

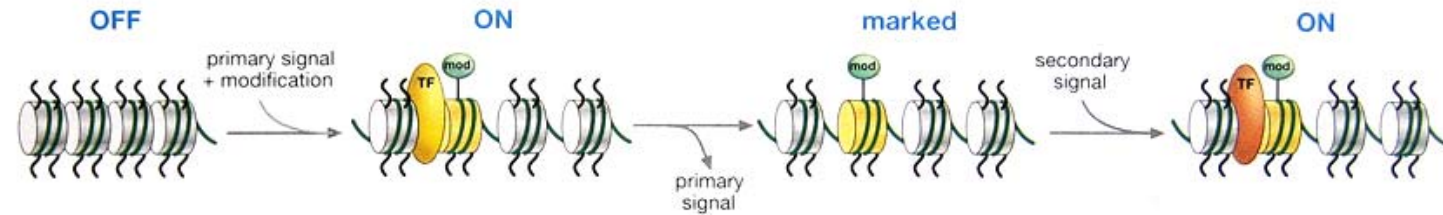
Хроматин и регуляция активности генов

Разные уровни регуляции, на которых участвуют изменения структуры хроматина

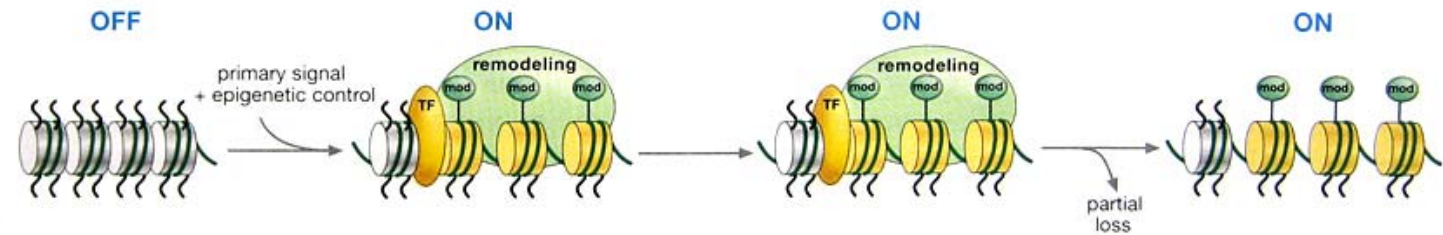
- Регуляция отдельных генов
- Регуляция протяженных локусов хромосом
- Регуляция на уровне целой хромосомы

Хроматин и активация транскрипции

Временные локальные изменения хроматина в окрестностях промотора для активации транскрипции



Эпигенетическая программа, «клеточная память»



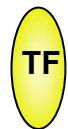
Сигнал (TF) больше не требуется, состояние активности наследуется



«обычные» нуклеосомы



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



Транскрипционный фактор

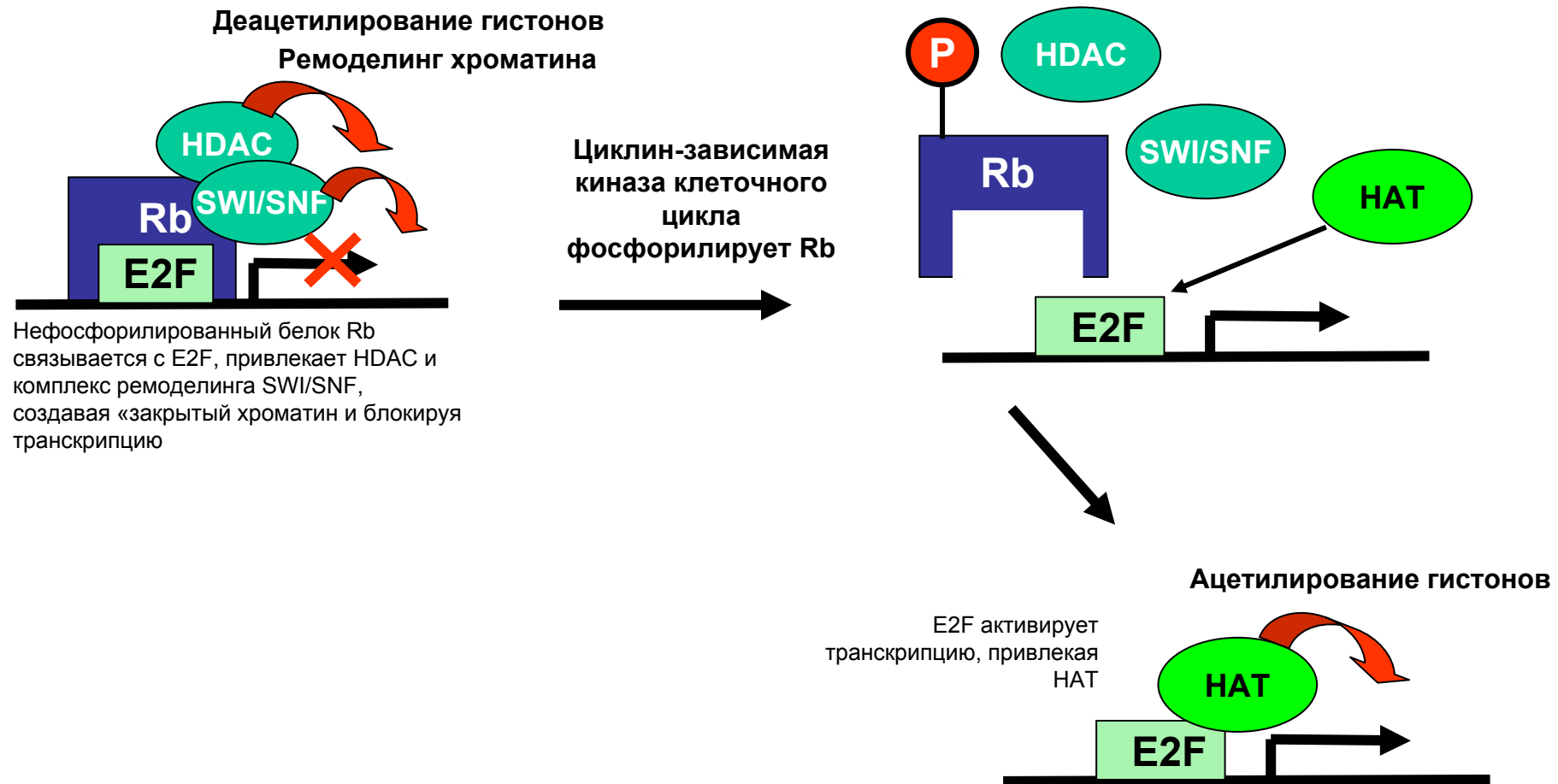


Модификации хроматина

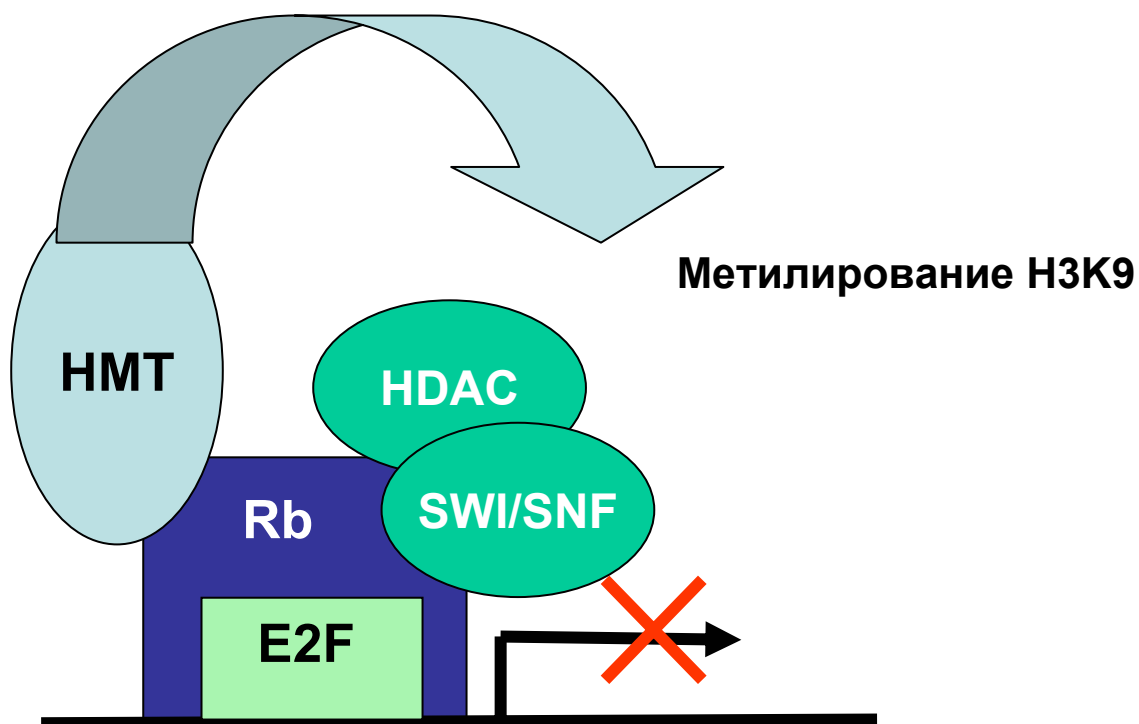
Временные локальные изменения хроматина в окрестностях промотора в регуляции транскрипции на примере генов, участвующих в репликации

Многие гены, в которых закодированы белки, необходимые при репликации ДНК (ДНК-полимераза, гистоны и др.), транскрибируются только на определенной стадии клеточного цикла – в конце фазы G1.

Все эти гены в промоторной зоне имеют сайт для посадки белка-активатора транскрипции E2F

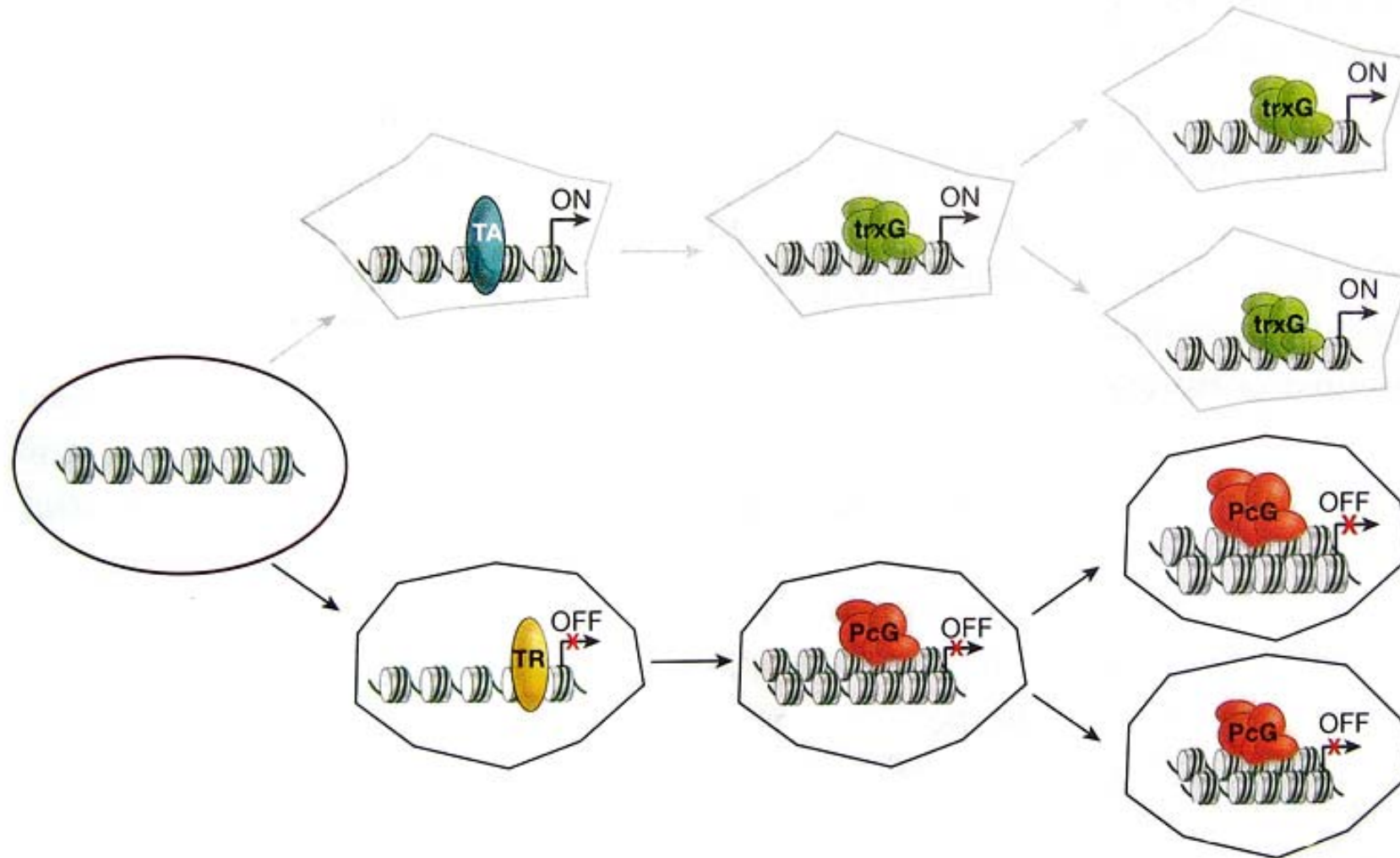


Если клетке пора выходить из клеточного цикла и больше не реплицировать ДНК, с Rb связывается гистонметилтрансфераза и метилирует H3K9. Метилирование обеспечивает более надежную и длительную репрессию

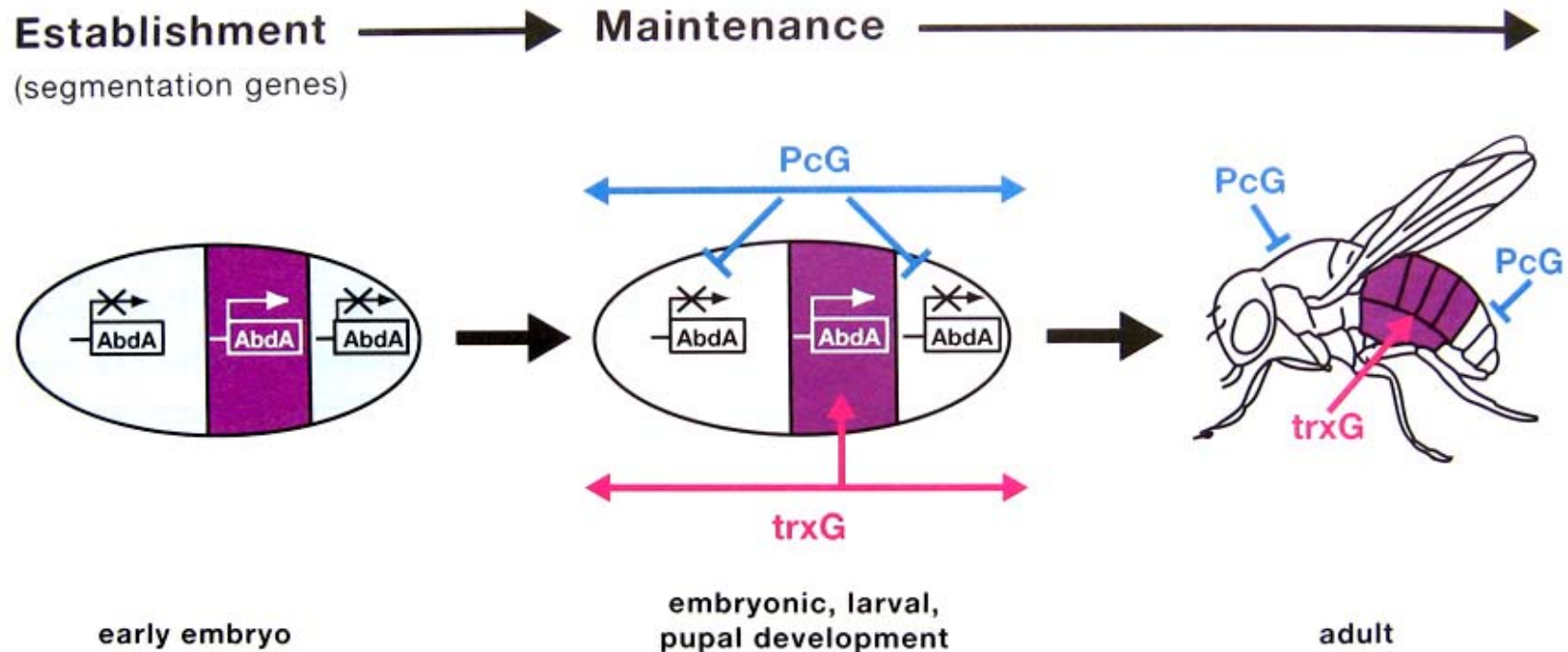


Эпигенетическая репрессия-активация на примере регуляции генов раннего развития, обеспечиваемой белковыми комплексами Polycomb и Tritorax

Комплексы Polycomb и Tritorax связываются с одними и теми же регуляторными элементами, обеспечивают наследуемое выключенное (Polycomb) или рабочее состояние (Tritorax) регулируемых генов



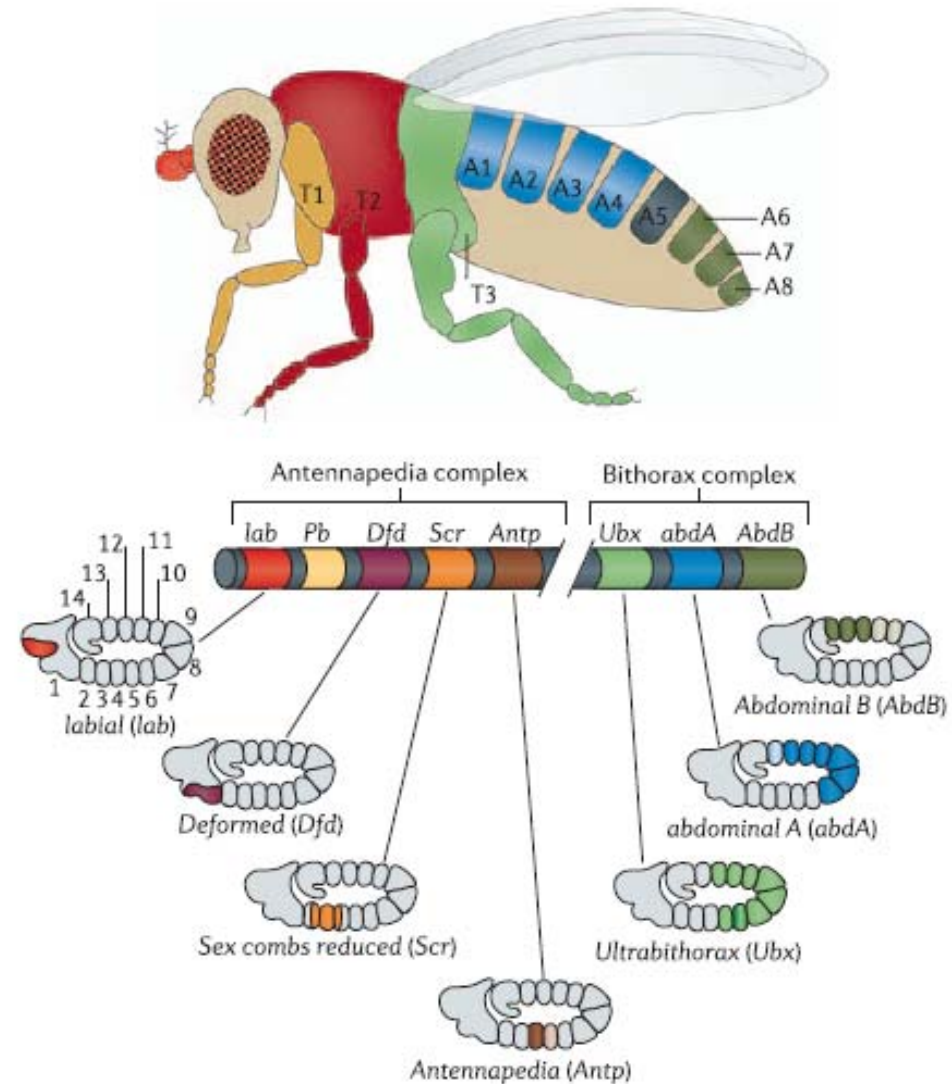
Например, гены локуса *Bitorax*, отвечающие за дифференцировку сегментов тела дрозофилы, регулируются системой Polycomb/Tritorax (PcG/TrxG)



Для нормального развития каждый из этих генов должен работать только в определенных сегментах, в остальных же он должен быть выключен. На более поздних стадиях все гены раннего развития подвергаются Polycomb-зависимой репрессии.

Для нормального развития каждый из этих генов должен работать только в определенных сегментах, в остальных же он должен быть выключен. На более поздних стадиях все гены раннего развития подвергаются Polycomb-зависимой репрессии.

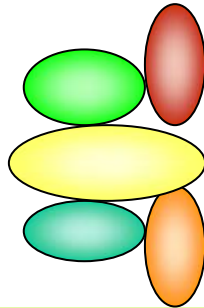
a



РсG комплексы

PRC1 (Polycomb Repressive complex 1)

PC Polycomb Содержит хромодомен (связывается с MetH3K27)
Ингибирует ремоделинг хроматина



Другие компоненты комплекса

PRC2 (Polycomb Repressive complex 2)

ESC HDAC
E(Z) HMT

Trx комплексы

TAC1 (Tritorax activating complex 1)

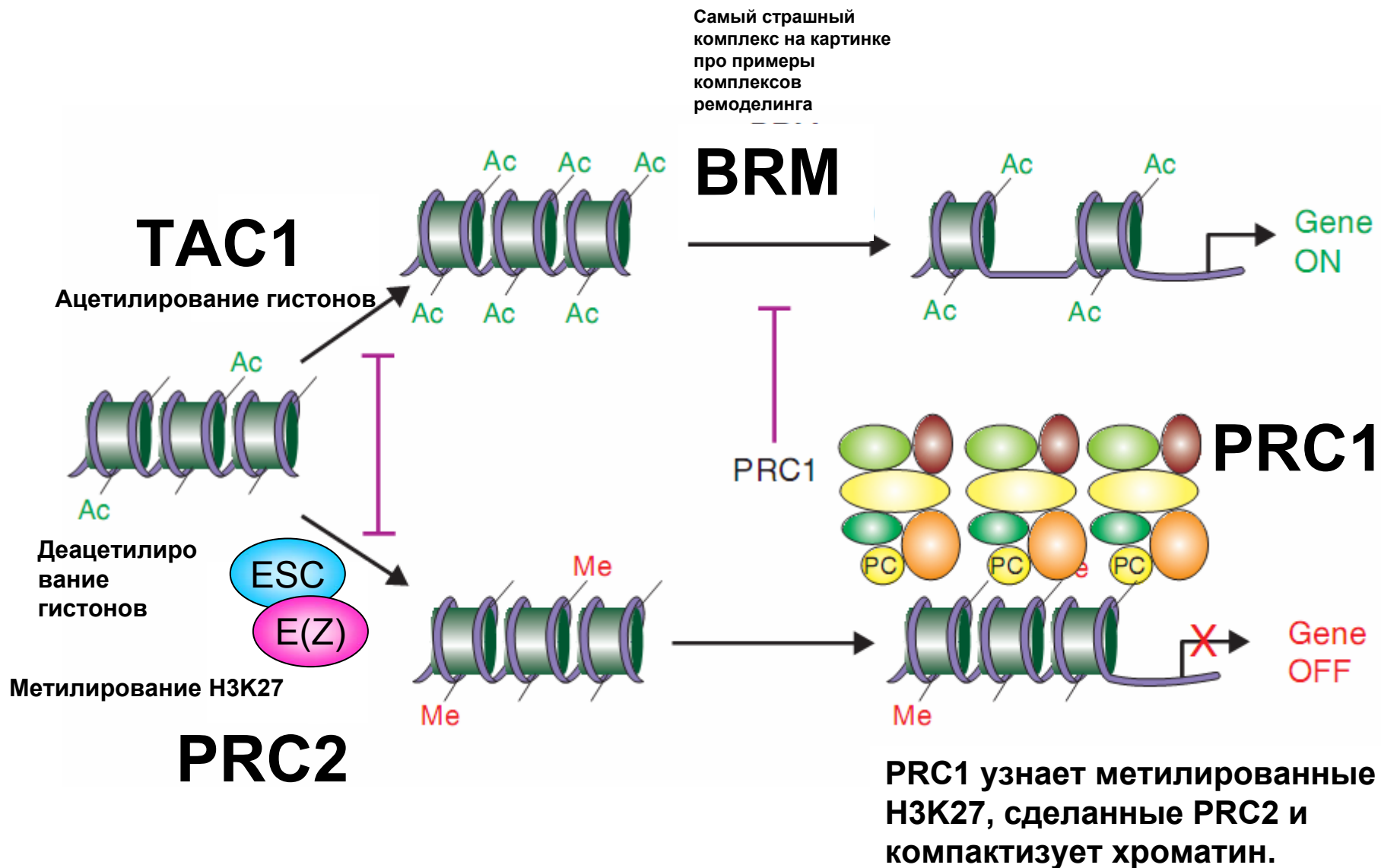
Содержит НАТ, коактиваторы транскрипции

BRM

Комплекс ремоделинга. Включает Brahma АТФазу

Как работают PcG и TrxG комплексы

И PcG и TrxG узнают специальные последовательности ДНК – PRE/TRE (Polycomb/Tritorax response elements)



Репрессия и сайленсинг

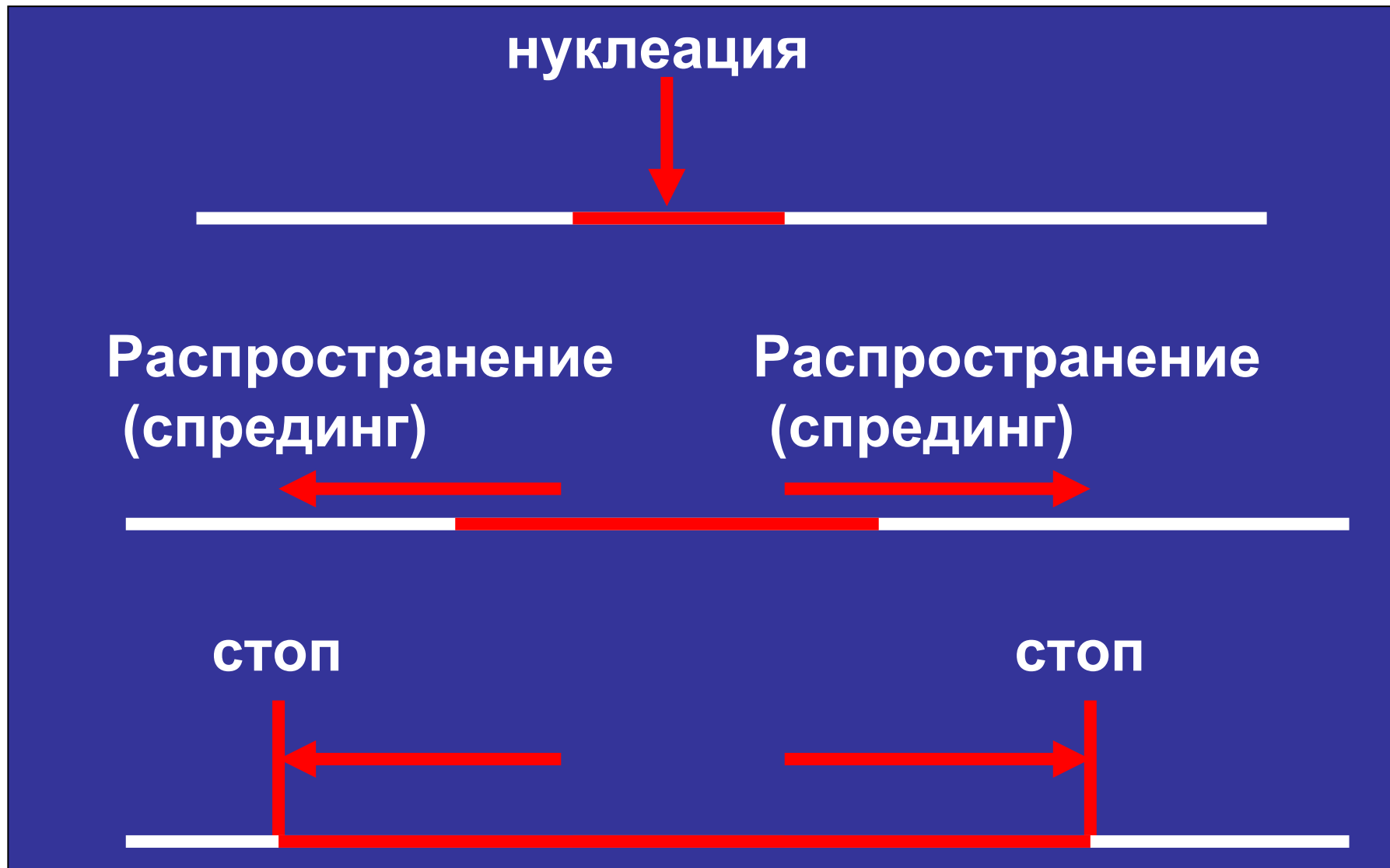
Удобно провести разделение между локальными феноменами (условно, «репрессия») и сайленсингом

При сайленсинге состояние репрессии начинается от определенного сайта «нуклеации» (начала сборки), а потом распространяется вдоль по хромосоме.

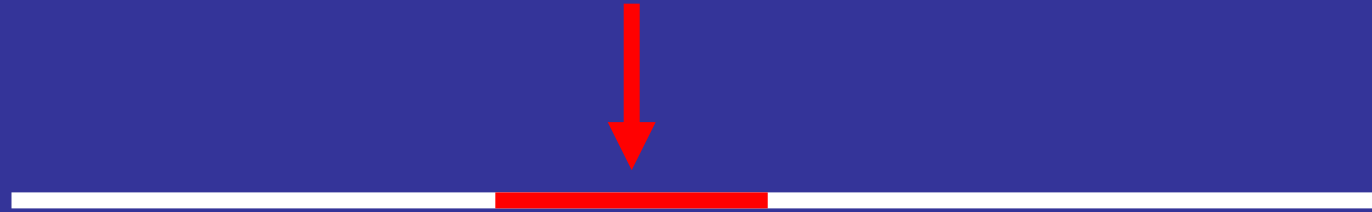
В результате образуется гетерохроматин

Как происходит инактивация протяженных участков хромосом?

(сходным образом могут устанавливаться и протяженные участки активного хроматина, например, при активации единственной X-хромосомы самцов дрозофилы)

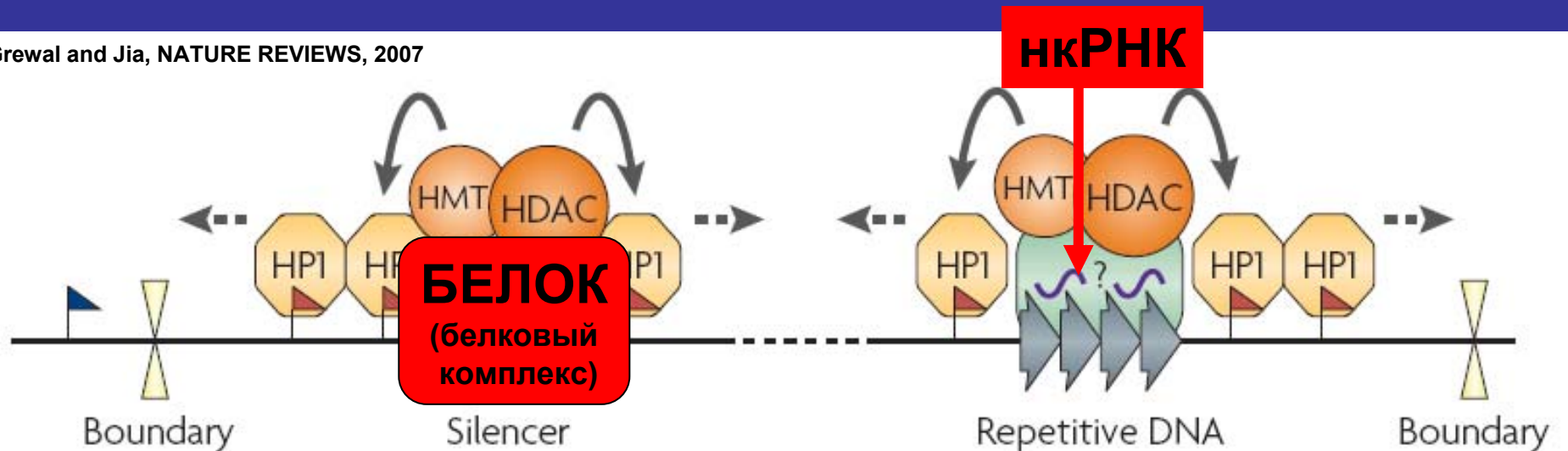


нуклеация



Механизмы инициации сборки гетерохроматина

Grewal and Jia, NATURE REVIEWS, 2007



Все начинается с белков

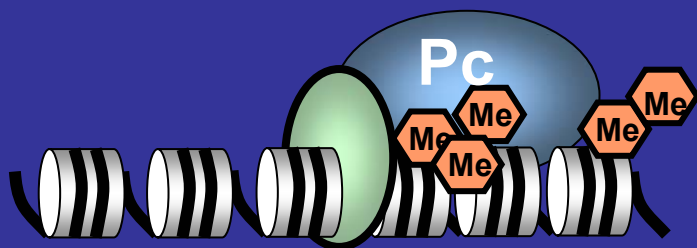
Все начинается с гомологичной некодирующей РНК

репрессия эухроматиновых генов



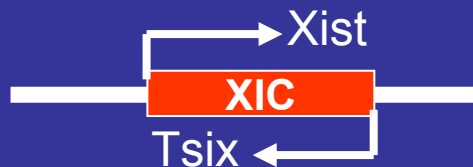
Малые РНК

Возникают при транскрипции
регуляторных
последовательностей

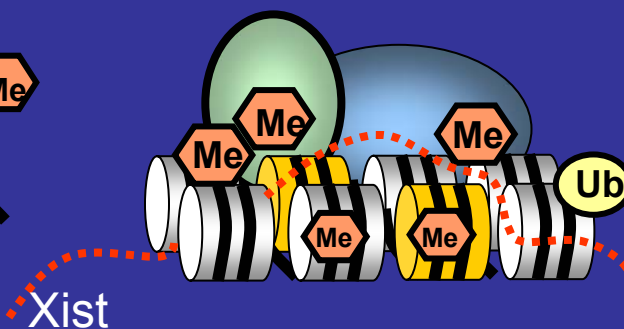


Дисперсное распределение в ядре

Инактивация X-хромосомы у млекопитающих

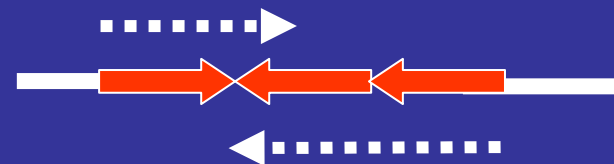


Xist РНК



Тельце Барра

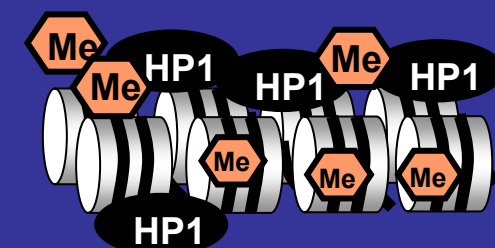
конститутивный гетерохроматин



2ц РНК

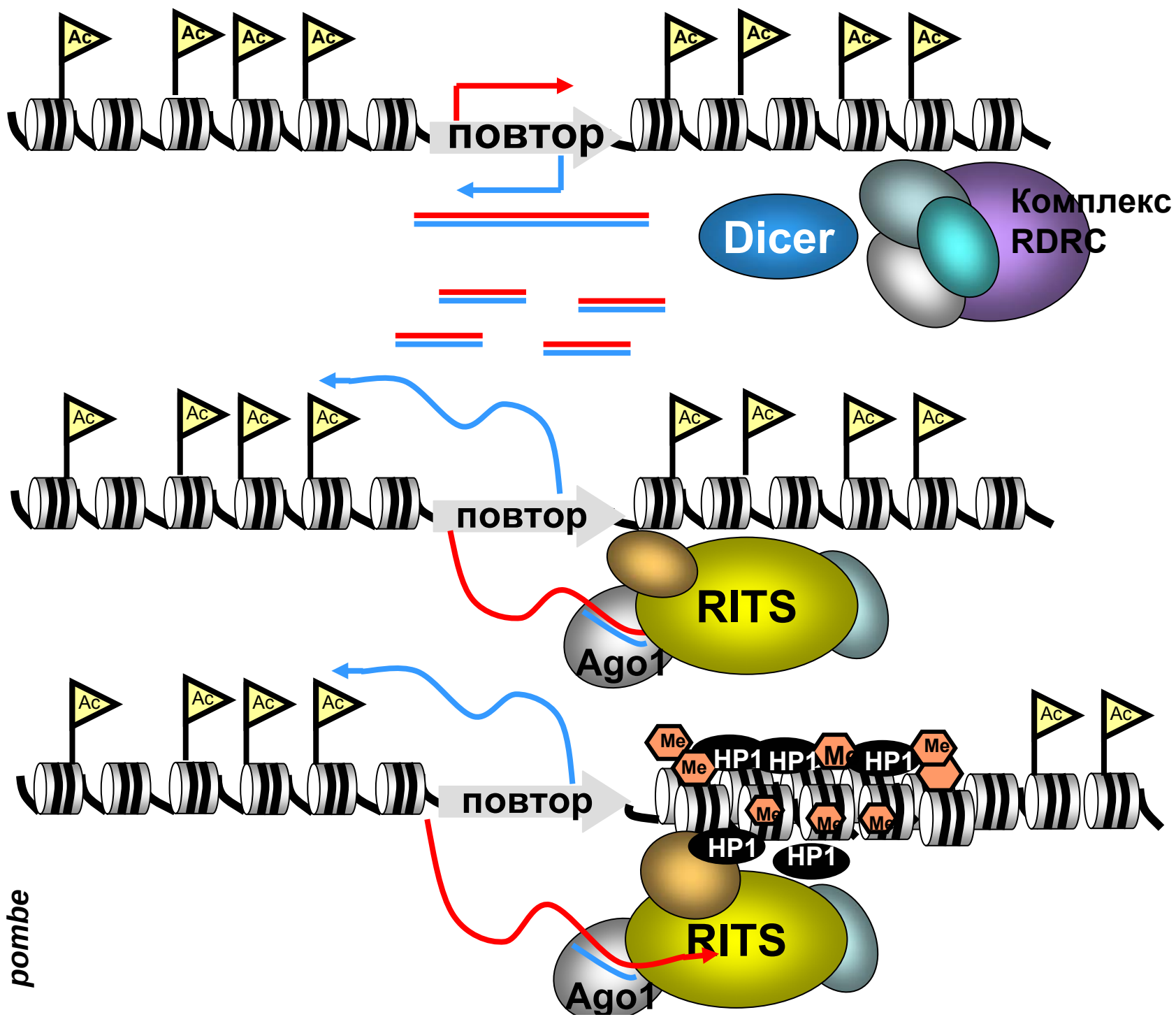


Dicer

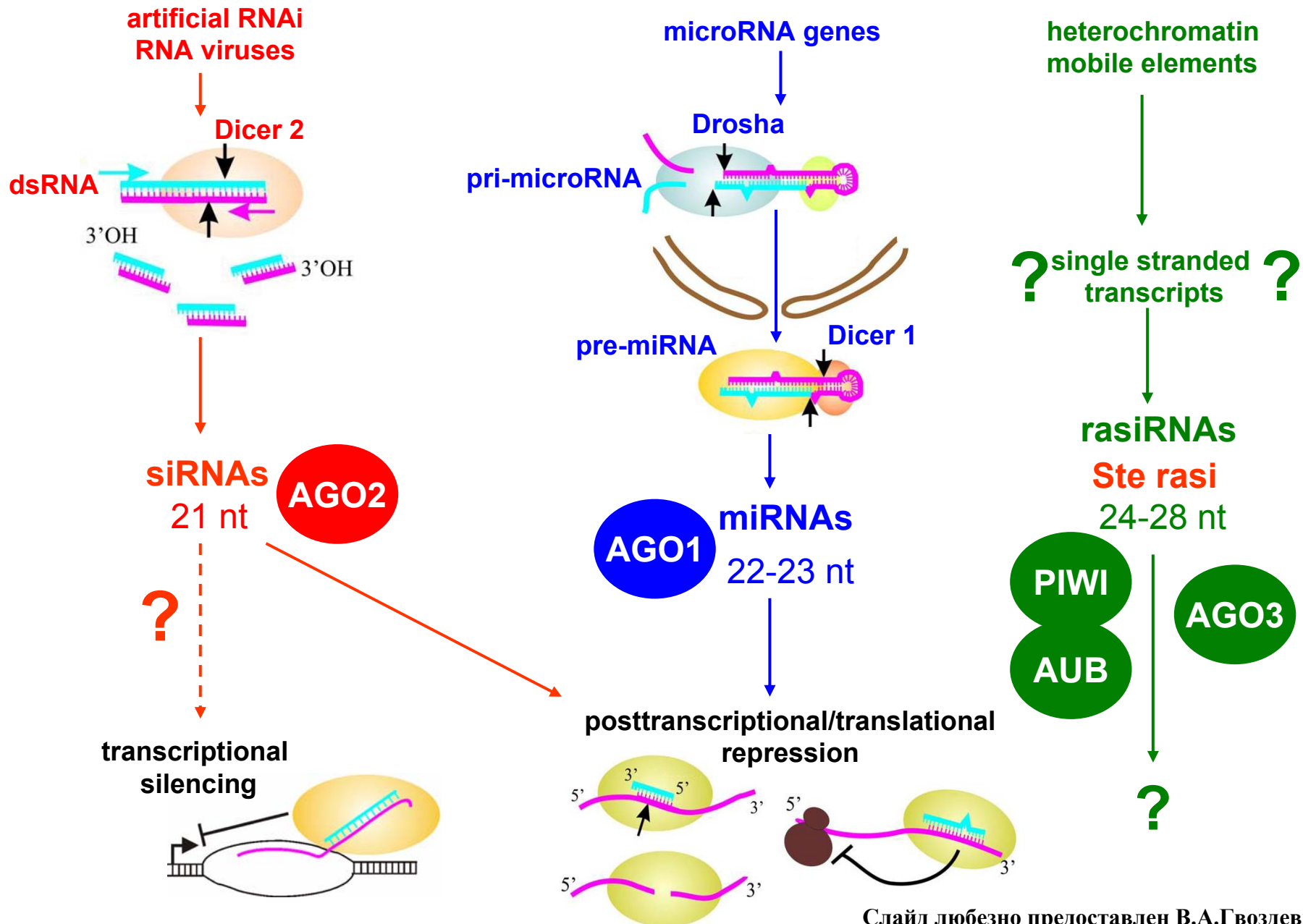


Фокусы гетерохроматина

Универсальный механизм инициации формирования гетерохроматина, впервые исследованный на *Schizosaccharomyces pombe*



Short RNA pathways in Drosophila



**Распространение
(спрединг)**

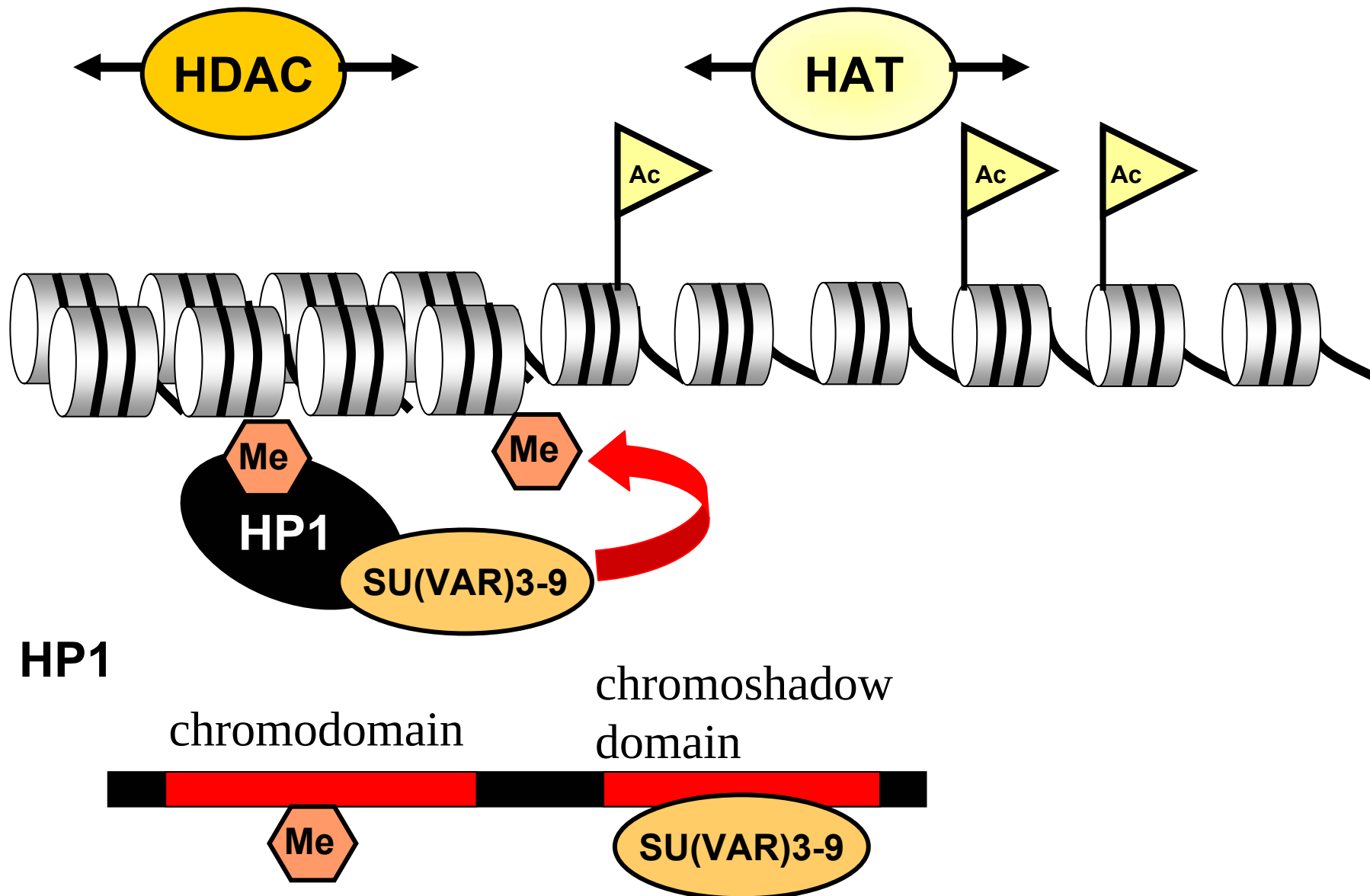


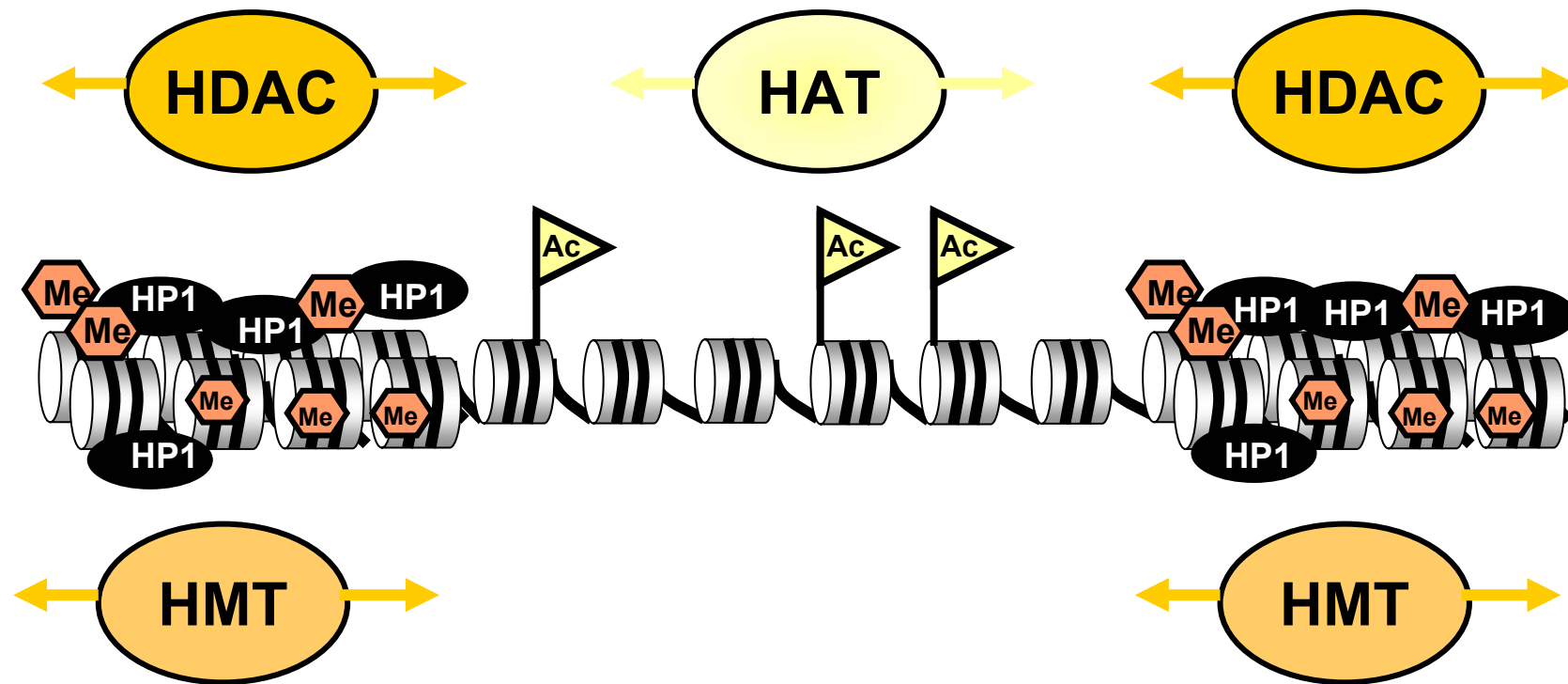
**Распространение
(спрединг)**



Распространение гетерохроматина

(прицентромерный гетерохроматин)





дрожжи
S.pombe

SWI6

Crl4

D.melanogaster

HP1

SU(VAR)3-9

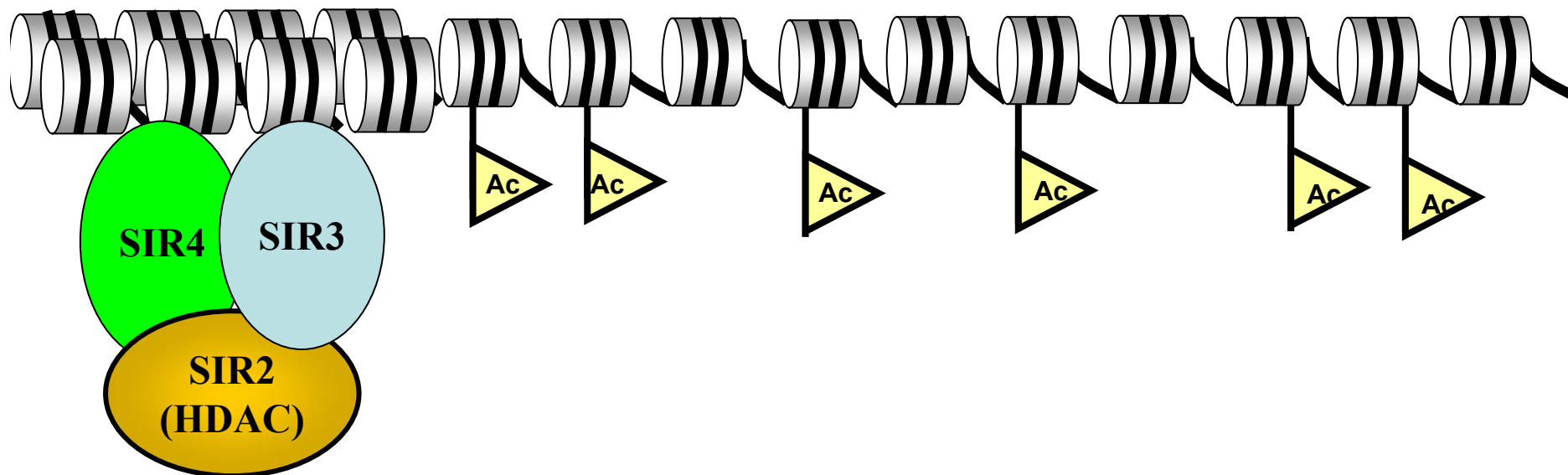
H.sapiens

HP1 α,β,γ

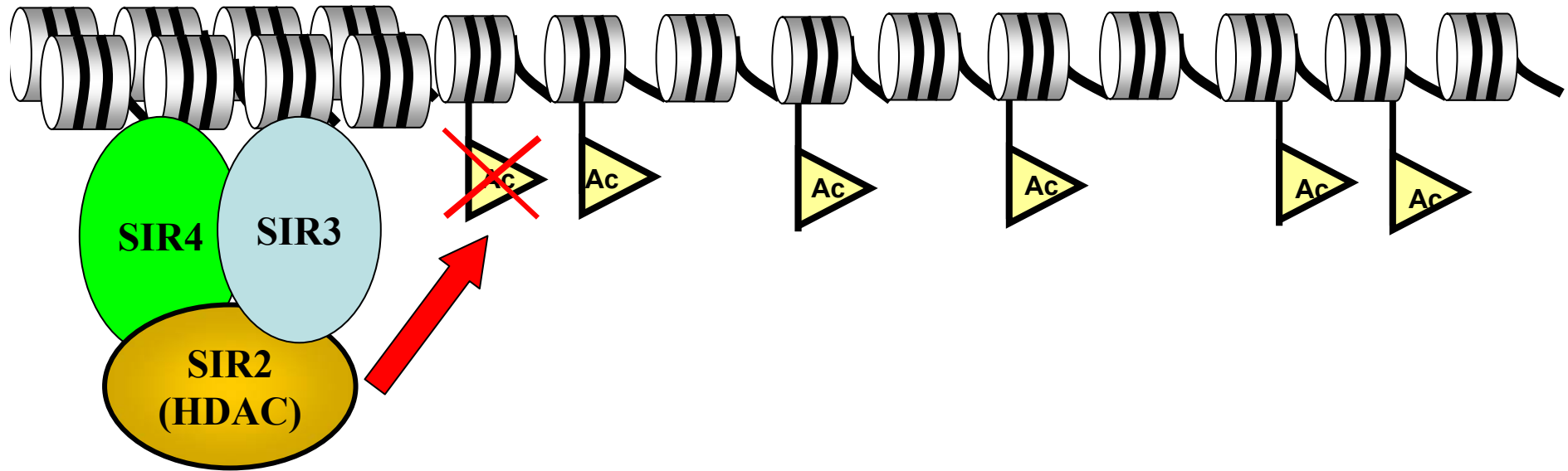
SUV39h1,2

За формирование гетерохроматина у эукариот отвечают высоко консервативные белки.
Исключение составляют дрожжи *S. cerevisiae*

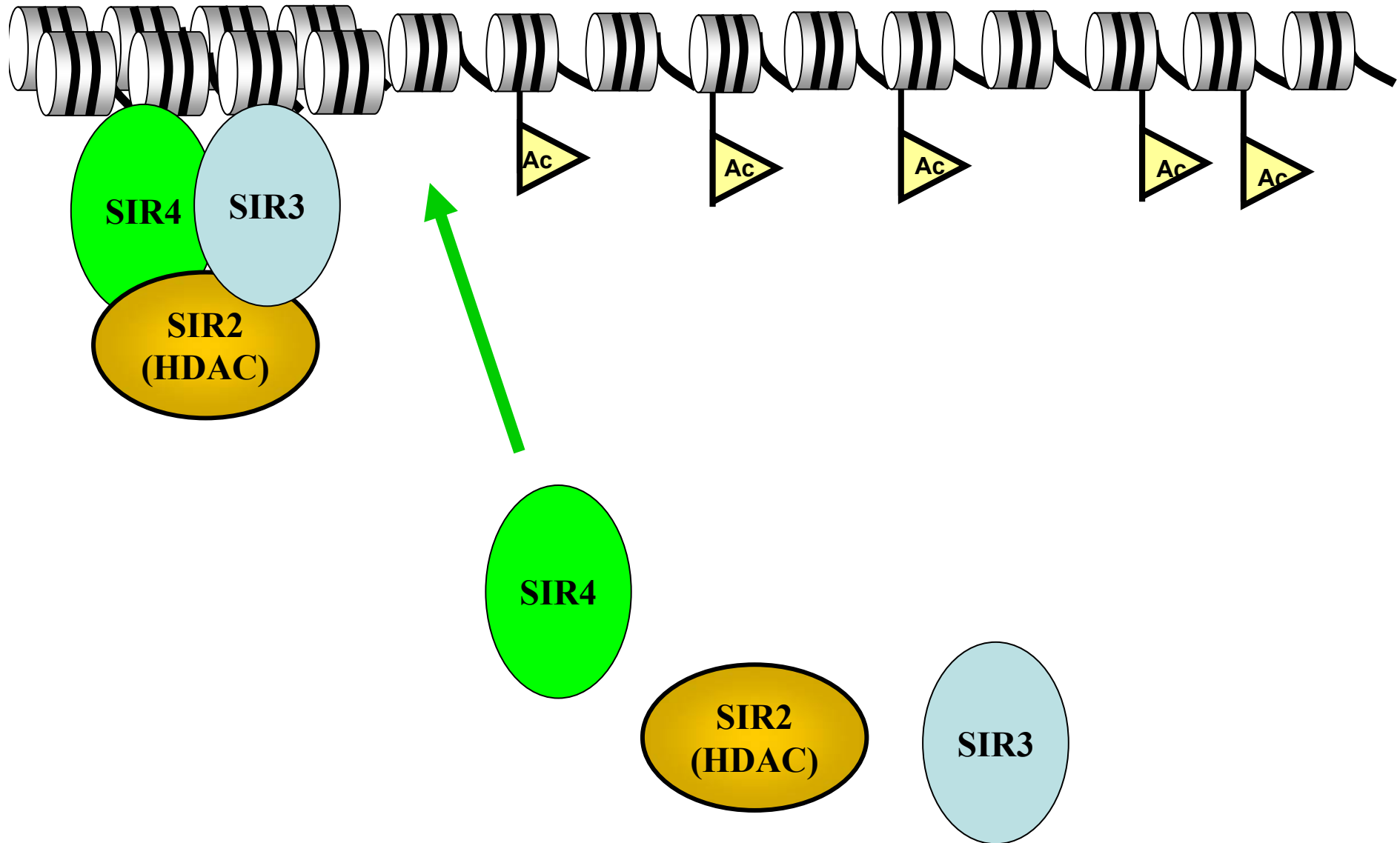
Распространение гетерохроматина у *S. cerevisiae*



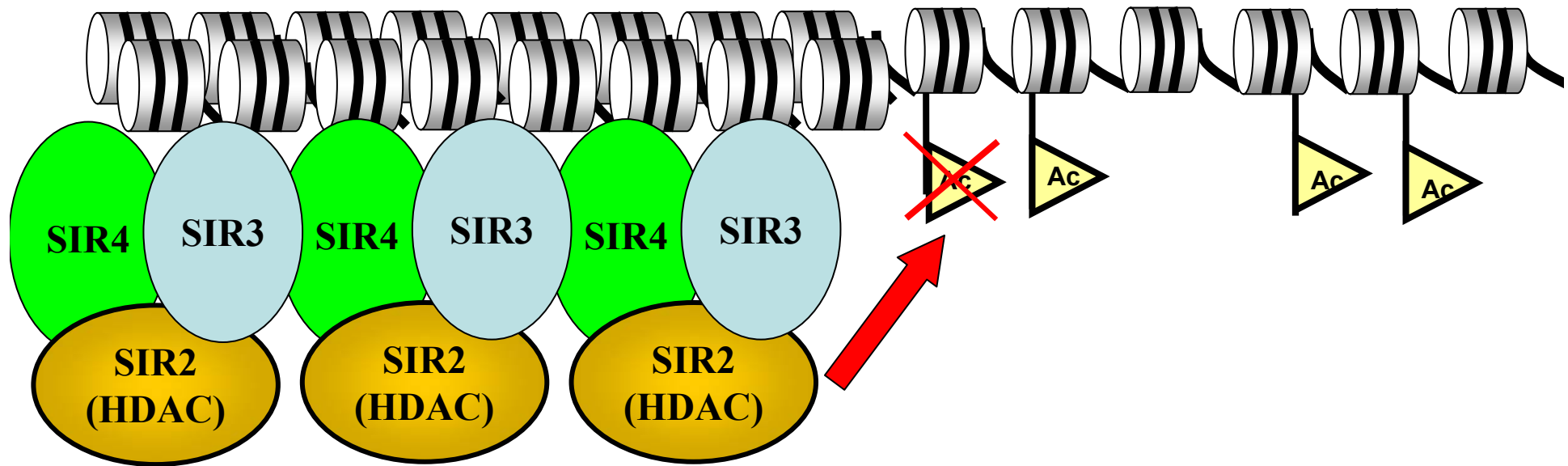
S. cerevisiae



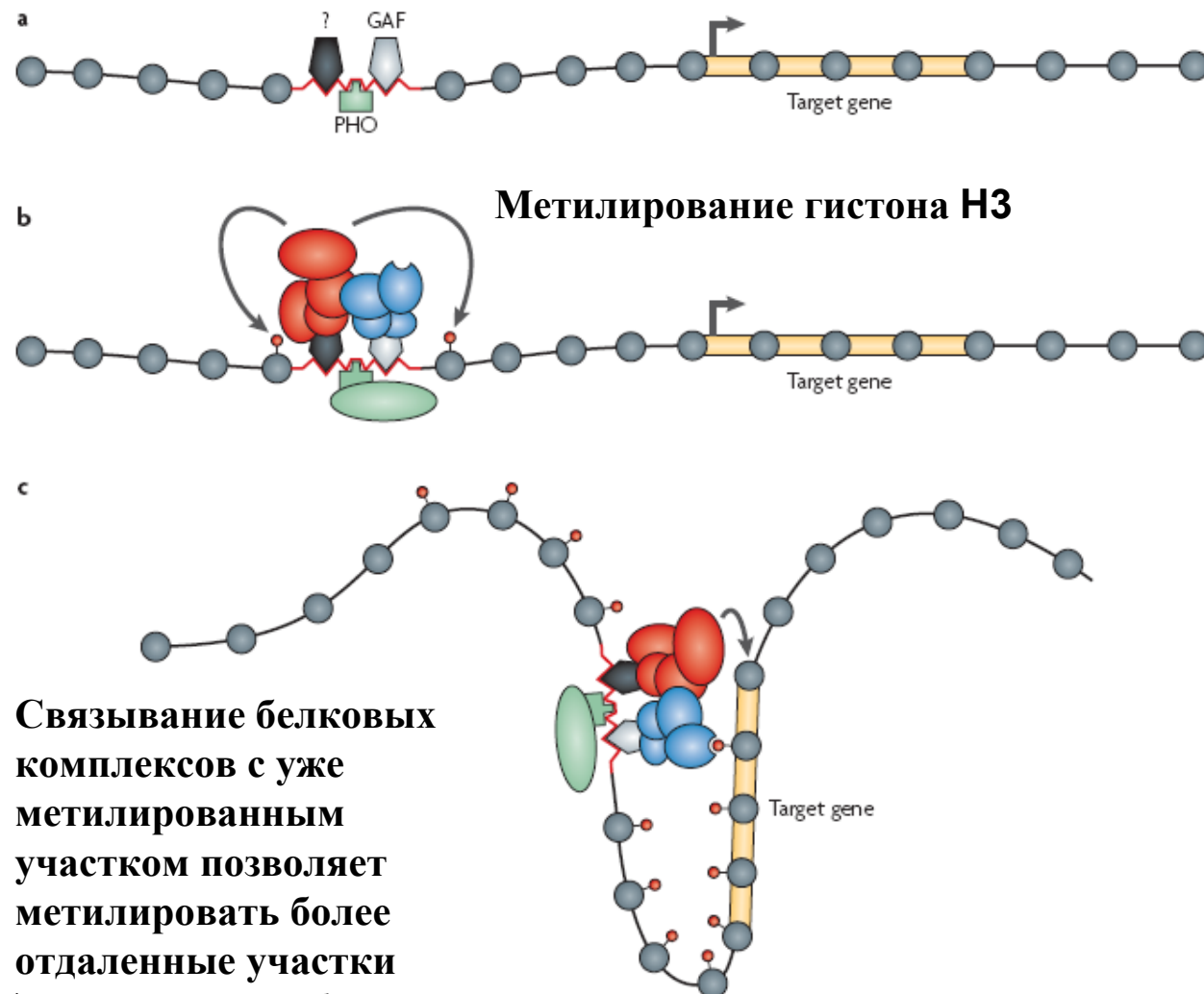
S. cerevisiae



S. cerevisiae



Предполагаемый механизм спрединга в случае Polycomb-зависимого сайленсинга



терминация



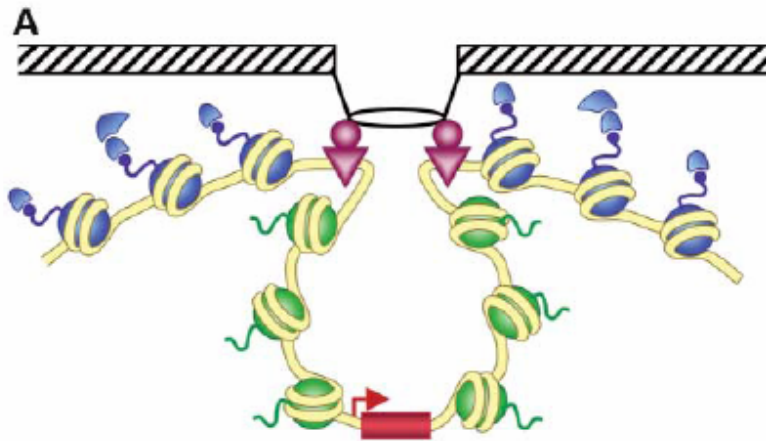
Механизмы остановки распространения гетерохроматина

Противоположная активность ферментов-модификаторов хроматина (например, активность HAT против активности HDAC)

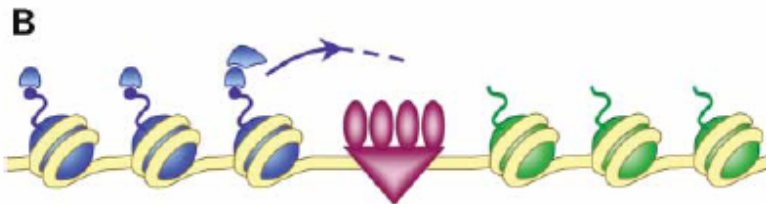
Исчерпывание транс-факторов (особенно наглядно проявляется в случае эффекта положения мозаичного типа)

Барьеры различной природы (инсуляторы, транскрибирующиеся гены и др.)

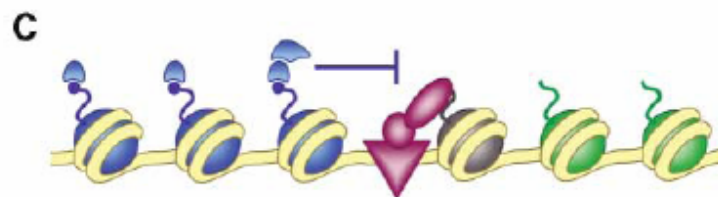
Механизмы остановки распространения гетерохроматина



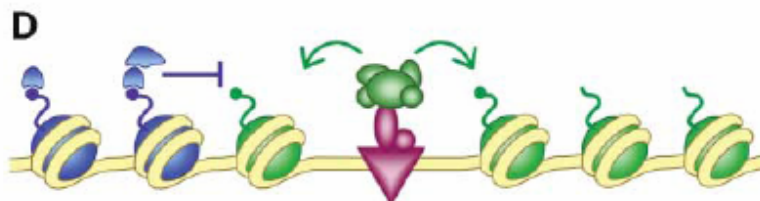
Прикрепление к ядерной поре или ядерной ламине



Ферменты-модификаторы, обеспечивающие спрединг гетерохроматина не могут «дотянуться» до нуклеосом по другую сторону инсультатора, дальнейший спрединг невозможен



Белки на инсультаторе защищают нуклеосомы от модификаций. Спрединг невозможен

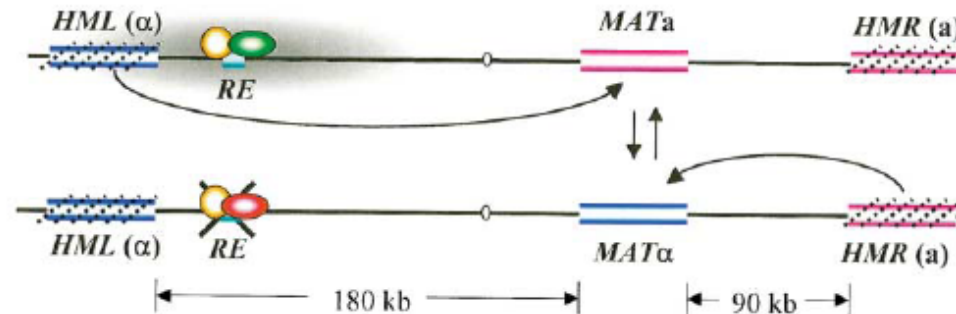


Связывание фермента, удаляющего гетерохроматиновые модификации

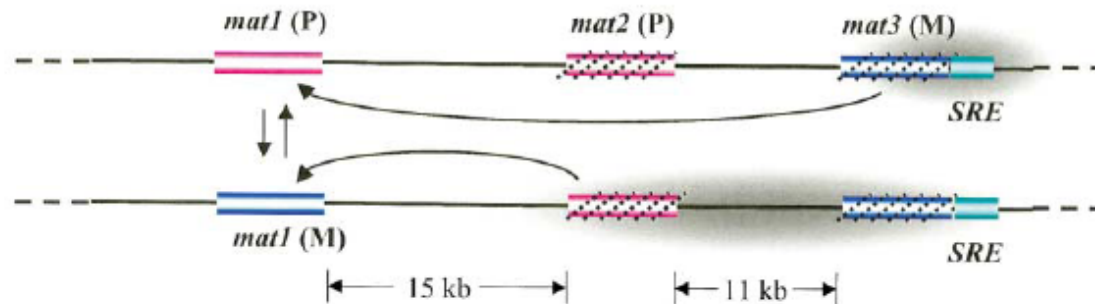
**Организация гетерохроматиновых районов
на примере *S. cerevisiae***

Локусы, отвечающие за «пол» у дрожжей – одни из наиболее изученных примеров гетерохроматина (не забываем, что эти два вида дрожжей используют при формировании гетерохроматина очень разные (не родственные) белковые комплексы)

A *Saccharomyces cerevisiae*



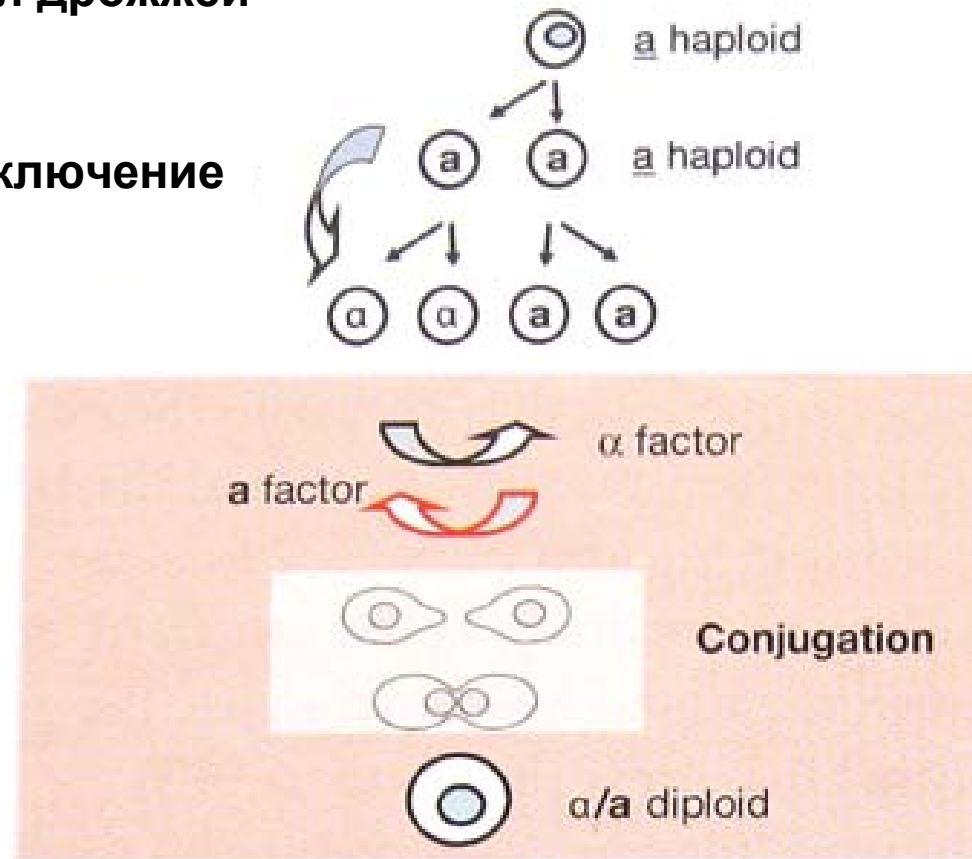
B *Schizosaccharomyces pombe*



У дрожжей происходит чередование «мужского» и «женского» поколений. Это обеспечивается существованием двух аллелей локуса MAT. В геноме всегда присутствует три копии этого локуса. Две – «мужская» и «женская» - всегда упакованы в гетерохроматин и не экспрессируются. Третья копия является активным геном и отвечает за синтез пол-специфического белка. Каждое новое поколение происходит вырезание рабочей копии, и гетерохроматиновая копия «другого пола» используется как матрица для вставки нового варианта.

Жизненный цикл дрожжей

Переключение
пола

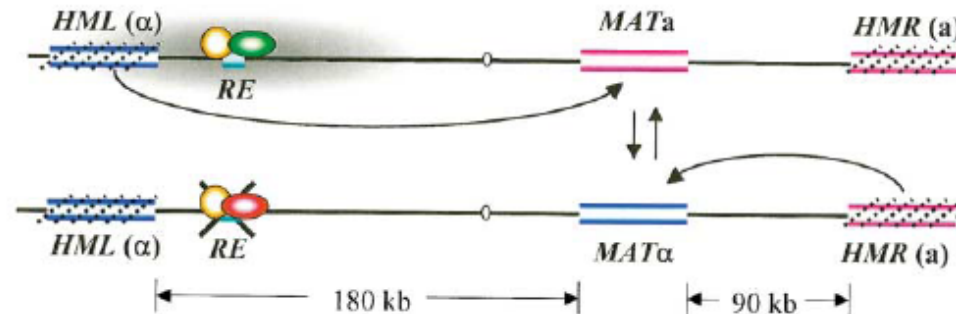


Конъюгировать могут только «разнополые» дрожжи

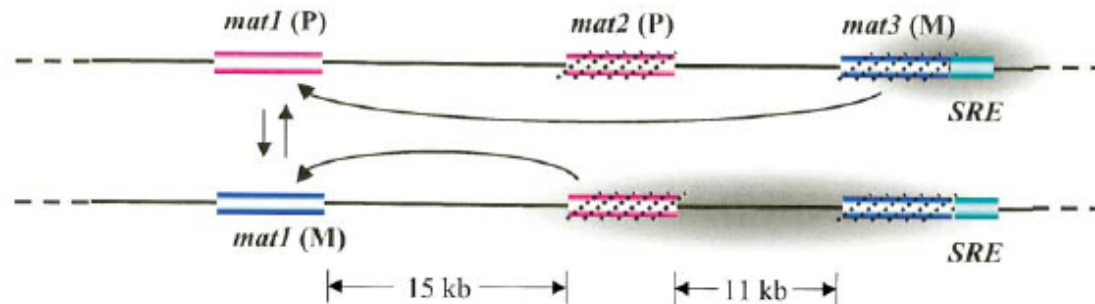
a и α

Локусы, отвечающие за «пол» у дрожжей – одни из наиболее изученных примеров гетерохроматина (не забываем, что эти два вида дрожжей используют при формировании гетерохроматина очень разные (не родственные) белковые комплексы)

A *Saccharomyces cerevisiae*



B *Schizosaccharomyces pombe*



У дрожжей происходит чередование «мужского» и «женского» поколений. Это обеспечивается существованием двух аллелей локуса MAT. В геноме всегда присутствует три копии этого локуса. Две – «мужская» и «женская» - всегда упакованы в гетерохроматин и не экспрессируются. Третья копия является активным геном и отвечает за синтез пол-специфического белка. Каждое новое поколение происходит вырезание рабочей копии, и гетерохроматиновая копия «другого пола» используется как матрица для вставки нового варианта.

Организация гетерохроматиновых районов на примере *S. cerevisiae*

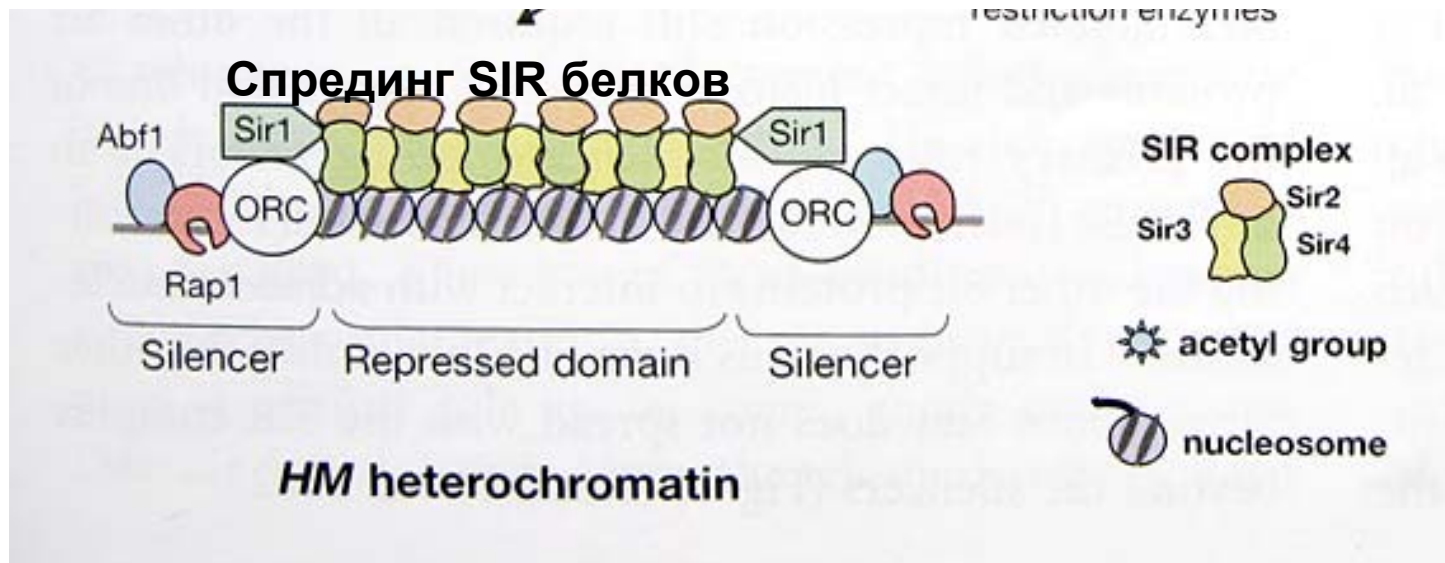
Формирование гетерохроматина в молчащих половых локусах

Нуклеация

Белок Rap1 узнает специфическую последовательность ДНК - сайленсер

Вокруг Rap1 собирается белковый комплекс, который узнают SIR белки

Спрединг SIR белков



Организация гетерохроматиновых районов на примере *S. cerevisiae*

Формирование теломерного гетерохроматина

Нуклеация

Белок Rap1 специфически связывается с теломерными повторами

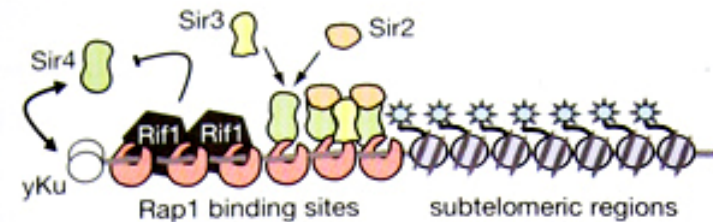
Белки Ku узнают концевой «обрыв» ДНК

SIR белки узнают Rap1 и связываются

Спрединг SIR белков

Упаковка хроматина высокого порядка, прикрепление к ядерной ламине (участвуют Ku белки)

STEP 1) Recruitment of Sir4, then Sir2 and Sir3 to telomere-bound Rap1



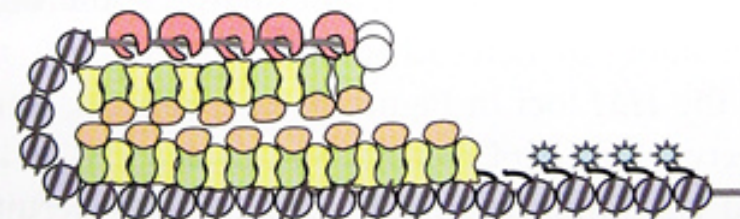
STEP 2) Sir2-mediated deacetylation of histone H4K16



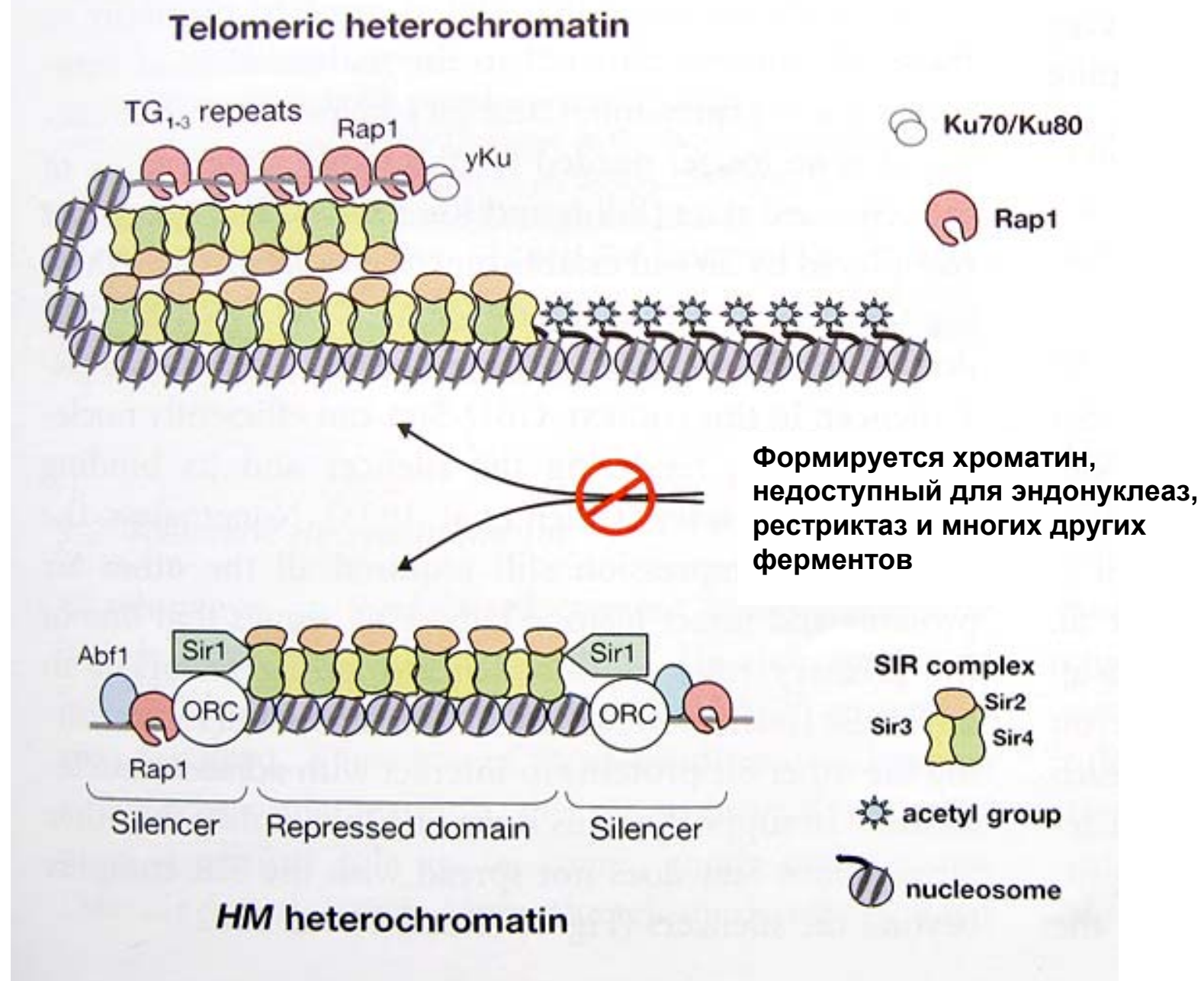
STEP 3) Spreading of the SIR complex along nucleosomes



STEP 4) Folding of a silent telomere into a higher-order structure

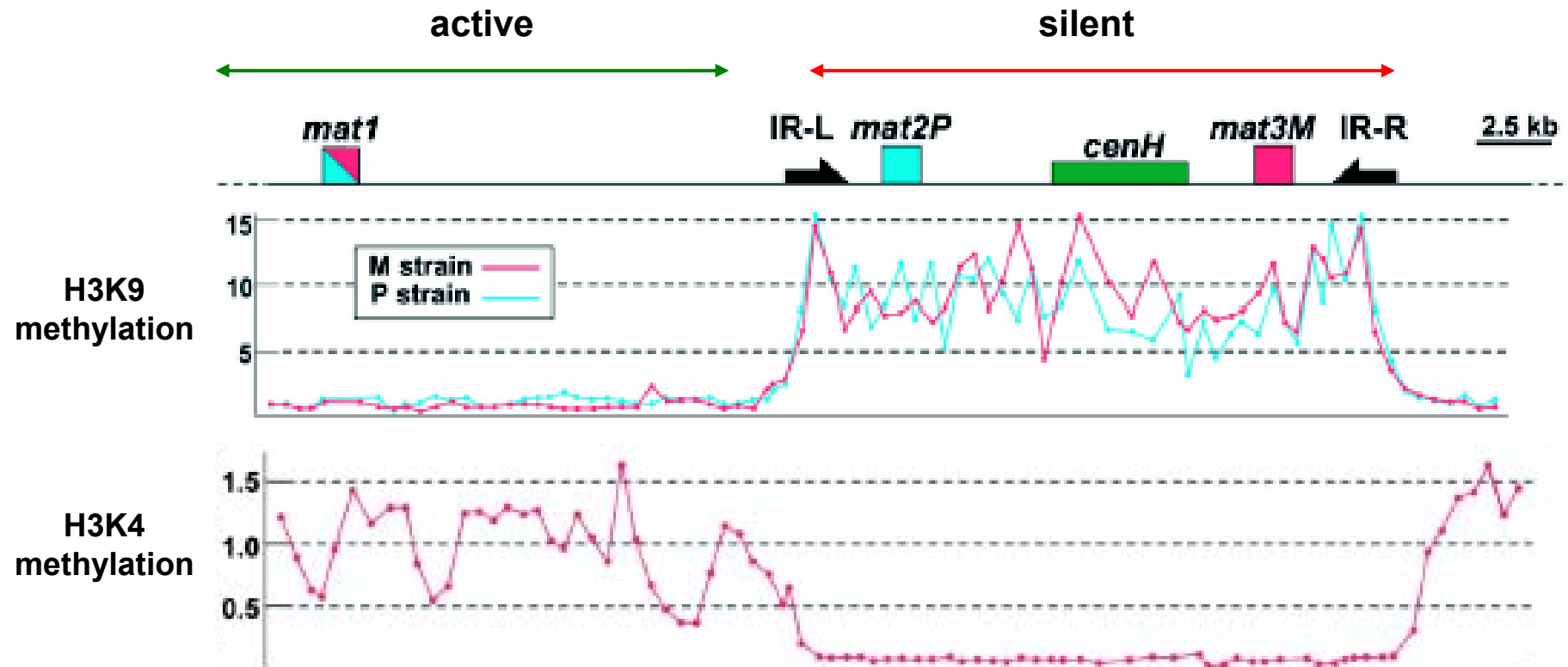


Организация гетерохроматиновых районов на примере *S. cerevisiae*



S.cerevisiae

Участок гетерохроматина



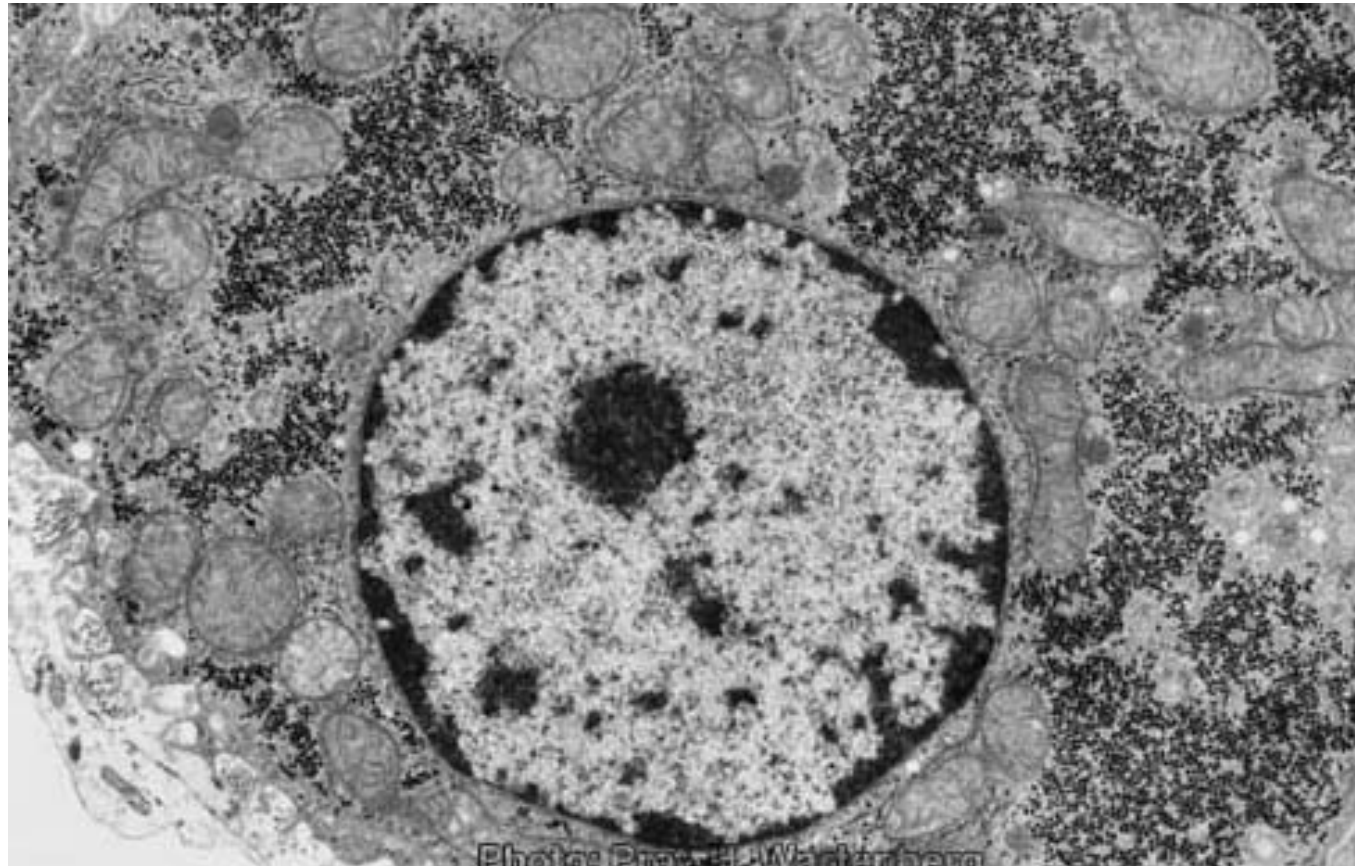
Что такое гетерохроматин?

Гетерохроматин – это участки хромосом,
плечи или целые хромосомы,
которые обладают рядом свойств:

- компактное состояние
- поздняя репликация
- обогащенность повторенными последовательностями ДНК
- обедненность генами
- низкая частота рекомбинации
- окраска С-методом
- способность вызывать эффект положения

Характерно в значительной степени для конститутивного гетерохроматина

Гетерохроматин в интерфазном ядре



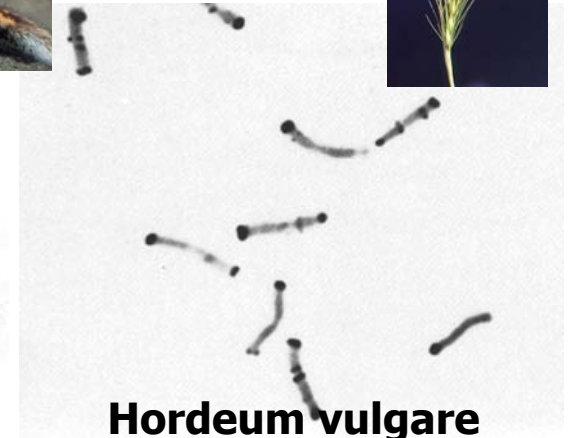
С-окраска на гетерохроматин



Vormela peregusna



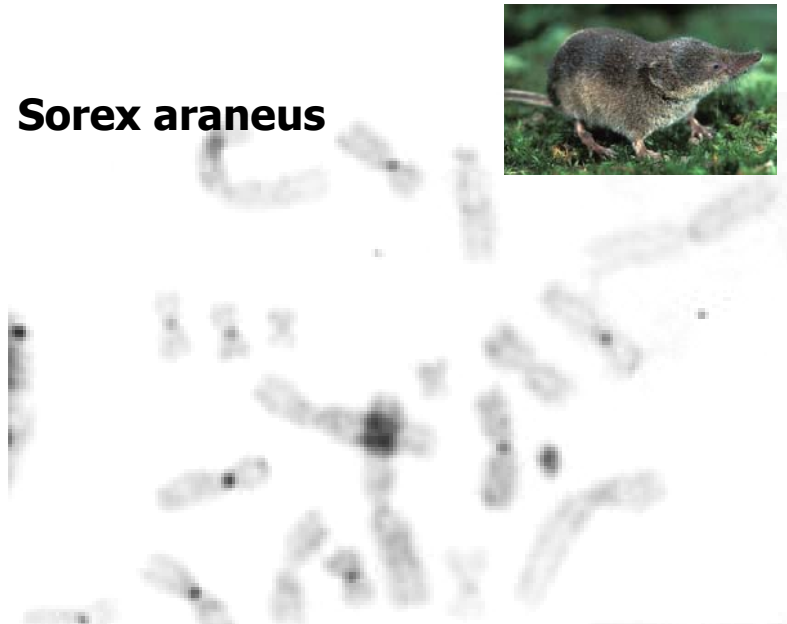
Drosophila melanogaster



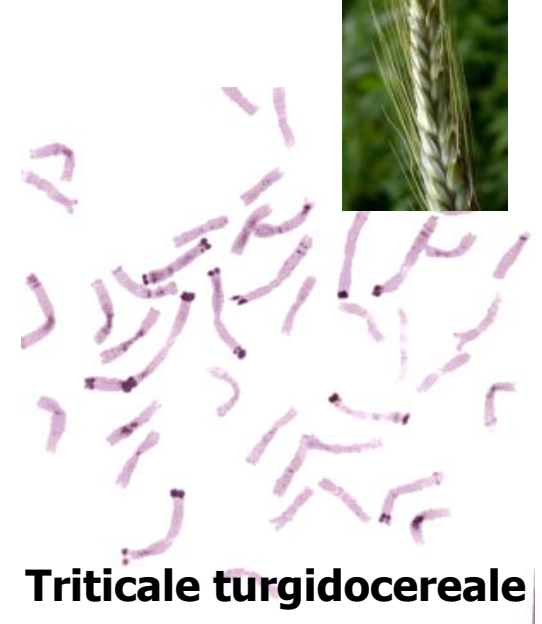
Hordeum vulgare



Sorex araneus



Equus caballus

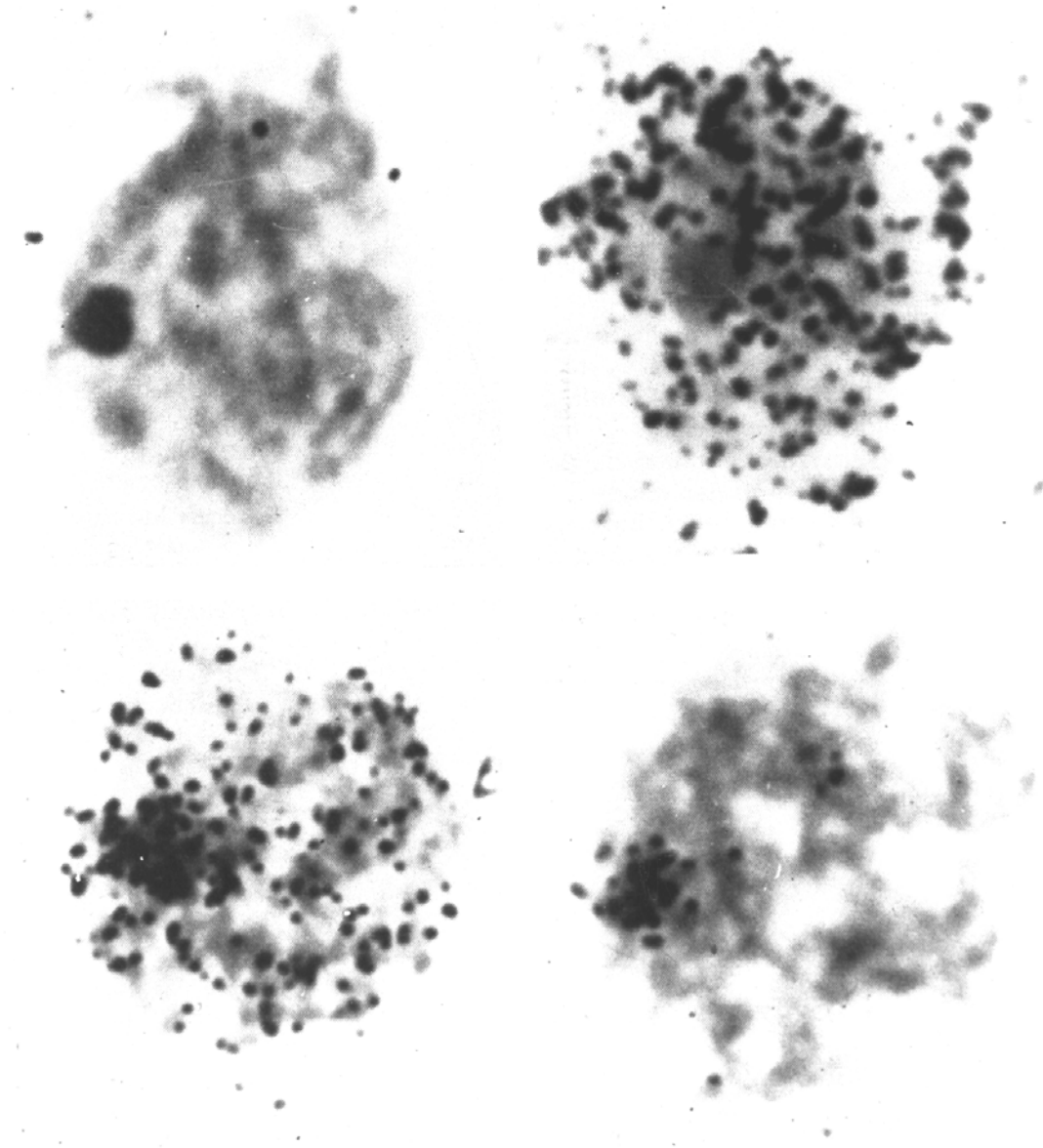


Triticale turgidocereale

Поздняя репликация

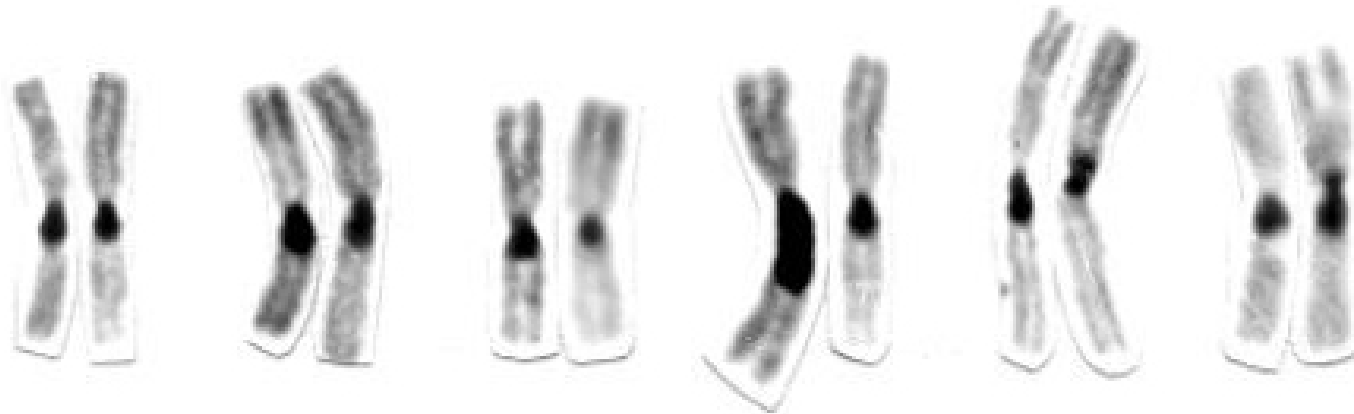


Melanoplus
differentialis



Варьирование количества Гетерохроматина (выявление с-окраской)

Варианты хромосомы 1 *Homo sapiens*



Варианты хромосомы Y *Homo sapiens*



C-парадокс

1. Избыточность генома, т.е.
размер генома больше,
чем нужно для кодирования
2. Геномы даже близких видов
могут сильно отличаться
по размеру



Amoeba proteus
290 000 000 000



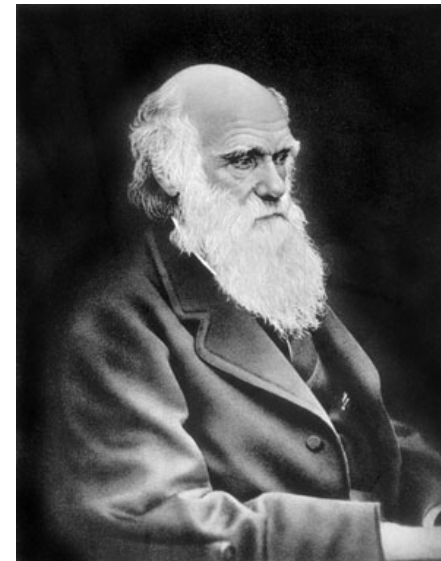
Amoeba dubia
670 000 000 000



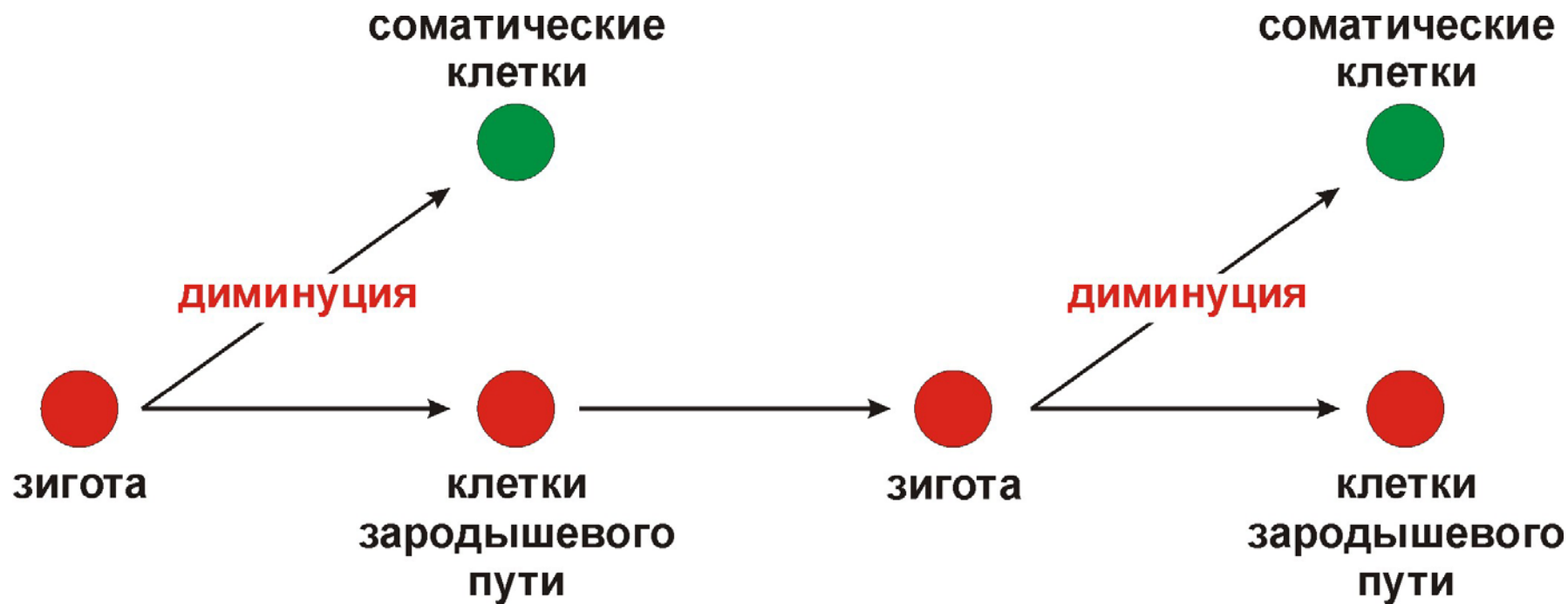
Psilotum nudum
250 000 000 000



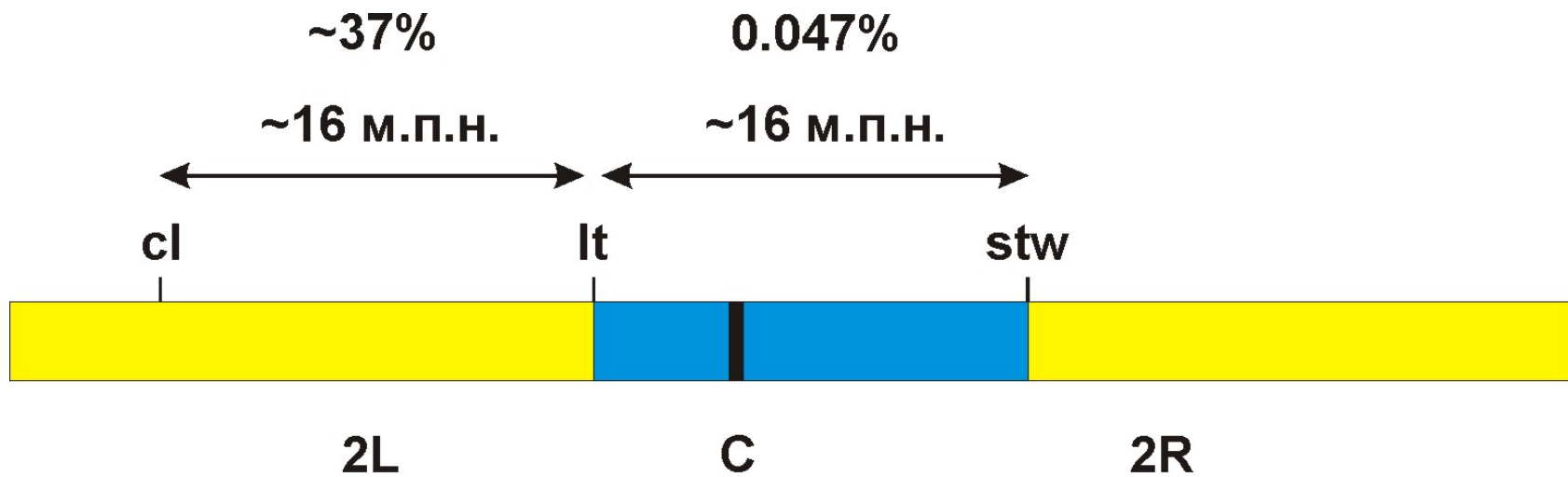
Arabidopsis thaliana
115 000 000



Homo sapiens
2 900 000 000

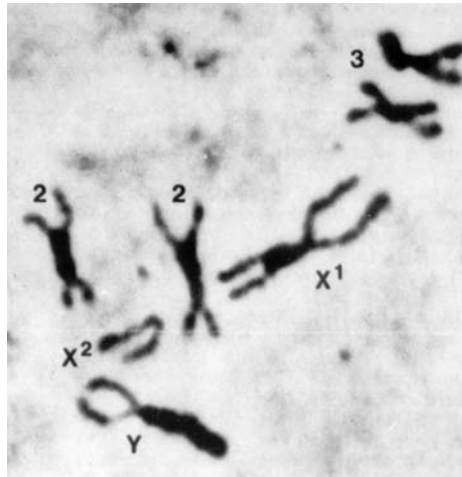


Низкая частота рекомбинации

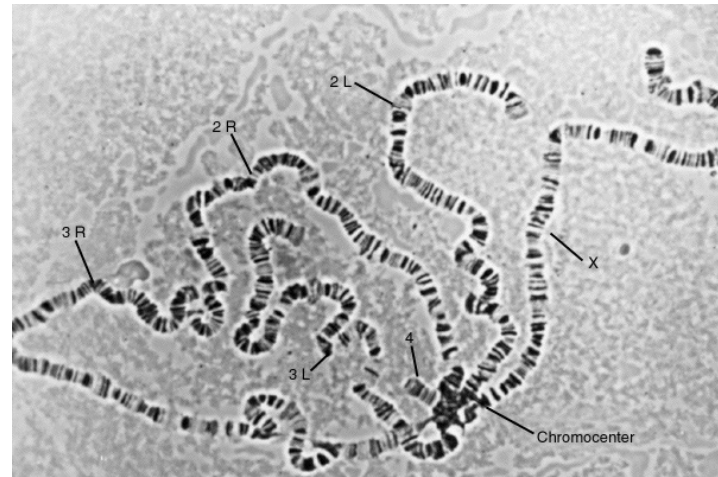


Конъюгация гетерохроматиновых районов

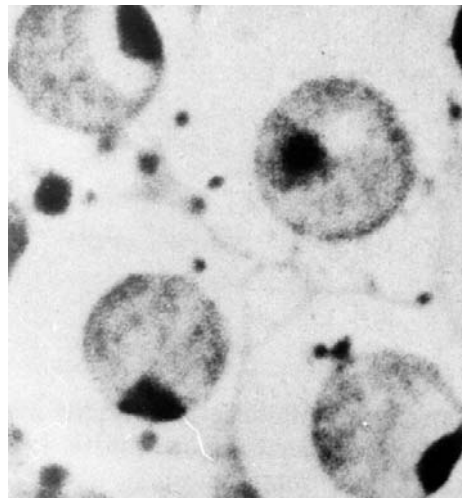
D. athabasca,
профаза митоза



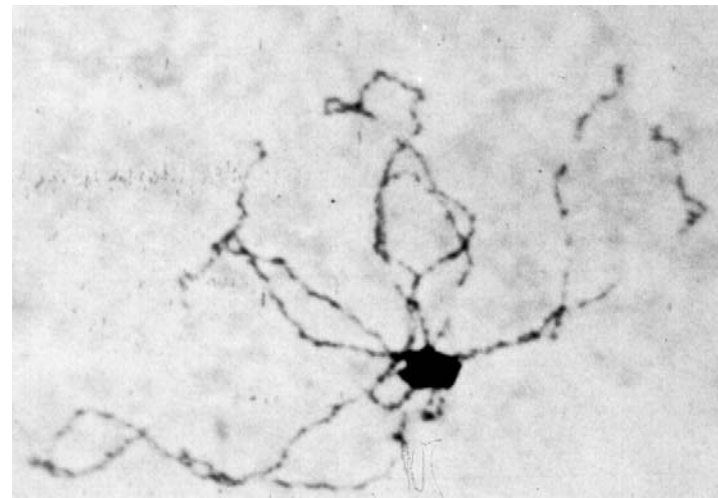
D. melanogaster
политенные хромосомы



D. melanogaster
нейробласты



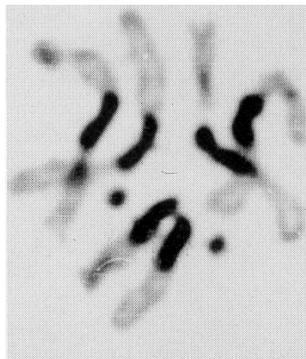
D. melanogaster
профаза мейоза



Гетерохроматин в раннем эмбриогенезе

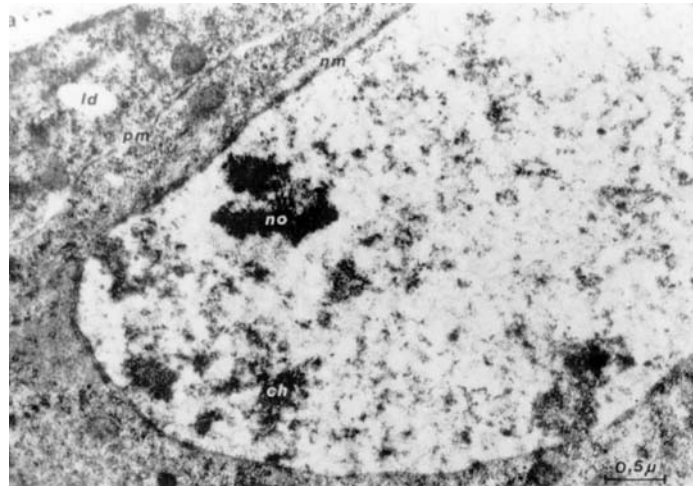
D. melanogaster

хромосомы в делении
дробления и обычном митозе

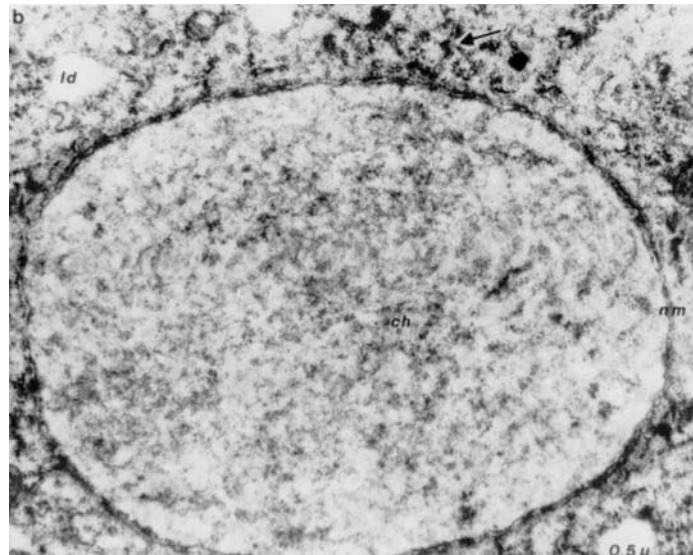


D. melanogaster

ядро клетки бластодермы



в норме



через 15 минут
после помещения в
неоплодотворенное
яйцо

**Где в геномах находится
гетерохроматин?**

Инструментом для выявления гетерохроматиновых районов может служить эффект положения генов

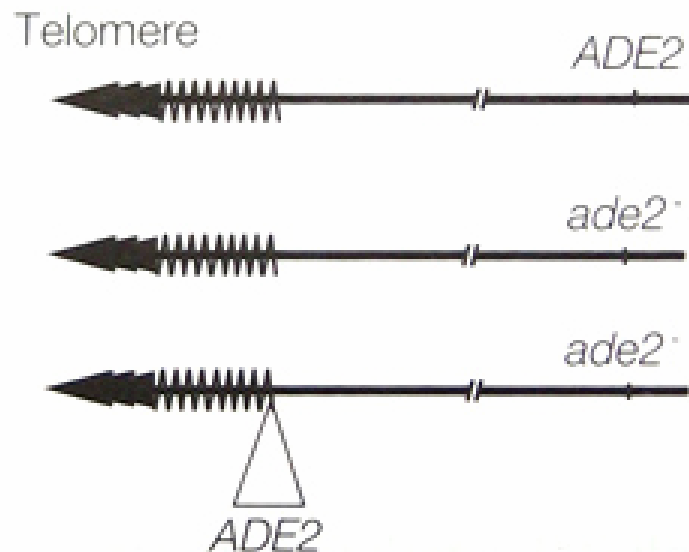
Способность района вызывать эффект положения генов (полную или частичную инактивацию генов, искусственно перенесенных в этот район) часто рассматривают как достаточное условие отнесения его к гетерохроматину

У дрожжей это один из немногих способов выявления гетерохроматиновых районов, так как хромосомы слишком малы для морфологических исследований.

Экспериментальные модели для исследования ЭП

Мозаичный эффект положения гена у дрожжей

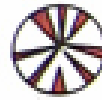
Встройка в разные места генома *S. cerevisiae* гена *ade2*, продукт которого участвует в синтезе аденина. Если ген не работает, накапливается красный промежуточный продукт синтеза аденина.



Нормальный ген, колония дрожжей белого цвета



Мутант по *ade2*, ген не работает, колония красная.

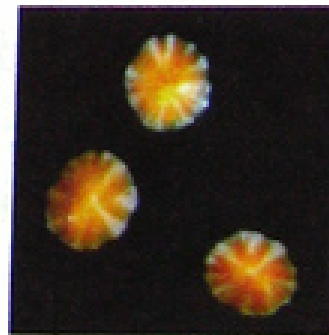


Встройка трансгена, несущего нормальную копию *ade2* на фоне мутации *ade2*, Трансген попал в соседство с теломерным гетерохроматином.

В некоторых клетках он поддерживает и наследует рабочее состояние (белые сектора), в других он инактивируется (красные сектора)

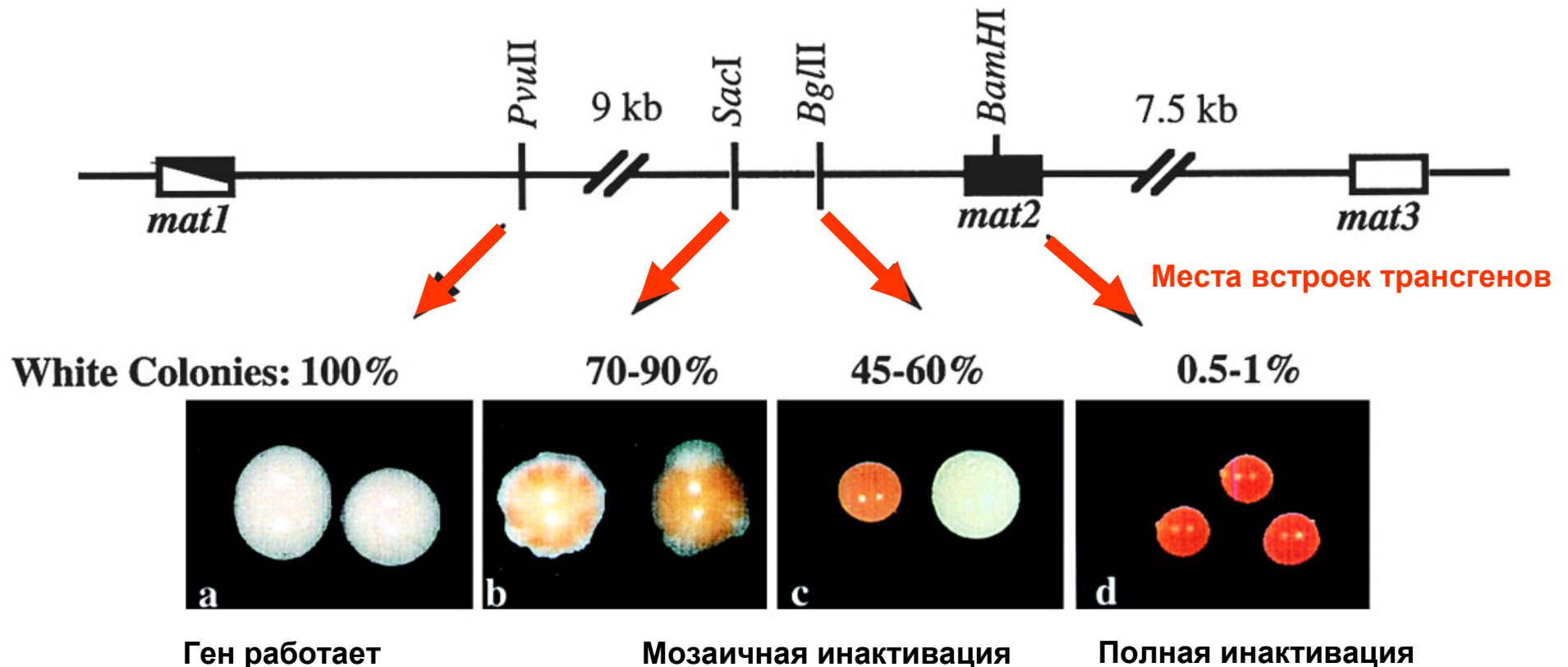
ade2⁻; ADE2-TelVR

variegated
repression



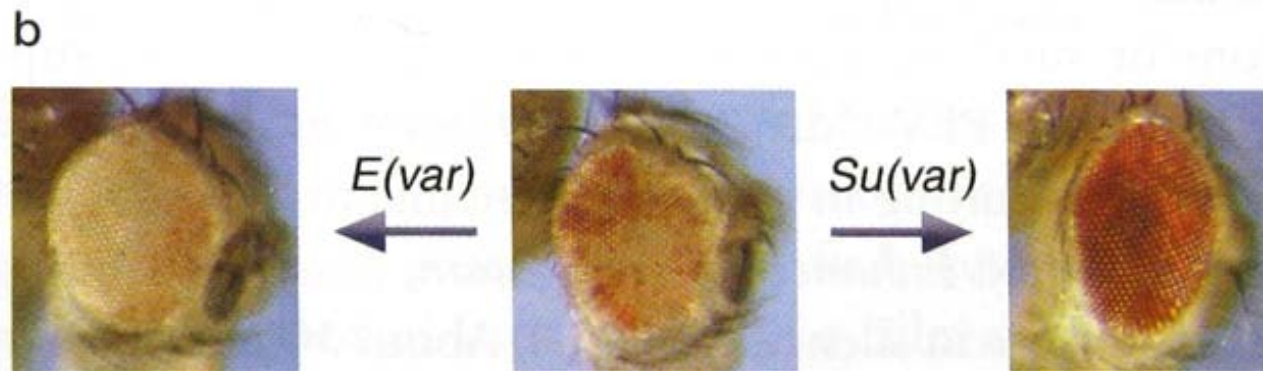
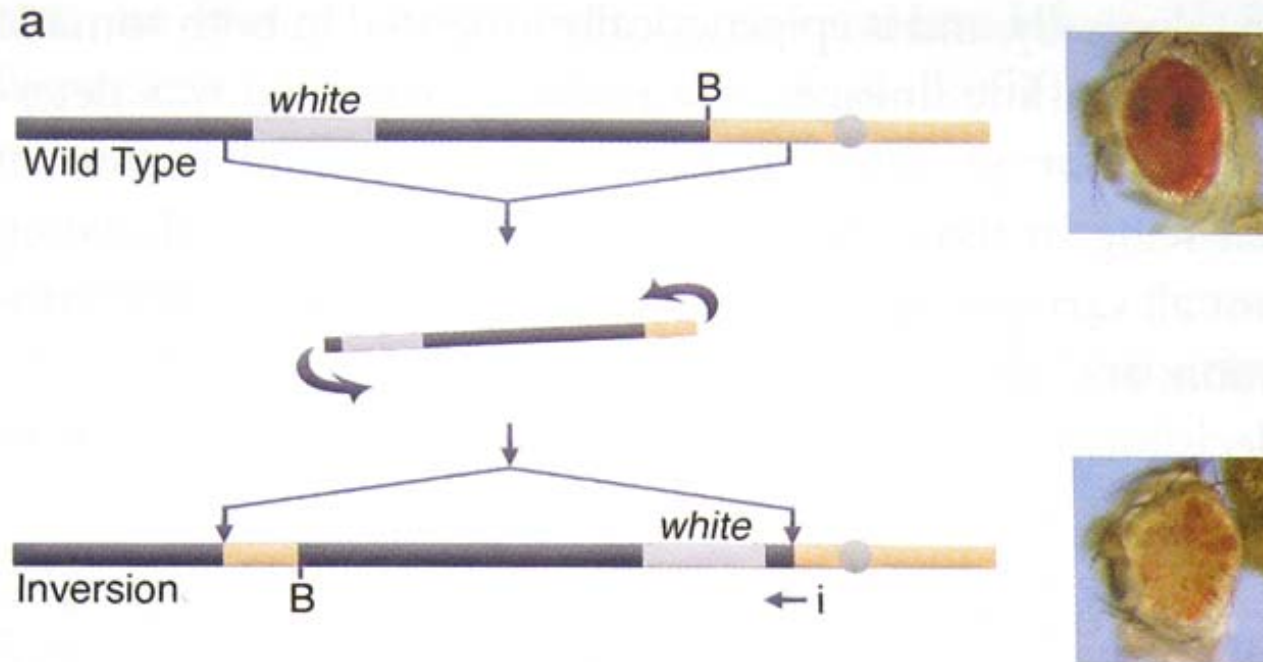
Schizosaccharomyces pombe, ген *ade6*

Эффект положения гена вблизи локусов, отвечающих за «пол»



Чем ближе встройка трансгена к гетерохроматину, тем сильнее и чаще происходит инактивация

Ген *white* переносится в соседство с прицентромерным гетерохроматином хромосомной перестройкой



Энхансеры эффекта положения

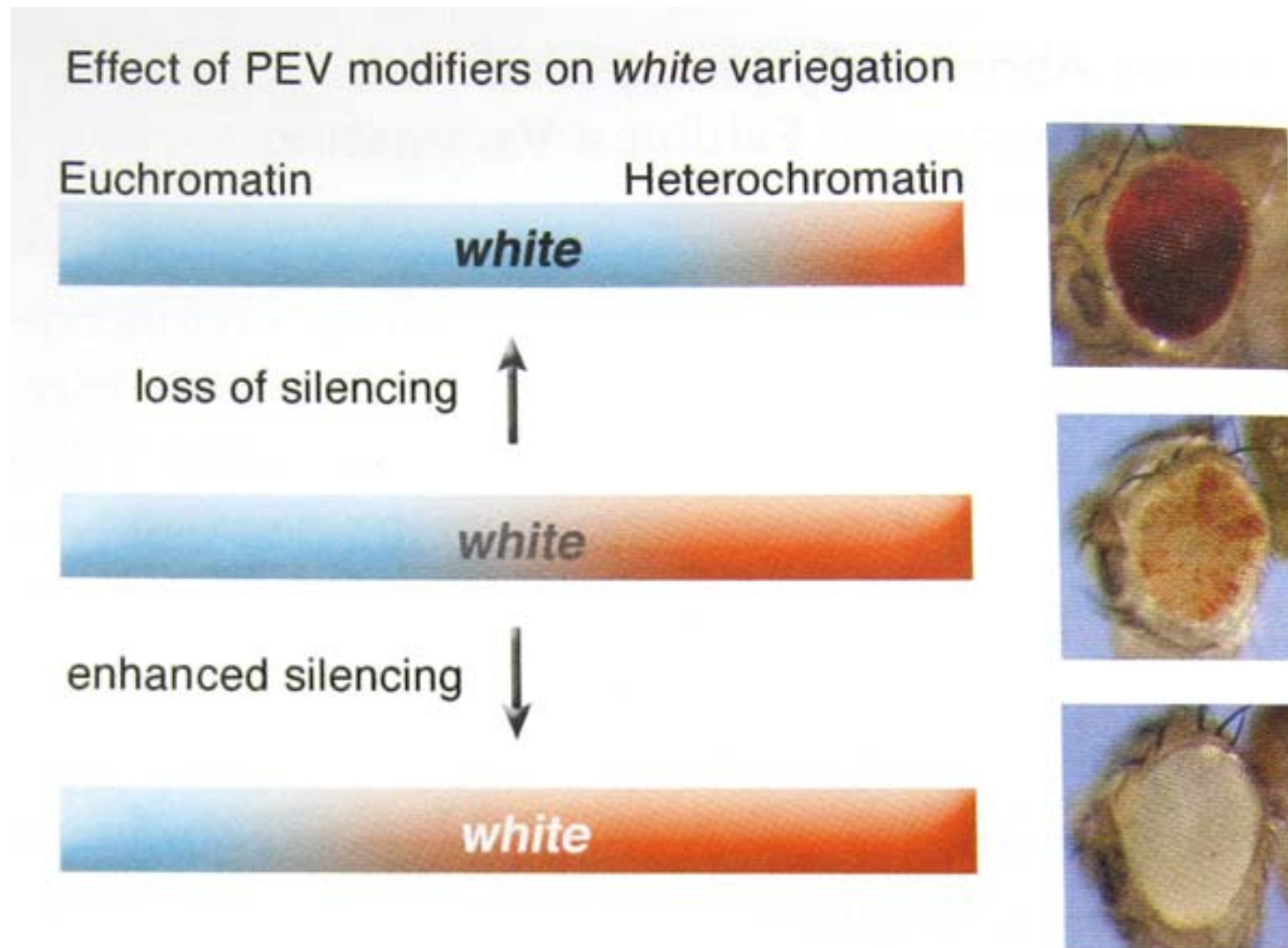
Например, мутации в генах, кодирующих НАТ

Супрессоры эффекта положения

Например, мутации по HP1, HMT *Su(var)*3-9

Мутации в генах, кодирующих компоненты гетерохроматина, ослабляют эффект положения

Мозаичный эффект положения у дрозофилы



Ген, попавший на границу эу и гетерохроматина, подвергается мозаичной инактивации. В некоторых случаях спрединг гетерохроматина доходит до этого гена, в других – нет.

Модификаторы эффекта положения

дрозофила:

Su(var)2-1 - деацетилирование

Su(var)2-10 - деацетилирование

Su(var)2-5 - HP1

Su(var)3-3 - деметилирование

Su(var)3-6 - фосфатаза

Su(var)3-7 - ДНК-связывающий белок

Su(var)3-9 - гистонметилтрансфераза

дрожжи:

локусы, отвечающие за пол
теломеры
кластер генов рРНК

Drosophila:

прицентромерный гетерохроматин
интеркалярный гетерохроматин
теломеры

млекопитающие:

прицентромерный гетерохроматин
теломеры