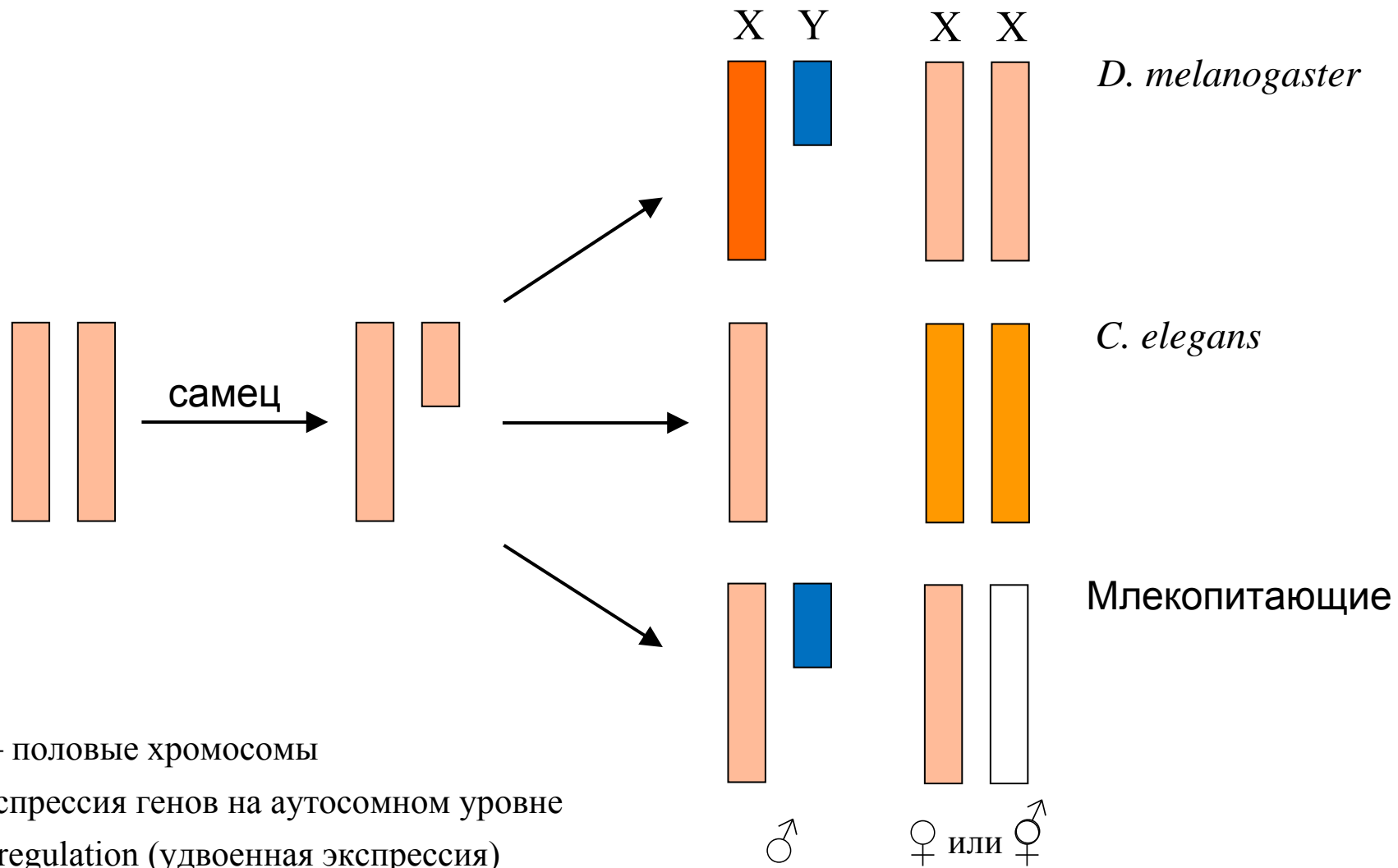


Инактивация X-хромосомы у самок млекопитающих

Елена Дементьева

Лаборатория эпигенетики развития
Институт цитологии и генетики СО РАН

Дозовая компенсация генов X-хромосомы



X, Y – половые хромосомы

■ экспрессия генов на аутосомном уровне

■ upregulation (удвоенная экспрессия)

□ инактивация генов

■ снижение экспрессии генов с обеих X-хромосом

■ Y-хромосома

Инактивация X-хромосомы – процесс, при котором в раннем эмбриогенезе самок млекопитающих одна из двух X-хромосом становится транскрипционно неактивной

Инактивация X-хромосомы

```
graph TD; A[Инактивация X-хромосомы] --> B[Импринтированная]; A --> C[Случайная];
```

Импринтированная

преимущественная
инактивация X-хромосомы,
наследуемой от отца

сумчатые млекопитающие

предымплацентарное развитие и
экстраэмбриональные ткани
некоторых плацентарных

Случайная

равная вероятность
инактивации отцовской и
материнской X-хромосом

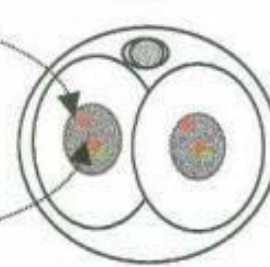
плацентарные млекопитающие

Инактивация X-хромосомы в предимплантационном развитии самок мыши

Heard, Disteche, 2006

Зиготическая активация генов

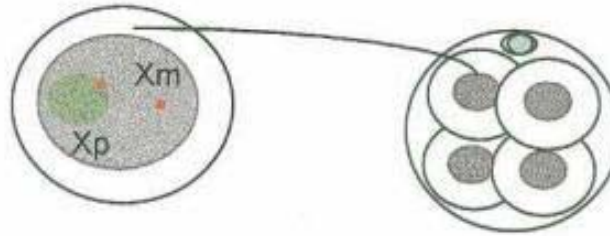
Экспрессия генов на обеих X-хромосомах



2-клеточная стадия

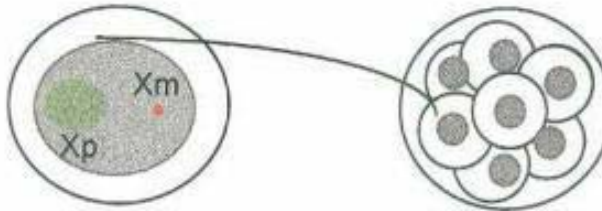
Экспрессия *Xist* РНК на Xp

исключение РНК-полимеразы II
инактивация генов



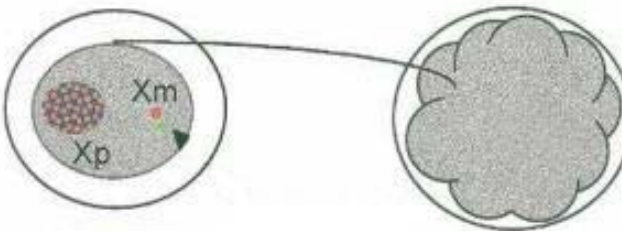
4-клеточная стадия

гипометилирование H3K4
гипоацетилирование H3K9



8-клеточная стадия

триметилирование H3K27
ассоциация с гистоном
макроH2A1.2

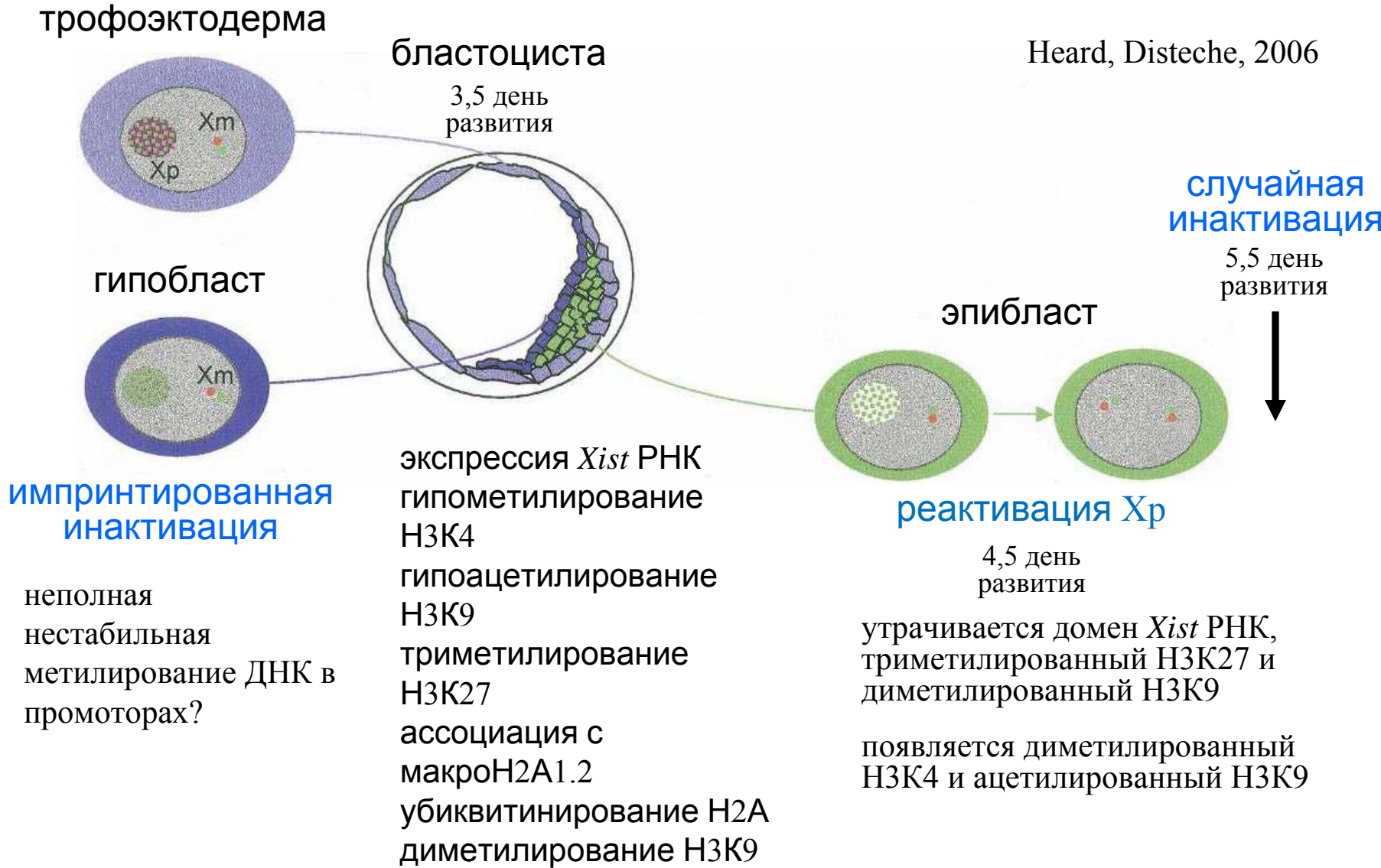


морула

Xp – X-хромосома, унаследованная от отца; Xm – X-хромосома, унаследованная от матери

Инактивация X-хромосомы в раннем эмбриогенезе самок мыши

Heard, Disteché, 2006



Xp – X-хромосома, унаследованная от отца; Xm – X-хромосома, унаследованная от матери

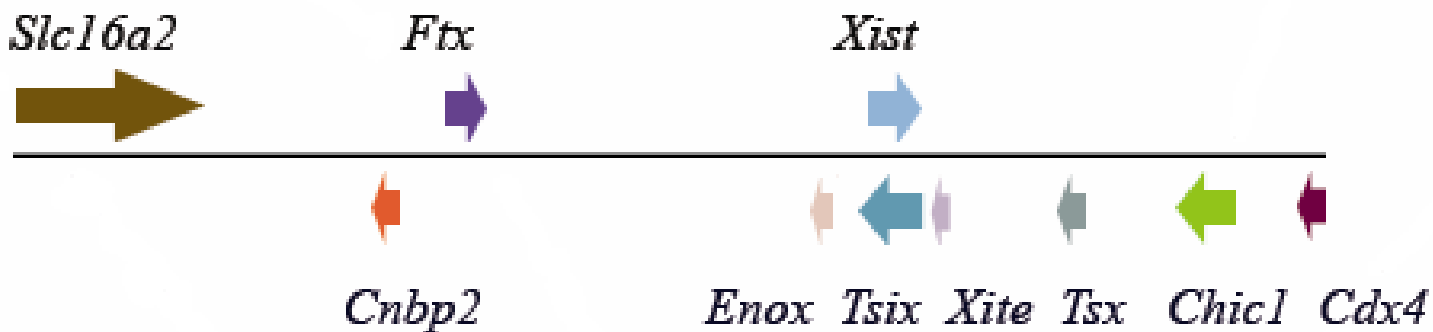
Стадии случайной инактивации X-хромосомы

1. Подсчет числа X-хромосом на диплоидный набор;
2. Выбор активной и неактивной X-хромосомы;
3. Инициация инактивации
4. Распространение неактивного состояния;
5. Поддержание неактивного состояния.

Эмбриональные стволовые клетки мыши – модельная система для изучения процесса случайной инактивации

Центр инактивации X-хромосомы мыши

~ 500 т.п.н.



Xist (X inactive-specific transcript) – ген некодирующей РНК, необходимой для инактивации X-хромосомы

Tsix – негативный регулятор гена *Xist*

Xite – энхансер гена *Tsix*

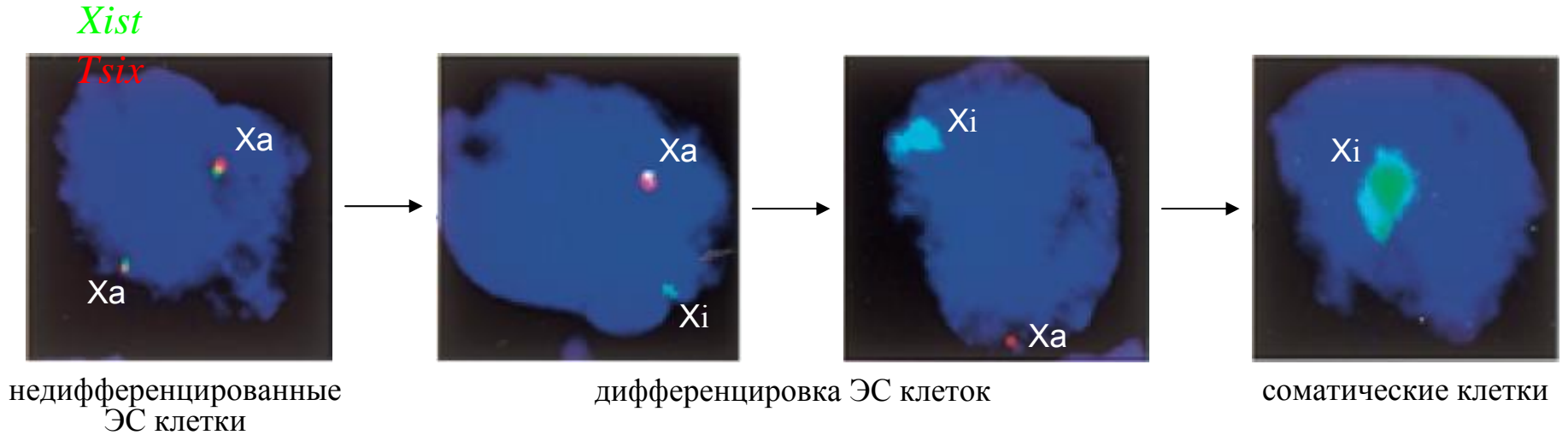
Enox (*Jpx*), *Ftx* – гены некодирующих РНК, которые активируют экспрессию гена *Xist*

Tsx – ген некодирующей РНК, роль в инактивации?

Slc16a2, *Cnbp2*, *Chic1*, *Cdx4* – белок-кодирующие гены, роль в инактивации?

Инициация инактивации X-хромосомы у мыши

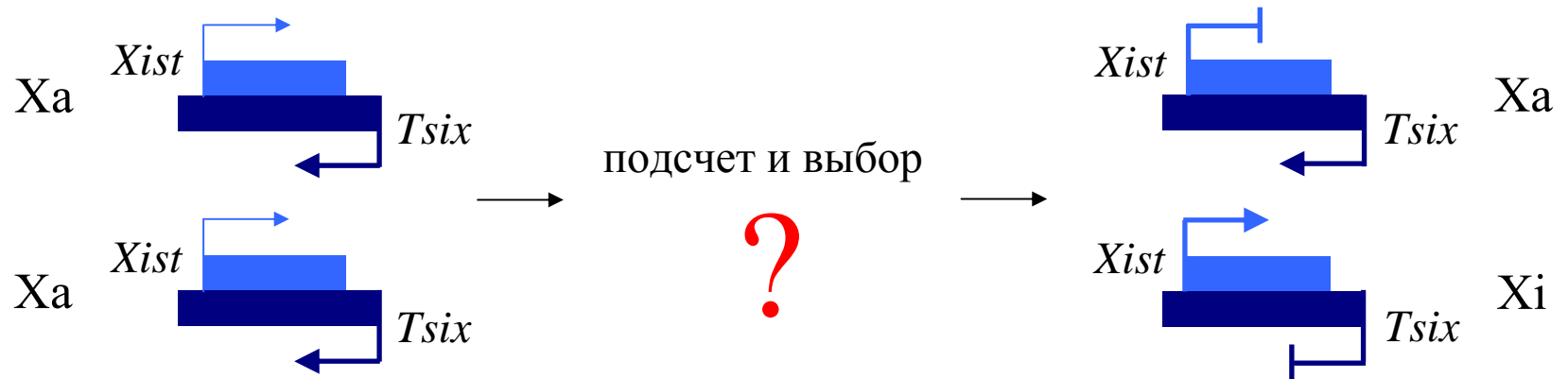
Экспрессия генов *Xist* и *Tsix* в процессе инактивации X-хромосомы



Boumil, Lee, 2001

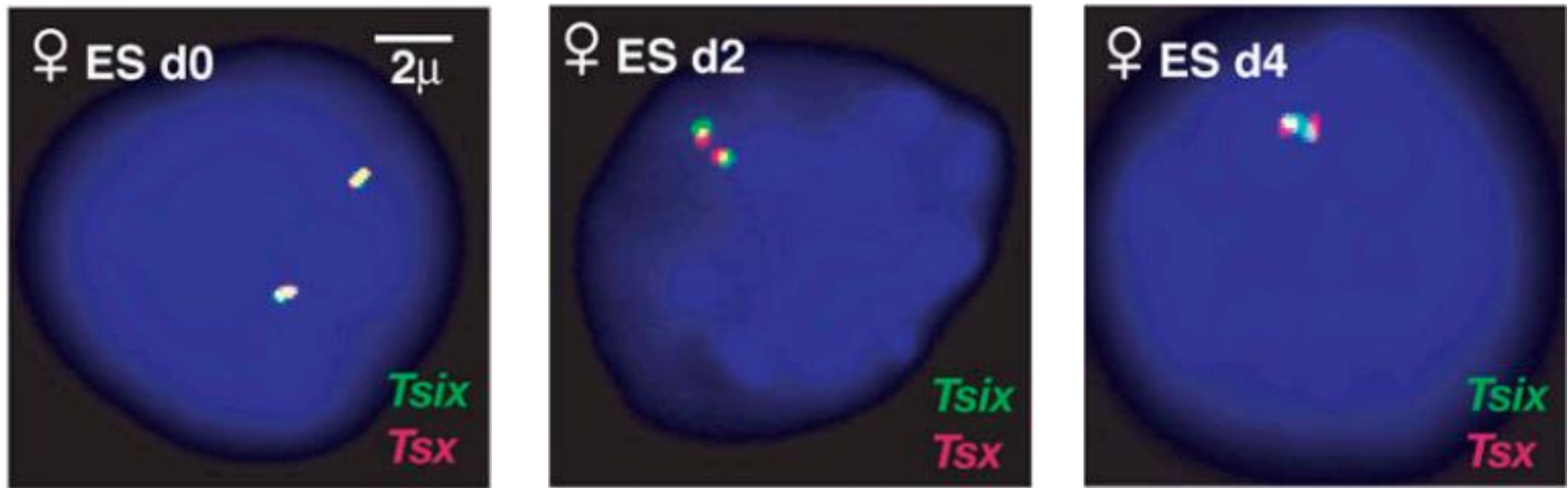
Ха – активная X-хромосома, Xi – неактивная X-хромосома

Инициация инактивации X-хромосомы у мыши



X_a – активная X-хромосома, X_i – неактивная X-хромосома

Механизм подсчета и выбора при инактивации X-хромосомы у мыши



0 день

2 день

4 день

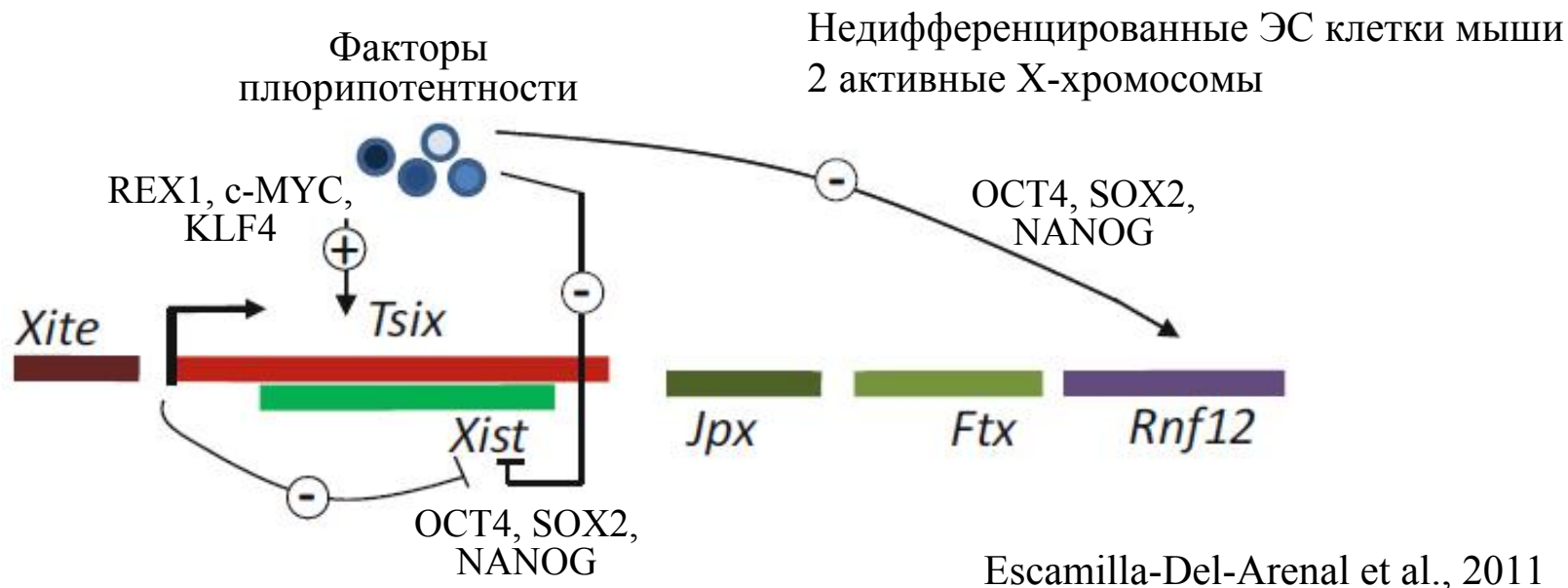
дифференцировка эмбриональных стволовых клеток

На 2-4 дни дифференцировки эмбриональных стволовых клеток самок мыши происходит сближение центров инактивации двух X-хромосом

В образовании пары между центрами инактивации участвуют районы генов *Tsix* и *Xite*

Сближение центров инактивации необходимо для правильной регуляции процессов подсчета и выбора

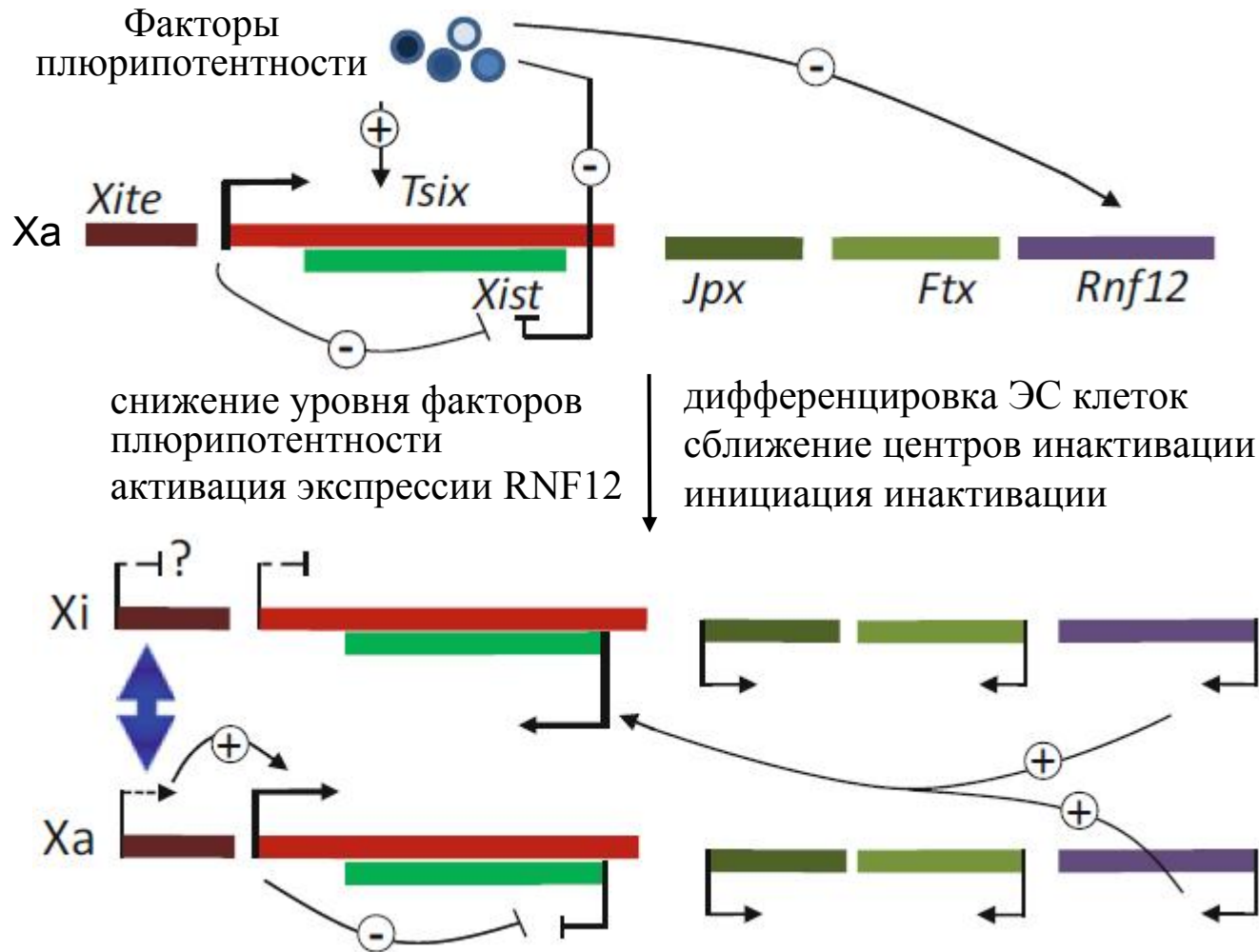
Регуляция экспрессии генов *Xist* и *Tsix* при инициации инактивации



Транскрипционные факторы, ответственные за поддержание плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток принимают участие в регуляции экспрессии генов *Xist* (репрессия) и *Tsix* (активация)

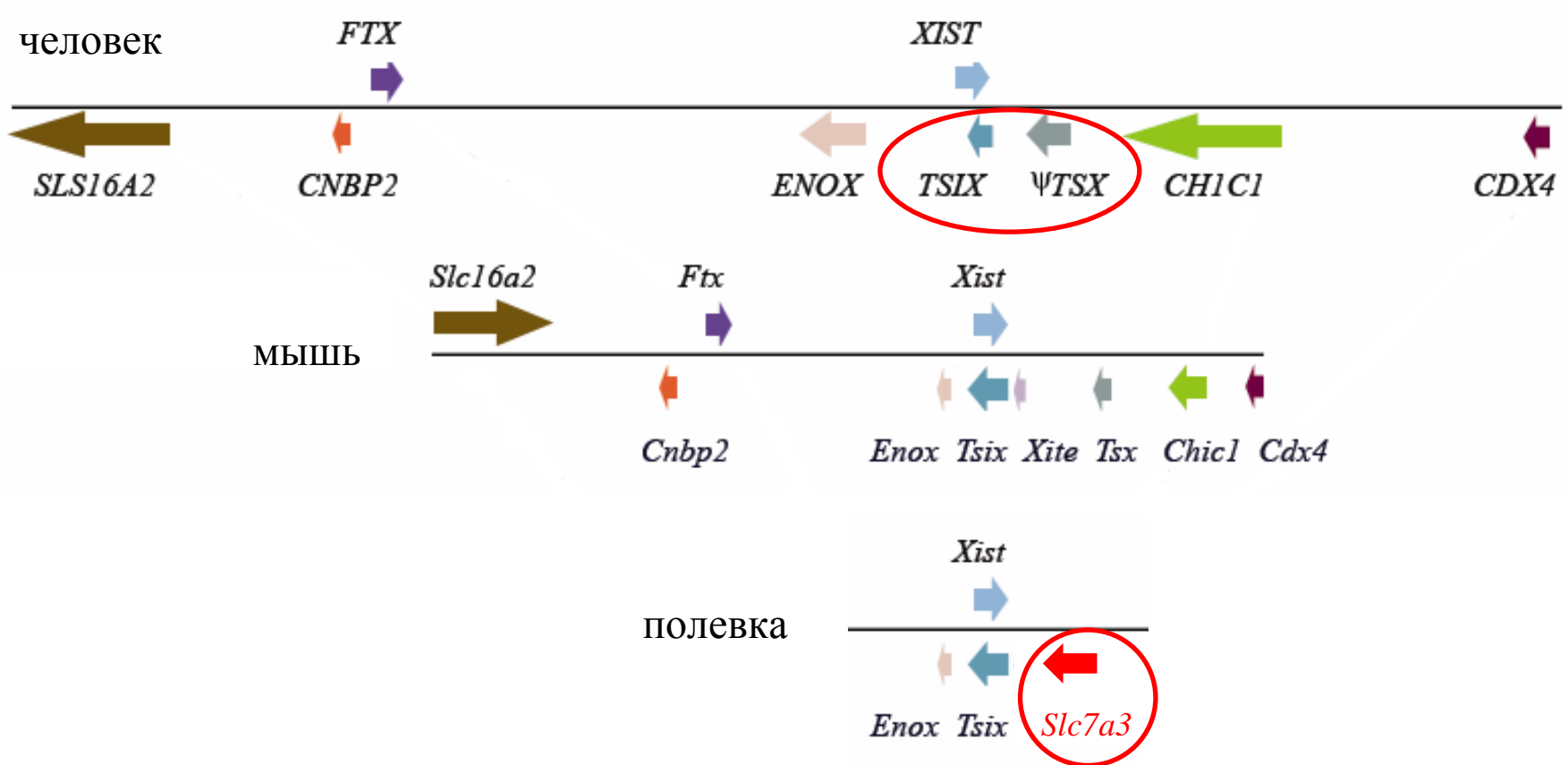
Убиквитин-лигаза RNF12 активирует экспрессию гена *Xist* в дозозависимой манере. Ее экспрессия репрессируется факторами плюрипотентности

Регуляция экспрессии генов *Xist* и *Tsix* при инициации инактивации



Ха и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

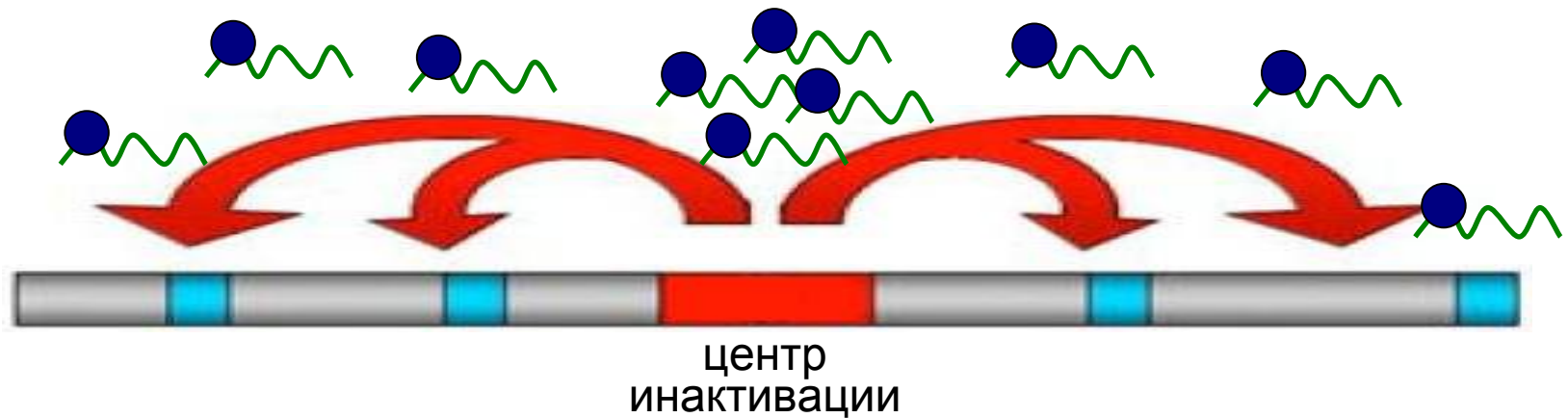
Центр инактивации X-хромосомы у других видов плацентарных




Элементы центра инактивации, регуляция гена *Xist* и процесса инактивации могут быть видоспецифичными

Распространение неактивного состояния вдоль X-хромосомы

МОДЕЛЬ «ОСТАНОВКИ В ПУТИ»



 *Xist* РНК

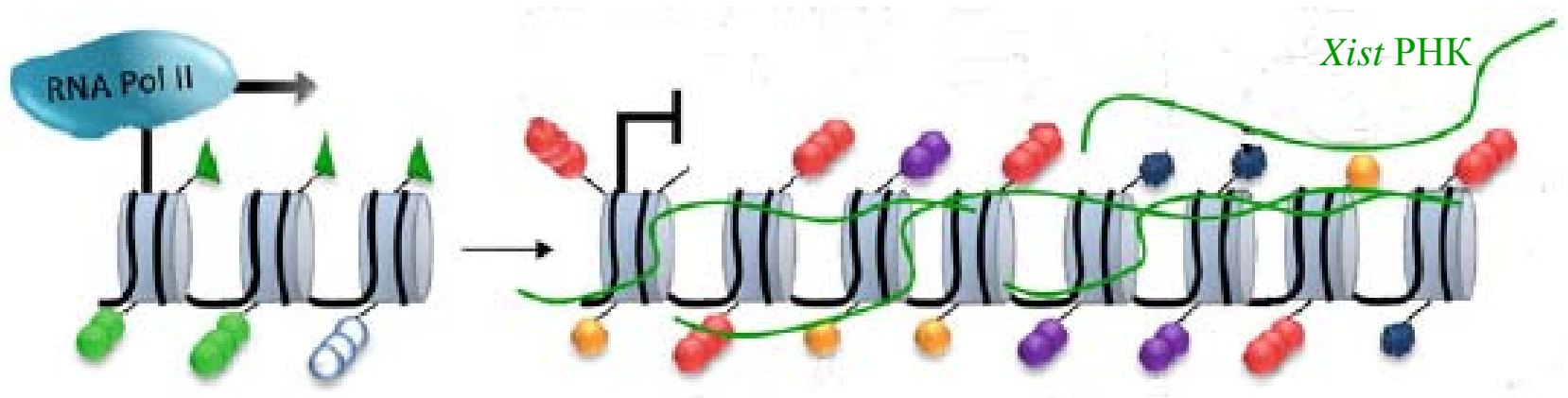
 взаимодействующие с *Xist* РНК
факторы

 way stations, «пересадочные станции»

LINE – главные кандидаты на роль way stations

- LINE характерны для всех видов млекопитающих
- двукратное обогащение LINE-1 на X-хромосоме по сравнению с аутосомами
- менее эффективное распространение сигнала инактивации на аутосомах
- неслучайное распределение LINE-1 на X-хромосоме: наибольшая плотность в центре инактивации и подвергающихся инактивации районах X-хромосомы, а также низкая плотность в избегающих инактивации районах

Ранние эпигенетические события при инактивации X-хромосомы

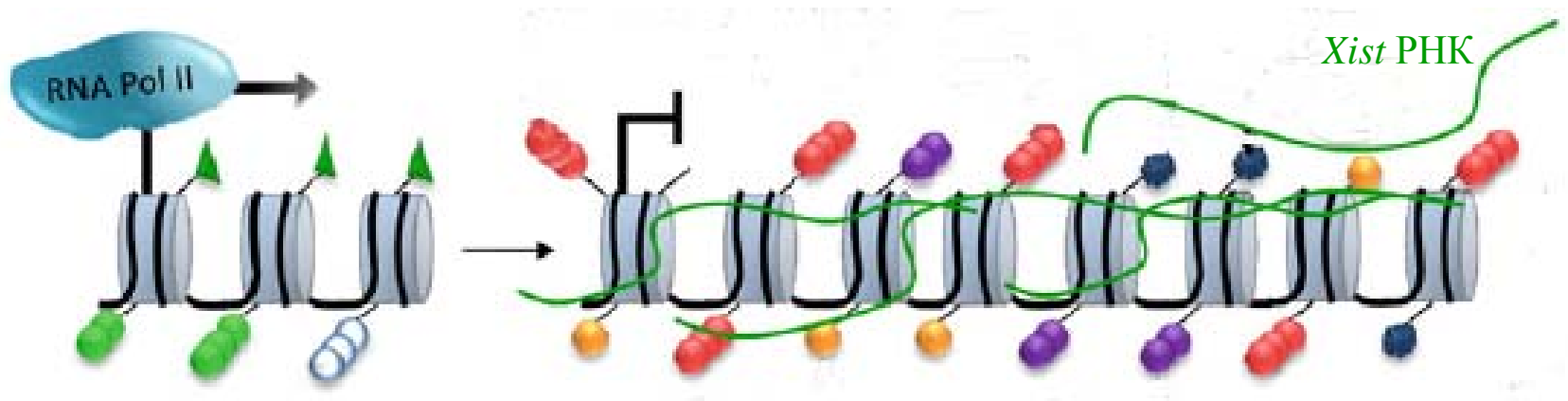


2-4 дни дифференцировки
ЭС клеток

Escamilla-Del-Arenal et al., 2011

1. Накопление *Xist* РНК и ее распространение вдоль X-хромосомы
2. Исключение РНК-полимеразы II
3. Потеря модификаций активного хроматина:
 - гипометилирование H3K4
 - гипометилирование H3K36
 - деацетилирование H3 и H4

Ранние эпигенетические события при инактивации X-хромосомы



2-4 дни дифференцировки
ЭС клеток

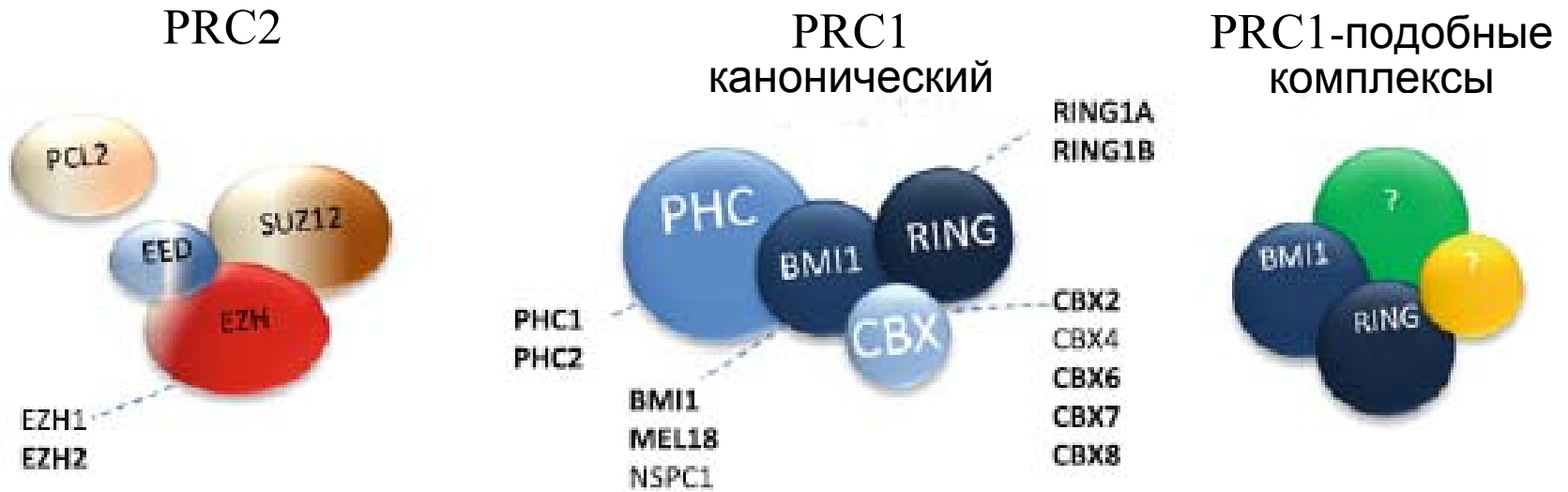
Escamilla-Del-Arenal et al., 2011

4. Приобретение модификаций неактивного хроматина:

- триметилирование H3K27
- моноубиквитинирование H2AK119
- диметилирование H3K9
- метилирование H4K20

5. Установление поздней репликации

Комплексы, модифицирующие хроматин на неактивной X-хромосоме



триметилирование H3K27

моноубиквитинирование H2AK119

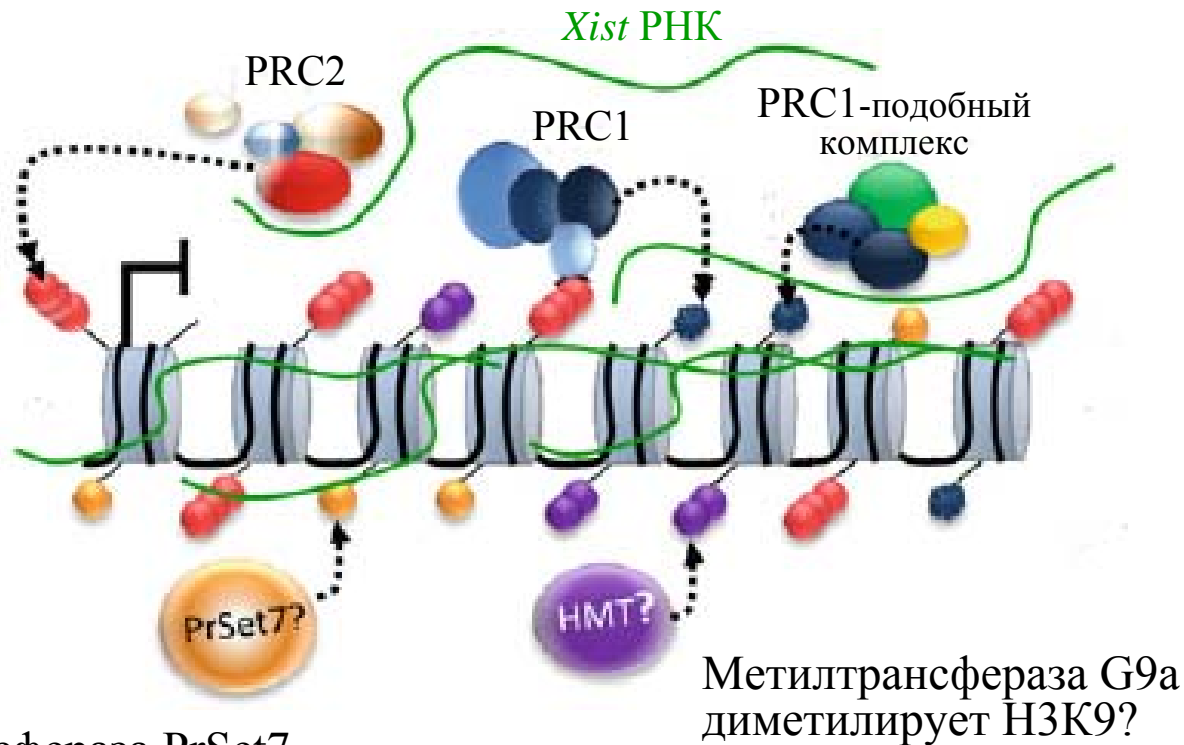
EZH/ENX1 – гистон-метилтрансфераза

PCL2 отвечает за связывание с неактивной X-хромосомой

RING1A, RING1B – убиквитин-лигазы

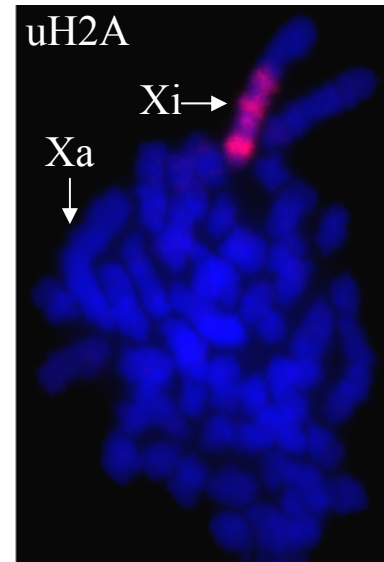
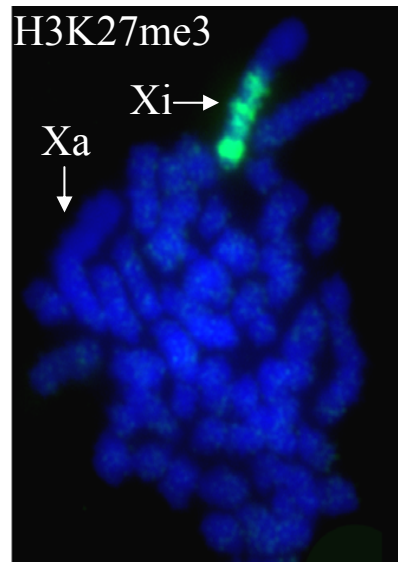
PRC, Polycomb repressive complex

Комплексы, модифицирующие хроматин на неактивной X-хромосоме

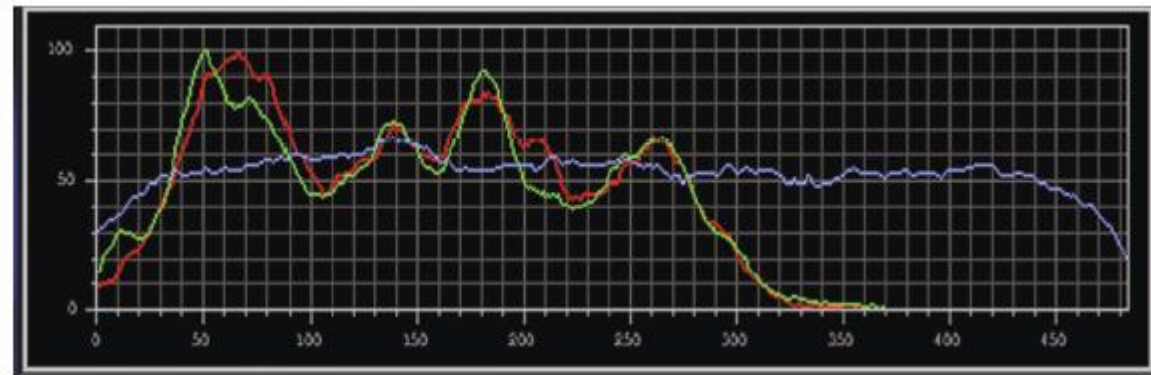


Метилтрансфераза PrSet7
осуществляет
мометилирование H4K20?

Два типа факультативного гетерохроматина на неактивной X-хромосоме полевки



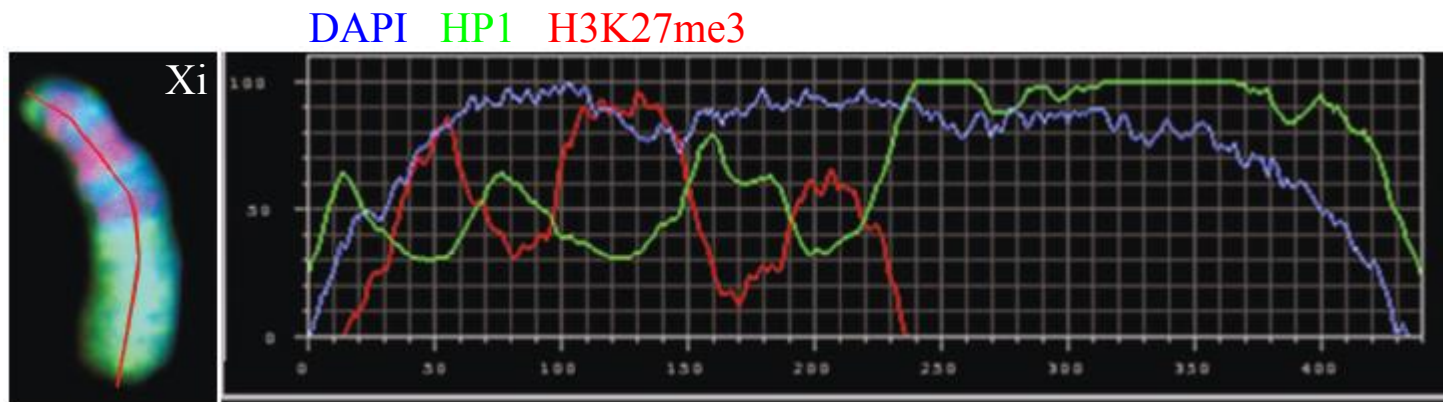
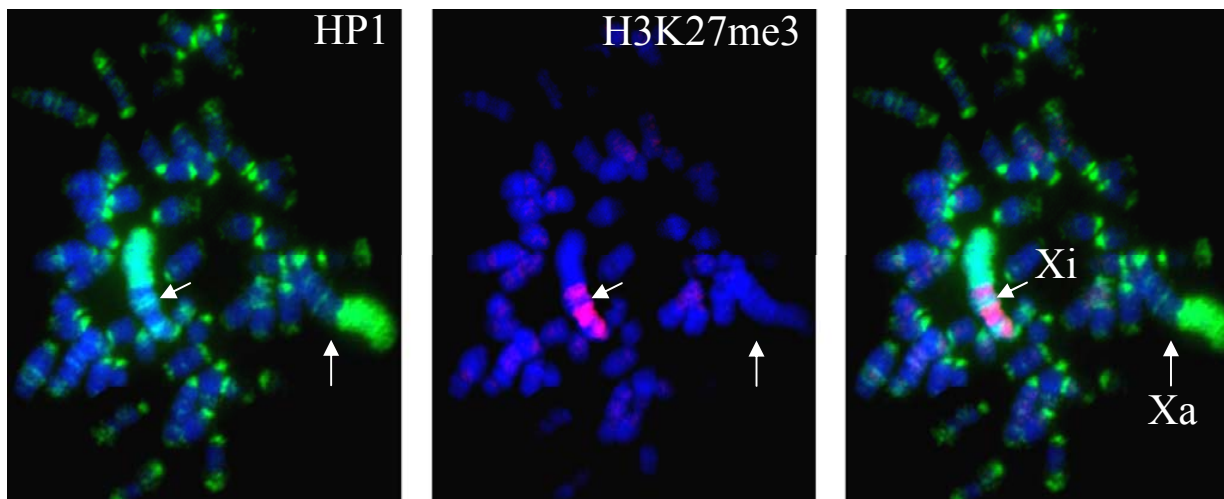
DAPI H3K27me3 uH2A



H3K27me3 – триметилированный H3K27, uH2A – убиквитинированный H2A

Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

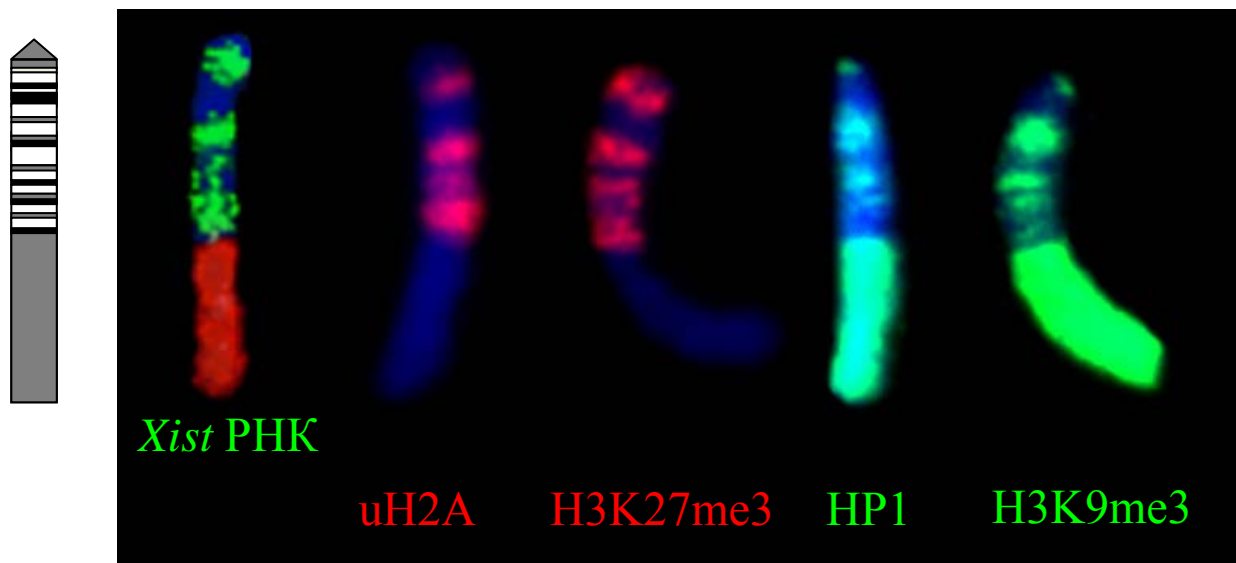
Два типа факультативного гетерохроматина на неактивной X-хромосоме полевки



H3K27me3 – триметилированный H3K27

Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

Два типа факультативного гетерохроматина на неактивной X-хромосоме



Аналогичные типы гетерохроматина были обнаружены на неактивной X-хромосоме человека (Chadwick, Willard, 2004) и коровы (Coppola et al., 2008)

Первый тип гетерохроматина в G-негативных бэндах:

Xist РНК, триметилированный H3K27, убиквитинированный H2A, гистон макроH2A1.2

Второй тип гетерохроматина в G-позитивных бэндах:

HP1, триметилированные H3K9 и H4K20

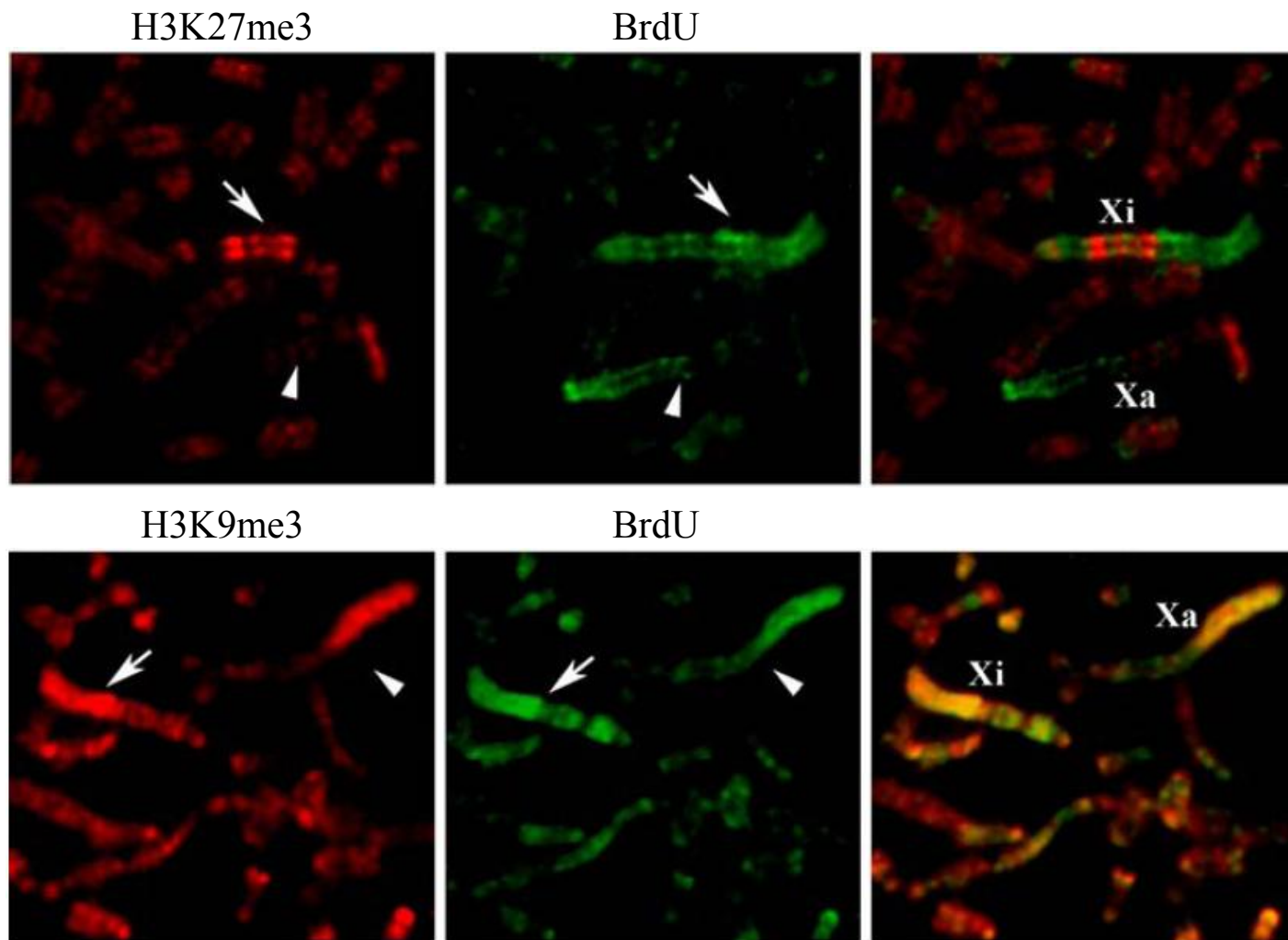
Репликация неактивной X-хромосомы

Неактивная X-хромосома реплицируется в поздней S-фазе, то есть позже, чем активная X-хромосома

Как обеспечивается поздняя репликация неактивной X-хромосомы?

- использование меньшего числа ориджинов по сравнению с активной X-хромосомой
- задержка активации ориджинов на неактивной X-хромосоме (определяется структурой хроматина, вероятно, гипоацетилированием гистонов)

Различное время репликации двух типов факультативного гетерохроматина

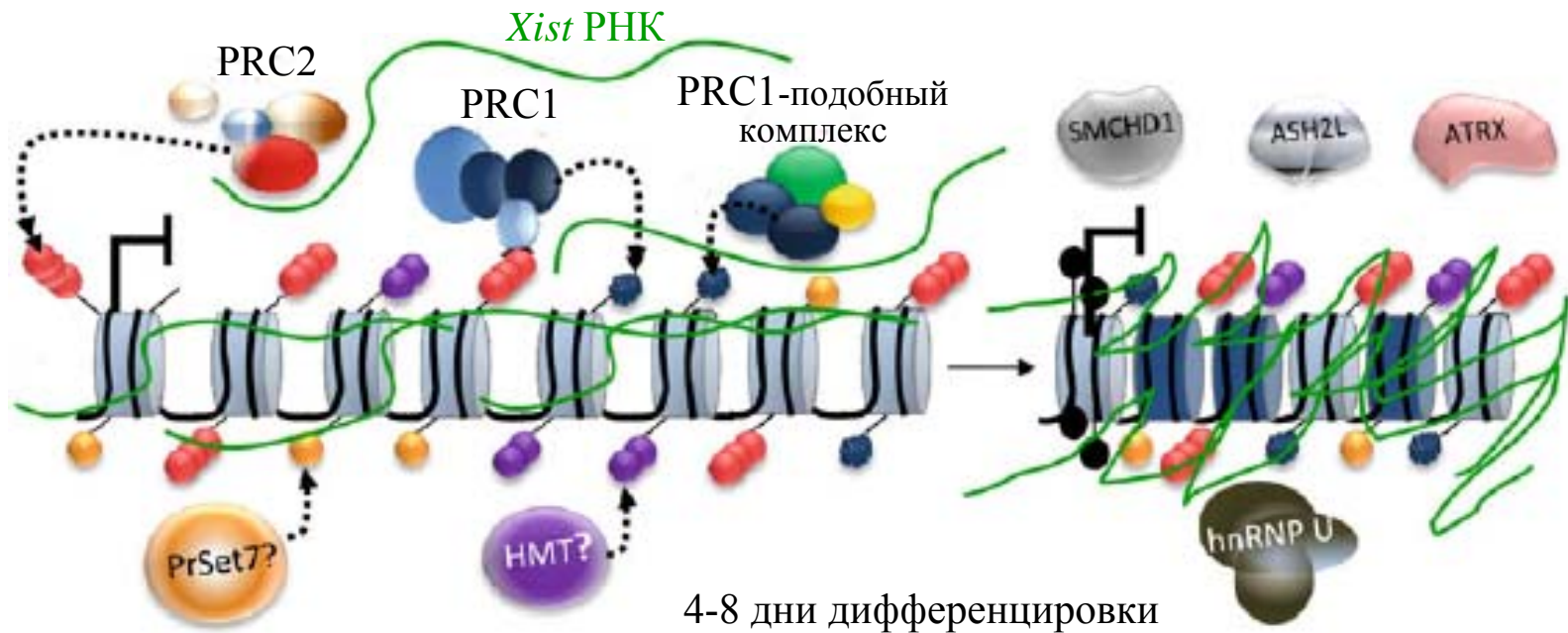


H3K27me3 и H3K9me3 – триметилированные H3K27 и H3K9, BrdU – 5-бром-2-дезоксисуридин

Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

Shevchenko et al., 2009

Поздние эпигенетические события при инактивации X-хромосомы



Escamilla-Del-Arenal et al., 2011

6. Обогащение гистоном макроH2A1.2
7. Метилирование ДНК промоторных районов генов
8. Связывание с белками SMCHD1, ASH2L, ATRX и hnRNP U

Метилирование ДНК в процессе инактивации X-хромосомы

Уровень метилирования ДНК на активной X-хромосомы более чем в два раза превышает уровень метилирования на неактивной X-хромосоме



гипометилирование в промоторной области

гиперметилирование в структурной части

○ неметилированный CpG

● метилированный CpG

Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

Изменение характера метилирования при инактивации:

гиперметилирование в промоторной области

гипометилирование в структурной части

DNMT3B – основная метилтрансфераза в процессе инактивации

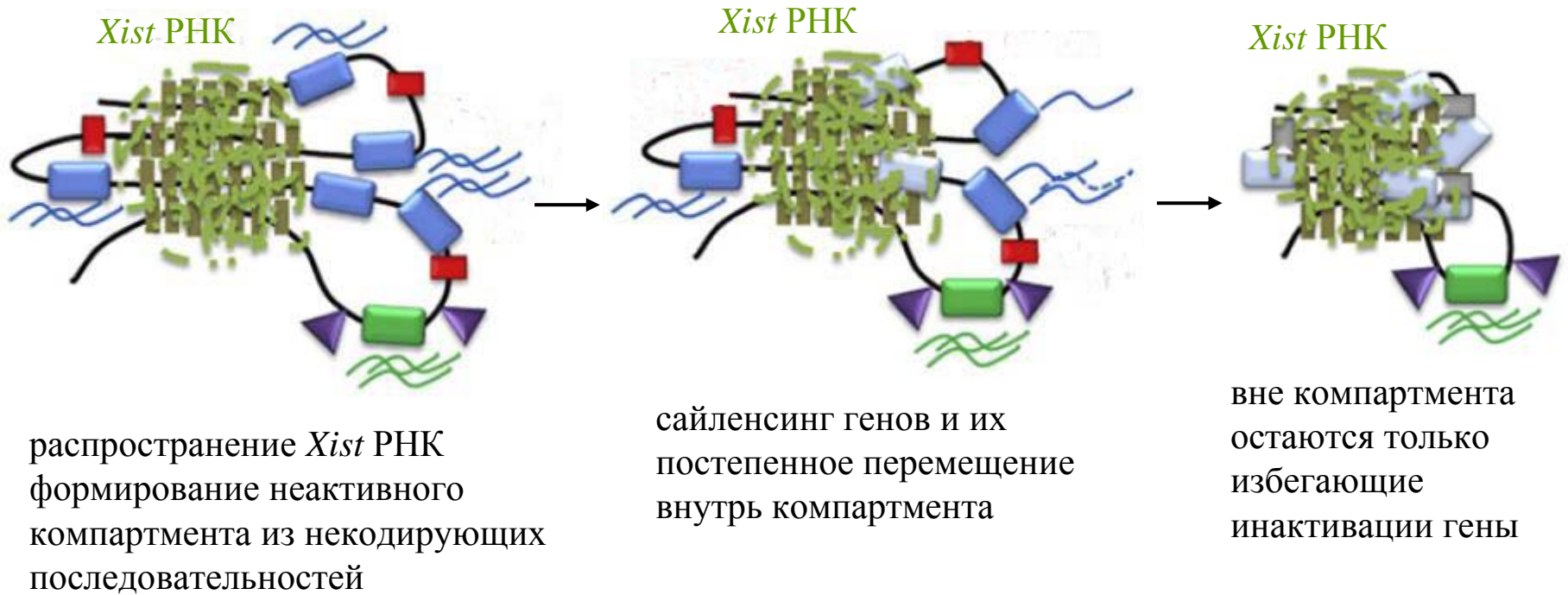
SMCHD1, structural maintenance of chromosomes hinge domain containing 1
опосредованно задействован в метилировании ДНК

ATRX, SWI/SNF2 АТФ-зависимая геликаза
играет роль в метилировании ДНК повторов и формировании гетерохроматина

ASH2L, Trithorax protein
роль в процессе инактивации?

hnRNP U обеспечивает связывание *Xist* РНК с хроматином неактивной X-хромосомы и участвует в организации ее хромосомной территории

Пространственная организация неактивной X-хромосомы в ядре

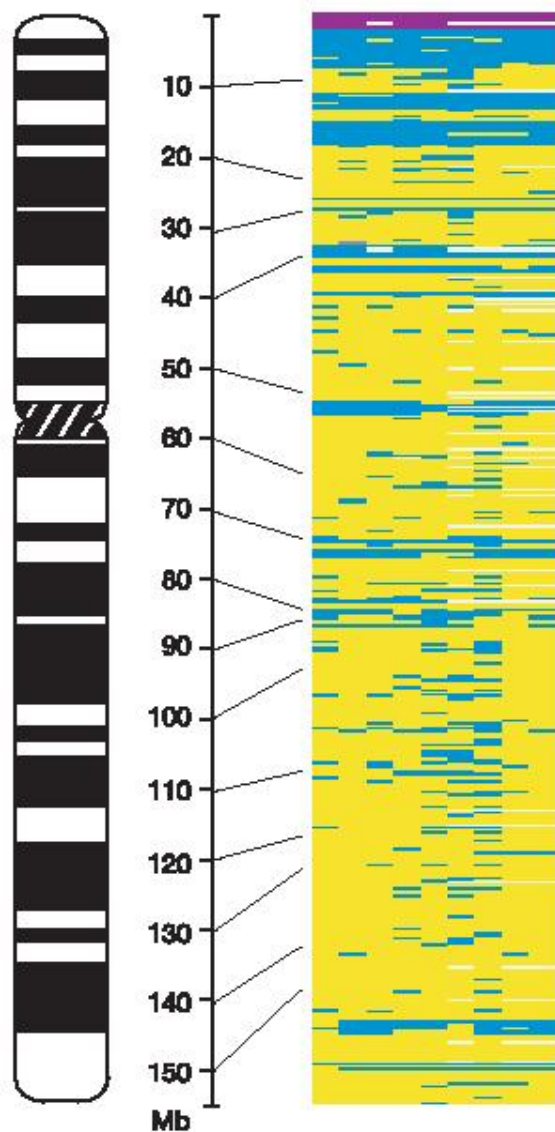


распространение *Xist* РНК
формирование неактивного
компартмента из некодирующих
последовательностей

сайленсинг генов и их
постепенное перемещение
внутри компартмента

вне компартмента
остаются только
избегающие
инактивации гены

Статус экспрессии генов X-хромосомы человека



Статус	Количество генов	Доля
подвергается инактивации	468	75%
избегает инактивации	94	15%
гетерогенная экспрессия	62	10%
Всего	624	100%

■ экспрессия гена на неактивной X-хромосоме
■ инактивация гена

Сравнение статуса экспрессии генов X-хромосомы у человека и мыши

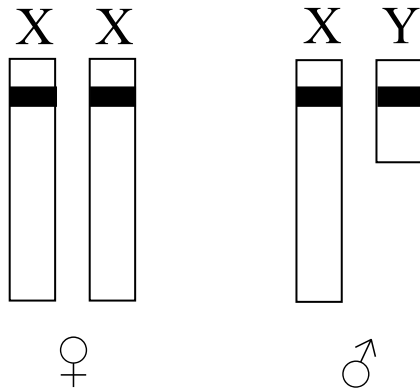
	МЫШЬ		ЧЕЛОВЕК	
подвергается инактивации	380	96,7%	468	75%
избегает инактивации	13	3,3%	94	15%
гетерогенная экспрессия	-	-	62	10%
Всего	393	100%	624	100%

Carrel, Willard, 2005; Yang et al., 2010

На X-хромосоме мыши гораздо меньше генов, избегающих инактивации

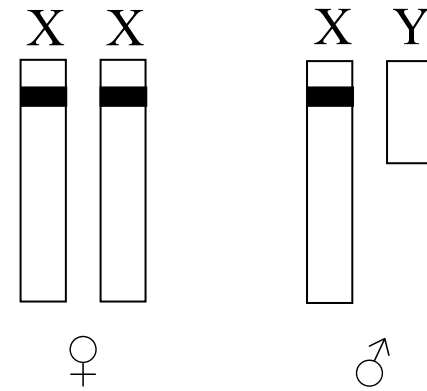
Виды избегающих инактивации генов

наличие функционального
Y-гомолога



обеспечение равного уровня
экспрессии генов X-хромосомы
между полами

отсутствие Y-гомолога или
специализированный Y-
гомолог



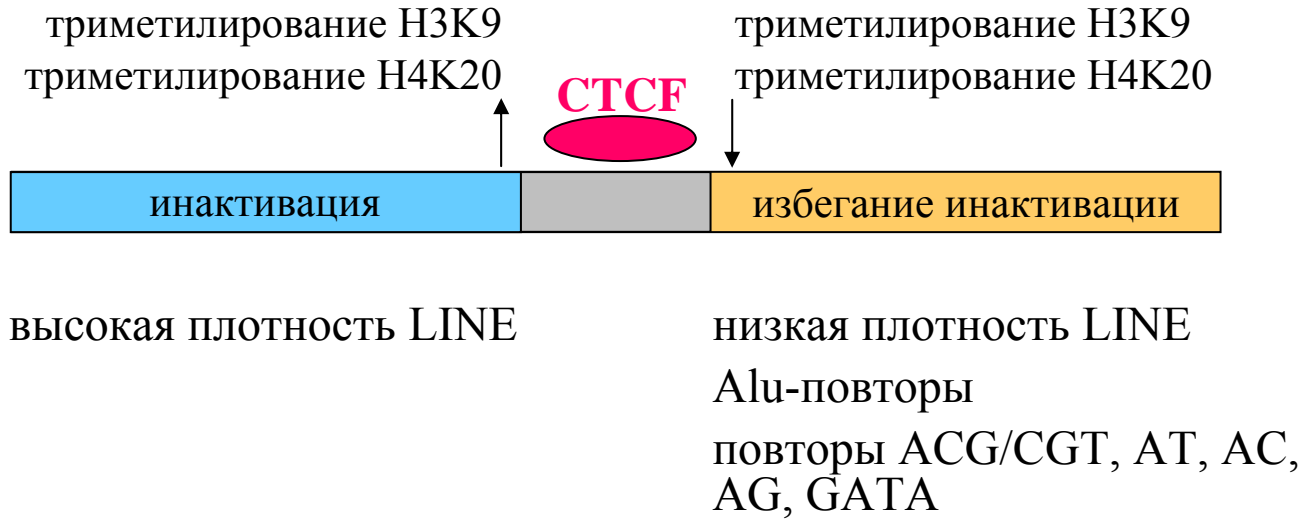
- формирование специфичных для женского пола признаков
- компенсация после транскрипции
- более высокий уровень экспрессии у самок не играет роли

Свойства хроматина избегающих инактивации генов

инактивация	избегание инактивации
триметилирование H3K27 метилирование H3K9 метилирование ДНК в промоторной области поздняя репликация	ацетилирование H3 и H4 триметилирование H3K4 метилирование ДНК в структурной части гена ранняя репликация

Избегающие инактивации гены сохраняют модификации, свойственные транскрипционно активному хроматину

Механизмы избегания инактивации

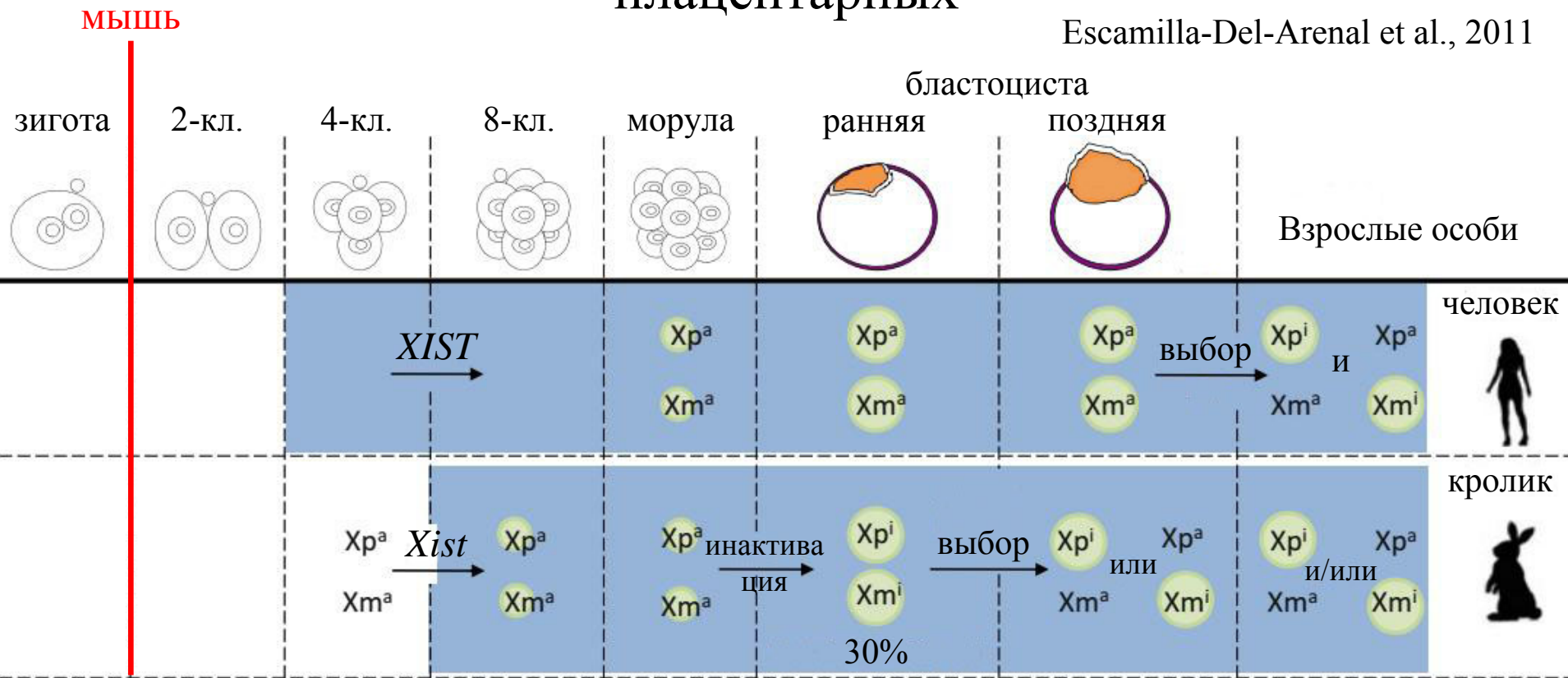


Роль CTCF-фактора в избегании инактивации:

- препятствует распространению модификаций неактивного хроматина в избегающие инактивации домены
- участвует в формировании петель хроматина, содержащих избегающие инактивации домены

Инактивация X-хромосомы в раннем развитии плацентарных

Escamilla-Del-Arenal et al., 2011

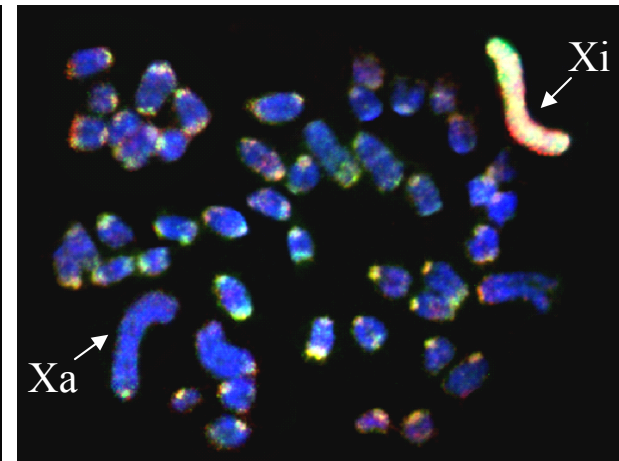
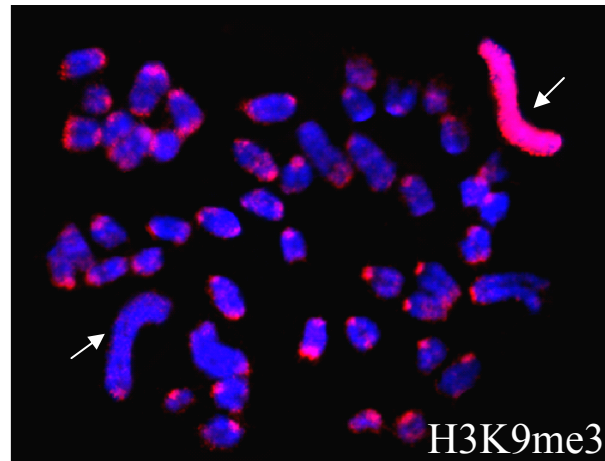
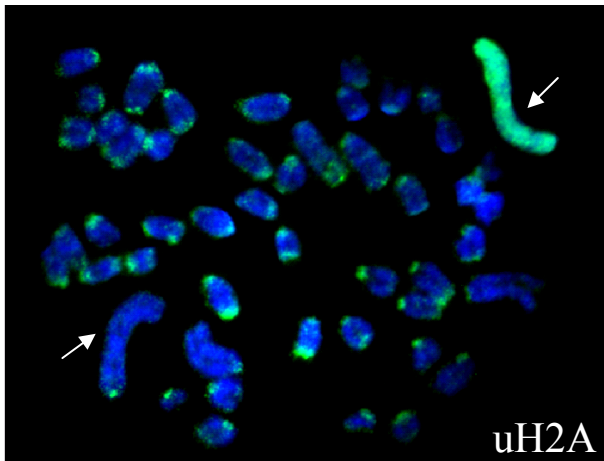
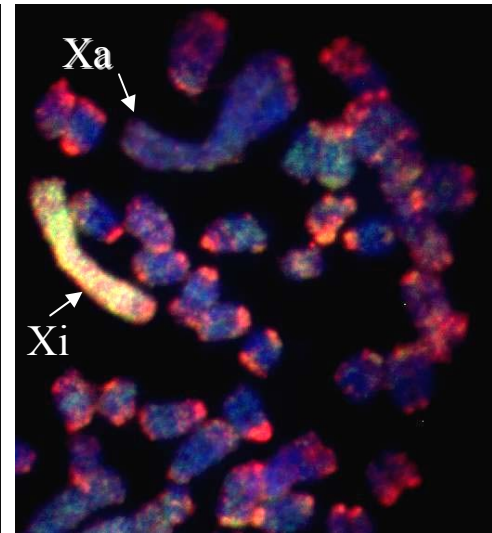
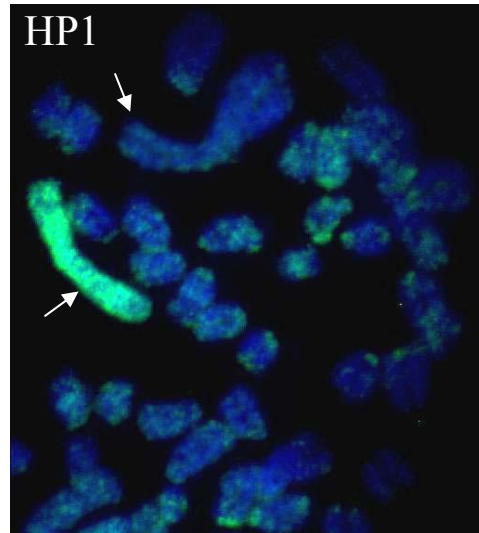
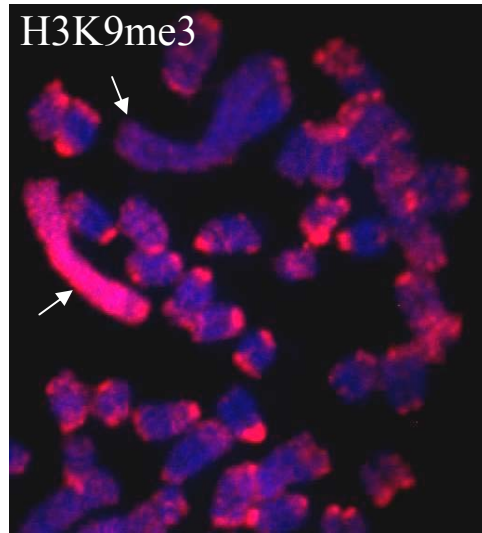


Xm^a – активная материнская X-хромосома; Xm^i – неактивная материнская X-хромосома;
 Xp^a – активная отцовская X-хромосома; Xp^i – неактивная отцовская X-хромосома.

Инактивация X-хромосомы по-разному инициируется в раннем развитии различных таксонов плацентарных млекопитающих

Что определяет предрасположенность отцовской X-хромосомы к инактивации в раннем развитии мыши?

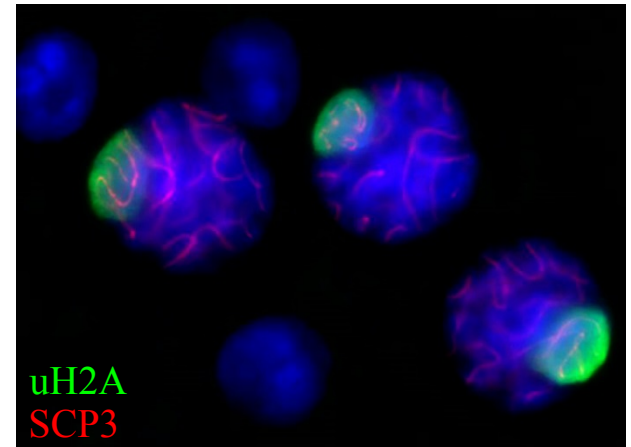
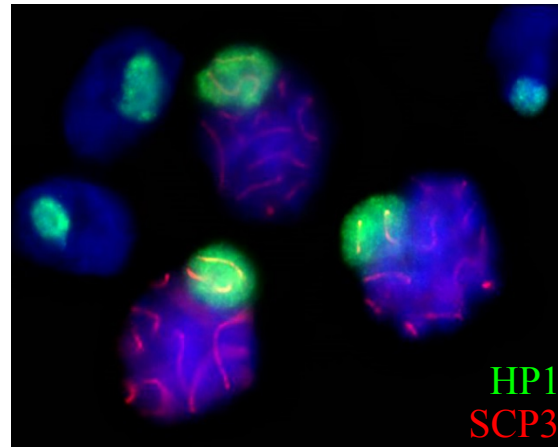
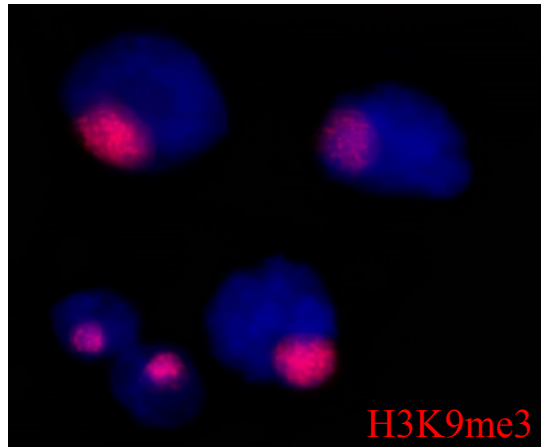
Модификации в трофобластных стволовых клетках самок полевок



Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

Vaskova et al.

Модификации хроматина в сперматогенезе обыкновенных полевок



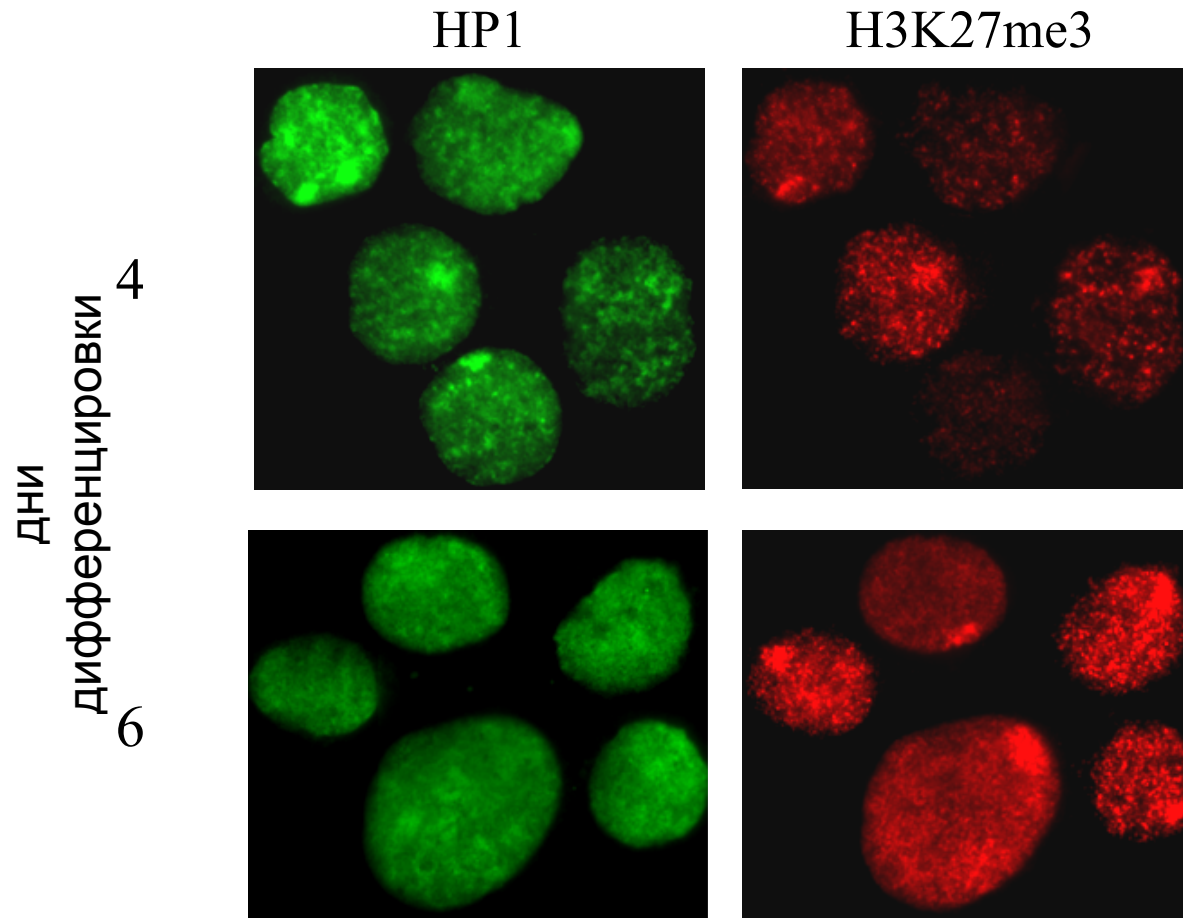
H3K9me3 – триметилированный H3K9; uH2A – убиквитинированный H2A;
SCP3 – белок синамтонемного комплекса

Vaskova et al.

Для хроматина X-хромосомы в сперматогенезе характерно обогащение триметилированным H3K9, HP1 и убиквитинированным H2A

Сходство набора модификаций хроматина на неактивной X-хромосоме в сперматогенезе и на ранних стадиях импринтированной инактивации

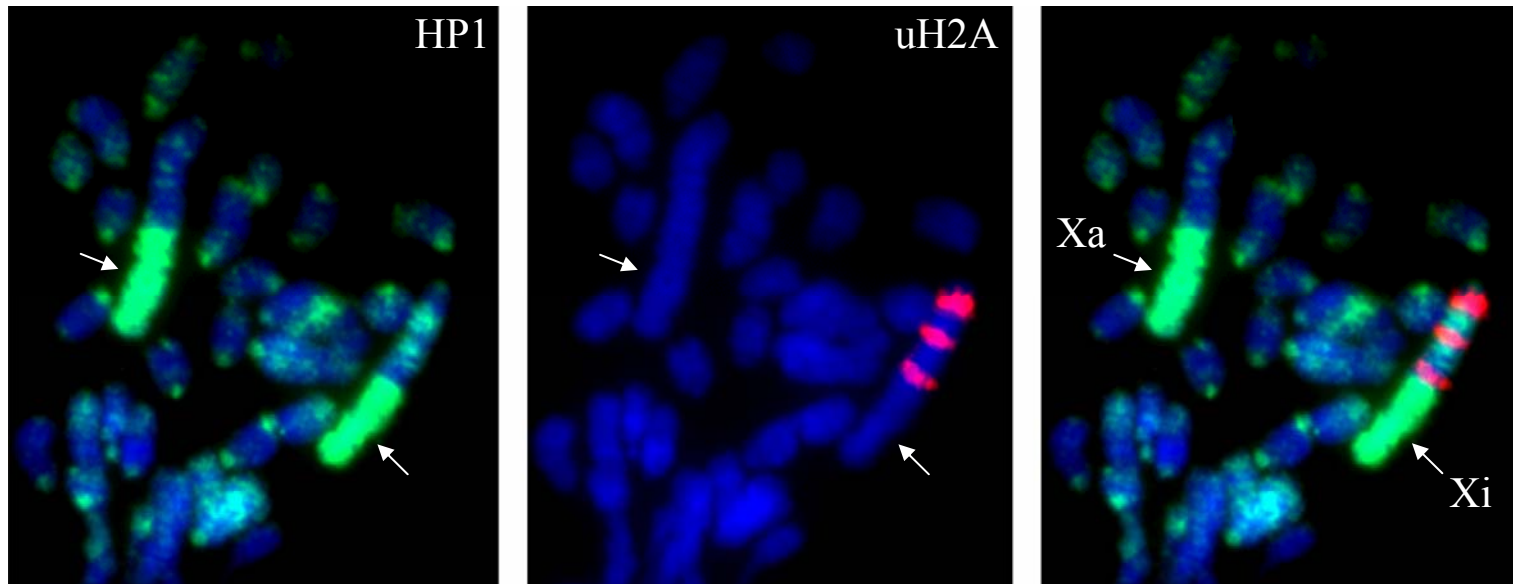
Модификации хроматина при дифференцировке трофобластных стволовых клеток самок полевок



Vaskova et al.

При дифференцировке трофобластных стволовых клеток на неактивной X-хромосоме происходит триметилирование H3K27 и снижается уровень триметилированного H3K9 и гетерохроматинового белка HP1

Модификации хроматина в клетках экстраэмбриональной энтодермы самок полевок



Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

Shevchenko et al., 2009

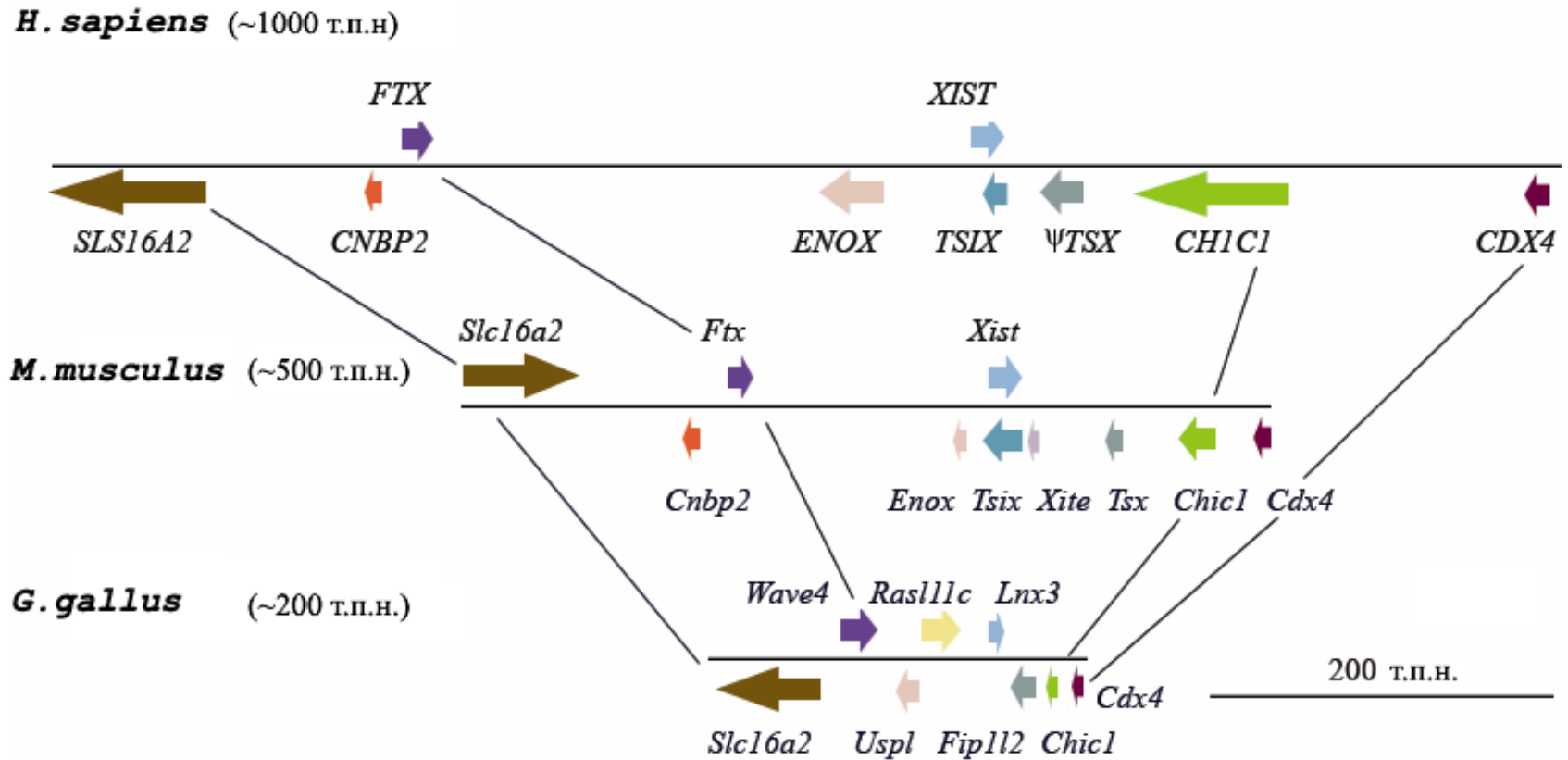
При импринтированной инактивации X-хромосомы действуют две системы сайленсинга:

- триметилированный H3K9 и HP1
- триметилированный H3K27 и убиквитинированный H2A

Инактивация X-хромосомы у сумчатых

- импринтированная
- неполная
- нестабильная
- тканеспецифичная
- нет гена *Xist*

Происхождение генов центра инактивации X-хромосомы у плацентарных



Ген *Xist* возник из последовательностей белок-кодирующего гена *LnX3* и мобильных элементов разных классов

Гены *Tsx*, *Enox(Jpx)* и *Ftx* произошли из генов *Fip112*, *Uspl* и *Wave4* соответственно

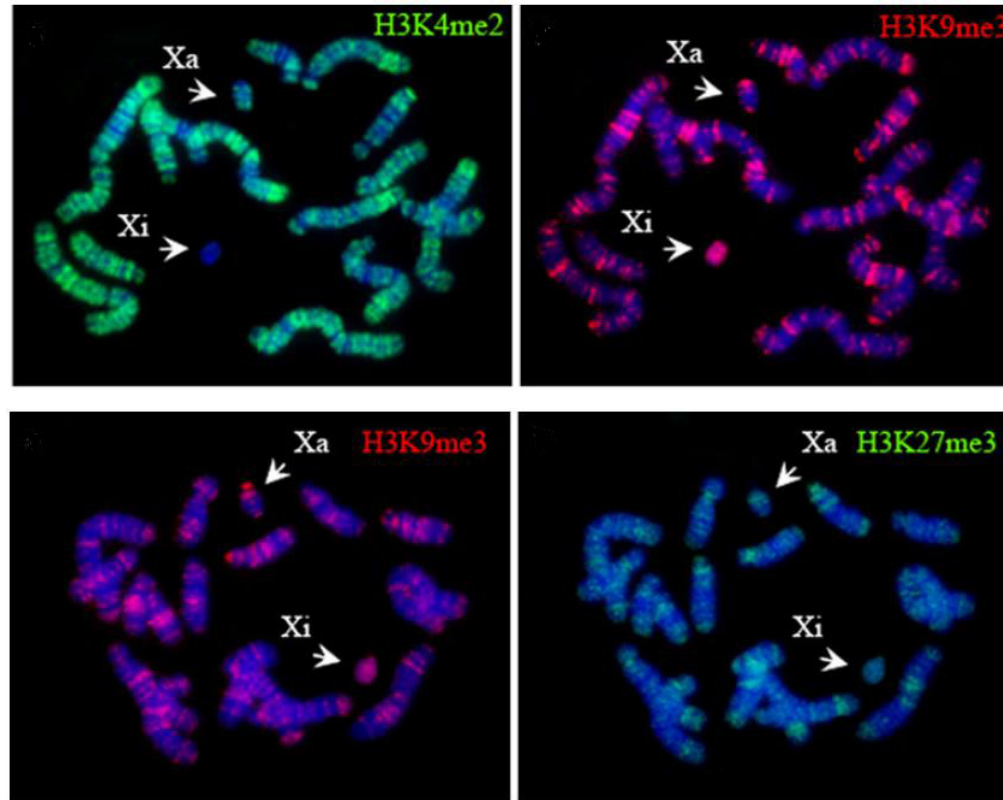
Инактивация X-хромосомы у сумчатых

За процесс инактивации у сумчатых, вероятно, отвечает нетранслируемая ядерная РНК *Rsx* (RNA-on-the-silent X)

Свойства *Rsx* РНК:

- длинная обогащенная микросателлитными повторами некодирующая РНК
- экспрессируется только у самок с неактивной X-хромосомы
- распространяется вдоль неактивной X-хромосомы
- вызывает сайленсинг генов

Модификации хроматина на неактивной X-хромосоме сумчатых



Неактивная X-хромосома сумчатых обогащена HP1, триметилированными H3K9 и H4K20. Выявляется временная ассоциация с триметилированным H3K27

Xa и Xi – активная и неактивная X-хромосомы

Zakharova et al., 2011

Эволюция эпигенетических механизмов процесса инактивации X-хромосомы

