

Организация на прокариотния и еукариотния геном. Кариотип.

Доц. Милена Атанасова, д.б.

Ръководител сектор “Биология”

МУ-Плевен

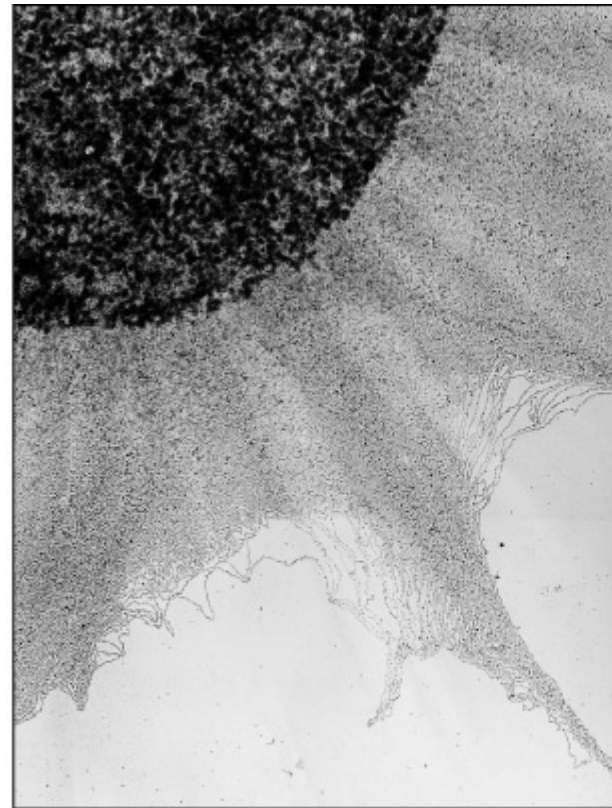
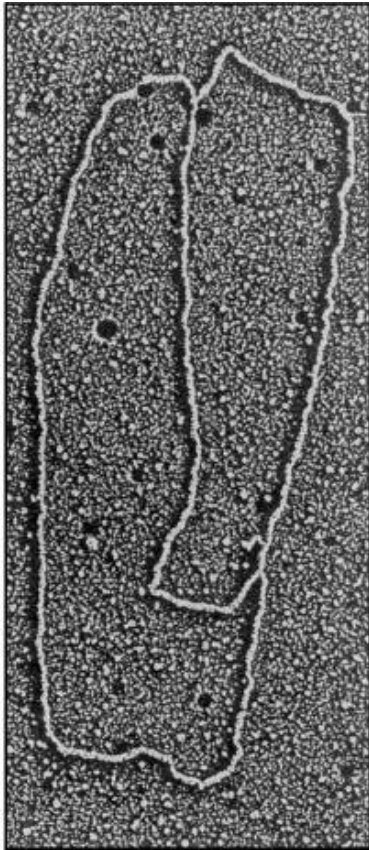
Хромозомната ДНК може да е:

- кръгова (прокариоти)

- линейна (еукариоти)

интерфазни
/релаксирани/

метафазни
/спирализирани/



(A)

10 μm



(B)

1 μm

Прокариотни хромозоми

- 1. Типичните прокариоти имат кръгова, двойноверижна молекула ДНК – една хромозома, но някои притежават няколко по-малки молекули ДНК - **плазмиди**.

Borrelia burgdorferi (Лаймска болест) има 0.91 Mb линейна хромозома и допълнителни 0.53 Mb под формата на 17 различни линейни и кръгови молекули.

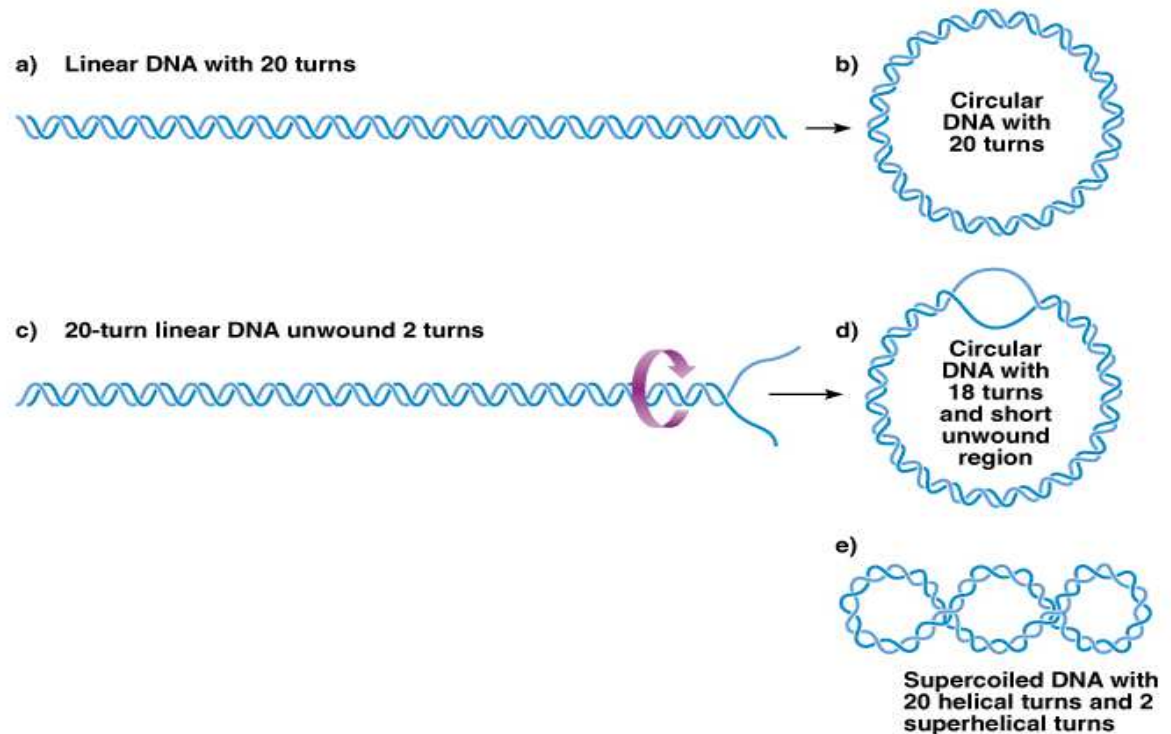
Agrobacterium tumefaciens (заболяване по растенията) има 3.0 Mb кръгова хромозома и 2.1 Mb линейна.

Прокариотни хромозоми

- 2. Archaeobacteria също се различават по организацията на наследствения материал, но се откриват само кръгови молекули ДНК. Примери:
 - а. *Methanococcus jannaschii* - 3 хромозоми от по 1.66 Mb, 58 kb и 16 kb.
 - б. *Archaeoglobus fulgidus* – 1 кръгова хромозома 2.2 Mb.
- 3. Eubacteria и Archaeobacteria нямат отделено с мембрана ядро и се класифицират като прокариоти. ДНК е плътно пакетирана в дадена област в цитоплазмата и се означава като **нуклеоид**.

Суперспирализация на ДНК

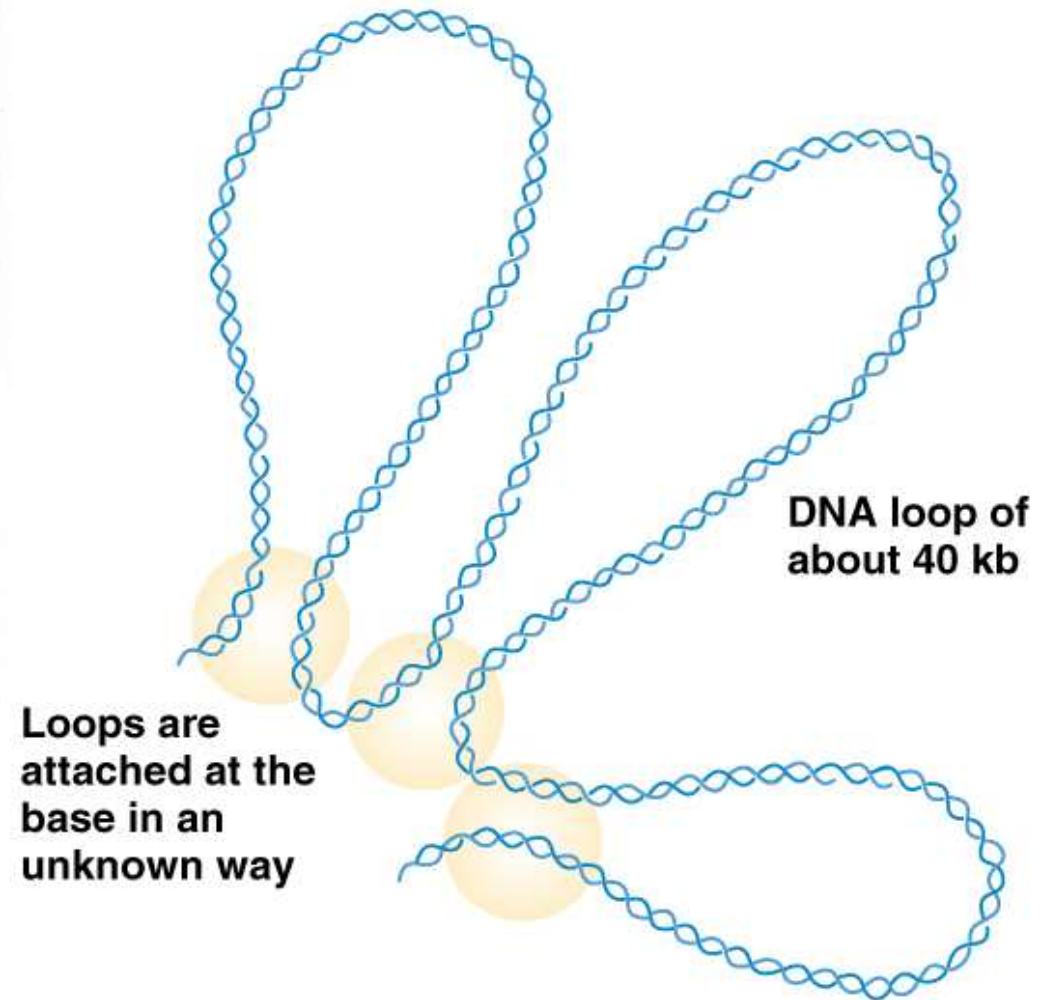
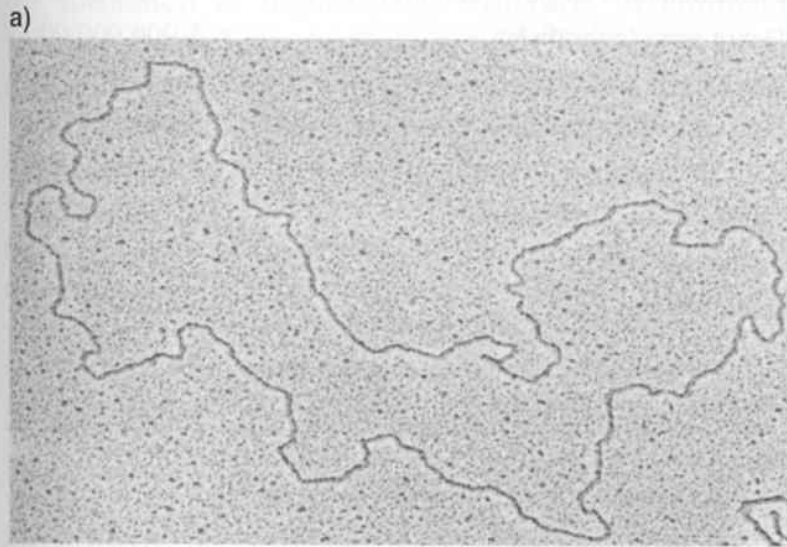
При лизис на *E. coli* се освобождава 4.6-Mb кръгова хромозома, която е силно спирализирана. Дължината и в неспирализирано състояние е около 1 mm, около 10^3 пъти по-дълга от клетката на *E. coli*. Суперспирализацията на ДНК е приспособление за да се побере в клетката.



Суперспирализация на ДНК

- Наблюдават се позитивна и негативна суперспирализация.
- Топоизомеразите са ензими, спирализиращи ДНК молекулите.
- Прокариотите освен спирализация се нагъват допълнително под формата на бримки - образуват бримчести домени, като краищата на домените са суперспирализирани независимо един от друг. Намалява дължината на нуклеоида 10 пъти.
- Броят на бримчестите домени е видово-специфичен и зависи от размера на генома. *E. coli* има 100 домена, по 40 kb всеки.

Модел на бактериална хромозома



Еукариотни хромозоми

- Повечето прокариоти са с 1 хромозома, докато еукариотите имат **диплоиден набор** хромозоми.
- **Геномът** е информацията в един пълен хаплоиден набор. Количеството ДНК в хаплоидния геном на един вид е неговата **C стойност**. Структурната сложност и C стойността на организма не са взаимно зависими, от което произтича **парадоксът на C стойността**.

Размер на генома: Парадокс на стойността на С.

C = Количеството на ДНК в хаплоиден (1N) набор

Варира при различните видове, като няма пряка пропорционална зависимост между размера С и структурната или функционална сложност на организмите.

Примери стойност на С (нд)

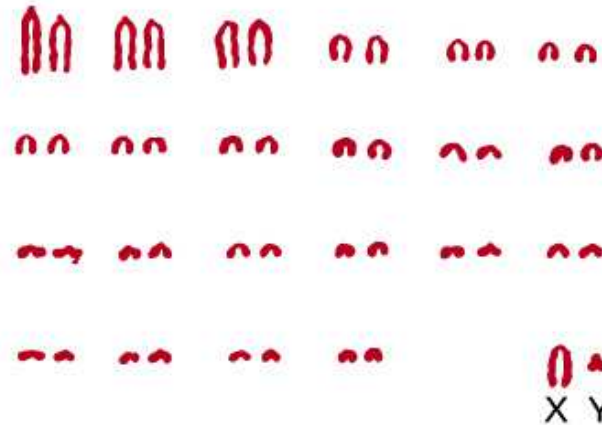
λ	48,502
T4	168,900
HIV-1	9,750
<i>E. Coli</i>	4,639,221
<i>Lilium formosanum</i>	36,000,000,000
<i>Zea mays</i>	5,000,000,000
<i>Amoeba proteus</i>	290,000,000,000
<i>Drosophila melanogaster</i>	180,000,000
<i>Mus musculus</i>	3,454,200,000
<i>Canis familiaris</i>	3,355,500,000
<i>Equus caballus</i>	3,311,000,000
<i>Homo sapiens</i>	3,400,000,000

Table 2.4 Haploid DNA Content, or C Value, of Selected Species

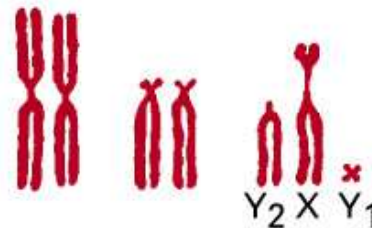
Species	C Value (bp)
Viruses and Phages	
λ (bacteriophage)	48,502
T4 (bacteriophage)	168,900
Feline leukemia virus (cat virus)	8,444
Simian virus 40 (SV40)	5,243
Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1, causative agent of AIDS)	9,750
Measles virus (human virus)	15,890
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	4,214,810
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease spirochete)	910,720
<i>Escherichia coli</i>	4,639,221
<i>Helicobacter pylori</i> (bacterium that causes stomach ulcers)	1,667,860
<i>Neisseria meningitidis</i>	2,272,350
Archaea	
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,664,970
Eukaryotae	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (budding yeast; Brewer's yeast)	13,105,020
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (fission yeast)	14,000,000
<i>Lilium formosanum</i> (lily)	36,000,000,000
<i>Zea mays</i> (maize, corn)	5,000,000,000
<i>Amoeba proteus</i> (amoeba)	290,000,000,000
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	180,000,000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	97,000,000
<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	1,900,000,000
<i>Xenopus laevis</i> (African clawed frog)	3,100,000,000
<i>Mus musculus</i> (mouse)	3,454,200,000
<i>Rattus rattus</i> (rat)	3,093,900,000
<i>Canis familiaris</i> (dog)	3,355,500,000
<i>Equus caballus</i> (horse)	3,311,000,000
<i>Homo sapiens</i> (humans)	3,400,000,000

*These C values derive from the complete genome sequence; all others are estimates based on other measurements.

Няма проста зависимост между броя на хромозомите, сложността на вида и размера на генома



китайска скална коза



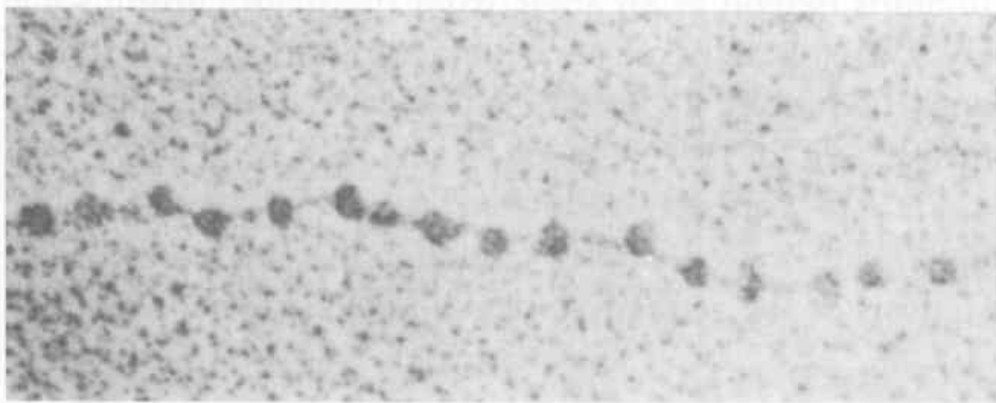
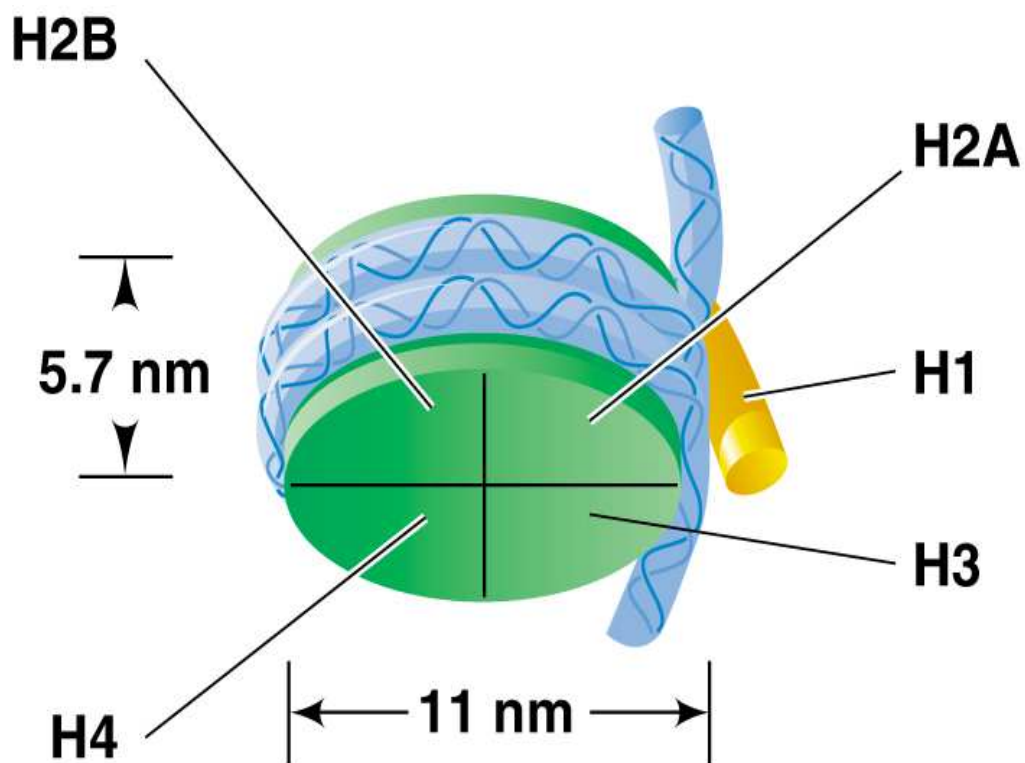
индийска скална коза

Структура на хроматина

- Всяка еукариотна хромозома е сложен комплекс, съставен от линейна двuverижна молекула ДНК и двойно по-голямо количество протеини.
- Комплексите ДНК-протеин се наричат **хроматин**. Хроматинът при еукариотите е консервативен.
- 1. Протеините на хроматина се делят на хистонови и нехистонови.
- 2. **Хистоните** са малки протеини с общ (+) заряд. 5 главни типа - H1, H2A, H2B, H3 и H4. В тегловно съотношение, хромозомите съдържат еквивалентно количество ДНК и хистони.
- 3. Хистоните са много консервативни в различните видове (H1 е по-малко консервативен).

- 4. **Нехистони** е общото име на останалите белтъци, асоциирани с ДНК.
- Голяма група структурни и преходно присъстващи протеини.
- Варират дори при различни клетки в един и същ организъм.
- Повечето са заредени отрицателно (-), и се свързват с хистоните.
- HMG (high mobility group) са група добре проучени нехистонови протеини. Ролята им е да нагъват в пространството нуклеофиламентите.
- Варират като количество между 50% и 100% от масата на ДНК

Нуклеозома/октамер



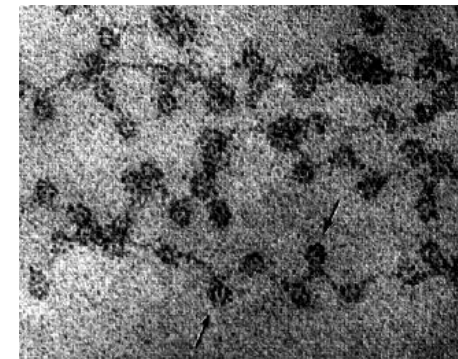
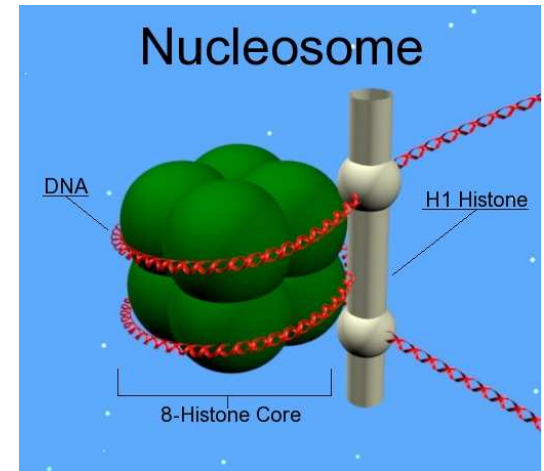
5. **Хистоните** в рамките на хроматина кондензират хромозомите, така че да се поберат в клетката/ядрото. Два компонента на хроматина:

а. Две молекули от всеки H2A, H2B, H3 and H4 се свързват и и формират **нуклеозомна сърцевина (октамер)**, и ДНК се увива около нея $1\frac{3}{4}$ пъти и намалява дължината 7 пъти. Нуклеозомата е с диаметър 11 nm.

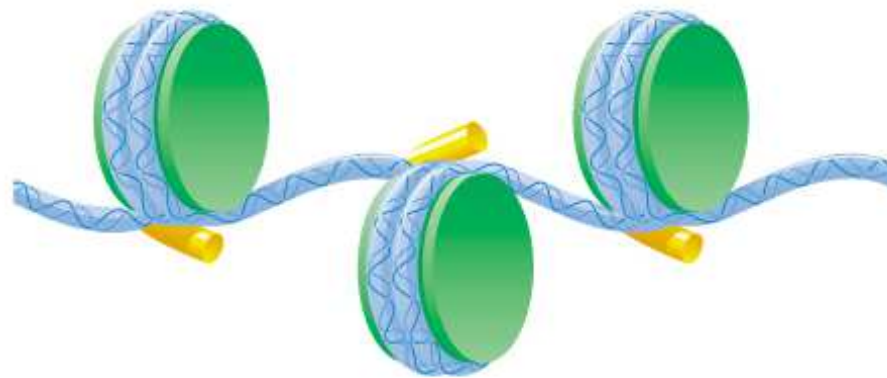
TABLE 12.2**CATEGORIES AND PROPERTIES
OF HISTONE PROTEINS**

Histone Type	Lysine-Arginine Content	Molecular Weight (Da)
H1	Lysine-rich	23,000
H2A	Slightly lysine-rich	14,000
H2B	Slightly lysine-rich	13,800
H3	Arginine-rich	15,300
H4	Arginine-rich	11,300

- H1 “завързва” ДНК около нуклеозомата
- Нарича се **линкер**, защото се свързва с линкерна ДНК, която е последователност, разположена между нуклеозомите (приблизително 20-80 нд)
- Стабилизира зигзагообразна структура с диаметър 30 nm и намалява 6-кратно дължината на ДНК
- Структурата се нарича хроматинова нишка и наподобява огърлица от мъниста

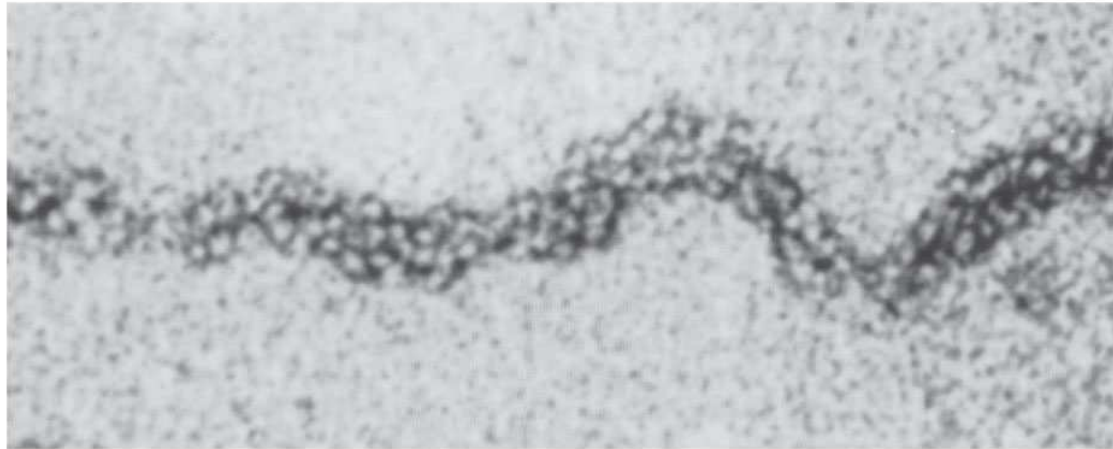


Beads-on-a-string form of chromatin



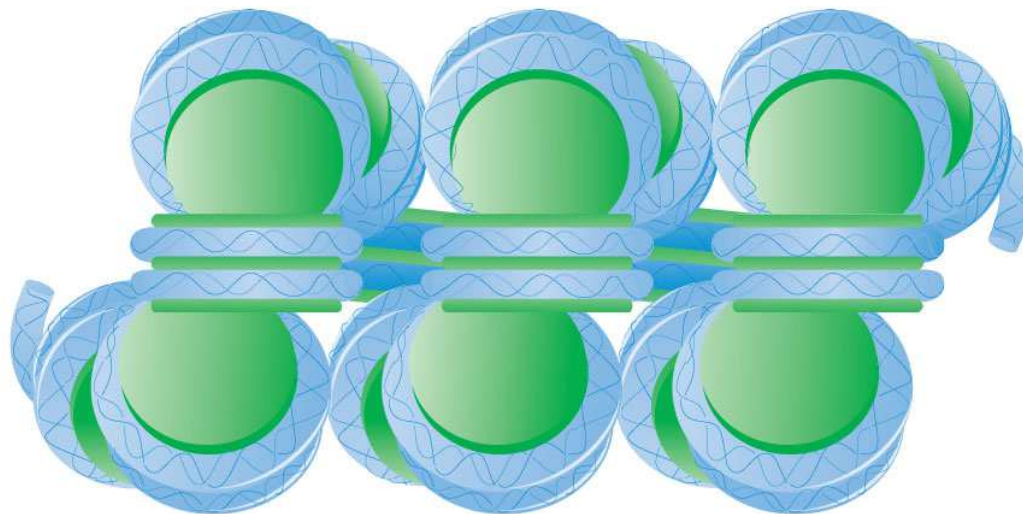
11 nm

a) Electron micrograph of 30-nm chromatin fiber



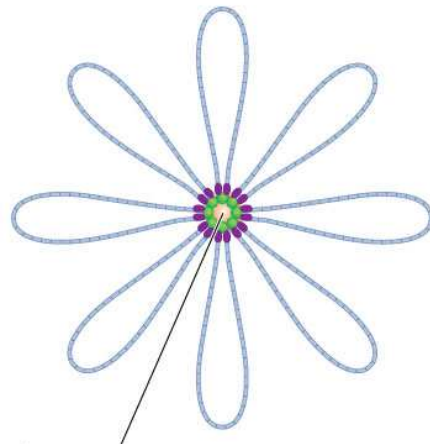
Соленоидно
ниво на
компактизация

b) Solenoid model for nucleosome packaging
in the 30-nm chromatin fiber (H1 is not shown)



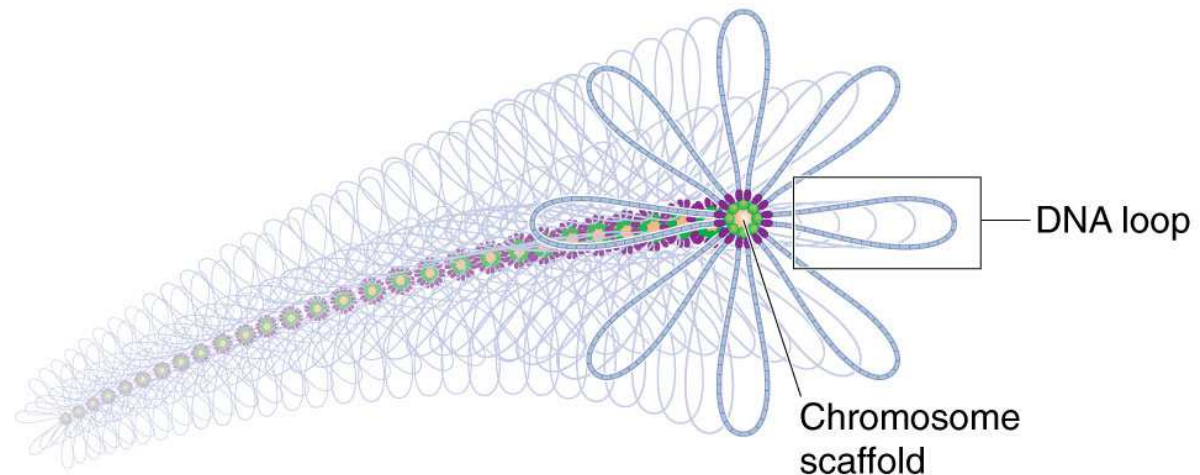
- 6. Соленоидът е нагънат в **бримчести домени**, подобни на тези при прокариотите. Бримките са закотвени за ядрения матрикс чрез ДНК последователности наречени MARs (matrix attachment regions). Средна по големина човешка хромозома има около 2000 бримчести домени. Те вероятно играят роля за регулация на транскрипцията и репликацията.

a) Fiber loops of 30-nm chromatin fibers attached to chromosome scaffold

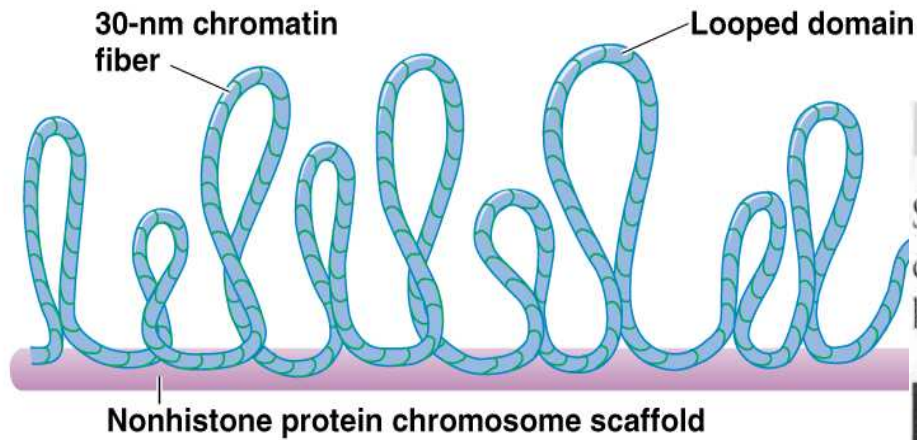


Other nonhistone scaffold components

b) Model of section of metaphase chromosome

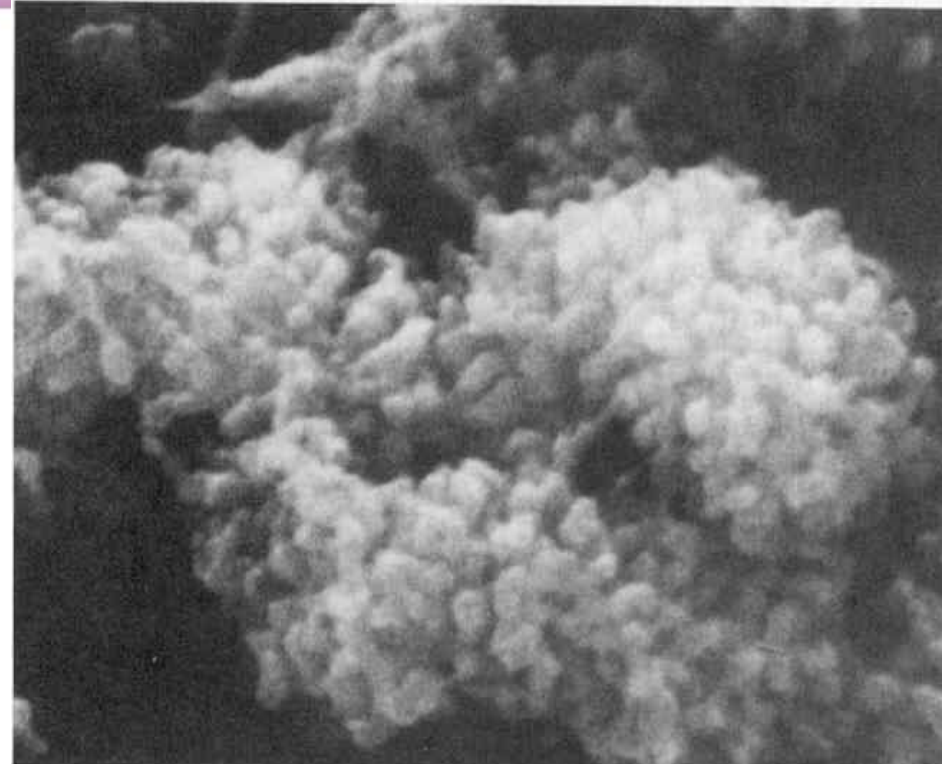


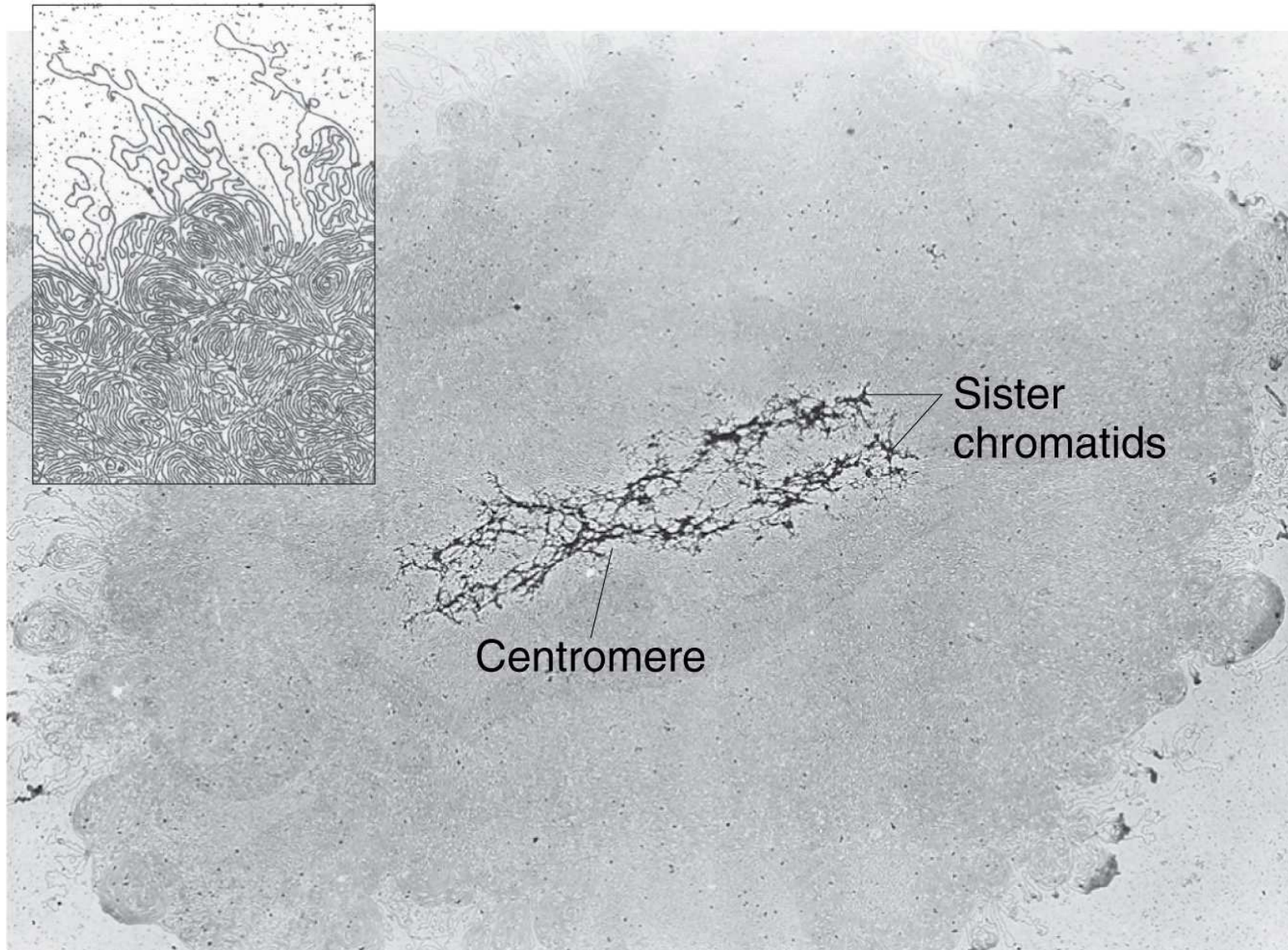
Организация на хроматина в 30-nm бримчести домени, закотвени към нехистоново белтъчно скеле



~ FIGURE 10.29

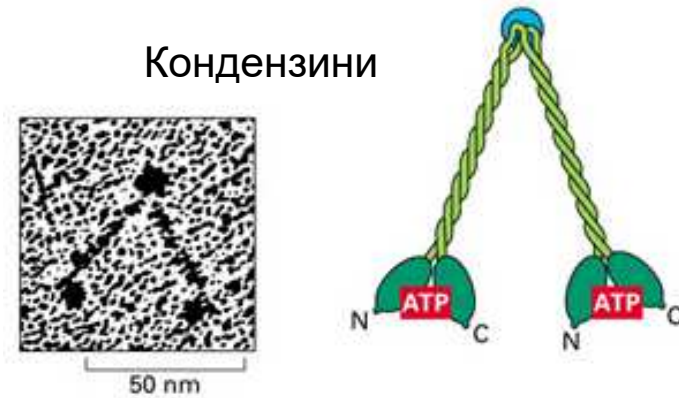
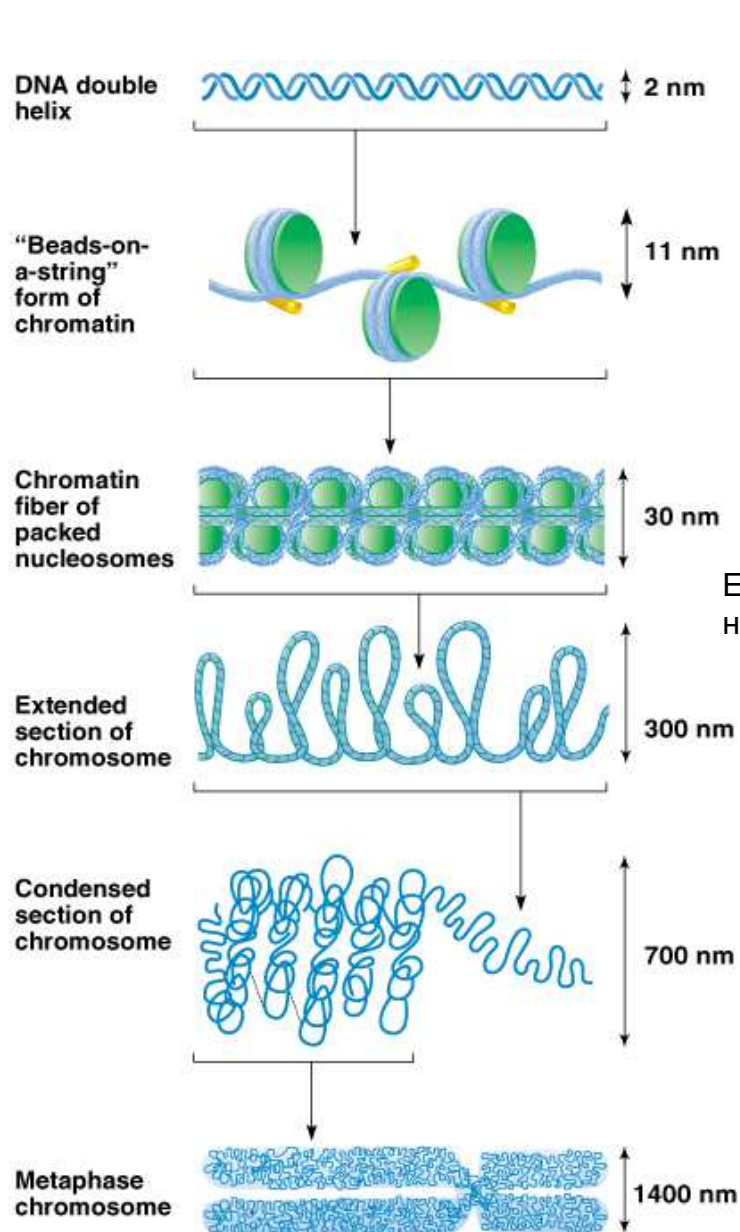
Scanning electron micrograph of a region of a mitotic chromosome showing the tips (knoblike projections) of looped domains of 30-nm chromatin fibers.



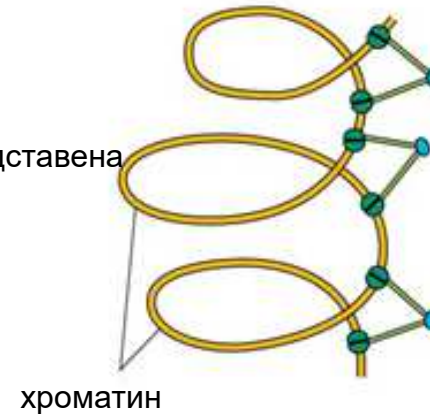


Метафазната хромозома изобилства с хистони, но формата и се базира на нехистоново скеле.

Нива на кондензация на метафазната хромозома



Една мол. кондензини е представена на всеки 10000 н. дв.



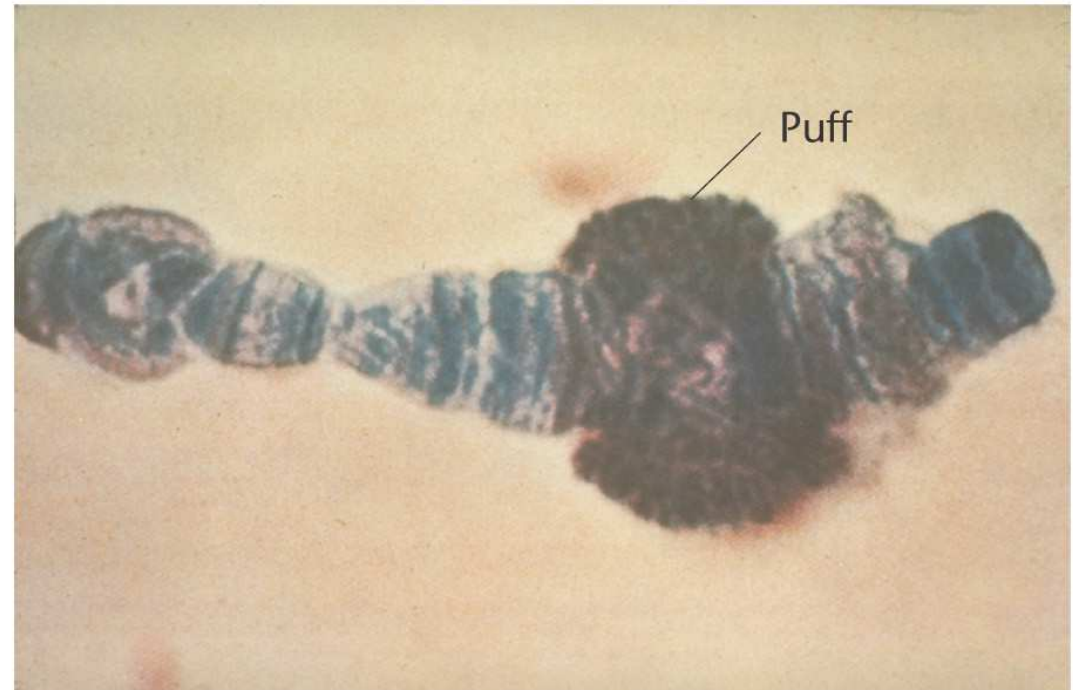
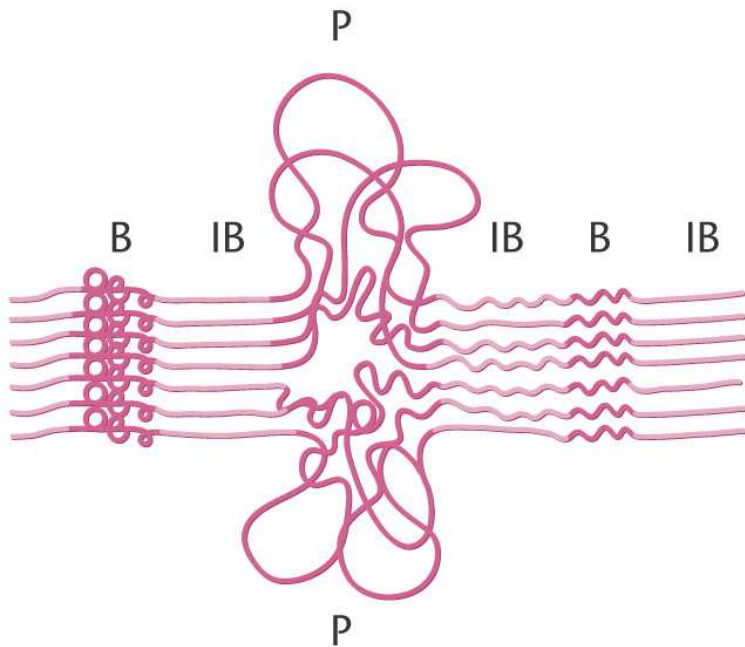
ВСЯКА ДНК МОЛЕКУЛА Е ПАКЕТИРАНА В МИТОТИЧНА ХРОМОЗОМА, КОЯТО Е 10 000 ПЪТИ ПО-КЪСА. ДВА МЕТРА ЧОВЕШКА ДНК Е ПАКЕТИРАНА В ЯДРО С ДИАМЕТЪР ~ 6 μM

Политенни хромозоми

- Valbiani, 1881
- Някои клетки на дигтера (напр *Drosophila* слюнни жлези)
- Репликация без разделяне на клетката
 - 1000 до 5000 ДНК дуплекси за хромозома
 - Различията в структурата са причина за ивичеста структура след оцветяване
 - Ивиците представляват гени
 - Претърпяват разгъване по време на експресия (**пуфи**)



Хромозомни пуфи

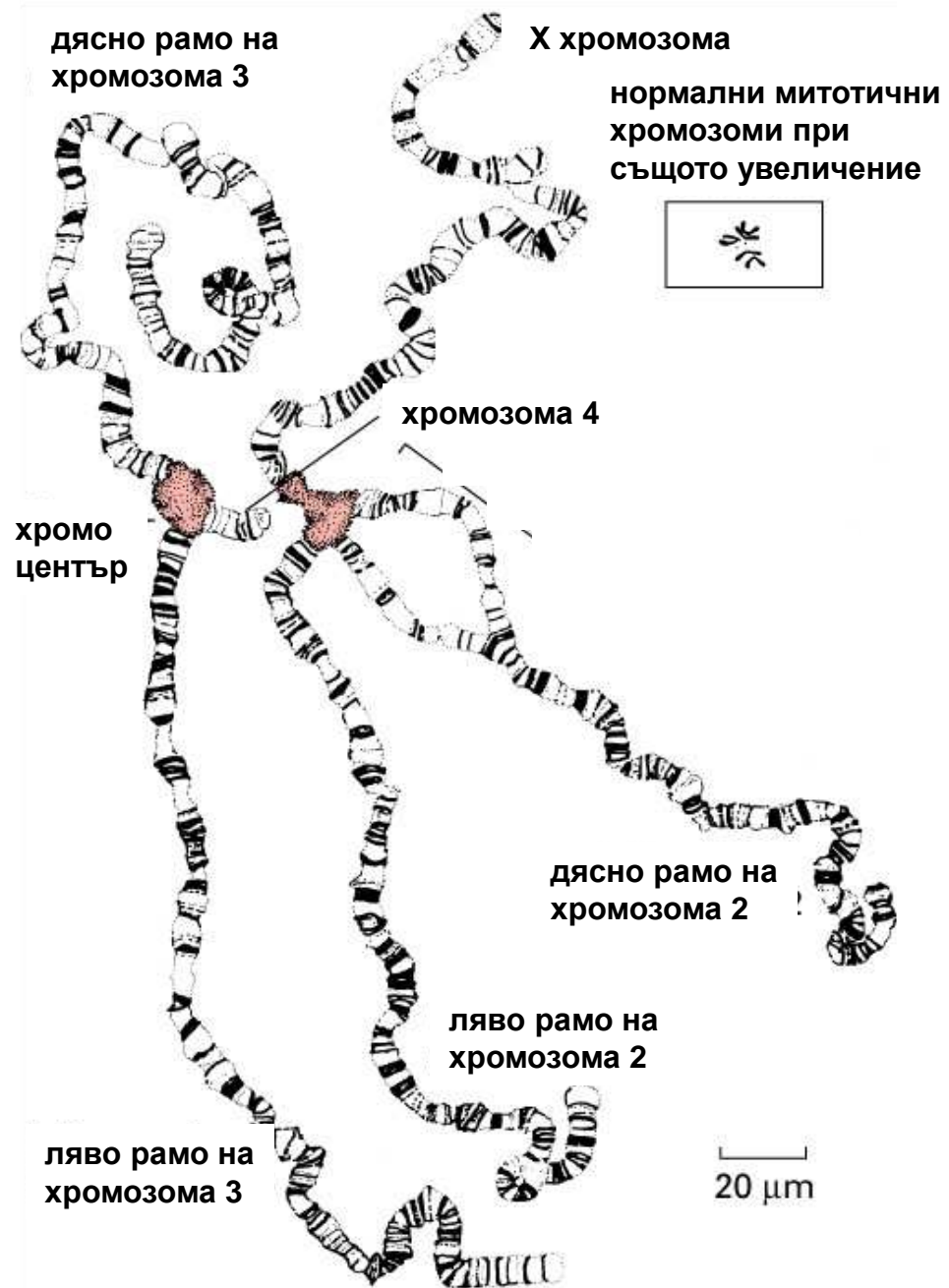


Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

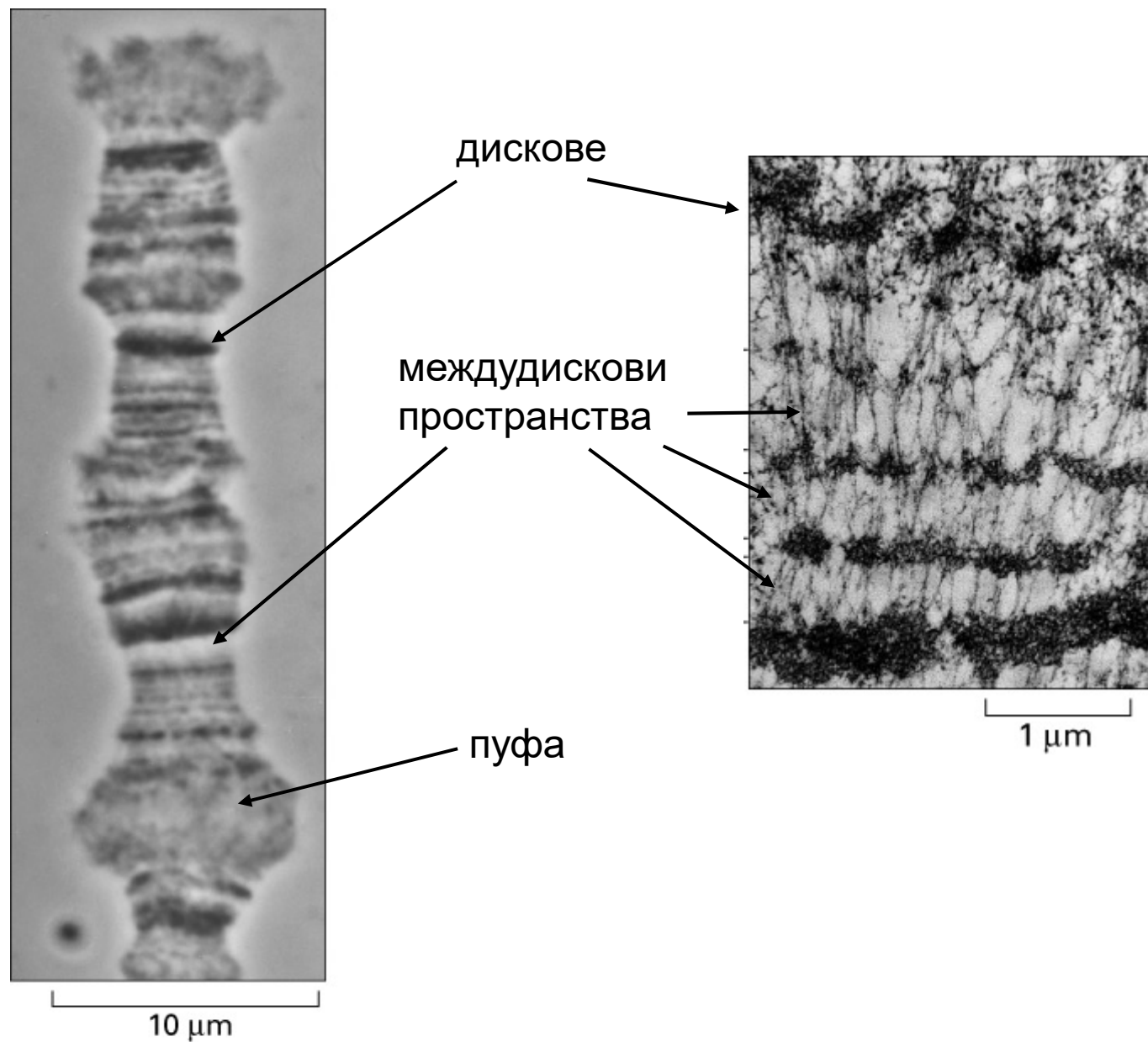
- Претърпяват разгъване по време на експресия (**пуфи**)

Политенни хромозоми

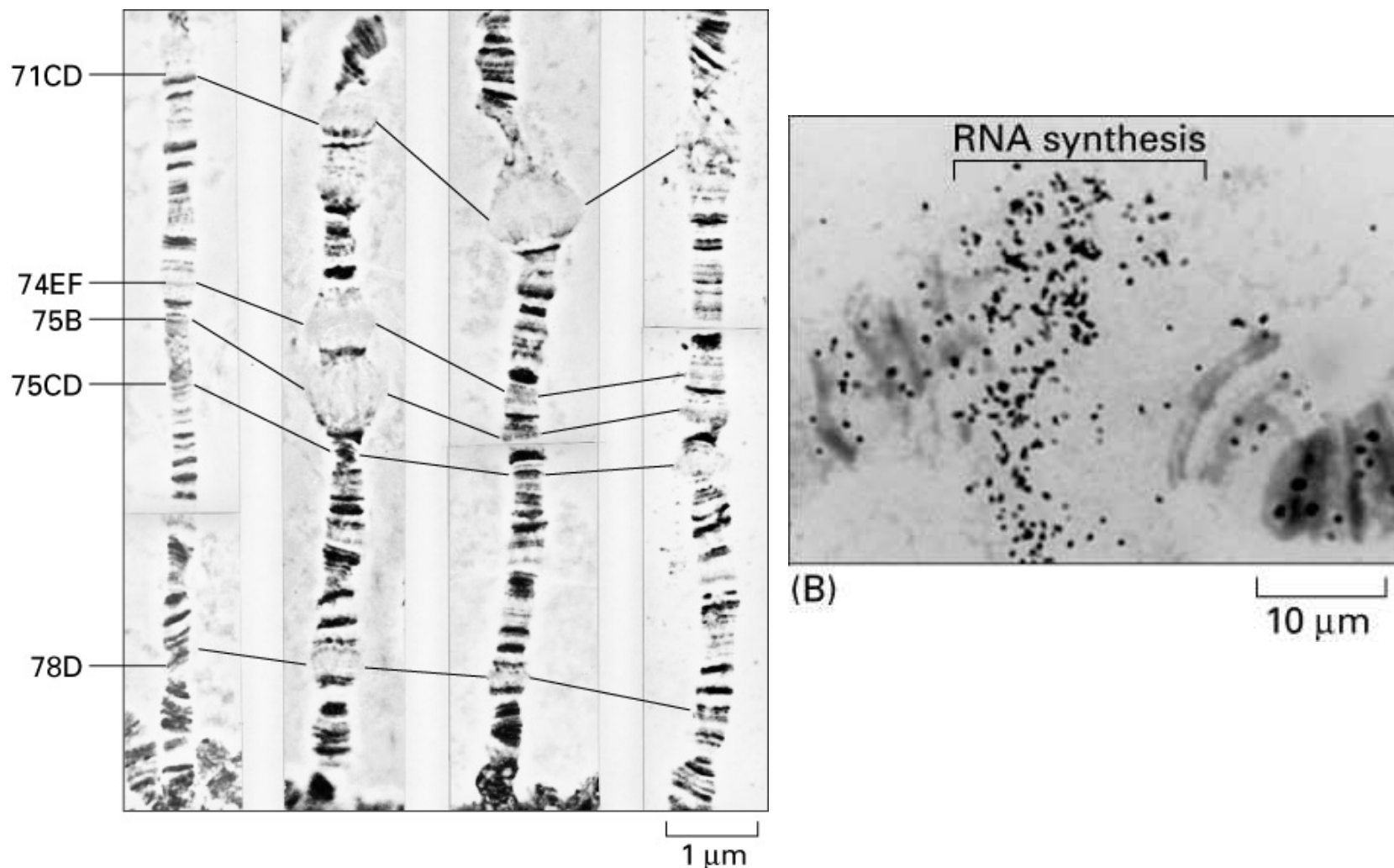
- в ларви на двукрили насекоми (слюнчни жлези, малпигиеви тръбици и др.)
- интерфазни хромозоми
- разлики от обикновените метафазни хромозоми:
 - многократно реплицирани (по-дебели, $2^{10} = 1024$ мол ДНК/хромозома)
 - не са кондензирани (по-дълги)
 - хаплоиден брой (n) намират се в трайна соматична конюгация
 - активни (синтез на РНК)
 - позволяват да се наблюдава диференциалната активност на гените



Морфология на политенните хромозоми



Пуфите са места на активен синтез на РНК

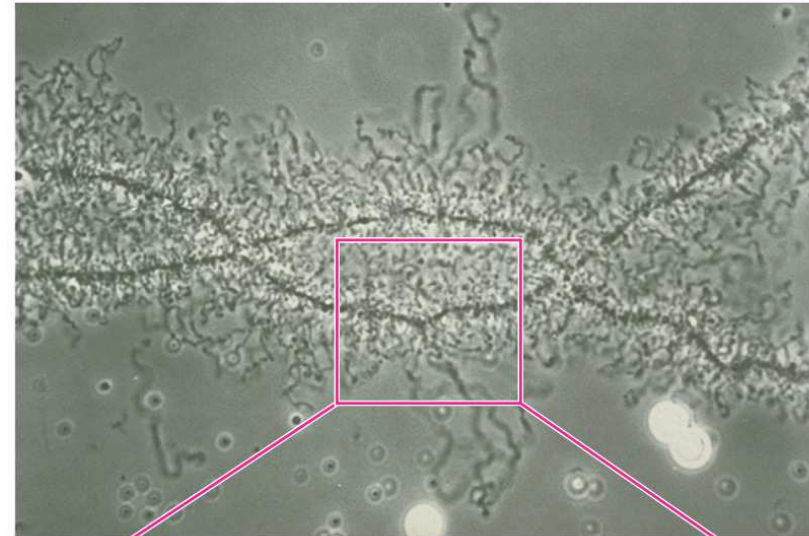


Една и съща хромозома, наблюдавана в продължение на 24 часа, показва превръщането в пуфи (активирани на синтеза на и РНК) на различни дискове. По такъв начин може директно да се наблюдава активирането на различни гени, чиито продукти са необходими на ларвата през различни периоди от развитието и.

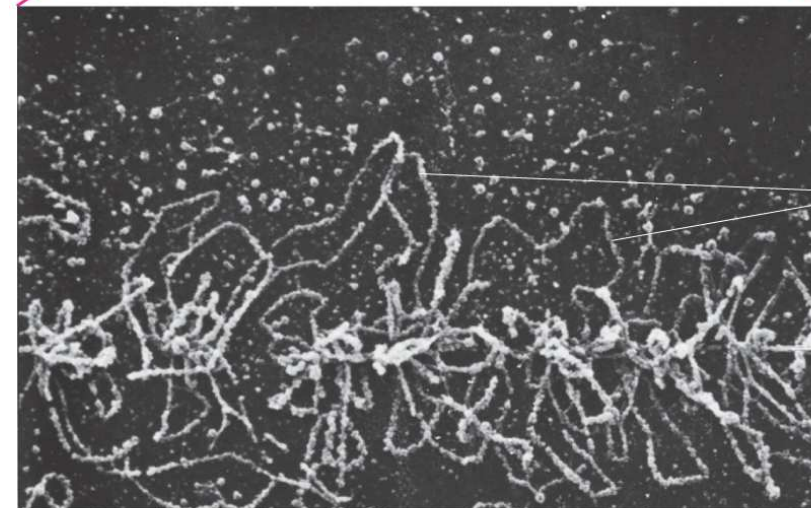
Хромозоми тип “лампови четки”

- Овоцити на гръбначни, сперматоцити на някои насекоми
 - Диплотен на мейозата
- Изглежда като четка за чистене на шише на газова лампа
- активни – върху тях се синтезира иРНК необходима за изграждане на резервните белтъци на яйцето (метафазните хромозоми са неактивни по отношение на синтез на РНК)
- съдържат 4 молекули (нишки) ДНК
- Подпомагат проучването на кръсинговъра и генната експресия
- Предполага се, че гранулите са сплайсозоми

(a)

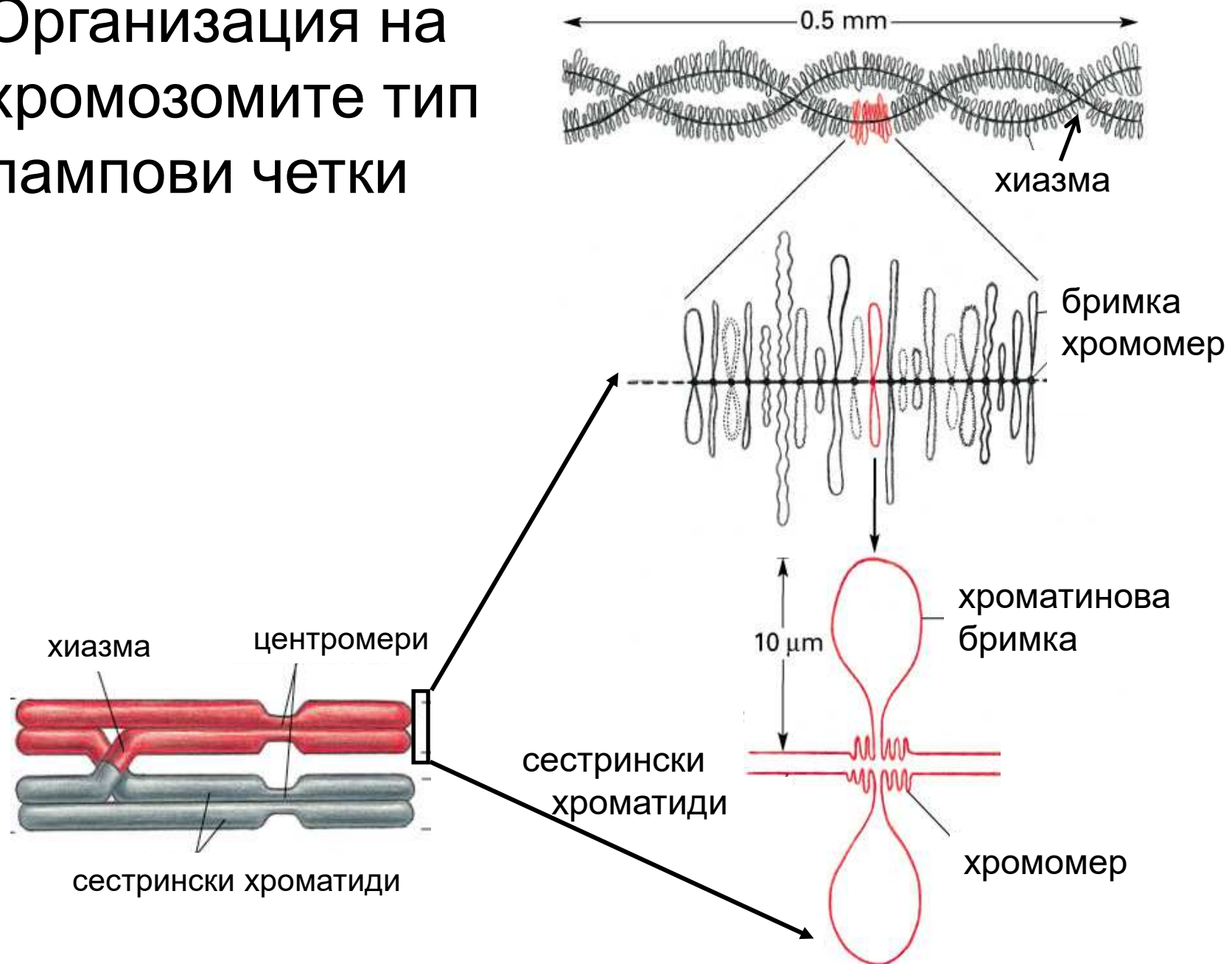


(b)



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Организация на хромозомите тип лампови четки



Еухроматин и хетерохроматин

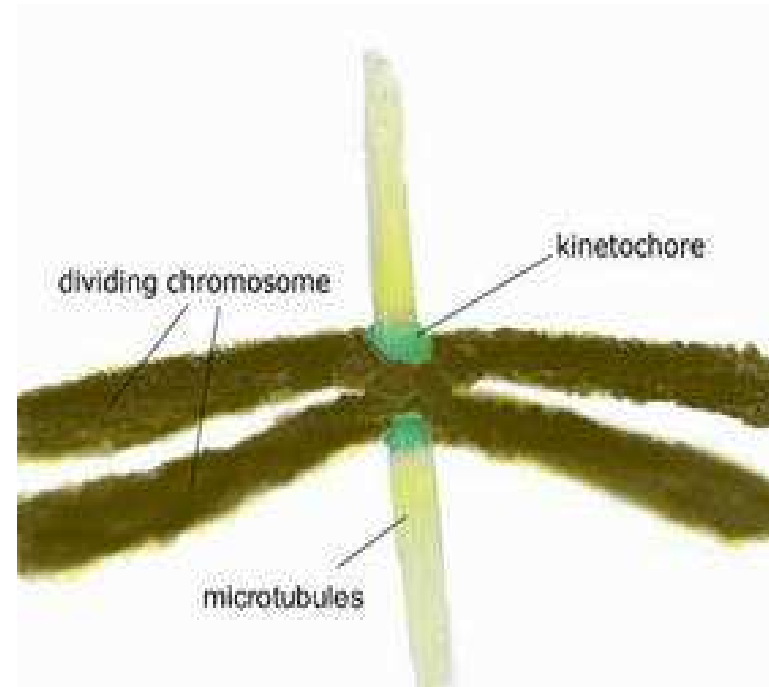
- 1. Клетъчният цикъл повлиява пакетирането на ДНК – кондензира се по време на митоза и мейоза, декондензира се по време на интерфаза. Хромозомите са най-силно кондензирани по време на метафаза, когато бримчестите домени са спирализирани на по-високо ниво и имат диаметър около 700 nm. Нехистоновите протеини формират скеле за по-нататъшната кондензация.
- 2. оцветяването на хроматина разкрива две форми:
 - а. **Еухроматин** - кондензира и декондензира в зависимост от клетъчния цикъл. Транскрибира се активно и няма повторени последователности. По-голямо количество в клетката.

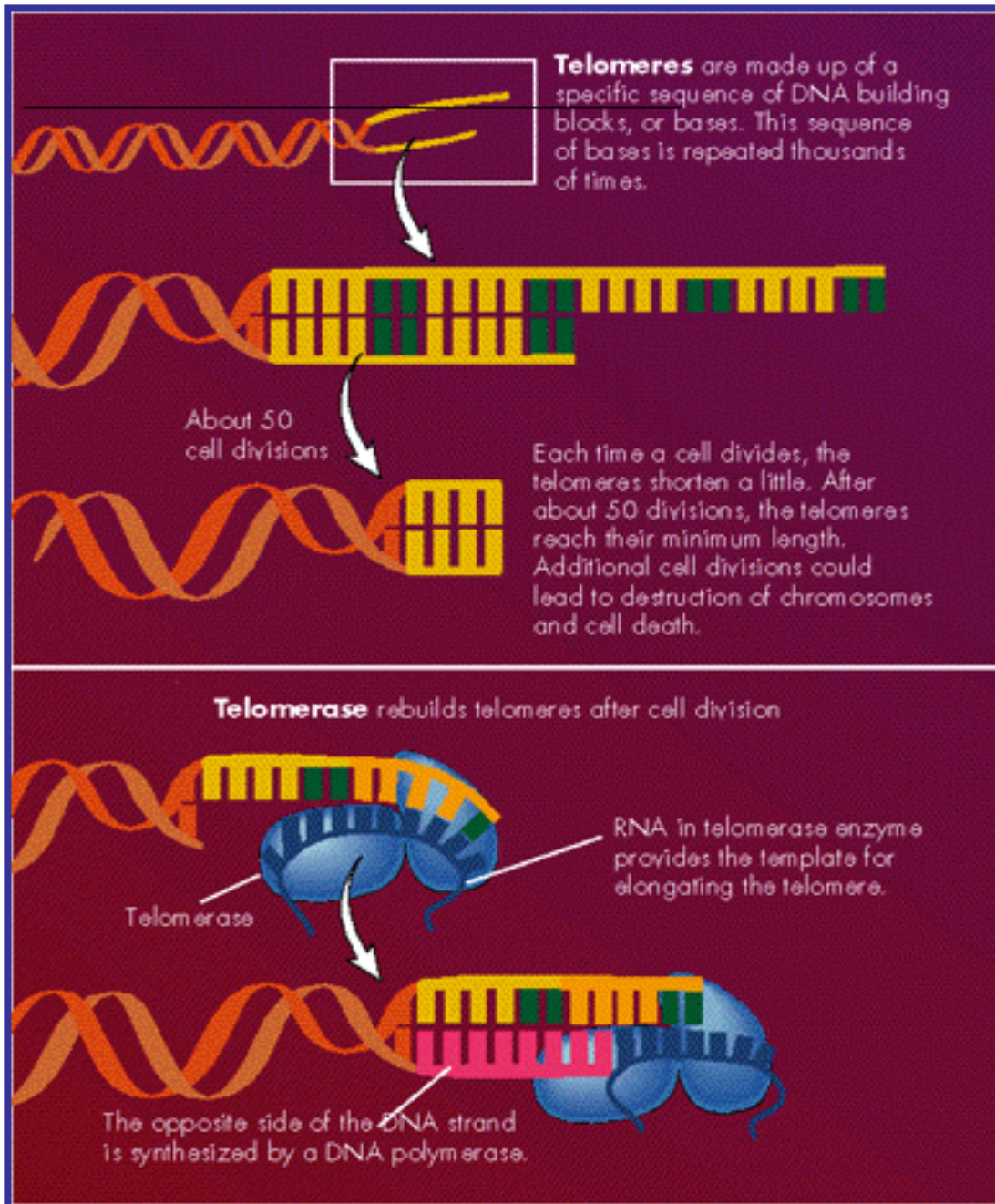
Еухроматин и хетерохроматин

- **b. Хетерохроматин** - остава кондензиран през целия клетъчен цикъл. Реплицира се по-късно от еухроматина и е транскрипционно неактивен.
- Два типа според функционалността му:
 - **i. Конституитивен хетерохроматин**, предимно от високоповторени ДНК (напр. центромерните участъци).
 - **ii. Факултативен хетерохроматин** – варира в зависимост от клетъчния тип или стадия им, и дори между двете хомоложни хромозоми. Съдържа кондензиран, и по този начин неактивен еухроматин (напр. Телцата на Бар)

Центромерни и теломерни ДНК

- 1. **Центромерите и теломерите** са райони в еукариотните хромозоми със специфични функции.
- 2. Центромерите са част от кинетохора, за който се захващат митотичните нишки, при разделянето на хроматидите.
- 3. Центромерите на дрождите (*Saccharomyces cerevisiae*) се наричат СЕН райони или α -сателитна ДНК и съдържат голямо количество повторени последователности или транспозабилни елементи.





Теломерите са изградени от специфични последователности повторени хиляди пъти

При всяко делене, съответно репликация теломерите се скъсяват по малко. След около 50 деления, теломерите достигат минималната си дължина и при всяко следващо делене хромозомата се уврежда/скъсява и затова клетката умира.

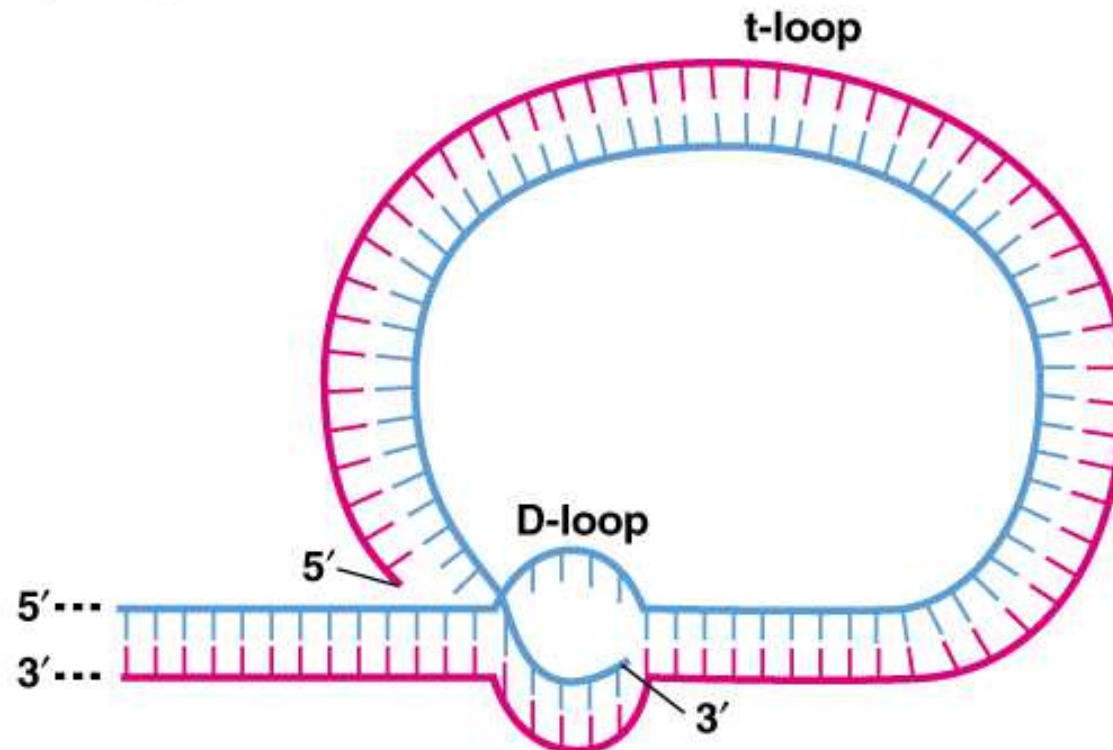
Съществува ензим теломераза, изграждащ теломерите след всяко клетъчно делене. РНК е шаблон за действието на този ензим.

Telomeres

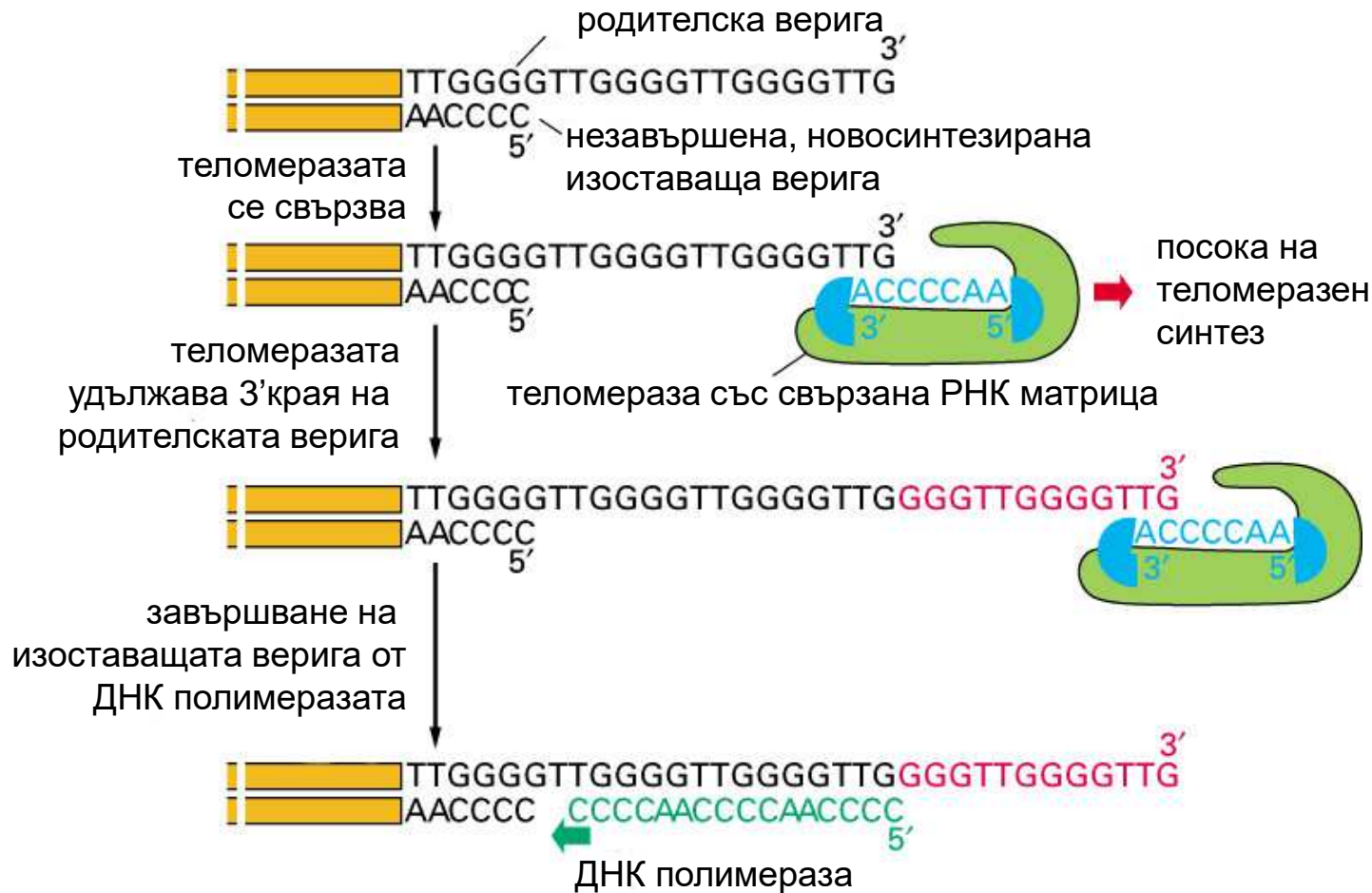
a) *Tetrahymena* simple telomeric sequences



b) t-loop model for telomeres



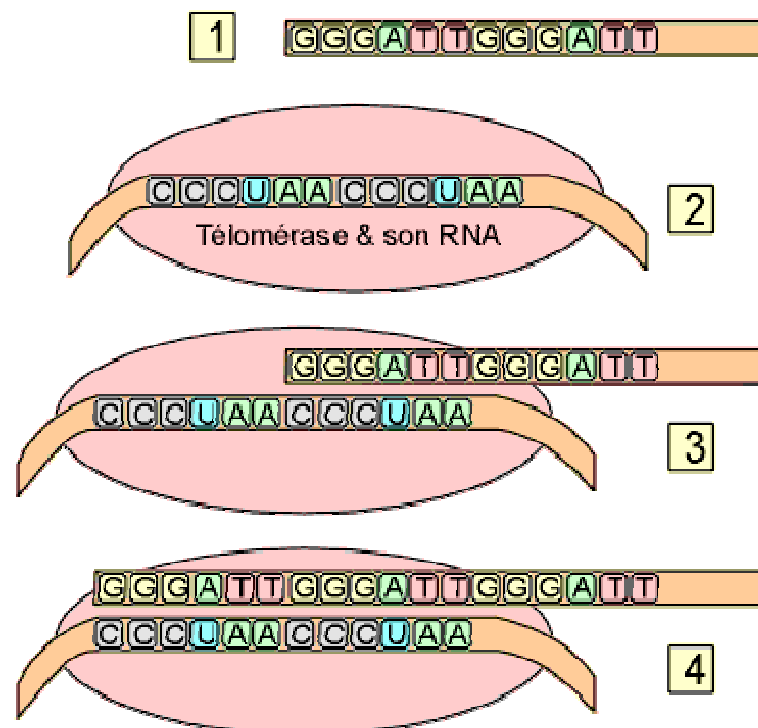
Теломеразата удължава теломерните участъци на майчината верига ДНК до пълното реплициране на новоизграждащата се верига



Теломери – тандемни повтори от къси G богати секвенции (при човек – 10 000 нуклеотида от повтарящи се GGGTTA секвенции)

Теломери

- Скъсяването на хромозомите се предотвратява от ензими теломеразата – хибриден ензим, изграден от РНК и белтък.
- Къс участък РНК в теломеразата се използва за матрица и на практика теломеразата е **обратна транскриптаза**.
- Теломерните последователности са къси, изграден 7 бази последователности, повторени от многократно (тандемни повтори).



Уникални и повторени последователности в ДНК

- 1. Според това, колко пъти се повтарят в генома, ДНК-последователностите се разделят на:
 - а. **Уникални** последователности, в едно или няколко копия.
 - б. **Умерено повторени** ДНК-последователности, от няколко до 10^5 копия.
 - с. **Високо повторени** ДНК-последователности, 10^5 – 10^7 копия.
- 2. Прокариотите притежават предимно уникални ДНК-последователности, с повтори само за рРНК и тРНК.
- При еукариотите се наблюдава смесване в генома на уникални и повторени последователности.

Уникални и повторени последователности в ДНК

- 3. **Уникалните** ДНК последователности са главно структурни гени, кодиращи протеини, както и други хромозомни области. Човешката ДНК съдържа около 65% уникални последователности.
- 4. **Повторените** последователности включват **умерено или високо** повторени последователности, които са **разпръснати** в генома или са **тандемно повторени**.
- 5. **Разпръснатите** повтори са групирани в **генни семейства** съставени от сходни последователности. Има два начина на разположение на разпръснатите последователности :
 - а. **SINEs** (short interspersed repeated sequences) къси разпръснати последователности с дължина 100–500 bp. Пример е Alu повторът, открит при някои примати и човек, като тези 200–300 нд съставляват 9% от целия геном.

Уникални и повторени последователности в ДНК

- b. **LINEs** (long interspersed repeated sequences)
дълги разпръснати последователности, с дължина 5 kb и повече. Пример при бозайниците е LINE-1, -7 kb дълги.
- 6. **Тандемните** повтори са общи за еукариотния геном, от много къси (1–10 нд) до огромни размери. Тук се класифицират **центромерите и теломерните участъци, и гените за рРНК и тРНК.**
- Тандемни повтори, обикновено са познати като **“сателитна ДНК”** поради факта, че заради многократното им повторение се променя честотата на различните базови нуклеотиди и при центрофугиране в плътностен градиент, те се отделят във втори **“сателитен”** слой

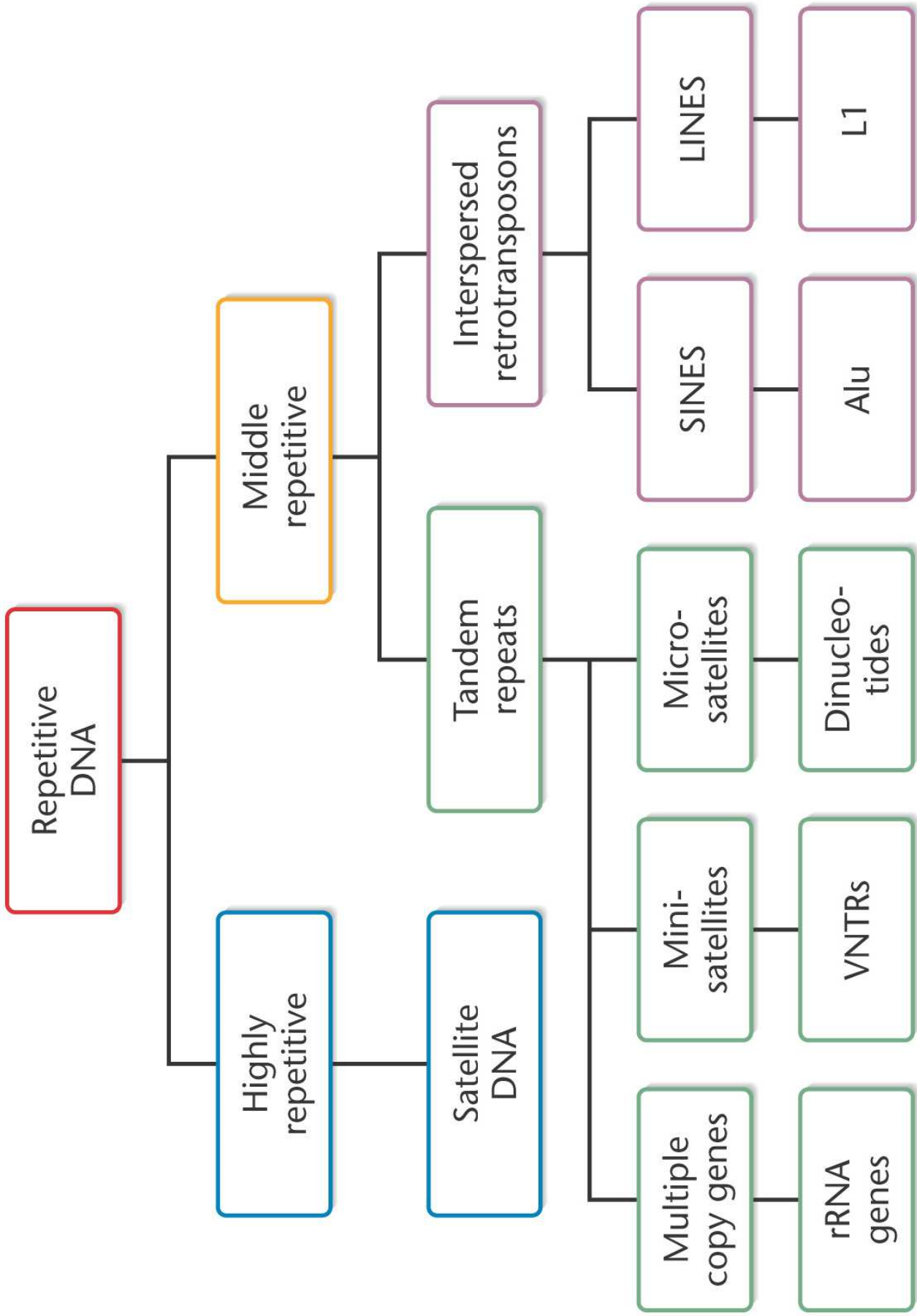
Сателитни ДНК-последователности

Сателитните ДНК-последователности се класифицират в три групи:

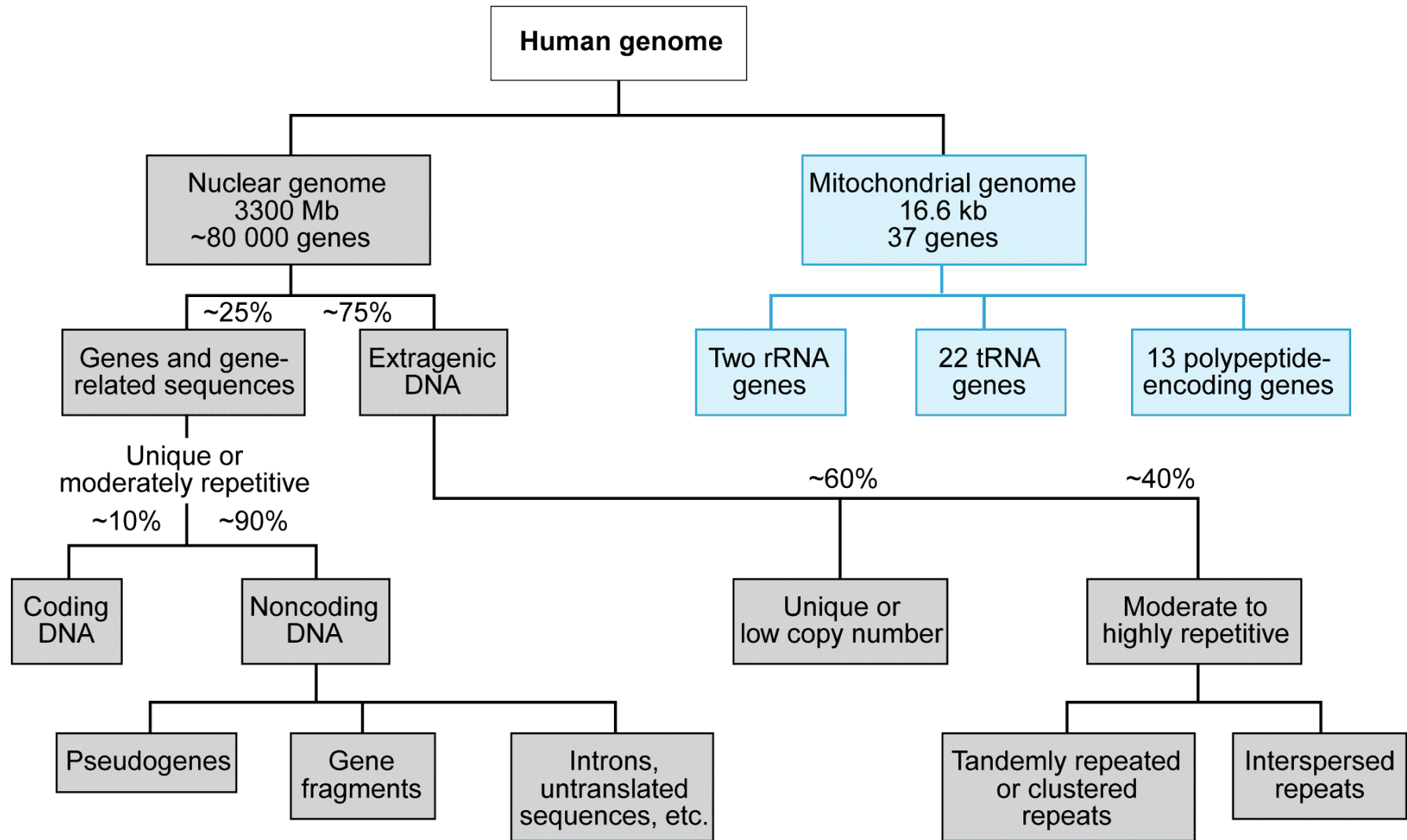
- 1. Сателити** много високо повторени с дължина на повторения сегмент няколко хиляди нд. Обикновено са организирани в големи (> 100 милиона нд !) клъстери/групи в **хетерохроматиновите** области, близо до центромерите и теломерите; открити са в големи количества и в Y хромозомата.
- 2. Минисателити** –умерено повторени, тандемни повтори - последователности със **среден** размер (9 до 100 нд, най-често 15 нд). Наблюдават се в **еухроматинови** области на генома на гръбначните, гъбите и растенията и варират по големина.
- 3. Микросателити** средно повторени, съставени от **къси** (2-6 нд) повтори – при гръбначни, насекоми и растения. Човешкият геном съдържа 30,000 микросателитни локуса в **еухроматина**. Броя на повторенията варира в границите от 10 до 100.

Сателитните ДНК-последователности

- Сателитните ДНК са различават при различните индивиди от даден вид, особено по отношение на броя на повторенията в даден локус.
- **Минисателитните локуси** са най-полиморфните елементи в човешкия геном, и установяването на дължината и броя на тези локуси е в основата на ДНК типизиране, което се използва в **съдебната медицина**.



ЧОВЕШКИ ГЕНОМ



Организация на човешкия геном

Митохондриален геном

- Малък размер (16.5 мб) кръгови ДНК
- Съдържат гени за рРНК, тРНК и гени за протеини (37) субединици за ензими, участващи в е-транспортните вериги
- 1 ген/0.45 мб
- Няколко повтори
- Няма интрони
- 93% кодиращ
- Няма рекомбинация
- Гените се транскрибират заедно
- Унаследяване по майчина линия

Митохондриален геном

- В хода на еволюцията се забелязва склонност към намаляване на митохондриалния геном. Човешките митохондрии имат около 5 пъти по-малко ДНК от дрождите и я оползотворяват максимално.
- Митохондриалните гени се презаписват заедно, без последователности, регулиращи транскрипцията.
- Още не е ясно дали митохондриалната ДНК се "опакова" от белтъци

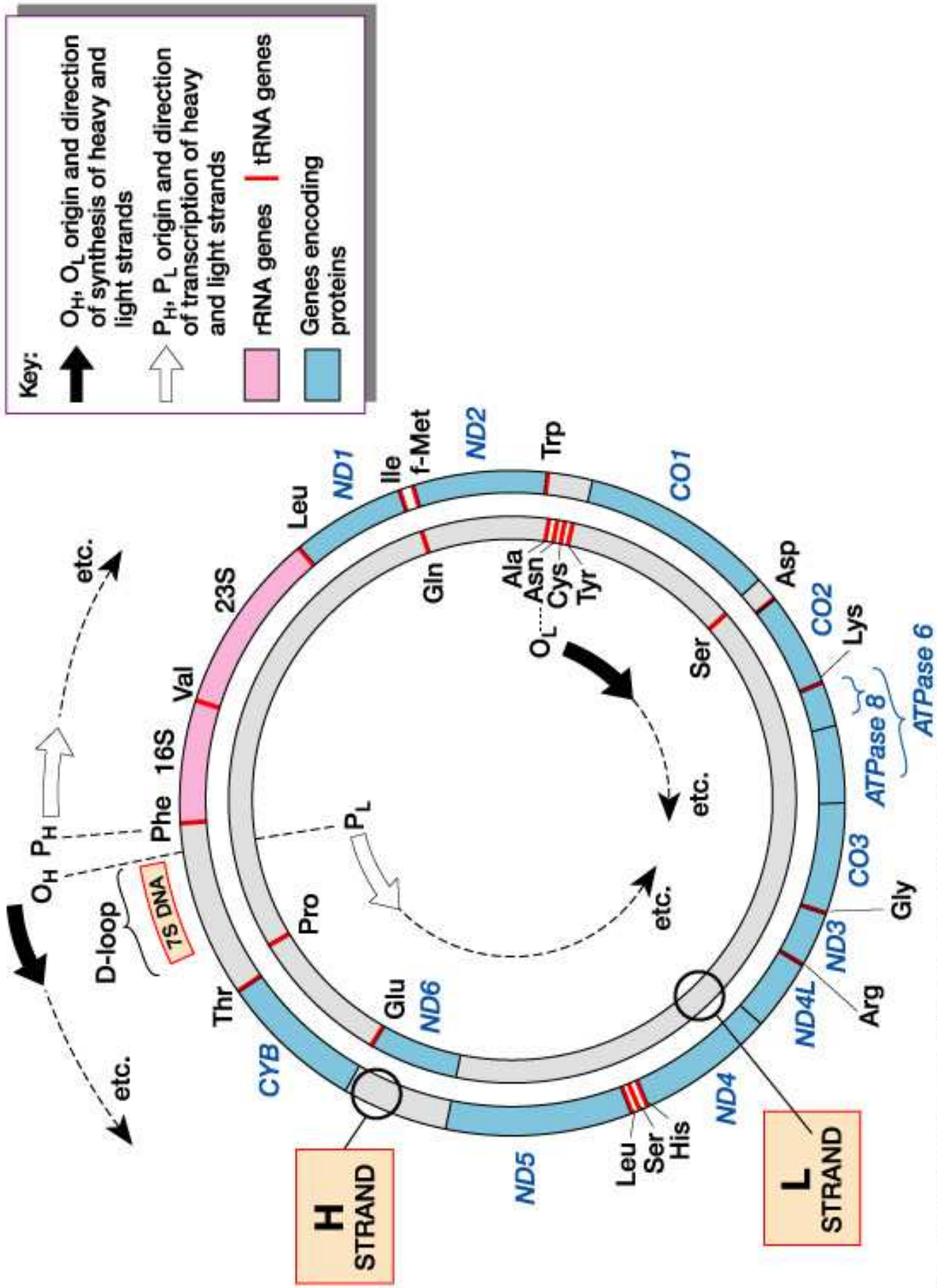


Figure 9-2 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

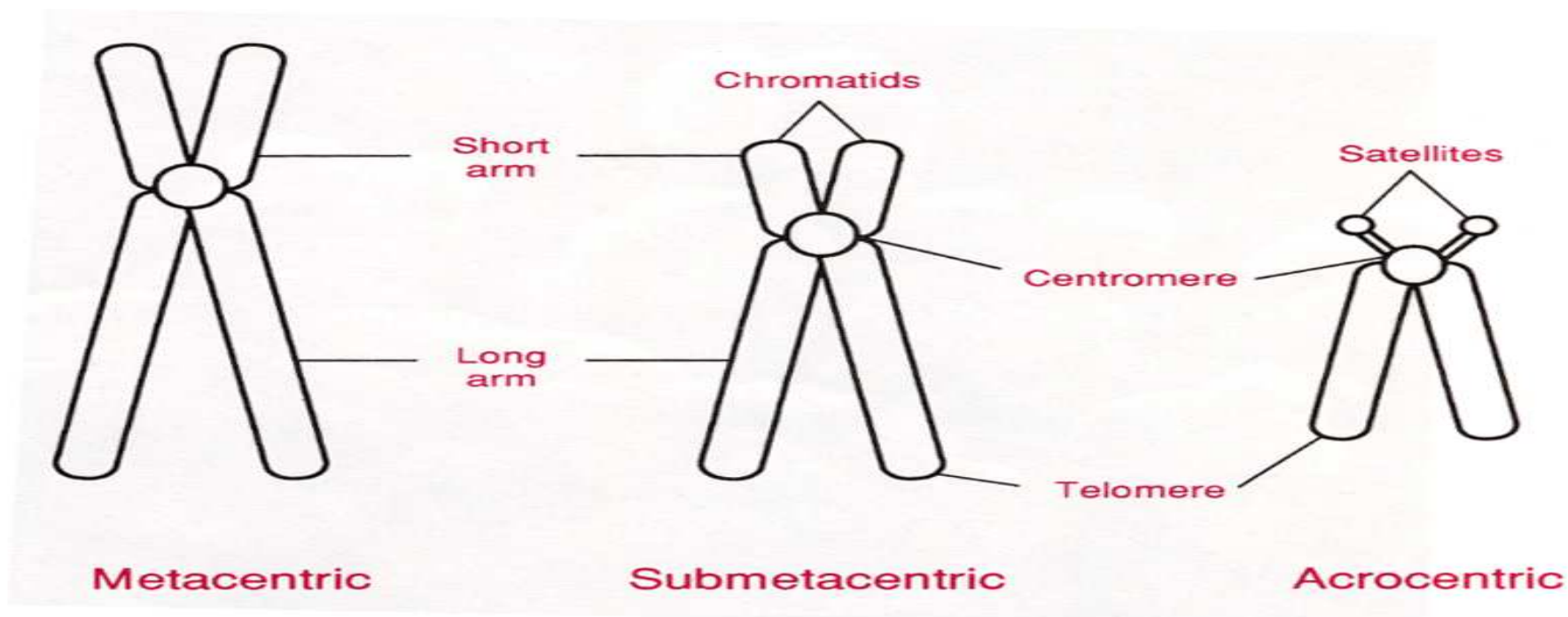
Ограничена автономия на мт геном

	мт	ядро
NADH dehydrog	7 субединици	>41 субединици
Succinate CoQ red	0 субединици	4 субединици
Cytochrome b-c1	1 субединици	10 субединици
Cytochrome C oxidase	3 субединици	10 субединици
ATP synthase complex	2 субединици	14 субединици
тРНК компоненти	22 tRNAs	-
рРНК компоненти	2 компонента	-
Рибозомални белтъци	-	~80
ДР Мт протеини	-	Мт ДНК пол, РНК пол и др.

- Субединиците, кодирани от митохондриите, са каталитични, а субединиците, кодирани от ядрото регулаторни.
- Генетичната система на митохондриите е изцяло под контрола на ядрото.

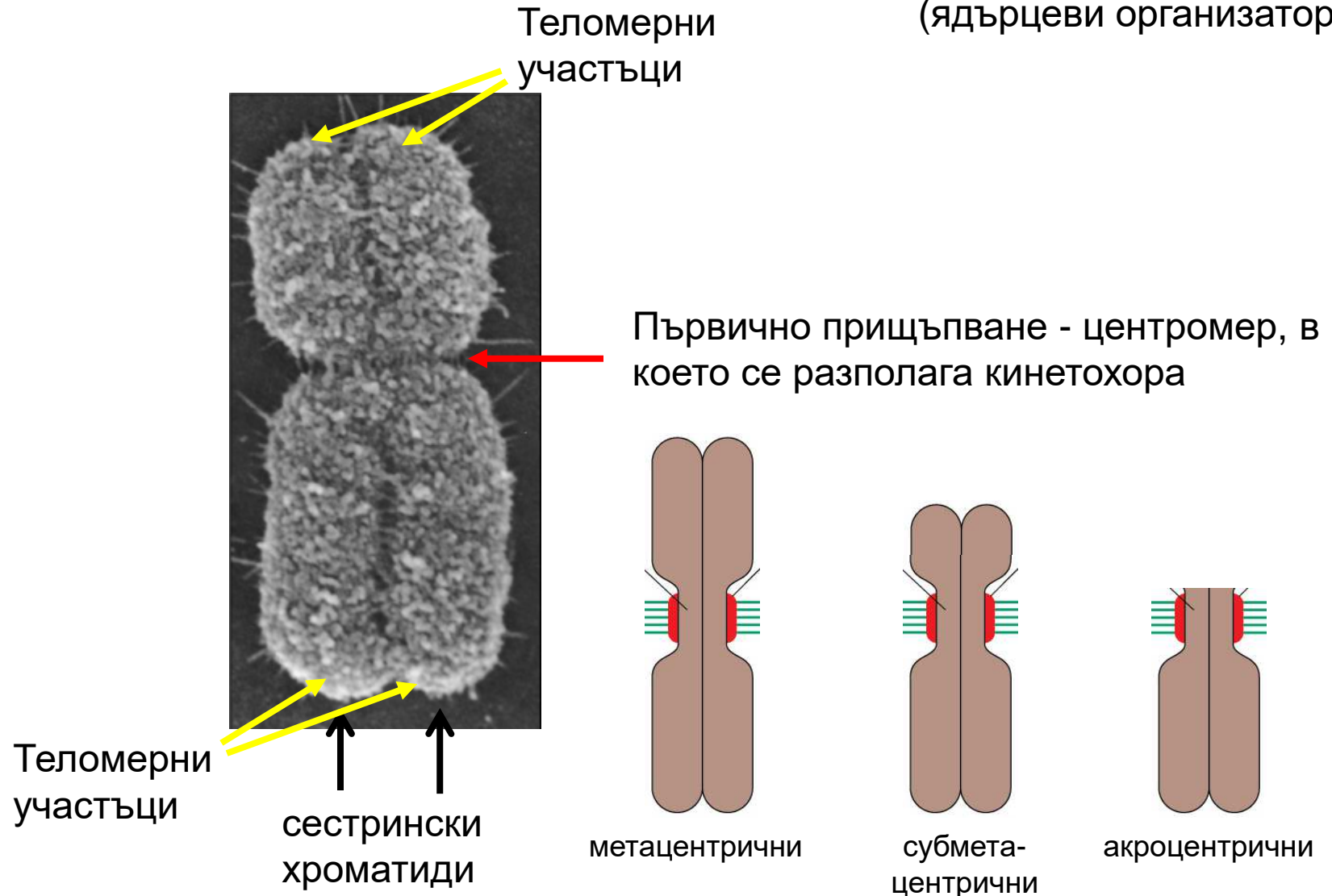
Хромозоми

- Класифицирани според **позицията на центромера**
- В центъра - **метацентрични**
- Субтерминален центромер - **acroцентрични**
 - Имат сателити с множество копия на ген за рРНК
- Не точно в средата - **субметацентрични**



Морфология на метафазните хромозоми:

- първично прищъпване
- теломери
- вторично прищъпване (ядърцеви организатори)



Хромозоми

- 22 автозомни и полови хромозомни двойки
- Класифицирани според:
 - Дължината им
 - Разположението на центромера
 - Наличието или липсата на сателити
- Автозомни групи от А до G

–А 1-3

–Е 16-18

–В 4-5

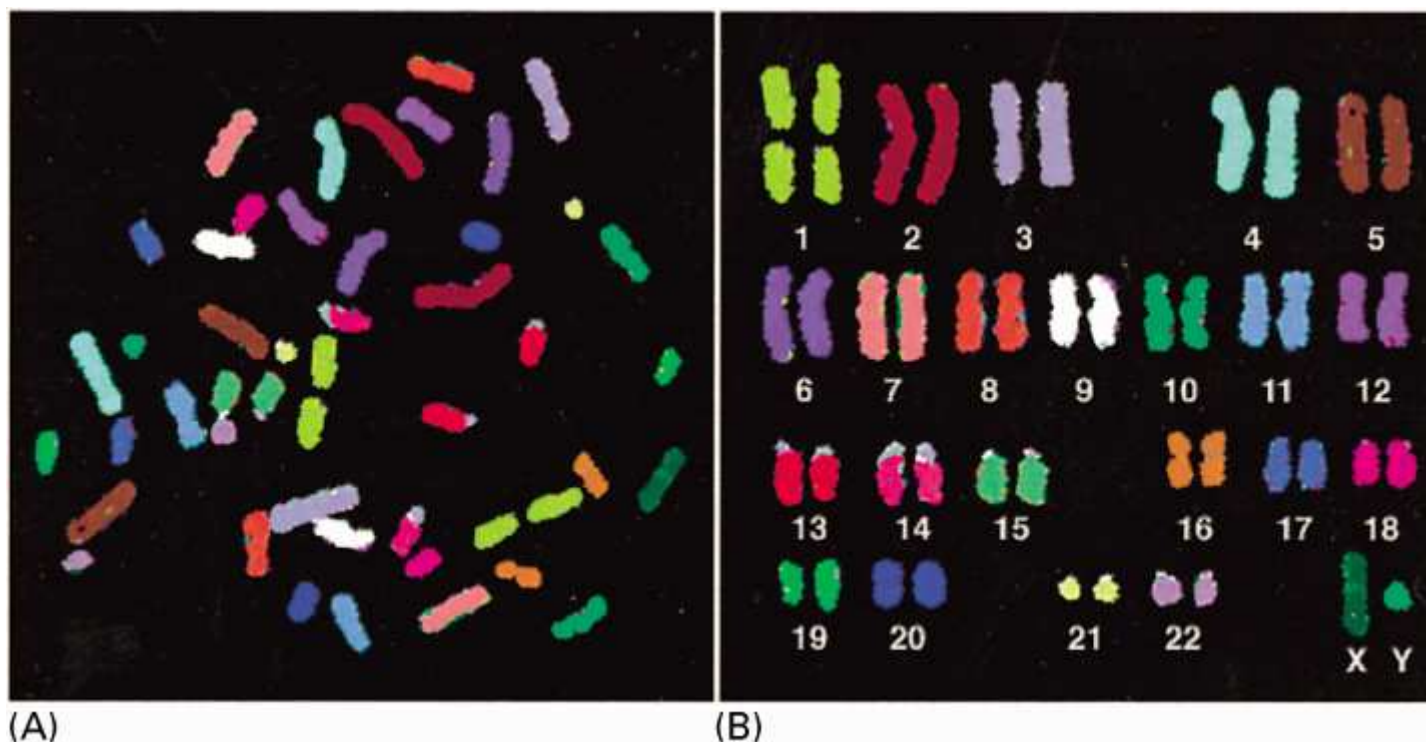
–F 19-20

–С 6-12 + X

–G 21-22 +Y

–D 13-15

Кариотип – съвкупност от броя и морфологичните характеристики на хромозомите на даден вид



Хромозомно оцветяване на човешки метафазни хромозоми.
Използвани са ДНК молекули, специфични за всяка от хромозомите, които са свързани с различни флуоресцентни багрила. Хибридизирането им със съответните хромозоми довежда до обагряне на всяка от хромозомите в различен цвят и позволява точната им идентификация

Кариотипиране

- Методи за оцветяване за идентифициране на хромозомите
- G бандиране - Giemsa
- Q бандиране - Quinacrine
- R бандиране - Реверсивни
- C бандиране - Центромерно
(хетерохроматин)

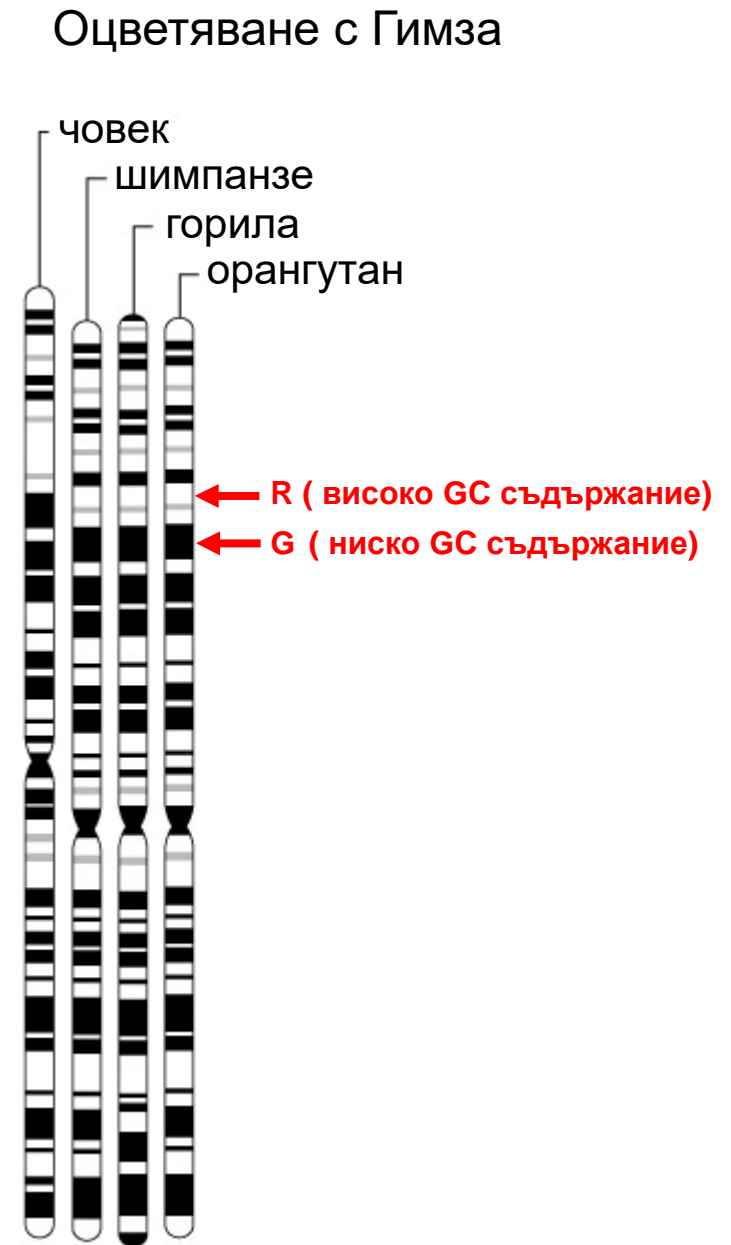
Бандиране на метафазните хромозоми



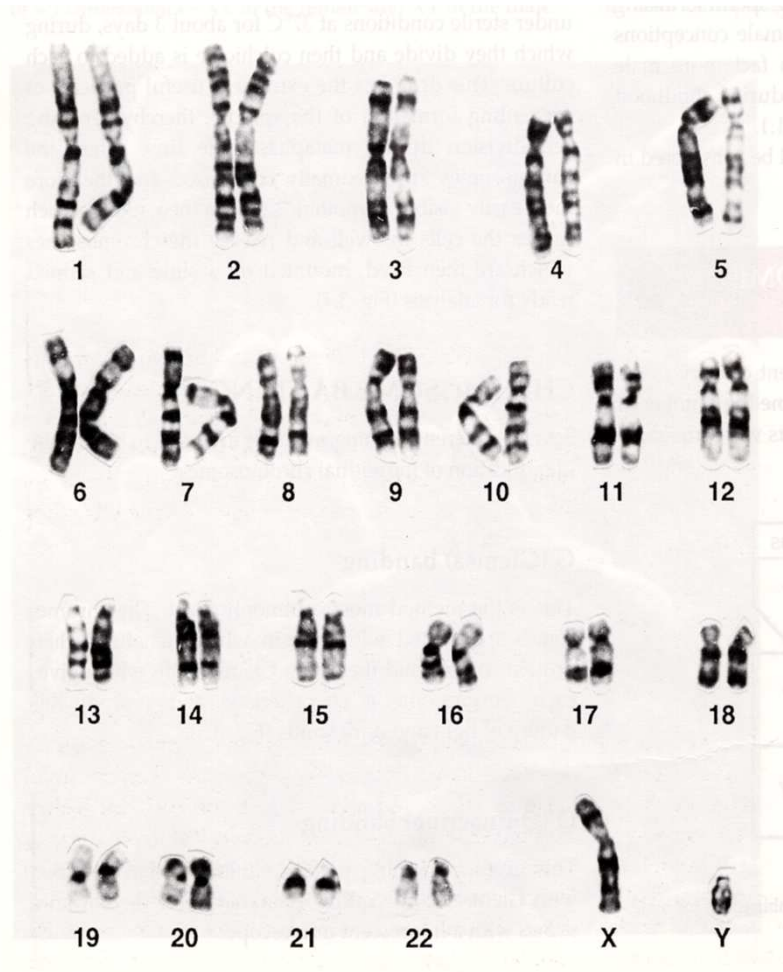
○ - ядръцеви организатори

Бандиране на метафазните хромозоми

- Според бандирането/оцветяването различаваме **G**, **C** и **R** бандове/ивици.
- **G** и **C** бандове са късно реплициращи се области през S период – кореспондират с хетерохроматина, разполагат се по периферията на ядрото
- **R** бандовете се реплицират по-рано през S-фазата - кореспондират с еухроматина
- R са богати на ацетилирани хистони – модификация, която се запазва при митоза и активира транскрипция.



Нормален мъжки кариотип



- 13, 18, 21 не съдържат много гени
– Тъмни хромозоми
- $21 < 22$
- 22 два пъти повече гени от 21
– 200 върху 21
– 400 върху 22

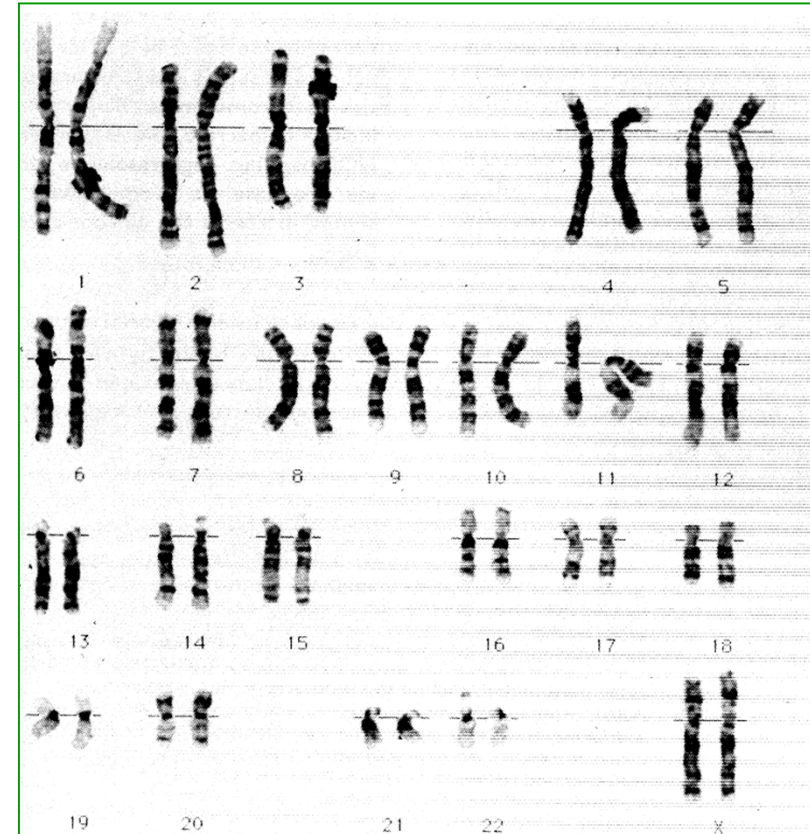
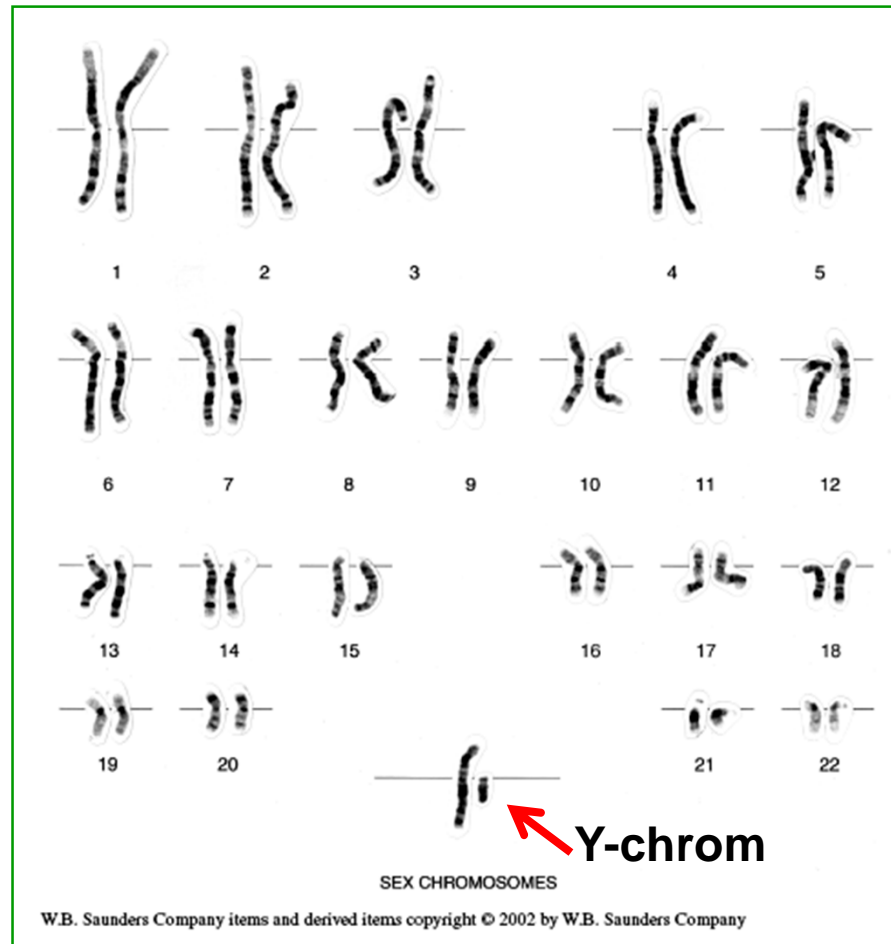
Нормален женски кариотип



Хромозоми при човека

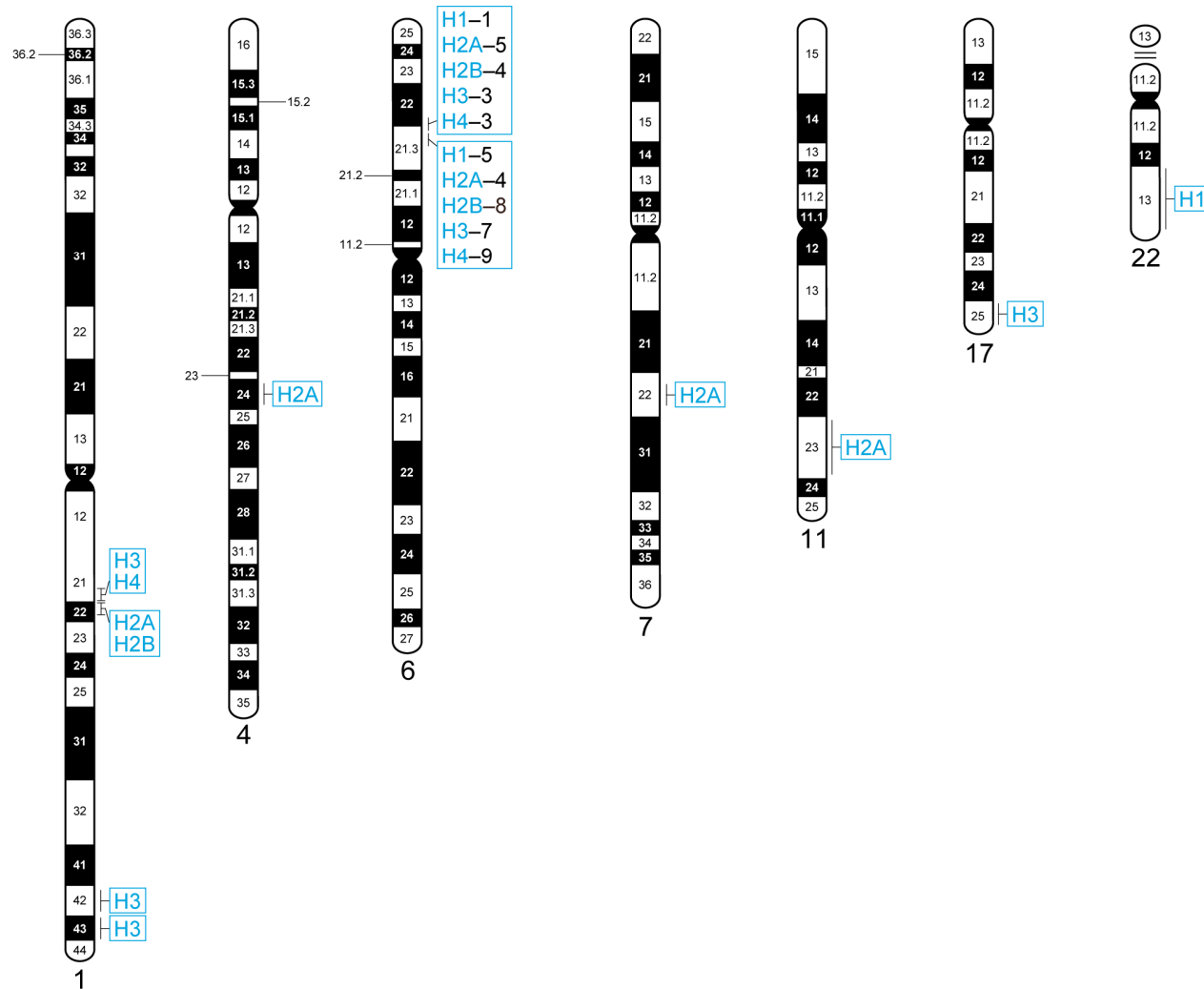
МЪЖ

жена

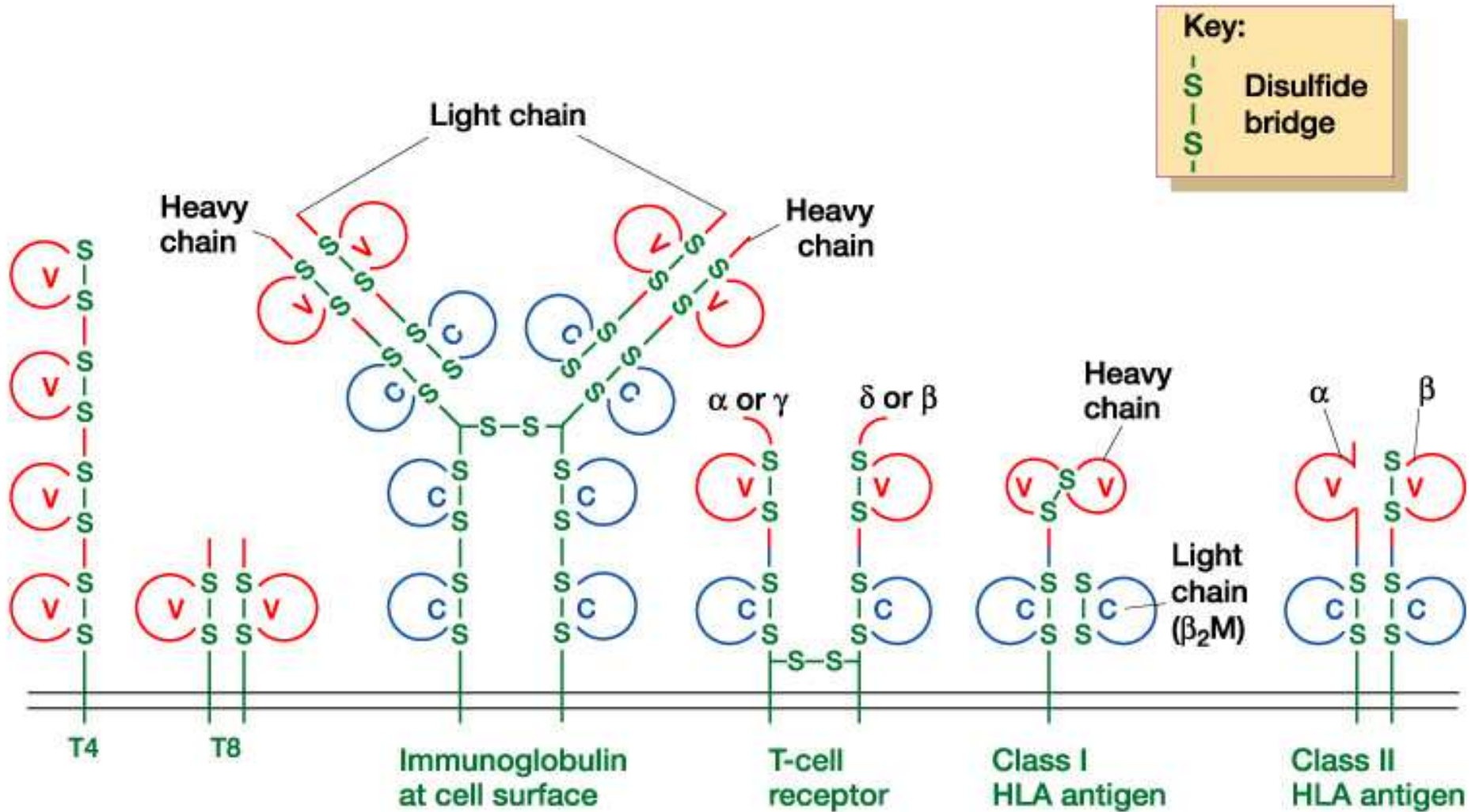


Генни семейства

– Състоят се от функционално сходни гени , но разпръснати из генома

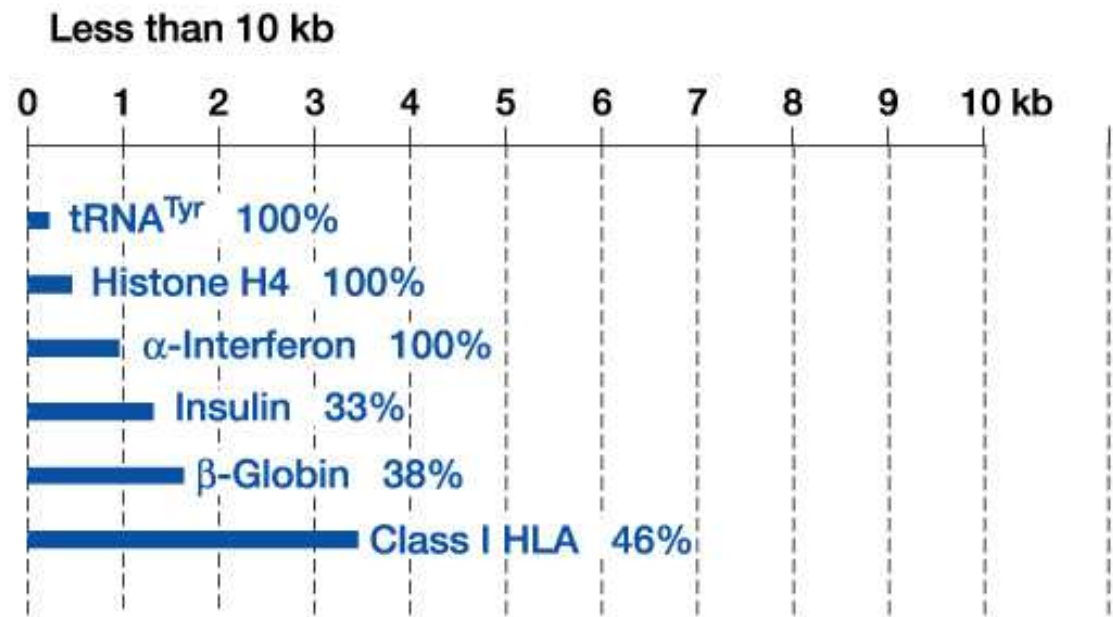


- Ig суперсемейство
 - Рецептори по повърхността на клетките



Гените варираат по големина и екзони

(A)



(B)

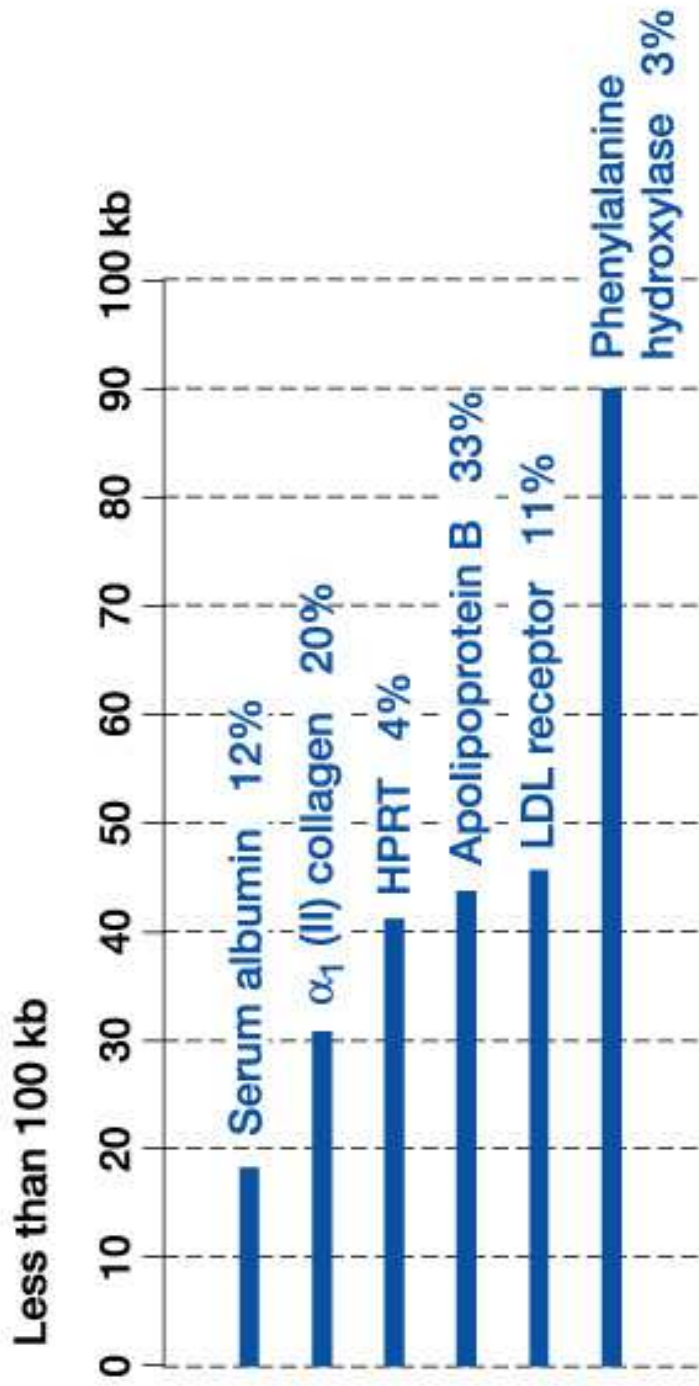
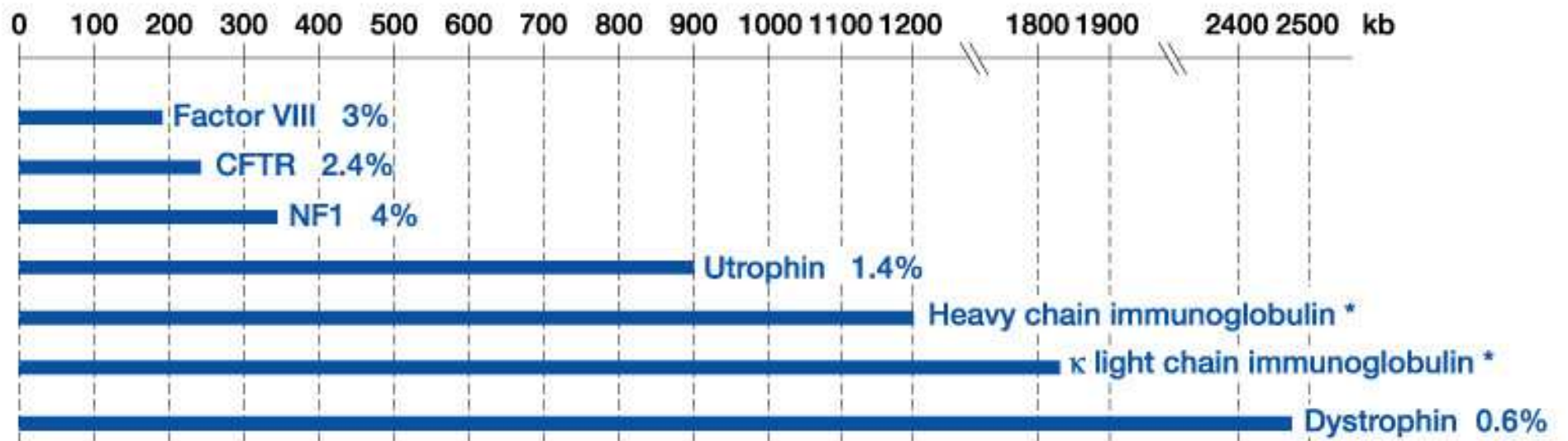


Figure 9-7 part 2 of 3 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

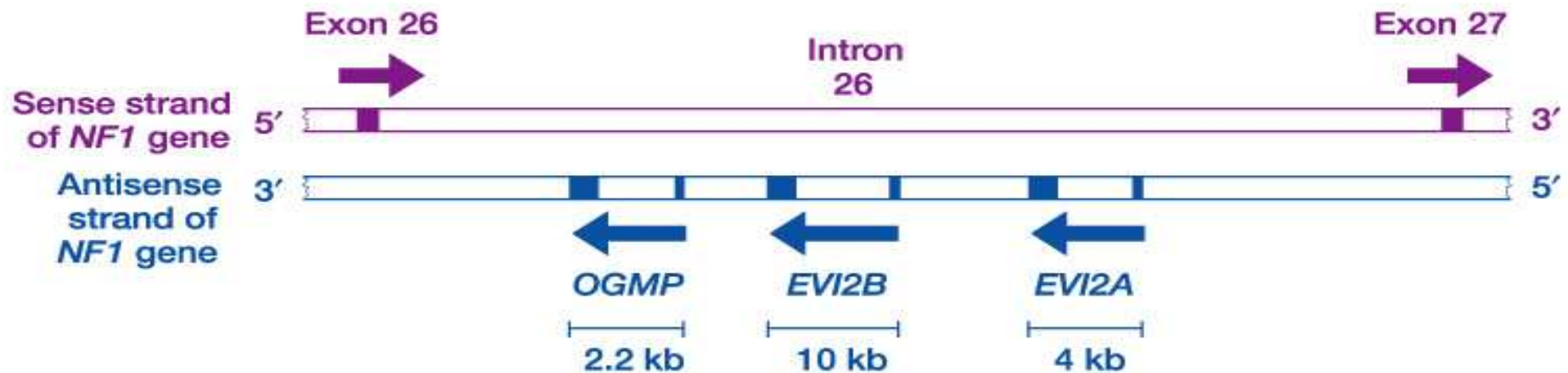
(c)

More than 100 kb



- Гени в гените
 - Интрон 26 на NF1 съдържа 3 вътрешни гена.
 - неврофиброматоза - туморно заболяване, причинено от мутация на ген NF1 в 17 хромозома

(B)



- <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromatinEducEng.html>
- <http://www.johnkyrk.com/chromosomestructure.html>