
СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

Отличительной особенностью организации генома эукариот является упаковка ДНК в хроматин и размещение его в особом компартменте — клеточном ядре. Упаковка в хроматин обеспечивает многократное сокращение линейных размеров ДНК, необходимое для размещения ее в ядре. Для того чтобы оценить масштабность проблемы, заметим, что геном человека имеет размер около 3×10^9 пар оснований. Если бы весь геном состоял из одной молекулы ДНК (т. е. не был бы разделен на ряд хромосом), то протяженность такой молекулы составила бы ≈ 2 м. Диаметр же клеточного ядра составляет, как правило, около 10 мкм. Очевидно, что для размещения в ядре геномной ДНК ее линейные размеры должны быть сокращены в 200 000 раз. При этом необходимо обеспечить доступность определенных последовательностей ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции.

Все эти непростые задачи решаются на уровне упаковки ДНК в хроматин, которая происходит в несколько этапов; наиболее изученными являются накручивание ДНК на нуклеосомы, компактизация нуклеосомной нити с образованием так называемой 30-нм фибриллы и сворачивание последней в гигантские (50–200 т. п. н.) петли, закрепленные на белковой скелетной структуре ядра — ядерном матриксе (рис. 1). Ниже мы рассмотрим более подробно эти три уровня упаковки ДНК в хроматине. Сначала, однако, следует кратко охарактеризовать белки, участвующие в формировании хроматина.

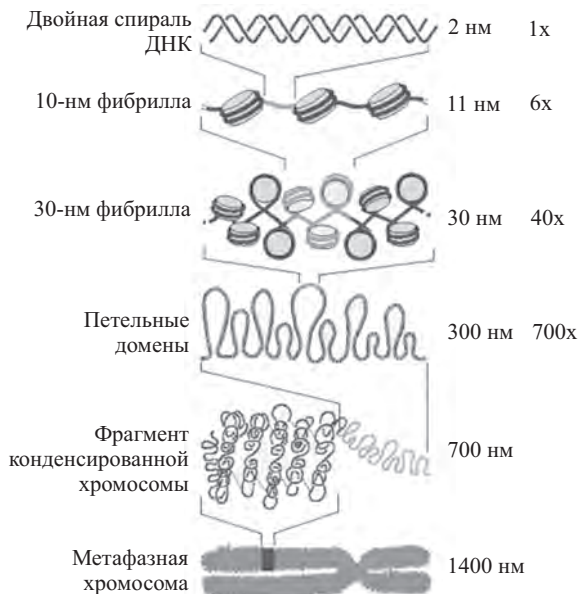


Рис. 1. Уровни компактизации генома

На рисунке схематично изображены различные уровни организации хроматина и характерные для каждого уровня размеры структурных единиц и степень компактизации (количество ДНК в равных по длине участках соответствующих фибрилл).

Из Alberts B. et al. “Essential Cell Biology” (2nd ed.) 2004, с любезного разрешения Taylor & Francis Group.

1.1. ГИСТОНЫ

Наибольшую часть ядерных белков составляют гистоны. Выделяют пять основных типов гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. В эритроцитах птиц вместо Н1 присутствует близкородственный гистон Н5. Гистоны Н2А, Н2В, Н3 и Н4 входят в состав белковой глобулы минимальной нукleosомы. Это небольшие белки с молекулярными массами 10–15 кДа. Они чрезвычайно богаты положительно заряженными аминокислотами (лизинном и аргинином). Положительно заряженные аминокислоты сосредоточены преимущественно в С-концевых и N-концевых частях молекул нукleosомных гистонов, тогда как центральный домен относительно богат гидрофобными остатками. Вторичная структура всех нукleosомных гистонов характеризуется присутствием протяженного α -спирального домена, который фланкируют (с обоих концов) домены, содержащие короткие α -спирали и пет-

ли. Аминокислотные остатки (15–30), расположенные на N-концах нукleosомных гистонов, не организованы в какие-либо выраженные вторичные структуры. Эти части молекул нередко называют «хвостами» («tails»). В денатурированном виде гистоны образуют самые различные агрегаты. Нативные молекулы нукleosомных гистонов образуют в растворе два типа комплексов: тетрамер (H3-H4)₂ и димер H2A-H2B.

Нукleosомные гистоны относятся к числу наиболее консервативных белков. Их аминокислотные последовательности имеют почти 100%-ю гомологию у всех эукариот. В геноме позвоночных животных гены, кодирующие каждый из нукleosомных гистонов, представлены несколькими копиями. Так, в геноме человека присутствует 15 генов, кодирующих H2A, 17 генов, кодирующих H2B, 10 генов, кодирующих H3, и 14 генов, кодирующих H4.

Гистон H1 существенно отличается от четырех гистонов, входящих в состав минимальной нукleosомы. Этот гистон имеет молекулярную массу, превышающую 20 кДа. В составе H1 присутствует значительно больше остатков лизина, чем аргинина, причем все положительно заряженные аминокислотные остатки сконцентрированы преимущественно в C-концевом домене молекулы H1, который является достаточно длинным (100 аминокислотных остатков) и характеризуется неупорядоченной структурой. Центральная область N-концевой части молекулы H1 богата гидрофобными аминокислотными остатками и в растворе образует глобулу, которая может быть отделена от остальной части молекулы посредством мягкой обработки трипсином. Неструктурированный N-концевой домен является достаточно коротким.

В последние годы обнаружено много так называемых вариантных форм гистонов. Как правило, эти формы отличаются от основных несколькими аминокислотными заменами. Существуют, однако, вариантные формы гистонов, имеющие серьезные отличия от основных форм. В настоящее время охарактеризованы группы вариантных форм гистонов H1, H2A, H2B и H3. Каждая из вариантных форм кодируется собственным геном, который представлен одной копией. Исключение составляет H3.3. В геноме человека присутствует две копии гена, кодирующего этот вариант гистона H3. Вариантных форм гистона H4 пока не обнаружено.

Наибольшее количество вариантных форм обнаружено для гистона H1. Самой хорошо изученной вариантной формой гистона H1 является упоминавшийся выше гистон H5, который замещает H1 в неактивных ядрах эритроцитов птиц. В клетках мыши иден-

тифицировано восемь вариантов H1, причем шесть из них присутствует в соматических клетках и два — в клетках зародышевой линии. Биологическая значимость различных вариантов H1 пока остается неясной. Во всяком случае, удаление (knock-out) поочередно каждого из генов, кодирующих эти варианты H1, не приводило к каким-либо видимым последствиям. Лишь в одном случае (регуляция экспрессии генов 5S рРНК у шпорцевой лягушки в ходе развития) было четко показано, что прекращение экспрессии кластера генов 5S рРНК в ооцитах коррелирует с замещением ооцитарного варианта гистона H1 (H1M) на мажорный вариант H1, экспрессирующийся после стадии средней бластулы.

Наиболее хорошо изучены вариантные формы нуклеосомных гистонов H3 и H2A. Вариантом гистона H3 является белок CENP-A, который замещает H3 в нуклеосомах, расположенных в центромерной области. По аминокислотной последовательности эта вариантная форма сильно отличается от основной формы гистона H3 в N-концевой области. CENP-A экспрессируется в конце S-фазы и в G₂-фазе. Особые свойства центромерных участков хромосом определяются именно присутствием белка CENP-A. Привлечение CENP-A в какой-либо участок хромосомы приводит к формированию в этом участке нормально функционирующей центромеры. В противоположность другим гистонам, которые в сперматозоидах замещаются на протамины, CENP-A остается связанным с центромерными участками хромосом. Это позволяет говорить о существовании особого типа эпигенетической памяти, существенного для передачи информации о позициях центромерных участков. Аналоги CENP-A млекопитающих выявлены и у других эукариотических организмов. У дрозофилы аналогом белка CENP-A является белок Cid. У дрожжей центромерным вариантом H3 является Cse4. В современной литературе все центромерные варианты H3, включая и CENP-A, часто называют CenH3 (**centromeric H3**).

Другими вариантами гистона H3 (H3.1) являются H3.2 и H3.3. Гистон H3.2 отличается от H3.1 только одной аминокислотной заменой, поэтому данные варианты H3 часто рассматривают как одну форму. Вариантный гистон H3.3 отличается от основной формы (H3.1) заменами в четырех аминокислотных позициях. Этот вариант гистона H3 присутствует в транскрипционно-активном хроматине. По приблизительным оценкам, примерно 25% всех нуклеосом содержат гистон H3.3. Следует отметить, что H3.3 характеризуется высокой эволюционной консервативностью. Эта

вариантная форма H3 была обнаружена у всех изученных эукариот; от дрожжей до человека. Экспрессия H3.3 не координирована с клеточным циклом. В отличие от основной формы гистона H3 вариантная форма H3.3 включается в состав нуклеосом по не зависящему от репликации хроматина пути (см. разд. 3.8). Недавно обнаружена еще одна вариантная форма гистона H3 — H3.1t. Этот вариант гистона H3 присутствует только в клетках семенников. Специфичными для клеток семенников и для сперматозоидов являются и все известные в настоящее время варианты гистона H2B (hTSH2B и H2BFWT).

Описано несколько вариантов гистона H2A, выполняющих специальные функции. Гистон masoH2A сосредоточен в неактивной копии X-хромосомы млекопитающих (у особей женского пола, имеющих две X-хромосомы) и присутствует в некоторых специфических позициях в других хромосомах. Этот гистон сильно отличается от канонического H2A. В N-концевом домене masoH2A гомологичен гистону H2A на 64%. Протяженный участок аминокислотной последовательности masoH2A (57% от общей длины) вообще не имеет гомологии с каким-либо из известных гистонов. Описано три субварианта masoH2A (masoH2A1.1, masoH2A1.2 и masoH2A2). Высокая консервативность masoH2A, в том числе присутствие этого варианта гистона H2A в хроматине птиц, не имеющих неактивной X-хромосомы, указывает на возможность его участия в процессе инактивации генов (так называемого «сайленсинга», silencing) в различных областях генома у всех высших эукариот. Существует и вариант гистона H2A, функционально противоположный masoH2A — H2A.Vbd. Этот вариант, который имеет лишь 42% гомологии с H2A, практически отсутствует в неактивной копии X-хромосомы (отчего он получил свое название — **Var**g **b**ody **d**eficient, «отсутствующий в тельце Барра») и, вероятно, является одним из компонентов активного хроматина. Согласно ряду данных, компонентом активного хроматина является гистон H2A.Z. Другие исследователи, напротив, обнаружили H2A.Z в составе центрального гетерохроматина и в ряде других неактивных геномных областей. Таким образом, функции этого варианта H2A могут зависеть от хромосомного контекста. Гистон H2A.Z присутствует у широкого спектра организмов: от дрожжей до человека. Ген, кодирующий гистон H2A.Z, является необходимым для выживания у таких далеко отстоящих друг от друга на эволюционной лестнице организмов, как тетрахимена и дрозофила. У всех высших эукариот обнаружен гистон

H2A.X; фосфорилированная форма этого гистона, получившая обозначение γ H2A.X, маркирует места разрывов в ДНК и, по-видимому, стимулирует каким-то образом их репарацию.

Список вариантных форм гистонов, скорее всего, не является окончательным. Тем не менее уже сейчас является очевидным, что нуклеосомы, построенные с участием вариантных форм гистонов, могут отличаться от канонических и выполнять некие особые функции. Эта идея отражена в сформулированной в последние годы гипотезе «гистонового кода», которая будет обсуждаться более подробно в разд. 1.3.

Различия между отдельными нуклеосомами возникают и в связи с посттрансляционными модификациями гистонов. Основными модификациями являются ацетилирование лизиновых остатков, метилирование лизиновых, аргининовых и гистидиновых остатков, фосфорилирование остатков треонина и серина, сумоилирование и убиквитинилирование лизиновых остатков и поли-АДФ-рибозилирование остатков глутаминовой кислоты. Мишени для модификаций сосредоточены преимущественно в неструктурированных N-концевых («хвостовых») доменах. Модификации нуклеосомных гистонов играют важную роль в установлении и поддержании различных хроматиновых структур, в том числе активного и неактивного хроматина (разд. 2.1). Посттрансляционным модификациям подвергаются не только основные, но и вариантные формы гистонов. При этом некоторые важные мишени для модификаций, присутствующие в основных формах гистонов, утрачиваются в некоторых вариантных формах.

- Гистоны — небольшие положительно заряженные белки — являются наиболее важными белками хроматина.
- Существует пять основных типов гистонов: H1, H2A, H2B, H3 и H4.
- Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 формируют нуклеосомную глобулу.
- Наряду с каноническими гистонами существует широкий спектр вариантных форм гистонов, которые кодируются отдельными генами и выполняют специальные функции.
- Гистоны часто подвергаются различным посттрансляционным модификациям. Основные мишени для модификаций сосредоточены в N-концевых доменах гистонов.

1.2. НЕГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ

Термин «негистоновые белки», вообще говоря, следует признать устаревшим. Если понимать его в широком смысле, то наряду с негистоновыми белками собственно хроматина в эту группу следует включить все белки ядра, кроме гистонов, в том числе структурные белки (ламины, белки поровых комплексов и белки ядерного матрикса), белки РНП частиц, в том числе рибосом, сборка которых происходит в ядрышке, все присутствующие в ядре ферменты (в частности, ДНК- и РНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы, ферменты, осуществляющие ремоделирование хроматина, ферменты репарации ДНК, ферменты сплайсинга), все белки, участвующие в регуляции транскрипции и репликации и т. д. Ясно, что объединение столь разнородных белков в общую группу на том лишь основании, что они не являются гистонами, лишено всякого смысла.

В узком смысле можно говорить о негистоновых белках, непосредственно участвующих в формировании хроматиновых фибрилл. В этом случае в данную группу попадут НМГ-белки и белки, участвующие в формировании компактных (неактивных) хроматиновых структур, которые в последнее время часто называют архитектурными белками хроматина. К числу архитектурных белков хроматина обычно относят HP1 (**heterochromatin protein 1**), белки группы Polysomb, белок MENT, присутствующий в терминально дифференцированных клетках (эритроциты птиц, лейкоциты млекопитающих), MeCP2 (**methyl-CpG binding protein 2**) позвоночных животных и Sir-белки дрожжей.

НМГ-белки

Белки НМГ можно разделить на три группы — НМГА (ранее назывались НМГ-1/Y), НМГВ (НМГ-1/2) и НМГН (НМГ-14/17), в каждой из которых присутствует характеристический белковый домен. Наиболее широко представлены в ядре белки группы НМГВ. В большинстве клеток общее количество этих белков примерно в 10 раз меньше, чем гистонов. Белки группы НМГВ характеризуются наличием так называемого домена НМГ-1 (НМГ-1 box). Домен НМГ-1, включающий три α -спиральных участка, связывается с малой бороздкой ДНК и вызывает частичное разворачивание двойной спирали, приводящее к резкому изгибу молекулы. Связывание домена НМГ-1 с ДНК не является специфичным в отношении последовательности.

Белков группы HMGA в ядре примерно в 100 раз меньше, чем HMGB, и в 10 раз меньше, чем белков HMGN. Для HMGA характерно присутствие так называемого АТ-крючка (АТ-hook). Это положительно зараженный домен из 9 аминокислотных остатков, содержащий консервативную Gly-Arg-Pro (GRP) последовательность, фланкированную остатками аргинина. АТ-крючок связывается с малой бороздкой АТ-богатых последовательностей ДНК. Связывание не является в строгом смысле специфичным в отношении последовательности ДНК. В противоположность домену HMG-1, АТ-крючок предотвращает нарушения правильной укладки двойной спирали ДНК.

Белки HMGN с ДНК непосредственно не связываются. Они содержат домен связывания с нуклеосомами, причем с нуклеосомной частицей могут связываться гомодимеры (HMG-14)₂ и (HMG-17)₂, но не гетеродимеры, содержащие одну молекулу HMG-14 и одну молекулу HMG-17. Связываясь с нуклеосомными частицами, HMGN вызывают определенные изменения в их структуре, которые приводят к декомпактизации нуклеосом. Функции HMG-белков в хроматине в течение многих лет связывали с формированием транскрипционно-активного хроматина. Сейчас ясно, что спектр их функций существенно шире. Непосредственную роль HMG-белков в хроматине можно охарактеризовать как архитектурную. Вызывая различные изгибы в ДНК и влияя на уровень компактизации нуклеосомной фибриллы, эти белки могут способствовать либо, наоборот, препятствовать связыванию с ДНК различных транскрипционных факторов и других регуляторных белков. HMG-белки участвуют в реализации большинства процессов, требующих декомпактизации хроматина и нарушения регулярного расположения нуклеосом на ДНК.

Хотя HMG-белки традиционно относят к белкам хроматина, их ассоциация с ДНК и нуклеосомами является довольно непрочной. Эти белки легко экстрагируются из ядра 0,35 М раствором NaCl, т. е. в тех же условиях, что и большинство транскрипционных факторов. Для сравнения скажем, что для полной экстракции нуклеосомных гистонов необходима инкубация ядер в 2 М растворе NaCl.

HP1 (heterochromatin protein 1)

Белок HP1 был первоначально идентифицирован в клетках дрозофилы как один из важных компонентов неактивного гетерохроматина. Отсюда происходит и название этого белка.

Впоследствии гомологи HP1 дрозофилы были обнаружены у всех эукариотических организмов. Молекулярная масса HP1 и его гомологов составляет ≈ 20 кДа. В аминокислотной последовательности этих белков присутствуют два важных домена. На N-конце молекулы находится хромодомен (**chromodomain**, CD), ответственный за связывание с метилированным остатком лизина K9 гистона H3. Аналогичные домены обнаружены также в аминокислотных последовательностях белков группы Polycomb и гистонметилазы Su (var)3-9. На C-конце молекулы HP1 расположен так называемый «теновой» хромодомен (**chromoshadow domain**, CHD), имеющий определенное сходство с основным хромодоменом. Этот домен существенен для димеризации HP1 и его взаимодействия с рядом других белков, включая переносчик гистонов CAF1. HP1 необходим для образования компактных хроматиновых структур (гетерохроматина) (см. разд. 2.4).

Белки группы Polycomb

Подобно HP1, белки группы Polycomb (PcG) были впервые обнаружены у дрозофилы и впоследствии у других эукариотических организмов. Название этих белков происходит от названия мутации одного из гомеотических генов дрозофилы, приводящей к появлению дополнительных половых щетинок. В состав группы Polycomb входит ряд различных белков, которые формируют два разных комплекса (PC1 и PC2), участвующих в регуляции динамики хроматина. Связывание этих белков с определенными регуляторными элементами на ДНК (**Polycomb response elements**, PRE) приводит к инактивации генов, находящихся под контролем этих элементов (см. разд. 2.4).

MENT

Белок MENT (**myeloid and erythroid nuclear termination stage protein**) присутствует в достаточно больших количествах в ядрах терминально дифференцированных эритроцитов птиц и лимфоцитов млекопитающих. Его молекулярная масса 42 кДа. Основной функцией белка MENT является участие в конденсации хроматина. Конкретный механизм этой конденсации пока не изучен. Согласно ряду данных, MENT стимулирует сближение линкерных фрагментов внутри хроматиновой фибриллы, обеспечивая таким образом сворачивание 30-нм фибриллы в более компактную

структуру. Одновременно с этим MENT участвует в поддержании взаимодействий между разными фибриллами, что способствует более компактной упаковке ДНК, характерной для неактивных ядер терминально дифференцированных клеток. Осуществление этих функций не требует взаимодействия MENT с каждой нуклеосомной глобулой. В эритроцитах кур одна молекула MENT приходится на 50 нуклеосомных частиц.

MeCP2

MeCP2 (**methyl-CpG binding protein 2**) был первоначально описан как белок, связывающийся с метилированной ДНК. В аминокислотной последовательности этого белка с молекулярной массой 53 кДа присутствуют MBD-домен, который необходим для связывания с метилированной ДНК, репрессорный домен (TRD), подавляющий инициацию транскрипции и WW-мотив, необходимый для образования комплексов с рядом других белков. Роль MeCP2 в образовании неактивных хроматиновых доменов подробно рассматривается в разд. 2.4.

В последнее время получен целый ряд экспериментальных результатов, свидетельствующих о том, что роль MeCP2 в регуляции динамики хроматиновой фибриллы является более многообразной, чем предполагалось ранее. Показано, в частности, что этот белок связывается с олигонуклеосомами, собранными *in vitro* как на метилированной, так и на неметилированной ДНК. При этом происходит компактизация олигонуклеосомных фрагментов с образованием эллипсоидных частиц с последующей их олигомеризацией в достаточно крупные (более 60 нм) комплексы.

SIR3

SIR3 является одним из компонентов комплекса белков SIR (**silent information regulator**), играющего ключевую роль в формировании неактивных хроматиновых доменов в дрожжевых клетках (см. разд. 2.4). В рамках обсуждения архитектурных белков хроматина следует отметить, что SIR3 связывается с олигонуклеосомными фибриллами, вызывая их ассоциацию в большие комплексы. При этом сам SIR3 способен к образованию олигомеров, что увеличивает возможности построения различных надмолекулярных структур.

- Термин «негистоновые» белки является устаревшим и имеет неоднозначную трактовку.
- По существующей традиции, наиболее важными негистоновыми белками считаются белки группы HMG. Можно выделить три подгруппы HMG-белков (HMGB, HMGN и HMGA). Все эти белки выполняют в ядре некие «архитектурные функции» и регулируют динамику нуклеосомных фибрилл.
- Наряду с HMG-белками к негистоновым белкам, выполняющим структурные функции в хроматине, относятся белки, участвующие в формировании гетерохроматина (HP1, Polycomb, MENT, MeCP2, Sir).

1.3. НУКЛЕОСОМЫ

Открытие нуклеосом заложило основу современных представлений о хроматине. Хроматин перестал быть аморфной массой и предстал перед глазами исследователей в виде достаточно упорядоченной структуры, построенной по иерархическому принципу.

Нуклеосома является базовой структурной единицей первого уровня упаковки ДНК в хроматине. Она представляет собой белковую глобулу или, точнее говоря, некое подобие диска, на который намотан фрагмент ДНК протяженностью 146 п. н. Намотанная на нуклеосомную глобулу ДНК образует 1,65 супервитка. Глобула состоит из восьми молекул гистонов: тетрамера (H3-H4)₂ и двух димеров H2A-H2B. Диаметр глобулы-диска составляет ≈ 11 нм, а высота — 5,7 нм (рис. I на цветной вклейке).

Нуклеосомы были обнаружены при электронной микроскопии развернутых хроматиновых фибрилл (хроматина, полученного после мягкой обработки ядер стафилококковой нуклеазой и экстракции 0,2 мМ ЭДТА). На электронно-микроскопических снимках были выявлены единообразные глобулы, регулярно расположенные на молекуле ДНК. Эти структуры (рис. 2) получили название «бусины на нити». Другое важное свидетельство того, что ДНК в составе хроматина организована в регулярные структуры, было получено при анализе результатов частичного расщепления ядерной ДНК стафилококковой нуклеазой. Типичным продуктом такого расщепления является набор фрагментов с размерами, кратными 200 п. н. (рис. II на цветной вклейке). Это свидетельствовало о том, что в хроматине ДНК организована в некие единообразные

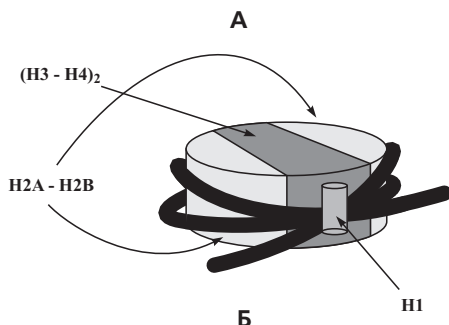
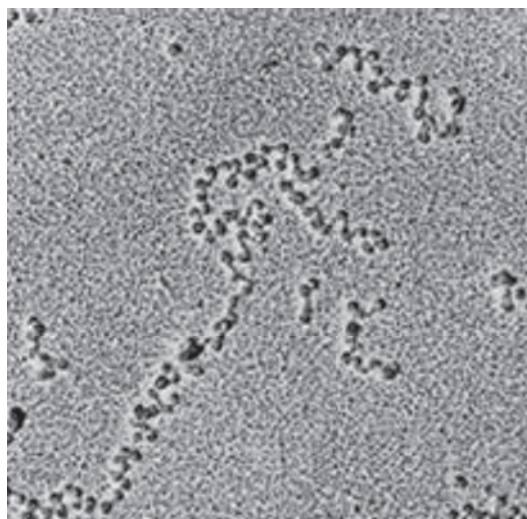


Рис. 2. Устройство 10-нм хроматиновой фибриллы («бусины на нити»)

Показаны электронная микрофотография нескольких нуклеосом (А) и схема пространственной организации хроматосомы — коровой нуклеосомы с молекулой гистона Н1 (Б). Гистон Н1 связывается с обоими концами нуклеосомной ДНК. Взаимное пространственное расположение Н1 и дуплексов ДНК определяет структуру и 10-нм и 30-нм фибриллы.

А: © Brian Staveley, Memorial University of Newfoundland.

и регулярно расположенные на молекуле ДНК структурные единицы, обеспечивающие относительную защиту фрагментов ДНК протяженностью 200 п. н. Предпочтительной мишенью для нуклеазной атаки представлялась так называемая спейсерная ДНК, т. е. ДНК, расположенная между структурными единицами. Структурные единицы хроматина, защищающие от нуклеазной атаки 200 п. н. фрагменты ДНК, легко отождествлялись с глобу-

[...]