

Struktura lidského genomu

Historický úvod

*Základní poznatky o struktuře lidského genomu
(DNA, nukleosomy, chromatinové vlákno)*

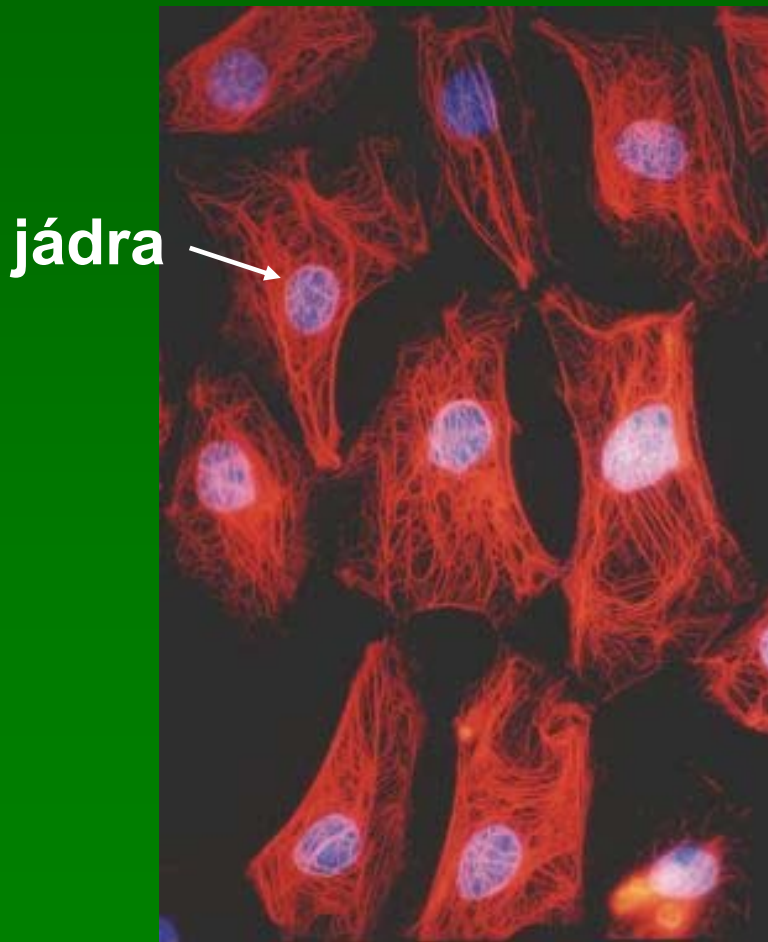
Metodické přístupy

Chromosomy (stavba, členění, teritoria - CT)

*Globální struktura genomu (stavba CT, radiální vs
angulární distribuce, pohyblivost molekul a CT)*

Jádro buňky (Robert Brown, 1831)

Buňky a jejich jádra

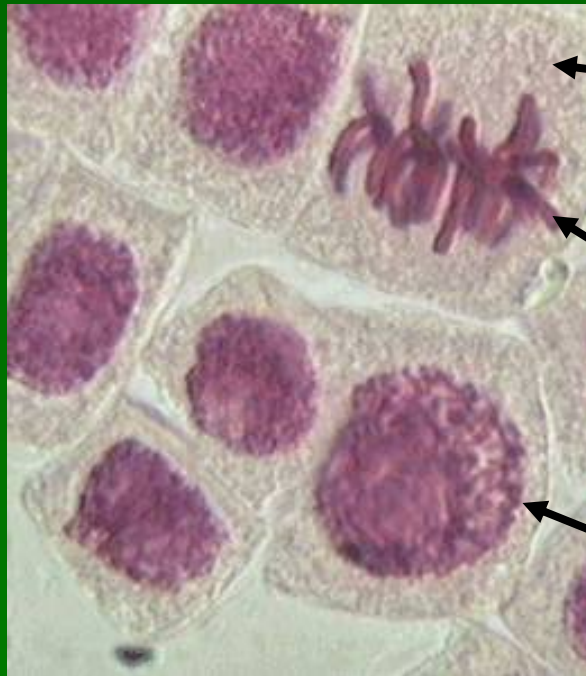


Jádro předává dědičnou informaci (Haeckel 1866)

V jádře je obsažena kyselá látka – nuklein (DNA) (Miescher 1869)

Nukleová kyselina vs protein (Miescher 1874)

Dělení buněk (Walther Flemming, 1882)



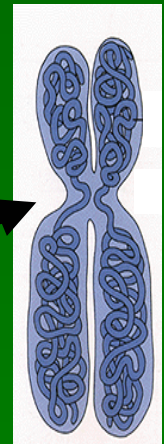
Buňka před dělením

Mitotické
chromosomy

Interfázní
buňka

Chromosom

Centro
mera



Walther Flemming: zkoumal dělení buněk, první pozoroval chromosomy, zavedl pojem mitóza a chromatin



První představy o struktuře genomu

Dlouhou dobu se vědci domnívali, že nukleová kyselina v jádře buňky je rozprostřena náhodně všude se stejnou pravděpodobností.

Pozorování mitotických chromosomů však vedlo již koncem 19. století některé badatele k závěru, že také v interfázi si mohou chromosomy uchovat svou identitu (genetickou a strukturální) (Rabl 1885, Boveri 1888).



Theodor Boveri: dědičnost je vázána na chromosomy (1887), po znovuobjevení Mendlových zákonů Hugo de Vriesem (1900) pokračuje ve výzkumu dědičnosti.

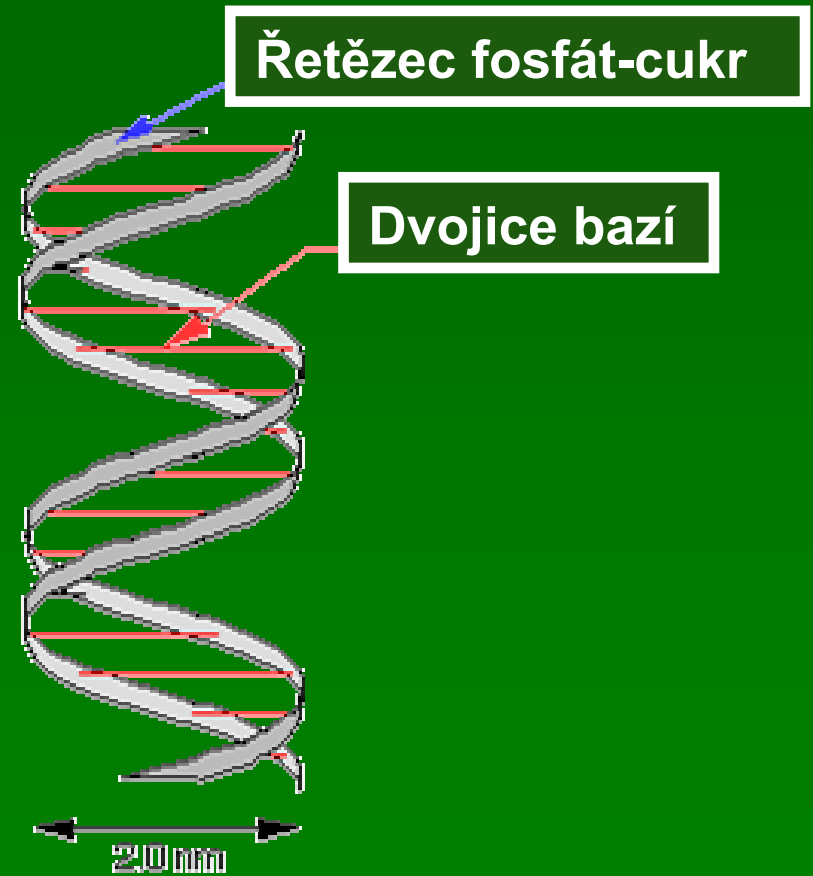
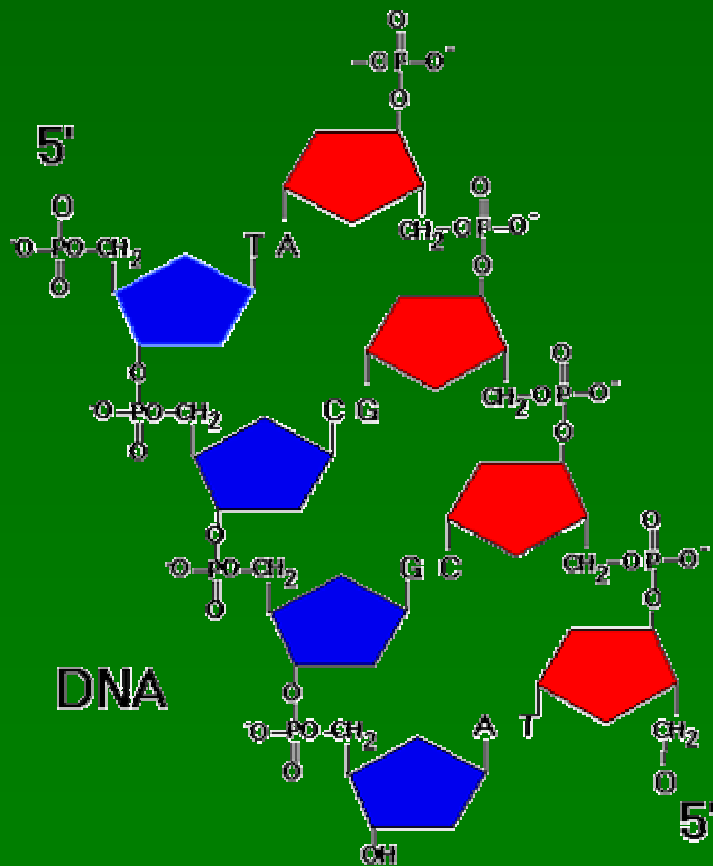
Základní poznatky o struktuře genomu

Primární a sekundární struktura DNA

Nukleosom a chromatinové vlákno

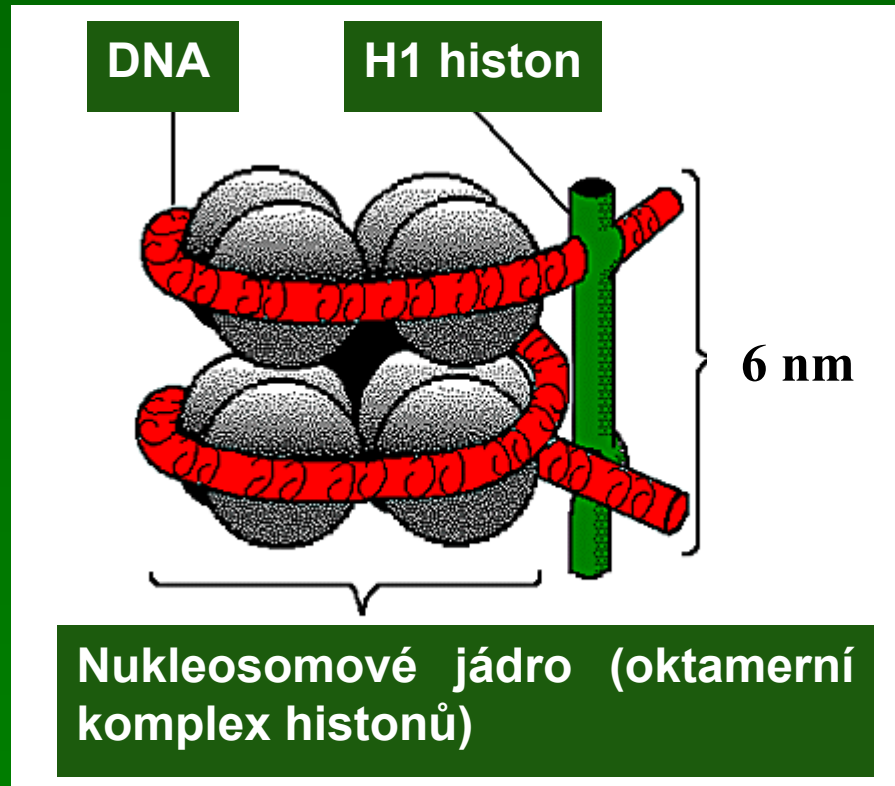
Chromosomy a genom

Primární a sekundární struktura DNA



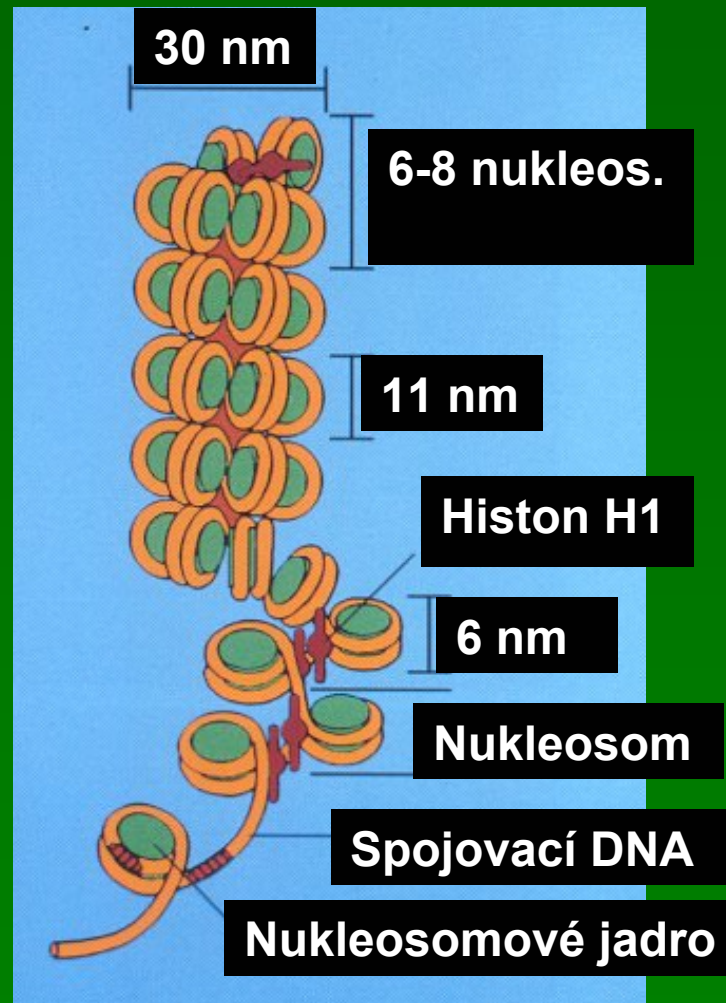
Watson a Crick, 1953

Nukleosom



Roger Kornberg, 1974

Chromatinové vlákno



DNA, nukleosomy, chromatin, chromosom a genom

Chromosom

Genom v jádře

Buňka

Chromatinové
vlákno

Nukleosomy

DNA

Metodická část

Techniky používané pro studium struktury lidského genomu

Buňky a jejich fixace

FISH a 3D-FISH

In vivo techniky (SRL, GFP)

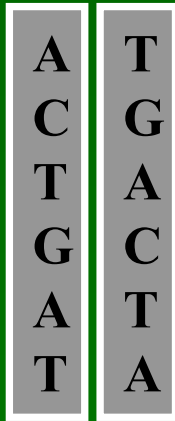
Kombinované značení

Konfokální mikroskopie

Analýza obrazu

Fluorescenční *in situ* Hybridizace (FISH)

Chromosomová DNA



Denaturace



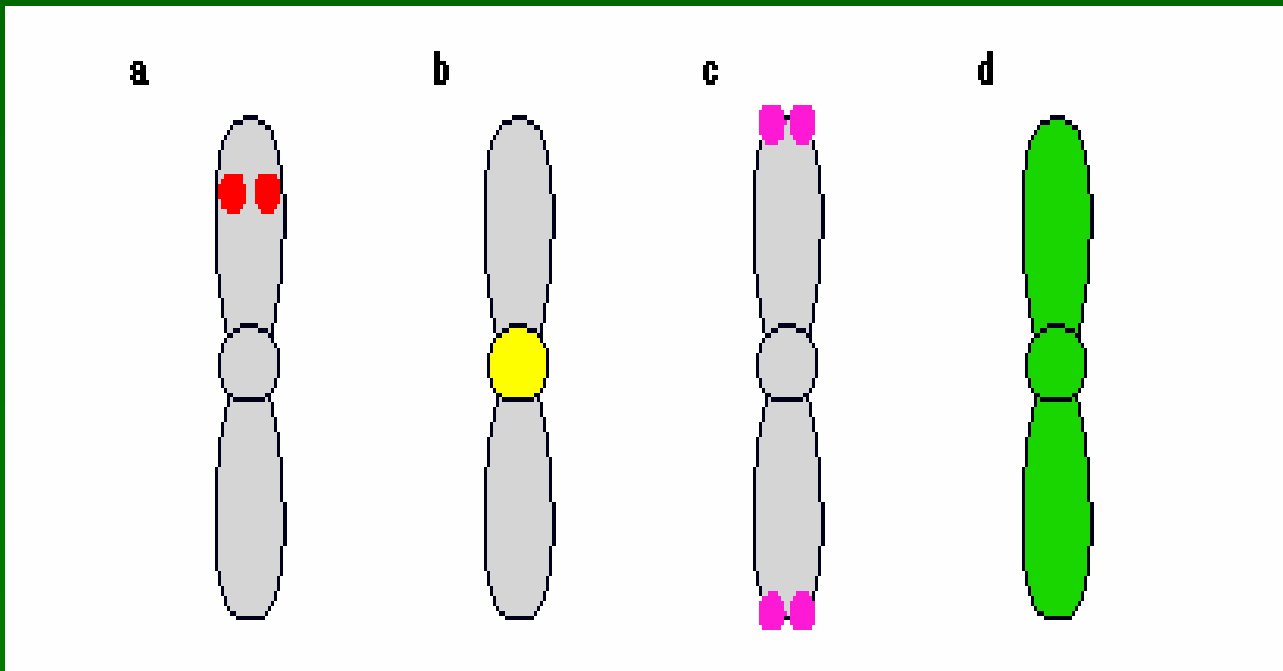
DNA proba (sonda)



Hybridizace

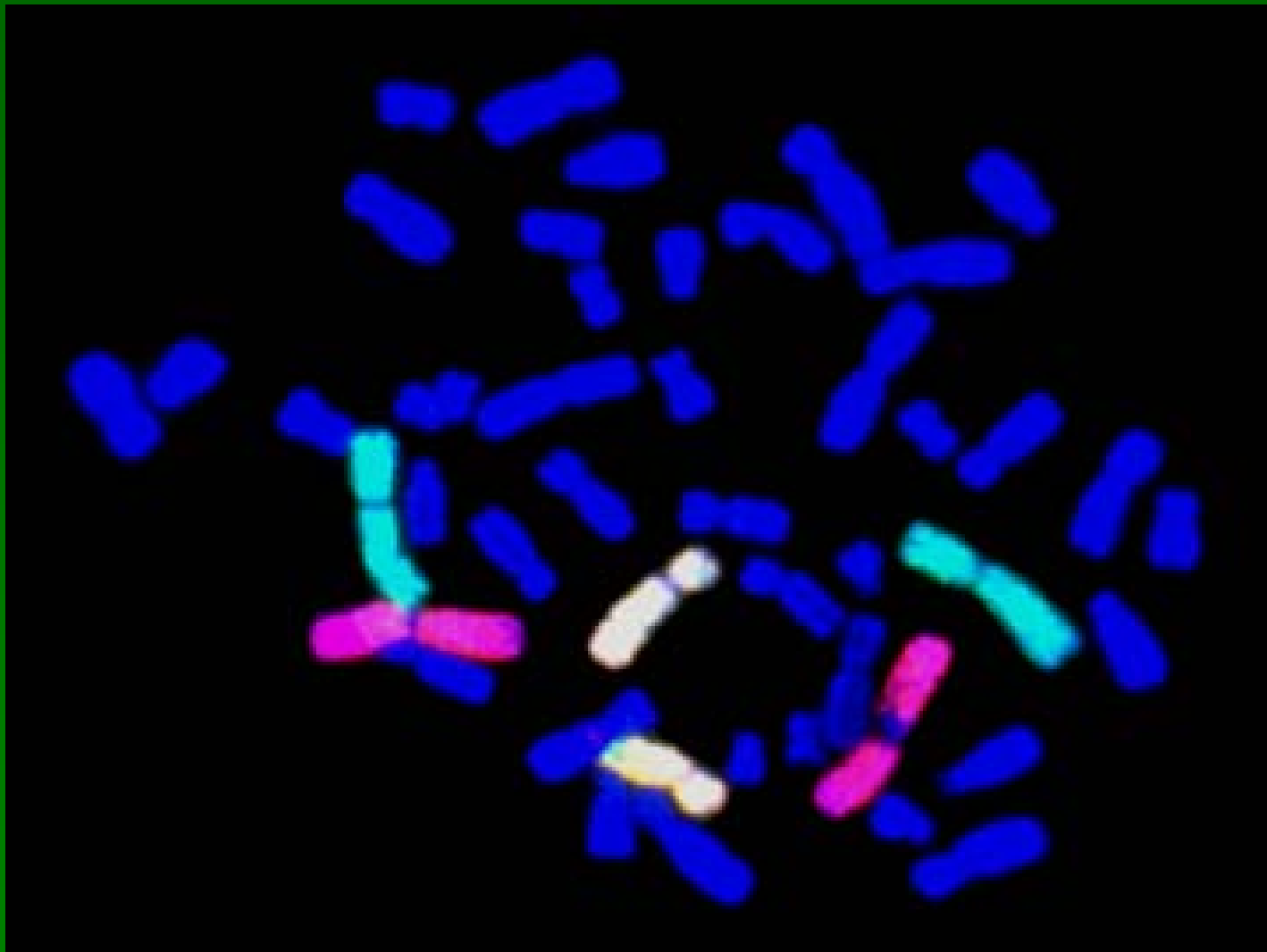


Druhy sond pro FISH

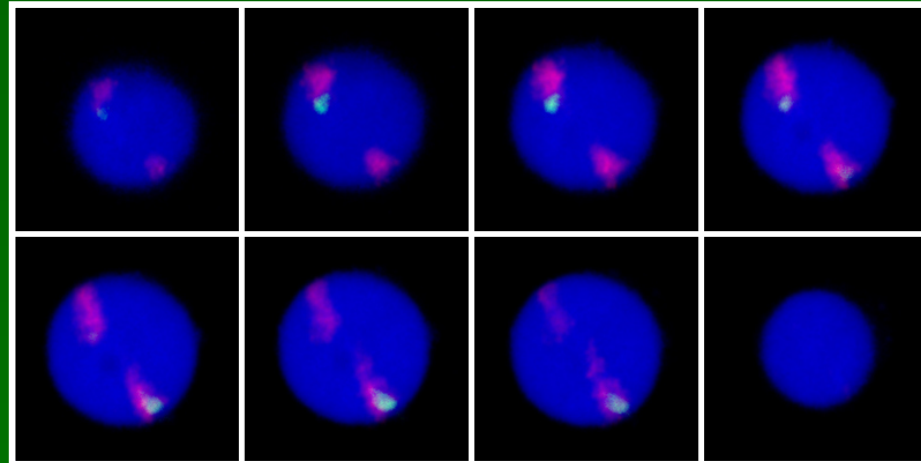
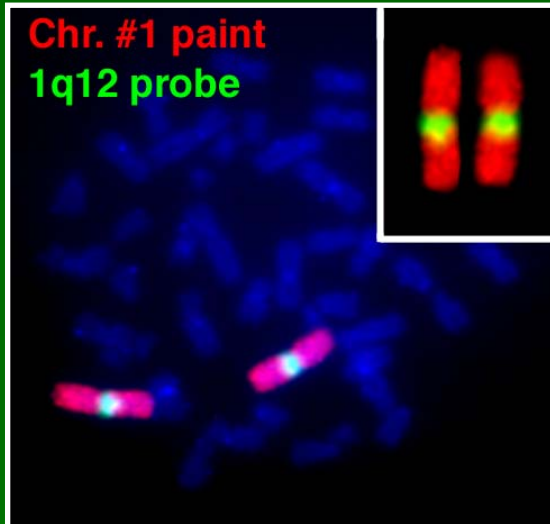


- a) Sondy specifické pro určité geny (sekvence)
- b) Sondy specifické pro repetitivní sekvence v okolí centromer
- c) Sondy specifické pro telomery
- d) "Paintingové" sondy pro celé chromosomy

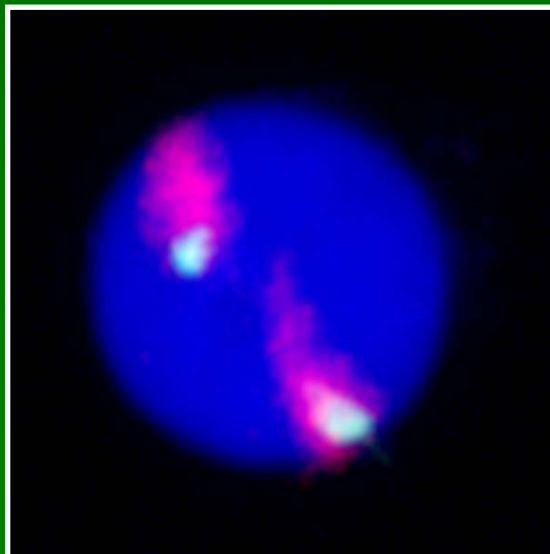
Chromosomy obarvené FISH technikou



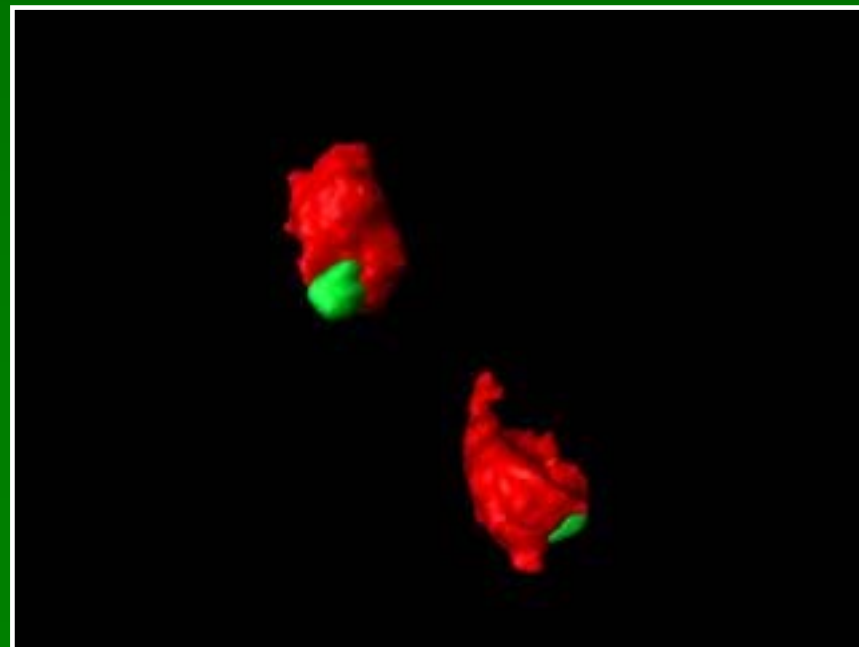
3D-FISH a konfokální mikroskopie



Galerie optických řezů



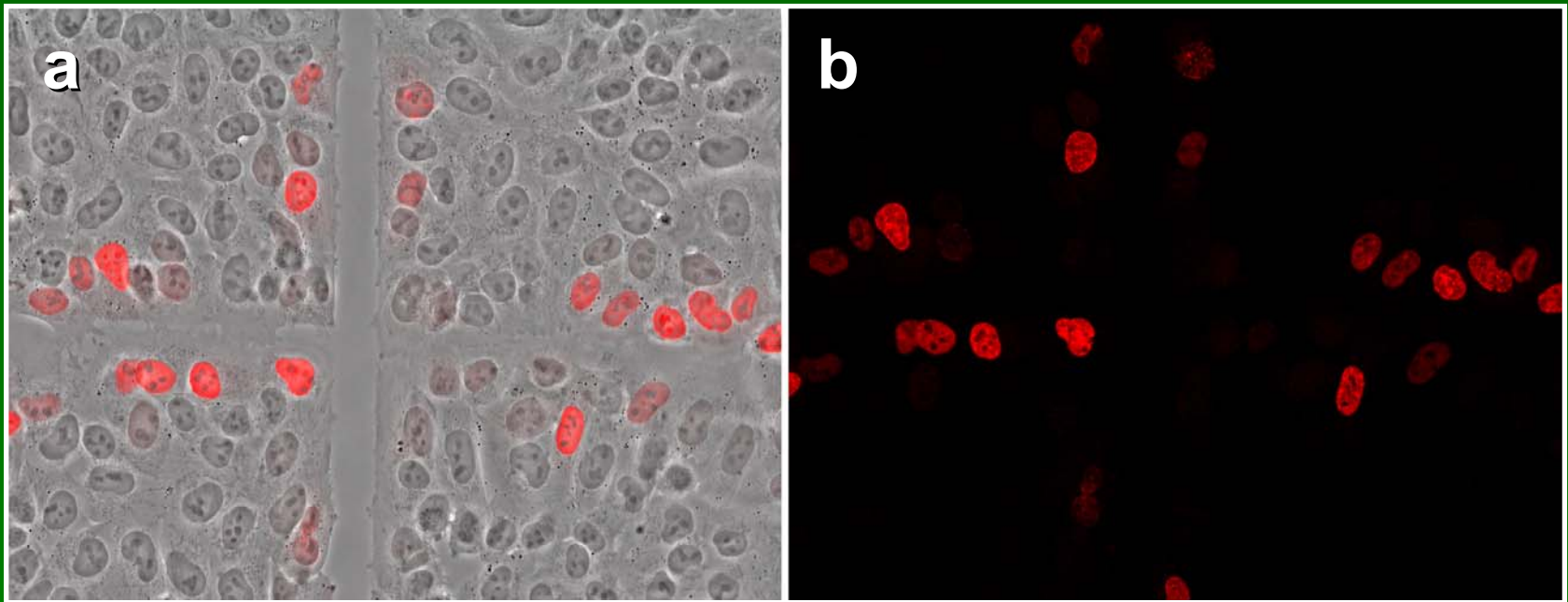
Maximální obraz
Všech řezů



3D rekonstrukce CT

Weierich et al., (2003) in press

Značení buněk metodou SRL (scratch replication labeling) užitím nukleotidů konjugovaných s fluorochromem

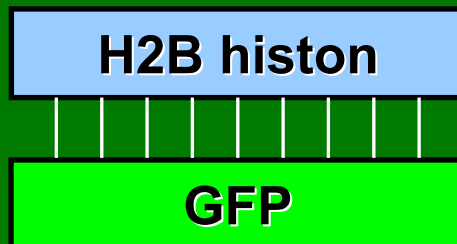


(SRL on neuroblastoma cells with **Cy3-dUTP** - fixed 30' after labelling)

Vizualizace vazebných míst proteinu V DNA *in vivo* pomocí GFP

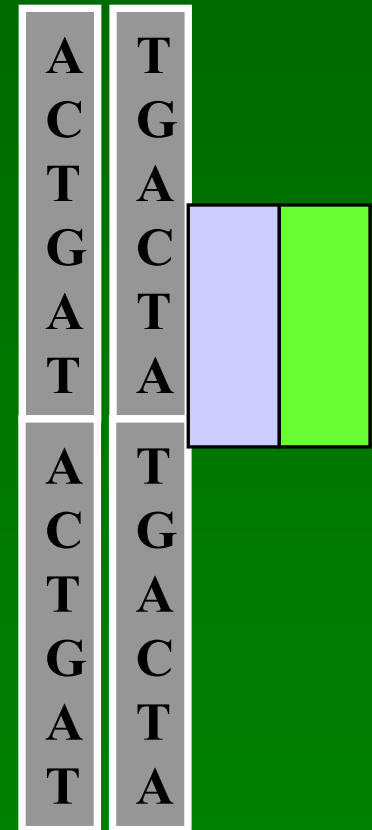
Do buňky se vloží plasmid kodující
daný protein konjugovaný s GFP

Syntéza konjugo-
vaného proteinu

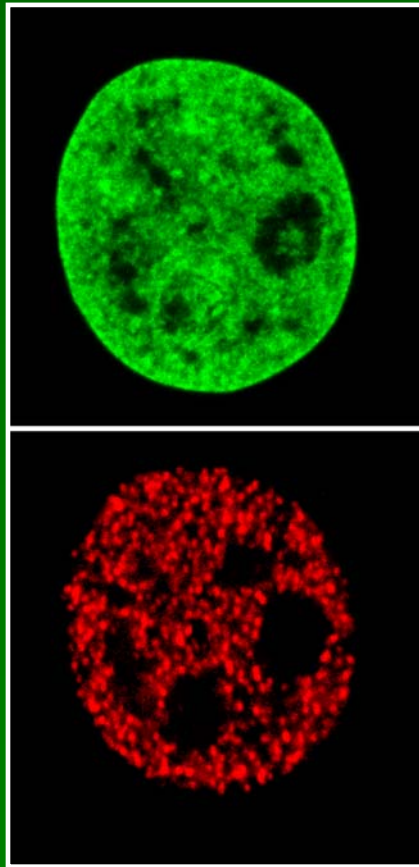


Protein se váže na
cílová místa v DNA,
Která potom zeleně
fluoreskují

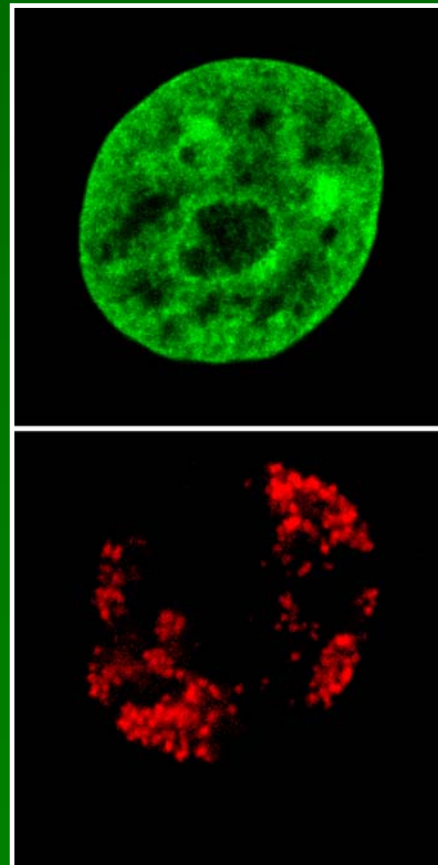
Chromosomová DNA



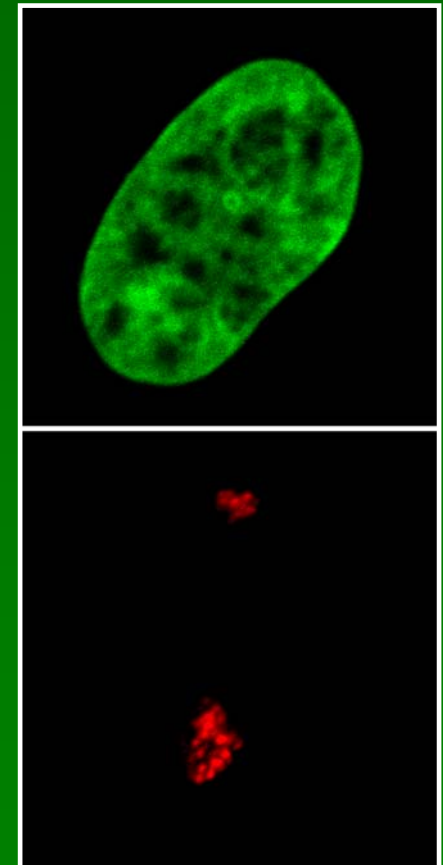
SRL pomocí Cy3-dUTP (červená) a segregace chromosomových teritorií u jader HeLa buněk s histonem H2B konjugovaným s GFP (zelená)



1st cycle

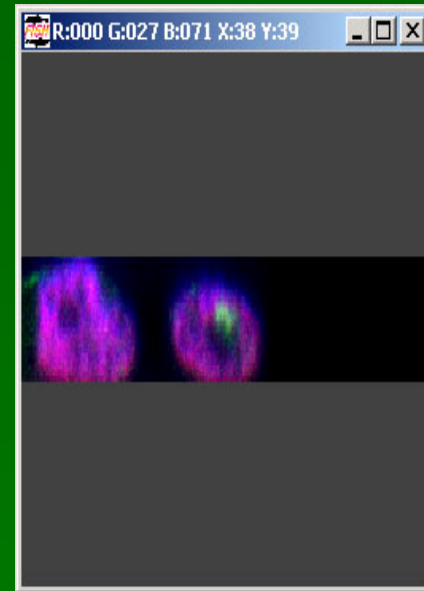
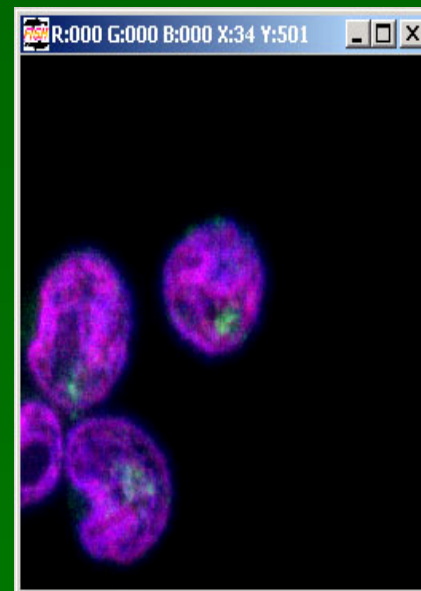
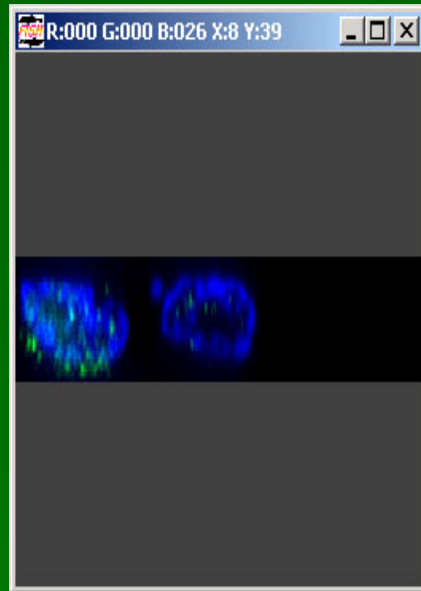
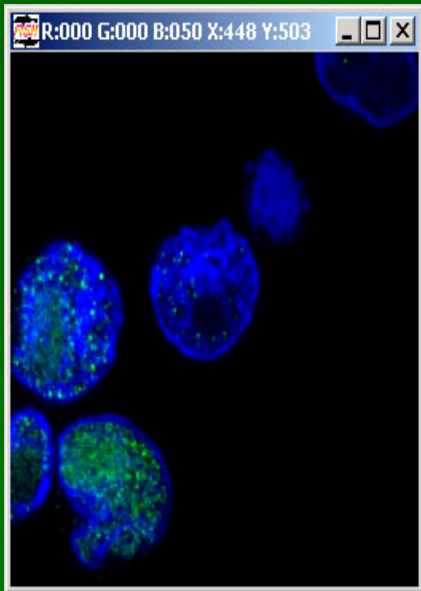


3rd cycle



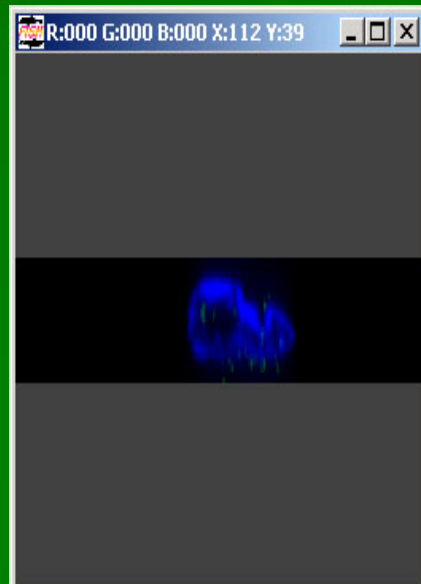
after at least 6 cycles

Sekvenční vizualizace užitím imunochemických a FISH technik



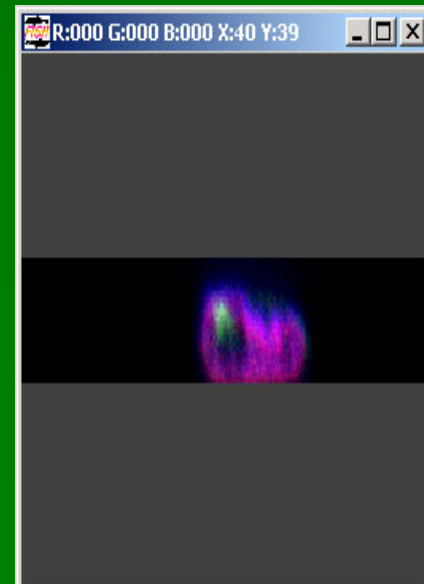
1.značení (užitím
protilátek)

**Topoisomeráza
alfa**



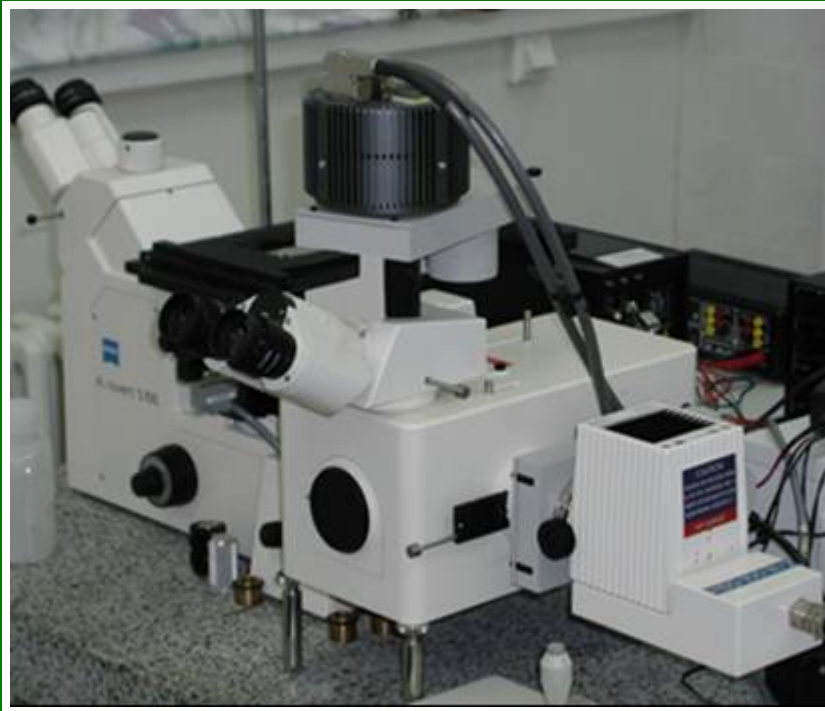
2.značení užitím
hybridizace

**Teritorium
HSA 17**



Cytometrie s vysokým rozlišením (automatizovaná konfokální mikroskopie)

ZEISS A100 + CARV



LEICA + CSU-10a



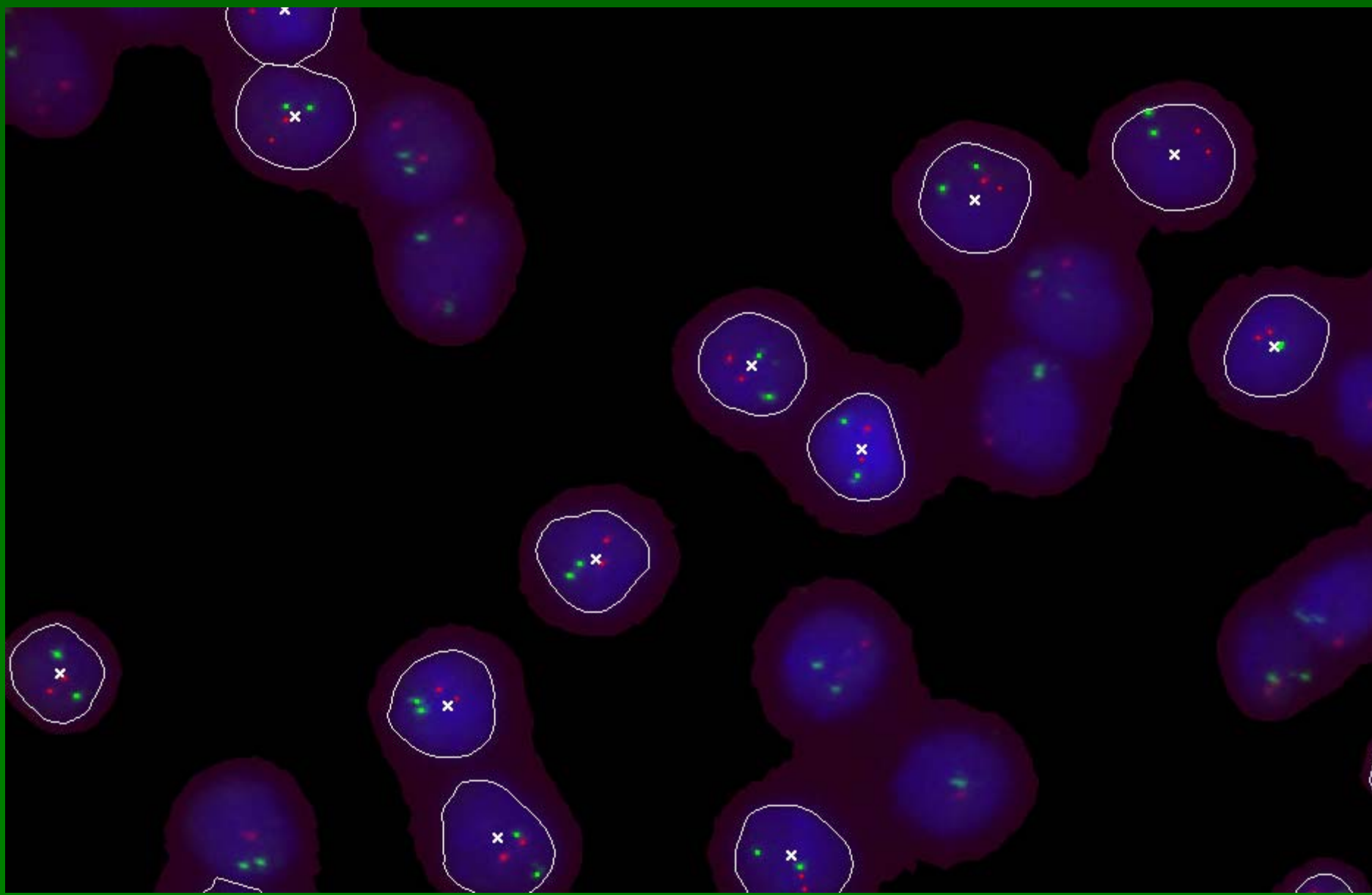


Software pro snímání obrazu a jeho analýzu

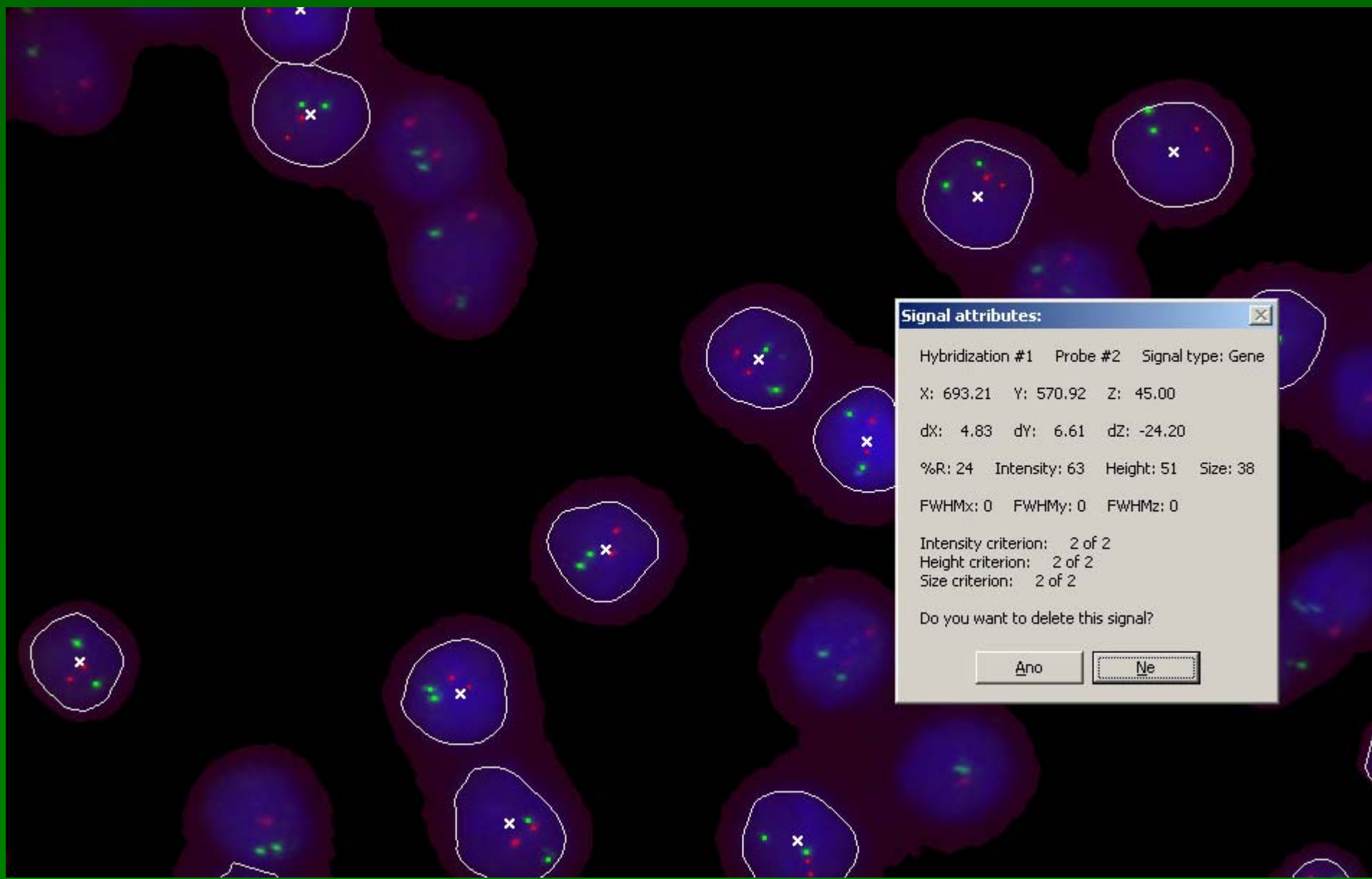
Umožňuje nastavení řady uživatelských parametrů pro snímání (pozice na sklíčku, meandrovité snímání, počet řezů, krok vertikálního posunu, počet a druh fluorochromů, rozsah intenzit apod.)

Analýza se provádí buď manuálně nebo automaticky. Při automatické analýze lze obvykle zadat řadu parametrů pro segmentaci obrazu a 3D analýzu signálů

Automatická analýza obrazu



Automatická analýza obrazu



Signal attributes:

Hybridization #1 Probe #2 Signal type: Gene

X: 693.21 Y: 570.92 Z: 45.00

dX: 4.83 dY: 6.61 dZ: -24.20

%R: 24 Intensity: 63 Height: 51 Size: 38

FWHMx: 0 FWHMy: 0 FWHMz: 0

Intensity criterion: 2 of 2

Height criterion: 2 of 2

Size criterion: 2 of 2

Do you want to delete this signal?

Ano

Ne

Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

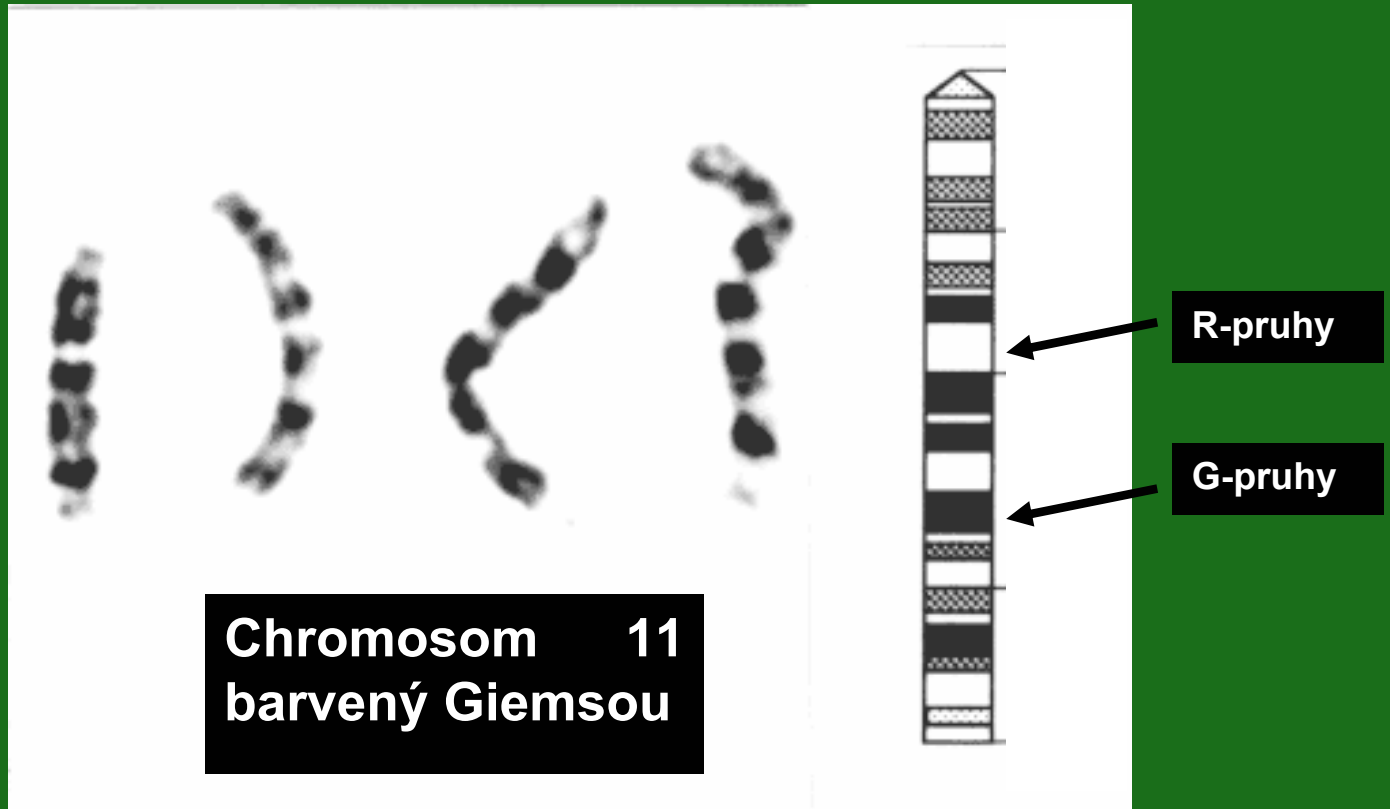
CT a jejich části jsou disjunktní

Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

Nenáhodná vnitřní struktura CT

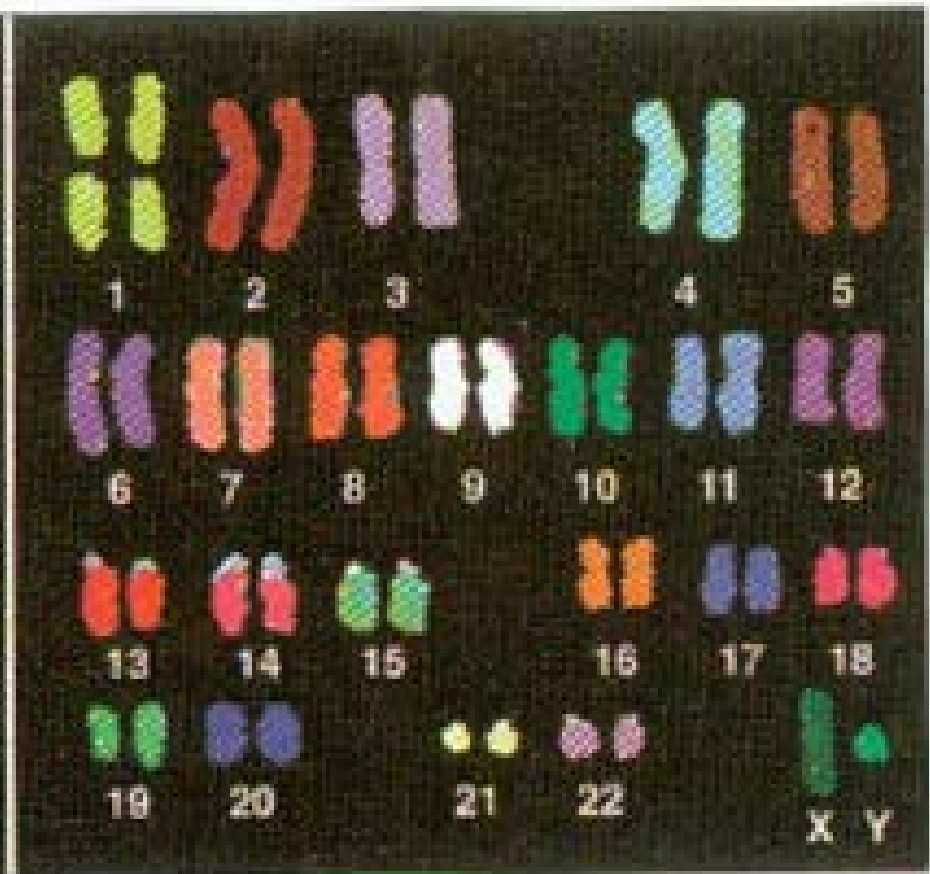
Klasické barvení chromosomů



Lidské chromosomy obarvené pomocí multicolor FISH

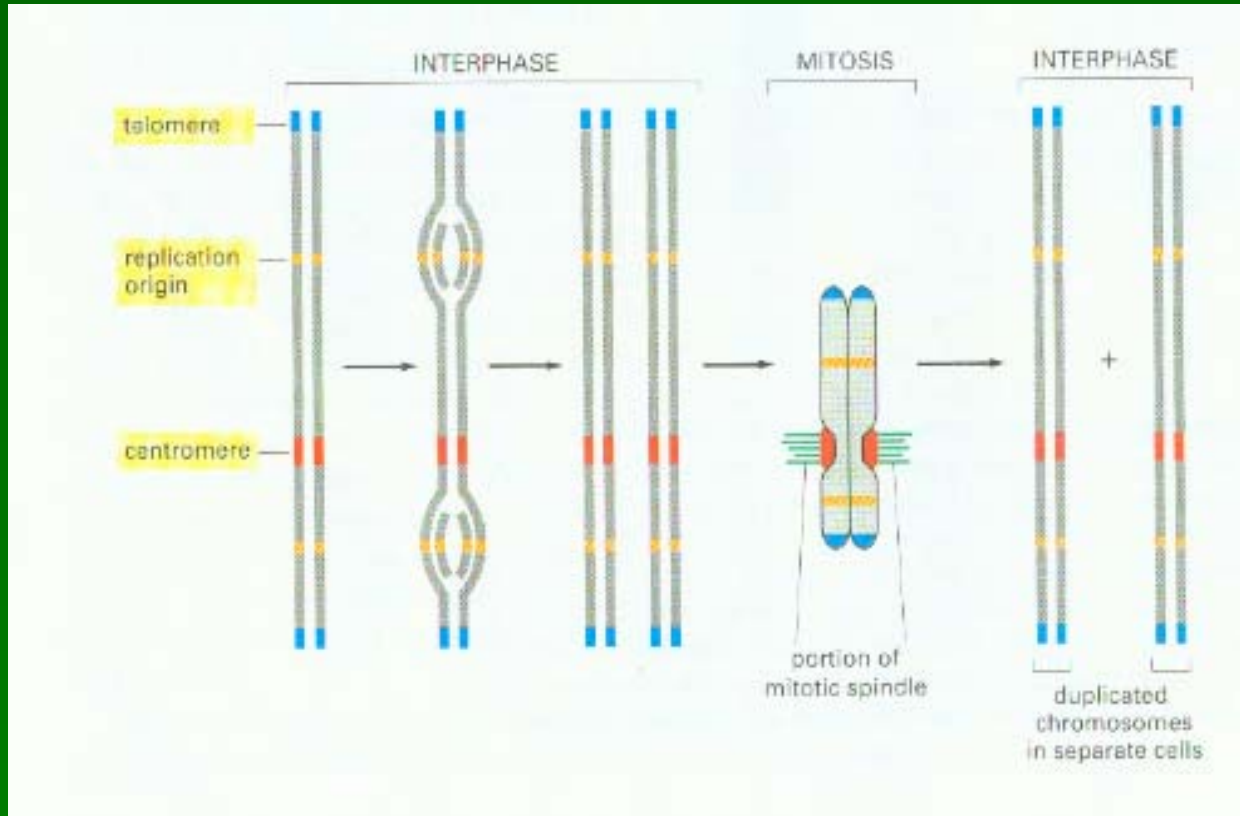


(A)



(B)

Významné sekvence na chromosomech

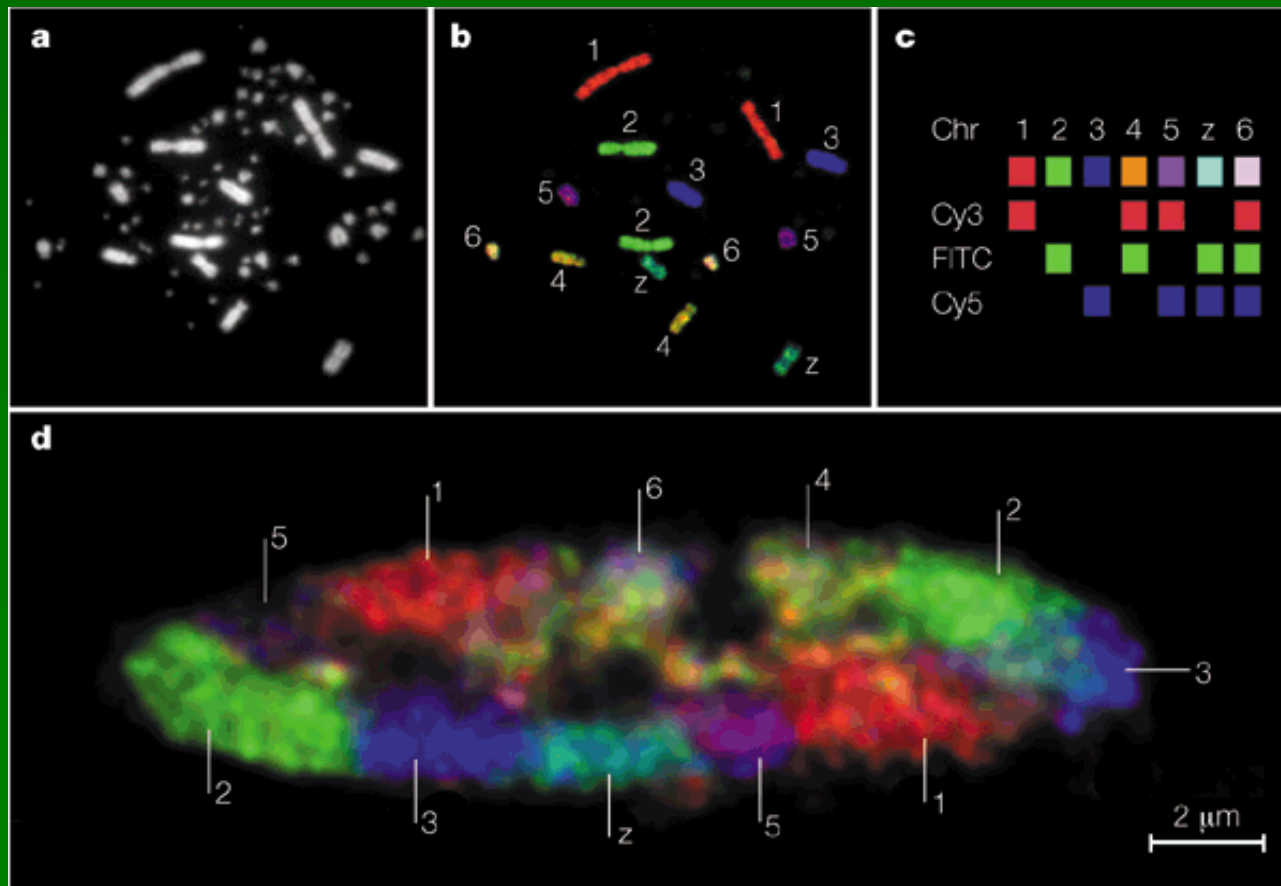


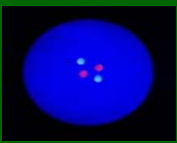
Centromery – identifikovatelné jako místa konstriktce, v nichž jsou chromatidy spojeny k sobě, odpovědné za segregaci CT, fixovány na určité místo v CT, mají určitou sekvenci. Tyto sekvence mohou být stejné nebo podobné pro více CT.



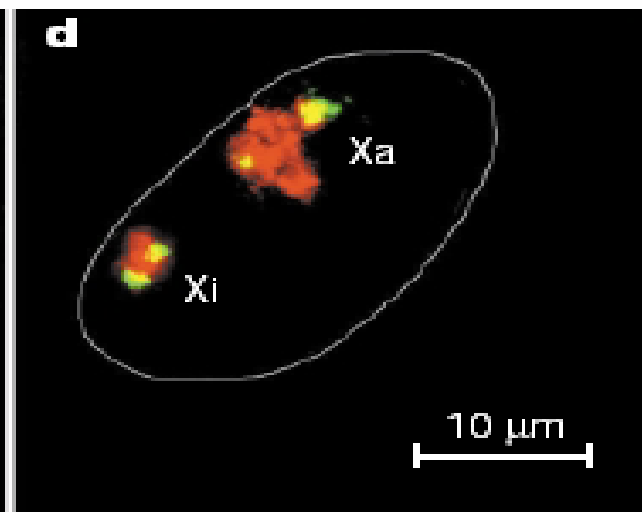
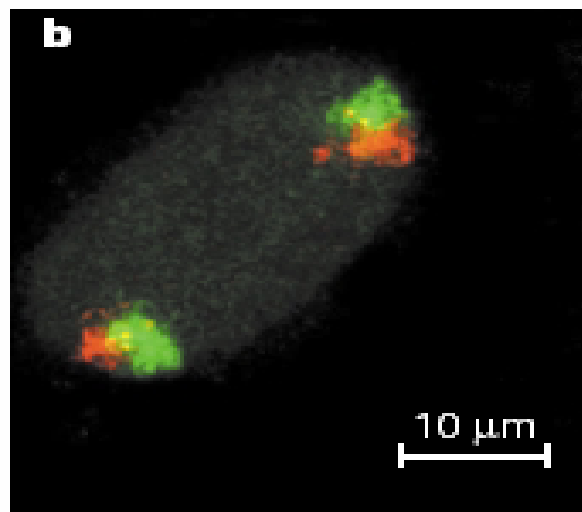
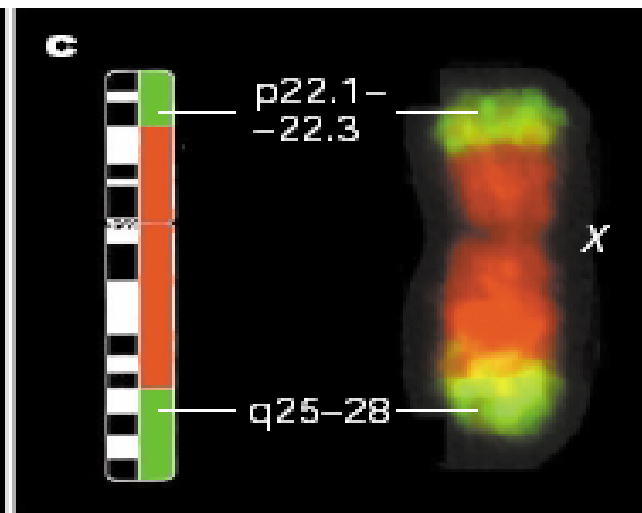
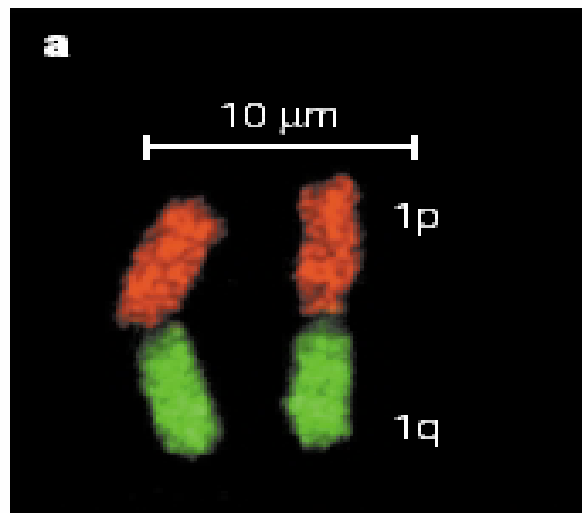
Chromosomová teritoria (CT)

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

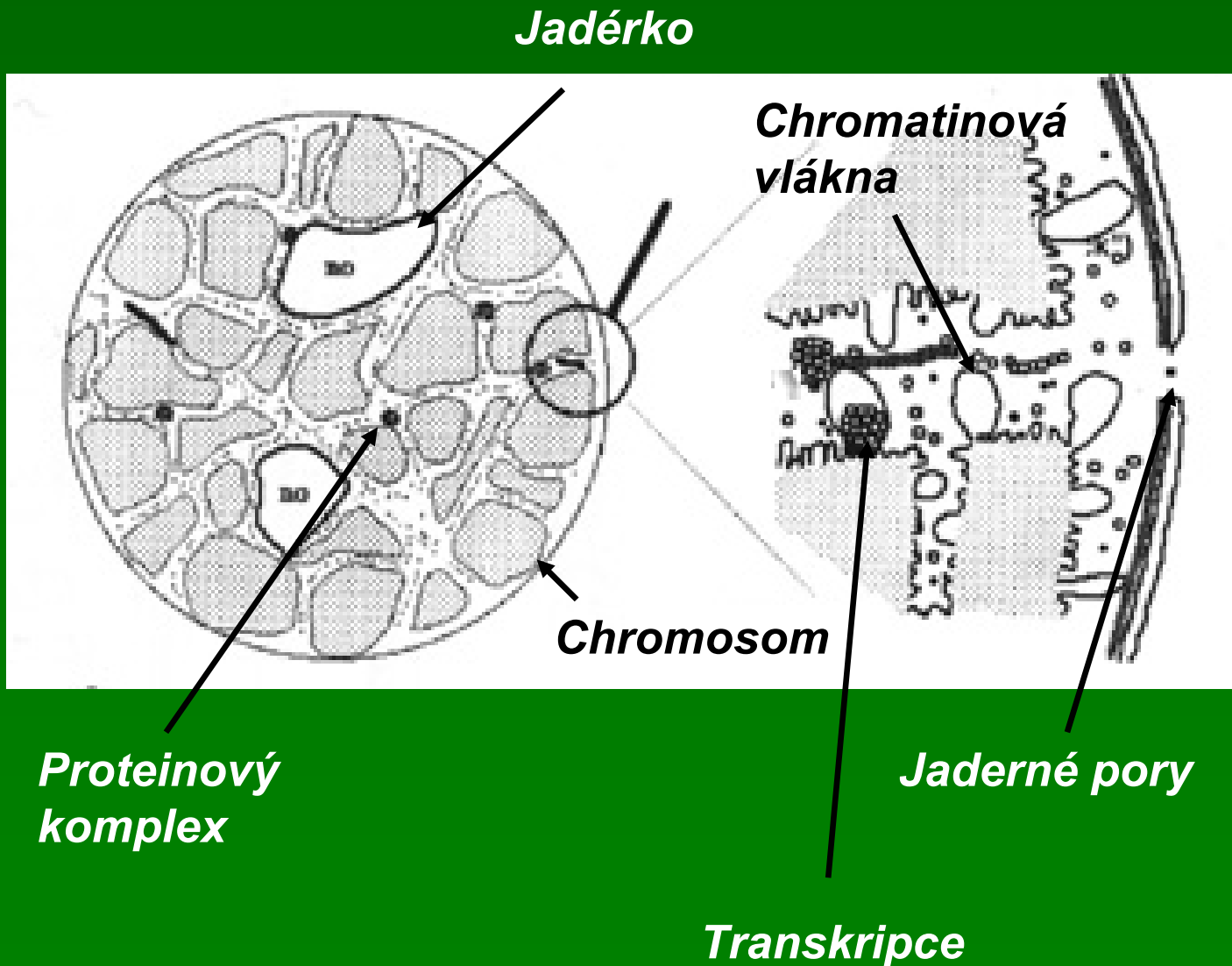




Chromosomová teritoria se nepřekrývají; ani jejich části



Funkční uspořádání genomu v jádře



Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

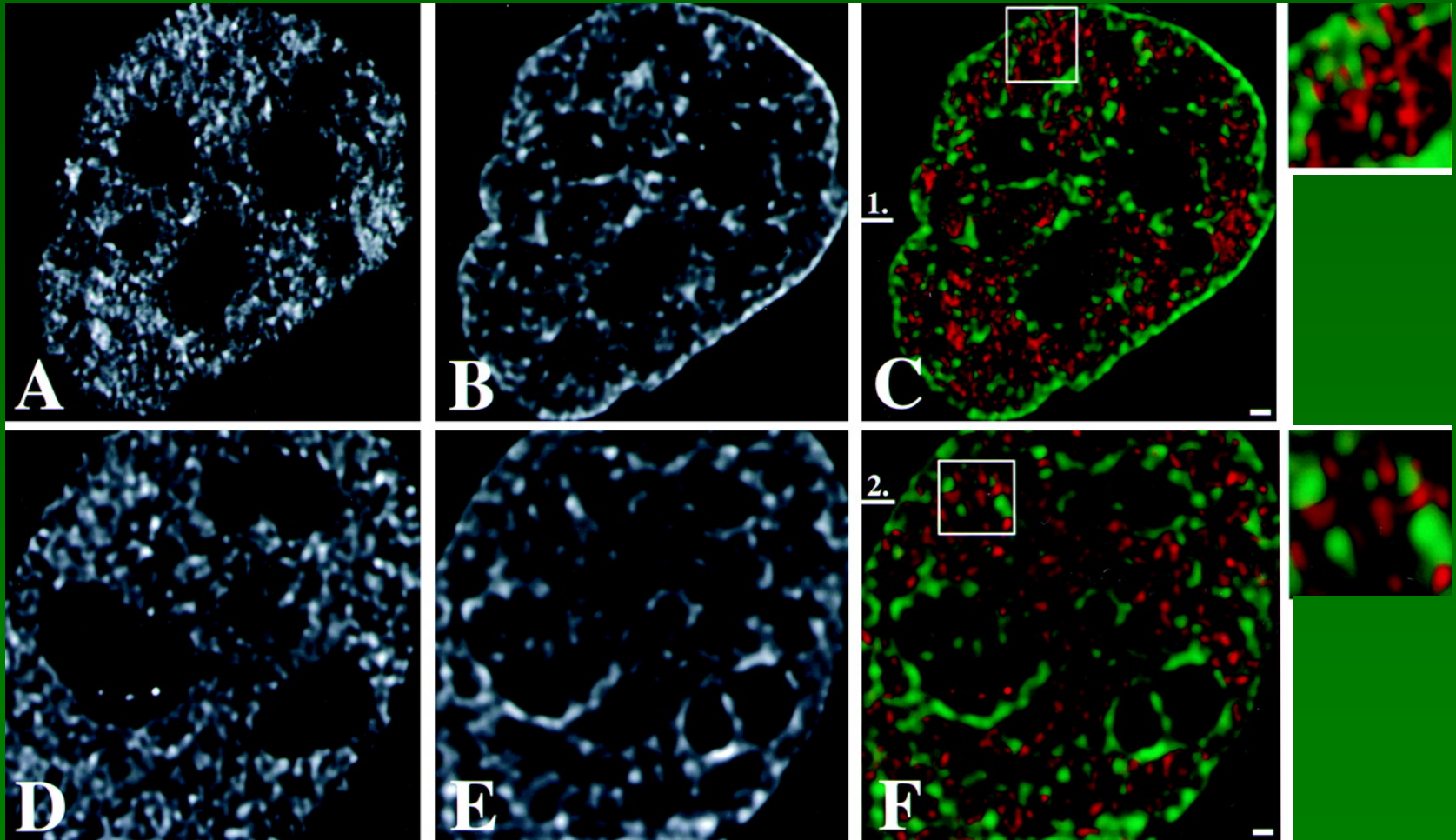
CT a jejich části jsou disjunktní

Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

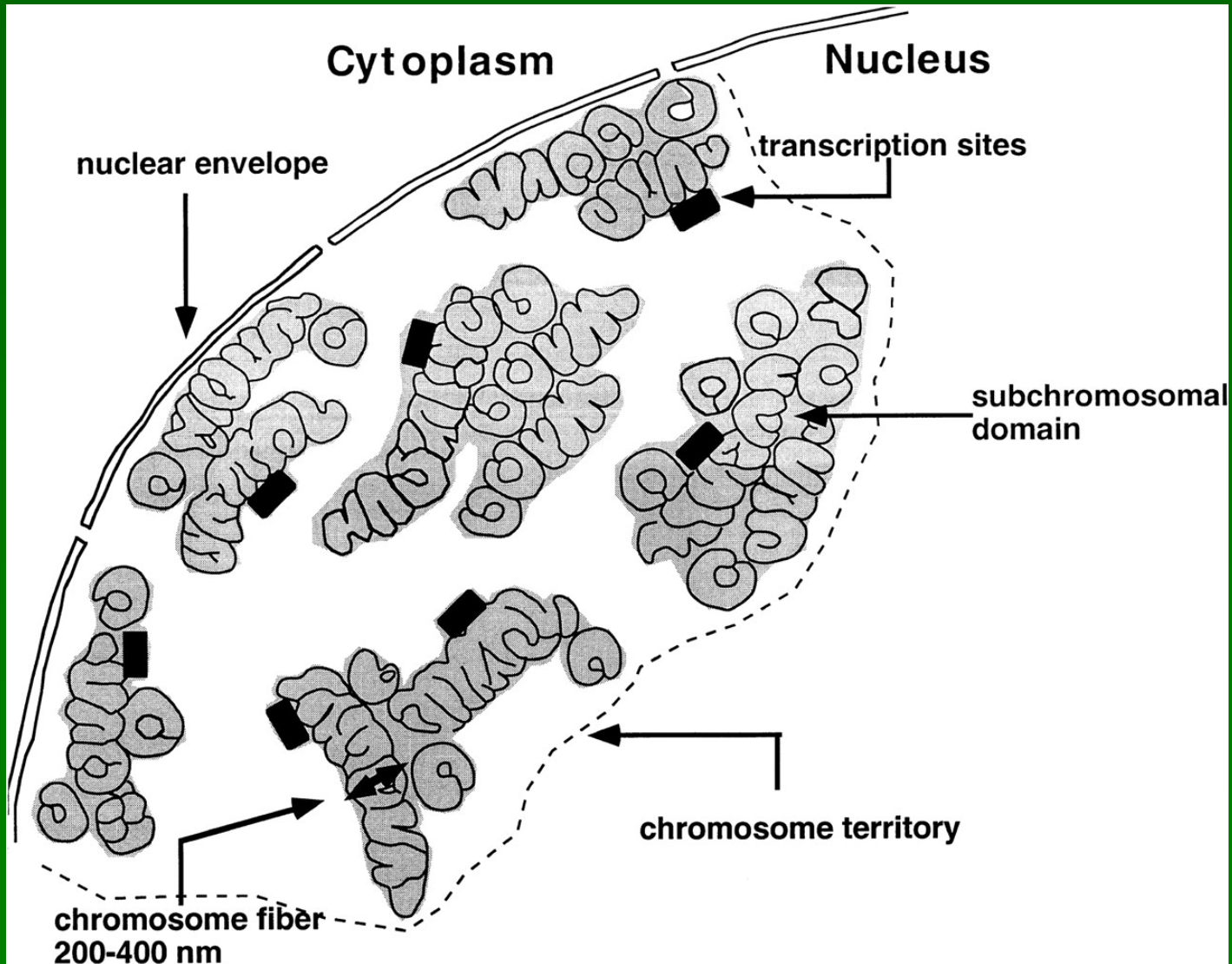
Nenáhodná vnitřní struktura CT

Struktura CT – CT je tvořeno subdoménami



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

Struktura CT - schéma



Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

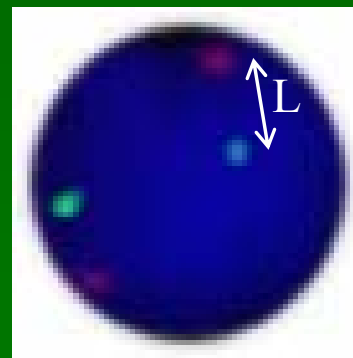
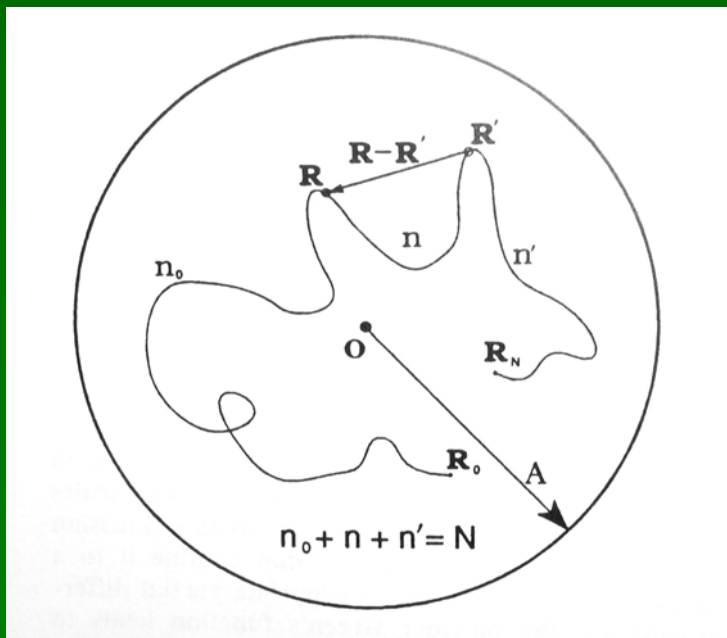
CT a jejich části jsou disjunktní

Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

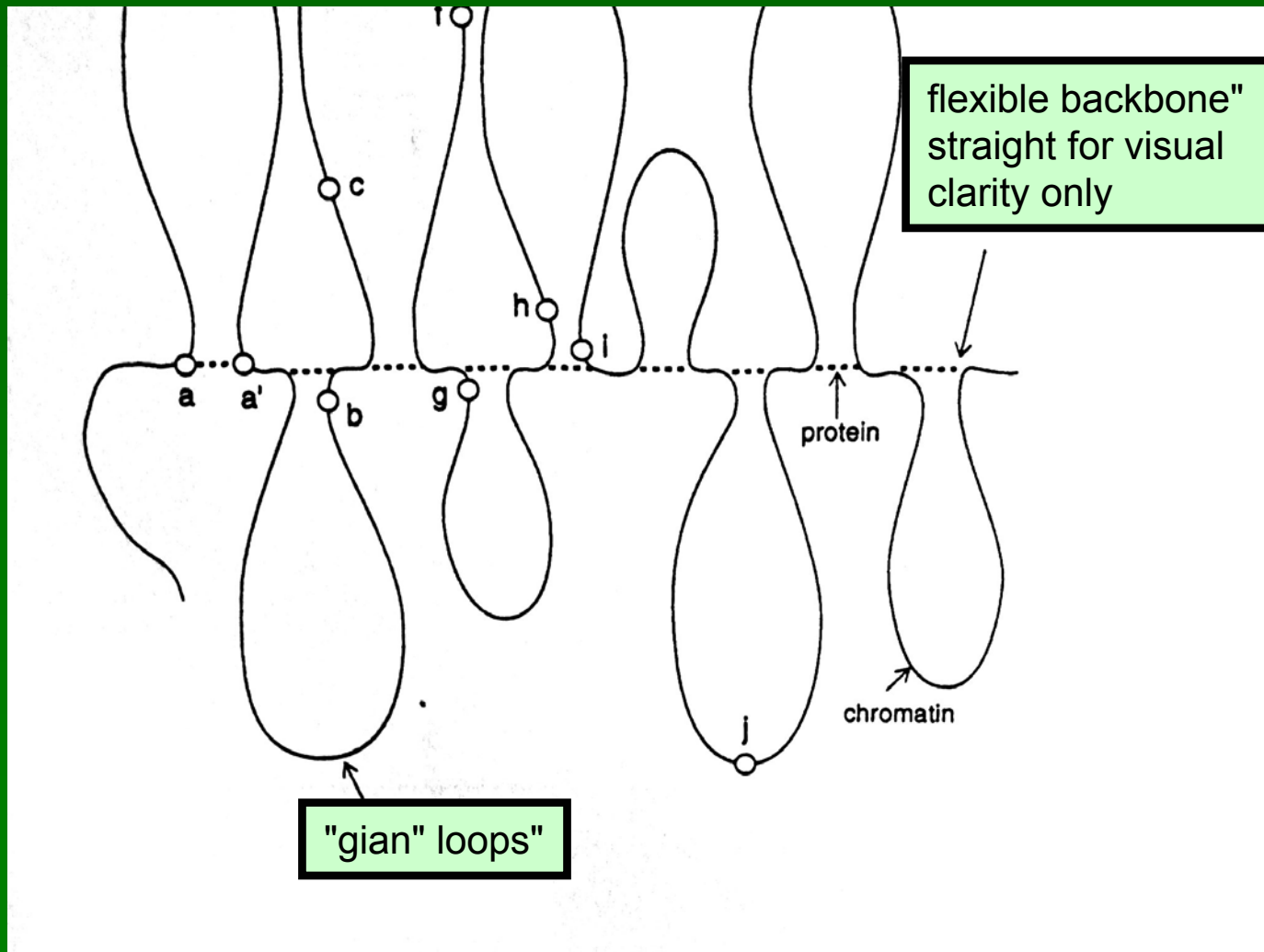
Nenáhodná vnitřní struktura CT

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



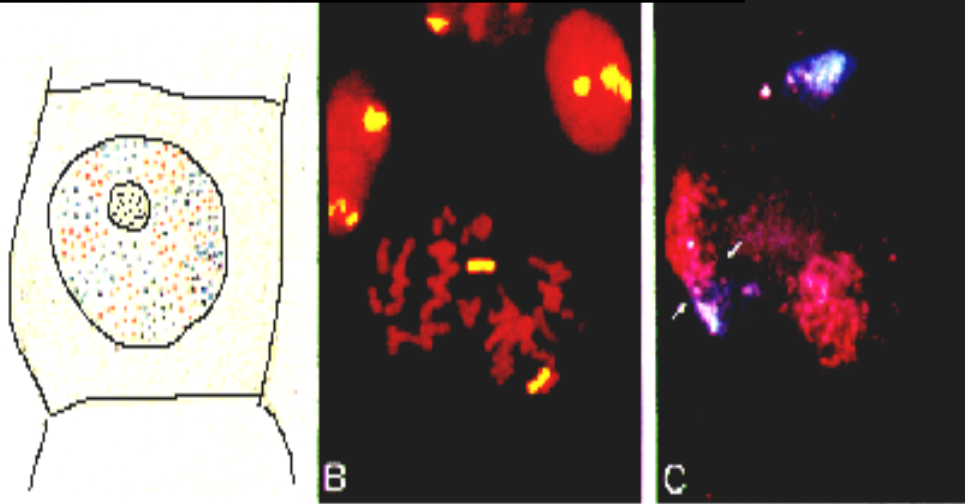
$$\langle L^2 \rangle \approx n$$

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

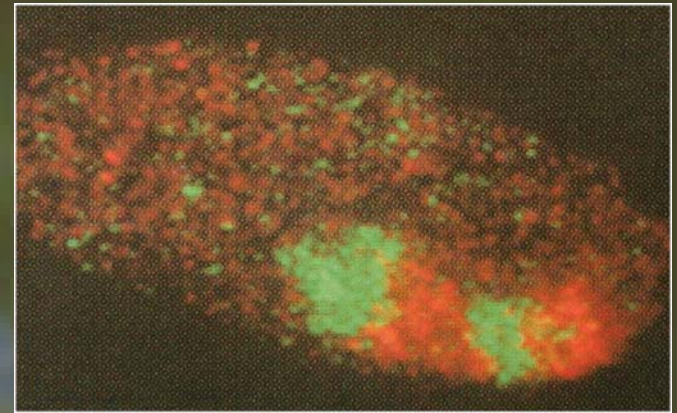


Multi-loop subcompartment model (Münkel et al., 1999)

Existence disjunktních CT



Existence subdomén uvnitř CT



D

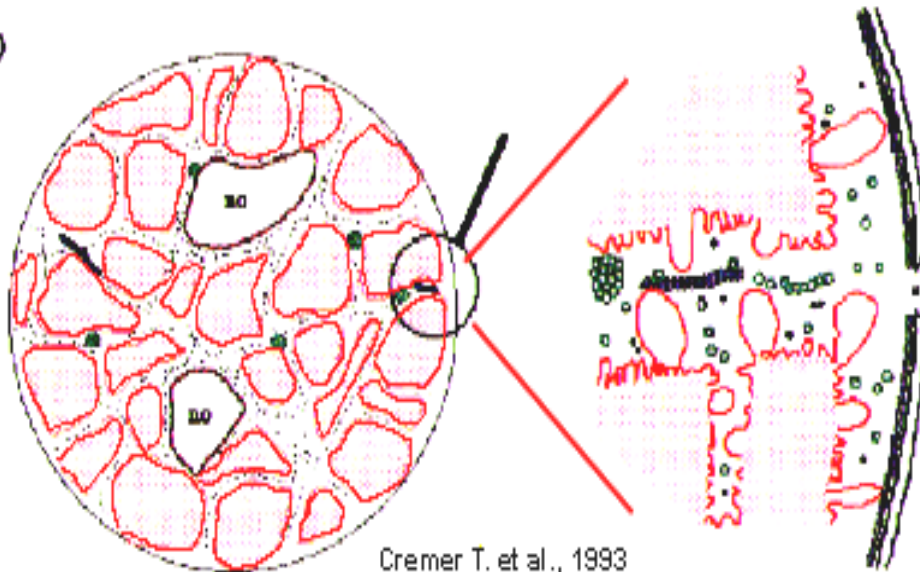
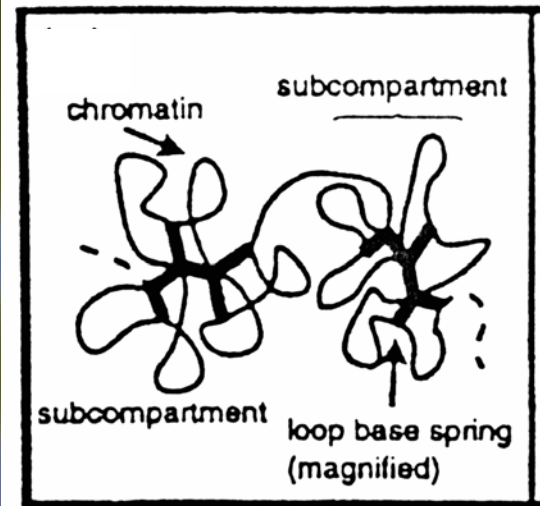


Schéma modelu



Chromosomy

Úvod - mitotické a interfázní chromosomy

Barvení chromosomů (klasika, FISH)

Významné elementy chromosomů

CT a jejich části jsou disjunktní

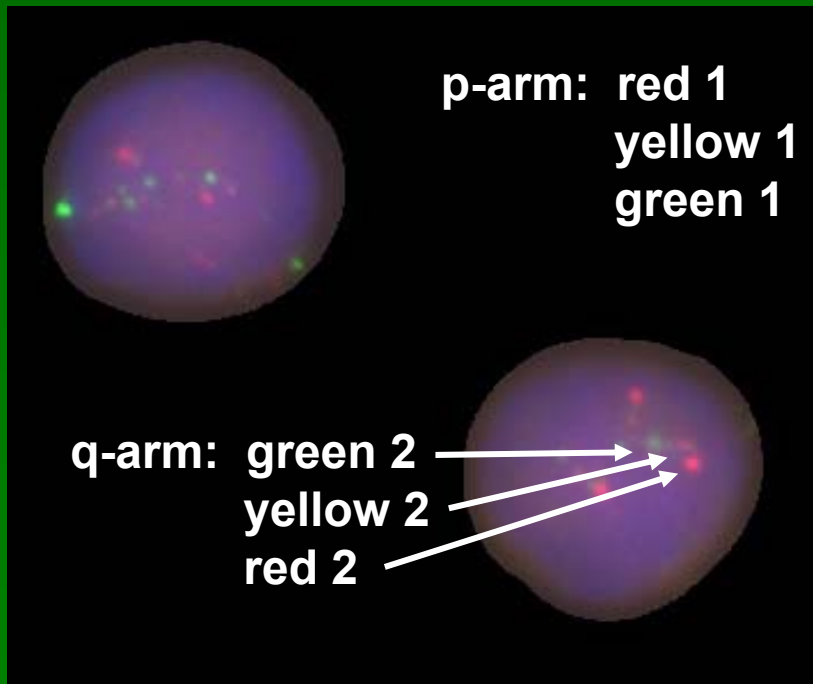
Subdomény CT

Chromosom jako náhodný polymer

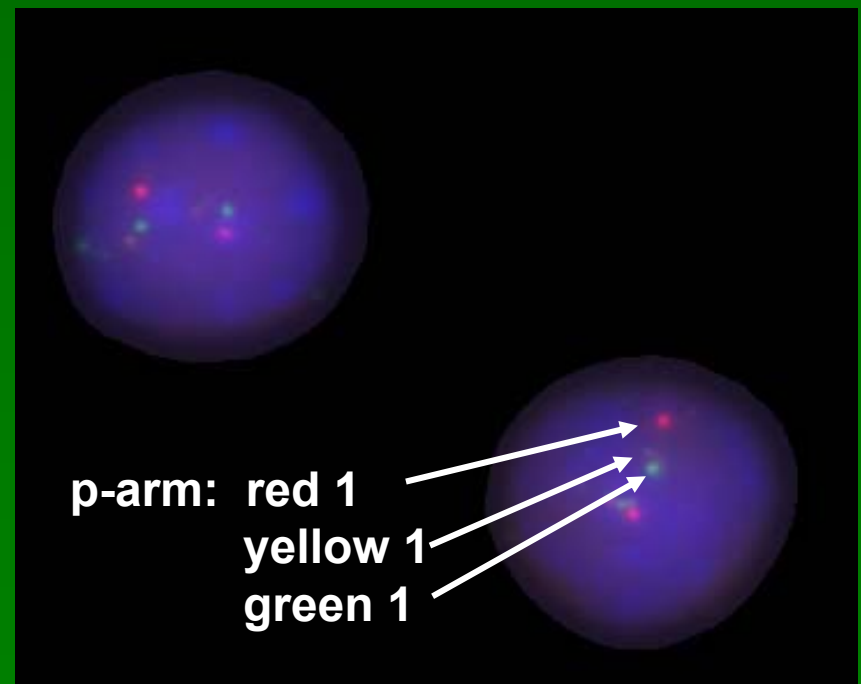
Nenáhodná vnitřní struktura CT

Použití více DNA prob pro tentýž chromosom

Signály z první hybridizace lze rozlišit v druhé



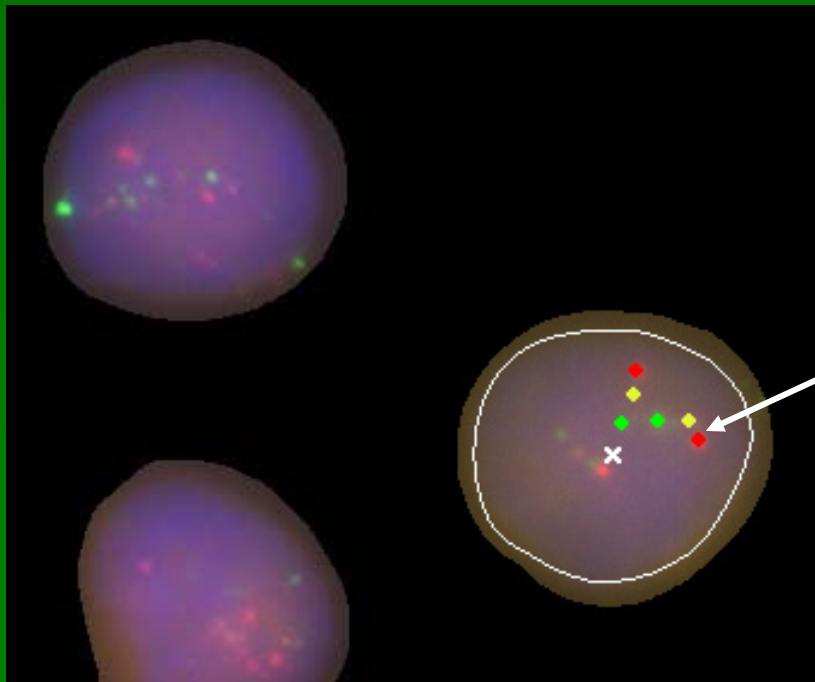
1st hybridization – 6 probes



2nd hybridization – 3 probes

Cytometrie s vysokým rozlišením – nalezení signálů

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



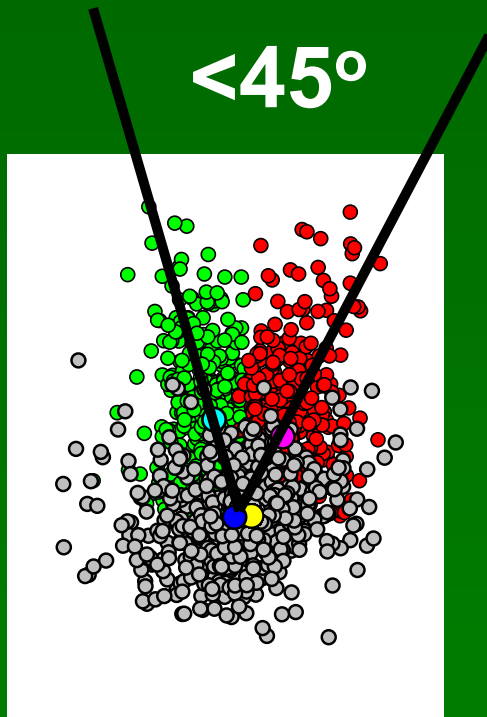
Signal attributes:

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

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

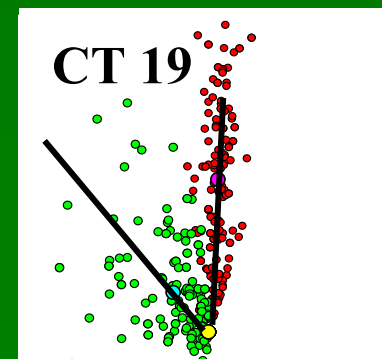
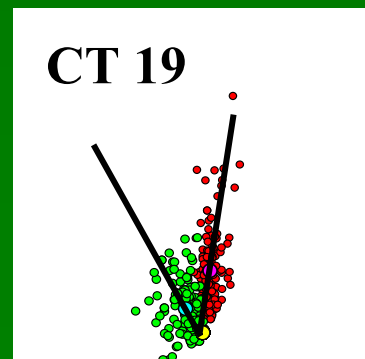
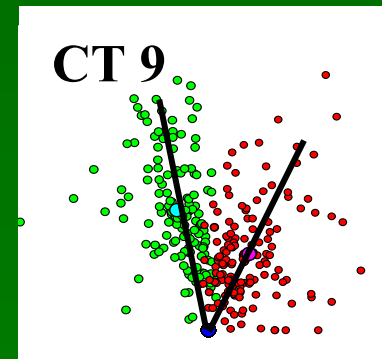
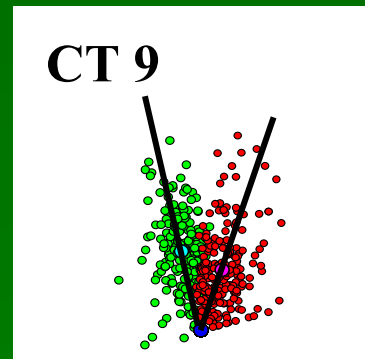
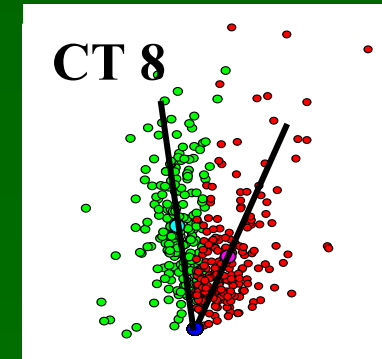
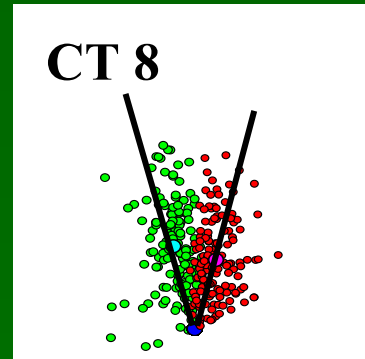
Do you want to delete this signal?

Polární struktura chromosomových teritorií



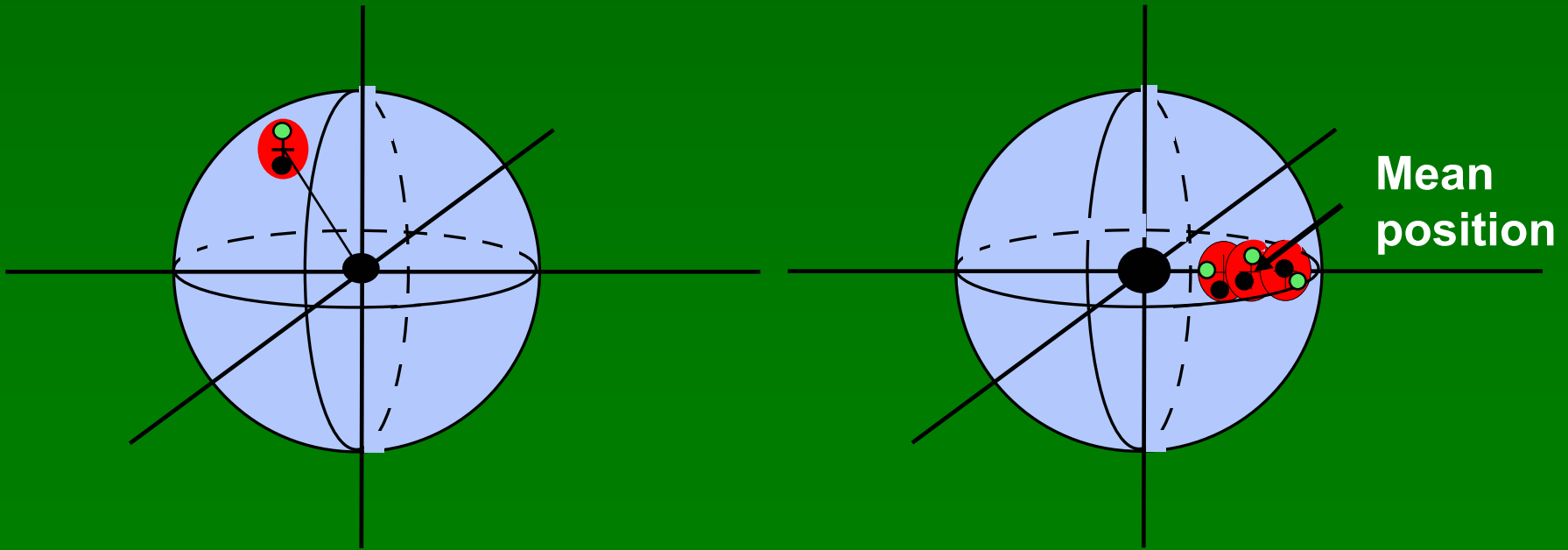
CT 8 in
Go-lymphocytes

Go-lymphocytes Stimulated lym



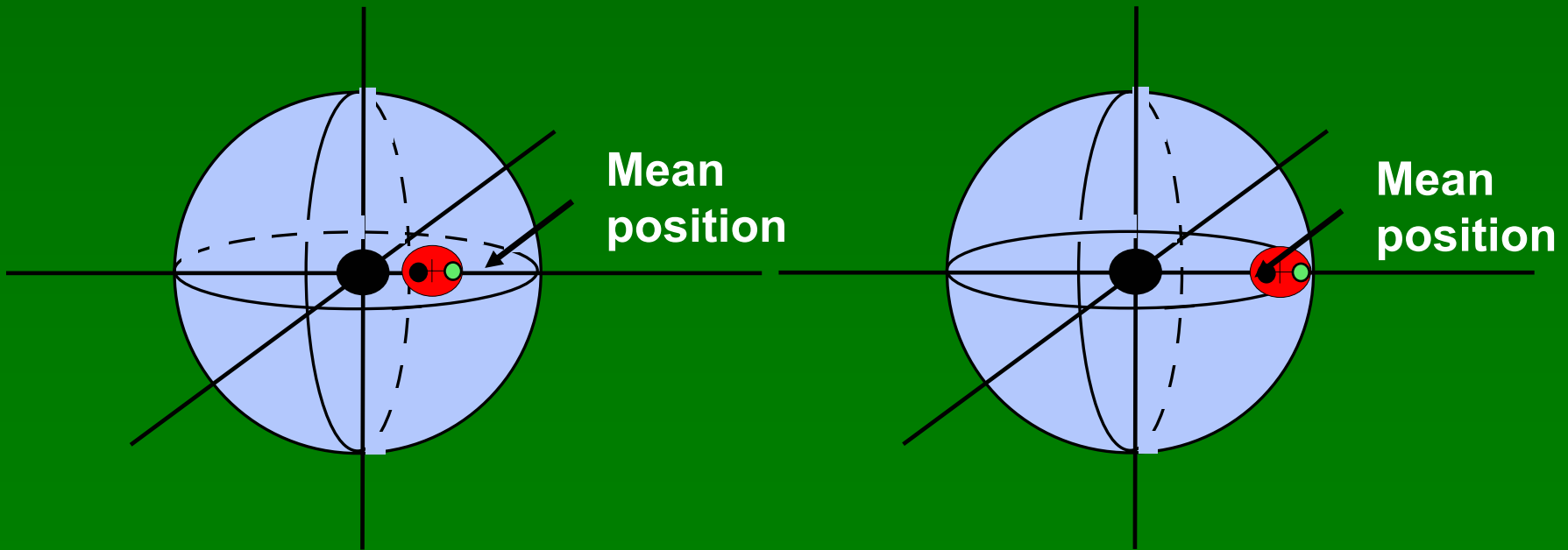
Orientace CT v jádrech buněk

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

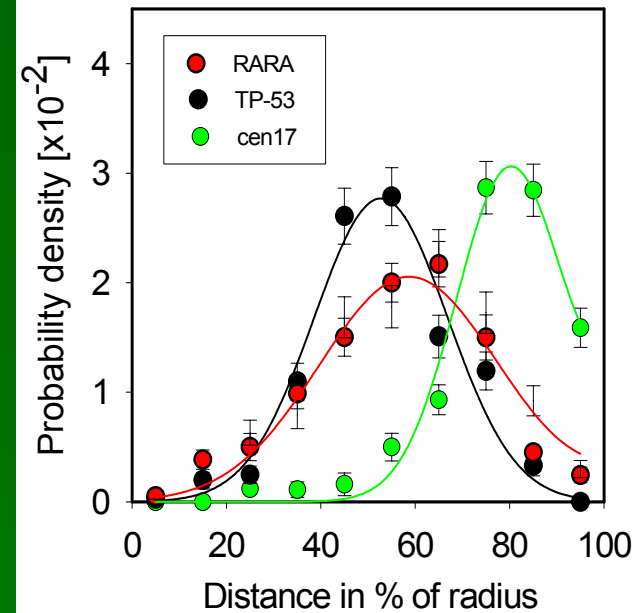
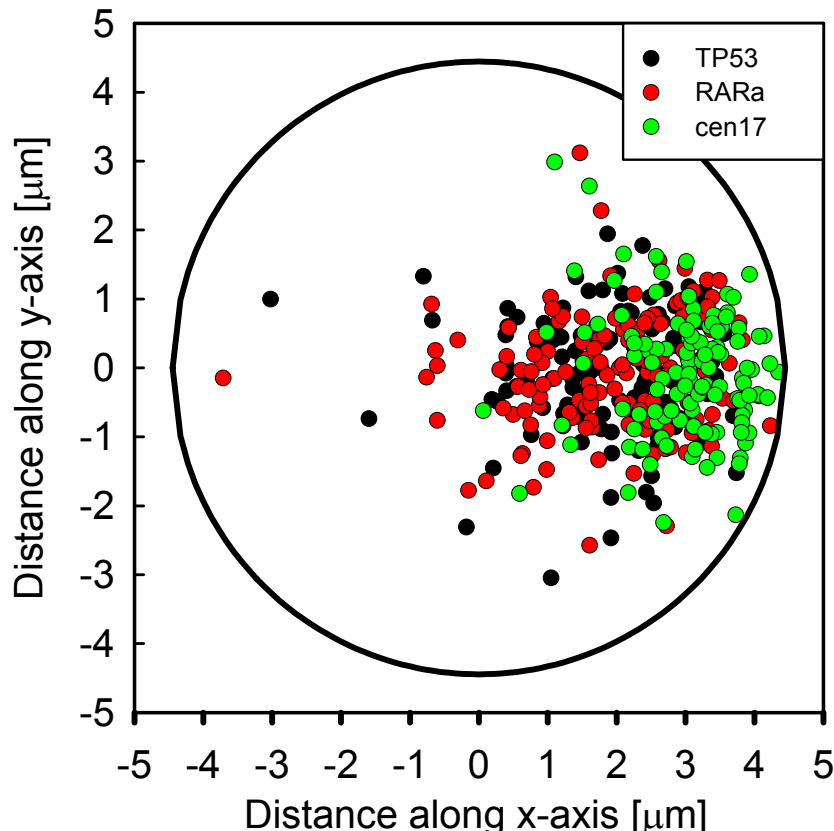


Transformace CT v jádře buňky

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



Orientace CT v jádře buňky



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

Struktura chromosomových teritorií

Závěry o nenáhodném uspořádání chromosomových teritorií:

- 1) Úhly trojúhelníku jež vznikne ze tří genetických elementů stejného CT v jádře jsou v mnoha případech menší než 60° , tj. hodnota, kterou lze očekávat pro náhodnou strukturu.
- 2) Orientace jader se zviditelněnými CT a jejich genetickými elementy poskytuje důkaz o orientaci a polaritě CT.

Uspořádání genomu v jádře buňky

Rozdělení genetických elementů v jádře pro různé typy buněk a různé živočišné druhy (radiální distribuce)

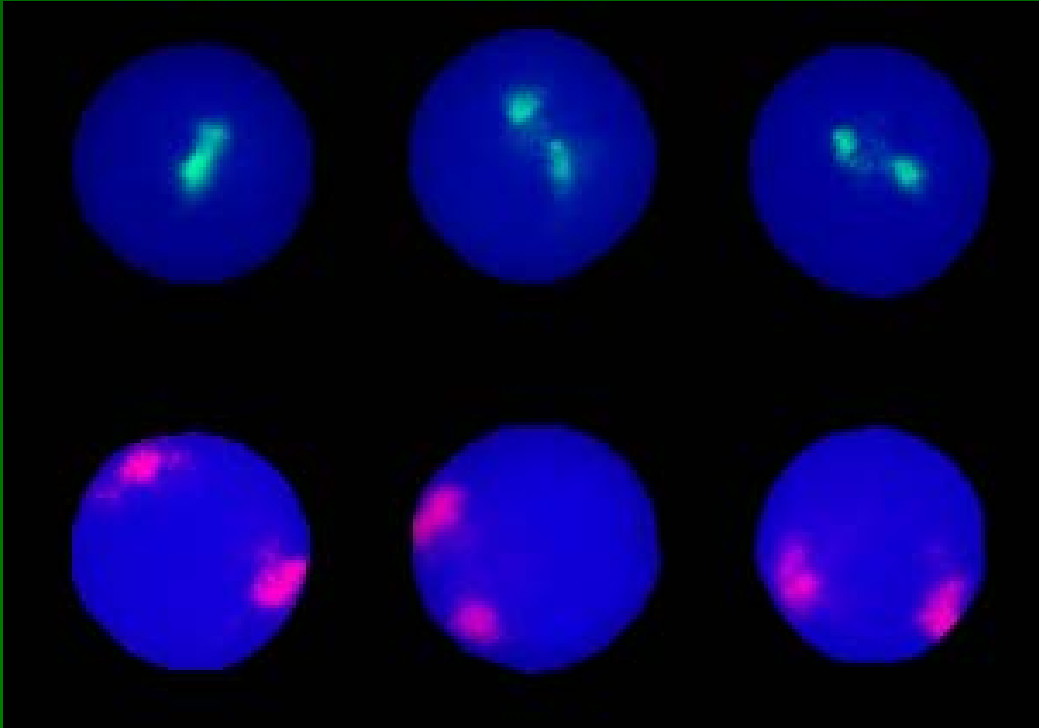
Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

Vzájemné vzdálenosti genetických elementů – výpočet a porovnání s experimentem

Vazba genetických elementů (CT) mezi sebou

Genom se příliš nehýbe

Polohy chromosomů v jádře se mohou lišit

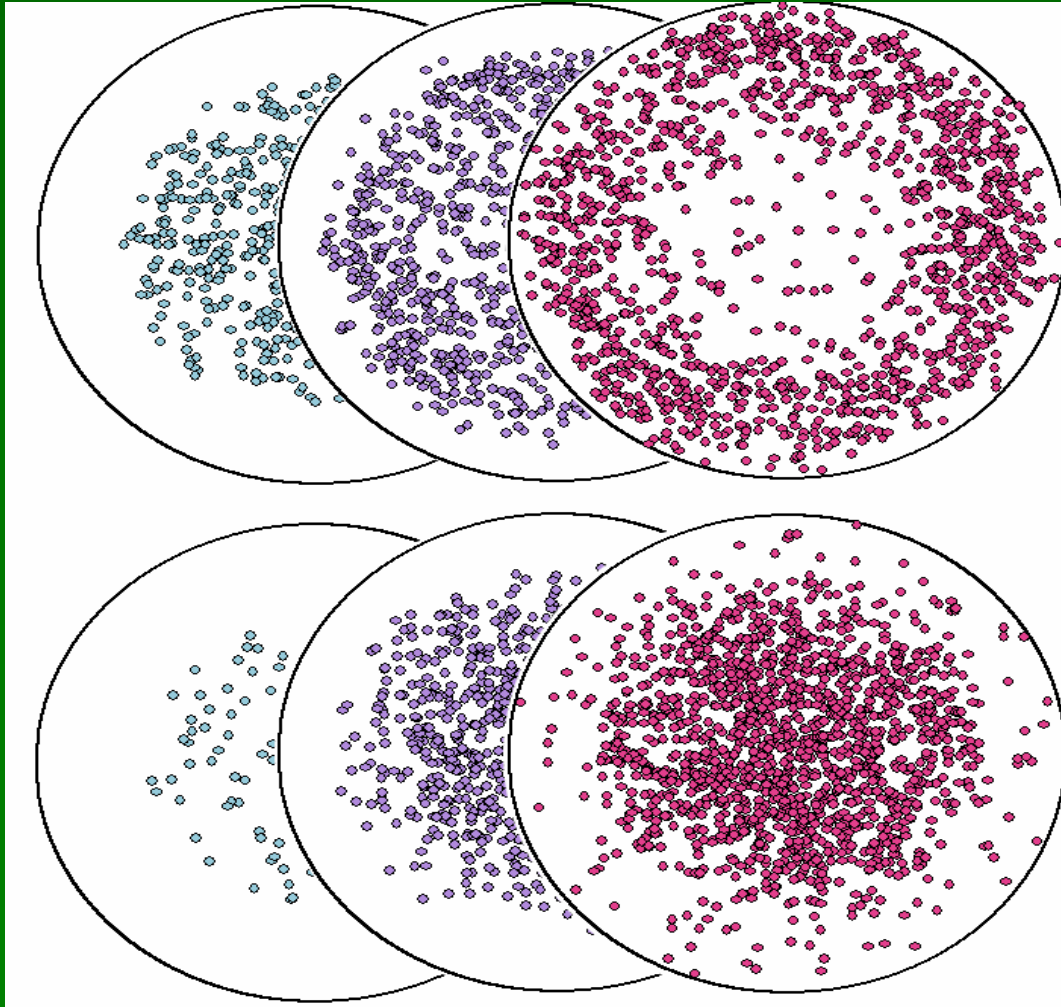


Chr. 22

Chr. 8

Polohy genetických elementů v jádře

Řezy středem jádra z různých jader přeložené přes sebe pro dva geny (c-MYC a ABL)

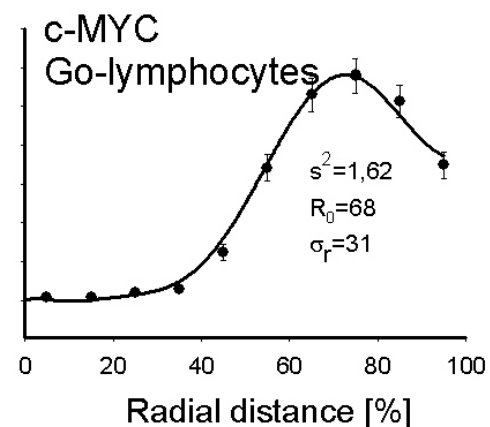
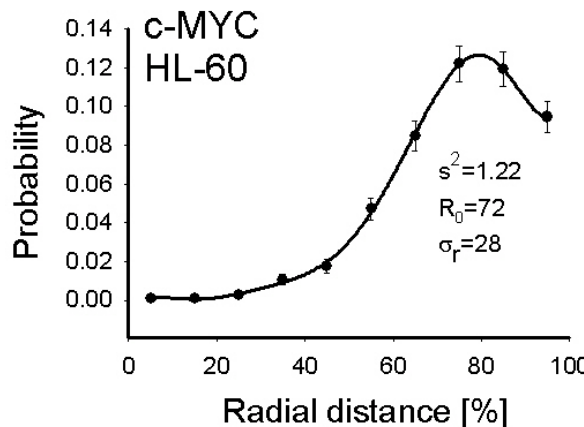
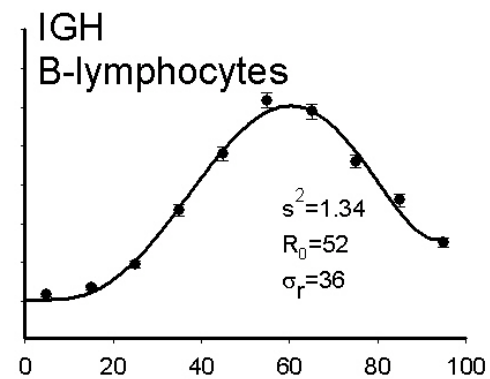
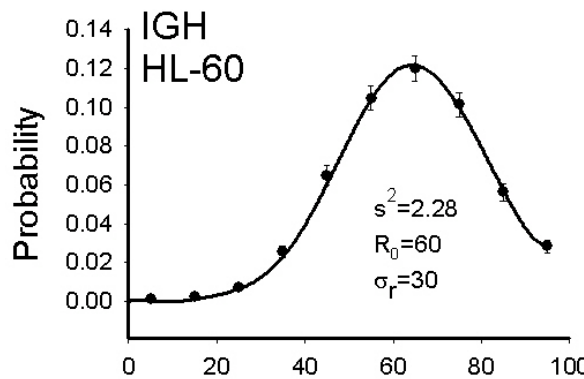
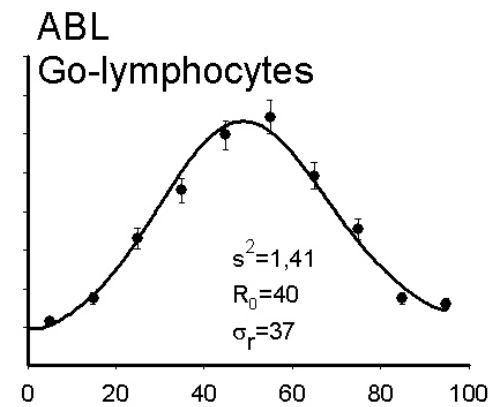
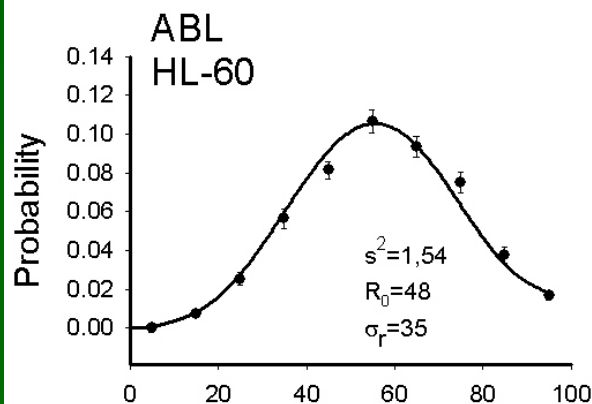


c-MYC

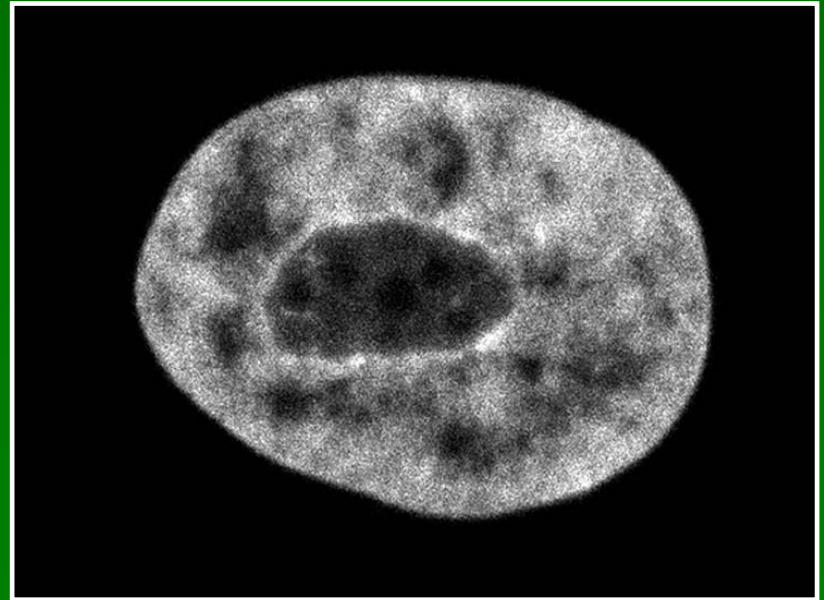
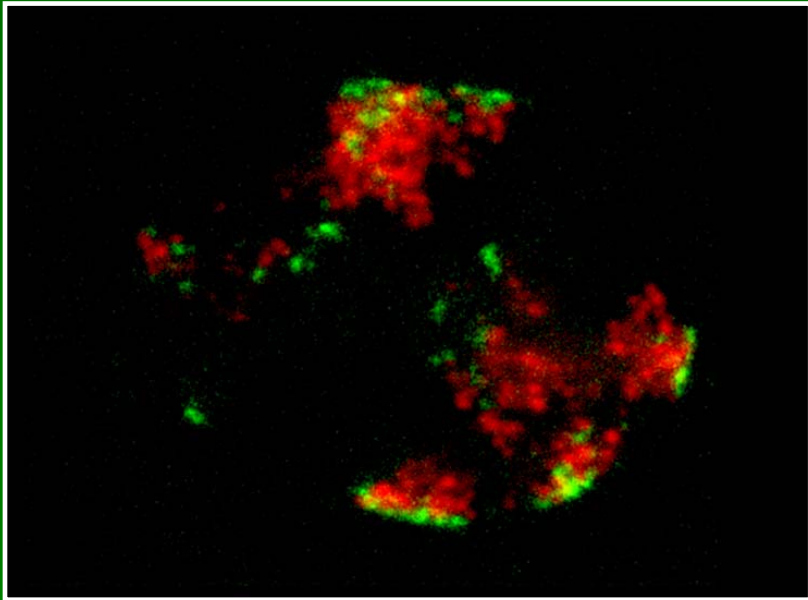
ABL

Vzdálenosti genů od středu jádra

ABL, IGH a C-MYC v
buňkách HL-60 a
v G_0 lymfocytech

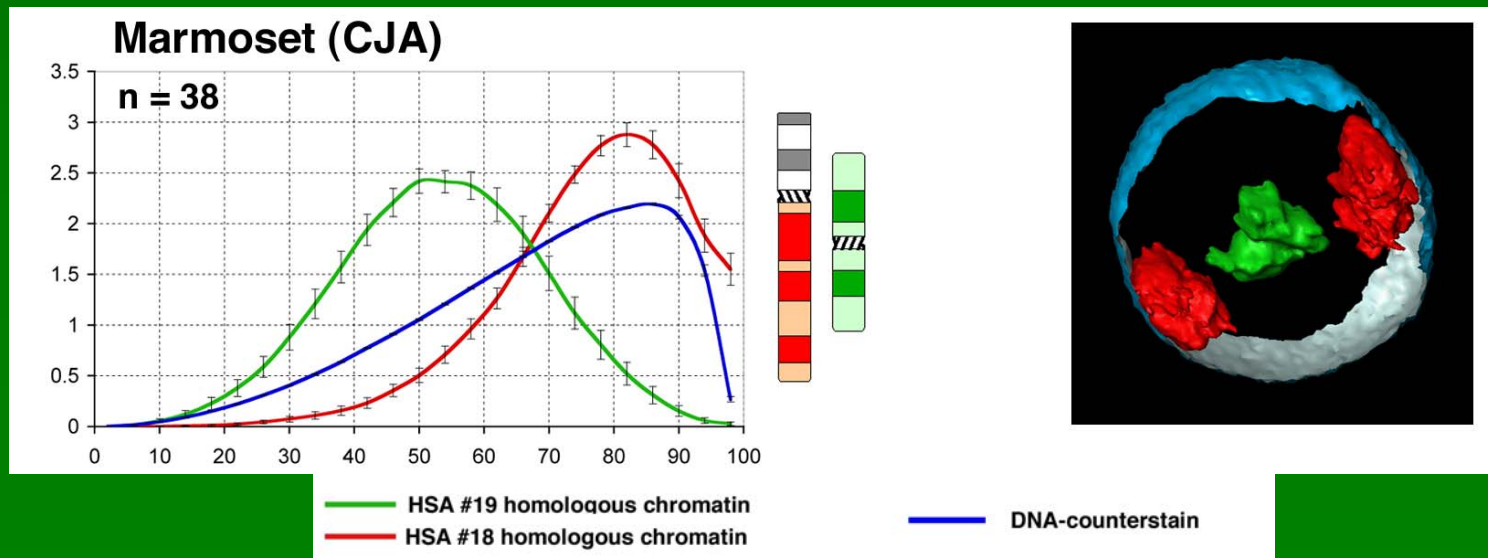
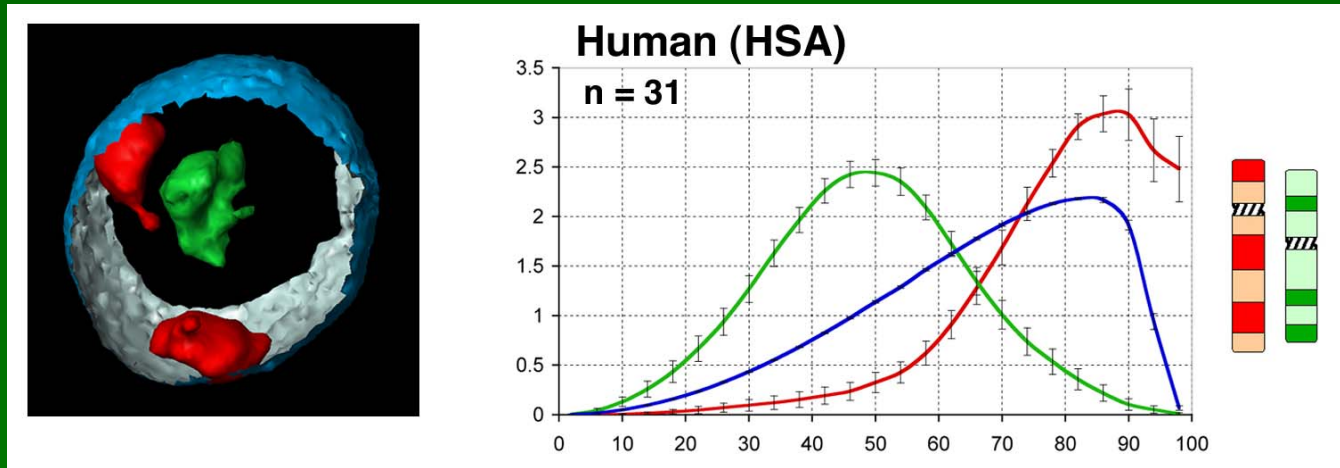


Radiální uspořádání chromosomů v jádře (genově bohaté a časně se replikující oblasti (červeně) a genově chudé a pozdě replikující oblasti (zeleně))

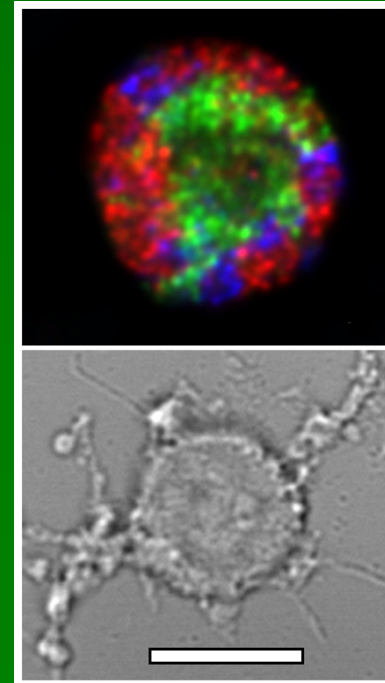
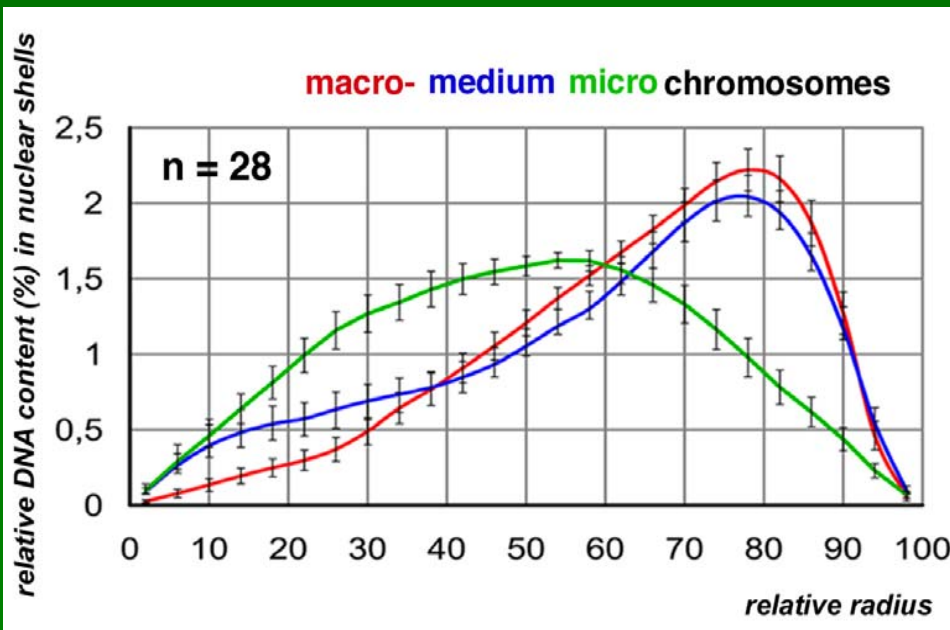
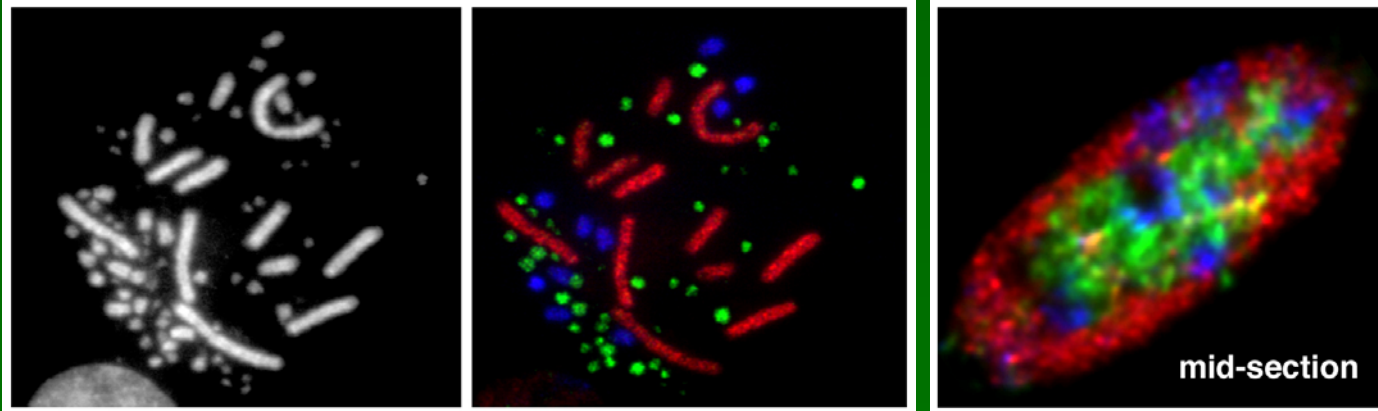


Two color replication labeling of SH-EP N14 cells with **Cy3-dUTP** and **FITC-dUTP**

Uspořádání chromatinu homologního k lidským chromosomům #18 a #19 se u lymfoidních buněk zachovalo v průběhu evoluce vyšších primátů



Distribuce časně se replikujícího chromatinu microchromosomů a pozdně se replikujícího chromatinu makrochromosomů v interfázi kuřecích buněk a embryonálních fibroblastů a neuronů



Uspořádání genomu v jádře buňky

Rozdělení genetických elementů v jádře pro různé typy buněk a různé živočišné druhy (radiální distribuce)

Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

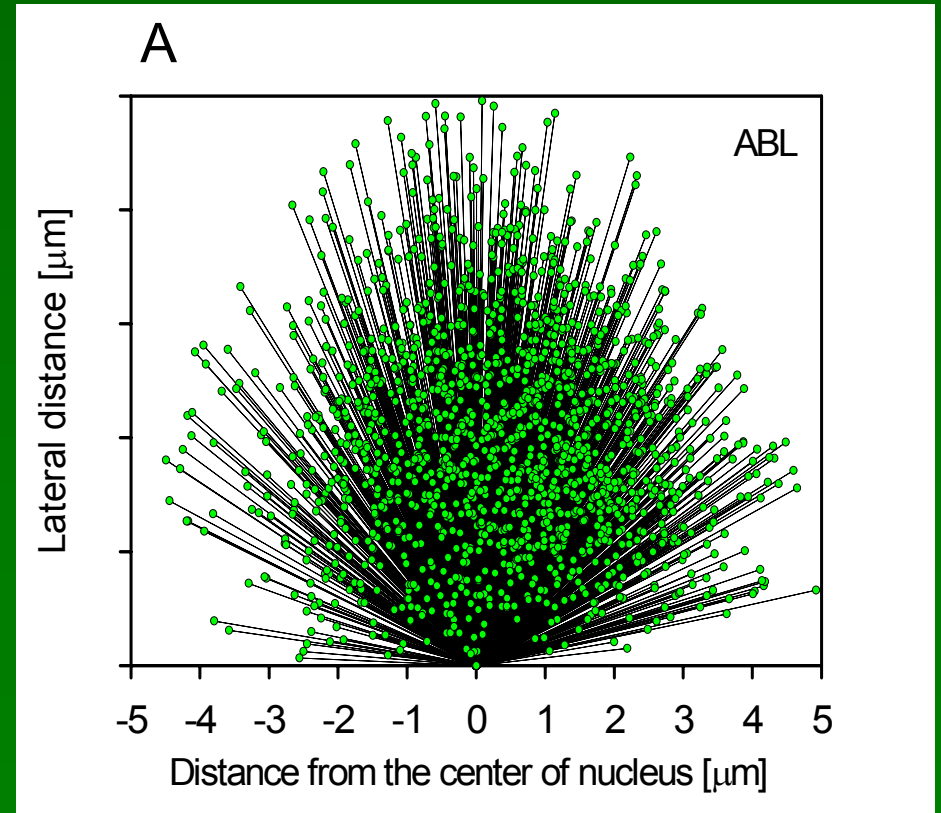
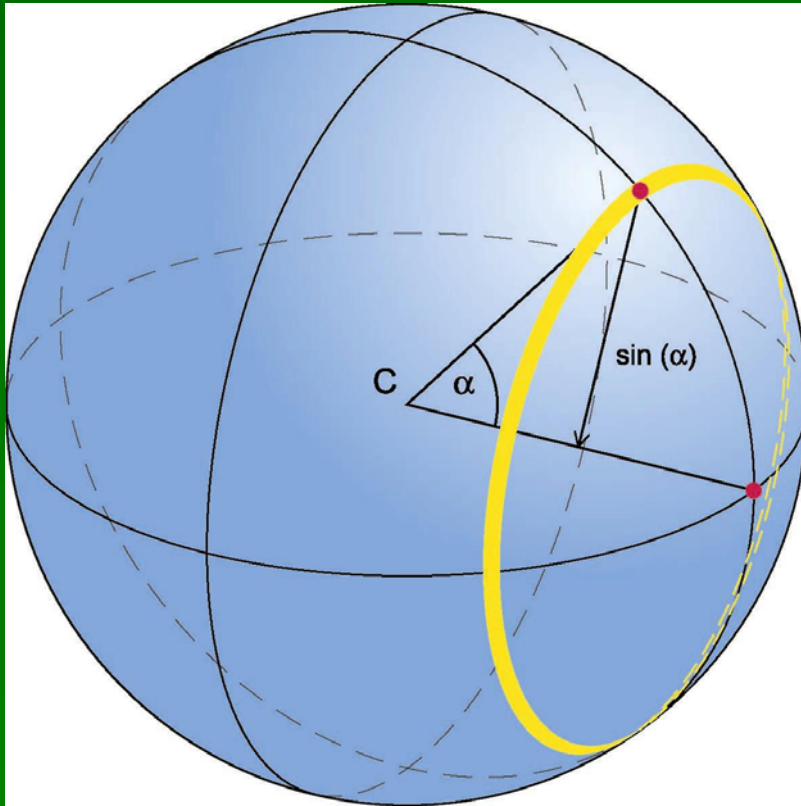
Vzájemné vzdálenosti genetických elementů – výpočet a porovnání s experimentem

Vazba genetických elementů (CT) mezi sebou

Genom se příliš nehýbe

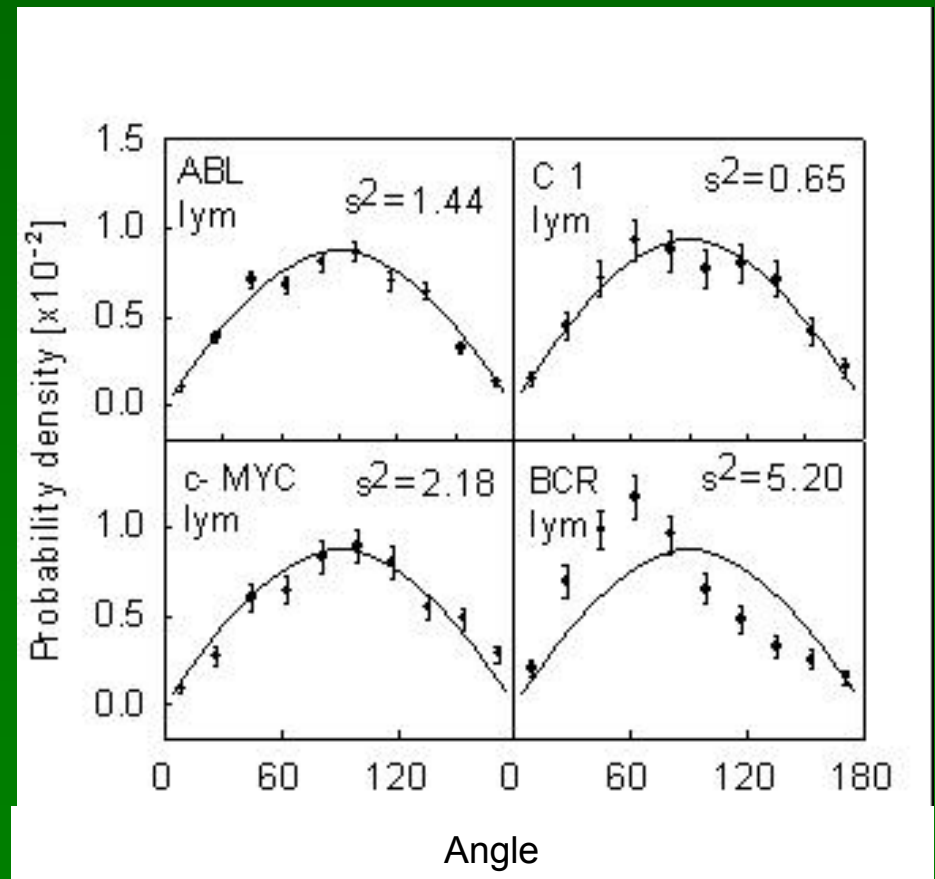
Úhlové distribuce

Rozdělení úhlů mezi spojnicemi střed jádra – gen pro homologní dvojice genů. Jeden z genů dvojice leží na ose x, druhý je v ploše obrázku.



Rozdělení úhlů gen-střed-gen

Geny ABL, c-MYC, BCR,
centromera C1 v buňkách
Go-lymfocytů



Uspořádání genomu v jádře buňky

Rozdělení genetických elementů v jádře pro různé typy buněk a různé živočišné druhy (radiální distribuce)

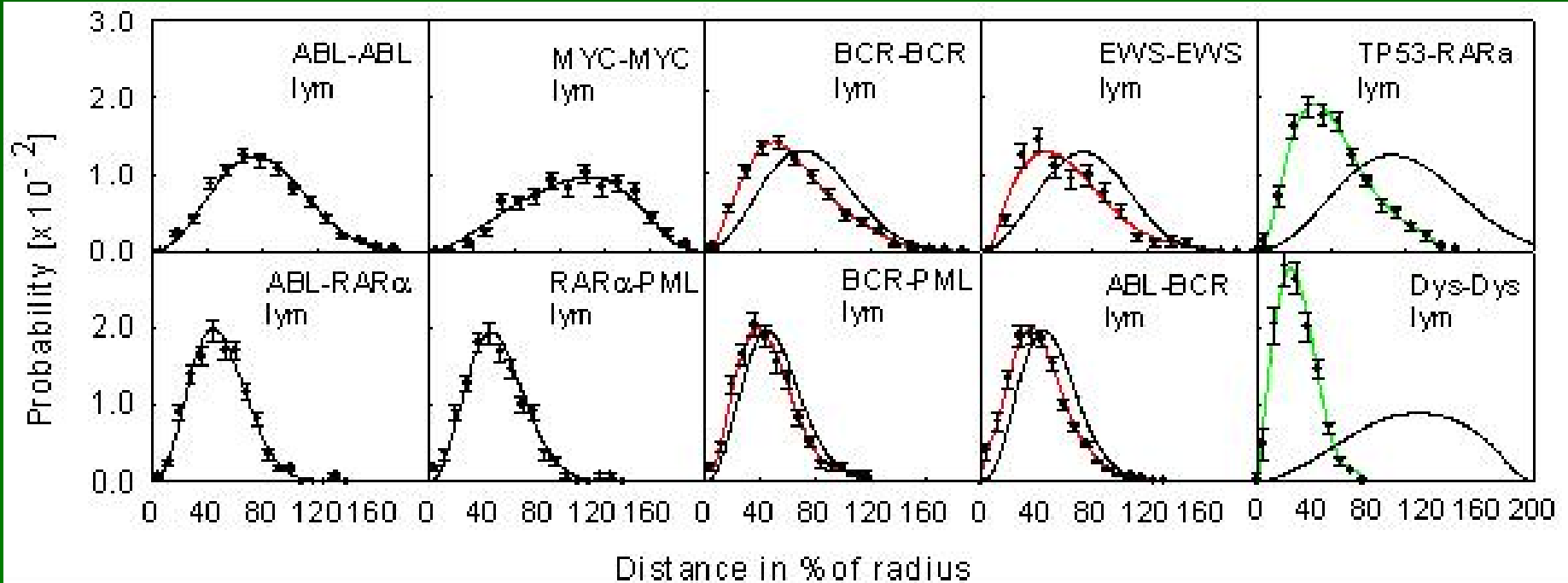
Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

Vzájemné vzdálenosti genetických elementů – výpočet a porovnání s experimentem

Vazba genetických elementů (CT) mezi sebou

Genom se příliš nehýbe

Vzdálenosti mezi homologními a heterologními genetickými elementy



Uspořádání genomu v jádře buňky

Rozdělení genetických elementů v jádře pro různé typy buněk a různé živočišné druhy (radiální distribuce)

Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

Vzájemné vzdálenosti genetických elementů – výpočet a porovnání s experimentem

Vazba genetických elementů (CT) mezi sebou

Genom se příliš nehýbe

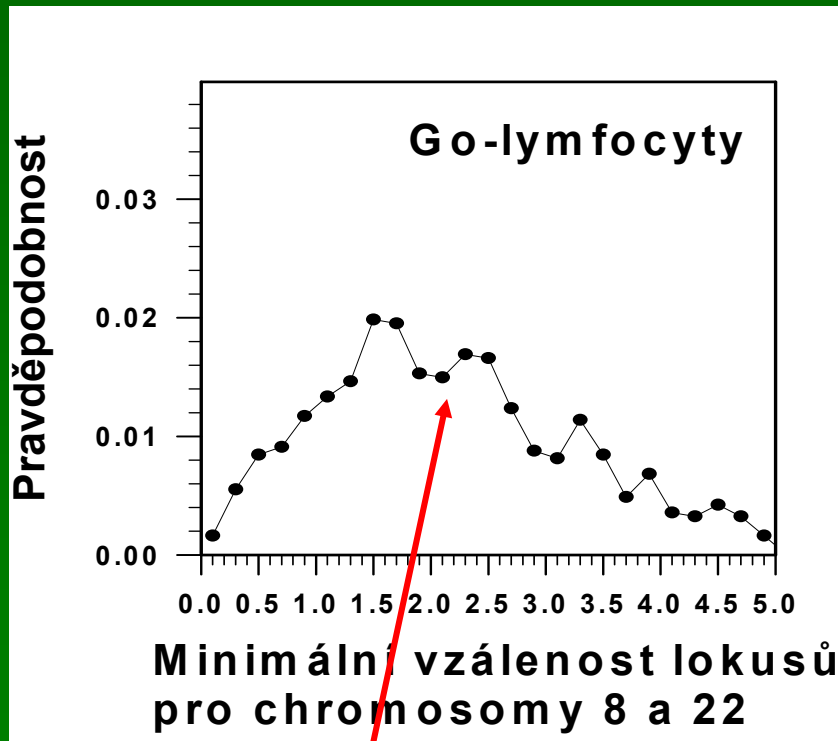
Polohy dvou genů na chromosomech 9 a 22

Vázané stavy



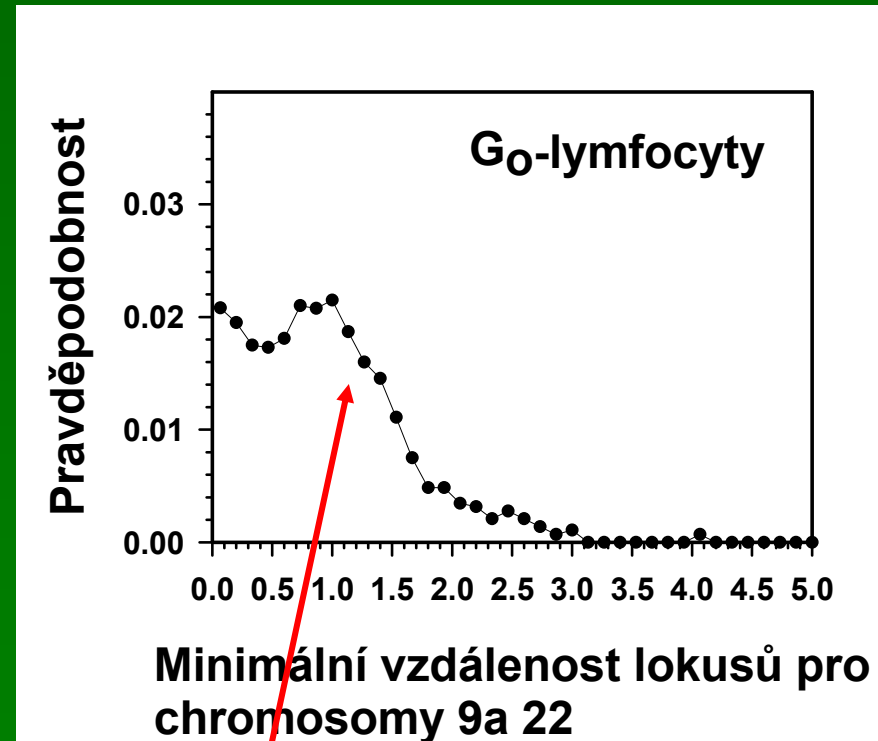
Vzdálenosti dvou genů na heterologních chromosomech

Chromosomy 8 a 22



Typické pro řadu dvojic genů a buněčných typů

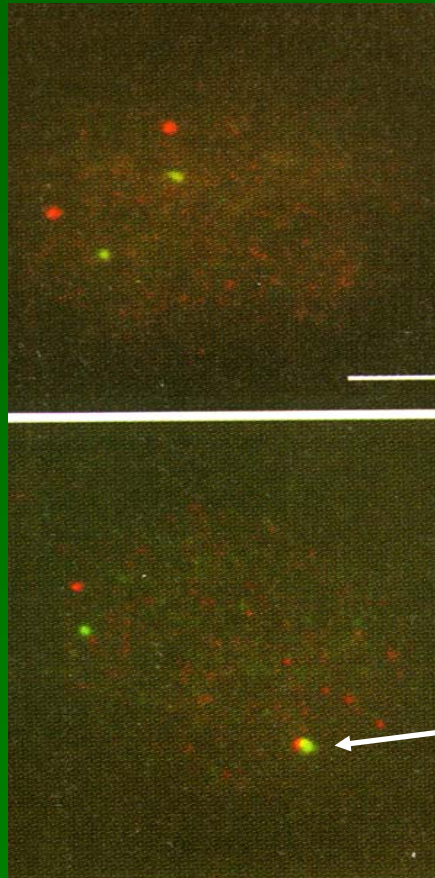
Chromosomy 9 a 22



ABL a BCR geny v G₀-lymfocytech

Vazba mezi genetickými lokusy

**Geny RET a H4
v buňkách štítné
žlázy**



Vazba mezi geny

Uspořádání genomu v jádře buňky

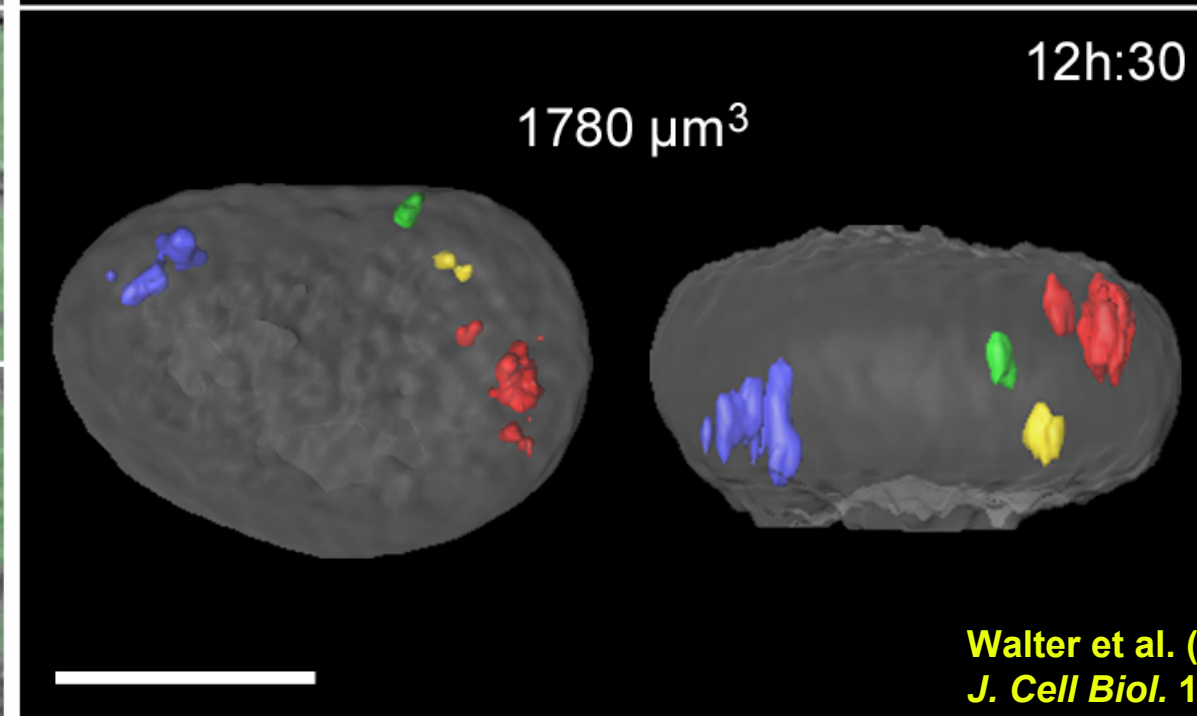
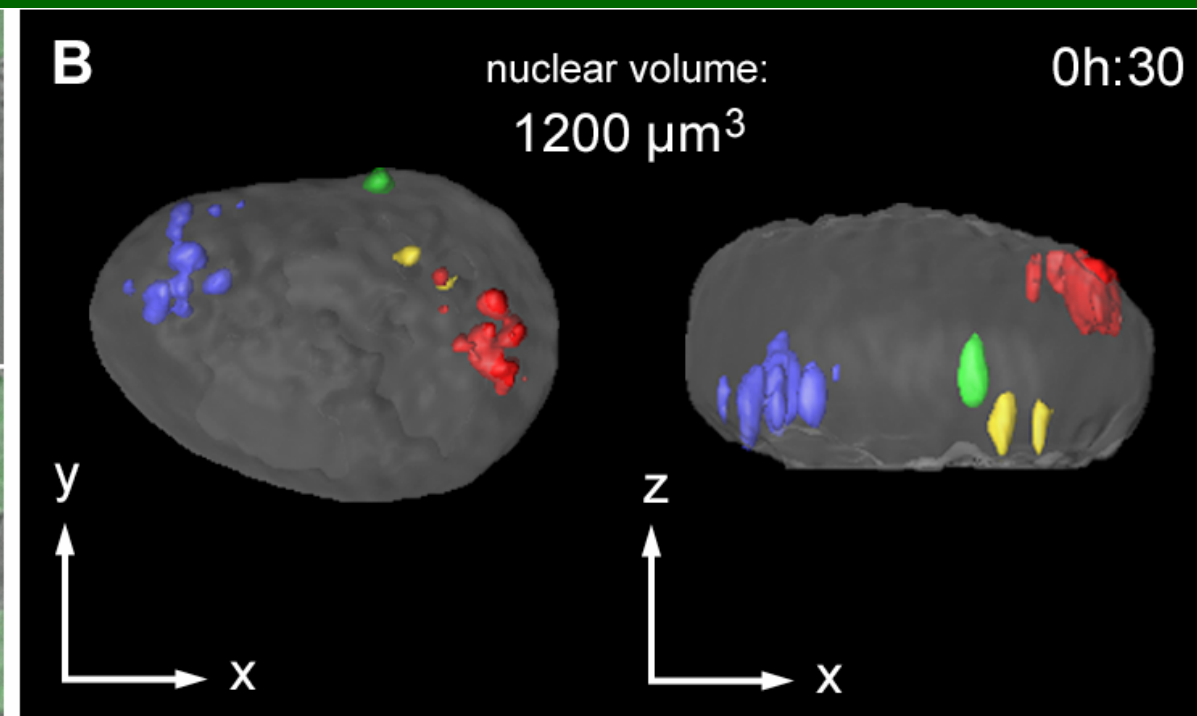
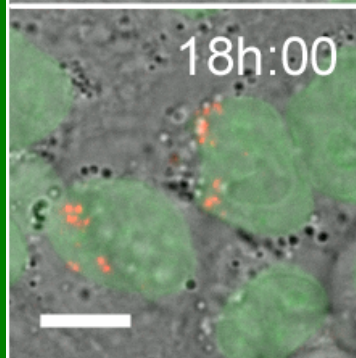
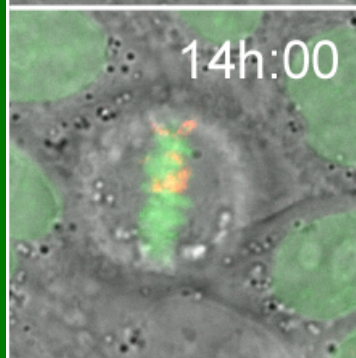
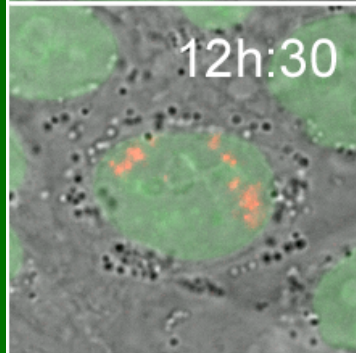
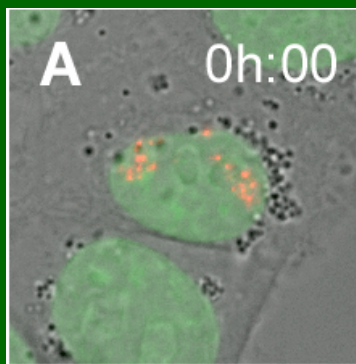
Rozdělení genetických elementů v jádře

Radiální distribuce, hustota provděpodobnosti

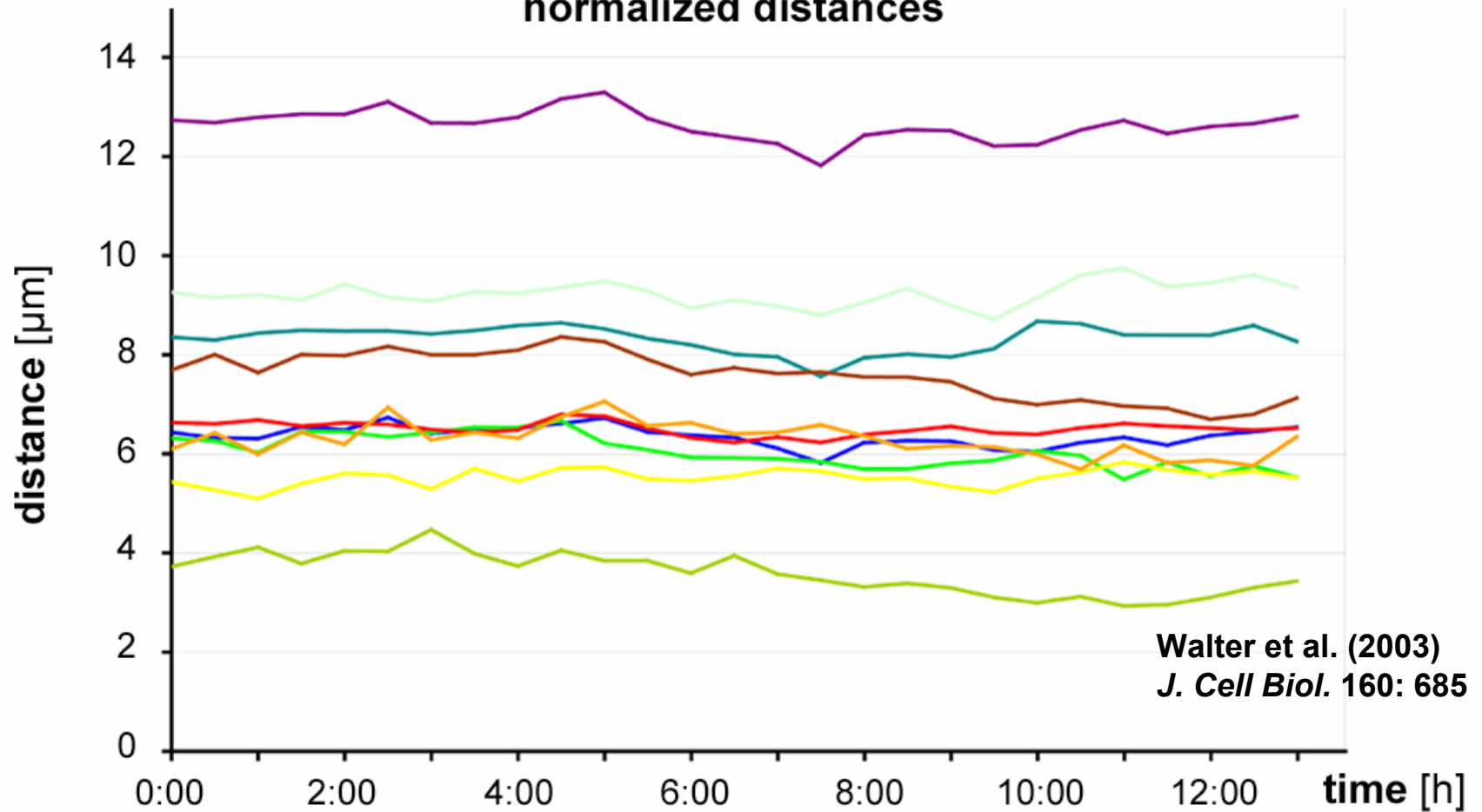
Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

*Vzájemné vzdálenosti genetických elementů –
výpočet a porovnání s experimentem*

*Genom se příliš nehýbe, ke změnám dochází v
mitóze*



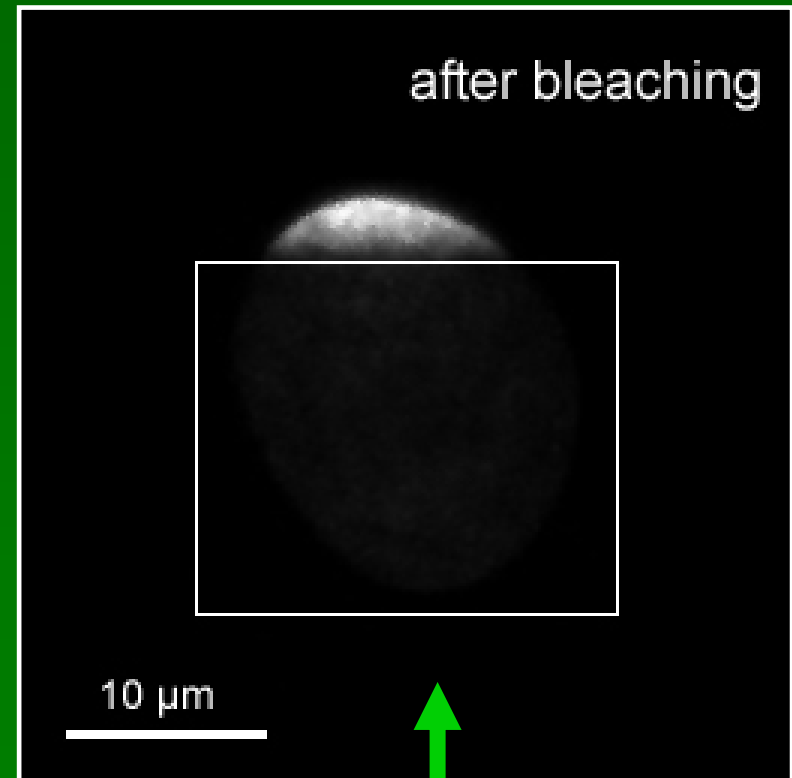
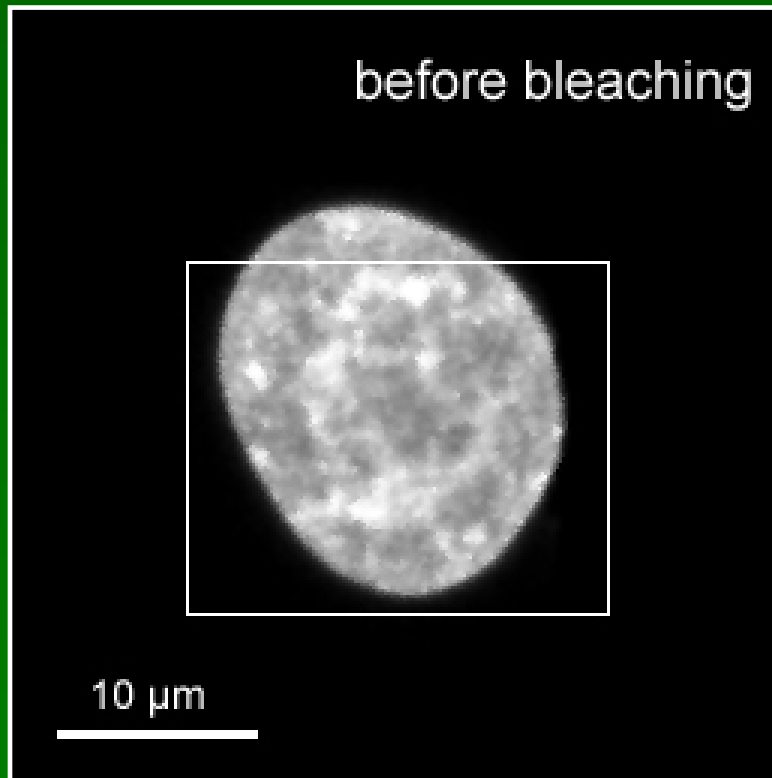
normalized distances



Walter et al. (2003)
J. Cell Biol. 160: 685

		$\Delta(\text{max-min}) [\mu\text{m}]$			
—	CT 1 - CT 2			1.11	
—	CT 3 - CT 1			1.04	
—	CT 3 - CT 2			1.54	mean \pm SD
—	CT 4 - CT 1			1.48	1.37 \pm 0.25
—	CT 4 - CT 2			1.66	
—	CT 4 - CT 3			1.37	
—	CT 1 - CN	0.91			
—	CT 2 - CN	1.19	mean \pm SD		
—	CT 3 - CN	0.73	0.85 \pm 0.27		
—	CT 4 - CN	0.57			

HeLa buňky stabilně exprimující H2B-GFP



Walter et al. (2003)
J. Cell Biol. 160: 685

Jak se bude chovat nevysvícený
chromatin v průběhu cyklu ?

Uspořádání genomu v jádře buňky

Rozdělení genetických elementů v jádře

Radiální distribuce, hustota provděpodobnosti

Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

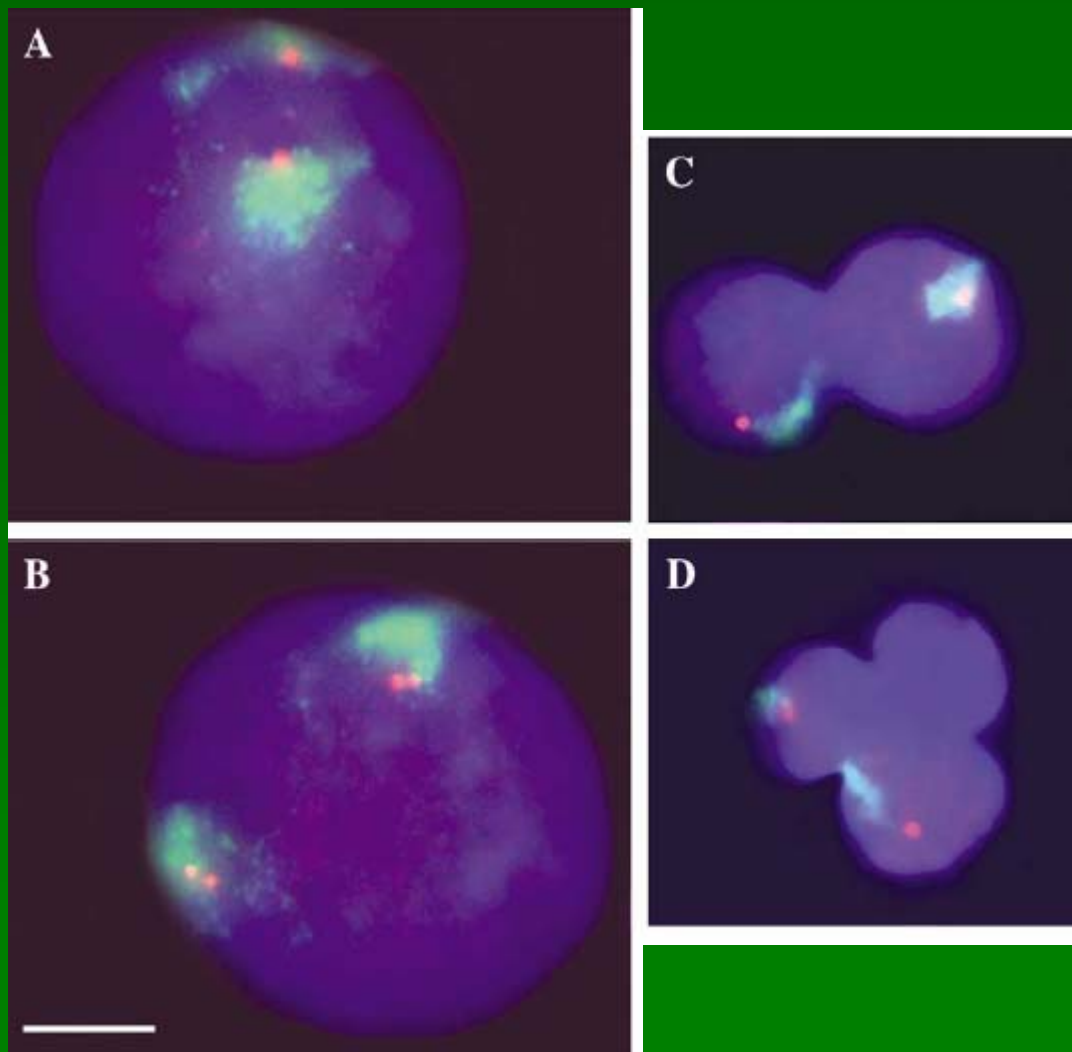
*Vzájemné vzdálenosti genetických elementů –
výpočet a porovnání s experimentem*

*Genom se příliš nehýbe, ke změnám dochází v
mitóze*

*Změny genomu: diferenciaci, reparace,
apoptóza, transformace*

Globální struktura u nádorových buněk

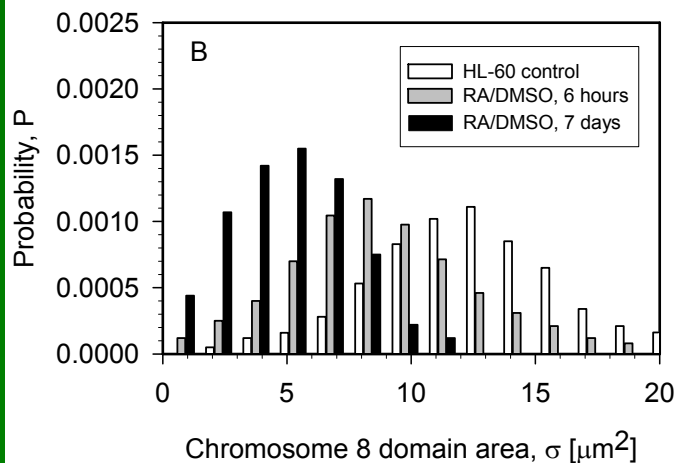
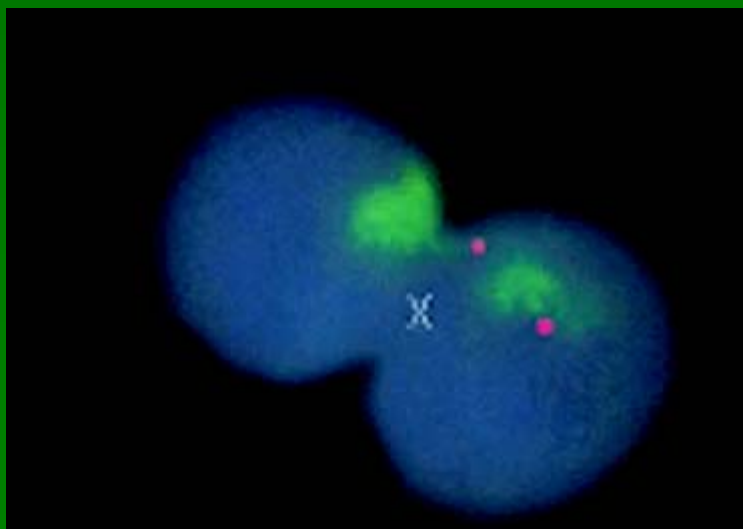
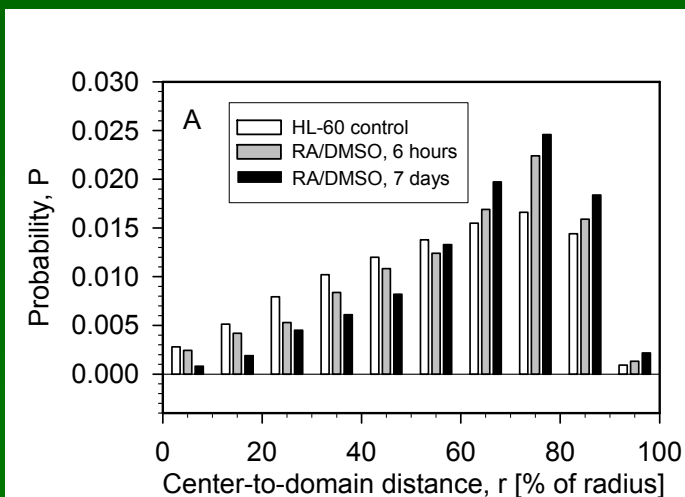
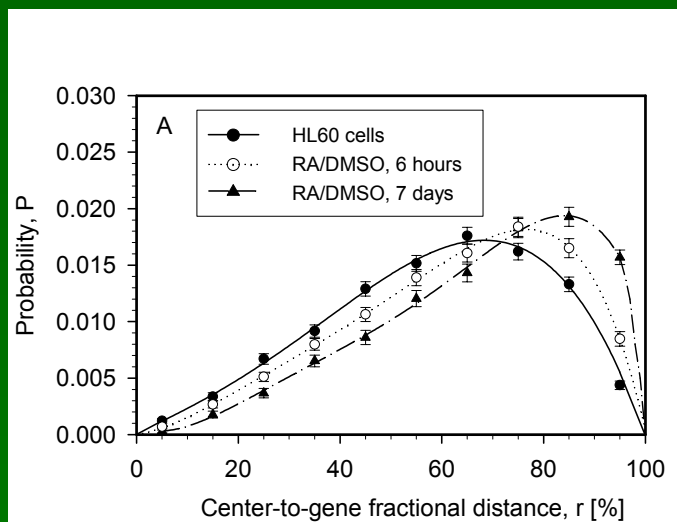
Změny struktury genomu v průběhu diferenciacce (Bártová et al., 2000, 2001, 2002)



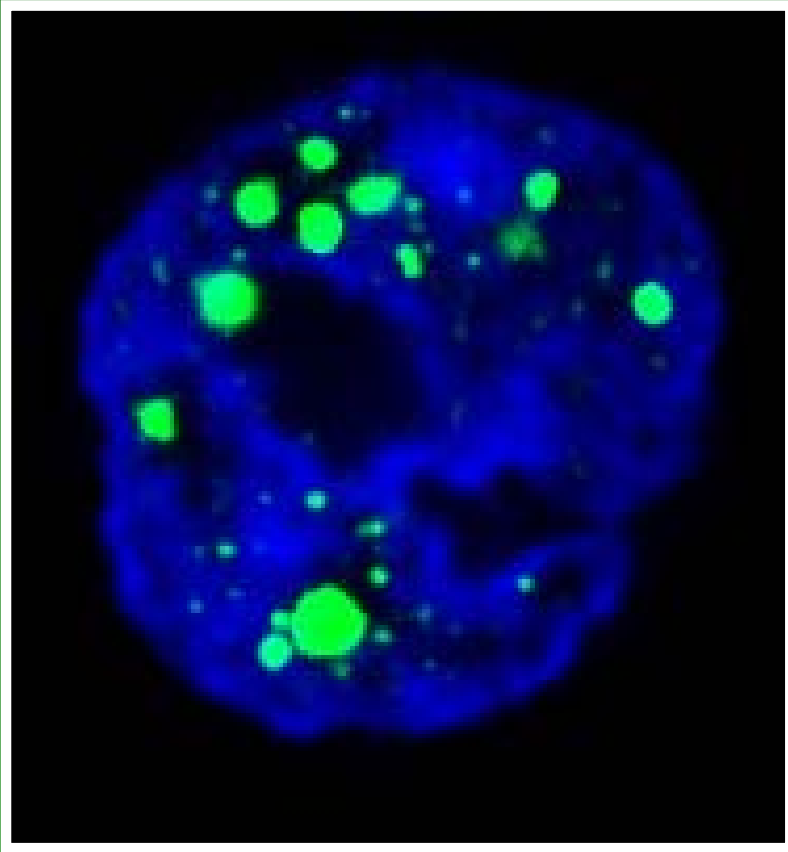
HL-60 cells

granulocytes

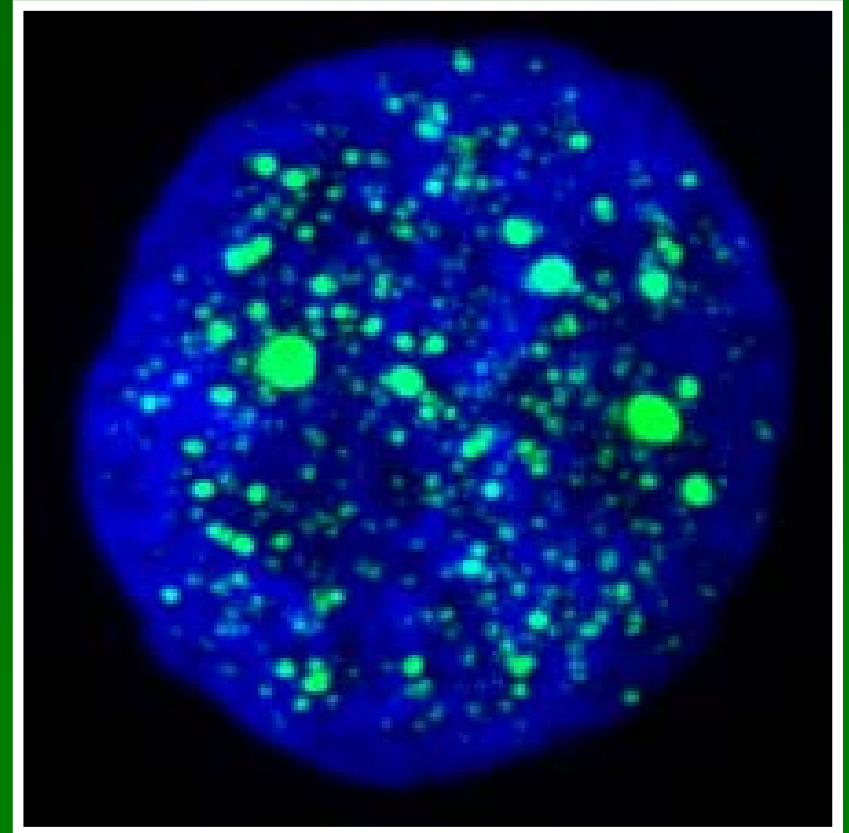
Změny struktury genomu v průběhu diferenciacce (Bártová et al., 2000)



Změny struktury genomu po indukci fúzního proteinu PML/RAR α (Falk M. et al., 2003)

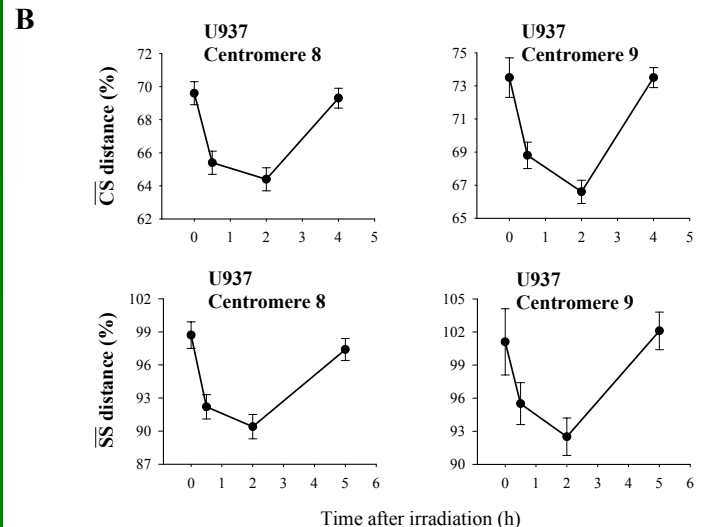
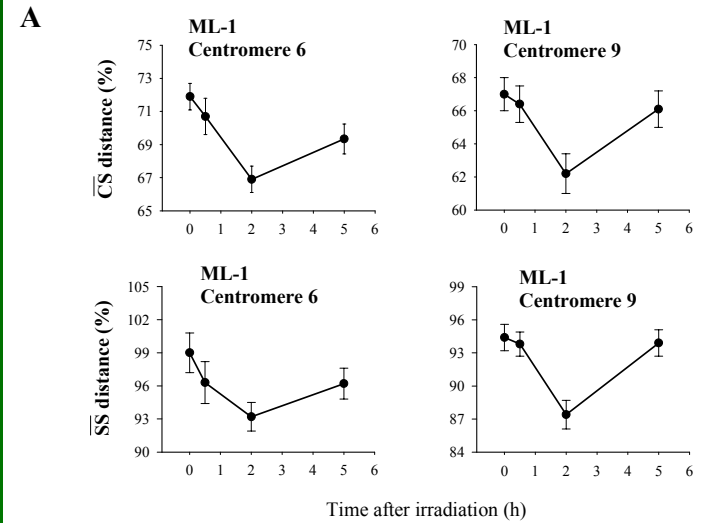
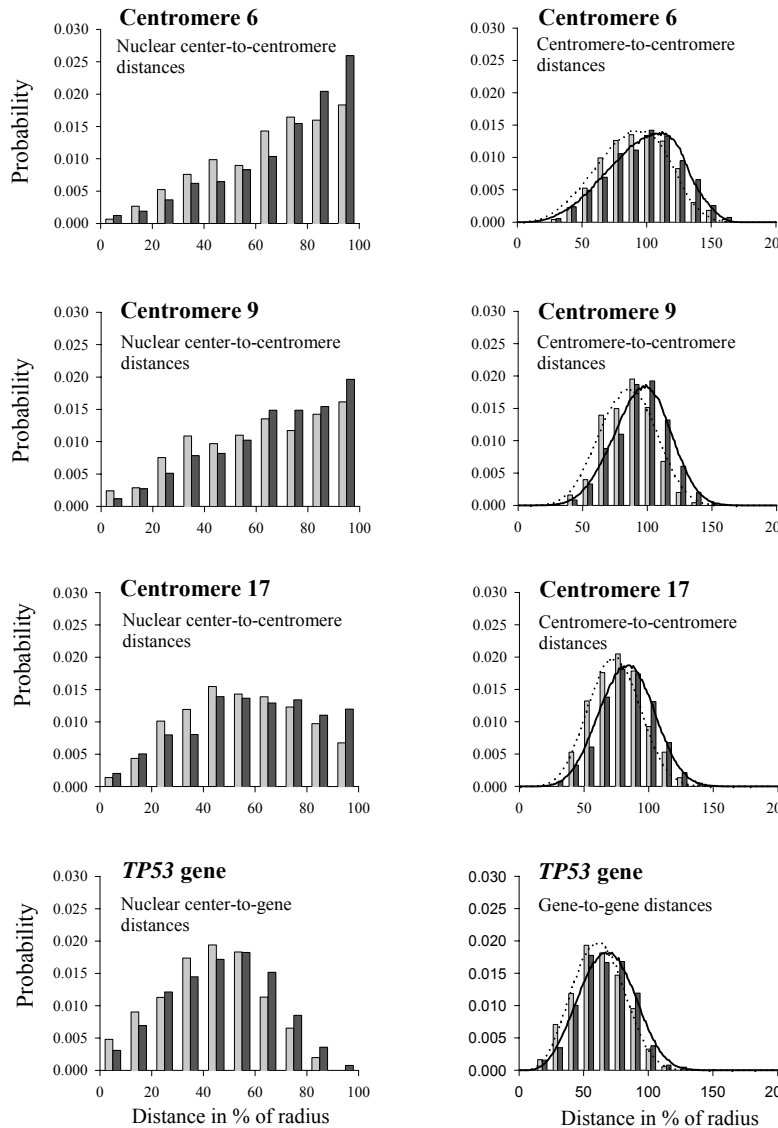


protein PML (nuclear bodies)

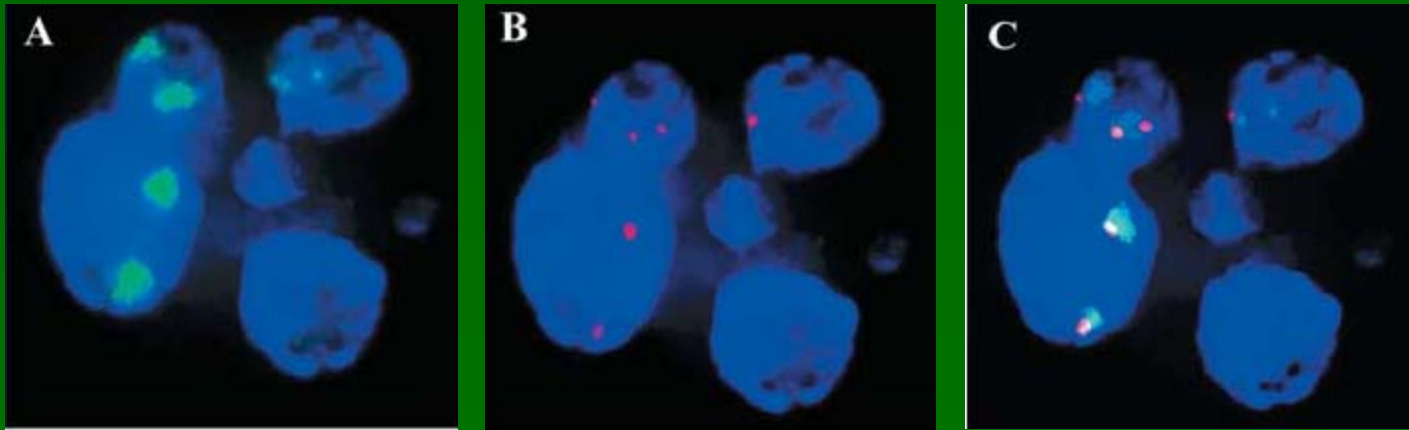


fusion protein PML/RAR α
(microspeckles)

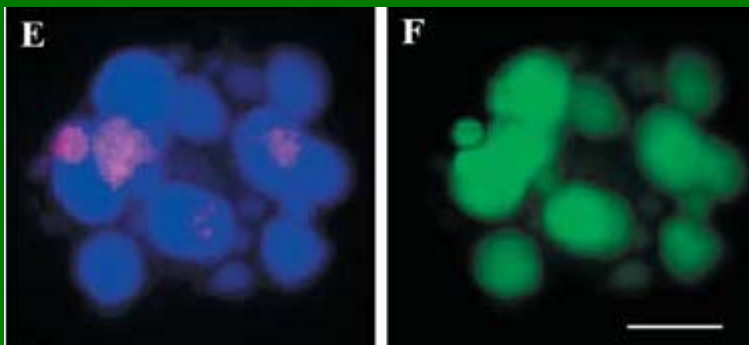
Změny struktury genomu indukované zářením



Změny struktury genomu v průběhu apoptózy



Fragmentace CT 11 (zobrazeno CT, centromera a překryv obou obrazů)



Apoptická tělíska a rozpad CT 21

Uspořádání genomu v jádře buňky

Rozdělení genetických elementů v jádře

Radiální distribuce, hustota provděpodobnosti

Úhlové distribuce pro geny a CT - interpretace

*Vzájemné vzdálenosti genetických elementů –
výpočet a porovnání s experimentem*

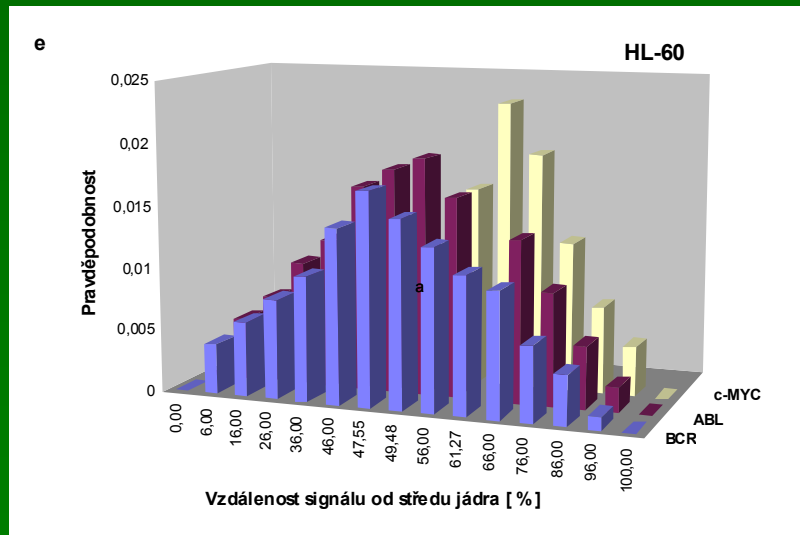
*Genom se příliš nehýbe, ke změnám dochází v
mitóze*

*Změny genomu: diferenciace, reparace,
apoptóza, transformace*

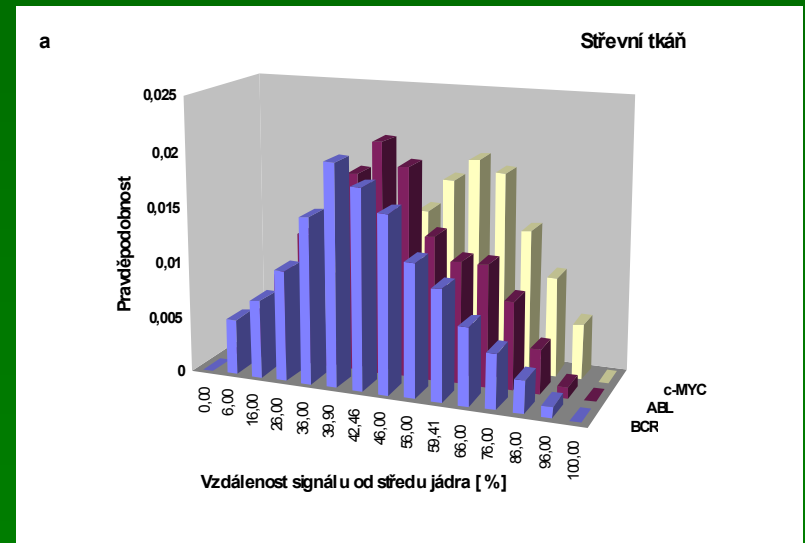
Globální struktura u nádorových buněk

Radiální rozdělení genetických lokusů v buňkách HL-60 a v buňkách střevní tkáně

Spatial distributions of the BCR, ABL and c-MYC genes in HL-60



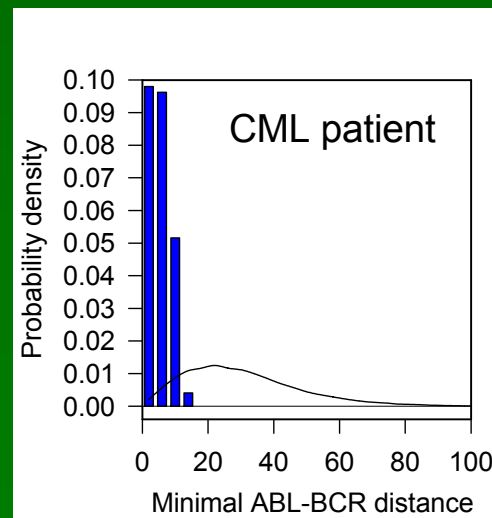
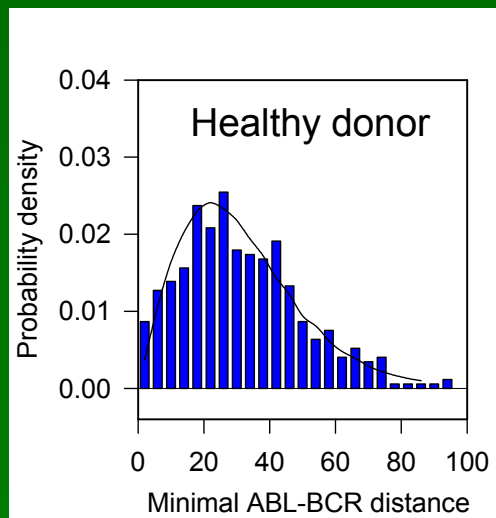
Spatial distributions of the BCR, ABL, and c-MYC genes in colon cells



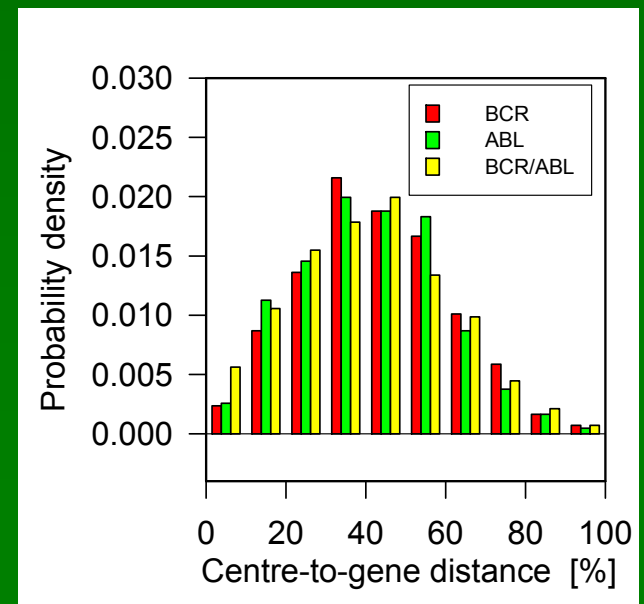
Mean values of radial distributions: $45.0 \pm 2.2\%$ (ABL), $42.3 \pm 2.6\%$ (BCR), $60.8 \pm 0.7\%$ (c-MYC), $56.9 \pm 1.3\%$ (cen1), $61.5 \pm 1.4\%$ (cen 8) a $65.8 \pm 1.0\%$ (cen 9). The parameters do not differ significantly for HL-60, HT-29 and colon tissue cells.

Radiální distribuce fúzního genu BCR/ABL

ABL-BCR distances in control and leukemic cells



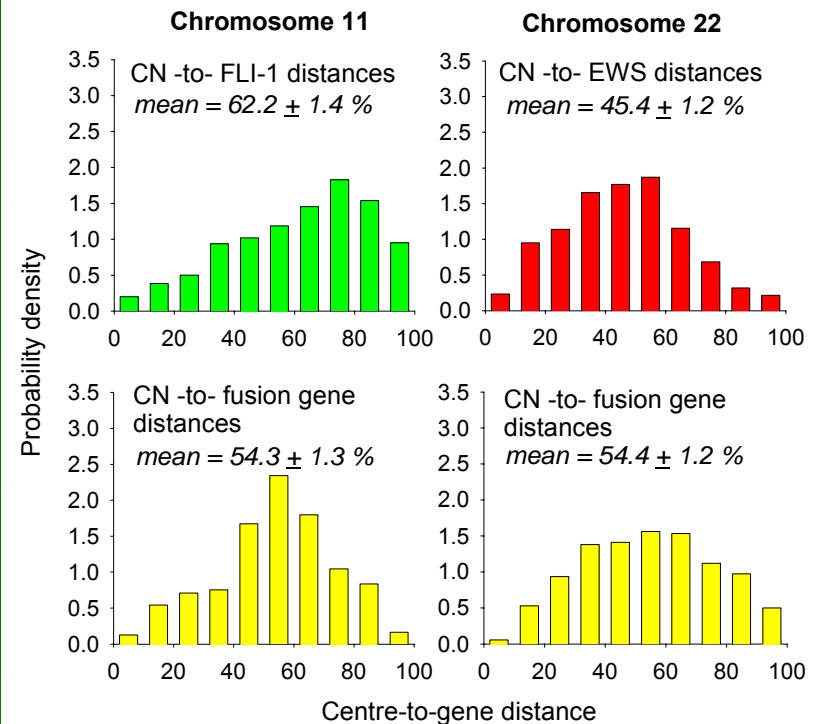
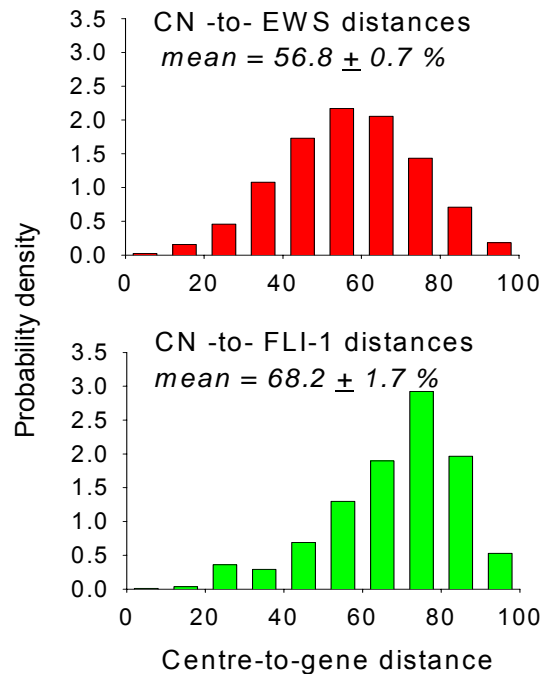
Spatial distributions of BCR, ABL, and BCR/ABL



Radiální distribuce fúzních genů v buňkách Ewingova sarkomu

Radial 3D distributions of EWS and FLI genes in human lymphocytes

Radial 2D distributions of EWS, FLI and both fusion loci in Ewing sarcoma cells



Struktura lidského genomu

Závěry:

- 1) Genetické elementy v jádrech lidských buněčných linií jsou lokalizovány přednostně v radiálních vzdálenostech jež jsou specifické pro daný element; chromosomová teritoria tudíž vykazují radiálně závislou vnitřní strukturu
- 2) Nenáhodné radiální uspořádání je podobné u různých typů buněk a zachovalo se i v průběhu vývoje vyšších primátů a pravděpodobně i v průběhu delší evoluce
- 3) Genetické elementy různých chromosomů jsou lokalizovány nezávisle na sobě, a proto jsou chromosomová teritoria v jádrech buněk lokalizována nezávisle (tj náhodně) jedno na druhém
- 4) Genetické elementy a tím i CT mohou být vázány k sobě; frakce buněk s vázanými elementy se může lišit v závislosti na typu buněk
- 5) Chromatin je v interfázi málo pohyblivý (vazba k matrici?, málo prostoru), CT nemění vzájemné polohy, ty se mohou měnit v mitóze.
- 6) Při diferenciaci“, po ozáření při apoptóze a po indukci fúzního proteinu dochází ke změnám struktury.
- 7) V nádorových buňkách je globální struktura podobná avšak v něčem se může lišit.