



М И Р биологии и медицины

Эпигенетика

Под редакцией С.Д. Эллиса,
Т. Дженюэйна, Д. Рейнберга

Перевод с английского
под редакцией д.б.н. А.Л. Юдина

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2013

УДК 575
ББК 28.04
Э71

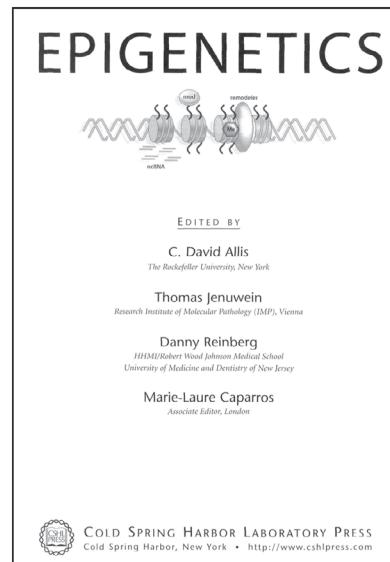
Э71 Эпигенетика

Под ред. С.Д. Эллиса, Т. Джениуэйна, Д. Рейнберга
Москва: Техносфера, 2013. – 496 с. ISBN 978-5-94836-257-1

Книга ярко и наглядно повествует о новой науке общебиологического значения – эпигенетике, а также об ее отдельных областях. В издании представлено детальное описание разных эпигенетических сигналов и механизмов их реализации, а также собственно феномен, история и концепции эпигенетики, ее отдельные механизмы и пути реализации эпигенетических сигналов в клетке. Авторы различных глав данной книги – ведущие в мире специалисты в области эпигенетики, являющиеся, как правило, и основоположниками ее отдельных областей.

Издание будет полезно широкому кругу читателей, интересующихся коренными проблемами живого мира, сущности жизни и молекулярных механизмов ее проявления.

УДК 575
ББК 28.04



Originally published in English as *Epigenetics* edited by C. David Allis, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg and associate editor Marie-Laure Caparros, © 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA

© 2013, ЗАО «РИЦ «Техносфера», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление

Официальный русский перевод английского издания © 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Перевод издан и распространяется с разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press, владельца всех прав, уполномоченного выдавать лицензии, издавать и продавать их

ISBN 978-5-94836-257-1
ISBN 978-087969724-2 (англ.)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	12
Глава 1	
Эпигенетика: от явления к области науки.....	13
<i>Daniel E. Gottschling</i>	
1. Введение	13
2. История эпигенетики на симпозиумах Колл Спринг Харбор.....	14
3. 69-й симпозиум	19
3.1. Гипотеза гистонового кода	19
3.2. Динамический «молчащий» хроматин	20
3.3. Ядерная организация	20
3.4. Прионы	21
3.5. Новое явление	21
4. Заключительные соображения	21
Благодарности	22
Литература	22
Глава 2	
Краткая история эпигенетики.....	26
<i>Gary Felsenfeld</i>	
1. Введение	26
2. Ключи от генетики и биологии развития	27
3. Во всех соматических клетках организма ДНК одинакова	27
4. Роль метилирования ДНК	28
5. Роль хроматина.....	28
6. Все механизмы взаимосвязаны.....	30
Литература	31
Глава 3	
Общий обзор и основные понятия	33
<i>C. David Allis, Thomas Jenuwein и Danny Reinberg</i>	
Общее резюме	33
1. Генетика vs. эпигенетика	34
2. Модельные системы для изучения эпигенетики	36
3. Определение эпигенетики	38
4. Хроматиновая матрица	39
5. Более высокие уровни организации хроматина	40
6. Различие между эухроматином и гетерохроматином.....	44
7. Модификации гистонов и гистоновый код.....	46
8. Комплексы, осуществляющие ремоделинг хроматина, и варианты гистонов	49
9. Метилирование ДНК	50
10. РНКи и сайленсинг генов, направляемый РНК	51
11. От одноклеточных систем к многоклеточным	53
12. Polycomb и Trithorax	55
13. Инактивация X-хромосомы и факультативный гетерохроматин.....	57
14. Репрограммирование клеточной судьбы	58
15. Рак	60
16. В чем же в действительности заключается эпигенетический контроль?	62
17. Основные вопросы в эпигенетических исследованиях	64
Литература	65
Глава 4	
Эпигенетика дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
<i>Michael Grunstein и Susan M. Gasser</i>	
Общее резюме	71
1. Генетические и молекулярные методы исследования дрожжей	72
2. Жизненный цикл дрожжей	73

3. Гетерохроматин у дрожжей находится в «молчащих» локусах типов спаривания <i>HM</i> и теломерах.....	74
4. Гетерохроматин отличается репрессивной структурой, которая распространяется на весь молчщий домен.....	75
5. Отдельные этапы сборки гетерохроматина	77
5.1. <i>HM</i> гетерохроматин.....	77
5.2. Теломерный гетерохроматин	78
6. Деацетилирование гистонов белком Sir2 обеспечивает сайты связывания для распространения SIR-комплексов	78
7. Sir2 деацетилирует гистон H4 по 16-му остатку лизина.....	79
8. Ацетилирование гистонов в эухроматине ограничивает распространение SIR-комплексов.....	80
9. Образование теломерных петель	80
10. Нарушение непрерывности репрессии естественных субтеломерных элементов теломерными петлями	81
11. Взаимодействие теломер <i>in trans</i> и перинуклеарное прикрепление гетерохроматина	81
12. Наследование эпигенетических состояний.....	82
13. Старение и Sir2 связаны нестабильностью повторов рДНК	83
14. Резюме.....	84
Литература.....	84
Глава 5	
Эффект положения мозаичного типа, формирование гетерохроматина и сайленсинг генов у <i>Drosophila</i>.....	87
<i>Sarah C.R. Elgin и Gunter Reuter</i>	
Общее резюме	87
1. Гены, оказывающиеся в ненормальном соседстве с гетерохроматином, обнаруживают мозаичный фенотип	88
2. Скрининг супрессоров и энхансеров PEV позволил идентифицировать хромосомные белки и модификаторы хромосомных белков.....	90
3. Иммунофлуоресцентное окрашивание политеческих хромосом позволило идентифицировать белки, специфически ассоциированные с гетерохроматином	93
4. Модификация гистонов играет ключевую роль в сайленсинге гетерохроматина	95
5. Хромосомные белки образуют взаимозависимые комплексы для поддержания и распространения гетерохроматиновой структуры.....	96
6. Как формирование гетерохроматина «нацеливается» у <i>Drosophila</i> ?	97
7. Не весь гетерохроматин идентичен	100
8. PEV, формирование гетерохроматина и сайленсинг генов у различных организмов	101
9. Подведение итогов: мы не знаем о гетерохроматине очень многое	102
Благодарности	102
Литература.....	103
Глава 6	
Грибы как модельные организмы для эпигенетических исследований:	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> и <i>Neurospora crassa</i>.....	106
<i>Robin C. Allshire и Eric U. Selker</i>	
Общее резюме	107
1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : организм.....	107
1.1. Сайленсинг хроматина у <i>S. pombe</i> отличается от такого у <i>S. cerevisiae</i>	108
1.2. Гены, помещенные в центромеры дробянковых дрожжей, сайленсированы.....	108
1.3. Центромеры дробянковых дрожжей состоят из разных гетерохроматиновых и центральных кинетохорных доменов.....	109
1.4. Центромерные внешние повторы без посторонней помощи делают возможной сборку «молчашего» хроматина.....	111
1.5. РНК-интерференция направляет сборку «молчашего» хроматина	112
1.6. Транскрипция центромерных повторов РНК-полимеразой II связывает RNAi с модификациями хроматина	113
1.7. «Молчаший» хроматин в центромерах необходим для опосредования когезии сестринских центромер и нормальной сегрегации хромосом	113
1.8. Эпигенетическое наследование функционального состояния центромеры	114
1.9. Различные механизмы сайленсинга у грибов	115
2. <i>Neurospora crassa</i> : история и особенности организма.....	116
2.1. Метилирование ДНК у <i>Neurospora</i>	117
2.2. RIP — система защиты генома, имеющая как генетические, так и эпигенетические аспекты	119
2.3. Исследования реликтов RIP позволило проникнуть в контроль метилирования ДНК	120
2.4. «Подавление» (quelling).....	121
2.5. Мейотический сайленсинг, осуществляемый неспаренной ДНК (MSUD)	122

2.6. Вероятные функции и практическое использование RIP, «подавления» и MSUD	123
3. Заключительные замечания	124
Благодарности	125
Литература	125

Глава 7

Эпигенетика инфузорий.....	129
-----------------------------------	-----

Eric Meyer u Douglas L. Chalker

Общее резюме	130
1. Инфузории: одиночные клетки с двумя разными геномами	131
2. Коньюгация: реципрокное оплодотворение обнаруживает неменделевскую наследственность	131
3. Цитоплазматическая наследственность у инфузорий	132
4. Кортикальное паттернирование: случай структурной наследственности	133
5. Макронуклеусы и микронуклеусы: модель активного и «молчащего» хроматина	135
5.1. Разделение микро- и макронуклеарных гистонов выявляет различную роль вариантов гистонов.....	135
5.2. Модификации хроматина коррелируют с состояниями активности	135
6. В ходе развития макронуклеуса происходят общегеномные перестройки	136
6.1. Внутренние делеции ДНК: точные (внутригенные IES) и неточные (межгенные повторы) события.....	137
6.2. Фрагментация хромосом.....	138
7. Механизмы перестроек генома.....	138
8. Зависящий от гомологии сайленсинг генов у инфузорий	139
8.1. Сайленсинг, индуцируемый трансгенами	139
8.2. Сайленсинг индуцируется двунитевой РНК	139
9. Перестройки генома направляются зависящими от гомологии механизмами	140
9.1. Экспериментальная индукция специфических делеций в развивающемся макронуклеусе.....	140
10. Паттерны перестроек определяются, вероятно, путем сравнения геномов зародышевой линии и соматического	141
10.1. Парадигма d48: эпигенетическое наследование альтернативных перестроек	141
10.2. Эпигенетическое наследование экспериментально индуцированных делеций.....	141
10.3. «Спонтанная» элиминация чужеродных последовательностей, интродуцированных в макронуклеарный геном.....	142
10.4. Экспериментальное «спасение» наследуемых макронуклеарных делеций.....	142
10.5. Экспериментальное подавление элиминации IES в развивающемся макронуклеусе	143
11. <i>Trans</i> -нуклеарное сравнение целых геномов, опосредованное РНК-интерференцией	144
11.1. Связь коротких РНК с элиминацией ДНК	145
11.2. Транспорт РНК из материнского в зиготические макронуклеусы у <i>Paramecium</i>	145
12. Заключение: элиминация ДНК как механизм защиты генома	146
13. Будущий вклад исследований на инфузориях в эпигенетику.....	149
Литература	149

Глава 8

RNAi и сборка гетерохроматина	153
--	-----

Robert Martiensser u Danesh Moazed

Общее резюме	153
1. Обзор RNAi-пути.....	154
2. Ранние данные, позволяющие предполагать, что РНК является посредником в транскрипционном сайленсинге	156
3. RNAi и сборка гетерохроматина у <i>S. pombe</i>	156
4. Малые РНК инициируют сборку гетерохроматина в связи с эффекторным комплексом RNAi	158
5. Синтез dsRNA и образование siRNA	159
6. Модели распознавания РНК-РНК versus РНК-ДНК	160
7. Как RNAi рекрутирует энзимы, модифицирующие хроматин?	161
8. Модификации хроматина и ДНК у <i>Arabidopsis</i> , опосредованные RNAi	162
9. Консерватизм модификаций хроматина, опосредованных RNAi, у животных	164
10. Заключительные замечания	165
Литература	165

Глава 9

Эпигенетическая регуляция у растений.....	169
--	-----

Marjori Matzke u Mittelsten Scheid

Общее резюме	169
1. Преимущества использования растений в эпигенетических исследованиях	170
1.1. Сходство растений и животных по организации (эпи)генома	170
1.2. Растения предоставляют дополнительные направления эпигенетических исследований	170
1.3. Растения лучше выносят некоторые методологические манипуляции, которые очень трудно применимы к млекопитающим	173
1.4. Исследование растений внесло самый значимый вклад в эпигенетику	177
2. Молекулярные компоненты хроматина у растений	177
2.1. Регуляторы метилирования ДНК у растений.....	177
2.2. Ферменты модификации гистонов.....	179
2.3. Другие белки хроматина.....	180
3. Молекулярные компоненты путей опосредованного РНК-сайленсинга	182
3.1. Выработка РНК-зависимого сайленсинга у растений	182
3.2. Путь 1: связанное с трансгенами посттранскрипционное и индуцированное вирусами замалчивание генов (PTGS/VICS)	182
3.3. Путь 2: регуляция развития растений miРНК и транс-действующими siРНК.....	184
3.4. Путь 3: связанный с трансгенами транскрипционный сайленсинг, направляемое РНК метилирование ДНК и образование гетерохроматина	186
4. Эпигенетическая регуляция без участия РНК	187
5. Перспективы	187
Литература	188
WWW источники	190
Глава 10	
Модификации хроматина и механизм их действия.....	191
<i>Tony Kouzarides и Shelley L. Berger</i>	
Общее резюме	191
1. Гистоны и ацетилирование играют регуляторную роль в транскрипции	192
2. Ацетилирование и деацетилирование	193
3. Фосфорилирование	195
4. Метилирование	196
4.1. Метилирование лизинов.....	196
4.2. Деметилирование лизинов.....	200
4.3. Метилирование аргининов	201
5. Деиминирование	202
6. Убиквитилирование/деубиквитилирование и сомуилирование	202
7. Темы в модификациях.....	203
7.1. Гистоновый код.....	203
7.2. Паттерны модификаций	203
7.3. Изменения в структуре хроматина, связанные с активацией транскрипции и элонгацией.....	204
8. Заключительные замечания	205
Литература	205
Глава 11	
Транскрипционный сайленсинг, осуществляемый белками группы Polycomb	210
<i>Ueli Grossniklaus и Renato Paro</i>	
Общее резюме	211
1. Введение	211
1.1. Концепция клеточной памяти	211
1.2. Генетическая идентификация группы Polycomb	212
2. Установка меток сайленсинга на хроматин	214
2.1. Компоненты PRC2 и его эволюционный консерватизм	214
2.2. Модифицирующая хроматин активность PRC2	216
2.3. Динамическая функция PRC2 в развитии.....	218
3. Поддержание транскрипционного сайленсинга.....	219
3.1. Компоненты PRC1	219
3.2. «Нацеливание» PRC1 на сайленсированные гены.....	220
3.3. Установление репрессивных функций с помощью PRC1.....	222
3.4. Предотвращение наследуемой репрессии антисайленсингом	222
4. Репрессия PcG в развитии млекопитающих	223
4.1. От репрессии гена к репрессии хромосомы	223

4.2. Последствия аберрантной активации транскрипции	224
4.3. Поддержание судьбы стволовой клетки	225
5. Заключение и перспективы	226
Литература	226
Глава 12	
Регуляция транскрипции белками группы Trithorax	230
<i>Robert E. Kingston и John W. Tamkun</i>	
Общее резюме	230
1. Введение	231
1.1. Идентификация генов, участвующих в поддержании детерминированного состояния	232
1.2. Белки trxG у других организмов	233
1.3. Белки trxG играют разные роли в эукариотической транскрипции	235
2. Связи между белками trxG и хроматином	236
2.1. Белки trxG, участвующие в АТФ-зависимом ремоделировании хроматина	236
2.2. Белки trxG, ковалентно модифицирующие нуклеосомные гистоны	240
3. Связи между белками trxG и общей транскрипционной машинерией	242
4. Биохимические функции других белков trxG	242
5. Функциональные взаимодействия между белками trxG	242
6. Белки trxG: активаторы или антирепрессоры?	243
7. Выводы и перспективы	243
Литература	245
Глава 13	
Варианты гистонов и эпигенетика	247
<i>Steven Henikoff и Mitchell Smith</i>	
Общее резюме	247
1. У всех организмов ДНК упаковывается архитектурными белками	248
2. Эукариотические коровые гистоны развились из гистонов архей	249
3. Основная масса гистонов откладывается после репликации ДНК	250
4. Варианты гистонов откладываются на протяжении всего клеточного цикла	251
5. Центромеры идентифицируются специальным вариантом H3	252
6. Замещение гистоновым вариантом H3.3 обнаруживается в активном хроматине	254
7. Фосфорилирование H2AX функционирует в репарации двунитевых разрывов ДНК	255
8. H2AZ играет роль в регулировании транскрипции	257
9. Белковые комплексы для откладки и замещения вариантов H2A	258
10. Другие варианты H2A дифференцируют хроматин, но их функции все еще неизвестны	259
11. Эволюция многих гистонов была направлена на более плотную упаковку ДНК	259
12. Заключение и перспективы исследований	260
Литература	261
Глава 14	
Эпигенетическая регуляция хромосомного наследования	263
<i>Gary H. Karen и R. Scott Hawley</i>	
Общее резюме	264
1. Введение	264
1.1. Как осуществляется хромосомная наследственность?	264
1.2. Какие элементы требуются для хромосомной наследственности?	264
2. Эпигенетическая регуляция репликации ДНК, репарации и теломер	266
2.1. Инициация репликации ДНК контролируется эпигенетическими механизмами	266
2.2. Репарация ДНК включает эпигенетические изменения в структуре хроматина	267
2.3. Эпигенетический контроль структуры и функции теломер	268
3. Эпигенетическая регуляция идентичности и функции центромер	269
3.1. Структура и функция центромеры у разных эукариот	270
3.2. Центромерные последовательности не являются необходимыми или достаточными для формирования и функционирования кинетохора	271
3.3. Необычный состав центромерного хроматина	272
3.4. Модели структуры, функции и воспроизведения центромер	275
3.5. Эпигенетика и эволюция центромер	276
4. Гетерохроматин и мейотическое спаривание / расхождение	277
4.1. Обнаружение сайта гетерохроматинового спаривания у самцов <i>Drosophila</i>	278

4.2. Спаривание гетерохроматина облегчает расхождение у самок <i>Drosophila</i>	279
4.3. Роль центромеры в облегчении ахиазматической сегрегации у почкающихся дрожжей	279
4.4. Ассоциированный с гетерохроматином локус Ph1 у кукурузы и его роль в опосредовании гомологичного versus негомологичного спаривания.....	280
5. Гетерохроматин и мейотический драйв.....	280
5.1. Нарушитель сегрегации (Segregation Distorter) у самцов <i>Drosophila</i>	280
5.2. Утеря отцовской хромосомы у <i>Sciara</i> и картирование реагирующего элемента.....	281
5.3. Утеря отцовских хромосом у <i>Nasonia</i>	281
5.4. Вздутие 10 у кукурузы — роль последовательностей, соответствующих гетерохроматиновым «вздутиям», в облегчении расхождения хромосом в мейозе I.....	282
6. Сайленсинг генов неспаренными ДНК в мейозе	282
6.1. Мейотический сайленсинг неспаренной ДНК в мейозе у <i>Neurospora</i>	282
6.2. Сайленсинг асинаптических хромосом у мыши.....	283
6.3. Дисфункция половой хромосомы у <i>Drosophila</i>	283
7. Перспективы и выводы	283
Литература	284
Глава 15	
Эпигенетическая регуляция X-хромосом у <i>C. elegans</i>	287
<i>Susan Strome и William G. Kelly</i>	
Общее резюме	287
1. Дисбаланс половых хромосом у <i>C. elegans</i>	288
2. DDC похож на комплекс конденсина	288
3. Оценка отношения X:A	290
4. Рекрутирование и распространение DCC	292
5. Эффекты DCC: даун-регуляция сцепленных с X генов и аутосомного гена <i>her-1</i>	292
6. Регулирование X-хромосом в зародышевом пути.....	293
7. Развитие зародышевого пути и сайленсинг X-хромосомы.....	293
8. Единственная X-хромосома у самцов обнаруживает метки гетерохроматина	294
9. Влияние MSUD на паттерны экспрессии генов в зародышевом пути.....	296
10. Регуляция сайленсинга X-хромосомы модификаторами гистонов MES.....	296
11. X-хромосома спермия импринтирована	298
12. Заключительные замечания	299
Литература	300
Глава 16	
Компенсация дозы у <i>Drosophila</i>	302
<i>John C. Lucchesi и Mitzi I. Kuroda</i>	
Общее резюме	302
1. Явление компенсации дозы было открыто у <i>Drosophila</i>	303
2. Компенсация дозы связана с модификациями хроматина	303
3. Регулирование компенсации дозы начинается с измерения отношения X:аутосомы	306
4. Некодирующие РНК goX облегчают сборку и «нацеливание» комплекса MSL на X-хромосому	307
5. Балансировка между антагонистическими активностями ремоделинга хроматина.....	309
6. Перспективы.....	310
Литература	311
Глава 17	
Компенсация дозы у млекопитающих	313
<i>Neil Brockdorff и Bryan M. Turner</i>	
Общее резюме	314
1. Введение	314
1.1. Преимущества полового воспроизведения	314
1.2. Способы определения пола	315
1.3. Хромосомные способы детерминации пола создают необходимость в компенсации дозы	316
1.4. Идентификация неактивной X-хромосомы у самок млекопитающих	316
2. Ключевые концепции	316
2.1. Инактивация X регулируется в ходе развития.....	316
2.2. Сайленсинг хромосомы включает множественные уровни эпигенетической модификации	317
2.3. Некоторые гены избегают X-инактивации	317
2.4. X-инактивация регулируется главным локусом-переключателем — центром X-инактивации	317

3. Инициация X-инактивации.....	317
3.1. Импринтированная versus случайная X-инактивация.....	317
3.2. Регуляция импринтированной X-инактивации	318
3.3. Регуляция случайной X-инактивации — счет	319
3.4. Регуляция случайной X-инактивации — выбор.....	321
3.5. Способы переключения инактивации в раннем эмбриогенезе	322
4. Воспроизведение и поддержание неактивного состояния	322
4.1. Xist-RNК, сайленсинг генов и сборка гетерохроматина.....	322
4.2. Гетерохроматиновая структура неактивной X-хромосомы	323
4.3. Энзимология модификаций гистонов на Xi.....	325
4.4. Последовательность событий, приводящих к X-инактивации; ES-клетки как модельная система	326
4.5. Распространение «молчачего» хроматина.....	327
4.6. Уход от инактивации X-хромосомы	327
4.7. X-инактивация у сумчатых млекопитающих	328
5. Реактивация и репрограммирование X-хромосомы	328
5.1. Стабильность X-инактивации в соматических клетках.....	328
5.2. Реактивация X-хромосомы в нормальном развитии	329
5.3. Реактивация X-хромосомы в ходе экспериментального репрограммирования	329
5.4. Уроки из опытов с индуцильными трансгенами Xist	329
6. Резюме и направления будущих исследований	330
Литература.....	330
Глава 18	
Метилирование ДНК у млекопитающих.....	333
<i>En Li и Adrian Bird</i>	
Общее резюме	334
1. Механизм клеточной памяти	334
1.1. Гипотеза.....	334
1.2. Данные о наследуемых паттернах метилирования.....	334
1.3. Поддерживающая ДНК-метилтрансфераза млекопитающих.....	335
2. Происхождение паттернов метилирования ДНК	335
2.1. De novo метилирование ДНК у ранних эмбрионов	335
2.2. Открытие de novo метилтрансфераз	336
2.3. Островки CpG и паттерны метилирования ДНК	336
2.4. Динамические изменения в паттернах метилирования ДНК в ходе развития	337
2.5. Активное деметилирование зиготического отцовского генома	338
2.6. Что защищает островки CpG от метилирования ДНК?	339
2.7. Переключается ли метилирование ДНК структурой хроматина?	339
2.8. Роль SWI/SNF-подобных белков ремоделинга хроматина	340
3. Регуляция экспрессии генов метилированием ДНК	340
3.1. Ранние данные.....	340
3.2. Интерференция со связыванием транскрипционного фактора.....	340
3.3. Притяжение белков, связывающихся с метил-CpG	341
3.4. MeCP2 и синдром Ретта	342
3.5. MBD2 опосредует зависящую от метилирования репрессию транскрипции.....	343
4. Метилирование ДНК, мутации и стабильность хромосом	343
4.1. Метилирование ДНК и мутации	343
4.2. Метилирование ДНК и нестабильность хромосом.....	344
5. Будущие направления исследований	344
5.1. Факторы внешней среды, индуцирующие эпигенетические изменения	345
5.2. Эпигенетическая нестабильность и комплексные заболевания	345
5.3. Модуляция обратимых эпигенетических состояний.....	345
Литература.....	346
Глава 19	
Геномный импринтинг у млекопитающих.....	349
<i>Denise P. Barlow и Marisa S. Bartolomei</i>	
Общее резюме	349
1. Исторический обзор.....	350
2. Геномный импринтинг — эпигенетическая система регуляции генов	353
3. Ключевые открытия в области геномного импринтинга	355

3.1. Импринтированные гены контролируют эмбриональный и неонатальный рост.....	355
3.2. Функция геномного импринтинга у млекопитающих.....	355
3.3. Импринтированные гены собраны в кластеры и контролируются импринтными контрольными элементами	357
3.4. Кластеры импринтированных генов содержат по меньшей мере одну ncRNA.....	359
3.5. Роль метилирования ДНК в геномном импринтинге	360
3.6. Два типа <i>cis</i> -действующего сайленсинга, идентифицированного в кластерах импринтированных генов	362
4. Геномный импринтинг — модель эпигенетической регуляции у млекопитающих	364
5. Направления будущих исследований	365
Благодарности	365
Литература	365
WWW-ресурсы	367
Глава 20	
Зародышевая линия и плюрипотентные стволовые клетки	368
<i>M. Azim Surani и Wolf Reik</i>	
Общее резюме	369
1. Введение. Жизнь млекопитающих: генетическая и эпигенетическая непрерывность	369
2. Генетические и эпигенетические механизмы, регулирующие спецификацию половых клеток (от раннего эмбриона к половым клеткам).....	372
2.1. Принципы развития половых клеток в различных группах животных.....	372
2.2. Раннее развитие линии половых клеток у млекопитающих.....	372
2.3. Роль Blimp 1 в спецификации PGC	374
2.4. Репрессия соматической программы в половых клетках – явление, эволюционно консервативное	374
2.5. Регуляция эпигенетической программы у мышей после спецификации PGC	375
2.6. Линия половых клеток и стволовые клетки – обратимый фенотип	376
2.7. Развитие половых клеток из плюрипотентных ES-клеток	376
2.8. От примордиальных половых клеток к гаметам	376
3. От ооцитов к раннему эмбриону	377
3. 1. Материнская наследственность и потенциальное асимметрическое распределение?.....	377
3.2. Эпигенетические события при оплодотворении	378
3.3. От зиготы к бластоцисте	379
4. От плюрипотентных клеток к соматическим клеткам и обратно к половым клеткам	379
4.1. Получение плюрипотентных стволовых клеток	379
4.2. Эпигенетические свойства плюрипотентных стволовых клеток	380
4.3. Способность стволовых клеток к репрограммированию	381
5. Перспективы.....	382
Благодарности	383
Литература	383
Глава 21	
Эпигенетическое регулирование лимфоцитопоэза	387
<i>Meinrad Busslinger и Alexander Tarakhovsky</i>	
Общее резюме	387
1. Введение	388
2. Коммитирование линий в раннем лимфопоэзе.....	390
2.1. Внеклеточные сигналы	390
2.2. Транскрипционные факторы	390
2.3. Эпигенетический контроль экспрессии генов.....	392
3. Эпигенетический контроль разнообразия рецепторов антигенов	392
3.1. Регуляция перестроек генов рецепторов антигенов в процессе развития	392
3.2. Субъядерное перемещение генов иммуноглобулинов	395
3.3. Сокращение локуса генов иммуноглобулина	395
3.4. Контроль аллельного исключения в локусах IgH и Igκ	396
4. Конечная дифференцировка зрелых В-клеток	398
4.1. Дифференцировка плазматических клеток.....	398
4.2. Пластиичность зрелых В-клеток в процессе развития	400
5. Заключительные замечания	401
Литература	401

Глава 22

Трансплантация ядер и репрограммирование генома	405
<i>Rudolf Jaenisch и John Gurdon</i>	
Общее резюме	405
1. История.....	406
2. Процедуры пересадки ядер	406
2.1. Амфибии	406
2.2. Млекопитающие	406
3. Фенотип клонированных животных	409
3.1. Амфибии	409
3.2. Млекопитающие	410
3.3. Получение клонированных млекопитающих из терминально дифференцированных клеток	411
4. Изменения, связанные с репрограммированием ядра	414
4.1. Амфибии.....	414
4.2. Млекопитающие	416
5. Эпигенетическая память.....	417
6. Значение ядерной трансплантации для медицины.....	418
6.1. Репродуктивное клонирование	419
6.2. Применение ядерной трансплантации в терапии.....	420
6.3. Репродуктивное versus терапевтическое клонирование: в чем разница?.....	421
Литература.....	421

Глава 23

Эпигенетика и болезни человека	424
<i>Huda Y. Zoghbi и Arthur L. Beaudet</i>	
Общее резюме	424
1. Введение	425
2. Исследования болезней человека вскрывают роль эпигенетики в биологии.....	426
3. Заболевания человека	427
3.1. Нарушения геномного импринтинга	427
3.2. Нарушения, влияющие на структуру хроматина в <i>trans</i> -конфигурации.....	431
3.3. Расстройства, влияющие на структуру хроматина в <i>cis</i> -конфигурации	435
3.4. Взаимодействие эпигенетики и окружающей среды	438
4. Глядя в будущее.....	439
Благодарности	439
Литература.....	439

Глава 24

Эпигенетические детерминанты при раковых заболеваниях.....	445
<i>Stephen B. Baylin и Peter A. Jones</i>	
Общее резюме	445
1. Биологическая основа раковых заболеваний.....	446
2. Значение хроматина для раковых заболеваний	447
3. Роль метилирования ДНК при раковых заболеваниях.....	448
4. Гиперметилированные промоторы генов при раковых заболеваниях	449
4.1. Гены, участвующие в процессе	449
4.2. Поиск новых генов, эпигенетически сайленсированных при раке	451
4.3. Определение функциональной важности генов, гиперметилированных при раковых заболеваниях	452
5. Эпигенетический сайленсинг генов и его роль в эволюции рака – значение для ранних стадий развития опухоли	452
6. Молекулярная анатомия эпигенетически сайленсированных раковых генов	455
7. Резюме главных результатов исследований по осмыслению эпигенетического сайленсинга генов при раке ..	458
8. Выявление рака посредством метилирования ДНК	459
9. Эпигенетическая терапия	459
Литература.....	461

Приложение 1

WWW-ресурсы	465
--------------------------	-----

Приложение 2

Модификации гистонов и литература.....	468
---	-----

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Глубокоуважаемый читатель !

Перед Вами русскоязычное издание первой в мире обстоятельной научной книги об эпигенетике. Под эпигенетикой обычно понимают область знаний о совокупности свойств организма, которые не прямо, а опосредованно закодированы в геноме и, по определению, должны передаваться по наследству. По сути дела в первую очередь эта наука имеет дело с механизмами, контролирующими экспрессию генов и клеточную дифференцировку. У организмов существуют мощные регуляторные элементы (в самом геноме и даже целые системы в клетках), которые контролируют работу генов, в том числе и в зависимости от разных внутренних и внешних сигналов биологической и абиотической природы. Эти сигналы накладываются на генетику и часто по-своему решают коренной вопрос – быть или не быть? Действительно, даже самая отличная генетика может вовсе и не реализоваться, если эпигенетика неблагополучна. По образному выражению Нобелевского лауреата П. Медавара «генетика полагает, а эпигенетика располагает».

Долгое время эпигенетику многие не признавали совсем, а часто стыдливо или даже намеренно умалчивали о ней. В основном, это происходило потому, что знания о природе эпигенетических сигналов и путях их реализации в организме были очень расплывчатыми. Сегодня стало ясно, что одним из таких эпигенетических сигналов в клетке является энзиматическая модификация (метилирование) самой генетической матрицы, то есть метилирование ДНК. С раскрытием и описанием исключительной роли метилирования ДНК в жизни организмов, по сути дела, впервые по-настоящему произошли становление и материализация эпигенетики как науки. Именно в России были открыты тканевая и возрастная специфичность метилирования ДНК у эукариотических организмов, в том числе у животных и высших растений, и было впервые обоснованно заявлено, что эта энзиматическая модификация генома может быть одним из механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки. Здесь же были получены первые данные о том, что метилирование ДНК контролируется горизонтально, а искажение метилирования ДНК – путь к раку.

Набор и природа эпигенетических сигналов в клетке весьма разнообразны, таких сигналов много и сегодня они разделяются, по крайней мере, на несколько групп – метилирование и деметилирование ДНК, «гистоновый код» (энзиматическая модификация гистонов – ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование и другие), транскрипционное и трансляционное замалчивание генов малыми РНК, позиционирование элементов хроматина. Любопытно, что многие из этих процессов переплетены между собой и взаимозависимы. Это во многом обеспечивает и гарантирует надежность эпигенетического контроля за избирательным функционированием генов. Детальное описание разных эпигенетических сигналов и механизмов их реализации можно найти в соответствующих главах этой любопытной книги. В ней детально описаны собственно феномен, история и концепции эпигенетики, ее отдельные механизмы и пути реализации эпигенети-

ческих сигналов в клетке. Особое место занимают главы, описывающие роль малых РНК в замалчивании генов, ре-modelирование хроматина, его разные энзиматические модификации, транскрипционное замалчивание генов белками групп поликомб и триторакс, инактивацию X хромосом и половую дифференцировку у нематод и млекопитающих, механизмы дозовой компенсации генов у дрозофилы и млекопитающих, метилирование ДНК и механизмы геномного импринтинга у млекопитающих, эпигенетические механизмы дифференцировки стволовых клеток, эпигенетический контроль за лимфопоэзом, пересадку ядер и репрограммирование ядра, эпигенетику рака, эпигенетические болезни человека. По отдельности в соответствующих главах довольно детально рассматривается так называемая частная эпигенетика разных групп организмов: дрожжей и других грибов, насекомых (дрозофилы), ресничатых простейших (*Ciliata*), высших растений.

Каждая из глав этой книги написана крупными, ведущими в мире специалистами в эпигенетике, которые, как правило, являются и основоположниками ее отдельных областей. К сожалению, работы наших соотечественников, внесших достойный вклад в становление и развитие эпигенетики, остались практически без внимания. Жаль также, что в этой книге не приняли участие и такие всемирно известные родоначальники эпигенетики, как Робин Холлидей, Артур Ригтс, Вальтер Дерфлер и другие. Эта многообещающая область знаний развивается очень быстро и бурно, и уже сегодня эта книга могла бы быть изрядно дополнена принципиально новыми и важными научными сведениями.

Книга дает очень хорошее и обширное представление об эпигенетике в целом, ее отдельных областях и молекулярных механизмах.

Наука эпигенетика уже успела основательно прорасти в технологии. В одном из последних бюллетеней (Technology Review) Массачусетского технологического института (США) эпигенетика названа среди десяти важнейших технологий, которые в ближайшее время могут изменить мир и оказать наибольшее влияние на человечество. И это действительно так. С ней безусловно связан прогресс биологии, медицины, сельского хозяйства и разных биотехнологий.

Разумеется, эта книга, ярко и наглядно повествующая о новой науке нашего века общебиологического значения – эпигенетике, очень полезна для широкого круга читателей, интересующихся коренными и острыми современными проблемами живого, сущности жизни и молекулярных механизмов ее проявлений. Поэтому появление этой книги в России следует всячески приветствовать, она не только пробудит интерес к эпигенетике, расширит и углубит наши знания, но и послужит развитию этой важной научной дисциплины в стране.

Книга переведена на русский язык и издана по инициативе известного российского ученого – Николая Викторовича Томилина. Перевод сделан к.б.н. В.В. Ашапкиным (глава 4), чл.-кор. РАН Б.Ф. Ванюшиным (глава 9), к.б.н. Ю.И. Подлипаевой (главы 21, 23 и 24), к.б.н. И.И. Фридлянской (глава 20) и д.б.н. А.Л. Юдиным.

Член-корреспондент РАН
Б.Ф. Ванюшин

ГЛАВА I

ЭПИГЕНЕТИКА: ОТ ЯВЛЕНИЯ К ОБЛАСТИ НАУКИ

Daniel E. Gottschling

Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98109

Содержание:

- 1. Введение
- 2. История эпигенетики на симпозиумах Колд Спринг Харбор
- 3. 69-й симпозиум
 - 3.1. Гипотеза гистонового кода
 - 3.2. Динамический «молчщий» хроматин
 - 3.3. Ядерная организация
 - 3.4. Прионы
 - 3.5. Новое явление
- 4. Заключительные соображения
- Благодарности
- Литература

1. Введение

Состоявшийся летом 2004 года 69-й симпозиум (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology) был посвящен теме «Эпигенетика» и многие авторы этой книги были в числе его участников. Как наблюдатель на этом симпозиуме я знал, что это должна была быть интересная встреча. Совещание началось достаточно просто — с попыток определения эпигенетики. После недельных распросов участников на эту тему стало ясно, что задавать такой вопрос — все равно что просить кого-то определить, что такое «семейные ценности»: каждый знает, что это такое, но для каждого это имеет разный смысл. Как объяснил Дэвид Хейг [David Haig], отчасти причину такого широкого спектра мнений можно понять исходя из этимологии слова «эпигенетика»: это слово имеет двойное происхождение в биологической литературе прошлого века, и значение этого термина продолжает эволюционировать. Уоддингтон [Waddington] первым изобрел этот термин для обозначения исследований «каузальных механизмов», посредством которых «гены генотипа осуществляют фенотипические эффекты» (см. Haig, 2004). Позже Нэнни [Nanney] использовал этот термин для объяснения своих представлений о том, как клетки с одним и тем же генотипом могут иметь разные фенотипы, сохраняющиеся на протяжении многих поколений.

Я определяю эпигенетическое явление как изменение в фенотипе, которое является наследуемым, но не связано с мутацией в ДНК. Более того, это изменение в

фенотипе должно быть похожим на переключение типа «ВКЛЮЧЕНО» или «ВЫКЛЮЧЕНО», а не градуальной реакцией, и оно должно наследоваться даже если первоначальные условия, вызвавшие это переключение, исчезают. Таким образом, в число эпигенетических явлений я включаю переключение между лизисом и лизогензией у бактериофага лямбда (Ptashne, 2004), переключение пилей у уропатогенной *Escherichia coli* (Hernandez et al., 2003), эффект положения нестабильного типа у *Drosophila* (Henikoff, 1990), наследуемые изменения в кортикальном паттерне у *Tetrahymena* (Frankel 1990), прионные болезни (Wickner et al., 2004) и инактивацию X-хромосомы (Lyon, 1993).

69-й симпозиум состоялся в 100-ю годовщину генетики как области исследований в Лаборатории Колд Спринг Харбор, что делает очень своевременным рассмотрение эпигенетики. Учитывая этот исторический контекст, я считал уместным рассмотреть изучение эпигенетики в свете предыдущих симпозиумов Колд Спринг Харбор. Хотя 69-й симпозиум был первым, посвященным специально этой теме, эпигенетические явления и их изучение оказались представленными на протяжении всей истории этой выдающейся серии симпозиумов. Предлагаемая мною история сужается далее моими собственными ограничениями и предпочтениями. Для более полной и академической картины я могу порекомендовать свыше 1000 обзоров по эпигенетике, написанных за последние пять лет.

Представляя этот хронологический отчет, я надеюсь передать свое ощущение от того, как коллекция внеш-

не несопоставимых явлений слилась воедино в область исследований, затрагивающую все разделы биологии, а также показать, что изучение эпигенетики основывается на стремлении объяснить неожиданное — возможно, в большей степени, чем любая другая область биологических исследований.

2. История эпигенетики на симпозиумах Колд Спринг Харбор

В 1941 году, во время 9-го симпозиума, великий генетик дрозофилист Герман Меллер (H.J. Muller) описал результаты дальнейшей разработки явления, первоначально названного им «eversporting displacement», — явления, когда крупные хромосомные перестройки приводили к мутантной мозаичной экспрессии генов вблизи точки разрыва (Muller, 1941). Ко времени симпозиума он называл это «мозаицизмом, обусловленным эффектом положения» («position effect variegation»). Было надежно установлено, что затрагиваемые гены были перенесены «в соседство с гетерохроматиновым районом», что перенесенные эухроматиновые участки «были частично, но в разной степени, трансформированы в состояние гетерохроматина — “гетерохроматинизированы” и что добавление экстракопий гетерохроматиновых хромосом «позволяло затронутому гену становиться более нормальным в своем функционировании». В то время это последнее наблюдение вызывало недоумение и было неожиданным, хотя теперь мы знаем, что это результат титрования лимитирующих компонентов гетерохроматина.

На 16-м симпозиуме (1951) высший приоритет имело детальное понимание гена. Этим можно объяснить, почему в понимании мозаицизма, обусловленного эффектом положения (PEV), имел место незначительный прогресс, хотя и были открыты новые примеры этого явления. Однако первый докладчик отметил, что PEV станет захватывающей областью будущих исследований (Goldschmidt, 1951). Барbara МакКлинток отметила, что хромосомные эффекты положения являются основой различий в «мутабильных локусах» кукурузы, и высказала предположение, что наблюдавшаяся ею изменчивость мутабильности, возможно, коренится в тех же механизмах, что лежат в основе PEV у *Drosophila* (McClintock, 1951).

Ко времени 21-го симпозиума идеи МакКлинток о «контролирующих элементах» получили дальнейшее развитие (McClintock, 1956). Две из них имели особо близкое отношение к эпигенетике. В системе контролирующего элемента *Spm* она обнаружила варианты, позволившие ей различать *trans*-действующие факторы, которые могут «подавлять» ген (уменьшать или устраивать его фенотипическое выражение), а не заставлять его мутировать. Она также отметила, что некоторые контролирующие элементы могли подавлять действие гена не только в том локусе, куда они вставлены, но и в локусах, которые расположены на некотором расстоянии с той или другой стороны от него. Другие исследователи также обнаруживали этот «эффект распростране-

ния». Шульц представил биохимические и физические характеристики целых *Drosophila*, содержащих разные количества гетерохроматина (Schultz, 1956). Хотя эта работа была весьма примитивной, а сделанные на ее основе выводы имели ограниченное значение, она явилаась примером первых попыток расчленить структуру гетерохроматина и продемонстрировала, насколько трудной окажется эта проблема.

Два сообщения на 23-м симпозиуме явились вехами в свете нашего сегодняшнего симпозиума. Во-первых, Бринк описал свои ошеломляющие наблюдения «парамутаций» в локусе R у кукурузы. Если две аллели (R^a и R^r) с разными фенотипами в гомозиготном состоянии комбинируются и образуют гетерозиготу, и это растение R^a/R^r , в свою очередь, снова скрещивается, получающееся в результате потомство, которое содержит аллель R^r , всегда будет иметь фенотип R^a , хотя аллель R^a больше не присутствует (Brink, 1958). Однако этот фенотип является метастабильным — в последующих скрещиваниях он ревертирует к нормальному фенотипу R^r . Бринк предполагал, что слово «парамутация» «должно использоваться в этом контексте в своем буквальном смысле, как указывающее на явление, отличное от мутации, но и не полностью непохожее на нее». Во-вторых, Нэнни пошел очень далеко в попытках сформулировать «концептуальные и операциональные различия между генетическими и эпигенетическими системами» (Nanney, 1958). По существу он определил эпигенетику иначе, чем первоначально предполагалось Уоддингтоном (Waddington) (детали см. Haig, 2004). Он считал необходимым поступить таким образом, для того чтобы описать явления, наблюдавшиеся им у *Tetrahymena*. Он получил данные о том, что происхождение цитоплазмы коньюгирующих родительских клеток влияет на детерминацию типа спаривания получающегося потомства. Данное им определение охватывало и наблюдения, сделанные другими исследователями, включая работу Бринка по локусу R и работу МакКлинток, отмеченную на 21-м симпозиуме.

На 29-м симпозиуме значительный интерес вызвала гипотеза инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих, незадолго до этого предложенная Мэри Лайон (Lyon, 1961). Гартлер, Бойтлер и Нанс представили новые данные в ее поддержку (Beutler, 1964; Gartler and Linder, 1964; Nance, 1964). Бойтлер дал обзор многочисленных примеров мозаичной экспрессии сцепленных с X генов у женщин, которые свидетельствовали в пользу случайной природы X-инактивации. Основываясь на тщательном количественном анализе продукта гена, сцепленного с X, Нанс заключил, что инактивация X-хромосомы происходит до наступления 32-клеточной стадии эмбриона.

38-й симпозиум на тему «Структура и функция хромосом» явился возвратом к изучению эукариотических хромосом — к этому времени значительный прогресс был достигнут в изучении прокариотических и фаговых систем, и, как следствие, в расцветающей области молекулярной биологии в мышлении в основном доминировала экспрессия бактериальных генов. Однако росло и понимание роли хроматина (ДНК с гистонами и не-

гистоновыми белками) у эукариот, но было неясно, связана ли его роль со структурой хромосомы, с ее функциями или же и с тем, и другим (Swift, 1974). Тем не менее, несколько групп начали высказывать предположения, что с транскрипцией генов или с общей структурой хромосом связана посттрансляционная модификация белков хроматина, в том числе гистонов (Allfrey et al., 1974; Louie et al., 1974; Weintraub, 1974). В воздухе витал лишь намек на эпигенетические явления. Высказывались гипотезы о том, что у эукариот большинство генов регулируются повторяющейся ДНК — отчасти исходя из того факта, что открытые МакКлинток контролирующие элементы повторены в геноме. Сообщалось, однако, что большая часть повторяющихся нуклеотидных последовательностей ДНК не скреплена с генами (Reacock et al., 1974; Rudkin and Tartof, 1974). С учетом этих наблюдений идея о том, что повторяющиеся элементы регулируют экспрессию генов, в значительной мере утратила поддержку со стороны присутствовавших. Что, однако, более важно, в этих же самых исследованиях обнаружилось, что большая часть повторяющейся ДНК локализована в гетерохроматине.

42-й симпозиум продемонстрировал, что за четыре года поразительное количество технических и интеллектуальных достижений полностью преобразили изучение эукариотических хромосом (Chambon 1978). К их числу относились использование ферментов рестрикции ДНК, разработка технологии рекомбинантных ДНК, рутинное разделение белков и нуклеиновых кислот, возможность проведения Саузерн- и Норзерн-анализа, быстрое секвенирование ДНК и РНК и иммунофлуоресценция на хромосомах. Была представлена нуклеосомная гипотеза и был открыт сплайсинг и РНК. Основной интерес на этом симпозиуме привлекли биохимические и цитологические различия в структуре хроматина, особенно между активно транскрибирующими и неактивными генами. Если, однако, говорить о том, что имело наиболее близкое отношение к эпигенетике, то Вайнтрауб с сотрудниками представил свои соображения относительно того, каким образом хроматин может обуславливать мозаичную экспрессию генов у организма (Weintraub et al., 1978).

45-й симпозиум явился торжеством открытий Барбары МакКлинток — подвижных генетических элементов (Yarmolinsky, 1981). Выполненные в механистическом плане исследования бактериальной транспозиции продемонстрировали чрезвычайный прогресс и вполне оправданно составили около половины всех представленных сообщений, в то время как другие доклады содержали данные о том, что транспозиция и регулируемая реорганизация генома происходят не только у кукурузы, но и у других эукариот, в том числе у мух, львиного зева, трипаносом, гриба *Ascochylus* и почекущихся дрожжей. В контексте этого совещания все наблюдавшиеся случаи мозаичной экспрессии были отнесены на счет транспозиций. Более того, имела место скрытая тенденция всерьез считать, что контролирующие элементы ответственны за большую часть регуляции генов (Campbell, 1981), что привело некоторых участников к предположению, что «единственной функцией

этих элементов является стимулирование генетической изменчивости». В сущности, идея о том, что за регулируемую экспрессию в мозаизме, обусловленном эффектом положения, ответствен гетерохроматин, была поставлена под сомнение. По отношению к будущим эпигенетическим исследованиям, вероятно, наибольшее внимание заслуживало твердое обоснование наличия «молчащих» кассет типов спаривания («silent mating cassettes») у *Saccharomyces cerevisiae* (Haber et al., 1981; Klar et al., 1981; Nasmyth et al. 1981; Rine et al., 1981).

В порядке подготовки к 47-му симпозиуму у позвоночных была установлена общая корреляция, согласно которой общий уровень метилирования цитозинов в ДНК-последовательностях CpG ниже для генов, которые транскрибируются, чем для тех, которые не транскрибируются. Однако имелись исключения из этого общего правила, и более детальный анализ показал, что наиболее важным является метилирование специфических участков промотора гена (Cedar et al., 1983; Doerfler et al., 1983; La Volpe et al., 1983). Базируясь на системах рестрикции-модификации у бактерий, полагали, что метилирование ДНК предотвращает связывание ключевых регуляторных белков. К тому же было показано, что паттерны метилирования ДНК у позвоночных могут наследоваться через митоз, что приводило к гипотезе о том, что метилирование ДНК может служить средством транскрипционной «памяти» в процессе деления клеток в ходе развития (Shapiro and Mohandas, 1983). Еще одним главным открытием, имеющим отношение к эпигенетике, была идентификация нуклеотидных последовательностей ДНК по ту или другую сторону от «молчащих» кассет типов спаривания» у почекущихся дрожжей, которые отвечают за транскрипционную экспрессию генов, находящихся внутри этих кассет; они, таким образом, оказались первыми нуклеотидными последовательностями ДНК, необходимыми для хромосомных эффектов положения (Abraham et al., 1983).

«Молекулярная биология развития» была темой 50-го симпозиума, и на нем тоже был представлен ряд важных достижений. Возможно, одним из самых волнивших успехов было осознание всеми того факта, что фундаментальные молекулярные свойства являются консервативными в ходе эволюции — например, RAS человека функционирует в почекущихся дрожжах, гомеобоксные белки консервативны у мух и человека (Rubin et al., 1985). Новые попытки понять хромосомный импринтинг начались с разработки техники ядерных пересадок у мышей (Solter et al., 1985). Эти исследования показали, что в отцовском и материнском геномах новой зиготы хранится информация о происхождении от того или другого родителя; важна не просто ДНК сама по себе; хромосомы содержат дополнительную информацию, через кого из родителей они прошли, и эта информация необходима для успешного развития эмбриона. Полагали, что частично ответ лежит в том факте, что от происхождения хромосомы от того или другого родителя зависит дифференциальная экспрессия генов (Cattanach and Kirk, 1985).

Имелся ряд исследований, направленных на понимание сложной регуляции комплекса bithorax; особен-

но следует отметить сообщение Льюиса, который специально остановился на странной природе известных *trans*-регуляторов этого локуса; почти все они являются репрессорами данного локуса (Lewis, 1985). Таким образом, поддержание гена в «молчащем» состоянии на протяжении многих клеточных удвоений является обязательным для нормального развития. Это противоречило весьма распространенному в то время мнению, согласно которому там, где будут приниматься критические регуляторные решения, касающиеся развития, имеет место активация/индуциция гена.

К тому времени для ряда организмов была разработана техника ДНК-трансформации и инсерционного мутагенеза. Один из примеров особенно продуктивного и имеющего отношение к эпигенетике использования этой технологии был получен на *Drosophila*. Был создан транспозон Р-элемент с геном *white* (цвет глаз) на нем и он «прыгал» по всему геному (Rubin et al., 1985). Это дало возможность картировать во всем геноме *Drosophila* сайты, где мог происходить PEV.

Этот симпозиум выяснил также первые генетические подходы к расчленению (dissection) явлений детерминации пола и компенсации дозы половых хромосом у *Drosophila* (Belote et al., 1985; Maine et al., 1985) и *Caenorhabditis elegans* (Hodgkin et al., 1985; Wood et al., 1985).

58-й симпозиум отвел главное место празднованию 40-й годовщины открытия, сделанного Уотсоном и Криком. Частью этого торжества была выездная «тусовка», посвященная эпигенетическим явлениям: говорилось об идентификации новых явлений, начале молекулярного анализа других явлений, на ряде систем был достигнут существенный прогресс, позволяющий предлагать гипотезы и тестировать их.

У трипаносом гены семейства Генов Вариабельных Поверхностных антигенов (*VSG* — *Variable Surface antigene Genes*), локализованных возле теломер, в основном «молчат», и в каждый данный момент экспрессируется только один *VSG*. Хотя этот организм, по-видимому, не содержит метилированной ДНК, сообщалось, что «молчание» гены *VSG* содержат новое минорное основание, β -Д-глюкозилгидроксиметилурацил (Borst et al., 1993). Это основание, по-видимому, занимает в ДНК место тимицидина. Нетрудно провести параллели между этим основанием и метилированием цитозина у других организмов — эти модификации важны для поддержания «молчания» гена. Но как это основание вводится в ДНК или как оно осуществляется такую функцию, было неясно.

Прогресс был также достигнут в изучении эпигенетических явлений у позвоночных, в том числе хромосомного импринтинга и инактивации Х-хромосомы (Ariel et al., 1993; Li et al., 1993; Tilghman et al., 1993; Willard et al., 1993). К этому времени стало ясно, что у млекопитающих многие локусы подвержены импринтингу; в диплоидных клетках экспрессируется лишь одна аллель, и экспрессия зависит от ее происхождения от того или другого родителя. Особый интерес представлял локус *Igf2-H19*, главным образом потому, что он содержал два соседних гена, которые регулировались противоположным образом. *Igf2* экспрессируется в отцовской хромосоме, тогда как материнская копия репрессирована; в то же время отцовская аллель

H19 репрессирована, а материнская аллель этого гена экспрессируется. Интересно, что метилированные CpG наблюдались на отцовской хромосоме непосредственно «вверх по течению» от обоих генов. Предположили, что дифференциальное метилирование регулирует доступ этих двух генов к близлежащему энхансерному элементу — этот энхансер расположен ближе к *H19* и непосредственно «вниз по течению» от него (Tilghman et al., 1993). Можно было представить себе взаимоисключающую конкуренцию между этими двумя генами за энхансер; когда ген *H19* метилирован, энхансер свободен и активирует более удаленный ген *Igf2*. В пользу идеи, что метилирование ДНК играет регуляторную роль в этом процессе, свидетельствовали эксперименты с мышами. Мутация первого гена позвоночных, кодирующего 5-метилцитозин-ДНК-метилтрансферазу в ES-клетках, показала, что по мере развития эмбрионов отцовская копия *H19* становилась гипометилированной, и этот ген становился транскрипционно активным (Li et al., 1993).

Важным шагом в расшифровке того, как $^{5\text{m}}$ CpG опосредует свои эффекты, явилась очистка первого комплекса, связывающегося с $^{5\text{m}}$ CpG в ДНК (MeCP1 — $^{5\text{m}}$ CpG DNA-binding complex) (Bird 1993). MeCP1 не только связывается с ДНК, но и, связавшись «вверх по течению» от репортерного гена, вызывает репрессию этого гена. Хотя это и не объясняло регуляцию в локусе *Igf2-H19*, но давало возможный механизм для объяснения общей корреляции между метилированием ДНК и репрессией гена.

Генетическое картирование на протяжении ряда лет позволило идентифицировать ту часть Х-хромосомы человека, которая является критичной для инактивации Х-хромосомы. Исследования этого центра Х-инактивации с использованием молекулярного клонирования привели к открытию гена *Xist* (Willard et al., 1993), некодирующую РНК размером ~17 т.о., который экспрессируется только на неактивной Х-хромосоме. Мышиная версия *Xist* оказалась на удивление гомологичной по структуре и нуклеотидной последовательности и обещала стать прекрасной модельной системой для «расчленения» того пути, на котором эта РНК функционирует и репрессирует большую часть Х-хромосомы.

Два заслуживающих внимания открытия были описаны у *Neurospora* (Selker et al., 1993). Во-первых, было показано, что метилирование цитозина в ДНК не ограничено динуклеотидами CpG, а может происходить как будто бы в любом ДНК-контексте. Вторым открытием стало описание удивительного явления индуцируемых повторами точечных мутаций (RIP — repeat-induced point mutation). Когда в гаплоидном геноме имеется дупликация некой последовательности (сцепленная или несцепленная), и этот геном посредством конъюгации проводится через половой цикл, нуклеотидные последовательности становятся «RIPованными». Происходят два события: обе копии дуплицированной ДНК приобретают мутации типа G:C → A:T, а ДНК в пределах нескольких сотен пар оснований «RIPованных» последовательностей становится метилированной. Эта двойная атака на геном весьма эффективна — 50 % несцепленных локусов подвержены RIP, тогда как тесно сцеплен-

ные локусы достигают 100 % — и легко подавляет функцию генов.

Ген *brown* у *Drosophila*, будучи транслоцирован в соседство с гетерохроматином, демонстрирует доминантный PEV; транслоцированная копия может вызвать репрессию копии дикого типа. В ходе поисков энхансеров и супрессоров этого явления *trans*-инактивации Хеникоф (Henikoff) открыл, что дупликация гена, локализованного вблизи гетерохроматина, повышает уровень репрессии на нормальной копии (Martin-Morris et al., 1993). Хотя механизм, лежащий в основе этого события, оставался загадочным, постулировали, что это явление могло бы быть аналогичным RIP у *Neurospora*, хотя оно должно происходить в отсутствии метилирования ДНК, которое у *Drosophila* не происходит.

Пол Шедл (Paul Schedl) изложил концепцию хромосомных «границных элементов» (Vazquez et al., 1993). Первые такие элементы были локализованы с той или другой стороны района «пуфа» в локусе теплового шока у *Drosophila* и определены по необычной структуре их хроматина — устойчивому к нуклеазе кору величиной ~300 п.н., ограниченному гиперчувствительными к нуклеазе сайтами. Постулировали, что такие элементы разделяют домены хроматина вдоль по длине хромосомы. Два теста *in vivo* свидетельствовали в пользу этой гипотезы: (1) Ограничивая ту или другую сторону репортерного гена, граничные элементы эффективно устранили хромосомные эффекты положения, когда этот конструкт случайным образом вставлялся в геном. (2) Граничный элемент определялся также по его способности блокировать функцию энхансера. Будучи вставлен между промотором гена и его энхансером, граничный элемент блокировал экспрессию данного гена. Хотя и не в столь определенном виде, эта концепция граничных элементов была разработана и для других организмов, особенно на глобиновом локусе у млекопитающих (Clark et al., 1993).

Исследования на почкующихся дрожжах выясвили развивающийся механистический подход [a mechanistic introd] к связанным с хроматином эпигенетическим явлениям. Было уже установлено, что сайленсеры в «молчащих» локусах типа спаривания являются сайтами для нескольких связывающихся с ДНК белков. Их связывание оказалось зависимым от контекста, примером чего может быть белок Rap1, который не только играет важную роль в сайленсинге, но и связывается «вверх по течению» от ряда генов, активируя транскрипцию (обзор см. Laurenson and Rine, 1992).

На протяжении ряда лет были установлены многочисленные связи между репликацией ДНК и транскрипционно «молчащими» районами генома. Неактивная X-хромосома, гетерохроматин и «молчание» импринтированные локусы — все они, как сообщалось, поздно реплицируются в фазе S по сравнению с транскрипционно активными районами генома. Кроме того, было показано, что установление сайленсинга в «молчащих» локусах типа спаривания требует прохождения через фазу S, что заставляет предполагать, что «молчаний» хроматин должен быть построен на недавно реплицированной ДНК. Так, огромный интерес вызывал

тот факт, что один из сайленсеров оказался точкой начала репликации ДНК («ориджином»), а его активность в этом качестве нельзя было отделить от функции сайленсинга (Fox et al., 1993). Более того, мутанты в недавно идентифицированном комплексе распознавания «ориджина» (ORC — origin recognition complex) «портили» сайленсинг (Bell et al., 1993; Fox et al., 1993).

Еще один подход к «расчленению» структуры гетерохроматина и ее влияние на экспрессию генов обусловило открытие, показавшее, что теломеры у *Saccharomyces cerevisiae* приводят в действие PEV, аналогичный наблюдаемому у *Drosophila*. Репортерные гены, вставленные около теломер, обнаруживают мозаичную экспрессию в колонии дрожжей. Репрессированное состояние зависит от многих генов (*SIR2*, *SIR3*, *SIR4*) из тех, что необходимы для сайленсинга в «молчащих» локусах типа спаривания. Были описаны несколько ключевых аспектов, касающихся структуры «молчащего» хроматина и регуляции мозаичной экспрессии. Заслуживает упоминания тот факт, что цитологически гетерохроматин определяется как конденсированный хроматин, но «молчаний» хроматин у *S. cerevisiae* никогда не удавалось визуализировать таким образом. Тем не менее, из-за сходства с PEV у *Drosophila* «молчаний» хроматин у дрожжей всегда были склонны рассматривать как функциональный эквивалент гетерохроматина (описано в Weintraub, 1993).

На основе исследований на дрожжах начал формироваться ряд фундаментальных концепций. Во-первых, стало очевидным важное значение гистонов H3 и H4. В частности, аминотерминалный «хвост» гистонов H3 и H4 оказался непосредственным участником формирования «молчащего» гетерохроматина (Thompson et al., 1993). Специфические мутации в «хвостах» этих гистонов облегчили или портили сайленсинг и позволяли думать, что и общий заряд остатков на «хвостах», и специфические остатки в составе «хвостов» вносят вклад в сайленсинг. Кроме того, на заре использования иммунопреципитации хроматина (ChIP) было продемонстрировано, что лизины в аминотерминальном «хвосте» гистона H4 гипоацетилированы в районах «молчащего» хроматина по сравнению с остальной частью генома. Более того, одна из гистоновых мутаций позволила идентифицировать H4K16 гистонов (который может быть ацетилирован) как критичный для формирования «молчащего» хроматина.

Теломеры оказались простейшей системой для более глубокого понимания того, каким образом белки Sir опосредуют сайленсинг. Была разработана концепция рекрутования белков сайленсинга. Говоря коротко, оказалось, что белок Rap1, связывающийся с теломерной ДНК, взаимодействует с Sir3 и Sir4 двугибридным способом (by two-hybrid methods — описано в Palladino et al. 1993). Таким образом, Rap1 может «рекрутить» эти белки Sir к теломерному району генома. Имелись данные о том, что Sir3 и Sir4 могут связываться друг с другом и что (и это особенно важно) Sir3 и, возможно, Sir4 взаимодействуют с «хвостами» гистонов H3 и H4 (Thompson et al., 1993). Более того, сверхэкспрессия Sir3 заставляет его «распространяться» по хроматиновой фибрилле внутрь от теломеры, позволяя предпо-

лагать, что он является лимитирующим компонентом «молчащего» хроматина и может «полимеризоваться» вдоль хроматина (Renauld et al., 1993). Все вместе показывало, что существует, оказывается, обширная сеть взаимодействий, важная для сайленсинга, — белки Sir инициируют сборку на теломерной ДНК, благодаря их взаимодействию с Rap1, а затем полимеризуются от теломеры вдоль хроматинового волокна, предположительно связываясь с «хвостами» гистонов H3 и H4.

Переключение между транскрипционными состояниями при мозаичной теломерной экспрессии оказалось результатом конкуренции в отношении экспрессии между «молчаними» и активными генами (Aparicio and Gottschling, 1994; описано в Weintraub, 1993). Если транскрипционный активатор для теломерного гена делецирован, базовый механизм транскрипции этого гена оказывается недостаточным для экспрессии, и этот ген оказывается конститтивно сайленсированным. Наоборот, сверхэкспрессия активатора заставляла теломерный ген экспрессироваться постоянно — это ген никогда не был сайленсирован. В отсутствие *SIR3* (или *SIR2* или *SIR4*) базальная экспрессия гена была достаточной, тогда как увеличенная доза *SIR3* повышала долю клеток, которые были сайленсированы. Хотя транскрипционный активатор мог преодолеть сайленсинг на протяжении всего клеточного цикла, он был наиболее эффективным, когда клетки были остановлены в фазе S — предположительно, когда хроматин реплицируется и, отсюда, оказывается наиболее чувствительным к конкуренции. Несколько удивляет, что клетки, остановленные на G₂/M, также можно было легко переключить, что заставляло предполагать, что «молчаний» хроматин еще не был полностью собран к этому времени.

Было показано, что «молчаний» хроматин у дрожжей не поддается действию нуклеаз и ферментов модификации ДНК; это позволяет предположить, что лежащая в его основе ДНК гораздо менее доступна, чем большая часть генома (описано в Thompson et al., 1993).

Оказалось также, что имеет место иерархия сайленсинга в геноме дрожжей: наиболее чувствительны к пертурбациям теломеры, затем идет *HML*, а наименее чувствителен *HMR*. Действительно, когда ген *SIR1* мутировал, локусы *HM*, в норме полностью сайленсированные, обнаруживали мозаичную экспрессию (Pillus and Rine, 1989).

Наконец, Sir3 и Sir4 были локализованы на периферии ядра, как и теломеры. Предположили, что ядро организовано таким образом, что ядерная оболочка обеспечивает специальную среду для сайленсинга (Palladino et al., 1993).

Schizosaccharomyces pombe тоже имеют «молчание» кассеты типов спаривания, которые, как подозревают, ведут себя аналогично кассетам типов спаривания у *S. cerevisiae*. Однако у *S. pombe* в истории с переключением типов спаривания был дополнительный поворот. В элегантной серии экспериментов Эймар Клар (Amar Klar) выдвинул предположение о том, каким образом в клетке «метка» импринтируется на одной нити ДНК (Klar and Bonaduce, 1993). Эта метка проявляется, после двух клеточных делений, в одной из четырех «внучатых»

клеток как двунитевой разрыв, облегчающий переключение типа спаривания. У этих дрожжей отсутствуют какие-либо известные модификации ДНК (метилирование и т.п.); отсюда постулируется, что на нити ДНК оставляется метка какого-то иного типа.

Темой 59-го симпозиума была «Молекулярная генетика рака». Концепция эпигенетической регуляции в онкогенезе начала развиваться после того, как утвердилась идея генов-супрессоров опухолей. Была опубликована пара исследований в пользу таких представлений, но интересный поворот в этой истории возник в исследованиях пациентов с синдромом Бэквита-Видеманна и опухолями Уилмса. Мутации у пациентов обоих типов были картированы в локусе, включавшем импринтированные гены *H19-IGF2*. Файнберг с соавторами (Feinberg et al., 1994) открыл у таких больных «утрату импринтинга» (LOI — loss of imprinting) для этих генов — материнский локус утрачивал свой импринт, *H19* был репрессирован, а *IGF2* — экспрессирован. Таким образом, LOI, которая в принципе могла бы происходить в других местах генома, могла вызывать либо биаллельную экспрессию, либо исчезновение генов, критичных для онкогенеза, либо и то и, другое.

Через пару лет на пути к 63-му симпозиуму на тему «Механизмы транскрипции» произошли важные события, которые впоследствии повлияют на понимание молекулярных механизмов нескольких эпигенетических феноменов. Были идентифицированы ферменты, модифицирующие гистоны, а именно, ацетилазы и деацетилазы гистонов. Некоторые из этих энзимов играли критическую роль в регулировании экспрессии генов и позволили подойти к генным продуктам, непосредственно влияющим на РЕВ и сайленсинг. На симпозиуме была представлена верхушка этого айсберга (см. Losick, 1998). Молекулярное «расчленение» сайленсирующих белков Sir3 и Sir4 у дрожжей выявило поливалентную природу их взаимодействий и показало, каким образом сеть взаимодействий между всеми белками Sir, гистонами и разнообразными факторами, связывающимися с ДНК, формирует «молчаний» хроматин. Кроме того, были показаны молекулярные детали того, как разнообразные локусы (теломеры, рДНК, локусы *HM* и двунитевые разрывы) могут конкурировать за ограниченные ресурсы белков Sir. При нарушении способности специфического локуса рекрутировать факторы сайленсинга уровня содержания белков Sir в других локусах повышались (Cockell et al., 1998). Это прямо доказывало, что работает принцип действия масс и что сайленсинг в одном локусе может влиять на эпигенетический сайленсинг в других локусах (идея, первоначально выдвинутая в исследованиях РЕВ у *Drosophila*, но все еще не проверенная) (Locke et al., 1988). Еще одно открытие позволило объяснить, каким образом метилирование ДНК может регулировать экспрессию генов через хроматин. Были идентифицированы белковые комплексы, состоящие из MeCP2, которые связываются и с метилированной ДНК, и с деацетилазой гистонов (Wade et al., 1998). Метилированная ДНК могла служить точкой рекрутирования деацетилаз к локусу и таким образом облегчать сайленсинг близлежащих генов.

Концепция граничных элементов была распространена с *Drosophila* на млекопитающих (четкие данные были получены на локусе β -глобина), показывая таким образом, что границы хроматина, вероятно, действительно консервативны у многоклеточных и, возможно, у всех эукариот (Bell et al., 1998).

На 64-м симпозиуме, темой которого был «Сигнalling и экспрессия в иммунной системе», были приведены данные о том, как возникает моноаллерльная экспрессия, и о том, что она может быть распространена более широко, чем думали раньше. Моноаллерльная экспрессия в локусах иммуноглобулинов на протяжении некоторого времени была очевидна для лимфоцитов — она гарантировала продукцию единственного типа рецепторов в каждой лимфоидной клетке (Mostoslavsky et al., 1999). Аллель, которая будет экспрессироваться, выбирается на ранних стадиях развития, очевидно, случайным образом: обе аллели вначале находятся в репрессированном состоянии, но через некоторое время одна из них деметилируется. Было неясно, как происходит выбор одной из аллелей, но это явление обнаруживается и в других локусах, где необходимость моноаллерлизма была не столь очевидна. Например, экспрессируется только одна аллель генов, кодирующих цитокины IL-2 и IL-4 (Pannetier et al., 1999).

Наиболее значительное сообщение на 65-м симпозиуме, имеющее отношение к эпигенетике, касалось открытия того, что белок Sir2 является деацетилазой гистонов (Imai et al., 2000). Это был единственный белок Sir, у которого были очевидные гомологи у всех других эукариот и который регулировал PEV. Создавалось впечатление, что этот фермент в основном отвечает за удаление ацетильных компонентов гистонов в «молчащем» хроматине. Кроме того, поскольку это был фермент, зависящий от NAD, он связывал регуляцию сайленсинга (гетерохроматина) с клеточной физиологией.

68-й симпозиум на тему «Геном *Homo sapiens*» явился важной вехой в генетике, и хотя все еще остается про-делать большую генетическую работу, полное секвенирование этого и других геномов означало, что пришло время переходить на «надгенетический» уровень — в буквальном значении слова «эпигенетика».

Этот исторический отчет высвечивает несколько тем, общих со многими другими областями исследования. Во-первых, он демонстрирует эпизодическую природу достижений в эпигенетике. Во-вторых, по мере постижения молекулярных механизмов, лежащих в основе эпигенетических явлений, стало легче связывать эпигенетику с биологической регуляцией в целом. В-третьих, он показал, что исследователи, которых мы в настоящее время считаем корифеями науки, установили эти связи очень рано — потребовалось лишь некоторое время, чтобы большинство остальных «увидели» очевидное.

3. 69-й симпозиум

С годами выявилось несколько универсальных принципов, общих для всех эпигенетических явлений, и эти принципы определяют экспериментальные подходы в

наших попытках понять детали. Во-первых, различия между двумя фенотипическими состояниями («ВКЛЮЧЕНО» и «ВЫКЛЮЧЕНО») всегда коррелируют с соответствующим различием структуры в ключевой регуляторной точке — форма транслируется в функцию. Отсюда, основная задача заключается в идентификации этих двух различных структур, компонентов, из которых эти структуры состоят, и композиционных различий между ними. Во-вторых, эти различающиеся структуры должны обладать способностью поддерживать и воспроизводить себя в окружении конкурирующих факторов и сил энтропии. Таким образом, каждая структура нуждается в самоусилении, или в контурах положительной обратной связи, обеспечивающих ее поддержание и воспроизведение на протяжении многих клеточных делений; в некоторых случаях, таких как инактивация X-хромосомы, это время оказывается сравнимым со временем жизни.

На 69-м симпозиуме продолжалось уточнение многих механистических принципов, установленных на предыдущих симпозиумах, но были и новые разработки. Чтобы поместить эти новые разработки в наш контекст, важно отметить, что важное влияние на эпигенетику оказали еще два открытия. Одним было открытие РНК-интерференции и родственных, базирующихся на РНК, механизмах регуляции. Другим было открытие механизмов, лежащих в основе гипотезы прионов. За последнее десятилетие обе эти области быстро развивались, и некоторые из этих исследований внесли вклад в наши знания об эпигенетике, базирующейся на хроматине, тогда как другие наметили новые перспективы в проблеме наследственной передачи фенотипов.

Многие достижения, представленные на этом симпозиуме, детально описываются в разных главах этой книги, поэтому я воздержусь здесь от обсуждения этих тем. Однако я затрону несколько успешных и перспективных исследований, которые привлекли мое воображение и которые не освещаются на этих страницах. В конце я попытаюсь сформулировать наиболее важные концепции, вынесенные мною из этого симпозиума.

3.1. Гипотеза гистонового кода

В ходе рассмотрения модификаций гистонов и их потенциального информационного содержания состоялось много дискуссий относительно «гипотезы гистонового кода» (Jenuwein and Allis 2001). Большинство этих споров, в которых я принимал участие или о которых мне рассказывали, были неформальными и довольно оживленными. Сторонники «кода» приводили такие примеры, как trimетилирование гистона H3 по K9 и его повышенное сродство к классу HPI белков гетерохроматина (Jenuwein and Allis, 2001). Их противники приводили биохимические и генетические данные о том, что на связывание с ДНК или на фенотип существенно влияет суммарный заряд на аминотерминальном «хвосте» гистона H4, независимо от того, где этот заряд расположен (Megee et al., 1995; Zheng and Hayes, 2003).

Грюнштейн (Grunstein) представил данные, включавшие анализ модификаций (ацетилирования) гисто-

нов и связанных с хроматином белков во всем геноме *S. cerevisiae* с использованием специфических антител и метода ChIP-Chip (Millar et al., 2004). Он сделал акцент на ассоциированном с ацетилированием H4K16 эпигенетическом переключении к связыванию или несвязыванию определенных белков хроматина, поддерживая таким образом гипотезу гистонового кода. Некоторые из его данных, хотя они и не обсуждались, по-видимому, свидетельствуют в пользу сообщений других исследователей о том, что для большой части генома нет корреляции между специфическими модификациями гистонов и экспрессией генов (т.е. все активные гены имеют одинаковые метки, и эти метки отсутствуют на неактивных генах) (Schubert et al., 2004; Dion et al., 2005). Учитывая всю совокупность этих результатов, я подозреваю, что в качестве механизмов регулирования структуры хроматина и экспрессии генов обычно используются специфические модификации, и влияние общего заряда.

3.2. Динамический «молчащий» хроматин

Я должен признаться, что, основываясь на статических изображениях гетерохроматина и на рефрактерной природе «молчашего» хроматина, я был убежден, что, однажды установившись, гетерохроматиновое состояние остается прочным, как гранит. Только когда наступает время репликации ДНК, эта непробиваемая структура становится релаксированной. Думая таким образом, янеразумно игнорировал принципы равновесной динамики, с которыми познакомился в курсе химии. Однако к этим урокам заставили возвратиться исследования «молчашего» хроматина и гетерохроматина, где было показано, что белки сайленсинга у дрожжей (Sir3) и белки гетерохроматина в клетках млекопитающих (HP1) находятся в состоянии динамического равновесия — эти белки быстро обмениваются между гетерохроматином и растворимым компартментом — даже когда хроматин находится в своем наиболее непроницаемом состоянии (Cheng and Gartenberg, 2000; Cheutin et al., 2003). Осознание динамических качеств хроматина вынудило меня иначе взглянуть на то, каким образом поддерживается и воспроизводится его эпигенетическое состояние. Этот взгляд предполагает, что в некоторых системах эпигенетическое состояние может быть revertировано в любое время, а не только в ходе репликации ДНК. Отсюда мы можем заключить, что для «молчашего» хроматина механизмы усиления и воспроизведения должны функционировать постоянно.

Широко распространено мнение, что метилирование гистонов является модификацией, накладывающей на хроматин «перманентную» метку (обзор см. Kubicek and Jenuwein, 2004). В противоположность всем другим модификациям гистонов (например, фосфорилированию, ацетилированию, убиквитинированию) нет известных ферментов, которые могли бы обратимо удалять метильную группу с аминогруппы лизина или аргинина. Более того, считается, что удаление метильной группы простым гидролизом в физиологических условиях невыгодно и, таким образом, вряд ли происходит спонтанно.

Несколько сообщений слегка поколебали систему верований тех, кто думал, что метки метилирования

являются перманентными. Во-первых, было показано, что ядерная пептидиларгининдеиминаза (PAD4) может удалять монометилирование с остатков аргинина (R) гистона H3 (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Хотя результатом этого процесса удаления метильного компонента является конвертация остатка аргинина в цитруллин, и, следовательно, это не является истинной реверсией данной модификации, он, тем не менее, представляет собой механизм элиминации перманентной метильной метки.

Робин Олшайр (Robin Allshire) привел провоцирующий генетический аргумент, согласно которому ген *tis2* из *S. pombe* revertiert диметилирование по K9 в гистоне H3 (R. Allshire, личное сообщение). Возможно, он был на верном пути, поскольку через несколько месяцев после симпозиума было показано, что неродственный фермент LSD1 из млекопитающих специфически деметилирует ди- и монометилы на гистоне H3 по K4 (Shi et al., 2004), revertируя «активную» метку хроматина. Весьма интересно, что LSD1 не работает на trimetилированном H3K4 — таким образом, метилирование может быть revertировано в ходе процесса маркировки, но реверсия невозможна, коль скоро метка полностью созрела.

Однако Стив Хеникофф (Steve Henikoff) описал способ, которым могла бы элиминироваться перманентная trimetilлизиновая метка. Он показал, что вариантный гистон H3.3 может замещать канонический гистон H3 независимым от репликации и сопряженным с транскрипцией образом (Henikoff et al., 2004). По существу гистон, содержащий метильные метки для сайленсинга, мог бы быть удален и заменен гистоном, более подходящим для транскрипции. Когда был изолирован суммарный хроматин, оказалось, что гистон H3.3 имел на себе намного больше меток метилирования хроматина (например, K79me), чем канонический гистон H3.

При рассмотрении всех этих результатов создается впечатление, что может и не быть простой молекулярной модификации гистонов, которая служит как метка памяти для воспроизведения состояния «молчашего» хроматина в ходе клеточного деления. Скорее, должен иметь место тонкий набор взаимодействий, увеличивающих вероятность того, что «молчашее» состояние будет поддерживаться, хотя и не гарантирующих это.

3.3. Ядерная организация

Корреляции между ядерной локализацией и экспрессией генов были установлены уже много лет назад (Mirkovitch et al., 1987). На основе этих наблюдений начало формироваться мнение, что в клетке имеются специальные компартменты, которыми ограничены экспрессия генов или сайленсинг. Приводили доводы в пользу того, что такая организация необходима для поддержания сложности генома и его регуляции в работоспособном состоянии. Эта идея была поддержана исследованиями на *S. cerevisiae*, где теломеры преимущественно локализовались на периферии ядра, как и ключевые компоненты комплекса сайленсинга, такие как Sir4 (Palladino et al., 1993). Результатом мутаций, высвобождающих теломеры или

Sir4 с ядерной периферии, является утрата теломерного сайленсинга (Laroche et al., 1998; Andrlulis et al., 2002). Более того, искусственная привязка частично сайленсированного гена к этой периферии делала его полностью сайленсированным (Andrlulis et al., 1998).

В очень информативном эксперименте Гассер показал, что если теломеры и сайленсирующий комплекс высвобождаются с периферии и могут свободно перемещаться по всему ядру, легко устанавливается теломерный сайленсинг (Gasser et al., 2004). Таким образом, по-видимому, нет особой нужды локализовать локусы в компартменте. Это в большей мере согласуется с данными о том, что быстрое перемещение белков хроматина на хромосомы и с хромосом может, кроме того, определять такую эффективную регуляцию, как сайленсинг. Возможно, чтобы поддерживать высокие локальные концентрации связанных с этим факторов в специальных (стрессовых?) условиях, какая-то локализация и необходима. Или же это может быть комбинацией доменов, собранных вместе в ходе эволюции, которая давно работает без всякой конечной цели.

3.4. Прионы

Викнер дал обзор прионов и критерии для их определения, и из его описания становится ясным, что они (прионы) — это часть эпигенетического ландшафта (Wickner et al., 2004a,b). В простейшем молекулярном смысле прионы — это белки, которые могут вызывать наследуемые фенотипические изменения, действуя на родственный этим белкам генный продукт и изменяя его. Никаких изменений нуклеотидной последовательности ДНК не происходит; скорее, прион, в общем случае, навязывает своему субстрату некое структурное изменение. Прионы, относящиеся к лучше всего изученному и понятому классу, заставляют растворимые формы белка преобразовываться в амилоидные волокна. Во многих случаях эта амилоидная форма снижает или вовсе устраняет нормальную активность данного белка, вызывая таким образом изменение в фенотипе. Викнер определил еще один класс прионов, которые не формируют амилоидных нитей. Это ферменты, для активации которых требуется своя же ферментативная активность. Если клетка обладает лишь неактивными формами этого энзима, тогда необходим внешний источник активного энзима, чтобы положить начало тому, что затем станет самовоспроизводящимся признаком, пока по крайней мере одна активная молекула передается каждой клетке. Он привел два примера и выразил уверенность в том, что этот класс белков составит новую группу эпигенетических механизмов для исследования.

Ши представил предварительные данные о том, что прионная модель может объяснить обучение и память у *Aplysia* (Si et al., 2004). В нейрональных клетках этого моллюска трансляция ряда запасенных иРНК в белки важна для поддержания кратковременной памяти. Он обнаружил, что регулятор белковой трансляции, СРЕВ, может существовать в двух формах и что активированная форма СРЕВ действует доминантно, воспроизведя себя. Проверка этой идеи все еще находится в самом

начале, но обещает фантастические новые подходы на тему о том, каким образом мы помним.

3.5 Новое явление

Описание нового и неожиданного феномена всегда поражает наше воображение. Одно сообщение в особенности занимало мои мысли на протяжении нескольких недель после симпозиума. Стандартный генетический анализ мутантных аллелей гена *HOTHEAD*, регулирующего слияние органов у *Arabidopsis*, показал, что обычные правила менделевской генетики здесь не выполняются (Lolle et al., 2005). Оказалось, что если гетерозиготные (*HOTHEAD/hothead*) растения самоопыляются и производят гомозиготное растение *hothead/hothead*, а затем этому гомозиготному растению *hothead/hothead* дают самоопылиться, потомство от этого гомозиготного родителя reverтирует к генотипу *HOTHEAD/hothead* с частотой до 15 %. Этот потрясающе высокий уровень реверсии к дикому типу давал, на нуклеотидном уровне, точный дубликат гена дикого типа, наблюдавшегося в предшествующих поколениях. Эта реверсия не ограничивалась локусом *HOTHEAD* — несколько других локусов обнаруживали сходные частоты реверсии к аллелям дикого типа. Однако для всех этих реверсий требовалось, чтобы родитель был гомозиготным *hothead/hothead*. Продукт гена *HOTHEAD* не дает никакого очевидного объяснения, как такое может происходить, но прошедшие обсуждения определенно заставляют предполагать, что некая архивная копия гена дикого типа передавалась в ряду последовательных поколений, возможно через РНК. Хотя можно возразить, что это явление лежит вне сферы «эпигенетики», — поскольку связано с изменениями в нуклеотидной последовательности ДНК, — наследственная передача этой предполагаемой архивной копии не подчиняется нормальным генетическим правилам. Так или иначе, этот феномен чреват огромными последствиями для генетики, особенно в области эволюционного мышления.

4. Заключительные соображения

Итак, что еще нужно сделать, чтобы понять эпигенетические механизмы? По большей части мы все еще собираем (открываем) их отдельные компоненты. Точно так же, как полная последовательность генома чрезвычайно облегчила прогресс в области генетики, так и более ясное понимание эпигенетики придет, вероятно, тогда, когда станут известными все составные части. Успехи, достигнутые за последнее десятилетие, очень вдохновляют.

Признаюсь, я не в состоянии различить, близки ли мы или далеки от точного, в механистическом плане, понимания того, каким образом поддерживаются и воспроизводятся эпигенетические состояния. Первым, возможно, придет понимание феноменов, базирующихся на прионах; те же явления, которые базируются на хроматине, по-видимому, наиболее далеки от этого. Поливалентная природа взаимодействий, которые, по-видимому, необходимы для установления сайленсированного состояния на хромосоме, увеличивает

сложность проблемы. Последняя еще более усложняется динамической природой «молчащего» хроматина. Возможность узнать больше о движении компонентов в хроматиновые структуры и из них требует для окончательного понимания применения усовершенствованных или совсем новых методов. Иммунопреципитация хроматина, оказавшаяся важной в установлении того, какие компоненты находятся в составе структуры, временно заслонила от нас динамику.

Я подозреваю, что, учитывая эту сложность, простое измерение констант связывания и равновесия для всех компонентов и попытки получить систему дифференциальных уравнений для имитации эпигенетических переключателей могут оказаться неэффективной тратой ресурсов и не обязательно приведут к лучшему пониманию. Скорее, я предполагаю, что потребуется разработка математического подхода нового типа в комбинации с новыми экспериментальными методами измерения для окончательного понимания эпигенетических событий. В частности может потребоваться разработка систем *in vitro*, надежно воспроизводящих эпигенетическое переключение между состояниями.

Идея конкуренции между двумя состояниями в большинстве эпигенетических явлений, вероятно, отражает «гонку вооружений», происходящую на многих уровнях клетки, за которой следуют попытки исправить «сопутствующий ущерб». Например, белки сайленсинга возможны, возможно, для защиты генома от транспозонов. Однако, поскольку белки сайленсинга работают через посредство вездесущих нуклеосом, становятся репрессированными некоторые критичные гены. Чтобы преодолеть это, возникли модификации гистонов (например, метилирование H3K4 и H3K79) и замещение варианты гистонами, чтобы предотвращать связывание белков сайленсинга с критичными генами. В зависимости от последующих событий эти изменения могут быть кооптированы для других процессов — например, может стать полезной репрессия некоторых генов белками сайленсинга («молчание» локусы типа спаривания). Механизмы сайленсинга могут кооптироваться и для других функций, таких как стимуляция расхождения хромосом. И так далее...

Я жду секвенирования геномов новых организмов, поскольку это может привести нас к пониманию последовательности эволюционных событий, приведших к возникновению эпигенетических процессов, которые мы наблюдаем сегодня. Например, у *S. cerevisiae* отсутствует аппарат RNAi, но у многих других грибов он есть. Заполняя некоторые филогенетические пробелы между видами, мы можем выяснить, какие события привели к тому, что *S. cerevisiae* больше не «нуждаются» в этой системе.

Изучение эпигенетики, возможно, более, чем какая-либо другая область биологических исследований, основывается на стремлении понять неожиданные наблюдения, начиная с мозаичизма, обусловленного эффектом положения, до полярной сверхдоминантности в фенотипе *callipyge* (Georges et al., 2004). Надежда понять что-то необычное служит для нас приманкой, но скоро мы приходим в восторг при виде разумности используемых механизмов. Этим можно объяснить, по-

чему эта область привлекла непропорционально много веселых и светлых умов. Я подозреваю, что так и будет продолжаться по мере достижения нами более высокого уровня мастерства и открытия новых и неожиданных эпигенетических явлений.

Благодарности

Я благодарю моих коллег в Университете Чикаго и Раковом исследовательском центре Фреда Хатчинсона, которые сделали мои собственные исследования по эпигенетике столь приятными; я благодарен также Национальным институтам здоровья за финансовую поддержку.

Литература

- Abraham J., Feldman J., Nasmyth K.A., Strathern J.N., Klar A.J., Broach J.R., and Hicks J.B. 1983. Sites required for position-effect regulation of mating-type information in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47: 989-998.
- Allfrey V.G., Inoue A., Karn J., Johnson E.M., and Vidali G. 1974. Phosphorylation of DNA-binding nuclear acidic proteins and gene activation in the HeLa cell cycle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 785-801.
- Andrulis E.D., Neiman A.M., Zappulla D.C., and Sternnglanz R. 1998. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 394: 592-595.
- Andrulis E.D., Zappulla D.C., Ansari A., Perrod S., Laiosa C.V., Gartenberg M.R., and Sternnglanz R. 2002. Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8292-8301.
- Aparicio O.M. and Gottschling D.E. 1994. Overcoming telomeric silencing: A *trans*-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev.* 8: 1133-1146.
- Ariel M., Selig S., Brandeis M., Kitsberg D., Kafri T., Weiss A., Keshet I., Razin A., and Cedar H. 1993. Allele-specific structures in the mouse Igf2-H19 domain. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 307-313.
- Bell A., Boyes J., Chung J., Pikaart M., Prioleau M.N., Recillas F., Saitoh N., and Felsenfeld G. 1998. The establishment of active chromatin domains. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63: 509-514.
- Bell S.P., Marahrens Y., Rao H., and Stillman B. 1993. The replicon model and eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 435-442.
- Belote J.M., McKeown M.B., Andrew D.J., Scott T.N., Wolfner M.F., and Baker B.S. 1985. Control of sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 605-614.
- Beutler E. 1964. Gene inactivation: The distribution of gene products among populations of cells in heterozygous humans. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 29: 261-271.
- Bird A.P. 1993. Functions for DNA methylation in vertebrates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 281-285.
- Borst P., Gommers-Ampt J.H., Ligtenberg M.J., Rudenko G., Kieft R., Taylor M.C., Blundell P.A., and van Leeuwen F. 1993. Control of antigenic variation in African trypanosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 105-114.

- Brink R.A. 1958. Paramutation at the R locus in maize. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **23**: 379-391.
- Campbell A. 1981. Some general questions about movable elements and their implications. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 1-9.
- Cattanach B.M. and Kirk M. 1985. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**: 496-498.
- Cedar H., Stein R., Gruenbaum Y., Naveh-Many T., Sciaky-Gallili N., and Razin A. 1983. Effect of DNA methylation on gene expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**: 605-609.
- Chambon P. 1978. Summary: The molecular biology of the eukaryotic genome is coming of age. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 1209-1234.
- Cheng T.H. and Gartenberg M.R. 2000. Yeast heterochromatin is a dynamic structure that requires silencers continuously. *Genes Dev.* **14**: 452-463.
- Cheutin T., McNairn A.J., Jenuwein T., Gilbert D.M., Singh P.B., and Misteli T. 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**: 721-725.
- Clark D., Reitman M., Studitsky V., Chung J., Westphal H., Lee E., and Felsenfeld G. 1993. Chromatin structure of transcriptionally active genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 1-6.
- Cockell M., Gotta M., Palladino P., Martin S.G., and Gasser S.M. 1998. Targeting Sir proteins to sites of action: A general mechanism for regulated repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 401-412.
- Cuthbert G.L., Daujat S., Snowden A.W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M., Schneider R., Gregory P.D., Tempst P., Bannister A.J., and Kouzarides T. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545-553.
- Dion M.F., Altschuler S.J., Wu L.F., and Rando O.J. 2005. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 5308-5309.
- Doerfler W., Kruczak I., Eick D., Vardimon L., and Kron B. 1983. DNA methylation and gene activity: The adenovirus system as a model. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**: 593-603.
- Feinberg A.P., Kalikin L.M., Johnson L.A., and Thompson J.S. 1994. Loss of imprinting in human cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **59**: 357-364.
- Fox C.A., Loo S., Rivier D.H., Foss M.A., and Rine J. 1993. A transcriptional silencer as a specialized origin of replication that establishes functional domains of chromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 443-455.
- Frankel J. 1990. Positional order and cellular handedness. *J. Cell Sci.* **97**: 205-211.
- Gartler S.M., and Linder D. 1964. Selection In mammalian mosaic cell populations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **29**: 253-260.
- Gasser S.M., Hediger R., Taddei A., Neumann F.R., and Gartenberg M.R. 2004. The function of telomere clustering in yeast: The circe effect. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 327-337.
- Georges M., Charlier C., Smit M., Davis E., Shay T., Tordoir X., Takeda H., Caiment R., and Cockett N. 2004. Toward molecular understanding of polar overdominance at the ovine callipyge locus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 477-483.
- Goldschmidt R.B. 1951. The theory of the gene: Chromosomes and genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**: 1-11.
- Haber J.E., Weissenbach B., Rogers D.T., McCusker J., and Rowe L.B. 1981. Chromosomal rearrangements accompanying yeast mating-type switching: Evidence for a gene-conversion model. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 991-1002.
- Haig D. 2004. The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 67.
- Henikoff S. 1990. Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* **6**: 422-426.
- Henikoff S., McKittrick E., and Ahmad K. 2004. Epigenetics, histone H3 variants, and the inheritance of chromatin states. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 235-243.
- Hernday A.D., Braaten B.A., and Low D.A. 2003. The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the pap epigenetic switch. *Mol. Cell* **12**: 947-957.
- Hodgkin J., Doniach T., and Shen M. 1985. The sex determination pathway in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Variations on a theme. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 585-593.
- Imai S., Johnson F.B., Marciniak R.A., McVey M., Park P.U., and Guarente L. 2000. Sir2: An NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **65**: 297-302.
- Jenuwein T. and Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Klar A.J., and Bonaduce M.J. 1993. The mechanism of fission yeast mating-type interconversion: Evidence for two types of epigenetically inherited chromosomal imprinted events. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 457-465.
- Klar A.J., Hicks J.B., and Strathern J.N. 1981. Irregular transpositions of mating-type genes in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 983-990.
- Kubicek S. and Jenuwein T. 2004. A crack in histone lysine methylation. *Cell* **119**: 903-906.
- La Volpe A., Taggart ML, Macleod D., and Bird A. 1983. Coupled demethylation of sites in a conserved sequence of *Xenopus* ribosomal DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**: 585-592.
- Laroche X., Martin S.G., Gotta M., Gorham H.C., Pryde F.E., Louis E.J., and Gasser S.M. 1998. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr. Biol.* **8**: 653-656.
- Laurenson P. and Rine J. 1992. Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol. Rev.* **56**: 543-560.
- Lewis E.B. 1985. Regulation of the genes of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 155-164.
- Li E., Beard C., Forster A.C., Bestor T.H., and Jaenisch R. 1993. DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 297-305.
- Locke J., Kotarski M.A., and Tartof K.D. 1988. Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* **120**: 181-198.
- Lolle S.J., Victor J.L., Young J.M., and Pruitt R.E. 2005. Genome-wide non-mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature* **434**: 505-509.
- Losick R. 1998. Summary: Three decades after sigma. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 653-666.
- Louie A.J., Candido E.P., and Dixon G.H. 1974. Enzymatic modifications and their possible roles in regulating the binding of basic proteins to DNA and in controlling chromosomal structure. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 803-819.
- Lyon M.R. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**: 372-373.
- Lyon M.R. 1961. Epigenetic inheritance in mammals. *Trends Genet.* **9**: 123-128.

- Maine E.M., Salz H.K., Schedl P., and Cline T.W. 1985. Sex-lethal, a link between sex determination and sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 595-604.
- Martin-Morris L.E., Loughney K., Kershisnik E.O., Poortinga G., and Henikoff S. 1993. Characterization of sequences responsible for trans-inactivation of the *Drosophila brown* gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 577-584.
- McClintock B. 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**: 13-47.
- McClintock B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **21**: 197-216.
- Megee P.C., Morgan B.A., and Smith M.M. 1995. Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev.* **9**: 1716-1727.
- Millar C.B., Kurdistani S.K., and Grunstein M. 2004. Acetylation of yeast histone H4 lysine 16: A switch for protein interactions in heterochromatin and euchromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 193-200.
- Mirkovitch J., Gasser S.M., and Laemmli U.K. 1987. Relation of chromosome structure and gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **317**: 563-574.
- Mostoslavsky R., Kirillov A., Ji Y.H., Goldmit M., Holzmann M., Wirth T., Cedar H., and Bergman Y. 1999. Demethylation and the establishment of κ allelic exclusion. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **64**: 197-206.
- Muller H.J. 1941. Induced mutations in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9**: 151-167.
- Nance W.E. 1964. Genetic tests with a sex-linked marker: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **29**: 415-425.
- Nanney D.L. 1958. Epigenetic factors affecting mating type expression in certain ciliates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **23**: 327-335.
- Nasmyth K.A., Tatchell K., Hall B.D., Astell C., and Smith M. 1981. Physical analysis of mating-type loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 961-981.
- Palladino F., Laroche T., Gilson E., Pillus L., and Gasser S.M. 1993. The positioning of yeast telomeres depends on SIR3, SIR4, and the integrity of the nuclear membrane. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 733-746.
- Pannetier C., Hu-Li J., and Paul W.E. 1999. Bias in the expression of IL-4 alleles: The use of T cells from a GFP knock-in mouse. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **64**: 599-602.
- Peacock W.J., Brutlag D., Goldring E., Appels R., Hinton C.W., and Lindsley D.L. 1974. The organization of highly repeated DNA sequences in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 405-416.
- Pillus L. and Rine J. 1989. Epigenetic inheritance of transcriptional states in *S. cerevisiae*. *Cell* **59**: 637-647.
- Ptashne M. 2004. *A genetic switch: Phage lambda revisited*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Renauld H., Aparicio O.M., Zierath P.D., Billington B.L., Chhablani S.K., and Gottschling D.E. 1993. Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev.* **7**: 1133-1145.
- Rine J., Jensen R., Hagen D., Blair L., and Herskowitz I. 1981. Pattern of switching and fate of the replaced cassette in yeast mating-type interconversion. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 951-960.
- Rubin G.M. 1985. Summary. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 905-908.
- Rubin G.M., Hazelrigg T., Karess R.E., Laski F.A., Laverty T., Lewis R., Rio D.C., Spencer F.A., and Zuker C.S. 1985. Germ line specificity of P-element transposition and some novel patterns of expression of transduced copies of the white gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 329-335.
- Rudkin G.T. and Tartof K.D. 1974. Repetitive DNA in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 397-403.
- Schubeler D., MacAlpine D.M., Scalzo D., Wirbelauer C., Kooperberg C., van Leeuwen R., Gottschling D.E., O'Neill L.P., Turner B.M., Delrow J., et al. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**: 1263-1271.
- Schultz J. 1956. The relation of the heterochromatic chromosome regions to the nucleic acids of the cell. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **21**: 307-328.
- Selker E.U., Richardson G.A., Garrett-Engle P.W., Singer M.J., and Miao V. 1993. Dissection of the signal for DNA methylation in the ζ - η region of *Neurospora*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 323-329.
- Shapiro L.J. and Mohandas T. 1983. DNA methylation and the control of gene expression on the human X chromosome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**: 631-637.
- Shi Y., Lan E., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., and Casero R.A. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
- Si K., Lindquist S., and Kandel E. 2004. A possible epigenetic mechanism for the persistence of memory. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 497-498.
- Solter D., Aronson J., Gilbert S.F., and McGrath J. 1985. Nuclear transfer in mouse embryos: Activation of the embryonic genome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 45-50.
- Swift H. 1974. The organization of genetic material in eukaryotes: Progress and prospects. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 963-979.
- Thompson J.S., Hecht A., and Grunstein M. 1993. Histones and the regulation of heterochromatin in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 247-256.
- Tilghman S.M., Bartolomei M.S., Webber A.L., Brunkow M.E., Saam J., Leighton PA., Pfeifer K., and Zemel S. 1993. Parental imprinting of the H19 and Igf2 genes in the mouse. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 287-295.
- Vazquez J., Farkas G., Gaszner M., Udvardy A., Muller M., Hagstrom K., Gyurkovics H., Sipos L., Gausz J., Galloni M., et al. 1993. Genetic and molecular analysis of chromatin domains. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 45-54.
- Wade P.A., Jones P.L., Vermaak D., Veenstra G.J., Imhof A., Sera T., Tse C., Ge H., Shi Y.B., Hansen J.C., and Wolffe A.P. 1998. Histone deacetylase directs the dominant silencing of transcription in chromatin: Association with MeCP2 and the Mi-2 chromodomain SWI/SNF ATPase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 435-445.
- Wang Y., Wysocka J., Perlin J.R., Leonelli L., Allis C.D., and Coonrod S.A. 2004. Linking covalent histone modifications to epigenetics: The rigidity and plasticity of the marks. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 161-169.
- Weintraub H. 1974. The assembly of newly replicated DNA into chromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 247-256.

- Weintraub H. 1993. Summary: Genetic tinkering local problems, local solutions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 819-836.
- Weintraub H., Flint S.J., Leffak I.M., Groudine M., and Grainger R.M. 1978. The generation and propagation of variegated chromosome structures. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 401-407.
- Wickner R.B., Edskes H.K., Ross E.D., Pierce M.M., Baxa U., Brachmann A., and Shewmaker F. 2004a. Prion genetics: New rules for a new kind of gene. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 681-707.
- Wickner R.B., Edskes H.K., Ross E.D., Pierce M.M., Shewmaker P., Baxa U., and Brachmann A. 2004b. Prions of yeast are genes made of protein: Amyloids and enzymes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **69**: 489-496.
- Willard H.F., Brown C.J., Carrel L., Hendrich B., and Miller A.P. 1993. Epigenetic and chromosomal control of gene expression: Molecular and genetic analysis of X chromosome inactivation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 315-322.
- Wood W.B., Meneely P., Schedin P., and Donahue L. 1985. Aspects of dosage compensation and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 575-583.
- Yarmolinsky M.B. 1981. Summary. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 1009-1015.
- Zheng C., and Hayes J.J. 2003. Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers* **68**: 539-546.