

Основная догма молекулярной биологии:

ДНК → РНК → БЕЛОК

генотип → фенотип (согласно классической генетике)

ДНК ответственна за хранение, передачу и реализацию наследственной информации

То есть, в ДНК закодирована вся наследственная информация?

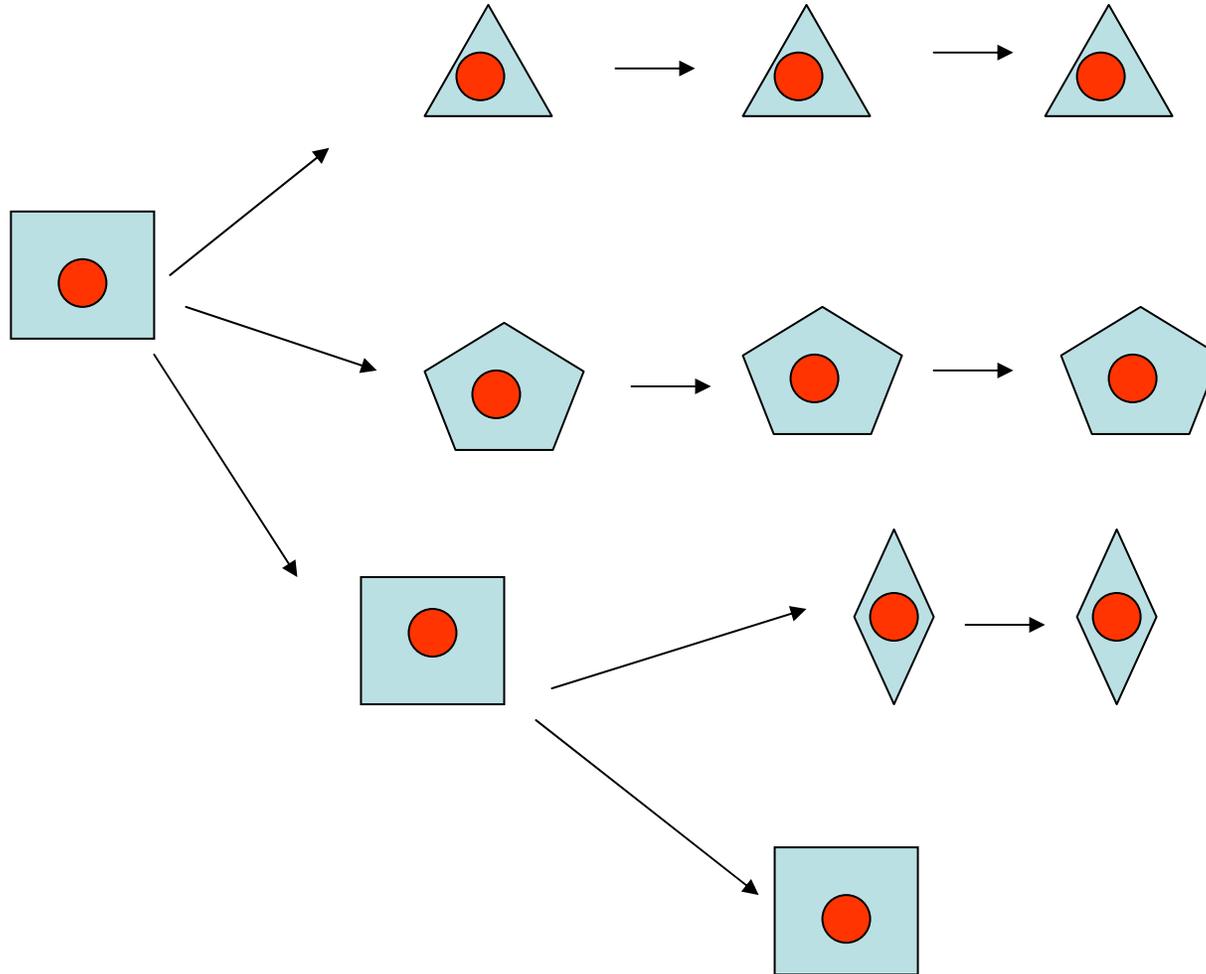
**НО:**

Что такое развитие многоклеточного организма?



# Одинаковый генотип – разные клеточные фенотипы

Клеточный фенотип может эпигенетически наследоваться



# Что такое ЭПИГЕНЕТИКА?

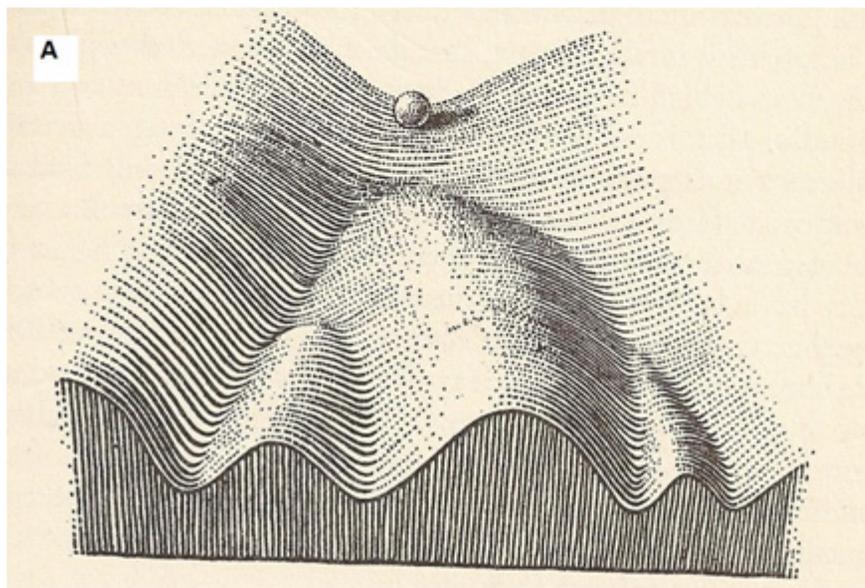
**В более общем смысле предметом эпигенетики являются явления, связанные с развитием различных фенотипов клеток или организмов на основе одного генотипа**

**В более узком смысле эпигенетика - раздел генетики, который изучает наследуемые изменения активности генов во время развития организма или деления клеток.**

**Эпигенетическое наследование – наследование паттерна экспрессии генов**

Первые термины эпигенетика предложил выдающийся английский генетик [Конрад Халл Уоддингтон \(Conrad Hall Waddington\)](#) в 1947 году.

В 1957 году он в качестве поясняющей метафоры сформулировал концепцию «эпигенетического ландшафта».



«Несколько лет назад (в 1947 г.) я ввел термин *эпигенетика*, произведя его от аристотелевского «эпигенеза» — слова, которое почти вышло из употребления,— и предложил называть эпигенетикой ветвь биологии, изучающую причинные взаимодействия между генами и их продуктами, образующими фенотип. Этот термин в настоящее время довольно часто используется именно в таком смысле, но, к сожалению, он оказался весьма привлекательным, и некоторые авторы употребляют его для обозначения совсем других понятий...

К.Х.УОДДИНГТОН. ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНЦЕПЦИИ

В кн.: На пути к теоретической биологии. I. Прологомены. — М.: Мир, 1970. С. 11–38.

# Примеры эпигенетических явлений

## Феномен клеточной памяти

### Центромеры

Центромеры эукариот не имеют консервативных последовательностей ДНК, наследуются эпигенетически (см. лекцию 4).

### Различия между близнецами

Различия в инактивации X-хромосомы  
Различия в паттерне экспрессии некоторых генов за счет метилирования

### Наследование ON или OFF состояния гена в течение нескольких поколений организмов у многоклеточных

Метилирование ДНК в области промотора гена может передаваться следующему поколению  
Известные примеры: наследование окраски у мышей, наследование формы цветка у растений

### Старение

Одним из механизмов старения у многоклеточных является накопление неправильных эпигенетических меток, в частности, метилирования ДНК, приводящего к инактивации или ослаблению экспрессии многих генов.

### Онкогенез

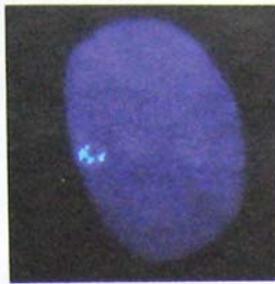
Раньше считалось, что для превращения клетки в раковую должен произойти ряд мутационных событий, приводящий к экспрессии онкогенов и супрессии антионкогенов.  
Накапливается все больше фактов в пользу того, что при онкогенезе важную роль играют не только мутации, но и перепрограммирование генома.

**И многие другие**

У любых близнецов есть различия, связанные с различиями в эпигенетических метках. Эти различия усиливаются с возрастом.



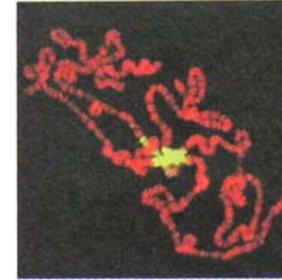
twins



Barr body

Эпигенетически репрессированная одна из X-хромосом самок млекопитающих, видимая как тельце Барра

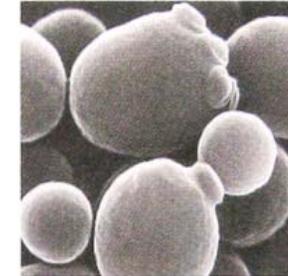
Гигантские политенные хромосомы дрозофилы – инструмент для изучения распределения и взаимодействия эпигенетических меток на хромосомах.



polytene chromosomes



# epigenetic biology

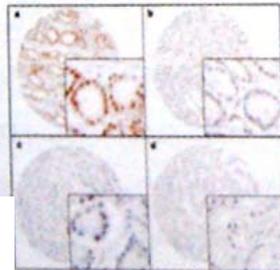


При клонировании трехцветной кошки никогда не получится кошка идентичного окраса, так как рисунок определяется случайной пятнистостью и случайной инактивацией одного из аллелей гена, определяющего окраску (черный/коричневый), в X-хромосоме

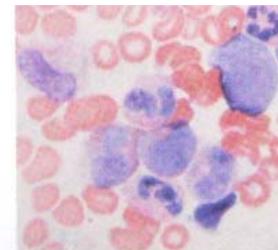
Определение пола у дрожжей. Пол определяется единственным активным локусом, в то время как в геноме в неактивном состоянии присутствуют локусы, определяющие оба пола. От поколения к поколению клеток активный локус заменяется по образцу молчащей копии гена, отвечающего за противоположный пол. Происходит смена пола в поколениях.



Два наследуемых в поколениях растений эпигенотипа цветка арабидопсиса, возникших на основе одинаковых генотипов.



В опухолевых клетках паттерн эпигенетических модификаций значительно отличается от такового в нормальных клетках.

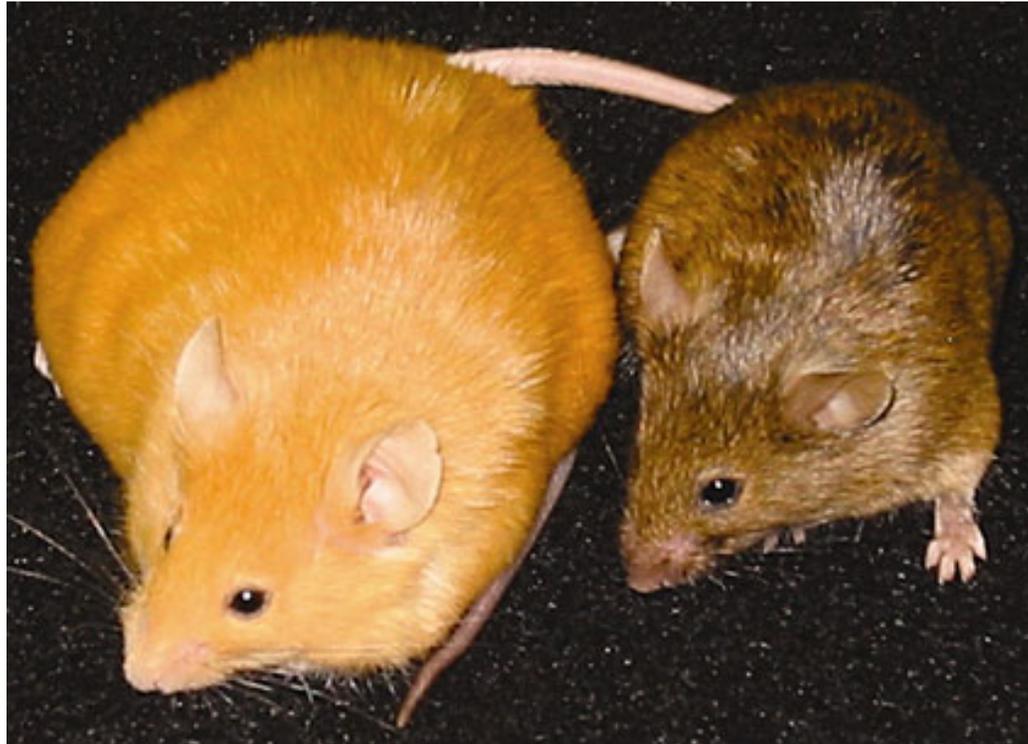


blood smear

Гетерогенные клетки крови формируются на основе одного генотипа.

# **Примеры эпигенетических явлений**

**Наследование ON или OFF состояния гена в течение нескольких поколений организмов у многоклеточных**



Метилирование ДНК в области промотора гена может передаваться следующему поколению  
Известные примеры: наследование окраски у мышей, наследование формы цветка у растений

## Случайная инактивация одной из X-хромосом у самок млекопитающих

При клонировании трехцветной кошки никогда не получится кошка идентичного окраса, так как рисунок определяется случайной пятнистостью и случайной инактивацией одного из аллелей гена, определяющего окраску (черный/коричневый), в X-хромосоме



**Rainbow**



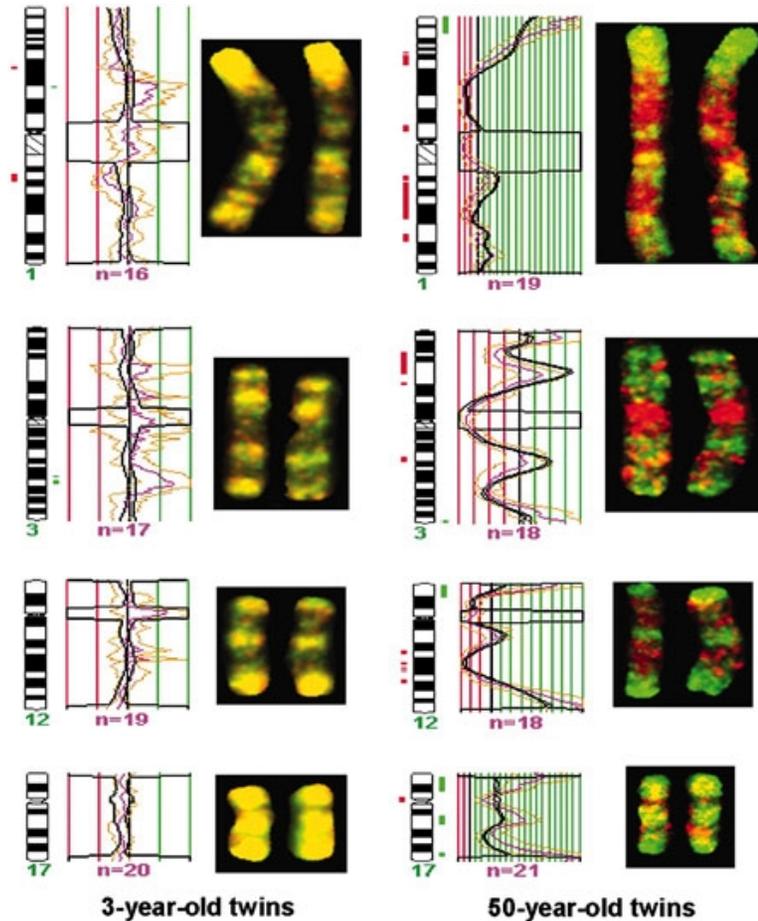
**Rainbow's  
clone**

## Различия между близнецами

У любых близнецов есть различия, связанные с различиями в эпигенетических метках. Эти различия усиливаются с возрастом.

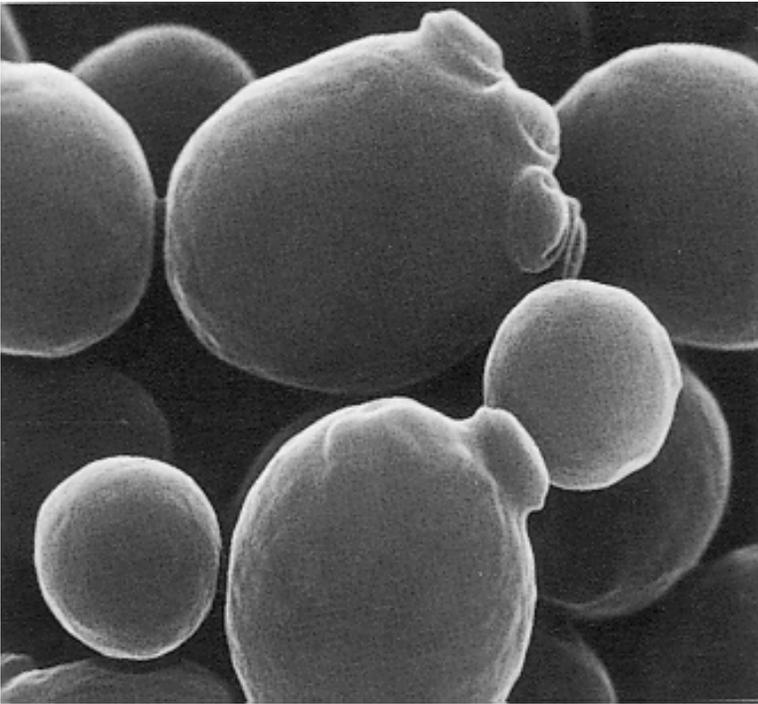
### Различия в инактивации X-хромосомы

Разлиия в паттерне экспрессии некоторых генов за счет метилирования

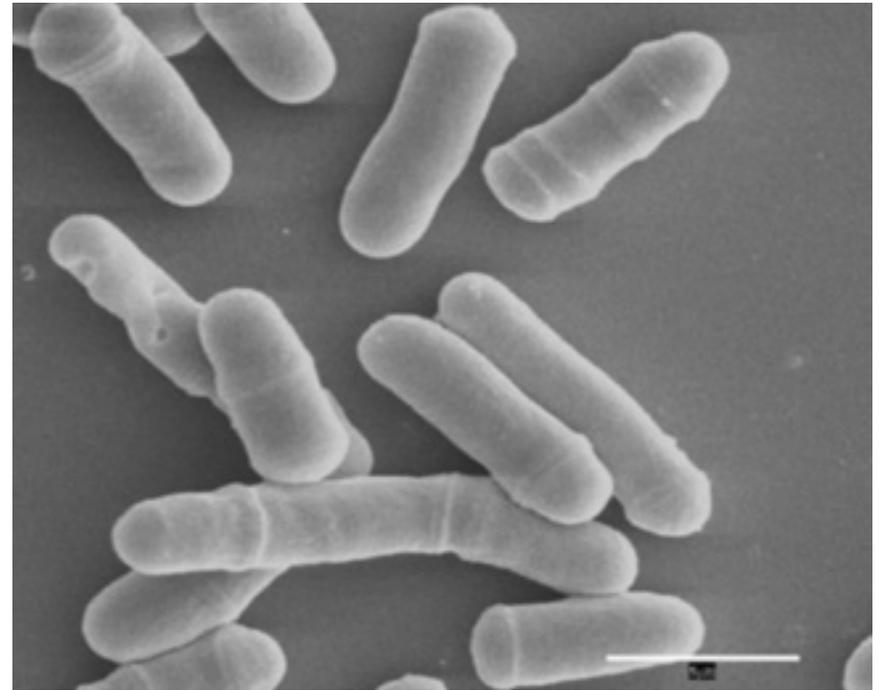


## Определение пола у дрожжей

Пол определяется единственным активным локусом, в то время как в геноме в неактивном состоянии присутствуют локусы, определяющие оба пола. От поколения к поколению клеток активный локус заменяется по образцу молчащей копии гена, отвечающего за противоположный пол. Происходит смена пола в поколениях.



**Saccharomyces cerevisiae**

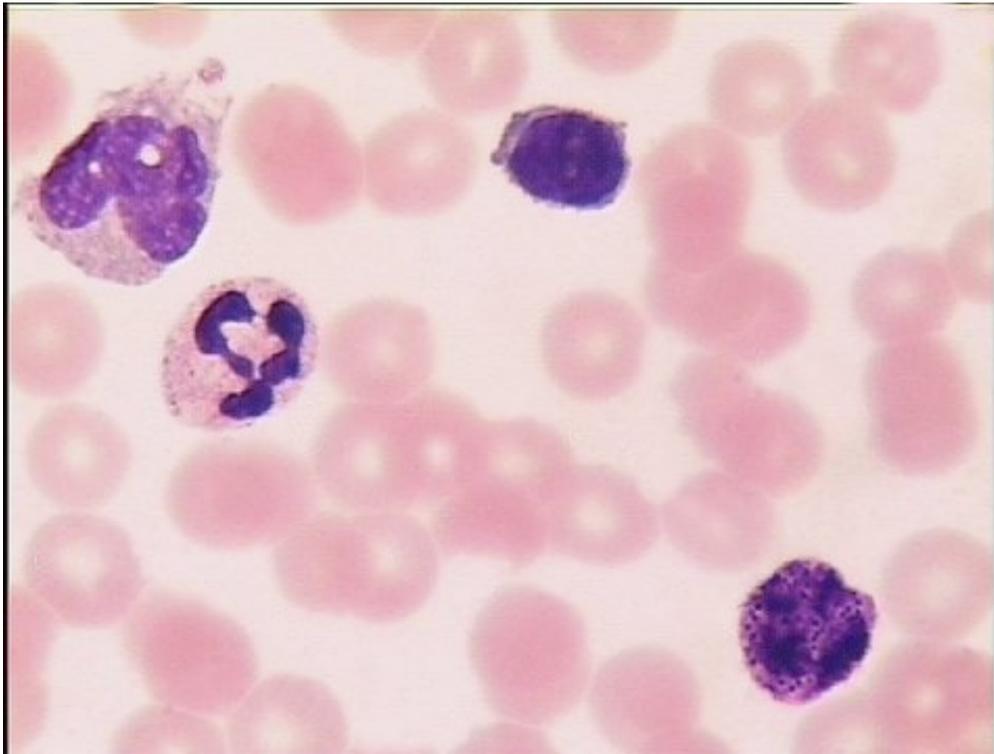


**Schizosaccharomyces pombe**

## Примеры эпигенетических явлений

Гетерогенные клетки крови формируются на основе одного генотипа

Гены иммуноглобулинов

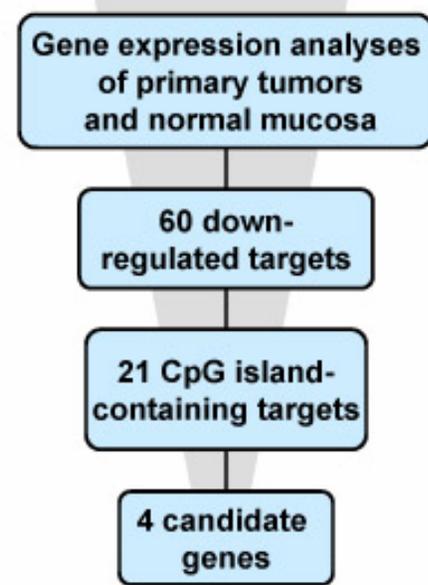
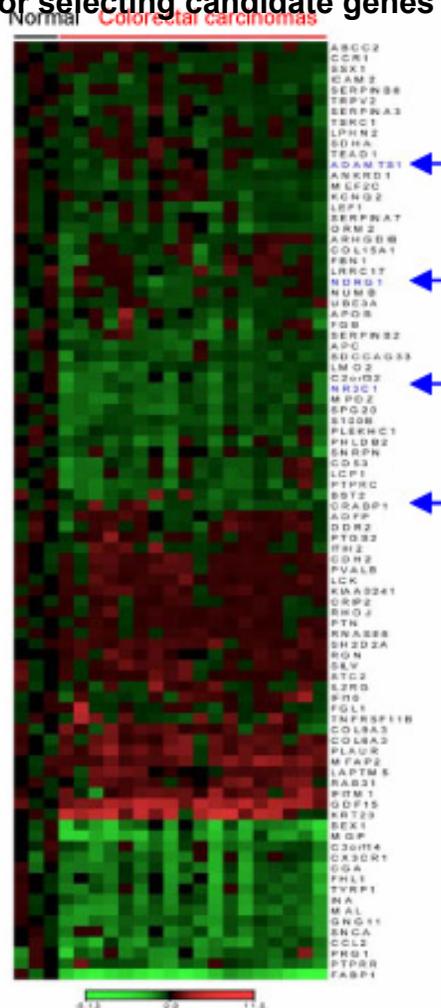
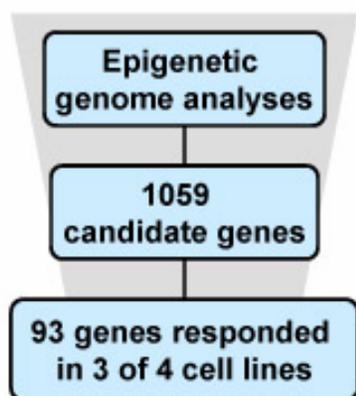


**В опухолевых клетках паттерн эпигенетических модификаций значительно отличается от такового в нормальных клетках**

Раньше считалось, что для превращения клетки в раковую должен произойти ряд мутационных событий, приводящий к экспрессии онкогенов и супрессии антионкогенов. Накапливается все больше фактов в пользу того, что при онкогенезе важную роль играют не только мутации, но и перепрограммирование генома.

# В опухолевых клетках паттерн эпигенетических модификаций значительно отличается от такового в нормальных клетках

Example of methodological approach for selecting candidate genes inactivated by hypermethylation in colorectal cancer



## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Как правило необратимые (мутации)

Изменения первичной структуры ДНК

Стабильно наследуемые

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Как правило обратимые \*

Не затрагивают изменений первичной структуры ДНК \*

Бывают долговременные и кратковременные

- Кратковременные локальные изменения хроматина
- Наследуемые много клеточных поколений изменения, могут затрагивать протяженные хроматиновые домены или целые хромосомы (клеточная память)
- Наследуемые через мейоз (примеры есть, но их пока не много)

**Множество взаимосвязанных механизмов**

\* Исключением являются перестройки ДНК в локусах иммуноглобулинов, диминуция хроматина (выбрасывание части генома в соматических клетках некоторых организмов)

Хроматин – высоко организованная система хранения информации, генетической и эпигенетической

## Как записана информация о дифференциальной экспрессии генов и состоянии хроматина?

● В ДНК закодированы белки – регуляторы, узнающие метки, записанные в последовательности ДНК, модификациях структуры хроматина

● Метки в последовательности ДНК для узнавания специфическими факторами транскрипции и др. белками, метки для позиционирования нуклеосом

● Генные сети. Контурсы + и – обратных связей

● Варианты гистонов → Стабильность связывания нуклеосом

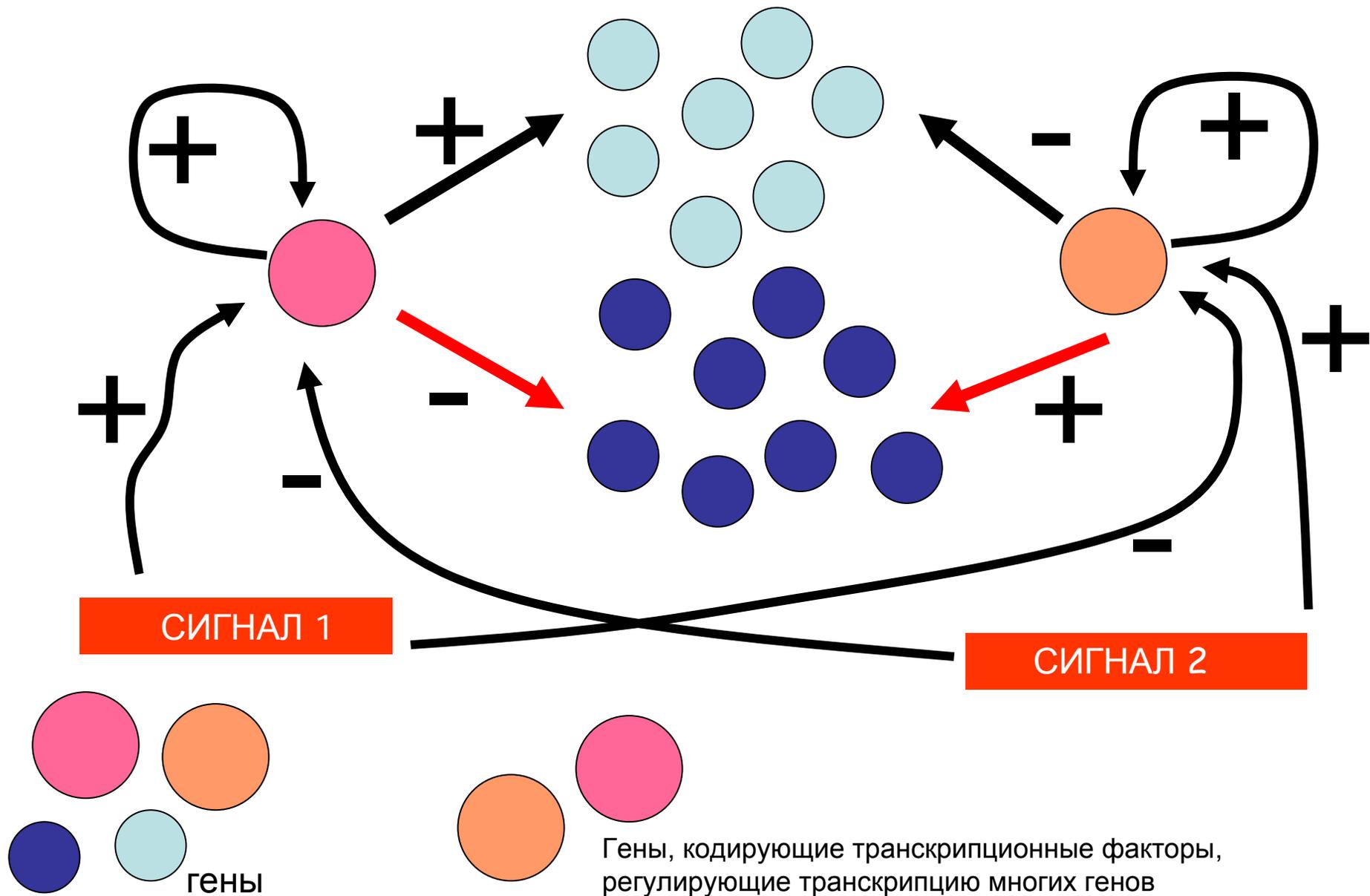
● Метилирование ДНК → Молекулярные метки

● Ковалентные модификации гистонов → Молекулярные метки

● АТФ-зависимый ремоделинг хроматина → Сборка – разборка (+шапероны), Слайдинг, Дестабилизация нуклеосом

● Некодирующие РНК → Зонды! Обеспечивают направленное привлечение белковых комплексов

# Генные сети. Контуры + и – обратных связей



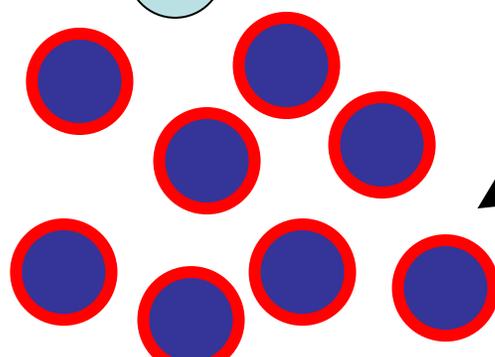
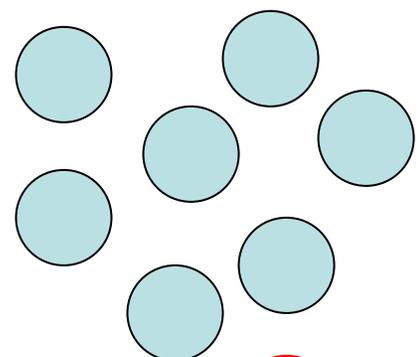
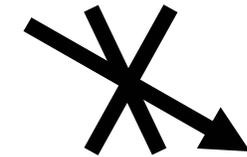
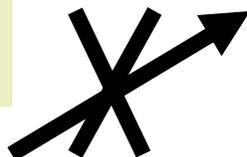
# ПРИМЕР:

## Соматическая клетка

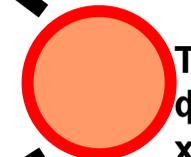
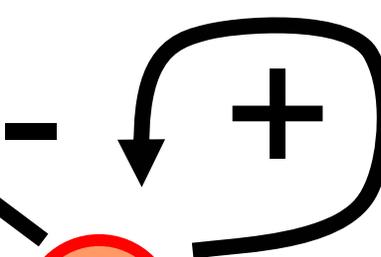
ОCT4 – один из главных факторов транскрипции, необходимый для поддержания клеток в состоянии стволовых

Гены, препятствующие дифференцировке, поддерживающие состояние стволовой клетки

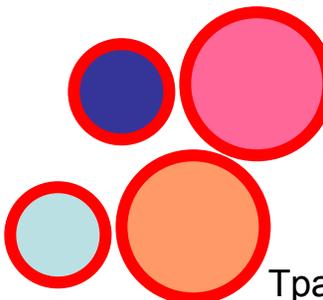
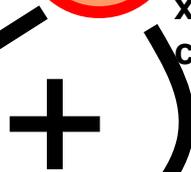
Ген *Oct4* не экспрессируется



Гены, отвечающие за дифференцировку

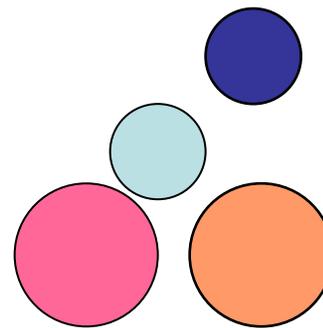


Транскрипционные факторы, характерные для соответствующей ткани



Транскрибирующиеся гены

«выключенные» гены





# «История» открытия эпигенетических механизмов

**1969г** Гипотеза о роли метилирования ДНК в поддержании клеточной памяти

**1975г**

Открыли пары рестриктаз, узнающие одни и те же последовательности ДНК в метилированном и неметилированном состоянии

**например:   HpaII   GCGC**  
**MspI   GC\*GC**

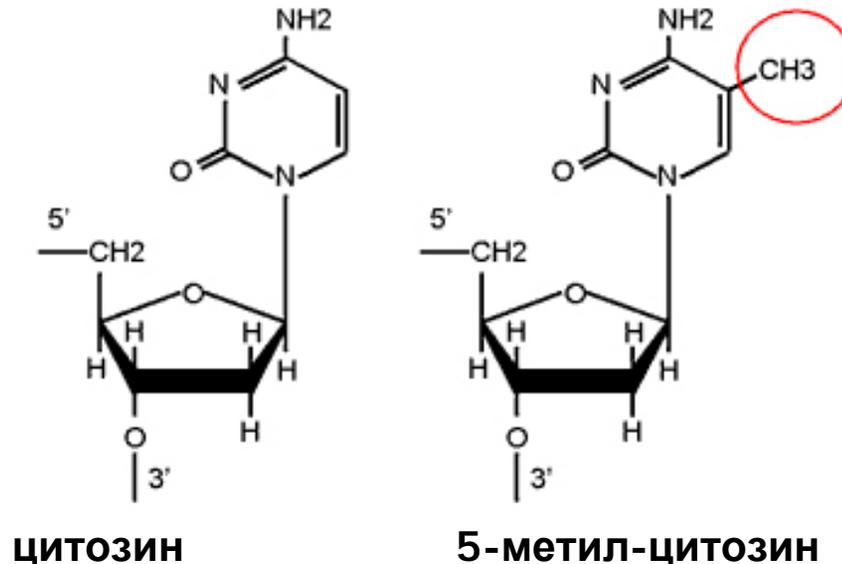
По различию в картине рестрикции можно было определить, метилирован ли участок ДНК

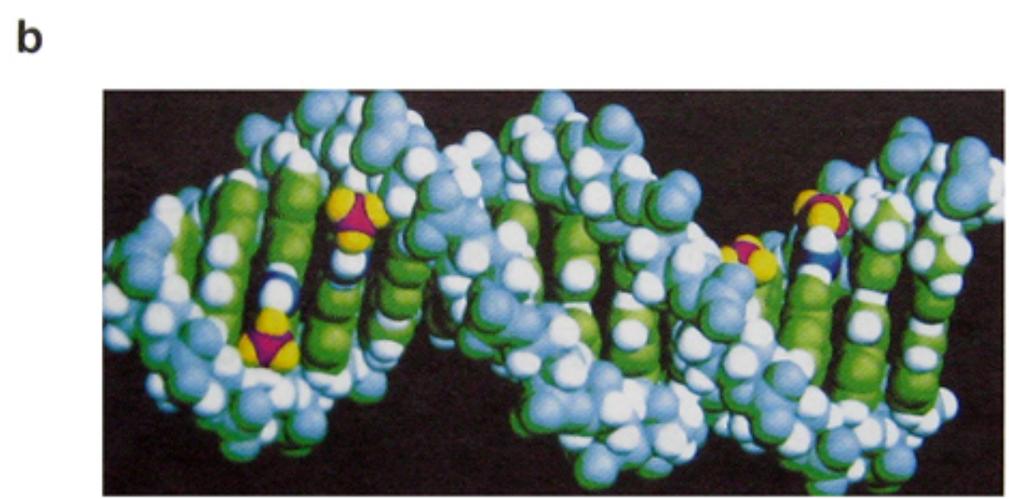
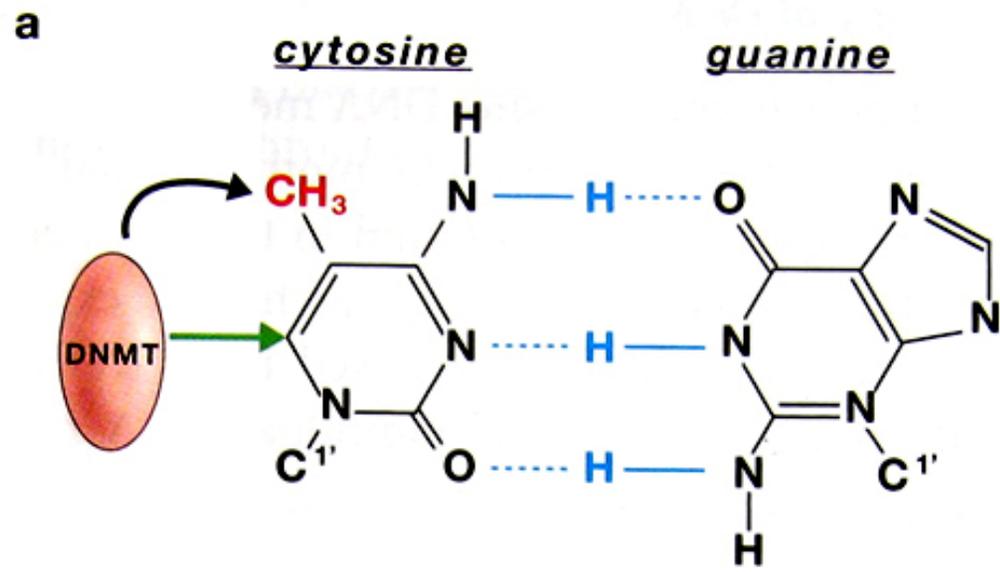
**Открыли роль метилирования ДНК в инактивации X-хромосомы млекопитающих, геномном импринтинге**

**До самого конца 20 века не знали других механизмов**

**Метилирование ДНК** — это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК, что можно рассматривать как часть эпигенетической составляющей генома. Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Метилирование ДНК считается, в основном, присущим эукариотам. У человека метилировано около 1 % геномной ДНК.

Около 60-70 % всех CpG-динуклеотидов у млекопитающих метилированы. Неметилированные CpG-динуклеотиды сгруппированы в т. н. «CpG-островки», которые присутствуют в 5' регуляторных областях многих генов. Различные заболевания, например, рак, сопровождаются аномальным гиперметилированием CpG-островков в промоторных областях генов, что приводит к устойчивой репрессии транскрипции. Репрессия транскрипции в этом случае опосредована белками, которые способны связываться с метилированными CpG-динуклеотидами.





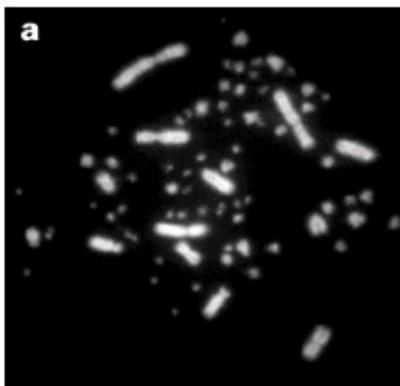
Начало 21 века

**Прорыв, связанный с появлением  
НОВЫХ методов исследования!**

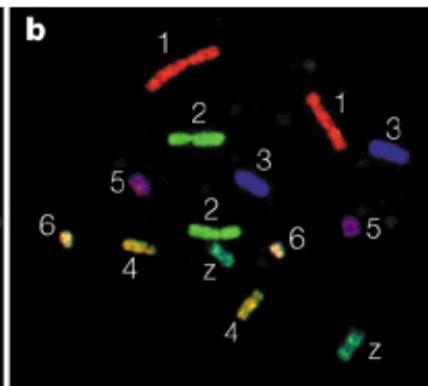
<b>ПОДХОД</b>	<b>НОВЫЕ ОТКРЫТИЯ</b>
<p><b>Секвенирование ДНК</b>  Определение первичной структуры ДНК, компьютерный анализ и сравнение геномов</p>	<p>Неоднородность генома по АТ-ГС составу, плотности генов и повторенных последовательностей  Гомология → предсказание функции новых белков  Консервативность → поиск функциональных районов  Полный сиквенс генома → возможность создания чипов для тотального картирования</p>
<p><b>Микроэррей (ДНК-чипы)</b>  Тотальное картирование транскрипции и репликации</p>	<p>Группирование генов со сходными паттернами транскрипции  Группирование ориджинов репликации по времени включения в S-фазе  Взаимосвязь транскрипционной активности генов и времени их репликации в S-фазе  Обнаружена негенная транскрипция. Транскрибируется значительная часть генома!</p>
<p><b>Методы тотального картирования белков</b>  (Chip on chip, DAM ID)</p>	<p>Построение полных геномных карт распределения белков, нуклеосом, модификаций гистонов</p>
<p><b>Методы поиска белок-белковых взаимодействий</b>  (коиммунопреципитация, дигибридная дрожжевая система)</p>	<p>Белки работают в составе огромных белковых комплексах  Многие белки входят в состав разных комплексов</p>
<p><b>Новые методы микроскопических исследований</b>  (3D микроскопия, многоцветная детекция, прижизненное мечение)</p>	<p>Новые представления о пространственной организации ядра: обнаружены хромосомные территории, транскрипционные фабрики, транскрипционные территории, фокусы репликации. корреляция между транскрипционными территориями и фокусами репликации.  Все белки связаны с хромосомами динамично: очень быстрый обмен белков.</p>

# Что такое хромосомные территории?

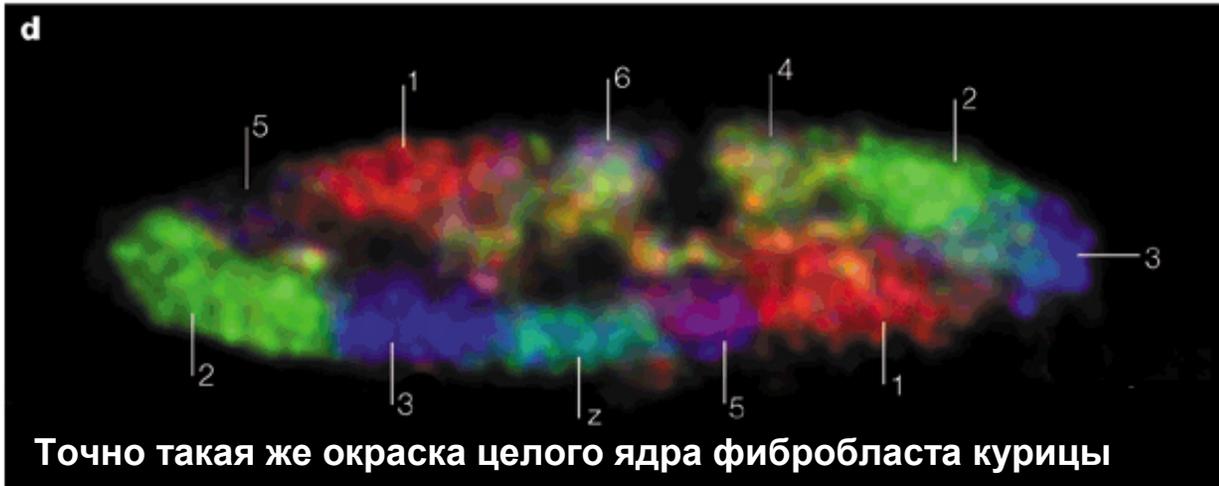
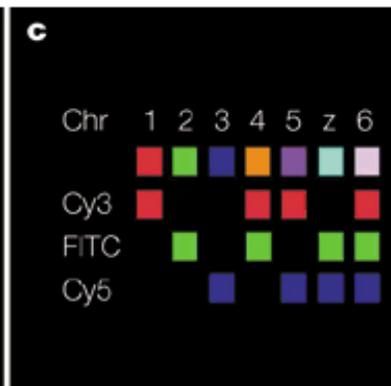
Метафазные хромосомы курицы



Многоцветное окрашивание, позволяющее различить отдельные хромосомы



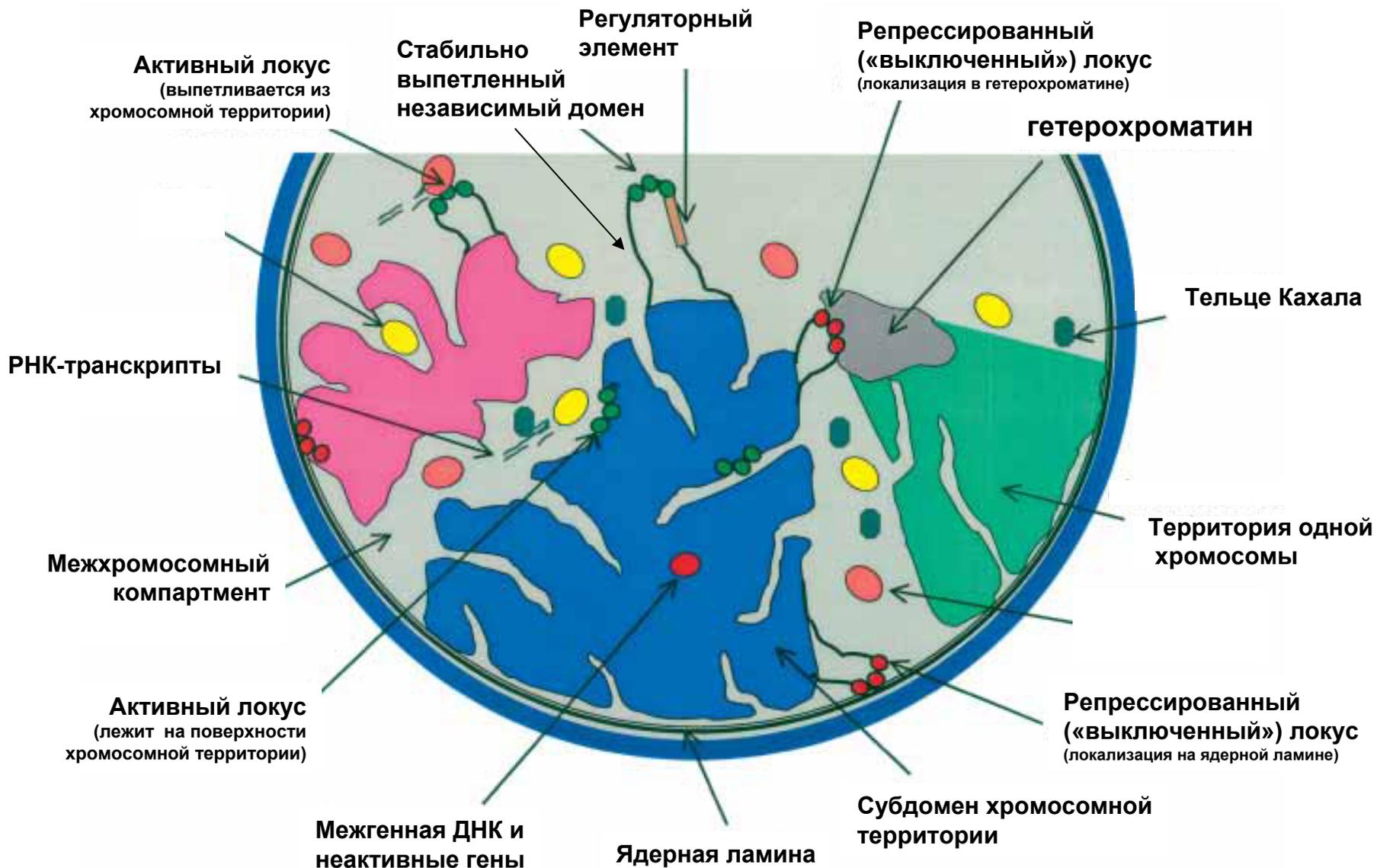
Набор из трех флюорохромов позволяет дифференциально окрасить 7 пар хромосом



Точно такая же окраска целого ядра фибробласта курицы

Каждая хромосома в ядре занимает определенную территорию. Хромосомы не «смешиваются» в ядре

# Организация интерфазного ядра

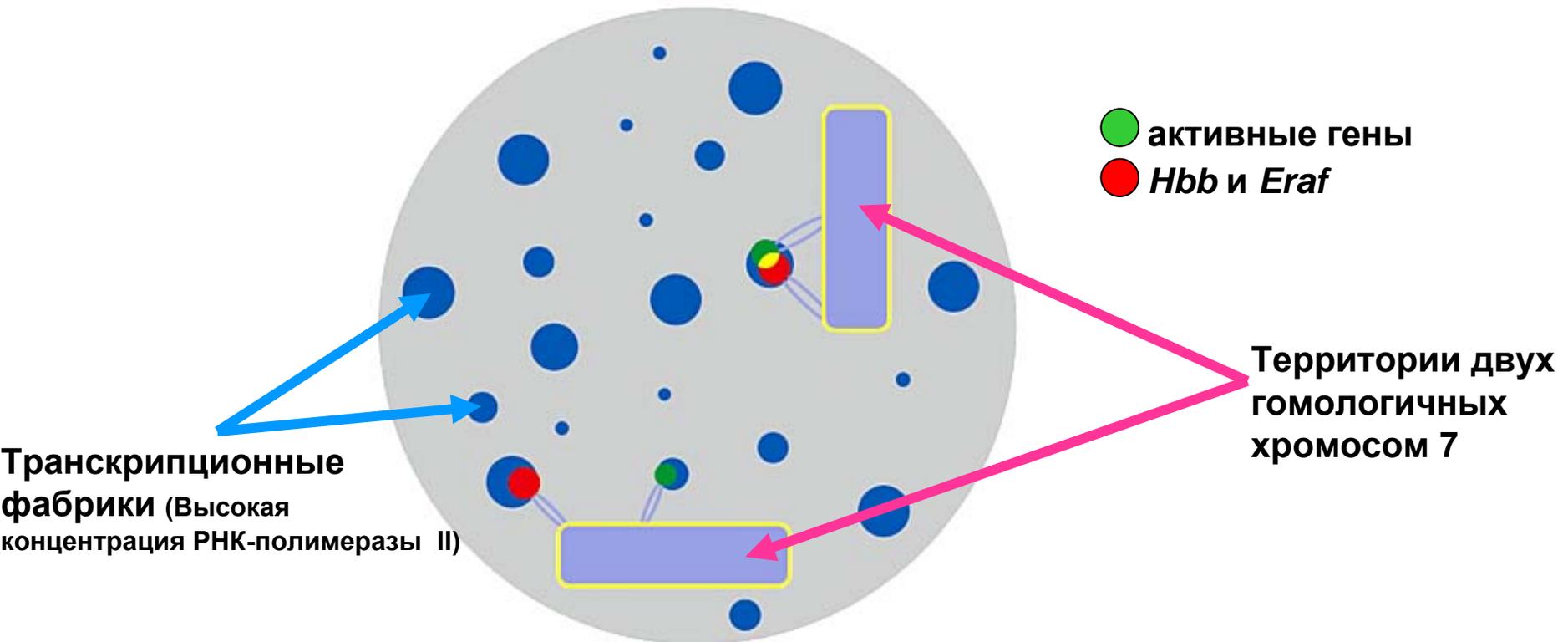


# Что такое транскрипционные фабрики?

Самые активно транскрибирующиеся гены «выпетливаются» из своей хромосомной территории в межхромосомные транскрипционные фабрики, где концентрируются РНК-полимеразы и другие компоненты транскрипции.

ПРИМЕР:

Локализация активных генов *Hbb* (b-цепи гемоглобина) и *Eraf* (эритроидного фактора) в транскрипционных фабриках в межхроматиновом пространстве интерфазного ядра эритроидной клетки мыши

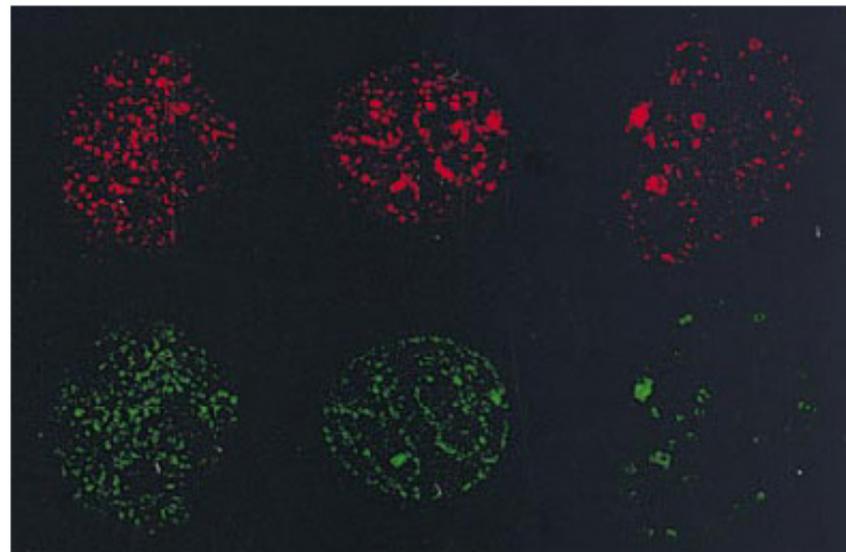
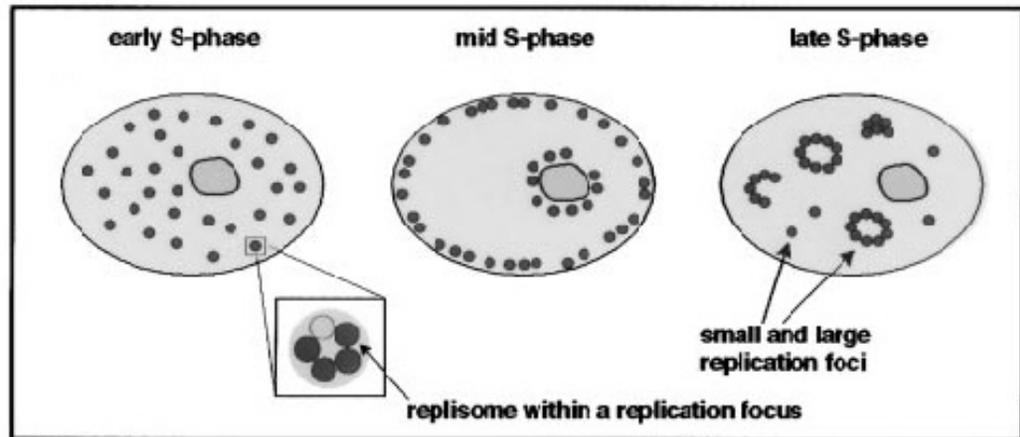


# Что такое фокусы репликации?

**Фокусы репликации** - это дискретные сайты интерфазных ядер, в которых собираются ферменты репликации ДНК для одновременной элонгации репликационных вилок на 10–100 соседних репликалах. Размеры фокусов варьируют в широких пределах. В среднем один фокус соответствует около 1000 т. п. н.. Среднее время репликации индивидуального фокуса - 45–60 мин.

Фокусы репликации являются стабильными структурами, сохраняющими хромосомную локализацию в течение клеточного цикла и в клеточных поколениях. Полагают, что они представляют собой фундаментальные структурные единицы хромосомной организации.

В ходе S-фазы  
клеточного цикла  
количество активных  
фокусов,  
соответствующих  
эухроматиновым  
районам, в  
нуклеоплазме  
постепенно падает до  
нуля, а количество  
активных фокусов,  
ассоциированных с  
гетерохроматиновыми  
районами, в  
нуклеоплазме, вокруг  
ядрышек и около  
ядерной мембраны  
возрастает.



**BrdU**  
Аналог dT  
маркер  
репликации

**GFP-PCNA**  
Маркер  
вилки  
репликации

ранняя

S-фаза

поздняя

# Хромосомные домены

- Хромосомные территории
- Скоординированная экспрессия генов (транскрипционные территории)
- Скоординированная репликация (фокусы репликации)

По каким характеристикам можно выделить хромосомные домены?

**Плотность активно транскрибирующихся генов**

**Набор модификаций гистонов**

**Набор негистоновых белков**

**Время репликации**

**Плотность генов**

**Плотность повторяющихся последовательностей**

**Локализация в ядре**

**Границы (барьеры, конкуренция между противоположными ферментными активностями)**

## **В итоге сформировалось представление, что регуляция экспрессии генов может осуществляться на разных уровнях**

- Некоторые гены регулируются только на уровне промотора**
- Другим генам дополнительно необходимы энхансеры или сайленсеры**
- Многие участки генома регулируются как единые протяженные домены хроматина. На этом уровне возможна эпигенетическая регуляция (эпигенетическое наследование состояния экспрессии)**

В этой регуляции участвуют

Варианты и модификации гистонов

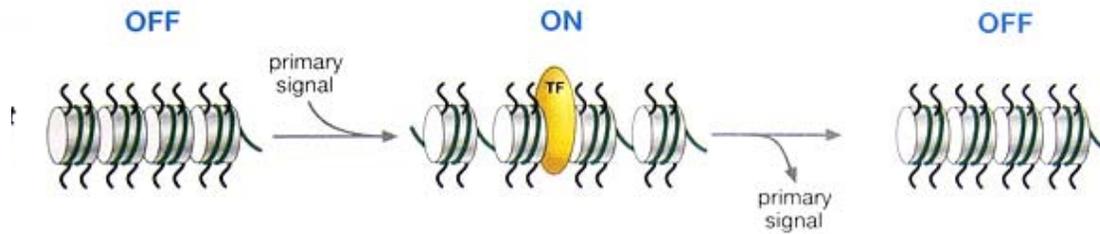
Различные негистоновые белки хроматина

Пространственная организация ядра

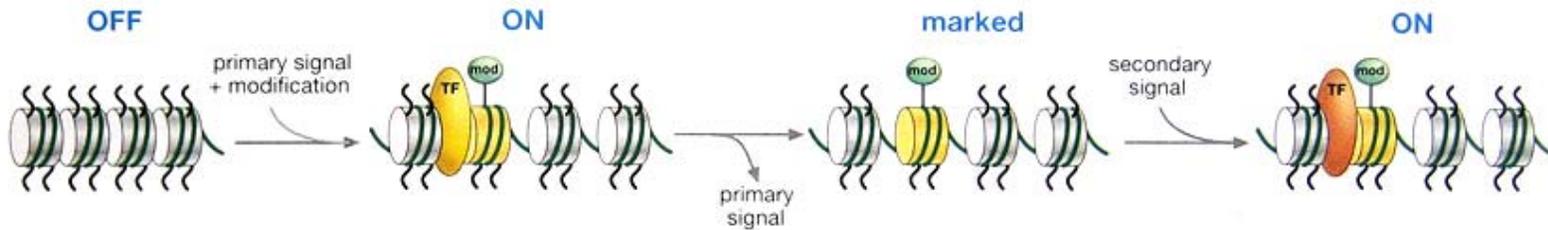
Пространственно-временная картина репликации

# Особенность эпигенетической регуляции – «запоминание информации»

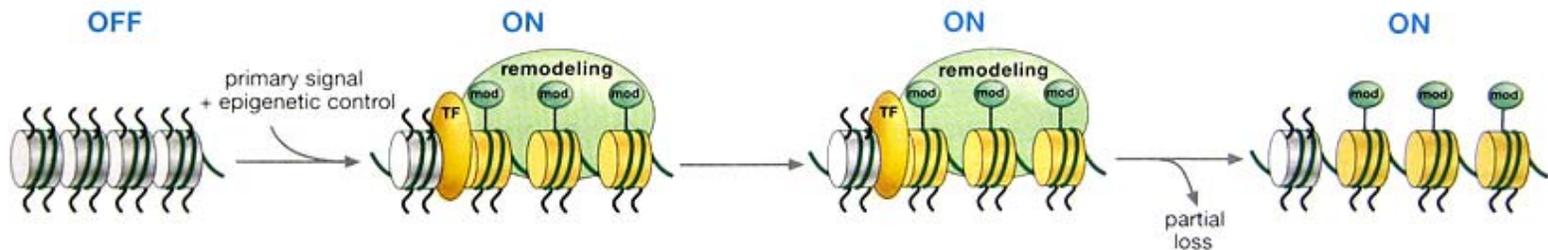
Временный сигнал



Повторяющийся сигнал



Эпигенетическая программа



mod - модификации хроматина

«обычные» нуклеосомы

Нуклеосомы, в которых отдельные гистоны заменены на варианты гистонов (H3 на H3.3)

TF Транскрипционный фактор

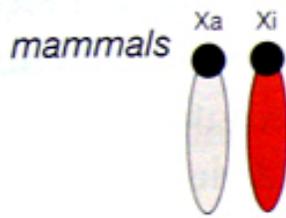
**Сигнал (TF) больше не требуется, состояние активности наследуется**

Гетерохроматин, эффект  
положения

*S.cerevisiae*

Дрожжи

Гетерохроматин, эффект  
положения  
РНК-интерференция



mammals



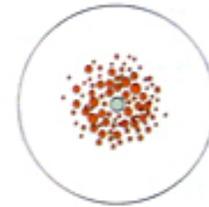
*S.pombe*

Мозаичная инактивация  
генов дрозофилы при  
переносе к  
гетерохроматину



*Drosophila*

Модельные  
объекты, на которых  
изучают эпигенетику



*Neurospora*

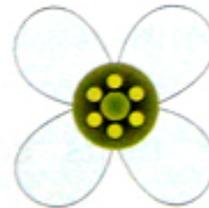


*C. elegans*

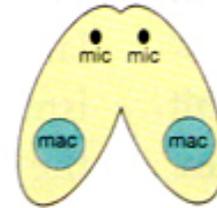
Открытие РНК-интерференции



maize



*Arabidopsis*



*Tetrahymena*

Диминуция хроматина при  
формировании макронуклеуса у  
инфузорий

# Консервативность эпигенетических механизмов у эукариот

## Epigenetic Mechanisms That Operate in Different Model Organisms

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>N. crassa</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	Mammals	<i>A. thaliana</i>
<b>GENOMIC FEATURES</b>							
Genome size	12 Mb	14 Mb	40 Mb	100 Mb	180 Mb	3,400 Mb	150 Mb
Number of genes	6,000	5,000	10,000	20,000	14,000	~25,000	25,000
Average size of genes	1.45 kb	1.45 kb	1.7 kb	2 kb	5 kb	35–46 kb	2 kb
Average number of introns/gene	≤1	2	2	5	3	6–8	4–5
% Genome as protein coding	70	60	44	25	13	1–1.5 (Hs)	26
<b>EPIGENETIC FEATURES</b>							
ON	Histone acetylation	+	+	+	+	+	+
ON	H3K4 methylation	+	+	+	+	+	+
ON	H3K36 methylation	+	+	+	+	+	+
ON	H3K79 methylation	+	+	+	+	+	+
ON	H3.3 histone variant	+	+	+	+	+	+
ON/OFF	SWI/SNF ATPase complexes	+	+	+	+	+	+
ON	CHD1 ATPase family	+	(+) <sup>a</sup>	(+) <sup>a</sup>	(+) <sup>a</sup>	+	+
ON	SWR1 ATPase	+	(+) <sup>a</sup>	(+) <sup>a</sup>	(+) <sup>a</sup>	+	(+) <sup>a</sup>
ON/OFF	ISWI ATPase	+	+	+	+	+	+
ON/OFF	INO80 ATPase	+	+	+	+	+	+
OFF	MI-2 ATPase	–	(+) <sup>a</sup>	(+) <sup>a</sup>	+	+	+
OFF	CENP-A centromeric histone variant	+	+	+	+	+	+
OFF	H3K9 methylation <sup>b</sup>	–	+	+	+	+	+
OFF	HP1-like proteins	–	+	+	+	+	+
OFF	RNA interference	–	+	+	+	+	+
OFF	H4K20 methylation <sup>c</sup>	–	+	+	+	+	+
OFF	H3K27 methylation	–	–	+	+	+	+
OFF	Polycomb repressive complexes	–	–	–	+	+	+
OFF	DNA methylation	–	–	+	–	(+) <sup>d</sup>	+
OFF	DNA methylation binding proteins	–	+ <sup>e</sup>	+	+ <sup>f</sup>	+ <sup>g</sup>	+
OFF	Imprinting	–	–	–	–	+ <sup>h</sup>	+

Abbreviation: (Hs) *Homo sapiens*.

<sup>a</sup> Epigenetic feature considered to be present based on sequence homology but no functional data.

<sup>b</sup> There is evidence that H3K9 methylation is found at active chromatin regions; however, the functional significance of this is unknown.

<sup>c</sup> H4K20 tri-methylation is not present in *S. cerevisiae*, whereas all three H4K20 methylation states are present in multicellular organisms.

<sup>d</sup> *Drosophila* possess very low levels of DNA methylation.

<sup>e</sup> Mutated Dnmt2.

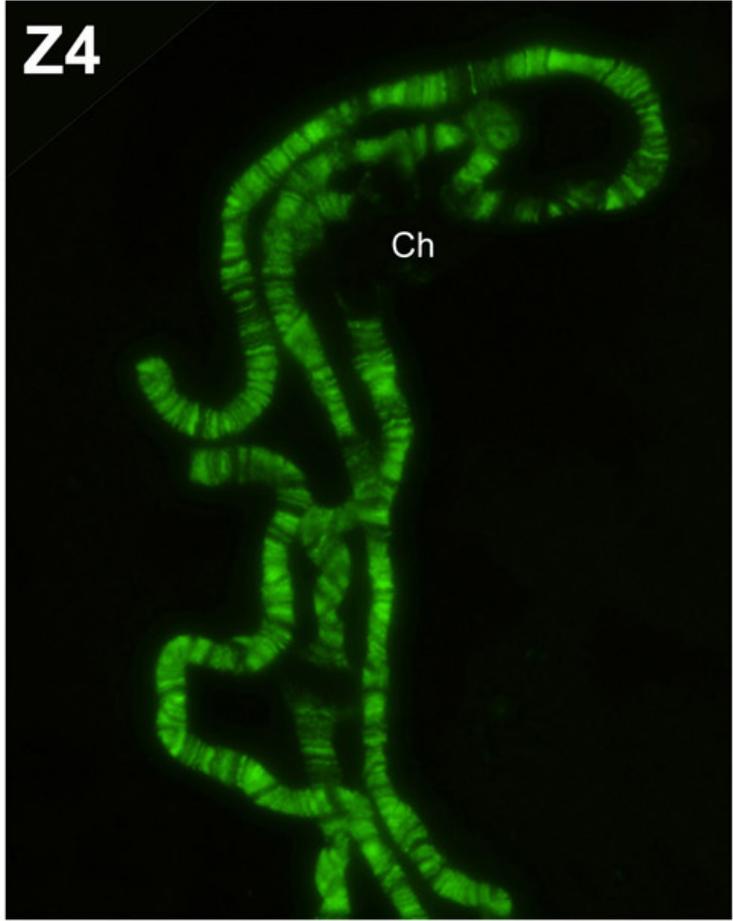
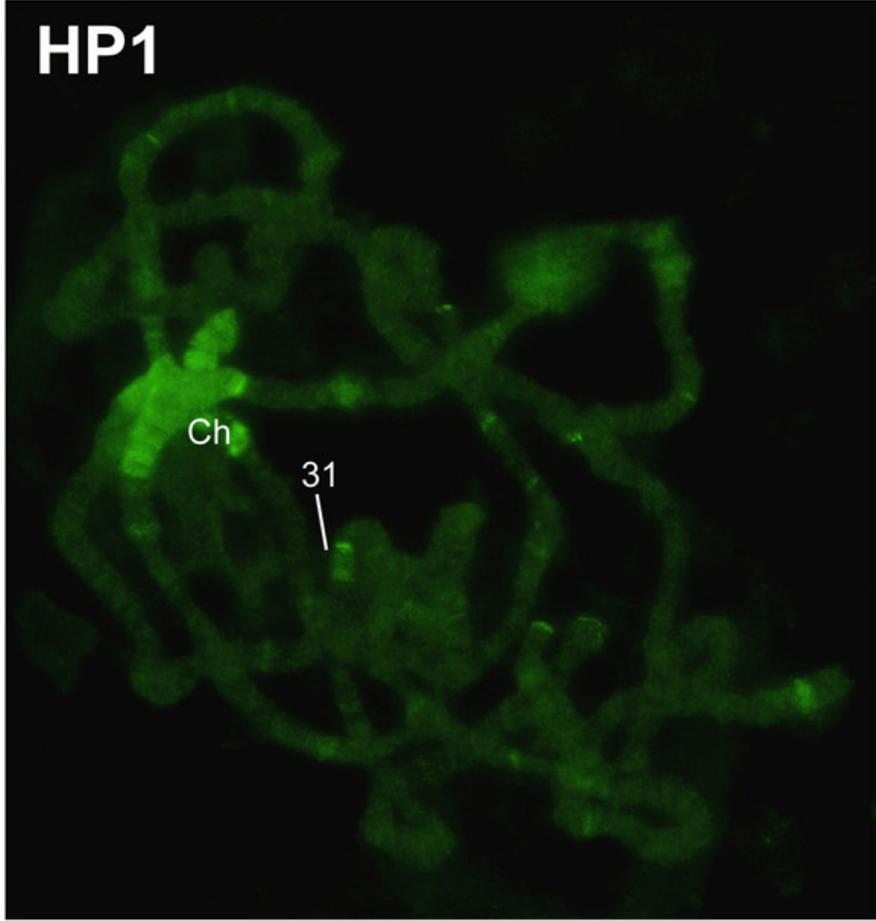
<sup>f</sup> Dnmt2 (Pp) and MBD-domain proteins (Ce, Cb, Pp).

<sup>g</sup> Dnmt2 and MBD-domain proteins (Dm).

<sup>h</sup> Chromosome- or genome-wide rather than gene-specific.

Гигантские политенные хромосомы дрозофилы – инструмент для изучения распределения и взаимодействия эпигенетических меток на хромосомах

*SuUR*

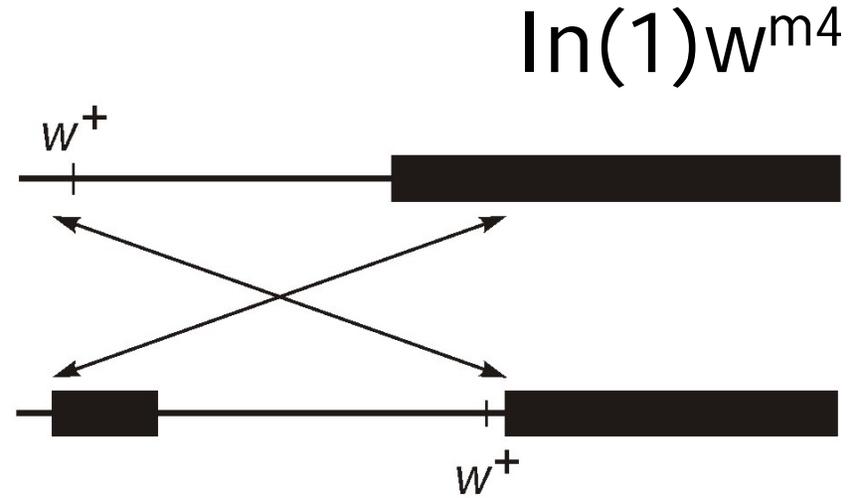


# Мозаичный эффект положения гена



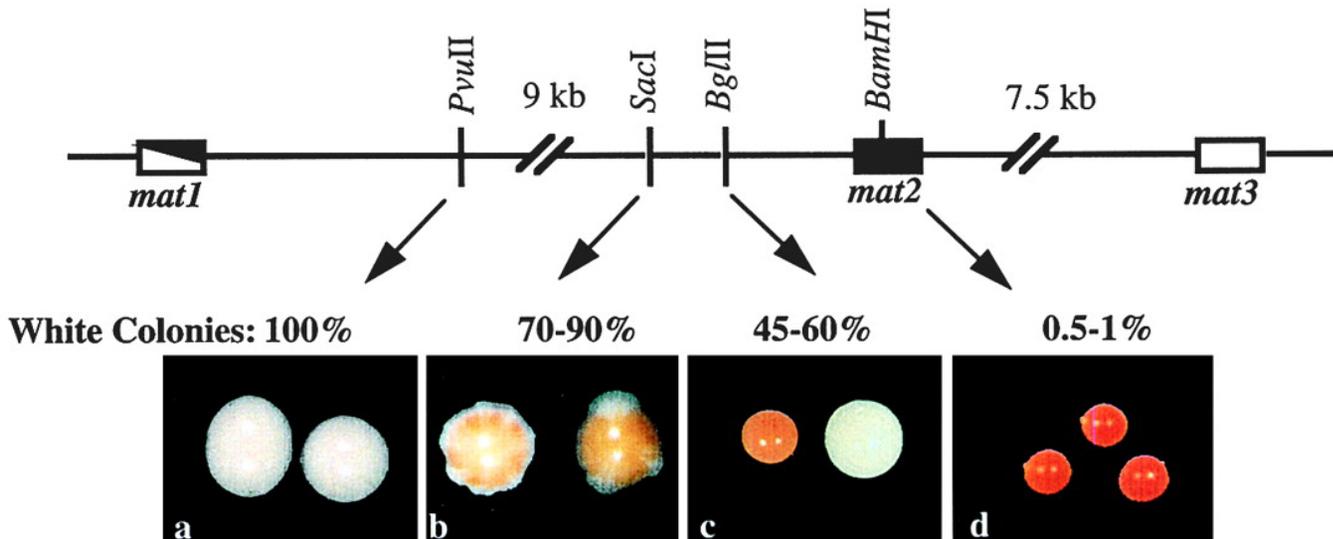
Нормальная  
X-хромосома

$In(1)w^{m4}$



У дрозофилы

# Мозаичный эффект положения гена



У дрожжей