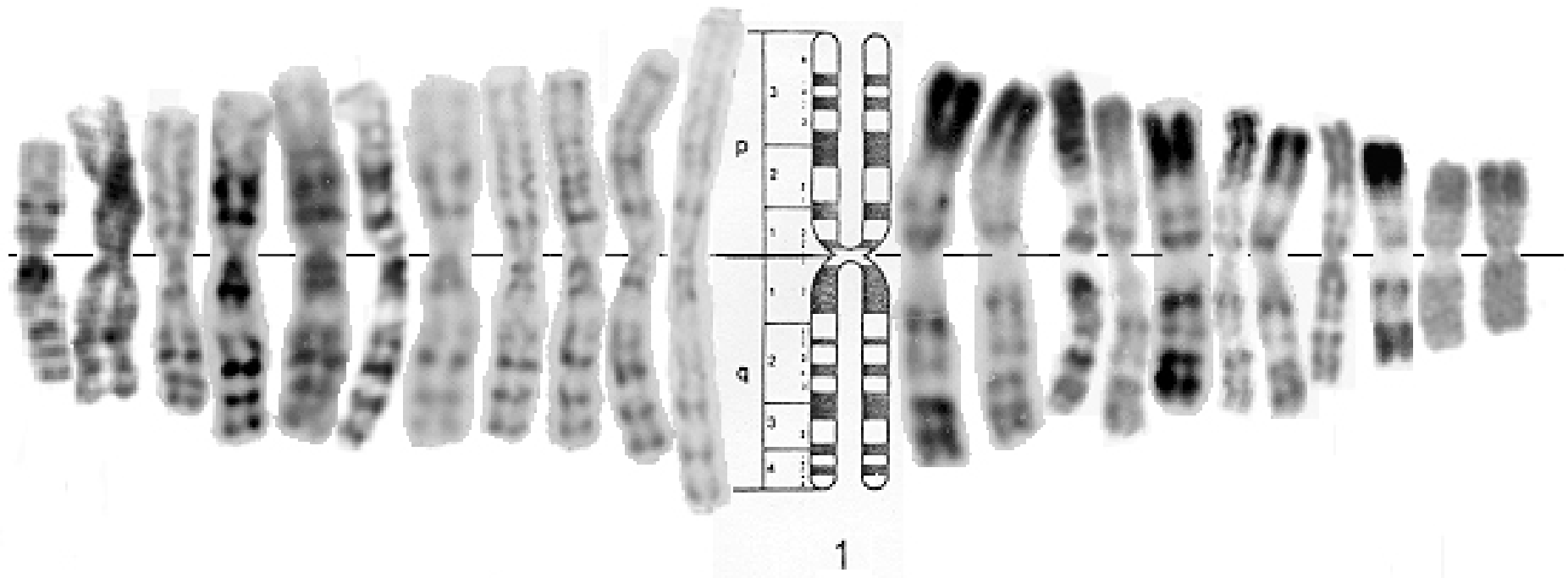


**Все, что не является конститутивным
гетерохроматином, можно традиционно
назвать «эухроматин», но его свойства
очень неоднородны**

Homo sapiens

G-окраска

R-окраска



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	16p, G-диск, недалеко от теломеры	11p, R-диск
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

**Варианты паттернов экспрессии генов в эухроматине.
Неоднородность эухроматина по способности влиять на экспрессию репортерного гена.**

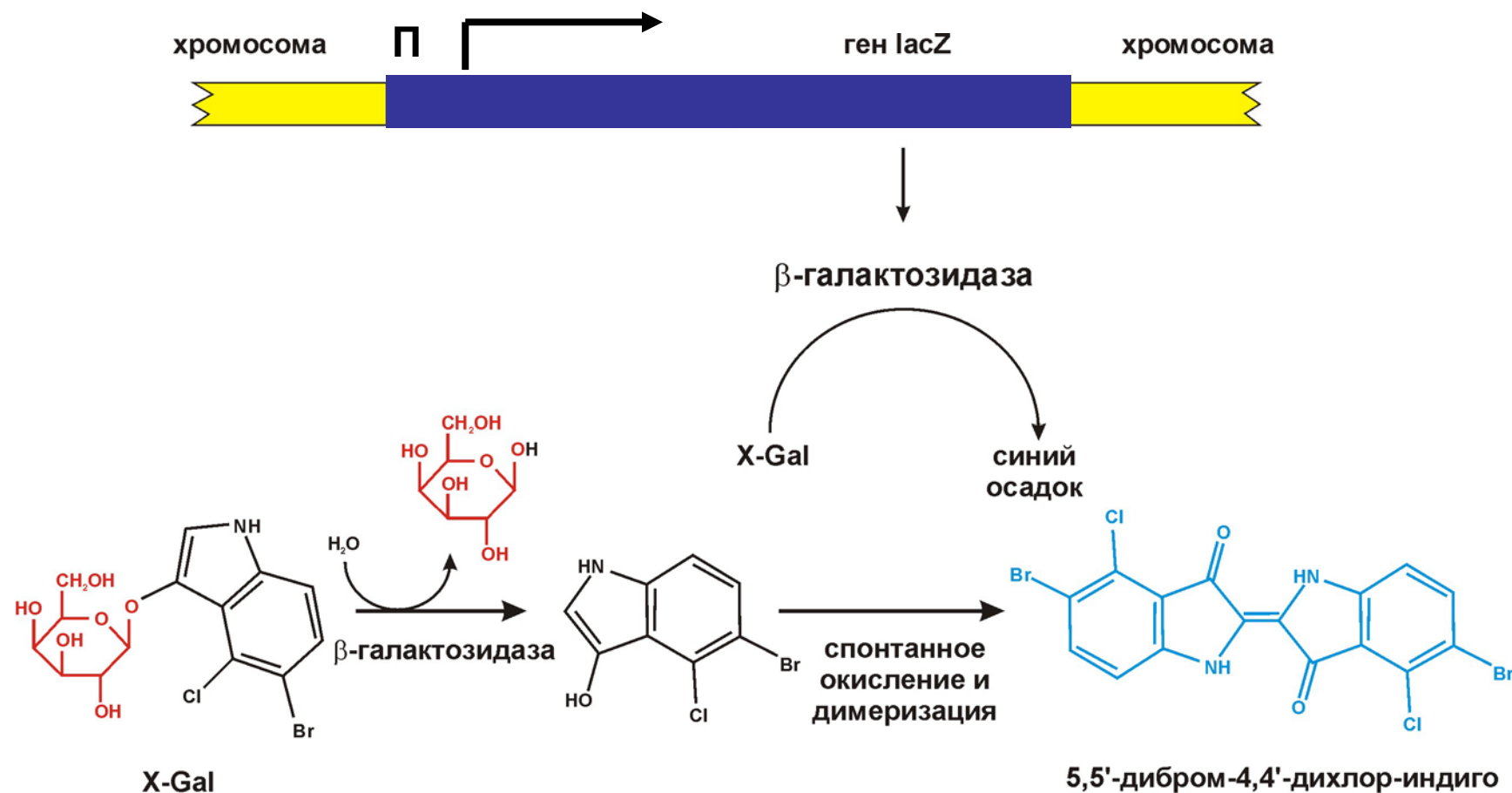
Если трансген не содержит собственных регуляторных элементов (энхансеров, инсуляторов), его можно использовать в качестве репортера для исследований потенциала хроматина и регуляторных элементов влиять на экспрессию генов.

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

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)

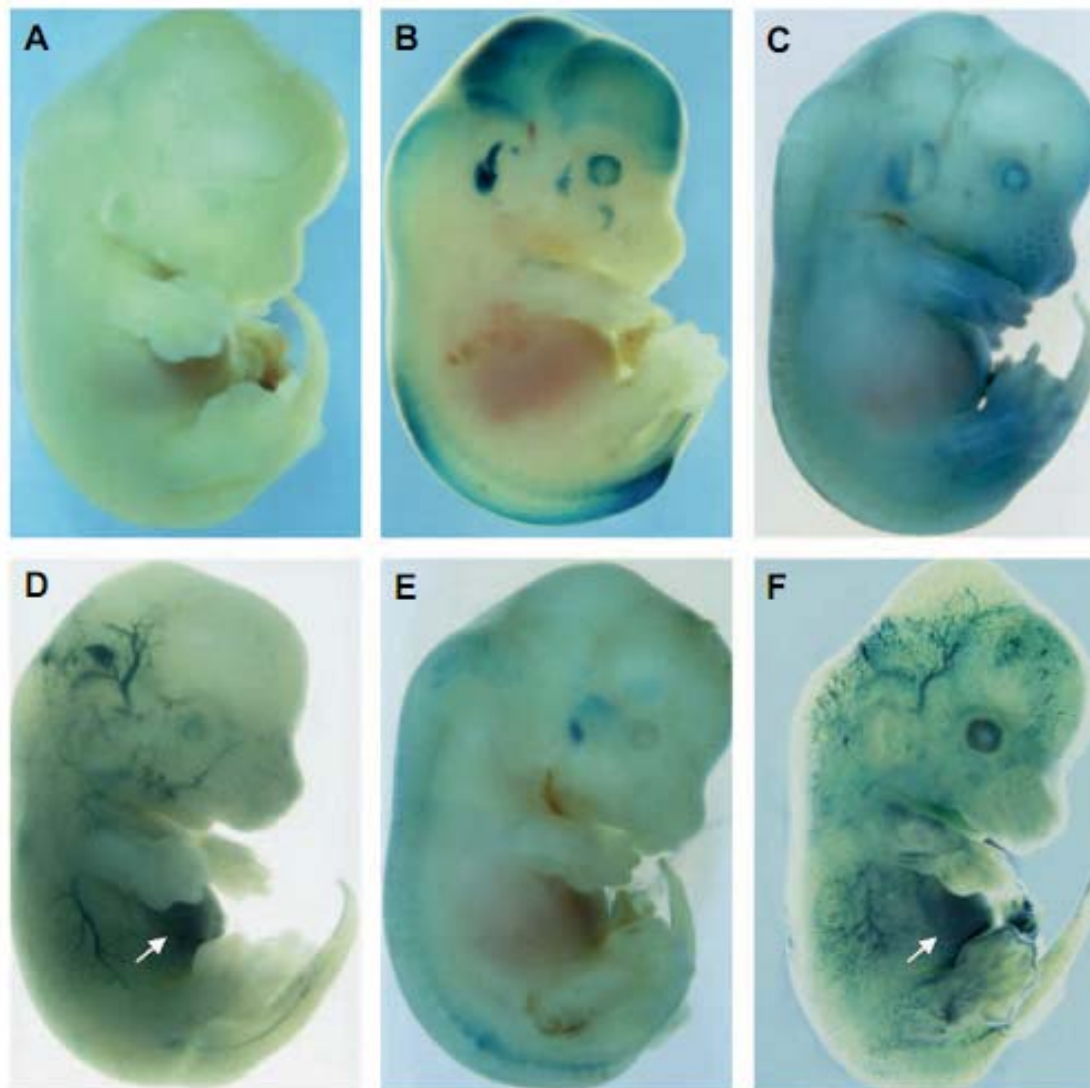
Выявление экспрессии репортерного гена LacZ



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

Продукт синего цвета

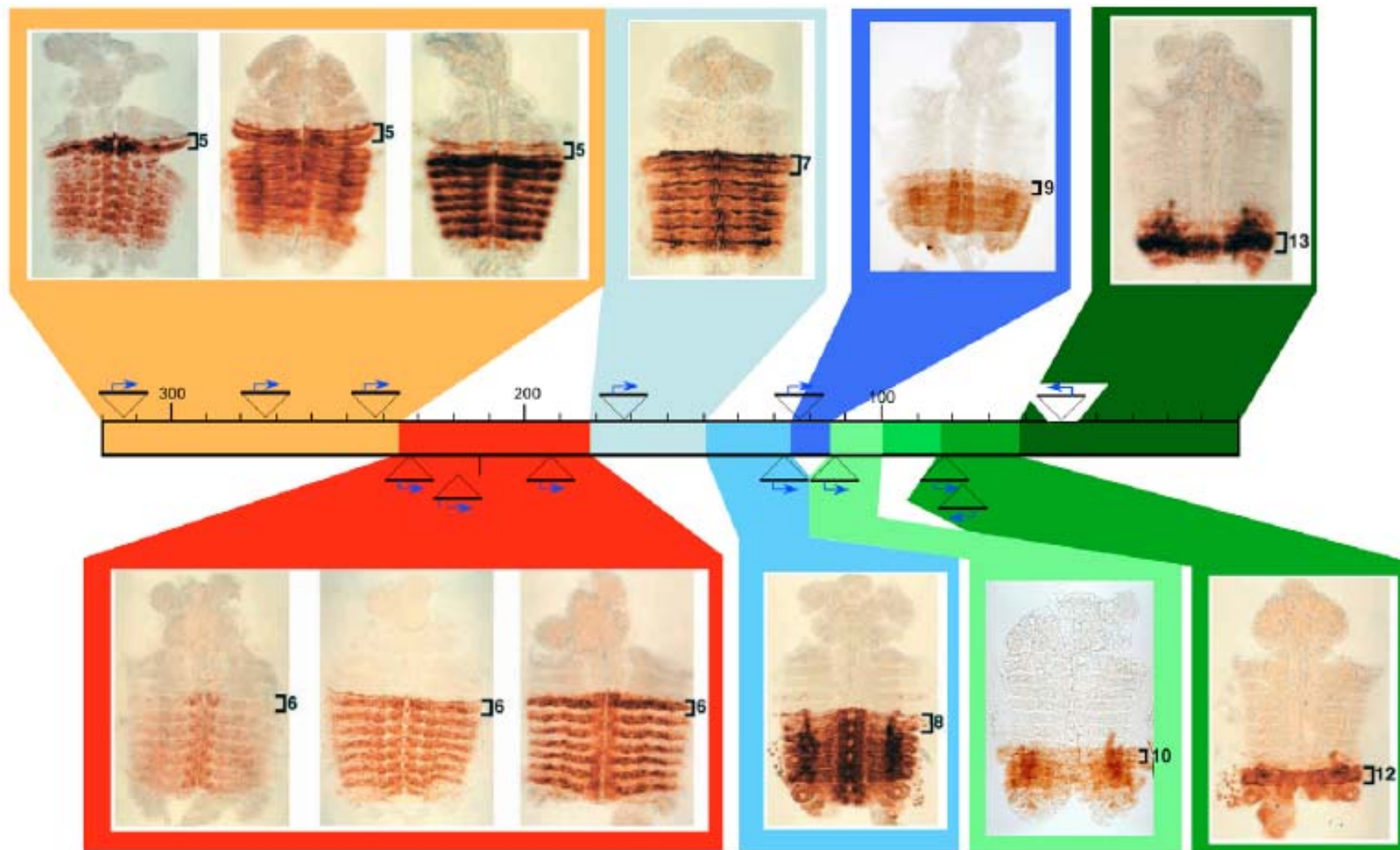
Пример



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

Пример

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



Эухроматин не однороден по свойствам и по-разному может влиять на транскрипцию!

Локальные факторы, влияющие на экспрессию трансгена

- Особенности хроматинового домена
 - Плотность генов
 - Плотность повторенных последовательностей
 - Набор негистоновых белков
 - Упаковка в гистоны
 - Модификации гистонов
 - Границы доменов
 - Локализация в ядре
- Регуляторные элементы (Энхансеры, Сайленсеры, LCR)
- Петлевая организация хроматина

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.

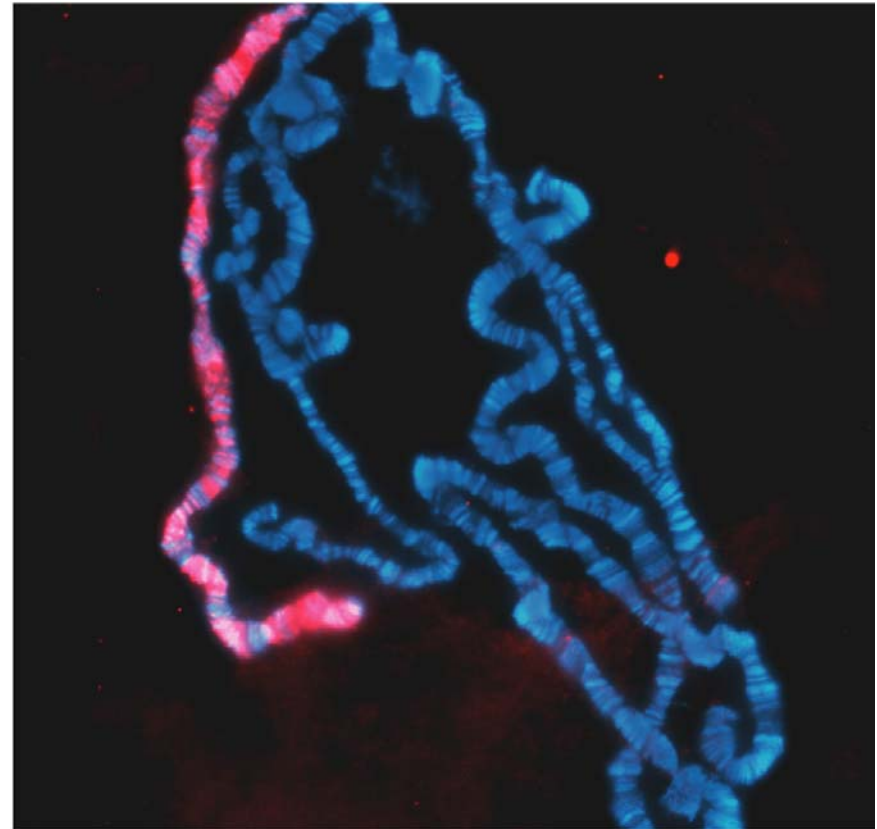
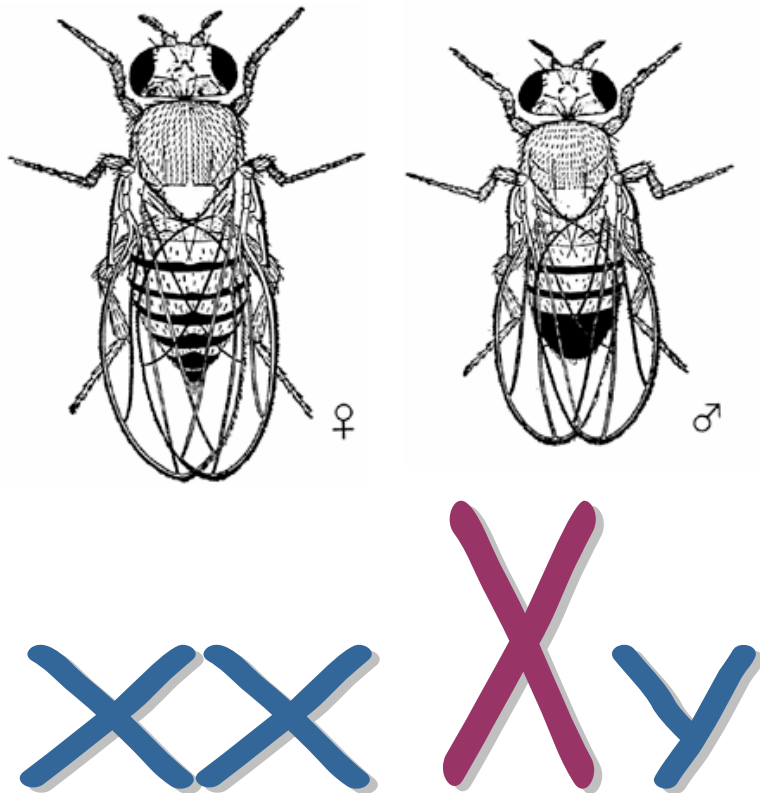
X-хромосома самцов дрозофилы претерпевает дозовую компенсацию. Это необходимо для того, чтобы уровень экспрессии X-хромосомных генов был одинаковым у самок (XX) и самцов (XY). У дрозофилы, в отличие от млекопитающих, такой эффект достигается двукратным усилением транскрипции по всей самцовой X. В этом участвует ацетилирование гистонов (AcH4K16).

Ацетилирование H4K16

Антагонист действию ISWI

Единственная известная модификация гистонов, приводящая к глобальной деконденсации хроматина

Dosage Compensation in *Drosophila*

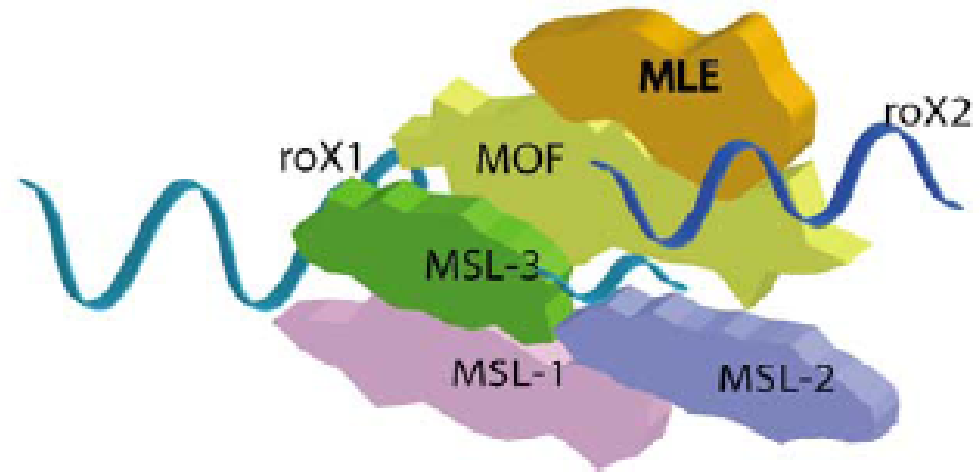


MSL complex

two-fold expression of genes on single male X

Male Specific Lethal (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

How is a whole chromosome targeted?

Two-step model

X



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

X

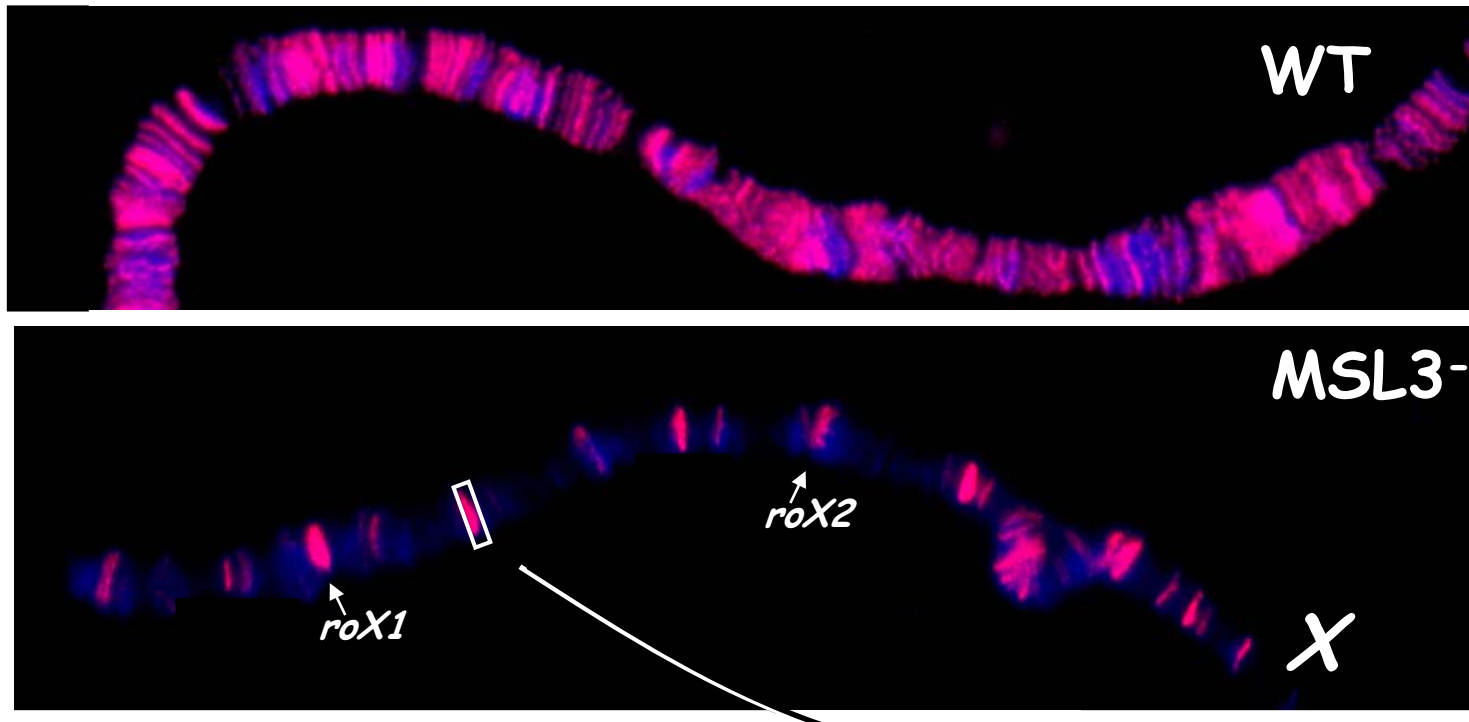


2. Local spreading *in cis*

X



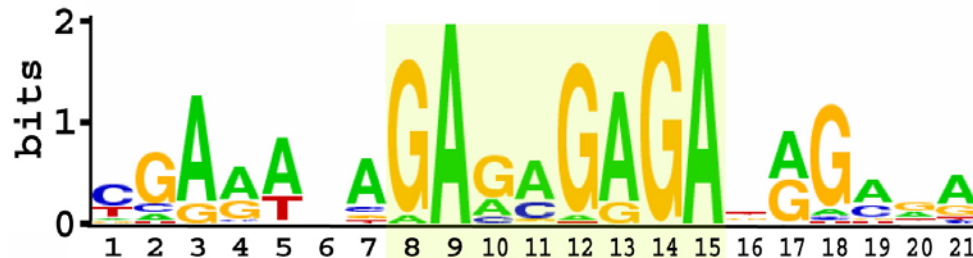
У нормальных самцов комплекс MSL распространяется от «энтри-сайтов» вдоль X-хромосомы, связываясь со всеми транскрибируемыми генами



У особей с мутацией в отдельных компонентах комплекса, комплекс выявляется только в «энтри-сайтах»

MRE is required for MSL binding to CES

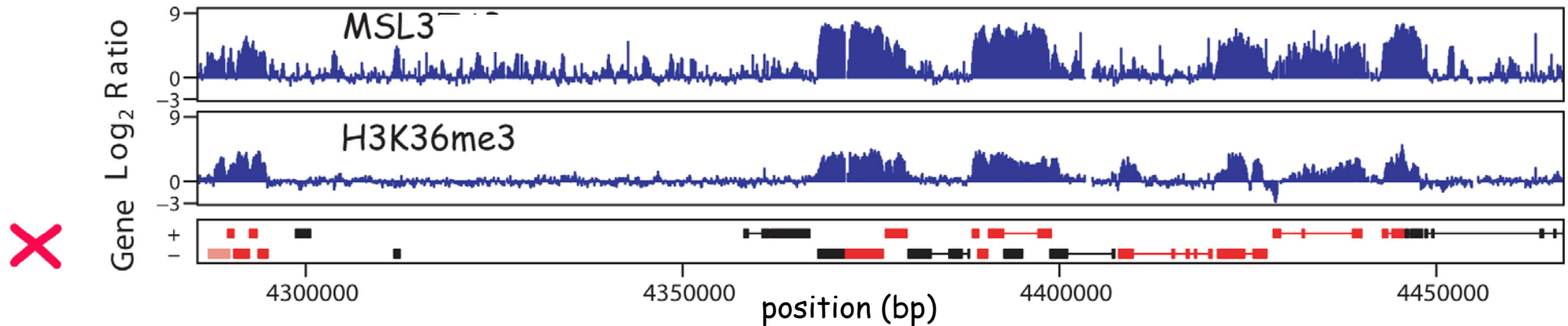
Consensus MRE-motif logo



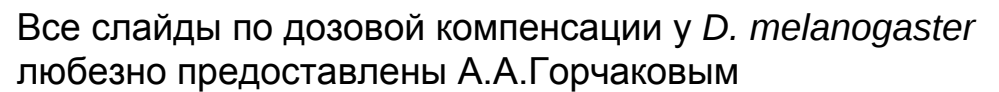
CES11D1	CGAATATGAGCGAGATGGATG
M2R	CGAATATGAAAAAGATGGATG
M3R	CGAATATGAAAAAATGGATG

В «энтри-сайтах» присутствуют «консенсусные» последовательности ДНК

MSL targets are mostly **transcribed** genes



Распространение комплекса вдоль по хромосоме не требует определенных последовательностей ДНК, но идет по всем участкам транскрипции.

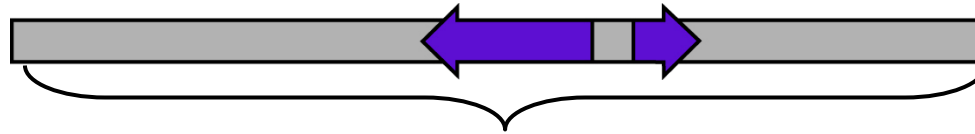


The Trojan Horse

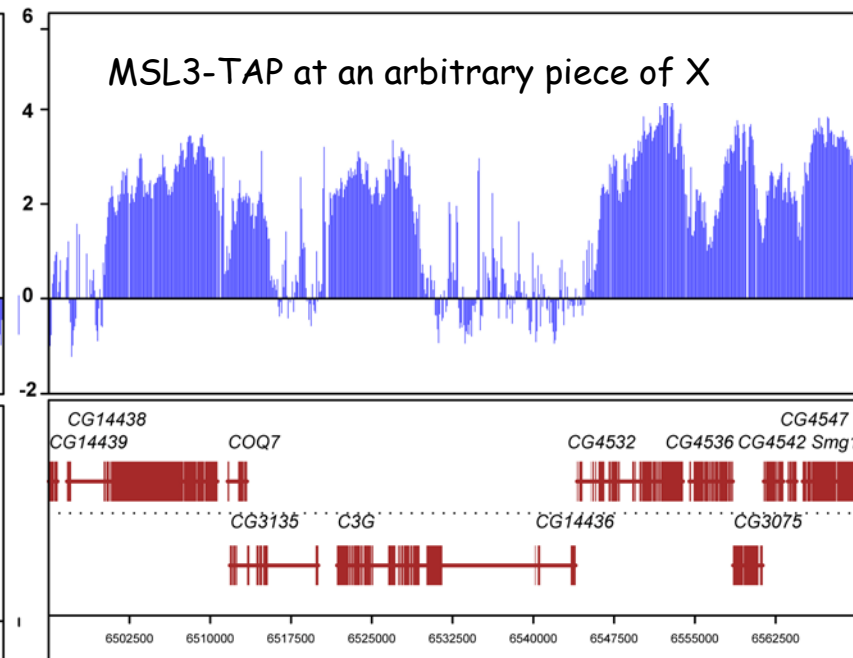
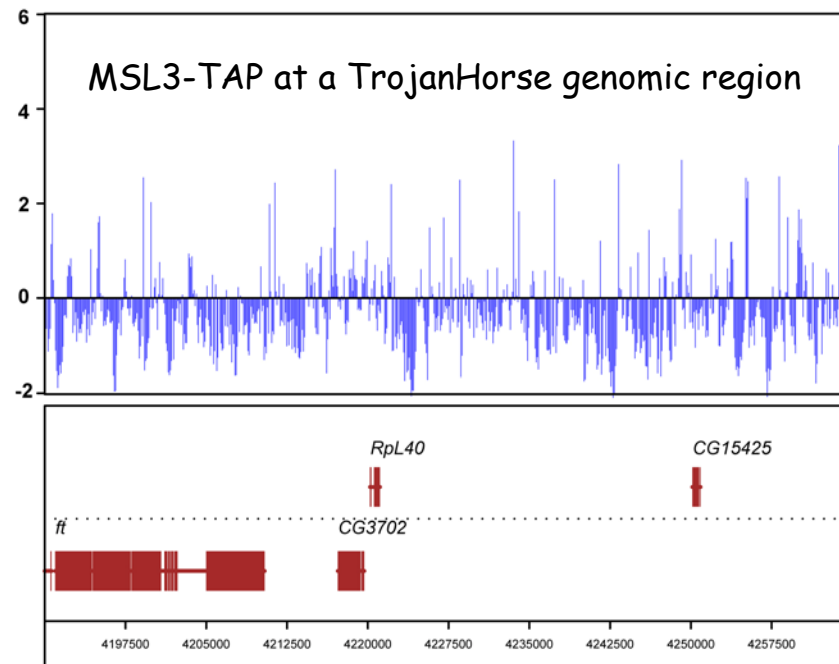


Autosomal DNA (TrojanHorse)

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.

Could TrojanHorse be a special case?

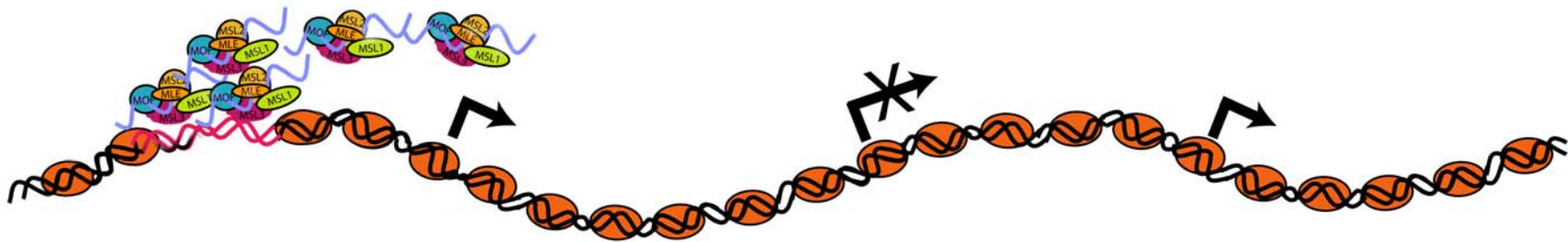
Upgrade the TrojanHorse to

TrojanElephant: 65 kb, 20 genes

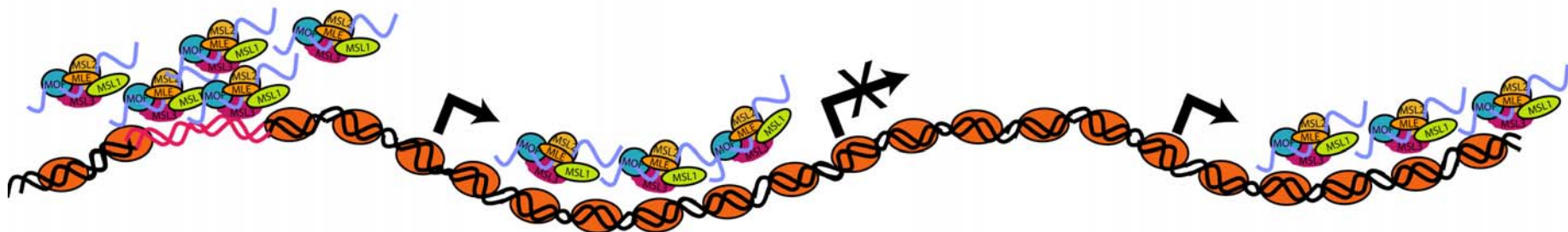
current two-step model

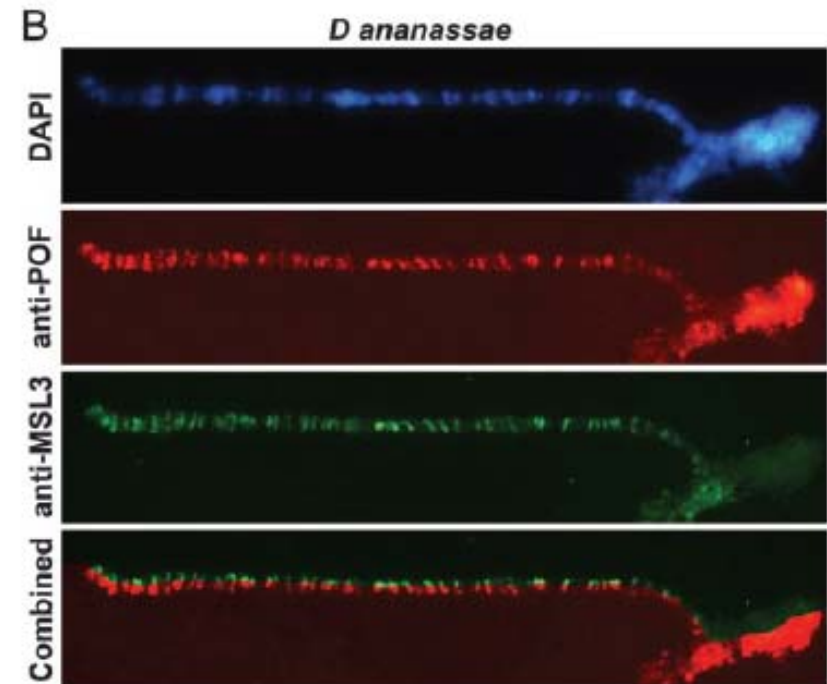
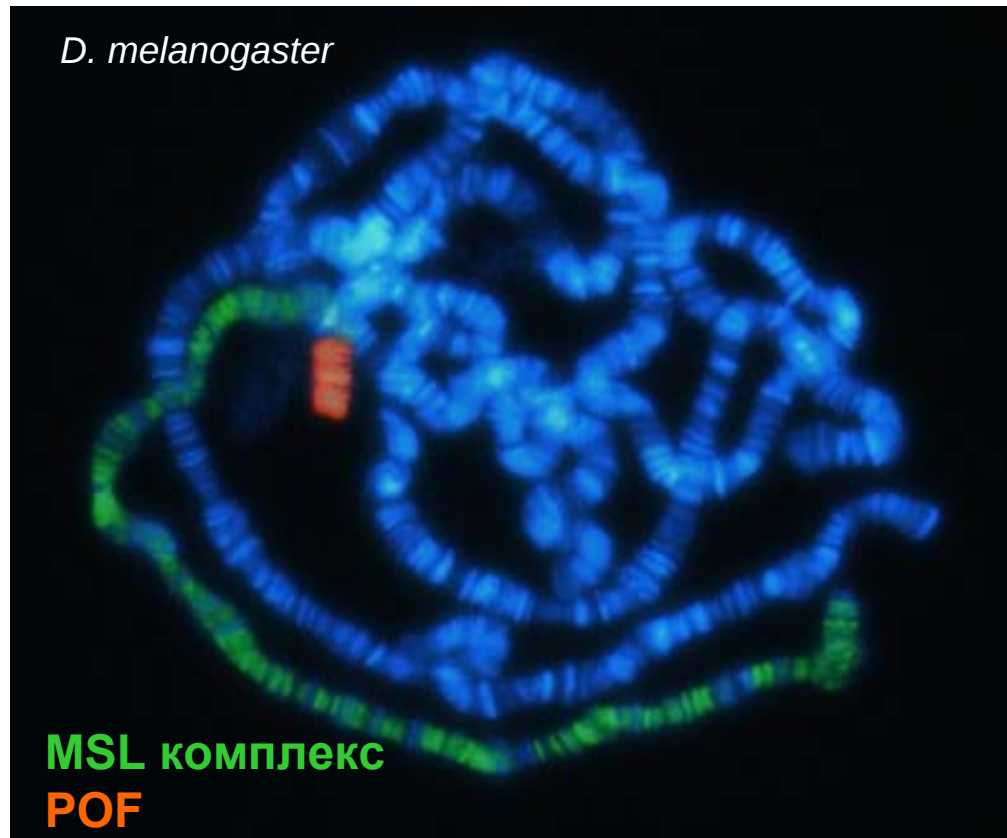


1. MSLs bind available chromatin entry sites with MRE-motifs



2. Sequence-independent recognition of transcribed genes nearby

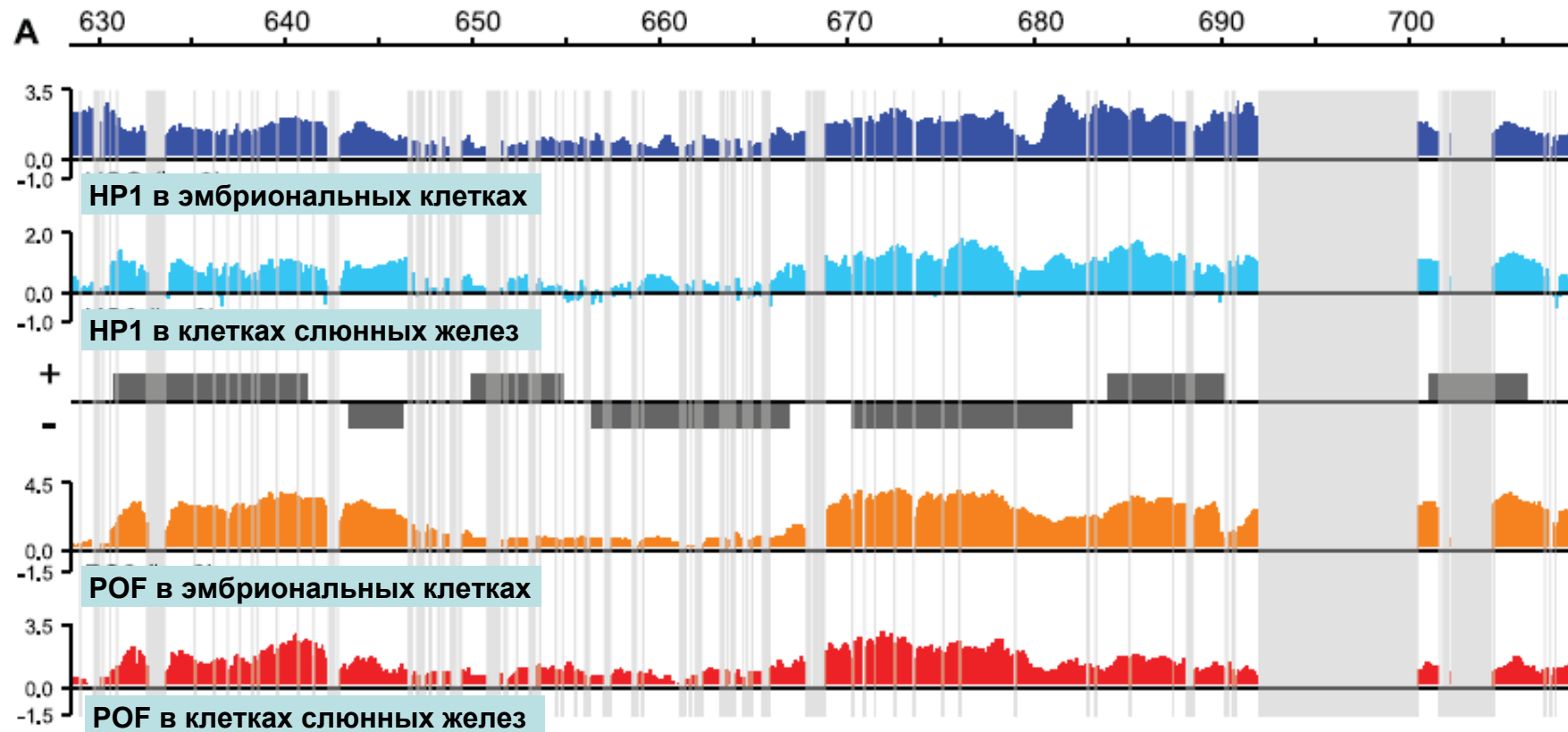




Larsson et al. PNAS June 29, 2004 vol. 101 no. 26 9731

У *Drosophila melanogaster* известен белок Painting of the Fourth (POF), который специфически маркирует хромосому IV.

Этот белок у некоторых других видов дрозофил является белком дозой компенсации, а район генома, соответствующий хромосоме IV *D. melanogaster*, принадлежит половой хромосоме.

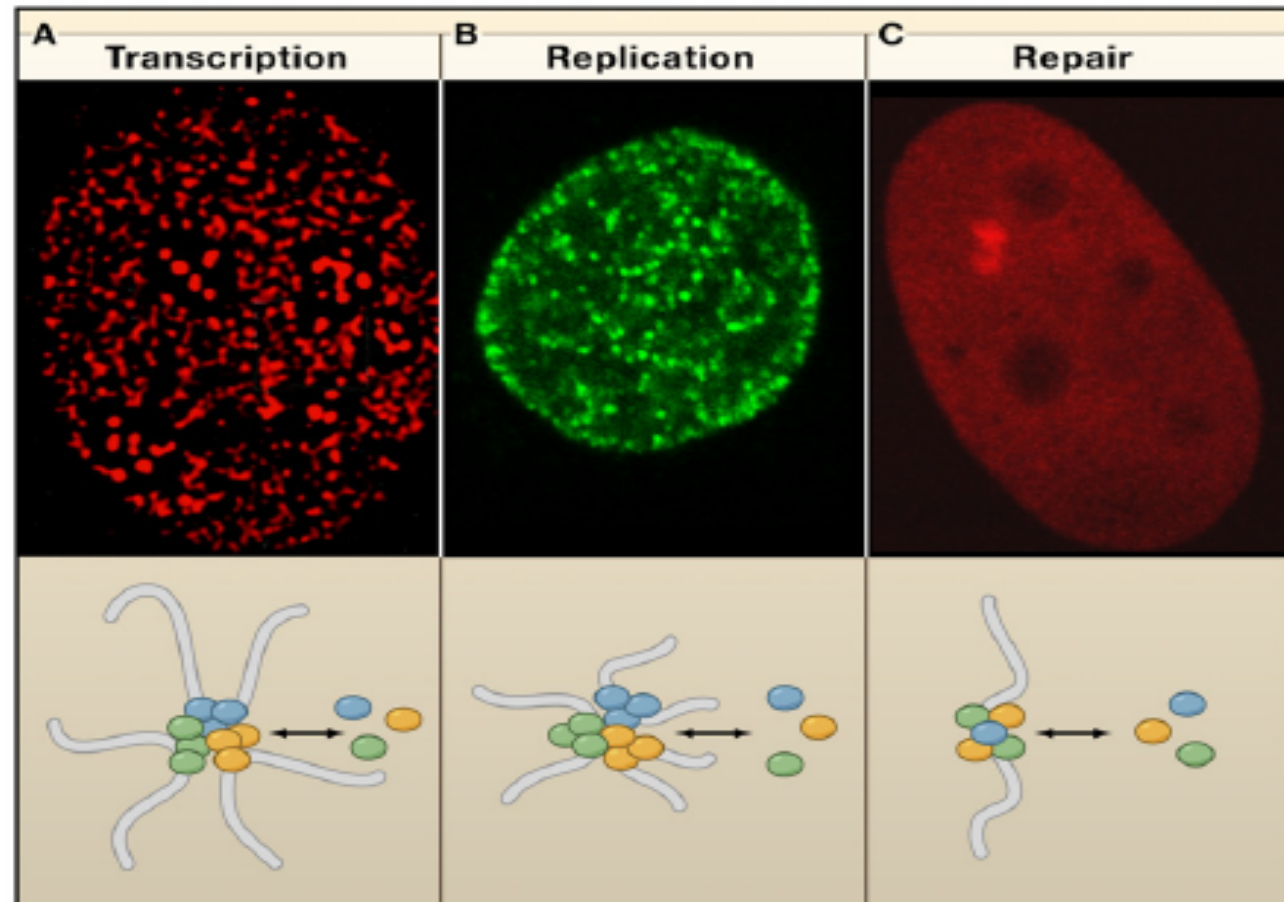


Белок POF почти полностью колокализуетсся с белком HP1. Если первый усиливает транскрипцию, то второй – репрессирует ее.

Все больше и больше внимание уделяется роли петлевой организации хроматина в регуляции транскрипции.

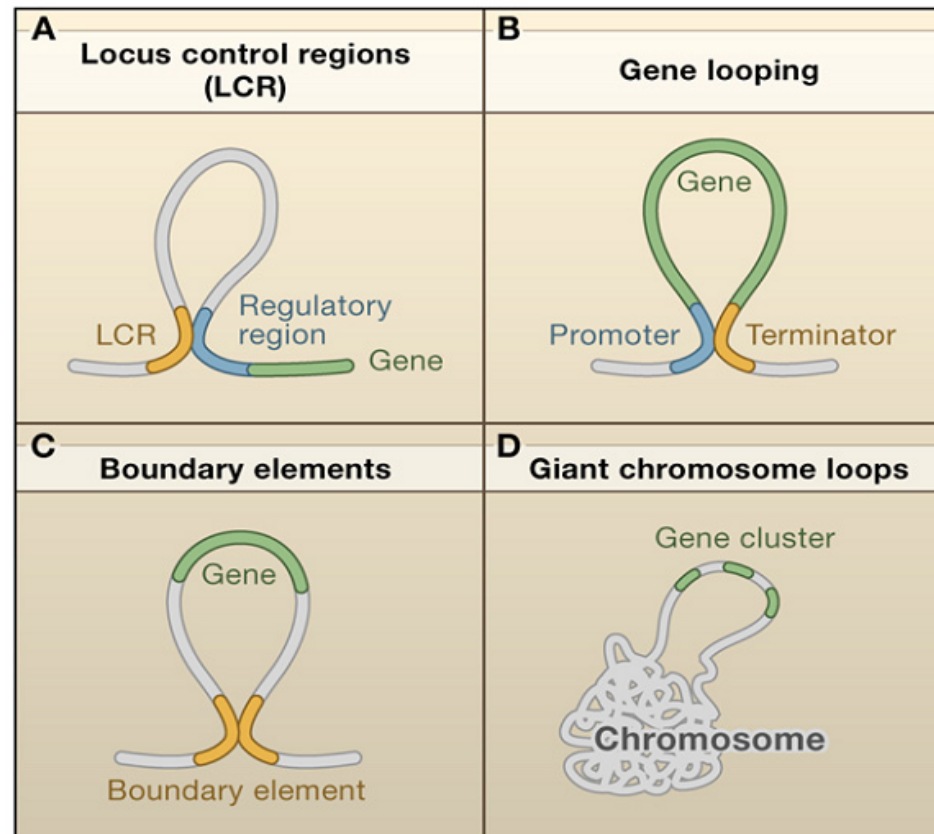
Считается, что сближение районов в ядре помогает координировать различные процессы во времени

Например, фокусы репликации – собранная в единую структуру группа репликонов, одновременно начинающих репликацию



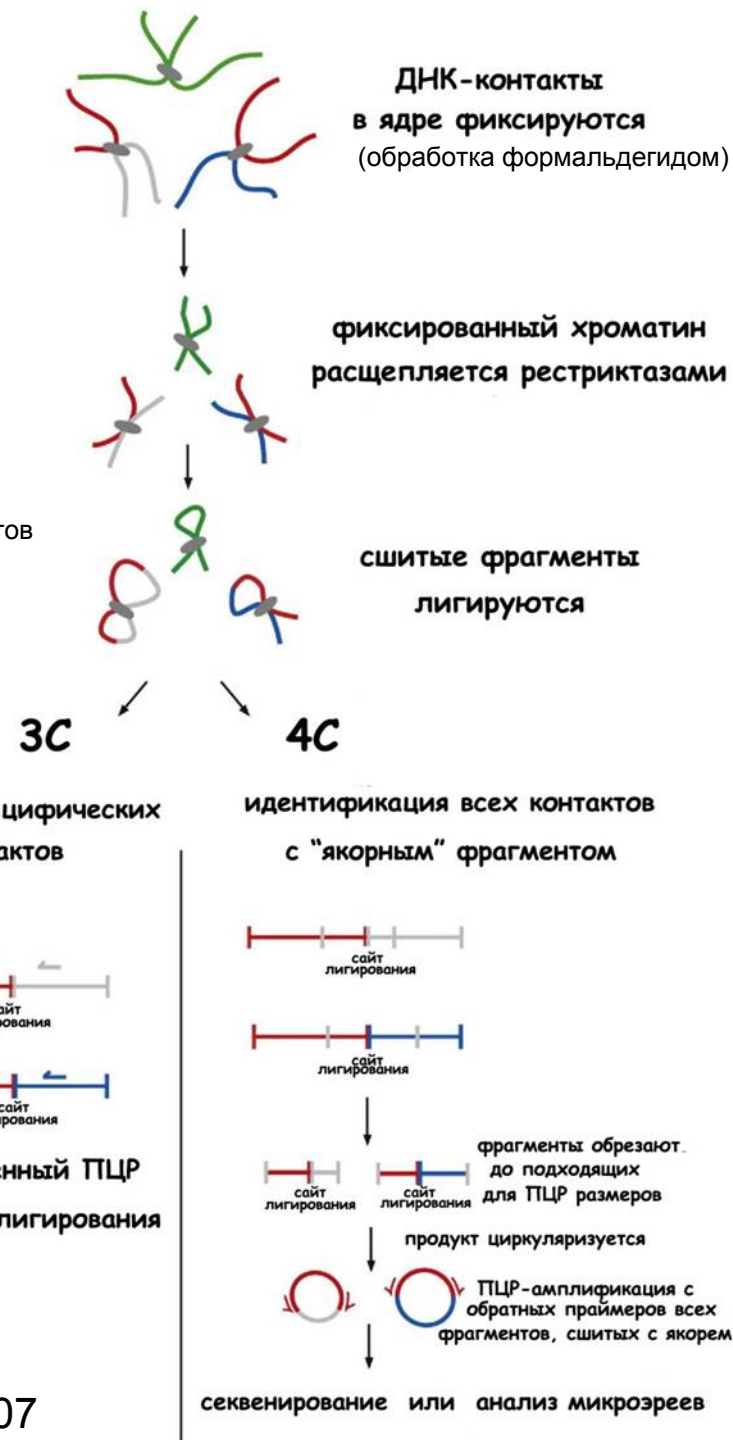
Как образуются петли?

- Взаимодействие белков на различных регуляторных элементах
- Прикрепление к «подложке» (ядерной ламине, ядерному матриксу)
- Выпетливание из плотного хроматинового домена

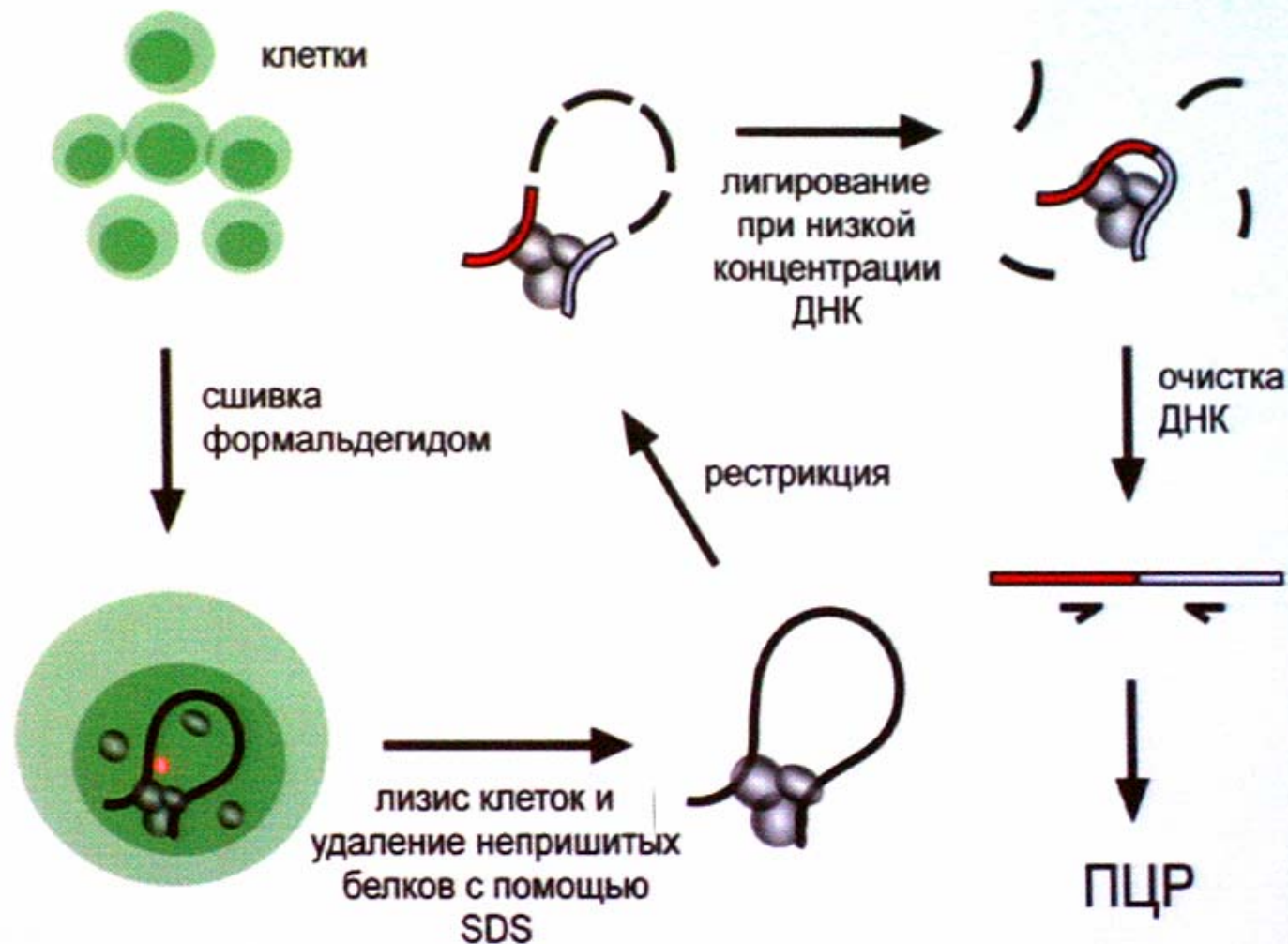


МЕТОД 3C – chromatin conformation capture позволяет картировать сближенные друг с другом участки ДНК и искать новые регуляторные элементы

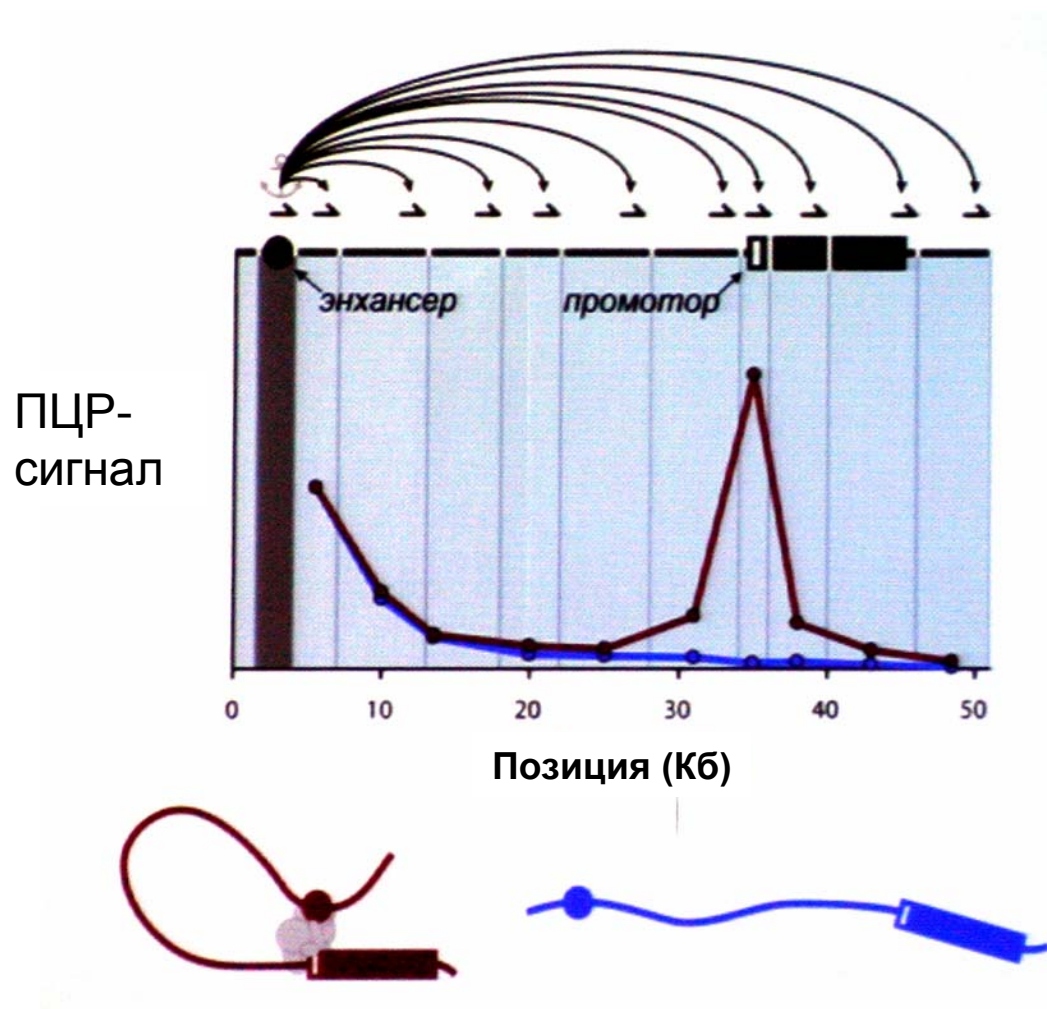
Случайное разрезание-лигирование с большой вероятностью приводит к сшивке сближенных за счет белок-белкового взаимодействия фрагментов ДНК



МЕТОД 3C – chromatin conformation capture позволяет картировать сближенные друг с другом участки ДНК и искать новые регуляторные элементы



Представление и интерпретация данных 3С-анализа



Роль энхансеров и инсуляторов

Энхансер это генетический цис-элемент, обладающий усиливающим транскрипцию действием, которое практически не зависит от расположения элемента относительно контролируемого им гена. Энхансеры представлены короткими последовательностями ДНК, состоящими из отдельных элементов (модулей), включающих десятки нуклеотидных пар. Энхансер увеличивает эффективность транскрипции гена в десятки и сотни раз. Особенность энхансеров состоит в том, что они способны действовать на больших расстояниях (более чем 1000 п.н.) и вне зависимости от ориентации по отношению к направлению транскрипции гена.

Энхансеры являются своеобразными матрицами для сборки сложных белковых комплексов, структура которых обеспечивает высокоспецифические белок-белковые связывания и передачу регуляторных сигналов РНК-полимеразе II, находящейся в составе инициационного комплекса.

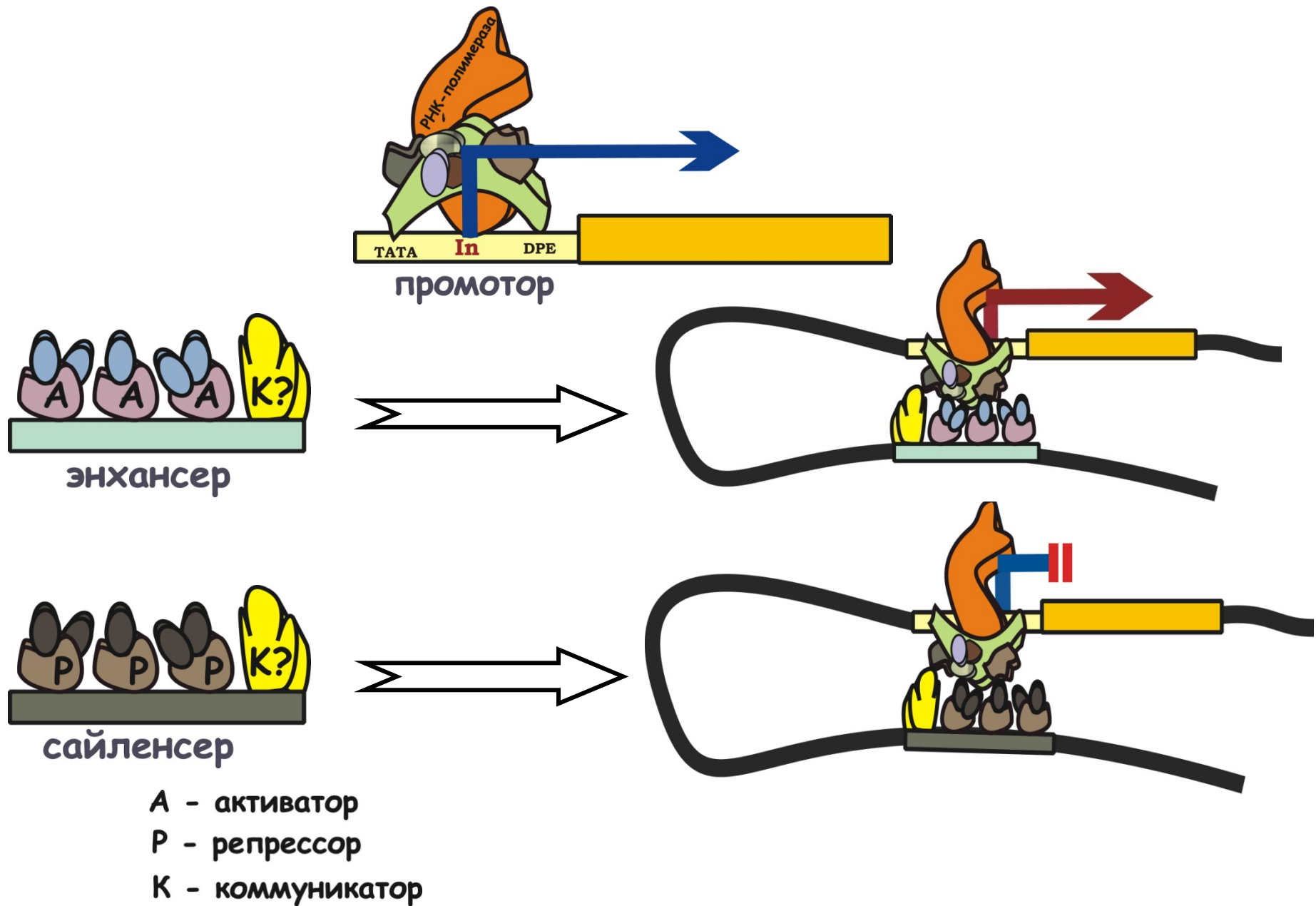
Еще одной важной характеристикой энхансера является его способность активировать любой промотор, расположенный сравнительно недалеко.

Энхансеры - основное средство регуляции транскрипции в клетках высших эукариот.

Для взаимодействия энхансера с промотором необходимо приблизить эти сайты друг к другу. Возможность такого контакта может определяться другими регуляторными участками, формирующими петлевую укладку хроматина.

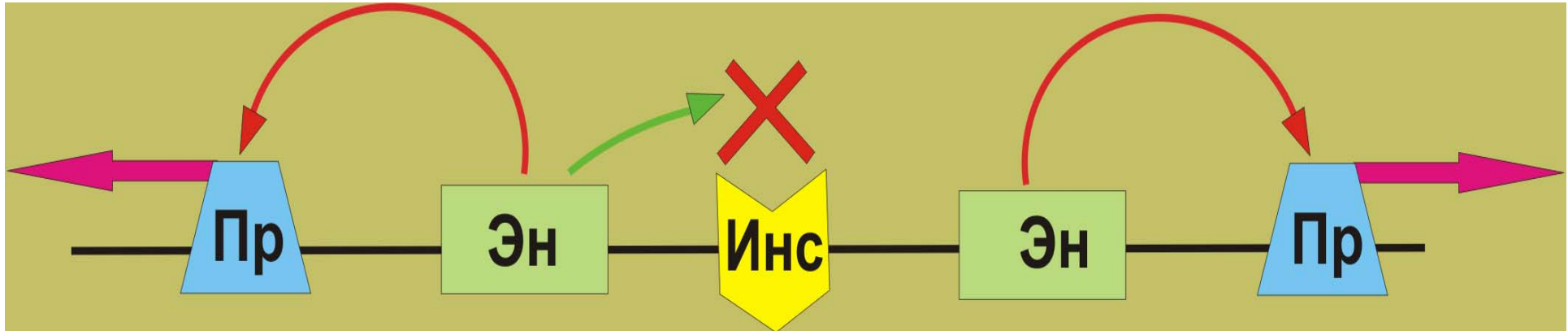
Такими элементами могут быть MARs и инсуляторы

Модель регуляции генов удаленными цис-регуляторами



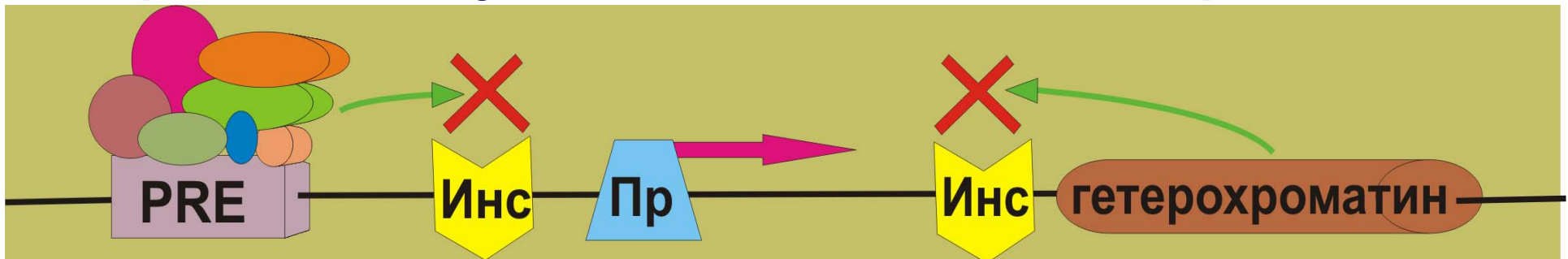
Инсуляторы были определены как цис-элементы, способные блокировать взаимодействие между энхансером и промотором, а также блокировать распространение гетерохроматина

1. Изоляция энхансера от промотора

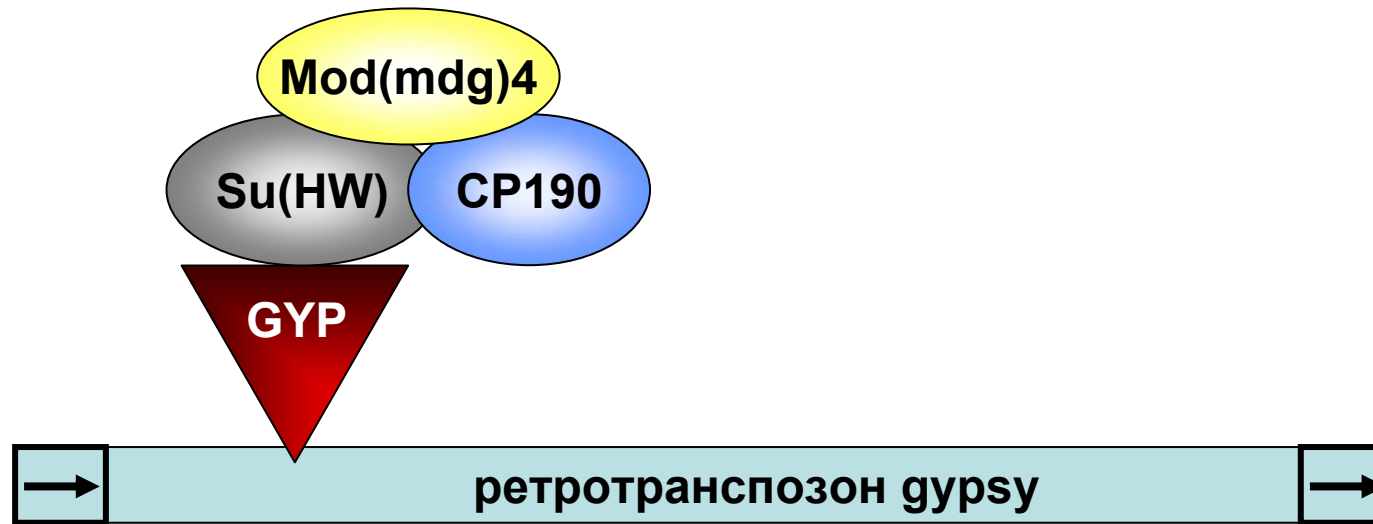


Накапливаются данные, что инсуляторы не просто блокируют энхансеры, но обеспечивают правильную для данной клетки пространственную организацию ДНК, тем самым могут регулировать, каким энхансером работать, а каким нет. То есть, инсуляторы являются теми самыми коммутаторами (см. Предыдущий слайд)

2. Граница между активным и неактивным хроматином

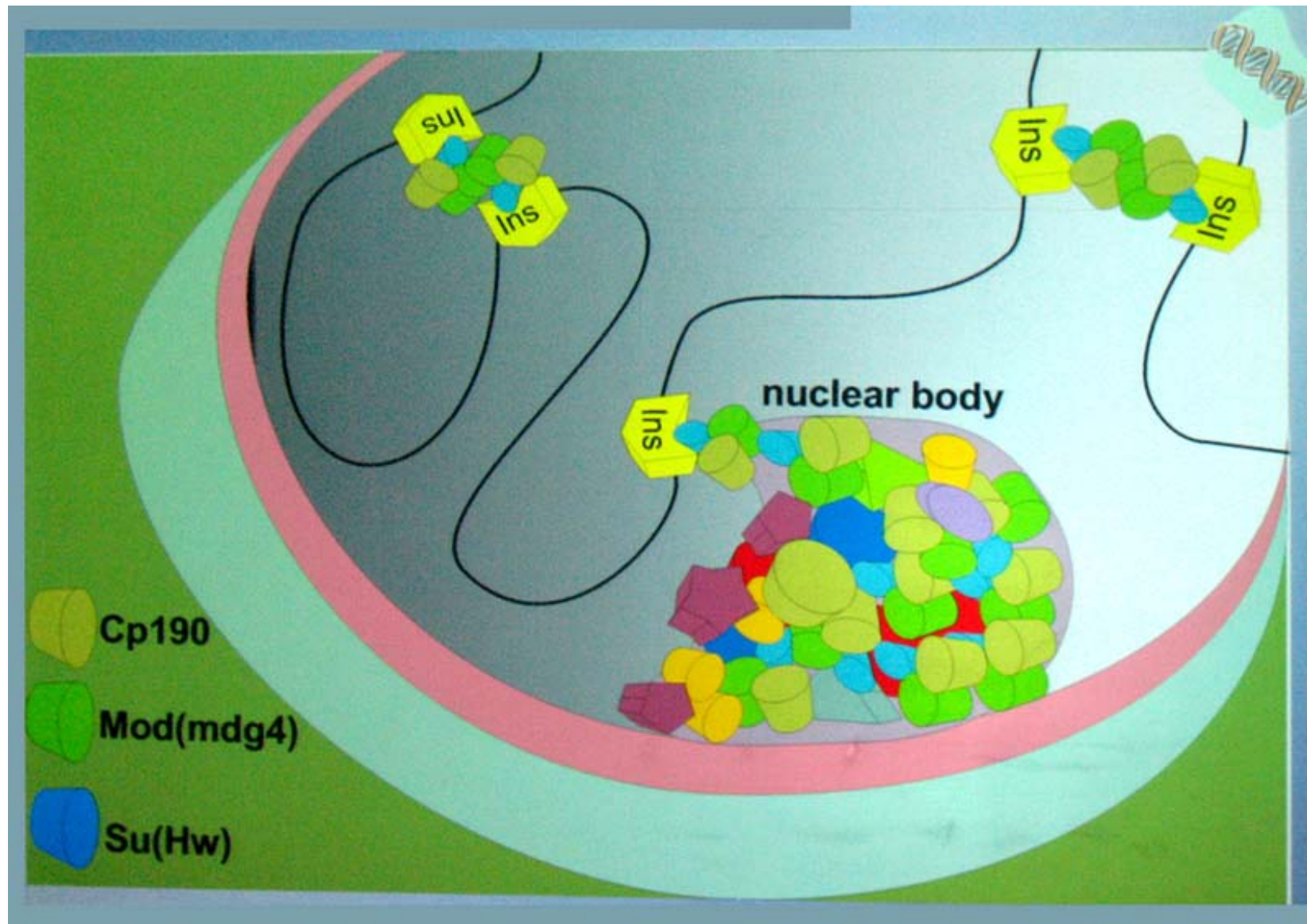


Комплекс белков, собирающийся на инсультаторе *gypsy* дрозофилы
(впервые выделен в составе ретровируса (ретротранспозона) *gypsy*)



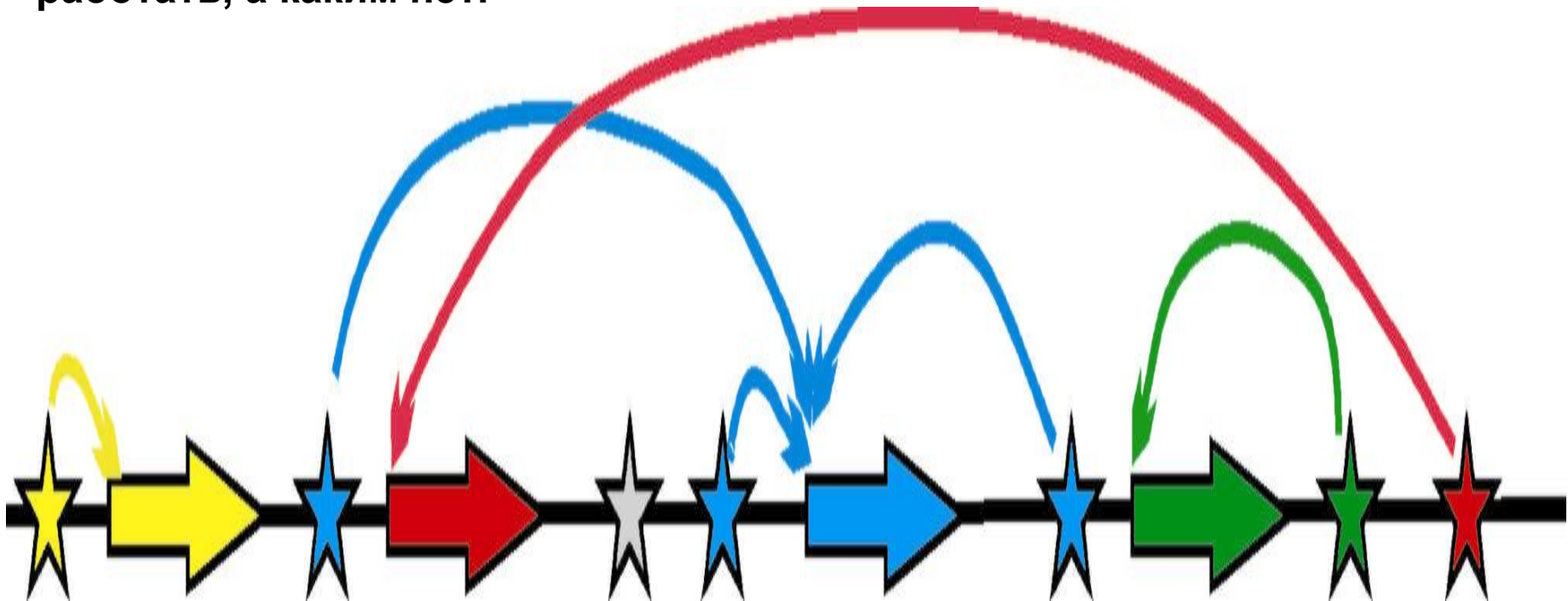
Блокирует энхансеры и сайленсеры

Роль инсуляторов в пространственной организации ДНК в ядре



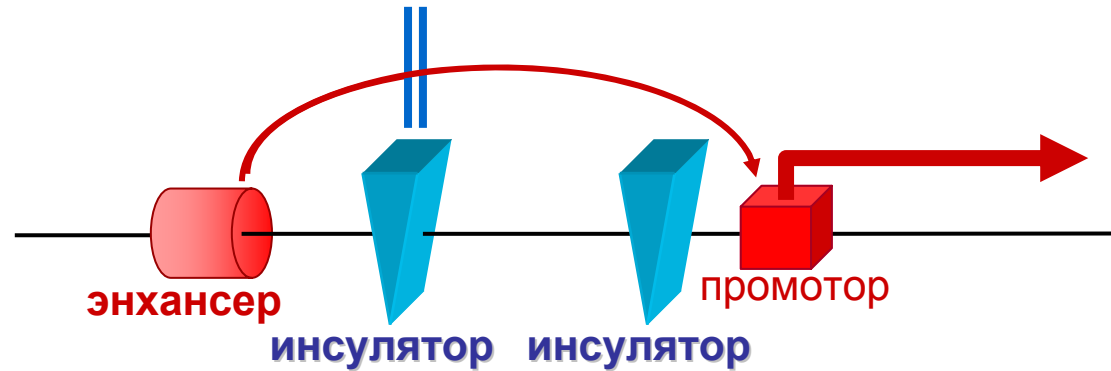
Инсуляторы помогают энхансерам выбрать, какой промотор активировать!

Накапливаются данные, что инсуляторы не просто блокируют энхансеры, но обеспечивают правильную для данной клетки пространственную организацию ДНК, тем самым могут регулировать, каким энхансером работать, а каким нет.

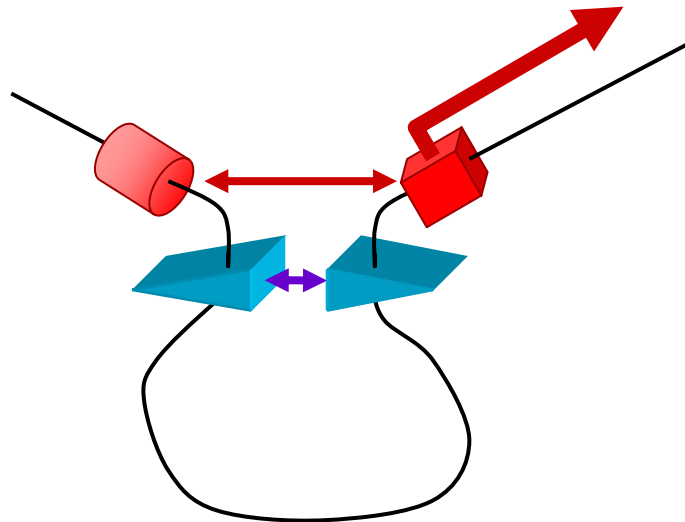


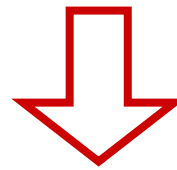
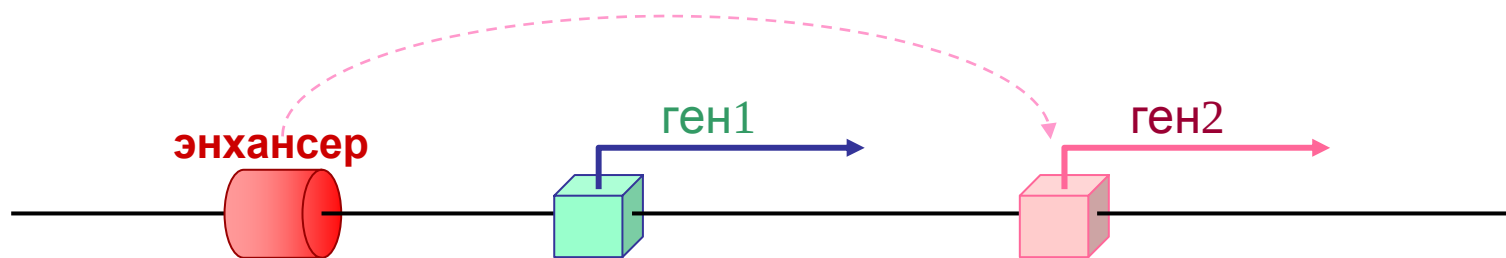
инсулятор изолирует промотор от энхансера

добавление второй копии инсулятора приводит к ослаблению инсуляции

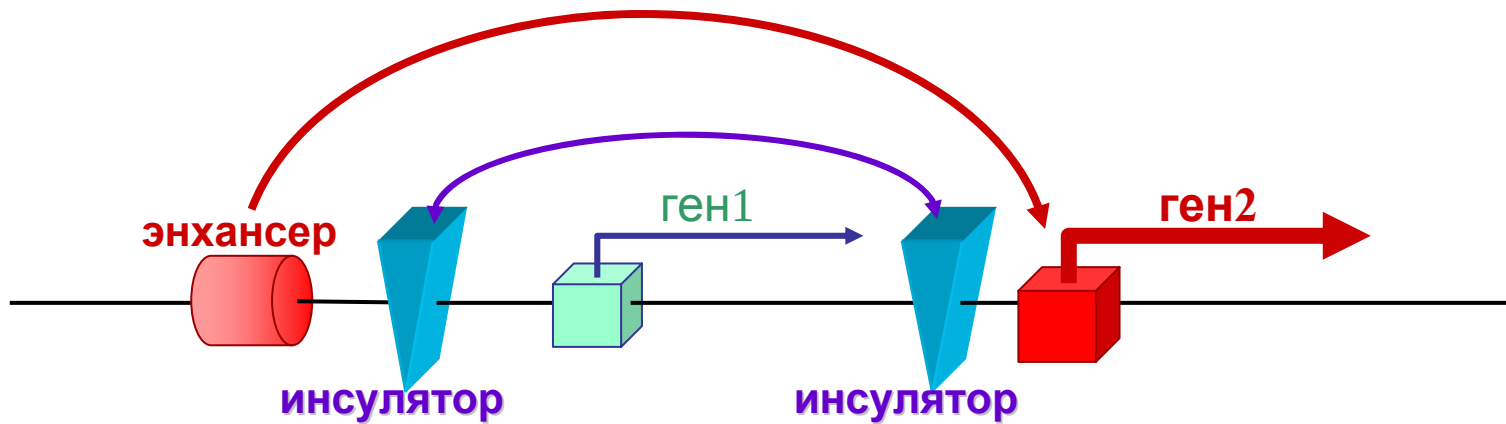


нейтрализация действия инсуляторов связана с их способностью взаимодействовать друг с другом

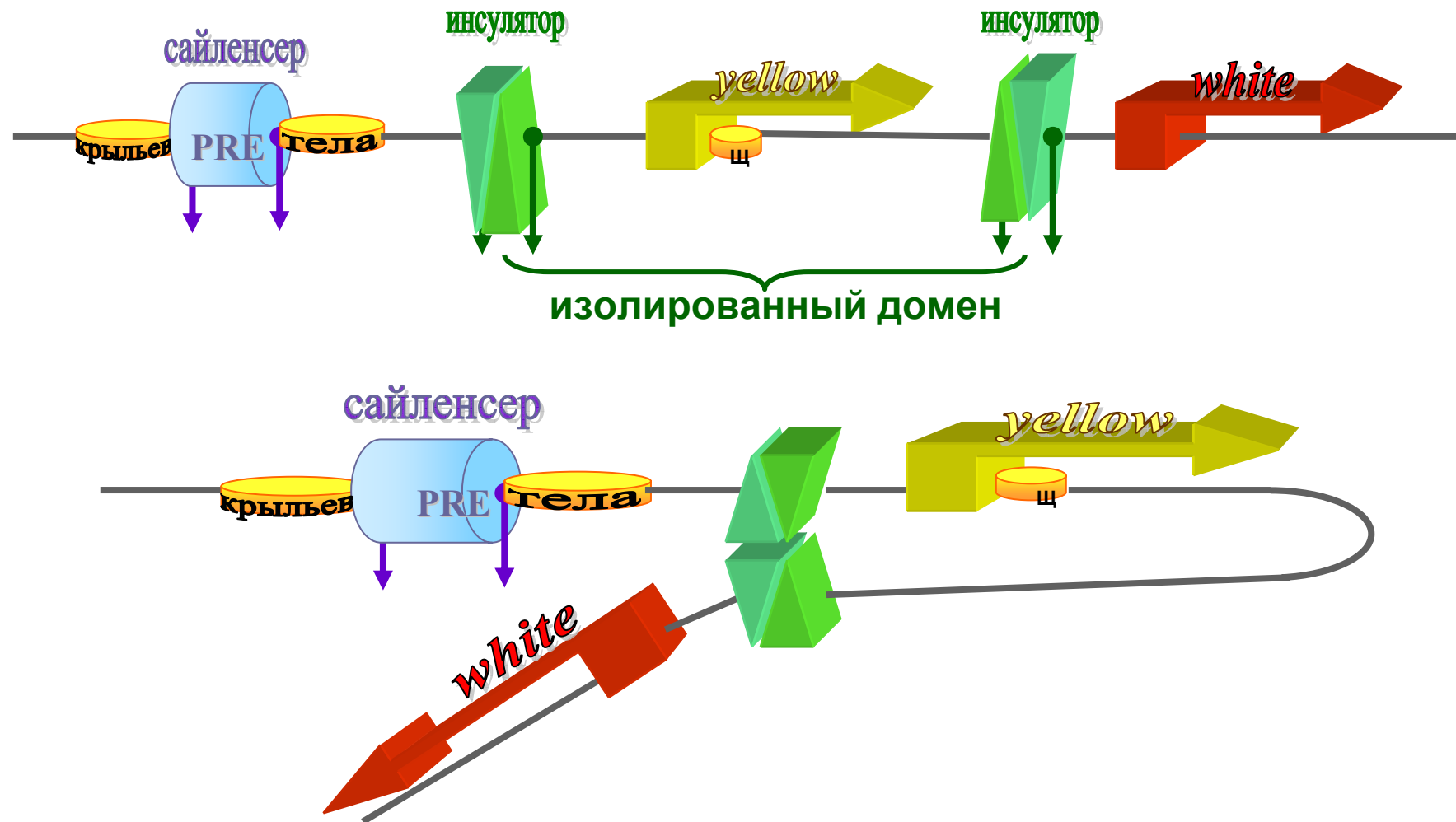




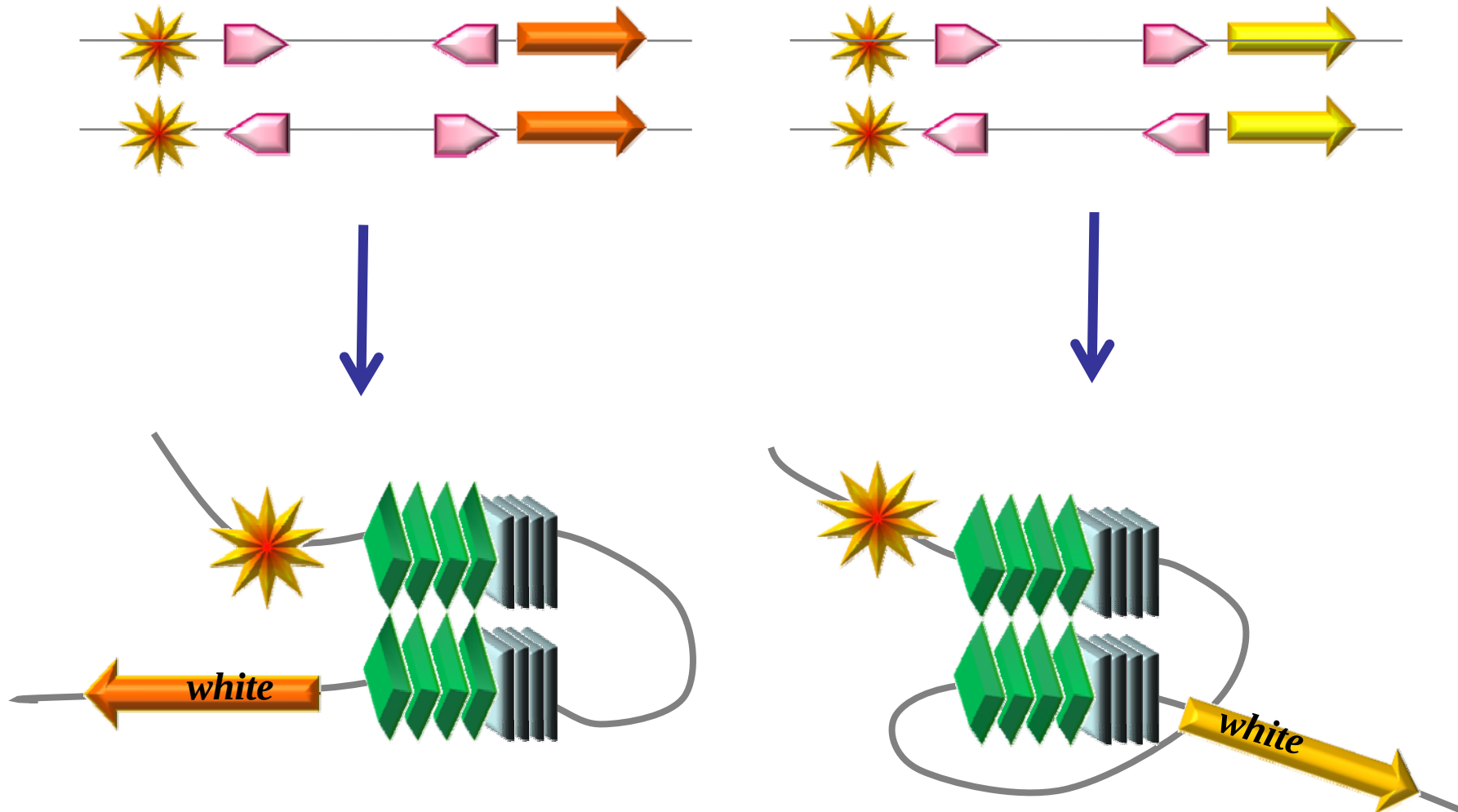
Взаимодействие между инсуляторами стабилизирует коммуникацию между энхансером и промотором



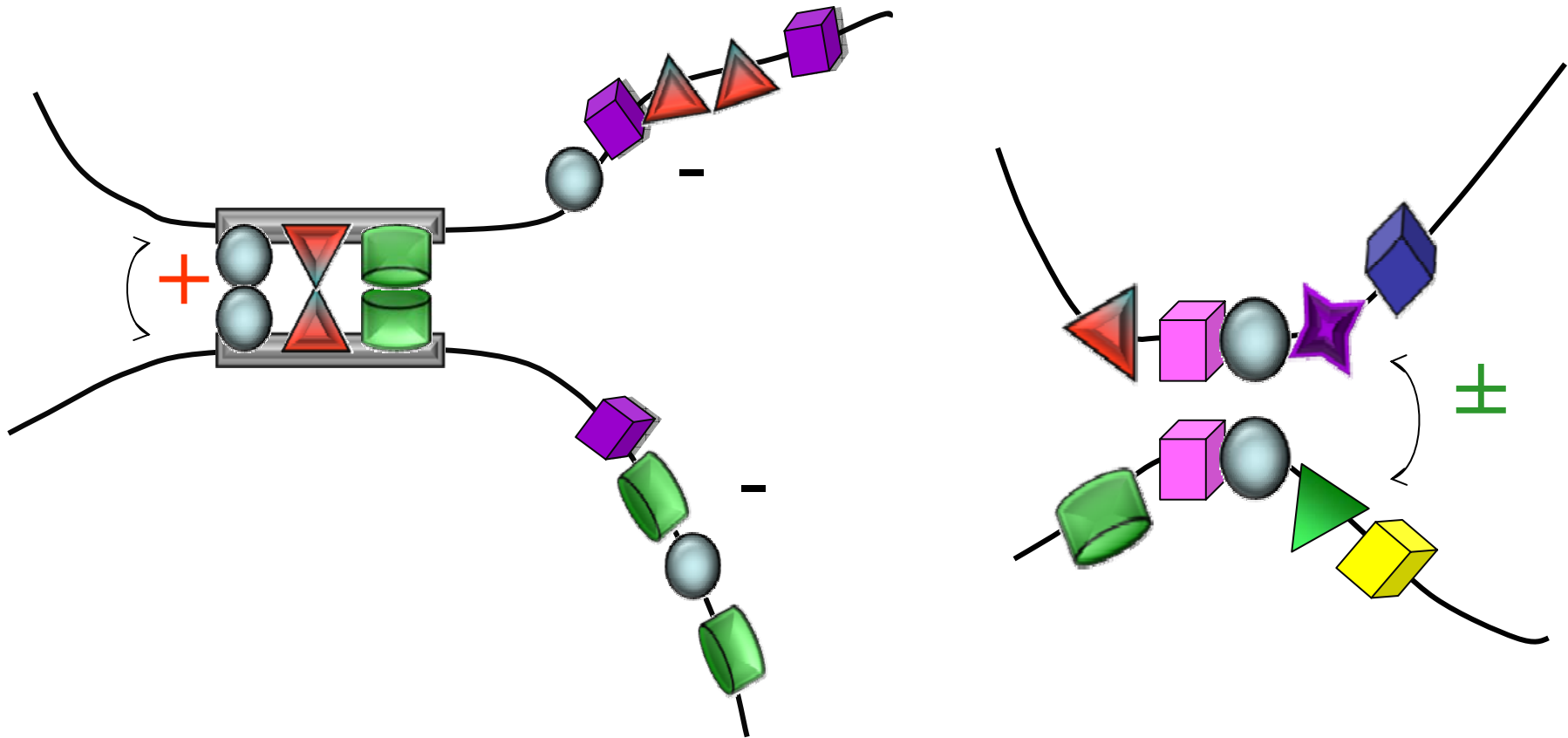
В результате взаимодействия двух инсуляторов происходит образование двух независимых доменов



Взаимная ориентация комбинаций сайтов связывания приближает или изолирует активатор от промотора

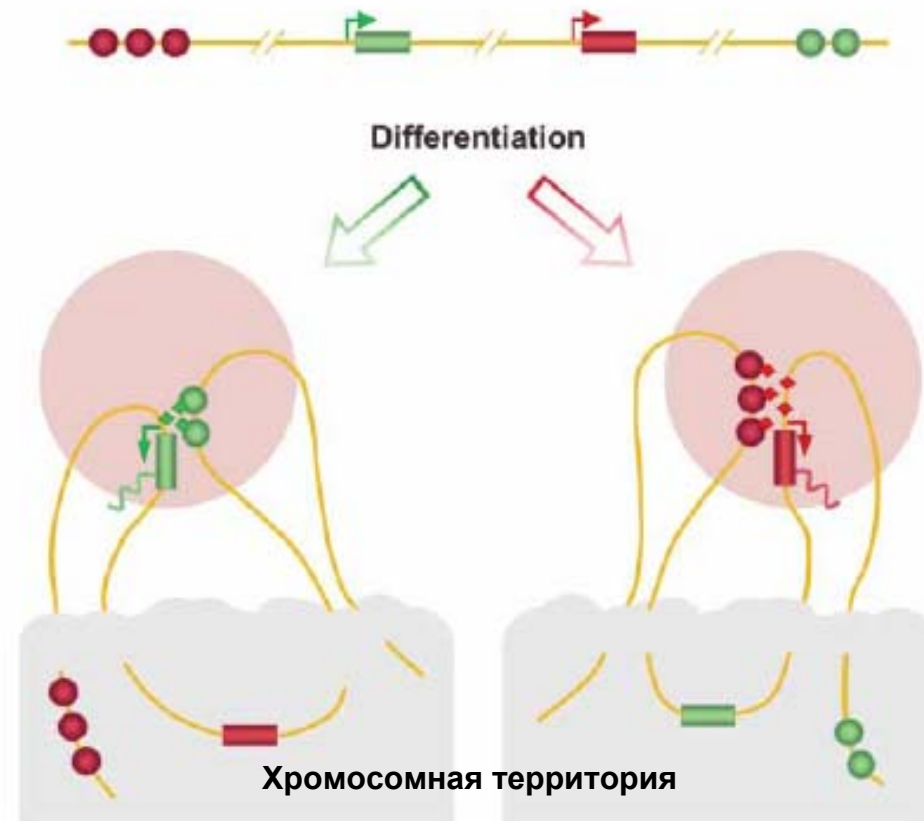


Модель: специфичное взаимодействие между
инсульторами возникает благодаря связыванию
нескольких белков в определенной
последовательности

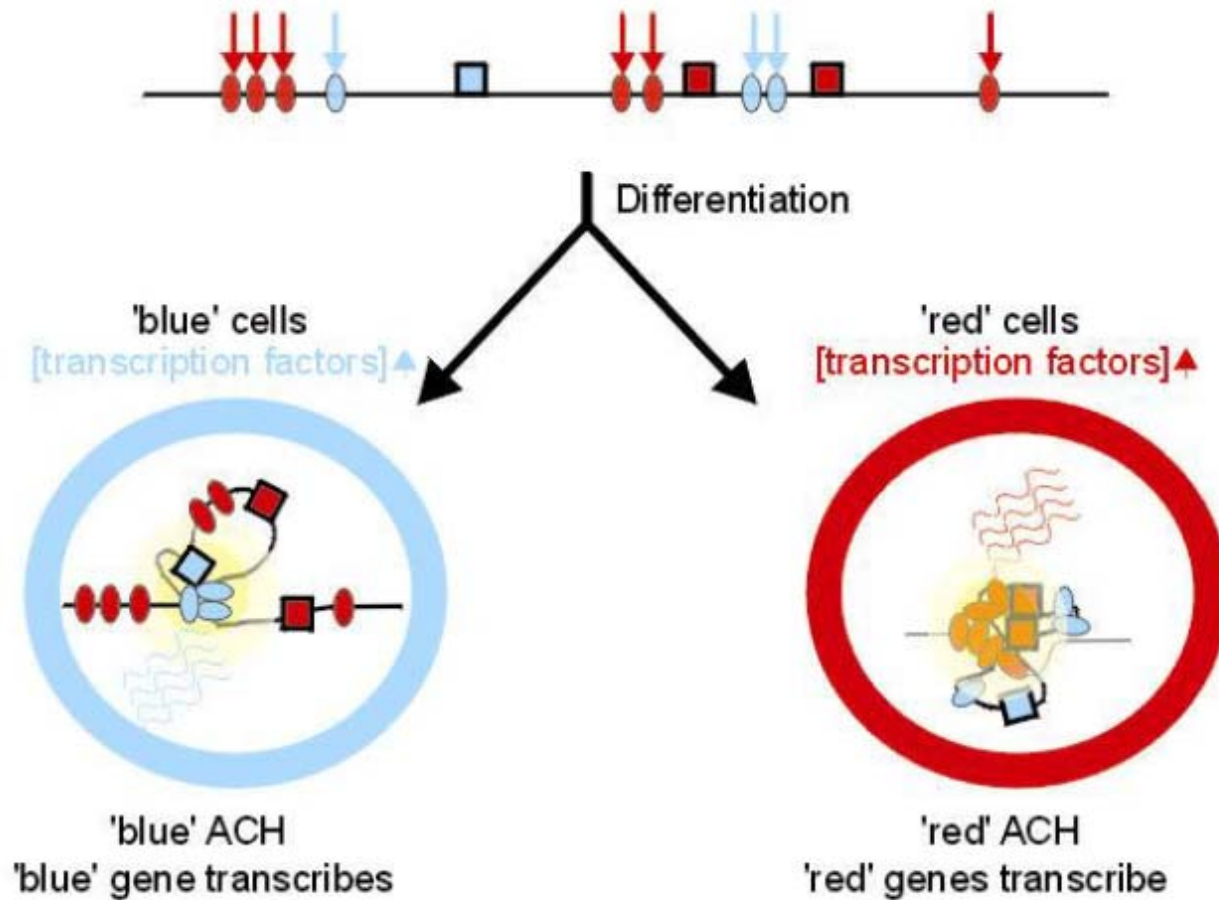


Энхансер 1

Энхансер 2

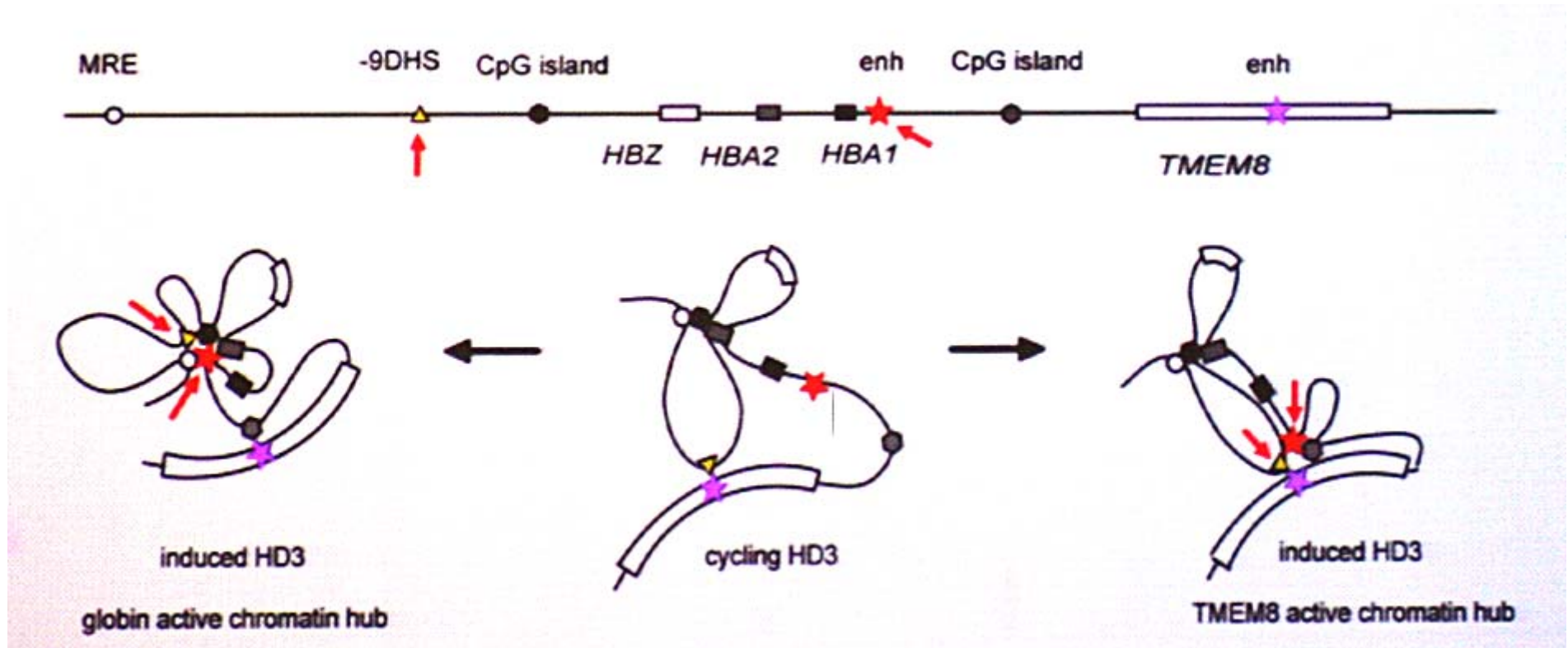


active chromatin hub



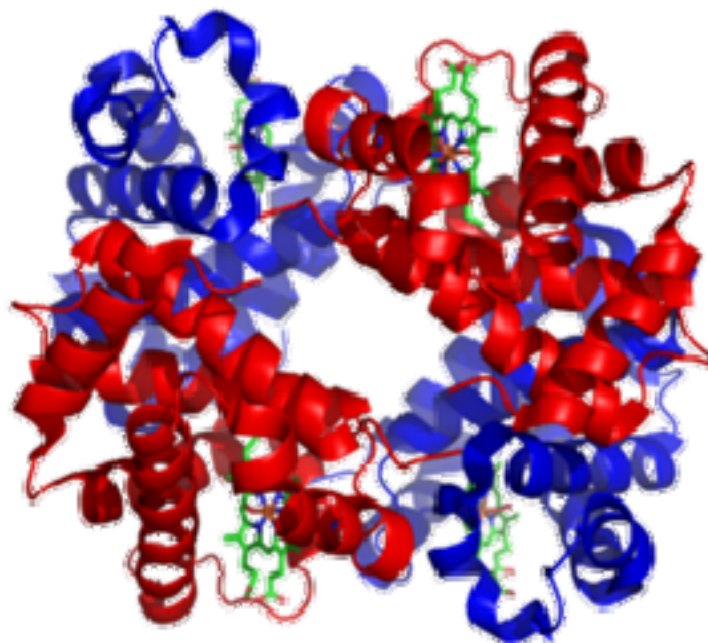
The assembly of multiple simultaneous interactions that leads to the clustering of several activating elements has been termed *active chromatin hub* (ACH)

activ chromatin hub



**Гены глобинов – классические модельные
объекты регуляции экспрессии
эукариотических генов**

Гемоглобин состоит из четырёх субъединиц - двух альфа-подобных и двух бета-подобных цепей, закодированных в альфа- и бета-глобиновых локусах соответственно.

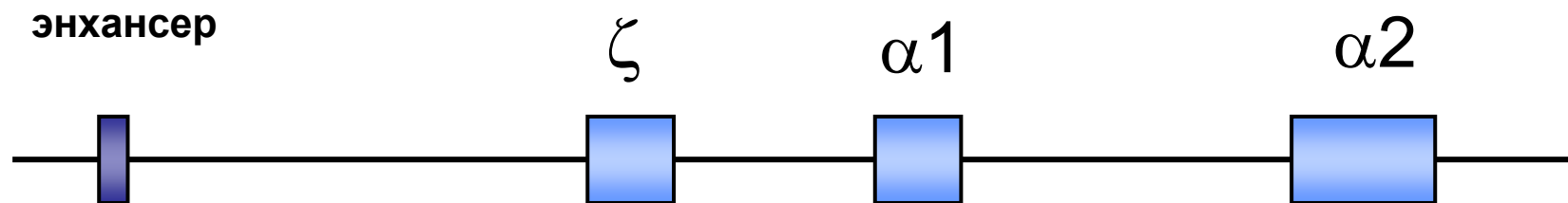


Hemoglobin, human, adult
(heterotetramer, $(\alpha\beta)_2$)

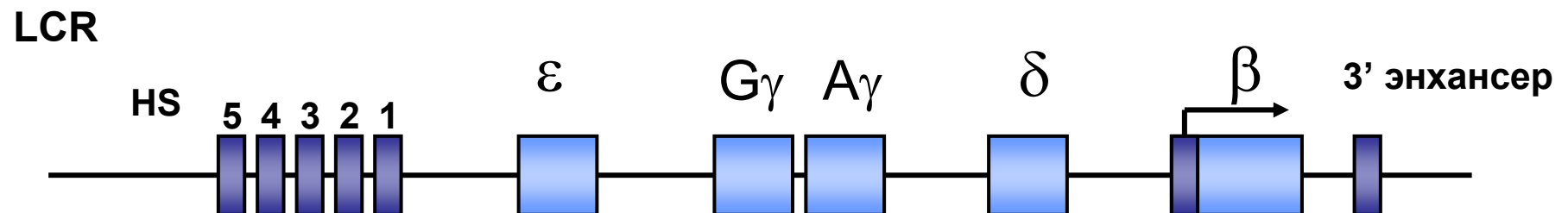
Гемопоз на ранних стадиях развития эмбрионов происходит в желточном мешке, после чего функция кроветворения переходит к печени. Последним из кроветворных органов в онтогенезе развивается красный костный мозг, играющий главную роль в гемопозе взрослых особей. На каждом этапе экспрессируются разные варианты глобинов, составляющих гемоглобин, но все они являются гомологами и закодированы в альфа- и бета-глобиновом локусах.

Альфа и бета – глобиновые локусы включают несколько генов, расположенных тандемно, экспрессия которых регулируется в развитии.

В кластере альфа ген ζ экспрессируется на самой ранней эмбриональной стадии, когда кроветворение происходит в желточном мешке. Гены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ экспрессируются в более позднем эмбрионе и в постнатальный период. Все эти гены регулируются сильным энхансером, расположенном на расстоянии 40 т.п.н. от гена ζ .



Бета-глобиновый локус содержит ген ε работающий в желточном мешке два фетальных $A\gamma$ и $G\gamma$, работающих в печени плода. Псевдоген ψ и два гена, работающих во взрослом организме δ и β . Все эти гены регулируются одним и тем же энхансером HS2 – одним из элементов LCR, расположенных в 10 т.п.н. от гена ε .



Альфа, и бета-глобиновые гены, несмотря на различия в способе регуляции, экспрессируются на одном и том же уровне в одних и тех же клетках на одних и тех же стадиях развития.

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

Кластеры α - и β - глобиновых генов человека имеют сходные функции, транскрибируются в одних и тех же клетках, но имеют принципиально разную организацию и регуляцию.

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

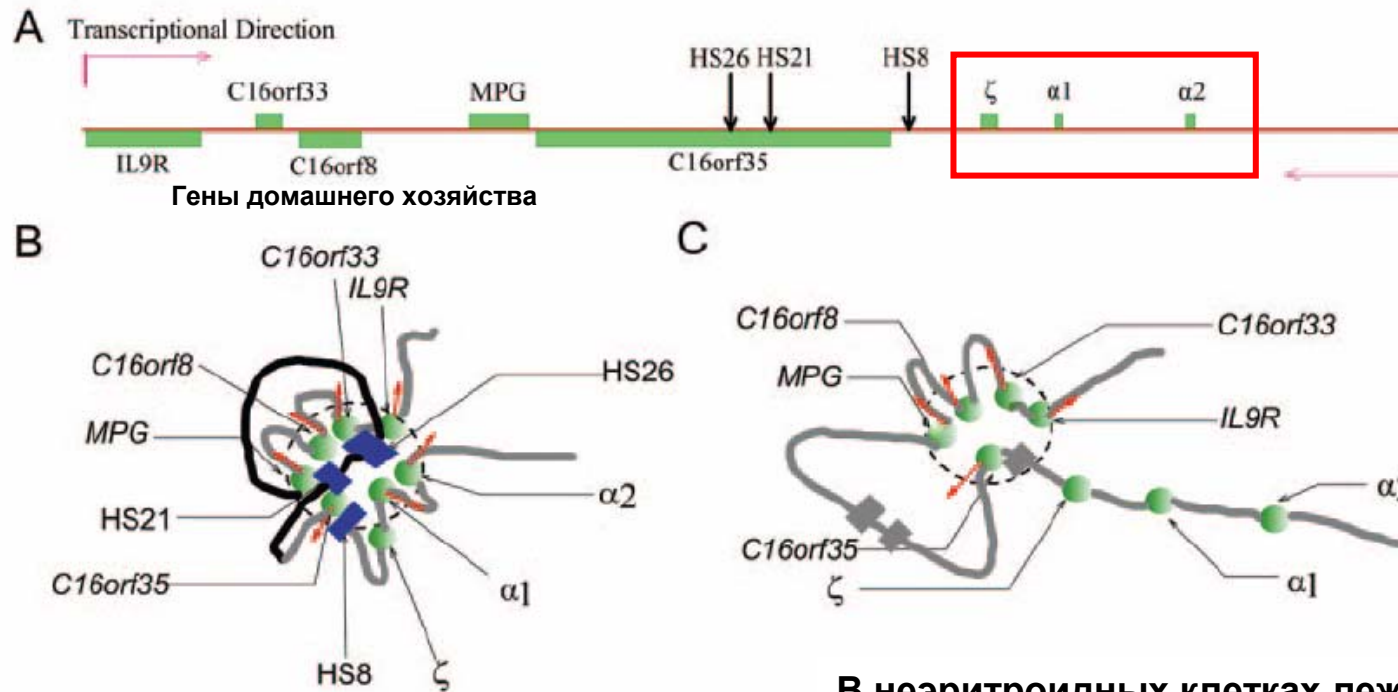
β - глобиновый кластер локализован в G-диске, недалеко от теломерного гетерохроматина. Во всех тканях, где он не экспрессируется, происходит его упаковка в факультативный гетерохроматин. При активации необходима реорганизация хроматина на уровне протяженного участка хромосомы, изменение времени репликации, модификаций гистонов и т.д.

	α -кластер	β -кластер
локализация	16p, G-диск, недалеко от теломеры	11p, R-диск
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

Организация альфа-глобинового кластера.

Окружен постоянно экспрессирующимися генами домашнего хозяйства.

Во всех тканях реплицируется рано, лежит в открытом хроматине.



Когда один из генов локуса экспрессируется, он помещается в транскрипционную фабрику, общую с соседними генами.

В незэритроидных клетках лежит вне транскрипционной фабрики

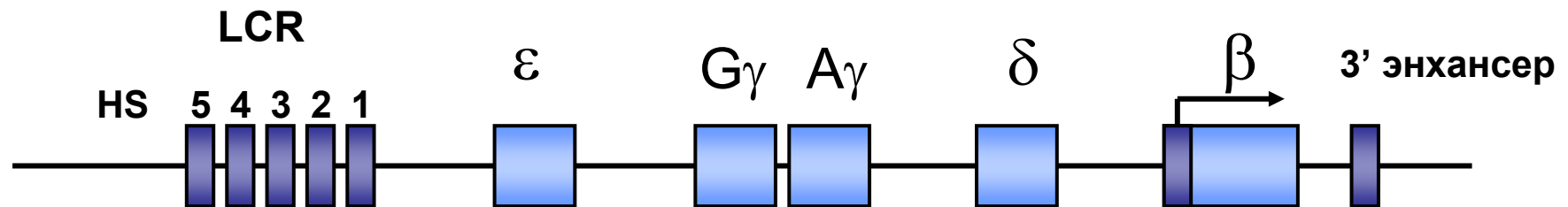
Организация бета-глобинового кластера

β -глобиновый локус находится в локусе неактивного хроматина. В тканях, где он не работает, для него характерна плотная упаковка, эпигенетически метки гетерохроматина и поздняя репликация.

Кластер β -глобиновых генов регулируется LCR – многокомпонентной регуляторной зоной, включающей энхансеры, инсуляторы, MARs и другие регуляторные элементы.

LCR занимает 16 т.п.н. ДНК

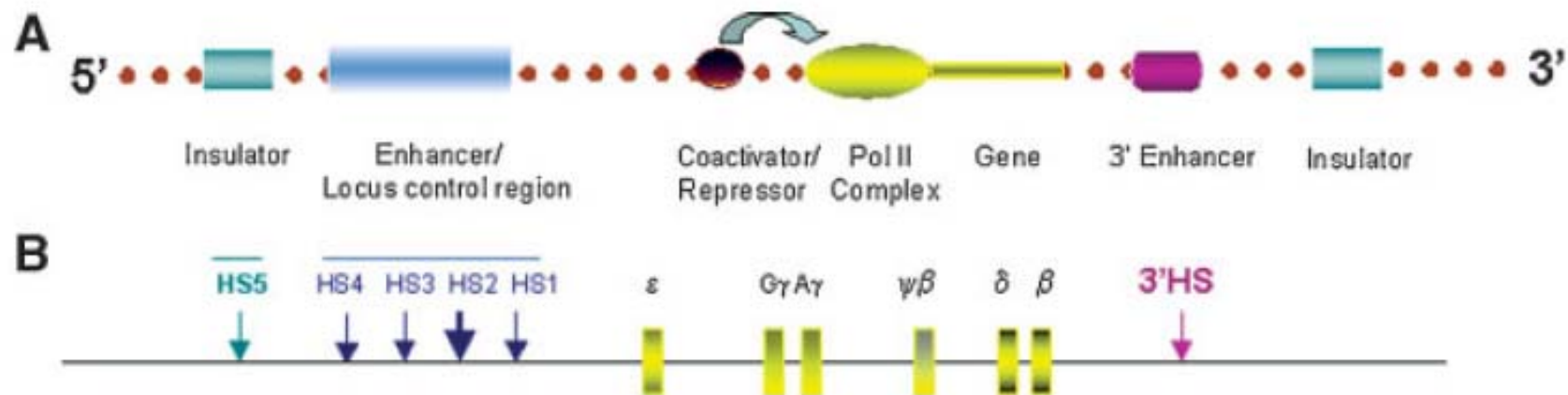
В LCR выявляются сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I (HS).



HS – гиперчувствительные сайты для ДНКазы I

Гиперчувствительными сайтами для ДНКазы I являются участки, свободные от нуклеосом. Считается, что такие участки являются регуляторными. К ним относятся сайты связывания регуляторных белков, MARs

LCR бета-глобинового локуса принимает участие в различных способах регуляции генов локуса.



- Усиление транскрипции (энхансер)

Mahajan et al. Journal of Cellular Biochemistry 102:801–810 (2007)

- Создание активной структуры хроматина (связывание белков-модификаторов хроматина и комплексов ремоделинга, что приводит к ранней репликации и потенциальной возможности транскрипции)

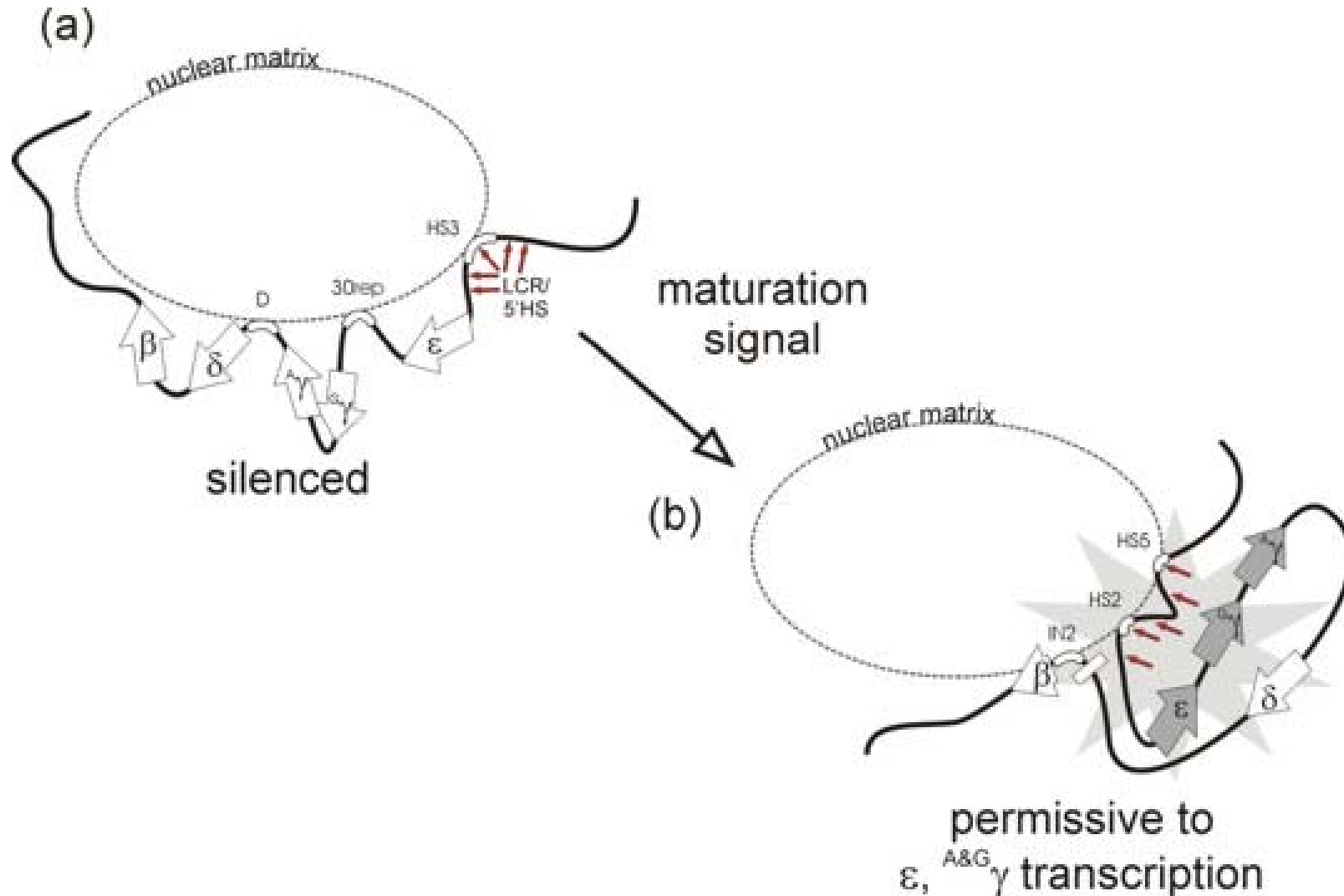
- Инсуляторы позволяют ограничить от эффекта прилежащего гетерохроматина

- MARs участвуют в регуляции взаимного расположения генов в локусе относительно регуляторных элементов

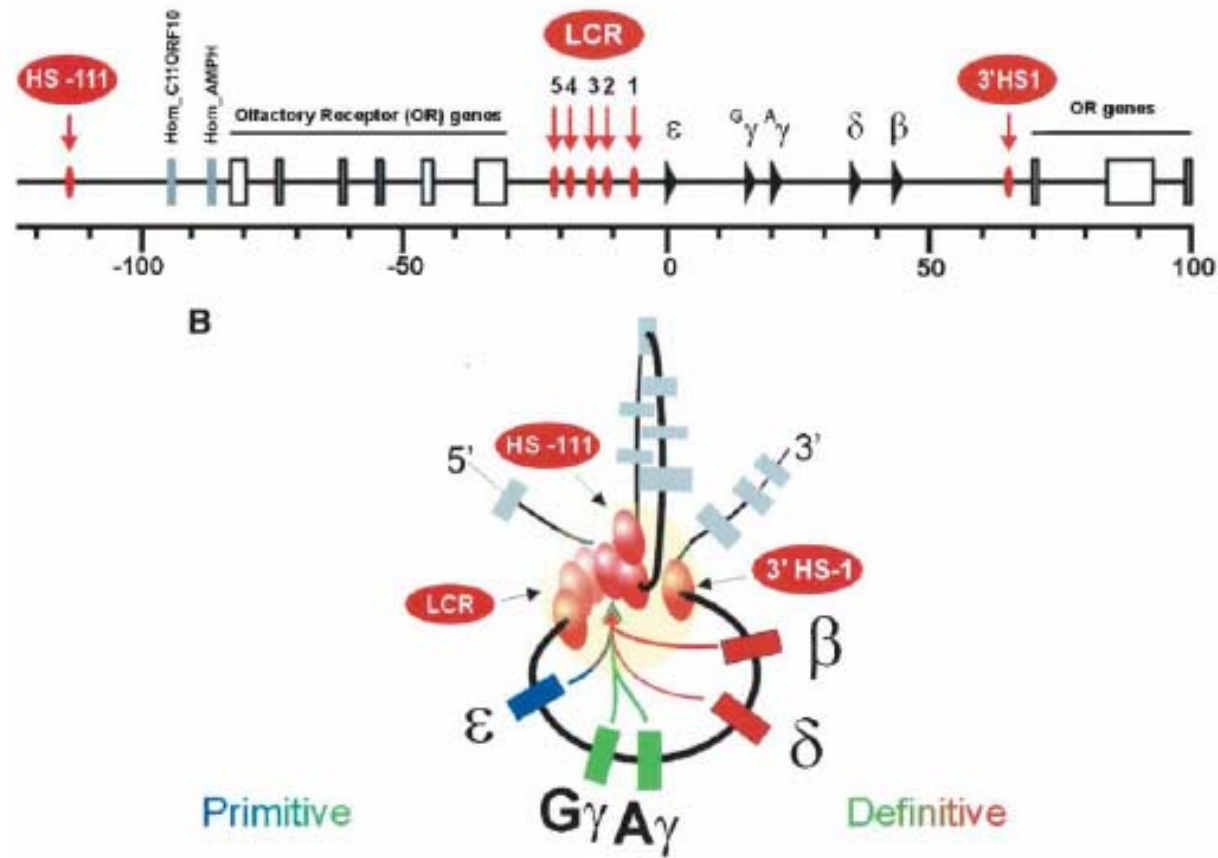
- Регуляция положения локуса в ядре (отправка в транскрипционную фабрику)

- Обнаружено, что негенная транскрипция, начинающаяся от LCR, играет роль в регуляции транскрипции генов, но механизм пока не известен

Для активной транскрипции гена в составе β -глобинового локуса человека, ген должен быть пространственно приближен к регуляторным элементам LCR (что дает возможность провзаимодействовать энхансеру с промотором, проработать некоторым транскрипционным факторам, HAT локально проацетилировать гистоны и т.д.)



Формирование Activ Chromatin Hub (ACH)



The genes are depicted in different colors, indicative of their interaction with the LCR within the ACH during development

Patrinos et al., *Genes Dev.* 2004

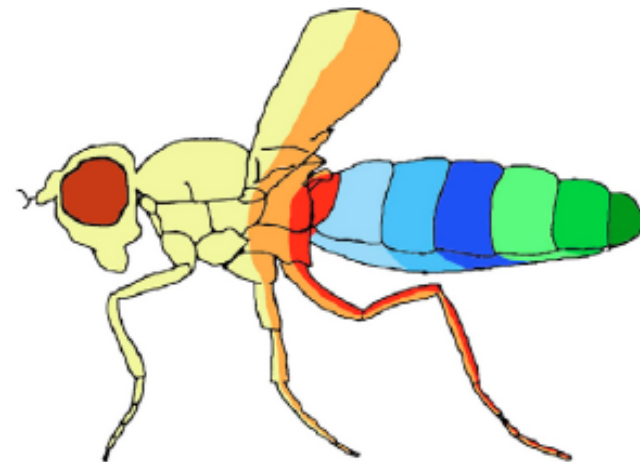
**Сложные регуляторные элементы,
включающие энхансеры, инсуляторы и
сайленсеры на примере регуляторной зоны
ВХ-С комплекса дрозофилы**

Организация комплекса генов *ВХ-С*

Локус *ВХ-С* отвечает за дифференцировку каждого из **девяти** (пара)сегментов. Структурных генов всего три, но **ровно 9 регуляторных участков**.

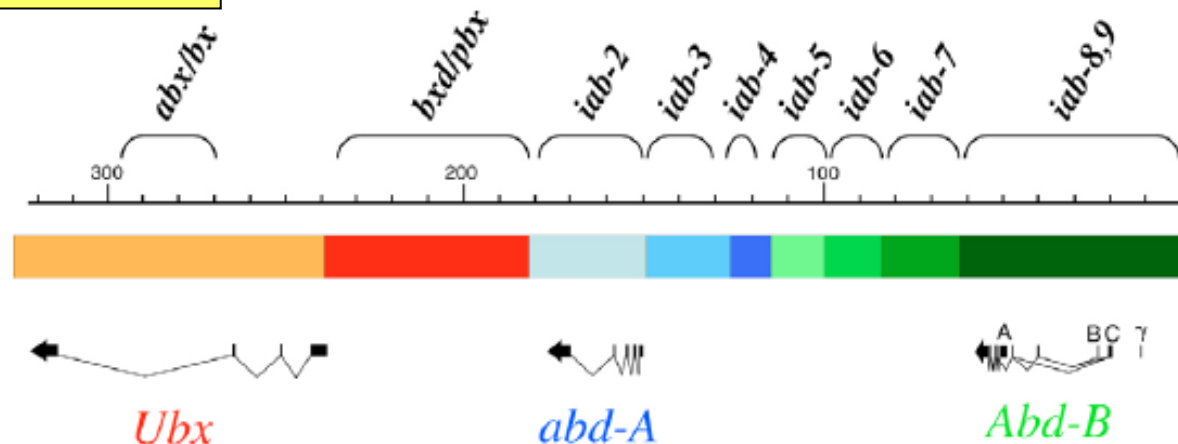
В каждом регуляторном участке есть:

- **энхансер**, который активирует транскрипцию соответствующего гена на нужном для данного парасегмента уровне (связывание комплексов *Tritorax*).
- **Сайленсер** (сайт связывания комплексов *Polyscomb*), блокирующий транскрипцию в тех сегментах, где соответствующий энхансер не должен работать, а так же отвечающий за гетрохроматинизацию локуса на более поздних стадиях развития.
- **Инсуляторы** ограничивают каждый регуляторный участок, обеспечивая правильное тканеспецифическое взаимодействие энхансеров с промоторами



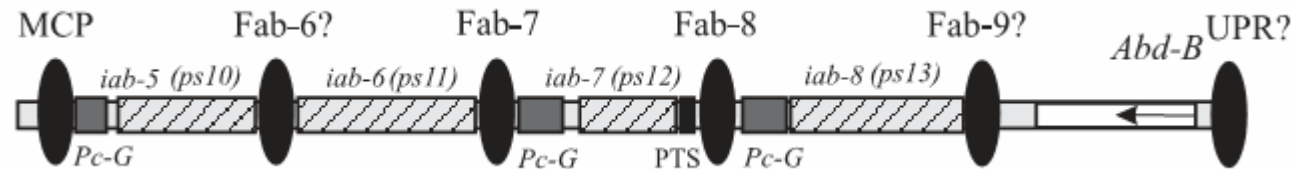
Регуляторные
последовательности

Структурные
гены



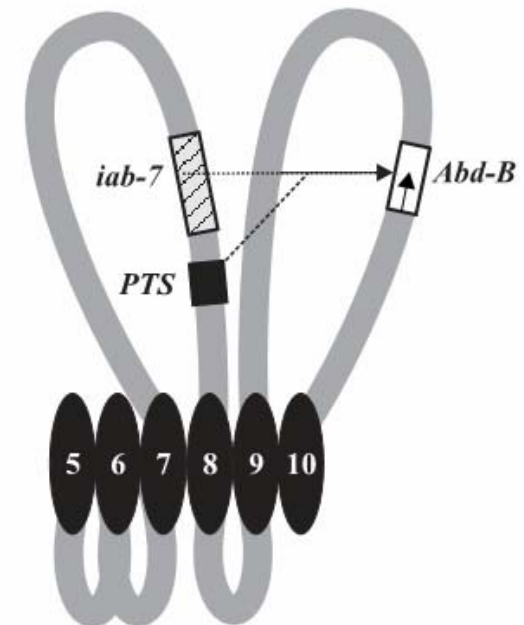
Регуляторная область гена Abdominal-B (Abd-B)

Одного из трех структурных генов локуса BX-C



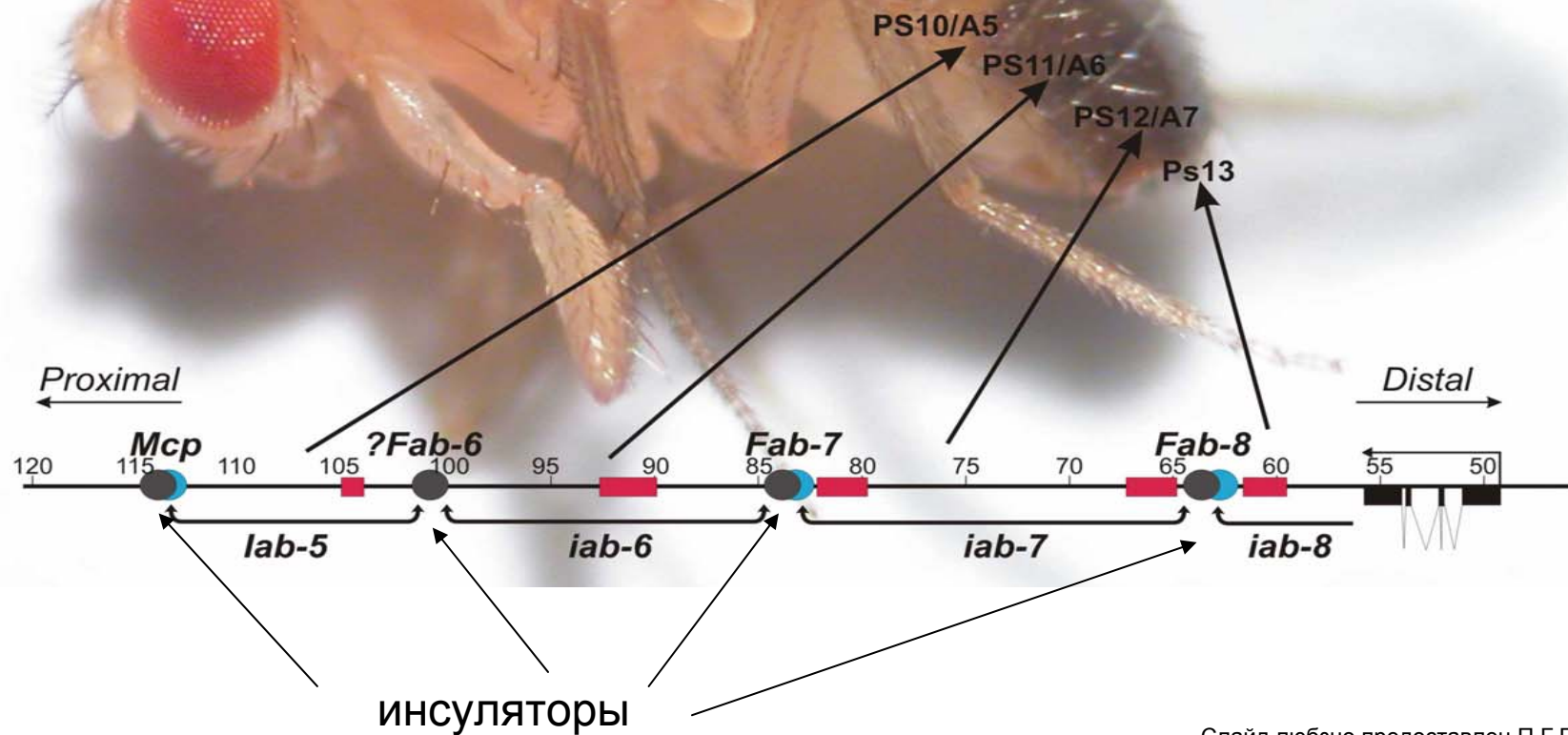
Локус *Abd-B* содержит около 50 т.п.н. 3' цис-регуляторной ДНК. Стрелкой указан сайт начала транскрипции гена *Abd-B*. *iab* энхансеры (*iab-5*, *iab-6*, *iab-7* и *iab-8*) активируют экспрессию гена *Abd-B* в парасегментах 10–13 соответственно. Каждый *iab* энхансер окружен инсульторами (MCP, Fab-7 и Fab-8). Предполагается существование Fab-6 и Fab-9 инсульторов, а также инсультора (UPR) в области промотора *Abd-B* гена. PcG – сайты связывания комплексов Polycomb (сайленсеры)

Модель взаимодействия между энхансерами и промотором в *Abd-B*.

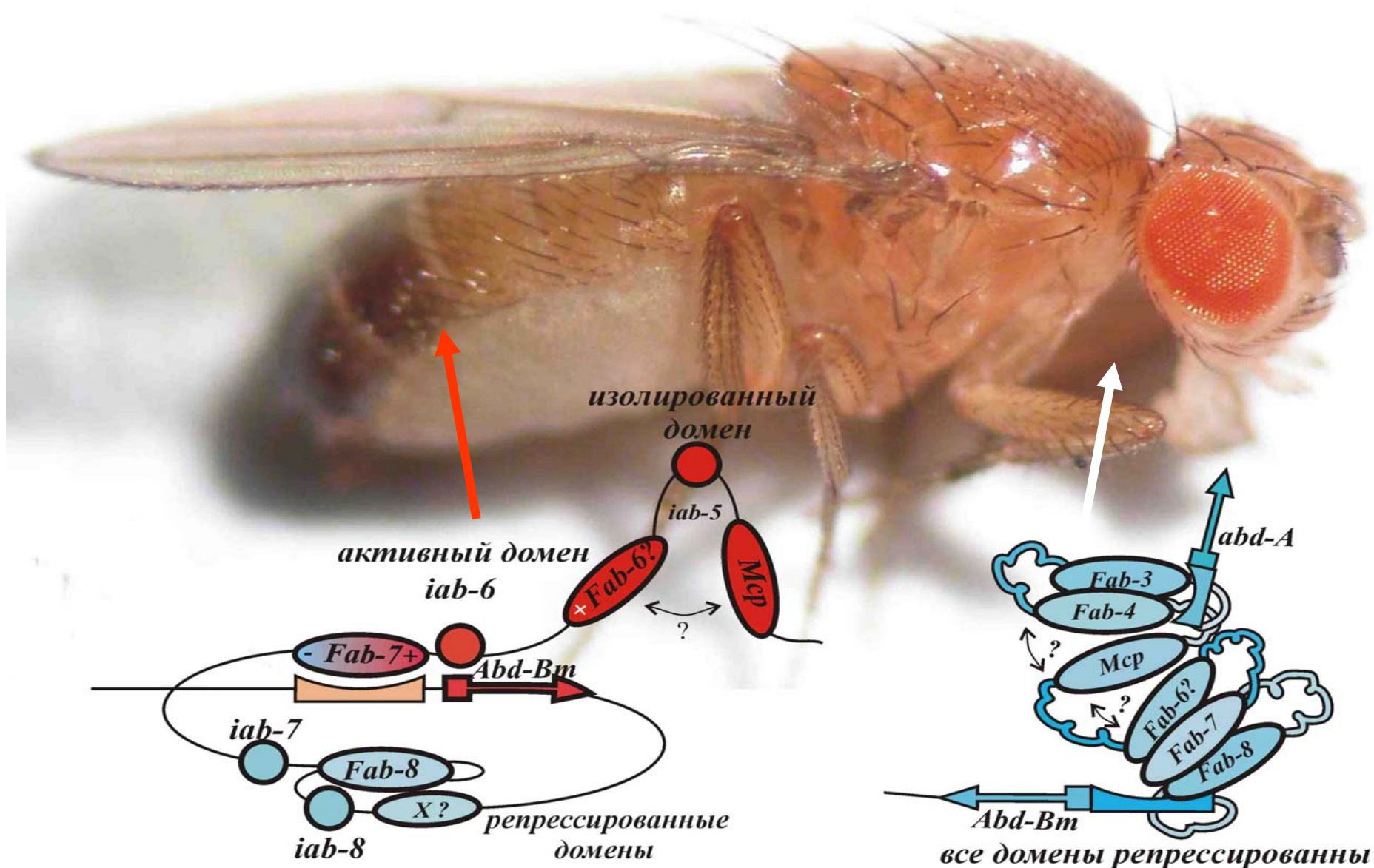


Регуляторная область гена *Abdominal-B* (*Abd-B*)

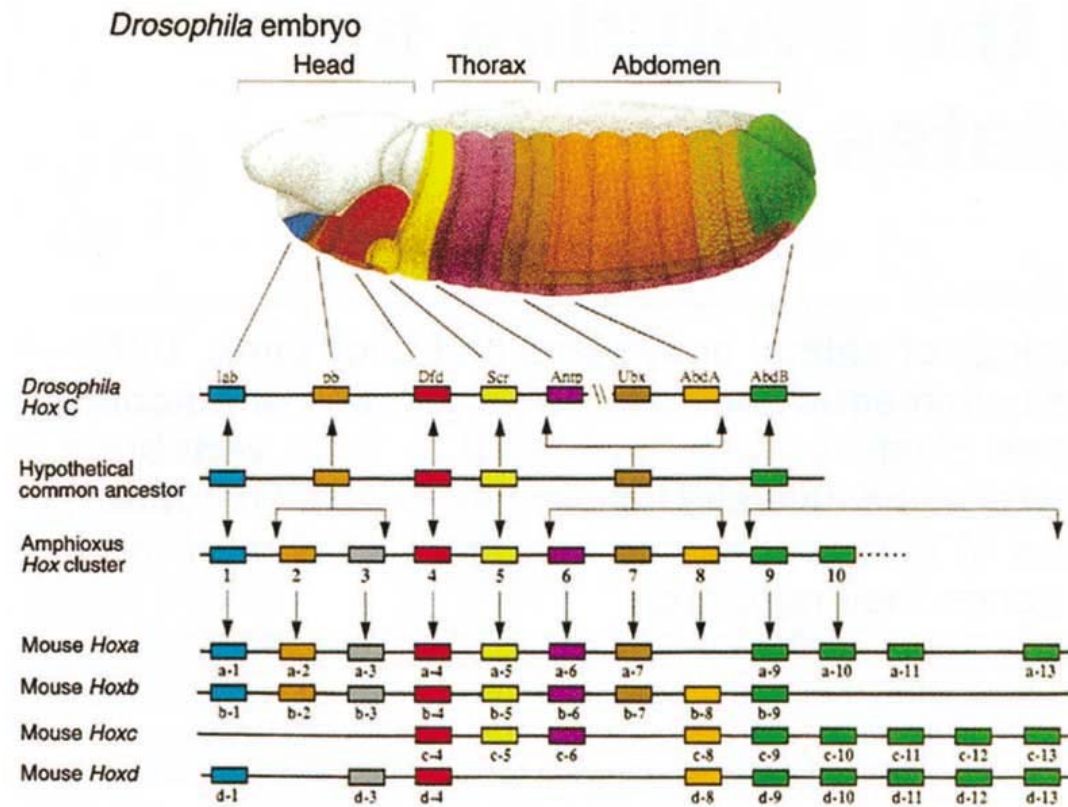
Одного из трех структурных генов локуса *BX-C*



Модель регуляции *Abd-B* гена



Консервативность НОХ кластеров в эволюции



Mouse embryo

