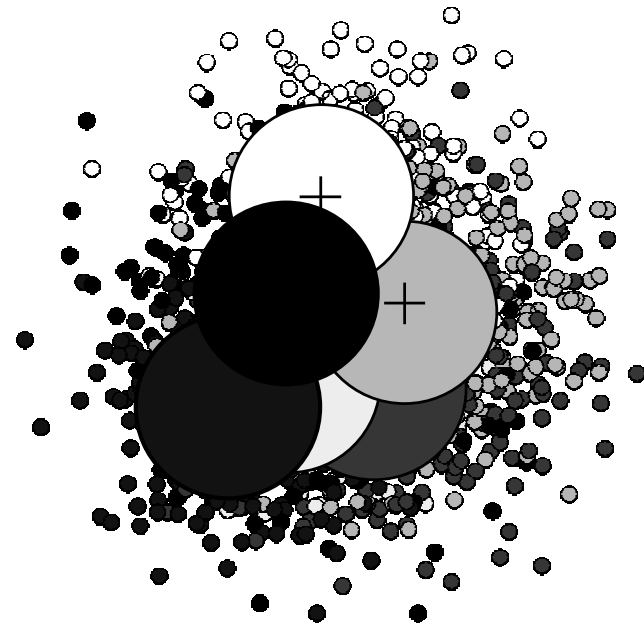


Stimulated lymphocytes

Porovnání s náhodnými modely: pro více elementů se zmenšuje jejich vzájemná vzdálenost po rotaci



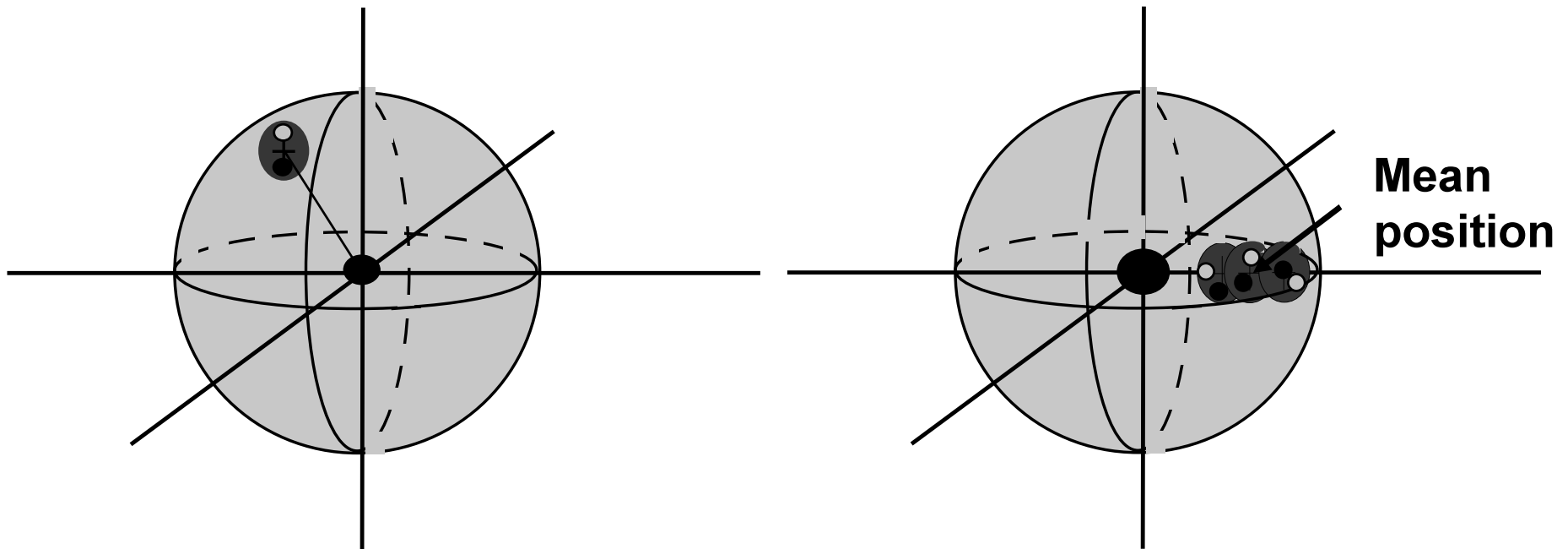
Points restricted in a spatial volume



Gaussian distribution

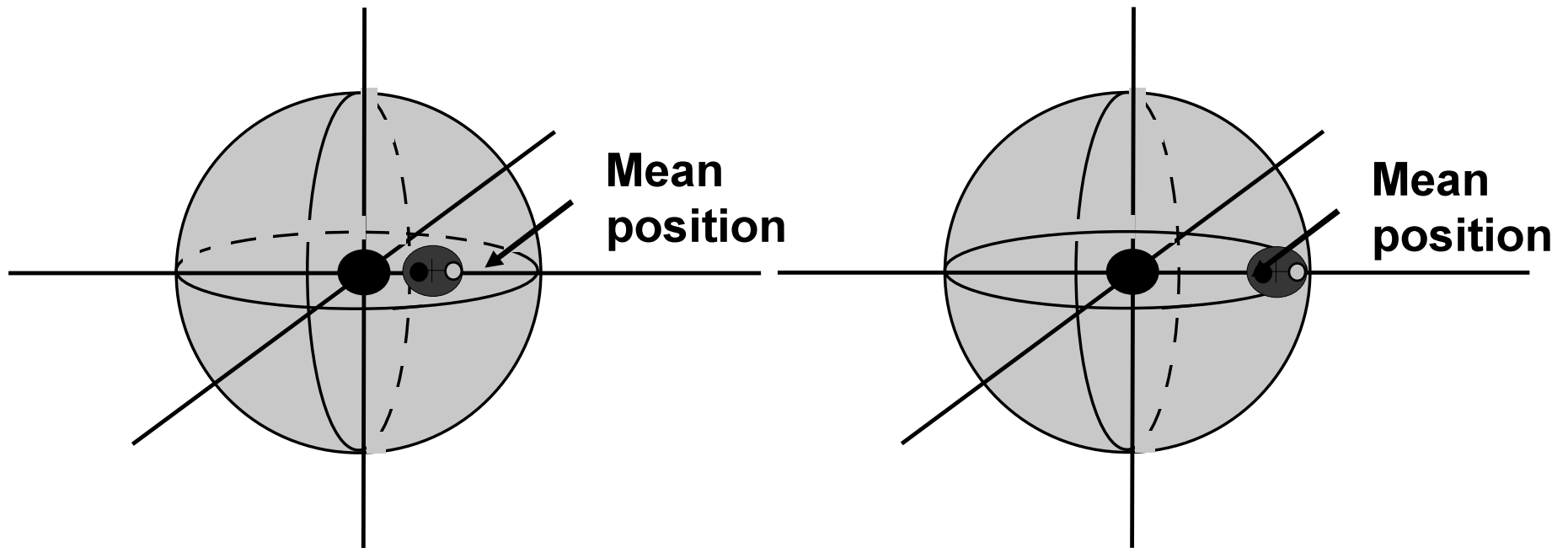
Orientace CT v jádrech buněk

- 1) Buněčná jádra rotujeme tak, abychom dostali CT na jednu osu
- 2) Vypočte se střední poloha CT na této ose

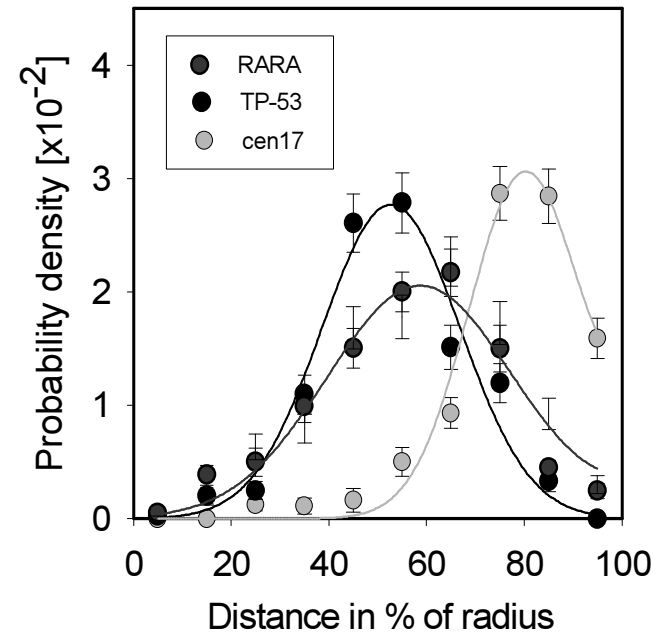
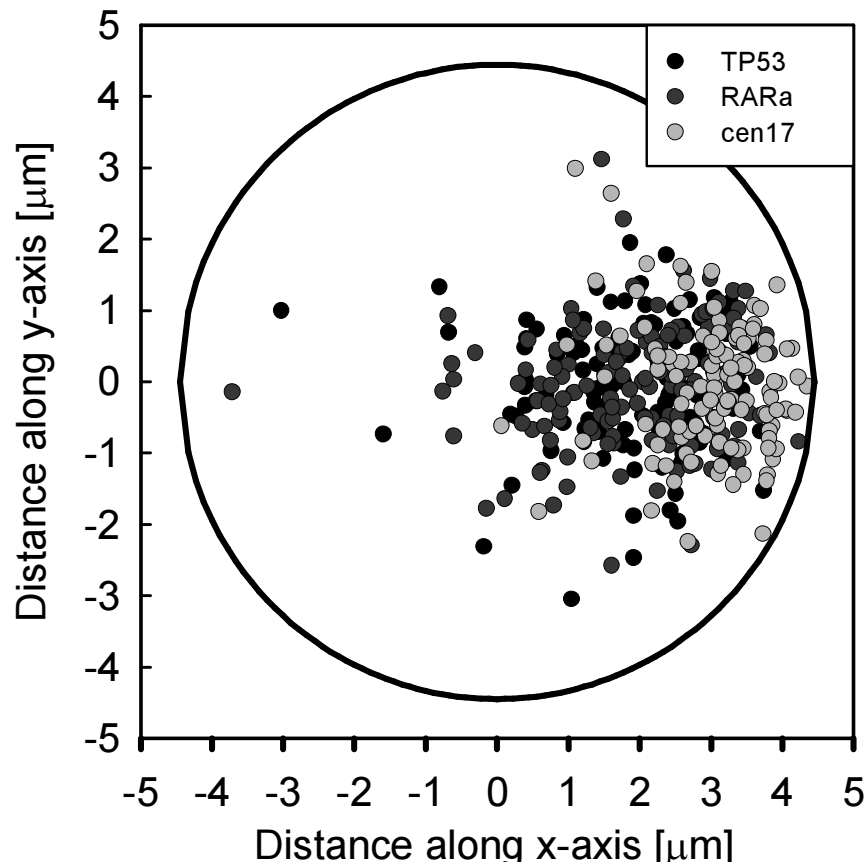


Transformace CT v jádře buňky

- 3) Těžiště CT posuneme podél osy do jednoho bodu – střední polohy
- 4) Vezmeme tenký řez jádrem kolem roviny vedoucí přes střed jádra a střed CT



Orientace CT v jádře buňky



Výše popsaným způsobem dostaneme reálné polohy genetických lokusů vzhledem k CT a také do značné míry vzhledem k jádru. Transformace odstraní fluktuace polohy genetických elementů jež jsou způsobené fluktuacemi CT uvnitř jádra

Struktura chromosomových teritorií

Závěry o nenáhodném uspořádání chromosomových teritorií:

- 1) Poměr mezi standardní odchylkou a střední hodnotou vzdálenosti mezi dvěma genetickými lokusy je v mnoha případech menší než 0.5, což je hodnota typická pro Rayleighovu distribuci.**
- 2) Úhly trojúhelníku jež vznikne ze tří genetických elementů stejného CT v jádře jsou v mnoha případech menší než 60° , tj. hodnota, kterou lze očekávat pro náhodnou strukturu.**
- 3) Pro větší počet genetických oblastí, polohy elementů ve 3D prostoru mají menší rozptyl než klastry vzniklé pro náhodně generovanou strukturu.**
- 4) Orientace jader se zviditelněnými CT a jejich genetickými elementy poskytuje důkaz o orientaci a polaritě CT.**