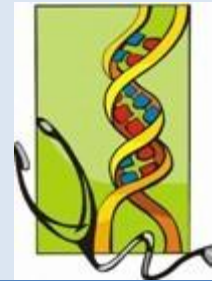


**Белки групп Trithorax и Polycomb
(TrxG/PcG) - ключевые
эпигенетические факторы
поддержания клеточной
дифференцировки**



Симонова Ольга Борисовна

2017

МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРЕДНЕ-ЗАДНИХ ГРАДИЕНТОВ

Поляризация
цитоплазмы
(материнский эффект)



Градиент белка
Hunchback



Гар-гены



Гены правила парности



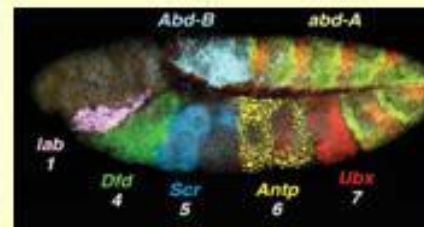
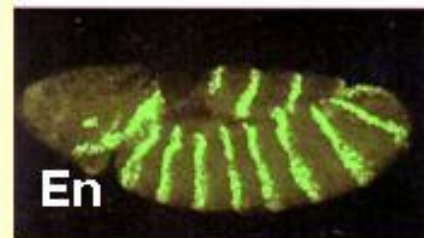
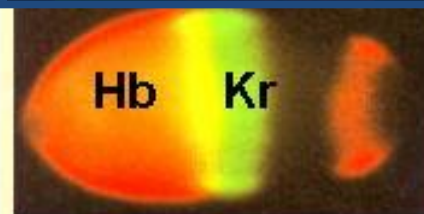
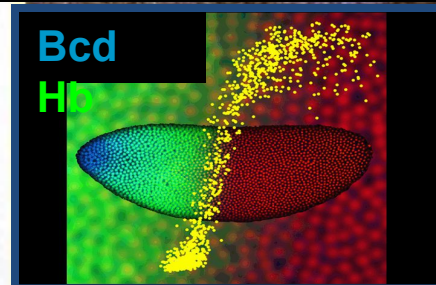
Гены сегментной
полярности



Гомеозисные
гены



Как
контролируется
экспрессия Нох-
генов на
поздних
стадиях
развития?



Мутант по гену *Polyscomb*

ДИКИЙ ТИП



Половой гребешок
(sex comb)

1 нога

2 нога

3 нога

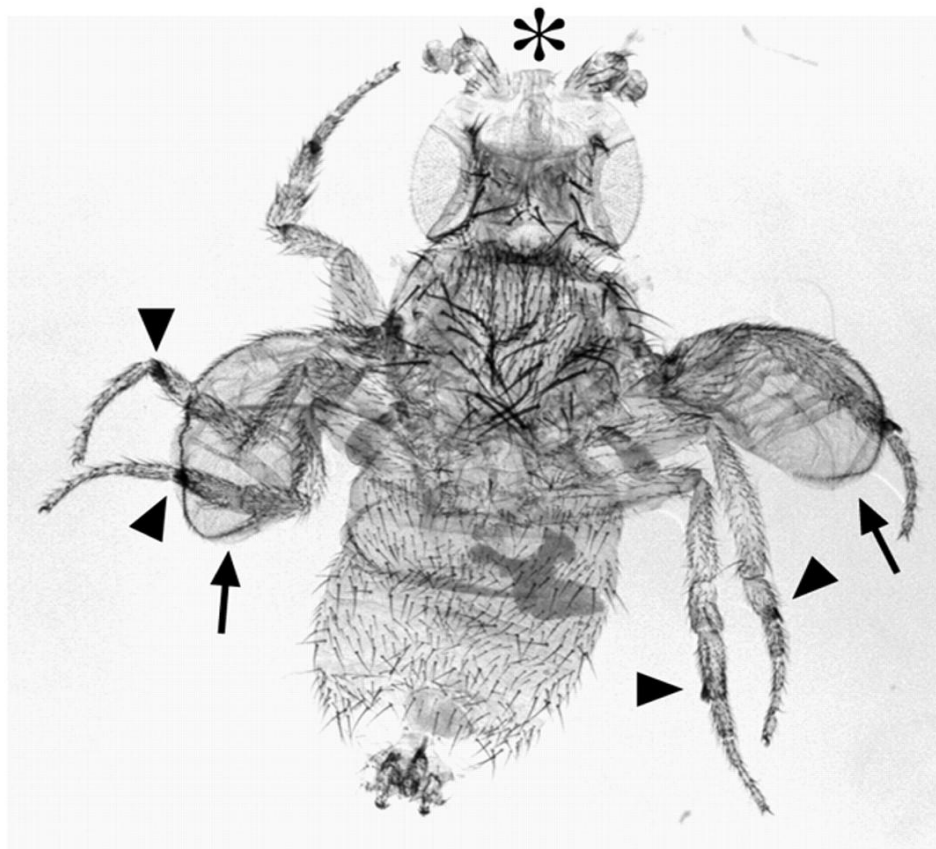


Мутант



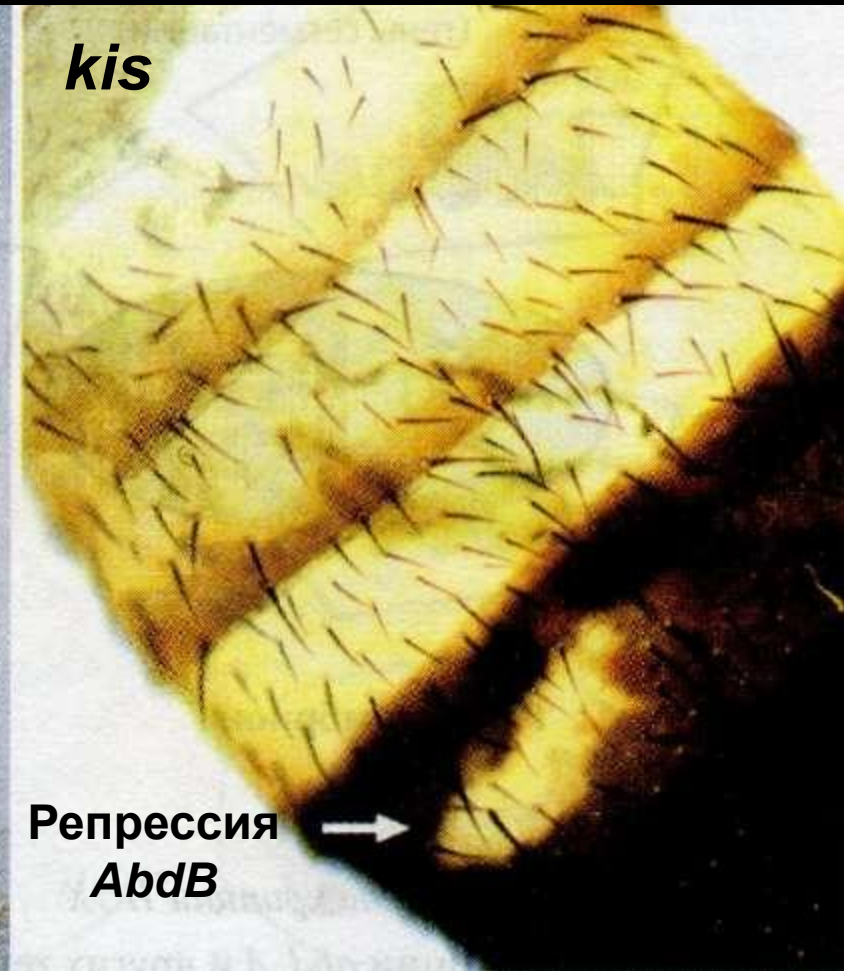
Мутант по гену из семейства *Polycomb* *-Suppressor of zeste 12*

Мутация в не гомеозисном гене может проявлять гомейозисный эффект!

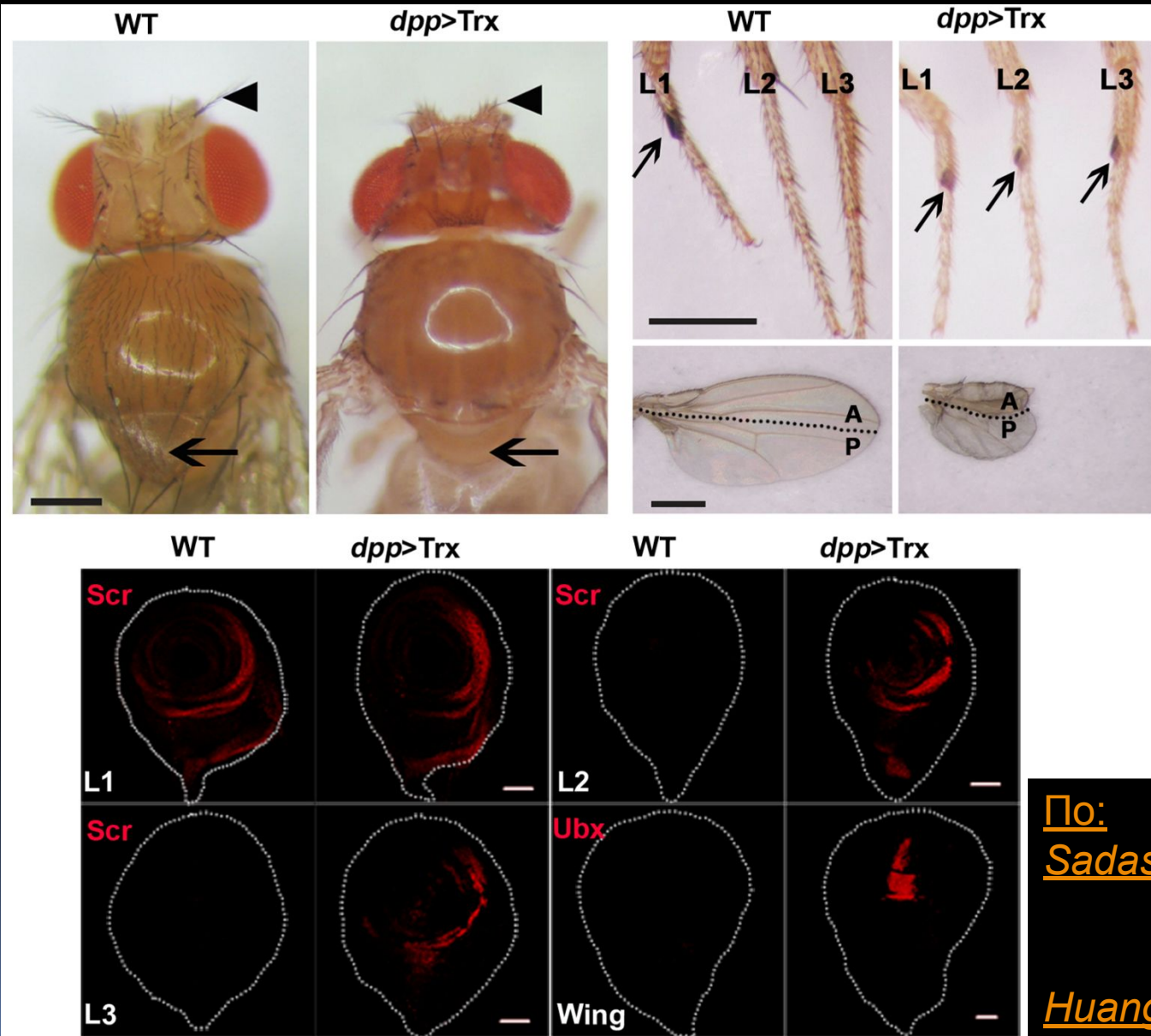


$Su(z)12^5 / Su(z)12^3$

Мутации другой группы генов **TRX-C**
приводит к репрессии гомеозисных генов



Активация группы генов **TRX-C** приводит к дерепрессии гомеозисных генов

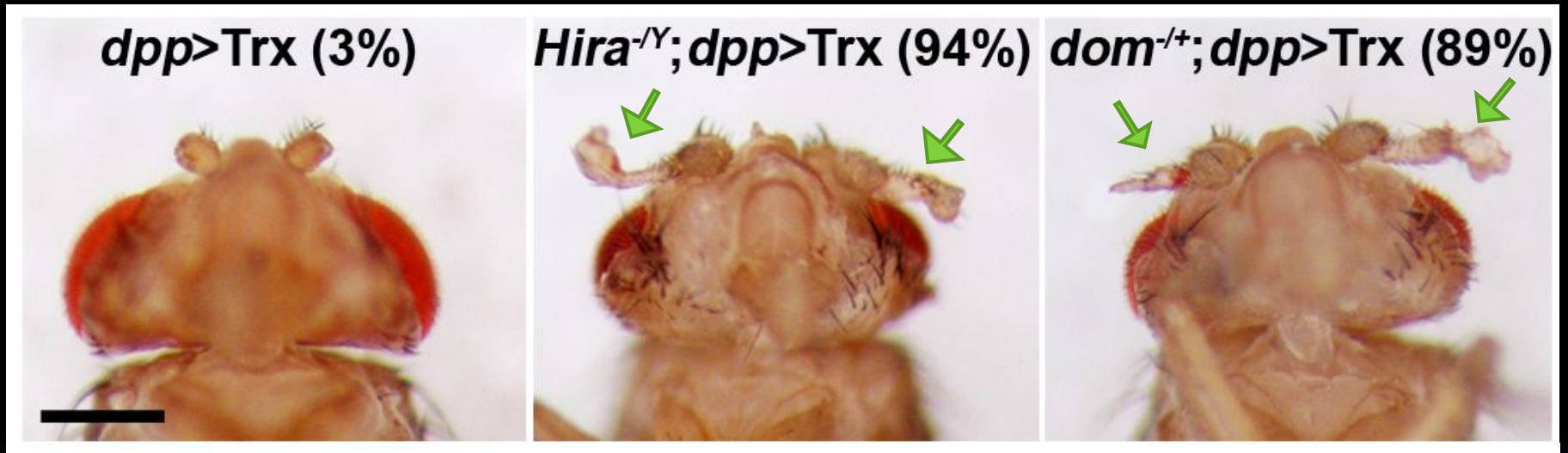


По:
Sadasivam

Huang

2016.

Реактивация гомеозисных генов усиливается на фоне мутации генов *Hira* и *dom*, кодирующих гистоновые шапероны



Эктопическая экспрессия гомеозисного гена *Antp*

По: [Sadasivam DA](#), [Huang DH](#). 2016.

Maintenance of Tissue Pluripotency by Epigenetic Factors Acting at Multiple Levels. [PLoS Genet](#)

РcG и TrxG - поддержание экспрессии

ГЕНОВ
Раннее развитие
Детерминация,
инициация



Материнские гены, Gap,
Pair-rule, segment
polarity

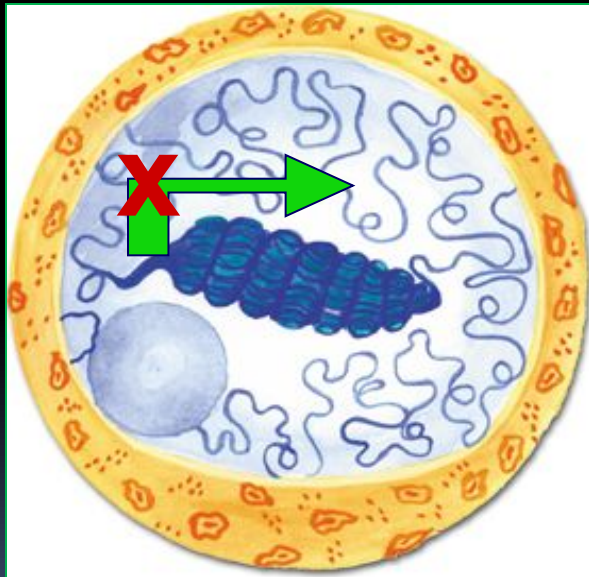
OFF

ON

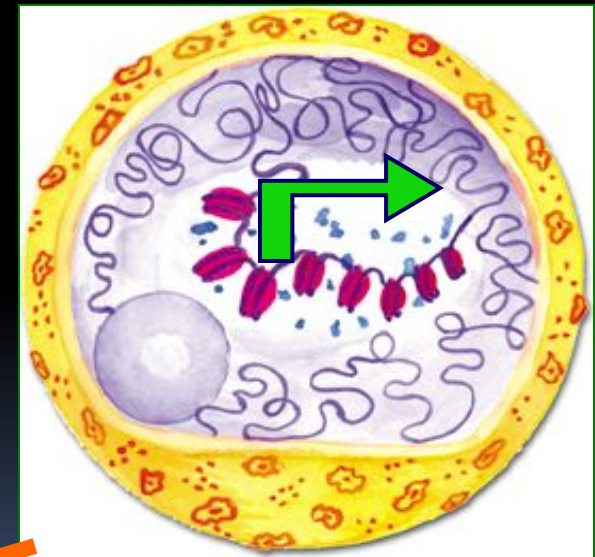
Polycomb-

Фаза поддержания

*trithorax-*группа



Сохранение
паттернов
экспрессии
гомеозисных
генов

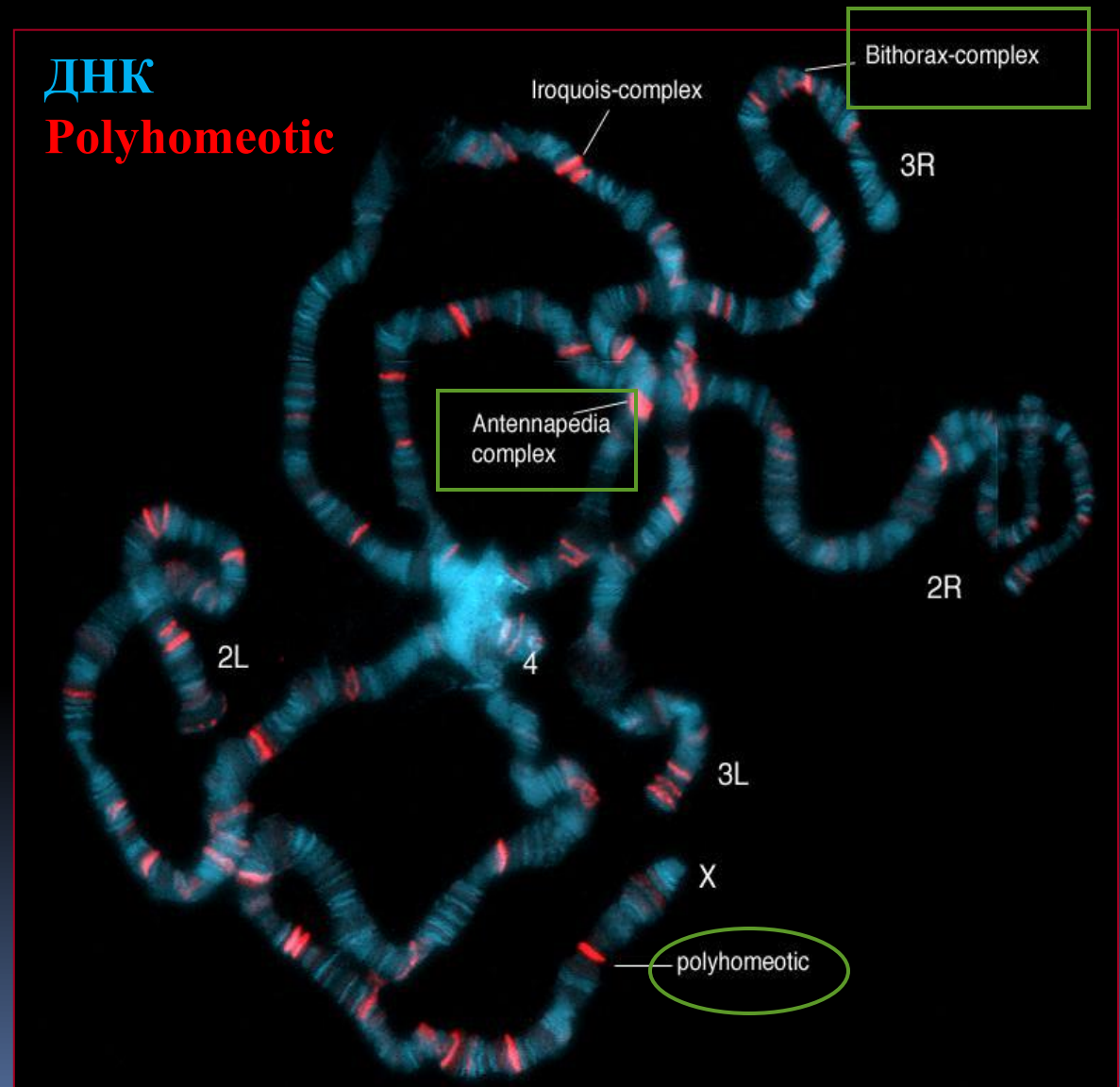


-
OFF



+
ON

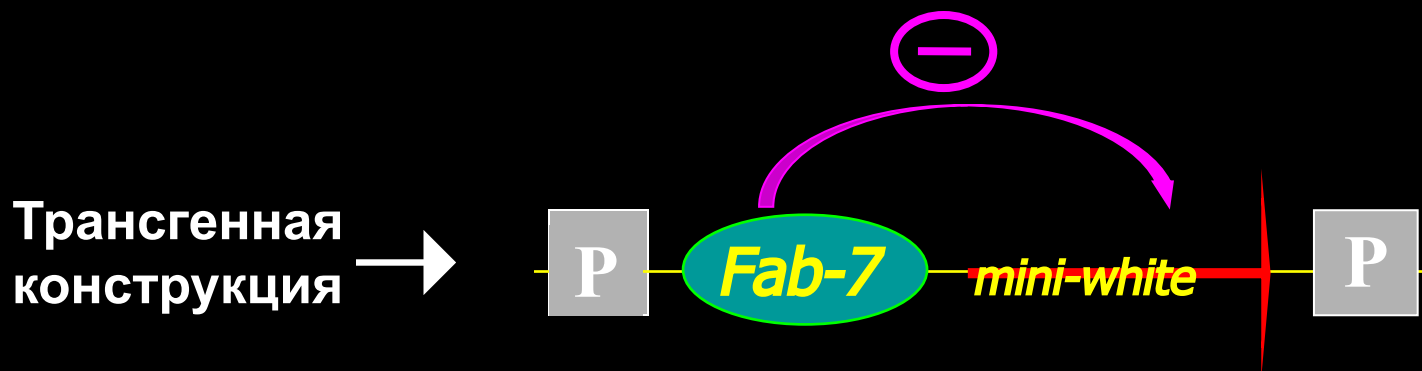
**Белки PcG и TrxG связываются со многими геномными локусами:
гомеозисными генами, членами *PcG* и *trxG* и др.**



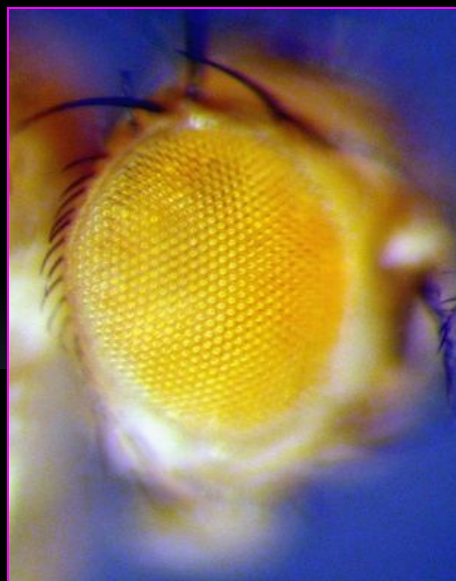
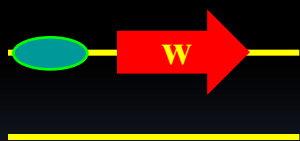
РсG и TrxG белки осуществляют свою функцию посредством взаимодействия со специфическими регуляторными *цис*-элементами, PRE/TRE

- Связаны с РсG/TrxG-белками *in vivo* (на политенных хромосомах, в X-ChIP экспериментах - Cross-linked иммунопреципитация хроматина)
- Связывание необходимо для поддержания репрессии (или усиления уровня экспрессии) **репортерных** генов
- Репрессия (или активация) усиливаются в присутствии множественных копий PRE/TRE (“pairing”-эффект)
- PRE и TRE обычно колокализуются (перекрываются)

«Pairing»-чувствительная репрессия: усиление репрессии репортерного гена *mini-white* при увеличении копий PRE (*Fab-7*)

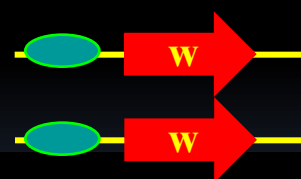


Transgenic *Fab-7* heterozygous



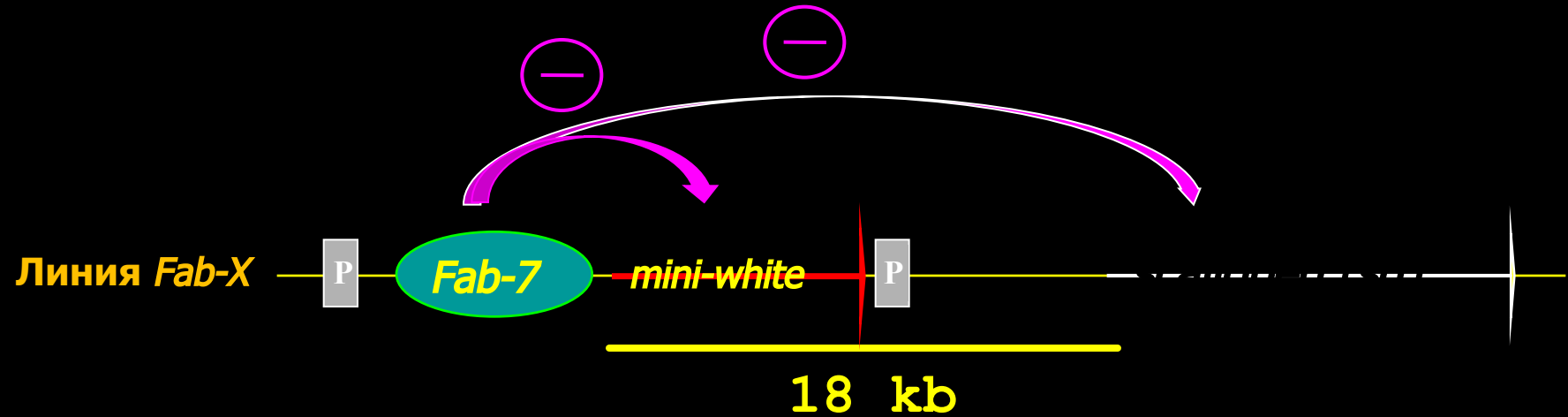
---> weak silencing of the *mini-white* reporter gene

Transgenic *Fab-7* homozygous

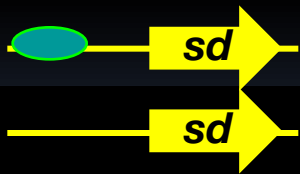


---> strong *mini-white* silencing

В трансгенной линии *Fab-X*, элемент PRE (*Fab-7*) в гомозиготном состоянии репрессирует ген, расположенный вблизи от сайта инсерции



Гетерозиготный трансген *Fab-7*



Нет репрессии эндогенного гена *sd*

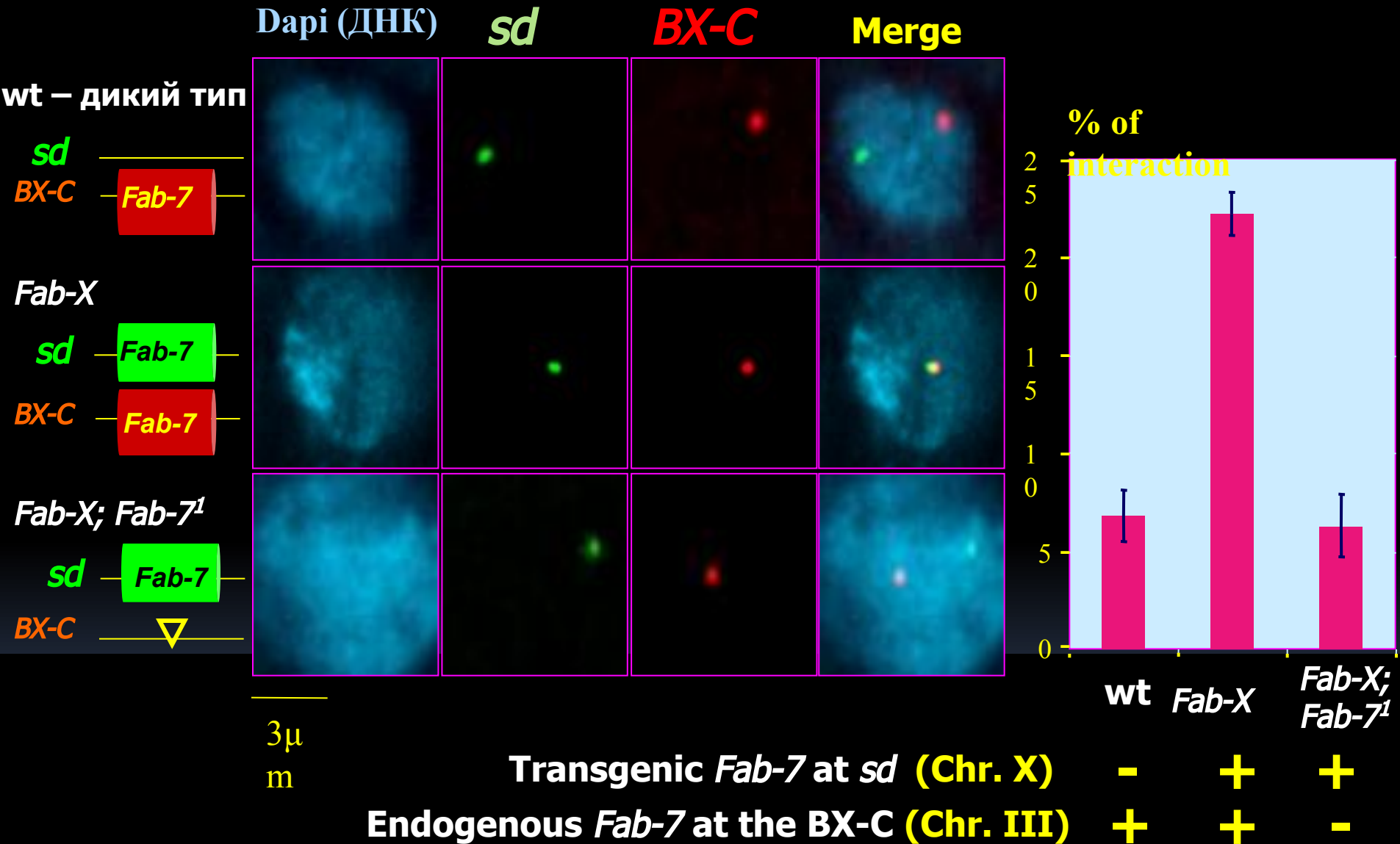
Гомозиготный трансген *Fab-7*



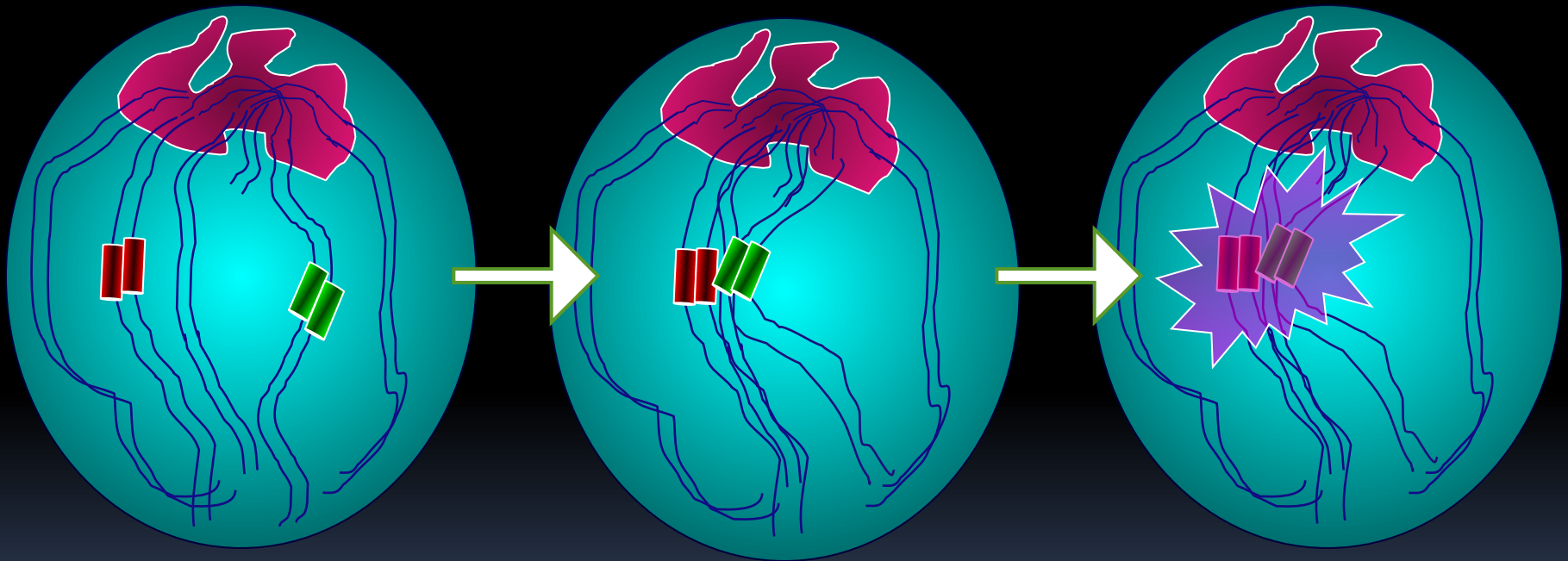
Сильная репрессия эндогенного гена *sd*

**Взаимодействие между
ГОМОЛОГИЧНЫМИ КОПИЯМИ
PREs**

Гомологичные *Fab-7* (*PRE*) копии ассоциируют в ядре



Два идентичных Fab-7, находящиеся на различных хромосомах (!) могут взаимодействовать в ядре, что ведет к усилению PcG-зависимой репрессии



Филогенетическое сравнение сайтов *PRE/TRE* района *bxd* гена *Ubx*

D. ps CAACGCTAGGCCAAGCCCTAAGCAGCGAAGCGCGATGGCA-----GCGCACACGGAA**GCCATA**ACAGGCAGG-CAAAGTGCCTATAACTCAAAGCAACTGTGGG---
D. vir CCAAGCTAGGCCAAGCCTCGCTGCGACAGCGCTGCCGACGACAACGACGCGCATACGGAA**GCCATA**ACAG**GCCATA**-----ACGATAACTCAAAGCAA**ATGGC**GTGCGC
D. eug CTCT-CTAGGCCAAGCCCC-----TTCCACACGGAA**GCCATA**ACAGGCAGG-CAAAGTGCAGATAACTCAAAGAA---GAGAGAGGGC
D. mel CTCT-CTAGGCCAAGCCCC-----TTCCACACGGAA**GCCATA**ACAGGCAGAACCAAAGTGCAGATAACTCAAAGAA---GAGAGAGGGC

BglI

D. ps AAAACG**GCCAT**GCAGCGAGGCTGAGAGCGAGACAACATGAGCGACAT-----GCTG-GCCAAACCATGATGGCTGGCGCGCCGATG**AGAGAGAG**CGGGACAGGACA
D. vir AAGTGGGACAGATAGTGCACAGAGAGAGT**GAGCG**TATGTGCGCTGCGAAGAGAGCGAAA-CT--GCGCACCC**TAATGGC**TGCGCA-TTAAGCCCTGACTGGTTTTG----
D. eug TATTGGTGGTCATGCATGTGTT---GGAGTGAG---ATGC-----AGCTAAAGCTGCGCGCACCAT**TAATGGC**TGCGC-GTAAAGAGAG--ATGGT--GGAAT
D. mel TATTCCAACTCTGACGTGCGTA--AGAGCGAG--ATAC-----AGATAGGACTACGCGCACCAT**TAATGGC**TGCGCGGTAAAGCGAG--AGCGAT**CGAGC**

D. ps GAGAGTGTGCTTGTGTTGCC CTCTCGCTCGCGC GCTGGCTGTTGCTGCTCA-----GCGCAGCCACGTGTTCTCTGACATTAAACAATT-----
D. vir CTGCCGCTGTTGCTGCTGCTGCTCTCTCTCGCTCTCGCAGGCGAAGCTCTCAACGATGAACCTGTGCCAGGCGCCAGTGT-CTCTCGCATTAAACAAGTAAATCGCCAGTT
D. eug GAGATAG-ATATCTCGCTCAG-TCTCTCTTCTCATT-----CTCAG-GAT-----GCCATGTGCTCTCTCGCATTAAAGACAAGTAAATCGCCCTGTT
D. mel GAGATGG-CTAAC-CGTA---TCTCTCTCTCTCTC-----

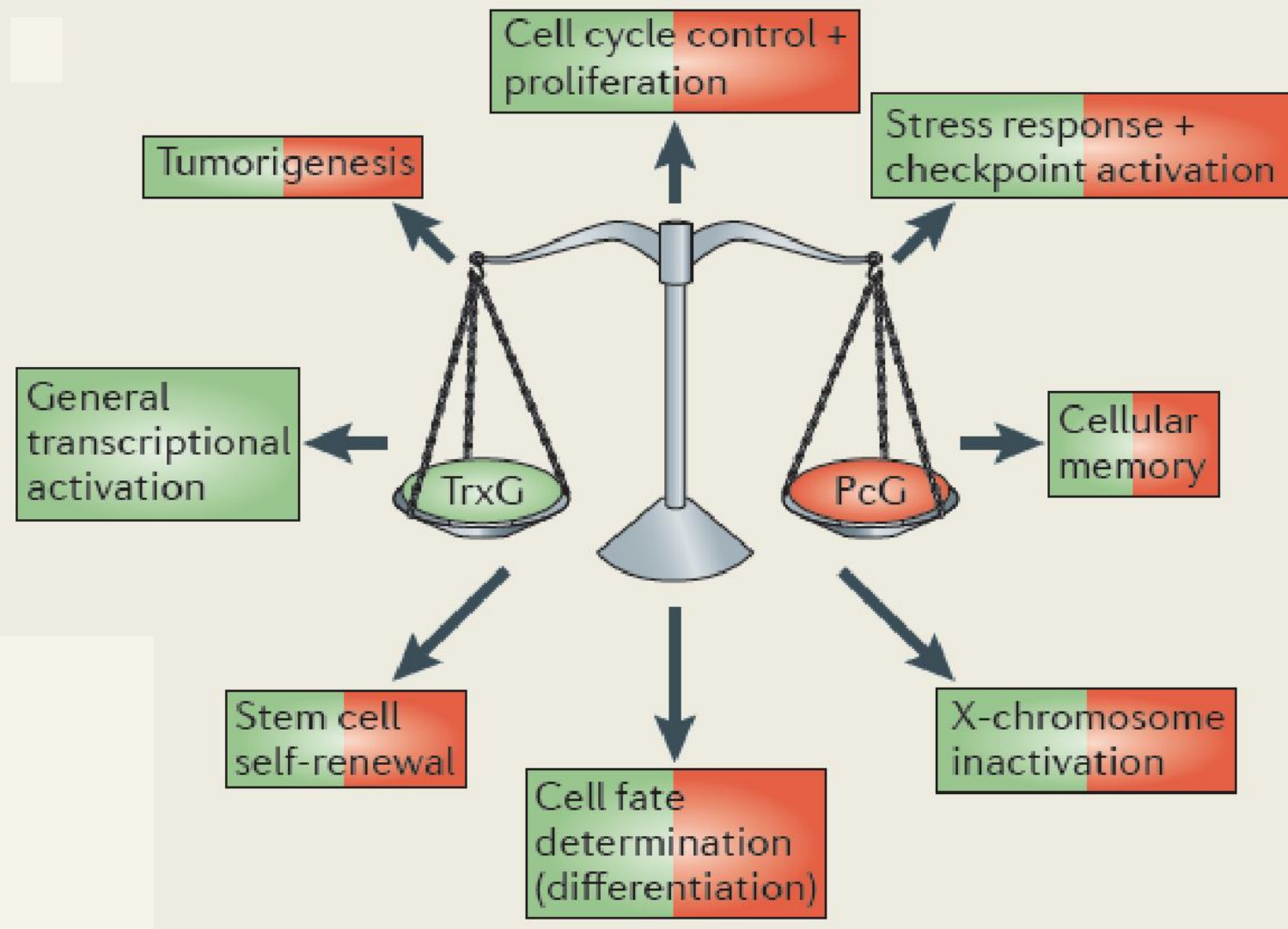
D. ps GAGCATAATCGATACACACTCGTGCACCGCCCTTCTGCTCTTTGCGATTCTATTCTCGTTGCTGAGAAATGGAATGGTTTTGT-CTCTTGGCTCTGCGCGC-CGCGCGCG
D. vir GAGCATAATCGATACACAGCTCGTTCTGATTCA-----TTGCTGAGAAATGCTTTTCTCACGCTCTTGGACTCTTGGCGAG-CGCGCGGAC
D. eug GAGCATAATCGATAAGCAGCTC-----TTGCTGAGAAATGGCTTTTCTCACGCTCTTGGCGG-TT--GCAG-----CGCA
D. mel -----CGCAGTGGCGGCGCA

D. ps -----CGTCC**CCATA**ACTGTGCTGCTTATGGCCATTTAAGTGGAGTGAATGTGGCTC--AATCGCGAGAAGAGAGCCCAAGTTTTAAGGCATT
D. vir GTCGCGCGGGAAGTGGCGTTGTTGTA**CCATA**ACTGTGCTGCTTTATGGCCGTTTAAAGTGGAGTGGCTCTCATAATCGTTTGTGAATGTTGC-----TCAAT
D. eug GTCGC-GGC-TCT--GCCG-CGTCGTC**CCATA**ACTGTGCTTCTGAATGGCCGTTTAAAGTGGAGTGGCTCTCATAATCGTTTGTGAATGTTGC-----TCAAT
D. mel GTCGC-TGCCTCT--GCAG-CTCCGTC**CCATA**ACTGTGCTTCTGAATGGCCGTTTAAAGTGGAGTGGCTCTCATAATCGTTTGTGAATGTTGTTGTTCTCAAT

PstI HinFI

GCCAT	PHO binding site	GAGAG	GAGA binding site	YGAGYG	ZESTE binding site		DNase I hypersensitive site
--------------	------------------	--------------	-------------------	---------------	--------------------	--	-----------------------------

Процессы, контролируемые PcG и TrxG



Белки групп **Polycomb** и **Trithorax**: эпигенетические регуляторы функционирования генома

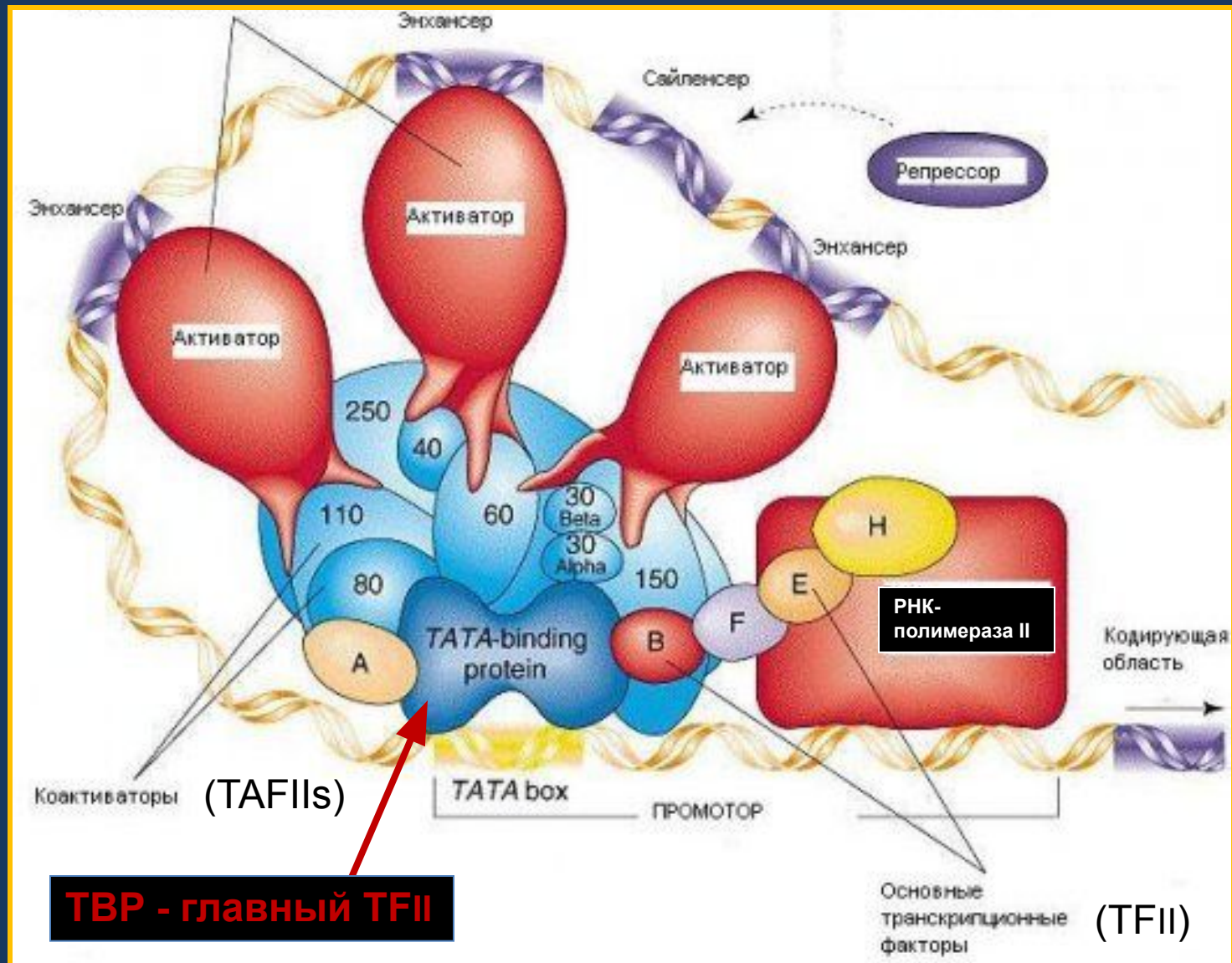
- Исходно открытые у *Drosophila* как регуляторы гомеозисных генов **НОХ**, отвечают за спецификацию плана формирования тела, а также регулируют многие гены, участвующие в **клеточной дифференцировке** и **пролиферации**.
- Поддерживают тканеспецифическое распределение экспрессии генов, передаваемое по наследству дочерним клеткам (**эпигенетическая регуляция**, «**клеточная память**»).
- Предполагаемый механизм функционирования: специфическое привлечение **хроматин-ремоделирующих** активностей к конкретным хромосомным участкам генов-мишеней («**гистоновый код**»); комбинация **цис-** и **транс-взаимодействий** между отдалёнными регуляторными хромосомными элементами («**модули клеточной памяти**»)
- **Эволюционно консервативные** механизмы
- У млекопитающих (и человека), эти белки поддерживают дифференцировку клеток, а также их функция необходима для **пролиферации** и **поддержания** разных типов стволовых клеток, включая **эмбриональные стволовые клетки**. Наконец, эти белки регулируют **X-инактивацию** у самок и **геномный импринтинг**.
- **Мутации**, нарушающие работу этих эпигенетических факторов (PcG и TrxG), ведут к серьезным патологиям, индуцируют многие типы **раковых заболеваний**

◎ **Что такое эпигенетическая регуляция?**

Как можно регулировать транскрипцию генов?

- На уровне базовой транскрипции (базовые (TFII) и специфические транскрипционные факторы)
- На уровне компактизации хроматина (факторы, ремодулирующие хроматин)

Схема преинициаторного транскрипционного комплекса (Регуляция на уровне транскрипции)



Регуляция на уровне компактизации хроматина

- Белки групп **PcG** и **TrxG** участвуют в «ремоделировании» хроматина, изменяя доступность ДНК для других факторов, требующихся для транскрипции данного гена.
- Гены группы **PcG** участвуют в репрессии генов, через формирование «закрытого» хроматина, гены группы **TrxG** противодействуют этой репрессии и участвуют в поддержании активной транскрипции гена, обеспечивая формирование «открытого» локального хроматина.

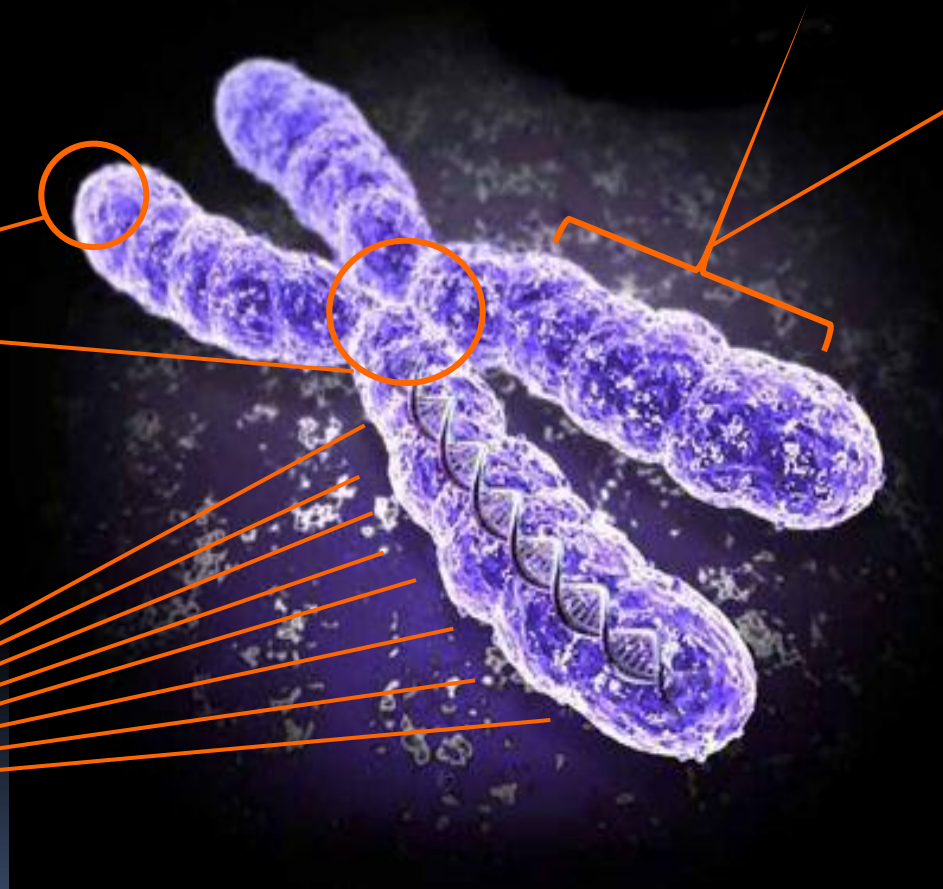
Где на хромосомах находится «закрытый» и «открытый» хроматин?

«Закрытый»
конденсированный
хроматин

Конститутивный
гетерохроматин

Теломеры
Центромеры

Конденсированный
хроматин
выявляется также в
районах многих
молчащих генов,
находящихся на
хромосомных
плечах



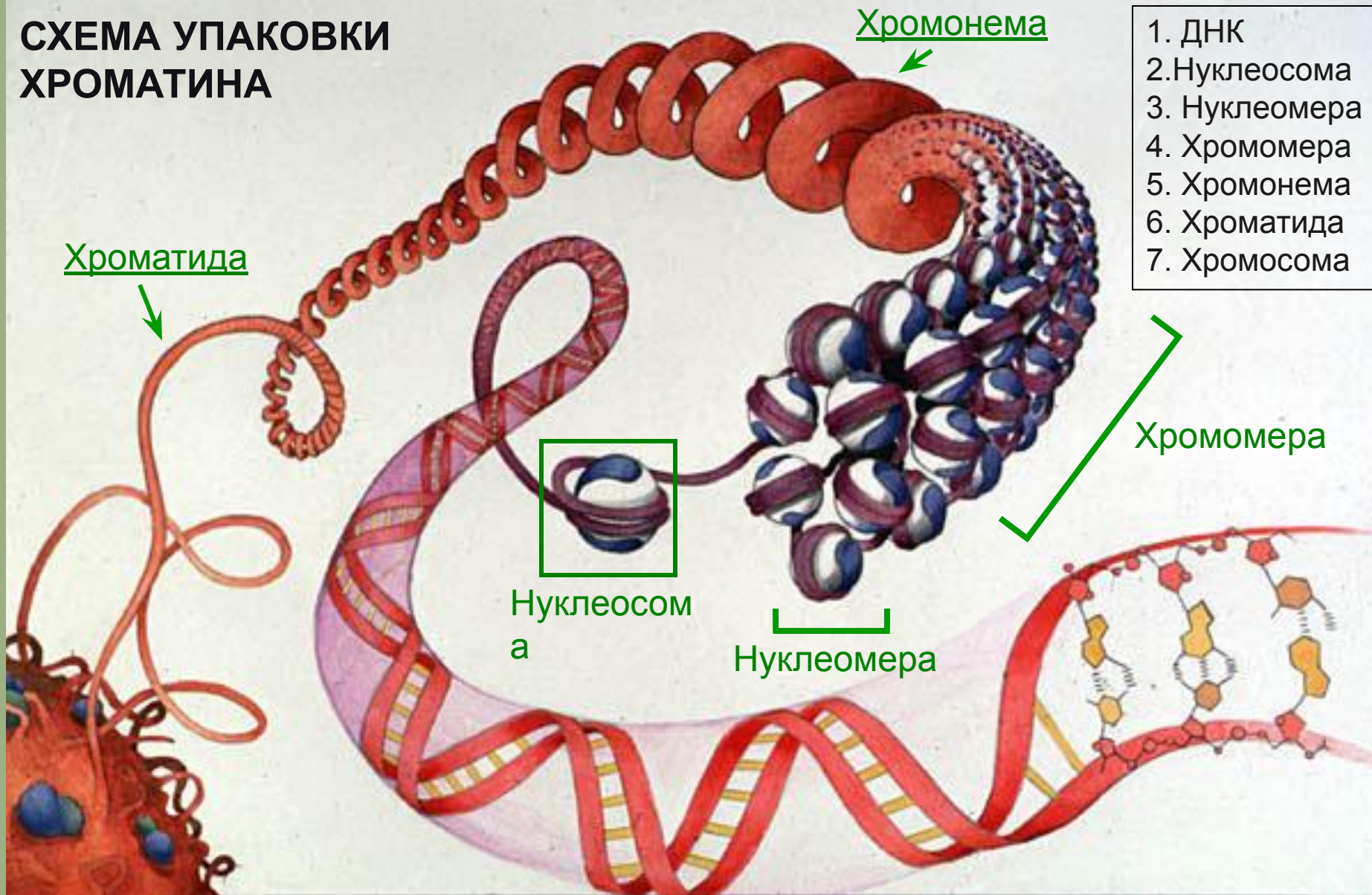
«Открытый»
хроматин

Типичен для
локусов
активных генов
вдоль
хромосомных
плечей



Гены групп *PcG* и *trxG* – важнейшие регуляторы структуры хроматина вдоль хромосомных плечей

СХЕМА УПАКОВКИ ХРОМАТИНА

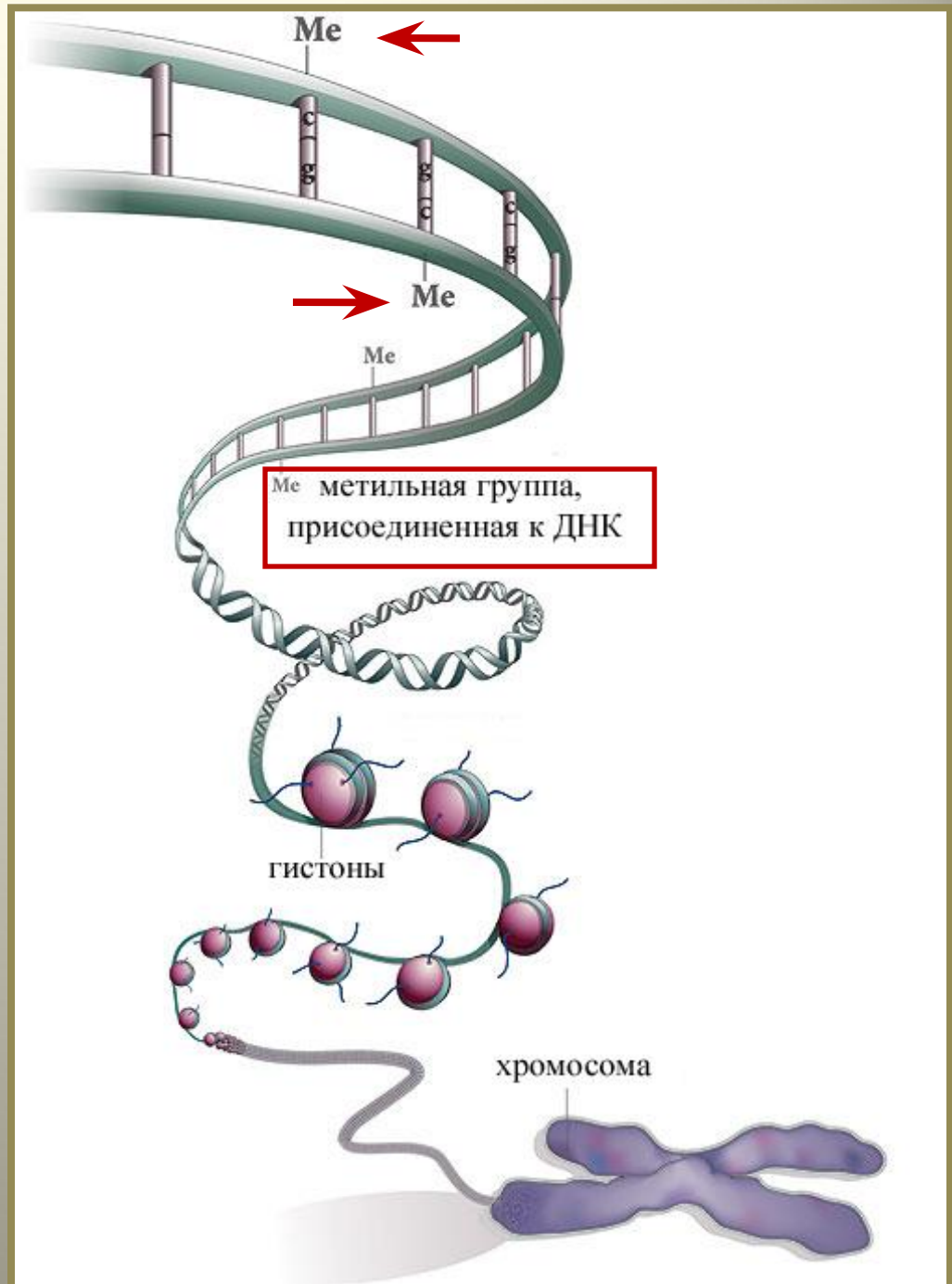


Хроматин является не просто пассивным «упаковщиком» ДНК, но и носителем эпигенетической информации.

**Механизмы,
кодирующие эпигенетическую
информацию:**

- 1. Метилирование ДНК**
- 2. Динамичные преобразования белков хроматина (гистонов)**

Метилирование ДНК и связанные с ним процессы



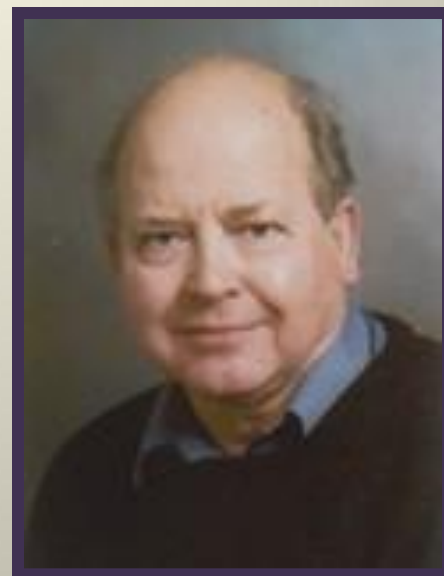
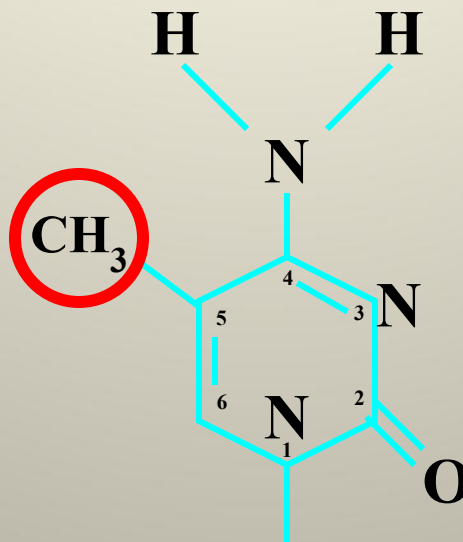
Молекулярные основы эпигенетики

Метилирование ДНК



Б.Ф. Ванюшин

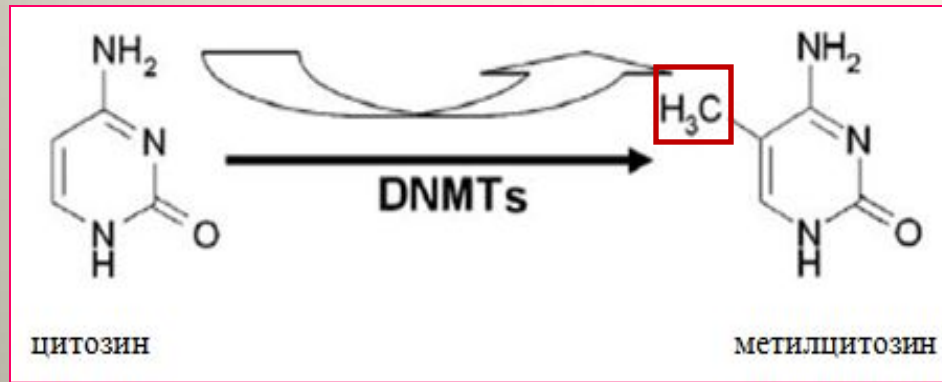
Впервые определил природу метилируемых последовательностей ДНК у разных видов организмов (1959 г.)



Robin Holliday

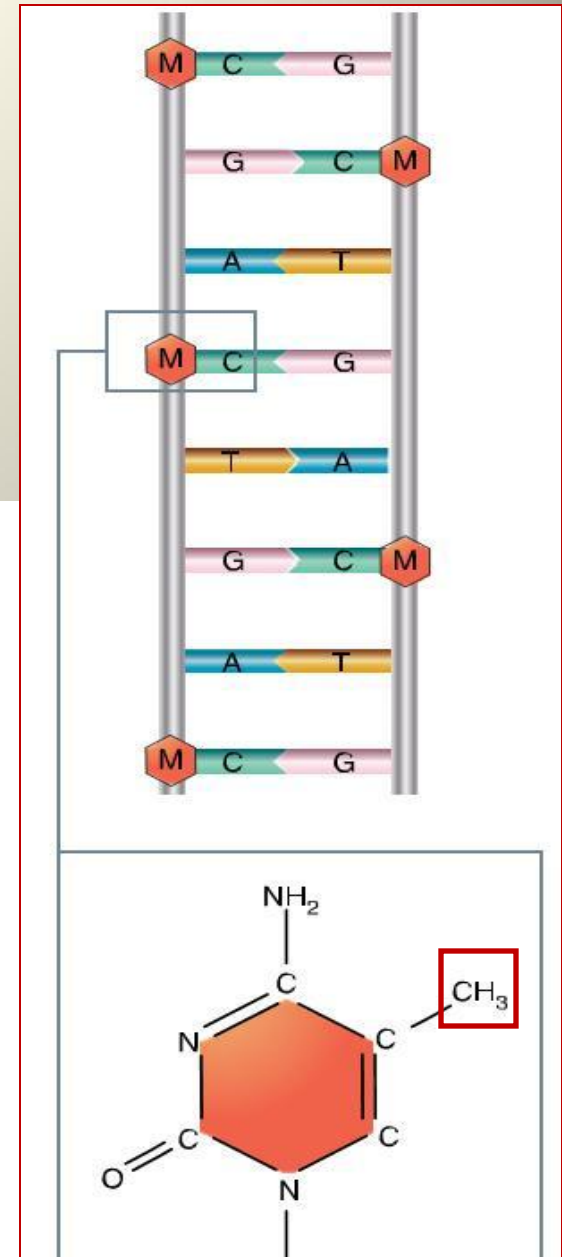
Обосновал роль метилирования ДНК в регуляции работы гена. Предложил термин «эпимутация» (1987 г.)

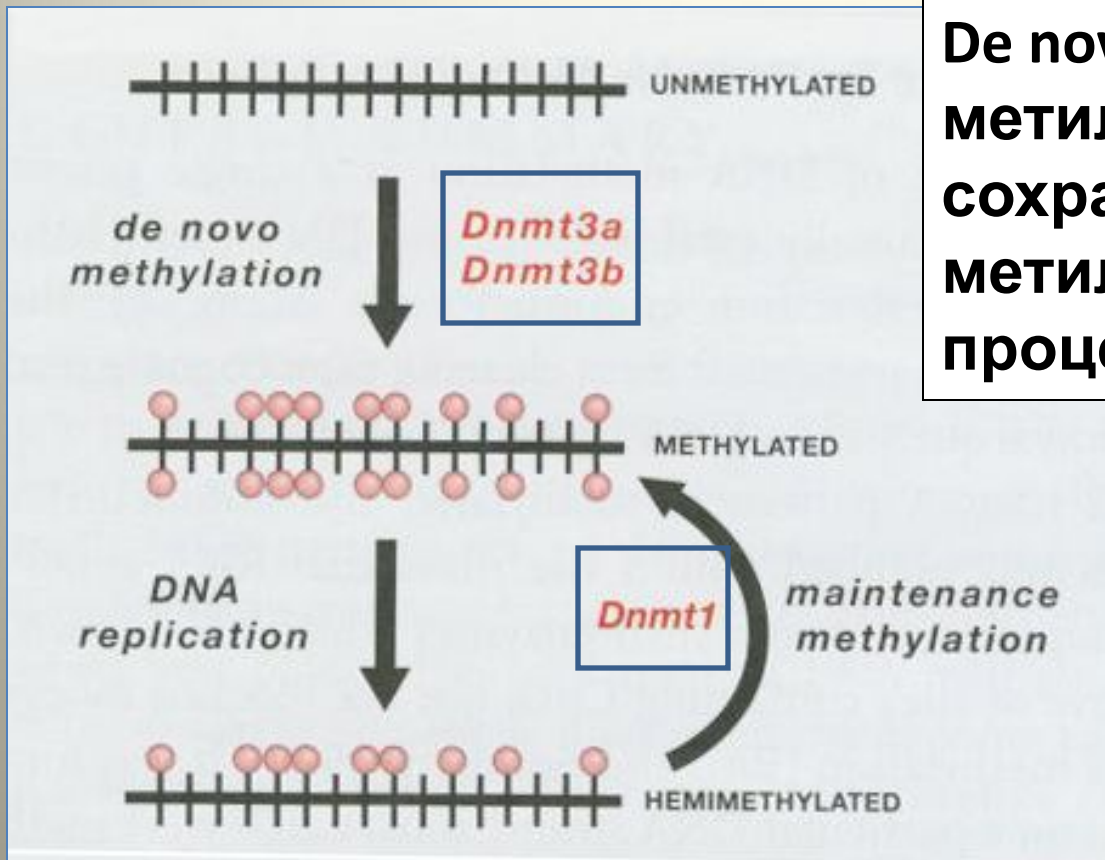
Метилирование ДНК



Метилированию в норме подвергается **от 2 до 7%** всех цитозиновых остатков ДНК клетки. При этом **в 70% случаев метилируется цитозин в составе динуклеотидов C-G (CpG)**. CpG-участки, как правило, представляют собой фрагменты ДНК длиной более чем 500 п.н. и базируются в промоторных зонах у более чем **40%** генов млекопитающих.

ДНК-метилтрансферазы (DNMTs) условно делят на **две группы** – метилирующие ДНК de novo, то есть в тех участках, где ранее не было метилцитозина (**DNMT3A** и **DNMT3B**), и «поддерживающие» метилирование в дочерней цепи ДНК, образующейся в процессе репликации (**DNMT1**), сохраняя, таким образом, структуру, присущую материнской цепи.





De novo метилирование ДНК и сохранение характера метилирования ДНК в процессе репликации

Высокометилированные последовательности:

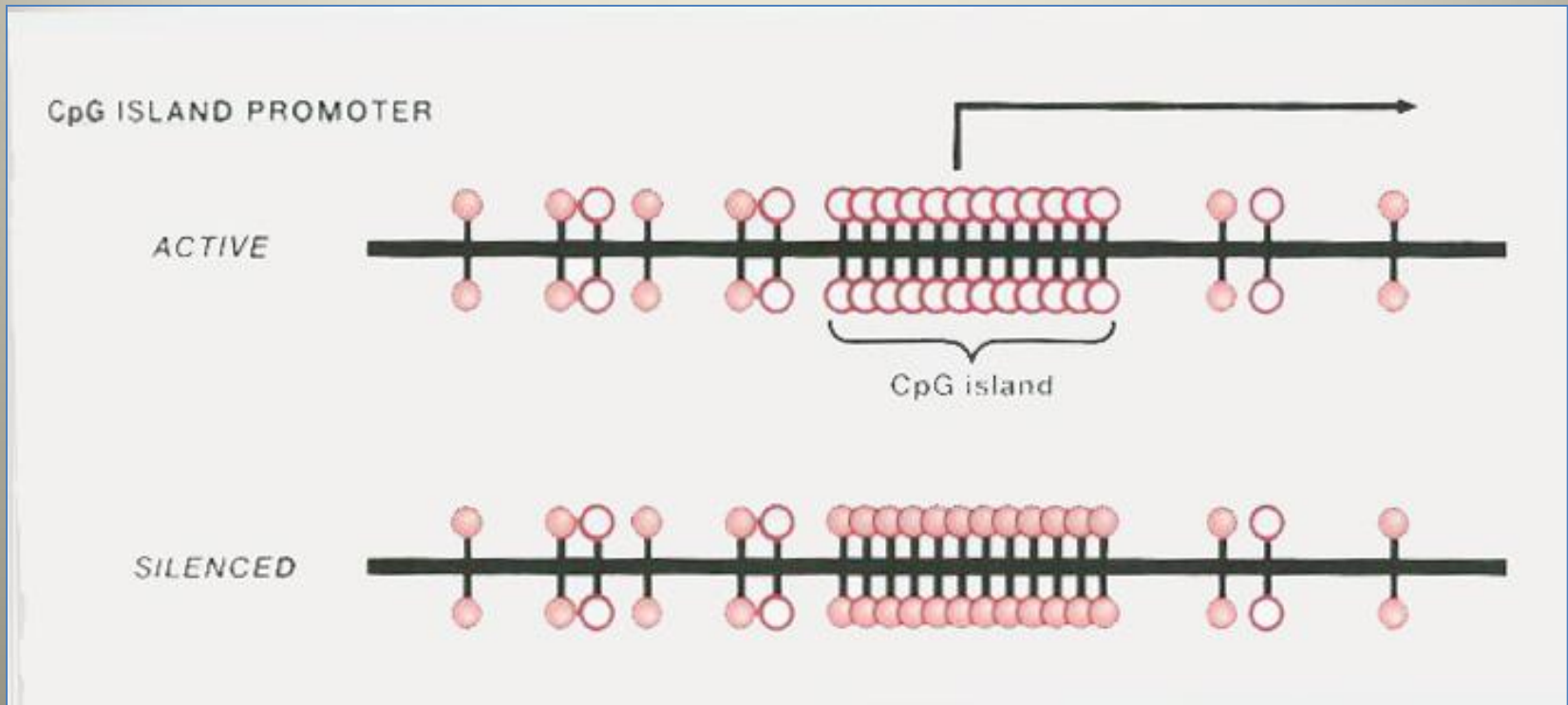
- Сателлитная ДНК
- Повторяющиеся элементы (в т.ч. транспозоны)

Механизмы инактивации гена в результате метилирования промоторной области

1. Метильные группы нарушают ДНК-белковые взаимодействия, выступая в большую бороздку ДНК и препятствуя связыванию специфических транскрипционных факторов.
2. Метилированные районы ДНК специфически связывают транскрипционные репрессоры.
3. Метилирование ДНК влияет на структуру хроматина.

CpG – островки

- неметилированные участки длиной 1 kb
- в 5`-концах 60% промоторов активных генов

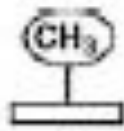


Что защищает их от метилирования?

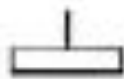
- они защищены белками
- постоянная работа деметилаз
- нетипичный состав оснований

Репрессия транскрипции посредством метилирования ДНК

активная транскрипция

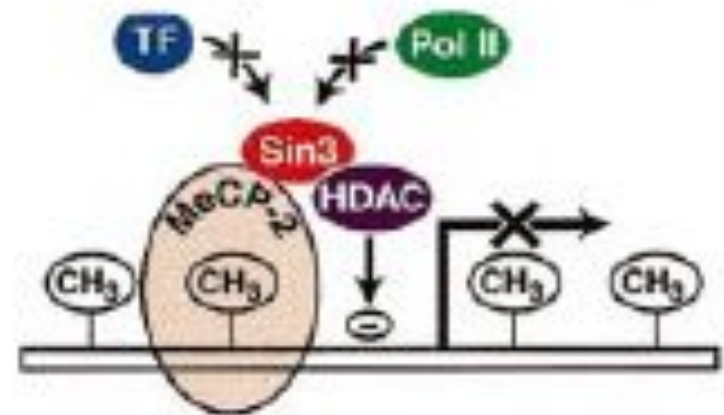


метилированный CpG



неметилированный CpG

репрессия транскрипции



**Варианты
эпигенетической
регуляции с
участием
метилирования ДНК**

- **Геномный импринтинг** — эпигенетический процесс, при котором экспрессия определенных генов осуществляется в зависимости от того, от какого родителя поступил аллель гена.
- Открыт в 80-х годах XX века
Это процесс, который **не подчиняется наследованию по Менделю**.

Например:

Цвет глаз: карий передаётся потомкам независимо, и от отца и от матери – доминантный признак.



- Если бы этот ген был импринтный, то он бы **не проявлялся**, если бы передавался, например, от матери, а проявлялся, только, если приходил от отца.

Как был открыт импринтинг?

Примеры импринтинга



Лошак -помесь [жеребца](#) и [ослицы](#). Лошаков выводят в странах [Средиземноморья](#) и в [Азии](#). Однако, так как они уступают мулам по работоспособности и выносливости, встречаются гораздо реже, чем мулы. Самцы лошака всегда бесплодны, самки в большинстве случаев.

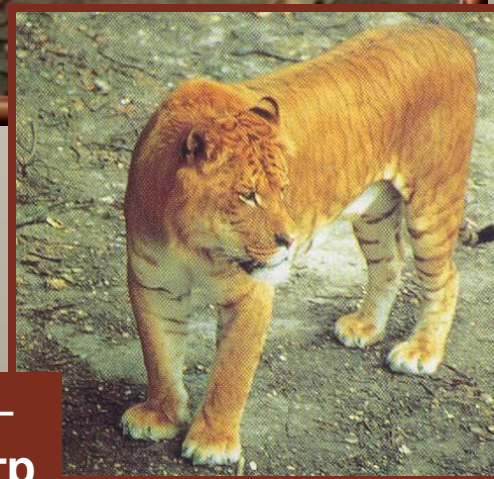


- Мул результат скрещивания [осла](#) и [кобылы](#). Отличаются большей, чем лошаки, долговечностью (живут до 40 лет), меньшей восприимчивостью к заболеваниям, нетребовательностью к корму и уходу. Муловодство развито в странах [Азии](#), [Африки](#), юга [Европы](#), [Северной](#) и [Южной Америки](#).

Примеры импринтинга



Лигр –
папа лев,
мама тигрица



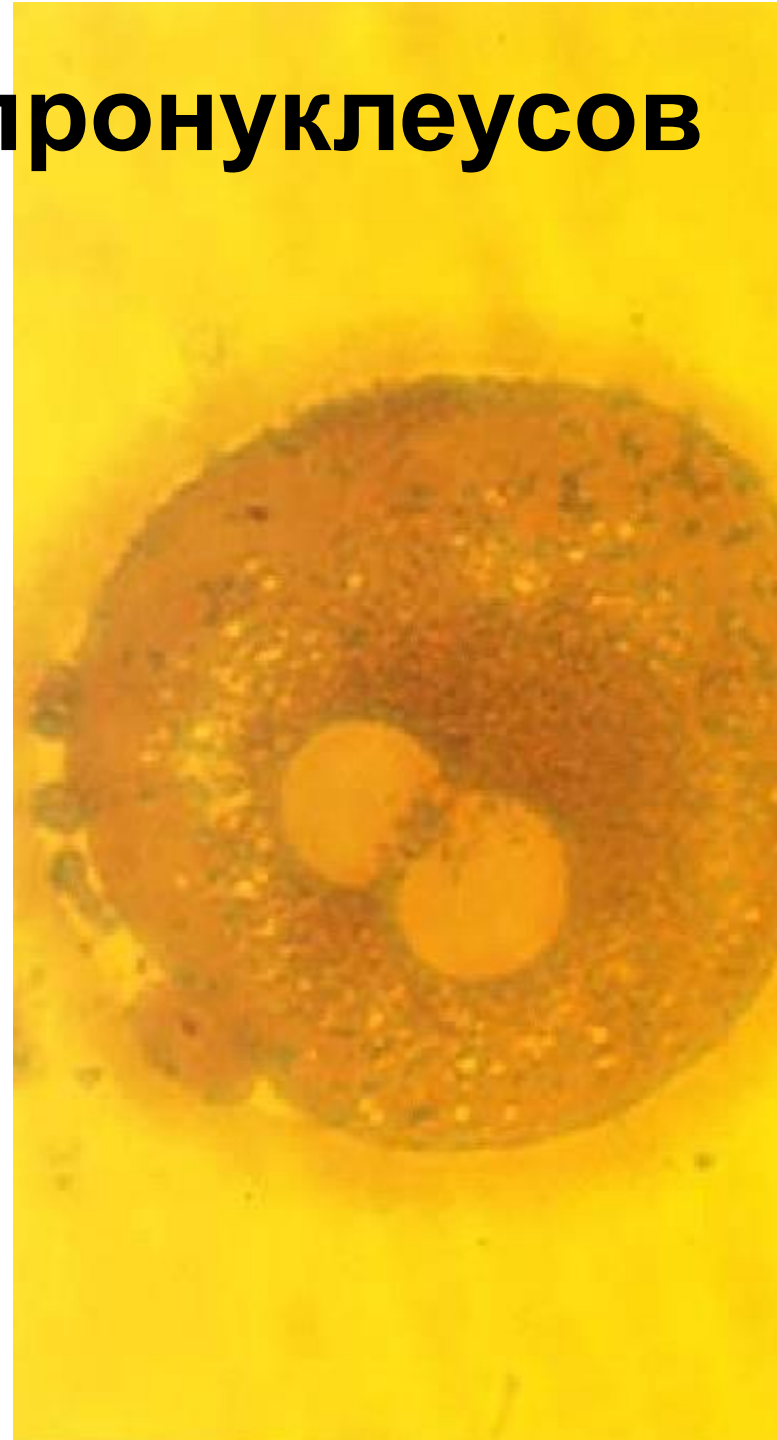
Тигрон –
папа тигр
мама лев

Неравнозначность пронуклеусов

Мужской и женский пронуклеусы можно считать генетически эквивалентными, однако результаты проведённых исследований свидетельствуют о том, что между этими пронуклеусами имеются

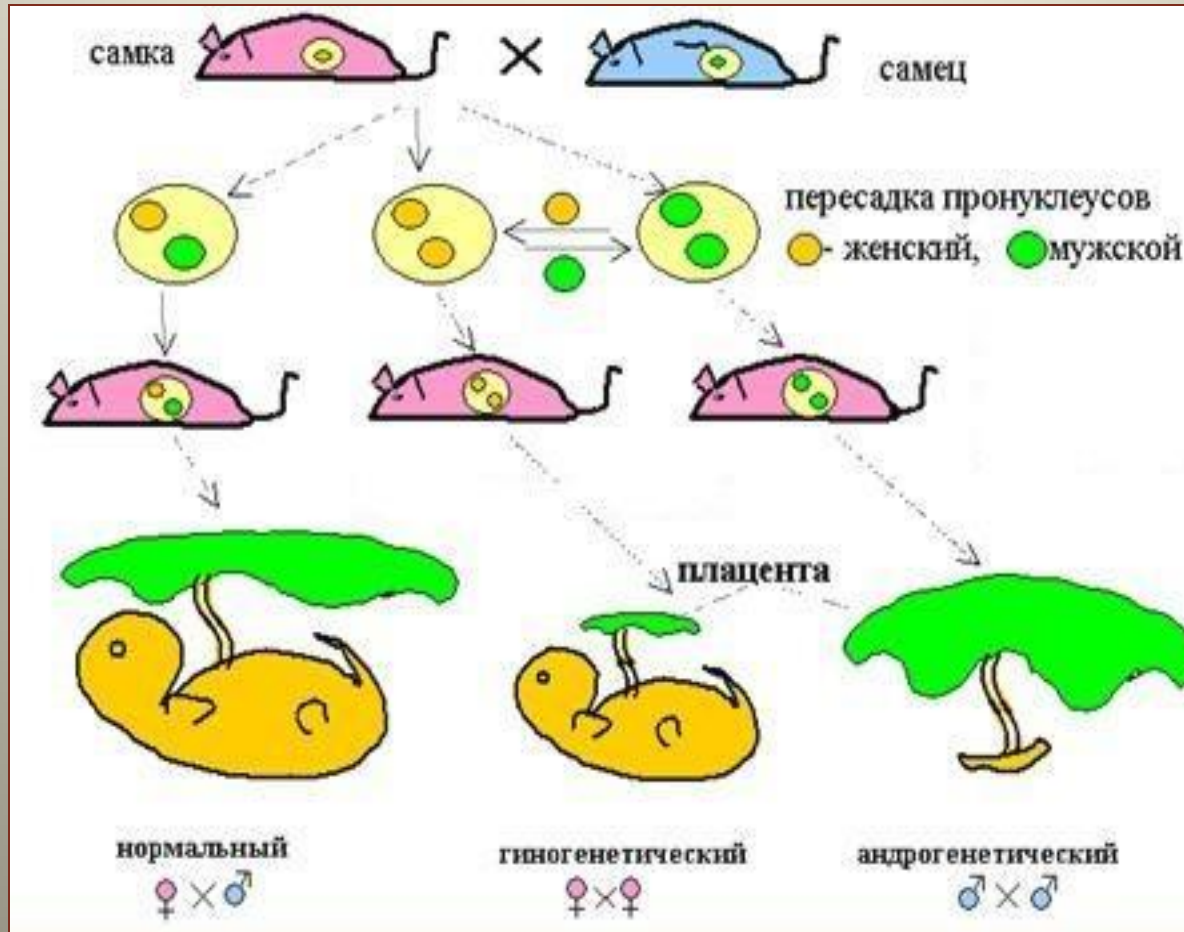
функциональные различия
McGrath J., Solter D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell 37: 179—183 **Филадельфия**

Barton S. C., Surami M. A. H., Norris M. L. 1984. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. Nature 311: 374—376 **Кэмбридж**



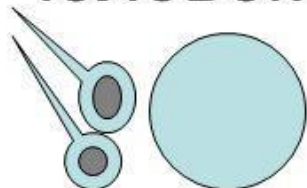
Эксперименты по трансплантации пронуклеусов у мышей

(или почему невозможен партеногенез у млекопитающих)



Примеры геномного импринтинга

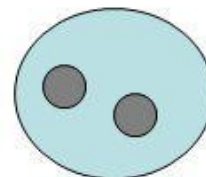
- У человека аналогично:



Если 2 сперматозоида оплодотворят яйцеклетку без ядра



Истинный пузырьный занос



Если же начнет развиваться диплоидная яйцеклетка



Эмбриональная тератома без плаценты

Зачем нужны такие гены???

Импринтинг генов в составе генома показан **только для млекопитающих** кроме яйцекладущих.

Импринтинг – редкий процесс – **только 1%** генов подвержено импринтингу (около 140 генов)

- **50%** импринтных генов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постnatalного роста: **отцовские** импринтных генов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постnatalного роста: отцовские **гены** импринтных генов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постnatalного роста: отцовские гены отвечают за образование **плаценты**, импринтных генов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постnatalного роста: отцовские гены отвечают за образование плаценты, а **материнские** импринтных генов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постnatalного роста: отцовские гены отвечают за образование плаценты, а материнские — за дифференцировку клеток **эмбриона** при **формировании тканей и органов** **Зачем нужны такие эволюционно невыгодные гены???**
- **20%** - нейрологические процессы

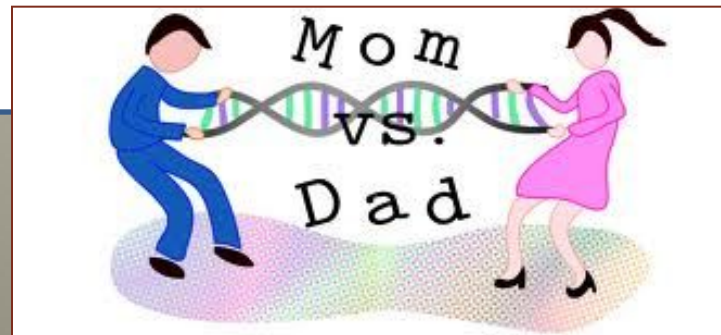
Гипотеза «конфликта интересов родителей»

(Moore and Haig, 1991)

Оба родителя стремятся **увеличить шансы на эволюционный успех своих генов** за счет ресурсов **только одного** из родителей – матери.

Отцовские гены **улучшают развитие плаценты** для лучшего питания эмбриона за счет ресурсов матери. Подавляются те гены, которые ответственны за требование еды потомками.

Материнские гены **ухудшают питание плода через плаценту**, стремясь сэкономить ресурсы, чтобы иметь возможность выносить и других потомков (возможно от другого отца).





Портрет

Евгении Мартинес

Валеджо 1680. Музей Прадо,
Мадрид.

Считается, что девочка
страдала синдромом
Прадера-Вилли.

На картине ей 6 лет
при весе 54 кг.

делеция неметилованных (активных)
генов на **отцовской хромосоме15**. Эти
же гены на материнской хромосоме
метилованы и неактивны.

Общая схема структуры кластера импринтированных генов

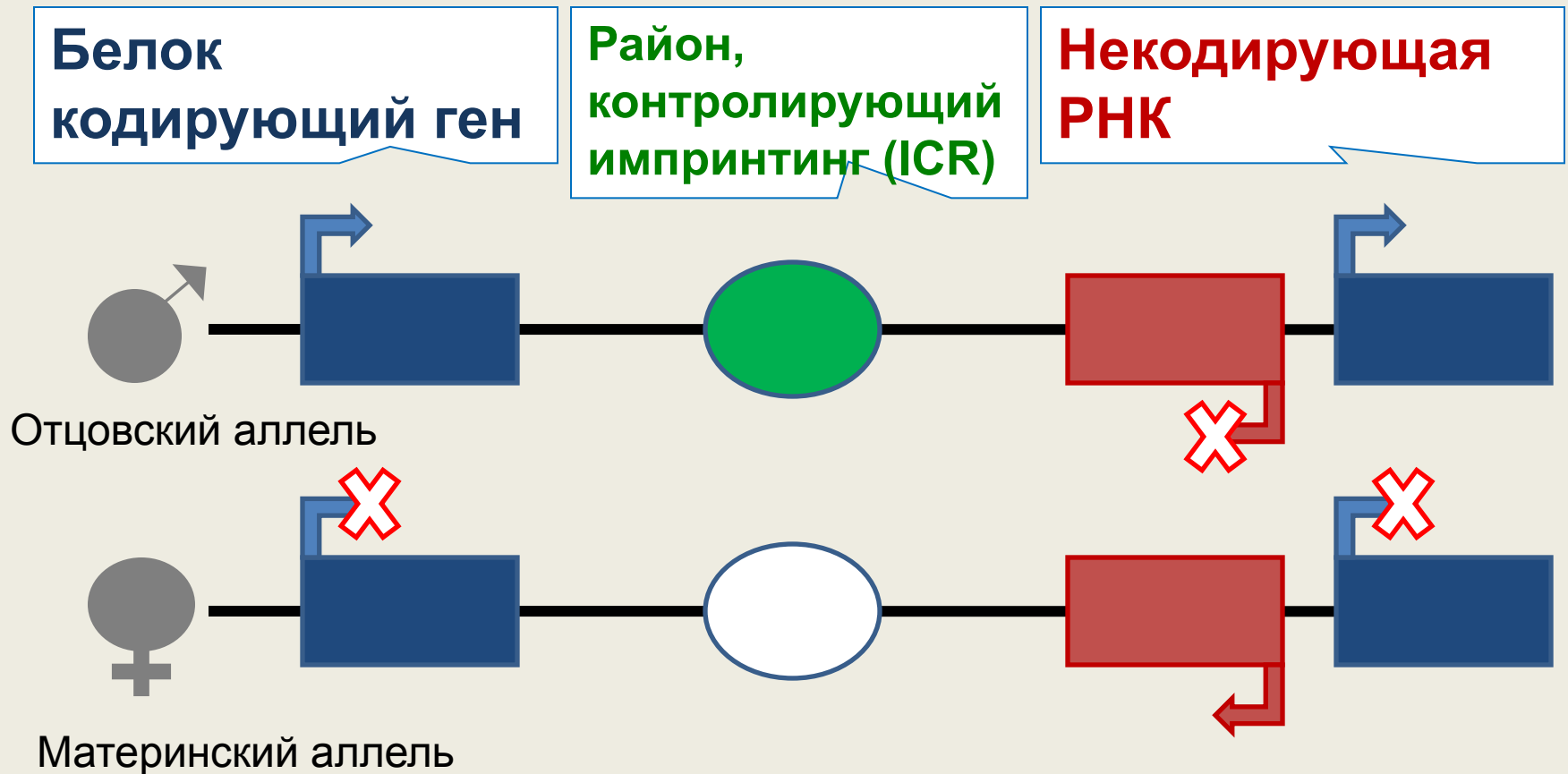
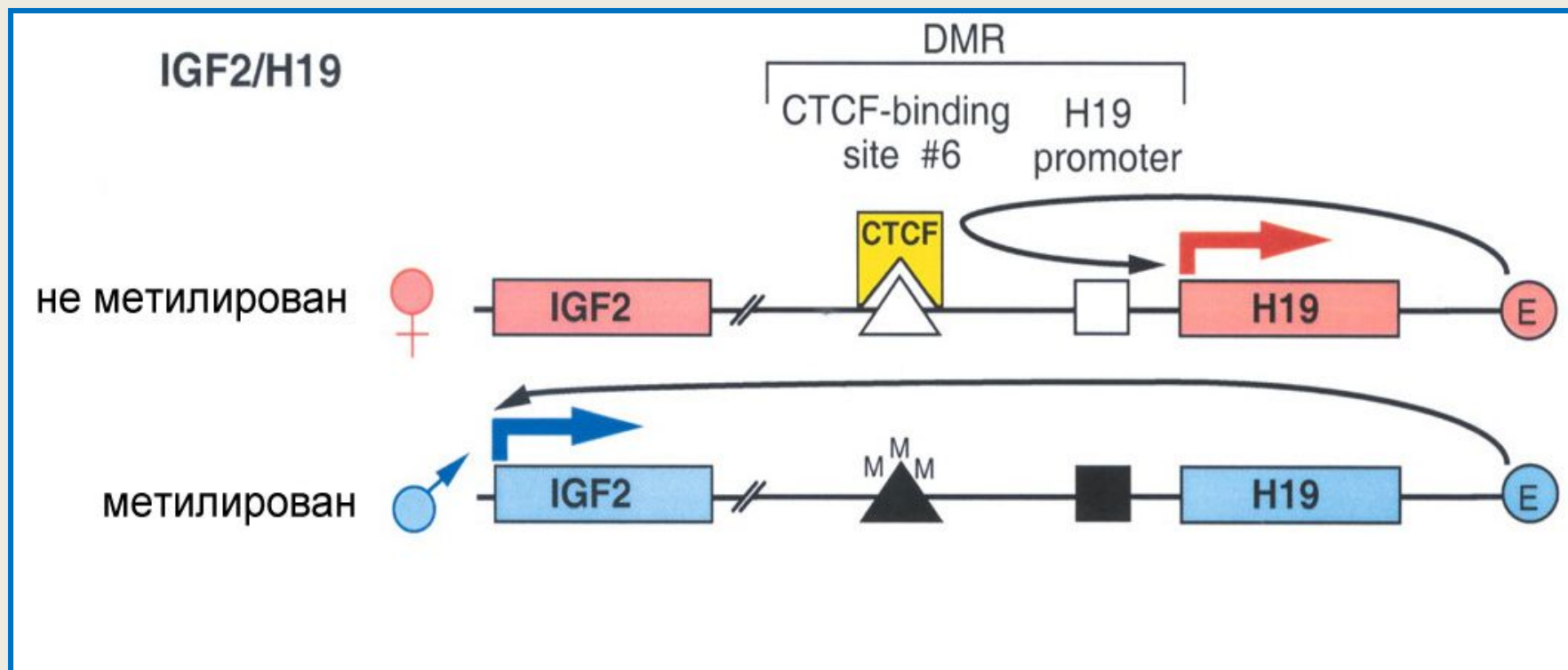
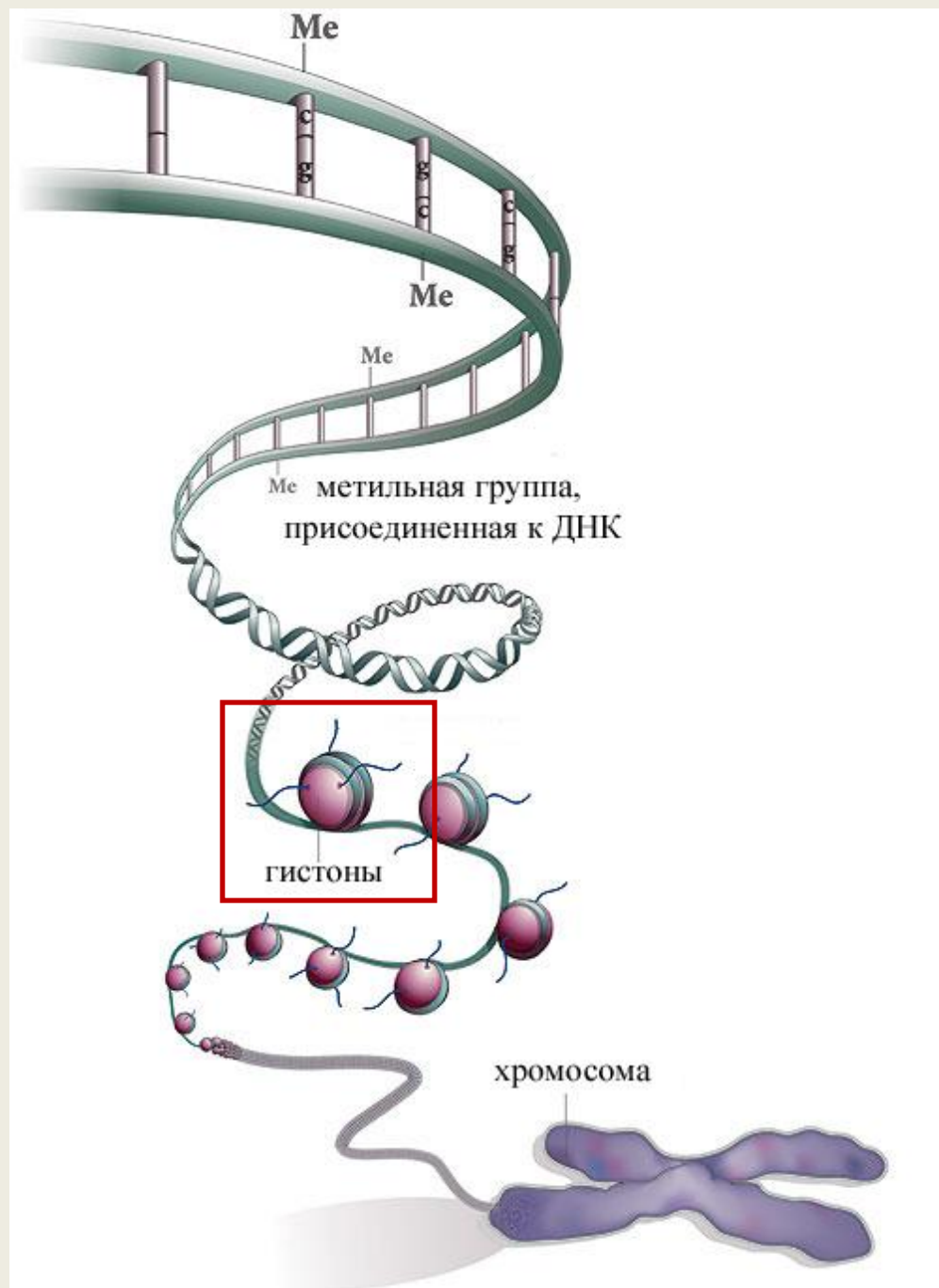


Схема работы импринтированного локуса инсулиноподобного фактора роста 2 *Igf2/H19*

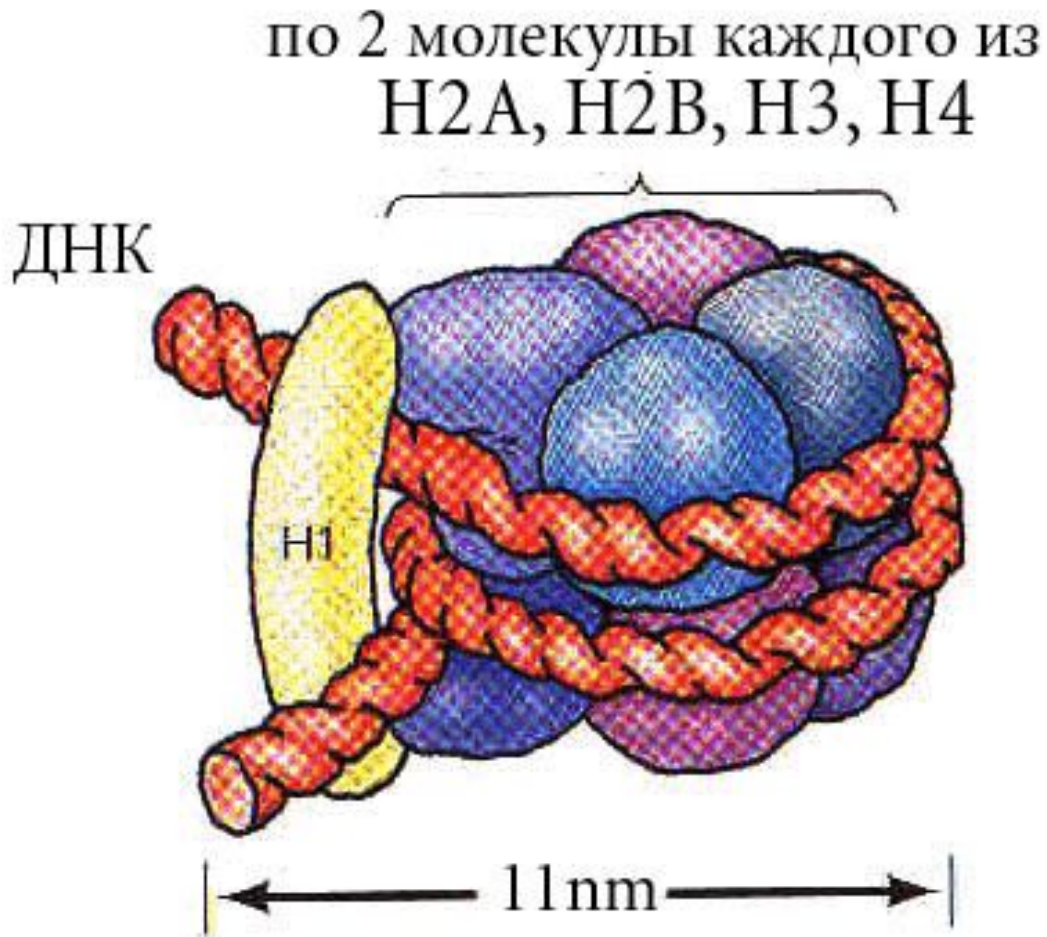
Дифференциально
метилированный район



**Посттрансляционные
модификации
ГИСТОНОВ
«ГИСТОНОВЫЙ КОД»**

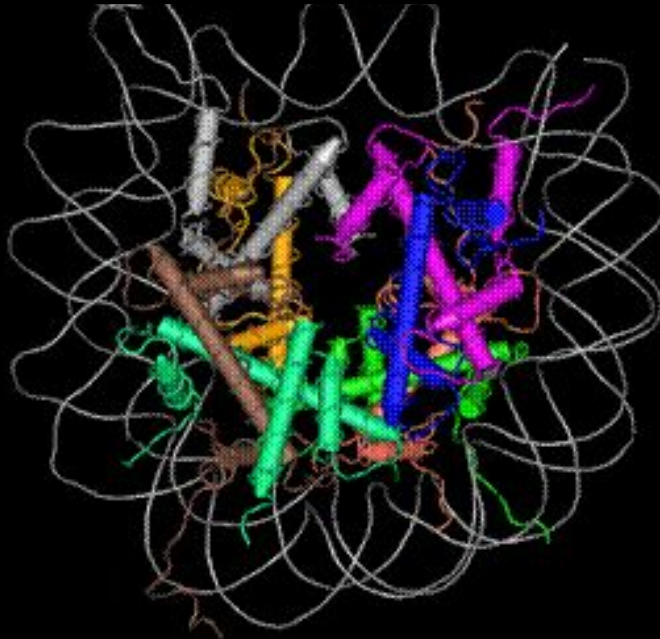


Структура нуклеосомы



- Ядро нуклеосомы состоит из гистонов четырех типов (по два каждого) H2A, H2B, H3 и H4. Гистон H1 участвует во взаимодействии нуклеосом между собой и нужен для их укладки в компактную структуру более высокого порядка – 30-нм нить.
- Гистоны представляют собой небольшие основные (щелочные) белки, высоко консервативные у всех эукариот.
- В состав хроматина входят также негистоновые структурные белки – HMG, компоненты кинетохора, белки ядерной оболочки, топоизомераза II, и многие другие.

Нуклеосомы - рентгеноструктурный анализ в двух проекциях



Коровые гистоны:

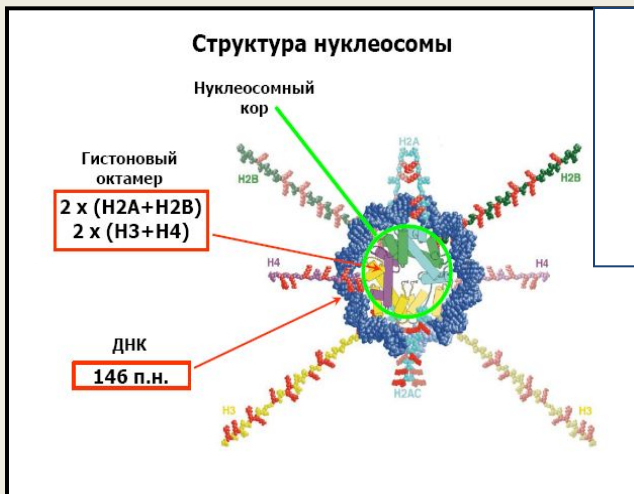
H2A	H2B
-----	-----

H3	H4
----	----

H2A	H2B
-----	-----

H3	H4
----	----

K. Luger, *et al.*, "Crystal Structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution,"
Nature, **389**, 251-260 (1997).



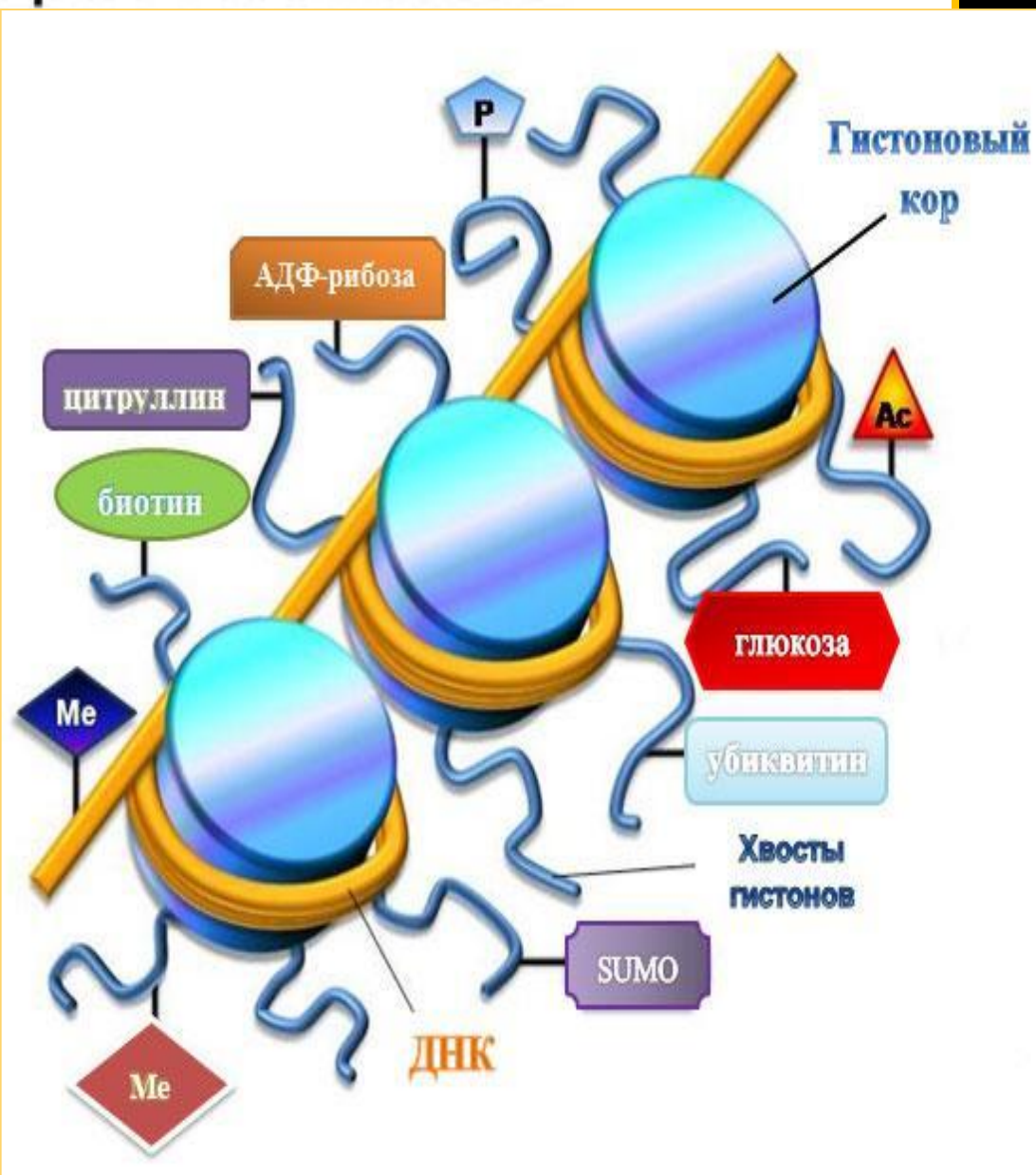
N-концы ГИСТОНОВ выступают за пределы ядра нуклеосомы и могут взаимодействовать с другими белками хроматина



Молекула каждого гистона состоит из структурированного **центрального домена** (альфа-спиральные участки, соединенные петельным сегментами) и неструктурированного **N-терминального «хвоста»**.

Модификации гистонов

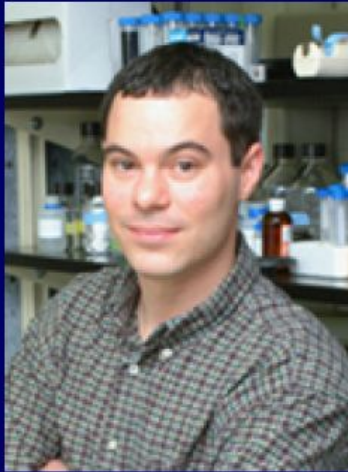
Аминокислота	Модификация
Лизин (K)	Метилирование (Me) Ацетилирование (Ac) Убиквитинирование (Ub) Сумоимирование (Su) Рибозилирование (Rib)
Аргинин (R)	Метилирование (Me)
Серин (S) Треонин (T) Цистеин (C)	Фосфорилирование (P)



**«Гистоновый код» –
совокупность ковалентных
модификаций гистонов**

Теория "гистонового кода"

Brian Strahl
(США)



Charles Allis
(США)



Thomas Jenuwein
(Австрия)



Nature, 2000

The language of covalent histone modifications

Brian D. Strahl & C. David Allis

Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Virginia Health Science Center, Charlottesville, Virginia 22908, USA

Histone proteins and the nucleosomes they form with DNA are the fundamental building blocks of eukaryotic chromatin. A diverse array of post-translational modifications that often occur on tail domains of these proteins has been well documented. Although the function of these highly conserved modifications has remained elusive, converging biochemical and genetic evidence suggests functions in several chromatin-based processes. We propose that distinct histone modifications, on one or more tails, act sequentially or in combination to form a 'histone code' that is, read by other proteins to bring about distinct downstream events.

How eukaryotic genomes are manipulated within a chromatin environment is a fundamental issue in biology. At the heart of chromatin structure are highly conserved histone proteins (H3, H4, H2A, H2B and H1) that function as building blocks to package eukaryotic DNA into repeating nucleosomal units that are folded into higher-order chromatin fibres^{1,2} (Fig. 1). Once thought of as static, non-participating structural elements, it is now clear that histones are integral and dynamic components of the machinery responsible for regulating gene transcription. The same is probably

Transcription-linked acetylation, catalysed by the GCN5 family of HATs, shows a preference for lysine 14 of H3 *in vitro*^{3,4} although an expanded set of lysine residues is likely to be used *in vivo*^{5,6}. How is this acetylation site specificity in H3 brought about?

Solution and crystal structure data of various members of the GCN5 HAT family, including co-crystals of the enzyme with H3 tail peptides^{7,8}, have begun to yield important insights into the enzymatic mechanisms underlying the site specificity of these HATs⁹⁻¹¹. One important concept to emerge from these studies is that residues

Science, 2001

Translating the Histone Code

Thomas Jenuwein¹ and C. David Allis²

Chromatin, the physiological template of all eukaryotic genetic information is subject to a diverse array of posttranslational modifications that largely impinge on histone amino termini, thereby regulating access to the underlying DNA. Distinct histone amino-terminal modifications can generate synergistic or antagonistic interaction affinities for chromatin-associated proteins, which in turn dictate dynamic transitions between transcriptionally active or transcriptionally silent chromatin states. The combinatorial nature of histone amino-terminal modifications thus reveals a "histone code" that considerably extends the information potential of the genetic code. We propose that this epigenetic marking system represents a fundamental regulatory mechanism that has an impact on most, if not all, chromatin-templated processes, with far-reaching consequences for cell fate decisions and both normal and pathological development.

Genomic DNA is the ultimate template of our heredity. Yet despite the justifiable excitement over the human genome, many challenges remain in understanding the regulation and transduction of genetic information (1). It is unclear, for example, why the number of protein-coding genes in humans is estimated at ~35,000

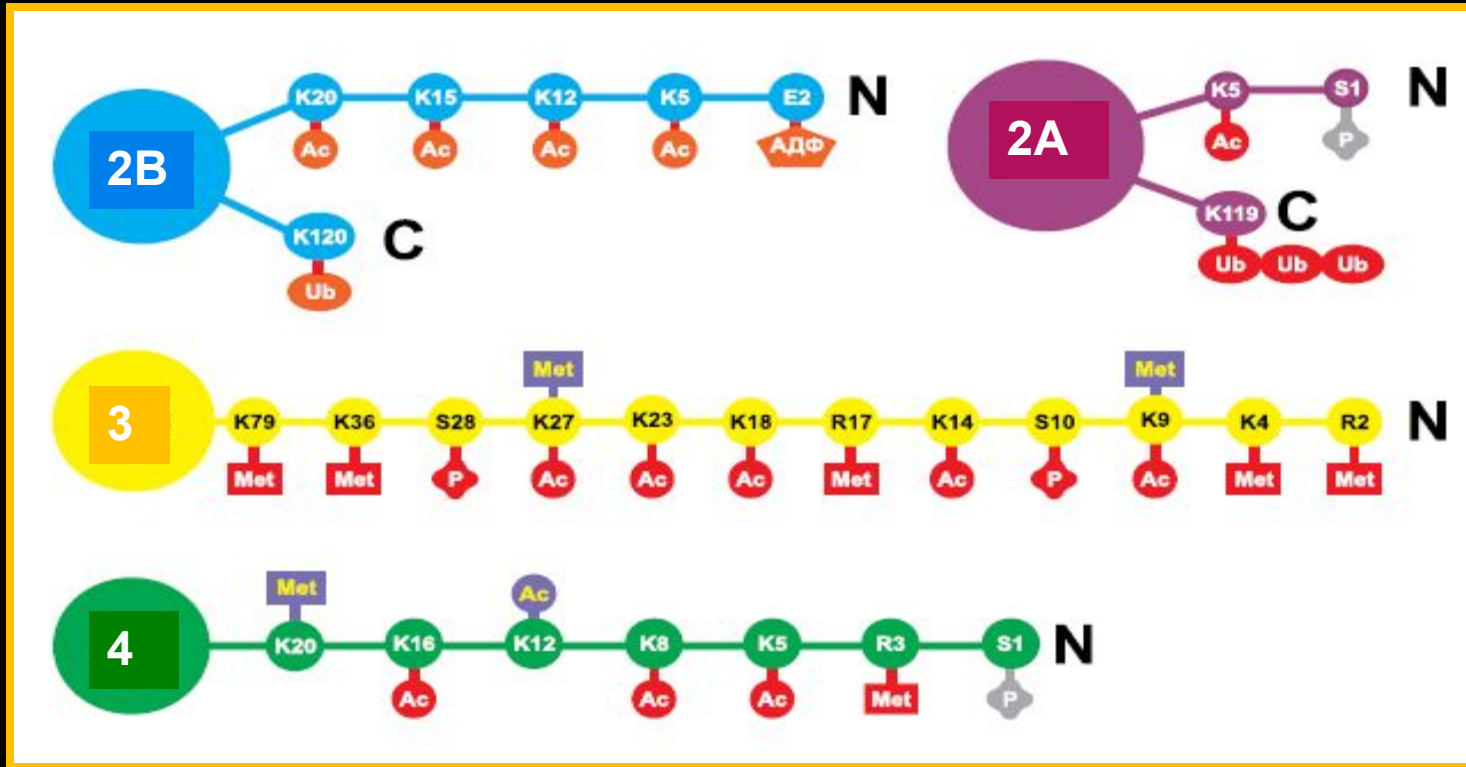
and how such a code is "read" and translated into biological functions.

Throughout this review, we have chosen epigenetic phenomena and underlying mechanisms in two general categories: chromatin-based events leading to either gene activation or gene silencing. In particular, we consider the

transcriptionally inert are highly condensed in the interphase nucleus and remain cytologically visible as heterochromatic foci or as the "Barr body," which is the inactive X chromosome in female mammalian cells (2). The distinct levels of chromatin organization are dependent on the dynamic higher order structuring of nucleosomes, which represent the basic repeating unit of chromatin. In each nucleosome, roughly two superhelical turns of DNA wrap around an octamer of core histone proteins formed by four histone partners: an H3-H4 tetramer and two H2A-H2B dimers (3). Histones are small basic proteins consisting of a globular domain and a more flexible and charged NH₂-terminus (histone "tail") that protrudes from the nucleosome. It remains unclear how nucleosomal arrays containing linker histone (H1) then twist and fold this chromatin fiber into increasingly more compacted filaments leading to 30 nm diameter

REVIEW

Варианты модификаций гистонов и статус клетки



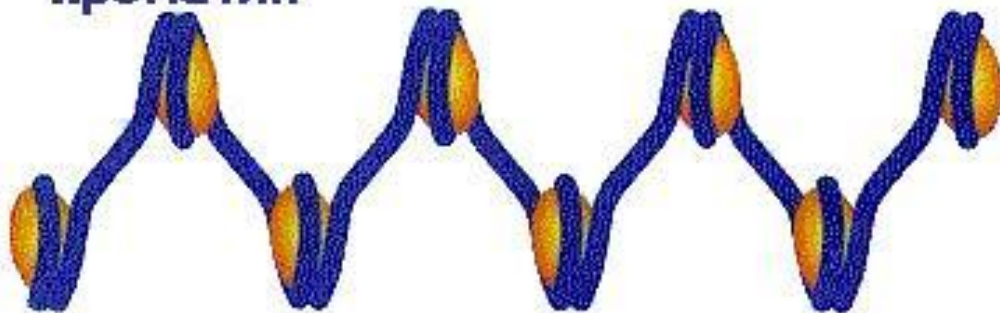
Фиолетовый - модификации, характерные для репрессированного хроматина,

красный – для **активного** хроматина.

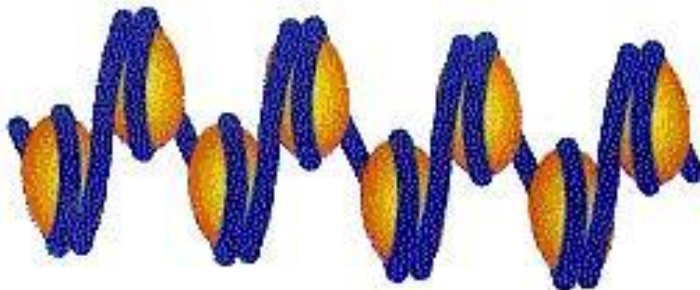
Серый - модификации, связанные с конденсацией хромосом при митозе либо гаметогенезе.

Ацетилирование / деацетилирование гистонов и ремоделирование

Деконденсированный хроматин



Конденсированный хроматин



Ацетилирование связано с

активацией транскрипции

• белки, осуществляющие ацетилирование - **ГИСТОНОВЫЕ ацетилтрансферазы (HAT)**; донор ацетильной группы – ацетил коА

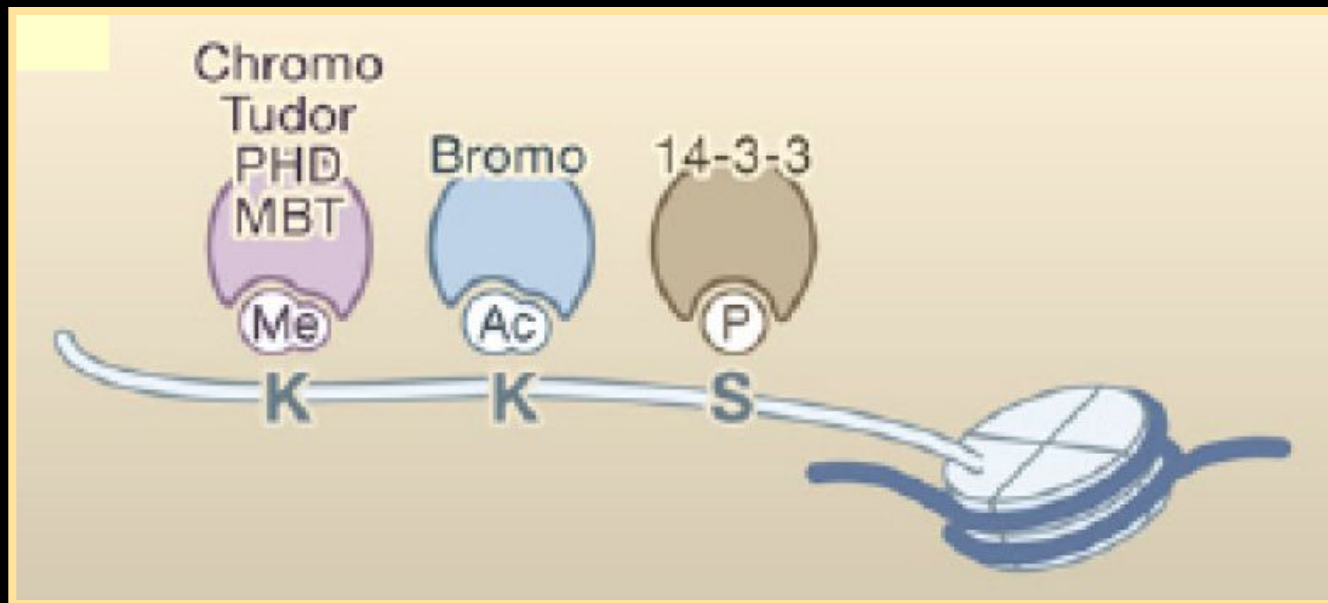
• белки, осуществляющие деацетилирование – **ГИСТОНОВЫЕ**

деацетилазы (HDAC)

Как работает «гистоновый код»?

1. Аминокислотный остаток в гистоне
2. Модифицирующий фермент
3. Белок, «воспринимающий» модификацию

Домены белков, распознающие модификацию - метилированные лизины, ацетилированные лизины, фосфорилированные серины - принадлежат белкам PcG и TrxG



Ацетилированный лизин - Бромодомен

Метилированный лизин – Хромо- и Тюдор-домены

Как формируются и функционируют
комплексы PсG и TхG?

РcG-белки выявляются в составе многокомпонентных

- **1 комплекс, Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1)**, содержит белки Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior Sex Combs (PSC) и dRING.
- **2 комплекс, (PRC2)** содержит 4 коровых белка: **гистон-метилтрансферазу** Enhancer of Zeste (E(Z)), **которая триметирует лизин 27 гистона H3 (H3K27me3) и лизин 9 гистона H3 (H3K9me3)**, Extra sex combs (ESC), Suppressor of zeste-12 (SU(Z)12), **и ремоделирующий нуклеосому фактор 55 (NURF-55)**.
- **3 комплекс, PhoRC** содержит ДНК-связывающий белок **PHO** и белок **dSfmbt**, узнающий моно- и диметилированные по H3K9 и H4K20 концы гистонов H3 и H4

Предполагаемый ступенчатый процесс формирования репрессивного комплекса

1. Связывание комплекса **PhoRC**

2. Привлечение комплекса **PRC2** через взаимодействие с PhoRC

3. PRC2-зависимая **модификация гистонов (H3K27me3)** в месте формирования комплекса

Триметилирование
лизина гистона H3

4. Привлечение комплекса **PRC1** через узнавание и **связывание Pc с H3K27me3**

-Однако, это лишь очень упрощённое представление.

-Только лишь PNO/PNOL-сайты связывания не достаточны для образования PC-репрессивного комплекса.

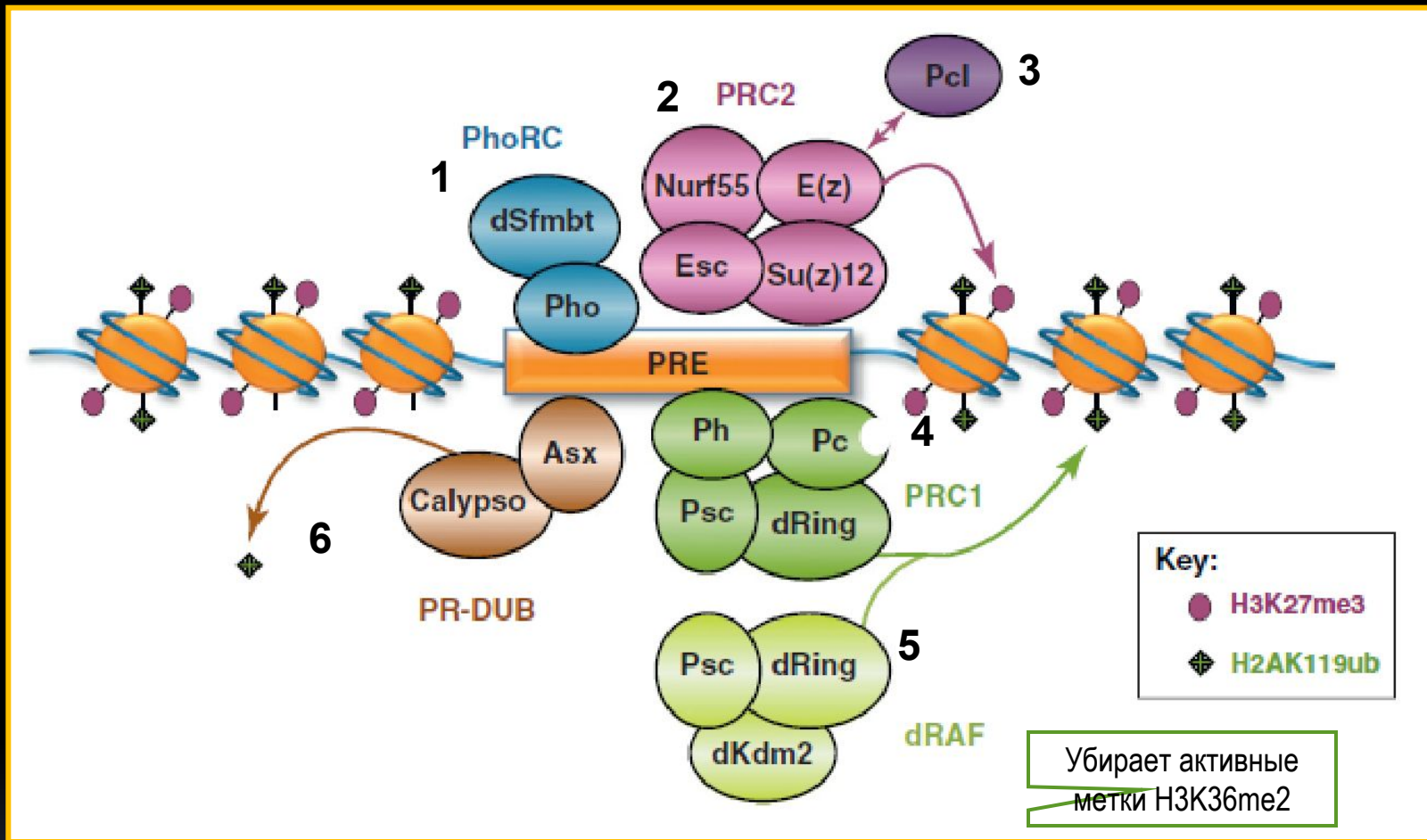
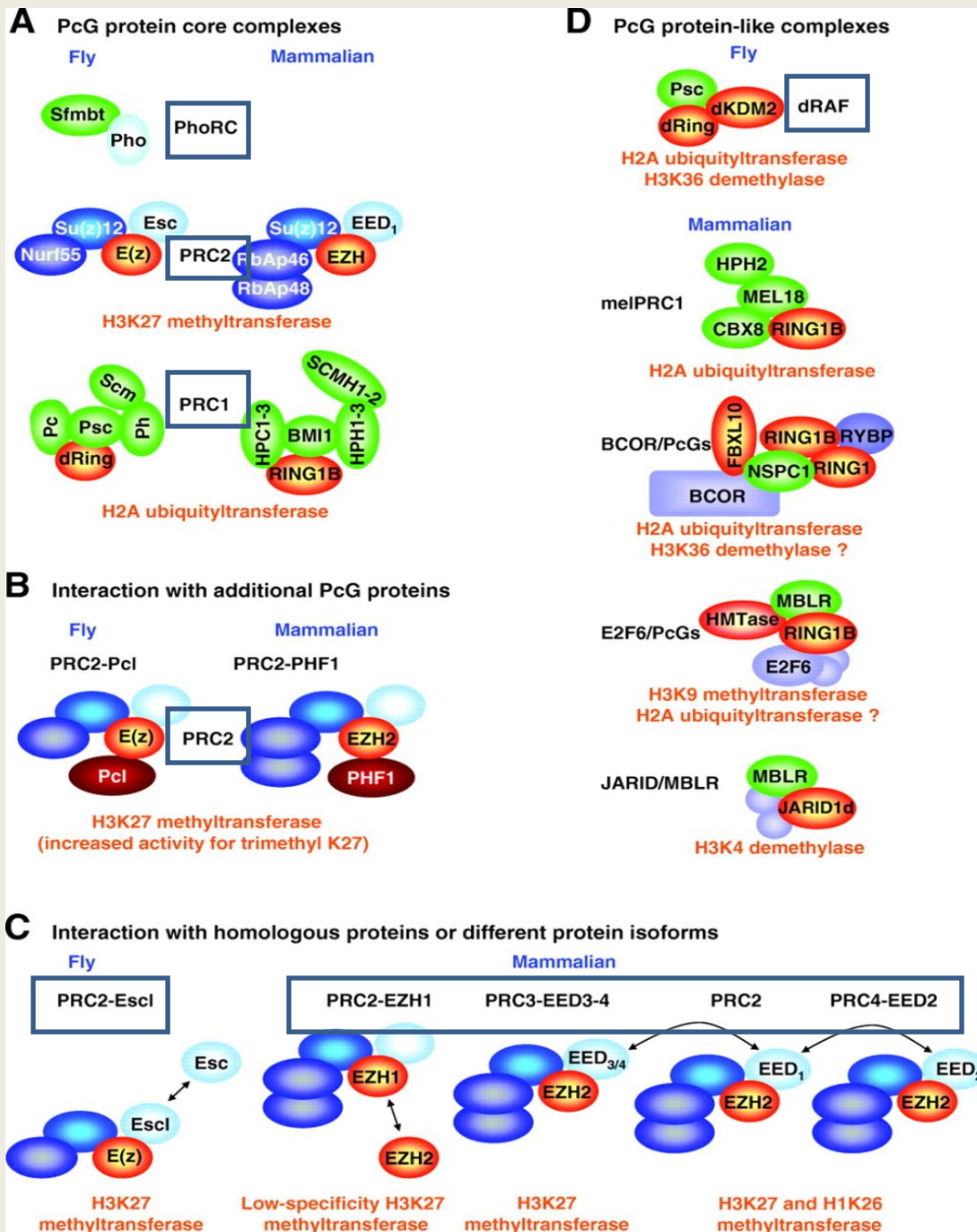


Figure 1. PcG complexes on chromatin. (a) Schematic representation of the five PcG complexes in *Drosophila* (adapted from [4]). PcG complexes are recruited to Polycomb response elements (PRE) by a combination of DNA-binding proteins, including the PhoRC. Once recruited to PRE, the E(z) subunit of PRC2 trimethylates H3K27. Association of Pcl with PRC2 allows high levels of H3K27me3. This repressive mark is recognized by the chromodomain of the Polycomb subunit (Pc) of PRC1. Another subunit of PRC1, dRing, is responsible for the deposition of another repressive mark, the mono-ubiquitylation of H2AK119. dRING is also part of the dRAF complex, which can also be recruited to PREs and contains dKdm2, a demethylase for the active mark H3K36me2. Surprisingly, the recruitment of PR-DUB, a recently identified PcG complex, deubiquitylates H2AK119ub and leads to gene repression. Polycomb gene silencing could thus entail a dynamic balance between H2A ubiquitination by PRC1 and dRAF, and H2A deubiquitination by PR-DUB. In mammals, PRE-like elements as well as CpG islands depleted of activating motifs can recruit PRC1 and PRC2, and PcG complexes



Разнообразие комплексов PcG.

(из Schuettengruber and Cavalli, 2009).

(A) Три принципиальных типа комплексов белков группы Поликомба (PcG) у *Drosophila* и млекопитающих (PRC1, PRC2, PhoRC)

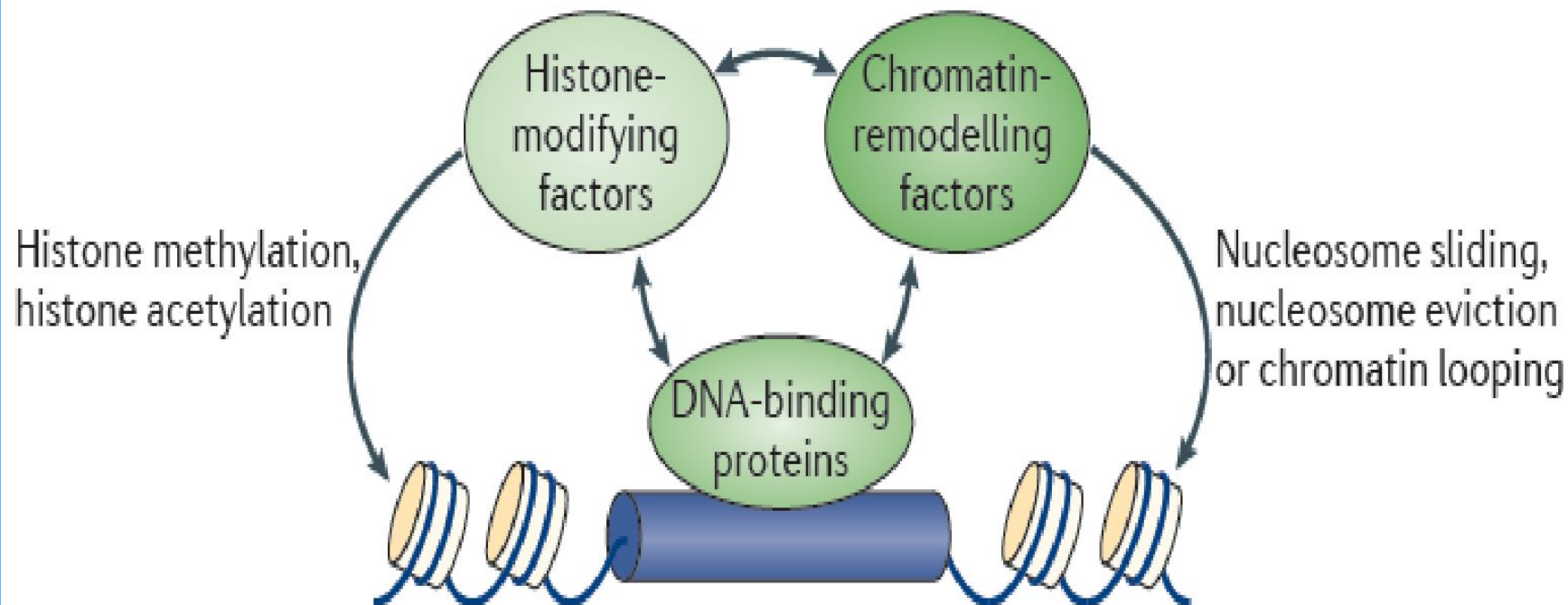
(B-D) Разнообразие дополнительных PcG-комплексов достигается

(B) путем **взаимодействия с дополнительными PcG-белками**,

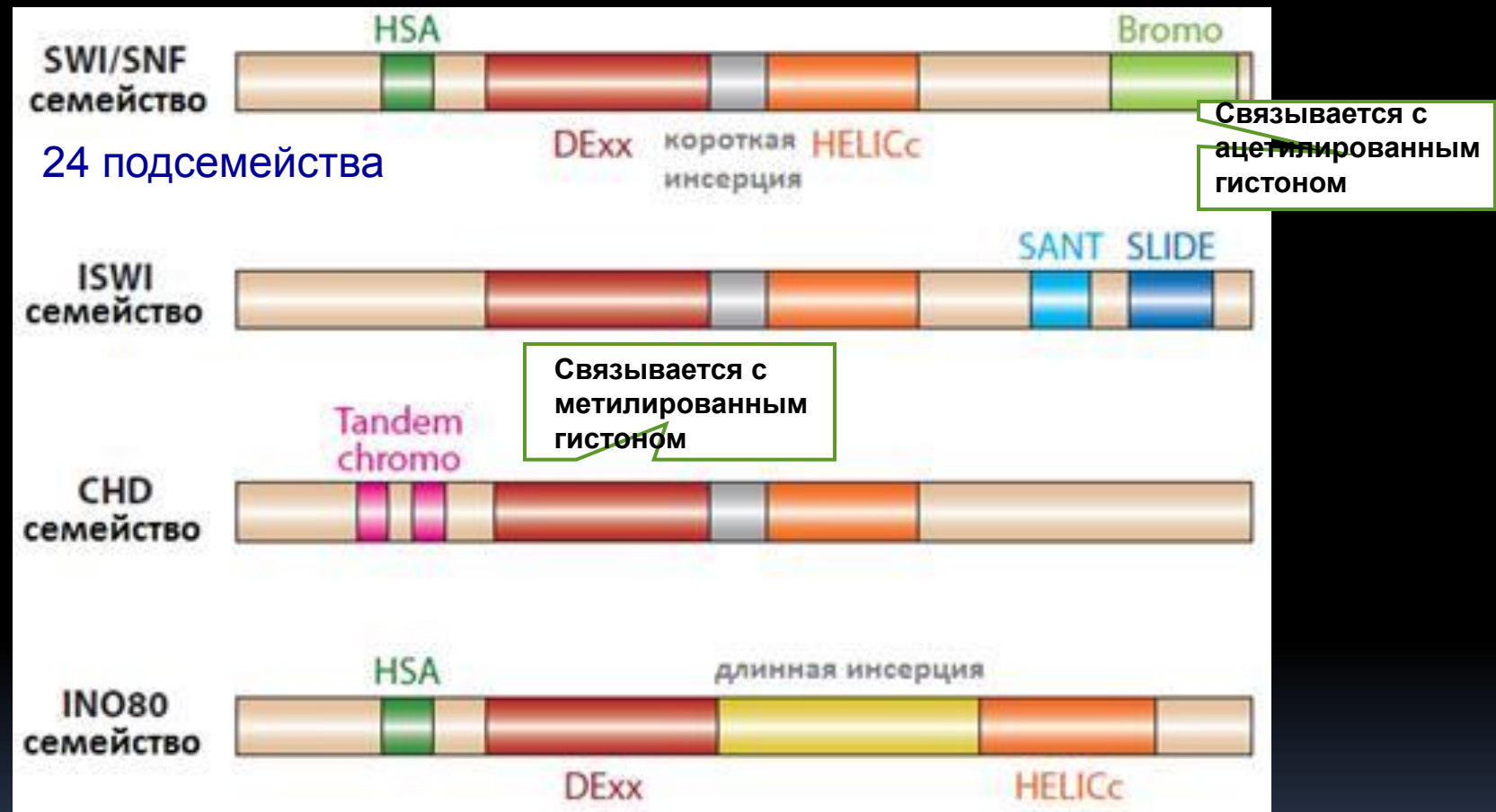
(C) путем включения в комплекс **гомологичных белков** или разных белковых **изоформ**,
 (D) путем образования комплексов, которые **включают только некоторые из коровых компонентов комплекса PRC1 в комбинации с другими регуляторами хроматина.**

Основные энзиматические компоненты каждого комплекса выделены красным цветом, а их известные биохимические активности указаны ниже каждого комплекса.

Комплексы и белки группы TrxG у разных видов

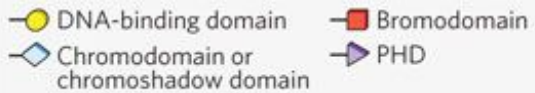


Нуклеосом ремоделирующие комплексы белков TrxG содержат субъединицы с АТФазной активностью



АТФазный домен в этих субъединицах разделён на две части **Dexx** и **HELICc**. ДОМЕНЫ: **Бромодомен**, хеликазный домен - **HSA (helicase-SANT)**. **SANT-SLIDE** домены, тандем **хромомоменов**.

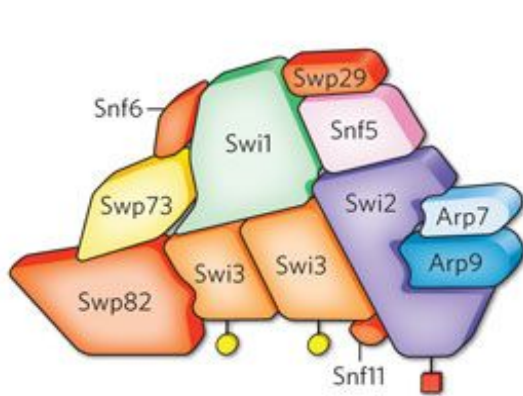
Nucleosomes



Multicellularity, DNA methylation, linking histones

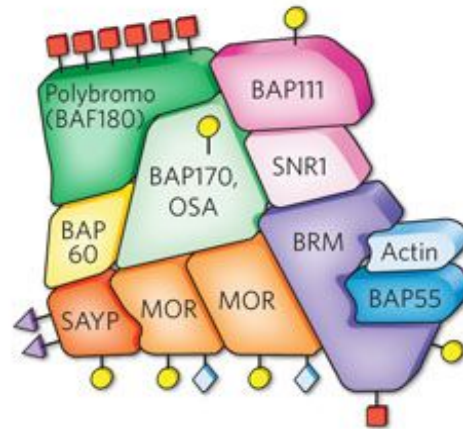
Increased genome size and vertebrate organogenesis

Yeast
Swi/Snf complex
Monomorphic



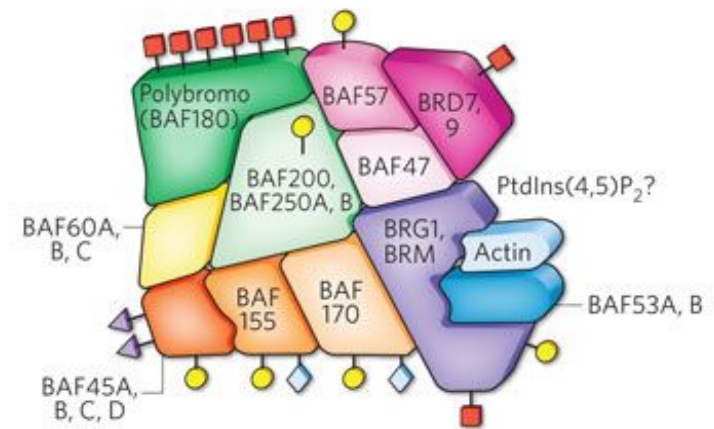
Transcriptional activation

Drosophila melanogaster
BAP complexes
Dimorphic



Transcriptional activation
Transcriptional repression

Mouse
BAF complexes
Polymorphic

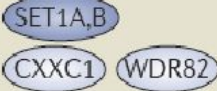
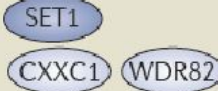

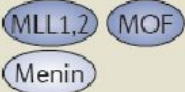


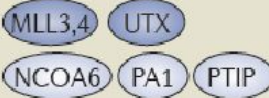
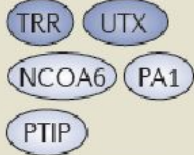
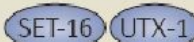

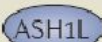
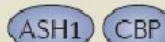


Transcriptional activation
Transcriptional repression
Tumour suppressors

Эволюционное разнообразие SWI/SNF-комплексов (из [Ho and Crabtree, 2010]).

Гомологичные субъединицы комплексов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Swi/Snf), *Drosophila melanogaster* (BAP, **Brahma**(BRM)-ассоциированные белки и **polybromo-содержащий BAP** (PBAP); на рис. оба варианта показаны вместе как BAP-комплексы) и мыши (комбинаций различных субъединиц ведут к образованию огромного разнообразия **BAF-комплексов**, содержащих **brahma-ассоциированные факторы, BAF**) обозначены одинаковыми фигурами и выделены одним цветом. Домены субъединиц, которые могут взаимодействовать с ДНК или гистоновыми модификациями показаны на поверхности соответствующих белков (объяснение - на рисунке сверху слева). В случае комплексов дрозофилы обозначены белки группы Триторакса: MOR (Moir), OSA, BRM (Brahma), SAMP ("supporter of activation of yellow protein", E(y)3).

Комплексы и белки группы TrxG у разных видов

Complex	Comment	Mammals	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	Plants
Гистон-модифицирующие комплексы					
COMPASS	Global gene activation; mediates bulk trimethylation of K4 on histone H3 (H3K4me3)	 ASH2L, DPY30, HCF1, RBBP5, WDR5	 ASH2, DPY30, HCF1, RBBP5, WD5		
COMPASS-like	HOX-family gene regulation, tumour suppressor activity and HAT activity for H4K16	 ASH2L, DPY30, HCF1, RBBP5, WDR5	 ASH2, DPY30, HCF1, RBBP5, WD5		 ASH2R, RBL, WDR5A
	Activates nuclear receptors in mammals and ectyosone-induced promoters in <i>D. melanogaster</i> ; demethylase activity for H3K27me3 plays a part in dosage compensation and the attenuation of RAS signalling in <i>C. elegans</i>	 ASH2L, DPY30, RBBP5, WDR5	 ASH2, DPY30, RBBP5, WD5	 ASH-2, DPY-30, WDR-5	
TAC1	Counteracts PcG silencing, but also has a more global role in gene activation; has HAT activity for H3K27 in <i>D. melanogaster</i>		 SBF1		
ASH1	Counteracts PcG silencing and has HMT activity for H3K36 and HAT activity for H3K27 in <i>D. melanogaster</i>				

Ацетилтрансфераза гистона (HAT)

Комплексы и белки группы TrxG у разных видов

Complex	Comment	Mammals	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	Plants
АТФ-зависимые ремоделирующие комплексы					
SWI/SNF	Binds acetylated histones via its bromodomain, regulates cell cycle, cell signalling, proliferation and chromosome segregation	BRM, BRG1 Actin, BAF45A, BAF45B, BAF45C, BAF45D, BAF47, BAF53A, BAF53B, BAF60A, BAF60B, BAF60C, BAF155, BAF170, BAF180, BAF200, BAF250A, BAF250B, BAP57, BRD7, BRD9	BRD Actin, BAF60, BAF180, BAP55, BAP111, Dalao, BAP170, OSA, MOR, SAYP, SNR1		
ISWI	Binds unmodified histones via its SANT domain and reads H3K4me3 via its PHD finger; regulates transcription, cell fate determination and differentiation	BPTF RBAP46, RBAP48, SNF2L	NURF301 ISWI, NURF38, RBAP46, RBAP48	NURF ISW-1	CHR11,17
CHD1, CHD2	Bind H3K4me3 via their chromodomains; have roles in development and ES cell maintenance; H3.3 deposition in <i>D. melanogaster</i>	CHD1,2	CHD1,2		
CHD3, CHD4	HDAC activity; regulate transcription, replication and DNA repair; regulate cell fate determination in <i>C. elegans</i> and counteract PcG silencing in plants	CHD3,4 HDAC1,2 RBAP46, RBAP48, MBD2, MBD3, MTA1, MTA2, MTA3, p66	Mi2 RPD3 MBD2, MBD3, MTA, p55, p66, p68	HDA-1 LET-418 MEP-1	PKL
CHD6, CHD7, CHD8	Bind dimethylated H3K4 (H3K4me2) and H3K4me3 via their chromodomains; counteract PcG silencing and regulate transcriptional elongation in <i>D. melanogaster</i>	CHD8 ASH2L, RBBP5, WDR5	CHD6 CHD7 CHD8 KIS-L		

Brahma

АТФаза

Как рекрутируются комплексы Trx-G?

Из обзора Schuettengruber et al. (2011)
Nature, 12: 799-814

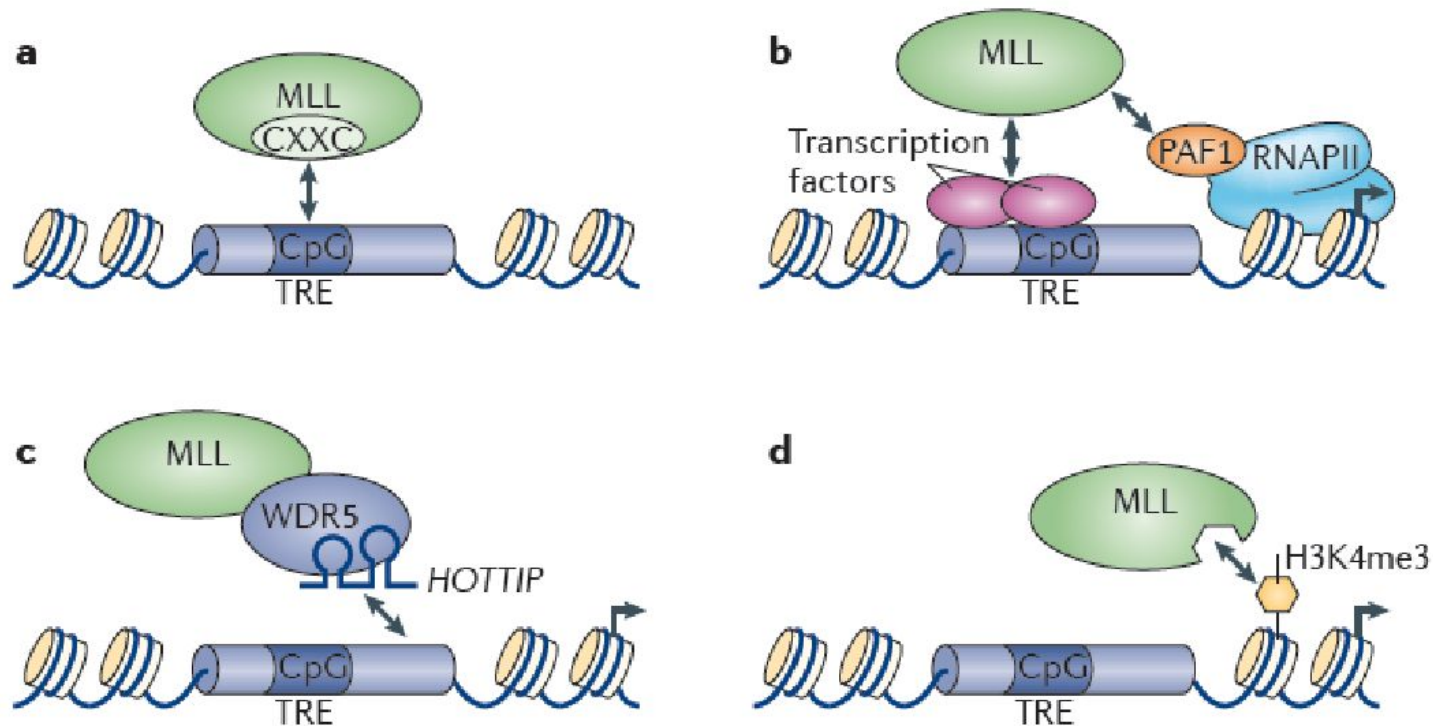


Figure 2 | **Multiple mechanisms recruit TrxG complexes to their target sites.**

a | MLL can directly interact with CpG-rich sequences via its CXXC domain.

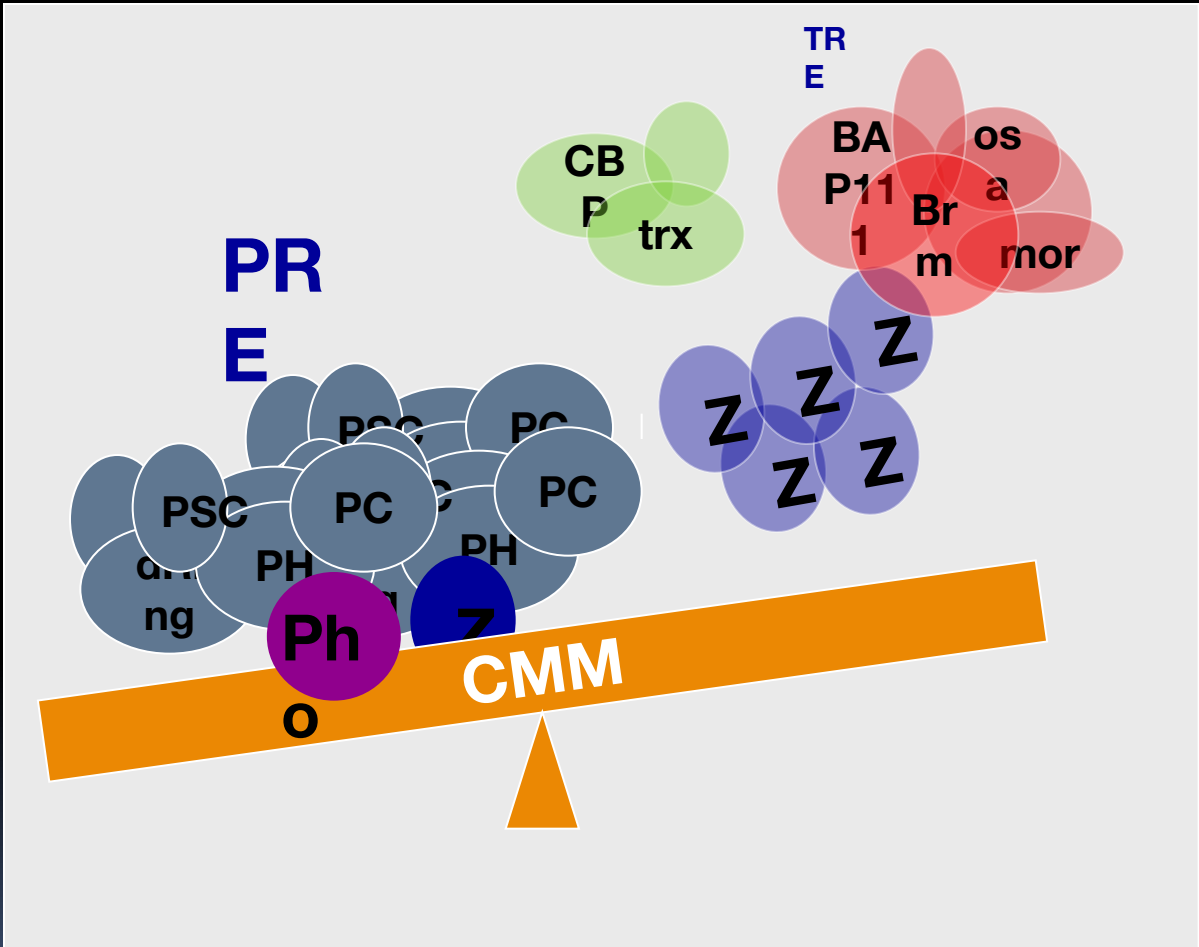
b | Alternatively, MLL can be targeted to DNA by interacting with sequence-specific transcription factors or the polymerase-associated factor 1 (PAF1) elongation complex.

Similarly, in flies, Trithorax group (TrxG) complexes can be recruited to TrxG response elements (TREs) via their interaction with sequence-specific DNA-binding proteins.

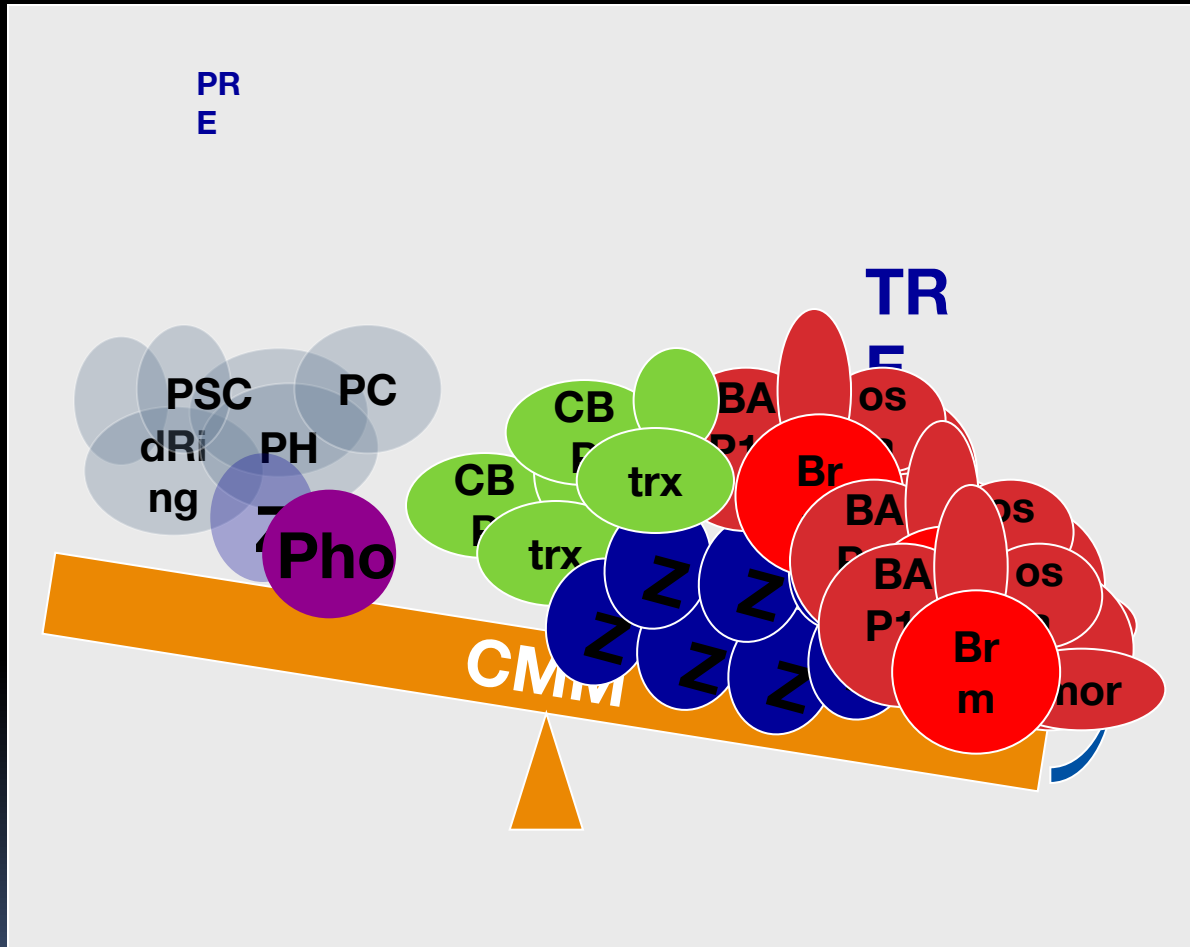
Note that TREs have not been identified in mammals so far. **c** | RNAs, such as *HOXA* transcript at the distal tip (*HOTTIP*), can recruit MLL via their interaction with the adaptor protein WD repeat-containing 5 (WDR5).

d | The plant homeodomain (PHD) finger domain of MLL can bind to trimethylated Lys4 on histone H3 (H3K4me3), helping to target MLL to chromatin. RNAPII, RNA polymerase II.

Если PRE детерминируется во время раннего развития...



... и когда функция TRE активируется



**Как модули «клеточной памяти»
передают информацию дочерним
клеткам ?**

Или

**Как стабильно наследуется
потенциально обратимые модификации
локального хроматина?**

**Механизмы поддержания эпигенетической информации на двух
принципиальных стадиях клеточного цикла:**

репликации и митоза.

Гипотетический механизм воспроизведения (сохранения) модификаций гистонов и связанных с ними белков на дочерних цепях ДНК после репликации - ? Часть метилированных гистонов сохраняется?

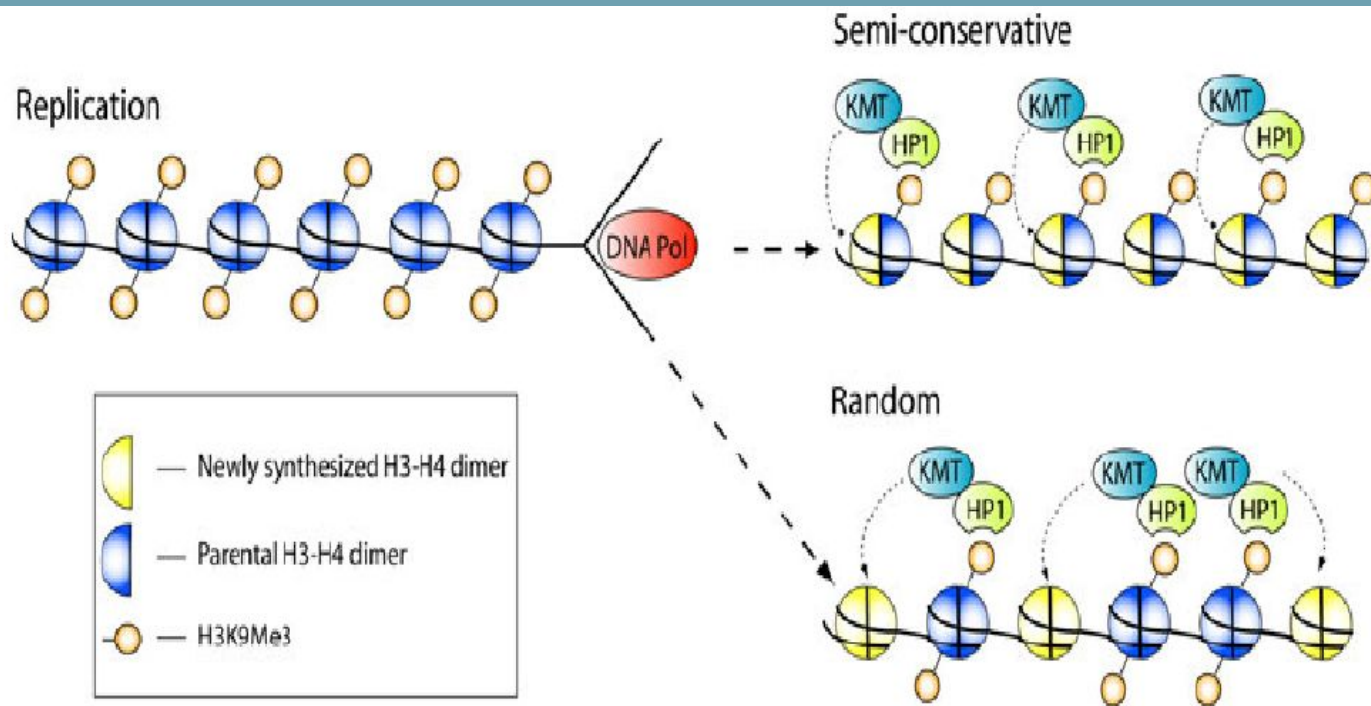


Fig. 1 Restoration of H3K9 methylation after DNA replication. During the S-phase, nucleosomes are disrupted by the replication machinery and subsequently reassembled at the daughter strands. This requires both parental histones as well as newly synthesized histones. Parental H3-H4 tetramers can be randomly deposited at the daughter strands. Alternatively, in certain instances H3-H4 tetramers can be

split into dimers. This would facilitate the semi-conservative model, in which parental H3-H4 dimers pair with newly synthesized H3-H4 dimers in order to form hemi-parental nucleosomes. The propagation of the H3K9Me3 mark is facilitated by HP1 and KMTs, where HP1 binds parental H3K9Me3 marks and induces H3K9 methylation of newly synthesized histones

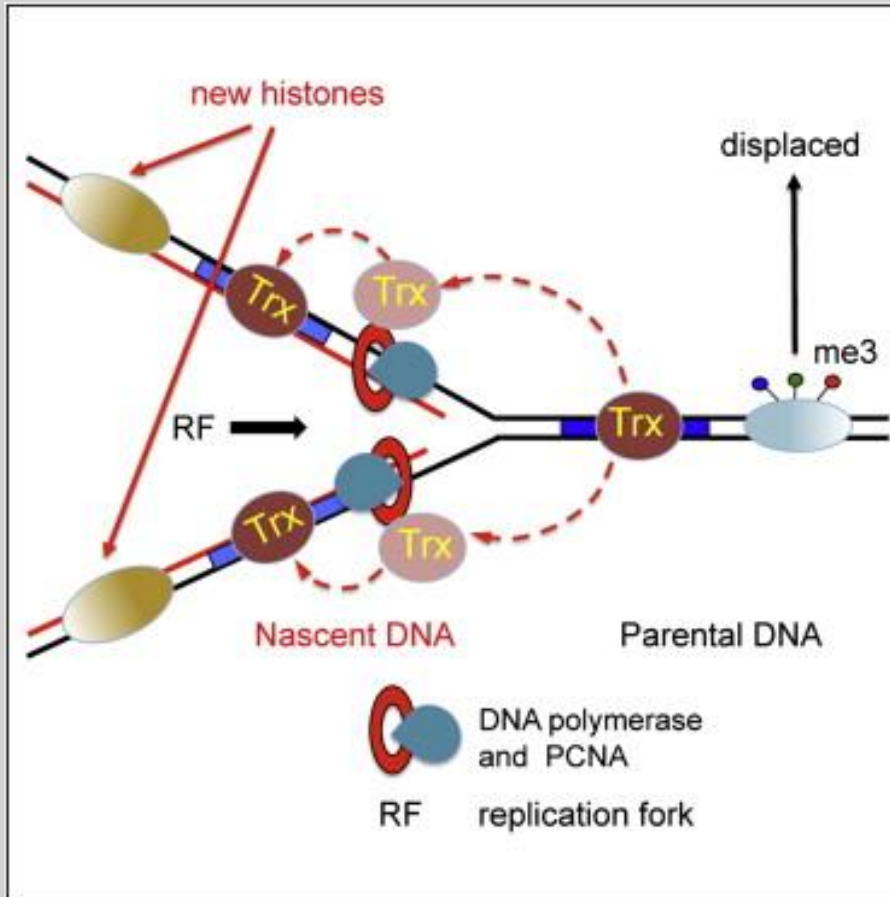
- TrxG and PcG Proteins but Not Methylated Histones Remain Associated with DNA through Replication



Светлана Петрук.

Институт биологии гена РАН. Москва. 1990 г.

TrxG and PcG Proteins but Not Methylated Histones Remain Associated with DNA through Replication



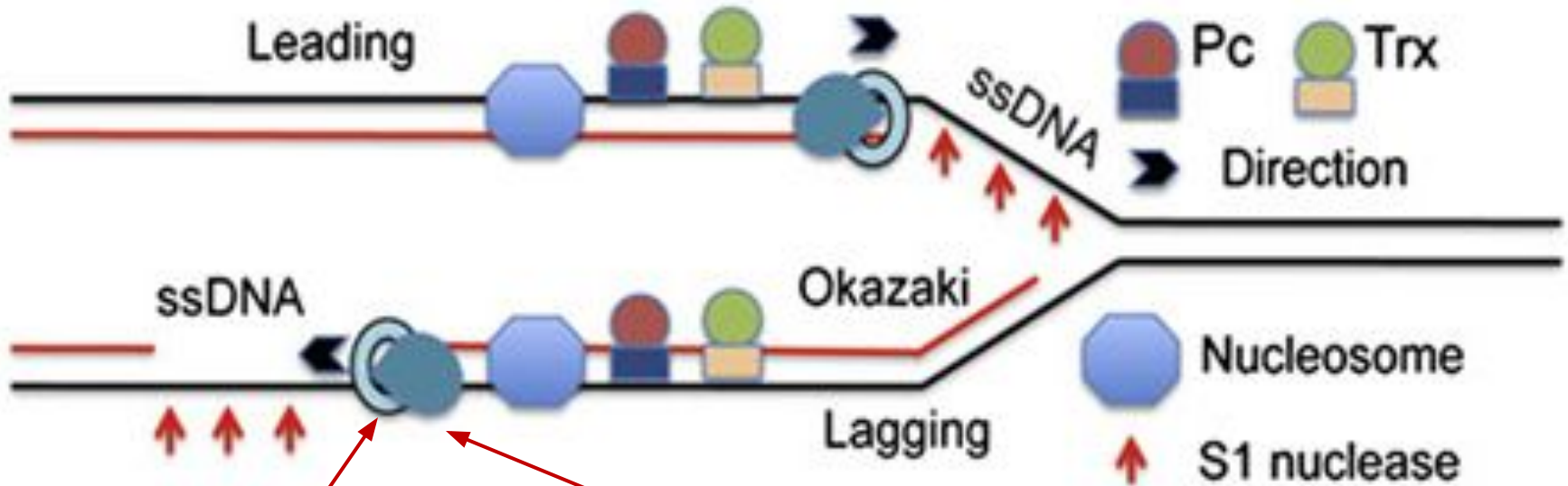
Parental H3K4me3 and H3K27me3 are not transferred to original sites on nascent DNA

- ▶ De novo methylation of H3 occurs only in the next G phase
- ▶ Trx, Pc, and E(z) are transiently associated with PCNA
- ▶ Trx, Pc, and E(z) are transferred to their response elements during DNA replication

Histone modification enzymes may re-establish the histone code on newly assembled unmethylated histones and thus may act as epigenetic marks.

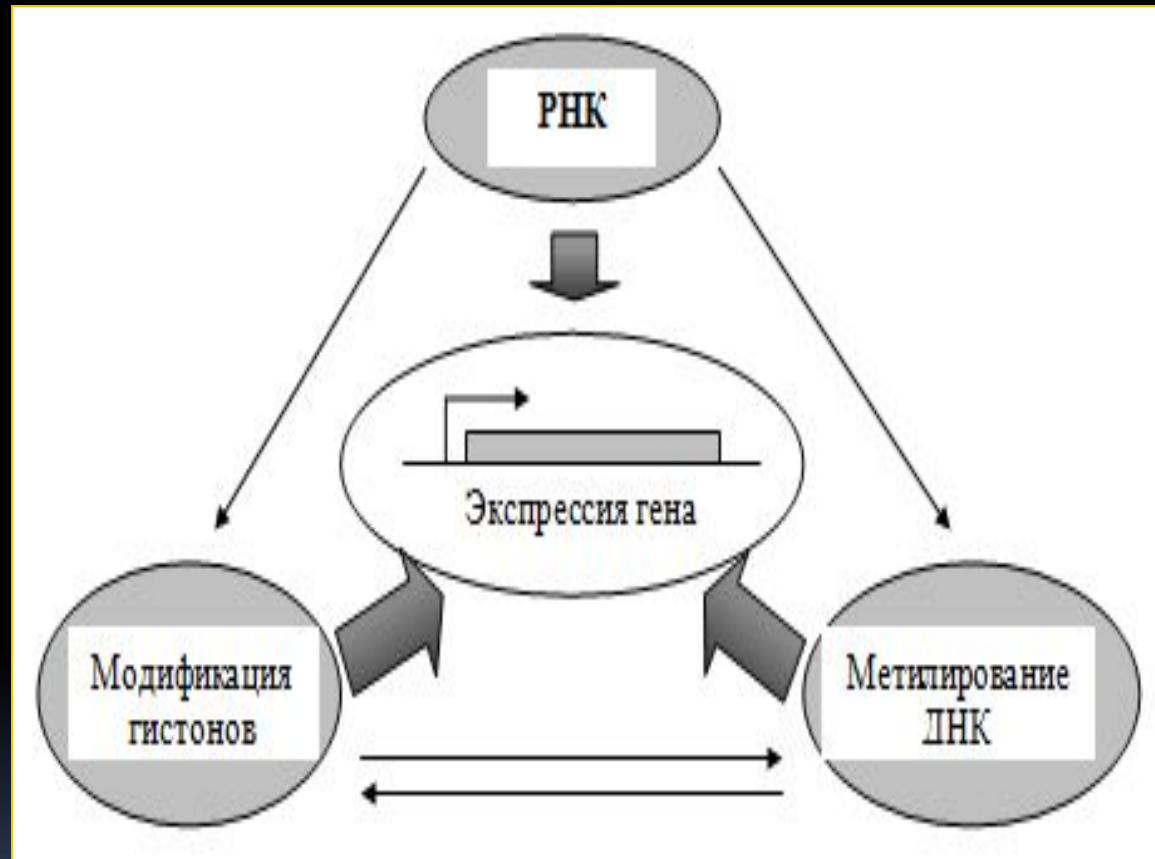
Petruk et al. (2012) Cell, 150, 922-933

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein acts as a platform to recruit DNA polymerase and many other proteins to the single-stranded DNA (ssDNA) located downstream of the RF and acts as a processivity factor for the DNA polymerase. PCNA is stably associated with DNA on both leading and lagging strands.



PCNA is indicated as a torus, and **the polymerase** as a tear drop

Взаимосвязь механизмов эпигенетической регуляции

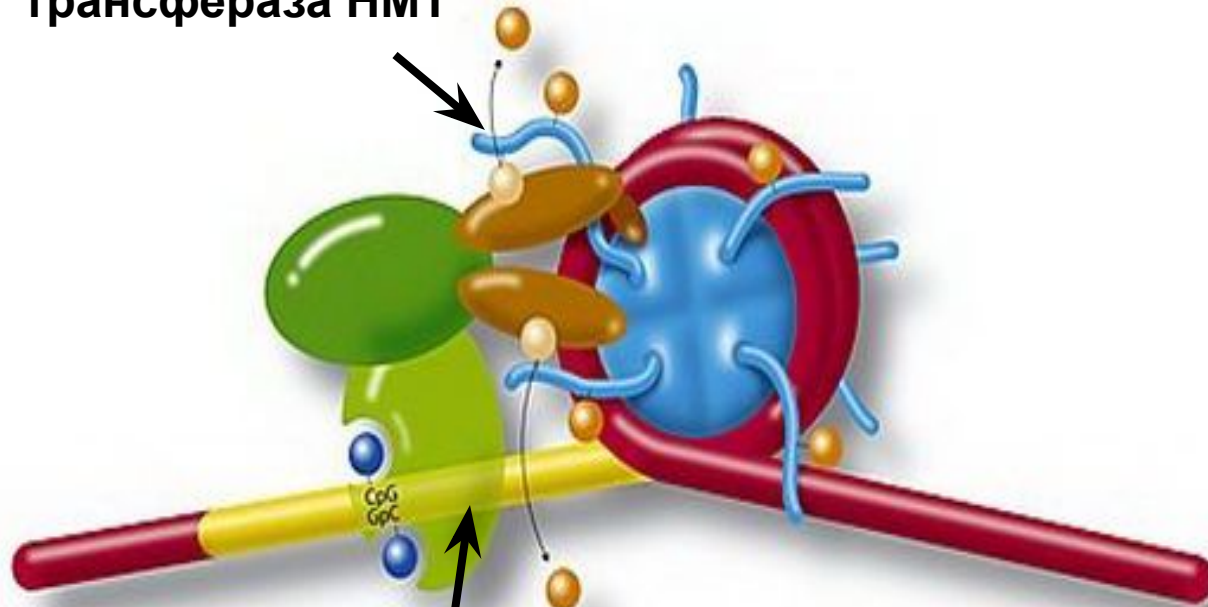


метилирование ДНК
может быть предварительным
условием метилирования гистонов.

метилирование ДНК

Метилирование ДНК активирует модификации гистонов

Гистоновая метил
трансфераза HMT



DAMT – ДНК метилтрансфераза

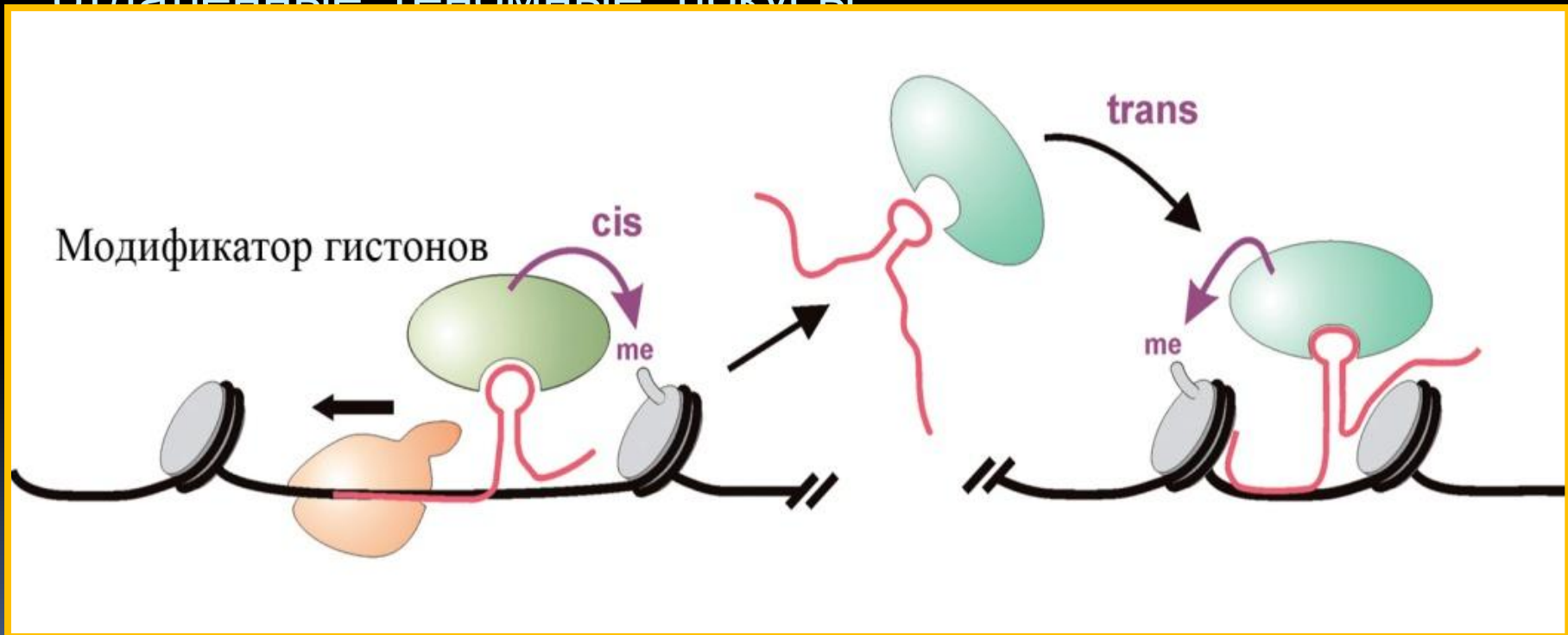


Мир некодирующих РНК

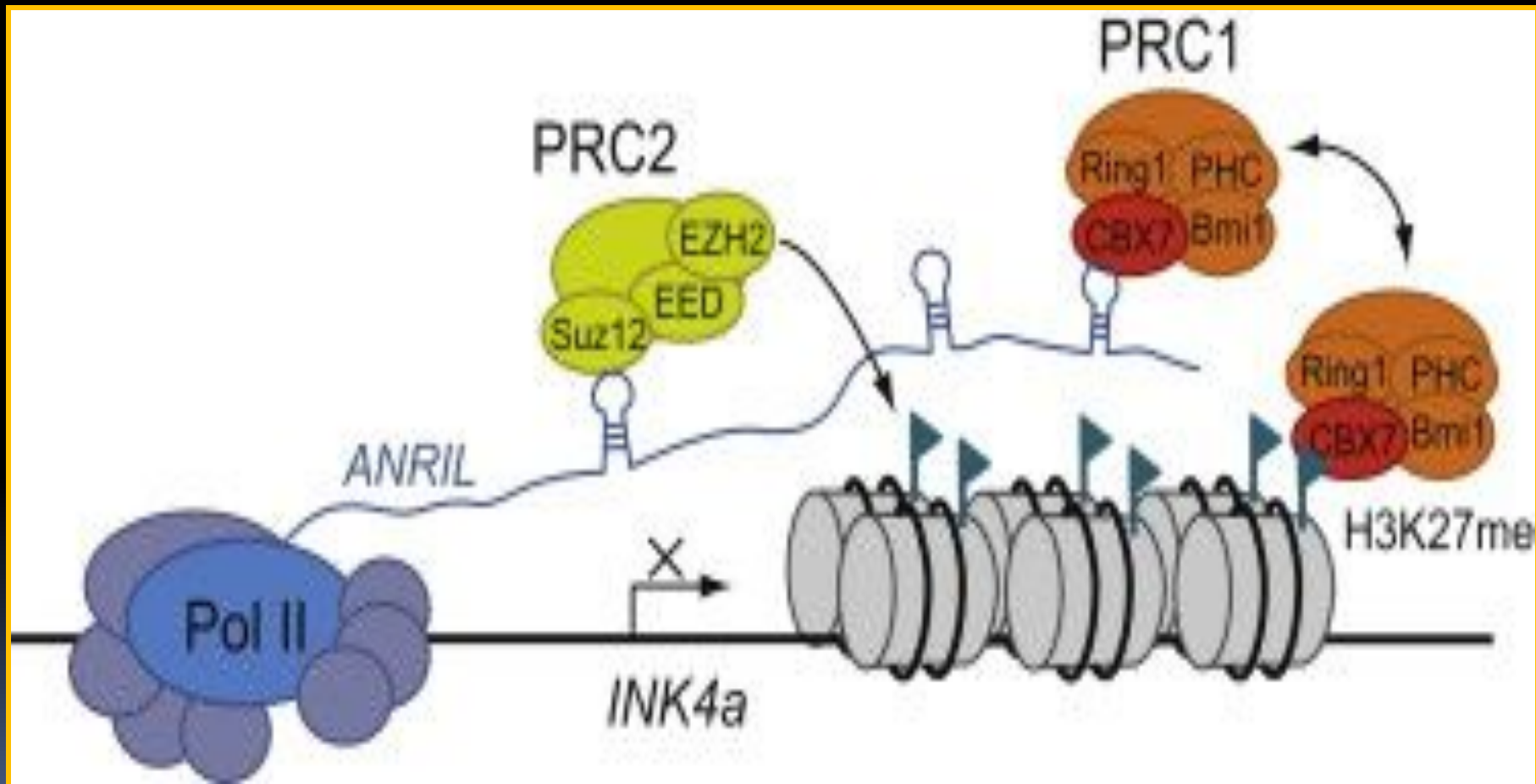
(нкРНК)

- ❑ Недавние исследования показали, что **большая часть генома человека** транскрибируется как нкРНК
- ❑ **Белок-кодирующая фракция геномной ДНК** обратно пропорциональна сложности организма (Taft et al., 2007):
у прокариот – 90% генома, в дрожжах – 68%, у нематод – 25%, у насекомых – 17%, у **человека – 1%** (!)
- ❑ В последние несколько лет наблюдается все возрастающее накопление данных о **центральной роли нкРНК в разнообразных эпигенетических механизмах** регуляции тканеспецифической активности генов (в развитии) и ремоделирования хроматина

Эпигенетическая регуляция: Антисмысловые транскрипты формирует структуру, которая узнаётся различными гистон-модифицирующими комплексами. Рекрутируемые комплексы могут действовать, как в *цис*-положении, так и в *транс*-положении, перемещаясь с помощью нкРНК в отдалённые геномные участки

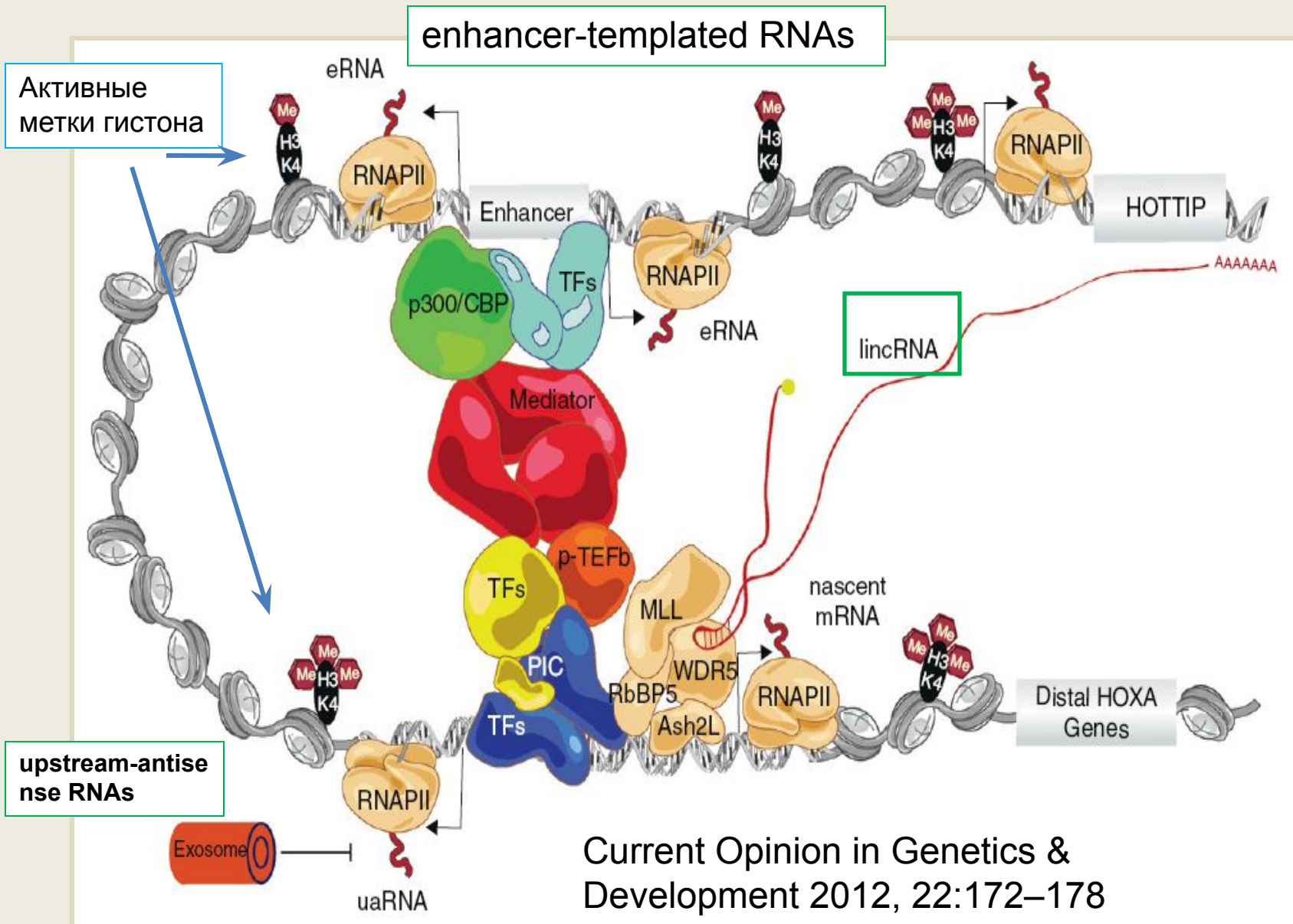


Пример эпигенетической регуляции в *цис*-положении



RNA Marks Enhancer Elements:

Организация промотора кодирующего гена, его энхансера и lincRNA-гена



«Генетика предполагает, а эпигенетика располагает».

Питер Медавар (*P. Medawar*), Нобелевский лауреат

Благодарю за внимание