

Механизмы эпигенетического наследования

В многоклеточном организме присутствуют различные типы клеток, обладающие одинаковой последовательностью ДНК. Следовательно, характеристики, отличающие клетки одну от другой, могут быть записаны «над» последовательностью ДНК. Некоторые из них обладают способностью стабильно наследоваться в клеточных поколениях. Именно такие характеристики мы относим к эпигенетическим. Это в первую очередь паттерн экспрессии генов. Но сюда же можно отнести и пространственно-временную организацию репликации ДНК, становление и поддержание пространственной архитектуры ядра и таких специфических хроматиновых доменов как центромеры и теломеры, а также поддержание доменной организации хроматина в целом. В настоящей главе мы обсудим именно механизмы стабильного поддержания эпигенетических характеристик в клеточных поколениях.

В самом простом случае для наследования активного или, наоборот, неактивного состояния гена достаточно механизма положительной обратной связи. Предположим, что ген А должен постоянно экспрессироваться в клеточных поколениях после разового воздействия определенного внешнего сигнала. Для постоянного поддержания гена А во включенном состоянии достаточно, чтобы продукт гена А активировал его экспрессию (Рис. 1). Можно предположить также, что этот продукт будет со временем разрушаться, и в клетке будет определенная равновесная концентрация. Деление клетки должно привести к разбавлению концентрации продукта А в клетке, но оно будет через некоторое время компенсировано синтезом дополнительного продукта. Если продукт гена А будет выступать как репрессор гена В, то постоянное поддержание А будет обеспечивать выключенное состояние гена В.

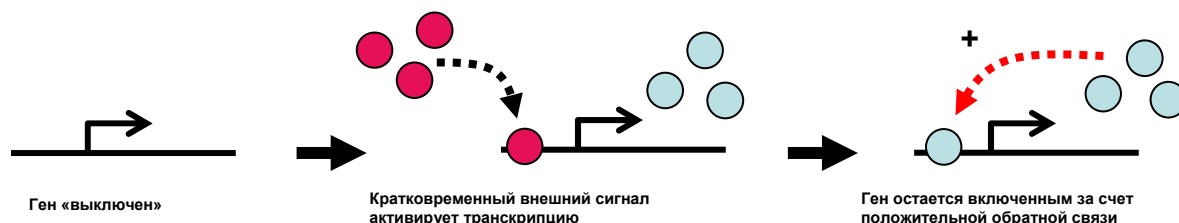


Рис. 1. Петля положительной обратной связи позволяет поддерживать ген в активном состоянии

Еще в 1961 году Ф. Жакоб и Ж. Моно предложили схему наследственной передачи информации об активности генов, основанной на так называемом генетическом триггере. Отрицательные обратные связи между двумя оперонами создают двухоперонный триггер — систему с двумя наследуемыми устойчивыми функциональными состояниями (Рис. 2). Примером реального триггера является система управления репликацией у фага лямбда [Ратнер, 1975; Ratner, Tchuraev, 1978], а наследуемого состояния — лизогения. Выбор режима функционирования (в простейшем случае — есть или нет активность гена) зависит от регуляторных молекул, циркулирующих в клетке.

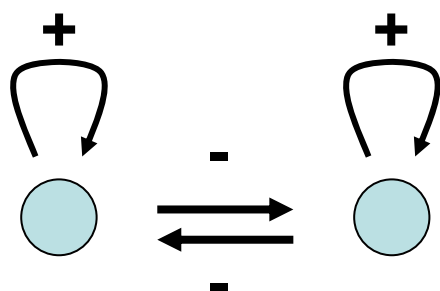


Рис. 2. Двухоперонный триггер – система с двумя устойчивыми функциональными состояниями.

Роль подобных триггеров в развитии и дифференцировке клеток эукариотических организмов можно продемонстрировать на примере логической схемы, связанной с выбором между состоянием плюрипотентности, характерным для стволовых клеток, или же состоянием, связанным с дифференцировкой. В стволовых клетках присутствуют факторы транскрипции, в частности, *Ost4*, которые являются активаторами для целого набора генов, необходимых клетке для поддержания ее в плюрипотентном состоянии. Эти факторы одновременно подавляют экспрессию множества генов, работающих в дифференцированных клетках. В геноме закодированы и факторы транскрипции, оказывающие противоположное действие на тот же набор генов (Рис. 3). В каком состоянии будет находиться система? Вероятно, это зависит от того, действие которого фактора окажется сильнее. Добавим положительную обратную связь самим факторам транскрипции и подавление ими транскрипции друг друга. В такой системе каждое из двух возможных состояний системы становится устойчивым. Тот транскрипционный фактор, который «победил», будет наследовать собственное включенное состояние и постоянно подавлять экспрессию «конкурента». Переключить систему из одного состояния в другое можно при помощи внешнего фактора, который мог бы пересилить действие «победителя» и активировать фактор с противоположной активностью. Тогда экспрессия первого фактора начнет падать и, в конце концов, вся система окажется «перепрограммированной». Именно такой подход применили японские ученые, впервые получившие индуцированные плюрипотентные клетки [Takahashi, Yamanaka, 2006, Wernig et al., 2007].

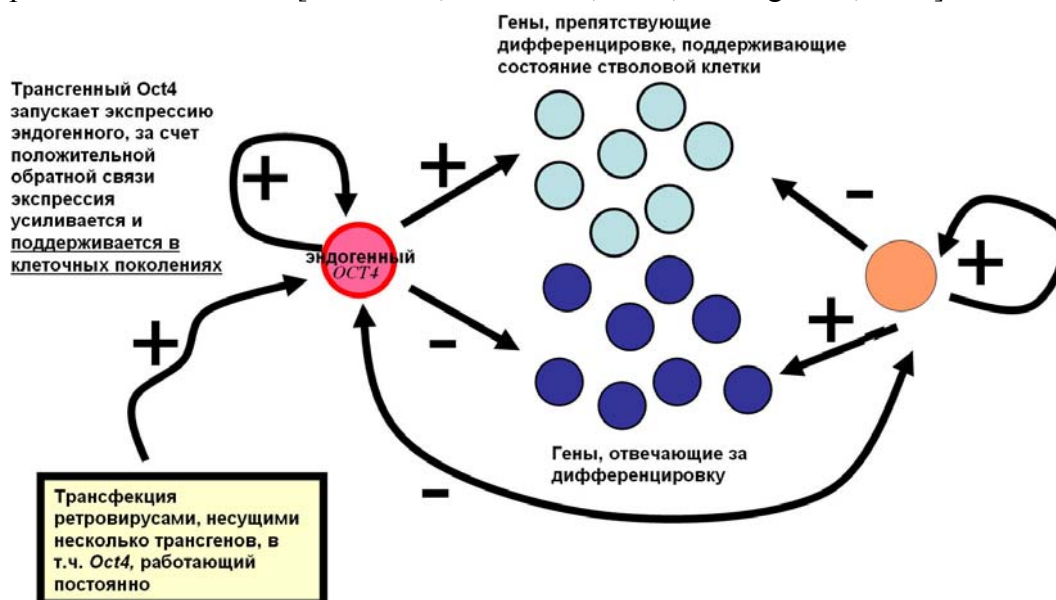


Рис. 3. Логическая схема экспериментального перепрограммирования соматической клетки в стволовую.

Но, вероятно, для стабильного существования многоклеточного организма этого оказалось не достаточно. У высших эукариот важнейшую роль в поддержании и наследовании состояния экспрессии генов берет на себя хроматин. Транскрипционные факторы работают в определенном хроматиновом ландшафте, который не так-то просто «перепрограммировать». Именно поэтому репрограммирование клеток – процесс очень низкоэффективный (около 1% клеток достигают плюрипотентности) и постепенный, требующий множество клеточных поколений и последовательных почти стохастических промежуточных шагов [Hiratani, Gilbert, 2009]. Хроматин выполняет и другие важные функции, в частности, поддержание структурных элементов хромосом - центромер и теломер.

В хроматине можно выделить два типа меток: кратковременные инструкции, которые могут быть быстро изменены в ответ на соответствующие сигналы (например, тепловой шок или повреждения в ДНК) и долговременные инструкции, способные поддерживаться длительное время, уже без участия первоначального индуктора. Как правило, долговременные инструкции,

записанные в хроматине, работают на уровне относительно протяженных доменов. Такие домены характеризуются определенным набором модификаций гистонов, вариантов гистонов, набором негистоновых белков, положением в ядре, временем репликации в S-фазе, плотностью активных генов. Все эти характеристики являются взаимосвязанными, они устанавливаются в данном типе клеток на определенном этапе дифференцировки и могут стабильно поддерживаться. Вопрос о механизмах такого поддержания можно разделить на два:

- Стабильность эпигенетических меток во времени.
- Поддержание эпигенетических меток в ходе последовательных клеточных делений. В частности, способность сохранения или точного воспроизведения эпигенетических меток во время таких серьезных событий как сборка-разборка хроматина при репликации и глобальная реорганизация ядра в митозе.

Стабильность эпигенетических меток во времени

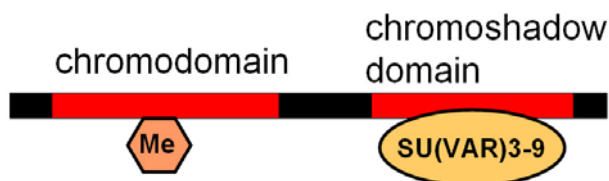
Круговорот гистонов и стабильность эпигенетических меток. Вопрос о стабильности эпигенетических меток в течение длительного времени возникал, в первую очередь, в связи с вопросом о стабильности эпигенетического статуса долгоживущих клеток, например, нейронов. Но он стал еще более актуальным, когда стало выясняться, что многие характеристики хроматина гораздо более динамичны, чем о них думали раньше. Оказалось, например, что в хроматине очень быстро происходит круговорот гистонов (histone turnover). Исследования на культуре клеток дрозофилы показали, что в районах сайтов инициации транскрипции (transcription start site, TSS) активно работающих генов полный обмен нуклеосом происходит очень быстро - всего за один час. Время одного клеточного цикла в этой культуре клеток составляет около 15 часов, и за это время нуклеосомы должны обновиться около 15 раз. Более того, в сайтах посадки таких белков как EZ и PSC – важнейших участников эпигенетического наследования - время обмена гистонов составляло в этих клетках всего полтора часа [Deal et al., 2010].

Интересно, что круговорот димеров H2A-H2B происходит значительно быстрее, чем круговорот H3-H4. Предполагается, что именно поэтому большинство меток, определяющих длительное поддержание эпигенетического состояния, связано именно с модификациями гистона H3 [Kimura, Cook, 2001; Probst et al., 2009]. Кроме того, метилирование гистонов считается более стабильной меткой, чем ацетилирование. Ацетилирование гистонов динамично в клеточном цикле и регулируется равновесием между ацетилтрансферазами и деацетилазами. Так, например, acetyl-H3K9/14 удаляется из хроматина в прометафазе митоза и восстанавливается лишь в телофазе [Kruhlak et al., 2001]. Общий уровень ацетилирования может значительно меняться и в ответ на другие сигналы клеточного цикла, например, во время G2/M-чекпоинта [Bonenfant et al., 2007].

Становится очевидным, что любое длительное поддержание в домене определенных характеристик нуклеосом обеспечивается динамическими процессами.

Механизм положительной обратной связи обеспечивает стабильность гетерохроматиновых доменов. Поскольку все компоненты хроматина связаны с ним динамично, общий механизм сохранения локальных особенностей хроматина – опять-таки механизм положительной обратной связи. Рассмотрим действие этого механизма на примере HP1-зависимого гетерохроматина. HP1-зависимый гетерохроматин присутствует у всех исследованных эукариот за исключением дрожжей *S. cerevisiae*. Как правило, он связан с прицентромерными районами, обогащенными повторенными последовательностями. Его главной характеристикой является ди- и триметилирование гистона H3 по девятому лизину (H3K9Me2, H3K9Me3). Это метилирование осуществляет гистонметилтрансфераза, которая у дрозофилы носит название SU(VAR)3-9 (Suv39h1,2 – у человека, Crl4 – у *S. pombe*).

А Структура белка HP1



Б

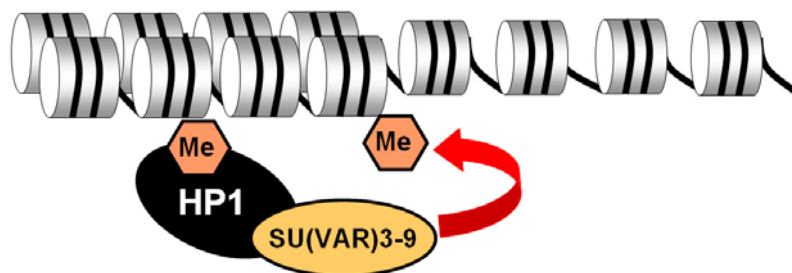


Рис. 4. Структура белка HP1 (А) и механизм поддержания HP1-зависимого хроматина (Б)

Белок HP1 имеет хромодомен (chromodomain), который позволяет ему связываться с метилированными H3K9. Кроме того, в белке HP1 есть так называемый хромотеновый домен (chromoshadow domain), который отвечает за белок-белковые взаимодействия. Этот домен обеспечивает, в частности, взаимодействие молекул HP1 друг с другом и с SU(VAR)3-9. Привлекая в хроматин SU(VAR)3-9, HP1 обеспечивает новое метилирование H3K9 в той же или в соседних нуклеосомах. Новые сайты метилирования будут снова привлекать HP1 и так далее (Рис. 4). Таким образом, формируется петля положительной обратной связи (самоподдерживающаяся петля) [Lachner et al., 2001].

У млекопитающих с HP1 может связываться и ДНК метилаза DNMT1, которая вносит метильную метку в ДНК. С метилированной ДНК, в свою очередь, взаимодействует белок MBR, способный привлекать в хроматин деацетилазу гистонов и гистонметилтрансферазу. Получается, что присутствие в хроматине метилирования ДНК будет способствовать дальнейшему метилированию ДНК, деацетилированию гистонов, метилированию гистонов по H3K9 и привлечению HP1. Все эти модификации будут также поддерживать метилирование ДНК и друг друга. Такой хроматин может стабильно сохранять свой характерный набор модификаций длительное время, несмотря на динамическую природу связывания отдельных его компонентов – гистонов и негистоновых белков.

Так ли стабильные эпигенетические метки? Динамическое равновесие между различными компонентами хроматина во времени и в пространстве ядра позволяет стабильно поддерживать определенный статус экспрессии генов, но оставляет возможность на определенных этапах жизненного цикла изменить ситуацию. При определенных условиях можно сдвинуть равновесие, обеспечить доступ к хроматину новым регуляторным белкам и перепрограммировать хроматиновый домен, переведя его в новое состояние динамического равновесия.

Интересно отметить, что для полного сохранения хроматиновым доменом своих свойств необходимо, чтобы все соответствующие структурные белки и ферментативные активности присутствовали в ядре. Оказалось, что многие компоненты хроматина экспрессируются не постоянно, но лишь на определенных стадиях клеточного цикла. Складывается впечатление, что можно говорить о значительной динамике свойств хроматиновых доменов в целом в ходе клеточного цикла [Bonenfant et al., 2007, Scharf et al., 2009].

Поддержание эпигенетических меток во время репликации ДНК

В ходе репликации происходит точное воспроизведение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. А что происходит во время репликации с эпигенетическими маркерами? Оказывается, в репликационной вилке идут процессы, обеспечивающие точное воспроизведение паттерна многих хроматиновых меток. Это касается метилирования ДНК, некоторых модификаций гистонов и некоторых структурных белков хроматина. Мы говорим, только некоторых? Да, именно так. Некоторые компоненты хроматина во время репликации снижают концентрацию или вовсе покидают хроматин, и для их полного восстановления требуется время, иногда, большая часть клеточного цикла.

Ниже мы обсудим несколько взаимосвязанных механизмов, работающих в репликационной вилке и необходимых для эпигенетического наследования.

Наследование паттерна метилирования ДНК. Среди всех механизмов наследования эпигенетических меток через репликационную вилку первым был открыт механизм наследования метилирования ДНК у млекопитающих. Здесь клетки используют полуконсервативность репликации. Во вновь синтезированной ДНК одна из цепей сохраняет все метильные метки. Сразу после синтеза ДНК с метильными группами в полуметилированных дочерних цепях, связывается белок NP95. С ним связывается поддерживающая ДНК-метилтрансфераза DNMT1 и обеспечивает точное воспроизведение паттерна метилирования ДНК.

Казалось бы, эффективность такого наследования может быть абсолютной. На самом деле, ситуация немного сложнее. Оказалось, что поддерживающие метилазы обеспечивают не полное воспроизведение паттерна. Пропущенные метки затем восстанавливаются учреждающими ДНК метилазами. Таким образом, для поддержания метилирования ДНК также необходимо взаимодействие с другими компонентами хроматина и принцип положительной обратной связи [обзор Blomen, Boonstra, 2011].

Сборка-разборка нуклеосом в репликационной вилке. Во время репликации молекула ДНК, находящаяся в репликационной вилке, в какой-то момент должна быть полностью освобожденной от нуклеосом. Но если нуклеосомы уходят, каким образом можно сохранить модификации гистонов и связанные с ними свойства хроматина?

Чтобы разобраться в этом вопросе, необходимо остановиться на механизмах сборки и разборки хроматина.

Нуклеосома является стабильной структурой только тогда, когда на нее намотана молекула ДНК. В растворе гистоны могут присутствовать в виде димеров H3-H4, H2A-H2B. H3-H4 формирует стабильный в отсутствие ДНК тетрамер. При сборке нуклеосомы с ДНК в первую очередь связываются димеры H3-H4, формируя тетрамер, затем присоединяются димеры H2A и H2B. Разборка происходит в обратном порядке [Henikoff, 2008].

Для правильной сборки хроматина в нуклеосомы необходимо как минимум два класса белков-помощников: это так называемые гистоновые шапероны и белки АТФ-зависимого ремоделинга хроматина. Поскольку гистоны имеют значительный положительный заряд, простое добавление гистонов к молекуле ДНК в растворе приводит к образованию нерастворимого комплекса. Гистоновые шапероны всегда сопровождают гистоны на пути в ядро и управляют сборкой нуклеосом. Эти белки, в частности, временно экранируют заряд гистонов. Белки ремоделинга хроматина обеспечивают упорядоченное распределение нуклеосом по ДНК [Haushalter, Kadonaga, 2003].

Во время репликации гистоновые шапероны локализуются непосредственно в репликационной вилке. В частности, CAF1 связан с PCNA, ASF1 – с MCM. Эти белки участвуют как в разборке, так и в сборке хроматина. По-видимому, при сборке хроматина нуклеосома разбирается на димеры (только димеры создают устойчивый комплекс с шаперонами CAF1 и ASF1 *in vitro*), и эти димеры не «уплывают» из репликационной вилки, но встраиваются тут же, во вновь синтезированной молекуле ДНК. Таким образом, гистоны,

несущие определенные метки, встраиваются в хроматин в непосредственной близости от того места, где они были до прихода репликационной вилки.

В литературе активно обсуждался вопрос, происходит ли сборка нуклеосом по полуконсервативному принципу (то есть, каждая нуклеосома должна включать ровно половину старых гистонов и половину новых), или же происходит «случайно», то есть, новая нуклеосома может состоять как из комбинации старых и новых гистоновых димеров, так и только старых или только вновь синтезированных гистонов. Большинство фактов говорит в пользу второго варианта. Например, известно, что вариант гистона H3 - H3.3 не синтезируются во время S-фазы и встраивается в хроматин на других этапах клеточного цикла. В случае полуконсервативного механизма во время S-фазы должны возникать «смешанные» нуклеосомы H3/H3.3, однако экспериментально обнаружить такие нуклеосомы не удалось [Loyola et al., 2006]. Нередко встречается точка зрения, что старые H3-H4 переносятся из старого хроматина в новый в виде тетрамера. В подтверждение, недавно было обнаружено, что, гистоновые шапероны из класса Nap-белков (Nucleosome assembly proteins, в частности, Nap1 и Vps75 дрожжей *S. cerevisiae*) связываются с гистонами H3 и H4 именно в форме тетрамера [Bowman et al., 2011]. Однако, даже если «истинно полуконсервативный» принцип при сборке нуклеосом не работает, мы знаем, что хроматиновые метки, связанные с эпигенетической регуляцией, как правило организованы в протяженные домены. Для воспроизведения хроматиновых меток на уровне однородного протяженного домена точного полуконсервативного принципа и не требуется - ферменты, вносящие метки в хроматин, будучи связанными с одной нуклеосомой, могут вносить метки в соседние нуклеосомы.

Механизм прямого переноса белков из старого хроматина в новый работает не только для гистонов. Так, например, шаперон CAF1 обладает функцией связываться с молекулой HP1 перед репликационной вилкой и переносить его во вновь собирающийся за вилкой хроматин [Loyola et al., 2009].

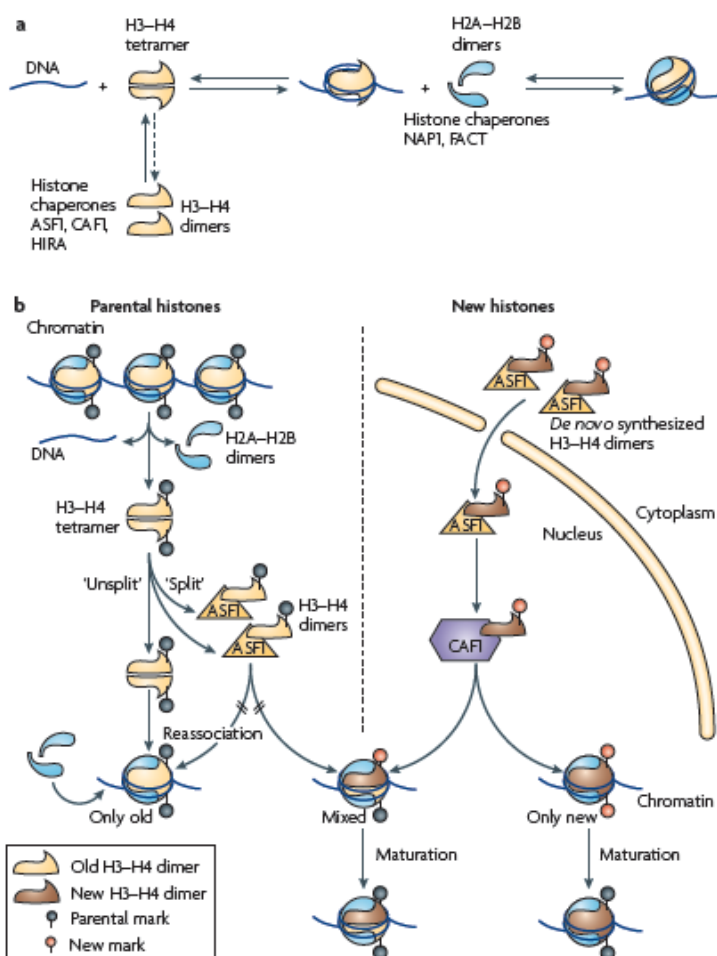


Рис. 5. Сборка-разборка нуклеосом

А. При сборке нуклеосомы сначала на ДНК собирается тетрамер (H3-H4)₂, затем присоединяются димеры H2A и H2B. Димеры H3-H4 поставляются гистоновыми шаперонами CAF1 и ASF1, HIRA участвует в транспортировке димеров, содержащих вариант H3.3. Димеры H2A-H2B связаны с шаперонами NAP1 и FACT.

Разборка нуклеосом происходит в обратном порядке.

Б. Во время репликации нуклеосомы снимаются с ДНК, при этом они распадаются на родительский тетрамер H3-H4, который затем может быть разобран на димеры гистоновыми шаперонами и димеры H2A-H2B. Родительские гистоны сохраняют все модификации гистонов неизменными. При сборке новых нуклеосом возможны различные комбинации старых и новых гистонов. Новые гистоны несут специфические для них модификации, которые будут заменены во время или после встраивания гистона в хроматин. [По: Probst et al., 2009].

Проблема снижения концентрации эпигенетических маркеров в хроматине после репликации. Описанный выше механизм приводит к тому, что все гистоны, вместе со своими модификациями, будут сохранять свое положение в пределах хроматиновых доменов после прохождения репликационной вилки. В то же время, после репликации ДНК становится в два раза больше, и для упаковки всей этой ДНК требуется в два раза больше гистонов.

Синтез гистонов в клетке приурочен к S-фазе клеточного цикла. Вновь синтезированные гистоны получают в цитоплазме специфический набор модификаций, которые будут «переписаны» во время встраивания этих гистонов в хроматин или во время созревания хроматина после репликации.

Важно отметить, что во время S-фазы в клетке синтезируются только основные варианты гистонов. Такие специфические варианты как H3.3 или центромерный вариант H3 синтезируются на других этапах клеточного цикла.

Таким образом, гистоны, которые были в хроматине до репликации и несли эпигенетические метки, будут «разбавлены» вновь синтезированными гистонами, таких меток не имеющими.

Однако, если в хроматине сохраняется хотя бы половина модификаций, то, как мы уже упоминали, остальные могут быть восстановлены по механизму обратной связи, в частности, за счет взаимодействия между модификациями. Такое восстановление действительно происходит. При этом некоторые модификации восстанавливаются очень быстро, непосредственно в репликационной вилке. Другие же могут вноситься позднее, во время пострепликационного «дозревания» хроматина, или даже гораздо более поздних этапах клеточного цикла, например, в метафазе или G1.

Восстановление хроматиновых меток непосредственно в репликационной вилке. Множество ферментов-модификаторов хроматина сидят непосредственно в репликационной вилке. Главной посадочной площадкой для них служит PCNA. Этот гомотример, с одной стороны, стабилизирует взаимодействие ДНК-полимеразы с ДНК, а с другой стороны, взаимодействует с огромным количеством белков, привлекая их к месту синтеза ДНК (Рис. 6) [Moldovan et al., 2007, Probst et al., 2009]. В частности, у млекопитающих непосредственно с PCNA взаимодействуют деацетилазы гистонов и метилтрансферазы, вовлеченные в монометилирование H4K20, ДНК метилтрансфераза DNMT1, а также белки ремоделинга хроматина (Williams syndrome transcription factor (WSTF)–SNF2H). Кроме того, с PCNA в вилке репликации связан гистоновый шаперон CAF1, который участвует не только в сборке – разборке нуклеосом, но тоже является посадочной площадкой для ряда белков. Он может взаимодействовать с метил-СpG-связывающим белком MBD1, H3K9-гистонметилтрансферазой SetDB1 (обеспечивающей монометилирование H3K9) и белком HP1. Предполагается, что именно CAF1 переносит молекулы HP1, из хроматина перед репликационной вилкой, во вновь формирующийся хроматин. При мутации в HP1-связывающем сайте белка CAF1 S фазы доходит до середины и останавливается. [Для обзора см. Probst et al., 2009].

Некоторые модификаторы гистонов привлекаются в репликационную вилку машиной метилирования ДНК, используя ее одновременно в качестве посадочной площадки и в качестве маркера соответствующего типа хроматина. Например, DNMT1 и NP95 привлекают в репликационную вилку деацетилазы гистонов. Кроме того, DNMT1 взаимодействует с гистонметилтрансферазой G9a. NP95 имеет сродство как к полуметилированной ДНК, так и к гистонам, метилированным по H3K9. Следовательно, этот белок может связываться с полуметилированной ДНК, интерпретировать гистоновое окружение и осуществлять петлю обратной связи, обеспечивающую взаимное усиление метилирования ДНК и меток в гистонах.

Не только PCNA, но и некоторые другие белки репликации принимают участие в эпигенетическом наследовании. Например, комплекс MCM2-7 взаимодействует с гистоновым шапероном ASF1, который, также как и CAF1, участвует в координации потока гистонов между родительскими и дочерними цепями ДНК.

Одновременное привлечение всех этих белков в репликационную вилку, вероятно, обеспечивает координацию между всеми метками, вносимыми в ДНК и гистоны. После репликации PCNA, вместе с CAF1, сохраняются на отреплицированной ДНК еще около 20 минут, что позволяет закончить все необходимые модификации хроматина. Кроме того, соседство гистоновых шаперонов и модификаторов хроматина позволяет вносить некоторые модификации в гистоны еще до сборки нуклеосомы. Это относится к ацетилированию [Lande-Diner et al., 2009] и монометилированию H3K9 [Loyola et al., 2006].

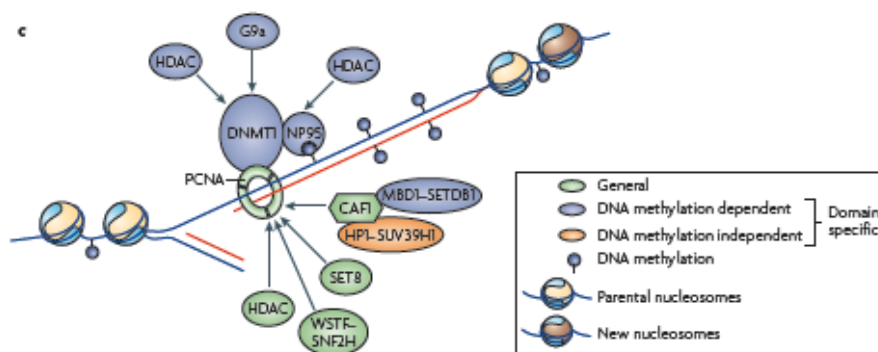


Рис. 6 PCNA является посадочной площадкой для множества белков, обеспечивая координацию между синтезом ДНК и пострепликационной сборкой хроматина

При репликации ДНК в клетках млекопитающих PCNA привлекает в репликационную вилку chromatin assembly factor 1 (CAF1), модификаторы гистонов: деацетилазы гистонов (HDAC) гистонметилтрансферазу SET8, белки ремоделинга хроматина (WSTF-SNF2H). В зависимости от присутствия метилирования ДНК, PCNA вместе с NP95 привлекает ДНК-метилтрансферазу (DNMT1), которая метилирует полуметилированные CpG сайты на дочерних цепях. [По: Probst et al., 2009].

Пострепликационное дозревание хроматина. Несмотря на то, что, казалось бы, в вилке сосредоточены все возможные ферментативные активности, связанные с модификациями гистонов, далеко не все события непосредственно сопровождают репликацию. Исследования модификаций гистонов в клеточном цикле методами масспектрометрии показали, что если ацетилирование и монометилирование происходят достаточно быстро, то ди- и триметилирование происходит медленно и постепенно. Такое постепенное восстановление хроматиновых маркеров после репликации назвали «дозревание хроматина».

В работе, сделанной на клетках HeLa, было показано, что монометилирование происходит во время или сразу после сборки нуклеосом. Вероятно, те гистонметилтрансферазы, которые присутствуют в репликационной вилке, отвечают именно за монометилирование. За этим резким всплеском метилирования следует относительно медленное повышение более высоких уровней метилирования [Scharf et al., 2009]. Это согласуется с более ранними результатами, полученными на дрозофиле, что монометилирование может предшествовать и быть необходимым для дальнейшего метилирования [Schotta et al., 2004].

Последовательное метилирование указывает на дополнительный уровень регуляции перехода между менее и более метилированными формами. Триметилированные формы намного лучше связывают структурные белки, такие как HP1 или Polycomb, которые конденсируют хроматин посредством предотвращения ремоделинга хроматина. Можно спекулировать, что медленное триметилирование предотвращает преждевременную конденсацию хроматина, в результате чего ДНК на время остается более доступной для внешних сигналов. Эта уникальная возможность (window of opportunity) может позволить клеткам изменить профиль экспрессии генов в случае получения соответствующих внешних сигналов [Scharf et al., 2009].

Возможно, в пострепликационном созревании хроматина могут участвовать дополнительные сайт-специфические факторы, например, ДНК-связывающие белки. В результате одни и те же свойства, создаваемые в хроматине во время репликации ДНК, могут затем использоваться по-разному в разных доменах.

Динамика метилирования H3K27 в клеточном цикле. Выше мы обсудили HP1/SU(VAR)3-9/H3K9Me2 хроматин. Еще один важный класс хроматиновых доменов, связанный с репрессией генов, необходимых на разных этапах развития многоклеточных, связан с белками группы Polycomb. Характерной для таких доменов гистоновой модификацией является триметилирование H3K27.

Белки группы Polycomb впервые были открыты у дрозофилы, поэтому при описании мы будем использовать названия белков, принятые для дрозофилы. Эти белки формируют несколько комплексов, наиболее консервативными среди которых являются PRC1 и PRC2 (Polycomb repressive complex 1, 2). Enhancer of zeste (E(Z)) (у млекопитающих EZH2) – субъединица комплекса PRC2. Это гистонметилтрансфераза, метилирующая лизин 27 гистона H3. Эта хроматиновая метка специфически узнается хромодоменом белка Polycomb (PC), входящего в комплекс PRC1. Комплекс PRC1 обладает рядом каталитических активностей, необходимых для репрессии транскрипции и формирует транскрипционно-неактивный хроматин. Комплекс PRC2 тоже может узнавать H3K27Me3.

Поддержание во времени и эпигенетическое наследование хроматина, связанного с Polycomb-сайленсингом, в общих чертах сходно с поддержанием прицентромерного гетерохроматина. В то же время, Polycomb-регуляция значительно более динамична в ходе развития организма и, вероятно, требует более тонкой регуляции.

Долгое время считалось, что, как только в хроматине устанавливается метилирование H3K27me3, оно привлекает комплекс PRC2, что приводит к новому метилированию. В пользу быстрого восстановления статуса метилирования H3K27 во время репликации говорили и данные о том, что PRC2 локализован в репликационной вилке и сокоагулируется с PCNA [Hansen et al., 2008].

Однако, множество фактов указывает на то, что гистонметилтрансферазы, локализованные в репликационной вилке, катализируют только монометилирование. Это относится и к EZH2, которая в целом отвечает за все уровни метилирования [Scharf et al., 2009]. В результате, после репликации происходит заметное снижение уровня H3K27Me3. Кроме того, на клетках HeLa было показано, что количество H3K27Me3 снижается примерно в два раза и во время митоза, после чего в ходе поздней G1 и S фазы происходит восстановление уровня метилирования [Aoto et al., 2008]. На каком же этапе клеточного цикла происходит восстановление триметилирования H3K27?

Совсем недавно в исследованиях на клетках дрозофилы и клетках млекопитающих было показано, что в клеточном цикле на стадии, предшествующей репликации, происходит значительный подъем уровня экспрессии компонентов всех комплексов, участвующих в Polycomb-сайленсинге. Одновременно в хроматине наблюдается значительное повышение общего уровня триметилирования H3K27. Эти события происходят в ранней S-фазе, предшествуя репликации генов – мишеней Polycomb сайленсинга. На стадии поздней S-фазы, когда происходит репликация соответствующих локусов, уровень триметилирования H3K27

снижается [Lanzuolo et al., 2011]. Для сравнения интересно отметить, что уровень H3K9Me2 в ходе всего клеточного цикла претерпевает лишь незначительные колебания [Aoto et al., 2008], что еще раз подчеркивает различия в поведения HP1- и Polycomb-зависимого хроматина в клеточном цикле.

Этот пример показывает, что созревание хроматина может происходить на самых разных этапах клеточного цикла и даже непосредственно перед очередным раундом репликации. Главное, что для поддержания «информации» о состоянии хроматина в ряду клеточных поколений достаточно восстановить некий базовый уровень соответствующих меток хотя бы один раз в клеточном цикле.

Динамика вариантов гистонов в клеточном цикле. В ходе репликации в хроматин встраиваются только основные варианты гистона H3. Другие варианты, такие как H3.3 и CENPA транскрибируются на других этапах клеточного цикла и встраиваются в хроматин независимо от репликации при помощи специальных гистоновых шаперонов.

Вариант H3.3 встраивается в такие участки хроматина, где происходит наиболее быстрый обмен гистонов. Как правило, это транскрипционно активный хроматин. Во время сборки хроматина в репликационной вилке все H3.3 гистоны будут приходить только из родительских нуклеосом, то есть, будет происходить разбавление метки H3.3.

Однако, судя по всему, разбавление H3.3 и его модификаций в два раза в ходе репликации не влияет на транскрипционный статус соответствующего района. Если же ген продолжает активно экспрессироваться, будет происходить быстрая замена H3.1 на H3.3. Модификации гистонов, связанные с унаследованными молекулами H3.3, могут привлекать факторы, которые модифицируют вновь встроенные H3.3, а также создают метки активного хроматина в H3.1. Показано, что, будучи в соседстве с нуклеосомами, несущими H3.3, нуклеосомы с вариантом H3.1 накапливают метки активного хроматина [Loyola et al., 2006].

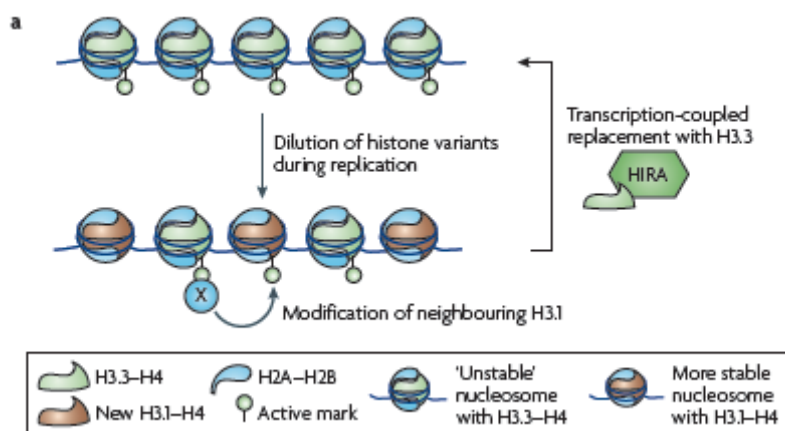


Рис. 7. Динамика хроматина, содержащего гистоновый вариант H3.3, в клеточном цикле.

«Разбавление» во время S-фазы и постепенное восстановление концентрации во время транскрипции. В этом восстановлении участвует гистоновый шаперон HIRA. [По: Probst et al., 2009].

Вариант гистона H3 - CENPA определяет положение центромеры. Связывание CENPA с центромерами является исключительно стабильным, и практически не подвержено динамике в ходе клеточного цикла. Исследования, проведенные на клетках млекопитающих, показали, что включение новых CENPA в центромеры происходит в очень коротком промежутке клеточного цикла – поздней телофазе – ранней G1 [Jansen et al., 2007].

Центромерная ДНК реплицируется в S фазе, при этом родительские CENPA нуклеосомы распределяются между дочерними цепями. Следовательно, после репликации хроматин в центромерах несет только половину соответствующей метки до окончания S фазы, всю последующую фазу G2 и большую часть фазы M. До конца не ясно, в каком виде центромерный хроматин «дожидается»стройки вновь синтезированных центромерных

нуклеосом. Наиболее вероятно, что в ходе репликации центромерный хроматин частично упаковывается в нуклеосомы, несущие H3.1, которые затем будут заменены на другие, содержащие CENPA. Можно предположить, что в хроматине временно будет понижена концентрация нуклеосом.

Однако, есть еще один возможный сценарий. Недавно было показано, что CENPA-содержащие нуклеосомы могут иметь необычную структуру. Так, у *S. cerevisiae*, специализированная нуклеосома, несущая cse4 (дрожжевой вариант центромерного гистона H3), существует в форме, где гистоны H2A и H2B заменены на негистоновый белок suppressor of chromosome missegregation 3 (Scm3) [Mizuguchi et al., 2007]. У *D. melanogaster*, обнаружены «полунуклеосомы» которые состоят из гистонов cenH3 (центромерный вариант H3), H4, H2A и H2B в одном экземпляре [Dalal et al., 2007]. Можно спекулировать, что «необычные» нуклеосомы, содержащие CENPA, соответствуют центромерному хроматину на промежуточном этапе сборки, несущему половину CENPA, до того, как вновь синтезированные молекулы CENPA восстановятся в количестве на более поздних этапах клеточного цикла.

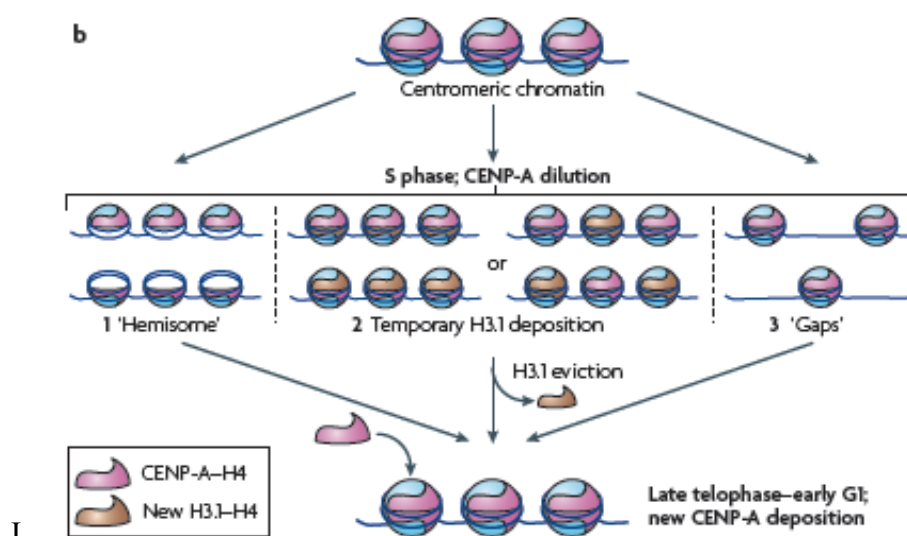


Рис. 8 Три гипотетических модели «поведения» центромерных нуклеосом в клеточном цикле (см. текст). [По: Probst et al., 2009].

Роль времени репликации хроматиновых доменов в эпигенетическом наследовании.

Еще один важный механизм, участвующий в эпигенетическом наследовании различных типов хроматина – пространственно-временная регуляция репликации генома. В целом можно сказать, что активный хроматин реплицируется на ранних этапах S-фазы, в то время как хроматин, соответствующий генам в состоянии сайленсигна, реплицируется в середине S-фазы, и последним реплицируется большая часть конститутивного гетерохроматина.

Само по себе разделение во времени и в пространстве репликации и, соответственно, сборки разных типов хроматина, кажется очень разумным решением, поскольку обеспечивает дополнительную защиту от случайного перераспределения хроматиновых меток. Так, например, очень важно, чтобы центромерный вариант гистона H3 собрался вновь только на центромерной ДНК. Появление этого гистона в других районах хромосомы может привести к возникновению эктопической центромеры. Предполагается, что у всех эукариот центромерный хроматин является независимым репликационным доменом, хотя время репликации центромерной ДНК может значительно отличаться. Так, у дрожжей *Candida albicans*, *S. cerevisiae* и *S. pombe* центромерный хроматин реплицируется в самом начале S-фазы [Kim et al., 2003, Koren et al., 2010]. Для *Candida albicans* показано, что ориджин репликации, связанный с центромерой, является наиболее рано активирующимся ориджином в хромосоме, при этом перенос центромерных детерминант в эктопический сайт также приводит очень ранней репликации [Koren et al., 2010]. У высших эукариот центромерная ДНК может реплицироваться

на самых разных этапах S-фазы, однако всегда асинхронно с соседним прицентромерным гетерохроматином [Weidtkamp-Peters et al., 2006].

Кроме такого пассивного влияния на упаковку хроматина, пространственно-временная организация репликации позволяет обеспечить активный механизм эпигенетического наследования. Оказывается, что набор белков, участвующих в упаковке и модификациях хроматина может значительно отличаться в репликационных вилках, работающих на разных этапах S-фазы.

Пожалуй, наиболее яркой иллюстрацией дифференциальной сборки хроматина на разных этапах S-фазы является ситуация с ацетилированием гистонов [Lande-Diner et al., 2009]. Оказалось, ацетилирование гистонов H3 и H4, сопровождающее сборку хроматина в репликационной вилке, определяется именно временем репликации соответствующего района. Вновь синтезированные димеры H3/H4, прежде чем попасть в нуклеосому, подвергаются следующим модификациям: на этапе ранней S-фазы изначально не ацетилированный гистон H3 активно ацетируется. Для этого с репликационной вилкой связываются ацетилазы гистонов. На этапе поздней S-фазы, наоборот, с репликационной вилкой связаны деацетилазы гистонов, которые деацетилируют гистон H4, который приходит в ядро в преацетилированном состоянии.

Получается, что ДНК, запрограммированная реплицироваться в ходе первой половины S фазы автоматически переупаковывается в ацетилированные коровые гистоны, в то время как районы генома, лежащие в поздно реплицирующихся участках, получают деацетилированные гистоны. Если заставить последовательности ДНК, изначально упакованные в нуклеосомы с деацетилированными гистонами, реплицироваться в ранней S-фазе, происходит «перепакровка» хроматина в ацетилированные гистоны. Наоборот, изменение репликации от ранней к поздней сопровождается упаковкой хроматина в деацетилированные гистоны [Lande-Diner et al., 2009].

Поскольку время репликации ДНК у высших эукариот регулируется на уровне протяженных (около 1 Мб) доменов, получается, что во время репликации геном будет подразделяться на два дискретных типа доменов – гипо или гиперацилированные. Это очень хорошо согласуется с организацией хромосом млекопитающих, где выделяются гиперацилированные рано реплицирующиеся R-диски и гипоацилированные и реплицирующиеся позднее G-диски.

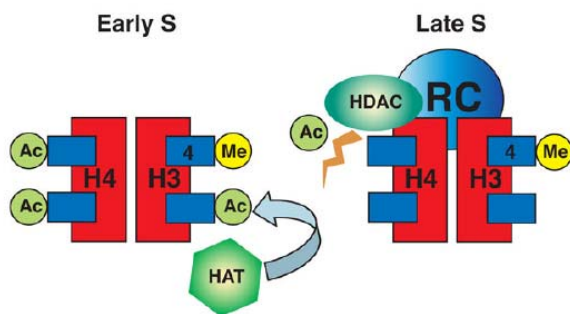


Рис. 9 Бимодальная система ацетилирования димеров H3-H4 в репликационной вилке.

В ранней S-фазе гистон H3 активно ацетируется посредством гистонацетилтрансфераз. Это происходит в репликационной вилке, но еще до формирования нуклеосомы. Гистон H4 приходит в ядро в пре-ацетилированном состоянии. В поздней S-фазе в репликационной вилке гистонацетилтрансферазы отсутствуют, зато присутствуют деацетилазы, которые активно удаляют ацетильные метки с гистона H4 [По: Lande-Diner et al., 2009].

Метилирование H3K4 осуществляется как в ранней, так и в поздней S-фазе.

ДНК- и H3K9-метилтрансферазы обнаруживаются в вилках репликации на стадии поздней S-фазы, что обеспечивает упаковку всех поздно реплицирующихся последовательностей в гетерохроматин.

Получается, что мы опять имеем дело с петлей обратной связи. Тип хроматинового домена определяет время репликации, а время репликации, в свою очередь, определяет тип хроматина, в который будет упаковываться домен.

Вероятно, таким образом поддерживается «грубое» разделение доменов на открытый и закрытый типы хроматина, которое осуществляется непосредственно в репликационной вилке. После репликации постепенно происходит последовательное дозревание хроматина, в котором могут участвовать дополнительные район-специфические факторы, в частности, ДНК-связывающие белки, узнающие определенные сайты-мишени или некодирующие РНК, сиквенс-специфически привлекаемые к определенным участкам генома.

Важно, что, регулируя время репликации района, можно не только воспроизводить хроматиновые метки в клеточных поколениях, но и перепрограммировать состояния района. Так, при инъекции плазмиды, несущей репортерный ген, в культуре клеток млекопитающих на стадии поздней S-фазы, во время репликации репортерный ген запаковывается в закрытый хроматин и не транскрибируется. Это состояние затем наследуется в клеточных поколениях. Если же инъекция происходит на более ранних этапах S-фазы, репортерный ген стабильно транскрибируется в клеточных поколениях [Zhang et al., 2002, Lande-Diner et al., 2009]. Вероятно, такое перепрограммирование играет большую роль при дифференцировке клеток [Hiratani et al., 2010].

Поведение хроматиновых меток во время митоза

Во время митоза многие белки покидают хромосомы. Это и факторы транскрипции, и белки, связанные с энхансерами, и, собственно РНК полимеразы [для обзора см. Burke et al., 2005]. Значительно снижается концентрация HP1, Pc, DNMT1, HDAC1 и некоторых других белков, участвующих в поддержании эпигенетического состояния хроматина [Aoto et al., 2008]. Уход из хроматина ферментов – модификаторов гистонов, а также таких важных игроков на поле эпигенетики как HP1 и PC, показывает, что поддержание хроматина во время митоза – еще один важный вопрос, требующий обсуждения.

HP1-зависимый хроматин во время митоза. Во время митоза киназа Aurora B фосфорилирует соседние с H3K9Me H3S10, что приводит к уходу из хроматина HP1. Однако уровень диметилирования H3K9 остается практически неизменным. После митоза фосфатаза PP1 дефосфорилирует H3S10, после чего HP1 может снова связаться с метилированными H3K9 и восстановить свою роль гетерохроматинового регулятора [обзор Blomen, Boonstra, 2011].

Итак, мы снова имеем дело с петлей обратной связи между метилированием H3K9 и HP1. Казалось бы, никаких дополнительных механизмов и не требуется. Однако, у *S. pombe* поддержание хроматина, связанного с метилированным H3K9 и дрожжевым гомологом HP1 – SWI6 в ряду клеточных поколений требует дополнительного участия системы РНК-интерференции.

Дрожжи *S. pombe* проводят значительную часть времени в фазе G2, во время которой прицентромерные повторы упакованы в нуклеосомы, обогащенные H3K9me2, с которыми связан SWI6. Когда клетки входят в митоз, гистон H3 фосфорилируется по основанию S10, что приводит к снижению связывания SWI6 и облегчает сегрегацию хромосом. Центромеры вступают в репликацию очень рано, еще до начала цитокинеза. Связанное с репликацией разбавление гистонов H3K9me2 приводит к дальнейшему снижению концентрации SWI6. Это делает соответствующий участок ДНК доступным для RNA полимеразы II, и начинается двунаправленная транскрипция прицентромерных повторов. Транскрипты подвергаются процессингу до малых интерферирующих РНК (siRNA), которые накапливаются во время S фазы. Затем по механизму связанного с РНК-интерференцией транскрипционного сайленсинга происходит привлечение в соответствующие районы H3K9 гистонметилтрансферазы и деацетилазы гистонов, восстанавливающих гетерохроматиновые характеристики [Chen et al., 2008; Kloc et al., 2008, для обзора см. Probst et al., 2009]. Получается, что у *S.pombe* в каждом клеточном цикле гетерохроматин формируется де ново.

Считается, что у высших эукариот подобный механизм принимает участие в становлении HP1-зависимого хроматина на этапах раннего развития, в то время как при дальнейшем наследовании его в клеточных поколениях достаточно взаимодействия между хроматиновыми метками. Ди- и триметилированные H3K9 сохраняются на всех этапах клеточного цикла, кроме

того, не все молекулы HP1 уходят из хроматина во время митоза. Однако показано, что в клетках мышей в конце митоза, в G1 и в ранней S-фазе также идет накопление центральных РНК. Их роль в эпигенетическом наследовании не известна [Lu, Gilbert, 2007].

Интересно, что в клетках человека в течение всего митоза HP1, ассоциированный собственно с центромерой, остается связанным с хроматином, и это связывание не зависит от метилирования H3K9 [Nayakawa et al., 2003]. Это заставляет задуматься о том, что когда мы говорим «прицентромерный гетерохроматин упакован в HP1-зависимый хроматин», мы не должны забывать, что реально прицентромерный гетерохроматин не однороден, в нем можно выделить различные типы хроматина, связанные и не связанные с HP1 [Demakova et al., 2007]. Вероятно, для поддержания разных типов доменов могут использоваться различные дополнительные механизмы эпигенетического наследования.

Polysomb-зависимый хроматин во время митоза. Во время митоза концентрация H3K27me3 в хроматине снижается [Aoto et al., 2008], однако около половины этой метки все-таки сохраняется. Большая часть комплексов PRC2 также продолжает выявляться в районах хромосом, маркированных H3K27Me3. Во время митоза из хроматина уходят комплексы PRC1, и возвращаются они в PRC2-зависимые H3K27Me3 районы после окончания клеточного деления. Приход PRC1 обеспечивает формирование структуры хроматина более высокого порядка. Интересно, что глобальное восстановление статуса метилирования этих доменов происходит только по окончании стадии G1.

Наследование уровней упаковки хроматина более высокого порядка и пространственной организации ядра

Обратим внимание, что во время митоза из хроматина уходят именно те компоненты системы Polysomb-сайленсинга, которые формируют структуры хроматина высокого порядка. Белок HP1 тоже участвует в глобальной упаковке хроматина в ядре, например, в формировании хромоцентров. Можно предположить, что сохранение подобных структур мешало бы упаковке хроматина, необходимой для сегрегации хромосом. Возникает вопрос, каким образом эти структуры высшего порядка восстанавливаются после митоза. Вероятно, здесь работает несколько факторов. Во-первых, в хроматине сохраняются метки, которые будут узнаваться возвращающимися белками и позволят им вновь связаться со своими районами. Во-вторых, архитектура хроматина (то есть, взаимное расположение отдельных участков генома, петлевая организация) разрушается не полностью. Она должна сохраняться на таком уровне, чтобы вернувшиеся в хроматин белки, начав взаимодействовать друг с другом, могли обеспечить ее дальнейшую самосборку, причем, единственно правильным образом.

Ядерный матрикс и поддержание пространственной организации ядра. Одним из важных механизмов поддержания петлевой организации хроматина является сохранение во время митоза контактов ДНК с ядерным матриксом [Iarovaia et al., 2004, Iarovaia et al., 2005]. Участки генома, взаимодействующие с ядерным матриксом, называются MAR (matrix associated regions). MAR-районы являются важной эпигенетической характеристикой клеток. Они принимают непосредственное участие в регуляции репликации ДНК (эффективные ориджины репликации обязательно должны быть прикреплены к матриксу) и тканеспецифической транскрипции. ДНК/матрикс контакты приводят к образованию хроматиновых петель, размерами от 20 до 200 тпн. которые могут значительно меняться в ходе дифференцировки клеток [обзор Разин, 2006].

Однако прикрепления ДНК к ядерному матриксу неоднородны по своей природе. Они могут быть разделены на две большие группы: (1) перманентные участки прикрепления, и (2) временные участки прикрепления, возникающие в связи с осуществлением различных функциональных процессов [обзор Разин, 2006]. Судя по всему, взаимодействия между энхансерами и промоторами относятся к временным взаимодействиям. Именно постоянно взаимодействующие участки, вероятно, являются каркасом для дальнейшей сборки пространственной организации ядра.

Одним из кандидатов на главную роль в поддержании этих постоянных тканеспецифических взаимодействий является CTCF. Этот белок, первоначально описанный как инсуляторный, выполняет в ядре множество функций. Накапливаются факты о глобальной роли CTCF в формировании хроматиновых петель и контактов между различными районами хромосом. В частности, он обеспечивает взаимодействия между энхансерами и промоторами. В клетках млекопитающих CTCF обнаруживается на границах доменов активного и неактивного хроматина. Считается, что здесь он играет важную роль в разграничении доменов. [Guelen et al., 2008; Barski et al., 2007; Cuddapah et al., 2009]. Согласно другим исследованиям, CTCF часто маркирует границы гетерохроматиновых доменов, связанных с ядерной ламиной [Guelen et al., 2008]. Все это указывает на важную роль в пространственной организации хроматина в ядре.

Оказалось, что как связывание CTCF с хроматином, так и пространственное взаимодействие удаленных участков хроматина, обусловленное CTCF, может сохраняться в митотических хромосомах [Burke et al., 2005; Rubio et al., 2008, обзор Phillips, Corces, 2009]. Предполагается, что взаимодействие связанных с удаленными участками хроматина молекул CTCF друг с другом, а также с другими белками, может обеспечивать стабилизацию определенного уровня организации хроматина. Можно полагать, что сохранение структуры доменов в целом позволит затем восстановить более тонкие пространственные взаимодействия, в частности, взаимодействие энхансеров с промоторами.

Чтобы лучше понять, как это происходит, рассмотрим, как CTCF участвует в пространственной организации бета-глобинового локуса мыши (Рис. 10). Этот локус включает несколько генов, расположенных тандемно. Их экспрессия происходит последовательно и только в клетках эритроидного ряда. Для того, чтобы экспрессироваться, каждый ген должен быть пространственно приближен к локус-контролирующему элементу (locus control region, LCR), в состав которого входит энхансер. В окрестностях кластера есть четыре потенциальных сайта связывания для белка CTCF, один из которых находится в LCR. В незритроидных клетках CTCF не связывается со своим потенциальным сайтом в LCR бета-глобинового локуса. В этой ситуации энхансер в принципе не может взаимодействовать с промотором – хроматин организован так, что они расположены очень далеко друг от друга. В клетках-эритроидного ряда CTCF сидит во всех четырех сайтах, в результате чего сайты взаимодействуют друг с другом, образуя розетку петель хроматина. Глобиновые гены оказываются в одной петле, пространственная организация которой позволяет энхансеру взаимодействовать с промоторами при наличии соответствующих транскрипционных факторов. Как только эти транскрипционные факторы появятся в клетке – это происходит на определенном этапе развития - автоматически формируется новая петля между энхансером и промотором. Точно также, если во время митоза транскрипционные факторы покинут хромосому, но сохранится петлевая организация, основанная на взаимодействиях CTCF сайтами, то после возвращения транскрипционных факторов петли быстро восстановятся [обзор Phillips, Corces, 2009].

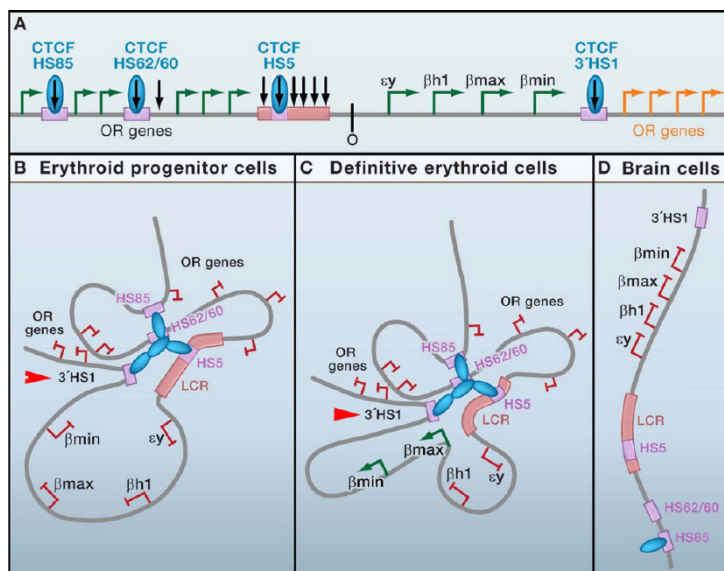


Рис.10. Специфические для разных клеточных типов внутрихромосомные взаимодействия в бета-глобиновом локусе мыши, обусловленные CTCF.

(А) Схематически представлен мышинный β -глобиновый локус. Четыре гена глобинов ($\epsilon\gamma$ и $\beta h1$ активны в примитивных эритроидных клетках, β -major и β -minor – в дефинитивных эритроидных клетках) оказались внутри кластера генов обонятельных рецепторов. Локус-контролирующий район (LCR) содержит несколько сайтов, гиперчувствительных к обработке ДНКазой I (HS, черные стрелки), соответствующих различным регуляторным элементам. Розовые прямоугольники обозначают потенциальные сайты связывания CTCF. (B-D) Специфический паттерн связывания CTCF в предшественниках эритроидных клеток, дефинитивных эритроидных клетках и не эритроидных (нервных) клетках определяет пространственную организацию локуса. Хотя петли изображены так, как будто молекулы CTCF взаимодействуют непосредственно друг с другом, вероятно, на самом деле они взаимодействуют через посредников, которые пока не известны [По: Phillips, Corces, 2009].

Итак, если взаимодействие энхансер-промотор достаточно динамично, то структура, создаваемая с участием CTCF, стабильна и способна сохраняться при прохождении через митоз. Возвращение в хроматин энхансер-связывающих белков после митоза автоматически восстановит энхансер-промоторное взаимодействие, так как эти структуры поддерживаются пространственно сближенными.

Транс-факторы и наследование пространственной организации ядра. Кроме цис-факторов, остающихся в хроматине во время митоза, важную роль должны играть и транс-факторы, распределяющиеся по дочерним клеткам и временно не связанные с хроматином. Если поместить дифференцированные ядра *Xenopus* в экстракт яиц *Xenopus*, компетентных к митозу, в них происходят глобальные изменения хромосомной архитектуры. В частности, значительно меняется характерный размер петель хроматина, заякоренных на ядерном матриксе. Следовательно, в экстракте присутствуют какие-то транс-факторы, которые позволяют наследовать и перепрограммировать упаковку хроматина в петли.

Среди таких транс-факторов, управляющих сборкой петлевой структуры, можно отметить базовые компоненты пререпликативного комплекса – ORC. Показано, что выбор сайтов, с которыми в данном клеточном цикле будет связан ORC, происходит в конце митоза - начале G1, как раз в то время, когда начнется восстановление ядерной организации. Существует очень хорошая корреляция между размером петель и размером репликационных [Courbet et al., 2008]. И ремоделинг размера петель, и распределение ориджина репликации, и привлечение в хроматин ORC находятся в зависимости от топоизомеразы II [Lemaitre et al., 2005]. Различия в концентрации ORC и локальных условиях хроматина, влияющих на связывание ORC, могут быть фактором, управляющим петлевой организацией хроматина.

Заключение

Мы рассмотрели некоторые общие закономерности, которые могут обеспечить стабильное поддержание в клеточных поколениях различных эпигенетических характеристик. Мы коснулись только наиболее изученных вопросов, поэтому из нашего рассмотрения выпали некоторые важные направления, например, роль некодирующих РНК (интересный пример, касающийся механизмов участия некодирующих РНК и РНК-интерференции в эпигенетическом наследовании можно найти в главе про диминуцию хроматина у инфузорий). В качестве примера мы использовали самые известные типы хроматиновых доменов. На самом деле, в хроматине можно выделить значительно больше типов доменов. Для многих из них механизмы наследования до сих пор не известны. Важно подчеркнуть, что локальные эпигенетические характеристики относительно легко изменяются, если появляется соответствующий сигнал. Например, ковалентные модификации гистонов, каждая в отдельности, находятся в динамическом равновесии и достаточно обратимы. Напротив, организация хромосом на уровне протяженных доменов, пространственная организация этих доменов в ядре, по-видимому, являются гораздо менее обратимыми. К такого рода явлениям относятся, например, изменения, наблюдаемые при инактивации X хромосомы. Можно отметить следующую тенденцию: чем выше уровень организации хроматина, тем стабильнее его эпигенетическое состояние. Вероятно, здесь сказывается одновременная работа большого количества взаимосвязанных механизмов, обеспечивающая в целом очень стабильное воспроизведение всех эпигенетических меток.

1. **Разин С.В.** Пространственная организация эукариотического генома и работа эпигенетических механизмов // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1605-1614.
2. **Ратнер В.А.** Молекулярно-генетические системы управления. Новосибирск: Наука, 1975. 287 с.
3. **Aoto T., Saitoh N., Sakamoto Y., Watanabe S., Nakao M.** Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and is required for S phase progression // The Journal of biological chemistry. 2008. Vol. 283. P. 18905-18915.
4. **Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K.** High-resolution profiling of histone methylations in the human genome // Cell. 2007. Vol. 129. P. 823-837.
5. **Blomen V.A., Boonstra J.** Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle // Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2011. Vol. 68. P. 27-44.
6. **Bonenfant D., Towbin H., Coulot M., Schindler P., Mueller D.R., van Oostrum J.** Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry // Molecular & cellular proteomics : MCP. 2007. Vol. 6. P. 1917-1932.
7. **Bowman A., Ward R., Wiechens N., Singh V., El-Mkami H., Norman D.G., Owen-Hughes T.** The histone chaperones Nap1 and Vps75 bind histones H3 and H4 in a tetrameric conformation // Mol Cell. 2011. V. 41. P. 398-408.
8. **Burke L.J., Zhang R., Bartkuhn M., Tiwari V.K., Tavoosidana G., Kurukuti S., Weth C., Leers J., Galjart N., Ohlsson R., Renkawitz R.** CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin // EMBO J. 2005. Vol. 24. P. 3291-3300.
9. **Chen E.S., Zhang K., Nicolas E., Cam H.P., Zofall M., Grewal S.I.** Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly // Nature. 2008. Vol. 451. P. 734-737.
10. **Courbet S., Gay S., Arnoult N., Wronka G., Anglana M., Brison O., Debatisse M.** Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells // Nature. 2008. Vol. 455. P. 557-560.
11. **Cuddapah S., Jothi R., Schones D.E., Roh T.Y., Cui K., Zhao K.** Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains // Genome research. 2009. Vol. 19. P. 24-32.
12. **Dalal Y., Wang H., Lindsay S., Henikoff S.** Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase Drosophila cells // PLoS biology. 2007. Vol. 5. P. e218.
13. **Deal R.B., Henikoff J.G., Henikoff S.** Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones // Science. 2010. Vol. 328. P. 1161-1164.
14. **Demakova O.V., Pokholkova G.V., Kolesnikova T.D., Demakov S.A., Andreyeva E.N., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F.** The SU(VAR)3-9/HP1 complex differentially regulates the compaction state and degree of underreplication of X chromosome pericentric heterochromatin in Drosophila melanogaster // Genetics. 2007. Vol. 175. P. 609-620.

15. **Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., de Klein A., Wessels L., de Laat W., van Steensel B.** Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // *Nature*. 2008. Vol. 453. P. 948-951.
16. **Hansen K.H., Bracken A.P., Pasini D., Dietrich N., Gehani S.S., Monrad A., Rappsilber J., Lerdrup M., Helin K.** A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark // *Nature cell biology*. 2008. Vol. 10. P. 1291-1300.
17. **Haushalter K.A., Kadonaga J.T.** Chromatin assembly by DNA-translocating motors // *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2003. Vol. 4. P. 613-620.
18. **Hayakawa T, Haraguchi T, Masumoto H, Hiraoka Y.** Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase // *J Cell Sci*. 2003. Vol. 116. P. 3327-3338.
19. **Henikoff S.** Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression // *Nature reviews. Genetics*. 2008. Vol. 9. P. 15-26.
20. **Hiratani I., Gilbert D.M.** Replication timing as an epigenetic mark // *Epigenetics*. 2009. Vol. 4. P. 93-97.
21. **Hiratani I., Ryba T., Itoh M., Rathjen J., Kulik M., Papp B., Fussner E., Bazett-Jones D.P., Plath K., Dalton S., Rathjen P.D., Gilbert D.M.** Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis // *Genome research*. 2010. Vol. 20. P. 155-169.
22. **Iarovaia O.V., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D., Razin S.V.** Induction of transcription within chromosomal DNA loops flanked by MAR elements causes an association of loop DNA with the nuclear matrix // *Nucleic acids research*. 2005. Vol. 33. P. 4157-4163.
23. **Iarovaia O.V., Bystritskiy A., Ravcheev D., Hancock R., Razin S.V.** Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene // *Nucleic acids research*. 2004. Vol. 32. P. 2079-2086.
24. **Jansen L.E., Black B.E., Foltz D.R., Cleveland D.W.** Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis // *The Journal of cell biology*. 2007. Vol. 176. P. 795-805.
25. **Kim S.M., Dubey D.D., Huberman J.A.** Early-replicating heterochromatin // *Genes & development*. 2003. Vol. 17. P. 330-335.
26. **Kimura H., Cook P.R.** Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B // *J Cell Biol*. 2001. Vol. 153. P. 1341-1353.
27. **Kloc A., Zaratiegui M., Nora E., Martienssen R.** RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication // *Current biology : CB*. 2008. Vol. 18. P. 490-495.
28. **Koren A., Tsai H.J., Tirosh I., Burrack L.S., Barkai N., Berman J.** Epigenetically-inherited centromere and neocentromere DNA replicates earliest in S-phase // *PLoS genetics*. 2010. Vol. 6. P. e1001068.
29. **Kruhlak M.J., Hendzel M.J., Fischle W., Bertos N.R., Hameed S., Yang X.J., Verdin E., Bazett-Jones D.P.** Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin // *The Journal of biological chemistry*. 2001. Vol. 276. P. 38307-38319.
30. **Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T.** Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins // *Nature*. 2001. Vol. 410. P. 116-120.
31. **Lande-Diner L., Zhang J., Cedar H.** Shifts in replication timing actively affect histone acetylation during nucleosome reassembly // *Molecular cell*. 2009. Vol. 34. P. 767-774.
32. **Lanzuolo C., Lo Sardo F., Diamantini A., Orlando V.** PcG complexes set the stage for epigenetic inheritance of gene silencing in early S phase before replication // *PLoS genetics*. 2011. Vol. 7. P. e1002370.
33. **Lemaitre J.M., Danis E., Pasero P., Vassetzky Y., Mechali M.** Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure // *Cell*. 2005. Vol. 123. P. 787-801.
34. **Loyola A., Bonaldi T., Roche D., Imhof A., Almouzni G.** PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state // *Molecular cell*. 2006. Vol. 24. P. 309-316.
35. **Loyola A., Tagami H., Bonaldi T., Roche D., Quivy J.P., Imhof A., Nakatani Y., Dent S.Y., Almouzni G.** The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin // *EMBO reports*. 2009. Vol. 10. P. 769-775.
36. **Lu J., Gilbert D.M.** Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin // *J Cell Biol*. 2007. Vol. 179. P. 411-421.
37. **Mizuguchi G., Xiao H., Wisniewski J., Smith M.M., Wu C.** Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes // *Cell*. 2007. Vol. 129. P. 1153-1164.
38. **Moldovan G.L., Pfander B., Jentsch S.** PCNA, the maestro of the replication fork // *Cell*. 2007. Vol. 129. P. 665-679.
39. **Phillips J.E., Corces V.G.** CTCF: master weaver of the genome // *Cell*. 2009. Vol. 137. P. 1194-1211.
40. **Probst A.V., Dunleavy E., Almouzni G.** Epigenetic inheritance during the cell cycle // *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2009. Vol. 10. P. 192-206.
41. **Ratner V.A., Tchuraev R.N.** Simplest genetic systems controlling ontogenesis: organization principles and models of their function // In: *Progress in Theoretical Biol. - N.Y.: Acad. Press*. 1978. V. 5. P. 82-127.

42. **Rubio E.D., Reiss D.J., Welch P.L., Distèche C.M., Filippova G.N., Baliga N.S., Aebersold R., Ranish J.A., Krumm A.** CTCF physically links cohesin to chromatin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. P. 8309-8314.
43. **Scharf A.N., Barth T.K., Imhof A.** Establishment of histone modifications after chromatin assembly // *Nucleic acids research*. 2009. Vol. 37. P. 5032-5040.
44. **Scharf A.N., Meier K., Seitz V., Kremmer E., Brehm A., Imhof A.** Monomethylation of lysine 20 on histone H4 facilitates chromatin maturation // *Molecular and cellular biology*. 2009. Vol. 29. P. 57-67.
45. **Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D., Jenuwein T.** A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin // *Genes & development*. 2004. Vol. 18. P. 1251-1262.
46. **Takahashi K., Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 663-676.
47. **Weidtkamp-Peters S., Rahn H.P., Cardoso M.C., Hemmerich P.** Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase // *Histochemistry and cell biology*. 2006. Vol. 125. P. 91-102.
48. **Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R.** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state // *Nature*. 2007. Vol. 448. P. 318-324.
49. **Zhang J., Xu F., Hashimshony T., Keshet I., Cedar H.** Establishment of transcriptional competence in early and late S phase // *Nature*. 2002. Vol. 420. P. 198-202.