

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za *matematiko in fiziko*



Oddelek za fiziko

MOLEKULARNA BIOFIZIKA
SEMINAR

Fizika kromatina

Maruša Vitek

avgust 2012

POVZETEK

Kromatin je kompleks DNA in histonskih proteinov v jedru evkariontske celice. Njegova osnovna enota je nukleosom, ki ga sestavljata povezovalna DNA in oktamer histonskih proteinov, na katerega je navita DNA. Odvijanje DNA z nukleosoma in drsenje nukleosoma vzdolž DNA sta procesa, pomembna za delovanje celice. Za strukture višjih redov je nujen privlak med nukleosomi, ki ga povzročajo pozitivno nabiti histonski repi. Nukleosomi so povezani v strukturo 30 nm vlakna, ta pa naprej v strukture na višjih skalah, ki še niso pojasnjene.

Kazalo

1	Uvod	1
2	Nukleosom	2
2.1	Odvijanje DNA	4
2.2	Drsenje nukleosomov vzdolž DNA	5
2.3	Privlak med nukleosomi	7
3	30 nm vlakno	9
4	Struktura kromatina na velikih skalah	12
5	Zaključek	13

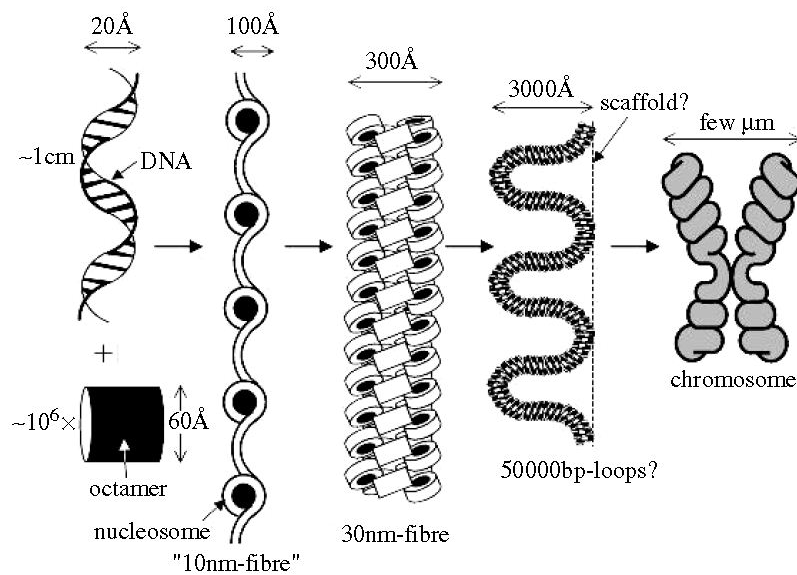
1 Uvod

Vsi doslej poznani organizmi imajo dedni zapis shranjen v molekuli DNA. To je molekula, sestavljena iz nukleotidov, ki ima obliko dvojne vijačnice. Vsak nukleotid je sestavljen iz sladkorjev in fosfatne skupine, ki se vežejo v vijačnico, ter iz ene od štirih dušikovih baz. Po dve dušikovi bazi iz nasprotnih verig sta povezani v bazni par. Ena perioda dvojne vijačnice vsebuje deset baznih parov in je dolga 3,4 nm. Človeški dedni zapis vsebuje približno 6×10^9 baznih parov, molekula DNA je torej dolga približno 2 m. Ta dolga molekula je shranjena v celičnem jedru velikosti nekaj kubičnih mikrometrov. Med celično delitvijo je molekula DNA v jedru razdeljena na 46 manjših delov, kromosomov.

DNA je ena najbolj nabitih molekul v naravi, ima dva osnovna naboja na dolžino, ki pripada enemu baznemu paru, to je 0,34 nm. Ob prisotnosti polivalentnih protionov DNA kondenzira v zelo goste toroidne svitke. Na ta način je lahko DNA pakirana v virusih, kjer je pomembno le, da je spravljena v virusni kapsidi. V evkariontskih celicah ta način pakiranja ni primeren, saj ima pakiranje tu dve nalogi: spraviti 2 metra dolgo DNA v mikrometrsko celično jedro in omogočiti dodatno kontrolo pri procesu izražanja genov s tem, da so različni deli DNA različno gosto pakirani. Proteinom mora biti omogočen dostop do posameznih delov genskega zapisa, hkrati pa morajo druga področja ostati skrita. Tudi diferenciacija celic v večceličnih organizmih v veliki meri temelji na pakiranju DNA.

Molekula DNA je v evkariontih pakirana v kromatinu. To je kompleks DNA in histonskih proteinov. Struktura kromatina je odvisna od tega, v katerem delu celičnega cikla se celica nahaja. Med delitvijo celice je kromatin pakiran zelo gosto, v kromosomih, ko se celica ne deli pa je pakiranje ohlapnejše, da je DNA dostopna proteinoma RNA–in DNA polimerazi. S tem sta omogočena procesa prepisovanja in podvojevanja DNA.

Osnovna enota kromatina je nukleosom, sestavljen iz osmih histonskih proteinov, ki sestavljajo nukleosomsko sredico, in iz dela molekule DNA, ki obsega približno 200 baznih parov. Strukturo nukleosomske sredice so določili z rentgensko kristalografijo z ločljivostjo 0,19 nm [2]. Pri nizkih koncentracijah soli je kromatin najohlapnejši, ima



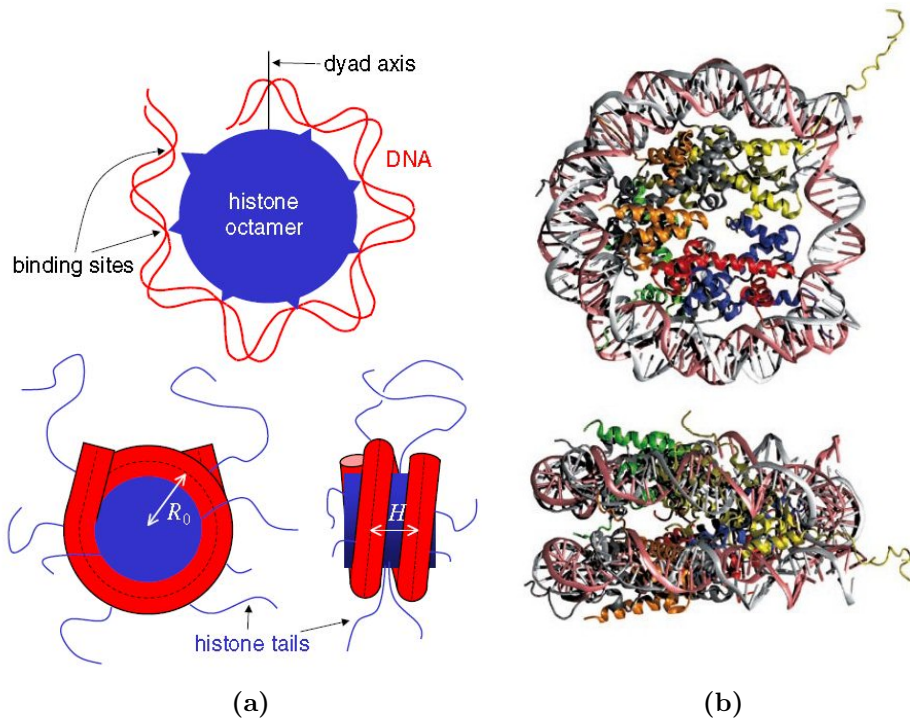
Slika 1: Kromatin je kompleks DNA in histonskih proteinov, ki sestavljajo oktamer. Tvorijo strukturo kroglic na vrvici, 10 nm vlakno. Pri fizioloških pogojih je ta struktura nadaljnje zvita v 30 nm vlakno. Pakiranje na višjih skalah še ni pojasnjeno. Kromatin se nahaja v celičnem jedru. Med celično delitvijo je zelo gosto pakiran v kromosomih, med interfazo pa je pakiranje ohlapnejše. Vzeto iz [1].

strukturo kroglic na vrvici. Tej strukturi pravimo tudi 10 nm vlakno. Pri koncentracijah soli, podobnih fiziološkim pogojem, je kromatin tesneje pakiran. Struktura ima premer približno 30 nm, zato ji pravimo 30 nm vlakno. Strukture na mikrometrskih skalah še niso pojasnjene [1].

2 Nukleosom

Nukleosomska sredica je sestavljena iz štirih različnih histonskih proteinov, H2A, H2B, H3 in H4, ki se dvakrat ponovijo. Osem proteinov sestavlja oktamer, ki je obstojen le skupaj z DNA. Ima obliko cilindra s premerom 6,5 nm in višino 6 nm. Osnovni ploskvi nista povsem vzporedni. Okoli cilindra je po določeni vijačni poti navit del molekule DNA, ki naredi 1,75 zasuka. Dolžina navitega dela je 147 baznih parov. K enemu nukleosomu prištevamo okrog 200 baznih parov DNA. Tisti del, ki ni navit okrog nukleosomske sredice, ampak je prost in povezuje dve sosednji nukleosomski sredici, imenujemo povezovalna DNA. Ta je lahko dolga od 160 do 240 baznih parov, dolžina pa se razlikuje ne le med vrstami organizmov, temveč tudi med različnimi celicami istega organizma [3]. V večini evkarionstskih organizmov vhodni in izhodni del DNA povezuje peti histonski protein, povezovalni histon H1 ali H5 [3].

Vsi histonski proteini v oktameru imajo po en fleksibilen rep, ki je močno pozitivno nabit. Ti repi izhajajo iz nukleosomske sredice na vrhu ali na dnu cilindra, ali pa med obema navojema DNA. So zelo pomembni za strukturo višjih redov.



Slika 2: (a) Shema nukleosoma z višino H in krivinskim radijem v sredini molekule DNA R_0 . Na vsakih 10 baznih parov je DNA vezana na vezavno mesto na oktameru. Vzeto iz [2]. (b) Računalniška simulacija nukleosoma. V sredini so z različnimi barvami narisani histonski proteini, okoli njih je navita DNA. Na spodnji sliki lahko opazimo, da je nukleosom rahlo klinaste oblike. Vzeto iz [4].

Molekula DNA je na štirinajstih mestih vezana na površino nukleosomske sredice. Povezujejo ju vodikove vezi, vmesne vodne molekule in kationske verige iz nukleosomske sredice, ki segajo v male žlebiče molekule DNA [2]. Vezavno energijo enega vezavnega mesta znamo le oceniti. Je vsota energije ukrivljanja DNA in efektivne vezavne energije, ki jo pridobimo z vezavo že ukrivljene molekule. Prvo ocenimo tako, da DNA opišemo z modelom "črvaste" verige (*ang.* worm-like chain) s persistenčno dolžino $l_P \approx 50$ nm. Energija ukrivljanja je

$$E_b = k_B T \frac{l_P L}{2R_0^2}, \quad (1)$$

kjer je L dolžina ukrivljene DNA, približno $127 \times 0,34 \text{ nm} \approx 43$ nm, $R_0 \approx 4,3$ nm pa radij ukrivljanja. Energija ukrivljanja molekule DNA na eni nukleosomski sredici je približno $58k_B T$, kar na vezavno mesto znese približno $4k_B T$. Drug prispevek k vezavni energiji, efektivna vezavna energija, znaša približno $1,5 - 2k_B T$ na vezavno mesto oz. na deset baznih parov. Tako dobimo oceno za vezavno energijo na vezavno mesto, ki znaša približno $6k_B T$.

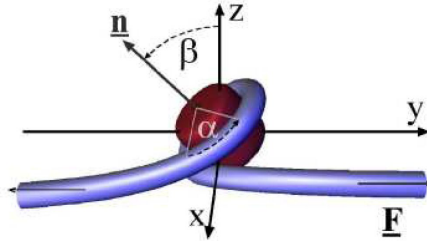
2.1 Odvijanje DNA

Na ravni nukleosomov je za delovanje celice zelo pomembno odvijanje DNA, ki omogoča dostopnost vseh baznih parov proteinom, pri čemer struktura nukleosoma ostaja stabilna.

Oceno za kritično silo, ki povzroči odvitje molekule DNA z nukleosoma, lahko dobimo iz ocene za efektivno vezavno energijo, ki za 147 baznih parov znaša približno $30k_B T$. Veriga iz 147 baznih parov je dolga približno 50 nm. Iz tega lahko ocenimo kritično silo:

$$F_c = \frac{30k_B T}{50\text{nm}} = 2,5\text{pN}. \quad (2)$$

V eksperimentu, kjer so verigo 17 nukleosomov raztegovali z zunanjo silo na krajiščih, se je pokazalo, da se pri majhni sili ($F < 10$ pN) z nukleosomske sredice odvijajo 70-80 baznih parov, pri veliki sili ($F > 20$ pN) pa se nenadoma neravnovesno odvijajo še preostali [2]. Kritična sila je torej bistveno večja, kot če jo ocenimo iz vezavne energije. Razlika je posledica histonskih repov, elektrostatskih interakcij med navojema DNA in geometrije nukleosoma.



Slika 3: Odvijanje opišemo s pomočjo modela "črvaste" verige. Stopnjo adsorpcije DNA opišemo s kotom α , nagib nukleosoma med odvijanjem pa s kotom β . Vzeto iz [2].

Nukleosomsko DNA lahko opišemo z modelom "črvaste" verige, kjer zanemarimo torzijsko deformacijo, saj predpostavimo prosto vrtljive konce verige. Stopnjo adsorpcije DNA opišemo s kotom α . Definiran je tako, da je enak 0, če je DNA navita okrog nukleosomske sredice za točno en zavo (slika 3). Odvijanje ni ravninski proces. S kotom β opišemo nagib nukleosoma med odvijanjem glede na ravnino začetnega stanja. Če na DNA delujemo s silo v smeri y-osi, bo hkrati prišlo do deformacije in odvijanja DNA ter do nagibanja nukleosoma iz ravnine. Krivinski radij v sredini molekule DNA označimo z R_0 (slika 2). Energijo sistema v limiti ploščatega svitka, kjer je R_0 večji od višine H , zapišemo kot

$$E(\alpha, \beta) \Big|_{R_0 \ll H} = 2R \left[k^a - \frac{K_c}{2R_0^2} - F \right] \alpha + 2FR \cos \beta \sin \alpha + 8\sqrt{K_c F} \left[1 - \sqrt{\frac{1 + \cos \alpha \cos \beta}{2}} \right], \quad (3)$$

kjer je K_c elastični modul ukrivljanja, κ ukrivljenost na mestu s , k^a gostota adsorpcijske energije na enoto dolžine navite DNA, R radij nukleosomske sredice, F sila in Δy razdalja, za katero se premakne vsak od koncev verige [2]. Prvi člen predstavlja vsoto adsorpcijske energije, ki teži k navijanju DNA, in energije ukrivljanja navite DNA ter

energije raztezanja verige zaradi zunanje sile, ki skušata DNA odviti z nukleosomske sredice. Drugi člen je geometrijski in opisuje spremembo potencialne energije zaradi odvijanja DNA in nagibanja nukleosoma. Lahko ga zanemarimo. Največji prispevek da tretji člen, ki predstavlja energijo ukrivljanja odvite DNA. Energija je minimalna pri $\alpha = \beta$ [2].

Za vrednost $k^a = 2k_bT/\text{nm}$, ki jo dobimo iz ocene vezavne energije, se dobljeni rezultat ne sklada z eksperimentom. Upoštevati je treba še, da k^a vzdolž celotnega navitja ni konstanten. Navoja DNA se elektrostatsko odbijata, upoštevati pa je potrebno še pozitivno nabite histonske repe, ki se adsorbirajo na molekulo DNA. Dokler sta navoja dva, si delita njihov privlak. Če pa se DNA odvije, tako da je na nukleosomski sredici samo še en navoj, bodo vsi repi delovali le nanj, zato bo za odvitje tega navoja potrebno dovesti bistveno več energije kot za odvitje prvega.

To upoštevamo tako, da za k^a vzamemo dve vrednosti, eno za $\alpha > 0$ (manj kot en navoj) in drugo za $\alpha < 0$ (več kot en navoj). S prilagajanjem modela rezultatom eksperimenta so ugotovili, da je vrednost k^a za manj kot en navoj med 3 in $3,5k_BT/\text{nm}$, za več kot en navoj pa je $2k_BT/\text{nm}$ kar dobra ocena [2].

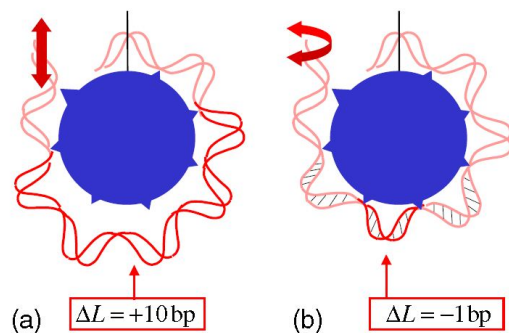
Z razliko med tema vezavnima energijama lahko pojasnimo, kako je DNA lahko povsod dostopna proteinom in hkrati stabilna. Eden od obeh navojev se lahko odvije zaradi termičnih fluktuacij, kar povzroči močnejšo vezavo preostalega navoja. Ta zato ostane stabilno vezan in struktura se ohrani.

2.2 Drsenje nukleosomov vzdolž DNA

Še en pomemben proces na ravni nukleosoma je njegovo drsenje vzdolž molekule DNA. V *in vitro* eksperimentih so opazili, da se nukleosomi spontano predstavljajo vzdolž molekule DNA [2]. Poskusi so bili izvedeni na kratkih molekulah (od 200 do 400 baznih parov). Izkazalo se je, da je termalno povzročeno drsenje počasen proces. Pri temperaturah okrog 37°C ima značilni čas od nekaj minut do nekaj ur, pri nizkih temperaturah pa ga sploh ni opaziti [2]. Pokazalo se je še, da prisotnost povezovalnih histonov H1 in H5 zmanjšuje mobilnost nukleosomov.

Ker je DNA na nukleosomsko sredico vezana na 14 vezavnih mestih, bi bilo navadno drsenje, kjer bi se nukleosomska sredica na vseh 14 mestih hkrati odlepila od DNA in se nato pomikala vzdolž nje, energetsko zelo neugodno. Drsenje mora potekati preko manjših korakov, ki niso tako energetsko potratni. Schiessel v [2] predlaga dva možna mehanizma drsenja. Oba potekata prek majhnih defektov, do katerih v nukleosomski DNA pride spontano.

Defekt v prvem mehanizmu je odvečnih 10 baznih parov v nukleosomski DNA. Do njega pride tako, da se nekaj DNA spontano odvije z nukleosomske sredice. Namesto, da bi se nato enako adsorbirala nazaj, se to zgodi z zamikom 10 baznih parov, na vezavno mesto se veže naslednji mali žlebič DNA (slika 4). V nukleosomski DNA je zato presežek desetih baznih parov. Defekt nato difundira vzdolž nukleosomske DNA in zapusti nukleosom na enem od obeh njenih koncev. Na ta način se nukleosom lahko premakne za 10 baznih parov. Na enak način bi lahko prišlo tudi do defektov z več kot deset baznimi



Slika 4: Na sliki sta shematsko prikazana dva možna mehanizma drsenja nukleosoma vzdolž DNA prek majhnih defektov. Na levi je defekt desetih baznih parov odvečne DNA, ki se tvori s spontanim odvitjem dela DNA, ki se nato adsorbira nazaj z zamikom desetih baznih parov. Defekt nato difundira vzdolž DNA in nukleosom se efektivno premakne. Na desni je mehanizem drsenja prek torzijskega defekta. Med dvema od štirinajstih vezavnih mest se namesto 10 nahaja 9 ali 11 baznih parov. Vzeto iz [2].

pari, vendar bi bili ti energijsko manj ugodni zaradi potrebnega večjega ukrivljanja in zvijanja presežne DNA. Difuzijska konstanta nukleosomske sredice je v tem scenariju zelo majhna, približno $10^{-16}\text{cm}^2/\text{s}$, tipični čas drsenja nukleosoma pa na ravni nekaj ur, kar se ujema z eksperimentom.

Drugi mehanizem drsenja predpostavlja torzijski defekt v obsegu enega baznega para. Do njega pride tako, da se DNA na enem od koncev nukleosoma spontano torzijsko deformira. Tudi ta defekt difundira vzdolž nukleosomske DNA. Med sosednjima vezavnima mestoma med katerima se defekt nahaja je tako 9 ali 11 baznih parov (odvisno od smeri v katero je DNA zvita), namesto običajnih 10. Difuzijska konstanta oktamera je v tem primeru bistveno večja, približno $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$, kar da tipičen čas drsenja v sekundni skali. Prej omenjeni eksperimenti so bili izvedeni na vzorcih DNA, ki se ne ukrivljajo izotropno. Zaradi tega se difuzijska konstanta zmanjša na približno $10^{-15}\text{cm}^2/\text{s}$, kar da tipičen čas primerljiv z izmerjenim.

V eksperimentih so se pokazali močni dokazi v prid drugega predlaganega mehanizma. Zdi se, da v večini primerov nukleosomi vzdolž DNA drsijo prek torzijskih defektov. Izkazalo pa se je tudi, da je v posebnih primerih mogoče tudi drsenje v skladu s prvim mehanizmom [2].

Za delovanje celice je drsenje nukleosomov pomembno pri procesu transkripcije. Ugotovili so, da RNA polimeraza kljub temu, da je del DNA vezan v nukleosome, uspe izvesti transkripcijo celotnih genov, ki obsegajo na desetine ali celo na stotine nukleosomov. Razlaga, da polimeraza v zanki sledi molekuli DNA okrog nukleosomske sredice, ni skladna z nekaterimi rezultati eksperimentov. Alternativna razlaga je, da polimeraza med transkripcijo nukleosom poriva pred sabo, da ta drsi vzdolž DNA. Ta teorija se sklada tudi z opažanjem, da na vzorcih DNA z več nukleosomi pod določenimi pogoji transkripcija povzroči uničenje nukleosomskih sredic [2].

2.3 Privlak med nukleosomi

Nukleosomi so povezani v strukturo kroglic na vrvcici, 10 nm vlakno. Taka struktura je bila eksperimentalno opažena le pri nizkih koncentracijah soli, pri fizioloških pogojih pa kromatin tvori približno 30 nm debelo vlakno. Obstajati mora nek mehanizem pakiranja, nekakšna privlačna interakcija med nukleosomi, ki omogoča to strukturo. Ta mehanizem mora uravnnavati tudi gostoto pakiranja, tako da so pravi deli genskega zapisa dostopni proteinom, ostali deli pa so neaktivni [5].

Eksperimenti kažejo, da bi bil iskani mehanizem lahko premoščanje histonskih repov. Ti so zelo fleksibilni in dovolj dolgi, da lahko dosežejo sosednje nukleosome. Repi so pozitivno nabiti. Pozitivno nabit je sicer tudi oktamer, a je celoten nukleosom zaradi velikega naboja, ki ga nosi DNA, nabit negativno. Repi so zato adsorbirani na površino nukleosoma. Z zviševanjem koncentracije soli se repi postopno desorbirajo, saj sol v okolici senči privlačni potencial nukleosoma. Efektivni radij nukleosoma se povečuje, dokler se pri fizioloških pogojih ne nasiči, repi se takrat povsem odvijajo [3].

Obnašanje delcev NCP (*ang.* nucleosome core particle) so eksperimentalno preučevali v solnih raztopinah različnih koncentracij [6]. NCP je nukleosomska sredica z nukleosomsko DNA, ki ji je bila odščipnjena povezovalna DNA. V eksperimentu so opazili, da se pri koncentraciji 50 mM monovalentne soli giracijski radij malo poveča, bistveno pa se poveča maksimalni doseg delca. To lahko pripišemo desorpciji histonskih repov z nukleosoma. Zaradi soli v okolici, je naboj, ki drži repe adsorbirane na površino nukleosoma, senčen. Drugi virialni koeficient postane pri koncentracijah soli, višjih od 50 mM, negativen, zato interakcija med dvema nukleosomoma postane privlačna.

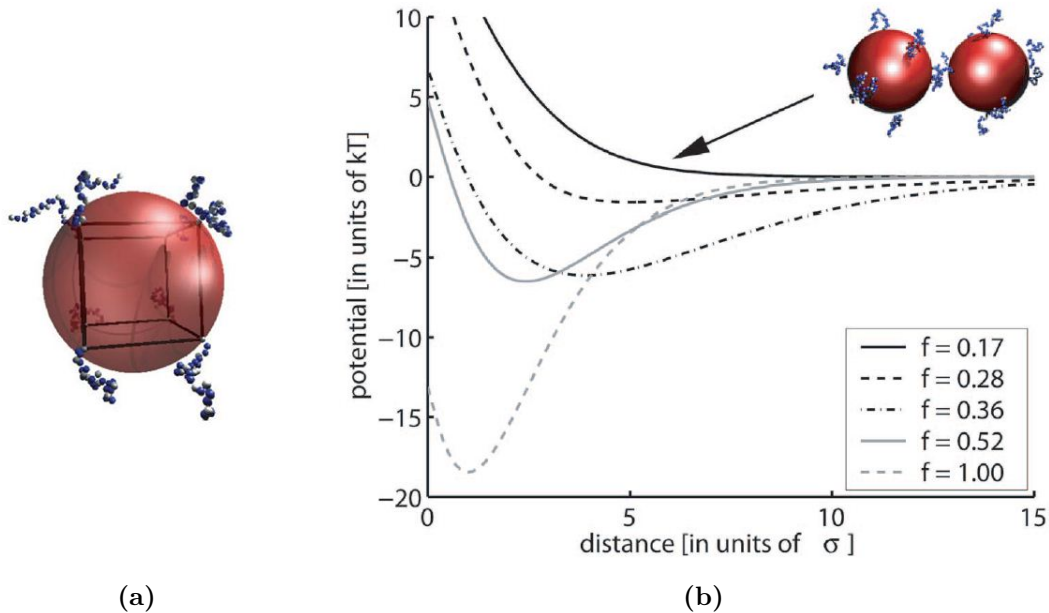
Druga študija [7] kaže, da privlačna sila med nukleosomi izgine, če jim odstranimo repe. Iz teh dveh rezultatov lahko sklepamo, da privlačno silo med nukleosomi povzročajo histonski repi.

Mühlbacher in sodelavci so postavili minimalni model delca NCP, ki upošteva vseh osem histonskih repov. Oktamer z navito nukleosomsko DNA so predstavili z negativno nabito kroglo, na katero so bile v ogliščih vrisane kocke pritrjene pozitivno nabite fleksibilne verige iz 28 monomerov (slika 5) [5].

Interakcije so opisali z Debye-Hückle-ovim potencialom z inverzno dolžino senčenja $\kappa = \sqrt{4\pi l_B c_s}$, kjer je $l_B = e^2/\epsilon k_B T$ Bjerrumova dolžina, c_s pa koncentracija monovalentne soli.

$$\begin{aligned} V_{mm}(r) &= l_B k_B T \frac{e^{-\kappa r}}{r}, \\ V_{mc}(r) &= l_B k_B T Z \frac{e^{-\kappa r}}{r} \frac{e^{\kappa a}}{1 + \kappa a}, \\ V_{cc}(r) &= l_B k_B T Z \frac{e^{-\kappa r}}{r} \frac{e^{2\kappa a}}{(1 + \kappa a)^2}. \end{aligned} \tag{4}$$

Tu V_{mm} , V_{mc} in V_{cc} predstavljajo potencial interakcije med dvema monomeroma, potencial interakcije med monomerom in kroglasto sredico in potencial interakcije med dvema sredicama; a je radij krogle, Z pa naboj krogle, ki je enak vsoti nabojev negativno nabite DNA in pozitivnega oktamera.



Slika 5: (a) Model nukleosoma. Kroglja predstavlja nukleosomsko sredico, verige iz 28 monomerov pa histonske repe. (b) Graf prikazuje odvisnost potenciala premoščanja od razdalje med nukleosomskima sredicama za različne deleže naboja na repih. Polna črta predstavlja šibko nabite repe, najgloblji potencial je za naboj enak dejanskemu. Vzeto iz [5].

Ocenimo lahko energijo, potrebno za tvorbo mostu. V osnovnem stanju je rep adsorbiran na površino nukleosomske sredice. Vsak monomer v repih čuti potencial

$$e\phi \propto k_B T Z l_B (\kappa a^2)^{-1}. \quad (5)$$

Ko se krogli približata na razdaljo, manjšo od dolžine repa, lahko pride do premoščanja [2]. Pri tvorbi mostu se mora določeno število monomerov dvigniti s površine v območje med kroglama, kjer je potencial senčen. Če z λ označimo dolžinsko gostoto naboja in z d razdaljo med nukleosomoma, je to število (ob predpostavki, da je $d > \kappa^{-1}$) približno enako $\lambda(d - \kappa^{-1})$. Energija, potrebna za tvorbo mostu, je tako enaka

$$E_{most} = k_B T (d - \kappa^{-1}) Z l_B \frac{\lambda}{\kappa a^2}. \quad (6)$$

V okviru modela Mühlbacherja in sodelavcev se je izkazalo, da so interakcije med NCP-ji predvsem posledica histonskih repov. Ugotovili so, da je iskani mehanizem privlaka res premoščanje repov, kjer se premoščanje tipično zgodi preko enega samega repa. Odkrili so tudi, da je premoščanje močno odvisno od naboja na repih. Pri majhnih nabojih na repih sploh ne pride do privlačne interakcije, z večanjem naboja pa se minimum potenciala znižuje in premika k manjšim razdaljam med NCP-ji (slika 5).

Velika odvisnost od naboja na repih bi lahko bila ključ do uravnavanja gostote pakiranja kromatina. V celici namreč obstajajo mehanizmi, ki lahko kontrolirajo stanje

naboja na histonskih repih. To sta acetilacija lizinske skupine, ki povzroči razelektritev in deacetilacija, ki povzroči naelektritev. Acetilirana področja kromatina so aktivna in zato redkeje pakirana, deacetilirana pa so neaktivna in zelo gosto pakirana [5]. Gostota pakiranja je tako regulirana na biokemijski način s fizikalnim mehanizmom premoščanja [2].

3 30 nm vlakno

V fizioloških pogojih ($c_{soli} \sim 100$ mM) ima kromatin ob prisotnosti povezovalnih histonov strukturo približno 30 nm debelega vlakna, ki mu pravimo tudi kromatinsko vlakno. Če povezovalni histoni niso prisotni, kromatin tvori redkejšo strukturo [1]. Večina znanja o kromatinskem vlaknu prihaja iz *in vitro* eksperimentov. Za njegov opis je bilo predlaganih več modelov [3].

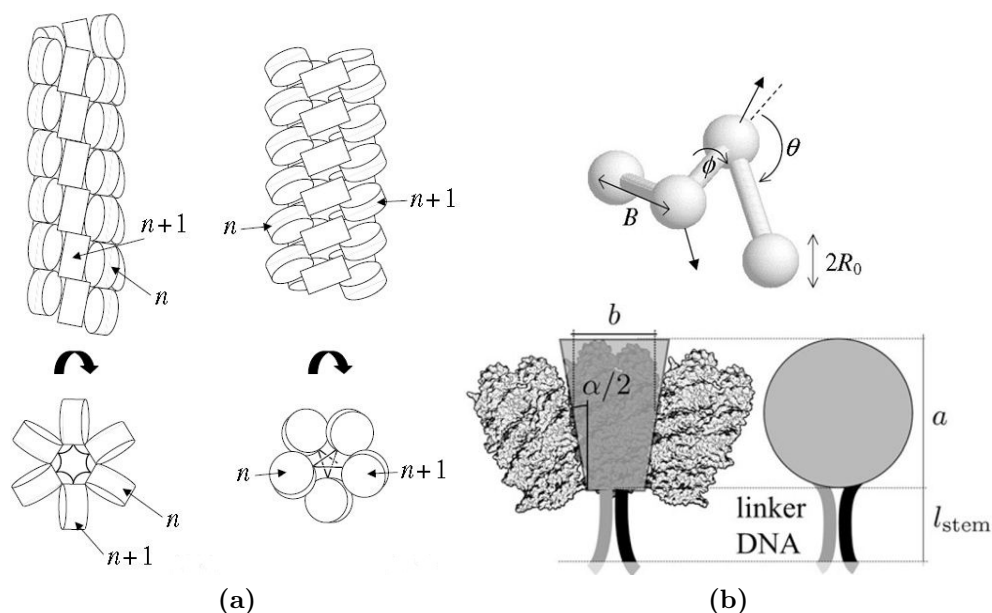
Dolgo sta bila osnovna modela za opis strukture kromatinskega vlakna solenoidni model in model prekrizane povezovalne DNA (slika 6a). V solenoidnem modelu so nukleosomi nanizani v vijačnico, tako da sta diadična os in os oktamerskega cilindra pravokotni na os vijačnice. Del nukleosoma, kjer DNA vstopa in izstopa iz nukleosoma, je obrnjen v notranjost vijačnice, kjer je tudi celotna povezovalna DNA. Da lahko povezuje sosednje nukleosome, mora biti precej ukrivljena. Zaradi velike energije ukrivljanja mora biti privlak med nukleosomi dovolj močan. Zaradi predpostavljene močnega privlaka je v tem modelu premer vlakna neodvisen od dolžine povezovalne DNA. Model prekrizane povezovalne DNA predpostavlja ravno povezovalno DNA, ki povezuje nukleosome na nasprotnih straneh vlakna. Tu je premer vlakna odvisen od dolžine povezovalne DNA.

Pri nizkih koncentracijah soli slike, posnete z elektronsko krio-mikroskopijo, podpirajo model prekrizane povezovalne DNA, enako tudi slike, posnete z mikroskopom na atomsko silo. Pri zviševanju koncentracije soli je opazno vedno gostejše pakiranje, ni pa mogoče določiti, kakšna je struktura kromatina pri fizioloških pogojih [1].

Posplošitev modela prekrizane DNA je model vlakna, ki ga opišemo z dvema kotoma (*ang. two-angle fiber*) [1]. Geometrija vlakna po tem modelu izhaja iz oblike nukleosomov, elastična energija povezovalne DNA, interakcije med nukleosomi ipd. pa v model vstopajo šele kot popravki. Kot med vhodno in izhodno DNA označimo s $\pi - \theta$ in je različen od nič. Če so prisotni povezovalni histoni, povežejo vhodno in izhodno DNA na vsakem nukleosomu, s čemer povzročijo, da sta na razdalji ~ 3 nm približno vzporedni. Tvorijo se nekakšen pecelj (slika 6b). S $\pi - \theta$ v tem primeru označimo kot med koncema DNA, ki izhajata iz peclja. Določen je s koncentracijo soli v okolici [1]. Drugi kot, ki parametrizira vlakno, je rotacijski kot ϕ med osema sosednjih nukleosomov (slika 6b). Tretji parameter vlakna je L , dolžina povezovalne DNA. S temi tremi parametri je vlakno povsem določeno. V modelu je nukleosom predstavljen kot točkast delec, povezovalna DNA pa je ravna. Premer vlakna je

$$2R = \frac{L \sin \frac{\theta}{2}}{1 - \cos^2 \frac{\theta}{2} \cos^2 \frac{\phi}{2}} \quad (7)$$

in je linearno sorazmeren z dolžino povezovalne DNA [1].



Slika 6: (a) Levo solenoidni model in desno model prekrizane povezovalne DNA. Oba je ovrgel poskus Robinsona *et al.* [8]. Vzeto iz [1]. (b) Zgoraj je model vlakna, parametriziranega z dvema kotoma. To je posplošen model modela prekrizane povezovalne DNA. Spodaj prikaz "peclja", ki ga tvori DNA na izhodu z nukleosoma ob prisotnosti povezovalnih histonov (tloris in naris). Vzeto iz [1] in [9].

Ob eksperimentalnem preizkušanju odvisnosti debeline vlakna od dolžine povezovalne DNA je prišlo do zanimivih rezultatov [8]. V eksperimentu so rekonstruirali kromatinska vlakna, ki so se razlikovala po dolžini povezovalne DNA. Tako so dobili vlakna, katerih povezovalna DNA je obsegala od 10 do 70 baznih parov (v korakih po 10 baznih parov). Vlakna so vsebovala tudi povezovalne histone. Izkazalo se je, da je rezultat eksperimenta neodvisen od vrste le-teh.

Premer vlaken so merili z elektronsko mikroskopijo. Rezultat je bil nepričakovan. Izkazalo se je, da ima odvisnost debeline vlakna od dolžine povezovalne DNA diskreten prehod. Za dolžine od 10 do 40 baznih parov je premer vlakna enak 33 nm, za dolžine od 50 do 70 baznih parov pa 44 nm. V odvisnosti od dolžine povezovalne DNA imamo torej dva razreda vlaken. Pakiranji v teh dveh razredih sta različno gosti. Linearna gostota nukleosomov v vlaknih debeline 33 nm je $\sim 1,0 \text{ nm}^{-1}$, v 44 nm debelih vlaknih pa $\sim 1,4 \text{ nm}^{-1}$ [8].

Ti rezultati so v nasprotju tako s solenoidnim modelom, ki ne predvideva odvisnosti od dolžine povezovalne DNA, kot tudi z modelom prekrizane povezovalne DNA, ki predvideva linearno odvisnost. Depken in Schiessel sta leta 2009 postavila model trakov (*ang.* ribbon model), v katerem sta strukturo kromatinskega vlakna pripisala vplivu oblike nukleosomov [9]. Nukleosomi so cilindrične oblike, vendar pa njihovi osnovni ploskvi nista vzporedni. Kot med njima je $\beta = 8^\circ$. Nukleosomi so torej klinaste oblike. Model predpostavlja postavitev nukleosomov v trakove (slika 7). Glavna interakcija v modelu je interakcija med nukleosomi, ki je kratkega dosega [9].

Tako postavitve lahko opišemo s parom števil (N, m) , kjer je N število trakov, m pa pove, koliko korakov je med nukleosomoma, ki ju povezuje povezovalna DNA [9]. Solenoidni model bi tu denimo opisali z $(1,1)$ [3]. Za $N = 1, 2, 3, 4, 6$ so edine možne strukture takšne, kjer so povezani sosednji nukleosomi ($m = 1$). Za pet trakov je mogoča še struktura $(5,2)$, za sedem trakov še strukturi $(7,2)$ in $(7,3)$, itd.

Iz znane geometrije nukleosomov so za različne možne strukture vlaken izračunali premer vlakna, linearno gostoto nukleosomov, naklon trakov in kot zasuka med sosednjimi nukleosomi znotraj enega traku. Pri tem so upoštevali prisotnost povezovalnih histonov [9]. Rezultate povzema tabela 1.

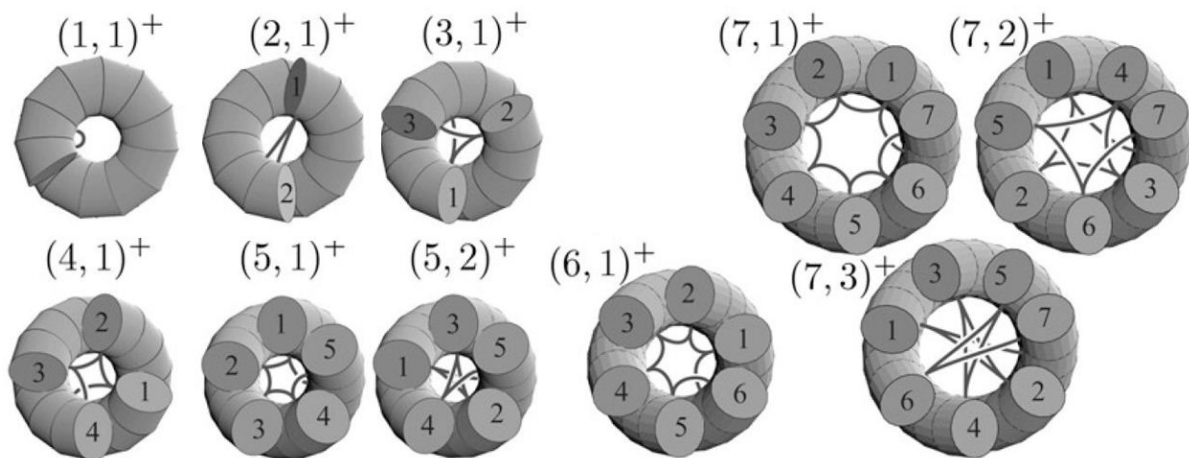
Možne strukture vlaken za 5-8 trakov (N, m)	Premer vlakna [nm]	Linearna gostota [nm ⁻¹]	Dolžina povezovalne DNA [št. baznih parov]
(5,1)	33	1,0	25 - 66
(5,2)	33	1,0	29 - 66
(6,1)	38	1,2	32 - 127
(7,1)	44	1,5	39 - 205
(7,2)	44	1,5	54 - 205
(7,3)	44	1,5	63 - 205
(8,1)	52	1,8	45 - 298
(8,3)	52	1,8	82 - 298

Tabela 1: Premer in linearna gostota nukleosomov za različne strukture trakov. Prirejeno po [3, 9].

Opazimo lahko, da se predvidena premera in linearni gostoti za vlakni s petimi in sedmimi trakovi ujemata z eksperimentom. Če opisani model pravilno opiše strukturo kromatinskega vlakna, se zastavlja vprašanje, zakaj v eksperimentu ni bilo opaziti premerov, značilnih za 6 in 8 trakov.

Na sliki 7 vidimo, da je povezovalna DNA v primerih struktur $(5,2)$ in $(7,3)$ najmanj ukrivljena, kar je energijsko zelo ugodno. Vezavo kromatina v kromatinsko vlakno povzroča privlačna interakcija med nukleosomi, nasprotujeta pa ji dva pojavi: ukrivljanje povezovalne DNA in elektrostatski odboj med posameznimi enotami povezovalne DNA.

Privlačna interakcija med nukleosomi je opisana v prejšnjem poglavju. Energijski prispevek premoščanja je približno $-3k_B T$ [3]. Elektrostatski odboj je manjši problem, kot bi pričakovali, saj ga senči privlačni potencial magnezijevih ionov. Poskusi namreč kažejo, da se kromatinsko vlakno tvori le ob prisotnosti le-teh [3]. Velik problem pa predstavlja ukrivljanje povezovalne DNA. Poglejmo si primer strukture s petimi trakovi. Pri kratki povezovalni DNA, ki ravno omogoča strukturo $(5,1)$, je energija ukrivljanja še sorazmerno majhna. Če pa dodamo še 10 ali 20 baznih parov, se mora DNA zelo ukriviti, če želi povezovati sosednja nukleosoma brez spreminjanja njunih pozicij. Ocena energije ukrivljanja povezovalne DNA, ki pripada enemu nukleosomu, je za tako strukturo med 30 in 40 $k_B T$, in to že brez upoštevanja povezovalnega histona, ki povzroči, da sta izhoda



Slika 7: Po modelu Depkena in Schiessla [9] do takih konfiguracij pride samo zaradi oblike nukleosomov. Če vzamemo v obzir še energijo ukrivljanja DNA, ki mora biti minimalna, vidimo, da sta najugodnejši strukturi (5,2) in (7,3). Tema strukturama pripadata radija 33 in 44 nm in linearni gostoti nukleosomov 1.0 /nm in 1.5 /nm. To se zelo dobro ujema s podatki iz eksperimenta Robinsona *et al.* [8]. Vzeto iz [9].

DNA pod specifičnim kotom [10]. Vsota energij je v tem primeru bistveno večja od nič, kar pomeni, da ne moremo dobiti vezanega stanja. Ključnega pomena je torej, da je povezovalna DNA čimbolj ravna.

Kromosomsko vlakno zato teži k čim večjemu možnemu m in s tem k tem bolj ravni povezovalni DNA. Zaradi tega v eksperimentu ni opaziti vlaken s premerom 38 nm. Iz tabele 1 je namreč razvidno, da je struktura (6,1) mogoča v območju dolžine povezovalne DNA med 32 in 127 baznih parov. To celotno območje pa je pokrito z unijo območij za strukturi (5,2) in (7,3), ki sta energijsko ugodnejši.

4 Struktura kromatina na velikih skalah

30 nm vlakno je približno petdesetkrat krajše od molekule DNA, ki jo vsebuje [3]. Premer svitka, ki bi ga lahko to vlakno tvorilo v fizioloških pogojih je približno 140 μm , kar je še vedno bistveno več od premera celičnega jedra [3]. To kaže na še en nivo kondenzacije vlakna, ki je potrebna, da je kromatinsko vlakno lahko v celoti pakirano v celičnem jedru.

V celičnem jedru je ena molekula DNA, ločena na 46 kosov. Ti so med celično delitvijo pakirani v kromosome, med interfazo, se pravi v času, ko se celica ne deli, pa so ločeni v domene znotraj celičnega jedra in se ne prepletajo [3]. Aktivni del kromatina, ki je redkeje pakiran, imenujemo eukromatin, neaktivni del, pakiran zelo gosto, pa heterokromatin. Jedro ni nikoli povsem v ravnovesju, aktivni procesi v njem vplivajo na porazdelitev kromatina [3].

Ko celica iz interfaze preide v metafazo, se kromatin iz vseh domen sinhrono in zelo

hitro zgosti; tvorijo se kromosomi. Emanuel *et al.* v [3] navajajo nekaj možnih razlag pakiranja kromatina v domene med interfazo in v kromosome med celično delitvijo.

Prva od njih je, da je kromatin tako gosto pakiran zgolj zato, ker je omejen z jedrsko ovojnico. Ta scenarij verjetno ni pravi, saj v jedru obstajajo tudi domene, kjer ni kromatina. Drug scenarij predlaga v jedru nekakšen skelet iz proteinov ali proteinskih filamentov, na katerega se na specifičnih mestih veže kromatin. Tako naj bi bil kromatin organiziran v domene. Problem te teorije je, da takšnega skeleta eksperimentalno niso opazili.

Ena od možnih razlag je tudi že prej omenjeno premoščanje histonskih repov, ki povzročajo privlak med nukleosomi in s tem omogočajo gosto pakiranje kromosoma. Poleg tega je premoščanje zelo odvisno od naboja na repih, tega pa lahko celica uravnava. Tako je omogočeno različno gosto pakiranje za različno aktivne dele kromosoma. Tudi v tem scenariju nekatere stvari ostajajo nerazumljive. Tako struktura kromatina na veliki skali ostaja zaenkrat nepojasnjena.

5 Zaključek

Kromatin je kombinacija molekule DNA in histonskih proteinov v jedru vsake evkariontske celice. Osnovna enota kromatina je nukleosom, ki ga sestavljata oktamer histonskih proteinov, na katerega je navitega 1,75 navoja DNA, in povezovalna DNA, ki povezuje sosednje nukleosomske sredice.

Za delovanje celice je pomembno, da so vsi deli DNA lahko dostopni proteinom, denimo RNA polimerazi pri procesu transkripcije in DNA polimerazi pri procesu podvajanja. Zato je pomembno odvijanje DNA z nukleosomov. Zaradi termičnih fluktuacij se lahko eden od navojev odvijje. Zaradi pozitivno nabitih histonskih repov, ki sedaj vsi elektrostatsko delujejo le na preostali navoj, je ta zelo močno vezan. S tem je zagotovljena stabilnost strukture.

Drug pomemben proces je drsenje nukleosomov vzdolž molekule DNA. Tudi ta je pomemben pri procesu transkripcije. Drsenje poteka prek malih defektov, ki se spontano pojavijo v nukleosomski DNA. Eksperimenti potrjujejo predlagani mehanizem, kjer drsenje poteka preko torzijskih defektov. Tu med vezavnima mestoma zaradi zasuka DNA dobimo en bazni par preveč ali premalo. Če tak defekt oddifundira na drug konec nukleosomske DNA, se nukleosom efektivno premakne za en bazni par.

Nukleosomi so povezani v strukturo kroglic na vrvi, ta pa naprej v strukturo 30 nm vlakna. Privlačno interakcijo med nukleosomi, ki omogoča vezavo v kromatinsko vlakno in v strukture višjega reda lahko pojasnimo s premoščanjem histonskih repov. Sila premoščanja je močno odvisna od njihovega naboja. Ta odvisnost bi lahko bila ključna za uravnavanje gostote pakiranja glede na aktivnost posameznih segmentov DNA.

Strukturo 30 nm vlakna so opisali z različnimi modeli. Nekatere je ovrgel eksperiment, ki je pokazal, da ima pri različnih dolžinah povezovalne DNA v nekem območju premer kromatinskega vlakna le dve različni vrednosti: 33 nm za krajše povezovalne DNA in 44 nm za daljše. Ta dva premera je skupaj s še nekaterimi napovedal model trakov Depkena in Schiessla [9], ki sta iz znane geometrije nukleosomov izračunala različne

parametre za možne strukture trakov. Zaradi velike energije ukrivljanja povezovalne DNA sta dve strukturi z najmanjšim ukrivljanjem ((5,2) in (7,3)) energijsko najbolj ugodni. Predvidena premera za ti strukturi sta 33 in 44 nm.

30 nm vlakno se veže še v nadaljnje strukture. Šele tedaj je pakiranje dovolj gosto, da je celotna DNA lahko v notranjosti celičnega jedra. Med interfazo je kromatin razdeljen na 46 domen, ki se nato ob prehodu v metafazo zelo hitro spakirajo vsaka v svoj kromosom. Kaj je sila, ki povzroči to gosto pakiranje in kako je kromatin organiziran v domene je vprašanje, na katerega še ne znamo odgovoriti.

Literatura

- [1] H. Schiessel. The physics of chromatin. *J. Phys.: Condens. Matter*, 15:R699–R774, 2003.
- [2] H. Schiessel. The nucleosome: A transparent, slippery, sticky and yet stable DNA-protein complex. *Eur. Phys. J. E*, 19:251–262, 2006.
- [3] M. Emanuel, N. H. Radja, A. Henriksson, and H. Schiessel. The physics behind the larger scale organization of DNA in eukaryotes. *Phys. Biol.*, 6:025008, 2009.
- [4] H. Schiessel. Verwickelter zellkern. *Physik Journal*, 10:31–36, 2011.
- [5] F. Mühlbacher, H. Schiessel, and C. Holm. Tail-induced attraction between nucleosome core particles. *Phys. Rev. E*, 74:031919, 2006.
- [6] S. Mangenot, A. Leforestier, P. Vachette, D. Durand, and F. Livolant. Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles. *Biophys. J.*, 82:345–356, 2002.
- [7] A. Bertin, A. Leforestier, D. Durand, and F. Livolant. Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles. *Biochemistry*, 43:4773–4780, 2004.
- [8] P. J. J. Robinson, L. Fairall, Van A. T. Huynh, and D. Rhodes. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *PNAS*, 103:6506–6511, 2006.
- [9] M. Depken and H. Schiessel. Nucleosome shape dictates chromatin fiber structure. *Biophys. J.*, 96:777–784, 2019.
- [10] G. Lanzani and H. Schiessel. Out of register: How DNA determines the chromatin fiber geometry. *EPL*, 97:38002, 2012.