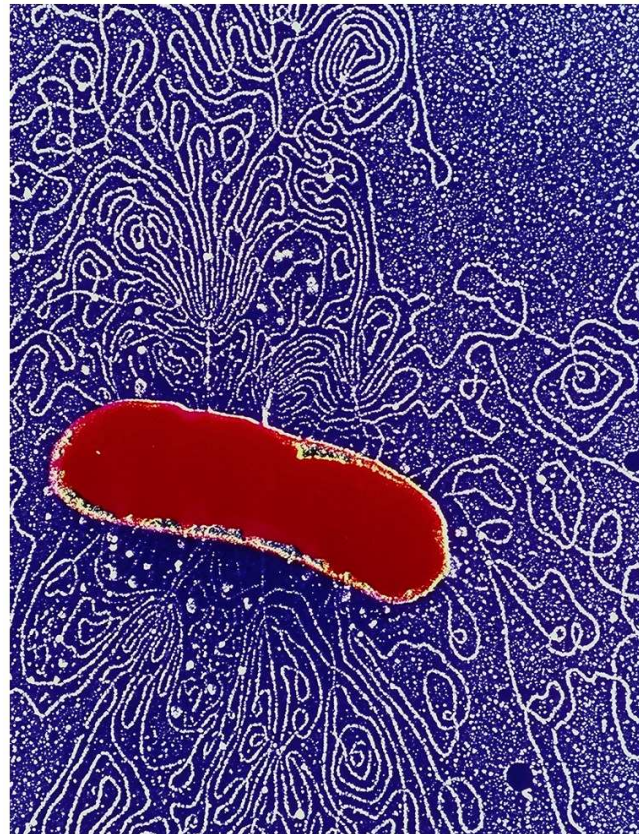


Přednáška 2

DNA a molekulární struktura chromozomů



Osnova přednášky

- funkce genetického materiálu
- důkaz, že DNA je nositelkou genetické informace
- struktura DNA a RNA
- struktura chromozomů prokaryot a virů
- struktura chromozomů eukaryot

Objev nukleinu

r.1868, Johan Friedrich Miescher

- izolace buněk z hnisu
- ovlivnění pepsinem (proteolytickým enzymem izolovaným z žaludku prasat)
- po degradaci proteinů získal kyselou hmotu bohatou na dusík a fosfor, kterou nazval nuklein
- jeho výsledky nebyly přijaty k publikaci až do roku 1871
- funkce nukleinu zůstala dlouho nejasná (polynukleotidové řetězce a jejich schopnost uchovávat genetickou informaci byly objeveny až ve 40. letech 20. stol., dvoušroubovice DNA v r. 1953)

Funkce genetického materiálu

- schopnost uchování, replikace a přenosu genetické informace na potomstvo v nezměněném stavu
(**genotypová funkce**)
- řízení růstu a vývoje organismu a jeho vlastností
(genová exprese, **fenotypová funkce**)
- umožnění adaptace organismů na změny okolí (mutace, **evoluční funkce**)

Chromozomy

Geny jsou umístěny na chromozomech (silná korelace mezi způsobem přenosu genů a chromozomů při rozmnožování, výzkum chemické podstaty dědičnosti zaměřen na molekuly nesené chromozomy)

Chromozomy jsou tvořeny dvěma typy organických makromolekul: **nukleovými kyselinami (DNA a RNA) a proteiny**

Ve 40. a 50. letech 20. stol. bylo jednoznačně prokázáno, že genetická informace je uložena v nukleových kyselinách a ne proteinech

DNA je nositelkou genetické informace

U většiny organismů je genetická informace zakódována v DNA

U některých virů je genetickým materiálem RNA

Nepřímé důkazy

- korelace mezi počtem chromozomů a obsahem DNA v buňkách
- somatické buňky diploidních organismů obsahují dvojnásobné množství DNA než haploidní pohlavní buňky stejných organismů
- struktura DNA je stejná u všech buněk organismu, zatímco struktura RNA a proteinů je variabilní
- DNA je stabilnější než RNA a proteiny

Viroidy mají povahu infekčních činitel složených pouze z RNA

Priony jsou infekční proteiny

Důkaz, že DNA je nositelkou genetické informace: zodpovídá za transformaci

40. léta 20. stol., bakterie *Streptococcus pneumoniae* (Avery, MacLeod, McCarty)

Využití objevu transformace bakterií

- přidání purifikované DNA k bakteriím mění jejich vlastnosti (tvar kolonií, schopnost vyvolat onemocnění, apod.)
- získané vlastnosti se přenášejí do následných generací

Provedení experimentu:

Existují 2 příbuzné kmeny *S. pneumoniae*, které se liší morfologicky a stupněm patogenicity:

Kmen S: tvoří hladké kolonie, po injekci usmrcuje laboratorní myši

Kmen R: tvoří drsné kolonie a není letální

DNA purifikovaná z kmene S transformuje kmen R, takže získává vlastnosti kmene S

Důkaz, že DNA je nositelkou genetické informace: transformace *S. pneumoniae*

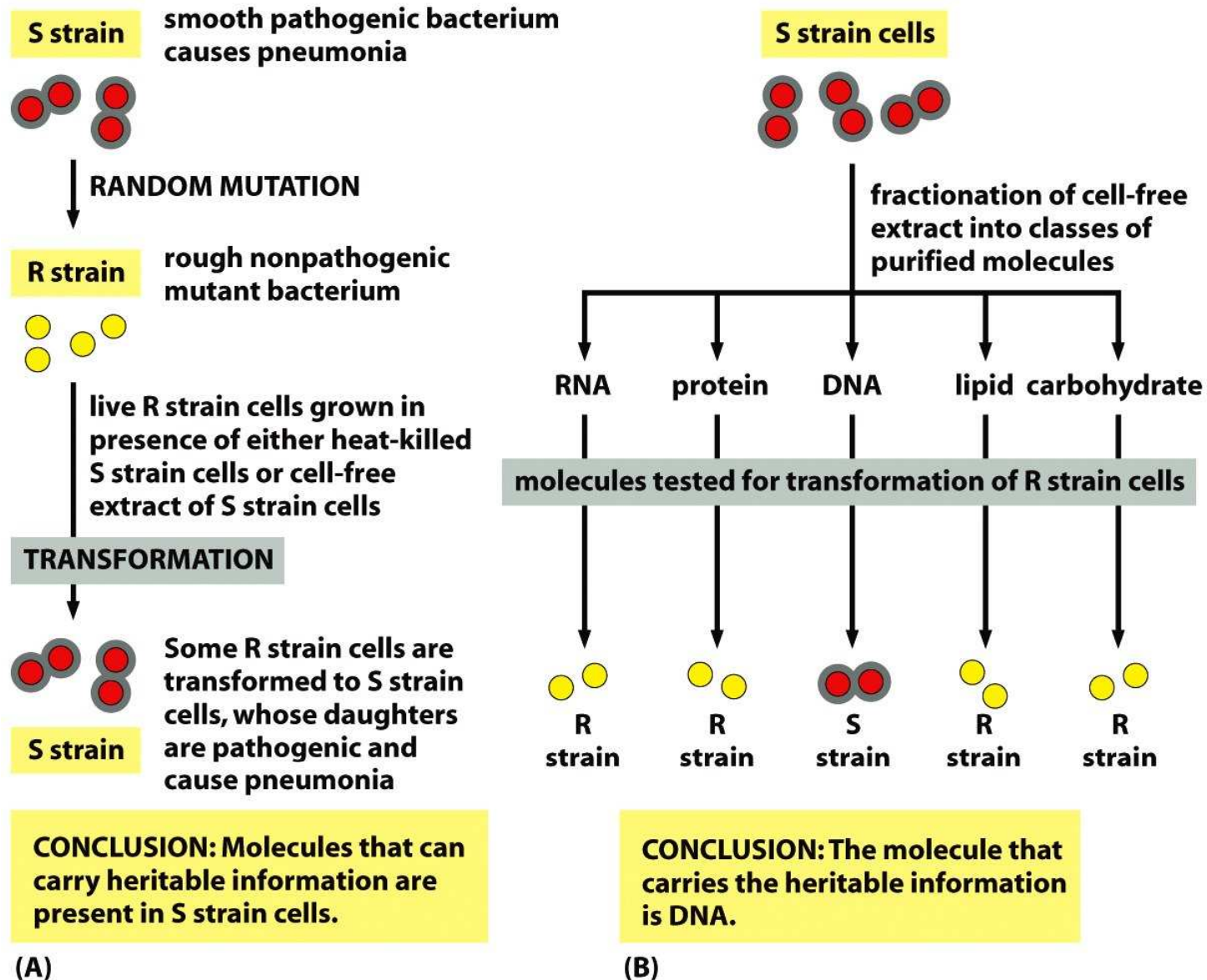


Figure 4-2 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

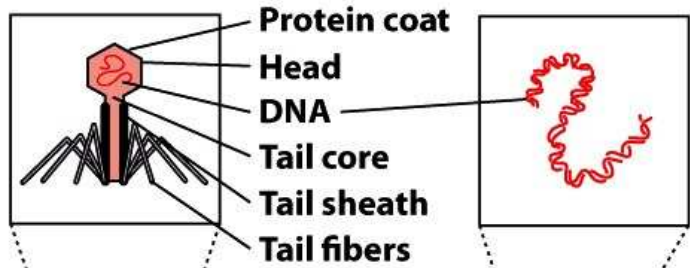
Důkaz, že DNA je nositelkou genetické informace u bakteriofága

- 1952, Alfred Hershey (Nobelova cena 1969) a Martha Chase:
- důkaz, že genetická informace bakteriofága T2 je uložena v DNA (fág se reprodukuje v buňce, do buňky proniká jen DNA)

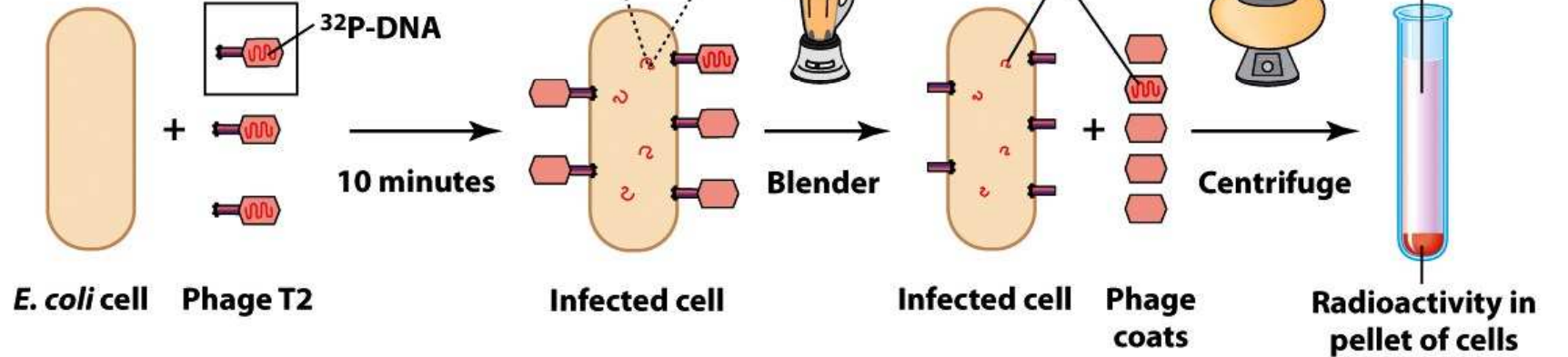
Provedení experimentu:

- základem je fakt, že DNA obsahuje fosfor a neobsahuje síru, naopak proteiny obsahují síru, ale málo fosforu
- (1) označení fágové DNA izotopem fosforu ^{32}P
- (2) označení fágových proteinů izotopem síry ^{35}S
- krátké smísení značených fágových částic s buňkami *E. coli*, aby mohlo dojít k adsorbci
- mechanické oddělení fágových částic od buněk a studium distribuce radioaktivity

Závěr: pouze DNA fága vstupuje do hostitelské buňky, fágový proteinový plášť zůstává mimo buňku



**Experiment I:
32P-labeled phage**



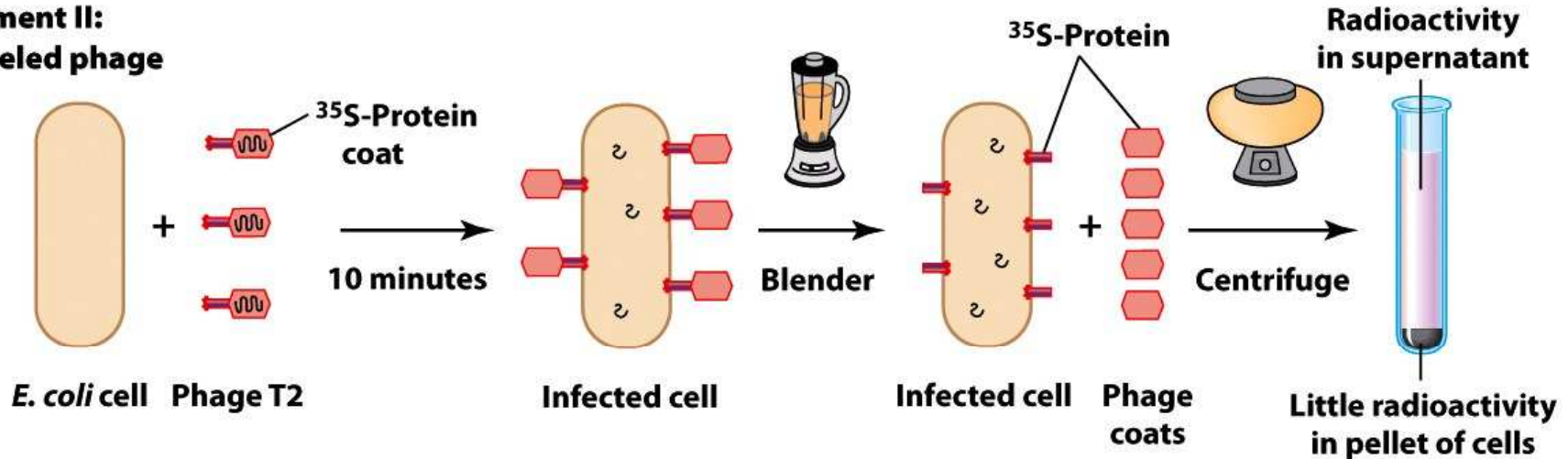
STEP 1 Mix phage and bacteria.

STEP 2 Allow time for phage to infect bacteria.

STEP 3 Subject to shearing forces in blender.

STEP 4 Separate bacteria from phage by centrifugation.

**Experiment II:
35S-labeled phage**

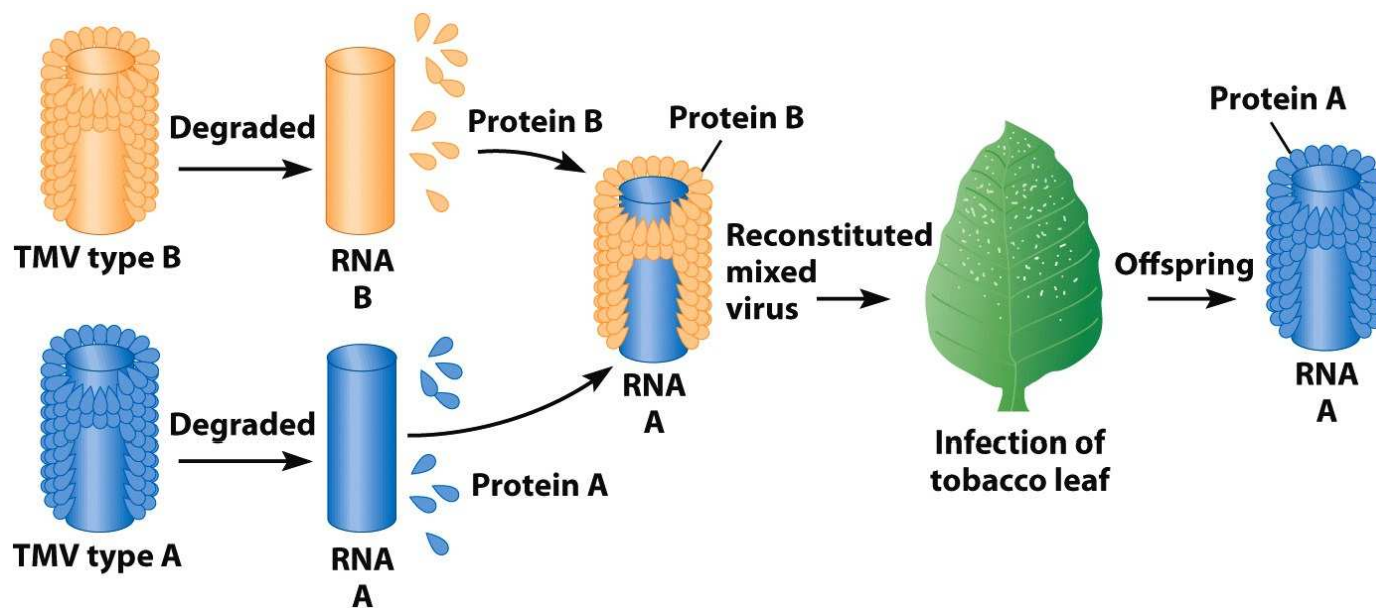


Genetickým materiálem viru tabákové mozaiky (TMV) je RNA

při studiu některých virů se ukázalo, že obsahují proteiny a RNA, ale žádnou DNA

- důkaz:
- oddělení RNA a proteinů u dvou kmenů TMV (A a B, lišících se chemickým složením proteinových obalů)
 - vytvoření virových částic smísením RNA (A) s proteinem (B)
 - vznikl životaschopný virus, jehož potomstvo mělo fenotyp A
 - po smísení RNA (B) s proteinem (A) vznikl virus s fenotypem B

závěr: potomstvo virů je genotypově a fenotypově shodné s rodičovským virem, ze kterého byla získána RNA



Viroidy a Priony

Viroidy jsou infekční molekuly RNA ("virus-like")

- objeveny v 60. letech 20. století
- na rozdíl od virů nejsou obklopeny proteinovým pláštěm
- tvoří je kružnicová molekula RNA, která se autonomně replikuje v hostitelských buňkách
- mění genovou expresi v hostitelských buňkách
- způsobují onemocnění rostlin

Viroidy a Priony

Priony jsou dědičné infekční proteiny, které neobsahují nukleové kyseliny

- objeveny v roce 1982 (**Stanley Prusiner**, Nobelova cena v roce 1997)
 - zodpovídají za skupinu vážných neurodegenerativních chorob (Creutzfeldt-Jakobova nemoc, kuru u člověka, "nemoc šílených krav" u skotu, skrapie u ovcí)
 - jsou to aberantní formy proteinů, kódovaných normálními savčími geny
 - když se vytvoří aberantní forma proteinu (prion), způsobuje konverzi dalších normálních molekul proteinu do infekční prionové formy
 - větší počet prionových molekul dokáže zabít hostitelskou buňku
 - výsledkem je "měknutí mozku" postižených vyplývající ze zvyšujícího se počtu mezer vzniklých odumřením buněk
- šíření choroby: konzumování potravy obsahující infekční proteiny

Take home message

- genetická informace většiny živých organizmů se uchovává v DNA
- u některých virů se genetická informace uchovává v RNA
- viroidy a priony představují infekční molekuly RNA, resp. proteinů

Struktura DNA a RNA

- **DNA** je obvykle dvouvláknová molekula, ve které jsou obě vlákna spojena vodíkovými vazbami mezi dvojicemi bází adenin - thymin a guanin - cytozin
- **RNA** je obvykle jednovláknová a obsahuje místo thyminu uracil

DNA

- uchovává genetickou informaci téměř všech organismů
 - jakou má strukturu?
 - jakým způsobem může obsáhnou genetickou informaci?
 - jak ji může buňka předávat z generace na generaci?
- odpovědi na tyto otázky znamenají významný přínos pro pochopení podstaty života

DNA a RNA mají podjednotkovou strukturu

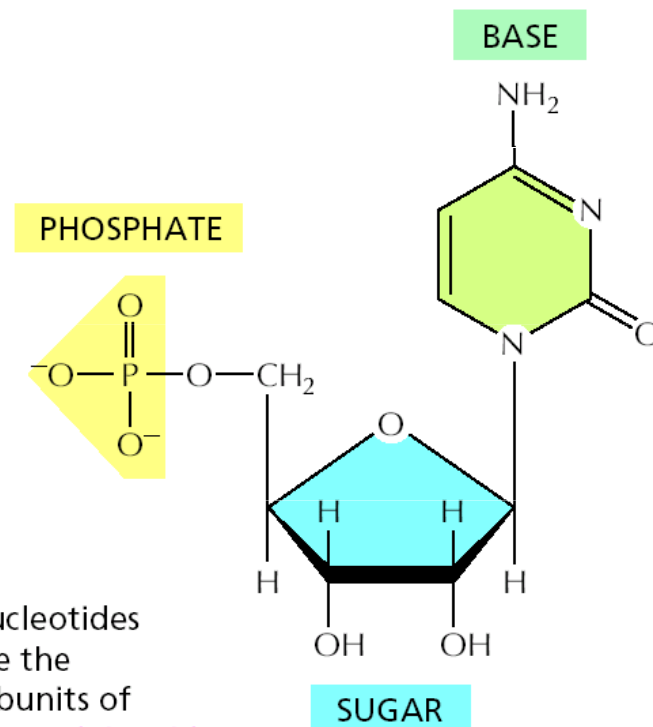
Opakujícími se podjednotkami jsou nukleotidy

Nukleotidy mají 3 složky:

pětiuhlíkový cukr
dusíkovou bázi
zbytek kyseliny fosforečné

NUCLEOTIDES

A nucleotide consists of a nitrogen-containing base, a five-carbon sugar, and one or more phosphate groups.



Nucleotides are the subunits of the nucleic acids.

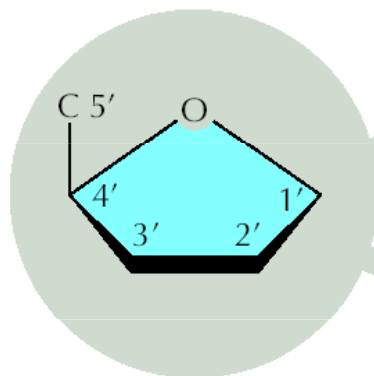
Cukerné složky nukleotidů

- **ribóza** u ribonukleových kyselin
- **deoxyribóza** u deoxyribonukleové kyseliny
- odlišnost je v přítomnosti/nepřítomnosti hydroxylové skupiny na 2' uhlíku

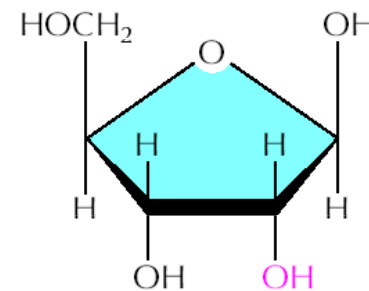
SUGARS

PENTOSE

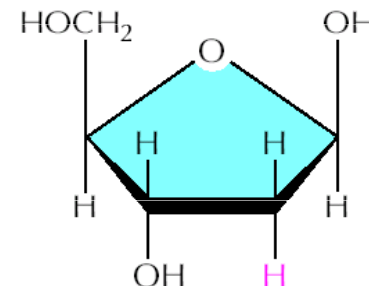
a five-carbon sugar



two kinds are used



β -D-ribose
used in ribonucleic acid



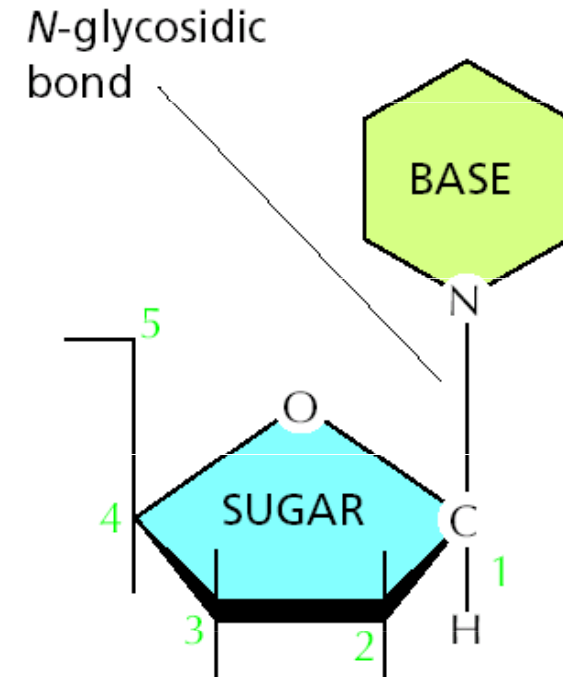
β -D-2-deoxyribose
used in deoxyribonucleic acid

Each numbered carbon on the sugar of a nucleotide is followed by a prime mark; therefore, one speaks of the "5-prime carbon," etc.

Dusíkové báze nukleotidů

připojují se na 1' uhlík cukru
kovalentní N-glykozidickou vazbou

BASIC SUGAR LINKAGE



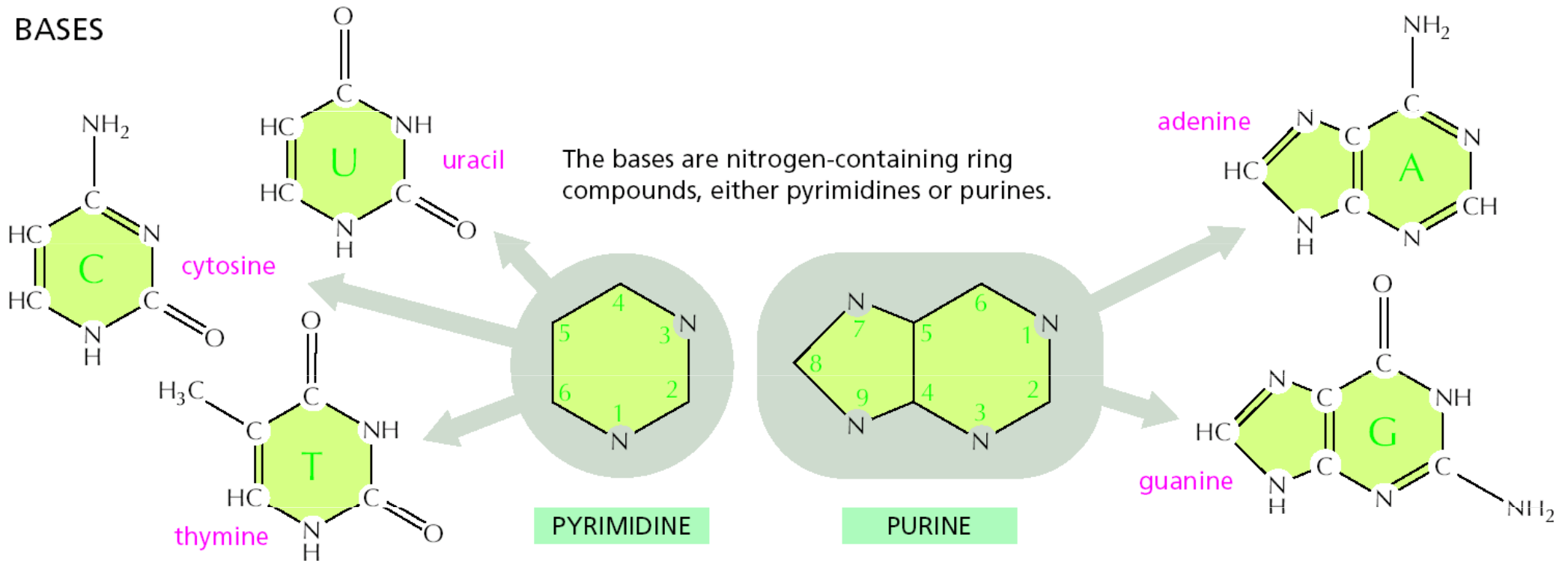
The base is linked to the same carbon (C1) used in sugar-sugar bonds.

Dusíkové báze nukleotidů

jsou dvou typů:

- purinové (adenin, guanin)
- pyrimidinové (cytozin, tymin, uracil)

BASES

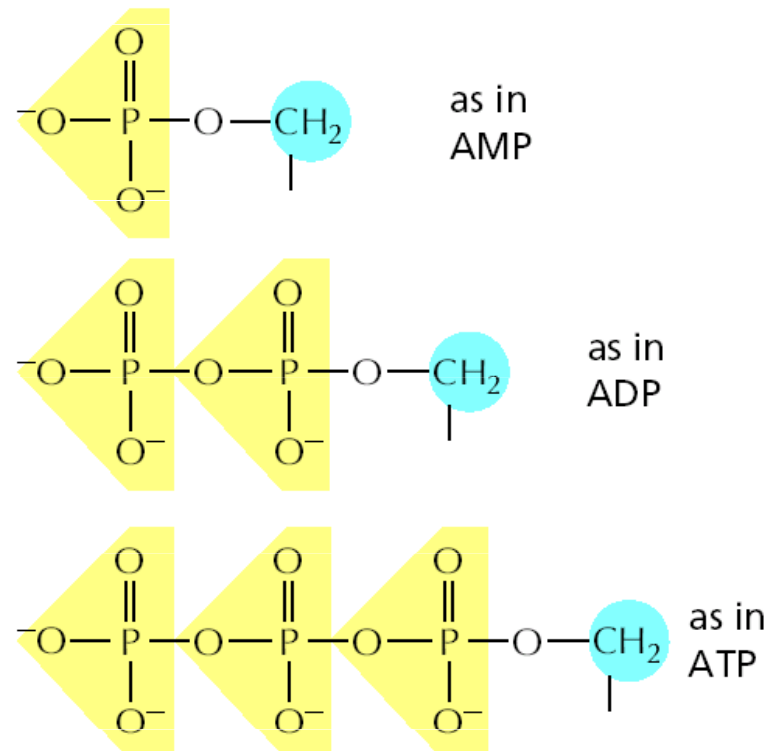


Součástí nukleotidů je kyselina fosforečná

- připojena k 5' uhlíku cukru
- přináší nukleotidu negativní náboj

PHOSPHATES

The phosphates are normally joined to the C5 hydroxyl of the ribose or deoxyribose sugar (designated 5'). Mono-, di-, and triphosphates are common.



The phosphate makes a nucleotide negatively charged.

Nukleosid není totéž co nukleotid

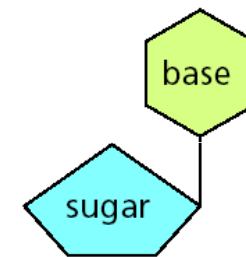
NOMENCLATURE

A nucleoside or nucleotide is named according to its nitrogenous base.

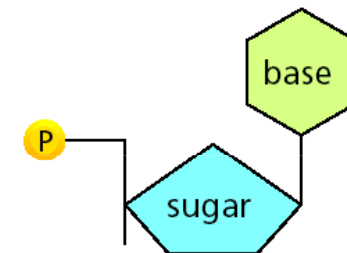
BASE	NUCLEOSIDE	ABBR.
adenine	adenosine	A
guanine	guanosine	G
cytosine	cytidine	C
uracil	uridine	U
thymine	thymidine	T

Single letter abbreviations are used variously as shorthand for (1) the base alone, (2) the nucleoside, or (3) the whole nucleotide—the context will usually make clear which of the three entities is meant. When the context is not sufficient, we will add the terms “base”, “nucleoside”, “nucleotide”, or—as in the examples below—use the full 3-letter nucleotide code.

AMP = adenosine monophosphate
 dAMP = deoxyadenosine monophosphate
 UDP = uridine diphosphate
 ATP = adenosine triphosphate



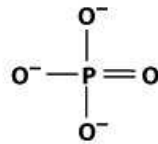
BASE + SUGAR = NUCLEOSIDE



BASE + SUGAR + PHOSPHATE = NUCLEOTIDE

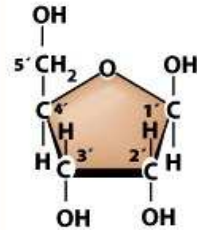
**Nucleic acids are composed of repeating subunits called nucleotides.
Each nucleotide is composed of three units.**

(1)
A
phosphate
group:

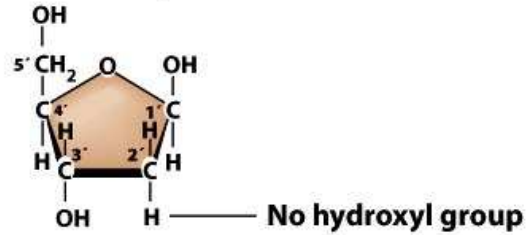


(2)
A
five-carbon
sugar or
pentose:

(a) In RNA:
Ribose

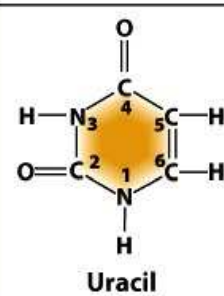


(b) In DNA:
2-Deoxyribose

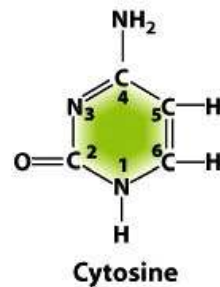


(3)
A
cyclic,
nitrogen-
containing
base:

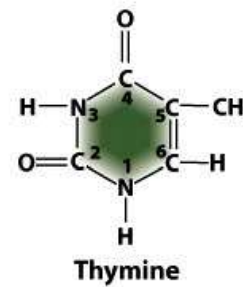
(a) In RNA only
(with rare exceptions):



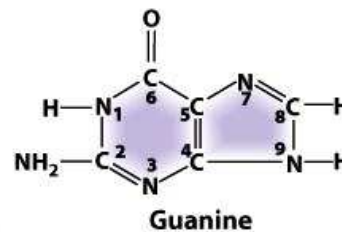
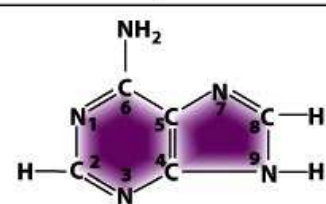
(b) In both RNA
and DNA:



(c) In DNA only
(with rare exceptions):



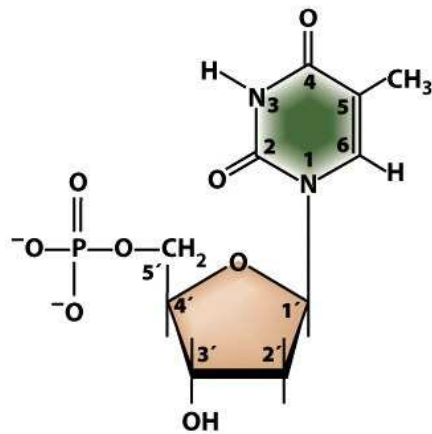
Pyrimidines



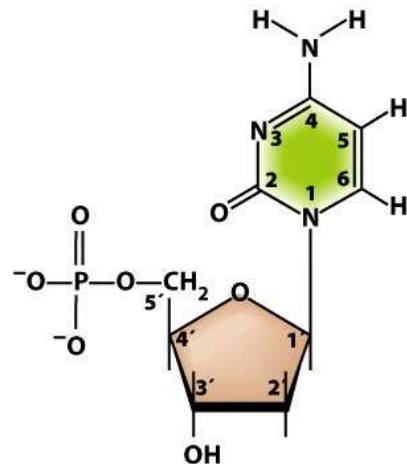
Purines

Deoxyribonukleotid

Pyrimidine nucleotides

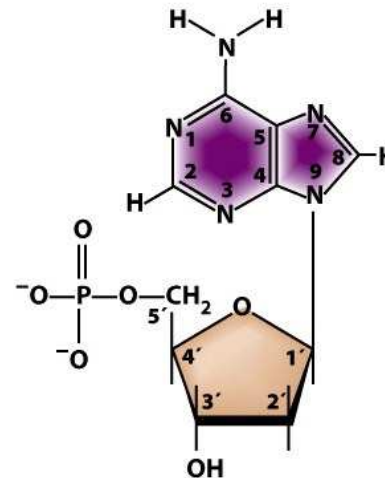


Deoxythymidine
monophosphate, dTMP

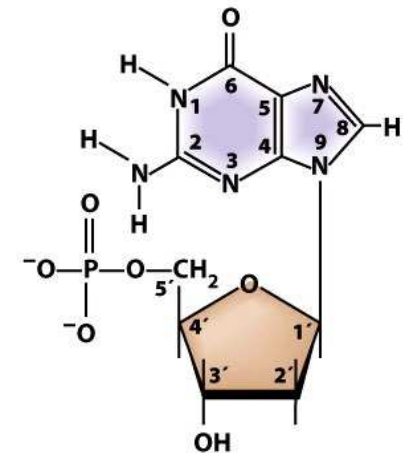


Deoxycytidine
monophosphate, dCMP

Purine nucleotides



Deoxyadenosine
monophosphate, dAMP



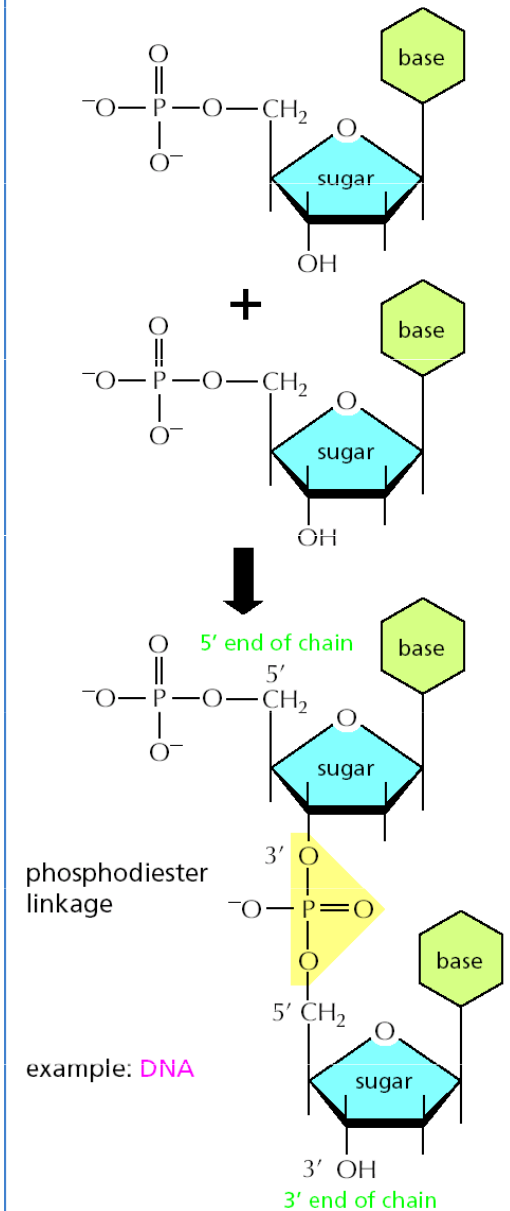
Deoxyguanosine
monophosphate, dGMP

Nukleotidy se spojují do řetězců nukleových kyselin

- zbytek kyseliny fosforečné spojuje sousední cukry nukleotidů kovalentními **fosfodiesterovými vazbami** mezi uhlíky 5' a 3' cukerných jednotek
- pravidelné střídání motivu cukr-fosfát-cukr-fosfát... tvoří **cukr-fosfátovou kostru** řetězců nukleových kyselin
- **řetězce mají chemickou polaritu**: 1 konec obsahuje fosfát (5' konec), druhý obsahuje hydroxyl (3' hydroxyl)

NUCLEIC ACIDS

Nucleotides are joined together by a **phosphodiester linkage** between 5' and 3' carbon atoms to form nucleic acids. The linear sequence of nucleotides in a nucleic acid chain is commonly abbreviated by a one-letter code, A—G—C—T—T—A—C—A, with the 5' end of the chain at the left.

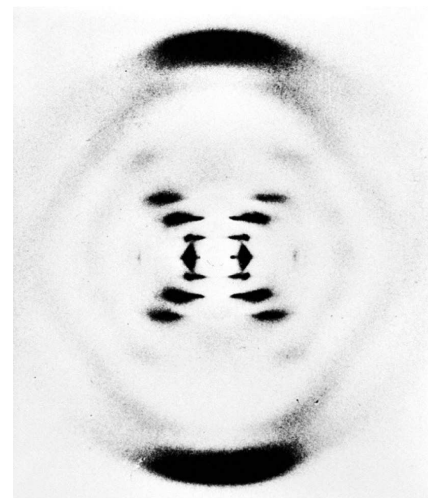
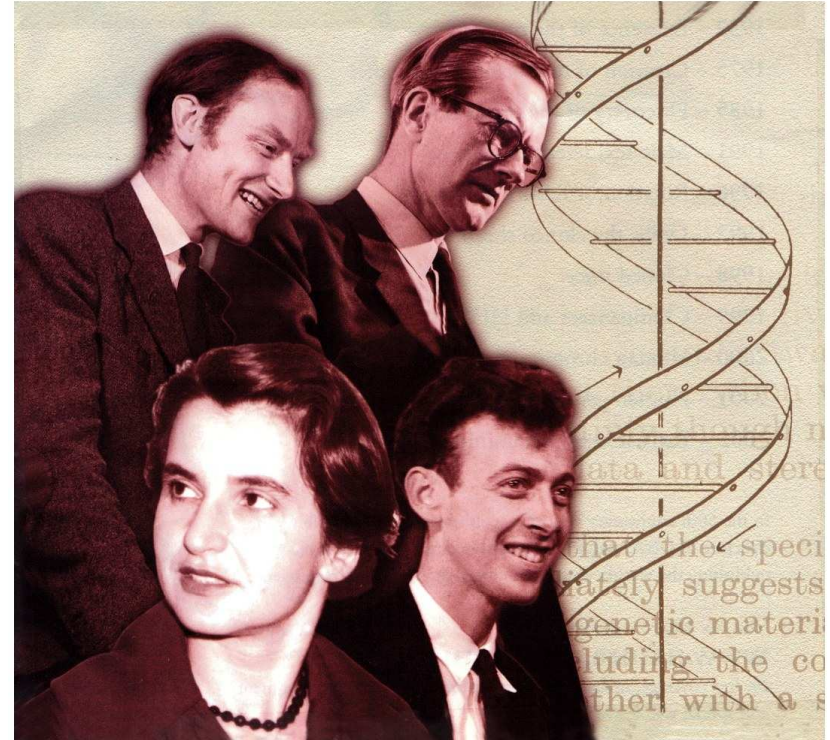


Objev dvoušroubovice DNA

1953: James Watson a Francis Crick
odvodili strukturu DNA na základě
těchto údajů:

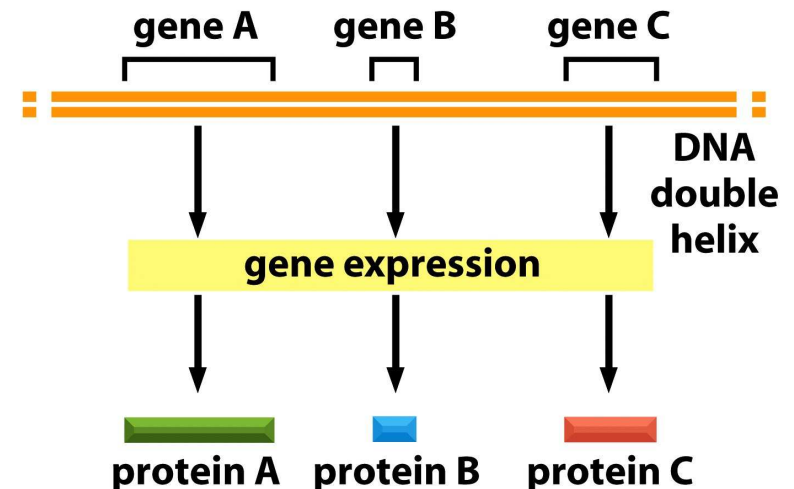
Erwin Chargaff: chemická data -
koncentrace tyminu je v nejrůznějších
organizmech stejná jako koncentrace
adeninu a koncentrace cytozinu je vždy
stejná jako koncentrace guaninu

Maurice Wilkinson a Rosalind Franklin:
fyzikální data - po vystavení
purifikovaných molekul DNA
rentgenovému záření, dochází k
charakteristickému rozptylu paprsků,
které signalizují způsob uspořádání
složek DNA



Struktura DNA vysvětluje způsob uchování a exprese genetické informace

- pořadí nukleotidů v obou řetězcích určuje genetickou informaci, která se kopíruje před svým přenosem do dceřiné buňky
- organizmy se o sebe liší proto, že jejich DNA se liší v pořadí nukleotidů a tím instrukcemi pro tvorbu proteinů
- **lineární sekvence nukleotidů** určuje lineární pořadí aminokyselin v proteinech
- **lineární sekvence aminokyselin** určuje trojrozměrnou strukturu proteinů
- **trojrozměrná struktura proteinů** určuje funkci proteinů

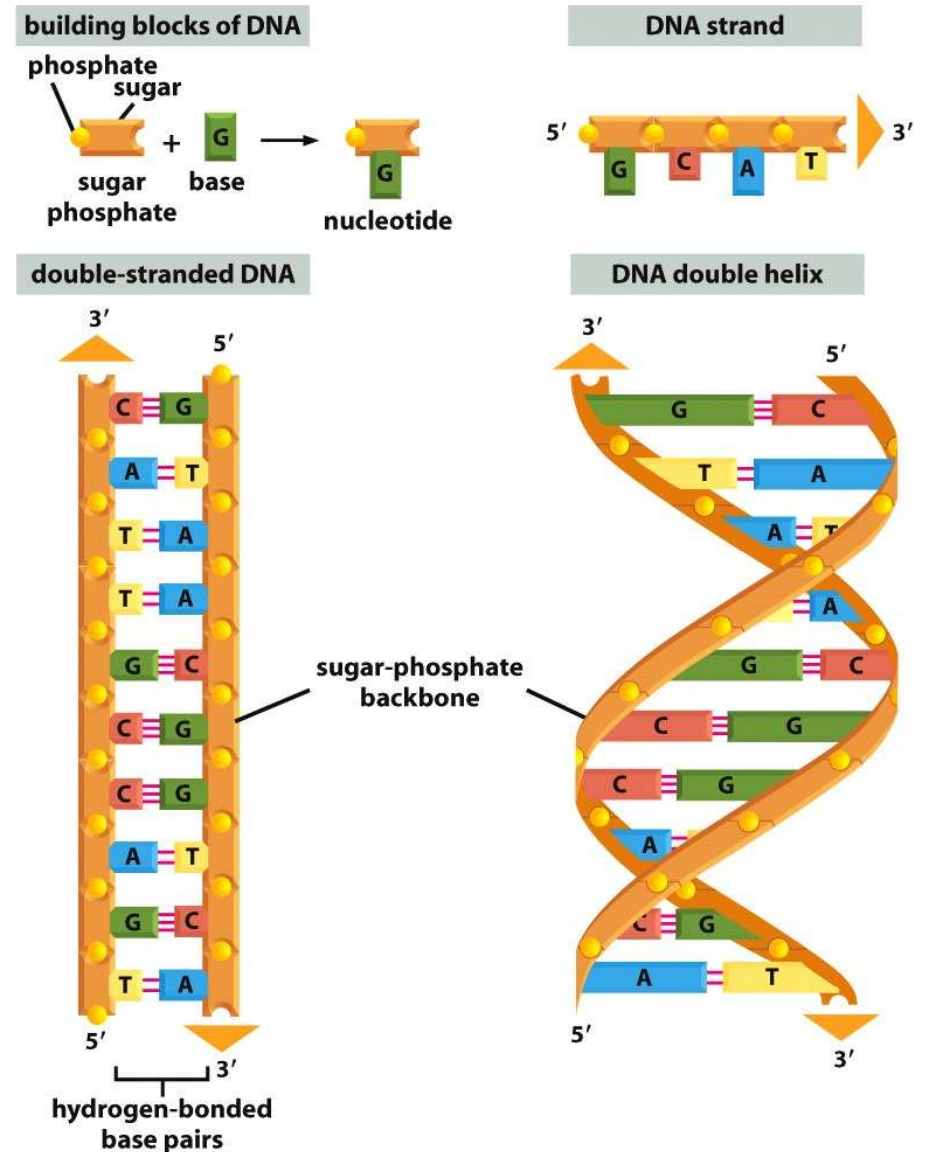


Struktura DNA vysvětluje způsob přenosu genetické informace z generace na generaci

- komplementarita vláken dvoušroubovice usnadňuje kopírování a přenos genetické informace
- vodíkové vazby mezi vlákny dvoušroubovice jsou mnohem slabší než kovalentní vazby mezi nukleotidy uvnitř vláken
- s pomocí určitých enzymů lze dosáhnout oddělení vláken a jejich kopírování do komplementárního vlákna (**replikace DNA**)

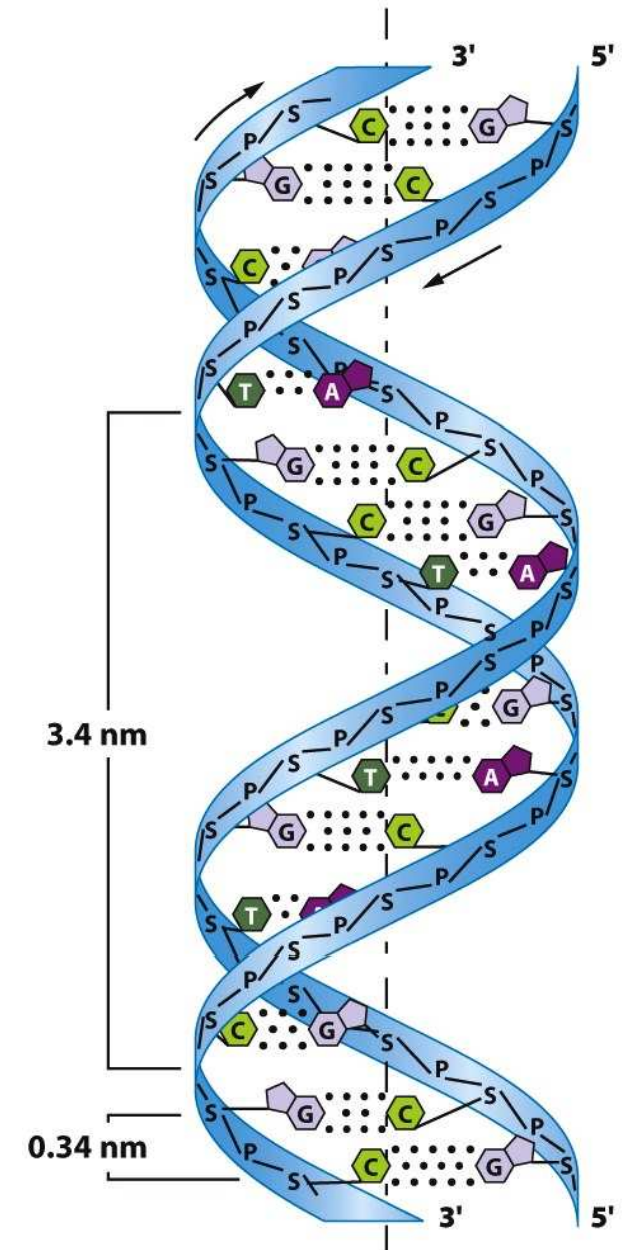
Trojrozměrná struktura DNA

- tvorba dvoušroubovice je důsledkem chemických vlastností dvou polynukleotidových řetězců
- oba řetězce jsou vázány k sobě vodíkovými vazbami mezi bázemi, proto jsou báze orientovány dovnitř dvoušroubovice, cukr fosfátová kostra je na její vnější straně
- k stabilitě přispívá to, že větší purinová báze se páruje s menší pyrimidinovou (A se páruje s T, G s C)



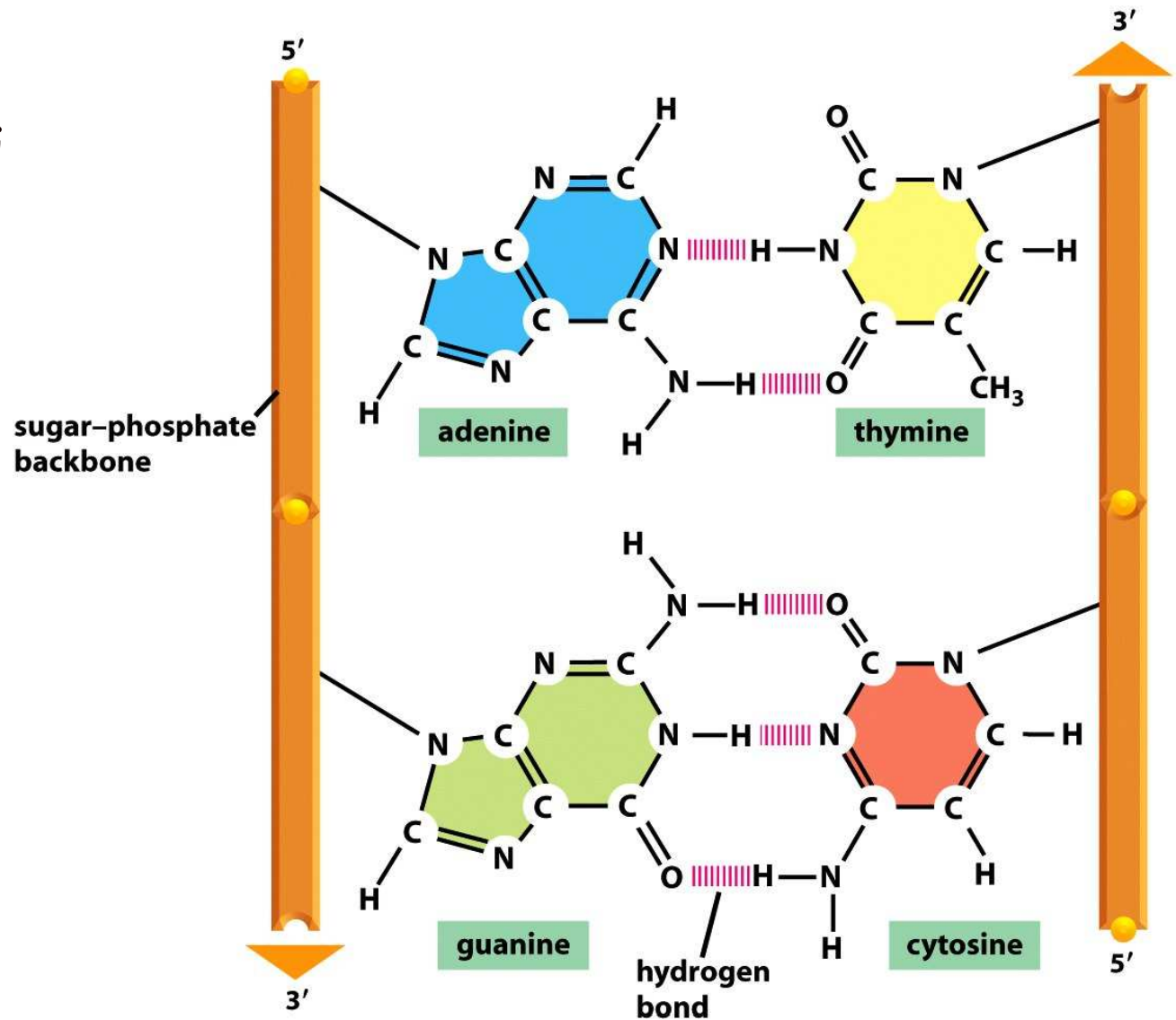
Trojrozměrná struktura DNA

- DNA má povahu pravotočivé dvoušroubovice
- každý polynukleotidový řetězec se skládá ze sekvence nukleotidů, které jsou k sobě vázány fosfodiesterovými vazbami mezi sousedními deoxyribózami



Trojrozměrná struktura DNA

- adenin se spojuje s thyminem dvěma vodíkovými vazbami
- guanin s cytosinem třemi vodíkovými vazbami



Trojrozměrná struktura DNA

- báze se uvnitř dvoušroubovice orientují do energeticky nejvýhodnějšího uspořádání
- jedna otáčka šroubovice připadá na 10 párů bází
- vinutí vytváří v šroubovici velký a malý žlábek
- obě vlákna dvoušroubovice jsou antiparalelní a plně komplementární

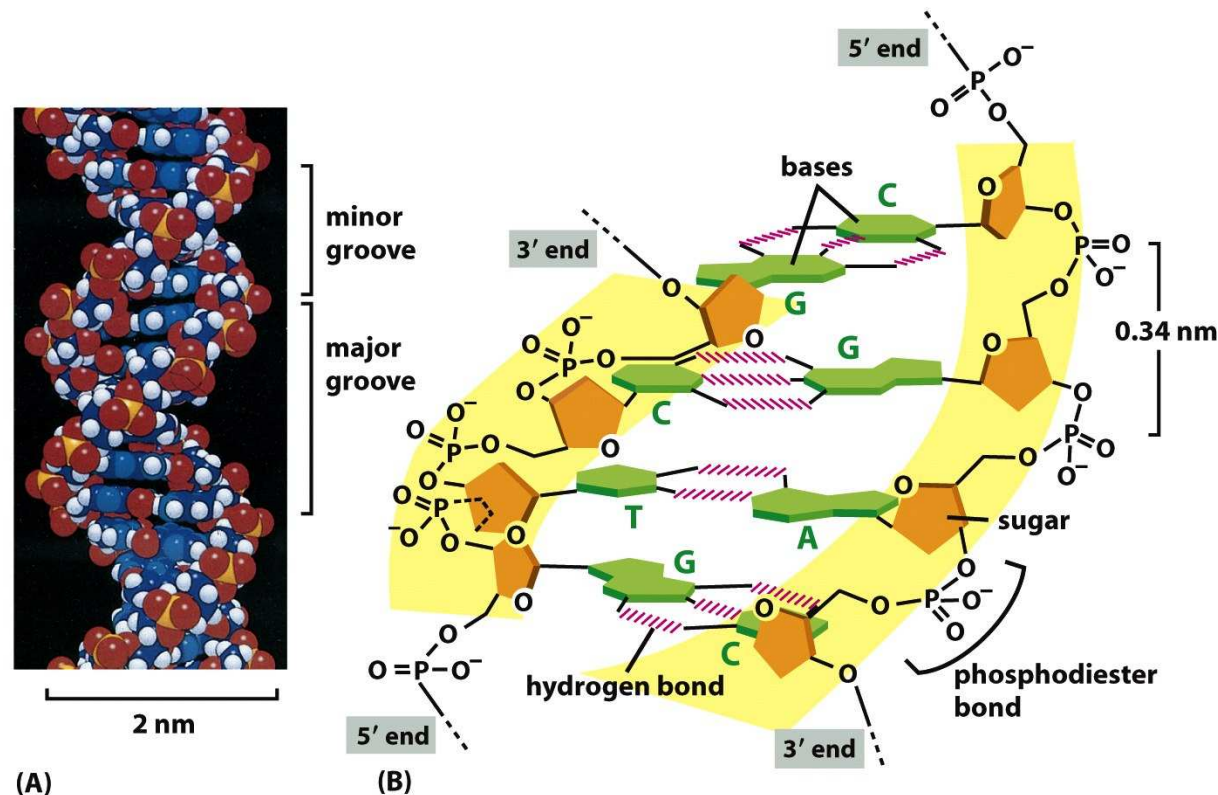


Figure 4-5 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

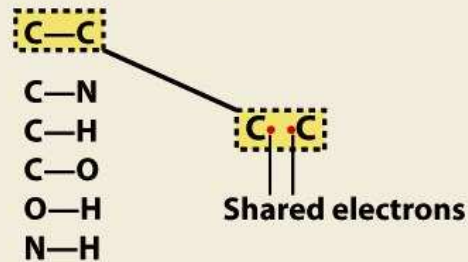
► **TABLE 9.2**

Chemical Bonds Important in DNA Structure

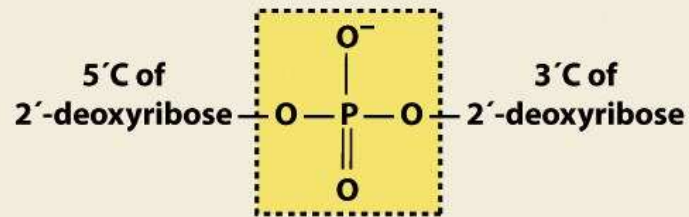
(a) Covalent bonds

Strong chemical bonds formed by sharing of electrons between atoms.

(1) In bases and sugars

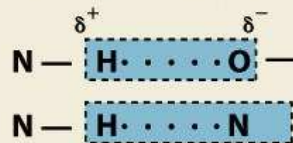


(2) In phosphodiester linkages



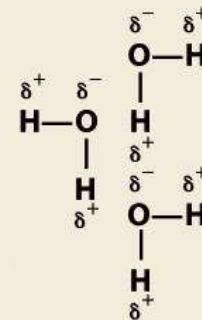
(b) Hydrogen bonds

A weak bond between an electronegative atom and a hydrogen atom (electropositive) that is covalently linked to a second electronegative atom.



(c) Hydrophobic "bonds"

The association of nonpolar groups with each other w^t present in aqueous solutions because of their insolubili in water.

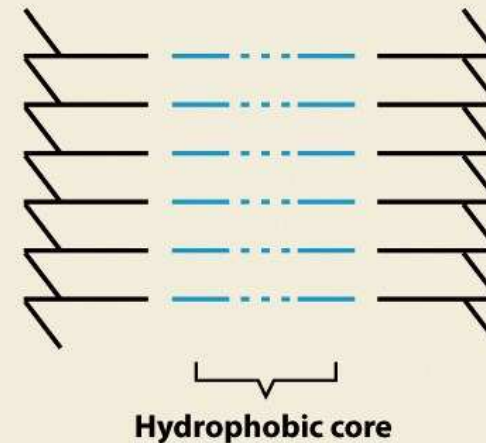


Water molecules are very polar (δ⁻ O and δ⁺ H's).

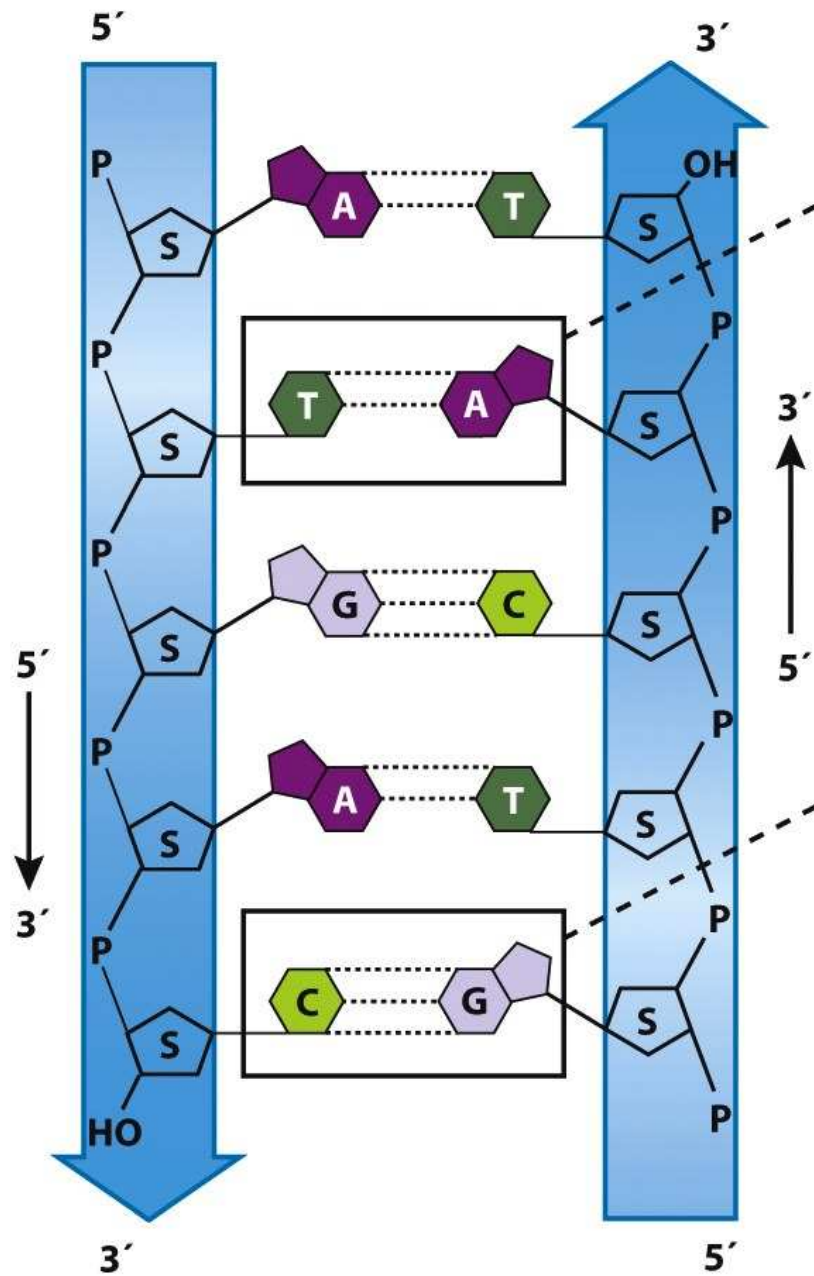
Compounds that are similarly polar are very soluble in water ("hydrophilic").

Compounds that are nonpolar (no charged groups) are very insoluble in water ("hydrophobi

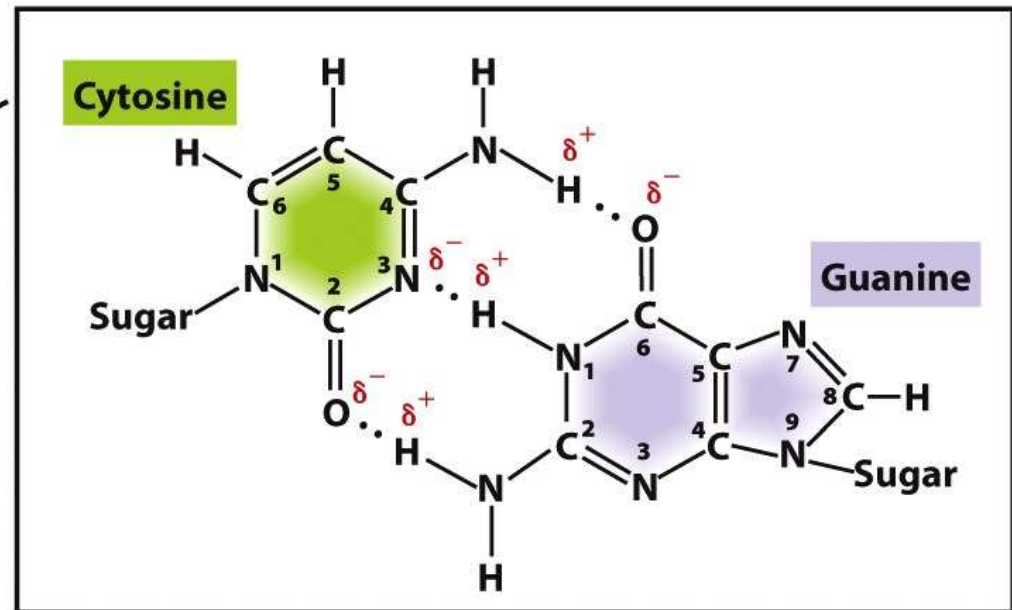
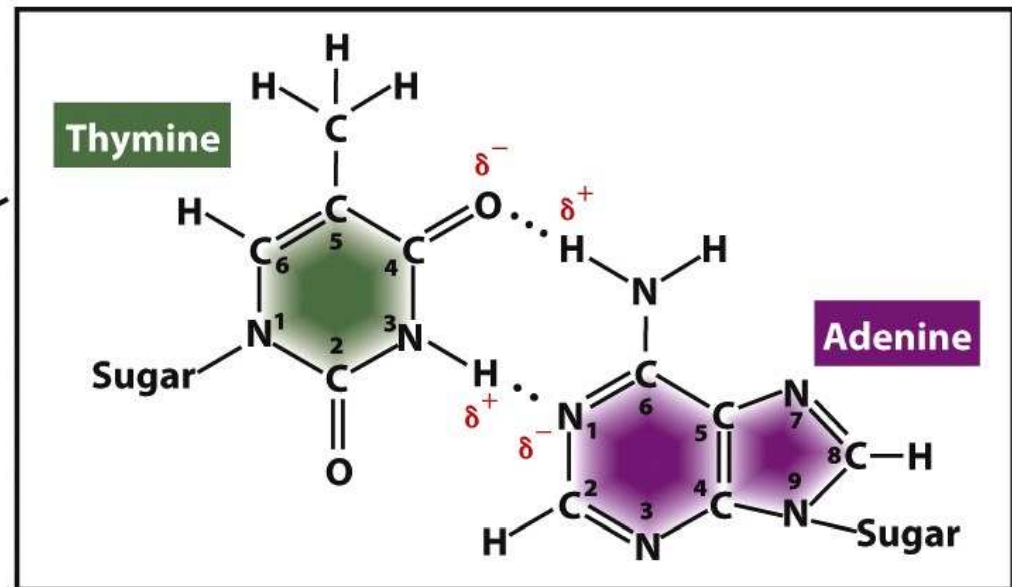
The stacked base pairs provide a hydrophobic core.

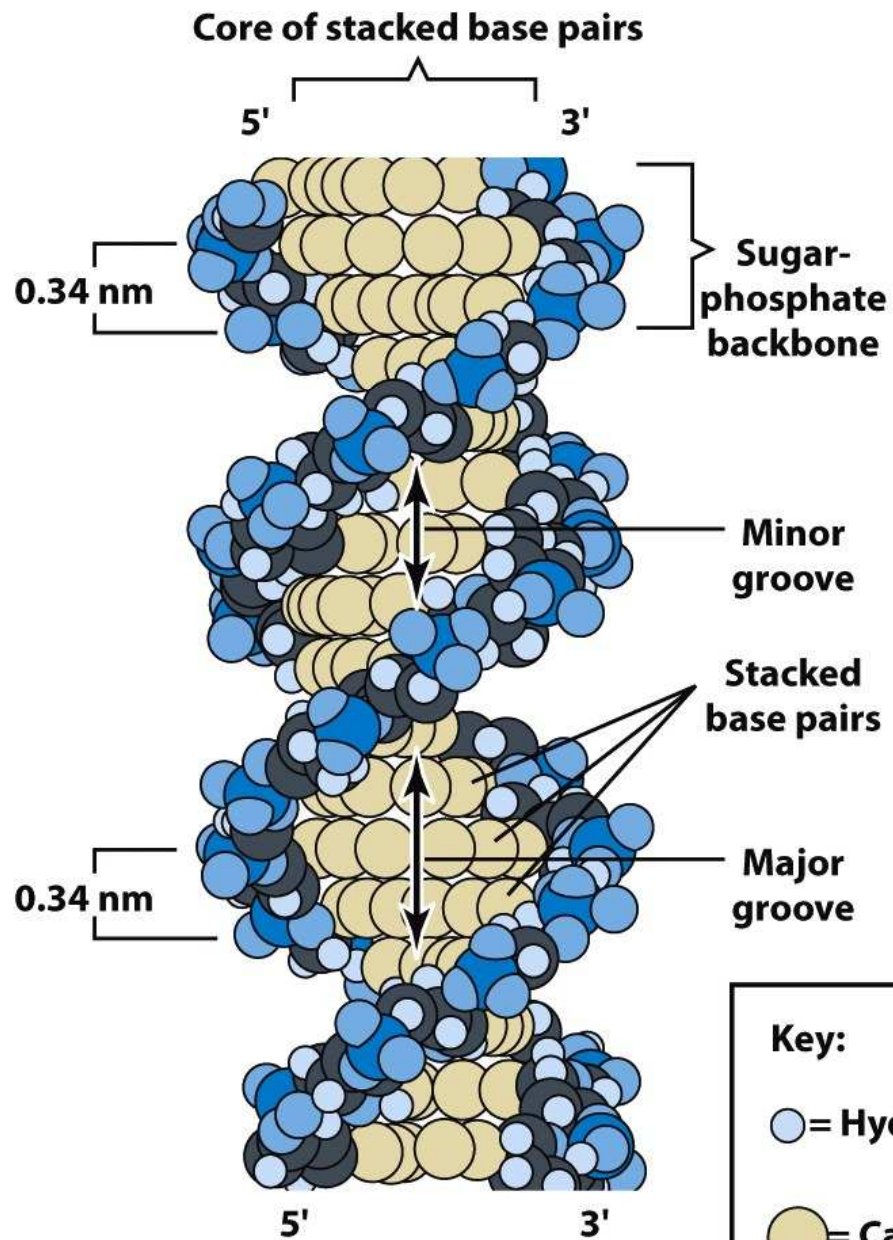


Opposite polarity of the two strands



Hydrogen bonding in A-T and G-C base pairs





Key:

- = Hydrogen ● = Oxygen ● = Carbon
- = Carbon and nitrogen in base pairs ● = Phosphorus

Konformace DNA

- pravotočivá dvoušroubovice **B-DNA**, 10 nukleotidových párů na otáčku - fyziologická konformace popsaná Watsonem a Crickem (ve vodných roztocích s nízkými koncentracemi solí)
- pravotočivá dvoušroubovice **A-DNA**, 11 nukleotidových párů na otáčku - ve vysokých koncentracích solí nebo po částečné dehydrataci (*in vivo* pouze u duplexů DNA/RNA, RNA/RNA)
- levotočivá dvoušroubovice **Z-DNA**, 12 nukleotidových párů na otáčku, zvláštní uspořádání vazeb cukr-fosfátové kostry, výskyt u sekvencí bohatých na GC, funkce nejasná

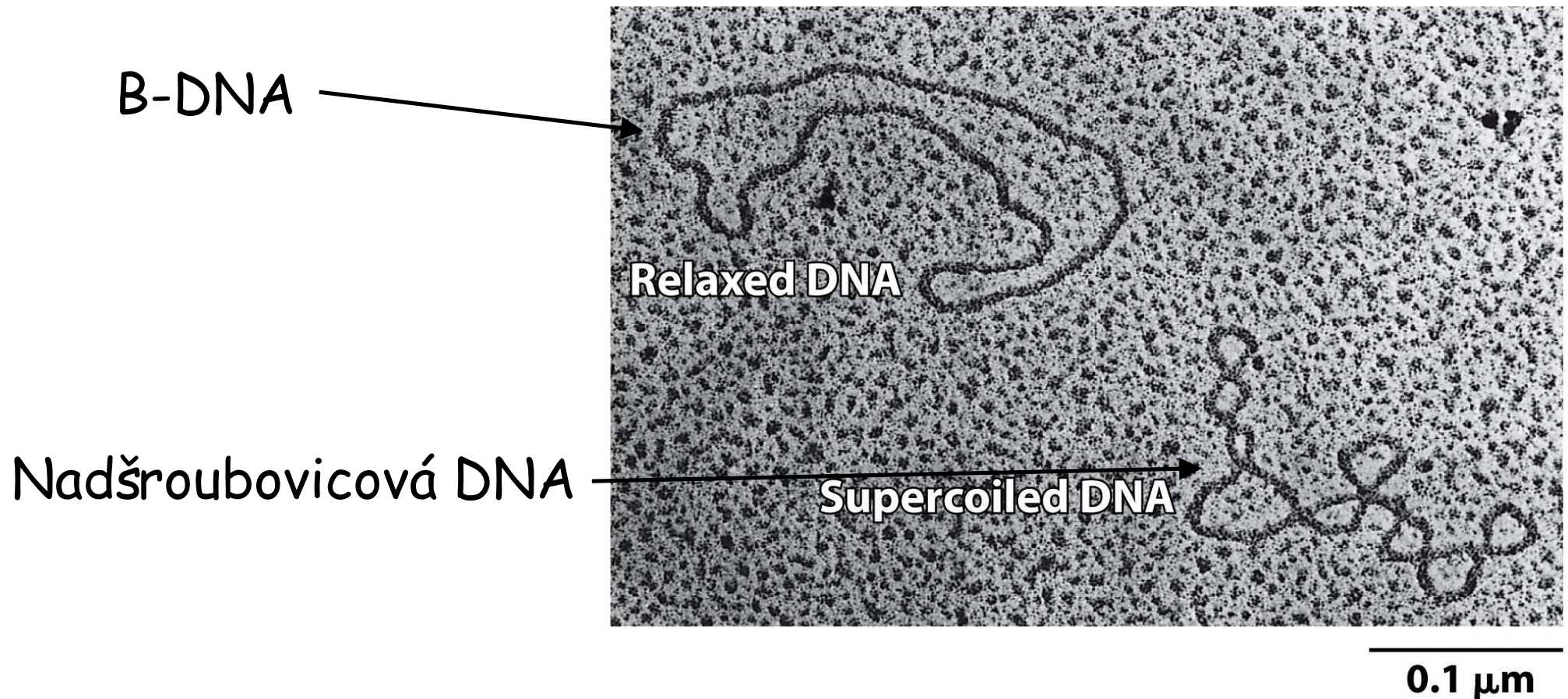
▶ **TABLE 9.3**

Alternate Forms of DNA

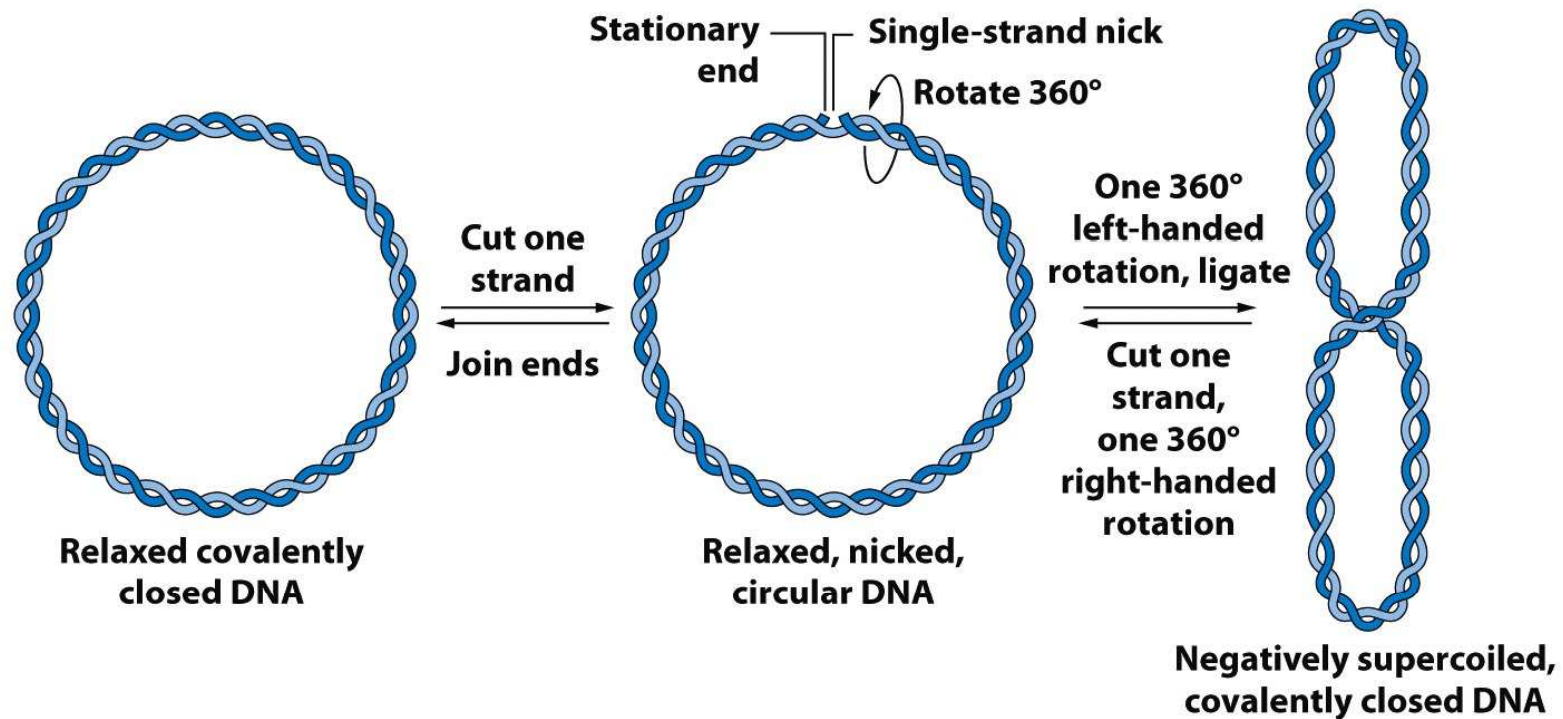
Helix Form	Helix Direction	Base Pairs per Turn	Helix Diameter
A	Right-handed	11	2.3 nm
B	Right-handed	10	1.9 nm
Z	Left-handed	12	1.8 nm

Nadšroubovice ("superhelix")

- běžná u funkčních DNA živých buněk
- vzniká po přerušení jednoho řetězce a po otáčení komplementárních vláken kolem sebe
- struktura připomíná stočený telefonní drát



- závitý nadšroubovice ve struktuře DNA vznikají (a zanikají) působením enzymů
- vznik nadšroubovice vyžaduje ukotvení konců DNA (splněno u prokaryot i eukaryot)
- negativní nadšroubovicové vinutí se uplatňuje při replikaci DNA, rekombinaci, genové expresi a její regulaci
- nadšroubovice se objevuje v podobné míře u prokaryot i eukaryot



Take home message

- DNA obvykle tvoří dvoušroubovici, ve které jsou obě vlákna držena pohromadě vodíkovými vazbami mezi komplementárními páry bází
- komplementarita obou řetězců dvoušroubovice z DNA činí velmi vhodný materiál pro uchování a přenos genetické informace
- řetězce dvoušroubovice DNA mají opačnou chemickou polaritu
- funkční molekuly DNA jsou v buňkách uspořádány v podobě negativní nadšroubovice

Struktura chromozomů u prokaryot a virů

prokaryota a viry: důležitý zdroj informací o struktuře DNA

- nižší úroveň biochemické i genetické komplexity
- jsou **monoploidní** (obsahují jednu sadu genů)
(nezaměňovat s termínem „haploidní“, který označuje redukovaný počet chromozomů v gametách)
- mají jedinou sadu genů nesenou jediným chromozomem, který obsahuje jedinou molekulu nukleové kyseliny

Příklady prokaryot a virů

bakteriofág MS2

- genom v podobě jedné molekuly RNA
- velikost genomu: 3569 nukleotidů, 4 geny

bakteriofág ϕ X174

- genom v podobě jedné molekuly DNA
- velikost genomu: 5386 nukleotidů, 11 genů

největší DNA viry (např. fág T2) a živočišné pox viry obsahují kolem 150 genů

baktérie mají cca 2500-3500 genů, většinou na 1 molekule DNA

Chybné představy o struktuře DNA v minulosti

prokaryotické chromozomy=nahá DNA (bez proteinů)

eukaryotické chromozomy=komplexní vzhledem k velkému zapojení asociovaných proteinů

důvody zjednodušení:

- EM snímky prokaryotických chromozomů znázorňovaly izolované molekuly DNA a ne funkční chromozomy
- fotografie eukaryotických chromozomů znázorňovaly kondenzované mitotické chromozomy, které rovněž nebyly ve funkčním stavu

Chromozom bakterie *E.coli*

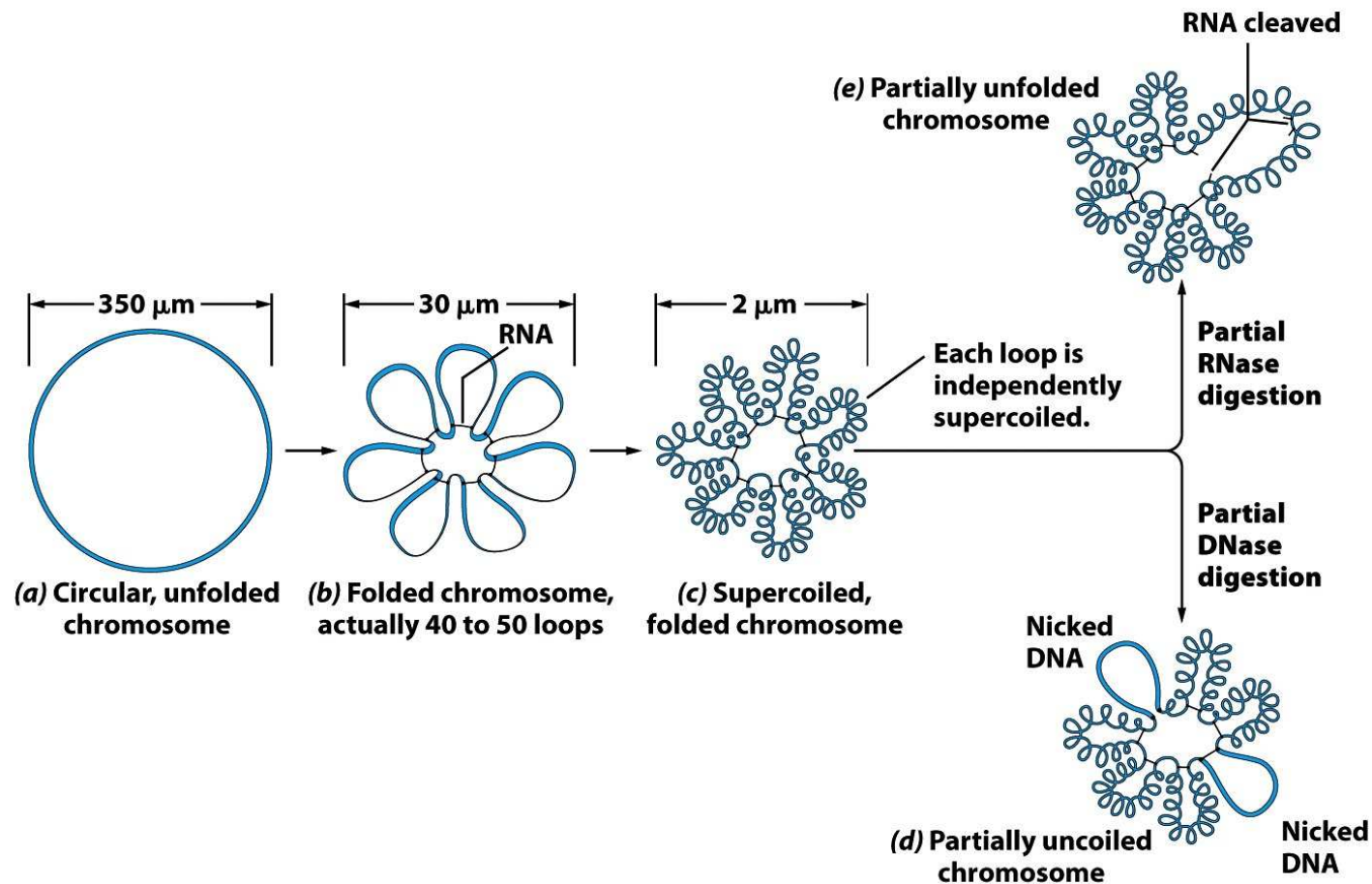
délka molekuly DNA: 1500 μm

průměrná velikost buňky: 1-2 μm

- DNA je vysoce kondenzovaná (poskládaná)
- v kondenzovaném stavu může být DNA izolována jemným postupem (bez iontových detergentů a za přítomnosti vysokých koncentrací kationtů - např. polyaminů, tj. bazických pozitivně nabitých proteinů nebo solí)

Způsob složení DNA *E.coli*

- DNA je organizována do cca 50 domén (smyček)
- každá smyčka má negativní nadšroubovicové vinutí
- na skládání DNA se podílejí RNA a proteiny



Take home message

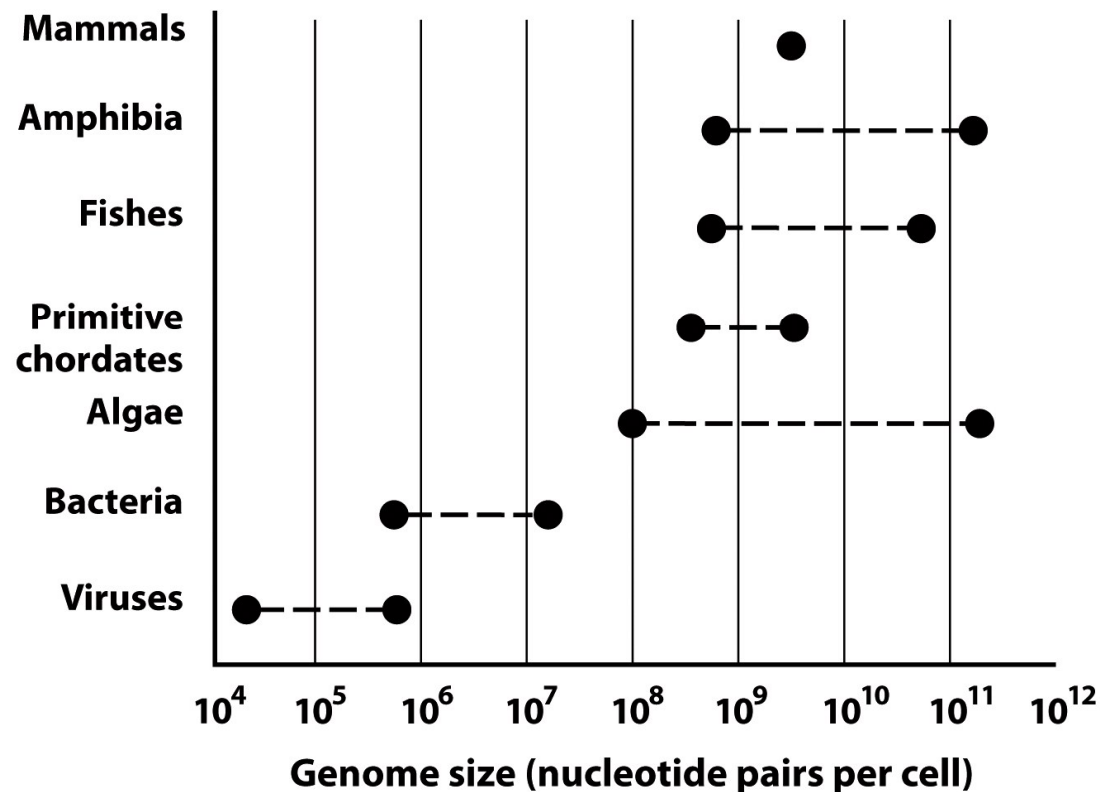
- molekuly DNA prokaryotických a virových chromozomů jsou organizovány do negativních nadšroubovicových domén
- bakteriální chromozomy tvoří kruhové molekuly DNA, které jsou členěny do přibližně 50 domén

Struktura chromozomů eukaryot

- vysoká míra komplexity
- většinou diploidní (dvě sady chromozomů, každá od jednoho rodiče)
- někdy polyploidní (u rostlin)
- typické přítomností centromery a telomer

Velikost genomu a vývojová komplexita

- počet genů je u eukaryot 2x - 15x vyšší než u prokaryot
- velikost DNA je řádově vyšší (důsledek existence rozsáhlých sekvencí bez kódující funkce)



Velikost genomu

Srovnání délky DNA

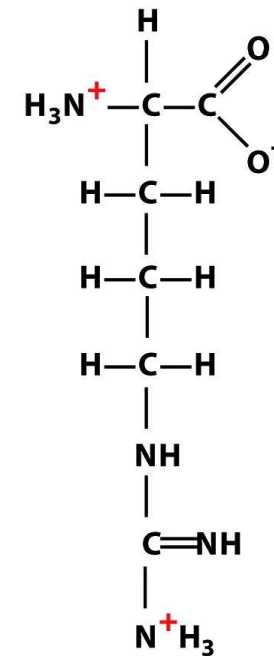
- chromozom prokaryot (na 1 buňku *E. coli*): **1,5 mm**
 - chromozomy eukaryot (na jednu lidskou buňku, haploidní stav): **1m**
 - DNA největšího lidského chromozomu: **8,5 cm (=85000 μm)**
- (jak se může DNA této velikosti při mitóze kondenzovat do struktury o velikosti **0,5 μm x 10 μm ?)**

Chemické složení eukaryotických chromozomů: chromatin

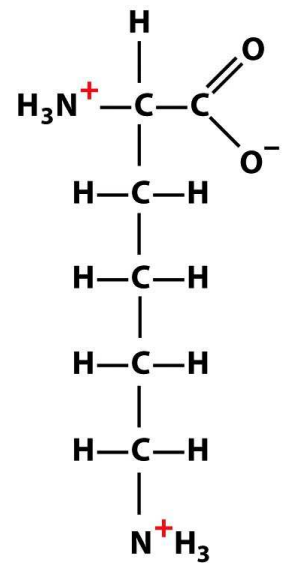
- chromatin = komplex **DNA** a **proteinů** (v menší míře je zastoupena **RNA**)
- 2 typy chromatinových proteinů:
 - **bazické** (v neutrálním pH nesou kladný náboj) = **histony**
 - **kyselé** (v neutrálním pH nesou záporný náboj) = **nehistonové chromozomové proteiny**

Histony

- hlavní strukturální úloha v chromatinu
- v buňkách přítomny v množství, které koreluje s množstvím DNA
- hlavní typy histonů: **H1, H2a, H2b, H3, H4**
- bazické proteiny, v hojné míře zastoupeny **arginin** a **lysin** (20-30% histonových aminokyselin)
- vysoce konzervativní struktura histonů, přítomny téměř ve všech buněčných typech



Arginine



Lysine

Čtyři typy histonů jsou složkami nukleozomů

nukleozomy

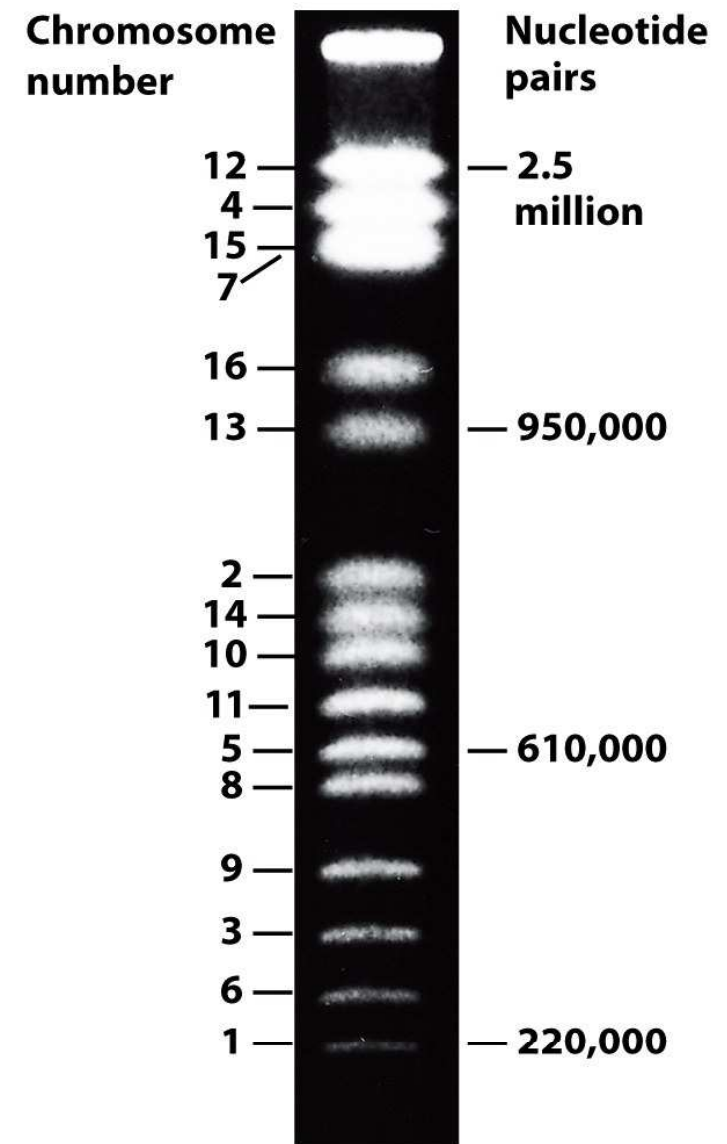
- elipsoidní útvary (11 nm x 6,5 nm) vzniklé interakcí H2a, H2b, H3 a H4 s DNA
- podíl na správném složení DNA
- chemické modifikace histonů mohou ovlivnit genovou expresi
- interakce mezi histony a DNA usnadňují elektrické náboje (DNA je polyanion, histony jsou díky bazickým aminokyselinám polykationty)

Nehistonové proteiny chromatinu

- různé u různých buněk (i v rámci téhož organismu)
- nepodílí se na uspořádání DNA v chromozomech
- účast na regulaci genové exprese

Pulzní gelová elektroforéza dokáže rozdělit velké molekuly DNA

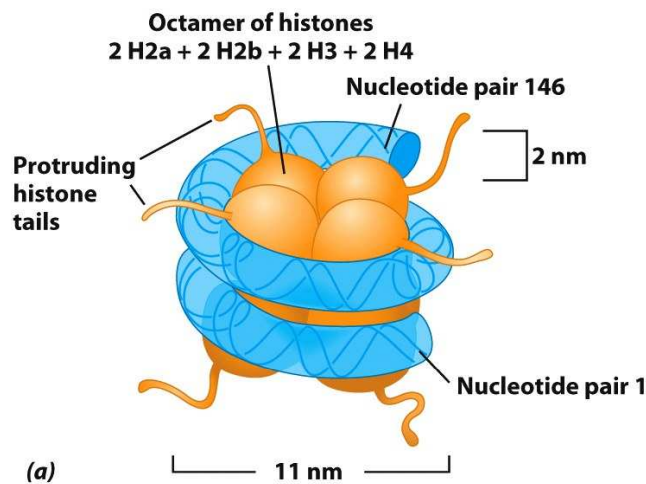
- důkaz, že chromozom obsahuje 1 molekulu DNA
- střídavě jsou aplikována jsou dvě elektrická pole v odlišných úhlech (90°)
- takto lze rozdělit velmi velké molekuly DNA
- tato technika dokáže separovat DNA jednoho chromozomu od DNA druhého



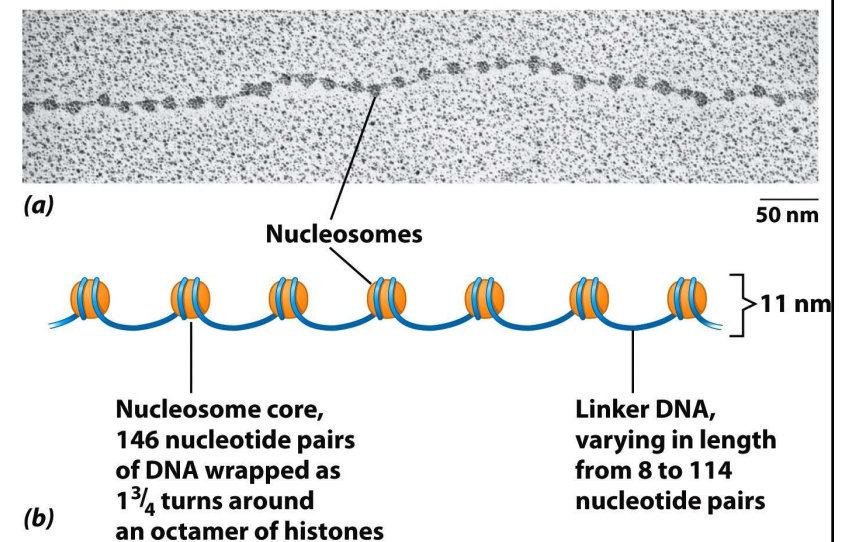
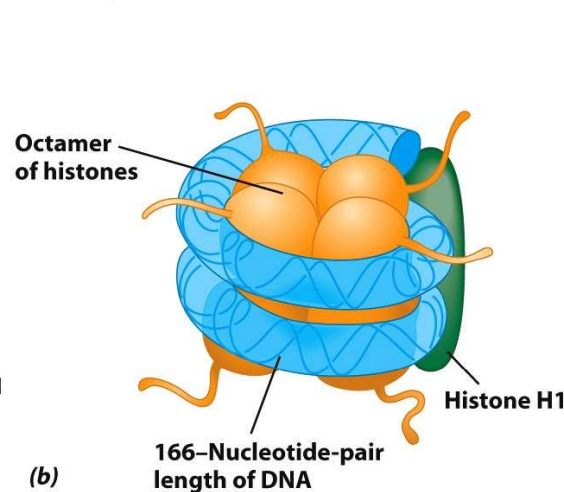
Tři úrovně sbalení eukaryotických chromozomů: 1. nukleozomy

- EM: interfázová DNA vypadá jako provázek s korálky (nukleozomy)
- systém pravidelného navíjení DNA
- **jádro nukleozomu** tvoří oktamer histonů $2 \times (H2a + H2b + H3 + H4)$ a nadšroubovicová DNA o velikosti 146 pb
- **úplný nukleozom** je stabilizován histonem H1 a obsahuje DNA o velikosti 166 nukleotidových párů
- výsledkem je interfázové chromatinové vlákno o průměru **11 nm**

Nucleosome core

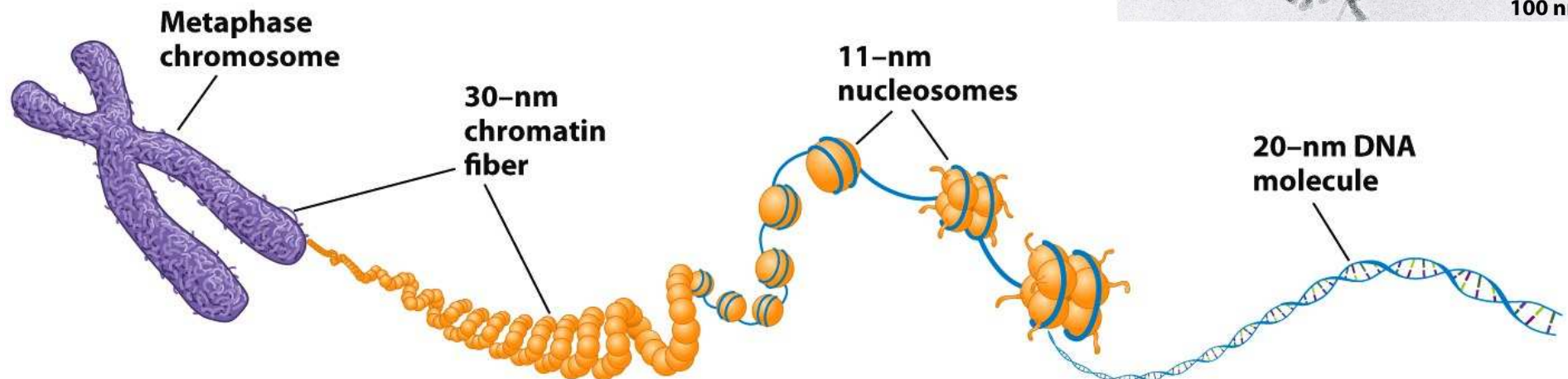
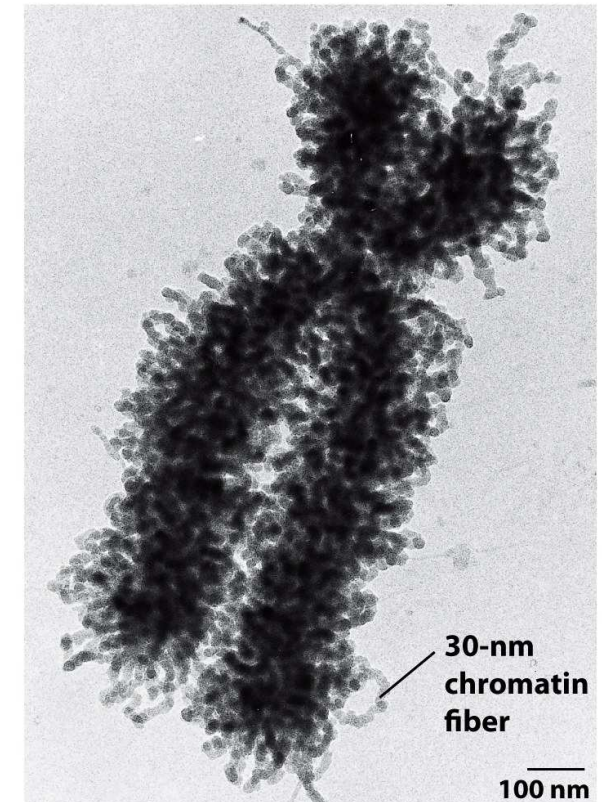


Complete nucleosome



2. chromatinové vlákno o tloušťce 30 nm

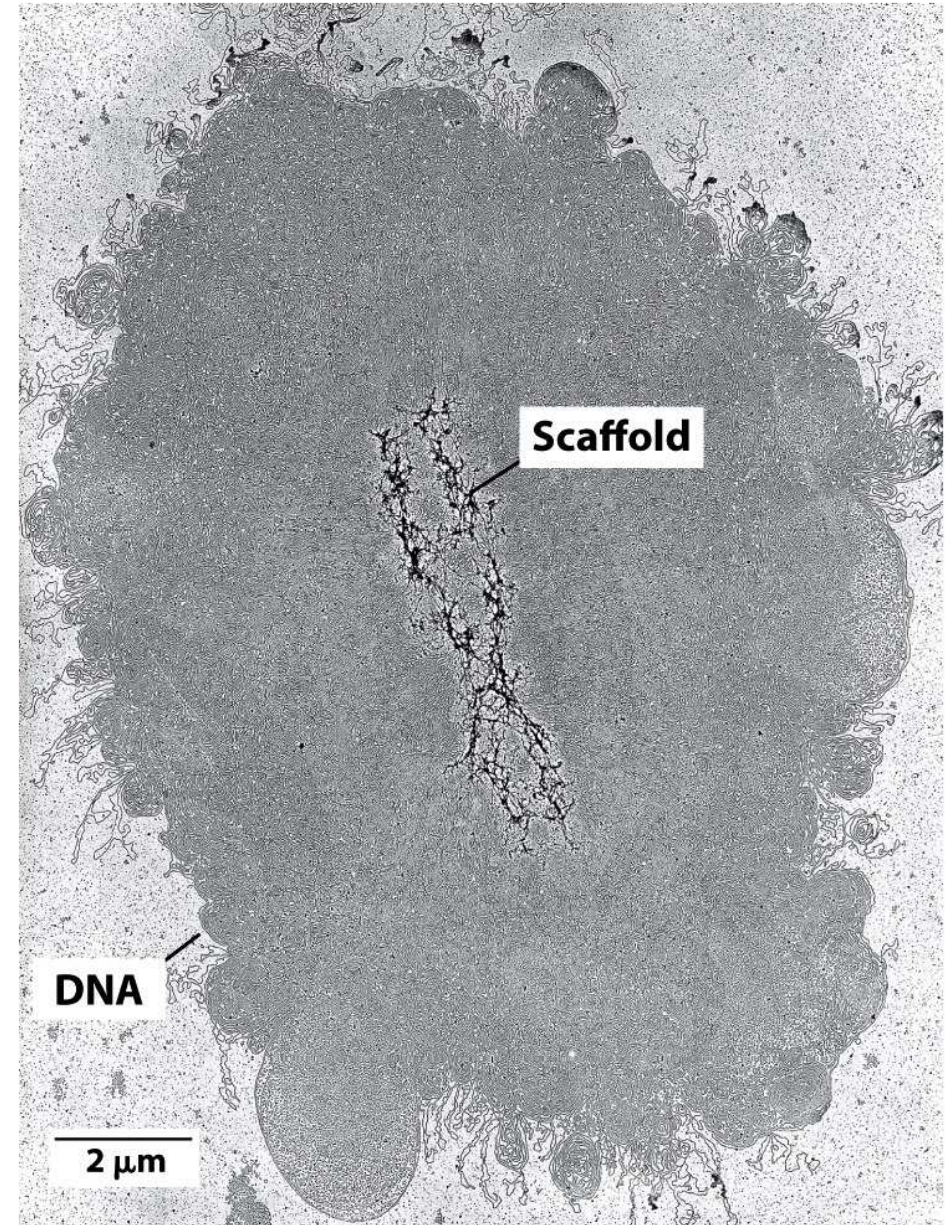
- patrné u EM snímků metafázních chromozomů
- vzniká v důsledku interakcí mezi nukleozomy, vzniká vyšší úroveň vinutí, tzv. **solenoid** (30 nm chromatinové vlákno)
- 1 závit solenoidu je tvořen 6 nukleozomy



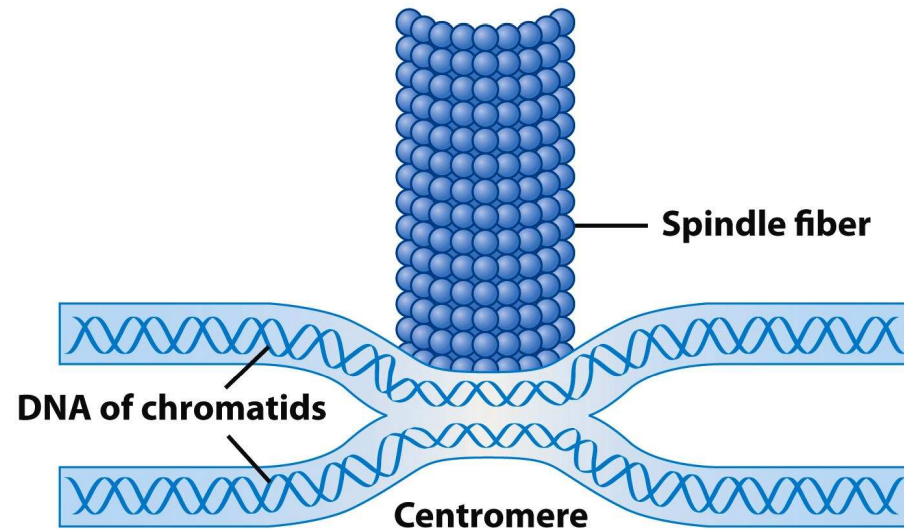
3. kondenzace 30 nm vlákna pomocí proteinového lešení ("scaffold")

- typické pro metafázní chromozomy
- proteiny nehistonové povahy (např. topoizomeráza I, proteiny HMG, transkripční faktory, polymerázy, atd.) tvoří **proteinové lešení („scaffold“)**
- lešení napomáhá složení 30 nm vlákna do struktury metafázických chromozomů

EM: lidský metafázický chromozom po odstranění histonů



Centromera



- zúžená oblast chromozomu
- místo vazby mikrotobulů dělicího vřeténka
- nezbytná pro správnou segregaci chromozomů při anafázi mitózy a meiózy
- stejná funkce - podobná struktura u všech chromozomů
- obsahuje nukleotidové sekvence, na které se vážou proteiny zprostředkovávající vazbu vřeténka

Centromery u kvasinek

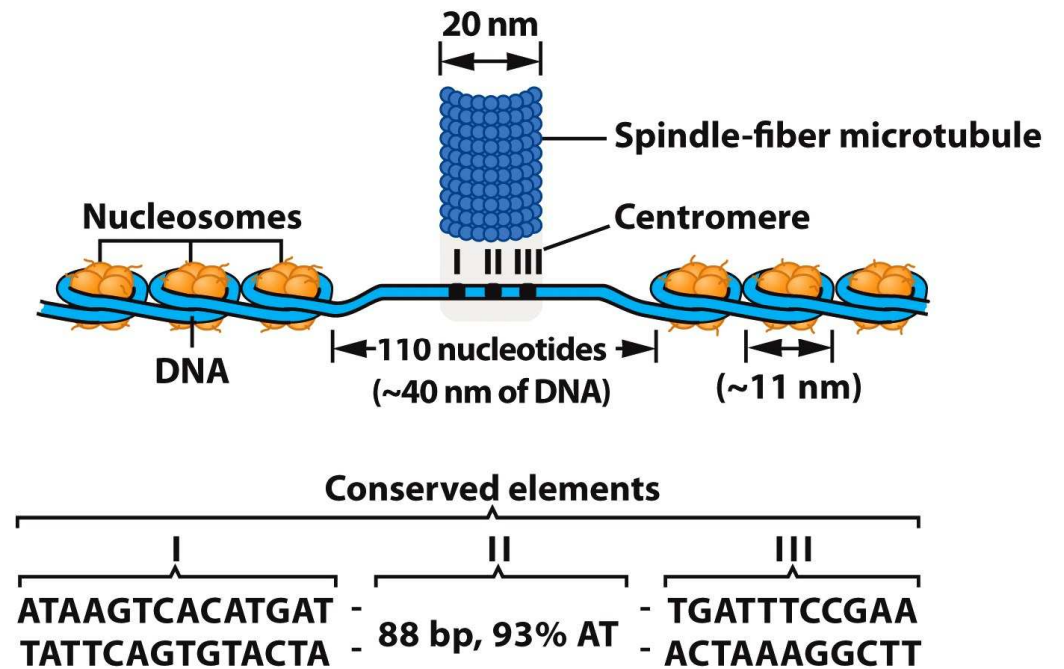
- 110-120 nukleotidových párů
- 3 oblasti:

Oblasti I a III

- krátké s konzervativními hraničními sekvencemi
- obsahují vazebná místa pro proteiny

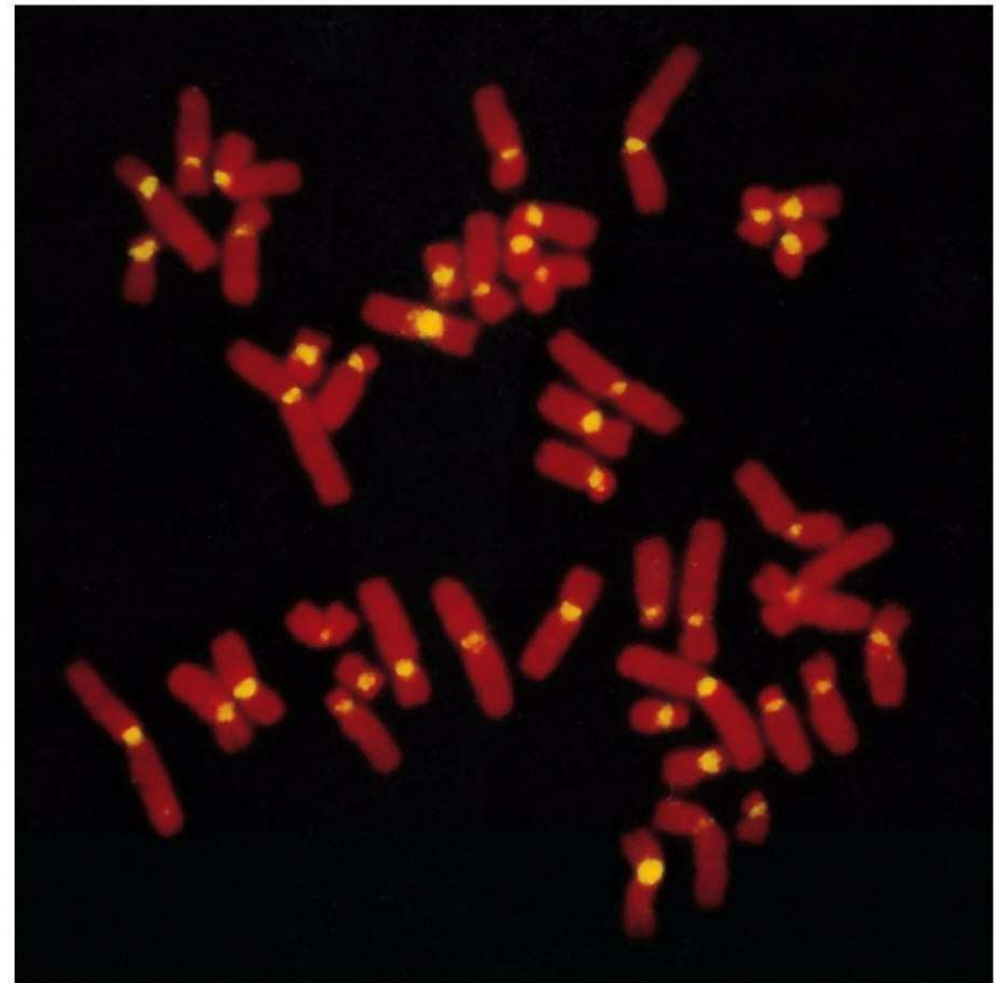
Oblast II

- bohatá na AT (>90%)



Centromery u mnohobuněčných eukaryot

- mnohem větší a složitější než u kvasinek
- obsahují mnohonásobně se opakující sekvence (např. u člověka 5000x - 15000x opakovaná sekvence alfa - tzv. alfoidní satelit dlouhý 171 párů bází)
- obsahují vazebné sekvence pro proteiny



5 μ m

Telomery

(z řečtiny: telos = konec, meros = část)



Human telomeres visualized using fluorescent probes and *in situ* hybridization.

Hermann J. Muller, 1938: první důkaz, že absence přirozených konců chromozomů drozofily (odstraněných rentgenovým zářením) znemožňuje přenos chromozomů do buněk potomstva

Barbara McClintock, 1948: nové konce přerušovaných chromozomů jsou lepivé a mají tendenci se spojovat za vzniku fúzních chromozomů; normální konce chromozomů tuto vlastnost nemají

problém s replikací konců lineárních chromozomů

Tři hlavní funkce telomer

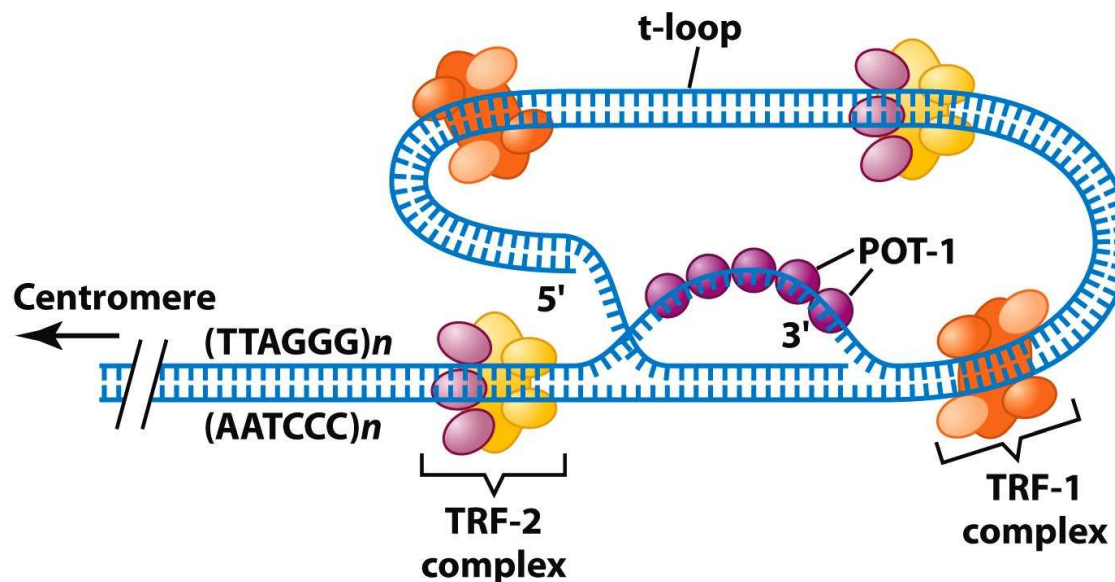
- chrání konce lineárních molekul DNA před deoxyribonukleázami
- brání fúzi konců chromozomů s jinými molekulami DNA
- umožňuje úplnou replikaci konců lineárních molekul DNA

Struktura telomer

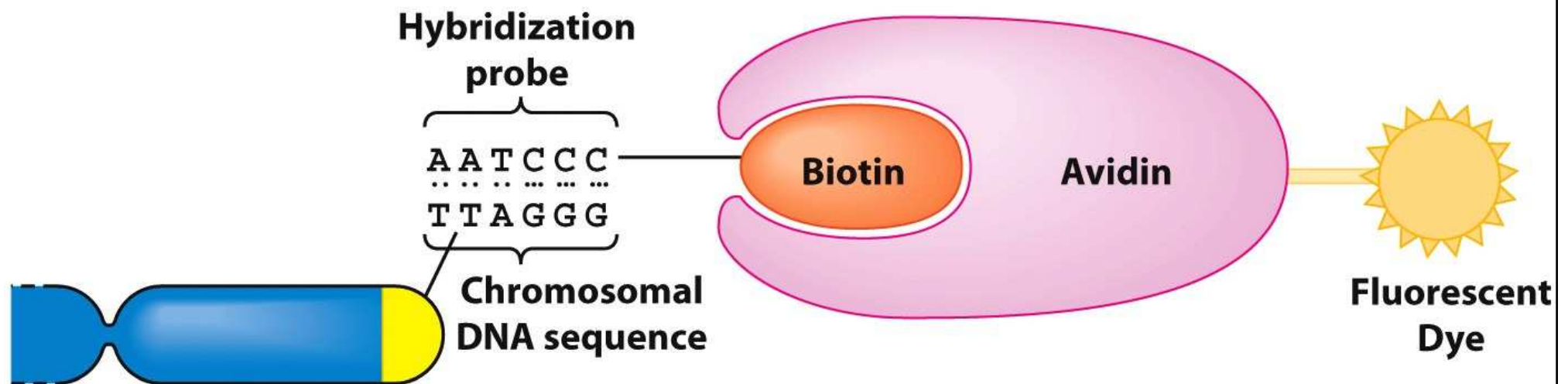
- obsahují krátké nukleotidové sekvence, které se opakují
- struktura opakujících se sekvencí je u různých druhů podobná (člověk TTAGGG, *Tetrahymena* TTGGGG, *Arabidopsis* TTTAGGG)
- počet opakování těchto jednotek se liší (u různých druhů, mezi různými chromozomy téhož druhu i při srovnání stejných chromozomů u různých buněčných typů)
- u zdravého člověka se hexanukleotidy opakují 500x - 3000x, s věkem tento počet postupně klesá
- to neplatí pro zárodečné buňky a buňky nádorové, kde se telomery nezkracují

Struktura telomer

- telomery tvoří tzv. **T smyčky**
- T smyčky využívají krátkých jednořetězcových úseků na koncích DNA (3' konce přesahují 5' konce)
- jednořetězcové vlákno 3' konce se otáčí, vytěsňuje jedno vlákno dvoušroubovice v místě některého z předcházejících opakování telomerické opakované jednotky
- pomocné proteiny POT chrání vytěsněné jednořetězce před degradací, tvorby smyček se účastní proteinové komplexy TRF1 a TRF2



Hybridizace *in situ*



Visualization of human telomeres by using fluorescent dyes and *in situ* hybridization.

Take home message

- každý eukaryotický chromozom obsahuje jednu velkou molekulu DNA, která se skládá do elipsoidních útvarů o průměru 11-nm zvaných nukleozomy
- kondenzované chromozomy, které jsou typické pro mitózu a meiózu a také pro šetrně izolované interfázové chromozomy se skládají z vláken chromatinu o průměru 30-nm
- v metafázi jsou 30-nm vlákna se pomocí nehistonových chromozomových proteinů a chromozomového lešení uspořádána do domén
- centromery jsou místa pro vazbu dělicího vřeténka a telomery mají specifické funkce na koncích chromozomů