

Зачем же нужен конститутивный гетерохроматин?

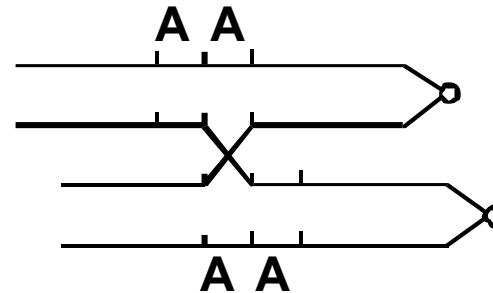
Для ответа на этот вопрос, посмотрим, в каких районах хромосом он обычно присутствует

Drosophila:	прицентромерный гетерохроматин интеркалярный гетерохроматин теломеры
дрожжи:	локусы, отвечающие за пол теломеры кластер генов рРНК
млекопитающие:	прицентромерный гетерохроматин теломеры

Первый тип районов – кластеры повторенных генов, например, гены рРНК

Гены рРНК у многих организмов окружены гетерохроматином

рРНК клетке требуется много. Вероятно, поэтому эти гены присутствуют в большом количестве копий. Но такая повторенность могла бы привести к неравному кроссинговеру и постепенной потере копий.

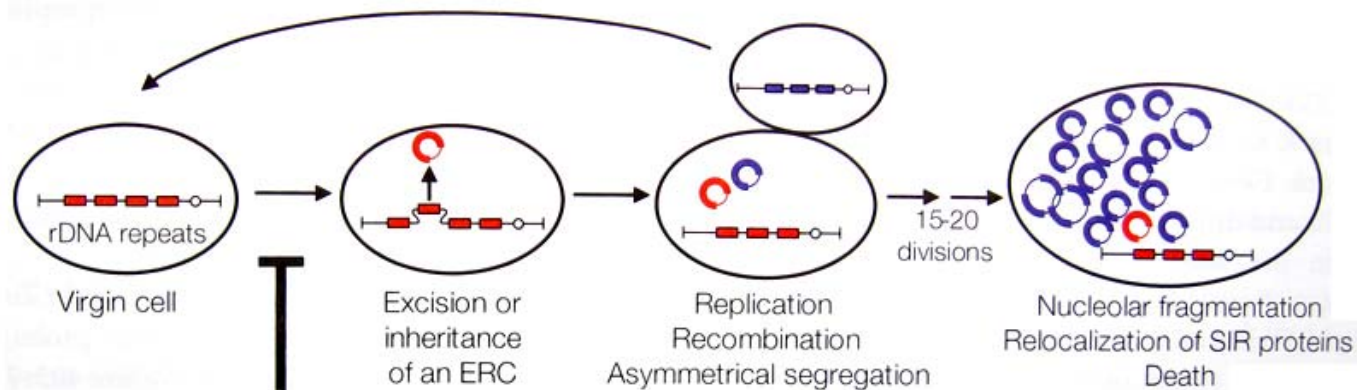


Упаковка в гетерохроматин защищает эти гены от рекомбинации?

Первый тип районов – кластеры повторенных генов, например, гены рРНК

Упаковка в гетерохроматин защищает эти гены от рекомбинации?

Подтверждение – быстрое «старение» дрожжей *S. cerevisiae* при мутациях, затрагивающих SIR белки



Sir2 запрещает рекомбинацию в кластере генов рРНК

У мутантов по Sir2 ядрышко постепенно вырезается, дрожжи стареют и умирают

Второй тип районов – теломеры и прителомерные районы

Теломерный гетерохроматин служит для защиты концов хромосом от слияния

Если конец хромосомы специально не запаковать, клетка решит, что это 2-цепочечный разрыв в ДНК, который надо репарировать.

У мутантов по гетерохроматиновым белкам концы хромосом слипаются друг с другом, происходят нарушения расхождения хромосом в митозе и гибель клеток.



Xenopus laevis
TTAGGG



Arabidopsis thaliana
TTTAGGG



Physarium
TTAGGG



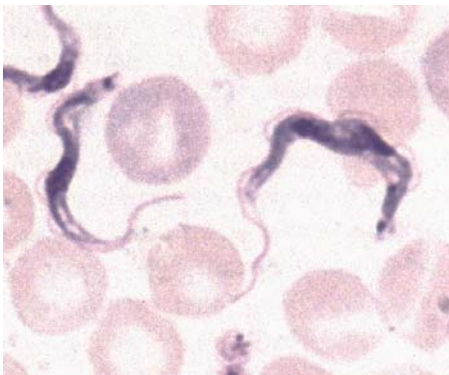
Caenorhabditis elegans
TTAGGC



Chlamydomonas
TTTTAGGG



Bombyx mori
TTAGG



Trypanosoma
TTAGGG

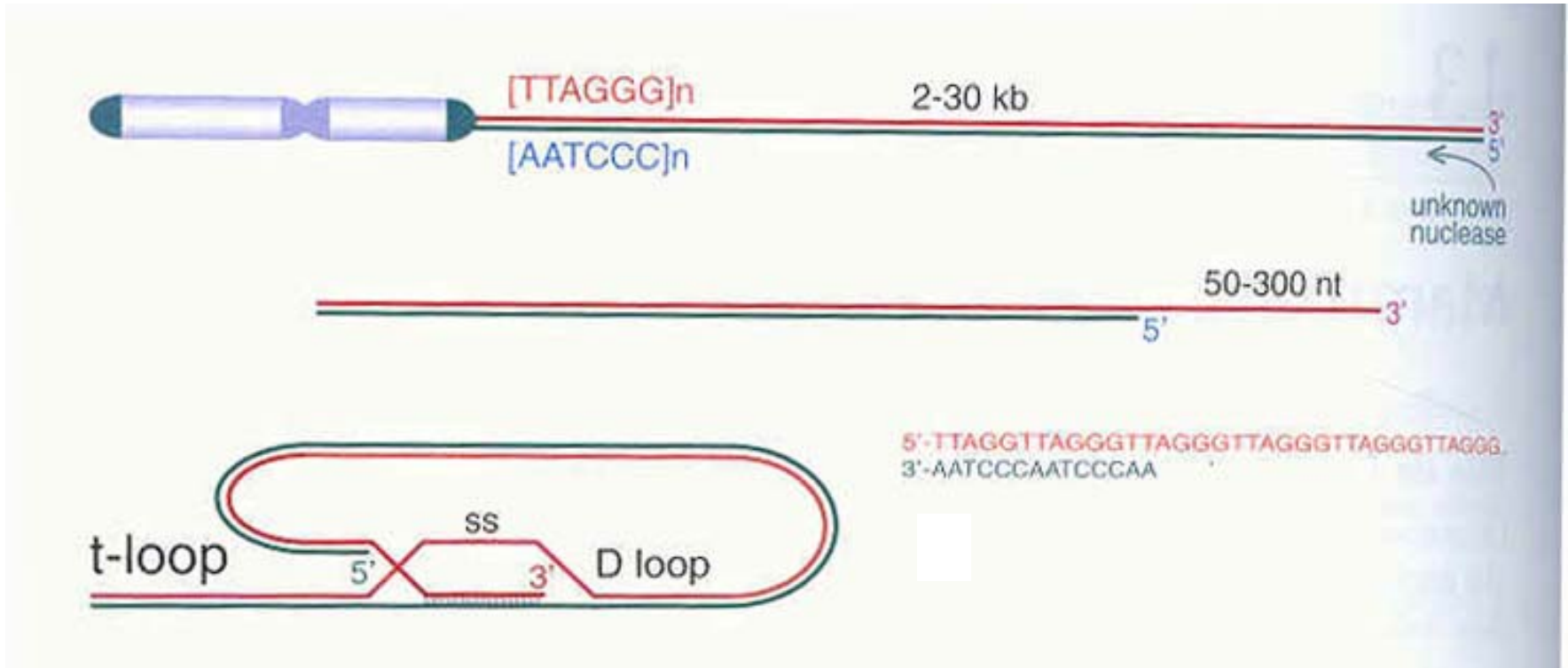


Tetrachymena
TTGGGG



Neurospora crassa
TTAGGG

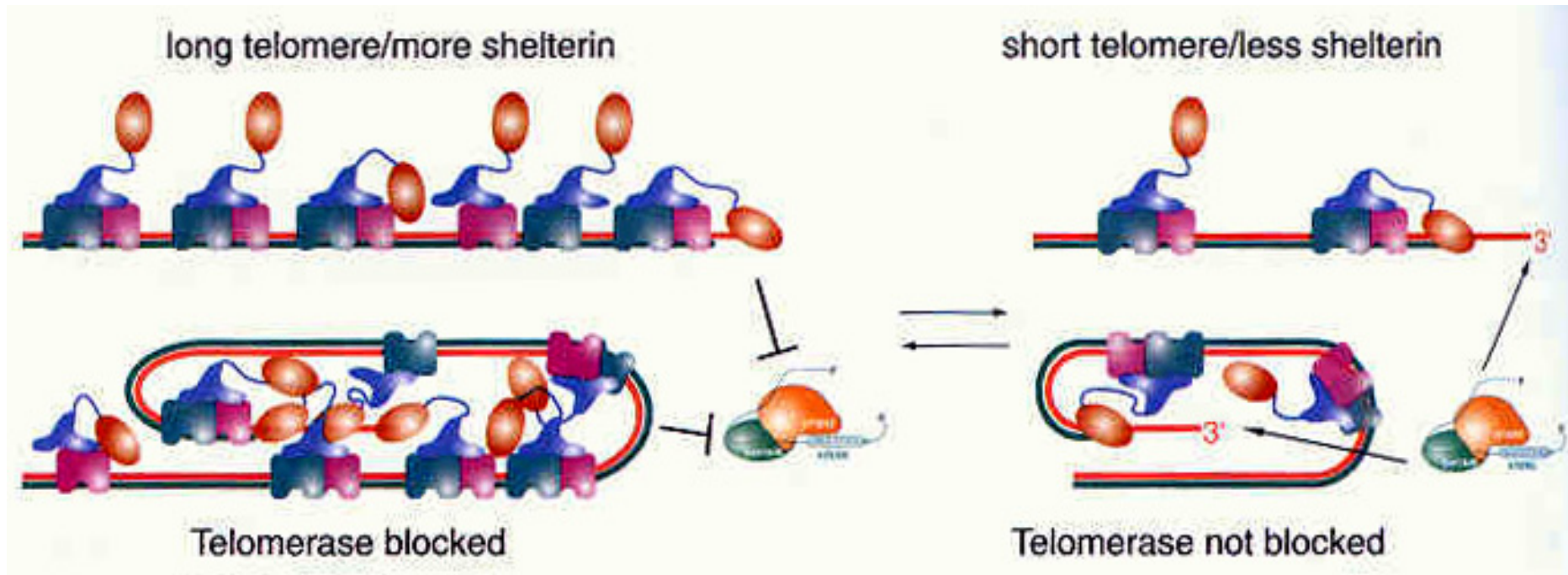
Организация теломеры в хромосомах человека



ДНК сворачивается, образуется Т-петля. В результате, свободный конец ДНК «прячется».

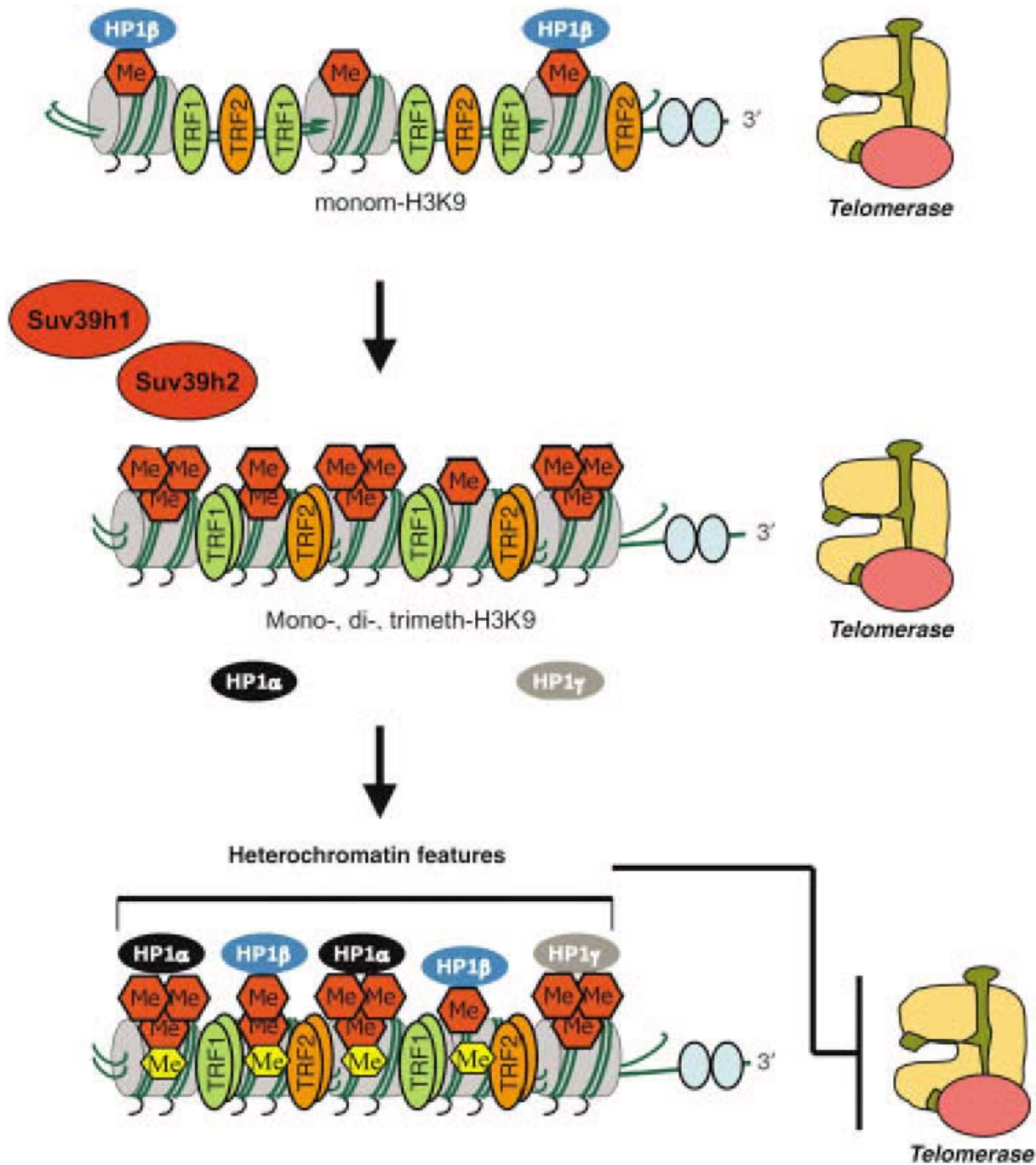
Для стабилизации структуры происходит упаковка в гетерохроматин.

С теломерными повторами связываются специальные белковые комплексы, которые привлекают гетерохроматиновые белки

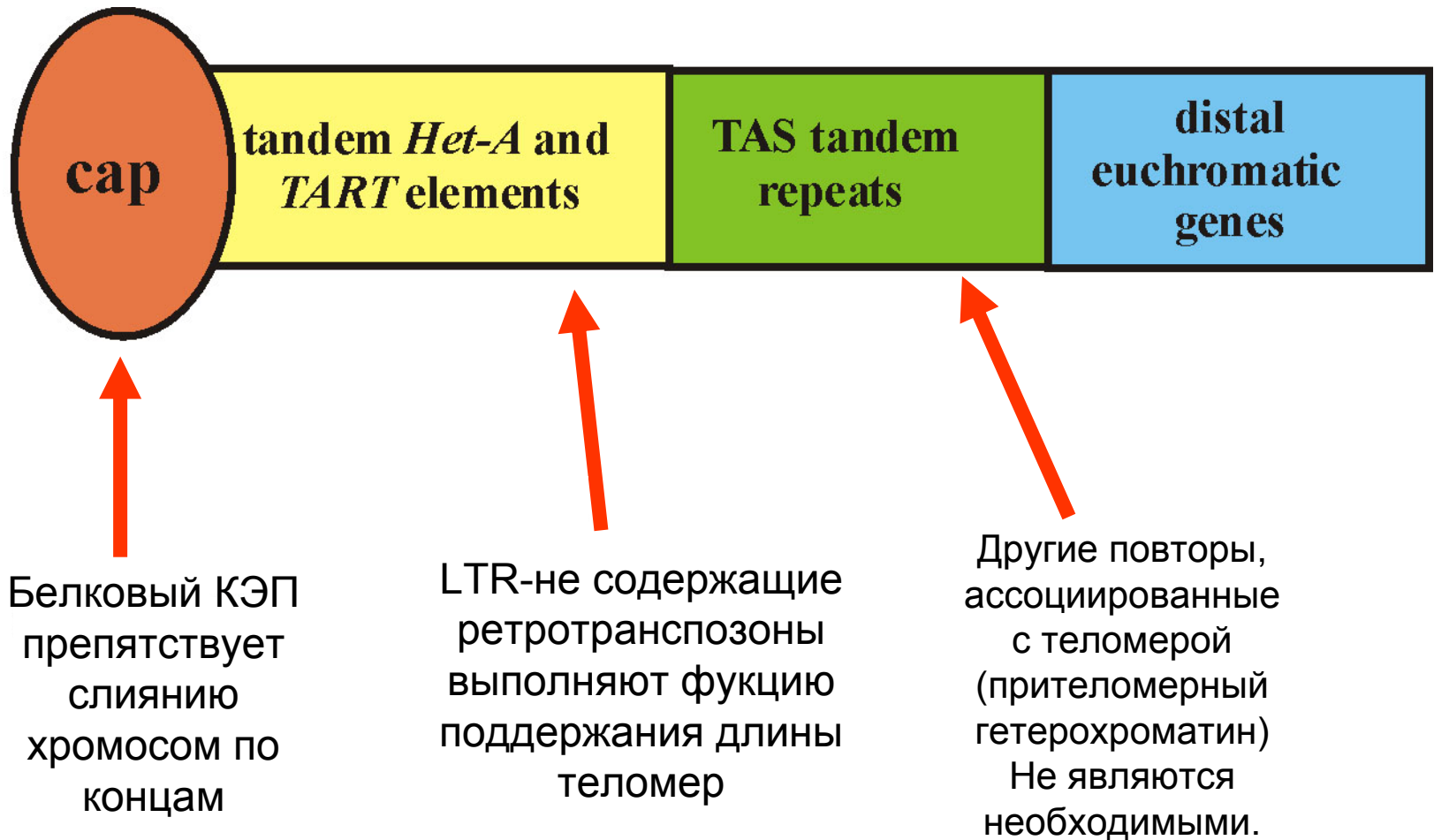


Еще одна функция упаковки теломерной ДНК в гетерохроматин – не позволять теломеразе делать слишком длинные теломеры

Пока теломера достаточно длинная для формирования Т-петли, белковые комплексы блокируют теломеразную активность на данной теломере.



У дрозофилы нет теломеразы, проблема недорепликации 3' концов решается ретротранспозонами.



Гетерохроматиновые белки, например, HP1, Su(VAR)3-9 и др.

Судя по тому, что количество прицентромерного гетерохроматина очень сильно варьирует даже в пределах вида, он нужен клетке в значительной степени как структура, а его состав и точное количество клетке почти безразлично.

Хотя...

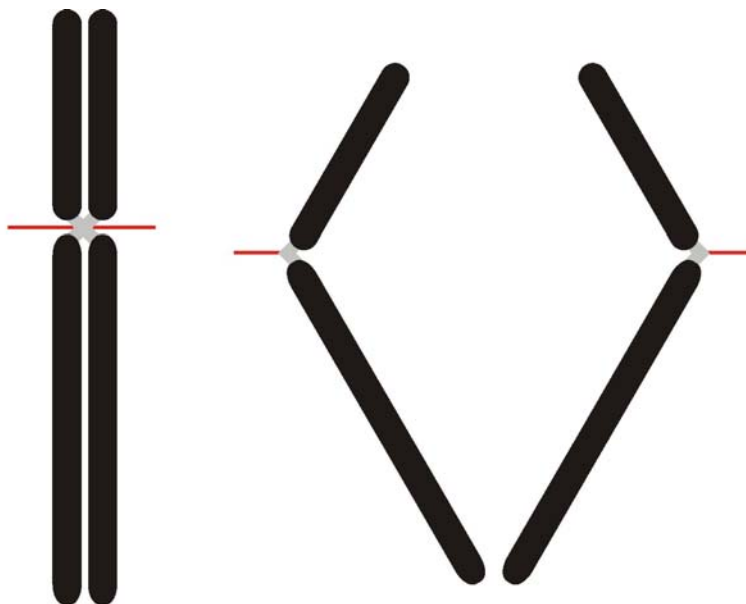
Чтобы понять роль гетерохроматина в обеспечении функции центромеры, надо понять, как устроена центромера

Чтобы понять роль гетерохроматина в обеспечение функции центромеры, надо понять, как устроена центромера

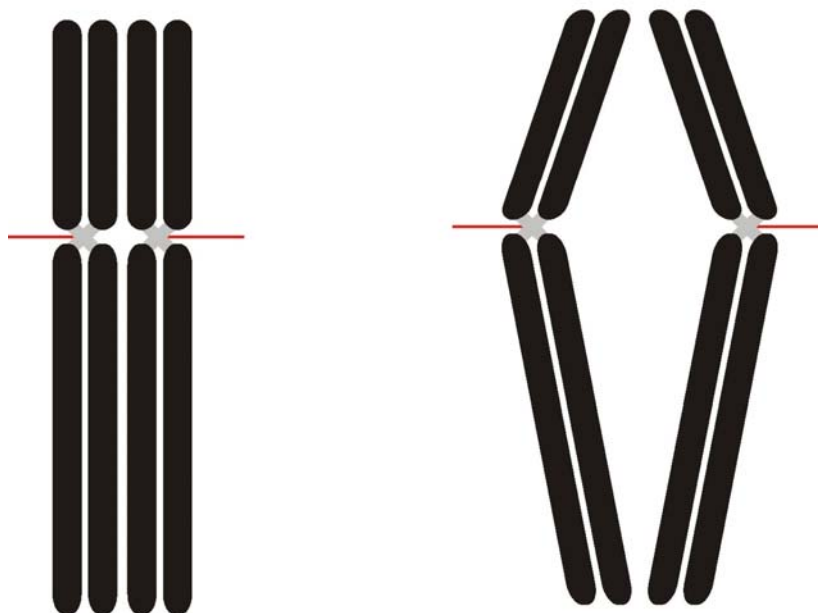
Центромера – участок хромосомы, к которому прикрепляются нити веретена деления при митозе и мейозе.

На ней формируется ДНК-белковый комплекс – кинетохор, к которому и прикрепляется веретено.

Митоз



Мейоз

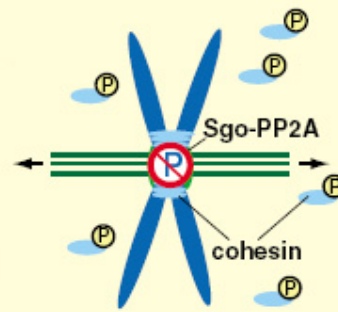


Phosphorylation of cohesin



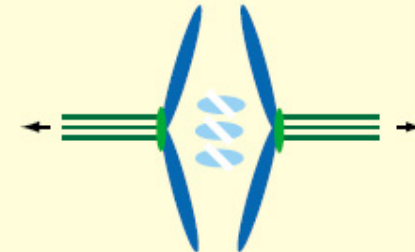
Prophase

Chromosome condensation



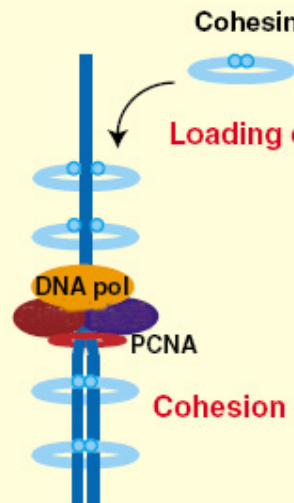
Metaphase

Sister chromatid separation



Anaphase

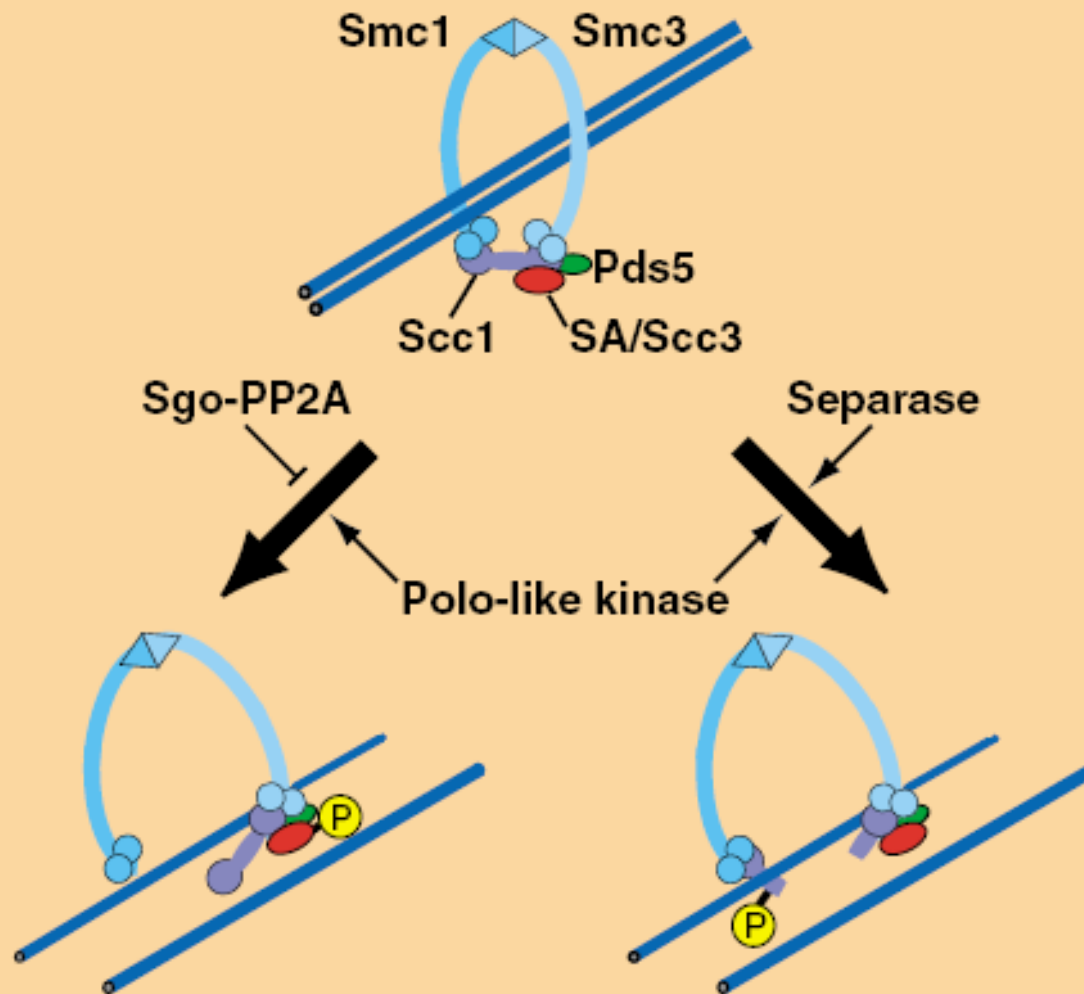
Loading of cohesin

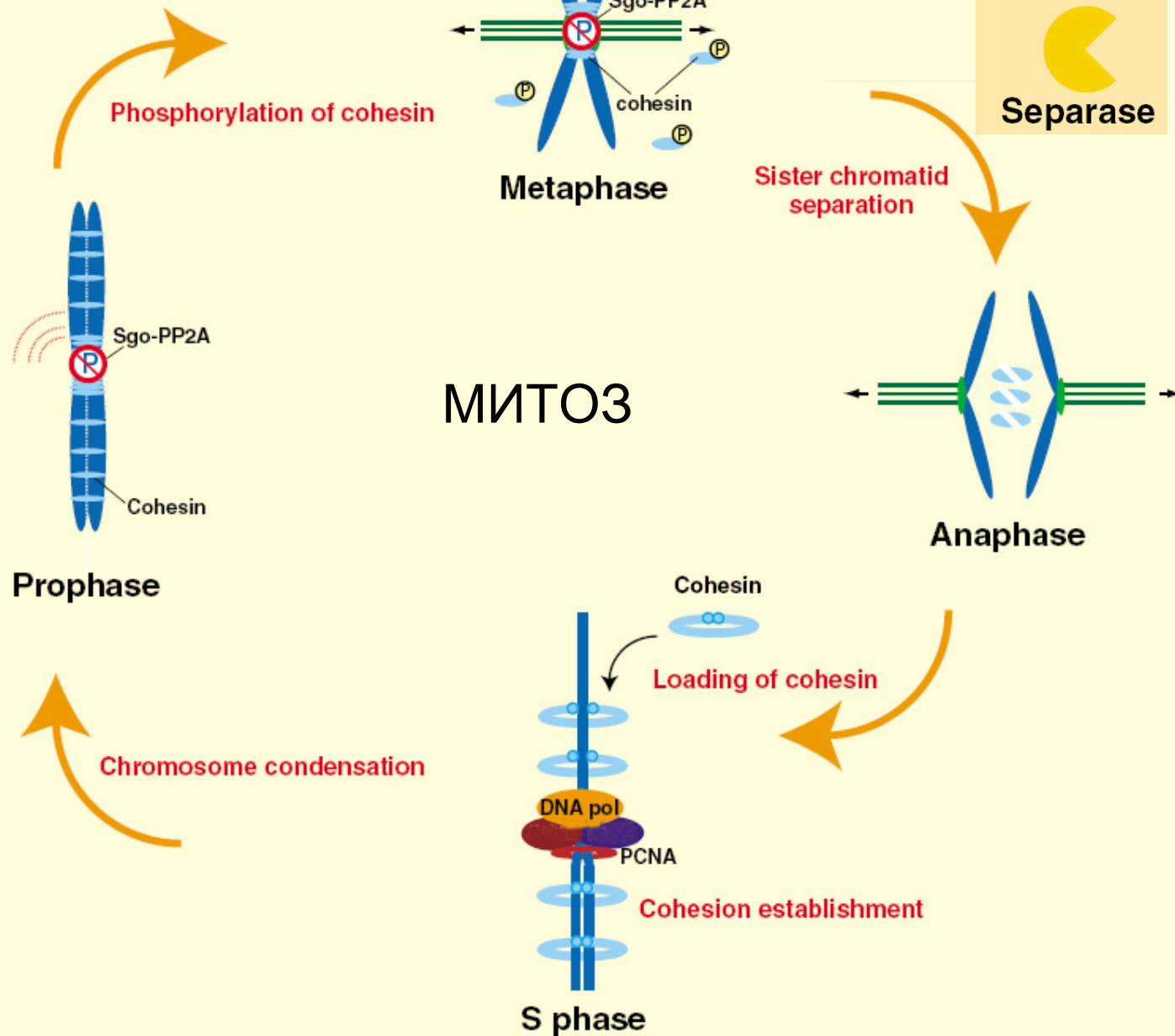


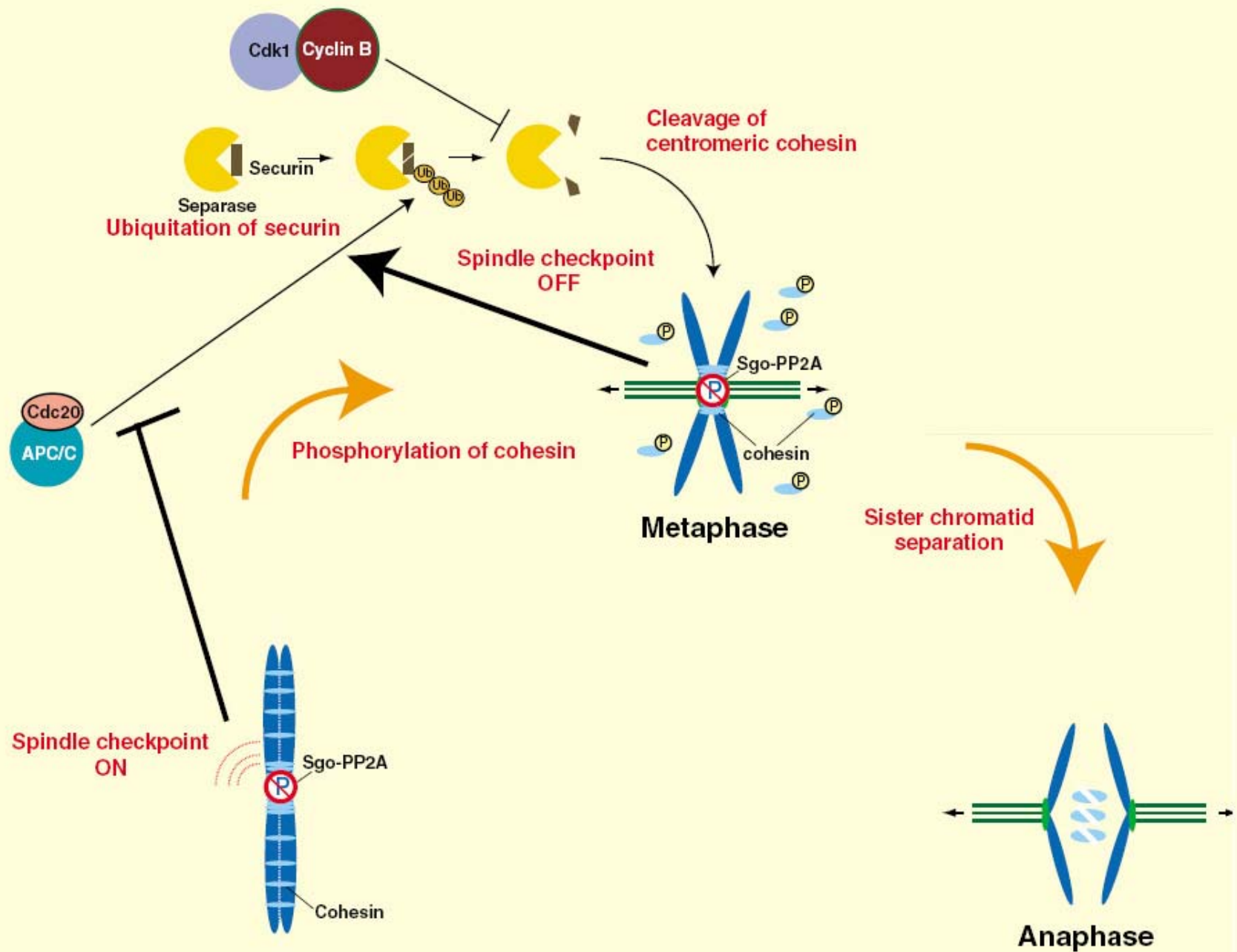
S phase

MITO3

Dissociation of cohesin







Что нужно для работы центромеры?

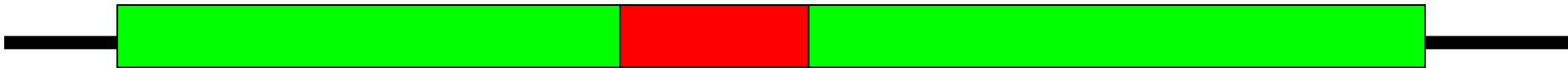
Нет консервативности последовательностей ДНК

КОНСЕРВАТИВНЫЕ БЕЛКИ!

Прицентромерный
хроматин

Прицентромерный
хроматин

Центромерный
хроматин



Белок CENP-A – центромерный вариант гистона H3

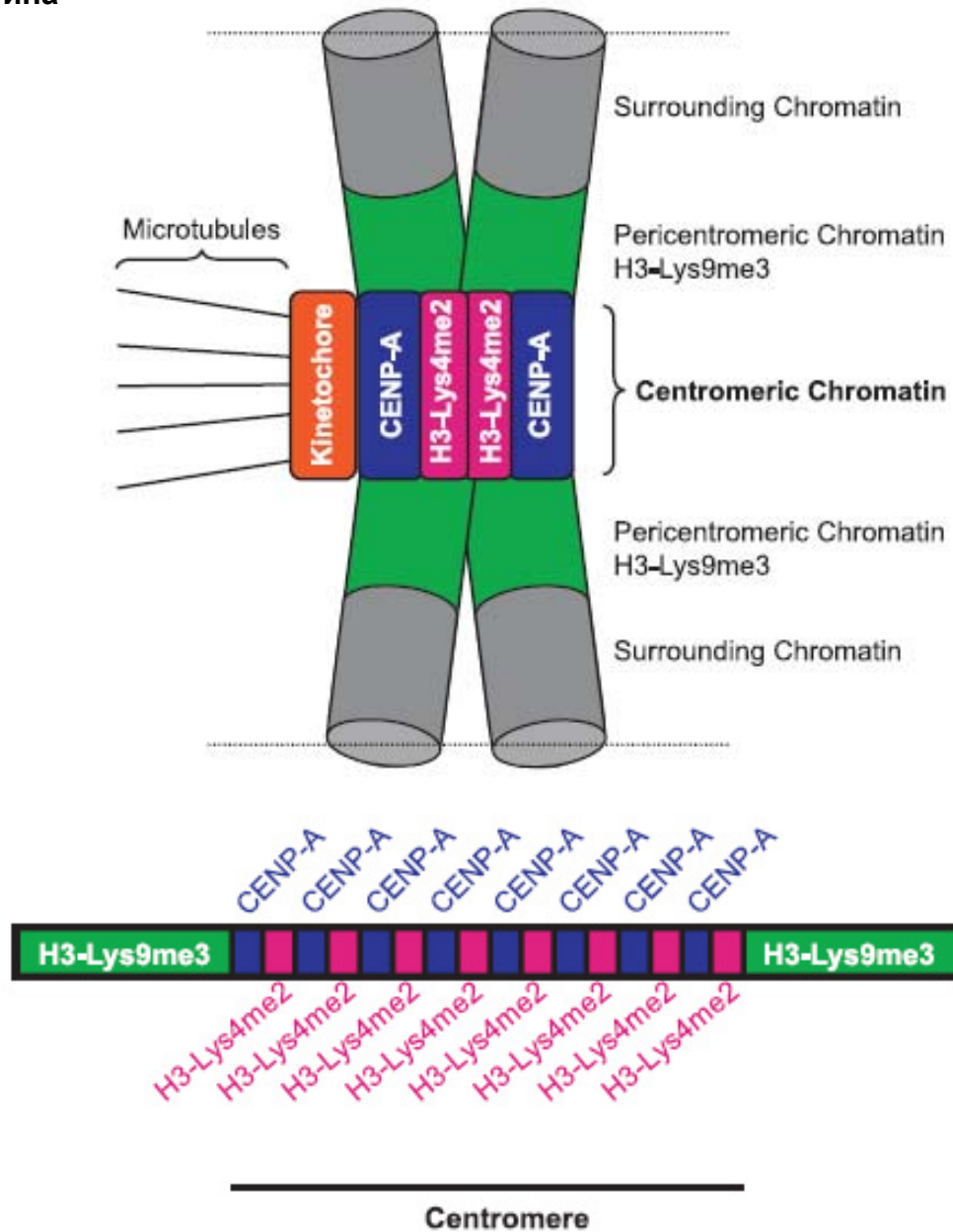
Белок CENP-A менее консервативен, чем основной набор гистонов



Hamster	MGPRR---KPRTPRRRRPSSSPVP--GPSRRSSSRPG-----KRRKFLWLKEI	40
Mouse	MGPRR---KPQTPRRRRPSSSPAP--GPSRQSSSVGSQ-TLRRRQKFMWLKEI	45
Human	MGPRRRSRKPEAPRRRSPSPTPTPGPSRRGPSLGASSHQHSRRRQGWLKEI	51
Hamster	KKLQRSTDLLLRKLPPFSRVVREICGKFTRGVDLCWQAQALLALQEAAEAFL	91
Mouse	KTLLQKSTDLLFRKKPFMSVVREICEKFSRGVDFWWQAQALLALQEAAEAFL	96
Human	RKLQKSTHLLIRKLPPFSRLAREICVKFTRGVDFNWWQAQALLALQEAAEAFL	102
Hamster	VHLFEDAYLLTLHAGRVTIFPKDIQLTRRIRGIEGGLG	129
Mouse	IHLFEDAYLLSLHAGRVTLFPKDIQLTRRIRGFEGGLP	134
Human	VHLFEDAYLLTLHAGRVTLFPKDVQLARRIRGLEEGLG	140

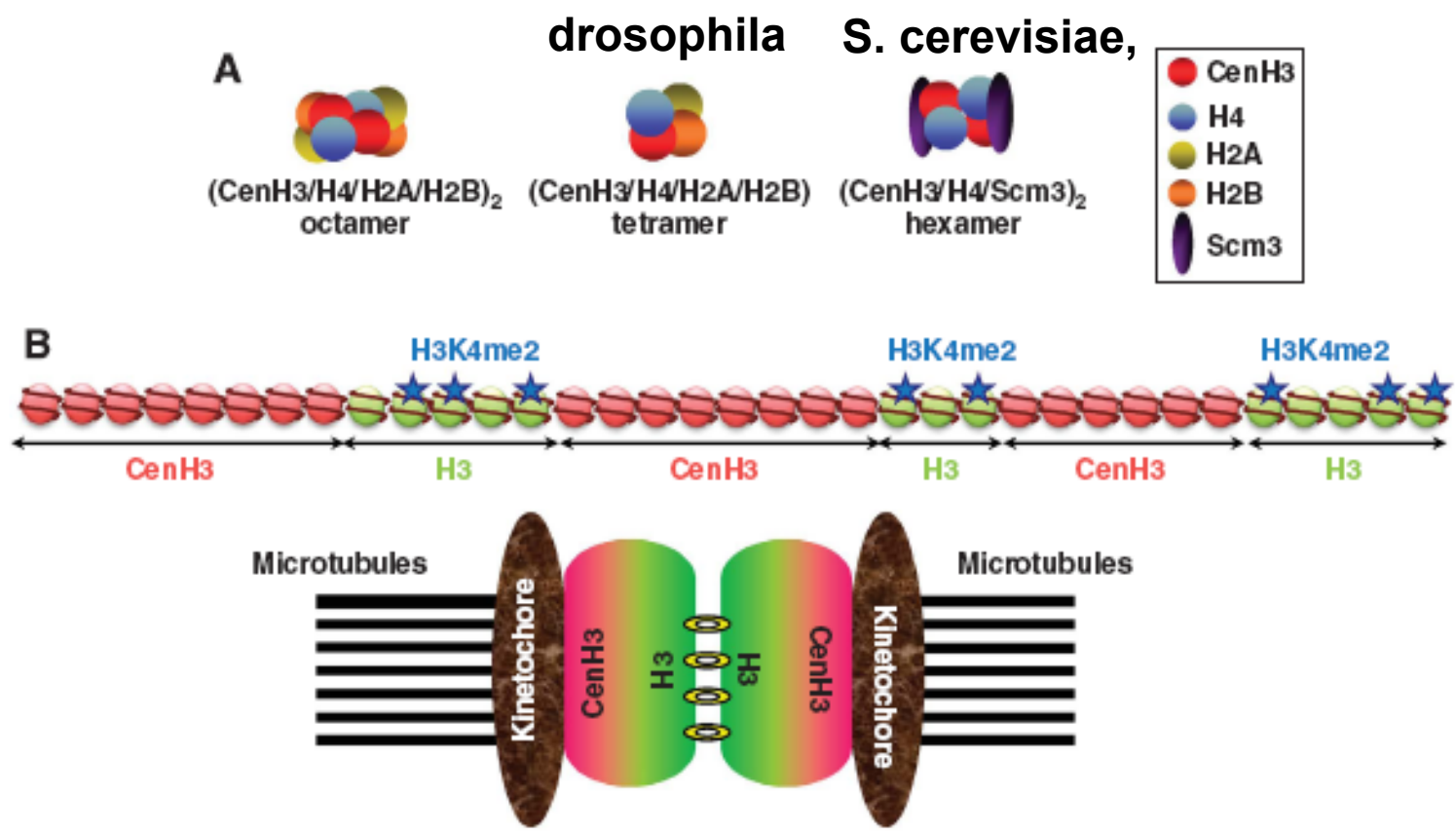


Для того, чтобы сформировалась центромера, в хромосоме периодически повторяются участки с разными свойствами хроматина

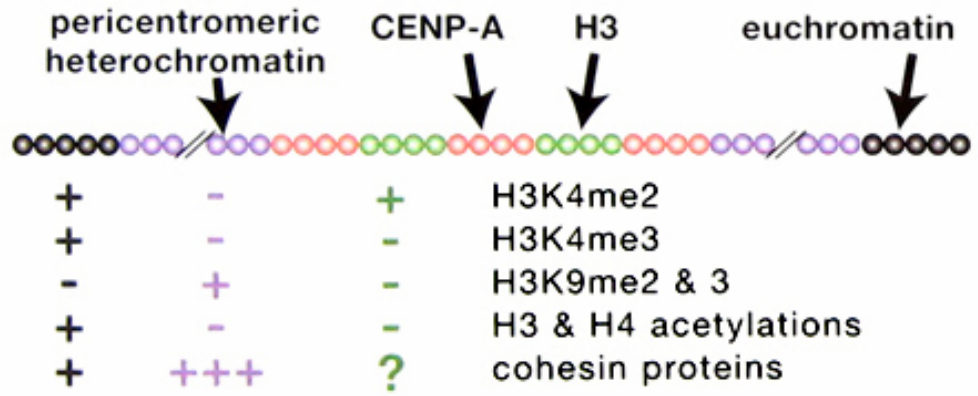


Vos et al., 2006

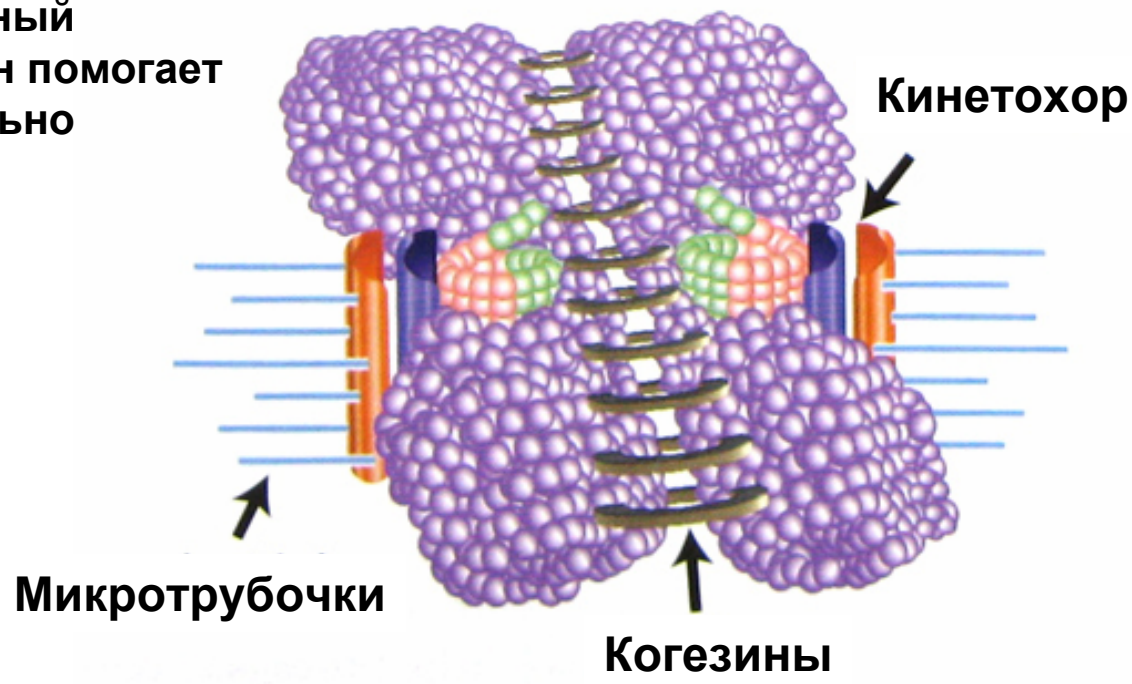
The role of chromatin on the regulation of centromere identity and function
M Torras-Llort *et al*



Для того, чтобы сформировалась центромера, в хромосоме периодически повторяются участки с разными свойствами хроматина



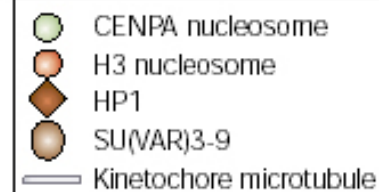
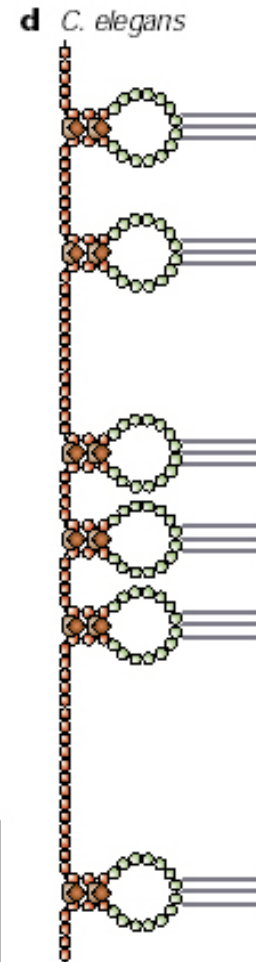
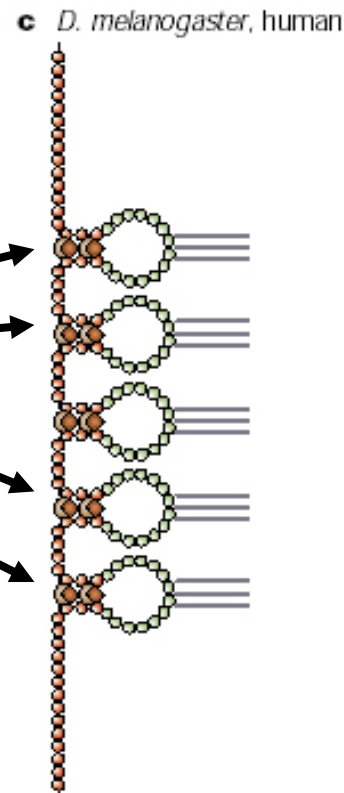
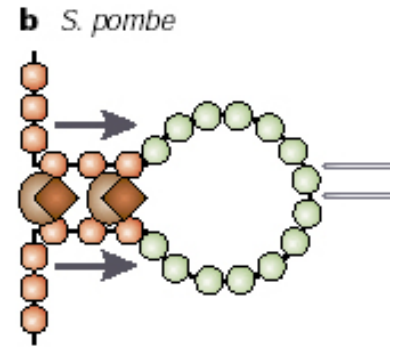
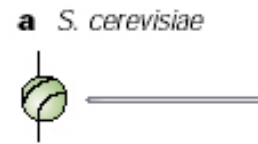
Прицентромерный гетерохроматин помогает все это правильно упаковать



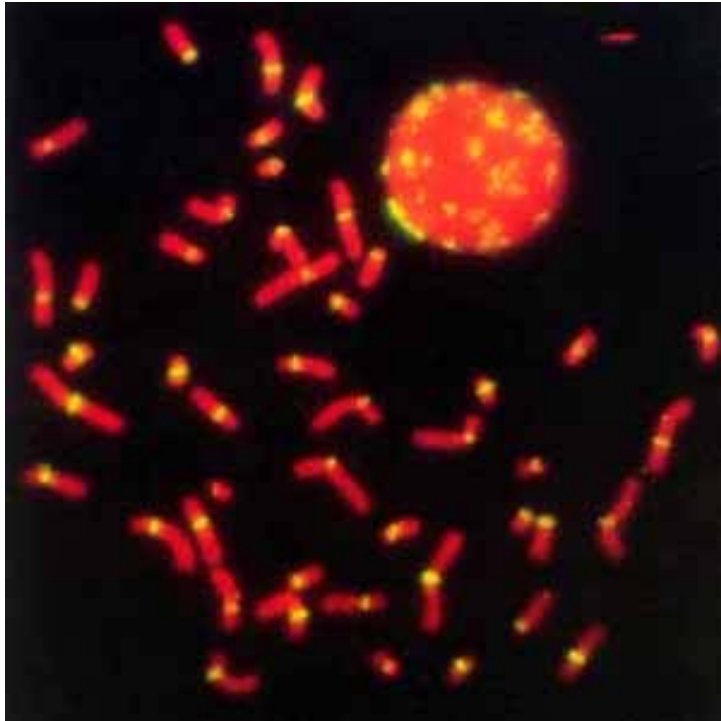
Одна из современных моделей организации центромеры

Хорошо объясняет, зачем нужно чередование свойств хроматина

Прицентромерный гетерохроматин помогает все это правильно упаковать



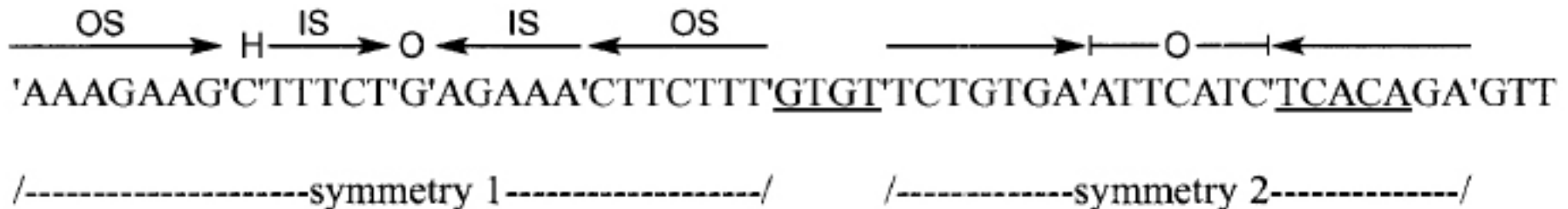
Центромеры в хромосомах человека



альфа-сателлит
~171 п.н.

консервативная часть - 54 п.н.
вариабельная часть - ~117 п.н.

Primate alpha satellite DNA



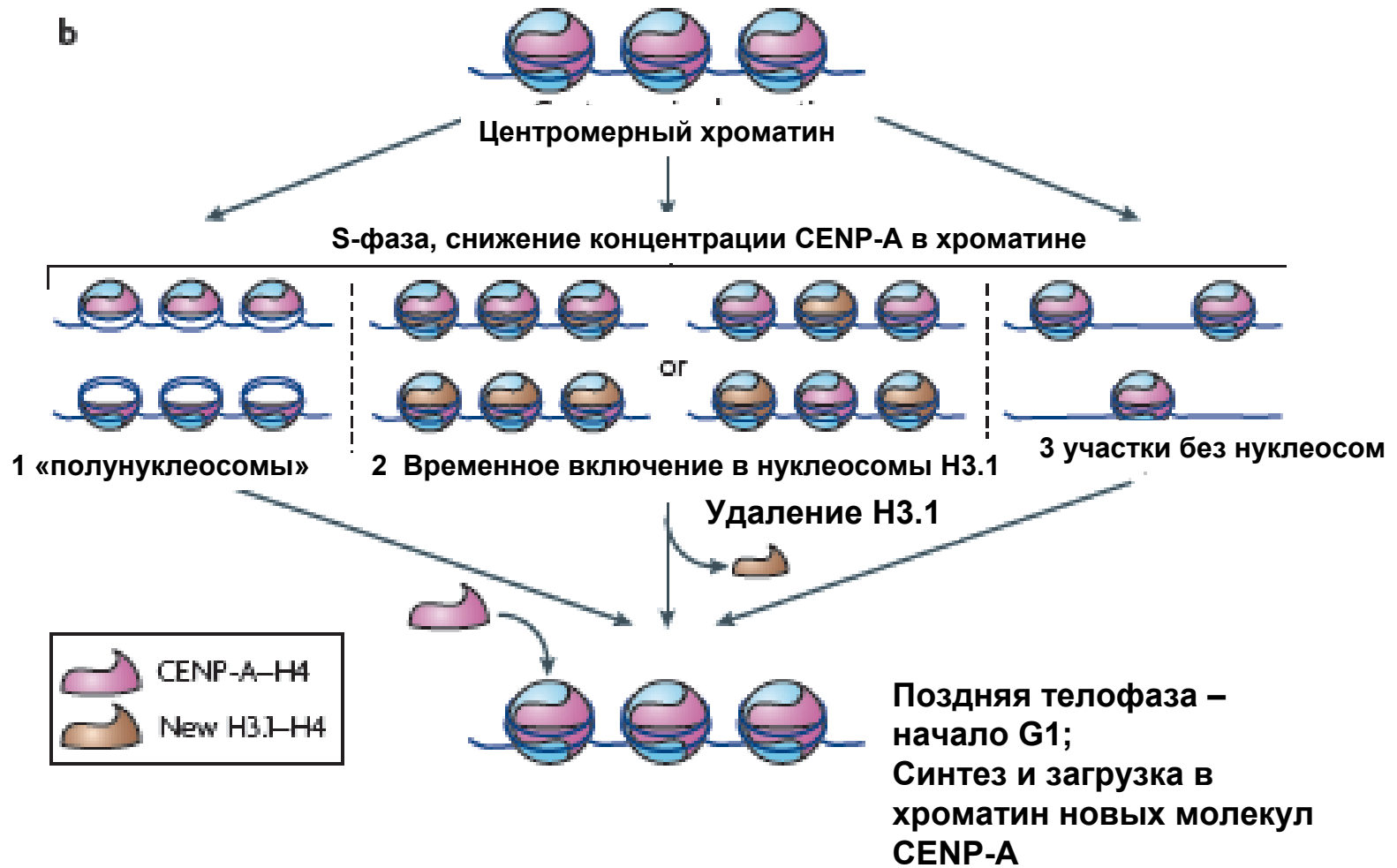
Эпигенетическое поддержание центромеры

**Воспроизведение
центромерного хроматина
во время репликации**

**Центромерный хроматин реплицируется рано в
S-фазе.**

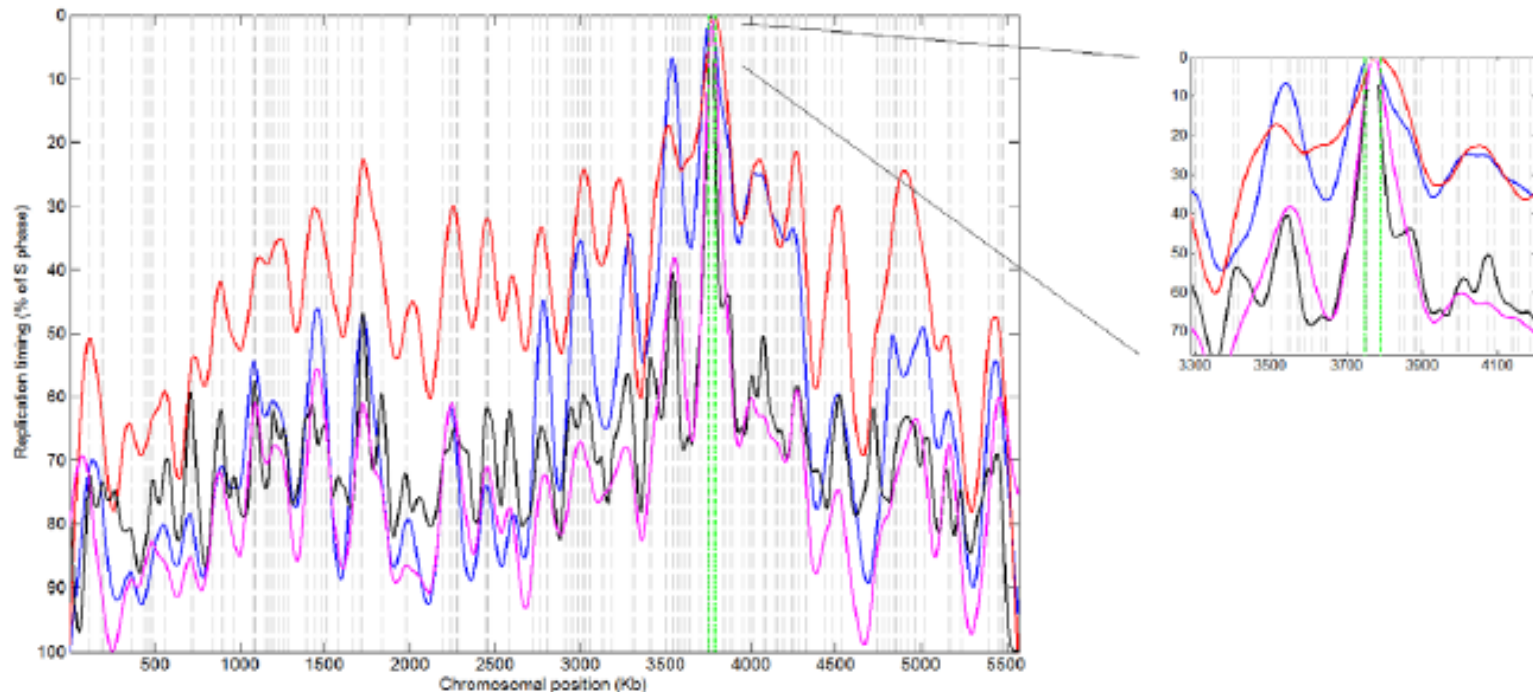
**Расположение в глубине поздно
реплицирующегося прицентромерного
гетерохроматина помогает
поддерживать локализацию
центромеры, не дает «расползаться»
центромерным гистонам при репликации**

b



Профиль репликации хромосомы 1 дрожжей *S. pombe*

Центромерная ДНК реплицируется первой



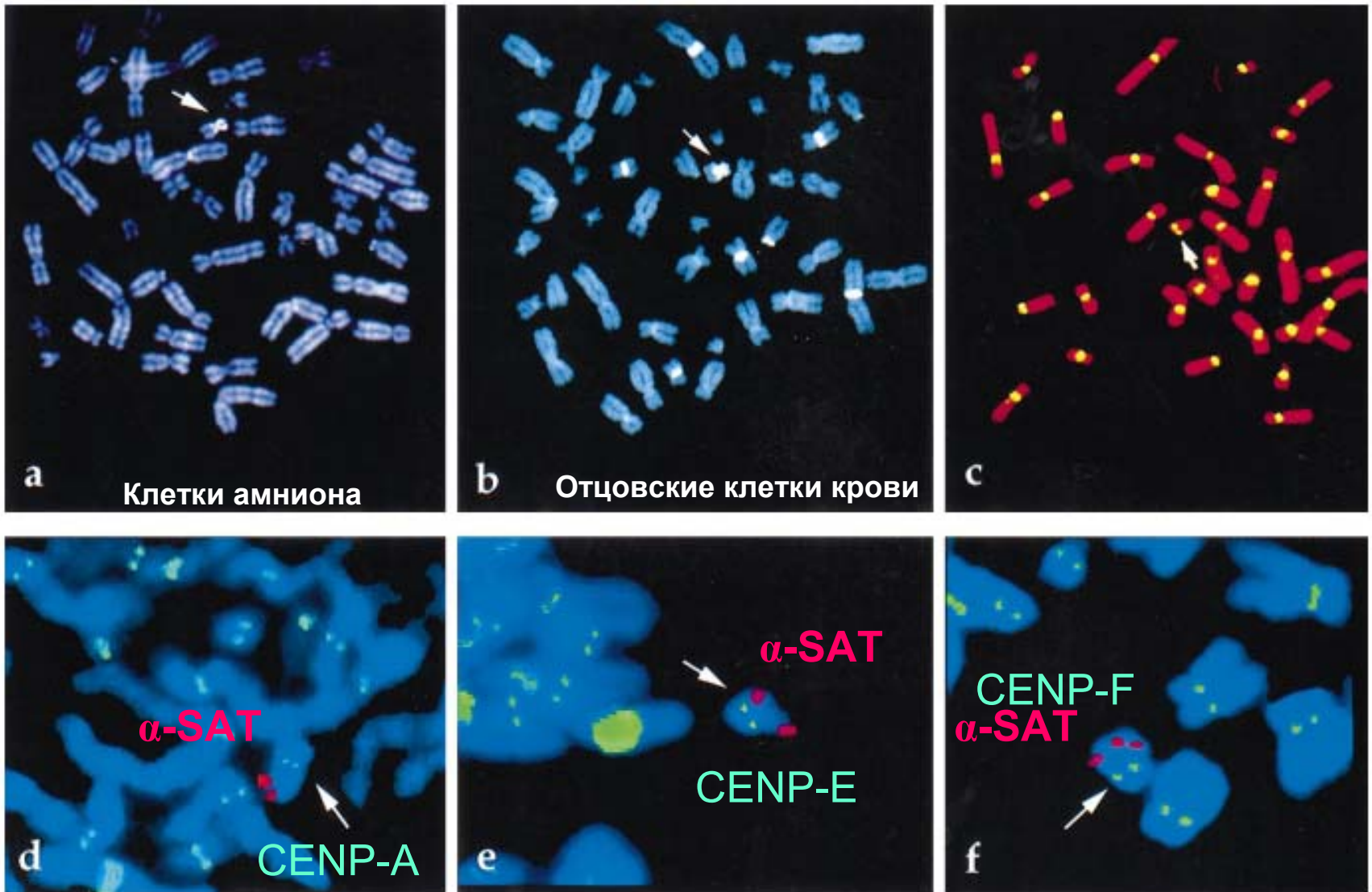
Replication timing profile of *S. pombe* chromosome 1. Replication timing microarray data for chromosome 1 from [35] (blue), (red- time course experiment; black- HU experiment), and [36] (magenta) show early replication at CEN1. Green lines: centromere location; dashed grey lines: ORC binding sites that also incorporated BrdU [38].

Функции прицентромерного гетерохроматина для поддержания центромеры:

- **Структурная роль: гетерохроматин удлиняет зону контакта между сестринскими хроматидами в метафазе**
- **Роль в поддержании центромеры как независимого хроматинового домена.**
- **Сама центромера состоит из повторенных последовательностей, и ее надо защитить от рекомбинации?**

**Неоцентромеры –ключ к пониманию эволюции и устройства
центромер**

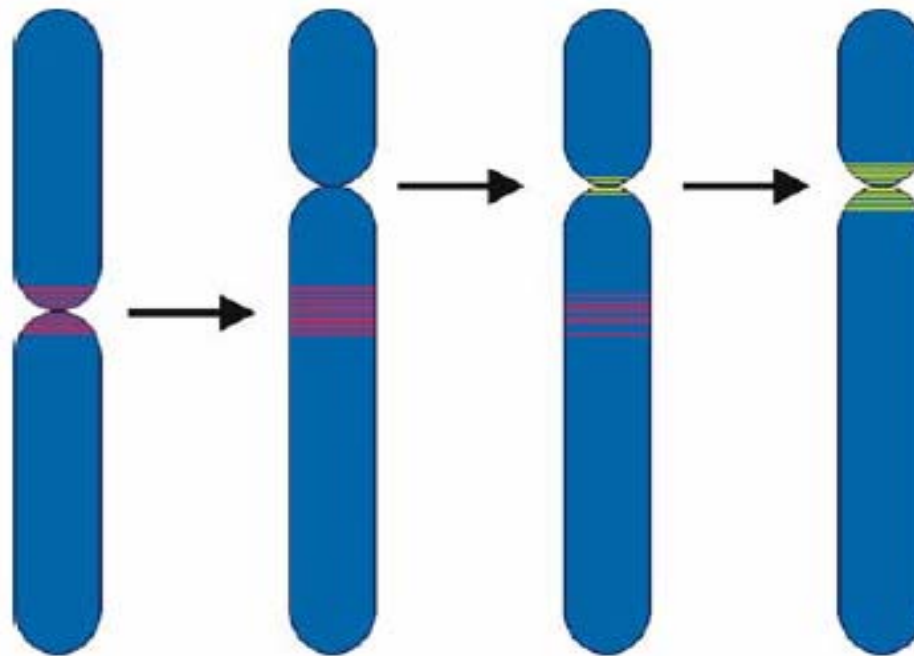
Пример возникновения и наследования от отца к сыну неоцентромеры в Y хромосоме человека



α -SAT – сателлит, который продолжает картироваться там, где раньше была центромера в Y хромосоме. Все белки, участвующие в формировании кинетохора, локализуются в другом месте, которое служит новой центромерой.

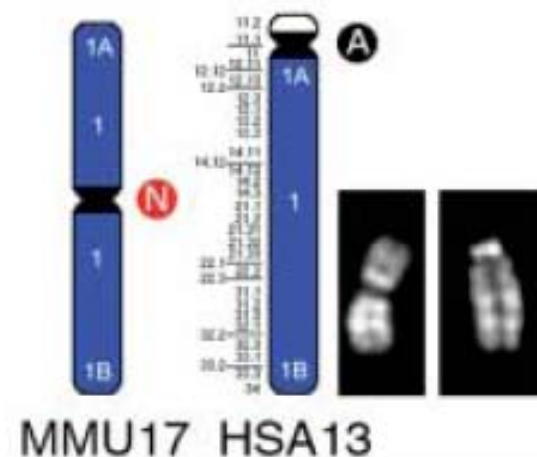
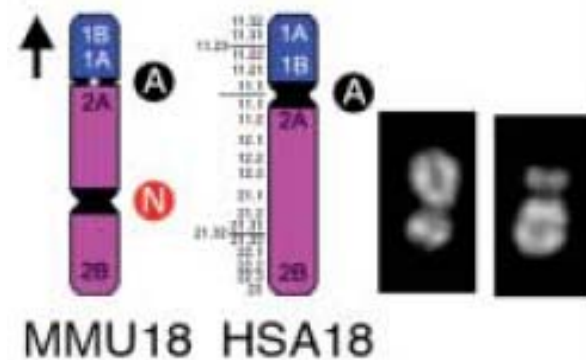
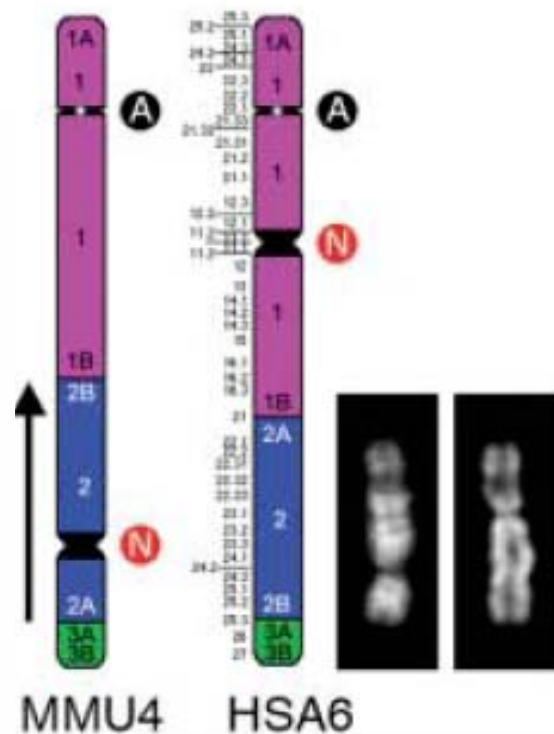
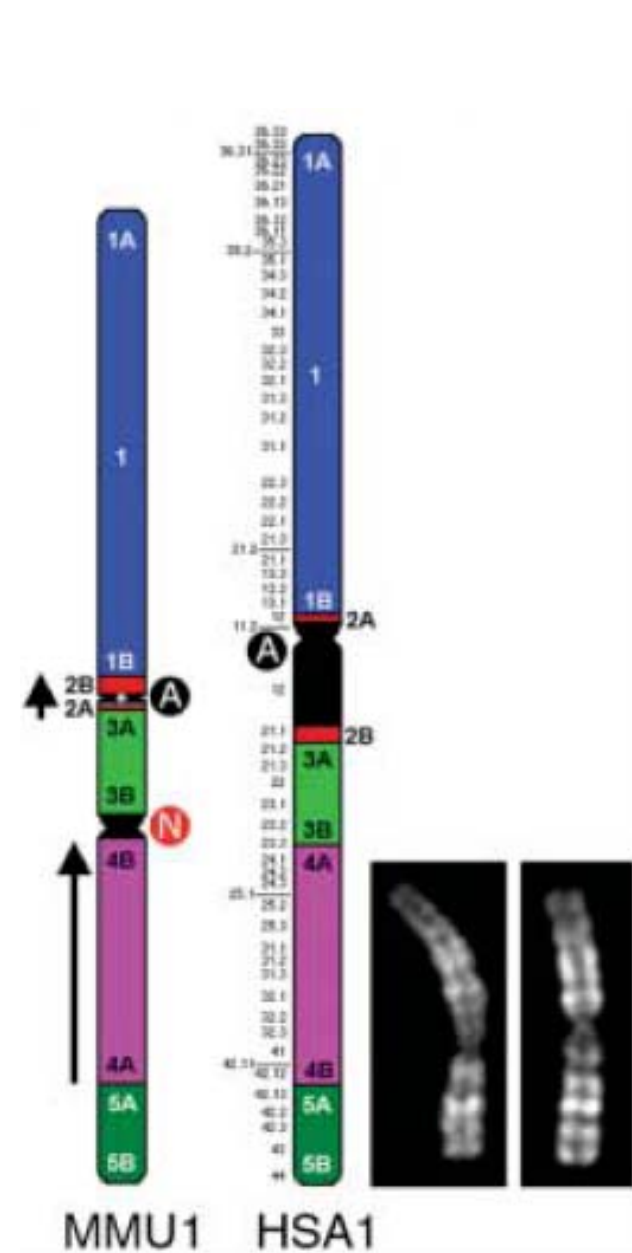
Неоцентромеры – ключ к пониманию эволюции и устройства центромер

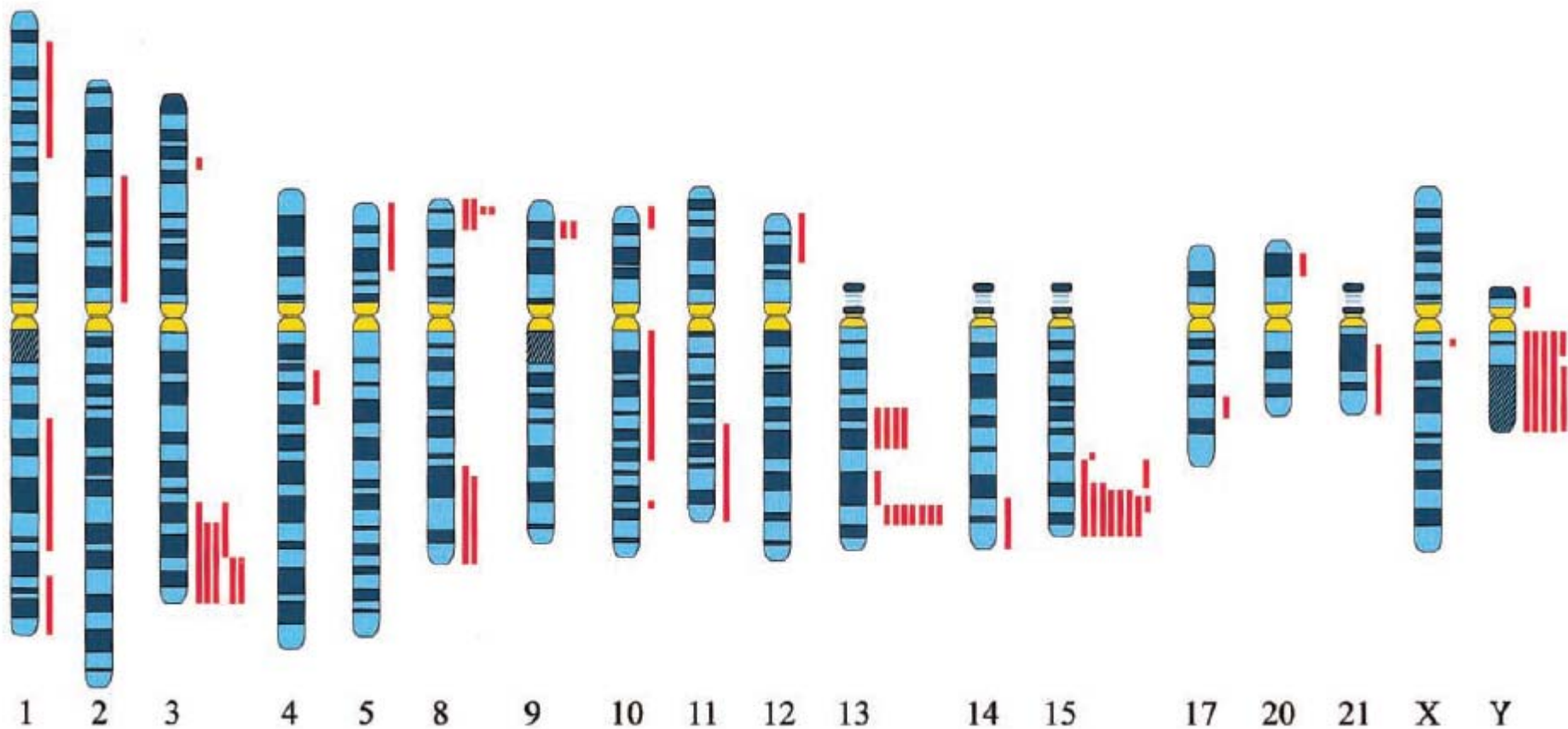
Модель эволюции центромер



Случайное событие – центромера изменила положение на хромосоме. Последовательность ДНК в хромосоме еще не изменилась, но комплекс белков собирается и эпигенетически наследуется в новом положении

Постепенное накопление повторов (механизм не понятен) вокруг новой центромеры. Постепенная элиминация повторов на месте старой (снятие запрета на рекомбинацию?)





1. Неоцентромеры возникают случайно,
а последующий отбор оставляет лишь некоторые?
2. Есть «горячие точки» возникновения неоцентромер?

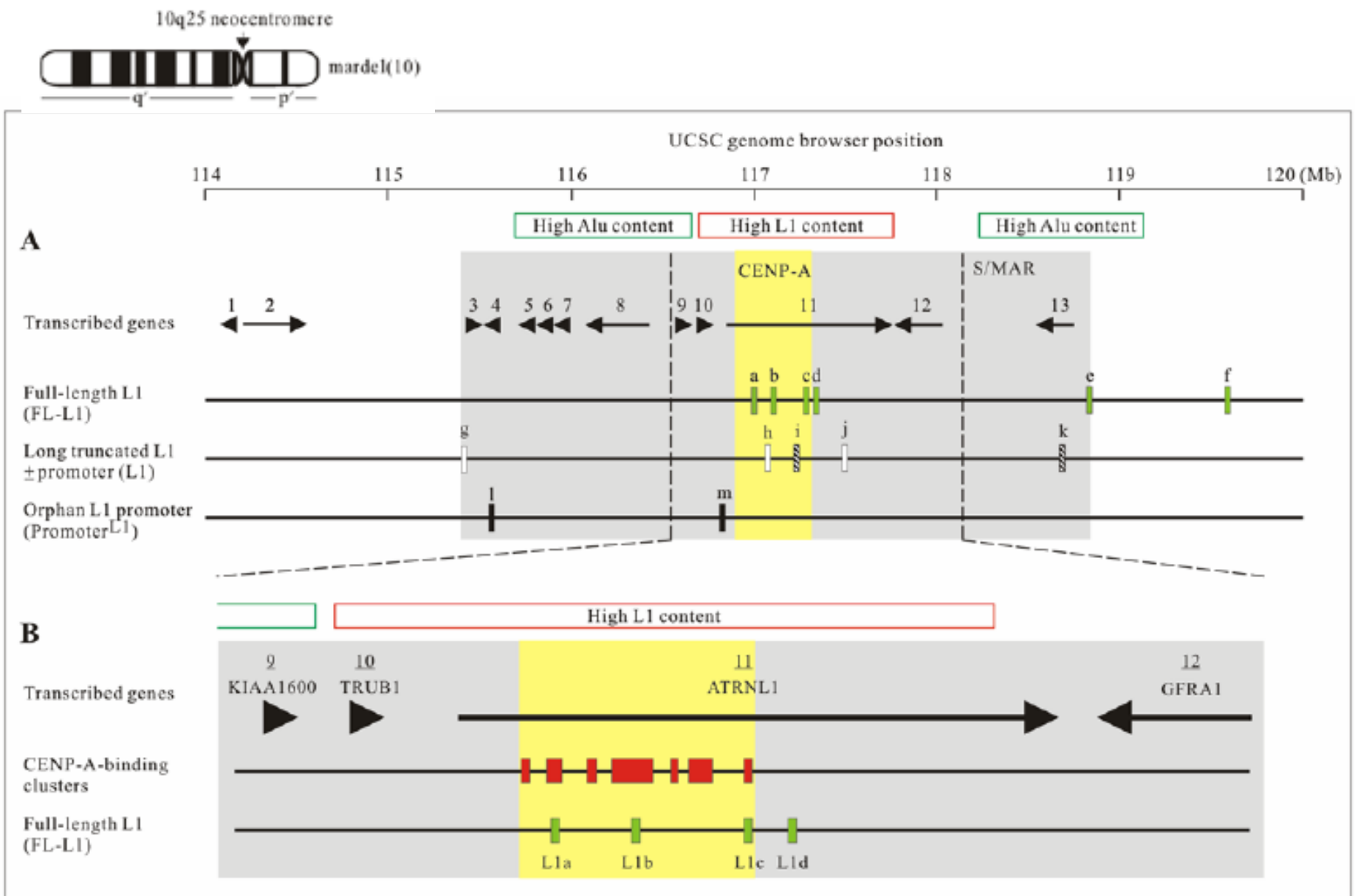
LINE Retrotransposon RNA Is an Essential Structural and Functional Epigenetic Component of a Core Neocentromeric Chromatin

Anderly C. Chueh[‡], Emma L. Northrop, Kate H. Brettingham-Moore, K. H. Andy Choo*, Lee H. Wong*

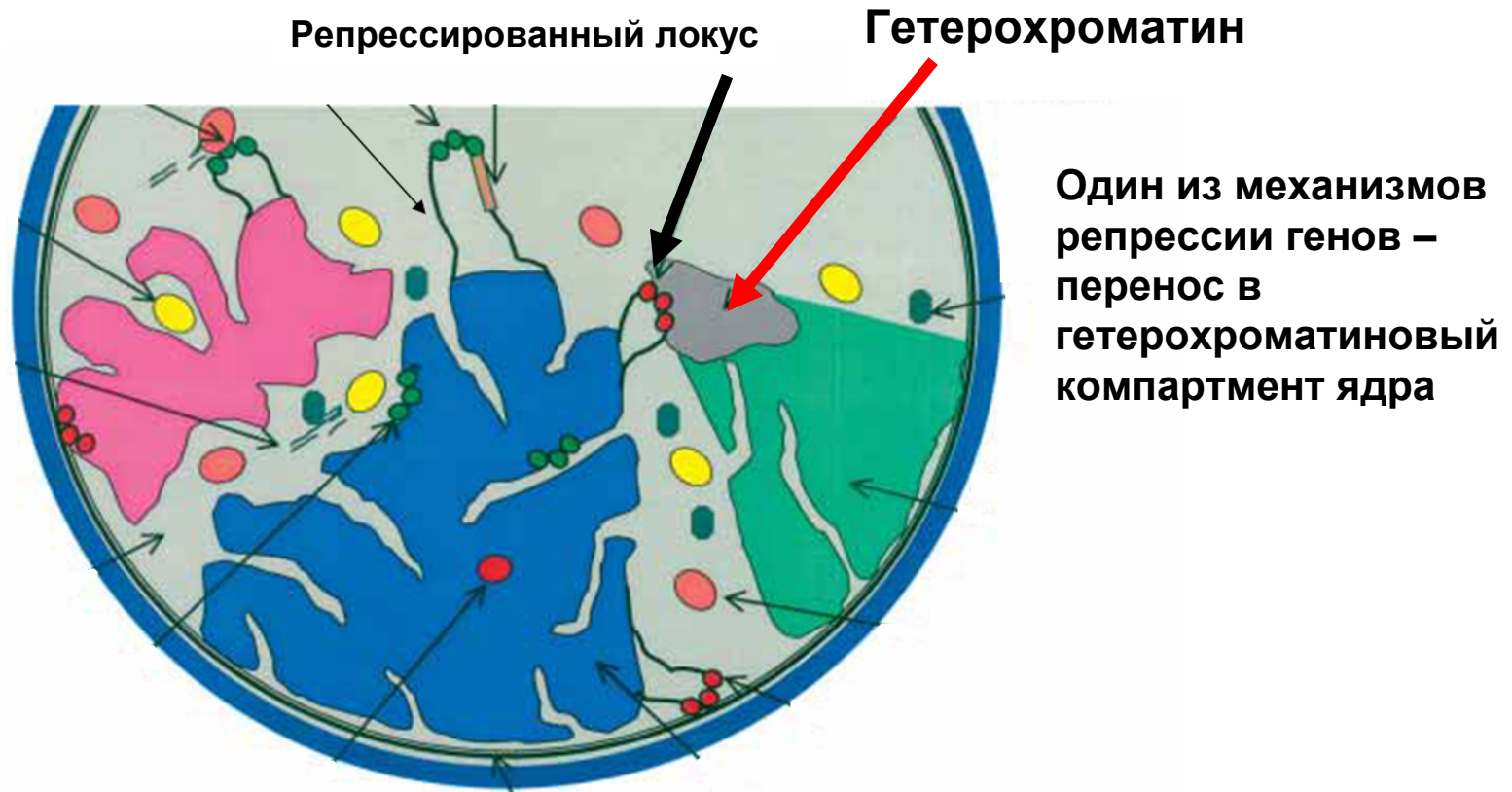
Chromosome and Chromatin Research Laboratory, Murdoch Children's Research Institute, Melbourne University Department of Paediatrics, Royal Children's Hospital, Parkville, Victoria, Australia

Abstract

We have previously identified and characterized the phenomenon of ectopic human centromeres, known as neocentromeres. Human neocentromeres form epigenetically at euchromatic chromosomal sites and are structurally and functionally similar to normal human centromeres. Recent studies have indicated that neocentromere formation provides a major mechanism for centromere repositioning, karyotype evolution, and speciation. Using a marker chromosome mardel(10) containing a neocentromere formed at the normal chromosomal 10q25 region, we have previously mapped a 330-kb CENP-A-binding domain and described an increased prevalence of L1 retrotransposons in the underlying DNA sequences of the CENP-A-binding clusters. Here, we investigated the potential role of the L1 retrotransposons in the regulation of neocentromere activity. Determination of the transcriptional activity of a panel of full-length L1s (FL-L1s) across a 6-Mb region spanning the 10q25 neocentromere chromatin identified one of the FL-L1 retrotransposons, designated FL-L1b and residing centrally within the CENP-A-binding clusters, to be transcriptionally active. We demonstrated the direct incorporation of the FL-L1b RNA transcripts into the CENP-A-associated chromatin. RNAi-mediated knockdown of the FL-L1b RNA transcripts led to a reduction in CENP-A binding and an impaired mitotic function of the 10q25 neocentromere. These results indicate that LINE retrotransposon RNA is a previously undescribed essential structural and functional component of the neocentromeric chromatin and that retrotransposable elements may serve as a critical epigenetic determinant in the chromatin remodelling events leading to neocentromere formation.



Еще одна роль гетерохроматина – участие в пространственной организации ядра



Каждая хромосомная территория устроена сложно.
гетерохроматин помогает их правильной укладке?

Фокусы поздней репликации соответствуют гетерохроматину. Мы знаем, что поздняя репликация – механизм поддержать репрессированное состояние

Функции прицентромерного гетерохроматина:

- Гетерохроматиновые районы в ядре сливаются между собой, образуя ядерный компартмент, который участвует в репрессии некоторых генов**

Функции конститутивного гетерохроматина:

- **Поддержание центромеры**
- **Поддержание теломеры**
- **Защита повторов от рекомбинации**
- **Гетерохроматиновые районы в ядре сливаются между собой, образуя ядерный компартмент, который участвует в репрессии некоторых генов**
- **Инактивация транскрипции повторенных последовательностей (потенциальная опасность)**

**Регуляция экспрессии генов?
Депо белков?**

**Все, что не является конститутивным
гетерохроматином, можно традиционно
назвать «эухроматин», но его свойства
очень неоднородны**

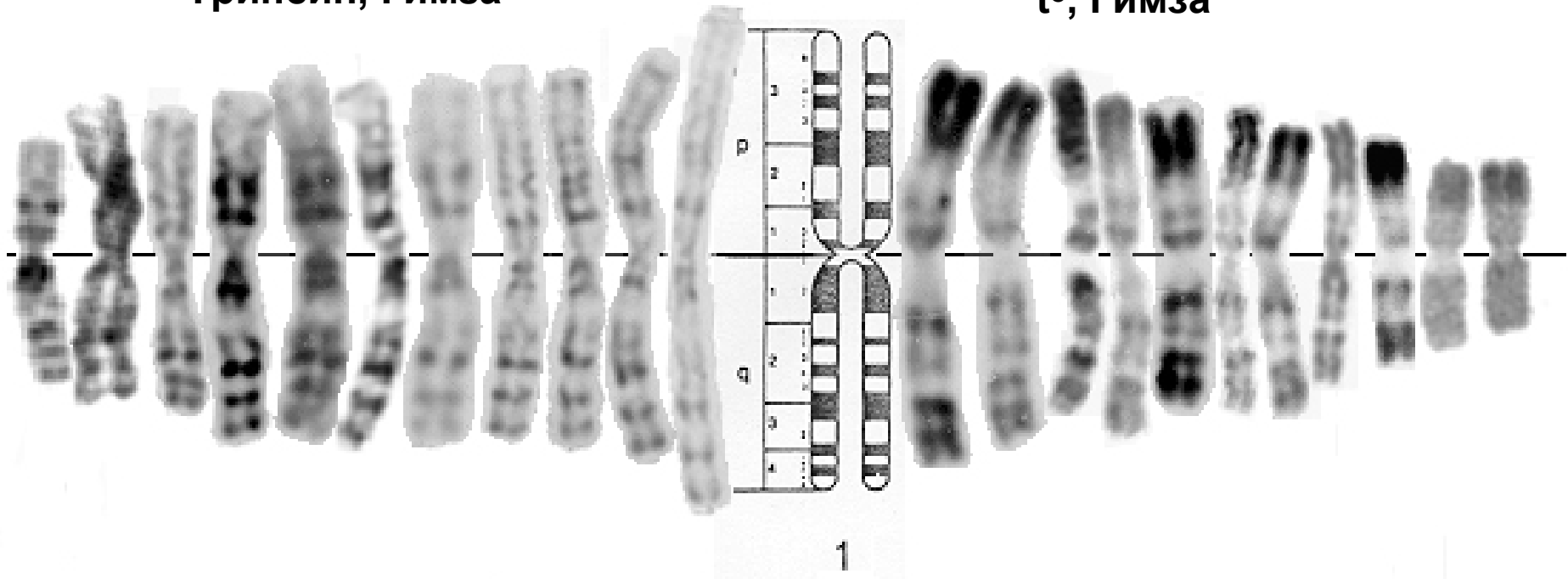
Homo sapiens

G-окраска

Трипсин, Гимза

R-окраска

t^o, Гимза



Районы «открытого» и «закрытого» хроматина на примере локусов генов альфа-глобинов и бета-глобинов человека.

α - Глобиновый кластер локализован в R-диске, регулируется индивидуально (независимо от соседних генов).

β - глобиновый кластер локализован в G-диске, недалеко от теломерного гетерохроматина.

При активации необходима реорганизация хроматина на уровне протяженного участка хромосомы, изменение времени репликации, модификаций гистонов и т.д.

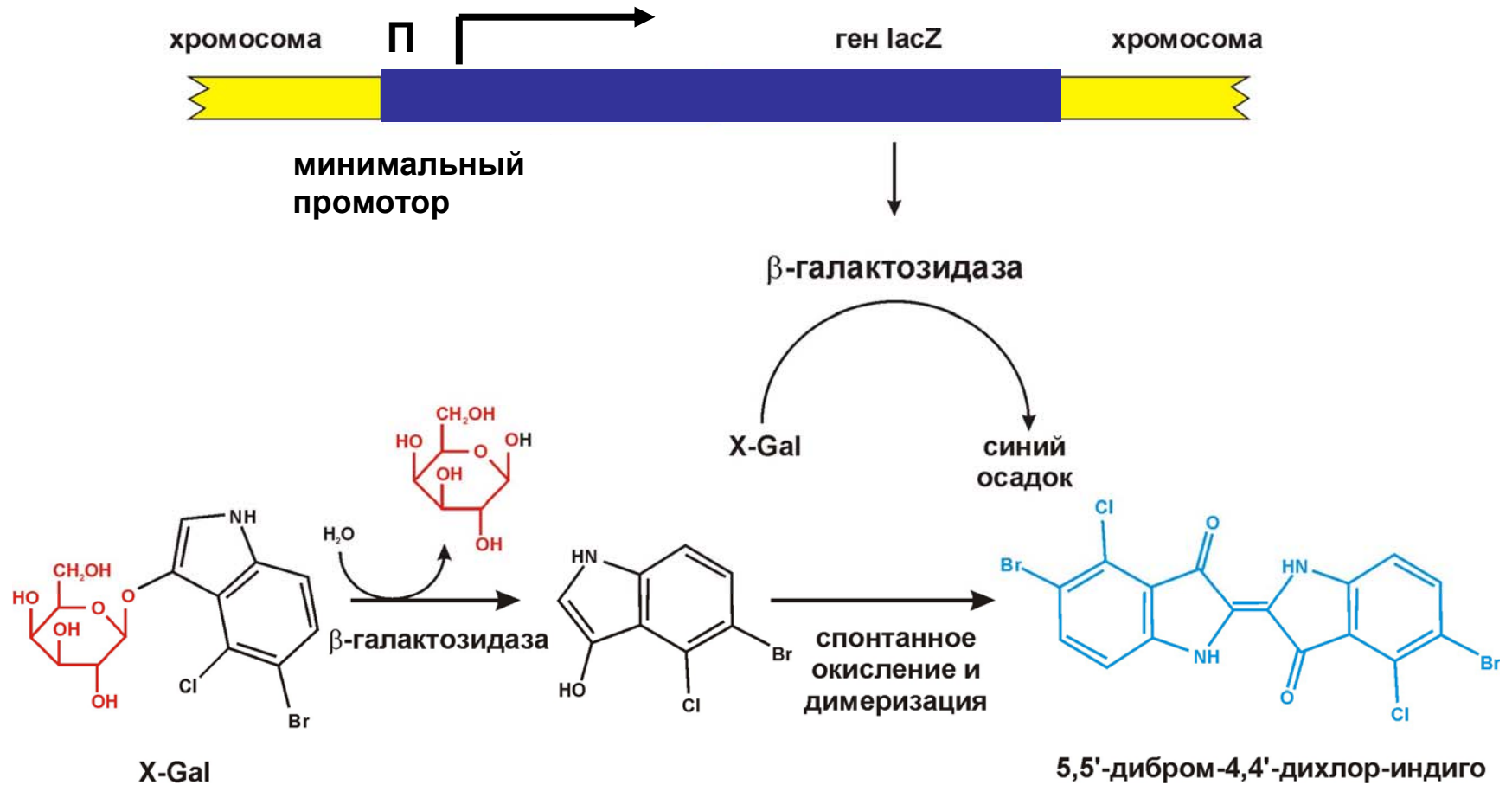
	α-кластер	β-кластер
локализация	11p, R-диск	16p, G-диск, недалеко от теломеры
Плотность генов в окрестностях	высокая	низкая
Процент GC	54%	39,5%
хроматин	открытый	Закрытый -> открытый
Способ регуляции	энхансер	LCR
Время репликации в S-фазе	рано	поздно -> рано
MARs	Не обнаружены	Множественные

Неоднородность эухроматина по способности влиять на экспрессию репортерного гена.

Если трансген не содержит собственных регуляторных элементов (энхансеров, инсуляторов), его можно использовать в качестве репортера для исследований потенциала хроматина и регуляторных элементов влиять на экспрессию генов.

Используют репортерный ген (LacZ, GFP) с минимальным промотором. Такой промотор не содержит дополнительных регуляторных элементов, обеспечивая слабую однородную экспрессию

Выявление экспрессии репортерного гена LacZ



Чтобы выявить экспрессию галактозидазы, исследуемые объекты (эмбрионы, личинки дрозофилы и пр.) помещают в раствор, содержащий X-Gal.

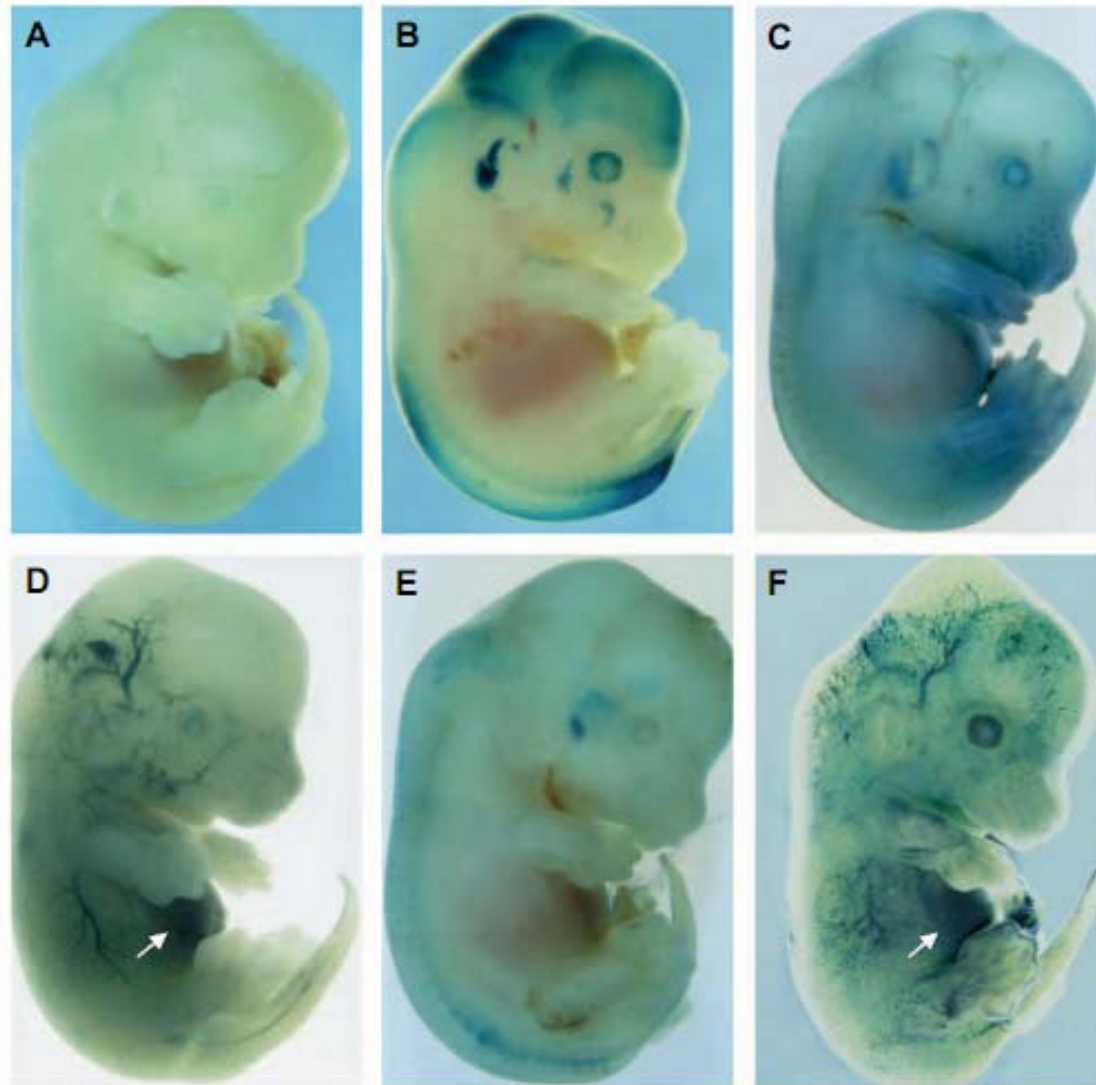
Продукт синего цвета

Неоднородность эухроматина по способности влиять на экспрессию репортерного гена.

Возможные эффекты встройки:

- Место встройки не влияет на уровень экспрессии (экспрессия на том же уровне, как в плазмиде или в конструкции, ограниченной инсуляторами)
- Ослабление экспрессии вплоть до полного отсутствия (попал в гетерохроматин или в соседство с локальным сайленсером)
- Усиление экспрессии
- Специфическая экспрессия (например, тканеспецифичная)

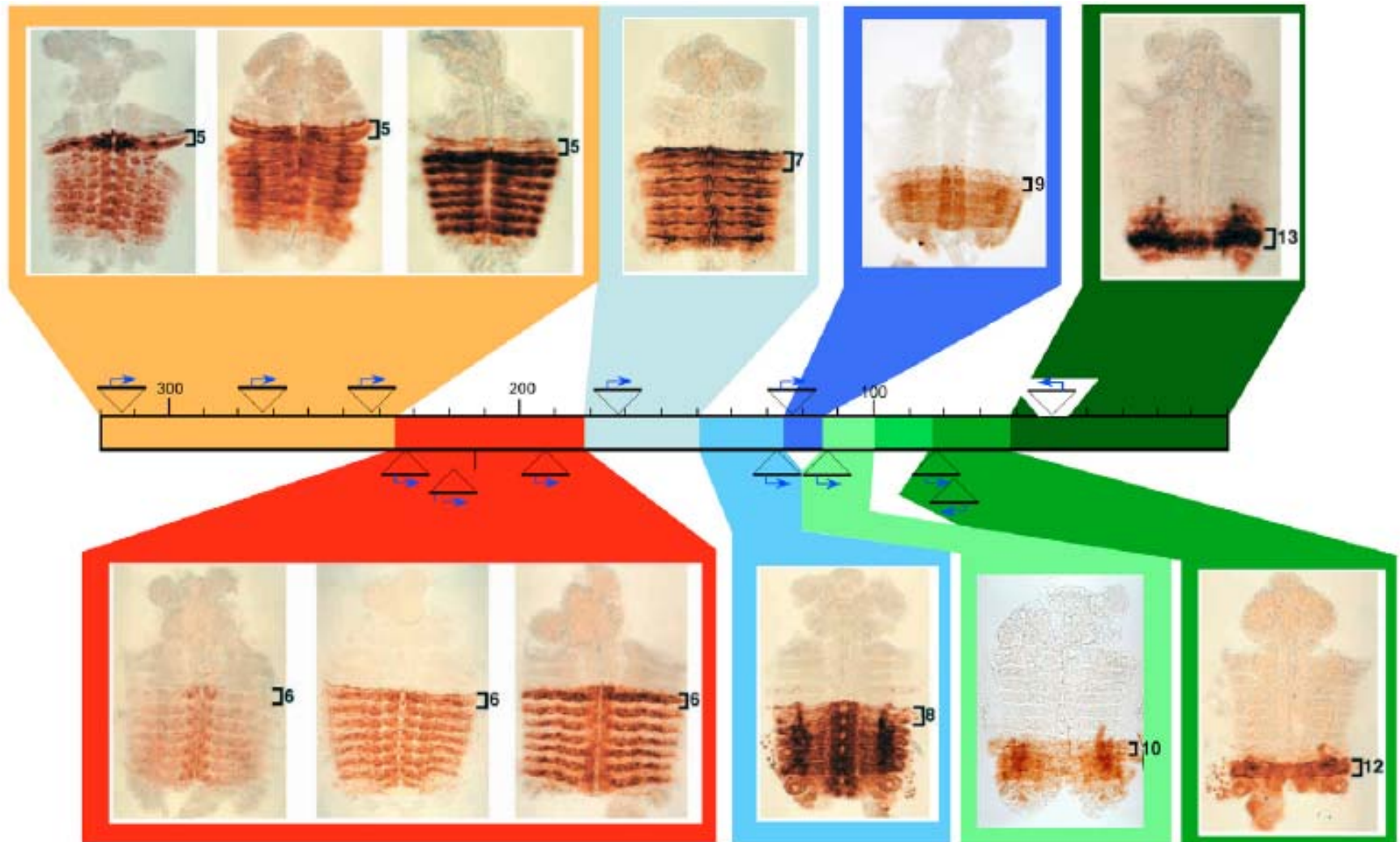
Пример



Выявление экспрессии LacZ, встроенного около различных регуляторных элементов LCR β -глобинового локуса.

Пример

Выявление экспрессии репортерных генов, встроенных в разные регуляторные зоны локуса ВХ-С дрозофилы.



Примеры активирующих транскрипцию эффектов, обусловленных состоянием хроматина

В локусах, где идет активная транскрипция, происходит замена H3 на его вариант H3.3.

Хроматин, содержащий H3.3 облегчает и усиливает транскрипцию. Такое состояние хроматина затем может эпигенетически наследоваться в клеточных поколениях.

Примеры активирующих транскрипцию эффектов, обусловленных состоянием хроматина

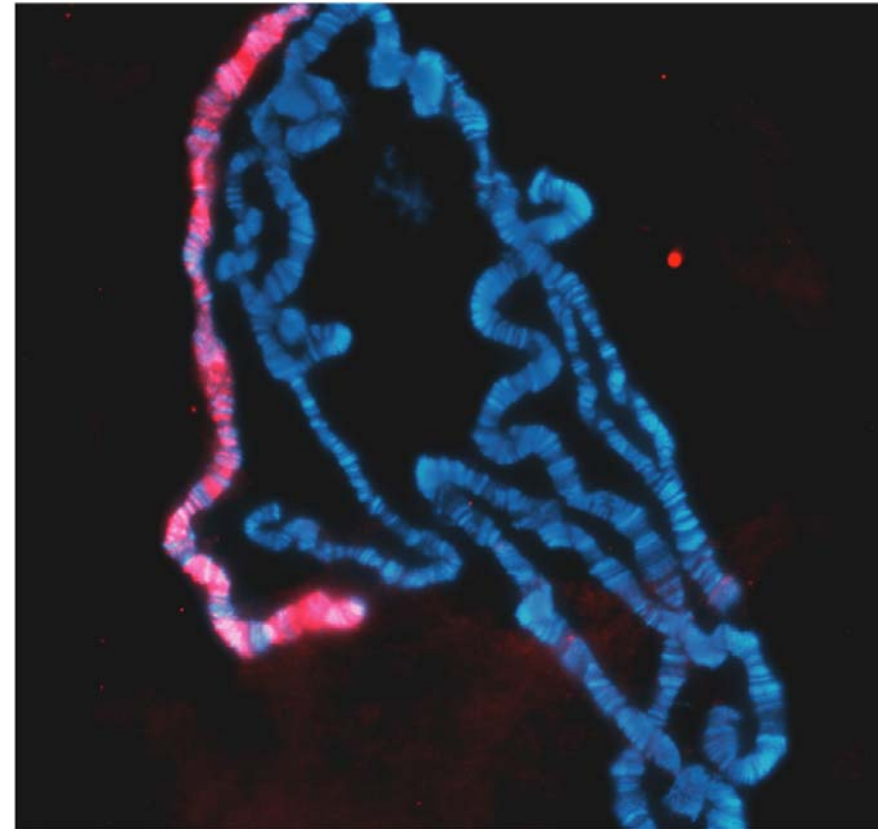
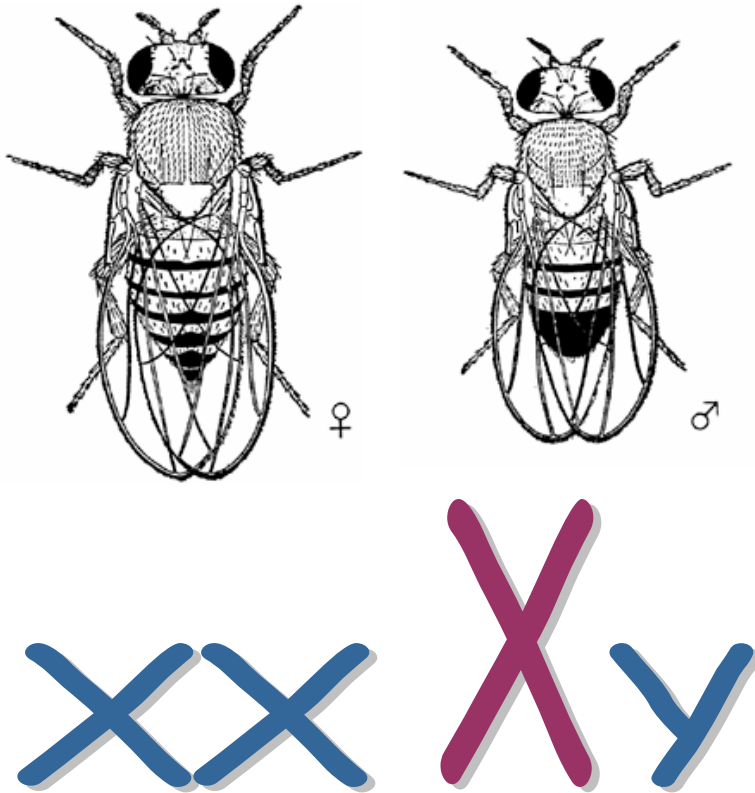
X-хромосома самцов дрозофилы претерпевает дозовую компенсацию. В этом участвует ацетилирование гистонов (AcH4K16).

Ацетилирование H4K16

Антагонист действию ISWI

Единственная известная модификация гистонов, приводящая к глобальной деконденсации хроматина

Dosage Compensation in *Drosophila*

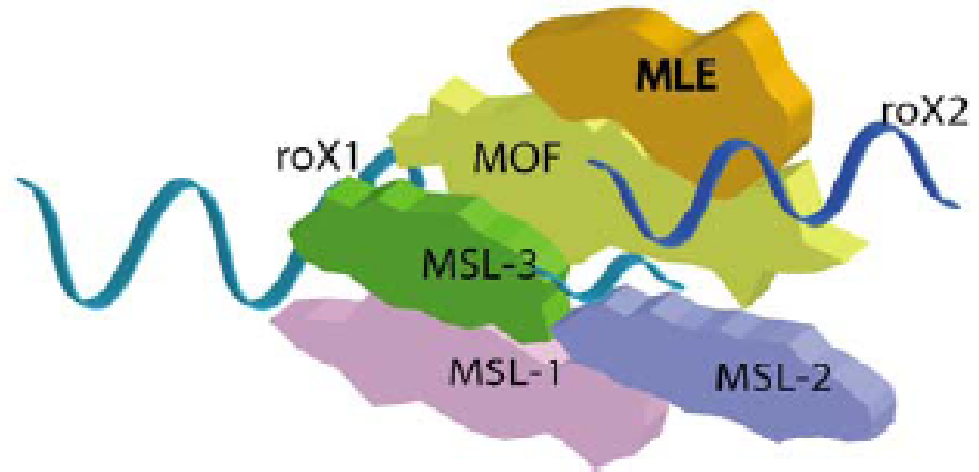


MSL complex

two-fold expression of genes on single male X

Male **S**pecific **L**ethal (**MSL**) complex:

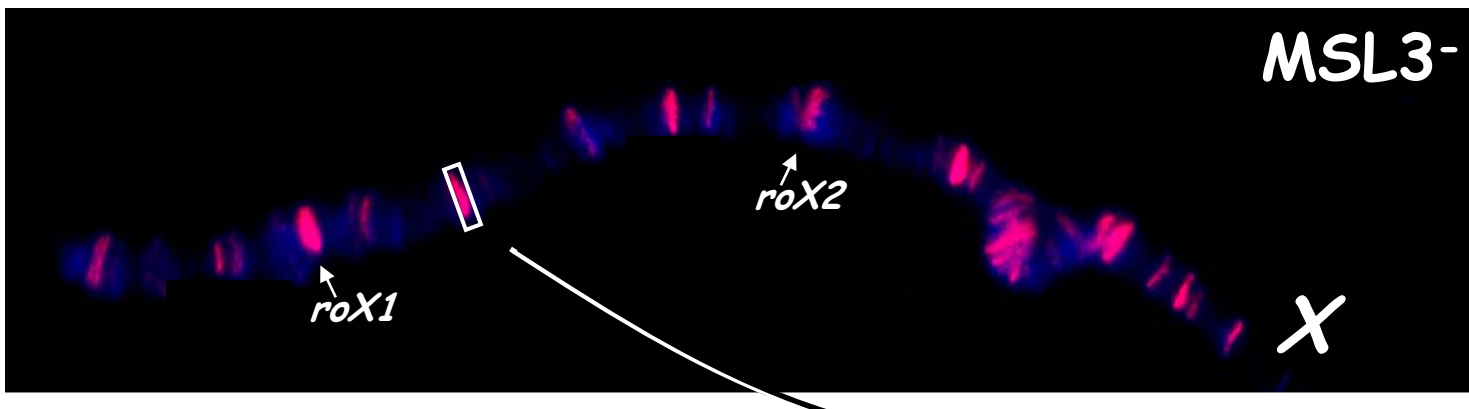
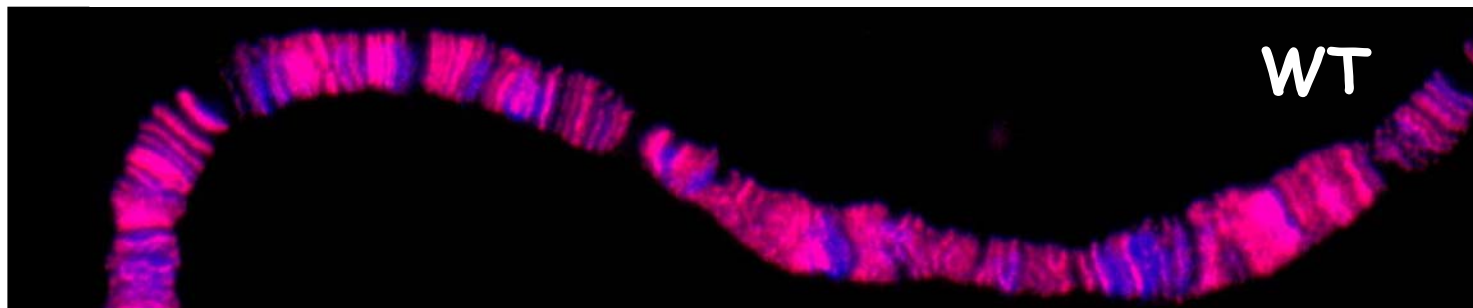
male-specific lethal (**MSL**)
form a core protein
complex



ncRNAs *RNA on the X* (**roX**)

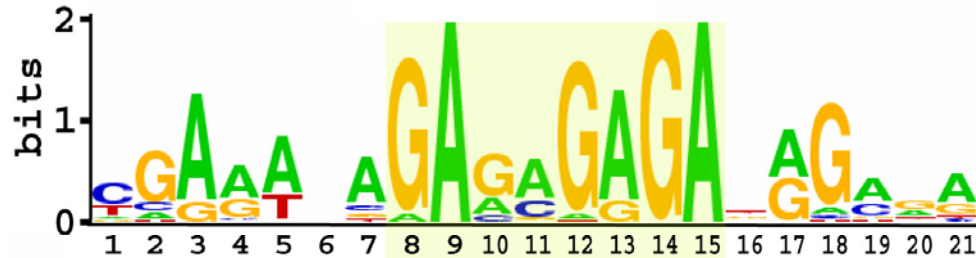
males absent on the first (**MOF**) - HAT

maleless (**MLE**) - RNA/DNA
helicase



MRE is required for MSL binding to CES

Consensus MRE-motif logo



CES11D1 CGAATATGAGCGAGATGGATG
 M2R CGAATATGAAAAAGATGGATG
 M3R CGAATATGAAAAAAATGGATG

How is a whole chromosome targeted?

Two-step model



1. Assembly on *roX* genes and other chromatin entry sites (CESs)

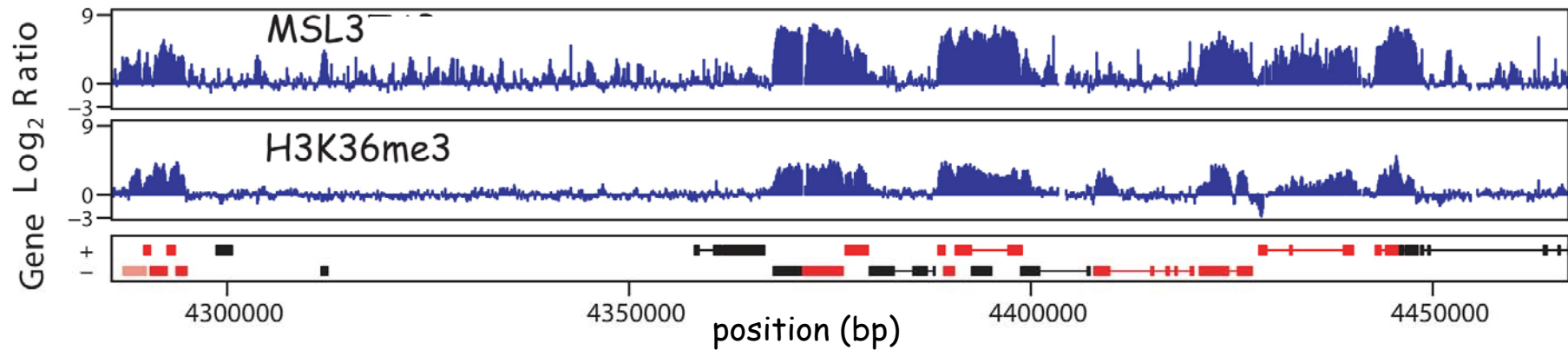


2. Local spreading *in cis*



MSL targets are mostly **transcribed** genes

✗

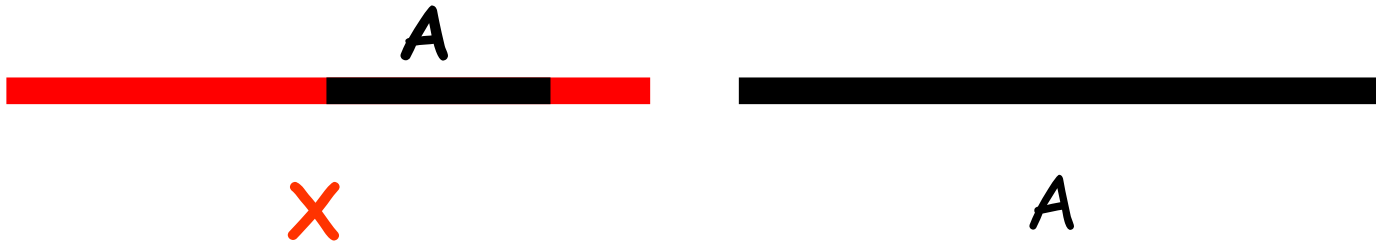


Basic Question

- Can autosomal/exogenous genes become MSL targets in the male X environment?

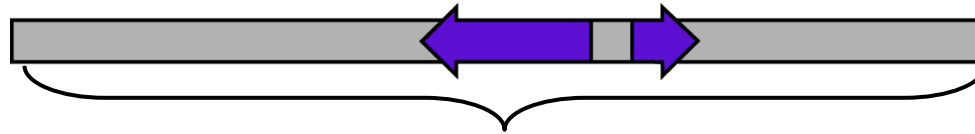


Experimental design:

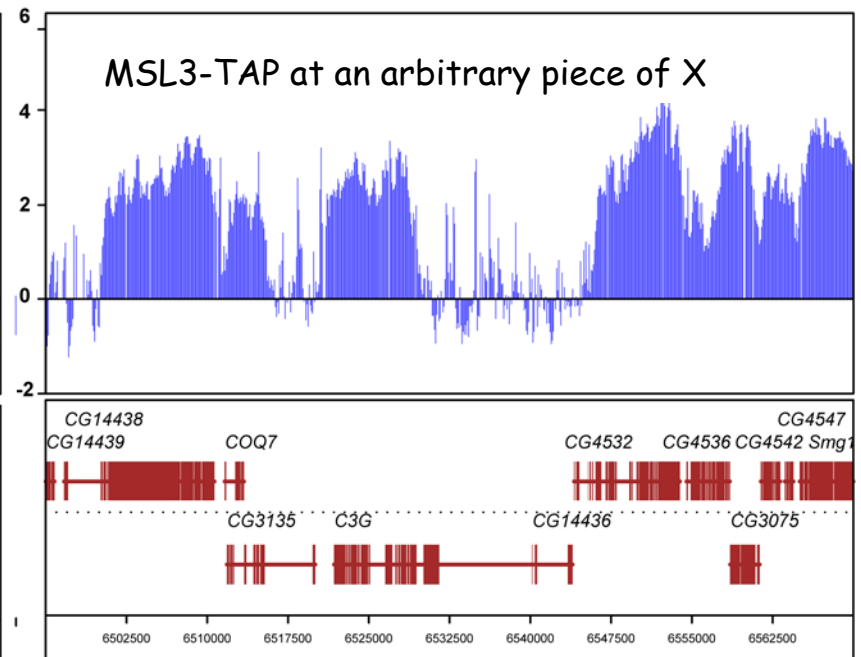
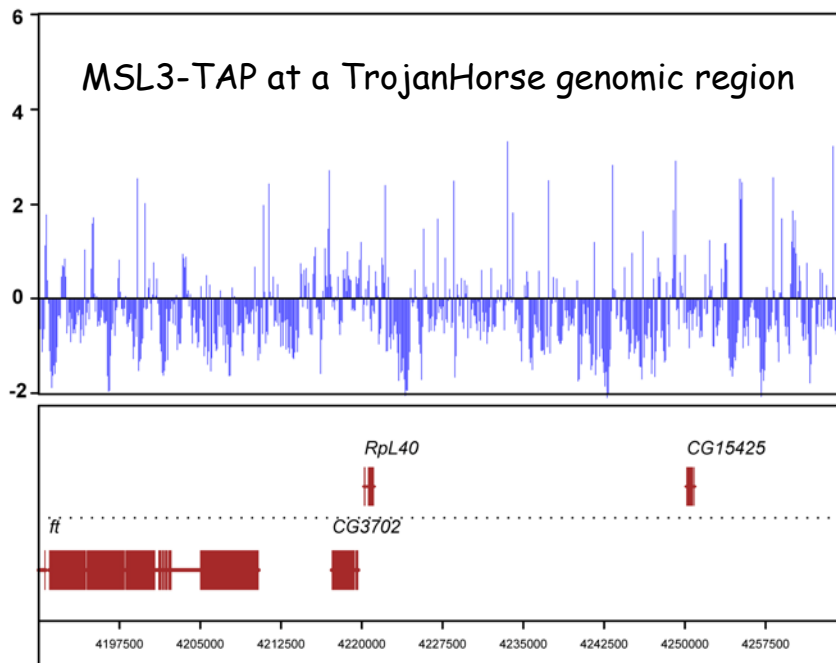


Autosomal DNA (TrojanHorse)

cg3702 *Rpl40*



14 kb from 2L



Conclusion:

- It is **transcription** but not the **DNA sequence** that is important for MSL complex to identify its targets on the X.



