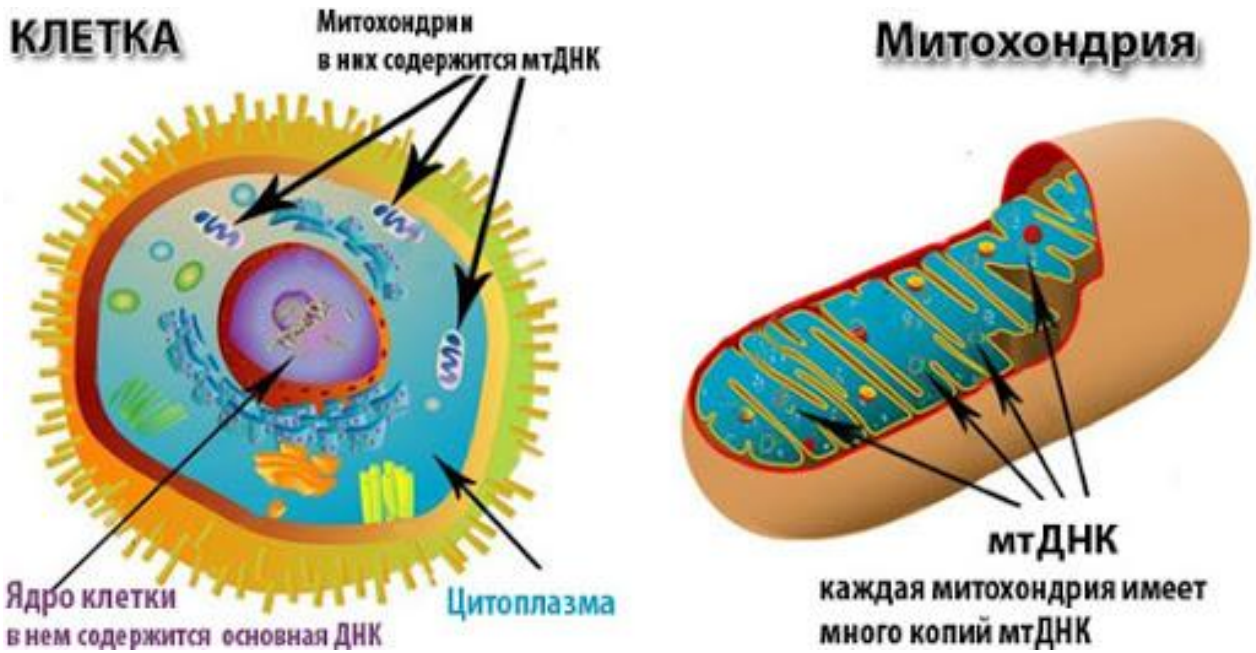
Ядро. Организация генетического материала у эукариот

Эукариотная ДНК

Расположена:

- В ядре
- В митохондриях



Ядерная ДНК

- Длинные линейные молекулы;
- В виде хроматина ↔ хромосом;
- Около 10% ДНК – кодирующая, остальная – некодирующая;
- Активность ядерных генов зависит от:
  - Онтогенетического периода;
  - Типа клетки

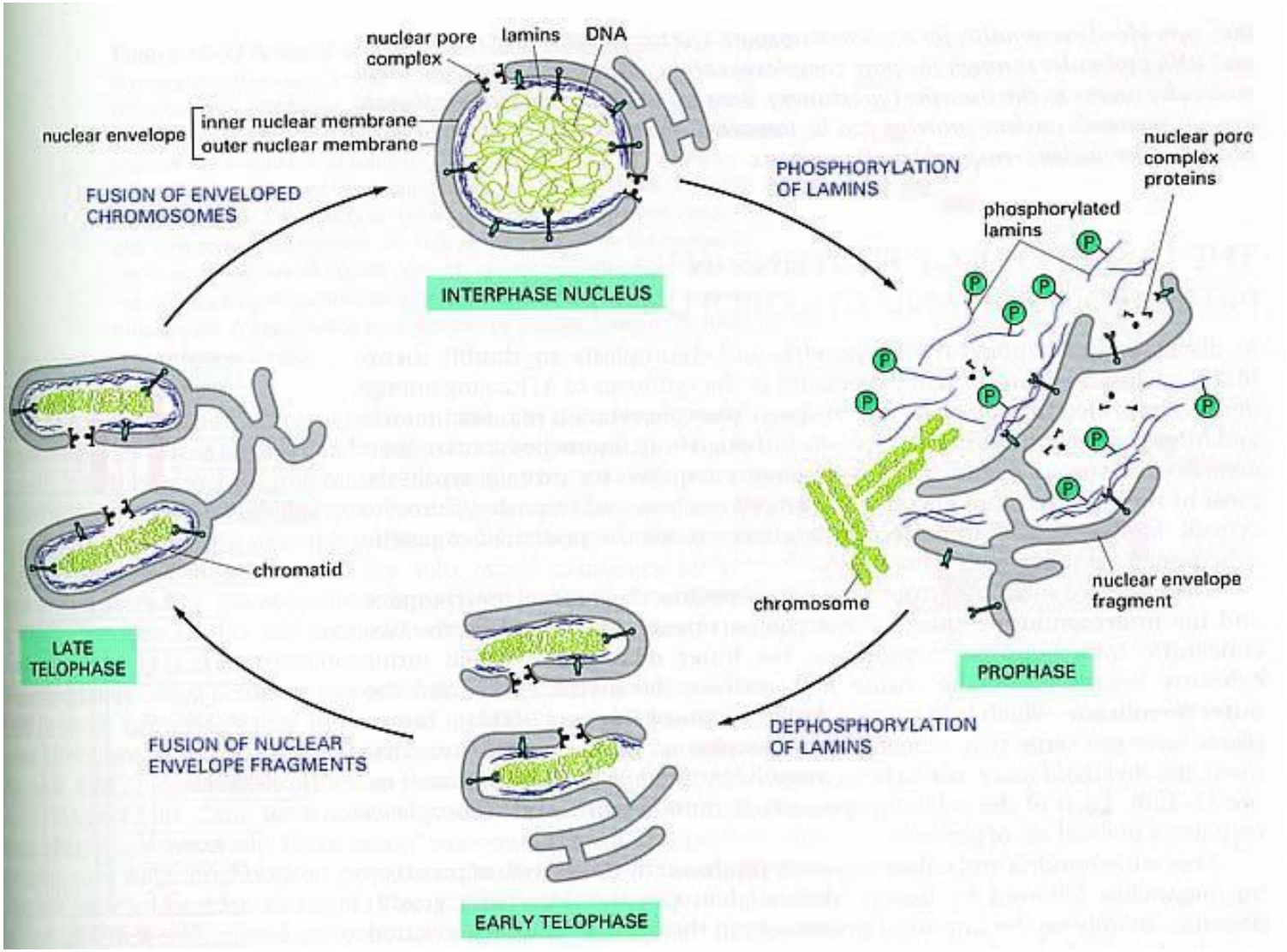
↓

!!! Необходим механизм сохранения ГИ для оптимальной пространственной и временной активности

Митохондриальная ДНК

- Небольшие кольцевые молекулы
- Количество – от 2-х до 10 в одной митохондрии
- Количество мт-ДНК в клетке зависит от числа митохондрий в ней
- Содержит 99% кодирующих последовательностей
- Наследуется исключительно по материнской линии

Ядро на разных этапах клеточного цикла



Функции ядра

1) Хранение и функциональная упаковка ДНК:

Эухроматин – активная ГИ;

Гетерохроматин – неактивная ДНК.

2) Контроль жизнедеятельности клетки путем дифференциальной экспрессии генов:

Транскрипция и процессинг РНК.

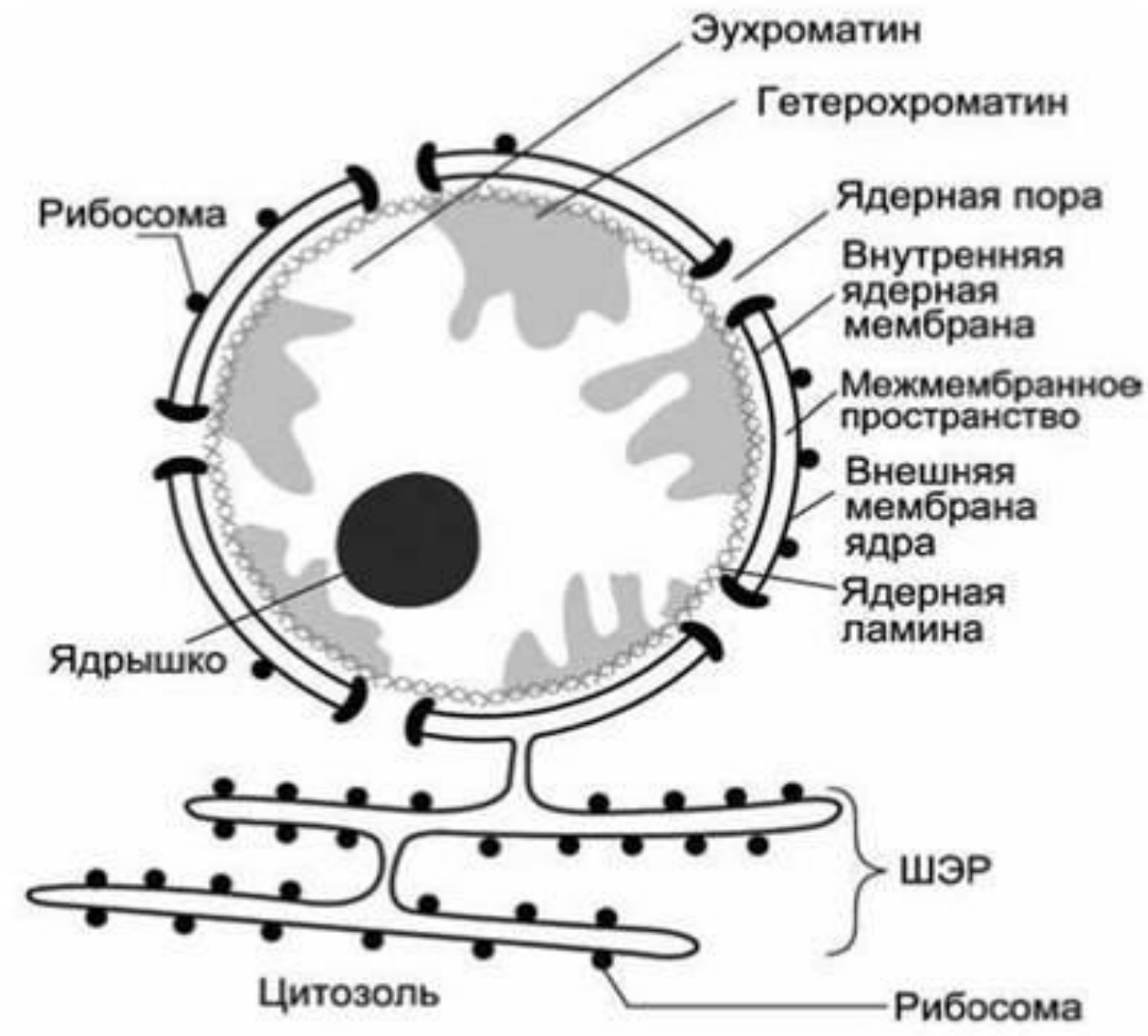
3) Контроль клеточного деления и передачи ГИ от клетки – к клетке:

Репликация ДНК и митоз

4) Биогенез рибосом

Строение ядра

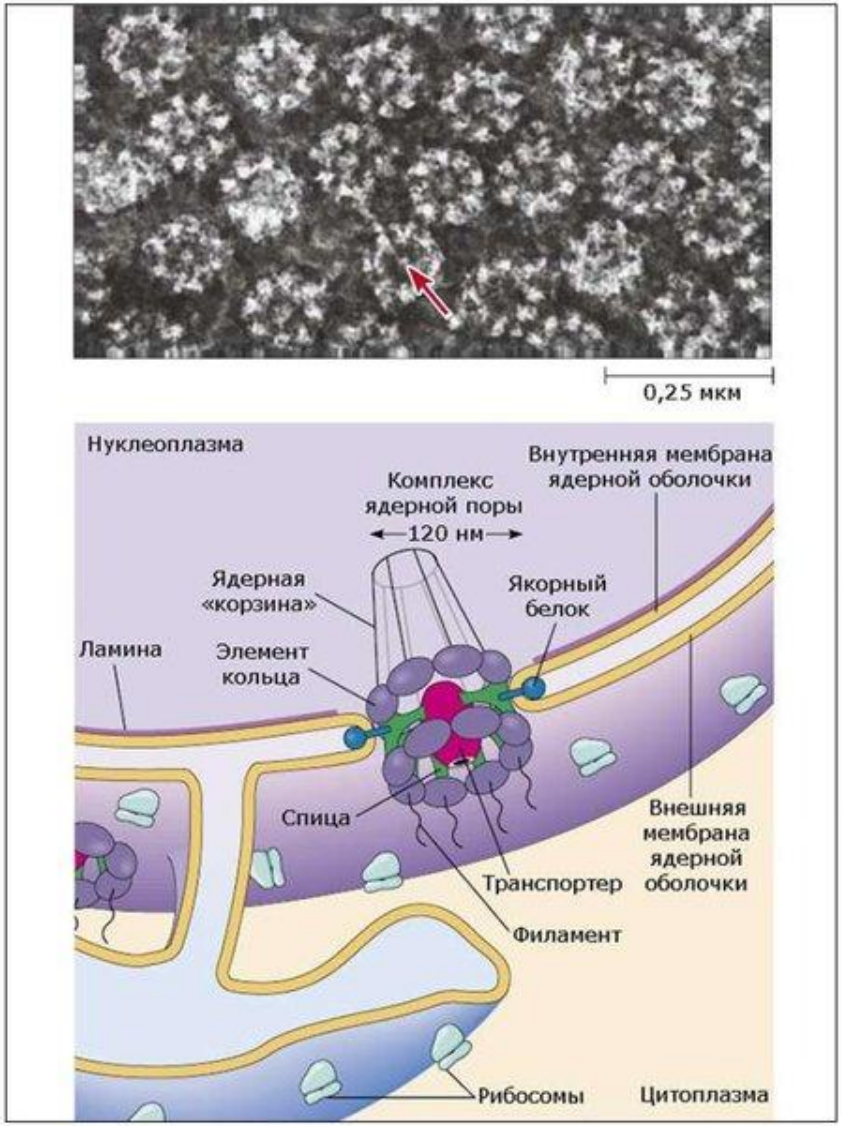
1) Ядерная оболочка:
   - Внешняя ядерная мембрана
   - Внутренняя ядерная мембрана
   - Перинуклеарное пространство
   - Поровый комплекс
   - Ядерная ламина
2) Кариоплазма
   - Лабильная фаза
   - Ядерный матрикс
3) Ядрышки
4) Хроматин
   - Эухроматин
   - Гетерохроматин

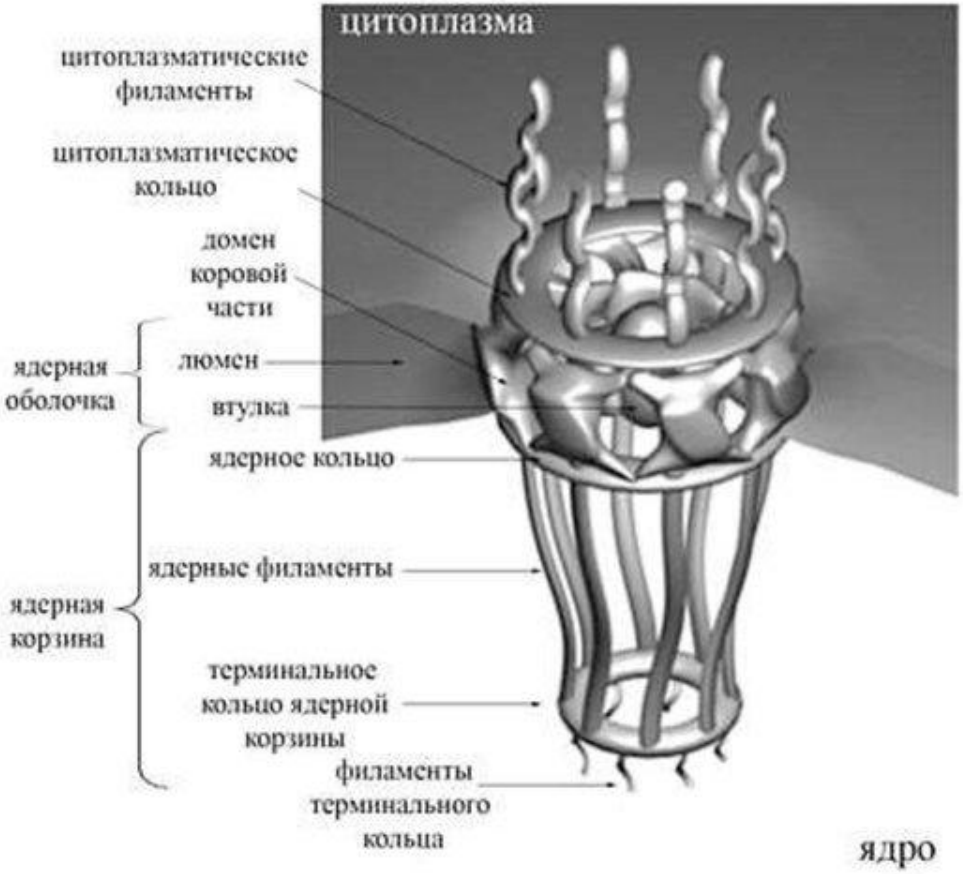

Эухроматин
Гетерохроматин
Рибосома
Ядерная пора
Внутренняя ядерная мембрана
Межмембранное пространство
Внешняя мембрана ядра
Ядерная ламина
Ядрышко
ШЭР
Цитозоль
Рибосома

1. Ядерная оболочка

- Состоит из двух мембран липопротеиновой природы
- Внешняя мембрана продолжается в мембраны шЭПС, на ней могут быть рибосомы
- Поры образованы тремя слоями белков нуклеопоринов и работают по принципу диафрагмы фотоаппарата
- Количество пор неодинаково и зависит от возраста клетки, её активности и состояния.

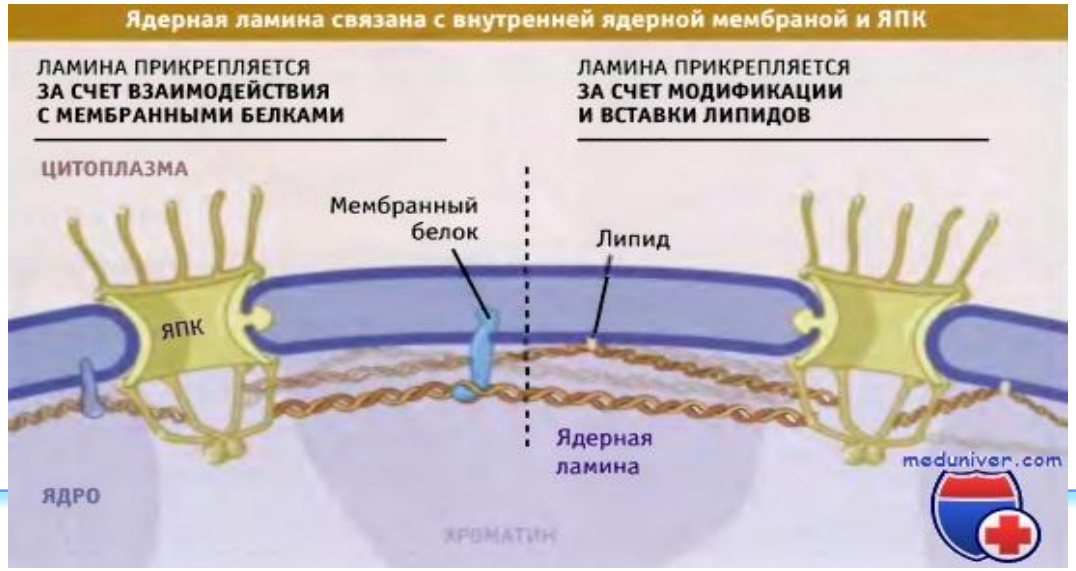
Комплекс ядерной поры



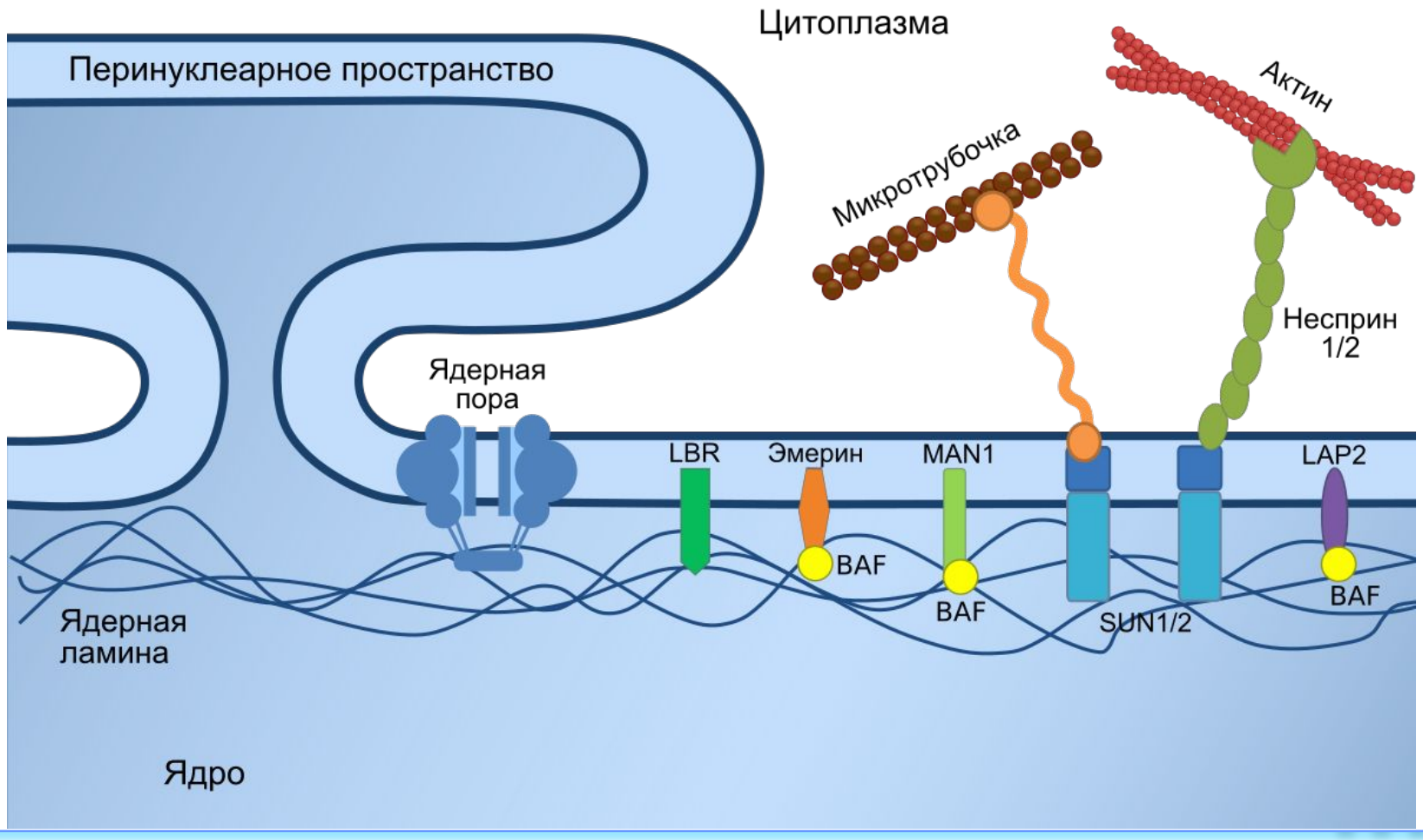


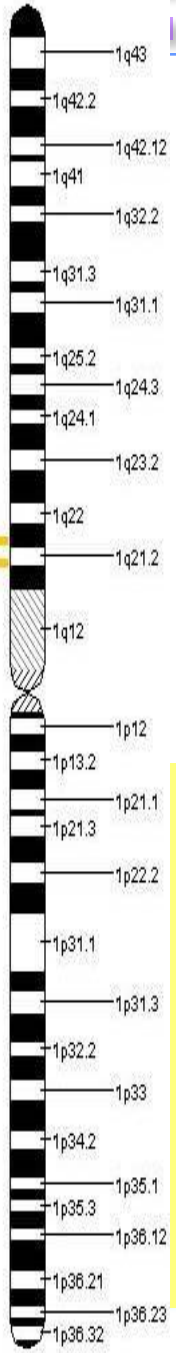
Ядерная ламина (1)

- Поддерживает целостность и форму ядра,
- Отвечает за дезинтеграцию и реорганизацию ядерной оболочки в процессе митоза,
- Отвечает за упорядоченное расположение хромосом в интерфазном ядре и фиксацию хроматиновых нитей в интерфазе,
- Участвует в образовании порового комплекса

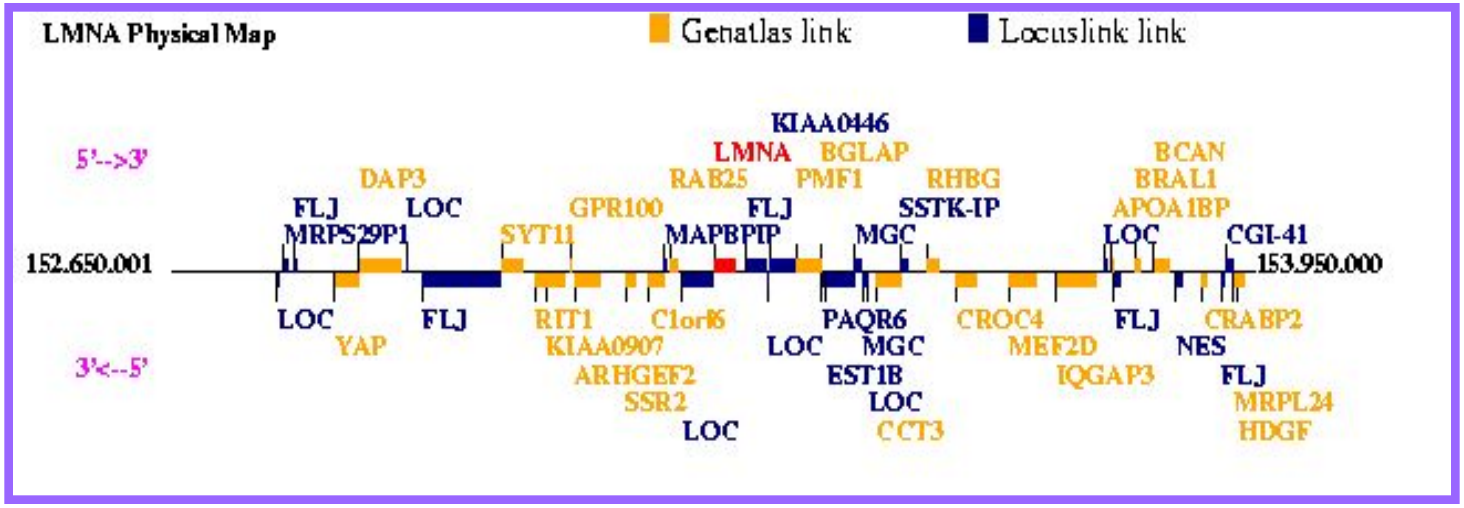


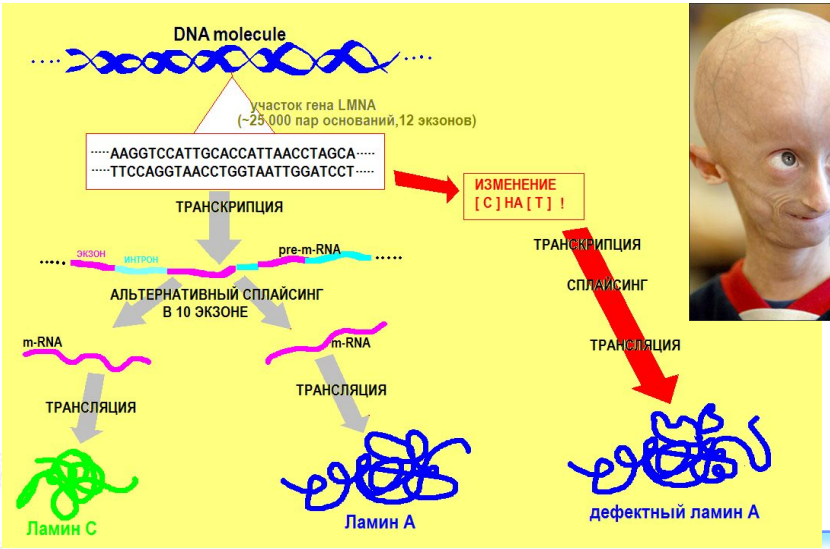
Ядерная ламина (2)

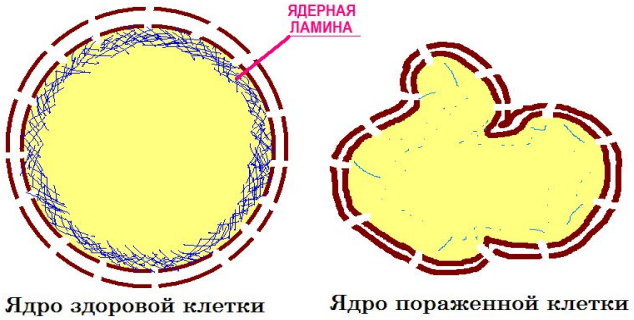




LMNA - нормальный ген







Ядерная ламина, болезни и старение человека

- **Мутации гена ламина A/C (LMNA) у пациентов с дилатационной кардиомиопатией и их фенотипические проявленияю -** Вайханская Т.Г., Сивицкая Л.Н., Даниленко Н.Г., Курушко Т.В., Давыденко О.Г. Евразийский кардиологический журнал @eurasian-cardiology-journalВайханская Т.Г., Сивицкая Л.Н., Даниленко Н.Г., Курушко Т.В., Давыденко О.Г. Евразийский кардиологический журнал @eurasian-cardiology-journal, 1, 2016 г.

- Burke B, Stewart CL. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3:575-585

- Mattout A, Dechat T, Adam S A, Goldman and Gruenbaum Y. Nuclear lamins, diseases and aging//Current Opinion in Cell Biology 2006,18:335-341

- Worman H., Ostlund C., Wang Y. Diseases of the nuclear envelope. Cold Spring Harb Perspect. Biol 2010; 2:760-776

2. Кариоплазма и ядерный матрикс

- внутреннее содержимое ядра,
- содержит жидкую фракцию и матрикс
- жидкая фракция ядра (вода, растворимые белки, нуклеотиды, мРНК, тРНК и др.)

- Функции кариоплазмы: 1) поддержание постоянства внутриядерной среды;
- 2) обеспечение условий для внутриядерных транспортов и перемещений;
- 3) обменные процессы с цитоплазмой

Ядерный матрикс

- Собственно матрикс (нерастворимые белки – негистоны, ферменты, нуклеоплазмины, матрины и др.)
- Внутриядерная сеть фибриллярных и гранулярных компонентов, участвующих в молекулярных процессах в ядре, а также в поддержании и расположение хромосом в ядре.

Функции ядерного матрикса

- Обеспечивает форму и внутреннюю организацию ядра
- Пространственное распределение хроматина и его конденсация (упаковка)
- Передвижение субчастиц рибосом

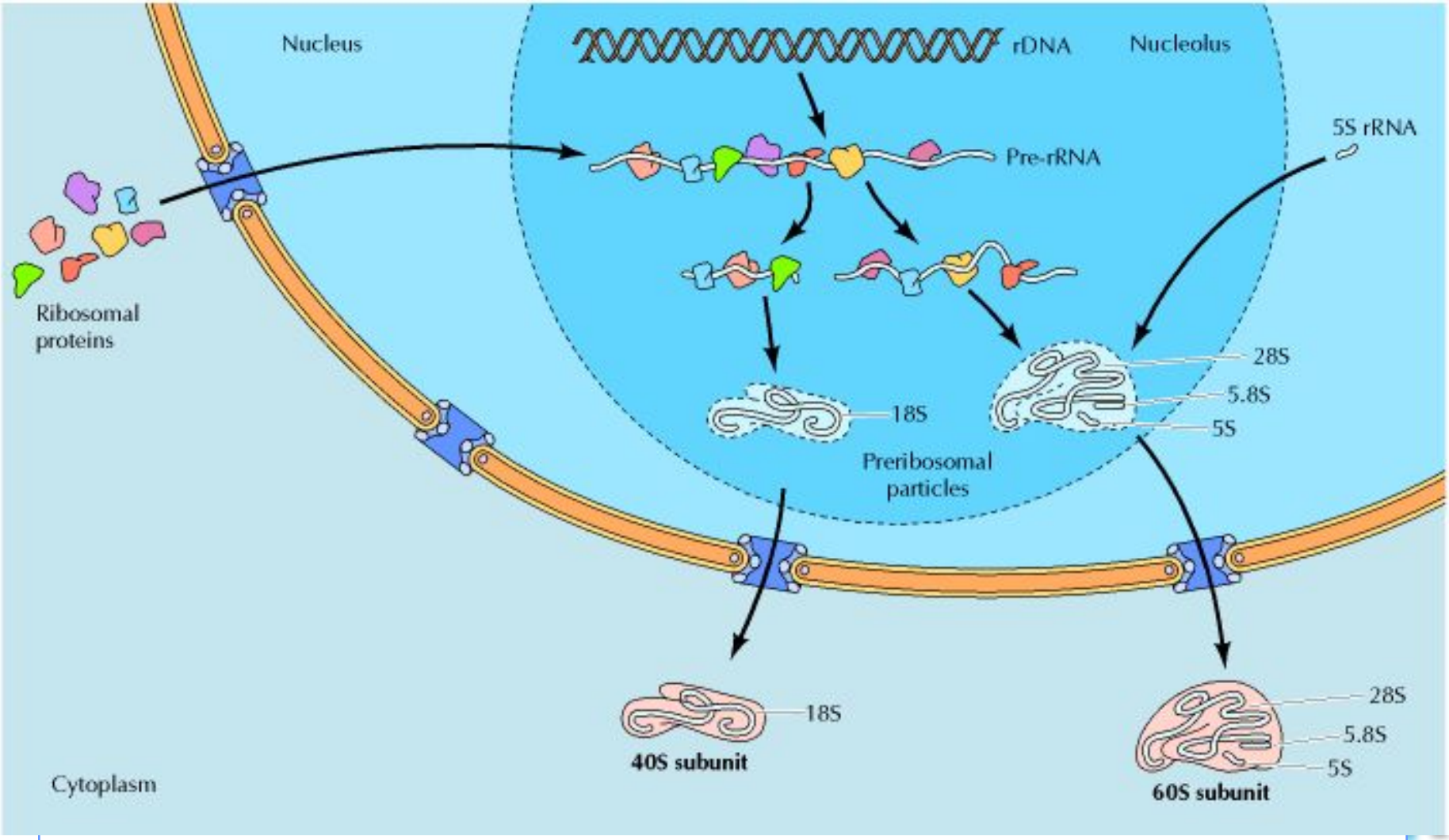
3. Ядрышко

- Ядрышковый организатор – фрагменты ДНК содержащие информацию о рРНК;
- рРНК: первичные транскрипты 45S; рРНК 5S, рРНК 5,8S, рРНК 18S, рРНК 28S;
- Рибосомные белки;
- Белки аппарата синтеза рРНК;
- RNP 40S и 60S.

Ядрышко –

область биогенеза рибосом:

- Транскрипция рибосомных генов и синтез про-рРНК (45S);
- Процессинг про-рРНК 45S с образование 3-х фракции рРНК: 5,8S + 18S + 28S;
- Образование RNP:
  - рРНК 18 S + 33 рибосомных белков = 40S – малая рибосомная субчастица;
  - рРНК 28 S + рРНК 5,8 S + рРНК 5 S + 49 рибосомальных белков = 60S – большая рибосомная субчастица


Nucleus
rDNA
Nucleolus
5S rRNA
Pre-rRNA
Ribosomal proteins
28S
5.8S
5S
18S
Preribosomal particles
18S
40S subunit
28S
5.8S
5S
60S subunit
Cytoplasm

Нобелевская премия в области химии 2009 года

- ***«за изучение структуры и функций рибосом“***

- Venkatraman Ramakrishnan, MRC Laboratory of Molecular Biology , Cambridge, United Kingdom
- Thomas A. Steitz, Yale University New Haven, CT, USA; Howard Hughes Medical Institute
- Ada E. Yonath, Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel

4. ХРОМАТИН $\underset{\text{телофаза}}{\overset{\text{профаза}}{\rightleftarrows}}$ ХРОМОСОМЫ

- Хроматин – это частично упакованный генетический материал в интерфазе;
- Хромосома – максимально упакованный генетический материал в митозе.
- Химический состав:
  - 30% ДНК + 40% гистоны + 25% негистоновые белки + 5% РНК

Хромосомная ДНК – содержит, передает и реализует ГИ;

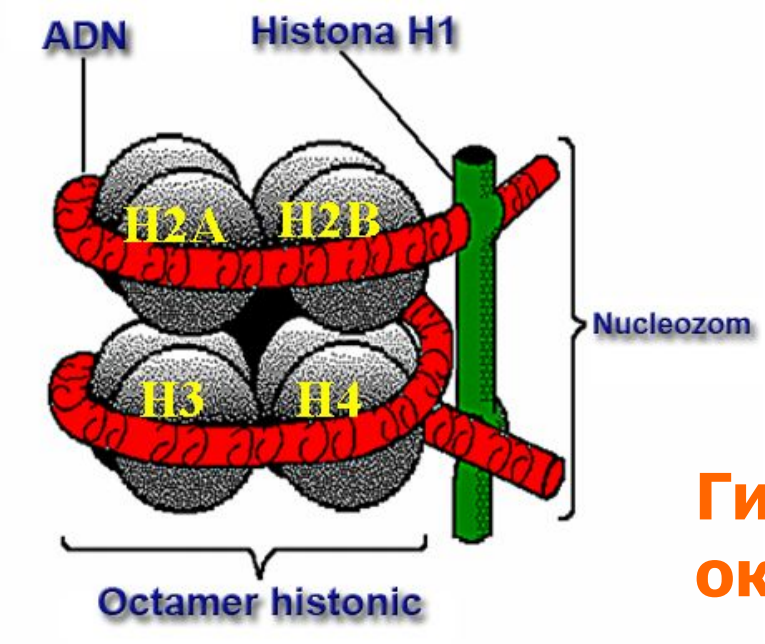
- Длинные, линейные молекулы;
- Гетерогенные молекулы:
  - Кодирующие последовательности (гены):
    - Активные – транскрибируемые;
    - Неактивные – нетранскрибируемые.
  - Некодирующие последовательности:
    - Структурные – теломеры, центромеры, сателлиты;
    - Регуляторные

Гистоновые белки:

- Глобулярные
- Богатые Liz и Arg;
- 5 классов: H1, H2A, H2B, H3, H4
- Функция:
  - Упаковка ДНК на нуклеосомном уровне
  - Неспецифичный контроль экспрессии генов

Тип гистонов	Характерные аминокислоты	К-во аминокислот	Конформация белка
H1	Liz	215	NH_2 COOH
H2A	Leu, Liz	129	NH_2 COOH
H2B	Ser, Pro, Liz	125	NH_2 COOH
H3	Arg, Cis	135	NH_2 COOH
H4	Arg, Liz	102	NH_2 COOH

Гистоновые белки



ДНК + гистоны = нуклеосома

a. Нуклеосомное ядро:

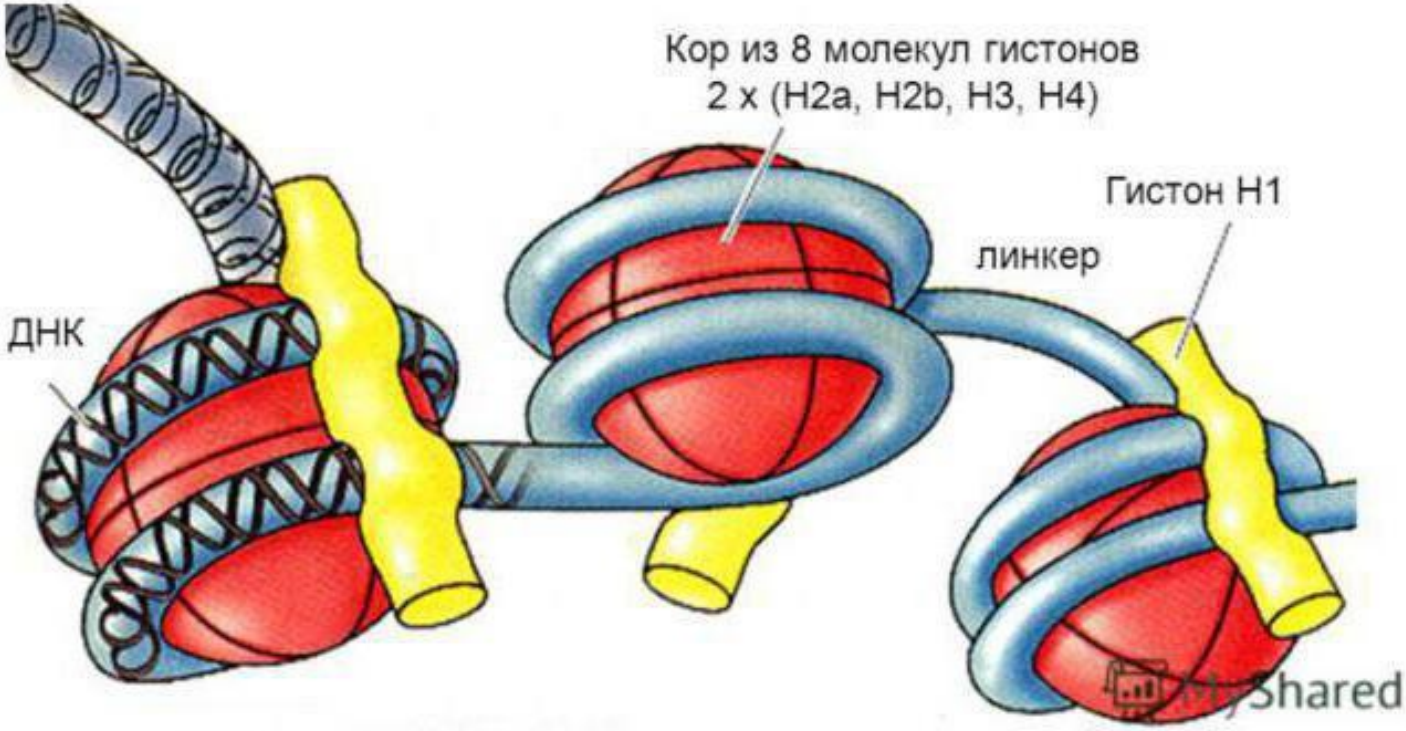
Гистоновый октамер

- $2H_2A$
- $2H_2B$
- $2H_3$
- $2H_4$

b. 200 п.о. нуклеосомная **ДНК**

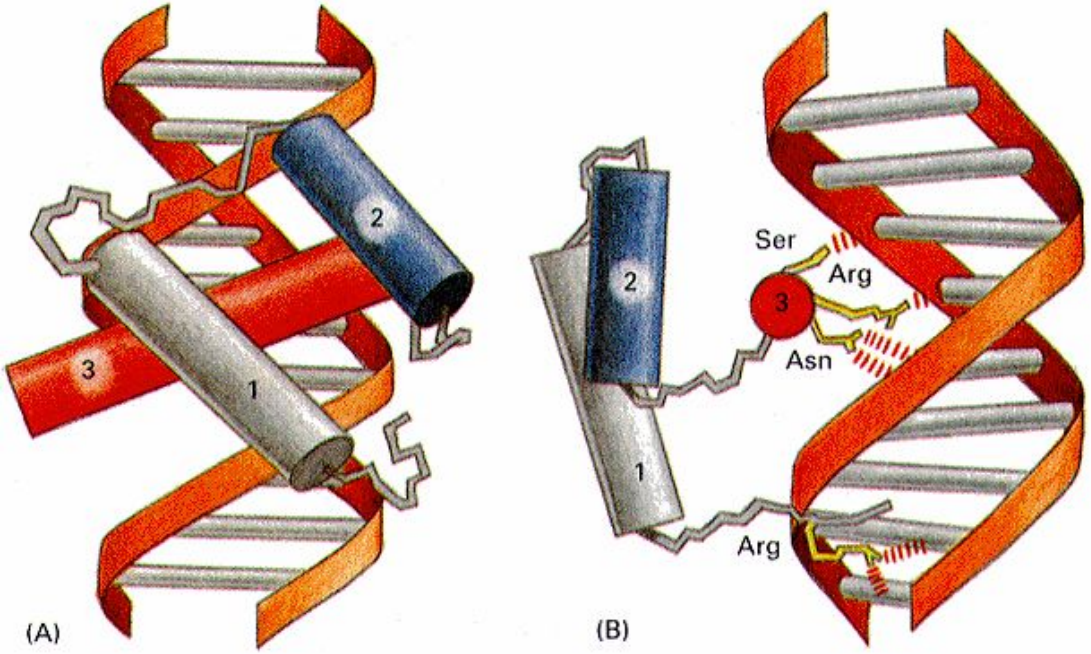
c. H1 – стабилизирует DNP

Строение нуклеосомы



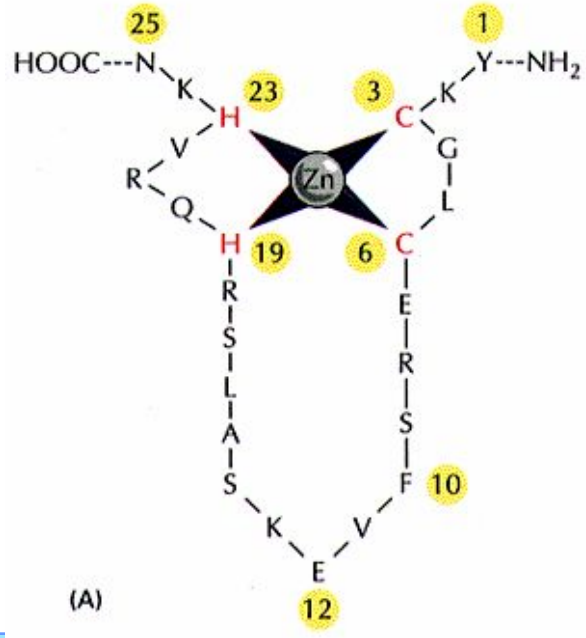
Негистоновые белки

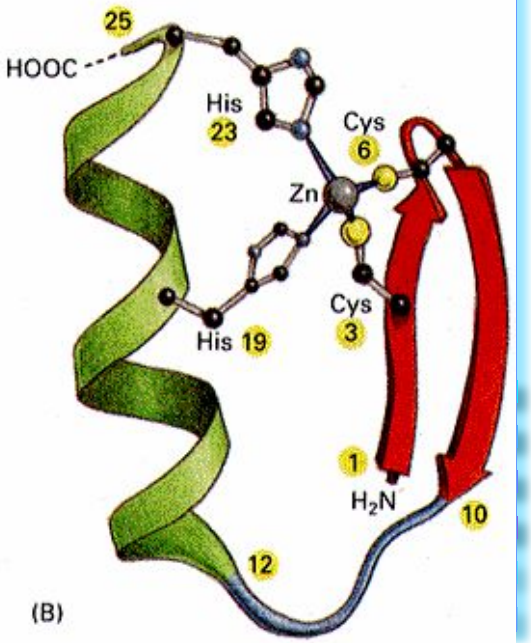
- Крайне гетерогенные белки;
- Ядерные ферменты для:
  - репликации (праймаза, ДНК-пол., ДНК-лиг.);
  - репарации (эндонуклеазы, ДНК-пол);
  - транскрипции (РНК-пол., факторы транскр.);
  - процессинга РНК (рибозимы);
  - биогенеза рибосом (рибосомальные белки)
- Сайт-специфичные белки (SAP, zinc-finger);
- Белки хромосомной оси (scaffold)



Helix-Turn-Helix
"спираль-поворот-спираль".

Zink finger
"цинковые пальцы".

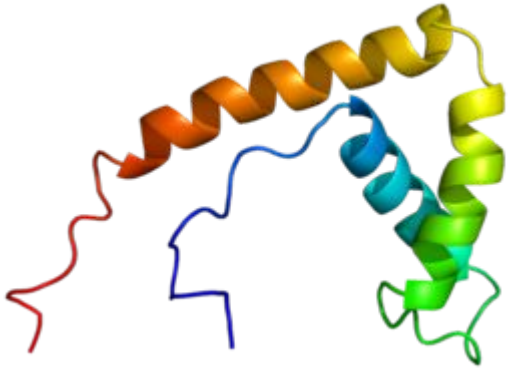




- К группе негистоновых регуляторных белков, которые постоянно ассоциированы с хроматином, относят белки высокой подвижности (**HMG-белки**- от англ, *high mobility gel proteins*).

- Это небольшие белки с молекулярной массой менее 30 кД

- Они характеризуются высоким содержанием заряженных аминокислот.



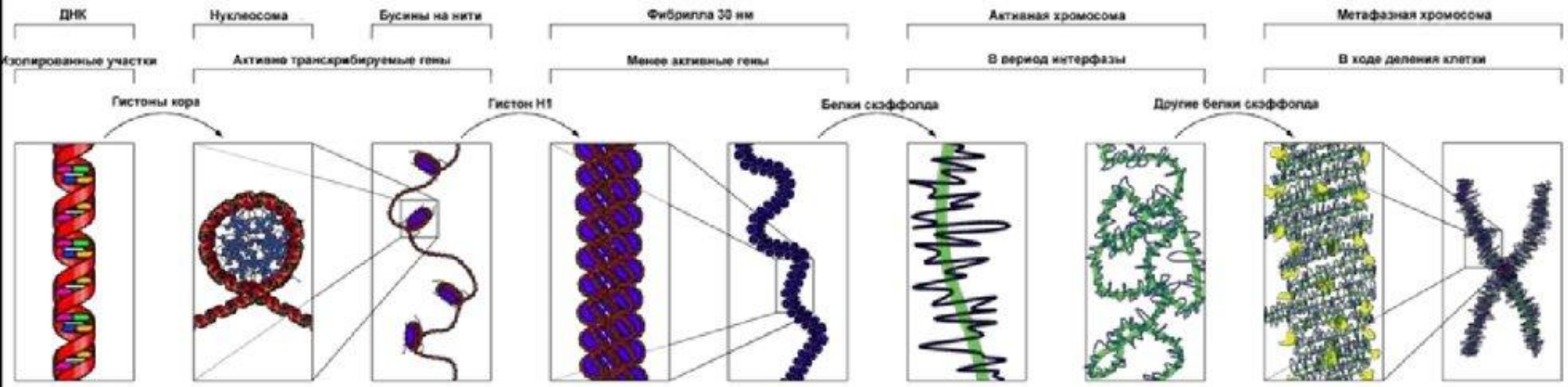
Хромосомная РНК

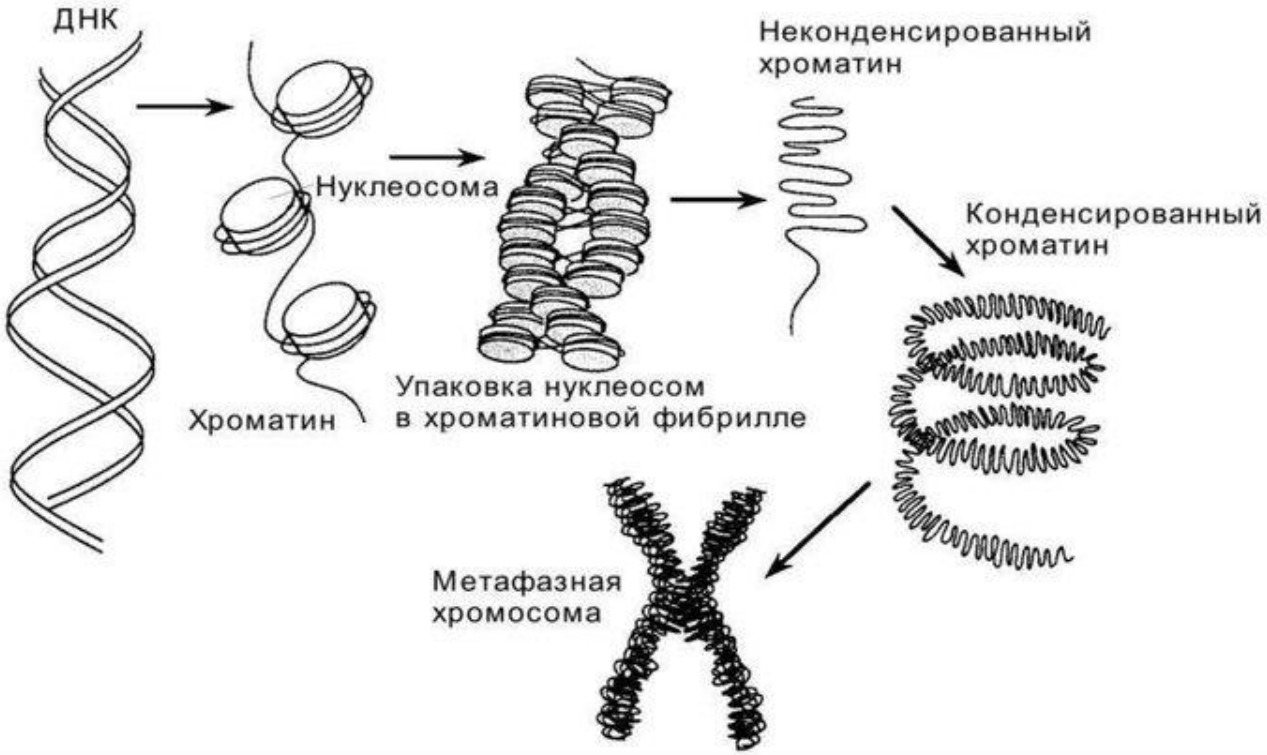
- Первичные транскрипты
- микроРНК в составе ядерных ферментов

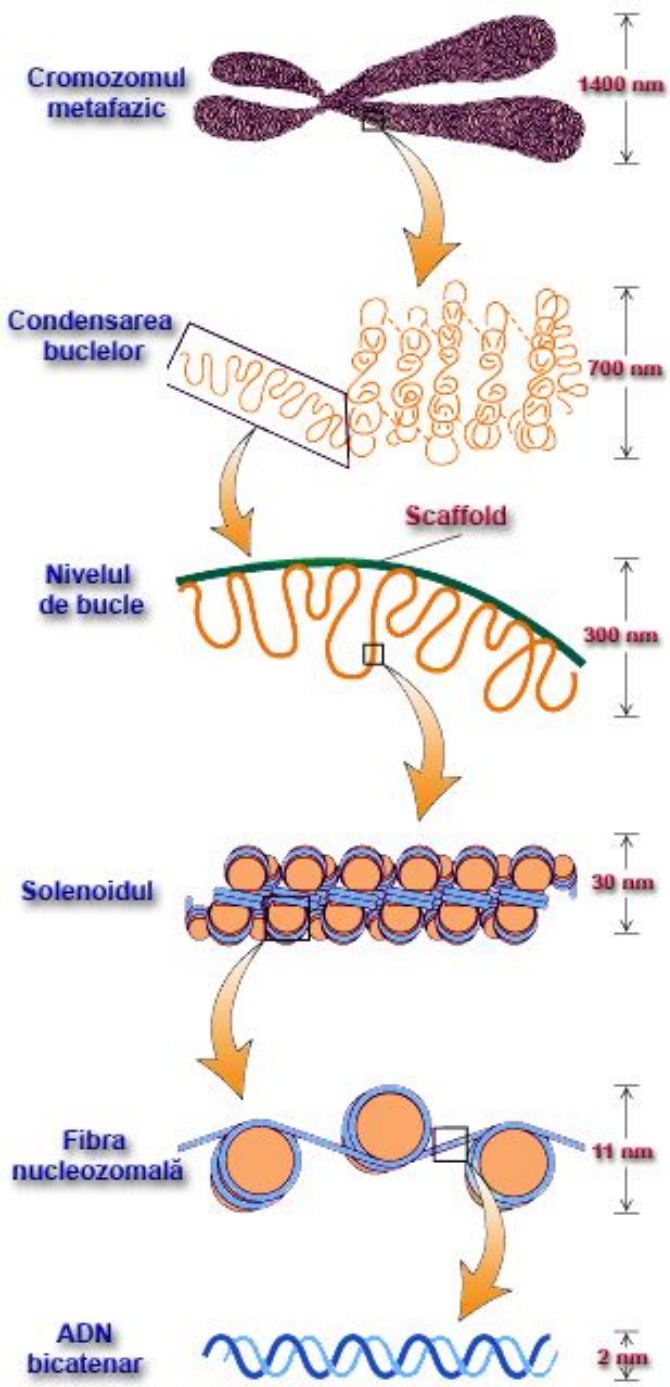
Уровни упаковки ДНК

- I уровень – нуклеосомный = нити хроматина;
- II уровень – соленоид = нити хроматина;
- III уровень – петли
- IV уровень – метафазная хромосома

Уровни компактизации хроматина





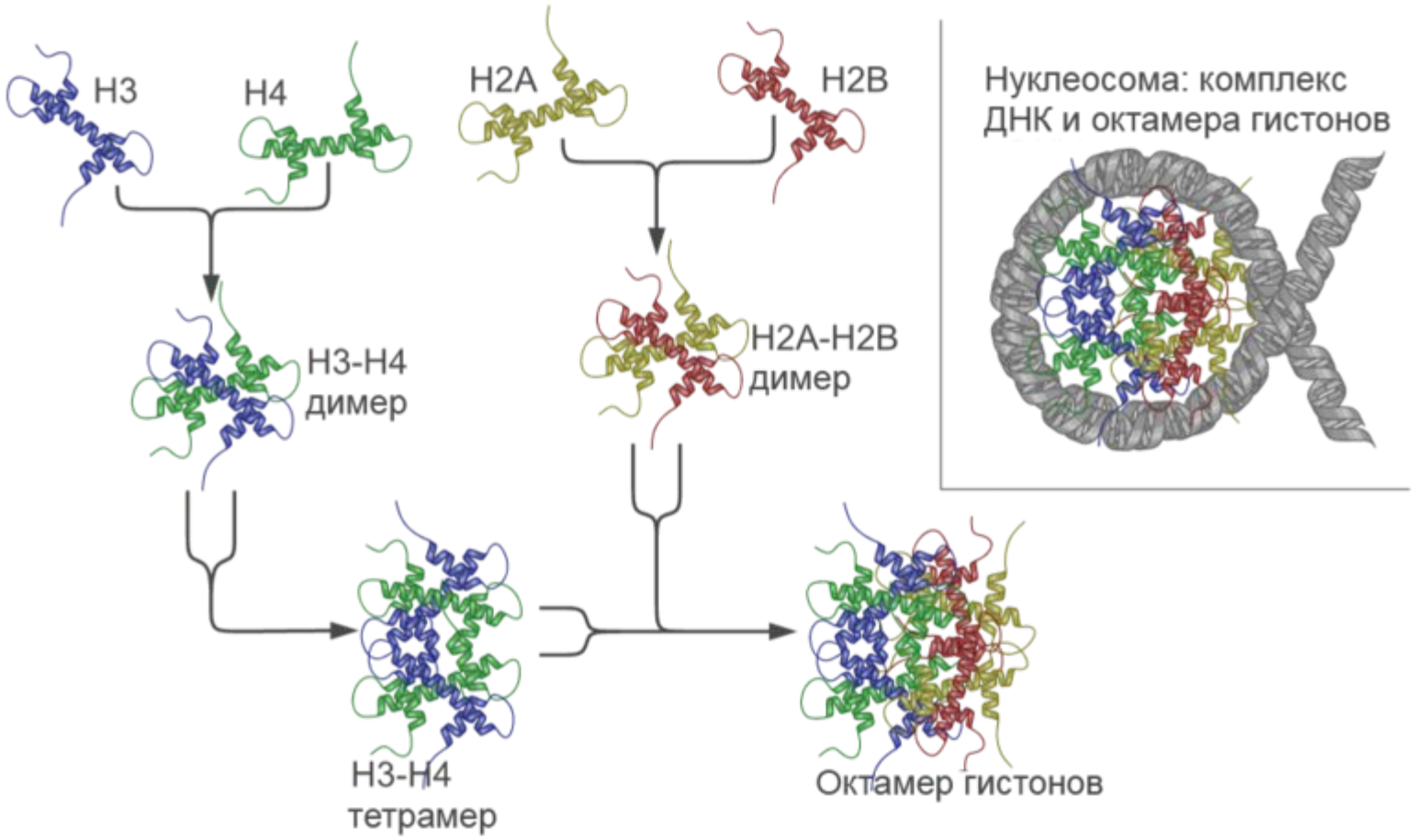


Уровни упаковки отличаются:

- Степенью конденспации ДНК;
- Толщиной хроматиновой нити;
- Механизмом образования;
- Уровнем транскрипционной активности;
- Периодом клеточного цикла.

I уровень- нити хроматина:

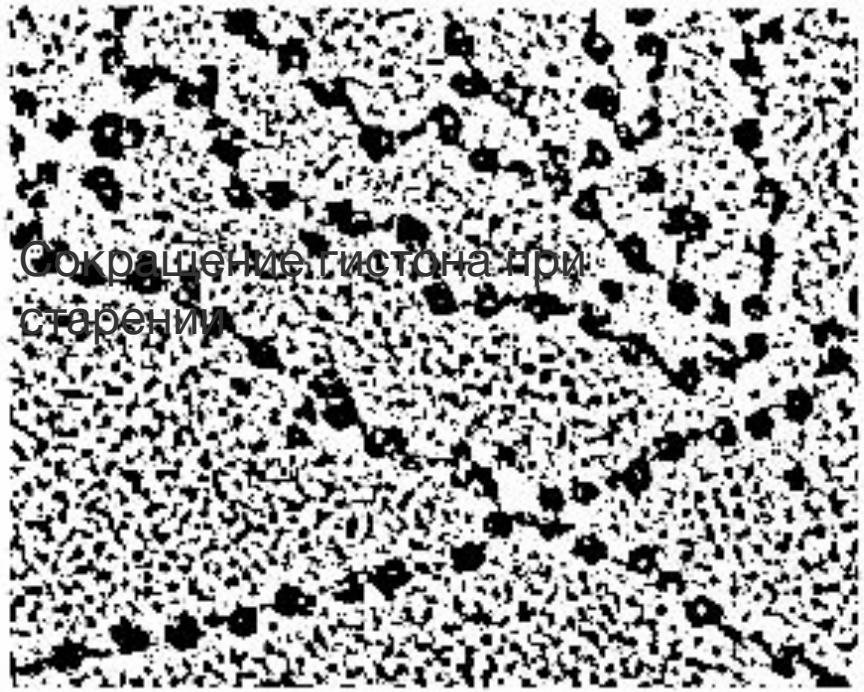
- Полинуклеосомная нить 11nm;
- Степень конденсации – х 6 раз;
- Механизм образования:
  - Взаимодействие ДНК$^{-}$ с гистоновыми основными белками$^{+}$
- Транскрипция - возможна.


H3
H4
H2A
H2B
Нуклеосома: комплекс ДНК и октамера гистонов
H3-H4 димер
H2A-H2B димер
H3-H4 тетрамер
Октамер гистонов

- Гистоны в октамере имеют подвижный N-концевой фрагмент («хвост») из 20 аминокислот, который выступает из нуклеосом и важен для поддержания структуры хроматина и контроля над генной экспрессией.

- Детали механизма регуляции до конца не выяснены.

I уровень- нити хроматина 10 nm



- Некоторые модификации гистонов (фосфорилированиеНекоторые модификации гистонов (фосфорилирование и ацетилированиеНекоторые модификации гистонов (фосфорилирование и ацетилирование) локализованы преимущественно на участках хроматина с активными генами, тогда как их деацетилированиеНекоторые модификации гистонов (фосфорилирование и ацетилирование) локализованы преимущественно на

Zheng Y. et al. Histone H1 phosphorylation is associated with transcription by RNA polymerases I and II (англ.) // The Journal of Cell Biology. — 2010. — Vol. 189, iss. 3. — P. 407.

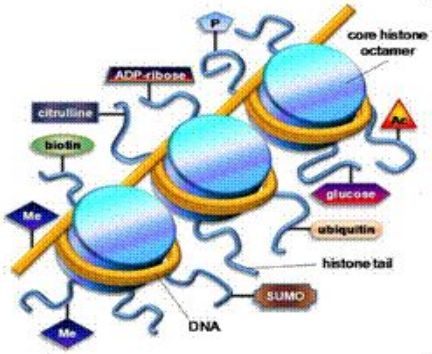
Gerasimova A. et al. Predicting Cell Types and Genetic Variations Contributing to Disease by Combining GWAS and Epigenetic Data (англ.) // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, iss. 1. — P. e54359.

Биологи нашли слабое место в ДНК человека и других животных

- Ученые Института биомедицинских исследований обнаружили, что белок гистон Н1 является основным фактором защиты генома от нестабильности.
- Мутации в гене гистона Н1 могут приводить к гибели организма.
- Сокращение синтеза гистона при старении

Модификации гистонов

Аминокислота	Модификация
Лизин (K)	Метилирование (Me) Ацетилирование (Ac) Убиквитинирование (Ub) Сумоилирование (Su) Рибозилирование (Rib)
Аргинин (R)	Метилирование (Me)
Серин (S) Треонин (T) Цистеин (C)	Фосфорилирование (P)



- Метилирование H3 (Lys4) – активная экспрессия гена
- Метилирование H3 (Lys9) – атенуация транскрипции
- Ацетилирование гистонов – расплетание хроматина, транскрипция
- Дезацетилирование гистонов – упаковка хроматина, инактивация транскрипции
- Фосфорилирование H1 – сверхконденсация ДНК
- Дефосфорилирование H1 – деконденсация хроматина

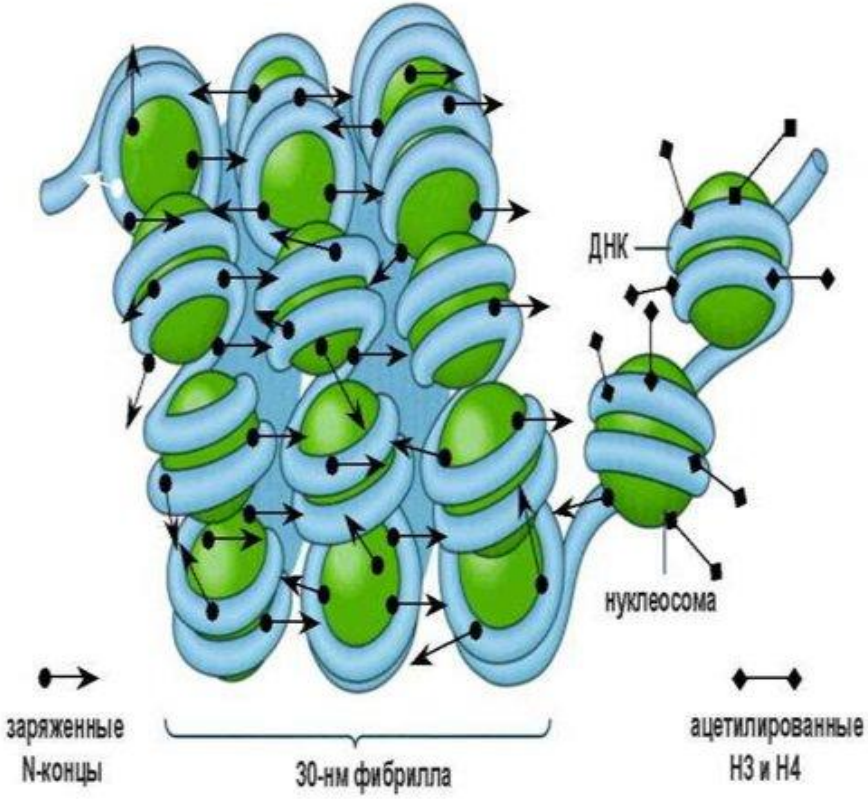
Пора переходить от слов к делу…

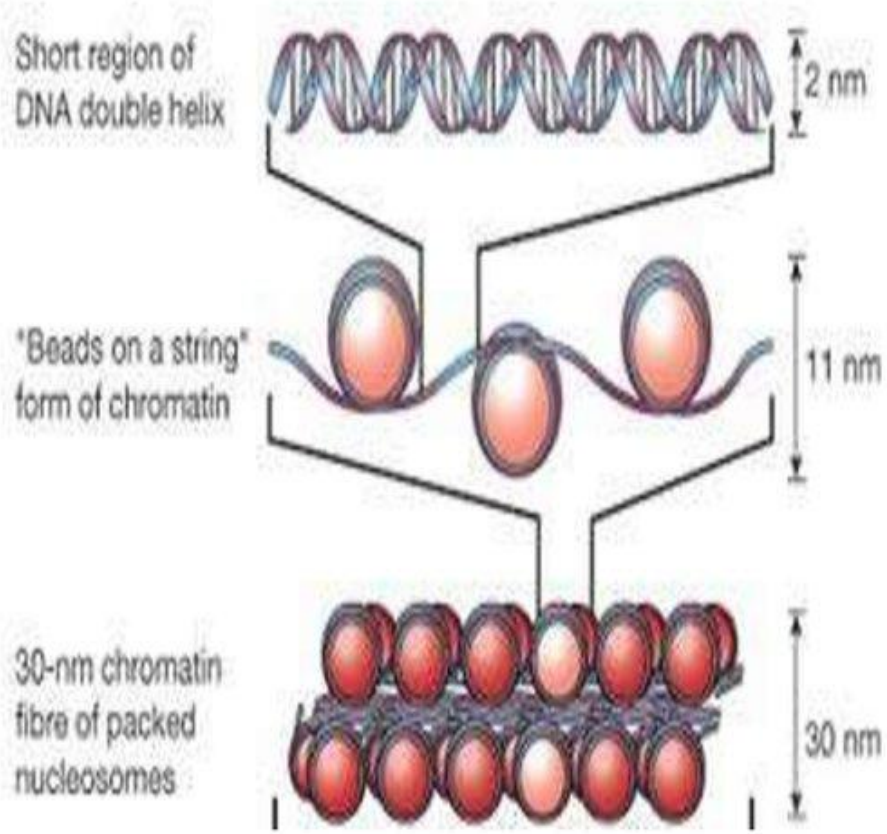
- Как повлиять на ацетилирование гистонов для защиты от стресса и старения, для борьбы с онкологическими заболеваниями?
- Каков точный механизм участия фосфорилирования гистонов в возникновении онкологических заболевания и старении?
- Как можно повлиять на механизмы модификации гистонов с целью достижения терапевтического эффекта при лечении возрастассоциированных заболеваний?

II уровень – соленоид

- Нить хроматина 30 nm;
- Степень конденсации – х40 раз;
- Механизм образования:
  - Фосфорилирование Н1 □ сверхспирализация полинуклеосомной нити – по 6 нуклеосом в витке;
- Блокирование транскрипции ДНК.

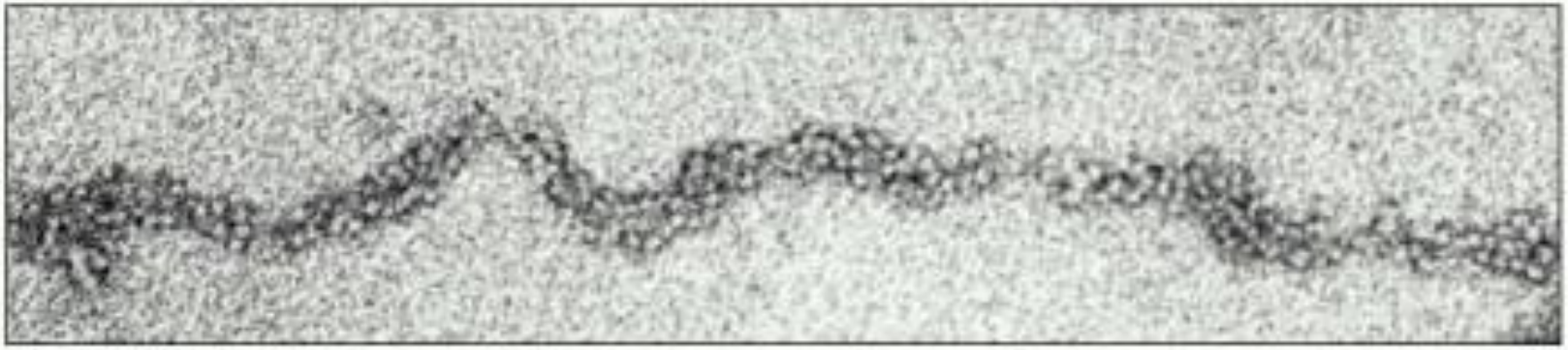
Соленоидная модель.
Нуклеомерная модель.
Второй уровень упаковки хроматина

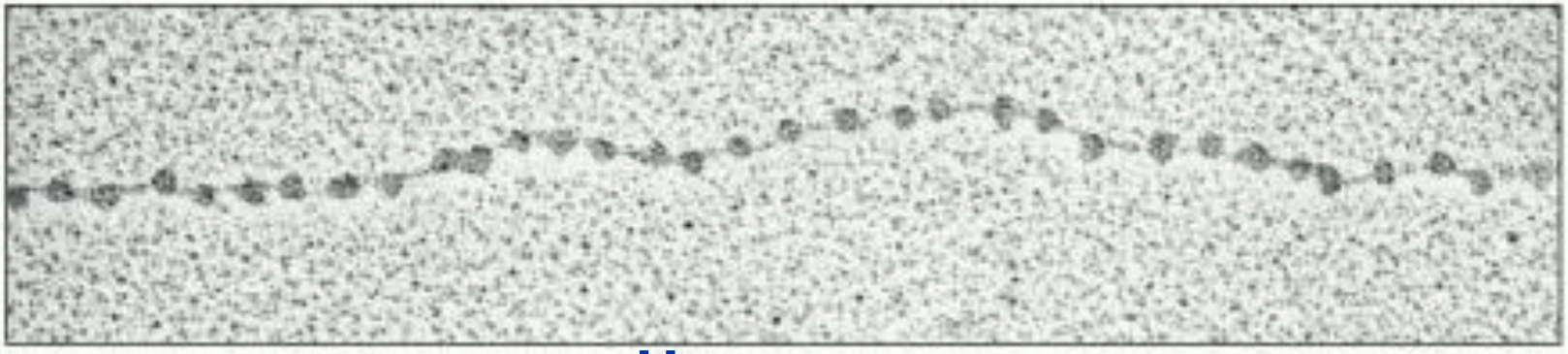




Нить хроматина

Соленоид– 30 nm

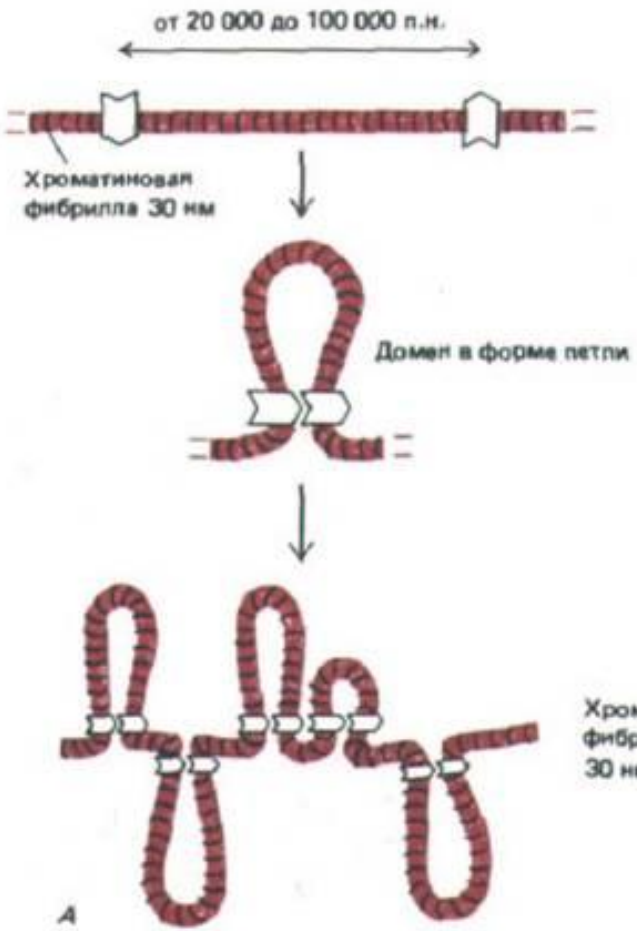


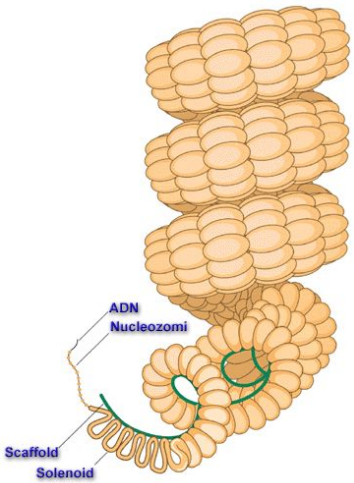


Нуклеосомная нить – 10 nm

III уровень- петли

- Петли большие и малые, диффузные или компактные, толщина – 300 nm;
- Степень конденсации – x600-1000;
- Механизм образования:
  - Прикрепление нити хроматина 30nm к белковой оси – scaffold;
  - Взаимодействие SAR – scaffold
- Транскрипция генов – заблокированна


от 20 000 до 100 000 п.н.
Хроматиновая фибрилла 30 нм
Домен в форме петли
А


ADN
Nucleozomi
Scaffold
Solenoid

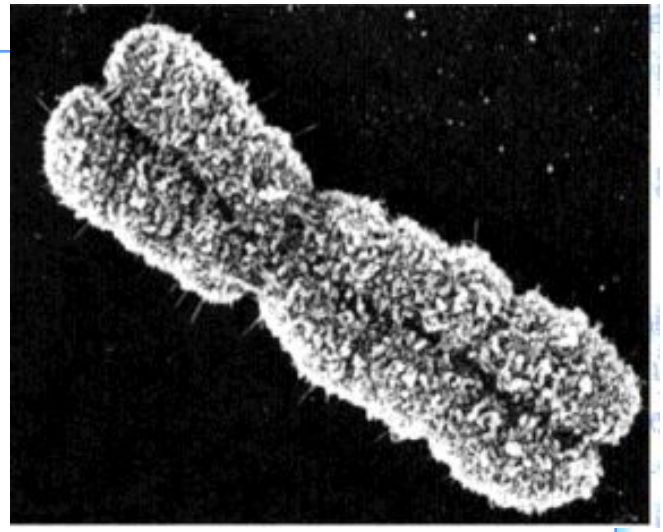
Домен в форме петли
Хроматиновая фибрилла 30 нм
Б
Белки, образующие хромосомную ось

!!! SAR (MAR) - (Scaffold /Matrix Associated Region) – специфические сайты ДНК ответственные за присоединение к *scaffold* – хромосомной оси;

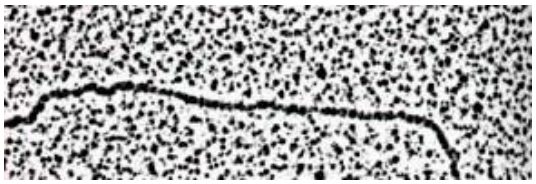
!!! SAP- (Scaffold /Matrix Associated Proteins) - сайт специфические белки взаимодействуют с:

- нитями хроматина;
- обеспечивают III уровень упаковки
- ламиной *lamina fibrosa* с поверхности внутренней мембраны ядерной оболочки.

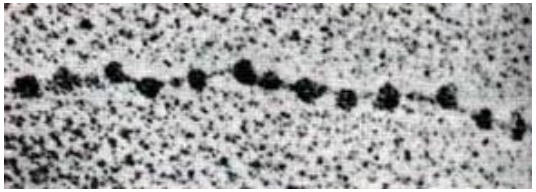
IV уровень – метафазная хромосома

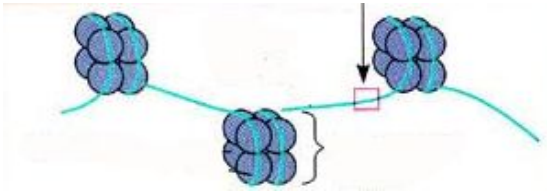


- Наивысший уровень упаковки ДНК – х10000 раз;
- Толщина хроматиды ~700nm;
- Механизм образования:
  - Фосфорилирование ламины --- диссоциация ядерной оболочки;
  - Полное фосфорилирование Н1 – конденсация хроматина.
- Транскрипция заблокирована

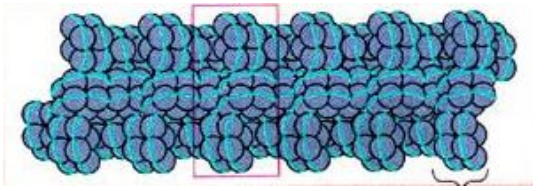


2 nm

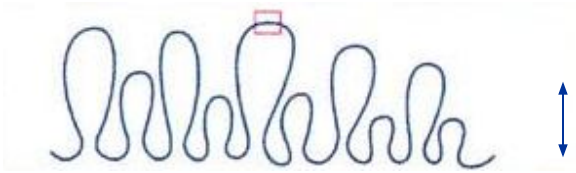




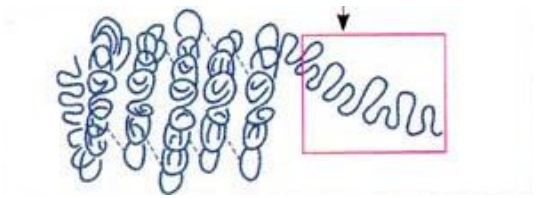
11 nm



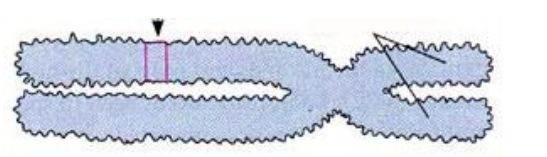
30 nm



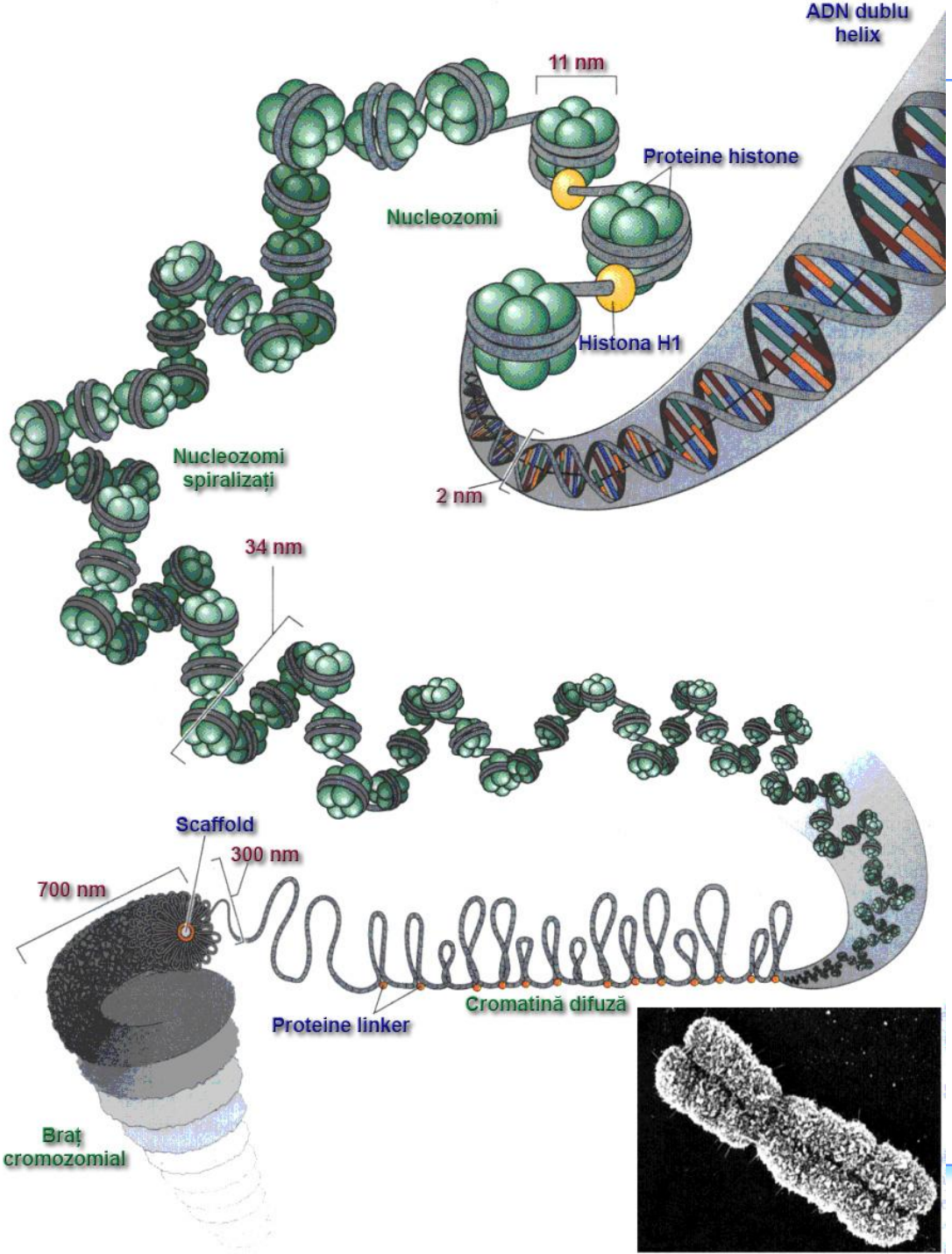
300 nm



700 nm



1400 nm


ADN dublu helix
11 nm
Proteine histone
Nucleozomi
Histona H1
2 nm
Nucleozomi spiralizați
34 nm
Scaffold
300 nm
700 nm
Proteine linker
Cromatină difuză
Braț cromozomial

Период клеточного цикла и степень конденсации хроматина

- Интерфаза:
  - Период G1;
  - Период S;
  - Период G2;
- Митоз:
  - Профаза
  - Метафаза
  - Анафаза
  - Телофаза

I уровень

II уровень

III уровень

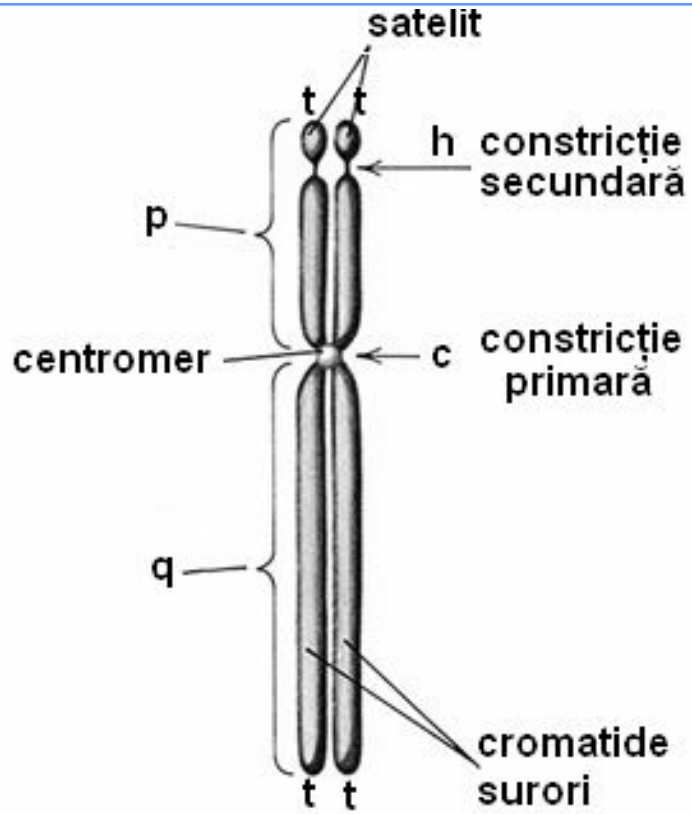
IV уровень

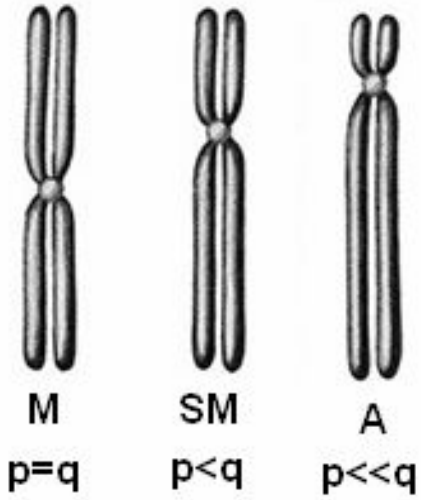
Функциональная классификация хроматина:

- Эухроматин:
  - Активные фрагменты ДНК;
  - Содержит кодогенную ДНК.
- Гетерохроматин:
  - Неактивные фрагменты ДНК;
  - Содержит некодогенную ДНК;
  - Содержит кодогенную ДНК, но неактивную в данный момент;
  - Может быть конститутивным и факультативным.

Гетерохроматин

- Конститутивный:
  - Некодирующая, репетитивная ДНК;
  - Ценромеры, теломеры, сателлиты, спейсеры.
- Факультативный:
  - Кодирующая, неактивная ДНК;
  - Может переходить в эухроматин;
  - Может быть аутосомным или половым;
  - Определяет:
    - **Клеточную дифференциацию;**
    - **Половую дифференциацию;**
    - **Контроль онтогенеза**



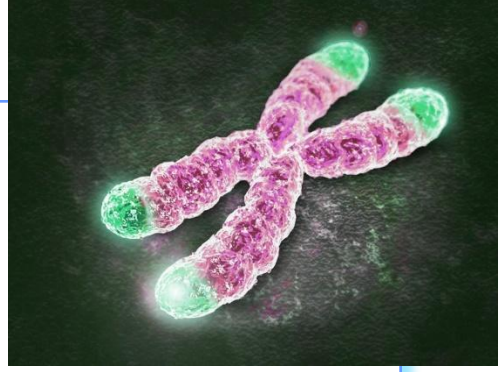


- Центромера = первичная перетяжка
- Теломера

Центромера

- Повторяющиеся последовательности, богатые A/T
- Конститутивный гетерохроматин
- H3 замещен CENP-A
- Связывает хроматиды до анафазы митоза (коэзин)
- Обеспечивает присоединение кинетохоров
- Обеспечивает взаимодействие с веретеном деления

Теломеры

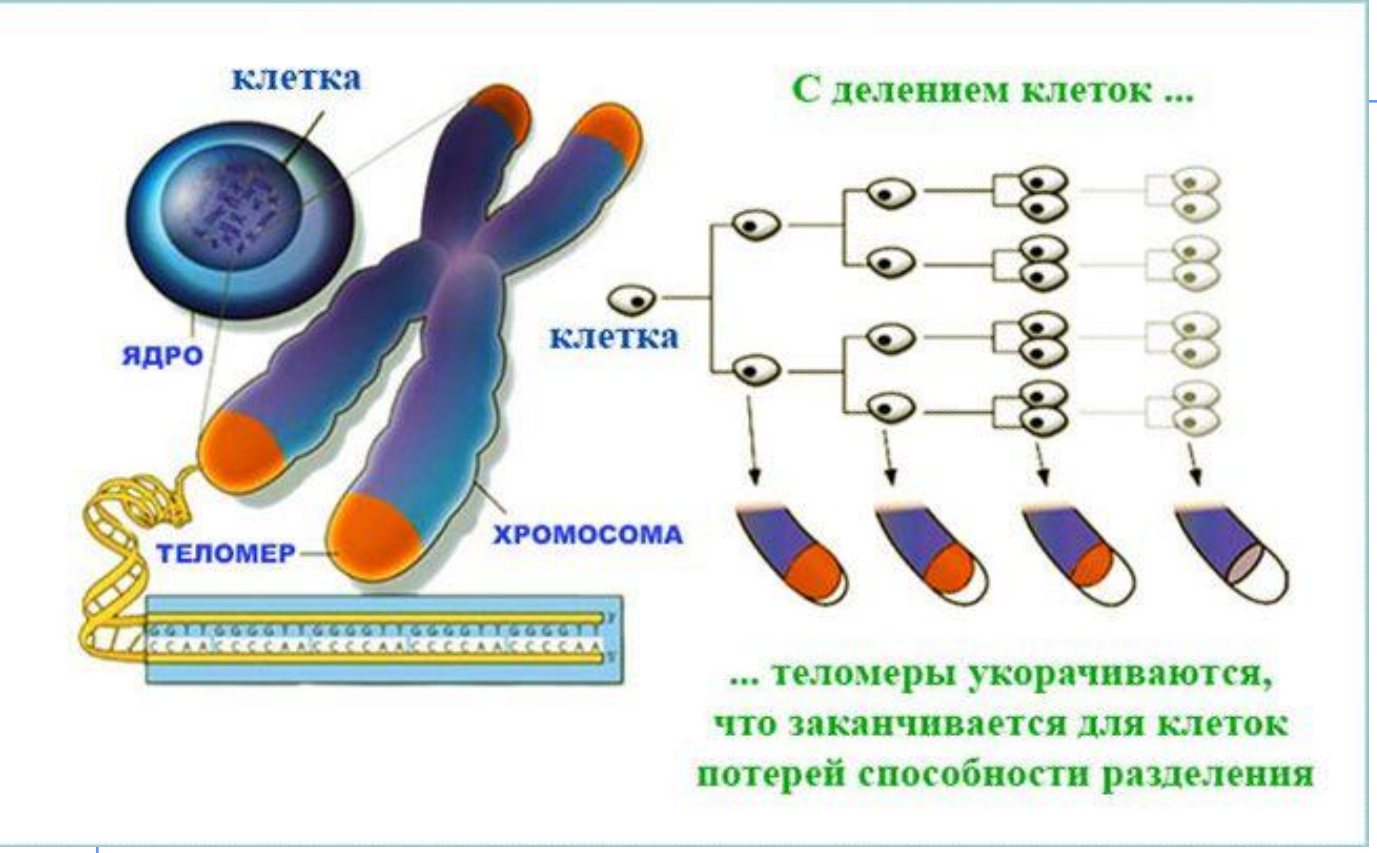


- Участки на концах хромосом, которые не несут генетической информации
- Каждая клетка человека имеет 92 теломеры
- Защищают хромосомы в процессе репликации от деградации и укорачивания
- Обеспечивают целостность хромосом и препятствуют слипанию их концов
- Защищают клетки от мутаций, старения
- Обеспечивают стабильность генома

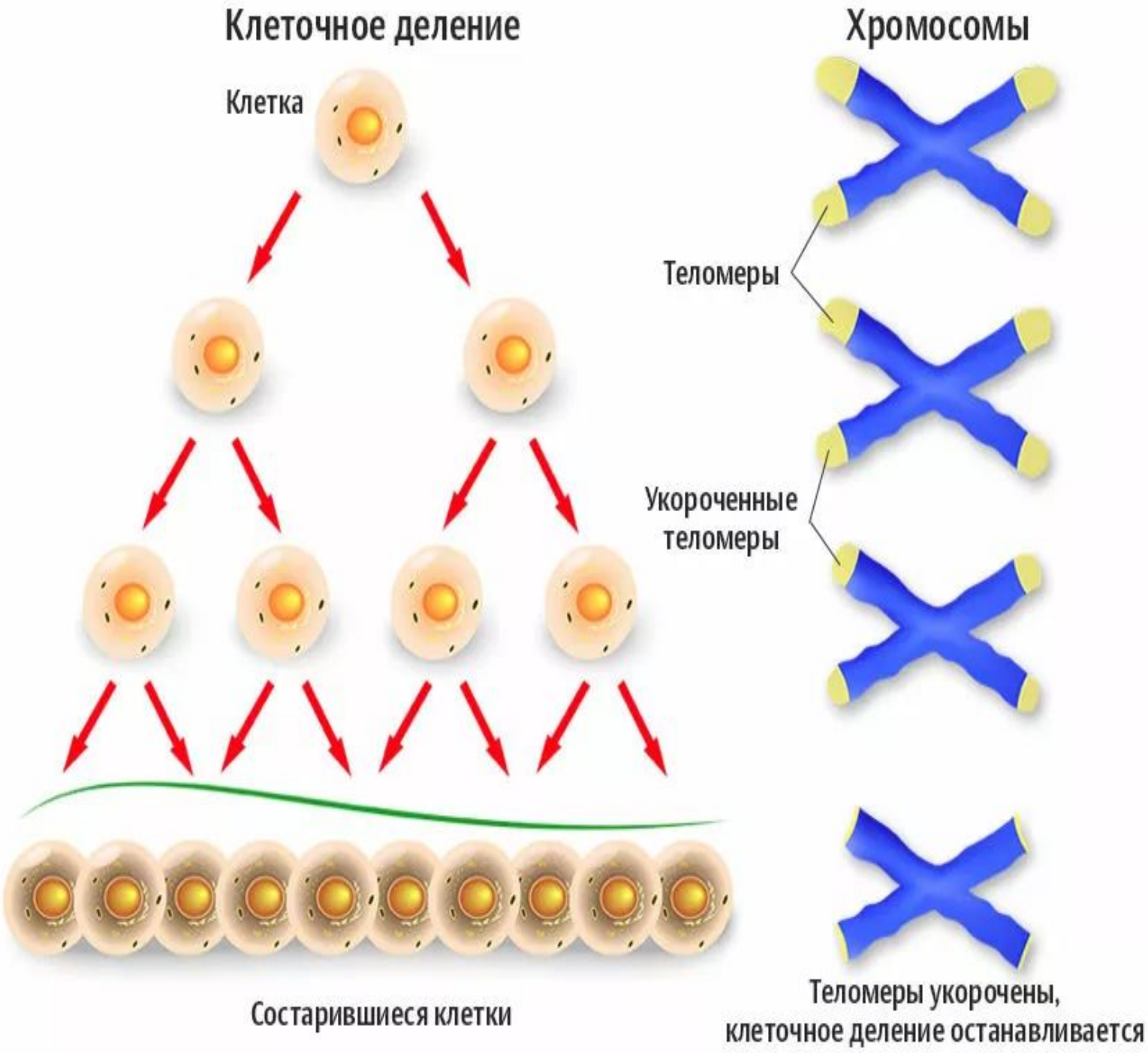
- В 1930 году Герман Меллер и Барбара Мак-Клинток пришли к заключению, что фрагментированные хромосомы склонны к слиянию между собой, при этом нормальные хромосомы поддерживают стабильность благодаря наличию особых концевых участков. Эти концевые участки Меллер назвал теломерами (от греческого “telos” — конец, “meros” — часть).

- В 1961 г. американский ученый, профессор анатомии Калифорнийского университета Леонард Хейфлик обнаружил, что клетки способны делиться лишь ограниченное количество раз. Так было выявлено что количество делений составляет 52 делений.

https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature/5(23).pdf (дата обращения: 03.10.2018)



Сокращение теломеров
с возрастом


Клеточное деление
Хромосомы
Клетка
Теломеры
Укороченные теломеры
Состарившиеся клетки
Теломеры укорочены, клеточное деление останавливается

- В 1971г. Алексей Оловников предложил теорию, которая объясняла механизм работы такого «счетчика» (при матричном синтезе полинуклеотидов ДНК-полимераза не может полностью восстанавливаться).

- 1978год.Э. Блэкберн и Дж. Шостак продемонстрировали, что функция теломер заключается в защите целостности хромосом.

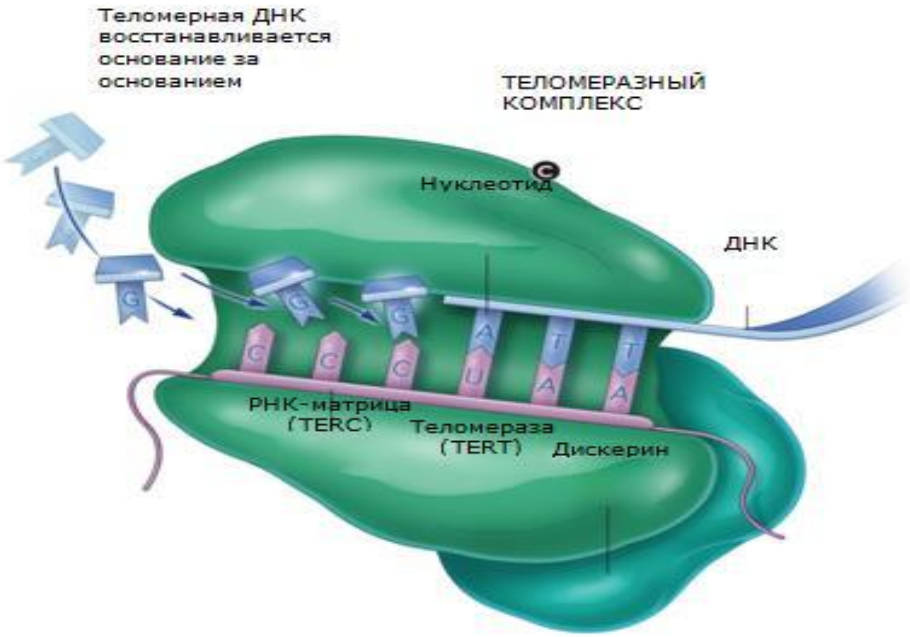
- 1990 год. К.Харли установил связь между сокращением длины теломер и клеточным старением.

- В 1994 году Билл Эндрю***с*** и его команда клонировали первый ген теломеразы.

https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature/5(23).pdf (дата обращения: 03.10.2018)

Теломераза – удивительный фермент

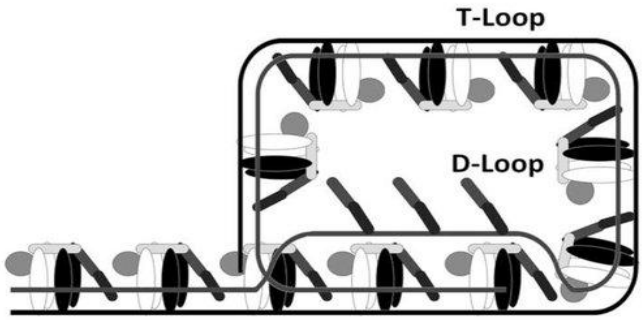
- Способна достраивать короткие теломерные участки
- Состоит из РНК-матрицы и белкового компонента



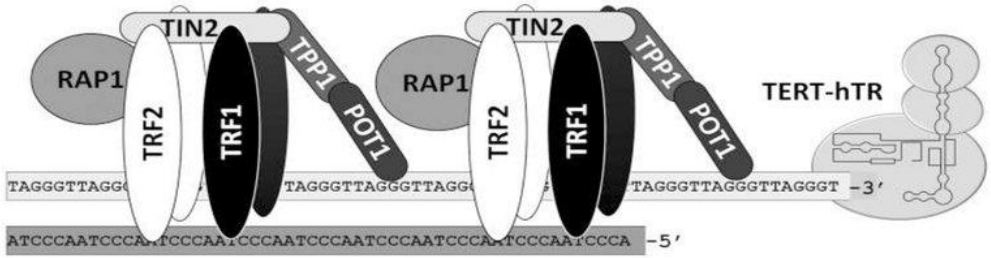
Молекулярная организация теломеров

- Последовательности богатая G/C
- Образует петли на концах хромосом
- У человека теломеры содержат единственный повтор GGGTTA

Теломеры. Строение



- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF. 2012. Telomere structure and telomerase in health and disease. Int J Oncol. 41(5):1561-9.

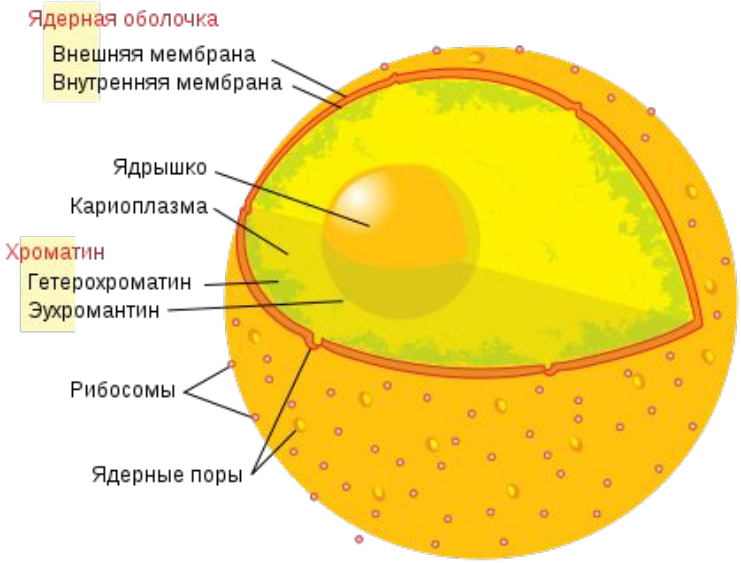
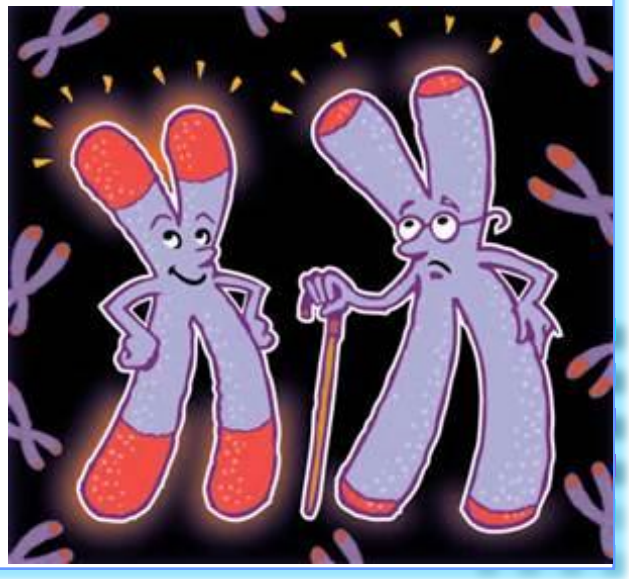


The Nobel Prize in Medicine 2009

- *"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"*
- Elizabeth H. Blackburn, University of California San Francisco, CA, USA
- Carol W. Greider, Johns Hopkins University School of Medicine , Baltimore, MD, USA
- Jack W. Szostak, Harvard Medical School; Massachusetts General Hospital , Boston, MA, USA; Howard Hughes Medical Institute

Функции теломер

- Обеспечивают целостность хромосом и препятствуют слипанию их концов
- Защищают концы хромосом от действия экзонуклеаз
- Защищают хромосомы в процессе репликации от деградации и укорачивания
- Обеспечивают коньюгацию и правильную рекомбинацию хромосом
- Защищают клетки от мутаций, старения
- Обеспечивают стабильность генома



Благодарю за внимание и желаю успехов!