دانشگاه پیام نور

بیوشیمی کروماتین

مؤلفان: دکتر بهزاد لامع راد، دکتر شهریار سعیدیان

و عباس گل بداق

برای دانشجویان ارشد بیوشیمی

www.ShimiPedia.ir

فصل 1

تنظیم نسخه برداری: اهداف تقسیم شده و مکانیزم های مشترک

مقدمه

اگر ساده ترین موجود زنده در تغییرات اجتناب ناپذیری که شرایط محیطی برای او فراهم کرده، قرار گیرد باید با آن روبرو شود. این شرایط تغییرات حرارتی، pH ، قابلیت دستیابی به مواد غذایی و غیره است. مسیرهای متابولیکی ممکن است برای یک مجموعه ای از شرایط برای موجود خاصی مناسب به نظر برسد، اما برای موجود دیگر غیر ضروری یا حتی زیان آور باشد. ما اکنون می دانیم که موجودات زنده معمولاً با این مطالبات زیست محیطی از طریق تنظیم بیان ژن های اختصاصی خود را با آن وفق می دهند. برای مثال اگر موجود زنده در محیطی به طور موقت فاقد قند گالاکتوز زندگی کند، معلوم است که انرژی کمی تولید می نماید، لذا شروع به ساختن آنزیم های مورد نیاز برای متابولیزم گالاکتوز می کند. وقتی گالاکتوز در محیط فراهم شد، باید سنتز این آنزیم ها را قطع کند. البته مانند همه چیزهای دیگر، این گزینه نیز بدون هزینه نیست و مستلزم آن است که موجود زنده به موقع و در پاسخ به محیط زیست و خواسته های متابولیکی خود، ژن های خاصی را روشن یا خاموش نماید. همانطور که خواهید دید، این مکانیزم نیاز به پروتئین های خاصی دارد و سنتز این پروتئین ها در آن محل باز هم نیاز به تأمین انرژی خواهد داشت. با این حال، استراتژی های جایگزین برای همه ژن ها وجود دارند و اگر تمام ژن ها دائماً روشن باشند، این موضوع نمی تواند ثابت کند که از لحاظ تکاملی باید موجود زنده به همین ترتیب باشد و به طور کل عمومیت دارد. قطعاً این موضوع کار را ساده تر می کند و لی مقرون به صرفه نیست.

در طول چند سال گذشته، معلوم شده است که مکانیزم های بنیادین بیان ژن و تنظیم آنها بر اساس نوسانات مطالبات متابولیکی، درجه قابل توجهی از حفاظت یک موجود را در مقابل موجود دیگر نشان می دهند. این همان چیزی است که به عنوان پاداش برای دانشمندان تجربی است. ما می توانیم روی سیستم های یک مدل ساده بررسی نماییم، چون مکانیزم های خاصی ممکن است در آن سیستم حذف شده باشند، در نتیجه مطالعات به صورت امن و معقولی صورت می گیرند، البته باز هم موقعیت های پیچیده زیاد هستند. با این وجود، ما با اصول کلی شروع می کنیم و سپس بررسی آنزیمولوژی را در هنگام نسخه برداری یک موجود ساده مثل باکتری ها را آغاز می کنیم.

www.ShimiPedia.ir

بعضی از اصول کلی

اصول مرکزی

از اوایل سال 1960 پذیرفته شد که پروتئین ها از ژن ها توسط ماده حدواسط و ناپایداری به نام RNA پیامبر (mRNA) رمز گذاری می شوند. مسیر یک طرفه و ساده ای به صورت DAN ← RNA ← پروتئین را اصول مرکزی (central dogma) گویند. این اصل نیز مانند سایر اصول ممکن است کاملاً صحیح نباشد. آنزیمی که توسط retovirus رمز گذاری می شود (ویروس هایی که به جای DNA موجود در ژنوم از RNA استفاده می کنند) را reverse transcriptase می نامند. این آنزیم ها می توانند از روی الگوی RNA برای تهیه DNA عمل نمایند. اما هنوز نمونه ای در هیچ سیستمی پیدا نشده که از پروتئین برای رمز گذاری RNA یا DNA استفاده کند. اساس نسخه برداری (transcription) (یعنی سنتز RNA از روی الگوی DNA) و ترجمه (translation) (سنتز پروتئین از روی الگوی mRNA) را در شکل 1- 1 مشاهده می کنید. برخی از اطلاعات اولیه در ساختار DNA در پیوست- 1

در انتهای این فصل ارایه شده است.

نقاط کنترل بالقوه

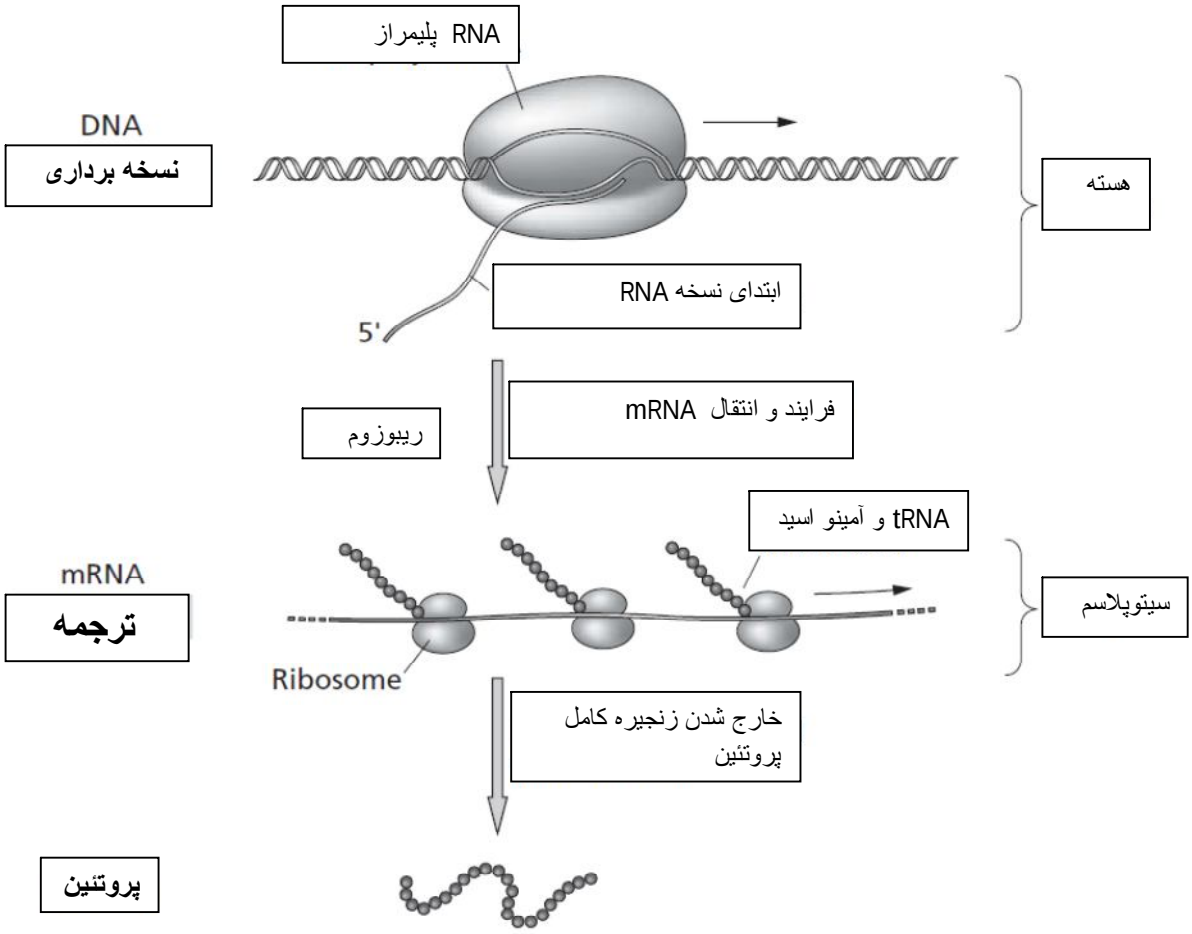
هدف نهایی از تنظیم ژن معمولاً تغییر مقدار پروتئین خاص یا گروهی از پروتئین ها است. به طور کل، این پروتئین ها هستند که بسیاری از عملکردهای مورد نیاز سلول زنده را تأمین می کنند. بنابراین واضح است که حتی از نمودار ساده ای مثل شکل 1- 1 چند نقطه برای کنترل مسیر از ژن به پروتئین وجود داشته باشد. این نقاط به صورت زیر هستند:

1. شروع نسخه برداری - کنترل می تواند توسط میزان سرعت پیوند مولکول پلیمراز (polymerase) به ژنی که می خواهد نسخه برداری شود، صورت گیرد. این اولین نقطه کنترل است و معمولاً اولین کنترل دستور کار برای سایر نقاط کنترل را صادر می کند. اگر ژن خاموش باشد، پس سایر نقاط کنترل حذف می شوند.

2. سرعت نسخه برداری. یعنی سرعتی که در آن پلیمراز در طول ژن پیشرفت می کند. در نگاه اول این محل نقطه کنترل به نظر نمی رسد. واکنش های آنزیمی بستگی به متغییرهایی مانند دما، غلظت سوبسترا، pH ، و غیره دارد. برخی از آنها خارج از کنترل

www.ShimiPedia.ir

سلول قرار دارند و بدیهی است که هیچ یک از آنها در تنظیم نسخه برداری ژن خاص دخالت ندارند. به هر حال، پروتئینی در سلول هست که نقش اساسی در مرحله طویل شدن نسخه برداری بعهده دارد. چند پروتئین از جمله آنهایی که اخیراً شناسایی شده اند در سلول های یوکاریوتی وجود دارند. بعضی از آنها نقش عمومی دارند و برخی دیگر برای ژن های خاصی مورد نیاز هستند. چنین پروتئین هایی ممکن است به نوبه خود نقش مهمی در کنترل نسخه برداری داشته باشند.



شکل 1- 1 مسیر از ژن تا پروتئین.

3. خاتمه زودرس نسخه برداری – این مرحله در باکتری ها اتفاق می افتد و به آن مرحله تضعیف (attenuation) گویند. این عمل ذاتاً اسراف (از بین بردن بخشی از نسخه برداری) است و به نظر می رسد که برای بیان الگوهای بسیار کوچک مورد استفاده قرار می گیرد. برای مثال، حذف مقادیر کوچکی از نسخه برداری ژن هایی که قبلاً برگردانده شده بود، صورت می گیرد.

www.ShimiPedia.ir

4. پایداری و پردازش mRNA - پایداری mRNA در سلول ها متفاوت است و اغلب دلیل منطقی برای آن وجود دارد. پروتئینی که فقط برای مدت کوتاهی مورد نیاز سلول است توسط یک پیغام ناپایدار به بهترین حد ممکن ساخته می شود و با خاموش شدن ژن، سنتز آن کاهش می یابد (نمونه خوبی که می توان در مورد کنترل از طریق پایداری قابل تغییر RNA ای که محصول ژن Xist در موش است، در فصل 11 روی آن بحث خواهد شد). پایداری را با در نظر گرفتن نواحی غیر کد شونده مولکول RNA ، می توان تا حدی تعیین کرد. در موجودات عالی، بسیاری از نسخه های RNA همانطور که از محل سنتز شده روی DNA به طرف محل هایی که ترجمه صورت می گیرد حرکت می کند، تغییر می نماید. در سلول های یوکاریوتی، این عمل با برش در RNA و سپس چسباندن آنها به یکدیگر (پیرایش یا splicing) انجام می شود، در نتیجه می تواند mRNA های سیتوپلاسمی مختلفی به دست آید و از یک ژن ، پروتئین های مختلفی تهیه گردد.

5. کنترل های ترجمه – mRNA ممکن است قطع شود یا ترجمه ممکن است به طور انتخابی مسدود گردد. برای مثال، mRNA های هیستونی در اووسیت ارکین دریایی در هسته اولیه فقط بعد از لقاح قطع می شود و داخل سیتوپلاسم رها می گردد.

فهرستی که از دخالت ترکیبات مختلف تهیه شده مختصر و مطمئناً ناقص است و فقط برای تأکید محل کنترل شروع نسخه برداری در نظر گرفته شده است. این نقطه، اولین محل در رتبه بندی است و در سلول مکانیزم هایی برای تنظیم مقادیر پروتئین ها (یا RNA هایی که عمل پیامبری ندارند) وجود دارد. با این حال، همانطور که خواهید دید، کنترل شروع نسخه برداری اغلب مهمترین قسمت را تشکیل می دهد.

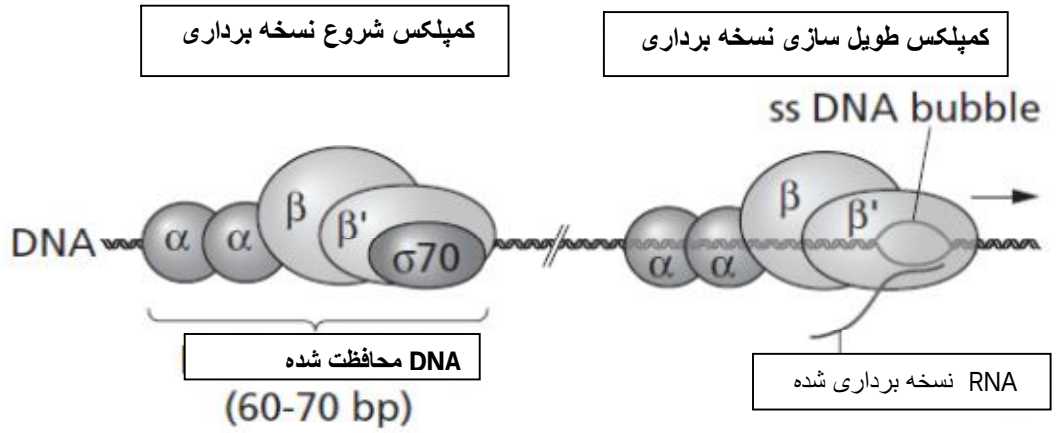
www.ShimiPedia.ir

نسخه برداری در پروکایوت ها

RNA پلیمراز باکتری

RNA پلیمراز اولین ترکیبی است که رهبری مسیر از ژن به پروتئین را انجام می دهد. آنزیم باید (در محدوده این دستور) توالی DNA را تشخیص دهد تا بتواند به آن پیوند یابد و از DNA دو رشته ای جدا شود (البته فقط یکی از رشته ها به عنوان رشته کد کننده عمل می کند). ریبو نوکلئوزید تری فسفات ها بر طبق بازهای مکمل خود که روی رشته کد کننده هستند، مرتب می شوند و تشکیل ستون اصلی حاوی قندهای فسفات دار را در زنجیره در حال رشد RNA کاتالیز می نمایند، و بالاخره با حرکت در طول زنجیره DNA عمل خود را به پایان می رساند. تمام این توانایی ها برای پلیمراز ضروری است و برای یک سلول زنده، حیاتی می باشند. اما از آنجا که تمرکز ما به تنظیم نسخه برداری است بنابراین در درجه اول کنترل اتصال پلیمراز به DNA و همچنین تمرکز روی اولین مرحله نسخه برداری از اهمیت خاصی برخوردار است.

ساختار اصلی RNA پلیمراز در باکتری کوچکی مثل E.coli را در شکل 1- 2 مشاهده می کنید. جرم مولی این آنزیم kDa 465 است. و حاوی چهار زیر واحد α (دو تا)، β ، β' ، و σ می باشد. در نگاه اول ممکن است ساختار پیچیده ای داشته باشد، اما با توجه به وظیفه آنزیم ، مدل ساده ای است.



شکل 1- 2 زیر واحدهای RNA پلیمراز باکتری ها

www.ShimiPedia.ir

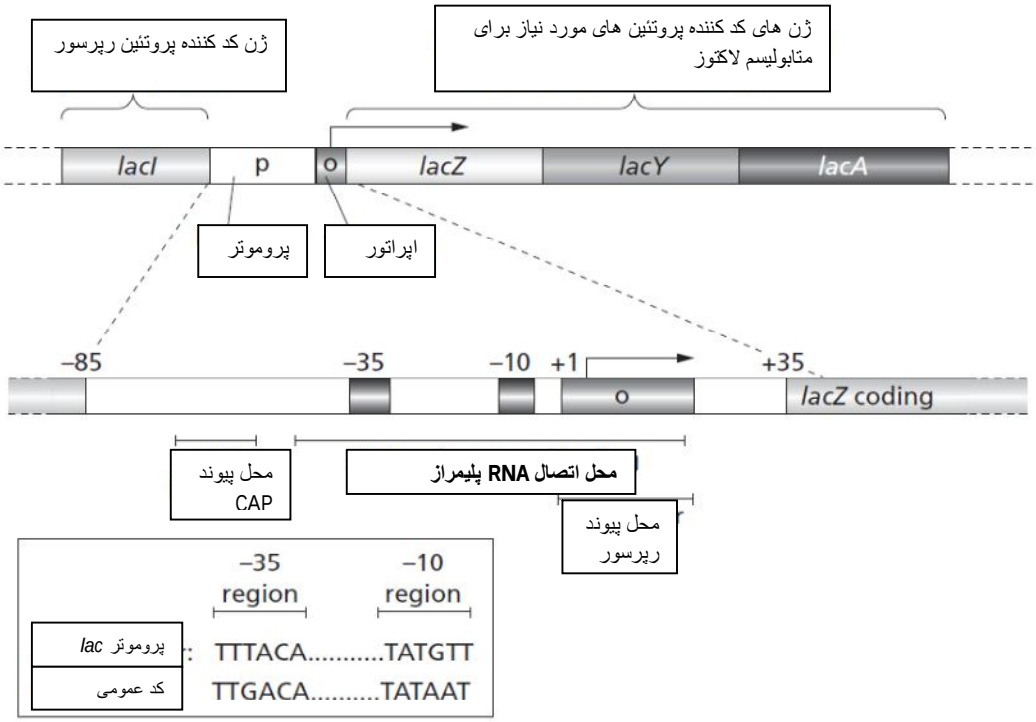
پروموترهای باکتری

RNA پلیمراز باید قادر به تشخیص و اتصال به توالی DNA در ناحیه فرادست (upstream) در ژن ها باشد. برای این قسمت از ژن محل دقیقی نسبت به نقطه شروع نسخه برداری در نظر گرفته شده است. توالی DNA در مجاورت محل شروع نسخه برداری (محلی که پلیمراز و سایر پروتئین ها می توانند متصل شوند) به نام پروموتر (promoter) می شناسند. تشخیص این قسمت با زیر واحد σ است. (در E.coli هفت زیر واحد σ مختلف وجود دارد که اغلب از σ70 استفاده می کند). در باکتری ها اغلب یک پروموتر قادر است که چندین ژن ساختاری را کنترل کند. آنزیم پلیمراز از تمام ژن ها عبور می کند و تولید یک نسخه از RNA را می نماید. عمل تولید پروتئین های مجزا از این نسخه را ماشین سنتز پروتئین گویند. ژن های ساختاری بهم متصل شده معمولاً پروتئین هایی که در یک مسیر متابولیکی شرکت دارند را رمز گذاری می کنند. بنابراین منطقی است که تمام آنها با هم تنظیم شوند. واحد هماهنگی کل یعنی پروموتر، ژن های ساختاری ، و بالاخره هر ناحیه ای که کنترل اضافی را انجام دهد را تحت عنوان اپرون (operon) نامگذاری کرده اند. نمونه ای از آن را در شکل 1- 3 به نام اپرون لاکتوز (*lac* operon) مشاهده می کنید. این اپرون حاوی ژن های ساختاری و تمام آنزیم های کد کننده ای است که در متابولیسم لاکتوز دخالت دارند. همراه با پروموتر، یک ژن کد کننده پروتئین که می تواند باعث قطع نسخه برداری شود (repressor) ، و محلی که پروتئین قطع کننده بتواند متصل شود، دیده می شود. ما با تنظیم اپرون lac در قسمت بعد سروکار خواهیم داشت.

توالی پروموتر در E.coli و سایر باکتری ها متنوع است. بعضی از آنها قوی (strong) (یعنی میل ترکیبی آنها به پلیمراز زیاد است) و بعضی ضعیف (weak) (یعنی میل ترکیبی آنها به پلیمراز کم است) هستند. علی رغم این اختلافات، پروموتر توسط زیر واحد σ70 مربوط به RNA پلیمراز تشخیص داده می شود. به ویژه، دو توالی شش بازی در موقعیت های 10 و 35 جفت باز در ناحیه فرادست نسبت به شروع نسخه برداری وجود دارند (یعنی در موقعیت های 10 - یا 35-) که در پروموترهای مختلف کمی با هم فرق می کنند. این توالی ها را در شکل 1- 3 مشاهده می کنید. توالی های توافقی (consensus) برای این دو ناحیه TATAAT (10-) و

TTGACA (35-) هستند. تعداد زیادی از پروموترهای باکتریایی، این دو ناحیه را دارند. پروموتری که در شکل 1- 3 (*lac* promoter) نشان داده شده است، نمونه ای از آنهاست.

www.ShimiPedia.ir



شکل 1- 3 اپرون *lac* . فلش ها محل شروع و جهت نسخه برداری را نشان می دهند. هر RNA نسخه برداری شده شامل ژن های *lacA* ، *lacY* ، *lacZ* در یک طول RNA است. ناحیه پروموتر محلی است که پروتئین به آن متصل می شود. بازهای DNA فرادست (5́) نسبت به اولین باز (با عدد 1+ نشان داده شده است)را با اعداد منفی و بازهایی که در ناحیه پایین دست قرار دارند با اعداد مثبت مشاهده می کنید. توالی که زیر واحد σ در RNA پلیمراز می تواند متصل شود (در محدوده 35- و 10-) را در شکل می بینید.

به غیر از توالی های 10- و 35- یک ناحیه دیگری وجود دارد که برای اتصال پروتئین CAP می باشد. این پروتئین در تنظیم نسخه برداری دخالت دارد.

در باکتری های جهش یافته که بازهای ناحیه محافظت شده آنها تغییر کرده است، اتصال RNA پلیمراز نیز تغییر می کند. جایگزینی بازها در ناحیه غیر محافظت شده یعنی در فواصل نواحی فوق تأثیری نخواهد داشت، اما اگر این ناحیه کوتاهتر یا بلندتر شود (توسط وارد کردن یا حذف کردن بازها) ، مطالعات نشان دادند که در اتصال پلیمراز تأثیر دارد. توضیحی که برای این موضوع می توان داد این است که در قرار گرفتن پلیمراز و اتصال آن به پروموتر مؤثر است. نواحی خاصی روی پروتئین σ می

www.ShimiPedia.ir

تواند با محل های 10- و 35- ارتباط پیدا کند و این ارتباط دارای درجه ویژگی بازی است (یعنی فقط ترکیب بعضی از بازها اجازه می دهد که این اتصال اتفاق افتد). فواصلی در DNA وجود دارند که باعث می شوند، نواحی محافظت شده از هم جدا شده و فواصل صحیحی نسبت بهم به وجود آیند.

هیچ باز خاصی که مورد نیاز همه پروموترهای σ70 باشد، هنوز پیدا نشده است. این موضوع نشان می دهد آنچه که پروتئین تشخیص می دهد و آن را قادر می سازد که به DNA پیوند یابد، ترکیب توالی DNA و کانفورماسیون آن است، به جای این که آرایه خاصی از بازها باشد (روشی که پروتئین ترادف خاصی از DNA را تشخیص می دهد، بعداً توضیح داده خواهد شد). به نظر می رسد که چندین ترکیب مختلف از بازها می توانند پیوندهای مناسبی برای پروتئین به DNA فراهم کنند.

این موضوع ترجیحاً ویژگی پیوند را نشان می دهد و شدیداً در تضاد با ویژگی های نشان داده شده توسط سایر پروتئین هایی است که قادر به پیوند با DNA هستند، می باشد. از طرف دیگر، σ70 باید به پروموترهای مختلفی پیوند یابد. اگر همه آنها نواحی مشابهی داشته باشند، پس باید به آنها با میل ترکیبی یکسان متصل شوند و در ضمن سرعت شروع نسخه برداری یکسان باشد. این چیزی نیست که در تمام آنها لازم است. بعضی از ژن ها باید بارها نسخه برداری شوند، در حالیکه برخی دیگر به ندرت یا تحت شرایط خاصی نسخه برداری می گردند. در دو مورد آخر، پروموتر ضعیف باید ببیند که به چه احتیاج دارد. در واقع، جهش هایی که باعث تبدیل پروموتر ضعیف به قویتر می شوند اغلب برای سلول زیانبار هستند. بنابراین اشتباه است که فکر کنیم پروموتر ضعیف درجه دوم یا بی فایده است، پس باید در انتظار تکامل در جهت بهبود عملکرد آنها بود. آنها مملو از نقش ها و ویژگی های حیاتی هستند.

نقش فاکتور σ در تشخیص پروموتر

پروموترهای قوی و ضعیف سطح اول تنظیم ژن در باکتری ها را تشکیل می دهند (یعنی راندمانی که ژن های مختلف می توانند نسخه برداری کنند). نقش فاکتورهای σ در ابتدا مربوط به شروع نسخه برداری از طریق مکان یابی صحیح پلیمراز مابین پروموتر است. فاکتور σ70 شایعترین فاکتور سیگما در E.coli است، اما شش فاکتور دیگر هم وجود دارند که می توانند جایگزین σ70 در RNA پلیمراز شوند (هولو آنزیم) (یعنی کمپلکس پلیمراز فعال با زیر واحدهای کاتالیتیکی و تنظیمی). هر فاکتور σ در آنزیم پلیمراز توانایی تشخیص توالی خاصی روی پلیمراز را دارد، در نتیجه شروع نسخه برداری از گروه معینی از ژن ها را انجام می دهد.

www.ShimiPedia.ir

شواهدی وجود دارند که فاکتورهای σ نقش جدا کردن دو رشته DNA را در اطراف ناحیه 10 بازی، بعهده دارد. هر وقت صحبت از جدایی دو رشته شد، اشاره به این دارد که DNA دو رشته ای از کمپلکس بسته به کمپلکس باز تبدیل شود. این عمل برای نسخه برداری ضروری است. بنابراین فاکتور σ بعد از این که نسخه برداری در حدود 10 باز را انجام داد می تواند جدا شود، پس واضح است که برای ادامه عمل جدا سازی دو رشته DNA و مراحل کاتالیتیکی سنتز RNA با پیشرفت پلیمراز به این فاکتور احتیاج نیست. به همین منظور این فاکتور را فاکتور شروع نسخه برداری در نظر گرفته اند.

در برخی موارد، سرعت نسخه برداری توسط اتصال σ70 قابل تنظیم است و هنوز نیز به افزایش سرعت بستگی دارد. ژن های کد کننده RNA هایی که قسمتی از زیر واحدهای ریبوزومی را تشکیل می دهند (ژن های rRNA) سریع ترین نسخه برداری و قویترین پروموترها را در E.coli دارند. اما آنها توالی 40 تا 60 باز در قسمت فرادست نسبت به محل شروع نسخه برداری دارند که به زیر واحدهای α در RNA پلیمراز فعال پیوند می یابند. این توالی برای سرعت بالای نسخه برداری لازمند. جهش در زیر واحد α موجب کاهش نسخه برداری ژن های rRNA می شود ولی در نسخه برداری سایر ژن ها اثر کمی می گذارد. از پنج زیر واحد RNA پلیمراز فعال، سه زیر واحد آن (منظور σ و دو α است) از طریق اتصال به توالی انتخاب شده ای روی DNA تنظیم شروع نسخه برداری دخالت می کنند.

اگر چه کنترل از طریق نقاط قوت پروموترهای مختلف انجام می شود ولی انتخاب فاکتورهای σ برای اولین مرحله نسخه برداری مهم است. به هر حال، تمام نیازهای مربوط به نسخه برداری حتی نیازهای ساده نیز در سلول برآورده نمی شوند. باکتری فعال باید قادر به وفق دادن مداوم خود نسبت به تغییر محیط زیست باشد، مخصوصاً نسبت به تغییرات مواد غذایی ویژه ای که در اختیاراو قرار می گیرد. این عمل با ساختن آنزیم های مناسب یا خاموش کردن ساخت موادی که به آن نیاز ندارد، صورت می گیرد. این تنظیم مستمر در پاسخ به محیط زیست نشانه نیاز آنها به تنظیم اضافی است.

www.ShimiPedia.ir

تغییرات ژنتیکی در باکتری ها

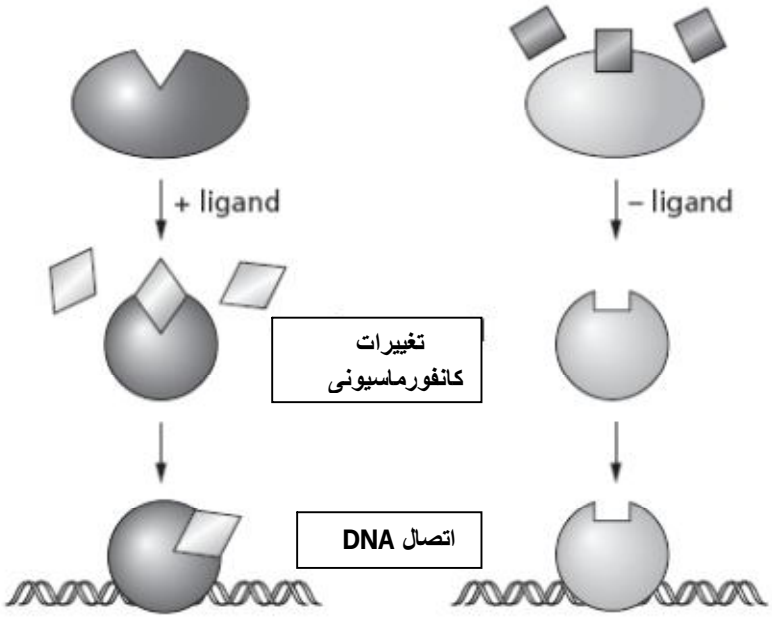
پروتئین های پیوندی به DNA متکی به لیگاند

مکانیزم پروتئین هایی که قادرند ساختار خود را تغییر دهند تا عمل خاصی صورت گیرد معمولاً به توانایی اتصال آنها بستگی دارد و به دو صورت است: (1) آنها می توانند به توالی خاصی روی DNA متصل شوند، (2) آنها توسط متابولیت توانایی اتصال پیدا می کنند (این متابولیت ممکن است آمینو اسیدی مثل تریپتوفان یا قندی مثل لاکتوز باشند). در این کتاب مولکولی که به پروتئین پیوند می یابد را لیگاند (ligand) می گوییم. آنچه که باعث ویژگی این پروتئین می شود، داشتن محل پیوند به لیگاند است، در نتیجه کانفورماسیون پروتئین تغییر می کند. این لیگاند ممکن است اثر مثبت یا منفی جهت اتصال پروتئین به DNA داشته باشد (شکل 1-4). پروتئین هایی که به DNA متصل می شوند گاهی از نسخه برداری ممانعت بعمل می آورند (اغلب محل پروموتر را مسدود می کنند). از طرف دیگر، پروتئین پیوندی به DNA می تواند با اتصال به پلیمراز عمل آن را ساده تر کند (شاید توسط اتصال مستقیم به یکی از زیر واحدهای پلیمراز و نگهداشتن آن در محل خود). به این ترتیب، نسخه برداری از ژن های انتخاب شده می تواند در حضور یا عدم حضور لیگاند کاهش یا افزایش یابد. اپرون *lac* در E.coli مثال خوبی از این نوع است.

تنظیم متکی به لیگاند در اپرون *lac*

اپرون *lac* (شکل 1- 3) توسط هم فعال کننده و هم بازدانده تنظیم می شود (هر یک از آنها از طریق لیگاند عمل می کنند). موقعی که مقدار لاکتوز کم است، بازدارنده *lac* (بدون اتصال به لاکتوز) به محل اپراتور که جنب پروموتر *lac* قرار دارد، متصل می شود و از نسخه برداری ژن های کد کننده آنزیم هایی که در متابولیسم لاکتوز دخالت دارند، ممانعت بعمل می آورد. وقتی مقدار لاکتوز افزایش یافت، تعداد پروتئین های بازدارنده *lac* که به قند پیوند یافته اند، زیاد می شود. بازدارنده های فاقد لیگاند (یعنی لاکتوز آزاد) موجب می شوند که تعداد اپراتورهای آزاد شده از بازدارنده زیاد شوند و نسخه برداری آغاز گردد (شکل 1- 5). بدین ترتیب از اتصال بازدارنده جهت شروع نسخه برداری جلوگیری می شود ولی کافی نیست. بعلاوه، شروع نسخه برداری نیاز به پروتئین فعال کننده دارد

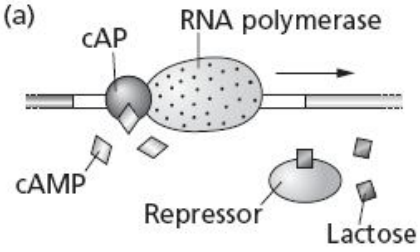
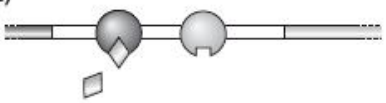
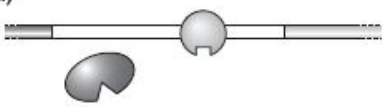
www.ShimiPedia.ir



شکل 1- 4 اتصال لیگاند می تواند کانفورماسیون بعضی از پروتئین ها را تغییر دهد، در نتیجه توانایی اتصال به DNA در آنها به وجود می آید. بعضی از پروتئین ها می توانند به مولکول های کوچک در محل های خاصی پیوند یابند (قندها مثل گالاکتوز یا استروئیدها مثل اسید رتینوئیک). اتصال لیگاند (در شکل به صورت ◊ یا مربع توپر نشان داده شده است)می تواند موجب تغییر شکل پروتئین شود (در شکل به صورت گرد یا بیضی دیده می شوند). بعی از پروتئین ها محل های پیوندی برای مولکول های کوچک و DNA دارند. بعضی دیگر وقتی لیگاند خاصی به آنها متصل می شود توانایی اتصال به DNA پیدا می کنند (شکل سمت چپ). برخی پروتئین ها وقتی به لیگاندی متصل نیستند توانایی اتصال به DNA خواهند داشت (شکل سمت راست).

که به پروموتر در قسمت فرادست به محل پیوندی RNA پلیمراز متصل می شود. بنابراین، اتصال فعال کننده، به لیگاند احتیاج دارد. در این مورد لیگاند مورد نظر نوکلئوتیدی است که به آن AMP حلقوی (cAMP) گویند (شکل 1- 5، a تا d).

www.ShimiPedia.ir

Proteins bound to promoter region	Lactose	Glucose	cAMP	*lacZ* transcription
(a) 	+	−	+	Yes
(b)	+	+	−	No
(c) 	−	−	+	No
(d) 	−	+	−	No

شکل 1- 5 تنظیم نسخه برداری *lacZ* توسط لاکتوز و AMP حلقوی.

طبق معمول، دلیل زیستی خوبی برای مکانیزم کنترل آن وجود دارد. آنزیم β- گالاکتوزیداز تبدیل لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز (که بعد به خودی خود تبدیل به گلوکز می شود) را بعهده دارد. گلوکز (کارآمدترین) منبع انرژی برای باکتری هاست. بنابراین تا موقعی که گلوکز در محیط کشت وجود دارد، بدیهی است که ژن ها، متابولیسم لاکتوز را خاموش نگه دارند (چه لاکتوز در محیط باشد چه نباشد). وقتی مقدار گلوکز کم است، نسخه برداری از ژن های وابسته به فعال کننده های پیوند شده به اپراتور انجام می شود. این عمل توسط ساخت فعال کننده هایی انجام می شود که خودشان نسبت به گلوکز حساس باشند، ولی در واقع توسط افزایش ماده شیمیایی تنظیم گردند (وقتی مقدار گلوکز کم شود و cAMP افزایش یابد). این ماده پیام رسان دوم در سلول های یوکاریوتی است و نقش مهمی در تنظیم بعضی از ژن های یوکاریوتی دارد. پروتئین فعال کننده را CAP (catabolite

www.ShimiPedia.ir

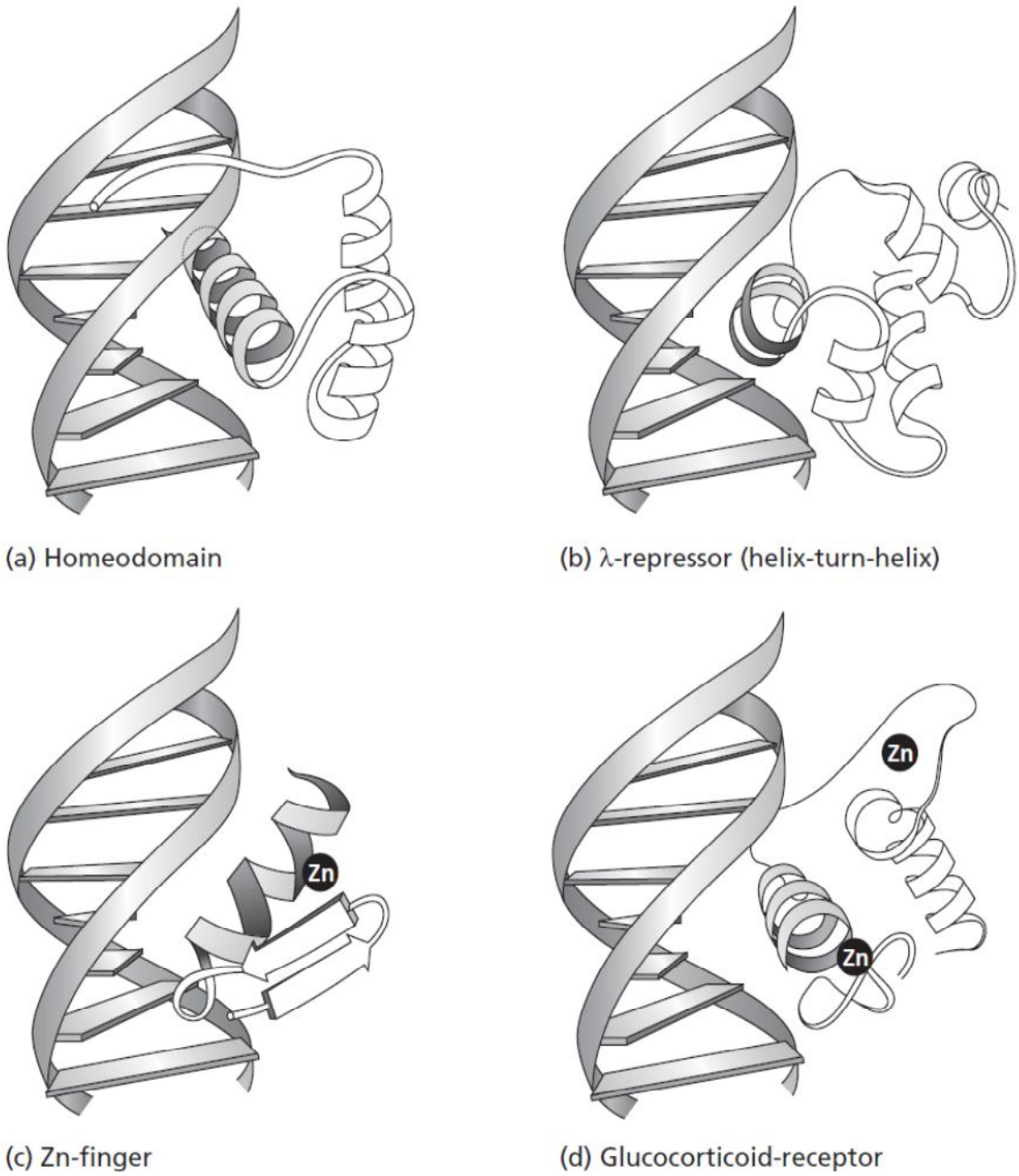
activator protein) می نامند (این نام، قبل از دانستن نقش cAMP روی آن گذاشته بود). در نگاه اول، استفاده از cAMP به جای گلوکز به نظر می رسد غیر ضروری باشد. احتمالاً به دلیل پایین آمدن گلوکز، فعالیت برای متابولیسم لاکتوز لازم نیست بلکه برای استفاده از منابع کربن دیگر لازم می شوند.

این چرخه باید قادر به یکپارچه سازی مجموعه ای از یک سری خواسته های متابولیکی باشد و به جای گلوکز، cAMP انتخاب مناسب تری است. با این توضیحات، واقعیت این است که اگر مقدار گلوکز کم شود و مقدار cAMP بالا رود، بنابراین فعال کننده کمپلکس cAMP به محل نزدیک به پروموتر *lac* پیوند می یابد و اتصال RNA پلیمراز را آسان می کند (شکل 1- 5، a). این موضوع نشان می دهد که ارتباط مستقیم بین cAMP – CAP و پلیمراز وجود دارد.

اندرکنش های پروتئین با DNA

نسخه برداری و تنظیم توسط اندرکنش های بین پروتئین و DNA انجام می شود و بعد از آن باید مرتب سازی یکی نسبت به دیگری صورت گیرد. همانطور که مشاهده می شود، پروتئین های پیوندی به DNA تعیین می کنند که یک ژن نسخه برداری شود یا نه. اگر نسخه برداری گردد، به چه میزان نسخه برداری انجام شود. در طول چند سال گذشته ، روش های مختلفی برای تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین های پیوندی به DNA ارایه شد و اطلاعات جدید ارزنده ای در اختیار محققان قرار دادند. خوشبختانه، برخی از اصول با ارزش از آنها پدید آمده است. پروتئین های پیوندی به DNA ، صرفنظر از منشاء آنها، معمولاً در یکی از چهار گروه زیر قرار می گیرند و این گروه ها در موتیف (motif) ساختاری پیوند به DNA مشترکند. این چهار گروه را در شکل 1- 6 مشاهده می کنید. در مورد هر یک از آنها در قسمت های مختلف این کتاب توضیح می دهیم. زنجیره های جانبی آمینو اسیدها با جفت بازهایی که در لبه مارپیچ DNA قرار دارند، اتصال برقرار می کنند. این اتصال در ناحیه شیار بزرگ مارپیچ $-\alpha$ اتفاق می افتد. این پیوند موجب تغییر در ساختار DNA و پروتئین می گردد. (در نتیجه اندرکنش های دیگری به وجود می آید که موجب پایداری می شود). اغلب پروتئین های پیوندی به DNA جزء خانواده HTH (helix- turn- helix) هستند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 1- 6 ساختار موتیف های پروتئین های پیوندی به DNA که به چهار گروه طبقه بندی شده اند.

www.ShimiPedia.ir

تشخیص DNA توسط پروتئین های helix- turn- helix

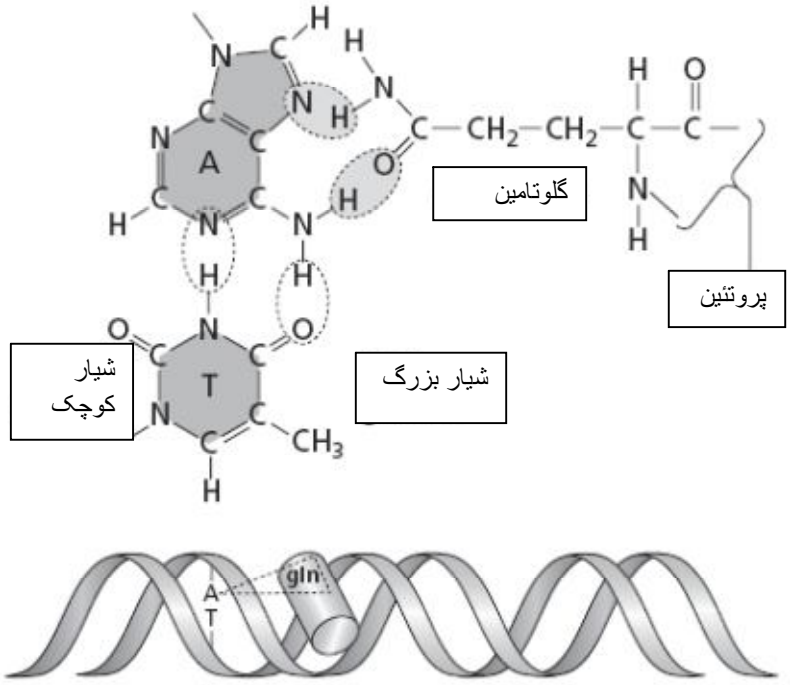
ناحیه پیوند DNA به پروتئین های HTH حاوی دو قسمت در مارپیچ α است که توسط یک قسمت کوتاه یا همان turn (که منطقه بدون ساختار است) از هم جدا می شوند.

کل موتیف از 20 آمینو اسید تشکیل شده است (البته قسمت turn می تواند متفاوت باشد). در پروتئین HTH دو مارپیچ α ممکن است عملکردهای متفاوتی از خود نشان دهند. یکی از این عملکردها که در اکثر آنها دیده می شود بدین صورت است (این حالت در

λ – repressor DNA وجود دارد): زنجیره جانبی گلوتامین ایجاد پیوندهای هیدروژنی با ادنین و تیمین در شیار بزرگ مارپیچ DNA می کنند (شکل 1- 7). پیوندهای هیدروژنی بسیار ضعیف هستند (حدود $1\ kcal\ mol^{-1}$ در آب و در مقایسه با پیوندهای یونی که برابر با $3\ kcal\ mol^{-1}$ می باشد) و چند پیوند هیدروژنی در مارپیچ α و توالی DNA حالت پایداری به وجود نمی آورند. آنها باعث می شوند که در پروتئینی که در حال اسکن کردن DNA است وقفه ایجاد می کند. پایداری بیشتر از دو طریق به وجود می آید: (1) آمینو اسیدها، وجود گروه های آمینی در انتها، مارپیچ موجود در HTH و اتصال آن به دُمین پیوندی DNA ، گاهی ساختار قند و فسفات، آمینو اسیدهایی که خارج از دُمین پیوندی DNA قرار دارند ممکن است در پایداری شرکت داشته باشند. این اندرکنش ها متکی به تشخیص ویژه در توالی (sequence- specific recognition) هستند. (2) قدرت پیوند پروتئین های HTH نیز می تواند در پایداری دخالت کند. پایداری آنها وقتی به صورت دیمر در می آید بیشتر هم می شود (یعنی یک جفت از زیر واحدهای مشابه). اتصال به صورت همو دیمر باعث می شود که تغییرات انرژی آزاد دو برابر شود، اما همین موضوع موجب افزایش تعادل (یا میل ترکیبی) نیز می گردد. (رابطه بین ثابت تعادل، K ، و انرژی آزاد، ΔG° چنین است: $e^{-\Delta G^\circ/RT}$ که در آن R ثابت گازها و T درجه حرارت مطلق است).

از مطالعات مربوط به توالی DNA ، اطلاعات اولیه در مورد اتصال پروتئین های HTH به صورت دیمر به دست آمد. این پروتئین ها معمولاً متقارن (یعنی از دو محل با ترادف شبیه هم) ولی از دو جهت مخالف به DNA متصل می شوند (شکل 1- 8). برای ایجاد این شکل از اتصال باید ساختار سوم پروتئین ها مکمل هم باشند تا بتوانند به B – DNA متصل شوند (پیوست 1-1). همانطور که در شکل

www.ShimiPedia.ir



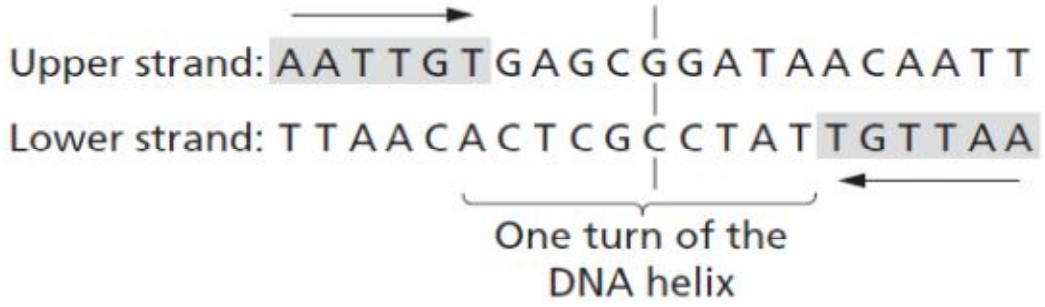
شکل 1- 7 اتصال زنجیره های جانبی پروتئین با بازها در DNA . باقیمانده ویژه ای در مارپیچ DNA مربوط به پروتئین λ – repressor دقیقاً در شیار بزرگ DNA قرار می گیرد (قسمت پایین شکل فوق). بنابراین اتم هیدروژن و اتم اکسیژن در زنجیره جانبی قادر است با اتم های نیتروژن و هیدروژن باز ادنین پیوندهای هیدروژنی ایجاد کنند (قسمت بالای شکل فوق). این پیوندها به صورت سایه دار نشان داده شده اند.

1 - 9 مشاهده می کنید، ساختار دیمر به گونه ای است که این دو دُمین پیوندی در DNA در موقعیت دقیق خود قرار گیرند تا بتوانند در شیار بزرگ اندرکنش ایجاد نمایند.

www.ShimiPedia.ir

پروتئین های پیوندی به DNA از دُمین های عملکردی مختلف ساخته شده اند

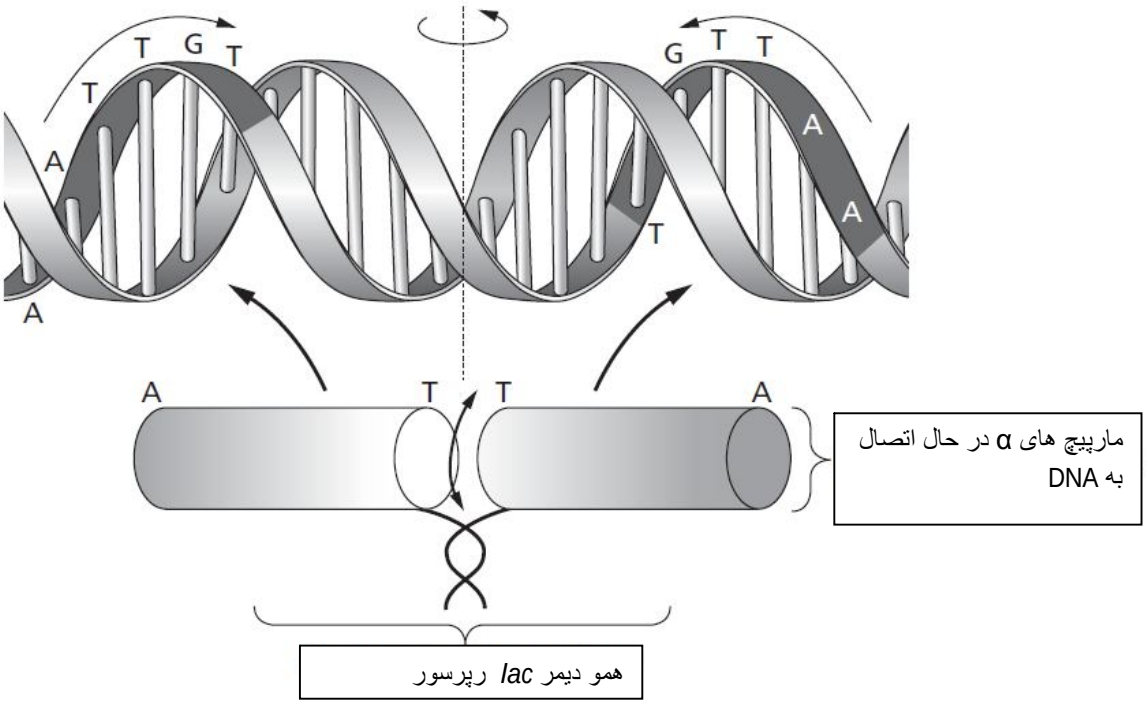
اگر پروتئین هایی مثل بازدارنده *lac* بخواهند کارشان را صحیح انجام دهند باید اتصال های آنها به درستی صورت گیرد. برای مثال بازدارنده باید به لاکتوز پیوند یابد تا بتواند شکل خود را تغییر دهد در نتیجه با سایر پروتئین های بازدارنده *lac* ایجاد دیمر یا تترامر نماید. نواحی ویژه (دُمین ها) در پروتئین ها این عمل را انجام می دهند.



شکل 1- 8 ترادف اپراتور DNA .

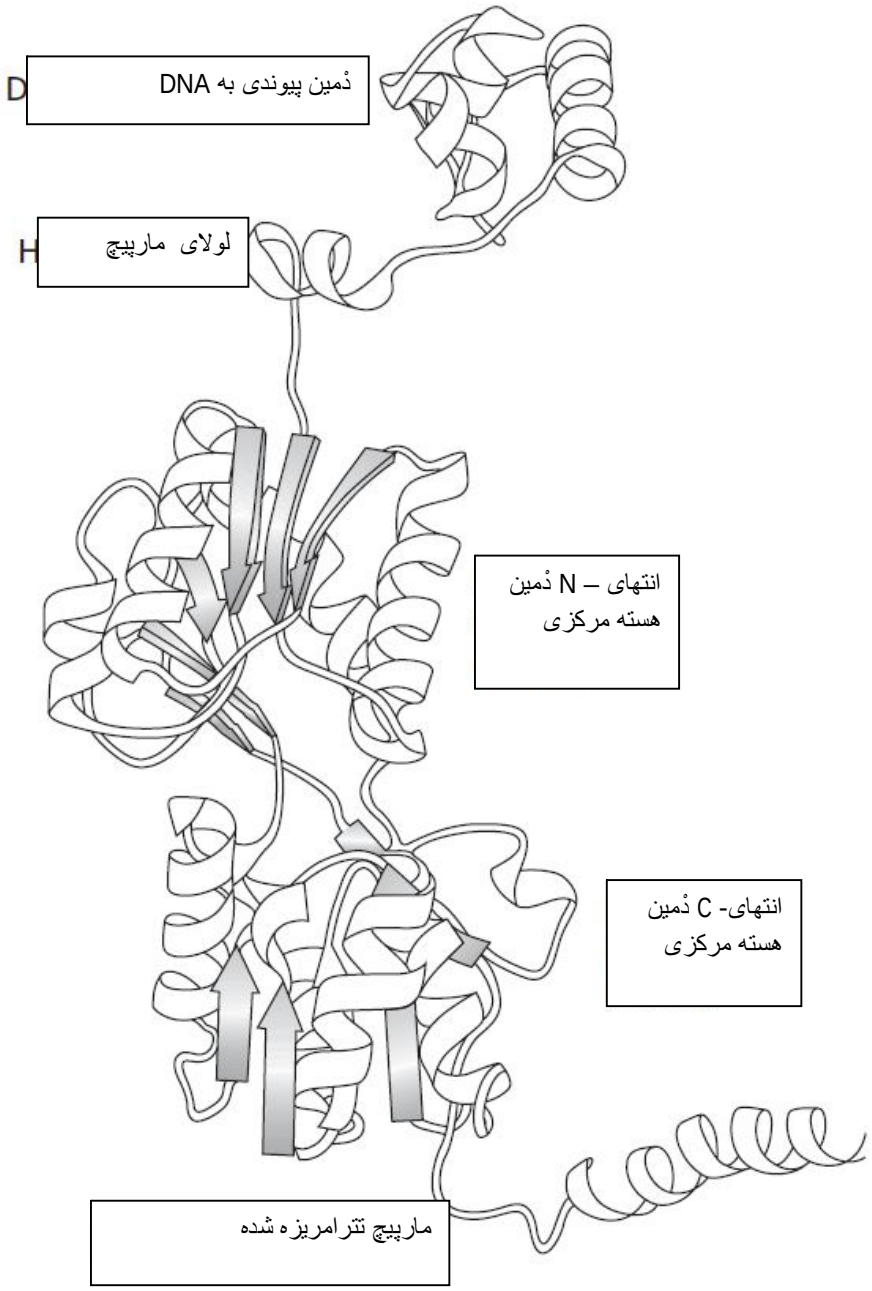
دُمینی از بازدارنده *lac* را در شکل 1- 10 مشاهده می کنید. ارجاع خاص به عملکردهای دُمین ها معمولاً از مطالعات مربوط به ایجاد جهش به دست می آیند. برای مثال، جهش هایی که موجب حذف یا تغییر در ناحیه 3 مارپیچ می شوند، عمل پیوند به DNA را از بین می برند، در حالیکه جهش هایی که در انتهای C- صورت می گیرند از تشکیل تترامر جلوگیری می کنند. (نقش دقیق عملکرد تترامر همچنان مورد بحث است). آمینو اسیدهای مهم (تعیین کننده) می توانند اثراتی که به واسطه جایگزینی آنها با سایر آمینو اسیدها در عملکردشان حاصل می شود، مشخص نمود و سپس با تجزیه و تحلیل دقیق ساختاری مورد تأیید قرار داد. امروزه مبادله دُمین در آزمایشگاه انجام پذیر است. برای مثال، توالی DNA ای که دُمین پیوندی به DNA را در پروتئین خاصی کد گذاری می کنند را می توان در دُمین دیگری که مربوط به اتصال به لیگاند است، پیرایش نمود. وقتی ژن جدید را به سلولی وارد کنیم و بیان نماییم، تولید پروتئین هیبرید می کند که خواصی از خود نشان می دهد که عملکرد دُمین آن جالب خواهد بود.

www.ShimiPedia.ir



شکل 1- 9 توالی بازهای متقارن در اپراتور *lac* اجازه می دهد که پروتئین بازدارنده بتواند با همودیمر پیوند به وجود آورد. دو محل پیوند به DNA در مارپیچ ها در امتداد هم قرار دارند، در نتیجه آنها دقیقاً در شیارهای بزرگ شکل B- DNA جای گیرند (محلی که با توالی بازدارنده *lac* در ارتباط است AATTGT). دو پیچ در جهت مخالف هم هستند و دیمر به صورت متقارن چرخیده است (توسط خط نقطه چین در شکل نشان داده شده است). اگر این مولکول 180° عمود به صفحه بچرخد، همان ساختار ظاهر می شود. اپراتور *lac* نیز همان تقارن را دارد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 1- 10 ساختار دُمین منومر بازدارنده *lac* . این ساختار شامل 357 آمینو اسید است. نواحی مارپیچ- α به صورت مارپیچ (بعضی از آنها فقط یک یا دو پیچ دارند) و نواحی صفحات- β به صورت فلش مشخص شده اند. خطوط رسم شده مسیر باقیمانده های آمینو اسیدها را در ساختار آن نشان می دهند.

www.ShimiPedia.ir

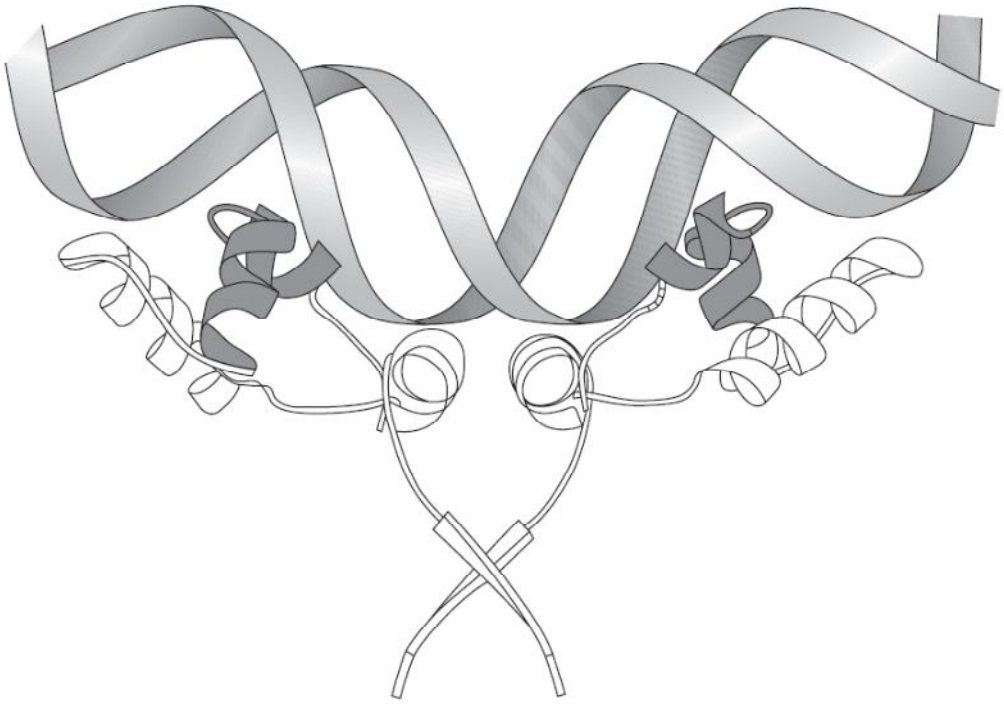
اتصال پروتئین به DNA می تواند تغییرات ساختاری در پروتئین و DNA به وجود آورد

مولکول DNA وقتی در ارتباط با پروتئین باشد کاملاً انعطاف پذیر می شود و جای تعجب نیست اگر اتصال پروتئین های HTH به آن ایجاد خمیدگی کنند. برای مثال، اتصال بازدارنده *lac* به اپراتور همیشه ایجاد خمیدگی در DNA می کند. این امر تا حدی مربوط به آمینو اسیدهایی می شود که در ناحیه لولا مانند قرار دارند و موجب گسترش شیار کوچک می شوند (شکل 1-11). در مقابل، اتصال همودیمر CAP موجب خمیدگی DNA به سمت پروتئین می گردد. خمیدگی DNA نه فقط جای مناسبی بین پروتئین و DNA به وجود می آورد، بلکه از لحاظ عملکردی نیز حائز اهمیت می باشد. برای مثال، نواحی مجاور هم در DNA که در حقیقت روی یک مولکول خطی قرار دارند، بهم نزدیک شده و با پروتئین یا کمپلکس پروتئین اندرکنش ایجاد می کنند.

میزان خمیدگی در DNA تحت تأثیر توالی بازها است. بعضی از توالی های DNA یک انحنای ذاتی مستقل از پروتئین ها دارند. برای مثال توالی خاصی که شامل 3 تا 6 ادنین در یک رشته باشد موجب خمیدگی در DNA می گردند. روشن است، حتی اگر بازهایی در ارتباط مستقیم با پروتئین متصل شده به DNA نباشند ممکن است در میل ترکیبی پیوند از طریق اثرات خود روی انحنای ذاتی DNA اثر بگذارند. انحنای ذاتی در همان جهتی که پروتئین القا کرده، ایجاد می شوند، در حالیکه در جهت مخالف، کاهش در انحنا را خواهیم داشت.

اتصال DNA می تواند ساختار پروتئین متصل شده را تغییر دهد. در بازدارنده *lac* ، آمینو اسیدها 50 تا 58 به دُمین پیوندی DNA متصل شده و ناحیه مرکزی مارپیچ $-\alpha$ فقط در حضور DNA تشکیل می شود. مارپیچ مربوطه ارتباط ویژه ای با DNA ایجاد می کند و به نظر می رسد که خود DNA القای بازآرایی ساختاری را به وجود می آورد (در نتیجه تشکیل مارپیچ می دهد). چنین تحولاتی در انواع مختلف پروتئین های پیوندی به DNA دیده شده است.

www.ShimiPedia.ir



شکل 1- 11 اتصال دیمر بازدارنده *lac* به اپراتور DNA موجب القای خمیدگی می شود. دو مارپیچ – α در اتصال به DNA در ناحیه شیار بزرگ قرار دارند. در این محل ایجاد پیوندهای هیدروژنی با بازهایی که در توالی اپراتور قرار دارند، می نمایند. مارپیچ – α طویلتر به آن نزدیک شده و در این اندرکنش پایداری به وجود می آورد (احتمالاً از طریق ارتباط بیشتر با DNA). مارپیچ های کوتاهتر در ارتباط با شیار کوچک DNA هستند. این اندرکنش ها موجب خمیدگی در DNA می شوند.

گمان هایی در مورد طبیعت اتصال DNA به پروتئین

با توجه به آنچه که از بحث های مربوط به بخش قبلی ذکر شد به دو نکته مهم تأکید شده است: نکته اول این است که چه نوع تصویری برای اندرکنش های پروتئین ها و DNA می توان در نظر گرفت. مرسوم این است که چیزی شبیه مدل قفل و کلید که در آنزیم ها مطرح است، تصور می کنیم یعنی کلید مناسبی که درست در محل خاصی داخل قفل قرار گیرد. این موضوع موقعیت آن را به صورت همه یا هیچ بیان نمی کند. اگر بگوییم کلید باید تقریباً درست انتخاب شود شاید سخن بی فایده ای باشد. در نگاه اول، اندرکنش بین پروتئین و DNA از طریق مشابهی صورت می گیرد. دُمین های پیوندی در پروتئین های HTH مجاور هم

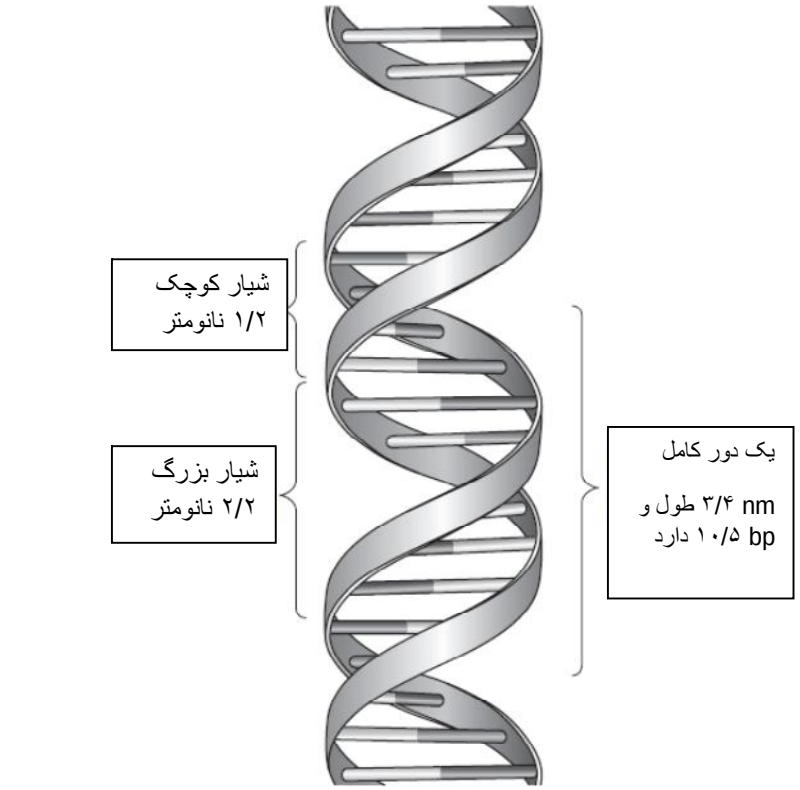
www.ShimiPedia.ir

هستند و شیارهای بزرگ B- DNA محل هایی هستند که شبیه قفل و کلید بنظر می رسند ولی اختلاف مهمی بین آنها وجود دارد. یکی از اختلافات این است که در اینجا قفل و کلید هر دو انعطاف پذیرند. همانطور که دیدیم، ساختار هم پروتئین و هم DNA می توانند تغییر کنند و موجب تقویت و تضعیف اندرکنش ها شوند. اختلاف دیگر این است که کلید تقریباً مناسب در بعضی موارد لازم است.

پروموترهای ضعیفی که به فاکتور σ در RNA پلیمراز متصل می شوند موجب نسخه برداری ژن ها در حد بسیار پایین شده و این عمل برای آن ژن مناسب است. نکته دومی که بر آن تأکید می شود این است که چگونه DNA را از روی پروتئین تشخیص دهیم؟ نکته اساسی در اینجا این است که آنچه در پروتئین ها دیده می شود توالی بازها نیست بلکه شکل، چشم انداز محتویات شیمیایی آن است که ممکن است یا ممکن نیست بتواند اتصال ایجاد کند. ترادف ویژه در پروتئین های پیوندی به DNA می تواند مسیر خود را در امتداد شیارهای بزرگ DNA پیدا کند و جفت بازهای ویژه را تشخیص دهد. اما وقتی DNA پیچ خورد، این موضوع نمی تواند دلیل بر میل ترکیبی زیاد آن باشد. تغییراتی که در شکل آنها ایجاد می شوند موجب از بین رفتن پیوند خواهد شد (حتی اگر توالی لازم در جفت بازهای آن هنوز وجود داشته باشد).

www.ShimiPedia.ir

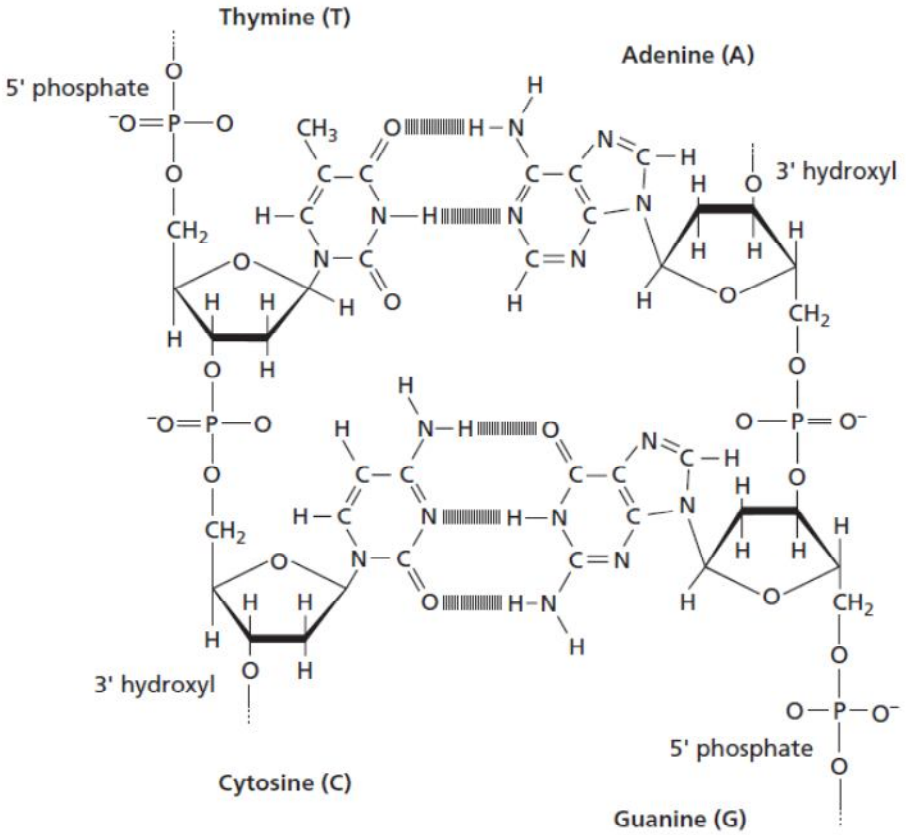
پیوست ۱ ساختار اصلی DNA



الف) ابعاد مارپیچ دو تایی DNA

www.ShimiPedia.ir

ادامه پیوست ۱



ب) دو رشته DNA توسط پیوندهای هیدروژنی بین بازها به هم متصل شده اند

www.ShimiPedia.ir

منابع:

مطالعات عمومی:

Hartl, D. L. & Jones, E. W. (1998) *Genetics: principles and analysis*. Jones and Bartlett, Sudbury, MA

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A. *et al.* (1995) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, New York.

Ptashne, M. (1992) *A Genetic Switch*. Cell Press/ Blackwell Scientific Publications, Oxford.

White, R. J. (2000) *Gene Transcription*. Blackwell Science Ltd, Oxford.

مطالعاتی راجع به کمپلکس RNA پلیمراز – پروموتر

Naryshkin, N., Revyakin, A., Kim, Y., Mekler, V. & Ebright, R. H. (2000) Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, **101:** 601-611.

McClure, W. R. (1985) Mechanisms and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, **54:** 171-204.

مطالعاتی راجع به پروتئین های پیوندی به DNA

Harrison, S. C. (1991) A structural taxonomy of DNA binding domains. *Nature*, **353:** 715-719.

Kerchner, M. A., Lu, P. & Lewis, M. (1997) *Lac* repressor-operator complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7:** 76-85.

Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.*, **61:** 1053-1095.

Parkinson, G., Wilson, C., Gunasekera, A. *et al.* (1996) Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 A resolution: a complete picture of the protein-DNA interface. *J. Mol. Biol.*, **260:** 395-408.

www.ShimiPedia.ir

مطالعاتی راجع به اندرکنش های پروتئین – پروتئین

McNight, S. L. (1991) Molecular zippers in gene recognition. *Sci. Am.*, April 1991: 32-39.

www.ShimiPedia.ir

فصل 2

نسخه برداری یوکاریوت ها: مشکلات و پیچیدگی در آنها

مقدمه

در فصل قبل بیان ژن را در موجودات ساده مثل پروکاریوت ها معرفی کردیم و مفاهیم مهمی در باره ژن ها ارایه شد مثلاً چگونه ژن ها خاموش یا روشن می شوند. این سیستم ها تا حدی با ارزش هستند چون ماشین مولکولی که این نوع سیستم ها را کار می اندازد می تواند فرایندهای سلولی پایه را هدایت کند و خصوصیاتی دارد که در بسیاری از آنها مشترک است. با این حال، این حقیقت اجتناب ناپذیر است که هر چه موجود زنده پیچیده تر می شود، اطلاعات مورد نیاز جهت مونتاژ کردن و مدیریت بخش های مختلف روز بروز افزایش می یابد، در نتیجه ژنوم بزرگتر می گردد.

همانطور که ملاحظه خواهید کرد، بزرگتر شدن اندازه ژنوم فراهم کننده فرصت ها ست ولی مشکلاتی را نیز بهمراه دارد. سیستم های کنترل کننده ای که برای ژنوم های کوچک می توانند خوب کار کنند، وقتی سیستم در سطح بالاتری از پیچیدگی قرار می گیرد به واسطه اطلاعات ژنتیکی مورد نیاز، دیگر کارایی چندانی نخواهد داشت. به منظور غلبه به این مشکلات، سیستم های قدیمی کنار گذاشته نشده اند، بلکه چیزهایی به آنها اضافه شده یا اصلاح گردیده اند.

پیدایش یوکاریوت ها

برآوردهای ما نشان می دهند که اولین موجودات زنده تک سلولی در حدود 3/5 بیلیون سال قبل بر روی زمین ظاهر شده اند. حدود 2 بیلیون سال بعد، برخی از موجودات تک سلولی از طریق بسته بندی های جدید، مواد ژنتیکی را در اندامک های غشادار قرار دادند (هسته). مواد ژنتیکی همراه با پروتئین های خاصی به نام هیستون ها دیده می شوند. سپس آنها نیاز به غشاهای سیتوپلاسمی و اندامک هایی مثل میتوکندری پیدا کردند. این نوآوری منجر به ظهور خانواده جدیدی از موجودات زنده تک سلولی به نام یوکاریوت ها گردید. چگونگی این تغییرات پایه ای در ساختار و سازماندهی سلولی مشخص نشده است ولی بین ظهور اولین پروکاریوت تا به وجود آمدن یوکاریوت زمان طولانی لازم داشت که این موضوع نشان دهنده مراحل تکاملی پیچیده

www.ShimiPedia.ir

است. این عمل ممکن است مستلزم اتصال سلول ها و ایجاد نوع جدیدی از آنها باشد (شاید یک رابطه همزیستی بین دو سلول پروکاریوتی به وجود آمده است). شواهدی در دست است که میتوکندری ها هنوز ژنوم هایی از نوع باکتری ها را حفظ کرده اند.

منشاء آنها هر چه باشد، اهمیت مراحل تکاملی آنها آنقدر زیاد است که در واقع سخن اقرار آمیزی نخواهد بود. سلول های یوکاریوتی هنوز در حال پیشرفت هستند و نیاز به ترکیبات ژنتیکی اضافی می باشند تا به صورت موجودات پر سلولی در آیند. وجود یک هسته و روش بخصوصی جهت بسته بندی DNA در داخل آن و بالاخره قرار دادن همه آنها در یک غشای سیتوپلاسمی باعث شد که بتواند تولید انرژی و تنظیم متابولیکی نماید (از آنهم مهمتر، امکانات اضافی برای تنظیم بیان تعداد زیادی از ژن ها فراهم آمد).

ساده ترین یوکاریوت ها

همه یوکاریوت ها به مراحل تکاملی بالاتر نرفته اند، بلکه برخی مانند مخمرها به صورت تک سلولی باقی مانده اند. به دلیل سادگی آنها، این تک سلولی های یوکاریوتی برای انسان بسیار با ارزش هستند. این سلول ها نه تنها برای پخت و پز لازمند بلکه برای انجام آزمایش روی موجوداتی مثل آنها بسیار مفید می باشند. در ضمن آنها در شرایط آزمایشگاهی آسان و سریع رشد می کنند (در مدت یک تا دو ساعت، دو برابر می شوند). اهمیت بیشتر آنها در این است که برای دستکاری ژنتیکی مفید هستند. در این روش می توان ژن های خاصی را اضافه، حذف، بازسازی، و تغییر داد در نتیجه ابزار ژنتیکی پر قدرتی جهت تجزیه و تحلیل عملکرد و محصولات آنها (یعنی پروتئین ها) خواهیم داشت. اطلاعات آزمایشگاهی که از خصوصیات دو مخمر *Saccharomyces cerenisiae* و *Schizosaccharomyces prombe* به دست آمده است را در فصل های بعدی مشاهده خواهید کرد.

با این که *S.cerevisiae* یک تک سلولی است ولی تعداد بسیار زیادتری ژن نسبت به پروکاریوتی مثل E.coli دارد (جدول 2-1). در حقیقت E.coli یک پروکاریوت پیچیده است، ولی اختلاف بین تک سلولی یوکاریوتی و پروکاریوتی بیش از آنچه که در جدول آمده می باشد. اطلاعات ژنتیکی بیشتر در تک سلولی یوکاریوتی برای ایجاد اندامک های اضافی است که در مسیرهای متابولیکی اضافی مجبورند آنزیم های بیشتری را کد کنند (مثل اکسیداتیو فسفوریلاسیون) و همچنین رفتارهای زیستی مثل جفت گیری (و میوز) نیز توسط مخمرها انجام می شوند.

www.ShimiPedia.ir

جدول 2-1 نمونه هایی از اندازه و دانسیته ژنوم

Organism	DNA (Mb) (haploid)	Genes (protein coding)	Chromosomes	Gene density (genes/Mb)
Bacterium (*E. coli*)	4.5	4000	1	900
Yeast (*S. cerevisiae*)	15	6200	17	400
Worm (*C. elegans*)	100	18400	6	180
Fruitfly (*D. melanogaster*)	120*	13600	4	110*
Human (*H. sapiens*)	3300	~30000	23	9

*This organism also has 60 Mb of largely repetitive, non-coding DNA ('heterochromatic' DNA) that is not included in the calculation (see Chapter 9). The same type of DNA is found in humans and other mammals, but in amounts that do not significantly affect the calculation of gene density.

موجودات پر سلولی

مرحله تکاملی مهم بعدی (که به ظاهر تنها برای یوکاریوت هاست)، ایجاد شکل های بدنی که شامل چندین نوع سلول مختلف (یعنی پرسلولی) است. آنچه که ذهن در جستجوی آن است چگونگی تبدیل موجودات پروکاریوت می باشد. موجودات پروکاریوت و یوکاریوت می توانند تحت شرایط محیطی خاص یعنی قرار دادن سلول ها در محیط آبکی تشکیل شوند. یوکاریوت های ساده (مثل کپکی به نام *Dictiostelium disioidium*) چرخه زندگی تک سلولی و پرسلولی دارند. چرخه زندگی پرسلولی حاوی انواع مختلف سلول می باشد. چرخه یوکاریوت پرسلولی قطعاً از اجداد تک سلولی در زمان خاصی (احتمالاً در حدود 500 میلیون سال) صورت گرفته است.

انتظار می رود که پرسلولی بودن، نیازهایی دارد که باید همراه خود بیاورد. این نیازها افزایش اطلاعات ژنتیکی است که در نتیجه آن ژنوم بزرگتر می شود. در ابتدا ژنوم باید اطلاعات ژنتیکی را کد گذاری کند و این عمل برای ساختن و راه اندازی انواع مختلف سلول ها لازم است. دوم این که باید دستورالعمل مورد نیاز را برای تنظیم این اطلاعات، کد گذاری مناسب نماید. به عنوان مثال باید اطمینان داشته باشد که ژن مورد نیاز در سلول خاصی روشن شود و یا در سلول دیگر خاموش گردد. سوم این که کد گذاری اطلاعات لازم جهت برقراری ارتباط بین انواع سلول ها را فراهم کند. الگوی بیان ژن در سلول های خاص اغلب توسط سلول هایی که آنها را احاطه کرده اند، تحت تأثیر قرار می دهند. این عمل می تواند از طریق تماس فیزیکی صورت گیرد یا از طریق مولکول های پیام رسان محلولی که قادر به نفوذ هستند، امکان پذیر می گردد. بنابراین موجودات پرسلولی باید اطلاعات

www.ShimiPedia.ir

ژنتیکی را هم دریافت کنند و هم قادر باشند که آنها را انتقال دهند. این اعمال نیاز به پیام رسان های مختلف و بزرگتری نسبت به تک سلولی ها دارد. در این صورت می توان انتظار داشت که پرسلولی های یوکاریوتی ژنوم های پیچیده تر و بزرگتری نسبت به تک سلولی ها دارند.

کپک *D. discoidium* در مراحل خاصی از چرخه زندگی خود موجود چند سلولی است و در حدود 12500 ژن دارد در حالیکه مگس سرکه *Drosophila melanogaster* (موجودی که در آزمایشگاه های تحقیقاتی زیاد استفاده می شود) دارای 13500 ژن می باشد. هر چه پیچیدگی بدن بیشتر می شود، تعداد ژن ها نیز بالا می رود. بنابراین، کرم نماتود *Caenorhabditis elegans* در هنگام بلوغ کمتر از 30 نوع سلول مختلف و 18500 ژن دارد، در حالیکه انسان بیش از 200 نوع سلول مختلف و دارای حدود 30000 ژن است. (این اطلاعات بر اساس نتایجی است که از ترادف ژنوم انسان به دست آمد. این نتایج 2 تا 3 مرتبه کمتر از آنچه بود که قبلاً حدس می زدند. دلیل آن این است که تعیین ترادف DNA ای که ژن های کنشی را مشخص می کنند، مشکل است).

به این ترتیب می توان پیچیدگی موضوع را در نظر داشت و سپس روی آن بحث کرد. در مورد انسان، پیچیدگی آن از تمام مهره داران بیشتر است (مثل موش یا ماهی) ولی از لحاظ زیست شناسی، یعنی از لحاظ تعداد انواع سلول های مختلف و مشکلات تکاملی باید از لحاظ شکل گیری و مونتاژ آنها موضوع را بررسی نمود که در این صورت ما موجودات چندان مشکلی نیستیم. در حقیقت، موش (Mus musculus) و ماهی بادکنکی (Fugu rubripes) دارای تعداد ژن هایی برابر با ما هستند.

هر چه ژنوم ها بزرگتر شوند، راندمان ژن کاهش می یابد

محتویات DNA و اندازه ژنوم در موجودات مختلف را در جدول 2- 1 مشاهده می کنید. هر چه موجود پیچیده تر می شود، تعداد ژن ها افزایش می یابند ولی دانسیته ژن (یعنی ژن بر میلیون باز یا Mb) به طور چشمگیری کم می شود. برای مثال، در E.coli حدود 890 ژن در هر میلیون باز وجود دارد ولی در انسان 9 ژن در هر Mb دیده می شود. چرا چنین است؟ دلیل اصلی آن حضور مقدار قابل ملاحظه ای از DNA غیر کد شونده دریوکاریوت ها هستند و به آنها DNA بیهوده نیز گفته می شود. دلیل آن این است که در طول تکامل به صورت تصادفی این مقدار DNA وارد سلول ها شدند (شاید از طریق DNA ویروس ها). سپس این DNA ها تقسیم و توسعه پیدا کردند ولی توانایی کد شدن را از دست دادند. تمام چیزهایی که گفته شد اتفاق می افتند ولی اشتباهاتی که رخ می دهند بعلت عدم عملکرد آن ژن ها می باشند. همانطور که در بخش های بعدی خواهید دید، DNA غیر

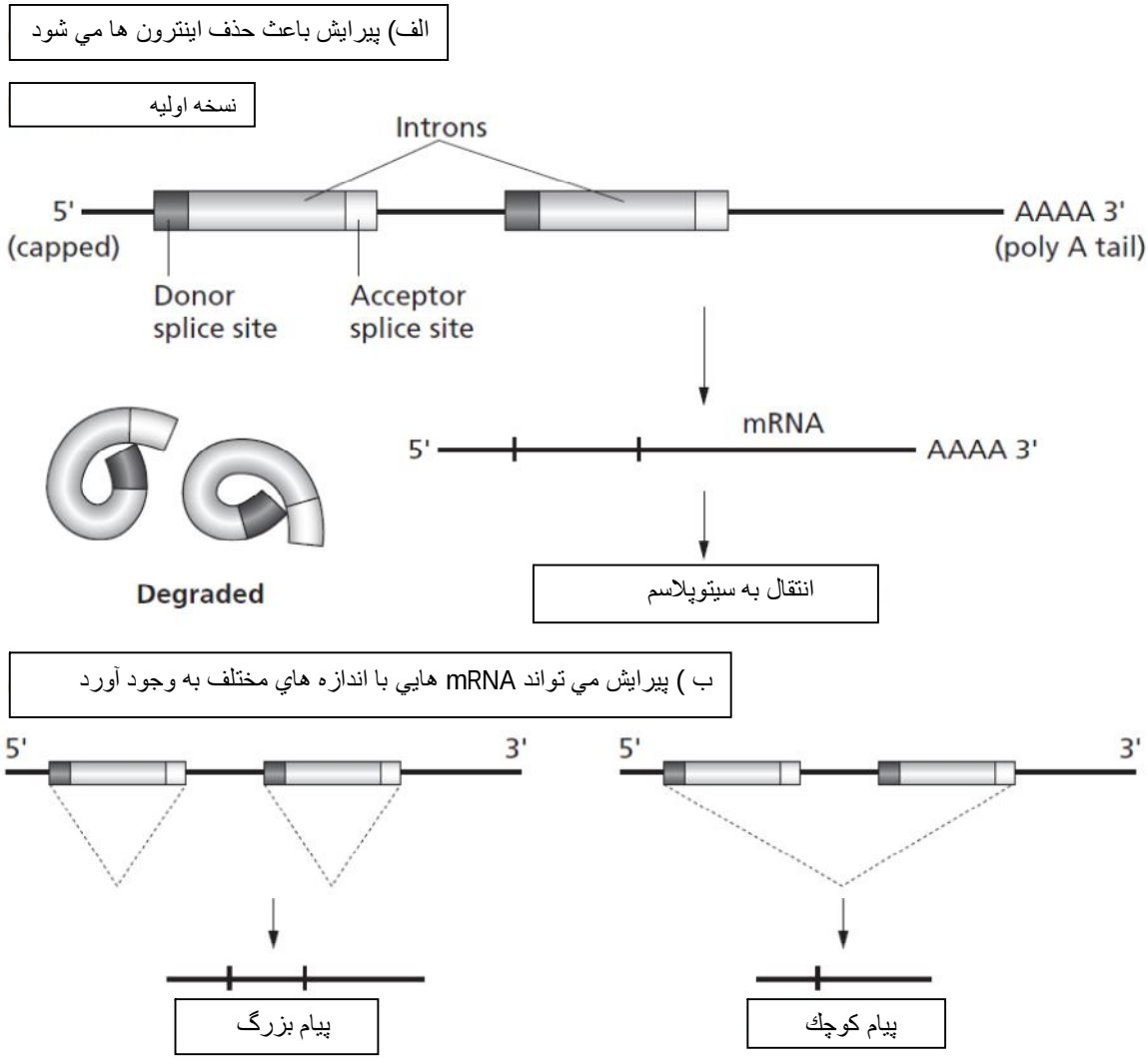
www.ShimiPedia.ir

کد شونده نقش مهمی در تعیین موقعیت محل های پیوندی صحیح برای پروتئین ها هستند. این اعمال در مقیاس کوچک موجب اندرکنش پروتئین های نزدیک بهم می شوند و در مقیاس بزرگتر فواصل لازم برای تاخوردگی های چندین کیلو باز در DNA فراهم می گردد. در مقیاس خیلی زیاد، توالی غیر کد شونده طویل (حدود Mb) (اغلب تکراری) می تواند ساختارهای ویژه پروتئین- DNA به وجود آورند (هتروکروماتین) در نتیجه تأثیر زیادی روی رفتار ژن های همجوار می گذارند. در مگس سرکه DNA غیر کد شونده تکراری زیاد است (حدود یک سوم کل DNA ، جدول 2- 1) که می توانند اثر بهم ریختگی در نسخه برداری به وجود آورند(فصل6). ما مطمئناً نمی توانیم بگوییم که DNA تکراری بخاطر توانایی تأثیر آن روی نسخه برداری است ولی می توان گاهی از آن صرفنظر کرد.

ژن های یوکاریوت های عالی و DNA غیر کد شونده

در یوکاریوت های عالی، DNA غیر کد شونده نه تنها بین ژن ها قرار دارند بلکه داخل ژن ها نیز دیده می شوند. این توالی ها را اینترون (intron) گویند که در فرایند پیچیده ای به نام پیرایش (splicing)، جزیی از مکانیزم انتقال mRNA ها از هسته به سیتوپلاسم است. ماشین پیرایش می تواند گاهی اوقات از توالی مشابهی روی DNA از طریق استفاده از محل های پیرایش مختلف چند محصول پروتئینی متفاوت به وجود آورد که به آن پیرایش متناوب (alternative splicing) گویند (شکل 2- 1). پیچیدگی به وجود آمده در اثر ماشین پیرایش بنظر می رسد تا حدی مفید باشد. تاریخ تکاملی اینترون ها و پیرایش آنها مشخص نیست. محصولات جانبی و توسعه این سیستم ها جهت انتقال RNA نسخه برداری شده از هسته به سیتوپلاسم با دقت انجام می شود (جایی که آنها ترجمه می شوند). اینترون ها در مقایسه با ژن های پروکاریوت ها، قسمت کوچکی از DNA غیر کد شونده را در یوکاریوت های عالی اشغال کرده اند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 2- 1 پیرایش RNA باعث می شود اینترون ها جدا شوند. اغلب ژن های یوکاریوتی انترون دارند که موجب طویل شدن DNA می گردند ولی توالی کد شونده نیستند. اینترون ها از RNA نسخه برداری شده توسط کمپلکسی که شامل آنزیم های بخصوصی هستند و در محل های ویژه ای در هسته قرار دارند، جدا شده و تجزیه می شوند. RNA نسخه برداری شده پیرایش می شود و سپس به سیتوپلاسم جهت انجام عمل ترجمه انتقال می یابد.

www.ShimiPedia.ir

ماشین نسخه برداری در یوکاریوت ها

در دومین قسمت از این فصل راجع به ماشین مولکولی نسخه برداری یوکاریوت ها صحبت می کنیم. بعضی از فرایندها بین پروکاریوت ها و یوکاریوت ها شبیه هم هستند که این خود دلیل بر منشاء مشترک و تکامل در آنها است. منتهی بعلت بزرگتر شدن ژنوم در یوکاریوت ها، پیچیدگی هایی در آن به وجود آمد که قابل درک می باشد.

RNA پلیمرازهای یوکاریوتی

سه RNA پلیمراز مختلف در سلول های یوکاریوتی وجود دارند که به آنها PolI (polymerase I) ، PolII ، و PolIII گویند. زیر واحدهای آنها را در جدول 2- 2 مشاهده می کنید. اطلاعاتی که در جدول آورده شده آنزیم هایی هستند که از *S. cerevisiae* به دست آمده اند ولی خصوصیات آنها شبیه سایر یوکاریوت ها است.

جدول 2- 2 RNA پلیمرازهای یوکاریوتی

Polymerase	Genes transcribed	Core subunits		Shared subunits	Specific subunits
		β, β′-like	α-like		
PolI	rRNA	135+190 kDa	19+40 kDa*	Six (10–27 kDa)	Five (12–49 kDa)
PolII	protein-coding	150+220 kDa	44 kDa (two)	Six (10–27 kDa)	Four (12–32 kDa)
PolIII	small RNAs (e.g. tRNAs)	128+168 kDa	19+40 kDa*	Six (10–27 kDa)	Seven (11–82 kDa)

*These subunits are the same in PolI and PolIII.

ساختار بعضی از زیر واحدهای این سه آنزیم و آنزیم اصلی RNA پلیمراز پروکاریوت هایی مثل E.coli شباهت هایی دیده می شود. زیر واحدهای آنزیم های یوکاریوتی دارای همان زیر واحدهای β ، β'، و α که در پروکاریوت ها دیده می شوند، هستند. زیر واحدهای β' در مخمر، دروزوفیلا، و E.coli مشابه هم هستند که این خود دلیلی بر منشاء یکسان بین پروکاریوت ها و یوکاریوت ها است.

واضح است که پلیمرازهای یوکاریوتی ساختار پیچیده تری نسبت به پروکاریوت ها دارند. پروکاریوت ها یک زیر واحد از α، β ، و β' دارند (زیر واحد σ برای پیوند آنزیم به پروموتر DNA ویژگی نشان می دهد) در حالیکه آنزیم های یوکاریوتی دارای

www.ShimiPedia.ir

10 تا 13 زیر واحد می باشند. شش زیر واحد از آنها در هر سه آنزیم مشترک هستند و بقیه برای هر یک از آنزیم ها ویژگی دارند (جدول 2-2). دلیل این که این سه پلیمراز باهم اختلاف دارند این است که هر کدام از آنها برای نسخه برداری یک سری از ژن ها اختصاص یافته اند. PolI نسخه برداری ژن های RNA های ریبوزومی را انجام می دهد و PopII نسخه برداری از ژن های RNA های کوچک مثل tRNA (transfer RNA) و RNA های ریبوزومی 5S را بعهده دارد. ژن هایی که توسط PolI و PolIII نسخه برداری می شوند چندین کپی از RNA های ساختاری و عملکردی را انجام می دهند (بستگی به نیاز سلول دارد). توجه داشته باشید که این ژن ها (منظور RNA های تولید شده هستند که قادرند خودشان محصولات عملکردی شوند) وارد فرایند ترجمه (translation) نمی شوند (چون از ژن های دیگر در نهایت پروتئین تولید می شود ولی از این ژن ها پروتئین ساخته نمی شود). ساختارهای مختلف PolI، PolII ، و PolIII نسبت به درخواست ها و سرعت نیاز اعضای مختلف سلول هماهنگ می شوند. جالب است که ساختار RNA پلیمراز غالب معمولاً خود را با ژن های ویژه ای تطبیق می دهد و نسخه برداری صورت می گیرد. این عمل توسط فاکتورهای σ انجام می شود که قادر به اتصال به محل خاصی روی DNA (منظور پروموتر ویژه) هستند. در ضمن این عمل ممکن است با جایگزین شدن زیر واحد α نیز جهت تسهیل در نسخه برداری از ژن های rRNA صورت گیرد.

از سه پلیمراز یوکاریوتی در این کتاب بیشتر به عملکرد PolII می پردازیم. این آنزیم مسئول نسخه برداری ژن های کد کننده پروتئین ها است و حضور یا عدم حضور آن بستگی به گروهی از ژن هایی دارد که در هنگام تمایز و تکامل باید نسخه برداری شوند (گاهی هم نباید نسخه برداری گردند). مسائلی که در تنظیم ژن به آن توجه شده مربوط به مشکلاتی است که در کنترل PolII دخالت دارند. به هر حال، PolI و PolIII نه فقط برای حیات سلول ضروری هستند بلکه گاهی از آن در مدل های تجربی و کسب نتایج کلی جهت فهم بهتر عملکرد آنها استفاده می شوند. ما در انتهای این فصل مجدداً به این موضوع می پردازیم.

www.ShimiPedia.ir

پروموترهای یوکاریوتی

در پروموترهای E.coli برای ژن هایی که کد کننده پروتئین هستند (ساختار دو طرفه ما بین توالی بازهای DNA به طور گسترده ای متفاوتند) طیف وسیعی از پروموترها دیده شده اند که قادرند با RNA پلیمراز پیوندهای قوی یا ضعیف به وجود آورند. این تنوع یک عنصر مفید در تنظیم سرعت نسخه برداری است. در یوکاریوت ها، ژن های پروموترهایی که کد کننده پروتئین هستند (یعنی ژن های نسخه برداری شده توسط PolII) اختلاف بیشتری نسبت به هم دارند. سه عنصر در توالی DNA در پروموترهای یوکاریوتی دیده می شوند (به صورت منفرد یا ترکیب با هم) (جدول 2- 3). این عناصر شامل TATA box (این نام بخاطر توالی TATA روی آن گذاشته شده است)، عنصر شروع، و عناصر غنی از دی نوکلئوتید CpG می باشند. عناصر CpG را جزایر CpG هم می گویند که در فصل 9 راجع به آن بیشتر صحبت می شود. ژن هایی که نسخه برداری در آنها اختلاف زیادی دارند (حتی از یک نوع سلول به نوع دیگر یا از طریق چرخه سلولی) در تمام پروموترهای آنها TATA box دیده می شود.

RNA پلیمرازهای یوکاریوتی خودشان به طور کل نمی توانند به پروموترها یا DNA متصل شوند. آنها بهمراه سایر فاکتورهای پروتئینی قادر به اتصال خواهند بود. تسهیلاتی که این پروتئین ها فراهم می کنند اتصال به پروموتر ویژه روی DNA ، نحوه تشخیص RNA پلیمراز، و تعیین موقعیت دقیق روی پروموتر هستند. (نقش آنها را می توانید با CAP و پروتئین های فعال کننده پلیمراز در پروموترهای E.coli مقایسه کنید).

جدول 2- 3 عناصر DNA در پروموترهای یوکاریوتی

Element	Defining sequence elements	Distance from start site	Genes in which this type of promoter tends to be found
TATA box	. . . $TATA^{A}/_{T}A$. . . .	−20 to −35	Rapidly transcribed, often cell-cycle or tissue-specific (e.g. histones, globins)
Initiator	. . . $PyCAN^{T}/_{A}PyPy$* . . .	CA at −1, +1	Various (frequent in viral promoters)
CpG island	CpG-rich region of 20–50 bp	−100 to −200	Slowly transcribed (e.g. enzymes of intermediary metabolism)

*N=any nucleotide, Py=a pyrimidine base (C or T)

توجه داشته باشید که پروموتر فقط موقعیتی است که توسط توالی خاصی مشخص می شود. عناصر توالی DNA به طور مشترک در پروموترها دیده می شوند، بنابراین در فرایند نسخه برداری از اهمیت بالایی برخوردار نیستند. RNA پلیمراز نیز هر توالی

www.ShimiPedia.ir

DNA را می تواند نسخه برداری کند (البته وقتی دستور نسخه برداری داده شد)، بنابراین تفاوت در انجام دادن این عمل یا انجام ندادن آن نیاز به پروتئین های اضافی و ترکیبات شیمیایی خاصی دارد.

یک نمونه ژن یوکاریوتی

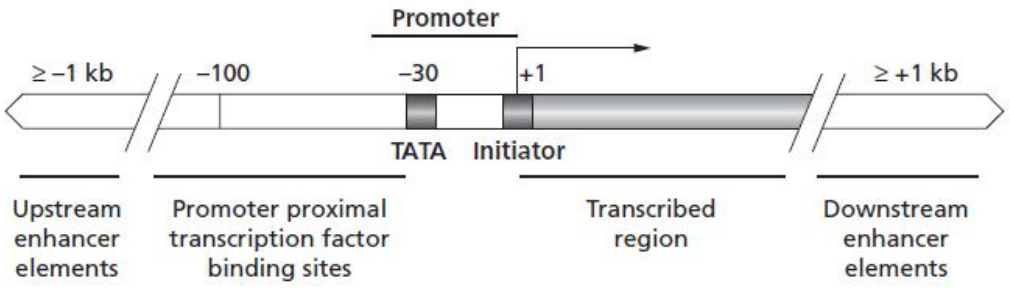
در این کتاب بیشتر روی PolII و نسخه برداری از ژن های کد کننده پروتئین بحث می شود. به طور کل، ژنی به عنوان نمونه (تمام آنها مثل هم رفتار کنند) جهت نشان دادن عمل PolII وجود ندارد ولی به صورت فرضی ژن شکل 2- 2 انتخاب شد و نواحی اصلی DNA که در تنظیم ژن های PolII دخالت دارند، نشان داده شده است.

عناصر فرادستی که به پروتئین های خاصی متصل می شوند (فاکتورهای نسخه برداری) از خصوصیات عمل PolII است. اغلب عناصر تقریباً نزدیک به پروموتر قرار دارند (یعنی بین 200 جفت باز) ولی محل های مربوط به تقویت کننده ها (enhancers) حدود چند کیلو باز (kb) نسبت به پروموتر فاصله دارند. تقویت کننده ها در ناحیه فرادست هستند ولی می توانند در ناحیه پایین دست نیز مثل Igf2/H19 (در فصل 10 راجع به آن صحبت می شود) دیده می شوند.

پروتئین هایی که به این محل ها متصل می شوند یا بطور مستقیم و یا توسط پروتئین های حدواسط با کمپلکس RNA پلیمراز اندرکنش می دهند. پروتئین ها دو نوع عملکرد دارند: (1) آنها ساختار DNA را به نحوی تغییر می دهند که بتوانند با کمپلکس RNA پلیمراز ارتباط پیدا کنند. آنها باید به پروموتر دسترسی یافته و سایر پروتئین ها نیز در جایگاه خود قرار گیرند تا اندرکنش ها بتوانند به خوبی انجام شوند. آنها این اتصالات را با هیستون ها و پروتئین هایی که مسئول بسته بندی DNA (منظور کروماتین است) هستند، نیز انجام می دهند. این اندرکنش ها تعیین کننده سرعت و عملکرد مونتاژ کمپلکس (pre- initiation complex) PIC هستند. (2) نقش دیگر پروتئین های پیوندی، پایداری پلیمراز و پروتئین های همراه با آن است. وقتی مونتاژ کامل شد، PIC وارد عمل می شود. آنها این اعمال را توسط اندرکنش با پروتئین های خاصی در کمپلکس پلیمراز انجام می دهند.

این پروتئین های پیوندی دقیقاً همان توالی آمینواسیدهایی که ساختارهای موتیف وسوم پروتئین پیوندی پروکاریوت ها دارند را حفظ کرده اند (مثل HTH). آنها دُمین هایی که مورد نیاز اندرکنش های پروتئین به پروتئین است را نیز دارند. این دُمین ها مونتاژ را برای PIC آسان می کنند.

www.ShimiPedia.ir

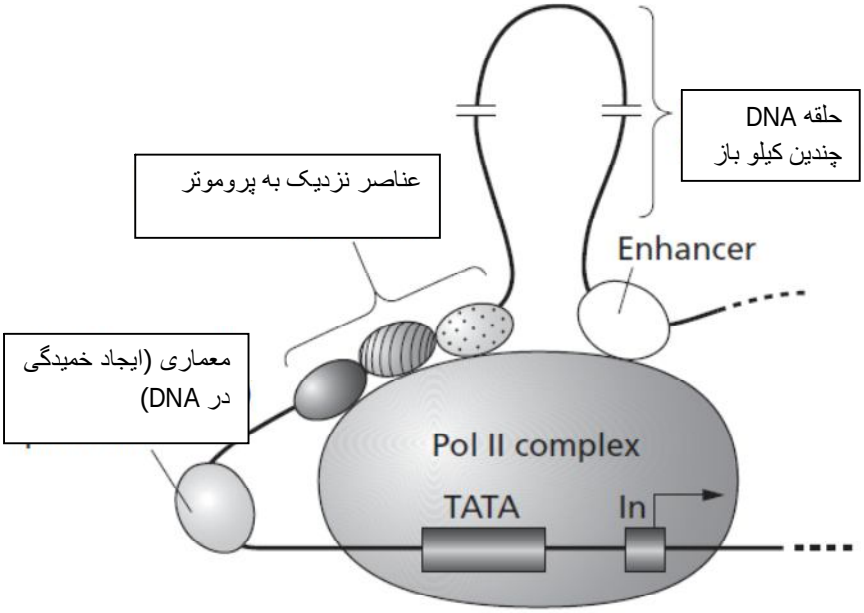


شکل 2- 2 توزیع عناصر تنظیمی در ژن یوکاریوتی.

آنها غالباً به صورت هم آرایی (synergic) عمل می کنند. یعنی دو پروتئین با آن که به صورت جداگانه و دور از هم قرار دارند، ولی رویهم اثر می کنند. برخی از محل های نزدیک به پروموتر در قسمت فرادست قرار دارند و فاکتورهای نسخه برداری به آنها متصل می شوند. این فاکتورها در بسیاری از ژن ها وجود دارند (مثل NF1 و SP1). تعداد محدود دیگری از این عوامل وجود دارند که به عنوان حد واسط عمل می کنند و وابسته به عوامل محیطی یا شیمیایی هستند. از این نوع ترکیبات می توان عنصر مسئول AMP حلقوی

(cyclic AMP response element) یا CRE و عنصر HSE (heat shock element) را نام برد. در هر پروموتر ممکن است بیش از یک نسخه از این عناصر در فرادست دیده شوند. به منظور این که عملکردها صحیح انجام شوند، پروتئین ها به محل هایی در قسمت فرادست متصل و با PIC مونتاژ شده در اطراف TATA box اندرکنش می دهند. محل های اتصالی برای این پروتئین ها می توانند بیش از 200 bp در قسمت فرادست TATA box باشند. این مقدار باز حدود 70 nm از B-DNA را در بر می گیرد. فاصله ای در این حد را می توان تصور کرد که بیش از حدی است که اندرکنش پروتئین به پروتئین صورت گیرد. بنابراین در DNA باید خمیدگی ایجاد شود. خمیدگی در DNA باعث می شود که پروتئین های فرادست بتوانند با PIC اندرکنش دهند. انجام اندرکنش های فوق را معماری پروتئین ها گویند. برای مثال پروتئین هایی مثل پروتئین های غیر هیستونی ممکن است در این عمل کمک کنند یا خود کروماتین هم می تواند نقش داشته باشد (شکل 2- 3).

www.ShimiPedia.ir



شکل 2- 3 پروتئین هایی که به عناصر DNA متصل می شوند در قسمت فرادست پروموتر با ترکیبات کمپلکس RNA پلیمراز II اندرکنش می دهند. کمپلکس PolII در پروموتر مونتاژ می شود (بحث بیشتر در شکل 2- 4 آمده است). بسیاری از پروموترهای یوکاریوتی (البته نه همه) حاوی توالی TATA و توالی شروع در محل شروع نسخه برداری هستند (شکل 2- 2). پروتئین هایی که به عناصر واقع در فرادست محل شروع نسخه برداری متصل می شوند معمولاً مونتاژ کمپلکس را آسان می کنند یا ممکن است برای انجام عملکرد مناسب کمک نمایند. اندرکنش با کمپلکس پروتئین های متصل به DNA در نزدیکی پروموتر صورت می گیرد که از پروتئین های خم کننده DNA کمک گرفته می شود. عناصر تقویت کننده (enhancer) می توانند در فاصله حدود چندین کیلو باز نسبت به محل شروع نسخه برداری باشند. با ایجاد تاخوردگی، فواصل روی DNA از بین می روند و پروتئین ها به عناصر تقویت کننده متصل می شوند تا کمپلکس PolII بتواند عمل کند. این فرایند را حلقوی شدن DNA (looping) گویند ولی ساختارهای واقعی که در این عمل دخالت دارند هنوز ناشناخته است.

دستکاری DNA موقعی که توالی های بالاتر از قسمت فرادست پروموتر موثر باشند، حادتر می شود. چنین توالی هایی را معمولاً تقویت کننده می گویند که می توانند چندین کیلو باز در قسمت فرادست پروموتر قرار گیرند و آن را کنترل کنند. نسخه برداری از بعضی از ژن ها کاملاً بستگی به عمل چنین تقویت کننده هایی دارد. در برخی موارد، این نواحی فرادست در مسائل تنظیمی پیچیده تری دخالت می کنند. برای مثال، جایگاه ناحیه تنظیمی LCR (locus control region) مربوط به β- گلوبین انسان

www.ShimiPedia.ir

در 50 kb فرادست قرار دارد (البته نه به عنوان یک تقویت کننده). ولی این محل برای بیان صحیح ژن از طریق توسعه سایر ژن ها بر روی ژن

β- گلوبین لازم است. فقدان این ناحیه به صورت ژنتیکی باعث بیماری تالاسمی (کمبود هموگلوبین و کم خونی حاد) می شود (حتی اگر ژن های گلوبین و پروموترهایشان طبیعی باشند). آوردن LCR به نزدیکی پروموترهای β- گلوبین و سایر ژن های این مجموعه، نیاز به دستکاری گسترده تری دارد. این عمل توسط عمل حلقوی شدن DNA (looping) انجام می شود (شکل 2-3)، ولی واقعیت نحوه انجام این اعمال هنوز روشن نشده است. به این موضوع مجدداً اشاره خواهد شد.

فاکتورهای کلی نسخه برداری، TAF ها و کمپلکس پیش شروع PolII

شکل 2- 3 اصول کلی مونتاژ PIC را نشان می دهد. در قسمت بعدی بحث مفصل تری در باره ترکیبات PIC و مسیر مونتاژ آن خواهیم داشت. جزئیات دقیقتر مربوط به آن موضوع هنوز کشف نشده اند ولی واکنشگرهای اصلی این فرایند شناسایی شده اند و مسیر مونتاژ مشخص است (شکل 2- 4).

PIC تشکیل شده از کمپلکس PolII همراه با مجموعه ای از شش فاکتور نسخه برداری کلی که به صورت TFIIA، TFIIB و غیره نامگذاری شده اند. همه آنها برای شروع نسخه برداری لازمند. هر کدام از آنها کمپلکس چند پروتئینی هستند. برخی از جزئیات مربوط به اجزای مختلف از کمپلکس شروع نسخه برداری در انسان را در جدول 2- 4 مشاهده می کنید. اساساً همین ترکیبات در سایر یوکاریوت ها نیز وجود دارند (ممکن است ترکیب بندی دقیق آنها متفاوت باشد). (نامگذاری این کمپلکس ها، خوشبختانه نسبتاً منطقی صورت گرفته است). TF علامت اختصاری فاکتور نسخه برداری (transcription factor) است، II اشاره به PolII دارد، و حروف A تا H دلالت بر ترتیب شناسایی کمپلکس ها دارد (C و G بنظر می رسد که در این مسیر گم شده اند). اولین مرحله مونتاژ PIC اتصال (منظور خود پلیمراز نیست) فاکتور TFIID است (TFIIA کوچکترین کمپلکس تشکیل شده می باشد). TFIID دست کم 12 زیر واحد پروتئین مختلف دارد که یکی از آنها پروتئین TBP (TATA-binding protein) است. TBP در اغلب پروموترهای یوکاریوتی وجود دارد و برای آنزیم RNA پلیمراز لازم است (حتی آنهایی که TATA box ندارند). مطالعات نشان دادند اگر چه TBP میل ترکیبی زیادی به DNA دارد ولی گاهی ویژگی آن برای TATA box بسیار کمتر از حالت معمول می شود (منظور پروتئین هایی است که برای اتصال به DNA ویژگی ترادفی دارند) در نتیجه این موضوع معما را کمی حل می کند. در حقیقت TATA box در داخل سلول به تنهایی عملکردی روی

www.ShimiPedia.ir

پروموتر ندارد. بنابراین موقعیت TBP در DNA مرحله مهم مونتاژ PIC است و خود TATA box یکی از فرایندهای آن است (یا بعضی از پروموترهای آن) پس عملکرد آن می تواند توسط سایر توالی های روی DNA تنظیم گردد.

جدول 2- 4 ترکیبات کمپلکس شروع نسخه برداری در انسان (به ترتیب بکار گیری آنها)

Factor	Subunits	Size range (kDa)	Some functions
TFIID—TBP	1	38	TATA box recognition, TFIIB recruitment
TFIID—TAFs	12	15–250	Promoter (non-TATA) recognition, regulatory functions (see Table 2.5)
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilization of TBP/TAF–DNA interactions
TFIIB	1	35	Recruitment of PolII and TFIIF
TFIIF	2	30, 74	Promoter targeting of PolII, reduces *non-specific* PolII–DNA interactions
RNA PolII	12	10–220	Catalytic function in RNA synthesis, recruitment of TFIIE
TFIIE	2	34, 57	Recruitment of TFIIH and modulation of its catalytic activities
TFIIH	9	35–89	Helicase activity separates DNA strands at the promoter; kinase activity helps initiate elongation

Taken from Roeder, R.G. *Trends Biochem. Sci.*, **21**: 327–335.

TFIID شامل TBP به همراه مجموعه ای از پروتئین های اضافی که به آنها TAFs (TBP- associated factors) گویند.

این

پروتئین ها و خود TFIID در طول تکامل کاملاً حفاظت شده هستند (با مقایسه این کمپلکس ها در انسان، مگس، و مخمرها). TAFs انسان را در جدول 2- 5 مشاهده می کنید. TAFs های مختلف نقش متفاوتی در شروع نسخه برداری دارند و ممکن است از پروموتری به پروموتر دیگر فرق کنند. امکان دارد با توجه به نیازهای خاص پروموتر بکار گرفته شده ، ترکیب TFIID تفاوت کند. عملکردهای مختلف TAFs را می توان در سه سر فصل مختلف مورد توجه قرار داد که در زیر به ترتیب می آیند.

www.ShimiPedia.ir

جدول 2- 5 بعضی از ترکیبات فاکتور نسخه برداری TFIID انسانی

Component*	Structural features	Contacts with other proteins	Other functions
TBP	Small (30 kDa), unusual DNA-binding properties via *minor* groove	Various, mostly via N-terminal tail	The *only* DNA-binding component, bends DNA by widening minor groove
$TAF_{II}250$	HMG box, bromodomains		Acetyltransferase and protein kinase activities
$TAF_{II}135$		TFIIA	
$TAF_{II}80$	resembles H4, histone fold	TFIIE, TFIIF	Part of histone octamer-like structure?
$TAF_{II}55$		multiple activator proteins (E1A, YY1)	
$TAF_{II}31$	resembles H3, histone fold	TFIIB, acidic activator proteins (p53)	Part of histone octamer-like structure?
$TAF_{II}30$		Estrogen receptor	
$TAF_{II}20$	resembles H2B		Part of histone octamer-like structure?

*TBP, TATA Binding Protein ; TAF_{II}, TBP Associated Factor (PolII), followed by its molecular mass.

TAFs به توالی های روی DNA خارج از TATA box متصل می شود و ویژگی پروموتری فراهم می کند

اتصال TFIID می تواند از DNA در مقابل هضم توسط نوکلئاز بین 50 kb فرادست و 35 kb پایین دست از TATA box محافظت کند، ولی میزان این حمایت (در نتیجه از اتصال TFIID) از پروموتری به پروموتر دیگر فرق می کند. در مگس سرکه TAF_{II} 150 قادر است به ناحیه ای پایین دست TATA box متصل شود (که شامل منطقه آغازگر در محل شروع نسخه برداری هم می گردد). ترکیب عملکردهای TAF_{II} 150 بزرگترین TAF یعنی TAF_{II} 250 بنظر می رسد برای فعالیت نسخه برداری متکی به آغازگر لازم باشد. همانطور که در بالا اشاره شد، TATA box به تنهایی قادر به انجام شروع نسخه برداری در داخل سلول نیست. اتصال توالی های مجاور DNA از طریق TAFs باعث می شود ویژگی اتصال اضافه گردد (توسط تشخیص توالی های مجاور ویژه به خود TATA box) در نتیجه این عمل به اتصال TBP به پروموتر پایداری می بخشد.

www.ShimiPedia.ir

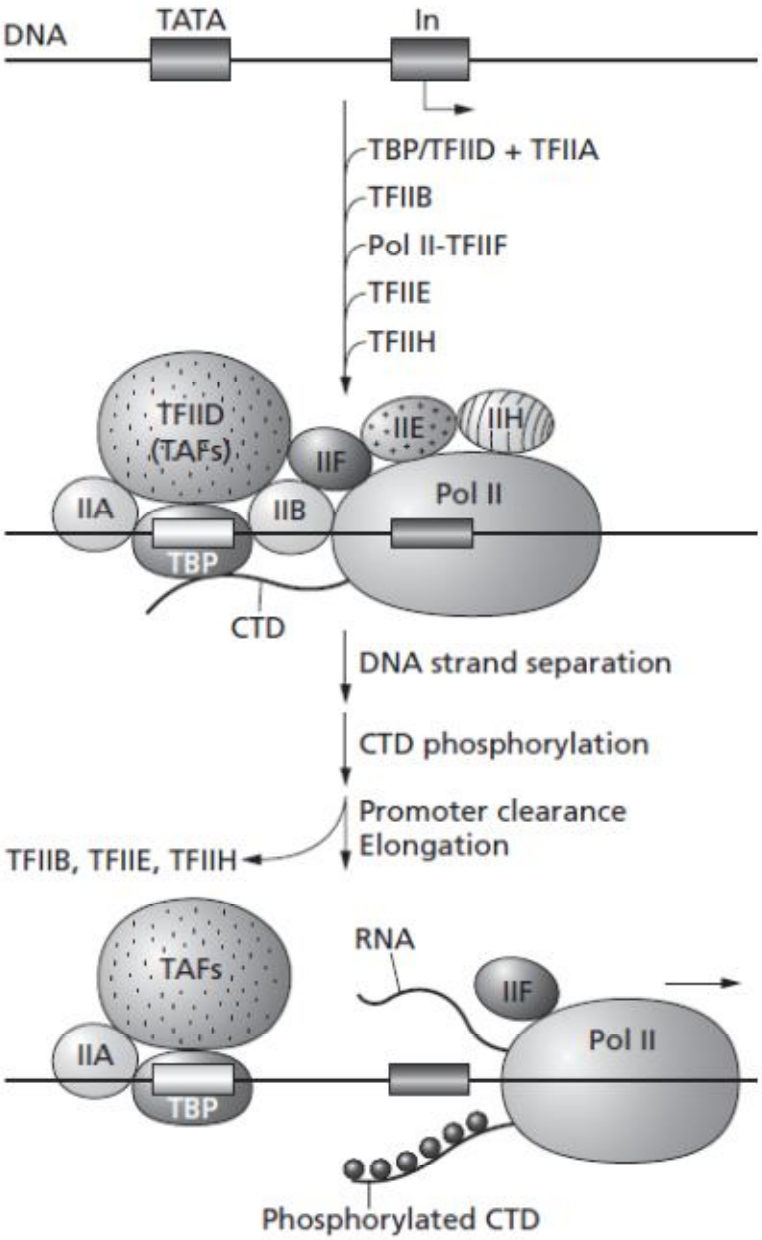
اتصال TAFs به پروتئین های فعال کننده و فعال کننده مشترک (coactivator) متصل می شود و مراحل اتصال پروموتر را آسان می کند

اتصال TBP به TATA box کندترین مرحله شروع نسخه برداری است (یعنی دارای محدودیت سرعت یا rate limiting). هر چیزی که سرعت این مرحله مهم را بالا ببرد (یا پایین بیاورد) می تواند اثر زیادی در سرعت نسخه برداری بگذارد. برای بسیاری از ژن های یوکاریوتی، توالی های DNA در کمی بالاتر از TATA box دارای محل های پیوندی به پروتئین هایی است که موجب تسهیل بکارگیری TBP می شوند، بنابراین نسخه برداری را فعال می کنند. بعضی از این فاکتورهای نسخه برداری در مجاورت بسیاری از پروموترها دیده شده اند (مثل SP1) البته در سایر فاکتورها محدودیت هایی وجود دارد (مثل گیرنده استروژن). تعداد کمی از این پروتئین های فعال کننده به TBP متصل شده اند ولی اغلب آنها به TAFs ویژه اتصال دارند و موجب تقویت بکارگیری کمپلکس TFIID می شوند. برای مثال SP1 با TAF_{II} 110 و گیرنده استروژن با TAF_{II}30 اندرکنش می دهند. بعضی مواقع TAFs (یا خود TBP) مستقیماً با پروتئین های فعال کننده متصل به DNA اندرکنش نمی دهند بلکه از طریق حد واسط هایی به نام فعال کننده مشترک (coactivator) ارتباط برقرار می کنند.

TAF ها موجب مونتاژ فاکتورهای نسخه برداری می شوند و کمپلکس PIC را کامل می کنند

اتصال TFIID به پروموتر، شروع مونتاژ PolII PIC و بکارگیری سایر فاکتورهای کلی نسخه برداری است. TAFs در مونتاژ این کمپلکس ها از طریق اندرکنش های ویژه پروتئین- پروتئین دخالت می کند. تمام اعمالی که در مونتاژ PIC دخالت دارند را می توانید در شکل 2- 4 مشاهده کنید. نمودار نشان می دهد توالی اضافی در کمپلکس های TAFII مختلف، کمپلکس شروع را کامل می کند. بحث هایی در مورد این که واقعاً در داخل سلول این اعمال اتفاق می افند یا این که PolII (به صورت هولوآنزیم) حاوی PolII بعلاوه TFIIB ، TFIIF ، TFIIE ، TFIIH بوده و پیش مونتاژ می شود یا نه هنوز وجود دارند. این اعمال ممکن است در مخمر اتفاق افتند ولی نقاط مهم این مرحله بکارگیر TFIID در شروع (با کمک TFIIA) و مونتاژ آن در پروموتر و تکمیل آن (PolII حاوی PIC) است. عملکردهای کمپلکس های مختلف TFII (یا ترکیبات آنها) هنوز شناخته نشده اند. به هر حال، بعضی از خصوصیات مهم آنها در ارتباط با اعضای آن گروه معلوم گردیده اند (جدول 2- 4).

www.ShimiPedia.ir



شکل 2- 4 مونتاژ کمپلکس پیش شروع نسخه برداری

تجزیه و تحلیل کریستالوگرافی از کمپلکس TATA box نشان داده است که TBP از طریق آمینو اسیدهای آبگریز واقع در شیار کوچک به DNA متصل می شود. این مکانیزم اتصال غیر معمول، DNA را کج می کند و موجب می گردد که پیچ مربوط به مارپیچ دو رشته ای بهم بخورد و محور مارپیچ کج شود. برای نمونه، TBP به صورتی که در شکل 2- 3 نشان داده شده می تواند اتصال برقرار کند (البته در مقیاس کوچک). امکان دارد که کمپلکس سه تایی حاوی DNA ، TBP ، و TFIIB را به

www.ShimiPedia.ir

شکل بلور در آورند (شکل 2- 4). با این عمل امکان تجزیه و تحلیل دقیق اندرکنش های پروتئین- پروتئین به وجود می آید و در این صورت مراحل مونتاژ را نیز می توان مشاهده کرد.

نسخه برداری توسط PolI و PolIII

PolI چندین نسخه از ژن های rRNA (ribosomal RNA) و PolIII ژن های tRNA و RNA های هسته ای کوچک را نسخه برداری می کنند. پروموترهای اکثر این ژن ها فاقد TATA box هستند ولی نسخه برداری آنها هنوز نیاز به TBP دارد. احتمالاً دلیل آن این است که TBP بکارگیری سایر پروتئین هایی که برای نسخه برداری ژن ها مهم اند را انجام می دهد. در حقیقت جهش در TBP موجب مهار اتصال آن به TATA box می شود ولی ممانعتی در نسخه برداری PolI و PolIII ایجاد نمی کند. شروع نسخه برداری توسط PolI نیاز به اتصال پروتئینی است که دو زیر واحد دارد. این پروتئین، فاکتور UBF یا

Upstream binding factor است. UBF کمپلکسی است که حاوی TBP و سه فاکتور TAFs (یعنی 48 TAF_{III} ، 63 TAF_{III} ، و 110 TAF_{III}) می باشد. سپس این کمپلکس می تواند PolI را نیز در اختیار بگیرد. اتصال یک یا چند پروتئین TAF_{III} باعث مهار اتصال TBP به TATA box می شود، در نتیجه از اتصال کمپلکس به پروموترهای PolII ممانعت بعمل می آورد.

عمل آنزیم PolIII کمی پیچیده تر است. ژن هایی که توسط PolIII نسخه برداری می شوند از سه نوع پروموتر مختلف هستند. نسخه برداری ژن های tRNA نیاز به دو عنصر 10 bp دارد که بین ناحیه کد شونده قرار دارند. این دو عنصر به یک فاکتور نسخه برداری که حاوی چند زیر واحد است، متصل می شوند (TFIIIC) و به ترتیب آنها را بر می دارد. در حدود 2000 ژن RNA ریبوزومی کوچک (5SRNA) وجود دارند که توسط PolIII کد می شوند (در سلول های انسان چندین نسخه تکراری دیده می شوند). همانند ژن های tRNA ، ژن های 5SRNA دارای ناحیه تنظیمی است که مابین نواحی کد شونده قرار دارند. در این حالت این ناحیه به TFIIIA متصل می شود (یک پلی پپتیدی با جرم مولی 40 kDa و چندین موتیف زینک فینگر (zinc finger است).

www.ShimiPedia.ir

TFIIIA ابتدا فاکتور TFIIIC را در اختیار می گیرد و سپس به PolIII متصل می شود (در مورد ژن های tRNA). سومین نوع پروموتر PolIII در ژن های U6snRNA دیده شد که ترکیبات snRNA (small nuclear) مربوط به ریبو نوکلئو پروتئین

(RNPs) که در فرایند پیرایش دخالت دارند را کد می کند. این ژن ها فاقد عناصر تنظیمی داخلی هستند ولی موتیف TATA box دارند.

اگرچه PIC های PolI و PolIII پیچیدگی های PolII را ندارند ولی از یک خانواده اند. هر سه پلیمراز، پروموترهای خود را در اختیار می گیرند (به عنوان اولین مرحله). این عمل به صورت "پروتئین متصل به DNA با ویژگی توالی" یا به کمک عناصر روی DNA انجام می شود. سپس سایر پروتئین ها با "پروتئین متصل به DNA" اتصال برقرار می کنند (در مورد PolII قبلاً به قسمتی از کمپلکس FFIID وصل می شود) و در آخر هر دو در موقعیت مناسبی روی پلیمراز قرار می گیرند.

مرحله طویل شدن نسخه برداری

اتصال PIC به یکدیگر اولین فاز شروع نسخه برداری است. این فاز کندترین مرحله است و تنظیم را بعهده دارد. به هر حال، در مراحل بعدی هم می توانند نقش تنظیمی را مشاهده کنیم. جدا شدن متکی به انرژی، دو رشته DNA (که خود آن در مجاورت محل شروع نسخه برداری قرار دارد) اولین محل تنظیم است. سپس آنزیم پلیمراز از کمپلکس PIC رها می شود. برای انجام این عمل، دُمین انتهای C - (C- terminal domain) مربوط به زیر واحد β در آنزیم پلیمراز II توسط آنزیم پروتئین کینازی که در فاکتور TFIIH قرار دارد، فسفوریله می شود. بنظر می رسد که پلیمراز II توسط CTD به PIC محکم شده است ولی فسفوریلاسیون آن موجب ضعیف شدن آن می شود در نتیجه این دو ترکیب از هم جدا می شوند. در این مرحله، TFIIB ، TFIIE ، و TFIIH از کمپلکس جدا شده و TFIID و TFIIA هنوز متصل به پروموتر باقی می مانند. در این حالت پلیمراز همراه با TFIIF شروع به نسخه برداری می نماید (شکل 2- 4). نظیر اعمال فوق در پروکاریوت ها نیز دیده می شود.

در یوکاریوت ها، پولیمرازها نمی توانند DNA برهنه را نسخه برداری کنند و DNA آنها به صورت کروماتین بسته بندی شده است. این حالت در پروکاریوتها دیده نمی شود. بنابراین، تعداد بیشتری زیر واحد نیاز دارند. به هر حال، جالب است که در اغلب موارد موقعی که پلیمراز شروع بکار می کند، PIC از آن جدا می شود. توجه داشته باشید که بسیاری از پیچیدگی های آن

www.ShimiPedia.ir

منعکس کننده خواسته های تنظیم برای مرحله شروع است، منظور این است که عملکردهای کاتالیزوری اضافی نیاز ندارد. هنگامی که پلیمراز از PIC جدا شد، حالا راه باز است تا پلیمراز جدید را به خود و پروموتر متصل کند و فرایند شروع مجدد صورت گیرد. در تمام مدتی که TFIID و فاکتورهای مرتبط با آن در اتصال به پروموتر باقی می مانند، نسخه برداری دور دوم بسیار سریعتر از دور اول انجام می شود.

در فصل قبل اشاره شد که در پروکاریوت ها نسخه برداری توسط پلیمراز گاهی اوقات می تواند دچار مکث یا توقف شود، در نتیجه به طور موثر کاهش در میزان کلی نسخه برداری خواهیم داشت. شبیه همین عمل در یوکاریوت ها نیز اتفاق می افتد یعنی تنظیم از طریق پلیمراز جهت به تأخیر انداختن نسخه برداری صورت می گیرد. به محض این که سلول در محیط نا مناسبی قرار می گیرد (در مدت چند دقیقه)، ژن شوک حرارتی (heat shock) بسیار سریع تنظیم نسخه برداری را انجام می دهد (یعنی یکمرتبه حرارت را بالا می برد). بیشترین مطالعات روی ژن HSP70 در مگس سرکه انجام شد. در شرایط عادی، ژن HSP70 ، پلیمراز پیچیده ای دارد یعنی پس از نسخه برداری حدود 25 جفت باز متوقف می شود. افزایش حرارت موجب یک سری اتفاقاتی می گردد که منجر به رها شدن پلیمراز متوقف شده، می شود، در نتیجه سنتز کامل نسخه برداری از ژن HSP70 صورت می گیرد. این مکانیزم یک روش بسیار کارآمد در کنترل ژن است که در آن تنظیم سریع نسخه برداری انجام می شود.

ملاحظات تجربی

تا کنون، توجه کمی به چگونگی این اطلاعات در ترکیب PIC یوکاریوتی شده است. با در نظر گرفتن مفاهیم کلی، توجه کمی در مورد مشکلات عمده آزمایشگاهی جهت درک بهتر عمل آنها گردیده است. برخی آزمایش های معتبر در این مورد را در فصل بعد مطالعه خواهید کرد ولی در ابتدا باید چند نکته کلی در مورد آنها بیان شود.

اول این که اطلاعات ارایه شده از ترکیب روش های بیوشیمیایی و ژنتیکی بسیار سودمند بودند. کمپلکس های پروتئینی مثل TFIID توسط روش متداول در بیوشیمی یعنی کروماتوگرافی ستونی خالص شده و توانایی آنها جهت افزایش نسخه برداری در شرایط آزمایشگاهی مورد اندازه گیری قرار گرفتند. به منظور مشخص کردن ترکیبات پروتئینی موجود در این کمپلکس ها، توانستند آنها را جدا کرده و هر یک از پروتئین ها را خالص نمایند. برای بسیاری از این پروتئین ها، امکان تشخیص، کلون کردن، و تعیین توالی ژن های کد کننده آنها وجود دارند. این روش ها موجب شد که توالی آمینو اسیدهای پروتئین مورد آزمایش و

www.ShimiPedia.ir

سنتز مقدار پروتئین نوترکیب در باکتری های منتقل شده ، فراهم گردند. این پروتئین های نوترکیب می توانند به یکدیگر متصل شده و کمپلکس های نسخه برداری شده در خارج از سلول مورد آزمایش قرار گیرند.

دوم این که محققان از سیستم های ساده ای مثل مخمرها استفاده زیادی کردند. ژنتیک مخمر از توانایی بالایی برخوردارند و در مورد عملکرد پروتئین ها تحقیقات زیادی روی آنها انجام شده است. استفاده های آنها از حذف بعضی از ژن ها و تأثیر این ژن ها روی فنوتیپ گرفته تا تحقیقات پیچیده تر مثلاً ایجاد جهش و نقش عملکرد پروتئین بخصوصی می باشند. مثال هایی در این مورد را در فصل بعد مورد بررسی قرار می دهیم. همانطور که در فصل قبل ذکر شد، حفاظت بسیار زیاد از طریق تکامل ، تعداد زیادی از عناصر موجود در نسخه برداری نشان می دهند که مطالعه روی یوکاریوت های ساده می تواند برای بررسی سیستم های موجودات عالی مفید واقع شوند.

مشکلات ژنوم بزرگ: چرا آنها تا این اندازه پیچیده شده اند؟

حال به مرحله ای رسیدیم که در این مرحله سعی می شود تا حدی پیچیدگی های فوق العاده PIC یوکاریوتی را توجیه کنیم. چرا باید این چنین پیچیدگی در موجوداتی مثل پروکاریوت ها با سادگی و ظرافت انجام شوند (در حالیکه یوکاریوت هایی مثل مخمرهای تک سلولی در مقابل پروکاریوت ها هیولا هستند).

برای پاسخ به آن می توان گفت که احتمالاً نیاز به ژن های تنظیمی بیشتری داریم. در نتیجه ساختار درون سلولی پیچیده تر می شود و پیچیدگی بیشتر مربوط به پاسخ به محیط زیست و پیام های تغذیه ای است. برای پاسخ دادن به چنین سؤالاتی باید گفت که نیاز به بیان ژن های بیشتر و هماهنگی بین آنها داریم، در حالیکه در پروکاریوت ها همین اعمال را در اپرون ظریف و با مکانیزم ساده می توان مشاهده کرد.

عناصر تنظیمی در قسمت فرادست پروکاریوت ها ناشناخته نیستند ولی کمیاب اند، در حالیکه همین عناصر در یوکاریوت ها متعادل اند. برای این که آنها کار خود را انجام دهند، فعال کننده های مختلفی باید وجود داشته باشند تا بتوانند موجب افزایش تجمع عملکرد PIC شوند (منظور روی بخشی از ژن های مورد نظر است). ساخت کمپلکس های PIC مختلف و تلاش برای تطبیق آنها امری بی فایده است چون طیف وسیعی از فعال کننده ها در قسمت فرادست وجود دارند که بدین ترتیب پاسخ منطقی را نمی توان به آنها داد. منطقی تر این است که یک کمپلکس عمومی تری انتخاب کنیم که بتواند با ده ها هزار ژن مختلف کار

www.ShimiPedia.ir

کند حتی اگر در ژنی بعضی از ترکیبات زاید باشند. پروتئین به تنهایی نمی تواند این درجه از انعطاف پذیری را فراهم کند، به عنوان مثال، TBP خودش مستقیماً با تعدادی از فعال کننده های نسخه برداری اندرکنش دارد بنابراین انکان فراهم کردن محل های پیوندی برای این همه فعال کننده ها و پروتئین های کمک کننده فعال کننده ها را ندارند.

www.ShimiPedia.ir

منابع:

Evolutionary issues and cell types

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. & Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Edition. Garland, New York.

Bird, A. P. (1995) Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.*, **11:** 94–100.

Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. (1977) Postembryonic cell lineages of the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **56:** 110–156.

Genome composition and sequencing

Recently, issues of the journals *Science* and *Nature* have been devoted to descriptions of the genomes of particular organisms. Specific articles are cited, but others in the same issues are also of interest. For the most complete and up-to-date information, consult the listed Web sites:

***Yeast* (*S. cerevisiae*)**

http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H. *et al*. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274:** 546–567.

Mewes, H. W., Albermann, K., Bühr, M. *et al*. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature*, **387:** 7–9.

Caenorhabditis elegans

http://www.sanger.ac.uk/Projects/C/elegans/

C. elegans sequencing consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, **282:** 2012–2018.

Drosophila melanogaster

http://flybase.bio.indiana.edu/

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A. *et al*. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287:** 2185–2195.

Humans, mice

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/

Bouck, J. B., Metzker, M. L. & Gibbs, R. A. (2000) Shotgun sample sequence comparisons between mouse and human genomes. *Nature (Genetics)*, **25:** 31–33.

Rubin, G. M. *et al*. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, **287:** 2204–2215.

Promoter DNA

Kollmar, R. & Farnham, P. J. (1993) Site-specific initiation of transcription by RNA polymerase II. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., **203:** 127–139.

McClure, W. R. (1985) Mechanisms and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, **54:** 171–204.

RNA polymerases and transcription initiation complexes

Nikolov, D. N., Chen, H., Halay, E. D. *et al.* (1995) Crystal structure of a TFIIB–TBP–TATAelement ternary complex. *Nature*, **377:** 119–128.

Roeder, R. G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci*., **21:** 327–335.

Travers, A. (1996) Building an initiation machine. *Curr. Biol.*, **6:** 401–403.

White, R. J. (2000) *Gene Transcription*. Blackwell Science Ltd, Oxford.

Young, R. A. (1991) RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem*., **60:** 689–715.

Zawel, L. & Reinberg, D. (1995) Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Ann. Rev. Biochem*., **64:** 533–561

www.ShimiPedia.ir

فصل 3

نوکلئوزوم: واحد ساختاری کروماتین ها

مقدمه

تمام موجودات (پروکاریوت ها و یوکاریوت ها) با مشکل بسته بندی قطعه نسبتاً طویل DNA دردرون یک فضای کوچک در داخل سلول مواجه اند. در یوکاریوت ها، DNA در یک اندامک سلولی به نام هسته قرار می گیرند. در ابتدا، برای حل مشکل اندازه، چیزهای مختلفی را در سلول در مقیاس بزرگ نشان می دادند مثلاً هسته به اندازه یک گریپ فروت (یعنی با قطری حدود 10 cm) بود. در این مقیاس، مولکول های DNA در یک سلول یوکاریوتی باید طولی حدود 20 km داشته باشند. حتی با در نظر گرفتن همین مقیاس، مولکول DNA بسیار نازک است (حدود 0/02 mm) و حجم ظرفی که بتواند این مقدار DNA را در خود جای دهد باید خیلی بزرگ باشد. بنابراین، مشکل بسته بندی به همین سادگی نیست. آنچه که در این مورد باید مورد توجه قرار گیرد، نیاز مبرم DNA به انجام اعمال مربوطه در مکانی ثابت است. DNA باید با دقت بسیار زیاد همانند سازی انجام دهد (حتی برای چندین مرتبه) و هر دفعه دو نسخه تهیه نماید و سپس از هم جدا شده و هر کدام در سلول دختری قرار گیرند. بدین ترتیب اطلاعات ژنتیکی برای کد گذاری توسط DNA باید در سلول دختری بیان شده و در سلول های خاصی به مراحل تکاملی ویژه خود برسند.

تصور این که مکانیزمی وجود داشته باشد که چنین DNA ای را در هسته سلول به نحوی بسته بندی کند که اثر مهمی در عملکرد آن نیز داشته باشد، کمی سخت است. با توجه به جنبه های مشکل ساختاری و عملکردی در بسته بندی DNA ، این دو مورد باید با یکدیگر طوری تطبیق کنند که در مواقع لازم عمل مورد نظر خود را انجام دهند. چنین عمل تکاملی تطبیقی مسلماً منجر به ارتباط های مکانیکی بین این دو فرایند می شوند. علاوه بر این، دو عملکرد اصلی DNA یعنی همانند سازی و نسخه برداری به طور فزاینده ای بهم پیوسته و در طول تکامل بین آنها سازش و پالایش صورت گرفته است.

www.ShimiPedia.ir

کشف چگونگی بسته بندی DNA در هسته سلول

اگر فردی بتواند هسته ای را از سلول های مورد نظر یا از بافت خاصی (که معمولاً یک روش عام آزمایشگاهی است) جدا کند و پروتئین های آن را استخراج نماید، تقریباً نیمی از وزن پروتئین ها به هیستون ها اختصاص می یابد. هیستون ها در حدود 100 سال پیش کشف شده اند و اولین بار توسط آلبرت کوسل (Albert Kossel) در سال 1884 نامگذاری شد. هیستون ها پروتئین های کوچکی هستند که جرم مولی آنها بین 10 تا 12 کیلو دالتون است و غنی از آمینو اسیدهای لیزین و آرژنین می باشند. این آمینو اسیدها در pH خنثی دارای بار مثبت هستند. هیستون ها در تمام سلول های یوکاریوتی وجود دارند و در سلول های پروکاریوتی دیده نمی شوند. البته بعضی از سلول های پروکاریوت ها ساختار موتیفی خاصی دارند که شبیه هیستون ها است. با شناخت خصوصیات بیشتر هیستون ها معلوم شد که پنج نوع هیستون داریم که از لحاظ اندازه، بار، مقدار لیزین و آرژنین، و بالاخره حلالیت با یکدیگر اختلاف دارند. در ابتدای کشف هیستون ها نام های مختلفی به آنها دادند ولی امروزه نحوه نامگذاری آنها چنین است (جدول 2-1): H1 ، H2A ، H2B ، H3 و H4 .

جدول 3-1 بعضی از خصوصیات هیستون ها

Histone	Number of residues	Molecular mass	Residues/mol (%)		Net charge
			Lysine	Arginine	
Core					
H2A	129	13960	14 (10.9)	12 (9.3)	+15
H2B	125	13774	20 (16.0)	8 (6.4)	+19
H3	135	15273	13 (9.6)	18 (13.3)	+20
H4	102	11236	11 (10.8)	14 (13.7)	+16
Linker					
H1	224	22500	66 (29.5)	3 (1.3)	+58

به دلیل این که هیستون ها پروتئین های کوچکی هستند و در سلول ها به مقدار فراوان وجود دارند، لذا جزء اولین پروتئین هایی بودند که خالص و توالی آنها تعیین گردید. با جمع آوری اطلاعات مربوط به توالی هیستون ها از گونه های مختلف معلوم شد که ساختار اولیه هیستون ها (یعنی توالی آمینو اسیدها) شبیه هم هستند. هیستون های H3 و H4 جزء پروتئین های بسیار محافظت شده می باشند.

www.ShimiPedia.ir

وزن هیستون ها در هسته سلول برابر با وزن سایر ترکیبات اصلی هسته (DNA) است. نقش های این دو ترکیب هسته ای (یعنی DNA و هیستون ها) تا حدود 50 سال پیش مورد بحث محققین بود. بعضی از محققین فکر می کردند که DNA یک پلیمر ساده برای کد گذاری اطلاعات ژنتیکی است و هیستون ها بیشتر به عنوان مخزن های آنها عمل می کنند. کشف ساختار مارپیچ دو تایی DNA ، شکافی در نوع نگرش آنها در مورد نقش DNA به وجود آورد. نقش ساختاری و بارهای مثبت هیستون ها کم کم این ابهام را در مورد اتصال آنها به DNA از بین برد. به هر حال، در آن زمان چگونگی اتصال هیستون ها به DNA و نحوه آزمایش در خارج سلول هنوز شناخته نشده بود، ولی ظهور رسوب در لوله آزمایش باعث تردید در نوع نگرش آنها شد (منظور این است که با اضافه کردن هیستون ها به DNA رسوب حاصل شد).

مشاهدات بعدی نشان دادند که هیستون ها و DNA ایجاد کمپلکس در هسته سلول می کنند. این قضیه نسبت به کشف مارپیچ DNA دو رشته ای توجه کمتری را به خود جلب کرد، ولی این موضوع بسیار مهیج و مورد بحث دانشمندان قرار گرفت. در این کتاب بیش از این شرح داستان چگونگی بسط و توسعه محققین به این موضوع گفته نمی شود بلکه مستقیماً مدل های ارایه شده در مورد ساختار کروماتین مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرند. اگر خواستید توضیح کاملی از نحوه پیدایش این کشف داشته باشد به کتاب کنسال ون هولد (Kensal Van Hold) سال 1988 که خودش هم در آن دخالت داشت، مراجعه فرمایید.

ساختار زیر واحد کروماتین

تلاش هایی که برای آشکار شدن زیر واحد کروماتین انجام گرفت در نتیجه زحمات گروه های محقق و اشخاصی بوده است که گاهی با یکدیگر همکاری می کردند و یا بدون اطلاع از کارهای یکدیگر روی این موضوع مشغول تحقیقات بودند. یکی از فرایندهایی که این ساختار را در سال های اخیر نشان داد و مرکز تحقیقات کروماتین قرار گرفت، هضم DNA توسط آنزیم های اندونوکلئاز بود. اندونوکلئازها آنزیم هایی هستند که باعث برش در پلیمر DNA می شوند (در مقابل اگزونوکلئازها هضم DNA را از دو انتهای آن بر عهده دارند).

در سال 1973 مقاله کوتاهی ارائه شد، تحت عنوان "هسته کبد موش صحرایی دارای فعالیت اندونوکلئازی درون زاست" به صورتی که وقتی هسته سالم تحت شرایط مناسب گرماگذاری شود (انکوبه گردد)، DNA تحت اثر اندونوکلئازها در فواصل تکراری به صورت منظمی برش داده می شود. نویسنده مقاله پیشنهاد کرد که "..... کروماتین دارای ساختار ساده تکراری با فواصل تکراری مشخصی هستند که از مکان های خاصی در دسترس قرار می گیرند.....(منظور در دسترس اندونوکلئازها).

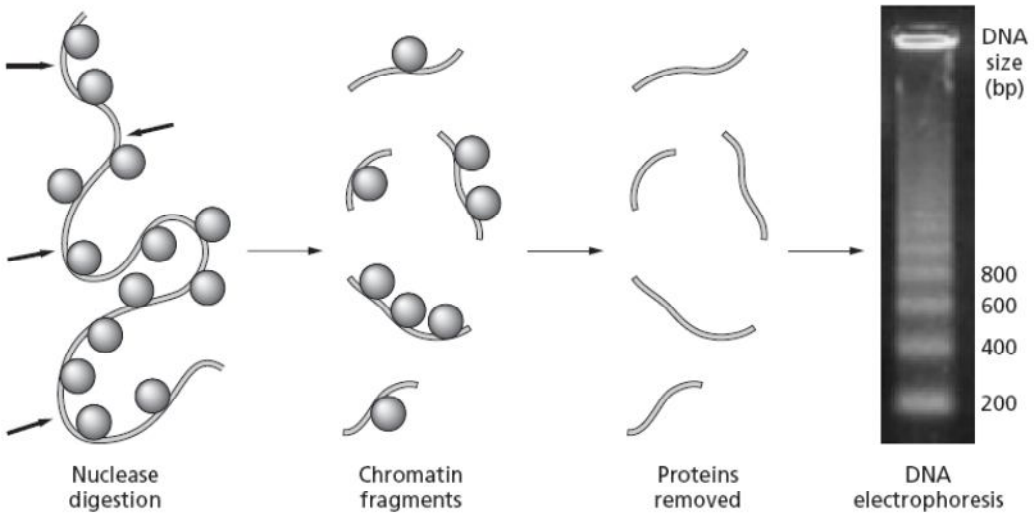
www.ShimiPedia.ir

تفسیر حاصل از این نتایج در شکل 3- 1 آمده است. طولی نکشید که نشان داده شد الگوی مشابه حاصل از شکستن DNA می تواند از طریق هسته ای که فاقد نوکلئاز درون زاست به دست آید. البته این عمل توسط گرماگذاری با آنزیم های باکتریایی نوکلئاز (micrococcal nuclease) تحت شرایطی که به آن اجازه ورود به هسته داده شود، انجام گردید.

اکثر DNA موجود در هسته سلول (85%) مستعد این الگوی شکستگی بودند. این الگو نشان می دهد که واحدهای بسته بندی تکراری (هر چه که باشد) برای بسته بندی کردن اغلب DNA های هسته عمل می کنند. این نتیجه کاملاً هم تعجب آور نبود. این رویداد با اطلاعات اولیه حاصل از تجزیه کل هسته توسط تفرق اشعه X متناقض بود (تفرق اشعه X همان روشی است که برای تعیین ساختار مارپیچ دو تایی DNA استفاده می شود).

این روش آزمایشگاهی نشان داد که در تمام هسته و کروماتین تهیه شده یک نظمی وجود دارد و این نظم را نمی توان برای DNA یا پروتئین ها به تنهایی توضیح داد. به هر حال، برای بعضی از نمونه ها ساختار منظم تکراری پیشنهاد شده است.

کروماتین ها یا کل هسته تهیه شده در آزمایشگاه را با بلورهای تهیه شده برای انجام روش پراش اشعه- X مقایسه کردند. این موضوع موجب پیچیدگی بیشتری جهت تفسیر اطلاعات کسب شده گردید.



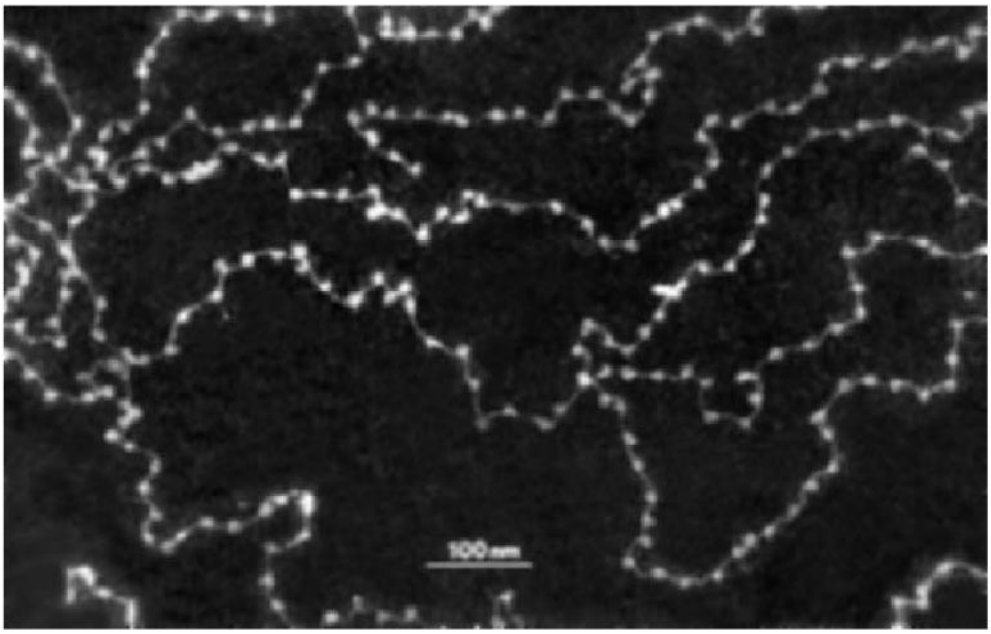
شکل 3- 1 قطعات DNA توسط برش هایی که نوکلئازها بر روی کروماتین ایجاد کردند را در شکل مشاهده می کنید. قطعات DNA در حدود 200 bp هستند. فلش های کلفتر محل هایی که امکان دارد توسط نوکلئاز قطع شوند را نشان می دهند.

www.ShimiPedia.ir

معلوم شد که کروماتین از زیر واحدهای بازی و تکراری تشکیل شده است و قدم بعدی پیدا کردن راهی جهت تخلیص این زیر واحدها به طور دست نخورده و سالم بود تا بتوان آنها را از لحاظ ساختاری و خصوصیات بیوشیمیایی مورد بررسی قرار داد. برای انجام این عمل نیاز به قرار دادن هسته در شرایطی داشت که کروماتین استخراج شده شکسته و ساختار زیر واحدها به طور سالم به دست آیند (منتهی این شرایط نباید موجب تجزیه کامل آنها شود). با توسعه روش میکروسکپ الکترونی، ساختار کروماتین به طور مستقیم مورد مشاهده قرار گرفت. با نگاهی به کل هسته یا قسمتی از آن اطلاعات مفیدی به دست آمد و روش های تخریبی مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

مشکل اصلی این بود که این روش های تخریبی یا تثبیت آنها خودشان ساختار اصلی کروماتین را بهم نزنند. دستیابی جهت اصلاح این روش ها موقعی موفقیت آمیز بود که توانستند کمپلکس های نسخه برداری را در کروموزوم های تخمک دوزیستان به نام لمپ براش (lampbrush) (بزرگترین کروموزوم شناخته شده در تخمک دوزیستان است که در مرحله دیپلوتن میوز به وجود می آید) مشاهده کنند. هسته بافت های مختلف را تحت شرایط ایزوتونیک (یعنی KCl 200 mM) خالص کردند و سپس با کاهش غلظت نمک، باد کرده و لیز نمودند. هسته لیز شده تحت این شرایط توسط فرمالدهید تثبیت گردید و درون شبکه های پوشیده شده با کربن جهت تجزیه و تحلیل با میکروسکپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. این رشته ها در خارج از هسته لیز شده، قابل رویت هستند. در مقاله ای که توسط دونالد و آدا اولینز (Donald and Ada Olins) ارائه شد، رشته های مشاهده شده را رشته های تسبیح مانند نامیدند (beads – on – a- string). این ذرات به قطر 60 تا 80 آنگستروم بودند که توسط رشته های 15 آنگسترومی از هم جدا می شدند (شکل 3- 2). این آزمایش توسط سایر محققین همزمان با استفاده از روش های مختلف انجام شد و تصاویر مشابهی به دست آمد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 3- 2 نوکلئوزوم ها و رابط DNA (linker) زیر میکروسکپ الکترونی. هسته گلبول های قرمز خون مرغ در محلول نمکی رقیق لیز شدند. کروماتین خارج شده توسط فرمالدهید تثبیت گردید. سپس در دانه های پوشیده شده با کربن توسط سانتریفیوژ پخش شد و با یورانیل استات رنگ گردید.

ذرات مشاهده شده توسط بعضی از محققین کمی بزرگتر (در حدود 100 تا 300 آنگستروم) بود. این ذرات را اولینز (Olins) ذرات- v (v- bodies) نامید و پیشنهاد کرد که آنها از تجمع 5 هیستون و DNA به وجود آمدند و رابط بین آنها یک DNA برهنه است (رشته ای 15 آنگسترومی).

این ساختار با سایر رشته های تهیه شده با استفاده از روش های مختلف توسط میکروسکپ الکترونی (EM) مورد مقایسه قرار گرفتند. این نتایج نشان داد که هنگام هضم توسط نوکلئاز، نظم خاصی دیده می شود و در هنگام برش در کروماتین مقاومت وجود دارد ولی نسبت به قسمت های بین نوکلئوزوم ها حساس است. اندازه ذرات در تمام هسته و کروماتین 100 آنگستروم می باشد.

www.ShimiPedia.ir

بهتر است که همیشه تصویری از ساختارهای پیشنهاد شده داشته باشیم ولی تجزیه و تحلیل با میکروسکپی نشان دادکه دو اشکال بدیهی و اجتناب ناپذیر وجود دارد: اول این که ممکن است ساختارهای مشاهده شده فرآورده های مصنوعی باشند و دوم این که میکروسکپ الکترونی اطلاعات کافی را در زمینه ترکیب ساختار مشاهده شده در اختیار ما قرار نمی دهند. بنابراین نیاز به جداسازی و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنها داریم. مجدداً تأکید می شود که هضم توسط نوکلئاز توانست بسیاری از مسائل را حل کند. اگر هسته ها توسط نوکلئاز میکروکوکی (micrococcal nuclease) اینکوبه شوند، سپس کروماتین را تحت شرایط ملایم خالص کنیم (این عمل با سانتریفیوژ کردن آنها در شیب سوکروز صورت می گیرد) (شکل 3- 3 ، a)، نموداری شبیه شکل 3-3 ، b به دست می آید (اگر با غلظت های ملایم نمک یعنی حدود 0/4 M هیستون H1 را جدا کنیم). فراکسیون های جدا شده توسط شیب سوکروز نشان دادند که هیستون های H2A، H2B، H3 ، و H4 از لحاظ مولی برابر بودند و در هر فراکسیون مقداری DNA وجود داشت. در اثر هضم توسط نوکلئاز همانطور که در شکل 3- 3 ، c دیده می شود، نوارهای DNA نیز مشاهده می گردد. این آزمایش ها نه فقط ترکیب زیر واحدهای کروماتین را مشخص می کنند بلکه به ما می گویند که هیستون H1 جزء ترکیبات ضروری زیر واحد نیست.

در سال 1974 راجر کورنبرگ (Roger Kornberg) با استفاده از اطلاعات حاصل از ذرات فوق توانست اطلاعات بیشتری راجع به اندرکنش هیستون- هیستون در محیط خارج سلولی به دست آورد و مدل ساده و دقیقی برای ساختار کروماتین پیشنهاد کند. این مدل تا امروز مبنای ساختار کروماتین قرار گرفت. او پیشنهادات خود را چنین مطرح نمود:

1. کروماتین حاوی یک زیر واحد تکراری است که از 200 bp تشکیل شده است و دو تا از هر چهار هیستون های H2A ، H2B ، H3 ، و H4 در ساختار هشت تایی (اکتامر) دیده می شود. استوکیومتری آن در نگاه اول به صورت مقادیر نسبی از هیستون های متفاوت در گونه های مختلف پایه ریزی شد (این اطلاعات در عمل از آزمایش های تقاطعی مختلف هیستون –هیستون به دست آمده اند). بعدها این مطلب توسط پیر کامبون (Pierre Cambon) و همکارانش مورد تأیید قرار گرفت. آنها ذرات حاصل از کروماتین را خالص کردند و مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند و نام آن ذرات را نوکلئوزوم (nucleosome) گذاشتند.
2. یک رشته کروماتین از تعداد زیادی نوکلئوزوم به وجود آمده است و یک زنجیر به هم پیوسته انعطاف پذیر آنها را بهم متصل می کند. در زیر میکروسکپ الکترونی به صورت دانه های تسبیح دیده می شوند.

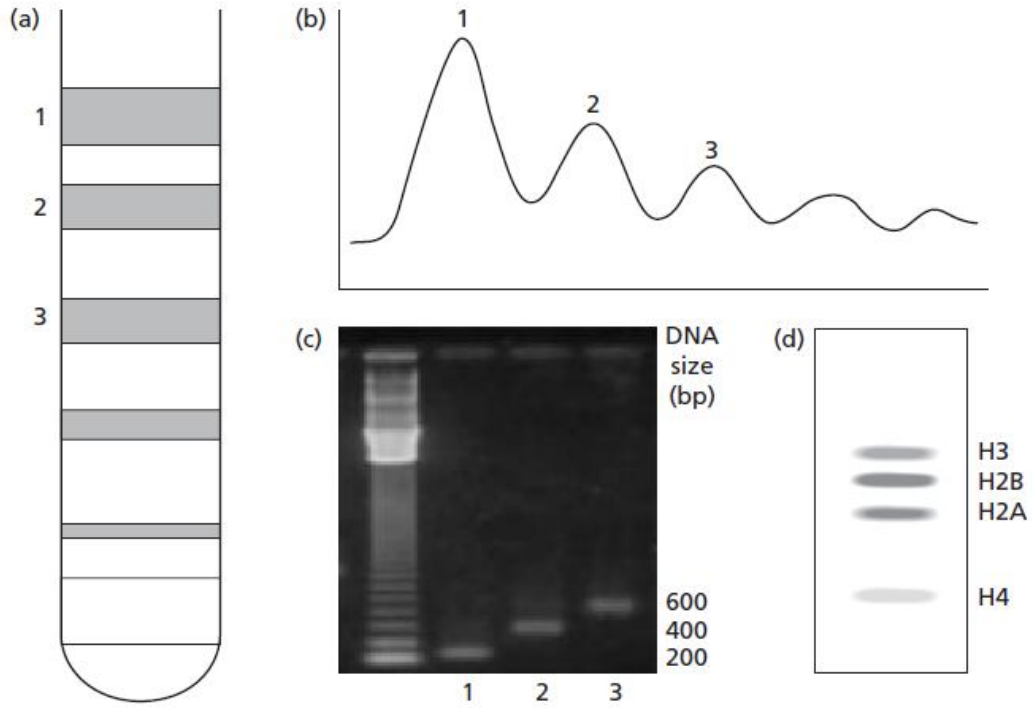
www.ShimiPedia.ir

ساختار نوکلئوزوم

اندرکنش های تقاطعی هیستون- هیستون درون نوکلئوزوم توسط ترکیبات شیمیایی انجام شد و معلوم گردید که هشت هیستون ایجاد یک ذره را می نمایند (هیستون اکتامر) و این ذره در شرایط یونی به تترامر $(H3 - H4)_2$ و دو دیمر $(H2A - H2B)$ تجزیه می شود. با این وجود، این شرایط نمی توانست به طور دقیق رابطه DNA سازمان یافته را با هیستون ها آشکار کند.

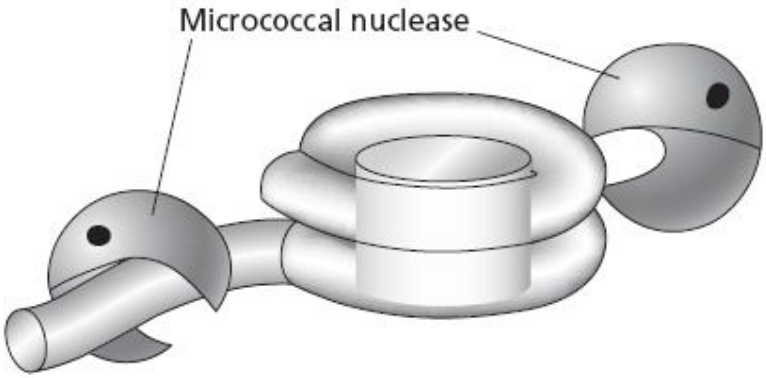
اولین شواهد بار دیگر از مطالعات مربوط به هضم نوکلئاز به دست آمد. وقتی نوکلئوزوم تحت تاثیر اندونوکلئاز DNaseI قرار گرفت معلوم شد که DNA در خارج اکتامر هیستونی پیچ خورده است. در نگاه اول به نظر می رسید که هیستون ها در مقابل هضم نوکلئاز میکروکوکی یا در واقع نوکلئازهای درون زا از DNA محافظت می کنند. این مشاهدات بر این اساس بود که DNA را می توانستند با اندونوکلئازهای مختلف برش دهند. نوکلئاز میکروکوکی، DNA دو رشته ای را مانند یک بُرنده عمودی بُرش می دهد یعنی قبل از برش توسط این آنزیم باید دو رشته DNA رویهم قرار گرفته باشند (شکل 3- 4). به همین دلیل آنزیم قادر نیست باقیمانده DNA ای که در قسمت سطحی قرار دارد را برش دهد. این موضوع نشان می دهد که چرا DNA نوکلئوزومی از برش توسط نوکلئاز میکروکوکی محافظت شده است (با آن که در خارج از اکتامر هیستونی قرار دارد) (شکل 3 – 4).

www.ShimiPedia.ir



شکل 3- 3 قطعات کروماتین با اندازه های مختلف را می توان توسط سانتریفیوژ از هم جدا کرد. (a) بعد از تهیه کروماتین (طبق روشی که در شکل 3- 1 اشاره شد)، آن را در بالای محلول سروکروز که داخل لوله سانتریفیوژ است، قرار می دهیم. سپس با دور 100000 g سانتریفیوژ می کنیم. قطعات کروماتین با سرعت های مختلف در لوله سانتریفیوژ شروع به حرکت می کنند. هر چه اندازه قطعه بزرگتر باشد، حرکت آن سریعتر می شود. بعد از چند ساعت، نوارهای مشخصی در محلول سرکروز دیده می شوند. (b) نوارهای کروماتین از بالای لوله به طرف پایین با استفاده از دانسیته نوری (optical density) اندازه گیری می شوند. (c) اگر DNA حاصل از هر یک از فراکسیون های منحنی را در ژل الکتروفورز قرار دهیم، تشکیل نوارهایی با اندازه های مشخص می نماید (رنگامیزی با اتیدیوم بروماید). (d) الکتروفورز پروتئین آنها چهار نوار با اندازه های مختلف را نشان می دهد (وقتی مقادیر اکی مولار استفاده شود).

www.ShimiPedia.ir

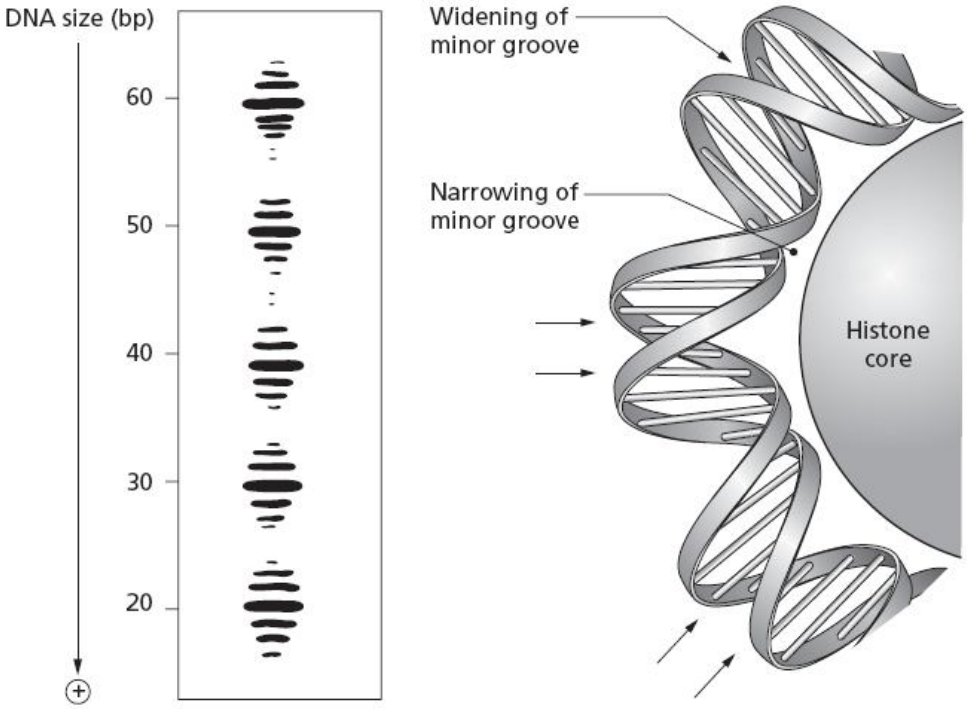


شکل 3- 4 نوکلئاز میکروکوکی باید در اطراف DNA قرار گیرد تا بتواند آن را برش دهد، بدین ترتیب DNA موجود در هسته نوکلئوزوم محافظت می شود (حتی اگر در سطح خارجی آن باشد).

آنزیم DNaseI به صورت متفاوتی عمل می کند. در جایی که این آنزیم به DNA اتصال می یابد، ایجاد برش در یک رشته یا اگر DNA مارپیچ دو رشته ای باشد می تواند در هر دو رشته ایجاد برش نماید. موقعی که DNA در سطح نوکلئوزوم قرار گرفت، DNaseI می تواند در یکی از رشته ها سوراخ به وجود آورد ولی DNA ای که کمی دورتر از سطح قرار دارد راحتر بریده می شود. شما این مطلب را در شکل 3- 5 مشاهده می کنید. برش های DNaseI با روش های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت و معلوم شد که DNA نوکلئوزومی در اطراف هسته هیستون (histone core) می پیچد.

به هر حال، تا قبل از دهه 1970 ، ترکیب و ساختار اصلی زیر واحد کروماتین مشخص نشده بود. معلوم شد که ساختار اصلی نوکلئوزم حتی در غیر مرتبط ترین یوکاریوت ها (میکروارگانیزم های تک سلولی مثل مخمرها تا گیاهان عالی و پستانداران) مشابه هم هستند. به هر حال، ساختار نوکلئوزوم زمانی کاملاً مشخص شد که توانستند به طور مستقیم مورد تجزیه و تحلیل قرار دهند. تجزیه و تحلیل مربوطه توسط کریستالوگرافی اشعه x امکان پذیر شد. مشکل اصلی در استفاده از این روش قدرتمند، زمانی برطرف شد که توانستند بلورهای نوکلئوزوم را با کیفیت بسیار بالا به دست آورند. متمایزترین ویژگی بلورها، نظم ساختاری آنها است و تولید بلورها وقتی از مخلوط غیر همگن استفاده شود، غیر ممکن است.

www.ShimiPedia.ir



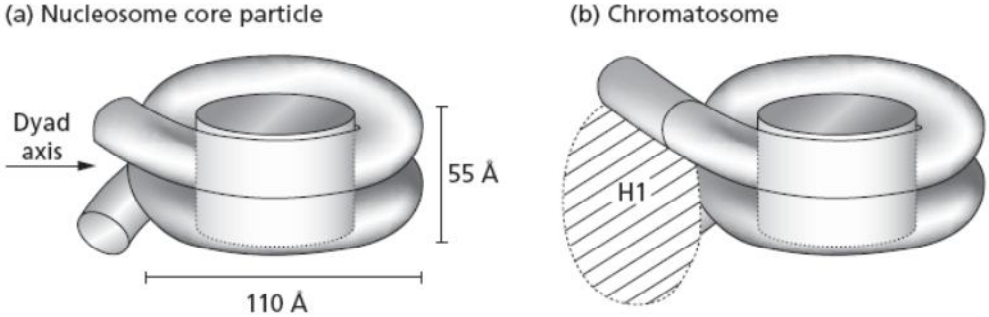
شکل 3- 5 نوکلئاز DNaseI می تواند DNA نوکلئوزومی را در محل هایی دورتر از هسته هیستون برش دهد. برش های ایجاد شده در یک رشته DNA را با فلش نشان دادیم. قطعاتی که توسط تیمار با DNaseI ایجاد شده حدود 10 bp هستند (یعنی در هر دور از مارپیچ DNA). برش های به وجود آمده توسط روش الکتروفورز مشخص گردیدند.

متاسفانه نوکلئوزوم ها، همانگونه که قبلاً توضیح داده شد، در این دسته جای دارند. حتی منو نوکلئوزوم هایی که توسط شیب سوکروز خالص شدند نیز غیر همگن بودند. طول DNA رابط (linker) در نوکلئوزوم های خالص شده متفاوت بود. این اختلاف در نتیجه تغییرات اجتناب ناپذیر محل های دقیق برش توسط نوکلئاز است (رجوع شود به شکل 3 – 1). به منظور غلبه بر این مشکل، بعد از اتصال کامل DNA به اوکتامر، نوکلئاز اضافه شد، در نتیجه DNA متصل به اکتامر بدون برش باقی ماند (در تمام آنها 146 bp بود). یعنی تمامی DNA رابط برداشته شده بود. بنابراین برش تا خود ذره پیش نرفت. این ساختار یعنی هسته مرکزی نوکلئوزوم توسط کلاگ (Kelug) و همکارانش در آزمایشگاه زیست مولکولی MRC (دانشگاه کمریج) به شکل بلور در آمد و مورد مطالعه دقیق قرار گرفت. بعد از چندین سال آزمایش های طاقت فرسا، با استفاده از کریستالوگرافی اشعه x ، ساختاری با وضوح $25^{\circ}A$ مورد بررسی قرار گرفت و در سال 1977 مقاله آن منتشر شد.

www.ShimiPedia.ir

بدین ترتیب نخستین تصویر قطعی از ساختار بنیادی هسته نوکلئوزوم به دست آمد. ساختار اصلاح شده با وضوح $7^{\circ}A$ در سال 1984 به دست آمد و منتشر گردید. چیزی که در این آزمایش ها مشخص شد عبارت بود از یک هسته هیستون که اطراف آن را DNA دو رشته ای با 146 جفت باز می پوشاند و 1/8 دور در اطراف هسته هسیستون می پیچد. این هسته تقریباً به شکل یک استوانه ای است که قطر آن $110^{\circ}A$ و ارتفاع آن $55^{\circ}A$ باشد. این هسته به شکل گوه است و این شکل باعث می شود که مجموعه ذرات هسته در بلورها، ایجاد یک انحناء کند. در این هسته یک محور با تقارن دوگانه وجود دارد و به آن دیاد (dyad axis) گویند. ساختار آنها را در شکل 3- 6 ، a مشاهده می کنید.

علی رغم موفقیت های بزرگ حاصل از تجزیه و تحلیل کریستالوگرافی اشعه x هنوز سوال اصلی در باره آنها باقی است؟ یکی از این سوالات این است که نقش هیستون H1 چیست؟ در واقع هنگام استخراج کروماتین، از محلول های نمکی استفاده می شد و این عمل موجب جدا کردن هیستون H1 می گردید. به هر حال، مطالعات دقیقتر توسط سینتیک هضم کروماتین با نوکلئاز میکروکوکی نشان داد که هیستون H1 در داخل سلول ارتباط نزدیکی با نوکلئوزوم دارد. وقتی هضم آنزیمی در کروماتین طبیعی یا دست نخورده (یعنی همراه با H1) به وجود آوردند، کوچکترین قطعه به دست آمده حاوی DNA ای با 165 جفت باز بود. با ادامه عمل هضم این قطعات به 146 جفت باز کاهش یافت. ذرات حاوی 165 bp را خالص کردند و مشاهده گردید که هیستون H1 دارند (در حالی که در ذرات 146 جفت بازی هیستون H1 نبود). با توجه به مشاهدات فوق نتیجه گرفته شد که هیستون H1 مانع هضم شدن تقریباً 20 جفت باز (توسط نوکلئاز) گردید. تصور می شود که قسمت رابط در خارج از هسته اکتامر قرار دارد و باید در محلی باشد که رشته DNA از آن خارج یا به آن وارد می شود. این نتایج به واسطه تاثیر H1 بر هضم شدن توسط نوکلئازها به دست آمد. همچنین نتایج استوکیومتری نشان داد که به ازای هر نوکلئوزوم یک مولکول H1 وجود دارد. یک نوکلئوزوم به همراه H1 را گاهی کروماتوزوم (chromatosome) هم می گویند را در شکل 3- 6 مشاهده می کنید.



www.ShimiPedia.ir

شکل 3- 6 ابعاد ذره هسته نوکلئوزوم (a) و مکان احتمالی هیستون رابط H1 در کروماتوزوم (b) می باشند.

هیستون H1 دارای یک هسته کروی و دو انتهای نسبتاً طویل N و C است که این امکان را فراهم می کنند تا با هر دو DNA مربوط به رابط و هسته در ارتباط باشد. ارتباط دقیق ساختاری بین هیستون H1 و نوکلئوزوم هنوز مورد بحث محققین است و این بحث تا زمانی ادامه خواهد داشت که امکان کریستالیزه کردن کروماتوزوم به وجود آید.

ساختار ذره هسته با وضوح بالا

در سال 1997 مقاله ای در مورد ساختار بلورهای هسته نوکلئوزوم با وضوح $2/8\ ^{\circ}A$ منتشر شد. در این مقاله گزارش قابل توجه ای راجع به جزئیات ساختاری و سازماندهی هیستون و DNA ارایه گردید. موتیف های ساختاری در هسته هیستون ها مشخص شد سپس مسیر DNA و ساختار آن در مقیاس اتمی تعیین گردید. این ساختارها را در شکل های 3- 1 و 3- 2 مشاهده می کنید. معرفی ساختارهای پیچیده کروماتین مدیون روش های طراحی کامپیوتری است و لازم به ذکر است که دلیل اصلی این موفقیت ها استفاده از مجموعه های همگن ذرات هسته به منظور بلوری کردن آنها می باشد. این دستاوردها در خارج از سلول توسط قطعات DNA نوترکیب و هیستون های نوترکیب (یعنی هیستون هایی که در پلاسمید باکتری ها بیان شدند، آنها حاوی ژن های H2A ، H2B ، H3 و H4 مربوط به دوزیستان بودند) به دست آمدند. هیستون های نوترکیب فاقد تغییرات پس ترجمه

(post- translational modifications) بودند (در حالی که در حالت طبیعی وجود دارند). به همین علت بلورها و ذرات هسته ای یکنواخت تری تولید شد.

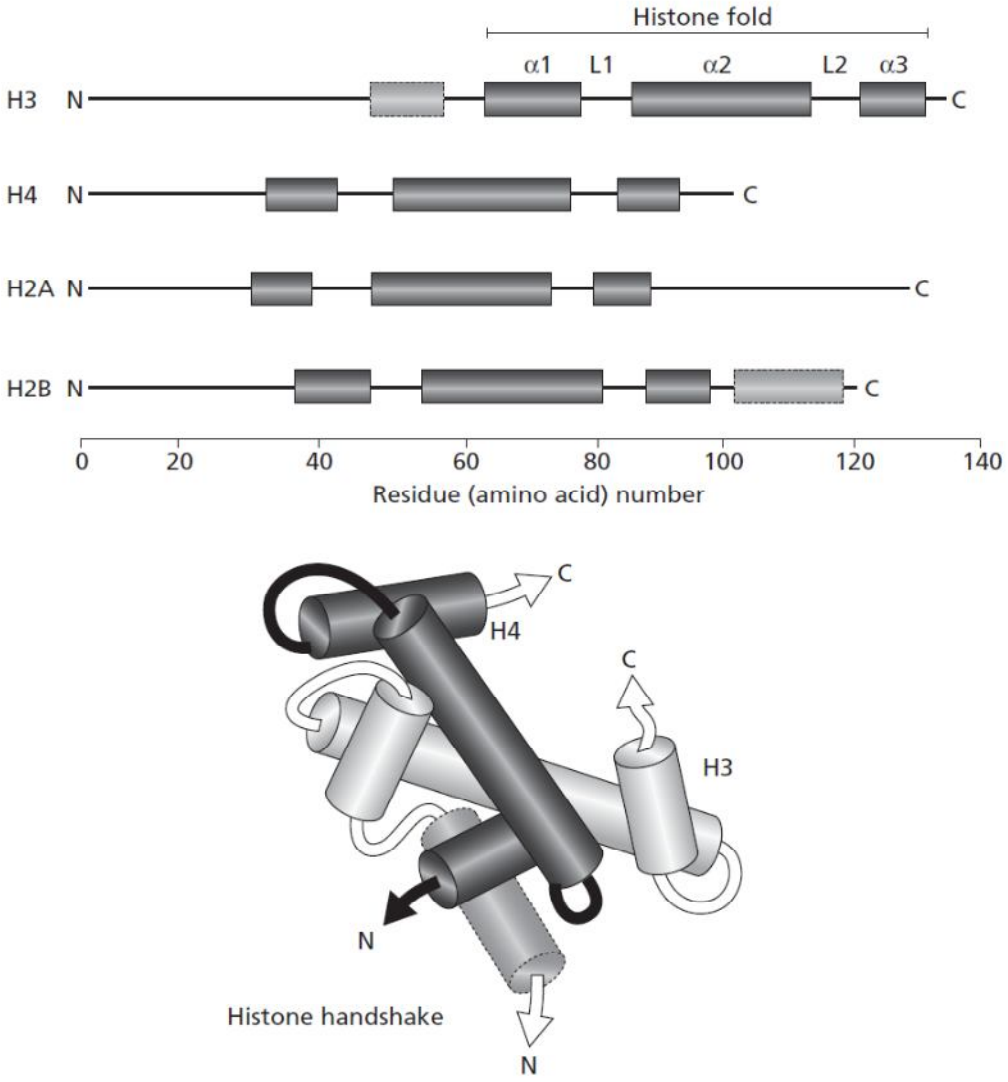
اندرکنش های هیستون – هیستون در نوکلئوزوم

بعضی از داده های آزمایشگاهی مهم که باعث شد اولین مدل نوکلئوزومی ارائه شود، مربوط به ارتباط بین هیستون ها در محیط خارج سلولی بود. برخی از هیستون ها به راحتی به یکدیگر متصل شده و تشکیل هترودیمر می دهند. این هیستون ها H3 – H4 و H2A – H2B هستند. دیمر H3 –H4 می تواند مجدداً بهم متصل شده و ایجاد تترامر $(H3 - H4)_2$ نماید. اولین سر نخی که حاکی از ارتباط این پیوندها در محیط داخل سلولی می شد از مشاهده تجزیه قطعات کروماتین به واسطه افزایش غلظت نمک و از دست دادن دیمرهای H2A – H2B بود (در این حالت DNA حاوی فقط تترامرهای $(H3- H4)_2$.

www.ShimiPedia.ir

جزئیات بیشتر در مورد اندرکنش های بین اکتامرها در غیاب DNA توسط کریستالوگرافی اشعه x به ویژه در آزمایشگاه مودریاتاکنس (E. Moudrianakis) به دست آمد. این مطالعات عناصر ساختار دوم (از همه مهمتر مارپیچ های – α) یعنی هیستون های واقع در اکتامر را تعیین کرد. در ضمن منجر به شناسایی دو موتیف ساختاری مهم گردید: یکی از آنها تا خوردگی هیستون (histone fold) یا هیستون تا خورده و دیگری دستداد هیستون (histone handshake) است (برای نشان دادن بعضی از شکل های دو بعدی یا موتیف ها از کلمه hand استفاده می شود مثل right- handed) (شکل 3- 7). نواحی هیستون تا خورده شامل توالی های مربوط به سه مارپیچ – α است که یکی از آنها بلند و دو تای دیگر کوتاه هستند. این مارپیچ ها توسط نواحی حلقه مانندی (loop) (توجه داشته باشید که مارپیچ نیستند) از هم جدا می شوند. این خصوصیات که در سازماندهی مارپیچ های- α وجود دارند در هر چهار هیستون مشاهده شده اند (البته در بعضی از پروتئین های غیر هیستونی نیز وجود دارند). در هسته اکتامر، سه ناحیه مارپیچ وجود دارند که در هر چهار هیستون مشابه هم هستند و ساختار سوم آنها را تشکیل می دهند. در نتیجه به این نوع ساختار، هیستون تا خورده (histone fold) گفته می شود (شکل 3- 7).

www.ShimiPedia.ir



شکل 3- 7 دُمین های کروی و مرکزی هسته هر چهار هیستون که حاوی سه مارپیچ – α هستند و ساختاری به نام هیستون تاخورده (histone fold) را به وجود می آورند. مستطیل های پر رنگتر که با نام های α_1 ، α_2 ، و α_3 مشخص شده اند (در قسمت بالای شکل فوق مشاهده می کنید) نواحی مارپیچ – α در دُمین هیستون تا خورده می باشند. L_1 و L_2 حلقه هایی (غیر مارپیچ) هستند که رابط می باشند.

www.ShimiPedia.ir

تا خودگی هیستون های H3 و H4 و همچنین H2A و H2B به یکدیگر به نحوی است که می توانند بهم قفل شوند (شکل 3- 7). در اثر این عمل دیمرهای H3 – H4 و H2A – H2B پایدار می شوند و هسته اصلی اکتامر را به وجود می آورند.

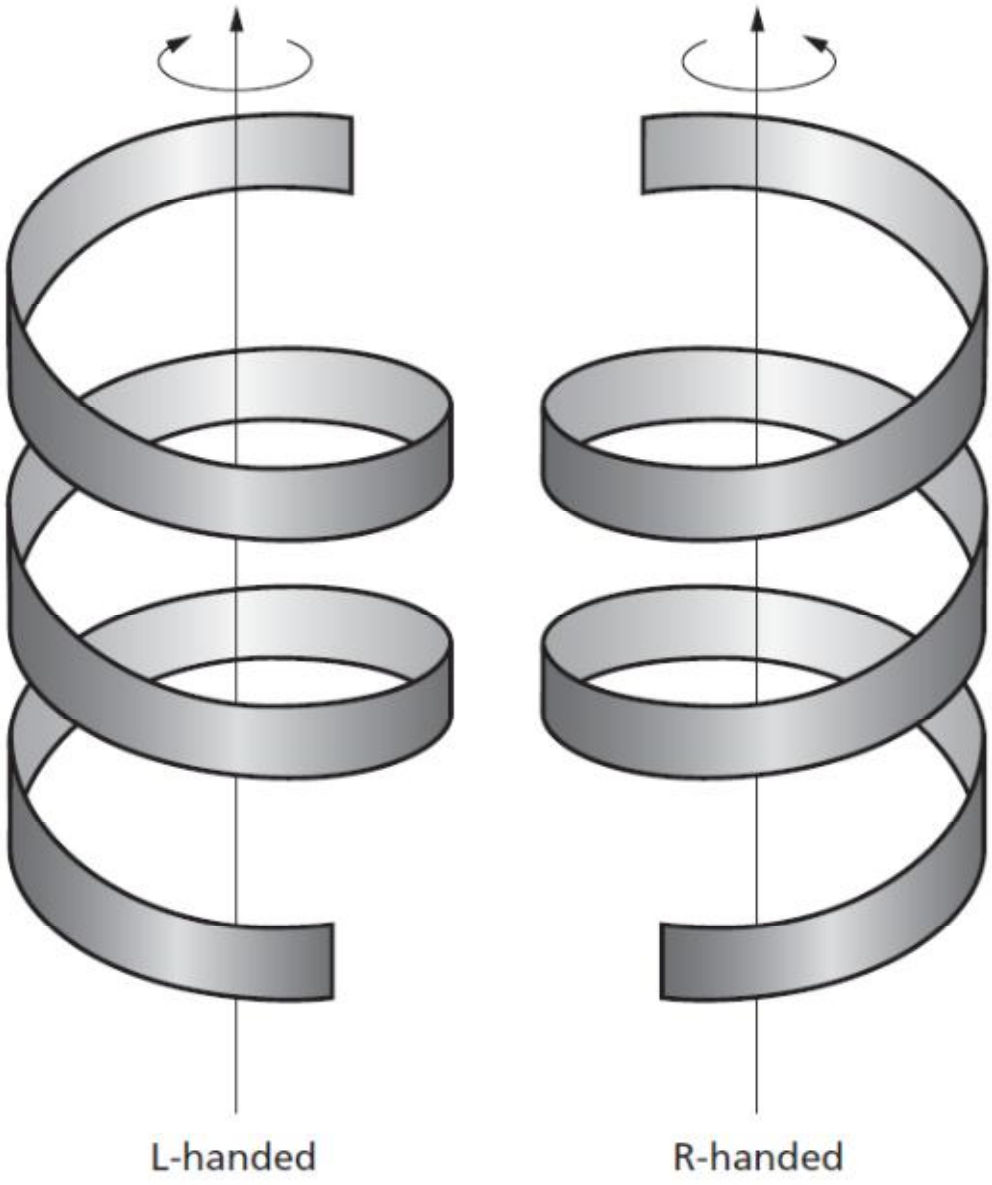
DNA نوکلئوزومی

مسیری که مارپیچ دو تایی DNA در سطح اکتامر هیستونی طی می کند توسط روش های کریستالوگرافی اشعه x ، هضم نوکلئازی، و اتصال هیستون- DNA مشخص شدند. مولکول DNA در اطراف هسته هیستون 1/8 دور به صورت ابر مارپیچ چپ گرد می زند. مارپیچ دو تایی DNA خودش راستگرد است (شکل 3- 8). مسیر و ساختار DNA در اطراف اکتامر با وضوح 2/8 ° A تعیین شد. مولکولDNA ، یک مسیر هموار و پیوسته را دنبال نمی کند و بعضی از نواحی آن خمیدگی بیشتری نسبت به سایر نقاط دارد. این نوع خمیدگی (bending) را که موجب پیچش بیشتری می شود، درجه خمیدگی گویند. خم شدن غیر یکنواخت DNA هسته را می توانید در شکل 3- 2 مشاهده کنید. پیچیدن مارپیچ دو تایی روی بعضی از عملکردهای DNA نوکلئوزومی تأثیر می گذارد (مثل توانایی تشخیص پروتئین های اتصالی به DNA). مسیر DNA می تواند نقش مهمی در تنظیم نسخه برداری داشته باشد. مقاومت های نسبی توالی های مختلف DNA در برابر خم شدن می توند عامل اصلی تعیین دقیق محل های DNA باشد.

یکی از خصوصیات DNA هسته ذره که مورد توجه و بحث محققین قرار گرفته بود، نحوه پیچش آن به دور هسته بود (یعنی مقدار جفت بازهای آن در هر دور کامل).

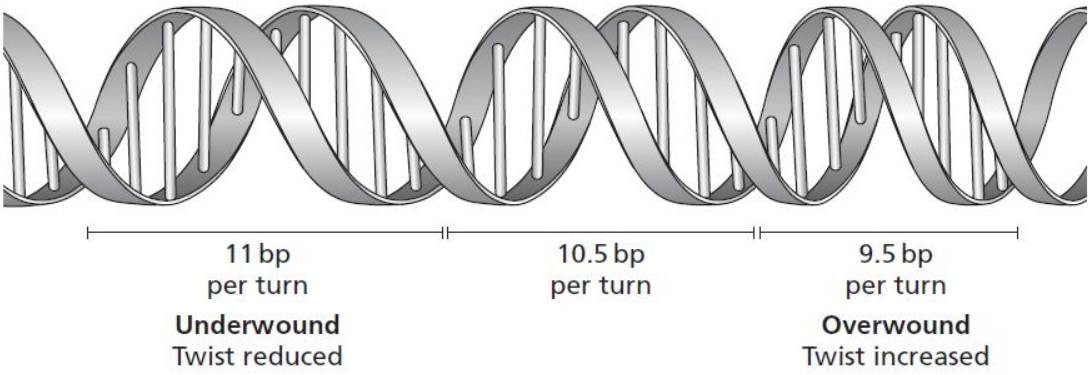
در هر دور کامل B- DNA (شکل طبیعی آن در محلول ایزوتونیک) 10/6 جفت باز وجود دارد. در نوکلئوزوم، بنظر می رسد که بازهای آن در هر دور به 10 bp کاهش یابد (یعنی پیچش DNA بیشتر شود) (شکل 3- 9). تعیین این تعداد جفت باز در هر دور کامل کار چندان ساده ای نبود (نیاز به تجزیه و تحلیل دقیقی با استفاده از هضم آنزیمی توسط DNaseI داشت). تفاوت هایی که در اثر پیچش بیشتر یا کمتر ممکن است ایجاد شوند را در شکل 3- 9 مشاهده می کنید. چگونگی تغییرات موضعی پیچش DNA در اثر حمله نوکلئازی یا اتصال پروتئین های پیوندی به DNA نباید کار چندان مشکلی باشد. توجه داشته باشید که مسیر دقیق DNA در اطراف هسته اکتامر و خصوصیات موضعی آن بستگی به خصوصیات هسته هیستون ها و توالی DNA دارد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 3- 8 شکل روبان مارپیچ های چپ گرد و راستگرد را نشان می دهد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 3- 9 مارپیچ دو تایی DNA با پیچش بیشتر و کمتر.

اندرکنش های هیستون – DNA

تلاش اولیه برای تعیین نقاطی که اندرکنش های ابر مارپیچ DNA با اکتامر ایجاد می کند، انجام شد. این عمل با استفاده از روش های تقاطعی هیستون- DNA صورت گرفت. با استفاده از روش کریستالوگرافی اشعه- x توانستند اندرکنش های بین آمینو اسیدهای ویژه و DNA را مشخص کنند. دُمین های تاخورده هیستون در پیوند بین آنها و DNA نقش دارند (121bp) . چهار هیستون هترودیمر هسته ذره را می سازند (یعنی دو تا H2A – H2B و دو تا H3 – H4) و تقریباً به 30 bp از DNA متصل می شوند. به طور کل، اتصال اولیه بین آمینو اسیدهای مارپیچ – α (یا نواحی حلقه ای میانی) با فسفو استرهای DNA صورت می گیرد. این اتصال اجازه می دهد که اکتامر با راندمانی برابر به توالی های مختلف و نا محدودی از DNA متصل شود. هر وقت شیارهای کوچک DNA با هسته های هیستونی مواجه می شوند، اتصالات رخ می دهند و این پیوندها شامل پیوندهای هیدروژنی، اتصال نمکی بین آنها و فسفات های DNA و بالاخره اندرکنش های غیر قطبی با گروه های داکسی ریبوز هستند. بعلاوه، برای هر 14 اتصال که شیارهای کوچک با هسته هیستونی تماس پیدا می کنند، یک گروه جانبی باقیمانده آرژنین در دُمین تاخورده هیستون (10 مرتبه) یا ناحیه انتهای- N (4 مرتبه) قرار دارد.

www.ShimiPedia.ir

مونتاژ و از هم باز شدن نوکلئوزوم

ترکیب هیستون- DNA منجر به مونتاژ هسته نوکلئوزومی می شود و این عمل باعث ایجاد ساختار ثابت و پایدار می گردد. با وجود این، نوکلئوزوم مانند بسیاری از کمپلکس های ماکرومولکولی نسبت به تغییرات حتی کوچک قدرت یونی، حساس است، به طوری که در قدرت یونی پایین 1 mM و بالای 300 mM باز شدگی جزیی دیده می شود. قدرت یونی پایین یا قرار گرفتن در معرض معرف هایی مثل اوره، باعث تجزیه اندرکنش های هیستون- هیستون می شوند (برخی از آنها اندرکنش های آبگریز هستند). قدرت یونی بالا (غلظت های نمک 800 mM به بالا) موجب شکستن پیوندهای یونی بین DNA و هیستون ها می شود، در نتیجه تجزیه کامل هسته DNA می گردد. با وجود این، حتی در غلظت های نمکی بین 100 و 300 میلی مولار (غلظت هایی که ایزوتونیک هستند) موجب تجزیه موضعی DNA (یعنی نه به طور کامل) از اکتامر می شود. این مسئله احتمالاً حاصل جدا شدن DNA و متعاقب آن اتصال مجدد آن است (منظور از نقاطی است که DNA به هسته اکتامر وارد یا خارج می شود). این نوع از تعادل دینامیکی هنگامی مهم است که فاکتورهای نسخه برداری بخواهند به DNA بسته بندی شده به صورت نوکلئوزوم متصل شوند. همانطور که انتظار می رود، هیستون H1 اثر قوی در پایداری آنها دارد و باعث می شود که انتهای DNA در اتصال به اکتامر باقی بماند (شکل 3- 6 ، b).

علاوه بر آنچه که در بالا گفته شد، هسته نوکلئوزوم به طور خود بخودی نیز تشکیل می شود و تحت شرایط مناسب و از لحاظ انرژیتیکی مطلوب ، توانایی مونتاژ دارد. ذرات هسته خالص شده می توانند توسط نمک 2 M کاملاً تجزیه شده و پیوندهای هیستون از DNA شکسته شوند. اگر به این ترکیب اوره 5 M اضافه کنیم، اکتامر تجزیه شده و هیستون ها دناتوره می شوند. اگر محلول فوق را دیالیز کنیم و کم کم به همان شرایط اول یعنی غلظت نمک پایین برسانیم، ذرات هسته مجدداً تشکیل می شوند. این ذرات قابل تشخیص از مواد آغازین خود نخواهند بود (یعنی از لحاظ ساختاری مثل ضریب ته نشینی، هضم نوکلئازی، و زیر میکروسکپ الکترونی). توانایی مونتاژ مجدد ذرات هسته از اجزای تفکیک یافته، به دفعات در آزمایش های متعدد مورد بررسی قرار گرفته و این نوع ساختار به اثبات رسیده است.

www.ShimiPedia.ir

منابع

General

Van Holde, K. E. (1988) *Chromatin*. Springer, New York.
Wolffe, A. (1998) Chromatin: Structure and Function. 3rd Edn. Academic Press.

Early days

Hewish, D. R. & Burgoyne, L. A. (1973) Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52:** 504–510.
Kornberg, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184:** 868–871.
Kornberg, R. D. & Klug, A. (1981) The nucleosome. *Sci. Am.*, Feb 1981: 52–64.
Noll, M. (1974) Subunit structure of chromatin. *Nature*, **251:** 249–251.
Olins, A. L. & Olins, D. E. (1973) Spheroid chromatin units (ν bodies). *Science*, **183:** 330–332.

High-resolution nucleosome structure

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C. *et al.* (1991) The nucleosome core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88:** 10148–10152.
Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D. *et al.* (1977) Structure of the nucleosome core particle of chromatin. *Nature*, **269:** 29–36.
Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389:** 251–260.
Pruss, D., Hayes, J. J. & Wolffe, A. P. (1995) Nucleosome anatomy—where are the histones? *BioEssays*, **17:** 161–170.
Rhodes, D. (1997) The nucleosome core all wrapped up. *Nature*, **389:** 231–233.
Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, **311:** 532–537.

www.ShimiPedia.ir

فصل 4

تغییرات ژنتیکی در هیستون ها

در فصل قبل راجع به هسته نوکلئوزوم و نقش آن در متراکم کردن DNA بحث کردیم. همچنین در مورد حفظ ساختار آن در طول تکامل، چگونگی ساخت هیستون ها، و بالاخره اندرکنش های بین DNA و آمینو اسیدهای ویژه صحبت شد. نقش نوکلئوزوم تنها بسته بندی DNA نیست بلکه نوکلئوزوم دارای عملکرد ثانویه نیز می باشد که آن هم از اهمیت خاصی برخورد دار است. نقش ثانویه آن حمل اطلاعات اپی ژنتیک (epigenetic information) است.

اطلاعات اپی ژنتیک، دستوالعملی است که نشان می دهد چگونه اطلاعات ژنتیکی از روی توالی بازهای DNA رمز گشایی شوند و مورد استفاده قرار گیرند. برای مثال، یک دستورالعمل اپی ژنتیک ممکن است چنین باشد "این ژن نسخه برداری نشود" یا

"این ژن در صورتی نسخه برداری شود که ....." . بنابراین در این کتاب تلاش می شود که چگونگی دستورالعمل های داده شده و به موقع، مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند و نحوه تغییر و انتقال این اطلاعات از نسلی به نسل دیگر شکافته شود. پس قابل ذکر است که اولین محلی که باید در نظر گرفته شود، همین نوکلئوزوم ها می باشند.

در اولین نگاه، بنظر نمی رسد که انجام این عمل چندان امیدوار کننده باشد چون از لحاظ تکاملی این اطلاعات هم توسط خود ذرات و هم توسط هیستون های مونتاژ شده کاملاً حفاظت شده هستند. پس کجا باید به دنبال آن رفت؟ پاسخ به این سوال محل های ویژه ای در هسته های هیستونی است که در آن نقاط در ساختارهای اشعه- X بلورهای هسته ذرات دیده نمی شوند (منظور نواحی حدود 25 آمینو اسیدی است که در انتهای- N هر هشت هیستون موجود در هسته قرار دارند). این قسمت از نوکلئوزوم شامل دنباله هایی است که در سطح نوکلئوزوم هستند ولی ساختار ثابت و محکمی ندارند. بطور کل، توالی آمینو اسیدهای دُمین های دنباله در طول تکامل کاملاً حفاظت شده هستند. به هر حال، دنباله های هیستونی، بر عکس قسمت کروی آنها، تحت تأثیر آنزیم های مختلف و تغییرات پس ترجمه ای هستند. زنجیرهای جانبی آمینو اسیدهای ویژه ای را توسط گروه های شیمیایی خاصی می توان تغییر داد (مثلا توسط فسفات یا استات) در نتیجه موجب تغییر کانفورماسیون و بار هیستون ها می شوند. بنابراین علی رغم حفاظت آنها از لحاظ تکاملی، دُمین های مربوط به دنباله، متحمل تغییرات زیادی در هنگام انجام عمل پس ترجمه شدند.

www.ShimiPedia.ir

این تغییرات منبع اصلی اطلاعات اپی ژنتیکی را تشکیل می دهند. در این فصل از کتاب راجع به دنباله های هیستونی و تغییرات پس ترجمه ای آنها صحبت می شود.

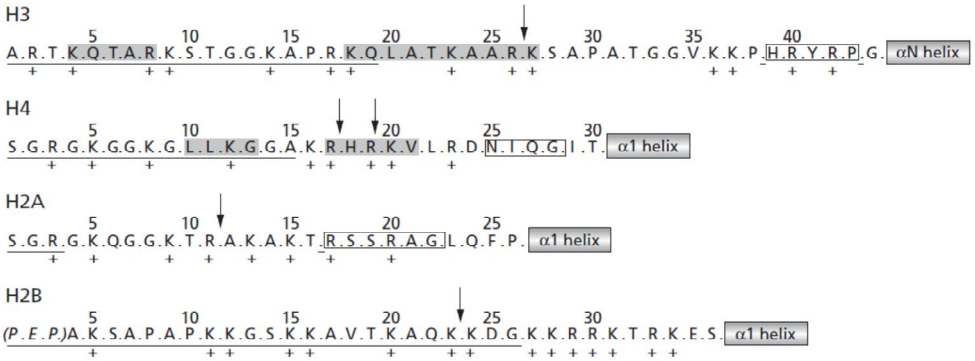
دنباله های هیستونی

دُمین های انتهای- N هیستون ها به به طور کامل توسط کریستالوگرافی اشعه- x شناسایی نشدند، زیرا آنها ساختار ثابتی در بلورهای هسته ندارند. این دُمین ها متحرک هستند و ساختارهای مختلفی به خود می گیرند. دُمین های دنباله غنی از آمینو اسیدهایی هستند که بار مثبت دارند (شکل 4- 1) بنابراین ترکیب این آمینو اسیدها به نحوی است که موتیف های معمول در ساختار دوم پروتئین ها نمی توانند داشته باشند. برای مثال، مقدار زیاد گلیسین در هیستون H4 و H2A همچنین مقدار زیاد پرولین در هیستون H2B موجب می شوند که نتوانند تشکیل مارپیچ $-\alpha$ دهند. دُمین های دنباله معمولاً ساختار رندوم کویل دارند. به هر حال، موضوع به همین سادگی نیست چون مشاهده شده است که نواحی کوتاهی از دنباله ها قادر به ایجاد ساختار مارپیچ $-\alpha$ هستند و شواهد نشان می دهند که تحت شرایط خاصی این عمل انجام می شوند (شکل 4- 1). در دنباله ها و در نواحی نزدیک به هسته، تشکیل ساختارهای دوم امکان پذیر است (حتی اگر ترکیب آمینو اسیدها مطلوب نباشند).

تصویری از نوکلئوزوم با تفکیکی پذیری بالا به دست آمد که در این تصویر بعضی از جزئیات دُمین های انتهای- N دنباله ها را نشان داد. این نواحی در نزدیکی هیستون تاخورده قرار دارند و دقیقاً محل هایی هستند که این دنباله ها می توانند هسته مربوطه را ترک کنند. دنباله های H3 و H4 در میان دو رشته DNA قرار دارند و دقیقاً از کانال باریکی که در شیارهای کوچک واقع شده اند، خارج می شوند. دنباله های H2A و H4 از شیارهای کوچکی (در قسمت بالا یا پایین) که در کنار هم قرار دارند، خارج می شوند.

نتیجه آخر این که انتهای- N دنباله هیستون در هر 20 جفت باز ، یکبار پدیدار می شود (شکل 4- 2). مطالعات اخیر نشان می دهند که هضم کنترل شده ذرات هسته نوکلئوزومی با پروتئازها (مثل تریپسین) موجب از بین بردن دُمین های انتهای- N همه هیستون ها و قسمت کوچکی از انتهای- C مربوط به H2A (حدود 11 باقیمانده آمینو اسید) و H3 می شود. بقیه قسمت های هیستون ها دست نخورده باقی می مانند. در آزمایش هایی که با استفاده از آنتی بادی ها انجام شدن نیز معلوم گردید که نواحی انتهای- N دُمین های دنباله ها و انتهای- C هیستون H3 در دسترس مستقیم انتی بادی ها قرار می گیرند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 4- 1 توالی آمینو اسیدهای (با اعلایم اختصاری تک حرفی) انتهای- N مربوط به دُمین های دنباله هر چهار هستون را مشاهده می کنید. شماره هر آمینو اسید در بالای آن نوشته شده است و در قسمت پایین آمینو اسیدهای باردار مثبت (لیزین با K و آرژنین با R) علامت + گذاشته شده است. فلش ها محل هایی را نشان می دهند که آنزیم تریپسین (پروتئاز) می تواند برش ایجاد کند. این محل ها معرف قسمت هایی از دُمین انتهای- N هستند که در دسترس آنزیم قرار می گیرند. محل هایی که بیشتر در قسمت انتهای- C هستند از شکسته شدن توسط آنزیم محافظت می شوند. خط هایی که در زیر آمینو اسیدها کشیده شده اند، محل هایی را نشان می دهند که تا کنون توسط کریستالوگرافی اشعه – x مشخص نشده اند و ممکن است بدون ساختار باشند یا چندین ساختار مختلف داشته باشند. به هر حال، بر اساس توالی آمینو اسیدها بعضی از نواحی هیستون ها H3 و H4 احتمالاً ساختار مارپیچ- α دارند (مستطیل های سایه دار). قسمت هایی که در مستطیل قرار دارند (در هیستون های H3 و H4) نواحی کوتاهی هستند که ساختار مارپیچ – α دارند، در ضمن این ناحیه در هیستون H3 احتمالاً متحرک است. باقیمانده های .P.E.P در انتهای- N مربوط به هیستون H2B وقتی از روش نوترکیب، بلورهای ذرات هسته تهیه شد، حذف شدند.

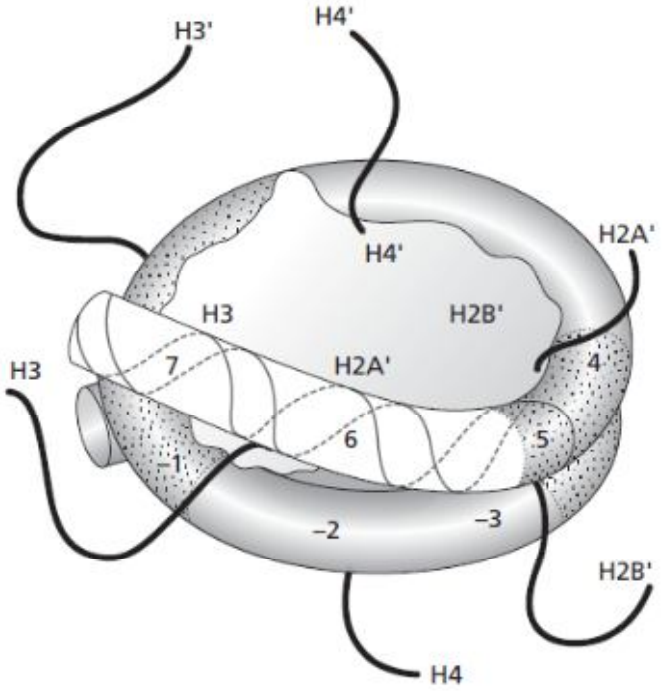
بنابراین چنین نتیجه گیری می شود که نواحی حساس به پروتئازها در سطح نوکلئوزوم قرار دارند.

مناطق انتهای- N ، قسمت قابل ملاحظه ای از هیستون های ذرات هسته (histone particle) را تشکیل می دهند (28%) و آزمایش نشان داد که حذف این مناطق با استفاده از فرایند پروتئولیز، باعث تغییرات اساسی در خواص فیزیکی آن نمی شود (این موضوع حکایت از آن دارد که ساختار بنیادین آن بهم نخورده است). علاوه براین، اگر دنباله های هیستون را خارج کنیم و نوکلئوزوم ها را در معرض غلظت بالای نمک و اوره قرار دهیم، آنها تجزیه شده و مولکول های آزاد DNA و هیستون ها به

www.ShimiPedia.ir

وجود می آیند. با استفاده از عمل دیالیز می توان نمک و اوره را از محیط خارج کرد، در نتیجه مشاهده شده است که نوکلئوزوم ها مجدداً به حالت طبیعی خود بر می گردند. بنابراین، برای حفظ ساختار نوکلئوزوم و انجام عمل مونتاژ نوکلئوزوم ها (در محیط آزمایشگاهی) به دنباله های هیستون ها نیازی نیست. عدم وجود نقش ساختاری دنباله های هیستونی و محافظت آنها در طول تکامل (مخصوصاً در مورد H3 و H4) ، حاکی از نقش مهم آنها است.

آزمایش ها (در محیط آزمایشگاهی) نشان دادند که کروماتین دارای توانایی تشکیل ساختارهایی با نظم بالاتر را دارد.



شکل 4- 2 ذرات هسته نوکلئوزومی و دُمین های دنباله هیستونی. تصویر فوق بر اساس بلورهای ذرات هسته ساختار اشعه- x به دست آمده است. شماره های داخل مارپیچ DNA پیچ های کامل آن را نشان می دهند. از شماره 1 تا 7 در جهت خاصی پیچ ها را مشاهده می کنید و در جهت عکس آن شماره های 1- تا 7- گذاشته شده اند. انتهای- N دنباله های هیستون های H3 و H4 را مشاهده می کنید (برای هر جفت از آنها) و همچنین انتهای- N دنباله های هر یک از هیستون های H2A و H2B را می بینید. محل های خروج هر یک از این دنباله ها نیز نشان داده شده اند. طول هر دنباله بستگی به محل برش تریپسین دارد و برای هر آمینو اسید $3/7\ ^{\circ}A$ در نظر گرفته شده است. در حقیقت، دنباله ها بر اساس ساختار داخل سلولی تعریف شده اند (اگر فقط اندرکنش های آنها با سایر پروتئین ها یا هسته DNA را داشته باشیم). نواحی نقطه چین، محل های حساس به نوکلئازها را نشان می دهند.

www.ShimiPedia.ir

نوکلئوزوم ها از نقطه نظر فشرده سازی رشته های طویل DNA در هسته سلول اهمیت زیادی دارند، لذا سطوح تاخوردگی بالاتری را طلب می کنند و در این خصوص تلاش های متعدد و بیشماری در جهت مدل سازی این ساختارها در محیط آزمایشگاهی صورت گرفته است. شایان ذکر است که طول رشته های کروماتین از 100 nm (کانفورماسیون تسبیح مانند) به سطوح تاخوردگی بالاتر (در زیر میکروسکپ الکترونی مشاهده شده است) تغییر می کند. حذف دنباله ها توسط فرایند پروتئولیز به طور موثری، ساختارهای با نظم بالاتر را سرکوب کرد. بار دیگر، این یافته ها با تصویرهای به دست آمده از ساختارهای بلوری با درجه تفکیک بالا هماهنگی داشت. در این آزمایش ها معلوم شد که یکی از دو دنباله انتهای- N مربوط به هیستون H4 (باقیمانده های 16 تا 24) با بازهای دارای بار منفی هیستون های H2A و H2B اتصال برقرار می کنند. ولی این احتمال وجود دارد که این اتصالات غیر واقعی باشند و هنگام انجام روش های بلوری کردن آنها به وجود آمده باشند (البته در محیط آزمایشگاهی). به هر حال، بررسی این احتمال شایان ذکر و ارزشمند است که چنین پیوندهای درون نوکلئوزومی ممکن است باعث تجمع ساختارهای دارای نظم بالاتر و تسهیل در مونتاژ آنها نمایند.

تغییرات هیستون ها

دومین علامت و سر نخ در باره نقش احتمالی این دنباله ها از این حقیقت ناشی می شود که تعداد زیادی از آمینو اسیدهای موجود در انتهای- N درون دنباله های هیستونی می توانند به وسیله فعالیت های آنزیمی خاصی دستخوش تغییر شوند. این تغییر در نتیجه مطالعات اولیه تعیین توالی هیستون ها نیز مشخص شده بود. آزمایش نشان داد که باقیمانده های لیزین های بخصوصی در دنباله دُمین های H3 و H4 در اغلب موارد با اتصال گروه استات تغییر می کنند. مطالعات بعدی نشان دادند که دُمین های دنباله های هسته هیستون ها می توانند تغییر کرده و فسفوریله ، متیله، یا ADP – ریبوزیله شوند. دُمین های انتهای- C مربوط به H3 و H2A که خیلی کوتاه هستند، تغییر نمی کنند (البته یک استثناء وجود دارد و آنهم اتصال پپتید کوچک یوبی کوئی تین به لیزین شماره 119 مربوط به هیستون H2A است). هر یک از این تغییرات به وسیله آنزیم ها یا گروه هایی از آنزیم های خاص انجام می شوند (توجه داشته باشید که واکنش های معکوس آنها نیز اتفاق می افتند). این تغییرات در طول تکامل حفظ شده اند. برای مثال، تمام گونه هایی که تا کنون مورد آزمایش قرار گرفته اند قادر به استیله کردن هیستون H4 هستند. از نقطه نظر آزمایشگاهی، این تغییرات موجب ناهمگن سازی نوکلئوزوم ها می شوند. حتی اگر نوکلئوزوم هایی را خالص کنیم که به آنها DNA هایی با طول

www.ShimiPedia.ir

یکسان متصل باشند، مشاهده می شود که در یک جمعیت مختلط، تنوع زیادی دیده می شود. تنها بکارگیری هیستون های نوترکیب با استفاده از باکتری های مهندسی شده (از لحاظ ژنتیکی) بر این مشکل فایق آمد.

واضح است که سلول ها مقدار زیادی انرژی برای تغییرات هیستون ها (هم تولید ماشین آنزیمی جهت فراهم کردن لوازم مورد نیاز برای این تغییرات و هم کسب انرژی متابولیکی لازم برای انجام مراحل مختلف این نوع تغییرات) مصرف می کنند.

این نتایج کاملاً معقول و منطقی به نظر می رسند چون تغییرات ذکر شده در فوق نقش مهمی در تنظیم عملکردهای کروماتین دارند (محققین هنوز درحال جمع آوری شواهد بیشتری هستند). در حال حاضر تحقیقات مختصری در باره تغییرات پس ترجمه ای هیستون ها انجام شده است.

استیلاسیون

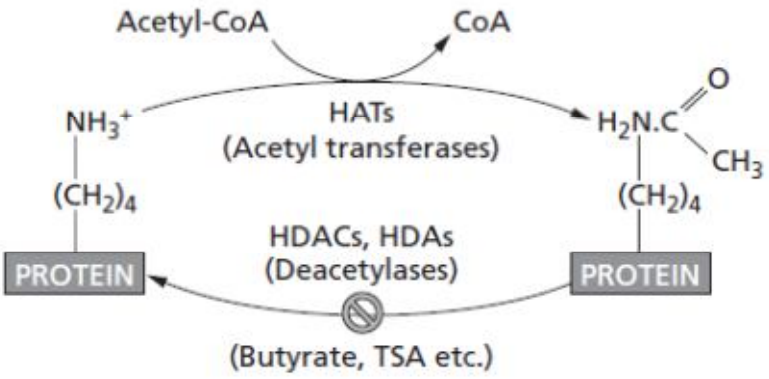
استیلاسیون هیستون ها یک تغییر پس ترجمه ای است که در تمام گونه های جانوری و گیاهی (که تا کنون مورد آزمایش قرار گرفته اند) در هسته نوکلئوزومی انجام می شود. استیلاسیون در گروه های آمینی- ε لیزین های بخصوصی اتفاق می افتد و تمام آنها در دُمین های انتهای- N هیستون های موجود در هسته قرار دارند (شکل 4- 1) (جدول 4- 1). در این مرحله تشخیص بین استیلاسیون گروه های آمینی $-\varepsilon$ و گروه آمینی $-\alpha$ در باقیمانده سرینی که در انتهای $-$ N قرار دارد، مهم است (استیلاسیون سرین در هنگام سنتز هیستون H2A و H4 و بسیاری از پروتئین های دیگر اتفاق می افتد). توجه داشته باشید که استیلاسیون سرین تغییری ایجاد نمی کند، هر چند که در اغلب پروتئین ها ، این عمل برای سنتز، انتقال یا فرایندسازی آنها مهم است ولی تا کنون تحقیقات نشان داده است که در کروماتین نقش تنظیمی ندارد.

www.ShimiPedia.ir

جدول 4- 1 محل های استیلاسیون هیستون های پستانداران

Histone	Lysines that can be acetylated
H2A	5, 9 (minor)
H2B	5, 12, 15, 20
H3	9, 14, 18, 23
H4	5, 8, 12, 16

انتقال گروه های استات از استیل – CoA به هیستون ها و متعاقب آن خارج کردن این گروه ها توسط آنزیم های هیستون استیل ترانسفرازها HAT (histone acetyl transferase) و هیستون داستیلاز (histone deacetylase) صورت می گیرند (شکل 4- 3). فرایند استیلاسون هیستون ها در محل های ژنومی خاصی به صورت واکنش های کاتالیزوری تعادلی بین این دو آنزیم انجام می شوند.



شکل 4- 3 چرخه استیلاسیون- داستیلاسیون هیستون ها

هر دو آنزیم ساختارهای پیچیده دارند و از چند زیر واحد تشکیل شده اند و اخیراً ترکیب و خصوصیات آنها مشخص شده اند. بعضی از زیر واحدهای آنها را خالص کرده اند و معلوم شده است که توسط ژن هایی رمز گشایی می شوند که در بیان ژن های تنظیمی دخالت دارند.

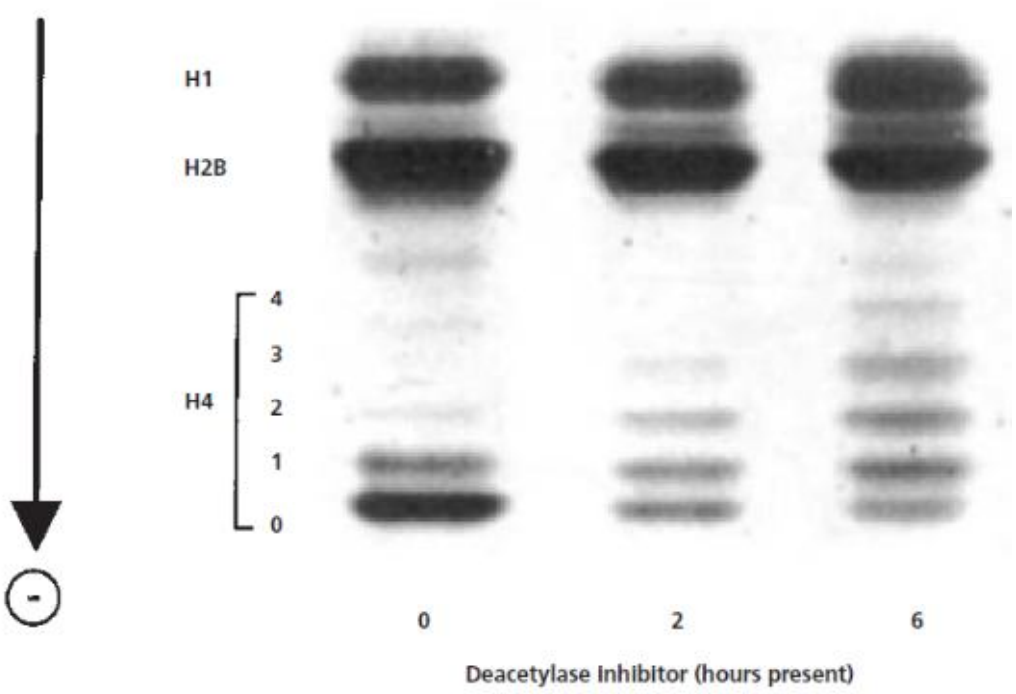
حالت پایا (steady state) و سرعت اولیه واکنش های آنزیمی استیلاسیون در سلول های مختلف با هم فرق دارند، نیمه عمر آنها بین چند دقیقه تا چند ساعت است. ماهیت دینامیکی چرخه استیلاسیون- داستیلاسیون توسط تیمار سلول ها با مهار کننده های آنزیم های داستیله کننده (مثل نمک های اسید بوتیریک یا پروپیونیک) مورد آزمایش قرار گرفتند. این روند بیشتر به سمت تجمع

www.ShimiPedia.ir

ایزوفرم های استیله شده (در همان دقایق اول) پیش رفت. علت آن اینست که هر گروه استات اضافه شده به هیستون ها موجب کاهش بارهای مثبت می شود (برای جدا کردن ایزوفرم های استیله شده می توان از الکتروفورز استفاده کرد) (شکل 4- 4). توجه داشته باشید که ایزوفرم های به دست آمده از روش الکتروفورز صرفاً نباید همگن باشند و ممکن است مخلوطی از مولکول های استیله شده یکسان باشند که فقط محل های استیلاسیون آنها با هم فرق دارند. برای مثال، ایزوفرم منو- استیله شده (mono-acetlated) هیستون H4 در شکل 4- 4 ممکن است این عمل استیله شدن در لیزین های 5 ، 8 ، 12 یا 16 اتفاق افتند. بنابراین، حرکت الکتروفورزی آنها یکسان است. استیلاسیون در تمام لیزین ها رخ نمی دهد و کاملاً روی لیزین های مشخصی اتفاق می افتد. مشاهد شده است که عمل استیلاسیون در موجودات مختلف با هم فرق دارند. برای مثال، در ماهی مرکب (یا سپیداج) (موجود زنده آزمایشگاهی مناسب که دوست دارد در سواحل دریا باشد) ایزوفرم منو استیله شده هیستون H4 را خالص کردند و مشاهده شد که لیزین شماره 12 آن استیله می شود. وقتی سطح فرایند استیله شدن افزایش می یابد، لیزین های شماره 5 ، 16 ، و 8 نیز در شرایط خاص و ثابت به طور غیر تصادفی استیله می شوند (جدول 4- 2).

فرایند استیله شدن هیستون H4 در سلول های پستانداران غیر تصادفی است، اما ترتیب استیله شدن در آنها کاملاً متفاوت است. منو- استیله شدن هیستون H4 در سلول های انسان و گاو منحصراً در لیزین شماره شماره 16 انجام می شود. استیله شدن به ترتیب در لیزین های شماره 8 ، 12 ، و بالاخره 5 انجام می شود (جدول 4- 2). بعلت این که ساختار نوکلئوزوم در پستانداران و ماهی مرکب یکسان است، الگوهای متفاوتی برای استیله شدن وجود دارند و بستگی به خصوصیات آنزیم های مداخله گر خواهند داشت (به جای این که بستگی به ساختار نوکلئوزوم داشته باشد).

www.ShimiPedia.ir



جدول 4- 4 ایزوفرم های استیله شده در هیستون H4 را می توان توسط الکتروفورز از هم جدا کرد. هیستون ها بار مثبت دارند و اگر در هنگام انجام عمل الکتروفورز در pH پایین قرار دهیم، به طرف قطب منفی حرکت می کنند. برای هر لیزین استیله شده، یک بار مثبت کم می شود بنابراین هیستون مربوطه آهسته تر به طرف قطب منفی حرکت می کند. ایزوفرم های استیله شده H4 در ژلی که حاوی غلظت های زیاد اسید استیک، اوره، و دترژانت ترایتون 100- x (Triton x- 100) باشد، به خوبی از هم جدا می شوند. در سلول هایی که تیمار نشده باشند، ایزوفرم هایی که عمل استیله شدن آنها زیاد باشد، نادر است (مگر این که سلول ها در معرض مهار کننده های داستیلاز قرار گرفته باشند).

توالی پروتئین نشان می دهد که استیلاسیون هیستون های H3 و H2B در سلول های انسان و گاو غیر تصادفی است. شایان ذکر است که این نوع تجزیه و تحلیل را فقط در سطح حالت پایای استیلاسیون و در محل خاصی از ایزوفرم های استیله شده قابل بررسی است. برای هر ایزوفرم، این سطح ممکن است در نتیجه چرخه های استیلاسیون- داستیلاسیون مختلف ایجاد شود (شاید در سرعت های مختلف و در بخش های متفاوتی از ژنوم اتفاق افتد).

www.ShimiPedia.ir

جدول 4- 2 لیزین های هیستون H4 را در جدول زیر مشاهده می کنید که به طور غیر تصادفی استیله می شوند.

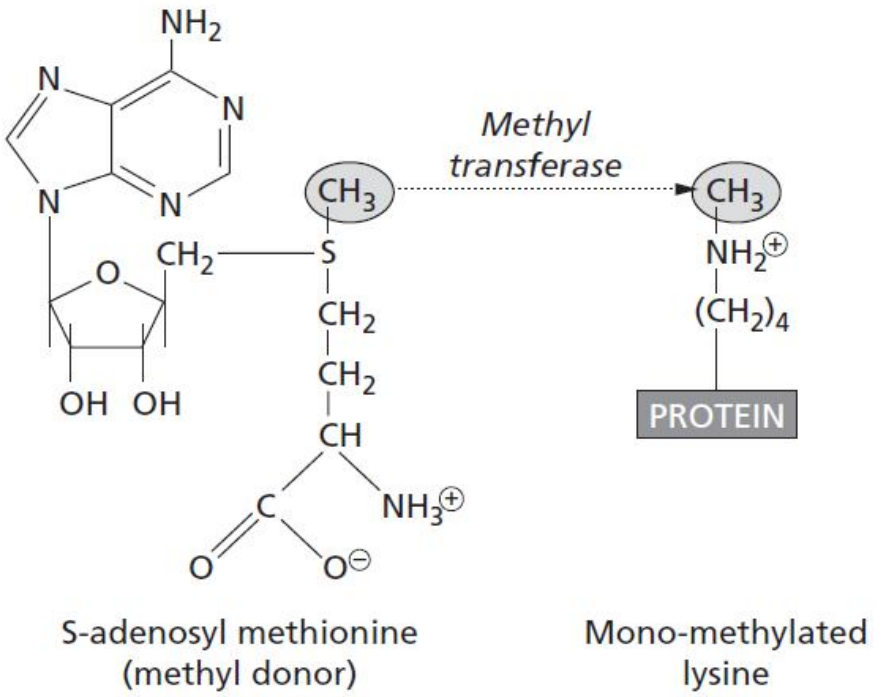
Number of acetates	H4 lysines acetylated	
	Mammals	Cuttlefish
1 (mono-acetylated)	16	12
2 (di-acetylated)	16, 12 (or 8)	12, 5
3 (tri-acetylated)	16, 12, 8 (or 5)	12, 5, 16
4 (tetra-acetylated)	16, 12, 8, 5	12, 5, 16, 8

متیلاسیون

در مطالعات اولیه مربوط به تعیین توالی هیستون های H3 و H4 معلوم شد که گروه های جانبی بعضی از باقیمانده های لیزین متیله شده بودند. لیزین متیله شده مانند لیزین استیله شده از لحاظ شیمیایی پایدارند. وقتی لیزین متیله می شود بر عکس استیله شدن، بار مثبت از بین نمی رود بنابراین در ژل الکتروفورز، هیستون ها بر اساس متیلاسیون لیزین ها از هم جدا نمی شوند. لیزین هیستون ها می تواند 1، 2 یا 3 گروه متیل قبول کند و معمولاً دهنده متیل S- ادنوزیل متیونین (S- adenosylmethionine) است (شکل 4- 5).

در اغلت موارد متیلاسیون اتفاق می افتد (در مهره داران روی هیستون های H3 و H4). آزمایش نشان داد که تغییرات معمولاً بعد از مونتاژ کروماتین اتفاق می افتند (به جای این که در هیستون های تازه سنتز شده رخ دهند). توالی آمینو اسیدهای هیستون های خالص شده نشان داد که هیستون H3 می تواند لیزین های شماره 9 و 27 متیله داشته باشد و در هیستون H4 فقط لیزین شماره 20 متیله می شود. مطالعات اخیر روی HeLa cell نشان داد که در هیستون H3 لیزین شماره 4 نیز متیله شده بود. در این سلول لیزین ها به صورت منو و دی و تری متیل بودند. در سلول های یوکاریوتی پست (مخصوصاً مخمرها و تک یاخته ای مژه دار Tetrahymena) فقط لیزین شماره 4 در هیستون H3 متیله شده بود و به صورت منو یا دی متیل بودند. عمل متیلاسیون همانند استیلاسیون در موجودات مختلف با هم فرق دارند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 4- 5 آنزیم متیل ترانسفراز باعث انتقال گروه متیل از S- ادنوزیل متیونین به گروه آمینی- ε در لیزین می شود.

از ویژگی های Tetrahymena این است که در هر سلول آن دو هسته وجود دارد. یکی از هسته های آن به نام ماکرو نوکلئوس

(macronucleus) است که از لحاظ نسخه برداری فعال می باشد و دیگری میکرو نوکلئوس (micronucleus) است و فعال نیست. در ماکرو نوکلئوس استخراج شده آنزیم متیل ترانسفراز فعال و هیستون H3 متیله شده وجود دارد (البته هیستون استیله شده و آنزیم هیستون استیل ترانسفراز فعال نیز دیده می شوند). ارتباط بین استیلاسیون و متیلاسیون هیستون بر روی سلول های هلا بررسی شد. در این سلول هیستون H3 تازه متیله شده در نوکلئوزوم هایی بسته بندی می شود که حاوی هیستون استیله شده H4 هستند و در مقابل هیستون H4 متیله شده در کروماتین استیله شده جایگزین می گردند. به هر حال، از این اطلاعات می توان چنین نتیجه گرفت که هم متیلاسیون و هم استیلاسیون نقش مهمی در کروماتین فعال هنگام نسخه برداری دارند. آنچه که در حال حاضر حائز اهمیت می باشد این است که متیلاسیون و استیلاسیون در برخی از مسیرهای عملکردی مهم در ارتباط با یکدیگر هستند، یعنی یکی از تغییرات (برای مثال استیلاسیون) ممکن است نوکلئوزوم را برای تغییر دیگر (مثلا متیلاسیون) مستعد نماید. بنابراین

www.ShimiPedia.ir

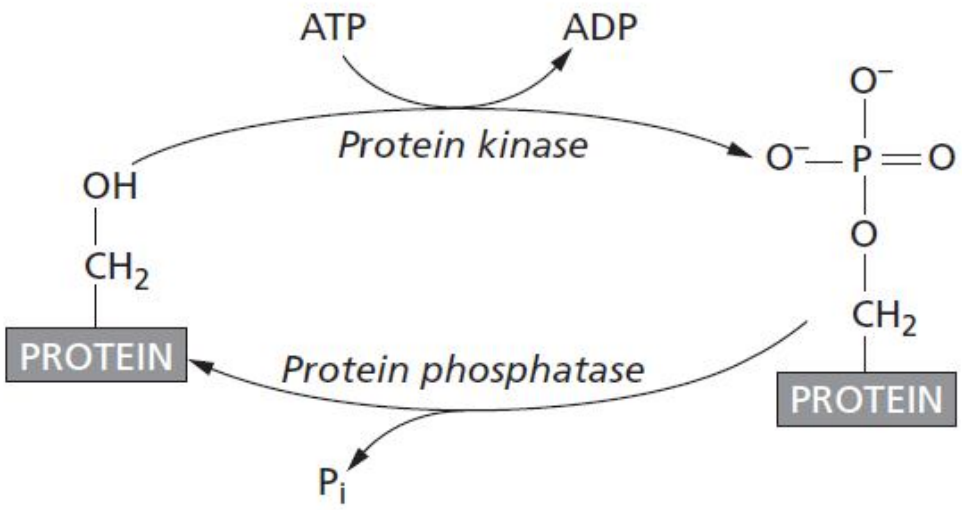
نوکلئوزوم هایی که دو بار تغییر یافته اند احتمالاً دارای ویژگی هایی هستند که در آنهایی که یک بار تغییر کردند دیده نمی شود. واضح است که تغییرات هیستون به تنهایی نباید در جدا سازی مد نظر قرار گیرد. ویژگی های عملکردی نوکلئوزوم (و کروماتینی با نظم بالاتر) تقریباً وابسته به ترکیب تغییراتی است که آن را پردازش می کنند. پس تمام تغییرات و فراوانی هر یک از آنها و آمینو اسیدهای درگیر در این تغییرات همگی مهم خواهند بود.

خصوصیات آنزیم های هسته ای که قادر به متیلاسیون لیزین های هیستون ها هستند، تعیین گردید و معلوم شد که نقش مهمی در تراکم کروماتین و خاموش کردن ژن دارند. آنزیم CARM1 (coactivator- associated arginine methylItransferase 1) که باقیمانده های آرژنین را در هیستون H3 متیله می کند، اخیراً در آزمایشگاه خالص شد و ژن آن کلون گردید. این آنزیم به پروتئین هایی از خانواده p160 که جزء فعال کننده ها هستند، پیوند می یابد (این پروتئین ها در فعال کردن ژن توسط گیرنده های هورمون هسته ای دخالت دارند). جهش در پروتئین CARM1 موجب شد که آنزیم متیل ترانسفراز غیر فعال شود.

فسفوریلاسیون

پروتئین در داخل سلول توسط گروه های جانبی آمینو اسیدهای سرین و ترئونین و گاهی تیروزین فسفوریله می شود. در این عمل فسفات جانشین گروه هیدروکسیل می شود و اتصال O- فسفات به وجود می آورد (شکل 4- 6). لیزین، هیستیدین و آرژنین نیز فسفوریله می شوند منتهی اتصال N- فسفات به وجود می آید. این تغییرات توسط خانواده خاصی از آنزیم ها به نام پروتئین کیناز و در جهت معکوس آن فسفاتاز انجام می شوند. دهنده گروه فسفات نوکلئوتید تری فسفات ها مثل ATP یا GTP و AMP حلقوی می باشند. این آنزیم ها از طریق مسیرهای پیام رسانی (signaling) در بسیاری از سلول ها عمل می کنند. بنابراین ، این آنزیم ها در اتصال و جدا کردن گروه فسفات به آمینو اسیدهای خاصی دخالت دارند. همانطور که قبلاً توضیح داده شد پروتئین کینازها جزء کمپلکس شروع Pol II هستند و فعالیت آنها در عملکرد این کمپلکس لازم است. برای مثال، فسفوریلاسیون دُمین انتهای- C در زیر واحد کاتالیتیکی Pol II امری ضروری برای شروع عمل نسخه برداری و ادامه آن است. خوب این سوال پیش می آید که آیا فسفوریلاسیون اجزای ساختاری خود کروماتین نیز (یعنی هیستون ها) نقشی ایفا می کند؟

www.ShimiPedia.ir



شکل 4- 6 چرخه فسفوریلاسیون – دفسفوریلاسیون

پروتئین کینازهای مختلفی شناسایی شده اند و معلوم شد که قادرند در محیط آزمایشگاهی باقیمانده های آمینو اسیدهای مختلف را فسفوریله کنند (ولی در محیط داخل سلولی هیستون ها فقط باقیمانده های سرین و ترئونین را تغییر می دهند). درهیستون H1 که در قسمت رابط (linker) قرار دارد بیشترین عمل فسفوریلاسیون انجام می شود. پنج باقیمانده سرین و ترئونین در انتهای- C و انتهای- N دنباله ها، می توانند فسفوریله شوند که بالاترین سطح فسفوریلاسیون در سلول های میتوزی صورت می گیرد. گاهی این فعالیت به فعالیت های رشد یعنی کینازهای متکی به سیکلین یا CDK (cyclin- dependent kinase) بستگی دارد. هنوز نقش فسفوریلاسیون H1 در هنگام تقسیم میتوزی مبهم است. به نظر می رسد که هیستون H1 با اندرکنش به قسمت مرکزی یا هسته نوکلئوزوم و رابط، نقش مهمی در تشکیل ساختار نظم با درجه بالاتر را داشته باشد.

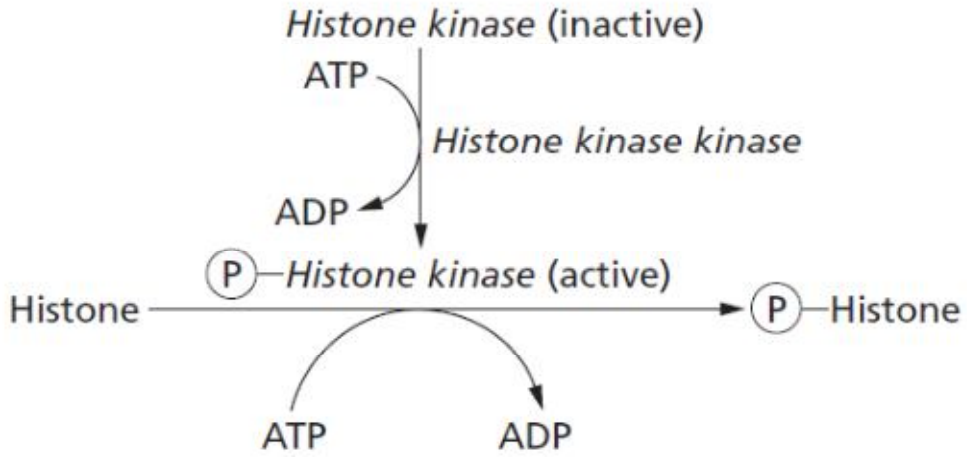
در قسمت مربوط به هیستون های مرکزی یا هسته، فسفوریلاسیون هیستون H3 مورد مطالعه قرار گرفت و این هیستون نمونه ای از عملکرد تاثیر تغییرات ترکیبی روی سایر پروتئین ها است. فسفوریلاسیون هیستون H3 منحصراً در سرین شماره 10 انجام می شود و به دو صورت زیر می باشد: (1) فسفوریلاسیون گسترده و شدیداً حفظ شده که در H3S10 انجام می شود و معمولاً هنگامی صورت می گیرد که سلول وارد تقسیم میتوز گردد، (2) فسفوریلاسیون محدودتر در همان باقیمانده سرین در سلول هایی که توسط فاکتورهای رشد برای ورود به فاز میتوز از فاز سکون تحریک شده اند. نکته جالب اینجا است که فسفوریلاسیون دقیقاً در همان ژن هایی که نسخه برداری از آنها توسط فاکتور رشد فعال می شود، انجام می گردد که اصطلاحاً به این ژن ها، ژن های

www.ShimiPedia.ir

شروع اولیه نسخه برداری گویند. ولی این موضوع ما را با یک تناقض مواجه می کند: از یک طرف، تغییرات همراه با تراکم کروماتین انجام می شود که در نتیجه آن هنگام ورود به فاز میتوز نسخه برداری سرکوب می گردد، از طرف دیگر، این تغییرات همراه با فعال شدن نسخه برداری در ژن های مورد نظر صورت می گیرد. توضیحی که ممکن است از مطالعات آزمایشگاهی در این مورد به دست آید این است که در هیستون H3 به طور همزمان فسفوریلاسیون و استیلاسیون انجام می شوند. یعنی در سلول های تحریک شده با فاکتور رشد، قسمت کوچکی از هیستون H3 فسفوریله شده مربوط به کروماتین استیله شده است. در حالیکه در سلول های میتوزی این حالت وجود ندارد. این امکان وجود دارد که استیلاسیون، کروماتین را مستعد فسفوریلاسیون های بعدی نماید و آن را به عنوان یک سوبسترای فعالتر برای کینازها مهیا کند.

کینازهای مسئول فسفوریلاسیون H3 هنوز به طور قطعی شناسایی نشده اند ولی به نظر می رسد که آنزیم های مختلفی فسفوریلاسیون مرتبط با رشد و تقسیم میتوزی را کاتالیز می کنند. یکی از آنزیم هایی که در فسفوریلاسیون های مرتبط با رشد دخالت دارد، آنزیم RSK2 (ribosomal S6 kinase 2) است (این آنزیم جزء خانواده سرین/*ترئونین* کینازها می باشد). این کیناز در بیمارانی با سندروم نقص ژنتیکی Coffin- Lowry وجود ندارد. سندروم Coffin- Lowry یک بیماری ژنتیکی در کروموزوم X است و غالب می باشد. در این بیماری مشکلاتی در مغز به وجود می آید و نقایصی هم در رشد، قلب و همچنین انحنا در ستون فقرات دیده می شود. سلول های این بیماران در فسفوریلاسیون H3S10 در اثر تحریک با فاکتور رشد ناتوان می باشند ولی در فسفوریلاسیون هنگام ورود به تقسیم میتوزی مشکلی ندارند. به نظر می رسد که آنزیم RSK2 در سلول های تحریک شده با فاکتور رشد (نه سلول های میتوزی) باعث فسفوریلاسیون H3S10 می شود ولی این احتمال وجود دارد که RSK2 موجب تبدیل شکل غیر فعال کیناز H3 به شکل فعال آن شود و کیناز H3 فعال مسئول فسفوریلاسیون H3S10 باشد. چنین آبشارهای کینازی در مسیرهای مختلف پیام رسانی سلولی به خوبی شناخته شده اند. مثالی فرضی از هیستون کیناز غیر اختصاصی در شکل 4- 7 نشان داده شده است. فقدان هیستون کیناز و یا هیستون کیناز کیناز مانع از فسفوریلاسیون هیستون می شود.

www.ShimiPedia.ir



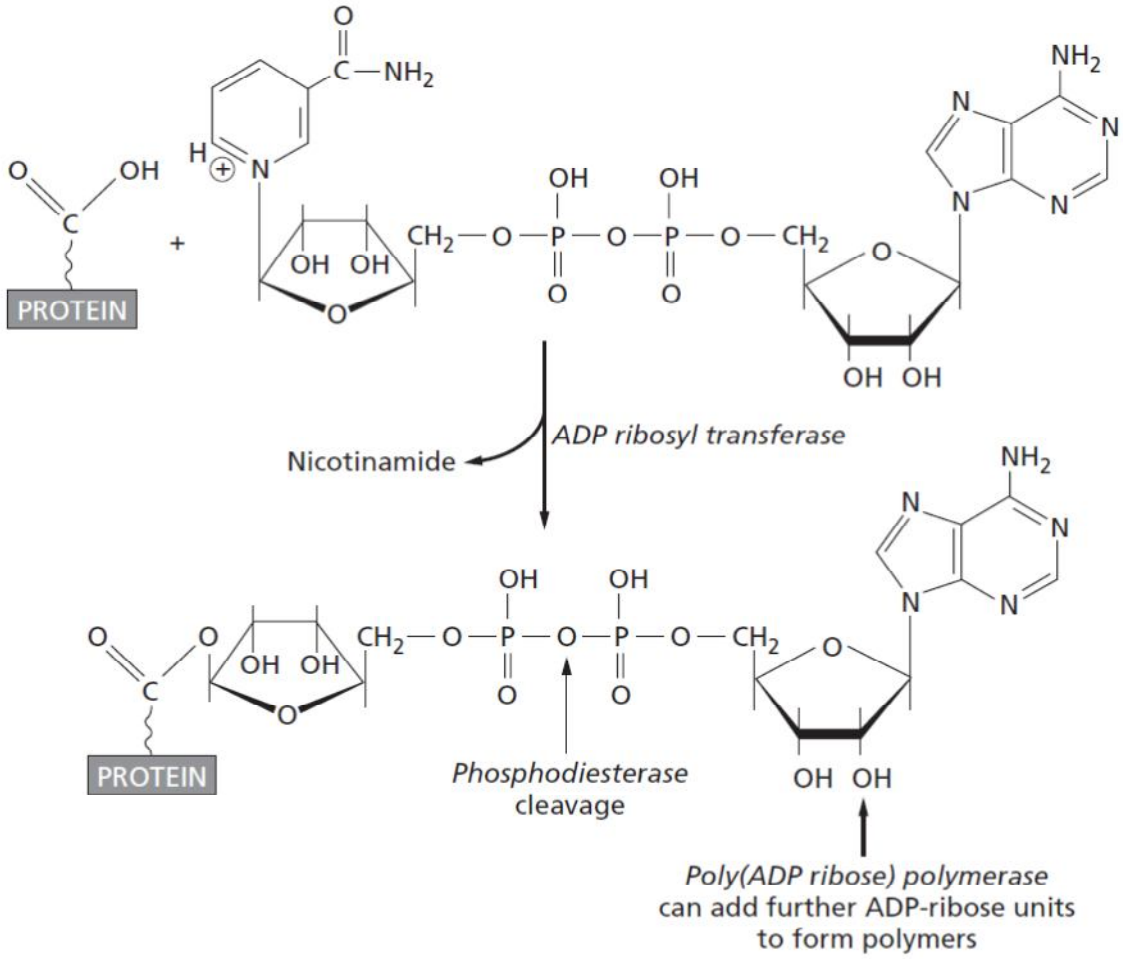
شکل 4- 7 شکلی از آبشار فرضی هیستون کیناز. در این مدل پیشنهاد شده است که موقعی آنزیم هیستون کیناز فعال می شود که فسفوریله گردد، بنابراین فسفوریلاسیون هیستون نیاز به آنزیم هیستون کیناز و آنزیم دیگری به نام هیستون کیناز کیناز دارد تا فعال شود. این یک مدل ساده آبشار پروتئین کیناز است. پس خود هیستون کیناز کیناز هم باید فسفوریله شود. چنین آبشارهایی مسیرهای پیام رسانی بین سلولی را نشان می دهند. فعالیت پروتئین کینازها اغلب توسط پروتئین فسفاتازها خنثی می شود.

ADP- ریبوزیلاسیون

هیستون ها و سایر پروتئین های هسته ای و سیتوزولی می توانند به وسیله اتصال به بخش هایی از ADP- ریبوز تغییر نمایند. ADP- ریبوز از نیکوتین امید ادنین دی نوکلئوتید (NAD^+) مشتق شده است. NAD^+ یک کوآنزیم مهم است که از احیای NADH به وجود می آید و در غلظت های میلی مولار در داخل سلول وجود دارد و به عنوان یک واسطه عمل می نماید. آنزیم ADP- ریبوزیل ترانسفراز به طور معمول اتصال ADP- ریبوز (مشتق شده از NAD^+) را به واحدهای گلوتامیک اسید کاتالیز می نماید (با جایگزینی بخش های نیکوتین آمید). این تغییرات می تواند توسط آنزیم ADP- ریبوزیل پروتئین لیاز برگشت نماید. آنزیمی به نام پلی ADP- ریبوزیل پلیمراز قادر است واحدهای اضافه تر ADP- ریبوز را به واحد اولیه اصلی بیافزاید و باعث پیچیده تر شدن و متنوع تر شدن این تغییرات گردد (شکل 4- 8). این تغییرات همیشه اتفاق نمی افتند ولی زمانی که روی دهند باعث ایجاد پلیمرهایی شاخه دار با بیش از 200 واحد ADP- ریبوز می گردند. فعالیت آنزیم پلی ADP- ریبوزیل پلیمراز وابسته به گسستگی

www.ShimiPedia.ir

رشته DNA است. آغشته نمودن سلول ها با ترکیباتی مانند دی متیل سولفات (DMS) معمولاً با افزایش میزان شکست و گسستگی DNA همراه است و منجر به افزایش وسیع هیستون های پلی ADP- ریبوزیل شده می شود.



شکل 4- 8 فرمول های شیمایی ADP- ریبوزیلاسیون

الکتروفورز دو بُعدی هیستون ها که باعث جدا سازی هیستون ها بر اساس بار در مرحله اول و اندازه در مرحله دوم می شود در سلول هایی که تحت تأثیر ماده DMS بودند، 12 نوع ایزوفرم مختلف از H1 و H2B و سایر هیستون های هسته مرکزی شد.

www.ShimiPedia.ir

وقتی سلول ها در محیط دارای NAD^+ رادیواکتیو رشد داده شدند، این ایزوفرم ها به راحتی قابل شناسایی بودند. منتهی این ایزوفرم ها با رنگ آمیزی

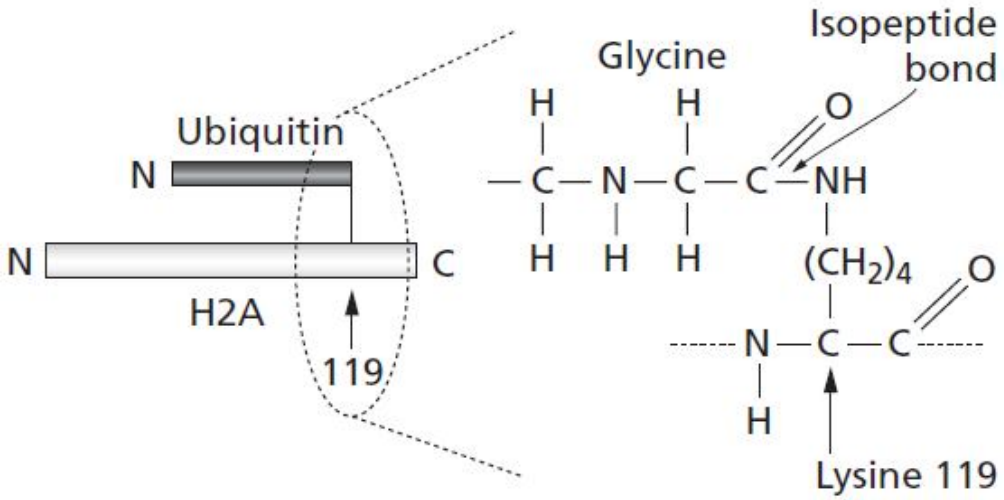
Coomassie Blue قابل ردیابی و تشخیص نمی باشند. این ایزوفرم ها باید تنها نسبت کوچکی از کل هیستون ها را شامل شوند (کمتر از 5%). همچنین پلی (ADP- ریبوز) که به صورت آزاد در سلول های تحت تأثیر DMS بودند، معلوم کرد که با دُمین دنباله ها پیوند ایجاد می کنند. این پیوندها دلالت بر عملکردهای جالب آنها است. فقط H2B باقیمانده گلوتامیک اسیدی دارد که قابل دسترس به آنزیم ADP- ریبوزیل ترانسفراز در کروماتین است.

پلی (ADP- ریبوز) پلیمراز دُمین پیوند به DNA و همچنین دو زینک فینگر (zinc finger) دارد و می تواند به محل های شکسته شده در DNA (چه به صورت تک رشته ای و چه به صورت دو رشته ای) متصل شود، در نتیجه موجب تغییر هیستون ها گردد. احتمالاً این محل ها برای ترمیم DNA می باشند. آنها ممکن است هنگام فرایند ترمیم موجب تسریع عمل remodeling کروماتین نیز بشوند. انتهای- N دنباله های هیستون های H3 و H4 میل ترکیبی زیادی برای اتصال به پلی (ADP- ریبوز) و DNA دارند. بنابراین حضور چنین پلیمری روی H2B یا سایر پروتئین ها می تواند در جدا کردن H3 و H4 از DNA کمک کند. این پلیمرها عملی شبیه به چپرون ها را نیز انجام می دهند در نتیجه انتهای- N دنباله های بار دار زمانی که دُمین های کروی هیستون های مرکزی بهم متصل می شوند را محافظت می کند و موجب سازماندهی DNA در نوکلئوزوم جدید می شود.

یوبی کوئی تینه کردن

یوبی کوئی تین (ubiquitin) پپتید کوچکی است که 76 آمینو اسید دارد و یکی از پروتئین هایی که در طول تکامل کاملاً محافظت شده است. این پپتید در سلول های پروکاریوتی، جانوران و گیاهان وجود دارد و معمولاً به پروتئین های دیگر چسبیده است (هم به صورت منفرد و هم به صورت پلیمر). این پپتید برای ایجاد تغییر در پروتئین دیگر به دو یا سه آنزیم احتیاج دارد: آنزیم فعال کننده یوبی کوئی تین یا E1 ، آنزیم کانژوگیت یوبی کوئی تین یا E2 ، و گاهی آنزیم لیگاز یا E3 . یوبی کوئی تین به گروه آمینی- ε لیزین های خاصی با اتصال غیر معمول (ایزو پپتیدی) پیوند می یابد (شکل 4- 9). یوبی کوئی تین بعدی نیز به همین طریق متصل می شود و بالاخره می تواند پلی یوبی کوئی تین به وجود آورند. نقش اصلی عمل یوبی کوئی تینه کردن پروتئین های هدف، تجزیه آنها است (البته عمل تجزیه پروتئین های هدف توسط آنزیم های پروتئاز صورت می گیرد) یعنی عمل پروتئوزوم ها (proteosomes).

www.ShimiPedia.ir



شکل 4- 9 با اتصال پپتید کوچک یوبی کوئی تین، لیزین شماره 119 در هیستون H2A ، این هیستون یوبی کوئی تینه می شود.

یوبی کوئی تینه کردن هیستون H3 در طویل سازی اسپرماتیدها دخالت دارد. در سلول های یوکاریوتی عالی 10% از هیستون H2A و

بین 1 تا 2% از هیستون H2B به صورت ایزوفرم های منو یا پلی یوبی کوئی تینه شده هستند. مقدار یوبی کوئی تینه شدن آنها بستگی به مراحل پیشرفت یا رشد سلول دارد. یوبی کوئی تینه شدن هیستون H2B (و در مقیاس کمتر H2A) برای ادامه عمل نسخه برداری صورت می گیرد (یعنی به نظر می رسد که شروع عمل نسخه برداری آنقدرها تأثیر ندارد بلکه باعث تداوم عمل نسخه برداری می شود). ساختار بلوری نوکلئوزوم با درجه تفکیک بالا نشان داد که لیزین شماره 120 در هیستون H2B به سمت داخل پروتئین رفته و مدفون شده است، در نتیجه آنزیم ها نمی توانند تغییری در آن به وجود آورند. شاید این تغییرات در هنگام نسخه برداری انجام شده باشد و در این زمان یوبی کوئی تین به آن متصل می شود.

www.ShimiPedia.ir

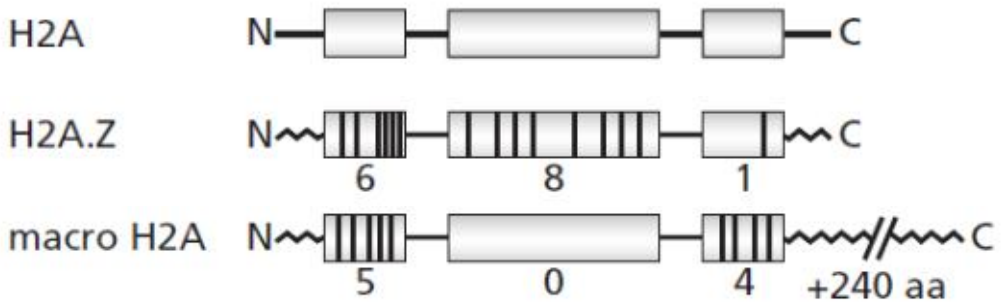
تفاوت بین هیستون ها

در سلول های یوکاریوتی عالی، چندین کپی از ژن های هیستونی دیده می شوند. معمولاً مجموعه ای از ژن های این پنج هیستون وجود دارند و بعد به تعداد زیادی تکرار می شوند. بدین ترتیب هنگام همانند سازی DNA در زمان فاز- S (در چرخه سلولی) تعداد زیادی هیستون جدید ساخته می شوند. بیشترین بیان ژن های هیستون ها در فاز –S صورت می گیرد و در سایر قسمت های چرخه سلولی فقط مقدار کمی از آنها کپی می شوند و نیاز سلول هنگام ترمیم DNA و فعالیت های remodeling را برطرف می کند.

گاهی آمینو اسید خاصی جایگزین آمینو اسید هیستون می شود که مطالعات نشان دادند این عمل بسیار کم اتفاق می افتد و اگر هم انجام شود تأثیر زیادی روی خصوصیات عملکردی هیستون ها نمی گذارد. برای مثال ، سه هیستون مختلف برای H3 در پستانداران وجود دارد: H3.1 ، H3.2 ، و H3.3 . هیستون H3.2 با H3.1 در یک آمینو اسید با هم اختلاف دارند (سرین جایگزین سیستئین شماره 96 شده است). این جایگزینی باعث می شود که حرکت پروتئین ها در ژل الکتروفورز فرق کند (ژل حاوی اسید، تریتون و اوره) ولی رفتار هیستون در سیستم، تغییر نمی کند. به هر حال، هیستون های H3.1 و H3.2 در فاز –S و هیستون H3.3 در سایر قسمت های چرخه سلولی سنتز می شوند.

بین هیستون H2A در انسان نیز اختلافاتی دیده شده است. هیستون H2A.Z با H2A.1 در 15 آمینو اسید با هم اختلاف دارند که در سه دُمین مارپیچ قرار گرفته اند. اضافه شدن و حذف بعضی از آنها را در انتهای- N یا انتهای-C و یا در دُمین های حلقه در شکل 4- 10 مشاهده می کنید. همین اختلافات را در مگس دروزوفیل نیز دیدند. احتمالاً H2A.Z در ابتدای مراحل تکاملی به وجود آمد و حفظ شد. این هیستون نقش عملکردی ویژه ای داشت. نقش آن ممکن است در تنظیم نسخه برداری باشد (همانطور که مشابه عمل H2A.Z مربوط به Tetrahymena پیدا کردند). هیستون متفاوت دیگری که مورد مطالعه قرار گرفت macro H2A است. این هیستون بیش از 200 آمینو اسید اضافی در انتهای- C دارد (شکل 4- 10). هیستون macro H2A در کروموزوم X غیر فعال در پستانداران ماده دیده می شود و حدس می زنند که نقش آن در تراکم کروماتین و خاموش کردن ژن باشد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 4- 10 گوناگونی هیستون H2A غیر آللی. هیستون H2A.Z توسط ژن های مختلفی رمز گشایی می شود. انتهایN - و انتهای – C هیستون H2A با گونه های دیگر آن کاملاً با هم فرق دارند. دُمین انتهای - C مربوط به macro H2A طولانی تر شده است. تفاوت این هیستون ها در جایگزینی آمینو اسیدهای مختلف بین مارپیچ های دُمین تا شده است (خطوط عمودی). اعدادی که زیر آنها نوشته شده است، تعداد آمینو اسیدهای جایگزین شده را نشان می دهند.

تغییراتی که در انتهای – N دنباله هیستون H2B اتفاق افتاده است، فقط در اسپرم مشاهده شده است. اندرکنش 21 آمینو اسید در انتهای – N با DNA رابط در اسپرم ممکن است در متراکم کردن DNA دخالت داشته باشند. در اورکین دریایی چهار هیستون H2B مختلف وجود دارد.

www.ShimiPedia.ir

برای مطالعه بیشتر به منابع زیر مراجعه شود:

Histone tails

Hansen, J. C., Tse, C. & Wolffe, A. P. (1998) Structure and function of the core histone Ntermini: more than meets the eye. *Biochemistry*, **37:** 17637–17641.

Luger, K. & Richmond, T. J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8:** 140–146.

Histone modifications

Spencer, V. A. & Davie, J. R. (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, **240:** 1–12.

Acetylation

Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation. *EMBO J.*, **19:** 1176–1179.

Morales, V. & Richard-Foy, H. (2000) Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Mol. Cell Biol.*, **20:** 7230–7237.

Turner, B. M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays*, **22:** 836–845.

Methylation

Annunziato, A. T., Eason, M. B. & Perry, C. A. (1995) Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry*, **34:** 2916–2924.

Chen, D., Ma, H., Hong, H. *et al*. (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284:** 2174–2177.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D. *et al*. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406:** 593–599.

Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G. & Allis, C. D. (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **96:** 14967–14972.

Phosphorylation

Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A. *et al.* (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within centric heterochromatin during G_2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106:** 348–360.

Hsu, J.-Y., Sun, Z.-W., Li, X., Reuben, M. *et al*. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ip1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102:** 279–291.

Thomson, S., Mahadevan, L. C. & Clayton, A. L. (1999) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Sem. Cell Dev. Biol.*, **10:** 205–214.

ADP-ribosylation

Althaus, F. R. (1992) Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J. Cell Sci.*, **102:** 663–670.

Jacobson, M. K. & Jacobsen, E. L. (1999) Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *TIBS*, **24:** 415–417.

Ubiquitination

Baarends, W. M., Hoogerbrugge, J. W., Roest, H. P. *et al*. (1999) Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.*, **207:** 322–333.

Huang, H. H., Kahana, A., Gottschling, D. E., Prakash, L. & Liebman, S. W. (1997) The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **17:** 6693–6699.

Moazad, D. & Johnson, A. D. (1996) A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, **86:** 667–677.

www.ShimiPedia.ir

فصل 5

سازماندهی ساختار کروماتین با درجه نظم بالاتر

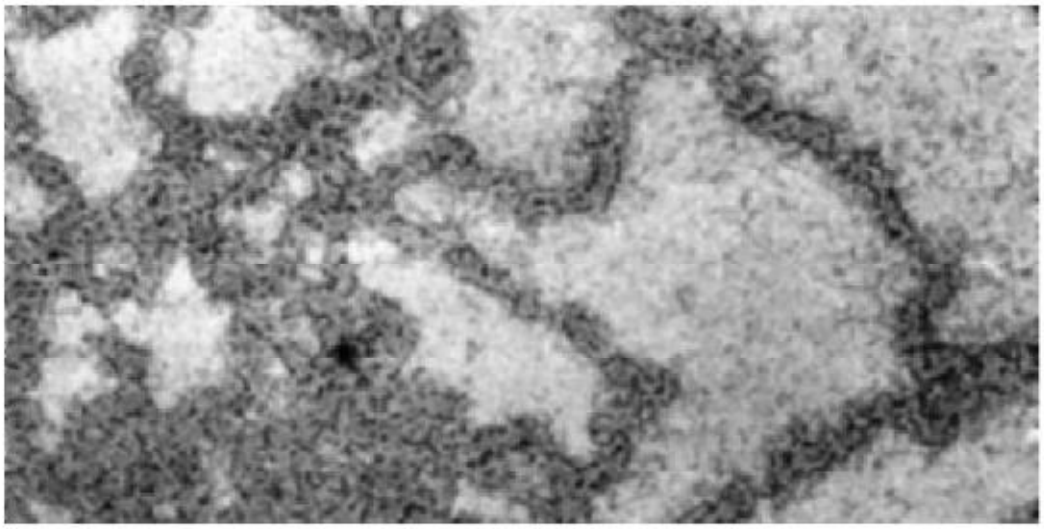
مقدمه

در فصل قبل به اینجا رسیدیم که رشته های طویل DNA با عملکردهای مختلف چگونه داخل هسته سلول قرار می گیرند. بعد از این که واحد اصلی ساختار کروماتین مشخص شد باید به نقش احتمالی آن یعنی تنظیم بیان ژن پرداخت. به هر حال، نوکلئوزوم اولین مرحله بسته بندی DNA در داخل هسته سلول است. برای این که بدانیم بسته بندی DNA تا کجا پیش می رود نیاز به بررسی بیشتر ی است. در هسته سلول طول DNA انسان حدود 2 متر است. از طرف دیگر، طول کلی مجموعه تمام 46 کروموروم انسان در مرحله متافاز حدود 200 µm یا ۲×10^{-4} m است (در حقیقت این طول مربوط به 46 کروموزوم انسان روی شیشه اسلاید می باشد). بنابراین، مجموع کاهش طول ژنوم در متافاز حدود 10000 مرتبه است. در مرحله آنافاز فشردگی کروموزوم کمتر است و به 250 مرتبه می رسد. وقتی در نوکلئوزوم، DNA به صورت سوپر کویل در می آید، طول آن تقریباً 7 مرتبه کاهش می یابد. بنابراین باید تاخوردگی بیشتری در سطوح بالاتر برای از بین بردن شکاف بین رشته های کروماتین و کروموزوم های متافازی وجود داشته باشد. با استفاده از میکروسکپ الکترونی و کریستالوگرافی اشعه $x-$ می توان ساختار نوکلئوزوم را تعیین کرد. هسته های لیز شده زیر میکروسکپ الکترونی رشته هایی با قطر 30 nm را نشان داد (شکل 5- 1).

رشته های 30 نانومتری

مدل های ساختاری ارایه شده امکان ساختارهای کروماتین با سطح تاخوردگی بالاتر را نشان می دهند. همیشه بهترین روش برای شروع، بررسی ساختار ساده و کار کردن روی آن است و در این مرحله قدم اول بررسی ساختار نوکلئوزوم دو تایی است. این مرحله از آزمایش ها کاملاً آموزنده است، چون نوکلئوزوم دو تایی بعضی از محدودیت های جدی را بر خلاف رشته های 30 نانومتری، ندارد. مسیر عبور رشته DNA در نوکلئوزوم دو تایی (منظور نحوه عبور رشته DNA از یک نوکلئوزوم به نوکلئوزوم دیگر است) مورد

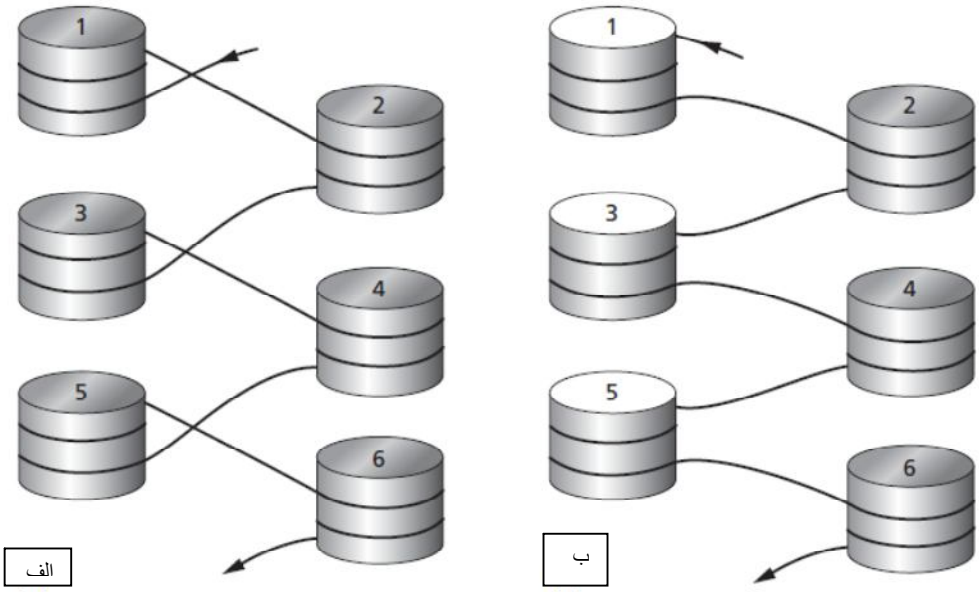
www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 1 تصویر میکروگرام الکترون رشته های کروماتین با قطر 30 نانومتری که ظاهراً به صورت نوکلئوزوم در آمده اند. این نوع تصاویر قطر رشته ها را نشان می دهند ولی ساختار آنها را مشخص نمی کنند.

مطالعه قرار گرفت (شکل 5-2). دو نوکلئوزوم مجاور هم ممکن است هر دو در یک جهت باشند (مثلاً سر آنها به سمت بالا باشد) (شکل 5- 2 ، الف) یا یک در میان معکوس شوند (مثلاً اولی قسمت سر آن بالا و دومی پایین باشد) (شکل 5- 2 ، ب). این نوع مسیر برای زمانی که نوکلئوزوم به صورت تسبیح مانند است، مطلوب نیست ولی برای رشته های 30 نانومتری که می خواهیم شرح دهیم، صدق می کند. این مسیر ممکن است به صورت زیگزاگ یا دندانه ای باشد. آرایش زیگزاگ در اغلب تصاویر میکروسکپ الکترونی دیده شده است. مدل هایی که برای رشته های 30 نانومتری پیشنهاد شده اند برای عبور مسیر DNA از میان نوکلئوزوم دو تایی هستند. این مدل ها در جزئیات متفاوتند ولی می توان آنها را در دو گروه مختلف قرار داد. یکی از آنها مدل روبان پیچ خورده (twisted- ribbon) است (شکل 5- 3). در این مدل، رشته های کروماتین به صورت زیگزاگ قرار گرفته اند که به دور یک لوله فرضی با قطر 30 نانومتر پیچیده اند. بنابراین آرایش این نوع مدل به صورت دو مارپیچ موازی است که یکی از مارپیچ ها دارای شماره های فرد و مارپیچ دیگر شماره های زوج دارند (شکل 5- 3). در این شکل، مارپیچ دو تایی حاوی 18 نوکلئوزوم در هر پیچ است (طول تکرار مارپیچ 32 nm است و یک مرکز توخالی دارد).

www.ShimiPedia.ir



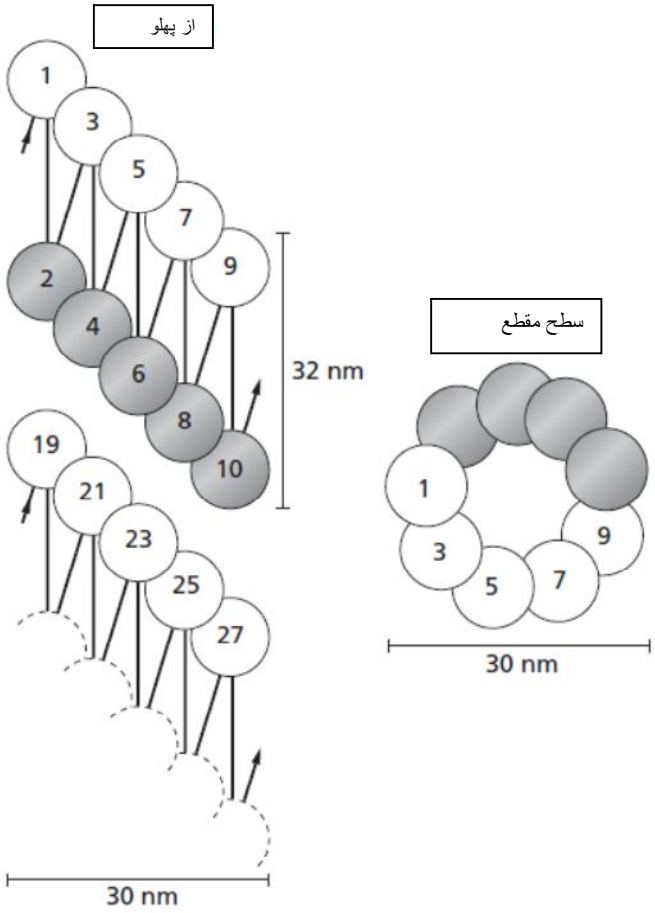
شکل 5- 2 مسیر عبور رشته DNA بین نوکلئوزوم ها. (الف) تمام نوکلئوزوم ها در یک جهت قرار دارند، (ب) نوکلئوزوم ها

یک در میان معکوس شده اند.

در این مدل به خوبی با مسیری که قسمت رابط DNA (linker) دارد، مطابقت می کند، در ضمن مکانیزم اتصال ساده ای برای رشته کروماتین به صورت زیگزاگ را نشان می دهد. عیب آن قرار گیری قسمت رابط DNA و رابط هیستون ها در حاشیه خارجی رشته می باشد. شواهد تجربی بیانگر آن است که هر دو رابط ها داخلی هستند (چون در این صورت می توانند به ترتیب از حمله نوکلئازها و پروتئازها محافظت شوند).

مدل دیگری به نام رابط متقاطع (crossed- linker) در رشته های 30 نانومتری بسیار شبیه روبان پیچ خورده است. این مدل حاوی دو مارپیچ با تناوبی از نوکلئوزوم هایی باشماره های زوج و فرد است (حدود 18 نوکلئوزوم در هر پیچ مربوط به مارپیچ دو گانه) (شکل 5- 4). در این مدل، پهنای مارپیچ متناسب با طول رابط DNA است. رابط DNA و هیستون H1 درون رشته محفوظ شده اند. از این مدل معلوم نمی شود که چطور رشته 30 نانومتری می تواند به صورت رشته خطی زیگزاگ درآید؟ ولی این مسئله به سختی آنچه به نظر می رسد، نیست. در شکل 5- 5 (سمت چپ) شش نوکلئوزوم را مشاهده می کنید که به صورت زیگزاگ بهم متصلند و

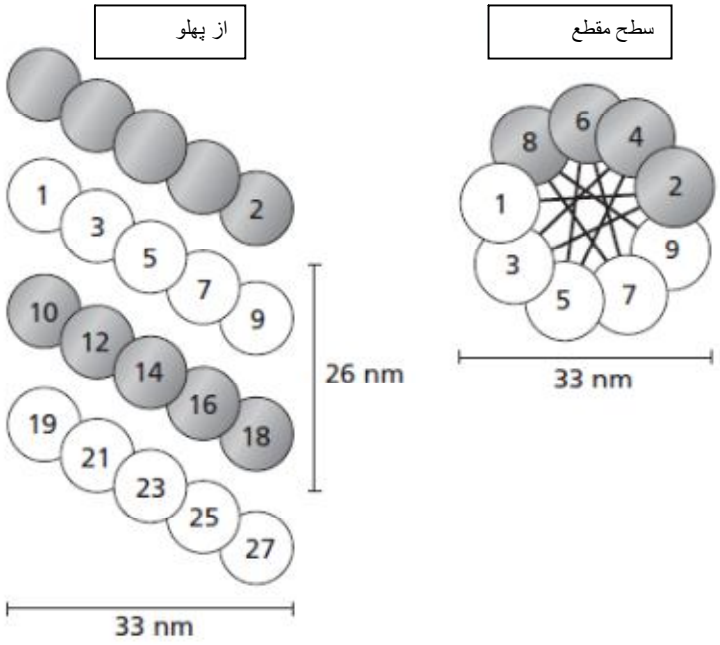
www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 3 مدل روبان پیچ خورده رشته های 30 نانومتری. در اینجا فقط نوکلئوزوم های مربوط به یک طرف لوله 30 نانومتری رسم شده اند (آنهایی که در طرف دیگر هستند، دیده نمی شوند).

در سمت راست همان شش نوکلئوزوم به شکل رشته های رابط متقاطع دیده می شوند. این انتقال می تواند توسط فشرده کردن رشته ها از بالا در جهت موافق حرکت عقربه ساعت به وجود آید (این پیشنهاد در مورد چگونگی بهم پیوستن رشته 30 نانومتری در داخل سلول نیست بلکه راهی برای نمایش نحوه انتقال بن دو ساختار را نشان می دهد).

www.ShimiPedia.ir

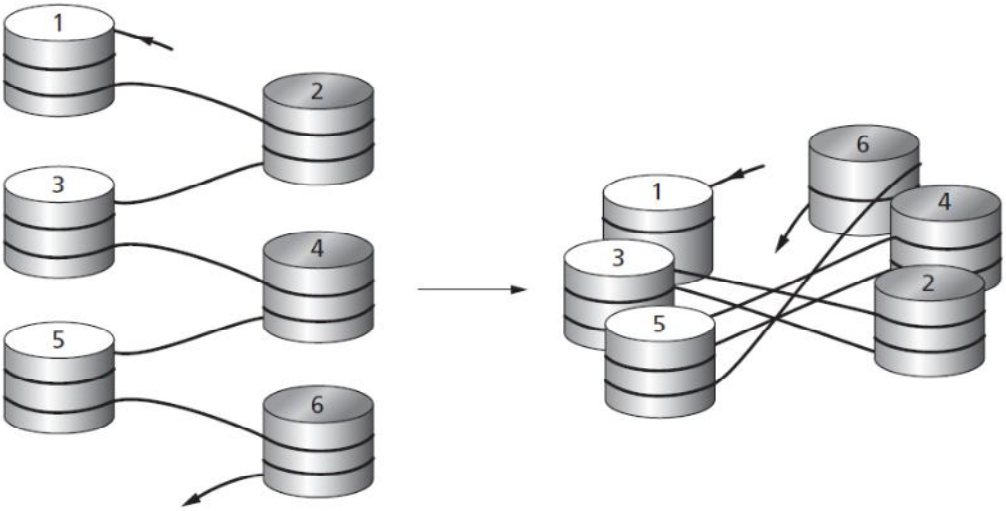


شکل 5- 4 مدل رابط متقاطع رشته 30 نانومتری .

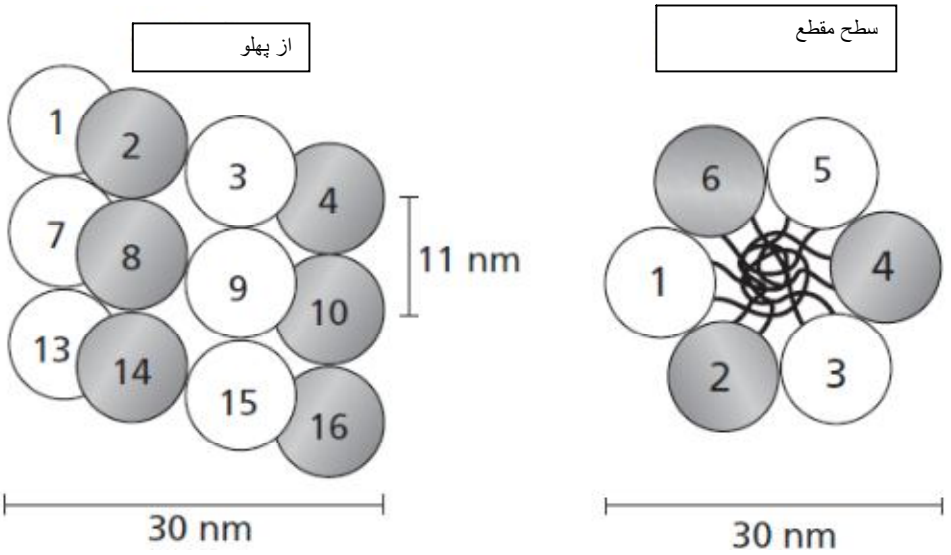
مدل سوم برای رشته 30 نانومتری قابل فهم تر است و گاهی به عنوان ساختار قطعی مطرح می شود (گرچه شواهد موافق با آن قطعی نیست). این مدل یک سلنوئید (solenoid) ساده است که حدود 6 نوکلئوزوم در هر پیچ دارد (هر پیچ 11 نانومتر است که رابط DNA و هیستون H1 به سمت درون آن رفته اند) (شکل 5- 6). نوکلئوزوم هایی که در رشته خطی کنار هم قرار گرفته اند، در سلنوئید نیز کنار هم باقی می مانند. این مدل توسط آزمایش های مختلف مورد تأیید قرار گرفته است. به هر حال، این مدل برای مسیر پیشنهادی، آنچه که مربوط به رابط DNA است را به خوبی نشان نمی دهد. همانطور که در ساختار فرضی شکل 5- 7 مشاهده می کنید، رابط های DNA باید شدیداً بین نوکلئوزوم های مجاور هم شوند. در این شکل مسیر رابط های DNA به صورت خط باریک رسم شده اند ولی در واقعیت این DNA ، ساختار بسیار پهن و انعطاف پذیری دارد.

رشته 30 نانومتری توسط یافته های تجربی متنوعی مثل میکروسکپ الکترونی، پراش اشعه- x ، دو رنگ نمایی دورانی (circular dichroism) و اندازه گیری توسط روش هیدرودینامیک مورد مطالعه قرار گرفت. متأسفانه تمامی این دست یافته ها از محدودیت های زیادی برخوردار بود و مانع دسترسی به اطلاعات موثقی گردید که بتوان جزئیات ساختار رشته 30 نانومتری را مشخص کند. حتی

www.ShimiPedia.ir



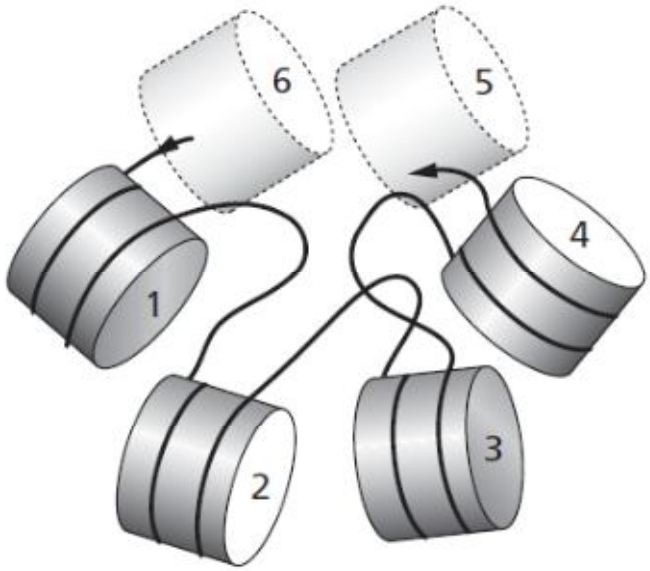
شکل 5- 5 شکل فوق نشان می دهد که چگونه نوکلئوزوم ها ممکن است به صورت رشته رابط متقاطع درآیند.



شکل 5- 6 مدل سلنوئید برای رشته 30 نانومتری.

مطمئن نیستیم که آیا نوکلئوزوم ها در مارپیچ های راست گرد سازماندهی شده اند یا چپ گرد (شکل 5- 2). ما نمی دانیم که چطور نوکلئوزوم ها بین رشته ها جهت یابی شده اند و یا چگونه با یکدیگر اندرکنش می دهند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 7 مدل سلنوئید برای رشته 30 نانومتری . در این مدل رابط DNA باید بین نوکلئوزوم های مجاور خم شوند.

شواهدی در دست است که نحوه مونتاژ قسمت رابط هیستون H1 و دنباله های انتهای- N مربوط به هیستون های هسته را نشان می دهند.

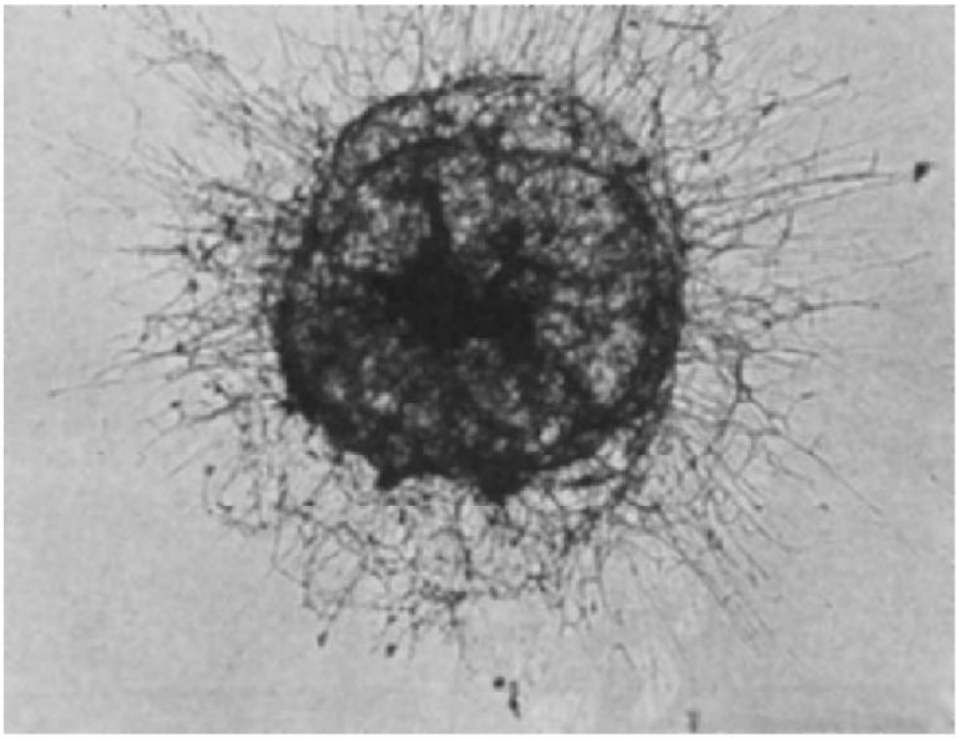
برای سنجش مدل های مختلف، مدل روبان پیچ خورده شاید کمترین سازگاری را با شواهد تجربی داشته باشد ولی مدل رابط متقاطع و مدل سلنوئید طرفداران بیشتری دارند. به هر حال باید این حقیقت را پذیرفت تا زمانی که روش آزمایشگاهی دقیقتری برای تعیین ساختارهای مختلف مخصوصاً رشته 30 نانومتری به وجود نیایند (منظور در داخل سلول است)، ساختار آنها به صورت بحث برانگیز و نامطمئن باقی می مانند.

حلقه های DNA

بعضی از آزمایش های انجام شده در دهه 1960 اطلاعات مهمی از نحوه سازمان یافتگی خود DNA درون هسته سلول های یوکاریوتی ارایه داد و نکات مهمی در مورد نحوه سازمان یافتگی کروماتین ماورای رشته 30 نانومتری فراهم کرد. اگر هسته ای را از محیط کشت حاوی سلول های خاصی (مثلاً سلول های HeLa) تهیه کنیم و با استفاده از سدیم کلرید 2 M آن را استخراج

www.ShimiPedia.ir

نماییم، تمام هیستون ها به انضمام سایر پروتئین ها حذف می شوند، در نتیجه ساختار شبه هسته ای قابل تشخیص مانند نوکلئوئید (nucloid) باقی می ماند . اگر احتیاط لازم برای مهار نوکلئازها را انجام شود، DNA نیز محافظت می شود و می تواند توسط رنگ های فلورسنت دیده شوند و مانند هاله ای از آنچه که از هسته باقی مانده، احاطه گردد (شکل 5- 8).



شکل 5- 8 نوکلئوئید: کمپلکس متراکم الکترونی از هسته سلول پس از استخراج توسط نمک بالا. DNA به صورت رشته هایی از هاله وسط پخش شده اند.

DNA پلیمر طویلی است که ممکن است به صورت بهم پیچیده در هسته باقی بماند. به هر حال، آزمایش قابل توجه زمانی انجام شد که نوکلئوئیدها در معرض رنگ هایی مثل اتیدیوم (ethidium) قرار گرفتند. این رنگ بین جفت بازهای DNA می رود و باعث تغییر کانفورماسیون آن می شود. DNA خطی می تواند به سادگی با چرخاندن دو انتهای آزاد خود باز شده و طول آن افزایش یابد. به هر حال، موقعی که نوکلئوئید در معرض غلظت بالای اتیدیوم قرار گیرد، هاله DNA به جای این که بیشتر پخش شود، پیچیده تر می شود. DNA القا شده توسط اتیدیوم با استفاده از دو روش مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. یکی شامل اندازه گیری قطر هاله DNA است که با استفاده از میکروسکپ فلورسنت و نوکلئوئیدهای رنگامیزی شده به دست آمد. روش

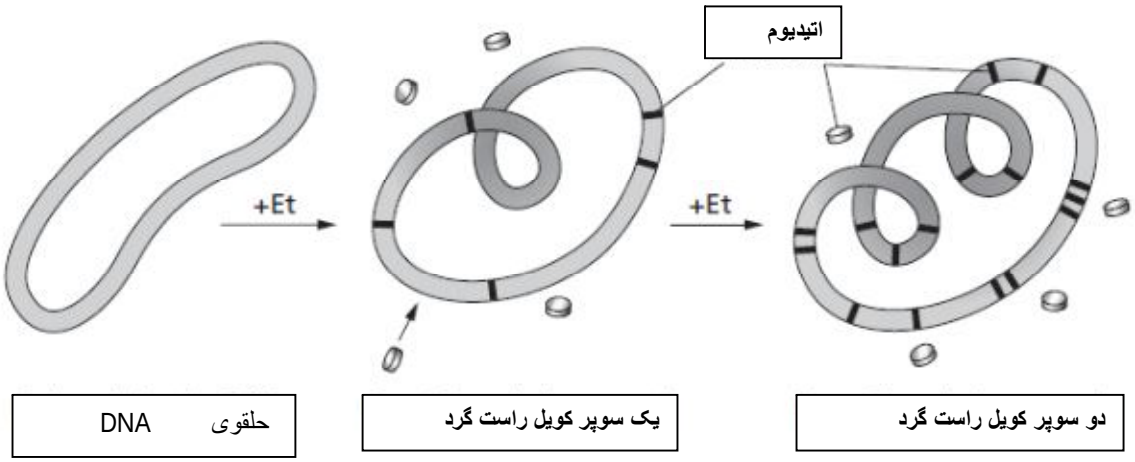
www.ShimiPedia.ir

دیگر اندازه گیری میزان سرعت سدیمانتاسیون (sedimentation) هنگام سانتریفیوژ با استفاده از گرادیان سوکروز است. هر دو روش نتایج گیج کننده مشابهی را نشان دادند.

رفتار DNA در نوکلئوئید، تاخوردگی DNA با درجه نظم بالاتر را نشان می دهد (رفتاری که تحت نام ابر پیچ یا سوپر کویل می شناسیم). ما قبلاً با واژه سوپر کویل زمانی که در مورد مسیر DNA حول نوکلئوزوم صحبت می کردیم، توضیح دادیم و با توجه به این که همه DNA های یوکاریوتی در نوکلئوزوم ها بسته بندی شده اند، بنابراین وجود سوپر کویل به خودی خود تعجب آور نیست. چیزی که در مورد این نتایج شگفت آور است این است که در حضور غلظت بالای رنگ هایی مثل اتیدیوم، سوپر کویل های اضافی در DNA دیده می شود (این رفتار را در DNA های حلقوی باکتری ها و ویروس ها دیده بودیم). در یک مولکول DNA حلقوی کاملاً بسته شده، باز شدن کامل آن هرگز دیده نشده است (ممکن است در محل های خاصی باز شود ولی در محل دیگری از آن پیچیدگی بیشتری به وجود می آید، بنابراین تغییری در تعداد جفت بازها در هر پیچ رخ نمی دهد). DNA های حلقی بسته شده باید راهی دیگر برای برطرف کردن فشار وارد شده از طریق این رنگ ها پیدا کند. این عمل توسط ایجاد پیچ خوردگی بیشتر در مارپیچ DNA انجام می شود و به این خاصیت ابر پیچش (supercoiling) گویند (شکل 5- 9). ابر پیچش DNA می تواند انقباض DNA را در نوکلئوئید نشان دهد ولی DNA انسان یا به طور کل DNA یوکاریوتی به صورت حلقوی نیست. برای این که به این مسئله پاسخ داده شود، چنین مطرح شد که DNA در هسته به شکل حلقه (loop) در آمده است و بازهای حلقه ها به عناصر ساختاری داخل هسته متصلند. بنابراین داخل شدن رنگ اتیدیوم درون رشته DNA هیچ ارتباطی به نحوه اتصال حلقه ها ندارد (شکل 5- 10).

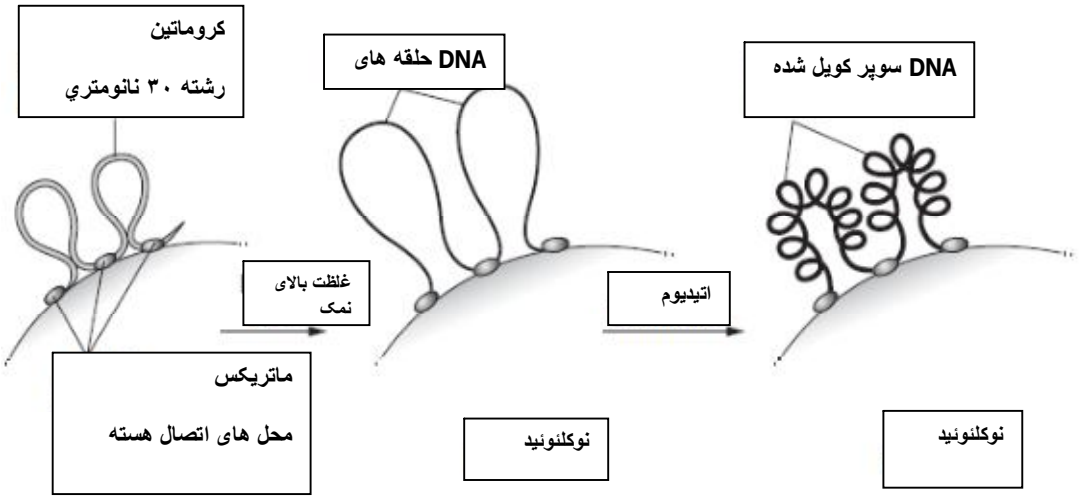
آزمایش نشان داده است که DNA در سلول های انسانی به صورت حلقه سازماندهی شده اند. اگر هیستون ها را از کروموزوم های متافازی انسان جدا کنیم (مثلاً تیمار با NaCl 2 مولار) سپس روی شبکه پوشیده شده با کربن در محلولی با قدرت یونی پایین پخش

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 9 رنگ های داخل شده درون رشته DNA مثل اتیدیوم (ET) که موجب القای سوپر کویل در DNA حلقوی می شود.

نماییم، حلقه های DNA با توجه به ساختار هسته مرکزی که داربست کروموزوم را مشخص می کنند، نمایان می شوند (شکل 5-11 ، نیازی به توضیح نیست، چون این آزمایش ها با همین توضیح مختصر قابل فهم نیستند).



شکل 5- 10 حلقه های DNA که به ماتریکس هسته ای متصل شده اند و شبیه DNA حلقوی است. غلظت بالای اتیدیوم ایجاد سوپر کویل می نماید.

www.ShimiPedia.ir

شکل 5- 11 DNA در یک کروموزوم متافازی انسانی به صورت حلقه هایی در آمد که از هسته متراکم الکترونی مرکزی پخش شده اند (منظور داربست کروموزومی است). منشأ دو انتهای حلقه ها از منطقه مرکزی (ناحیه سیاه رنگ) است. طول حلقه های مربوط به یک سمت کروماتید کوچک اندازه گیری شد و تقریباً بین 5 تا 50 µm گردید. اکثر DNA های ژنوم انسانی حلقه هایی بین 10 تا 30 µm داشتند (30 تا 90 kb).

www.ShimiPedia.ir

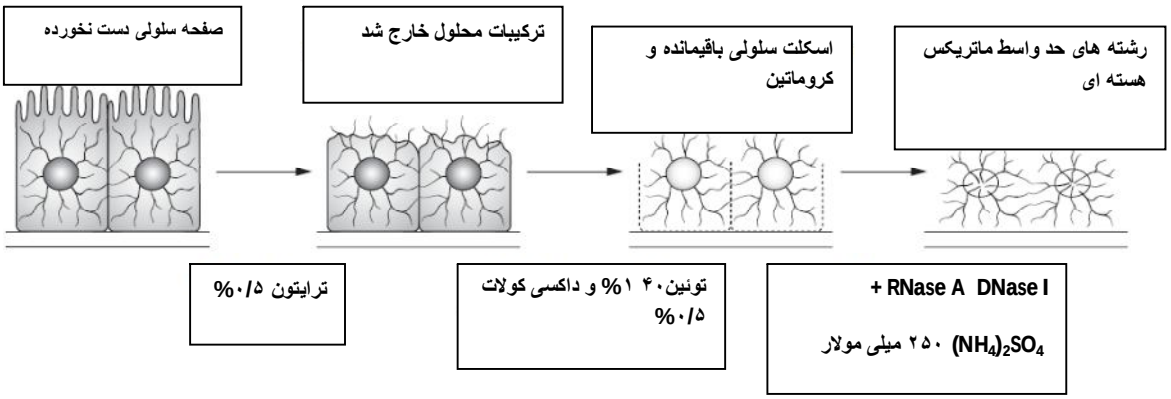
در این روش چون مستقیماً حلقه ها قابل رویت هستند بنابراین قابل اندازه گیری نیز می باشند. آنها در اندازه های مختلف و میانگین حدود 70 µm که معادل 200 bp در B- DNA است، قرار می گیرند. برخی روش های آماده سازی به جای این که DNA به صورت حلقه دیده شود شکلی شبیه گل و بوته به وجود می آورد، ولی پیام هر دو در اصل یکی است (یعنی DNA به تناوب به ساختار زیر بنایی متصل می شود و تشکیل حلقه های بسته شده را می دهد).

ماتریکس هسته ای و داربست های کروموزومی

اگر DNA درون هسته واقعاً به صورت حلقه سازماندهی شده است، پس با استفاده از میکروسکپ الکترونی و تیمار با رنگ های قابل نفوذ در رشته های DNA باید بتوان ساختار گره ها یا پایه های حلقه ها را مشاهده نمود. چگونگی عمل این ساختار مدتهای زیادی است که دانشمندان و گروه های علمی را مشغول بررسی روی آنها کرده و باعث بحث و مجادله فراوانی شده است.

همانطور که قبلاً بیان شد، اگر هسته سلول ها در تامپون هایی حاوی دترژانت یونی و غلظت بالای نمک باشند، ساختار کلی هسته اصلی محفوظ می ماند. هضم طولانی با آنزیم نوکلئاز باعث خارج کردن اسیدهای نوکلئیک می شود ولی این عمل ساختار آن را از بین نمی برد. در حالیکه تخریب RNA (نه DNA) باعث می شود که این ساختار تغییر کند و زیر میکروسکپ مشاهده نشود. ساختاری که بعد از انجام این روش استخراج بر جا می ماند معمولاً تحت عنوان ماتریکس هسته ای (nuclear matrix) می شناسند. ترکیب پروتئینی و ظاهر ماتریکس هسته ای بستگی به روش استخراج دارد (یک نمونه از آن را در شکل 5- 12 مشاهده می کنید). گفته می شود که ساختار بر جا مانده اساساً پیامدی از تجمع ترکیبات هسته ای است که توسط روش استخراج القا می شود. اگر از روش استخراج ملایمی استفاده شود، زیر میکروسکپ الکترونی شبکه تار مانندی درون هسته مشاهده می شود. به عنوان مثال چیزی شبیه شبکه رشته ای سیتوپلاسمی یا اسکلت سلولی است. بعد از تحقیقات زیاد روی ماتریکس هسته ای و ساختارهای مرتبط با آن فقط یک شبکه پروتئینی در هسته های یوکاریوتی شناخته شد و خصوصیات آن مشخص گردید. این شبکه، لامینای هسته ای است که از سه پروتئین لامین A ، B و C (lamins A, B and C) به وجود آمده است. یکی از آنها (منظور لامین A) خصوصیات ساختاری شبیه ترکیبات اصلی اسکلت سلولی دارد (رشته های حد واسط). لامینای هسته ای سطح داخلی پوشش هسته را می پوشاند، اما تا آنجا که ما می دانیم، درون بدنه هسته گسترش نمی یابد. لامین ها بدون شک ترکیبات ساختاری مهمی هستند و ممکن است در تنظیم عملکرد هسته نقش دارشته باشند، اما بعید است که مسئول بستن حلقه های DNA در سرتاسر هسته باشند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 12 روش استخراج ترکیبات حد واسط رشته های ماتریکس هسته ای از یک صفحه سلولی اپیتلیال. تنوع زیادی در این موضوع پایه ای وجود دارند.

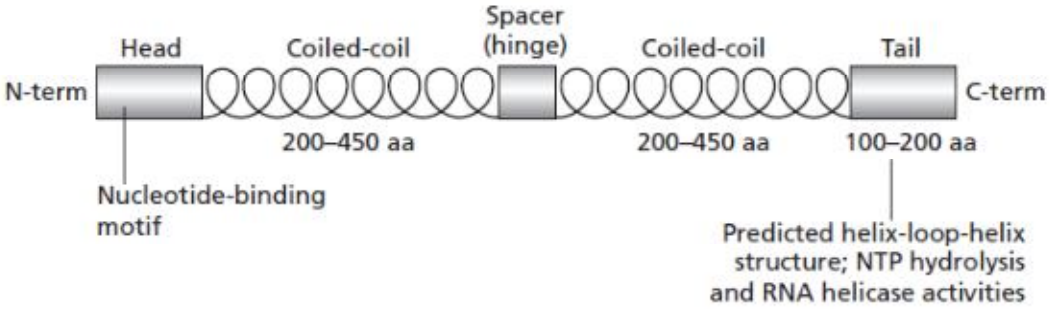
وقتی فراورده های ماتریکس هسته ای به وسیله روش پلی الکتروفورز تفکیک می شوند، یکی از نوارهای مهم پروتئینی روی ژل همین لامین ها هستند که در میان پروتئین های هسته ای یافت می شوند. در برخی فراورده ها، اکثریت آنها پروتئین های شناخته شده مرتبط با ترکیبات RNA هسته ای و درگیر در پردازش RNA هستند.

این یافته ها این احتمال را مطرح می کنند که ماتریکس هسته ای در داخل سلول باید خیلی شل یا متحرک باشند که همراه با ترکیبات RNA و پروتئین هستند. چنین مدلی یقیناً دشواری جداسازی ماتریکس ها (به عنوان ساختارهای مجزا) را نشان می دهند. این مدل دینامیک همچنین این سؤال را پیش می آورد که احتمال شباهت ماتریکس های جدا شده در خارج و داخل سلول چقدر بهم نزدیک اند. آنها نمی توانند عمل تخلیص را درست مثل خالص سازی قبلی انجام دهند و نتایج را مقایسه کنند چون اسکلت سلولیپایداری به دست نمی آید. تسحیص بین یک نمونه قابل قبول و یک تجمع ترکیبات غیر طبیعی القا شده بسیار مشکل است.

اولین عکس های میکروسکپ الکترونی از حلقه های DNA در کروموزوم های متافازی نشان داد که داربست ها (scaffold) به بازهای حلقه ها متصل اند. امکان دارد که این داربست ها از جنس پروتئین باشد و DNA روی آن تجمع یافته و ساختار فشرده ای به وجود آمده است. در ماتریکس هسته ای انترفازی، ترکیبات داربست کروموزومی گرایش به تجمع دارند و مشاهدات اولیه ممکن است متفاوت از ساختار داربست به وجود آمده باشد. با وجود این، دانشمندان قبول کردند که بازهای DNA محیط به

www.ShimiPedia.ir

حلقه ها باید به جیزی متصل شوند. جدا سازی داربست کروموزومی متافازی و بررسی محتوای پروتئینی آنها آشکار کرد (بر خلاف ماتریکس هسته ای) که فقط دو پروتئین اصلی SC- I و SC- II وجود دارند. سپس معلوم شد که پروتئین SC- I همان توپوایزومراز II (topo II) است. این آنزیم توانایی جدا کردن رشته های DNA را دارد و مکانیزم عمل آن برش و اتصال مجدد است. این نوع فعالیت برای جدا سازی رشته های DNA همانند سازی شده در فاز- S لازم است. توپوایزومراز II در فشردگی کروموزوم پیش از میتوز نیز دخالت دارد. بنابراین عجیب نیست که این آنزیم در همه سلول های یوکاریوتی جزء آنزیم های ضرورن باشد. پروتئین بعدی یعنی SC- II به عنوان عضوی از خانواده پروتئینی SMC است. پروتئین های SMC اولین بار در مخمر ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyce cervisiae*) به عنوان پروتئین های ضروری در فشردگی و جدا سازی کروموزوم ها در میتوز شناخته شد (با استفاده از روش های ایجاد جهش). این مطالعات روی مینی کروموزوم ها انجام شد. متعاقباً، روی پروتئین هایی با عملکرد مشابه در جوجه، دوزیستان و کرم های نماتود نیز مطالعاتی صورت گرفت. ساختار پروتئین های SMC (شکل 5- 13) پیشنهاد می کند که آنها توانایی اتصال به DNA (از طریق دُمین هلیکس- لوپ- هلیکس) را دارند و برای هیدرولیز نوکلئوتید 3- فسفات از طریق دُمینی شبیه آنچه در RNA هلیکاز و پروتئین های انتقالی قادرند به پروتئین های دیگر اتصال یابند و تشکیل هترودیمر دهند.



شکل 5- 13 ساختار دُمین پروتئین های SMC . NTP علامت اختصاری nucleotide three phosphate است.

به طور کل، ساختار پروتئین های SMC شبیه پروتئین هایی مثل کاینزین (kinesin) است. این پروتئین به اسکلت سلولی متصل می باشد (مخصوصاً به ریز لوله ها) و در جابجایی ترکیبات درون سلولی دخالت دارند. به عبارت دیگر، خصوصیات پروتئین های SC-I

و SC- II دقیقاً جیزهایی است که پروتئینی برای جابجایی و دستکاری ترکیبات سلولی بزرگ مثل کروموزوم ها لازم دارد. به طور مشخص، وقتی از آنتی بادی های دو پروتئین SC- I و SC- II برای رنگامیزی کروموزوم های متافازی استفاده کردند

www.ShimiPedia.ir

(تحت شرایط ملایمتری نسبت به زمانی که برای میکروسکپ الکترونی استفاده می کردند، قرار داند)، آنها کانونی را نشان دادند که باعث حرکت هر کروماتید از قسمت مرکز به طرف پایین می شد.

داربست کروموزوم متافازی کاملاً ساختار محافظت شده دارند (حداقل در مورد پروتئین های اصلی). اگرچه ساده نشان دادن موقعیت آنها چندان معقولانه نیست. پروتئین های SC- I و SC- II معمولاً بعد از روش های استخراج شدید به همراه DNA کروموزومی باقی می مانند. سایر ترکیبات ضروری و عملکردی ممکن است در آغاز روش خالص سازی وجود داشته باشند ولی در طول عمل تخلیص ناپدید می شوند. در حقیقت پروتئین های SC- I و SC- II (یا ترکیباتی نظیر آنها) برای متراکم کردن و جدا سازی کروموزوم کافی نیستند. برای مثال فشرده سازی DNA در خارج از سلول که در استخراج از تخمک های زنوپوس انجام شد، معلوم گردید که نیاز به پروتئین های SMC و توپوایزومراز II دارد (به نام XCAP- C و XCAP- E) . به علاوه، مطالعات جهشی در مخمر نشان داد که چندین ژن برای فشرده سازی و رفتار کروموزوم هنگام میتوز لازمند. جای تعجب نیست اگر دیده شود که چنین فرایند پیچیده ای نیاز به چندین پروتئین داشته باشد و باید ترکیبات ویژه و عملکردی بخصوصی را محدود و نشاندار کرد تا از این حالت پیچیده کمی خارج شود. پروتئین های SC- I و SC- II دقیقاً هر دو نقش آنزیمی و ساختاری را دارند که اجزای داربست کروموزومی متافازی است. اگر چه توزیع آنها بر اساس وضعیت های مختلف فرق می کند، اما به احتمال زیاد نقش های دیگری هم در سلول و هم در سایر پروتئین ها دارند. آنها ممکن است بخشی از داربست همراه با پروتئین های دیگر باشند. توجه داشته باشید وقتی از مدلی به سیستم مدل دیگر روی آوریم، ممکن است که موجودات مختلف پروتئین های بسیار محافظت شده و به طرق دیگر استفاده کنند. اگر چه سیستم های مدل های پیشنهاد شده ارزشمند هستند، اما آنها به احتمال برای آن موجود، ویژگی خود را خواهد داشت.

در این مرحله مهم است که بدانیم اهمیت متراکم شدن کروماتین فقط در فاز میتوز انجام نمی شود بلکه عمل متراکم شدن در تنظیم بیان ژن نیز دخالت دارد. با این پیش زمینه دو یافته جدید مورد توجه محققین قرار گرفت: نخست این که دو پروتئین SC- I و SC- II از کمپلکس UB2 (این پروتئین حاوی فاکتورهای پیوندی به DNA هستند و در تنظیم نسخه برداری دخالت دارد) خالص شدند. دوم اینکه در نماتودی به نام *C.elegans* پروتئینی کشف شد به نام MIX- I جزء خانواده SMC بود و متوجه شدند که ویژگی اتصال به کروموزوم X در حیوانات XX (هرمافرودیت) دارد (در حقیقت به نرهای XY پیوند پیدا نمی کند). این پروتئین قسمتی از کمپلکس پروتئینی است که در تنظیم نسخه برداری از ژن های متصل شده به کروموزوم X (در

www.ShimiPedia.ir

حیواناتی که به صورت XX هستند) دخالت دارد و این قسمت یک بخش الحاقی به مکانیزم جبرانی در *C.elegans* می باشد. این موضوع در فصل 12 به تفصیل صحبت خواهد شد. آنچه که در مورد MIX- I درسلول هایی که در مرحله اینترفاز هستند جالب است. اتصال آنها تنها به کروموزوم X در موجودات XX می باشد، در حالیکه در متافاز ، معلوم شد که آنها در تمام کروموزوم های حیوانات XX و XY یافت می شوند و نقش آنها متراکم کردن کروموزوم در مرحله متافاز است. بنابراین یک پروتئین دارای دو نقش مهم است هم در مرحله تنظیم ژن (قسمتی از مکانیزم جبرانی) دخالت دارد و هم در متراکم کردن کروموزوم در میتوز نقش ایفا می کند.

نواحی مربوط به داربست یا ماتریکس

ماتریکس هسته (nuclear matrix) یا داربست کروموزومی (chromosomal scaffold) همیشه حاوی مقدار کمی DNA هستند که هنگام انجام عمل استخراج در روش های مختلف و هضم توسط آنزیم نوکلئاز باقی می ماند. این DNA در نتیجه یک برش تصادفی از ژنوم نیست. انتظار می رود که این DNA به علت اتصال غیر ویژه باشد، ولی در عوض مشاهده شد که مجموعه ای از قطعاتی با قابلیت تکثیر هستند (تهیه این قطعات با تهیه ماتریکس هسته شروع می شود که در شکل 5- 12 نشان داده شده است و با انجام عمل هضم آن توسط پروتئازها مشاهده شد که قطعات DNA رها شدند. این قطعات DNA از هضم شدن آن توسط DNase I محافظت شدند). در کل، به نظر می رسد که قطعاتی از DNA خاصی هم در هنگام تهیه ماتریکس هسته ای (مرحله اینترفاز) و هم در داربست کروموزومی (مرحله متافاز) وجود دارند. این قطعات را (matrix associated rgions) MAR یا SAR

(scaffold associated regions) گویند. اگر این دو واژه را بهم تبدیل کنیم، می توان آنها را همان MAR نامید.

هر آزمایشی که شامل ماتریکس هسته ای باشد پیچیدگی فراوانی دارد و تعیین DNA همراه با ماتریکس به تنهایی کافی نیست. ساده ترین روش این است که توالی DNA بخصوصی که هنگام تهیه ماتریکس به دست می آید را تعیین کنیم ولی باز هم به همین سادگی نمی توان ادعا کرد که یک MAR معتبر است یا مثلاً بگوییم که در داخل محلول همان DNA همراه با ماتریکس می باشد.

www.ShimiPedia.ir

وقتی قطعات DNA جدا شده از ماتریکس هسته ای را به DNA ای که به ماتریکس متصل نیست مورد آزمایش قرار دادند و نحوه پیوند آن آزمایش شد، فقط مقدار کمی از آن توانایی پیوند اختصاصی را نشان داد. چرا این گونه است؟ ممکن است تعدادی از قطعات خالص شده از ماتریکس به طور غیر اختصاصی به ماتریکس چسبیده باشند، اما شاید علت وجود آنها این باشد که نسخه برداری آنها بعد از خالص سازی ماتریکس صورت گرفته باشد. این موضوع می تواند شاهدی برای این فرض باشد که ماشین نسخه برداری با روش هایی که شناخته نشده، انجام می شود. این زنجیره های نسخه برداری توانایی ذاتی پیوند با ماتریکس را ندارند و آنها زمانی می توانند به ماتریکس پیوند یابند که توسط روش تخلیص، ماتریکس متوقف گردند. لازم است که این DNA های همراه با ماتریکس مورد آزمایش های بیشتری قرار گیرند مثلاً سنجش پیوند آنها در خارج از سلول با استفاده از کلونینگ یا نشاندار کردن قطعات DNA .

توالی DNA باقی مانده هسته ای تعیین گردید. حال می خواهیم نشان دهیم که آیا میل ترکیبی برای پیوند را دارد یا نه؟ این موضوع مورد بررسی محققین قرار گرفت.

قطعات MAR خالص شده دارای اندازه هایی بین 300 تا 1000 bp هستند و هر کدام چندین محل برای اندرکنش با DNA داربست دارند. MAR ها غنی از AT هستند ولی هیچ توالی موتیف ساده ای که بتوان آنها را مشخص نمود، وجود ندارد. موقعی که پیوند بین قطعات MAR نشاندار شده به ماتریکس یا داربست تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت، معلوم شد که در حد اشباع بود یعنی تعداد محدودی محل های پیوند وجود دارند. معلوم نیست که قطعات MAR به کدام یک از پروتئین های ماتریکس پیوند پیدا می کند. فواصل بین MAR ها کمتر از 3 kb تا 140 kb است یعنی نزدیک به محدوده اندازه های هر حلقه که توسط میکروسکپ الکترونی اندازه گیری شد.

یک مشکل باقیمانده این است که حتی اگر توالی مربوط به ماتریکس و میل ترکیبی زیاد پیوند آنها در خارج سلول مشخص شود، باز هم نمی توان فرض کرد که در داخل سلول نیز چنین باشد. دلیل آن روش های بکار رفته است. روشی که برای خالص سازی ماتریکس استفاده می شود اغلب به صورت دوره ای است، هر چند این دوره کوتاه است ولی زمانی است که قطعات DNA برهنه در معرض پروتئین های ماتریکس قرار می گیرند و ممکن است با آنها پیوند به وجود آورند. برای مثال توالی خاصی پیدا شده است که محکم با آنزیم توپوایزومراز II (پروتئین اصلی ماتریکس) پیوند می یابد و در DNA ژنومی وجود دارد. این توالی را در ماتریکس خالص شده توانستند مشخص کنند. به هر حال، بقیه ممکن است همراه با ماتریکس در هنگام انجام عمل

www.ShimiPedia.ir

تخلیص به وجود آمده باشند. اتصال به ماتریکس در MAR ها و عناصر پیوندی به آنزیم توپوایزومراز II از طریق بسته بندی کروماتین تنظیم می شود یا ممکن است یا جلوگیری شود.

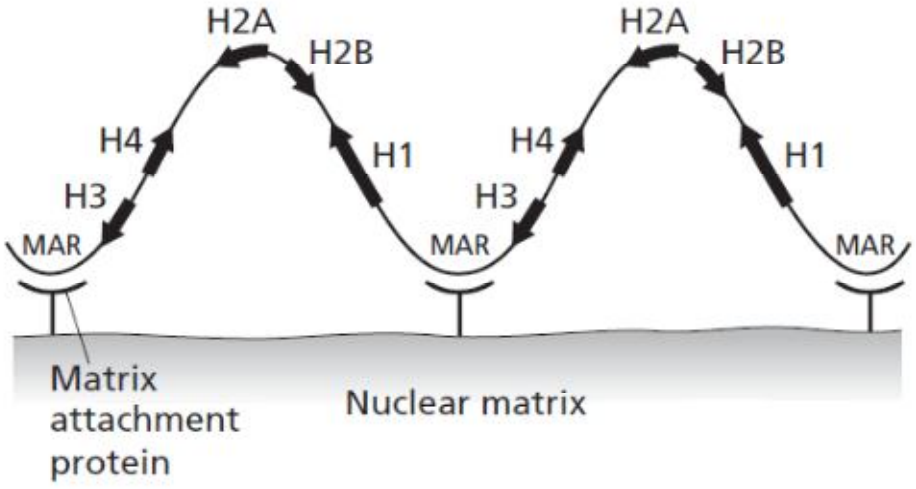
یکی از بهترین خصوصیاتی که MAR ها را مشخص کرد، جدا سازی مجموعه ژن های هیستونی از *Drosophila melanogaster* است. همانطور که در سلول های یوکاریوتی عالی مشاهده شد، معلوم گردید که ژن های هیستون ها در *Drosophila melanogaster* به صورت مجموعه ای در چندین نسخه است. همانطور که در شکل 5- 14 مشاهده می شود هر مجموعه توسط یک MAR جدا می شود. MAR حاوی قطعات DNA است و دو پروتئین در نواحی پیوندی دارد (هر کدام

200 bp) و توسط فضایی با 100 bp از هم جدا می شوند. این ناحیه غنی از توالی خاصی جهت پیوند با توپوایزومراز II است. موقعیت MAR نشان می دهد که مجموعه ای از حلقه های 5 کیلو بازی وجود دارند. به هر حال، همانطور که قبلاً گفته شد، مشکل است ثابت کنیم MAR ها واقعاً در داخل سلول همراه با ماتریکس هستند یا نه؟

موقعیت MAR های هیستونی به طور قطعی تخمین زده شده است ولی مجموعه دُمین های حلقوی در شکل 5- 14 در داخل سلول نیاز به اثبات دارد.

اگر بدانیم عملکرد مهم MAR ها چیست، کار بزرگی صورت می گیرد و گاهی فکر می شود که آنها قسمتی از عناصر مرزی باشند یعنی نواحی از DNA که پایان دُمین های ژنومی عملکردی را مشخص می کنند و ممکن است (1) ژن های درون خود را از تأثیر عوامل کنترلی خارجی محافظت می نمایند یا (2) از این که عناصر بین دُمین ها توسط ژن های خارج از آن تنظیم شوند، جلوگیری بعمل می آورند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 14 امکان سازماندهی مجموعه ژن های هیستونی در *Drosophila melanogaster*

البته مشخص نیست که چرا سلول ها یک مجموعه ای از ژن های هیستونی را از مجموعه بعدی جدا می کنند و این عمل چه فایده ای دارد؟ همه آنها یکسان عمل می کنند یعنی تنظیم متکی به چرخه سلولی و تا آنجا که ما می دانیم ژن ها عملکرد هماهنگی دارند. ممکن است که در نواحی غنی از ژن هایی با قابلیت نسخه برداری بالا، فاصله نزدیک بهم MAR ها موجب پایداری ساختاری شوند و سازماندهی مناسبی برای ژن ها به وجود آورند.

دُمین های عملکردی و نوارهای کروموزومی

اگر کروموزوم های متافازی را رنگامیزی کنیم، جزئیات ساختاری کمی را نشان می دهند. اگر آنها را قبل از رنگامیزی به طور اختصاصی تیمار نماییم (خود این موضوع یک راز است)، نواحی خاصی با شدت رنگامیزی گوناگون بازوهای کروموزومی مشخص خواهند شد. یکی از این تیمارها شامل تثبیت سلول ها در مرحله متافاز در متانول: اسید استیک به نسبت 3 به 1 و چکاندن قطره قطره ای آن بر روی اسلاید شیشه ای و سپس تیمار آن به مدت چند دقیقه با آنزیم پروتئولیتیک (معمولاً تریپسین) و بالاخره رنگامیزی توسط گیمسا می باشد. این روش باعث می شود که در کروموزوم ها نوارهای تاریک و روشن به وجود آید. نوارهای تیره، نوارهای G -

www.ShimiPedia.ir

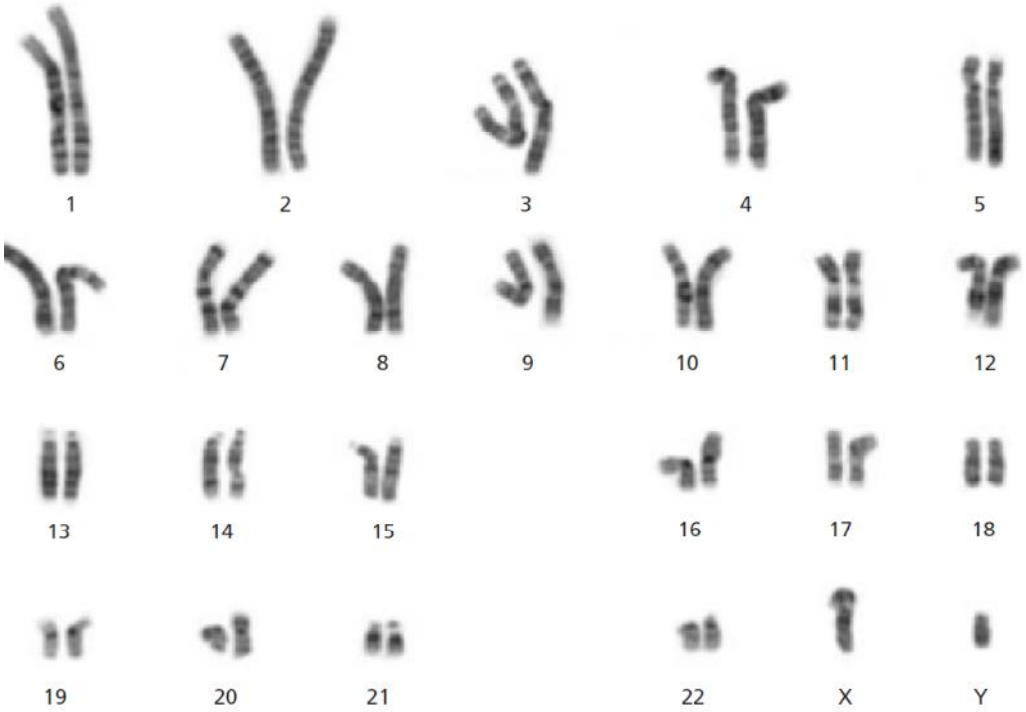
(G- bands) هستند (شکل 5- 15) . اگر کروموزوم های روی اسلاید را با محلول قلیایی گرم (نه با تریپسین) و قبل از رنگامیزی با گیمسا تیمار کنیم، مشاهده می شود که نوارها، رنگ بیشتری بخود می گیرند و به آنها نوارهای- C (C- bands) گویند. این نوارها در اطراف سانترومر تمام کروموزوم های انسانی دیده می شوند. آنها نواحی مرکزی هتروکروماتین هستند. خصوصیات هتروکروماتین در فصل 9 گفته می شود ولی فعلاً باید متذکر شد که نوارهای- C غنی از توالی عناصر تکراری هستند که در اواخر فاز- S همانند سازی می شوند و حاوی مقدار بسیار کمی DNA کد کننده هستند.

الگوی نوارهای- G در کروماتیدهای خواهری در هر کروموزوم دقیقاً یکسان است و بسیار مهم است که بدانیم در یک گونه خاص، الگوی نوارهای- G قابلیت تکثیر از یک فرد به فرد دیگر و همچنین از یک سلول به سلول دیگر را دارند. درجه متراکم شدن کروموزوم های متافازی بستگی به روش آماده سازی نمونه دارد و همچنین نحوه پخش کردن آنها روی اسلاید مهم است. کروموزوم های متافازی بزرگ هستند و به راحتی شکل خود را از دست می دهند.

اگر چه کروموزوم های بلندتر تمایل به ایجاد نوارهای بیشتری نسبت به این که بیشتر متراکم شوند، دارند، معمولاً می توانند یک نوار بزرگ را به چندین نوار کوچکتر تقسیم کنند. توانایی تکثیر مجدد الگوی نوارهای- G ، این فرضیه را که این نوارها تنها پس از تیمار توسط رنگ ها در خارج از سلول آشکار می شوند را تأیید می کند. آنها باید خصایص ساختاری که در زیر این نوارها پنهان شده اند را در کروموزوم های متافازی منعکس کنند.

شواهدی که این واقعیت را تأیید می کند این است که الگوهای نوارهای گوناگونی که شبیه نوارهای- G هستند با روش های تیمار گوناگون مشاهده می شوند. روش های ابداع شده رنگامیزی ویژه و خوبی (با گیمسا) در نواحی بین نوراهای – G به وجود می آورند و امروزه به آنها نوارهای- R (R- bands) گویند (روش رنگامیزی معکوس). بنابراین توزیع نوارها تحت تأثیر پیش تیمار نیست بلکه آنها فقط شدت رنگ پذیری را مشخص می کنند. شواهدی که برای این موضوع وجود دارند، مشاهده توزیع نوارهای- G در کروموزوم های متافازی است که شبیه نواحی توزیع کروماتین متراکم شده در کروموزوم های مرحله پاکیتین (pachytene) میوز است.

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 15 شکل کروموزومی انسان. از کروموزوم های متافازی استفاده شد و در اینجا از کروموزوم های گلبول های سفید خون به دست آمد. در این روش آنها توسط تریپسین هضم و با گیمسا رنگامیزی شدند. در شکل فوق نوارهای - G را مشاهده می کنید. در این روش آماده سازی، کروماتیدهای خواهری (محصول همانندسازی در فاز - S) جدا نشده اند. کروموزوم های مادری و پدری الگوی یکسانی دارند ولی نوع هر کروموزوم منحصر بفرد است.

این نواحی، کروومرها (chromomeres) هستند که با میکروسکپ نوری قابل دیدن می باشند. این واقعیت که وجود نوارهای یکسان (یا خیلی شبیه هم) در کروموزوم های هر دو تقسیم یعنی میتوز و میوز، این فرض را ایجاد می کند که آنها یک خصلت ساختاری بنیادی دارند و ممکن است که روش های مختلف ایجاد نوار باعث افزایش این نواحی در کروموزوم های میتوزی شده باشند.

شواهدی برای این گمان وجود دارند که ترکیبات بازهای DNA کروموزومی ممکن است نقشی در نوارهای کروموزومی داشته باشند. رنگامیزی کروموزوم ها با ماده فلوروکروم کوئینا کرین (fluorochrome quinacrine) که می تواند به DNA پیوند یابد (بدون پیش تیمار) ، نوارهای رنگامیزی شده روشنی به وجود می آورند که به آنها نوارهای - Q (Q- bands) گویند و شبیه نوارهای - G هستند. اگر بخواهیم توضیحی برای این موضوع بدهیم این است که شدت فلورسنت ماده کوئیناکرین با مقدار جفت

www.ShimiPedia.ir

بازهای GC کاهش می یابد یعنی نواحی غنی از GC باعث جذب یا در حقیقت پاک کردن (quench) نور فلورسنت منتشر شده می شوند، در حالیکه نواحی غنی از AT روشن می مانند. بنابراین آزمایش با کوئیناکرین مشخص می کند که نوارهای- G غنی از جفت بازهای AT هستند (نسبت به نوارهای – R). به هر حال، به نظر نمی رسد که تنها ترکیب بازها بتواند عامل و علت نوارها باشند.

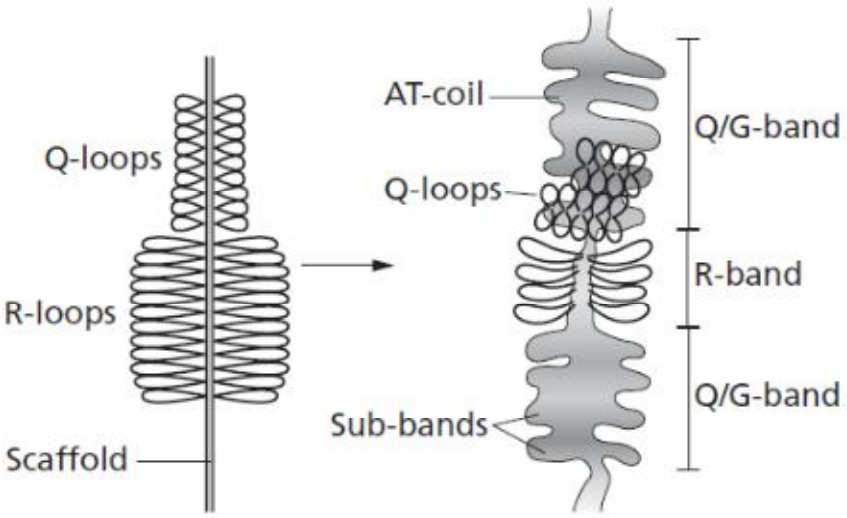
اختلاف در ترکیب بازها بین نوارهای- G و نوارهای – R بسیار کم است و به تنهایی قابل اندازه گیری نیست ولی اختلاف در شدت فلورسنت توسط کوئیناکرین و سایر فلوروکروم ها می تواند کمک کند. شواهدی وجود دارند که توالی غنی از GC و AT به ترتیب حضور نوارهای- R و نوارهای- G را نشان می دهند. نوارهای- R حاوی مقدار زیادی تکرار عناصر توالی DNA غنی از GC است و به آن SINES گویند، در حالیکه نوارهای- G حاوی مقدار زیادی از خانواده غنی از AT است و آن را با LINES می شناسند. بعلاوه، نوارهای- G می تواند توسط تیمار با آنزیم های پروتئولیتیک القا شوند یعنی پروتئین ها به نحوی درگیر هستند. بنابراین به نظر می رسد که اکثر پروتئین ها (شامل همه یا اغلب هیستون ها) طی عمل آماده سازی کروموزوم های متافازی توسط تثبیت با اسید استیک و متانول خارج می شوند. این پروتئین ها احتمالاً پیوند محکمی با کروموزوم های DNA دارند.

حلقه ها، SARs/MARs و نوارهای کروموزومی

مدلی با استفاده از DNA حلقوی و DNA مربوط به ماتریکس یا داربستی مطرح شد تا خصوصیات نوارهای کروموزومی در متافاز را مورد مطالعه قرار دهند. محققینی که با DNA کروموزومی کار می کنند، دوست دارند روی توالی DNA متصل به داربست کروموزومی یعنی SAR ها مطالعاتی انجام دهند، هر چند که تحقیقات نشان داده است که آنها از همان خانواده توالی ناحیه ماتریکس یعنی MAR ها هستند. این مدل بر اساس تحلیل پیچیده کروموزوم های نشاندار شده با رنگ دانومایسین (daunomycin) (رنگ فلوروکروم است که توالی DNA غنی از AT را نشاندار می کند) مورد بررسی قرار می دهد. در ضمن با استفاده از رنگ فلورسنت YOYO متصل شده به DNA هراه با رنگ متیل سبز (Methyl Green) که فلورسنت نیست، مطالعاتی صورت گرفته است. این رنگ توالی DNA غنی از AT را نشاندار می کند و موجب پاک کردن (quench) فلورسنت YOYO می شود (مخلوط

www.ShimiPedia.ir

YOYO – MG برای توالی DNA غنی از GC ویژگی دارد). موقعی که کروموزوم های گوزن آسیایی را (بیش از سایر پستانداران توسعه یافته است) با این رنگ های فلورسنت رنگ شدند (دانومایسین نوارهای G/Q را به طور قوی و نوارهای R را به صورت ضعیف نشاندار می کند). به هر حال، این نوع رنگامیزی ساختار مارپیچی مابین نوارهای - G را نشان داد (شکل 5- 16).



رشته های کروماتین اینترفاز کروماتید متافازی

شکل 5- 16 مدلی از ساختار کروموزوم متافازی بر اساس اندازه های متفاوت حلقه های کروماتین و ترکیب بازها.

در DNA نواحی غنی از AT وجود دارند که در ارتباط با ساختار داربستی کروموزوم هستند. آنها حلقه هایی با اندازه های مختلف ایجاد کرده اند. این داربست با مارپیچ های DNA در متافاز مرتبط اند (AT- coil). حلقه های کوچکتر Q ، کروماتین متراکم تری را به وجود آوردند (نوارهای Q/G)، در حالیکه حلقه های - R کروماتینی با پراکندگی بیشتر ایجاد نمودند (نوارهای - R). نوارهای - R و Q/G کاملاً به صورت حلقه هستند که در شکل فوق بعضی از آنها نشان داده شده است.

رنگ YOYO- MG در نوارهای - R ترجیح داده می شود. ساختار مارپیچ بین نوارهای - G می تواند به عنوان داربست کروموزومی در نظر گرفته شود که بسیار مرتبط با DNA عنی از AT (غنی از SAR) باشد. فراوانی بالای SAR ها ایجاد حلقه های کوچک می کند. در مقابل، در نواحی نوارهای - R (SARها) با فراوانی کم و حلقه های بزرگتر وغنی از GC می شوند

www.ShimiPedia.ir

(شکل 5- 16) . در این مدل اختلاف زیادی بین میزان و تراکم DNA در نوارهای- R و نوارهای-G وجود ندارند و فقط حلقه ها در اندازه های مختلف هستند. ارتباط بین نوارهای DNA غنی از AT و داربست کروموزومی توسط آزمایش با آنتی بادی ها معلوم شد که به توپوایزومراز II مربوط به داربست نشاندار شده متصل شدند و به همان ترتیب دانومایسین نواحی غنی از AT را نشاندار کرد.

اهمیت عملکرد نوارهای کروموزومی

تکمیل روش هایی که موجب تکثیر نوارهای حاصل از کروموزوم متافازی شد، باعث گردید که موفقیت های بزرگی در شاخه های مختلف پزشکی و ژنتیک به وجود آید. با تعیین الگوی نوارهای ویژه در فرد بخصوص می توان کروموزوم ها و مناطق خاصی از کروموزوم های فرد را شناسایی نمود یعنی شبیه بارکدهایی است که در سوپر مارکت ها برای شناسایی اجناس استفاده می شود، است. نوارهای کروموزومی برای شناسایی نقایص مادرزادی، تشخیص جابجایی کروموزومی در سلول های سرطانی و نقشه ژنی (و بسیاری موارد دیگر) استفاده می شود. این روش در علوم و علوم پزشکی بالینی ارزش بسیار زیادی دارد. با این حال، پرسش های زیادی در مورد اهمیت عملکرد نوارهای کروموزومی باقی می ماند. به طور کل، اگر آنها در ترکیب بازهای DNA که بسته بندی شده اند و در میتوز، کروموزوم هایی که متراکم گردیده اند، تأثیر داشته باشند، پس همین دلیل منطقی شناسایی فرایند ثانویه را طلب می کند و باید فهمید که سلول ها چگونه کار می کنند. به عبارت دیگر، اگر امکان نشان دادن ارتباط بین نوارها (مثلاً تعیین موقعیت مجموعه ای از ژن ها یا خانواده هایی از ژن هایی که الگوی بیان آنها در ارتباط با هم باشند) را بدانیم، ممکن است موضوع بسیار جالب شود.

مطالعات بر روی توزیع ژن ها در طول کروموزوم ها نشان داده است که به طور کل بیشتر ژن ها در نوارهای- R قرار می گیرند (تا در نوارهای- G) . امروزه مطالعات پیشنهاد می کنند که حدود 80 درصد از ژن ها در نوارهای- R و 20 درصد در نوارهای- G هستند. ژن های خانه پا (housekeeping) (یعنی ژن هایی که در همه جا بیان می شوند) در نوارهای-G وجود ندارند. همانطور که نقشه

ژنوم به سرعت در حال تکمیل شدن است، اطلاعات در مورد ژن ها نیز بیشتر می شود، ولی بعید به نظر می رسد که این موضوع اساساً تغییری به وجود آورد. با این حال، باید در نظر داشت تعیین قطعی این که ژنی در نوارهای- G قرار دارد یا نه، آسان نیست. دلیل آن این است که بیشتر ژن ها با استفاده از توالی و تجزیه و تحلیل ارتباطات ژنتیکی، نقشه برداری می شوند (در صورتی که

www.ShimiPedia.ir

نوارهای کروموزومی توسط تجزیه و تحلیل میکروسکپی مربوط به کروموزوم های متافازی مشخص شده اند). بنابراین تطبیق نقشه های مختلف با هم مشکل است. حتی وقتی که ژنی به طور میکروسکپی در نوارهای- G توسط هیبریداسیون DNA پروبی که نشاندار شده، قرار گرفته باشد، باز هم ممکن است در تجزیه و تحلیل نوارهای- G حتی با تفکیک بالا، تنها چیزی که بتوان مشاهده کرد تقسیم آنها به زیر گروه های دیگر است (در این حالت ژن مورد نظر در ناحیه ای بین نوارها قرار می گیرد). پیشنهاد شده است که ژن ها می توانند بسته به فعالیت نسخه برداری آنها بین نوارهای- R و نوارهای- G جابجا شوند اما هیچ شاهدی بر این مطلب وجود ندارد.

به نظر می رسد که تفاوت بین نوارهای- G و نوارهای- R به نحوی مربوط به ترکیب بازهای آنهاست. بنابراین فراوانی ژن ها در نوارهای- R ممکن است نتیجه رمزگذاری DNA و توالی بازهای نزدیک به آن باشد (تقریباً توالی غنی از GC). تمام ژن های خانه پا (housekeeping) و 40% از ژن های بافت های خاصی که غنی از GC هستند (به آنها جزایر CpG گویند، فصل 10) از نوارهای- R تشکیل شده اند، در ضمن 86% از جزایر CpG نیز از نوارهای- R می باشند. نهایتاً زیر گروه هایی از نوارهای- R وجود دارند که به عنوان نوارهای- T (T- band) شناخته شده اند. این نوارها غنی از GC و غنی از ژن ها (gene- rich) می باشند. تراکم بالای SARها به علت این است که غنی از AT هستند (ولی نواحی دارای ژن های کمتر از نواحی غنی از GC وجود دارندکه خودشان غنی از ژن ها هستند)، بنابراین الگویی از حلقه ها را به وجود می آورند که در شکل 5- 16 به عنوان نوارهای- R و G/Q نشان داده شده اند.

ترکیب کروماتین در نوارهای کروموزومی

از نظر تجربی مقایسه ساختار و ترکیب کروماتین در ژنوم مناطق نوارهای- G و نوارهای- R مشکل است و اختلافات اساسی در ساختار نوکلئوزومی بین آنها می باشد. به هر حال، یکی از تفاوت های چشمگیر آنها توسط آزمایش با روش ایمونولوژیگی در کروموزوم های متافازی مشاهده شد . در این روش از آنتی بادی های هیستون های H3 و H4 استیله شده استفاده گردید. این آزمایش ها نشان داد که نوارهای- C (C- bands) (centric heterochromatin) مقدار کمی هیستون استیله شده دارند (گاهی اصلاً ندارند). نواحی خاصی در بازوهای کروموزوم وجود دارند که تحت استیله شدن هستند و نوارهای فلورسنت ایجاد می کنند. نشانه هایی وجود دارند که مشخص می کنند مناطق استیله شده مربوط به نوارهای- G هستند اما در حقیقت روش های آماده سازی کروموزوم که برای نوارهای- G استفاده می شوند (همچنین در روش های ایمونوفلورسانس) باید جزئیات مقایسه

www.ShimiPedia.ir

الگوهای این دو نوار را بیشتر نشان دهند. به هر حال، نوارهای- G ژن های کمتری را در خود جای می دهند و غنی از AT هستند، نسخه برداری از آنها کند انجام می شود. همه خصوصیات آنها میزان زیاد محور هتروکروماتین (centric-heterochromatin) را نشان دهند. با توجه به این موضوع بعید نیست اگر نوارهای- G در کروماتین نیز تحت استیلاسیون قرار بگیرند.

نوارها در کروموزوم انترفازی

در حالیکه نوارهای کروموزوم متافازی اطلاعات مفیدی در ساختار ژنوم پستانداران ارائه کرد، ولی برای محققینی که مطالعات آنها روی بیان ژن بود از نقطه نظر این که این مطالعات را در مرحله متافاز انجام دهند، یک نقطه ضعف به حساب می آمد. در این مرحله نسخه برداری در حد ناچیز و کروموزوم ها برای تکمیل وظیفه بسیار خاص خود که همان تقسیم ژنوم در سلول های دختری است، بسته بندی شده اند. آیا نوارهای کروموزومی می توانند یک ویژگی در کروماتین میتوزی باشد و ارتباطی با عملکرد کروماتین در سلول های اینترفاز ندارد؟

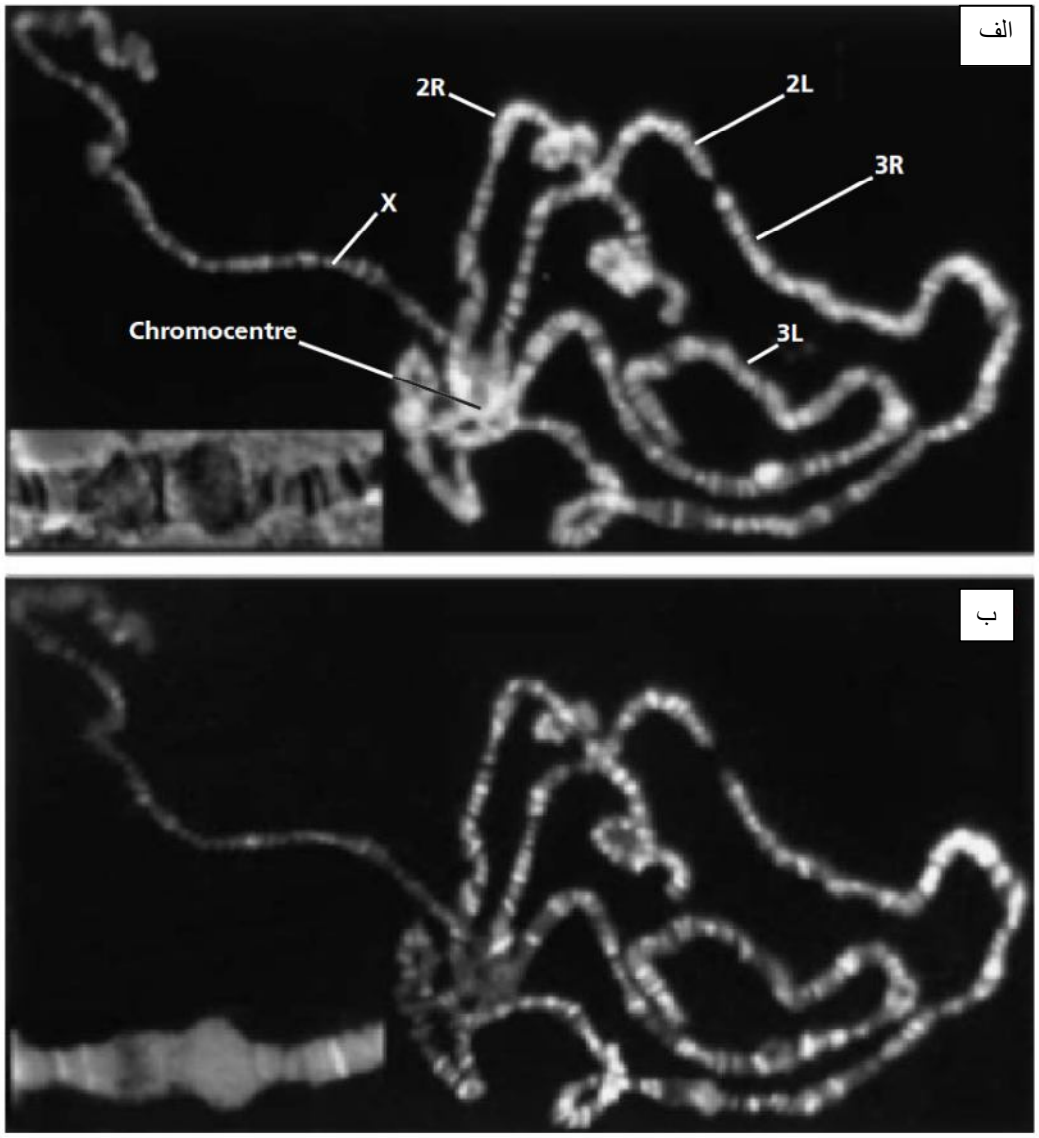
اگر چه روش های میکروسکپی از ارزش کمی در بررسی ساختار کروماتین در اکثر سلول های اینترفاز برخوردار هستند، شرایط ویژه ای در این مورد وجود دارد که می توان انجام داد. این شرایط در سلول هایی وجود دارند که در آنها چندین دور همانندسازی DNA بدون تقسیم سلولی رخ می دهد و این وضعیت در کروموزوم های پلی تن (polytene) دیده می شود. در این کروموزوم هزار رشته DNA دقیقاً پهلوی هم قرار می گیرند. کروموزوم غدد بزاقی مگس سرکه این سیستم را دارد. استفاده از این کروموزوم ها یک موفقیت در این کار است. وقتی شما بر انتقال آنها روی اسلاید تسلط داشته باشید، به راحتی می توانید زیر میکروسکپ نوری آنها را مشاهده کنید. هنگامی که DNA آنها رنگامیزی شود یا وقتی که با تغییر کنتراست تصویر گرفته شود، یک الگوی تجدید پذیر از نوارهای تاریک و روشن دیده می شود (شکل 5- 17). در حدود 5000 نوار در *D. melanogaster* و نقشه هایی با جزئیات زیاد مدتهاست که در حال تحقیق است. از این نقشه ها می توان در تعیین موقعیت ژن های خاص و دُمین های کروموزومی استفاده کرد. توجه داشته باشید که اینها کروموزوم های اینترفازی هستند و ژن های آنها به صورت فعال در حال نسخه برداری می باشند. ژن هایی که سریعاً نسخه برداری انجام می دهند مانند ژن هایی که با استفاده از هورمون ها یا شوک حرارتی تحریک شده اند، زیر میکروسکپ کاملاً قابل مشاهده هستند و به آنها puff گونید (شکل 5- 17).

www.ShimiPedia.ir

بنابراین کروماتین اینترفازی (حداقل در سلول های پلی تن) یک الگو از نوارها را به نمایش می گذارند. نوارها چه چیزی را نشان می دهند؟ و آیا آنها خصوصیات مشترکی با نوارهایی که در کروموزوم های متافاز پستانداران دیده می شوند، دارند؟ شاید اولین نکته مورد توجه این باشد که کروماتین در نوارهای کروموزومی پلی تن در حشرات بیشتر در داخل نوارها (interbands) فشرده شده اند (شاید حدود 5 به 1 باشند). این وضعیت به آسانی در اسکن میکروگراف های الکترونی در کروموزوم های پلی تن دیده می شود (شکل 5- 18). این نکته نیز قابل توجه است که میزان استیله شدن هیستون H4 در داخل نوارهای پلی تن بیشتر از بین نوارهاست. مناطقی که به شدت با Hoechst رنگ می گیرند، اغلب با آنتی بادی های H4 استیله شده ، به طور ضعیف نشاندار می شوند و بالعکس (مقایسه توزیع نشاندار شدن در طول بازوهای کروموزوم را در شکل 5- 17 ، الف و ب مشاهده می کنید).

سه دسته از شواهدی که نشان می دهند نوارهای کروموزومی پلی تن ساختار پایداری دارند عبارتند از: (1) امکان آماده سازی نقشه کروموزوم های پلی تن از بافت های مختلف، (2) الگوهای نوارها در طول تکامل کاملاً حفظ شده اند، (3) در جابجایی کروموزومی همچنان زنده مانده اند. این خصوصیات پیشنهاد کننده این مطلب است که تفاوت در نواحی بین نوارها و داخل نوارها در سطح DNA می باشد. به هر حال، شواهدی مبنی بر تفاوت در ساختار بازهای بین نوارها و داخل نوارها وجود ندارد، تاکنون در مقایسه توالی موتیف های خاص در داخل نوارها تفاوتی دیده نشده است. این احتمال وجود دارد که با تکمیل پروژه توالی ژنوم *Drodophila* تفاوت هایی پیدا شود. همچنین ممکن است تفاوت مربوط به ساختار موتیف ها مانند مارپیچ های صلیبی یا سه تایی که ناشی از تفاوت در توالی عناصر DNA است، باشد و شناسایی آنها نیاز به روش های تحلیلی پیچیده ای دارد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 17 کروموزوم های پلی تن *Drosophila melanogaster* . (a) کروموزم های رنگامیزی شده با Hoechst 33342 فلوروکروم متصل به DNA . کروموزوم های 2 و 3 مناطق کروموزومی در دو طرف سانترومر (نزدیک به وسط) با L و R مشخص شده اند. سانترومر کروموزوم X در یک انتها وجود دارد. به شدت رنگ پذیری کروموسنتر (پایین سمت چپ) منطقه ای که دسته ای از سانترومرهای غنی از هتروکروماتین وجود دارند، دقت شود. کروموزوم کوچک 4 با کروموسنتر در کنار هم جمع شده اند و به راحتی در این عکس قابل تشخیص نیست. مناطق بین نوارهای کروموزوم به شدت و مناطق داخل نوارها به طور ضعیف رنگ گرفته اند که نشاندهنده نسبت میزان DNA آنهاست. لاروها قبل آماده کردن کروموزوم مختصری شوک حرارتی (37 °C) دیده اند و ژنوم مربوط به شوک حرارتی HSP70 در موقعیت 87 A و 87 C از نظر نسخه برداری

www.ShimiPedia.ir

فعال شده و تشکیل دو puff را داده اند (پایین مرکز). DNA مربوط به puff ها با رنگ Hoechst به طور ضعیفی رنگ گرفته اند. ناحیه بزرگ 87 A – C تحت کنتراست قابل مشاهده است. مناطق puff دارای فاز متراکم هستند که به علت غلظت بالای نسخه های RNA و پروتئین است. (ب) در این شکل همان کروموزوم بالایی است منتهی توسط روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با آنتی سرم هیستون H4 استیله شده در لیزین 8، نشاندار شده است. در اینجا به نشاندار شدن ضعیف کروموسنتر و عدم هماهنگی بین Hoechst و الگوی آنتی بادی نشاندار شده، توجه کنید. توزیع H4 استیله شده بازتابی از DNA (کروماتین) نیست. Puff بزرگتر حاصل از شوک حرارتی (87 C) شامل سه کپی از ژن HSP70 است که نشاندار شدن آن بسیار شدیدتر از 87 A می باشد. دلیل این مسئله روشن نیست و تفسیر آن به علت تجمع RNA و پروتئین در puff ها و اثرات احتمالی آنتی بادی های در دسترس، پیچیده شده است.

دُمین های هسته ای و ساختار هسته در اینترفاز

به استثنای موارد خاص، سلول های پلی تن که در بالا صحبت شد، سال هاست که در مورد ارتباط بین ساختار و عملکرد آنها در اینترفاز بحث می شود و تجزیه و تحلیل آزمایش های مربوط به آنها با مشکلات عدیده ای روبرو بود که تقریباً در اکثر موارد ناشی از عدم استفاده از پروب های مولکولی اختصاصی بوده است. سه روش آزمایشگاهی ، مطالعه بر روی هسته های اینترفازی را دگرگون کرده اند. اولین روش، استفاده همزمان از پروب های RNA و DNA های نشاندار است که همراه با روش های *in situ* هیبریداسیون بکار می روند. این روش ها برای آشکارسازی کروموزوم های ویژه، ژن ها، عناصر DNA و نسخه های RNA داخل هسته استفاده می شوند. روش دوم استفاده از آنتی بادی ها توسط روش ایمونولوژی است که برای تشخیص ترکیبات هسته ای بخصوصی بکار می رود. روش سوم استفاده از پیش سازهای تغییر یافته DNA و RNA غیر رادیواکتیو است. در این روش آنها را توسط آنتی بادی های ویژه که با رنگ های فلورسنت نشاندار شدند شناسایی می کنند.

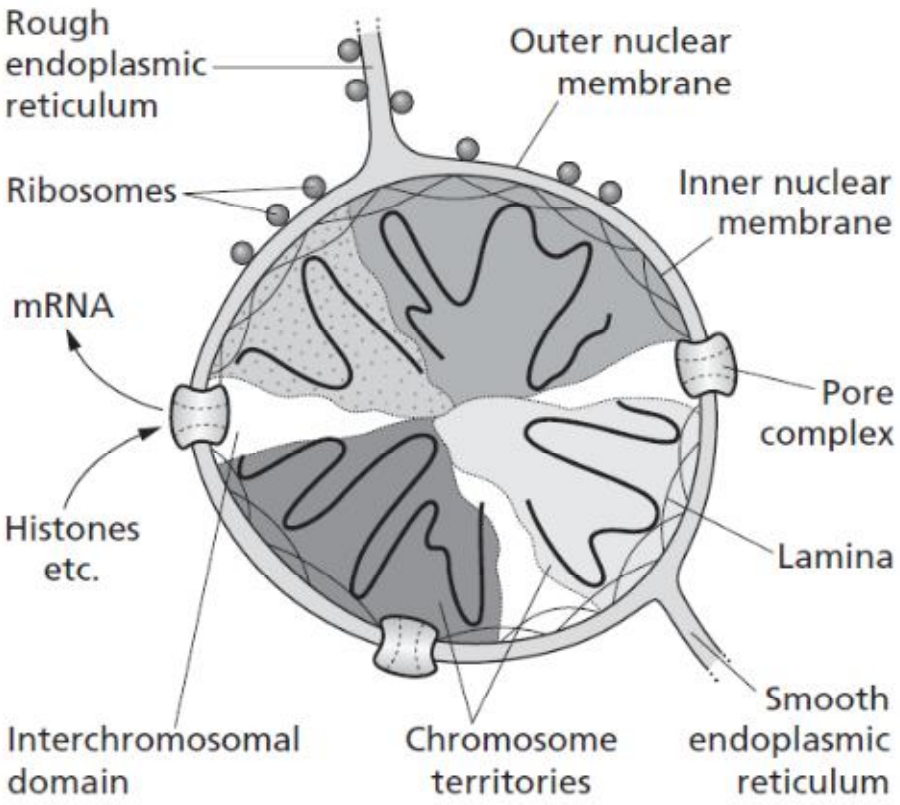
روش های نشاندار کردن مختلف می توانند توأماً در یک هسته مورد استفاده قرار می گیرند، این هسته رنگ های فلوروکروم مختلف ایجاد می کند که در تشخیص آنها مهم است. موقعی که این روش ها با میکروسکپ های پیشرفته و سیستم های تجزیه و تحلیل تصویری همراه شوند، می توانند یک تصویر سه بعدی از ساختار هسته و عملکرد آن به وجود آورند.

www.ShimiPedia.ir

آزمایش با هسته اینترفازی تثبیت شده و رنگ شده توسط میکروسکپ نوری، توده رنگامیزی شده و متراکمی را نشان می دهد (گاهی با ظاهر دانه ای شکل). این ترکیبات محل های سنتز RNA ریبوزومی (rRNA) و مونتاژ ریبوزوم هستند. در بعضی از سلول ها شما می توانید تکه های تیره رنگ را ببینید که مجاور غشای هسته قرار دارند. این نواحی همان هتروکروماتین هستند (که کاملاً متراکم شدند). در این نواحی DNA حاوی تعداد کمی ژن است که قبلاً آنها را به عنوان نوارهای C – (C- bands) در کروموزوم های متافازی نامگذاری کردیم. این دو مشاهده ساده به ما می گوید که ژنوم به طور اتفاقی در هسته توزیع نشده اند بلکه بعضی از ژن ها برای مثال ژن های rRNA در انسان روی کروموزوم های 13 ، 14 و 15 و عناصر DNA روی هتروکروماتین قرار دارند. این استدلال اخیراً به وسیله استفاده از رنگ آمیزی کروموزوم (پروب های DNA که فقط یک کروموزوم مشخص را شناسایی می کنند) تقویت شده و نشان می دهد که هر کروموروم فضای مشخصی را اشغال می کند. بعلاوه استفاده از پیش سازهای RNA غیر رادیواکتیو این امکان را به وجود آورد که نسخه های RNA را زیر میکروسکپ مشاهده کنیم. شواهد نشان می دهند که نسخه بردارای تمایل دارد که در سطح دُمین کروموزومی اتفاق افتد. این یک مدل جالب است که در فضای داخل کروموروم کانال هایی وجود دارند که نسخه های RNA به سوراخ های هسته هدایت شده و از آنجا به سیتوپلاسم منتقل شوند.

وظیفه اصلی هسته سلول جابجایی و انجام فرایند نسخه های RNA است و بدین ترتیب عمل تنظیم نسخه برداری و اندازه مناسب آنها نیز صورت می گیرد. جالب است که بدانید بعضی از ساختارهای هسته سالها پیش توسط میکروسکپ الکترونی توصیف شده بود و اخیراً مشخص شد که در فرایند پردازش RNA نیز دخالت دارند. این ساختارها شامل عناصر مبهمی است که به صورت اجسام پیچ خورده و توده های دانه مانند داخل کروماتین هستند. خوشبختانه، تمرکز روی واکنش های فرایند RNA از محدوده این کتاب خارج است ولی توجه داشته باشید که این ساختار مثال خوبی است تا اهمیت سازماندهی با درجه نظم بالای هسته اینترفازی مشخص شود. ساختار هسته در یک مدل ساده را در شکل 5- 19 مشاهده می کنید. سازماندهی و توزیع دُمین های کروماتین در هسته از چندین طریق تنظیم ژن را بعهده دارند و در فصل های بعد مورد بررسی قرار می گیرند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 5- 19 مدلی برای ساختار هسته سلول. خطوط پر رنگ مسیر محورهای کروموزوم را نشان می دهند. حلقه های کروماتین که از محورها توسعه یافته اند ناحیه سایه زده را پر می کنند (داربست). شواهدی وجود دارند که ژن های فعال در نواحی خارجی نسبت به کروموزوم قرار می گیرند. نسخه های RNA در نواحی خاصی داخل دُمین کروموزوم پردازش می شود و از طریق سوراخ های هسته به سیتوپلاسم منتقل می گردند.

www.ShimiPedia.ir

منابع:

مطالعه بیشتر

Higher-order chromatin structure

Belmont, A. S. & Bruce, K. (1995) Vizualization of G1 chromosomes–a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell Biol.*, **127:** 287–302.

Pederson, D. S., Thoma, F. & Simpson, R. T. (1986) Core particle, fibre and transcriptionally active chromatin structure. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **2:** 117–147.

Williams, S. P., Athey, B. D., Muglia, L. J., Schappe, R. S., Gough, A. H. & Langmore, J. P. (1986) Chromatin fibres are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys. J.*, **49:** 233–248

The nuclear matrix

Fey, E. G., Wan, K. M. & Penman, S. (1984) Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix–intermediate filament scaffold: three dimensional organization and protein composition. *J. Cell Biol.*, **98:** 1973–1984.

Van Driel, R., Wansink, D. G., van Steensel, B. *et al.* (1995) Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int. Rev. Cytol.*, **162A:** 151–189.

DNA loops and matrix attachment

van Drunen, C. M., Sewalt, R. G. A. B., Costerling, R. W. *et al.* (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucl. Acids Res.*, **27:** 2924–2930.

Mirkovitch, J., Mirault, M.-E. & Laemmli, U. K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on the nuclear scaffold. *Cell*, **39:** 223–232.

Mullinger, A. M. & Johnson, R. T. (1980) Packing DNA into chromosomes. *J. Cell Sci.*, **46:** 61–86.

Paulson, J. R. & Laemmli, U. K. (1977) The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, **12:** 817–828.

Pienta, K. J. & Coffey, D. S. (1984) A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J. Cell Sci.*, Suppl. 1, 123–135.

Chromosome bands

Craig, J. M. & Bickmore, W. A. (1993) Chromosome bands–flavours to savour. *BioEssays*, **15:** 349–354.

Korenberg, J. R. & Rykowski, M. C. (1988) Human genome organization: Alu, Lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell*, **53:** 391–400.

Saitoh, Y. & Laemmli, U. K. (1994) Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, **76:** 609–622.

Chromosome compaction

Gasser, S. M. (1995) Coiling up chromosomes. *Curr. Biol.*, **5:** 357–360.

Nuclear domains and organization

Jackson, D. A. & Cook, P. R. (1995) The structural basis of nuclear function. *Int. Rev. Cytol.*, **162A:** 125–149.

Kurz, A., Lampel, S., Nickolenko, J. E. *et al.* (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J. Cell Biol.*, **135:** 1195–1205.

Lamond, A. I. & Earnshaw, W. C. (1998) Structure and function in the nucleus. *Science*, **280:** 547–553.

Spector, D. L. (1992) Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **9:** 265–315.

www.ShimiPedia.ir

فصل 6

نسخه برداری در حضور کروماتین

مقدمه

در تمام سلول های یوکاریوتی برای بسته بندی DNA در داخل هسته، فرایندهای همانندسازی دقیق و ایجاد سلول های دختری (هنگام چرخه سلولی) در کروماتین لازم اند. این اعمال به تنهایی ضرورت کروماتین را در حیات سلول های یوکاریوتی نشان می دهند. به نظر می رسد که کروماتین باید روی سایر عملکردهای هسته سلول های یوکاریوتی مثل بیان ژن اثر بگذارد. ارتباط تنگاتنگ بین هیستون ها با DNA و همچنین سطوح بسته بندی بالاتر DNA را در فصل قبلی صحیت کردیم. تمام این ارتباطات روی پیوند DNA به فاکتورهای نسخه برداری و سایر ترکیبات مربوط به کمپلکس نسخه برداری اثر دارند. دستگاه نسخه برداری یکی از اولین مراحل تکاملی در سلول های یوکاریوت است که کروماتین موظف به انجام آن است. این اطلاعات ساده ما را به مشکل پیچیده تری یعنی مکانیزم تنظیم نسخه برداری هدایت می کند. برای حل این مشکل می توان به دو نقش مهم آن توجه کرد. اول این که کروماتین یک وسیله بسته بندی کننده DNA است و همین عمل مانع انجام نسخه برداری می شود بنابراین باید برای غلبه بر آن عملی انجام دهد که روی بیان ژن اثر نکند و آن را غیر فعال ننماید. دوم این که کروماتین جزیی جدایی ناپذیر از مکانیزم تنظیم نسخه برداری است و این نقش در طول تکامل به طور موازی با نقش بسته بندی DNA در بیان ژن عمل می کند. تفاوت در عملکرد این دو عمل مثل این است که تعدادی چراغ های ترافیکی داشته باشیم و از طرف دیگر یک توده بزرگی از سنگ مانع حرکت اتومبیل ها شود. این دو عامل می توانند به یک اندازه مؤثر باشند. چراغ های ترافیکی را می توان تنظیم کرد در حالیکه توده سنگ ها قابل کنترل نیستند (مثل کروماتین). پاسخ این است که احتمالاً این دو نقش در کروماتین جدا از هم نیستند و می توانند روی هم اثر بگذارند. تمایز مهم است. برای مشخص کردن مکانیزم هایی که در آنها کروماتین به صورت فعال دخالت دارد بهتر است که بدانیم ژن ها چگونه تنظیم می شوند و محصولات کروماتین چگونه روی آنها اثر می گذارند. البته قابل ذکر است که در برخی موارد کروماتین می تواند اثر مثبت روی بیان ژن بگذارد. همانطور که در قسمت های بعدی بحث خواهد شد، کروماتین می تواند با خم کردن DNA به طوری که محل های پیوندی به پروتئین را به هم نزدیک کند،اندرکنش بین پروتئین-پروتئین به وجود آورد. این موضوع بیشتر نقش دوم کروماتین را نشان می دهد و به یاد داشته باشید که ما داریم سعی می کنیم یک

www.ShimiPedia.ir

سیستم بسیار پیچیده را مورد بررسی قرار دهیم. در هر سلول پستاندار دهها هزار ژن وجود دارد و هر یک از این ژن ها باید طوری تنظیم شوند که نیازهای سلول را برآورده کنند. این موضوع به این معنا نیست که برای تنظیم هر ژن، دهها هزار مکانیزم مختلف نیاز دارد یا این که تمام ژن ها فقط توسط یک مکانیزم کنترل می شوند.

در یوکاریوت های تک سلولی مانند مخمرها، برخی از ژن ها سطح فعالیت خود را هنگام تمایز در چرخه سلولی تغییر دادند و از طرف دیگر بیان ژن در آنها در پاسخ به محرک های محیطی نیز قابل تغییر است. بنابراین، موجودات پرسلولی نیازمند تنظیمات ژنی بیشتری هستند. کروماتین یک عنصر ضروری در مکانیزم های تنظیم و بیان ژن است و سلول ها برای انجام چنین فعالیتی با توجه به شرایط موجود، روش های مختلفی را انتخاب می کنندکه این موضوع در خصوص فعالیت نوکلئوزوم ها بسیار مهم است. در فصل سوم در مورد چگونگی حفظ این ساختار سلولی طی مراحل تکاملی و همچنین عدم تغییر و تحول مکانیزم ساخت هیستون های اکتامر در بیش از صدها میلیون سال بحث شد. حفظ این ساختار طی چندین سال تکامل، تأییدی بر تنظیم بیان ژن نیست، ولی نباید نقش آنها را در نیازهای تنظیمی ژن های مختلف نادیده گرفت. در اینجا به برخی از مکانیزم های احتمالی تنظیم ژن توسط کروماتین در گونه های مختلف اعم از مخمر، مگس سرکه و پستانداران به همراه معایب و مزایای آنها اشاره می کنیم (هر چند که اطلاعات ما از این مکانیزم های مولکولی ناقص است). شاید این گونه درک شود که موجودات مختلف به روش های مختلفی می توانند از کروماتین جهت تنظیم ژن استفاده کنند ولی باید اشاره شود که در اکثر موارد یک مکانیزم خاص با اختلاف جزیی (بسته به اهداف زیستی) در اکثر موجودات بکار می رود. طیف وسیعی از مکانیزم های کشف شده به عنوان ابزار مولکولی در تعیین و درک وظایف موجودات مختلف، کمک زیادی می توانند بکنند.

ژن ها حتی وقتی نسخه برداری می شوند، درون نوکلئوزوم ها بسته بندی شده اند

یک روش ساده برای دسترسی به کروماتینی که دستگاه نسخه برداری را تحریک کرده این است که از بسته بندی ژن ها جلوگیری کنیم. کد شدن حدود 1 تا 2 در صد از کل DNA پستانداران (به عنوان بخش کوچکی از ژنوم) توسط مکانیزم های قابل تشخیص در مناطق مختلف انجام می شود (حتی روی نوکلئوزوم آزاد). بنابراین واضح است که ژن های درون هسته به صورت کروماتین بسته بندی شده اند. همانطور که در شکل 6-1 مشاهده می کنید، هسته های اینترفازی را توسط آنزیم نوکلئاز میکروکوکی به آرامی هضم کردند، در نتیجه DNA های کد شونده (ژن ها) و غیر کد شونده به قطعات الیگونوکلئوزوم تبدیل

www.ShimiPedia.ir

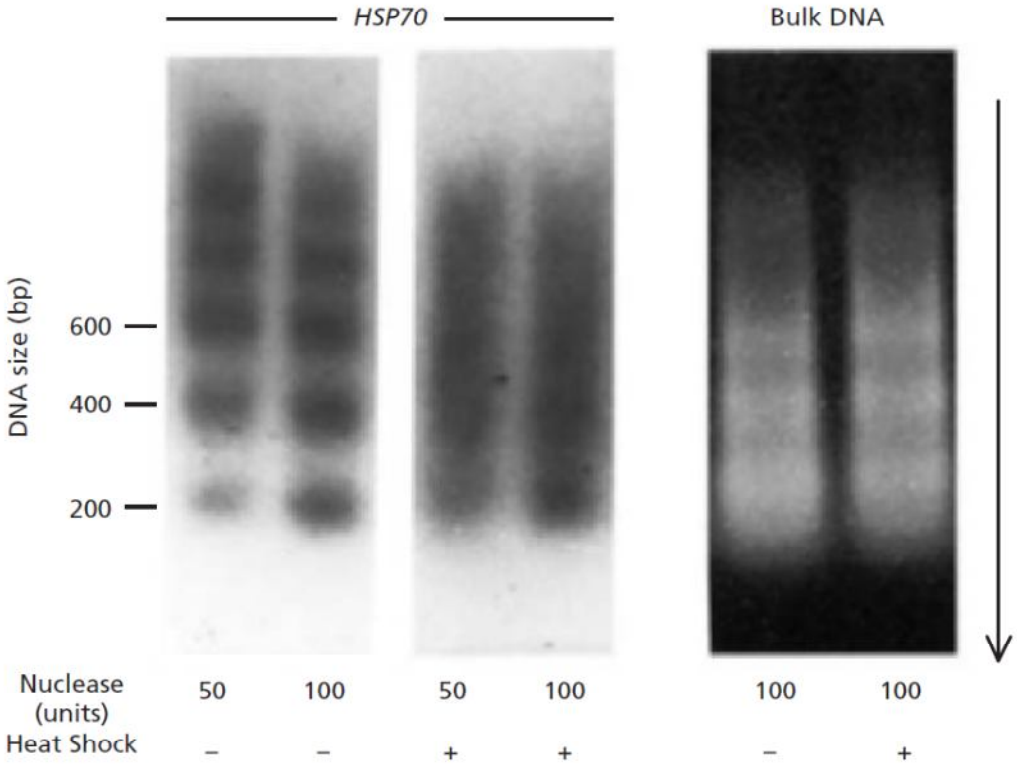
شدند (یعنی این DNA ها به صورت نوکلئوزوم هستند). این قطعات را توسط سانتریفیوژ شیب سوکروز به صورت ذراتی با ضریب ته نشستی 11 S جدا کردند.

طی تغییر وضعیت ژن ها از حالت خاموش به حالت روشن و شروع فعالیت نسخه برداری، تغییرات قابل توجهی در ساختار کروماتین اتفاق می افتد. این تغییرات برای ژن هایی با نسخه برداری بسیار سریع توسط هضم با نوکلئاز میکروکوکی قابل تشخیص هستند (یعنی نوارهای تیز، واضح و نردبانی از قطعات DNA برای ژن های غیر فعال و نوارهای پراکنده برای ژن های فعال در ژل الکتروفورز) (شکل 6- 1). از آزمایش فوق دو نتیجه به دست آمد: (1) نسخه برداری در فواصل نوکلئوزوم ها ایجاد آشفتگی کرد و احتمالاً این آشفتگی در DNA نیز اتفاق افتاد، در نتیجه نوارهای DNA به صورت لکه نمایان شد. با وجود اطلاعات ما در باره مکانیزم عمل RNA پلیمرازها این نتایج غیر منتظره نبود، زیرا پلیمرازهای پروکاریوتی طی مراحل نسخه برداری و طویل شدن با 50 bp از DNA در ارتباط هستند. این مقدار از DNA توسط آنزیم پوشیده می شود و در حدود 10 تا 20 جفت باز در جایگاه فعال آن به صورت باز (منظور دو رشته DNA از هم جدا شده اند) وجود دارند.

بنابراین، باور کردن این موضوع کمی مشکل است که آنزیم پلیمراز به سهولت در اطراف نوکلئوزوم قرار گرفته و به راحتی بتواند جابجا شود یا این که در ساختار آن تغییر به وجود آورد. نحوه جاسازی پلیمرازها در اطراف نوکلئوزوم ها بحث بعدی ما خواهد بود. ایجاد نوارهای لکه ای DNA توسط هضم نوکلئازی فقط در ژن های کاملاً فعال نسخه برداری که مقدار زیادی پلیمراز دارند، دیده می شود (مثل ژن های شوک حرارتی و RNA های ریبوزومی). این پدیده بیان می کند که تغییرات ساختاری ایجاد شده در نوکلئوزوم ها توسط پلیمرازها، گذرا و برگشت پذیرند. نوکلئوزوم هایی که مقدار کمی پلیمراز در طول ژن ها دارند عمدتاً طبیعی هستند.

(2) دومین نتیجه ای که از شکل 6- 1 به دست می آید این است که نوکلئوزوم ها و یا ساختارهای شبیه نوکلئوزوم ها می توانند به همراه DNA کد شونده نسخه برداری شوند، زیرا اگر این گونه نبود، DNA ژن مربوطه به سرعت هضم می شد و قطعات باقی مانده قادر به ظهور نوارهای لکه ای نبودند. نتایج فوق را از آزمایش های مربوط به هسته هیستون ها و نسخه برداری DNA از روش تیمار

www.ShimiPedia.ir

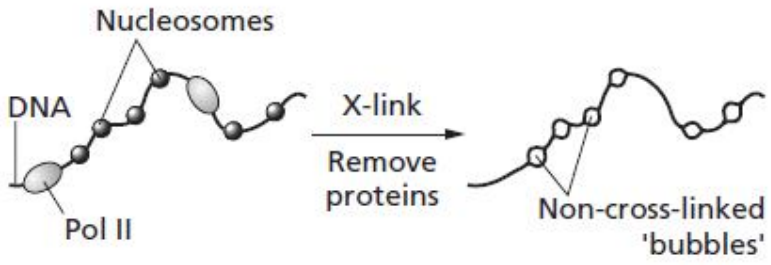


شکل 6- 1 هضم نوکلئاز میکروکوکی، ایجاد آشفتگی در نوکلئوزوم ژن های نسخه برداری شده، می کند. اگر سلول های مگس سرکه در محیط کشتی در حرارت 30° C رشد داده شوند، مشاهده شده است که سطح بالایی از نسخه برداری در گروهی از ژن های شوک حرارتی آغاز می گردد. هضم نوکلئاز میکروکوکی در هسته تحت شوک حرارتی و سلول های کنترل، تفاوت خاصی در الگوی هضمی کروماتین ایجاد نکرد (ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم، سمت راست). آزمایش ساترن بلات (Southern blotting) بر روی نمونه های DNA فوق با یک پروب از HSP70 (ژن های شوک حرارتی) بیانگر ژن های نسخه برداری نشده و ظهور نوارهای نردبانی در فواصل نوکلئوزوم ها می باشد (شکل سمت چپ) (در مقابل ژن فعال یعنی بعد از شوک حرارتی)

با فرمالدئید بررسی شد. نتایج تصویری نیز از نسخه برداری PolII از ژن های RNA ریبوزومی توسط میکروسکپ الکترونی به دست آمد. اغلب این ژن ها از نظر اندازه بین نوکلئوزوم و مولکول RNA پلیمراز می باشند. مطالعات اخیر با استفاده از روش پیش تیمار با ماده سورالن(psoralen) انجام شد (دترژانتی است که ارتباط تقاطعی بین رابط های DNA برقرار می کند، ولی ارتباطی بین ذرات هسته نوکلئوزومی به وجود نمی آورد). اگر DNA مورد مطالعه به روش های مختلف دناتوره شده و پروتئین

www.ShimiPedia.ir

های آن خارج شوند، زیر میکروسکپ الکترونی، نوکلئوزوم ها به شکل حباب های تک رشته ای و بدون پیوندهای تقاطعی دیده می شوند (شکل 6- 2). باید توجه داشت که انجام این آزمایش و تفکیک ذرات توسط میکروسکپ الکترونی، چون اندازه نوکلئوزوم و PolI تقریباً یکسان است، تشخیص آنها از یکدیگر را کمی مشکل می کند.



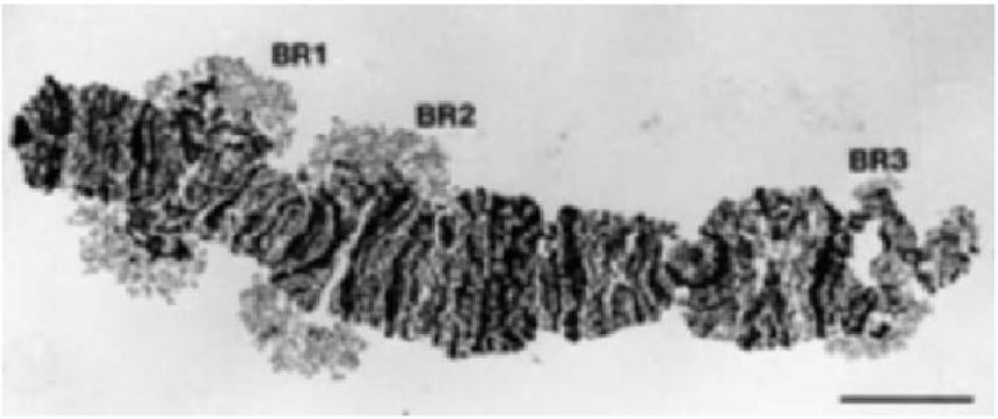
شکل 6- 1 تیمار با سوالن و تشخیص نوکلئوزوم ها هنگام نسخه برداری DNA .

ساختار کروماتین هنگام نسخه برداری از ژن

تمام روش های بکار رفته برای فهم و درک نسخه برداری به طور غیر مستقیم می باشد. ما بعداً در این فصل بحث خواهیم کرد که چگونه می توان حساسیت مناطقی از ژنوم را به آنزیم نوکلئاز و ایجاد برش و شکستگی در ژنوم اندازه گیری نمود. همچنین چگونه می توان فعالیت کروماتین را به روش رسوب سنجی ایمنی ChIP (chromatin immunoprecipitation) جهت حضور هیستون ها و تغییر حالت آنها مورد سنجش قرار داد. اما هیچ یک از روش ها نمی توانند ساختار کروماتین را به خوبی نشان دهند. هم اکنون سؤالی مطرح می شود که آیا حضور دانه های تسبیح مانند (beads- on- a- string) به اندازه 10 nm بر روی رشته های کروماتین یا رشته های 30 nm در کروماتین (با میکروسکپ الکترونی مشاهده شد) طی فرایند نسخه برداری، چه هستند؟ البته برای چنین سؤالاتی پاسخ قطعی و واضح وجود ندارد و به طور کل هنوز روش های قابل اعتمادی جهت تجسم اندازه ساختارها و پیچیدگی رشته های کروماتینی داخل هسته های اینترفازی وجود ندارد. از طرف دیگر تهیه نمونه هایی که در آنها پخش و تثبیت جهت مشاهده با میکروسکپ الکترونی صورت گرفته باشد نیز باعث جلوگیری از تجزیه و تحلیل ساختار کروماتین می گردد. با این حال، مطالعاتی روی سیستم نسخه برداری ژن های حلقه بالبیانی (Balbiani ring) در پشه *Chironomus* صورت گرفت. غدد بزاقی لارو *Chironomus* واجد کروموزوم های پلی تن با اندازه ای بزرگتر از کروموزوم های پلی تن

www.ShimiPedia.ir

موجود در لارو دروزوفیلا است که به همان اندازه نوارهای ایجاد شده بر روی ژل الکتروفورز قابل رویت هستند. مجموعه ای از کروموزوم های بسیار کوچک که واجد دو ترکیب puff می باشند به عنوان حلقه های بالبیانی شناخته شده اند که دارای جایگاه هایی برای رمز گذاری پروتئین های ترشحی لارو *Chironomus* جهت چرخاندن منافذ محافظت کننده لارو هستند (شکل 6- 3). در شکل 6- 3 عکس EM از کروموزوم شماره 4 پشه chironomus و حلقه های بالبیانی (BR1, BR2 and BR3) را مشاهده می کنید.

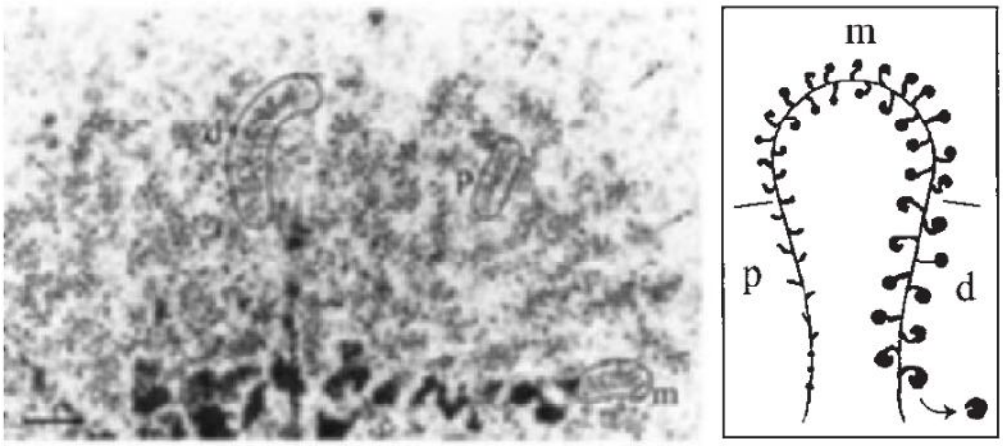


شکل 6- 3 میکروگراف الکترونی از کروموزوم شماره 4 خالص شده از غدد بزاقی لارو پشه *Chironomus* .

سه ترکیب puff بسیار بزرگ به نام حلقه های بالبیانی یا BR های 1 ، 2 و 3 را در شکل فوق مشاهده می کنید.

واحدهای عملکردی نسخه برداری از پروتئین ها جهت حمل و نقل و پردازش با بزرگنمایی بالاتر را در شکل 6- 4 می بینید. برتیل دن هولت (Bertil Daneholt) و همکارانش از میکروسکپ الکترونی جهت بررسی ساختار کروماتین و نحوه نسخه برداری در ترکیبات puff استفاده نمودند و دریافتند که نسخه برداری سریع کروماتین باعث ایجاد یک رشته 5 nm می کند (شکل 6- 5 ، A و B). به هر حال، در شکاف بین پلیمرازها (نوکلئوزوم ها) رشته های 10 nm (شکل 6- 5 ، C) و حتی رشته های 30 nm (شکل 6- 5، D) مجدداً تشکیل می شوند. رنگامیزی با ایمونو آنتی بادی های ادغام شده با ذرات طلا (قابل رویت توسط میکروسکپ الکترونی) نشان داد که هیستون های H1 ارتباط نزدیکی با نسخه برداری سریع رشته های کروماتین دارد.

www.ShimiPedia.ir

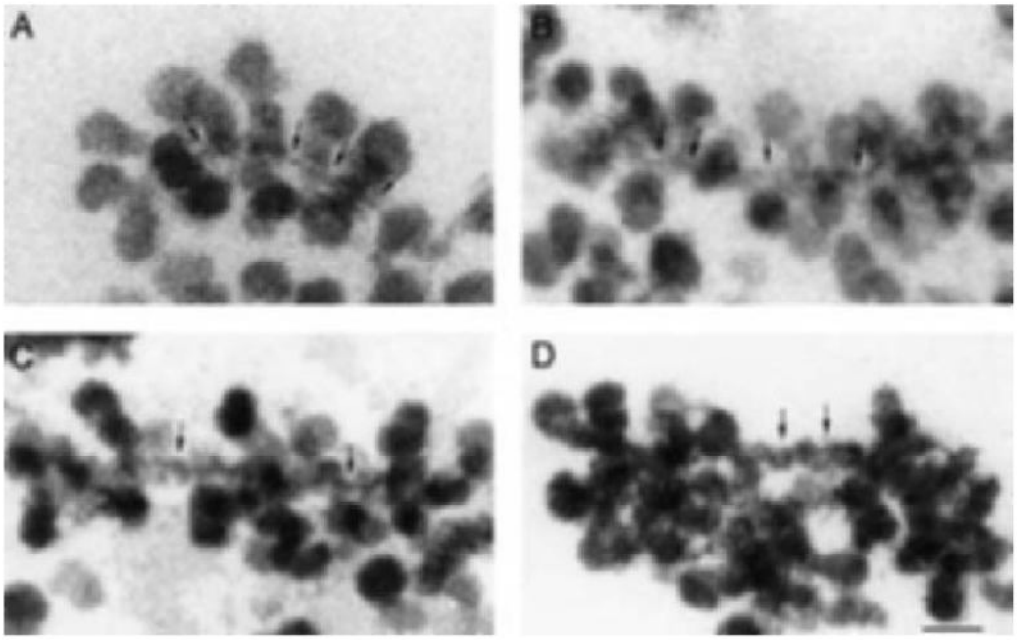


شکل 6- 4 در شکل فوق بسته بندی ژن های حلقه بالبیانی با پروتئین را قبل از این که نسخه برداری از نسخه های RNA کامل شود، مشاهده می کنید. نسخه های بسته بندی شده را به صورت نقاطی متراکم از الکترون در میکروگراف الکترونی ژن های حلقه بالبیانی قابل رویت هستند. کمپلکس های پروتئین - RNA به عنوان محصولات نسخه برداری به صورت نزدیک (proximal) با p ، میانی (medial) با m و انتهایی (distal) با d در جایگاه شروع نسخه برداری قابل رویت می باشند.

پیامی که از این نتایج به ما داده می شود این است که عمل نسخه برداری کروماتیناز لحاظ ساختاری پویا است و مناطقی که فاقد آنزیم پلیمراز هستند به سرعت می توانند دو باره به شکل اولیه خود یعنی بسته بندی با درجه بالاتر بروند. از آنجا که تعداد زیادی از ژن ها با روند بسیار آهسته تر از ژن های حلقه بالبیانی نسخه برداری می شوند (یعنی دانسیته آنها کمتر از پلیمرازها است)، ممکن است که رشته های کروماتین 30 نانومتری یا کلفت تر با سرعت معینی نسخه برداری انجام دهند.

به طور خلاصه، اطلاعات به دست آمده نشان می دهند که نوکلئوزوم ها و پلیمرازها می توانند هنگام نسخه برداری یک ژن در کنار هم باشند. اما به این نکته باید تأکید کرد که آنها همیشه این عمل را انجام نمی دهند، حتی در ژن های بسیار فعال مخمرها، پلیمرازها در فواصل 100 bp قرار دارند که در این صورت جایی برای نوکلئوزوم ها و حتی اتصال هیستون ها به یکدیگر باقی نمی ماند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 6- 5 رشته های کروماتین با قطرهای مختلف به همراه نسخه برداری فعال از ژن های حلقه بالبیانی را مشاهده می کنید.

شکل های فوق چهار میکروگراف الکترونی از نسخه های RNA به همراه پروتئین را نشان می دهند (نقاط متراکم). رشته هایی با قطرهای 5 nm (شکل A و B) و 10 nm (شکل C) و 30 nm (شکل) توسط فلش مشخص شده اند. میکروسکوپ الکترونی قادر به نمایش چنین رشته هایی نمی باشد ولی می تواند DNA برهنه (5 nm) و یا DNA بسته بندی شده (10 nm و 30 nm) را به همراه ساختار کروماتین نشان دهد. این اطلاعات بیان می کند که DNA قادر است درون کروماتین بین واحدهای نسخه برداری تجمع یابد و این پدیده برای تجمع و باز شدن کروماتین هنگام نسخه برداری لازم است.

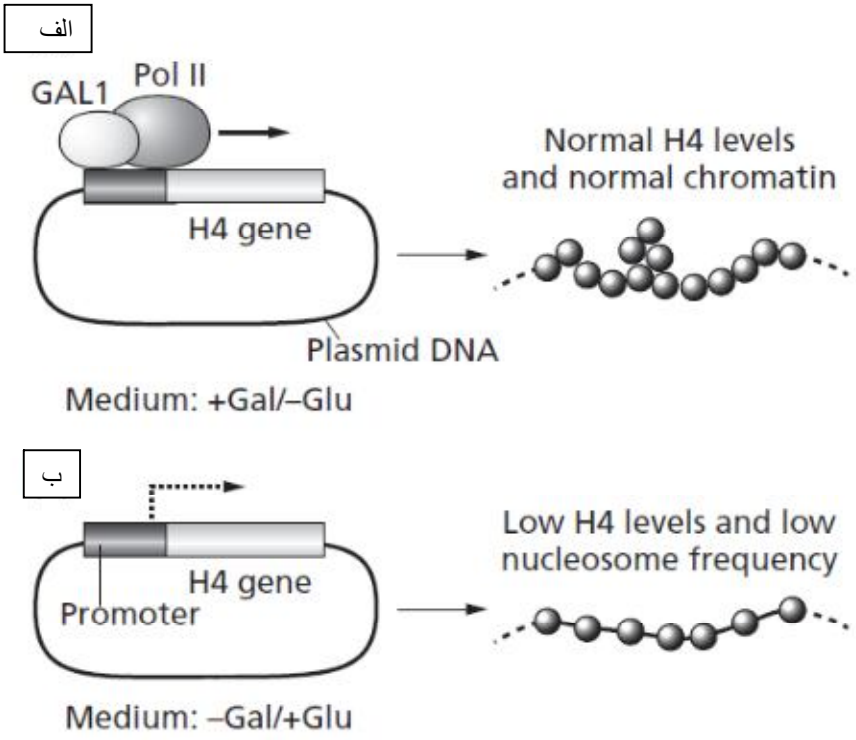
باز هم تأکید می شود که نوکلئوزوم ها می توانند از ژن ها و نسخه برداری DNA محافظت کنند ولی آنطور که قبلاً ادعا می شد، عمل ماشین نسخه برداری برای ما چندان روشن و شفاف نیست. بنابراین، تنها کاری که ما انجام می دهیم این است که مجموعه ای از آزمایش های ژنتیکی اثبات شده را شرح دهیم.

www.ShimiPedia.ir

آزمایش های ژنتیکی در مخمر اهمیت هیستون ها را در تنظیم بیان ژن نشان می دهند

نتایج حاصل بیان می کند که هیستون ها نقش به سزایی در تنظیم بیان ژن در شرایط داخل سلولی دارند، به طوری که جهش ایجاد شده در هیستون ها باعث بروز نواقص خاصی در مخمر ساکارومایسس سرویسیه (*Sacchromyces cereviciae*) می گردد. یکی از مزایای مطالعه مخمر ساکارومایسس سرویسیه این است که این مخمر فقط دو نسخه ژن برای هر یک از هیستون های هسته مرکزی (core) دارد، در حالیکه تعداد نسخه ها در یوکاریوت ها به صد یا بیشتر می رسد. این پدیده بدین معنا است که آنها برای ایجاد جهش و سپس تجزیه و تحلیل آن مناسبترند. در اواخر دهه 1980 جهت کشف کاهش مقدار هیستون ها و تأثیر آن در بیان ژن مخمر، آزمایش هایی در آزمایشگاه میشل گرانشتین (Michael Grunstein) و فرد وینستون (Fred Winston) آغاز شد. یک سؤال ساده ولی گمراه کننده این است که آیا می توان با کاهش مقدار هیستون های هسته مرکزی الگوی تنظیم بیان ژن توسط سلول و تراکم نوکلئوزوم ها را در طول DNA تغییر داد؟ برای پاسخ باید به نقش نوکلئوزوم در تنظیم بیان ژن توجه کرد، زیرا اگر نوکلئوزوم درتنظیم بیان ژن نقش ایفا کند، پاسخ سؤال فوق بلی است و اگر دخالت آن توسط ماشین نسخه برداری نادیده گرفته شود، پاسخ خیر خواهد بود. بنابراین، برای پی بردن به این موضوع دانشمندان نوعی مخمر را طراحی کردند که فاقد ژن H4 بود ولی در پلاسمید خارج کروموزومی و تحت کنترل پروموتر GAL1 تهیه شد. وقتی سلول ها در محیط حاوی گالاکتوز رشد نمودند، پلاسمید حاوی ژن H4 فعال شد و مقدار H4 به حد طبیعی رسید. زمانی که سلول ها در محیط حاوی گلوکز به جای گالاکتوز رشد کردند، فعالیت نسخه برداری از ژن H4 کاهش یافت و مقدار هیستون H4 کم شد (شکل 6- 6).

www.ShimiPedia.ir



شکل 6- 6 پلاسمید مخمر حاوی ژن H4 تحت کنترل پروموتر GAL1 در حضور گالاکتوز فعال و در غیاب آن غیر فعال است. سلول های جهش یافته که واجد دو ژن H4 بودند، فعلاً به صورت غیر فعال درآمدند ولی از طریق پلاسمید قادر به ساخت H4 می باشند. حذف گالاکتوز از محیط کشت باعث کاهش سنتز H4 گردید و فعالیت نوکلئوزوم نیز کاهش یافت در نتیجه کروماتین همانندسازی DNA را انجام نداد.

یکی از خصوصیات بارز مخمر، انعطاف پذیری قابل توجه آن است. از طرف دیگر ساختار آن پیچیدگی سلول های یوکاریوتی را ندارد. هر چند این انعطاف پذیری گاهی مشکل ساز است ولی برای انجام این آزمایش ها، وقتی مقدار قابل توجهی از H4 کم می شود، رشد و تکثیر مخمر ادامه می یابد (منتهی با سرعت کمتر). این ویژگی به ما اجازه می دهد تا مطمئن شویم که اثرات مشاهده شده طی آزمایش به دلیل کاهش هیستون است، نه این که عواملی مثل مرگ یا بیماری سلول باعث آن شده باشند. همچنین در سلول هایی که میزان هیستون آنها کاهش یافته است، به طور وضوح افزایش حساسیت آنها نسبت به هضم توسط آنزیم نوکلئاز است و این فرایند درنهایت باعث کاهش تراکم نوکلئوزوم نیز می گردد.

www.ShimiPedia.ir

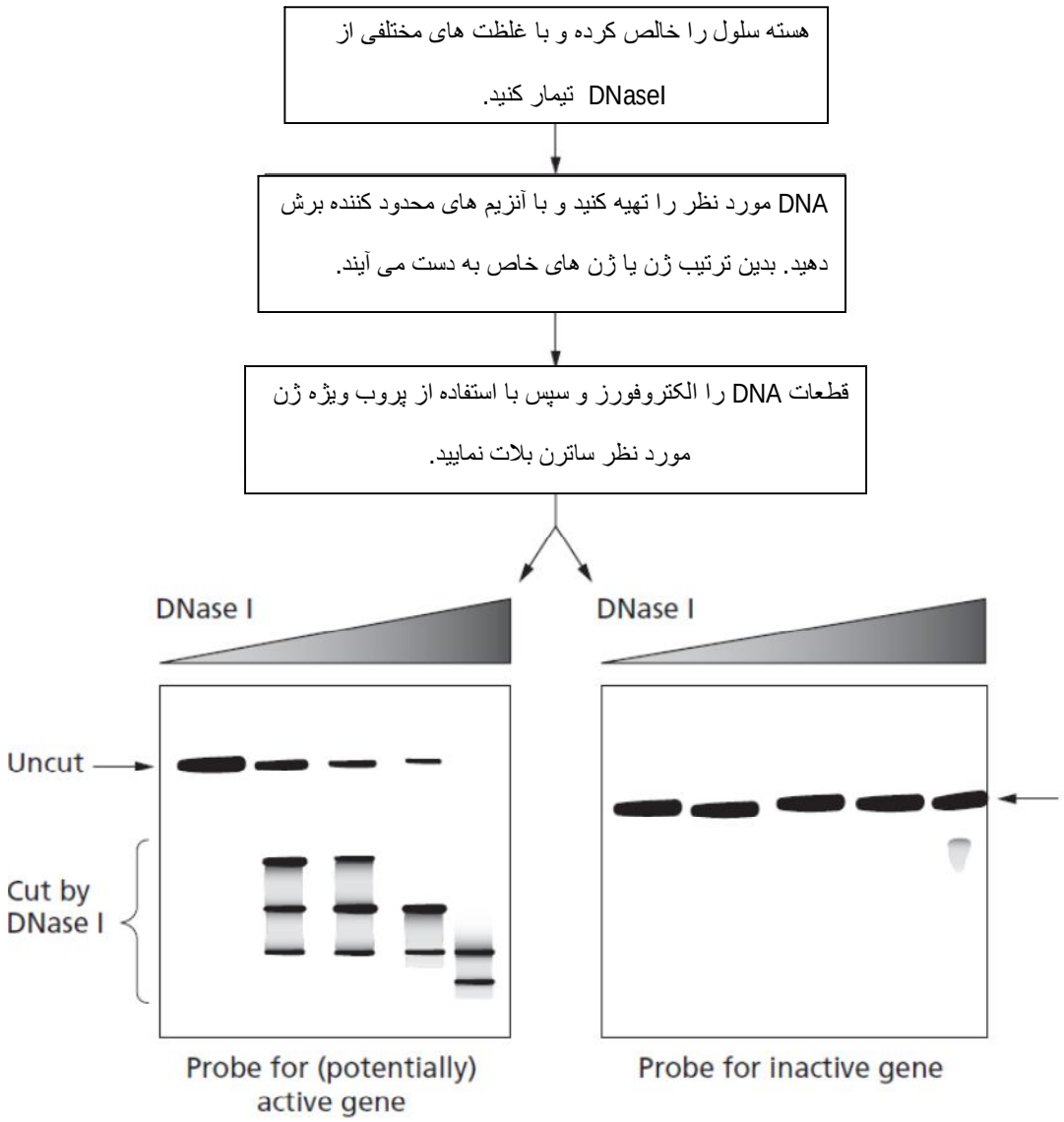
کاهش هیستون باعث عدم سرکوب بیان ژن های H4 درون زا می شود و از طرفی ژن هایی که باید بیان شوند توسط القا کننده های خاصی تنظیم می شوند مثل GAL1 (ژن القا شده توسط گالاکتوز) ، HIS3 (ناشی از فقدان آمینو اسید) و PHO5 (ژن القا شده در اثر مقدار پایین فسفات معدنی). برخی از ژن های القا کننده مانند CUP1 کمتر از ژن های ساختاری آسیب می بینند (منظور ژن هایی فعالی است که دائماً روشن هستند). با این وجود، پیام "مواظب باشید که چه می گویی" به طور قابل توجه ای روشن است، یعنی کاهش هیستون مانع سرکوبی برخی از ژن های مهم نمی شود و نوکلئوزوم ها حداقل باید از ماشین های تنظیمی ژن کمک بگیرند.

تغییر در ساختار کروماتین قبل از فعال شدن ژن

از اندونوکلئازها بیش از 20 سال است که به عنوان پروب در نسخه برداری فعال و غیر فعال کروماتین استفاده می شود. در واقع اهمیت نوکلئازها مربوط به توانایی آنها در برش های ظریف از DNA می باشد که کروماتین در آن با حساسیت بالایی بسته بندی شده اند. بسته بندی کروماتین به دو دلیل باعث مهار برش می گردد که عبارتند از: (1) حفاظت و پوشش توسط نوکلئوزوم ها، (2) ایجاد تاخوردگی و تبدیل شدن آنها به ساختارهای منظم. تا خوردگی باعث خمیدگی هایی در محل های خاصی می شود که در بعضی موارد همین خمیدگی ممکن است DNA را در معرض برش قرار دهد. در اکثر برش های آنزیمی از دو اندونوکلئاز به نام های DNaseI و نوکلئاز میکروکوکی استفاده می شود که اختلاف آنها در نحوه عملکردشان است. DNaseI قادر به ایجاد برش یا شکستگی در DNA تک رشته ای است در حالیکه نوکلئاز میکروکوکی فقط ایجاد شکاف در قسمت های رابط (linker) می نماید (شکل 3- 4). این آنزیم ها مانند سایر آنزیم ها، فعالیتشان تحت تأثیر شرایط آزمایشگاهی خواهد بود. با توجه به این شرایط می توان مناطق حساس را در DNA نسبت به این آنزیم ها پیدا کرد.

آزمایش هایی که روی ژن های گلوبین (glubin) و اوالبومین (ovalbumin) در گلبول های قرمز جوجه برای اولین بار انجام شد، مشخص کرد که حساسیت در ژن های فعال و غیر فعال نسبت به هضم توسط DNaseI متفاوت است، همچنین آنزیم نوکلئاز میکروکوکی اغلب (البته نه همیشه) قادر به برش آنها است. به دنبال این یافته ها دانشمندان طی آزمایش هایی متوجه شدند که ژن های اوالبومین فعال در سلول های لوله های رحمی نسبت به برش توسط DNaseI بسیار حساس هستند. مطالعات دیگر بررسی تفاوت حساسیت نوکلئازها در بسیاری از ژن ها بوده است که به طور معمول افزایش حساسیت هنگام فعالیت نسخه برداری در کروماتین 10 برابر محاسبه شده است (شکل 6- 7).

www.ShimiPedia.ir



شکل 6- 7 حساسیت بیشتر هنگام نسخه برداری کروماتین با توجه به فعالیت هضم توسط آنزیم DNaseI قابل اندازه گیری است.

مطالعات اخیر نشان می دهند که ژن های خاصی در کروماتین از حالت مقاوم به نوکلئاز به حالت حساس به نوکلئاز تغییر می کنند. این پدیده به طور قابل ملاحظه ای قبل از تنظیم نسخه برداری دیده می شوند. به عنوان مثال، رمز گذاری ژن های زنجیره های سبک وسنگین ایمونوگلبولین ها دستخوش تغییراتی هنگام فعالیت نسخه برداری می شوند (همراه با نوآرایی غیر معمول در DNA). این عمل هنگام بلوغ لنفوسیت های تولید کننده آنتی بادی ها انجام می شود. همچنین مطالعه روی ژن زنجیره سبک k

www.ShimiPedia.ir

موش (mouse k light chain) نشان می دهد که حساسیت به DNaseI در تنظیم فعالیت نسخه برداری بسیار دخیل می باشد به طوری که این حساسیت بیشتر باعث افزایش قابلیت نسخه برداری می شود تا این که بگوییم افزایش فقط فعالیت نسخه برداری را به وجود می آورد. هم اکنون اکثر دانشمندان پذیرفته اند که نوسانات ناشی از حساسیت به نوکلئاز و به دنبال آن تغییر ساختار کروماتین نقش به سزایی در شروع و تنظیم فعالیت نسخه برداری دارد. گروهی از دانشمندان معتقدند که این حساسیت نوکلئازی می تواند مستقل از نسخه برداری و دور از حوزه فعالیت ژن باشد. به عنوان مثال، ژن اوالبومین جوجه، حوزه حساسیت آن نسبت به DNaseI به اندازه 80 kbp دورتر از ژن مربوطه قرار دارد، در حالیکه خود ژن و پروموتر و همچنین ناحیه تحت کنترل آن در فاصله های کمتر از 12 kbp واقع شده اند. باید توجه داشت که تغییرات کروماتینی قبل از نسخه برداری شروع شده و به طور قطعی وابسته به فعالیت نسخه برداری نمی باشد.

نحوه تغییرات ساختاری کروماتین در بروز حساسیت نوکلئازی تا حدودی مشکل است ولی دانشمندان می توانند تغییرات بخصوصی در ترکیبات کروماتین به وجود آورند و در سطح مولکولی مطالعه نمایند. این اطلاعات را می توان با تغییرات مربوط به حساسیت نوکلئازی تطبیق نمود. برخی از این نوع مطالعات عبارتند از: مطالعه مولکولی برای اصلاحات هیستونی، استوکیومتری H1 و ارتباط پروتئین های غیر هیستونی و متیلاسیون DNA . اصلاحات کروماتین نیز نقش به سزایی در حساسیت نوکلئازی دارد.

افزایش استیلاسیون هیستون ها قبل یا همراه با شروع نسخه برداری

حدود 40 سال قبل دانشمندان نشان دادند که تحریک گلبول های سفید در محیط کشت باعث شروع فعالیت نسخه برداری و افزایش مقدار استیلاسیون هیستون ها می گردد. محققین برای پاسخ به این سؤالات که آیا رخداد استیلاسیون نتیجه تغییرات کروماتین همراه با شروع نسخه برداری است؟ و چه مکانیزم هایی در این عمل دخالت دارند؟ تلاش های زیادی را متحمل شده اند که برخی از آنها را اشاره می کنیم. اقدامات اولیه در خصوص ایجاد برش هنگام نسخه برداری کروماتین به کمک روش های بیوشیمیایی امکان پذیر است. همچنین مشخص شده است با توجه به این که فعالیت نسخه برداری کروماتین بیشتر از حجم کروماتین استیله شده است، ولی قادر به مهار فعالیت استیلاسیون نبوده و فعالیت کروماتین همچنان پایدار است. همانطور که در پیوست 2 مشخص شده است، استفاده از آنتی بادی های مختلف باعث جدا شدن هیستون های استیله و غیر استیله شده گردید. هبس (Hebbes) و همکارانش در سال 1988 در آزمایشی بر روی گلبول های قرمز جوجه در حال رشد نشان داد که در ژن های

www.ShimiPedia.ir

فعال گلوبین میزان DNA استیله شده کاهش یافت در حالیکه این کاهش در اوالبومین غیر فعال دیده نشد. همچنین مشخص گردید که افزایش استیلاسیون β- گلوبین در منطقه ای با بیش از

1000 Kb رخ می دهد و منطقه هیبریداسیون شباهت زیادی به منطقه حساسیت به DNaseI دارد.

یکی از یافته های مهم این بود که دُمین استیله شده در پیش سازهای گلبول های قرمز (حتی قبل از شروع نسخه برداری ژن β- گلوبین) دیده شد. از طرف دیگر، استیلاسیون کروماتین بسیار مهمتر از خود عمل نسخه برداری است. روش رسوب سنجی ایمنی نشان داد که علاوه بر دُمین بزرگ کروماتین، برخی از ژن ها می توانند استیلاسیون کوتاه مدت به همراه نسخه برداری داشته باشند. البته این تغییرات بسیار محدود است و ممکن است فقط به یک یا دو نوکلئوزوم در منطقه پروموتر و گاهی محدود به هیستون های ویژه ای می شود. این عمل بستگی به ژن دارد مثلا ممکن است H3 بیشتر از H4 استیله شود. این تغییرات موضعی در استیلاسیون ممکن است نیاز به آنزیم های HAT و HDAC به ترتیب برای استیلاسیون و دِاستیلاسیون داشته باشد. مکانیزم مولکولی اسیتلاسیون هیستون ها هم برای شروع و هم برای مهار نسخه برداری به صورت معما در آمده است و در فصل 8 شرح داده خواهد شد. استیلاسیون در دُمین های بزرگی از کروماتین ممکن است به صورت ساختار باز شده (حساس به نوکلئاز) یا ساختار منظم (این عمل با مهار توسط اتصالات تقاطعی ما بین نوکلئوزوم ها صورت می گیرد) به وجود آید که در فصل 4 شرح داده شد. همچنین شواهدی وجود دارند که مقدار زیاد استیلاسیون در ساختارهای منظم کروماتین (در شرایط خارج سلولی) را نشان می دهند. در ضمن این عمل باعث تسهیل در نسخه برداری در نوکلئوزوم DNA نیز می گردد (فصل 7).

www.ShimiPedia.ir

پیوست ۲ **روش رسوب سنجی کروماتین یا ChIP**

تهیه کروماتین

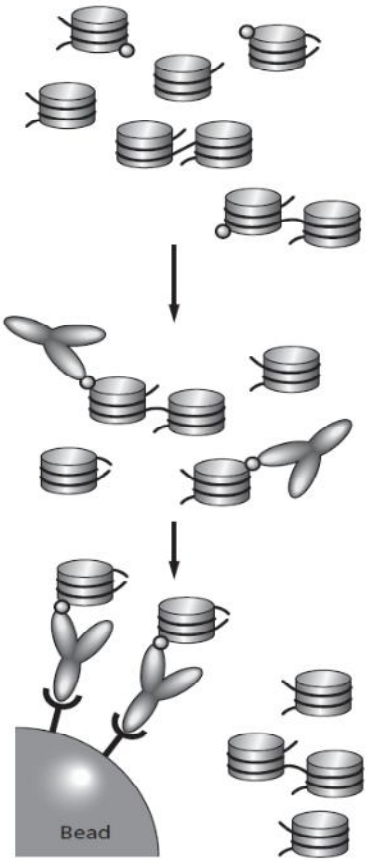
با هضم هسته سلول توسط نوکلئاز یا افزودن فرمالدهید به سلول های در حال رشد (در نتیجه پیوندهای کووالانی بین هیستون ها یا سایر پروتئین ها با DNA به وجود می آید) و سپس سونیکه کردن وشستن سلول ها، رسوبی که حاوی DNA دو رشته ای شکسته شده است، به دست می آید.

با آنتی بادی مخلوط کنید

آنتی بادی باید برای هیستون تغییر یافته یا پروتئین غیر هیستونی ویژه داشته باشد (ایجاد اتصالات تقاطعی فقط با کروماتین)

اضافه کردن ذرات bead حاوی پروتئین A و ساتریفیوژ

این عمل برای جدا سازی آنتی بادی پیوند شده و پیوند نشده از کروماتین انجام می شود (به ترتیب در رسوب و مایع رویی ظاهر می شوند)



استفاده از دترژانت قوی

دترژانت قوی مثل SDS ۱% باعث جدا سازی DNA از پروتئین می شود (مثلاً توسط استخراج بافنل/کلروفرم

Antibody-bound fraction (pellet)

Unbound fraction (supernatant)

DNA | Protein

DNA | Protein

پروتئین: آزمایش برای حضور پروتئین های (تغییر یافته) ویژه توسط الکتروفورز و وسترن بلات

DNA :

آزمایش برای تعیین حضور توالی خاصی از DNA توسط Slot blotting و هیبریدیزاسیون با پروب های DNA نشاندار شده، PCR کمی یا DNA array analysis

*p.

www.ShimiPedia.ir

جایگاه های بسیار حساس به DNaseI

هضم اندونوکلئازی کروماتین یا هسته همراه با روش ساترن بلات (Southern blotting) (به عنوان روش نشاندار کننده انتهایی می شناسند) امکان رسم نقشه ای که محل های حساس به نوکلئاز را فراهم می کنند، بسیار سودمند بود. بدین ترتیب نواحی ژنومی خاصی که هنگام نسخه برداری تغییر کرده باشند، مشخص می شوند (پیوست 3). با استفاده از روش های فوق در منتطقه ای از ژنوم که حداقل شامل 100 جفت باز است، دانشمندان متوجه شدند که هضم اندونوکلئازی غیر اختصاصی با حساسیت بسیار زیاد انجام شد. این شکستگی ها توسط مواد شیمیایی مختلف نیز مورد آزمایش قرار گرفت. شکسته شدن DNA در این منطقه سریعتر از دیگر مناطق حساس به نوکلئاز (که در بالا ذکر شد) رُخ می دهد. استفاده از آنزیم DNaseI معمولاً روشی برای شناسایی نواحی حساس می باشد که بر این اساس به این مکان ها "جایگاه های بسیار حساس به DNaseI " یا DHS (DNaseI hypersensitive) اطلاق می شود.

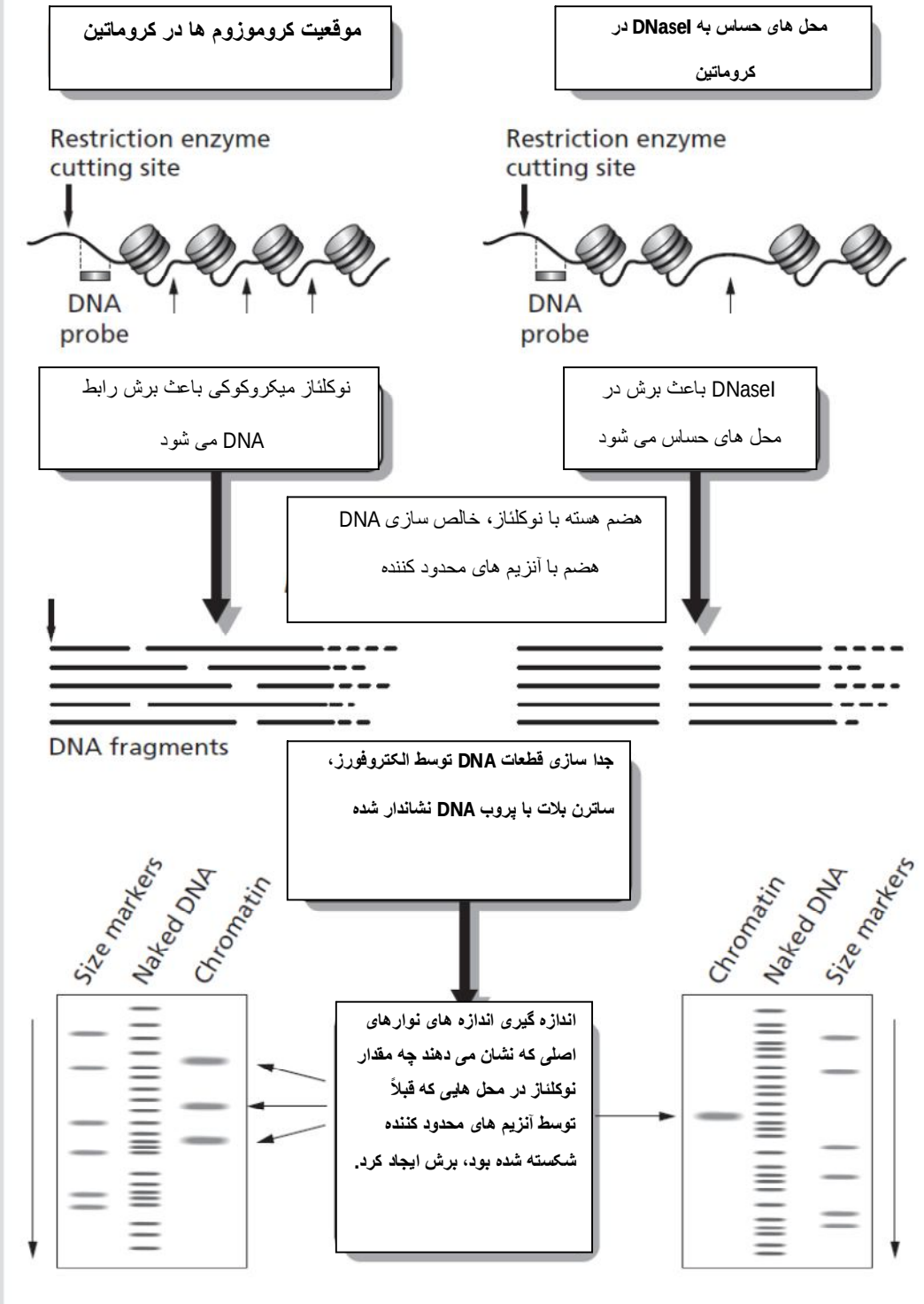
میزان سرعتی که در آن DHS هضم می شود، مشخص می کند که نوکلئوزوم ها به صورت آزاد هستند یا نه! (این عمل از لحاظ آزمایشگاهی قابل اجراست). یکی از آزمایش هایی که این نتایج را نشان داد، استفاده از ویروس SV40 خالص شده از هسته سلول های پستانداران بود. استفاده از ویروس برای مطالعه کروماتین یوکاریوت ها شاید یک مدل غیر معمول باشد، ولی اطلاعات ارزنده ای از آنها به دست آمد. در مطالعه ای که روی DNA این ویروس صورت گرفت مشاهده شد که DNA حلقوی آن با طولی برابر با

5243 bp کاملاً به صورت کروماتین بسته بندی شده بود و وقتی توسط آنزیم نوکلئاز هضم شد، منطقه DHS در محلی بسیار حساس قرار داشت (با ORI نشان داده شده است) و این مناطق شامل محل شروع همانند سازی، پروموتر و محل اتصال پروتئین تنظیمی ویروس یعنی آنتی ژن- T (T- antigen) بودند. آزمایش روی کروماتین ویروس توسط میکروسکپ الکترونی نیز منطقه ای بدون نوکلئوزوم و در حدود 350 bp را مشخص کرد. عدم وجود نوکلئوزوم ها در جایگاه DHS را می توان با تیمار آن با فرامالدهید ثابت کرد (چون فرمالدهید باعث اتصال تقاطعی بین هیستون ها و DNA می شود).

استفاده از روش رسوب سنجی با آنتی بادی های آنتی هیستون ها برای بررسی برش در کروماتینی که عمل اتصالات تقاطعی داشتند،

www.ShimiPedia.ir

پیوست ۳ **روش نشاندار کردن غیر مستقیم**



www.ShimiPedia.ir

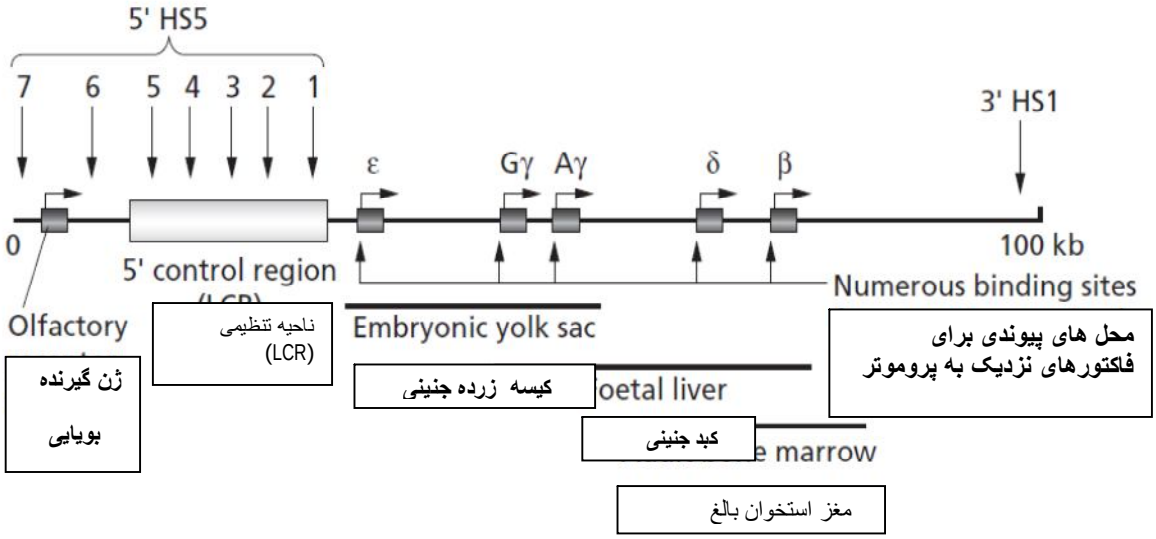
موفقیت آمیز نبود و حتی نتوانست نشان دهد که آیا هیستون ها ارتباطی با جایگاه DHS دارند یا نه؟ (این آزمایش با ویروس SV40 و ژن hsp70 مگس سرکه انجام شد). به هر حال، به طور قاطع نمی توان گفت که در جایگاه DHS نوکلئوزوم ها به صورت آزاد هستند یا حتی نمی توان گفت که این جایگاه یک موقعیت غیر معمول است. ما در قسمت های بعد شرح خواهیم داد که چگونه گروهی از فاکتورها می توانند محل حساس به DNaseI روی DNA به وجود آورند و این مناطق هنوز در ارتباط با نوکلئوزوم هستند. به هر حال، DHS از لحاظ عملکردی یا تجربی مورد تأیید است ولی به طور کل اطلاعات چندانی راجع به شکل فضایی یا نحوه بسته بندی DNA به ما نمی دهد.

اهمیت عملکرد DHS

همانطور که از نام DHS (جایگاه بسیار حساس به DNaseI) مشخص است، این جایگاه در برقراری ارتباط بین بخش های مختلف DNA مثل پروموترها، تقویت کننده ها (enhancers) و نقاط شروع همانند سازی نقش به سزایی دارد، به طوری که وجود آن باعث کمک به عمل پیوند پروتئین ها به توالی ویژه ای روی DNA می شود. چه راهی برای کسب اطمینان از اثر این اتصالات پروتئینی به محل خاصی روی DNA وجود دارد؟ واضح است که از DHS به عنوان جایگاه تنظیمی فعال، یا به صورت ساختاری (یعنی حضور همیشه آن) و گاهی نیز در مراحل خاصی از تکامل در بافت ها و سلول های بخصوصی استفاده می شود. برای مثال، ژن β- گلوبین روی کروموزوم شماره 11 انسان قرار دارد و دو جایگاه DHS روی آن دیده شده است، یکی از آنها ساختاری و دیگری محل هایی است که فقط در سلول های قرمز خون آنهم زمانی که ژن ها به صورت فعال در حال بیان شدن هستند، می باشند (شکل 6- 8).

یکی از کارهایی که DHS انجام می دهد این است که می تواند نمایانگر مناطقی از ژنوم باشد که آن مناطق بدون نوکلئوزوم شده در نتیجه اتصال پروتئین های تنظیمی ساده تر شود. اگر چنین عملی درست باشد، بنابراین باید روی مکانیزم بسته بندی DNA و بیان ژن اثر بگذارد. اگر مونتاژ نوکلئوزوم ها روی DNA تصادفی نباشد، یک چنین مکانیزم محافظتی لازم است و اگر کاملاً تنظیم شده باشد، بنابراین در بعضی از توالی های DNA باید مونتاژ صورت گیرد و در برخی دیگر انجام نشود. این چنین مکانیزم های نوکلئوزومی می

www.ShimiPedia.ir



شکل 6- 8 مجموعه ژنی β- گلوبین انسان. در شکل فوق ژن های خاصی در مراحل تکاملی جنینی در زمان های مختلف را مشاهده می کنید.

توانند اتصال پروتئین های تنظیمی را به توالی پیوندی خاصی روی DNA (یا در نواحی نزدیک به آن توالی) با چسبیدن خودشان به آن محل ها (منظور نوکلئوزوم ها هستند) مهار کنند. در بخش های بعدی آزمایش هایی مربوط به این نوع مکانیزم ارایه خواهیم کرد.

موقعیت نوکلئوزوم ها در شرایط داخل سلولی و خارج سلولی

در بخش اول این فصل چگونگی هضم ملایم هسته سلول را با آنزیم نوکلئاز میکروکوکی مورد مطالعه قرار دادیم و مشاهده شد که DNA به قطعات حدود 200 bp بریده شد، البته این نوع برش به نوع سلول نیز بستگی دارد. برش ها در قسمت های رابط DNA انجام شد. فقدان یا حضور هیستون های مختلف (مانند H1 ، $H1^{\circ}$ و H5) می توانند فضای بین نوکلئوزوم ها را تحت تاثیر قرار دهند، هر چند که این فرایند در تمام نقاط ژنوم پاسخگو نمی باشد، با این حال در این مناطق نوکلئوزوم ها با توالی های خاصی از DNA موقعیت یابی می شوند و ایجاد ارتباط می نمایند (اطلاعات مربوط به موقعیت یابی نوکلئوزوم ها به طور کامل با استفاده از روش نشاندار کردن غیر مستقیم در پیوست 3 نشان داده شده است). توجه داشته باشید که برای یک یا چند نوکلئوزوم، فضای خاصی تعیین شده و محل تعریف شده و مشخصی وجود دارد.

www.ShimiPedia.ir

تعیین موقعیت نوکلئوزوم با کمک توالی DNA

برای این که یک ذره مرکزی نوکلئوزوم تشکیل شود، DNA دو رشته ای باید دو دور در اطراف نوکلئوزوم بزند. این خمیدگی باعث شد که شیار کوچک DNA در سمت داخل سوپرکویل قرار گیرد (یعنی چسبیده به هیستون ها) و سمت خارجی DNA کمی کشیده شده (گسترده تر) و تقریباً دو برابر سمت داخل می شود. بنابراین برای این که چرخش بهتر انجام شود، خمیدگی DNA به توالی نوکلئوتیدها بستگی دارد. یکی از نمونه های مشخص این است که جفت بازهای AT ترجیحاً در سمت داخل و جفت بازهای GC در سمت خارج قرار می گیرند (این عمل بازتاب توانایی در فشرده سازی و تطبیق آن با قرار دادن شیار کوچک DNA در سمت داخل است). به هر حال، قواعدی که در توانایی ایجاد خمیدگی در DNA وجود دارند بیشتر مربوط به توالی نوکلئوتیدها است.

اولین تلاشی که برای تعریف چنین قواعدی بکار رفت بر اساس یافته هایی بود که با استفاده از ژل الکتروفورز انجام شد. در شرایط مطلوب، حرکت قطعات DNA در ژل بستگی به مقاومت در برابر خم شدن آن دارد. اگر دو قطعه از DNA با اندازه های برابر داشته باشیم ولی توالی نوکلئوتیدهای آنها متفاوت باشند (در شرایط مشابه)، قطعه ای که انعطاف پذیری بیشتری دارد سریعتر حرکت می کند. این عمل شاید به این علت باشد که انعطاف پذیری رشته DNA اجازه می دهد تا بتواند در منافذ ژل آکریلامید راحتتر نفوذ کند و سریعتر به جلو برود. در آزمایش بعدی و در شرایط خارج سلولی، قطعات DNA به صورت تصادفی ساخته شد ودر نوکلئوزوم ها با استفاده از دیالیز نمکی جمع آوری گردید. این مولکول های DNA مشاهده شد که در اطراف کروماتین قرار گرفته بودند بنابراین خالص شده یعد از انجام عمل کلونینگ، توالی آنها تعیین گردید. در کل روش های بکار برده شده نتایج مطلوبی از نحوه اتصال و پیچش DNA در نوکلئوزوم ها نشان داد، البته مشخص شده است که قواعد یا موتیف های خاصی جهت اصلاح این فرایند وجود ندارد.

یک نتیجه مهم از این آزمایش ها این است که نوکلئوزوم ها لزوماً به صورت تصادفی روی DNA قرار نمی گیرند اما قرار گیری آنها در مکان هایی صورت می گیرد که بتوانند خمیدگی مطلوب به وجود آورند. به چنین جایگاه هایی، توالی های جایگاه نوکلئوزومی

(nucleosome positioning sequences) گویند. برخی اوقات پیام های تعیین موقعیت با دقت بیشتری انجام می شود وتجمع نوکلئوزوم ها در محل های خاصی صورت می گیرد. توالی های داخلی AT و خارجی GC شرایطی را پیش می آورند

www.ShimiPedia.ir

تا شکل فضایی DNA نوکلئوزومی قادر به ساخت یک موقعیت بسیار قوی شود. در زنجیره ساخته شده به طور پشت سر هم نمادهای

$W_3N_2S_3N_2$ مشهود است که نماد W (یعنی ضعیف weak) بیانگر بازهای A یا T و نماد S (یعنی قوی strong) بیانگر بازهای C یا G و بالاخره N (هر نوکلئوتیدی می تواند باشد) هستند. به دنبال تکرار ده تایی زنجیره مارپیچی DNA به طور اتوماتیک جفت بازهای AT در درون و جفت بازهای GC به سمت خارج قرار می گیرند. مثال های خوبی که می توان زد، تشکیل زنجیره های حاوی ژن های 5SrRNA است که توسط Pol III نسخه برداری آن انجام شده است. این ژن کوچک (120 bp) کاملاً حفاظت شده است و ژن هایی با تکرار زیاد در آزمایشگاه برای بررسی اتصال فاکتورهای نسخه برداری به نوکلئوزوم ها مورد استفاده قرار می گیرند (فصل 7).

از DNA های ساخته شده برای تجزیه و تحلیل آزمایش های داخل سلولی از لحاظ انرژتیکی هنگام مونتاژ نوکلئوزوم ها استفاده شد. دانشمندان از آزمایش هایی به نام بازسازی رقابتی برای مقایسه توالی DNA های مختلف هنگام مونتاژ نوکلئوزوم ها نیز بهره جستند. قطعات DNA مورد مطالعه در فوق که حاوی 5 نسخه بودند را با ژن های 5SrRNA طبیعی مقایسه کردند و سپس آنها را جهت بررسی مونتاژ نوکلئوزومی مخلوط نمودند (یعنی از DNA های منو نوکلئوزومی). این آزمایش توانایی DNA را در مونتاژ نوکلئوزوم ها نشان داد و معلوم شد که هر چه تعداد نسخه های توالی موقعیتی (positioning sequence) بیشتر باشد، مونتاژ بهتر انجام می شود. آنها متوجه شدند که DNA ای با 5 نسخه در شرایط خارج سلولی ، قابلیت مونتاژی حدود 100 مرتبه بیشتر از موقعی که به صورت منو نوکلئوزومی طبیعی باشد، دارد. بهترین توالی موقعیتی 5SrRNA با فقط دو نسخه از DNA ساخته شده فراهم می کند.

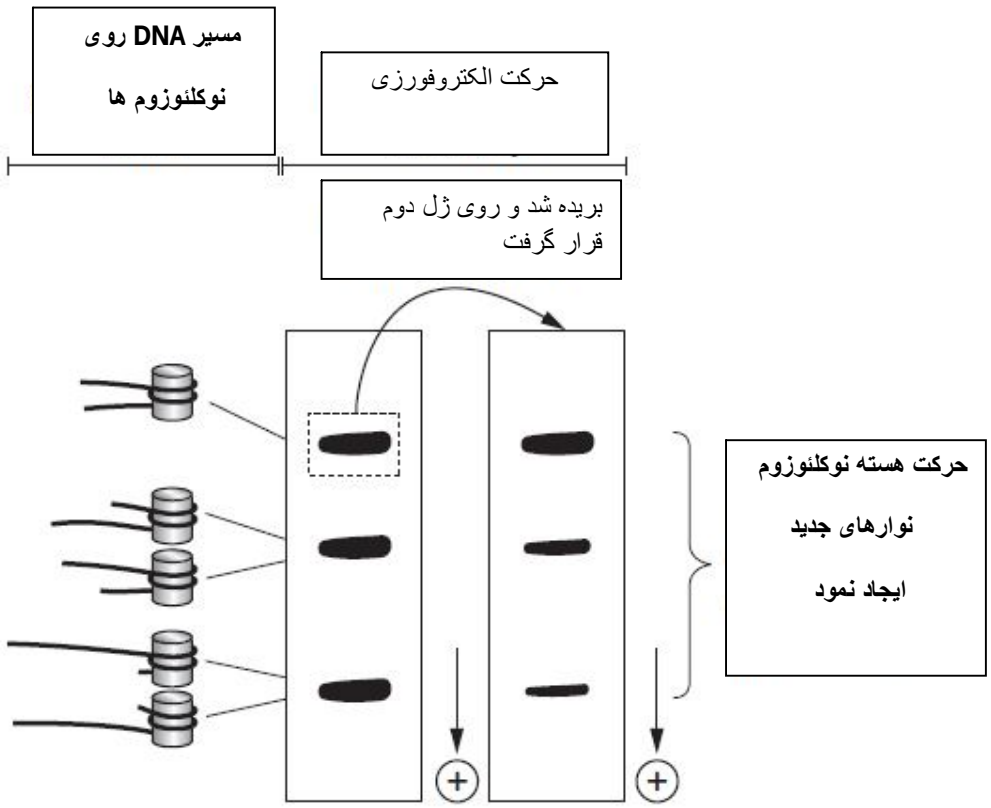
حفظ تحرک نوکلئوزوم های مستقر در DNA

نوکلئوزوم ها از طریق چند پیوند یونی ایجاد شده بین DNA و هسته هیستون ها پایدار می گردند. هر کدام از این پیوندها به تنهایی پیوند ضعیفی هستند ولی در کنار هم ایجاد پیوندهای قوی و ذره های پایدار می نمایند به طوری که جدا سازی آنها غلظت های بالای نمک و دترژانت های یونی احتیاج دارد. بنابراین، هدف از این بخش از کتاب این است که بدانیم آیا پایداری نوکلئوزوم ها به واسطه ایجاد یک موقعیت پایدار است یا نه؟

www.ShimiPedia.ir

پس از کشف ساختار نوکلئوزوم ها مشخص شد که نوکلئوزوم ها قادرند بدون جدا شدن از روی رشته DNA در طول آن حرکت نمایند که به این پدیده "خاصیت لغزشی" (sliding) گفته می شود. البته این فرایند فقط در قدرت های یونی بالا رْخ می دهد و وجود آن در شرایط داخل سلولی به اثبات نرسیده است. اخیراً مطالعات نشان می دهند، نوکلئوزوم هایی که در شرایط خارج سلولی به طور محکم در یک توالی خاصی قرار گرفته اند (مانند ژن 5SrRNA) قادر به تحرک در قدرت های یونی پایی (یا در غیاب اندرکنش ها یا حتی تضعیف کننده های اندرکنش های بین DNA و هیستون ها) می باشند. برای تعیین خمیدگی در DNA از روش الکتروفورز استفاده می شود، منتهی مشکل این است که در این روش نوکلئوزوم ها از ژل خارج شده و فقط قطعات DNA روی ژل حرکت می کنند (شکل 6- 9). حرکت الکتروفورزی با موقعیت اکتامری هیستون های موجود در DNA رابطه نزدیکی دارند. الکتروفورز باید در حرارت $4\ ^{\circ}C$ انجام شود تا از بهم پیوستن نوکلئوزوم ها (پس از جدا شدن) جلوگیری شود. اگر ناحیه ای از ژل که حاوی نوکلئوزوم های جدا شده هستند را به مدت چند دقیقه در دمای $37\ ^{\circ}C$ قرار دهیم و مجدداً الکتروفورز نماییم ، هر نوار به چندین نوار تقسیم شده و هر کدام حرکتی متفاوت خواهند داشت (شکل 6- 9). بنابراین، می توان نتیجه گرفت که انکوباسیون در دمای معمولی بدن می تواند باعث القای حرکت نوکلئوزوم های اکتامر در طول رشته DNA می شود که این پدیده در خصوص توالی های 5SrRNA با قدرت حرکت متفاوت مشاهده شده است. اما باید توجه داشت که مشاهده یک چنین پدیده ای در توالی 5SrRNA دلیلی بر این که تمام نوکلئوزوم ها از این روش پیروی می کنند، نیست.

www.ShimiPedia.ir



شکل 6- 9 حرکت نوکلئوزوم را می توان توسط الکتروفورز تعیین کرد. در این آزمایش، اکتامر هیستون ها را در سه محل متفاوت روی ژل مشاهده می کنید. علت وجود سه نوار ، کانفورماسیون های مختلف آنها است که عمدتاً به نحوه نفوذ آنها در ماتریکس ژل بستگی دارد. این ژل در دمای $4\ ^{\circ}C$ قرار دارد که در این دما نوکلئوزوم ها موقعیت خود را حفظ می کنند. اگر یکی از نوارها (مثلاً بالایی) را بریده و در حرارت $37\ ^{\circ}C$ مجدداً الکتروفورز نماییم، نوار فوق به چندین نوار جدید تقسیم می شود. از این روش برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های بازسازی کروماتین (chromatin remodellig) استفاده می شود.

نتایجی که از این آزمایش ها به دست آمد این بود که موقعیت های مختلف توسط DNA هایی با 10 جفت باز (یعنی یک پیچ کامل از DNA) مشاهده شد که از هم جدا می شوند، بنابراین موقعیت های چرخشی در آن حفظ شده است. یعنی جفت بازهای اولیه در جایگاه خود باقی مانده اند (این فرایند را در شکل 6- 10 مشاهده می کنید). البته هنوز روشن نشده است که چنین تحرکی برای نوکلئوزوم ها در شرایط داخل سلولی امکان پذیر است یا نه؟ به عنوان مثال، باید دید که آیا حرکت نوکلئوزوم در DNA هایی با 10 ، 20 یا 30 جفت باز باعث اتصال فاکتورهای نسخه برداری به توالی DNA و همچنین شروع بیان ژن می شود

www.ShimiPedia.ir

یا نه؟ نتایج فوق بیان می کنند که توالی های DNA به تنهایی نمی توانند پیام موقعیتی قوی در شرایط داخل سلولی بدهند، زیرا موقعیت نوکلئوزوم های مستقر در DNA ژنوم مخمر و لارو مگس سرکه در شرایط داخل سلولی و خارج سلولی متفاوت است. بنابراین، ممکن است توالی های DNA فقط جزء یکی از عوامل ضروری درتعیین موقعیت جایابی نوکلئوزوم ها باشد.

استقرار قطعی نوکلئوزوم ها در شرایط داخل سلولی

حرکت نوکلئوزوم ها در شرایط داخل سلولی باعث طرح این سؤال می شود که آیا تعیین موقعیت و استقرار نوکلئوزوم ها در کنترل نسخه برداری دخالت دارد؟ یک مطالعه انجام شده در مورد موقعیت نوکلئوزوم ها در شرایط داخل سلولی با استفاده از روش نشاندار کردن غیر مستقیم (پیوست 3) در بیش از 20 ژن مخمر و سایر سلول های یوکاریوت های عالی نشان داد که هم نوکلئوزوم های مستقر در موقعیت خاصی روی DNA نقش دارند و هم عناصر توالی DNA مؤثرند (مثل تحقیقاتی که روی مخمر *S.cerevisiae* انجام شد و در فصل های بعدی صحبت می شود).

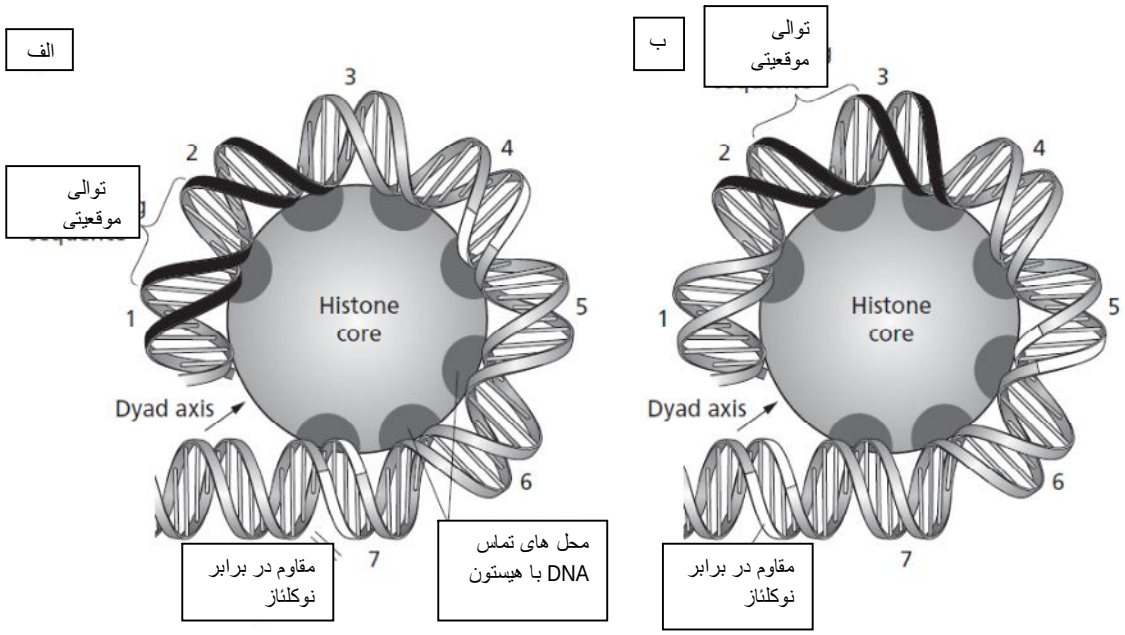
ژن PHO5

ژن PHO5 در مخمر ساکارومایسس سرویسیه کد کننده آنزیم اسید فسفاتاز است. وقتی مقدار فسفات معدنی (Pi) در محیط کشت کم باشد، مقدار ترشح این آنزیم 50 برابر افزایش می یابد. ترشح ژن PHO5 مستلزم اتصال دو پروتئین به پروموتر است که این پروتئین ها عبارتند از:

1) Pho4 : یک فعال کننده انتقالی بازی است با ساختار HLH (Helix- Loop- Helix) که به دو جایگاه متفاوت در نواحی فرادست توالی های فعال کننده (UASp2 و UASp1) متصل می گردد.

2) Pho2 : شامل یک هومئوباکس (homeobox) است که با پروتئین های متصل به DNA در چند محل به پروموتر وصل می شود. یکی از این محل ها UASp1 و دو محل دیگر آن به UASp2 اتصال می یابند (شکل 6- 1، الف).

www.ShimiPedia.ir



شکل 6- 10 حرکت DNA مرتبط باتغییرات اکتامر هیستونی توسط 10 جفت باز که فقط باعث تغییرات انتقالی می شود، تغییرات چرخشی به وجود نمی آورد.

PHO5 توسط آنزیم پروتئین کیناز تنظیم می شود. این آنزیم عمل فسفوریلاسیون انجام می دهد. عمل فسفوریلاسیون در محیطی که مقدار فسفات زیاد است، صورت می گیرد در نتیجه باعث غیر فعال شدن فرایند می گردد. پروموتر PHO5 در داخل چهار نوکلئوزوم مستقر در DNA قرار گرفته است. این نوکلئوروم ها واجد جعبه TATA و UASp2 (البته فاقد UASp1) با حساسیت فوق العاده به نوکلئاز می باشند (شکل 6- 11).

بیان ژن PHO5 باعث حذف سریع "نوکلئوزوم موقعیتی" می شود (این اطلاعات توسط هضم نوکلئازی و روش نشاندار کردن نوکلئوزوم ها به دست آمد). این بدان معنا نیست که ضرورتاً نباید از پروموتر ژن PHO5 حذف شوند. هر چند شکی در رخداد این پدیده نیست ولی می توان مطمئن بود که نوکلئوزوم ها به گونه ای تغییر می کنند که باعث می شوند تا DNA بیشتری در اختیار آنزیم نوکلئاز قرار گیرد. با این تفاسیر مشخص می گردد که نوکلئوزوم ها نقش به سزایی درتنظیم بیان ژن PHO5 دارند. در گونه های مختلفی از مخمرها که مقدار نوکلئوزوم ها را کاهش دادند، متوجه شدند با وجود این که غلظت بالایی از فسفات

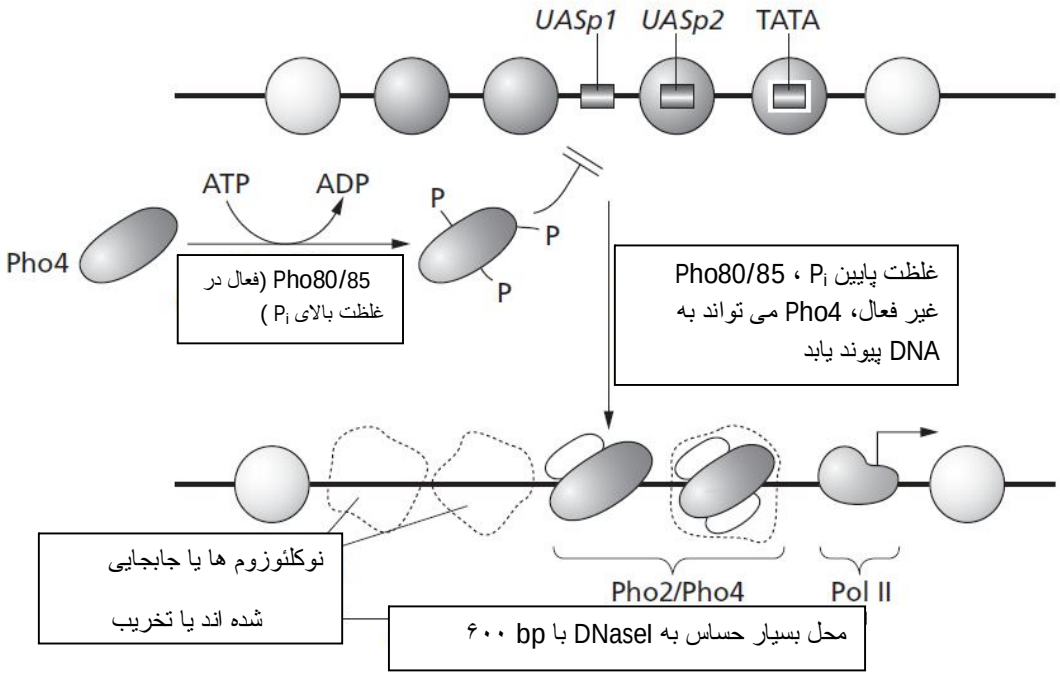
www.ShimiPedia.ir

معدنی در محیط کشت بود ولی نسخه برداری انجام می شد (البته فعالیت آن به اندازه سلول هایی که در محیط کشت طبیعی بودند، نمی رسید).

فعال شدن ژن PHO5 همراه با تخریب ساختار کروماتین بود ولی از این موضوع نباید برداشت کلی از نسخه برداری نمود. مطالعات نشان می دهند که سازماندهی مجدد نوکلئوزوم ها در غلظت های پایین P_i در سلول هایی که ژن PHO5 و جعبه TATA آنها جهش یافته اند هنوز انجام می شود و این ژن قادر به نسخه برداری نیست. همچنین برای بیان ژن PHO5 نیازی به همانند سازی DNA نمی باشد، بلکه اتصال Pho4 به جایگاه UASp1 در نوکلئوزوم آزاد ضروری است که این امر باعث اتصال دومین مولکول Pho4 به جایگاه UASp2 می گردد. در شرایط طبیعی، اتصال Pho4 به جایگاه UASp2 امکان پذیر نمی باشد (البته وقتی UASp1 جهش یافته باشد). می توان گفت که سنتز زیاد Pho4 منجر به اتصال آن به UASp2 شده بنابراین حضور نوکلئوزوم ها تأثیر چندانی در اتصال ندارد. تخریب کروماتین در این شرایط مانند تخریب پروموتر در گونه وحشی است. با این تفاسیر تخریب کروموزوم های 1 تا 4 یک فرایند ادغامی است طی تحریک یکی از آنها باعث ادغام تحریک در تمام آنها می شود. البته هنوز ابهاماتی در خصوص مکانیزم مولکولی سازماندهی مجدد کروماتین ها وجود دارد که در فصل 8 به برخی از آنزیم های دخیل در این فرایند اشاره خواهد شد.

حال این سؤال پیش می آید که چرا پروموتر PHO5 اینقدر پیچیده است؟ و آیا PHO5 فعال نمی توانست فقط با اتصال به UAS باعث بیان ژن شود؟ یا سؤال دیگر این که وجود دومین UAS و جعبه TATA چه ضرورتی داشت در حالیکه تحت پوشش نوکلئوزوم ها قرار داشتند؟ در پاسخ باید گفت که UASp2 در نوکلئوزوم آزاد می تواند به Cpf1 که یک فعال کنند نسخه برداری است، متصل شود. از طرفی Cpf1 در ارتباط با PHO5 بوده که به روش های مختلفی تنظیم می شود. همچنین پنهان شدن UASp2 در نوکلئوزوم، از اتصال Cpf1 و احتمالاً پروتئین های مربوط به آن در بیان نامناسب ژن PHO5 جلوگیری می نماید. در نهایت می توان گفت که پنهان شدن جعبه TATA در نوکلئوزوم یک عامل مؤثر در جلوگیری از اتصال پروتئین متصل شونده به TATA است، چون باعث بیان نامناسب ژن می شود.

www.ShimiPedia.ir



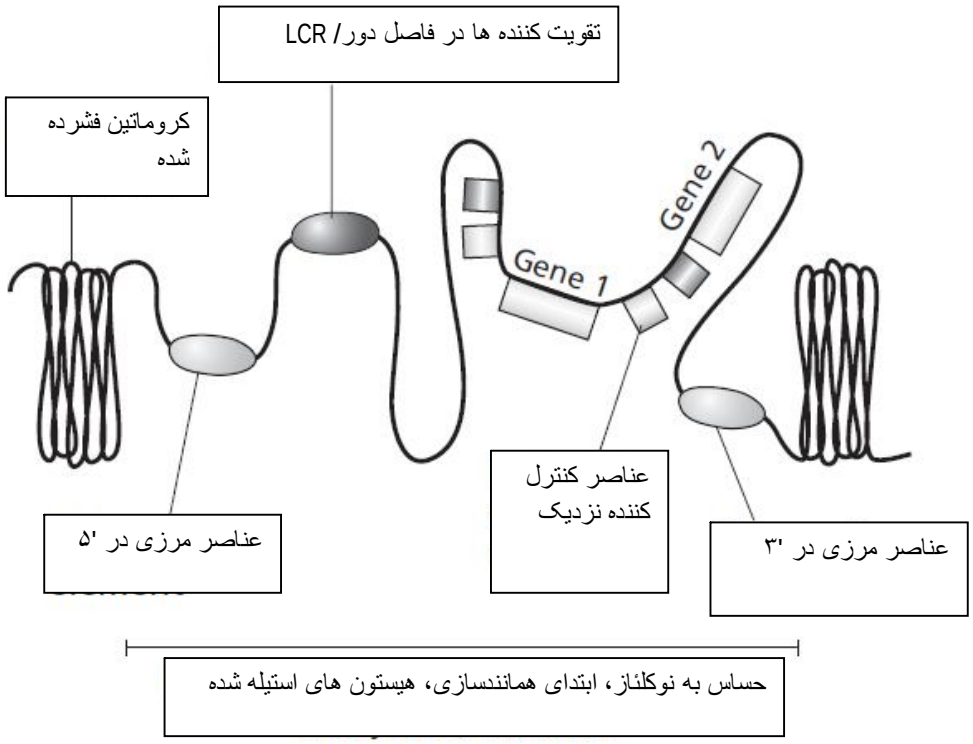
شکل 6- 11 استقرار نوکلئوزوم ها در پروموتر PHO5 وقتی غلظت فسفات معدنی (P_i) کم است. فاکتور نسخه برداری Pho4 توسط کینازها در مقدار زیاد فسفات معدنی (P_i) فسفوریله می شود، در این صورت Pho4 نمی تواند به DNA متصل شود. کینازها در مقدار کم فسفات معدنی غیر فعال شده در نتیجه Pho4 نیز دفسفوریله می شود و در نهایت با اتصال به DNA (همراه با Pho2) ، فرایند نسخه برداری شروع می شود. چهار نوکلئوزوم شکل فوق که تیره تر رسم شده اند، همگی تحت فعالیت نسخه برداری تغییر کرده اند. آنها به نوکلئاز حساس اند و ما نمی دانیم که آیا از لحاظ ساختاری واقعاً تغییر کرده اند یا تخریب شده اند؟

دُمین های کروماتین

هیچ جایگاهی به عنوان دُمین (domain) مخصوص کروماتین وجود ندارد. دُمین های کروماتینی دارای ویژگی های مختلفی هستند و هیچ دُمینی وجود ندارد که تمام این ویژگی ها را با هم داشته باشد. شاید بهترین تعریف برای دُمین این باشد که دُمین یک واحد عملکردی است. در واقع، دُمین ناحیه ای از ژنوم است که از چندین ژن ساخته شده و به طور مستقل از سایر ژن ها و کروموزوم های اطراف، تنظیم می شود. نواحی با حساسیت بالا معمولاً بین 50 تا 200 کیلو باز می باشد و دارای ویژگی هایی از

www.ShimiPedia.ir

قبیل حساسیت بالا یا گاهی حساسیت پایین به آنزیم نوکلئاز هستند. نواحی با حساسیت بالا معمولاً در ارتباط با ژن های بالقوه از نظر نسخه برداری هستند و در برخی موارد شامل گروهی از ژن های عملکردی می باشند. یک نمونه از این دُمین را در شکل 6- 12 مشاهده می کنید. این دُمین شامل دو ژن با پروموترهای متصل به فاکتور نسخه برداری و تقویت کننده ها (در منطقه ای با چندین کیلو باز دورتر در قسمت فرادست قرار دارند) می باشند که تنظیم نسخه برداری هر دو ژن را بعهده دارد. علی رغم فشردگی کروماتین در اطراف دُمین (که باعث مقاومت در برابر آنزیم نوکلئاز می شود) ، دُمین ها دارای فعالیت نسخه برداری می باشند. برای جلوگیری از بروز اشتباه در ساختار دُمین و خاموش شدن فرایند نسخه بردارای ، بخش های انتهایی '3 و '5 توسط "عناصر مرزی" (boundary elements) محافظت می شوند.

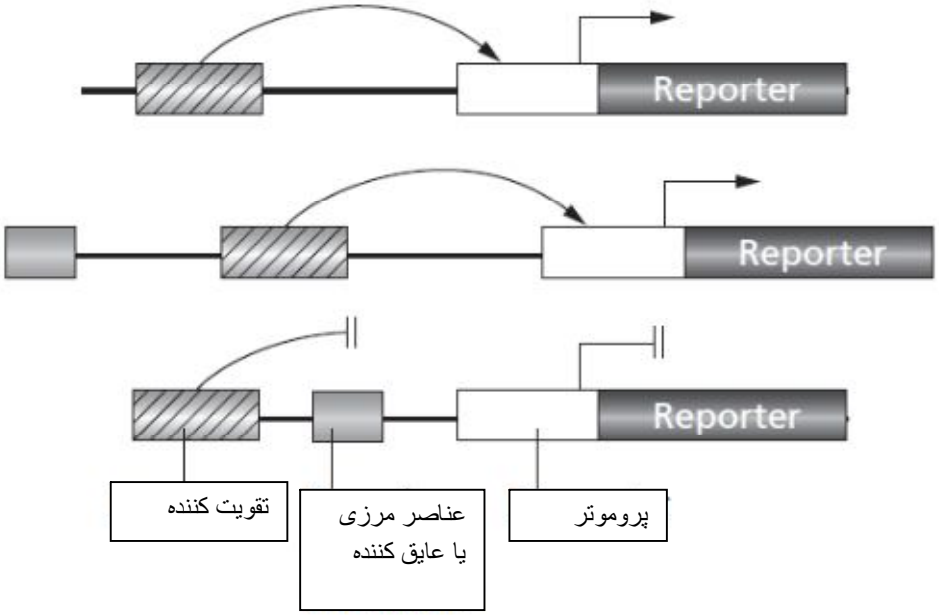


شکل 6- 12 ترکیبات فرضی یک دُمین کروماتین

این ناحیه از DNA به عنوان عایق کننده (insulator) شناخته شده است و قادر به مهار اندرکنش بین پروموتر و تقویت کننده ها می باشد (شکل 6- 13). تا کنون توالی بیش از 10 عایق کننده در گونه های مختلف شناسایی شده است، ولی شواهدی وجود ندارند که این عناصر به طور مشترک با یکدیگر فعالیت نمایند. احتمالاً تمام آنها از طریق اتصال به پروتئین های مختلف به طور

www.ShimiPedia.ir

اختصاصی عمل می کنند. با توجه به اطلاعات جزئی در خصوص اندرکنش پروموترها و تقویت کننده ها، چگونگی مهار توسط عایق کننده ها مشخص نیست، ولی می توان گفت که عملکرد این عناصر در توالی وسیعی از ژن ها حفظ شده اند. یک عایق کننده با طول 1200 kb و ایجاد کمپلکس با FSb- 7 در مگس سرکه مشاهده شد که در سلول های پستانداران به خوبی فعال بود.



شکل 6- 13 عناصر مرزی گاهی می توانند مانع اندرکنش بین پروموتر و تقویت کننده شوند. شکل فوق سه ساختار مختلف DNA را برای بررسی نحوه عملکرد عناصر مرزی در سلول های کشت داده شده، نشان می دهد.

یک نمونه مناسب جهت مطالعه دُمین کروماتین در مهره داران، بررسی جایگاه β- گلوبین می باشد. این جایگاه شامل یک خانواده ژنی بوده که مسئول سنتز پروتئین های انتقال دهند اکسیژن در گلبول های قرمز مهره داران می باشد که این خانواده ژنی به طور کامل طی تکامل مهره داران حفظ شده است. ژن های α- گلوبین توسط ژن های تنظیمی غیر وابسته به طور جدا از هم رمز گذاری می شوند (گونه انسانی β- گلوبین در شکل 6- 8 نشان داده شده است). تمامی ژن های تأمین کننده هموگلوبین مورد نیاز جنینی، در زمان های مختلف از رشد جنین بیان شده و بالغ می گردند که این نواحی بر اساس حساسیت بسیار زیاد به آنزیم DNase (DHS) در منطقه فرادست ژن γ- گلوبین مشاهده می شود. این نواحی یک جایگاه مشخص از عناصر تقویت کننده

www.ShimiPedia.ir

هستند که تحت عنوان ناحیه جایگاه کنترل (locus control region) یا LCR می باشد. البته خصوصیات LCR انسانی طی آزمایش های خاصی شناسایی شده است. در این آزمایش، ژن β- گلوبین انسان را در ژنوم موش وارد کردند. اگر جایگاه ژن مربوط به β- گلوبین دست نخورده باشد، طی مراحی تکامل این ژن باید در موش بیان شود. این پدیده را می توان توسط جهش های مختلف در نواحی متفاوت مورد بررسی قرار داد. اگر برخی یا تمام ترکیبات DHS (که شامل LCR هم می شود) حذف شوند، معلوم می شود که انتقال ژن به خوبی انجام نشده یعنی نسخه برداری به علت روش غیر قابل پیش بینی مهار شده است. به این پدیده "گوناگونی جایگاه اثر " (position effect variegation) اطلاق می شود که در فصل بعدی مورد بحث قرار خواهد گرفت. نکته مهم این است که ترکیب LCR به دلیل توانایی در باز کردن ساختار کروماتین و حفظ آن در برابر عوامل محیطی، مانع بروز پدیده گوناگونی جایگاه اثر می شود که در واقع دارای خصوصیات یک عنصر مرزی (همان عایق کننده) است و در جایگاه 5´HS5 قرار دارد.

ساختار کروماتین β- گلوبین در جوجه که جزء مهره داران است ولی گلبول های قرمز آن هسته دارند، مورد مطالعه قرار گرفت. این ساختار به طور ویژه منبع غنی از کروماتین های هموژن می باشد. طی اندازه گیری به روش رسوب سنجی ایمنی دْمین حساس به DNaseI شناسایی شد. در این ناحیه کاهش هیستون H1 و افزایش استیلاسیون هیستونی مشاهده گردید. این نتایج نشان داد که افزایش حساسیت به DNaseI و استیلاسیون هیستون ها به طور همزمان انجام می شود. این همزمانی می تواند یک پدیده عمومی باشد یا فقط به برخی از جایگاه های ژنوم محدود شود. یک قطعه از DNA با طول 1/2 bp از LCR جوجه (به ویژه جایگاه HS4) مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که دارای تمام خصوصیات یک عایق کننده به عنوان ممانعت از عمل تقویت کننده در سلول های انسانی می باشد، در ضمن دیده شد که در مقابل "اثر جایگاه" در مگس سرکه محافظت می کند. این قطعه به عنوان عایقی که غنی از بازهای GC به طول 250 bp است در انتهای 3´ حفظ شده است.

www.ShimiPedia.ir

منابع:

نوکلئوزوم ها، کروماتین و نسخه برداری

Ericsson, C., Grossbach, U., Bjorkroth, B. & Daneholt, B. (1990) Presence of histone H1 on an active Balbiani ring gene. *Cell*, **60:** 73–83.

Ericsson, C., Mehlin, H., Bjorkroth, B., Lamb, M. M. & Daneholt, B. (1989) The ultrastructure of upstream and downstream regions of an active Balbiani ring gene. *Cell*, **56:** 631–639.

Han, M. & Grunstein, M. (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell*, **55:** 1137–1145.

Solomon, M. J., Larsen, P. L. & Varshavsky, A. (1988) Mapping protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*, **53:** 937–947.

Wu, C., Wong, Y.-C. & Elgin, S. C. R. (1979) The chromatin structure of specific genes: II. Disruption of chromatin structure during gene activity. *Cell*, **16:** 807–814.

نوکلئوزوم موقعیتی و حرکت

Drew, H. R. & Calladine, C. R. (1987) Sequence-specific positioning of core histones on an 860 base-pair DNA. Experiment and theory. *J. Mol. Biol.*, **195:** 143–173.

Meersseman, G., Pennings, S. & Bradbury, E. M. (1992) Mobile nucleosomes–a general behaviour. *EMBO J.*, **11:** 2951–2959.

Simpson, R. T., Roth, S. Y., Morse, R. H. *et al*. (1993) Nucleosome positioning and transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **58:** 237–245.

Svaren, J. & Horz, W. (1995) Interplay between nucleosomes and transcription factors at the yeast *PHO5* promoter. *Semin Cell Biol.*, **6:** 177–183.

حساسیت به نوکلئاز و محل های بسیار حساس

Gross, D. S. & Garrard, W. T. (1988) Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Ann. Rev. Biochem.*, **57:** 159–197.

Stalder, J., Larsen, A., Engel, J. D. *et al.* (1980) Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNase I. *Cell*, **20:** 451–460.

دُمین کروماتین، نواحی تنظیمی و مرزها

Bell, A. C. & Felsenfeld, G. (1999) Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9:** 191–198.

Bender, M. A., Bulger, M., Close, J. & Groudine, M. (2000) b-*globin* gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous b-*globin* locus in mice do not require the Locus Control Region. *Mol. Cell*, **5:** 387–393.

Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W. & Crane-Robinson, C. (1994) Core histone hyperacetylation comaps with generalized DNase I sensitivity in the chicken b-globin chromosomal domain. *EMBO J.*, **13:** 1823–1830.

Kellum, R. & Elgin, S. C. R. (1998) Chromatin boundaries: punctuating the genome. *Curr. Biol.*, **8:** R521–524.

Prioleau, M.-N., Nony, P., Simpson, M. & Felsenfeld, G. (1999) An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken b-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.*, **14:** 4035–4048.

Schubeler, D., Francastel, C., Cimbora, D. M. *et al.* (2000) Nuclear localization and histone

www.ShimiPedia.ir

acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human b-globin locus. *Genes Dev.*, **14:** 940–950.
Strouboulis, J., Dillon, N. & Grosveld, F. (1992) Developmental regulation of a complete 70-kb human b-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev.*, **6:** 1857–1864.

دُمین های هسته ای و عمل عوامل دور دست

Bulger, M. & Groudine, M. (1999) Looping vs. linking: towards a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.*, **13:** 2465–2477.
Ferreira, J., Paolella, G., Ramos, C. & Lamond, A. I. (1997) Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J. Cell Biol.*, **139:** 1597–1610

www.ShimiPedia.ir

فصل 7

ارتباط دستگاه نسخه برداری با کروماتین

مقدمه

در شرایط خارجی سلولی می توان نوکلئوزوم ها را به کمک قطعات معینی از DNA و هیستون های خالص شده، تهیه نمود. ادغام برخی از توالی های DNA به عنوان پروموتر یا توالی های خاصی از DNA که پروتئین ها به آن متصلند، برای مطالعه ی نقش نوکلئوزوم ها (یا فاکتورهای متصل به آنها) در عمل نسخه برداری بسیار با ارزش است. اگر یک توالی خاصی از DNA همراه با نوکلئوزوم های آن را داشته باشیم، اکتامر هیستون در جایگاه خاصی از DNA قرار می گیرد. بنابراین یک سیستم ساده در شرایط خارج سلولی خواهیم داشت. با توجه به این که ذرات نوکلئوروم در شرایط داخل سلولی با درجه نظم بالا هستند، بنابراین عملکرد آن در شرایط خارج سلولی تحت عوامل فیزیکی با عملکرد آن در شرایط داخل سلولی به طور جزیی متفاوت خواهد بود. در فصل بعد شرایط پیچیده آزمایشگاهی جهت مدل سازی عوامل زیستی شرح داده خواهد شد.

بررسی اتصال فاکتورهای نسخه برداری در شرایط خارج سلولی

مطالعاتی در خصوص اتصال پروتئین های پیوند شده به DNA با نوکلئوزوم های DNA در شرایط خارج سلولی انجام شده است. در این روش از شیب غلظت نمکی برای اتصال هیستون ها و قطعاتی از DNA که واجد یک یا چند ناحیه اتصال برای پروتئین ها می باشند، استفاده شده است. بدین ترتیب تمام پروتئین ها جهت اتصال با خودشان مخلوط شدند و نوکلئوزوم های تخلیص شده به همراه فاکتورهای مورد نیاز تهیه گردیدند. سپس اتصال آنها در ژل الکتروفورز مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه بر روی ژل الکتروفورز مشاهده شد که نوکلئوزوم های پیوند شده با پروتئین در طول ژل حرکتی آهسته تر از نوکلئوزوم های آزاد (پیوند نشده) دارند. در واقع این پروتئین پیوند شده همان پروتئین مورد نظر است که آن را از روی ژل برداشته و پس از صاف کردن

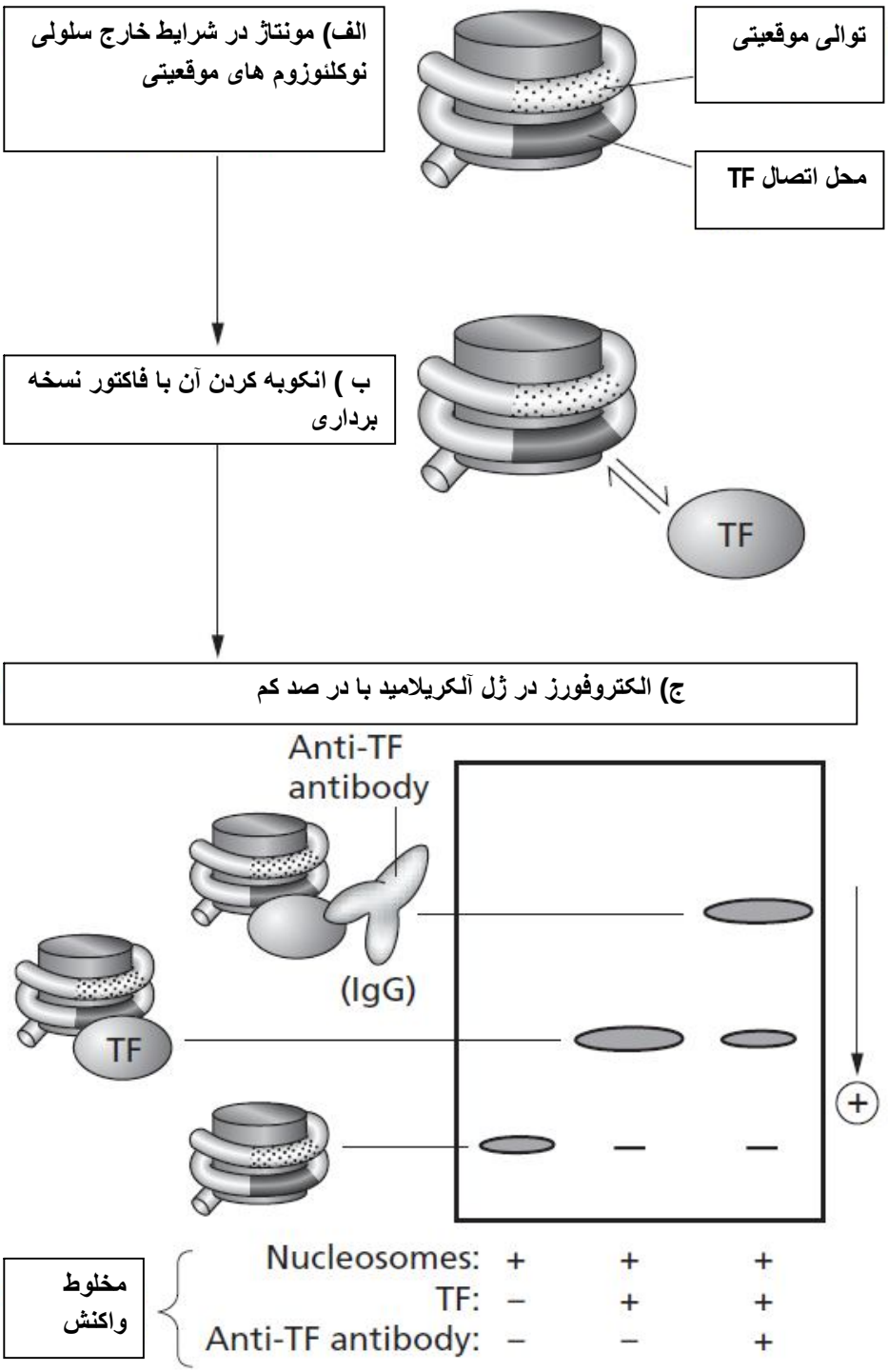
www.ShimiPedia.ir

توسط آنتی بادی ها نشاندار می شود. البته می توان قبل از الکتروفورز، آنتی بادی ها را به نمونه ها اضافه کرد و حرکت آهسته تر آن را بررسی نمود. خلاصه ای از این نتایج را در شکل 7- 1 مشاهده می کنید.

توجه داشته باشید که علی رغم سادگی پدیده فوق، انجام آن با روش های آزمایشگاهی فعلی کمی دشوار است. در ضمن باید قبول کرد که برخی از پروتئین ها، تحت شرایط آزمایشگاهی دچار تغییراتی در رفتارهای اتصالی می شوند. با وجود همه مشکلات ناشی از شرایط آزمایشگاهی، تفسیر سؤالات مطرح شده و بررسی نتایج آنها بسیار ارزشمند خواهد بود.

در ابتدا باید روشن شود که پروتئین های همگن (یا غیر همگن) چگونه به هم متصل می شوند و نوکلئوزوم ها را به وجود می آورند؟ در واقع هیستون های مورد نیاز از بافت ها و سلول های استخراج شده چگونه ایجاد یک مخلوط ناهمگن از ایزوفرم های مختلف می کنند؟ این پروتئین ها طی تغییرات پس ترجمه ای (مانند استیلاسیون) به یکدیگر متصل می شوند. معمولاً از هیستون های نوترکیب جهت بر طرف کردن مشکلات ناشی از تجمع و ساخت کروماتین ها استفاده می شود. سؤال بعدی این است که چه خصوصیاتی در توالی DNA وجود دارد که منجر به بروز وضعیت چرخشی (rotational) یا انتقالی می گردد؟ جهت پاسخگویی باید به روش های مورد استفاده در آزمایش هایی که قبلاً صحبت شد، رجوع کرد. شواهد ناشی از مطالعات انجام شده در خصوص موقعیت نوکلئوزوم در DNA بیان می کنند که موقعیت آنها ثابت نبوده و بین تعداد معدودی از آنها در مناطق خاصی از DNA ، رابطه ای خاصی وجود دارد. در چنین شرایطی با در نظر گرفتن جایگاه خاص برای اتصال، پروتئین های مورد آزمایش به صورت اتفاقی باید محل مناسب را برای اتصال پیدا کنند و سپس متصل شوند. اگر پیوند پروتئین ها پایدار باشد، سطح بالایی از پروتئین های پیوند یافته به صورت نوکلئوزوم در می آیند. بنابراین، چگونه می توان ادعا کرد که پیوند پروتئین ها و ایجاد نوکلئوزوم ها وابسته به شرایط یونی است؟ متأسفانه کروماتین در شرایط خارج سلولی و در محیط یونی پایدار نمی ماند. بنابراین تصور این که در شرایط داخل سلولی چگونه عمل می کند، کمی مشکل است. یکی از عوامل تغییر دهنده ساختار کروماتین، وجود غلظت های مختلفی از کاتیون های دو ظرفیتی است. با وجود تمام مشکلات تکنیکی، نتایج ناشی از آزمایش های خارج سلولی، اطلاعات مهمی از مکانیسم فرایندها در شرایط داخل سلولی در اختیار محققین قرار گرفته است که عبارتند از:

www.ShimiPedia.ir



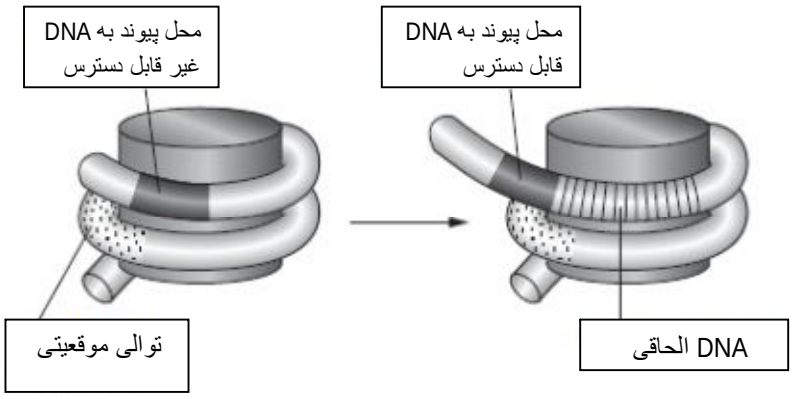
شکل 7- 1 اتصال فاکتورهای نسخه برداری (TF) به DNA نوکلئوزومی را می توان توسط الکتروفورز بررسی نمود.

www.ShimiPedia.ir

1) به طور کل، نوکلئوزوم مانع اتصال پروتئین به DNA می شود. البته در این خصوص استثناهایی وجود دارد، مثلاً فاکتور مهار کننده نسخه برداری NF1 از هر گونه اتصال جلوگیری بعمل می آورد، ولی در مقابل فاکتور فعال کننده نسخه برداری در مخمر یعنی GAL4 باعث برقراری اتصال می گردد.

۲) جایگاه های ترجمه ای و چرخشی در ایجاد پیوندها، مؤثر هستند. موقعیت نوکلئوزوم ها، در مناطق چرخشی و ترجمه ای قابل تغییر می باشد. GAL4 به جایگاه ترجمه ای حساس است و راحتتر به نقاط حاوی DNA و نوکلئوزوم در نزدیک محور مرکزی اتصال می یابد (شکل 7- 2).

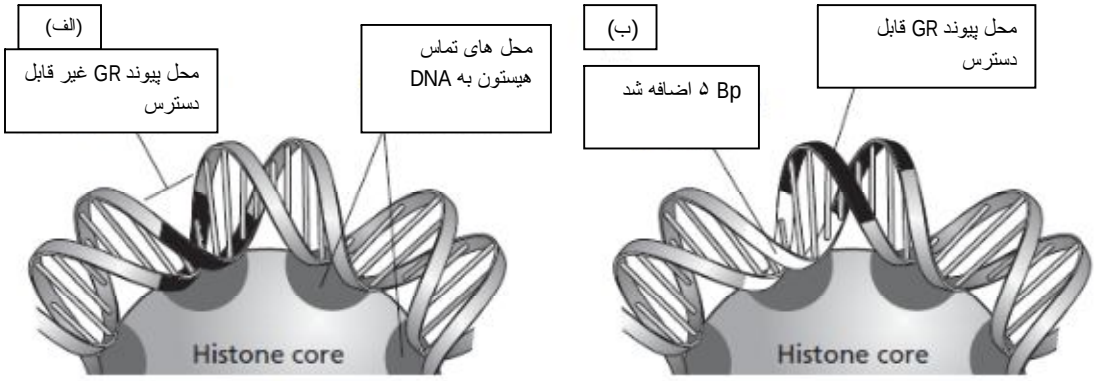
احتمالاً پروتئین هایی که به دو انتهای اکتامر هیستون ها متصلند، راحتتر از DNA جدا می شوند (نسبت به آنهایی که به قسمت وسط اکتامر به DNA وصل شده اند). گیرنده های استروئیدی به جایگاه چرخشی حساس هستند. در این جایگاه ها اتصال، زمانی انجام می شود که عنصر پاسخ دهنده در کنار مارپیچ DNA (دور از هسته هیستون) قرار گرفته باشد. از جمله مثال های واضح، DNA نوکلئازI است (شکل 7-3). در مقابل، فاکتور نسخه برداری NF1 در اثر تحریک نمی تواند به موقعیت های چرخشی یا انتقالی پیوند یابد،



شکل 7- 2 تغییرات ناشی از جایگاه ترجمه ای نوکلئوزوم در DNA می تواند شرایط اتصال فاکتور نسخه برداری را تغییر دهد.

البته مگر این که محل پیوند آن از نوکلئوزوم خارج شود. بنابراین عدم اتصال فاکتور NF1 به DNA ممکن است به علت موقعیت خاصی باشد که نخواهد از اتصال آن ممانعت بعمل آورد.

www.ShimiPedia.ir

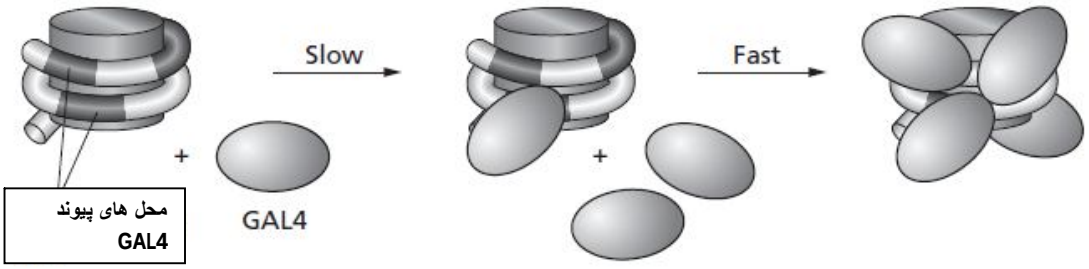


شکل 7- 3 تغییرات ایجاد شده در جایگاه چرخشی DNA نوکلئوزومی می تواند محل اتصال گیرنده های گلوکو کورتیکوئیدی GR (glucocorticoid receptor) را تغییر می دهد. (الف) توالی DNA نسبت به اکتامر هیستون به گونه ای واقع شده است که محل اتصال گیرنده GR به سمت داخل قرار دارد و غیر قابل دسترس برای پروتئین است. (ب) اگر در قسمت جلوی DNA مربوط به جایگاه GR ، 5 جفت باز اضافه کنیم، جایگاه چرخشی دچار تغییر می شود. در این صورت جایگاه GR به سمت بیرون DNA می چرخد. در این حالت ما به سایر توالی های موقعیتی دست نزدیم.

در بیشتر از 20 مورد مشاهده شده است که NF1 تمایل زیادی جهت اتصال به مناطق خاصی از مارپیچ DNA دارد. این تمایل در برخی از موارد غیر ممکن است و این عمل زمانی اتفاق می افتد که سطح DNA مورد نظر توسط پروتئین خاصی اشغال نشده باشد. از این نوع موارد می توان به ناتوانی اتصال نوکلئاز میکروکوکی جهت شکافتن DNA نوکلئوزومی اشاره کرد (شکل 3- 4). در مقابل، پروتئین هایی مثل گیرنده های استروئیدی (قبلاً شرح داده شد) با میل ترکیبی کمتری (یعنی قدرت اتصال ضعیف) به سطح DNA متصل می شوند. این پروتئین ها حتی اگر فقط یک سطح از DNA آزاد باشد، قادر به اتصال می باشند، البته به شرطی که آن سطح از DNA به سمت بیرون باشد.

3) پروتئین ها با تغییر در موقعیت نوکلئوزوم می توانند به اتصال خود کمک نمایند. این رویداد باعث بروز پدیده تعاونی (cooperative) می شود، در نتیجه تسهیل در اتصال پروتین های مشابه به وجود می آید. به عنوان مثال، اتصال یک مولکول GAL4 به نوکلئوزوم (طی پدیده تعاونی) باعث می شود که سایر GAL4 ها راحتتر متصل شوند (شکل 7- 4).

www.ShimiPedia.ir



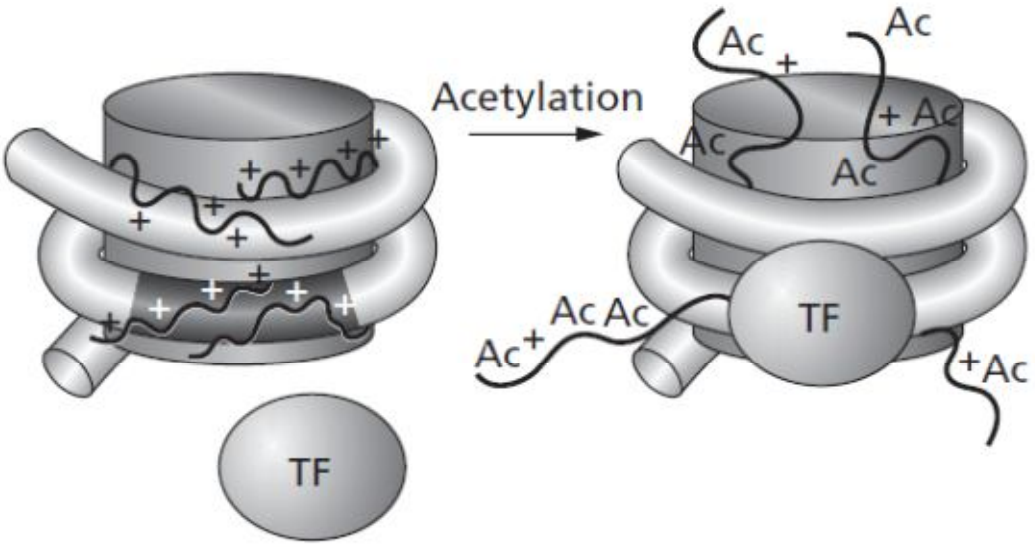
شکل 7- 4 GAL4 طی پدیده تعاونی به چند جایگاه از DNA نوکلئوزومی متصل می شود.

زمانی که همان قطعه DNA بدون پیچش در اطراف نوکلئوزوم مورد آزمایش قرار گیرد، اثر تعاونی رُخ نمی دهد. بنابراین وجود اثر تعاونی در شرایط داخل سلولی توسط پروتئین های تنظیمی، موقعی عمل می کند که چند جایگاه اتصالی پهلوی هم باشند. به برخی از این عوامل تنظیمی مثل عناصر پاسخ دهنده استروئیدی SRE (Steroid Response Element) در پروموترهای وابسته به استروئید مانند ویروس تومور پستان موش اشاره خواهد شد. آزمایش بر روی نوکلئوزومی که DNA آن دارای توالی GAL4 و فاکتور نسخه برداری مستقل (مانند فاکتور NF- kB پستانداران) بود، انجام شد. از این آزمایش معلوم شد که اثر تعاونی در تمام آنها صورت می گیرد. با استناد به این نتایج، تفسیر اندرکنش بین پروتئین های ویژه به واسطه اثر تعاونی در شرایط داخل سلولی کمی مشکل شد. به هر حال، اتصال اولین فاکتور به نوکلئوزوم باید به گونه ای موقعیت نوکلئوزوم را تغییر دهد که اتصال سایر پروتئین ها آسان گردد. بنابراین، در چنین شرایطی رُخداد اثر تعاونی متفاوت خواهد شد. شاید بهترین نمونه مطالعه شده در خصوص اثر تعاونی اتصال گیرنده پروتئین λ به سه منطقه مجاور اُپراتور در باکتریوفاژ λ باشد.

4) هر چند اندرکنش بین هیستون ها و DNA ضعیف است، ولی در کل هیستون ها نمی توانند جابجا شوند و جایگزین پیوند پروتئین با DNA نوکلئوزومی گردند. به عنوان مثال، اگر چه اتصال تعدادی از مولکول های GAL4 باعث جدایی سریع هیستون ها از نوکلئوزوم نمی شود ولی وجود رقابت، در اتصال هیستون ها منجر به جایگزینی بهتر نوکلئوزوم ها می شود. این نتیجه گیری با ایجاد تعادل بین هیستون های پیوند شده و پیوند نشده به دست می آید که بعد از مدتی متوجه شدند واکنش به سمت هیستون های پیوند نشده پیش رفت.

www.ShimiPedia.ir

5) حذف انتهای - N هیستون ها (منظور قسمت دُم است) توسط تغییرات بخصوصی در این ناحیه یا ایجاد استیلاسیون باعث می شود که روی پیوند مربوط به فاکتورها اثر بگذارد. دُمین های هیستون ها در انتهای - N در سطح نوکلئوزوم قرار دارند (انتهای – C آنها کوتاه است). بنابراین، حضور آنها در اتصال پروتئین به DNA نوکلئوزومی بسیار مؤثر خواهد بود. شواهد موجود نشان می دهند که اتصال فاکتور نسخه برداری TFIIIA به ژن 5SRNA در زنوپوس (*Xenopus*) و پیوند مولکول GAL4 به جایگاه ویژه می توانند تحت تأثیر دُم های هیستون ها باشند (ممکن است این قسمت از هیستون ها حذف شود یا استیلاسیون در آن رُخ دهد). در هر دو حالت پروتئین ها به نوکلئوزوم هایی که فاقد انتهای - N (دُم) هستند، متصل می شوند یا به قسمتی که در آنها استیلاسیون صورت گرفته وصل می گردند (شکل 7- 5).



شکل 7- 5 استیلاسیون (یا حذف توسط پروتئولیز) دُمین های قسمت دُم در انتهای - N هیستون منجر به تسهیل اتصال فاکتور نسخه برداری (TF) می شود.

نتایج فوق قابل پیش بینی هستند ولی آنچه که مشکل ایجاد می کند این است که یافته های ناشی از TFIIIA قابل تکرار نیستند. شاید فاکتورهایی که مورد استفاده قرار گرفته اند مشکل به وجود می آورند. نقش دُم های هیستونی در اتصال فاکتورهای نسخه برداری نیز مهم است. اما با این چشم انداز، باید خاطر نشان شد که در شرایط داخل سلولی، دُمین دُم ها برای اتصال به سایر پروتئین ها یا نواحی خاصی از DNA تحت فشار قرار می گیرند. آزمایش ها در شرایط خارج سلولی احتمالاً قادر به شرح بسیاری از وقایع واقعی داخل سلولی نمی باشند.

www.ShimiPedia.ir

برخی از اظهارات در خصوص انرژی پیوندی

به طور معمول انرژی مورد نیاز جهت اتصال یک فاکتور نسخه برداری به توالی خاصی از DNA حدود $12- 15\ kcal\ mol^{-1}$ می باشد. البته قدرت این انرژی در مقایسه با انرژی لازم جهت اتصال DNA به هسته هیستون بسیار کم است (شکل 7-5). در محلول نمکی، نیروی الکترو استاتیک حدود $0/1 – 0/15\ kcal\ mol^{-1}$ می باشد (منظور از قدرت DNA : اتصال اکتامر هیستونی به DNA است که به قدرت یونی بسیار حساس است). هر چند ارقام ذکر شده تقریبی هستند ولی بیانگر این است که در هسته هیستونی متصل به 10 جفت باز مربوط به DNA و جابجایی آن با پروتئینی که می خواهد اتصال یابد، نیاز به انرژی قابل ملاحظه ای دارد. اثر تعاونی در GAL4 ممکن است با جدا سازی DNA از هسته نوکلئوزومی همراه شود تا بتواند محل هایی را برای دسترسی به جایگاه های اتصالی برقرار کند. این رویداد ممکن است با اولین اتصال در محل ورود و خروج DNA از نوکلئوزوم شروع شود (در این محل اندرکنش بین هیستون و DNA محدود است).

نوکلئوزوم B ویروس تومور پستان موش نمونه ای از نوکلئوزوم فشرده

پروموتر ویروس تومور پستان موش MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) یک مدل مناسب برای مطالعه اتصال فاکتورهای نسخه برداری مختلف به کروماتین است. نسخه های متعددی از ژنوم MMTV می تواند به DNA گونه های مختلفی از موش ها متصل شود. ژنوم MMTV در ابتدا عناصر کنترل کننده نسخه برداری را از میزبان گرفته و شروع به تنظیم نسخه برداری ژن های خود می کند. یک توالی طویل در فرادست ژن وجود دارد که باعث تکرار MMTV می شود و دارای جایگاه هایی برای اتصال فاکتورهای نسخه برداری مختلف از یوکاریوت ها با عناصر پاسخ دهند استروئیدی (SRE) می باشد. این جایگاه ها، اتصال لیگاند به گیرنده های هورمون های استروئیدی را انجام می دهند. بنابراین، ژن های ویروس فقط در حضور هورمون های استروئیدی یا در حضور سلول هایی با محتویات گیرنده های هورمون استروئیدی بیان می شوند. از DNA تخلیص شده ویروس MMTV می توان به عنوان مدلی جهت مطالعه عملکرد عناصر دخیل در پاسخ به هورمون های پستانداران استفاده نمود.

جایگاه های اتصال فاکتورهای نسخه برداری در شکل 7-6 نشان داده شده است. چهار جایگاه اتصال برای گیرنده هورمون های استروئیدی (SR) (موتیف TGTCT) و دو جایگاه اتصال برای فاکتورهای نسخه برداری OCT1 و NF1 وجود دارند. تمام

www.ShimiPedia.ir

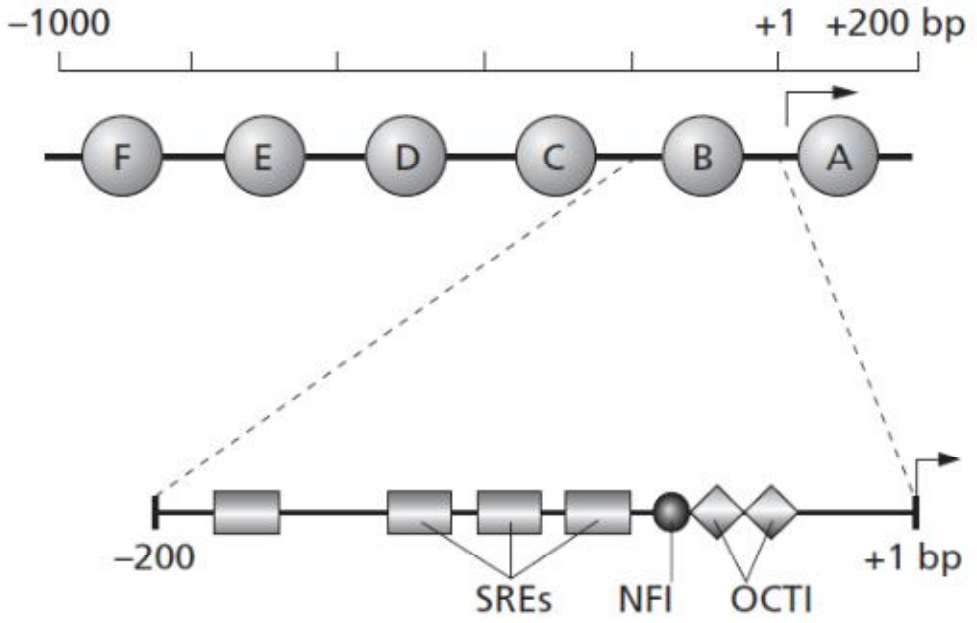
این فاکتورها برای حداکثر عملکرد نسخه برداری باید به جایگاه های اتصال خود متصل شوند. بروز جهش در هر کدام از این جایگاه ها به طور عمده باعث کاهش نسخه برداری می گردد. استوکیومتری دقیق برای اتصال گیرنده هورمون های استروئیدی (SRE) نا مشخص است. موتیف متقارن TGTTCTnnnAGAAGA به همراه بازهای مجاور خود به گیرنده گلوکو کورتیکوئید (به صورت کمپلکس هورمون- گیرنده) به طور همودیمر متصل می شود. برخی از جایگاه ها به اعضای دیگر گیرنده های هورمون های استروئیدی همان خانواده متصل می شوند که آنها را نیز تحت ابرخانواده SRE ها می شناسند.

هضم نوکلئازی روش های شرح داده شده در فصل قبل نشان می دهد که در شرایط داخل سلولی، پروموتر MMTV دارای شش نوکلئوزوم است (شکل 7- 6) . یکی از آنها، نوکلئوزوم B است که شامل چهار جایگاه SRE و NF1 و احتمالاً یکی از دو جایگاه OCT1 می باشد.

جعبه TATA داخل و نزدیک نوکلئوزوم A قرار گرفته است. تمام این جایگاه ها در ژن MMTV در یک کروموزوم یا پلاسمید میزبان قابل مشاهده می باشد. در شرایط خارج سلولی جایگاه های مشابه ای از قطعات استفاده شده MMTV باعث شده است که احتمالاً پیام رسان موقعیتی باشند که در توالی DNA قرار دارند. هنوز به طور قطعی عمل پیام رسانی یا چگونگی سازماندهی آنها در کروماتین شناخته نشده است.

مطالعات اخیر بر روی پیوندهای نوکلئوزوم نشان می دهند که وقتی توالی مربوط به گیرنده گلوکو کورتیکوئید (GR) داخل یک نوکلئوزوم می شود، مقدار گیرنده کاهش می یابد، در ضمن پیوند NF1 به آن نیز حذف می شود. به همین دلیل فقط نوکلئوزوم B

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 6 موقعیت نوکلئوزوم ها در طول پروموتر ویروس تومور پستان موش (MMTV). نوکلئوزوم A باعث محو کردن جایگاه شروع نسخه برداری شد. نوکلئوزوم B حاوی چهار عنصر پاسخ دهنده استروئیدی (SRE) است. این توالی توسط پروتئین های گیرنده گلوکو کورتیکوئید (یا پروژسترون) شناسایی می شوند که همراه آنها محل های NF1 و OCT1 نیز وجود دارند.

تأثیر به سزایی در بیان ژن (به واسطه پروموتر MMTV) خواهد داشت. در شرایط خارج سلولی جایگاه چرخشی DNA نوکلئوزومی یک جایگاه حیاتی است. بنابراین، وقتی توالی قابل تشخیص توسط GR در داخل مارپیچ DNA (یعنی چسبیده به سطح نوکلئوزوم) باشد، اتصال آن خیلی کمتر از موقعی است که در قسمت بیرون واقع شده باشد (شکل 7- 3). این نتایج بیانگر مکانیسمی است که تأثیر کروماتین را در عمل نسخه برداری نشان می دهد یعنی تغییر در جایگاه نوکلئوزوم باعث تغییر جایگاه چرخشی فاکتورها می گردد. نوکلئوزوم B در شرایط داخل سلولی اغلب در موقعیت خاصی قرار دارد، بدین ترتیب که دو SRE (II و III) در داخل نوکلئوزوم قرار دارد و در دسترس نمی باشد و دو نوع دیگر آن در سطح خارجی نوکلئوزوم واقع شده اند.

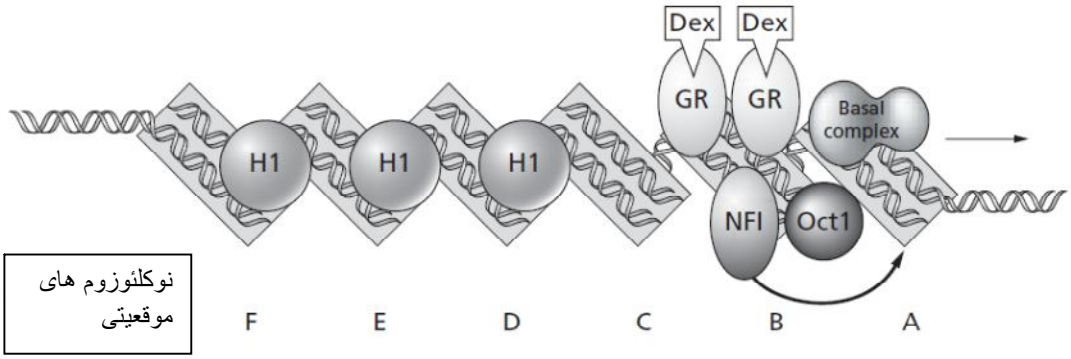
www.ShimiPedia.ir

دومین نتیجه حاصل از مطالعات ژن MMTV این است که اتصال GR باعث تسهیل اتصال دو فاکتور دیگر یعنی NF1 (که به خودی خود نمی تواند متصل شود) و OCT1 می شود (که باعث فشردگی نوکلئوزوم همراه با فاکتورهای پیوند شده می گردد). مطالعات خارج سلولی نشان می دهند که تمام این فاکتورها نمی توانند به طور همزمان به DNA برهنه (naked DNA) متصل شوند (شکل 7- 7). هر چند اطلاعات دقیقی از جابجایی فاکتورهای مختلف یا استوکیومتری آنها نداریم، ولی معلوم شده است که هیستون ها جابجا نمی شوند، زیرا این نوکلئوزوم ها به صورت بسیار فشرده قرار دارند و در محلی نزدیک به محور ساختار ایجاد شده، معلوم شد که حساس به نوکلئاز (جایگاه DNase با حساسیت بالا) می باشد. احتمالاً این محل ها باید همان جایگاه هایی باشند که توسط گیرنده های استروئیدی اشغال شدند، در نتیجه باعث می شوند که نوکلئوزوم ها به صورت آزاد در آیند. هر چند که شواهد قطعی در این خصوص وجود ندارد.

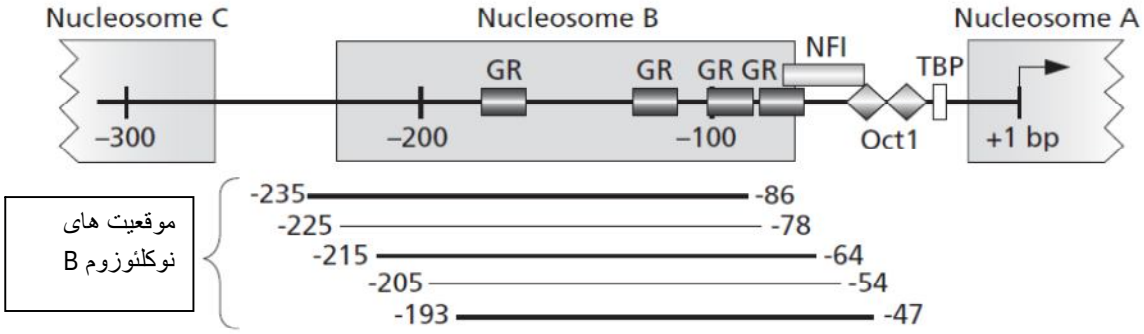
این سؤال مطرح می شود که آیا باز سازی کروماتین به همراه پیوند لیگاند متصل شده به GR با کمک اتصال فاکتورهای مختلف نسخه برداری به نوکلئوزوم B انجام می شود یا نه؟ ممکن است برخی از آنزیم ها مانند هیستون استیلازها که قابلیت باز سازی کروماتین را دارند، کمک کنند تا کروماتین تغییر نماید.

ژن MMTV دارای پیچیدگی بسیاری است و برخی از اطلاعاتی که در سال های اخیر به دست آمده با آنچه که قبلاً شناخته شده بود، تفاوت کرد (شکل 7- 8). به کمک روش هضم نوکلئازی بر روی کروماتین تثبیت شده با فرمالدهید، قطعات منو نوکلئوزومی توسط پرایمر شناسایی شدند. نتایج حاصل از این روش نشان می دهد که نوکلئوزوم B دارای سه جایگاه مشترک است که با فواصل 50 جفت باز از یکدیگر قرار گرفته اند. نکته جالب این است که جایگاه های مناسب برای اتصال در فواصل حدود 10 جفت باز (یعنی یک پیچ کامل از مارپیچ DNA) واقع شده اند که این امر باعث حفظ وضعیت چرخشی رشته DNA می گردد (جایگاه های نوکلئوزوم B در شکل 7- 8 نشان داده شده است).

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 7 فعال سازی پروموتر MMTV در نقاطی از DNA که توسط نوکلئوزوم های A و B اشغال شدند باعث اتصال چند فاکتور نسخه برداری به آنها می شود. تجمع فاکتورهای نسخه برداری منجر به بروز تغییرات عمده در ساختار نوکلئوزوم و پدیدار شدن جایگاه های حساس به من DNaseI می گردد. اما احتمالاً باعث تغییر مکان هیستون های اکتامر نمی شود.



شکل 7- 8 نوکلئوزوم B دارای جایگاه هایی بر روی پروموتر MMTV است که نسبت به سایر جایگاه ها ارجهیت دارد. خطوط تیره معرف جایگاه های اصلی و خطوط نازکتر نشانگر جایگاه هایی است که کمتر استفاده می شوند. توجه داشته باشید، جایگاه ها با فواصل 10 جفت باز واقع شده اند و بر این اساس وضعیت چرخشی DNA نوکلئوزومی دچار تغییر نمی شود.

www.ShimiPedia.ir

پس از تجزیه و تحلیل آزمایش های مربوط به اتصالات متقاطع کروماتین با استفاده از فرمالدهید در شرایط داخل سلولی، چندین محل قابل تشخیص بود و اختلاف قابل ملاحظه ای بین نوکلئوزوم ها وجود نداشت. این نتایج در شرایط خارج سلولی قابل تحث نیست. به هر حال، در شرایط داخل سلولی احتمالاً نوکلئوزوم ها به صورت محصر به فرد داخل سلول قرار می گیرند و طی تکثیر کروماتین به نسل های بعد انتقال می یابند. اگر سلول های کشت داده شده حاوی کروموزوم هایی با MMTV باشند و با گلوکو کورتیکوئید تیمار داده شوند، فقط در 15 تا 20 درصد آنها نسخه برداری از پروموتر MMTV شروع شد. این امر در تضاد با سایر پروموترهای تنظیم شده توسط نوکلئوزوم های موقعیتی است. در سلول های مخمر با القای ژن PHO5 (در محیطی که P_i کم است) مشاهده شد که در 95 تا 100 در صد از سلول ها بیان ژن PHO5 صورت گرفت. احتمالاً بیان یا عدم بیان ژن MMTV در سلول ها نشانگر بازتاب های مختلف نوکلئوزوم های موقعیتی در سراسر پروموتر MMTV است. شاید در شرایط داخل سلولی فقط برخی از جایگاه ها اجازه نسخه برداری دارند.

با توجه به نتایج فوق، از فعالیت پروموتر MMTV این سؤال مطرح می شود که چرا بیان ژن PHO5 در مخمر پیچیده است؟ علت این پیچیدگی دخالت هورمون های استروئیدی جهت بیان ژن می باشد، زیرا هورمون های استروئیدی اثرات فیزیولوژی چندگانه بر سلول های هدف و بیان ژن دارند. همچنین افزایش بیان ژن توسط گیرنده های استروئیدی اغلب به صورت گذرا و با اتصال به لیگاند انجام می شود. روشن یا خاموش بودن ژن بستگی به وضعیت پروموتر MMTV دارد. زمانی که سلول ها واجد کروموزوم یا اپی زوم (episome) MMTV هستند و تحت گیرنده های هورمون های استروئیدی قرار می گیرند، فعالیت نسخه برداری پروموتر MMTV یک ساعت طول می کشد. بر این اساس بازده نسخه برداری طی 24 ساعت در حضور هورمون به سطح پایه (حد نرمال) می رسد. در سلولی که واجد پروموتر موقت MMTV (بدون سازماندهی نوکلئوزوم) است، در حضور هورمون و گیرنده های پروتئینی بیان ژن نامحدود می گردد. این یافته ها نشان می دهند که کروماتین هنگام نسخه برداری از لحاظ فیزیولوژیکی نیز می تواند ممانعت ایجاد کند. همچنین شایان ذکر است که پروموتر MMTV علاوه بر هورمون های گلوکو کورتیکوئید به ترکیباتی چون آندروژن (androgen) ، مینرالو کورتیکوئید (mineralocorticoid) و ..... نیز پاسخ می دهد. برخی از گیرنده ها به این هورمون ها متصل می شوند و آنها به موتیف مشابه ای با توالی TGTTCT قابلیت اتصال دارند (مثل گیرنده گلوکو کورتیکوئید). احتمالاً کروماتین در تعیین پاسخ به گیرنده های هورمون های مختلف در سلول ها نقش دارد.

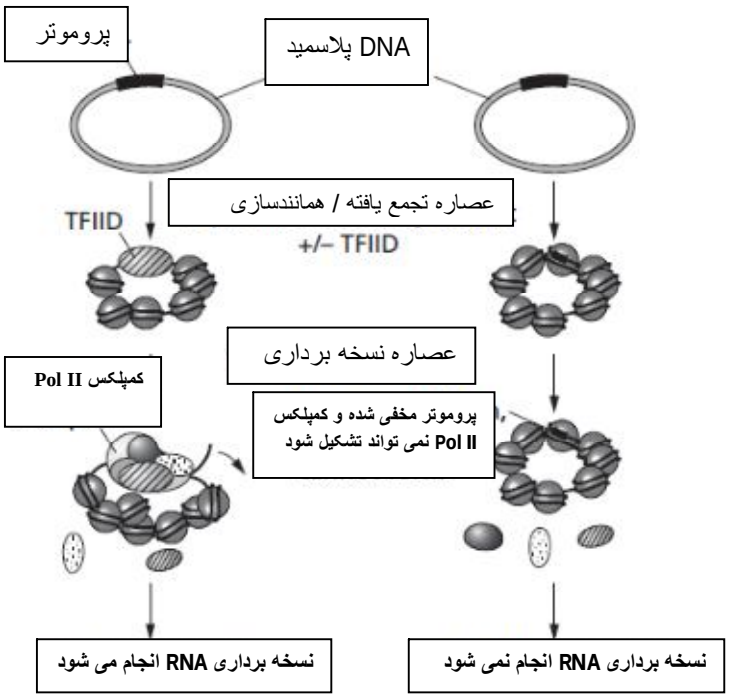
www.ShimiPedia.ir

عملیات موجود در خصوص چگونگی توزیع عوامل سرکوبگر کروماتین

به طور کل در شرایط داخل سلولی سه در شروع فرایند نسخه برداری دخالت دارند که ممکن است هر یک از آنها انجام عمل نسخه برداری را مهار کنند یا باعث تغییراتی در کروماتین گردند. اول این که آیا در محل مورد نظر روی DNA ، نوکلئوزوم متصل است یا نه؟ برای تشخیص این محل از روش حساسیت بسیار زیاد به DNaseI استفاده می شود. دوم اطمینان یافتن از وجود مکانیسم های آنزیمی ویژه و مؤثر در بازسازی کروماتین (این مکانیسم ها در فصل 8 شرح داده می شود). سوم باید زمان کافی جهت اتصال DNA به هیستون (در شرایط طبیعی) و جدا شدن آن در مدت کوتاهی پی از عمل چرخه سلولی وجود داشته باشد (یعنی این اعمال در زمان کوتاهی پس از همانند سازی DNA رخ دهند). اگر از این مکانیسم در شرایط داخل سلولی استفاده شود، فاکتورهای نسخه برداری که طی همانند سازی به DNA متصل می شوند باید تا فرایند بعدی ساخت کروماتین به آن متصل بمانند. این مکانیسم را می توان در شرایط خارج سلولی مورد آزمایش قرار داد.

جهت انجا آزمایش های مربوط به کروماتین در شرایط خارج سلولی ، تخلیص کروماتین توسط روش دیالیز با استفاده از شیب نمک انجام می شود. در این روش، کروماتین تجمع یافته و از سایر ترکیبات جدا می شود. غلظت بالای نمک باعث مهار اتصال فاکتورهای نسخه برداری می گردد. بنابراین، غلظت مناسب نمک باعث برقراری اتصال فاکتور TF می شود. برای حل این مشکل دانشمندان مطالعات خود را در شرایطی شبیه به شرایط فیزیولوژیکی انجام دادند در نتیجه تجمع کروماتین به راحتی صورت گرفت. این عصاره از تخم یا اووسیت زنوپوس که حاوی تمام ترکیبات از جمله هیستون ها و ترکیبات لازم جهت پیچش سریع DNA و مونتاژ کروماتین می باشد. البته می توان این عصاره را از جنین دروزوفیلا نیز استخراج نمود که حاوی ترکیبات لازم برای همانند سازی، تجمع کروماتین و سایر فاکتورهای نسخه برداری است. DNA پلاسمید افزوده شده به جنین عصاره ها در کروماتین سازماندهی می شود (به طوری که از نوکلئوزوم های موجود در کروماتین قابل تشخیص نمی باشند). در زمان افزودن DNA پلاسمید ، اگر فاکتور نسخه برداری نیز اضافه شود، این فاکتور جهت اتصال به DNA با هیستون ها رقابت می کند و موجب کاهش مهار می گردد (این مطالب به طور شماتیک در شکل 7- 9 مشاهده می شود).

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 9 فرایند نسخه برداری می تواند با تجمع کروماتین و حضور فاکتور نسخه برداری TFIID فعال شود.

آزمایش نشان داده است که پلاسمید حامل ادنو ویروس(adenovirus) به عنوان یک مدل آزمایشگاهی حاوی پروموتر تأخیری (late promoter) و Pol II به همراه یک جعبه TATA می باشد. نشان دار کردن UTP توسط مواد رادیو اکتیو نشان داد که اتصال TATA به کمپلکس TFIID و عناصر TBP هنگام ساخت کروماتین به طور مؤثر باعث کاهش مهار نسخه برداری در شرایط خارج سلولی می گردد. در نتیجه ای مشابه دیده شد که پروموتر Pol III بدون نیاز به جعبه TATA باعث کاهش مهار در نسخه برداری می شود. به عنوان مثال می توان به ژن RNA ریبوزومی 5S اشاره نمودکه نسخه برداری آن نیاز مبرم به پروموتر PolIII دارد. Pol III شامل سه فاکتور TFIIIA ، TFIIIB و TFIIIC می باشد. فاکتور TFIIIA وقتی به تنهایی به DNA متصل شود قادر به مهار نسخه برداری کروماتین نیست. همچنین نسخه برداری بتا- گلوبین جوجه فاقد جعبه TATA است و نیاز مبرم به دو فاکتور نسخه برداری ویژه اریتروئید به نام های GALA-1 و NF- E4 دارد.

اکثر آزمایش های مربوط به سازماندهی کروماتین به کمک روش ها و عصاره های فوق الذکر امکان پذیر است. در برخی از روش ها دو نقش اساسی پیشنهاد می شود: اول این که ماشین نسخه برداری قادر نیست به تنهایی از پروموتر موجود در کروماتین

www.ShimiPedia.ir

بسته بندی شده جهت شروع نسخه برداری استفاده نماید. دوم این که اتصال و ادغام فاکتورهایی مانند TBP و یا سایر فاکتورها با مهار عوامل ساخت کروماتین شروع نسخه برداری را تسهیل می بخشند. این مسأله در مطالعه مکانیسم ها در شرایط خارج سلولی بسیار مهم است، چون علاوه بر کد گذاری پروموترهای خاص (جهت نسخه برداری طی تکثیر DNA) قادر است به طور بالقوه انرژی لازم را جهت تکثیر های بعدی DNA و سازماندهی کروماتین فراهم سازد.

کروماتین استخراج شده از دروزوفیلا و زنوپوس به طور طبیعی فاقد هیستون H1 است، بنابراین عدم تجمع کروماتین به علت این است که ذرات هسته نوکلئوزوم به صورت مجزا از یکدیگر قرار دارند. هیستون H1 یک ترکیب مهم کروماتینی در سلول های بالغ است که نمونه ای مناسب جهت تأثیر آن روی تجمع کروماتین و فرایند نسخه برداری در شرایط خارج سلولی می باشد. به طور کل، آزمایش ها نشان می دهند که هیستون H1 باعث مهار نسخه برداری می شود. یافته های به دست آمده کمی تعجب آور است چون همانطور که در فصل 3 گفته شد، هیستون H1 نقش اساسی در بسته بندی کروماتین و ایجاد ساختاری با درجه نظم بالاتر دارد. برخی از مطالعات انجام شده نیز اظهار می کنند که هیستون H1 در فرایند نسخه برداری (احتمالاً با قدرت مهاری) نقش مهمی ایفا می کند. تأثیر دو گانه هیستون H1 بیان می کند که جهت بررسی چنین کمپلکسی در شرایط خارج سلولی باید از عوامل متنوعی استفاده نمود تا بتوان نتیجه مؤثری به دست آورد. به عنوان مثال غلظت نوکلئوزوم های موجود در پلاسمید (که واجد فضاهای بین نوکلئوزومی می باشد) در اثر تغییرات ناشی از هیستون ها (مانند استیلاسیون) و مقادیر مختلفی از پروتئین های غیر هیستونی تنظیم می گردد. بنابراین، تمام این موارد در فرایند نسخه برداری مؤثر هستند.

نوکلئوزوم ها به ندرت باعث افزایش نسخه برداری می شوند

درک مکانیسم های کروماتین که باعث مهار نسخه برداری می شوند خیلی مهم است. شواهد قوی وجود دارد که نشان می دهند رویداد مهار نسخه برداری نباید یک امر معمول باشد. با این حال آزمایش های انجام شده بر روی کروماتین (مخصوصاً نوکلئوزوم ها) بیان می کند که نوکلئوزوم به طور قاطع باعث افزایش نسخه برداری می گردد. سارا الجین (Sarah Elgin) و همکارانش برای اولین بار جزئیات نوکلئوزوم را در منطقه فرادست ژن شوک حرارتی hsp26 در دروزوفیلا مورد بررسی قرار دادند. این ناحیه نوکلئوزومی بین دو جایگاه فوق العاده حساس به DNaseI با طولی حدود 300 bp قرار گرفته است. این نواحی شامل توالی از DNA متصل شده به فاکتور شوک حرارتی (HSF) می باشد. HSF یک پروتئین ضروری جهت تنظیم سریع ژن شوک حرارتی در پاسخ به استرس است (شکل 7- 10). این ناحیه نوکلئوزومی باعث نزدیک کردن دو دسته ژن SHF به

www.ShimiPedia.ir

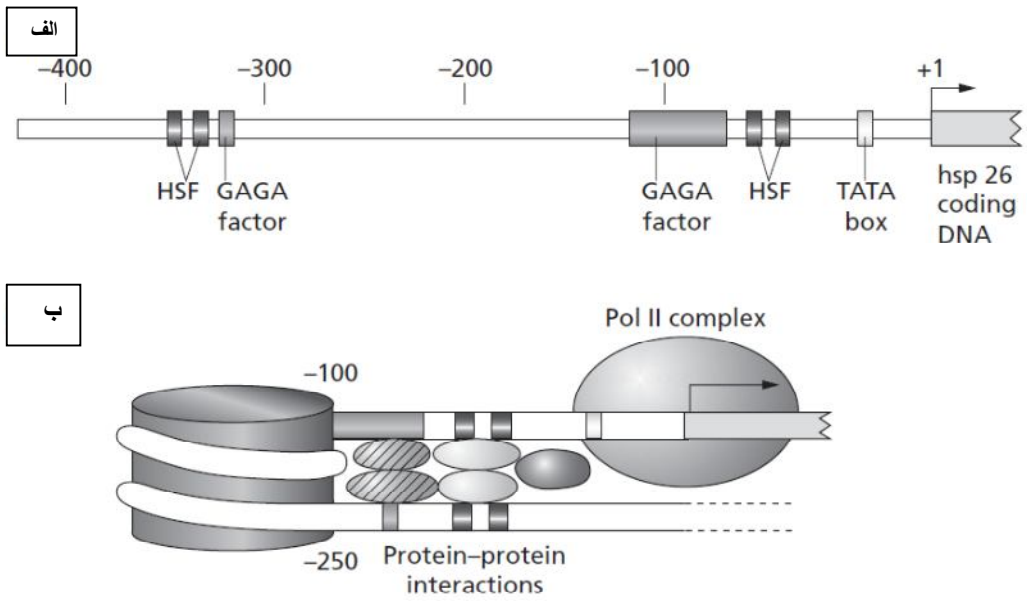
یکدیگر می شود (با ایجاد اندرکنش های پروتئین- پروتئین و برقراری اتصالات هم آرایی). این ناحیه جهت ایجاد پیوند نه تنها به توالی DNA وابسته است بلکه نیاز مبرم به فاکتور GAGA دارد. به نظر می رسد فاکتور GAGA نقش مهمی در این نواحی نوکلئوزومی ایفا می کند. از مثال های دیگر در خصوص تأثیر مثبت نوکلئوزوم بر نسخه برداری در شرایط خارج سلولی می توان به مطالعه ژن ویتلوژنین (vitellogenin) در زنوپوس اشاره کرد. در این ژن ، DNA به صورت حلقه در آمده تا بتواند باعث نزدیک کردن پروموتر تقویت کننده شود (با طولی حدود 300 bp در ناحیه فرادست جایگاه شروع نسخه برداری)، جعبه TATA جایگاه های اتصال پروتئین های مجاور ، بهم نزدیک می شوند. نسخه برداری توسط نوکلئوزوم موقعیتی در مقایسه با DNA برهنه (فاقد نوکلئوزوم) حدود 10 تا 20 برابر افزایش می یابد. در مقابل، کروماتین های غیر اختصاصی (یعنی فاقد نوکلئوزوم موقعیتی) به شدت اثر مهاری بر نسخه برداری دارند.

فرصت های موجود برای همانندسازی DNA

در چرخه های سلولی که معمولاً DNA به صورت بسته بندی شده قرار دارد وقتی همانند سازی انجام می شود مسلم از که ساختار کروماتین باید از حالت مونتاژشده خارج شود. برای انجام عمل همانند سازی برای زمان کوتاهی ، قسمت کوچکی از DNA باید از حالت پیچ خورده خارج شود و ساختار نوکلئوزوم ها بهم می خورد. سلول هایی که در این دوره زمانی هستند، هم برای عمل نسخه برداری و هم برای همانندسازی باید ساختار نوکلئوزوم ها تغییر کنند و بعد از انجام اعمال فوق مجدداً به حالت اولیه برگردند.برخی از آزمایش های قبلی مکانیسمی را پیشنهاد می کند که اکثر ترکیبات دخیل در شروع نسخه برداری مانع سازماندهی کروماتین می شوند.

همانندسازی DNA فقط در فاز- S چرخه سلولی انجام می شود. بعد از فاز- S (یعنی فازهای G1 و G2 و تقسیم میتوز)، DNA فقط سنتز می شود که مربوط به مراحل حذف و جایگزینی بازها در DNA آسیب دیده توسط ماشین ترمیم است. شروع همانندسازی در جایگاه ویژه ای به نام نواحی شروع همانندسازی OR (origins of replication) انجام می شود. البته ابهاماتی در مورد این که

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 10 قرار گیری جایگاه های اتصال پروتئین روی DNA توسط نوکلئوزوم موقعیتی که باعث اندرکنش های پروتئین- پروتئین و شروع نسخه برداری می شوند. نسخه برداری ژن شوک حرارتی shp26 توسط چندین جایگاه اتصال در ناحیه فرادست برای فاکتور شوک حرارتی (HSF) و فاکتور GAGA تنظیم می گردد. اتصال این پروتئین ها به DNA طی اندرکنش پروتئین- پروتئین راحتتر می شود. در حالیکه دُخداد این پدیده در فاصله بین دو جایگاه از DNA آزاد بسیار مشکل است. (الف) به هر حال، قرار گرفتن یک نوکلئوزوم در این جایگاه ها که در شکل (ب) نشان داده شده است، باعث همجواری اتصال با DNA و خروج یا حذف نوکلئوزوم و ایجاد یک کمپلکس پروتئینی می گردد. این کمپلکس پروتئینی به نوبه خود خود باعث پیشبرد فرایند نسخه برداری و اتصال TBP می شود.

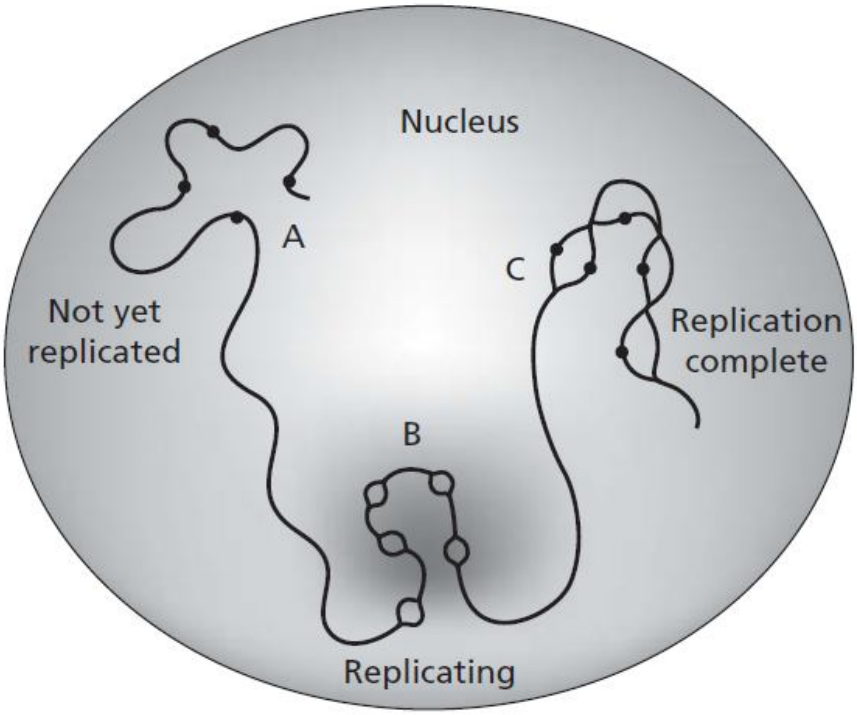
چگونه چند قطعه از DNA نواحی شروع را تعیین می کنند، هنوز وجود دارد. در کل هر دو عامل یعنی عناصر توالی DNA و نحوه بسته بندی DNA در این فرایند دخالت دارند. معمولاً چندین هزار منطقه OR در یک سلول وجود دارند که با فواصل kb 100 در ژنوم پراکنده اند. همانندسازی در زمان های مختلفی از فاز- S چرخه سلولی در مراکز OR شروع می شود. با شروع فعالیت در OR قابلیت همانندسازی یوکروماتین به سرعت افزایش می یابد و همانندسازی زودرس (replicate early) انجام می شود، سپس به دنبال آن هتروکروماتین همانندسازی تأخیری را انجام می دهد. به نظر می رسد که یک محل شروع یعنی OR نمی تواند همانندسازی را به طور مستقل تنظیم کند، لذا به صورت واحدهای گروهی شامل 20 تا 80 محل شروع (OR) می شوند، عمل می کنند. مشاهدات میکروسکپی نشان می دهند که این واحدها داخل هسته از لحاظ فیزیکی در جایگاه های ویژه ای تجمع

www.ShimiPedia.ir

می یابند (شکل 7- 11). شروع همانند سازی در یک واحد در زمان مشخص انجام می شود و در فاز- S واحدهای مختلف در زمان های متفاوت این اعمال را آغاز می کنند. این نتایج ناشی از تغییرات منطقه ای در ژنوم است. بررسی نتایج فوق با تغییر محیط کشت سلول ها و پیشبرد مراحلی مشابه (با تغییرات جزیی) پس از نشاندار کردن پیش سازهای DNA (فقط برای چند دقیقه) در زمان های مختلف از فاز – S چرخه سلولی انجام می شود. نشاندار کردن DNA هنگام همانند سازی (یعنی اضافه کردن نوکلئوتیدهای نشاندار) باعث می شود پیشرفت عمل همانند سازی مورد بررسی قرار گیرد. سلول های نشاندار شده وارد مرحله بعدی چرخه سلولی یعنی متافاز می شوند. حال می توان کروموزوم ها را خالص کرد و توالی نشاندار شده را تعیین نمود. این مطالعات نشان دادند که نواحی غیر کد شونده در هتروکروماتین مهار می شوند و در فاز- S به تأخیر می افتند. نواحی خاصی به نام G- band که غنی از بازهای AT هستند معمولاً پس از نواحی R- band که غنی از بازهای GC می باشند، همانند سازی را انجام می دهند.

سیر تکاملی سلول ها در مراحل مشخصی از تمایز بستگی به عوامل مختلف دارد که این عوامل می توانند همانند سازی DNA یا تقسیم سلولی باشند. چرخه سلولی به سلول ها این اجازه را می دهد که الگوهای بیان ژن که مراحل مختلفی دارد، مشخص نماید. این پیچیدگی ها و تغییراتی که جهت هماهنگی با آنها به وجود می آیند توسط پیام هایی که از سلول های مجاور ارسال می گردند، ایجاد می شوند. پیام ها ممکن است توسط هورمون های در حال گردش یا برنامه های اندوژنی باشند. برخی از تغییرات در ساختارهای کروماتین به وجود می آیند. برای مثال، خاموش کردن تکاملی و تنظیم ژن های همئوتیک (homeotic genes) در لارو دروزوفیلا است که احتمالاً این تنظیم منجر به گسترش پیشرفته سرکوب کروماتین در یک کمپلکس چند ژنی شده است. تغییرات ایجاد شده در سلول ها از یک شکل به شکل دیگر طی تمایز سلولی و تکامل، مربوط به تغییرات بیان ژن می باشد که از طریق چرخه سلولی انجام می شود (توجه داشته باشید که مراحل تمایز غیر قابل تفکیک از یکدیگرند). برخی از سلول ها می توانند بدون تمایز و از طریق چرخه سلولی به تکامل برسند ولی استثناهایی برای بعضی از سلول ها وجود دارد و آن این است که در برخی از سلول ها چرخه سلولی دیده نمی شود بنابراین تمایز وجود نخواهد داشت. از این نوع سلول ها می توان به سلول های بنیادی و سلول های کشت داده شده اشاره کرد که در تمام دوران زندگی فقط یک مرتبه تمایز در آنها اتفاق می افتد. هر چند از لحاظ مولکولی اطلاعات چندانی در دسترس نمی باشد. در واقع کشف و فهم چگونگی بروز کمپلکس ها و مکانیسم های ساده نوکلئوزومی در شرایط خارج سلولی و تطبیق آنها با شرایط داخل سلولی بسیار دشوار است. سؤال مطرح شده این است که هنگام نسخه برداری و همانند سازی DNA چگونه نوکلئوزوم ها جدا می شوند و چه مکانیسم هایی دخالت دارند؟

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 11 نواحی شروع همانند سازی در یک مجتمع اتفاق می افتد. در مجتمع A هنوز همانند سازی شروع نشده است. مجتمع B در حال انجام همانند سازی می باشد که توسط برومو داکسی یوریدین یا BrdU (bromodeoxyuridine) زیر میکروسکپ قابل رویت است. همانند سازی در مجتمع C به اتمام رسیده است.

برای پاسخ به این سؤال می توان در خصوص فرایند نسخه برداری و همانند سازی DNA در هسته های مصنوعی در شرایط خارج سلولی مطالعاتی انجام داد.

بحث فعلی این است که مایع سیتوپلاسمی استخراج شده از اووسیت زنوپوس دارای تمام ترکیبات لازم جهت بررسی کروماتین در شرایط خارج سلولی می باشد. ماده استخراج شده نه تنها واجد ترکیبات مایع سیتوپلاسمی است، بلکه حاوی وزیکل های غشایی نیز می باشد. این ساختار غشایی قادر به احاطه کردن DNA است، در واقع ایجاد یک پوشش هسته ای می کند. در چنین شرایطی

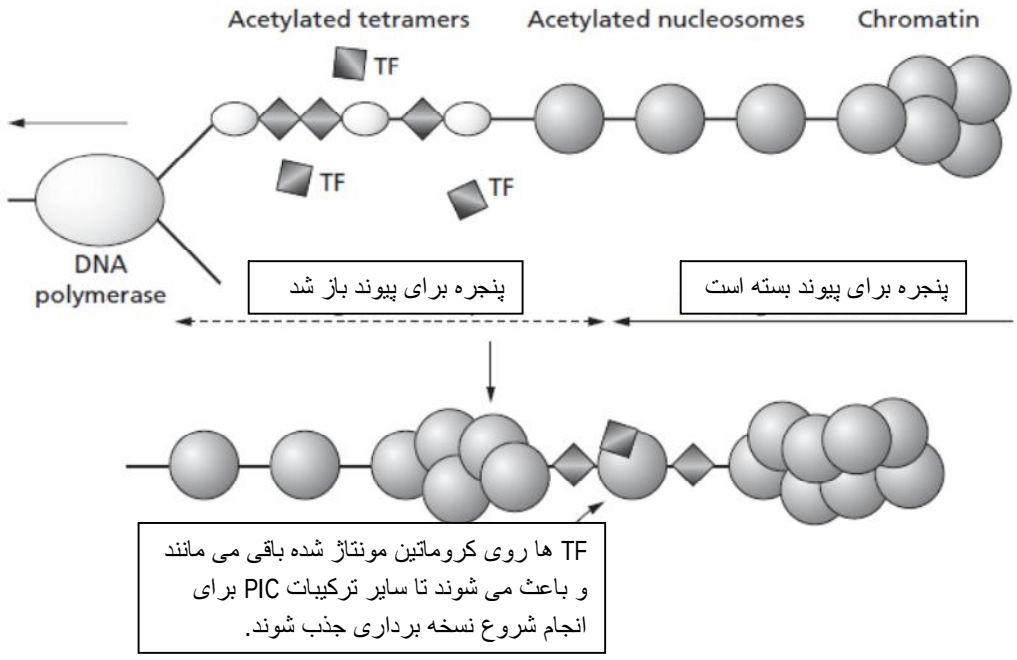
www.ShimiPedia.ir

نوکلئوزوم ها در محل های دقیق خود روی DNA قرار گرفته و همانند سازی انجام می شود. این هسته های مصنوعی مدل های با ارزشی جهت مطالعه رابطه بین همانند سازی DNA ، مونتاژ کروماتین و نسخه برداری از ژن های خاص در اختیار دانشمندان می گذارد. به این DNA می توان یک ژن خاصی اضافه کرد (بدون یا همراه با پروتئین های تنظیمی و فاکتورهای نسخه برداری). به محض این که کروماتین ساخته شود، می توان فعالیت نسخه برداری را آزمایش کرد.

از این رو تحقیقاتی جهت بررسی بیان ژن β^A- گلوبین جوجه فراهم گردید. آزمایش های اولیه بر اساس یافته های قبلی و بر روی ژن های دیگر انجام شد و معلوم گردید که حضور ژن مورد نظر در کروماتین، در غیاب فاکتورهای نسخه برداری باعث غیر فعال شدن فرایند نسخه برداری می گردد. اگر نسخه برداری غیر فعال باشد، ژن بسته بندی شده در کروماتین همانند سازی DNA را انجام می دهد و سپس غیر فعال می شود. این نتایج بیان می کنند که همانند سازی DNA به تنهایی قادر نیست به طور اتوماتیک نسخه برداری در ژنی که قبلاً غیر فعال بود را فعال نماید. به هر حال، پروتئین های استخراج شده از گلبول های قرمز جوجه (به همراه فاکتورهای نسخه برداری) باعث بروز فرایند همانند سازی و سازماندهی کرماتین می گردد. بنابراین، وقتی ترکیبات لازم جهت نسخه برداری اضافه شوند، ژن مربوطه فعال می گردد. همچنین نتایج فوق بیان می کنند که همانند سازی DNA فرصتی برای دسترسی مجدد DNA

به فاکتورهای نسخه برداری و شروع مجدد نسخه برداری از یک ژن را فراهم می سازد (شکل 7- 12). علاوه بر این، همانند سازی DNA به طور اتوماتیک (به تنهایی) قادر به بازگشت نسخه برداری نمی باشد. در ضمن همانند سازی قادر به غیر فعال کردن ژن سازمان یافته در کروماتین نیست (یعنی ژن در کروماتین در حضور فاکتورهای RBC سازماندهی می شود). پاسخ به این سؤال باقی می ماند که آیا حافظه نسخه برداری همراه با فاکتورهای RBC ، قابلیت ادامه نسخه برداری را دارد یا این قابلیت در کانفورماسیون کروماتین بعد از انجام فرایند همانند سازی DNA فراهم می گردد؟ به هر حال، نتایج به دست آمده برای تمام ژن ها و یا فاکتورهای نسخه برداری یکسان نخواهد بود. باید توجه داشت که فاکتورهای نسخه برداری هنگام مونتاژ کروماتین جابجا می شوند و این جابجایی بستگی به میل ترکیبی آنها با هیستون ها دارد. میل ترکیبی فاکتورهای نسخه برداری اختلاف زیادی با یکدیگر دارند و ممکن است بعضی از آنها دو برابر دیگری باشد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 12 مراحل اولیه در پس همانند سازی (postreplication) کروماتین مونتاژ شده فرصتی را برای اتصال فاکتورهای نسخه برداری (TF ها) فراهم می نماید.

کروماتین و مرحله طویل شدن نسخه برداری

نوکلئوزوم ها خودشان می توانند مانعی برای شروع نسخه برداری باشند. برای شروع نسخه برداری اتصال TBP به جعبه TATA در مقایسه با اتصال سایر فاکتورهای نسخه برداری با توالی های مشابه بسیار ضعیف است. آیا حضور نوکلئوزوم ها مانع مهمی برای فعالیت RNA پلیمراز است (منظور بعد از جدا شدن آن از کمپلکس شروع و حرکت در طول DNA می باشد)؟ پلیمراز II یک آنزیم بزرگ با 12 زیر واحد و وزن مولکولی 1 MDa است. این آنزیم زیر مجموعه برخی از فاکتورهای عمومی نسخه برداری می باشد (سایر ترکیبات در پروموتر باقی می مانند، شکل 2- 4). در این شکل، در واقع کمپلکس پلیمرازها کوچک شده و به اندازه نوکلئوزوم ها دیده می شوند (به طوری که وزن مولکولی اکتامر هیستون ها حدود 100 KDa است). به این فرایند از لحاظ انرژتیکی نیز باید توجه کرد، به طوری که جایگزینی کامل اکتامر هیستون ها نیازمند 10 تا 50 Kcal mol^{-1} انرژی می باشد (مقدار آن بستگی به غلظت نمک دارد). این انرژی بسیار با ارزش است زیرا هر نوکلئوتید طی نسخه برداری RNA نیاز به انرژی زیادی (حدود 10 Kcal mol^{-1} در شرایط خارج سلولی دارد). بنابراین جهت نسخه برداری 150 جفت باز از DNA

www.ShimiPedia.ir

متصل به نوکلئوزوم حدود $1500\ Kcal\ mol^{-1}$ انرژی نیاز است (البته این فقط مربوط به RNA می باشد). انرژی سینتیک مورد نیاز در نقشه ماکرومولکول ها هنوز محاسبه نشده است.

آیا اکتامر هیستون ها ارتباطی با آنزیم پلیمراز در نسخه برداری دارد؟ پاسخ به این سؤال در شرایط خارج سلولی "نه" است. با آن که Pol II یا هر RNA پلیمراز پروکاریوتی قادر به انجام نسخه برداری کروماتین در شرایط خارج سلولی می باشد، ولی سرعت نسخه برداری در این حالت بسیار آهسته تر از نسخه برداری در DNA برهنه است. این نتایج نشان می دهند که آنزیم به محض مواجه شدن با نوکلئوزوم ها، متوقف می شود. آزمایش های انجام شده در شرایط خارج سلولی به کمک روش های پیچیده و بسیار گسترده جهت سنجش اندرکنش پروتئین - نوکلئوزوم نشان دادند که پلیمرازها هیچ تبادلاتی با کروماتین ندارند. بنابراین، در شرایط داخل سلولی به کمک سایر فاکتورها، تبادلات صورت می گیرند. اخیراً گروهی از خانواده های پروتئینی تحت عنوان پروتئین های طویل کننده (elongins) و کمپلکس بازسازی کروماتین (remodeling complex) با علامت FACT شناسایی شده اند که در انجام تبادلات دخالت دارند (فصل 8).

در شرایط خارج سلولی پیشرفت نسخه برداری در کروماتین به سختی انجام پذیر است ولی نتایج آن تا حدی مفید می باشد. انجام آزمایش های اولیه توسط گری فلزنفیلد (Gary Felsenfeld) و همکارانش نشان داد که پلیمرازهای ساده پروکاریوتی قادرند قطعات کوچکی از DNA (حدود 200 bp) حول نوکلئوزوم را بدون جدا شدن کامل از اکتامر هیستون، نسخه برداری و سازماندهی نمایند. به عبارت دیگر، پلیمراز به جای این که نوکلئوزوم را کاملاً جابجا کند، ترجیح می دهد که در اطراف آن وارد عملیات خاصی شود. در اینجا سؤالی مطرح می شود که فعالیت پلیمرازهای پروکاریوتی تا چه حد شبیه کمپلکس Pol II است؟ بنابراین، یافته های آزمایشگاهی نشان می دهند که نسخه برداری بدون جابجایی اکتامر صورت می گیرد. باید اشاره کرد که اکتامرها در شرایط یونی ناپایدارند، بهتر این که آنها توسط پلی آنیون ها مانند DNA محافظت شوند.

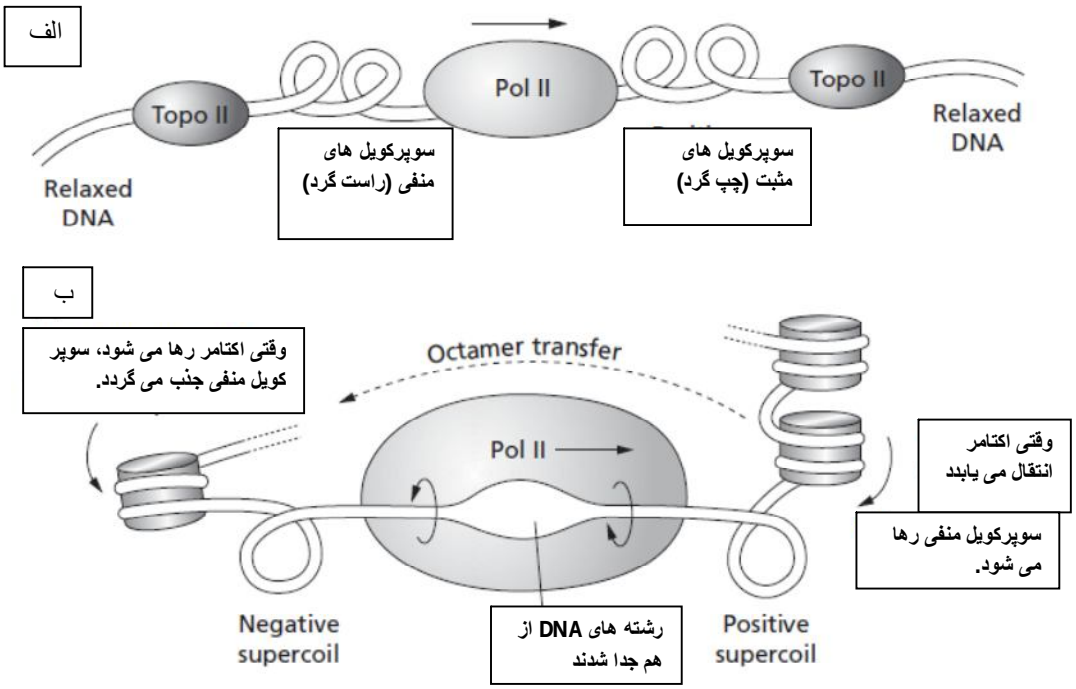
بر این اساس طی نسخه برداری از رشته DNA ، پلیمراز حدود 30 bp از مارپیچ DNA دو رشته ای را از هم باز می کند، مگر این که انتهای DNA به طور آزاد پیچ خورده باشد (در این صورت اگر بحث ما بخش کوچکی از DNA خطی باشد). سپس DNA باید از نظر توپولوژی تنظیم گردد تا فرایند باز شدن رشته به خوبی پیش رود. این پدیده توسط سوپرکویل انجام پذیر است. شواهدی وجود دارند که هنگام نسخه برداری، سوپرکویل مثبت (راست گرد) در جلوی آنزیم پلیمراز و سوپرکویل منفی (چپ گرد) در عقب آن قرار دارند (شکل 7- 13، الف). پدیده سوپرکویل توسط آنزیم توپوایزومرازها کنترل می شود.

www.ShimiPedia.ir

توپوایزومرازها آنزیم هایی هستند که طی ساخت و ترمیم DNA تک رشته ای یا DNA دو رشته ای ، از سوپرکویل آزاد شده و DNA را برش می دهند. در صورتی که انتهای DNA باز باشد، توپوایزومرازها الزاماً در مسیرهای کنترل شده باعث پیچش مارپیچ DNA می شوند. همچنین پدیده سوپرکویل می تواند باعث انتقال اکتامر هیستون از انتهای رشته رهبر به انتهای آنزیم پلیمراز گردد. این دلایل نشان می دهند که DNA پوششی به دور نوکلئوزوم با سوپرکویل منفی ایجاد می کند. هسته اکتامرهای هیستون ها از DNA آزاد می شوند و به دنبال آن سوپرکویل منفی به وجود می آید، در نتیجه سوپرکویل مثبت توسط پلیمراز حذف می شود (شکل 7- 13، ب). وقتی اکتامر به عقب پلیمراز منتقل می شود، با DNA سوپرکویل منفی مواجه می گردد و به سرعت مجدداً مونتاژ می شود (شکل 7- 13ف ب).

مدل انتقال اکتامر پیشنهاد شده از لحاظ انرژتیکی و توپولوژی توسط آزمایش های مختلف مورد قبول محققین می باشد. اکتامرها باید در محلولی با قدرت یونی فیزیولوژیکی باشد تا ساختار آنها حفظ گردد. در ارتباط با مدل های انتقال اکتامر، آزمایش نشان داد که مونتاژ هیستون ها هنگام نسخه برداری هم توسط اکتامرهای قبلی انجام می شود و هم از اکتامرهایی که به آنها اضافه شد (خلال انجام آزمایش) صورت می گیرد و بین آنها از لحاظ راندمان نسخه برداری تفاوت چندانی وجود ندارد. در ضمن جدا شدن هیستون ها از یکدیگر هنگام نسخه برداری لازم نیست.

www.ShimiPedia.ir



شکل 7- 13 DNA سوپرکویل از جلو و عقب پلیمراز توسط توپوایزومرازها تنظیم می شوند. این عمل ممکن است انتقال اکتامرهای هیستون را ساده کند. (الف) رشته DNA در جلوی آنزیم پلیمراز که فعالیت کاتالیزوری دارد به صورت سوپرکویل مثبت و در عقب آن سوپرکویل منفی دیده می شوند. (ب) جدا شدن اکتامر هیستون در جلوی پلیمراز باعث از بین بردن یک سوپرکویل منفی و حذف یک سوپرکویل مثبت می شود. انتقال اکتامر به عقب پلیمراز موجب حذف یک سوپرکویل منفی می گردد.

www.ShimiPedia.ir

Further Reading

Transcription factor binding to nucleosomal DNA

Beato, M. & Eisfeld, K. (1997) Transcription factor access to chromatin. *Nucl. Acids Res.*, **25:** 3559–3563.

Felsenfeld, G. (1996) Chromatin unfolds. *Cell*, **86:** 13–19.

Owen-Hughes, T. & Workman, J. L. (1994) Experimental analysis of chromatin function in transcriptional control. *Crit. Rev. Euk. Gene Expr.*, **4:** 403–441.

Parajape, S. M., Kamakaka, R. T. & Kadonaga, J. T. (1994) Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.*, **63:** 265–297.

Workman, J. L. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **67:** 545–579.

Mouse Mammary Tumour Virus promoter

Eisfeld, K., Candau, R., Truss, M. & Beato, M. (1997) Binding of NF1 to the MMTV promoter in nucleosomes: influence of rotational phasing, translational positioning and histone H1. *Nucl. Acids Res.*, **25:** 3733–3742.

Smith, C. L. & Hager, G. L. (1997) Transcriptional regulation of mammalian genes *in vivo*. A tale of two templates. *J. Biol. Chem.*, **272:** 27493–27496.

Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Hache, R. J. G. & Beato, M. (1995) Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J.*, **14:** 1737–1751.

Transcription can be enhanced by a nucleosome

Elgin, S. C. R. (1988) The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.*, **263:** 19259–19262.

Schild, C., Claret, F.-X., Wahli, W. & Wolffe, A. P. (1988) A nucleosome-dependent static loop potentiates oestrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter *in vitro*. *EMBO J.*, **12:** 423–433.

DNA replication and transcription

Almouzni, G. & Wolffe, A. P. (1994) Replication-coupled chromatin assembly is required for the repression of basal transcription *in vivo*. *Genes Dev.*, **7:** 2033–2047.

Almouzni, G., Mechali, M. & Wolffe, A. P. (1990) Competition between transcription complex assembly and chromatin assembly on replicating DNA. *EMBO J.*, **9:** 573–582.

Barton, M.C. & Emerson, B. M. (1994) Regulated expression of the b-globin gene locus in synthetic nuclei. *Genes Dev.*, **8:** 2453–2465.

Fangman, W. L. & Brewer, B. J. (1992) A question of time: replication origins of eukaryotic chromosomes. *Cell*, **71:** 363–366.

Chromatin and the elongation phase of transcription

Bednar, J., Studitsky, V. M., Grigoryev, S. A., Felsenfeld, G. & Woodcock, C. L. (1999) The nature of the nucleosomal barrier to transcription: direct observation of paused intermediates by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell*, **4:** 377–386.

Shilatifard, A., Conaway, J. W. & Conaway, R. C. (1997) Mechanism and regulation of transcriptional elongation and termination by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7:** 199–204.

Studitsky, V. M., Kassavetis, G. A., Geiduschek, E. P. & Felsenfeld, G. (1997) Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. *Science*, **278:** 1960–1963.

Thoma, F. (1991) Structural changes in nucleosomes during transcription: strip, split or flip. *Trends Genet.*, **7:** 175–177.

Tsao, Y.-P., Wu, H.-Y. & Liu, L. F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*, **56:** 111–118.

www.ShimiPedia.ir

فصل 8

ماشین بازسازی کروماتین

مقدمه

هم اکنون شواهدی وجود دارند که نشان می دهند مونتاژ نوکلئوزوم ها در پروموتر می تواند شروع نسخه برداری را مهار کند. آنها این عمل را با ممانعت از اتصال فاکتورهای نسخه برداری و سایر پروتئین ها در نقاط خاصی از DNA انجام می دهند. در برخی از سلول ها مکانیسم هایی وجود دارند که موقعیت نوکلئوزوم را در نواحی خاصی در پروموتر به شرطی که در ناحیه رابط (linker) نباشد، تعیین می کنند. با وجود تمام این موارد از جمله مکانیسم های تقویت کننده و حضور نوکلئوزوم در اطراف پروموتر و سایر موارد باید از عدم فعالیت پروموتر مطمئن شد. همانطور که قبلاً بحث شد، بعضی از فاکتورهای نسخه برداری قادرند به خوبی به نواحی خاصی از DNA متصل شوند (حتی زمانی که به اجبار بر روی نوکلئوزوم قرار گرفته اند). گاهی برای سرکوب عمل نسخه برداری فقط عدم اتصال فاکتورهای نسخه برداری کافی نیست. از طرف دیگر مکانیسم های آنزیمی نیز در مهار یا شروع فعالیت ذاتی کروماتین دخالت دارند. این مکانیسم ها را می توان به دو گروه طبقه بندی کرد: (1) آنزیم هایی که به طور مستقیم در مکانیسم وابسته به ATP روی ساختار نوکلئوزوم اثر می گذارند، به طوری که فاکتورهای نسخه برداری و DNA و پروتئین های متصل شونده در دسترس DNA قرار گیرند، (2) آنزیم هایی که کروماتین ها را تحت تأثیر استیلاسیون در هسته هیستون ها در ناحیه انتهای- N قرار می دهند. این آنزیم ها تحت عنوان استیلازها (acetylases) و داستیلازها (deacetylases) می شناسند.

آنزیم هایی که در بازسازی نوکلئوزوم ها دخالت دارند

به طور کل، کمپلکس های آنزیمی باعث جایگزینی یا تخریب نوکلئوزوم ها می گردند و بر این اساس دسترسی به DNA مورد نظر افزایش می یابد. در اکثر موارد، اولین کمپلکس توسط مطالعات ژنتیکی بر روی مخمر کشف شدند.

www.ShimiPedia.ir

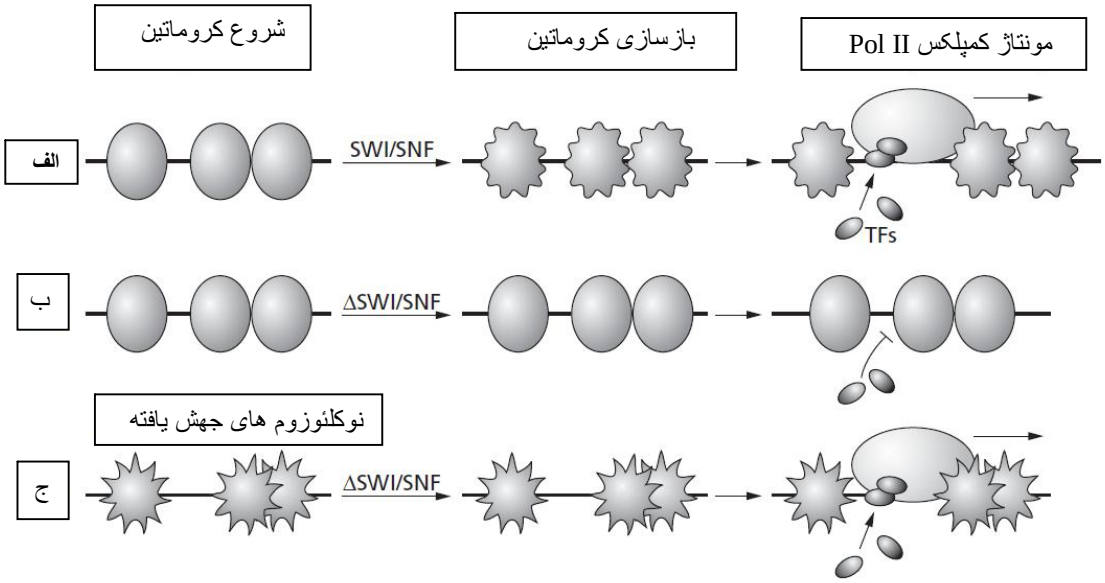
خانواده SWI / SNF

اولین مطالعات انجام شده بر روی دو نوع از مخمرهای جهش یافته صورت گرفت. اولین جهش مربوط به مخمرهای جهش یافته در محیط کشتی بود که در حضور سوکروز قادر به رشد نبودند. آنها دارای ژن جهش یافته SNF (sucrose non-fermenting) بودند که این جهش باعث می شود سوکروز تخمیر نشود. نوع دیگری از مخمرهای جهش یافته وجود دارند که واجد ناهنجاری تغییر وضعیت ناشی از جهش در ژن SWI (Switching mating type) بودند. البته چنین جهش هایی گاهی منجر به بروز هر دو نوع فنوتیپ می گردند. ژن های مسئول بروز هر دو نوع فنوتیپ به ژن های SWI/SNF (switch-shiff) معروف اند. ژن های

SWI/SNF به صورت مزدوج در بروز فنوتیپ های فوق الذکر یعنی نقص درمتابولیسم سوکروز و نقص در نقشه تغییر وضعیت دخالت دارند. ولی حضور هر دوی آنها برای بیان زیر واحدهای کوچکی از ژن (عاملین بروز چنین فنوتیپی) الزامی است.

یکی از شواهد موجود برای تنظیم این زیر مجموعه ژنی از طریق کروماتین ها مربوط به یافته هایی در خصوص جهش های دیگری بود که روی فنوتیپ جهش SWI/SNF اثر می گذاشت. این جهش باعث بی ثبات کردن یا از هم گسیختن ساختار کروماتین طبیعی جهت جلوگیری از بروز فنوتیپ های SWI/SNF می شدند. از نظر ژنتیکی به آنها جهش های سرکوبگر (supperssor mutations) گویند. این جهش های سرکوبگر می توانند دقیق (مانند جهش های نقطه ای در هسته هیستون) یا غیر دقیق (مانند جهش هایی که باعث کاهش 50 در صد اتصال در هیستون های H2A و H2B می شوند) باشند. بنابراین جهش هایی که علت آنها وجود ساختارهای غیر طبیعی نوکلئوزوم یا کاهش غلظت نوکلئوزوم باشند، باعث تغییر محصولات ژن های غیر ضروری SWI/SNF می گردند (شکل 8- 1). این اطلاعات ژنتیکی وجود یک کمپلکس پروتئینی بزرگ شامل ژن های SWI/SNF جدا شده از مخمر به روش های بیوشیمیایی را تأیید می کند. همچنین بیانگر بازسازی نوکلئوزوم ها در شرایط خارج سلولی می باشد. یعنی تغییر ارتباط بین هیستون ها و DNA که با استفاده از نوکلئوزوم های موقعیتی (positioned nucleosome) به عنوان سوبسترا می توان مورد سنجش قرار داد و تغییرات به دست آمده را توسط برش های ایجاد شده توسط DNase I شناسایی و اندازه گیری نمود. همانطور که در فصل 3 شرح داده شد، DNaseI ترجیح می دهد نقاطی از شیار کوچک را که دورتر از هسته هیستون ها قرار دارند، برش دهد (یعنی در فواصل 10 جفت باز) (شکل 3- 5).

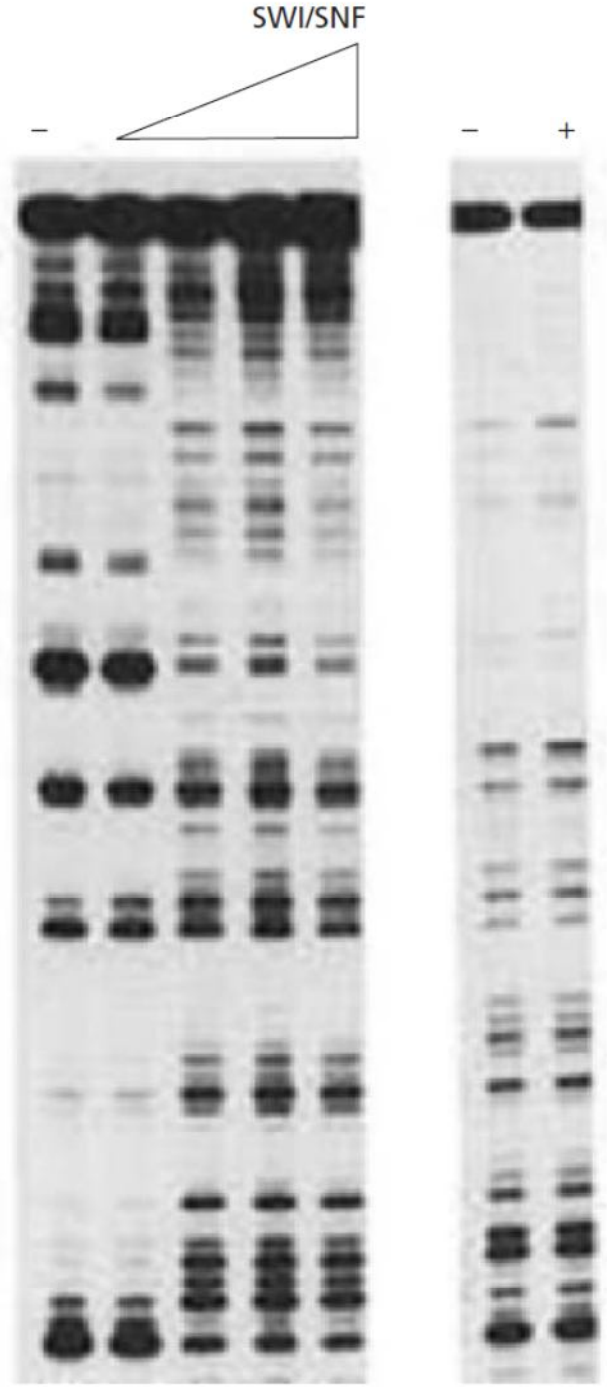
www.ShimiPedia.ir



شکل 8- 1 جهش هایی که روی کمپلکس بازسازی SWI/SNF اثر می گذارند و نسخه برداری برخی از ژن ها را مهار می کنند، بعضی از جهش ها ساختار نوکلئوزوم را تغییر می دهند. (الف) در سلول های طبیعی (گونه های وحشی) SWI/SNF نوکلئوزوم ها در محل پروموتر بعضی از ژن ها بازسازی شده و نسخه برداری شروع می شود. (ب) جهش ناشی از SWI/SNF با جلوگیری از فرایند بازسازی باعث مهار نسخه برداری در این ژن ها می گردد. (ج) دومین جهش ایجاد شده که باعث تغییر ساختار نوکلئوزوم (مانند جهش هسته هیستون) می شود که در این صورت بازسازی SWI/SNF انجام شده و فرایند نسخه برداری به وضعیت طبیعی بر می گردد.

SWI/SNF باعث دگرگونی در شکاف نوکلئوزوم ها می شوند در نتیجه شبیه DNA آزاد عمل می کنند (شکل 8- 2). در این شکل توجه کنید که با افزایش غلظت SWI/SNF ، برش در جایگاه های مشخص اصلی نامحسوس می شود و محل های برش جدیدی ظاهر می گردند (چنین وضعیتی مربوط به DNA آزاد است). انرژی لازم برای بازسازی نوکلئوزوم از شکسته شدن ATP تأمین می شود که این فرایند در شکل 8- 2 نشان داده شده است. شکسته شدن ATP توسط زیر واحدهای SWI/SNF کاتالیز می شود (جدول 8- 1). فعالیت دُمین ATP آز (ATPase) در SWI2/SNF2 شبیه آنزیم هلیکاز عمل می کند. هلیکاز آنزیمی است که انرژی آزاد شده از شکسته شدن ATP را برای باز کردن پیچ های DNA یا RNA استفاده می کند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 8- 2 بازسازی SWI/SNF باعث تغییر الگوی هضم نوکلئازی در DNA نوکلئوزومی شده و بر این اساس شبیه DNA آزاد می گردد. قطعات DNA توسط هضم نوکلئازی کروماتین به وجود می آیند سپس توسط الکتروفورز تفکیک می شوند (ژل سمت چپ انتهایی). افزایش پیش تیمار کروماتین با SWI/SNF انسانی به دلیل بروز قطعات اضافی DNA است که حضور آنها در چنین توالی مربوط به هیستون ها و DNA آزاد می باشد (ژل های سمت راست مربوط

www.ShimiPedia.ir

به عکس سمت چپ). SWI/SNF هیچ تأثیری در هضم نوکلئازی DNA آزاد ندارد (ژل های سمت راست).
علامت های + و - به ترتیب حضور و عدم حضور SWI/SNF را نشان می دهند.

هر چند که مطالعات روی نوکلئوزوم های بازسازی شده اطلاعات مفیدی در اختیار دانشمندان قرار داد ولی با این حال هنوز فهم مکانیسم بازسازی کروماتین در کمپلکس های SWI/SNF مبهم است. حتی با وجود بخش های چرخشی و تصادفی DNA و دسترسی بیش از حد پروتئین هایی که قابلیت اتصال به DNA را دارند، باز هم مشاهده شده است که DNA های نوکلئوزومی اتصال خود را با اکتامرهای هیستونی حفظ کرده اند. این فرایند احتمالاً باعث تشکیل مارپیچ DNA دو رشته ای می گردد. شواهدی وجود دارند که دُم های هسته هیستون ها جهت بازسازی SWI/SNF مورد نیاز می باشند. از طرفی استیلاسیون این دُم ها باعث کاهش فعالیت بازسازی می گردد. در اینجا فرایندهای جایگزینی، برش یا سازماندهی مجدد دیمرهای H2A/H2B و ترامرهای H2/H4 لازم نیست. با این وجود، اکتامرهای هیستونی به سادگی در کروماتین های بازسازی شده جابجا می شوند و طول DNA با افزایش هسته هیستونی کاهش می یابد.

کمپلکس SWI/SNF به مقدار کمی (کمتر از 200 مولکول در هر سلول) در سلول های مخمر یافت می شود و مطالعات ژنتیکی نشان داد که تعداد معدودی از آنها را تحت کنترل دارند. این موضوع توسط آزمایش با آرایش های الیگو نوکلئوتیدی با غلظت بالا یا HADs (high – density oligonucleoide arrays) مورد تأیید قرار گرفت. با استفاده از روش فوق بررسی نسخه های mRNA در مخمرهای جهش یافته که فاقد یک یا گروهی از پروتئین هایی بودند که در تنظیم ژن دخالت داشتند (این فرایند در پیوست 4 به طور خلاصه نشان داده شده است). در موتانت های فاقد Swi2/Snf2 ATPase (بدون کمپلکس بازسازی SWI/SNF) نسخه های mRNA از کل ژن های 5695 به 126 ژن کاهش یافت. در مقابل، وقتی کمپلکس SWI/SNF دخالت کند، نسخه های mRNA حدود 203 ژن می شود (یعنی حدود دو برابر) (نکته مهم این است که هیچ ژن بیان شده ای مشاهده نشد که به طور مستقیم توسط کمپلکس SWI/SNF تنظیم گردد، ولی ممکن است برخی از ژن ها تحت تنظیمات SWI/SNF قرار گیرند). احتمالاً نتیجه به دست آمده از این اطلاعات این است که بازسازی کروماتین برای دسترسی بیشتر DNA به پروتئین های فعال کننده و مهار کننده صورت می گیرد.

www.ShimiPedia.ir

جدول 8- 1 کمپلکس های بازسازی کروماتین

Complex	Organism	Subunits	ATPase	Notes
SWI/SNF family				
SWI/SNF	*S. cerevisiae*	11	SWI2/SNF2	1
RSC	*S. cerevisiae*	15	STH1	2
hSWI/SNF	*H. sapiens*	~10	hbrm, BRG-1	3
Brahma	*D. melanogaster*	>7	BRM	4
Mi-2 family				
Mi-2	*X. laevis*	6	Mi-2	5
NuRD	*H. sapiens*	>7	Mi-2	5
ISWI family				
ACF	*D. melanogaster*	2	ISWI	6
CHRAC	*D. melanogaster*	5	ISWI	7
NURF	*D. melanogaster*	4	ISWI	8

1 . به مقدار زیاد وجود ندارند (احتمالاً کمتر از 200 جهش در هر سلول). موتانت ها زنده می مانند. ATP آز توسط dsDNA ، ssDNA و نوکلئوزوم ها برانگیخته می شود. هنگام بازسازی کروماتین نسبت کمپلکس به نوکلئوزوم ها باید 1 به 1 باشد و نتایج به دست آمده از الگوی هضم نوکلئازی شبیه DNA برهنه می گردد.

2 . در این کمپلکس حداقل سه زیر واحد مشابه با SWI/SNF وجود دارد (یعنی خصوصیات آنزیمی و اثر مشابه روی کروماتین). آنها حداقل 10 برابر بیشتر از SWI/SNF هستند و از دست دادن عملکرد موتانت ها باعث مرگ آنها می شود.

3 . هر چند دو ترکیب hbrm و BRG- 1 ATPase با هم فرق دارند ولی کمپلکس های آنها در ارتباط با یکدیگرند. هر دو دارای کمپلکس SNF5 مشابه Hsnf5 می باشند.

4 . پروتئین BRM در فعالیت نسخه برداری ژن های هومئوتیک طی تکامل و رشد و نمو خالت دارند. موتانت های -/- مرگ آور هستند. کمپلکس SNF5 مشابه SNR1 است.

5 . دو کمپلکس NuRD و Mi- 2 در ارتباط تنگاتنگ با یکدیگر هستند. Mi-2 به عنوان یک آنتی ژن عمل می کند و در بیماری انسانی به نام درماتومیوزیت (dermatomyositis) (این بیماری در بافت پیوندی است که روی پوست و ماهیچه باعث زخم می شود) دخالت دارد. سایر پروتئین ها در ارتباط با MTA2 می باشند. MTA2 به دلیل این که در برخی از سرطان های انسانی فعالیت متاستازی دارد، در گروه آنتی ژن های MTA1 طبقه بندی می شود. همچنین این کمپلکس ها واجد استیلازهای هیستونی در HDAC1 و HDAC2 و سایر پروتئین ها می باشند. آنها از طریق متیلاسیون با DNA در ارتباط اند.

6 . آنها به همراه برخی از چپرون های هیستونی مانند NAP1 و CAF1 به صورت متناوب در کروماتین سازماندهی می شوند. این امر باعث تسهیل در برقراری پیوند با TF شده و منجر به تنظیم فاصله بین نوکلئوزوم ها می گردند.

7 . آنها باعث تنظیم فاصله بین نوکلئوزوم ها در کروماتین می شوند، در نتیجه دسترسی آنزیم های محدود کننده به آنها افزایش می یابد.

www.ShimiPedia.ir

8. ATPase توسط نوکلئوزوم ها تحریک می شود (توجه داشته باشید که توسط فقط DNA این تحریک صورت نمی گیرد). آنها باعث هضم میکروکوکی نوکلئاز شده ، در نتیجه دسترسی جهت برش افزایش می یابد (ولی تعداد برش ها در حد DNA برهنه نیست).

آزمایش های اخیر نشان می دهند که کمپلکس SWI/SNF به طور خاص در تنظیم ژن هایی دخالت دارند که هنگام تقسیم میتوز جزء ژن های تأخیری هستند.

دومین کمپلکس مخمرها به عبارتی RSC (remodel the structure of chromatin) در ارتباط نزدیک با SWI/SNF می باشند و کروماتین را با روشی مشابه بازسازی می نمایند. مقدار RSC حداقل 10 مرتبه بیشتر از SWI/SNF است و وجود آن برای حیات سلول ضروری است (جدول 8- 1). هم اکنون همولوگ هایی از کمپلکس SWI/SNF در پستانداران و دروزوفیلا یافت شده است (جدول 8- 1). کمپلکس های SWI/SNF و RSC دارای یک DNA وابسته به فعالیت ATPآز می باشند. در دروزوفیلا، محصول ژن Brahma (brm) که ATPase است باعث ساخت پروتئینی می گردد که وجود آن برای حفظ و پایداری نسخه برداری ژن های خاص طی تکامل ضروری است و به این کملکس در انسان hSWI/SNF اطلا ق می شود. دو نوع ATPآز به نام های hBRM و BGR- 1 وجود دارند که همولوگ هایی از پروتئین Drosophila Brahma می باشند.

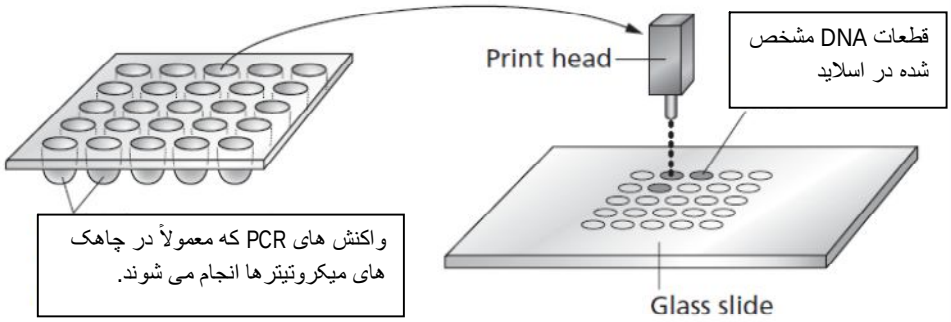
کمپلکس های SWI/SNF پستانداران

نقش اصلی کمپلکس های بازسازی کننده کروماتین در بررسی نسخه برداری ژن بتا- گلوبین تحت کنترل فاکتور نسخه برداری EKLF (erythroid kruppel- like factor) مشخص گردید.

www.ShimiPedia.ir

پیوست ۴ DNA microarrays

آرایش DNA را می توان توسط الیگو نوکلئوتیدهای ساخته شده (حدود bp ۲۵) یا از قطعات DNA (بیش از bp ۱۰۰) با استفاده از PCR تهیه نمود. محصولات PCR را می توان از cDNA (برای تجزیه و تحلیل آزمایش) یا از DNA ژنومی تهیه نمود. این عمل با استفاده از پریمرهای طراحی شده از محل های خاصی روی ژنوم انجام می شود.

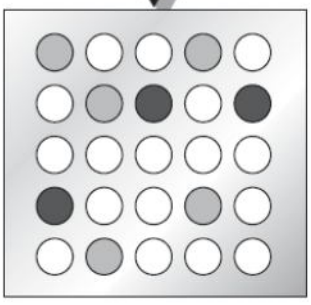


واکنش های PCR که معمولاً در چاهک های میکروتیترها انجام می شوند.

DNA مورد نظر را تهیه کرده و توسط رنگ فلورسنت نشاندار می کنیم (برای تجزیه و تحلیل DNA مورد نظر که از mRNA ساخته شده از آنزیم reverse transcriptase و PCR استفاده می شود)

هیبرید سازی

DNA پیوند نشده را شسته و با کمک laser scanner و رنگ فلورسنت غربال سازی انجام می شود.



آرایش هایی که حاوی چندین هزار قطعه DNA هستند. شدت فلورسنت DNA در هر نمونه و با مقایسه با کنترل های مناسب، همچنین نسبت به تعداد توالی موجود در هر نمونه مورد آزمایش می توان مقدار DNA را مشخص کرد.

www.ShimiPedia.ir

وجود EKLF برای شروع نسخه برداری از لوکوس بتا- گلوبین در دوران جنینی ضروری است. فعالیت EKLF در آزمایشگاه با استفاده از ژن بتا- گلوبین مونتاژ شده در کروماتین مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که برای نسخه برداری، علاوه بر فاکتور EKLF نیاز به فاکتور ثانویه استخراج شده از هسته نیز می باشد (مراجعه کنید به فصل 7). این فاکتور از کشت سلول های اریترولوکمیا (کم خونی اریتروسیت) استخراج شده است که قادر به افزایش نسخه برداری ژن بتا- گلوبین می باشد. این فاکتور یک کمپلکس چند پروتئینی (حاوی BRG- 1) می باشد و همولوگ پیش سازهای کمپلکس SWI/SNF مخمر است. به این کمپلکس اخیراً E- RC1 گویند که نقش به سزایی در بازسازی نوکلئوزوم ها ایفا می کند. E- RC1 شامل یک جایگاه بسیار حساس به DNaseI در فرادست پروموتر بتا- گلوبین است که برای شروع نسخه برداری از ژن بتا- گلوبین در شرایط داخل سلولی ضروری است (نگاه کنید به شکل 8- 1 و 8- 2). نکته مهم این است که وجود کمپلکس E- RC1 برای نسخه برداری حتی پس از اتصال EKLF به کروماتین الزامی است. هر چند فاکتور E- RC1 باعث افزایش فعالیت نسخه برداری از DNA بتا- گلوبین و تقویت ژن های مونتاژ شده در کروماتین نمی گردد ولی حضور آن جهت انجام نسخه برداری ضروری است. بنابراین، یکی از پروتئین های موجود در کمپلکس E- RC1 یا SWI/SNF انسانی باید مسئول شناسایی کمپلکس ها با پروموترهای اختصاصی باشد. این شناسایی احتمالاً از طریق پیوند با فاکتورهای نسخه برداری یا مارکرهای ویژه ای از پروموترها امکان پذیر خواهد بود.

بازسازی کروماتین ها توسط کمپلکس های انسانی که شامل ATPaseهای مربوط به hbrm یا BRG-1 هستند مورد آزمایش قرار گرفت. هر دو کمپلکس hbrm و BRG-1 با اتصال به محصول پروتئین p105Rb در ژن مهار کننده تومور RB باعث کاهش رشد سلول های سرطانی می گردند. در واقع این فرایند با کاهش نسخه برداری از ژن های تنظیمی فاکتورهای نسخه برداری E2F صورت می گیرد که حضور آن در پیشرفت چرخه سلولی ضرورت دارد (جزئیات بیشتر بعداً شرح داده خواهد شد). با توجه به بررسی مخمرهای جهش یافته، انتظار می رود که برخی از پیش سازهای SWI/SNF پستانداران در مهار یا شروع نسخه برداری از ژن ها دخالت داشته باشند.

با مطالعه بر روی فنوتیپ موش های جهش یافته که فاقد ژن BRG- 1 یا hbrm بودند، معلوم شد که تعداد کمپلکس های SWI/SNF پستانداران بیشتر از فاکتورهای فعال کننده نسخه برداری می باشد. ژن hbrm در رشد و نمو مگس Drosophila Brahma نقش حیاتی دارد، به طوری که فقدان نسخه هایی از آن در موش باعث نقص در رشد می گردد. مشاهده شده است که

www.ShimiPedia.ir

برخی از این موش ها از نظر جثه10 تا 15 در صد بزرگتر از موش های طبیعی هستند (یعنی نقصی در تنظیم رشد صورت گرفته است) و رشد سلول های فیبروبلاست آنها نیز متوقف شده است. در مقابل فقدان ژن BRG- 1 باعث مرگ زودرس چنین موش های آزمایشگاهی می گردد. گاهی اوقات اثرات غیر مقبول فنوتیپی ناشی از جهش ها، در پیش سازهای پروتئین های بازسازی کننده کروماتین مشاهده می شود که علت آن مربوط به اختلالات ناشی از اندرکنش پروتئین- پروتئین یا فعالیت بیش از حد آنها است.

خانواده ISWI

برخی از کمپلکس های بازسازی کروماتین که مرتبط با SWI/SNF می باشند در هسته دروزوفیلا یافت شده اند. در حقیقت کمپلکس NURF (جدول 8- 1) اولین کمپلکس بازسازی کروماتین بود که با روش های بیوشیمیایی بر پایه هضم هسته میکروکوکی در خصوص آرایش نوکلئوزوم ها تخلیص گردید. روش بکار رفته در این آزمایش با روش سنجش SWI/SNF در شکل 8- 2 متفاوت است، زیرا در اینجا به جای اندازه گیری تغییرات در مورد فاصله نوکلئوزوم ها، تغییرات در مورد هر یک از ذرات هسته نوکلئوزوم ها مورد ارزیابی قرار می گیرد. کارل وو (Carl Wu) و همکارانش در پژوهشکده .N.I.H جهت آزمایش بر روی NURF، دو کمپلکس بازسازی کروماتین را در *D.melanogaster* مورد بررسی قرار دادند که در جدول 8- 1 لیست شده است. تمام این کمپلکس ها حاوی زیر واحدهای هلیکازی/ATPآزی وابسته به DNA هستند. این پروتئین شاخص با نام ISWI (Imitation Switch) می باشد. آنها از نظر عملکرد بیوشیمیایی سه اختلاف اساسی دارند. ISWI شبیه پروتئین SWI2/SNF2 در مخمر است و دارای دُمین ATPآز می باشد. البته دُمین ATPآز در ISWI قادر نیست جایگزین SWI2 در محیط آزمایشگاهی شود. خصوصیات مهم هر سه کمپلکس این است که آنها نواحی مربوط به نوکلئوزوم خود را در طول DNA با روش هایی متفاوت (حداقل در شرایط خارج سلولی) تغییر می دهند. بنابراین، آنها متفاوت از SWI/SNF هستند. به نظر می رسد علاوه بر بازسازی نوکلئوزوم در تنظیم موقعیت و آرایش نوکلئوزوم ها نیز دخالت دارند (یه هر حال، بازسازی نوکلئوزوم ها توسط SWI/SNF ممکن است باعث نوآرایی از طریق فعالیت سایر فاکتورها صورت گیرد). وجود انواع کمپلکس ها نشان می دهد که احتمالاً سلول های یوکاریوتی دارای فعالیت های متفاوتی از بازسازی کروماتین ها هستند. البته بعید نیست که بازسازی کروماتین نه تنها بخشی از شروع نسخه برداری و طویل سازی باشد، بلکه ممکن است در همانندسازی و ترمیم DNA و پیشرفت چرخه سلولی دخالت داشته باشند.

www.ShimiPedia.ir

خانواده Mi- 2

کمپلکس های بازسازی بر پایه فعالیت Mi- 2 ATPase ، دو خاصیت عمده دارد که آنها را از سایر کمپلکس ها مجزا می سازد. اول این که آنها دارای یک مکانیسم درون سیستمی هستند که یکی از زیر واحدهای پروتئینی به DNA متیله شده پیوند می یابد. همچنین افزایش سطح متیل سیتوزین در ارتباط با فشردگی در کروماتین و کاهش اثرات ژنتیکی است. دوم این که کمپلکس های Mi- 2 شامل داستیلازهای هیستونی (histone deacetylase) یعنی HDAC2 و HDAC1 هستند. هیستونی که هنوز استیلاسیون روی آن انجام نشده، از لحاظ نسخه برداری غیر فعال است. در خصوص آنزیم داستیلاز و کمپلکس Mi- 2/NURD در همین فصل بحث خواهد شد، ولی هم اکنون باید خاطر نشان کرد که کمپلکس Mi- 2 در شرایط داخل سلولی فعالیت های دیگری دارد که باعث تغییرات کروماتین می شوند. به هر حال، آنها با یک روش هماهنگ (حتی زمانی که با هم در ارتباط نیستند) عمل می نمایند و فعالیت یکی از آنها ممکن است باعث مهار یا فعال کردن دیگری شود.

استیل ترانسفرازهای هیستونی (HATs)

تمام هیستون ها در بخش مرکزی نوکلئوزوم ها قرار گرفته اند که تابع تغییرات پس ترجمه ای هستند. دُمین انتهای –N اکثر آنها در سطح نوکلئوزوم واقع شده اند که فرایند مربوطه در فصل 4 شرح داده شد. اکثر این تغییرات مربوط به استیلاسیون باقیمانده لیزین است. استیلاسیون یک فرایند پویا است که در این عمل انتقال، گروه های استات به هیستونی با نیمه عمر بین چند دقیقه تا چندین ساعت مبادله می شوند. این آنزیم ها دارای دو خانواده هستند که عبارتند از: (1) استیل ترانسفرازهای هیستونی HATs (acetyltransferases histone) که با فعالیت کاتالیزوری باعث انتقال گروه استات از استیل کوآنزیم A به گروه آمینی آمینو اسید لیزین می گردد. (2) آنزیم های داستیلازهای هیستونی HDACs (histone deacetylases) که باعث خارج شدن استات ها می شوند (شکل 3- 14). اتصال یک گروه استات باعث خنثی شدن بار مثبت باقیمانده لیزین می گردد و در نهایت طی تغییرات ایجاد شده میل پیوندی آنها به DNA کاهش می یابد. به نظر می رسد که دُمین انتهای- N استیله شده یا نشده به تنهایی تأثیر چندانی در ساختار هسته نوکلئوزوم ها نخواهد داشت ولی اثرات آنها به طور جدی تر به ساختار کروماتین با درجه نظم بالاتر دیده می شود (فصل 5). همچنین فرایند استیلاسیون و داستیلاسیون هیستون ها می تواند تأثیر به سزایی در اتصال کروماتین ها به فاکتورهای نسخه برداری و سایر پروتئین های موجود در شرایط خارج سلولی داشته باشد (فصل 7). آزمایش های ژنتیکی درمخمرها نشان می دهند که انتهای- N هیستون ها در تنظیم بیان ژن دخیل هستند. بنابراین، استیلاسیون هیستون ها تعیین کننده

www.ShimiPedia.ir

پیرایش و عملکرد کروماتین ها است. اهمیت آنها در تنظیم نسخه برداری این است که مسئول چرخه استیلاسیون و داستیلاسیون هستند.

استیل ترانسفرازهای سیتوپلاسمی

آزمایش های بیوشیمیایی نشان دادند که از لحاظ محل های موجود در داخل سلول، دو نوع HAT داریم: آنزیم های سیتوپلاسمی در خانواده HATB و آنزیم های هسته ای در خانواده HATA طبقه بندی می شوند. آنزیم های سیتوپلاسمی مسئول استیلاسیون پس ترجمه ای لیزین های شماره 5 و 12 هستند. این فرایند یک امر مهم در مونتاژ کروماتین جهت همانند سازی DNA است. آنزیم های هسته ای جهت فعالیت کروماتین، مورد نیاز هستند. در ابتدا ژن مربوط به HAT کلون شد که این ژن توالی همین آنزیم در سیتوپلاسم را داشت. در این صورت به این آنزیم HAT1 گفته شد. این ژن از *Saccharomyces cerevisiae* تهیه گردید. یک مسئله خوشایند این بود که ژن مورد نظر در باکتری هم کلون شد و هم بیان گردید. پروتئین نوترکیب توانست هیستون H4 را در لیزین های شماره 5 و 12 استیله نماید. به هر حال، اکتشافات جدید در سلول های مخمر خیلی سریع مشخص کرد که HAT با پروتئین دیگری به نام HAT2 کمپلکس به وجود می آورد. با این که این پروتئین فاقد فعالیت استیل ترانسفرای هیستونی است ولی به نظر می رسد که نقش مهمی در شناسایی سوبستراهای اختصاصی HAT1 ایفا می کند. این کمپلکس شامل دو پروتئین است که در شرایط خارج سلولی فقط در جایگاه 12 لیزین قادر به استیلاسیون H4 می باشد. یافته های اخیر به این نکته مهم اشاره می کند که کمپلکس HATها به همراه سایر پروتئین ها قادر به تغییر در ویژگی های سوبسترا هستند. بروز جهش در ژن hat1 موجب کاهش فعالیت HAT می شود و اثر فنوتیپی دیگری مشاهده نشد. در صورت حذف hat1، سایر HATها قادر به استیلاسیون H4 سیتوپلاسمی می باشند. بنابراین، فرایند تکامل به خوبی پیش می رود (باید خاطر نشان کرد که عدم وجود فنوتیپ حاصل از hat1 در مخمر، در محیط آزمایشگاه نشان داد که به جای استیله کردن لیزین ها، آرژنین ها استیله شدند). این مشاهدات معلوم کرد که استیلاسیون لیزین های شماره 5 و 12 جهت مونتاژ کروماتین ضروری نمی باشند. هر چند یافته های اخیر در خصوص سنتز H4 در موجودات مختلف مانند مخمر و انسان برخی از امتیازات ویژه خود را پیشنهاد می کنند.

www.ShimiPedia.ir

HATهای هسته ای و کواکتیواتورهای نسخه برداری

آزمایش روی پروتوزوآ (*Tetrahymena thermophila*) نشان داد که HATها برای شروع نسخه برداری باید همراه با HATB تخلیص شوند (تحت عنوان p55). این ژن شبیه GCN5 مخمر است. مطالعات ژنتیکی نشان داد که ژن GCN5 (یعنی Gcn5) تنظیم کننده نسخه برداری است تحقیقات بعدی روی پروتئین استخراج شده از ژن Gcn5 مخمر معلوم کرد که احتمالاً p55 فعالیتی شبیه به فعالیت HAT های موجود در ژن Gcn5 دارد. شباهت بسیار نزدیکی بین ژن Gcn5 مخمر با سایر گونه ها دیده شد (مثل انسان). چند نمونه از آنها را در جدول 8- 2 مشاهده می کنید.

جدول 8- 2 برخی از کمپلکس های استیل ترانسفرازهای هیستونی (HATs) در مخمر و انسان

HAT	Complex	Size	Other protein components
Yeast (*S. cerevisiae*)			
Gcn5	HAT-A2	~200 kDa	Ada2,3+others
	ADA	~900 kDa	Ada2,3+others
	SAGA	~2 MDa	Ada1–5, Spt and TAF_{II} proteins, Tra1
Esa1	NuA4	1.3 MDa	Tra1 +various others
Human			
$TAF_{II}250$*	TFIID		TBP+various other TAF_{II} proteins
CBP/p300	various	various	Gene-specific activators PCAF, ACTR, SRC-1; all of which are also HATs
PCAF, hGcn5	not named	~20 proteins	Counterparts of Ada, Spt and Tra proteins + TAF_{II}s + others

*The equivalent TAFs in yeast and *Drosophila* also have HAT activity.

آنزیم های مربوط به Gcn5 فقط در HAT ها نیستند. در ارتباط بین HAT ها و فرایند نسخه برداری بر اساس تحقیقات انجام شده معلوم کرد که فاکتورهای تنظیم کننده نسخه برداری دخالت زیادی دارند (ربطی به Gcn5 ندارد ولی دارای فعالیت HAT می باشند). آنها دارای دو پروتئین مهم به نام های CBP/p300 هستند. این پروتئین ها در چرخه سلولی و فعالیت ژن ها در پاسخ به پیام های سلولی و مولکول AMP حلقوی (cAMP) نقش به سزایی دارند. پروتئین های CBP و p300 از لحاظ عملکرد یکسان هستند. آنها عضوی از پروتئین های نسخه برداری هستند که به آنها کواکتیواتورها (coactivators) گویند. از آنجا که

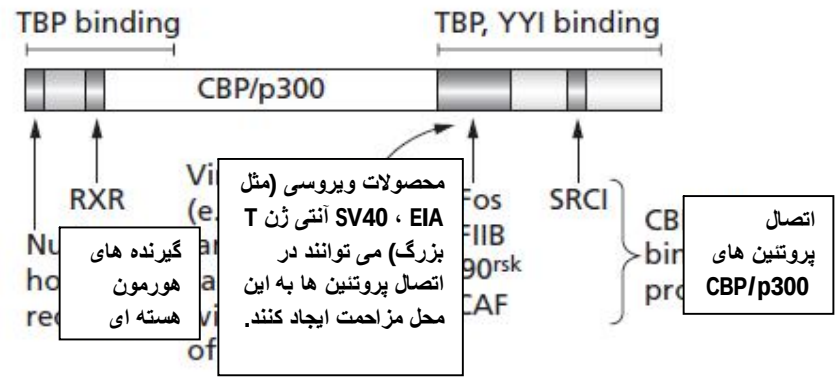
www.ShimiPedia.ir

این پروتئین ها جزء "پروتئین های اتصال به DNA با توالی ویژه" نمی باشند، بنابراین جزء فاکتورهای نسخه برداری نیستند، ولی امکان اتصال به پروتئین های دیگری که خود آنها قادر به پیوند به DNA هستند را دارند. CBP/p300 یک پروتئین بزرگ با بیش از 2400 آمینو اسید است. آنها چندین نقش مختلف دارند و با سایر پروتئین ها اندرکنش ایجاد می کنند. دُمین های انتهای - N و انتهای - C در CBP/p300 با اتصال به کمپلکس TBP قادر به شروع نسخه برداری هستند. به هر حال، در نسخه برداری با چنین مکانیسمی هنوز ابهامات زیادی وجود دارد (شکل 8- 4).

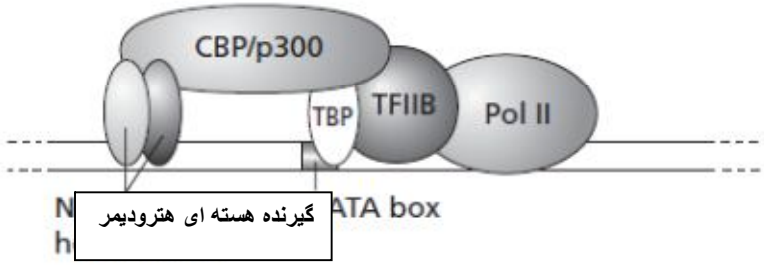
تحقیقات نشان می دهند که CBP/p300 باعث فعال شدن HAT می شود. در شکل 8- 5 نمونه ای از مراحل الحاق CBP/p300 به DNA نمایش داده شده است که نتایج به دست آمده معلوم کرد که اتصال آنها موجب افزایش استیلاسیون هیستون ها می گردد. باز شدن کروماتین ها در شکل 8- 5 احتمالاً به دلیل وجود پل های داخل نوکلئوزومی یا تخریب کمپلکس های واسط بین دُم های هیستونی و پروتئین های غیر هیستونی است.

حداقل سه پروتئین وجود دارند که می توانند به CBP/p300 متصل شوند (به نام های PCAF ، SRC- I و ACTR) که فعالیت HAT دارند. دلیل وجود سه ترکیب HAT در چنین کمپلکسی هنوز کاملاً شناخته نشده است، ولی دانشمندان به این موضوع پی برده اند که پروموترهای مختلف نیاز به ترکیبات مختلفی از HAT دارند. برای مثال نسخه برداری پروتئین های پیوند شده به عناصر CAMP (CREB) نیاز مبرم به فعالیت نوعی HAT به نام CBP دارد در حالیکه فعالیت گیرنده ریتنوئیک اسید (RAR) نیازمند فعالیت نوعی HAT به نام PCAF است. هر چند که فعالیت CBP نیازی به فعالیت RAR ندارد ولی به نظر می رسد که وجود آن جهت عملکرد گروهی از کمپلکس های پروموتر امری ضروری است. این اظهار نظر بیانگر نکته مهمی است که ترکیبات HAT مرکزی نقش کاتالیزوری دارند و این موضوع دلیل بر این است که زیر واحدهای کاتالیزوری HAT به طور اختصاصی احتمالاً توسط استیلاسیون هیستون های مختلف و یا هر پروتئین غیر هیستونی عمل می نمایند. انواع مختلفی از استیلاسیون ها نیاز مبرم به فعالیت بهینه ای از تنظیمات مختلف ژن ها دارند. همچنین ممکن است ژن های مختلف جهت فعالیت بهینه طی مراحل تکاملی نیاز به HAT های متفاوتی داشته باشند البته این دلیل قانع کننده ای نیست که ژن خالص جهت فعالیت خود، همیشه نیازمند فعالیت HAT باشد. علاوه بر HAT های چند گانه، ترکیب CBP/P300 دارای یک نوع پروتئین کیناز به نام PP90rsk بوده (شکل 8- 3) که حضور آن برای فعالیت ژن های فعال کننده Ras امری ضروری است.

www.ShimiPedia.ir



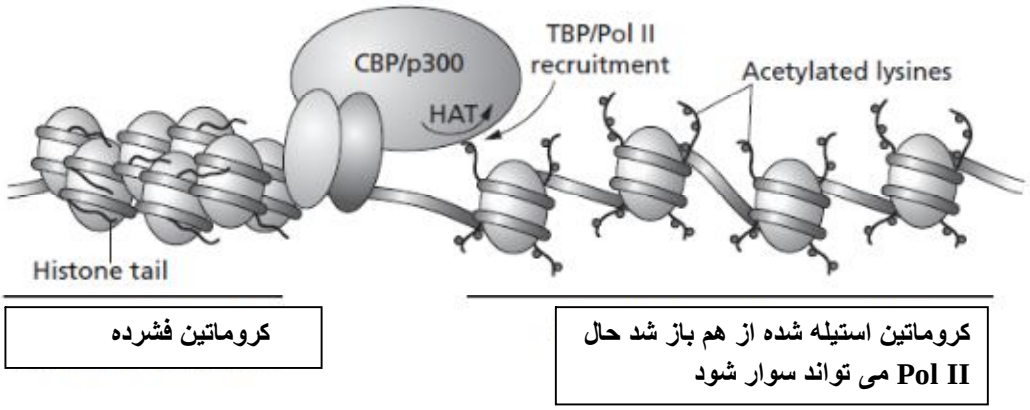
شکل 8- 3 دُمین ساختاری و اتصال پروتئین های ویژه CBP/p300



شکل 8- 4 CBP/p300 وابسته به هم پروتئین های فعال کننده متصل به DNA است و هم کمپلکس

قبل از شروع نسخه برداری.

www.ShimiPedia.ir



شکل 8- 5 CBP/p300 دارای فعالیت استیل ترانسفرا هیستونی هستند و قدرت تغییر ساختار کروماتین در پروموترها را نیز دارند.

Ras یکی از پروتئین های پیوند شده به GTP است که پیام هایی را از گیرنده های سطحی به داخل هسته انتقال می دهد. این یافته تأیید می کند که کمپلکس های عظیم و قوی، انرژی زیادی در اطراف CBP/P300 و سایر پروتئین های پروموتر به عنوان مدیاتور (یا واسطه ها)توسط پیام های داخل سلولی، تولید می نمایند. البته ممکن است این کمپلکس ها مرحله ای از مراحل آبشاری پروتئین کیناز باشند که پیام ها را از سیتوپلاسم به هسته جهت اتصال به ژنوم انتقال می دهند. با توجه به این که فعالیت CBP/P300 قادر به تغییر وضعیت فسفوریلاسیون می باشد، سایر آنزیم های تغییر دهنده کروماتین می توانند مسیر فوق الذکر (فعالیت CBP/P300 و فسفوریلاسیون) را جهت فعالیت انتخاب نمایند. باید خاطر نشان شویم که علاوه بر استیلاسیون، چندین روش دیگر برای تغییرات هیستونی نیز وجود دارند که در فصل 4 شرح داده شد. برخی از آنزیم های مؤثر در فسفوریلاسیون و متیلاسیون هیستون ها اخیراً کشف شده اند که به ترتیب مربوط به باقیمانده های آمینو اسیدهای سرین و لیزین هستند و سایر آنزیم ها هنوز کشف نشده اند. البته این احتمال وجود دارد که مبدل های (تغییر دهنده وضعیت هیستون ها) یافت شده نقش مکمل یا ضد آنها داشته باشند. برای مثال در پپتید HS سرین شماره 10 فسفوریله می شود و در این حالت نسبت به سایر پپتیدهای غیر فسفوریله در شرایط خارج سلولی، سوبسترای بهتری برای ترکیب HAT- GCH5 در مخمر می شود. البته بعید نیست که هیچ عملکرد مهمی به طور متقابل بین مبدل های مختلف هیستونی در شرایط داخل سلولی وجود نداشته باشد. به عبارت دیگر احتمالاً طی چند سال آینده مبدل های هیستونی دیگری که تمایل زیادی به رشته های کروماتین داشته باشند، کشف شوند.

www.ShimiPedia.ir

کمپلکس های بسیار بزرگ

تلاس های انجام شده جهت خالص سازی هسته ترکیبات HAT توسط ابزارهای بیوشیمیایی مرسوم (مانند ستون کروماتوگرافی) نشان می دهد که هسته بسیاری از آنها علاوه بر کمپلکس CBP/P300 واجد ترکیبات بزرگتری متشکل از چند کمپلکس با بیش از 20 ترکیب پروتئینی و با وزن مولکولی بسیار سنگین حدود 2 MDa (2×10^3 KDa) می باشند. در خصوص این کمپلکس های شناخته شده به روش های مختلف بین دانشمندان اختلاف نظر وجود دارد، به طوری که گروهی بر این عقیده هستند که پروتئین ها طی مراحل تخلیص از بین می روند و گروهی دیگر می گویند که پروتئین ها طی این مراحل به دست می آیند. برخی از این کمپلکس ها به همراه سایر خانواده های آنزیمی HAT در جدول 8- 2 شرح داده شده اند. دانشمندان معتقدند که یکی از ترکیبات شروع کننده فرایند نسخه برداری در مخمر $IAF_{II}145$ و در انسان $IAF_{II}250$ بوده که واجد فعالیت آنزیمی HAT می باشد. هر چند که این فرضیه کاملاً شناخته شده نیست ولی احتمالاً در ارتباط مستقیم با یافته های اخیر در خصوص استیلاسیون پروتئین های موجود در کمپلکس فوق (در شرایط خارج سلولی) می باشد. البته مقدار آن در مقایسه با هیستون ها به نسبت پایین است و دلیل آن این است که جهت سنجش فعالیت HAT در شرایط خارج سلولی فقط از هسته پروتئین های هیستونی به عنوان سوبسترا استفاده می شود ولی در شرایط داخل سلولی پروتئین های غیر هیستونی نیز بکار می روند. یکی از کاربردهای الیگو نوکلئوتیدها سنجش و اندازه گیری تعدادی از mRNA های موجود در گونه های وحشی و جهش یافته مخمرها می باشد و کاربرد دیگر آن تعیین مکانیزم جهش ایجاد شده در کاهش عملکرد ژن GCN5 (ژن کد کننده ترکیب کاتالیتیکی SAGA) و ترکیب $IAF_{II}145$ (یک نوع پروتئین HAT مخمری که شروع کننده کمپلکس نسخه برداری است) می باشد. اختلال ناشی از نقص ژن GCN5 در مقایسه با نقص ناشی از ژن AW1/SNF فقط حدود 5% بوده در حالیکه این اختلال در نقص ناشی از ژن $IAF_{II}145$ به 16% می رسد. بر این اساس می توان گفت که تقریباً نسخه برداری 75% ژن ها وابسته به $IAF_{II}17$ است که یک پروتئین کوچک در ترکیب SAGA می باشد، به هر حال، کمپلکس شروع کننده نسخه برداری نیست. به طور واضح سنجش و بررسی محدودیت های ناشی از جهش ها نشان می دهد که مکانیزم های دیگری باید در این فرایند دخالت داشته باشد، اما تا به حال مکانیزم خاصی در خصوص چگونگی عمل این کمپلکس ها و ترکیبات مربوطه مشاهده نشده است. بنابراین جهت بررسی فرایند نسخه برداری نیازمند ژن هایی تقریباً مشابه هستیم. البته نیاز به مطالعه بیشتری دارد تا معلوم شود که آیا تغییر در رشته های کروماتین کاملاً اختصاصی است یا نه ؟ و همچنین باید خاطر نشان شد که فعالیت ژن های $IAF_{II}145$ جهت رشد و نمو سلول

www.ShimiPedia.ir

لازمند و مخمرهایی که در ژن HAT- GCN5 آنها جهش ایجاد شده است، مشاهده گردید که از لحاظ تکاملی بسیار ضعیف عمل می کنند.

داستیلازهای هیستونی

استیل ترانسفرازها و داستیلازهای هیستونی آنزیم هایی هستند که باعث استیلاسیون هیستون ها در ژنوم و یا گاهی در سیتوپلاسم می گردند. بررسی آنها بر اساس فهرست بندی سر فصل ها کار ساده ای است ولی باید دانست که آنها بخش مهمی از مکانیزم تنظیم ژن ها می باشند که برخی از آنها ترکیبات HAT و HDAC و کمپلکس های چند زیر واحدی بوده و گروهی دیگر از پروتئین ها واجد هر دو نوع کمپلکس هستند. شناسایی پروتئین HDACS و مطالعات کلونیگ ژن کد کننده آن بیان می کند که این پروتیئن شباهت زیادی به پروتئین های HAT دارد. برای اولین بار HDAC را به صورت هموژن از کشت سلول های انسانی با روش ویژه ای از کروماتوگرافی ماتریکس ستونی به کمک مهار کننده HDAC به نام تراپوکسین (trapoxin) تخلیص نمودند. مشاهدات میکروسکوپی، دو پروتئین چسبیده به دیواره ستون کروماتوگرافی نشان می دهد که یکی از آنها RbAP48 بوده که پروتئین مربوط به ژن مهار کننده تومور RB است و دیگری ترکیب HDAC1 بوده که یک پروتئین جدید مهار کننده تراپوکسین و ناحیه کاتالیتیکی آنزیم داستیلاز می باشد.

مطالعات در خصوص تخلیص و تکثیر توالی DNA مربوط به انواع موجودات نشان می دهد که پپتید HDAC توسط DNA انسانی نیز کد می شود. همچنین شواهدی وجود دارد که آنزیم داستیلاز هیستونی در تنظیمات ژنی دخیل بوده و 60% از توالی آمینو اسیدهای ترکیب HDAC1 انسانی شامل پروتئین های کد شده توسط ژن RPDs در مخمر می باشند که این عامل دلیلی بر تنظیم نسخه برداری است. همچنین مشخص شد که پروتئین RPd3 مخمر نیز واجد فعالیت داستیلاز هیستونی است به طوری که دانشمندان طی انجام آزمایش های بیوشیمیایی بر روی مخمر سرویسیه دو کمپلکس پروتئینی با فعالیت داستیلازی هیستونی جدا نمودند که یکی از آنها کمپلکس RPd3 و دیگری یک نوع داستیلاز به نام HDA1 است. در سلول های یوکاریوت ساده مانند سرویسیه سه هومولوکسی از ترکیبات HDA1 به نام های HOS1 و HOS2 و HOS3 استخراج کردند که داستیلازهای هیستونی مشتق شده از خانواده آنزیم ها می باشند. این شرایط ممکن است در اکثر کمپلکس ها دیده شود زیرا تمام آنزیم های داستیلاز نیاز به هومولوکس های RPD3 و HAD1 ندارند. گزارش شده است که پروتئین کد شونده توسط ژن

www.ShimiPedia.ir

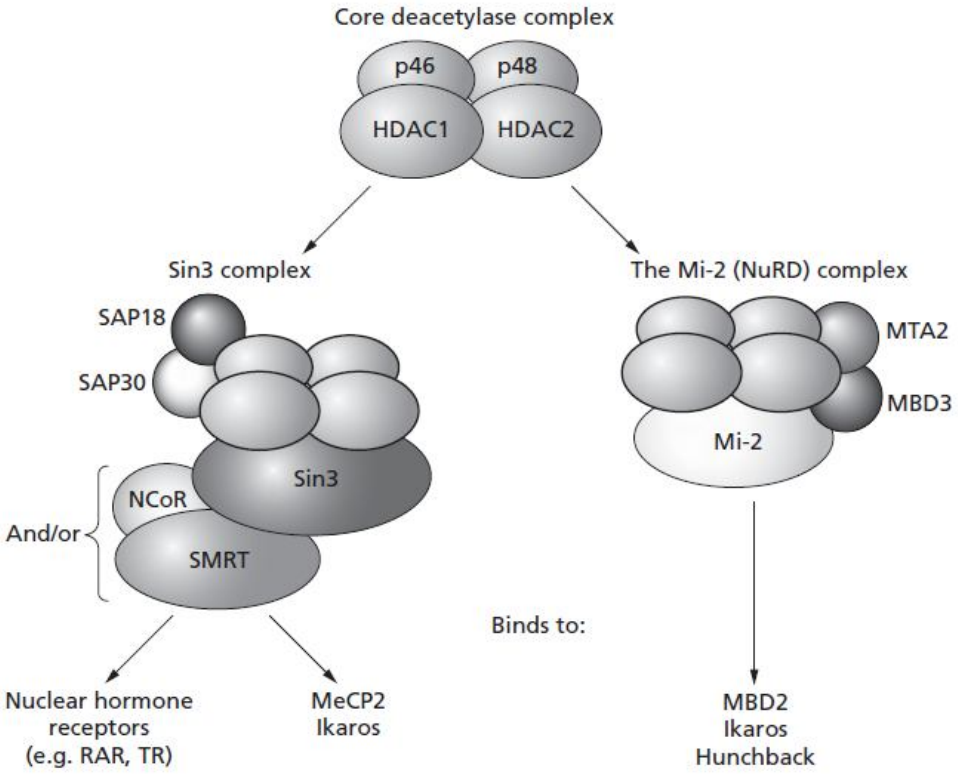
SIR2 مخمر نیز دارای فعالیت داستیلازی هیستونی است. ولی تا کنون هیچ هومولوکسی با فعالیت داستیلازی در مخمر یا سایر موجودات یافت نشده است، زیرا فعالیت آن نیاز مبرم به حضور غلظت های میلی مولار از NAD دارد. البته بعید است که انرژی ناشی از ترکیبات Sir2 که به تغییرات حد واسط های متابولیسم حساس است منجر به تغییر ساختار کروماتین گردد. باید توجه داشت فعالیت HAT در برخی از ترکیبات HDACS به عنوان بخشی از کمپلکس های چند زیر واحدی نقش مهمی در افزایش فعالیت برخی از پروتئین ها دارد. البته این پدیده در تمام گونه های مختلف خانواده HDAC وجود دارد ولی مسلماً زیر واحدهای HDAC1 و HDAC2 در یوکاریوت ها بیشتر قابل توجه هستند. این گونه به نظر می رسد که هسته کاتالیتیکی کمپلکس فوق متشکل از HDAC1 و HDAC2 (که معمولاً با هم یافت می شوند) و RbAp48 و احتمالاً پروتئین RbQP46 می باشد (شکل 8- 6). پروتئین های مختلف با عملکرد مشخص و یا مشکوک در تنظیم ژن نیز دخیل هستند. خوشبختانه نحقیقات جدید نشان می دهند که اکثر این اندرکنش ها توسط یکی یا هر دو پروتئین کلیدی به نام Sin3a و Mi-2 انجام می شود که موقعیت آن در شکل 8- 6 قابل رویت است. کمپلکس Sin3 علاوه بر ترکیبات HDAC1/2 و RbAp46 واجد پروتئین های کوچکتری به نام های SAP30 و SAP18 می باشد (SAP در واقع پروتئین مربوط به Sin3 است).

ترکیب Sin3 با چهار ناحیه آمفی پاتیک مارپیچی جفت شده است که در اندرکنش با پروتئین های کمپلکس است (شکل 8-7). از آنجا که کمپلکس Sin3 قادر به بر قراری پیوند با پروتئین های نسبتاً بزرگ مانند NCOR (مهار کننده گیرنده های هورمونی هسته) و SMTR (مدیاتور خاموش کننده رتینوئید و گیرنده هورمون تیروئید) است به آن مدیاتور پیوند شده به گیرنده هورمون ها گویند مثل استروژن و رتینوئید اسید یا ویتامین D . احتمالاً کمپلکس Sin3 با پیوندهای هترودیمری DNA مانند mad/mox و یا با پروتئین mecp2 پیوند شده با متیل DNA در ارتباط است که این ترکیبات را در شکل 8- 6 مشاهده می کنید. در واقع هدف اصلی این پروتئین بر قراری ارتباط با کمپلکس داستیلاز Sin3 در بخش های ویژه ای از ژنوم است. گروه دیگری از کمپلکس های HDAC1/2 ، پروتئین Mi-2 می باشند که ساختار آن در شکل 8- 7 نشان داده شده است. به نظر می رسد که یک هومولوکوس با فعالیت helicase/ATPase وجود دارد که شامل زیر واحدهای هلیکازی از کمپلکس SW1/SNF می باشد. پروتئین Mi-2 علاوه بر فعالیت ATPase قادر به ترمیم و ایجاد تغییر در نوکلئوزوم نیز می باشد که بر این اساس نام دیگر آن کمپلکس NuRD است و علامت اختصاری nucleosome remodeling histon deacetylase می باشد. این کمپلکس علاوه بر ترکیبات HDAC1/2 و RbAP46/48 و Mi- 2 و دارای نواحی پیوند شده به گروه متیل

www.ShimiPedia.ir

DNA (MBD) با دو زیر واحد MBD2 و MBD3 است که در واقع نوعی پروتئین مشابه برای متاستاز است که عامل تومور انسانی به نام MIA1 است.

همانطور که در شکل 8-6 نشان داده شده است، ترکیب Mi-2 یا NuRD قادر است با پروتئین های دیگر در نواحی خاصی از ژنوم ایجاد پیوند نماید. فهرست طویلی از پروتئین های کمپلکس های Sin3 و Mi-2 (NuRD) در شکل 8-6 مشاهده می شود که اغلب پروتئین ها در ارتباط با هر دو کمپلکس مذکور هستند. هدف اکثر پروتئین های پیوند شده به DNA و عملکرد اولیه آنها فعال کردن کمپلکس HDAC در نواحی خاصی از ژنوم می باشد. برای مثال فاکتور نسخه برداری mad/max (با پیوندهای هترودیمر) به عنوان هدفی برای ژن های تنظیم کننده رشد و نمو با مکانیزمی تقریباً آرام در زمان های مختلف است. پروتئین هایی مانند NCOR و SMRT توانایی اتصال به DNA خودشان را ندارند ولی قادرند به هسته Sin3 جهت فعالیت پروتئین ها ملحق شوند.

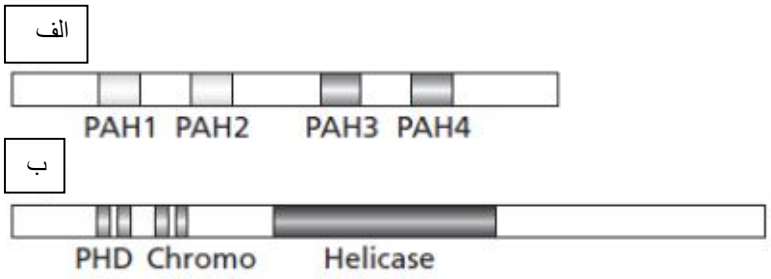


شکل 8-6 عملکرد داستیلازهای هیستونی HDAC1 و HDAC2 موجود در بخشی از کمپلکس های چند پروتئینی.

دو ترکیب HDAC1 و HDAC2 برای انجام فعالیت کاتالیزوری باید به پروتئین های دیگر مثل p46 و

www.ShimiPedia.ir

p48 متصل شوند. از طرف دیگر این دو پروتئین با پروتئینی به نام رتینوبلاستوما Rb (retinoblastoma) می توانند پیوند برقرار کنند. این فعالیت کاتالیزوری در هسته کمپلکس می تواند با کمپلکس های بزرگتر مانند کمپلکس های Sin3 و Mi-2 الحاق شود. کمپلکس Mi- 2 در بازسازی کروماتین دخالت دارد. این کمپلکس ژن های ویژه ای را هدف قرار می دهد و به نواحی خاصی از کروموزوم توسط پروتئین های دیگر مثل گیرنده های هورمون های هسته ای و پروتئین های پیوند به متیل - CpG (با علامت های اختصاری MeCP2 و MBD2) متصل می شود.



شکل 8- 7 ساختار دُمین های Sin3 و Mi- 2 پستانداران. پروتئین Sin3 شامل چهارجفت مارپیچ آمفی پاتیک PAH (paired amphipathic helix) است که احتمالاً با سایر پروتئین ها اندرکنش می دهد، در نتیجه به فعالیت کمپلکس داستیلاز کمک شایانی می نماید (مارپیچ آمفی پاتیک در واقع آمینو اسیدهایی با بارهای مخالف دارد که درست در سمت مخالف مارپیچ قرار می گیرند). آنها گاهی در برقراری پیوند پروتئین - پروتئین دخالت می کنند). Mi- 2 بزرگترین ترکیب مؤثر در کمپلکس داستیلاز Mi-2 است که به آن کمپلکس NuRD نیز گفته می شود. این کمپلکس شامل دو هومئو دُمین PHD (plant homeodomain) و دو کرومو دُمین (chromodomain) و بالاخره یک ناحیه ATP آزی - هلیکازی SWI/SNF می باشد که دخالت آنها در بازسازی کروماتین امری ضروری است.

www.ShimiPedia.ir

به نظر می رسد که این موقعیت با دخالت شماری از پروتئین ها و برخی از ترکیبات تجزیه کننده تکمیل گردد. پروتئین هایی که در فرایند داستیلاز دخالت دارند معمولاً در یک گروه سه تایی در کنار هم دیده می شوند و عبارتند از:

1) پروتئین های کاتالیتیکی: HDAC1 و HDAC2 ترکیباتی هستند که در جایگاه کاتالیتیکی آنزیم در استیلاز قرار می گیرند ولی باید دانست که دو پروتئین RbAp46 و RbAp48 نقش مهمی در سهولت فعالیت کاتالیتیکی دارند. HDAC1 نو ترکیب بیان شده در باکتری E.coli به طور کاتالیتیکی غیر فعال می شود ولی ترکیب RbAp48 تخلیص شده به روش بیوشیمیایی تا حدودی فعال است. فعالیت برخی از پروتئین ها به طور اختصاصی بر دو زیر واحد کاتالیتیکی کمپلکس مذکور اثر می گذارند (البته صحت آن زمانی قابل قبول است که این شواهد به طور قطعی ثابت شوند). پروتئین Mi-2 با فعالیت ATPase نقش به سزایی در این فرایند خواهد داشت.

2) پروتئین های هدف: پروتئین هایی با کمپلکس های هترو دیمری مانند mad/max و RAR/RXR هستند. این پروتئین ها به ژن های خاصی مانند ژن هایی که دارای DNA متیله شده هستند، گرایش دارند (MeCP2) و ایجاد اندرکنش بین HDAC ها و پروتئین های متصل به متیل DNA (حدواسط هایی بین هیستون های داستیله شده با DNA متیله شده) می نمایند. پروتئین های RbAp48 با کمپلکس سازمان دهنده کروماتین CAF1 پیوند برقرار می کنند که احتمالاً در کروماتین هایی که اخیراً داستیله شده اند، وجود دارند.

3) پروتئین های واسطه گر: ترکیب HDAC ها به قدری کوچک است که به تنهایی توانایی اتصال به تمام پروتئین های هدف را ندارد. بنابراین جهت برقراری اتصال، نیازمند پروتئین های واسطه گر (میانجیگر) بزرگ Sin3 ، Mi- 2 ، NCoR و یا کمپلکسی مشترک از آنها است. مشابه چنین مکانیسمی را می توان در کمپلکس های HAT با میانجیگری پروتئین CBP/p300 به عنوان آنزیم و پروتئین واسطه گر بزرگ یافت.

گیرنده های هسته ای

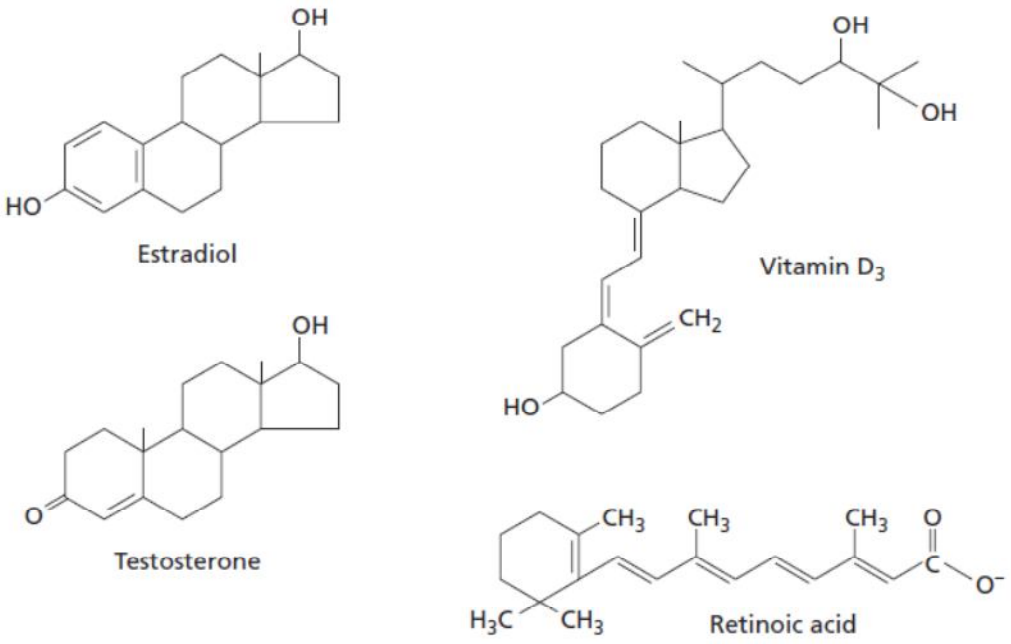
پروتئین هایی هستند که توانایی اتصال به هورمون ها را داشته باشند و بتوانند مجموعه ای از ژن ها در مناطق حساس به هورمون را فعال نمایند. برخی از این پروتئین ها عبارتند از گیرنده های هسته ای هورمون های تیروئیدی، استروئیدی، رتینوئیدها و ویتامین D . اگر چه این گیرنده ها از نظر ماهیت شیمیایی متفاوتند ولی اکثر آنها کوچک بوده و به دلیل خاصیت هیدروفوبی به راحتی از

www.ShimiPedia.ir

غشای سلول عبور می کنند (شکل 8- 8). این هورمون ها در یک سمت سلول به گیرنده های پروتئینی متصل می شوند و هنگام عمل نسخه برداری روی مجمو عه ای از ژن ها اثر می گذارند.

تمام گیرنده ها به توالی خاصی از DNA به صورت هترودیمر متصل می شوند و همه آنها از CBP/p300 به عنوان کواکتیواتور استفاده می کنند. گیرنده های هسته ای شامل دو گروه بزرگ به نام های گیرنده های رتینوئیک اسید (retinoic acid receptor)

یا RAR و گیرنده های تیروئیدی می باشند. با مثال های ارائه شده نقش آنها در فعالیت HAT ها و HDAC ها طی روشن و خاموش کردن ژن خاصی مشخص می گردد. به عنوان مثال به گیرنده RAR اشاره می نمائیم که ارتباط نزدیکی با بیماری های انسانی دارد. شکل جهش یافته RAR به طور مستقیم باعث بروز تومورهای انسانی می گردد.



شکل 8- 8 نمونه هایی از لیگاندها که می توانند به گیرنده های هسته ای متصل شوند و روی تنظیم ژن و نحوه اتصال به DNA اثر بگذارند.

پس از اتصال لیگاند به گیرنده، RAR به صورت دیمر به همراه پروتئین RXR به توالی خاصی از DNA متصل می شود. در شرایط خارج سلولی لیگاند مربوطه به صورت دیمر با تعدادی از کواکتیواتورهای CBP/p300 و CAF همچنین فاکتورهای

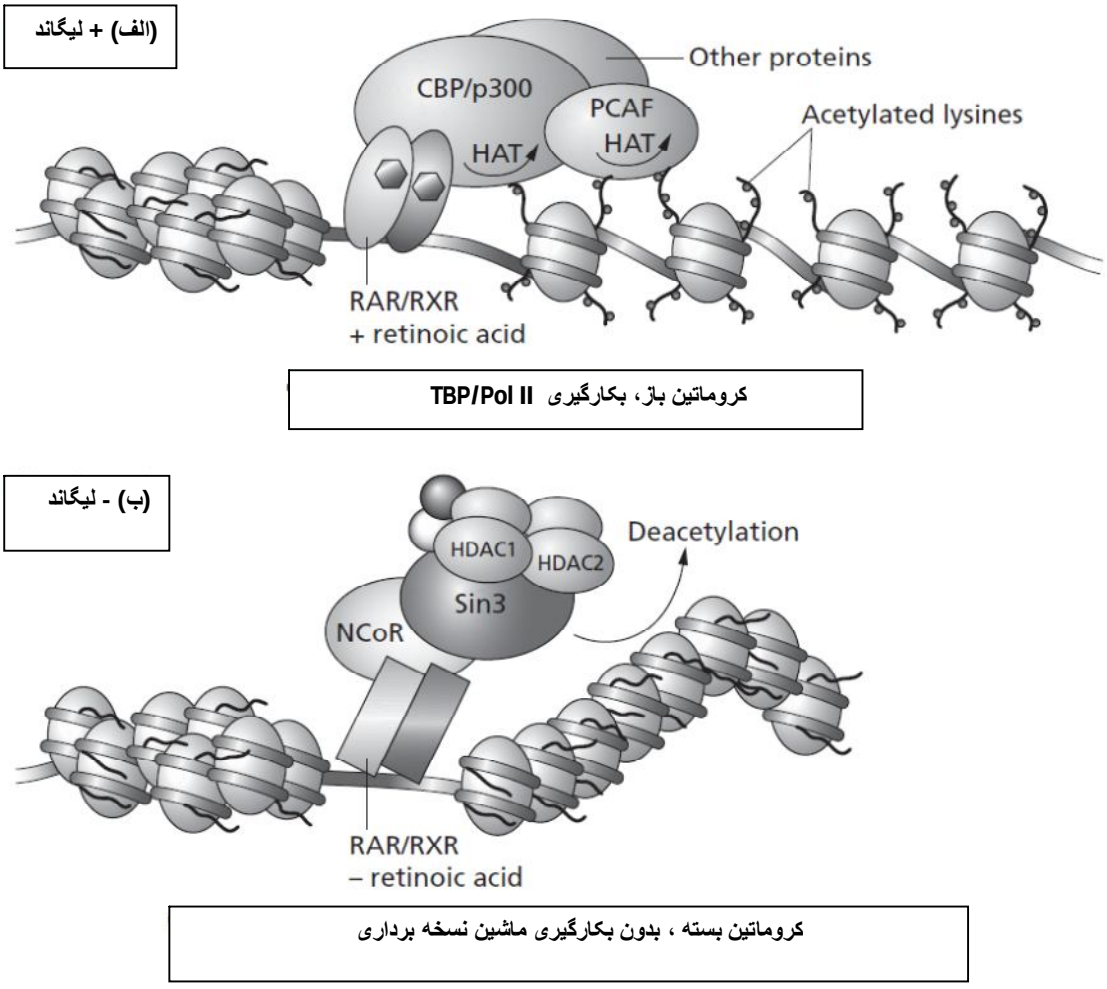
www.ShimiPedia.ir

فعال کننده نسخه برداری ایجاد پیوند می کند. آزمایش های ایمنو پرسیپیتاسیون (رسوب سنجی ایمونولوژی یا ChID) در کروماتین ها با آنتی بادی های H3 و H4 استیله شده، بیانگر افزایش فاکتورهای تنظیم کننده نسخه برداری به همراه افزایش استیلاسیون هیستونی در نوکلئوزوم های نزدیک به پروموتر ژن های پاسخگوی RAR می باشد. مکانیسم این فرایند به طور خلاصه در شکل های 8 – 4 و 8- 5 آمده اند. فعال بودن ژن ها به نوع و مرحله تمایز سلول وابسته است. به طور معمول حضور این ژن ها برای تمایز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی (apoptosis) ضروری است به طوری که با کاهش بیان ژن RA رشد و تکثیر سلول افزایش می یابد.

در شرایط خارج سلولی، هترودیمر RAR/RXR توانایی بهتری در اتصال به DNA نوکلئوزومی در مقابل DNA برهنه دارد، ولی رتینوئیک اسید قدرت کمتری در اتصال به دیمرهای هتروکروماتین نشان می دهد. به هر حال، گیرنده های RA قادر است تنظیم سازماندهی نوکلئوزوم بر روی پروموتر $RAR\beta_2$ را تغییر دهد. معمولاً از این مدل پروموتر در آزمایشگاه جهت مطالعه چگونگی عملکرد RAR استفاده می شود. نتایج به دست آمده نشان می دهند که فعالیت هترودیمر RAR/RXR به جای جایگزینی یا تخریب موقعیت نوکلئوزوم ها ترجیح می دهد که سازماندهی مجدد در آرایش نوکلئوزوم ها به وجود آورد. ممکن است این عمل سازماندهی مجدد در کروماتین همان بازسازی کروماتین باشد که قبلاً در مورد آن گفته شد. شواهد قوی وجود دارند که فعالیت گیرنده گلوکوکروتیکوئید (خانواده مربوط به گیرنده های هسته ای) و احتمالاً RAR ، نیازمند همولوگ SW1/SNF و کمپلکس BRG- 1 می باشد. چنین یافته هایی نشان می دهند که ارتباط نزدیکی بین کمپلکس های مختلف کواکتیواتورها و کمپلکس های آنزیمی مربوط به ترمیم کروماتین وجود دارد. البته آنزیم های بکار رفته ممکن است در سلول ها، ژن ها و کروماتین های مختلف متفاوت باشد. از هترودیمر RAR/RXR می توان جهت مطالعه ارتباط بین گیرنده های هترودیمر و کمپلکس های آنزیمی استفاده نمود. در حضور لیگاند، RAR/RXR از کمپلکس CBP/p300 HAT جهت اتصال به پروتئین ها استفاده می کند (شکل 8- 9 ، الف) . در غیاب لیگاند، هترودیمرهای RAR/RXR در شرایط خارج سلولی می تواند به همان توالی از DNA متصل شود ولی توسط کمپلکس Sin3 HDA مانع نسخه برداری می گردد (شکل 8- 9، ب). این مدل ها در شرایط داخل سلولی با غلظتی بالا انجام می شود که دانشمندان تا کنون موفق به انجام آزمایش قابل قبولی در شرایط خارج سلولی نشده اند. با این حال، این مدل اثر مهاری بر روی HDAC در سلول های تغییر یافته دارد و حداقل یک کار مناسب در خصوص موقعیت کمپلکس ها می باشد که از نظر زیست شناسی مدل با ارزشی محسوب می شود. ژن هایی که نقش کلیدی در تمایز و تکامل سلولی دارند شبیه ژن هایی هستند که در پیشرفت چرخه سلولی دخالت کرده و به شدت تحت کنترل هستند.

www.ShimiPedia.ir

تنظیم مثبت و منفی آنها بدون تعیین زمان مشخص انجام می شود. البته حذف فاکتورهای خاموش کننده یا حذف محرک های نسخه برداری جهت کاهش فرایند نسخه برداری اثر مطلوبی نمی باشد، بنابراین کلید روشن و خاموش (یا واسطه گرها) توسط لیگاند به طور اختصاصی عمل می کند.



شکل 8- 9 پیوند رتینوئیک اسید مشخص می کند که هترودیمر RAR/RXR جهت فعال کردن کمپلکس استیل ترانسفراز هیستون (HAT) استفاده شود یا برای سرکوب کردن کمپلکس داستیلاز هیستونی (HDAC) عمل کند. زمانی که هترودیمر RAR/RXR به لیگاند رتینوئیک اسید متصل می شود، شکل آن تغییر می نماید. توانایی و ویژگی اتصال گیرنده های لیگاند شده یا نشده به DNA یکسان است. اما گیرنده لیگاند شده به کمپلکس CBP/p300 ملحق می شود (الف) و گیرنده لیگاند نشده به کمپلکس داستیلاز Sin3 متصل می گردد (ب).

www.ShimiPedia.ir

کروماتین و سرطان

بررسی آنزیم های تغییر دهنده شکل و بازسازی کروماتین، اطلاعات خوبی در خصوص نقش کروماتین در بیان ژن در اختیار ما می گذارد. این یافته ها علاوه بر این که زمینه ای برای تحقیقات و درمان بعضی از بیماری ها است، به مهارت هایی که در بیان ژن نیز دخالت دارند، کمک می کند. نکته مهم این است که کمپلکس تغییر دهنده شکل کروماتین نقش اساسی در پیسرفت سرطان های انسانی ایفا می نماید.

اغلب سرطان ها در اثر جابجایی کروموزوم ها یا تغییر در ساختار و الگوی بیان ژن های تنظیمی مربوط به رشد ایجاد می شوند. یکی از موارد جابجایی در موقعیت کروموزوم 22: 8 مربوط به گلبول های سفید خون می باشد که منجر به بروز سرطان خون مزمن میلوئید

CML (chronic myeloid leukemia) می گردد. این جابجایی ناشی از حذف بخش کوچکی از کروموزوم 22 (تحت عنوان کروموزوم فیلادلفیا) و بخشی از انتهای کروموزوم 8 است. در واقع ناحیه ای از کروموزوم 8 حامل ژن ABL است. ABL ژن کد کننده آنزیم تیروزین کیناز است که بدین ترتیب تیروزین کیناز نیز باعث پیام رسانی از غشای پلاسمایی سلول می شود. در کروموزوم فیلادلفیا، ABL در نواحی خاصی که جهت نسخه برداری می باشند، ایجاد برش می نماید. به این منطقه، ناحیه خوشه ای نقطه انفصال BCR (breakpoint cluster region) گویند. بنابراین عدم پاسخ دهی پروتئین بهم پیوسته BCR/ABL (کنترل کننده سلول های حاوی ABL تیروزین کیناز) باعث رشد غیر طبیعی سلول های میلوئیدی خون شده و در نتیجه سرطان CML بروز می نماید. مطالعات اخیر نشان می دهند که پدیده جابجایی در سلول های میوتیک نبوده بلکه مربوط به سلول های سوماتیک است. بر این اساس جهش در سلول های سوماتیک منجر به بروز سرطان می گردد و ممکن است سرطان یک استعداد ارثی باشد. در نمونه های زیادی از سرطان های مربوط به لوکمیا و سارکوما (sarcoma) دیده شده است. شمار زیادی از این تغییرات در کمپلکس های کواکتیواتورها و کورپرسورهایی مانند HAT و HDAC مشاهده شده است.

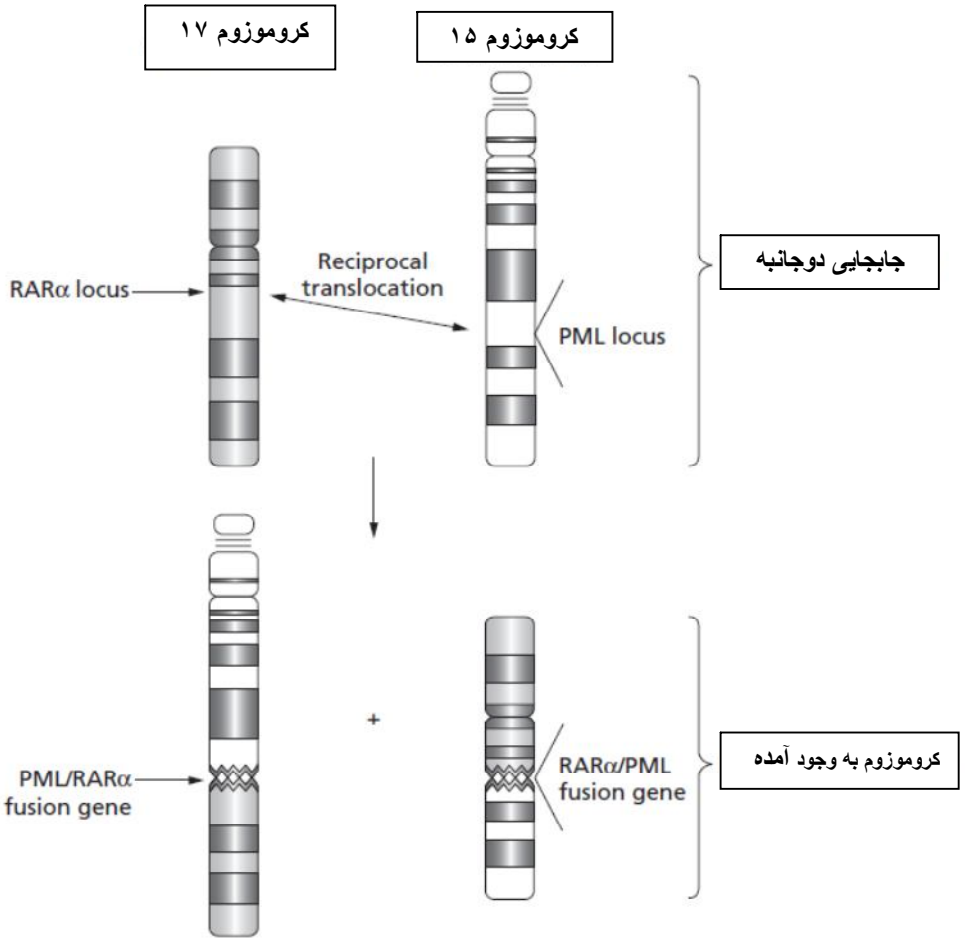
www.ShimiPedia.ir

گیرنده رتینوئیک اسید و لوکمیا پرومیلوسیتیک

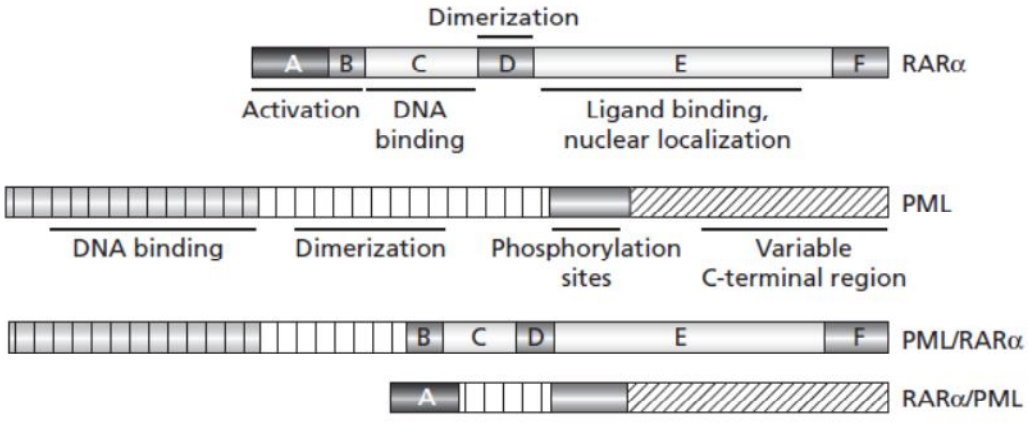
در جابجایی دو طرفه مربوط به لوکمیا پرومیلوسیتیک APL (promyelocytic leukaemia) مشاهده شده است که باعث افزایش پروتئین های هیبریدی مانند گیرنده های رتینوئیک اسید (مخصوصاً در زیر واحد RAR α) می گردد. دو پروتئین دیگر در سلول ها وجود دارند، یکی به نام PML (promyelocytic leukaemia protein) که باعث جابجایی کروموزوم 15 و 17 می شود و دیگری به نام پروتئین PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) است (پروتئینی حاوی موتیف زینک فینگر) که در سلول ها باعث جابجایی معکوس در کروموزوم 11 و 17 می گردد. ادغام RML/RARα توسط محققین شناسایی و بررسی گردید. مثل پروتئین RAG-1 که در DNA نوترکیب وجود دارد). (2)آنها شامل ناحیه ای با چند مارپیچ - α هستند و موقعی که به شکل دیمر در می آیند، ساختار coiled- coil ایجاد می کنند. ساختار آن شبیه ساختار RAR دیمر است. (3) آنها یک دُمین غنی از باقیمانده های پرولین و سرین دارند که این توالی قابل تشخیص است و توسط آنزیم کازئین کیناز II فسفوریله می شود. این کیناز تغییراتی در اکثر فاکتورهای نسخه برداری ایجاد می کند و موجب تغییر در عملکرد آنها می شود. ادغام دو پروتئین RML/RARα ناشی از جابجایی دو طرفه است و پروتئین حاصل از قسمت بزرگتر دارای دُمین های مهم عملکردی می باشد (شکل 8-11). یکی از آنها در ایجاد بیماری در APL مؤثر است. نقش محصول به دست آمده از قسمت کوچکتر هنوز ناشناخته است. ترتیب ادغام پروتئین های PLZF/RAR شباهت زیادی به ادغام پروتئین فوق الذکر دارد. لوکوس PLZF بر روی کروموزوم 11 قرار دارد. محصول پروتئینی آن دارای 9 موتیف زینک فینگر است. این ترکیب شبیه فاکتور نسخه برداری ژن کروپل (Kruppel) در دروزوفیلا است. نتایج جابجایی قسمت هایی از ژن های 11 و 15 تولید ژنی می کند که انتهای - C پروتئین حاصل از آن ژن قسمتی از PLZE را می سازد. این پروتئین دو زینک فینگر دارد و انتهای - N آن قسمت بیشتر RARα را به وجود می آورد (شکل 8- 12). در حقیقت، بخش RARα به طور مشابه در پروتئین های ادغام شده PLZF/RARα و PML/RARα وجود دارد.

پروتئین های PML/RARα و PLZF/RARα هر دو به عناصر پاسخ دهنده رتینوئیک اسید RARE (retinoic acid response element) متصل می گردند و ژن های کنترل شده توسط این عناصر در غیاب لیگاند خاموش می شوند. به هر حال، این خاموشی ژن حتی در حضور غلظت های فیزیولوژیکی ($10^{-9} - 10^{-7}$ M) رتینوئیک اسید همچنان باقی می ماند.

www.ShimiPedia.ir



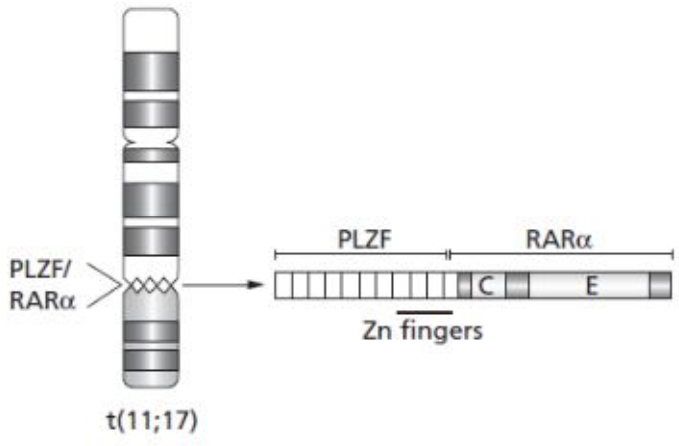
شکل 8- 10 جابجایی معکوس بین کروموزوم های 15 و 17 را در شکل فوق مشاهده می کنید.



شکل 8- 11 ساختار دُمین پروتئین های PML و RARα و پروتئین جدید ناشی از بیماری لوکمیا پرومیلوسیتیک (PML)

www.ShimiPedia.ir

پروتئین های هیبرید می توانند با لیگاند اتصال برقرار کنند، اما آنها قادر به تحمل تغییرات ساختاری نیستند و این تغییرات مربوط به آزاد شدن همزمان کمپلکس مهاری و سپس اتصال با کواکتیواتورهای CBP/p300 است (شکل 8- 9). نقص در فعالیت ژن ها طی مراحل تمایز میلوئیدها باعث مهار تمایز و رشد نامطلوب سلول ها و سرانجام بروز لوسمی (کم خونی) می گردد.



شکل 8- 12 ژن بهم پیوسته PLZF/RARα و پروتئین تولید شده توسط آن را در شکل فوق مشاهده می کنید.

به طور کل، رفتار پروتئین های هیبرید RML/RAR و PLZF/RAR بسیار مشابه است. مطالعات انجام شده در دودمان های مختلف سلولی نتایج متفاوتی را نشان می دهند. برای مثال کمپلکس مهار کننده در حضور غلظت بالای رتینوئیک اسید از RML/RARα جدا می شود، در حالیکه از PLZF/RARα جدا نمی شود. شاید در ابتدا جزئیات آزمایش نامشخص باشد ولی آنچه که در این آزمایش ها اهمیت دارد این است که غلظت بکار رفته $2\times10^{-5} - 10^{-7}$ M می باشد. البته به نظر می رسد که غلظت های این مواد در شرایط داخل سلولی بالاتر باشد و از لحاظ دارویی و درمان در همین حدود است. بر این اساس یافته های جدید احتمال درمان APL را افزایش می دهند. در کل، بیماران مبتلا به APL از نوع PML/RARα به درمان با رتینوئیک اسید به خوبی پاسخ می دهند در نتیجه مهار تمایز سلول ها از بین رفته و بیماری لوسمی بهبود می یابد. متأسفانه این بهبودی معمولاً تا یک سال دوام دارد، به طوری که پس از آن لوسمی با شکل مقاوم- RA عود می کند. در مقابل افراد مبتلا از نوع PLZF/RARα به هیچ عنوان به درمان RA پاسخ نمی دهند. کاهش حساسیت به RA در مبتلایان از نوع PLZF/RAR

www.ShimiPedia.ir

باعث می شود تا PLZF قادر به استفاده از HDAC (حاوی کمپلکس مهاری) باشد. حتی اگر کمپلکس مهاری به ترکیب RAR آزاد شده از RA متصل شود، باز هم قادر به اتصال با ترکیب PLZF نخواهد بود.

یافته های جدید در خصوص مکانیسم مهار ژن توسط RAR و مسیرهای تخریب لوسمی، ما را امیدوار می کند که درمان های جایگزین برای بیمارانی که RA در آنها مؤثر نیست یا بیمارانی که پس از درمان طولانی به RA پاسخ نمی دهند، کشف شود. یکی از این نوع یافته ها، استفاده از مهار کننده های HDAC به تنهایی یا همراه با RA است. برخی از آزمایش ها نشان می دهند که فعالیت کورپرسور همراه با PLZF به ترکیب TSA مهار کننده HDAC حساس است. آزمایش های کلینیکی در خصوص سایر مهار کننده های HDAC مانند سدیم فنیل بوتیرات در حال انجام است.

پروتئین های AML1 و ETO

اکثر ژن هایی که به علت جابجایی های کروموزومی تخریب شدند و در ارتباط با لوسمی میلوئید هستند روی کروموزوم شماره 21 قرار دارند و به آنها AML1 (acute myeloid leukaemia) گویند. AML1 یک فاکتور نسخه برداری ضروری را برای فعالیت ژنها رمز گذاری می کند که حضور آن برای تمایز سلول های هماتوپوتیک (haematopoietic) لازم است. آنها حاوی ژن هایی برای برخی از فاکتورهای رشد مانند اینترلوکین - 3 و فاکتور تحریک کننده کلونی ماکروفاژ - گرانولوسیت GMCSF (granulocyte- macrophage colony stimulating factor) همچنین برخی از آنزیم های خاص مانند میلوپراکسیداز (myeloperoxidase) هستند. پروتئین AML1 حاوی یک دُمین پیوندی به DNA است که کاملاً محافظت شده می باشد. این دُمین مشابه فاکتور نسخه برداری PUNT در دروزوفیلا است. وقتی این دُمین فعال شود می تواند از HATCBP/p300 استفاده نماید.

یکی از جابجایی های کروموزومی معمول در AML ، جایگاه های 8 و 21 است که دارای 177 آمینو اسید در ناحیه انتهای - N می باشد و معمولاً با ژنی به نام ETO (eight twenty one) ادغام شده است. پروتئین هیبریدی که توسط ژن AML1/ETO رمز گذاری شده است می تواند ناحیه پیوند به DNA مربوط به AML1 را حفظ کند، ولی توانایی اتصال به p300 را از دست داده است. پروتئین ETO به طور ویژه قادر است به کورپرسور N- Cor یا کمپلکس کورپرسور N- Cor/SMRT/HDAC متصل شود. بنابراین، ژن های ضروری برای تمایز صحیح سلول های هماتوپویتیک (جدا از فرایند فعال سازی) مهار کننده های قوی هستند (شکل 8- 9 را مشاهده کنید). نتایج اعمال فوق باعث می شوند که سلول ها تجمع یافته و

www.ShimiPedia.ir

ازمسیر تمایز سلولی منحرف شوند و سرانجام موجب بروز لوسمی گردد. متأسفانه توانایی پروتئین هیبرید AML1/ETO جهت جلوگیری از تمایز توسط مهار کننده های HDAC به صورت برگشت پذیر نمی شود. احتمالاً این موضوع بخاصر فعالیت کاتالیزوری داستیلاز است که برای عملکرد کورپرسور خاص مورد نیاز نمی باشد. به عبارت دیگر، احتمالاً جایگاه کاتالیزوری موجود در پروتئین هیبرید به مهار کننده های داستیلاز مقاوم است. پاسخ به این سؤال ممکن است در تصمیم گیری جهت درمان انواع مختلف سرطان ها مهم باشد.

دو مثال شرح داده شده به خوبی نشان می دهنده که چگونه اختلال در مکانیسم های روشن و خاموش شدن ژن های لازم در تنظیم تمایز سلولی می تواند باعث بروز لوسمی در انسان شود. مطالعه بر روی این بیماری ها و جابجایی های ویژه، مستلزم تجزیه و تحلیل داده های دقیق آزمایشگاهی است. به هر حال، مانند سایر بیماری ها و سرطان های انسانی، این بیماری نیز در نتیجه ایجاد اختلال در کمپلکس های کواکتیواتور/کورپرسور به وجود می آید. به عنوان مثال، نوع دیگری از AML با جابجایی (8 ؛ 16) (p 11 ؛ p 13) شناسایی شده است که باعث ادغام ژن CBP با MOZ می شود. MOZ یک ژن کد کننده پروتئینی شبیه HAT است.

www.ShimiPedia.ir

منابع:

Further Reading

ATP-powered remodelling complexes

Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y. *et al.* (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, **87:** 1249–1260.

Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L. & Peterson, C. L. (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, **265:** 53–60.

Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J. A. *et al*. (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol. Cell*, **5:** 355–365.

Krebs, J. E., Fry, C. J., Samuels, M. L. & Peterson, C. L. (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell*, **102:** 587–598.

Peterson, C. L. & Workman, J. L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10:** 187–192.

Tyler, J. K. & Kadonaga, J. T. (1999) The dark side of chromatin remodelling: repressive effects on transcription. *Cell*, **99:** 443–446.

Remodelling mechanisms

Brehm, A., Langst, G., Kehle, J. *et al.* (2000) dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and modilization properties. *EMBO J.*, **19:** 4332–4341.

Cote, J., Peterson, C. L. & Workman, J. L. (1998) Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **95:** 4947–4952.

Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark-Adams, C. D. & Winston, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.*, **6:** 2288–2298.

Imbalzano, A. (1998) SWI/SNF complexes and facilitation of TATA binding protein:nucleosome interactions. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*, **15:** 303–314.

Logie, C., Tse, C., Hansen, J. C. & Peterson, C. L. (1999) The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry*, **38:** 2514–2522.

Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R. *et al.* (1999) Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, **400:** 784–787.

HATs and deacetylases

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T. *et al.* (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homologue to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84:** 843–851.

Kochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. & Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, **11:** 162–166.

Marmorstein, R. (2001) Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nature Reviews*, **2:** 422–432.

Ng, H. H. & Bird, A. (2000) Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.*, **25:** 121–126.

Taunton, J., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272:** 408–411.

Utley, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A. *et al.* (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, **394:** 498–502.

Effects on transcription (mutational analysis)

Holstege, F. C. P., Jennings, E. G., Wyrick, J. J. *et al.* (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95:** 717–728.

www.ShimiPedia.ir

Chromatin and cancer

Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G. & Baylin, S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature (Genetics)*, **21:** 103–107.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C. *et al*. (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptora recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, **391:** 815–818.

He, L.-Z., Guidez, F., Tribioli, C. *et al.* (1998) Distinct interactions of PML–RARa and PLZF–RARa with corepressors determine differential responses to RA in APL. *Nature (Genetics)*, **18:** 126–.

www.ShimiPedia.ir

فصل 9

هتروکروماتین

مقدمه

در مجموعه ای از مطالعات میکروسکپی روی سلول های گیاهی و جانوری بین سال های 1934 تا 1982 یک سلول شناس آلمانی به نام هایتس(Heitz) اظهار داشت که نواحی مشخصی روی برخی از کروموزوم ها را می توان به عنوان قطعاتی مجزا به نام هتروپیکنوتیک (heteropycnotic) در هسته اینترفاز در نظر گرفت (این قطعات شدیداً رنگ پذیر بودند). اوکروماتین های کم رنگ موجود در هسته را یوکروماتین (euchromatin) و کروماتینی که به شدت رنگ گرفته بود را هتروکروماتین (heterochromatin) نامید. در واقع این قطعات رنگ پذیر همانطور که در مرحله اینترفاز متراکم هستند، در مرحله پروفاز نیز متراکم باقی می مانند. طی مطالعات ژنتیکی در دروزوفیلا دو خاصیت دیگر هتروکروماتین آشکار شد. اول این که حاوی تعداد کمی ژن می باشد و دوم این که طی تقسیم میوز، پدیده کراسینگ اور کمی در این نواحی رُخ می دهد. بعد از این که آنها را با مواد رادیواکتیو نشاندار کردند و همچنین با استفاده از روش اتورادیوگرافی، مشخص شد که هتروکروماتین در مرحله سنتز (S-phase) آهسته تر از یوکروماتین همانندسازی می نماید. این خاصیت هتروکروماتین در بسیاری از سلول ها و بافت های مختلف تأیید شده است. به هر حال، بعد از 60 سال، آزمایش ها معلوم کردند که این خصوصیات در تمام کروماتین ها و سلول ها و حتی در موقعیت های تکاملی مختلف وجود ندارند.

دو ویژگی در اکثر هتروکروماتین ها وجود دارد، یکی از آنها غیر فعال بودن ژنتیکی است و دیگری متراکم ماندن آنها در چرخه سلولی می باشند. شناسایی هتروکروماتین ها کمی طولانی شد، زیرا در تحقیقات کروماتینی، آنها به عنوان یک مرداب در نظر گرفته شدند. ولی هم اکنون دانشمندان دریافتند که قطعات کروماتینی در نسخه برداری ژن ها اثر می گذارند و از طرف دیگر پذیرفته شد که یک ساختار کروماتینی قادر است گروهی از ژن ها یا حتی کل کروموزوم را خاموش نماید. بنابراین، عملکرد کروماتین ممکن است نقش مهمی در تنظیم بیان ژن داشته باشد.

www.ShimiPedia.ir

توجه زیاد به هتروکروماتین منجر به پیدایش واژه ای شده است که به طور وسیع برای انواع کروماتین ها استفاده می شود. گاهی در بهترین حالت یک تعریف ناقص و در بدترین حالت یک تعریف گمراه کننده ارائه می شد. حتی دو خاصیتی که در ابتدا گفته شد برای تمام کروماتین هایی که نقش هتروکروماتین داشتند صحیح نبود، زیرا هیچ یک از این خصوصیات به تنهایی قادر به بیان نقش صحیح هتروکروماتین نبودند. اولین خاصیتی که برای آن گفته شد، غیر فعال بودن ژنتیکی آن است، این بدان معنا است که هتروکروماتین حاوی تعداد بسیار کمی ژن است (اگرچه ژن های موجود ممکن است از نظر نسخه برداری فعال باشند) یا این که ژن های موجود در آن طبیعی بوده ولی عمل نسخه برداری غیر فعال شده است. همانطور که در ادامه بحث اشاره می شود، خواهیم دید که هر دو مورد فوق در خصوص هتروکروماتین صحیح هستند. خاصیت دوم، تراکم ساختاری آن است. نظریه متراکم بودن هتروکروماتین زمانی مشخص شد که DNA در مرحله اینترفاز چرخه تقسیم سلولی با رنگ های معمولی به شدت رنگ گرفت و هتروکروماتین های موجود در مرحله متافاز نیز که بدون شک متراکم هستند، به شدت رنگ پذیر بودند. در نهایت این نتایج مشخص کرد که واکنش رنگ پذیری مربوط به تراکم کروماتین ها است. البته تحقیقات جدید که توسط اندازه گیری حساسیت به هضم نوکلئازی و تصویر برداری سه بُعدی انجام شد معلوم کرد که هتروکروماتین آنقدرها که قبلاً فکر می شد، متراکم نیست. این تحقیقات نشان دادند که ساختار هتروکروماتین متفاوت از جسم کروماتین است، البته مطالعات مولکولی در این خصوص وجود ندارد. ممکن است اختلافات زیادی بین گونه ها و سلول ها و مراحل مختلف چرخه سلولی وجود داشته باشند. به نظر می رسد مانند سایر مسائل مربوط به هتروکروماتین واژه "متراکم" فقط یک اصطلاح خیلی ساده باشد.

هتروکروماتین α و β در دروزوفیلا

همانطور که در آزمایش های اولیه مشخص شد، برخی از خصوصیات را به سختی می توان به هتروکروماتین نسبت داد. هایتس (Heitz) با انجام آزمایش های مختلف روی کروموزوم های پلی تن سلول های غدد بزاقی لارو دروزوفیلا، به این نتجه رسید که این سلول ها حاوی دو نوع هتروکروماتین به نام های α و β هستند. تفاوت آنها مربوط به خصوصیات رنگ پذیری، موقعیت قرارگیری در هسته و گستردگی آنها هنگام همانندسازی جهت ایجاد کروموزوم های پلی تن می باشد (یعنی تکثیر DNA). هر دو نوع هتروکروماتین در کروموسنتر (chromocentre) واقع شده اند. کروموسنتر ناحیه ای است که سانترومرهای چهار کروموزوم پلی تن در آنجا جمع شده اند و شناسایی آنها برا اساس ویژگی های رنگ پذیریشان است. هتروکروماتین α در ناحیه ای کوچک و به شدت رنگ پذیر واقع شده است، در حالیکه هتروکروماتین β به طور گسترده تری در طول نواحی نزدیک به

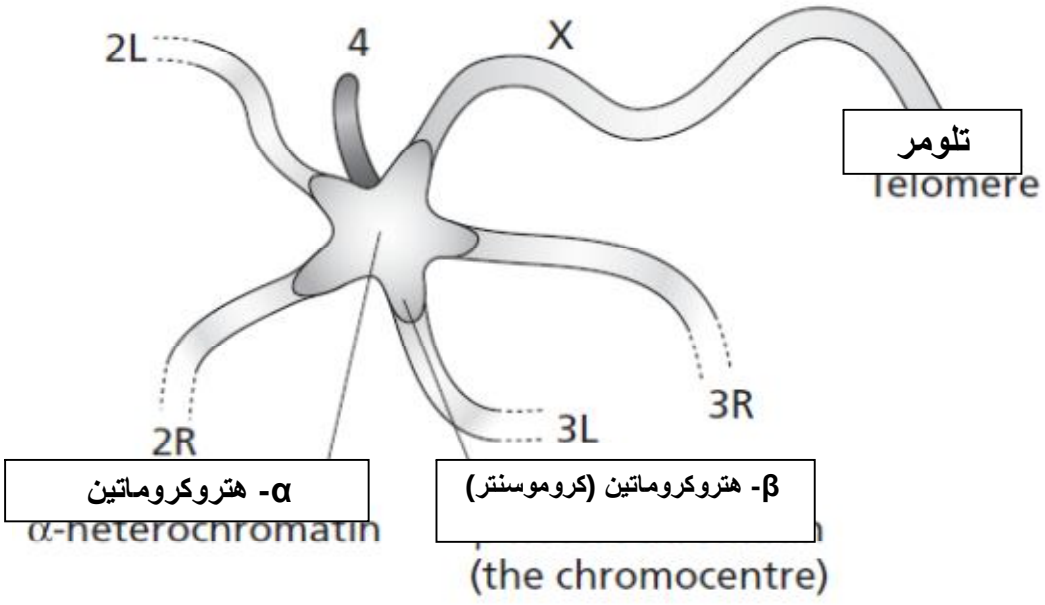
www.ShimiPedia.ir

بازوهای کروموزوم قرار دارند (شکل 9- 1 و همچنین رنگ آمیزی ایمونولوژیکی کروموزوم های پلی تن منتشر شده را در شکل 5- 17 مشاهده کنید). به زودی مشخص شد که گسترش کروموزوم های پلی تن یک عامل گمراه کننده در هتروکروماتین ژنوم دروزوفیلا بود. رنگ آمیزی کروموزوم های مرحله متافاز در لارو دروزوفیلا نشان داد که آنها حاوی هتروکروماتین هایی بسیار بزرگ در مقایسه با کروموزوم های پلی تن مرحله اینترفاز می باشند (شکل 9- 2). کروموزوم Y هتروکروماتیک است و به صورت کروموزوم های پلی تن گسترش نمی یابد. دلیل قانع کننده جهت توضیح موضوع فوق این است که برخی از نواحی هتروکروماتیک مانند بقیه ژنوم موجود زنده، نمی توانند همانندسازی درونی انجام دهند (مثل تشکیل کروموزوم های پلی تن چند رشته ای). در کل، آنها به صورت قطعاتی از هتروکروماتین α و به شکل مخفی و دیپلوئیدی باقی می مانند. چنین به نظر می رسد که اگر چه قطعات کروموزوم Y در کروموسنتر مخفی می مانند ولی برخی از آنها به طور قابل توجه ای به صورت پلی تن در می آیند. ساختار این نواحی از نظر سیتولوژی جزء نواحی غیر قابل طبقه بندی و پیچیده است.

β- هتروکروماتین خصوصیات کلی هتروکروماتین را نشان می دهد و شاید همین ناحیه است که دانشمندان را گمراه می کند و تمام خصوصیات هتروکروماتین را به همین قسمت مربوط می کنند (نباید عمومی سازی کرد). سیتولوژی β- هتروکروماتین نشان می دهد که از نظر نسخه برداری فعال است و حداقل واجد چندین نسخه از سه خانواده ژنی rRNA است که خیلی فعال می باشند و هستک را سنتز می کنند. همچنین حاوی چندین نسخه منفرد از ژن های دیگر بوده که جهش در آنها باعث تغییراتی در "قابلیت زیستن" ، "بارورسازی" و "مورفولوژی" می گردد. همانطور که در قسمت های دیگر بحث خواهد شد، β- هتروکروماتین و ژن های آن واجد خصوصیات مختص به خود هستند مثل خصوصیات ساختاری ویژه مربوط به کروماتین و توالی تکراری عناصر DNA که در قسمت یوکروماتین به ندرت دیده می شوند.

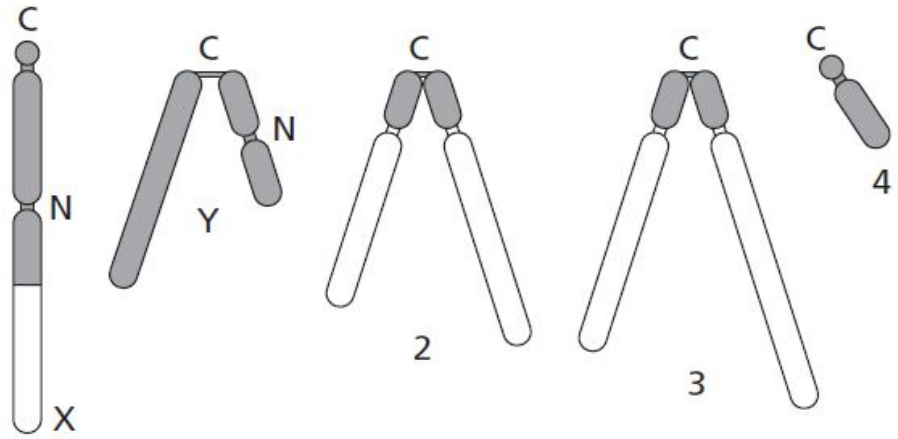
β- هتروکروماتین در کروموسنتر مطمئناً از مهمترین انواع هتروکروماتین ها در سلول های پلی تن می باشد. علاوه براین، از نظر عملکردی یکی از نواحی کوچک ولی مهم هتروکروماتین است که در تلومرها و سرتاسر کروموزوم 4 یافت می شود. این کروموزوم کوچک از نظر داشتن قطعات هتروکروماتین در سرتاسر طول خود غیر معمول است. تنظیم فعالیت و پراکندگی طبیعی ژن ها بستگی به کروموسنتر دارد.

www.ShimiPedia.ir



شکل 9- 1 کروموسنتر در هسته پلی تن دروزوفیلا. سانترومرهای کروموزوم های بزرگ 2 و 3 و شاخه X با یکدیگر ایجاد کروموسنتز می کنند. سانترومر کروموزوم های 2 و 3 در نزدیکی بخش میانی واقع شده اند، در حالیکه کروموزوم X در بخص انتهایی قرار دارد. بازوهای کروموزوم در اطراف سانترومر با حروف R و L مشخص شده اند. کروموزوم 4 ناحیه منحصر به فردی از هتروکروماتین است و باقیمانده آن تقریباً در ارتباط با کروموسنتر می باشد. کروموزوم های دروزوفیلا نواحی منحصر به فردی از توالی های تکراری DNA هستند که نسخه برداری نمی شوند و باعث ساخت کروموزوم پلی تن می شوند. این نواحی α- هتروکروماتین نامیده می شوند که روی کروموزوم های پلی تن واقع شده اند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 9- 2 هتروکروماتین و یوکروماتین در کروموزوم های متافاز دروزوفیلا. نواحی از هتروکروماتین و یوکروماتین در طول کروموزوم شماره 4 به صورت پراکنده وجود دارند.

هتروکروماتین اختیاری و اجباری

هتروکروماتین ها به دو زیر گروه اختیاری و اجباری تقسیم می شوند. هتروکروماتین اختیاری، کروماتینی است که تمام خصوصیات مربوط به چگالی ژنی و ویژگی های توالی DNA در یوکروماتین ها (در شرایط داخل سلولی) را دارند و می توانند خود را با خصوصیات ساختاری و عملکردی هتروکروماتین سازگار کند. این خصوصیات شامل شدت رنگ پذیری، ظاهر متراکم کروماتینی، همانندسازی با تأخیر در مرحله سنتز چرخه سلولی و فاقد فعالیت نسخه برداری هستند. بهترین نمونه از هتروکروماتین اختیاری، مطالعه کروموزوم X غیر فعال یا Xi (inactive X) در سلول های سوماتیک پستانداران ماده است. این فرایند یک مثال واضح از مکانیسم هایی است که توسط آن کروماتین می تواند یک تأثیر طولانی مدت روی فعالیت ژنتیکی سلول ها بگذارد.

هتروکروماتین اجباری می تواند به صورت موتیف های متوالی DNA، مخصوصاً به صورت عناصر تکراری قابل تشخیص از یوکروماتین ها مطرح شود. به هر حال، نکته مهم این است که وجود موتیف های متوالی دلیل بر این است که یک قطعه DNA همیشه به صورت هتروکروماتین است. در واقع موتیف های متوالی DNA فقط توان تشکیل هتروکروماتین را فراهم می کنند و حضور یک چنین توانی بستگی به وجود سایر اجزای مورد نیاز دارد. تحقیقات اخیر روی هتروکروماتین نشان می دهد که هتروکروماتین یک ترکیب انعطاف پذیر است و به موازات تغییرات ناشی از رشد و تمایز تغییر می کند.

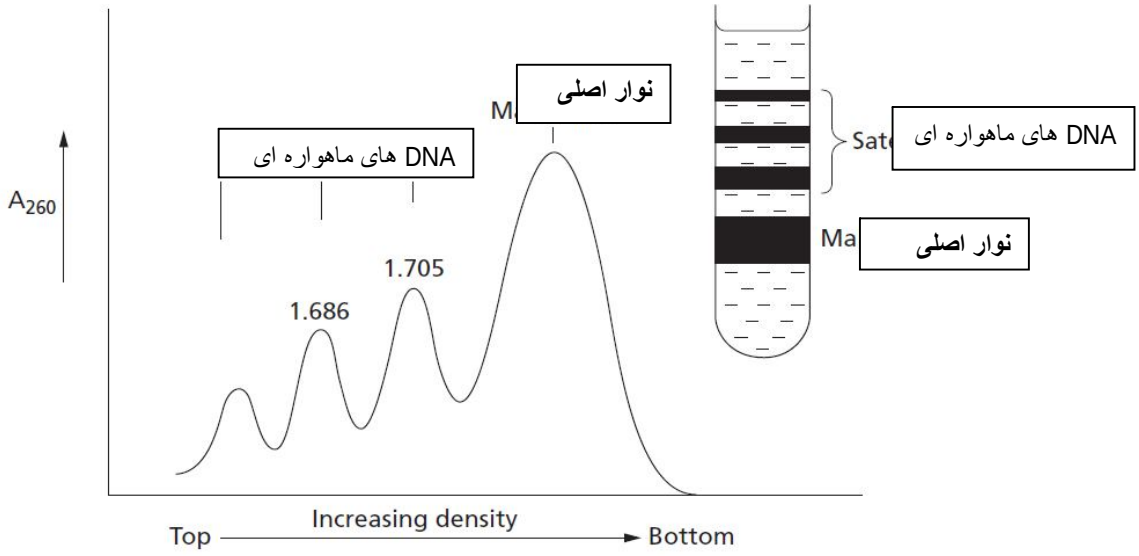
www.ShimiPedia.ir

هتروکروماتین DNA

اگر پروتئین های موجود در DNA تخلیص شده از سلول های یوکاریوتی را جدا کنیم و DNA بدون پروتئین را تحت تأثیر سانتریفیوژ با شیب غلظت سزیم کلرید قرار دهیم، نمودار آن حاوی چند پیک خواهد شد. نمونه آن را در شکل 9- 3 مشاهده می کنید. تفکیک پیک ها به علت اندازه های مختلف DNA نیست بلکه چگالی آنها موجب جدا سازی گردیده است. در واقع طی عمل سانتریفیوژ هر مولکول DNA در نقطه هم چگال خود با شیب غلظت سزیم کلرید رسوب می کند و در آنجا باقی می ماند. چگالی DNA به ترکیب DNA بستگی دارد. مولکول های DNA غنی از جفت بازهای آدنین- تیمین نسبت به DNA های غنی از سیتوزین – گوانین چگالی کمتری دارند. پیک منفرد و اصلی (که به عنوان نوار اصلی DNA شناخته می شود) شامل بیشترین DNA ژنومی بوده و حاوی توالی هایی است که DNA کد شونده و غیر کد شونده را تشکیل می دهد. چگالی آنها در واقع بازتابی از میانگین نسبت AT:CG می باشد. این چگالی از گونه ای به گونه دیگر متفاوت است. دروزوفیلا ملانوگاستر با 57% از بازهای AT پیوند اصلی DNA را می سازد که میانگین چگالی آن $1/701\ g\ cm^{-3}$ است. بر خلاف آن، پیک های کوچک ماهواره ای (satellite) حاوی مولکول های DNA ای است که اساساً ترکیب بازهای آن متفاوت از پیوند اصلی DNA می باشد. علت این تفاوت این است که DNA های ماهواره ای به طور عمده شامل توالی های تکراری ساده زیادی هستند. برای مثال DNA موجود در پیکی با چگالی $\rho = 1/672$ حاوی تکرار 5 بار از بازهای AATAT تا چندین هزار بار می باشد. DNA های ماهواره ای حدود 21% از ژنوم هاپلوئید دروزوفیلا ملانوگاستر را تشکیل می دهند. این نکته مهم است که ترکیب DNA های ماهواره ای دروزوفیلا ملانوگاستر از گونه هم نژاد خود یعنی دروزوفیلا سیمولانس (*D. simulans*) کاملاً متفاوت اند.

وجود DNA های کلون شده و تعیین توالی آن فرصت بیشتری برای مطالعه جزئیات درون هر پیک را فراهم می کند. هر یک شامل توالی هایی است که پر تکرارترین آنها در جدول 9- 1 آورده شده است. برای نشان دادن چگونگی توزیع ماهواره های متفاوت در طول کروموزوم ها از هیبریداسیون در شرایط طبیعی و نشاندار کردن DNA های ماهواره ای می توان استفاده کرد. نواحی خاصی که

www.ShimiPedia.ir



شکل 9- 3 جدا سازی نوار اصلی و DNA های ماهواره ای از دروزوفیلا ملانوگاستر تحت سانتریفیوژ با شیب غلظت سزیم کلرید.

در این آزمایش نمونه باید با سرعت زیاد و برای مدت طولانی سانتریفیوژ شود، سزیم کلرید ($CsCl_2$) با شیب غلظت خاصی در لوله سانتریفیوژ ریخته می شود (به طوری که در بالای لوله سزیم کلرید با چگالی کم و در پایین لوله با چگالی زیاد باشد).

چگالی قطعات DNA بستگی به اندازه آنها ندارد، ولی به نوع بازهای DNA حساس است. فراکسیون های ایجاد شده توسط شیب می تواند موقعیت نوارهای مختلف را تعیین کند.

محققان ژنتیک و سیتولوژی این نوع کروماتین را به عنوان هتروکروماتین اجباری یا اصلی معرفی کردند که محل های تمرکز DNA های ماهواره ای است. جدول 9-1 نشان می دهد که هر DNA ماهواره ای خصوصیات توزیعی خودش را بین 5 کروموزوم متفاوت دروزوفیلا دارد. به نظر می رسد دو توالی مشابه AAGAG و AAGAGAG با خصوصیات رنگ پذیری ویژه در نواحی کروموزومی مطابقت دارند که هر یک موقعیت یابی شده و افزایش رنگ نمونه، معرف نوارهای N (N-banding) می باشد. کروموزوم Y دروزوفیلا که در جنس نر یافت می شود بیشتر از DNA ماهواره ای و هتروکروماتین ساخته شده است و تنها اندکی از ژن های ضروری برای باروری جنسی نر را دارد. کروموزوم شماره 4 تقریباً کوچکترین کروموزوم دروزوفیلا است که حاوی 50% DNA ماهواره ای است (بیشتر از توالی های تکراری AATAT)، ولی در عین حال غنی از توالی های تکراری و تعداد قابل ملاحظه ای ژن است که برخی از آنها برای حیات موجود ضروری می باشند.

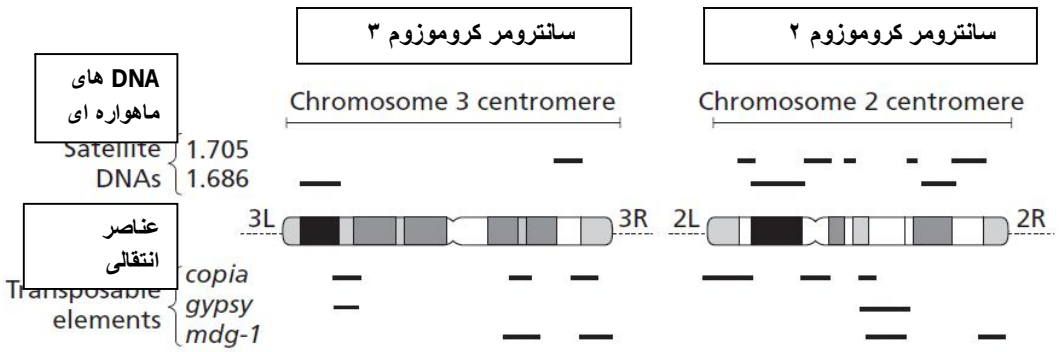
www.ShimiPedia.ir

جدول 9- 1 DNA های ماهواره ای در دروزوفیلا ملانوگاستر

Satellite		Satellite DNA (Mb) per chromosome				
Sequence	Density	X	Y	2	3	4
AATAAAC	1.669	0	1.6	0	0	0
AATAT	1.672	0.60	5.8	0.01	0.63	2.7
AATAC	1.680	0	3.5	0	0	0
AATAACATAG	1.686	0	0	1.9	1.6	0
AATAGAC	1.688	0	1.6	0	0	0
359 bp	1.688	11	0	0	0	0
AAGAC	1.689 1.701	0.08	8.5	1.8	0.11	0
AAGAG	1.705	1.2	7.2	5.5	1.1	0.17
AAGAGAG	1.705	0.27	1.8	1.7	0.14	0.10
Total satellite		16.1	32.5	11.1	3.6	3.0
Total DNA		40	34	62	66	6

علاوه بر DNA های ماهواره ای، هتروکروماتین دروزوفیلا غنی از عناصر انتقالی TE (transposable element) نیز می باشد. این عناصر می توانند در 30 الی 50 خانواده مجزا طبقه بندی شوند که البته حدود 10% DNA ژنومی را شامل می شوند. اکثر این توالی ها از رترو ویروس ها (retrovirus) استخراج شده اند و حاوی توالی های تکراری با انتهای بلند مختص به همان ویروس ها یا نواحی مشابه ای از ژن های ویروسی *pol* (در reverse transcriptase) و *gag* (polyprotein) می باشند. بسیاری از عناصر انتقالی با شروع نسخه برداری در ژنوم جابجا می شوند و با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس از RNA می توانند یک نسخه DNA بسازند و سپس از DNA ساخته شده در مکانی جدید استفاده می کنند. یک بررسی دقیق از TE ها در سراسر کروموزوم های متافازی دروزوفیلا به کمک هیبریداسیون و DNA فلورسنت نشاندار شده در آزمایشگاه انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که عناصر TE در یوکروماتین ها نادرند، اما این عناصر به میزان زیادی در سراسر سانترومرهای هتروکروماتین منتشر شده اند (شکل 9- 4). این انتشار در گونه های مختلف دروزوفیلا به شدت محافظت شده اند.

www.ShimiPedia.ir



شکل 9- 4 انتشار DNA های ماهواره ای و عناصر انتقالی (TE) در سانترومر هتروکروماتین در کروموزوم های 2 و 3 دروزوفیلا ملانوگاستر.

دو نکته مهم از این نوع تحقیقات به دست آمد. اول این که سانترومر هتروکروماتین از عناصر DNA ناهمگون تشکیل شده است (مثل توالی های ماهواره ای ، عناصر انتقالی و ژن های فرعی). نکته دوم این که قطعات مختلف هتروکروماتین دارای خصوصیات ساختاری از همین ترکیبات می باشند. اختلافات موجود ممکن است مربوط به فعالیت آنها باشد.

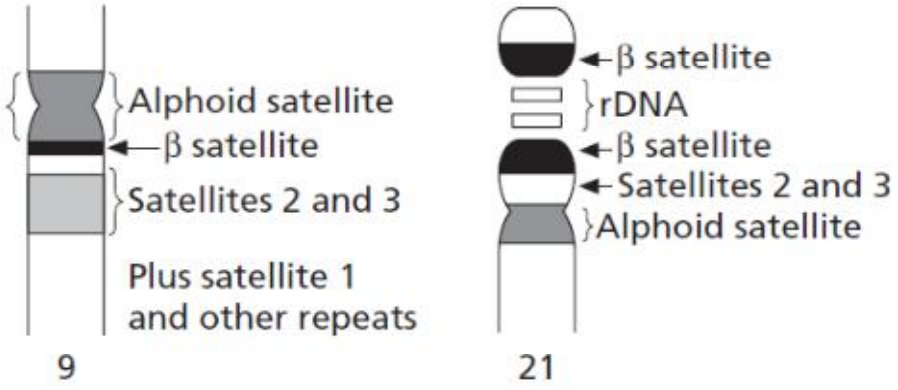
DNA های ماهواره ای یکی از خصوصیات مشترک هتروکروماتین ها در اکثر گونه ها مثل انسان است. در حشرات، DNA های ماهواره ای موجود در انسان در اندازه های مختلف و توالی های متفاوت و در مکان های کروموزومی خاص دیده می شوند (هر چند که تجزیه و تحلیل آنها در انسان ممکن است شبیه دروزوفیلا نشود). نمونه ای از DNA های ماهواره ای انسان در جدول 9- 2 نشان داده شده است. همچنین نمونه ای از پراکندگی آنها در میان سانترومر کروموزوم های 9 و 12 در شکل 9- 5 مشاهده می شود. برخی از عناصر انتقالی در ژنوم انسانی مشاهده شده است که به دو گروه بزرگ به نام عناصر هسته ای متفرق کوتاه یا SINES (short interspersed nuclear elements) و عناصر هسته ای متفرق بلند یا LINES (long interspersed nuclear elements) تقسیم می شوند. بسیاری از اعضای هر دو گروه در شکل 9- 6 نشان داده شده اند. هر دو واجد توالی های بسیار متغییری هستند به طوری که توالی های LINES- 1 می تواند تا 5 برابر افزایش طول داشته باشد مثلاً اندازه متوسط یکی از توالی های LINES- 1 برابر 1/4 kb است، در حالیکه طول کامل عنصر برابر با 6/1 kb می باشد. بررسی عناصر انتقالی دروزوفیلا نشان می دهد که هر دو توالی فوق در سراسر ژنوم بدون وجود تقدم در هتروکروماتین پراکنده اند.

جدول 9- 2 طبقه بندی DNA ماهواره ای (تکرار پشت سرهم) در سلول های انسانی.

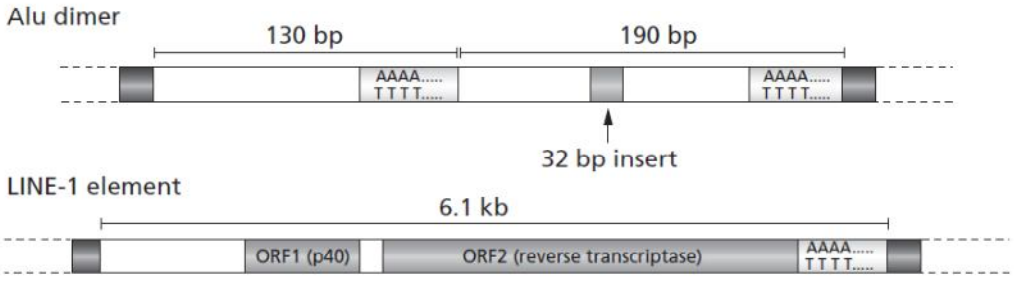
www.ShimiPedia.ir

Class	Size of blocks	Family	Repeat unit size (bp)	Major locations
(Major) Satellite	0.1 Mb to >2 Mb	satellite 1	25–48	Centromeric and other heterochromatin; AT rich
		satellites 2, 3	5	Most chromosomes
		alpha satellite	171	Centromeric heterochromatin, all chromosomes
		beta satellite	68	Centromeric heterochromatin, chrom's 1,9,13,14,15,21,22,Y
Minisatellite	0.1 – 20 kb		6–24	At or near telomeres
Microsatellite	often <150 bp		1–4	All chromosomes

در کل، انتشار این عناصر اتفاقی نمی باشد. LINES های غنی از AT در نوارهای G و SINES غنی از GC در نوارهای R (فصل 5) قرار گرفته اند. هر دو توالی از نظر نسخه برداری بسیار فعال اند.



شکل 9- 5 انتشار DNA های ماهواره ای در سانترومر هتروکروماتین کروموزوم های 9 و 12 انسان.



www.ShimiPedia.ir

شکل 9- 6 نمونه هایی از عناصر SINE با طول کامل آن در انسان (Alu) و LINE- 1 . منظور از open reading frame = ORF است.

ژن های هتروکروماتین

از میان 40 ژن دروزوفیلا در ناحیه هتروکروماتین فقط برخی از آنها برای ادامه حیات این حشره ضروری هستند. اکثر این ژن ها شامل RNA ریبوزومی 18 S ، 28 S (ژن های چند نسخه ای در اینجا به عنوان یک ژن محسوب می شوند) و 30 S می باشند که اختلال در این ژن ها باعث نقص در باروری، مورفولوژی و حیات موجود زنده می گردد. این ژن ها در نواحی جانبی و به صورت کاملاً متفاوتی در ژن های یوکروماتین سازماندهی شده اند. اینترون های بزرگتر با چگالی زیادی از DNA های تکراری درست شبیه نواحی β- هتروکروماتین هستند. ژن روشن مثل یک ژن ضروری در هتروکروماتین مربوط به کروموزوم شماره 2 را می توان در نظر گرفت (این ژن در تعداد زیادی از سلول ها بیان می شود). نسخه های اولیه ای که در برخی از ژن های فاکتورهای مربوط به تکثیر را رمز گذاری می کنند مشاهده شد که در بخش هتروکروماتینی کروموزوم Y قرار دارند. این ژن های اولیه بزرگتر از 1 Mb هستندو دارای توالی هایی با تکرار متوسط یا توالی های ماهواره ای می باشند. ژن های هتروکروماتینی نه تنها مجبور به تحمل محیط خاص ایجاد شده توسط هتروکروماتین هستند بلکه برای فعالیتشان به آن محیط نیاز دارند. اگر این ژن ها به یوکروماتین منتقل شوند، بیان آنها بسیار کاهش یافته و گاهی به صفر می رسد. علت این کاهش نوع جایگاه اثر است که در قسمت بعدی شرح داده می شود. این رفتار باید حالات ویژه ای را در کنترل این ژن ها منعکس نماید و احتمالاً به علت حضور توالی های تکراری DNA (مخصوصاً β- هتروکروماتین) در آنها است. نکته مهم این که بیان این ژن ها مستلزم این است که RNA پلیمرازها و فاکتورهای اصلی نسخه برداری از هسته ای که حاوی هتروکروماتین است، خارج نشده باشند.

پروتئین های هتروکروماتین

علی رغم شناسایی توالی های DNA مرتبط با هتروکروماتین در موجودات مختلف، به نظر می رسد محتویات DNA به تنهایی برای شکل دهی و ساختار هتروکروماتین کافی نمی باشد. این بررسی درمورد هتروکروماتین اختیاری انجام شد ودر اینجا نواحی ژنومی مشابه (در DNA هایی با عملکرد یکسان) از همان سلول مشاهده شد که می تواند هتروکروماتین یا یوکروماتین باشند. در مورد هتروکروماتین اجباری آزمایش ها و مشاهدات نشان می دهند که حضور و رفتار کروماتین به شرایط رشد یا مراحل پیشرفت

www.ShimiPedia.ir

فرایند بستگی دارد. در اکثر سلول ها ساختار هتروکروماتین به توالی های DNA بستگی ندارد، بلکه ممکن است به اندرکنش پروتئین های خاصی با DNA در ارتباط باشد.

هیستون ها در هتروکروماتین

آزمایش های اولیه نشان دادند که بیشترین پروتئین در کروماتین (یعنی هیستون ها) به نسبت مساوی در هتروکروماتین و یوکروماتین قرار دارند و اولین واحد بسته بندی DNA نوکلئوزوم است. به هر حال، اخیراً اختلافاتی در محتویات هیستون های هتروکروماتینی و یوکروماتینی مشاهده شده است. اختلاف آنها مربوط به مرحله پس ترجمه ای است که به واسطه عمل استیلاسیون تغییراتی در آنها صورت می گیرد. مطالعات میکروسکپی و ایمونوفلورسنت با کمک آنتی بادی های ویژه روی ایزوفرم های استیله شده هیستون H4 ، نشان می دهند که H4 موجود در هتروکروماتین پستانداران و دروزوفیلا استیله شده اند. استیله شدن هیستون H4 یکی از ویژگی های مشترک در هتروکروماتین اجباری و اختیاری در بسیاری از گونه ها می باشد. همچنین مشاهده شد که قطعات هتروکروماتین در مجاور سانترومرهای کروموزوم های متافازی انسان قرار دارند. برای نمونه هتروکروماتین اختیاری کروموزوم غیر فعال X در جنس ماده و هتروکروماتین های سلول های پلی تن دیپلوئید درروزوفیلا از این نوع هستند وباز هم آزمایش نشان داد که همه آنها استیله شدند. علاوه بر این اکثر اختلافات هیستون H4 مربوط به شماره لیزین های استیله شده است (مثل لیزین های شماره 5 ، 8 و 12). مطالعات روی کروموزوم های پلی تن نشان دار شده با آنتی بادی در لارو دروزوفیلا ملانوگاستر انجام شد. روی هیستون H4 در β- کروماتین کروموسنتر و کروموزوم شماره 4 آزمایش شد و مشاهده گردید که لیزین های شماره 5 ، 8 و 16 استیله شدند، در حالیکه استیلاسیون همین هیستون در یوکروماتین در لیزین شماره 12 بیشتر دیده می شود. اختلاف در استیلاسیون لیزین های خاص در هیستون H4 نتیجه شکل گیری هتروکروماتین است که مورد بحث زیادی قرار گرفته است. برای مثال به نظر می رسد برخی از لیزین های نواحی هتروکروماتین خارج از دسترسی آنزیم های استیله کننده H4 قرار دارند. استیلاسیون H4 در لیزین شماره 12 ناحیه ای که عموماً استیله شده است، نقش مهمی در سازماندهی هتروکروماتین دارد.

دومین تغییر در باقیمانده خاصی از هیستون، فسفوریلاسیون سرین 10 در هیستون H3 است که احتمالاً نقش مهمی در فشردگی کروماتین (البته در شکل گیری کروماتین نقش ویژه ای دیده نشد) دارد. این پدیده در اواخر فاز G_2 (هنگامی که سلول ها برای میوز آماده می شوند) رُخ می دهد. فسفوریلاسیون ابتدا در ناحیه سانترومر هتروکروماتین انجام می شود و سپس در سراسر

www.ShimiPedia.ir

کروموزوم به دنبال حرکت چرخه سلولی به سمت میتوز، انتشار می یابد. البته این تغییر فقط یکی از چندین تغییر هیستونی پس ترجمه ای مربوط به فشردگی کروماتین است. چرخه سلولی به ترکیب هیستون ، استیلاسیون، فسفوریلاسیون و متیلاسیون باقیمانده ویژه موجود در سانترومر هتروکروماتین بستگی دارد. این فرایندها مثال خوبی از چگونگی اصلاحات ایجاد شده توسط ترکیب چندین تغییر است. همچنین این فرایندها می توانند بیانگر علائم اپی ژنتیک مرتبط با تغییرات خاصی در عملکرد و ساختار هتروکروماتین باشند.

سانترومر هتروکروماتین ساختار دیگری در هیستون H3 به وجود می آورد، بدین ترتیب که بخش مرکزی و کروی مولکول کاملاً طبیعی است ولی قسمت انتهای- N آن کمی متفاوت می شود (گاهی به صورت کشیده در می آید). این مغایرت هیستونی در موش های GenA ، انسان، سارکومیسس سرویسیه (Cse4p)، سنورابدیتیس الگانس (*Caenorhabditis elegans*) و دروزوفیلا (Cid) یافت شده است. این مغایرت حتی در سلول های مختلف در سانترومر هتروکروماتین دیده شده است. اهمیت کاربردی آنها مشخص نیست (ولی به نظر می رسد که بیشتر مربوط به عملکرد سانترومر باشد تا تشکیل هتروکروماتین).

پروتئین های غیر هیستونی در هتروکروماتین

ژن تنظیمی فاکتور GAGA توسط میکروسکپ ایمنوفلورسنت مکان یابی شد و معلوم گردید که در سانترومر هتروکروماتین وجود دارد. یکی از DNA های ماهواره ای بزرگ ($1/705\ gcm^{-2}$) در دروزوفیلا ملانوگاستر شامل موتیف GAGA است (جدول 9- 1). فاکتور GAGA ممکن است برای شکل گیری و عملکرد هتروکروماتین مهم باشد، زیرا در مراحل اولیه چرخه سلولی بیان نادرست فاکتور GAGA باعث نقص در انجام عمل میتوز می گردد. اخیراً اتصال پروتئین حاصل از ژن Prod (proliferation disrupter) کشف شده است که به DNA ماهواره ای ملانوگاستر (با اندازه ای برابر با $1/686\ gcm^{-2}$) متصل بود (جدول 9- 1).

www.ShimiPedia.ir

Prod تحت پدیده تعاونی و ادغام باعث اتصال توالی های تکراری DNA ماهواره ای می شود و پیشنهاد شده است که شکل گیری چند زیر واحدی آن باعث فشردگی در DNA ماهواره ای می شود.

اولین پروتئین پیوند شده به هتروکروماتین در دروزوفیلا، پروتئین هتروکروماتین 1 یا (heterochromatin protein 1) HP1 بود. آزمایش با استفاده از روش های ایمنولوژی و نشاندار کردن کروموزوم پلی تن در حضور HP1 نشان داد که پروتئین به طور عمده به β- هتروکروماتین نزدیک به سانترومر و کروموزوم شماره 4 قرار دارد (شکل 9- 1). همچنین PH1 در میان بازوهای کروموزومی و برخی از تلومرها دیده شده است. باید توجه داشت که PH1 به ناحیه کوچکی روی هتروکروماتین متصل می شود سپس به بازوهای کروموزومی انتقال می یابد (اتصال آن بیشتر از آن که وابسته به مکان کروموزوم باشد، وابسته به توالی های DNA است).

شکل 9- 6 ساختار دُمین هتروکروماتین در پروتئین HP1 .

توالی های آمینو اسیدهای پروتئین HP1 شامل موتیف هایی است که باعث بروز عملکرد و شاید فعالیت آن می گردد (شکل 9- 7). بخش خاصی از آن ایجاد کرومودُمین (chromodomain) می کند (این نام به این علت گذاشته شد چون تغییر دهنده سازمان کروماتین یا Chromatin organization modifier است). همچنین این دُمین در شماری از خانواده ژنی چند خوشه ای PcG (polycomb group) نیز دیده می شود. پروتئینی که از آنها به وجود می آید نقش مهمی در انتخاب ژن خاموش طی عمل تکامل دارد. البته پروتئین های دیگری نیز در این مسیر یا سایر مسیرها جهت تغییر ساختار کروماتین وتنظیم بیان ژن دخالت دارند. این دُمین طی مراحل تکامل به شدت حفظ شده است و در پروتئین های بسیاری از گونه ها مثل انسان یافت می شوند. اهمیت آنها مربوط به این است که این پروتئین ها (بدون استثنا) مستقل از هم می باشند، به عبارت دیگر، هر یک از آنها موتیف هایی با توالی های مختلف دارند و می توانند به DNA متصل شوند. ولی شواهد شفاف و واضحی در شرایط خارج سلولی وجود ندارند که نشان دهند دارای فعالیت پیوند به DNA هستند. در این مطالعه معلوم شد که محل اتصال HP1 به جایگاه های خاصی روی کروموزوم باید نتیجه اندرکنش (مستقیم یا غیر مستقیم) با پروتئین هایی باشد که قدرت اتصال به DNA را دارند.

www.ShimiPedia.ir

نتایج اخیر به طور شگفت آوری نشان می دهند که پروتئین ویژه ای باعث تغییر شکل هیستون H3 می گردد. سنجش پیوندها به DNA در شرایط خارج سلولی نشان می دهد که فقط وقتی لیزین شماره 9 پپتید سنتز شده ای شبیه انتهای- N هیستون H3 متیله شود، پروتئین HP1 با قدرتی بالا به این پپتید (حداقل به باقیمانده های 1 تا 16) متصل می شود. پروتئین HP1 نمی تواند به پپتید H3 غیر متیله یا پپتید H3 متیله شده در لیزین 4 متصل شود. شواهدی وجود دارند که در شرایط داخل سلولی ممکن است دو موضوع زیر مهم باشند. اول این که آنزیم متیله کننده هیستون H3 وجود دارد که به طور اختصاصی لیزین شماره 9 را متیله می کند. دوم این که پروتئین HP1 می تواند در اثر تیمار با غلظت های بالای پپتید H3 متیله شده، در هتروکروماتین جابجا شود. در اثر جهش ایجاد شده در کرومودُمین، پیوند HP1 با H3 متیله شده در لیزین شماره 9 (H3me9) می تواند از بین برود (هر چند نتایج استخراج شده پاسخ کاملی نمی دهد). به عنوان مثال، H3me9 زیادی وجود دارند که هیچ ربطی به هتروکروماتین ندارند و از طرفی در موش های فاقد ژن Suvar39h سطح طبیعی از H3me9 در هیستون های اصلی دارند. H3me9 به تنهایی قادر نیست پیام ویژه ای از یک هتروکروماتین ایجاد نماید. ما در انتهای این فصل مجدداً به بحث در این مورد خواهیم پرداخت.

پروتئین های واکنش دهنده با HP1

در آزمایش های مختلف چندین پروتئین شناسایی شدند که تمام آنها توانستند با HP1 دروزوفیلا یا مشابه آنها در موش و انسان اندرکنش به وجود آورند. در برخی از آنها اندرکنش به طور مستقیم رُخ داد در حالیکه در برخی دیگر اندرکنش ها با بخشی از HP1 که خودش در یک کمپلکس پروتئینی بود، انجام شد. HP1 با روش هایی مثل رسوب دهی ایمنی آزمایش شد و مشاهده گردید که با ترکیباتی از کمپلکس شروع همانندسازی ORC (origin of replication complex) در دروزوفیلا همراه بود. این کمپلکس مسئول شروع همانندسازی در DNA در نواحی ژنومی تعیین شده می باشد. همانند سازی در مرحله آخر فاز- S چرخه سلولی یک خاصیت تقریباً مشترک هتروکروماتین است که حتی وجود آنها برای تشکیل کروماتین ضروری است.

اندرکنش بین HP1 – ORC ممکن است فقط مخصوص ماشین همانندسازی در هتروکروماتین باشد یا نقش مهمی در تعیین زمان همانندسازی ایفا کند. یکی دیگر از اندرکنش های مهم HP1 با گیرنده لامین B (lamin B receptor) است. این پروتئین در غشای داخلی هسته واقع شده است و به مستقر شدن لامین های A ، B و C در حاشیه هسته کمک می نماید (شکل 5- 19). اندرکنش آن با HP1 می تواند جاگزینی آن در هتروکروماتین را با این بخش از هسته توضیح دهد.

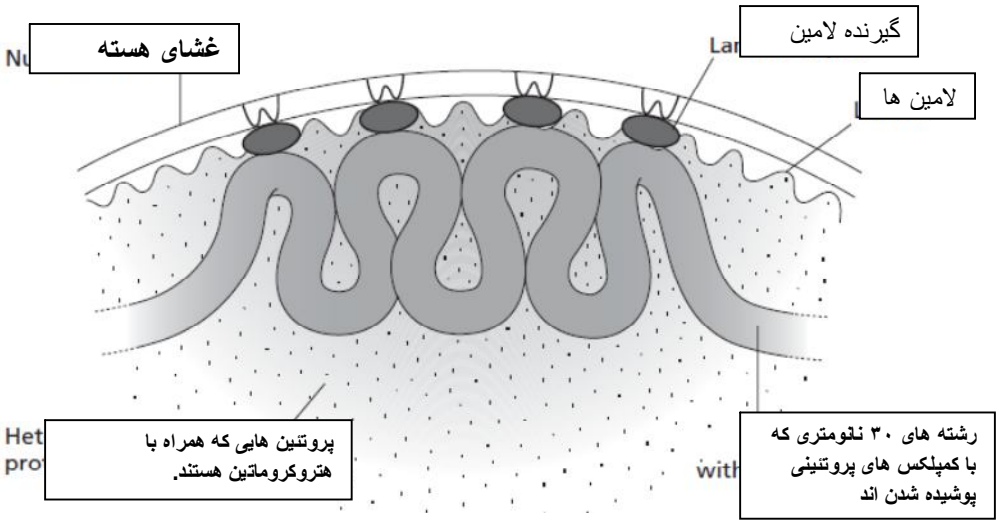
www.ShimiPedia.ir

شواهد تأیید کننده ای نیز وجود دارند که بیانگر ضرورت حضور پروتئین های غیر هیستونی (nonhistone protein) جهت سازماندهی هتروکروماتین می باشد که از آزمایش های اولیه ژنتیکی به دست آمد. هنوز جزئیات هیچ یک از پروتئین های دخیل در تشکیل هتروکروماتین به مانند HP1 شرح داده نشده است. به هر حال، با این اطلاعات به سادگی می توان مدلی از ساختار هتروکروماتین ارائه داد که مقدمه ای بر سازماندهی کمپلکس های چند پروتئینی می باشد. این یافته ها به صورت شماتیک در شکل

9- 8 نشان داده شده است.

ایجاد تنوع توسط جایگاه اثر

هتروکروماتین محیط مناسبی برای بیان اکثر ژن ها نیست. آزمایش با گروهی از ژن هایی که به طور تصادفی وارد ژنوم موش و حشرات کردند، مشاهده شد که ژن های مستقر شده در نواحی هتروکروماتین نتوانستند بیان شوند. این آزمایش حتی در ژن های انتقال یافته با پروموترهای قوی و عناصر تقویت کنند (enhancer) نیز انجام شد ولی باز هم بیان آن ژن ها صورت نگرفت. فقط بعضی از عناصر DNA به نام عناصر مرزی یا نواحی کنترل کننده لوکوس قادر بودند ژن مستقر در یوکروماتینی که توسط هتروکروماتین احاطه شده بود، بیان کنند (این عناصر DNA در فصل 6 توضیح داده شد).



شکل 9- 8 دُمین های هتروکروماتین می توانند در ارتباط با غشای هسته باشند و احتمالاً نواحی فعال غنی از پروتئین های متصل به هتروکروماتین مانند HP1 می باشند.

www.ShimiPedia.ir

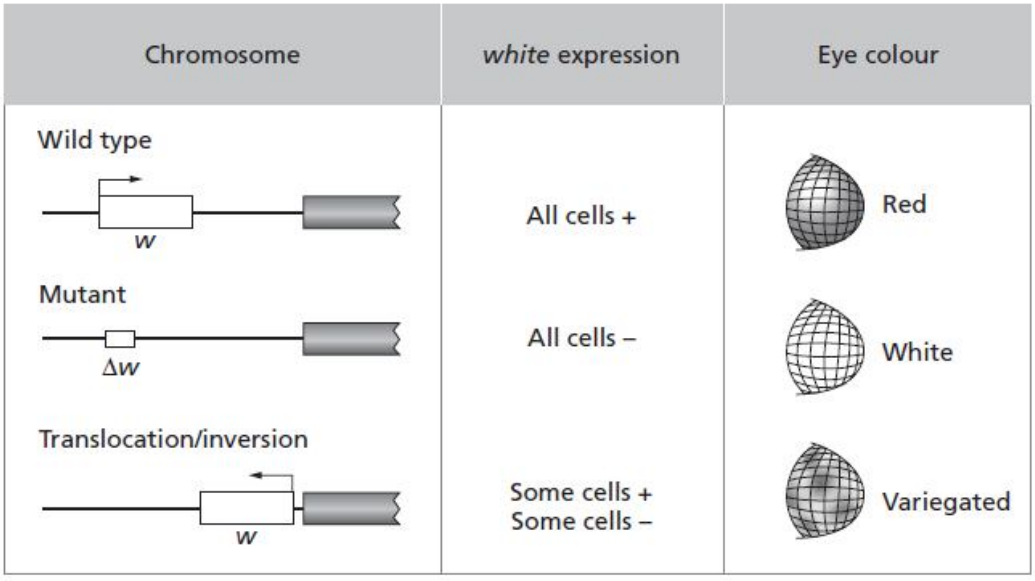
بنابراین، قطعات مهم سازنده هتروکروماتین بر روی بیان ژن های یوکروماتین اثر می گذارند. اکثر مشاهدات مربوط به آزمایش های ژنتیکی اخیر در دروزوفیلا می باشد. در تعداد کمی از حشرات جهش یافته، فنوتیپ جهش یافته فقط در برخی از سلول ها بیان شد. این موضوع بیانگر وجود تنوع است. این اختلاف به علت بازآرایی های کروموزومی است که ناشی از حرکت ژن یوکروماتین از جایگاه طبیعی خود به جایگاه همجوار یعنی قطعات هتروکروماتین است. در حالت طبیعی هتروکروماتین باید در سانترومر، تلومر یا کروموزوم شماره 4 واقع شود. جهش تغییری در خود ژن ایجاد نمی کند، بلکه باعث تغییر موقعیت در کروموزوم می شود. به این پدیده ایجاد تنوع توسط جایگاه اثر یا PEV (position effect variegation) می گویند که این پدیده بیش از 60 سال معمای ژنتیکی بود.

یک مثال خوب از مطالعات انجام شده در خصوص PEV مربوط به وجود تنوع در بیان ژن سفید (white) در مگس سرکه است. حالت طبیعی این ژن در دروزوفیلا باعث می شود که چشمی به رنگ قرمز به وجود آید، در حالیکه نقص ناشی از جهش در این ژن باعث تولید چشم های سفید می گردد (بنابراین ژن را ژن سفید می نامند). این ژن در انتهای ناحیه بازوی چپ کروموزوم X قرار دارد. بازآرایی کروموزوم باعث تغییر مکان ژن سفید به هتروکروماتین در اطراف سانترومر X می شود و در نهایت این ژن در برخی از سلول ها (نه در تمام آنها) خاموش می گردد. از آنجا که جنس نر یک کروموزوم X دارد، بنابراین بازآرایی کرموزوم X باعث تبدیل فنوتیپ چشم قرمز (گونه وحشی) به چشم سفید (گونه جهش یافته) می شود (شکل 9- 9). در برخی از فنوتیپ های جنس ماده با کروموزوم XX مشاهده شده است که بازآرایی در اولین کروموزوم X باعث انتقال آلل سفید غیر فعال به کروموزوم X دوم نیز می گردد. وجود پدیده تنوع را می توان بر اساس نسبت بالای نواحی قرمز یا سفید اندازه گیری نمود. ایجاد این تنوع فنوتیپی می تواند به عنوان یک فاکتور مهم در ادامه مباحث مربوط به ژن سفید به صورت یک مدل آزمایشی مطالعه شود. بهترین الگوی تنوع در چشم را می توان چنین تفسیر کرد. اول این که، خاموشی ژن سفید طی مراحل اولیه تکامل رُخ می دهد. دوم این که، وقتی این ژن در سلول خاصی خاموش می شود، در تمام سلول های حاصل از تکثیر آن به صورت خاموش باقی می ماند. به عبارت دیگر، حالت خاموشی به طور موروثی و پایدار از سلولی به سلول دیگر انتقال می یابد. این پایداری موروثی باعث ایجاد نواحی قرمز و سفید می شود و هر منطقه حاوی یک سلول اصلی است که ژن سفید (روشن یا خاموش) دارد. توجه کنید که این حالت موروثی بر اساس توالی DNA نمی باشد، بلکه مانند حالت های فعال یا خاموش ژن است، اما گاهی اطلاعات انتقال می یابند. این موضوع در مقوله کلی اپی ژنتیک موروثی قرار می گیرد.

www.ShimiPedia.ir

ساختار کروماتین و PEV

شواهد ژنتیکی نشان می دهند ژن هایی که به هتروکروماتین انتقال می یابند می توانند خاموش شوند. برای توضیح مشاهدات حاصل از تحقیقات فوق، نقطه شروع را با دو مدل کلی آغاز می کنیم. (1) ژن ها به دنبال تغییر ساختار کروماتین (احتمالاً مانند هتروکروماتین ها) می توانند خاموش شوند. این فرایند انتشار می یابد تا ساختاری شبیه ساختار هتروکروماتین به وجود آورد و این عمل آنقدر ادامه می یابد تا به ژن مجاور برسد. (2) نواحی همجوار با هتروکروماتین ممکن است از فاکتورهای لازم برای نسخه برداری ژن های یوکروماتین پوشیده شود. این عمل یک اثر موضعی داخل سلولی است، بنابراین نیازی به تغییر ساختار کروماتین نیست. به طور معمول، با آن که مدل های آزمایشگاهی منحصر به فرد نیستند ولی ممکن است هر دو مکانیسم، یک نقش را ایفا نمایند (شکل 9- 10). آزمایش های اخیر نشان می دهند که تغییراتی در ساختار کروماتین صورت می گیرد. جهش های حذفی با کمتر از تعداد معمول



شکل 9- 9 بازآرایی کروموزوم با انتقال ژن سفید (w) به جایگاهی نزدیک به قطعات هتروکروماتین (نواحی تیره) که باعث تغییر در تنوع بیان ژن می شود.

www.ShimiPedia.ir

(یعنی بین 100 تا 150) در ژن های هیستون هنوز به طور قابل ملاحظه ای سالم اند یعنی تغییری در هیستون ایجاد نمی کنند، اما باعث کاهش PEV می شوند (یعنی کاهش خاموشی). پیشنهاد شده است که خاموشی بستگی به مونتاژ کروماتین دارد. علاوه بر این، اگر به لارو حشرات مهار کننده داستیلازهای هیستونی (مانند سدیم بوتیرات) اضافه کنیم، PEV نیز مهار می گردد. همچنین مشاهده شده است که تخریب هتروکروماتین تحت استیلاسیون نیز باعث تخریب PEV می شود (توجه داشته باشید که به هر حال، بوتیرات برای حشرات سم است). همچنین مطالعات مستقیم میکروسکپی بر روی ساختار نوارهای کروموزوم های پلی تن از نواحی جابجا شده یوکروماتین نزدیک به هتروکروماتین، بیانگر افزایش غلظت در برخی از هسته ها می باشد. بسیاری از آزمایش های اخیر ساختار کروماتین در ژن شوک حرارتی hsp26 وارد شده به هتروکروماتین یا یوکروماتین را مورد مطالعه و مقایسه قرار دادند. علی رغم وجود پروموتر قوی، hsp26 به هتروکروماتین جفت شد. همچنین مشخص شد که انتقال ژن به هتروکروماتین در مقایسه با یوکروماتین، حساسیت کمتری به هضم نوکلئازی نشان داد، در ضمن بسته بندی در هتروکروماتین نسبت به یوکروماتین منظم تر انجام شد. با توجه به این شواهد، هتروکروماتین، نسخه برداری ژن های مجاور با یوکروماتین را با تغییر در ساختار کروماتین مهار می نماید. به هر حال، این نتایج مورد تأیید همه محققان نیست. آزمایش هایی که توسط دسترسی آنزیم های محدود کننده انجام شد و توسط PCR مورد بررسی قرار گرفت نتوانست تغییرات ایجاد شده به وسیله PEV را تشخیص دهد (PEV باعث خاموشی می شود). احتمالاً تغییرات ساختار کروماتین با خاموشی ژن ها در ارتباط است ولی نشان دادن آنها با مدل های ساده با توجه به ساختار هتروکروماتین کمی مشکل است.

مشاهدات اخیر در خصوص مکانیسم PEV

مشاهدات اخیر بر روی فاکتورهای مؤثر در PEV موجب شد که مدل های خاصی پیشنهاد شوند که در شکل های 9- 8 و 9- 10 مشاهده می کنید. این نتایج از انواع مختلف حشرات به دست آمد. این حشرات حامل ژن سفید بازآرایی شده بودند که می توانند بر تعدادی از هتروکروماتین های موجود در کروموزوم های دیگر اثر بگذارند. اکثر آزمایش های ساده در حشرات جنس نر با حمل کروموزوم Y انجام شد. آنها معمولاً به طور کامل هتروکروماتین بودند و در تعداد خیلی کمی از آنها کرووزوم Y خاموش بود. علاوه بر این، در حشراتی که دو کروموزوم Y داشتند، تنوع کاهش یافت. این مشاهدات بیان می کنند که کروموزوم Y با سایر نواحی

www.ShimiPedia.ir

کروموزومی در تشکیل هتروکروماتین رقابت می کند. با توجه به این رقابت احتمالاً کمتر ژن سفید دارند، بنابراین، ژن غیر فعال کاهش خواهد یافت. این مشاهدات نشان می دهند که یک یا چند پروتئین برای تشکیل هتروکروماتین کافی است و معمولاً در مقدار محدود وجود دارند. اگر تعداد آنها زیاد باشد، انتظار می رود که هتروکروماتین های اضافی هیچ اثری نداشته باشند.

پروتئین هایی که روی PEV اثر می گذارند: Su (var) و E (var)

اگر تعداد پروتئین های تشکیل دهنده هتروکروماتین محدود باشد، بنابراین کاهش تعداد آنها به نصف باید روی PEV اثر بگذارد، در آزمایشگاه این اثر را می توان اندازه گیری کرد. چنین کاهشی را می توان توسط جهش هایی که روی ژن های مربوط به این پروتئین ها می شود، انجام داد. به منظور تشخیص چنین ژن هایی بررسی های گسترده ای انجام شد. در حشرات جهش یافته ای که PEV آنها خاموش یا تقویت شده اند، تحقیقات زیادی صورت گرفته است. بین سلول هایی که ژن مارکر بیان شود (منظور ژن white است) و آنهایی که بیان نشدند، تعادل برقرار می کنند. تحقیقات روی جهش های غیر فعال از یک طرف و اتفاقات دیگر از طرف دیگر برای پروتئین هایی که تشکیل هتروکروماتین می دهند، صورت گرفت. بر اساس این تحقیقات جهش هایی که فعالیت یک یا چند پروتئین هتروکروماتین را کاهش می دهند (یعنی مهار می کنند) متفاوت با جهش هایی هستند که باعث افزایش مقدار آنها یا عملکرد آنها می شوند (یعنی تقویت می کنند).

هدف از این تحقیقات شناسایی جهش هایی است که باعث تغییر در محصولات PEV می شوند، در خصوص همین موضوع بیش از 100 جهش شناسایی شدند. احتمالاً جهش های مهار کننده و به عبارتی Su (var) (suppressor) بیشتر از جهش های تقویت کننده یعن E (var) (enhance) رُخ می دهند. نکته مهم این است که Su (var) می تواند در برخی از حشرات به عنوان تقویت کننده PEV عمل نماید (این عمل در حشراتی صورت می گیرد که به جای دو نسخه از ژن دارای سه نسخه باشند). بنابراین، به عنوان triplo- enhancer و haplo- suppressor عمل می کنند. این فرایند به طور کامل در ارتباط با مدل های کاری ما می باشد. سه نسخه از ژن باعث افزایش 50 در صدی تولید پروتئین و یک افزایش قابل توجه در تشکیل هتروکروماتین خواهد شد. پیچیدگی این آزمایش ها این است که Su (var) و E (var) می توانند انواع مهار کنندگی در ژن هایی که در مرکز هتروکروماتین یا کروموزوم 4 قرار دارند، به وجود آورند. از طرف دیگر این جهش ها در بیان ژن های مجاور تلومرها اثری ندارند. هتروکروماتین تلومری باید در برخی از عملکردهای مهم، متفاوت باشد.

www.ShimiPedia.ir

البته بسیاری از جهش های شناسایی شده در این زمینه، ناشی از تغییرات غیر مستقیم در PEV و در تشکیل کروماتین است. مسلماً تأثیرات فنوتیپی پیچیده ای که ناشی از PEV باشد، بروز می کند. ژن های جهش یافته ای که مربوط به همین موضوع بودند را کلون کردند، سپس توالی آنها را شناسایی و محصولات پروتئینی را بررسی نمودند. برخی از مثال های آنها در جدول 9- 3 نشان داده شده است. این ژن ها به صورت هتروژن بوده و حاوی پروتئین هایی با ویژگی های خاص برای سازماندهی هتروکروماتین ها می باشند. مدل های پیشنهاد شده را در شکل 9- 8 مشاهده می کنید. یکی از این ژن ها Su (var)2- 5 است که پروتئین HP- 1 را رمز گذاری می نماید (همانطور که انتظار می رفت پس از غربال سازی، این پروتئین مورد شناسایی قرار گرفت و متوجه شدند که بین این پروتئین و هتروکروماتین ارتباط وجود دارد). مهار کننده دیگری به نام Su (var)3- 7 وجود دارد که دارای موتیف زینک فینگر است. یکی از محل هایی که این پروتئین می تواند به DNA پیوند یابد متوجه شدند که حاوی آمینو اسیدهای اسیدی است.

جدول 9- 3 مثال هایی از مهار کننده ها و تقویت کننده ها که در ایجاد تنوع به واسطه " جایگاه اثر" دخالت دارند.

Type	Gene/mutant	Protein product
Dominant suppressors of PEV	*Su(var)2-5*	HP1; associates with heterochromatin and, directly or indirectly, with other proteins
	Su(var)3-7	SU(VAR)3-7; associates with heterochromatin and HP1, seven zinc fingers
	Su(var)3-9	SET domain; histone methyltransferase
	k43	ORC2 (component of replication complex); associates with HP1
	modulo	MODULO; binds DNA and RNA; basic N-terminal and C-terminal domains
Dominant enhancers of PEV	*E(var)3-95E*	E2F; transcriptional activator and cell cycle regulator
	E(var)62/trithorax-like	GAGA factor; associates with euchromatin; POZ domain
	E(var)3-64BC	RPD3; histone deacetylase
	hel	HEL; ATP-dependent RNA helicase

Data taken from Wallrath (1998).

تغلیظ کروماتین توسط Su (var)3- 7 ممکن است در برقراری پیوند DNA با موتیف زینک فینگر و اندرکنش بین رشته های پلی اسیدی با پروتئین های کروماتینی که بار مثبت دارند، به وجود آید. این پروتئین ها شباهت زیادی به هیستون ها دارند و

www.ShimiPedia.ir

ترکیبات پلی اسیدی در Su (var)3- 7 دیده می شوند، در ضمن پروتئین های دیگری وجود دارند که پیوند شده به هیستون ها هستند مثل HMG1 ، HMG2 و نوکلئوپلاسمین. به هر حال، یک معما باقی می ماند که چرا آنزیم RPD3 داستیلاز تقویت کننده PEV است؟ تمام شواهد نشان می دهند که هیستون ها در هتروکروماتین به صورت استیله شده هستند. بنابراین، فقدان آنزیم داستیلاز باعث افزایش استیلاسیون هیتسون ها می شود و در نهایت هتروکروماتین به حالت سکون در می آید.

چگونگی انتشار هتروکروماتین

مدل های آزمایشگاهی نشان می دهند که هتروکروماتین از جایگاه طبیعی به سمت ژن های مجاور حرکت می نمایند. آنچه که انتشار می یابد احتمالاً مجموعه ای از پروتئین هاست که DNA را کاملاً می پوشانند و مانع عمل نسخه برداری می شوند. این فرضیه چند سال پیش توسط زوخرکاندل (Zucherkandl) پیشنهاد شد. برخی از این پروتئین ها با DNA پیوند دارند و احتمالاً موقعیت DNA یوکروماتینی ممکن است برای تعیین اندازه این انتشار، ما را راهنمایی کند.

ادامه مباحث مربوط به مدل های انتشاری، باعث شد که مدل های قابل آزمایش پیشنهاد شوند. وقتی دو ژن جابجا شده در مجاورت هتروکروماتین باشند و اگر ژن های دورتر غیر فعال گردند، درنتیجه ژن های نزدیکتر باید غیر فعال شوند. این فرایند را در شکل 9- 10 مشاهده می کنید.

شاید این نوع آزمایش ها به ظاهر ساده باشند ولی انجام آنها به دلیل فقدان ژن های مارکر بسیار مشکل است. نتایج تجربی اولیه مدل انتشار هتروکروماتین را به صورت مدل انتشار متوالی بیان نمودند ولی آزمایش های اخیر آن را فرضیه ای کاملاً اشتباه می پندارند. در بررسی های اخیر چند گونه از حشرات که دارای ژن سفید (w) و ژن زبر (rst) یا roughest بودند، مشاهده شد که این ژن ها در مجاورت هتروکروماتین قرار داشتند. بیان ژن rst توسط یک فنوتیپ ویژه چشم مشخص می شود که حضور یا فقدان رنگدانه چشم در آنها با میکروسکپ قابل رویت است. بسیاری از نمونه های مورد بررسی حاوی ژن rst بودند و مشاهده

www.ShimiPedia.ir

شد که ژن rst با آن که کمی دورتر قرار داشت ولی خاموش بود، در حالیکه ژن w در فاصله نزدیکتر قرار داشت ولی بیشتر بیان می شد.

در مواردی که ژن دورتر نسبت به هتروکروماتین خاموش باشد، ولی ژن نزدیکتر هنوز بیان گردد، بنابراین ژن نزدیک به نحوی قرار گرفته که از تأثیرات هتروکروماتین محفوظ مانده است. این موضوع بیانگر آن است که تأثیرات موضعی کروماتین قادر است بر تأثیرات هتروکروماتین غلبه کند و در نهایت یک ژن فعال یا غیر فعال را که ناشی از پدیده رقابت است را نشان دهد. اهمیت تأثیرات موضعی غالباً با فرایند انتقال ژن (transgene) در هتروکروماتین ها مشخص می شود. خاموشی ژن ها به طور جدی می تواند در موضع یابی آنها مؤثر باشد. نکته جالب توجه این است که ژن های انتقال یافته ای که در نزدیکی هتروکروماتین قرار دارند، وقتی به صورت چند نسخه ای وارد می شوند خاموش اند (زمانی که یک نسخه از ژن انتقال می یابد، این عمل کمتر صورت می گیرد). بنابراین، به نظر می رسد توالی های تکراری DNA خاموش می شوند. در حقیقت ژن های انتقال یافته به هر جا در ژنوم منتقل می شوند، منتهی آرایش پشت سر هم آنها باعث می شود که ساختاری شبیه هتروکروماتین به وجود آید، در نتیجه فعالیت نسخه برداری را مهار می کند. عناصر تکراری مختلفی که خصوصیات هتروکروماتینی دارند ممکن است در ساختار تشکیلات هتروکروماتین نقش به سزایی داشته باشند و در DNA یوکروماتینی دیده نمی شوند. دخالت آنها در انتشار هتروکروماتین بعید به نظر می رسد. به هر حال، سایر عناصر DNA که هنوز شناخته نشده اند ممکن است باعث مهار یا تقویت ساختار شبیه هتروکروماتین شوند. تکرار این عناصر تعیین کننده اثر ژنی است که در مجاور هتروکروماتین قرار دارد. این نکته جالب توجه است که یک پروتئین پیوند شده به DNA ماهواره ای به نام Prod در یوکروماتین بافت شده است که احتمالاً در پیوند با عناصر DNA یوکروماتینی می باشد.

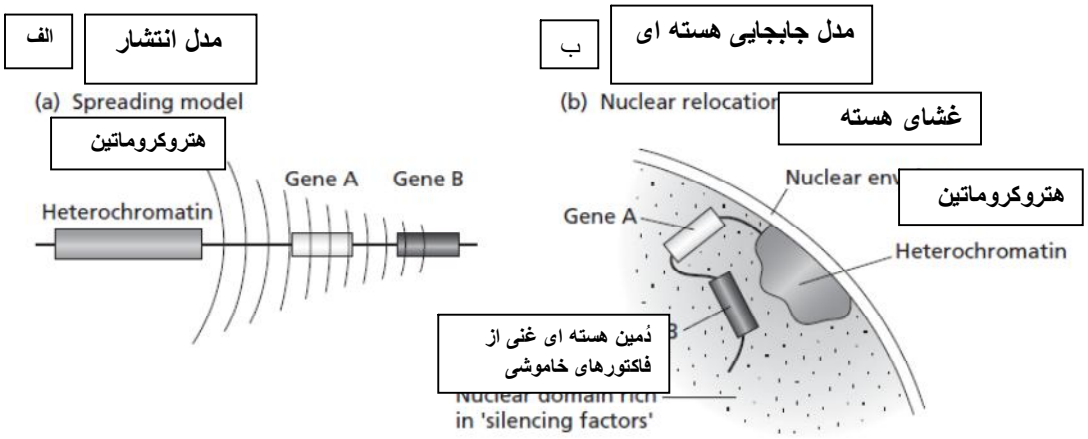
تشکیل هتروکروماتین و موقعیت داخل هسته ای

این مدل پیشنهاد می کند که هتروکروماتین در محل خاص و مشخصی از هسته قرار دارد و در آن شرایط برای فشرده کردن DNA به صورت ساختار کاملاً تعریف شده و مشخص در می آید (منظور مکان های نامناسب برای نسخه برداری نیست، بلکه بیانگر حضور برخی از ژن های فعال از نظر نسخه برداری در هتروکروماتین می باشد). این نواحی احتمالاً شامل سطوح بالایی از پروتئین هی ضروری جهت سازماندهی هتروکروماتین است. این پیشنهاد توسط مطالعات انجام شده در مخمر حمایت می شود. این مطالعات نشان می دهند که نواحی همجوار با غشای هسته هم در تلومرازهای مخمر وجود دارند و هم غنی از پروتئین های مورد

www.ShimiPedia.ir

نیاز برای سازماندهی تشکیلات شبه هتروکروماتین می باشند. این ساختار موجب خاموش کردن نسخه برداری می شود. در این مدل، ژن مستقر شده تحت تغییرات ساختار کروماتین است، اما نیازی به انتشار ساختار تغییر یافته در طول DNA نمی باشد (شکل 9- 10).

مطالعات انجام شده بر روی ژن های جهش یافته دروزوفیلا به نام ژن غالب قهوه ای یا bw^D از مدل های مربوط به PEV حمایت می نماید. در این جهش حدود 2 Mb از نوع DNA های ماهواره ای را وارد لوکوس ژن قهوه ای کردند (شکل 9- 11). مشاهدات اولیه نشان داد که این جهش نه تنها ژن قهوه ای (*brown*) را خاموش می کند، بلکه در مسیرهای مختلف باعث خاموشی ژن های طبیعی مشابه آن نیز می شود. این نوع ژن، نمونه ای از غیر فعال سازی ترانس (trans- inactivation) است. اثر ترانس با انتشار در هتروکروماتین فرق می کند. یک توضیح احتمالی ناشی از مشاهداتی است که در برخی از ژن های دروزوفیلا به دست آمده است. ژن های مشابه در مرحله ایترفاز هسته جفت می شوند و احتمالاً به طور فیزیکی با هم در ارتباط هستند. این مورد در هسته های دیپلوئیدی مانند bw و سایر لوکوس ها، بر اساس هیبریداسیون پیچیده و تجزیه و تحلیل تصاویر، ثابت شد. وجود برخی از مکانیسم های جفت شدن در کروموزوم های سوماتیک هنوز ناشناخته مانده است. احتمالاً از ترکیباتی استفاده می شود که در جفت شدن کروموزوم های



شکل 9- 10 مکانیسم هایی که توسط آن هتروکروماتین ممکن است ژن های همجوار را غیر فعال کند. (الف) در این مدل، یک ساختار مهار کننده کروماتین که همان قطعه ای از هتروکروماتین می باشد در طول رشته کروماتین انتشار می یابد. وجود این انتشار از یک هسته به هسته دیگر باعث بیان مختلف در ژن های مجاور می شود. ژن A بیشتر از ژن B

www.ShimiPedia.ir

غیر فعال می شود.این مدل پیشنهاد می کند که ژن A برای همیشه غیر فعال می گردد ولی غیر فعال شدن ژن B دائمی نیست. (ب) این مدل بیان می کند که دُمین های هسته ای هتروکروماتین غنی از پروتئین های هتروکروماتینی و و فاکتورهای خاموش کننده است. ژن هایی که در نزدیکی هتروکروماتین قرار دارند ناگزیربه سمت این دُمین کشیده می شوند و احتمالاً غیر فعال می گردند. این مدل در حد امکان اجازه می دهد که در هسته های مشابه، ژنی که به هتروکروماتین نزدیکتر است می تواند بیرون از محدوده دُمین خاموش قرار گیرد، در حالیکه ژن های دورتر امکان دارد در محدوده هتروکروماتین باشند. این فرایند به مسیر رشته کروماتین وابسته است.

مشابه در سلول های میوتیک رُخ می دهد. اما آیا مکانیسم جفت شدن سوماتیک قادر است توضیحی برای اثر ژن bw^D فراهم کند. پیشنهاد می شود که ژن همولوگ bw طبیعی توسط جفت سوماتیک خود به ناحیه همجوار که جهش یافته است، کشیده می شود (این ناحیه آلل هتروکروماتین است). این نواحی، ایجاد منطقه ای می کنند که برای تشکیل هتروکروماتین مناسب است، اما قابل مقایسه برای نسخه برداری ژن های یوکروماتین نمی باشد. بنابراین، آلل های طبیعی ممکن است خاموش شوند. برای توضیح پدیده های تنوع، ما باید بپذیریم که دو آلل مقابل هم از یک ژن در یک هسته با همان آلل ها در هسته دیگر فرق می کنند. زمانی که به یکدیگر نزدیک شوند، آلل طبیعی خاموش می شود (منتهی در اکثر مواقع اینگونه نیست). این توضیحات در شکل 9- 11 آورده شده است.

در این مرحله، شاید بهتر باشد که در باره خصوصیات PEV بیشتر بررسی نماییم. به عبارت دیگر، وقتی یک ژن خاموش یا روشن است، بیان آن آلل در هنگام تکثیر سلولی پایدار باقی می ماند. اگر بخشی از این اظهارات بر اسای موقعیت های داخل سلولی درست باشد، می توان پیشنهاد داد که این جایگاه همیشه پایدار خواهد ماند. این را می توان مثالی از تنظیم اپی ژنیتیک در سطحی از هسته سلولی در نظر گرفت.

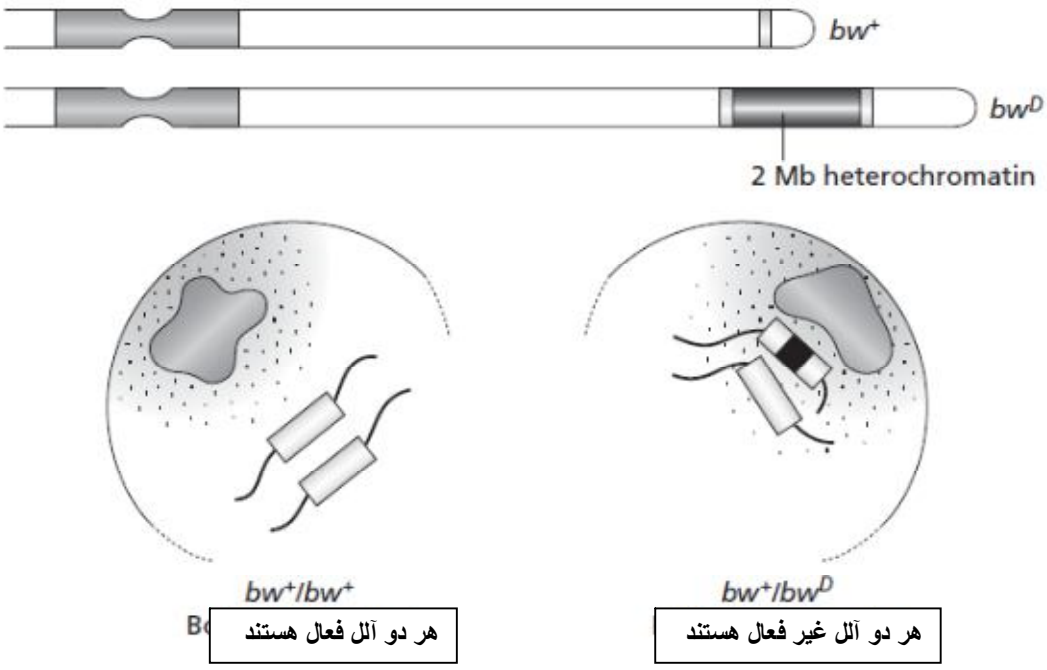
بیان ژن و هتروکروماتین در پستانداران

اکثر مطالعات روی PEV مربوط به دروزوفیلا بوده است، اما اخیراً مطالعات نشان دادند که چنین پدیده ای در پستانداران نیز وجود دارد. اطلاعات اولیه ناشی از مطالعات انجام شده بر روی ژن CD2 انسان بود. این ژن مسئول رمز گذاری پروتئین سطحی در گلبول های سفید خون می باشد که در بخشی از مراحل تکامل آنها صورت گرفته است. این ژن به طور طبیعی مسئول تنظیم

www.ShimiPedia.ir

نواحی خاصی به نام نواحی کنترل لوکوس LCR (locus control region) (فصل 6) می باشد. ژن انتقال یافته حاوی LCR در یک مکان مستقل در موش بیان می گردد. در مقابل، ژن های انتقال یافته ای که فقط شامل ناحیه تقویت 3'CD2 هستند بیان آنها از یک موش به موش دیگر فرق می کند. بنابراین، ژن های انتقال یافته فاقد LCR با استفاده از آنتی بادی می توان بیان ژن را از سلولی به سلول دیگر مورد بررسی قرار داد. این مطالعات نشان داد که بیان ژن در دودمان های سلولی متفاوت است، یعنی در برخی از سلول ها ژن ها بسیار قوی بیان می شوند و در برخی دیگر اصلاً بیان ژن وجود ندارد. با استفاده از پروب های DNA نشاندار شده با فلورسنت برای تعیین محل ژن CD2 در کروموزوم های متافازی، مشخص شد که تمام آنها به ژن های انتقال یافته ملحق شدند (یا در مرکز هتروکروماتین قرار گرفتند).

هماهنگی چشمگیری بین تأثیرات عملکردی هتروکروماتین در انسان و حشرات مشاهده می شود مثلاً تأثیر دُمین قهوه ای بین پستانداران یکسان نیست ولی عوامل هماهنگ کننده ای وجود دارند. در شرایط طبیعی و با استفاده از پروب های DNA نشاندار شده با فلورسنت،



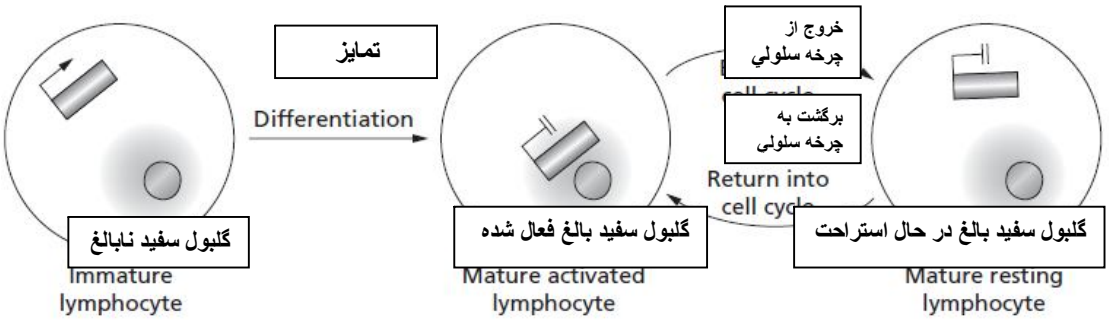
شکل 9- 11 جهش دُمین قهوه ای (bw^D). در این جهش، ژن قهوه ای (bw) روی کروموزوم شماره 2 دروزوفیلا ملانوگاستر توسط ورود قطعه ای از هتروکروماتین غیر فعال شده است. به طور شگفت آوری، جهش مربوطه باعث غیر فعال شدن آلل طبیعی bw بر روی کروموزوم مشابه شده است. این پدیده ممکن است به این دلیل باشد که ژن جهش

www.ShimiPedia.ir

یافته مجدداً در دُمین هتروکروماتین در هسته قرار گرفته و آلل طبیعی را به سمت خود کشیده است. تحقیقات نشان داد که کروموزوم های مشابه تمایل به جفت شدن در مرحله اینترفازی دارند. آلل طبیعی از طریق همجواری با هتروکروماتین غیر فعال می شود. این موضوع شکلی از نحوه ایجاد تنوع به واسطه جایگاه اثر است.

مطالعاتی روی هیبریداسیون صورت گرفت و موقعیت های داخل سلولی برای مجموعه ای از ژن های گلبول های سفید خون را مشخص کردند. در این آزمایش معلوم شد که سلول ها می توانند از حالت خاموش به سمت روشن حرکت کنند. در این سلول های خاموش، ژن های موجود در هسته می توانند پخش شوند. زمانی که سلول ها جهت رشد در محیط کشت تحت تأثیر فاکتورهای رشد قرار می گیرند، ژن هایی که در گلبول های سفید خون بیان نمی شوند، شروع به حرکت به سمت مرکز هتروکروماتین می کنند. طی سه روز تحریک پذیری، یک یا هر دو آلل ژن های بیان نشده در اغلب سلول ها، مشاهده شد که در همجوار هتروکروماتین قرار می گیرند. این دو ژن در بعضی از مراحل تمایز در گلبول های سفید خون مانند مارکر سطحی CD8α و آنزیم ریکامبیناز Rag ، بیان شدند. همچنین این ژن ها در سلول های دیگر مانند ژن عصب ویژه ای به نام Sox1 نیز متوجه شدند که قابلیت بیان پیدا کردند. ممکن است جابجایی ژن به نواحی همجوار هتروکروماتین یک روش عمومی برای خاموشی ژن در پستانداران باشد. به نظر می رسد که این مکانیسم در سلول های تغییر شکل یافته عملی نباشد. در سلول های مشتق شده از تیموس مربوط به بیماری Hodgkin متوجه شدند که ژن Rag یا سایر ژن های آن را می توان توسط دارو یا تیمار با آنتی بادی و اتصال آن به گیرنده T- cell خاموش کرد. این خاموشی در غیاب ژن های جابجا شده رُخ می دهد. به هر حال، زمانی که سلول ها پس از چند روز مجدداً کشت داده شدند، ژن هایی مانند Rag در آنها مجدداً بیان گردیدند. این نتایج نشان می دهند که فرایند جابجایی برای مهار اولیه نسخه برداری ضروری نمی باشد، اما برای حفظ طولانی مدت حالت غیر فعال نسخه برداری لازم است. اگر چه این فرایند ناشی از دخالت پروتئین های هتروکروماتین یا ترکیب Su (var) پستانداران است، اما فاکتور نسخه برداری لنفوئید به نام ایکاروز (Ikaros)، متحمل جابجایی با مجموعه ای از هتروکروماتین در زمان رشد گلبول های سفید خون می گردد و احتمالاً از طریق داستیلاز هیستونی نقش مهمی در پیشرفت فرایند ایفا می کند (فصل 8). این فرایند به طور خلاصه در شکل 9-12 نشان داده شده است.

www.ShimiPedia.ir



شکل 9- 12 تغییر موقعیت ژن ها در ارتباط با دُمین های سانترومر هتروکروماتین (قسمت های سایه دار) طی تمایز گلبول های سفید خون. توجه داشته باشید که موقعیت اولیه سانترومر به نحوی است که در حالت استراحت می باشد. وقتی سلول های بالغ خاموش شدند از چرخه سلولی خارج می شود.

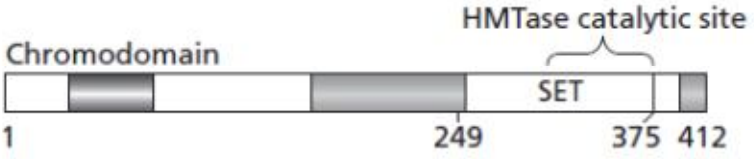
فعالیت کاتالیزوری Su (var) پستانداران

انسان و موش حاوی همان Su (var) هستند که در دروزوفیلا وجود داشت و به نظر می رسد نقش آنها شباهت زیادی به یکدیگر دارد. برای مثال، گونه Su (var)3- 9 در انسان و موش در مرکز هتروکروماتین واقع شده که با HP- 1 پستانداران اندرکنش می دهد. همچنین یک نسخه از ژن انتقال یافته ای که در انسان SUV39H1 را رمز گذاری می کند را به برخی از حشرات وارد کردند و مشاهده شد که قادر به تقویت PEV و جابجایی ژن سفید (white) گردید (دقیقاً همان کاری که در دروزوفیلا انجام می داد) (جهت یاداوری، Su (var) تقویت کننده PEV است و موقعی که سه نسخه یا بیشتر از آن حضور داشته باشد موجب افزایش خاموشی می شود ولی یک نسخه از آن مهار می کند).

یکی از عوامل مهم درک چگونگی فعالیت Su (var) مربوط به زمانی بود که فعالیت متیل ترانسفراز هیستونی در هر دو همولوگ های Su (var)3- 9 انسان و موش (به ترتیب SUV39H1 و SUV39h1) شناخته شد (جزئیات این اندرکنش در شکل 4- 5 نشان داده شده است). در سایر هیستون ها یا در سایر لیزین های H3 فعالیت متیله شدن مشاهده نشد. جایگاه کاتالیزوری آنها ما بین دُمین SET قرار داردکه یک ناحیه محافظت شده در اکثر پروتئین ها است و شامل پروتئین PcG یا E(Z) و پروتئین گروه تری توراکس (trithorax) یا TRX می باشد. به هر حال تا کنون دُمین SET دیگری مشاهد نشده است که فعالیت متیل ترانسفرازی هیستونی داشته باشد. احتمالاً به نظر می رسد فعالیت SUV39H1 وابسته به دُمین SET و باقیمانده های غنی از سیستئین می باشد. ساختار دُمین SUV39H1 در شکل 9- 13 نشان داده شده است.

www.ShimiPedia.ir

آزمایش هایی که در شرایط خارج سلولی انجام شد نشان داد که نوترکیب Suvar39h به طور ویژه هیستون H3 را در لیزین شماره 9 متیله می نماید. نکته مهم این است که پروتئین هتروکروماتین HP1 از طریق کرومودمین (chromodomain) با H3 متیله شده در این جایگاه پیوند برقرار می کند. بنابراین، سوالی که به وجود می آید این است که آیا H3me9 تولید شده توسط Suvar39h (منظور این است که HP1 را هدف قرار داده تا به دُمین های خاصی در کروماتین پیام برساند) باعث شکل گیری هتروکروماتین می گردد؟ هر چند پاسخ ب این سوال فقط بخشی از مسئله را حل می کند ولی می توان گفت که Su (var)39h در شرایط داخل سلولی ترجیحاً در ارتباط با هتروکروماتین است (در حالیکه H3me9 اینگونه نیست). در حقیقت به نظر می رسد که فقط بخش کوچکی از H3me9 می تواند از SUVAR39h تولید شود (موش های فاقد آنزیم مربوطه تقریباً سطح طبیعی از H3me9 در هیستون های اصلی دارند). احتمالاً HP1 نیاز به متیلاسیون لیزین شماره 9 و میزان کمی از استیلاسیون هیستونی (از خصوصیات کلی هتروکروماتین ها) قبل از اتصال به کروماتین دارد. سوالی که باقی می ماند این است که چگونه ممکن است Suvar39h هدف دُمین های هتروکروماتین باشد؟ احتمالاً پروتئین های پیوند شده به هتروکروماتین در این امر دخالت دارند. شواهدی وجود دارند که Suvar39h و HP1 با پروتئین های Rb مهار کننده نسخه برداری در ارتباط هستند و به عنوان پروموتر انتخاس می شوند. این نتجه بسسار مهمی است که ترکیبات HP1 ، Suvar39h و H3me9 نقش مهمی در تنظیم نسخه برداری و سازماندهی هتروکروماتین دارند.



شکل 9- 13 ساختار دُمین SUV39H1 . دُمین SET بین باقیمانده های 249 و 375 واقع شده است. نواحی غنی از سیستئین به رنگ سیاه نشان داده شده اند.

با این که انسان و موش هر دو واجد همولوگ های شبیه بهم از Su (var)3- 9 هستند، بنابراین چگونه می توان اختلافات عملکردی و فعالیت کاتالیزوری آنها را نشان داد؟ موش هایی که یکی از همولوگ های آنها از بین رفته هنوز قابلیت زیستی در آنها دیده می شود ولی وقتی هر دو همولوگ از بین بروند فقط 25 در صد زنده می مانند و رشد آنها با تأخیر انجام می شود. به طور چشمگیرمشاهده شده که فیبروبلاست جنینی از دو همولوگ غیر فعال ساخته می شود که بیانگر تکثیر سلول هایی با هسته

www.ShimiPedia.ir

های غیر طبیعی می باشد و دارای نقص در جدا شدن کروموزوم ها طی مرحله میتوز هستند. همچنین در هیستون H3 آنها سرین شماره 10 فسفوریله می شود. نکته باقی مانده از این مشاهدات این است که در واقع فسفوریلاسیون H3S10 برای پیشرفت طبیعی مراحل میتوز چرخه سلولی ضروری است. همانطور که قبلاً ذکر شد تغییرات مربوطه در اواخر فاز G2 در مرکز هتروکروماتین صورت می گیرد و در کروموزوم انتشار می یابد. اما چرا عدم حضور Suv39h1/2 در تغییر فسفوریلاسیون H3 مؤثر است؟ یک پاسخ موجود در این زمین مربوط به نتایج به دست آمده از اندازه گیری کیناز H3 در شرایط خارج سلولی است. این کیناز مسئول فسفوریلاسیون H3S10 است. هیستون H3 غیر متیله سوبسترای مناسبتری نسبت به H3 متیله شده در لیزین 9 برای این آنزیم است. احتمالاً متیلاسیون H3 در لیزین 9 جهت تنظیم فسفوریلاسیون H3 در سرین 10 موجود در هتروکروماتین ضروری است تا سلول برای مرحله میتوز آماده شود. هنوز کارهای تجربی زیادی باید انجام شوند ولی همین یافته ها نه تنها دیدگاه جالبی از اتفاقات ناشی از فعالیت Su (var) را بیان می کنند، بلکه به طور واضح تغییرات مربوط به انتهای هیسون ها و تأثیر عملکردی آنها را بازگو می نماید.

www.ShimiPedia.ir

منابع:

General reviews

Hennig, W. (1999) Heterochromatin. *Chromosoma*, **108:** 1–9.

Strachan, T. & Read, A. P. (1997) *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 183–209.

Wallrath, L. L. (1998) Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8:** 147–153.

Heterochromatin DNA

Gatti, M. & Pimpinelli, S. (1992) Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Ann. Rev. Genet.*, **26:** 239–275.

Lohe, A. R., Hilliker, A. J. & Roberts, P. A. (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **134:** 1149–1174.

Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L. *et al.* (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **92:** 3804–3808.

Heterochromatin genes

Weiler, K. S. & Wakimoto, B. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.*, **29:** 577–605.

Heterochromatin proteins

Aagaard, L., Laibl, G., Selenko, P. *et al.* (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV modifier *Su(var)3–9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.*, **18:** 1923–1938.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F. *et al.* (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain. *Nature*, **410:** 120–124.

Eissenberg, J. C. & Elgin, S. C. R. (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10:** 204–210.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410:** 116–120.

Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U.-M. *et al.* (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412:** 561–565.

Raff, J. W., Kellum, R. & Alberts, B. (1994) The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle. *EMBO J.*, **13:** 5977–5983.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D. *et al.* (2000) Regulation of chromatin structure by sitespecific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406:** 593–599.

Torok, T., Gorjanacz, M., Bryant, P. & Kiss, I. (2000) Prod is a novel DNA-binding protein that binds to the 1.686g/cm$_3$ 10bp satellite repeat of *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.*, **28:** 3551–3557.

Heterochromatin and transcription—position effect variegation

Belyaeva, E. S., Koryakov, D. E., Pokholkova, G. V., Demakova, O. V. & Zhimulev, I. F. (1997) Cytological study of the Brown Dominant position effect. *Chromosoma*, **106:** 124–132.

Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P. *et al.* (1996) Locus-control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science*, **271:** 1123–1125.

Hennikoff, S. (1994) A reconsideration of the mechanism of position effect. *Genetics*, **138:** 1–5.

Sabl, J. F. & Hennikoff, S. (1996) Copy number and orientation determine the susceptibility of a gene to silencing by nearby heterochromatin in *Drosophila*. *Genetics*, **142:** 147–158.

Talbert, P. B. & Hennikoff, S. (2000) A reexamination of spreading of position effect variegation in the *white-roughest* region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **154:** 259–272.

Zhimulev, I. F., Belyaeva, E. S., Fomina, O. V., Protopopov, M. O. & Bolshakov, V. N. (1986) Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **94:** 492–504.

www.ShimiPedia.ir

Intranuclear positioning

Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merkenschlager, M. & Fisher, A. G. (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol. Cell*, **3:** 207–217.

Hennikoff, S., Jackson, J. M. & Talbert, P. B. (1995) Distance and pairing effects on the Brown (Dominant) heterochromatin element in *Drosophila*. *Genetics*, **140:** 1007–1017.

Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G. & Georgatos, S. D. (1996) The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J.*, **15:** 7108–7119.

www.ShimiPedia.ir