ФГБУ «ПИЯФ» НИЦ «Курчатовский институт»

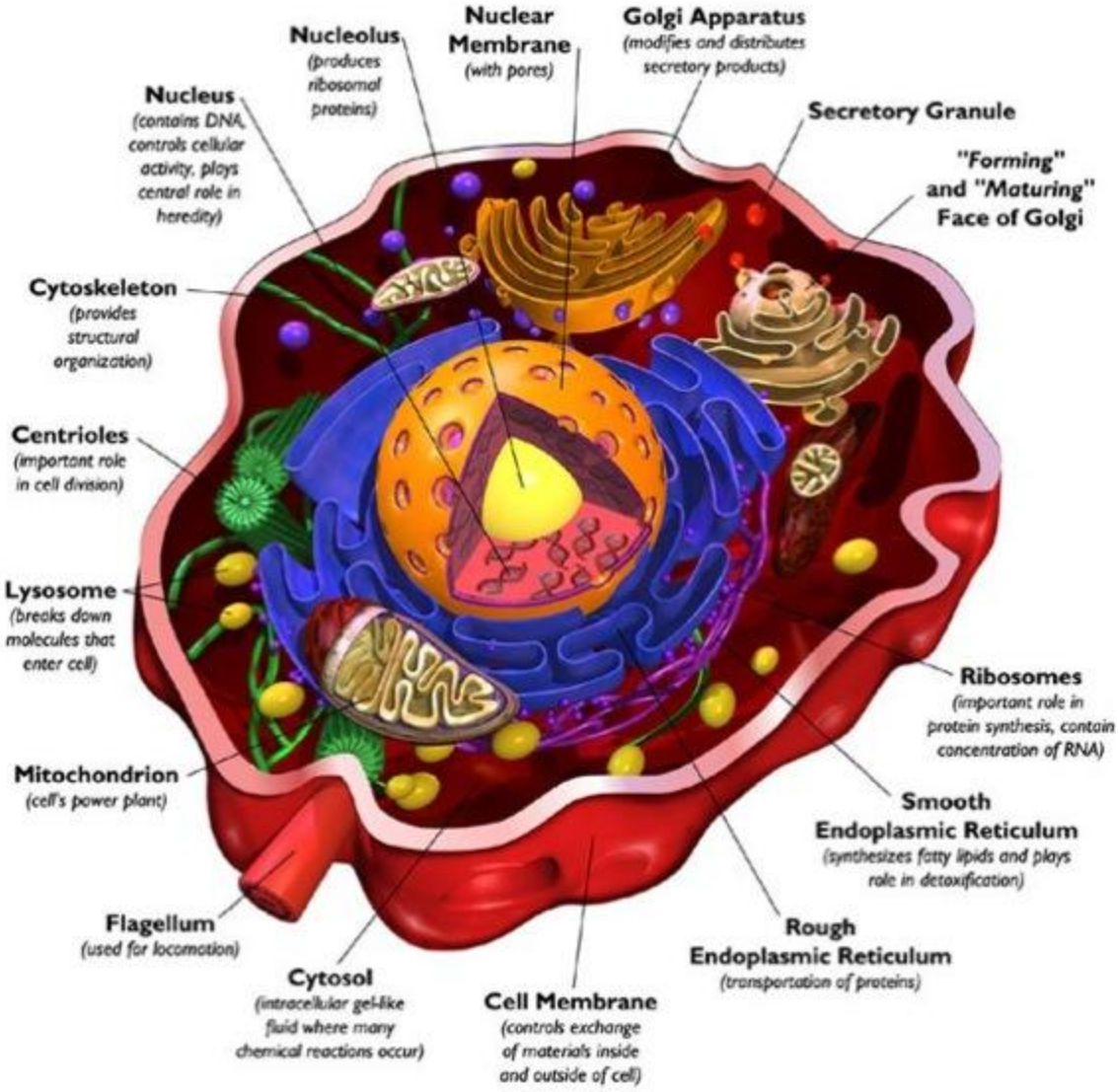
Структурная организация генома высших организмов: феномен фрактальной организации хроматина по данным МУРН

РНСИ-КС-2014

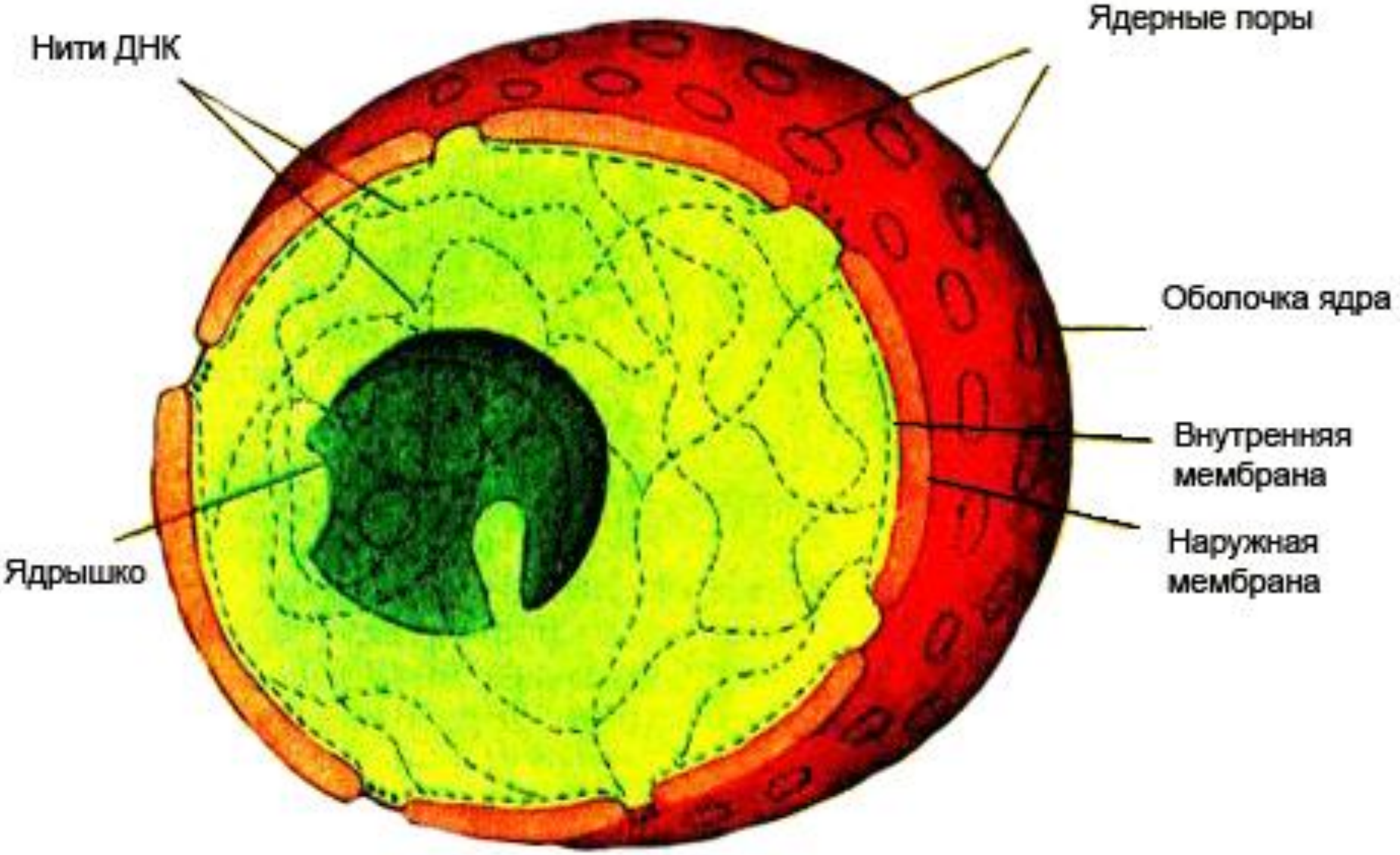
29 октября 2014

Санкт-Петербург, Старый Петергоф

тка — элементарная единица строения и жизнедеятельности всех организмов (кроме вирусов, о которых нередко говорят, как о неклеточных формах жизни), обладающая собственным обменом веществ, способная к самостоятельному существованию, самовоспроизведению и развитию


Nucleolus
(produces ribosomal proteins)
Nuclear Membrane
(with pores)
Golgi Apparatus
(modifies and distributes secretory products)
Nucleus
(contains DNA, controls cellular activity, plays central role in heredity)
Secretory Granule
"Forming" and "Maturing" Face of Golgi
Cytoskeleton
(provides structural organization)
Centrioles
(important role in cell division)
Lysosome
(breaks down molecules that enter cell)
Ribosomes
(important role in protein synthesis, contain concentration of RNA)
Mitochondrion
(cell's power plant)
Smooth Endoplasmic Reticulum
(synthesizes fatty lipids and plays role in detoxification)
Flagellum
(used for locomotion)
Rough Endoplasmic Reticulum
(transportation of proteins)
Cytosol
(intracellular gel-like fluid where many chemical reactions occur)
Cell Membrane
(controls exchange of materials inside and outside of cell)

Ядро (лат. *nucleus*) — это один из структурных компонентов эукариотической клетки, содержащий генетическую информацию (молекулы ДНК), осуществляющий основные функции: хранение, передача и реализация наследственной информации с обеспечением синтеза белка.

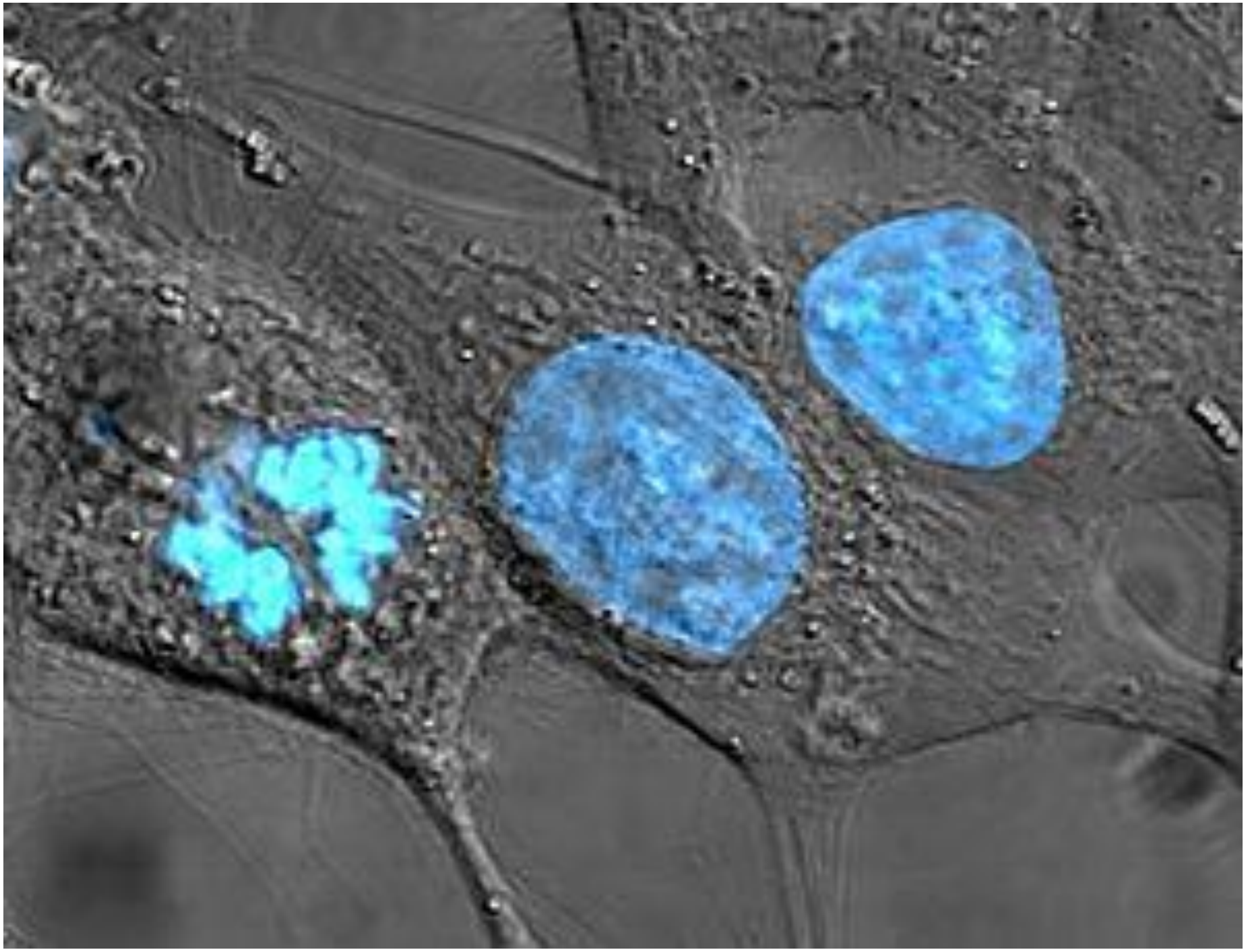

Нити ДНК
Ядерные поры
Оболочка ядра
Внутренняя мембрана
Наружная мембрана
Ядрышко

Хроматин (греч. χρώματα — цвета, краски) — это вещество хромосом — комплекс ДНК, РНК и белков. Хроматин находится внутри ядра клеток эукариот и входит в состав нуклеоида у прокариот. Именно в составе хроматина происходит реализация генетической информации, а также репликация и репарация ДНК.

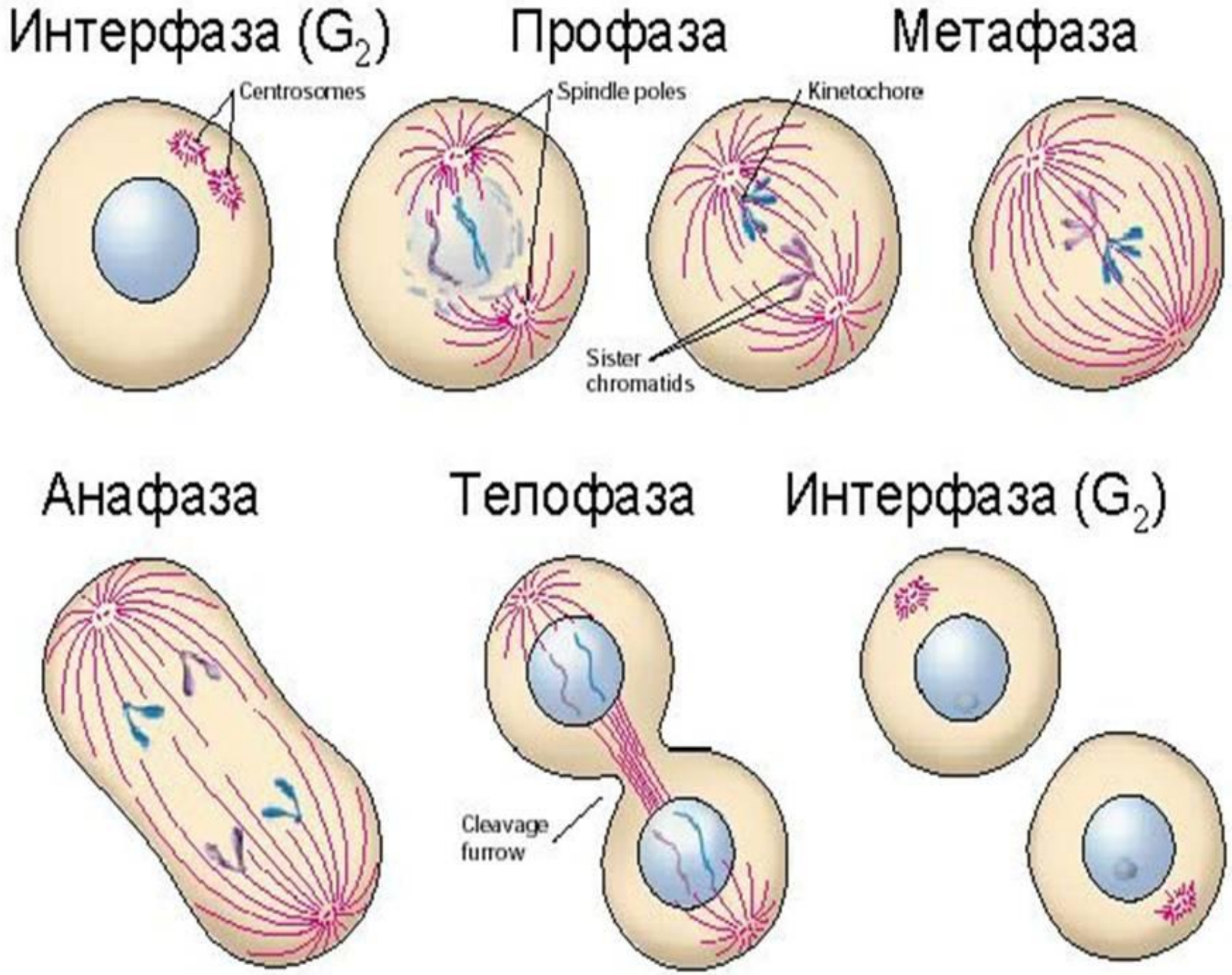
ДНК – 30-40% по массе

Гистоновые белки -30-50%

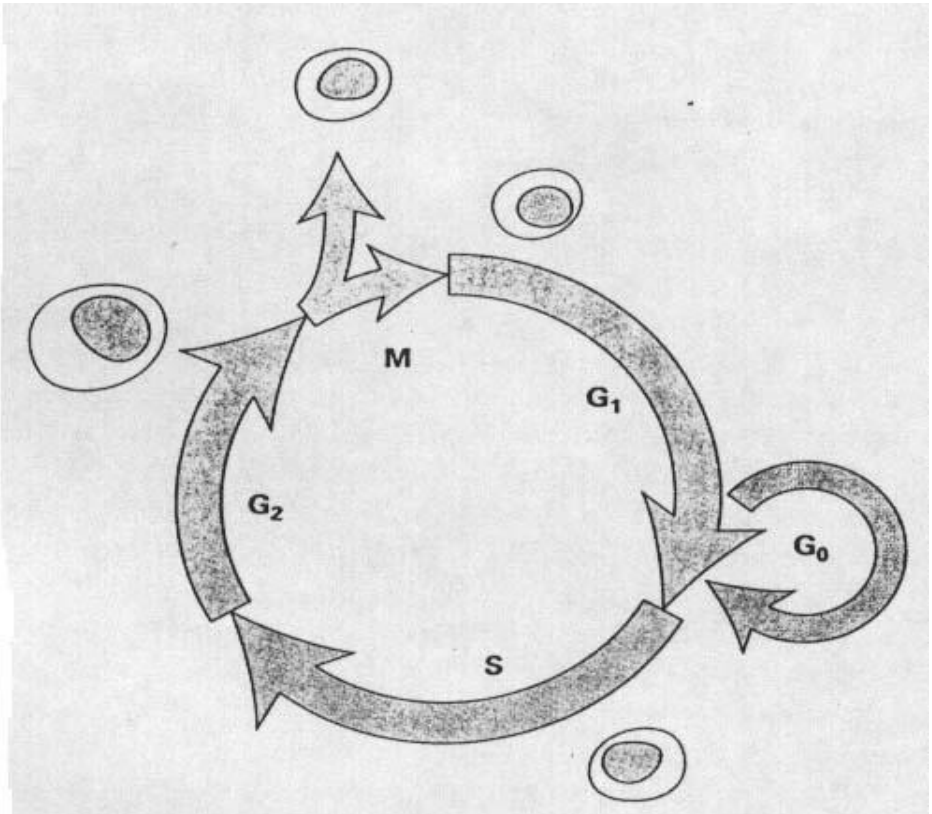
Негистоновые белки и РНК 4-33%



Клеточный цикл — это период существования клетки от момента её образования путем деления материнской клетки до собственного деления или гибели.


Интерфаза (G_2)
Профаза
Метафаза
Centrosomes
Spindle poles
Kinetochore
Sister chromatids
Анафаза
Телофаза
Интерфаза (G_2)
Cleavage furrow

Cell cycle



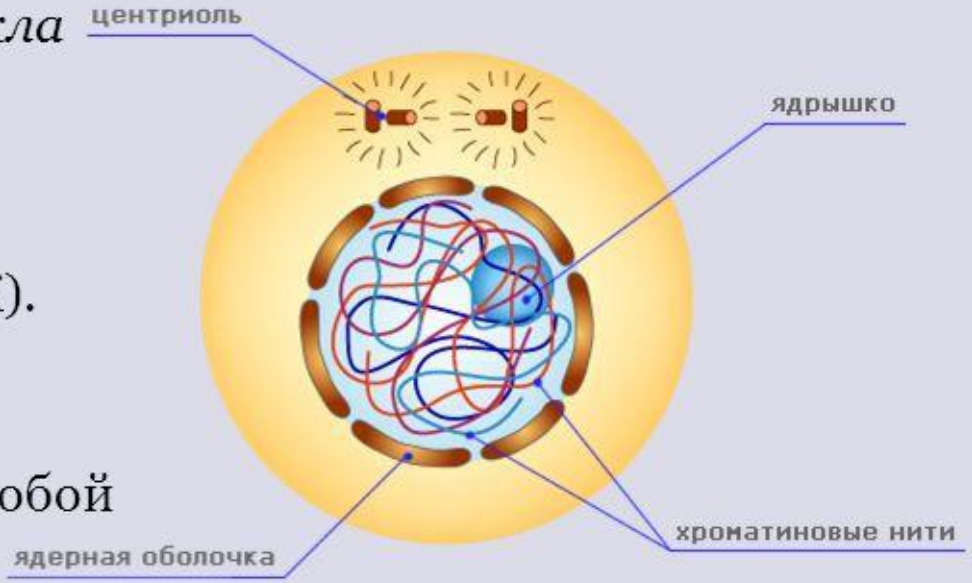
▲ **FIGURE 1-9 The eukaryotic cell cycle.** In most growing cells, the four phases proceed successively, taking from 10–20 hours depending on cell type and developmental state. Interphase comprises the G_1, S, and G_2 phases. DNA is synthesized in S, and other cellular macromolecules are synthesized throughout interphase, so the cell roughly doubles its mass. During G_2 the cell is prepared for the mitotic (M) phase, when the genetic material is evenly partitioned and the cell divides. Nondividing cells exit the normal cycle, entering the quiescent G_0 state.

Interphase comprises the G_1, S and G_2 phases. Nondividing cells exit in G_0 state.

Интерфаза

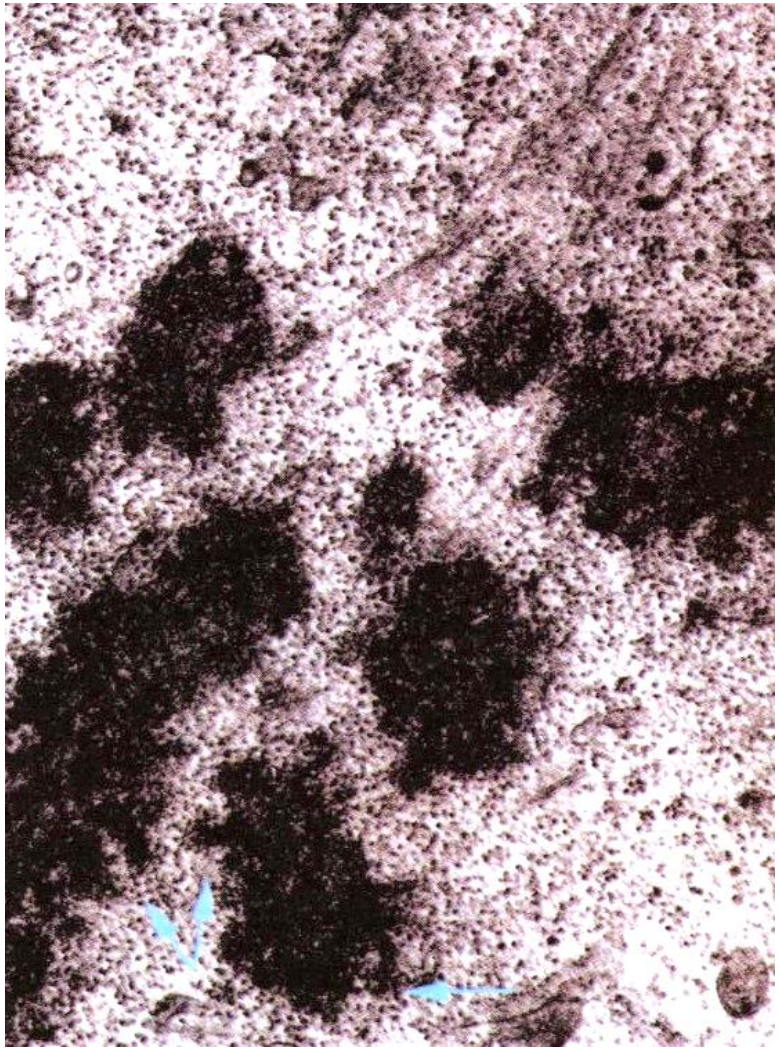
- *период подготовки клетки к делению,*
- *первый этап клеточного цикла*
- *Фаза относительного покоя клетки.*
- Здесь происходят процессы:

1. Репликация (удвоение ДНК).
2. Накопление питательных веществ.
3. Хромосомы представляют собой вытянутые нитевидные образования.

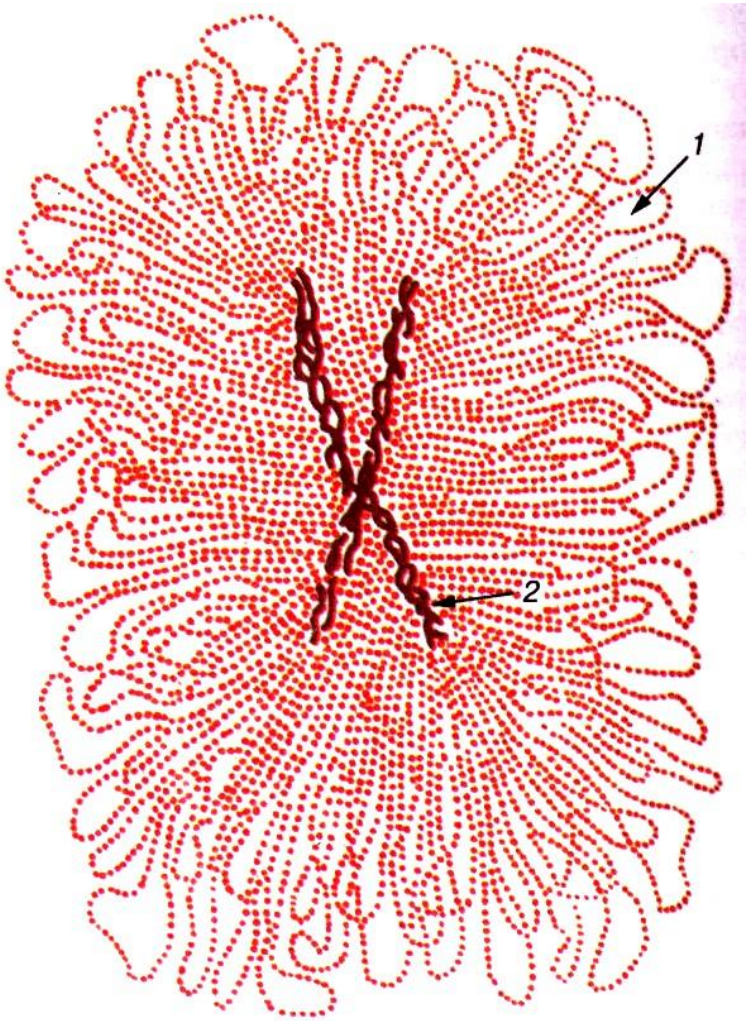


это период между двумя делениями.

MyShared

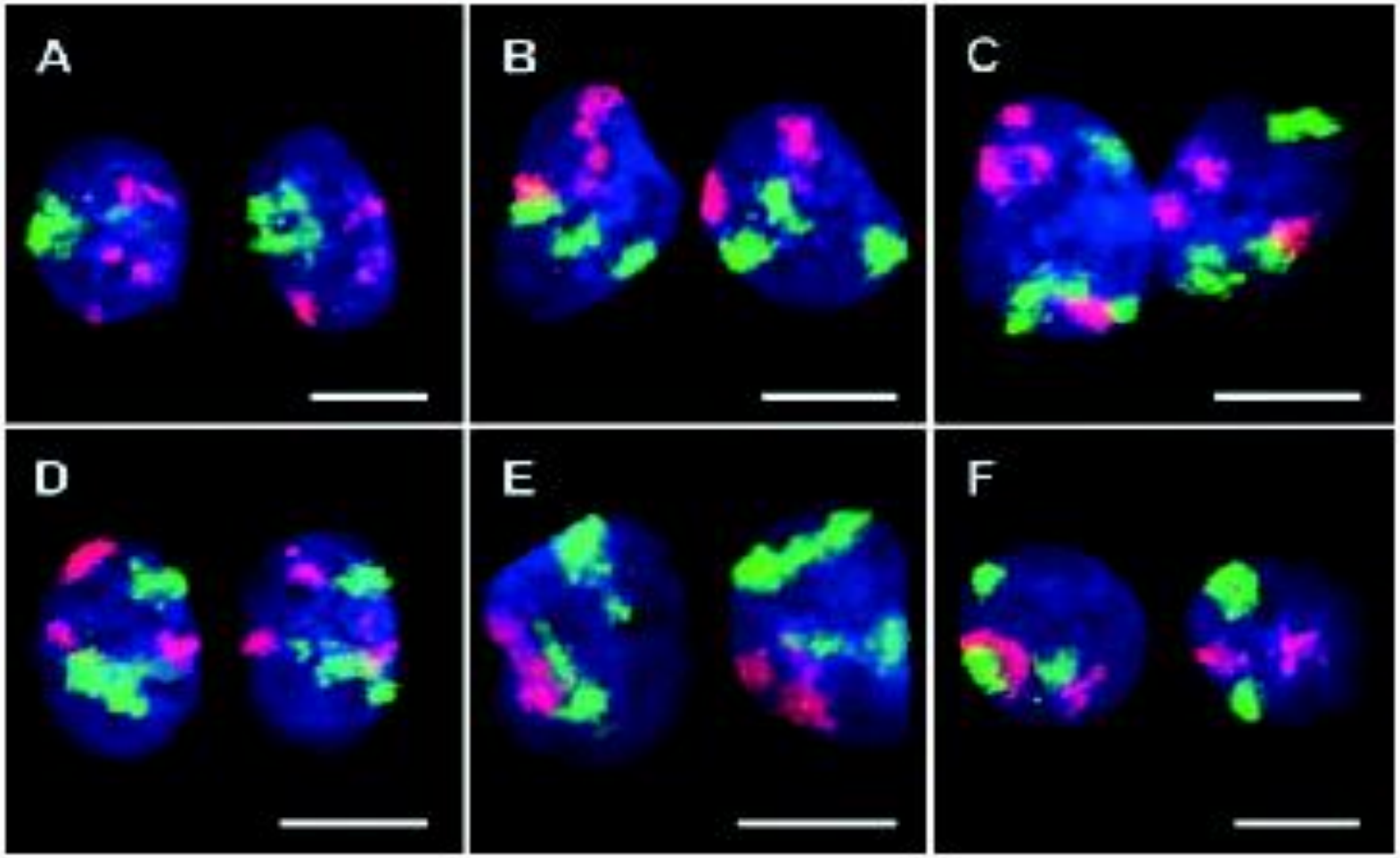


Глыбки хроматина в интерфазном ядре



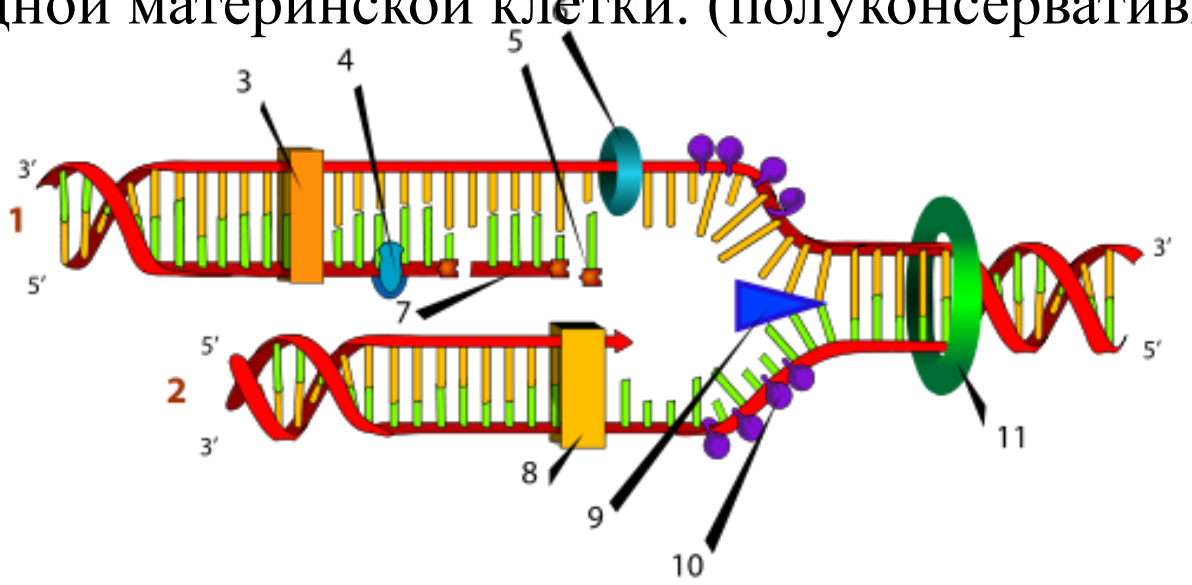
1. Нить ДНК в виде хроматина.
2. Она же в виде хромосомы при делении клетки

Территориальный принцип упаковки хромосом



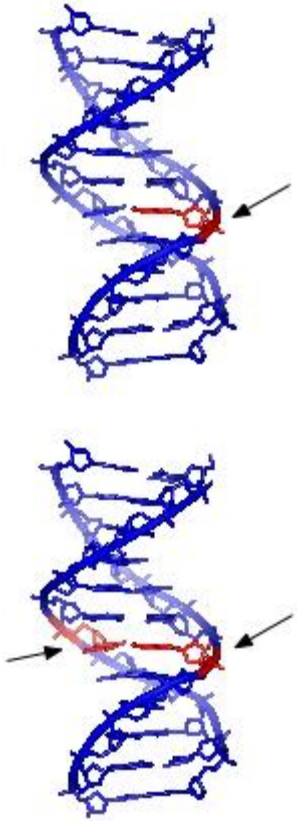
chromosome order in HeLa cells J.Walter et al., J. Cell Biol. 2003

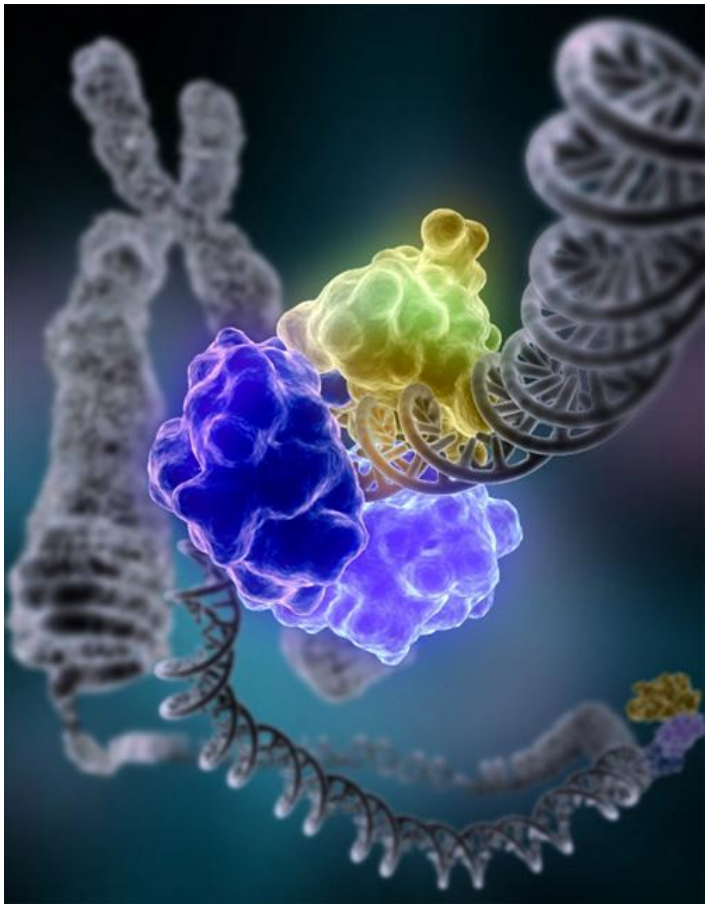
ция (от лат. *replicatio* — возобновление) — процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. (полуконсервативная)



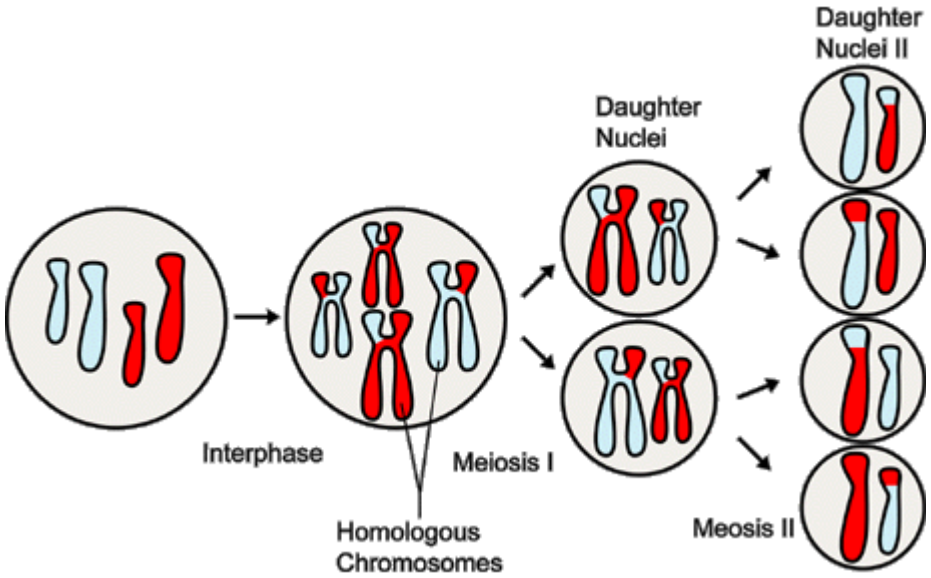
Схематическое изображение процесса репликации, цифрами отмечены: (1) запаздывающая нить, (2) лидирующая нить, (3) ДНК-полимераза (Polα), (4) ДНК-лигаза, (5) РНК-праймер, (6) праймаза, (7) фрагмент Оказаки, (8) ДНК-полимераза (Polδ), (9) хеликаза, (10) одиночная нить со связанными белками, (11) топоизомераза

Репарация (от лат. *reparatio* — восстановление) — особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, повреждённой при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических агентов. Осуществляется специальными ферментными системами клетки

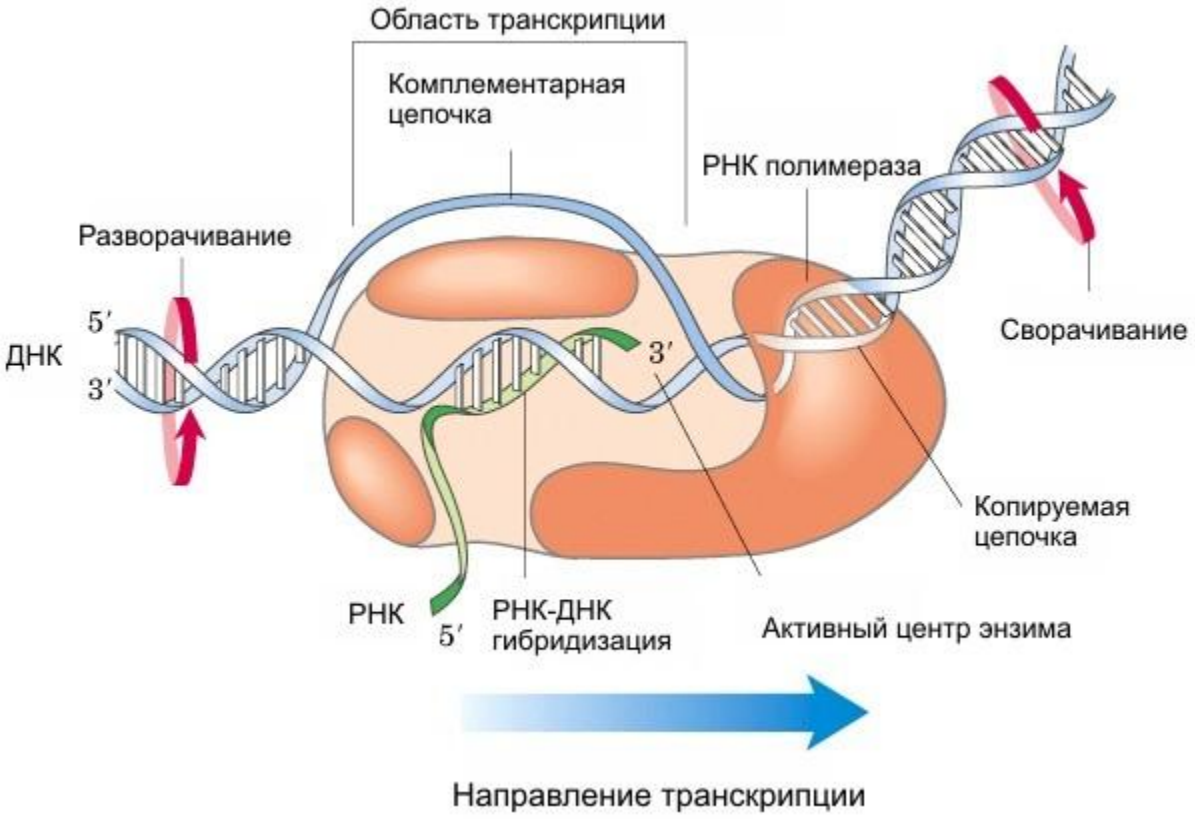




Рекомбинация — процесс обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул. Рекомбинация происходит при репарации двунитевых разрывов в ДНК и для продолжения репликации в случае остановки репликационной вилки у эукариот, бактерий и архей. У вирусов возможна рекомбинация между молекулами РНК их геномов. Рекомбинация у эукариот обычно происходит в ходе кроссинговера в процессе мейоза, в частности, при формировании сперматозоидов и яйцеклеток у животных.



пция (от лат. *transcriptio* — переписывание) — процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.



Эпигенетика (греч. επί — над, выше, внешний) — в биологии, в частности в генетике — представляет собой изучение закономерностей эпигенетического наследования — изменения экспрессии генов или фенотипа клетки, вызванных механизмами, не затрагивающими последовательности ДНК. Эпигенетические изменения сохраняются в ряде митотических делений соматических клеток, а также могут передаваться следующим поколениям. Примерами эпигенетических изменений являются метилирование ДНК и деацетилирование гистонов.

е тки — недифференцированные (незрелые) клетки, имеющиеся во всех многоклеточных организмах. Стволовые клетки способны самообновляться, образуя новые стволовые клетки, делиться посредством митоза и дифференцироваться в специализированные клетки, то есть превращаться в клетки различных органов и тканей.

Развитие молекулярной и клеточной биологии в последние два десятилетия позволило продвинуться в понимании многих молекулярных механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки.

Накоплен громадный экспериментальный материал, позволяющий в деталях понять отдельные аспекты функционирования конкретных макромолекулярных машин, которые обеспечивают молекулярную основу актов репликации, репарации, клеточного деления, клеточной дифференцировки.

Однако число работ, в которых делается попытка системного взгляда на клетку, как целое остается небольшим и, в основном, пока эти работы содержат дискуссию терминологического плана, касающуюся вопроса, что такое системная биология [Cell 2005].

Не менее интригующий уровень понимания живой системы это клеточное ядро.

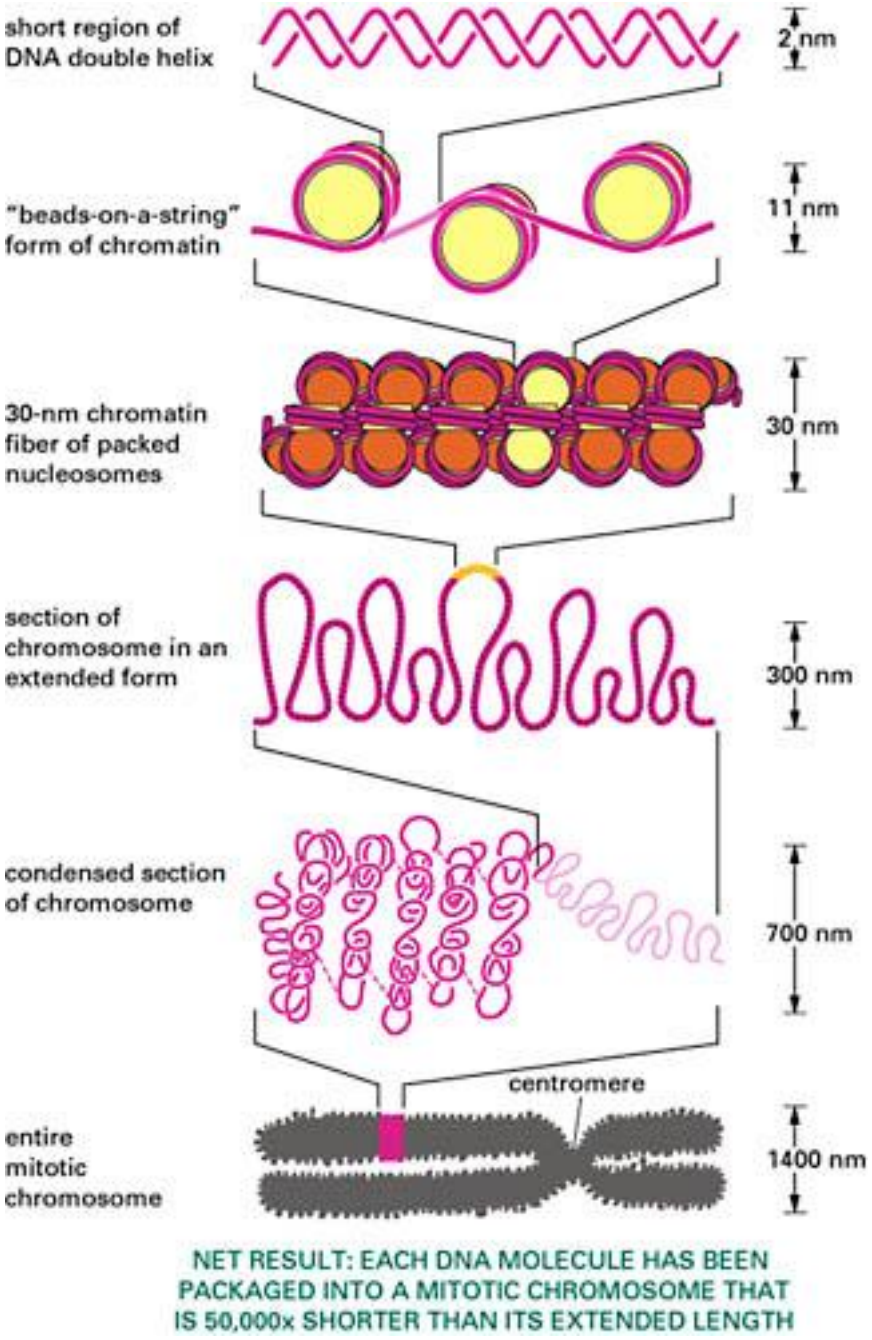
Основная парадигма молекулярной биологии - связь структуры и функции.

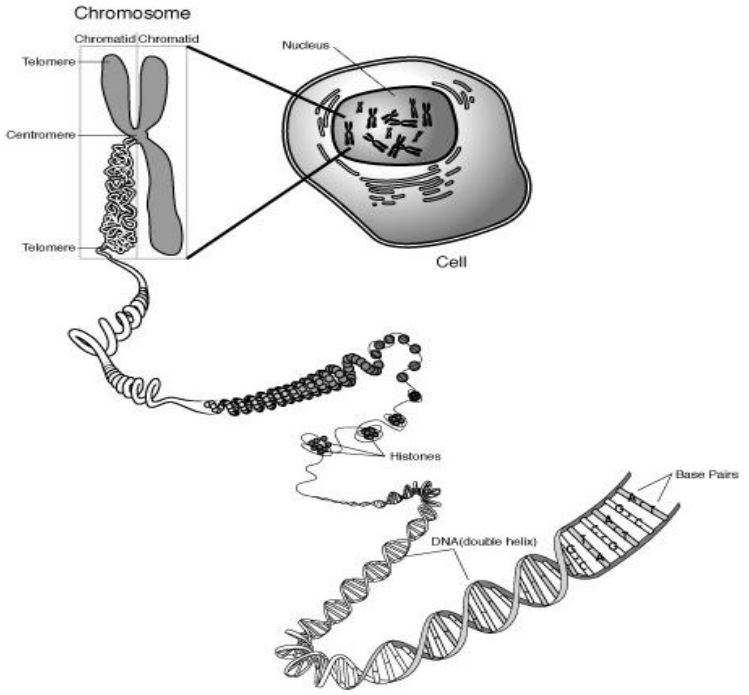
Понимая, как работают, те или иные гены в составе генома, мы не знаем общих принципов упаковки генома в структуру хроматина ядра. Тем более мы не знаем общих принципов транспорта низкомолекулярных соединений и макромолекулярных комплексов в клеточном ядре.

Такое положение приводит к попыткам создания структурных моделей, которые бы позволили объяснить особенности транспорта в ядре.

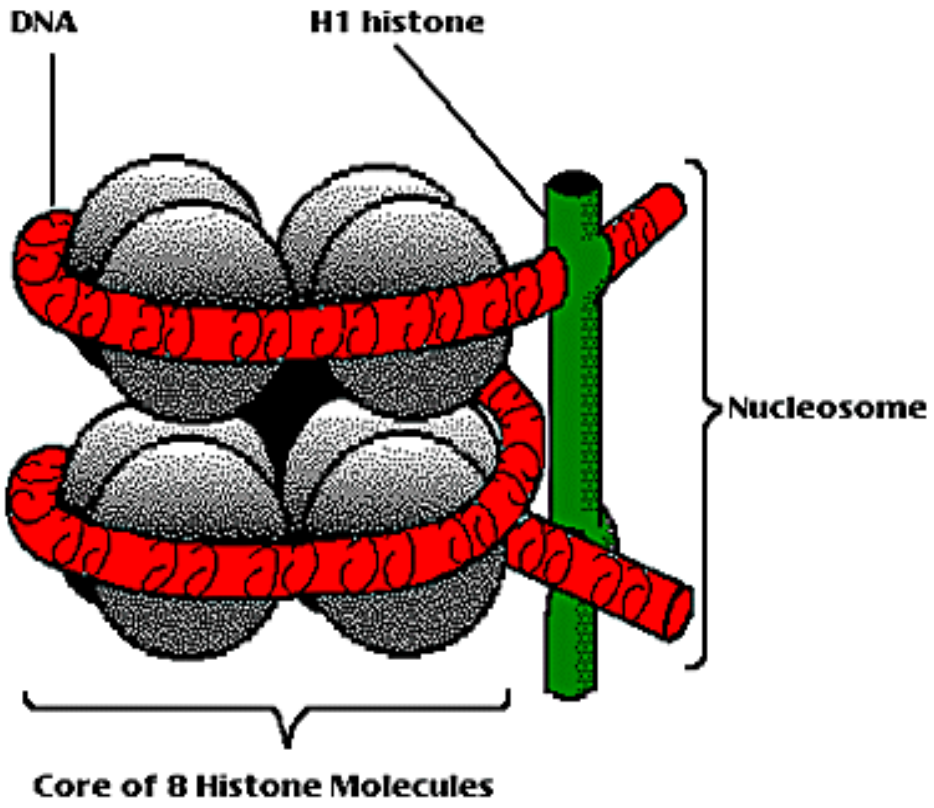
Иными словами, нет формального языка, на котором можно говорить об упаковке хроматина в интегральном смысле.

Levels of Chromatin Packing



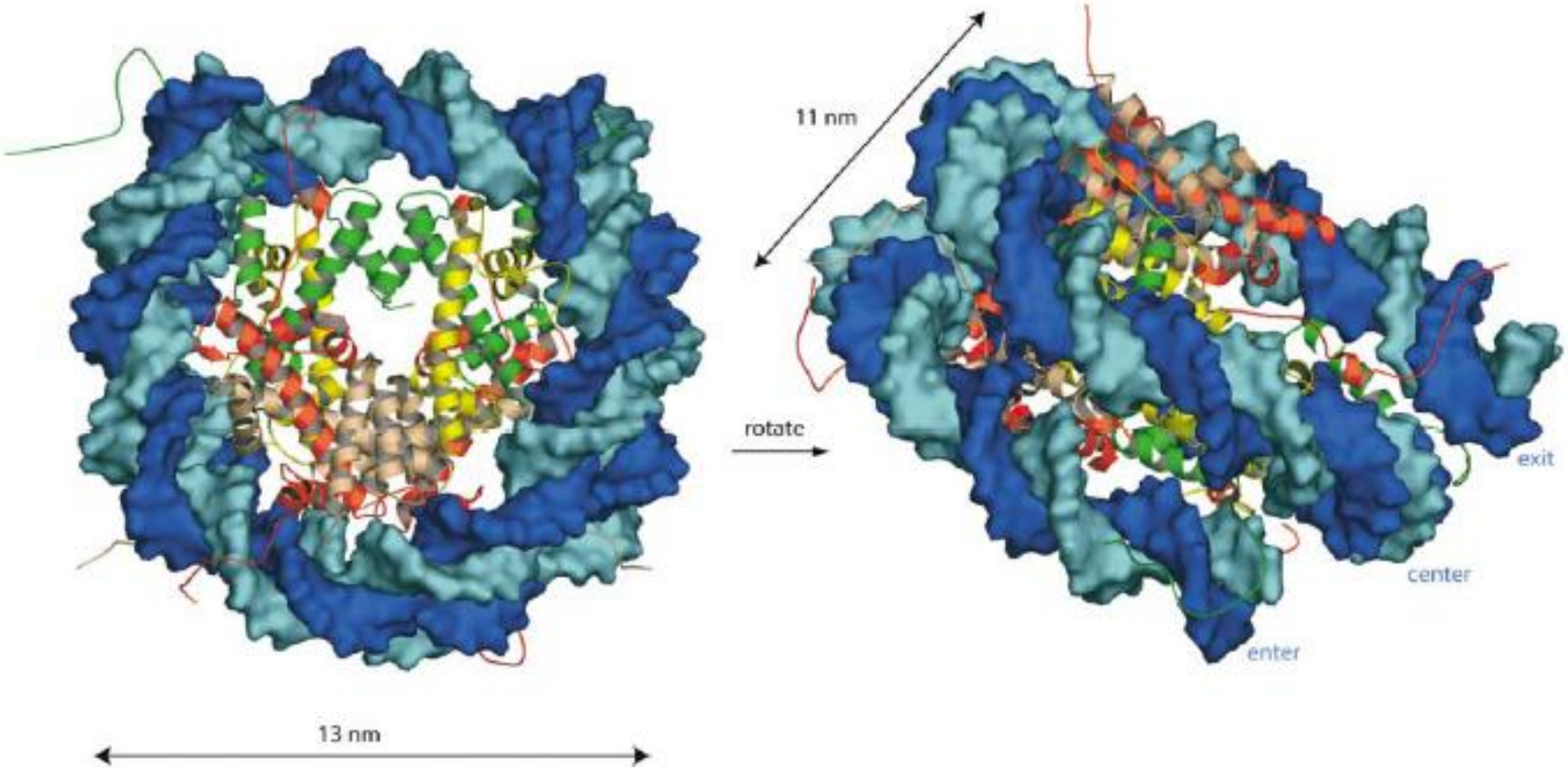


Nucleosome

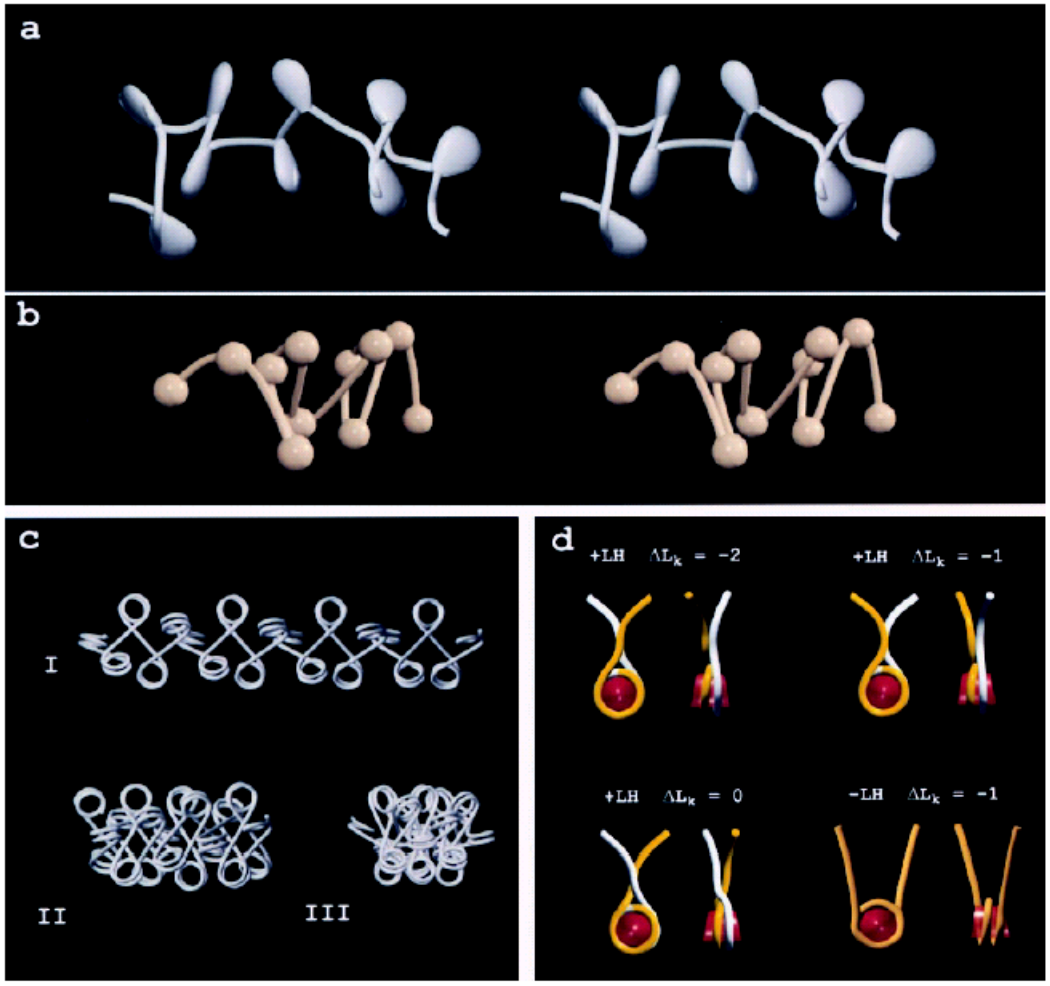


Nucleosome

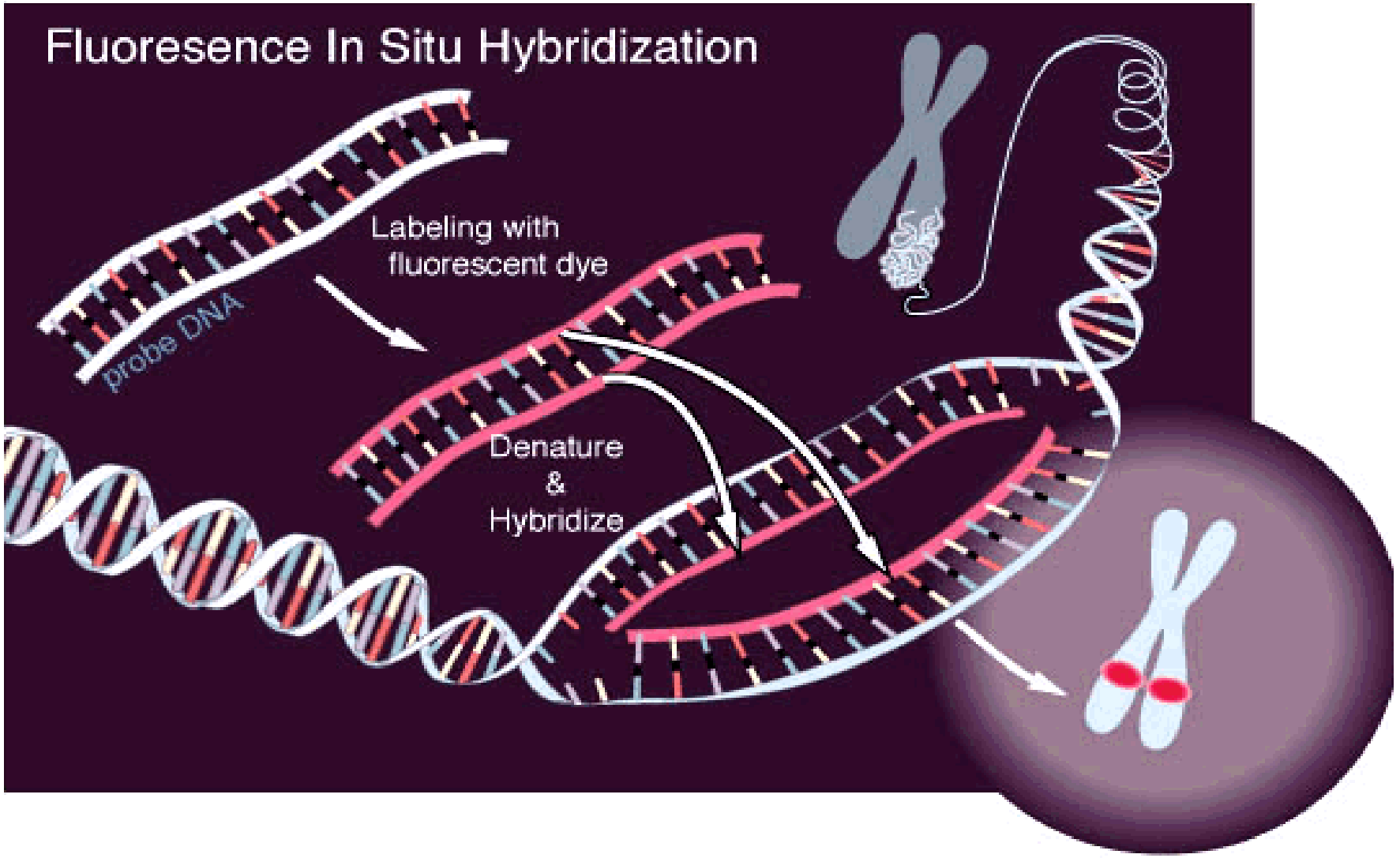
The atomic structure of the nucleosome core particle



Zig - Zag Models



FISH


Fluoresence In Situ Hybridization
Labeling with
fluorescent dye
probe DNA
Denature
&
Hybridize

Flory exponent

Swollen polymer (repulsive forces prevail);

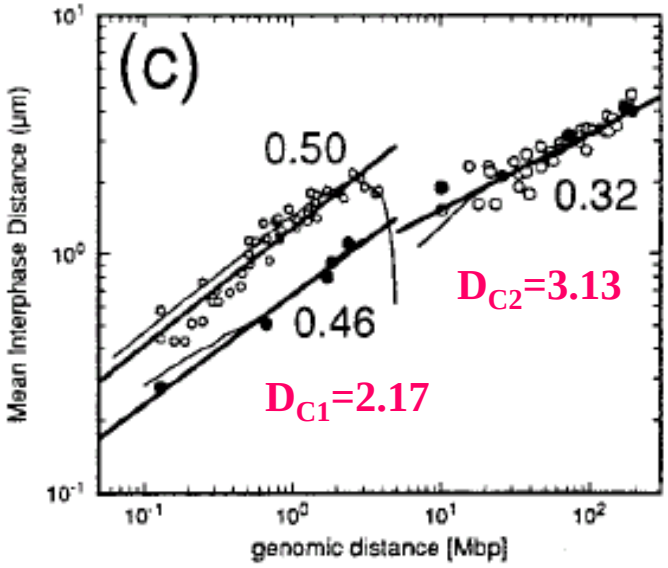
$R \sim N^{3/5}$

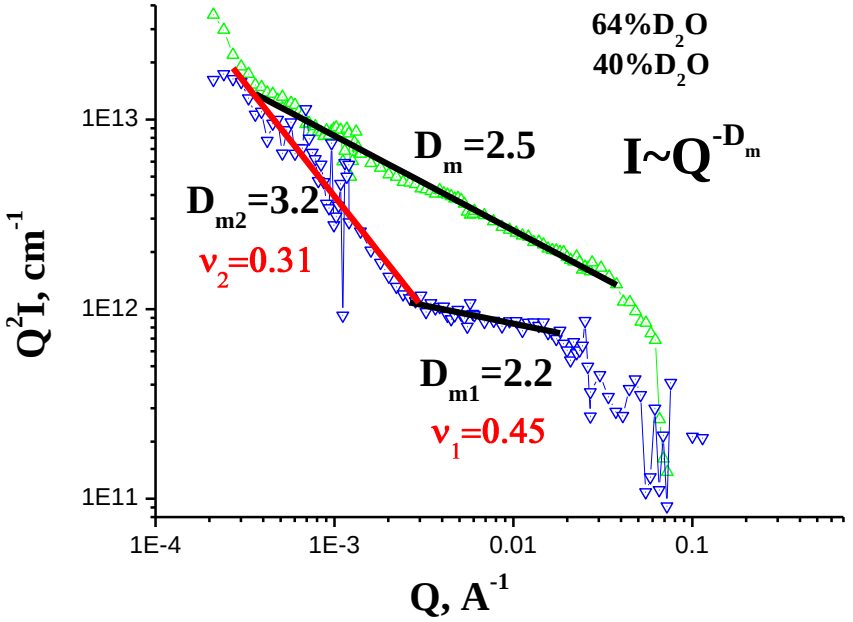
Collapsed polymer (attractive forces prevail);

$R \sim N^{1/3}$

Ideal solvent (θ – point), gaussian polymer

$R \sim N^{1/2}$





R – end-to-end distance;

N – number of monomers;

$$R \propto N^{\nu}$$

ν- Flory exponent;

$D_C = 1/\nu$ ‘chain’ dimensionality;

YokotoY H at.al-1998

R – radius of sphere;

N` - number of monomers in R

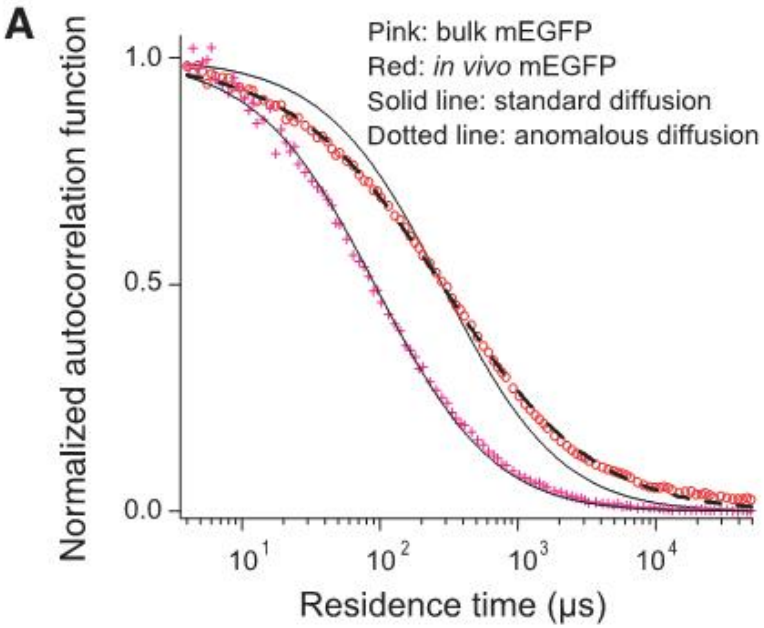
$$M \propto R^{D_m}; R \propto N^{`1/D_m};$$

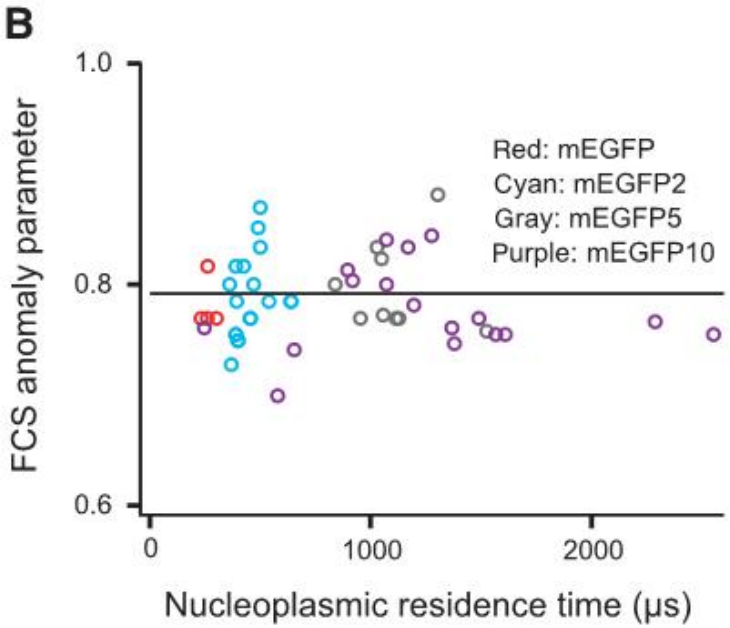
$$N` \to \infty; D_C = D_m$$

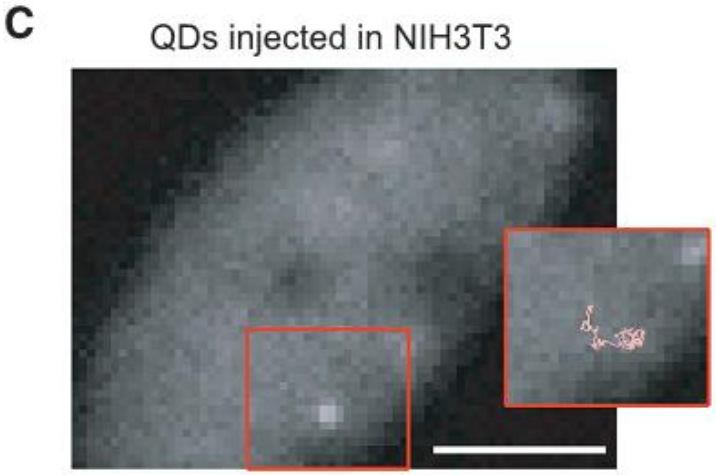
Lebedev D at.al - 2005

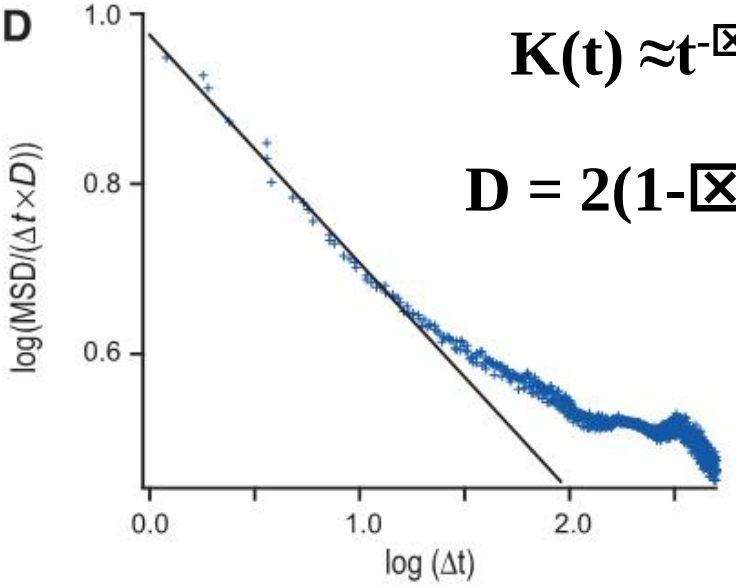
Two phases - two polimer-like behavior

Конфокальная микроскопия







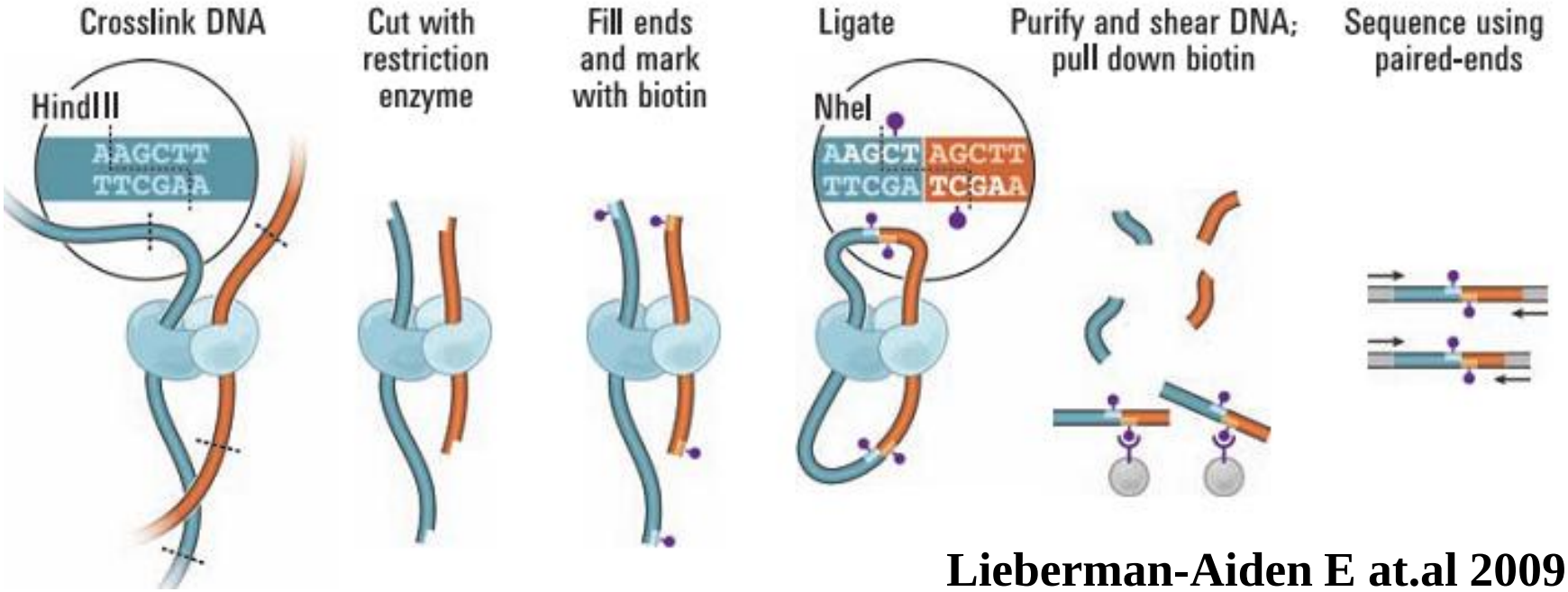


$$K(t) \approx t^{-\alpha}$$

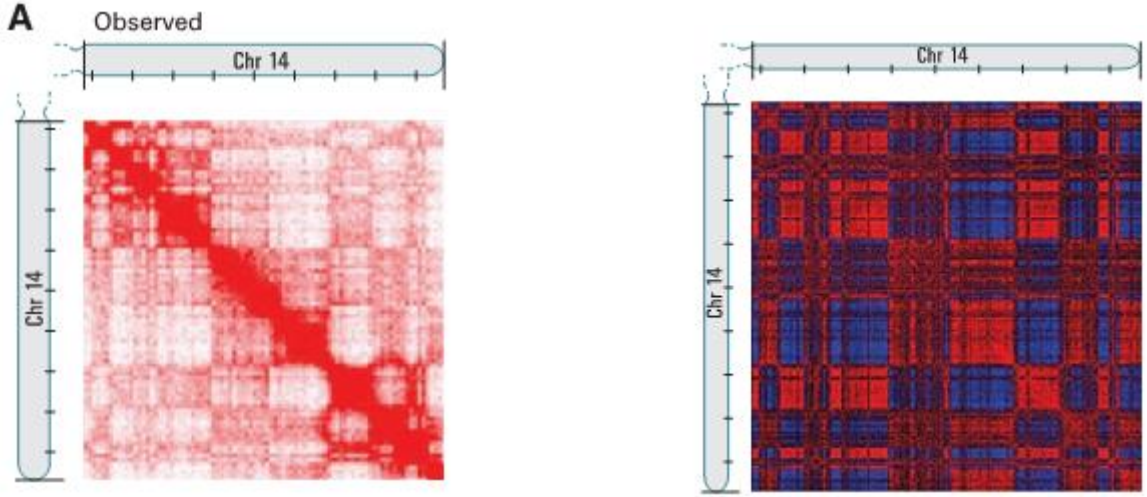
$$D = 2(1-\alpha)/\gamma$$

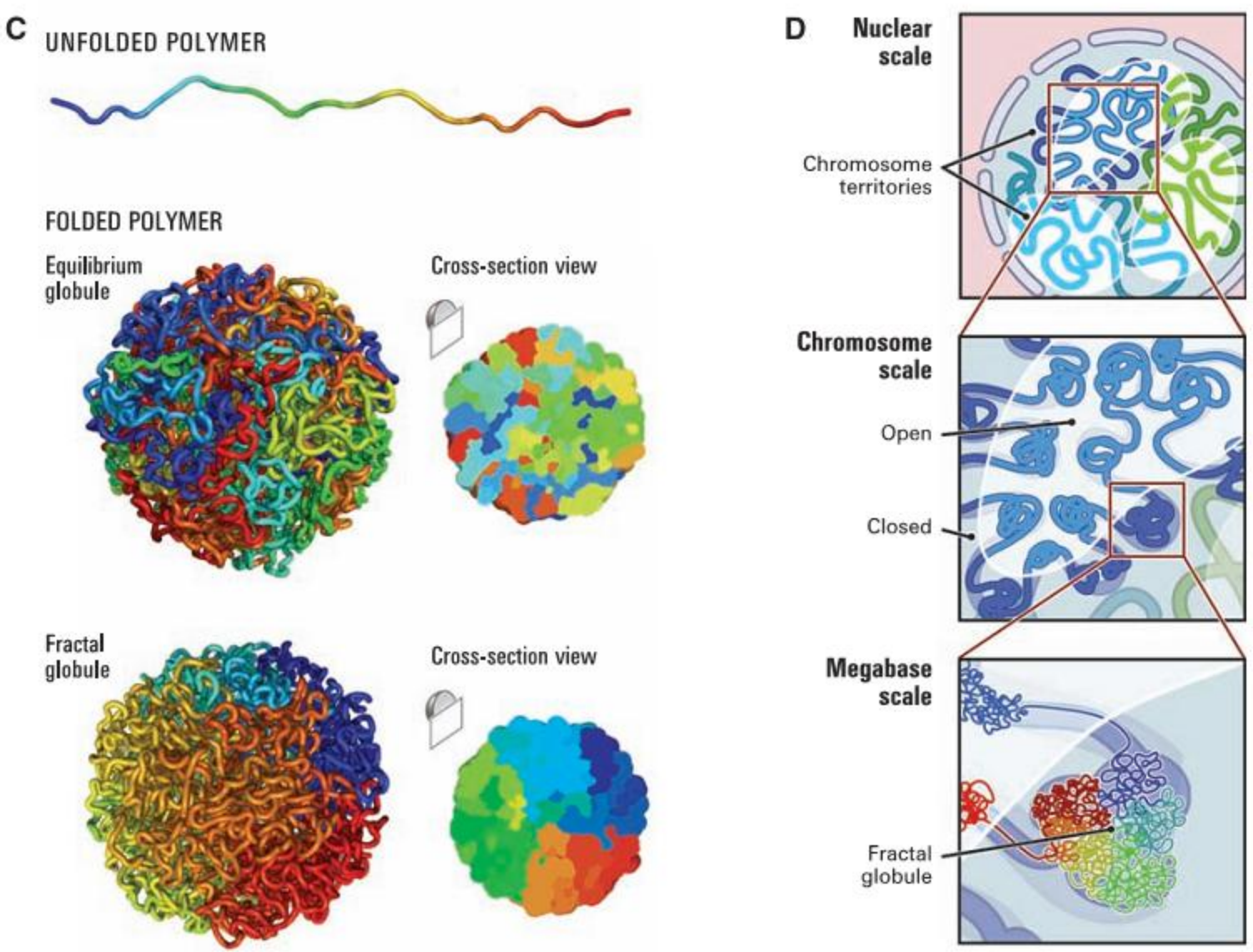
Bancaud A at.al - 2009

Hi-C



Lieberman-Aiden E at.al 2009




C
UNFOLDED POLYMER
FOLDED POLYMER
Equilibrium globule
Cross-section view
Fractal globule
Cross-section view
D
Nuclear scale
Chromosome territories
Chromosome scale
Open
Closed
Megabase scale
Fractal globule

Objective

To investigate the higher-order chromatin structure in the native cell nuclei

Method

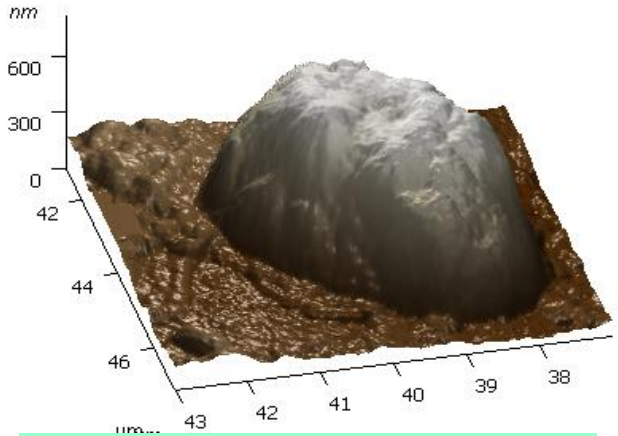
SANS: wide range of structure size; investigation of protein and nucleic components of chromatin by contrast variation

Model objects

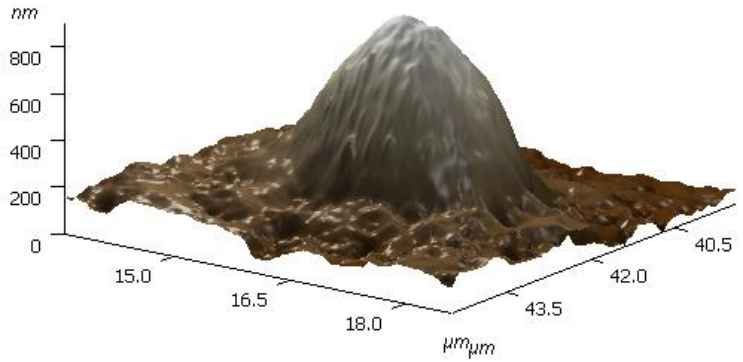
- Chicken erythrocyte nuclei (quiescent nuclei) phase G0
- Nuclei of rat lymphocytes (active nuclei)
- the human cervical adenocarcinoma cell line HeLa
- the Chinese hamster fibroblast cell line A238
- Glioma rat C6
- Glioma human
- Fruit Fly (drosophila embryos)

Получены изображения топографии поверхности ядер клеток высших из различных организмов

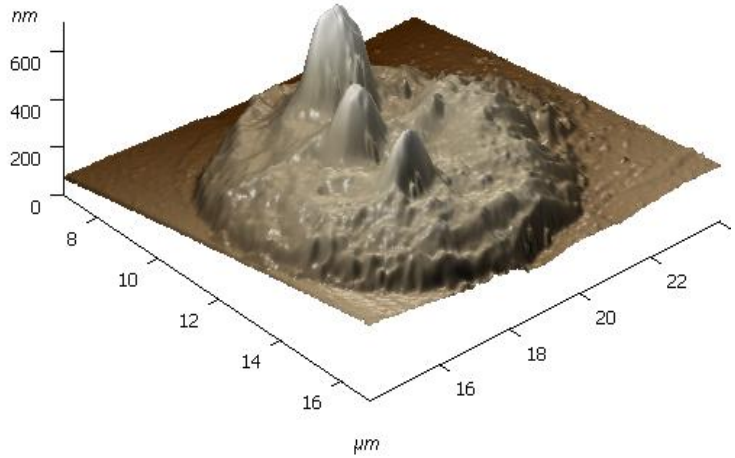
Ядро эритроцита курицы



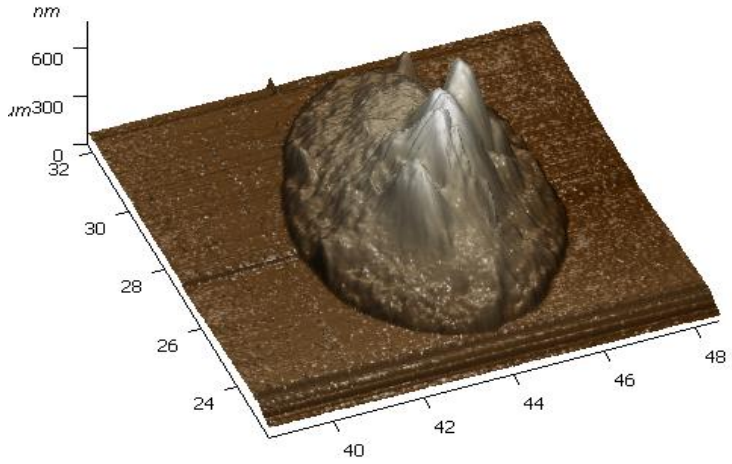
Ядро лимфоцита крысы



Ядро клетки HeLa



Ядро клетки A238



Contrast

$\Delta\rho = \langle g(r)\rangle = 1/V \int[\rho(r) - \rho s]dr = \bar{\rho} - \rho s$

DNA & RNA = 40% D_2O

Prot = 65% D_2O

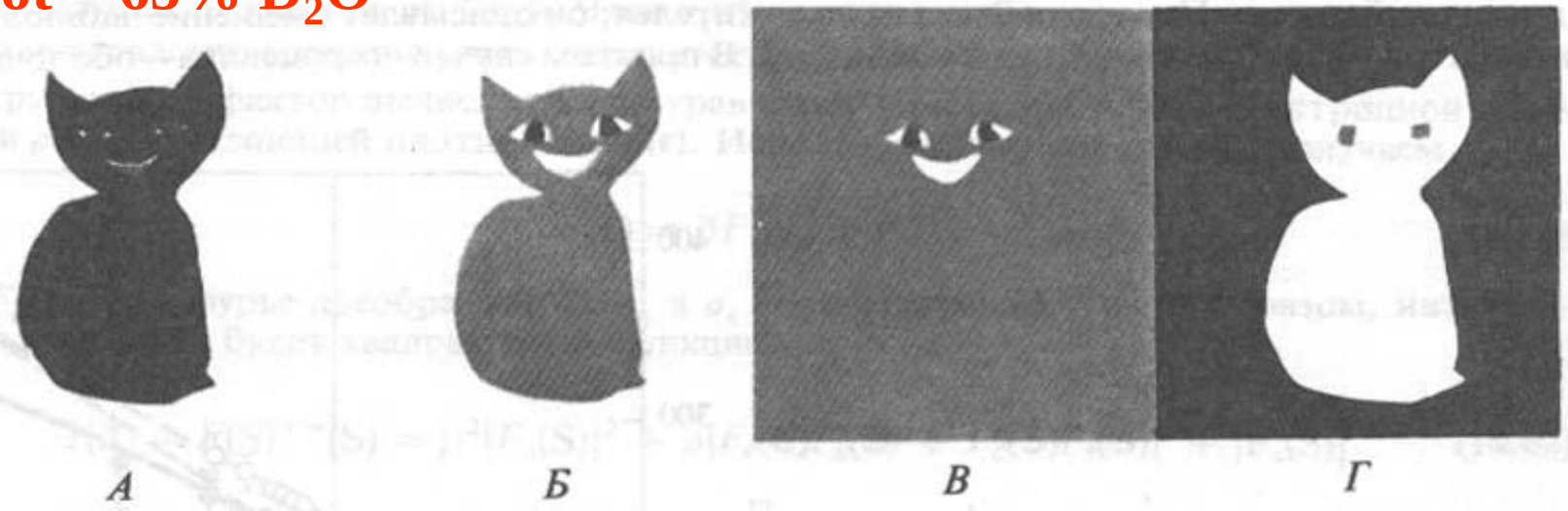


Рисунок служит иллюстрацией того, как вариации контраста между объектом и его фоном могут изменять вид объекта. *А*. Когда контраст $\bar{\rho}$ велик и положителен, то видна лишь общая форма объекта, но большинство внутренних деталей утеряно. *Б*. Вид объекта в отсутствие какого бы то ни было фона. *В*. Когда $\bar{\rho} = 0$, общая форма объекта не просматривается и видны только внутренние неоднородности. *Г*. Когда контраст $\bar{\rho}$ велик и отрицателен, ясно обрисовывается общая форма объекта, но видны лишь некоторые внутренние детали.

Small-angle spectrometers used

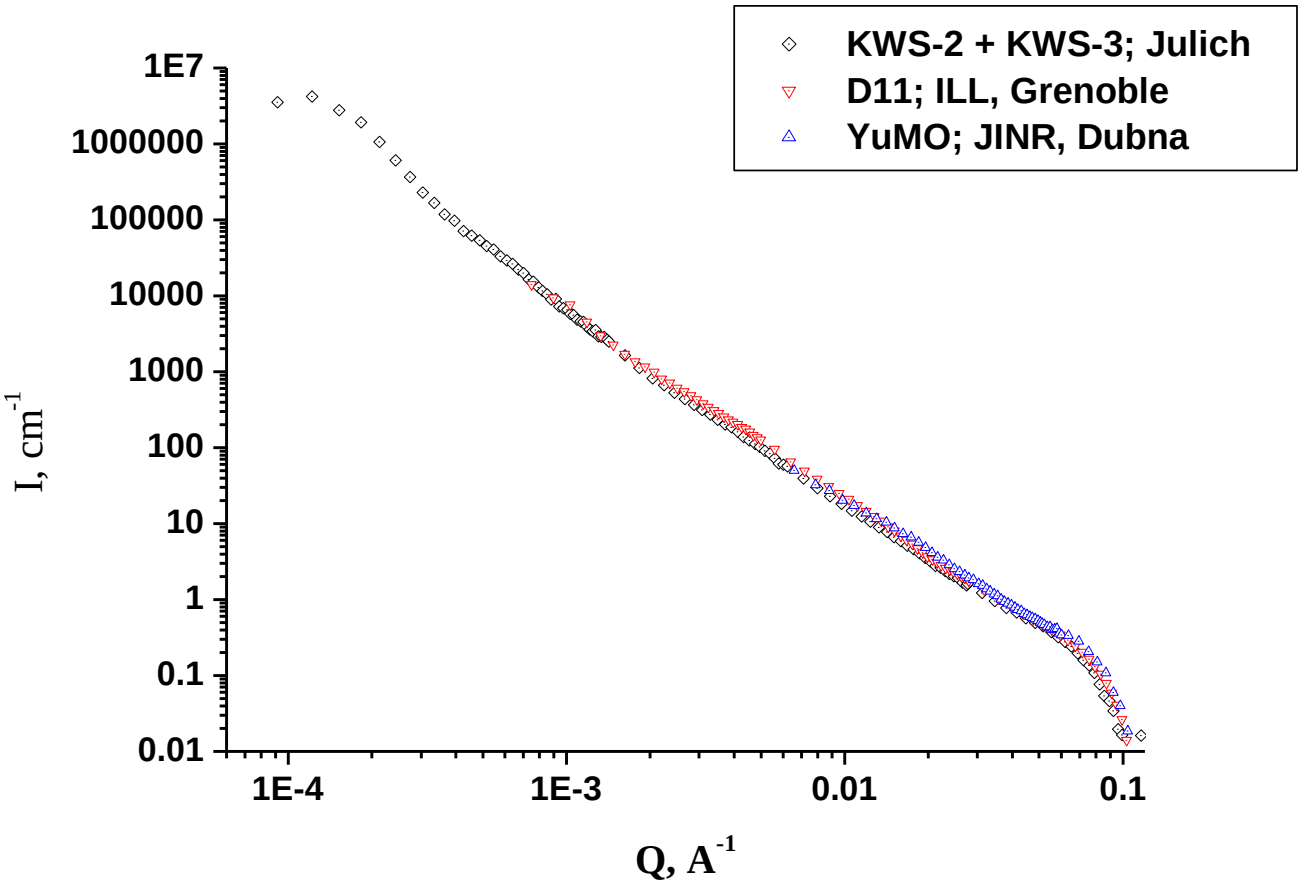
YuMO: Q = $7 \cdot 10^{-3}$ 0.5 $Å^{-1}$ - Dubna
λ=0.5 8Å;
d = 12 ÷ 900Å

D11: Q = $7 \cdot 10^{-4}$ ÷ 0.1 $Å^{-1}$ - Grenoble
apert=2m & 10m=>λ=8Å; apert=36m=> λ=12Å
d = 60 9000Å

KWS-2: Q = $1 \cdot 10^{-3}$ 0.1 $Å^{-1}$ - Julich & Garching
apert=2m & 8m=>λ=8Å; apert=20m=> λ=12Å
d = 60 ÷ 6000Å

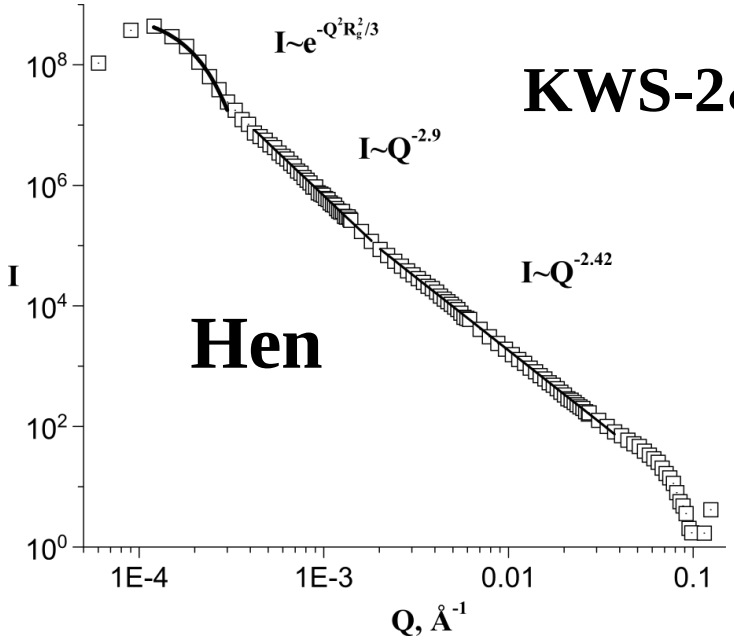
KWS-3: Q = $1 \cdot 10^{-4}$ $2 \cdot 10^{-3}$ $Å^{-1}$ - Julich & Garching
λ=12,7 Å
d = 3000 ÷ 60000Å

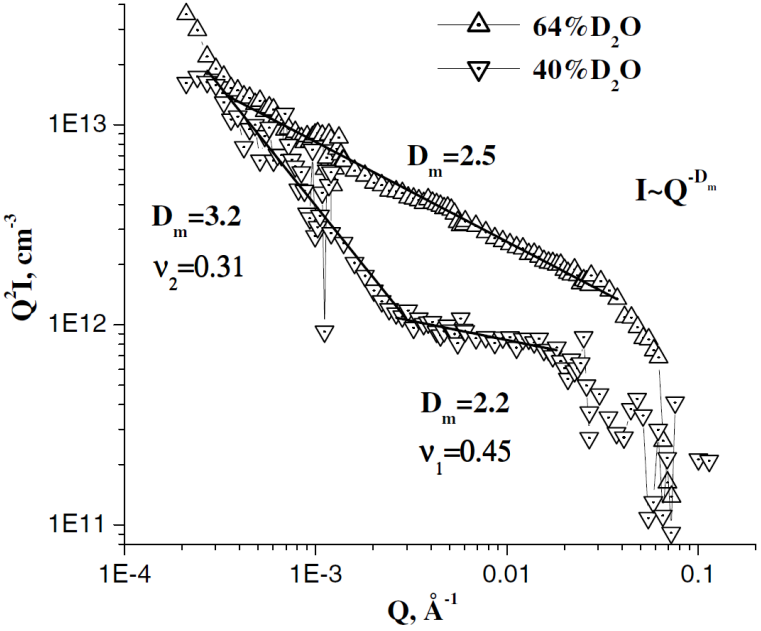
Comparison of scattering curves from chicken erythrocyte nuclei obtained on different spectrometers



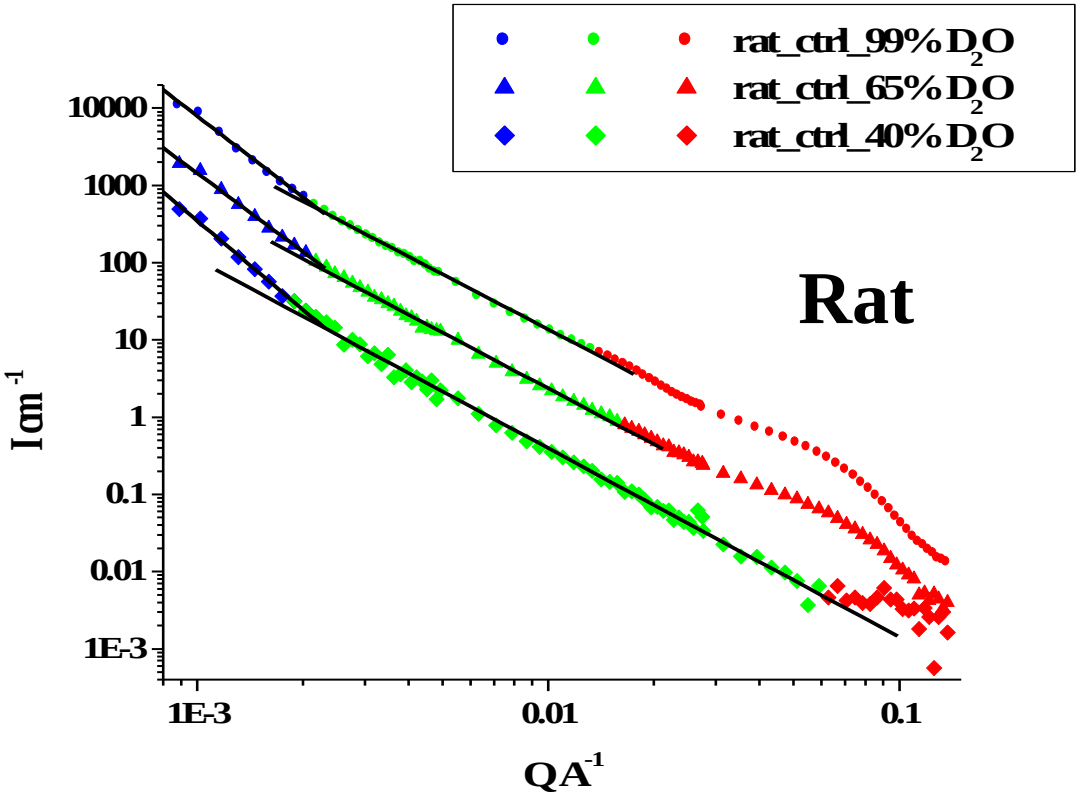
Спектры МУРН для целых ядер

KWS-2&KWS-3



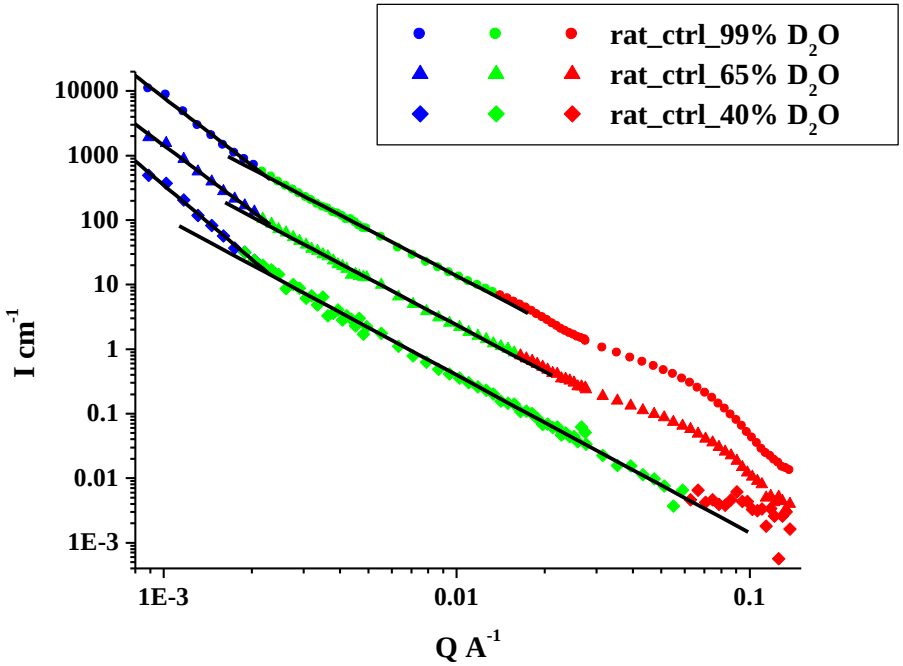


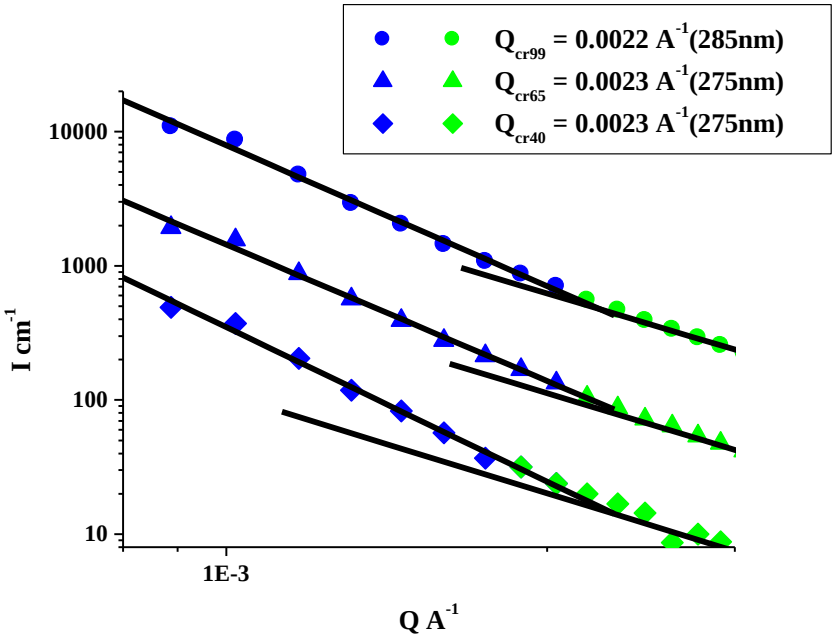
D 11

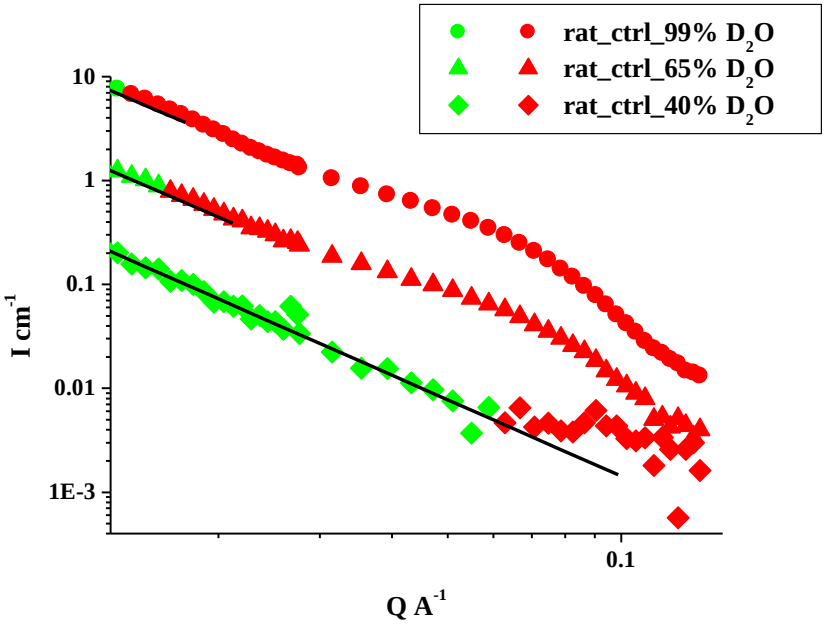


Dmitry V. Lebedev *et al*. 2005. FEBS Letters, 579:1465-1468.
Исаев-Иванов В. и др. 2010. ФТТ 52: 996-1005.

Rat ctrl


rat_ctrl_99% D2O
rat_ctrl_65% D2O
rat_ctrl_40% D2O
I cm-1
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
1E-3
1E-3
0.01
0.1
Q A-1


Qcr99 = 0.0022 A-1(285nm)
Qcr65 = 0.0023 A-1(275nm)
Qcr40 = 0.0023 A-1(275nm)
I cm-1
10000
1000
100
10
1E-3
Q A-1


rat_ctrl_99% D2O
rat_ctrl_65% D2O
rat_ctrl_40% D2O
I cm-1
10
1
0.1
0.01
1E-3
0.1
Q A-1

Fractals

d = 1,2,3 – размерность Евклидова пространства;

Масса объёмного или масс-фрактала M с диаметром L и фрактальной размерностью D_m определяется следующим выражением:

$$\mathbf{M=M_0L^{Dm}}$$

M_0 –константа а $D_m \leq d$ Если фрактал связанная структура, то $1 \leq D_m \leq 3$

Площадь поверхностного фрактала A (имеющего нормальную плотность) с диаметром L и фрактальной размерностью D_S определяется выражением:

$$\mathbf{A = A_0L^{Ds}}$$

A_0 – константа а $2 \leq D_S < 3$

Можно показать [P.W. Schmidt], что для масс-фрактала

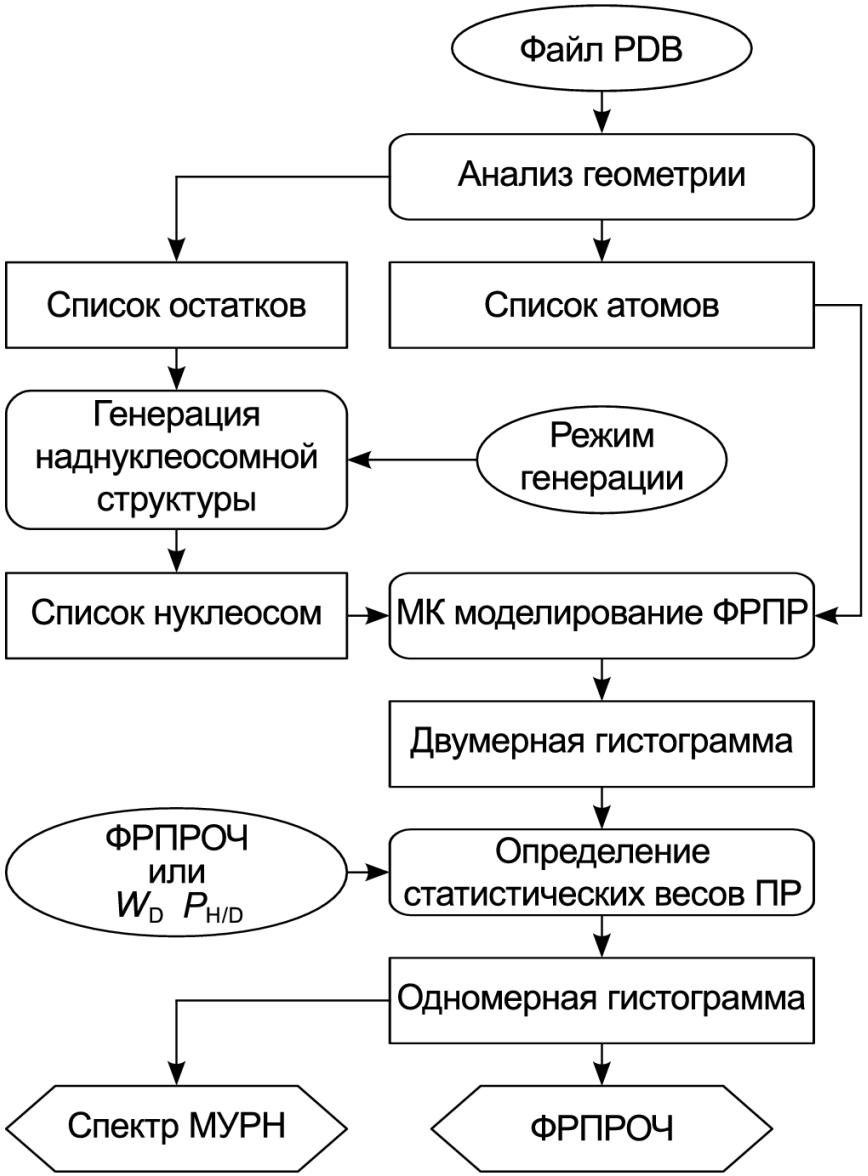
$\mathbf{I(q) \sim q\text{-}Dm}$ Когда qL >> 1 а qa <<1,

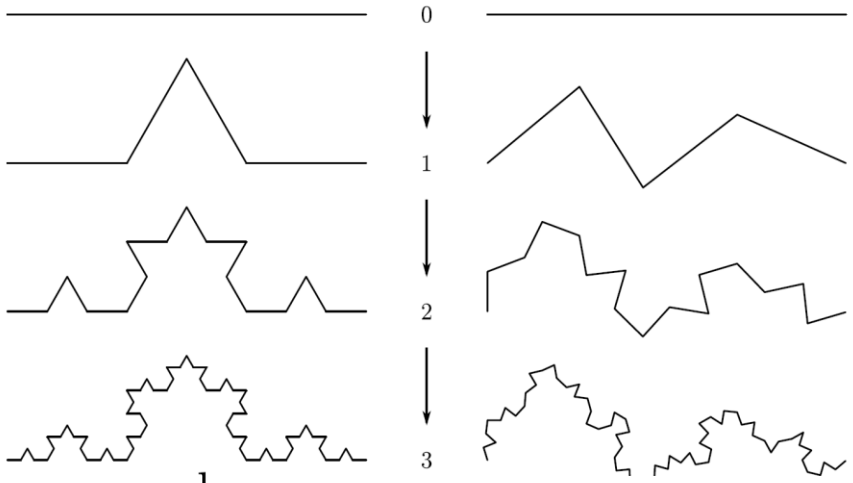
А для поверхностного фрактала

$$\mathbf{I(q) \sim q\text{-}(6\text{-}Ds)}$$

в дважды логарифмических координатах для масс фрактальной структуры наклон прямой не может быть больше 3, а для поверхностного фрактала между 3 и 4.

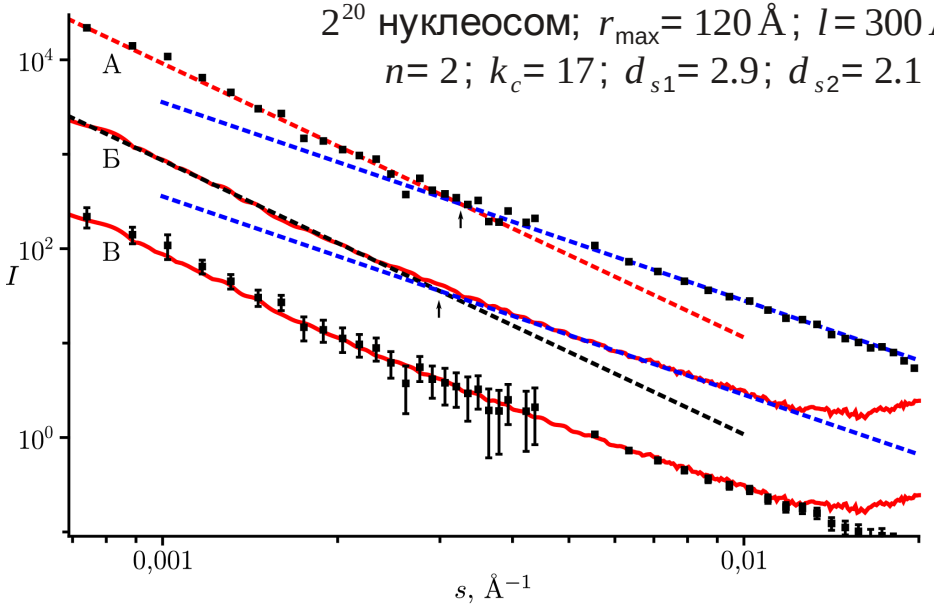
Моделирование и расчет спектров МУРН



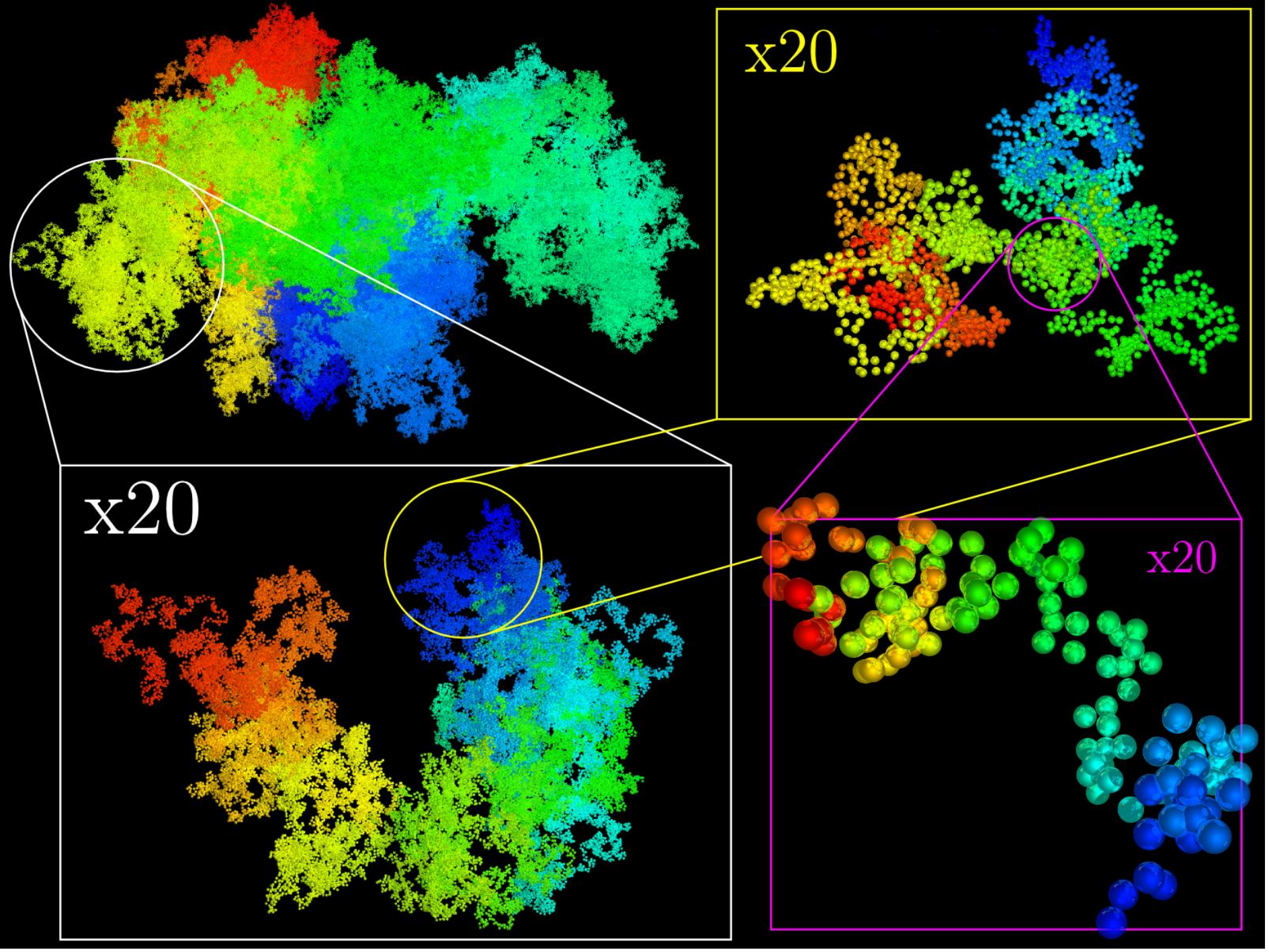


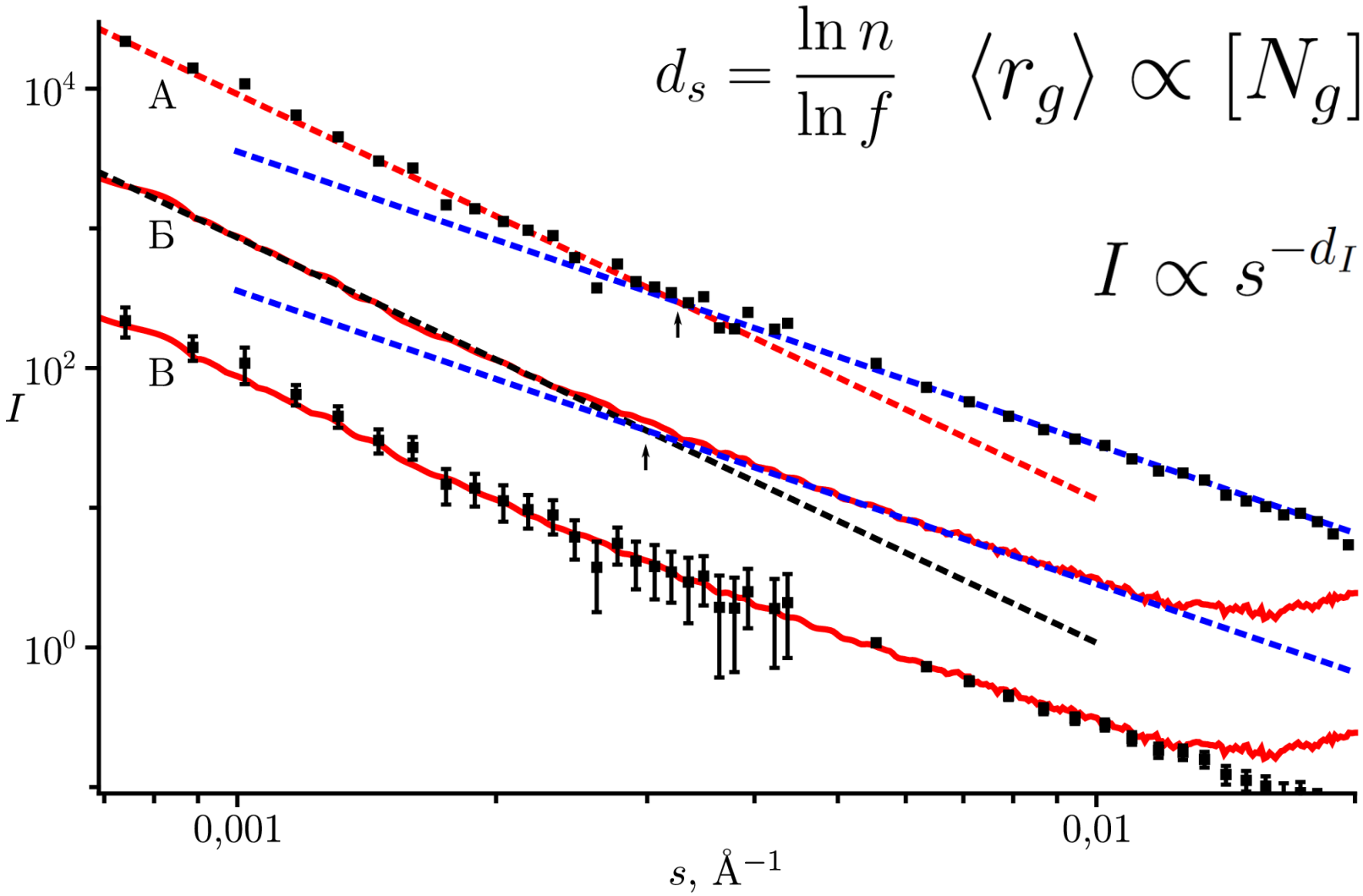
$$d_s = \frac{\ln n}{\ln f} \qquad \langle r_g \rangle \propto [N_g]^{1/d_g} \qquad I \propto s^{-d_I}$$

2^{20} нуклеосом; r_{max}= 120 Å; l= 300 Å;
n= 2; k_c= 17; d_{s1}= 2.9; d_{s2}= 2.1

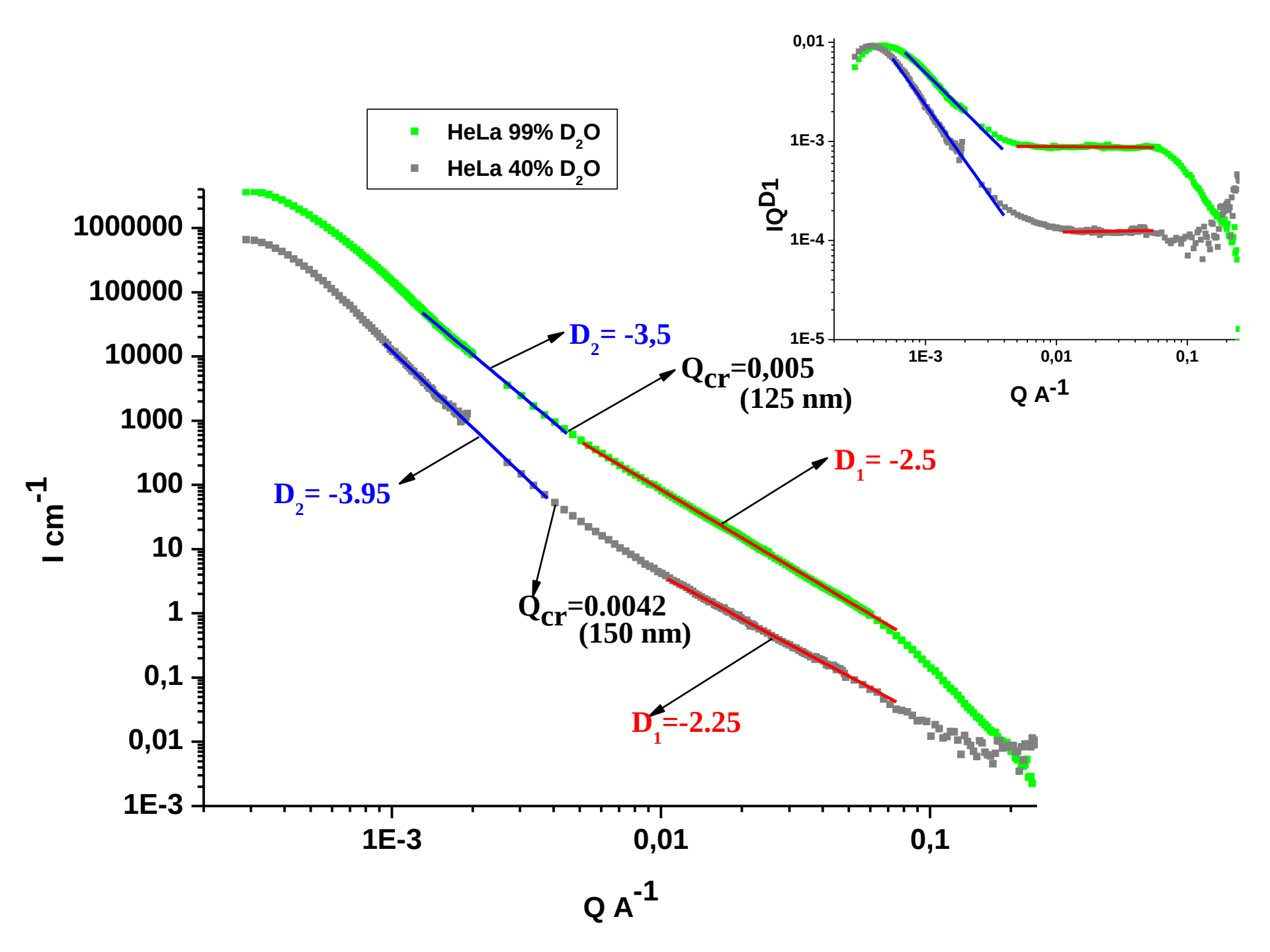


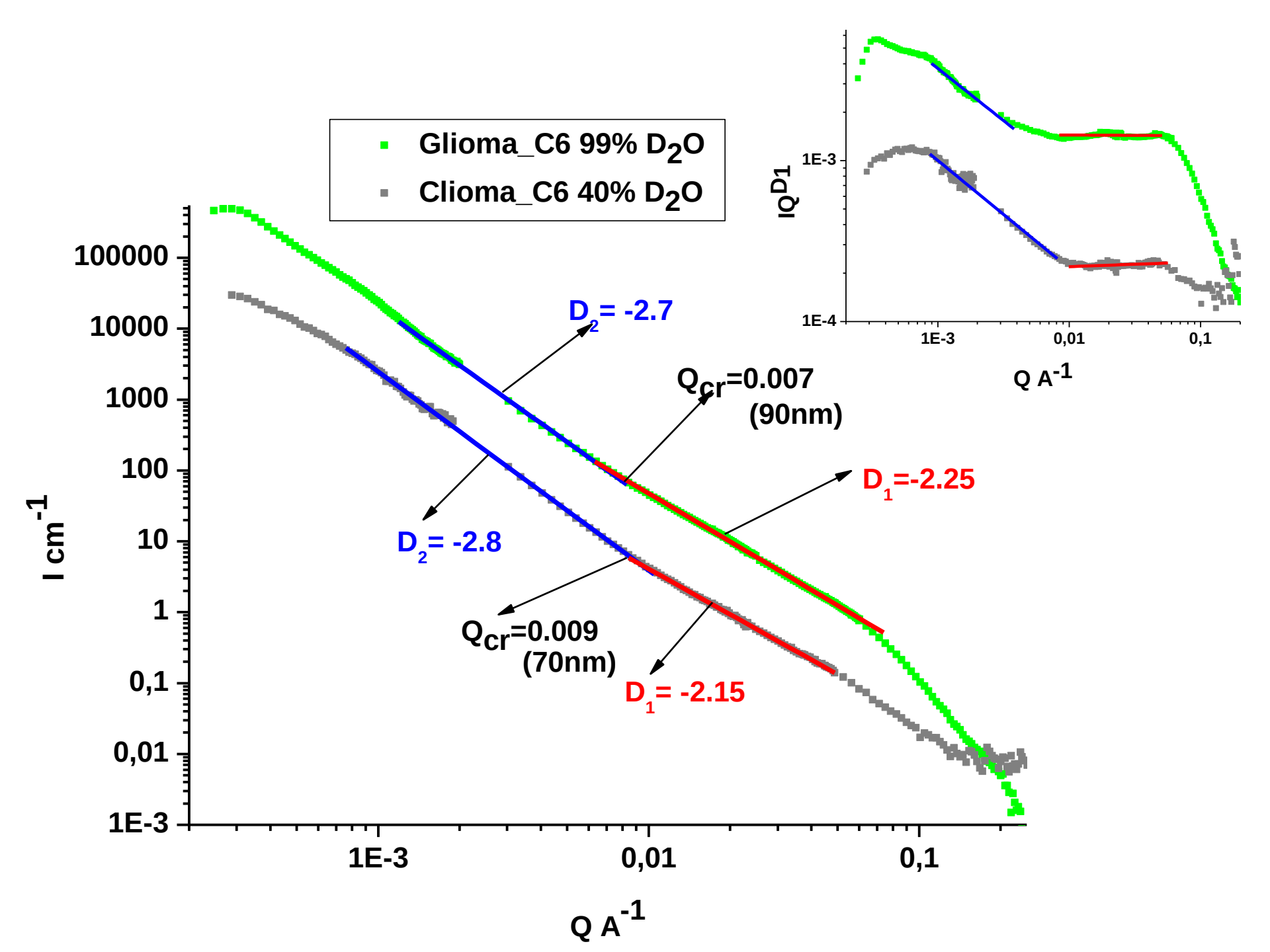
Ilatovskiy A. et al. 2011. J Appl Phys 110: 102217.
Ilatovskiy A. et al. 2012. J Phys: Conf Ser 351: 012007.

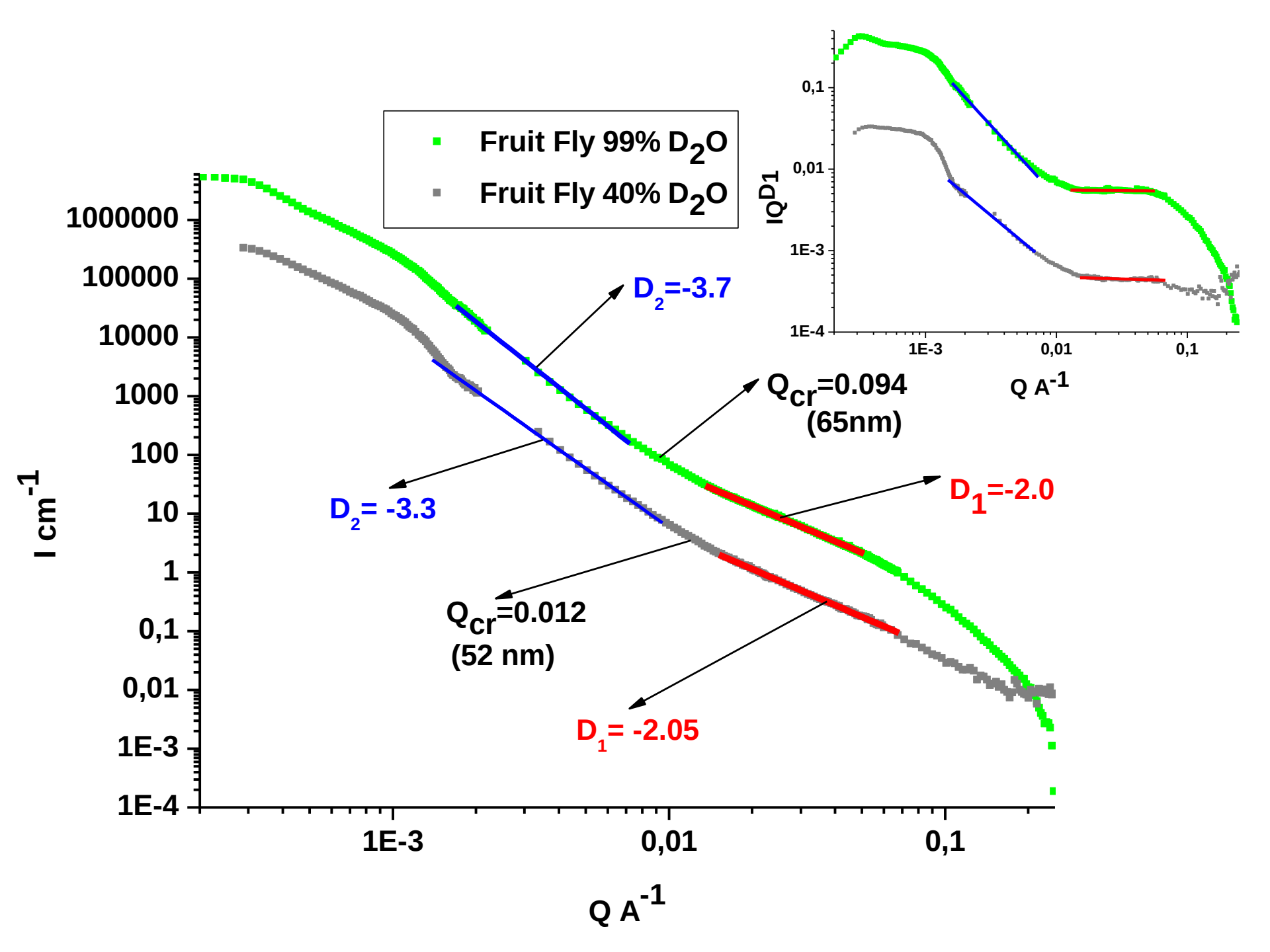

x20
x20
x20

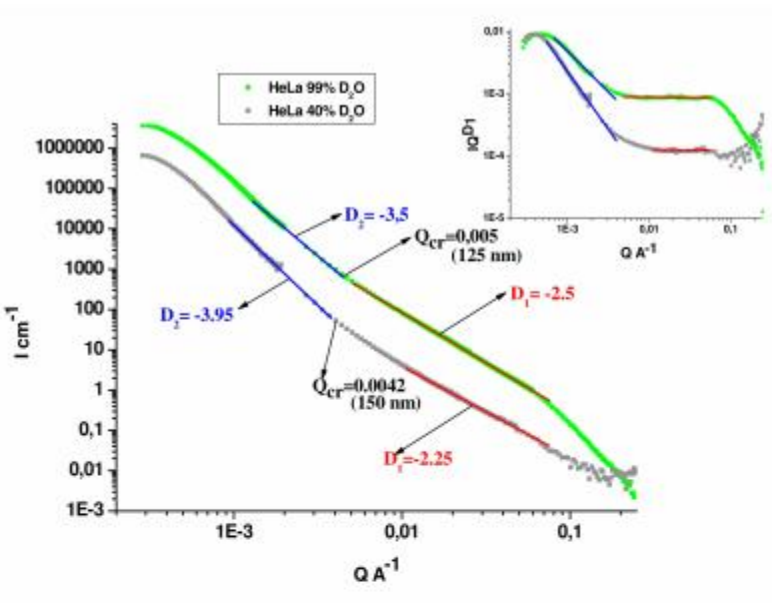


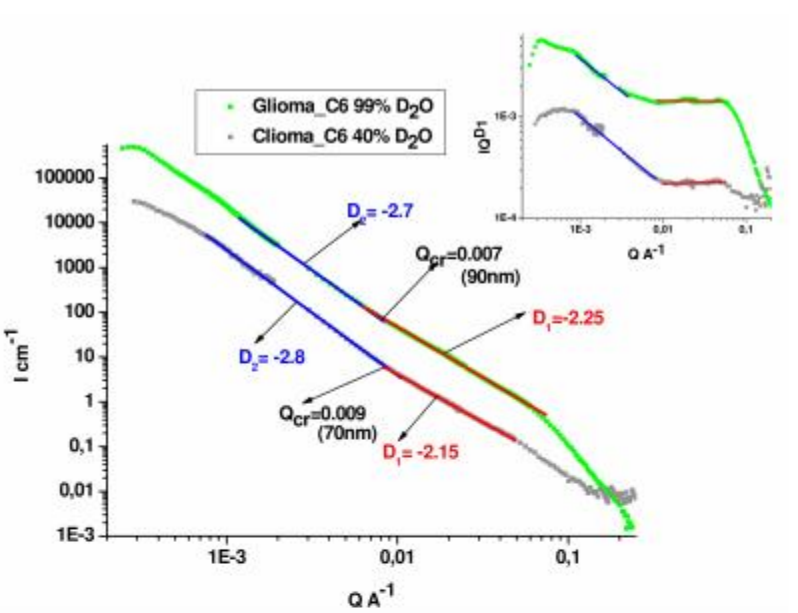
2^{20} нуклеосом; r_{max} =120 A; l = 300 A; n = 2; k = 17; d_{s1} = 2.9; d_{s2} = 2.1

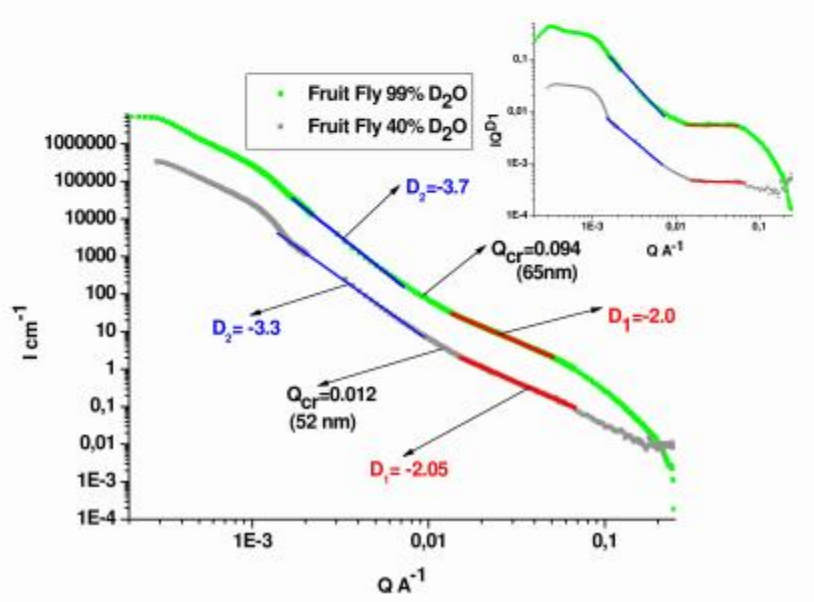

HeLa 99% D2O
HeLa 40% D2O
I cm-1
Q A-1
D2= -3,5
Qcr=0,005
(125 nm)
D2= -3.95
D1= -2.5
Qcr=0.0042
(150 nm)
D1=-2.25
IQD1
Q A-1

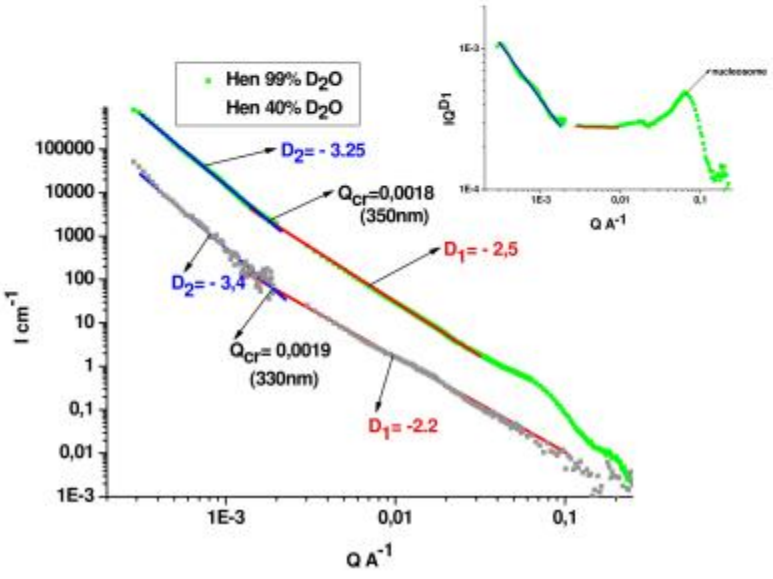

Glioma_C6 99% D2O
Clioma_C6 40% D2O
I cm-1
Q A-1
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
1E-3
1E-3
0,01
0,1
D2= -2.7
Qcr=0.007
(90nm)
D1=-2.25
D2= -2.8
Qcr=0.009
(70nm)
D1= -2.15
IQD1
1E-3
1E-4
1E-3
0,01
0,1
Q A-1


Fruit Fly 99% D2O
Fruit Fly 40% D2O
I cm-1
Q A-1
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
1E-3
1E-4
1E-3
0,01
0,1
D2=-3.7
D2= -3.3
Qcr=0.094
(65nm)
D1=-2.0
Qcr=0.012
(52 nm)
D1= -2.05
IQD1
Q A-1


HeLa 99% D2O
HeLa 40% D2O
D2= -3,5
Qcr=0,005
(125 nm)
D2= -3.95
D1= -2.5
Qcr=0,0042
(150 nm)
D1=-2.25
I cm-1
Q A-1
IQD1
Q A-1


Glioma_C6 99% D2O
Clioma_C6 40% D2O
D2= -2.7
Qcr=0.007
(90nm)
D1=-2.25
D2= -2.8
Qcr=0.009
(70nm)
D1= -2.15
I cm-1
Q A-1
IQD1
Q A-1

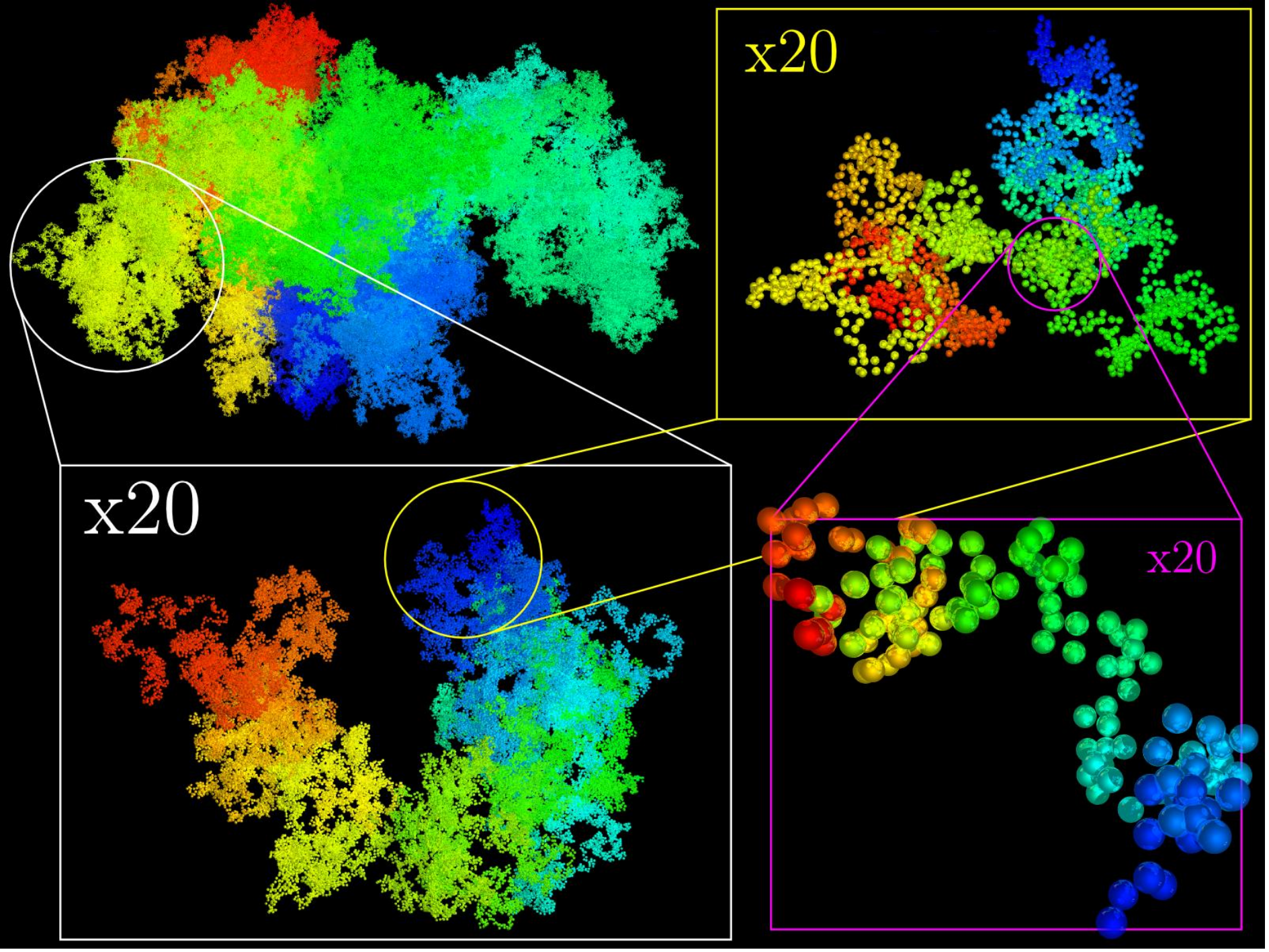

Fruit Fly 99% D2O
Fruit Fly 40% D2O
D2=-3.7
Qcr=0.094
(65nm)
D2= -3.3
D1=-2.0
Qcr=0.012
(52 nm)
D1= -2.05
I cm-1
Q A-1
IQD1
Q A-1


Hen 99% D2O
Hen 40% D2O
D2= - 3.25
Qcr=0,0018
(350nm)
D1= - 2,5
D2= - 3,4
Qcr= 0,0019
(330nm)
D1= -2.2
I cm-1
Q A-1
IQD1
mononucleosome
Q A-1

	Hen 99	HeLa 99	HeLaRNA 99	C6 99	DE 99
$D_1=D_m$	-2,5	-2,5	-2,5	-2,3	-2,0
$D_2(D_s)$	-3,3 (2.7)	-3,5 (2.5)	-3,8 (2.2)	-2,7 (D_m)	-3,7 (2.3)
Q_{cr} Å $^{-1}$	0,0018	0,005	0.004	0,007	0,094
Q_{cr} нм	350	125	160	90	65
	Hen 40	HeLa 40	HeLaRNA 40	C6 40	DE 40
$D_1=D_m$	-2,2	-2,3	-2,4	-2,2	-2,1
D_2 (D_s)	-3,4 (2.6)	-3,9 (2.1)	-4,0 (2)	-2,8 (D_m)	-3,3 (2.7)
Q_{cr} Å $^{-1}$	0,0019	0,0042	0,0042	0,009	0,012
Q_{cr} нм	330	150	150	70	52

	Hen Gr	*Hen MFeb*	*Hen Gam Gr*	*Rat Gr*	*Rat Gam Gr*	*C6 MFeb*	*C6 MMay*	*C6 Rna-s MMay*	*HeLa MFeb*	*HeLa MMay*	*HeLa Rna-s MMay*	*Fly MMay*	*Fly MMay Mut*
$D_1=D_m$													
99% D_2O	2.41	2.51	2.43	2.37	2.23	2.26	2.36	2.36	2.49	2.51	2.51	2.24	2.53
	$D_{mH}=2.45\pm0.05$			**$D_{mR}=2.32\pm0.07$**					**$D_{mHL}=2.50\pm0.01$**			2.24	2.53
	$D_m=2.4\pm0.1$												
40% D_2O	2.27	2.26	2.15	2.44	2.15	2.13	2.27	2.21	2.25	2.32	2.41		
	$D_{mH}=2.23\pm0.07$			**$D_{mR}=2.24\pm0.12$**					**$D_{mHL}=2.33\pm0.08$**				
	$D_m=2.25\pm0.1$												
$D_2=-(6-D_s)$													
99% D_2O	3.08	3.25	3.77	3.48	3.19	(2.7)	3.63	3.2	3.5	4.0	3.75	3.24	3.64
	$D_{2H}=3.4\pm0.4$			**$D_{2R}=3.4\pm0.2$**					**$D_{2HL}=3.8\pm0.3$**			3.24	3.64
	$D_{sH}=2.6\pm0.4$			**$D_{sR}=2.6\pm0.2$**					**$D_{sHL}=2.25\pm0.3$**			2.76	2.36
	$D_2=3.5\pm0.3$												
	$D_s=2.5\pm0.3$												
40% D_2O	3.53	3.37	3.64	3.82	3.19	(2.82)	4.0	3.23	3.96	4.05	4.05		
	$D_{2H}=3.5\pm0.1$			**$D_{2R}=3.6\pm0.4$**					**$D_{2HL}=4.0\pm0.1$**				
	$D_{sH}=2.5\pm0.1$			**$D_{sR}=2.4\pm0.4$**					**$D_{sHL}=2.0\pm0.1$**				
	$D_2=3.7\pm0.3$												
	$D_s=2.3\pm0.3$												

	Hen Gr	*Hen MFeb*	*Hen Gam Gr*	*Rat Gr*	*Rat Gam Gr*	*C6 MFeb*	*C6 MMay*	*C6 Rna-s MMay*	*HeLa MFeb*	*HeLa MMay*	*HeLa Rna-s MMay*	*Fly MMay*	*Fly MMay Mut*
$Q_{cr}(Å^{-1})*10^{-3}$, R_{cr}(nm)													
99% D_2O	1.5	1.8	1.75	2.2	1.9	(7)	3.7	3.8	5.0	5.2	4.0	4.6	3.8
	Q_{crH}=1.7±0.1			**2.0±0.2**			**3.75±0.07**		**Q_{crHL}=4.7±0.6**			4.6	3.8
	419	349	359	**Q_{crR}=3±1**					126	121	157	137	165
	R_{crH}=380±30			286	331	(90)	170	165	**R_{crH}=135±20**			137	165
				310±30			**168±4**						
				R_{crR}=240±80									
40% D_2O	1.75	1.9	2.8	2.3	2.6	(9)	3.7	3.2	4.2	6.5	4.2		
	Q_{crH}=2.2±0.6			**2.45±0.2**			**3.5±0.4**		**Q_{crHL}=5.0±1**				
	359	331	224	**Q_{crR}=3.0±0.6**					150	97	150		
	R_{crH}=300±70			273	242	(70)	170	196	**R_{crH}=130±30**				
				260±20			**180±20**						
				R_{crR}=220±60									


x20
x20
x20

99%D_2 O

D_m (cp) = 2.4 0.1

D_s (cp) = 2.5 0.3

Fruit Fly

99%D2 O

Dm = 2.0

Ds =2.3

40% D_2O (DNA+RNA)

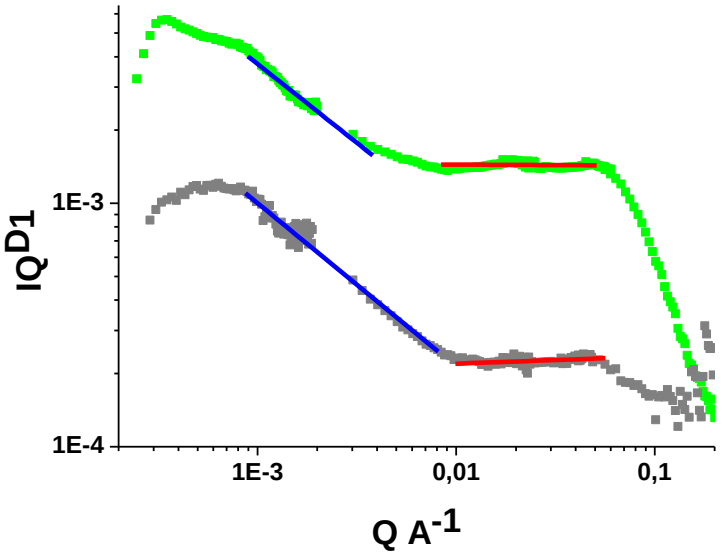
D_m (cp) = 2.25 0.1

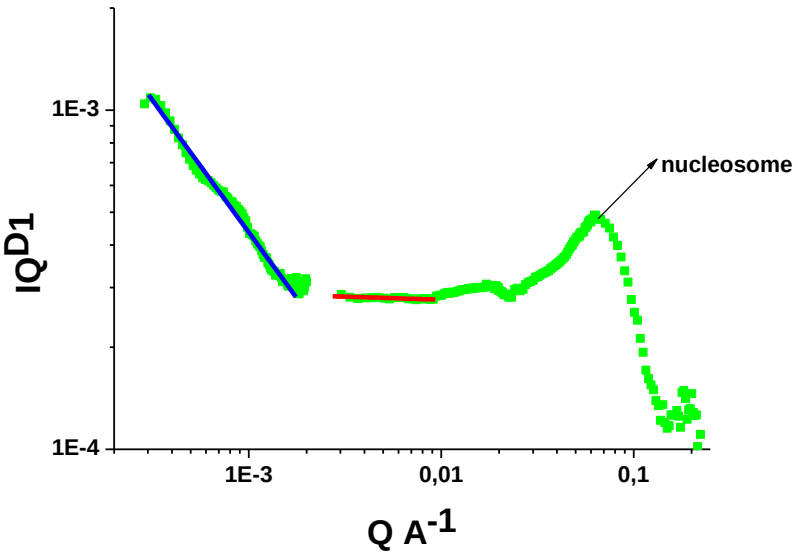
D_s (cp) = 2.3 0.3

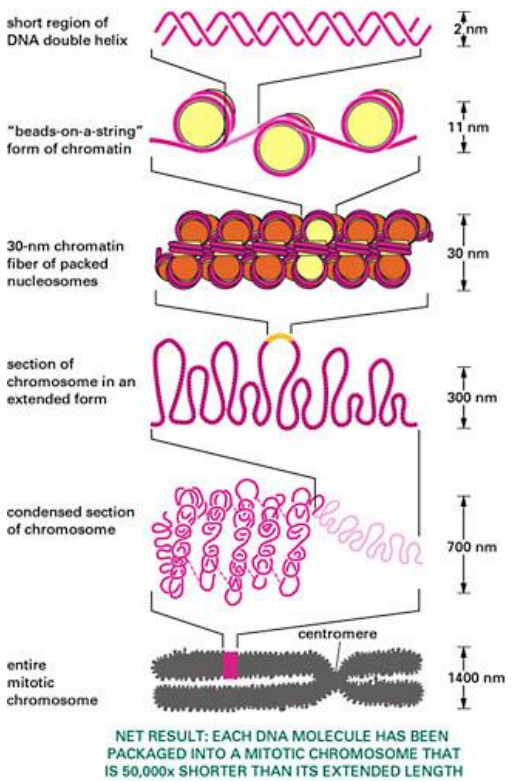
40% D2O (DNA+RNA)

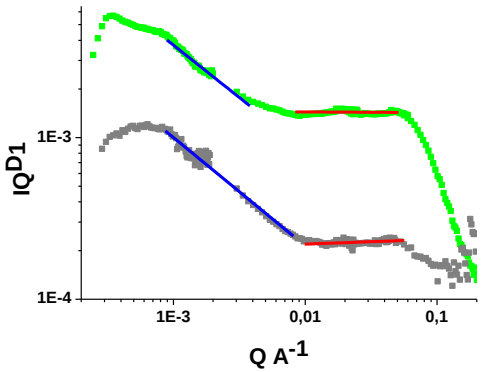
Dm = 2.1

Ds = 2.7



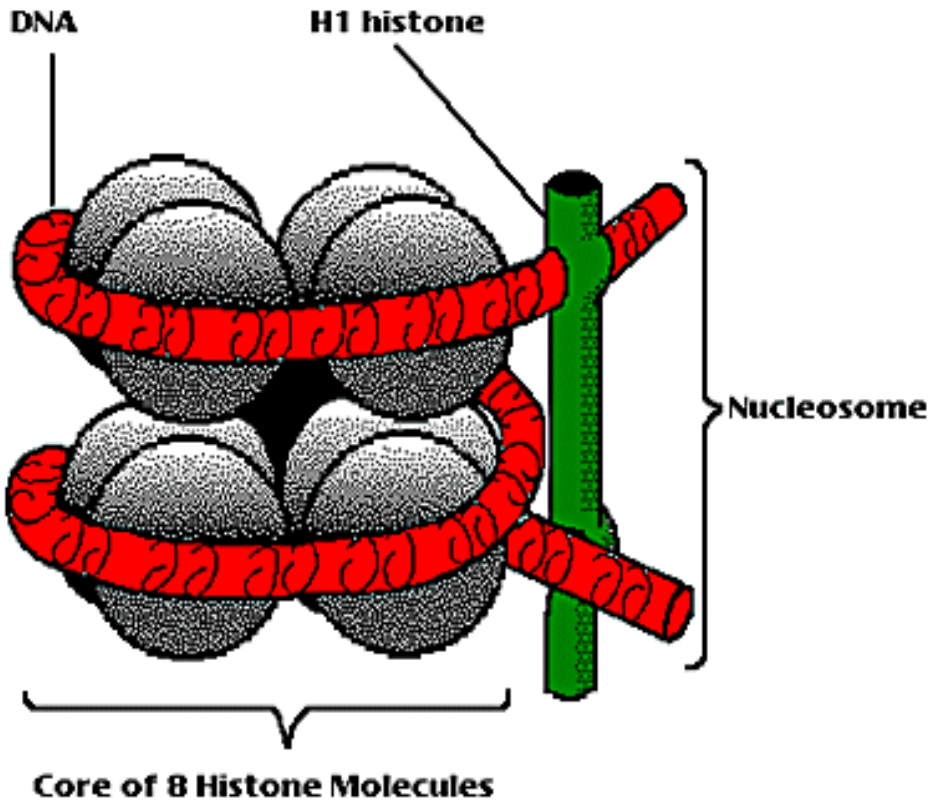




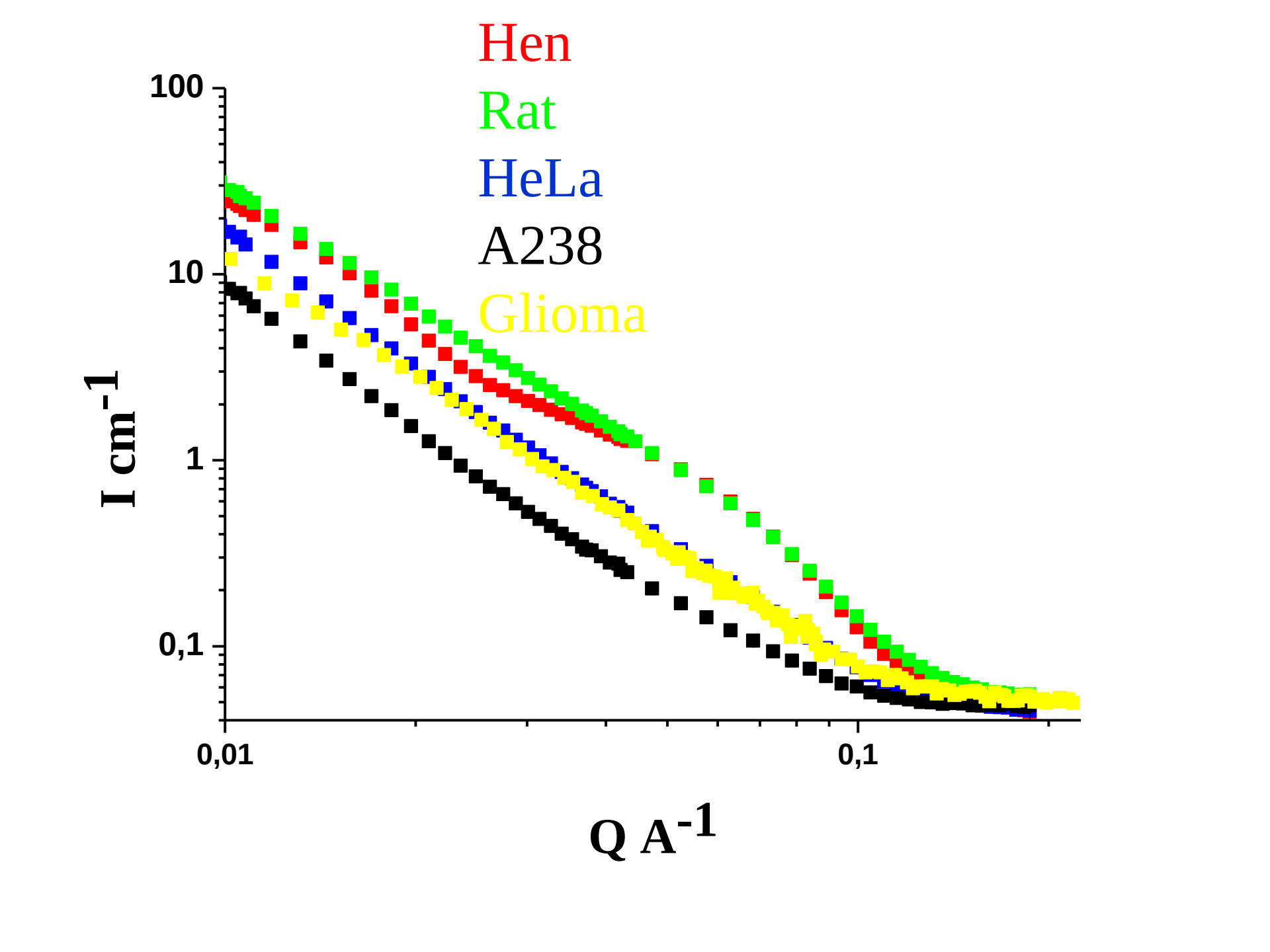


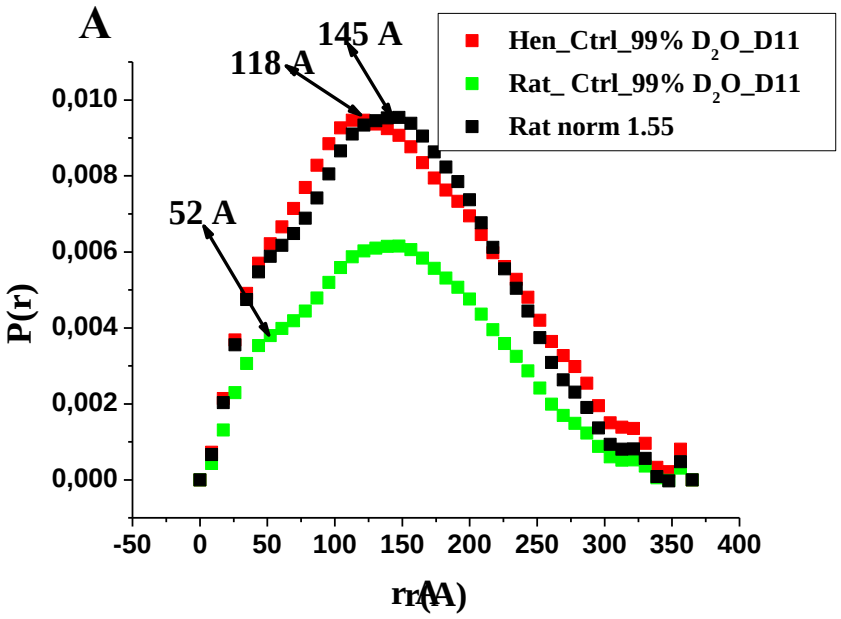
МУРН – 3 типа упаковки хроматина
Нуклеосомы
Масс-фрактал
Поверхн фрактал
Качественные сходства и различия
Феноменология, полимеры, расплав колец, Гроссберг
Различия в нуклеосомной упаковке
Моделирование, прямая задача МУРН
Мол динамика
Внесение возмущений в структуру хроматина

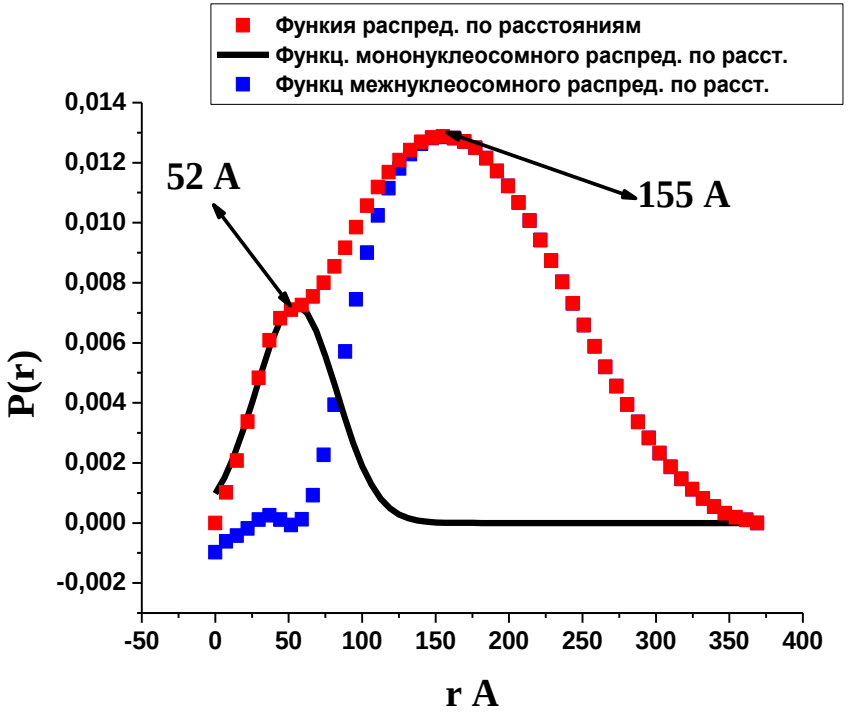
Nucleosome

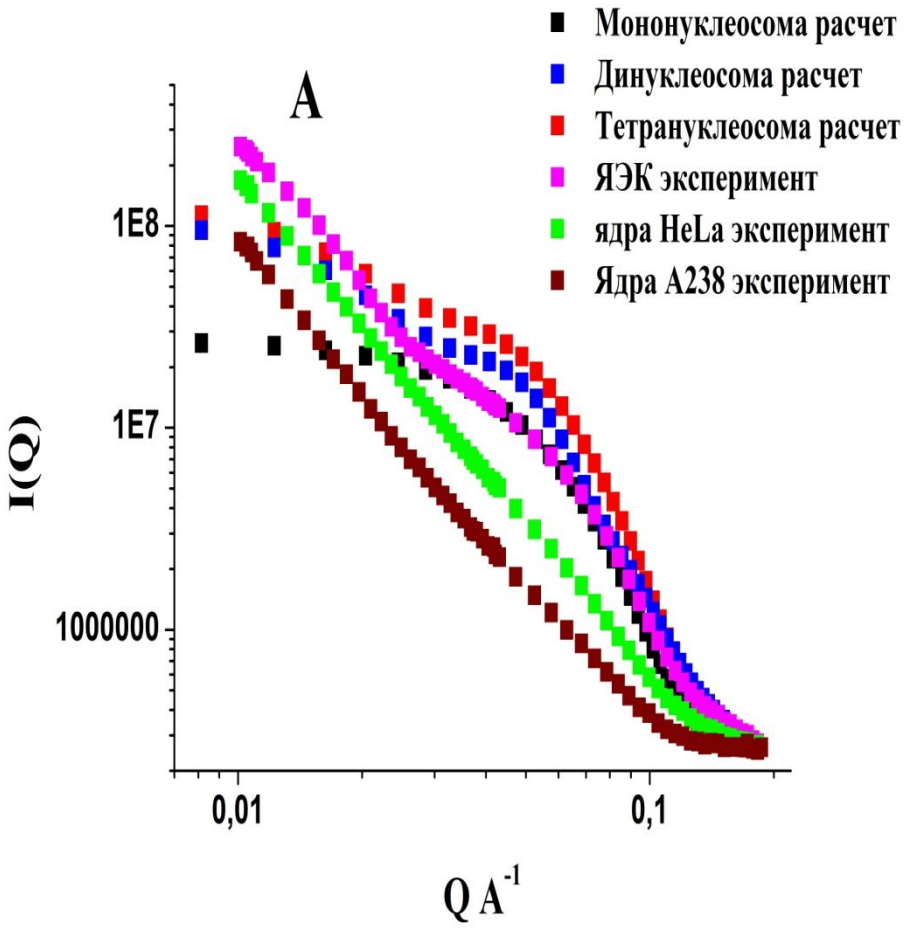


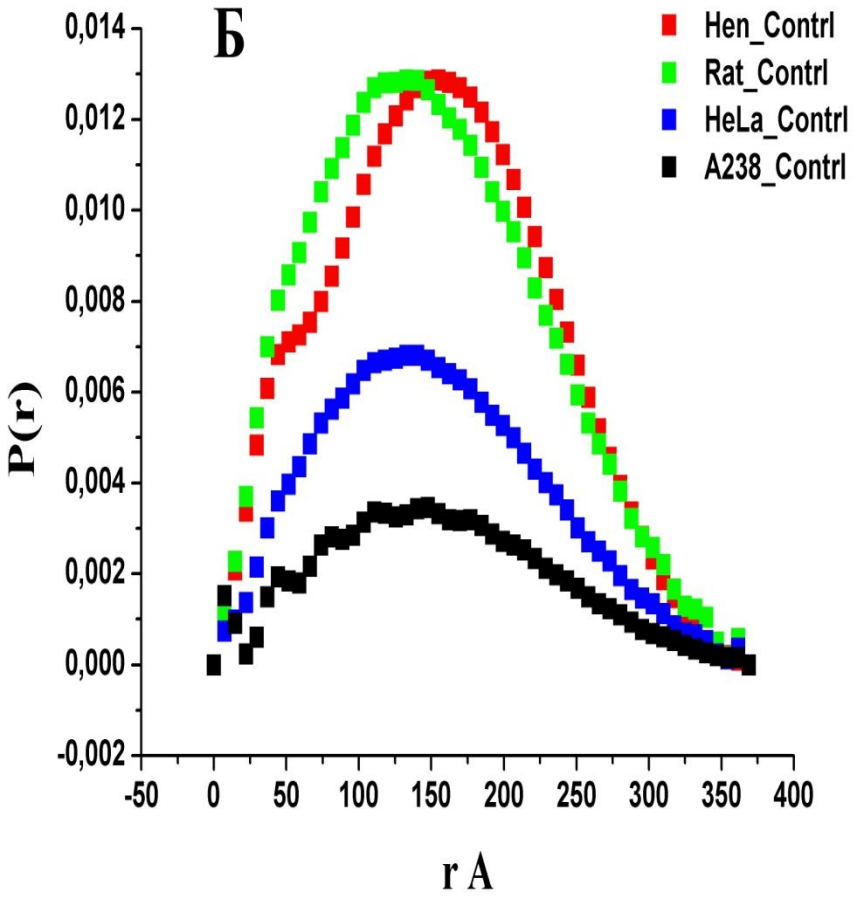
Nucleosome

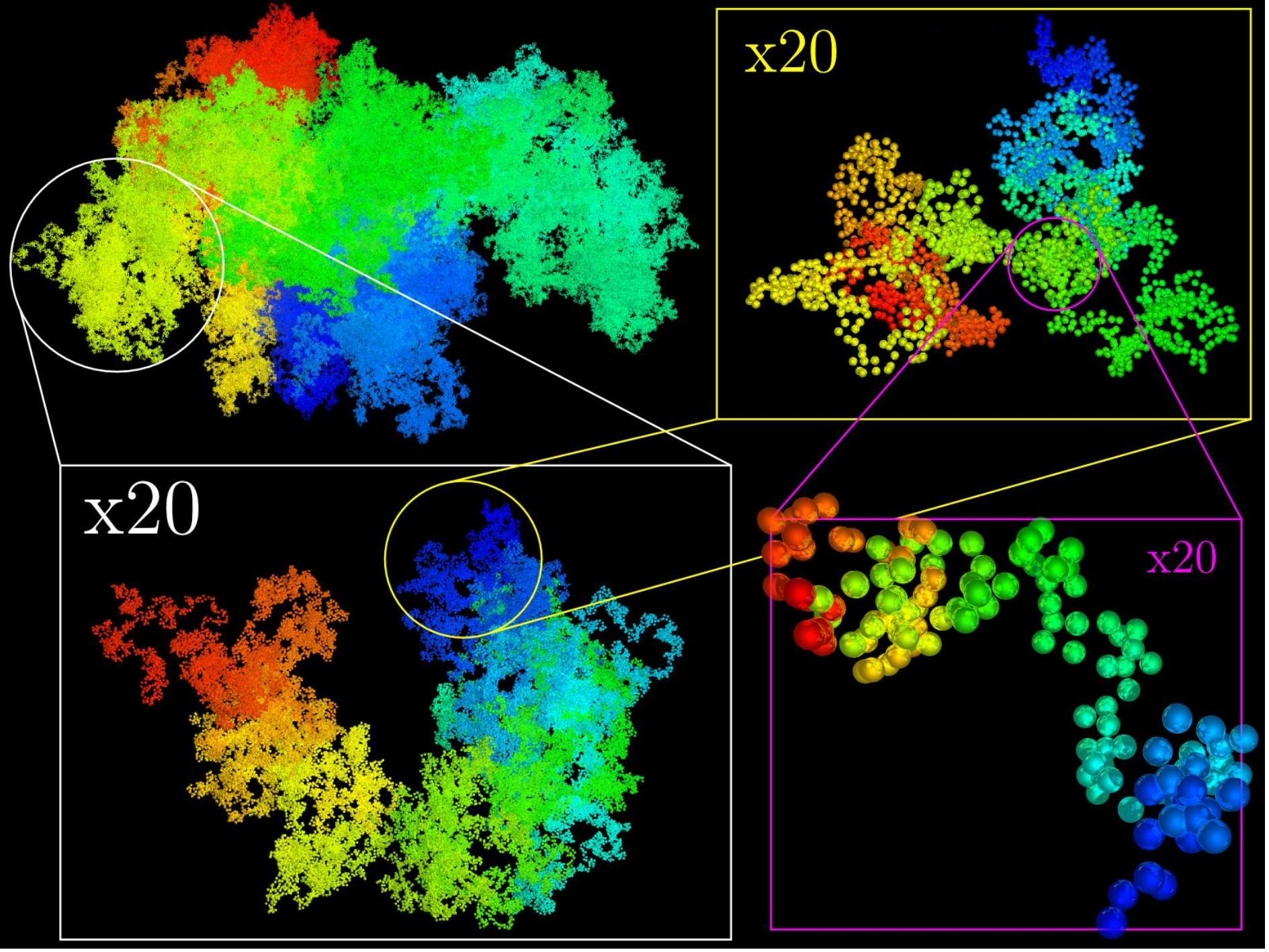

Hen
Rat
HeLa
A238
Glioma
100
10
1
0,1
I cm-1
0,01
0,1
Q A-1

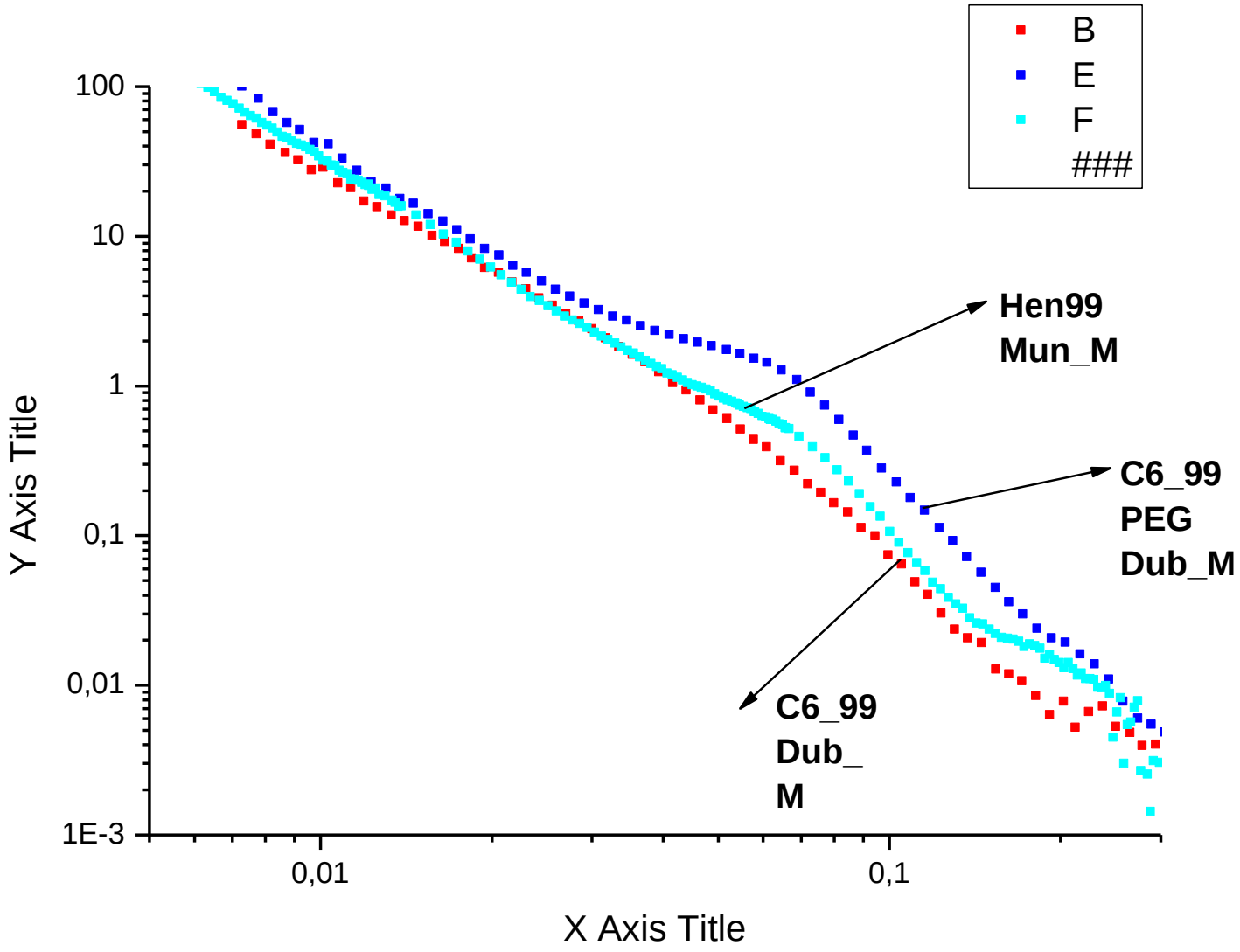

A
145 A
118 A
52 A
Hen_Ctrl_99% D2O_D11
Rat_ Ctrl_99% D2O_D11
Rat norm 1.55
P(r)
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
r(A)

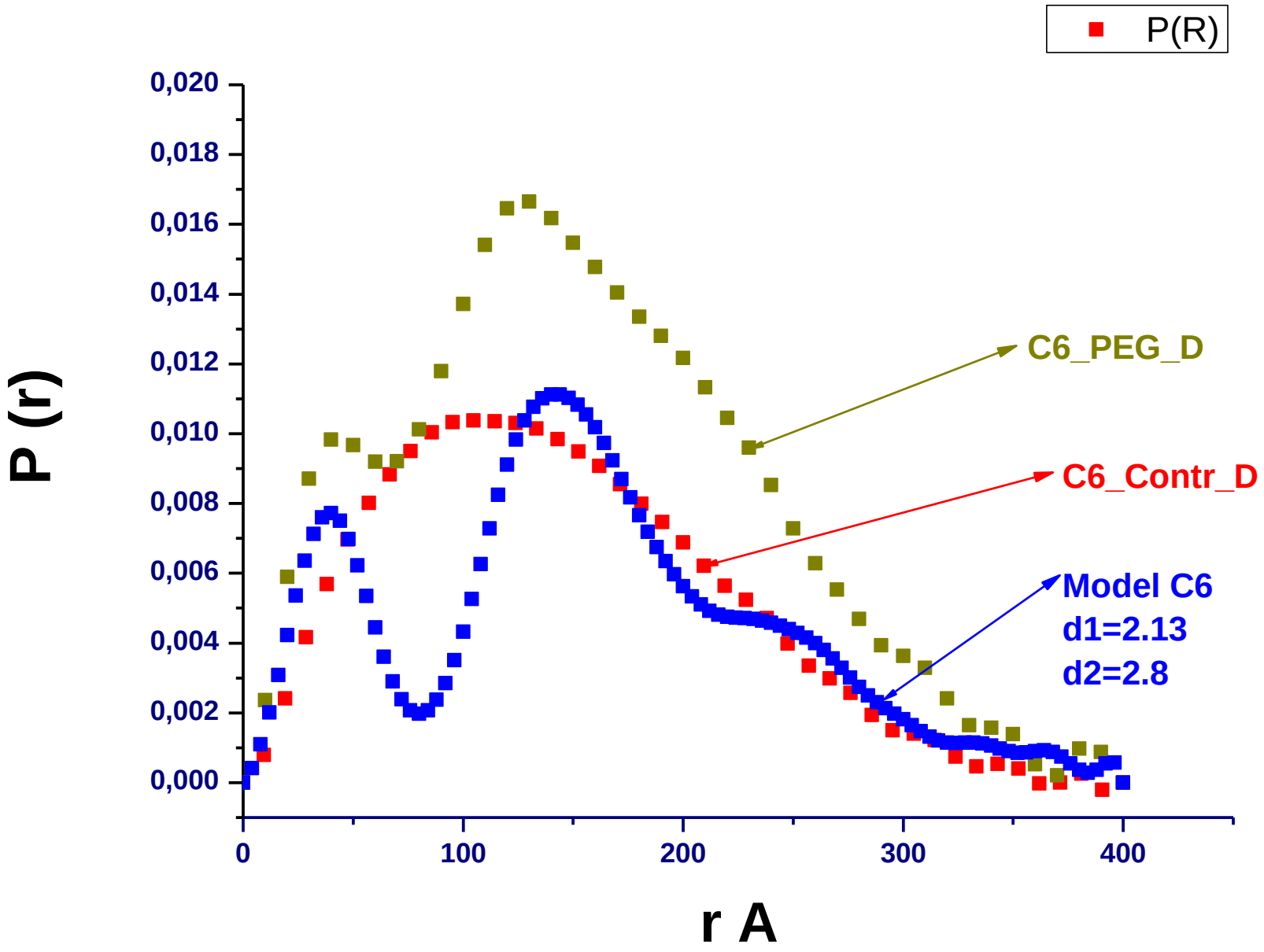

Функция распред. по расстояниям
Функц. мононуклеосомного распред. по расст.
Функц межнуклеосомного распред. по расст.
52 A
155 A
P(r)
0,014
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
-0,002
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
r A

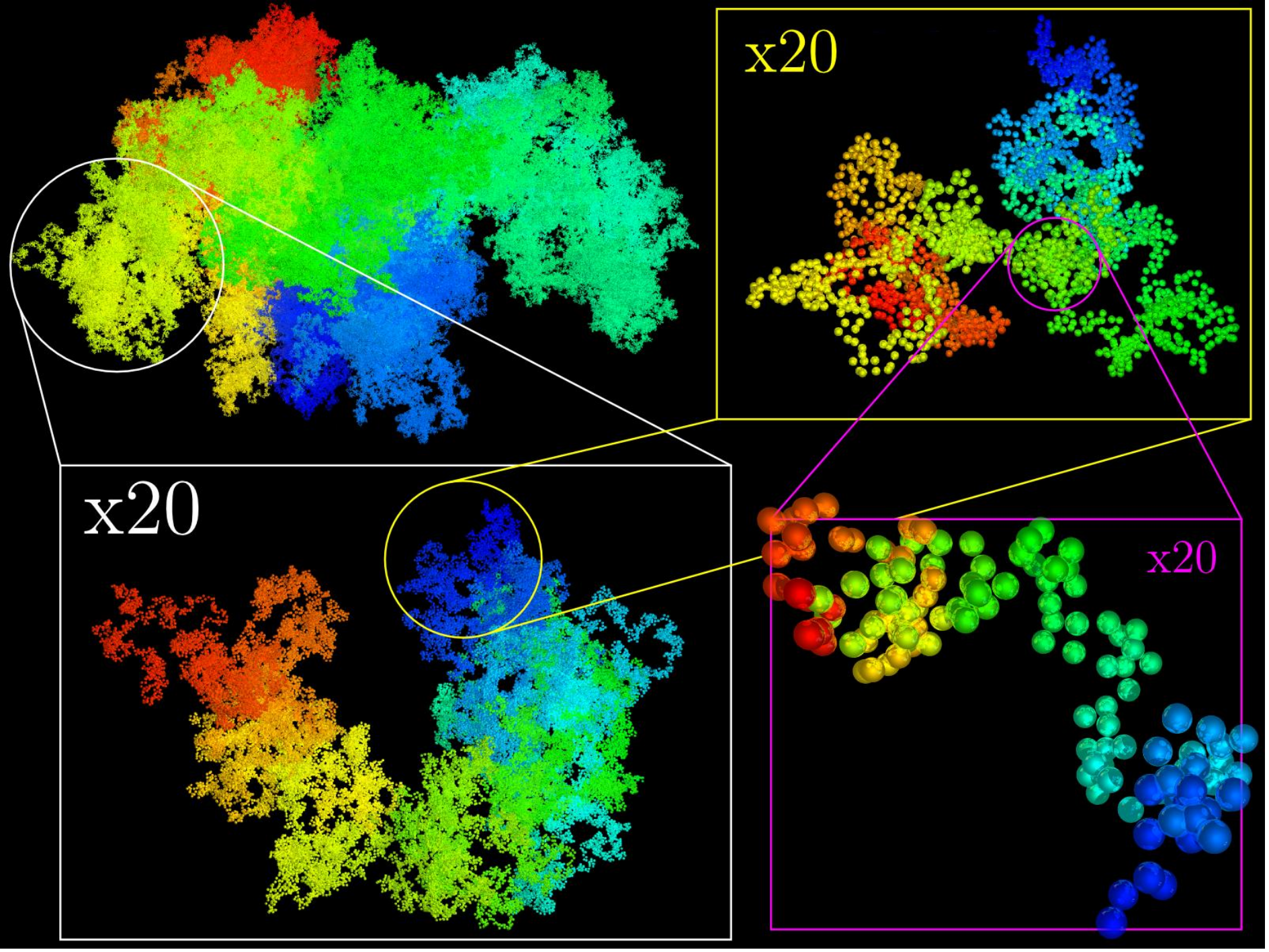

А
Мононуклеосома расчет
Динуклеосома расчет
Тетрануклеосома расчет
ЯЭК эксперимент
ядра HeLa эксперимент
Ядра А238 эксперимент
I(Q)
1E8
1E7
1000000
0,01
0,1
Q A-1


Б
Hen_Contrl
Rat_Contrl
HeLa_Contrl
A238_Contrl
P(r)
0,014
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
-0,002
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
r A


x20
x20
x20


B
E
F
###
100
10
1
0,1
0,01
1E-3
Y Axis Title
0,01
0,1
X Axis Title
Hen99
Mun_M
C6_99
PEG
Dub_M
C6_99
Dub_
M


P(R)
P (r)
0,020
0,018
0,016
0,014
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
0
100
200
300
400
r A
C6_PEG_D
C6_Contr_D
Model C6
d1=2.13
d2=2.8


x20
x20
x20

Благодарности:

ПИЯФ:

Назаренко В.А.
Лаб клеточной биологии,
Топерверг Б.П.
Воробьев А.

Юлих, Гаршинг
Радулеску А.
Иоффе А.И.
Пипич В.

КИ:
Велихов В.Е.

ОИЯИ:
Куклин А.И.,
Горделий В.И.
Аксенов В.Л.

т29 ОФН Президиума РАН
Грант ФЦП 2012-2013
Грант РФФИ-офи-м 2012-2013
Грант РФФИ-офи-м 2014-2016

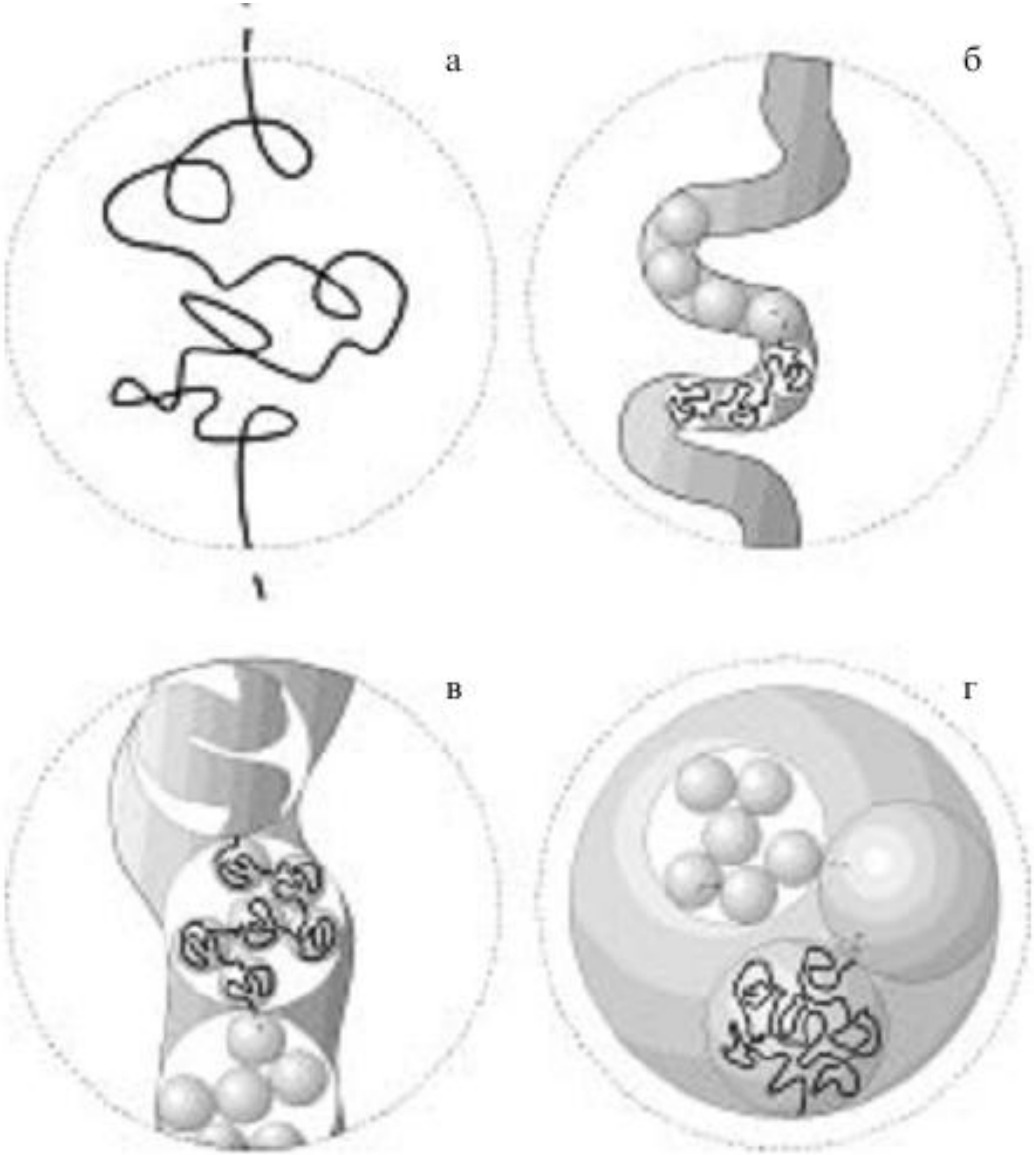
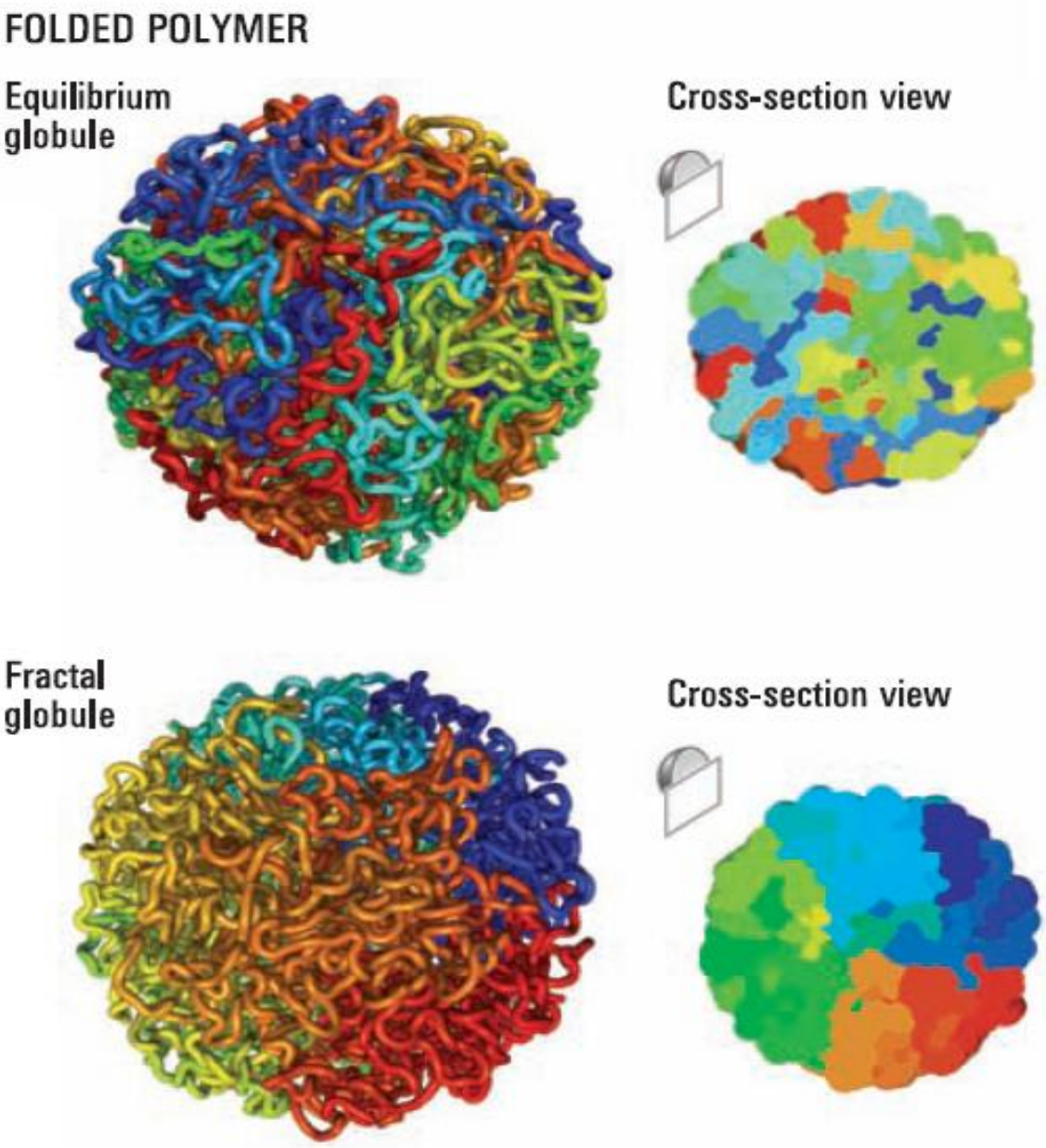


Рис. 14. Последовательные этапы формирования складчатой (фрактальной) глобулы (а – в). Самоподобная структура складчатой глобулы, сегрегированной на всех масштабах (г).



Фрактальная упаковка хроматина на уровне ядра

FISH	2,2 (< 1 мкм) ~3 (> 1 мкм)
Hi-C	3 (> 1 мкм)
FCS	2,2 — 2,6 (< 0,1 мкм)